

一种基于数字微流控技术的 PCR 微芯片

牛嘉琦 王伟强

(南京理工大学机械工程学院, 南京 210094)

摘要:基于数字微流控(digital Microfluidics, DMF)的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)微芯片系统设计, 主要在于对样品液滴的运动进行控制和对进行 PCR 所需要的温度控制。设计了一种基于介电润湿(electrowetting-on-dielectric, EWOD)原理的数字微流控 PCR 微芯片, 并实现了对芯片不同区域的温度控制以满足 PCR 所需的要求。基于数字微流控技术的 PCR 微芯片系统由一个双基板结构的数字微流控芯片, 芯片的驱动电路以及温度控制组件构成。实现驱动样品液滴在该装置上运动至不同温度的反应区域, 在不同的反应区域满足的 PCR 反应所需的变性, 退火和延伸各阶段所需的温度, 继而实现 PCR 扩增。

关键词:PCR; 数字微流控; 温度控制; 介电润湿

中图分类号: TP212.3 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 460.4020

Digital microfluidic chip for polymerase chain reaction

Niu Jiaqi Wang Weiqiang

(School of Mechanical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract: The design of polymerase chain reaction (PCR) microchip system based on digital microfluidic technology is mainly to control the movement of micro droplets and the temperature of PCR reaction. In this paper, we designed a digital microfluidic PCR chip based on electrowetting-on-dielectric(EWOD), and the temperature controlled to meet the requirements of PCR is designed and implemented in different regions on the chip. PCR microchip system based on digital microfluidic technology is composed of a dual substrate structure chip, a driving device for driving the chip and a temperature control module. The reaction region of the driving sample is realized to move to different temperature in the device, and the temperature required for the PCR reaction is satisfied in different reaction areas, and then realize the PCR.

Keywords: PCR; digital microfluidic; temperature control; EWOD

1 引言

随着微机电系统(micro-electro-mechanical system, MEMS)技术的发展, 数字微流控芯片已经在微液滴的驱动和控制技术等方面有所突破, 依靠其自身优势在生物、化学和医药等领域得到了广泛的应用。各种细胞等样品可以在数字微流控芯片中培养、移动和分析^[1]。从各个领域的广泛应用可以看出, 数字微流控芯片有着体积小、试剂使用量小、反应快、易携带、可并行处理和易实现自动化等优势^[2], 并且已经开始商业化。

常见的 PCR 微流控芯片主要有两种: 微反应腔式 PCR 芯片^[3-7]和连续流动式 PCR 芯片^[8-13]。微反应腔式 PCR 芯片是指在芯片上加工一个腔体用来储存实验试

剂, 通过加热器件和降温器件对腔体加热和降温来达到 PCR 扩增各阶段所需要的温度, 经过一次温度循环完成一次扩增过程, 但由于升降温的速率由加热器件和降温器件控制, 且温度的升高和降低都有一个时间过程, 每个增值循环的时间都比较长。连续流动式 PCR 芯片通过控制试剂在芯片内的通道上连续流动, 经过 3 个不同的温度区域, 在 3 个区域分别实现 DNA 变性、退火和延伸。实验试剂每在 3 个区域经历一个循环, 就完成了一次 DNA 扩增的过程, 但是因为实验样品在芯片内是不停流动的, 所以反应时间等变量的控制主要通过设计芯片上微通道的结构来实现, 通常结构相对更复杂也需要比较大的空间。

为了解决上述两种 PCR 芯片的缺点, 本文采用了基于介电润湿的数字微流控技术设计了一种 PCR 微芯片。

在芯片上控制 3 个不同的区域稳定在 PCR 反应 3 个阶段所需要的温度。控制反应试剂液滴流经 3 个温度区域,每循环一次,便完成一次 DNA 的增值。但同时由数字微流控技术的原理和特点可知,数字微流控在芯片上是以液滴为单位对每个单独的液滴进行控制。实验试剂在每个区域行进和停留的时间都可以根据需要自己设定,所以芯片并不需要设计很长的通道,仅需要使试剂液滴停留在反映区域一段时间即可。可以在芯片的设计上实现微反应腔式 PCR 芯片结构简单小巧的特点。同时仅需控制试验液滴运动至不同的温度区域即可完成对应的反应过程,系统不需要对芯片上的反应区域有升温或者降温的操作,仅需要保持 3 个反应区域的温度稳定,兼具连续流动式 PCR 芯片循环速度快不需要升降温过程的优点。

2 系统设计与制备

本文设计的基于介电润湿技术的数字微流控 PCR 微芯片系统由数字微流控芯片,数字微流控芯片驱动电路和温度控制系统 3 部分组成^[14],其中数字微流控芯片和数字微流控芯片驱动电路实现试剂样本液滴的驱动,温度控制系统则保证芯片上不同反应区域的所需温度的实现和稳定。

2.1 数字微流控芯片设计与制备

利用微机械加工工艺,设计制备了应用于 PCR 的数字微流控器件,如图 1 所示,器件由试剂储藏区域、反应区域、检测区域、连接各区域的传输部分以及电极和电极接线组成。

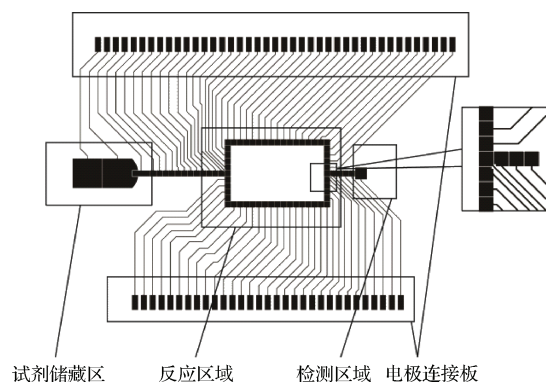


图 1 数字微流控 PCR 芯片设计

为保证实验试剂不受到外界污染以及液滴运动的稳定可靠。本文设计的数字微流控 PCR 微芯片采用双基板结构,如图 2 所示。

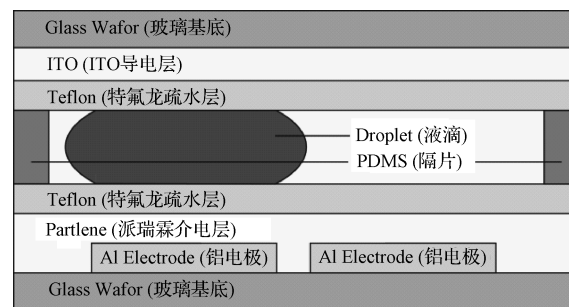


图 2 双基板数字微流控器件结构

下基板采用玻璃作为数字微流控芯片基底材料,首先如图 3(a)采用溅射工艺在基底上镀一层铝薄膜,然后如图 3(b)所示通过光刻加工出各种形状的驱动电极,电极引线 and 接线电极。之后如图 3(c)所示采用蒸镀工艺制备约 7 μm 厚的 Parylene 薄膜作为介电层,最后如图 3(d)采用 Teflon 作为疏水材料,通过旋涂,烘烤,得到 80 nm 左右的疏水层。如图 3(e)所示,上基板采用玻璃作为基底材料,在玻璃基板表面通过真空蒸发沉积的方法制备 ITO 薄膜作为导电层^[15],之后通过旋涂,烘烤制备一层 Teflon 涂层作为疏水层,制作工艺与下基板疏水层制作工艺相同。两基板间采用 PDMS 加工出电极上方液滴运动所需的空隙,与上下基板建合形成液滴运动的通道。

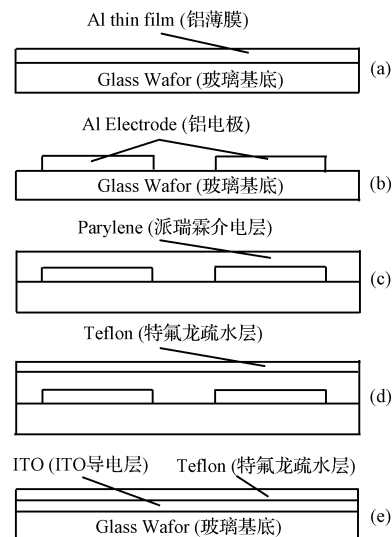


图 3 数字微流控 PCR 芯片器件制备

制备的数字微流控 PCR 芯片如图 4 所示。

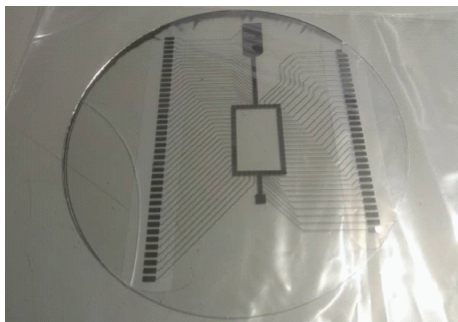


图4 数字微流控 PCR 芯片实物

2.2 数字微流控芯片控制驱动电路设计

数字微流控芯片驱动液滴需要控制驱动电路,该电路可以按照一定顺序使一定幅值的电压按所需要的通断顺序和频率施加在数字微流控芯片的电极上,进而使芯片上的液滴按照所需的速度方向运动^[16]。

本文所设计的数字微流控芯片控制驱动电路原理如图5所示。利用PC通过控制数字IO来控制继电器组的接通或者关断,继而使交流电源提供的一定电压和频率的交流电施加在数字微流控芯片不同的电极上,来控制芯片上液滴的运动。

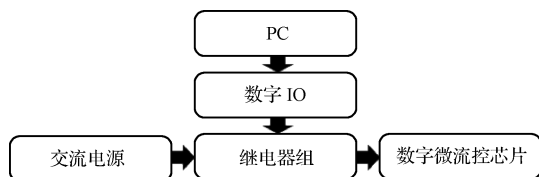


图5 数字微流控 PCR 芯片控制原理

2.3 温度控制系统设计与实现

在PCR微芯片中,通过数字微流控系统驱动样品液滴运动至3个不同的反应温度区域,如图6所示,在不同的区域实现变性,退火和延伸反应,完成扩增^[17]。在数字微流控PCR微芯片中,不同反应区域的温度保持不变,试剂在芯片中由配发区域产生试剂液滴,液滴循环的经过3个不同的区域,每经过一次循环实现一次扩增过程。

温度控制系统由加热部件,温度采集和温度控制器3部分组成。加热部件是整个温度控制器的重要组成部分

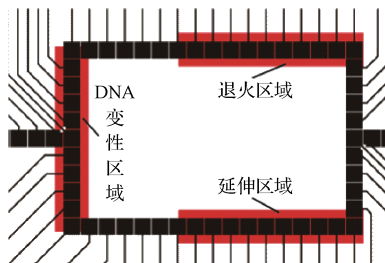


图6 PCR 芯片温度区域

分,由于双基板结构数字微流控芯片的内部为液滴的通道,所以加热部件只能设置在上基板上或下基板的下方。由于芯片上部设计为透明的基板以便对芯片内部液滴运动情况的观察,而若选择将加热器放置在上部,则会对观察造成遮挡,不便在实验中实时的观察芯片内部的运行情况。本实验设计的方案选择将加热器部件放置在芯片下基板的下方部位,结构和实物如图7、8所示。

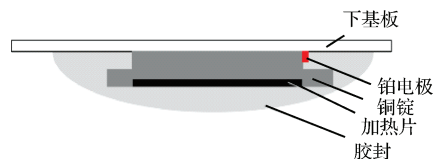


图7 加热部件示意



图8 加热部件实物

本系统采用电阻值 $R=10\ \Omega$ 的陶瓷加热片作为加热系统的热源,在加压 $U=10\ \text{V}$ 的时候最大干烧温度可以达到 $210\ ^\circ\text{C}$,具有体积小、重量轻、热响应时间快的优点,完全可以满足系统的需要。温度采集部分采用PT100铂电阻作为温度采集传感器,铂电阻具有体积小、精度高的优点,可以满足系统高精度的测温需求^[18]。温度控制器采用OMRON E5CN-R2MTD型温控器,具有采样速度快,精度高的优点,并可以自行输入PID参数对温度进行控制进而实现温度控制的稳定可靠。

3 实验结果与讨论

3.1 温度控制系统

由于加热片及温度采集都装置在数字微流控芯片的下基板外侧,所以实验中温度控制器设定的温度应稍高于PCR反应各个阶段所需的温度,但在系统稳定后,反应区域内部和控制器设定温度的差值基本固定,所以通过设置,仍可以使数字微流控芯片反应的各个区域温度稳定在所需要的数值。在室温下($30\ ^\circ\text{C}$)使用测温仪对反应区域进行检测得到本数字微流控PCR芯片各个区域的温度控制曲线如图9所示,可以满足PCR反应的扩增对于温度的需求。

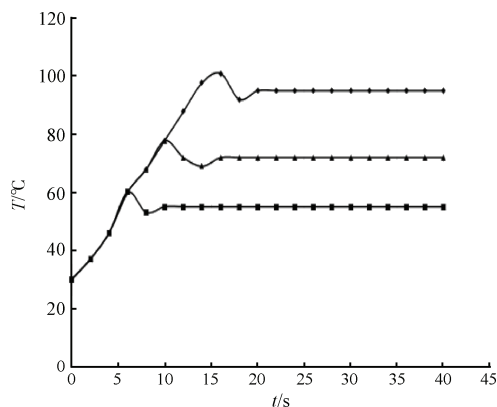


图9 温度控制曲线

3.2 数字微流控 PCR 微芯片

本文方案制得的数字微流控 PCR 微芯片通过介电润湿技术控制可以样品液滴在芯片中的运动,实现液滴分配,移动等操作,如图 10、11 所示。

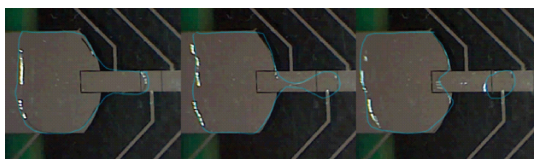


图10 液滴分配



图11 液滴移动

由于数字微流控技术可以精确的产生并控制每个液滴的特点,在实验中,实验试剂在储藏区域经由液滴分配的过程生成试剂液滴,每个液滴都可以视为 PCR 微芯片中的 1 个扩增反应的微反应室,试样通过芯片的控制运动经过 3 个反应区域,每经历 1 个温度循环,就完成 1 次扩增过程。这种基于数字微流控技术的 PCR 微芯片大大降低了 PCR 微芯片的复杂度的操作难度。试样液滴在反应区域经过多次循环后,完成样品 DNA 的扩增。之后将试样液滴移动至检测区域进行检测。

4 结 论

本文设计的基于数字微流控技术的 PCR 微芯片,应用介电润湿原理通过对微液滴状的样品在芯片上的运动进行控制,可以有效的减少所需的样品量。通过对芯片中几个反应区域的温度控制,实现样品在芯片中的聚合酶链式反应。有效的简化了 PCR 微芯片结构,具有结构简单小巧的特点,控制方式稳定可靠,系统不需要对芯片上的反应区域有升温或者降温的操作,仅需要保持 3 个反应区域的温度稳定,PCR 每个温度循环所需时间大大减小。仅需控制试验液滴运动至不同的温度区域即可完成对应的反应过程。在后续的实验中可以增加对芯片的实时荧光检测功能,荧光检测中可实时的对芯片中样品液滴中的 DNA 扩增进行检测,可有效的提高检测效率并增加检测结果的精确性。

参 考 文 献

- [1] SISTA R, HUA Z, THWAR P, et al. Development of a digital microfluidic platform for point of care testing[J]. Lab on A Chip, 2008, 8(12):2091-2104.
- [2] DITTRICH P S, MANZ A. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2006, 5(3):210-8.
- [3] NEUZIL P, PIPPER J, HSIEH T M. Disposable real-time microPCR device: lab-on-a-chip at a low cost[J]. Molecular Biosystems, 2006, 2(6-7):292-8.
- [4] OTTESEN E A, HONG J W, QUAKE S R, et al. Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria[J]. Science (New York, N. Y.), 2006, 314(5804):1464-1467.
- [5] BU M, PERCH-NIELSEN I R, S? RENSEN K S, et al. A temperature control method for shortening thermal cycling time to achieve rapid polymerase chain reaction (PCR) in a disposable polymer microfluidic device[J]. Journal of Micromechanics & Microengineering, 2013, 23(7):549-553.
- [6] CAI D, XIAO M, XU P, et al. An integrated microfluidic device utilizing dielectrophoresis and multiplex array PCR for point-of-care detection of pathogens[J]. Lab on A Chip, 2014, 14(20):3917-24.
- [7] TANAKA H, YAMAMOTO S, NAKAMURA A, et al. Hands-off preparation of monodisperse emulsion droplets using a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip for droplet digital PCR[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(8):4134-43.
- [8] KOPP M U, MELLO A J D, MANZ A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip[J]. Science, 1998, 280(5366):1046-1048.

(下转第 99 页)