

基于低成本聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)电泳芯片的微型 DNA 分析仪 *

杨 茜^{1,2)} 熊 强^{1,2)} 姜成涛³⁾ 李彩霞³⁾ 孙爱梅⁴⁾ KEITH MITCHELSON^{1,4)}
 邢婉丽^{1,2)} 叶 健^{3,5)**} 程 京^{1,2)**}

(¹⁾清华大学医学系统生物学研究中心, 北京 100084; (²⁾生物芯片北京国家工程研究中心, 北京 102206;

(³⁾公安部物证鉴定中心, 北京 100038; (⁴⁾博奥生物有限公司, 北京 102206; (⁵⁾中国人民公安大学研究生部, 北京 100083)

摘要 在低成本的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)电泳芯片上, 利用双通道共聚焦激光诱导荧光检测系统实现了单链 DNA 快速高效的分离检测. 选用 0.8 mm 厚度的 PMMA 薄片加工微管道, 一方面降低了检测限, 另一方面提高了散热性能. 通过线性聚丙烯酰胺筛分胶液以及使用纤维素衍生物对微管道表面进行动态修饰等条件的优化, 芯片完成了高分辨率、高重现性的短串联重复序列(STR)等位基因的快速分型检测. 两个 STR 位点 D13S317 和 CSF1PO 的等位基因分型标准物(allelic ladder)和实际样本的 PCR 扩增产物均在 3 min 内达到了基线分离, 表明低成本的 PMMA 电泳芯片在法医学及临床医学领域的基因分析方面具有良好的发展潜能.

关键词 聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)芯片, 双通道共聚焦激光诱导荧光检测, 背景荧光, 短串联重复序列(STR)分析

学科分类号 Q595, O65

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00165

短串联重复序列(short tandem repeats, STRs)是一类遍布于整个基因组的具有长度多态性的短片段重复 DNA 序列, 通常每个 STR 位点的重复单位为 2~6 bp. 利用 STR 位点高度保守、家族遗传、分布广泛、易于检测等特性, STR 分析已被广泛应用于法医物证检验中的个体识别、亲子鉴定等方面^[1,2]. 目前, STR 分析的常规方法是首先使用 PCR 技术扩增待测实际个体的多个 STR 位点, 然后通过毛细管电泳技术分离实际个体 STR 位点并与 STR 等位基因分型标准物的长度进行比对, 确定各个 STR 位点的重复数从而判定其基因型^[3,4].

自 20 世纪 90 年代 Manz 等^[5]提出“微全分析系统”(micro-total analysis systems, μ -TAS)的概念以来, 芯片毛细管电泳(chip-based capillary electrophoresis, chip CE)已经成为该领域发展最为迅猛的一个分支, 它具有分析速度快、样品消耗量少、便于集成化、微型化等诸多优点, 特别适于法医和临床方面对于 DNA 小片段(<400 bp)的快速高效分离. Schmalzing 等^[6]首先利用熔融石英电泳芯片, 在 2 min 内完成了 4 个人类 STR 等位基因位点的快速分析. Yeung 等^[7]在 96 通道的阵列毛细管

玻璃电泳芯片上使用四光路的检测器实现了 16 个人类 STR 等位基因位点的同步检测. Shi 等^[8]在聚丙烯芯片上基于 4.5 cm 长的分离管道分析了与 Schmalzing 等相同的 4 个 STR 位点. Qin 等^[9]使用 PMMA 电泳芯片在 4 min 内对东方人参与西洋参的两个 STR 位点进行快速检测, 不仅可以区分人参与西洋参而且可以区分野生型西洋参和人工种植的西洋参.

本研究首先对以聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)为材料加工的高质量低成本毛细管电泳芯片, 进行了微管道表面修饰和筛分胶液等条件的优化, 大幅提高了芯片分离单链 DNA 的分辨率. 然后进一步选取了法医学鉴定中两个常见的 STR 位点 D13S317 和 CSF1PO, 利用优化后的 PMMA 芯片进行分型检测, 在 3 min 内快速分离了碱基长度相差 4 bp,

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2006AA020701).

** 通讯联系人.

叶健. Tel: 010-63434093, E-mail: yejian77@126.com

程京. Tel: 010-62772239, E-mail: jcheng@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2008-05-18, 接受日期: 2008-12-30

总长度 ≤ 357 bp 的单链 DNA 片段, 表明基于 PMMA 芯片的毛细管电泳技术在低成本 STR 检测方面极具潜力。

1 实验与方法

1.1 试剂

STR 位点 D13S317 和 CSF1PO 的等位基因分型标准物由公安部物证鉴定中心提供。纯化探针由 Invitrogen 公司合成。Cy5-dCTP 和 Cy3-dCTP 购于 Amersham Biosciences 公司。羟丙基纤维素(HPC, 平均相对分子质量 100 000) 购于 Acros Organics 公司, 甲基纤维素(MC, 20℃ 2%水溶液的黏度为 4 000 cp)和羟丙基甲基纤维素 (HPMC, 20℃ 2%水溶液的黏度为 3 500~5 600 cp) 购于 Sigma 公司。0.5×TBE 缓冲液含 45 mmol/L Tris, 45 mmol/L 硼酸, 1 mmol/L EDTA, pH 7.8。0.5×TTE 缓冲液含 25 mmol/L Tris, 25 mmol/L TAPS, 1 mmol/L EDTA, pH 7.8。丙烯酰胺, 尿素, 过硫酸铵和四甲基乙二胺等均购于 Sigma 公司。其余试剂均为分析纯。试剂全部使用 18.2 MΩ 去离子水配制。

1.2 PMMA 芯片加工

PMMA 芯片由大连理工大学精密与特种加工教育部重点实验室采用 UV-LIGA-电铸, 热压, 热键合等工艺加工成型^[10, 11]。如图 1a 所示, 芯片采用十字交叉型设计, 4 根微管道末端均连接有直径为 2 mm 的储液池。图 1b 是偏移量为 120 μm 的双 T 型进样口的局部扫描电镜照片, 可以看出微管道加工质量较高, 管道壁面平整光滑。

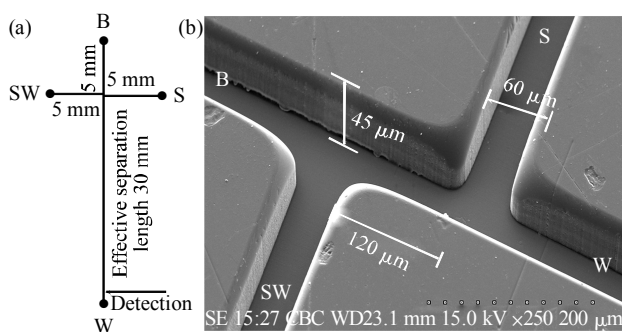


Fig. 1 Design of the single-channel PMMA chip(a) and scanning electron microscope image of the twin-T injector of the PMMA chip (b)

B, S, W and SW denote reservoirs for buffer, sample, waste and sample waste, respectively.

1.3 筛分胶液

根据文献[12], 首先在 0℃ 条件下用含有

7 mol/L 脲的 0.5×TTE 缓冲液配制 20 ml 6%丙烯酰胺溶液, 并在高纯氮气环境中静置 1 h 去除氧气。然后加入 20 μl 10% 过硫酸铵和 20 μl 10%四甲基乙二胺触发聚合反应, 同时磁力搅拌 8 h 使丙烯酰胺充分聚合形成线性聚丙烯酰胺原液。实验中使用此原液与含有 7 mol/L 脲的 0.5×TTE 缓冲溶液以适当比例混合配制所需浓度不同的线性聚丙烯酰胺溶液。

1.4 管道表面修饰

实验中分别选取了 3 种纤维素衍生物, 甲基纤维素(MC), 羟丙基纤维素(HPC)和羟丙基甲基纤维素(HPMC)对芯片微管道表面进行修饰。修饰方式分为动态修饰和吸附修饰两种, 其中动态修饰是直接使用分别掺入 0.5%的各种纤维素衍生物水溶液的线性聚丙烯酰胺作为电泳筛分胶液, 吸附修饰则是在电泳之前使用 1%的各纤维素衍生物水溶液填充微管道并静置 5 h 后用氮气推出, 用去离子水冲洗去除未被吸附的纤维素衍生物后吹干待用, 而电泳时仅使用未掺入纤维素衍生物的线性聚丙烯酰胺作为筛分胶液。

1.5 芯片毛细管电泳

芯片毛细管电泳实验采用夹流进样方式。进样时, 在样品池(S)和样品废液池(SW)之间的进样管道上施加 250 V/cm 的进样场强, 同时分别在缓冲液池(B)和废液池(W)之间施加 100 V/cm 的夹流场强, 从而在双 T 进样口处形成一段体积固定的样品柱。分离时, 在缓冲液池和废液池之间的分离管道上施加 250 V/cm 的分离场强, 同时分别在样品池和样品废液池施加 100 V/cm 的回流场强防止多余样品泄漏至分离管道中。电泳信号通过自行搭建的基于激光诱导荧光检测原理的共聚焦芯片毛细管电泳检测系统, 同时进行双通道采集(Cy5 通道: 632 nm 激发, 670 nm 采集; JOE 通道: 532 nm 激发, 570 nm 采集)^[13]。在检测 PMMA 芯片基本特性(荧光背景、检测限、分离重现性)实验和 STR 分型实验中, 分别选用了溶于 0.5×TBE 的 0.5% MC 溶液和溶于含有 7 mol/L 脲, 0.5×TTE 的 4%线性聚丙烯酰胺溶液作为筛分胶液。

1.6 STR 人源实际样品

基因组 DNA 样品由公安部物证鉴定中心提供。PCR 反应体系为 25 μl, 含 0.2 mmol/L dNTPs, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 1.5 U Taq DNA 聚合酶(宝生物工程(大连)有限公司), 0.2 μmol/L 引物和 50 ng 基

基因组 DNA. 引物序列见表 1. PCR 反应在 PTC-225 Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA) 中完成, 程序为 95℃ 3 min, 94℃ 30 s, 68 s, 60℃ 30 s, 50 s, 70℃ 45 s, 循环 10 次; 90℃ 30 s, 60 s, 60℃ 30 s, 50 s, 70℃ 45 s, 循环 22 次; 60℃ 30 min 后 4℃ 保存. PCR 产物通过 NucleoSpin® Extract II kit (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) 去盐纯化. 芯片毛细管电泳检测之前将 PCR 产物 (2.5 μ l), 等位基因分型标准物 (2.5 μ l), 5 μ l 50% 的甲酰胺溶液混合, 95℃ 变性 2 min, 迅速冰上冷却备用.

Table 1 The primers used to amplify STR loci

Locus	Primer name	Primer sequence(5'→3')
CSFIPO ¹⁾	CSFIPO-F	Cy5-CCGGAGGTAAAGGTGTCTTAAAGT
	CSFIPO-R	ATTTCTGTGTCTCAGACCCCTGTT
D13S317 ²⁾	D13S317-F	ATTACAGAAGTCTGGGATGTGGAGGA
	D13S317-R	Cy5-GGCAGCCCAAAAAGACAGA
CSFIPO ³⁾	CSFIPO-F	Cy5-CCGGAGGTAAAGGTGTCTTAAAGT
	CSFIPO-R	ACCACCTGTGTCTCAGTTTTC

^{1,2)} Primer sequences were the same as those used in preparing allelic ladders, and were used to produce PCR products for STR genotyping.

³⁾ Primers were used to produce PCR fragments for optimization of electrophoresis.

2 结果与讨论

2.1 PMMA 芯片的基本特性

2.1.1 背景荧光. 芯片材料的背景荧光是影响芯片检测限的重要因素, 而聚合物材料成分复杂, 所以在挑选加工芯片的聚合物材料时应首先考察其背景荧光特性. 通过对 Pyrex 玻璃, 石英玻璃, 钠钙玻璃, PDMS, COP 以及 PMMA 等诸多芯片加工材料的测试, 我们发现, PMMA 具有与石英玻璃、Pyrex 玻璃相当的低于其他材料的背景荧光, 同时与 PDMS 相比具有更短的光漂白时间和更稳定的背景荧光波动. 这些优良的特性表明, 我们的芯片所采用的 PMMA 材料比传统的芯片材料更适于高性能荧光标记的 DNA 分型检测. 同时, 我们还发现, 不同厂商生产的 PMMA 材料的背景荧光特性存在差异, 所以在芯片加工之前需要仔细选取低背景荧光的材料.

2.1.2 检测限. 使用 40 pmol/L Cy5-dCTP 和 200 pmol/L Cy3-dCTP 的混合水溶液测定 Cy5 和 JOE 通道的检测限, 得到 Cy5-dCTP 和 Cy3-dCTP 的信噪比分别为 30 和 21. 若以信噪比大于 3 作为有效信号的判断标准, 则 Cy5-dCTP 和 Cy3-dCTP

的实际检测限可分别低至 4 pmol/L 和 30 pmol/L. 使用同一检测系统在 PDMS 和石英片贴合芯片上分析相同的 40 pmol/L Cy5-dCTP 时信噪比为 7^[13], 可以看出 PMMA 材料制作的芯片具有更高的检测限.

2.1.3 重现性. 分别计算溶于水和 0.5×TBE 缓冲液的 Cy5-dCTP 和 Cy3-dCTP 连续进样后迁移时间和峰高的标准偏差, 用以表征 PMMA 芯片的重现性. 溶于水的样品具有明显的场放大效应, 峰高随进样次数的增加明显降低. 而溶于缓冲液的样品表现出更好的峰高重现性. 当将 Cy3 通道的 Cy3-dCTP 信号作为内标归一化 Cy5 通道的 Cy5-dCTP 信号后, 溶于水和缓冲液的样品均获得了良好的峰高和迁移时间重现性(表 2). 此结果表明在 PMMA 芯片上可以通过不同荧光标记的等位基因分型标准物, 归一化实际样品并得到精确的基因分型结果.

Table 2 Reproducibility before and after normalization

Sample	RSD before normalization		RSD after normalization	
	t_m ³⁾	Peak height	t_m ³⁾	Peak height
Cy5dCTP ¹⁾	1.72%	42.6%	0.05%	4.23%
Cy3dCTP ¹⁾	1.68%	42.9%	Standard	Standard
Cy5dCTP ²⁾	0.60%	5.04%	0.11%	4.49%
Cy3dCTP ²⁾	0.68%	5.19%	Standard	Standard

¹⁾ Sample contained 4 nmol/L Cy3-dCTP and 1 nmol/L Cy5-dCTP dissolved in water, $n=16$. ²⁾ Sample contained 8 nmol/L Cy3-dCTP and 1.6 nmol/L Cy5-dCTP dissolved in 0.5×TBE, $n=9$. ³⁾ t_m denotes migration time. The effective separation length was 1 cm and the separation field was 250 V/cm.

2.2 STR 分析

2.2.1 条件优化.

当在不含有脲的非变性胶(4% LPA, 0.5×TTE)中进行电泳时, 各电泳峰出现明显不对称的前伸部分. 而当换用含有脲的变性胶(4% LPA, 7 mol/L 脲, 0.5×TTE)时前伸部分基本消失, 峰型正常, 可能是在含有脲的变性环境中, 已经变性的单链 DNA 样品的复性过程受到抑制, 从而降低了复性双链 DNA 对峰型的干扰, 所以在后续实验中均选择在含有脲的变性胶中进行电泳.

为了改善微管道表面不稳定的理化性质避免单链 DNA 样品的非特异性吸附, 实验中比较了 3 种纤维素衍生物的动态和吸附 2 种表面修饰方法的效果. 尽管动态和吸附修饰都降低了 DNA 样品的特异性吸附, 使基线更平稳, 峰型更尖锐, 但动态修

饰后的分辨率并没有得到提升,而在电泳前进行的吸附修饰却得到了比较好的分离效果. 其中 MC 和 HPMC 在分辨率和重现性方面的表现均优于 HPC, 此外, MC 本身还具有很强的预防电泳峰拖尾的能力, 所以我们决定对 PMMA 芯片表面用 MC 吸附法进行修饰.

最后考察 LPA 浓度对电泳的影响. 一般而言, 筛分胶液的浓度越高, 小片段 DNA 的分辨率越高, 但同时浓度的升高将导致筛分胶液黏稠度的上升, 不仅会延长分离所需的时间还会增加填充微管道的难度, 所以必须均衡分辨率和易操作性的需

求. 我们分别尝试了 1%, 2%, 3%, 4% LPA 的 4 个浓度, 分辨率随着浓度增高大幅提升. 最终我们选择了 4% LPA, 一方面它可以满足 DNA 样品基线分离的要求, 另一方面在 PMMA 芯片中填充更高浓度的筛分胶液比较困难.

经过上述筛分胶液和表面修饰等条件的优化, 我们在 3 min 之内完成了长度相差 4 bp、总长度小于 350 bp 的 DNA 片段在 PMMA 芯片微管道中的分离和检测(图 2a), 同时达到 10 次连续进样中迁移时间相对标准偏差小于 0.23%的高重现性(图 2b, 表 3).

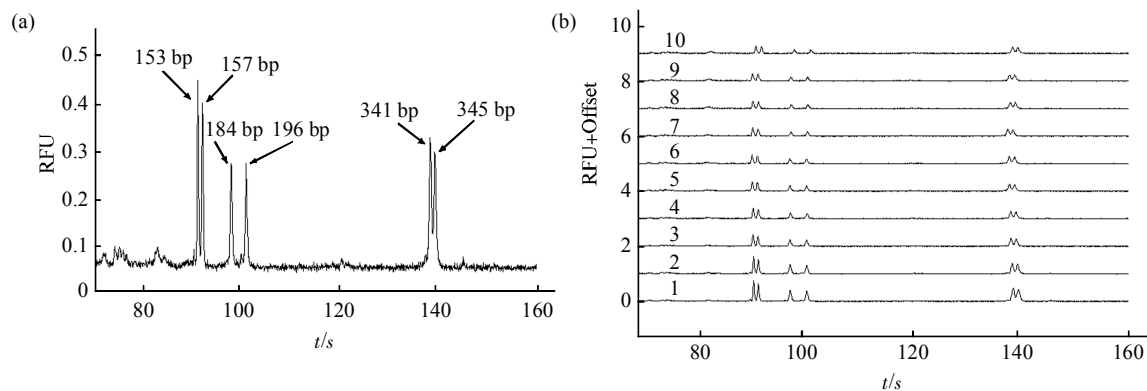


Fig. 2 Electropherogram of 6 denatured PCR fragments from STR loci of D13S317 and CSF1PO
(a) Representative electropherogram. (b) Electropherograms of 10 sequential runs. The PMMA chip was coated with aqueous solution of 1% MC prior to the run. The sieving matrix contained 4% LPA and 7 mol/L urea dissolved in 0.5×TTE.

Table 3 Reproducibility of PMMA chips with an adsorptive coating

Species	153 bp	157 bp	184 bp	196 bp	341 bp	345 bp
RSD of t_m	0.2%	0.2%	0.25%	0.23%	0.2%	0.2%

Data were calculated from Figure 2b, $n=10$.

2.2.2 STR 分型检测

经过电泳条件的各项优化, 我们选取 D13S317 和 CSF1PO 两个 STR 基因位点进行 PMMA 芯片上的分型实验. D13S317 和 CSF1PO 位点等位基因分

型标准物的 DNA 片段长度分别分布在 176~208 bp, 321~357 bp 内, 重复单位均为 4 bp. 图 3 即展示了 Cy5 标记的 D13S317 和 CSF1PO 位点等位基因分型标准物与 JOE 标记的实际样品 PCR 扩增产物的同步电泳图. 图 3 中, 上方数据采自 Cy5 通道, 为 D13S317 和 CSF1PO 位点等位基因分型标准物的电泳结果, 下方数据采自 JOE 通道, 为实际样品 PCR 扩增产物的电泳结果, 通过上下两图的比对可以直观地判定实际样品的分型结果.

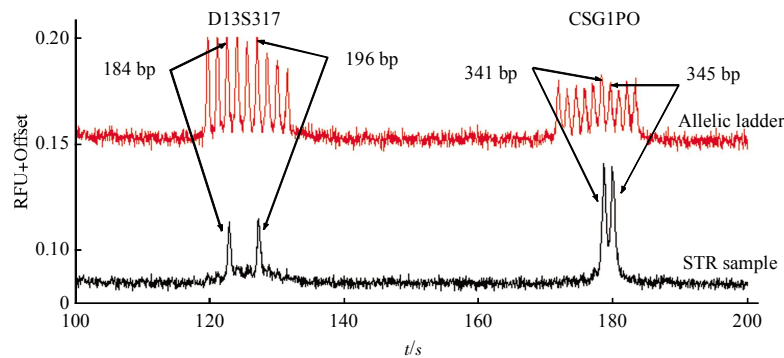


Fig. 3 Two-loci STR typing of an individual based on the PMMA chip
The upper electropherogram trace is the Cy3 channel (allelic ladder) and the lower trace is the Cy5 channel (PCR products of an individual). The sample contained a denatured mixture of PCR products from the individual and the allelic ladder. The effective separation length was 3 cm and the separation field was 200 V/cm.

Schmalzing 等^[6]达到的最高分辨率为碱基长度相差 4 bp, 总长度 ≤ 357 bp 的 CSF1PO 位点单链 DNA 片段的分离, 尽管分析速度很快, 但芯片制作和修饰过程复杂费时, 成本较高. Yeung 等^[7]和 Shi 等^[8]的工作中除芯片成本较高之外, 对于相同的 CSF1PO 位点的分析时间均超过了 10 min, 虽然比使用普通商用毛细管电泳仪缩短了时间, 但费时的确不算少. Qin 等^[9]选取了低成本的 PMMA 芯片, 由于使用低黏度的 HPMC 作为筛分介质分离双链 DNA 片段, 其最高分辨率仅为碱基长度相差 6 bp, 总长度 ≤ 239 bp 的人参 STR 位点双链 DNA 片段的分离. 为了实现快速高效低成本的芯片毛细管电泳检测, 提高其在 STR 检测领域的实用性, 我们同样选取了低成本的 PMMA 芯片, 通过纤维素衍生物对微管道表面的动态修饰以及筛分胶液成分和浓度等条件的优化, 提高了芯片分离单链 DNA 片段的分辨率, 在 3 min 内完成了碱基长度相差 4 bp, 总长度 ≤ 357 bp 的 CSF1PO 位点单链 DNA 片段的快速高效分离及双光路检测.

此外, 在比对分型结果中, 准确判读 DNA 片段长度也十分关键. Wenz 等^[14]提出对于分别相差 1、2、3、4 bp 的 STR 等位基因位点若想获得 99.7% 置信区间, 标准偏差不可高于 ± 0.15 bp、 ± 0.30 bp、 ± 0.45 bp 和 ± 0.63 bp. 通过在 PMMA 芯片上分析得到的 STR 位点等位基因分型标准物各峰的迁移时间, 进行计算可以得出 176~357 bp

之间的 DNA 片段长度与迁移时间具有很高的线性相关性($r^2=0.9999$). 使用自编程序 “Peak Analyzer” 对 PMMA 芯片的电泳结果进行迁移时间自动判读, 然后以 Cy5 标记的 D13S317 和 CSF1PO 位点的等位基因分型标准物为准, 将 JOE 标记的实际个体样品的 DNA 片段大小依据与迁移时间的线性关系进行归一化计算. 如表 4 所示, 计算得到的 DNA 片段大小与理论值偏差很小, 其中平均标准偏差为 ± 0.07 bp, 最大为 ± 0.130 bp, 最小为 ± 0.057 bp, 远远低于 ± 0.63 bp 的基本要求, 与 Shi 等^[8]平均标准偏差 ± 0.06 bp, 最大标准偏差 ± 0.10 相当, 而明显优于商用毛细管电泳仪 ABI 3100 ± 0.20 bp 的标准偏差^[15], 说明我们研制的 PMMA 芯片具有很高的准确性和稳定性. 同时双光路分别检测不同荧光素标记的等位基因分型标准物和实际样品, 较之先前同一荧光素标记的等位基因分型标准物和实际样品共同电泳检测^[6,9], 避免了等位基因分型标准物与实际样品重叠后根据峰高变化判断的弊端, 大大降低了实际样品的检测极限. 但从表 4 也可看出理论样品长度和计算得到的样品长度之间有一定的偏移, 可能是由于分别用于标记等位基因分型标准物和实际样品的荧光素基团本身存在带电量 and 分子大小的差异, 影响了 DNA 片段的迁移率^[16,17]. 通过不同荧光素基团标记相同等位基因分型标准物的同步电泳也证实了这种偏移的存在.

Table 4 Precision of sizing STR products on PMMA chips

STR locus	Expected size/bp	Calculated size/bp	SD between runs ¹⁾ /bp	RSD between runs ¹⁾ %
D13S317	184	184.97	0.057	0.031%
	188	188.77	0.075	0.040%
	192	192.64	0.053	0.028%
	196	196.61	0.069	0.037%
CSF1PO	333	334.05	0.130	0.039%
	345	346.25	0.066	0.019%
	353	354.29	0.067	0.019%
	349	350.28	0.078	0.022%

¹⁾ Electrophoretic conditions were the same as in Figure 3, $n=8$.

参 考 文 献

- Ruitberg C M, Reeder D J, Butler J M. STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(1): 320~322
- Edwards A L, Civitello A, Hammond H A, *et al.* DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*, 1991, **49**(4): 746~756
- Butler J M, Buel E, Crivellente F, *et al.* Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI prism310 and 3100 genetic analysers for STR analysis. *Electrophoresis*, 2004, **25** (10 ~ 11): 1397~1412
- Tagliaro F, Bortolotti F. Recent advances in the applications of CE to forensic sciences (2001 ~ 2004). *Electrophoresis*, 2006, **27** (1): 231~243
- Manz A, Graber N, Widmer H M. Miniaturized total analysis systems: a novel concept for chemical sensors. *Sens Actuators B Chem*, 1990, **1**(1~6): 244~248
- Schmalzing D, Koutny L, Adourian A, *et al.* DNA typing in thirty seconds with a microfabricated device. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(19): 10273~10278

- 7 Yeung S H I, Greenspoon S A, McGuckian A, *et al.* Rapid and high-throughput forensic short tandem repeat typing using a 96-lane microfabricated capillary array electrophoresis microdevice. *J Forensic Sci*, 2006, **51**(4): 740~747
- 8 Shi Y, Anderson R C. High-resolution single-stranded DNA analysis on 4.5 cm plastic electrophoretic microchannels. *Electrophoresis*, 2003, **24**(19~20): 3371~3377
- 9 Qin J, Leung F C, Fung Y, *et al.* Rapid authentication of ginseng species using microchip electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem*, 2005, **381**(4): 812~819
- 10 罗 怡, 褚德南, 姜志峰, 等. 电沉积技术制作高聚物微流控芯片模具. *电化学*, 2005, **11**(2): 204~207
Luo Y, Chu D N, Lou Z F, *et al.* *Electrochemistry*, 2005, **11**(2): 204~207
- 11 罗 怡, 王晓东, 刘 冲, 等. 一种新型微流控芯片金属热压模具的制作工艺研究. *中国机械工程*, 2005, **16**(17): 204~207
Luo Y, Wang X D, Liu C, *et al.* *Chin Mech Eng*, 2005, **16**(17): 204~207
- 12 Carrilho E, Ruiz-Martinez M C, Berka J, *et al.* Rapid DNA sequencing of more than 1000 bases per run by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrylamide solutions. *Anal Chem*, 1996, **68**(19): 3305~3313
- 13 熊 强, 邢婉丽, 谷光胜, 等. 可用于多种生物分析的高性能芯片毛细管电泳系统. *分析科学学报*, 2006, **22**(6): 627~630
Xiong Q, Xing W L, Gu G S, *et al.* *J Anal Sci*, 2006, **22**(6): 627~630
- 14 Wenz M H, Robertson J M, Menchen S, *et al.* High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome Res*, 1998, **8**(1): 69~80
- 15 Schoske R. The design, optimization and testing of Y chromosome short tandem repeat megaplexes: [Thesis]. Washington, DC: American University (http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/pub_pres/Schoske2003dis.pdf)
- 16 Tu O, Knott T, Marsh M, *et al.* The influence of fluorescent dye structure on the electrophoretic mobility of end-labeled DNA. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**(11): 2797~2802
- 17 Mitchelson K R, Cheng J. *Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids. Series: Methods in Molecular Biology*. Totowa, USA: Humana Press, 2001. 95~107

A Miniaturized DNA Electrophoresis Analyzer Employing Low-cost PMMA Electrophoresis Chips*

YANG Qian^{1,2}, XIONG Qiang^{1,2}, JIANG Cheng-Tao³, LI Cai-Xia³, SUN Ai-Mei⁴,
KEITH MITCHELSON^{1,4}, XING Wan-Li^{1,2}, YE Jian^{3,5}**, CHENG Jing^{1,2}**

⁽¹⁾ Medical Systems Biology Research Center, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

⁽²⁾ National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, Beijing 102206, China;

⁽³⁾ Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China; ⁽⁴⁾ CapitalBio Corporation, Beijing 102206, China;

⁽⁵⁾ Department of Postgraduate, Chinese People's Public Security University, Beijing 100038, China)

Abstract A novel method for high-performance and high-resolution separation and detection of single-stranded DNA based on low-cost plastic microchips using electrophoresis apparatus equipped with dual wavelength confocal fluorescence detection have been developed. High-quality microchannels are fabricated on a thin poly (methyl methacrylate) (PMMA) plastic sheet (0.8 mm), ensuring superior limits of detection and good dissipation of Joule heat. A reproducible allelic profiling assay for the analysis of short tandem repeat (STR) was developed using replaceable denaturing linear polyacrylamide as the sieving matrix and cellulose derivates as adsorptive modifiers to suppress nonspecific adsorption of DNA samples to the PMMA surfaces. Under optimal conditions, all fragments of the STR allelic ladders of the D13S317 and CSF1PO loci as well as PCR-amplified samples from individuals can be separated unambiguously within 180 s. These results demonstrates the potential of plastic microchips for low-cost genetic analysis.

Key words poly(methyl methacrylate) (PMMA) chip, two-color confocal laser induced fluorescence detection, background fluorescence, short tandem repeat (STR) analysis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00165

*This work was supported by a grant from The National High Technology Research and Development Program of China (2006AA020701).

**Corresponding author.

YE Jian. Tel: 86-10-63434093, E-mail: yejian77@126.com

CHENG Jing. Tel: 86-10-62772239, E-mail: jcheng@tsinghua.edu.cn

Received: March 12, 2008 Accepted: December 20, 2008