

分类号: 065

单位代码: 10335

密 级:

学 号: 10406034

浙江大学

博士专业学位论文



中文论文题目: 基于缺口管阵列技术的微流控
非均相免疫分析系统的研究

英文论文题目: Microfluidic Heterogeneous Immunoassay Systems
Based on Slotted Vial Array

申请人姓名: 石晓彤

指导教师: 殷学锋 教授

合作导师: 方 群 教授

专业名称: 分析化学

研究方向: 微流控分析

所在学院: 理学院

论文提交日期: 2010 年 1 月

基于缺口管阵列技术的微流控
非均相免疫分析系统的研究



论文作者签名: 石晓彤

指导教师签名: 殷学锋

论文评阅人 1: 牟颖 教授 浙江大学控制科学与工程学系

评阅人 2: 刘宝红 教授 复旦大学化学系

评阅人 3: 蒲巧生 教授 兰州大学化学化工学院

评阅人 4: 王建华 教授 东北大学分析科学研究中心

评阅人 5: 吴志勇 教授 东北大学分析科学研究中心

答辩委员会主席: 陈恒武 教授 浙江大学化学系

委员 1: 殷学锋 教授 浙江大学化学系

委员 2: 邬建敏 教授 浙江大学化学系

委员 3: 周建光 教授 浙江大学控制科学与工程学系

委员 4: 刘金华 教授 杭州师范学院理学院

答辩日期: 2010 年 3 月 5 日

Microfluidic Heterogeneous Immunoassay Systems

Based on Slotted Vial Array



Author's signature: _____

Supervisor's signature: _____

External Reviewers: Prof. Ying Mu Zhejiang University
Prof. Baohong Liu Fudan University
Prof. Qiaosheng Pu Zhejiang University
Prof. Jianhua Wang Northeastern University
Prof. Zhiyong Wu Northeastern University

Examining Committee Chairperson:

Prof. Hengwu Chen Zhejiang University

Examining Committee Members:

Prof. Xuefeng Yin Zhejiang University

Prof. Jianmin Wu Zhejiang University

Prof. Jianguang Zhou Zhejiang University

Prof. Jinhua Liu Hangzhou Teachers College

Date of oral defence: March 5, 2010

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名:  签字日期: 2010 年 3 月 6 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名: 

导师签名: 

签字日期: 2010 年 3 月 6 日

签字日期: 2010 年 3 月 10 日

致 谢

衷心感谢导师殷学锋教授和方群教授,感谢你们在我攻读学位期间给予我的悉心指导、教诲、耐心和鼓励!

衷心感谢陈恒武老师、何巧红老师、沈宏老师、赵璇老师和姚波老师几年来在学习和生活上给予我的关心、帮助和指导!

感谢潘建章为我精心设计步进电机程序!感谢祝莹、孙蒙多次指导我倒置荧光显微镜的使用!感谢张婷、潘建章、祝莹、孙蒙、程永强、林清湖热心地帮助我拍照了很多实验所需的照片!感谢古淑青、张婷、张云霞帮助我订、领试剂材料,并在实验中多次给予的热心帮助!感谢黄艳贞、季勤勤、王新珏在文献检索上的热情帮助!感谢范吉锋在 PDMS 芯片制作上的帮助!感谢张婷、李启帮助我修改和装订论文!感谢望秀丽、宿媛、蔡龙飞、章豪!感谢已毕业的杜文斌、陈宏、刘军、赵倩、叶晓兰、董娅妮!衷心感谢研究组的每一位老师和同学,没有你们的鼎力帮助我攻读博士学位的路途会更加漫长!从你们身上我学到了很多新的东西,得到了很多热心的帮助,能与你们相识,成为同学和朋友使我感到非常地温暖!

感谢微分所所有的老师、同学和朋友,谢谢你们多年来对我的关心和支持!

特别感谢刘有文、郭韵、张子新!感谢你们在我每次遇到困难的时候给予我的亲人般的关心和无私的帮助!

特别感谢我的家人!感谢你们几年来在学业、生活和精神上给予我的莫大的支持、鼓励、关爱、理解和包容!谢谢嘟嘟对妈妈的宽容和理解,希望能如你所愿!

石晓彤

2010 年 1 月 于杭州

摘 要

免疫分析是利用抗原和抗体之间的特异性相互作用对待测物进行检测的一种方法,具有很高的特异性和灵敏度,在临床检验、生化分析、环境监测、食品安全等领域的应用十分广泛。其中,非均相免疫分析,尤其是酶联免疫吸附测定法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),是当前临床及实验室医学领域进行定量检测占主导地位的分析技术。然而,常规的免疫分析方法,特别是ELISA,孵育时间长,多采用手工操作,分析过程繁琐费时,试样和试剂的消耗量过大,限制了其进一步发展和实际应用。微流控学是上世纪九十年代发展起来的在微米级结构中操控纳升至皮升级流体的科学和技术。微流控分析系统由于其独特的微尺度效应,具有反应时间短、分析速度快、试剂和样品消耗少、易集成化和自动化等优点。将微流控分析技术与免疫分析结合,在微流控芯片的微通道内进行免疫分析操作,能有效降低系统的试样试剂消耗、提高分析速度和通量、实现分析系统的集成化和自动化。

第一章对各种微流控免疫分析技术及其研究进展进行了综述,尤其对微流控非均相免疫分析方法及自动化的微流控非均相免疫分析系统的研究进展进行了重点介绍。

第二章发展了一种基于毛细管和缺口管阵列技术的微流控非均相免疫分析系统。以缺口管阵列作为试样和试剂储液池,以毛细管阵列作为取样探针和免疫反应通道,以重力作为驱动力,采用直线滑台自动控制缺口管阵列的移动,实现多通道免疫反应操作的完全自动化。该系统被成功地应用于人IgG分析,在10 min内同时完成了对9个IgG样品的同步分析。系统对IgG的检测限为 $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$,分析重现性为 1.8% (RSD, $n=9$),每次测定试剂和试样消耗为 $1.1\text{ }\mu\text{L}$ 。该系统具有结构简单、液体操控自动化、试样和试剂消耗低、易于实现阵列化的特点,为临床检验分析的自动化及高通量化提供了一种新途径。

第三章发展了一种基于缺口管阵列和微蠕动泵的聚二甲基硅氧烷(PDMS)免疫分析芯片。其中,建立了一个基于微型齿轮蠕动泵的液流驱动系统,具有结构简单、容易搭建、驱动可靠、流量可调($0.21\text{--}4.4\text{ }\mu\text{L/min}$)的优点。将蠕动泵与缺口管阵列配合,初步在PDMS芯片上实现多通道的人IgG的非均相免疫分析。系统对试样及试剂的消耗约 $0.4\text{ }\mu\text{L}$,对IgG的检测限为 $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$,可对5个样品进

行同步分析，总分析时间约8 min。

关键词：微流控；非均相免疫分析；毛细管；缺口管阵列；自动化；人 IgG；蠕动泵

Abstract

Immunoassay is a well-established analysis technique with high specificity and sensitivity based on specific interaction between antigen and antibody, and has been widely used in clinical diagnosis, biochemical analysis, environment monitoring and food safety control. Heterogeneous immunoassay, especially enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), is the most important and widely-used quantitative method in the field of clinical medicine. However, in most of the traditional immunoassays, the operations are usually carried out manually, which are tedious and time-consuming, and the consumption for sample and reagent is among several hundreds of microliters.

Microfluidics is the science and technology that manipulate small (nL-pL scale) amount of fluids in μm -scale channels and microfluidic systems. Microfluidic analytical systems have the advantages of fast analysis, low sample/reagent consumption and potential for integration and automation. The combination of microfluidic technique with immunoassay provides significant improvements in analysis speed and throughput, sample/reagent consumption, and integration and automation of the system.

In chapter 1, the progress in microfluidic immunoassay systems, especially in automated heterogeneous immunoassay, is reviewed.

In chapter 2, an automated microfluidic immunoassay system was developed based on capillary and slotted-vial arrays, in which fully automated operation for multi-step immunoassay was achieved. The system was applied in the immunoassay of human IgG. The assay for nine human IgG samples was achieved within 10 min. The limit of detection for IgG was $1.0\ \mu\text{g/mL}$. The precision of the system was 1.8% (RSD, $n=9$). The sample and reagent consumption was $1.1\ \mu\text{L}$ for each cycle.

In chapter 3, a microfluidic immunoassay system was developed based on slotted-vial array, microperistaltic pump and PDMS chip. The peristaltic pump with a micro-gear was used for liquid driving in six microchannels in PDMS chip, which had advantages of simple structure, ease of building, good reliability and adjustable flow rate range from $0.21\ \mu\text{L/min}$ to $4.4\ \mu\text{L/min}$. The feasibility of the system was demonstrated in a preliminary immunoassay for human IgG. The assay for five IgG samples was achieved within 8 min. The sample/reagent consumption was only $0.4\ \mu\text{L}$, and the limit of detection was $1.0\ \mu\text{g/mL}$ IgG.

Key words: Microfluidic; Heterogeneous immunoassay; Capillary; Slotted-vial array; Automation; IgG; Peristaltic pump

目 次

致谢.....	I
摘要.....	III
ABSTRACT	V
目次	
1 微流控免疫分析研究进展.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 微流控免疫分析概述	2
1.2.1 微流控免疫分析方法的分类.....	2
1.2.2 微流控免疫分析的特点.....	2
1.3 微流控均相免疫分析	3
1.3.1 芯片外反应-芯片上分离的微流控芯片免疫分析.....	3
1.3.2 集成化微流控芯片免疫分析.....	7
1.4 微流控芯片非均相免疫分析	12
1.4.1 芯片微通道壁作为固相载体	13
1.4.1.1 物理吸附固定抗体（或抗原）	14
1.4.1.2 通过共价键合固定抗体	21
1.4.1.3 其它抗体固定化方法	22
1.4.2 微珠作为免疫分析的固相载体.....	24
1.4.2.1 非磁性微珠固相载体	24
1.4.2.2 磁性微珠固相载体	28
1.4.3 电极或传感器表面作为固相载体.....	33
1.5 微流控免疫分析系统的自动化	35
1.6 小结与本论文的立题思想	47
1.7 参考文献	48
2 基于毛细管和缺口管阵列的自动化微流控免疫分析系统.....	59
2.1 引言	59
2.2 实验部分	60
2.2.1 实验试剂.....	60

2.2.2 仪器设备.....	60
2.2.3 抗体固定化毛细管的制备.....	60
2.2.4 系统搭建.....	61
2.2.5 系统优化实验.....	63
2.2.6 免疫分析操作.....	63
2.2.7 安全注意事项.....	65
2.3 结果与讨论	65
2.3.1 系统设计思想.....	65
2.3.2 毛细管的选择.....	66
2.3.3 荧光显微镜荧光检测条件的考察	67
2.3.3.1 荧光显微镜的检测稳定性	67
2.3.3.2 结合荧光抗体的毛细管荧光检测稳定性考察.....	68
2.3.3.3 毛细管放置位置的影响	70
2.3.3.4 毛细管内荧光强度的取值方法	71
2.3.4 免疫分析系统操作条件优化.....	74
2.3.4.1 IgG 与固定化抗体反应时间	74
2.3.4.2 荧光标记的羊抗人 IgG 抗体反应时间的优化	75
2.3.4.3 清洗时间的优化	76
2.3.5 系统分析性能.....	78
2.4 结论	81
2.5 参考文献	82
3 基于缺口管阵列和微蠕动泵的 PDMS 芯片微流控非均相免疫分析系统	85
3.1 引言	85
3.2 实验部分	86
3.2.1 试剂.....	86
3.2.2 材料.....	87
3.2.3 仪器设备.....	87
3.2.4 PDMS 芯片的加工	87
3.2.5 抗体的包被和封闭.....	89
3.2.6 基于 PDMS 芯片的免疫分析系统	90

3.2.7 免疫分析操作.....	91
3.3 结果与讨论	92
3.3.1 基于微型齿轮蠕动泵的 PDMS 芯片液流驱动系统	92
3.3.1.1 蠕动泵转速对微通道内液体流量的影响	92
3.3.1.2 PDMS 芯片厚度对微通道内流量的影响	93
3.3.1.3 不同通道之间液体流量的差异	95
3.3.2 人 IgG 非均相免疫分析	96
3.4 结论	98
3.5 参考文献	98
攻读学位期间完成的工作.....	101

1 微流控免疫分析研究进展

1.1 引言

免疫分析 (Immunoassay) 是利用抗原和抗体之间的特异性相互作用对待测物进行检测的一种方法, 具有很高的特异性和灵敏度, 在临床检验、生化分析、环境监测、食品安全等领域的应用十分广泛^[1]。根据是否将抗体固定在固相载体上, 可将免疫分析分为均相免疫分析 (Homogeneous immunoassay) 和非均相免疫分析 (Heterogeneous immunoassay) 两大类, 其中非均相免疫分析方法中的酶联免疫吸附测定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 因其具有很高的选择性和敏感性, 是当前临床及实验室医学领域进行定量检测占主导作用的分析技术。然而, 常规的免疫分析方法, 特别是ELISA, 需要较长的孵育时间和繁琐的液体操作程序, 从加样到出结果通常需要数小时, 甚至过夜。分析过程亦多采用手工操作, 繁琐费时, 且容易因操作技术的不熟练和不规范导致结果出现较大误差。试样和试剂的消耗量一般为几百微升-数毫升, 这对于昂贵的试剂及稀缺的样品来说, 消耗量过大。面对临床检测和生化研究等各个领域中对快速、自动、简便、低消耗、高通量检测方法的日益增长的需求, 传统免疫分析的上述问题已经成为限制其进一步发展和满足实际应用需要的关键瓶颈之一。

微流控学 (Microfluidics) 是上世纪九十年代发展起来的在微米级结构中操控纳升至皮升级流体的科学和技术^[2, 3]。微流控分析系统以分析化学为基础, 以微机电加工 (Micro electro-mechanical system, MEMS) 技术为手段, 以微通道网络为结构特征, 以生命科学为其目前主要应用对象, 其最终目标是把生化实验室的全部功能, 包括采样、样品预处理、稀释、清洗、添加试剂、反应、分离以及检测等集成在一个微芯片上, 构建微型全分析系统 (Miniaturized total analysis system, μ TAS), 或称为芯片上的实验室 (Lab on a chip, LOC)。微流控分析系统由于其独特的微尺度效应和显著增加的比表面积, 具有反应时间短、分析速度快、试剂和样品消耗少、易集成化和自动化等优点。

将微流控分析技术与免疫分析结合, 在微流控芯片上进行免疫分析操作, 能有效的克服常规免疫分析的缺点, 近年来已引起研究者的广泛关注, 已经成为免疫分析的研究热点之一。在微流控芯片的微通道内进行免疫反应, 由于尺寸上的减小, 加快了反应动力学过程, 使得基于生物大分子扩散控制的免疫反应速度显

著提高。微流控芯片多种功能结合与集成化的特点也使微流控芯片上的免疫分析与常规免疫分析相比具有很多潜在的优势,如操作步骤简化、样品和试剂的消耗大大降低、分析时间明显缩短、系统易于实现集成化,分析通量和自动化程度明显提高^[3-5]。

本章将对各种微流控免疫分析技术及其研究进展分别进行综述。

1.2 微流控免疫分析概述

1.2.1 微流控免疫分析方法的分类

根据免疫反应时是否将抗体(或抗原)固定在固相载体上,免疫分析可分为均相免疫分析和非均相免疫分析。均相免疫分析是抗原和抗体在同一介质中进行免疫反应的分析方法,而非均相免疫分析则将抗体或抗原固定在固相载体表面,通过特异性免疫反应,将所需的抗原或抗体结合在固相表面形成抗原-抗体免疫复合物的分析方法^[3]。目前,两种方法在微流控系统内的应用研究都取得很大进展。其中,微流控均相免疫分析系统主要是利用芯片毛细管电泳对游离和结合标记物进行快速分离,而微流控非均相免疫分析系统则利用微通道的高比表面积来提高免疫分析的性能^[1]。

根据抗原与抗体相互作用的方式不同,免疫分析亦可以分为竞争性免疫分析和非竞争性免疫分析。竞争性免疫分析中,待测抗原和标记抗原同时竞争结合抗体上有限的活性位点,其竞争力和浓度成正比。待测物抗原浓度越高,与抗体结合的越多,游离的标记抗原就越多,当检测抗原-抗体复合物的信号时,信号越低;当检测剩余游离标记抗原时,信号越高。非竞争性免疫分析中,抗体相对于抗原大大过量。检测信号强度与待测抗原浓度成正比^[6]。两种反应方式在微流控免疫分析系统内都有应用,其中,微流控均相免疫分析系统多采用竞争性反应方式,而微流控非均相免疫分析系统多采用非竞争性反应方式。

基于微流控芯片的免疫分析系统可以采用多种检测手段,如荧光、吸收光度、化学发光、热透镜、表面等离子体共振、电化学检测等。最常见的方法是荧光检测法,很多基于芯片毛细管电泳的系统都采用激光诱导荧光法进行检测,因为其具有较好的灵敏度和较快的响应时间。

1.2.2 微流控免疫分析的特点

在微流控芯片上进行免疫分析与常规免疫分析方法相比,具有反应速度快、分析时间短、试样和试剂消耗少、操作简便、系统易于实现集成化和自动化等特

点,大大改善了常规免疫测定的分析性能,在临床的快速诊断和检验(POCT)、家庭自我保健、环境及食品安全的现场监测等重要领域具有广泛的应用前景。

为方便叙述,本章将采用微流控均相免疫分析和微流控非均相免疫分析的分类方法对近年来微流控免疫分析的研究进展进行介绍。

1.3 微流控均相免疫分析

基于微流控芯片的均相免疫分析的研究可以分为两个阶段:初期阶段的研究多采用芯片外反应,芯片上分离的操作方式;随着研究的深入,多数系统逐渐进展为将混合、反应、进样、分离等多种操作单元集成到芯片上,实现了真正意义上的微流控芯片免疫分析。

1.3.1 芯片外反应-芯片上分离的微流控芯片免疫分析

这类系统的特点是先在微流控芯片外完成免疫反应,然后将免疫反应的产物转移到微流控芯片上的微通道内,进行抗原-抗体免疫复合物与游离的自由抗原或抗体的分离检测。毛细管电泳是最常采用的分离方法^[7-12]。虽然这些系统未实现免疫分析操作在芯片上的全部集成化,但与常规免疫分析系统相比,其分析速度加快,操作过程简化。

1996年,Koutny等^[7]首次将免疫分析与芯片毛细管电泳相结合,采用均相竞争性免疫反应,利用芯片毛细管电泳在30 s内完成了免疫反应后抗原-抗体复合物和游离的标记抗原的分离,建立了血液中可的松的免疫测定方法。其免疫反应并未在芯片上进行,而是先将抗体和荧光标记的抗原加入盛有待测抗原溶液的试管中混合,进行竞争免疫反应,然后将含有反应产物的溶液转移到芯片上的储液池中,利用毛细管电泳将游离的荧光标记抗原与抗原-抗体复合物分离并进行检测。微芯片上微通道的结构如图 1.1 所示,系统对不同浓度可的松的分离测定结果如图1.2所示。该方法对血清中可的松的测定浓度范围为1-60 $\mu\text{g/dL}$, 试样及试剂的消耗为80 μL ,电泳分离时间小于30 s。该系统不需要样品预处理,体积小,芯片上操作简便。但抗原与抗体的孵育时间需要 30 min,使得整个分析时间较长,且依靠手工进行芯片外试样和试剂的混合、搅拌、进样等操作。

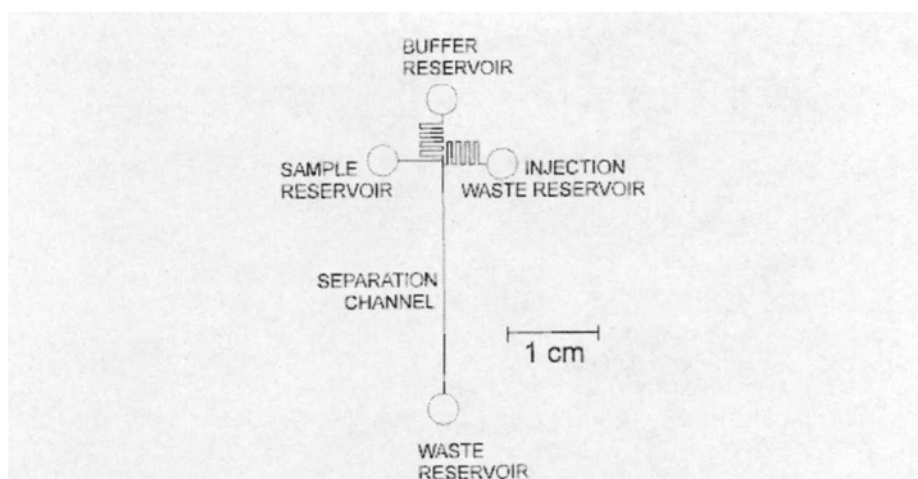


图1.1 用于免疫反应产物分离的毛细管电泳芯片通道构型^[7]。

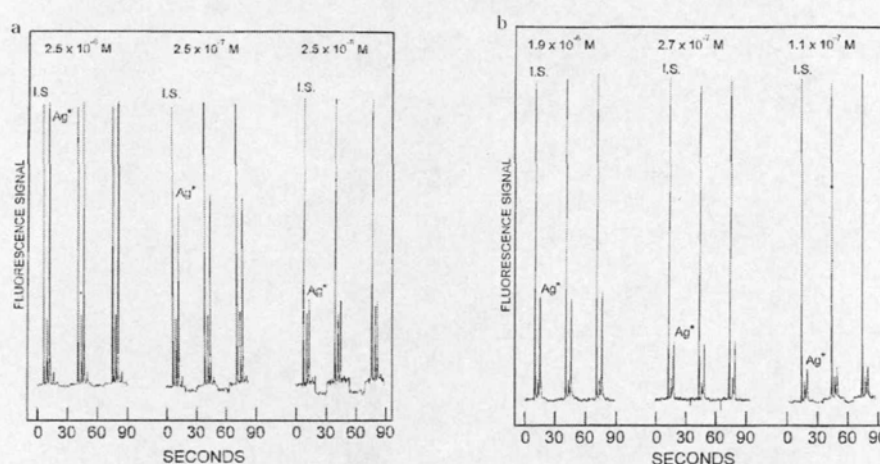


图1.2 芯片对三个不同浓度的可的松样品进行电泳分析的结果记录图^[7]。

(a) 可的松水溶液样品；(b) 可的松血清样品。

1997年, Chiem等^[9]分别采用均相免疫中的直接法和竞争法与芯片毛细管电泳结合实现了鼠腹水样品中抗BSA(牛血清白蛋白)抗体和血清中茶碱的测定。系统的芯片结构和工作原理见图1.3。采用直接法检测抗BSA抗体时,先在微离心管内将含有抗BSA的鼠腹水样品与荧光标记的BSA溶液(500 μL)混合,孵育15 min,发生免疫反应。将10 μL 反应后的产物溶液引入芯片上的样品池内,对标记抗原-抗体复合物和游离的标记抗原进行电泳分离,分离时间40 s。通过荧光检测到游离抗原信号的降低和抗原-抗体复合物信号的出现。系统对鼠抗BSA抗体的检测限为135 $\mu\text{g/mL}$,试样及试剂的消耗为数百微升,总分析时间约20 min。采用竞争法测定标准溶液及稀释血清中茶碱含量时,先在芯片外将含有不同浓度茶碱的标准溶液或稀释血清与荧光标记的茶碱抗原及抗茶碱抗体混合,孵育10 s。取反应后的产物溶液10 μL ,加入芯片上的样品池内进行分离、检测。

分离时间约 1 min。系统对未稀释样品中茶碱的线性检测范围为 2.5-40 $\mu\text{g/mL}$ ，稀释血清中茶碱的检测限为 1.25 ng/mL （图 1.4）。样品及试剂的消耗量为数十 μL 至 200 μL ，总分析时间约 1-2 min。该系统在孵育时间和分析时间上都有明显缩短，但样品及试剂的消耗较大，芯片外的操作仍依赖手工进行。

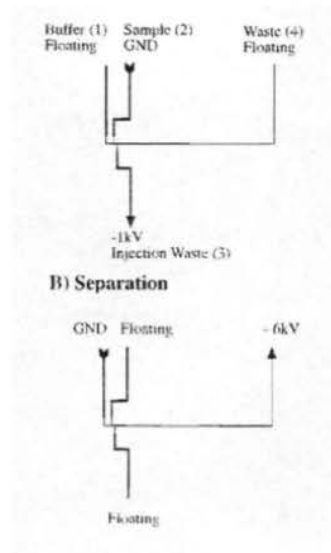


图1.3 免疫分析芯片结构示意图^[9]。

(A) 充样阶段；(B) 分离阶段。

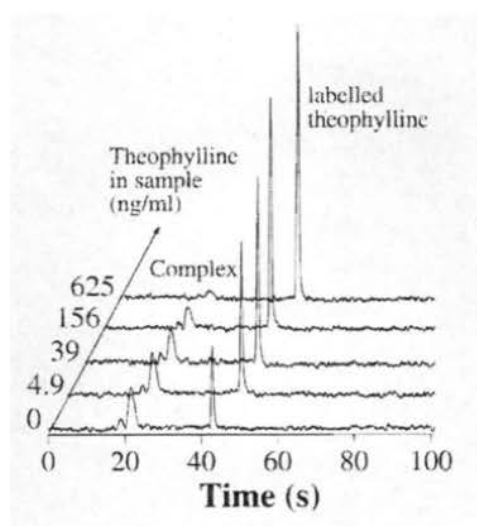


图1.4 芯片免疫分析系统得到的不同浓度氨茶碱测定的电泳图^[9]。

Mathies研究组^[12]在玻璃/聚二甲基硅氧烷（PDMS）芯片上加工了96条放射状的毛细管通道阵列，结构如图1.5所示。在芯片外将不同浓度的待测抗原TNT、荧光标记抗原TNT和抗TNT抗体混合、孵育进行均相竞争免疫反应。将反应后的

产物加入芯片上的样品池内,分别同时对多个TNT样品进行平行测定,电泳分离在2 min内完成,对TNT的检测限为1 ng/mL,检测线性范围达1-300 ng/mL。

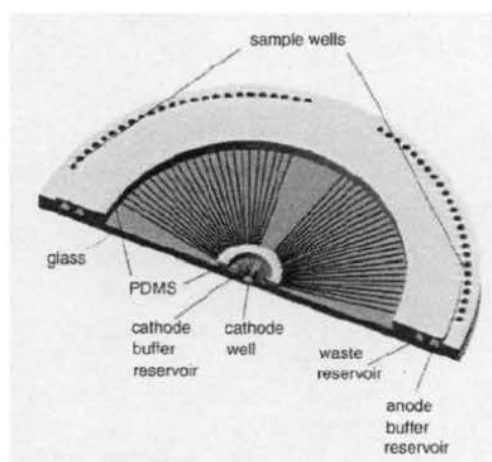


图1.5 毛细管阵列电泳芯片的结构示意图^[12]。

除采用芯片毛细管电泳分离及荧光检测外, Lim等^[13]采用芯片上阳离子交换树脂分离及电化学检测的方法测定了全血样品中的组胺含量。系统结构和工作原理如图1.6所示。系统采用聚丙烯酸甲酯(PMMA)芯片作为分析平台,微通道壁表面预先包被有阳离子交换树脂。先在PMMA芯片外将待测抗原组胺、BSA-组胺与Fc-IgG溶液混合孵育30 min,发生均相竞争免疫反应。然后将反应产物溶液在蠕动泵驱动下转移至PMMA芯片上的微通道内,通过阳离子交换树脂柱,使BSA-组胺/Fc-IgG免疫复合物与组胺/Fc-IgG免疫复合物及未结合的Fc-IgG分离。在电化学检测池内,BSA-组胺/Fc-IgG免疫复合物产生的电流通过集成在芯片上的电极进行检测,信号强度与样品中待测组胺含量成反比。该系统对全血中组胺的线性检测范围为200-2000 ng/mL。试剂及试样的消耗分别为10 μ L。信号检测仅需2 min,总分析时间约30 min。与传统的ELISA方法相比,该系统的样品及试剂消耗从300 μ L减少至10 μ L,分析时间从数小时缩短至30 min,操作过程简化,且无酶的副产物干扰测定。该系统采用阳离子交换柱进行免疫复合物的分离,为微流控芯片提供了不同于芯片毛细管电泳的另一种与免疫分析结合的分选技术。此外,系统通过在芯片上集成加工多个电极进行电化学检测,无需附加额外的大型检测设备,整个系统的体积只相当于一个信用卡大小,系统的集成化和便携化程度显著提高。

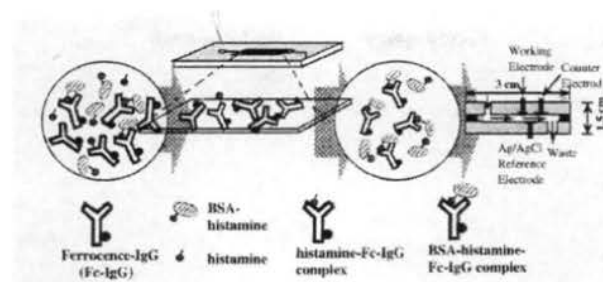
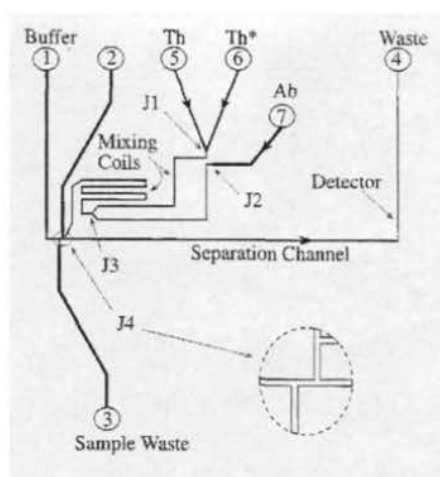


图1.6 阳离子交换树脂分离及电化学检测免疫分析芯片系统结构及原理图^[13]。

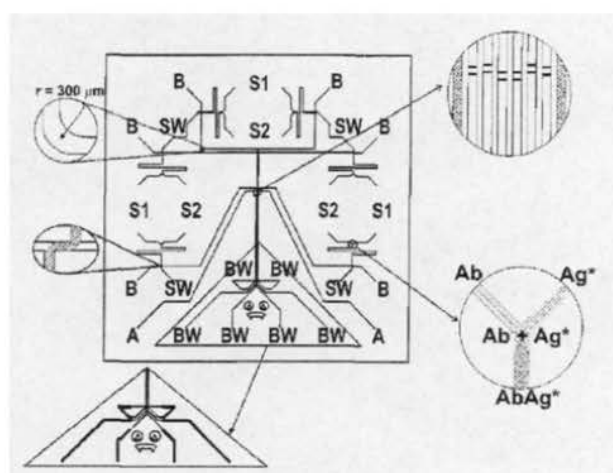
1.3.2 集成化微流控芯片免疫分析

此类微流控免疫分析系统的特点是在微流控芯片上同时实现了免疫反应和反应产物的分离，实现了系统的集成化。多数系统仍采用电动力驱动液流，以毛细管电泳为主要分离方法^[16-21]。

1998年，Harrison研究组^[16]首先将免疫反应和电泳分离过程同时集成在微流控芯片上，建立了集成化的均相免疫分析系统。系统在一个玻璃芯片上的微通道中集成了包括样品和试剂的引入、混合、免疫反应、结合的与游离的荧光标记抗原的电泳分离以及荧光信号的检测等多种功能，并应用于血清中茶碱含量的测定。图 1.7 为该系统芯片通道结构及功能集成示意图。试样和试剂充满各通道需要 2 min，在通道内混合耗时 2 min，免疫反应时间约为1.5 min，分离需1 min，总分析时间少于10 min。试样及试剂的消耗量为10 μL ，对血清茶碱的检测限为0.26 mg/L。与传统的免疫分析系统相比，分析时间、样品和试剂消耗均显著减少。更重要的是，该系统首次将液体混合、免疫反应与电泳分离及检测等所有分析步骤集成在一个微流控芯片上，系统的集成化、自动化程度与以往芯片系统相比显著提高。但该系统进行样品更换时，操作较为繁琐，需用注射器将样品池中的试样吸走，用6-10 μL 新的样品溶液清洗样品池三次，再加入8 μL 新试样溶液，需要30-120 s，不适于进行高通量分析。

图1.7 集成化免疫分析芯片结构示意图^[16]。

2001年,该研究组^[17]在前期单分析通道芯片的基础上,进一步在一块玻璃芯片上加工了六个平行分析单元,每个独立的分析单元都分别具有进样、混合、反应、分离等功能,可同时对多个样品进行平行反应和分离,并在检测区采用荧光扫描检测系统实现多个样品的同步检测。图1.8为该系统芯片流体通道结构示意图。利用该芯片,采用均相直接免疫分析法对抗雌二醇抗体进行了检测。可以在60 s内同步完成多个样品和标准品的混合、反应、分离和检测,大大缩短了分析时间,总分析时间不到2 min。多通道同时测定时,对抗雌二醇抗体的检测限为6.4 nM。图1.9为利用该系统对抗雌二醇抗体进行6通道同步分析的结果。该系统采用电渗驱动液流及电切换进样,操作简便、快速,进一步提高了系统的分析速度和通量。

图1.8 具有六个平行分析单元的微流控免疫分析芯片^[17]。

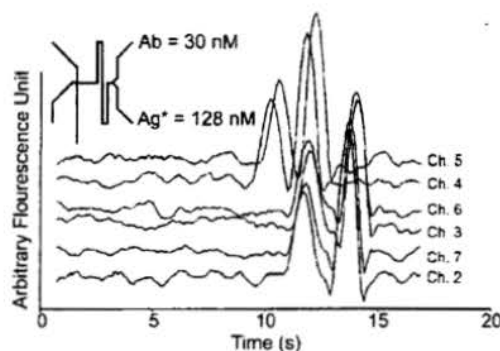


图1.9 对抗雌二醇抗体进行 6 通道同步分析的结果记录图^[17]。

除了对分离后的荧光标记抗原（或抗体）直接进行荧光检测外，Wang等^[18]采用碱性磷酸酶标记抗鼠IgG抗体，首次将柱前免疫反应与柱后酶反应同时集成在微流控芯片上，建立了集成化的均相酶免疫分析检测平台，用于鼠IgG的测定。图1.10为该芯片系统的结构示意图，系统将柱前的进样、混合、直接法免疫反应、电泳分离以及柱后的酶-底物反应和电化学检测等操作全部集成在一个玻璃芯片上。在试剂池中加入酶标记的抗鼠IgG抗体（Ab-E），在试样池中加入待测的鼠IgG（IgG），采用电动切换，将酶标记抗体和待测抗原引入反应池混合并发生直接免疫反应，反应后的产物溶液通过电切换和驱动进入分离通道，抗原-酶标抗体免疫复合物与游离的酶标抗体在通道中进行电泳分离，游离抗体和抗原-抗体复合物的迁移时间分别为125 s和340 s。分离后，通过底物池引入酶反应底物4-氨基苯磷酸盐与酶标抗体或酶标免疫复合物混合反应，生成4-氨基苯酚，在分离通道下游采用安培法检测该产物，得到游离的酶标抗体和酶标免疫复合物的两个峰，完成对待测抗原鼠IgG的定量分析。系统对模拟样品中鼠IgG的检测限为 2.5×10^{-16} g/mL。利用酶对底物的催化作用检测抗原和抗体的结合反应，是一种常见的免疫分析方法。该系统首次实现了柱前免疫反应和柱后酶反应在微流控芯片上的集成，使微流控均相免疫分析的范围进一步扩展到酶免疫分析领域。系统采用电动液流操控方法，操作简便、快捷。采用电化学检测，无需额外附加大型检测仪器，有利于减小系统的体积。

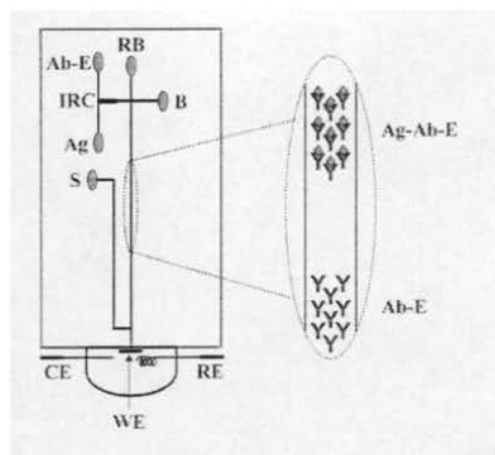
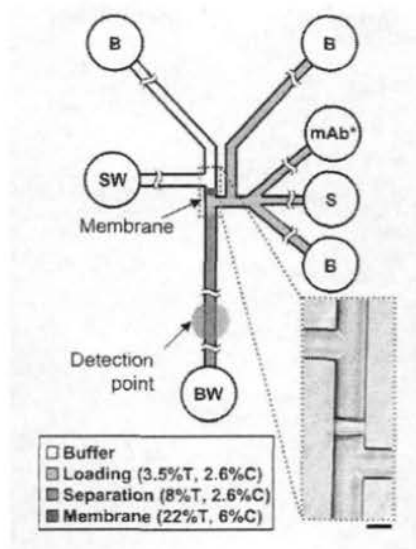


图 1.10 集成柱前免疫反应、柱后酶反应和电化学检测的微流控芯片^[18]。

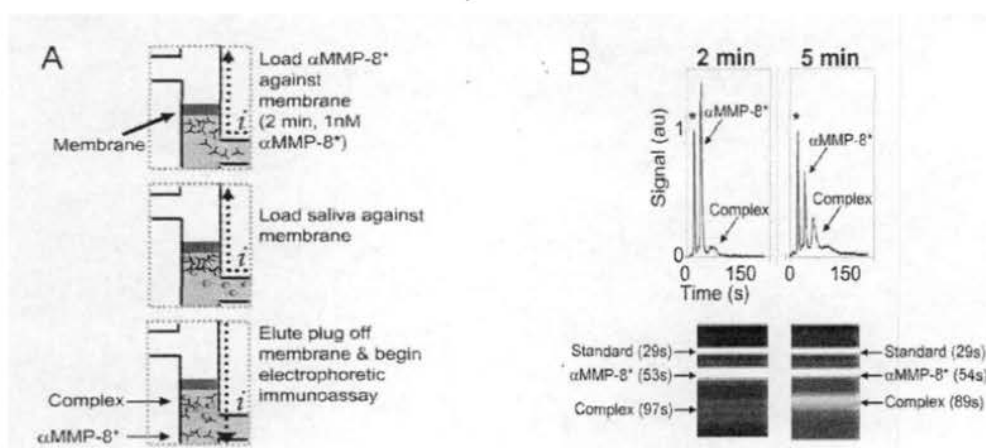
RB: 缓冲液; Ab-E: 酶标记抗体; Ag: 抗原; S: 底物; IRC: 免疫反应池;

RE: 参比电极; CE: 对电极; WE: 工作电极; B: 未用储液池。

传统免疫分析时间通常需要数小时, 分析检测时间的长短主要取决于抗原、抗体的孵育和反应时间。Herr等^[19]在芯片通道中加工特殊的膜结构, 在膜上进行样品和试剂的过滤、富集和免疫反应, 以提高抗原和抗体的混合和反应效率。该系统将样品的预处理(过滤、富集、混合)、抗原抗体反应、电泳分离集成在一个玻璃芯片上, 并直接在管道中进行荧光检测, 建立了一个快速检测人唾液中口腔疾病生物标志物MMP-8的系统。图1.11为该系统芯片结构示意图。图1.12为通道中样品的富集和反应的操作原理示意图(A), 以及标记抗体和免疫复合物的电泳分离结果记录图(B)。将荧光标记抗MMP-8抗体、MMP-8样品、缓冲液等分别加入芯片上相应的储液池内, 通过电压切换引入并驱动样品溶液和标记抗体溶液至通道内膜结构处富集、混合、反应, 形成抗原-抗体免疫复合物。在电压切换控制下, 免疫反应产物进入凝胶电泳通道完成游离的标记抗体与免疫复合物的分离, 并在分离通道的下游直接进行荧光检测。该系统可以在10 min内对唾液中的MMP-8进行分离和检测, 检测限约130 ng/mL, 试样消耗为20 μ L。检测结果与经典金标准ELISA方法之间有很好的-一致性($r^2=0.979$), 但显著缩短了分析时间, 简化了操作过程, 试样和试剂消耗亦明显减少。

图1.11 集成化免疫分析芯片结构示意图^[19]。

S: 样品; B: 缓冲液; SW: 样品废液池; BW: 缓冲液废液池; mAb*: 荧光标记抗体。

图1.12 (A) 样品富集和反应操作原理示意图；(B) 标记抗体和免疫复合物的电泳分离结果^[19]。

2003年, Kennedy研究组^[20]采用竞争免疫反应及毛细管电泳分离原理建立了一个微流控芯片均相免疫分析系统, 对活体胰岛的胰岛素分泌进行了实时监测。每间隔15 s进样一次, 对胰岛素的检测限达3 nM。2007年, 该研究组^[21]更进一步在玻璃芯片上设计了四组独立的单元结构, 分别将单个胰岛固定于样品池内, 采用压力驱动葡萄糖溶液持续灌注, 刺激胰岛不断分泌胰岛素, 采用电渗驱动将含有胰岛素的灌注液、荧光标记胰岛素及抗胰岛素抗体溶液引入反应通道进行混合和竞争免疫反应60 s。每间隔6.25 s进样一次, 在分离通道内对结合和游离的标记胰岛素进行分离, 在分离通道的下游通过荧光扫描共聚焦显微镜对各个通道内的

荧光信号进行平行检测,装置的结构示意图如图1.13所示。系统对胰岛素的检测限为10 nM,在40 min内对四个胰岛的胰岛素释放进行了平行监测,共完成了超过1450次的免疫测定。

虽然微流控芯片均相免疫分析系统具有无需清洗、操作步骤少等优点,但电泳分离效率受样品基体的影响较大,有时不能实现有效分离。而且,只有当免疫复合物与游离抗原或抗体的电泳迁移速率明显不同时,才能使用电泳分离。如果分析物是蛋白质或大分子,抗原-抗体复合物可能形成沉淀或多种复合物,也会影响分离效果。因此,上述系统在实际应用中存在一定的局限性。

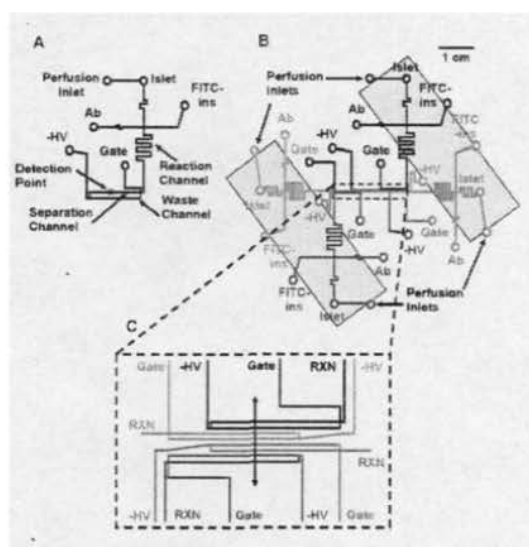


图1.13 对四个胰岛分泌胰岛素进行实时监测的微流控芯片中微通道结构示意图^[21]。

(A) 一组独立的通道网络结构示意图(所有通道为9 μm 深);(B) 完整的芯片设计(阴影部分为芯片下面的加热器);(C) 门式进样和检测区域的局部放大图,所有分离通道相互平行,采用激光扫描对四个通道内的信号进行平行荧光检测。

1.4 微流控芯片非均相免疫分析

与均相免疫分析中免疫复合物和游离的抗原或抗体始终处于同一相不同,非均相免疫分析需在检测前将抗原-抗体复合物固定在固相载体表面与其它反应物分离。因此,非均相免疫分析可以通过抗原-抗体反应使待测抗原(或抗体)从稀溶液中浓缩至固相载体表面,对待测抗原(或抗体)具有富集作用。与均相免疫分析方法相比,非均相免疫分析方法具有更高的灵敏度和更低的检测限,加之没有均相免疫分析如前所述的局限性,适用范围广,在临床检验中发挥着非常重要的作用,尤其是非均相免疫分析方法中的ELISA,其操作通常在96孔板上进行,

是临床检验工作中最常用的免疫分析方法,广泛地应用于蛋白质和多肽的检测和定量分析。典型的ELISA操作过程包括混合、反应、孵育、清洗等一系列的步骤,通常采用手工方法完成,劳动强度大、繁琐费时。同时,操作所需的孵育时间较长,完成一个分析过程常常需要数小时甚至两天的时间。尽管免疫反应本身是一个快速的过程,但在常规96孔板内抗原或抗体从溶液中传输到固相表面的效率较低,是导致孵育时间长的最主要原因。

微流控非均相免疫分析系统通常是将抗体(或抗原)固定在微流控芯片中的固相载体表面,实现抗原-抗体复合物与游离抗原或抗体的分离。但传统的非均相免疫分析(如ELISA)系统相比,微流控芯片系统的样品及试剂的消耗从100~300 μL 减少到数 μL ,更重要的是分析时间从数小时或十几小时缩短至几十分钟甚至几分钟。该效应归因于微通道内高效的传质效应。

1999年, Schult等^[22]首先建立了基于PMMA芯片的非均相免疫分析系统,用于人血清中绒毛膜促性腺激素(hCG)和茶碱的测定。在芯片外进行抗原和抗体的混合、反应,反应完毕后,将反应混合物引入芯片通道内的传感器表面,进行游离的标记抗体与免疫复合物的分离和检测。因此从严格意义讲,该系统尚属不完全的微流控芯片非均相免疫分析。但与传统非均相免疫分析系统相比,总分析时间明显缩短至10 min,试样及试剂消耗亦有所减少,显示出微流控技术与免疫分析相结合的巨大优势和发展潜力。

微流控芯片非均相免疫分析系统中,目前主要采用两类固相载体,一类是直接利用芯片微通道作为固相载体,包被抗体或抗原;另一类是在芯片通道中填充固体微珠,以微珠作为固相载体,在微珠表面包被抗体或抗原。此外,电极表面、传感器表面、凝胶等亦可作为固相载体。

1.4.1 芯片微通道壁作为固相载体

微流控芯片通道壁是最为常用的固相载体。其特点是芯片结构较为简单,具有较高的比表面积,反应后可直接进行荧光检测,操作简便,且具有较高的灵敏度。抗体(或抗原)在管壁上的固定方法主要有直接物理吸附法^[23-38]和共价键结合法^[39-44],还可以利用分子间高选择性的亲和作用来固定抗体^[22, 45-51]。利用疏水作用可将抗体直接固定于管壁,但是由于其构象发生改变,反应性减弱,有时需要对固相载体表面进行表面改性。为了减少蛋白质分子和小分子在管壁的非特异性吸附,必须对包被有抗体(或抗原)的固相载体表面进行封闭处理,有时亦需

要预先对载体表面进行表面修饰^[42, 55], 以达到免疫分析的要求。

1.4.1.1 物理吸附固定抗体(或抗原)

2001年, Rossier等^[23]将碳电极嵌在芯片微通道壁内, 在通道表面通过物理吸附固定抗体, 利用双抗体夹心法进行酶免疫分析及电化学检测, 实现了ELISA操作, 芯片结构如图1.14所示。该系统以大的蛋白复合体D-Dimer (D-二聚体, 是血液凝固机制中一种重要成分)作为待测抗原。采用手工操作将试样、清洗液、酶标记抗体、底物等依次加入储液池, 在通道出口采用负压抽吸驱动液流将上述试样及试剂顺序引入反应通道进行抗原与抗体的孵育反应、在固定抗体表面形成免疫复合物、酶催化底物反应以及电化学检测。由于微通道具有较高的比表面积, 且免疫试剂的扩散距离较小, 免疫反应每一步的孵育时间仅为5 min, 总分析时间为20 min。样品及试剂消耗仅为10 μL 。该工作是第一篇在微芯片上采用电化学检测进行快速和定量ELISA的报道, 并且实现了系统的芯片集成化。

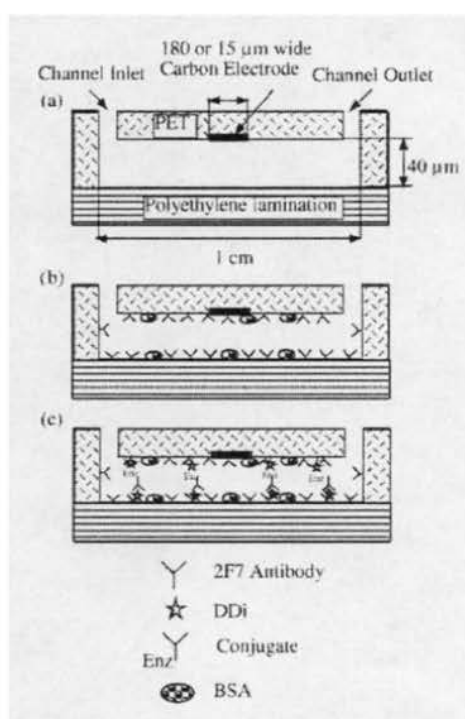


图1.14 D-二聚体ELISA芯片分析原理示意图^[23]。

(a) 抗体固定之前; (b) 通道表面吸附抗体及进行封闭之后; (c) 捕获样品中的D-二聚体及结合酶标记抗体 (HRP-抗体), 形成双抗体夹心免疫复合物。

Whitesides研究组^[24]在PDMS芯片的通道壁通过物理吸附固定抗体((羊抗人血红蛋白抗体)), 采用电穿孔技术 (Electrical breakdown) 和注射泵驱动液流将

酶标记抗体和酶催化底物依次引入反应通道,在微流控芯片上完成了人血红蛋白的ELISA测定。图1.15为PDMS芯片通道结构示意图。检测分析时,分别从芯片上的储液池3和4依次将捕获抗体、封闭试剂和试样及清洗液引入至通道内的检测池,进行抗体的固定、载体表面的封闭和捕获待测抗原,然后分别在液池1、2加高电压,液池3、4接地,通过电穿孔技术(-1 kV pulse for 1s)在连接液池3和4的通道壁上各打一个孔,采用微注射泵压力驱动将酶标记二抗和酶底物通过小孔顺序引入反应池,完成微通道内的ELISA测定,检测池内的荧光强度与待测抗原浓度成正比。检测结果如图1.16所示。抗体包被1小时,封闭30 min,总分析时间约2.5小时,试样及试剂的消耗为50 μL 。该系统采用电穿孔技术引入试剂,作用类似微阀,但芯片上无需加工微阀;同时该设计还可以减少试剂间的相互污染。但该系统试剂和试样的更换仍主要采用手工操作,并需要附加两个注射泵及高压电源,操作不够简便。

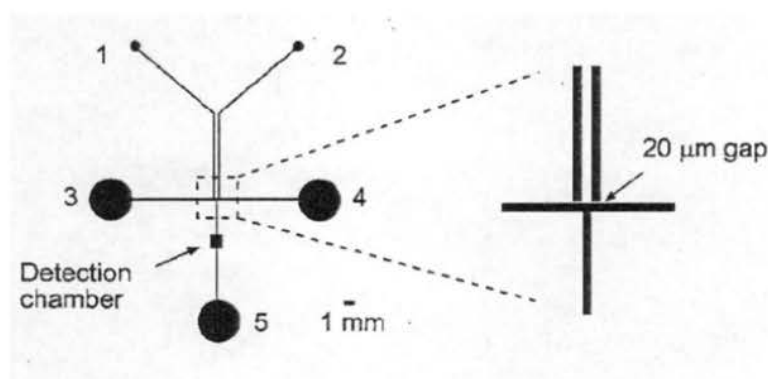


图1.15 用于ELISA的芯片通道结构示意图^[24]。

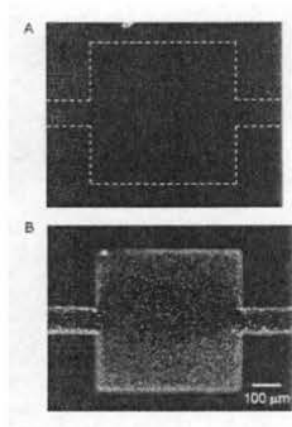


图1.16 人血红蛋白ELISA测定结果^[24]。

(A) 阴性对照实验,检测池内无荧光;(B) 含200 ng/mL血红蛋白样品,检测池内可见荧光信号。

自2001年起, Delamarche 研究组^[27-32]研制了多种微马赛克免疫分析 (Micromosaic immunoassay) 芯片。芯片通常由一个刻蚀有多条微通道的硅芯片和一个PDMS基片组成。测定前, 先在PDMS基片上固定多条相同或不同抗体(或抗原)的条带。测定时, 待测抗原(或抗体)的流动通道与固定条带相互垂直。由于待测物与固定条带的特异性反应, 在芯片上形成了马赛克形的结构。有免疫反应发生的地方即可检测到荧光信号, 实现了多样品、多指标的免疫分析, 微马赛克芯片结构示意图如图1.17所示^[27]。

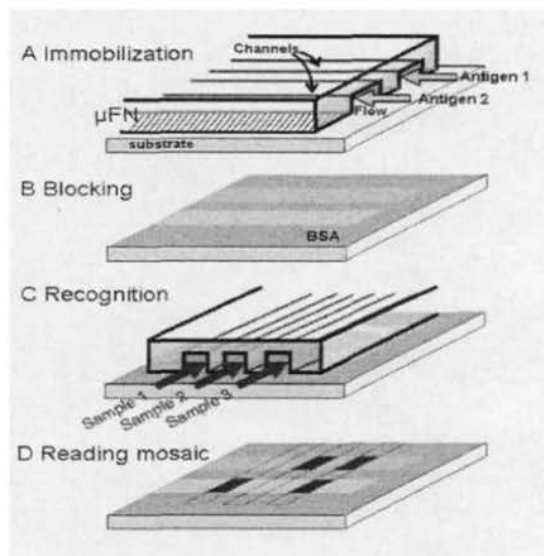


图1.17 微马赛克免疫分析芯片结构和工作原理示意图^[27]。

利用该芯片对蛋白A与八种不同种别来源的IgG之间的特异性相互作用进行了验证, 结果如图1.18所示。该系统的试剂消耗量仅为 $1\ \mu\text{L}$, 抗原-抗体反应仅需3 min, 尤其孵育时间仅需数秒至数分钟, 总分析时间为20 min。系统利用毛细力驱动液流, 无需附加其它的压力驱动装置, 简化了系统结构。但该系统仅在芯片上采用直接法对蛋白A和IgG之间的相互作用进行了验证, 尚未实现完整的ELISA中的典型的多步操作。

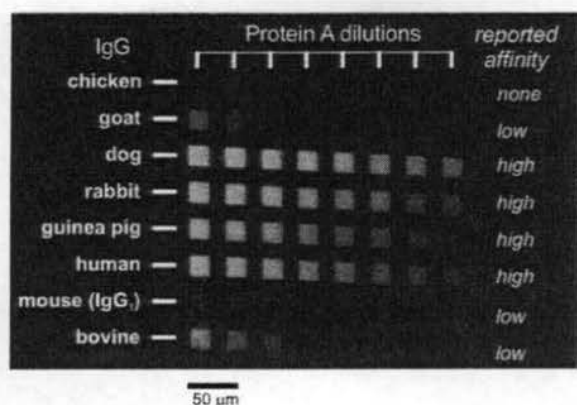


图1.18 蛋白A和不同种源IgG之间亲和力实验结果荧光照片^[27]。

在上述工作的基础上,该研究组增加了硅芯片上的通道数目,且每条通道各自具有独立的通道系统,分别由储液池、微通道和毛细作用泵组成,液流的驱动和流速通过毛细及蒸发作用控制,在微芯片上建立了双抗体夹心免疫分析系统^[28],如图1.19所示。系统对肿瘤坏死因子(TNF- α)进行了高灵敏荧光检测,检测限达到 ~ 20 pg/mL,试样及试剂的消耗量仅为600 nL。该系统采用具有11或17个通道系统的芯片,在PDMS芯片上可以形成最多 17×17 (289)个作用位点的马赛克状荧光点阵,如图1.20所示。与前期工作相比,系统集成度有所提高,检测通量变大。

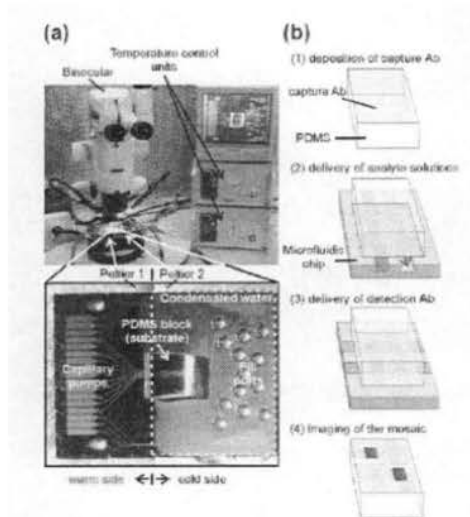


图 1.19 (a) 双抗体夹心免疫芯片分析系统; (b) 系统工作原理示意图^[28]。

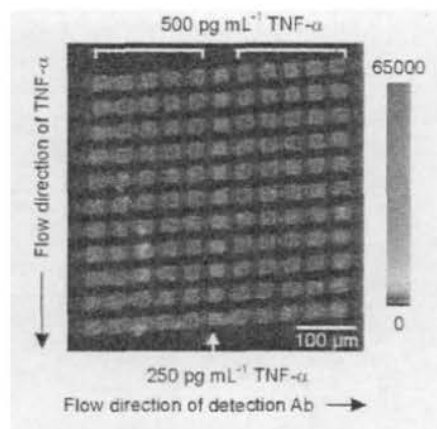


图1.20 双抗体夹心免疫芯片分析系统检测TNF- α 的荧光照片^[28]。

此外,该研究组还在微马赛克免疫分析芯片上采用双抗体夹心法,通过吸水纸或毛细作用泵驱动液流,对人血清中C-反应蛋白(CRP)的含量进行了检测^[29, 30],检测限分别为30 ng/mL和0.9 ng/mL,样品消耗仅1 μ L,分析时间约10 min。上述微马赛克免疫芯片分析系统实现了多样品、多指标的免疫分析,但系统仍然依靠手工操作(移液器)方式将试验所需的试样、试剂依次加入储液池,在进行高通量免疫分析中显得繁琐费时,自动化程度有待进一步提高。

2006年,Hosokawa等^[33]利用空气在PDMS中溶解度高和扩散速度快的特性,研制了一个无动力顺序注射非均相免疫分析芯片系统。PDMS/玻璃芯片微通道结构如图1.21所示。先将捕获抗体通过物理吸附固定在微通道内壁,将通道内空气抽出并用透明胶带封闭PDMS盖片表面,使微通道内形成负压以提供对液流的驱动力。抽气1-4 min后用微量移液器将试样、荧光标记抗体或抗原、清洗液等一系列溶液依次顺序加入通道入口处的储液池内,无需外加压力泵等额外设备,即可将一系列溶液顺序引入微通道,完成非均相竞争法和双抗体夹心法免疫分析的多步操作。该系统以兔IgG和人CRP为模型分析物,采用荧光法检测,检测限分别为0.21 nM和0.42 nM,试剂和试样消耗仅为0.5-1 μ L,抗原-抗体反应孵育时间6 min,总分析时间为20 min(包括抗体固定时间)。该系统结构简单,使用方便,无需外加动力驱动,检测快速,灵敏度高,成本低,尤其适于一次性使用。如果与便携式检测器组合可望应用于临床床旁检测领域。2007年,该研究组在前期工作基础上,提出叠层树状信号放大(LBLDA)技术,通过逐级放大荧光信号的方法,进一步提高检测灵敏度。系统对人CRP的检测限降低为0.15 pM,达到与经典ELISA方法相当的水平^[34]。

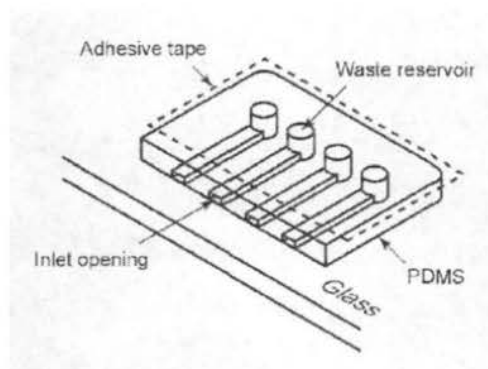


图1.21 顺序注射非均相免疫分析微芯片结构示意图^[33]。

Kurita等^[35]在PDMS/玻璃微芯片上的反应通道表面固定抗原，捕获免疫反应后溶液中过量的游离酶标抗体，引入底物经酶催化生成带巯基的产物，共价结合于检测通道内的金膜表面，利用表面等离子体共振技术进行实时监测，实现了对心力衰竭标志物 - BNP的痕量分析（如图1.22）。分析时间为30 min，检测范围为5 pg/mL-100 ng/mL。该系统便携、安全、灵敏度高，在现场分析应用方面，优于基于荧光或同位素检测的商业化免疫分析系统。

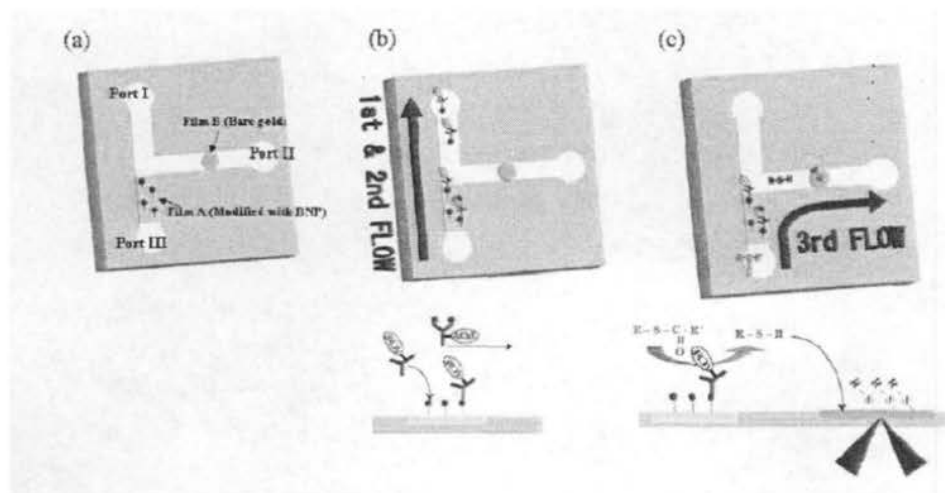


图1.22 对BNP进行非均相竞争法酶免疫分析的芯片结构和工作原理示意图^[35]。

Whitesides研究组^[37]在PDMS/玻璃芯片的微通道壁表面通过物理吸附固定抗体，在通道上加工TWIST阀控制通道内的液体的流向，建立了非均相免疫分析芯片系统。芯片的结构如图1.23所示。该系统采用双抗体夹心法对人血清中IgA和

IgG进行了测定。预先在检测区的通道内壁表面固定抗体,经清洗和封闭后,通过注射器分别从通道入口处引入样品血清(人IgA和IgG),然后打开相应的微阀,采用负压分别从储液池依次引入酶标记二抗及酶催化底物,在通道检测区形成双抗体夹心免疫复合物,并进行酶的催化反应生成荧光产物,采用荧光显微镜对荧光信号进行检测。该系统在芯片上加工了多个TWIST阀,通过阀的开闭在微芯片上完成了ELISA中一系列试样及试剂的顺序更换,提高了对液体的操控能力。但阀的开闭依然需手工进行,每一步液体的驱动也需依靠外加压力驱动。系统对试样及试剂的消耗为200 μL ,与常规ELISA系统接近。

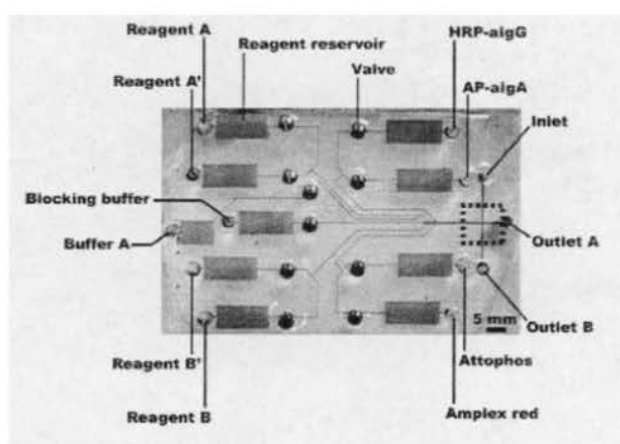
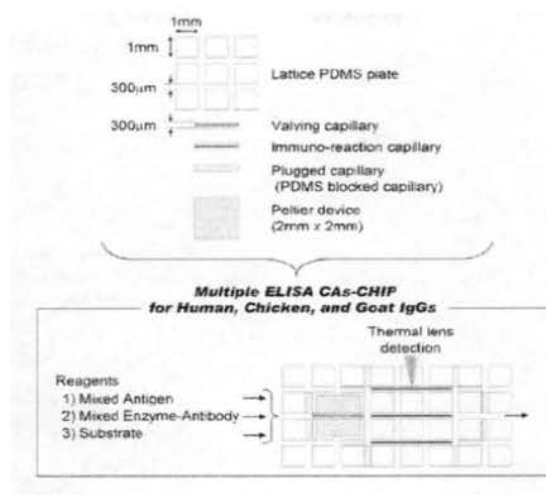


图1.23 人IgA、IgG双抗体夹心免疫分析微流控芯片系统^[37]。

储液池A、A'、B、B'和缓冲液池A未用于该测定;虚线内为芯片的反应和荧光检测区域。

Henares等^[38]将不同的抗IgG抗体(人、羊、鸡)分别固定在不同的毛细管内壁表面,再把毛细管嵌入PDMS芯片内,同时在芯片内嵌入热敏毛细管作为“阀”,通过“阀”的开关实现流体控制,采用热透镜进行检测,建立了一个多指标ELISA微流控芯片,完成了人、羊、鸡IgG的多元免疫检测(如图1.24)。系统试剂及试样的消耗约20 μL ,酶反应时间仅为30 s,总分析时间约30 min。该系统采用在不同的毛细管内固定不同的抗体,实现了多样品、多指标的同步分析。但热敏阀的响应时间较慢,打开或关闭阀约需要5-10 s。

图1.24 多指标检测ELISA毛细管-芯片系统结构示意图^[38]。

1.4.1.2 通过共价键合固定抗体

将抗体通过共价键合固定在通道壁上，可以提高抗体在固相载体表面的固定化效率，有效地减少蛋白质在微通道壁表面的非特异性吸附，提高系统的分析性能^[39-44]。

Yu等^[43]在PDMS基片上设计加工了多组微通道单元，可对人血清样品中的IL-5、HBsAg和IgG进行同步免疫检测。芯片的结构示意图如图1.25所示。芯片使用前，先引入硅烷化试剂对微通道内壁进行硅烷化处理，再引入右旋糖酐对通道壁进行表面修饰以改善通道壁表面的亲水性。然后，将不同的抗体分别引入各自的微通道内，通过与右旋糖酐结合固定在通道内壁表面。分析时，依次将样品溶液、清洗液、酶标记的检测抗体、清洗液和底物液从通道入口顺序泵入各微通道的检测池内，进行免疫反应、清洗、酶反应，对生成的蓝色产物进行比色测定。该系统检测限为100 pg/mL，试剂及样品消耗约数十微升，总分析时间在1小时以内。该系统采用右旋糖酐与抗体结合的方法固定抗体，改善了通道壁表面的亲水性，提高了通道壁表面固定抗体的效率，系统的灵敏度显著高于已报道的疏水的和经血浆处理的PDMS微流控免疫分析装置。

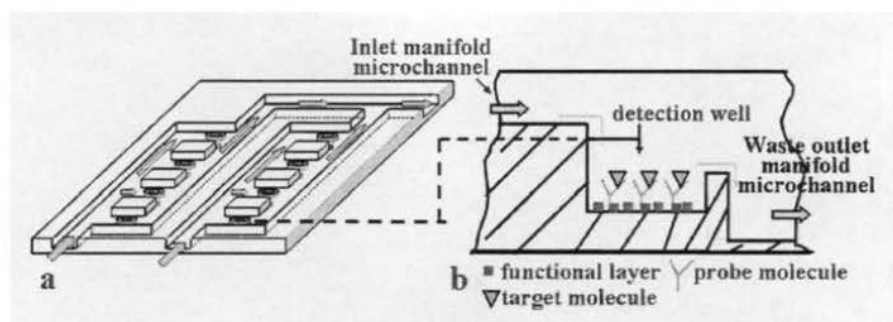


图 1.25 ELISA 微流控芯片结构示意图^[43]。

Sui等^[44]采用硅烷化试剂对PDMS芯片的通道内壁进行硅烷化处理,在修饰过的通道内壁上固定前列腺癌生物标志物(PSCA),依次引入不同浓度的抗PSCA抗体(待测指标)和荧光标记的二抗,进行非均相间接免疫反应和荧光检测。采用该方法对三个不同浓度的抗PSCA抗体进行了测定,系统工作原理及检测结果如图1.26所示,对抗PSCA抗体的检测限达1.0 nM。

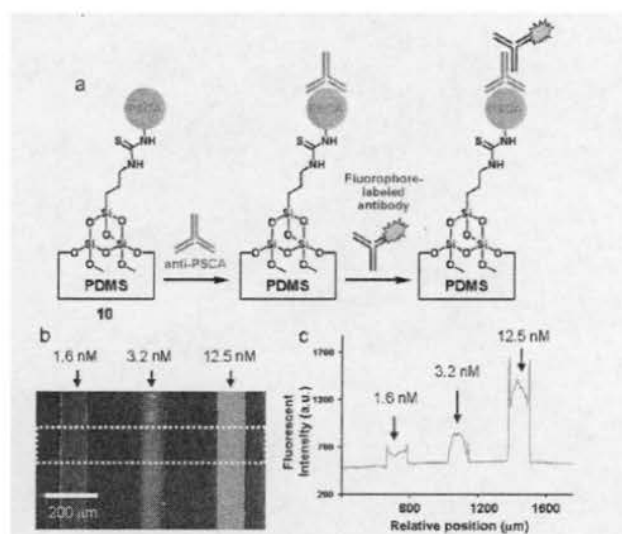


图1.26 PDMS芯片免疫分析原理示意图及检测结果^[44]。

(a) 系统工作原理; (b) 1.6, 3.2和12.5 nM 的样品测定结果。

1.4.1.3 其它抗体固定化方法

利用蛋白A与特定的IgG亚群之间^[45-48]以及生物素与中性抗生物素蛋白之间^[22,49-51]的高亲和性和高选择性,可以将抗体间接地固定在通道壁上,以降低非特异性吸附对系统分析性能的影响。

Dodge等^[45]在玻璃芯片微通道局部固定一层蛋白A,在芯片内部形成免疫反

反应室（体积 165 μL ），利用蛋白 A 与兔 IgG 之间的高亲和性和高选择性，进行非均相免疫分析。先对通道局部的免疫反应室进行硅烷化处理，然后将蛋白 A 溶液引入反应室将其固定在反应室内壁表面。此种抗体固定方法避免了直接将抗体固定在通道壁上其活性位点不能充分暴露在外的缺点，提高了检测灵敏度。该系统采用电动切换方法顺序引入所需的试样及试剂，避免了繁琐的手工操作（如图 1.27）。系统被应用于直接法和竞争法测定兔 IgG。

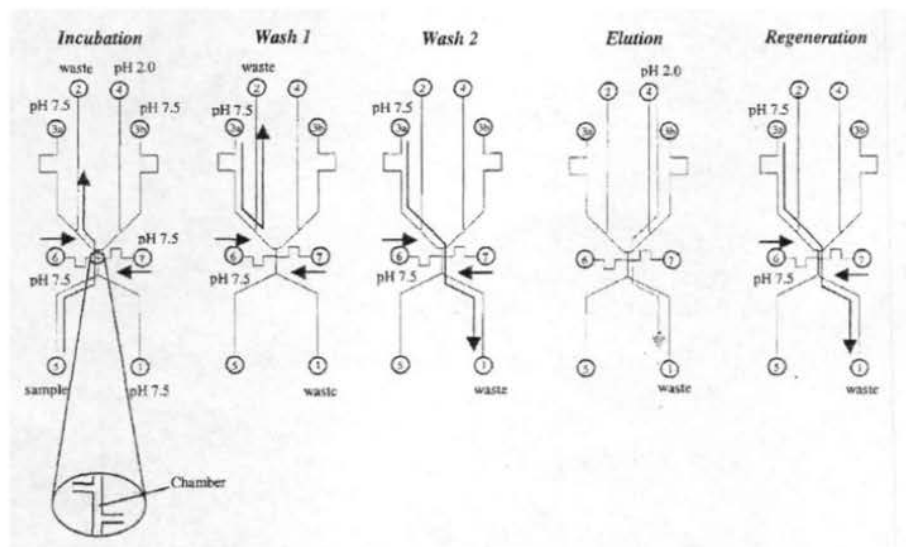


图1.27 直接非均相免疫分析芯片工作原理^[45]。

Linder等^[49]利用生物素与抗生物素蛋白之间的高选择性结合，采用所谓“三元亲和系统”（Ternary affinity system）在通道表面建立基于生物素-中性抗生物素蛋白-生物素（Biotin-neutravidin-biotin）的夹心包被体系，对芯片通道表面进行修饰。通过对比荧光物质在“三元亲和系统”涂覆处理前后通道壁表面的吸附现象，证实了采用该方法对通道壁进行表面修饰后明显减少，甚至基本消除了蛋白质在通道壁上的非特异性吸附。他们还利用该方法在PDMS芯片上固定抗体，采用简单的十字形通道、电动驱动及切换液流，对人血清中IgG进行了非均相竞争免疫分析^[50]。系统对人血清中IgG检测限为6 mg/mL 。试样和试剂的消耗为200 μL 。

此外，采用磷脂双层膜（SLB）^[52-54]、纤维素膜^[55]等对通道壁进行表面修饰，可以提高抗体结合效率，减少通道壁对蛋白质的非特异性吸附，提高系统的检测灵敏度。Dong等^[53]将卵磷脂双层膜修饰于PDMS芯片的通道壁表面，并在该膜的

表面再涂覆一层链球菌抗生物素蛋白加强该膜的稳定性,然后将生物素-包被抗体混合物引入通道,利用生物素与链球菌抗生物素蛋白的高度亲和性使抗体固定在通道壁表面。该系统用于牛奶中葡萄球菌肠毒素B (SEB) 的夹心法免疫分析。结果显示,蛋白质的非特异性吸附减少了100-1000倍,SEB的检测限达到0.5 ng/mL。

1.4.2 微珠作为免疫分析的固相载体

在微流控免疫分析系统中,采用微珠作为抗体(或抗原)的固定化载体,与利用通道壁作为固相载体相比具有独特的优势。微珠作为固相载体,比表面积增加更为明显,能提供更多的活性位置。微珠在微通道等微环境中易于分散,能有效地减少样品扩散到固相载体表面的距离和时间,从而提高免疫反应效率,缩短免疫反应的温育时间,加快免疫分析速度。在两次分析之间可以非常简便、快速地引入新的微珠进行固相系统的更新。采用磁性微珠,可以通过磁场对其进行方便的操控,这一特点尤其适用于从大体积样品中捕获微量的待测抗原。微珠表面可采用不同的修饰方法,引入不同的官能团,固定不同的抗体或其它分子。但微珠作为抗体的固相载体,亦存在一些不足。如微珠容易在通道壁和电极表面发生吸附,对膜和孔隙结构可能产生阻塞,对检测光有散射等,对其应用产生了一定的限制作用^[56]。

作为固相载体的微珠分为非磁性微珠和磁性微珠,非磁性微珠包括聚苯乙烯微珠^[57-65]、硅珠^[66]、凝胶微珠^[67-70]等;磁性微珠包括微米级磁珠和纳米级的超顺磁性纳米粒子^[71-84]。采用非磁性微珠作为固相载体时,微流控芯片需要加工用于拦截微珠的微堰或其它特殊结构,使微珠停留在微通道中,因此需要较高的微芯片加工技术。

1.4.2.1 非磁性微珠固相载体

2000年,Kitamori研究组^[57]采用聚苯乙烯微珠作为抗体的固相载体,建立了第一个微流控芯片非均相免疫分析系统。在石英芯片上加工了带有微堰的结构,将包被有免疫球蛋白A (s-IgA) 的聚苯乙烯微珠截留在微堰处,通过多个注射泵和微阀的配合将胶体金结合的抗体引入通道与微珠上的s-IgA反应,并被固定在微珠上,通过热透镜显微术 (Thermal lens microscopy) 进行检测。该系统芯片结构及工作原理如图1.28所示。与传统的在多孔板中进行的非均相免疫分析相比,该系统利用微珠表面作为固相载体,在微珠表面进行免疫反应,显著增加了

抗原和抗体反应的界面,同时明显缩短了扩散距离,使抗原、抗体反应达到平衡所需的时间从10-20小时缩短至仅需10 min。系统的敏感性亦优于传统方法,同时明显减少了试剂的消耗。此外,该系统所有的反应和清洗操作步骤均采用外置多个注射泵配合微阀切换,将所需的试样和试剂顺序引入微通道围堰处,避免了传统免疫分析方法中一系列繁琐费时的手工操作。

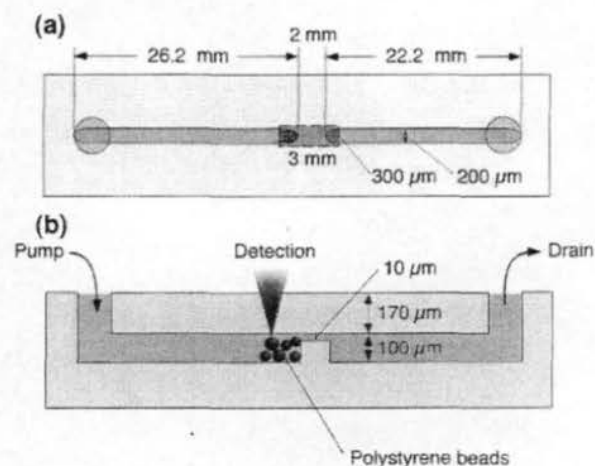


图1.28 基于微珠的非均相免疫分析芯片^[57]。

(a) 芯片俯视图; (b) 芯片侧视图。

在此基础上,该研究组进一步将该系统用于血清中大肠癌标记物—癌胚抗原(CEA)的夹心法免疫分析^[58],分析原理如图1.29所示。检测了13个病人的血清样本,结果与传统ELISA方法高度一致($r = 0.917$),且总分析时间缩短至常规方法的1%,即从45小时缩短为35 min。该方法具有很高的选择性和灵敏度,实现了CEA的超痕量测定,检测限比传统的ELISA方法降低十几倍。

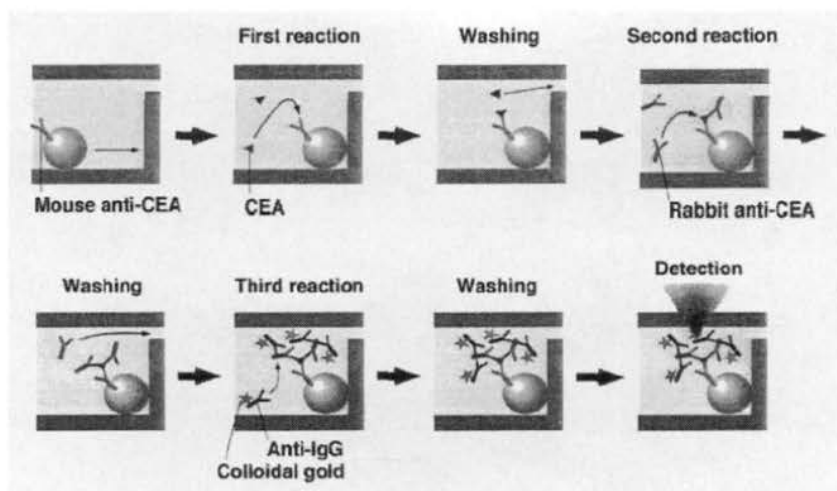


图1.29 基于微珠的夹心法免疫分析芯片工作原理示意图^[58]。

在单样品分析的基础上,该研究组将芯片上的单通道设计改为多通道网络,建立了可对多个样品进行同步分析的芯片系统^[59],如图1.30。芯片设计了树枝状的多通道结构,包含4个反应区和检测区域,仅需在共同出口配备一个注射泵即可同时完成4个样品和不同试剂的顺序引入。采用该系统对四个血清样品中的干扰素- γ (IFN- γ)进行了同步检测,检测限为0.01 ng/mL,通道间的信号误差小于10%。前期研究中一个样品的分析时间为35 min,该系统检测4个样品仅需50 min。

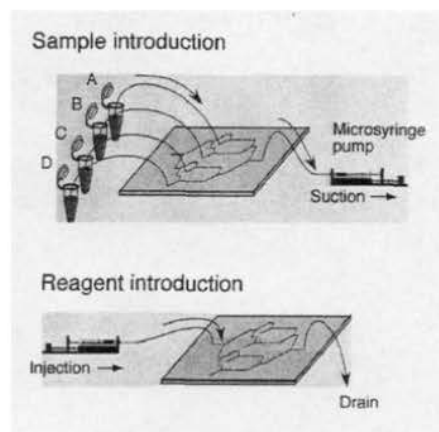


图1.30 基于微珠的非均相免疫分析系统的液体控制^[59]。

该研究组还建立了基于微珠的ELISA芯片分析系统(结构如图1.31),用于干扰素- γ (IFN- γ)的检测^[60],在玻璃芯片上设计了带有围堰的Y型通道结构,将包被有抗IFN抗体的微珠悬液引入微通道且固定在围堰处,然后通过外置微注射泵依次将样品和试剂溶液泵入微通道至微珠处,抗原和抗体充分反应后,再泵入酶

底物溶液,酶反应产物随缓冲液流过围堰,在通道下游采用热透镜检测器进行检测。检测限为0.1 ng/mL,总分析时间为35 min。

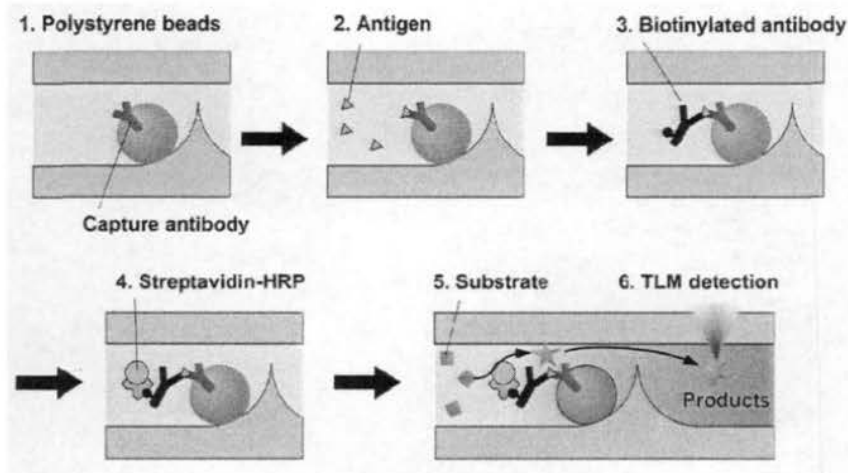


图1.31 基于微珠的ELISA分析芯片工作原理示意图^[60]。

上述系统均采用热透镜检测器进行检测。除此之外,荧光检测法在采用聚苯乙烯微珠作为固相载体的系统中应用非常广泛^[62-65]。Malmstadt等^[62]在聚苯乙烯微珠表面连接温度反应性高聚物PNIPAAm (N-isopropylacrylamide),同时将抗地高辛抗体连接在微珠上引入高聚物芯片的微通道,升高温度至37°C,连接抗体的微珠自动贴壁,再引入待测抗原地高辛和荧光标记的地高辛在微珠表面与抗体发生竞争免疫反应,然后降低温度使微珠远离通道壁随清洗液流至检测区,对微珠上结合的标记抗原的荧光信号进行检测。该方法不需要在芯片通道内加工特殊的围堰结构来截留微珠,仅通过改变温度即可快速便捷的固定和排出微珠,提供了一种简单、方便的固定微珠和更新通道表面的方法。

2006年,Haes等^[63]在玻璃芯片上建立了基于微珠的置换免疫分析系统,用于葡萄球菌B型肠毒素(SEB)的分析。在玻璃芯片上加工了具有双堰结构的微通道,用来固定和截留包被有抗SEB特异性抗体的微珠,芯片结构如图1.32所示。实验采用置换免疫分析原理,通过高压电源的电动切换,依次使样品和试剂流过微珠。荧光标记的抗原与微珠表面的抗体充分反应后,再加入未标记的SEB抗原,由于未标记的抗原与抗体的亲合力远大于标记抗原与抗体的亲和力,标记抗原被置换出来,而未标记抗原与微珠表面抗体形成免疫复合物。采用激光诱导荧光法检测置换出来的标记抗原的荧光信号,线性检测范围超过6个数量级,检测限达1

fM (28.5 fg/mL), 分析时间仅需20 min。

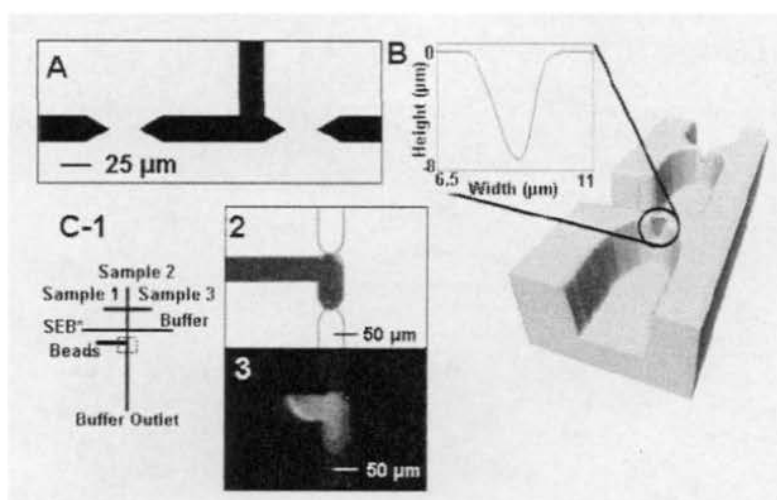


图1.32 具有双堰结构的微芯片用于基于微珠的置换免疫分析^[63]。

琼脂凝胶微珠亦可以作为抗体的固相载体^[67-70]。Moorthy等^[68]先在琼脂凝胶微珠表面修饰抗生物素蛋白,再结合生物素化的抗肉毒杆菌抗体。然后将琼脂凝胶微珠引入芯片微通道内截留在过滤膜处,依次引入含有肉毒杆菌类毒素的兔全血样品、HRP标记的二抗以及酶底物,在微珠表面进行夹心法ELISA分析,生成的有颜色产物沉淀于微珠表面,采用安培法检测。该系统对肉毒杆菌的检测限为1 μg/mL,试样及试剂的消耗为150-250 μL,分析时间约2小时。朱海霖等^[69]采用蛋白质A包被的凝胶微珠作为固相载体,将羊抗人IgG抗体固定在微珠上,采用顺序注射系统依次将固定有抗体的微珠、血清试样(IgG抗原)以及荧光标记的二抗注入芯片式微型流通池,并在其中进行夹心免疫分析。用荧光分光光度计测定截留于流通池中的抗体-抗原复合物的荧光强度。一次测定完成后,微珠即被排出流通池,流通池经缓冲液清洗后即可进行下一次测定。系统对IgG的检出限为0.1 mg/L,样品消耗量100 μL,分析时间约6 min。该系统采用顺序注射系统进行抗体、抗原及缓冲液等不同液体的切换,实现了免疫分析操作的自动化。

1.4.2.2 磁性微珠固相载体

在微球的操控方面,采用磁性微珠比非磁性微珠更具有优势。根据需要可施加磁场将磁珠固定在相应部位或移动磁珠,或者撤去磁场释放磁珠使之随液流流动及排出。

Choi等^[71]首先在芯片上建立了基于磁珠的非均相免疫分析系统。将电磁铁包

埋于微通道内壁,采用磁性微珠作为固相载体,通过磁场将磁珠均一地固定在通道壁上的电磁铁表面,根据夹心法分析原理依次引入混合抗原样品、标记二抗,在磁珠表面形成靶抗原的抗原-抗体复合物。撤去磁场释放磁珠,使结合有标记抗体的磁珠进入检测区进行检测。该系统的分析原理如图1.33。采用磁珠作为固相载体,无需在通道中加工拦截微珠的围堰,采用磁场可以方便地控制磁珠的固定和流动,系统结构简单,微珠操作方便。但该系统仍采用手工更换试剂方法,自动化程度不高。

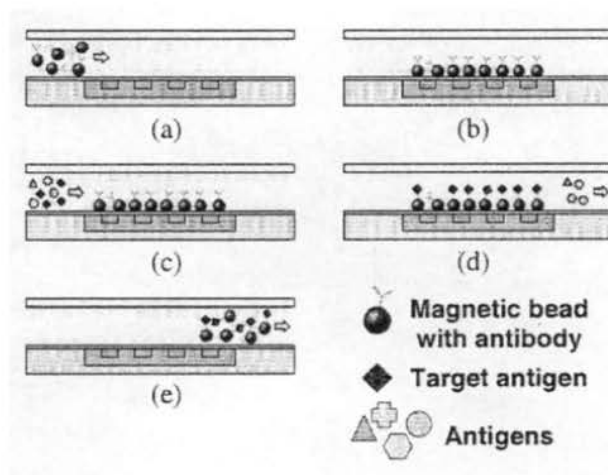


图1.33 芯片上基于磁珠的微流控免疫分析操作步骤^[71]。

(a) 引入固相磁珠; (b) 磁珠固定; (c) 引入试样; (d) 靶抗原固定; (e) 释放磁珠至检测区。

Hayes等^[72]为了进一步获得高比表面积,利用直径仅为1-2 μm 的小磁珠作为抗体的固相载体,采用通道外附加磁场对小磁珠进行操控,在芯片微通道内形成磁珠床,对甲状旁腺激素(PTH)和白细胞介素-5(IL-5)进行了免疫分析。使用小粒径磁珠所形成的固相载体床仅占据一部分通道,非完全堵塞通道,这种设计可以在低压的驱动力时保持相对较高的流速,有利于缩短样品引入时间和洗涤时间。系统中,抗原、抗体反应时间为10 min,总分析时间约1小时,PTH及IL-5的检测灵敏度均达到临床诊断要求。测定结束后撤去磁场,排出微珠,通道可以重复使用。

磁珠作为固相载体的方法在酶免疫分析中的应用也非常广泛^[74-78]。Choi等^[74]采用磁珠作为抗体的固相载体,在芯片上对鼠IgG进行了ELISA分析及电化学检测,试样消耗为10 μL ,分析时间为20 min。Tabrizian研究组^[77]在一个双层结

构的 PDMS 芯片上建立了基于磁珠的 ELISA 分析平台, 可以同时进行 8 个样品的平行分析, 对血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的定量检测达到皮摩尔水平。所有的抗原-抗体反应均在上层芯片的通道中进行, 通过磁场和两层芯片间压力阀的共同控制将含有磁珠的反应混合物引入下层芯片通道, 进行酶催化反应和检测。8 个平行分析总的的时间不到 1 小时。系统的工作原理如图 1.34 所示。该系统的这种双层设计使免疫反应和酶反应在不同的通道进行, 不仅避免了耗时的芯片预处理过程, 还可以去除蛋白质对通道壁的非特异性吸附所导致的背景噪音, 明显减小了系统误差。

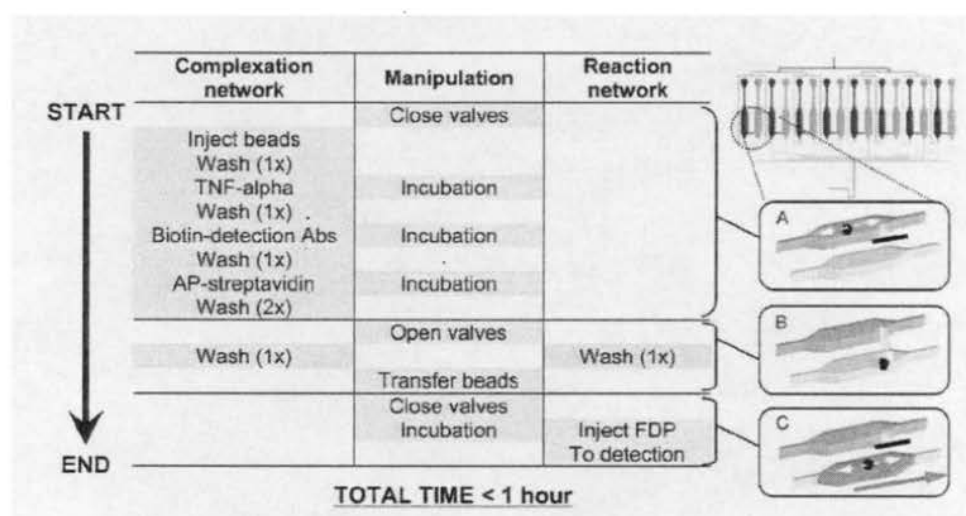


图 1.34 双层 PDMS 芯片分析 TNF- α [77]。

(A) 免疫反应阶段 (阀-关闭); (B) 磁转移阶段 (阀-打开); (C) 酶反应及检测阶段 (阀-关闭)。

与微米级大小的磁性微珠相比, 纳米级的粒子具有更高的比表面积, 因而具有进行超灵敏检测和单分子操纵的潜力^[79-82]。Gijs 等^[79]采用磁性纳米粒子作为固相载体, 对纳升级的杂交瘤细胞培养液中的鼠单克隆抗体进行了非均相夹心法免疫分析, 建立了一个基于磁性纳米粒子的、全部操作 (包括孵育、洗涤和检测等) 集成在芯片上的免疫分析系统。首先将链球菌连接素 (Streptavidin) 包被在直径为 500 nm 的超顺磁性纳米粒子表面, 在芯片外采用均一的磁场使磁性纳米粒子在通道内自组装成磁性纳米粒子串阵列, 保持在通道中横截面呈周期性扩大的部分, 且占据整个液体流经通道, 如图 1.35 所示。然后依次引入与生物素连接的一抗 (Biotinylated-capture Ab)、待测抗原 (鼠单克隆抗体)、荧光标记的检测抗体 (二抗), 在纳米粒子串上显示出很强的荧光信号, 由 CCD 及倒置荧光显微镜

进行荧光检测。该系统对两种鼠单克隆抗体的检测限分别为1 ng/mL和100 ng/mL, 样品和试剂消耗仅50 nL, 分析时间为15-25 min。

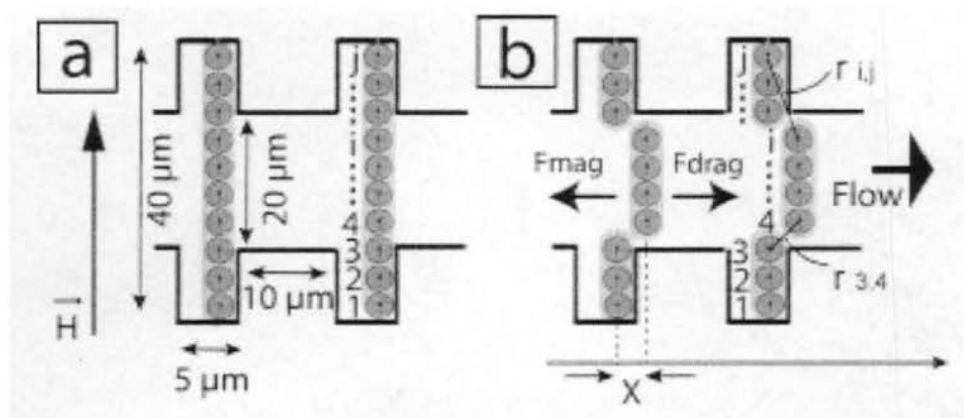


图1.35 在磁场作用下, 通道内形成的自组装磁性纳米粒子串^[79]。

(a) 没有液体流过时; (b) 有液体流过时。

上述有关磁珠及磁性纳米粒子非均相免疫分析的研究大多为对样品中的单一组分进行检测, 将磁性纳米粒子和荧光编码的聚苯乙烯微珠同时作为抗体的固相载体, 通过待测抗原使二者连接为一个整体, 通过测定磁性纳米粒子-聚苯乙烯微珠联合体在磁场中的偏移距离可以方便、快速地实现样品中不同待测组分的多元免疫分析^[80-82]。Park研究组^[80]在芯片外对聚苯乙烯微珠进行不同颜色的荧光编码, 并且在微珠和磁性纳米粒子表面分别标记与不同待测抗原相对应的特异性抗体。然后使含有不同待测抗原的样品同时与微珠及磁性纳米粒子混合、反应, 根据夹心法原理, 磁性纳米粒子即通过抗原-抗体复合物的形成与微珠联结成一个整体。将反应后的微珠悬液用注射泵引入芯片微通道内, 在磁场的作用下, 有磁性和无磁性的微珠在流动过程中被分开, 不同待测抗原携带的微珠荧光颜色不同, 用荧光检测器即可进行检测。该系统被用于鼠IgG和兔IgG的检测, 检测限分别为15.6 ng/mL和244 pg/mL, 总分析时间小于1小时, 试样消耗60 μL。他们^[82]将彩色编码微珠增加为红、黄、蓝三种, 分别连接抗羊IgG、抗兔IgG、抗鼠IgG; 采用抗生物素蛋白与超顺磁性纳米粒子连接; 使微珠、磁性纳米粒子同时与样品中三种生物素化的待测抗原(羊IgG、兔IgG、鼠IgG)混合、孵育, 利用相同的系统对羊IgG、兔IgG、鼠IgG三种不同待测抗原的浓度进行同步检测, 检测限分

别为10.9、30.6和12.1 fM。与以往的磁珠免疫分析和分离方法相比,上述方法采用磁性纳米粒子和聚苯乙烯微珠作为免疫反应的固相载体,在简单的装置上方便、快捷的实现了多元免疫分析。

在基于磁珠的微流控免疫分析中,结合电润湿操控液滴技术,可以建立基于液滴和磁珠的非均相免疫分析数字微流控系统^[83-84]。这种通过操纵液滴来控制磁珠的方法,不需要在芯片上刻蚀通道,亦不用担心会堵塞通道,液滴可以自由向两侧移动,因此系统结构简单,加工方便。利用电润湿技术和磁场对含有不同内容物的液滴进行协同操控,可以方便快速的实现基本的液滴操作,如分配、运输、混合/孵育及分裂,与传统的免疫分析方法中需要反复更换试剂、反复清洗等繁琐的手工操作相比,该系统在操作的便捷性和分析速度方面具有显著的优势。图1.36显示了系统对液滴及磁珠的关键性操控步骤^[83]。Ramakrishna等^[83]利用该平台完成了人胰岛素和白细胞介素-6(IL-6)的酶免疫分析,采用化学发光方法进行检测。单次分析检测的时间仅为7 min,试样消耗1 μL ,试剂消耗3-5 μL 。在上述研究的基础上,该研究组^[84]进一步对液滴和磁珠的操控以及试样和不同试剂的顺序引入完全采用程序控制,在一个标准的384孔板上建立了一个高度集成的、便携的、自动化的磁珠ELISA分析平台,对标准溶液和人全血中的重要的心脏病指标—肌钙蛋白I(troponin I, TnI)进行了快速检测。试样及试剂的消耗减少为300 nL,对TnI的检测限约为5 ng/mL,总分析时间为8-10 min。

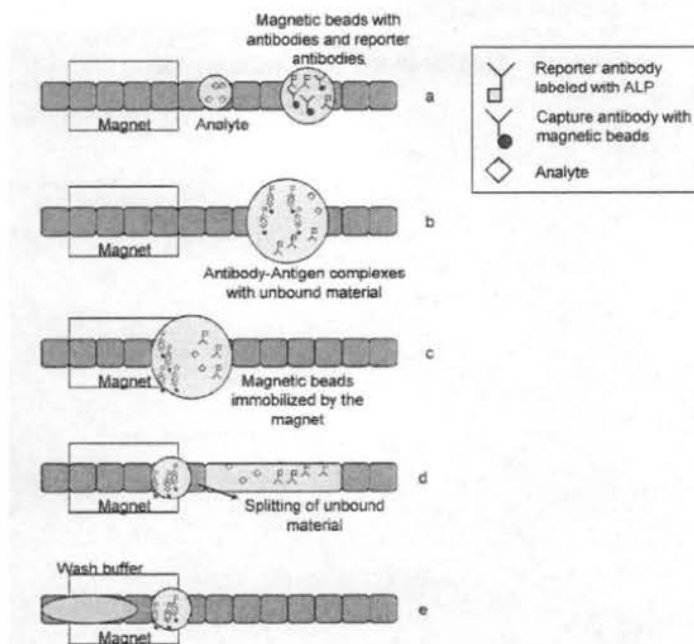


图1.36 数字微流控平台上进行非均相免疫分析的工作过程^[83]。

(a) 试剂的分配; (b) 液滴的混合和孵育; (c) 磁珠的固定; (d) 液滴成分的分离及清洗; (e) 加入新的清洗缓冲液。

1.4.3 电极或传感器表面作为固相载体

有一类微流控芯片免疫分析系统, 采用电极表面作为免疫反应的固相载体^[85-89]。Dong等^[88]以电极表面作为抗体的固相载体, 在一个叠层结构的芯片上建立了一个微流控夹心酶免疫分析系统, 用于鼠IgG的测定。系统的结构示意图如图1.37所示, 芯片由基片层、工作电极和参比电极层、导线层、微流控通道层叠加而成。首先, 在工作电极的表面覆盖一层PPA多聚物薄膜, 覆盖了PPA薄膜的电极表面能够使抗体通过共价结合高效地固定在电极表面。依次将抗鼠IgG抗体、试样(鼠IgG)、碱性磷酸酶标记的抗鼠IgG抗体、酶底物PAAP、清洗液等溶液顺序引入至电极表面, 在电极表面进行抗体固定、抗原捕获、酶标抗体的结合、酶催化反应及电化学检测。该系统对鼠IgG的检测限为10 ng/mL, 试剂及试样的消耗为500 μ L-3 mL, 抗体包被和封闭时间约为4小时, 从进样到检测所需时间约为4小时。

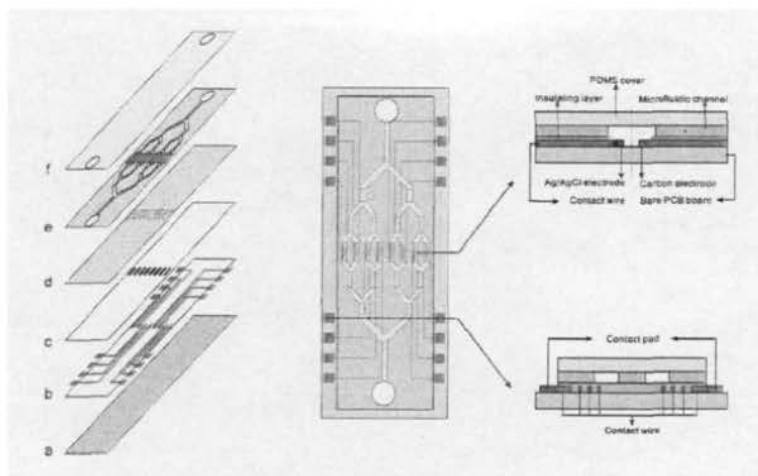


图 1.37 在电极表面进行 ELISA 分析的叠层微流控芯片^[88]。

Yang等^[90]在生物传感器表面覆盖一层涂覆有羧甲基右旋糖酐的金膜,使抗IL-8抗体(MAB208)通过共价键合固定在金膜表面。检测时,将传感器芯片置于微通道内,然后将含IL-8的缓冲溶液或唾液稀释液、抗IL-8第二抗体(JK8-2,与一抗在IL-8上的结合位点不同)溶液依次引入微通道,并连续流过传感器表面,在传感器表面形成固定抗体-IL-8抗原-第二抗体的夹心式免疫复合物,采用表面等离子体共振技术(SPR)实时监测抗原和抗体分子之间的相互作用。系统对缓冲溶液和唾液稀释液中的IL-8的检测限分别为2.5 pM和184 pM,样品消耗量为100 μ L,总分析时间为13 min。每次分析后,引入再生溶液使待测抗原和二抗脱离传感器表面,传感器表面可循环再生。

Mujika等^[91]在微流控芯片上集成了一个微加工传感器,在传感器膜表面固定抗O157:H7抗原的特异性抗体,建立了对食物和临床样本中存在的大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)的O157:H7抗原进行分析的方法,系统结构如图1.38所示。将待测抗原(含O157:H7抗原的细菌样品)及与磁性纳米粒子结合的二抗依次输送至传感器表面,在传感器表面形成固定抗体-待测抗原-磁性纳米粒子二抗免疫复合物,传感器通过感受磁场对磁性纳米粒子作用时所产生的磁场变化,对待测抗原的浓度进行定量检测。

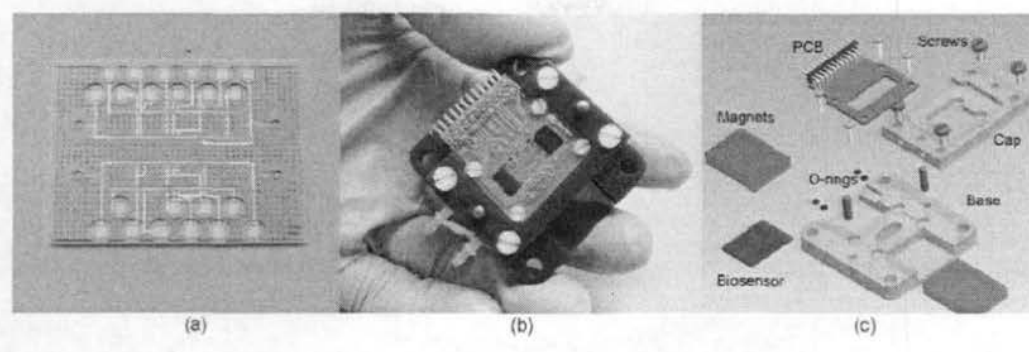


图1.38 传感器表面为固相载体的免疫分析芯片^[91]。

(a) 集成有生物传感器的微流控芯片；(b) 完整的免疫分析芯片系统；(c) 系统组成示意图。

1.5 微流控免疫分析系统的自动化

随着微流控免疫分析研究的逐渐深入,人们逐渐开始关注各种系统中仍然普遍存在的一个问题,即仍然采用手工方法进行进样和更换试剂。传统非均相免疫分析中采用手工操作进行反复多次的加样、清洗及更换试剂,整个过程繁琐、费时、低效,是长期以来一直困扰操作者的一个突出问题。上述大多数微流控免疫分析系统仍然采用移液器加样和换样的手工方法,顺序引入一系列不同的试样和试剂。少数工作虽然在芯片上采用微阀控制试样及试剂的顺序引入,但仍然需要手工操纵微阀的开闭。建立自动化的微流控免疫分析系统,对于进一步缩短分析时间,降低人为因素所导致的系统误差,提高系统的分析性能和效率,尤其对于高通量分析及多指标分析,具有重要的意义。

电渗驱动和切换是微流控免疫分析系统最早和最常采用的自动化技术^[18,45,50,63,93-97]。2001年,Wang等^[18]采用电渗驱动和切换技术将酶标记抗体和待测抗原引入反应池混合并进行直接免疫反应,再将反应混合物引入分离通道进行电泳分离,实现了柱前免疫反应和柱后酶反应在芯片上的集成,建立了自动控制的微流控均相酶免疫分析系统。Dodge等^[45]在芯片上采用电渗驱动和切换技术实现非均相免疫分析操作,对兔IgG进行了检测,避免了繁琐的手工操作,整个分析过程操作方便快捷。Li研究组^[93]在PDMS芯片上采用电渗驱动和切换技术依次将兔抗幽门螺旋杆菌抗体(一抗)、荧光标记的抗兔IgG抗体(二抗)、缓冲液等试样及试剂引入通道的反应池内进行非均相免疫分析。对幽门螺旋杆菌的检测限为1 ng/ μ L,试剂消耗12 μ L,总分析时间为26 min。在“H”通道自动电切换非均相免

疫分析系统的基础上,他们^[94]在PDMS芯片上建立了针对10个样品的自动免疫分析系统,原理如图1.39所示。系统采用电渗驱动和切换技术将含有幽门螺旋杆菌抗体和大肠埃希氏菌抗体的人血清样品、清洗液、荧光标记的检测抗体等依次顺序引入通道的反应区及检测区,进行孵育、清洗及荧光检测。该系统可以在22 min内对10个样品进行分析,且可对幽门螺旋杆菌抗体和大肠埃希氏菌抗体进行同步检测,检测范围分别为0.02-10 $\mu\text{g/mL}$ 和0.1-50 $\mu\text{g/mL}$ 。

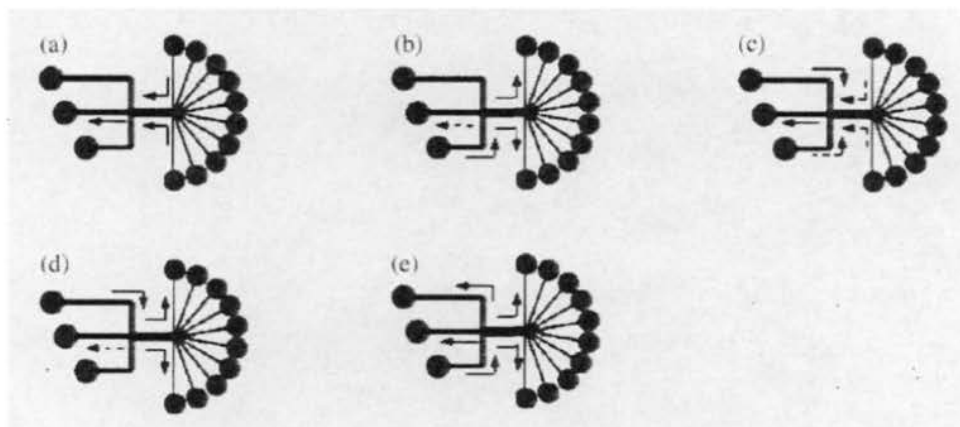


图 1.39 多通道电渗控制微流控芯片免疫分析系统^[94]。

(a) 样品的引入和孵育: 试样溶液从样品池流入反应区, 流出到废液池; (b) 样品的清洗: 缓冲液将样品溶液从反应区冲洗回样品池; (c) 样品溶液的第二次清洗: 将进入抗体通道的样品溶液冲洗至废液池; (d) 荧光标记抗体的引入和孵育; (e) 荧光标记抗体的清洗。

在近年来报道的微流控免疫分析系统中^[89, 98-105], 较多地采用在芯片上集成多个微阀的方法来实现系统操作的自动化。2006年, Kartalov等^[99]在PDMS芯片上建立了一个包含100个微反应器的高通量多指标非均相免疫分析系统。在PDMS芯片上加工了多个微阀形成微阀阵列, 通过压力的变化控制微阀的开关来操纵试样及试剂, 在微流控芯片上完成非均相酶免疫分析及荧光检测操作。系统可以对10个样品中的4种抗原进行同步分析。Zare研究组^[101]将微流控芯片与表面等离子体共振成像技术 (SPR) 相结合, 在一个复层PDMS/玻璃芯片上建立了非均相免疫分析系统。芯片内集成PDMS微阀阵列, 通过具有16个输出通道的压力控制器进行控制。系统的结构如图1.40所示。预先将不同浓度的抗体溶液和抗原溶液加入各储液池中, 将清洗液加入洗液池中, 调节微阀, 使抗体和抗原溶液依次流至各个通道交叉点金斑覆盖处, 抗原和抗体在金斑表面结合成免疫复合物,

免疫反应的过程由SPR成像技术实时监测。该系统通过独特的微通道设计和PDMS微阀阵列,实现了免疫反应中试样、试剂顺序引入的自动化,免疫反应和定量检测可在10 min内完成。

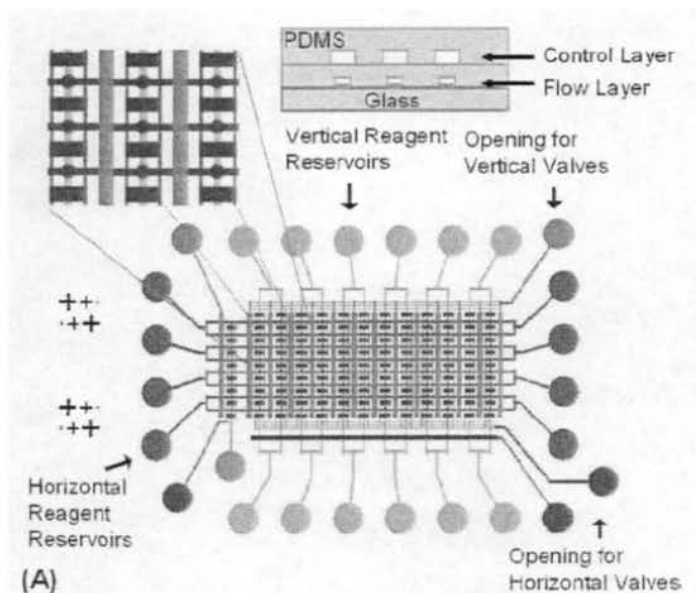


图1.40 加工有微阀阵列的微流控免疫分析芯片^[101]。

Lin等^[102]在一个玻璃-PDMS-玻璃三层结构的微芯片上集成了36个气动微阀和多个微泵,通过外加真空泵和压缩机控制各个微阀的开闭,实现了样品引入、清洗、免疫反应、酶催化等分析操作的自动化,建立了一个可以同时检测8个试样的免疫分析系统。免疫分析过程如图1.41所示。该系统对克伦特罗的线性检测范围和检测限分别为0~5.0 ng/mL和0.088 ng/mL,总分析时间少于30 min。

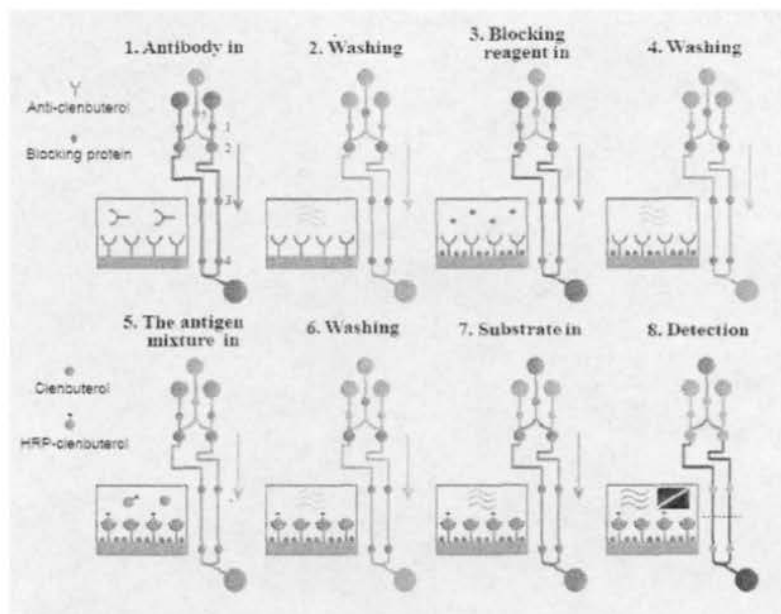


图1.41 集成化微流控芯片上竞争免疫分析的操作步骤^[102]。

溶液的引入及清洗步骤均通过集成在芯片上的微阀的自动切换来控制。

Yang等^[104]在玻璃/PDMS芯片上集成了三个微型的功能模块,试样孵育模块、流式血细胞计数模块和光学检测模块,建立了一个基于磁珠非均相夹心免疫分析的微型流式血细胞计数仪,用于登革热病毒的鉴别纯化和荧光检测。芯片的结构如图1.42所示。在各模块之间,采用PDMS加工的五个微泵和两个微阀,对微通道中溶液的引入和驱动进行自动操控。首先,将表面包被有抗登革热病毒抗体的磁珠与含有登革热病毒的样品溶液混合加入试样孵育模块的孵育池内,荧光标记的登革热病毒抗体加入二抗储液池内。检测时,通过程序控制打开相应的微泵使二抗溶液流入样品孵育池内,荧光标记抗体与病毒抗原结合形成磁珠/捕获抗体-病毒抗原-荧光抗体夹心的免疫复合物,在外加磁场的作用下与溶液中的其它成分分离,经清洗得到纯化。纯化的磁珠-病毒-荧光标记抗体复合物在相应的微泵、微阀的自动操控下被顺序引入至光学检测模块和流式血细胞计数模块进行检测和收集、计数。主要的分析检测过程如图1.43所示。该系统可以自动检测浓度为 10^3 PFU/mL的病毒样品,样品消耗为 $100\ \mu\text{L}$,抗体消耗为 $2\text{--}10\ \mu\text{L}$,总分析检测时间为40 min。该系统采用基于磁珠的免疫分析方法建立了一个自动的微流控流式血细胞计数仪,可以在较短的时间内自动的完成对病毒样品的纯化、光学检测以及病毒的收集和计数。为靶病毒的快速、自动检测提供了一个新的途径。

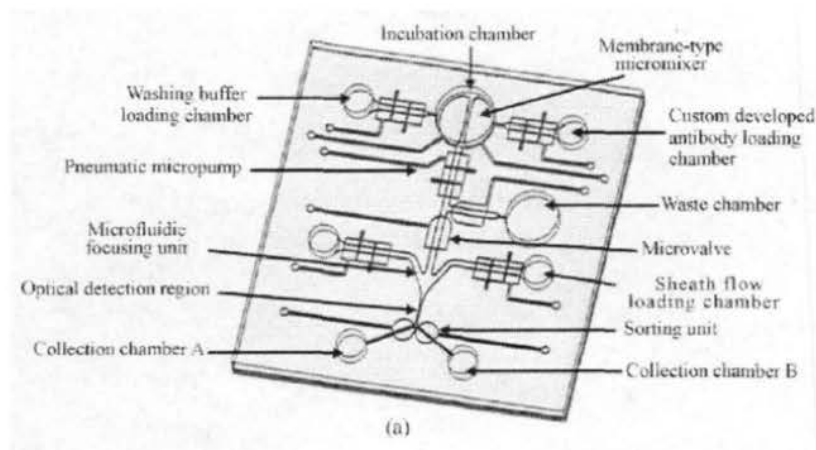


图1.42 基于磁珠免疫分析的自动化血细胞计数仪^[104]。

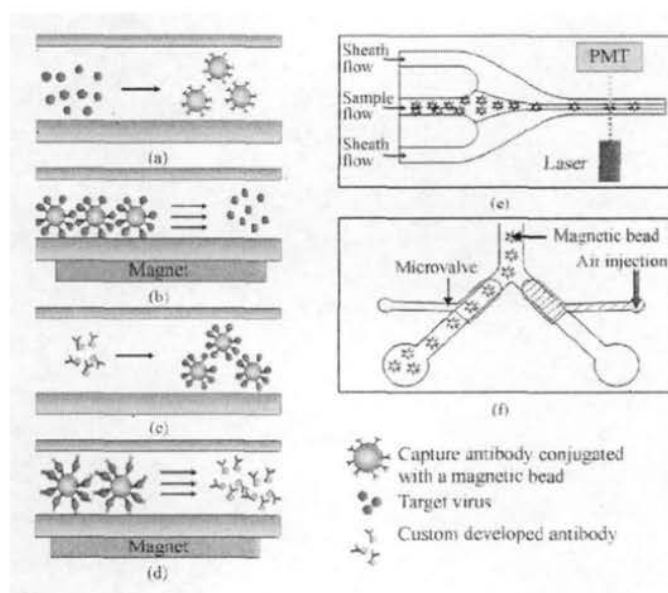


图 1.43 系统操作步骤示意图^[104]。

(a) 引入生物样品与磁珠混合；(b) 在磁场作用下，对靶病毒进行纯化和浓集；(c) 引入荧光标记抗体与磁珠上捕获抗体、靶病毒结合，形成夹心免疫复合物；(d) 洗去多余的未结合标记抗体；(e) 磁珠流经光学检测区时进行荧光检测；(f) 采用微阀操控磁珠的分类、计数。

Lee等^[105]基于离心式塑料圆盘芯片和石蜡微阀，建立了一个全自动微流控ELISA分析系统，对全血样本中的乙肝病毒表面抗原和表面抗体（HBsAg 和 Anti-HBs）进行了检测。系统在芯片上集成了血浆分离通道、底物池、清洗缓冲液池、终止液池、混合池、废液池和检测池，在相应的储液池内预先加入所需的

试剂,以全血为待测样品。在芯片上集成多个石蜡微阀,该阀是将氧化铁纳米微粒埋入固体石蜡中制备而成的,用较低强度的激光照射不到1 s即可使其溶解。通过一个激光器对多个微阀进行快速、灵活的操控,配合芯片旋转时产生的离心力,实现了从血浆的分离、抗原与抗体的孵育及免疫反应、反复多次的清洗、底物与酶的反应、吸光度检测等所有操作的自动化。芯片的结构和工作原理如图1.44所示。

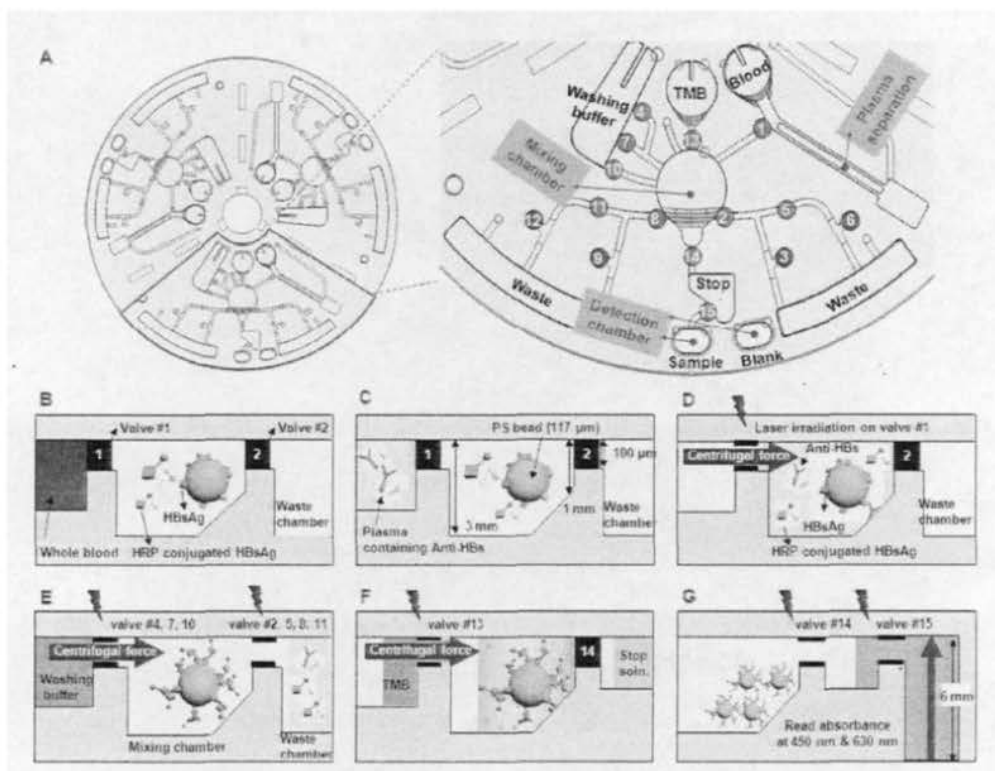


图1.44 (A) 集成多个微阀的圆盘芯片结构及功能示意图(数字表示石蜡微阀的操纵顺序); (B—G)芯片上ELISA的反应原理及操作步骤示意图(“闪电”符号代表激光对微阀进行照射)

[105]

在Anti-HBs的检测中,将结合了HRP的检测抗原和包被有捕获抗原的聚苯乙烯微珠悬浮于缓冲溶液中,预先加入到芯片上的混合池内,将150 μL 全血样品直接加入样品池中,芯片即开始以3600 rpm/min的转速旋转3 min,使血浆从全血样品中分离。其后,启动激光器照射石蜡微阀的程序控制,在离心力和微阀之间的相互配合下,ELISA的全部过程包括试样的引入、抗原-抗体反应、清洗、底物的引入、酶反应以及光学检测等即可自动顺序进行,在30 min内完成了Anti-HBs的检测,检测限为10 mIU /mL。

一些学者通过采用简单巧妙的设计实现微流控免疫分析系统的自动化。条带免疫分析(也称免疫色谱)以其简单、快速和相对敏感,在床旁诊断中具有重要的应用价值。Ahn-Yoon等^[106]采用硝酸纤维素膜片作为免疫分析的固相载体,预先在试验片上的不同区域固定含有红色染料连接有神经节苷酯的脂质体(GM1-liposome)和抗霍乱毒素抗体,将试验片插入含有霍乱毒素(CT)的样品溶液中,非均相夹心免疫反应即在试验片上自动进行。在毛细力的驱动下,CT-GM1脂质体复合物在试验片上前移至捕获抗体的固定区带,待测霍乱毒素被捕获在该区带形成红色条带,颜色深浅与待测霍乱毒素的浓度成正比(图1.45)。该方法简单、快速、灵敏度高,可以在20 min内完成对霍乱毒素的测定,且对水样品中霍乱毒素的检测限达到0.1-30 pg/mL。Paek研究组^[108]进一步在硝酸纤维素膜片上实现了夹心ELISA分析,对乙肝表面抗原(HBsAg)进行了测定,灵敏度比胶体金标记方法提高约30倍。

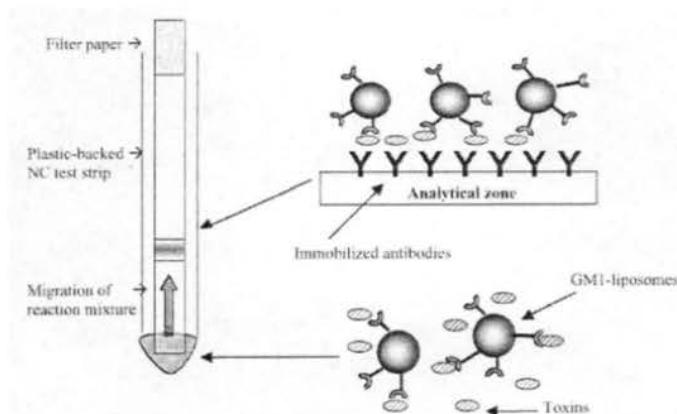


图1.45 硝酸纤维素膜片上的自动免疫分析^[106]。

2004年,Lai等^[108]在一个塑料CD形芯片上加工了24组相对独立的微流控装置,如图1.46所示。将抗体固定在各反应池中,并在芯片上集成了毛细泵、离心

泵等微流控功能,通过控制芯片旋转速度产生大小不同的离心力来自动操控不同试剂的顺序流动,实现了ELISA分析操作的自动化,且可以同步完成24个样品的分析。该系统用于大鼠IgG的ELISA分析,在芯片外操作抗体包被和封闭,时间分别为30 min和15 min。用移液器将样品、清洗液、二抗及底物溶液分别加入芯片上相应的储液池内,然后将芯片安装于电动板上,利用变换芯片的转速所产生的离心力将样品溶液、清洗液、二抗及底物溶液顺序引入至反应池内,形成抗体-抗原-标记抗体免疫复合物,用倒置荧光显微镜检测荧光信号,对大鼠IgG的检测限为5 $\mu\text{g/L}$ 。该方法与常规96孔板方法相比,检测范围相同,但试剂消耗减少至30 μL ,分析时间缩短至1 小时之内。

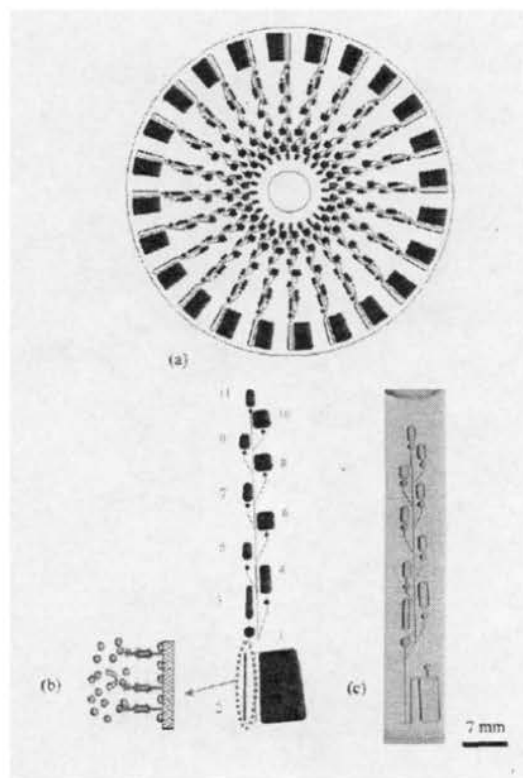


图1.46 具有24个分析单元的离心式自动ELISA分析芯片^[108]。

1, 废液池; 2, 检测池; 3, 一抗液池; 4, 6, 8, 10, 清洗液液池; 5, 封闭液池; 7, 抗原/样品液池; 9, 二抗液池; 11, 底物液池。

Nagai等^[109]在圆盘形离心芯片上,建立了基于微珠的非均相竞争酶免疫分析系统。芯片上加工了18个分析单元,每个单元有三个储液池——样品池、反应池、检测池,芯片结构如图1.47所示。系统被应用于分泌型IgA (sIgA) 的分析。反应池内各放置一个包被有sIgA的微珠,最外侧的检测池内装有酶底物和过氧化

氢。先在芯片外使样品中的sIgA和酶标记的抗sIgA抗体混合、反应，然后将1 μL 的反应混合液加入样品池，旋转芯片，利用离心力驱动反应混合液流入反应池与微珠混合，在反应池内进行竞争免疫反应，反应后的抗原-酶标记抗体复合物溶液在离心力的作用下自动流入检测池，与底物发生酶催化反应产生荧光信号，进行荧光检测。系统对sIgA 的检测限为2.5 $\mu\text{g/mL}$ ，同步分析18个样品的时间约30 min。

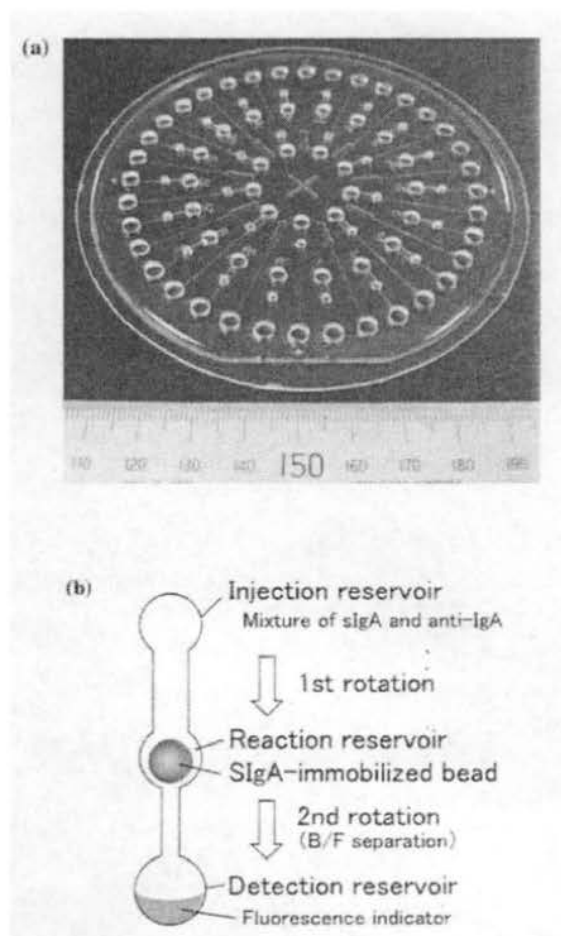


图1.47 基于微珠竞争酶免疫分析离心式芯片^[109]。

Linder等^[110]提出了一种新颖的试样及试剂的引入方式，预先将所需试剂通过气体间隔封装在小管中，分析时，将试剂预封管出口与通道入口相接，采用负压驱动液流，将所需试剂自动地引入微通道，自动完成免疫分析中一系列液体的顺序引入。该方法被用于抗兔IgG抗体及人血清中抗HIV-1抗体的非均相免疫分析。在抗HIV抗体的分析中，预先将HIV抗原通过物理吸附固定在PDMS基片上，形

成抗原条带，再将另一个加工有六条微通道的PDMS芯片盖在基片上，使六条通道的平行区域与抗原条带垂直，引入封闭液对各通道进行封闭处理，芯片结构如图1.48所示。将患者血清上清液引入芯片通道后，将试剂预封管与芯片通道入口连接，采用负压将清洗液、荧光标记的抗人IgG溶液、清洗液依次顺序引入微通道，在微通道内完成抗HIV抗体的非均相免疫反应和荧光检测，操作步骤如图1.49所示。该方法操作简便，检测快速，对HIV抗体的检测仅需13 min，对抗兔IgG抗体的检测仅需2 min，为临床的快速检验和现场诊断提供了一个具有实用价值的技术平台。

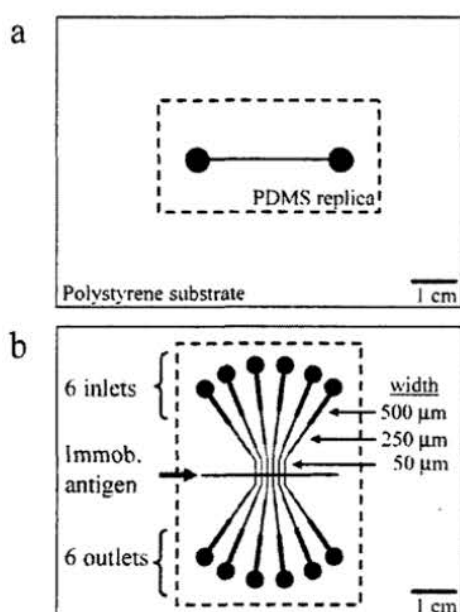


图1.48 PDMS非均相免疫分析芯片结构示意图^[110]。

(a) 抗原通过物理吸附固定在芯片的基片上形成一条抗原条带；(b) 六条平行的微通道与固定的抗原条带相互垂直，进行非均相免疫分析。

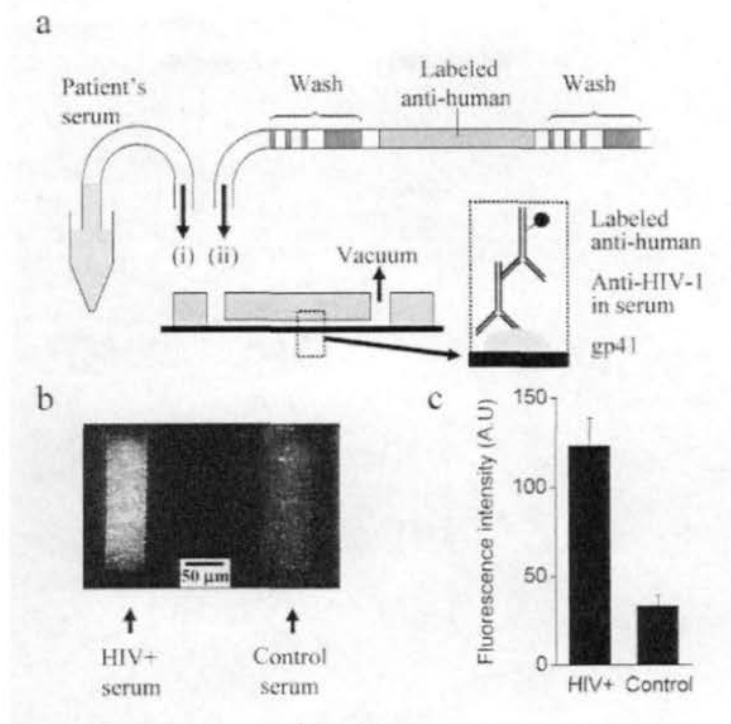
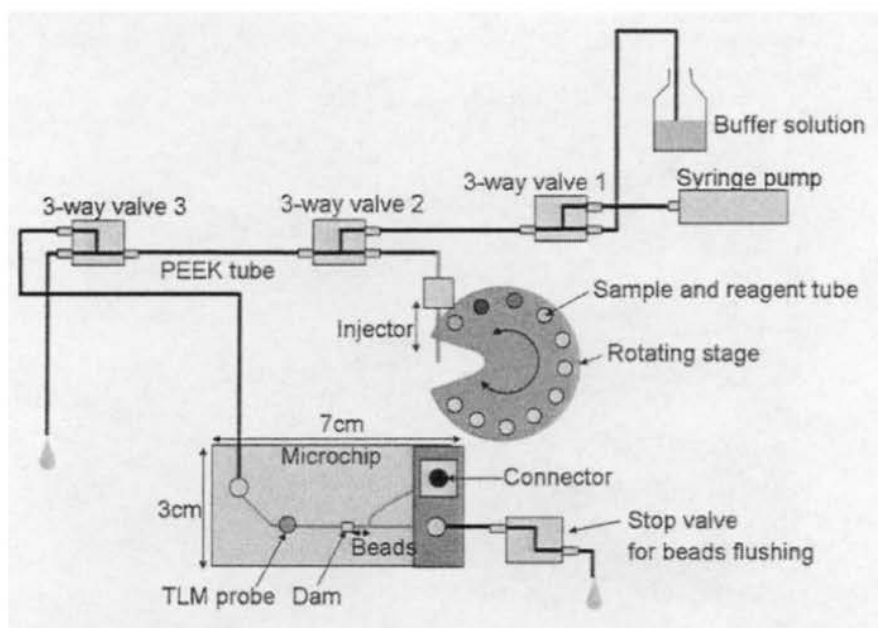


图1.49 用于HIV-1诊断的试剂预封管-非均相免疫分析芯片^[110]。

Kitamori研究组^[111]建立了一个基于微珠的自动化微流控ELISA系统,将装有试样和试剂溶液的小管固定在一个自动旋转平台上,采用程序控制注射泵和多个商品化微阀自动将试样及试剂顺序引入至玻璃芯片微通道内,系统的基本结构如图1.50。系统被应用于对过敏症患者血清中IgE的快速检测。首先将包被有过敏原的聚苯乙烯微珠引入微芯片通道内的围堰处,将试样和试剂分别加入自动旋转平台上不同的小管里,在注射泵的控制下,用注射器吸取一定体积的试样和试剂,然后采用程序控制注射泵和多个微阀,依次将试样溶液、清洗液、酶标记二抗溶液、清洗液、底物液等顺序地引入芯片的微珠填充区,在微珠表面进行非均相免疫反应和酶反应,最后进行光学检测。检测完毕,清除微珠,更换新的微珠悬液即可进行下一个试样的检测。增加微通道数目可以同步进行多个样品的平行分析。采用该系统对85个过敏症患者血清样品中的IgE水平进行了检测,检测结果与经典方法具有良好的相关性,IgE的检测限达2 ng/mL。但与传统方法相比,该系统的耗样量(5 μ L)减少了10倍,分析时间(12 min)缩短了20倍,而且该系统实现了全部ELISA分析操作的自动化。

图1.50 自动化ELISA分析系统^[111]。

Yakovleva等^[112]在一个硅芯片的微通道内固定抗体,采用注射泵、蠕动泵和一个六通阀顺序引入试样、酶底物、清洗液及更新试剂,建立了一个自动化非均相竞争免疫分析系统。该系统被用于一种除草剂Atrazine的检测。先在芯片外将样品(待测抗原)与酶标记抗原混合,通过六通阀将抗原混合液引入芯片微通道,与通道壁固定的抗体发生竞争免疫反应,通过注射泵引入清洗液,洗去未结合的标记抗原,再通过六通阀引入酶底物,与结合的标记抗原进行酶催化反应,对产物进行化学发光检测。通过蠕动泵引入更新试剂对通道壁进行恢复处理,可以进行下一个样品分析。该系统对Atrazine的检测限为0.80 ng/L,分析时间仅10 min。

Ju研究组^[113]建立了基于磁珠的双抗体夹心ELISA-化学发光检测自动化免疫分析系统,用于AFP的分析。系统采用磁珠为固相载体,采用六通阀切换和蠕动泵驱动自动顺序引入一系列试样及试剂,利用红外加热和被动混合的方法对免疫反应进行双重加速。系统的流动通道主要由一个三维的螺旋状玻璃管和两个盘状螺旋的玻璃管组成。三维的螺旋状玻璃管用于免疫反应物的快速混合,两个盘状螺旋的玻璃管分别用于免疫复合物的磁性分离和化学发光检测。免疫试剂和样品的混合溶液被引入三维螺旋玻璃管内孵育,同时采用红外加热促进了免疫反应,二者协同作用加速免疫反应,使免疫反应在90 s内完成。磁珠表面的标记免疫复合物在盘状螺旋管内通过磁场的作用,与溶液中的其它成分分离,并与引入的化学发光底物溶液混合。生成的发光产物通过另一个盘状螺旋管时由光电倍增管收

集化学发光信号进行检测。系统的操作步骤如图1.51所示。该系统对AFP的检测限为 $0.068\ \mu\text{g/L}$ ，线性范围为 $0.2\text{--}90\ \mu\text{g/L}$ ，试样消耗量为 $40\ \mu\text{L}$ ，试剂的消耗量为 $40\text{--}100\ \mu\text{L}$ ，分析时间仅为 $3\ \text{min}$ 。

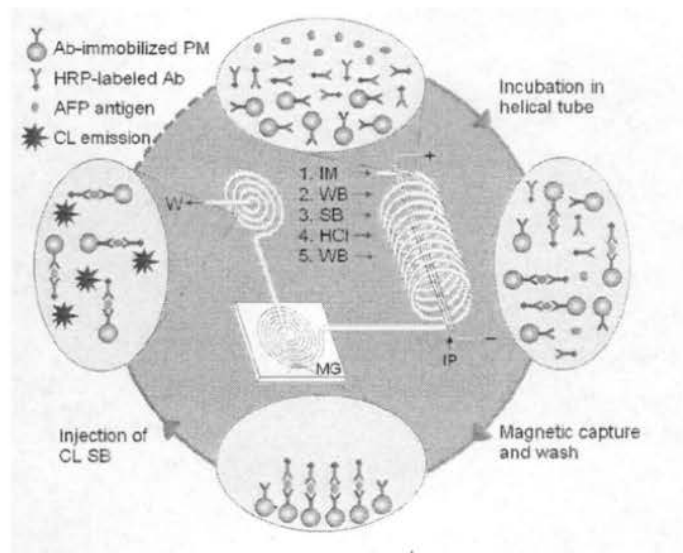


图1.51 基于磁珠的ELISA及化学发光免疫分析系统^[113]。

Ab，抗体；PM，磁珠；W，废液；IM，孵育混合物；WB，清洗缓冲液；SB，底物溶液；IP，红外线辐射石英管；MG，磁铁。

1.6 小结与本论文的立题思想

免疫分析以其极高的特异性和灵敏度在生物医学基础研究和临床检测、环境监测、食品安全检验等诸多方面均发挥着十分重要的作用，但长期以来，传统免疫分析方法费时、操作繁琐复杂、试剂及试样的高消耗等特点明显制约了其进一步的应用和发展。

近十年来，随着微流控技术的长足发展，不断有研究将微流控技术与免疫分析结合起来，以缩短分析时间，降低试样试剂消耗，简化操作过程。与传统免疫分析系统相比，微流控免疫分析系统通过特有的微尺度效应和显著提高的比表面积，使分析时间从数十小时缩短到数分钟或数十分钟，试剂及试样的消耗从数毫升或数百微升减少到数微升甚至数纳升。通过对芯片上微通道网络中流体的操控，使传统方法中主要依靠手工进行的繁琐操作亦得以简化或自动化。微流控免疫分析显著改善了传统免疫分析方法的弱点，进一步贴近了临床工作及环境和食

品安全中的快速及微量检测的实际需要。

如前所述,微流控免疫分析主要分为微流控均相免疫分析和微流控非均相免疫分析两大类,其中因非均相免疫分析方法具有更高的灵敏度和特异性更为常用。微流控非均相免疫分析方法与经典方法相似,具有两个主要特点:其一,是必须具备相应的固相载体;其二,必须顺序引入一系列的抗原、抗体溶液及不同的试剂完成所需的免疫反应、清洗、游离抗体与抗原-抗体复合物分离等一系列操作。微流控非均相免疫分析的相关研究亦主要集中在这两个方面,尤以对各种抗体固相载体的研究为重。而对于顺序引入一系列试剂和试样的分析操作则大部分系统仍然主要依靠手工操作,使得分析过程不够简便,试剂和试样的消耗仍较大,亦明显影响了分析速度。近年来,随着对微流控免疫分析方法认识的深入,人们逐渐认识到在微流控系统中实现免疫分析操作自动化的重要性和必要性。

目前,在文献报道的微流控免疫分析系统中,实现分析操作自动化的方法主要包括以下几类:1.电渗驱动和切换;2.芯片上集成微泵微阀;3.离心力驱动结合突破阀;4.预封装管结合芯片;5.顺序注射泵结合多位阀;6.毛细作用驱动结合免疫条带。这些方法通过相应的技术手段在芯片上不同程度地实现了一系列自动化操作,摆脱了以往传统方法中主要依赖手工进行的费时费力的繁琐操作,全部分析过程更加简便、快捷,同时亦进一步降低了试剂及试样的消耗。但上述研究的共同特点是系统中往往需要较复杂的设备或技术,如采用刻蚀、光刻及微加工技术制作具有微通道网络的玻璃/高聚物芯片甚至复层芯片,或在芯片上制备多个微阀并对微阀阵列进行操控,或借助多触点高压电源进行电动切换等。使得整个分析系统的搭建难度较大,或者对不同溶液的操控仍显得不够简便。

本论文的研究目标是采用相对简单的系统,自动地完成免疫分析所需的一系列试样和试剂顺序引入操作,系统具有容易搭建,使用方便的特点。同时,保持微流控分析系统分析速度快,试样及试剂消耗低的优势。

1.7 参考文献

- [1] 鞠焜先,邱宗荫,丁世家等.生物分析化学.北京:科学出版社,2007.
- [2] Whitesides G M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 2006, 442, 368-373.
- [3] 方肇伦等编著.微流控分析芯片.北京:科学出版社,2003.

- [4] 贾宏新, 吴志勇, 方肇伦. 微流控芯片免疫分析方法研究进展. *分析化学* **2005**, 33, 1489-1493.
- [5] 王立凯, 冯喜增. 微流控芯片技术在生命科学研究中的应用. *化学进展* **2005**, 17, 482-498.
- [6] 陶义训主编. 免疫学和免疫学检验(第二版). 北京: 人民卫生出版社, **1997**.
- [7] Koutny L B, Schmalzing D, Taylor T A, Fuchs M. Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 18-22.
- [8] Von Heeren F, Verpoorte E, Manz A, Thormann W. Micellar electrokinetic chromatography separations and analyses of biological samples on a cyclic planar microstructure. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2044-2053.
- [9] Chiem N, Harrison D J. Microchip-based capillary electrophoresis for immunoassays: analysis of monoclonal antibodies and theophylline. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 373-379.
- [10] Schmalzing D, Koutny L B, Taylor T A, Nashabeh W, Fuchs M. Immunoassay for thyroxine (T4) in serum using capillary electrophoresis and micromachined devices. *J. Chromatogr. B* **1997**, 697, 175-180.
- [11] Bromberg A, Mathies R A. Homogeneous immunoassay for detection of TNT and its analogues on a microfabricated capillary electrophoresis chip. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 1188-1195.
- [12] Bromberg A, Mathies R A. Multichannel homogeneous immunoassay for detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) using a microfabricated capillary array electrophoresis chip. *Electrophoresis* **2004**, 25, 1895-1900.
- [13] Lim T, Ohta H, Matsunaga T. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3316-3321.
- [14] Abad-Villar E M, Tanyanyiwa J, Fernandez-Abedul M T, Costa-Garcia A, Hauser P C. Detection of human immunoglobulin in microchip and conventional capillary electrophoresis with contactless conductivity measurements. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1282-1288.
- [15] Shin K-S, Kim Y-H, Min J-A, Kwak S-M, Kim S-K, Yang E-G, Park J-H, Ju B-K, Kim T-S, Kang J-Y. Miniaturized fluorescence detection chip for capillary electrophoresis immunoassay of agricultural herbicide atrazine. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 573-574, 164-171.
- [16] Chiem N H, Harrison D J. Microchip systems for immunoassay: an integrated immunoreactor with electrophoretic separation for serum theophylline

- determination. *Clin. Chem.* **1998**, 44, 591-598.
- [17] Cheng S B, Skinner C D, Taylor J, Attiya S, Lee W E, Picelli G, Harrison D J. Development of a multichannel microfluidic analysis system employing affinity capillary electrophoresis for immunoassay. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1472-1479.
- [18] Wang J, Ibanez A, Chatrathi M P, Escarpa A. Electrochemical enzyme immunoassays on microchip platforms. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5323-5327.
- [19] Herr A E, Hatch A V, Throckmorton D J, Huu M T, Brennan J S, Giannobile W V, Singh A K. Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics. *PNAS.* **2007**, 104, 5268-5273.
- [20] Roper M G, Shackman J G, Dahlgren G M, Kennedy R T. Microfluidic chip for continuous monitoring of hormone secretion from live cells using an electrophoresis-based immunoassay. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 4711-4717.
- [21] Dishinger J F, Kennedy R T. Serial immunoassays in parallel on a microfluidic chip for monitoring hormone secretion from living cells. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 947-954.
- [22] Schult K, Katerkamp A, Trau D, Grawe F, Cammann K, Meusel M. Disposable optical sensor chip for medical diagnostics: new ways in bioanalysis. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 5430-5435.
- [23] Rossier J S, Girault H H. Enzyme linked immunosorbent assay on a microchip with electrochemical detection. *Lab Chip* **2001**, 1, 153-157.
- [24] McDonald J C, Metallo S J, Whitesides G M. Fabrication of a configurable, single-use microfluidic device. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5645-5650.
- [25] Juncker D, Schmid H, Drechsler U, Wolf H, Michel B, de Rooij N, Delamarche E. Autonomous microfluidic capillary systems. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 6139-6144.
- [26] Morier P, Vollet C, Michel P E, Reymond F, Rossier J S. Gravity-induced convective flow in microfluidic systems: electrochemical characterization and application to enzyme-linked immunosorbent assay tests. *Electrophoresis* **2004**, 25, 3761-3768.
- [27] Bernard A, Michel B, Delamarche E. Micromosaic immunoassays. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 8-12.
- [28] Cesaro-Tadic S, Dernick G, Juncker D, Buurman G, Kropshofer H, Michel B, Fattinger C, Delamarche E. High-sensitivity miniaturized immunoassays for tumor necrosis factor α using microfluidic systems. *Lab Chip* **2004**, 4, 563-569.

- [29] Wolf M, Juncker D, Michel B, Hunziker P, Delamarche E. Simultaneous detection of C-reactive protein and other cardiac markers in human plasma using micromosaic immunoassays and self-regulating microfluidic networks. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 19, 1193-1202.
- [30] Ziegler J, Zimmermann M, Hunziker P, Delamarche E. High-performance immunoassays based on through-stencil patterned antibodies and capillary systems. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 1763-1769.
- [31] Sia S K, Linder V, Parviz B A, Siegel A, Whitesides G M. An integrated approach to a portable and low-cost immunoassay for resource-poor settings. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 498-502.
- [32] He X, Dandy D S, Henry C S. Microfluidic protein patterning on silicon nitride using solvent-extracted poly(dimethylsiloxane) channels. *Sensors and Actuators B.* **2008**, 129, 811-817.
- [33] Hosokawa K, Omata M, Sato K, Maeda M. Power-free sequential injection for microchip immunoassay toward point-of-care testing. *Lab Chip* **2006**, 6, 236-241.
- [34] Hosokawa K, Omata M, Maeda M. Immunoassay on a power-free microchip with laminar flow-assisted dendritic amplification. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 6000-6004.
- [35] Kurita R, Yokota Y, Sato Y, Mizutani F, Niwa O. On-chip enzyme immunoassay of a cardiac marker using a microfluidic device combined with a portable surface plasmon resonance system. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 5525-5531.
- [36] Du Z, Cheng K H, Vaughn M W, Collie N L, Gollahon L S. Recognition and capture of breast cancer cells using an antibody-based platform in a microelectromechanical systems device. *Biomed. Microdevices* **2007**, 9, 35-42.
- [37] Weibel D B, Kruithof M, Potenta S, Sia S K, Lee A, Whitesides G M. Torque-actuated valves for microfluidics. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 4726-473.
- [38] Henares T G, Funano S I, Terabe S, Mizutani F, Sekizawa R, Hisamoto H. Multiple enzyme linked immunosorbent assay system on a capillary-assembled microchip integrating valving and immuno-reaction functions. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 589, 173-179.
- [39] Eteshola E, Leckband D. Development and characterization of an ELISA assay in PDMS microfluidic channels. *Sensors and Actuators B* **2001**, 72, 129-133.
- [40] Driskell J D, Kwarta K M, Lipert R J, Porter M D. Low-level detection of viral

- pathogens by a surface-enhanced raman scattering based immunoassay. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 6147-6154.
- [41] Torabi F, Reza H, Far M, Danielsson B, Khayyamia M. Development of a plasma panel test for detection of human myocardial proteins by capillary immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 1218-1223.
- [42] Yu L, Li C-M, Zhou Q, Luong J H T. Poly(vinyl alcohol) functionalized poly(dimethylsiloxane) solid surface for immunoassay. *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 281-284.
- [43] Yu L, Li C-M, Liu Y-S, Gao J, Wang W, Gan Y. Flow-through functionalized PDMS microfluidic channels with dextran derivative for ELISAs. *Lab Chip* **2009**, 9, 1243-1247.
- [44] Sui G, Wang J, Lee C-C, Lu W, Lee S P, Leyton J V, Wu A M, Tseng H-R. Solution-phase surface modification in intact poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 5543-5551.
- [45] Dodge A, Fluri K, Verpoorte E, de Rooij N F. Electrokinetically driven microfluidic chips with surface-modified chambers for heterogeneous immunoassays. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3400-3409.
- [46] Eteshola E, Balberg M. Microfluidic ELISA: on-chip fluorescence imaging. *Biomedical Microdevices* **2004**, 6, 7-9.
- [47] Ho J A, Huang M-R. Application of a liposomal bioluminescent label in the development of a flow injection immunoanalytical system. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 3431-3436.
- [48] Hashimoto M, Kaji H, Kemppinen M E, Nishizawa M. Localized immobilization of proteins onto microstructures within a preassembled microfluidic device. *Sensors and Actuators B* **2008**, 128, 545-551.
- [49] Linder V, Verpoorte E, Thormann W, de Rooij N F, Sigrist H. Surface biopassivation of replicated poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels and application to heterogeneous immunoreaction with on-chip fluorescence detection. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4181-4189.
- [50] Linder V, Verpoorte E, de Rooij N F, Sigrist H, Thormann W. Application of surface biopassivated disposable poly(dimethylsiloxane)/glass chips to a heterogeneous competitive human serum immunoglobulin G immunoassay with incorporated internal standard. *Electrophoresis* **2002**, 23, 740-749.
- [51] Delehanty J B, Ligler F S. A microarray immunoassay for simultaneous

- detection of proteins and bacteria. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5681-5687.
- [52] Yang T, Jung S-Y, Mao H, Cremer P S. Fabrication of phospholipid bilayer-coated microchannels for on-chip immunoassays. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 165-169.
- [53] Dong Y, Phillips K S, Cheng Q. Immunosensing of staphylococcus enterotoxin B (SEB) in milk with PDMS microfluidic systems using reinforced supported bilayer membranes (r-SBMs). *Lab Chip* **2006**, 6, 675-681.
- [54] Phillips K S, Cheng Q. Microfluidic immunoassay for bacterial toxins with supported phospholipid bilayer membranes on poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.* **2005**, 77, 327-334.
- [55] Stokes D L, Griffin G D, Vo-Dinh T. Detection of E. coli using a microfluidics-based antibody biochip detection system. *Fresenius J Anal. Chem.* **2001**, 369, 295-301.
- [56] Bange A, Halsall B H, Heineman W R. Microfluidic immunosensor systems. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20, 2488-2503.
- [57] Sato K, Tokeshi M, Odake T, Kimura H, Ooi T, Nakao M, Kitamori T. Integration of an immunosorbent assay system: analysis of secretory human immunoglobulin A on polystyrene beads in a microchip. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1144-1147.
- [58] Sato K, Tokeshi M, Kimura H, Kitamori T. Determination of carcinoembryonic antigen in human sera by integrated bead-bed immunoassay in a microchip for cancer diagnosis. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1213-1218.
- [59] Kiichi Sato, Maho Yamanaka, Hiroko Takahashi, Manabu Tokeshi, Hiroko Kimura, Takehiko Kitamori. Microchip-based immunoassay system with branching multichannels for simultaneous determination of interferon- γ . *Electrophoresis* **2002**, 23: 734-739.
- [60] Sato K, Yamanaka M, Hagino T, Tokeshi M, Kimura H, Kitamori T. Microchip-based enzyme-linked immunosorbent assay (microELISA) system with thermal lens detection. *Lab Chip* **2004**, 4, 570-575.
- [61] Murakamia Y, Endo T, Yamamura S, Nagatanic N, Takamura Y, Tamiya E. On-chip micro-Xow polystyrene bead-based immunoassay for quantitative detection of tacrolimus (FK506). *Anal. Biochem.* **2004**, 334, 111-116.
- [62] Malmstadt N, Hoffman A S, Stayton P S. "Smart" mobile affinity matrix for microfluidic immunoassays. *Lab Chip* **2004**, 4, 412-415.

- [63] Haes A J, Terray A, Collins G E. Bead-assisted displacement immunoassay for staphylococcal enterotoxin B on a microchip. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 8412-8420.
- [64] Shin K-S, Lee S-W, Han K-C, Kim S-K, Yang E-K, Park J-H, Ju B-K, Kang J-Y, Kim T-S. Amplification of fluorescence with packed beads to enhance the sensitivity of miniaturized detection in microfluidic chip. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2261-2267.
- [65] Yasukawa T, Suzuki M, Sekiya T, Shiku H, Matsue T. Flow sandwich-type immunoassay in microfluidic devices based on negative dielectrophoresis. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2730-2736.
- [66] Peoples M C, Karnes H T. Microfluidic capillary system for immunoaffinity separations of C-reactive protein in human serum and cerebrospinal fluid. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 3853-3858.
- [67] Christodoulides N, Tran M, Floriano P N, Rodriguez M, Goodey A, Ali M, Neikirk D, McDevitt J T. A microchip-based multianalyte assay system for the assessment of cardiac risk. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 3030-3036.
- [68] Moorthy J, Mensing G A, Kim D, Mohanty S, Eddington D T, Tepp W H, Johnson E S, Beebe D J. Microfluidic tectonics platform: A colorimetric, disposable botulinum toxin enzyme-linked immunosorbent assay system. *Electrophoresis* **2004**, 25, 1705-1713.
- [69] 朱海霖, 陈恒武, 周永列. 顺序注射可更新表面固相荧光免疫法测定人血清中免疫球蛋白G. *分析化学*, **2004**, 32, 841-846.
- [70] Kakuta M, Takahashi H, Kazuno S, Murayama K, Ueno T, Tokeshi M. Development of the microchip-based repeatable immunoassay system for clinical diagnosis. *Meas. Sci. Technol.* **2006**, 17, 3189-3194.
- [71] Choi J-W, Ahn C H, Bhansali S, Henderson H T. A new magnetic bead-based, filterless bio-separator with planar electromagnet surfaces for integrated bio-detection systems. *Sens. Actuators B* **2000**, 68, 34-39.
- [72] Hayes M A, Polson N A, Phayre A N, Garcia A A. Flow-based microimmunoassay. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5896-5902.
- [73] Wellman A D, Sepaniak M J. Multiplexed, waveguide approach to magnetically assisted transport evanescent field fluoroassays. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 6622-6628.
- [74] Choi J-W, Oh K W, Thomas J H, Heineman W R, Halsall H B, Nevin J H,

- Helmicki A J, Henderson H T, Ahn C H. An integrated microfluidic biochemical detection system for protein analysis with magnetic bead-based sampling capabilities. *Lab Chip* **2002**, 2, 27-30.
- [75] Farrell S, Ronkainen-Matsuno N J, Halsall H B, Heineman W R. Bead-based immunoassays with microelectrode detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 379, 358-367.
- [76] Herrmann M, Veres T, Tabrizian M. Enzymatically-generated fluorescent detection in micro-channels with internal magnetic mixing for the development of parallel microfluidic ELISA. *Lab Chip* **2006**, 6, 555-560.
- [77] Herrmann M, Veres T, Tabrizian M. Quantification of low-picomolar concentrations of TNF- α in serum using the dual-network microfluidic ELISA platform. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 5160-5167.
- [78] Do J, Ahn C H. A polymer lab-on-a-chip for magnetic immunoassay with on-chip sampling and detection capabilities. *Lab Chip* **2008**, 8, 542-549.
- [79] Lacharme F, Vandevyver C, Gijs M A M. Full on-chip nanoliter immunoassay by geometrical magnetic trapping of nanoparticle chains. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 2905-2910.
- [80] Kim K S, Park J-K. Magnetic force-based multiplexed immunoassay using superparamagnetic nanoparticles in microfluidic channel. *Lab Chip* **2005**, 5, 657-664.
- [81] Hahn Y K, Jin Z, Kang J H, Oh E, Han M-K, Kim H-S, Jang J-T, Lee J-H, Cheon J, Kim S H, Park H-S, Park J-K. Magnetophoretic immunoassay of allergen-specific IgE in an enhanced magnetic field gradient. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 2214-2220.
- [82] Hahn Y K, Chang J B, Jin Z, Kim H S, Park J-K. Magnetophoretic position detection for multiplexed immunoassay using colored microspheres in a microchannel. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 1870-1876.
- [83] Sista R S, Eckhardt A E, Srinivasan V, Pollack M G, Palankib S, Pamula V K. Heterogeneous immunoassays using magnetic beads on a digital microfluidic platform. *Lab Chip* **2008**, 8, 2188-2196.
- [84] Sista R, Hua Z, Thwar P, Sudarsan A, Srinivasan V, Eckhardt A, Pollack M, Pamula V. Development of a digital microfluidic platform for point of care testing. *Lab Chip* **2008**, 8, 2091-2104.
- [85] Aguilar Z P, Vandaveer W R, Fritsch I. Self-contained microelectrochemical

- immunoassay for small volumes using mouse IgG as a model system. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 3321-3329.
- [86] Ko J S, Yoon H C, Yang H, Pyo H-B, Chung K H, Kim S J, Kim Y T. A polymer-based microfluidic device for immunosensing biochips. *Lab Chip* **2003**, 3, 106-113.
- [87] Dong H, Li C M, Zhou Q, Sun J B, Miao J M. Sensitive electrochemical enzyme immunoassay microdevice based on architecture of dual ring electrodes with a sensing cavity chamber. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 22: 621-626.
- [88] Dong H, Li C-M, Zhang Y-F, Cao X-D, Gan Y. Screen-printed microfluidic device for electrochemical immunoassay. *Lab Chip* **2007**, 7, 1752-1758.
- [89] Nashida N, Satoh W, Fukuda J, Suzuki H. Electrochemical immunoassay on a microfluidic device with sequential injection and flushing functions. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 3167-3173.
- [90] Yang C-Y, Brooks E, Li Y, Denny P, Ho C-M, Qi F, Shi W, Wolinsky L, Wu B, Wongbdef D T W, Montemagno C D. Detection of picomolar levels of interleukin-8 in human saliva by SPR. *Lab Chip* **2005**, 5, 1017-1023.
- [91] Mujika M, Arana S, Castano E, Tijero M, Vilares R, Ruano-López J M., Cruz A, Sainz L, Berganza J. Magnetoresistive immunosensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 including a microfluidic network. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 1253-1258.
- [92] Soto C M, Martin B D, Sapsford K E, Blum A S, Ratna B R. Toward single molecule detection of staphylococcal enterotoxin B: mobile sandwich immunoassay on gliding microtubules. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 5433-5440.
- [93] Hu G, Gao Y, Sherman P M, Li D. A microfluidic chip for heterogeneous immunoassay using electrokinetical control. *Microfluid. Nanofluid.* **2005**, 1, 346-355.
- [94] Gao Y, Sherman P M, Sun Y, Li D. Multiplexed high-throughput electrokinetically-controlled immunoassay for the detection of specific bacterial antibodies in human serum. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 606, 98-107.
- [95] Linder V, Verpoorte E, Thormann W, de Rooij N F, Sigrist H. Surface biopassivation of replicated poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels and application to heterogeneous immunoreaction with on-chip fluorescence detection. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4181-4189.
- [96] Gao Y, Hu G, Lin F Y H, Sherman P M, Li D. An electrokinetically-controlled

- immunoassay for simultaneous detection of multiple microbial antigens. *Biomed. Microdev.* **2005**, 7, 301-312.
- [97] Tsukagoshi K, Jinno N, Nakajima R. Development of a micro total analysis system incorporating chemiluminescence detection and application to detection of cancer markers. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1684-1688.
- [98] Wang C-H, Lee G-B. Automatic bio-sampling chips integrated with micro-pumps and micro-valves for disease detection. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 419-425.
- [99] Kartalov E P, Zhong J F, Scherer A, Quake S R, Taylor C R, Anderson W F. High-throughput multi-antigen microfluidic fluorescence immunoassays. *BioTech.* **2006**, 40, 85-90.
- [100] Lee K-H, Su Y-D, Chen S-J, Tseng F-G, Lee G-B. Microfluidic systems integrated with two-dimensional surface plasmon resonance phase imaging systems for microarray immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 23, 466-472.
- [101] Luo Y, Yu F, Zare R N. Microfluidic device for immunoassays based on surface plasmon resonance imaging. *Lab Chip* **2008**, 8, 694-700.
- [102] Kong J, Jiang L, Su X, Qin J, Du Y, Lin B. Integrated microfluidic immunoassay for the rapid determination of clenbuterol. *Lab Chip* **2009**, 9, 1541-1547.
- [103] Suarez G, Jin Y-H, Auerswald J, Berchtold S, Knapp H F, Diserens J-M, Leterrier Y, Manson J-A E, Voirin G. Lab-on-a-chip for multiplexed biosensing of residual antibiotics in milk. *Lab Chip* **2009**, 9, 1625-1630.
- [104] Yang S-Y, Lien K-Y, Huang K-J, Lei H-Y, Lee G-B. Micro flow cytometry utilizing a magnetic bead-based immunoassay for rapid virus detection. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 24, 855-862.
- [105] Lee B S, Lee J-N, ark J-M, Lee J-G, Kim S, Cho Y-K, Koa C. A fully automated immunoassay from whole blood on a disc. *Lab Chip* **2009**, 9, 1548-1555.
- [106] Ahn-Yoon S, DeCory T R, Baeumner A J, Durst R A. Ganglioside-liposome immunoassay for the ultrasensitive detection of cholera toxin. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2256-2261.
- [107] Cho J-H, Paek E-H, Cho I-H, Paek S-H. An enzyme immunoanalytical system based on sequential cross-flow chromatography. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 4091-4097.

- [108] Lai S, Wang S, Luo J, Lee L J, Yang S-T, Madou M J. Design of a compact disk-like microfluidic platform for enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1832-1837.
- [109] Nagai H, Narita Y, Ohtaki M, Saito K, Wakida S-I. A single-bead analysis on a disk-shaped microfluidic device using an antigen-immobilized bead. *Anal. Sci.* **2007**, 23, 975-979.
- [110] Linder V, Sia S K, Whitesides G M. Reagent-loaded cartridges for valveless and automated fluid delivery in microfluidic devices. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 64-71.
- [111] Ohashi T, Mawatari K, Sato K, Tokeshic M, Kitamori T. A micro-ELISA system for the rapid and sensitive measurement of total and specific immunoglobulin E and clinical application to allergy diagnosis. *Lab Chip.* **2009**, 9, 991-995.
- [112] Yakovleva J, Davidsson R, Lobanova A, Bengtsson M, Eremin S, Laurell T, Emneus J. Microfluidic enzyme immunoassay using silicon microchip with immobilized antibodies and chemiluminescence detection. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2994-3004.
- [113] Liu H, Yang Z, Yan F, Xu Y, Ju H. Three-minute-long chemiluminescent immunoassay using dually accelerated immunoreaction by infrared heating and passive mixing. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 4043-4047.

2 基于毛细管和缺口管阵列的自动化微流控免疫分析系统

2.1 引言

免疫分析的基础是抗原与抗体之间的特异性识别和结合,由于其具有极高的选择性和灵敏度,被广泛的应用于生物分子(尤其是蛋白质和多肽)的分析,在临床诊断治疗、生化分析、食品安全、环境监测等诸多领域发挥着极为重要的作用^[1,2]。非均相免疫分析方法由于具有更高的灵敏度和更适于蛋白质等大分子物质的分析成为实际应用领域中占主导地位的免疫分析技术^[3]。但常规的非均相免疫分析系统,通常采用手工法完成一系列步骤繁琐的操作,费时费力,试样和试剂消耗量较大(数百微升),已难以满足实际应用中快速检测、个体随检、低消耗以及自动化便携式检测方法的日益增长的需求。

近十年来,随着微流控免疫分析研究的进一步深入,有关实现微流控非均相免疫分析操作自动化的研究日益增多,多种自动化的微流体操控技术被应用于微流控免疫分析系统中,以实现操作的自动化。目前,文献报道较多的技术包括电渗驱动和切换技术^[4-6]、集成化PDMS微泵微阀技术^[7-9]、离心式芯片结合突破阀技术^[1,10-11]、试剂预封管结合芯片技术^[12]、以及注射泵和多位阀控制技术^[13-14]。上述研究通过相应的技术手段在微流控免疫分析芯片上实现了一系列试剂及试样顺序引入操作的自动化,摆脱了以往传统系统中费时、费力、繁琐的手工操作,全部操作过程更加简便快捷,进一步缩短了分析时间,降低了试剂及试样的消耗,显著提高了系统的分析通量和分析性能。

但在上述自动化微流控免疫分析系统中,不同程度上存在着一些局限性,如系统结构复杂,系统的构建往往需要特殊的微加工设备或复杂微加工工艺或技术等,在一定程度上影响了自动化微流控免疫分析技术在实际分析中的广泛普及。

在本章工作中,发展了一种基于毛细管和缺口管阵列的微流控非均相免疫分析系统。系统将毛细管阵列与缺口管阵列匹配,实现非均相免疫分析中试样试剂顺序引入操作的自动化。系统以重力作为液流驱动力,毛细管既作为取样探针,同时又作为抗原和抗体进行免疫反应的通道和固相载体,不需要微加工芯片以及复杂的流体驱动系统。系统具有结构简单,容易搭建,操作简便、快捷,成本低廉的特点。该系统被应用于人IgG的免疫分析中,免疫反应时间缩短至4 min,试样和试剂的消耗降至1.1 μL 。采用毛细管阵列,可同时完成9个样品的同步平

行测定。

2.2 实验部分

2.2.1 实验试剂

本实验中使用的所有试剂均为分析纯,实验用水为 Millipore 系统 (Millipore Co., Bedford, USA) 制备的超纯去离子水。

采用 0.1M 的 NaOH 溶液和 0.1M 的 HCl 溶液对毛细管内壁进行清洗。

毛细管硅烷化试剂:

(1) 10% 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (3-aminopropyltriethoxysilane, 3-APTES) 甲苯溶液: 取 3-APTES 50 μL , 溶于 450 μL 的甲苯中, 配制成 10% 的 3-APTES 甲苯溶液。

(2) 2.5% 戊二醛溶液: 取 25% 的戊二醛溶液 100 μL , 溶于 900 μL 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=7.0) 中, 配制成 2.5% 戊二醛溶液。

免疫试剂: 分别采用羊抗人 IgG 亲和纯化抗体 (2.3 mg/mL, Sigma-Aldrich, USA) 和 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体 (3.9 mg/mL, Sigma-Aldrich, USA) 作为非均相夹心免疫反应中的固定抗体和检测抗体, 实验前分别以包被缓冲液和 pH=7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS, 吉诺生物医药技术有限公司, 杭州) 稀释至 200 $\mu\text{g/mL}$ 备用。包被缓冲液为 pH=9.6 的碳酸盐缓冲液。

采用纯化的人 IgG 冻干粉 (纯度 > 98%, 北京博奥森生物技术有限公司) 作为样品, 实验前以 pH=7.4 的 PBS 稀释成不同浓度标准溶液备用。实验前用小牛血清白蛋白 (BSA, 北京博奥森生物技术有限公司) 和 pH=7.4 的 PBS 配制浓度为 1% 的 BSA 溶液作为封闭液。

2.2.2 仪器设备

直线滑台 (KR2602A, THK, 东京, 日本)

倒置荧光显微镜 (ECLIPSE TE-2000-S, Nikon Corporation, Japan)

高灵敏 CCD 照相机 (SPOT RT-SE6 Monochrome, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA)

2.2.3 抗体固定化毛细管的制备

实验中, 采用两种毛细管, 分别是聚酰亚胺涂层的熔融石英毛细管 (75- μm i.d., 375- μm o.d., 河北永年瑞沅色谱器件有限公司) 和紫外透明涂层的熔融石英毛细管 (75- μm i.d., 375- μm o.d., 郑州英诺色谱实验技术有限公司)。使用前需要

对毛细管的内壁进行硅烷化处理以提高抗体的固定效率。

（一）毛细管内壁硅烷化

（1）清洗：将一段长 13 cm 的毛细管的一端浸入 0.1M NaOH 溶液，另一端通过一段泵管与一个注射器相连，通过负压抽吸 0.1M NaOH 溶液清洗毛细管内壁 30 min，再用去离子水清洗 30 min；然后以同样方法用 0.1M HCL 溶液清洗毛细管 30 min，去离子水清洗 30 min。最后以 N₂ 气吹干毛细管内壁。

（2）硅烷化处理：采用注射器抽吸的方法立即将 10% 的 3-APTES 甲苯溶液充满刚刚清洗并吹干完毕的毛细管，将毛细管两端分别用小橡皮块塞封，常温下放置过夜，110℃ 加热 4 小时，然后以去离子水清洗 30 min。

（二）偶联戊二醛

采用注射器抽吸的方法将 2.5% 的戊二醛溶液充满毛细管 1 小时，再以去离子水清洗 30 min。

（三）抗体的固定化

（1）使用前用包被缓冲液将羊抗人 IgG 抗体溶液的浓度稀释为 200 μg/mL。将硅烷化处理完毕的毛细管的一端浸入抗体溶液，另一端通过一段泵管与一个注射器相连，通过负压抽吸固定抗体溶液充满毛细管，用小橡皮块分别将毛细管两端密封，4℃ 保存过夜。

（2）毛细管内壁固定抗体后需要对内壁表面进行封闭处理，以减少蛋白质的非特异性吸附。将已经固定好抗体的毛细管从冰箱中取出，用 pH=7.4 的 PBS 清洗毛细管内的抗体溶液 30 min，再吸入 1% 的 BSA 封闭液充满毛细管，用小橡皮块分别将毛细管两端密封后放入冰箱内，4℃ 保存过夜。24 小时后，用 PBS 清洗毛细管内的 BSA 封闭液 30 min，将清洗过的毛细管充满 PBS 缓冲液，两端密封后放入 4℃ 冰箱内保存备用。

2.2.4 系统搭建

该自动化微流控非均相免疫分析系统的结构如图 2.1 和图 2.2 所示。系统由毛细管阵列、缺口管阵列和直线滑台控制平移台组成。

用特种陶瓷石英毛细管切割刀（Polymicro Technologies, Phoenix, USA）切割经过抗体固定化处理的毛细管，将毛细管截成 10 段，每段长 1.3 cm，要求每段毛细管两端的端面尽可能平整光洁，没有突出的毛刺或缺口。用透明胶带将毛细管分别固定在玻璃载片上的凹槽内，保持 10 段毛细管的进口在同一条直线上。

玻璃载片的大小为长 63 mm, 宽 5 mm, 厚度为 1 mm。采用紫外光刻和湿法刻蚀的方法在载片上加工 10 条等距的凹槽, 凹槽的宽度为 250 μm 、深度为 100 μm , 相邻凹槽之间的间距为 4.5 mm。

缺口管阵列采用 384 孔板(Axygen, INC. USA)制作。在 384 孔板上截下 5×10 管的阵列, 在每一个小管的底部切割一个宽 1.5 mm, 深 1.5 mm 的缺口, 制成 5×10 缺口管阵列。将缺口管阵列通过乐高积木和热熔胶水平地固定在直线滑台的移动杆上, 由直线滑台按照预定程序带动缺口管阵列板的移动。直线滑台控制平台的运行程序由潘建章设计。

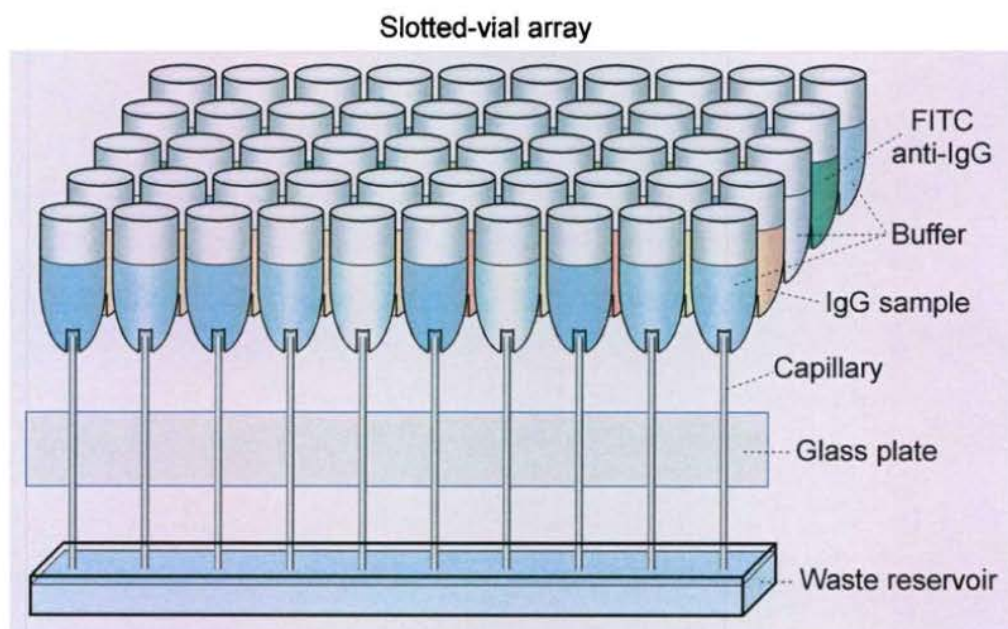


图 2.1 自动化微流控免疫分析系统装置图。

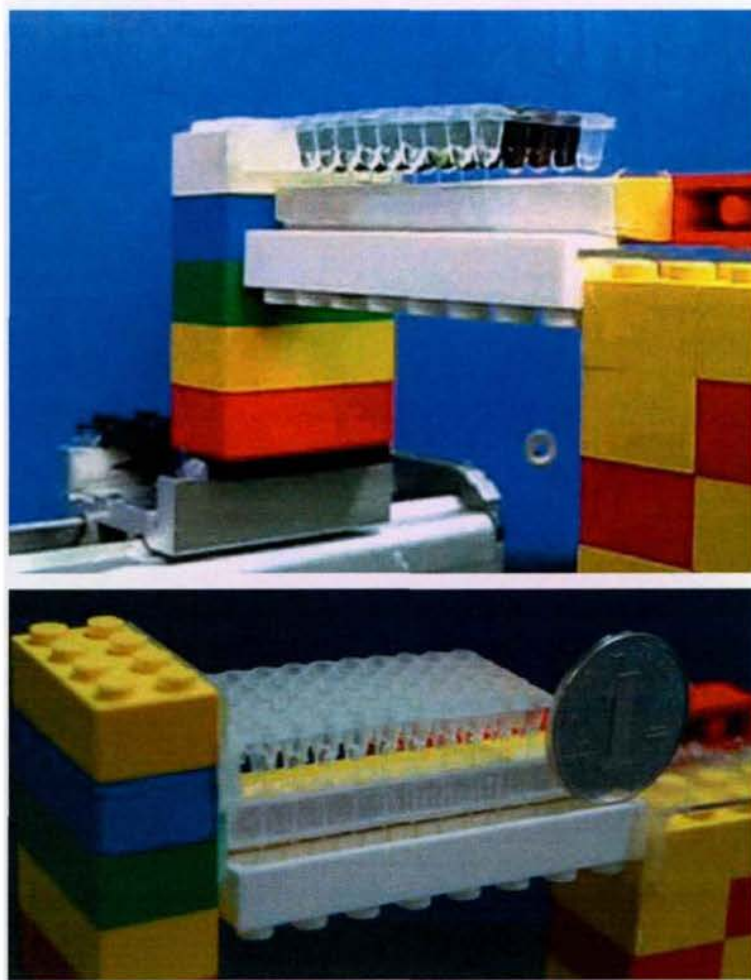


图 2.2 自动化微流控免疫分析系统照片。

2.2.5 系统优化实验

在进行人 IgG 的免疫测定前,对该免疫分析系统的实验条件进行了优化。具体条件包括:人 IgG 与固定抗体之间反应的时间、荧光标记抗体与固定化人 IgG 反应的时间、清洗未结合荧光标记抗体和 IgG 抗原所需要的时间。

在有关清洗时间优化的实验中,采用倒置荧光显微镜对清洗过程中毛细管通道内的荧光信号进行在线检测。毛细管水平放置于显微镜平台上,其出口端连接一段 Tygon 泵管。毛细管内液体的流速由毛细管入口端和泵管出口端之间的液位差决定。通过该液位差,使毛细管内液体的流速刚好与实际免疫分析系统中垂直放置的毛细管内液体的流速相等,即液体的流速为 $1.1 \mu\text{L}/\text{min}$ 。实验中,样品与固定抗体和标记抗体的反应时间均为 5 min。

2.2.6 免疫分析操作

本研究中以人 IgG 作为待测抗原,采用非均相夹心荧光免疫分析方法对其进

行测定。免疫分析原理如图 2.3 所示。

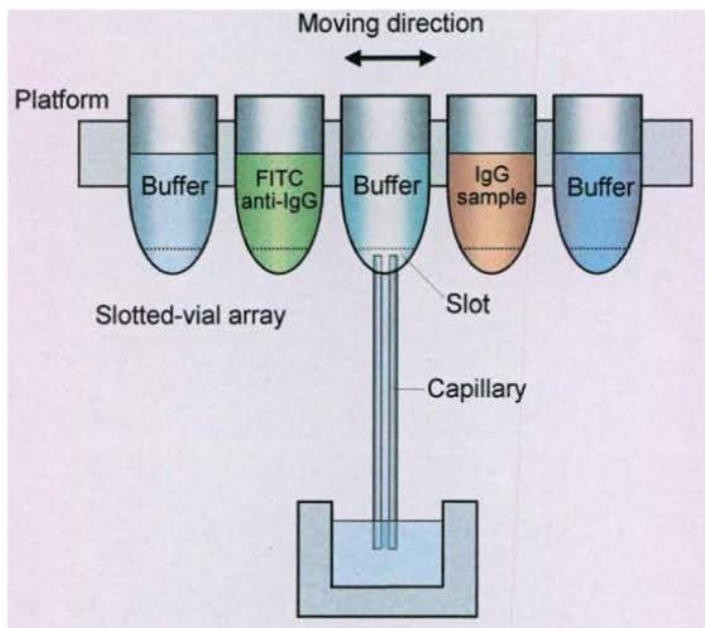


图 2.3 自动化微流控免疫分析系统分析原理图。

具体实验操作步骤如下：

- （1）在缺口管阵列中第二排的第 1 至第 9 个缺口管内分别加入 20 μL 样品溶液，第 10 管内加入 20 μL PBS 作为阴性对照；
- （2）在缺口管阵列中第四排的 10 个缺口管内分别加入 20 μL 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 FITC 标记抗 IgG 抗体溶液；
- （3）在缺口管阵列中第一排、第三排和第五排中的 30 个缺口管内，分别加入 20 μL PBS (pH=7.4)；
- （4）在废液池内加入去离子水；
- （5）将 10 个毛细管内充满 PBS (pH=7.4)，并固定在刻有凹槽的玻璃载片上，使各毛细管的进口端分别浸入其上方第一排缺口管内的 PBS 中约 1 mm，出口端浸入废液池中的液面以下。缺口管内的液体在液位差作用下，由进口端被引入毛细管，流经毛细管通道后，由出口端流入废液池；
- （6）打开直线滑台电源，在直线滑台预定程序的控制下，缺口管阵列每隔一定时间向前移动 4.5 mm，使各毛细管进口端浸入下一排缺口管的溶液内。顺序向毛细管内引入 PBS、人 IgG 试样、PBS、FITC 标记的抗人 IgG 抗体、PBS，

完成免疫分析操作。

(7) 将毛细管由玻璃载片上取下, 两端用真空封泥密封, 置于倒置荧光显微镜下, 采用 CCD 摄像机对毛细管通道进行拍照;

(8) 采用 Sicon Image 和 Microsoft Office Excel 2003 对荧光照片进行分析和数据处理。

2.2.7 安全注意事项

在进行毛细管的硅烷化处理时, 因为硅烷化试剂的挥发性和腐蚀性较强, 要佩戴双层手套, 并在通风橱内进行。在人 IgG 免疫分析测定的实验操作过程中需要戴乳胶手套, 以免生物、血清制品对皮肤或人体造成不良的刺激和影响。

2.3 结果与讨论

2.3.1 系统设计思想

常规的非均相免疫分析操作繁琐、费时, 尤其是需要依靠大量的、重复性的人工操作来完成反复的清洗步骤和多种试剂的更换。随着对快速检测需求的日益增加, 在保留传统免疫分析方法高灵敏度和高特异性优势的前提下, 建立一种能够快速、简便、自动地对待测样品进行分析和检测的免疫分析方法具有十分重要的意义。

近年来, 基于微流控系统的自动化免疫分析技术研究取得快速发展, 不断有自动化的微流控非均相免疫分析系统被报道。但相关系统在实现液体操控自动化的同时, 亦存在一些不足之处。如大多数研究均以微流控芯片为平台, 且芯片的结构复杂, 系统的构建往往需要较复杂的微加工技术。此外, 为了完成不同液体的顺序引入的自动化操作, 多数分析系统往往需要附加一些大型的或者较为复杂的仪器设备, 如需要附加高压电源对液流进行电动切换和驱动; 需要附加压力控制系统对芯片上集成的气动微阀阵列进行控制; 需要外加注射泵或真空泵驱动液流等。以上因素增加了整个分析系统构建的难度、复杂性和成本, 同时对不同液体顺序引入的操控虽然避免了繁琐费时的手工操作, 但仍显得不够简便。基于上述原因, 本研究的目的旨在构建一个结构简单、容易搭建、液体操控便捷、分析快速的自动化微流控免疫分析系统。

为实现上述目标, 在分析系统的设计中采取了三个措施:

(1) 采用取样探针-缺口管阵列技术实现非均相免疫分析过程中不同液体的自动化顺序引入。该技术由本研究组提出, 并成功地应用于微流控流动注射分析、

顺序注射分析和毛细管电泳分析系统中,用于实现高通量的无阀试样引入^[15-18]。与多数自动化的微流控非均相免疫分析系统相比,该系统结构简单,无需采用微阀或外置进样阀,对不同液体的引入和更换操作简单、方便、快捷。

(2) 采用毛细管作为取样探针,同时还作为抗原和抗体之间免疫反应的通道。与微流控芯片相比,毛细管结构简单,价廉易得,可以一次性使用,避免了复杂的芯片微加工过程。此外,毛细管本身可直接作为取样探针使用,亦避免芯片上取样探针的加工。采用多个毛细管构成的毛细管阵列,与缺口管阵列匹配,可实现多样品的平行同步测定。

(3) 毛细管内液流的驱动采用重力驱动方式,采用简单地将毛细管竖立的方法,利用其进、出口间的液位差驱动液流流动。其液流驱动系统极为简单,无需额外配备高压电源或外加注射泵或其它压力驱动装置。简洁的设计显著降低了系统构建的难度和成本。

2.3.2 毛细管的选择

实验初期曾采用带有聚酰亚胺涂层的石英毛细管,由于荧光不能透过该毛细管的外保护层,在检测前,需要用刀片刮去该保护层。操作中容易发生毛细管的断裂现象,尤其在多个样品同步自动分析时,失去外保护层的10个毛细管需要顺序滑过50个缺口管,更易出现毛细管的断裂现象而导致实验失败。

后期改为采用具有紫外透明涂层的石英毛细管,该毛细管内壁的清洗和处理方法与聚酰亚胺涂层毛细管完全相同。但由于其透明涂层可以透过荧光,在实验的全过程中无需去除该涂层,毛细管始终保持良好的弹性和韧性,避免了实验过程中毛细管的破损现象,保证了实验的顺利进行。且在免疫分析完毕后,可以直接将该毛细管置于荧光显微镜下进行观察和荧光检测。

此外,在实验初期还曾对比了内壁硅烷化和未进行硅烷化的毛细管的分析性能。实验采用硅烷化试剂及戊二醛对毛细管内壁进行硅烷化处理(操作步骤见2.2.3)。并在相同实验条件下,分别采用硅烷化和未硅烷化毛细管对同一人IgG样品进行非均相夹心免疫分析。实验结果如图2.4所示。

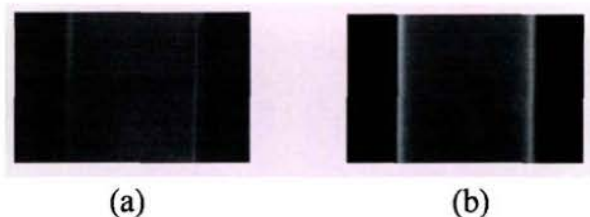


图 2.4 采用硅烷化和未硅烷化的毛细管进行免疫分析的结果。

(a) 未硅烷化的毛细管；(b) 硅烷化的毛细管。

从图 2.4 可以看出，在相同的实验条件下，硅烷化毛细管的荧光强度明显强于未硅烷化的毛细管，是后者的 5.6 倍。这一结果与相关文献报道^[19]的结论相一致，即对微通道内表面进行硅烷化处理，可以提高抗体在固相载体表面的固定效率，使其对样品溶液中的待测抗原的捕获和浓集的能力增强，进而使溶液中更多的荧光标记抗体与待测抗原结合，连接在毛细管内壁上，从而提高系统的检测灵敏度。因此，在后续实验中均采用硅烷化的毛细管进行相关的免疫分析。

2.3.3 荧光显微镜荧光检测条件的考察

2.3.3.1 荧光显微镜的检测稳定性

本系统采用倒置荧光显微镜作为荧光检测器。在检测过程中，随着时间的推移，显微镜的荧光光源强度可能会发生一定的变化。同时由于实验中同一批待检测毛细管荧光的检测并非同步进行，不同的检测时间，可能会影响最后的实验结果。因此在进行正式样品分析前，考察了荧光显微镜在荧光检测过程中的稳定性。采用 10^{-6} mol/L 的荧光素钠溶液为样品，将其充满一段长 1.3 cm 的实验用毛细管，毛细管两端用真空封泥密封。将该毛细管水平固定在显微镜的载物台上，在拍照的全过程中保持其位置不变。采用 CCD 照相机对该毛细管内的同一检测区连续拍照 18 次，结果如图 2.5 所示。相邻两张照片的拍摄时间相差 50 s，全部拍照时间约 15 min。对 18 个荧光照片进行数据处理得到结果如图 2.6 所示。

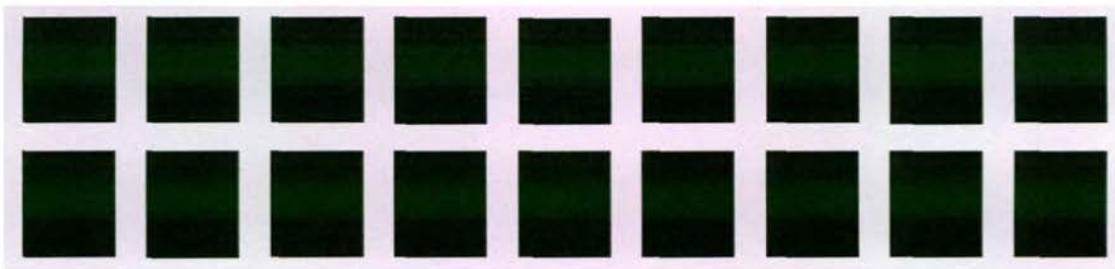


图 2.5 荧光显微镜的检测稳定性考察实验中拍摄的毛细管荧光照片。

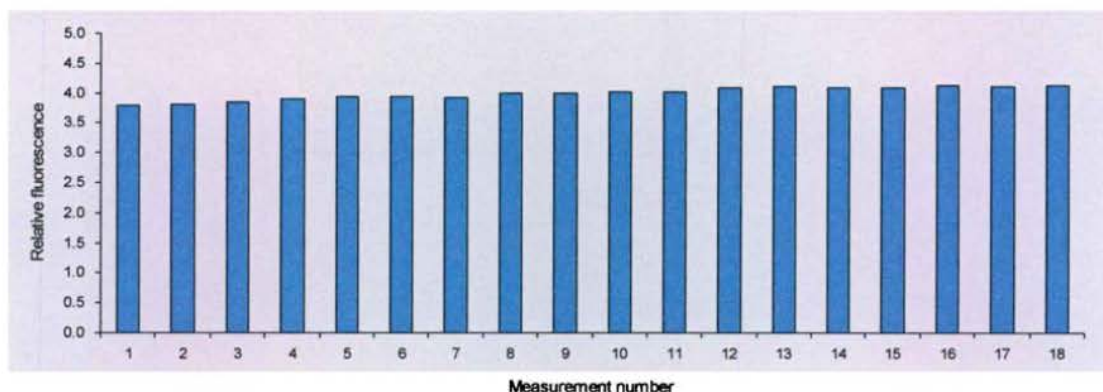


图 2.6 不同检测时间毛细管内荧光检测结果。

如图 2.5 和图 2.6 所示,不同的照片拍摄时间,毛细管内的荧光强度无显著变化。在 15 min 内,18 次检测中毛细管荧光强度峰值的相对标准偏差 (RSD) 为 2.7%。而在实际检测操作中,每一毛细管内荧光强度的检测可在 1 min 内完成。根据上述实验结果,可以认为 10 min 内倒置荧光显微镜和 CCD 照相机系统的工作性能基本稳定,不会对检测结果产生显著的不良影响。

2.3.3.2 结合荧光抗体的毛细管荧光检测稳定性考察

考虑到结合了荧光抗体的毛细管在荧光检测过程中,有可能随着激发光照射时间的延长,发生荧光染料漂白或荧光强度逐渐减弱的现象,为此考察了结合荧光抗体的毛细管在较长时间荧光检测过程中其信号的稳定性。实验中,采用免疫分析用毛细管以及 50 $\mu\text{g/mL}$ 的人 IgG 样品,完全按照本系统的标准步骤 (详见 2.2.6) 完成免疫分析操作。将完成免疫反应后的毛细管固定在倒置荧光显微镜的载物台上,并在整个检测过程中,保持该毛细管的位置始终固定不变。在检测过程中,使激发光连续照射毛细管检测区 10 min。在此期间,每隔 50 s 对该毛细管的同一检测区拍摄一次荧光照片,连拍 11 次。拍照时,显微镜采用 $\times 4$ 倍物镜,CCD 照相机曝光时间为 10 s。实验结果如图 2.7 及图 2.8 所示。

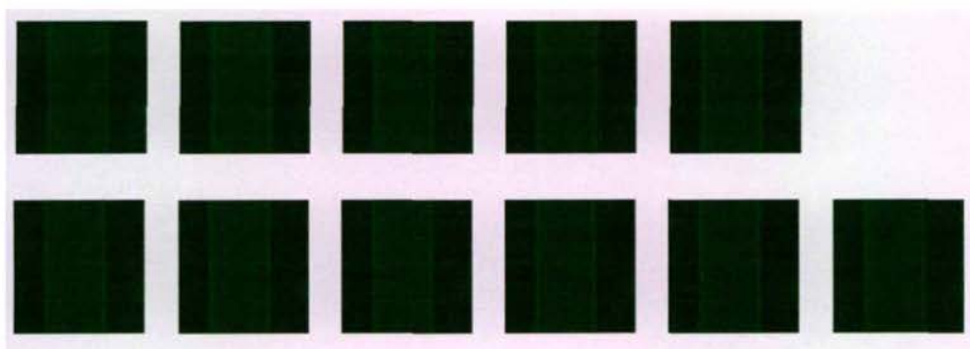


图 2.7 结合荧光抗体的毛细管荧光检测稳定性考察实验中拍摄的毛细管荧光照片。

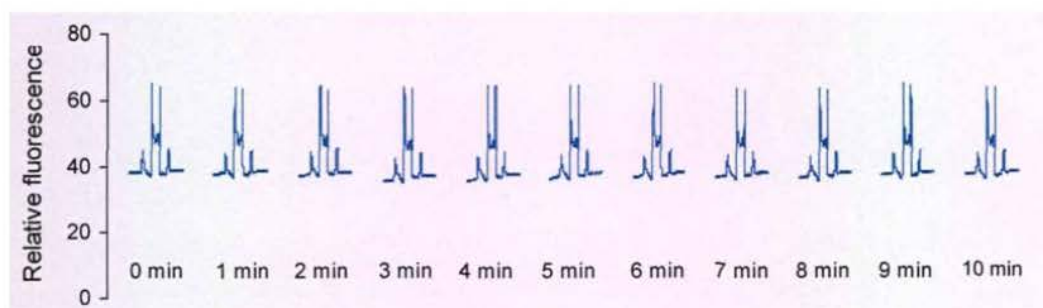


图 2.8 不同检测时间毛细管内荧光强度曲线。

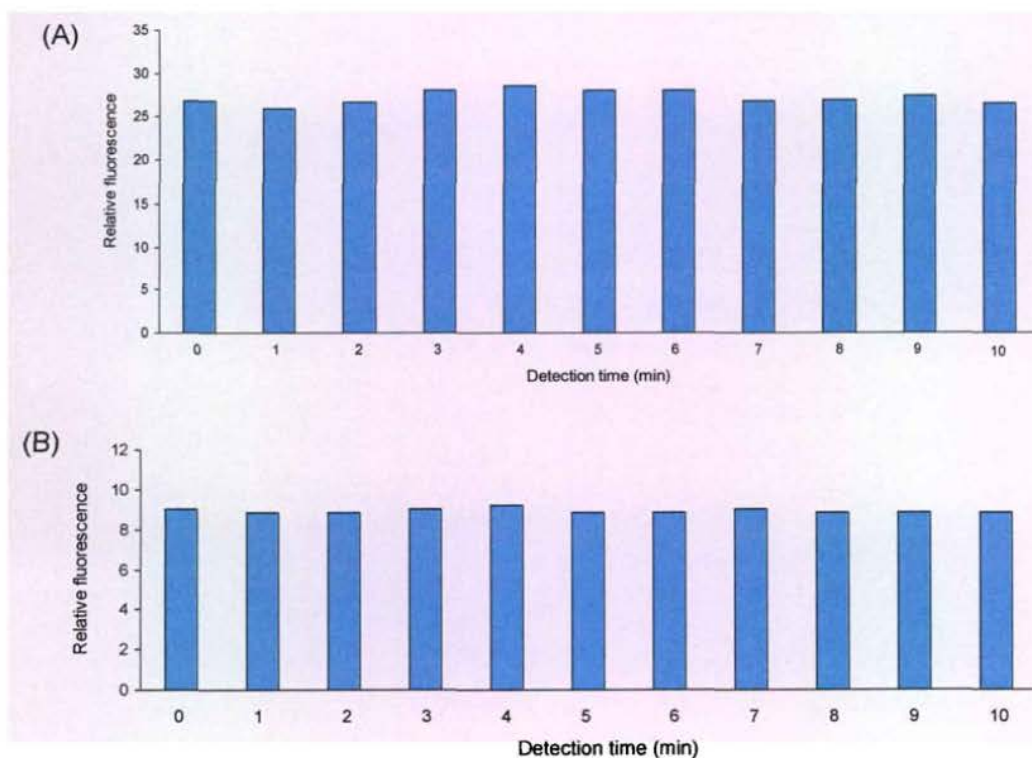


图 2.9 不同检测时间毛细管内荧光检测结果。

(A) 两侧峰值取值；(B) 中央凹值取值。

从图 2.9 可以看出,在激发光连续照射的 10 min 时间范围内,毛细管内的荧光信号强度无明显变化,未观察到荧光漂白和强度减弱现象。按荧光强度曲线的两侧峰值和中凹值取值,在不同检测时间荧光信号的 RSD 分别为 3.0%和 1.5%, $n=11$ 。同时,上述实验结果也表明,至少在 10 min 的检测时间范围内,毛细管在检测顺序上的差异不会对检测结果产生明显的影响。而实际分析时每一个样品毛细管的检测时间小于 1 min,10 个毛细管的检测可在 10 min 内完成。

2.3.3.3 毛细管放置位置的影响

在实验中,曾观察到在显微镜成像视场内,激发光源的照射强度存在一定程度的不均一性,而这种不均一性有可能会对毛细管的荧光检测结果造成一定的影响,为此实验考察了在显微镜视场内毛细管放置位置变化对其荧光信号的影响。

实验中测量得到,采用 $\times 4$ 倍物镜时的显微镜成像视场尺度为 1.6 (高) $\times$ 2.2 (宽) mm,将此区域等分为 9 个分视场,分别是 F1 (左上区)、F2 (中上区)、F3 (右上区)、F4 (左中区)、F5 (中心区)、F6 (右中区)、F7 (左下区)、F8 (中下区)和 F9 (右下区)。采用免疫分析用毛细管以及 50 $\mu\text{g/mL}$ 的人 IgG 样品,完全按照本系统的标准步骤 (详见 2.2.6) 完成免疫分析操作。将完成免疫反应后的毛细管固定在倒置荧光显微镜的载物台上,调整毛细管的位置使其检测区从分视场 F1 依次移至 F9 进行拍照,实验结果如图 2.10 所示。

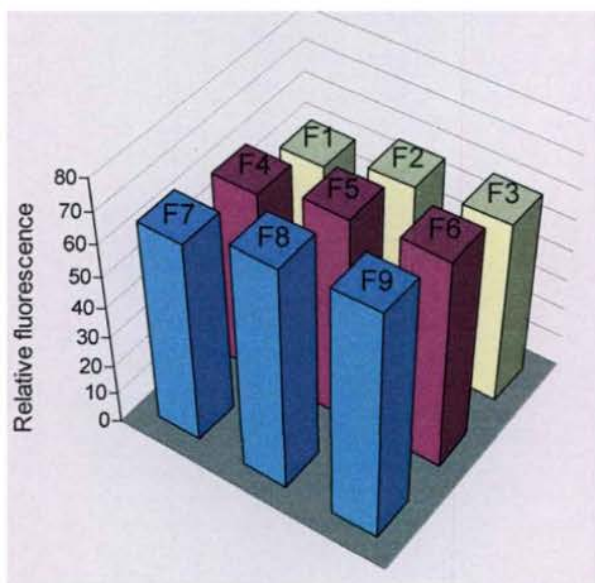


图 2.10 同一毛细管在不同分视场 (F1-F9) 的荧光强度分布。

从图 2.10 可以看出, 同一毛细管在不同的分视场内检测得到的荧光强度有较明显差异, 在 9 个视场内的荧光强度的 RSD 为 10% (两侧峰值取值), 而其中分视场间荧光强度的最大差异 (F1 与 F9 之间) 超过 30%。因而, 在荧光检测中, 应将毛细管的检测区域固定于同一个分视场内, 不宜在检测过程中变换不同的分视场, 否则将产生较大的实验误差。在本工作中, 固定采用 F5 中心区作为毛细管检测的分视场。实验考察了毛细管在该区域发生位置变动时对荧光检测信号的影响, 结果显示, 当毛细管位置在 ± 0.15 mm 范围内变动时, 11 次荧光检测结果的 RSD 为 2.0% (两侧峰值取值), 其位置变动对荧光检测无明显影响。

2.3.3.4 毛细管内荧光强度的取值方法

在本工作中, 典型的毛细管的荧光强度曲线如图 2.11 (b) 及图 2.12 (b) 所示, 毛细管内荧光强度的取值方法有两种, 一种方法是将其曲线两侧信号峰的两个尖端峰值的平均值作为荧光强度值, 该部分信号是由结合于毛细管通道内侧壁表面的荧光标记抗体产生的; 另一种方法是将荧光曲线中间低凹部水平区域值作为荧光强度值, 这部分荧光信号主要由结合于毛细管通道中央内壁表面的荧光标记抗体产生的。从荧光强度曲线中可以看出, 两侧峰值明显高于中央凹值, 因此采用两侧峰值取值法可以获得较高的检测灵敏度。但从 2.3.3.2 的结果看, 当采用 $\times 4$ 倍物镜拍照时, 采用两侧峰值取值法的结果重现性差于中央凹值法。为此, 实验还进一步考察了在倒置荧光显微镜下, 采用不同的放大倍数的物镜进行检测对毛细管荧光强度检测结果的可靠性和灵敏度的影响。

图 2.11 和图 2.12 分别为同一毛细管在 $\times 4$ 倍和 $\times 10$ 倍两种物镜拍摄得到的结果。由于采用 $\times 20$ 倍物镜拍照时毛细管 ($75\text{-}\mu\text{m i.d.}$, $375\text{-}\mu\text{m o.d.}$) 的影像模糊不清, 故未做进一步试验。

由图可见, 当毛细管内 IgG 浓度相同时, 采用 $\times 10$ 倍物镜检测得到的荧光强度明显高于 $\times 4$ 倍物镜的检测结果, 前者的曝光时间为 5 s, 后者的曝光时间是 10 s。由图 2.11 和 2.12 的 (b) 和 (c) 部分可以看出, 采用 $\times 4$ 倍物镜检测的荧光强度曲线的峰值两侧分布约 13 个像素点, 而在 $\times 10$ 倍物镜下却分布有 40 个像素点。进一步观察峰值部位的像素分布特点发现, $\times 4$ 倍物镜下荧光强度曲线的峰值尖端部位仅分布有一个像素点, 而 $\times 10$ 倍物镜下的尖端峰值部位分布有 3-5 个像素点。因而, 采用 $\times 4$ 倍物镜检测时, 毛细管荧光强度曲线的尖端峰值波动较大, 相应检测结果的重现性较差 (与 2.3.3.2 的结果一致)。而采用 $\times 10$ 倍物镜检

测时, 由于尖端峰值取决于多个像素点所对应的多个数值的总体分布特征, 因而其尖端峰值的随机波动较小, 应获得更好的检测重现性。

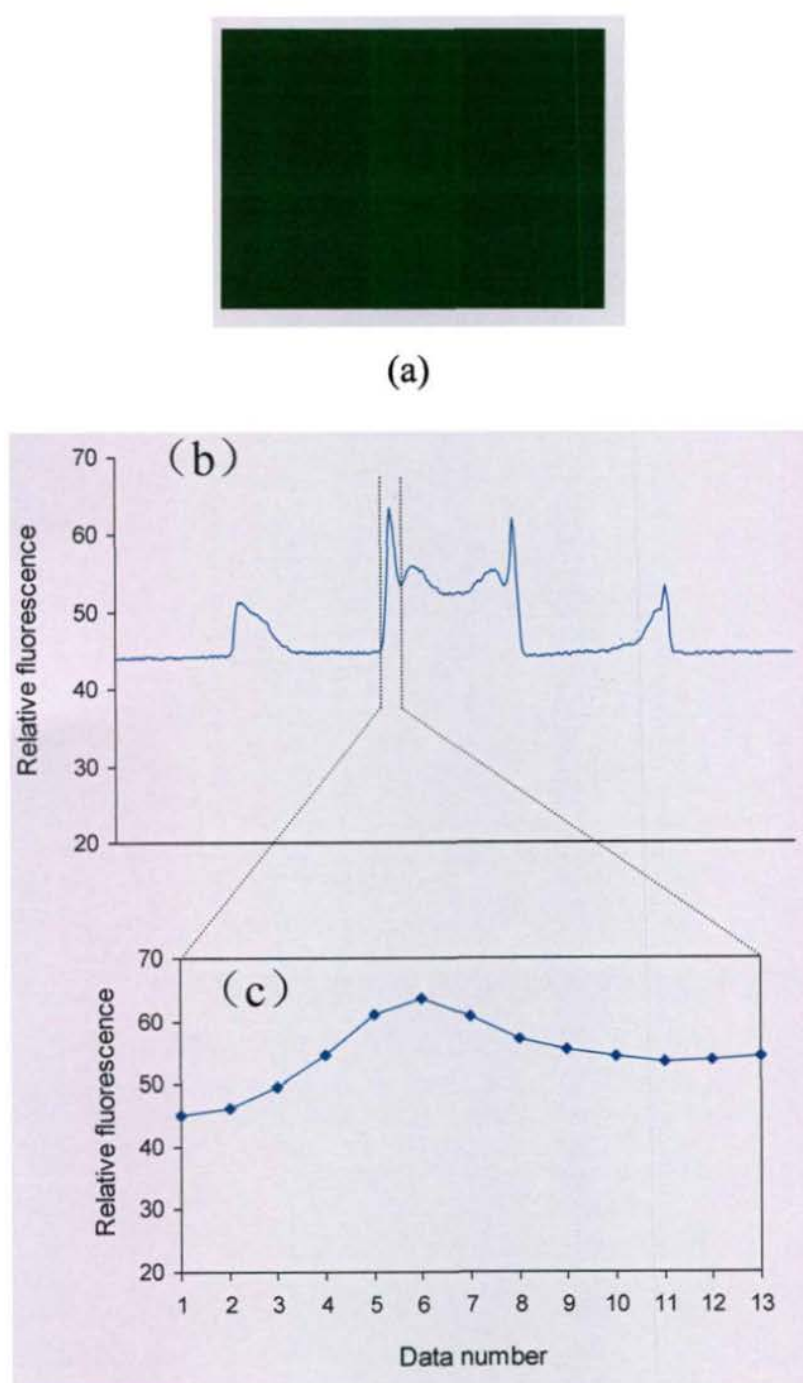


图 2.11 使用×4 倍物镜拍摄得到毛细管荧光照片及荧光强度曲线。

(a) 毛细管荧光照片; (b) 荧光强度曲线; (c) 荧光强度曲线上峰值区域的像素点分布。

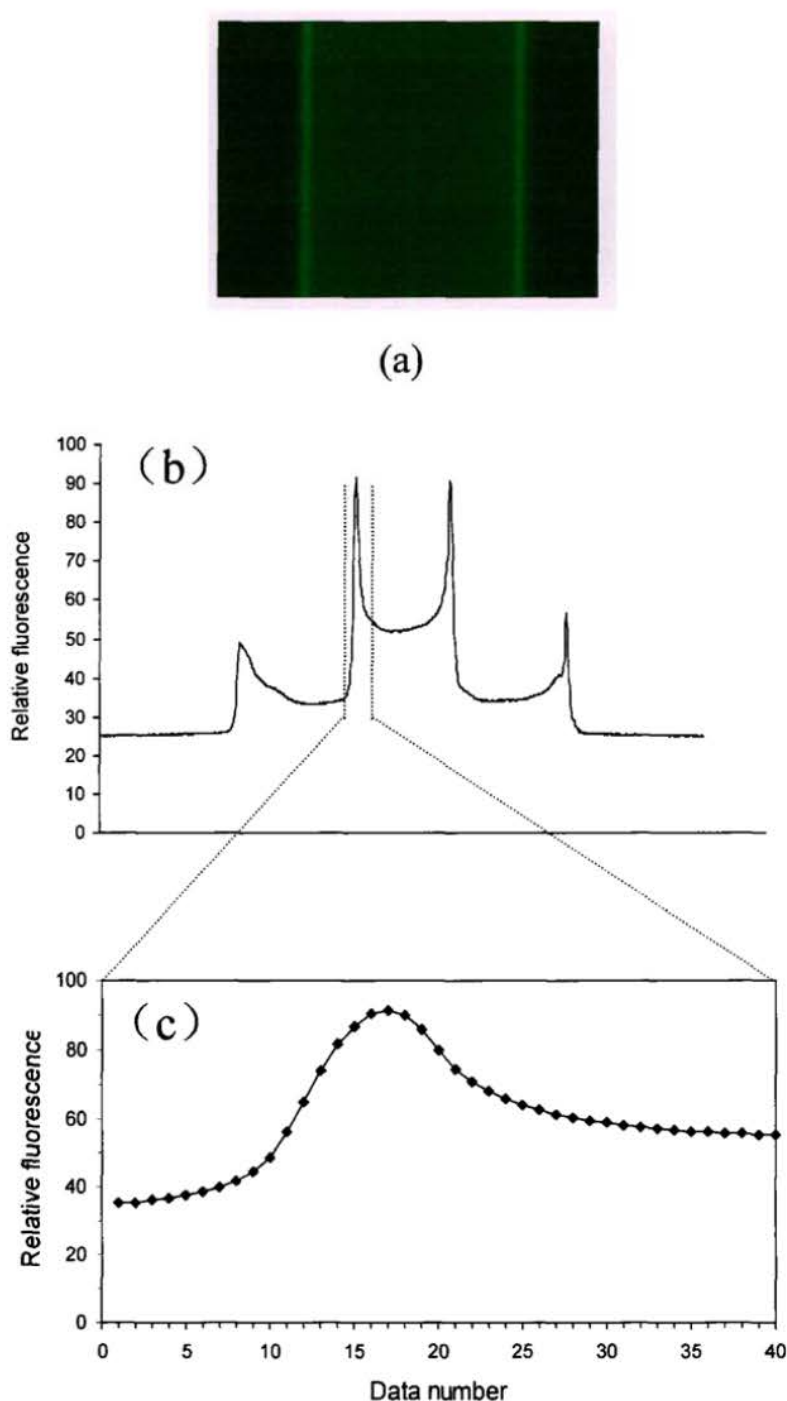


图 2.12 使用 $\times 10$ 倍物镜拍摄得到毛细管荧光照片及荧光强度曲线。

(a) 毛细管荧光照片; (b) 荧光强度曲线; (c) 荧光强度曲线上峰值区域的像素点分布。

实验中, 进一步考察了在采用 $\times 10$ 倍物镜拍照的条件下不同取值方法的性能。结果如图 2.13 所示。采用两侧峰值法取值结果的 RSD 为 1.7% ($n=5$), 中央凹值法结果的 RSD 为 0.8% ($n=5$)。二者均好于采用 $\times 4$ 倍物镜拍照的结果。同时, 采用两侧峰值法取值得到的信号高度通常是中央凹值法的 2.5 倍。

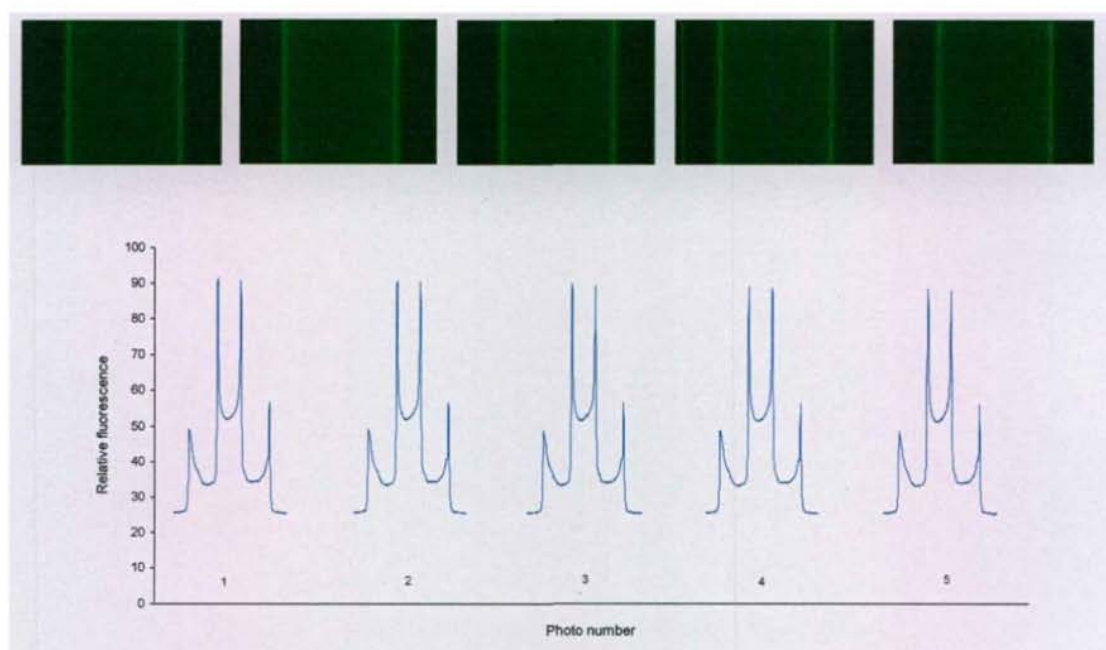


图 2.13 采用×10 倍物镜连续拍摄的毛细管荧光照片及其荧光强度曲线。

综上,采用倒置荧光显微镜对毛细管进行荧光检测时,如对检测灵敏度有更高要求时,可采用×10 倍物镜进行检测,采用两侧峰值取值法提取荧光强度数据。

2.3.4 免疫分析系统操作条件优化

2.3.4.1 IgG 与固定化抗体反应时间

在常规非均相免疫分析中,抗原与抗体之间进行特异性结合的孵育反应时间很长,在 37°C 下需要 30~60 min;在大多数微流控芯片非均相免疫分析系统中,抗原与固定化抗体之间的反应时间通常大于 10 min,抗原和抗体反应时间长是导致系统整个分析时间延长的关键因素。因此,实验对抗原与毛细管内固定化抗体之间反应时间的变化对系统性能的影响进行了考察。

实验中,通过改变毛细管在人 IgG 样品缺口管内停留的时间来改变反应时间。采用浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 IgG 试样,同时设定阴性对照管(PBS)和 10^{-6} mol/L 荧光素溶液对照管。毛细管在人 IgG 样品缺口管内停留的时间分别设定为 15 s、30 s、1 min、2.5 min、5 min、10 min、20 min 和 30 min。毛细管在 PBS 和荧光标记抗体溶液缺口管中的停留时间均为 5 min,即两次清洗时间和 IgG 与荧光标记抗体之间的反应时间均定为 5 min。

实验结果见图 2.14。随着毛细管在试样溶液缺口管内停留时间的增加,即随着待测抗原与毛细管内的固定抗体之间反应时间的延长,毛细管内的荧光信号强度逐渐增强。在 1 min 反应时间范围内,毛细管内的荧光强度随时间迅速增强,二者几乎呈线性关系;而随着反应时间从 1 min 进一步增加至 20 min,毛细管内的荧光信号强度的增强趋于缓慢,尤其当反应时间从 20 min 增加至 30 min 时,毛细管的荧光强度基本保持不变。

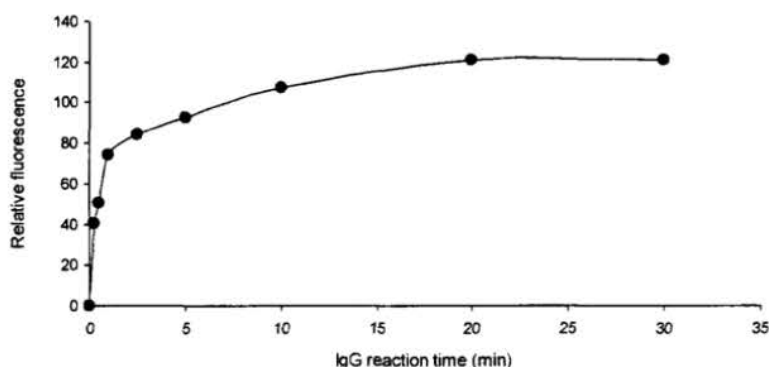


图 2.14 IgG 与抗体的反应时间与毛细管荧光强度之间的关系。

上述实验结果表明,与常规非均相免疫分析方法相比,在采用基于毛细管-缺口管试样引入系统的微流控非均相夹心免疫分析系统中,抗原 IgG 与毛细管内的固定抗体之间所需的反应时间明显缩短。这可能与抗原分子在微米尺度毛细管通道内的传质速度加快、抗原溶液的连续流动使抗原得以持续地更新等因素有关,两方面因素皆有利于提高抗原与抗体的反应效率。

上述实验结果还表明,反应时间为 1 min 时毛细管的荧光信号强度是反应时间为 30 min 时的 2/3 (66.7%),而时间仅为其 1/30。综合考虑检测灵敏度和分析速度的因素,本文选择待测抗原 IgG 与固定抗体之间的反应时间为 1 min,即毛细管在 IgG 缺口管内的停留时间为 1 min。

2.3.4.2 荧光标记的羊抗人 IgG 抗体反应时间的优化

通过改变毛细管在 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体缺口管内停留的时间来优化人 IgG 与荧光标记的羊抗人 IgG 抗体之间反应的时间。实验操作步骤与 IgG 的反应时间优化实验类似。采用浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 IgG 试样,同时设定阴性对照管 (PBS) 和 10^{-6} mol/L 荧光素溶液对照管。毛细管在 FITC 标记的羊抗人 IgG

抗体缺口管内停留的时间分别设定为 15 s、30 s、1 min、2.5 min、5 min、10 min、20 min 和 30 min。毛细管在 PBS 和人 IgG 溶液缺口管中的停留时间均为 5 min，即两次清洗时间以及 IgG 与固定抗体的反应时间均定为 5 min。

实验结果（图 2.15）表明，毛细管内的荧光强度随着反应时间增加而增强。在 1 min 之内，荧光强度随反应时间快速增加。而在 2.5 min 至 30 min 范围内，毛细管内的荧光强度增长渐缓。当反应时间为 1 min 时，毛细管的荧光强度约为 30 min 时的 62%，而两个反应时间相差近 30 倍。综合考虑分析速度和检测灵敏度两方面因素，选择荧光标记抗体与毛细管壁结合抗原的反应时间为 1 min，即毛细管探针在 FITC 标记的抗体溶液缺口管内的停留时间为 1 min。

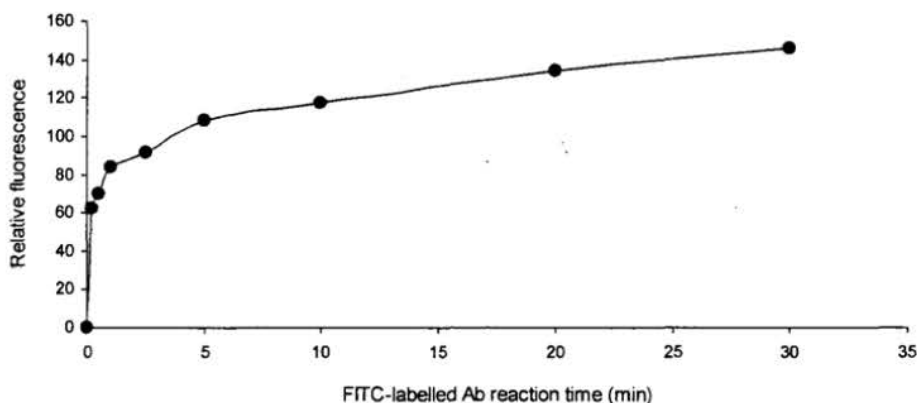


图 2.15 荧光标记抗体与抗原的反应时间与毛细管荧光强度之间的关系。

2.3.4.3 清洗时间的优化

清洗操作在常规非均相免疫分析过程中虽不是反应步骤，但却是最具技术性的操作步骤，也是决定实验成败的一个关键步骤^[3]。清洗的目的是除去反应液中与反应无关的成分和没有与固相抗体或抗原结合的游离抗原或游离抗体，以及在反应过程中吸附于固相载体表面的非特异性干扰物质。清洗如不彻底，将会干扰分析结果，特别是最后一次清洗，如有荧光标记物质或酶结合物的非特异性吸附及残留，将使响应信号升高^[3,20]，有可能产生假阳性结果。因此，清洗是常规非均相免疫分析测定过程中极为重要的关键性操作，但同时也是最繁琐、最费人工的一步操作。每一步清洗操作通常需要重复进行 3-4 次，有时甚至需要反复清洗 5-6 次。而采用 96 孔板进行的常规免疫分析中，每一次清洗操作所需时间为 3-5

min。微流控非均相免疫分析方法中的清洗操作过程与常规方法相比更为方便和快捷,尤其在自动化的微流控免疫分析系统中,清洗操作实现了程序自动控制,清洗时间亦明显缩短。但在大多数的微流控非均相免疫分析系统中,每一步的清洗时间多为数 min 至十几 min,最后一步清洗时间大多超过 3 min。为了了解在本系统内免疫分析过程中清洗时间的影响,实验对荧光标记抗体与待测抗原反应后的清洗过程进行了考察。

采用倒置荧光显微镜对清洗过程中毛细管通道内的荧光强度变化进行在线监测。实验结果如图 2.16。

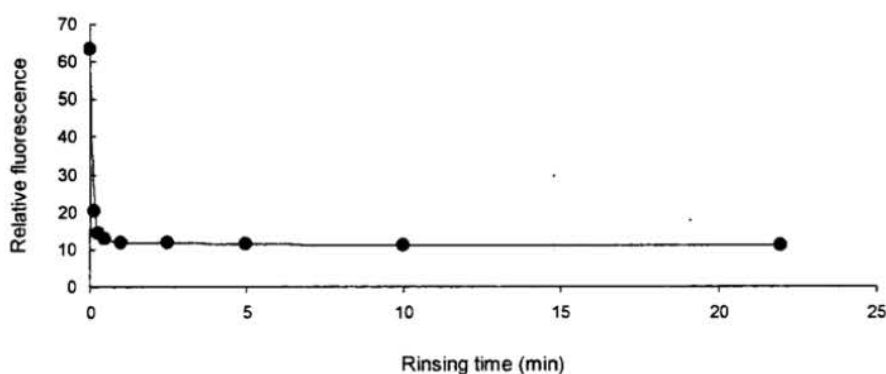


图 2.16 毛细管清洗时间与其荧光强度之间的关系。

从图 2.16 可见,在 1 min 内,毛细管内溶液的荧光强度显著降低。清洗时间在 1 min 至 22 min 的范围内,毛细管内荧光强度无显著变化。因此,可以认为在清洗时间为 22 min 时毛细管的荧光强度为其内壁结合的荧光标记抗体所产生的荧光信号,此时,毛细管通道内溶液中的游离荧光抗体分子已被清洗出毛细管通道。以该荧光强度为基值计算,则当清洗时间仅为 7 s 时,毛细管内溶液的荧光信号强度下降了 82.3%;当清洗时间至 1 min 时,荧光信号的下降值已达 98.3%,说明此时在毛细管通道内,绝大多数游离的标记抗体已被清洗出毛细管。上述结果表明,在毛细管微通道系统内采用连续流动的缓冲液进行清洗的方法,所需的清洗时间显著缩短,将常规非均相免疫分析系统中的清洗时间从 10-30 min 缩短至 1 min 即可获得满意的清洗效果。清洗时间的缩短显著缩短了总的分析时间,对提高系统的分析速度具有重要作用。本系统能够快速完成清洗操作的原因可能主要来源于以下两个方面。一方面,与常规非均相免疫分析系统通常在微孔板上

操作不同,毛细管的微通道内物质传质速度明显加快,清洗液与被清洗对象在短时间内即可实现快速接触和混合;另一方面与常规非均相免疫分析方法中通常采用的静止清洗的方式不同,在本系统中清洗液始终处于连续流动状态保证了清洗液的不断更新,并且可以对毛细管内壁起到一定的冲刷作用。

根据上述实验结果,综合考虑清洗效果和清洗时间两方面因素,实验选择抗原与荧光标记抗体反应后的清洗时间为 1 min。因在本系统中,人 IgG 抗原与固定于毛细管内壁表面的抗体反应后的清洗操作与上述操作类似,因此选择人 IgG 抗原与固定化抗体反应后的清洗时间同样为 1 min。

2.3.5 系统分析性能

IgG 是血清中最多的免疫球蛋白 (Ig), 占血清中总 Ig 的 75%, 是血清中主要的抗体成分, 在机体的免疫防御中具有重要作用, 大多数抗细菌、抗病毒、抗毒素抗体均为 IgG 类。IgG 的升高可见于各种感染性疾病、血液系统疾病及多种自身免疫性疾病, IgG 降低可见于各类先天性免疫缺陷病、获得性免疫缺陷病以及长期使用免疫抑制剂的病人^[21]。在临床工作中经常需要检测血清的 IgG 水平以帮助疾病的诊断、治疗和病情的监控。

我们以人 IgG 作为待测抗原, 以毛细管内壁作为抗体的固相载体, 在其表面固定羊抗人 IgG 抗体作为捕获抗体, 以 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体作为检测抗体, 采用双抗体夹心非均相免疫分析方法, 对基于毛细管-缺口管阵列的自动化微流控免疫分析系统的分析性能进行了考察。

根据前面的优化实验结果, 确定系统的工作条件包括: 实验用毛细管采用内径为 75 μm 的带有紫外透明涂层的石英毛细管, 其内壁经过内壁硅烷化和抗体包被处理; 毛细管内液体引入顺序为人 IgG、PBS、FITC 标记的抗人 IgG 抗体和 PBS, 每种液体的引入时间均为 1 min; 倒置荧光显微镜采用 $\times 10$ 倍物镜拍照; CCD 照相机曝光时间为 5-10 s; 荧光强度曲线取值方法采用两侧峰值法。

首先考察了系统工作的重现性, 选择 IgG 试样溶液的浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 采用 9 根毛细管对同一试样进行测定。重现性实验结果见图 2.17。毛细管的荧光强度的 RSD 为 1.8% ($n=9$), 说明系统具有良好的重现性。

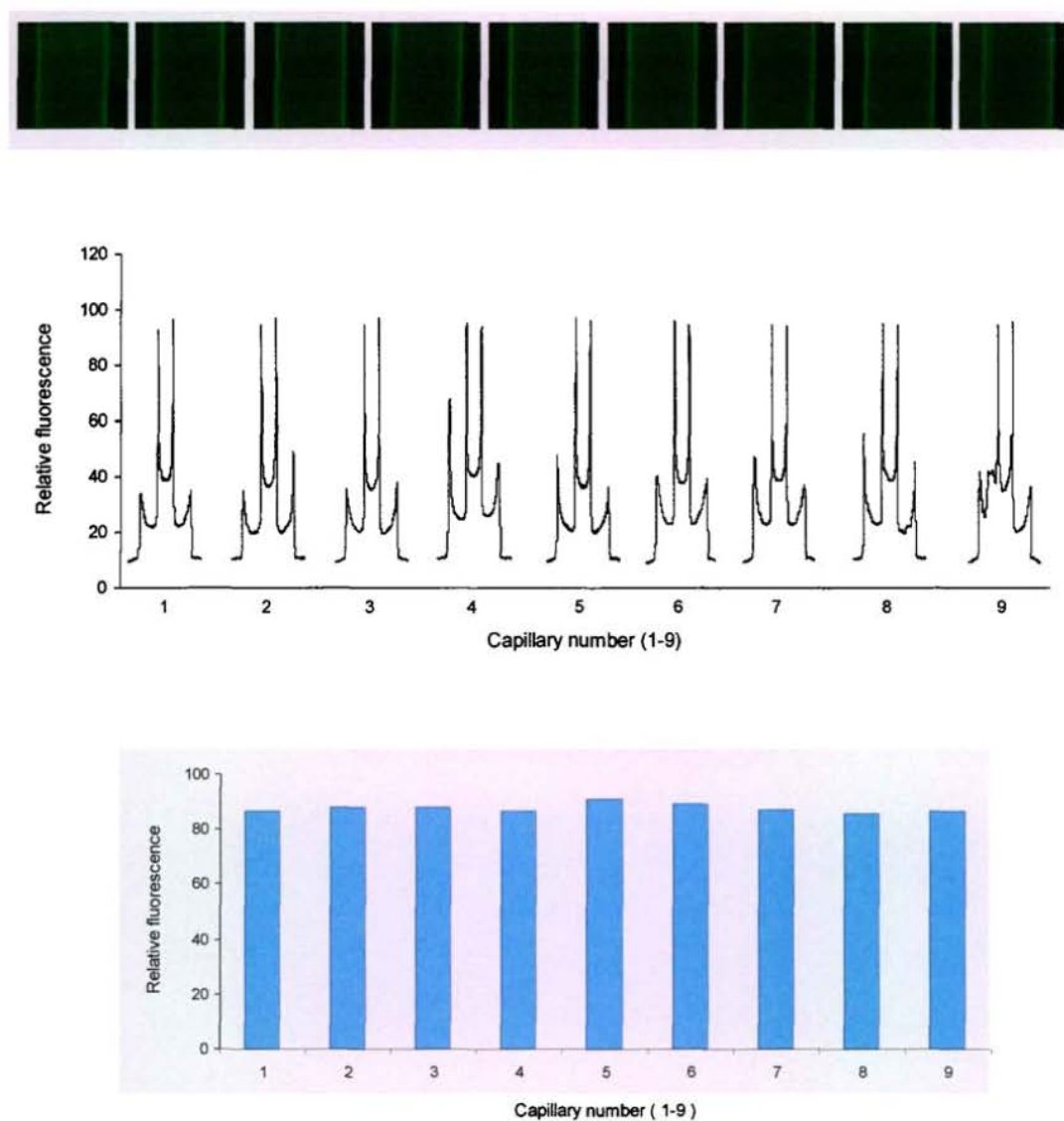


图 2.17 重现性实验中 9 根毛细管的荧光照片、荧光强度曲线及提取的荧光信号值。

在 0-1000 $\mu\text{g/mL}$ IgG 浓度范围内, 考察了毛细管荧光信号强度与 IgG 浓度之间的对应关系, 以说明系统应用于 IgG 定量分析的可行性。结果如图 2.18 和图 2.19 所示。

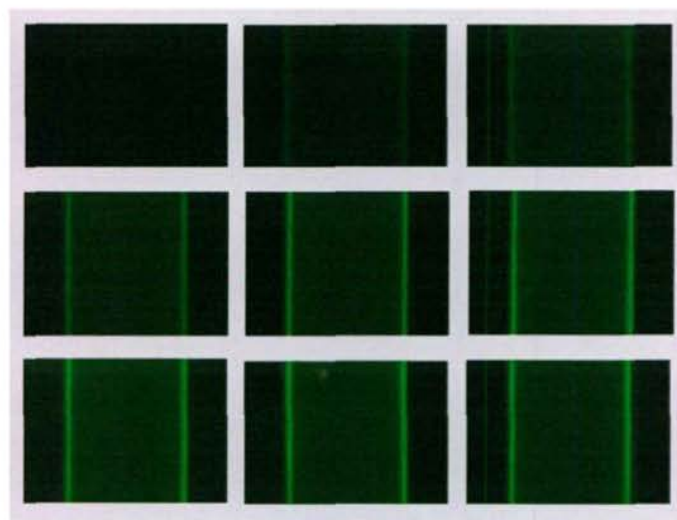


图 2.18 不同浓度 IgG 的毛细管荧光照片。

从左至右，从上到下，IgG 浓度依次为 0、10、25、50、100、250、500、750 和 1000 $\mu\text{g/mL}$ 。

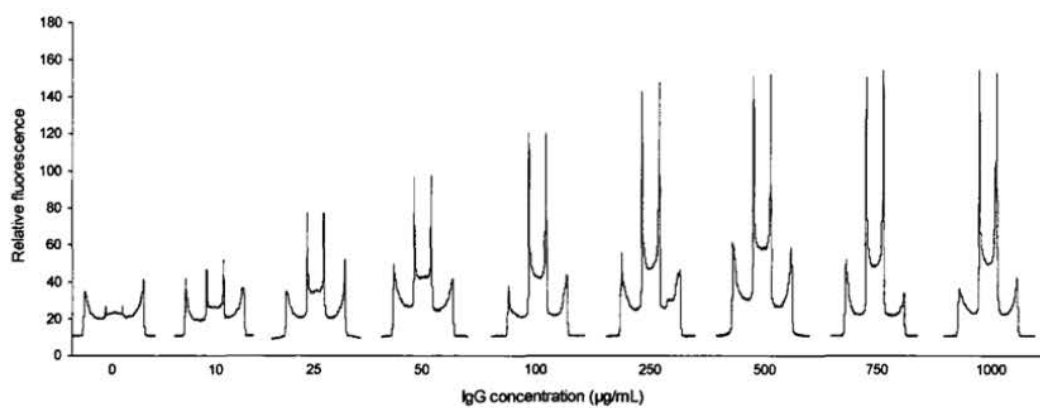


图 2.19 不同 IgG 浓度的毛细管荧光强度曲线。

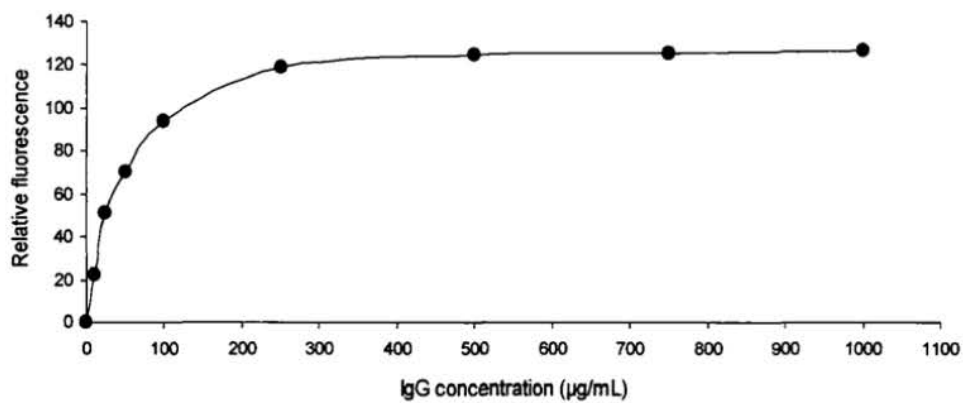


图 2.20 IgG 浓度与毛细管荧光强度之间的关系。

如图 2.20 所示, 在 0-250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 随着 IgG 浓度的升高, 毛细管的荧光信号强度呈逐渐增加趋势。当 IgG 浓度大于 250 $\mu\text{g/mL}$ 时, 毛细管的荧光强度已无明显变化。实验中采用 CCD 照相机所拍摄的荧光照片, 其像素的灰度只有 256 级, 所以在实验结果中 IgG 浓度与荧光强度直接成线性关系的范围较窄。仅在 0-25 $\mu\text{g/mL}$ 之间呈现一定的线性, 其线性回归方程为: $I=2.03C+0.80$, $r^2=0.9979$ 。据此方程及空白信号噪声的标准差, 可推算系统对 IgG 的检出限为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (3σ)。当将 IgG 浓度取对数时, 标准曲线的线性范围可扩展至 10-250 $\mu\text{g/mL}$ 范围内(见图 2.21)。人血清的实际样品中, IgG 浓度的正常范围是 7.6-16.6 mg/mL , 因此将血清样品做适当的稀释后即可采用本方法进行检测, 其检测灵敏度完全可以满足临床应用的需要。

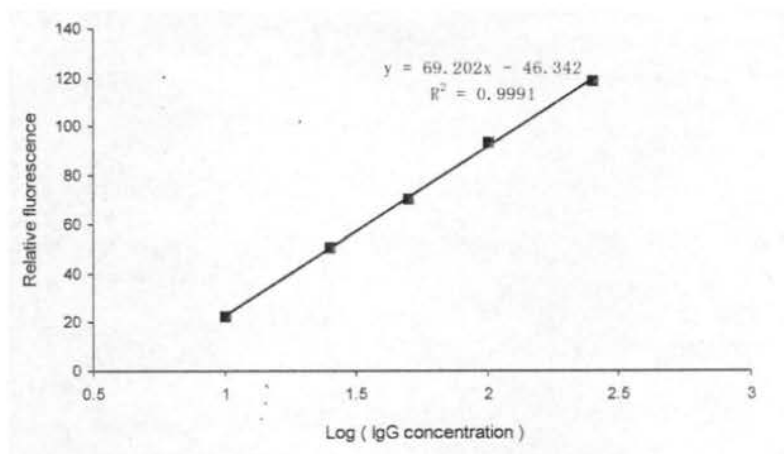


图 2.21 IgG 测定标准曲线。

在分析过程中, 系统在 4 min 内自动地完成了 9 个样品的免疫反应操作。如包括荧光检测时间, 全部 9 个试样的分析检测可在 10 min 内完成。系统中毛细管内液体的流量为 1.1 $\mu\text{L/min}$, 即每次测定试样及试剂的消耗仅为 1.1 μL 。实验中还考察了毛细管由一个缺口管移至下一个缺口管过程中所产生的携出效应。采用拍照的方法, 测算出毛细管在移动过程中所产生的携出为 1.2 nL。对于装液量为 20 μL 的缺口管而言, 这一携出所产生的交叉污染不到 1/10000, 可以忽略。此外, 系统使用的毛细管长度仅为 1.3 cm, 且价格低廉, 可以一次性使用, 以避免不同生物样品之间的交叉污染。

2.4 结论

本文采用基于毛细管取样探针和缺口管阵列的自动试样引入技术建立了微流控非均相夹心免疫分析系统, 成功地实现了一系列不同试剂/试样的顺序引入,

并应用于人 IgG 的免疫分析。实验结果表明,与传统免疫分析方法相比,该系统操作极为便捷,实现了一系列不同试样/试剂引入和更换过程的自动化,非均相免疫分析所需要的多步免疫孵育反应和清洗操作均自动完成,避免了常规方法中繁琐、费时的手工操作。免疫反应时间显著缩短,从几小时缩短到 4 min。试样/试剂的消耗明显减少,从数百 μL 降低到约 1 μL 。与其它多数自动化的微流控免疫分析系统相比,该系统结构简单,易于搭建,不需要复杂的微加工设备,无需加工微泵和微阀,亦无需附加高压电源、压力控制器、注射泵或真空泵等流体驱动装置。该系统采用毛细管阵列,在免疫反应时间不变的条件下,可方便地实现多试样的平行同步分析,具有在短时间内同时检测大批量样品的潜力。

综上,本文研制的自动化微流控免疫分析系统具有结构简单、液体操控自动化、试样/试剂消耗低、易于实现阵列化的特点,为临床检验分析的自动化及高通量化提供了一种新途径。

2.5 参考文献

- [1] Lai S, Wang S, Luo J, Lee L J, Yang S-T, Madou M J. Design of a compact disk-like microfluidic platform for enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1832-1837.
- [2] 鞠焜先, 邱宗荫, 丁世家等. 生物分析化学. 北京: 科学出版社, **2007**.
- [3] 陶义训主编. 免疫学和免疫学检验(第二版). 北京: 人民卫生出版社, **1997**.
- [4] Dodge A, Fluri K, Verpoorte E, de Rooij N F. Electrokinetically driven microfluidic chips with surface-modified chambers for heterogeneous immunoassays. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3400-3409.
- [5] Haes A J, Terray A, Collins G E. Bead-assisted displacement immunoassay for staphylococcal enterotoxin B on a microchip. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 8412-8420.
- [6] Gao Y, Sherman P M, Sun Y, Li D. Multiplexed high-throughput electrokinetically-controlled immunoassay for the detection of specific bacterial antibodies in human serum. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 606, 98-107.
- [7] Kartalov E P, Zhong J F, Scherer A, Quake S R, Taylor C R, Anderson W F. High-throughput multi-antigen microfluidic fluorescence immunoassays. *BioTech.* **2006**, 40, 85-90.
- [8] Luo Y, Yu F, Zare R N. Microfluidic device for immunoassays based on surface plasmon resonance imaging. *Lab Chip* **2008**, 8, 694-700.

- [9] Yang S-Y, Lien K-Y, Huang K-J, Lei H-Y, Lee G-B. Micro flow cytometry utilizing a magnetic bead-based immunoassay for rapid virus detection. *Biosens. and Bioelectron.* **2008**, 24, 855-862.
- [10] Lee B S, Lee J-N, Park J-M, Lee J-G, Kim S, Cho Y-K, Koa C. A fully automated immunoassay from whole blood on a disc. *Lab Chip* **2009**, 9, 1548-1555.
- [11] Nagai H, Narita Y, Ohtaki M, Saito K, Wakida S-I. A single-bead analysis on a disk-shaped microfluidic device using an antigen-immobilized bead. *Anal. Sci.* **2007**, 23, 975-979.
- [12] Linder V, Sia S K, Whitesides G M. Reagent-loaded cartridges for valveless and automated fluid delivery in microfluidic devices. *Anal Chem.* **2005**, 64-71.
- [13] Ohashi T, Mawatari K, Sato K, Tokeshic M, Kitamori T. A micro-ELISA system for the rapid and sensitive measurement of total and specific immunoglobulin E and clinical application to allergy diagnosis. *Lab Chip* **2009**, 9, 991-995.
- [14] Liu H, Yang Z, Yan F, Xu Y, Ju H. Three-minute-long chemiluminescent immunoassay using dually accelerated immunoreaction by infrared heating and passive mixing. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 4043-4047.
- [15] Du W B, Fang Q, He Q H, Fang Z L. High-throughput nanoliter sample introduction microfluidic chip-based flow injection analysis system with gravity-driven flows. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1330-1337.
- [16] Du W B, Fang Q, Fang Z L. Microfluidic sequential injection analysis in a short capillary. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 6404-6410.
- [17] Fang Q, Shi X T, Du W B, He Q H, Shen H, Fang Z L. High-throughput microfluidic sample introduction systems. *Trends Anal. Chem.* **2008**, 27, 521-532.
- [18] Zhang T, Fang Q, Du W B, Fu J L. Microfluidic picoliter-scale translational spontaneous sample introduction for high-speed capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 3693-3698.
- [19] Ho J A, Huang M R. Application of a liposomal bioluminescent label in the development of a flow injection immunoanalytical system. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 3431-3436.
- [20] 沈霞 主编. 临床免疫学与免疫学检验新技术 (第一版). 北京: 人民军医

出版社, **2002**.

[21] 王鸿利 主编. 实验诊断学 (第一版). 北京: 人民卫生出版社, **2001**.

3 基于缺口管阵列和微蠕动泵的 PDMS 芯片微流控非均相免疫分析系统

3.1 引言

聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 芯片是一种加工较为方便的高聚物芯片, 迄今为止, 在PDMS芯片上进行微流控非均相免疫分析已有较多报道。Whitesides课题组^[1]在PDMS芯片的通道壁通过物理吸附羊抗人血红蛋白抗体, 完成了人血红蛋白的ELISA测定。Delamarche课题组等^[2-7]采用PDMS基片与刻蚀有多条微通道的硅芯片一起组成微马赛克非均相免疫分析 (Micromosaic immunoassay) 芯片, 可以进行多样品、多指标的多元免疫分析。Kurita等^[8]在PDMS/玻璃微芯片上的反应通道表面固定抗原, 捕获免疫反应后溶液中过量的游离酶标抗体, 实现了对心力衰竭标志物 - BNP的痕量分析。Henares等^[9]将固定有不同抗IgG抗体 (人、羊、鸡) 的毛细管嵌入PDMS芯片内, 建立了一个多指标的ELISA芯片。Yu等^[10]在PDMS基片上设计加工了多组微通道单元, 对人血清样品中的IL-5、HBsAg和IgG进行了同步免疫分析。Kartalov等^[11]在PDMS芯片上建立了一个包含100个微反应器的高通量多指标非均相免疫分析系统, 可以对10个样品中的4种抗原进行同步分析。

相对于毛细管来说, 芯片系统更易于进行同一样品的多指标分析, 在多元分析方面与毛细管系统相比具有一定的优势, 故在第二章工作的基础上, 本章亦尝试将缺口管试样引入系统与PDMS芯片结合, 初步建立了基于PDMS芯片的人IgG非均相免疫分析系统。

PDMS芯片虽然具有加工简单、设计灵活、透光性好等优点, 但由于其表面具有较强的疏水性, 使得试样及试剂水溶液的引入较为困难。通常需要对PDMS芯片的通道表面进行表面修饰或采用压力驱动、电驱动等方法驱动液流。Sui等^[12]采用硅烷化试剂对PDMS芯片的通道内壁进行硅烷化处理, 完成了抗前列腺癌生物标志物 (PSCA) 抗体的非均相间接免疫分析。Whitesides研究组^[13]在PDMS/玻璃芯片的通道上加工TWIST阀控制通道内液体的流向, 采用负压驱动液流, 建立了人IgA和IgG的非均相免疫分析芯片系统。Linder等^[14]在PDMS芯片上采用负压驱动液流, 将所需试剂自动地引入微通道, 自动完成免疫分析中一系列液体的顺序引入, 对抗兔IgG抗体及人血清中抗HIV-1抗体进行了检测。Li研究组等^[15-16]

在PDMS芯片上采用电渗驱动和切换技术分别对人血清中IgG和幽门螺旋杆菌进行了非均相免疫分析。Kartalov等^[11]在PDMS芯片上通过压力的变化控制微阀的开关来操纵试样及试剂,在微流控芯片上完成了非均相酶免疫分析及荧光检测操作。Zare研究组^[17]在一个复层PDMS/玻璃芯片上集成PDMS微阀阵列,通过具有16个输出通道的压力控制器对液流进行控制和驱动,实现了免疫反应中试样、试剂顺序引入的自动化,免疫反应和定量检测可在10 min内完成。上述采用表面修饰、压力驱动或电驱动等方法驱动和操纵液流,通常需附加一些额外的设备,系统的构建较为复杂,操作亦不够简便。

本工作旨在建立一个系统结构简单、容易构建、操作方便的PDMS微流控芯片免疫分析系统。以缺口管阵列完成试样和多个试剂的顺序引入。研究中,我们还发展了一种基于齿轮微蠕动泵系统用于PDMS芯片内的液流驱动,该蠕动泵具有结构简单、体积小、容易搭建和使用、成本低的优点,其流量范围在0.21-4.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。采用上述系统,在多通道扇形PDMS芯片上初步完成了对人IgG的非均相免疫分析,免疫反应时间可以缩短至4 min,试样及试剂消耗减少至约0.4 μL 。

3.2 实验部分

3.2.1 试剂

本实验中使用的所有试剂纯度均为分析纯,实验用水为 Millipore 系统 (Millipore Co., Bedford, USA) 制备的超纯去离子水。

采用 HF/ NH_4F 刻蚀液 ($\text{HF}/\text{NH}_4\text{F}/\text{HNO}_3$ 的物质的量浓度比为 1:0.5:0.75) 对玻璃片进行湿法刻蚀制作阳模。

采用 pH 7.4 的 PBS 溶液 (吉诺生物医药技术有限公司, 杭州) 作为清洗液对 PDMS 基片及 PDMS 通道进行清洗。

免疫试剂: 实验前配制碳酸盐缓冲液作为抗体包被缓冲液 (Na_2CO_3 0.0015 g, NaHCO_3 0.0029 g, 以去离子水稀释至 1 mL, 调 pH 至 9.6)。实验前用 pH 7.4 的 PBS 配制 1% 的小牛血清白蛋白溶液 (1% BSA) 作为封闭液。分别采用羊抗人 IgG 亲和纯化抗体 (2.3 mg/mL, Sigma-Aldrich, USA) 和 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体 (3.9 mg/mL, Sigma-Aldrich, USA) 作为非均相夹心免疫反应中的固定抗体和检测抗体,在实验前分别以包被缓冲液和 pH 7.4 的 PBS 溶液稀释至 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 备用。采用纯化的人 IgG 冻干粉 (纯度 > 98%, 北京博奥森生物技术有限公司), 实验前以 pH 7.4 的 PBS 溶液稀释成不同浓度的 IgG 样品溶液备用。

3.2.2 材料

掩膜：在计算机上使用CoreDRAW12软件设计绘制芯片阳膜的图形，用高分辨率激光照排机在照相底片上制得光刻用掩膜。

SG2506型匀胶铬板（ $63.5 \times 63.5 \text{ mm}^2$ ，铬型LRC，铬层厚度145 nm，光胶类别S-1805，光胶厚度570 nm，长沙韶光铬板有限公司，长沙）。

PDMS有机预聚物Sylgard 184和固化剂（Dow Corning Co., Midland, USA.）。

缺口管；采用 0.2 mL 的平口 PCR 管（Axygen, INC. USA）为制作材料，从距 PCR 管底部 2 mm 处切掉管底部制成。

3.2.3 仪器设备

微型减速电机（13GA-050，华信精机，深圳）

蠕动泵电源（彤日科技有限公司，杭州）

倒置荧光显微镜（ECLIPSE TE-2000-S, Nikon Co., Japan）

CCD 照相机（SPOT RT-SE6 Monochrome, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA）

光刻机（JKG-2A, 上海光学机械公司，上海）

3.2.4 PDMS 芯片的加工

玻璃阳膜的加工：采用光刻和湿法刻蚀的方法加工PDMS芯片的玻璃阳膜。预先用CoreDRAW 12软件绘制芯片玻璃阳膜的掩膜图（ $63.5 \times 63.5 \text{ mm}^2$ ），抗体包被芯片为单一直通道芯片，免疫分析芯片为6通道扇形芯片，其构型如图3.1所示。

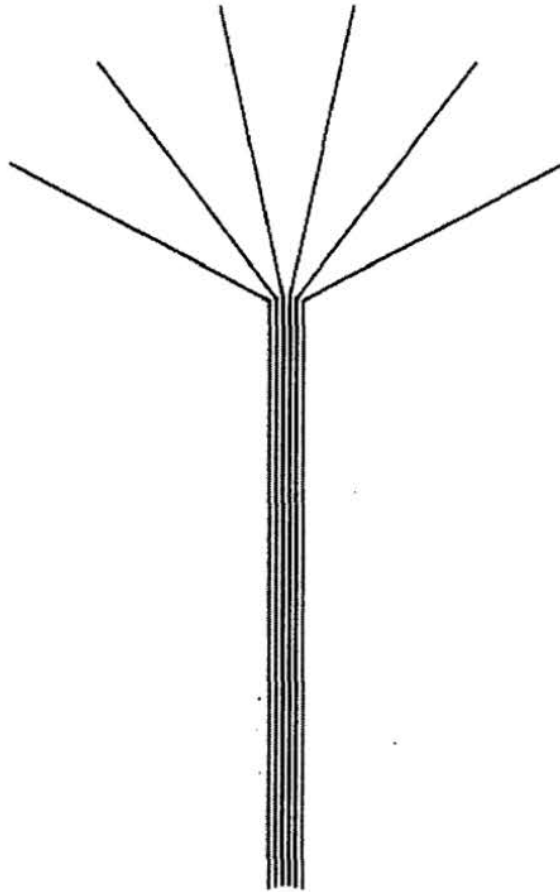


图3.16 6通道PDMS芯片的掩膜设计图。

通道宽 $150\text{ }\mu\text{m}$ ；通道间隔 $200\text{ }\mu\text{m}$ ，扇形展开部分通道长 1 cm ，相邻通道间隔角 25° ，
平行部分通道长 2 cm 。

用紫外光刻机将掩膜上的通道图形转移到涂覆有光胶的铬板基片上，曝光时间为 45 s 。光刻后，将铬板放入显影液（ 0.5% 的 NaOH 溶液）中 2.5 min ，洗除通道部分曝光过的光胶，用水冲洗，吹干。将铬板置于烘箱内， 110°C 加热 15 min ，将铬板在去铬液中轻轻摇晃、浸泡 1 min ，进一步去除通道图形部分裸露的铬层，得到透明的通道图形，清洗，吹干。将基片背面和裸露的玻璃边缘贴上透明胶带加以保护，放入 $\text{HF}/\text{NH}_4\text{F}$ 刻蚀液中，置于 40°C 的恒温摇床上进行化学刻蚀，刻蚀速度约为 $1.3\text{ }\mu\text{m}/\text{min}$ ，刻蚀时间为 40 min 。用水将基片冲洗干净，揭去透明胶带，用丙酮将覆盖在铬板上剩余的光胶擦掉，将基片浸入去铬液中完全去铬，得到透明的基片——玻璃阳膜。

PDMS芯片的制作：用洗洁精将玻璃阳膜搓洗干净，去离子水冲洗，吹干。将PDMS预聚物和固化剂按照 $10:1$ 的比例充分混合、除气后铺在玻璃阳膜表面，

水平放置形成厚度均匀的PDMS薄片（厚度0.5-1.5 mm），80℃加热1小时。将PDMS薄片从玻璃阳膜上揭下，得到直通道的抗体包被芯片（通道长1.5 cm，深50 μm ，宽150 μm ）和6通道扇形的免疫分析芯片（通道总长3 cm，深50 μm ，宽100 μm ，通道间隔250 μm ），芯片照片如图3.2所示。采用类似的方法将预聚物和固化剂混合、除气后铺在洁净玻璃片上，80℃加热1小时，制成PDMS基片（厚约0.6 mm）。

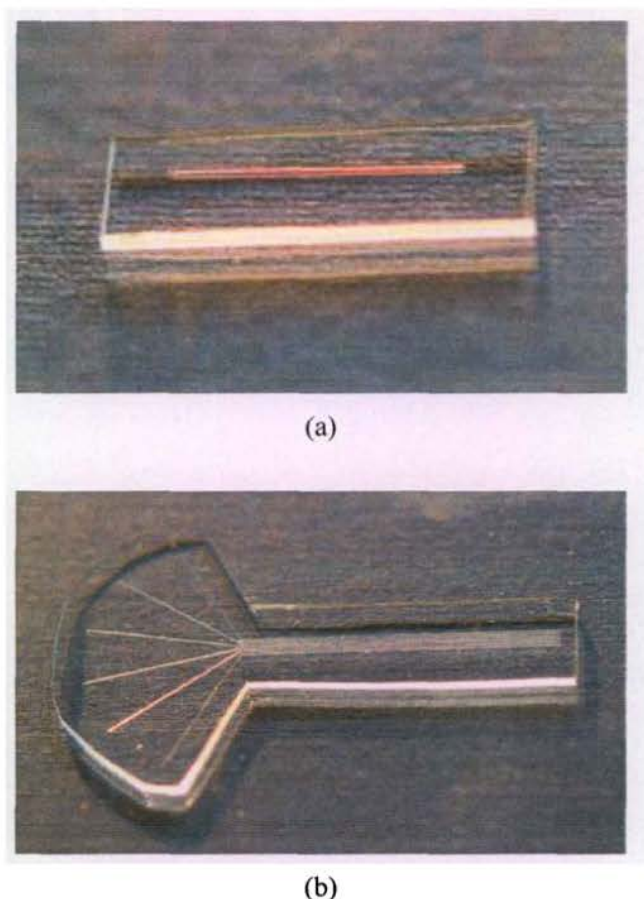


图3.2 (a) 用于抗体包被的直通道PDMS芯片；(b) 6通道PDMS免疫分析芯片。

(a) 通道长1.5 cm，深50 μm ，宽150 μm ；

(b) 通道总长3 cm，深50 μm ，宽100 μm ，通道间隔250 μm 。

3.2.5 抗体的包被和封闭

取外径为1.5 mm的注射器针头，将其尖端用砂纸磨成光滑平头状。用该注射器针头作为打孔器，在抗体包被芯片通道的入口和出口处打圆孔。将抗体包被芯片平铺在洁净的PDMS基片上。将羊抗人IgG抗体溶液（200 $\mu\text{g/mL}$ ）加入通道入口处的圆孔内并使其充满整个通道，室温下孵育2小时，使羊抗人IgG抗体通过物

理吸附固定在PDMS基片上,如图3.3所示。用PBS清洗通道两次,待通道内液体干后将抗体包被芯片从基片上揭下,即在基片上的相应位置形成包被抗体条带。将6通道免疫分析芯片盖在基片上,使6通道的平行部分与包被抗体条带相垂直。用刀片切割芯片各通道的入口端形成取样探针,如图3.4。将透明胶带贴在6通道芯片表面,并将芯片固定在蠕动泵齿轮正下方的装置平台上,调整蠕动泵至合适的压力和转速(10 rpm),驱动1%BSA溶液充满各个通道,常温下孵育1小时进行封闭处理,以减少基片及芯片通道表面的非特异性吸附。用PBS清洗各通道3 min,备用。

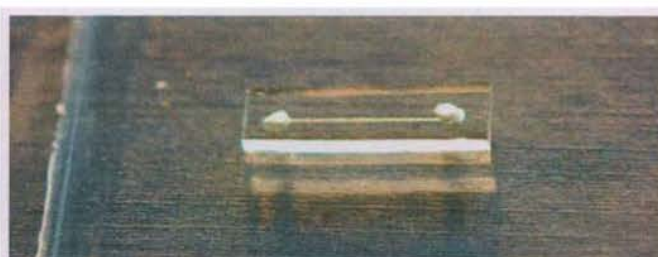


图3.3 抗体包被芯片盖在基片上进行抗体包被。

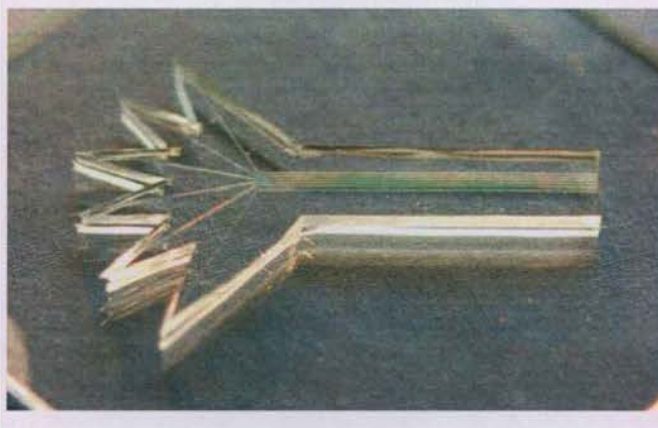


图3.4 枫叶状6通道免疫分析芯片。

3.2.6 基于 PDMS 芯片的免疫分析系统

分析系统由PDMS芯片、微型齿轮蠕动泵和缺口管阵列系统组成,装置如图3.5所示。PDMS芯片按照常规方法加工,多通道PDMS芯片厚度为0.8 mm,基片厚度0.6 mm。蠕动泵系统由齿轮和减速电机组成。在减速电机的主轴上固定一个塑料齿轮,齿轮厚度为6 mm,直径1 cm,共有14个齿,齿距1 mm。使用时,将减速电机固定在Lego积木搭制的平台上。将PDMS芯片放置在平台上,在芯片平

行通道区域的表面贴上一层透明胶带将芯片固定在平台上,同时透明胶带可以起到减少齿轮与芯片表面之间的摩擦及保护芯片表面的作用。通过调节减速电机主轴前端的弹性橡圈的紧张度来改变齿轮对PDMS芯片通道所产生的压力,使齿轮压住芯片的平行通道区域,开启电机,转动齿轮来驱动微通道内液体的流动。

在缺口管阵列系统中,将缺口管固定在半环形平台上,以使PDMS芯片上的每个取样探针可以插入到相应的缺口管内。

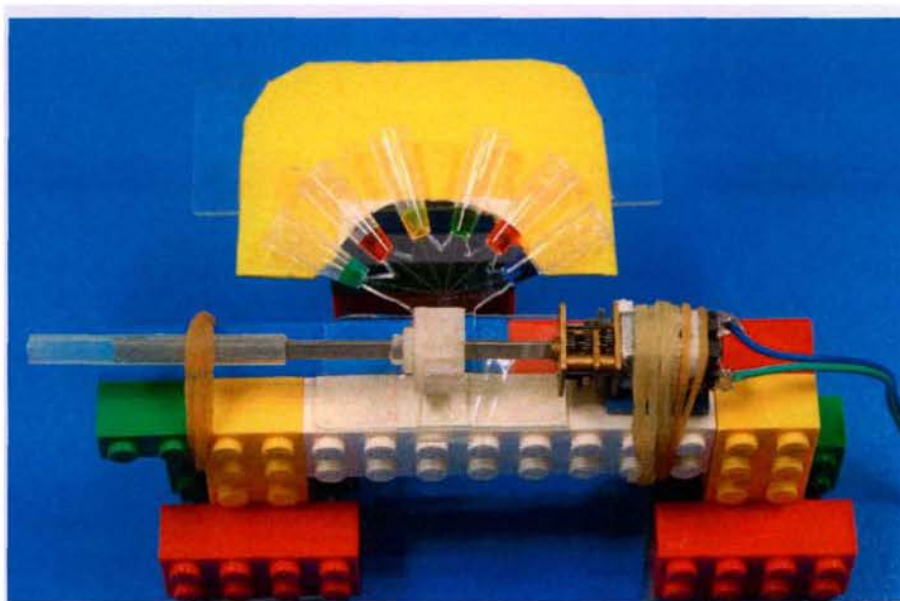


图3.5 基于缺口管阵列-微型齿轮蠕动泵的PDMS芯片免疫分析系统。

3.2.7 免疫分析操作

实验以人IgG溶液为待测试样,以缺口管阵列为试样及试剂的引入装置,采用微型齿轮蠕动泵驱动液流,在PDMS芯片上对人IgG进行了非均相夹心免疫分析。

具体实验操作步骤如下:

1. 实验前即时配制不同浓度的人IgG溶液;
2. 分别在不同的缺口管阵列内的6个缺口管中加入20 μL 的PBS、人IgG溶液、PBS、FITC标记的羊抗人IgG抗体(标记二抗, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和PBS;
3. 将芯片水平固定在装置平台上,使取样探针的入口端分别插入相对应的缺口管内的PBS溶液中;

4. 开启蠕动泵电源, 调整至合适的压力, 蠕动泵转速为10 rpm, 将PBS引入并充满芯片的各个通道;

5. 顺序更换缺口管阵列, 依次将不同浓度的人IgG样品溶液、PBS、FITC标记抗体、PBS引入芯片各通道, 在通道内基片上的抗体包被条带区进行抗原-抗体反应, 形成包被抗体-待测抗原-标记抗体夹心免疫复合物。每一步抗原、抗体反应时间和清洗时间均为1 min;

6. 将芯片从平台上取下, 置于倒置荧光显微镜下(采用×20倍物镜), 用CCD照相机拍照, 拍照曝光时间2 s。采用Sicon Image及Excel 2003软件对数据进行分析处理。

3.3 结果与讨论

3.3.1 基于微型齿轮蠕动泵的 PDMS 芯片液流驱动系统

实验初期曾采用与第二章相同的重力方法驱动PDMS芯片微通道内的液流, 但由于PDMS材料的疏水性, 通常需要对PDMS芯片微通道进行表面修饰或者处理, 或者采用注射泵、负压抽吸等方法, 将液体引入通道。实验中, 虽采用氧等离子清洗机对PDMS芯片进行了表面处理, 仍难以在PDMS芯片上实现稳定可靠的液流驱动。尤其在多通道同步实验时, 不同通道的流速会有较大差异, 且由于液位差较小(只有1 cm), 重力所产生的驱动力有限, 通道内液体的流量和稳定性都不能满足实验的要求。因此本工作发展了一种基于蠕动泵原理的PDMS芯片液流驱动系统。

系统中采用微型硬质塑料齿轮代替传统蠕动泵中使用的滚杠, 以简化系统的结构和加工难度。该齿轮直径仅为1 cm, 厚度为6 mm, 即可实现对PDMS芯片上多个通道内液流的同步驱动。实验分别对蠕动泵转速、芯片的厚度、蠕动泵对通道的压力以及不同通道间流速的差异等进行了考察。

3.3.1.1 蠕动泵转速对微通道内液体流量的影响

实验考察了微型齿轮蠕动泵的转速与PDMS芯片微通道内液体流量之间的变化关系。所采用的PDMS芯片厚0.5 mm。蠕动泵齿轮压力约为0.3 kg。实验结果如图3.6所示。

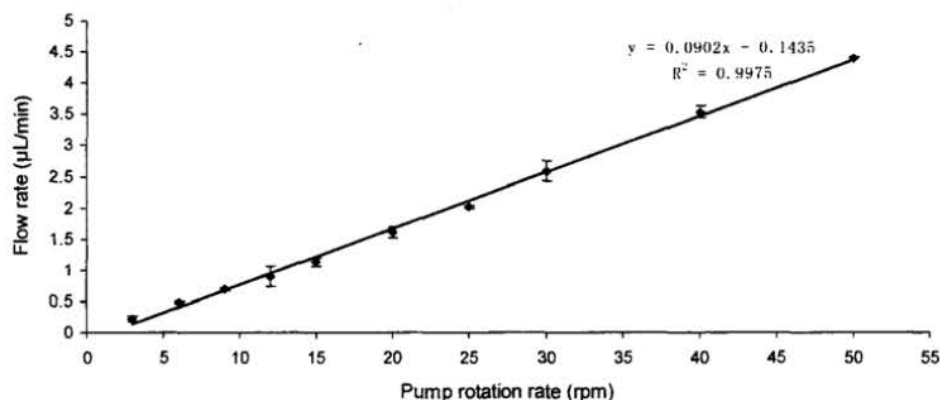


图3.6 齿轮蠕动泵转速与PDMS芯片通道内液体流量的关系。

图3.6表明,在蠕动泵转速变化为3-50 rpm的范围内,随着蠕动泵转速的增加,通道内液体的流量呈线性增加,二者之间有良好的线性关系($r^2=0.9975$)。通道内液体流量可通过调节蠕动泵转速在0.21-4.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ 范围内进行调节。当蠕动泵转速进一步增加到60 rpm时,过快的转速会导致芯片移位,使系统无法正常工作。但上述流量范围已可完全满足本系统对液体流量的要求。

3.3.1.2 PDMS 芯片厚度对微通道内流量的影响

实验中观察到PDMS芯片厚度的变化对微通道内的液体流量有显著的影响。芯片厚度变化以后,相应的蠕动泵对芯片的压力也需要做相应的调整,否则无法获得连续稳定的液流。经多次实验,总结出蠕动泵压力调节的方法如下:首先调松弹性橡圈的紧张度,将芯片的平行通道区域放置于齿轮下方,将芯片取样探针进口端插入相应的缺口管内溶液中;打开蠕动泵电源,调整到所需蠕动泵转速,逐渐增加弹性橡圈的紧张度,直至观察到芯片通道出口处有连续的液流流出时,所对应的蠕动泵压力即为其合适的工作压力。实验中,在蠕动泵的转速为12 rpm的条件下,考察了芯片厚度变化对蠕动泵压力选择及液流流量的影响,结果如图3.7和图3.8所示。

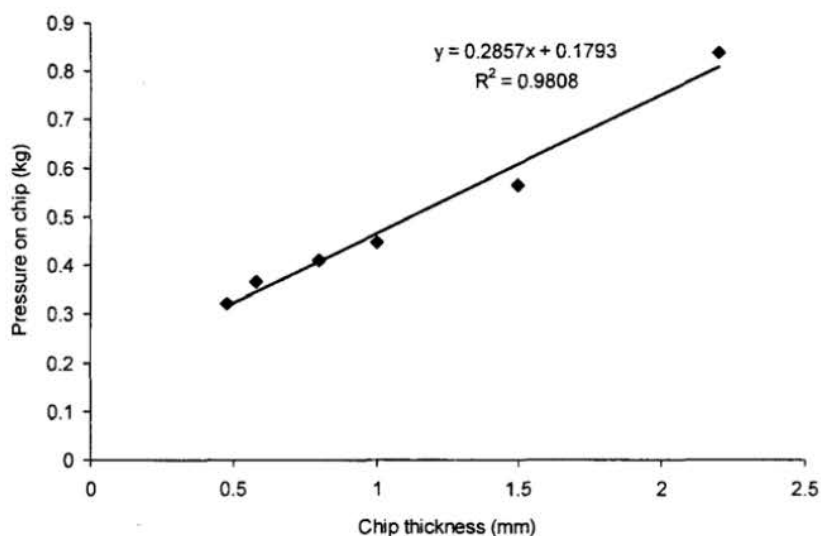


图3.7 芯片厚度与蠕动泵压力之间的关系。

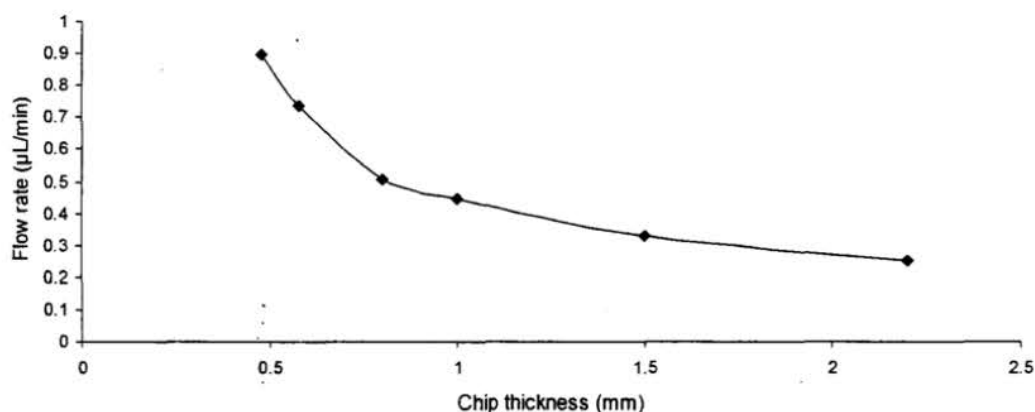


图 3.8 芯片厚度与PDMS芯片通道内液体流量之间的关系。

从图3.7和图3.8可以看出，在考察的芯片厚度范围内（0.5-2.2 mm），随着芯片厚度的增加，所需的蠕动泵齿轮对芯片通道的压力亦需随之增加，二者基本成线性关系。而与此同时，在相同蠕动泵转速下，芯片越厚，芯片通道内液体的流量越低。当芯片的厚度达2.2 mm时，继续增加蠕动泵对通道的压力亦未能驱动连续流动的液流，反而使芯片表面的透明胶带移位，并使上、下两层芯片之间出现缝隙导致空气进入通道。因此，在实验中芯片的厚度不宜超过2 mm。综合考虑蠕动泵对通道的压力、通道内液体的流速以及实验操作的难易程度，选择实验所用芯片厚度为0.8 mm。

3.3.1.3 不同通道之间液体流量的差异

本文中使用的免疫分析芯片共有6个通道，通道的取样探针部分长1 cm，相邻两个通道之间的间隔角为 25° ，呈扇形分开，以方便试样及试剂的引入。上述结构以及芯片加工中存在的不均一性有可能造成各条通道内的流动阻力差异，继而影响不同通道内液体流量的一致性。为此，实验考察了不同通道间流速的差异。实验结果如图3.9及图3.10所示。

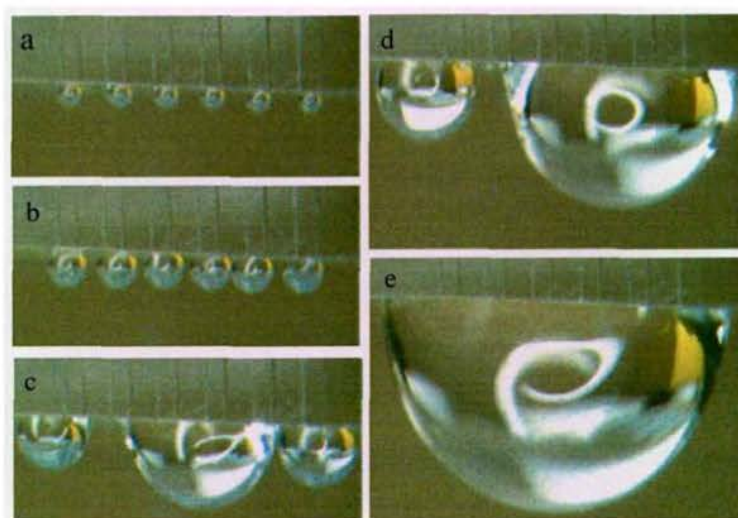


图 3.9 PDMS芯片上6个通道出口处液滴随时间变化的照片。

(a, b, c, d 和 e 分别对应的驱动液流时间为 1.2、1.8、7.5、28.4 和 60.4 s。)

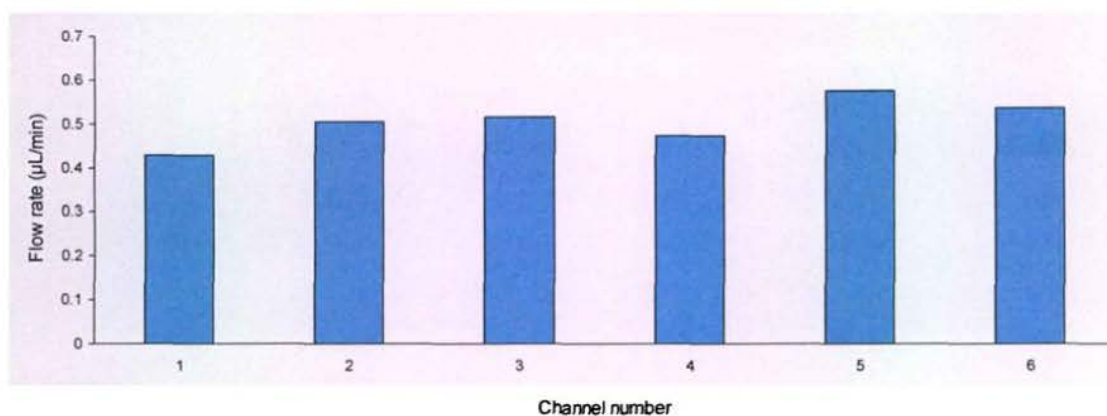


图3.10 不同通道间流速的差异。

从图3.9中各通道出口处液滴动态变化的照片看，在适宜的压力和转速下，蠕动泵对各个通道内的液流驱动具有较好的均一性。采用称重法对不同通道内的

流量进行定量测定, 结果如图3.10。由图3.10可见, 不同通道内液流的流量仍存在一定的差异。当蠕动泵转速为12 rpm, 芯片厚度为0.8 mm时, 同一芯片上的6个通道内液体的平均流量为0.51 $\mu\text{L}/\text{min}$, 流量的RSD为10.8%。在实验中, 通过适当延长每一步操作的时间, 可消除不同通道内流量差异造成的影响。

3.3.2 人 IgG 非均相免疫分析

将研制的免疫分析系统初步应用于人IgG样品的分析, 同时对5个不同浓度的人IgG样品进行测定。抗原和抗体的反应时间为3 min, PBS清洗时间为5 min。总免疫反应时间约16 min。实验结果如图3.11 (a) 和 (b) 所示。

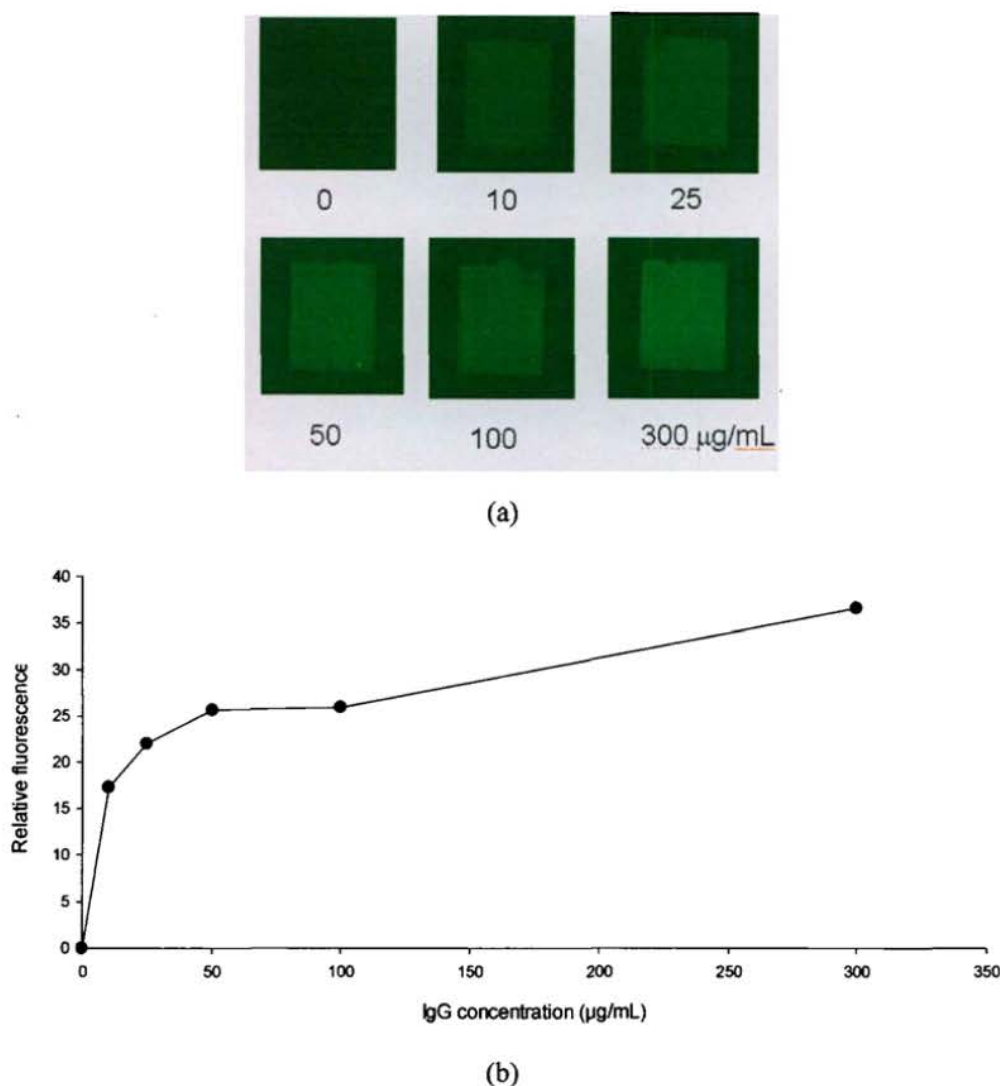
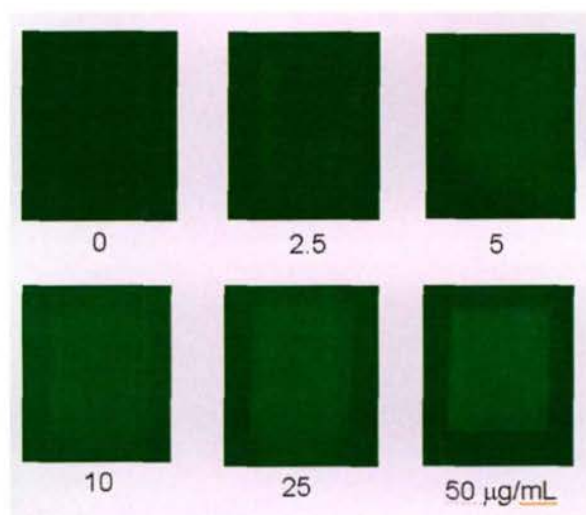


图3.11 PDMS芯片上不同通道的荧光照片及浓度-荧光曲线。

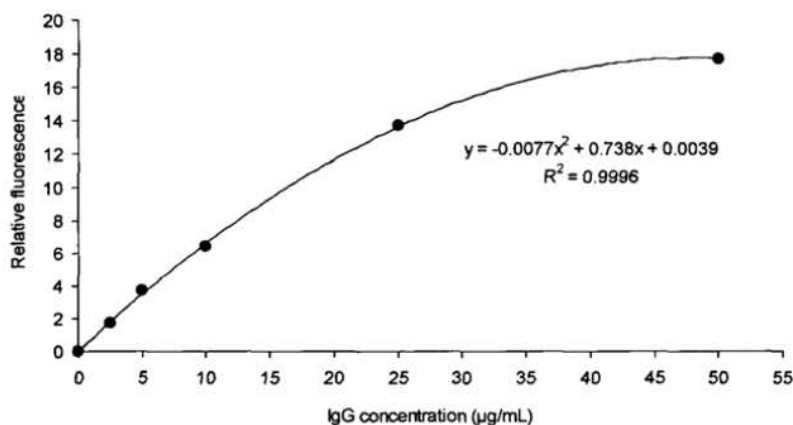
(a) 不同浓度IgG在基片上的荧光照片, IgG浓度依次为: 0、10、25、50、100和300 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

(b) IgG浓度与荧光强度之间的关系曲线。

从图3.11 (b) 可以看出, 在0至50 $\mu\text{g/mL}$ 范围, 荧光信号强度随IgG浓度增加较为快速, 超过50 $\mu\text{g/mL}$ 后, 荧光强度增加趋势渐缓。进一步将IgG浓度范围缩小到0至50 $\mu\text{g/mL}$ 进行考察。同时, 将每步抗原与抗体反应时间及PBS清洗时间进一步缩短为1 min, 总免疫反应时间缩短为4 min。实验结果如图3.12 (a) 和 (b) 所示。



(a)



(b)

图 3.12 0-50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围人IgG分析结果。

(a) 不同IgG浓度样品在基片上的荧光照片, IgG浓度依次为 0、2.5、5、10、25 和50 $\mu\text{g/mL}$;

(b) IgG浓度与荧光强度之间的关系曲线。

从图3.12可见, 在0至50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内, 荧光强度与IgG浓度之间呈现较好的相关关系, 采用二阶多项式回归, 回归方程的相关系数的平方 (r^2) 为

0.9996。系统对人IgG的检测限为1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。实验中蠕动泵的转速为10 rpm，通道内液体流速为0.42 $\mu\text{L/min}$ ，免疫反应时间为4 min，总分析时间为8 min。每次测定试样及试剂的消耗均不到0.5 μL 。

3.4 结论

本章建立的基于PDMS芯片的免疫分析系统具有系统结构简单，容易构建，节省试剂的特点。在研究中，还发展了一种微型齿轮蠕动泵，用于芯片通道内的液流驱动。该蠕动泵具有结构简单、体积小、容易搭建、成本低、流量容易调节的优点，不仅可应用于免疫分析系统，还可作为一种微型便携的液体驱动系统，应用到其它基于PDMS芯片的微流控系统中。

在本章研究工作中，初步验证了上述分析系统应用于免疫分析的可行性。在系统操作和多指标分析方面还有待进一步完善和提高，如实现免疫反应操作的全部自动化，利用微马赛克技术将系统应用于多指标的免疫分析等。

3.5 参考文献

- [1] McDonald J C, Metallo S J, Whitesides G M. Fabrication of a configurable, single-use microfluidic device. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5645-5650.
- [2] Bernard A, Michel B, Delamarche E. Micromosaic Immunoassays. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 8-12.
- [3] Cesaro-Tadic S, Dernick G, Juncker D, Buurman G, Kropshofer H, Michel B, Fattinger C, Delamarche E. High-sensitivity miniaturized immunoassays for tumor necrosis factor α using microfluidic systems. *Lab Chip* **2004**, 4, 563-569.
- [4] Wolf M, Juncker D, Michel B, Hunziker P, Delamarche E. Simultaneous detection of C-reactive protein and other cardiac markers in human plasma using micromosaic immunoassays and self-regulating microfluidic networks. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 19, 1193-1202.
- [5] Ziegler J, Zimmermann M, Hunziker P, Delamarche E. High-Performance immunoassays based on through-stencil patterned antibodies and capillary systems. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 1763-1769.
- [6] Sia S K, Linder V, Parviz B A, Siegel A, Whitesides G M. An Integrated approach to a portable and low-cost immunoassay for resource-poor settings. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 498-502.
- [7] He X, Dandy D S, Henry C S. Microfluidic protein patterning on silicon nitride using solvent-extracted poly(dimethylsiloxane) channels. *Sensors and Actuators*

- B. **2008**, 129, 811-817.
- [8] Kurita R, Yokota Y, Sato Y, Mizutani F, Niwa O. On-Chip enzyme immunoassay of a cardiac marker using a microfluidic device combined with a portable surface plasmon resonance system. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 5525-5531.
- [9] Henares T G, Funano S I, Terabe S, Mizutani F, Sekizawa R, Hisamoto H. Multiple enzyme linked immunosorbent assay system on a capillary-assembled microchip integrating valving and immuno-reaction functions. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 589, 173-179.
- [10] Yu L, Li C-M, Liu Y-S, Gao J, Wang W, Gan Y. Flow-through functionalized PDMS microfluidic channels with dextran derivative for ELISAs. *Lab Chip* **2009**, 9, 1243-1247.
- [11] Kartalov E P, Zhong J F, Scherer A, Quake S R, Taylor C R, Anderson W F. High-throughput multi-antigen microfluidic fluorescence immunoassays. *BioTech.* **2006**, 40, 85-90.
- [12] Sui G, Wang J, Lee C-C, Lu W, Lee S P, Leyton J V, Wu A M, Tseng H-R. Solution-phase surface modification in intact poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 5543-5551.
- [13] Weibel D B, Kruithof M, Potenta S, Sia S K, Lee A, Whitesides G M. Torque-actuated valves for microfluidics. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 4726-473.
- [14] Linder V, Sia S K, Whitesides G M. Reagent-loaded cartridges for valveless and automated fluid delivery in microfluidic devices. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 64-71.
- [15] Hu G, Gao Y, Sherman P M, Li D. A microfluidic chip for heterogeneous immunoassay using electrokinetic control. *Microfluid. Nanofluid.* **2005**, 1, 346-355.
- [16] Linder V, Verpoorte E, de Rooij N F, Sigrüst H, Thormann W. Application of surface biopassivated disposable poly(dimethylsiloxane)/glass chips to a heterogeneous competitive human serum immunoglobulin G immunoassay with incorporated internal standard. *Electrophoresis* **2002**, 23, 740-749.
- [17] Luo Y, Yu F, Zare R N. Microfluidic device for immunoassays based on surface plasmon resonance imaging. *Lab Chip* **2008**, 8, 694-700.

攻读学位期间完成的工作

- [1] 石晓彤, 潘建章, 方群. 基于毛细管和缺口管阵列试样引入系统的自动化微流控免疫分析系统. 第二届国际微流控学会议暨第五届全国微全分析系统学术会议论文集. 南京, **2008**, 243-244.
- [2] Fang Q, Shi X T, Du W B, He Q H, Shen H, Fang Z L. High-throughput microfluidic sample-introduction systems. *Trends in Analytical Chemistry* **2008**, 27(6): 521-532.
- [3] 姚波, 何巧红, 杜文斌, 石晓彤, 方群. 微流控高通量试样引入技术的研究进展. *色谱* **2009**, 5, 662-666.
- [4] Shi X T, Pan J Z, Yin X F, Fang Q. Automated microfluidic heterogeneous immunoassay system based on capillary and slotted-vial arrays. *in preparation*.
- [5] Shi X T, Pan J Z, Fang Q. PDMS chip based microfluidic immunoassay system with slotted vial array and micro-peristaltic pump. *in preparation*.