

• 论 著 •

毛细管液滴中的乙型肝炎病毒 DNA 提取与扩增*

王 维, 刘大渔, 梁广铁, 雷秀霞, 周小棉

(广州医学院附属广州市第一人民医院临床化学技术研究室 510180)

摘要:目的 利用毛细管液滴技术,发展一种集成 DNA 提取与扩增的乙型肝炎病毒分析方法。方法 利用聚四氟乙烯毛细管的疏水特性,向毛细管中先后引入油相和水相溶液,在表面张力作用下形成油包水液滴。顺序向毛细管中引入含有不同试样的液滴,完成进样、DNA 结合、洗涤、洗脱、扩增等过程。微液滴不仅有效解决了样品蒸发和扩散问题,同时在操作中起到微阀和微混合器微功能。结果 利用上述毛细管液滴方法分析了乙型肝炎病毒的血清样品,通过优化 DNA 提取和扩增条件,毛细管液滴方法能在较短时间内高效纯化并扩增 DNA。结论 上述方法具有简便快速和低成本的优势,有望发展成一种有潜力的微全核酸分析系统。

关键词:聚合酶链反应; 微全核酸分析系统; DNA 提取; 液滴; 毛细管

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1410-04

In-capillary droplet-based hepatitis virus B DNA extraction and amplification

Wang Wei, Liu Dayu, Liang Guangtie, Lei Xiuxia, Zhou Xiaomian

(Laboratory of Clinical Chemical Technology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, China)

Abstract: Objective To develop a droplet-based method for in-capillary hepatitis virus B DNA extraction and amplification.

Methods The water-in-oil droplets were formed in the capillary as the result of the hydrophobic nature of PTFE capillary. By serially introducing droplets containing sample or reagents, DNA Binding, magnetic beads rinsing, DNA elution and PCR were performed in the capillary. The droplets served as micro-valve, micro-mixer and micro-reactor during the operation. The in-capillary droplet-based method was used to analyze hepatitis virus B containing serum samples. **Results** Experimental results showed that DNA extraction, purification and PCR amplification can be effectively coupled in the capillary. **Conclusion** The current method is simple, fast and low-cost, thus has the potential to be further developed into a micro-total nucleic acid analysis system.

Key words: polymerase chain reaction; micro-total nucleic acid analysis system; DNA extraction; droplet; capillary

微全分析系统是将分析实验室的全部功能集成于一个微型化装置,应用于包括分子诊断和细胞分析等诸多领域^[1-2]。微全核酸分析系统主要包括 DNA 纯化、扩增与检测等功能单元。报道了多种基于微流控芯片平台的微全核酸分析系统,这些系统显示出微型化、集成化、低消耗以及分析快速的优势^[3-9]。芯片微全核酸分析系统也面临一些问题,如加工和使用成本高、控制复杂等。针对这一问题,近期许多研究都致力于开发低成本微型化核酸分析系统。使用玻璃^[10-11]和聚四氟乙烯(Polytetrafluoroethylene, PTFE)材质毛细管为反应器的振荡流 PCR 装置为低成本微全核酸分析系统的实现带来了希望^[12]。振荡流 PCR 装置使用压力发生器^[10]或微量注射泵^[11-12]驱动 PCR 液滴在不同恒定温区往复运动,因温度变化时间缩短所以有利于缩短反应时间。此外,上述系统使用标准毛细管作为 PCR 反应器,因而具有成本优势。毛细管振荡流 PCR 系统面临的问题是未能将核酸提取与纯化集成于系统之中,因而尚不能实现集成化核酸分析。针对这一问题,本研究发展了一种基于液滴技术的毛细管 DNA 提取与扩增方法。该方法利用聚四氟乙烯毛细管的疏水特性,向毛细管中先后引入油相和水相溶液,在表面张力作用下形成油包水液滴。通过向毛细管中顺序引入含有不同试样的液滴,完成进样、DNA 结合、洗涤、洗脱以及 PCR 过程。该系统在毛细管中集成了

DNA 提取与 PCR,有望实现低成本的微全核酸分析。

1 材料与方法

1.1 装置结构和控制 研究所用自行搭建的分析装置有两个温度控制模块(图 1),每个模块从上至下的结构分别为聚碳酸酯盖板、带沟槽加热铝板、加热片顶部固定铝板、Peltier 加热片以及加热片底部固定铝板。加热铝板的尺寸为 55 mm(长)×34 mm(宽)×4 mm(高),其表面有 10 个平行的 1 mm(宽)×1 mm(深)沟槽,间距为 2.5 mm。Peltier 加热片(北京帕尔贴半导体致冷有限公司)固定于上、下方铝板之间,其间隙涂有导热硅酯以保证紧密接触和快速温度传导。聚四氟乙烯毛细管(内径 0.6 mm,外径 1 mm,美国 Cole-Parmer 公司)固定于加热铝板沟槽中,顶部安装聚碳酸酯盖板保证其与沟槽表面紧密接触。

嵌合毛细管的加热铝板与加热片顶部固定铝板之间镶嵌有 PT 100 温度传感器(浙江东阳三星电子厂),用以反馈加热板温度。PT 100 温度传感器与温控器(DMC10D4CV0000,日本 Yamatake 公司)连接,后者将模拟信号转化为数字信号传输至计算机。计算机控制软件利用 PID 算法根据温度感应反馈信号至温控器,由温控器控制下位继电器是否电流至 Peltier 加热片。控制软件界面显示已经运行和尚未进行的注射泵运行程序,以及各个温度模块的设定与实际温度。毛细管末端与多通道微量注射泵连接,通过设定注射泵运行程序可以控制管

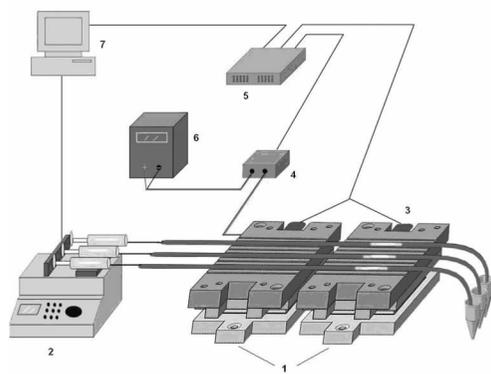
* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30870753);科技部国际合作项目(2010DFB3380);广东省自然科学基金资助项目(9151008901000190);广东省医学科研基金资助项目(A2009518、A2010458);广州市医药卫生科技重点项目(2009-ZDi-10、2009-ZDi-21);广州市科信局科技支撑计划资助项目(2010J-E241-1)。

中液滴的运动(图 1)。

1.2 DNA 提取 毛细管 DNA 提取使用磁珠法 DNA 提取试剂盒(BioFlux BSC08S2, 杭州博日公司)。实验中使用的乙型肝炎病毒(hepatitis virus B, HBV)阳性与阴性样品(小牛血清, 美国 Invitrogen 公司)经荧光定量 PCR 检测确认。HBV 阳性血液样品加入血清管静置后获得血清用于分析。将 10 μ L 血清、10 μ L 蛋白酶缓冲液与 1 μ L 蛋白酶 K 加入试管混合并在室温下放置 15 min。微量注射泵控制毛细管顺序吸入 10 μ L 血清裂解液、4 μ L 结合液以及 2 μ L 磁珠液。由于液滴的主动混合作用,血清裂解液中 DNA 与磁珠快速结合。当运行至磁场区时,液滴中结合 DNA 的磁珠被固定。将其余液体排出毛细管后引入含有洗涤液的液滴两次冲洗磁珠,最后引入含有洗脱液的液滴洗脱 DNA。作为对照,含 HBV 血清样品使用商品化 DNA 提取试剂盒(广州达晖公司)平行处理。回收的 DNA 均使用 HBV 定量 PCR 试剂盒(上海科华公司)在 Light-Cycler 480 荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)进行定量分析, DNA 样品的 OD260/280 比值使用紫外分光光度计测定。DNA 回收率测定使用一个 10⁸ copy/ μ L HBV DNA 样品,用小牛血清稀释为 10⁷、10⁵、10³ copy/ μ L 浓度。每个浓度样品经毛细管液滴法裂解、结合、洗涤和洗脱回收。DNA 回收率 = 洗脱液 DNA 拷贝数/原液 DNA 拷贝数 \times 100%。

1.3 毛细管中的振荡流液滴 PCR 完成 DNA 提取后,毛细管顺序吸入 5 μ L 矿物油、1 μ L 2 \times PCR 缓冲液和 1 μ L 纯化 DNA 溶液。PCR 液滴先在 95 $^{\circ}$ C 温区停留 2 min 完成热启动,继而在 95、65 $^{\circ}$ C 两个温区间往复运动 40 次进行热循环扩增。运行中液滴在 95、65 $^{\circ}$ C 温区停留等同时时间。振荡流 PCR 的 2 μ L 反应体系包含 1 \times PCR 缓冲液,0.2 mmol/L dNTP,上下游引物各 0.2 μ mol/L 以及不同浓度 SpeedStar 热启动 DNA 聚合酶。所用 PCR 试剂购自大连 Takara 公司。此外,反应体系中加入一定量牛血清清蛋白(美国 Sigma 公司)和吐温 20(美国 Amresco 公司)以改善生物兼容性,以及加入 0.1% 溴酚兰(美国 Amresco 公司)作为指示剂。

1.4 扩增产物分析 PCR 产物在自制激光诱导荧光检测芯片电泳分析仪上分析^[13]。PCR 产物用去离子水稀释 10 倍后加样于聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)材质芯片^[14]。芯片电泳使用的分离缓冲液为 20 mmol/L HEPES/40 mmol/L 咪唑(美国 Sigma 公司),1% 羟丙甲基纤维素(HPMC, 40-60 CP, 2% in H₂O, 美国 Aldrich 公司)作为筛分介质,以及 1 \times GeneFinder(厦门 Biovision 公司)作为插入式 DNA 染料。芯片电泳分析程序见先前报道^[14]。



1:加热模块;2:多通道微量注射泵;3:PT 100 温度传感器;4:继电器;5:温控器;6:电源;7:计算机。

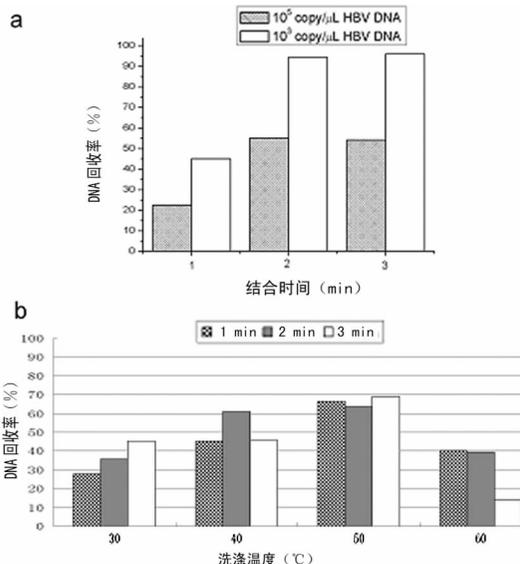
图 1 基于毛细管的核酸分析系统装置结构示意图

2 结果

2.1 结合与洗脱条件对 DNA 提取的影响 结合与洗脱条件对 DNA 提取的影响见图 2。

2.2 不同方法提取 HBV DNA 效果比较 不同方法提取 HBV DNA 效果比较见表 1。

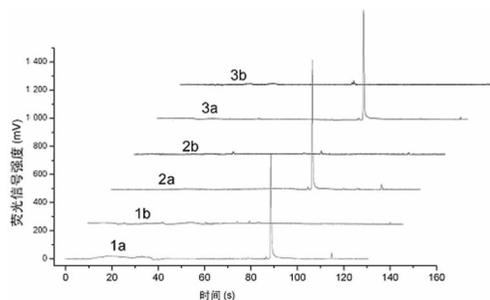
2.3 连续样品分析中交叉污染可能性考察 同一毛细管中连续交替进行 HBV 阳性与阴性样品处理所得回收样品 PCR 扩增产物的芯片电泳分析结果。见图 3。



a: 不同结合时间条件下 HBV DNA 回收率考查; b: 不同洗脱条件下 DNA 回收效率考查。

图 2 DNA 提取条件考查

2.4 芯片电泳分析比较振荡流 PCR 与台式 PCR 的扩增产量 振荡流 PCR 与台式 PCR 的扩增产量芯片电泳分析比较,见图 4。



每轮测试中阳性样品(a)为 HBV DNA 拷贝数 10⁷ copy/ μ L 的血清样品,样品(b)为细胞培养用小牛血清。

图 3 同一毛细管中连续交替进行 HBV 阳性与阴性样品处理所得回收样品 PCR 扩增产物的芯片电泳分析

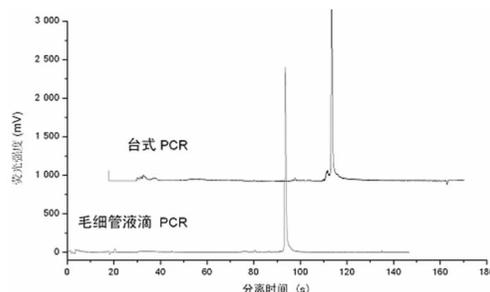


图 4 芯片电泳分析比较振荡流 PCR 与台式 PCR 的扩增产量

表 1 毛细管液滴法与对照方法提取 HBV DNA 荧光定量分析结果比较

样品编号	液滴方法提取 DNA		对照方法提取 DNA	
	液滴方法提取 DNA 定量平均值(copy/ μ L)	液滴方法提取 DNA 定量 相对标准偏差(n=5,%)	对照方法提取 DNA 定量平均值(copy/ μ L)	对照方法提取 DNA 定量 相对标准偏差(n=5,%)
1	8.91×10^3	25.8	8.17×10^3	9.3
2	5.53×10^5	26.3	9.04×10^5	10.9
3	9.64×10^7	17.9	4.59×10^7	18.4
平均值	—	23.3	—	12.9

—:无数据。

3 讨 论

3.1 毛细管中的液体运输 实验使用的 PTFE 毛细管具有高度疏水、耐高温、耐化学腐蚀的特性。在具有疏水表面的毛细管通道中,水相与油相间的表面张力小于水相与管壁间的表面张力。顺序引入油相与水相溶液时,由于表面张力的作用,油相会浸润管壁并包裹水相形成油包水液滴。油包水液滴的形成可以保持样品浓度的稳定,消除样品分子扩散和水分子蒸发。由于水相溶液与通道壁不直接接触,避免了连续试样引入过程中由于表面吸附可能造成的交叉污染。实验使用磁珠作为 DNA 结合载体,微小颗粒(平均粒径 1 μ m)磁珠具有很大的表面积-体积比因而有极强 DNA 结合能力。此外,运动过程中液滴内部以液流运动方向为轴形成循环回流加速液滴内成分的混合^[15]。这些因素均有利于 DNA 的高效结合。通过外部磁场可以将磁珠定位于毛细管的某个位置,顺序引入洗涤液和洗脱液,完成 DNA 纯化和回收。含有回收 DNA 的 PCR 反应液滴在 95、65 $^{\circ}$ C 两个温区间往复运动,实现振荡流 PCR 扩增。综上所述,借助微量注射泵驱动和外部磁场控制,从 DNA 提取到 PCR 的整个过程在毛细管液滴中完成。

3.2 毛细管液滴法 DNA 提取 有文献报导了微流控芯片平台上结合液滴和磁珠技术的 DNA 提取及扩增并显示出简便、快速的优势^[16-17]。这类方法的局限在于需要对微流控反应器表面进行疏水涂层,此外分析通量有限。相比之下,PTFE 毛细管不仅可以为液滴操作提供理想的疏水表面,也易于实现平行化操作。毛细管液滴法 DNA 提取的原理是顺序向毛细管中引入含有样品、磁珠、洗涤液和洗脱液的液滴,在液滴中完成样品-试剂混合、DNA 结合、磁珠洗涤以及 DNA 洗脱(图 5)。试样以油包水液滴形式引入毛细管,避免了表面吸附可能造成的交叉污染,因而液滴起到微阀功能。液滴运动中的主动混合效应可以加速 DNA 结合、洗涤和洗脱,起到微混合器作用;外部磁场驱动磁珠选择性定位并进入含有不同试样的液滴,起到微泵功能。实验使用的磁珠 DNA 提取法的原理是在低 pH 值、高离子强度结合液条件下 DNA 特异性地结合在磁珠上。结合了 DNA 的磁珠粒子被磁性材料捕获,通过洗涤过程将污染物除去,最后在高 pH 值、低离子强度洗脱液的作用下 DNA 从磁珠上洗脱并被收集。

3.2.1 结合与洗脱条件对 DNA 提取的影响 实验考查了结合时间及洗脱时间、温度对 DNA 提取效率的影响。本研究(图 2a)提示液滴中的 DNA 与磁珠可在 2 min 内完成结合。低浓度样品结合效率较高,2 min 结合时间条件下 10^3 copy/ μ L HBV DNA 的回收率超过 90%,而 10^5 copy/ μ L HBV DNA 样品的回收率只能达到 50%以上。相比较传统磁珠 DNA 提取方法,毛细管液滴法所需结合时间显著缩短(分别为 2 min 和 10 min)。这种快速结合考虑是由于微体系中分子扩散距离的缩短以及液滴主动混合效应加速了 DNA 与磁珠的结合过程。

本研究(图 2b)显示了不同洗脱条件下的 HBV DNA 回收率。在较低温度(30 $^{\circ}$ C)下,延长洗脱时间可提高 DNA 回收

率。提高温度可缩短洗脱时间,50 $^{\circ}$ C 时 1 min 就可以接近最大 DNA 洗脱量。然而,当洗脱温度提高至 60 $^{\circ}$ C 时 DNA 回收率又有所下降。这可能是因为较高温度下液滴变得不稳定,样品突破油水界面造成的表面吸附引起 DNA 回收量减少。

在使用 2 min 结合和 50 $^{\circ}$ C 1 min 洗脱条件下,所考察不同浓度 HBV DNA 样品的回收率均可以达到 60%以上(图 2b)。为简化实验操作,本研究还试验了以 $1 \times$ PCR 缓冲液作为洗脱液,也获得了相似的回收效率。本实验获得的 DNA 提取效率与先前文献报道的微流控核酸提取方法相当^[18-19],可以为核酸分析提供快速高效的样品前处理。

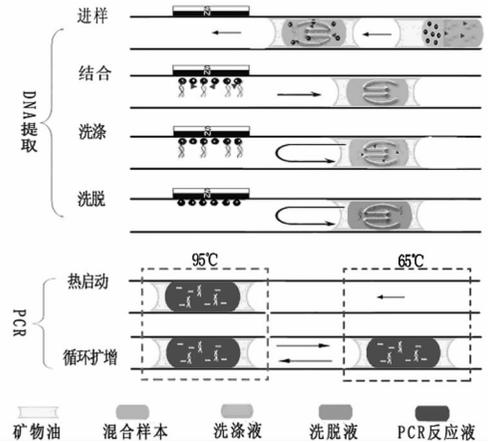


图 5 毛细管液滴方法 DNA 提取和 PCR 过程示意图

3.2.2 毛细管液滴 DNA 提取方法考察 优化后的血清 HBV DNA 提取过程包括使用室温下 15 min 蛋白酶 K 裂解,2 min 结合,2 min 洗涤 2 次以及 50 $^{\circ}$ C 下 1 min 洗脱,整个操作在 25 min 内完成。使用上述操作条件对含有 10^3 、 10^5 、 10^7 copy/ μ L 水平的 HBV 血清样品的 DNA 提取效果进行了考察。荧光定量 PCR 分析显示,毛细管液滴方法的 DNA 提取量与对照方法基本相当,而次间相对标准偏差要大于对照方法(23.3%与 12.9%)。紫外分光光度计测定结果显示,使用毛细管液滴方法提取的所有 DNA 样品 OD_{260/280} 比值均大于 1.8,提示该方法有效地纯化了 DNA。该结果说明通过一系列条件优化后毛细管液滴 DNA 提取方法可以有效纯化和回收 DNA 以满足后续定性或定量分析需要,而进样量偏差和样品在油水界面的捕获可能是影响重现性的因素。

3.3 连续样品分析中交叉污染可能性考察 连续样品分析中样品残留导致的交叉污染可能影响核酸的定性和定量分析结果。为考察毛细管液滴 DNA 提取方法的交叉污染可能性,实验中连续 3 次交替测试了 1 个 HBV 拷贝数为 10^7 copy/ μ L 的阳性样品和 1 个 HBV 阴性血清样品,每次操作后用 3 mol/L 盐酸溶液清洗毛细管,然后用矿物油润洗带走管壁残留液滴。所得洗脱样品加入 25 μ L HBV DNA 检测 PCR 体系扩增 40 个循环。电泳分析结果显示由 HBV DNA 阴性血清获得的洗脱液 PCR 扩增结果均为阴性(图 3)。该结果说明使用现有清

洗方法可以有效去除毛细管表面样品残留,因此毛细管液滴 DNA 提取方法可用于连续样品处理。

3.4 毛细管液滴 PCR 为改善液滴中反应兼容性,实验中向 PCR 反应体系中加入表面活性剂 Tween 20 以增强液滴稳定性,并添加 BSA 以降低管壁对反应组份的吸附。Tween 20 一方面可以在高温下维持 DNA 聚合酶的活性,另一方面可以降低油-水界面张力,减少反应组份在此界面的滞留并增强液滴的稳定性。芯片电泳分析结果显示,反应体系加入 Tween 20 和 BSA 可以显著改善扩增效果。添加 BSA 引起扩增效果改善的机制考虑是高浓度 BSA 抑制了毛细管表面对于反应组份的吸附。

与台式 PCR 扩增效果相比,添加 Tween 20 和 BSA 仅部分改善了振荡流 PCR 扩增效果。研究接下来考察了增加 DNA 聚合酶浓度对于扩增效果的影响。在常规 DNA 聚合酶用量条件下,振荡流扩增效果欠佳。当增加 DNA 聚合酶用量,发现 PCR 产量有所提高。当反应体系中 DNA 聚合酶浓度达到 0.3 U/mL 是 PCR 产量达到最高。该结果提示增加 DNA 聚合酶用量可以拮抗毛细管表面以及油水界面对于 DNA 聚合酶的吸附。

振荡流 PCR 在单根毛细管中进行,液滴在注射泵驱动下往返于两个温区。液滴在两个温区的停留时间分别对应变性和退火/延伸。因此,振荡流流速决定了变性和退火/延伸时间。通过固定铝板,Peltier 加热片将温度传导至毛细管。虽然振荡流 PCR 采用恒定温区形式,但液滴从一个温区迁移至另一个温区时会引起温度的瞬间波动。这种温度变化的延迟可能造成实际变性和退火/延伸时间的缩短。本研究考察了不同流速对于 DNA 扩增效果的影响。高流速可以缩短反应时间但由于惯性作用不利于液滴的稳定。芯片电泳分析结果显示,在 90 $\mu\text{L}/\text{min}$ 及以下的流速条件,PCR 扩增产量不受流速影响。在此流速条件下,单个 PCR 循环在 16 s 内完成,45 个循环仅需要 12 min。实验结果说明由于采用微量反应体系,毛细管中液滴可以快速达到温度平衡。运动过程中油包水液滴自身搅拌作用可以加速温度传导^[20]。此外,实验采用的快速 DNA 聚合酶也显著缩短了 PCR 延伸时间。上述因素共同作用造就了快速振荡流 PCR。

在优化反应条件下将振荡流液滴 PCR 与传统台式 PCR 的扩增效果进行了比较。本研究(图 4)显示,芯片电泳分析显示振荡流液滴 PCR 与台式 PCR 的扩增产量基本一致,说明通过一系列反应条件优化,毛细管通道表面对于 PCR 的抑制效应被有效克服。振荡流液滴 PCR 可以在 12 min 内完成 45 个循环,所需反应时间仅为传统台式 PCR (60 min) 的 1/5,反应体积降低了 25 倍(2 μL , 50 μL)。连续 5 次平行分析显示,振荡流液滴 PCR 的扩增产物信号强度标准偏差为 12%,与台式 PCR (11%) 接近。由于使用 PTFE 毛细管作为反应器,振荡流液滴 PCR 的分析成本几乎与传统台式 PCR 一样低廉。

本研究发展了一种基于液滴技术的毛细管 DNA 提取与扩增方法。该方法在毛细管液滴中完成了核酸分析所涉及的进样、DNA 结合、洗涤、洗脱、扩增等过程。血清样品分析 HBV DNA 的结果显示,毛细管液滴方法能在较短时间内高效纯化并扩增 DNA。上述方法具有简便快速和低成本的优势,有望发展成一种有力的微全核酸分析系统。

参考文献

[1] Reyes DR, Iossifidis D, Auroux PA, et al. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology [J]. Anal Chem,

2002, 74(12):2623-2636.

- [2] Auroux PA, Iossifidis D, Reyes DR, et al. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications [J]. Anal Chem, 2002, 74(12):2637-2652.
- [3] Auroux PA, Koc Y, de Mello A, et al. Miniaturised nucleic acid analysis [J]. Lab Chip, 2004, 4(6):534-546.
- [4] Chen L, Manz A, Day PJ. Total nucleic acid analysis integrated on microfluidic devices [J]. Lab Chip, 2007, 7(11):1413-1423.
- [5] Zhang C, Xing D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(13):4223-4237.
- [6] Zhang C, Xing D, Li Y. Micropumps, microvalves, and micromixers within PCR microfluidic chips: advances and trends [J]. Biotechnol Adv, 2007, 25(5):483-514.
- [7] Zhang C, Xu J, Ma W, et al. PCR microfluidic devices for DNA amplification [J]. Biotechnol Adv, 2006, 24(1):243-284.
- [8] Liu P, Mathies RA. Integrated microfluidic systems for high-performance genetic analysis [J]. Trends Biotechnol, 2009, 27(10):572-581.
- [9] Liu RH, Yang J, Lenigk R, et al. Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection [J]. Anal Chem, 2004, 76(7):1824-1831.
- [10] Chiou J, Matsudaira P, Sonin A, et al. A closed-cycle capillary polymerase chain reaction machine [J]. Anal Chem, 2001, 73(9):2018-2021.
- [11] Chen L, West J, Auroux PA, et al. Ultrasensitive PCR and real-time detection from human genomic samples using a bidirectional flow microreactor [J]. Anal Chem, 2007, 79(23):9185-9190.
- [12] Wang HY, Zhang CS, Li YY. Rapid Detection of tobacco mosaic virus from crude samples on oscillatory-flow reverse transcription polymerase chain reaction microfluidics [J]. Chn J Anal Chem, 2009, 37(14):1286-1290.
- [13] Liu D, Ou Z, Xu M, et al. Simplified transient isotachopheresis/capillary gel electrophoresis method for highly sensitive analysis of polymerase chain reaction samples on a microchip with laser-induced fluorescence detection [J]. J Chromatogr A, 2008, 1214(1-2):165-170.
- [14] Liu D, Zhou X, Zhong R, et al. Analysis of multiplex PCR fragments with PMMA microchip [J]. Talanta, 2006, 68(3):616-622.
- [15] Song H, Tice JD, Ismagilov RF. A microfluidic system for controlling reaction networks in time [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2003, 42(7):768-772.
- [16] Pippier J, Inoue M, Ng LF, et al. Catching bird flu in a droplet [J]. Nat Med, 2007, 13(10):1259-1263.
- [17] Pippier J, Zhang Y, Neuzil P, et al. Clockwork PCR including sample preparation [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47(21):3900-3904.
- [18] Price CW, Leslie DC, Landers JP. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip [J]. Lab Chip, 2009, 9(17):2484-2494.
- [19] Wen J, Legendre LA, Bienvenue JM, et al. Purification of nucleic acids in microfluidic devices [J]. Anal Chem, 2008, 80(17):6472-6479.
- [20] Song H, Chen DL, Ismagilov RF. Reactions in droplets in microfluidic channels [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2006, 45(44):7336-7356.

(收稿日期:2011-04-13)