

## 微流控芯片实验室在基因分析研究中的应用

秦建华<sup>1,2</sup>, 冯应升<sup>2</sup>, 林炳承<sup>1</sup>

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; 2. 香港大学化学系, 香港)

**摘要** 对微流控芯片实验室在基因分析中应用研究的最新进展予以综述, 特别注意到了这种新技术平台在不同类型的基因多态性检测和脱氧核糖核酸(DNA)测序中的贡献, 在一定程度上反映了这种贡献在临床诊断、法医学鉴定等领域已经产生的影响。

**关键词** 微流控芯片; 毛细管电泳; 突变; 多态性; 基因; 脱氧核糖核酸(DNA)测序

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2003)05-0464-05

## Development and Applications of Microfluidic Lab-on-a-chip in Gene Analysis

QIN Jianhua<sup>1,2</sup>, FENG Yingsheng (FUNG Yingseng)<sup>2</sup>, LIN Bingcheng<sup>1</sup>

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

2. Department of Chemistry, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

**Abstract**: The up to date development and applications of microfluidic lab-on-a-chip in gene analysis are reviewed. The special attention is paid to its contribution in the fields of the different kinds of DNA polymorphism analysis and DNA sequencing. The emergent influences of such contributions in the area of clinical diagnose and forensic sciences are described as well.

**Key words**: microfluidic chip; capillary electrophoresis; mutation; polymorphism; gene; DNA sequencing

微流控芯片实验室是指把生物和化学等领域中所涉及的样品制备、生物与化学反应、分离、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米的芯片上, 由微通道形成网络, 以可控流体贯穿整个系统用以完成不同的生物或化学反应过程, 并对其产物进行分析的一种技术。这种技术原则上适用于从核酸、蛋白质直到有机、无机小分子等各种不同类型分子的反应、分离和检测, 并涉及到了许多生物和非生物过程中的化学问题<sup>[1]</sup>。

20世纪90年代初, Manz和Harrison等<sup>[2]</sup>最早开展了微流控芯片的开拓性研究工作, 并以芯片毛细管电泳作为微流控芯片的早期形式。此后, 很多研究单位就芯片电泳相对于毛细管电泳在样品进样、反应、分离、集成和检测等方面的特殊性展开了诸多研究, 并取得了突破性的进展, 至今已实现了上千个阀和几百个反应器在芯片上的大规模集成<sup>[3]</sup>, 并充分显示出芯片由简单的电泳分离到大规模多功能集成的质的飞跃。微流控芯片集高通量和规模集成为一体的显著特点, 使其远远超越单一毛细管电

泳的分析功能, 它不仅能以极小的样品获得大量的信息, 更有可能以整体实验室的姿态面向市场。微流控芯片实验室技术已被公认为21世纪最为重要的前沿技术之一。由Agilent公司开发的第一代商品化微流控芯片分析仪(Agilent 2100 Analyzer)已投放市场, 主要用于脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)和蛋白质的分析研究。总体而言, 这种功能化微流控芯片主要包括3个部分, 即芯片、芯片检测系统及包含有实现芯片功能化的方法和材料的试剂盒。芯片本身涉及到尺寸和材料两个方面。现有典型的芯片通常约为几平方厘米大小, 其通道宽约50~100 μm, 深约20~50 μm。总体积较一般电泳毛细管小1个数量级左右。芯片的片基材料以玻璃、石英和各种塑料为主, 其中常用的有机聚合物包括刚性的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚碳酸酯(PC)和弹性的聚二甲基硅氧烷(PDMS)等。目前, 我们实验室已研制成功玻璃芯片、SU-8芯片和PMMA注塑芯片<sup>[4,5]</sup>。微流控芯片样品需要量极小(pL级), 这对信号的检测提出了较高要求。激光诱导荧

收稿日期 2003-02-28

作者简介 秦建华, 博士研究生。

通讯联系人 林炳承, E-mail: bclin@dicp.ac.cn.

基金项目 国家自然科学基金面上基金(20275039)、重点基金(20035010)、重大基金(20299035)、国际合作基金资助项目。

光检测灵敏度较高,甚至可达到单分子水平<sup>[6]</sup>,因而是目前微流控芯片的主要检测方法;其他方法包括电化学、质谱、紫外、化学发光和传感器等。可供商品化的激光诱导荧光芯片分析仪和电化学芯片分析仪均已在我们实验室研制成功<sup>[7,8]</sup>。

实现功能化的方法和材料的试剂盒是各种专一性微流控芯片实验室的核心部分,而功能化芯片的实现形式将最终体现在各方面的应用之中。由于承袭了毛细管电泳对双链或单链 DNA 分离的优势,微流控芯片一开始就在基因分析领域显示出极强的功能,并由最初对 DNA 限制性片段<sup>[9,10]</sup>和短寡核苷酸链<sup>[11]</sup>的简单分离过渡到进行复杂的遗传学诊断、法医学应用和 DNA 测序等方面。就分离体系而言,筛分仍是芯片电泳 DNA 分析的主要模式,常用的筛分介质为线性聚丙烯酰胺(LPA)、聚二甲基丙烯酸酰胺(PDMA)、聚吡咯烷酮(PVP)以及纤维素类衍生物,如羟乙基纤维素(HEC)等。就分析方法而言,微流控芯片主要与以聚合酶链反应(PCR)为基础的一些生物学手段相结合而实现其分析功能。在以下几节中,我们将重点阐述微流控芯片在基因分析应用研究中的最新进展。

## 1 多态性检测

基因多态性是人类各种可遗传变异中十分常见的现象,主要表现为长度和序列多态性两个方面。长度多态性包括大片段 DNA 插入或缺失引起的基因突变以及高度重复序列中小卫星或微卫星位点的重复串联数目不同而引起的多态性;而序列多态性则来源于单碱基的替换、插入或缺失,亦即基因的点突变。这些变异提供了大量的遗传标记,可用于疾病关联分析、疾病相关基因的定位、法医学中个人识别和亲权鉴定等方面。

### 1.1 基因大片段缺失检测

杜氏肌营养不良(DMD)是一种 X 染色体连锁的隐性遗传病,60% 的患者可伴有抗击萎缩蛋白基因的缺失,且主要发生在 9 个突变热点区<sup>[12]</sup>。PCR 技术可设计多个引物,通过多重 PCR 反应对缺失区域进行扩增并经电泳分析来鉴别缺失片段。Cheng 等<sup>[13]</sup>将 PCR 反应装置集成在硅-玻璃芯片上,通过芯片 PCR 反应和电泳分离过程的有机结合,成功检测了 DMD 患者的抗击萎缩蛋白基因的大片段缺失突变。他们将整个分析过程集成在几个芯片上完成,先在一块芯片上进行随机引物的 PCR 扩增(DOP-PCR),然后以此扩增产物为模板在另一芯片上进行 DMD 基因特异性位点的多重 PCR 反应,最后经芯片电泳分析。这种基于微流控技术实现基因

分析过程中关键步骤的集成,为最终实现高度集成化的诊断性功能芯片奠定了基础。

### 1.2 基因重排检测

T 细胞受体(TCR)基因和免疫球蛋白(IgH)基因是 T、B 恶性淋巴瘤的高表达基因,而 TCR 和 IgH 基因重排是诊断恶性淋巴瘤的重要依据。正常细胞群是多克隆起源,通过 PCR 扩增可获得多个产物,经电泳分析则呈现为多个峰;相对而言,淋巴瘤细胞具有单一克隆起源,即单一的 IgH 或 TCR 基因重排方式,因此,PCR 扩增可获得单一产物,电泳呈现为单一的窄峰,以此可确定是否有基因重排。Munro 等<sup>[14]</sup>成功地将芯片电泳用于对恶性淋巴瘤患者基因重排的检测,通过选择多个 PCR 引物对 TCR 的可变区和 IgH 的结合区进行扩增,以 YO-PRO-1 为荧光染料来标记 DNA 片段,然后经单通道芯片电泳分析,检测时间仅为 160 s。与传统的毛细管电泳(15 min)和平板电泳(2.5 h)相比,分析时间明显缩短。

### 1.3 微卫星多态性分析

短串联重复序列(short tandem repeat, STR, 又称微卫星)是广泛存在于人类基因组的具有长度多态性的 DNA 序列,一般长度在 100~500 bp,主要由 2~6 个 bp 构成一个核心序列<sup>[15,16]</sup>。由于 STR 种类多,等位基因数目相对较少,信息含量高,因此已成为遗传连锁分析以及法医学应用的理想标记。传统的垂直板凝胶电泳用于 STR 分析费时费力,且背景模糊,易造成判断错误,不适于临床需要。

脆性 X 综合征(FraX)是一种 X 连锁的智力低下综合征,其致病基因为脆性 X 智力低下基因(FMR1),其主要突变表现为 FMR1 基因 5'非翻译区中一段三核苷酸重复序列(CGG)<sub>n</sub>的不稳定扩增,这些短串联重复序列拷贝数目的不同可用于鉴别正常人群、携带者和患病人群<sup>[17]</sup>。

Sung 等<sup>[18]</sup>将 PCR 扩增的 CGG 重复序列产物在 PMMA 塑料芯片上进行电泳分析,3 min 内即可区分 CGG 重复数目不同的扩增片段,分析时间较传统的 Southern Blot 方法明显减少,有利于快速诊断。Cantafora 等<sup>[19]</sup>通过 Agilent 2100 芯片分析仪,以低密度脂蛋白受体基因 D19s394 位点的四核苷酸重复序列(AAAG)为遗传标记,对 70 名家族性高胆固醇血症携带者和 100 名正常人进行了基因分型,并做了家族性连锁分析,其核心序列的重复数目为 0~17 不等,等位基因判断的标准偏差为( $\pm 0.6 \sim \pm 0.75$ ) bp。

STR 是法医学中进行个人识别和亲权鉴定的重要遗传标记,法医学上常用的 STR 大多为 4 bp

重复单位,理论上要求电泳的分辨率必须在 4 bp 以上,但由于一些 STR 位点(比如 TH01)存在核心序列的非整数倍重复和基因的突变,实际上要求分辨率需达到 1~2 bp。Schmalzing 等对芯片电泳用于法医学 STR 分析进行了一系列研究,早期的研究工作是在分离通道为 2.6 cm 长的硅芯片上对 4 个常用 STR 位点(CSF1PO, TPOX, TH01, vWA)进行基因分型。他们以 LPA 为分离介质,以标准等位基因片段大小为内标,在同一反应管中进行多对引物的复合 PCR 扩增,2 min 内可完成对 4 个 STR 位点等位基因的检测<sup>[20]</sup>。后来,他们在 2 cm 长的分离通道,经二色激光诱导荧光检测,2.4 min 内可完成对 8 个 STR 位点等位基因的同时分析<sup>[21]</sup>。最近,通过改善通道设计和检测方法,他们将分离通道延长为 11.5 cm,采用四色荧光检测,35 min 内实现了对包含有 15 个 STR 位点和 1 个性别位点的所有等位基因的分析,并达到单碱基分离,信噪比较高<sup>[22]</sup>。

Mathies 研究组一直处于开发阵列高通量微流控芯片的前沿,并将其研究成果用于进行高通量的 STR 分析。他们利用自行设计的 96 通道 CD 状圆盘芯片,经四色共聚焦激光扫描检测,以不同能量转移染料来标记引物,对法医学中 6 个常用 STR 位点进行复合 PCR 扩增,其中每个通道含有 1~3 个 STR 位点的多个扩增子,使样品分析通量大为增加。结果显示,他们在 8 min 内分析了 122 个 STR 样品,对单个 STR 位点扩增片段鉴定的最大偏差为 2.2 bp,平均偏差 < 1 bp (0.2%)。与商品化 96 通道毛细管电泳仪(Mega BACE-1000)比较,芯片电泳分离通道长度仅为毛细管电泳的 1/8(5.5 cm vs. 40 cm),但分析时间缩短了 9/10(8 min vs. 75 min)<sup>[23]</sup>。这种高通量的微阵列芯片的开发与应用为遗传学和法医学进行大量样品的 STR 分析提供了一个强有力的平台。

#### 1.4 点突变检测

伴随着人类基因组计划的实施,越来越多的与疾病相关的基因被克隆,基因突变(尤其是点突变)可引起一些遗传病、肿瘤和遗传易感性疾病等这一结论已被医学界所公认,而微流控芯片的出现则加快了基因突变检测规模化 and 程序化的进程,并主要通过与其他突变检测手段相结合而实现其功能。

**1.4.1 单链构象多态性(single-strand conformation polymorphism, SSCP)分析** SSCP 原理是基于等长的单链 DNA 有单个碱基差异时,由于链内相互作用而形成的构象会有所差异,这种构象差异在电泳中则呈现为不同的淌度。这是一种常用于已知点突变的检测方法。Tian 等<sup>[24]</sup>以荧光染料 FAM 标记

引物,将 PCR-SSCP 分析与芯片电泳相结合,用于检测乳腺癌易感基因(BRCA1, BRCA2)常见的 3 个点突变(185delAG, 5382 ins C, 6174delT),依据正常和突变序列电泳淌度的变化来判断突变,每个突变的分析时间仅为 120 s,远远少于毛细管电泳所需的时间(10 min)。

**1.4.2 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析** RFLP 是一种常见的点突变检测方法,某些突变往往会产生 DNA 序列的限制性内切酶位点或使酶切位点消失,因此,通过比较电泳酶切图谱的变化可判断待测 DNA 是否发生突变。Lu 等<sup>[25]</sup>采用商品化 2100 芯片电泳仪,通过 RFLP 分析对线粒体疾病(MELAS 和 MERRF)家族中 7 个成员的 tRNA<sup>leu</sup>UUR 基因和 tRNA<sup>lys</sup>基因进行了突变检测。遗传性血色素沉着症(HHC)是美国较常见的一种常染色体隐性遗传病,其相关基因(HFE)位点的 3 种点突变(C282Y, H63D, S65C)与该病的发生密切相关。Mathies 等<sup>[26]</sup>将基于 PCR 基础上的 RFLP 分析与微阵列芯片技术相结合,对其中 2 个错义突变(C282Y, H63D)进行了人群筛查和检测,利用 48 通道芯片同时检测 96 个样品需要 8 min,平均 5 s 分析一个样品。最近,他们又开发了迄今为止通量最高的一种微流控分析系统,其芯片设计为 384 个通道呈放射状排列于圆盘状芯片上,检测装置通过旋转的物镜头与共焦部分相连来进行四色荧光扫描。利用该检测系统,以同样的分析方法(RFLP)进行了大量人群 H63D 突变的筛查,并进行基因型的鉴定(突变型、杂合型、野生型),基因分型的准确率达 98.7%,检测 384 个样品仅用了 325 s。与 96 通道阵列毛细管电泳仪比较,分析时间缩短了 4/5,而所能分析的样品通量却增加了 19 倍<sup>[27]</sup>。

**1.4.3 等位基因特异性扩增反应(allele-specific amplification, ASA)** ASA 分析的基本构思是设计两条特定的引物(一种与野生型 DNA 序列互补,另一种与突变型 DNA 序列互补),再用 PCR 扩增出各自的等位基因,当引物与靶序列互补时,扩增反应能够进行;反之反应受阻。因此,可依据电泳有无特异性扩增片段来鉴定是否有基因突变。ASA 也可以将多个引物在一个反应体系中进行扩增,通过电泳分析可以完成多个突变的同时检测。Tian 等<sup>[28]</sup>以荧光染料标记的等位基因特异性引物进行 PCR 扩增,然后经芯片电泳分析,180 s 内即可检出 BRCA1 基因的 3 种杂合子突变。Mathies 等<sup>[29]</sup>利用 96 通道阵列芯片平台,以 HEC 为分离介质,用不同颜色的荧光染料(R110, ROX)标记引物,将等位基因特

异性 PCR (AS-PCR) 分析用于白种人 H63C 突变的筛查, 依据电泳是否出现 R110 峰(蓝色)即可鉴别是否有突变的等位基因。由于 HEC 介质筛分能力有限, 且 ROX 在 488 nm 激光激发下荧光效率不高, 常需要较高浓度的 PCR 产物, 因此, 后来他们改用线性 LPA 为介质, 采用能量转移等位基因特异性引物进行 PCR 扩增, 使信噪比和检测灵敏度大为提高。在对人群 HFE 基因位点 3 种突变(C282Y, H63D, S65C)进行检测时, 他们在 10 min 内分析了 96 个样品, 分辨率和精确性均较高<sup>[30]</sup>。这也是人们首次将 AS-PCR 与能量转移标记技术相结合用于临床实际样品基因突变的筛查。

**1.4.4 异源杂合双链分析 (heteroduplex assay, HA)** HA 方法的原理是基于纯合与错配(异源)双链 DNA 在非变性条件下具有不同的电泳淌度。它是将杂合型 DNA 或潜在的纯合突变型 DNA 与野生型 DNA 混合, 经过热变性(解链)和复性过程, 形成错配双链 DNA, 然后在非变性条件下产生不同的电泳迁移率, 以此来鉴定突变。该方法常用于已知和未知点突变的检测。Tian 等<sup>[31]</sup>在单通道玻璃芯片上, 将 PCR-HA 分析与芯片电泳相结合, 以荧光染料 6-FAM 标记引物, 用于检测乳腺癌易感基因 BRCA1 的 5 个插入/缺失突变和 BRCA2 的 1 个替换突变, 并与毛细管电泳的检测时间进行比较。结果每种突变的检测时间为 130 s, 毛细管电泳则需 8~14 min。

## 2 DNA 测序

DNA 测序是进行核酸序列分析的根本手段。96 通道毛细管电泳的实用化曾大大加速了举世瞩目的基因组工程的进程, 使之由原定的 2003 年提前到 2000 年基本完成。而人类基因组项目的第二个五年计划将以开发创新性的测序技术为重点, 以期达到更加快速、灵敏、准确、廉价和自动化的目的。微流控芯片的出现在很大程度上满足了这一需求, 并正以迅猛的发展趋势在测序领域引起极大的关注。

1995 年, Mathies 等率先开展了采用微流控芯片进行 DNA 测序的研究。他们早期以 LPA 为分离介质, 用 3.5 cm 的有效分离长度, 7 min 内在单通道玻璃芯片上完成了长度为 150~200 bp 的序列测定<sup>[32]</sup>。后来, 他们将分离通道延长为 7.5 cm, 并改用四色荧光检测器, 20 min 内完成了阅读长度为 500 bp 的序列分析, 准确率达 99.4%<sup>[33]</sup>。Liu 等<sup>[34]</sup>利用 16 通道芯片, 15 min 内完成了片段长度为 450 bp 的序列分析, 最长可读片段为 543 bp, 准

确率达 99%, 证实了多通道芯片电泳进行高通量 DNA 测序的可行性。Mathies 等<sup>[35,36]</sup>还利用 96 通道微阵列芯片, 通过改善芯片设计增加可读片段长度, 将通道折叠, 延长分离距离至 16 cm, 25 min 内完成了平均长度为 430 bp 的序列分析。Schmalzing 等<sup>[37]</sup>曾系统研究了采用芯片进行 DNA 测序的各种分离条件, 如选择性、扩散、进样量、微通道长度等影响, 并与毛细管电泳进行了比较。Backhouse 等<sup>[38]</sup>在 50 cm 长的分离通道实现了阅读长度为 700 bp 的序列分析, 所需时间 2.5 h。这些研究结果显示, 采用微流控芯片进行 DNA 测序, 不仅能大大提高测序速度, 而且还可通过设计灵活的高密度阵列通道来提高分析通量, 减少试剂消耗, 因此在 DNA 测序领域具有很大的潜力。

## 3 其他

除了应用于基因多态性检测和 DNA 测序, 芯片电泳还可通过 PCR 产物分析进行外源性病原体基因的快速检测, 并具有较高的灵敏度和特异性。Chen 等<sup>[39]</sup>在 PMMA 塑料芯片上通过逆转录 PCR 产物分析, 于 1.5 min 内即可分离出 145 bp 的丙型肝炎病毒(HCV)的特异性扩增片段, 所用时间仅为毛细管电泳的 1/10。Hofgartner 等<sup>[40]</sup>在玻璃芯片上通过对单纯疱疹病毒(HSV)的 PCR 扩增片段分析, 成功地检测了 33 例临床疑诊单纯疱疹病毒脑炎的脑脊液标本(10 例阳性, 2 例弱阳性, 21 例阴性), 敏感性和特异性为 100%, 每份样品分析时间仅需 100 s, 而传统的液相杂交方法则需 18 h。我们在自行制作的塑料(PDMS)芯片上, 对临床常见的两种病原体结核杆菌(TB)和乙肝病毒(HBV)基因的 PCR 产物进行了快速检测, 分析时间为 260 s, 检测结果与平板电泳分析结果一致, 而分析时间明显缩短(260 s vs. 30 min)<sup>[41]</sup>。

集成化是微流控芯片的重要特征, 这种特征使其集样品进样、反应、电泳分离、衍生化及荧光检测等基本步骤为一体, 甚至可添加 PCR 反应器并实现多通道电泳, 原则上更加适用于基因分析。至今, 已有诸多研究报道实现了芯片上的 PCR 反应过程以及芯片 PCR 与电泳分离过程的集成<sup>[42~44]</sup>。Mathies 等<sup>[45,46]</sup>开发了一种集成化程度较高的 DNA 分析系统, 集微流控泵、阀、芯片 PCR 和电泳分离于一体, 在 280 nL 的 PCR 反应室实现了对单个 DNA 分子(M13/PUC13)的扩增, PCR 反应只需 20 个循环, 每次循环 30 s, 较传统的 PCR 反应时间明显缩短。Lee 等<sup>[47]</sup>研制成集有微混合器和 DNA 纯化装置的一次性微流控芯片系统, 用于 DNA 的样品制

备,在微通道里放置阴离子交换树脂,从单一头发丝中得到线粒体 DNA 的电泳图。Tezuka 等<sup>[48]</sup>在芯片上构建一种整体集成的纳米柱型阵列结构,这种纳米柱直径 200~500 nm,高 5  $\mu\text{m}$ ,类似于排列在一起的多个梳子,用于研究 DNA 的电泳特征及其分离,已分离了 T4 DNA 和 165.5 kbp 的 lambda 标样。Buch 等<sup>[49]</sup>在聚碳酸酯芯片上采用温度梯度,已用 100 bp 的模型样品实现了 DNA 的点突变检测。以上结果在很大程度上反映了目前微流控技术正在向集成化、微型化和自动化方向发展。

#### 4 结语

微流控芯片实验室技术继承了毛细管电泳的各种主要优点,又具有规模集成和高通量等独特的优势,已经被应用到基因分析的各个方面,并取得显著进展。该技术有可能为后基因组时代的基因组学研究提供一个更为强大的平台,并在基础医学、药学和临床医学等领域呈现出广泛的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Lin Bingcheng. Journal of Chinese Pharmaceutical University, 2003, 34(1):1  
林炳承. 中国药科大学学报, 2003, 34(1):1
- [2] Harrison D J, Manz A, Fan Z H. Anal Chem, 1992, 64: 1 926
- [3] Thorsen T, Maerkl S J, Quake S R. Science, 2002, 298: 580
- [4] Zhou Xiaomian, Dai Zhongpeng, Luo Yong, Lin Bingcheng. Chinese Patent, 0227436.0. 2002  
周小棉, 戴忠鹏, 罗 勇, 林炳承. 中国专利, 0227436.0. 2002
- [5] Dai Zhongpeng, Luo Yong, Lin Bingcheng. Chinese Patent, 0227434.4. 2002  
戴忠鹏, 罗 勇, 林炳承. 中国专利, 0227434.4. 2002
- [6] Effenhauser C S, Bruin G J M, Paulus A, Ehrat E. Anal Chem, 1997, 69: 3 451
- [7] Zhou Xiaomian, Luo Yong, Dai Zhongpeng, Lin Bingcheng. Chinese Patent, 02340741.7. 2002  
周小棉, 罗 勇, 戴忠鹏, 林炳承. 中国专利, 02340741.7. 2002
- [8] Jiang Lei, Qin Jianhua, Zhou Xiaomian, Lin Bingcheng. Chinese Patent, 02256483.7. 2002  
姜 雷, 秦建华, 周小棉, 林炳承. 中国专利, 02256483.7. 2002
- [9] Woolley A T, Mathies R A. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 11 348
- [10] Jacobson S C, Ramsey J M. Anal Chem, 1996, 68: 720
- [11] Effenhauser C S, Paulus A, Manz A, Widmer H M. Anal Chem, 1994, 66: 2 949
- [12] Matsuo M. IUBMB Life, 2002, 53: 147
- [13] Cheng J, Waters L C, Fortina P, Hvizchia G, Jacobson S C. Anal Chem, 1998, 257: 101
- [14] Munro N J, Snow K, Kant J A. Clin Chem, 1999, 45: 1 906
- [15] Wiegand P, Meyer E, Brinkmann B. Electrophoresis, 2000, 21: 889
- [16] March R E. Mol Biotechnol, 1999, 13: 113
- [17] Burman R W, Anoe K S, Popovich B W. Genet Med, 2000, 2: 242
- [18] Sung W C, Lee G B, Tseng C C, Chen S H. Electrophoresis, 2001, 22: 1 188
- [19] Cantafora A, Blotta I, Bruzzese N. Electrophoresis, 2001, 22: 4 021
- [20] Schmalzing D, Koutny L, Adourian A, Belgrader P, Matsudaira P. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 10 273
- [21] Schmalzing D, Koutny L, Chisholm D, Adourian A, Matsudaira P, Ehrlich D. Anal Biochem, 1999, 70: 148
- [22] Mitnik L, Carey L, Burger R, Desmarais S, Koutny L, Wernet O, Matsudaira P, Ehrlich D. Electrophoresis, 2002, 23: 719
- [23] Medintz I L, Berti L, Emrich C A, Tom T, Scherer J R, Mathies R A. Clin Chem, 2001, 47: 1 614
- [24] Tian H, Jaquins-Gerstl A, Munro N, Trucco M, Brody L C. Genomics, 2000, 63: 25
- [25] Lu C Y, Tso D J, Yang T, Jong Y J, Wei Y H. Clin Chim Acta, 2002, 318: 97
- [26] Simpson P C, Roach D, Woolley A T, Thorsent T, Johnston R, Sensabaugh G F, Mathies R A. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2 256
- [27] Emrich C A, Tian H, Medintz I L, Mathies R A. Anal Chem, 2002, 74: 5 076
- [28] Tian H, Brody L C, Fan S J, Huang Z L, Landers J P. Clin Chem, 2001, 47: 173
- [29] Medintz I, Wong W W, Sensabangh G, Mathies R A. Electrophoresis, 2000, 21: 2 352
- [30] Medintz I, Wong WW, Berti L, Shioh L, Tom J, Scherer J, Sensabaugh G, Mathies R A. Genome Res, 2001, 11: 413
- [31] Tian H, Brody L C, Landers J P. Genome Res, 2000, 10: 1 403
- [32] Woolley A T, Mathies R A. Anal Chem, 1995, 67: 3 676
- [33] Liu S, Shi Y, Ja W, Mathies R A. Anal Chem, 1999, 71: 566
- [34] Liu S, Ren H, Gao Q, Roach D J, Loder R T Jr, Armstrong T M, Mao Q, Blaga I, Barker D L, Jovanovich S B. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 5 369
- [35] Paegel B M, Hutt L D, Simpson P C, Mathies R A. Anal Chem, 2000, 72: 3 030
- [36] Paegel B M, Emrich C A, Wedemayer G J, Scherer J R, Mathies R A. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 574
- [37] Schmalzing D, Adourian A, Ehrlich D. Anal Chem, 1998, 70: 2 303
- [38] Backhouse C, Caamano M, Oaks F, Nordman E, Carrillo A, Johuson B, Bay S. Electrophoresis, 2000, 21: 150
- [39] Chen Y H, Wang W C, Young K C. Clin Chem, 1999, 45: 1 938
- [40] Hofgartner W T, Hunmer A F, Landers J P, Kant J A. Clin Chem, 1999, 45: 2 128
- [41] Qin Jianhua, Zhou Xiaomian, Luo Yong, Dai Zhongpeng, Lin Bingcheng. Shanghai: APCE2002, 2002  
秦建华, 周小棉, 罗 勇, 戴忠鹏, 林炳承. 上海: 第四届亚太国际微分离分析学术会, 2002
- [42] Waters L C, Jacobson S C, Krouchinina N, Khandurina J, Foote R S. Anal Chem, 1998, 70: 5 172
- [43] Obeid P J, Christopoulos T K, Crabtree H J, Backhouse C J. Anal Chem, 2003, 75: 288
- [44] Gottschlich N, Culbertson C T, McKnight T E. J Chromatogr B, 2000, 745: 243
- [45] Lagally E T, Simpson P C, Mathies R A. Sens Actuator B—Chem, 2000, 63: 138
- [46] Lagally E T, Medintz I, Mathies R A. Anal Chem, 2001, 73: 565
- [47] Lee N Y, Tamada M, Seki M. In: Baba Y, Shoji S, van den Berg A, eds. Proceedings of the  $\mu$ -TAS 2002 Symposium. Nara (Japan): Kluwer Academic Publishers, 2002. 195
- [48] Tezuka Y, Ueda M, Baba Y, Nakanishi H, Nishimoto T, Takamura Y, Horiike Y. In: Baba Y, Shoji S, van den Berg A, eds. Proceedings of the  $\mu$ -TAS 2002 Symposium. Nara (Japan): Kluwer Academic Publishers, 2002. 21
- [49] Buch J S, Rosenberger F, Devoe D, Lee C S. In: Baba Y, Shoji S, van den Berg A, eds. Proceedings of the  $\mu$ -TAS 2002 Symposium. Nara (Japan): Kluwer Academic Publishers, 2002. 233