

硅-玻璃聚合酶链式反应微芯片 对 β -葡萄糖苷酸酶基因的扩增*

邹志青 周 天 赵建龙** 徐元森

(中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050)

摘要 聚合酶链式反应 (PCR) 微芯片是基于微机电系统 (MEMS) 制作, 在微芯片上进行 PCR 反应, 实现生物样品扩增的一项新技术. 介绍了硅-玻璃 PCR 微芯片的设计和制作、微反应腔的清洗和表面处理、借助外置温度控制系统进行 PCR 扩增反应以及扩增产物在琼脂糖凝胶电泳下的检测分析, 实现了对 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因的有效扩增, 扩增时间由原来的 90 min 缩短到现在的 37 min.

关键词 PCR 微芯片, MEMS 技术, 表面处理

学科分类号 TP274+.2

近年来, 随着生物芯片技术和各种微系统的发展, 出现了基于微电子机械技术 (MEMS) 的 PCR 微芯片. 由于具有微型、快速、易于多种器件集成等特点, 微芯片已成为 PCR 技术中的热点. PCR 微芯片全称聚合酶链式反应微芯片, 它是运用 MEMS 技术在硅片或玻璃片等基片材料上加工一系列的微管道、微反应室等空间结构以及微阀、微加热器、微感应器等控制结构, 利用芯片集成度高和比表面积大的特性, 实现芯片上的快速 PCR 扩增^[1-5]. 与常规的 PCR 扩增技术相比, PCR 微芯片技术具有快速、高效、试剂消耗少、便于携带、集成密度高等优点, 可广泛用于生命科学、生物技术、疾病检测、临床医学和环境检测等领域, 是近年生命科学领域的研究热点之一.

本文介绍了一种可用于 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因扩增的聚合酶链式反应微芯片 (μ PCR 芯片) 系统. 整个扩增系统由一个基于 MEMS 技术制作的 μ PCR 芯片和一个高效的温度控制系统组成. μ PCR 芯片以硅片和 PYREX 玻璃片为材料, 采用紫外曝光光刻、KOH 湿法腐蚀和硅-玻璃阳极键合等工艺制作. 重复使用的芯片用化学方法清洗, 并用牛血清白蛋白进行表面修饰处理. PCR 扩增对象是 GUS 基因. 芯片在温度控制系统上进行 DNA 扩增反应, 快速 PCR 在 37 min 内完成 24 个循环, 扩增产物用紫外凝胶电泳仪分离分析, 实现了 GUS 基因的快速扩增.

1 实验部分

1.1 硅-玻璃 μ PCR 微池芯片的设计和制作

μ PCR 芯片以硅片和 PYREX 玻璃片为材料,

在硅片上刻蚀微反应池, 在玻璃上制作样品进出口, 硅片和玻璃片用阳极键合的方法结合在一起, 形成密闭的微反应腔. 最初设计的 μ PCR 芯片微池的尺寸为 10.0 mm $\times$ 6.0 mm $\times$ 180 μ m, 体积为 10 μ l (图 1). 由于晶体硅对 PCR 反应有抑制作用, 而氧化硅没有, 因此对微反应池的内壁进行氧化处理^[1]. 氧化硅具有亲水性, 这种结构在进样和取样的时候很容易产生气泡, 存在较大的死体积, 实验发现 10 μ l 样品扩增后往往只能取出 2 ~ 4 μ l. 为了减少死体积, 便于样品的进出, 而且又

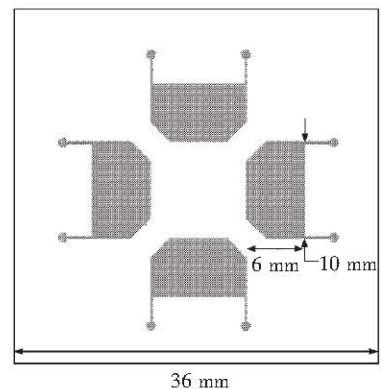


Fig. 1 Schematic photo-mask of a μ PCR chip

The dimensions of the micro-chambers were 10.0 mm $\times$ 6.0 mm $\times$ 180 μ m, with the volume 10 μ l. The chip in the figure was consisted of four micro-chambers.

* 中国科学院生物科学与生物技术研究特别支持费 (STZ-00-03) 和中国科学院知识创新工程项目 (KSCX-06).

** 通讯联系人.

Tel: 021-62511070-8709, Fax: 021-62511070-8714

E-mail: jilzhao@mail.sim.ac.cn

收稿日期: 2003-05-30, 接受日期: 2003-07-25

不改变微池体积，优化设计中将微池设计成具有较大长宽比的长方体，共设计了两种不同宽度的微反应池：一种微池的尺寸为 $20.0\text{ mm} \times 2.4\text{ mm} \times 170\text{ }\mu\text{m}$ ，体积为 $8.0\text{ }\mu\text{l}$ ；另一种微池的尺寸为

$60.0\text{ mm} \times 0.8\text{ mm} \times 200\text{ }\mu\text{m}$ ，体积为 $10\text{ }\mu\text{l}$ 。实验发现：优化设计后的微池较好地解决了死体积的问题。图 1、2 显示了设计的三种不同结构的芯片示意图，每个芯片上设计了四个独立的微反应腔。

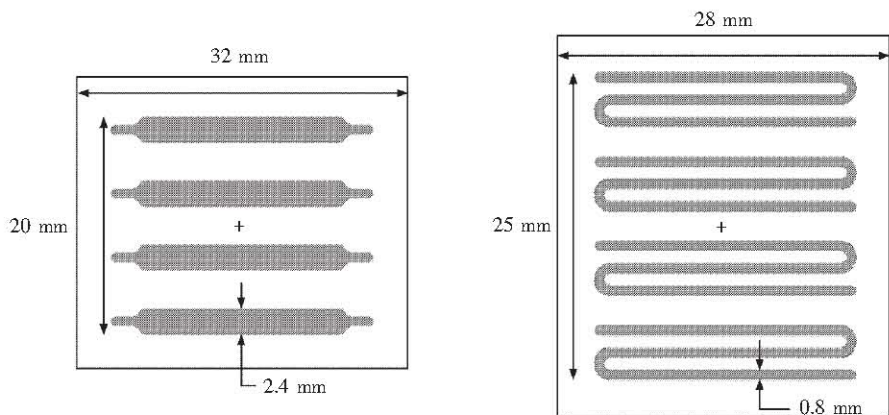


Fig. 2 Schematic photo-mask of improved μPCR chips

The dimensions of the micro-chambers on the left were $20.0\text{ mm} \times 2.4\text{ mm} \times 170\text{ }\mu\text{m}$, with the volume $8\text{ }\mu\text{l}$. The dimensions of the micro-chambers on the right were $60.0\text{ mm} \times 0.8\text{ mm} \times 200\text{ }\mu\text{m}$, with the volume $10\text{ }\mu\text{l}$.

微反应腔的制作采用微机电加工技术，主要包括紫外曝光光刻、KOH 湿法腐蚀、机械打孔和阳极键合等工艺。首先，2 英寸硅片用热氧化的方法形成厚度为 $1\text{ }\mu\text{m}$ 的氧化层。然后，用紫外曝光光刻和 HF 腐蚀体系在氧化层上形成微池的图形。然后，用 KOH 各相异性湿法腐蚀的方法在硅片上腐

蚀深度为 $200\text{ }\mu\text{m}$ 的微池。PYREX 玻璃用机械打孔的方法在对应位置制作直径为 0.8 mm 的进出样孔。最后，上下玻璃-硅片图形对准，在 400°C 、 800 V 电压下用阳极键合的方法将玻璃-硅结合在一起，形成密闭的微反应腔。微反应腔的内壁用自然氧化的方法形成氧化层。

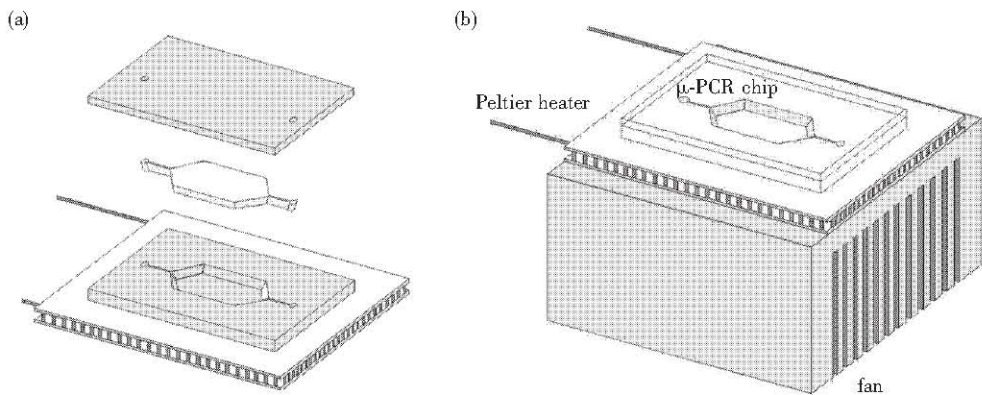


Fig. 3 Schematic 3D structure of the μPCR chip

(a) Schematic 3D structure of the μPCR chip. The μPCR chip was fabricated on silicon wafer and PYREX glass using photolithography, wet etching, and anodic bonding methods. (b) Refined design of the thermal module with the improved μPCR chip system.

1.2 温度控制系统

温度控制系统（与杭州朗基科学仪器有限公司合作设计制作）主要采用了更加直接有效的加

热平台，适合芯片的固定和温度控制，采用程序控制的方法，满足 PCR 扩增的要求。温度控制系统的最大升温速度为 3°C/s ，最大降温速度为 2°C/s ，

温度控制的精度为 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。为了测定芯片微反应池内的准确温度,用 Pt100/万用表检测程序控制下芯片上的温度变化情况(图 4)。结果表明,芯片上每个温度区间的温度准确度为 $\pm 1^{\circ}\text{C}$, 适合 PCR 扩增的要求。

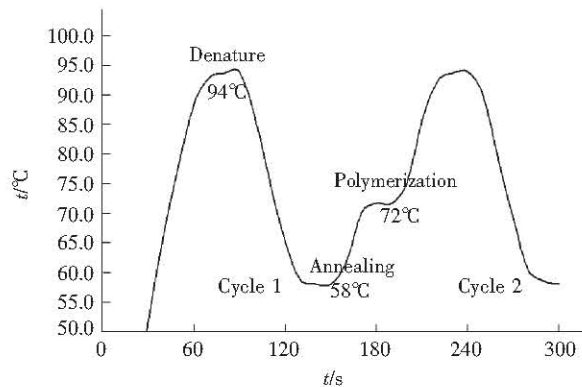


Fig. 4 Thermal cycle profiles of the μPCR system for GUS

1.3 PCR 微芯片的清洗和表面处理

由于 PCR 微芯片的体积小、比表面积大,对扩增体系的要求严格,因此需要对芯片微池进行充分的清洗。另外,重复使用的微芯片扩增剩余产物和密封用的石蜡油,会吸附在芯片内壁影响下一次扩增的性能,因此这些污染物也必须清洗干净。清洗过程先用有机溶剂洗脱石蜡油等有机杂质,然后用强酸混合物洗脱扩增剩余产物,最后用大量去离子水冲洗干净,并烘干。

微池比表面积的增加,微池内壁对扩增试剂的吸附严重影响了 DNA 扩增效率。为了减少试剂的吸附,尤其是对蛋白酶的吸附,用稀释的牛血清白蛋白(BSA)处理微池的内壁,对内壁进行封阻。

1.4 GUS DNA 样品的准备

GUS 基因所编码的酶为 β -葡糖苷酸酶, GUS 基因是用于禾谷类作物转化研究中最普遍的报告基因,在组织化学分析中应用这个标记基因,可以判断嵌合基因在不同细胞类型、器官和发育阶段。模板是质粒 pCAMBIA1301 (11.8 kb, 安徽省农业科学院提供), GUS 基因对应的引物对是 Primer5'-GGT CAG TGG CAG TGA AGG G-3'和 Primer5'-AGC GTC GCA GAA CAT TAC AT-3' (扩增 DNA 长度为 539 bp, 由上海华美生物工程公司合成)。100 μl PCR 扩增体系含有 10 μl 的 10 $\times$ 缓冲液, 2 $\times$

0.6 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 1.25 mmol/L MgCl_2 , 0.2% BSA 以及 8U Takara 聚合酶。

1.5 PCR 扩增和扩增结果的检测

配制好的 PCR 扩增体系由进样口小心加入微池,进出样口用石蜡油密封。芯片固定在温度控制系统的加热平台上,在设定的温度控制程序下进行扩增反应。扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳,用紫外凝胶成像仪分析结果。

2 结果与讨论

芯片上的 PCR 扩增与传统的 PCR 扩增不同。一方面,硅材料有良好的导热性能,有利于微反应池内样品的温度分布均匀;另一方面,由于体积的缩小,芯片的比表面积比较大,表面作用更为明显,表面清洗和表面修饰处理显得更为重要。另外,不同的芯片结构对扩增效率也有较大的影响。下面将分别讨论。

2.1 表面处理对扩增效率的影响

BSA 似乎能最有效地防止聚合酶在芯片内表面变性,并且 BSA 能有效封阻微反应腔内壁对试剂的吸附。不同 BSA 浓度的表面处理对扩增效率有很大影响。用质量百分比浓度分别为 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0% 的 BSA 处理同一块芯片的四个不同微反应腔内壁。扩增结果表明(图 5),当不用或者用低浓度(0.05%)的 BSA 处理内表面时,芯片扩增无效,当用浓度为 0.1% 或以上的 BSA 处理内表面时,芯片扩增有效,并且扩增效率与 BSA 浓度有关,更高 BSA 浓度处理芯片在操作

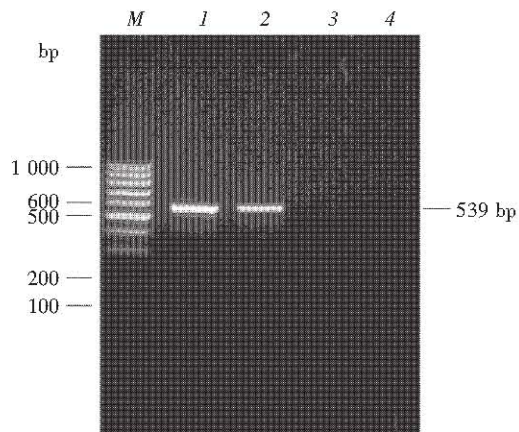


Fig. 5 Comparison of separation results in slab gel of GUS prepared with different concentration of BSA

Products 1 ~ 4 were amplified in μ -chambers prepared with BSA 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0% respectively.

上比较困难, 所以不能确定高 BSA 浓度对扩增效率的影响. 但在一定的浓度范围内, 提高 BSA 的浓度可以促进芯片上 GUS 基因的扩增.

2.2 不同酶量对扩增效率的影响

内壁对聚合酶有吸附作用, 虽经 BSA 内壁封阻处理后, 吸附现象已经大大减少, 但在 PCR 扩增体系中加大酶量对扩增效率也有明显的影响. 在同一

块芯片的四个不同微反应腔内加入不同的酶量, 使 PCR mix 中的酶含量分别是 0.067, 0.133, 0.200 和 0.333 U/ μ l. 扩增结果对比发现 (图 6), 加入 0.067 U/ μ l 酶的扩增效率较低, 加入 0.133 U/ μ l 酶的扩增效率较高, 并且与加入 0.200 U/ μ l 和 0.333 U/ μ l 酶的扩增效率相当. 这是因为, 虽然内壁经过了一定的表面修饰处理, 但是内壁对酶或者其他成分仍有一定的吸附或者抑制其活性, 因此, 在吸附饱和前, 适当加大酶量, 可以增加酶的活性, 但当达到饱和吸附后, 增加酶量对提高扩增效率已没有显著效果.

2.3 不同的芯片深度对扩增效率的影响

提高芯片的升降温度速度和热平衡速度, 可以提高芯片的扩增效率.

根据集中热电容模型^[6], 材料的散热时间与特征时间 t_d 有关^[7]. t_d 小, 则传热速度快, 易于达到温度平衡. 因此, 要提高样品的热平衡速度, 以及温度的均匀性, 关键要缩短 t_d .

$$t_d = \frac{L^2}{D}$$

(1)

其中 $D = \frac{\lambda}{\rho C}$, D 为热扩散系数, λ 为热导系数, ρ 为密度, C 为热容, L 为一维传热距离 (即微池深度)^[7].

Fig. 6 Comparison of separation results in slab gel of GUS using different concentration of polymerase
Products 1~4 were amplified in chip with polymerase 0.067, 0.133, 0.200, 0.333 U/ μ l respectively.

Table 1 Diffusion coefficients and thermal delays of different materials ^[7]					
	$\lambda / (\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$C / (10^3 \cdot \text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$D / (\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	L / mm	t_d / s
Silicon	150	0.7	9.2×10^{-5}	4	0.17
Plastic (PET)	0.2	1.2	1.2×10^{-7}	0.2	0.33
Sample (water)	0.65	4.182	1.5×10^{-7}	2	26
				0.4	1.0
PYREX Glass	1.13	0.753		0.5	

根据公式 (1) 和表 1, 硅片的热传导性能很好, 即使 1 mm 厚度的硅片, 达到温度平衡的特征时间只需要 0.04 s. 常规 PCR 扩增用的塑料管厚度为 0.2 mm, 达到温度平衡的特征时间是 0.33 s. 此外, 塑料管中的样品呈锥形, 热传导距离 L 比较长, 对于 10 μ l 样品, 热平衡的特征时间是 11.5 s, 对于 25 μ l 样品, 热平衡的特征时间是 21.2 s^[7]. 而在 PCR 微芯片中, 由于微池的深度均匀, 通常在 0.1 ~ 0.4 μ m, 达到热平衡的特征时间小于 1 s.

所以, 与常规的塑料管相比, PCR 微芯片选择合适的材料和合适的微池结构, 可以大大缩短样品热平衡的时间, 提高样品内部的温度均匀性.

根据公式 (1), 微池深度对样品内部热平衡有很大影响. 图 7 中 1、2 号产物对应的微反应腔的深度分别是 121 μ m、191 μ m. 理论计算得: $t_{d1} / t_{d2} = 1/2.5$. 1 号对应的热延迟时间短, 热平衡性能比 2 号高, 因此, 1 号产物对应的微反应腔的扩增效率比 2 号高.

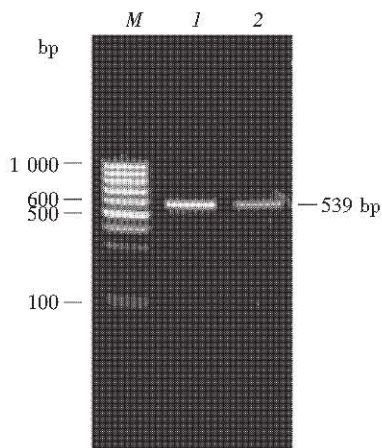


Fig. 7 Comparison of separation results in slab gel of GUS with different deep of μ -chambers

Product 1 was amplified in a μ -chamber with deep 121 μm ;
Product 2 was amplified in a μ -chamber with deep 191 μm .

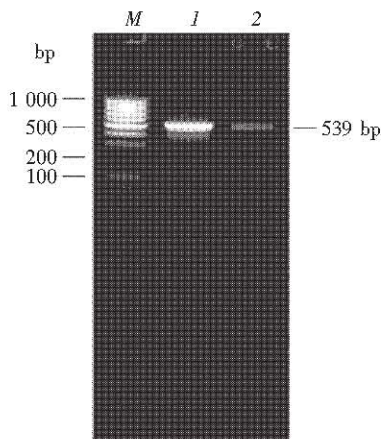


Fig. 8 Comparison of separation results in slab gel of GUS amplified with rapid PCR

Product 1 was amplified in tube; Product 2 was amplified in chip.

2.4 快速 PCR 扩增

扩增 GUS 基因常规 PCR 扩增耗时约 90 min. 由于硅-玻璃 PCR 芯片导热快、热容小、比表面积高, 有利于在芯片上实现快速 PCR 反应. 因此, 采用二步扩增法, 减少停留时间, 大大缩短了芯片上 DNA 的扩增时间, 程序如下:

94 $^{\circ}\text{C}$ 3.5 min

12cycles { 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s
64 $^{\circ}\text{C}$ 10 s

12cycles { 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s
64 $^{\circ}\text{C}$ 15 s

72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min

而原来的扩增程序是:

94 $^{\circ}\text{C}$ 3.5 min

30cycles { 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s
58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s
72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s

72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min

用修改后的程序扩增发现, 整个扩增时间由原来的 90 min 缩短到现在的 37 min. 电泳结果见图 8, 1 号对应塑料管产物, 2 号对应芯片产物. 芯片上扩增产物的特异性很好, 但信号较弱, 这是由于温度控制系统的温度控制性能不高引起的. 改善温度控制性能, 或者直接在芯片上集成微加热器和温度传感器, 可以提高快速 PCR 扩增效率.

3 总 结

采用 MEMS 技术设计和制作了硅-玻璃 PCR 微芯片, 利用温度控制系统进行温度控制下的 PCR 扩增, 用紫外凝胶成像仪进行分离分析, 成功实现了 GUS 基因模版在硅-玻璃 PCR 微芯片上有效扩增. 另外通过对比扩增分析发现: 在一定的范围内, 提高 BSA 表面处理试剂的浓度可以促进芯片上 GUS 基因的扩增; 芯片上适当加大酶量可以提高芯片 PCR 的扩增效率; 提高芯片内壁的比表面积可以提高芯片的扩增效率. 另外, 做了一部分提高芯片上 PCR 扩增速度的尝试, 将扩增时间从常规的 90 min 缩短到现在的 37 min.

提高芯片上的扩增效率, 缩小扩增体系的体积, 缩短 PCR 扩增的时间, 进行大批量样品的扩增分析, PCR 微芯片将在生命研究和疾病诊断方面发挥更大的作用. PCR 微芯片有着传统 PCR 扩增无可比拟的优点, 它将革命性地促进 PCR 扩增技术和微全分析系统技术的发展.

参 考 文 献

- 1 Northrup M A, Ching M T, White R M, *et al.* DNA amplification in a microfabricated reaction chamber. In: IEEE Electron Devices Society, eds. Proceedings of the 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators (transducers'93). Yokohama, Japan, 1993. Yokohama: Institute of Electrical Engineers of Japan, 1993. 924 ~ 926
- 2 Lin Y C, Huang M Y, Young K C, *et al.* A rapid micro-polymerase chain reaction system for hepatitis C virus amplification. Sensors and Actuators B, 2000, 71 (1 ~ 2): 127 ~ 133

- 3 Lin Y C, Yang C C, Huang M Y. Simulation and experimental validation of micro polymerase chain reaction chips. *Sensors and Actuators B*, 2000, **71** (1 ~2): 2 ~8
- 4 Kopp M U, de Mello A J, Manz A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. *Science*, 1998, **280** (5366): 1046 ~1048
- 5 Schneegaß I, Köhler J M. Flow-through polymerase chain reaction in chip thermocyclers. *Rev Mol Biotech*, 2001, **82** (2): 101 ~121
- 6 Daniel J H, Iqbal S, Millington R B, *et al.* Silicon microchambers for DNA amplification. *Sensors Actuators A*, 1998, **71** (1 ~2): 81 ~88
- 7 Zou Q B, Miao Y B, Chen Y, *et al.* Micro-assembled multi-chamber thermal cyclers for low-cost reaction chip thermal multiplexing. *Sensors Actuators A*, 2002, **102** (1 ~2): 114 ~121

A Silicon-glass Micro-polymerase Chain Reaction Chip for GUS Gene Amplification *

ZOU Zhi-Qing, ZHOU Tian, ZHAO Jian-Long **, XU Yuan-Sen

(Shanghai Institute of Micro-system and Information Technology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

Abstract A micro-polymerase chain reaction chip fabricated by MEMS technology, was successfully used to amplify the DNA molecule of GUS gene. Kinds of micro-chamber PCR chip were designed and fabricated. The surface of the chamber was washed and prepared using a special method. Sample amplification was performed with thermal cycling system. The GUS gene amplified in chip was analyzed by slab gel electrophoresis with separation of DNA markers in parallel. The polymerase chain reaction was successfully performed in chip. The rapid PCR was completed in 37 min for 24 cycles. The thermal cycle time in chip was reduced to 1/2 with a commercial PCR instrument.

Key words μ -PCR chip, MEMS technology, surface preparing

* This work was supported by grants from The Special Support Fee for Biological Science and Technology Research of CAS (STZ-00-03) and The Knowledge Innovation Program of CAS (KSCX-06).

** Corresponding author. Tel: 86-21-62511070-8709, Fax: 86-21-62511070-8714, E-mail: jlzhao@mail.sim.ac.cn

Received: May 30, 2003 Accepted: July 25, 2003