

旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台的研制

孔振翔, 姚延禄, 周新丽*

(上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093)

摘要: 微流控芯片用于聚合酶链式反应(PCR)可提高检测效率和自动化程度,但目前把核酸提取、扩增、检测功能集成到一块芯片上仍比较困难,此外,微流控芯片专用 PCR 仪也存在温度控制不够快速、精准的问题。作者采用空间上温度循环代替时间上温度循环的设计思路,搭建了一套旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台,对大肠杆菌进行核酸提取和扩增。结果表明,旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台拥有较好的热均匀性和热稳定性,平台的升降温速率分别为 3.5 °C/s 和 2.67 °C/s,单次循环时间为 110 s。与 9700 型 PCR 仪相比,所建平台的温度控制方案更为简单、升降温速率更高、循环时间更短。本研究结果可为实现核酸提取、扩增一体化的微流控 PCR 设备的研发提供参考。

关键词: 微流控技术;聚合酶链式反应(PCR);核酸扩增

中图分类号:Q 503 文章编号:1673-1689(2024)02-0107-06 DOI:10.12441/spyswjs.20221011002

Development of a Rotary Three-Temperature Zone Microfluidic PCR Amplification Platform

KONG Zhenxiang, YAO Yanlu, ZHOU Xinli*

(School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: The use of microfluidic chips for polymerase chain reaction (PCR) can improve detection efficiency and automation. However, it is still difficult to integrate the nucleic acid extraction, amplification and detection functions into one chip. In addition, the temperature control of the special PCR instrument for microfluidic chip is not fast and accurate enough. Based on the principle of temperature cycling in space instead of temperature cycling in time, a rotary three-temperature zone microfluidic PCR amplification platform was built by the authors to extract and amplify *E. coli* nucleic acids. The results show that the rotary three-temperature zone microfluidic PCR amplification platform has good thermal uniformity and stability. The heating and cooling rates of the platform were 3.5 °C/s and 2.67 °C/s, respectively. The single cycle time is only 110 s. Compared with the 9700 PCR, the platform has a simpler temperature control scheme, higher heating and cooling rates and shorter cycle time. This study provides a reference for the development of microfluidic PCR devices that integrates nucleic acid extraction and amplification.

Keywords: microfluidic technology, polymerase chain reaction (PCR), nucleic acid amplification

收稿日期: 2022-10-11 修回日期: 2022-10-19

* 通信作者: 周新丽(1979—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微流控芯片研究。E-mail: zjulily@163.com

实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 作为普遍使用的核酸检测技术之一, 具有检测成本低、操作简单、高特异性和灵敏度的优点^[1-2]。但是, 该方法耗时长且容易产生假阳性结果^[3]。微流控芯片技术可以将核酸提取、扩增、检测等功能集成到一片数平方厘米的芯片中^[4-5], 具有微型化、集成化、高通量、自动化等优势^[6]。微流控 PCR 仪将微流控芯片技术与 PCR 技术相结合^[7], 把检测过程中的核酸提取、试剂的预存储以及后续的扩增与荧光检测环节集成在一台仪器中, 可以减少试剂消耗, 提高热循环速度, 提高检测仪器的自动化程度, 显著提升检测效率^[8-10], 解决核酸扩增领域中存在气溶胶污染的问题^[11]。

目前, 微流控 PCR 仪的研制也存在两大难点: 一是将核酸提取、扩增、检测的功能全部集成在一张芯片上; 二是微流控芯片专用 PCR 仪所需 3 个温度的快速、精准控制。

在扩增平台的一体化、自动化方面, BioFire 公司的 FilmArray 产品使用柔性袋进行核酸提取, 使用巢式多重 PCR 技术进行核酸扩增, 同时搭配荧光检测, 在相同的血液样本中可一次检测出 24 种不同的病原体^[12]。Cepheid 公司研发的 GeneXpert 分子诊断试剂盒和配套使用的全自动测试仪器, 采用半导体制冷片对 PCR 反应管的上下两侧进行温度控制, 搭配风扇散热, 通过荧光组件实时测算 PCR 的循环状态^[13]。以上 2 种自动化核酸检测仪器均集成了核酸提取、核酸扩增及荧光检测全过程, 但这些过程并不都在微流控芯片上完成, 还借助了柔性袋、试剂盒等, 且核酸提取和温度控制部分的硬件控制都很复杂, 仪器制造成本较高。

在扩增平台的温度控制上, 根据微流控芯片中液体加热方式的不同, 可以分为静态微池 PCR^[14]和连续流动 PCR^[15]。李松晶等通过温控单元对溶液加热, 使芯片不同区域之间产生温差, 利用温差所产生的热对流来推动溶液循环流动^[16]。但是, 此方法需使用冷却液对溶液降温, 降温速率不可控, 且随着 PCR 扩增反应的进行, 冷却液温度逐渐回升, 进而会影响降温速率。Jung 等设计了一种旋转 PCR 分析仪, 该平台使用步进电机带动芯片依次通过 3 个加热块, 完成基因扩增仅需 25.5 min^[17]。但是此平台只有 PCR 扩增功能, 未集成核酸提取以及检测功能。

从以上分析可以看出, 要实现核酸提取、扩增

与检测集成, 目前仍有一些关键问题需要解决。作者设计并搭建了一套旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台, 在步进电机低转速条件下使用微流控芯片可完成基于磁珠法的核酸提取, 之后直接利用此旋转式三温区扩增平台完成扩增步骤, 实现核酸提取、扩增一体化。首先, 作者对三温区 PCR 扩增平台各模块进行功能分析以及机械结构设计, 然后对各模块进行装配并进行温度测试, 最后使用核酸提取芯片对大肠杆菌进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳评估扩增效果。本研究结果将为实现核酸提取、扩增一体化的微流控 PCR 设备的研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

光学级聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate, PMMA) 板材: 恒心亚克力制品有限公司; 聚四氟乙烯 (polytetrafluoroethylene, PTFE) 胶带: 晨光塑业有限公司; 光学级双面胶: 深圳泰赢科技有限公司。

Trans 1k Plus II Molecular Marker、10 × loading buffer、Easy Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL)、10 × EasyTaq buffer (含 Mg²⁺)、dNTPs (2.5 mmol/mL): 北京天根生化科技有限公司。

大肠杆菌 (ATCC43895): 中国检验检疫科学研究院动植物检疫所。

二氧化碳激光雕刻机 (VLS2.30): 美国 UNIVERSAL; 超声波清洗机 (YQ-620C): 上海易净超声波仪器有限公司; 芯片贴合机 (TBK508): 深圳市深旺达科技有限公司; 核酸提取仪: 西安天隆科技有限公司; 9700 型 PCR 仪: 美国 Applied Biosystems 公司; 超纯水仪: 美国 PALL 公司; Mini Protean III 型电泳槽、PowerPac300 多用电泳仪: 美国 Bio-Rad 公司; 凝胶成像仪: 美国 UVI 公司; ST16 低温离心机: 北京赛默飞科技有限公司。

1.2 芯片的设计与制作

芯片由 4 层厚度分别为 0.3、2.0、1.0、0.3 mm 的 PMMA 板材组成^[18], 第一层为盖板层, 包括进样孔以及抽样孔, 进样孔是将裂解混合液进入微流控芯片的孔, 抽样孔是将核酸洗脱液抽出进行质量浓度测定; 第二层为腔室层, 主要包括裂解腔、清洗腔 1~4、扩增腔, 用于试剂存储以及将各腔室隔离, 位于通道层之内, 各腔室的体积分别为 163、180、100、180、60、50 μL^[19]; 第三层为通道层, 通道层与腔室层厚度

差为 1 mm, 利用此厚度差使得磁珠在各腔室之间转移, 完成清洗以及洗脱步骤; 第四层为底板层, 主要用于密封键合芯片, 其结构见图 1。

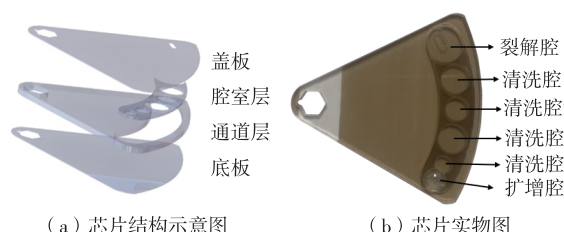


图 1 微流控芯片

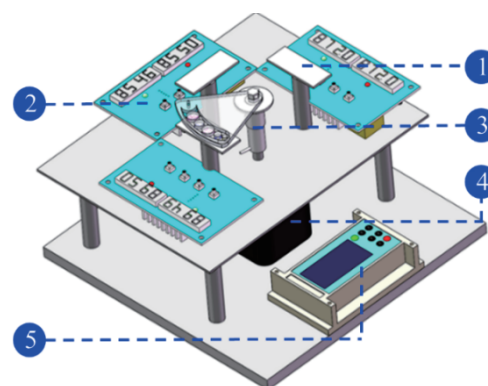
Fig. 1 Microfluidic chip

微流控芯片的制作采用二氧化碳激光雕刻法。首先使用 SolidWorks 软件设计出微流控芯片的三维结构, 通过结构分割将芯片划分为 4 层, 包括盖板层、腔室层、通道层及底板层, 并使用 CAD 软件绘制各层图案。然后, 将绘制好的各层几何图案通过数据传输传送至二氧化碳激光雕刻机进行平面雕刻, 雕刻参数为: 功率 80 W, 速度 20 s, PPI 1 000, 得到各通道层基片。然后, 将雕刻好的各层 PMMA 基片放入含有去离子水的超声清洗机中清洗 15 min 并放入烘箱中烘 10 min, 再将各层使用光学级双面胶并置于真空贴合机中键合, 键合参数设置为: 真空度 100 kPa、键合压力 4.2 kg/cm²、键合时间 10 min。最后将键合后的芯片放入除泡室中, 设置除泡压力 7.5 kg/cm²、除泡 10 min, 即获得最终芯片。

1.3 旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台的搭建

旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台, 采用空间上温度循环代替时间上温度循环的设计思路, 其整体结构见图 2。根据扩增系统的功能需求, 分为温度控制模块和旋转循环模块。温度控制模块包括陶瓷加热片和比例-积分-微分 (proportion-integral-derivative, PID) 恒温控制器。旋转循环模块包括转轴、步进电机和驱动控制器。

1.3.1 温度控制模块 采用热均匀性良好的陶瓷加热片作为加热元件, 树莓派开发板作为中央控制器, 通过 PID 恒温控制器 XH-W1419 来控制陶瓷加热片。在实际操作中, 中央控制器先将设定的温度值发送给恒温控制器, 之后以 1 Hz 的频率读取温度传感器的温度值, 当接近设定值时, 则缓慢改变电压来维持温度的稳定, 同时将计算出的温度值通过串口传递给中央处理器。中央处理器在接收到返回的温度值后刷新屏幕, 实现温度的控制与实时显示。



1. 陶瓷加热片; 2. PID 恒温控制器; 3. 转轴; 4. 步进电机; 5. 驱动控制器。

图 2 旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the rotary three-temperature zone microfluidic PCR amplification platform

1.3.2 旋转循环模块 采用发热低的日本山社 57 步进电机控制微流控芯片的旋转角度, 即控制芯片在不同温度的加热片上做周期性旋转, 从而完成核酸扩增过程中的变性、退火、延伸。同时, 为了承载陶瓷加热片、PID 恒温控制器、步进电机、电机驱动器以及驱动控制器, 设计一个旋转循环转台来放置这些配件。转台整体采用不锈钢材料, 且厚重的底板可以保证电机在高速运动的状况下不会出现位移和抖动。转轴的作用是连接芯片与电机, 实现电机动力的传输。整个扩增平台的运行流程见图 3。

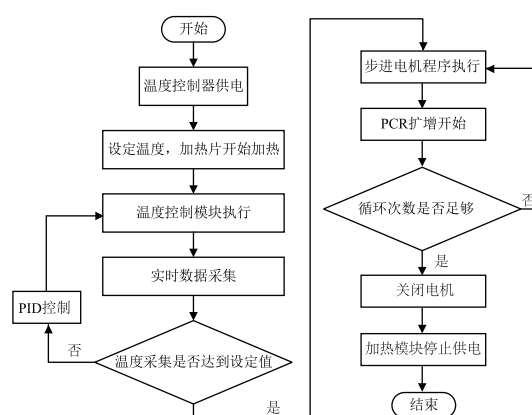


图 3 旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台流程图

Fig. 3 Flow chart of rotary three-temperature zone microfluidic PCR amplification platform

1.4 旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台的性能测试

1.4.1 陶瓷加热片的性能 为了保证加热模块的温控性能, 对陶瓷加热片表面的温度进行均匀性和

稳定性测试。通过 PID 温度控制器对 3 个加热片设置 3 个不同温度(95、55、72 °C),并在陶瓷加热片的中心和对角线位置处放置 3 个热电偶(a,b,c),用安捷伦 34970A 数据采集仪对加热片表面温度进行数据采集。

1.4.2 升降温速率 在旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台上,待加热片加热至预设温度后,将插有热电偶探头的微流控芯片放至离心转台。当反应腔室转至加热片上方时,记录下此刻的时间和芯片内部溶液的温度,待芯片内溶液加热至目标温度后,再次记录此刻的时间和芯片溶液内部的温度,即可得到升温速率。然后转动微流控芯片 90°至另一加热片之上,继续记录相对应的时间和温度,得到降温速率。

1.5 芯片上大肠杆菌的核酸扩增

将大肠杆菌加载到微流控芯片中,按照姚延禄的方法^[18],通过磁珠法在微流控芯片中提取核酸,提取到的核酸保存在扩增腔中。在搭建的旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台上,提前对 3 个加热片进行预热。然后,将芯片上转动至第一块加热片上方,芯片内溶液加热到 95 °C 维持 30 s,完成高温变性反应;再将芯片转动 90°,到达第二块加热片上方,芯片内溶液加热到 55 °C 维持 30 s,完成低温退火反应;继续转动芯片 90°,使反应区到达第三块加热片上方,芯片内溶液加热到 72 °C 维持 20 s,完成延伸反应。至此,完成一轮 PCR 反应,如图 4 所示。随后,使芯片继续沿同方向转动 180°,回到初始位置,按照上述过程,使芯片循环旋转 35 次。

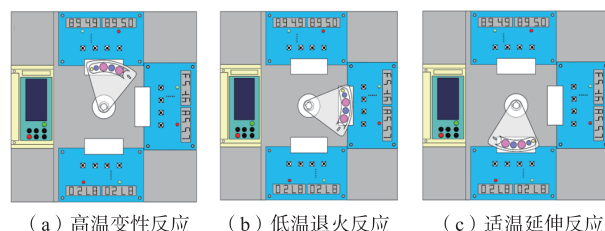


图 4 核酸扩增过程示意图

Fig. 4 Schematic diagram of nucleic acid amplification process

在 9700 型 PCR 仪上,设置扩增程序为:在 95 °C 下初始变性 5 min,95 °C 下变性 30 s,55 °C 下退火 30 s 和 72 °C 下延伸 20 s 进行 35 次循环,最后在 72 °C 下进行 10 min 的最终延伸。

扩增反应结束后,取 9700 型 PCR 仪和微流控

芯片中的扩增产物各 25 μ L,在 1 g/dL 琼脂糖凝胶上使用 120 V 电压电泳 30 min,用 0.5 mg/L 的溴化乙啶(EB)染色,然后将凝胶置于凝胶成像仪上,在紫外灯照射下观察并拍摄。

2 结果与分析

2.1 陶瓷加热片的性能

通过在陶瓷加热片的不同位置处放置热电偶对其进行均匀性和稳定性的测试,可以发现各个加热片上不同测温点的温度曲线近乎重合,温度在 0.1 °C 的范围内波动,且每个测温点的误差均在 ± 0.3 °C 的范围内,如图 5 所示。由此可见,该加热片上不同位置的温度波动不大,具有良好的温度均匀性和温度稳定性。

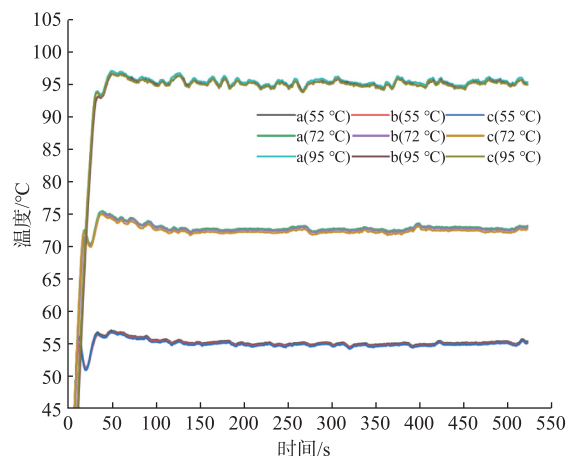


图 5 陶瓷加热片的温度均匀性和温度稳定性测试

Fig. 5 Temperature uniformity and stability of ceramic heaters

2.2 升降温速率

对芯片腔室内溶液的温度进行采集,结果见图6。随着步进电机的转动,芯片腔室内溶液的温度也随之变化,且芯片腔室内溶液的升温速率为 3.5 °C/s,降温速率为 2.67 °C/s,完成 1 个 PCR 温度循环的时间为 110 s。相较于 9700 型 PCR 仪,升温速率提升了约 36.19%,降温速率提升了约 24.77%,单次 PCR 温度循环缩减了 70 s,对于整个 PCR 扩增过程来说(35 次循环),至少可以节约 40 min,提高核酸扩增的效率。

2.3 大肠杆菌核酸扩增的结果

使用旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台与 9700 型 PCR 仪同时进行 PCR 扩增,扩增后的电泳结果见图 7。左侧为 9700 型 PCR 仪扩增结果,右侧

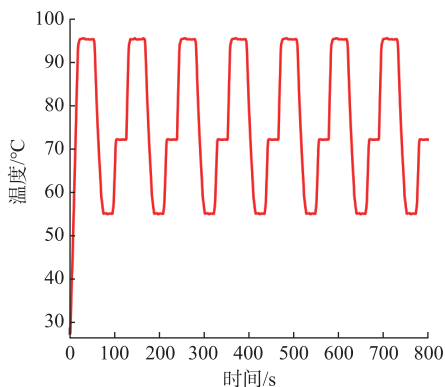
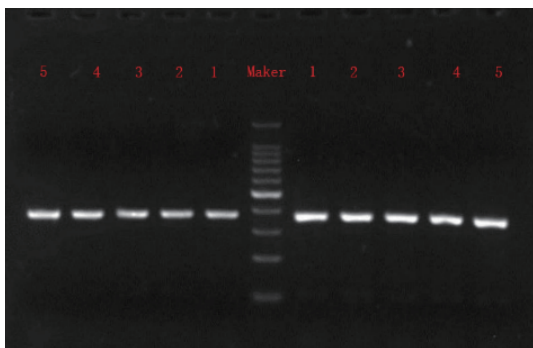


图 6 芯片内部溶液的升降温曲线

Fig. 6 Heating and cooling curve of the solution inside the chip

为旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台的扩增结果,且左右两侧 5 个重复实验的结果均在 369 bp 左右出现条带,二者亮度基本一致,说明旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台的扩增效果和重复性与 9700 型 PCR 仪基本相同。



9700型PCR仪扩增结果 微流控芯片扩增结果

图 7 大肠杆菌扩增产物电泳图

Fig. 7 Electropherogram of *E. coli*

Salman 等提出一种并列式的微流控 PCR 扩增平台,该平台搭载 3 个加热片,通过电机的旋转将微流控芯片加载到相应的加热片上,实现核酸扩增^[20]。但是,该平台升温速率和降温速率分别为 1.8 °C/s 和 2 °C/s,导致整个核酸扩增的循环时间有所延长。

将 9700 型 PCR 仪、单温区半导体制冷片微流控芯片、Salman 等搭建的三温区 PCR 扩增平台与本研究搭建的旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台进行对比分析,如表 1 所示。相较于 Salman 等搭建的三温区 PCR 扩增平台,作者搭建的旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台在升降温速率上更快,尤其在升温速率上,提升了将近 2 倍。与其他 2 款采用

单温区的 PCR 扩增平台相比,作者搭建的扩增平台采用三温区分别对微流控芯片内部的溶液进行加热,避免在单个温控片上进行升降温操作,提高升降温速率的同时也缩短了循环时间,并且温度控制也更加容易。

表 1 PCR 扩增平台性能对比

Table 1 Comparison of PCR amplification performance

微流控 PCR 仪类型	温控方式	温控难度	升降温速率/(°C/s)		循环时间/s
			升温	降温	
9700 型 PCR 仪	单温区半导体制冷片	困难	3	2	180
微流控芯片 ^[20]	单温区半导体制冷片	困难	2.57	2.14	200
三温区 PCR 扩增平台 ^[20]	三温区加热片	较难	1.8	2	—
旋转式三温区扩增平台	三温区陶瓷加热片	简单	3.5	2.67	110

3 结 语

微流控芯片与 PCR 技术相结合虽然取得了很大进展,但在微流控芯片的集成度和温度的控制上仍存在一定的问題。为此,作者在微流控芯片与 PCR 技术的基础上,采用空间上温度循环代替时间上温度循环的设计思路,搭建了一套旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台,测量陶瓷加热片上不同区域的温度和单点温度随时间的变化,结果表明陶瓷加热片不同区域之间的温差在 0.1 °C 范围内,单点的热稳定性在±0.3 °C 范围内,具有较好的热均匀性和热稳定性。与其他 3 款扩增平台相比,本平台的升降温速率有着较大的提升,能够缩减 PCR 扩增的时间,提高工作效率。对大肠杆菌的扩增产物进行电泳分析,可以发现本平台的电泳条带亮度与 9700 型 PCR 仪基本一致,但在扩增时间上有着较大的提升,仅需 110 s 即可完成单次循环,在一个完整的扩增周期内可以节约 40 min 左右的时间。旋转式三温区微流控 PCR 扩增平台在保证热均匀性和热稳定性的情况下,简化了温控结构、提升了升降温速率、缩短了循环时间。未来的研究可以尝试将核酸检测的功能集成到该平台上,在微流控芯片上实现核酸提取、扩增、检测的功能,实现平台的一体化、自动化。

参考文献:

- [1] FANG Y C,ZHANG H Q,XIE J C, et al. Sensitivity of chest CT for COVID-19: comparison to RT-PCR[J]. **Radiology**, 2020, 296(2): 115-117.
- [2] PARK S,ZHANG Y,LIN S, et al. Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics[J]. **Biotechnology Advances**, 2011, 29(6): 830-839.
- [3] DONG X B,LIU L Y,TU Y P, et al. Rapid PCR powered by microfluidics: a quick review under the background of COVID-19 pandemic[J]. **Trends in Analytical Chemistry**, 2021, 143: 116377.
- [4] HÜGLE M,BEHRMANN O,RAUM M, et al. A lab-on-a-chip for free-flow electrophoretic preconcentration of viruses and gel electrophoretic DNA extraction[J]. **The Analyst**, 2020, 145(7): 2554-2561.
- [5] KHNOUF R,ABDEL K J,KARASNEH D, et al. Simulation and optimization of a single heater convective PCR chip and its controller for fast *Salmonella* enteritidis detection[J]. **IEEE Sensors Journal**, 2020, 20(22): 13186-13195.
- [6] ZHU C C,WU X S,LI Z G, et al. A microfluidic system integrated one-step PCR and high-resolution melting analysis for rapid rice mutant detection[J]. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 2019, 33(1): 1164-1171.
- [7] XU J D,LYU X F,LIU Y, et al. Design of integrated control system for microfluidic PCR analysis instrument[J]. **Applied Mechanics and Materials**, 2012, 241: 1491-1495.
- [8] NASSERI B,SOLEIMANI N,RABIEE N, et al. Point-of-care microfluidic devices for pathogen detection[J]. **Biosensors & Bioelectronics**, 2018, 117: 112-128.
- [9] ASGHAR W,SHER M,KHAN N S, et al. Microfluidic chip for detection of fungal infections[J]. **ACS Omega**, 2019, 4(4): 7474-7481.
- [10] ZHAO X H,LI M,LIU Y. Microfluidic-based approaches for foodborne pathogen detection[J]. **Microorganisms**, 2019, 7(10): 381.
- [11] ZHANG D X,BI H Y,LIU B H, et al. Detection of pathogenic microorganisms by microfluidics based analytical methods[J]. **Analytical Chemistry**, 2018, 90(9): 5512-5520.
- [12] THATCHER S A, GREEN J P, HUYNH E W, et al. Sample preparation for difficult sample types: US11175205[P]. 2021-11-16.
- [13] SMITH J H, PERSING D H, WORTMAN A, et al. Methods and apparatus for sequential amplification reactions: US9873909[P]. 2018-01-23.
- [14] LIU J,ENZELBERGER M,QUAKE S. A nanoliter rotary device for polymerase chain reaction[J]. **Electrophoresis**, 2002, 23(10): 1531-1536.
- [15] KRICKA L J, WILDING P. Microchip PCR[J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2003, 377(5): 820-825.
- [16] 李松晶,杨天航,符海,等. 一种微流控 PCR 芯片.中国:CN111500406B[P]. 2022-10-25.
- [17] JUNG J H,CHOI S J,PARK B H, et al. Ultrafast rotary PCR system for multiple influenza viral RNA detection[J]. **Lab on a Chip**, 2012, 12(9): 1598-1600.
- [18] 姚延禄. 基于微流控芯片的核酸提取及 PCR 扩增平台的研制[D]. 上海:上海理工大学, 2022.
- [19] 曹宁,申炳阳,喻梓瑄,等. 用于 3 种食源性致病菌核酸提取的微流控芯片制备[J]. **食品与生物技术学报**, 2022, 41(1): 28-35.
CAO N,SHEN B Y,YU Z X, et al. Microfluidic chip for nucleic acid extraction of three food-borne pathogenic bacteria[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2022, 41(1): 28-35. (in Chinese)
- [20] SALMAN A,CARNEY H,BATESON S, et al. Shunting microfluidic PCR device for rapid bacterial detection[J]. **Talanta**, 2020, 207: 120303.