

文章编号: 0258-7025(2007)Supplement-0146-05

PMMA 基 PCR 生物芯片及其准分子激光制备技术的几个关键问题

陈 涛, 姚李英, 祁 恒, 刘世炳 吴 坚, 左铁钊

(北京工业大学激光工程研究院, 北京 100022)

摘要 分析了微流控聚合梅链式反应(PCR)芯片循环的几何结构,对常规非闭环的穿透形式,确定了可行的温区排列结构;对于闭环式的空间分布形式,分析了几种结构的热效率。研究了准分子激光对聚甲基丙烯酸甲脂(PMMA)基片的刻蚀机制,获得了刻蚀曲线。对于 PCR 芯片微流通道的加工,着重考虑了通道成形和表面粗糙度问题。其中,采用掩模形状控制法解决通道形状问题;采用激光抛光、近阈值能量、去应力退火等技术提高刻蚀通道的表面质量。在对 PMMA 基 PCR 芯片的键合问题研究中,采用了胶粘键合和热压键合两种方案,优选出热压键合的方案,制作了热压键合装置,获得了最佳键合参数,满足键合强度和通道成形要求。针对微流体连续流动的控制问题,研制了一台基于精密气泵结合气动控制的注射进样系统。利用制作的 PCR 芯片和进样系统,成功地对 170bp 的 DNA 模板进行了扩增。

关键词 光学工程; 准分子激光微加工; PCR 微流控生物芯片

中图分类号 TG665 **文献标识码** A

Some Key Problems in PMMA Based PCR Microfluidic Biochip by Excimer Laser Micromachining

CHEN Tao, YAO Li-ying, QI Heng, LIU Shi-bing, WU Jian, ZUO Tie-chuan

(College of Laser Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022)

Abstract The microfluidic polymerase chain reaction (PCR) biochip cycle circuit geometry is analyzed. For the general non-closed loop circuit paradigm, the feasible temperature zone arrangement is determined; for closed loop circuit paradigm, the heat exchange efficiency of several structural forms are described. Then the excimer laser etching on polymethyl methacrylate (PMMA) plate mechanism is studied, with the etching rate curves listing by experiments. For PCR chip microchannel fabrication, the channel shape and the bottom surface roughness are mainly considered. In the approach, mask shape is designed to fit with the channel shape; laser polishing, near threshold energy etching, heat annealing for stress relief are adopted to promote the channel surface quality. For the problem of chip bonding, the hot press solution is utilized at last. The hot press bonding system is constructed, the optimal bonding parameters is acquired by tests. For driving and controlling of the micro continuous flow, a precise pneumatic syringe pump system is developed. By utilizing the PCR chip and pump system, an experiment is performed and the amplified product of a 170 bp DNA template chain is successfully acquired.

Key words optical engineering; excimer laser micromachining; PCR; microfluidic chip

1 引 言

生物芯片是生物、医学、分析化学、微技术等交叉性很强的新技术。它在诸多领域具有潜在的应用前景,因而在近年成为引人关注的研究热点^[1~3]。

以准分子激光为代表的紫外激光微加工技术,在生物芯片微制备尤其是以高聚物为片基的生物芯片制作上具有较大的应用潜力。准分子激光微加工基

于烧蚀作用机制,在芯片微结构成型过程中,入射准分子激光使材料分离成气态的原子、分子或团簇的方式从基体逸出,未被分解的材料保持原有状态。去除区域的形状可以根据需要设计,去除量以微米量级的逐层去除方式控制,从而得到要求的基片微结构。

微流控聚合梅链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)生物芯片是生物芯片的一种。国内

基金项目: 国家自然科学基金(50335050)和北京市自然科学基金(3031001)资助课题。

作者简介: 陈 涛(1970—),男,重庆人,博士,副研究员。主要从事光学工程、激光微技术、生物芯片技术的研究。

E-mail: chentao@bjut.edu.cn

外研究的 PCR 芯片包括连续流、循环流和静态三种形式。最近几年,连续流型 PCR 芯片引起了较多的关注。其关键原因在于这种空间展开的 PCR 循环形式可以有效地节省 PCR 反应时间,对实际应用非常重要。

本文主要讨论聚甲基丙烯酸甲脂 (PMMA) 基连续流型微流控 PCR 生物芯片,着重阐述该生物芯片的制造工艺,包括循环微流路的成形、芯片的键合、进样等。

2 PCR 芯片穿行微结构的设计和筛选

2.1 非闭合温区形式

PCR 反应的基本要求就是要有针对 DNA 扩增的变性 (denaturized, melting)、退火 (annealing) 和延伸 (extension) 三个温度反应条件。如果三个 PCR 温区在空间上线性相连而在空间上不闭合,存在的可能排列形式和循环形式如图 1 所示。其中图

1(a)与(d)是一致的,(b)与(e)一致,实际上只存在(a),(b),(c),(f)四种情况。对于(a)所示的情况,反应液(通常包括抽提后的样本,引物,TAQ 酶,缓冲液和水的混合液)从 94 °C 的变性区到 55 °C 的退火区然后再进入 72 °C 的延伸区,符合 PCR 反应要求。但在进入下一循环的时候,需首先进入 55 °C 的退火区才能到达 99 °C 温区开始下一循环的变性,则说明温度循环失衡,可称其为负退火温度失衡。同样对于(f)所示的情况,也产生了负变性温度失衡。而对于(c)所示的情况,产生了过延伸温度失衡。

对于图 1(b)所示的情况,从 94 °C 变性温区过后,经过 72 °C 的中间过渡段,到达 55 °C 的退火区,温度可以自然过渡,然后再进入 72 °C 的延伸区进行延伸。之后进入 94 °C 的变性区开始下一循环。这一循环符合常规 PCR 反应的要求,因此是我们所期望的设计方案。这也是通常研究的形式,国外大多数研究报道都采用了此形式^[4~6]。

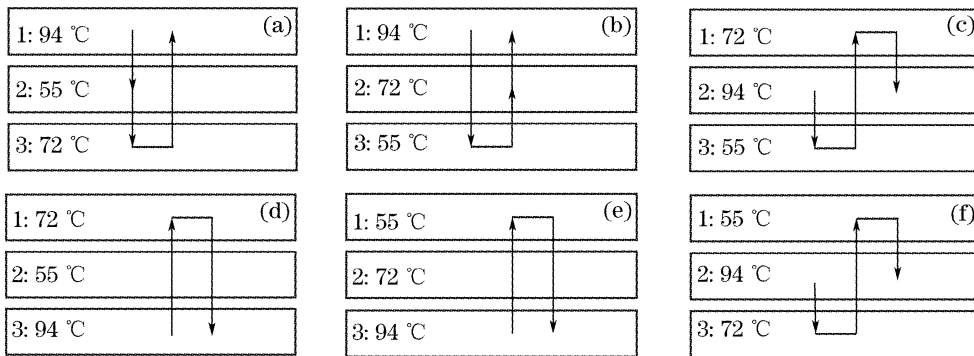


图 1 非闭合的 PCR 芯片温区构型图(箭头代表微流道流体流动方向)

Fig. 1 Several non-closed loop PCR chip temperature zone schemes (arrows for flow direction)

对非闭合流路形式的 PCR 芯片的热分析见文献^[8,9]。

2.2 闭合温区形式

如果三个温区在空间上首尾相连,形成闭合的空间结构,则可以设计图 2 列出的几种形式:

对第(1)种情形,左侧温区反应通道最长,温区的温度设定可依据每一温度所对应反应类型的要求时间来设置,比如需要变性反应时间最长,则可将其设

置在左侧温区。对第(2),(3)种情形,由于结构的完全对称性,并依据连续流的前提,三个反应时间是相同的,可任意设计温度位置。但第(2)种情形中,对每一温区单元的加工、装配时的对准,都有较高的要求。第(4)种情形,是利用空间叠接形成闭环温区接续。甚至采用更简便的形式(5),将镂空的方片分为三个区域,每一区域对应一个温度范围。根据每一温区的反应时间不同,可以对应设计该区域的线形长度。

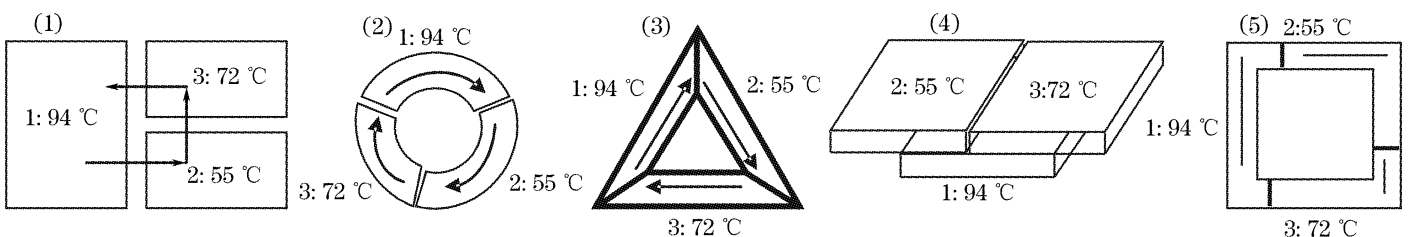


图 2 闭合的 PCR 芯片温区构型图(箭头代表微流道流体流动方向)

Fig. 2 Several closed loop PCR chip temperature schemes (arrows for flow direction)

通过对各种结构的热平衡分析,结构(4)与周围空气的热交换损失较小,但在微加工制作上存在一定的难度。(2),(3)结构在恒温平衡时温区间总热传导损失较小,因此是可供选择的 PCR 芯片结构形式。国内也有研究报道采用这类形式^[9]。

3 PCR 芯片的高聚物材料选择

硅、玻璃和高聚物是生物芯片目前使用的三大类材料。近年来,先后出现几种高聚物基片,一是有有机玻璃 PMMA,它具有机械强度高、光学透明性强、成本低的优点,但在化学稳定性和生物兼容性方面稍弱。二是有机硅橡胶——聚二甲基硅氧烷(PDMS),它在生物兼容性方面具有突出优势,在形成流体通道后不需要太多的腔壁修饰,因而为许多研究者所采用,但它在机械性能方面也存在明显的缺点。其他一些材料如聚碳酸酯(PC)、环烯共聚物(COC)等等,也有一些尝试性实验研究。也有一些研究工作者以厚 SU-8 胶工艺来改进芯片制作水平,但严格来讲,其更多地还是作为过渡层技术与硅基工艺相连,而不是独立的高聚物芯片工艺。我们先后对几种高聚物材料的准分子激光刻蚀作用进行了实验,包括 PMMA,PC,PDMS,POM(聚甲醛),ABS(丙烯腈-丁二烯-苯乙烯),PTFE(聚四氟乙烯甲)等,综合比较刻蚀率、刻蚀质量,确立以 PMMA 作为 PCR 芯片材料。

4 准分子激光刻蚀高聚物的实验

在准分子激光对聚合物材料 PMMA 的刻蚀机制的研究基础上,进行了刻蚀工艺参数的研究。选取准分子激光器(Lambda Physik LPX305iF)的工作电压:17~23 kV,脉冲频率:5~30 Hz。工作台移

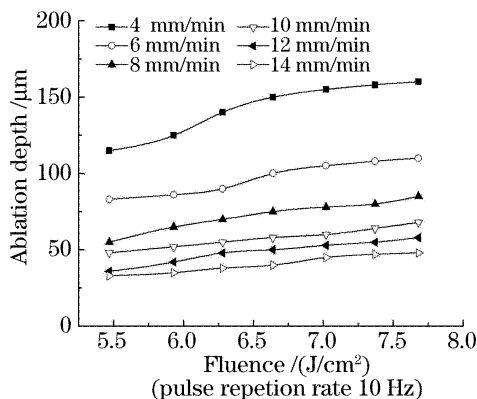


图 3 刻蚀深度与移动速度、电压的关系

Fig. 3 Etching depth versus translation stage, laser power supply voltage

动速度:4~14 mm/min。掩模尺寸:1 mm×1 mm, 3 mm×3 mm, 5 mm×5 mm。

1) 相同脉冲频率(10 Hz)和掩模尺寸(5 mm×5 mm)下,刻蚀深度与电压(17~23 kV)和工作台移动速度(4~14 mm/min)之间的关系如图 3。

2) 相同工作台移动速度(6 mm/min)和掩模尺寸(5 mm×5 mm)下,刻蚀深度与电压(17~23 kV)和脉冲频率(5~30 Hz)之间的关系如图 4。

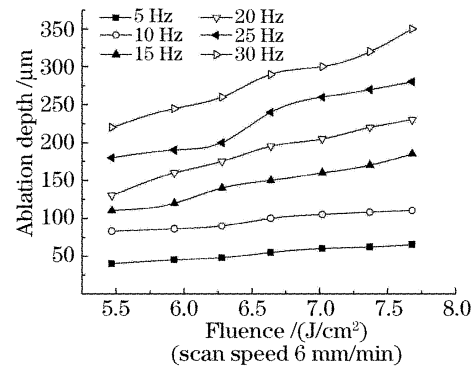


图 4 刻蚀深度与激光频率、电压的关系

Fig. 4 Etching depth versus laser frequency, laser power supply voltage

3) 相同工作台移动速度(6 mm/min)和脉冲频率(10 Hz)下,刻蚀深度与电压(17~23 kV)和掩模尺寸(1 mm×1 mm, 3 mm×3 mm, 5 mm×5 mm)之间的关系如图 5。

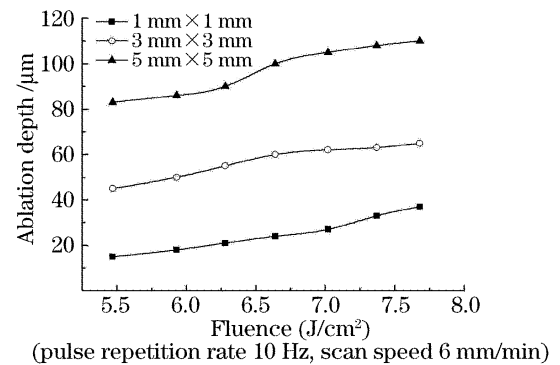


图 5 刻蚀深度与掩模尺寸、电压的关系

Fig. 5 Etching depth versus mask aperture size, laser power supply

基于此结果,我们获得了适合于 PCR 生物芯片微通道成形的加工参数。

5 PCR 芯片微流体通道的准分子激光微加工

由于微流控 PCR 芯片全部循环流路的尺寸大于准分子激光光斑,我们采用直写法来进行加工。所使用的直写系统包括 4 自由度的微工作台,一个可变光阑,一组缩小物镜组以及计算机控制系统。

如图 6 所示。

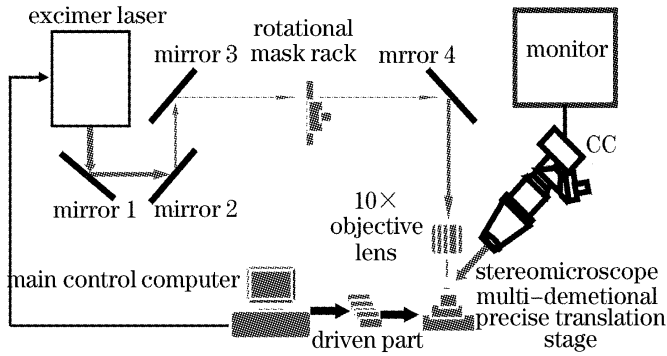


图 6 准分子激光微加工系统

Fig. 6 Excimer laser micromachining system

5.1 通道成形问题

微通道形状主要决定因素有固定点位脉冲深刻蚀的成型机制和掩模形状导致的内图案曝光时间差的成型机制。

1) 准分子激光在某一定点进行深刻蚀,影响其断面形状的机制较复杂,比如侧壁倾角形成的动态反射机制、刻蚀作用区的烧蚀反冲压力、烧蚀气体约束于腔内形成的压力作用、动态反射与蒸汽压作用的平衡机制等。在这些过程中,可控制参数如激光能量、掩模大小、光束发散角、透镜焦距等都可能带来影响,并最终影响刻蚀腔体形状。

2) 准分子激光光束由于双轴方向聚焦位置的不一致,很难以焦面位置作为加工面位置的基准。因此以像面位置为基准进行加工。可依据掩模成像形状导致的通光图案曝光时间差的成型机制来控制。可控参数包括掩模形状设计、激光曝光量、工作台移动速度等。实验获得了三角形断面、矩形断面、半圆形断面、梯形断面等不同微通道,如图 7。

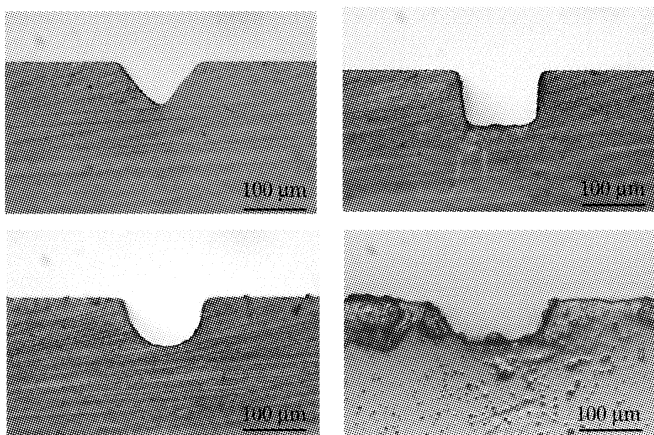


图 7 准分子激光微加工得到的不同断面形状微通道

Fig. 7 Microchannel different shape profile by excimer laser micromachining

5.2 表面粗糙度

我们采用几种办法来改进通道质量。包括激光

抛光法、近阈值能量法、去应力退火法等,这可以减少先前微通道中的脊状周期微结构。图 8 给出了已成形的 PCR 芯片的图片及其通道底面图。

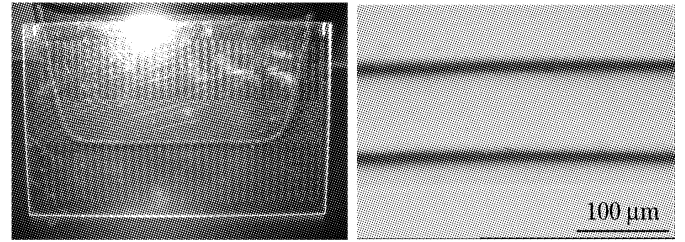


图 8 微流控 PCR 芯片样品

Fig. 8 Microfluidic PCR chip sample

6 PCR 芯片的键合

在微通道被加工成形后,实验研究了两种键合方法:一种是胶粘法键合,另一种是热压法键合。在胶黏法键合技术中,为了综合考虑粘结剂层的厚度、均匀性和黏性,需要采用一些措施。对于深度为 50 μm 的微通道,最适宜的黏结剂层厚度是 2~5 μm。

在热压法键合中,设计并制作了弹簧加压的装置。它的机械装配图如图 9 所示。用这种装置研究了热压键合的机制。试验各项参数如装置的机械压力、键合温度、键合时间、材料软化点以及降温所用的时间等,最终得到了一个稳定的键合结果和最佳键合参数。键合后的芯片如图 10,键合强度达到 1.05 MPa。

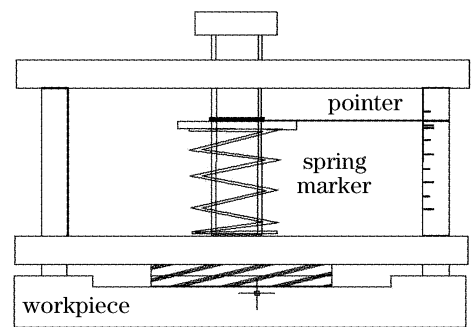


图 9 芯片热压键合装置示意图

Fig. 9 Hot embossing bonding device

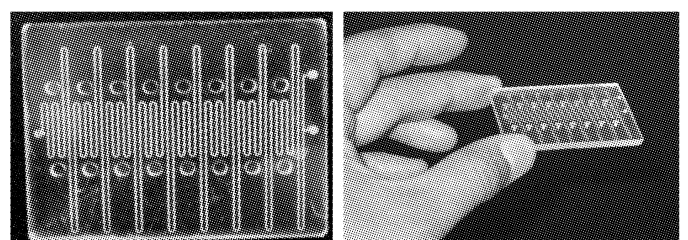


图 10 键合后的芯片样品

Fig. 10 Bondign chip sample

7 PCR 芯片反应的微流体驱动

与毛细管电泳芯片(CE)进行电泳分离所采用的电场驱动方式(电渗流效应)不同,连续流 PCR 芯片的微流体驱动方式要困难许多。因为其通道长度远大于电泳芯片(对于 25 次循环的芯片设计,总反应通道长 1937 mm),流路经过交变温区,而且高聚物的粘滞系数又较大,亲水性好,积分阻力高,沿程损失大,所以,最终确定采用压力驱动方式。比较液泵和气泵两种压力驱动方式,由于液泵驱动需要预注液启动,不利于控制分析样量,所以选择气动驱动方式。

设计制作了一套压力可调的进样和驱动装置。其工作示意图如图 11 所示。

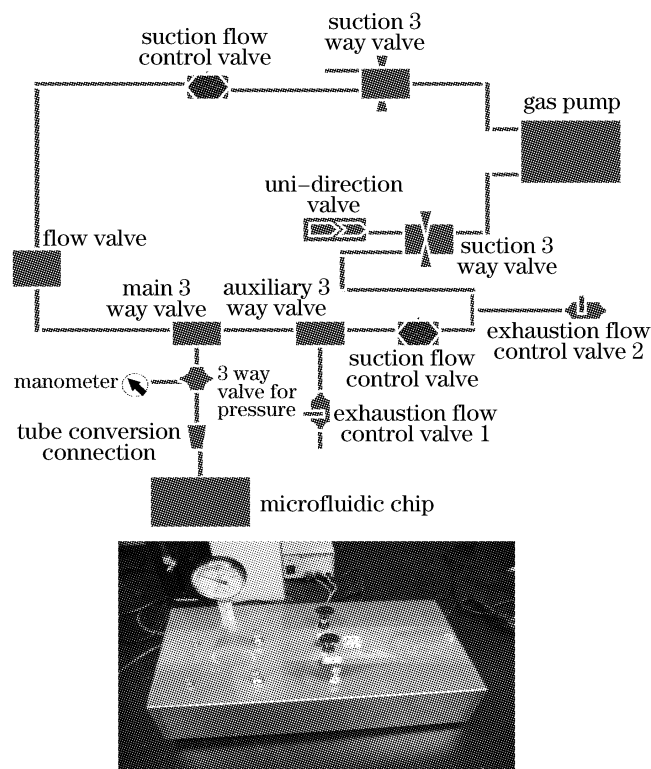


图 11 PCR 芯片气动进样与驱动装置结构

Fig. 11 PCR chip pneumatic introduction device

对 20 次循环的 PCR 芯片进行进样驱动实验(微通道深 $50\ \mu\text{m}$, 宽 $100\ \mu\text{m}$, 水为介质), 获得 $2 \times 10^4\ \text{Pa}$ 的启动压力, 而完成全部循环的稳定流过, 最大压力达 $8 \times 10^5\ \text{Pa}$ 。

8 扩增实验

将该系统进行实际的分子生物学扩增实验, 成功地对质粒 DNA (PGEM-T Vector) 170 bp 片段进

行了扩增。

上游引物

T7=5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', 20 bp,

下游引物

SP6=5'-CATACGATTTAGGGTGACACTATAG-3, 24bp,

具有明显的扩增亮带。

9 结 论

通过对微流控 PCR 芯片的结构、加工要求、制备流程和准分子激光刻蚀可行性的分析研究, 解决了其激光微制造工程中的关键问题。研究表明:

1) 芯片串连形式符合 PCR 反应的要求;

2) 采用准分子激光微加工技术制备获得了 PCR 微流控芯片;

随着激光微制造系统技术的发展, 将不断满足生物芯片的更复杂的制备要求。

参 考 文 献

- 1 Yang Rong, Xie Wenzhang, Cheng Jing *et al.*. Advances in study on biochips[J]. *Progress in Biotechnology*, 1999, **19**(4): 33~38
杨蓉, 谢文章, 程京等. 生物芯片研究进展[J]. *生物工程进展*, 1999, **19**(4): 33~38
- 2 Julia Khandurina, Andra's Guttman. Bioanalysis in microfluidic devices [J]. *J. Chromatography A*, 2002, **943**(2): 159~183
- 3 Holger Becker, Laurie E. Locascio. Polymer microfluidic devices [J]. *Talanta*, 2002, **56**(2): 267~287
- 4 Martin U. Kopp, Andrew J. de Mello, A. Manz *et al.*. Chemical amplification; continuous-flow PCR on a chip [J]. *Science*, 1998, **280**(5366): 1046~1048
- 5 Kai Suna, Akira Yamaguchi, Yutaka Ishida *et al.*. A heater-integrated transparent microchannel chip for continuous-flow PCR [J]. *Sensors and Actuators*, 2002, **B84**(2~3): 283~289
- 6 Ivonne Schneegaß, Reiner Bräutigam, Johann Michael Köhler. Miniaturized flow-through PCR with different template types in a silicon chip thermocycler [J]. *Lab. on a Chip*, 2001, **1**(1): 42~49
- 7 Zhang Yu. Fabrication, Bonding and Packaging of PMMA Based PCR Biochip by Excimer Laser [D]. Dissertation of Master Degree, Beijing University of Technology, 2004. 30~34
张瑜. PMMA 基 PCR 生物芯片的准分子激光微加工、键合、封装技术研究 [D]. 北京工业大学硕士学位论文, 2004. 30~34
- 8 Yao Liying. Fabrication of Polymer Based Continuous Flow PCR Chip by Excimer Laser and Its Application [D]. Dissertation of Ph. D, Beijing University of Technology, 2006. 52~67
姚李英. 高聚物基 PCR 微流控芯片的准分子激光制备和应用研究 [D]. 北京工业大学博士学位论文, 2006. 52~67
- 9 Liu Jinhua, Yin Xuefeng, Fang Zhaolun. Automatic continuously amplification of long fragments DNA with spiral flow through PCR microchip [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2004, **25**(1): 30~34
刘金华, 殷学锋, 方肇伦. 螺旋通道微流控 PCR 芯片连续自动扩增 DNA 片段的研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2003, **25**(1): 30~34