

激光技术在聚合酶链式反应微流控芯片中的应用

章春笋 邢达* 李彧媛

(华南师范大学激光生命科学教育部重点实验室,暨激光生命科学研究所,广州 510631)

摘要 评述了激光技术在聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 微流控芯片领域中的应用进展,包括激光技术在 PCR 微流控芯片微加工、微流体物理参数测量、温度循环控制以及芯片上在线产物检测(包括荧光实时定量/终点和毛细管电泳检测)中的应用。最后,展望了激光技术在未来基于 PCR 的微全分析系统 (micro-total analysis system, μ TAS) 中的新应用。

关键词 激光技术,聚合酶链式反应 (PCR),微流控芯片,微细加工,微流体物理参数测量与控制,评述

1 引言

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种选择性体外扩增 DNA 片断的技术,在分析化学、生物学以及医学等领域得到了广泛的应用。然而,目前常规 PCR 仪存在着热质大、升降温速度慢、试剂耗用多,以及能量消耗大而不便携等缺点。为了克服这些不足,近年来 PCR 微流控芯片扩增系统迅速发展,微流控系统的高比表面积有利于快速的热交换,而且较小的样品体积也具有较小的热质^[1-3]。目前,PCR 微流控芯片从构型上可分为微池静态式(包括单池、多池以及虚拟反应池等)和连续流动式 PCR (包括单向“蛇”型、单向螺旋型以及双向振荡型等 3 种)^[4-10]。

在生命分析化学的发展过程中,激光技术发挥越来越重要的作用^[2],它的优异特性例如高单色性、高的空间与时间相干性以及高的平均峰值强度等已在生命分析现代科学技术方面发挥了独特的作用。自 1960 年第一台激光器问世以来,陆续出现了多种不同类型的激光器,例如固体激光器 (Nd:YAG、红宝石等)、气体激光器 (He-Ne、Ar⁺、CO₂ 等)、半导体激光器 (GaAs、InGaAsP/InP 等)、准分子激光器 (XeCl、KrF 等) 以及自由电子激光器等。由于激光器的发展以及激光相关技术的不断进步,激光技术不断渗透到微流控芯片领域中^[1]。本文将综述激光技术在 PCR 微流控芯片中应用及其进展,主要包括激光技术在芯片微加工、微流体物理参数测量和控制、PCR 产物荧光检测 (实时定量法和终点法) 以及 PCR-毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 集成芯片中产物分离检测中的应用。

2 激光技术在 PCR 微流控芯片微加工中的应用

激光最早的实际应用就是被作为切削、钻孔以及焊接的工具,目前它已发展成为一种新的微电子机械系统 (micro-electro-mechanical system, MEMS) 加工技术,是一种非接触的微细加工工具,通常称为激光刻蚀法或激光烧蚀法。2001 年,Giordano 等^[11]通过激光刻蚀技术在厚度为 150 μ m 的聚酰亚胺 (polyimide, PI) 芯片上刻蚀出体积为 1.7 μ L 的孔洞,然后和另两个厚度为 125 μ m 的 PI 芯片键合,形成一个厚度为 400 μ m 的 PI 基 PCR 芯片。Yang 等^[12]通过 CO₂ 激光直写加工技术在价格低廉的聚碳酸酯 (polycarbonate, PC) 衬底上微加工出具有“蛇”型通道结构的 PCR 静态微反应器。这种 PCR 微反应器由上下两片透明的 PC 和一片黑色的 PC 片构成,每片厚 250 μ m,键合在一起为 750 μ m。在黑色 PC 片上激光加工而成的“蛇”型通道为宽 1.5 mm、深 0.25 mm,可以容纳 40 μ L 样品体积。Cheng 等^[13]采用 CO₂ 激光微加工技术在聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate, PMMA) 片上加工振荡型 PCR 微通道以及在透明的钢锡氧化物 (ITO) 涂层的玻璃上加工出电阻加热器芯片。在厚为 2 mm PMMA 芯片上,通过控制激光束的直径以及激光能量,获得不同宽深比的反应沟槽。在目前的技术条件下,沟槽特征宽度达到 80 μ m。值得指出的是,对于 PCR 反应芯片和温度控制芯片,采用相同的 CO₂ 激光加工过程能简

2007-06-12 收稿;2007-09-24 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30700155, 30670507, 30600128, 30470494) 和广东省自然科学基金 (No. 015012) 资助项目

* E-mail: xingda@scau.edu.cn

化整个加工过程,这允许芯片系统能按不同的要求快速地重新设计和加工。姚李英等^[14,15]采用柔性大且自动化程度高的 248 nm KrF 准分子激光加工技术在 PMMA 基片上制备“蛇”型通道的 PCR 微流控芯片。该文详细描述了 PMMA 基片的准分子激光微加工规律和原则。据报道,在 19 kV 和 18 mm/min 的优化加工条件下,加工宽 104 μm 、深 56 μm 、长 20.6 cm 的微通道大约需 110 min。芯片微通道横截面呈梯形,这主要由于当激光工作频率、入射激光能量以及工作台运动速度一定时,部分入射激光能量被微通道侧壁吸收,使得入射激光能量的空间分布发生改变的缘故。此外,Hashimoto 等^[16,17]利用准分子 KrF 激光器在 PC 芯片上钻孔(Φ 100 和 270 μm)来作为 PCR 样品进出口。文献[18,19]采用激光加工技术在玻璃片上钻孔作为 PCR 样品的进出口。

激光微细加工技术与其它 MEMS 加工技术(如光刻、干/湿化学刻蚀、聚合物(多层)软光刻、模塑、热压以及 LIGA 等)相比,其优势主要包括:(1)不论红外激光(如 CO_2 激光)还是紫外激光(如准分子激光)微加工,芯片打孔和微通道加工可一次完成,步骤简单,加工速度一般为 cm/min 量级,加工范围可达 dm 量级(一般光刻法很少超过 10 cm);(2)尽管不同聚合物材料的吸光特性不同,但通过调整加工条件,同一种激光微加工技术能在 PI、PC、PMMA、聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET),聚乙烯(polyethylene, PE),甚至聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)等多种聚合物衬底材料上微加工出微通道或反应池。因此,在需要几种不同衬底材料来组建复杂的、集成化的 PCR 微流控芯片^[16,17]时,它能极大地简化微机械加工的过程,从而减少芯片加工成本;(3)在微加工过程中,不向工件施加任何外力,受热影响区小,高穿透度,优良的宽深比例以及环保等也是激光微加工的优势之处。(4)随着激光技术的发展,新兴的激光微细加工技术不断涌现(如飞秒激光双光子聚合三维微细加工技术等),采用激光加工技术使快速有效地完成具有三维结构的、高度集成的 PCR 微全分析系统(μTAS)成为可能。然而,激光微细加工也有其不足之处:激光刻蚀所形成微通道的平整度与其它微加工方法相比还有一定的差距;不同衬底材料激光刻蚀形成的微结构形貌也有很大不同;激光微加工过程中溅射出的微粒可能会与空气中的氧发生反应并沉积在微通道中,从而影响电渗流。以上这些不足之处不利于 PCR 与 CE 等集成化的微流控芯片的开发研究。由于 PCR 微流控芯片相对于一般微流控芯片而言具有一些特殊性,包括系统的热容小,可提高反应速度;反应系统透明,便于产物在线光学检测;反应系统应包括微阀/微泵/微混合器等微流控元件,形成集成化的 PCR 芯片。这些特殊性往往要求几种衬底材料(如玻璃、聚合物甚至陶瓷等)在 PCR 芯片中耦合使用,对芯片的微加工提出较高的要求(如加工步骤简便、精度好以及价格便宜等)。而激光微加工技术在这方面具有很好的优势,因为该微加工技术可直接根据计算机 CAD 数据在聚合物、玻璃、陶瓷甚至金属等材料上加工出复杂的微结构。

3 激光技术在 PCR 微流控芯片微流体物理参数测量以及温度控制中的应用

3.1 激光技术在 PCR 微流控芯片微流体物理参数测量中的应用

在 PCR 微流控芯片中,反应体系的温度以及微流体速度测量具有重要意义,特别是在 PCR 反应中通过对温度的监测可以了解微反应体系运行过程中温度和流体分布以及变化状况,对结果分析以及芯片系统优化具有理论指导作用。Sun 等^[18]采用一种激光诱导的荧光光谱测温技术来监测连续流动式 PCR 芯片中的温度场。微通道中 1-嵌二萘磺酸钠(1-pyrenesulfonic acid sodium salt, PS-Na)的荧光光谱通过显微镜来获得,而荧光激发光源由飞秒钛:蓝宝石激光器和二次谐波成像技术构成,单个脉冲持续时间为 80 fs,重复频率为 80 MHz。通过这种测温技术发现微通道中温度波动大约 ± 1.9 $^{\circ}\text{C}$ (相对误差),而且微通道中的温度比玻璃上 ITO 薄膜表面温度低大约 2~4 $^{\circ}\text{C}$ (绝对误差)。Kim 等^[20]报道一种微 Raman 测温技术来监测 PCR 微通道中的温度分布。Raman 测温原理是基于 3000~3800 cm^{-1} 的范围内的 O—H 拉伸模式(O—H stretch mode)的变化。水的 O—H 拉伸模式的拉曼光谱在不同的温度下均能获取。氢键结合 O—H 拉伸模式(hydrogen-bonded O—H stretching (HB) mode)(位于小于等吸收点的低频率区域)随温度升高强度会降低;相反,非氢键结合的 O—H 拉伸模式(non-hydrogen-bonded O—H stretching (NHB) mode)(位于大于等吸收点的高频率区域)随温度升高而强度增强。Raman 光谱通过 488 nm,50.0 mW Ar^+ 激光器激发,光电倍增管(PMT)通过光纤连接到样品池检测散射

Raman 信号。这种测温技术的最大特点是:激光束直径能够调整到比微通道的宽度特征尺寸小得多(例如 $1\ \mu\text{m}$),因此它能聚焦在微通道中任何位置上,以便来测量微通道中微流体的温度分布,而不是某个“点”上的温度。另外,这种测温技术属于完全非干扰的非接触式测温技术,对流场的扰动可忽略不计,它优越于基于激光的荧光光谱测温技术。

在连续流动式 PCR 芯片中,微流体流速的信息主要通过数值模拟或注射泵间接获取,通过实验手段直接测量微通道中微流体流速的报道非常少。Li 等^[21]通过显微颗粒成像测速技术(micro particle image velocimetry, μ -PIV)测量连续流动式 PCR 微流控芯片中微流体速度分布。在测量中采用 532 nm 双脉冲 Nd:YAG 激光束来激发荧光,900 nm 荧光标记示踪粒子吸收激光能量后在峰激发波长 612 nm 处发射,发射光过滤后通过倒置生物显微镜来成像,CCD 照相机用来捕捉 μ -PIV 图像,获得微通道中不同位置上的微流体速度分布。这种微流体流速测量技术具有良好的精度和空间分辨率。

采用激光技术来测量 PCR 微流控芯片中微流体物理参数具有一定的优缺点。其优点是比较容易实现非接触式测量,对温度场或流场干扰减少甚至完全消除,因此非常有利于微流控 PCR 的快速扩增以及准确的温度场或流场的获得。在 PCR 微流控芯片的接触式测量中,测量元件本身的热容必然会改变被测对象的温度场或流场以及一定程度上减慢 PCR 的循环速度。其缺点是激光系统以及附属元件体积大,价格昂贵,不利于开发小型便携式的 PCR 微流控芯片。

3.2 激光技术在 PCR 微流控芯片温度循环控制中的应用

激光产生的光热效应能作为一种非接触式加热方法来对微流控芯片中的化学反应进行控制。在近红外区域的二极管激光器作为一种价格便宜、使用方便、结构紧凑的高效光源被广泛地使用。Slyadnev 等^[22]采用 635 nm、10 mW 的二极管激光器来加热微流控芯片上微通道中某一位置处的“吸收靶”——黑色墨点。由于光热过程,靶吸收的光能转换成热,并通过玻璃盖片中的热传导以及玻璃与溶液之间的对流换热,从而使试样达到一个平衡温度。不采用“吸收靶”的方法,YAG 激光器 1064 nm 发射光可作为一种直接的加热光源来获取快速的温度转换。在该报道中,受控制的反应体积仅 10 nL,反应产物的绝对数量小于 100 fmol。不过,反应产物的浓度依赖于照射时间、激光强度以及底物浓度。他们还采用红外二极管激光器对微流控芯片上化学反应的光热温度控制进行更加详细的研究^[22]。采用 1472 nm、150 mW 二极管激光器来直接加热微通道中的试样溶液。基于这种非接触式加热的热循环系统具有几个鲜明的特点:(1)它能分别取得 67 和 53 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 超快速加热/冷却速度,比传统热循环仪快 30 倍,也比电热微热循环快 3~6 倍;(2)红外激光诱导的加热器能对体积仅为 5 nL 的样品进行很好地温度控制,比已报道的芯片上电热加热系统低得多。同时,低热质样品的使用也有利于加热/冷却速度的提高;(3)在低的时间分辨率条件下(如 0.5 s),温度循环能很好地得到控制,具有很高的可重复性;(4)红外二极管体积小,适合用于微热循环系统的检测。另外,激光的光热效应也能用于 PCR 微流控芯片的样品制备^[23]。需要指出的是,尽管基于红外激光的非接触式 PCR 循环能获得超快速的加热和冷却速度,但其系统结构复杂,价格昂贵,而且很难做到微型化,因此目前还没有得到广泛的、深入的研究。

4 激光技术在 PCR 微流控芯片产物荧光实时定量/终点检测中的应用

目前,开发集荧光检测于一体的 PCR 微流控芯片已成为研究热点^[6,8,9]。就荧光检测过程而言,它可分为荧光实时定量法和荧光终点法。前者通过动态测量荧光探针/染料与数量不断增多的双链 DNA 的相互作用而引起的荧光信号强度来实现;后者可定义为 PCR 完成后对荧光强度的测量。不过,目前大多数研究者将集成该检测技术的 PCR 微流控芯片统称为荧光实时定量 PCR 微流控装置(real-time PCR microfluidics),以区别于 PCR 与其它产物检测方法^[6,8]。

在 PCR 微流控芯片中,基于激光诱导荧光(LIF)实现 PCR 产物在线荧光实时定量或终点检测在最近几年已得到广泛关注(表 1)。LIF 检测具有灵敏度高、选择性好以及响应速度快等优点。488 nm Ar^+ 激光器^[24, 25]和 633 nm He-Ne 激光器^[23, 26]等气体激光器的输出功率稳定、单色性好以及易于会聚成极小的光点,因此易获得高的检测灵敏度。但是,相关的检测器以及附属设备常常体积很大,功耗大,难以集成。为了减小 LIF 检测器体积以及增加集成性,一些研究者已采用半导体激光器作为激光光源、光纤

作为光学系统甚至基于 MEMS 微加工的硅光电二极管作为检测器来开发基于 LIF 的荧光定量 PCR 微流控芯片系统^[23, 26, 27]。半导体激光器具有功耗低、体积小、输出功率稳定、使用寿命长以及价格低廉等优点,光强度和单色性可满足荧光检测的需要。各种波长特别是短波长的高性能半导体激光器已经问世,这必然会丰富其在 PCR 微流控芯片领域中的应用。

目前,基于 LIF 的荧光实时定量 PCR 微流控芯片不仅能够进行常规的芯片上荧光定量 PCR 产物检测,而且能够对芯片上单池多元(如 2 元)^[26]或多池(如 4 池)平行^[27] PCR 扩增进行荧光定量检测,这种技术也许成为今后发展的主流。然而,基于 LIF 的荧光实时定量 PCR 微流控芯片系统的开发研究也存在以下几个方面的挑战:(1)激光器以及荧光检测器的尺寸与 PCR 微流控芯片尺寸“不匹配”,开发“袖珍型”荧光实时定量 PCR 微流控芯片系统仍具有很大的挑战;(2)结合 MEMS 技术(如集成在芯片上的光纤技术)能够简化光路,从而简化光学系统。然而,这种技术会提高芯片成本,这是因为在微流控 PCR 芯片领域中严格意义上要求微流控芯片一次性使用,以便减少交互污染或携带污染。

表 1 基于 LIF 的荧光实时定量 PCR 微流控芯片

Table 1 Fluorescent real-time PCR microfluidic chip based on laser induced fluorescence (LIF)

激光器类型 Types of laser	检测器类型 Types of detector	荧光染料或探针 Fluorescent dyes or probes	检测方法 Detection methods	PCR 微芯片类型 Types of PCR microfluidic chip
He-Ne laser (633 nm) ^[25] Ar ⁺ laser (488 nm) ^[24, 25]	MEMS 集成的光电二极管 (MEMS integrated photodiode) ^[23] , PMT ^[24, 25]	Nile Blue A Perchlorate ^[23] , SYBR Green I ^[24] ; Taq-Man probe ^[28]	终点法 End-point ^[24] , 实时定量法 Real-time method ^[25, 28]	单微池静态式池 Single micro-chamber stationary ^[23] , 连续流动式 Continuous-flow ^[24, 25, 28]
二极管泵浦固体激光器 Diode pumped solid-state laser (535 nm) ^[26]	2 个 PMT 双波长测量 Two different PMTs at two wavelengths ^[26]	SYTOX Orange and TO-PRO-3 dyes ^[26]	实时定量法 Real-time method ^[26]	微池静态式单池 Single micro-chamber stationary single-chamber ^[26]
单模光纤耦合半导体激光器 Single mode fiber coupled semiconductor laser (640 nm) ^[27]	光纤耦合 Si-PIN 光电探测器 Fiber coupled Si-PIN photo-detector ^[27]	Taq-Man probe ^[27]	实时定量法 Real-time method ^[27]	微池静态式, 4 池 Micro-chamber stationary, 4-chamber ^[27]

MEMS: micro-electromechanical system; PMT: photomultiplier tube; Si-PIN: silicon positive intrinsic-negative.

5 激光技术在 PCR 微流控芯片产物分离检测中的应用

与常规 CE 芯片^[29-31]上一样,在 PCR-CE 集成芯片上,LIF 居于微流控系统检测技术中的主导地位,CE 和 LIF 的搭配是目前 PCR-CE 集成芯片上或者单一 CE 芯片上产物分离检测最常见的搭配方式(表 2)。从表 2 可以看出:(1)在基于 LIF 的 PCR 微流控芯片产物分离检测中,输出波长为 488 nm 的小功率 Ar⁺ 激光器是最为常用的激光器。但该种激光器不能满足 PCR-CE 微型化系统对体积、价格、能耗、使用寿命等要求;(2)激光共聚焦以及激光激发 PMT 检测是使用最多的检测方式,少数研究者采用激光激发 CCD 检测^[33]的检测方式。激光共聚焦检测具有灵敏度高和背景低等优点;(3)将 CE 集成到 PCR 微流控芯片上以便通过 LIF 对产物进行在线检测已逐渐引起人们广泛深入地研究。一些研究者采用光纤技术来提高检测的灵敏度以及减少复杂光学元件和光路系统的使用^[51];通过选择适当荧光染料来提高 LIF 分离检测的灵敏度^[38];在同一的 PCR-CE 微流控芯片上进行单池多元化 PCR 扩增和 CE 分离检测^[32, 44]或多池平行化高通量 PCR 扩增和 CE 分离检测^[53-55];(4)Agilent Technologies 推出的全球第一台商业微流控芯片系统 LabChip Systems: Agilent 2100 Bioanalyzer 已被成功用来离线检测微流控芯片 PCR 产物^[43, 47-49]。该检测系统所使用的芯片是可以同时对 12 个样品进行分析的多通道芯片。平台采用二极管激光器作为激发光源、PMT 作为检测器的 LIF 技术对凝胶筛分的 DNA 或 RNA 片断进行检测。然而,由于该仪器本身各项参数均为定值不可更改,因此其应用受到一定程度的限制;(5)到目前为止,真正意义上可便携的基于 LIF 的 PCR-CE 微流控芯片系统报道很少。Lagally 等^[44]采用一种集微阀、薄膜加热器、温度传感器等于一体的 PCR-CE 基因分析微系统装置,其外形尺寸为 20 cm × 25 cm × 30 cm,其 LIF 检测系统采用功率可达 20 mW 的 488 nm 倍频二极管激光器作为激发光源,PMT 作为荧光检测器。

表 2 基于 LIF 的 PCR 微流控芯片产物分离检测

Table 2 Separation detection of microfluidic chip PCR products based on LIF

激光器类型 Types of laser	检测器类型 Types of detector	荧光染料或探针 Fluorescent dyes or probes	离线或在线分离检测 Off-line or on-line separation detection	PCR 微芯片类型 Types of PCR microfluidic chip
Ar ⁺ laser ^[32-42]	PMT ^[32-41] , CCD ^[33] , 单光子雪崩光电二极管 Single-photon avalanche photodiode ^[42]	Thiazole orange ^[37,38] , TOPRO ^[32,34] , YOPRO ^[33,39,40] , SYBR Green I ^[42]	在 CE 芯片 (On-line CE chip) ^[32-40] , 离线 ABI PRISM 310 基因分析仪 Off-line ABI PRISM 310 Genetic analyzer ^[41] , 离线 CE 芯片 (CE chip) ^[42]	微池静态式 Micro-chamber stationary ^[32-41] , 连续流动式 Continu- ous-flow ^[42]
二极管激光器 Diode laser ^[24, 43-46]	PMT ^[43-49]	SYTOX ^[45]	在线 CE 芯片 On-line CE chip ^[44, 45] , 离线 Agilent 2100 生 物分析器 Off-line (Agilent 2100 Bioanalyzer) ^[46-49]	微池静态式 Micro-chamber stationary ^[44, 45] , 连续流动式 Continu- ous-flow ^[46-49]
其它激光器 Other laser ^[11, 28, 50-58]	PMT ^[51]	YOPRO ^[11, 50, 51] , VIC dye ^[52] , SYBR Green I ^[58]	在线 CE 芯片 On-line CE chip ^[50-53] , Berkeley rotary con- focal scanner ^[54-56] , 离线 (off- line) Beckman2100 P/ACE ^[11] , CE 芯片 (CE chip) ^[57, 58] , Agi- lent 2100 Bioanalyzer ^[28]	微池静态式 Micro-chamber stationary ^[11, 50-57] , 连续流动式 Continu- ous-flow ^[28, 58]

6 总结与展望

综上所述,激光技术已经在 PCR 微流控芯片领域中得到一定程度的应用。然而,该技术在 PCR 微流控芯片领域中的应用仍然存在着几个相关而又急需解决的问题和困难:(1)发展和完善激光微细加工技术,进一步研究不同类型的激光器用于 PCR 微流控芯片微细加工时,激光相关参数对微通道/微池形貌以及内表面性质的影响。另外,应进一步开拓发展激光微细加工技术用于 PCR 微流控芯片的聚合物衬底材料上^[6,8];(2)激光系统与 PCR 微流控芯片空间体积、价格等相容的问题 PCR 微流控芯片始终朝微型化、便携化以及大众化等方向发展,而目前的激光系统在用于微流体物理参数测量、温度循环控制、芯片上 PCR 产物分离检测以及荧光实时定量/终点检测时,显得体积庞大、光路复杂以及价格昂贵。因此,开发体积小、价格低和寿命长的激光器以及附属光元件在 PCR 微流控芯片中应用显得非常必要。真正意义上的完全基于激光技术的 PCR 微流控芯片系统有待于进一步研究开发。在这样高度集成的 PCR 芯片系统中,样品制备、PCR 扩增以及产物检测都通过激光技术在芯片上在线完成。目前, Lee 等^[43]采用紧凑的二极管激光器的 808 nm 高能激光束来溶解病体,从而将样品制备与 PCR 扩增集成在单一的微流控芯片上。总而言之,随着激光技术以及微流控芯片各自的发展,激光技术在 PCR 微流控芯片中的应用程度会进一步加强。例如,利用近红外激光扫描仪来扫描与 PCR 微流控芯片集成在单一芯片上的微阵列杂交芯片,可以方便地检测基因点突变;采用信号放大技术(如光子计数技术等)来提高 LIF 检测的灵敏度,降低检出限,从而达到超高灵敏度荧光检测(如单分子检测);将激光微细加工技术(如飞秒激光微加工)与常规的化学刻蚀结合起来,加工具有复杂结构的、三维的、以硅或玻璃、聚合物甚至陶瓷为衬底的 PCR 微流控芯片在不久会成为可能。因此,激光技术在 PCR 微流控芯片领域会越来越广泛的应用前景。

References

- 1 Fang Zhao-Lun(方肇伦). *Fabrication and Application of Microfluidic Analysis-based Chip*(微流控分析芯片的制作及应用). Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2005: 88~91
- 2 Wang Er-Kang(汪尔康), Chen Yi(陈义). *Analytical Chemistry for Life Science*(生命分析化学). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2006: 73~76
- 3 Jiang Jia-Huan(蒋稼欢). *Technology and Application of Biomedical Microsystems*(生物医学微系统技术及应用). Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2006: 283~293
- 4 Zhang Chun-Sun(章春笋), Xu Jin-Liang(徐进良). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 2005, 33(5): 729~734
- 5 Zhang Chun-Sun(章春笋), Xu Jin-Liang(徐进良), Wang Jian-Qin(王建琴), Wang Han-Ping(王汉平). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 2006, 34(8): 1197~1202

- 6 Zhang C S, Xu J L, Ma W L, Zheng W L. *Biotechnol. Adv.*, **2006**, 24(3): 243 ~ 284
- 7 Zhang C S, Xu J L, Wang J Q, Wang H P. *Anal. Lett.*, **2007**, 40: 497 ~ 511
- 8 Zhang C S, Xing D. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35(13): 4223 ~ 4237
- 9 Zhang C S, Xing D, Li Y Y. *Biotechnol. Adv.*, **2007**, 25(5): 483 ~ 514
- 10 Zhang C S, Xing D, Xu J L. *Anal. Lett.*, **2007**, 40(9): 1672 ~ 1685
- 11 Giordano B C, Ferrance J, Swedberg S, Hmer A F R, Landers J P. *Anal. Biochem.*, **2001**, 291: 124 ~ 132
- 12 Yang J N, Liu Y J, Rauch C B, Stevens R L, Liu R H, Lenigk R, Grodzinski P. *Lab. Chip*, **2002**, 2: 179 ~ 187
- 13 Cheng J Y, Hsieh C J, Chuang Y C, Hsieh J R. *Analyst*, **2005**, 130: 931 ~ 940
- 14 Yao L Y, Liu B A, Chen T, Liu S B, Zuo T C. *Biomed. Microdevices*, **2005**, 7(3): 253 ~ 257
- 15 Yao Li-Ying(姚李英), Qi Heng(祁恒), Chen Tao(陈涛), Wen Si-Yuan(文思远), Bo Xiao-Chen(伯晓晨), Chen Su-Hong(陈苏红), Wang Sheng-Qi(王升启), Zuo Tie-Chuan(左铁钊). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*, **2006**, 27(3): 428 ~ 431
- 16 Hashimoto M, Hupert M L, Murphy M C, Soper S A. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(10): 3243 ~ 3245
- 17 Hashimoto M, Barany F, Soper S A. *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 21(10): 1915 ~ 1923
- 18 Sun K, Yamaguchi A, Ishida Y, Matsuo S, Misawa H. *Sens. Actuators B Chem.*, **2002**, 84: 283 ~ 289
- 19 Pal R, Yang M, Lin R, Johnson B N, Srivastava N, Razzacki S Z, Chomistek K J, Heldsinger D C, Haque R M, Ugaz V M, Thwar P K, Chen Z, Alfano K, Yim M B, Krishnan M, Fuller A O, Larson R G, Burke D T, Burns M A. *Lab. Chip*, **2005**, 5: 1024 ~ 1032
- 20 Kim S H, Noh J, Jeon M K, Kim K W, Lee L P, Woo S I. *J. Micromech. Microeng.*, **2006**, 16: 526 ~ 530
- 21 Li S F, Fozdar D Y, Ali M F, Li H, Shao D B, Vykoukal D M, Vykoukal J, Floriano P N, Olsen M, McDevitt J T, Gascoyne P R C, Chen S C. *J. Microelectromech. Systems*, **2006**, 15(1): 223 ~ 236
- 22 Slyadnev M N, Tanaka Y, Tokeshi M, Kitamori T. *Anal. Chem.*, **2001**, 73(16): 4037 ~ 4044
- 23 Schabmueller C G J, Pollard J R, Evans A G R, Wilkinson J S, Ensell G, Brunnschweiler A. *J. Micromech. Microeng.*, **2001**, 11: 329 ~ 333
- 24 Obeid P J, Christopoulos T K. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 494: 1 ~ 9
- 25 Mohr S, Zhang Y H, Macaskill A, Day P J R, Barber R W, Goddard N J, Emerson D R, Fielden P R. *Microfluid. Nanofluid.*, **2007**, 3(5): 611 ~ 621
- 26 Wang Z Y, Sekulovic A, Kutter J P, Bang D D, Wolff A. *Electrophoresis*, **2006**, 27: 5051 ~ 5058
- 27 Xiang Q, Xu B, Li D. *Biomed. Microdevices*, **2007**, 9(4): 443 ~ 449
- 28 Nakayama T, Kurosawa Y, Furui S, Kerman K, Kobayashi M, Rao S R, Yonezawa Y, Nakano K, Hino A, Yamamura S, Takamura Y, Tamiya E. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 386(5): 1327 ~ 1333
- 29 Liu Ke-Hui(刘科辉), Liang Ning(梁宁), Yao Bo(姚波), Luo Guo-An(罗国安), Wang Yi-Ming(王义明). *Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)*, **2005**, 33(9): 1350 ~ 1353
- 30 Yin Xue-Feng(殷学锋), Shen Hong(沈宏), Fang Zhao-Lun(方肇伦). *Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)*, **2003**, 31(1): 116 ~ 119
- 31 Liu Jin-Hua(刘金华), Yin Xue-Feng(殷学锋), Tang Juan-Juan(唐娟娟). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*, **2004**, 25(2): 270 ~ 272
- 32 Waters L C, Jacobson S C, Krutchinina N, Khandurina J, Foote R S, Ramsey J M. *Anal. Chem.*, **1998**, 70(1): 158 ~ 162
- 33 Khandurina J, McKnight T E, Jacobson S C, Waters L C, Foote R S, Ramsey J M. *Anal. Chem.*, **2000**, 72(13): 2995 ~ 3000
- 34 Dunn W C, Jacobson S C, Waters L C, Krutchinina N, Khandurina J, Foote R S, Justice M J, Stubbs L J, Ramsey J M. *Anal. Biochem.*, **2000**, 277: 157 ~ 160
- 35 Lagally E T, Simpson P C, Mathies R A. *Sens. Actuators B Chem.*, **2000**, 63: 138 ~ 146
- 36 Lagally E T, Medintz I, Mathies R A. *Anal. Chem.*, **2001**, 73(3): 565 ~ 570
- 37 Rodriguez I, Lesaicherre M, Tie Y, Zou Q, Yu C, Singh J, Meng L T, Uppili S, Li S F Y, Gopalakrishnakone P, Selvanayagam Z E. *Electrophoresis*, **2003**, 24: 172 ~ 178
- 38 Koh C G, Tan W, Zhao M, Ricco A J, Fan Z H. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(17): 4591 ~ 4598

- 39 Easley C J, Karlinsey J M, Bienvenue J M, Legendre L A, Roper M G, Feldman S H, Hughes M A, Hewlett E L, Merkel T J, Ferrance J P, Landers J P. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2006**, 103 (51): 19272 ~ 19277
- 40 Easley C J, Karlinsey J M, Landers J P. *Lab Chip*, **2006**, 6: 601 ~ 610
- 41 Legendre L A, Bienvenue J M, Roper M G, Ferrance J P, Landers J P. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(5): 1444 ~ 1451
- 42 Chen J F, Wabuye M, Chen H W, Patterson D, Hupert M, Shadpour H, Nikitopoulos, D, Soper S A. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(2): 658 ~ 666
- 43 Lee J G, Cheong K H, Huh N, Kim S, Choi J W, Ko C. *Lab. Chip*, **2006**, 6: 886 ~ 895
- 44 Lagally E T, Scherer J R, Blazej R G, Toriello N M, Diep B A, Ramchandani M, Sensabaugh G F, Riley L W, Mathies R A. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(11): 3162 ~ 3170
- 45 Zhou X M, Liu D Y, Zhong R T, Dai Z P, Wu D P, Wang H, Du Y G, Xia Z N, Zhang L P, Mei X D, Lin B C. *Electrophoresis*, **2004**, 25: 3032 ~ 3039
- 46 Liu Jin-Hua(刘金华), Yin Xue-Feng(殷学锋), Fang Zhao-Lun(方肇伦). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*, **2004**, 25(1): 30 ~ 34
- 47 Cho Y K, Kim J, Lee Y, Kim Y A, Namkoong K, Lim H, Oh K W, Kim S, Han J, Park C, Pak Y E, Ki C-S, Choi J R, Myeong H-K, Ko C. *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 21: 2161 ~ 2169
- 48 Consolandi C, Severgnini M, Frosini A, Caramenti G, De Fazio M, Ferrara F, Zocco A, Fischetti A, Palmieri M, De Bellis G. *Anal. Biochem.*, **2006**, 353: 191 ~ 197
- 49 Poulsen C R, El-Ali J, Perch-Nielsen I R, Bang D D, Telleman P, Wolff A. *J. Rapid Meth. Aut. Mic.*, **2005**, 13: 111 ~ 126
- 50 Ferrance J P, Wu Q, Giordano B, Hernandez C, Kwok Y, Snow K, Thibodean S, Landers J P. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 500: 223 ~ 236
- 51 Huang F C, Liao C S, Lee G B. *Electrophoresis*, **2006**, 27: 3297 ~ 3305
- 52 Kaigala G V, Huskins R J, Preiksaitis J, Pang X L, Pilarski L M, Backhouse C J. *Electrophoresis*, **2006**, 27: 3753 ~ 3763
- 53 Prakash R, Kaler K V I S. *Microfluid. Nanofluid.*, **2007**, 3: 177 ~ 187
- 54 Toriello N M, Liu C N, Mathies R A. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(23): 7997 ~ 8003
- 55 Liu C N, Toriello N M, Mathies R A. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(15): 5474 ~ 5479
- 56 Liu P, Seo T S, Beyor N, Shin K, Scherer J R, and Mathies R A. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(5): 1881 ~ 1889
- 57 Prakash A R, Adamia S, Sieben V, Pilarski P, Pilarski L M, Backhouse C J. *Sens. Actuators B Chem.*, **2006**, 113: 398 ~ 409
- 58 Jia X Y, Niu Z Q, Chen W Y. *Anal. Lett.*, **2005**, 38: 2143 ~ 2149

Applications of Laser Technique for Polymerase Chain Reaction Microfluidic Chips

Zhang Chun-Sun, Xing Da*, Li Yu-Yuan

(Ministry of Education Key Laboratory of Laser Life Science & Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract The broad applications of laser technique in polymerase chain reaction(PCR) microfluidic chips have been reviewed, including its applications onto microfabrication of PCR microfluidic chips, measures of microfluidic physical parameters and controls of PCR temperature cycling, as well as on-chip PCR product detection(for example fluorescence real-time/end-point detection and capillary electrophoresis(CE) detection). Finally, the bright future of laser application in the PCR-based micro-total analysis system (μ TAS) was prospected.

Keywords Laser technique, polymerase chain reaction (PCR), microfluidic chip, microfabrication, measures and controls of microfluidic physical parameters, review

(Received 12 June 2007; accepted 24 September 2007)