

 Springer

Microchip Diagnostics
Methods and Protocols

微流控芯片诊断 ——方法与方案

【法】Valérie Taly

【法】Jean-Louis Viovy

【法】Stéphanie Descroix 主编

王晶 译



兰州大学出版社
LANZHOU UNIVERSITY PRESS



王晶，1982年生，博士，甘肃中医药大学临床医学院副教授，临床检验诊断学硕士研究生导师，国家司法物证鉴定人。2004年毕业于兰州大学生物科学专业，2007年获得兰州大学发育生物学专业硕士学位，2007—2012年在清华大学医学系统生物学实验室（暨生物芯片北京国家工程研究中心）学习、2012年取得清华大学生物学专业博士学位，并获得“清华大学毕业生启航奖——银奖”。2017年至2020年先后赴摩尔多瓦“尼古拉·泰斯提米仓努”国立医科大学、悉尼大学医学院、美国辛辛那提儿童医院医学中心进行学术交流及公派访学。主要研究方向为利用生物芯片进行疾病诊断和机制研究。主持或参与国家自然科学基金、省自然科学基金，省高等学校基本科研项目，省重点实验室开放基金等科研项目20项，共发表论文40多篇，其中一篇论文入选“2013年领跑5000—中国精品科技期刊顶尖论文”，获国家实用新型专利4项，参与及主编论著3部。

Microchip Diagnostics Methods and Protocols

微流控芯片诊断 ——方法与方案

【法】Valérie Taly

【法】Jean-Louis Viovy

【法】Stéphanie Descroix 主编

王晶 译



兰州大学出版社
LANZHOU UNIVERSITY PRESS

《微流控芯片诊断——方法与方案》原著编委

- | | | | |
|-------|-------------------------|-------|------------------------|
| [日] | Yoshinobu Baba | [瑞士] | Robert D. Lovchik |
| [德] | Holger Becker | [美] | Shusheng Lu |
| [法] | Francois-Clément Bidard | [法] | Laurent Malaquin |
| [法] | Jérôme Champ | [法] | Guillaume Mottet |
| [新加坡] | Chia-Pin Chang | [日] | Daisuke Onoshima |
| [法] | Hamizah A. Cognart | [英] | Nicole Pamme |
| [法] | Patricia de Cremoux | [法] | Deniz Pekin |
| [比利时] | Deborah Decrop | [法] | Karla Perez-Toralla |
| [瑞士] | Emmanuel Delamarche | [法] | Jean-Yves Pierga |
| [法] | Stéphanie Descroix | [瑞典] | Harisha Ramachandraiah |
| [法] | Irena Draskovic | [比利时] | Elena Pérez Ruiz |
| [瑞典] | Asim Faridi | [瑞典] | Aman Russom |
| [法] | Davide Ferraro | [法] | M. Serra |
| [荷兰] | Séverine Le Gac | [美] | Feng Shen |
| [德] | Claudia Görtner | [法] | Valerie Taly |
| [法] | Ezgi Tulukcuoglu-Guneri | [英] | Mark D. Tam |
| [日] | Noritada Kaji | [瑞士] | Yuksel Temiz |
| [日] | Toshihiro Kasama | [法] | Bruno Teste |
| [美] | Robert T. Kennedy | [日] | Manabu Tokeshi |
| [法] | Jerzy Klijanieko | [比利时] | Lisa Tripodi |
| [比利时] | Tadej Kokalj | [法] | Jean-Louis Viovy |
| [比利时] | Phalguni Tewari Kumar | [瑞典] | Sergey Zelenin |
| [比利时] | Jeroen Lammertyn | | |

译者序

微流控是指在微尺度下的流体控制，其研究对象是使用微米级通道操控纳升以下微量液体系统。芯片是实现微流体控制的主要平台，所以微流控芯片是微流控的主要研究内容。微流控芯片技术的特点主要体现在两个方面：一是微尺度下流体的一系列特殊效应，包括层流效应、表面张力及毛细效应、快速热传导和扩散效应等，这些效应有利于精确控制流体和实现快速反应；二是微加工工艺的加工尺寸小，且微结构密度高，这便于实现各种操作单元的灵活组合与规模集成。因此，样品前处理、分离与分析、检测等流程可以实现在同一芯片上的集成化和并行化，从而达到微型化、自动化、低消耗和高效率的目的。

微流控研究始于20世纪90年代，至今已经有近三十年的发展历史，期间经历了基础理论奠定、单元操作技术发展、小规模集成和大规模集成几个历史发展阶段。现今，微流控技术已经较为成熟，在诊断领域得到了广泛认可并开始大范围应用，其产业化趋势也是愈发显著。2003年《福布斯》杂志把这项技术评为“影响人类未来15件最重要发明之一”；2004年，美国《Business 2.0》杂志封面文章将微流控芯片列为“改变世界”的七种技术之一；2006年《Nature》杂志出版了一期微流控专辑，题名为“本世纪的技术”。

2019年12月起由新型冠状病毒（SARS-CoV-2）导致的新型冠状病毒肺炎对全球公共卫生造成了重大和急迫威胁。在抗击新型冠状病毒肺炎疫情的艰苦战斗中，对病毒携带者与感染者的检测与确诊，是疫情防控的重点和难点。基于微流控技术开发的各种检测系统在此次抗疫战斗中发挥了重要作用。微流控检测芯片在疾病检测、防控中大展身手的同时，也给临床诊断从业人员带来了挑战。新的研发技术成果层出不穷，相关医疗人员需要根据临床需要，紧跟技术的更新，才能给患者提供更精准、更有效的

诊疗服务。初涉微流控领域的研究人员，也需要透过熟悉的语言文字，快速了解其中的核心技术及实验方案。译者从博士开始从事生物芯片研究，同时也是一名从事多年临床检验诊断教学和实践的教师及科研工作者，在阅读大量文献和书籍的过程中，译者发现了本书，它从微流控技术的发展历程到新技术成果，从微流控技术的商业价值到实验方案都做了详细介绍，并配有丰富、详细的实验操作及芯片彩图。这正是本书吸引译者，决心将其翻译并推荐给更多国内读者的理由。这本书除了可以作为微流控研究相关人员的实用参考书，对临床检验人员以及从事生命科学相关领域的教学、科研人员也是非常有价值的教科书。

在此，特别感谢甘肃中医药大学临床医学院陈彻院长对本译著工作的大力支持，感谢刘佳佳对本译著完成所提供的帮助；也向兰州大学出版社梁建萍编辑在整个出版过程中给与的指导和帮助表示感谢。此外，本书最终得以完成，丈夫立军的鼓励，对爱女佳茗的激励之心都是译者的动力。

理无专在，学无止境。本译著的错误和不当之处敬请各位读者批评指正。

王 晶

2020年4月

于美国辛辛那提

前言

通过实现微型化、并行化和集成化水平的突破性提高，微流控技术正日益发展成为一种新型的诊断工具。微流控技术的最新进展有可能彻底改变诊断方法，实现对生物标志物进行高度灵敏的检测和精细表征，这是研究人员一直在致力于开发的诊断策略和工具。然而，这些研究成果只有其中一小部分真正满足需求，可否应用于诊断需要明确的验证。本书概述了以诊断为目的的微流控技术最新进展，特别侧重于介绍与改善人类健康有关的设备和方法。本书介绍了基于细胞分子标志物的微流控技术是如何满足临床诊断的需求。目前，微流控技术已达到非常成熟的水平，因此，本书第一部分专门介绍基于微流控诊断系统的市场发展。第二部分集中介绍一些研究成果，突出有关蛋白检测微流控技术的共同特性。第三部分描述基于单链或双链核酸分析微流控方法。最后一部分汇集了微流控技术应用最新领域的研究成果：细胞分析和富集。

瓦莱丽·塔利

让-路易·维维

斯蒂芬妮·德斯科罗

于法国巴黎

目 录

第一部分 概 述

第一章 微流控诊断系统：市场、挑战与成果·····003

第二部分 蛋白生物检测芯片

第二章 微型免疫检测中毛细管驱动的微流控芯片：
用“芯片剥离”法高效制造并密封芯片·····023

第三章 微型免疫检测中毛细管驱动的微流控芯片：
使用微接触印刷和干膜抗蚀剂对捕获抗体进行构图·····035

第四章 多孔水凝胶微柱固定抗体微球微流控免疫分析装置的研制与评价···046

第五章 免疫电泳法监测激素分泌·····053

第六章 基于芯片上磁性颗粒的免疫分析：使用多层流进行临床诊断·····063

第七章 用于在飞升大小反应孔中进行单分子检测
的封装有磁性颗粒的数字微流控芯片·····077

第三部分 用于核酸分析的微芯片

第八章 用于单分子诊断的微流体DNA拉伸装置·····095

第九章 用于癌症分型的液滴微流控和磁性粒子平台·····102

第十章 数字核酸扩增芯片设备·····110

第十一章 利用被动液滴融合的路复用检测KRAS的突变·····120

第十二章 基于液滴的微流体数字化PCR对KRAS突变的检测	129
-------------------------------------	-----

第四部分 用于细胞富集和分析的微流控芯片

第十三章 利用微流控芯片负性富集循环肿瘤细胞	151
第十四章 基于微流体从全血中分离细菌并诊断血液感染	159
第十五章 用于诊断应用程序的并行单细胞分析微流控设备	171
第十六章 芯片中的荧光原位杂交: 癌细胞分型的微流控平台	193

▶ **第一部分**
概 述

第一章

微流控诊断系统：市场、挑战与成果

霍尔格·贝克尔 克劳迪娅·加特纳

摘要

微流控芯片在诊断方面已经成为一种重要工具。本章着重介绍了微流控芯片的发展在诊断方面技术层面的要求，例如，材料与方法的整合。此外，我们介绍了诊断市场现有的数据，如微流控芯片的商业化发展以及市场上的微流控芯片。

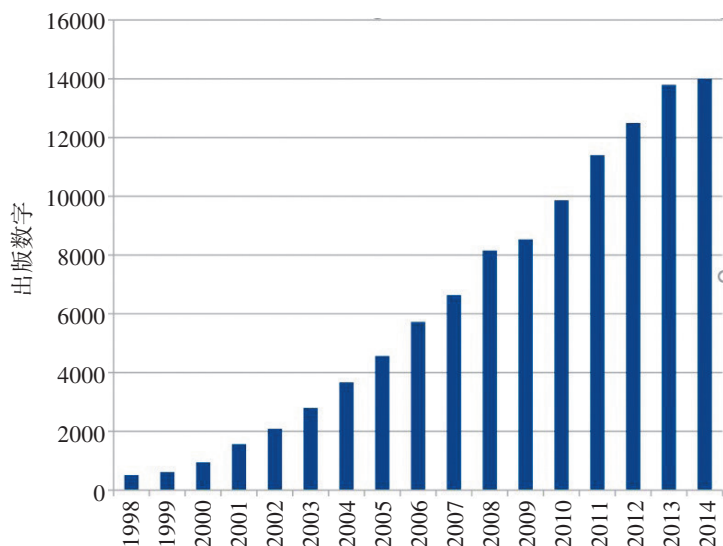
关键词

微流控芯片；商业化；产品发展；诊断试剂盒

1 引言

自从安德烈亚斯·曼茨及其同事提出了微型全化学分析系统 (μ -TAS) 观点的构想，微流控芯片研究在过去的 25 年中有了巨大的进展^[1]。微流控芯片的科学价值明显增大，在化学及生命等不同的科学领域中有关微流控芯片的出版物在不断增加 (图 1)^[2]。由于多种原因，将这些研究结果转化成商业产品，即诊断试剂，已经变成一项具有挑战性的任务：

1. 微流控本身是一种“有用的技术”。任何科学工作都是以技术为基础的，但必须将它应用于具体的产品，这是一个耗时的步骤，并且将科学成果转化成实际的应用方案，其中有很多困难，尤其是许多基本的微流控芯片方案不能广泛适用（混合液滴的生成分离，仅是常见的几个例子）^[3]。
2. 对许多实用产品的发展，每个微流控芯片启动系统不得不经历从无到有的过程^[4-8]。几乎没有正式的标准，或仅仅有少量非正式的标准，可以发挥与微电子元件库相似的功能，从而加快建设产品发展的模块或平台^[9, 10]（在 2.2.3 节亦可看到）；然而，这些方法与其他工业领域的技术水平相比，还不成熟。



在“谷歌学术”中搜索关键词“微流控芯片”，进行整理，数据截至2015年12月10日。

图1 微流控芯片出版物的数量变化

3. 基本工具的缺失显著阻碍了微流控芯片在生命科学或诊断方面的应用。由于缺少商用现货组件，一个简单的实验或仅仅是一个产品开发的预实验，都将受到影响，后续的开发也不得不搁浅。这涉及微流控器件定制、生产，以及后续功能验证的设计。由于这样一个初始设计在很大程度上不可能达到所有要求的全部规格，因此，微流控芯片的产品开发将显著受阻。

尽管将微流控芯片技术从科学工作转移到商业产品生产中有困难，但微流控芯片仍有强大、不可抗拒的优势，值得注意的是，目前，已有大量的微流控芯片产品，已经进入市场。在这种情况下，本章重点介绍了将样品通过微结构工程化基质（也称为“药筒”）运输的器械。在侧流装置中，样品运送的实现是通过在一张纸（像硝酸纤维素膜）上的毛细管力^[11]，例如，普通妊娠检查或血糖试纸条，但这不是本章介绍的内容^[12]。现有的市场调研数据可以反映出基于微流控芯片诊断设备的重要性，参见图2^[13]。

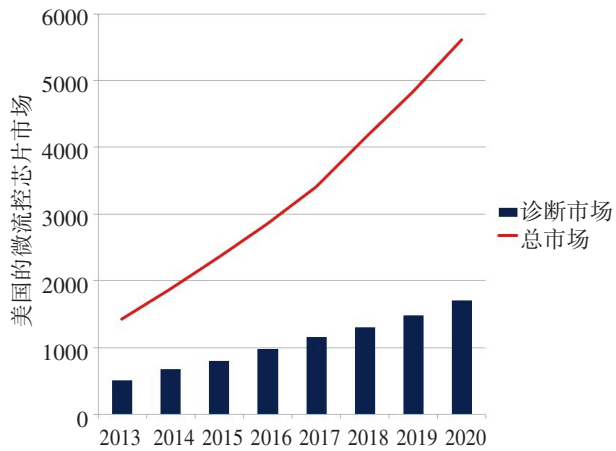


图2 微流控市场规模和细分（引自参考文献 [13]）

从市场分析数据中也可以明显看出，微流控诊断产品占据了诊断市场的核心地位。护理或临床诊断市场方面有三分之一的产品是微流控诊断产品。两个成功的市场研究数据在图3中做了展示^[13, 14]。新兴高科技产品市场的乐观预测较易实现，而工业实践及心理等因素方面仍缺乏好的预测工具^[15]。然而，显而易见，商业化微流控芯片已经成为诊断市场的关键驱动者之一^[16-19]。为了理解微流控芯片在诊断性产品商业化进程中的现状，很有必要去分析其发展背后的因素。在最近几年，许多关键性因素，预示着微流控芯片技术的成熟已经进入了关键阶段，如以下描述：

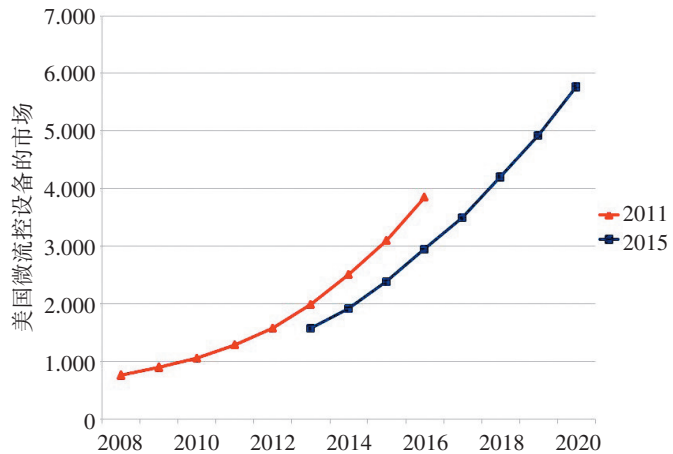
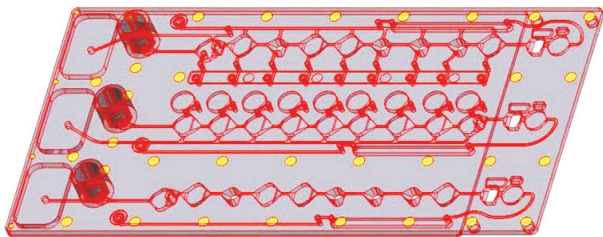


图3 后续市场研究的市場数据比较（来自参考文献 [13] 和 [14]）

1. 与来自早期商业化微流控芯片（像开立普实验室芯片）相比^[20]，设备的复杂性和应用性已大幅提高。开立普芯片是最

早将 μ -TAS概念和复杂工作流程整合在一起的芯片，这对微流控芯片的工业化产生了巨大的影响^[21]。在学术方面，许多活动更多关注采用特定芯片的方案，而典型的实验所采用的微流控芯片其实更像是一个由泵、阀门、流量管理等组成的实验室芯片。从工业的角度看，由于是核酸检测前的准备，商业化产品必须具备提供进样和输出结果的能力，这样才能与目前的诊断产品竞争——这组成了诊断流程中不可缺少的部分。这些方案在芯片上进行，很多年来这部分一直是被忽视的领域，直到近几年才受到关注^[22-26]。在以上检测的基础上最后产生了一个数据库，这个过程是实验室芯片商业化的必要环节。第二章将突出介绍微流控系统开发的关键因素。

2. 近几年来，产生了上述提到的数据库或大量关于制造方法和材料的专业知识，在微流控芯片生产早期，大多数的设备用了与微电子学产生相关的方法（光刻、刻蚀硅或基于玻璃形成的结构），这是由于成本原因和部件的局限性，要进行商业化就必须克服这些限制。目前的应用增加了热塑性聚合物的使用，产生了高性能聚合物，像环烯烃聚合物（COC、COP、产品名称“Topas”或“Zeonor”）和相关制造技术（像热压印和注射造模），为的是降低成本批量生产^[27-29]。除了考虑制造成本，商品尺寸大小对大范围应用也很重要。尽管光刻技术为从几微米到几十微米范围，但是光刻技术对产生每个光刻步骤的高度有限制，这个高度又限制了下一步。然而，现实生活中的诊断过程常常需要较大的样品或试剂体积，因此，生产制作技术很重要。在较大结构的邻近位置（大小以毫米计）创建一些小的结构，像坡道和任意壁角的自由形态结构应该是可能的。图4就



结构元素小于 $100\ \mu\text{m}$ ，由 $2\ \text{mm}$ 深度的控制室和射流连接器及高度超过 $5\ \text{mm}$ 的流体连接器组成。

图4 一种具有较大动态范围的微流控装置

是一个这种设置的例子，修饰“设备”的几何形态很有特点。只有微电子学和高容量聚合物制备技术进一步提高（例如，注射造模），微流控芯片才能够进入主流临床诊断行业。

2 产品发展面临的技术挑战

2.1 挑战的复杂性

一个完整的集成盒必须包含诊断的所有方案步骤。但这是微流控诊断产品发展面临的巨大挑战。以分子诊断为例，标准的操作步骤是这样的：

- 样品提取和预处理，如过滤、同质化或测量。
- 样品的准备，如溶解及核酸提取。
- 核酸的扩增，如通过传统的聚合酶链式反应（PCR）、等温扩增或其他方法。
- 分离，例如通过电泳、亲和力和捕获、磁力离心。
- 目标物的检测和应用，如通过光学（荧光、比色、光谱学）或电化学检测方法。
- 废物处理和数据存储。

免疫学方法与该步骤相似，一般没有扩增步骤，但额外增加了洗脱步骤。

提到的所有传统方法，包括移液及加样等多个处理步骤，按一定顺序和规范进行操作，如果要将这些步骤转运至微流控载体上，需要一些特定的方法。解决这样一个复杂问题的常规方法是将其拆解成单个更小的问题。解决单个问题，不一定能解决系统问题，例如，在微电子中应用得好，而在微流控系统中不一定可用，主要原因是在微流控盒中不同元素的相互作用^[11, 21, 30]，其中每个功能元件影响着其他元件的运行。尽管近年来的研究进展在整个系统模拟中受限，但是在微流控研究系统中可以建模。虽能模拟单个元素，像混合器或毛细管截止阀^[31, 32]，或者像高精度传热现象^[33]，但目前的工具在系统建模中也有局限性^[34]。考虑到这些限制，需要发展这种集成微流控设备的方案^[35, 36]。事实证明，采用双管齐下的方法是明智的。另一方面，在系统水平上，整体自上而下的方法对确保所有的微流控盒和相应仪器间的功能及界面（射流、技术、光学等）正常工作是必需的。流程图中的所有步骤在设备上的运行可以被转换成单个功能元件的运行。第二种方法是发展单个组件 [例如，脱氧核糖核酸（DNA）提取室、

裂解缓冲液的混合结构等] (通过模拟和随后的成型), 其功能在整合之前被证实。将理论 (或建模) 方法与来自组件原型的实验数据相组合是最佳的方案。这些功能在不同组件 (例如, 图5) 中被证实, 再逐步集成到一个单一的设备中, 最后可以整体运行。诊断一个复杂的集成微流控电路的故障是很困难的, 而上文讲到的这种阶梯式方法可以简化设备运行过程, 便于观察到过程中存在的可能问题, 并进行纠正。

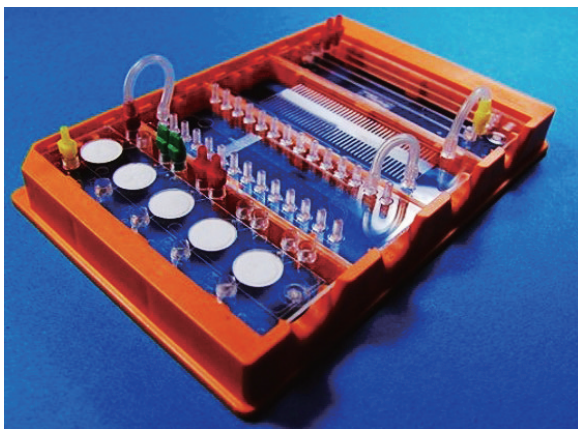


图5 用于单元操作 (例如过滤、分离、扩增和孵育) 的微流控模块示例

2.2 具体的技术 解决方案和 发展趋势

应用于诊断的微流控设备, 除了材料选择上有较多根本性问题^[37, 38], 一系列特殊技术挑战也值得注意。这些挑战也表明, 技术解决方案正在朝那个方向发展。这些技术解决方案反过来指导了应用, 引导了发展趋势及所谓的用户诱导趋势, 即用户和性能期望。

2.2.1 试剂储存

在大多数微流控盒中, 用于诊断的部分或全部试剂将必须位于储存板上^[39]。这样做的原因是更容易处理, 减少或消除试剂盒和仪器间的接口, 制成更简易的设备并减少污染。试剂可以以固体或者液体形式储存。根据所需要的量, 液体试剂、多种缓冲液, 可以储存在水泡 (也叫作“水罐”)、密封包或者试剂包中 (图6)。水泡已经用于首个微流控产品 (i-Stat) 中的试剂储存^[40]。一般容积从 25 μL 到 500 μL 不等。水泡是一个简单的聚合物囊^[40, 41], 或者由加热成型的聚合物复合薄膜制造而成^[42-45]。在系统设计上的两个重要方面是形成水泡和水泡的驱动。在开启水泡方面, 可通过两个技术完成: 易碎密封和穿刺针。