

# 聚合酶链式反应微流控芯片的准分子激光制备和应用研究

姚李英<sup>1</sup>, 祁恒<sup>1</sup>, 陈涛<sup>1</sup>, 文思远<sup>2</sup>, 伯晓晨<sup>2</sup>, 陈苏红<sup>2</sup>, 王升启<sup>2</sup>, 左铁钊<sup>1</sup>  
(1. 北京工业大学激光工程研究院, 北京 100022; 2. 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100085)

**摘要** 采用价格便宜的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)代替价格昂贵的硅或玻璃作为聚合酶链式反应(PCR)微流控芯片的基片材料, 采用柔性大且自动化程度高的准分子激光微加工方法代替加工工艺复杂的光刻化学腐蚀方法, 在 19 kV 和 18 mm/min 的优化加工参数下, 在 48 mm × 67 mm × 1 mm 的 PMMA 基片上制备出 20 个循环的 PCR 微流控芯片. 芯片微通道横截面呈梯形, 底面光滑. 微通道宽 104 μm, 深 56 μm, 长 2 060 mm, 加工耗时约 110 min. 该芯片和相同尺寸的盖片在 160 N 和 105 °C 条件下通过热压经 20 min 键合在一起, 键合强度为 0.85 MPa. 键合后的芯片和温控系统集成在一起, 采用比例积分微分(PID)方法得到的控温精度为 ±0.2 °C, 采用红外热像仪得到的相邻温区间的温度梯度分别为 16.5 和 22.2 °C, 最后利用该芯片在对 170 bp 的 DNA 片段实现了体外扩增.

**关键词** PMMA; PCR 微流控芯片; 准分子激光

**中图分类号** O657; TN249

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2006)03-0428-04

1998 年, Manz 等<sup>[1]</sup>首次应用玻璃基 PCR 微流控芯片对 176 bp 的 DNA 片段实现了体外连续放大, 完成了 20 次扩增, 最短需要 1.5 min, 最长需要 18.7 min. PCR 技术相对于第一代 PE-Cetus 公司的热循环仪和第二代静态的微反应槽 PCR 芯片<sup>[2,3]</sup>的优势在于: 在保证一定扩增效率的前提下, 样品的输入和输出是连续的, 反应体积可变, 反应从静态变为动态, 耗样减少, 反应时间缩短. 其原理是: PCR 反应混合物在精密注射泵的作用下以 nL/s 的流速进入基片分别处于 3 个恒温区的微通道, 通过控制微通道的长度实现 DNA 的变性、复性和延伸. 目前已有多家研究单位应用自己研制的 PCR 微流控芯片成功地实现了 DNA 的体外扩增<sup>[4~8]</sup>. 7 年来, PCR 微流控芯片虽有很大的发展, 但仍存在以下不足: (1) 基片大多为传统硅、玻璃或者石英, 价格昂贵, 生物相容性差. (2) 加工大多用光刻腐蚀法, 工艺复杂, 时间长. (3) 由于芯片的使用寿命短, 温控系统和芯片一体集成, 成本高.

为解决目前 PCR 微流控芯片存在的问题, 本文采用价格便宜且生物相容性好的 PMMA 高聚物材料代替硅和玻璃作为基片材料; 采用准分子激光这种新型的微加工方法在 PMMA 基片上加工出了 20 个循环的 PCR 微流控芯片. 该芯片和相同尺寸的盖片通过热压键合在一起. 芯片和温控系统分离集成, 降低了使用成本. 采用红外热像仪研究了芯片上 3 个温区的温度场的分布和不同温区间的温度梯度的分布, 最后应用 Kloehn 公司的精密注射泵作为进样装置, 在该芯片上实现了 DNA 的扩增.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

PCR 微流控芯片系统的结构示意图见图 1. 该系统由 3 部分组成: (1) 进样系统: 通过美国 Kloehn 公司的精密注射泵实现. (2) PCR 微流控芯片: 通过 248 nm 的准分子激光在 PMMA 基片上制备. (3) 温度控制系统: 由电热膜、Pt100 温度传感器、铜片和微型 PID 温控仪组成. 相邻铜片之间的间隙

收稿日期: 2005-06-06.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 50175002)和北京市自然科学基金(批准号: 3031001)资助.

联系人简介: 左铁钊(1941 年出生), 女, 博士生导师, 主要从事激光焊接、能量光子学和激光微技术方面的研究.

E-mail: neltzuo@bjut.edu.cn

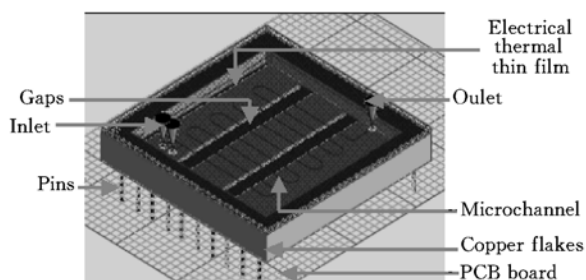


Fig. 1 The schematic diagram of continuous-flow PCR chip system

用于对不同温区进行隔热. 实验中采用 1 mm 厚的 PMMA 基片(安徽曙光公司), 实验装置(图 2)中的准分子激光器购自德国 Lambda Physik 公司, 波长 248 nm, 最大脉冲能量 1.2 J, 重复频率 1 ~ 50 Hz, X-Y-Z 工作台通过微电子机械器件计算机数值控制(MEMS CNC)软件进行控制. 实验中所选取的正方形掩模边长为 1 mm, 物镜的聚焦放大倍数为 10 倍, 掩模在工件表面的边长为 104  $\mu\text{m}$ . 实验中 PCR 反应混合物总体积为 20  $\mu\text{L}$ , 其中含有 5  $\times$  PCR 缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , dNTP 终浓度 200  $\mu\text{mol/L}$ , 上游引物( $T_7 = 5'$ -TAATACGACTCACTATAGGG-3', 20 bp), 下游引物( $SP_6 = 5'$ -CATACGATTTAGGGTGACACTATAG-3', 24 bp)各  $1 \times 10^{-11}$  mol, Taq DNA 聚合酶 0.5U. PCR 扩增模板为 PGEM-T Vector, 质粒 25 ~ 30 ng(均购自 Promega 公司). 实验结果所选用的 DNA Marker DL2000 购自 Takara 公司. 实验选择英国 TECHNE 公司的 25 孔 PCR 热循环仪, 凝胶电泳仪购自北京第六仪器厂.

## 1.2 实验过程

参照文献[9]方法, 在工作电压为 19 kV、加工能量密度为 11.931  $\text{J}/\text{cm}^2$ 、工作台速度为 18 mm/min、重复频率为 50 Hz 及单脉冲刻蚀率为 3.1  $\mu\text{m}$  的准分子激光加工参数下, 在 48 mm  $\times$  67 mm  $\times$  1 mm 的 PMMA 基片表面成功地制备了 20 个循环的 PCR 微流控芯片, 整个芯片的加工耗时约 110 min. 芯片由入口、出口、3 个恒温区(94  $^\circ\text{C}$  变性, 72  $^\circ\text{C}$  延伸, 55  $^\circ\text{C}$  复性)以及隔热网格组成. 芯片上微通道宽为 104  $\mu\text{m}$ , 深 56  $\mu\text{m}$ , 芯片总长为 2 060 mm. 将 20 个循环的 PCR 微流控芯片和相同尺寸的盖片通过热压键合在一起, 形成密闭的微通道.

本文采用自建热压装置实现了 20 个循环的 PCR 微流控芯片的键合. 键合设备包括 DH-101-OS 型电热恒温干燥箱和一台自制的弹簧压力机. 前者为键合提供恒温环境, 后者为键合提供一定的压力. 实验得出 PMMA 的最佳热压键合条件: 温度 105  $^\circ\text{C}$ , 压力 160 N, 时间 20 min. 通过 MST81022M/Teststar<sup>TM</sup> II<sub>3</sub> 型万能材料试验机测得键合力为 0.85 MPa, 能满足 PCR 实验中 0.1 MPa 的要求. 键合后的 PCR 微流控芯片进样结果如图 3. 最后应用如图 1 所示的系统, 采用 Kloehn 公司的精密注射泵将 PCR 反应混合物注射进 PCR 微流控芯片, 结合自行设计的控温系统实现 DNA 的体外放大.

## 2 结果与讨论

### 2.1 芯片上微通道的制备

采用准分子激光制得的芯片上的微通道横截面形貌由韩国 SNU 公司的形号为 SIS-2000 的三维轮廓仪测得[图 4(A)], 微通道宽约 104  $\mu\text{m}$ , 深约 56  $\mu\text{m}$ . 微通道底面采用 10 倍物镜的光学显微镜拍摄得到[图 4(B)], 微通道宽约 104  $\mu\text{m}$ . 由图 4(A)可看出, 微通道横截面呈梯形, 矩形度为 80%. 这是因为当激光工作频率、入射激光的能量和工作台运动速度一定时, 部分入射激光能量被微通道侧壁吸收, 使得入射激光的空间分布发生改变, 从而使得微通道呈现为梯形. 由图 4(B)可看出, 微通道底部较平滑, 接近于材料表面原有的粗糙度.

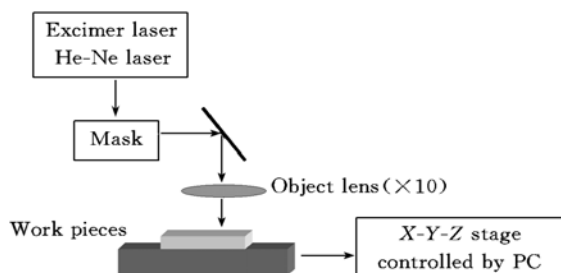


Fig. 2 The schematic diagram of excimer laser micromachining system

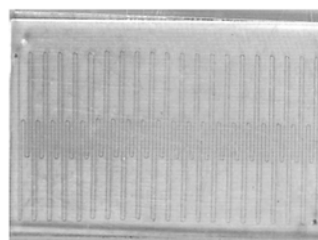


Fig. 3 The sample injection experiment for the bonded 20-cycle continuous-flow PCR chip

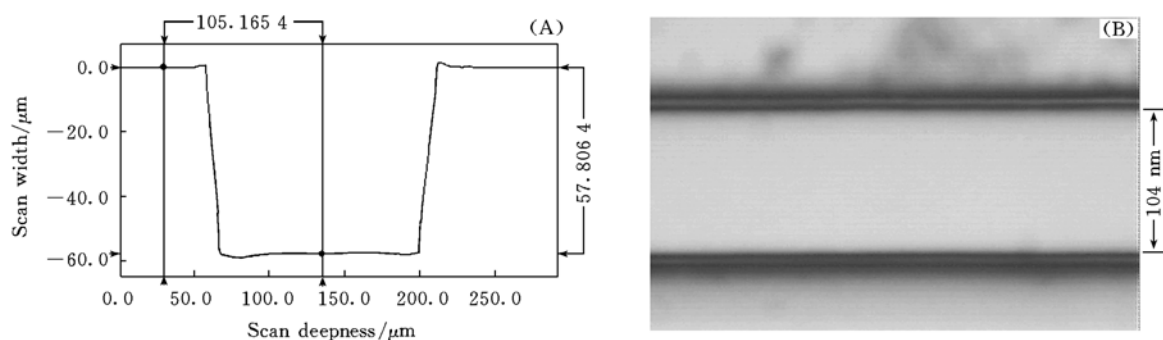


Fig. 4 The cross section (A) and the bottom surface (B) of microchannel

## 2.2 温控实验

作为一种完美的体外无限扩增核酸的技术, PCR 微流控芯片的关键技术之一就是温度控制系统. PCR 微流控芯片的温控系统包括 3 个不同温度范围的恒温区, 为确保 PCR 扩增反应顺利进行, 加热元件热响应要快, 每一温区的温度可单独设置和控制, 并要求有一定的温控精度, 温区内温度的分布要均匀, 温区间相互隔热. 目前的加热方案主要有: (1) 应用电对铜块或者铝块进行加热并配以风扇冷却, 这种方法有效地提高了冷却时的速度, 但整个装置耗能多, 体积大, 且不透明, 不利于对芯片内的反应进行在片检测<sup>[1,2,10]</sup>; (2) 将 ITO(氧化锡锡)薄膜沉积在玻璃芯片的基片上, 用作加热器. 将带状的金膜沉积在 ITO 薄膜的两侧作电极, 通过直流电源对 ITO 薄膜进行加热<sup>[6,11]</sup>. (3) 将铂薄膜作为加热和温度传感器沉积在基片上, 直接用外部电源进行加热<sup>[12]</sup>. 后两种方法具有加热效率高、可微型化、集成度高的优点, 但制作工艺复杂, 成本偏高. 不同之处是前者可进行在片检测, 后者则不能. 本文采用热响应快且价格便宜的电热膜作为加热元件, 尺寸为 10 mm × 60 mm × 0.4 mm, 于 25 °C 条件下的电阻为 15 Ω, 额定工作电流为 1.5 A, 额定工作电压 12 V, 工作温度小于 300 °C, 工作寿命 5 000 × 10 000 h. 采用精度高的 Pt 100 薄膜电阻作为测温元件, 测温范围为 -50 ~ 600 °C. 采用型号为 JCS-33A-S/M 的微型温控仪实现控温, 温控仪的测温范围为 -199.9 ~ 850.0 °C, PID 控制方式. Pt100 和电热膜先采用硅胶粘接, 再通过硅胶和厚度为 2 mm 的薄铜片粘接起来, 铜片的另一面则和芯片再粘接, 集成后的系统通过直插法和印刷电路板(PCB 板)连接, PCB 板和微型温控仪连接(图 1). 采用该温度控制系统的工艺简单、成本低、集成度高且可以在铜片上相邻温区间的间隙上进行在片检测.

集成后的系统能否满足不同温区间相互隔热是直接影响 PCR 微流控芯片能否扩增成功的关键问题. 为此先测量了 3 个温区同时加热时各自的升温曲线, 结果见图 5. 可以看出, 经过 5 min 后 3 个温区均达到了恒温状态, 它们的升温速率为 23 °C/min. 随后采用 NEC TH5102 红外热成像仪测量达到热平衡后的铜片表面的 3 个恒温区的温度场分布, 结果见图 6. 可见铜片上的温度场明显分为 3 个恒温区, 3 个温区的平均温度分别为 94.3, 72.1 和 55.6 °C, 温区的温控精度为 ±0.2 °C, 相邻温区间的温度梯度为 22.2 和 16.5 °C, 符合进行 DNA 放大的需求.

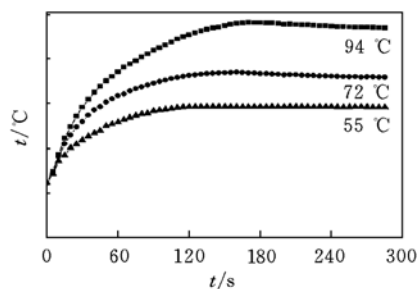


Fig. 5 The temperature rising curve of three different temperature zones

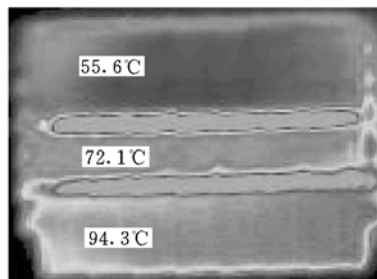


Fig. 6 The infrared thermal picture of three different temperature zones

## 2.3 DNA 扩增实验

采用美国 Kloehn 公司的精密注射泵作为进样系统, 在 10 nL/s 的进样速度下, 在 20 个循环的 PCR 微流控芯片上进行了 DNA 扩增实验, 实验耗时约 15 min. 实验时 3 个温区的温度分别为变性 104 °C,

复性 60 °C, 延伸 82 °C, 结果见图 7. 图 7 中第 1 条带为 Marker, 第 2 条带是采用传统 PCR 仪进行的 20 个循环的扩增产物, 第 3 条为采用 PCR 微流控芯片 20 个循环的扩增产物. 实验表明, 采用 PMMA 基的 PCR 微流控芯片可实现 DNA 扩增. 与文献 [6] 的结果比较发现, 当 PCR 反应混合物以低于某一流量进行扩增时, 其产物背景均比较高; 而当大于某一流量时, 其产物背景可以得到有效的抑制.

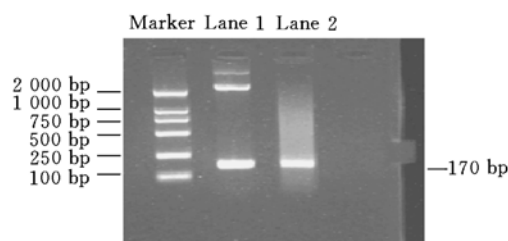


Fig. 7 The electrophoresis experiment for the product of continuous-flow PCR chip

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Kopp U. M., de Mello J. A., Manz A. *et al.*. Science[J], 1998, **280**: 1046—1048
- [ 2 ] Zhang Qing-tao, Wang Wen-hui, Zhang Hong-shen *et al.*. Sensors and Actuators B[J], 2002, **82**: 75—81
- [ 3 ] El-Ali J., Perch-Nielsen I. R., Poulsen C. R. *et al.*. Sensors and Actuators A[J], 2004, **110**: 3—10
- [ 4 ] Zheng Wei, Chen Shao-chen. Proc. SPIE[J], 2001, **4560**: 256—262
- [ 5 ] Obeid J. P., Christopoulos K. T. Analytica Chimica Acta[J], 2003, **494**: 1—9
- [ 6 ] Tatuhiro Fukuba, Takatoki Yamamoto, Takeshi Naganuma. Chemical Engineering Journal[J], 2004, **101**: 151—156
- [ 7 ] LIU Jin-Hua(刘金华), YIN Xue-Feng(殷学锋), XU Guang-Ming(徐光明) *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2003, **24**(2): 232—235
- [ 8 ] YAO Li-Ying(姚李英), CHEN Tao(陈涛), WANG Sheng-Qi(王升启) *et al.*. China Biotechnology(中国生物技术)[J], 2004, **24**(3): 90—97
- [ 9 ] YAO Li-Ying(姚李英), ZHANG Yu(张瑜), LIU Bao-An(刘保安) *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2004, **25**(Suppl): 37—38
- [ 10 ] Chiou J., Matsudaira P., Sonin A. *et al.*. Anela. Chem. [J], 2001, **73**: 2018—2021
- [ 11 ] Sun K., Akira Yamaguchi, Yutaka Ishida *et al.*. Sensors and Actuators B[J], 2002, **84**: 283—289
- [ 12 ] Ivonne Schneegaß, Reiner Brautigam, Johann Michael Kohler. Lab-on-Chip[J], 2001, **1**: 42—49

## Fabrication of Micro Flow Through PCR Chip by Excimer Laser and Its Application

YAO Li-Ying<sup>1</sup>, QI Heng<sup>1</sup>, CHEN Tao<sup>1</sup>, WEN Si-Yuan<sup>2</sup>, BO Xiao-Chen<sup>2</sup>,  
CHEN Su-Hong<sup>2</sup>, WANG Sheng-Qi<sup>2</sup>, ZUO Tie-Chuan<sup>1\*</sup>

(1. College of Laser Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China;

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract** A cheap PMMA was chosen as the substrate instead of expensive silicon or glass, and a 248 nm excimer laser with flexible and auto character replaced complex lithography as a new fabrication technique. A PMMA(48 mm×67 mm×1 mm) based micro flow through PCR chip with 20 cycles was fabricated at 19 kV and 18 mm/min excimer laser parameters. The section of the microchannel was trapezoid, and its bottom surface roughness was less than 0.5 μm. The microchannel had a width of 104 μm, a depth of 56 μm, and a length of 2 060 mm. It cost about 110 min to finish the total length. Then the chip was bonded together with another cover chip at 105 °C, 160 N and 20 min parameters. It could endure 0.85 MPa pressure and seal micro fluid well after sample injection experiment. In the end, the chip was integrated via the temperature control system. Three micro PID temperature controllers were chosen to control the temperature and gained ±0.2 °C temperature control precision. The temperature grads between the three temperature zones were 16.5 and 22.2 °C, respectively. Finally 170 bp DNA fragments was amplified by using this chip.

**Keywords** PMMA; Micro flow through PCR chip; Excimer laser

(Ed.: A, G)