

文章编号: 0258-7025(2009)05-1239-07

PMMA 基连续流式 PCR 微流控芯片的 CO₂ 激光直写加工与应用

祁 恒¹ 王贤松² 陈 涛¹ 马雪梅² 姚李英¹ 左铁钊¹

(¹北京工业大学激光工程研究院,北京 100124; ²北京工业大学生命科学与生物工程学院,北京 100124)

摘要 采用 CO₂ 激光直写烧蚀加工技术在聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)基片表面加工微通道,分析了 CO₂ 激光输出功率和激光束移动速度对加工质量的影响。选用 4.5 W 输出功率和 76.2 mm/s 移动速度,在 30 s 内加工了水力直径为 100 μm 的微通道。在进行微通道的大批量、快速加工时,CO₂ 激光直写烧蚀加工技术具有较高的工艺稳定性,工艺流程简单,可随时根据实验需要对微通道结构进行调整和再加工。微通道的激光拉曼光谱与 PMMA 基片相同,保证了微通道和盖片对聚合酶链式反应(PCR)物化学影响的一致性。虽然微通道边缘存在少量重铸物,但不会影响热压键合效果,芯片能够满足 PCR 扩增中的压力与密封要求。使用这种芯片实现了 180 bp 拟南芥脱氧核糖核酸(DNA)片段的 PCR 扩增,扩增效果与使用常规 PCR 仪相当,验证了采用 CO₂ 激光直写烧蚀方法加工 PMMA 基连续流式 PCR 微流控芯片的可行性。

关键词 激光技术; CO₂ 激光; 直写烧蚀; 微流控芯片; 聚合酶链式反应

中图分类号 TN249; R446 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL20093605.1239

Fabrication and Application of PMMA Continuous-Flow PCR Microfluidic Chip with CO₂ Laser Direct-Writing Ablation Micromachining Technique

Qi Heng¹ Wang Xiansong² Chen Tao¹ Ma Xuemei² Yao Liying¹ Zuo Tiechuan¹

(¹*Institute of Laser Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China;*
²*College of Life Science & Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China*)

Abstract CO₂ laser direct-writing ablation micromachining technique is used to fabricate the microchannel on the polymethyl methacrylate (PMMA) substrate. The correlation between the process parameters (the laser power and the beam translational velocity) and the micromachining quality (the depth and the width of the microchannel) is investigated. A laser power of 4.5 W and beam translational velocity of 76.2 mm/s is used to make ablation of the microchannel with a hydraulic diameter of 100 μm on the PMMA substrate. The time for the ablation process is 30 s. This technique is steady and efficient in the batch production. The microchannel has the same Raman spectra as that of the PMMA substrate. The spectra shows that they have the same chemical effect on the polymerase chain reaction (PCR) mixture. The presence of the bumps of resolidified material on the edges of the microchannel has no influence on the hot-press bonding result and the PCR microfluidic chip could satisfy the pressure and the sealing requirement in PCR process. An amplification of a DNA template with 180 bp fragment of arabidopsis thaliana is successfully performed with this chip, in less than 30 min. This result exhibits the availability of CO₂ laser direct-writing ablation technique on the micromachining of the PMMA continuous-flow PCR microfluidic chip.

Key words laser technique; CO₂ laser; direct-writing ablation; microfluidic chip; polymerase chain reaction

收稿日期: 2008-05-28; 收到修改稿日期: 2008-08-19

基金项目: 北京市自然科学基金重点项目(3031001)、北京市属市管高等学校人才强教计划资助课题。

作者简介: 祁 恒(1980—),男,博士研究生,主要从事微机电系统器件的激光加工技术与应用研究。

E-mail: qiheng@emails.bjut.edu.cn

导师简介: 左铁钊(1941—),女,教授,博士生导师,主要从事激光制造科学与工程技术研究。E-mail: ncltzu@bjut.edu.cn

1 引 言

聚合酶链式反应(PCR)是一种在体外模拟自然脱氧核糖核酸(DNA)复制过程的核酸快速扩增技术,是一个在热循环条件下的酶催化过程,通过高温变性、低温退火和适温延伸过程的循环进行,使目标脱氧核糖核酸(DNA)片段的合成量呈指数增长,从而达到迅速扩增的目的。目前,PCR技术已经在基因与遗传病诊断、病原体检测和动植物检疫等诸多领域得到广泛应用^[1,2]。

随着微机电系统(Micro-electro-mechanical-systems, MEMS)技术的发展,PCR芯片的研制与应用得到越来越多的关注。作为一种主要的PCR芯片形式,连续流式PCR(continuous-flow PCR, CF-PCR)微流控芯片是通过将PCR反应物在微通道中以连续流动的方式依次通过三个不同温度的恒温区,来实现温度循环,从而完成扩增过程。这种原理最初是由 Nakano 等^[3]在1994年提出的。这种芯片的主要控制参数是PCR反应物在不同温区内的停留时间,这取决于微通道的长度和PCR反应物在微通道中的流动速度。通过控制流动速度,可以调整其在不同温区内的停留时间,以满足PCR扩增所需的时间要求。CF-PCR微流控芯片的温度控制相对简单,液体反应物蒸发小,而且在保证一定扩增效率的前提下,反应物体积可变,可利用不同的流动控制方法进行单个或多个样品的连续扩增。但是,这种芯片的热循环次数是由芯片设计结构所决定的,不便于灵活控制,而且芯片尺寸较大。目前,对于CF-PCR微流控芯片的研究工作,还仅限于少数科研机构^[4~7]。

对于CF-PCR微流控芯片基底材料的选择,除了可以用传统的硅^[8,9]或玻璃^[10~12]材料以外,由于不需要芯片迅速变温,而且要求具有三个独立恒温区,所以也可以选用热导率较低的高聚物材料。其中,聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)因其价格低廉,具有良好的光学性能和对于生物样品的兼容性,而成为CF-PCR微流控芯片的一种主要基底材料。对于高聚物材料的微加工方法,常用的有热压法^[13,14]、注射成型法^[15]与激光刻蚀法^[16]等,其中激光刻蚀法因其具有柔性高、操作简便和速度快等优点,而成为一种极具潜力和应用价值的微加工方法,尤其适用于实验室研究阶段,能够显著降低研发成本。目前,准分子激光直写刻蚀技术已经成功应用于CF-PCR微流控芯片的加工^[17],但其加工时间较长(约2 h),成本相对较高,无法满足较大批量实验

使用的需求。

本文利用CO₂激光直写烧蚀加工速度快和操作简便的特点,在PMMA基底上加工CF-PCR微流控芯片所需的微通道,对其工艺参数进行分析,并利用激光拉曼光谱分析微通道底部的成分,然后采用热压键合方法制备出封闭的CF-PCR微流控芯片,通过对180 bp的拟南芥DNA片段进行PCR扩增,验证采用CO₂激光直写烧蚀方法加工PMMA基CF-PCR微流控芯片的可行性。

2 实 验

2.1 CF-PCR微流控芯片的结构设计

根据PCR扩增的基本原理,将CF-PCR微流控芯片的结构设计成如图1所示。芯片整体尺寸为63 mm×44 mm,基片和盖片的厚度均为1 mm。该芯片包括20个扩增循环。其中,适温延伸区位于芯片中部,上、下两侧分别为高温变性区和低温退火区。在三个区域之间添加有隔热微孔,以利于三个温区之间的相互隔热。预变性通道和后延伸通道分别位于扩增反应通道的前端和末端。每个扩增循环的微通道长度为93.4 mm,微通道的总长度约为1960 mm。进样口和出样口分别与两根毛细管相连,并用环氧树脂进行密封,以便于PCR反应物的引入和扩增产物的收集。

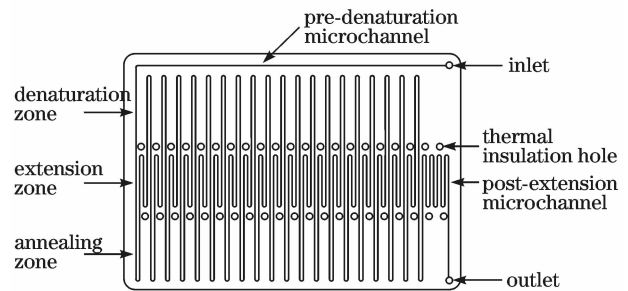


图1 CF-PCR微流控芯片结构示意图(20循环)

Fig. 1 Schematic diagram of the CF-PCR microfluidic chip (20 amplification cycles)

对于微通道尺寸的选择,根据流体力学原理将微通道的水力直径设计为100 μm,即微通道的截面形貌相当于边长为100 μm的正方形或直径为100 μm的圆形。

2.2 CO₂激光直写烧蚀微通道的工艺参数

使用商品化的小功率CO₂激光雕刻机(F1,北京海目激光与数控发展有限公司)在PMMA基片(安徽曙光化工集团,厚度为1 mm)表面进行微通道的快速直写烧蚀加工。激光雕刻机配备的CO₂激

光系统 (UL-30-OEM, Universal Laser Systems), 输出光斑直径为 4 ± 1 mm, 光束发散角 (全角) 为 5 ± 1 mrad。激光束通过一个反射镜和一个焦距为 63.5 mm 的聚焦镜照射到工件表面。将基片固定在工作台上, 通过镜组的移动可实现不同结构与形状的烧蚀加工。CO₂ 激光系统的输出功率和激光束移动速度均可通过电脑进行线性控制。

为了获得具有理想加工质量和设计尺寸的微通道, 需要对 PMMA 基片的 CO₂ 激光直写烧蚀加工工艺参数进行系统研究。选用的激光输出功率为 3.0~9.0 W, 激光束移动速度为 25.4~127.0 mm/s。在进行烧蚀加工之前, 将 PMMA 基片放入去离子水中进行 10 min 的超声清洗, 以去除材料表面的各种微小杂质, 然后用压缩空气进行干燥处理。随后, 将 PMMA 基片表面固定在激光系统的焦点位置以进行烧蚀加工。

使用光学显微镜测量不同工艺参数下得到的微通道结构与形貌, 分析激光输出功率和激光束移动速度对微通道尺寸的影响, 从而选择适当的工艺参数进行加工。

对于同一组工艺参数, 均进行 3 次加工实验, 分别在每条通道上的 5 个不同位置取点进行微通道形貌的测量, 并以平均数作为最终评价数值。

CO₂ 激光雕刻机工作台的最大雕刻面积为 900 mm×400 mm, 所以在同一批次加工中最多可以加工相同尺寸 (63 mm×44 mm) 的芯片约 125 个。为了分析在进行大批量加工时微通道质量的一致性, 选用适当的工艺参数进行大批量加工实验, 通过测量每个芯片上不同位置的微通道形貌, 对工艺稳定性进行研究。

在使用 CO₂ 激光直写烧蚀加工方法加工出微通道以后, 利用激光拉曼光谱对微通道的内壁成分进行分析, 并同 PMMA 基片本体进行比较, 分析 CO₂ 激光直写烧蚀加工对于材料有机官能团的影响。使用 JY-T64000 型拉曼光谱仪 (HORIBA Jobin Yvon) 进行分析, 使用波长为 514.5 nm 的氩离子激光器进行激发, 功率 40 mW, 测量范围 150~3500 cm⁻¹。

2.3 CF-PCR 微流控芯片的热压键合与密封性能测试

在完成 CF-PCR 微流控芯片的 CO₂ 激光直写烧蚀加工后, 需要将刻蚀有微通道的 PMMA 基片与相同尺寸的 PMMA 盖片通过热压方法键合在一起, 只有形成密闭的微通道后才能用于后续的 PCR

扩增实验。采用的热压键合设备包括电热恒温干燥箱 (DH-101-OS, 天津中环实验电炉有限公司) 和弹簧压力机 (自行研制, 如图 2 所示)。前者可为芯片键合提供恒温环境, 后者则可为键合提供一定的压力。



图 2 自行研制的弹簧压力机

Fig. 2 Home-built spring-press machine

在完成芯片键合后, 利用自行研制的简易气动进样装置^[18], 对 CF-PCR 微流控芯片进行液体流动性测试, 并在高温 (100 °C) 条件下, 通过使用高压进样 (最大进样气压 0.15 MPa) 检测芯片键合后的密封性能。

2.4 CF-PCR 扩增

为了验证采用 CO₂ 激光直写烧蚀加工的 PMMA 基 CF-PCR 微流控芯片的实际可用性, 使用 CF-PCR 微流控芯片进行 180 bp 拟南芥 DNA 片段的 PCR 扩增实验。PCR 反应体系包括 10×PCR 缓冲液、dNTPs (2.5 mmol/L)、上游引物 (10 μmol/L)、下游引物 (10 μmol/L)、模板 DNA 和 Taq 聚合酶 (2.5 U/μL), 配制成 15 μL 的反应体系进行扩增。PCR 扩增的变性、退火和延伸温度分别设置为 94 °C, 55 °C 和 72 °C。PCR 反应液在微通道中的流动速度由简易气动进样装置进行控制, 体积流速分别设置为 18 nL/s, 36 nL/s 和 72 nL/s。扩增结束后, 对扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电压 105 V, 时间 30 min。为了评价 CF-PCR 微流控芯片的扩增效果, 将相同 PCR 反应体系在常规 PCR 扩增仪 (T-Gradient, Thermalblock) 上进行扩增, 反应程序如下: 先在 95 °C 进行 5 min 预变性, 然后进行 30 个循环扩增 (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min), 最后在 72 °C 进行 7 min 的后延伸处理, 得到的扩增产物同样进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

3 实验结果与分析

利用 CO₂ 红外激光的高能束在 PMMA 基片表

面通过直写烧蚀方式加工微通道,基本原理如图3所示^[19],其中, D 和 W 分别为微通道的深度和上端宽度。

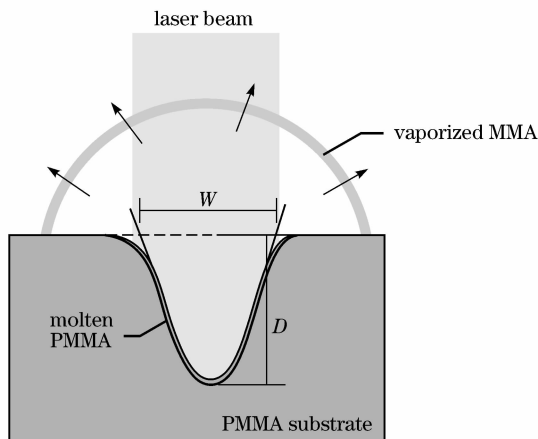


图3 CO₂激光烧蚀PMMA材料的基本原理

Fig. 3 Ablation mechanism of CO₂ laser on the PMMA substrate

当CO₂激光束聚焦在PMMA基片的表面时,PMMA材料开始升温,到达玻璃态温度(约115℃)之前保持固态;继续升温,PMMA变成可塑弹性状态,并开始发生热降解,PMMA聚合链断裂并发展为单体甲基丙烯酸甲酯(MMA)同时挥发出PMMA基片。热降解主要发生在370℃时,当CO₂激光束以一定的速度根据给定的轨迹进行移动时,就可以在PMMA基片上烧蚀加工出微通道^[20]。因为CO₂激光束的光强呈高斯型分布,所以当激光束以一定的速度运动时,相当于移动的高斯型分布的热流密度与材料发生相互作用,因此使用CO₂激光直写烧蚀得到的微通道截面也具有高斯型(倒置)特征。

在使用CO₂激光进行PMMA材料的烧蚀时,在工件位置一定的前提下,CO₂激光的输出功率和激光束移动速度是决定加工质量的两个主要参数。图4(a)和(b)分别为将PMMA材料表面置于激光聚焦光斑焦点位置,在激光输出功率为3.0~9.0 W,激光束移动速度为25.4~127.0 mm/s时,烧蚀得到的微通道深度和宽度与输出功率和激光束移动速度之间的关系。在本工作选用的工艺参数下,微通道深度在20~1000 μm之间,宽度在20~400 μm之间。由图4可知,在激光束移动速度相同的情况下,微通道深度和宽度均随输出功率的升高而增大;而在输出功率一定的情况下,微通道深度和宽度均与激光束移动速度成反比关系。其中,深度与输出功率呈线性增长关系,与Yuan等^[21]的理论

分析和实验结果基本一致;而宽度则与输出功率呈二阶多项式关系,随着输出功率的增大,微通道宽度的增大逐渐呈饱和状态。由此可以推测,在激光束移动速度一定时,当激光输出功率增大到一定程度,微通道宽度基本不再发生变化,而深度会继续增加,由此可以得到具有较大深宽比的微通道。

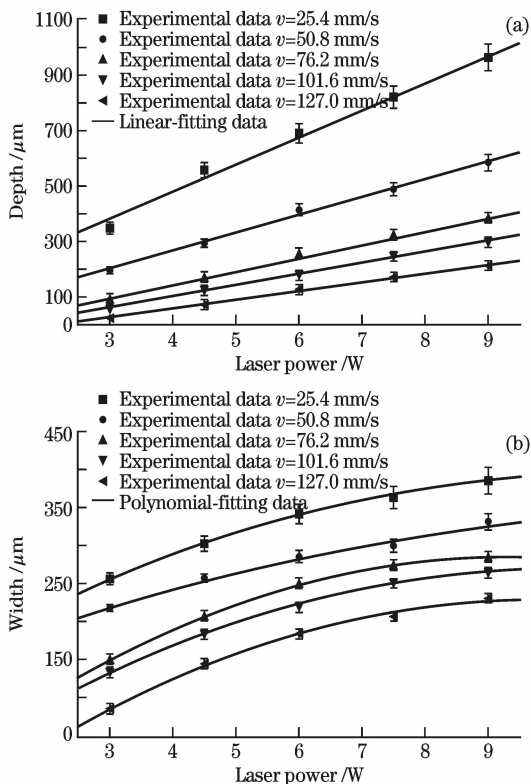


图4 微通道深度(a)和宽度(b)与CO₂激光输出功率及激光束移动速度之间的关系

Fig. 4 Variation of the depth (a) and the width (b) of the microchannel on the CO₂ laser power and the beam translational velocity

微通道的水力直径设计为100 μm,根据水力直径的计算公式($D_h = 4A/L$,其中 D_h 为微通道的水力直径, A 为微通道横截面的面积, L 为横截面的湿周),对不同加工参数下的微通道深度和宽度进行计算可知,当高斯型横截面的深度与上端宽度均为200 μm时,微通道的水力直径为100 μm。因此,应选用4.5 W激光输出功率和76.2 mm/s的激光束移动速度进行微通道加工,以此参数加工一片CF-PCR微流控芯片的基片只需30 s即可完成。图5(a)和(b)分别为在此工艺参数下加工出的微通道截面形状与底面粗糙度情况。由图5可知,采用CO₂激光直写烧蚀加工得到的微通道成倒置高斯型,在微通道边缘处存在少许重铸物,这可能会对后续芯片键合造成影响。

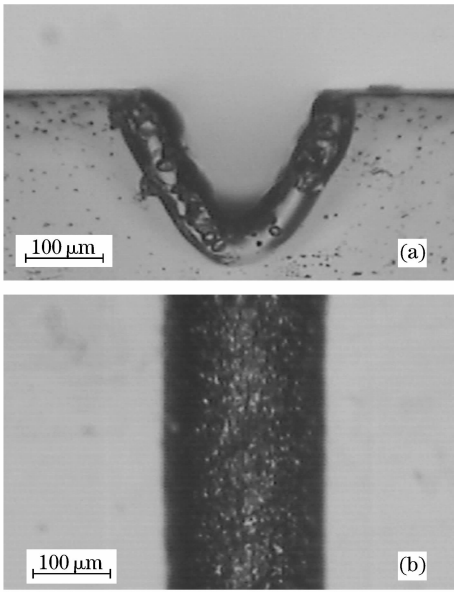


图 5 微通道横截面(a)与底面(b)形貌
Fig. 5 Cross-section(a)and bottom surface
(b)of the microchannel

对 CO₂ 激光直写烧蚀微通道工艺在进行大批量加工时微通道质量的一致性进行了研究,通过对同一批次加工出的 125 个芯片上的微通道形貌进行测量和分析,发现微通道的形貌保持很高的一致性,深度和宽度误差均在 5% 以内,这表明 CO₂ 激光直写烧蚀法在大批量加工微通道时具有较高的工艺稳定性。

加工 125 个芯片的时间约为 1 h,与传统的热压法和注射成型法相比,具有较高的加工效率,而且加工方法简单,可随时根据实验需要进行芯片微通道结构的调整和再加工,尤其适合于实验室研究阶段。

图 6 是 PMMA 基底与 CO₂ 激光烧蚀后的微通道内壁的激光拉曼光谱比较,根据谱线可知使用 CO₂ 激光烧蚀加工得到的微通道内壁与 PMMA 基底具有相同的特征峰,进一步证明 CO₂ 激光烧蚀不会改变 PMMA 材料本身的化学性质,有机官能团没有发生变化,只是对材料的表面形貌有所影响,这也保证了芯片在键合后,微通道与其盖片具有相同的化学性质,保证二者对于 PCR 反应物化学影响的一致性。

加工出微通道以后,必须将其键合并形成连续的密闭结构才能进一步应用。本工作采用热压法进行芯片键合。经过实验分析,PMMA 基微流控芯片的最佳键合温度为 105 °C,压力 160 N,时间 15~20 min,键合后的微通道截面如图 7 所示。由图 7 可知,通过热压法得到的密闭微通道形貌与键合前相比没有发生明显变化,微通道边缘处存在的少许重铸物对键合效果也没有影响,键合后的微通道尺

寸能够满足设计要求。通过使用 MST 万能材料试验机对芯片键合强度进行检测,其键合强度约为 0.85 MPa,完全能够满足进行 PCR 实验所需的进样压力要求(0.1 MPa)。对芯片进行流动性与密封性检测,在高温情况下(100 °C)实验工质(去离子水)能够在微通道内连续流动。经过 12 h 的持续加热与进样实验,芯片依然可以正常使用,能够满足 PCR 扩增实验的要求。图 8 为键合后的 PMMA 基 CF-PCR 微流控芯片实物图。

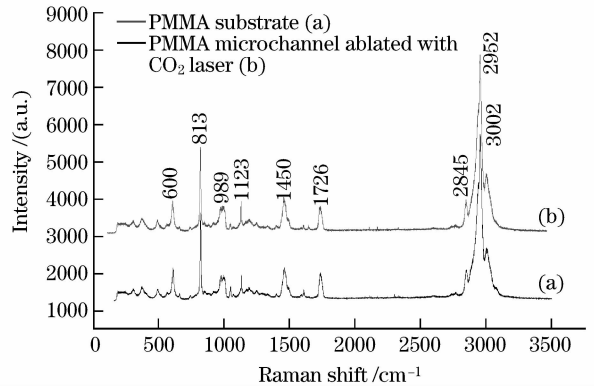


图 6 PMMA 基底(a)与 CO₂ 激光刻蚀微通道(b)的拉曼光谱

Fig. 6 Raman spectra of the PMMA substrate (a) and the microchannel ablated with the CO₂ laser (b)

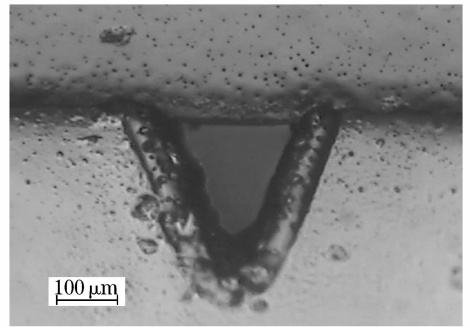


图 7 热压键合后的微通道截面形貌
Fig. 7 Cross-section of the bonded microchannel

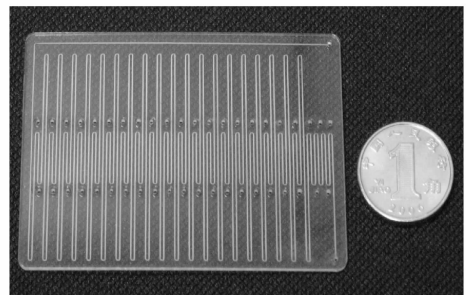


图 8 PMMA 基 CF-PCR 微流控芯片
Fig. 8 Top-view of the PMMA CF-PCR microfluidic chip

为了验证加工得到的 PMMA 基 CF-PCR 微流控芯片的实际可用性,使用 CF-PCR 微流控芯片及自行开发的温控系统,进行了 180 bp 拟南芥 DNA 片段的 PCR 扩增实验,并对扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳结果如图 9 所示。由图 9 可知,使用 CO₂ 激光直写烧蚀方法在 PMMA 基片上加工出的 CF-PCR 微流控芯片可以实现 180 bp 拟南芥 DNA 片段的 PCR 扩增,随着 PCR 反应物在微通道内流动速度的加快,扩增效果有所减弱。当体积流速为 18 nL/s 时,扩增时间约为 30 min,扩增结果与使用常规 PCR 扩增仪进行 72 min,30 循环扩增所得到的效果基本相同;而当体积流速加快到 72 nL/s 时,扩增时间仅为 7.5 min,虽然扩增条带亮度有所降低,但仍然清晰可见。这表明在使用 CF-PCR 微流控芯片进行快速扩增时,依然可以获得较好的扩增效果。

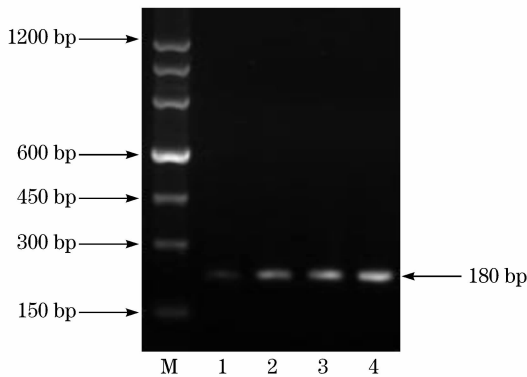


图 9 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳(1.5%)结果(M: DNA marker; 1: PCR 微流控芯片的扩增产物,体积流速 72 nL/s; 2: 体积流速 36 nL/s; 3: 体积流速 18 nL/s; 4: 常规 PCR 扩增仪的扩增产物)

Fig. 9 Agarose gel electrophoresis (1.5%) of the amplification product (M: DNA marker; 1: amplified in the PCR microfluidic chip with a flow rate of 72 nL/s; 2: 36 nL/s; 3: 18 nL/s; 4: amplified in the commercial thermal cycler)

4 结 论

系统分析了 CO₂ 激光的输出功率和激光束移动速度对于微通道加工质量的影响:在激光束移动速度相同的情况下,微通道的深度和宽度均随激光输出功率的升高而增大;而在输出功率一定的情况下,深度和宽度均与激光束移动速度成反比关系。其中,深度与输出功率呈线性增长关系,而宽度则与输出功率呈二阶多项式关系。根据微通道尺寸设计

要求,选用 4.5 W 的激光输出功率和 76.2 mm/s 的激光束移动速度加工微通道,获得了水力直径为 100 μm 的微通道,加工时间仅用 30 s,与准分子激光直写刻蚀加工方法相比,进一步缩短了加工时间,降低了加工成本。

利用 CO₂ 激光直写烧蚀方法可以在 PMMA 基片上进行微通道的大批量、快速加工,同一批次可以加工芯片 125 个,具有较高的工艺稳定性,与传统的热压法和注射成型法相比工艺流程更加简单,并且可以随时根据实验需要对微通道的结构进行调整和再加工。

使用 CO₂ 激光直写烧蚀方法在 PMMA 基片上加工出的微通道,其激光拉曼光谱与 PMMA 基片相同,说明材料的有机官能团没有发生变化,保证了微通道及其盖片对于 PCR 反应物化学影响的一致性。

虽然在加工出的微通道边缘处存在少量重铸物,但不会影响热压键合的效果,芯片能够满足 PCR 扩增中的压力与密封要求。

使用这种 CF-PCR 微流控芯片实现了 180 bp 拟南芥 DNA 片段的 PCR 扩增,扩增效果与使用常规 PCR 仪的效果相当,而时间却大为缩短,验证了采用 CO₂ 激光直写烧蚀方法加工 PMMA 基 CF-PCR 微流控芯片的可行性。

参 考 文 献

- 1 I. Schneegaß, J. M. Köhler. Flow-through polymerase chain reactions in chip thermocyclers [J]. *Rev. Molec. Biotechnol.*, 2001, **82**(2): 101~121
 - 2 S. C. Jakeway, A. J. de Mello, E. L. Russell. Miniaturized total analysis systems for biological analysis [J]. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2000, **366**: 525~539
 - 3 H. Nakano, K. Matsuda, M. Yohda *et al.*. High speed polymerase chain reaction in constant flow [J]. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 1994, **58**(2): 349~352
 - 4 M. U. Kopp, A. J. de Mello, A. Manz. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip [J]. *Science*, 1998, **280**: 1046~1048
 - 5 J. A. Kim, J. Y. Lee, S. Y. Seong *et al.*. Fabrication and characterization of a PDMS-glass hybrid continuous-flow PCR chip [J]. *Biochem. Eng. J.*, 2006, **29** (1-2): 91~97
 - 6 C. Y. Yu, W. S. Liang, Iching Kuan *et al.*. Fabrication and characterization of a flow-through PCR device with integrated chromium resistive heaters [J]. *J. Chin. Inst. Chem. Eng.*, 2007, **38**(3-4): 333~339
 - 7 Chen Tao, Yao Liying, Qi Heng *et al.*. Some key problems in PMMA based PCR microfluidic biochip by excimer laser micromachining [J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(Supp.): 146~150
- 陈涛,姚李英,祁恒等. 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 [J]. *中国激光*, 2007, **34**(增刊): 146~150

- 8 I. Schneegeß, R. Bräutigam, J. M. Köhler. Miniaturized flow-through PCR with different template types in a silicon chip thermocycler [J]. *Lab Chip*, 2001, **1**:42~49
- 9 Xing Chen, Dafu Cui, Changchun Liu *et al.*. Microfabrication and characterization of porous channels for DNA purification [J]. *J. Micromech. Microeng.*, 2007, **17**(1):68~75
- 10 P. J. Obeid, T. K. Christopoulos *et al.*. Microfabricated device for DNA and RNA amplification by continuous-flow polymerase chain reaction and reverse transcription-polymerase chain reaction with cycle number selection [J]. *Anal. Chem.*, 2003, **75**(2):288~295
- 11 S. F. Li, D. Y. Fozdar, M. F. Ali *et al.*. A continuous-flow polymerase chain reaction microchip with regional velocity control [J]. *J. Microelectromechanical Systems*, 2006, **15**(1):223~236
- 12 J. Felbel, A. Reichert, M. Kielpinski *et al.*. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in flow-through micro-reactors: Thermal and fluidic concepts [J]. *Chem. Eng. J.*, 2008, **135S**:S298~S302
- 13 A. Gerlach, G. Knebel, A. E. Guber *et al.*. Microfabrication of single-use plastic microfluidic devices for high-throughput screening and DNA analysis [J]. *Microsyst. Technol.*, 2002, **7**:265~268
- 14 M. Hashimoto, P. C. Chen, M. W. Mitchell *et al.*. Rapid PCR in a continuous flow device [J]. *Lab Chip*, 2004, **4**:638~645
- 15 O. Rötting, W. Ropke, H. Becker *et al.*. Polymer microfabrication technologies [J]. *Microsyst. Technol.*, 2002, **8**:32~36
- 16 A. Costela, I. Garciamoreno, F. Florido *et al.*. Laser ablation of polymeric materials at 157 nm [J]. *J. Appl. Phys.*, 1995, **77**(6):2343~2350
- 17 Qi Heng, Yao Liying, Wang Tong *et al.*. Excimer laser micromachining of PMMA based PCR micro-fluidic chip [J]. *Microfab. Technol.*, 2006, **1**:16~19
祁 恒, 姚李英, 王 桐等. PMMA 基 PCR 微流控生物芯片准分子激光加工 [J]. *微细加工技术*, 2006, **1**:16~19
- 18 Qi Heng, Chen Tao, Yao Liying *et al.*. Simple air-operated sampling device used for continuous-flow PCR microfluidic biochip [C]. *μ-TAS 2007. Dalian; Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences*, 2007:79~80
祁 恒, 陈 涛, 姚李英等. 连续流式 PCR 微流控芯片建议启动进样装置 [C]. 第四届全国微全分析系统学术会议论文集. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2007:79~80
- 19 H. Klank, J. P. Kutter, O. Geschke. CO₂-laser micromachining and back-end processing for rapid production of PMMA-based microfluidic systems [J]. *Lab Chip*, 2002, **2**:242~246
- 20 Fu Jianzhong, Xiang Hengfu, Chen Zichen. Modeling research of CO₂ laser direct writing polymer microfluidic chip [J]. *Chem. J. Chinese U.*, 2004, **25**:54~56
傅建中, 相恒富, 陈子辰. CO₂ 激光直写加工聚合物微流体芯片的建模研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2004, **25**:54~56
- 21 D. J. Yuan, S. Das. Experimental and theoretical analysis of direct-write laser micromachining of polymethyl methacrylate by CO₂ laser ablation [J]. *J. Appl. Phys.*, 2007, **101**:024901