

# 集成微流控芯片

赵亮<sup>①②</sup>, 申洁<sup>①②</sup>, 周宏伟<sup>①②</sup>, 黄岩谊<sup>①②\*</sup>

① 北京大学工学院, 北京 100871;

② 北京大学生物动态光学成像中心, 北京 100871

\* 联系人, E-mail: yanyi@pku.edu.cn

2010-12-08 收稿, 2011-01-28 接受

国家重点基础研究发展计划(2007CB714502)、国家自然科学基金(20705003, 20733001, 90913011)、北京市自然科学基金(2082011)和中国博士后基金(45210148)资助项目

**摘要** 作为一种能够在微米级尺度操纵液体的新兴技术, 微流控芯片已经受到科学家们的广泛关注. 高密度集成的微流控芯片装置可以实现高通量并行化的实验以及多种操作单元的功能一体化, 作为一种新的方法学平台, 已经越来越多地应用于化学和生命科学的研究中. 本文着重介绍了集成化微流控芯片装置的基本概念、构建方法、及其在细胞生物学、分子生物学以及化学合成应用研究中的最新进展, 尤其强调了集成微流控芯片系统在传统方法难以达成或实现的单细胞和高通量的研究中的优势, 展望了集成化微流控芯片在化学以及生命科学中的应用前景.

## 关键词

微流控  
集成化  
多层软蚀刻  
聚二甲基硅氧烷  
单细胞分析

微流控(microfluidics)技术是一种针对极小量( $10^{-9}$ ~ $10^{-18}$  L)的流体进行操控的系统科学技术. 微流控芯片(microfluidic chips)是微流控技术实现的主要平台和技术装置, 其主要特征是容纳流体的有效结构(通道、反应室和其他某些功能部件)至少在一个维度上为微米级尺度. 在这一尺度下, 流体的运动具有自己的特点, 与宏观尺度大不相同. 随着半导体微加工工艺技术在微流控芯片制备中的广泛应用, 以及使用弹性材料多层构建等新技术的发展, 人们已经可以将多种功能性的元件和结构规模集成在一块几个平方厘米大小的芯片上. 我们将这种包含多种结构或多个功能的、精确可控的复杂微流控芯片称之为“集成微流控芯片”, 在本文中我们将主要介绍这种规模集成的微流控芯片技术, 以及该类型芯片在化学及生命科学领域的部分应用.

化学及现代生物学的大部分实验都是在溶液状态下进行的, 这些实验都需要盛装液态物质的容器, 例如烧杯、烧瓶、试管、培养皿等; 也大量涉及到液体的转移与运输器材, 例如移液管、滴管、量筒、各

种管材等. 在这些实验中, 通常所运用的体积单位是毫升(常见于化学实验)和微升(常见于生物学实验). 在与生命科学相关的研究中随着通量的上升和样品量的限制, 我们所研究的体系开始使用更小的体积尺度, 这就需要我们用新的技术手段来进行更小尺度下的实验操作与观测. 微流控芯片就是在这样的一种需求下应运而生的技术, 用以进行微量甚至极微量液体的操纵与分析.

1975年, 斯坦福大学的 Terry 等人<sup>[1]</sup>在硅片上制作了第一个小型的气相色谱分析仪, 这个仪器中的关键部件是一个在硅片上通过微加工手段蚀刻的微细通道, 可以形象地看作是一根利用硅片制备的毛细管类似物. 这个芯片可能是第一个现代意义上的实用型“微流控”器件. 它的特点是体积小、分析所需时间短, 但是由于技术限制, 这种硅芯片并未引起广泛重视. 随后, 微流控技术的发展相对缓慢, 直到1990年 Manz 等人<sup>[2]</sup>提出“微全分析系统(micro total analysis system,  $\mu$ TAS)”的概念, 才进入了迅速发展的时期. 微全分析芯片的概念具有很强的吸引力, 它

的主要特点是将待分析样品的前处理、分离以及检测等步骤高度集成化,在一块芯片上完成.随后的近20年时间内,在潜在应用前景的鼓舞下,微流控技术的发展速度大大加快.同时,以微电子加工和微机电加工为背景的微加工技术不断发展,达到了一个相对成熟的时期,为微流控芯片的加工和推广提供了技术平台,并使得芯片制作的成本得以大大降低.

如今,微流控分析芯片特别是具备高密度、大规模、高通量、多功能等特点的集成微流控芯片已经在化学和生物学领域发挥着重要的作用.与宏观尺度的实验装置相比,这一技术显著降低了样品的消耗量,增大了流体环境的表面积,提高了反应效率,同时也降低了实验产生废物对环境的污染;集成微流控芯片操作的并行性优势可以实现实验的高通量、自动化控制;并且通过微阀微泵等微细结构的精确控制,微流控芯片在提高生命科学研究的时间与空间分辨率上有很大的灵活性,具有不可替代的优势.

## 1 集成微流控芯片的制备

微流控芯片所使用的材料是多种多样的,早期的芯片制备中硅和玻璃成为最重要和最常见的材料.这些材料的加工工艺比较成熟,通过光刻等图案化手段可以使玻璃基片的特定图案暴露而其余部分被光刻胶或者金属镀层所保护,再利用氢氟酸或其缓冲蚀刻剂(例如氢氟酸和氟化铵混合溶液)与暴露部分的玻璃反应,腐蚀出凹槽.这些凹槽的上部同另一平整表面封接后就形成了管道,完成了微流控芯片的构建.这种利用玻璃腐蚀工艺制作微流控芯片的技术被广泛用于芯片电泳的应用中.这类材料同时具有一定局限性,因为它们通常具有很大的刚性,在玻璃或者硅片上要想实现微全集成所必需的微泵和微阀等单元的制作是非常困难的.同时硅片在紫外及可见光区不透明,限制了其用于光学尤其是激光诱导荧光的检测.玻璃材料制备的微流控芯片在电泳分离与分析上应用方便,但其在制备过程中对工艺的要求相对比较严格,在大多数传统的化学与生物学实验室内不易推广.这一类材料制备的芯片在集成度上往往受到限制,难以取得方法学上的突破.要实现大规模、高通量、多功能的集成,需要发展更合适的加工方法与新的制备材料.1998年,美国哈佛大学 Whitesides 研究组提出了软蚀刻(soft lithography)的概念<sup>[3,4]</sup>,并且演示了应用模型复制的快速成型法

制作微流控芯片的技术<sup>[5]</sup>,这一技术在几年内得以拓展,成为一种新型的微加工手段,从此宣告微流控芯片进入了以聚二甲基硅氧烷(poly(dimethyl siloxane), PDMS)为关键材料的时代<sup>[6]</sup>.利用PDMS材料制备微器件的一个主要特点是加工方便,不需要特别苛刻的实验条件和昂贵的加工设备,这一优点促使微流控芯片又进入了新一阶段的快速发展时期.Effenhauser 等人<sup>[7]</sup>最先用PDMS材料做成微流控芯片用于DNA分析,整个芯片利用电渗流来控制.芯片的制备不再神秘,普通的实验人员也可以轻松完成.

软蚀刻方法的基本制备过程如图1所示<sup>[8]</sup>.首先利用计算机辅助,通过合适的程序进行管道设计;之后制备光刻掩膜,由于许多芯片中流体管道的宽度处在几十至几百微米的量级,甚至可以使用高分辨率的打印机将管道设计图打印在透明胶片上替代价格昂贵的传统铬版掩膜;再将光刻掩膜利用光刻技术将掩膜图案转移到涂有光刻胶的硅片上.以SU-8负性光刻胶为例,需要聚合的区域通过掩膜的透明部分接受紫外照射后发生交联反应而聚合,未经过紫外照射的区域则可以被显影液溶解,之后硅片及其表面上剩下的突起的SU-8结构构成制作PDMS微流控芯片的阳模.做好模板后,首先将模板硅片用含惰性基团(如氟代烷基)的硅烷处理以防止下一步操作时PDMS和硅片的永久键合.然后将PDMS预塑体(由两种不同化学官能化的硅氧烷组成,按照一定比例混合)浇铸到模板硅片上,之后将其处于40℃~80℃加速PDMS预塑体固化,再将固化后的PDMS从模板上揭下来,用打孔针在合适的位置上打孔作为溶液的进出口,最后将PDMS基片带有管道的一面与其他平面结合,进行可逆或不可逆性的密封完

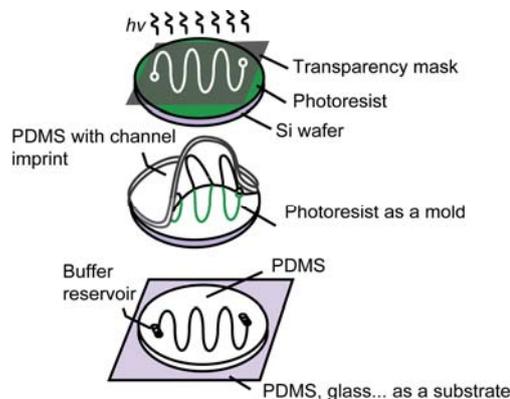


图1 基于软蚀刻技术的芯片快速复制法<sup>[8]</sup>

成芯片制作。

软蚀刻技术的出现,为制备集成微流控芯片,尤其是与集成电路相类似的多功能、高密度集成微流控芯片,开辟了一条新的道路。2000年,美国加州理工学院的 Quake 研究组<sup>[9]</sup>发明了多层软蚀刻技术(multilayer soft lithography),巧妙地利用了 PDMS 材料的弹性性质和聚合特性,在芯片上整合了可以快速、准确控制流体流动的微型气动阀,实现了在芯片上高密度流体运动的控制,为高通量大规模的功能集成提供了可能性。两年以后,他们以“微流控大规模集成芯片”为题报道了集成有上千个阀门和上百个微反应室的 PDMS 芯片,实现了微流控芯片由简单的单元操作到规模集成芯片的飞跃<sup>[10]</sup>。多层软蚀刻技术是传统软蚀刻技术的重要拓展,它通过创造三维交叠管道以实现简单有效的流体运动控制,主动阀的功能即是通过在芯片中相互交叉的立体管道来实现。当对下层(控制层)施加正气压时,处于两层之间的薄膜会产生向上的变形,如果气压足够,可以很好地封闭住上层(流体层)(图 2)。该种主动阀的反应时间为毫秒量级,压力在 100 kPa 量级。用同样的方法,他们在一条简单的流体管道上平行排列了三个控制阀,构成一种蠕动泵。这种通过多层软蚀刻技术制备的主动阀有体积小、密封性好、透光性好、响应快、可精确驱动、高度集成化、使用时间长、制作简单、成本低等优势,被广泛使用到高通量的集成微流控芯片中。这一技术在集成微流控芯片短短的发展历程中具有里程碑意义,极大地推动了微流控技术在化学和生命科学领域的应用,并解决了许多传统

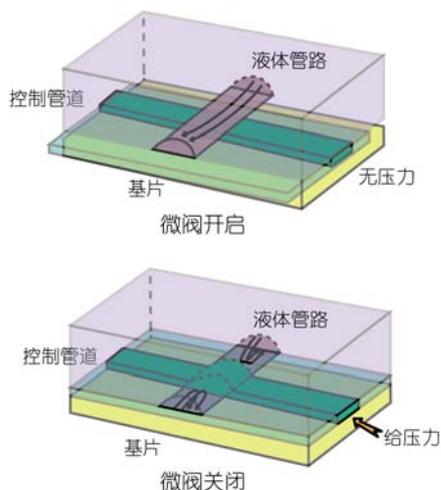


图 2 利用多层软蚀刻制备微流控压力可控阀门的示意图

技术或者单一功能芯片无法解决的难题。

## 2 集成微流控芯片的应用

### 2.1 集成微流控芯片在细胞培养与控制中的应用

细胞是生命的基本组成单元,细胞生物学是生命科学的基础之一。我们已有的许多认识是建立在针对大量细胞的系综平均结果基础上的,但是近年来的深入研究使许多生命现象的发生过程已经无法从系综平均上得以阐明,在少量细胞乃至单个细胞层次上进行生命科学的研究呈现出了迫切的重要性。绝大多数细胞的大小位于微米尺度,正好同微流控芯片中的通道大小相适应,这一匹配为少数或者单个细胞的操控提供了极为便捷的条件。集成微流控芯片在操作上很强的可控性同时为进行原位的细胞培养以及动态实时的微环境调控提供了可能性,在小体积内进行这样的实验还可以同时保持合适的浓度、较短的传质时间、较快的时间响应和长时间的动态追踪等。

集成微流控芯片在发挥高通量优势同时,可以锁定单个细胞,成功地进行细胞受激反应和调控的长时间动态观察与研究,同时可以观察细胞间通讯对于细胞生长的调节机制,得以了解生物体反馈机制的真正奥秘,而不是由于系综统计数据造成的假象。如果能够定量的进行单细胞分析,将会对生命过程的细节有更深刻的认识。斯坦福大学的 Zare 研究组<sup>[11]</sup>利用液体在微流控通道内层流的特点实现了对单个 Jurkat T 细胞的俘获、破膜、染色、特定分子检测等多个分析步骤,得到了在刺激下不同单细胞的响应,实验结果表明,基于单细胞的分析手段可以揭示许多在多细胞分析中被掩盖的个体区别,对于理解细胞应激响应有重要作用。当然这种依靠层流方式来获取一个一个单细胞的方法很难发展成为高通量的技术,而且工作条件对稳定性有很大影响,通量也很难得以扩大。

为了实现高通量的实验,加州大学伯克利分校的 Lee 研究组提出了一种在微流控芯片中加工大规模的微拦截阵列以批量拦截单细胞的方法<sup>[12]</sup>。利用 PDMS 芯片的双层结构,在拦坝的下方与基底之间有 2  $\mu\text{m}$  的缝隙,允许液流通过但细胞却无法通过而被拦截,这一简单的流体动力学方法即可以将细胞有效地俘获,通过改变拦坝的形状还可以控制每个拦

坝可以拦截的细胞数量. 作者利用荧光分子探针分析了单个细胞中羧基酯酶的活性, 展示了这种系统可以高效率地实现单细胞的分析研究, 是一种高密度显微成像的单细胞定量分析方法. 格拉斯哥大学的 Cooper 研究组借鉴这种单细胞拦截阵列的方法, 对单肿瘤细胞对抗肿瘤药物的反应动力学进行了研究. 细胞在芯片的拦坝上受到的剪切力较小, 结果表明这种高内涵(high content)显微分析的方法对细胞凋亡的有效评估可以与流式细胞仪相比拟, 而且需要的试剂量大大降低, 操作也更为简便<sup>[13]</sup>. 在传统的药物筛选过程中常常需要大量的细胞培养、多条件的筛选和专业化的人员配备, 而集成微流控芯片高通量、并行化、自动化的特点非常适合于药物筛选的研究<sup>[14,15]</sup>. 麻省理工学院的 Thorsen 研究组<sup>[16]</sup>报道了一种并行装载并培养细胞的阵列芯片装置, 用于药物毒性的筛选. 细胞装载管道与毒素刺激物的管道相垂直, 在两种管道的交汇处有圆形的细胞捕获小室, 每个小室中包含 8 个 U 型的细胞捕获结构, 经过流体力学计算和设计使得这些结构可以均一地捕获一定数目的细胞, 同时保证每个小室内细胞数量的相对均匀. 通过合理控制芯片上的气动阀门, 可以对许多平行的细胞装载管道与毒素管道进行单独控制操作. 他们在同一张芯片上制作了 576 个细胞培养小室, 可以同时获得 3 种细胞(小鼠成纤维细胞, 宫颈癌细胞, 牛内皮细胞)分别对 5 种不同毒素刺激物(洋地黄皂苷、皂草苷、CoCl<sub>2</sub>、NiCl<sub>2</sub>、丙烯醛)的组合反应. 该方法将细胞的装载固定、连续培养、药物处理和结果分析等实验过程全部集成在一块芯片上.

形成杂交细胞瘤和体细胞重组是生物学研究的重要内容, 而控制细胞的融合是这些研究的基础, 也是实验中面临的技术挑战. 由于传统的方法很难解决细胞高效配对与融合的问题, 细胞在大规模上的随机配对导致融合的效率不高. 美国麻省理工学院的 Voldman 研究组<sup>[17]</sup>采用集成微流控芯片技术, 加工出双层的大规模微阵列用来拦截细胞. 与简单的细胞拦截芯片不同, 他们为了让不同细胞达到“A-B”形式的配对, 在每个微拦坝的背部加工了一个只可容纳一个细胞的缺口, 而在正面则加工了一个可以容纳两个细胞的缺口. 实验中首先从反方向灌注 A 细胞悬液, A 细胞被拦坝背面的缺口拦截, 每个拦坝只拦截一个 A 细胞. 然后溶液从正方向灌入, 使原先拦截在拦坝背面的 A 细胞脱离落入下游拦坝的正面

缺口中. 由于层流的作用, 很少会出现两个细胞占据一个正面缺口的情况. 最后 B 细胞从正向灌入芯片, 进入正面缺口内剩下的一个细胞空间内, 这样微拦坝上拦截了的两个细胞就基本上成了“A-B”组合(图 3(a)). 两个单细胞的融合既可以用聚乙二醇(PEG)辅助, 也可以通过在芯片内上下两方集成的电极施加脉冲电位来实现电穿孔融膜. 与传统方法相比, 微流控芯片将 PEG 融合的效率从 6%提高到了 25%左右, 将电融合效率从 11%提高到 50%以上, 总体而言, 该方法将细胞融合的效率提高了 3~10 倍, 是对传统方法难以控制和实现的问题利用集成微流控芯片得以解决的一个范例.

在与细胞相关的实验操作中, 高通量和长时间的培养常常是必须的步骤. 在培养过程中进行实时的微环境调控、形态观察、生化检测等操作往往会带来污染的风险, 对保证实验的平行性和重现性也带来挑战. Quake 研究组在他们发展的大规模集成微流控芯片的基础上提出了一种全过程自动化的高通量活细胞培养微流控系统<sup>[18]</sup>. 该系统集成了 96 个可独立寻址的微培养腔, 每个微腔的工作体积只有 60 nL, 这种独立的高通量培养微腔和可控性适合各种自行设计的细胞培养实验和筛选研究(图 3(b)). 作者在该芯片上培养人间叶干细胞(Human primary mesenchymal stem cells), 研究了短期刺激对细胞增殖和细胞中碱性磷酸酶活性的影响. 细胞可以在芯片上连续培养 240 h 以上, 结合自动控制的荧光显微镜可以在无人值守情况下完成整个实验过程. 这一成果充分展示了大规模集成的微流控芯片作为一种新的细胞培养和研究工具的高效性和普适性.

除了通过高通量的实验获得大量数据用于统计分析外, 进行高时空分辨的细胞受激响应研究是认知细胞内部生化反应过程的必要手段. 集成微流控芯片在实现细胞分析的时间与空间分辨上有很大的灵活性, 具有不可替代的优势. 通过芯片的精确控制, 目的细胞可以被分配到芯片上指定的位置, 通过定时、定点的刺激来实现高通量的细胞刺激并可以实现原位实时观测. 加拿大不列颠哥伦比亚大学的 Hansen 研究组<sup>[19]</sup>近期一篇报道利用多层软蚀刻技术制备的芯片采用半压阀门控制捕获悬浮的酵母细胞, 在一块芯片上集成了 2048 个半压微阀, 以实现 8 个细胞系、每个细胞系同时进行 32 种定时刺激、每种刺激有 8 个并行实验的全目标. 整个实验通过自动

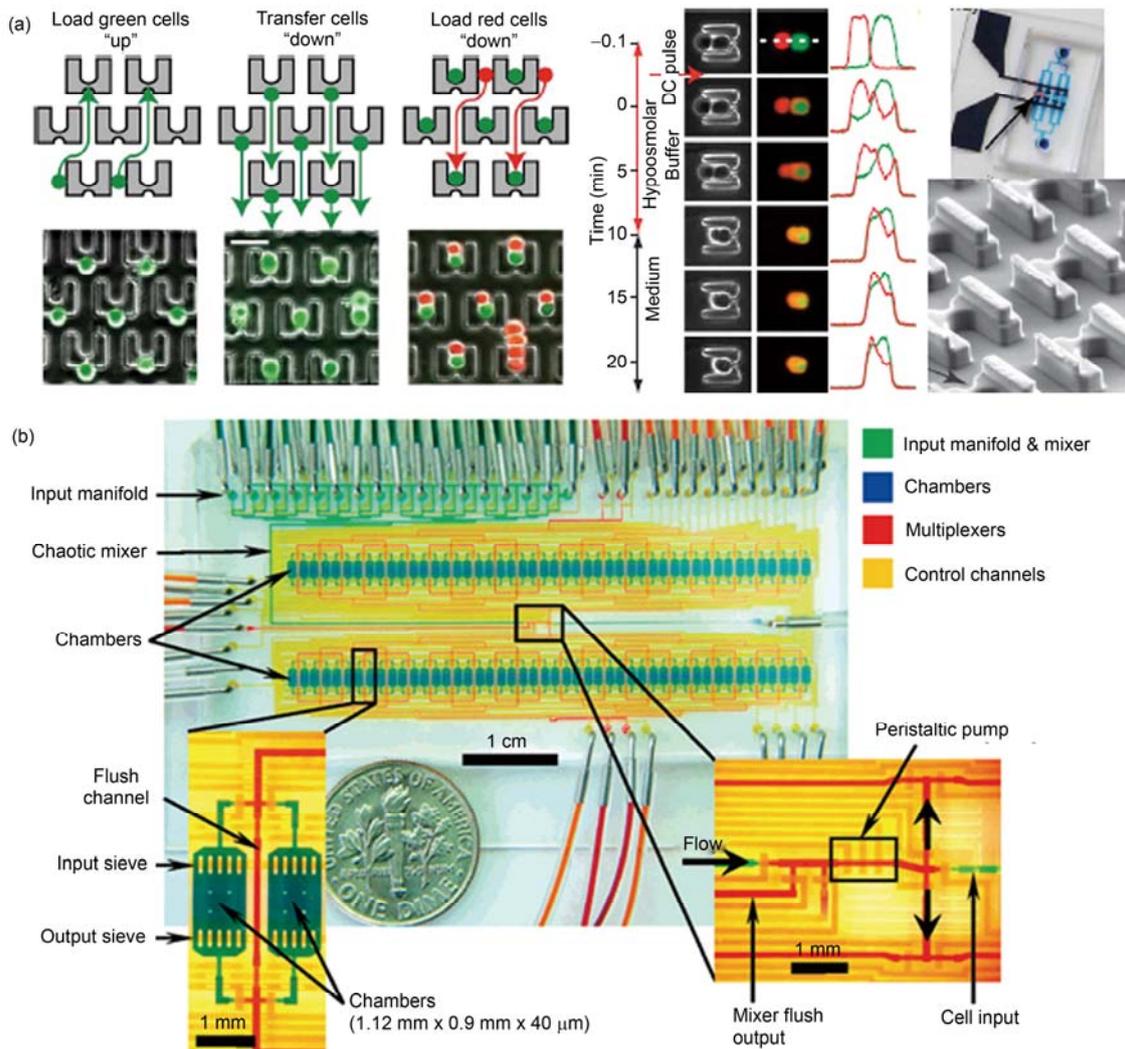


图3 集成微流控芯片对细胞的操控与全自动培养

(a) 利用芯片的加工对 A 和 B 细胞配对精确控制, 并在芯片上进行高效率细胞融合<sup>[17]</sup>; (b) 全集成微流控芯片对细胞的全自动化连续培养<sup>[18]</sup>

的实时控制和显微图像拍摄来获取大量数据. 这一实验展示了高集成度的微流控芯片作为一种新的细胞生物学研究工具, 在系统生物学研究领域具有巨大潜力.

集成微流控芯片在细胞培养特别是细胞微环境控制和单细胞培养上的优势是明显的, 芯片体系可以自动化地进行许多细胞培养、分离、富集以及分析步骤, 大大减少了人为误差、人力资源和试剂消耗. 即使与成熟的孔板技术相比, 集成微流控芯片所消耗的试剂更少、实验通量更高, 还可以摆脱孔板实验中边缘效应的干扰, 具有很好的潜力. 当然, 集成微流控芯片在细胞培养和操控上也存在一些局限性和

挑战. 首先, 芯片可以做得集成度很高, 但是外部的控制设备过于复杂, 如何简化芯片的操作, 使之更适应于化学家和生物学家的工作习惯, 是需要不断加以改进的技术问题; 其次, 芯片中细胞以及其他试剂的注入与回收存在许多芯片外的消耗, 这些消耗存在于连接管道、移液附件、外置泵体等处, 往往超过了芯片上的消耗, 如何解决这个“世界到芯片”的界面问题, 也需要不懈的努力; 第三, 在芯片内, 由于微环境可以精确控制, 且由于体积很小, 传质传热等过程都比较迅速, 这些环境如何在其他体系中再现, 使许多过程可以移植到更大规模的实验中, 也常常成为一个难题.

## 2.2 集成微流控芯片在核酸与蛋白质研究中的应用

核酸与蛋白质是两类最为重要的生物大分子,对核酸和蛋白质的结构、功能及调控过程的认识与研究为人类在分子水平上研究生命的本质奠定了基础.微流控芯片技术是研究核酸和蛋白质的良好平台:(1) 芯片上的液体消耗量极小,可以对极微量液体方便地进行操控,对于核酸和蛋白质这些生物大分子而言,可以减少样品量、增加浓度,并且有利于实现核酸和蛋白质的快速并行化分析;(2) 芯片的尺度在微米范围,该尺度下不仅仅传质和扩散速度很快有利于分析过程的许多操作快速完成,而且小尺度还具有常规尺度下不具备的某些性质如层流,电渗等可以很好地应用到分离分析中;(3) 集成化的多功能芯片实现了在极小尺寸下多个实验操作步骤的整合和流程化操作,在核酸和蛋白质的分析中,可以从细胞的培养开始,通过消化、裂解、提取、富集、纯化、标记、分离、信号放大、结果读出等多个操作环节,完成全部的操作得到最终数据,有助于减少样品损失和避免污染与实验操作人为误差.

加州大学伯克利分校的 Mathies 研究组<sup>[20]</sup>报道了一种用于超高通量基因分析的微流控装置.整个装置设计在一个直径为 200 mm 的圆盘状玻璃片上,由 384 条以辐射状排列的毛细微流管道组成.分析时,可以将样品加入到芯片边缘的储液池中,之后样品通过 8 cm 长的微流管道进行分离,最后用自制的四色旋转共聚焦荧光扫描仪进行检测.利用该装置,在 325 s 的时间内完成了 384 个在人的 HPE 基因中与血色沉着病相关联的 H63D 突变体的分析.这种 384 道微毛细管阵列分析电泳( $\mu$ CAE)制作简单,可工业化生产,将会大大提高筛选的速度,有望成为一种有力的分析工具.该研究组最近报道了利用电泳技术在芯片上对基因沉默细胞群中的单细胞进行基因表达量的全集成分析.该研究组最近报道了利用电泳在芯片上实现了基因沉默处理的细胞中的单细胞的基因表达量的全集成分析<sup>[21]</sup>.该方法将单细胞捕获、细胞裂解、cDNA 合成、亲和富集、电泳检测全部功能集成在了一块芯片上,整个分析过程只需要 70 min 左右(图 4).集成在微腔中的微金“岛屿”通过寡核苷酸的修饰和表面修饰有互补链的细胞相互作用,由于“岛屿”的面积( $25 \mu\text{m}^2$ )仅够容纳一个细胞,所以每

次分析严格地只分析一个单细胞.细胞被捕获后通过裂解和逆转录合成 cDNA 片段,在经过 30 次循环的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增后基因信号被显著地放大,集成在芯片管道上的一段亲和凝胶柱将待测基因片段进行有效的富集之后通过电泳的分离检测得到目标基因与对照基因的相对表达量.最终得到的基因沉默效率的结果与常规大量细胞的分析结果有明显不同,在对单细胞进行分析的结果显示按沉默效率来分类细胞可以分为两个大致的亚群,基因沉默的效率分别为 100% 和 50%,而这种细节信息在常规大体相群体细胞的分析中被完全“遮盖”了.集成微流控芯片的作用的优势不仅在于实现了高通量的并行操作和把多步实验步骤自动化处理,更重要的是,它提供了可靠、高效的新实验方法,而这样的实验,利用传统的分子生物学实验器材很难获得可靠的结果.

染色质免疫沉淀的方法是经典的研究 DNA 与蛋白相互作用的方法,可以精确地定位与蛋白结合的基因位点.传统方法依赖于有经验和技巧的实验人员,需要细胞量大( $10^5 \sim 10^7$ ),单次实验时间长(2~7 天).Quake 研究组<sup>[22]</sup>将这一方法在高度集成的微流控芯片装置上得以实现,芯片中环形管道上的阀门既可以独立使用,也可以配合使用形成蠕动泵.对其精确控制确保了每一步反应不被过量地稀释以及反应的充分与完全(图 5).最终通过在芯片上的填充柱将目标 DNA 片段捕获和富集,在芯片外完成定量 PCR 测定.该方法克服了体相系统实验中的许多局限性,实验仅需要 2000 个细胞就可以完成,实验过程中的孵育时间由过夜缩短至 2 h,整个实验完成缩短至一天之内,并且自动化的芯片控制系统可以无需有经验的技术人员控制免疫沉淀实验中的细节,确保实验的成功和平行性.

2006 年,Quake 小组<sup>[23]</sup>利用集成微流控技术发展了针对单个细胞的 mRNA 富集和扩增芯片,进行高灵敏度的基因表达研究.在常规方法中,由于 mRNA 降解、非特异性吸附等问题的存在,在 mRNA 纯化、cDNA 合成过程中不可避免存在样品残留或损失问题,因此要获得可靠的实验结果必须依赖于大量细胞的分析.而利用集成微流控芯片高通量和多功能化的特点,将单细胞捕获、裂解、mRNA 纯化、cDNA 合成以及 cDNA 纯化五步反应整合在一块芯片上,

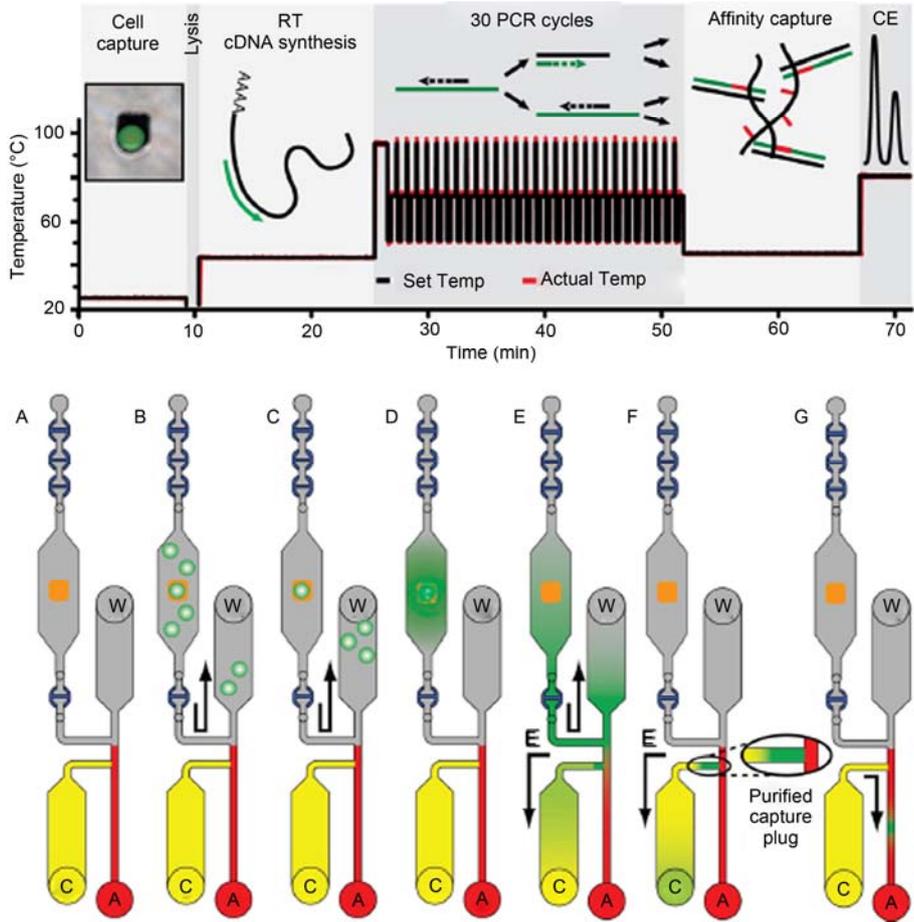


图 4 集成微流控芯片对单细胞中基因表达量的全集成分析过程示意图<sup>[21]</sup>

A~C: 单细胞被捕获在微“岛屿”上; D, E: 细胞被裂解, mRNA 逆转录合成 cDNA, PCR 扩增; F: 一段亲和柱有效富集目标基因片段; G: 目标基因片段电泳分离与检测。全过程在 80 min 之内完成

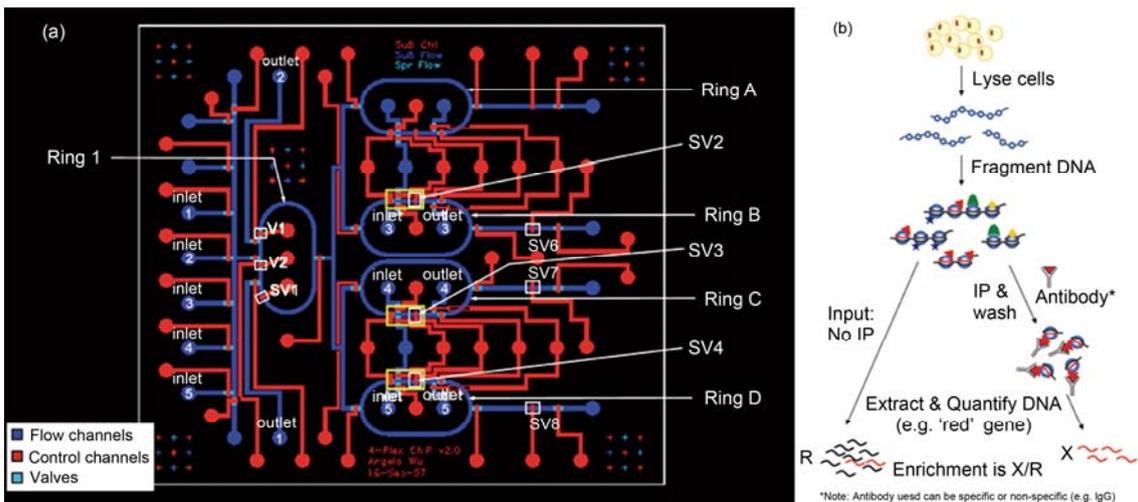


图 5 集成微流控芯片对 2000 个左右细胞进行染色质免疫沉淀的研究<sup>[22]</sup>

(a) 芯片设计结构示意图, 4 个环形管路设计可以在一次实验中对 4 组样品平行测定; (b) 染色质免疫沉淀的基本过程示意图

有效降低了样品损失,快速、高效地实现了对单细胞中低拷贝数 mRNA 的分析研究. 同年,哈佛大学谢晓亮教授研究组利用  $\beta$ -半乳糖苷酶基因作为报告基因结合单分子荧光技术和微流控技术将单个的酵母细胞封闭在微流控芯片的微培养腔室中,研究了单个细胞中蛋白表达的随机性. 芯片为单个酵母细胞提供了相对封闭的微环境,使得  $\beta$ -半乳糖苷酶催化生成的荧光产物即使很快地被泵出到细胞外也可以在微腔室中积累到足以被检测到的浓度<sup>[24]</sup>. 最近,谢晓亮研究组利用集成微流控芯片结合单分子荧光显微技术,对培养于微管道中的大肠杆菌基因文库进行单分子 mRNA 和相应蛋白表达量的荧光标记和高通量成像分析. 结果表明,在任意给定的基因文库中,单个细胞内 mRNA 的表达水平与对应蛋白的表达水平

没有呈现相关性<sup>[25]</sup>. 这种关联性缺失的原因在于 mRNA 与蛋白质在细胞内的寿命大不相同,所以在任意时刻,单个细胞内的蛋白组和转录组是有显著区别的. 该研究为在单细胞单分子水平揭示蛋白组调控和转录组调控的研究提供了新的平台和思路(图 6).

PCR 方法是核酸研究的利器,它能够复制特定的核酸序列,使其不断扩增. 这一方法已经广泛应用于生命科学的各个领域,为其带来革命性的变化. 但常规 PCR 存在耗时长、操作繁琐、试剂消耗量大等缺点. 集成微流控芯片以其在微小体积下显著改善热能传输、极大提高热循环速度、降低昂贵试剂的消耗等优势,为 PCR 操作的进一步优化提供了一条可行的途径. 充分利用微流控芯片高通量的优势,Mathies 研究组<sup>[26]</sup>报道了功能高度集成化的芯片

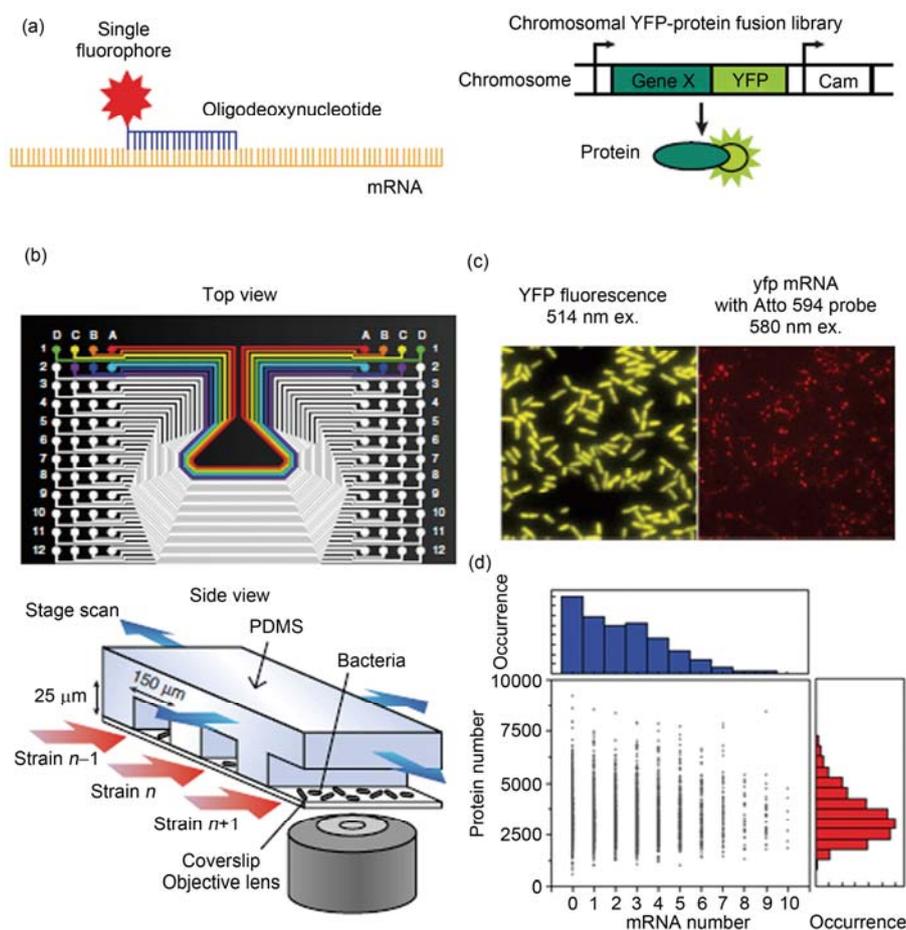


图 6 集成微流控芯片用于分析单个细胞中的单分子水平的 mRNA 和蛋白质表达<sup>[25]</sup>

(a) 荧光标记的寡聚脱氧核糖标记单个 mRNA 分子,黄色荧光蛋白融合的基因标记表达后的蛋白分子; (b) 芯片俯视图和实验装置示意图; (c) YFP 在细胞中的表达,显示出被转录和翻译的基因;与该基因对应的 mRNA 被转录; (d) 在某时刻时的 mRNA 转录水平和对应基因的蛋白质被翻译水平关系图,表明在该时刻转录水平和翻译水平之间没有显著的相关性

(图 7(a),(b)), 在该芯片上可以完成对 RNA 的分析, 即将逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR), 扩增产物的电泳分离和荧光检测在同一张芯片上完成. 这种芯片不仅高度集成化, 而且极大缩短分析时间(整个过程可以在 45 min 内完成)、减少样品消耗、避免交互污染、提高检测的灵敏度(RNA 分子的检出下限可达到 11 个拷贝), 从而可用于单细胞的基因表达分析. 他们用该装置检测出了正常的乳腺组织和癌变的乳腺组织中 RNA 表达的不同.

微流控技术还可以用于 DNA 的富集和扩增. 在微流控芯片内进行基因扩增, 特别是针对单个细胞的基因型分析和测序样品准备上, 和传统方法相比, 具有单个实验用量小(纳升甚至皮升)、利于高通量集成、便于控制平行实验条件等优点. Quake 小组<sup>[27]</sup>开

发的数位化 PCR 芯片(图 7(c),(d))集成了大量纳升微反应室, 当含有目的基因序列的样品被适当稀释后, 目的基因拷贝数在反应室中的分布符合泊松分布规律. 经过 PCR 过程, 最后观察反应室中产物的有无, 即可通过计数反推得到目的基因的拷贝数. 他们通过从环境土壤中分离无法进行实验室培养的微生物种群, 扩增并分析了参与白蚁及其共生体系中的关键酶的编码基因, 发现了未知的以核糖体 RNA 为基础的共生生物物种<sup>[28]</sup>. 这一方法还被成功运用于产前诊断中, 通过对母亲外周血内来自胎儿的游离 DNA 的测量进行产前染色体畸变疾病的筛查<sup>[29,30]</sup>. 这样的装置, 在对单细胞检测有重要需求的干细胞研究和测序研究可以大大提高效率、减少实验的成本并减小实验误差, 利用大规模集成的数位化 PCR 微

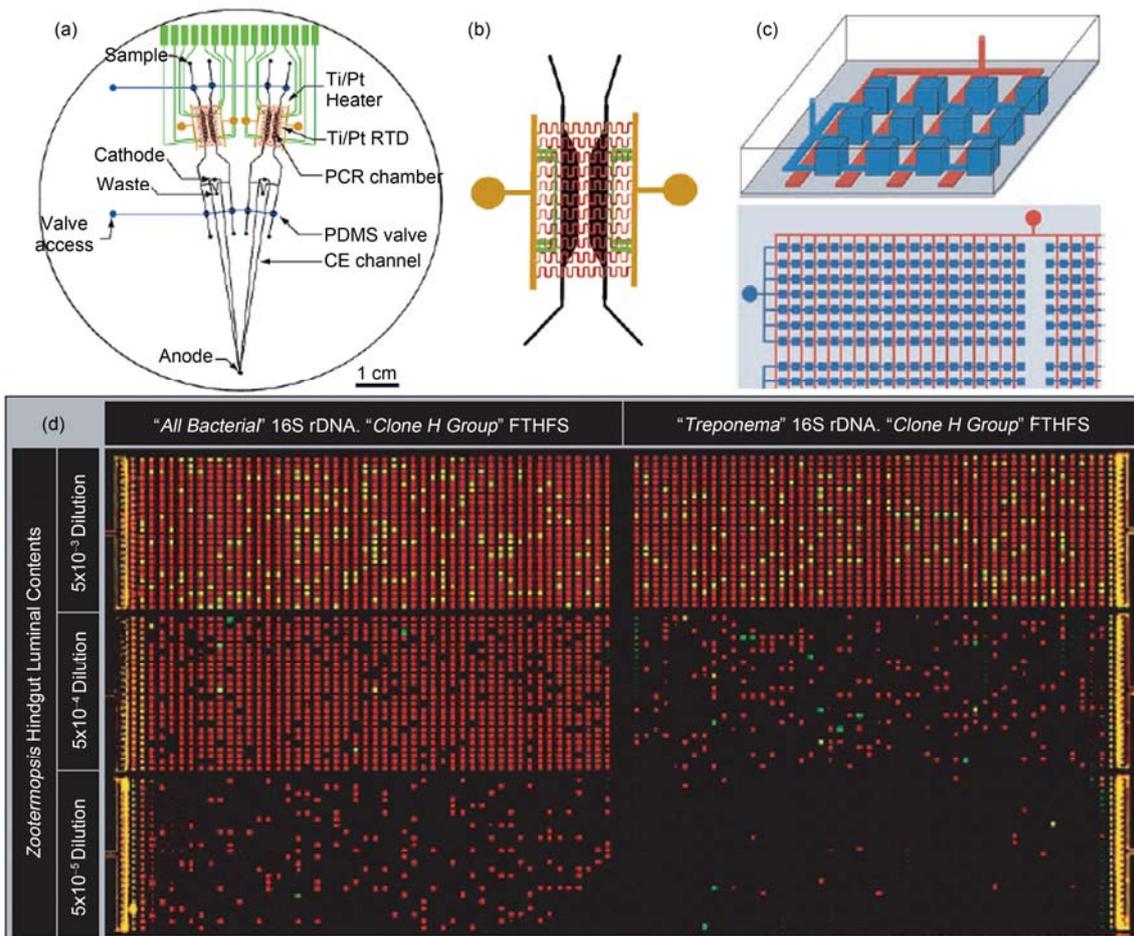


图 7 集成微流控芯片用于聚合酶链式反应(PCR)应用实例

(a) 多通道 RT-PCR-CE 芯片结构示意图, 在 1 块 100 mm 直径的芯片上集成有阻抗加热元件、加热电极引出条、Ti/Pt 感应温度传感器、PCR 反应腔室、电泳分离通道和 PDMS 气动微阀; (b) 反应腔室区域放大图<sup>[26]</sup>; (c) 数位式集成化 PCR 微流控芯片示意图, 深色, 反应微腔室; 浅色, 微阀; (d) 数位式集成 PCR 反应结果图<sup>[28]</sup>

流控芯片来进行基因组测序样本的质量控制,已经取得了很好的效果,为测序实验的成功提供了保证。

传统的核酸微阵列芯片依赖于高通量的自动点样系统,溶液的体积通常在微升级别;有些其他方法,如超声聚焦和压电喷液等,可以实现皮升级别的液体自动分配和点样,但是通量较低且商品化仪器价格昂贵。我们开发了一种全新的高通量开放式纳升级液体点样芯片(图 8)<sup>[31]</sup>。该芯片通过气压推动液体在微管道中流动,液滴进而由开放式出口挤出,通过编程控制各个液滴可寻址性的进入玻璃芯片上对应位置的微孔。定量 PCR 结果证实了该芯片的高度并行性、重复性和可控性。便捷的操作和开放式接口的设计,使该芯片在高通量核酸定量分析、高通量药物筛选等领域具有广阔的应用前景。

在免疫分析中最为人们所熟悉的检测手段之一就是 ELISA(酶联免疫检测),传统方法在操作过程中需要受过专门训练的技术人员进行操作而且费时费力,为一些重要疾病的诊断与治疗监测带来麻烦。利用集成微流控芯片的优势有望实现自动化且方便的 ELISA 检测。在相对复杂的集成微流控芯片操作中,控制流体的运动是关键,巧妙地驱动液体运动可以大大简化芯片的使用难度。Lai 等人<sup>[32]</sup>报道了一种 CD 光盘式的用来进行酶联免疫分析(ELISA)的微流控操作平台。整个微流控操作平台建立在一张塑料圆盘上,像 CD 唱机旋转唱片一样旋转圆盘,利用离心力和毛细管力来驱动反应中涉及到的溶液,酶联免疫分析的每一步反应的进样靠控制圆盘的旋转速度来自动控制。他们用该种装置来进行杂交瘤细胞中鼠的 IgG 分析,结果显示,与传统的 96 孔板的分析相

比,该方法具有相同的检测范围但却消耗更少的试剂和更短的时间,满足了医学诊断的需求。

规模集成化微流控芯片装置不仅可以在微尺度上实现常规生物学方法建立起来的检测体系和技术,而且可以实现很多常规手段和技术难以实现和达到的研究。比如:基因的表达与调控是生物学的核心问题之一,不同水平的基因调控都涉及到特定蛋白因子之间或蛋白因子与 DNA 或 RNA 之间的弱相互作用,传统方法缺乏实现对弱相互作用进行高通量研究的手段。Quake 实验室<sup>[33]</sup>利用机械力限制捕获的方法展示了一种高通量微流控芯片平台,用于测定转录因子的结合能谱。该芯片将气动微阀设计成了纽扣形状,在下压关闭时可以与下底面的位点直接接触而保留受较弱相互作用而结合的分子。基于此设计该研究组实现了对真核细胞转录因子与 DNA 之间结合能谱的描绘(图 9(a))。该方法可以实现不同转录因子与 DNA 结合能测量的高通量与并行化,为理解体内真核细胞转录因子参与基因的表达与调控提供了可参照的技术平台。同样利用该机械力限制捕获的设计,Quake 实验室<sup>[34]</sup>在集成化的微流控芯片平台上结合蛋白体外翻译系统实现了对肺炎链球菌 43 个蛋白之间相互作用的研究。在两个相邻的微腔室中,各自在基底上采用核酸和蛋白的点样,其中一个微管道中集成有纽扣式下压微阀作为机械限制力,在蛋白相互作用之后可以保留蛋白之间的弱相互作用力和测定蛋白之间的亲和作用(图 9(b))。该项研究发现了很多肺炎链球菌中新的蛋白相互作用对,验证了反馈调节在代谢调节中的普遍机制,并且证实某些蛋白在调节中扮演了多重调节角色。

X 射线衍射法是研究蛋白质分子三维结构的主要研究手段,如何快速得到高质量蛋白质晶体成为结构生物学发展的瓶颈。高度集成化的微流控芯片为蛋白质结晶条件的高通量、快速筛选提供了一个很好的平台。并且在微流体系的微小尺度下,因密度差异导致的自然对流可以忽略不计而自由扩散成为物质交换的主导因素,为蛋白质结晶提供了一个非常有利的动力学环境。Quake 实验室<sup>[35]</sup>在大规模集成微流控芯片制作的基础上通过一系列微泵和微阀的集成构建了可以实现多种溶液方便定量混合与操纵的芯片,成为“自动化配方”式微流控芯片装置,应用该芯片研究了木聚糖酶在不同沉淀剂配方条件下的晶相变化。该方法较之传统方法的结晶筛选效率提

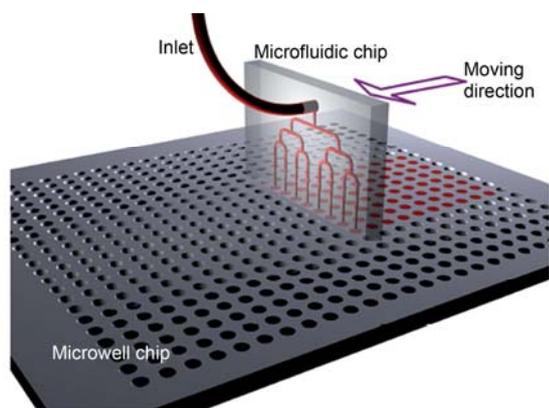


图 8 微流控微分配装置示意图<sup>[31]</sup>

微分配芯片在精密步进电机的带动下配合下方微池芯片实现高通量的自动化溶液分配

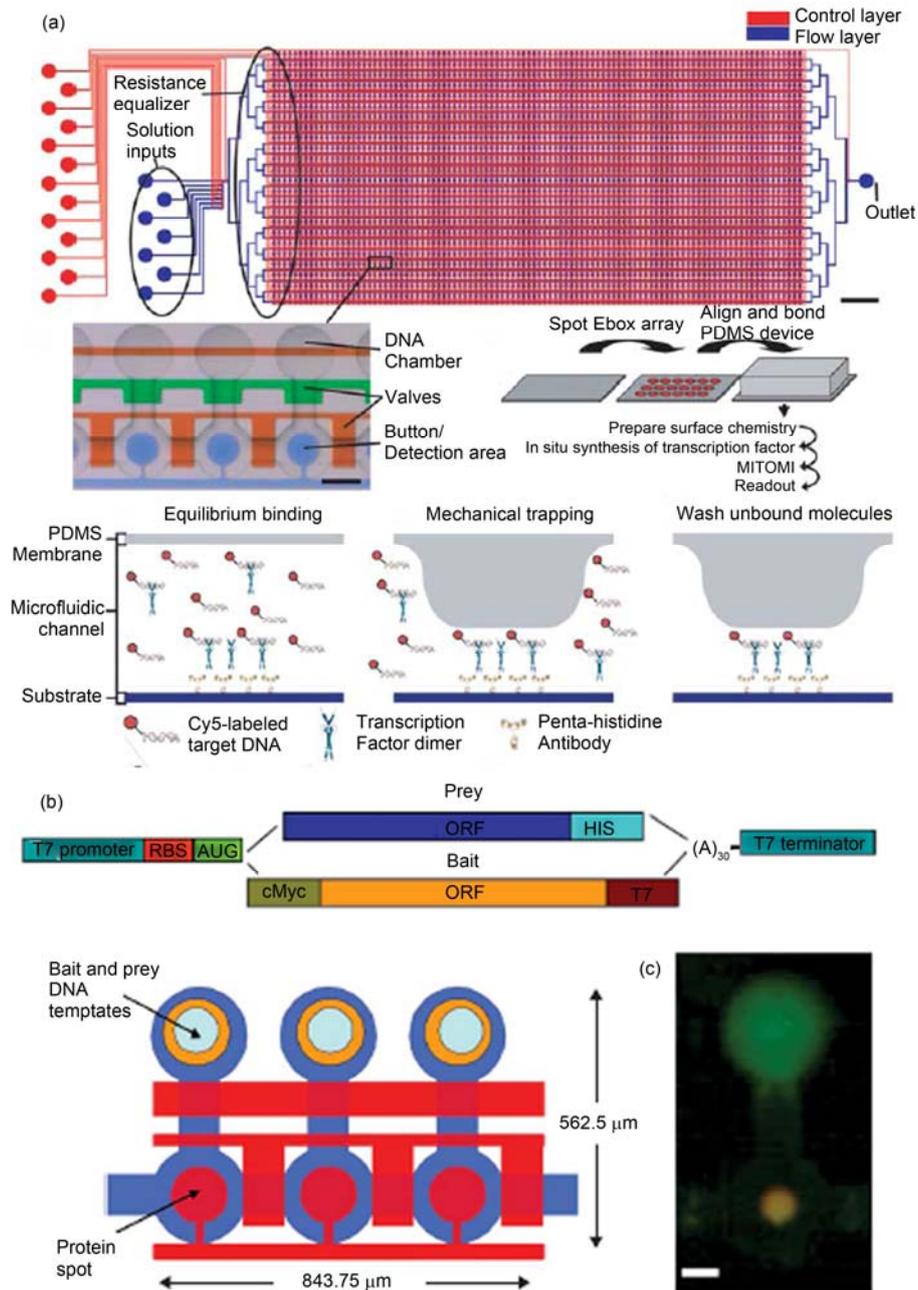


图9 高通量集成微流控芯片中利用机械力限制捕获弱相互作用保留测定和绘制转录因子和蛋白相互作用谱图

(a) 集成 2400 反应腔室和 7233 个微阀的芯片示意图, 测定转录因子与目标 DNA 结合作用力的测定过程<sup>[33]</sup>; (b), (c) 利用体外蛋白翻译系统结合芯片中限制捕获弱相互作用保留研究蛋白间相互作用芯片示意图和实际测定中的荧光照片<sup>[34]</sup>

高了 72 倍(图 10(a)). 这一方法及之后的改进与发展已经成功运用于结构生物学的研究中, 提高了获取晶体的成功率并节省了人力资源的消耗. Ismagilov 实验室利用油相将含有不同种类、浓度配比的蛋白质、沉淀剂和盐溶液的水相分散成一个个独立的液体, 进行蛋白质结晶条件的高通量筛选, 并且该方法生

成的蛋白质结晶产物可以保存在毛细管内直接进行原位 X 射线衍射分析(图 10(b))<sup>[36]</sup>. 在相似的液滴芯片中, 该实验室还利用蒸发扩散的原理, 使水分子在渗透压的作用下从低盐浓度的蛋白质结晶液滴中扩散到高盐浓度的溶液液滴中, 从而使结晶液滴中蛋白质浓度逐渐升高达到饱和, 进而形成结晶<sup>[37]</sup>. 最

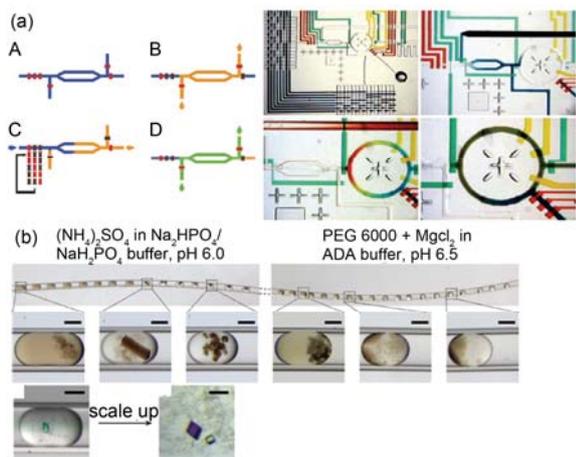


图 10 集成微流控芯片中研究蛋白质结晶条件的高通量筛选 (a) “自动化配方”式微流控芯片装置结构示意图与芯片实物图, 微阀与微泵的配合形成定量式的微注射于微混合器, 定量控制不同溶剂与沉淀剂所占的比例<sup>[35]</sup>; (b) 利用集成微流控芯片微液滴技术研究不同条件下膜蛋白的单晶形成和分子结构<sup>[36]</sup>

近, 该实验室利用自由界面扩散和“滑动”芯片技术设计了可以进行大规模蛋白结晶条件筛选的实验<sup>[38]</sup>. 用芯片上下两层之间的相互滑动控制可以实现预先分隔开来的蛋白溶液和沉淀剂通过自由界面扩散混合, 大规模的集成可以进行多个蛋白样品的平行实验和多个条件的筛选. 该技术在芯片的设计上巧妙地利用了输送液体管道的宽度变化实现了同一条件下的不同反应平衡时间的选择(图 11), 为了解决在滑动过程中有可能产生的溶液渗漏问题, 他们在芯片的平面上蚀刻了纳米尺度的点阵列, 使得表面的疏水性大大提高, 这样就限制了溶液从管道和储液池渗透出来. 最终在 3 块芯片上实现了的 480 个独立的条件实验, 每个蛋白样品仅消耗了 12  $\mu\text{L}$ , 在芯片上成功结晶了烯酯酰辅酶 A 水合酶和四氢叶酸还原酶. 这类“滑动”芯片虽然在结构集成上比较简单, 但是在操作上集成了机械运动, 大大拓展了芯片的使用范围, 值得关注.

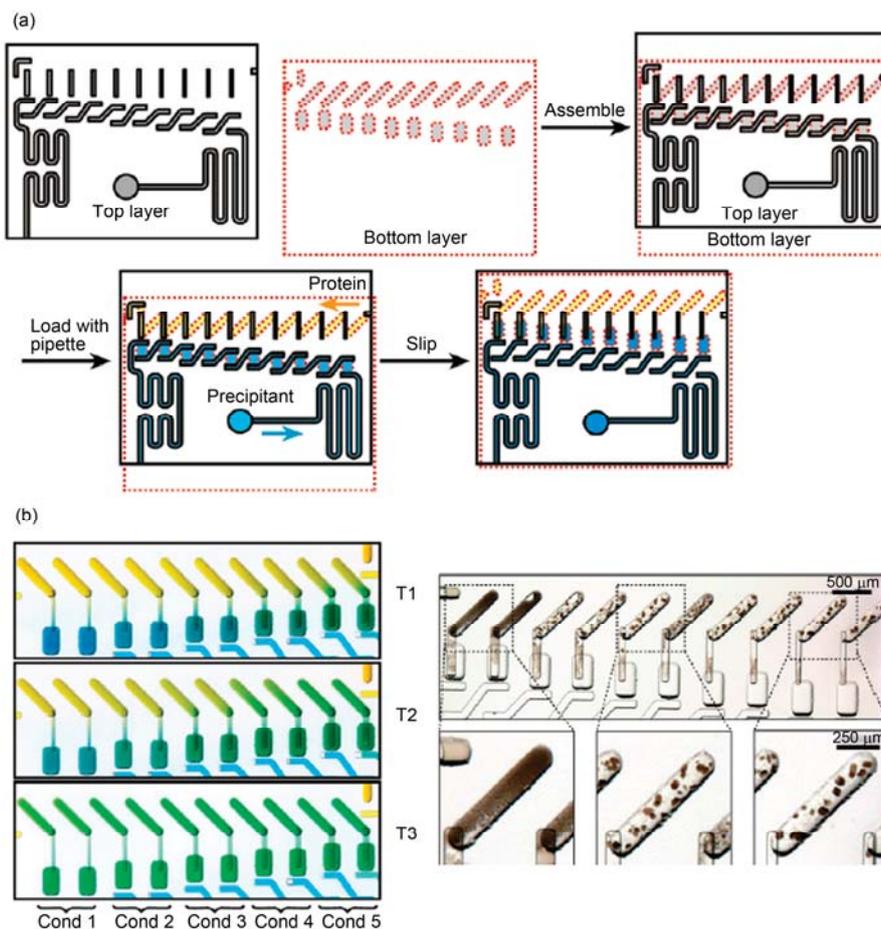


图 11 滑动微流控芯片进行蛋白结晶条件筛选实验<sup>[38]</sup>

(a) 芯片实验过程示意图; (b) 不同管道构型和尺寸在实验过程中控制蛋白结晶反应平衡时间实验照片

以上实例均反映了集成微流控芯片在生物大分子研究中的独特作用。现代分子生物学的实验通量越来越高、单个实验可以提供的样品量越来越少、高精度的重复劳动所占比例逐渐增加,这些都意味着集成微流控芯片有望成为下一代的试管和多孔板,成为分子生物学实验的常规方法。在实现这个目标之前,还有一些困难需要被克服:(1) PDMS 材料虽然大量被使用,但是其表面容易吸附蛋白质分子,对某些实验会带来影响,如何对 PDMS 表面进行改性,或者使用其他材料使其不容易吸附生物大分子,是一个重要问题;(2) 芯片实验往往针对特定的实验需要进行芯片的设计,分子生物学实验的步骤和试剂多变,如何能够设计一些通用性强的芯片,可以很容易的被生物学家们热爱并使用,是一个亟需解决的问题;(3) 如何在不断简化操作与设计的同时,增加芯片处理的通量,将符合后基因组时代利用微量样品进行超大规模实验的需求。

### 2.3 芯片上的化学合成

传统的化学合成通常在烧瓶,烧杯等大体积的容器中进行,为了获得更快的热传导、物质扩散和反应过程,进一步提高反应的选择性,人们开始关注在微反应器中进行化学合成,而这种微量的化学合成与生物医学的需求正好吻合。例如在核医学影像检查中,一个重要的技术是正电子发射计算机断层扫描(positron emission computerized tomography, PET),该方法中常用的一个示踪物质 2-18 氟-2-脱氧葡萄糖(2-deoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluoro-D-glucose,  $^{18}\text{F}$ FDG)的常规合成需要训练有素的工作人员使用放射性药物合成的特殊设备,花费几十分钟的工作时间。18-氟的半衰期却只有 110 min,反应过程不得不花费的时间为该技术的临床应用带来了一些局限性,例如需要加大放射性原材料的剂量和使用更大规模的设备等等。Quake 研究组和加州大学洛杉矶分校的放射药物学家合作,利用合理设计的微阀与微泵,将 $^{18}\text{F}$ FDG 合成中的氟化物富集、脱水、标记、脱乙腈、水解五步反应高度集成在微流控芯片上(图 12(a)),使 $^{18}\text{F}$ FDG 合成全过程缩短至 14 min,并将合成产物直接注入小鼠体内,利用 PET 得到肿瘤分布的清晰图像<sup>[39]</sup>。这一实验表明,在芯片上实现化学合成并非只是简单地在小体积反应器内重现反应过程,而是可以带来更多的优势。

由美国诺贝尔化学奖获得者夏普利斯(K. Barry Sharpless)实验室发展出一项名为点击化学(click chemistry)的新合成方法成为化学合成与药物发现领域的重要耦联技术之一,通过该方法能够产生一系列高立体选择性的产物,且其副产物无害。反应本身对氧气和水不敏感,具有高效率和高控制性的特点。将这项技术与高通量、高度自动控制等特点于一身的集成微流控芯片结合,美国加州大学洛杉矶分校的曾宪荣研究组选择经典的 bCAII 点击化学体系,在一块芯片上验证了同时进行 32 个同位点击化学反应的高效性和稳定性,并且极大的减少了珍贵样品如蛋白质的消耗<sup>[40]</sup>。这一成功范例展示了微流控芯片在高通量合成、筛选新型药物产业中的潜力,使得原先费时、费力、费钱的规模化合成实验以全新的方式来实现。

2007 年,Quake 实验室<sup>[41]</sup>报道了利用全氟聚醚(PFPE)材料通过集成微流控芯片实现高质量核酸合成的结果(图 12(b))。在合成过程中,需要使用到二氯甲烷等对 PDMS 材料有强溶胀能力的有机溶剂,而 PFPE 材料对绝大多数有机溶剂具有很好的抵抗能力,同时其力学行为和 PDMS 接近,具有很好的弹性,可以利用多层键合的方式加工集成微流控芯片,文章以 DNA 合成为例,演示了集成微流控芯片在复杂有机合成中的潜在用途。芯片上 DNA 分子的合成和传统方法相比没有本质的区别,因其具有样品低消耗的优势,他们采用 (1S)-(+)-(10-camphorsulfonyl)oxaziridine(CSO)作为氧化剂替代传统实验中使用的廉价碘剂,进一步提高合成的准确性。利用化学方法合成寡聚核酸分子,是现代生物学实验的重要依托手段之一。传统的方法是采用商品化的核酸合成仪通过设定不同的核苷按照一定次序逐步加成来实现的。这一方法发展到现在已经非常成熟了,采取固相有机合成技术,每一个核苷的加成一共经历了去保护、加成、氧化、封闭等 4 个化学反应步骤,4 个步骤完成一次的总产率一般都可以保持在 99%以上。在集成微流控芯片内合成的寡聚 DNA 分子在分子生物学的研究中具有重要的应用价值,首先产物的量大小合适,在 pmol 量级,特别适用于大部分分子生物学实验,大大减少了原料的浪费和废液废料的产生;其次,通过合理的布局,可以实现核酸文库的合成,这对于高通量的生物学研究具有重要辅助意义。最近,Quake 实验室<sup>[42]</sup>在 PDMS 上对上述合成方法进行了推广,在一块芯片上同时进行 16 个寡聚

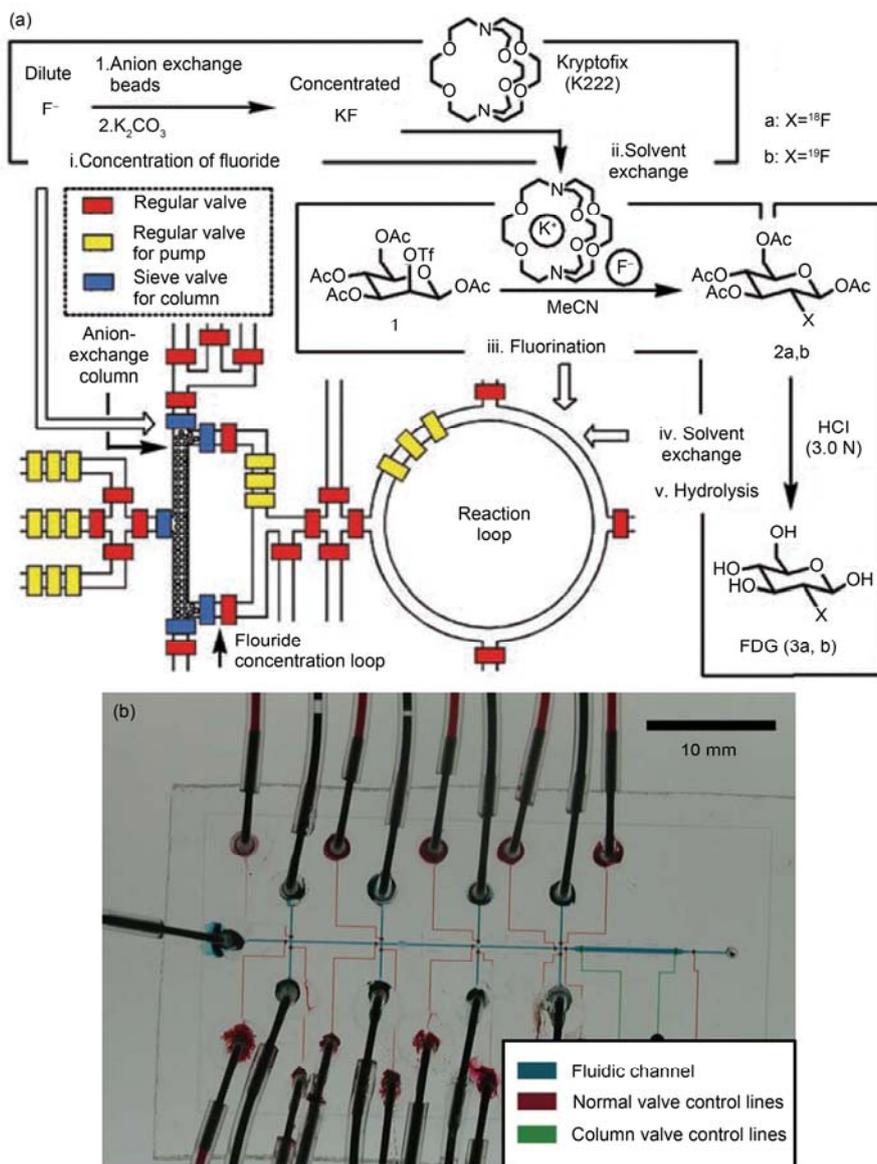


图 12 集成微流控芯片用于化学合成的研究

(a) 规模集成式芯片用于操控液体在芯片中合成 2-18 氟-2-脱氧葡萄糖芯片核心结构与过程示意图<sup>[39]</sup>; (b) 用于合成寡聚核苷酸分子的集成式 PFPE 微流控芯片实物图<sup>[41]</sup>

核酸序列的合成，并通过连接酶将其拼装成一段基因。这一技术对于合成生物学的发展将带来重要的技术支持，利用微流控芯片进行高通量 DNA 合成将是这个领域的发展趋势。

集成微流控芯片进入合成化学领域，并不能取代现有的绝大多数有机合成所使用的容器和方法。芯片上的合成化学必须适合于这个特殊的体系，并可以利用这个体系带来其他传统体系无法提供的便捷或效率。在组合化学、有机合成方法学、生物无机

化学、化学生物学、核酸化学等相关的领域，由于其受到现有手段的很多制约，是利用集成微流控芯片寻找突破口的最好切入点。

### 3 结论

集成微流控芯片已经成为深入分离分析、化学合成、药物微分析系统、分子免疫学、快速诊断系统、分子生物学、细胞生物学、神经生物学、系统生物学、结构生物学、组织生物学、微生物学等一系列应用研

究领域的综合性、多学科、多领域的交叉学科研究热点。大规模集成芯片不仅可以实现许多化学和一些传统生物学实验的自动化操作、检测与分析,而且可以大大减小样品、试剂和时间的消耗,极大地提高实验的通量,减少实验中废弃物的产生。更重要的是,

集成微流控芯片不仅仅是简单地对传统意义上的化学或生物学实验进行微型化的集成,它提供了一种全新的理念和技术平台,使得原先在传统的化学和生物学手段下很难完成或不能完成的某些实验能够得以顺利地实现。

**致谢** 感谢如下实验室成员在微流控芯片课题上的讨论和建议: 庞玉宏、郑春红、费鹏、李文涛、门涌帆、周莹、陈贵娥、王静雯、陈涛、虞之龙、纪旭、陈子天、姜夕霁、卜杰洵、熊亮、傅语思、张先念、王建斌、邱海维。

## 参考文献

- 1 Terry S C. A gas chromatographic air analyser fabricated on silicon wafer using integrated circuit technology. Dissertation for the Doctoral Degree. Palo Alto, CA: Stanford University, 1975
- 2 Manz A, Graber N, Widmer H M. Miniaturized total chemical-analysis systems—A novel concept for chemical sensing. *Sensor Actuat B-Chem*, 1990, 1: 244–248
- 3 Xia Y N, Whitesides G M. Soft lithography. *Annu Rev Mater Sci*, 1998, 28: 153–184
- 4 Xia Y N, Whitesides G M. Soft lithography. *Angew Chem Int Edit*, 1998, 37: 551–575
- 5 Duffy D C, McDonald J C, Schueller O J A, et al. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem*, 1998, 70: 4974–4984
- 6 McDonald J C, Duffy D C, Anderson J R, et al. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 2000, 21: 27–40
- 7 Effenhauser C S, Bruin G J M, Paulus A, et al. Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices: Analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips. *Anal Chem*, 1997, 69: 3451–3457
- 8 Whitesides G M, Stroock A D. Flexible methods for microfluidics. *Phys Today*, 2001, 54: 42–48
- 9 Unger M A, Chou H P, Thorsen T, et al. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 2000, 288: 113–116
- 10 Thorsen T, Maerkl S J, Quake S R. Microfluidic large-scale integration. *Science*, 2002, 298: 580–584
- 11 Wheeler A R, Thronset W R, Whelan R J, et al. Microfluidic device for single-cell analysis. *Anal Chem*, 2003, 75: 3581–3586
- 12 Di Carlo D, Aghdam N, Lee L P. Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell isolation arrays. *Anal Chem*, 2006, 78: 4925–4930
- 13 Wlodkowic D, Faley S, Zagnoni M, et al. Microfluidic single-cell array cytometry for the analysis of tumor apoptosis. *Anal Chem*, 2009, 81: 5517–5523
- 14 Ye N N, Qin J H, Shi W W, et al. Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device. *Lab Chip*, 2007, 7: 1696–1704
- 15 Ma B, Zhang G, Qin J, et al. Characterization of drug metabolites and cytotoxicity assay simultaneously using an integrated microfluidic device. *Lab Chip*, 2009, 9: 232–238
- 16 Wang Z H, Kim M C, Marquez M, et al. High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis. *Lab Chip*, 2007, 7: 740–745
- 17 Skelley A M, Kirak O, Suh H, et al. Microfluidic control of cell pairing and fusion. *Nat Methods*, 2009, 6: 147–152
- 18 Gomez-Sjoberg R, Leyrat A A, Pirone D M, et al. Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system. *Anal Chem*, 2007, 79: 8557–8563
- 19 Taylor R J, Falconnet D, Niemisto A, et al. Dynamic analysis of MAPK signaling using a high-throughput microfluidic single-cell imaging platform. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 3758–3763
- 20 Emrich C A, Tian H J, Medintz I L, et al. Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis. *Anal Chem*, 2002, 74: 5076–5083
- 21 Toriello N M, Douglas E S, Thaitrong N, et al. Integrated microfluidic bioprocessor for single-cell gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 20173
- 22 Wu A R, Hiatt J B, Lu R, et al. Automated microfluidic chromatin immunoprecipitation from 2,000 cells. *Lab Chip*, 2009, 9: 1365–1370
- 23 Marcus J S, Anderson W F, Quake S R. Microfluidic single-cell mRNA isolation and analysis. *Anal Chem*, 2006, 78: 3084–3089
- 24 Cai L, Friedman N, Xie X S. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature*, 2006, 440: 358–362

- 25 Taniguchi Y, Choi P J, Li G W, et al. Quantifying E-coli proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science*, 2010, 329: 533–538
- 26 Toriello N M, Liu C N, Mathies R A. Multichannel reverse transcription-polymerase chain reaction microdevice for rapid gene expression and biomarker analysis. *Anal Chem*, 2006, 78: 7997–8003
- 27 Warren L, Bryder D, Weissman I L, et al. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 17807–17812
- 28 Ottesen E A, Hong J W, Quake S R, et al. Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria. *Science*, 2006, 314: 1464–1467
- 29 Fan H C, Quake S R. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Anal Chem*, 2007, 79: 7576–7579
- 30 Fan H C, Blumenfeld Y J, El-Sayed Y Y, et al. Microfluidic digital PCR enables rapid prenatal diagnosis of fetal aneuploidy. *Am J Obstet Gynecol*, 2009, 200: 543.e1–543.e7
- 31 Wang J B, Zhou Y, Qiu H W, et al. A chip-to-chip nanoliter microfluidic dispenser. *Lab Chip*, 2009, 9: 1831–1835
- 32 Lai S, Wang S N, Luo J, et al. Design of a compact disk-like microfluidic platform for enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Chem*, 2004, 76: 1832–1837
- 33 Maerkl S J, Quake S R. A systems approach to measuring the binding energy landscapes of transcription factors. *Science*, 2007, 315: 233–237
- 34 Gerber D, Maerkl S J, Quake S R. An *in vitro* microfluidic approach to generating protein-interaction networks. *Nat Methods*, 2009, 6: 71–74
- 35 Hansen C L, Sommer M O A, Quake S R. Systematic investigation of protein phase behavior with a microfluidic formulator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 14431–14436
- 36 Li L, Mustafi D, Fu Q, et al. Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 19243–19248
- 37 Zheng B, Tice J D, Roach L S, et al. A droplet-based, composite PDMS/glass capillary microfluidic system for evaluating protein crystallization conditions by microbatch and vapor-diffusion methods with on-chip X-ray diffraction. *Angew Chem Int Edit*, 2004, 43: 2508–2511
- 38 Li L, Du W, Ismagilov R F. Multiparameter screening on SlipChip used for nanoliter protein crystallization combining free interface diffusion and microbatch methods. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 112–119
- 39 Lee C C, Sui G D, Elizarov A, et al. Multistep synthesis of a radiolabeled imaging probe using integrated microfluidics. *Science*, 2005, 310: 1793–1796
- 40 Wang Y J, Lin W Y, Liu K, et al. An integrated microfluidic device for large-scale *in situ* click chemistry screening. *Lab Chip*, 2009, 9: 2281–2285
- 41 Huang Y Y, Castrataro P, Lee C C, et al. Solvent resistant microfluidic DNA synthesizer. *Lab Chip*, 2007, 7: 24–26
- 42 Lee C C, Snyder T M, Quake S R. A microfluidic oligonucleotide synthesizer. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 2514–2521

## Integrated microfluidic chips

ZHAO Liang<sup>1,2</sup>, SHEN Jie<sup>1,2</sup>, ZHOU Hongwei<sup>1,2</sup> & HUANG Yanyi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China;

<sup>2</sup>Biodynamic Optical Imaging Center (BIOPIIC), Peking University, Beijing 100871, China

Microfluidic chips represent a new opportunity for performing chemical or biological experiments at the micrometer scale with spatial and temporal control of the microenvironment. This technology has a number of advantages, including low reagent consumption, time savings and large scalability. Application of highly integrated microfluidic devices holds significant promise in chemistry and life science research. This review covers the basic concepts of integrated microfluidic chips with their applications in cell biology, protein analysis, nucleic acids research and chemical synthesis. In particular, novel applications in single molecule studies and high-throughput experiments will be presented. Many subjects that were previously challenging or impossible to manage with conventional methods are now potentially accessible using integrated microfluidic chips.

**microfluidics, integration, multilayer soft lithography, poly(dimethylsiloxane), single cell analysis**

doi: 10.1360/972010-1955