

微流控高通量试样引入技术的研究进展

姚 波, 何巧红, 杜文斌, 石晓彤, 方 群*

(浙江大学化学系微分析系统研究所, 浙江 杭州 310058)

摘要: 如何实现外部宏观系统与芯片微观系统之间的衔接一直是微流控芯片分析领域中一个重要的研究课题。本文结合作者所在研究组的工作及成果, 介绍了当前微流控高通量试样引入技术的研究进展。其中分别介绍了基于固定储液池、流通池和取样探针 3 种模式的微流控芯片系统试样引入系统, 以及基于毛细管的微流控高通量试样引入系统。此外, 还对该领域研究发展的前景进行了展望。

关键词: 微流控分析; 高通量; 试样引入技术

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)05-0662-05 栏目类别: 专论与综述

Developments of high-throughput microfluidic sample introduction techniques

YAO Bq HE Qiaohong DU Wenbin SHI Xiaotong FANG Qun*

(Institute of Microanalytical Systems, Chemistry Department, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract How to achieve the interfacing between macro world and microchip is still one of the important topics in the research of microfluidic chips. In this paper, the recent progress in high-throughput microfluidic sample introduction techniques is described mainly based on the work achieved in the authors' group. Various high-throughput microfluidic sample introduction systems in three modes including reservoir flow-through cell and sampling probe based on microchips or capillaries are described. The developing prospects of high-throughput sample introduction techniques are also forecasted.

Key words microfluidic analysis; high throughput; sample introduction techniques

微流控芯片 (microfluidic chip) 技术是 20 世纪 90 年代初期在分析化学学科基础上发展起来的前沿领域, 它以微机电加工 (MEMS) 技术为依托, 以微管道网络为结构特征, 通过对微流体的操纵和控制, 将分析实验室的取样、试样预处理、反应、分离和检测等功能集成在微芯片上进行, 实现分析系统的整体微型化、集成化、自动化与便携化^[1, 2]。

基于微流控芯片的试样引入技术研究一直是微流控芯片分析领域内的重要研究方向之一, 其目的是解决外部宏观系统 (μL 级) 与芯片系统 ($\text{nL} \sim \text{pL}$ 级) 之间的衔接 (world-to-chip interfacing) 问题^[3]。目前微流控芯片系统中多采用基于固定储液池接口的手工间歇式试样引入方法, 操作步骤繁琐、费时, 效率低。因此, 研究自动化的高通量微流控试样引入技术, 实现宏观体系与微观流体之间的衔接, 对于提高微流控系统的分析性能和实用性至

关重要。

本研究组近十年来在微流控系统试样引入技术方面进行了较为深入系统的研究, 提出了多个试样引入新方法, 并应用于微流控芯片毛细管电泳、高速毛细管电泳、微流控流动注射分析和微流控顺序注射分析等领域^[4]。本文重点对上述研究成果和该领域的进展情况作介绍。

目前文献报道的微流控芯片系统试样引入装置可以分为固定储液池、流通池和取样探针 3 种模式 (如图 1 所示)^[4]。

1 固定储液池式微流控芯片试样引入系统

固定储液池式试样引入方法在目前微流控芯片系统中使用最多。该模式以芯片上的储液池为样品或试剂存储容器, 通常用移液器将几微升到几十微升溶液从样品管中取出加入到储液池, 再引入微通

* 通讯联系人: 方 群, 博士, 教授, 研究方向为微流控分析. E-mail: fangqun@zju.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (Nos. 20775071, 20825517 和 20890020) 和科技部“973”计划项目 (Nos. 2007CB714503, 2007CB914100).

收稿日期: 2009-08-10

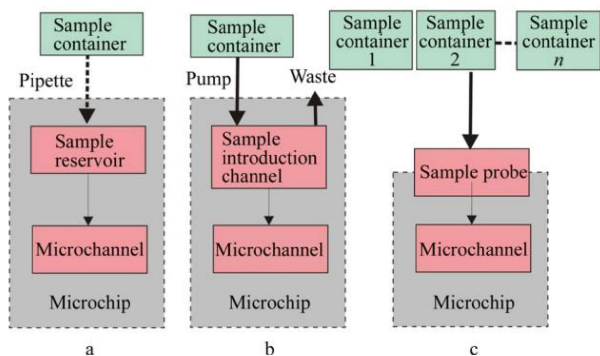
图 1 微流控芯片试样引入模式示意图^[4]

Fig 1 Modes of sample introduction systems on microfluidic chips [4]

a reservoir mode b continuous flow mode c sampling probe mode

道中(见图 1a)。分析结束后, 同样用移液器将溶液移出、清洗, 再加入下一个样品或试剂。储液池装置便于加工, 但是试样更换操作步骤繁琐、效率低, 不易实现操作的自动化。

固定储液池模式可以通过在一块芯片上集成多个独立分析单元的方式实现高通量分析。一个典型实例是安捷伦公司推出的芯片生化分析仪 (Agilent Bioanalyzer 2100^[5])。其采用了具有 12 个试样储液池的毛细管电泳芯片, 测定前一次性手工加入 12 个试样; 测定时通过各通道间液流的切换在芯片上实现换样, 而不需由外界再引入试样。一次分析任务完成后, 芯片即被废弃。Mathies 研究组^[6]在 1999 年制作了具有 96 个毛细管电泳单元的圆盘式芯片。为解决众多通道手工加样/换样的时耗问题, 他们还专门设计了一个 96 个通道的自动加样装置, 与阵列芯片、旋转扫描共焦激光荧光检测装置一起组成了一套高通量的毛细管电泳脱氧核糖核酸 (DNA) 分析系统。

Quake 研究组^[7]在其提出的多层软光刻制作气动微阀微泵技术的基础上, 建立了一种大规模集成的高密度微流控芯片系统。在聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 芯片上高密度地集成加工气动微阀微泵和 PCR (polymerase chain reaction) 温控系统。系统的试样和试剂微通道纵横排列 (20 行 × 20 列), 在垂直方向通道内引入 20 种 DNA 和 PCR 反应聚合酶, 水平通道内引入引物, 构建 400 个 PCR 反应器单元。采用分流和流水线式的试样引入方法, 大大降低了移液操作的复杂程度, 系统仅需 41 次移液加样操作, 而采用常规方法则需要进行 1 200 次移液操作。

采用上述微加工技术可加工高密度的芯片。但这些芯片的结构和操作通常较为复杂, 需要配备高

精度和程序化的电路、光学以及气路控制系统, 不易实现系统的普及。如果可以在简单的微流控芯片系统中实现快速而方便的样品切换, 可能对微流控芯片技术而言更具有实用价值, 这一问题吸引了包括作者在内的许多研究组的兴趣, 也提出了一些有价值的解决方法。

2 流通式微流控芯片试样引入系统

流通式试样引入方法是在固定储液池模式基础上加以改进而成的, 其结构如图 1b 所示, 通常在储液池和微通道之间设计一个试样引入通道作为过渡。Lin 等^[8]设计了一种芯片流通式试样引入系统, 采用 3 mm 宽的试样引入通道与 75 μm 宽的电泳分析通道相连。首先将试样导入芯片上的试样引入通道, 由此进入电泳分析通道, 采用门式进样法完成试样的注入。

上述流通式进样方法虽简化了试样更换操作, 但在实际应用中仍难以实现自动和连续地进行多试样的分析。针对上述问题, 2002 年, 我们提出了一种溢流式试样引入接口^[9]。在微流控芯片的储液池位置加工了一个溢流式试样引入通道, 以保证在长时间试样引入过程中流通池内液位的恒定。该系统可实现连续自动的试样引入, 芯片系统工作的稳定性和可靠性得到了显著提高。系统分析通量达到 40~80 个样品/h, 试样消耗量为 80~240 μL。该系统被应用于在线监测长达 4 h 的氨基酸荧光标记反应, 监测过程中内标峰高的相对标准偏差 (RSD) 为 4.9% (n = 166)。此后, 为了解决溢流式系统试样消耗量较大的问题, 我们还提出了一种滴液式试样引入接口^[10]。该系统采用液滴滴加的方式将试样溶液加入到试样引入通道, 保证换样系统和电泳系统的电隔绝。该系统被应用于氨基酸混合试样的毛细管电泳分离, 系统分析速度可达 40 个样品/h, 换样时间为 3~8 s, 每次换样量为 10~32 μL, 携出量低于 4%。

徐章润等^[11]将滴液式试样引入系统和芯片毛细管电泳系统集成, 建立了一种小型的可连续进样的微流控芯片分析仪。该系统分析速度为 35 个样品/h, 每次测定试样引入量为 150 μL。

何巧红等^[12]报道了将芯片上固定试样储液池改装为试样引入流通池的方法: 将一段毛细管直接插入芯片固定试样池中, 另一端连接试样容器, 利用电渗驱动方法将试样溶液引入到试样池内, 多余的试样溶液由试样池出口溢流流出。毛细管电泳系统采用夹流进样方法。

3 取样探针式微流控芯片试样引入系统

流通式试样引入系统的局限性是试样消耗量仍然较大。为了在实现高通量试样引入的同时降低试样消耗,出现了取样探针式试样引入模式。该方法是将毛细管与芯片耦合作为取样探针,以探针插入试样容器进行采样,其基本结构如图 1c 所示。

Zhang 等^[13]利用化学刻蚀方法在芯片通道的进样端和出口端分别加工直径为 390 μm 的圆形引导通道,将两根毛细管插入引导通道实现与芯片微通道的耦合,分别作为取样探针和连接质谱检测器的电喷雾喷嘴。取样毛细管从垂直固定在三维平移台上的 96 孔板中取样,这一设计有效地降低了试样引入的时间和体积,试样引入和通道清洗所需的时间分别为 2 s 和 3 s 试样消耗量为 500 nL。

然而,上述试样引入系统需要精确控制 96 孔板的三维移动,系统的结构和操作相对复杂。2004 年,我们提出了一种基于取样探针和缺口型试样管阵列的微流控高通量试样引入技术^[14]。其系统由加工有取样探针的微芯片和可按设定程序自动平移的缺口型试样管阵列组成。在试样管上加工供取样探针进出的取样缺口,只需通过一维移动试样管阵列扫过取样探针即可实现高通量的试样引入。采用上述方法,只需简单的系统和操作即可实现以往采用复杂系统和操作才能完成的 nL 级的试样引入,以及多个不同试样的快速切换。该技术首先被应用于重力驱动芯片流动注射分析系统(见图 2)^[15]。该系统无需加工流动注射微进样阀,采用样品管和空白管间隔配置的试样管阵列,在进行试样引入的

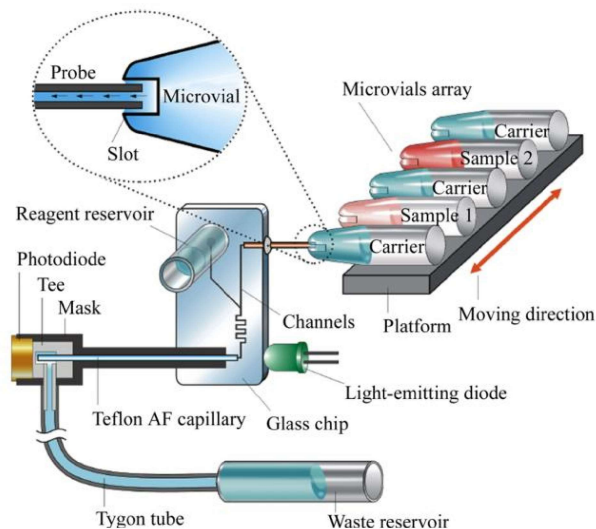


图 2 基于取样探针和缺口管阵列的微流控芯片高通量流动注射分析系统^[15]

Fig 2 Schematic diagram of the microchip-based flow injection analysis (FIA) system with a sampling probe and slotted-vial array [15]

同时即可完成流动注射进样操作。与文献报道的芯片流动注射分析系统相比,新系统提供了一个完全不同以往的构建芯片流动注射系统的新思路,其整体结构和操作大大简化,对不同试样的分析通量大幅度提高,最高达到 1 000 个样品/h 而每次测定试样的最低消耗量仅为 0.6 nL,分析精密度 (RSD) 达到 0.6% ($n = 11$)。

Guan 等^[16]利用上述缺口管阵列进样系统与毛细管蒸发泵结合,在芯片上建立了采用化学发光检测的流动注射分析系统。采用鲁米诺- Fe^{3+} - H_2O_2 化学发光体系考察系统的分析性能,分析速度为 30 个样品/h 分析重现性 (RSD) 为 1.4% ($n = 11$)。Xu 等^[17]也利用这种毛细管蒸发泵和进样方式,使用 Y 型汇流通道芯片,采用激光诱导荧光检测进行 DNA 分析,分析精度 (RSD) 达 1.6% ($n = 15$),分析通量为 76 个样品/h 每次测定试样消耗量为 95 nL。此外,Cai 等^[18]将缺口管阵列技术应用于微流控芯片液膜萃取系统,实现水相试样和有机萃取剂的顺序引入。Shen 等^[19]则将取样探针-缺口管阵列技术应用于芯片液滴阵列液液萃取-化学发光检测分析系统,实现清洗剂、有机溶剂/发光试剂、水相试样、发光催化剂和洗脱剂等多种液体的顺序引入,展现了该技术完成多步液体引入复杂操作的能力。

2005 年,He 等^[20]将取样探针-缺口管阵列系统应用于芯片毛细管电泳系统,利用毛细管与芯片的耦合技术,将毛细管水平连接于芯片的充样微通道作为取样探针,并与缺口管阵列的自动供样系统相结合,实现了电泳芯片试样引入和更换操作的自动化。系统的试样消耗量降至 240 nL,分析速度达 36 个样品/h。2007 年,他们又对芯片取样探针的加工方法进行了改进,提出了一种利用金刚砂钻头钻磨芯片的一体化取样探针加工技术^[21]。该技术简便易行,通用性强,可加工得到与常规石英毛细管外径相当甚至更细的针状取样探针。取样探针内不存在芯片与毛细管接口的死体积问题。利用上述技术,建立了电驱动连续试样引入芯片毛细管电泳系统(见图 3),并将该系统应用于荧光标记氨基酸试样的快速分离。对不同试样的分析速度达到 30~60 次/h 试样更换时间小于 1 s 试样携出量不超过 1.0%,每次测定试样的消耗量大幅度降低至 30 nL。

4 基于毛细管的高通量试样引入系统

上述取样探针-缺口管阵列试样引入系统不仅可以应用于微流控芯片,也可以作为毛细管分析系统的试样引入和换样装置。Du 等^[22]采用毛细管直接与缺口管阵列匹配的方法,实现不同液体的顺序

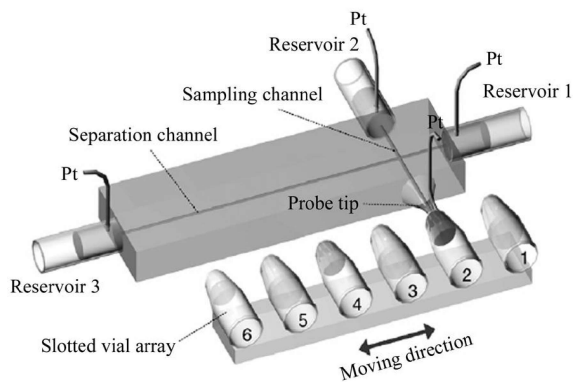


图 3 具有一体化取样探针的芯片毛细管电泳分析系统^[21]
Fig 3 Schematic diagram of the microfluidic chip based capillary electrophoresis system with a monolithic sampling probe [21]

引入操作,建立了基于毛细管的微流控顺序注射分析系统。该系统无需任何微加工设备和技术即可构建,在单通道毛细管内实现 nL 级试样和多个试剂的顺序引入、快速混合和反应,成功地解决了单通道毛细管系统不易实现多液体引入、汇合和反应的问题。同时还对单毛细管通道内串行多液体区带间的混合行为进行了理论分析和实验验证,结果证明在 nL 级区带体积范围内,串行液体区带间可实现有效的混合,其混合行为可用 Taylor 扩散模型准确预测。该系统还被应用于基于 β -半乳糖苷酶的高通量药物筛选实验,每次测定试样和酶试剂以及底物溶液的消耗量均为 4.2 nL,最高分析通量达到 300 个样品/h。

此外,取样探针-缺口管阵列试样引入模式也被应用于基于短毛细管的快速毛细管电泳系统中,实现进样和换样操作的自动化。Liu 等^[23]首先采用该技术建立了紫外检测快速毛细管电泳分离系统,将试样管和缓冲液管固定于一维平移台上,形成缺口管阵列;实验时,平移缺口管阵列,使毛细管进样端依次进入试样管和缓冲液管内,完成电动进样及电泳分离操作。将该系统应用于复方新诺明片中磺胺甲恶唑 (sulphanethoxazole, SMZ) 和甲氧苄氨嘧啶 (trimethoprim, TMP) 两组分的分离,最高分析速度为 72 个样品/h,进样体积为 1.8 nL,分离 SMZ 的塔板高度为 11 μm 。

Xu 等^[24]对缺口管阵列的结构进行了改进,提出了一种一体化的齿轮盘式缺口管阵列。通过旋转齿轮盘,使毛细管进样端依次浸入齿轮盘上的试样溶液和缓冲液,完成电动进样和电泳分离。当电动进样时间为 1 s 时,进样量为 2 nL。将该系统应用于氨基酸的电泳分离,分析通量为 60 个样品/h,试样携出量为 2.7%。

常规的高速毛细管电泳系统通过采用 pL 级进样、短毛细管和高分离场强的方法,将分析时间缩短至秒级,同时达到塔板高度低于 1 μm 的高分离效率。已经建立的光门进样和流动门进样等方法虽然能满足高速毛细管电泳对 pL 级进样的要求,但是它们结构复杂,并且无法克服进样歧视效应。基于微流控芯片的高速毛细管电泳可以利用微通道网络实现 pL 级进样,但是芯片加工难度和成本均较高。最近,我们^[25]将毛细管自发进样与取样探针-缺口管阵列进样技术相结合,建立了一种微流控平移自发进样方法,在毛细管内实现了低于 100 pL 的试样引入。该技术被成功地应用于高速毛细管电泳系统 (见图 4),在有效分离长度仅为 1.5 cm 的毛细管上,采用自由区带电泳模式在 5.4 s 内完成了 5 种氨基酸的基线分离,分离效率高达 0.40 μm 塔板高度;连续 51 次测定,各个电泳峰峰高的 RSD 在 1.2% 至 3.7% 之间。当将毛细管的有效分离长度延长至 5 cm 时,在 21 s 内实现了 8 种氨基酸的高速高效分离,对 8 个组分的分离效率为 163 000 ~ 251 000 塔板/m,相应的塔板高度为 0.31 ~ 0.20 μm 。该系统在分离速度和分离效率等性能方面已经达到甚至超过芯片毛细管电泳系统。

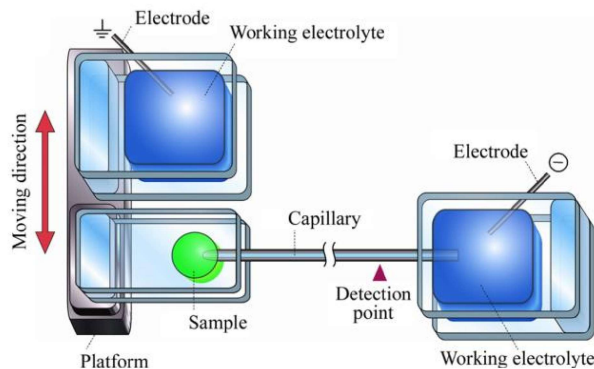


图 4 基于微流控平移自发进样和短毛细管的高速毛细管电泳系统示意图^[25]

Fig 4 Schematic diagram of the high speed capillary electrophoresis system based on translational spontaneous injection and a short capillary [25]

5 展望

综上所述,快速、连续、自动化的试样引入系统是微流控芯片系统必不可少的组成部分,也是在真正意义上实现微流控系统高速和高通量目标的重要技术环节。本文中列举的一系列实现高通量的试样引入技术,包括储液池阵列、大规模集成微泵微阀芯片和缺口管阵列等,均在一定程度上解决了微流控芯片试样引入的问题,具有各自的优点,但同时存

在一些不足。例如, 固定储液池阵列将不同样品分别置于相对独立的分析单元, 彼此间隔, 可有效避免交叉污染。但是, 这类系统一般需要大量的手工操作或三维移动的加样设备。当芯片集成高密度分析单元时, 实现不同试样的平行操作和检测的难度也会大大增加。基于微泵微阀的大规模集成 PDMS 芯片也可以获得很高的试样分析通量, 通过微泵微阀的操作可大大降低手工操作的次数。不过, 采用微泵微阀的结构使得芯片设计和加工的复杂性增加, 其操作也需要程序化控制。缺口管阵列装置在系统设计和加工方面均较为简单, 易于实现, 通过连续引入不同的试样可有效提高单一分析单元对不同试样的分析通量, 试样和试剂的消耗量真正达到 nL ~ pL 级。不过, 目前缺口管阵列系统还未能达到常规的 96 或 384 孔板的样品通量水平, 尚需进一步提高其阵列的集成密度。

此外, 基于毛细管和缺口管阵列的高通量试样引入系统为建立简单实用的微流控自动化分析平台提供了有效的工具, 显示了围绕毛细管构建微流控分析系统的优势及发展潜力, 可以作为微流控芯片分析系统的有益补充。这类非芯片系统不需要复杂昂贵的微加工设备, 在普通化学实验室即可加工, 而其分析性能却有可能达到与微流控芯片系统相当的水平。

参考文献:

- [1] Fang Z L. Fabrication and application of microfluidic analytical chip. Beijing: Chemical Industry Press (方肇伦. 微流控分析芯片的制作及应用. 北京: 化学工业出版社), 2005: 1
- [2] Fang Z L. Microfluidic analytical chip. Beijing: Science Press (方肇伦. 微流控分析芯片. 北京: 科学出版社), 2003: 1
- [3] Fredrickson A C K, Fan Z H. Lab Chip, 2004, 4(6): 526
- [4] Fang Q, Shi X T, Du W B, et al. Trends Anal Chem, 2008, 27(6): 521
- [5] Agilent Technologies. Bioanalyzer 2100 [2009-06-15]. <http://www.chem.agilent.com/en-US/Products/Instruments/lab-on-a-chip/2100bioanalyzer/Pages/default.aspx>
- [6] Shi Y, Simpson P C, Scherer J R, et al. Anal Chem, 1999, 71(23): 5354
- [7] Liu J, Hansen C, Quake S R. Anal Chem, 2003, 75(18): 4718
- [8] Lin Y H, Lee G B, Li C W, et al. J Chromatogr A, 2001, 937(1/2): 115
- [9] Fang Q, Xu G M, Fang Z L. Anal Chem, 2002, 74(5): 1223
- [10] Fang Q, Jia Z J, Fang Z L, //Baba Y, Shoji S, van den Berg A. Micro total analysis systems 2002, Vol. 1. Kluwer Dordrecht [s n], 2002: 685
- [11] Xu Z R, Wang S L, Fan X F, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (徐章润, 王世立, 樊晓峰, 等. 分析化学), 2003, 31(12): 1527
- [12] He Q H, Fang Q, Fang Z L. Chinese Journal of Analytical Chemistry (何巧红, 方群, 方肇伦. 分析化学), 2006, 34(5): 729
- [13] Zhang B, Foret F, Karger B L. Anal Chem, 2001, 73(11): 2675
- [14] Fang Q, Du W B, He Q H, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (方群, 杜文斌, 何巧红, 等. 高等学校化学学报), 2004, 25(8): 1442
- [15] Du W B, Fang Q, He Q H, et al. Anal Chem, 2005, 77(5): 1330
- [16] Guan Y X, Xu Z R, Dai J, et al. Talanta, 2006, 68(4): 1384
- [17] Xu Z R, Zhong C H, Guan Y X, et al. Lab Chip, 2008, 8(10): 1658
- [18] Cai Z X, Chen H W, Chen B, et al. Talanta, 2006, 68(3): 895
- [19] Shen H, Fang Q, Fang Z L. Lab Chip, 2006, 6(10): 1387
- [20] He Q H, Fang Q, Du W B, et al. Analyst, 2005, 130: 1052
- [21] He Q H, Fang Q, Du W B, et al. Electrophoresis, 2007, 28: 2912
- [22] Fang Q, Du W B, Fang Z L. Anal Chem, 2006, 78(17): 6404
- [23] Liu J, Fang Q, Du W B. Chinese Journal of Analytical Chemistry (刘军, 方群, 杜文斌. 分析化学), 2005, 33(12): 1799
- [24] Xu X R, Lan Y, Fan X F, et al. Talanta, 2009, 78(2): 448
- [25] Zhang T, Fang Q, Du W B, et al. Anal Chem, 2009, 81(9): 3693