

聚合物衬底材料在 PCR 生物芯片中的应用及相关技术^{*}

章春笋^{1,2} 徐进良¹

(1. 中国科学院广州能源研究所, 广州 510640; 2. 中国科学技术大学热科学和能源工程系, 合肥 230026)

摘要 介绍了聚合物衬底材料在聚合酶链式反应(PCR)生物芯片中的最新应用及相关技术,这些技术包括聚合物衬底材料的表面钝化,PCR生物芯片的微加工(注模、压模及激光刻蚀等)及封接(氧等离子体表面处理及热键合)等。

关键词 聚合物衬底材料 聚合酶链式反应 生物芯片 应用

聚合酶链式反应(PCR)是在体外或试管中进行 DNA 大量扩增复制的一种技术,它自 1986 年问世^[1]以来已经在临床疾病诊断、微生物检测等领域得到广泛应用。随着微电子机械系统(MEMS)技术的发展,20 世纪 90 年代早期 M. A. Northrup 等^[2,3]就成功地硅芯片上完成反应池内固定 PCR 扩增反应。由于硅微反应池具有较小的热容,而且具有良好的导热性能,容易集成化,所以它已成为 PCR 生物芯片的主要衬底材料。但是,未经表面处理过的硅对 PCR 扩增反应起抑制作用^[4],且透明性差。玻璃是一种透明的、对 PCR 生物芯片兼容性较好的电绝缘导热材料,一些研究者已经在玻璃芯片上完成连续流动式 PCR 扩增反应^[5-7]或将 PCR 和毛细管电泳集成在单一玻璃芯片上^[8-12]。但是用硅或玻璃衬底材料制作 PCR 芯片通常要采用真空溅射或蒸发沉积的金属镀膜技术在片基上镀上惰性金属作掩膜,制作困难、技术复杂、步骤多、成本高。近年来,采用聚合物有机材料作为衬底材料制作 PCR 生物芯片越来越受到研究者的重视,这些聚合物材料的显著优点是不需要镀膜,制作方法通常是压模、注模或激光刻蚀等,而且聚合物材料本身价格便宜,因而大大降低了成本,有可能促进 PCR 生物芯片的推广和应用。笔者主要结合近几年有关以聚合物为衬底材料的 PCR 生物芯片的文献报道,介绍聚合物衬底材料在 PCR 生物芯片中的最新应用及相关技术。

1 聚合物衬底材料在 PCR 生物芯片中的应用

1.1 聚二甲(基)硅氧烷

聚二甲(基)硅氧烷(PDMS)是世界上最为通用的硅氧烷,其应用范围有医学器件、弹性体、填缝胶和润滑剂等。PDMS 通常具有以下几个方面的优点:(1)低表面结合能和稳定的化学性质,大多数生物分子和聚合物都不易与 PDMS 表面粘合或发生化学反应;(2)良好的光学透明度(透光波长 230 ~700 nm);(3)不会随湿度的变化而发生膨胀或收缩;(4)良好的耐用性,且在机械形状方面不会有太大的形变。正是由于这些优点,在 MEMS 技术推动下 PDMS 已开始在 PCR 生物芯片的微制造中使用。

J. W. Hong 等^[13]开发了一种集 PCR 和毛细管凝胶电泳于一体的 PDMS-玻璃混合微芯片。它是将玻璃片覆盖在 PDMS 微芯片上而形成的。他们首次报道了在以 PDMS 为

衬底材料的集成芯片上完成基因分析。随后, Y. S. Shin 等^[14]开发了一种以 PDMS 为衬底材料的微 PCR 生物芯片,所需 PCR 混合物体积仅为 2 μL 。J. Liu 等^[15]首次在 PDMS 衬底材料上将旋转泵集成到 PCR 芯片上,开发了一种到目前为止所需 DNA 样品体积最小的 PCR 芯片(仅 12 nL)。该 PCR 芯片由于采用旋转泵驱动环通道中的 DNA 样品,它既可作连续流动式 PCR 又可作反应池内固定扩增式 PCR。最近, T. Fukuba 等^[16]开发了一种以 PDMS 为衬底材料的连续流动式 PCR 微通道芯片,并同以玻璃为衬底材料的温度控制芯片一起来实现 PCR 扩增循环。我国 Yu Xiaomei 等^[17]最近也在 PDMS 衬底材料上开发一种 3D 微阵列生物芯片来进行 DNA 扩增。

1.2 聚碳酸酯

聚碳酸酯(PC)是一种非晶体热塑性工程塑料,具有极为优良的力学性能、热稳定性及透明度(透光率 80% ~90%)等综合性能,它已在许多领域得到广泛的应用。近年来,一些研究者已经在 PC 芯片上刻蚀出微反应池来实现 PCR 扩增反应。Y. Liu 等^[18]在黑 PC 芯片上制作出 PCR、阀、杂交池等微流控结构,并和两块具有相同厚度的透明 PC 芯片热键合而形成封闭的微流控芯片装置,通过该芯片装置完成 DNA 扩增和杂交定量分析。他们也在 PC 上制造出微芯片毛细管电泳装置,将该装置的样品池作为 PCR 反应池,然后整个 PC 芯片进行热循环,从而在单一芯片装置上完成 PCR/毛细管电泳分析^[19]。J. Yang 等^[20]开发了一种 PC“蛇形”微反应芯片来进行高灵敏度、高特异性 PCR 分析,所需模板浓度低到 10 个 E. coli(埃希氏大肠杆菌)细胞,相当于 50 Fg 基因组 DNA。通过对不同病原体特异性基因片段进行多元 PCR 扩增来评价 PC 微 PCR 反应芯片的特异性。最近, R. H. Liu 等^[21]以 PC 为衬底材料制造出充分集成的生物芯片,在该芯片上完成样品制备、PCR 扩增及 DNA 微阵列检测。

1.3 聚酰亚胺

聚酰亚胺(PA)是在分子主链中含有酰亚胺环状结构的

^{*} 国家自然科学基金资助项目(10272102)

收稿日期:2004-06-22

环链聚合物,由于其具有优良的力学性能、电绝缘性、耐热性及高的尺寸稳定性等综合性能,已经被广泛地应用于光刻胶、高温胶带及胶粘剂等。也正是由于 PI 具有高的玻璃化转变温度(350℃)及在波长为 600 ~3 000 nm 范围内具有高的透明度两个特性,在集成化的 DNA 分析微芯片中它有可能成为 PCR 反应池较好的候选材料。B. C. Giordano 等^[22]利用 PI 上述两个特性制造出 PCR 微反应芯片,PCR 反应池的容积仅 1.7 μL ,通过红外非接触加热使 PCR 扩增反应在 240 s 内完成。

1.4 聚对苯二甲酸乙二醇酯

聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)是开发最早、产量最大、应用最广的聚酯。由于它具有价格低廉、透明度和耐热性高及韧性好等优点,其应用领域越来越广泛。近年来,新加坡微电子研究所 Q. Zou 等^[23]采用 PET 为衬底材料制造 PCR16 微池阵列芯片。PCR 反应池深 400 μm ,壁厚小于 200 μm ,容积大约 20 μL ,在所建立的热模型中热延迟时间 $t_d < 2$ s。

以上 4 种聚合物衬底材料的共同特点是价格便宜,具有高的耐热性和透明度,而且还具有稳定的化学性质和力学性能。最近, J. El-Ali 等^[24]采用新型聚合物 SU-8(以环氧、酚醛树脂作成膜材料)为衬底材料制作 PCR 热循环芯片,反应池容积为 20 μL ,并集成了铂薄膜加热器和传感器。SU-8 是一种在微系统中逐渐被应用的聚合物之一,具有相当稳定的化学性质,表面性质易于通过等离子体或化学处理而得到控制和改变,而且能使诸如流体通道、反应池及分离通道等微流控部件制作简单化。

2 PCR 生物芯片中聚合物衬底材料表面钝化技术

在 PCR 生物芯片中,由于比表面积相对增大,使微流控内表面与样品和反应混合物各成分之间不利的相互作用可能性增大,而且 PCR 扩增反应是一个多成分的反应,这些成分中至少有一种可能和芯片中的微流控内表面发生一定程度的结合,这两种因素都可能引起 DNA 聚合酶和蛋白质吸附到微流控内表面以致对 PCR 扩增产生不利的影响,甚至完全导致 PCR 扩增失败。早期的硅/玻璃 PCR 生物芯片研究揭示了这些不利的相互作用,人们开始对 PCR 微流控内表面进行钝化以获得“友善”的内表面^[3,4]。表面钝化技术一般可分为静力学钝化和动力学钝化两种,前者通常是在 PCR 芯片制作过程中将一种物质涂覆到芯片表面上完成,包括氧化物涂层和内表面硅烷化;后者主要发生在微芯片的样品填充和运行工作过程中,它是通过在反应混合物中添加钝化试剂来完成的。在以聚合物为衬底材料的 PCR 生物芯片中最常用的钝化技术是动力学钝化,钝化试剂通常有牛血清白蛋白(BSA)^[13, 18, 20, 21]、聚乙二醇(PEG)^[20, 22]、二氯二甲(基)甲硅烷(DDMS)^[24],也有少数研究者采用 2-异丁烯酰基乙氧基磷酰基胆碱(MPC)聚合物^[16],而在毛细管电泳中经常用来钝化毛细管壁面的 5% 聚乙烯吡咯酮(PVP)对 PC 微反应池中的 PCR 扩增没有显著的影响^[20]。

在以聚合物 PDMS 为衬底材料的 PCR 生物芯片中也常

采用浓 HCl(约 30%)^[13]、氧等离子体^[14, 17]来活化微流控内表面,它们都能使 PDMS 芯片的内表面由疏水性改为亲水性,有利于样品通过毛细管作用的注入^[13]和在微通道中的流动^[17]。氧等离子体表面活化的另外一个作用是键合 PDMS^[14, 17]。然而, Y. S. Shin 等^[14]发现将氧等离子体处理过的一小片 PDMS 放入 PCR 样品中也会引起 PCR 扩增的失败,于是他们采用聚对二甲苯来处理 PDMS 内表面。聚对二甲苯薄膜具有渗透性低、生物兼容性好等优点,用它处理过的 PDMS 微芯片不仅能防止气泡形成和样品蒸发,而且也能阻止 Taq DNA 聚合酶和引物吸附到芯片的表面,因而不需要任何添加剂(BSA 和 PEG 等)和其它表面处理就能成功地进行 PCR 扩增^[14]。

3 以聚合物为衬底材料的 PCR 生物芯片加工技术

3.1 注模技术

注模或再铸模技术是将熔化的塑料或未聚合的聚合物前体注入模具中,使其凝固或聚合,取下模具便可得到微流控芯片底片。该底片与另一薄片(塑料或其它聚合物)通过适当的方式粘合在一起即可得到封闭的微流控芯片。在以 PDMS 为衬底材料的 PCR 生物芯片中,通常采用注模技术来制造 PCR 反应池^[14, 16, 17]和微流体通道^[13, 14, 16, 17],也可通过打孔的方式来得到 PCR 反应池^[13],其制作过程一般包括:负光刻胶 SU-8 旋转喷涂到硅片上;软烤后将通过掩模对准系统将掩模上的图案通过照相平板印刷法复制到硅片上;SU-8 图案经曝光、显影及硬烤便可得 PDMS 模具;将 PDMS 预聚物和固化剂混合物注入模具中使其聚合或凝固,取下模具可得到 PDMS 复制品(即具有 PCR 微流体通道和/或反应池的 PDMS 芯片),有时为了制作较深的 PCR 反应池以减少交互式污染,在制作过程中也采用电感耦合等离子体(ICP)深刻蚀技术^[17]。在注模技术中,为了使 PDMS 复制品易于从模具中取下,通常在反应离子刻蚀系统阴硅模表面涂上一层由 CHF_3 等离子体聚合的碳氟化合物^[13, 16, 17]。

3.2 压模技术

压模技术是用阳模具将聚合物夹在一起加热,在压力和热的作用下使聚合物片形成微流控通道或反应池的技术。Y. Liu 等^[19]就利用压模技术在 PC 衬底上制造出微流控通道,其制作过程包括:通过标准照相平板印刷技术制造出具有三维微流体结构的硅阳模具;将玻璃片放置在较低压印盘的上表面以保证一个平滑的支撑面,然后将硅阳模具放在玻璃片表面上;系统温度加热到 188℃时,将预定数目的 PC 小球放入硅阳模具;再将空镍片放在 PC 小球上面,较高的压印盘通过水力开始下压;PC 片和硅阳模具从水压中分离后在空气中冷却 90 s 再脱模,整个 PC 芯片制作过程大约需要 3 min。

3.3 激光刻蚀技术

激光刻蚀技术是直接对衬底材料上烧蚀出微流控通道或反应池的一项技术,它包括紫外激光刻蚀、红外 CO_2 激光刻蚀等。不同于紫外激光刻蚀, CO_2 激光刻蚀能在波长为

1060 nm,最大输出能量为 40 W 条件下操作。当 CO₂激光聚焦于 PC 工作片时,激光束既能在工作片中产生微流体通道,又能完全刻蚀透过工作片,这主要取决于激光能量和刻写速度。Y. Liu 等^[18]利用 CO₂激光在 PC 衬底材料上成功刻蚀出深 250 μm 的 PCR 反应池、杂交池等微流控通道结构。J. Yang 等^[20]利用相同的激光刻蚀技术在 PC 衬底材料上制作出宽 1500 μm、深 250 μm 的“蛇形”PCR 微反应通道。由于 CO₂激光刻蚀技术不需要光掩模,因而制作过程快捷^[20]。B. C. Giordano 等^[22]也通过激光刻蚀技术在 PI 衬底材料上制造出深 150 μm、宽 2000 μm、长 5500 μm 的 PCR 反应池(容积仅 1.7 μL)。

3.4 多层软刻蚀技术

多层软刻蚀技术是由 M. A. Unger 等开发的一种微细加工新技术,它把软刻蚀和键合多重弹性体图案层的能力有机结合起来,其制作过程可参见文献[25]。J. Liu 等^[15]利用多层软刻蚀技术在 PDMS 衬底材料上成功地加工出旋转的连续流动式 PCR 芯片。

以上几种微加工技术是聚合物为衬底材料的 PCR 生物芯片制作过程中经常采用的加工技术,尤其是注模、压模及激光刻蚀技术。它们具有制作过程快速、简便易于实施、制作费用低等优点,而且芯片与芯片之间的差异较小,更适合批量生产。然而,也有些研究者采用传统计算机控制微加工技术^[21]、标准 MEMS 技术^[24]在聚合物 SU-8^[21]或 PC^[24]衬底材料上加工出 PCR 芯片。随着 MEMS 技术的不断发展,新型聚合物材料微加工技术也不断涌现,例如多层软刻蚀技术是从软刻蚀技术基础上发展起来的,它在制作过程中结合了注模技术^[15]。最近, Q. Zou 等^[23]采用硅模热加工成型技术制作具有皱纹底表面的 PET 塑料 PCR 微芯片,其中硅模是通过 KOH 刻蚀而成的。这种技术也具有简单、快速、费用低及批量化生产等优点。

4 以聚合物为衬底材料的 PCR 生物芯片封接技术

以聚合物为衬底材料的 PCR 生物芯片制成后需要通过一定的方式与另一基片(玻璃或聚合物)键合,从而形成一个封闭的 PCR 芯片系统。对于聚合物为衬底材料的 PCR 生物芯片而言,它的键合方式不同于硅/玻璃为衬底材料的 PCR 生物芯片,而且对于不同的聚合物材料要采用不同的键合方式,例如对于 PDMS 为衬底材料的 PCR 芯片经常采用氧等离子体表面处理键合^[14,16,17]或其它键合方式^[15];对于 PC 为衬底材料的 PCR 芯片则通常采用热键合方式^[18-21]。除此之外,还经常有胶键合方式^[18,23,24]。以下主要介绍氧等离子体表面处理键合和热键合两种方式。

4.1 氧等离子体表面处理键合

在反应离子刻蚀系统中通过氧等离子体表面处理来活化 PDMS 表面,这样可以引起两块固化的上下 PDMS 片永久性键合。它通常包括两个步骤^[17]:氧等离子体表面处理过的、具有活化表面的两块 PDMS 面对面地直接粘合在一起;然后放在炉中烘烤一段时间,在烘烤过程中通常加一外压,

这样有助于键合。在键合过程之前一般要通过多次试验来获取氧等离子体表面处理的优化条件^[17]。

4.2 热键合

将微加工而成的芯片与相同材质的盖片洗净、烘干、对齐、紧贴后平放于高温炉中,在芯片和盖片上下方各放一块抛光过的石墨板,在上面的石墨板上再压一块重锤,在高温炉中加热键合,封接温度 415 ~650℃,施加压力 7 ~700 kPa。

5 结语

聚合物衬底材料已经开始在 PCR 生物芯片中得到一定程度的应用,从应用的情况来看,PDMS 和 PC 有可能成为 PCR 生物芯片中的两种主要聚合物衬底材料。这两种聚合物材料的共同优点是具有较高的玻璃化转变温度,很适合 PCR 扩增热循环的要求。但是,PC 芯片通常具有相对强的固有荧光背景^[19],因而限制了 PCR 生物芯片的实时定量荧光检测;PDMS 的多孔性会在 PCR 扩增过程中引起一系列如气泡生成、样品蒸发等问题,然而通过聚对二甲苯表面处理可以解决这些问题^[14],而且在 PDMS 芯片上已经成功地通过 Taq Man 探针技术及利用 SYBR 绿 I 荧光染料对 PCR 扩增过程进行实时定量荧光检测^[15]。由于这两种聚合物各有自己的优缺点,一些研究者开始寻找新的聚合物作为 PCR 生物芯片的衬底材料。从生物兼容性来看,这些聚合物材料表面都会对 PCR 扩增过程产生一定的不利影响,因而都需要进行表面钝化。值得指出的是,通过 0.75% PEG 动力学钝化,直接置于以 PI 为衬底材料的 PCR 芯片反应池中的热电偶不会对 PCR 扩增过程产生任何不利影响,因而允许热电偶直接对 PCR 过程进行精确的温度控制。从微加工技术来看,以 PDMS 为衬底材料的 PCR 芯片适合用注模技术制造,而以 PC 或 PI 为衬底材料的 PCR 芯片通常用激光刻蚀技术制造,这两种方法的优点是制造简单、快速、成本低,而且容易批量化制造。由于 PDMS 具有自粘性,通常采用氧等离子体表面处理来实现两块 PDMS 片的键合,这种键合方法与热键合相比显得简便易实施。在聚合物为衬底材料的 PCR 芯片封接技术中,胶键合也是经常采用的一种快速键合方式,但是通过胶键合的 PCR 反应池很难承受在热循环过程中所产生的压力。再者,胶键合常常配合热键合一起使用,因为双面胶带里的胶和杂交反应是生物兼容的,而和 PCR 扩增反应一般是不生物兼容的。

总而言之,聚合物衬底材料虽然都具有一定的缺点,但是它们所具有的价格低廉、制作简单及生物兼容性较好等优点已经使它们在 PCR 生物芯片中展示了广阔的应用前景。目前,笔者正在开发一种以聚合物为衬底材料的、廉价的、一次性使用的 PCR 生物芯片,主要工作包括对 PCR 生物芯片的设计、加工、温度控制研究,同时也采用荧光显微镜等光检测装置对 PCR 扩增过程进行实时定量检测以便对其系统进行优化。

参考文献

- 1 Mullis K B, et al. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 1986, 51:

- 263
- 2 Northrup M A, et al. Proceeding of the 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators, 1993. 924
 - 3 Wilding P, et al. Clin Chem, 1994, 40: 1 815
 - 4 Shoffner M A, et al. Nucleic Acids Res, 1996, 24(2) : 375
 - 5 Kopp M U, et al. Science, 1998, 280: 1046
 - 6 Sun K, et al. Sens Actuat B, 2002, 84: 283
 - 7 Obeid P J, et al. Anal Chem, 2003, 75(2) : 288
 - 8 Lagally E T, et al. Sensors and Actuators B, 2000, 63: 138
 - 9 Dunn W, et al. Analytical Biochemistry, 2000, 257: 157
 - 10 Khandurina J, et al. Anal Chem, 2000, 72(13) : 2995
 - 11 Lagally E T, et al. Lab on a Chip, 2001, 1: 102
 - 12 Lagally E T, et al. Anal Chem, 2001, 73(3) : 565
 - 13 Hong J W, et al. Electrophoresis, 2001, 22: 328
 - 14 Shin Y S, et al. J Micromech Microeng, 2003, 13: 768
 - 15 Liu J, et al. Electrophoresis, 2002, 23: 1 531
 - 16 Fukuba T, et al. Chemical Engineering Journal, 2004, 101: 151
 - 17 Yu Xiaomei, et al. Sens Actuat A, 2003, 108: 103
 - 18 Liu Y, et al. Anal Chem, 2002, 74(13) : 3 063
 - 19 Liu Y, et al. Anal Chem, 2001, 73(17) : 4 196
 - 20 Yang J, et al. Lab Chip, 2002, 2: 179
 - 21 Liu R H, et al. Anal Chem, 2004, 76(7) : 1 824
 - 22 Giordano B C, et al. Analytical Biochemistry, 2001, 291: 124
 - 23 Zou Q, et al. Sensors and Actuators A, 2002, 102: 114
 - 24 El-Ali J, et al. Sensors and Actuators A, 2004, 110: 3
 - 25 Unger M A, et al. Science, 2000, 288: 113

APPLICATIONS AND RELATED TECHNIQUES OF POLYMER SUBSTRATE MATERIALS IN PCR BIOCHIPS

Zhang Chunsun^{1,2}, Xu Jinliang¹

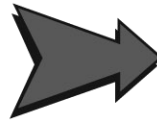
(1. Micro Energy System Laboratory, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. Department of Thermal Science and Energy Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

ABSTRACT Special attention is paid for presenting current applications of polymer substrate materials in polymerase chain reaction (PCR) biochips and their related techniques such as surface passivation for polymer substrate materials, micromachining (compression molding, injection molding and laser ablation etc.) and bonding (oxygen plasma treatment and anodic bonding) for PCR biochips.

KEYWORDS polymer substrate material, polymerase chain reaction, biochip, application

硅酮母粒



高品质塑料加工助剂
优质、低价、取代进口产品

在工程塑料中应用

- 改善工程塑料制品表面性能 (光滑、光亮、无浮纤、易脱模) 及注塑性能 (降低注塑温度、注塑压力)
- 优异的耐高温性: 可用于PA66、PC、PPS等作润滑剂
- 突出的耐磨性: 添加 1% ~ 3% 即可达到传统聚四氟乙烯 (PTFE) 粉5% ~ 10% 的耐磨效果。摩擦系数和磨损大幅度下降

在聚烯烃无卤阻燃电缆料中应用

- 改善加工性能: 极大地降低高填充无卤阻燃聚烯烃电缆料的熔体粘度, 使电缆制品挤出表面更加光滑、平整。挤出扭矩更小。降低加工温度, 减少材料分解
- 是 $Mg(OH)_2$ / $Al(OH)_3$ 的阻燃协效剂。可使氧指数大幅度提高, 降低无机阻燃剂的用量



本公司同时着力于有机硅材料在塑料中的应用和无卤阻燃材料的开发、应用, 各种开口爽滑等功能粒的生产。

成都思立可科技有限公司

通讯地址: 成都市洪河镇北路4号D区10栋407室
电 话: (028) 84631709 84202128
传 真: (028) 84631709

邮编: 610101
热线: 13308066379 13388168449
E-mail: guduyi2000@sina.com