

连续流动式聚合酶链式反应芯片的设计进展

章春笋^{1, 2} 徐进良^{* 2}

¹(中国科学技术大学热科学和能源工程系, 合肥 230026)

²(中国科学院广州能源研究所微能源系统实验室, 广州 510640)

摘 要 介绍了 PCR 的概念以及微型 PCR 芯片的优点, 着重介绍连续流动式 PCR (continuous-flow PCR) 芯片/微装置的一般原理、串行流动及其设计进展。

关键词 连续流动式聚合酶链式反应芯片, 串行流动, 设计进展, 评述

1 引 言

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)^[1~4] 是一种体外快速扩增 DNA 的技术, 它自纳入冷泉港第 51 次定量生物学讨论会以来, 已经在医学诊断、基因分析、法医鉴定等领域得到广泛的应用, 如今逐渐成为核酸分析和扩增^[4~6]的核心技术之一。传统的管式 PCR 技术样品消耗大、反应时间长, 能量消耗多、占据空间大, 而且手工操作过程复杂。例如, 通过传统的热循环装置来选择性扩增一定长度的 DNA 片段, 整个 PCR 循环过程大约需要 1~2 h。由于 Taq DNA 聚合酶的活性随着时间的延长而逐渐下降, 因此较长的反应过程对 PCR 是很不利的。然而, 随着集成电路和微机械电子系统 (micro-electromechanical system, MEMS) 技术的发展, 制造分析时间短、样品和能量消耗少, 空间体积小且自动化程度高, 并以硅、玻璃或者塑料为基底的便携式 DNA 分析仪已成为可能。自 1993 年 Northrup 等^[7]首次开发一种微型 DNA 扩增仪以来, 越来越多的人开始研究 PCR 微反应池^[8~17], 努力改善温度控制、提高升温或降温速率以及降低能量消耗。反应池内 PCR 固定扩增式逐渐成为 PCR 扩增芯片的一种形式, 可是微小反应池制造困难、价格昂贵, 其尺寸限制了样品的体积, 而且温度控制系统体积较大, 加热/冷却速度相对较慢。随着反应池内 PCR 固定扩增式发展的同时, 连续流动 PCR 扩增式也悄然兴起^[18~30]。本实验主要综述连续流动式 PCR 芯片/微装置的原理、特点及其设计进展, 同时也指出它可能的发展趋势。

2 PCR 芯片/微装置的优点

PCR 是一个控温的酶催化反应, 它在 3 个不同的温度区间进行周期性的重复反应, 包括解链、退火和延伸。解链反应是在大约 95 °C 下将双链 DNA 模板分解成两个随后扩增用的单链 DNA 分子; 退火反应是将温度降低到 50~65 °C 下进行 DNA 引物的退火, 退火温度取决于引物的长度、碱基组成和浓度以及靶基序列的长度; 引物的延伸反应是迅速将温度提高到大约 72 °C 下进行的, 它是 DNA 聚合酶的最适温度, 在 72 °C 时酶催化核苷酸的标准速率可达 35~100 个核苷酸/s。理论上讲, 经过一个循环, DNA 分子的数目是原来的 2 倍, 通过 20~30 次循环可以产生较大数目的扩增 DNA 分子。PCR 扩增过程是一个指数增长过程, 假定扩增前的 DNA 起始模板分子数目为 N_0 , PCR 产物的数目为 N , 反应循环数为 n , 那么在理论条件下可得到: $N = N_0 \cdot 2^n$, 但在实际情况下, 扩增数目可通过下式来推算: $N = N_0 (1 + E)^n$, 这里的 E 指每次反应循环的扩增效率, 通常情况下, $E = 0.8 \sim 0.9$ 。

传统的 PCR 热循环系统具有较大的寄生热容, 升温 and 降温速率较低 (大约为 2~10 K/s), 循环时间较长。通过热循环装置的微型化可以达到减少寄生热容、提高 PCR 反应速度以及减少能量消耗的目的。一般采用先进的薄膜沉积以及微机械技术来将功能性加热、控制热流以及测温元件进行集成化。微型热循环装置的优点有: (1) 加热和冷却元件具有较小的体积和热容, 加热和冷却速度能达到 15~40 K/s; (2) 测量局部温度的加热器和传感器作为电阻器被集成到反应器的底部, 由于底部更接近于液体

2004-01-05 收稿; 2004-05-09 接受

本文系国家自然科学基金资助项目 (No. 10272102)

样品,因而能快速测量样品的温度变化;(3)选择一定的材料和微系统结构以便在 PCR 整个过程中能较好地控制热流和瞬时热稳定性;(4)随着反应容积的减少并达到 μL 甚至 nL 量级,昂贵的、不安全的反应材料消耗量大大减少;同时随着反应容积的减少,反应容器中温度均一性能得到很好地控制,这一点对于 PCR 过程成功与否也是很重要的。

3 连续流动式 PCR 热循环的原理以及串行流动 (serial-flow) 方式

连续流动式 PCR 的主要原理是动态式反应器。样品和反应物通过连续流动经过 3 个不同的恒温带,而且多次通过 3 个不同的温区,从而达到 DNA 片段高温解链、低温退火和中温延伸的热循环扩增的目的。这种原理最初是由 Nakano 等^[31]在 1994 年描述。采用该种热循环装置进行 DNA 扩增的原因主要有^[23]:(1)在 DNA 高温解链时,PCR 样品液体的自由液面必须避免以防止液体蒸发,样品液体先驱动到恰当位置进行热循环反应,然后 PCR 产物又被驱离反应位置,在操纵小样品液体时这种过程有利于装置的密封,从而能避免样品液体的蒸发;(2)动态式反应器具有快速的温度变化的独特性质,而且只有流动液体的温度发生改变,通道壁的温度却维持恒定。1996 年 Baier 等^[32]首先介绍了连续流动式热循环芯片装置,并申请了专利。

动态式反应器最重要的特征之一是可能产生串行系列的样品塞 (sample plug),它们被微小的媒介所隔离来提高芯片装置的样品数目含量 (number capacity),同时与热滞后相关的问题大大减少^[29]。样品塞有较小的纵横比,它不会由于雷诺数不稳定而分离成为碎片^[18]。产生串行样品流动的一种途径是通过空气或其气体来将液柱隔开,但是由于液体和气体具有不同的流动行为,产生稳定流动比较困难,这种途径也是不可取的。如果采用液体媒介来使样品系列间隔,那么界面张力以及界面间的相互作用对流体控制起着重要的作用。另外,液体和通道壁面间的相互作用也必须充分考虑。在样品连续流动过程中,具有湿润表面的样品在其所占据的空间后面留下一样品薄膜,由于下一个样品将会占据这个薄膜空间,这种薄膜能够与其发生了交互污染,而薄膜的厚度却与液体内部的摩擦(力)、表面接触角以及样品流动速度有关^[33]。然而,这种交互污染效应通过微小的表面粗糙度、接触角滞后以及化学亲合性(力)来得到消除或减弱。鉴于这个事实,对于样品的连续流动而言,合理选择通道材料使其对 PCR 混合物的化学成分具有较小的亲合力以及对通道表面进行化学修饰是非常必要的。

4 连续流动式 PCR 芯片 微装置

连续流动式 PCR 芯片 微装置的设计除了要考虑总的设计要求:样品流速要均匀;样品在反应和储存时,不能挥发掉和随意徙动;使用材料要具有 PCR 生物相容性;防止样品流动对采集信号干扰之外,还必须注意以下几个方面:(1)PCR 过程的循环数目;(2)通道横截面的参数变量;(3)通道经过每个温度带的长度;(4)流体的驱动形式;(5)加热器/传感器的几何机构以及布置位置,最后还必须考虑 3 个温度的热绝缘问题。芯片热循环仪如何设计也直接影响其辅助设备,包括芯片衬底、封装、检测元件、电动控制以及流体控制等。目前,连续流动式 PCR 热循环装置的设计形式可以分为基于单直通毛细管式、芯片上矩形通道式以及 3 个温度带呈圆形(或圆柱)布置式等 3 种形式。

4.1 基于(单)直通毛细管式连续流动 PCR 微热循环装置

这种连续流动式 PCR 微装置一般是由毛细管、加热器以及可视化窗口等组成(图 1)。Chiou 等^[18]开发一种聚四氟乙烯 (PTFE) 毛细管式连续流动 PCR 装置。该装置通过毛细管两端贮油池的压力差来驱动样品塞,并采用矿物油的折射率 ($n = 1.48$) 比 PTFE 的折射率 ($n = 1.376$) 高的物理性质实现 He-Ne 激光束导入毛细管中的矿物油里。当激光束到达弯曲的油/样品塞界面时发生散射,和光电二极管一起实现了光检测系统自动追踪样品塞的位置,从而实现了微机自动控制加热过程。该装置由于采用了微机控制的



图 1 基于单直通式可视化 PCR 微装置示意图

Fig 1 Schematic diagram of continuous-flow polymerase chain reaction (PCR) based on the capillary tube

间歇往复式运动, 循环数目以及解链、退火和延伸时间比率都是不固定的。Belgrader等^[19]设计了一种毛细管式连续流动 PCR 装置, 毛细管中的样品流体通过注射泵精密控制, 反应物以及样品流体通过气隙和水隔开。这一方面可以减少交互污染和稀释, 另一方面可以消除流体损失以维持等于或大于 60°C 的温度, 同时和反应室两端的阀门配合能有效地消除热循环过程中样品流体区的运动。

4.2 芯片上矩形通道连续流动式 PCR 微热循环装置

这种连续流动式 PCR 芯片是通过 MEMS 技术在基底材料 (如玻璃、硅以及聚合物等) 上刻蚀出微流道通道作为 PCR 反应池, 样品流体连续地通过解链、退火以及延伸 3 个不同的温度带 (图 2)。它的结构设计能很好地控制 DNA 解链、退火、延伸时间以及扩增的速度, 而且反应混合物在 3 个温度带滞留时间仅仅表现为通道长度、横截面以及反应通道中样品流速的函数。如果在反应通道旁边沿顺流方向添加反应物, 这样的通用系统有可能沿着液体流动轨道实现几个不同的反应^[20]。这种芯片自 1998 年 Kopp 等^[21]首次提出应用连续流动式 PCR 芯片来进行 DNA 扩增以来经历了不同程度的改进, 它们各自具有不同的特点。

Obeid 等^[22]制造一种具有不同循环数目的连续流动式 PCR 和 RT-PCR 微芯片。该芯片的反转录 (reverse transcription, RT) 部分的通道宽 194 μm (顶部)、深 55 μm , 容积为 5 μL ; PCR 部分的通道宽 120 μm 、深 55 μm , 容积为 15.3 μL (40 循环数目)。PCR 通道具有 20、25、30、35 和 40 五个不同的循环数目, DNA 解链、引物退火以及酶促延伸所需的时间比为 4:4:9。通道中的样品通过 PC 控制的精密注射泵驱动, 注射泵的体积为 25 μL , 通过 2 μm 内嵌式微过滤器和芯片连接。芯片放在 4 块尺寸为 80 mm \times 20 mm \times 10 mm 铜板上, 把加热元件和温度传感器布置在铜块中实现温度的控制, 而铜块的温度则通过 4 个数字式 PID 控制器来控制。

Schneega 等^[23]在硅芯片上开发一种连续流动式 PCR 热循环仪。该种芯片热循环仪由刻蚀在玻璃片上的反应通道以及硅盖片组成, 盖片上沉积 0.2 μm 厚度的铂薄膜来制备作为电阻加热器和传感器的热传感器以实现精确的温度控制。玻璃通道呈重复的曲折状, 深 100 μm 、宽 250 μm 、长 1512 mm, 体积为 33 μL , 共有 25 个循环。通道中的流体通过注射泵驱动, 经过 3 个温度带, 其中引物延伸带布置在芯片中央, 每个温度带通过“热沟”来实现热绝缘。流体通道的弯曲部分呈圆形状, 这种设计不仅有利于产生连续流动式 PCR, 而且由于对扰动 (例如气泡) 具有低敏感性而能够在两相系统中产生均一的流动行为。通过把微量样品周期性的注射到连续流动的载流体中去来产生串行流动方式。

Sun 等^[24]开发一种以石英玻璃为基底, 以铟锡氧化物 (indium-tin-oxide, ITO) 薄膜为加热器的连续流动式 PCR 芯片。该芯片由于采用透明材料作为芯片基底和加热器, 实现了实时观察微流体通道中的荧光信号, 通过测量 1-pyrenesulfonic acid sodium salt (PS-Na) 水溶液的荧光光谱来确定微流体通道中的温度分布。温度传感器 (Pt100 电阻器) 安装在直流电驱动的 ITO 薄膜加热器表面上, ITO 的表面温度则通过固态继电器 (solid-state relay, SSR) 和 PID 数字温度控制仪而得到控制。微通道深 40 μm 、宽 120 μm , 其中的样品流体通过精密注射泵驱动。该芯片设计有两个明显的特点: (1) 通过比较微通道中的温度 T_c 和 ITO 薄膜表面的温度 T_s 来校准数字温度控制仪的温度设定, 以便正确选择 dsDNA 解链温度和引物退火温度; (2) 通过分析微通道中的温度分布与流体流速的关系来选择 PCR 过程中的样品流速, 从而来选择每一个循环所需要的时间。

Zhang^[25]和殷学锋^[26, 27]等也开展了芯片上矩形通道连续流动式微 PCR 芯片的研究。Zhang 等^[25]在硅片上刻蚀出深 40 μm 、宽 60 μm 、长 2 m 的矩形通道, 并将它与玻璃芯片阳极键合以便形成一个密闭的 PCR 芯片反应通道, 通过有限元分析法 (finite element analysis, FEA) 对芯片表面上的温度均一性和温度梯度进行分析, 所开发出的 PCR 芯片系统具有一个明显的特点: 采用蠕动泵反复驱动冷却水从退火温度带的铜孔流到延伸温度带的铜孔, 实现了单一加热的、连续流动式 PCR 所需的 3 个温度带; 殷学锋等^[26, 27]在玻璃片上通过光刻蚀法加工成深 20 μm 、宽 120 μm 、长约 3 m 的矩形通道, 共 24 个扩增

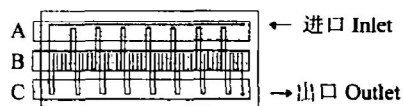


图 2 芯片上矩形通道连续流动式 PCR 芯片示意图

Fig 2 Schematic diagram of continuous-flow PCR based on the on-chip rectangular channel

循环,其中解链、退火和延伸区的通道长度之比为 4:4:9,他们优化了 PCR 芯片的厚度、隔热材料以及流速等影响 PCR 扩增的因素,在 4.9 min 内成功扩增了长为 500 bp 的 λ -DNA 模板片段。

4.3 3个温度带呈圆形(或圆柱)布置的连续流动式 PCR 微热循环装置

芯片上矩形通道连续流动式 PCR 微装置的温度带布置形式为:高温解链→中温延伸→低温延伸,它们具有平滑的温度梯度优点,但已解链的单链 DNA 样品经过延伸温度带时可能会与模板链或它们的互补链结合形成双链而降低 PCR 扩增效率。如果它们按照高温解链→低温退火→中温延伸布置时,在退火反应阶段将会需要强制性冷却而不是加热,这样会导致系统结构复杂^[28],如果 3 个温度带呈圆形(或圆柱)布置则能成功地解决该问题。

Liu 等^[28]开发一种旋转式 PCR 芯片。流体通道是一个具有进、出口的中心圆环(central loop),半径 2.5 mm、高 8.5 mm。环通道的宽是非对称的:左半圆通道宽 120 μm ,而右半圆通道宽 70 μm 。通道中流体通过集成旋转泵驱动循环。该种旋转式 PCR 芯片具有如下特点:(1)所需样品体积小,仅有 12 nL;(2)具有多功能性,通过控制呈顺时针方向布置的 3 个加热器(由钨薄膜组成)以及旋转泵,它既可以两步式 PCR 又可以三步式 PCR;既可以作连续流动扩增式 PCR 又可以作反应池内固定扩增式 PCR;(3)通道环左右两半圆的宽具有非对称性,样品流体在它们中的速度是不同的,因此样品流体在每个温度带的滞留时间既可以通过流体通道的宽度来调节,又可以通过薄膜加热器的长度来调节;(4)将热致变色液晶装载到流体通道中,利用颜色和温度之间的关系来确定高温解链的温度特性;低温退火/中温延伸的温度特性则通过电热调节器来校准。

Curcio 等^[29]设计一种分段动态式(segmented-flow)PCR 装置。该种装置有 3 个水浴池,内外径为 200/400 μm 、长度为 15 m 的 PTFE 圆管通道按照 PCR 循环数目的要求盘绕穿过 3 个不同温度的恒温水浴,同时根据 PCR 过程中解链、退火以及延伸所需时间的要求来确定通道在每个水浴池中的长度。在每一个循环中,解链、退火、延伸通道分别长 11、11 和 22 cm(其中在第一循环中解链通道长为 33 cm),共 30 个循环。每个水浴池中的温度通过水中盘管以及与 PID 控制器连接的 Pt-100 传感器来控制。该系统除设计简单之外,还具有一个明显的特点:PCR 产物的生产量不是取决于流体通道的长度,而是取决于样品塞的长度、样品之间的距离以及微流体经过通道的速度。

Park 等^[30]报道了一种圆柱形连续流动式紧凑 PCR 热循环装置,它主要由圆柱形的热循环组件和卷绕其上面的聚酰亚胺涂层过的熔融石英毛细管组成。热循环组件中有一个等边的似三角形截面的热绝缘塑料芯,3 个加热铜块分别布置在塑料芯的三边上,两个相邻的铜块之间有一个大约 5 mm 的“气沟”起着热绝缘的作用,这有助于形成温度均一的铜表面。圆柱体表面形成了宽 250 μm 、深 250 μm 的螺旋状沟槽,一根内外径分别为 100 和 240 μm 、长度为 3.5 m 的毛细管布置在其中形成了螺旋线间距为 1.5 mm 的 33 个螺旋(即 33 个循环),毛细管通道中的流体通过注射泵驱动。在每个铜块中安装直径 3.1 mm、长 32 mm 的加热元件和直径 1 mm、长 27 mm 的温度传感器以便实现精确的温度控制,圆柱形表面的温度分布通过 temperature sticker 来测量。值得指出的是:由于 3 块相似铜块对称地布置在塑料芯上,样品无论以什么适当速度流过通道,每一循环中解链、退火和延伸所需时间是均等的。当样品流速较大时,三者所需时间较短;反之则较长。

5 结论与展望

传统的 PCR 热循环装置具有较大的热容,反应速度慢。如果装置的热容减少,整个反应时间将大大缩短。基于这种思想,各种 PCR 微装置的设计尽管结构各不相同,但都有一个共同的特点:具有较小的热容。减少热容的一般途径是系统尺寸按比例缩小而微型化,于是出现微小反应池内 PCR 固定扩增式即时域式(time domain);另一种提高反应速度的途径是让样品连续通过 3 个不同温度带进行 PCR,于是出现连续流动 PCR 扩增式即空域式(space domain)^[28]。一般情况下,评价连续流动扩增式 PCR 微装置主要从以下 4 个方面:PCR 反应时间、能量消耗、样品体积以及与其他生物操作的集成能力。各种不同设计的 PCR 微装置这 4 个方面一般是不同的,它们具有不同的特点。有些研究组为了最大限度减少样品携带和/或交互式污染^[29,30]、改善微流体通道表面化学性质、液液两相流系统、串行流动以及样品

流体的速度等^[23]、改善 PCR 热循环的可重复性、敏感性、效率以及样品携带^[19]而对 PCR 微装置系统进行较为全面的优化。

从连续流动式 PCR 微装置的发展来看,基本上是样品流过单根微通道进行 PCR,这远不能满足平行分析的要求,而且样品大多数是通过注射泵驱动的^[19, 21~24, 26, 27, 30],集成化程度较低。表 1 比较了 3 种不同形式的连续流动式 PCR 芯片微装置的性能,从表中可以看出:芯片上矩形通道连续流动式 PCR 芯片由于具有容易与样品制备或电泳芯片集成等优点很有可能成为连续流动式 PCR 芯片的主要研究和形式。随着微机械加工技术的发展,能在价廉的弹性材料聚二甲基硅氧烷 (PDMS)^[28, 34]以及聚碳酸酯 (PC)^[35]上刻蚀出 PCR 微流体反应通道。因此,有可能制造出价廉的、集样品制备、反应、分离、检测,甚至数据处理于一体的连续流动式 PCR 微芯片。

表 1 3 种不同形式的连续流动式 PCR 芯片微装置性能比较

Table 1 Performance comparison of three types of continuous-flow PCR chips/microdevices

	单直毛细管式 Single straight capillary	芯片上矩形通道式 On-chip rectangular microchannel	温度带呈圆环(或圆柱)布置式 Circular arrangement of three temperature zones
基底材料 Substrate	聚四氟乙烯、聚全氟乙烯丙烯等 PTFE, FEP etc	硅、玻璃等 Silicon, glass etc	PDMS, 聚四氟乙烯、熔融硅等 PDMS, PTFE, fused-silica etc
制作方法 Fabrication	传统制作 Conventional fabrication	MEMS 技术 MEMS technique	MEMS 技术或传统制作 MEMS technique or conventional fabrication
循环数目 Circulating numbers	不固定 Fixable	通常固定 Usually fixable	固定或不固定 Fixable or unfixable
样品携带污染 Carryover contamination of sample	较小 Smaller	较小 Smaller	较小 Smaller
所占空间体积 Required volume	较大 Larger	较小 Smaller	较大或较小 Larger or smaller
PCR 过程中非特异性产物生成的可能性 Probability of non-specific PCR product formation		易产生二聚物 Ease to form dimer	较难产生二聚物 Difficult to form dimer
与 PCR 产物实时检测的集成难度 Integration difficulty with real-time detection of PCR products	较容易 Convenient	较容易 Convenient	难度适中 Moderate
与样品制备、电泳分离等微芯片集成能力 Integration capacity with chips for sample preparation, CE separation	较弱 Weaker	较强 Stronger	较弱 Weaker

PTFE: polytetrafluoroethylene; PDMS: polydimethylsiloxane; MEMS: microelectromechanical system; CE: capillary electrophoresis

References

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, **1986** 51: 263~273
- Taylor G R. In *PCR: A Practical Approach*; McPherson M J, Quicke P, Taylor G R, Eds; Oxford University Press Oxford, England, **1991**
- Eeles R A, Stamp S A C. *Polymerase Chain Reaction (PCR): The Technique and its Applications*. R G Landes Co., Austin, **1993**
- Mullis K B, Ferre F, Glibbs R A. Translated by Chen Shouyi (陈受宜), Zhu Lihuang (朱立煌). *The Polymerase Chain Reaction (聚合酶链式反应)*. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), **1997**
- Taylor G R, Robinson P. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1998**, 9: 35~42
- Whitcombe D, Newton C R, Little S. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1998**, 9: 602~608
- Northrup M A, Ching M T, White R M, Watson R T. *Proceeding of the 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators*. Yokohama, Japan, **1993**, 924~926
- Wilding P, Shoffner M A, Kricka L J. *Clin. Chem.*, **1994**, 40: 1815~1818
- Shoffner M A, Cheng J H, Vichia G E, Kricka L J, Wilding P. *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24(2): 375~379
- Talyer T B, Winn-Deen E S, Picozza E, Woudenberg T M, Albin M. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25(15): 3164~3168
- Northrup M A, Bennett B, Hadley D, Landre P, Lehw S, Richards J, Stratton P. *Anal. Chem.*, **1998**, 70(5): 918~922

- 12 Oda R P, Strausbauch M A, Huhmer A F R, Borson N, Jurrens S R, Craighead J, Wettstein P J, Eckloff B, Kline B, Landers J P. *Anal. Chem.*, **1998**, 70(20): 4361~4368
- 13 Belgrade P, Bennett W, Hadley D, Richard J, Stratton P, Mariella Jr R M, Milanovich F. *Science*, **1999**, 284: 449~450
- 14 Zhao Z, Chui D F, Yu Z Y, Wang L. *1st Annual International IEEE EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology*. Palais des Congrès Lyon, France, **2000**, 25~28
- 15 Lee T M H, Hsing I M, Lao A I K, Carlos M C. *Anal. Chem.*, **2000**, 72(17): 4242~4247
- 16 Belgrader P, Young S, Yuan B, Primeau M, Christell L A, Pourahmadi F, Northrup M A. *Anal. Chem.*, **2001**, 73(2): 286~289
- 17 Y. D. S. I. V. S. I. V. C. H. I. S. S. W. Q. K. W. C. I. I. C. I. M. I. M. **2003**, 13
- 27 Yin Xuefeng(殷学锋), Shen Hong(沈宏), Fang Zhaolun(方肇伦). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2003**, 31(1): 116~119
- 28 Liu J, Enzelberger M, Quake S. *Electrophoresis*, **2002**, 23: 1531~1536
- 29 Curcio M, Roeraade J. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(1): 1~7
- 30 Park N, Kim S, Hahn J H. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(21): 6029~6033
- 31 Nakano H, Matsuda K, Yohda M, Naganune T, Endo I, Yanane T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1994**, 58(2): 349~352
- 32 Baier V, Dillner U, Kehler J M, Poser S, Schimkat D. *Patent* WO 96/10456, **1996**
- 33 Litbom E, Curcio M, Emmer A, Roeraade J. *Micro Total Analysis Systems 2000*. Enschede, The Netherlands, **2000**, 447~454
- 34 Fukuba T, Yamamoto T, Naganuma T, Fujii T. *Chemical Engineering Journal*, **2004**, 101: 151~156
- 35 Hashimoto M, Chen P-C, Mitchell M W, Nikitopoulos D E, Soper S A, Murphy M C. *Lab on a Chip*, **2004**, 4: 638~645

The Design Development of Continuous-flow Polymerase Chain Reaction Chip

Zhang Chunsun^{1,2}, Xu Jinliang^{*2}

¹(Department of Thermal Science and Energy Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

²(Micro Energy System Laboratory, Guangzhou Institute of Energy Conversion,
Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640)

Abstract The general concept of polymerase chain reaction (PCR) and the merits of PCR microchip/device are introduced. The main attention is turned to the general principle, serial-flow and design development of continuous-flow microchip/device PCR.

Keywords Continuous-flow polymerase chain reaction chip, serial flow, design development, review

(Received 5 January 2004; accepted 9 May 2004)