

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※
※ 整合微熱管之新型溫控機制應用於提高微型
※ DNA 倍增反應器 PCR 反應效率
※
※

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

執行期間：90年8月1日至91年7月31日

計畫參與人員：簡欣堂

☐赴國外出差或研習心得報告一份

☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份

☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

中 華 民 國 九 十 一 年 十 一 月 二 十 五 日

整合微熱管之新型溫控機制應用於提高微型 DNA 倍增反應器 PCR 反應效率

New Thermocycling Mechanism Integrated with Heat Pipe for DNA Amplifier

Rapid Thermocycling and Effective PCR Amplification

計畫編號：NSC 90-2212-E-002-197

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：陳炳輝 國立台灣大學機械工程學系

計畫參與人員：簡欣堂 國立台灣大學機械工程學系

一、中文摘要

本計劃主要是設計一種能夠運用於聚合酵素連鎖反應之新型快速溫度循環控制機制，並企圖利用此設計來提高其反應效率。於聚合酵素連鎖反應之溫度循環控制時，使用玻璃毛細管來承載 10 μ L 之反應樣品，並配合輻射加溫與灑水冷卻機制來進行 DNA 變異溫度 (94 $^{\circ}$ C)、引子煉合溫度 (56 $^{\circ}$ C) 與引子延伸溫度 (72 $^{\circ}$ C) 間之溫度轉換與恆溫控制。利用灑水冷卻時，反應樣品之降溫速率可達 88 $^{\circ}$ C/sec，而藉由輻射加溫時，其升溫速率約為 5 $^{\circ}$ C/sec，在此條件下，一個溫度循環週期可於一分鐘之內被執行完成。根據本實驗結果，於 20 個溫度循環週期之複製反應後，439-bp 之 B 型肝炎 DNA 片段可於洋菜凝膠電泳分離中被檢測出來，並且整個複製反應的時間只需不到半個小時即可完成。

關鍵詞：聚合酵素連鎖反應、玻璃毛細管、輻射加溫、灑水冷卻、B 型肝炎、洋菜凝膠電泳分離

Abstract

This plan aims to develop a novel thermocycling system for a rapid and effective polymerase chain reaction (PCR) in a glass capillary tube containing 10 μ L sample. In each temperature cycle, this study proposed to employ an IR radiation to heat up the sample at denaturation stage from 72 $^{\circ}$ C to 94 $^{\circ}$ C, a water spray cooling at annealing stage from 94 $^{\circ}$ C to 56 $^{\circ}$ C and again an IR radiation to heat up the sample at

extension stage from 56 $^{\circ}$ C to 72 $^{\circ}$ C. The temperature ramping executed in a glass capillary tube has a temperature changing rate at 5 $^{\circ}$ C/sec for heating and 88 $^{\circ}$ C/sec for cooling. One cycle time could be achieved at a value less than one minute. After 20 cycles of the amplification, a 439-bp hepatitis B virus (HBV) DNA fragment could be visualized with ethidium bromide on agarose gels.

Keywords: polymerase chain reaction (PCR), glass capillary tube, IR radiation, water spray cooling, hepatitis B virus (HBV), agarose gel.

二、緣由與目的

本研究計劃嘗試以微機電製程，在玻璃基片上製備微型 DNA 倍增反應器，其尺寸為 1 mm (Length) x 1 mm (Width) x 10 μ m (Deep)，容積約為 10 nL；該晶片架構已可作為全流程的 DNA 序列分析儀器，但在現階段研究重點則針對微型 DNA 反應器進行 PCR 增生 DNA 樣本的程序進行深入研究。該項流程可謂是完整 DNA 定序分析的核心流程，如無法確實增生需求的 DNA 樣本，必定無法正確進行下一步 DNA 序列分析。因此，如何快速且高效率的在微容積 DNA 倍增反應器內進行 PCR，為本研究計劃的研究目的。

提高 PCR 效率的關鍵主要在於高速升降溫度能力(快速的退火降溫，避免因溫度下降振幅過大，造成引段序列產生二聚物及非特定需求 DNA 片段不正常增生)以及加熱冷卻的控制(控制變異化升溫反應

曲線，避免因過大的溫度上衝振幅造成 PCR 反應延伸複製用 Taq 酵素活性受損)，目前在微型的 DNA 反應器中進行溫控，其加熱冷卻方式可歸類為

- 利用熱電晶片(Thermoelectric)進行加熱或冷卻
- 利用高壓空氣源，以高速氣流強制對流熱傳加熱及冷卻
- 利用紅外線輻射加熱，以高速氣流強制對流進行冷卻

熱電晶片單一機構可用於加熱或冷卻，作為恆溫控制其構造簡單且控制精度高，但由於晶片本身成為額外的熱容，因此無法進行高速的昇溫或降溫(Khandurina 等人, 2000)，其冷卻速率僅 3~4°C/sec，加熱速率則為 2°C/sec，其昇降溫度速率低，無法滿足高效率 PCR 反應需高速昇降溫度的要求。高速氣流強制對流熱傳，原則上可滿足高速溫控的需求，但由於高溫氣流比容高，因此在加熱速率上稍慢。Huhmer 等人(2000)以紅外線輻射加熱，取代了高速氣流加熱昇溫，其加熱速率可高達 65°C/sec，但其降溫機制仍使用高速氣流強制冷卻，其降溫速率有 20°C/sec。如前所述，退火降溫是影響 PCR 效率的關鍵步驟，快速的退火降溫可避免引段序列產生二聚物及非特定需求 DNA 片段不正常增生，提高 PCR 之效率，依照 Huhmer 等人(2000)的實驗結果，高速氣流進行冷卻，仍有少部分的二聚物增生，是否能進一步再降低該異常增生現象，首要關鍵在於是否能進一步增快降溫速率。

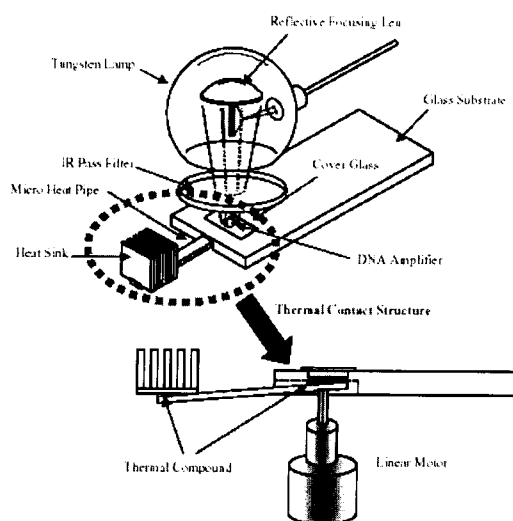


圖 1：溫控設計示意圖

本研究計劃擬整合微熱管(Micro Heat Pipe)於 DNA 倍增反應器上，以進一步增加降溫速率。其溫控設計為利用紅外線進行加熱，以微熱管自 DNA 倍增器將熱量傳導至外界散熱裝置散熱，結構可參見下圖 1。利用紅外線進行昇溫加熱，以微熱管導熱於散熱片上進行快速散熱降溫，與以往參考文獻中所使用的溫控機制比較，能提供更快的降溫速率，避免引段序列產生二聚物及非特定需求 DNA 片段不正常增生。機制的另一特點在於利用控制微熱管與 DNA 倍增反應器的熱接觸，以消弭因快速溫控而造成溫度的振盪，避免傷害 Taq 聚合酵素活性及造成不正常增生。根基於這兩項優越性，本計劃當能發展出能進行快速且高效率 PCR 反應的微型 DNA 倍增反應器。

三、結果與討論

實驗設備

進行 PCR 實驗時，將裝載反應試劑及 DNA 樣本的測試容器，利用鹵素燈泡(OSRAM HLX, Xenophot 64627) 對試劑以紅外線輻射加熱及泵浦 (Submersible Fountain Pump WP-102) 對裝載試劑的玻璃毛細管灑水降溫，並配合自動控制系統即時監控反應過程的溫度與時間做即時監控，以滿足 PCR 所需的溫度循環設定，本實驗設備架構如圖 2 所示。最後，再將 PCR 的產物進行洋菜凝膠電泳的分析。

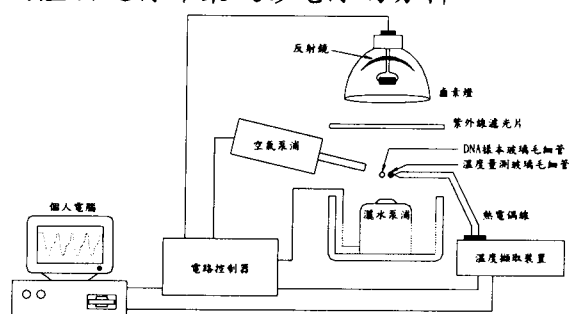


圖 2：實驗設備圖

昇降溫速率量測

本實驗設備除了可提供灑水降溫機制外，尚可搭配使用空氣泵浦 (TECAX, Air Pump AP-1500) 進行強制對流冷卻，以及自然對流冷卻。而此三種冷卻機制於 PCR 溫控過程中，由 DNA 變異溫度降溫到引子煉合溫度時，如圖 3 所示，其降溫速率分

別約為 $88^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 、 $6^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 和 $2^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 。

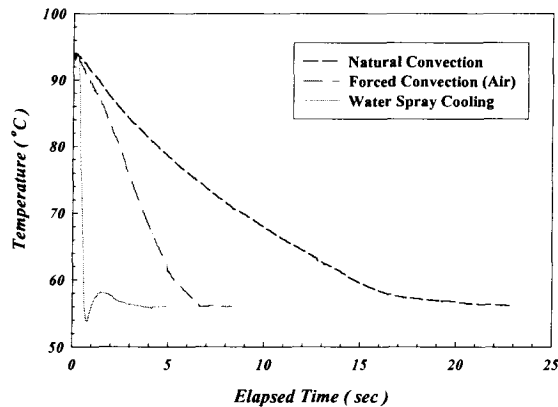
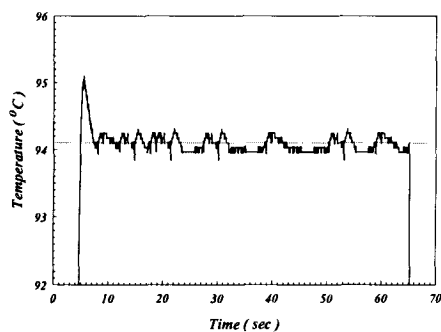


圖 3：降溫速率量測

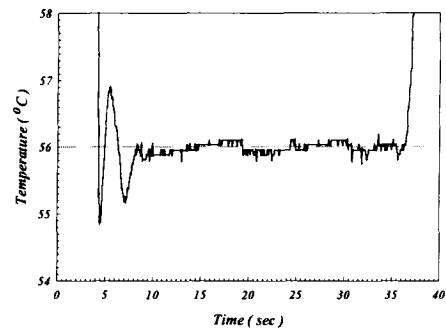
另外，利用鹵素燈泡對玻璃毛細管內反應試劑進行輻射加熱，其昇溫速率約為 $5^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ 。

恆溫控制情形

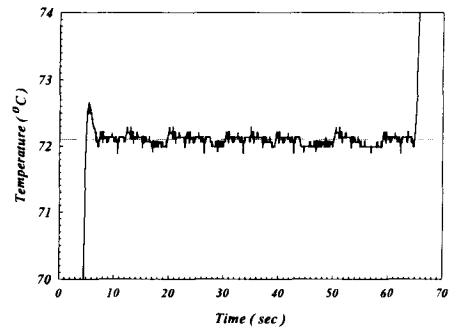
PCR 增生的溫度循環主要是三個特定溫度間的快速轉換與恆溫維持控制。本實驗利用熱電偶線來量測反應過程中試劑的溫度，再配合 PID 控制程式對試劑溫度進行監控，來達成 PCR 所需的溫度要求，並將其溫度循環自動化。當 DNA 變異溫度、引子煉合溫度與引子延伸溫度設定為 94°C 、 56°C 和 72°C 時，於本實驗設備與 PID 控制程式的操作下，恆溫控制的情形如圖 4 的量測結果所示，其溫度分別控制在 $94.1^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、 $56.0^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 和 $72.1^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 的範圍內。



(a) DNA 變異溫度 - 94°C



(b) 引子煉合溫度 - 56°C



(c) 引子延伸溫度 - 72°C

圖 4：三個特定溫度之恆溫控制量測

降溫速率對 PCR 增生的影響

在相同的溫度循環控條件下 ($94^{\circ}\text{C}/60\text{ sec}$ 、 $56^{\circ}\text{C}/30\text{ sec}$ 、 $72^{\circ}\text{C}/60\text{ sec}$ ，重覆進行 20 個溫度循環週期)，以三種不同的降溫方式分別進行 PCR 增生實驗，並將其增生產物與傳統商用熱循環機 (Biometra, TRIO-Thermoblock™) 所得的產物做比較，其洋菜凝膠分析結果如圖 5 所示。圖中顯示，利用本實驗設備進行輻射加熱設計所得 PCR 產量比傳統商用熱循環機來得少，這與 Oda 等人 (1998) 的實驗結果相同；但在自然對流、強制對流與灑水冷卻的比較上，證實快速的降溫速率可以提高 PCR 增生的效率。

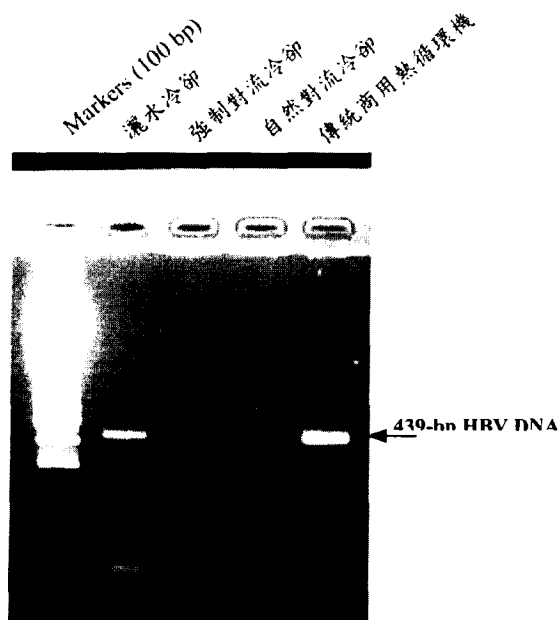


圖 5：不同降溫速率之 PCR 增生結果

快速 PCR 增生

紅外線輻射加熱與灑水冷卻搭配操作下，可將原先在傳統商用熱循環機上需要費時約 90 分鐘的 PCR 增生動作，縮短在半小時內完成 (94°C/10 sec、56°C/20 sec、72°C/20 sec，重覆進行 20 個溫度循環週期)，並於成功於洋菜凝膠電泳分析中檢出增生產物，如圖 6 所示。

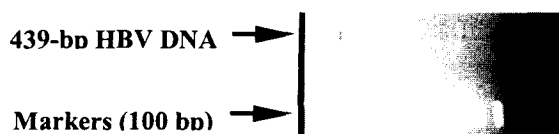


圖 6：快速增生結果

四、計畫成果自評

本計畫達成預期的新型 PCR 溫控機制之開發目標，並順利利用此設備於半小時內成功增生 B 型肝炎 DNA 片段。雖然計畫成果達成預期目標，但是仿照原先計畫設計進行時，會遭遇一些難題，故為了達成計畫目標，在降溫機制上由原先的整合微熱管設計改成灑水冷卻，如圖 2 所示。

利用原先設計所遇到的最大困難，是當玻璃晶片於高溫的變異反應(鹵素燈輻射加熱)後，接續進行與微熱管熱接觸降溫動作時，玻璃晶片局部高溫處(反應區域)和微熱管接觸瞬間，會因為熱應力效應，導致玻璃晶片的破裂。另外，由於玻璃晶片反應槽密封問題不易解決，故利用玻璃

毛细管取代玻璃晶片成為承載反應試劑之容器。以上兩項即為本研究與原先計畫不相符之處，然而，亦正因為如此，使本研究能在時效內達成計畫的預定目標。

五、參考文獻

- [1] Hühmer, A. F. R., and Landers, J. P., "Noncontact infrared-mediated thermocycling for effective polymerase chain reaction amplification of DNA in nanoliter volumes," *Anal. Chem.*, Vol. 72, pp. 5507-5512, 2000.
- [2] Innis, M. A., and Gelfand, D. H., "Optimization of PCRs," In *PCR protocols: a guide to methods and applications* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White), pp. 3-12. Academic Press, San Diego, 1990.
- [3] Khandurina, J., McKnight, T. E., Jacobson, S. C., Waters, L. C., Foote, R. S., and Ramsey, J. M., "Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices," *Anal. Chem.*, Vol. 72, pp. 2995-3000, 2000.
- [4] Lin, Y.-C., Huang, M.-Y., Young, K.-C., Chang, T.-T., and Wu, C.-Y., "A rapid micro-polymerase chain reaction system for hepatitis C virus amplification," *Sensors and Actuators B*, Vol. 71, pp. 2-8, 2000.
- [5] Oda, R. P., Strausbauch, M. A., Hühmer, A. F. R., Borson, N., Jurens, S. R., Craighead, J., Wettstein, P. J., Eckloff, B., Kline, B., and Landers, J. P., "Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA," *Anal. Chem.*, Vol. 70, pp. 4361-4368, 1998.
- [6] Taylor, T. B., Harvey, S. E., Albin, M., Lebak, L., Ning, Y., Mowat, I., Schuerlein, T., and Principe, E., "Process control for optimal PCR performance in glass microstructures," *Biomedical Microdevices*, Vol. 1, pp. 65-70, 1998.
- [7] Wittwer, C. T., Fillmore, G. C., and Hillyard, D. R., "Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air," *Nucleic Acids Res.*, Vol. 17, No. 11, pp. 4353-4357, 1989.
- [8] Wittwer, C. T., and Garling, D. J., "Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization," *BioTechniques*, Vol. 10, No. 1, pp. 76-83, 1991.
- [9] 余文華, "聚合酵素連鎖反應系統之開發與研究", *國立臺灣大學碩士論文*, 民國九十一年六月。