

微流控芯片发展与展望^{*}

方肇伦 方群

(浙江大学化学系微分析系统研究所 杭州 310028)

E-mail: imasz@mail.hz.zj.cn

摘要 介绍了微流控分析系统的一般特点、发展历史和近期的研究进展。分别讨论了微流控分析系统中有关流控系统、芯片材料、检测系统、集成化系统、分离系统、试样引入和前处理系统等研究领域的发展趋势,并对微流控分析系统的应用前景做出了展望。

关键词 微流控分析;微流控芯片;微全分析系统;芯片实验室

中图分类号 O65

Developments and Trends of Microfluidic Chip Analytical Systems

Fang Zhaolun Fang Qun

(Institute of Microanalysis Systems, Chemistry Department, Zhejiang University, Hangzhou 310028, P. R. China)

Abstract An overview is given on the general aspects, history and recent developments of microfluidic analytical systems. Various trends are discussed including the development of different fluidic systems, different chip materials, detection systems, integrated systems, separation systems, sample introduction and pretreatment systems. Potential application areas are also discussed.

Key words Microfluidic analysis; microfluidic chips; miniaturized total analysis systems; lab-on-a-chip

1 前言

微型全分析系统(Miniaturized Total Analysis Systems, TAS)或称芯片实验室(Laboratory-on-a-Chip, 简称 LOC)是一个跨学科的新领域,其目标是通过分析化学、微机电加工(MEMS)、计算机、电子学、材料科学及生物学、医学的交叉实现化学分析系统从试样处理到检测的整体微型化、自动化、集成化与便携化。四十年前微电子技术与信息科学的发展中引发了一场革命,并对20世纪科技发展起了重要的推动作用。最近的发展表明,90年代初提出的以微电子加工技术为依托的微型全分析系统,预计在未来十年内也将对分析科学乃至整个科学技术的发展发挥相似的作用。它不仅可使珍贵的生物试样与试剂消耗大大降低到微升甚至纳升级,而且使分析速度成十倍百倍地提高,费用成十倍、百倍地下降,从而为分析测试技术普及到千家万户,实现分析实验室的“家

庭化”、“个人化”创造了条件。微流控分析(Microfluidic Analysis)是微型全分析系统的主要组成部分,而将化学分析的多种功能集成在邮票大小的芯片上的微流控芯片(Microfluidic chips)又是当前最活跃的发展前沿,代表着21世纪分析仪器走向微型化、集成化的发展方向,已成为国内外许多著名实验室的奋斗目标。

微流控芯片与前些时间报道较多的生物芯片(Biochips)或称微阵列芯片(Microarray chips)统属LOC系统,在我国常被混为一谈,或把微流控芯片包容在生物芯片之中,但实际上微流控芯片与生物芯片涉及的是两个完全不同的学科技术领域,并经历了各自独立的发展过程。因生物芯片的应用对象主要是DNA分析,所以早期也称为DNA芯片,其发展要早于微流控芯片4~5年,始于80年代末。其发展契机主要来自于现代遗传学的一些重要发现,并直接受益于该领域的某些重要研究成果,即在载体上固定寡核苷酸的基础上以杂交法测序的技术。这类芯片在前

收稿日期:2001-07-11

^{*} 本文系第165次香山科学会议报告论文。

基金资助:本项目部分工作得到教育部和浙江省人事厅出国留学基金支持。

作者简介:方肇伦,1934年生于天津,祖籍浙江定海,男,东北大学、浙江大学教授,中国科学院院士,1957年北京大学化学系毕业,主要研究方向为流动注射分析和微流控分析。

几年发展较快,在国外已实现深度产业化。在国内获得国家较大的重视,形成了发展规划,得到较多的开发研究经费支持,从而得到较大发展。微流控芯片则是 90 年代初、中期主要在分析化学领域发展起来的,它以分析化学为基础,以微机电加工技术为依托,以微管道网络为结构特征,以生命科学为目前主要应用对象,是当前微型全分析系统领域发展的重点。它的目标是把整个化验室的功能,包括采样、稀释、加试剂、反应、分离、检测等集成在微芯片上,且可多次使用,因此较生物芯片有更广泛的适用性及应用前景。从表 1 中对微流控芯片与生物芯片的比较中可看出二者之间应是互补与相互融合的关系而不是以谁为主包容另一方的关系。这样才能有利于两种芯片在我国平行健康发展。

微流控芯片当前无论在基础研究还是产品开发方面国际上的竞争都日趋白热化。参与竞争的既有世界名牌大学和研究所,也有世界最大的分析仪器厂家。然而目前在微流控芯片各方面都领先的美国也仅在 90 年代中期才有较大投入,起步时间都还不久。如有相应的组织与投入,我们就有可能迅速赶上本领域的国际先进水平。

表 1 微流控芯片与生物芯片的比较

	微流控芯片	生物芯片
主要依托学科	分析化学、MEMS	生物学、MEMS
结构特征	微管道网络	微探针阵列
工作原理	微管道中流体控制	生物杂交为主
使用次数	数十至数百次	一般一次
前处理功能	多种技术供选择	基本无
集成化	全化验室功能	高密度杂交反应阵列
应用领域	全部分析领域	DNA 等专用生物领域
产业化程度	初始阶段	深度产业化

2 微流控芯片型微全分析系统的简要发展史

微全分析系统的概念是在 1990 年首次由瑞士 Ciba-Geigy 公司的 Manz 与 Widmer 提出^[1],当时主要强调了分析系统的“微”与“全”,及微管道网络的 MEMS 加工方法,而并未明确其外型特征。次年 Manz 等即在平板微芯片上实现了毛细管电泳与流动注射分析,从而把微系统的主要构型定位为一般厚度不超过 5 毫米,面积为数平方厘米至十几平方厘米的平板芯片^[2]。但直到 1994 年之前这一新领域的发展前景并不十分明朗。1994 年始,美国橡树岭国家实验室 Ramsey 等^[3]在 Manz 的工作基础上发表了一系列论文,改进了芯片毛细管电泳的进样方法,提高了其性能与实用性,引起了更广泛的关注。在此形势

下,该年首届 μ TAS 会议以工作室的形式在荷兰 Enchede 举行,起到了推广微全分析系统的作用。1995 年美国加州大学 Berkeley 分校的 Mathies 等人^[4]在微流控芯片上实现了高速 DNA 测序,微流控芯片的商业开发价值开始显现,而此时微阵列型的生物芯片已进入实质性的商品开发阶段。同年 9 月,首家微流控芯片企业,Caliper Technologies 公司在美成立,虽然只有三十多名雇员,但一年即集资近千万美元。1996 年 Mathies 等^[5]又将基因分析中有重要意义的聚合酶链反应(PCR)扩增与毛细管电泳集成在一起,展示了微全分析系统在试样处理方面的潜力,次年他们又实现了微流控芯片上的多通道毛细管电泳 DNA 测序,从而为微流控芯片在基因分析中的实际应用提供了重要基础。与此同时,有关企业中的微流控芯片研究开发工作也在加紧进行,1998 年之后专利之战日益激烈,一些微流控芯片开发企业纷纷与世界著名分析仪器生产厂家合作,利用各自的优势技术平台抢先推出首台微流控分析仪器。1999 年 9 月惠普(现 Agilent)与 Caliper 联合研制的首台微流控芯片商品化仪器开始在欧美市场销售,至今年 8 月已可提供用于核酸及蛋白质分析的 5~6 种芯片^[6]。其它几家厂商也于今年开始将其产品推向市场。

2000 年 5 月第四届国际 μ -TAS 会议的召开是对微全分析系统发展的一次全面检阅,它预示着微全分析系统的一个更大的发展高潮即将到来。

3 微型全分析系统的发展趋势

1)继微阵列生物芯片之后,微流控分析芯片已成为微型全分析系统当前的发展前沿。这在第四届国际微型全分析系统学术会议(μ TAS-2000)上有所反映。有关微流控芯片的会议论文数占总数的 87%,而生物芯片仅占约 4%^[7]。

2)微流控分析系统从以毛细管电泳分离为核心分析技术发展液-液萃取、过滤、无膜扩散等多种分离手段。其中多相层流分离微流控系统结构简单,有多种分离功能,具有广泛的应用前景^[8](图 1)。已有多篇文献报道采用多相层流技术实现芯片上对试样的无膜过滤、无膜渗析和萃取分离。同时也有采用微加工有膜微渗析器完成质谱分析前试样前处理操作的报道^[13]。亦有文献报道采用微加工方法制作微型过滤器^[7](图 2)。

3)微流控分析系统从以电渗流为主要液流驱动手段发展到流体动力、气压、重力、离心力、剪切力等多种手段。例如, Duffy 等^[9]研究了以离心力驱动试样和试剂的园盘式微流控系统,同时实现 48 个通道

的酶法比色测定。

增循环。扩增与分离全过程在 20 分钟内完成(图 4)。

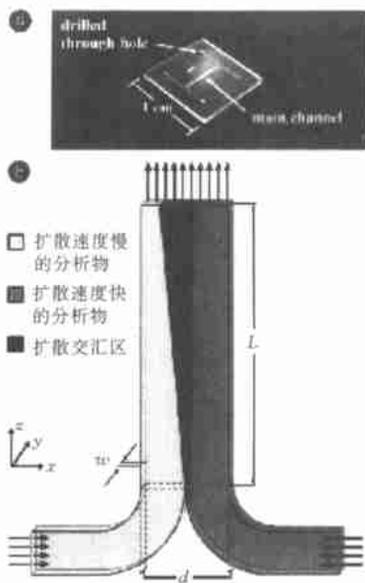


图 1 多相层流分离技术工作原理示意图

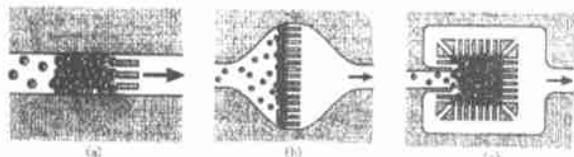


图 2 不同构型微加工微过滤器

4)微流控分析系统从单道检测发展到多重平行检测。加州大学伯克利分校 Mathies 的研究组在 1999 年提出了集 96 个分离通道于一体的如 CD 光盘的微流控阵列毛细管芯片系统^[10],用此芯片仅用 2 分钟便平行测定了 96 个 DNA 试样的片段(图 3)。

5)微流控分析系统从以激光诱导荧光及光度法为主要检测器发展到多种检测手段,如电化学、质谱、原子光谱、光声光谱、化学发光等。最近黄晓晶等实现了毛细管电泳微流控芯片上金属离子与氨基酸的分离与化学发光检测^[11]。

6)微型全分析系统已从分离检测发展为包括复杂试样前处理的高功能全分析系统。Manz 的研究组提出了聚合酶链反应(PCR)微流控芯片扩增反应器^[12]。芯片上的通道每个循环经过由三个加热铜块提供的 PCR 变性、退火及延伸温区,总共循环 20 次。用此装置最快时 90 秒后即可得到扩增的 DNA 试样,不但仪器体积缩小,减少了试样和试剂消耗,还提高了扩增速度。PCR 芯片还同时提供了与 DNA 测序芯片联用或集成化的可能性。Woolley 等^[4]则使用一个集成在芯片微通道入口处的可变温反应室进行 PCR 扩增与和毛细管电泳联用。反应物加入 PCR 反应室后,计算机控制反应室温度,25~30 秒完成一次扩

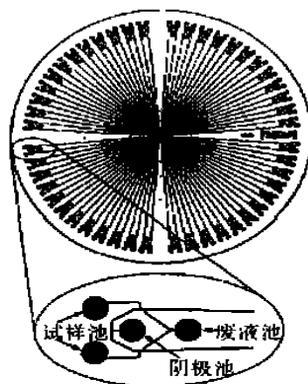


图 3 多通道阵列芯片

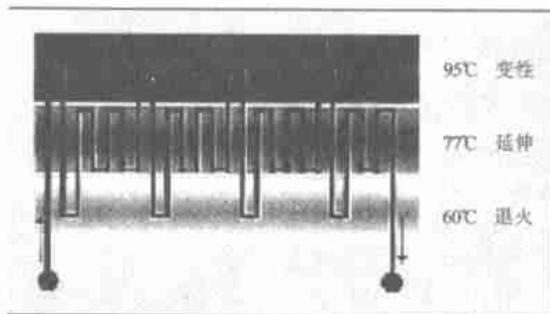


图 4 通道型 PCR 芯片工作原理示意图

7)微全分析系统从成分分析工具发展到包括在线检测的微型化学反应与合成手段,在新药物筛选中显示出强大的生命力。

8)微全分析系统从一般成分分析发展为单分子、单细胞分析。最近 Gosch 等^[13]在硅-玻璃微流控芯片上用共聚焦荧光显微技术检测了四甲基罗丹明标记的单个分子。

9)微流控芯片从以玻璃基质为主发展到玻璃与高分子聚合材料并重,尤其在芯片的产业化方面,后者将更具备优势^[14]。

10)微全分析系统开始从基础与应用基础研究阶段进入产业化及市场开发阶段。99 年 Agilent Technologies 与 Caliper Technologies 联合推出的具有代表性的商品化仪器 Bioanalyzer 2100 测定 DNA 的 1.78 × 1.78cm 芯片^[9]。其中间通道为毛细管电泳分离通道,仅长约 15mm。片上四个较大的孔为缓冲液及标准梯形条带试样池,12 个较小的孔为试样池,分别通向分离通道并与之交叉。当每个液池同时插入电极,并按一定次序通以高电压或切断时,12 个试样按十字通道进样的相似原理,相继注入分离通道,仅用 20 多秒,DNA 片断即达到分离,并立即在通道终端用激

光诱导荧光法进行检测。全部 12 个试样的测定约需 30 分钟。芯片价值十几美元,为一次性使用,测定 12 个试样后即弃去。其它竞争对手还有 Aclara Bio-Sciences, Orchid BioSciences 等。

11) 微流控分析目前发展中的一个主要薄弱环节是宏观试样与微芯片的衔接或接口问题,这已在本领域的研究者中取得共识。它对微流控系统的实际应用与普及十分重要,但目前进样多采用手工完成,效率低下,可靠性也较差。进样与换样的自动化、微型化、集成化势在必行。我们最近提出了一种流通式连续进样系统,在微流控芯片毛细管电泳分析中可连续进、换样数百次,携出率小于 $1.5\%^{[15]}$ (图 5)。

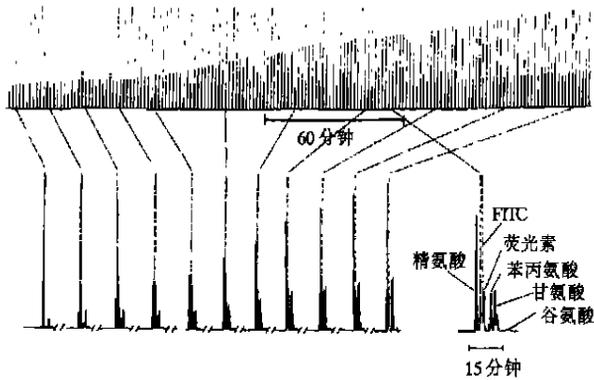


图 5 连续换样微流控芯片毛细管电泳分析系统在线监测异硫氰酸荧光素(FITC)标记不同氨基酸反应过程记录图

生物医学是当前微流控芯片的主要应用领域,针对人类基因与疾病关系的研究,研制超过生物芯片某些性能的用于单核苷酸多态性(SNP)检测、DNA 测序及后基因组时代的蛋白质测序的毛细管电泳微流控芯片是当务之急。用于临床检验的微流控芯片在我国将拥有最广泛的市场。新药物的合成与筛选是微型全分析系统另一个可发挥重要作用的领域。由于微型化的反应及在线测定条件,筛选过程可大大加速,费用大大降低。微流控分析芯片在新一代药物问世的过程中将可能起到至关重要的作用。其它重要应用领域包括食品和商品检验、环境监测、刑事科学、军事科学、及航天科学等。由于微全分析系统的目标是取代常规分析实验室的所有功能,其应用领域进一步扩大到需要化学成分分析的所有方面只是时间问题。微型全分析系统的研究除涉及到大量的微加工技术和芯片材料的内容外,还包括广泛的基础理论和应用基础内容,例如微米通道中的传质、导热、吸附及微区反应规律等。许多分析化学的传统理论在微、纳米尺度下将面临挑战而需要深入研究。

4 展望

从目前的发展水平看,微流控分析芯片已突破其发展初期在加工技术及基本流控技术上的主要难关,正在进入一个开展更深入的基础研究,广泛扩大应用领域,及深度产业化的转折时期。预计这一时期不会很长,少则二、三年,多则六、七年,以微流控芯片为核心的微分析系统将取代当前化学分析实验室的很多设备,使化学分析进入病房、生产现场甚至家庭。在此基础上再经过三、五年,能监测自身生化指标及基因变异、食品卫生及环境状况的便携式“个人化实验室”将可能成为现实。

参考文献

- [1] Manz A *et al.* Miniaturized Total Chemical Analysis Systems; A Novel Concept for Chemical Sensing. *Sens. Actuators B*, 1990(1): 244 ~ 248
- [2] Harrison D. J. *et al.* Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis Based Chemical Analysis System on a Chip. *Science*, 1993(261): 895 ~ 897
- [3] Ramsey J. M. *et al.* Microfabricated Chemical Measurement Systems. *Nature Med.*, 1995(1): 1093 ~ 1096
- [4] Woolley A. T., Mathies R. A. Ultra-high Speed DNA Sequencing Using Capillary Electrophoresis Chips. *Anal. Chem.*, 1995(67): 3676 ~ 3680
- [5] Woolley A. T. *et al.* Functional Integration of PCR Amplification and Capillary Electrophoresis in a Microfabricated DNA Analysis Device. *Anal. Chem.*, 1996(68): 4081 ~ 4086
- [6] http://www.chem.agilent.com/cag/products/sw_2100home_nonflash.htm
- [7] Van den Berg, A. Olthuis, W., Bergveld P. (Eds.), *Micro Total Analysis Systems 2000*, Netherlands Kluwer Academic Publishers
- [8] Van den Berg, A. Olthuis, W., Bergveld, P. (Eds.), *Micro Total Analysis Systems 2000*, Netherlands; 15 ~ 18
- [9] Duffy, D. C. *et al.* Microfabricated Centrifugal Microfluidic Systems: Characterization and Multiple Enzymatic Assays. *Anal. Chem.*, 1999(71): 4669 ~ 4678
- [10] Shi, Y., *et al.* Radial Capillary Array Electrophoresis Microplate and Scanner for High-performance Nucleic Acid Analysis. *Anal. Chem.*, 1999(71): 5354 ~ 5361
- [11] Huang X.-J., *et al.* Capillary Electrophoresis System with Flow Injection Sample Introduction and Chemiluminescence Detection on a Chip Platform. *Analyst*, 2001(126): 281 ~ 284
- [12] Kopp M. U., *et al.* Chemical Amplification: Continuous-flow PCR on a Chip. *Science*, 1998(280): 1046 ~ 1048
- [13] Van den Berg, A. Olthuis, W., Bergveld, P. (Eds.), *Micro Total Analysis Systems 2000*, Netherlands; 427 ~ 430
- [14] Soper S. A., *et al.* Polymetric Microelectromechanical Systems. *Anal. Chem.*, 2000(72): 643A ~ 651A
- [15] Fang Q., *et al.* A High Throughput Continuous Sample Introduction Interface for Microfluidic Chip Based on Capillary Electrophoresis Systems. *Anal. Chem.*, Submitted.