

# 聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)微流控芯片 DNA 分析系统的研制

杜晓光

东北大学理学院分析科学研究中心, 辽宁 沈阳 110004

**摘要** 生物分析是微流控芯片分析最具进一步发展及商品化前景的分支领域之一。报道了基于聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)微流控芯片 DNA 分析系统的研制。采用简易热压法自制的 PMMA 芯片, 以小型光纤式激光诱导荧光为检测器, 以四触点可切换 1 800 V 高压电源为电驱动系统, 以 2% 羟乙基纤维素(HEC)为筛分介质, 通过用于 DNA 分析的 TO-PRO-3 荧光染料和激光诱导荧光检测器 670 nm 截止滤光片的选择, 构建了微流控芯片 DNA 分析系统。芯片凝胶电泳分离  $\phi$ X174-Hae III RF DNA 片段, 以 603 bp 片段计算理论塔板数  $n$  为  $1.14 \times 10^6 \cdot \text{m}^{-1}$ , 271/281 bp 的分离度  $R$  为 1.2。建立的 PMMA 微流控芯片 DNA 分析系统具有制作和运行成本低, 芯片可重复使用, 分析重现性好等特点。该研究可用于制作微型化便携式 DNA 分析仪, 应用于临床诊断、疾病筛查等领域。

**关键词** 聚甲基丙烯酸甲酯; 微流控芯片; DNA 分析系统

**中图分类号:** O657.8 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)12-3379-04

## 引言

微流控芯片分析是当前分析科学发展的前沿和热点领域之一, 通过分析化学、微机电加工、电子学、材料学以及生物学和医学等多学科的交叉, 将取样、混合、孵化、反应、检测等分析过程的各个组件集成于由微米级通道网络组成的微流控芯片上, 实现分析系统的微型化与便携化<sup>[1]</sup>。微流控芯片分析自 1992 年诞生至今, 已发展了多个研究方向, 建立了多个技术平台, 但有效、实际的应用已成为今天微流控芯片分析进一步发展及商品化的瓶颈<sup>[2]</sup>。应用于临床诊断、疾病筛查和食品安全的微流控芯片分析是最具进一步发展及商品化前景的微流控芯片分支领域之一。

聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)微流控芯片易加工, 制作成本低, 表面可采用物理或化学方法进行多种用途的改性, 具有较好的生物适应性及易在片集成多种用途功能组件的特点, 已广泛应用于微流控芯片生物分析<sup>[3-5]</sup>。自 1995 年 Mathies 等<sup>[6]</sup>将微流控芯片用于 DNA 分析以来, 特别是在后基因组时代, 对于基因结构和功能分析的需要, 使得微流控芯片在生命分析, 尤其是 DNA 分析中的应用成为今后微流控分析研究的重点和方向<sup>[7]</sup>。目前, 商品化的微流控芯片分析仪大多应用于 DNA 分析, 如安捷伦 2100 型芯片电泳仪, 但仪器价格贵, 芯片(玻璃芯片)多为一次性使用, 且需配以

专用试剂盒, 分析费用高, 主要用于科学研究, 不易推广普及。本文采用自制的 PMMA 芯片, 以光纤式半导体激光诱导荧光为检测器, 建立了芯片可长期重复使用, 制作和运行成本低的小型微流控芯片 DNA 分析系统。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和试样

实验所用试剂均为分析纯, 水为 18 M $\Omega$ .cm 纯水。筛分介质: 2%(w/v)羟乙基纤维素(HEC, Aldrich 化学公司, 美国, MW 250 000, )+1 $\times$ TBE(89 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>三羟甲基氨基甲烷+89 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>硼酸+2 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>乙二胺四乙酸, Tris-boric-EDTA, pH 8.6), 含 0.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>荧光染料 TO-PRO-3(Molecular Probes, Eugene, 美国, 由包装浓度 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>稀释而成), 经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤。涂层改性试剂: 2%(w/v)羟乙基纤维素+1 $\times$ TBE, 经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤。50 ng $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>  $\phi$ X174-Hae III RF DNA(TaKaRa 公司, 美国, 由包装浓度 500 ng $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>稀释得到), 由 11 个片段组成, 片段范围: 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1 078, 1 353 bp。

### 1.2 PMMA 芯片制作

采用简易热压法制作 PMMA 芯片<sup>[8]</sup>, 芯片设计及实验装置如图 1 所示。首先, KOH 湿法腐蚀制作单晶硅阳模。由

收稿日期: 2008-11-22, 修订日期: 2009-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(20299030)和东北大学留学回国人员科研启动基金项目资助

作者简介: 杜晓光, 1965 年生, 东北大学理学院副教授 e-mail: xgyydu@yahoo.com.cn

于 KOH 腐蚀是各向异性的, 硅以  $54.7^\circ$  角进行刻蚀, 使得阳模的截面为梯形。阳模凸起的高度由 KOH 浓度、腐蚀液温度和腐蚀时间决定。通道表面的光洁度受刻蚀温度的影响较大, 适当降低阳模的刻蚀温度, 可提高其表面的光洁度。在  $50^\circ\text{C}$  50% KOH 溶液中 Si(100) 腐蚀速率约为  $10\ \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ 。单晶硅阳模制作简单, 成本低, 可在普通化学实验室中完成。每一单晶硅阳模可在 PMMA 基片上精确复制微通道网络 150 次以上, 适合于热压法制作热塑性聚合物微流控芯片。

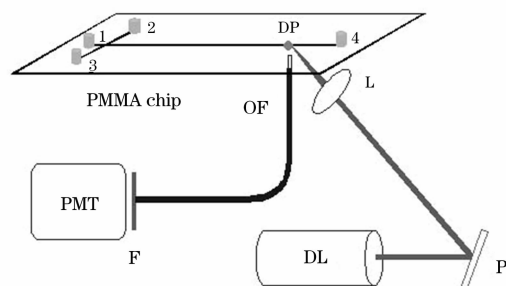


Fig. 1 Schematic representation of the experimental setup and the detection arrangement for the PMMA chip

1: Buffer reservoir; 2: Sample reservoir; 3: Sample waste reservoir; 4: Waste reservoir; DP: Detection point; L: Lens; P: Plane mirror; DL: Diode semiconductor laser; OF: Optical fiber; F: Filter; PMT: Photomultiplier tube

取 1.0 mm 厚的 PMMA (沈阳永魁有机玻璃制品有限公司) 片材置于自行设计简易热压装置中的单晶硅阳模上, 升温至  $130^\circ\text{C}$ , 加 1.0 MPa 压力, 并保持压力 45 s 后, 通水冷却至近室温, 脱模, 得到具微通道网络的基片。在 PMMA 基片微通道的端点处钻 2 mm 直径孔, 作为储液池。按 PMMA 基片大小, 剪裁 PMMA 盖片。将基片与盖片洗净, 烘干, 置于同一简易热压装置中, 升温至  $90^\circ\text{C}$ , 加 0.8 MPa 压力后, 通水冷却至近室温, 制成 PMMA 微流控分析芯片。

PMMA 芯片通道为十字形, 进样通道长 12 mm, 分离通道长 65 mm, 有效分离通道长为 55 mm; 通道宽  $100\ \mu\text{m}$ , 深约  $40\ \mu\text{m}$ 。

### 1.3 PMMA 芯片静置动态涂层表面改性

PMMA 芯片采用静置动态涂层方法进行表面改性<sup>[9]</sup>。PMMA 芯片微通道用  $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 溶液浸泡 4 h, 用水反复冲洗通道至中性。将 2% (w/v) HEC+1×TBE 的涂层改性试剂充入通道内, 芯片置于密闭容器中, 室温暗处放置。24 h 后, 将通道内的涂层改性试剂吸出, 再充入新鲜的涂层改性试剂, 如此往复 2~3 次, 完成芯片的静置动态涂层表面改性。

### 1.4 小型光纤式激光诱导荧光检测器

小型光纤式激光诱导荧光检测器 (东北大学分析科学研究中心) 设计如图 1 所示<sup>[10]</sup>。635 nm 半导体二极管激光器发射的激光束经平面镜呈  $45^\circ$  角反射至透镜 (直径 10.5 mm, 焦距 10 mm), 调整放置 PMMA 芯片的三维精密平台, 使透镜将激光束聚焦至芯片微通道的检测区域, 激发产生的荧光信号由检测区正下方多模石英光纤 (直径 0.7 mm) 收集, 光纤

导出的荧光信号经 670 nm 滤光片滤光后, 光电倍增管将光信号转变为电信号, 进行荧光检测。

### 1.5 四触点可切换 1 800 V 高压电源

采用电迁移进行 DNA 样品的进样与分离。为适应十字形通道的设计, 选用四触点可切换高压电源 (东北大学分析科学研究中心)。每一触点接一铂电极, 分别插入芯片的样品池、样品废液池、缓冲液池和废液池。通过电压切换分别进行 DNA 样品的电迁移进样和电泳分离。由于一般芯片分离通道长仅为几个 cm, 而对于 DNA 的分离场强在  $250\ \text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$  以下可以满足其分离的要求, 因此选用最高电压为 1 800 V 的高压电源。这将有助于进一步降低仪器制作的成本和体积。

### 1.6 DNA 分析

将经静置动态涂层表面改性的 PMMA 芯片微通道中用于静置动态涂层的涂层改性试剂吸出, 微通道和储液池充入用于凝胶电泳分离的新鲜的筛分介质。芯片置于光纤式 635 nm 半导体激光诱导荧光检测装置上, 与四触点可切换 1 800 V 高压电源相接的四支铂电极分别插入芯片的样品池、样品废液池、缓冲液池和废液池, 调整芯片的位置, 使激光束聚焦于芯片微通道检测区域, 加一定的进样电压和分离电压, 待基线稳定后, 将样品池内的筛分介质吸出, 加入  $5\sim 10\ \mu\text{L}$  DNA 样品。由于 DNA 带负电荷, 在样品废液池一端加正电压, 样品池一端电压为 0 V, 缓冲液池端和废液池端加一定的夹切电压, 也可悬浮。保持一定时间后, 样品池中的 DNA 样品通过样品通道与分离通道交叉区域, 进入样品废液池, 实现 DNA 样品的进样操作。进样后, 高压电源切换为分离模式, 即分离通道靠近检测区域的废液池端加正电压, 另一缓冲液池端电压为 0 V, 进样通道两端加一定的夹切电压, 将两通道交叉处的试样带入分离通道内分离。分离后的 DNA 片段在激光束照射下产生荧光信号, 经光电转换后, 由记录仪记录其电泳分离图谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 分析荧光染料的选择

发射波长在 635~750 nm 红区及红外区的半导体二极管激光器是最常见的, 也是价格相对最便宜的商品化激光器。实验选用的激光器为 635 nm 半导体二极管激光器 (3 mW, 南京来创激光科技有限公司)。根据激光器的发射波长选择用于 DNA 检测的荧光染料。碳菁染料的荧光激发和发射波长跨越可见至近红外光区, 适于不同的光源激发, 是目前 DNA 分子荧光探针和染色研究中较新的一类<sup>[11]</sup>, 其中 TO-TO-3 和 TO-PRO-3 荧光染料可用 635 nm 半导体二极管激光器激发。TO-PRO-3 (TP3) 为兰色嵌入式荧光染料, 价格较 TOTO-3 便宜许多, 自身荧光低, 与单链或双链 DNA 分子结合后, 荧光强度大大增加, 常超过 1000 倍, 本实验选用 TP3 作为 DNA 分析的荧光染料。

### 2.2 激光诱导荧光检测器滤光片的选择

TP3 的分子结构及其光谱如图 2 所示<sup>[12]</sup>。TP3 水溶液的最大吸收波长为 631 nm, 嵌入双链 DNA 分子后, 其最大

吸收波长漂移至 642 nm, 激发产生荧光的发射波长为 661 nm。由于半导体二极管激光器具有较好的单色性, 在最初的设计中在激光器前未加窄带滤光片, 但后续研究发现在激光器前加 635 nm 的窄带滤光片有助于降低仪器的背景噪声, 提高 DNA 分析的精密性。在光电倍增管光窗前加 670 nm 截止滤光片, 消除激光器发射波长对荧光信号检测的干扰。

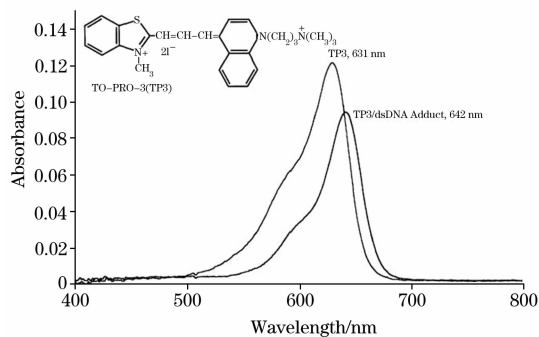


Fig. 2 Structure and visible spectra of TP3 and its adduct with dsDNA

### 2.3 微流控芯片 DNA 分析系统的分析性能

通过  $\phi$ X174-Hae III RF DNA 片段的分离, 考查了 PMMA 微流控芯片 DNA 分析系统的分析性能。PMMA 芯片经静置动态涂层表面改性后, 按 1.6 节 DNA 分析步骤进行芯片凝胶电泳分离。进样时间为 90 s, 夹切进样时各液池所加电压为缓冲液池 1: +120 V; 样品池 2: 0 V; 缓冲液池 3: +200 V; 废液池 4: +100 V。分离时各液池所加电压为缓冲液池 1: 0 V; 样品池 2: +150 V; 缓冲液池 3: +150 V; 废液池 4: +1 000 V。 $\phi$ X174-Hae III RF DNA 样品的典型电泳分离图如图 3 所示。按图中 603 bp 片段计算理论塔板数  $n$  为  $1.14 \times 10^6 \cdot \text{m}^{-1}$ , 271/281 bp 的分离度  $R$  为 1.2。

使用同一自制的 PMMA 微流控芯片, 在长达 3 个月的考查时间内, 有效分离 DNA 片段 200 余次。在保持高效能

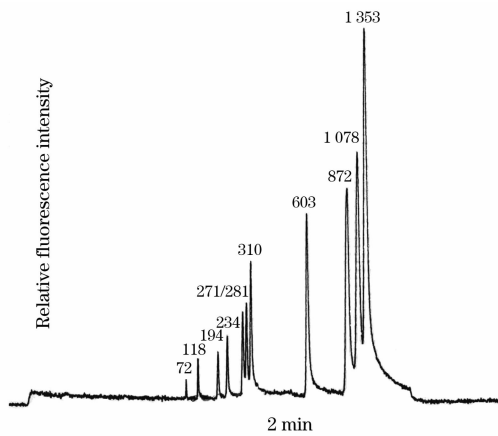


Fig. 3 Electropherogram of  $\phi$ X174-Hae III RF DNA restriction fragments separated on a PMMA chip-based DNA analysis device

分离  $\phi$ X174-Hae III RF DNA 样品同时, 各片段在考查时间内的保留时间变化很小<sup>[10]</sup>。表明聚甲基丙烯酸甲酯微流控芯片 DNA 分析系统分析性能稳定可靠。

## 3 结 论

本文建立的 PMMA 微流控芯片 DNA 分析系统制作成本低, 芯片可重复使用, 分析重现性好, 稳定可靠, 使用商品化的筛分介质和荧光染料, 运行成本低, 易于实现商品化。半导体激光器聚焦在芯片分离通道上的光斑大于 150  $\mu\text{m}$ , 若进一步改进检测器的光学系统, 缩小聚焦在通道上的光斑, 将有助于改善系统的分析性能。若采用发光二极管为激发光源, 光电管进行信号检测, 将可进一步降低 DNA 分析系统制作成本, 减小分析系统的体积, 提高其便携性和微型化。

## 参 考 文 献

- [1] Vilkner T, Janasek D, Manz A. Anal. Chem., 2004, 76: 3373.
- [2] Whitesides G M. Nature, 2006, 442: 368.
- [3] Dittrich P S, Tachikawa K, Manz, A. Anal. Chem., 2006, 78: 3887.
- [4] Chen Y, Zhang L Y, Chen G. Electrophoresis, 2008, 29: 1801.
- [5] Chen R, Guo H Z, Shen Y W, et al. Sens. and Actuators B: Chemical, 2006, 114: 1100.
- [6] Woolley A T, Mathies R A. Anal. Chem., 1995, 67: 3676.
- [7] Chen L, Manz A, Day P J R. Lab Chip, 2007, 7: 1413.
- [8] DU Xiao-guang, GUAN Yan-xia, WANG Fu-ren, et al(杜晓光, 关艳霞, 王福仁, 等). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 2003, 24: 1962.
- [9] Du X G, Fang Z L. Electrophoresis, 2005, 26: 4625.
- [10] XU Zhang-run, WANG Shi-li, FAN Xiao-feng, et al(徐章润, 王世立, 樊晓峰, 等). Chinese Anal. Chem.(分析化学), 2003, 31: 1527.
- [11] ZHANG Hua-shan, WANG Hong, ZHAO Yuan-yuan(张华山, 王红, 赵媛媛). Molecule Probes and Detection Reagents(分子探针与检测试剂). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2002. 318.
- [12] Rampal S, Liu M, Chen F A. J. Chromatogr. A, 1997, 781: 357.

# Fabrications of a Poly (Methyl Methacrylate ) ( PMMA ) Microfluidic Chip-Based DNA Analysis Device

DU Xiao-guang

Research Center for Analytical Sciences, College of Science, Northeastern University, Shenyang 110004, China

**Abstract** A DNA analysis device based on poly(methyl methacrylate) (PMMA) microfluidic chips was developed. A PMMA chip with cross microchannels was fabricated by a simple hot embossing. Microchannels were modified with a static adsorptive coating method using 2% hydroxyethyl cellulose. A high-voltage power unit, variable in the range 0-1 800 V, was used for on-chip DNA sample injection and gel electrophoretic separation. High speed, high resolution DNA analysis was obtained with the home-built PMMA chip in a sieving matrix containing 2% hydroxyethyl cellulose with a blue intercalating dye, TO-PRO-3 (TP3), by using diode laser induced fluorescence detection based on optical fibers with a 670 nm long-pass filter. The DNA analysis device was applied for the separation of  $\phi$ X-174/HaeIII DNA digest sample with 11 fragments ranging from 72 to 1 353 bp. A separation efficiency of  $1.14 \times 10^6$  plates/m was obtained for the 603 bp fragments, while the  $R$  of 271/281 bp fragments was 1.2. The device was characterized by simple design, low cost for fabrication and operation, reusable PMMA chips, and good reproducibility. A portable microfluidic device for DNA analysis can be developed for clinical diagnosis and disease screening.

**Keywords** Poly(methyl methacrylate); Microfluidic chips; DNA analysis device

(Received Nov. 22, 2008; accepted Feb. 26, 2009)

---

(上接 3378 页)

## May 2009

31-June 4 ASMS 2009 - 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry,

Philadelphia, PA;

Contact: American Society for Mass Spectrometry, 2019 Galisteo St., Building I -1, Sante Fe, NM, 87505; Tel. (505) 989-4517, Fax: (505) 989-1073;

E-mail: office@asms.org

Web site: <http://www.asms.org/>

## July 2009

19-23 51st Rocky Mountain Conference on Analytical Chemistry,

Snowmass, CO;

Contact: E-mail: info@rockychem.com

Web site: <http://www.rockychem.com/>

## August 2009

30-September 4 18th International Mass Spectrometry Conference (IMSC),

Bremen, Germany;

Contact: 18IMSC Secretariat, Institute of Chemistry, Brook-Taylor-Str. 2, 12489 Berlin, Germany; Fax: 49 30 2093 6985;

E-mail: office@imsc-bremen-2009.de

Web site: <http://www.imsc-bremen-2009.de/>

## Short Courses

April 20-23, 2009 CETAC Technologies ICP-AES/ICP-MS Continuing Education Series;

Contact: Web site: [http://www.cetac.com/news\\_events/icp-training.asp](http://www.cetac.com/news_events/icp-training.asp)