

- [7] Chen, Y. H., Chen, S. H., Analysis of DNA fragments by microchip electrophoresis fabricated on poly(methyl methacrylate) substrates using a wire-imprinting method. *Electrophoresis* 2000, 21, 165-170.
- [8] Liu, Y. J., Ganser, D., Schneider, A., Liu, R., Grodzinski, P., Kroutchinina, N., Microfabricated Polycarbonate CE Devices for DNA Analysis. *Anal. Chem.* 2001, 73, 4196-4201.
- [9] Rossier, J. S., Schwarz, A., Reymond, F., Ferrigno, R., Bianchi, F., Girault, H. H., Microchannel networks for electrophoretic separations. *Electrophoresis* 1999, 20, 727-731.
- [10] Kameoka, J., Craighead, H. G., Zhang, H., Henion, J., A Polymeric Microfluidic Chip for CE/MS Determination of Small Molecules. *Anal. Chem.* 2001, 73, 1935-1941.
- [11] Soper, S. A., Ford, S. M., Xu, Y., Qi, S., McWhorter, S., Lassiter, S., Patterson, D., Bruch, R. C., Nanoliter-scale sample preparation methods directly coupled to polymethylmethacrylate-based microchips and gel-filled capillaries for the analysis of oligonucleotides. *J. Chromatogr. A* 1999, 853, 107-120.
- [12] Yuan, C. H., Shiea, J., Sequential Electrospray Analysis Using Sharp-Tip Channels Fabricated on a Plastic Chip. *Anal. Chem.* 2001, 73, 1080-1083.
- [13] Takayama, S., McDonald, J. C., Ostuni, E., Liang, M. N., Kenis, P. J. A., Ismagilov, R. F., Whitesides, G. M., Patterning cells and their environments using multiple laminar fluid flows in capillary networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 5545-5548.
- [14] Ocvirk, G., Munroe, M., Tang, T., Oleschuk, R., Westra, K., Harrison, D. J., Electrokinetic control of fluid flow in native poly(dimethylsiloxane) capillary electrophoresis devices. *Electrophoresis* 2000, 21, 107-115.
- [15] Locascio, L. E., Perso, C. E., Lee, C. S., Measurement of electroosmotic flow in plastic imprinted microfluid devices and the effect of protein adsorption on flow rate. *J. Chromatogr. A* 1999, 857, 275-284.
- [16] Ross, D., Johnson, T. J., Locascio, L. E., Imaging of Electroosmotic Flow in Plastic Microchannels. *Anal. Chem.* 2001, 73, 2509-2515.
- [17] Henry, A. C., Tutt, T. J., Galloway, M., Davidson, Y. Y., Mcwhorter, C. S., Soper, S. A., Mccarley, R. L., Surface Modification of Poly(methyl methacrylate) Used in

- the Fabrication of Microanalytical Devices. *Anal. Chem.* 2000, 72, 5331-5337.
- [18] Henry, A. C., Waddell, E. A., Shreiner, R., Locascio, L. E., Control of electroosmotic flow in laser-ablated and chemically modified hot imprinted poly(ethylene terephthalate glycol) microchannels. *Electrophoresis* 2002, 23, 791-798.
- [19] Barker, S. L. R., Tarlov, M. J., Canavan, H., Hickman, J. J., Locascio, L. E., Plastic Microfluidic Devices Modified with Polyelectrolyte Multilayers. *Anal. Chem.* 2000, 72, 4899-4903.
- [20] Liu, y., Fanguy, J. C., Bledsoe, J. M., Henry, C. S., Dynamic Coating Using Polyelectrolyte Multilayers for Chemical Control of Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis Microchips. *Anal. Chem.* 2000, 72, 5939-5944.
- [21] Bianchi, F., Chevotot, Y., Mathieu, H. J., Girault, H. H., Photomodification of Polymer Microchannels Induced by Static and Dynamic Excimer Ablation: Effect on the Electroosmotic Flow. *Anal. Chem.* 2001, 73, 3845-3853.
- [22] McCormick R M; Nelson R. J; Alonso-Amigo M G; Benvegna D J; Hooper H H. Microchannel Electrophoretic Separations of DNA in Injection-Molded Plastic Substrates. *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2626-2630.
- [23] ZHOU Xiao-Mian(周小棉), DAI Zhong-Peng (戴忠鹏), LUO Yong (罗勇) et al. China patent [P], Patent No: ZL02353129.0
- [24] ZHOU Xiao-Mian(周小棉), DAI Zhong-Peng (戴忠鹏), LUO Yong (罗勇) et al. China patent [P], Patent No: ZL02353130.4
- [25] Huang, X., Gordon, M. J., Zare, R. N., Current-monitoring method for measuring the electroosmotic flow rate in capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* 1988, 60, 1837-1835.
- [26] Cratree, H. J., Cheong, E. C. S., Tilroe, D. A., Backhouse, C. J., Microchip Injection and Separation Anomalies Due to Pressure Effects. *Anal. Chem.* 2001, 73, 4079-4086.
- [27] Fridstroem, A., Markides, K. E., Lee, M. L., Micellar electrokinetic capillary chromatography using polymer hollow fibres. *Chromatographia* 1995, 41, 295-300.
- [28] Reijenga, J. C., Aben, G. U. A., Verheggen, T. P. E. M., Everaerts, F. M., Effect of electroosmosis on detection in isotachopheresis. *J. Chromatogr. A.* 1983, 260, 241-254.

- [29] Bohmer, M. R., Koopal, L. K., Adsorption of ionic surfactants on constant charge surfaces. Analysis based on a self-consistent field lattice model. *Langmuir* 1992, 8, 1594-1602.
- [30] Hayes, M. A., Ewing, A. G., Electroosmotic flow control and monitoring with an applied radial voltage for capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* 1992, 64, 512-516.
- [31] Janini, G. M., Chan, K. C., Barnes, J. A., Muschik, G. M., and Issaq, H. J., Separation of pyridinecarboxylic acid isomers and related compounds by capillary zone electrophoresis. Effect of cetyltrimethylammonium bromide on electroosmotic flow and resolution. *J. Chromatogr. A* 1993, 653, 321-327.

第八章 PMMA 微流控芯片表面静态改性研究

8.1 引言

随着 μ -TAS 技术的不断发展成熟, 各种聚合物材料已逐渐引起了人们的重视, 它的制作过程相对简单, 费用也比较低, 可以一次性使用, 因此有可能成为微流控芯片制作材料的理想替代品。但绝大多数聚合物材料表面都是疏水的, 聚合物芯片通道内表面经常与分析物发生疏水相互作用, 样品被吸附在通道内壁, 使通道内表面性质发生了改变, 从而导致定量结果不准确, 电渗流不稳定, 以及分析重现性降低。因此有必要对聚合物芯片内表面进行功能化修饰, 以增加通道内表面的亲水性, 减少吸附发生, 控制电渗流。

目前 PMMA 因为制作工艺简单, 成本低廉而成为应用较为广泛的微流控芯片材料之一。和大多数聚合物材质类似, PMMA 芯片通道内壁的疏水性也很强, 必须对其内壁进行改性后才能用于芯片电泳分析。迄今为止, 已有动态和静态两种方法被用于 PMMA 芯片内表面的修饰。在前一章中, 我们通过动态修饰在 PMMA 芯片上实现了氨基酸等分子的电泳分离。此外, 寡糖和 DNA 也已经在动态修饰后的 PMMA 芯片上成功的实现了分离^[1,2]。动态修饰法虽然简单易行, 但当芯片与质谱联用时, 缓冲液中的添加剂会对实验产生一定的不利影响, 而静态修饰法则可以避免这种不利影响。Henry 等人通过氨解反应将 PMMA 表面的酯基转化为氨基, 从而使 PMMA 芯片通道内表面带有氨基活性基团^[3]。不久他们又将氨化的 PMMA 芯片表面用正-十八烷-1-异氰酸酯进行衍生, 进而在修饰后的 PMMA 芯片上完成了 DNA 标准片段的反向 CEC 电泳分离^[4]。Johnson 等人通过脉冲 UV 准分子激光器 (KrF, 248 nm) 在较低频率时, 对 PMMA 微通道进行修饰^[5]。Zangmeister 等人则通过 UV/臭氧法对 PMMA 表面进行修饰^[6]。关于微流控芯片表面修饰的其他研究, 可以参照近期发表的综述^[7,8]。

在聚合物表面进行光聚合反应是由 Oster 等人首先提出的^[9]。紧接着 Rånby

等发展了一种新的光聚合方法，以苯甲酮作为夺氢反应的光敏剂^[10,11]。最近 Fréchet 和 Allbritton 等人将该项技术分别用于 Cyclic olefin copolymer (Topas 8007 X-10, COC) 和 PDMS 微通道内表面的改性研究^[12,13]。在本实验中，我们首次尝试将 Rånby 方法用于 PMMA 芯片微通道内壁的改性研究。以苯甲酮为光敏剂，通过预吸附的方法，使苯甲酮吸附在 PMMA 微通道内表面，然后通过紫外光聚合，使生成的亲水化合物聚丙烯酰胺成功接枝在 PMMA 芯片通道内壁。该修饰方法改善 PMMA 芯片通道内表面的疏水性，从而减少样品的吸附，并抑制通道内的电渗流。以肽和蛋白质为分析对象，对修饰后的 PMMA 芯片性能进行了考察。

8.2 实验部分

8.2.1 试剂与样品

荧光素钠 (FITC) 购自 Aldrich 公司。苯甲酮，丙烯酰胺，伴白蛋白，人血清白蛋白、胰蛋白酶、丙氨酸—缬氨酸 (Ala-Leu) 和缬氨酸—缬氨酸 (Leu-Leu) 均购自 Sigma 公司。聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) (韩国产品); 50 微米厚 PMMA 膜 (英国产品)。其他试剂均为国产分析纯。所有缓冲液均为二次水配制。

8.2.2 PMMA 微流控芯片

实验中所用芯片为本实验室自制的注塑型 PMMA 微流控芯片，制作方法参照文献^[14]，但有所改动。具体制作工艺见 7.2.2。所制得的 PMMA 微流控芯片具有十字交叉结构^[15,16]，分离通道长 4.8 cm，进样通道长 1.0 cm，十字交叉处距离样品池，样品废液池，缓冲液池均为 0.5 cm。微通道横截面近似为梯形，120 μm (上顶) \times 75 μm (下底) \times 30 μm (深)。刻有微通道的底板厚度为 1.3 mm，盖板是厚度为 0.05 mm 的 PMMA 薄膜。每片芯片上并列分布着三条相同的微通道。

8.2.3 PMMA 芯片内表面处理

首先将苯甲酮溶解于叔丁醇中 (5%, w/v)，通过予吸附的方法，在 PMMA 芯片内表面吸附一层苯甲酮分子，然后以高压汞 (氙) 灯 (光谱物理公司，500W) 为 UV 光源，对丙烯酰胺单体水溶液 (10%, w/v，水溶液在使用前通入氮气除

氧 15 分钟) 进行曝光, 引发单体在 PMMA 芯片内表面的聚合反应。然后用大量水冲洗。

8.2.4 电渗流的测定

电渗流的测定采用电流监测法^[17], 在芯片分离通道两端的储液池内分别加入等量的不同浓度的电泳缓冲液 (pH7.0, 10mM 和 6.7mM 的磷酸缓冲液)。在分离通道两端串联一个电阻, 加压后, 记录该串联电阻上电流变化所需时间, 以此时间作为中性物质在通道内的迁移时间, 由此得出微通道内的电渗流大小和方向。

8.2.5 蛋白质酶解

本实验中蛋白质酶解反应的操作步骤如下所示^[18]: 在加入胰蛋白酶进行酶解之前, 首先分别用 dithiothreitol 和 iodoacetamide 对已变性的伴白蛋白 (以 6 M 尿素为变性剂) 进行还原和烷基化反应。然后在 37℃, pH 8.0 的条件下, 加入 20 μg 胰蛋白酶对蛋白质样品进行酶解反应。酶解产物通过纤维素酯透析膜除盐 24 小时。将 6 mM FITC (溶于 DMSO 中) 按照 FITC 和伴白蛋白 10: 1 的比例 (摩尔比), 加入到酶解产物中进行荧光标记, 反应在室温下暗处进行 2 小时。标记好的酶解产物用二次水稀释到 1 mg/ml, 储存在 -20℃ 备用。

8.2.6 微流控芯片电泳分析条件

所有实验均在自制的激光诱导荧光芯片仪器上进行。激光的激发波长为 480 nm, 检测波长为 520 nm。伴白蛋白经胰蛋白酶酶解后, 用 FITC 进行标记, 人血清白蛋白和二肽也用 FITC 进行柱前标记。背景缓冲液为 10 mM Borax, 所有缓冲液在使用前均用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。在进样过程中, 将样品池接地, 施加 300 V 电压于样品废液池, 缓冲液池和废液池分别施加 150 V 电压, 进样时间为 20 s。在分离过程中, 将缓冲液池接地, 在废液池上施加 1000 V 电压, 样品池和样品废液池分别施加 250 V 电压。如无特殊说明, 检测点距十字交叉处 4.0 cm。

8.3 结果与讨论

8.3.1 PMMA 芯片通道内表面光聚合反应

目前可用于聚合物表面修饰的方法有很多，其中化学接枝法（grafting）是应用最为广泛的一种技术^[19]。虽然有多种方法可以在聚合物表面进行化学接枝反应，但因为微流控芯片要求反应只能在特定区域内进行，因此绝大多数方法并不适用于微流控芯片通道内壁的修饰，而由 UV 光引发的聚合反应则比较适合用于微流控芯片内表面的化学修饰。在化合物表面通过光聚合引入不同的化学基团，这一方法是由 Oster 和 Shibata 在上世纪 50 年代末期首先提出来的^[9]。之后不久，Rånby 就建立了一种快捷而有效的光化学反应方法，以苯甲酮作为夺取氢原子的光引发剂，并对其反应机理进行了阐述^[10,20]，如图 8-1 所述：

苯甲酮在紫外光作用下，从基态跃迁到激发态，夺取聚合物表面的氢原子，使表面产生自由基，从而引发单体在聚合物表面的聚合反应。因为苯甲酮既可以作为终止剂，也可以作为引发剂，因此当苯甲酮和单体的浓度足够大时，在 UV 光的连续照射下，聚合物表面所生成的产物链可以由线性变为交联结构，如图 8-2 所示^[21]：

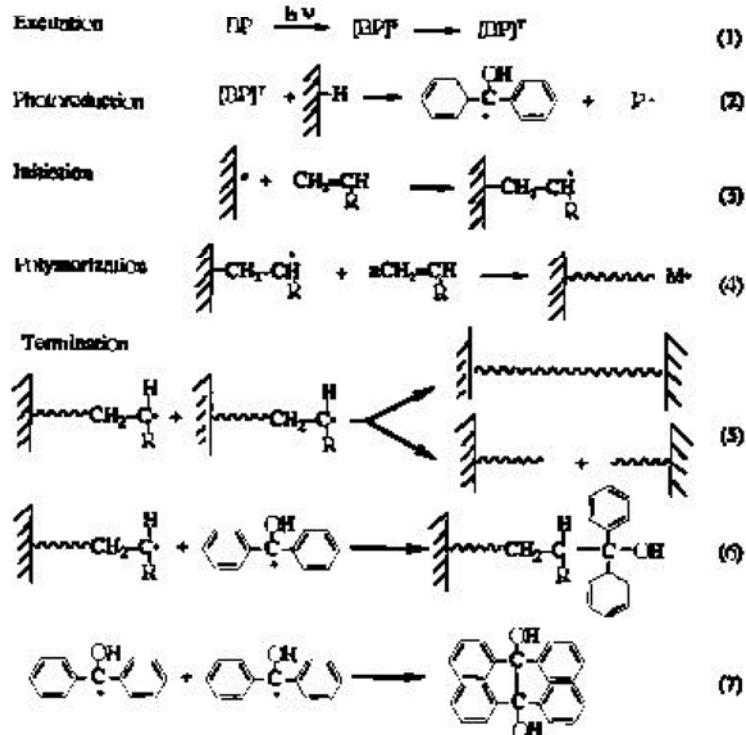


图 8-1 单体在苯甲酮作用下，在聚合物表面所生成的线性和交联结构产物示意图

Fig. 8-1 Reaction mechanism of photografting initiated by benzophenone on the surface of polymers

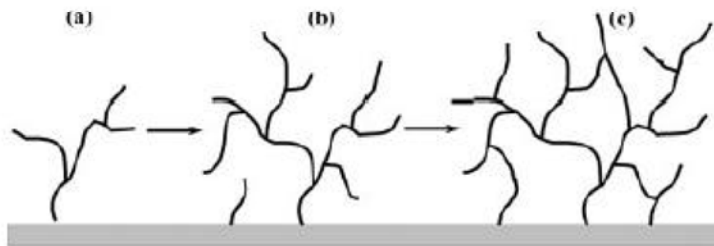


图 8-2 单体在苯甲酮作用下，在聚合物表面所生成的线性 (a 和 b) 和交联 (c) 结构产物示意图

Fig. 8-2 Schematic representation of branched (a, b) and crosslinked (c) polymer architectures using photografting initiated by benzophenone.

根据 Rånby 等的研究表明^[11], 将光引发剂固定在材料表面, 和将光引发剂置于溶液中相比, 前者可以加快表面的聚合反应速率, 因此在 PMMA 微流控芯片通道内表面的静态改性中, 我们首先在 PMMA 表面吸附一层苯甲酮, 然后再将亲水的单体 (丙烯酰胺) 通过光聚合的方法接枝在通道内表面上, 以改善微流控芯片通道内壁的亲水性, 减少样品的吸附。为了验证苯甲酮是否能被吸附在 PMMA 通道内壁, 并能引发单体在 PMMA 表面的聚合反应, 我们测定了通道内电渗流的变化 (修饰的和未修饰的)。因为电渗流是由材料表面电荷引起, 因此测定电渗流可以直观的反映表面电荷的多少及表面修饰的结果。PMMA 芯片通道内电渗流的变化如图 8-3 所示, 随着苯甲酮浓度的增加, 通道内的电渗流逐渐减小, 直至近乎接近于零。这表明丙烯酰胺单体在光引发剂苯甲酮的作用下, 在 PMMA 芯片内表面上发生了光聚合反应, 从而使通道内表面的电荷绝大多数被覆盖。

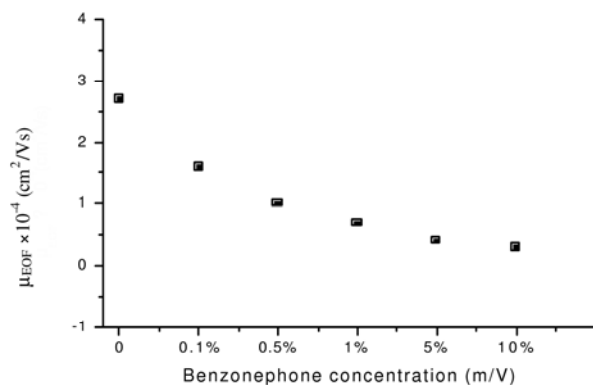


图 8-3 苯甲酮浓度对 PMMA 芯片通道内电渗流的影响 (丙烯酰胺浓度为 10%)

Fig. 8-3 Effect of the concentration of benzophenone on EOF in PMMA microchannel.

8.3.2 小肽在静态改性 PMMA 芯片中的电泳分离

将静态改性的 PMMA 芯片用于电泳分离研究, 首先以二肽 Ala-Leu 和 Leu-Leu 作为分析对象, 对静态改性后 PMMA 芯片分离效率、重现性以及使用寿命等进行了详细考察。图 8-4 是二肽混合物在未改性和改性后的 PMMA 芯片

中的电泳分离谱图。从图中可以看出，二肽混合物在改性后的 PMMA 芯片中得到了很好的分离，电泳峰型得到明显改善，Ala-Leu 和 Leu-Leu 的理论塔板数分别为 $3.9 \times 10^5/m$ 和 $3.6 \times 10^5/m$ 。在未做任何处理的芯片中，由于 FITC-二肽和 PMMA 表面发生相互作用，从而导致肽的电泳峰展宽，柱效下降，Ala-Leu 和 Leu-Leu 在未改性 PMMA 芯片中理论塔板数分别约为 $8.0 \times 10^4/m$ 和 $1.0 \times 10^5/m$ 。此外，在未改性的芯片中，二肽的出峰时间延长，这主要可能是因为电渗流与肽的电泳迁移方向相反以及 FITC-二肽和 PMMA 表面存在相互作用所致。由于 PMMA 芯片内表面吸附有 FITC-二肽，使通道内表面的电荷发生改变，从而导致 EOF 不稳定，使进样和分离的重现性都很差，基线经常发生漂移，Ala-Leu 和 Leu-Leu 迁移时间相对标准偏差在 7.5% 左右。而在经过静态改性后的 PMMA 芯片中则没有出现这些现象，分析的重现性较好，同一通道内肽的迁移时间相对标准偏差在 1% 左右，而在同一批修饰的芯片上，肽的迁移时间相对标准偏差在 3% 左右，两峰的迁移时间比基本保持不变，这说明该静态改性方法的批内重现性较好，具体结果如表 8-1 和 8-2 所示。

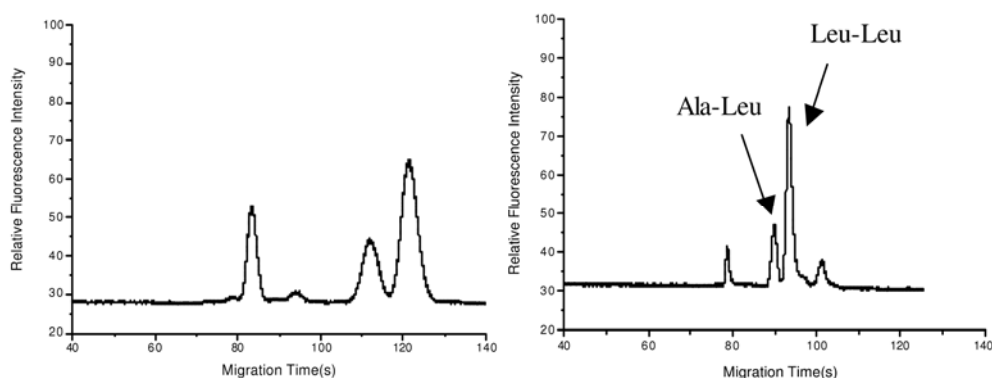


图 8-4 二肽在未改性和改性后的 PMMA 芯片中的电泳谱图。A 为未改性的 PMMA 芯片；B 为改性后的 PMMA 芯片。

Fig. 8-4 Electrophoregrams of peptides in PMMA microchannels with (B) or without (A) surface modification.

表 8-1 二肽在同一条通道内的重现性 (改性后)

运行次数	Ala-Leu 迁移时间 (s)	Ala-Leu 理论塔板数 (N/m)	Leu-Leu 迁移时间 (s)	Leu-Leu 理论塔板数 (N/m)
1	69.63	397334	73.21	343523
2	69.03	367549	72.37	354727
3	68.43	340552	71.96	376594
4	68.37	442191	71.75	363778
5	67.76	434336	71.1	352168
6	67.73	464130	70.82	417428
7	68.47	326597	71.8	317333
8	69.66	423326	72.91	375636
9	69.14	397858	72.52	361234
10	69.07	390968	72.4	360039
平均值	68.73	398484	72.08	362246
相对标准偏差 (RSD%)	1.00	11.12	1.04	7.11

注：检测点距十字交叉处 4cm。

表 8-2 二肽在同一批修饰的芯片上的重现性

PMMA 通道	参数	组分迁移时间均值 (s)		相对峰时间比
		Ala-Leu 迁移时间 (s)	Leu-Leu 迁移时间 (s)	
1		68.73	72.08	1.05
2		64.80	67.73	1.05
3		66.40	69.32	1.04
4		69.20	72.53	1.05
5		64.96	68.04	1.05
6		64.99	68.29	1.05
7		66.69	70.14	1.05
8		69.62	73.17	1.05
9		67.62	70.94	1.05
相对时间标准偏差 (RSD%)		2.82	2.91	

注：检测点距十字交叉处 4cm。

化学修饰的稳定性也是一个非常重要的参数,这将决定实际使用的次数和成

本。将静态改性的 PMMA 芯片连续用于肽的电泳分离，其中部分运行电泳谱图如图 8-5 所示。从图中可以看出，随着运行次数的增加，肽的峰型略有展宽，柱效和分离度有所下降。图 8-6 是肽的分离度随运行次数变化的曲线，当运行到 40 次以后时，肽的分离度明显下降。这表明当以二肽作为分离对象时，静态改性 PMMA 芯片的使用寿命约为 40 次，这一使用寿命足以满足一般常规电泳分析需要。

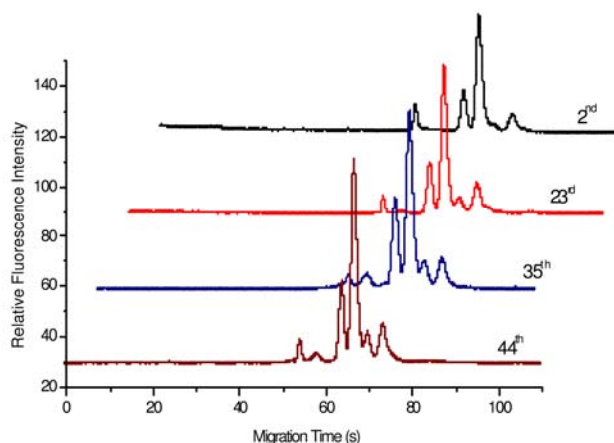


图 8-5 二肽在同一片静态改性 PMMA 芯片上连续多次运行电泳谱图

Fig. 8-5 Electropherograms of peptides in surface-grafted PMMA microchannel with consecutive running times.

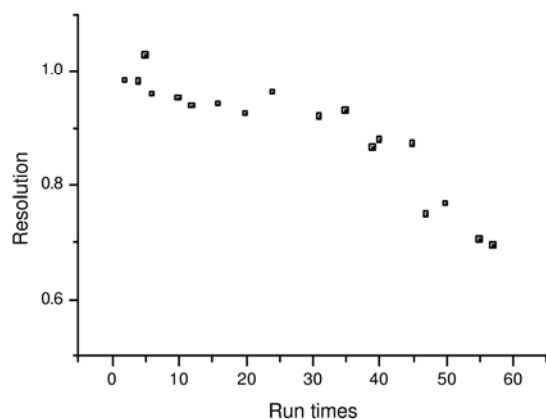


图 8-6 二肽在同一片改性 PMMA 芯片上分离度随运行次数变化曲线

Fig. 8-6 Resolution of peptides in surface-grafted PMMA microchannel with consecutive running times.

8.3.3 蛋白质水解产物在静态改性 PMMA 芯片中的电泳分离

蛋白质水解产物-多肽混合物的分析在蛋白质组学的研究中占有十分重要的地位。将静态改性后的 PMMA 芯片用于多肽混合物的电泳分析，以伴白蛋白胰蛋白酶水解产物—多肽混合物为研究对象，电泳分离谱图如图 8-7 所示。FITC-酶解产物在静态修饰的 PMMA 芯片中得到了较好的分离，而在未做任何处理的 PMMA 芯片中样品峰展宽严重，出峰时间延长，酶解产物没有得到任何分离，这可能是因为 FITC-酶解产物与疏水的 PMMA 芯片内表面之间发生严重的相互作用。

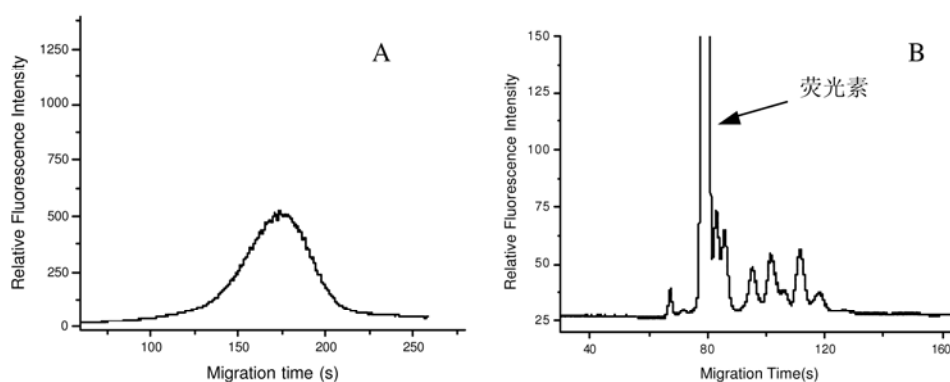


图 8-7 伴白蛋白胰蛋白酶水解产物 PMMA 芯片电泳谱图。A: 芯片未做任何处理；B: 静态改性的 PMMA 芯片。

Fig. 8-7 Electropherograms of tryptic digests of conalbumin in PMMA microchannels with (B) or without (A) surface modification.

8.3.4 蛋白质在静态改性 PMMA 芯片中的电泳分离

牛血清白蛋白因可以与疏水的聚合物表面发生相互作用，被强烈吸附，因此常被作为一种动态表面修饰的方法。以 FITC-牛血清白蛋白为分析对象考察 PMMA 芯片静态修饰的效果。未经改性的 PMMA 芯片对蛋白质吸附十分严重，FITC-牛血清白蛋白正向和负向运行均不能出峰，而在静态改性过的 PMMA 芯片中电泳谱图如图 8-8 所示，理论塔板数为 $8.0 \times 10^4/m$ 。与未处理过的芯片分离效果相比，该蛋白峰形对称，无明显拖尾，柱效及重复性均较好，表明 FITC-牛血清白蛋白在静态改性后的 PMMA 芯片内表面无明显吸附，聚甲基丙烯酸酰胺

均匀连续的覆盖了 PMMA 芯片微通道内表面。

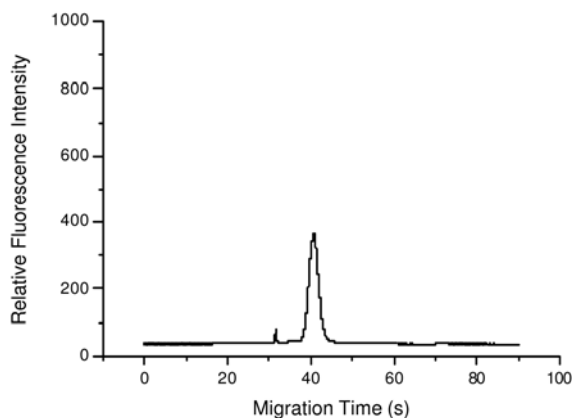


图 8-8 牛血清白蛋白在静态改性 PMMA 芯片中的电泳谱图。

Fig. 8-8 Electrophoregram of bovine serum albumin in surface-coated PMMA microchannel.

8.4 结论

建立了一种注塑型 PMMA 微流控芯片内表面静态修饰方法。以苯甲酮为光敏剂, 预先吸附在 PMMA 表面, 然后通过紫外光聚合, 在 PMMA 芯片通道内壁键合上一层亲水的聚丙烯酰胺。通过以上处理步骤所得到的 PMMA 芯片微通道内壁亲水性增强, 减少了肽和蛋白质等生物分子的吸附, 通道内的电渗流也被抑制到几乎可以忽略的地步。和未做任何处理的 PMMA 芯片相比, 肽和蛋白质的电泳分析效率都有显著的改善和提高。在修饰后的 PMMA 芯片中, Ala-Leu 和人血清白蛋白的理论塔板数分别达到 $3.9 \times 10^5/m$ 和 $0.8 \times 10^5/m$ 。Ala-Leu 和 Leu-Leu 在处理好的芯片中迁移时间的相对标准偏差在 1% 左右, 而在同一批处理的 PMMA 芯片间迁移时间的相对标准偏差小于 3%, 说明该方法的重复性很好。在同一条微通道上连续运行 Ala-Leu 和 Leu-Leu 二肽样品 40 余次, 柱效和分离度均没有明显的下降。以上结果表明该修饰方法可以在 PMMA 芯片通道内表面产生一个均匀、连续、重复性较好的聚丙烯酰胺涂层, 而这将拓宽 PMMA 芯片在生物分子特别是蛋白质组学分析领域中的应用。

参考文献

- [1] Dang, F., Zhang, L., Hagiwara, H., Mishina, Y., Baba, Y., Ultrafast analysis of oligosaccharides on microchip with light-emitting diode confocal fluorescence detection. *Electrophoresis* 2003, 24, 714–721.
- [2] Xu, F., Jabasini, M., Baba, Y., DNA separation by microchip electrophoresis using low-viscosity hydroxypropylmethylcellulose-50 solutions enhanced by polyhydroxy compounds. *Electrophoresis* 2002, 23, 3608–3614.
- [3] Henry, A. C., Tutt, T. J., Galloway, M., Davidson, Y. Y., McWhorter, C. S., Soper, S. A., McCarley, R. L., Surface Modification of Poly(methyl methacrylate) Used in the Fabrication of Microanalytical Devices. *Anal. Chem.* 2000, 72, 5331-5337.
- [4] Soper, S. A., Henry, A. C., Vaidya, B., Galloway, M., Wabuvele, M., McCarley, R. L., Surface modification of polymer-based microfluidic devices. *Anal. Chim. Acta* 2002, 470, 87–99.
- [5] Johnson, T. J., Waddell, E. A., Kramer, G. W., Locascio, L. E., Chemical mapping of hot-embossed and UV-laser-ablated microchannels in poly(methyl methacrylate) using carboxylate specific fluorescent probes. *Appl. Surf. Sci.* 2001, 181, 149–159.
- [6] Zangmeister, R. A., Tarlov, M. J., UV Graft Polymerization of Polyacrylamide Hydrogel Plugs in Microfluidic Channels. *Langmuir* 2003, 19, 6901-6904.
- [7] Belder, D., Ludwig, M., Surface modification in microchip electrophoresis. *Electrophoresis* 2003, 24, 3595-3606.
- [8] Makamba, H., Kim, J. H., Lim, K., Park, N., Hahn, J. H., Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels. *Electrophoresis* 2003, 24, 3607-3619.
- [9] Oster, G., Shibata, O., Graft copolymer of polyacrylamide and natural rubber produced by means of ultraviolet light. *J. Polym. Sci.* 1957, 26, 233-234.
- [10] Yang, W. T., Rånby, B., Radical Living Graft Polymerization on the Surface of Polymeric Materials. *Macromol.* 1996, 29, 3308-3310.
- [11] Deng, J. P., Yang, W. T., Rånby, B. Surface photografting polymerization of vinyl acetate (VAc), maleic anhydride (MAH), and their charge transfer complex (CTC). III. VAc(3). *J. Appl. Polym. Sci.* 2001, 80, 1426-1433.
- [12] Hu, S., Ren, X. Q., Bachman, M., Sims, C. E., Li, G. P., Allbritton, N. L., Surface-Directed, Graft Polymerization within Microfluidic Channels. *Anal. Chem.* 2004, 76, 1865-1870.

- [13] Stachowiak, T. B., Rohr, T., Hilder, E. F., Peterson, D. S., Yi, M. Q., Svec, F., Fréchet, J. M. J., Fabrication of porous polymer monoliths covalently attached to the walls of channels in plastic microdevices. *Electrophoresis* 2003, 24, 3689-3693.
- [14] McCormick, R. M., Nelson, R. J., Alonso-Amigo, M. G., Benvegna, D. J., Hooper, H. H., Microchannel Electrophoretic Separations of DNA in Injection-Molded Plastic Substrates. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2626-2630.
- [15] ZHOU Xiao-Mian(周小棉), DAI Zhong-Peng (戴忠鹏), LUO Yong (罗勇) et al. China patent [P], Patent No: ZL02353129.0
- [16] ZHOU Xiao-Mian(周小棉), DAI Zhong-Peng (戴忠鹏), LUO Yong (罗勇) et al. China patent [P], Patent No: ZL02353130.4
- [17] Huang, X., Gordon, M. J., Zare, R. N., Current-monitoring method for measuring the electroosmotic flow rate in capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* 1988, 60, 1837-1835.
- [18] Kinter, M., Sherman, N. E., Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry; Wiley-Interscience, Inc.: New York, 2000.
- [19] Uyama, Y., Kato, K., Ikada, Y., Surface Modification of Polymers by Grafting. *Adv. Polym. Sci.* 1998, 137, 1.
- [20] Rånby, B., Surface modification and lamination of polymers by photografting. *International Journal of Adhesion & Adhesives* 1999, 19, 337-343.
- [21] Rohr, T., Ogletree, D. F., Svec, F., Fréchet, J. M. J., Surface Functionalization of Thermoplastic Polymers for the Fabrication of Microfluidic Devices by Photoinitiated Grafting. *Adv. Funct. Mater.* 2003, 13, 264-270.

总结论

本论文主要围绕着微流控体系的基础研究展开，从微流控芯片分析仪、玻璃和 PMMA 微流控芯片三个方面较为系统地研究了微流控体系在电泳分离分析方面的一系列基本问题，得出下述主要结论：

1、自行设计并搭建了一系列激光诱导荧光微流控芯片装置，包括四色荧光共聚焦激光诱导荧光微流控芯片装置、脉冲式和连续式激光诱导荧光微流控芯片装置。其中后一种装置采用自行设计的软件对激光的脉宽和频率进行调控，从而使取样平均器（Boxcar）弱信号检测技术不仅可以用于脉冲式，也可以用于连续式半导体激光诱导荧光微流控芯片装置中，提高了信噪比，为微流控芯片中弱信号的快速检测提供了一种新的通用方法。

2、对实验室自制的玻璃和 PMMA 微流控芯片建立了性能考察和评价体系。发现自制玻璃芯片的重复性较好，表面性质稳定，使用寿命较长，各项主要指标与国际先进水平相当，其性能价格比则显示出明显优势。首次将超低粘度羟丙基甲基纤维素筛分介质用于玻璃微流控芯片中 DNA 片段的分离分析。这种粘度与水在同一个数量级上的筛分介质，使得微通道的冲洗和溶液灌入十分容易，在很大程度上避免了柱子堵塞现象的发生，因而特别适用于微流控芯片体系。实验发现，添加剂对体系的筛分性能具有重要影响，通过优化，可以将该筛分体系用于临床 PCR 样品的快速检测。

3、建立了注塑型 PMMA 微流控芯片内表面的动态和静态修饰方法。通过不同表面活性剂的加入，可以对 PMMA 微通道中的电渗流进行动态调控，并可增加其内壁的亲水性，也可根据不同分离对象的需求，增加、减小电渗流或使其反向，以得到最佳的微流控芯片电泳分离效果，其中 SDS 对小分子氨基酸的芯片电泳分离影响最大。在此基础上，研制了 PMMA 微流控芯片分离专用试剂盒。首次通过光聚合的方法对 PMMA 芯片微通道内表面进行静态修饰，以使其产生一个均匀、连续、重复性较好的聚丙烯酰胺涂层。修饰后的 PMMA 芯片微通道内壁亲水性增强，电渗流被抑制到几乎可以忽略的地步，和未做任何处理

的 PMMA 芯片相比, 分离效率和重复性都有显著提高。在静态修饰的 PMMA 微通道内连续运行小肽样品 40 余次, 柱效和分离度均没有明显的下降。光聚合修饰法极大的拓宽 PMMA 芯片在生物大分子特别是多肽和蛋白质分析中的应用。

作者简介

王辉：1974 年生于辽宁省大连市。1993 年考入北京大学化学系。1997 年毕业后开始在大连化学物理研究所攻读博士学位，在导师林炳承研究员白吉玲研究员的指导下从事微流控芯片电泳分析基础研究。

在博士期间论文发表情况如下：

1. Hui Wang, Jianhua Qin, Zhongpeng Dai, Li Wang, Jiling Bai, Bingcheng Lin, "Highly Efficient Separation of dsDNA Fragments on Glass Chips by Using Ultralow Viscosity Sieving Matrix" *Journal of Separation Sciences*, 2003, 26(9-10), 869-874.
2. Dazhi Li, Xinya He, Hui Wang, Bingcheng Lin, "Study of Interaction between Red-Tide Toxin, Domoic Acid and Double-stranded DNA by Capillary Zone Electrophoresis" *Chinese Chemical Letters*, 2004, 15(9) 1079-1082.
3. Xiaomian Zhou, Dayu Liu, Runtao Zhong, Zhongpeng Dai, Dapeng Wu, Hui Wang, Yuguang Du, Zhinan Xia, Liping Zhang, Xiaodan Mei, Bingcheng Lin "Determination of SARS-coronavirus by a Microfluidic Chip System" *Electrophoresis*, 2004, 25(17), 3032-3039.
4. Xiao-Mian Zhou, Zhong-Peng Dai, Yong Luo, Xin Liu, Hui Wang and Bing-Cheng Lin, "Modification of poly(methyl methacrylate) injection-molded microchip and its application for high performance analysis of DNA", *Journal of Separation Science*, 2004, in press.
5. Dazhi Li, Hui Wang, Zheng Shen, Yunna Fu, Xinya He, Renyan Liu, Li Sun, Shaojun Zhang, Bingcheng Lin, "New Approach to Survey the Distribution of Red Tide Toxin-Domoic Acid along Seacoast of China by Capillary Zone Electrophoresis", *Journal of biochemical and biophysical methods*, submitted.
6. Hui Wang, Xin Liu, Zhongpeng Dai, Xiaomian Zhou, Yan Gao, Li Wang, Jiling Bai, Bingcheng Lin, "Cross-linked coating in poly(methyl methacrylate)

microchannels for peptides electrophoretic separation”, *Journal of Chromatography A*, submitted.

7. 王辉, 林炳承, “芯片毛细管电泳及其在生命科学中的应用” 分析化学, 2002, 30(3), 359-364。
8. 王辉, 戴忠鹏, 王利, 白吉玲, 林炳承, “氨基酸对映体的芯片毛细管电泳拆分” 分析化学, 2002, 30(6), 665-669。
9. 王辉, 毛秀丽, 盖宏伟, 白吉玲, 林炳承, “芯片毛细管电泳中组分的迁移行为及其特征” 高等学校化学学报, 2002, 23(6), 1030-1034。
10. 周小棉, 戴忠鹏, 罗勇, 刘大渔, 王辉, 毛秀丽, 吴大朋, 林炳承, “注塑型聚甲基丙烯酸甲酯多通道微流控芯片的研制和性能考察” 高等学校化学学报, 2005, 1, 待发表。
11. 王辉, 戴忠鹏, 高雁, 马波, 王利, 白吉玲, 林炳承, “玻璃微流控芯片及其基本性能考察”, 高等学校化学学报, 已投稿。
12. Xiaomian Zhou, Dayu Liu, Runtao Zhong, Xiaodai Mei, Zhongpeng Dai, Dapeng Wu, Hui Wang, Yuguang Du, Long Sun, Bingcheng Lin, “Determination of SARS-coronavirus by microfluidic chip system”, *HPCE*, 2004, 2, pp183

在博士期间申请专利情况如下:

1. 王辉, 盖宏伟, 白吉玲, 林炳承, “一种聚合物芯片微通道内表面予处理的方法”, 申请号: 02132623.1 (发明)。
2. 王辉, 戴忠鹏, 王利, 白吉玲, 林炳承, “一种甲基丙烯酸甲酯微流控芯片分离分析用试剂盒”, 专利号: ZL200320127101.2 (实用新型)。
3. 王辉, 戴忠鹏, 王利, 白吉玲, 林炳承, “一种玻璃微流控芯片分离分析试剂盒”, 专利号: ZL200320105952.7 (实用新型)。
4. 王辉, 戴忠鹏, 王利, 白吉玲, 林炳承, “一种注塑型聚甲基丙烯酸甲酯微流控芯片的质量检测方法”, 申请号: 200310119500.9 (发明)。

5. 王辉, 戴忠鹏, 王利, 白吉玲, 林炳承, “一种玻璃微流控芯片的质量检测方法”, 申请号: 200310119466.5 (发明)。
6. 李大志, 王辉, 林炳承, “一种软骨藻酸的检测方法及其沿海赤潮毒素普查方法”, 发明专利, 申请号: 200310105074.3 (发明)。
7. 王辉, 刘欣, 戴忠鹏, 王利, 白吉玲, 林炳承, “一种新型内壁涂层的聚甲基丙烯酸甲酯微流控芯片”, 申请号: 200420120687.4 (实用新型)。
8. 王辉, 刘欣, 戴忠鹏, 王利, 白吉玲, 林炳承, “一种多肽分离分析专用聚甲基丙烯酸甲酯微流控芯片试剂盒”, 申请号: 200420120689.3 (实用新型)。

成果:

林炳承, 戴忠鹏, 王辉, 吴大朋, 周小棉, 等, “微流控芯片生产工艺与表面修饰技术”, 2004, 9, 26。鉴定单位: 中国科学院高技术研究与发展局。

致 谢

本论文是在林炳承研究员的精心指导下完成的。他为论文工作的展开和顺利进行倾注了大量的心血，并在实验中给了具体的指导。林老师宽广的知识面、高深的理论基础、以及活跃的学术思想都使我受益匪浅。在此对林老师的辛勤培养表示最诚挚的谢意。

作为合作导师的白吉玲研究员也在实验中给予了作者大量的指导和帮助，他的忘我的工作态度、极强的动手能力以及可亲可敬的为人态度都令我钦佩，在此也献上最诚挚的谢意。

在前期工作中与中国科学冶金所徐元森院士和赵建龙老师进行了有益的合作，在此向两位老师表示衷心的感谢。

感谢王利老师及其实验室里老师和同学的大力帮助和支持。

在几年的紧张学习生活中，组内的老师和同学们给予了作者许多无私的关怀和帮助。在和他们所进行的学术交流和讨论中，使我受益匪浅。感谢这些老师和同学们，他们是：薛俊、戴忠鹏、韩富天、丁永生、靳艳、董秀玲、李大志、许旭、宫守凤、周小棉、秦建华、时蔚、王琪、何新亚、王刚、盖宏伟、毛秀丽、梁爱叶、刘大渔、姜雷、沈铮、龙志成、刘晓君、刘欣、吴大朋、罗勇、於林芬、钟润涛、黄淮青、马波、高艳、解华、叶因楠、李博伟等。

研究生部的全体老师在学习上给了我无微不至的关心和帮助，在此表示衷心的感谢。

感谢我的家人给予我的支持和鼓励，特别感谢我的丈夫王延波，感谢他的始终如一的理解和支持，感谢他在艰难时刻对我在生活和工作上的关心、帮助和鼓励。

最后感谢所有帮助过我的人，谢谢你们。

2005年1月