

微流控 PCR 芯片微流体荧光测控流速

吴 坚, 谢 霞, 刘世炳

(北京工业大学 激光工程研究院, 北京 100124)

摘 要: 为使微流控荧光 PCR 扩增循环的实际流速与理论设计流速吻合, 保证芯片的 PCR 扩增过程与步骤的准确完成, 必需对微通道中的实际工作流体流速情况进行实时测量和流速调控. 利用在 39 个循环微通道的生物 PCR 微流控芯片中, 充满强阳性荧光 PCR 试剂微通道的荧光信号值为空微通道的荧光信号值的 4 倍左右, 为充满阴性荧光 PCR 试剂微通道荧光信号值的 10 倍左右的特性, 在芯片上建立荧光实时测速信息反馈系统, 对微通道中的实际工作流体流速情况进行实时反馈和控制.

关键词: 生物微流控荧光芯片; 荧光检测; 传感

中图分类号: Q 5, O 657.3

文献标识码: A

文章编号: 0254-0037(2009)06-0856-04

微全分析系统(Miniaturized Total Analysis System, μ -TAS)的概念于 20 世纪 90 年代初首次提出, 在此后十余年中该领域已发展为当前世界上最前沿的科技领域之一^[1]. μ -TAS 概念是在 100 平方毫米左右(甚至更小的面积)的芯片上, 实现微型化的全过程与步骤的生物化学分析系统, 达到生物化学分析目的. 微全分析系统具有检测速度快、试样用量少、通量高等显著的特点, 因此深受世界各国的关注, 并开展了大量相关研究.

目前微流控技术已成为实现 μ -TAS 理念的实用技术, 其特征是, 其各类导流和容纳流体的有效结构(包括微通道、反应室和其他某些功能部件)至少在一个维度上为微米尺度. 与现代实验室宏观尺度全过程与步骤的实验装置相比, 微米级结构的流体环境的面积/体积比例显著增加, 也就是说, 连接各类有效结构(包括反应室和其他某些功能部件)完成分析检验全过程与步骤的主要方式是以微通道为各类功能部件连接微结构、以微通道中微体积流体的流动为各类功能部件产生功能作用基本条件的. 因此, 在承载微流动液体的微通道中, 对微流动液体进行实际流速测速, 按需要进行调控流速, 是在微米级结构中操控纳升和皮升体积流体完成分析检验全过程与步骤的核心之一, 也是微流控技术的核心之一.

目前, 据有关文献报道的微流体流速测量技术有: 标记物测速方法^[2-6]、流体温度差异量标记测速方法^[7]、示踪微粒子成像测速方法^[8-11]和共焦荧光示踪物检测测速方法^[12]等. 但是上述的测速方法存在以下缺陷:

1) 测速方法中都需显示踪迹的物质进行非实际工作状态模拟测速和调控流速, 也就是说, 这些方法对理论和实验研究有一定的作用, 但对在微通道中的具体微流动液体实际工作的监测, 并没有更多的作用, 不能实现对微流动液体在微通道中的实际工作流体和介质流速情况进行实时反馈和控制.

2) 由于实现上述测速方法的外围设备体积大, 很难在将来的器件发展过程中实现功能集成结构缩微嵌入芯片工作的微型全分析系统理念.

本研究针对上述问题和需实现的技术要求, 用荧光信号值对生化分析芯片上微通道中的微流体进行测速反馈和控速进样执行系统的研究.

收稿日期: 2007-12-26.

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(2092007); 北京市教育委员会科研发展计划面上资助项目(KM200710005021);

2009 年飞秒强激光超精制造与超快效应创新平台项目资助.

作者简介: 吴坚(1964-), 男, 江西南昌人, 副研究员.

1 微流体荧光测速控速研究

1.1 微流体荧光测速控速技术基础

为了使微流控荧光 PCR 扩增循环的实际流速与理论设计流速吻合,保证芯片的 PCR 扩增过程与步骤的准确完成,必需对微通道中的实际工作流体流速情况进行实时测量和流速调控.利用在 39 个循环微通道的生物 PCR 微流控芯片中,充满强阳性荧光 PCR 试剂微通道的荧光信号值为空微通道的荧光信号值的 4 倍左右,而为充满阴性荧光 PCR 试剂微通道荧光信号值的 10 倍左右的特性(具体数据见表 1),在芯片上建立荧光实时测速信息反馈系统,在实际工作中对微通道中的流体流速情况进行实时反馈和控制.

表 1 39 个循环的生物 PCR 微流控芯片中不同的微通道荧光检测信号值

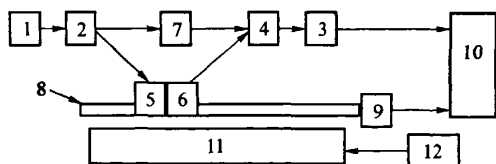
Table 1 Results of different micro-channel fluorescence detection of 39 circular biology-micro-continuous-flow PCR biochip

微通道中的情况	阳性	阴性	纯净水	空微通道	微通道中被填充黑色固体
荧光信号值	1003.2	103.4	99.6	252.2	208.1

在表 1 中,荧光信号值是平均值(原始值未单位标定),其检测的重复性偏差为 2.6%,稳定性偏差为 2.7%.

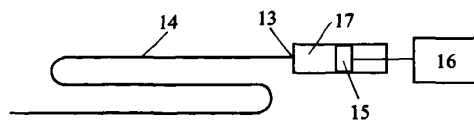
1.2 微流体荧光测速控速技术

生物微流控 PCR 荧光芯片微流控微通道动态检测系统结构如图 1 所示.



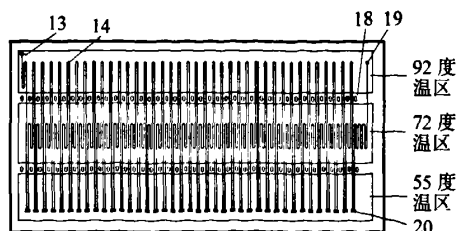
1—光源;2—激发光分光系统;3—光电检测器;4—发射光分光系统;5—激发光光纤传导系统;6—发射光光纤传导系统;7—多光路校准光纤系统(检测背景噪声调零);8—丝杠;9—步进电机;10—计算机;11—生物 PCR 微流控芯片;12—流速调控执行元件

(a) 检测系统



13—生物 PCR 试剂进样口;14—微流控芯片的微通道;15—注射生物 PCR 试剂和维持试剂在微流控芯片的微通道中流速的注射活塞;16—可注射控速调速的带有步进电机的平移注射杆系统;17—将被注入微流控芯片的微通道生物 PCR 试剂

(b) 流速调控执行元件



13—生物 PCR 试剂进样口;14—微流控芯片的微通道;18—风冷隔温孔;19—生物 PCR 试剂出样口;20—每次 PCR 循环实时扩增检测点

(c) 生物 PCR 微流控芯片

图 1 结构示意图

Fig.1 Sketch map of system structure

使用上述的实验装置,在 PMMA 有机玻璃材料制作的微流控生物分析芯片上(如图 1(c)),对乙肝荧光定量 PCR 试剂(激发光:480 nm;发射光:530 nm)进行实时扩增荧光定量 PCR 检测研究.

由于在 39 个 PCR 扩增循环中,对每个 PCR 扩增循环的时间和流过三温度区域的微通道长短和布局有“一致性”要求,因此在设计和制备微流控生物荧光 PCR 芯片时,其上的每个 PCR 扩增循环微通道的长短和布局是一样的.在 39 个循环的生物 PCR 荧光微流控芯片 11 的每个微通道上的同一位置都设置有检测点,每相邻的 2 个荧光实时检测点在微流体流动方向上的长度为一个微通道长度,第一个微通道的荧光检测点和生物 PCR 试剂进样口 13 之间的微通道长度,不视为生物 PCR 微通道工作长度.而一个微通道的长度可根据理论计算设计的每个 PCR 扩增循环的微通道得知.各个荧光检测点在同一直线上,丝杠 8 与该直线平行布置.

从第一个 PCR 扩增循环开始,通过检测到的微通道内的实际荧光信号值判断荧光 PCR 试剂的前端是否流到正在检测的荧光检测点,计算机记录微流体流经该通道的时间,就可获得微流体在该通道内的工作流速和实际流速需调整量.

实际的工作流速为一个微通道的长度/微流体流经该通道实际所需时间,实际流速需调整量为理论设计流速-实际工作流速.结果为正,说明实际的工作流速需增加;反之需减少;结果为零,说明实际的工作流速与理论计算设计的工作流速吻合,实际流速不需调整.

计算机 10 将实际流速调整量反馈到流速调控执行元件 12,即可对下一个循环进行流速调控,实现生物荧光 PCR 微流控芯片中每个微通道中微流体的荧光测速控速,使实际的工作微流体流速与理论计算设计的工作流速相吻合.

2 结论

1) 荧光测速控速保障了生物 PCR 扩增效果正常.由于生物 PCR 微流控芯片上的微通道是根据生物 PCR 的技术要求、三温度工作区的大小、微通道长短以及在芯片上的布局等要求设计和制备成的,因此微流控芯片一旦制备成后,以上各参数在实际试验中是不能改变的.而在实际的微通道中实际荧光 PCR 试剂流速与理论计算设计的试剂流速是否吻合,是决定微流控芯片生物 PCR 扩增效果成败的唯一的实际工作状态中可调控的参数.

经实验验证,使用本装置可实现对生物荧光 PCR 微流控芯片微通道中的微流体的荧光测速控速,可使具体实际的工作微流体流速与理论计算设计的工作流速相吻合,保障了荧光 PCR 扩增循环的外部工作条件,进而保证了芯片分析检验全过程与步骤的准确完成.

2) 在生物 PCR 扩增效果正常基础上,获得扩增过程生物荧光曲线.在 39 个 PCR 扩增循环中,要求对每个 PCR 扩增循环都要进行一次微通道中的荧光信号检测,这样构成在基因体外按 2 的 n 次方自我复制过程,即在 PCR 扩增循环过程中获得荧光信号变化曲线,分子生物学可根据该曲线获得被检测对象的多种生物基因信息和诊断依据.使用本装置进行荧光实时定点检测时,可获得 PCR 扩增循环过程中的荧光信号变化曲线.

参考文献:

- [1] 方肇伦.微流控分析芯片的制作及应用[M].北京:化学工业出版社,2005:1-4.
- [2] SCHRUM K F, LANCASTER J M, JOHNSTON S E, et al. Monitoring electroosmotic flow by periodic photobleaching of a dilute, neutral fluorophore[J]. Anal Chem, 2000, 72(18): 4317.
- [3] PITTMAN J L, HENRY C S, GILMAN S D. Experimental studies of electroosmotic flow dynamics in microfabricated devices during current monitoring experiments[J]. Anal Chem, 2003, 75(3): 361.
- [4] PAUL P H, GARGUILO M G, RAKESTRAW D J. Imaging of pressure-and electrokinetically driven flows through open capillaries[J]. Anal Chem, 1998, 70(13): 2459.
- [5] ROSS D, JOHNSON T J, LOCASCIO L E. Imaging of electroosmotic flow in plastic microchannels[J]. Anal Chem, 2001, 73(11): 2509.
- [6] STCLAIRE J C, HAYES M A. Heat index flow monitoring in capillaries with interferometric backscatter detection[J]. Anal Chem, 2000, 72: 4726.

- [7] WU S, LIN Q, YUEN Y, et al. MEMS flow sensors for nano-fluidic applications[J]. *Sens Actuators A*, 2001, 89(1): 152.
- [8] SANTIAGO J G, WERELEY S T, MEINHART C D, et al. A particle image velocimetry system for microfluidics[J]. *Exp Fluids*, 1998, 25(4): 316.
- [9] MEINHART C D, WERELEY S T, SANTIAGO J G. PIV measurements of a microchannel flow[J]. *Exp Fluids*, 1999, 27(5): 414.
- [10] 由长福, 祁海鹰, 徐旭常. 显微 PIV 系统与实现[J]. *流体力学实验与测量*, 2003, 17: 84.
YOU Chang-fu, QI Hai-ying, XU Xu-chang. Micro-PIV system and its realization[J]. *Experiments and Measurements In Fluid Mechanics*, 2003, 17: 84. (in Chinese)
- [11] SINGH A K, CUMMINGS E B, THROCKMORTON D J. Fluorescent liposome flow markers for microscale particle-image velocimetry[J]. *Anal Chem*, 2001, 73(5): 1057.
- [12] GOSCH M, BLOM H, HOLM J, et al. Hydrodynamic flow profiling in microchannel structures by single molecule fluorescence correlation spectroscopy[J]. *Anal Chem*, 2000, 72(14): 3260.

Fluorescence Measure and Control Flow Velocity for Micro-liquid in Micro-fluidic Chip PCR

WU Jian, XIE Xia, LIU Shi-bing

(Institute of Laser Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: In order to make the actual flow velocity of micro-channels be consistent with the theoretical value and make sure that the amplification process and the steps of PCR chip are completed exactly, it is needed to do real-time measurement and flow control of the actual work fluid flow condition. The fluorescence signal value of the micro-channel filled with the strong active fluorescence PCR reagent was about 4 times as great as that of the empty micro-channel and 10 times as great as that of the micro-channel filled with the negative fluorescence PCR reagent in the 39 cycled micro-channels of biological PCR micro-fluidic chip. Based on the above fact, a proposal was made that the real-time fluorescence detection micro-sensor should be set up on the chip to sense the information feedback, so the condition of the velocity of flow in the microchannel could be feed backed in time and the velocity of flow could be controlled.

Key words: Biological microfluidic fluorescence chip; Fluorescence detection; Sense

(责任编辑 张 蕾)