

# 微流控芯片上的免疫分析\*

冷 川<sup>1</sup> 张晓清<sup>2</sup> 鞠焜先<sup>1\*\*</sup>

(1. 南京大学化学化工学院 生命分析化学教育部重点实验室 南京 210093;  
2. 重庆医科大学医学检验系 临床检验诊断学教育部重点实验室 重庆 400016)

**摘 要** 近 20 年来,随着微流控芯片加工技术的不断发展,微流控分析已从一个概念发展为当前世界上最前沿的科技领域之一,微流控芯片上免疫分析的方法研究也取得重要进展。这些芯片包含传输流体的微通道和免疫分析程序中部分或全部的必要组件。微流控技术用于免疫分析在减少试剂用量、缩短分析时间、自动化等方面提高了分析性能。本文综述了微流控芯片上免疫分析的发展、分类,并评述了各类微流控免疫分析芯片的性能及优缺点。

**关键词** 微流控 免疫分析 免疫传感 芯片

中图分类号: O657 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2009)04-0687-09

## Microfluidic Chip-Based Immunoassay

Leng Chuan<sup>1</sup> Zhang Xiaoqing<sup>2</sup> J üHuangxian<sup>1\*\*</sup>

(1. Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Sciences, Ministry of Education, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** With the continuous development in microfluidic fabrication technology, microfluidic analysis has evolved from a concept to one of research frontiers in last twenty years. The immunoassay methods based on microfluidic devices have also made great progress. Such devices consist of microchannels for transporting fluids integrated with part or all of the necessary components of an immunoassay procedure. Microfluidic technology improves greatly the analytical performance of immunoassays by reducing the consumption of reagents, decreasing the analysis time, and developing automation. This review focuses on the development and classification of microfluidic immunoassays, and the characteristics of each type of chips and their performances are also discussed.

**Key words** microfluidics; immunoassay; immunosensors; chips

### Contents

- 1 Introduction
- 2 Classification and characteristics of microfluidic chip-based immunoassay
- 3 Homogeneous and heterogeneous immunoassay on microfluidic chips

- 3.1 Homogeneous immunoassay
- 3.2 Heterogeneous immunoassay
- 4 Perspectives

### 1 引言

免疫分析是利用抗原和抗体的特异性反应进行检测的一种方法,由于其极高的选择性和灵敏度,在

收稿: 2008 年 4 月, 收修改稿: 2008 年 6 月

\*国家自然科学基金创新研究群体重点与面上项目(No. 20821063, 20535010, 20875044)和江苏省自然科学基金创新学者攀登项目(No. BK2008014)资助

\*\*通讯联系人 e-mail: hxju@nju.edu.cn

临床诊断和生化分析中具有广泛的应用<sup>[1]</sup>。然而,常规免疫分析时间较长,通常需要数小时,操作过程复杂,需要消耗大量昂贵的免疫试剂,并且检测设备较大,难以满足现场检验的要求。1990年后发展起来的微流控分析技术在微米级结构中操控纳升至皮升体积流体,可执行样品预处理、分离与检测等步骤,具有体积小、比表面积大、反应时间短、分析速度快、试剂和样品用量少、易集成化和自动化等优点。因此,将微流控分析技术与免疫分析结合,可在一定程度上克服传统免疫分析的缺点,近几年来已引起研究者的广泛关注。基于微流控芯片的免疫分析大大改善了常规免疫分析的性能,具体包括:(1)易于集成化,便携化;(2)操作简便,自动化程度高;(3)免疫反应在微通道中进行,由于其体积小,比表面积大,缩短了反应时间,提高了分析效率;(4)大大节约了昂贵的免疫试剂用量<sup>[2-6]</sup>。本文对微流控芯片上的免疫分析的类型、相关技术及其新进展进行综述。

## 2 微流控芯片上免疫分析的分类和特性

从免疫反应方式,免疫分析可分为均相免疫分析和异相免疫分析。均相免疫分析利用液相中进行的抗原-抗体免疫反应检测,异相免疫分析则将抗体或抗原固定在固相载体中,而后与待测抗原或抗体进行免疫反应。近年来,基于微流控芯片的均相和异相免疫分析均取得了较大进展,前者主要利用生物分子在微芯片上的快速电泳分离进行分析,而后者则利用微通道的高比表面积来提高免疫分析方法的性能。

从定量方法上,微流控芯片上的免疫分析可以分为竞争免疫分析和非竞争免疫分析。竞争免疫分析中,待分析物和标记抗原竞争结合抗体上有限的活性位点,其竞争力和浓度成正比。待测物浓度升高,标记的抗原就被更多地取代,固相载体上结合的标记抗原浓度越低,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。在抗体的量趋近于零时可得其最大灵敏度,灵敏度决定于抗原和抗体的亲和力。非竞争免疫分析中(夹心法或直接法),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。这里,扩散过程尤其重要<sup>[7-9]</sup>。

从检测手段上微流控芯片上的免疫分析又可分为光学检测和电化学检测等,最常见的是荧光检测法。很多基于电泳的装置都用激光诱导荧光进行检测,因为其具有较好灵敏度和较短的响应时间。荧

光检测方式通常是将显微镜聚焦在微通道上,再与CCD连接。其他光学检测方法还包括化学发光<sup>[10]</sup>和热透显微镜<sup>[11-13]</sup>等。电化学是另一常用的检测方法,主要包括安培法、电位法、电容法检测。利用伏安曲线和固定电压下的电流-时间曲线都可进行安培法免疫分析。在结合微流控芯片时电化学检测可分为流经式、流向式和流通式<sup>[14]</sup>。微流控芯片中的伏安法检测的优势在于应用了微型电极而不降低免疫分析效果。为叙述方便,本文采用第一种分类方法进行综述。

## 3 微流控芯片上的均相和异相免疫分析

### 3.1 均相免疫分析

免疫试剂和待测物存在于同一相中,因此要在微流控芯片上设计一定的结构使他们从不同的微通道流入免疫反应微池或反应通道,抗原和抗体进行特异性反应后,在同一相中生成抗原-抗体复合物。由于免疫试剂和底物同在液相中,液流操作比较方便,也易实现多种分析功能的集成化。均相免疫分析免去了抗体固定和洗涤步骤,也无需考虑固相载体上的非特异性吸附,但因为免疫反应形成了复合物,一般需对混合物进行分离之后才能实现检测。

#### 3.1.1 芯片外免疫反应-芯片上分离

首先将免疫反应在微流控芯片外完成,再将免疫反应的产物与剩余的反应物转移到芯片上进行分离。主要的分离方法是毛细管电泳,利用电动力驱动液流,实现抗原-抗体复合物与游离的抗原、抗体的分离,因此只能算部分意义上的微流控芯片免疫分析。

Koutny等<sup>[15]</sup>首先建立了血清中可的松的免疫测定方法,在芯片外将抗体和荧光标记的抗原加入待测抗原中进行竞争反应,之后将混合物转移到芯片上,采用内标法定量,游离的荧光标记抗原被分离并检测,待测抗原浓度与检测信号成正比。线性范围是1-60 $\mu\text{g}/\text{dl}$ ,分离时间小于30s。Chiem等<sup>[16]</sup>亦采用这一方法实现了血清中茶碱的测定,利用荧光标记的抗原和抗体反应,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。此法还可以用于酶的分析。Cohen等<sup>[17]</sup>在芯片外,用蛋白激酶A催化磷酸基团从ATP到丝氨酸的转移,而后用芯片进行荧光标记的肽底物与产物的分离,由此进行酶反应动力学、抑制剂和底物的检测。

该方法首先在微流控芯片上实现了免疫分析,与常规免疫分析相比,分析速度加快,操作过程

简化。

### 3.1.2 集成免疫反应与分离的微流控芯片

该类系统的特点是免疫反应和反应组分的分离均在微流控芯片上实现,以提高免疫分析和芯片的性能,分析系统体积减小,更容易实现分析仪器的便携化。该方法主要采用电力驱动液流,并以毛细管电泳为主要分离方法。Wang 等<sup>[18]</sup>在玻璃芯片上,采用直接法免疫反应,在电泳分离前将抗原和酶标抗体混合,反应后形成的抗原-抗体复合物与酶标抗体在通道中进行电泳分离,柱后检测酶催化底物的安培响应信号,得到游离的酶标抗体和抗原-酶标抗体复合物的两个峰。他们还利用同样的芯片,采用二茂铁(Fc)标记的抗原或抗体进行免疫分析<sup>[19]</sup>,分别用直接法和竞争法进行柱前免疫反应,在通道中电泳分离,进行柱后电化学检测,分析方法如图 1 所示。

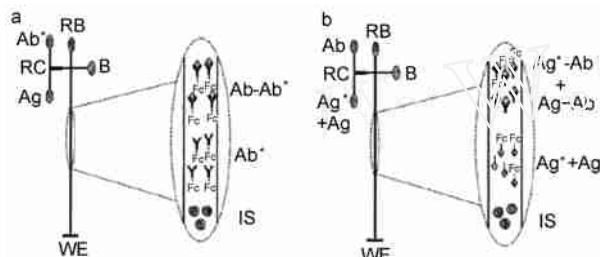


图 1 芯片上的电化学直接法免疫分析(a)和电化学竞争法免疫分析(b)方案<sup>[19]</sup>

**Fig. 1** Schematic of the on-chip (a) direct and (b) competitive electrochemical immunoassay protocols. RB: running buffer; B: unused buffer reservoir; Ab\*: ferrocene labeled antibody (direct); Ag\*: ferrocene labeled antigen (competitive); Ag: antigen; Ab: antibody; RC: reaction chamber; IS: internal standard; WE: screen-printed working electrode<sup>[19]</sup>

免疫反应也可在通道中进行。Chiem 等<sup>[20]</sup>首先利用微流控芯片将免疫反应和分离过程整合在微通道中,对血清中的茶碱进行免疫测定。芯片上的弯管促进了试剂的混合,竞争免疫反应的时间约为 1.5min,同时通道中形成的荧光标记的抗原-抗体复合物与游离荧光标记的抗原被分离并检测。Herr 等<sup>[21]</sup>用直接免疫分析法,在通道中将待测牙周金属蛋白酶-8(matrix metalloproteinase-8, MMP-8)抗原和荧光标记的 MMP-8 抗体混合,在膜上进行富集、反应,之后在管道中实现复合物与游离抗体的分离,直接在管道中用荧光检测,在小于 10min 的时间内,完成了对 20μl 唾液样品中 MMP-8 的分析,并比较了健

康的和有牙周疾病的对象的检测结果,发现病人唾液中 MMP-8 的含量显著大于健康对象。这种基于微流控芯片的现场(point-of-care)诊断为疾病状态下的蛋白类生物标志物提供了快速、可靠的检测方法。实验方案如图 2 所示。

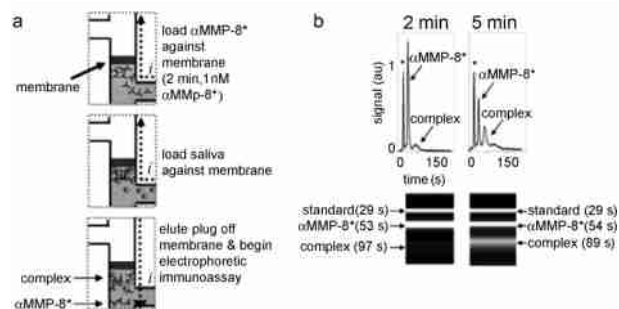


图 2 芯片上的样品富集:(a)微流控芯片电泳免疫分析操作步骤和(b)复合物的信号<sup>[21]</sup>

**Fig. 2** On-chip sample enrichment: (a) Schematic depicting operation of the microchip electrophoretic immunoassay ( $\mu$ CEI) device. Current flow is indicated by  $i$ ; (b) Electropherograms and gel-like plots show that, with all other conditions held fixed, substantial complex is observed after a 5-min enrichment. Protein internal standard is marked with an asterisk on the electropherograms<sup>[21]</sup>

Luo 等<sup>[22]</sup>利用金纳米粒子对抗体的沉积作用,在微流控芯片的管道中对标记的羊抗人免疫球蛋白 IgG(goat anti-human IgG)进行荧光检测,检测限达 10ng/ml。Hadd 等<sup>[23]</sup>用集成化的微流控芯片进行了酶分析,用荧光方法检测酶催化底物反应的生成物,反应和检测在管道中进行,这个实验不需要分离步骤。

微流控芯片均相免疫分析中电泳分离效率受样品基体影响较大,有时不能有效分离。此外,只有当复合物与游离抗原、抗体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-抗体复合物可能沉淀或形成多种复合物,也会影响分离效果。

### 3.2 异相免疫分析

异相免疫分析需在检测前分离游离的和结合的标记物。微流控芯片异相免疫分析大多是将抗体(有时是抗原)固定在固相载体上。其优点是能使抗原从稀溶液中浓缩富集到固相载体表面,通过洗涤,就可以实现抗原-抗体复合物与游离抗原或抗体的分离。此法抗体损失小,分析速度快,可以重复使用,灵敏度高,检测限低。将不同的抗体固定于微芯片的不同部位,可形成阵列,实现多元免疫分析。

### 3.2.1 利用微珠作载体

利用微珠作固相载体的微流控免疫分析相对于常规的免疫分析具有独特的优势。第一,微芯片中的比表面积增大。例如,在直径 $0.1\mu\text{m}$ 的管道中的 $1\mu\text{g}$ 微珠可产生约 $60\text{m}^2$ 的表面积<sup>[9]</sup>。抗原或抗体被固定在微珠表面,能有效地减少样品扩散到固相载体表面的时间,这样可减少免疫反应的温育时间,加快免疫反应分析速度。第二,利用压力或者电场,能有效地将表面修饰有抗原或抗体的磁珠传送到微通道。第三,微珠表面可有不同的修饰方法,引入不同的官能团,在微流控芯片中发挥不同的作用。第四,掺入铁的聚苯乙烯微珠是顺磁性的,可以用磁场进行控制,使其在微通道中流动或者固定。

Sato 等<sup>[11]</sup>加工了带有微堰结构的石英芯片,将吸附免疫球蛋白 A ( $s\text{-IgA}$ ) 的聚苯乙烯微珠填入芯片中,微珠截留在微堰处,金胶结合的抗体流过通道与磁珠上的  $s\text{-IgA}$  反应后被固定在磁珠上,通过热透镜显微术 (thermal lens microscopy) 进行检测。他们还用此芯片和微珠发展了夹心免疫分析方法 (如图 3),并用相同的原理进一步提出了四通道免疫分析的微流控芯片 (如图 4),使分析效率大大提高。

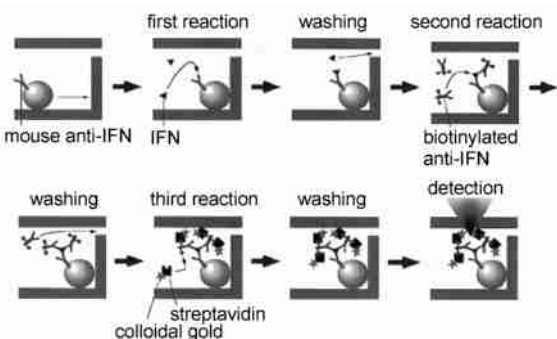


图 3 微流控芯片上的免疫吸附分析示意图<sup>[12]</sup>

Fig. 3 Schematic illustrations of microchip-based immunosorbent assay<sup>[12]</sup>

用聚苯乙烯微珠为载体结合荧光检测的免疫分析被广泛研究。Haes 等<sup>[24]</sup>制备了具有双堰结构 (double-weir structure) 的微流控芯片管道,用来固定微珠。如图 5 所示,微珠与葡萄球菌 B 型肠毒素 (SEB) 抗体结合,固定于通道中,荧光标记的抗原流过微珠,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和力远大于标记抗原与抗体的亲和力,此时标记抗原将被置换出来,而未标记抗原与抗体形成免疫复合物,在芯片上检测置换出来的标记抗原的荧光信号。信号强度与抗原浓度成正比,分析时间仅需 20min,检测限为  $1\text{fM}$

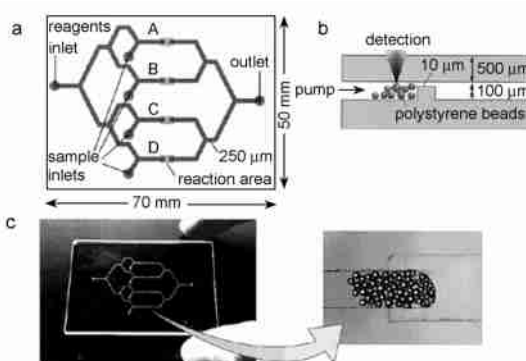


图 4 免疫吸附分析的石英玻璃微芯片:(a)示意图,(b)反应和检测部位,(c)微芯片和微珠聚集的照片<sup>[13]</sup>

Fig. 4 Quartz glass microchip for immunosorbent assay: (a) An overview; (b) A cross section of the reaction and detection area; (c) Photograph of the microchip and a close-up photograph of beads in a chip<sup>[13]</sup>

( $28.5\text{fg/ml}$ ),线性范围跨越 6 个数量级 ( $1\text{fM}$ — $1\text{nM}$ )。该系统对实际生物样品 (牛血清蛋白、干酪素和牛奶) 中的目标生物分子的检测也具有较高的灵敏度 ( $10\text{pM}$ ),但实际生物样品在检测前需要进行预处理。另外,对实验方案中的洗涤步骤的优化可以提高方法的定量性质,对样品富集机理进行研究将有助于发展微流控芯片上样品预富集的新方法。

Shin 等<sup>[25]</sup>在微流控芯片上制作了微珠腔,在芯片外先将抗体修饰在微珠上,注入芯片中,再将荧光标记的抗原与待测抗原通过负压打进腔中,充分反应后在腔中进行荧光检测。Yasukawa 等<sup>[26]</sup>利用负介电泳 (negative dielectrophoresis) 技术在微通道中形成一个笼子 (caged area),在其中进行夹心法免疫反应和荧光检测,反应时间为  $40\text{min}$ ,检测限为  $1.4\text{nM}$ 。

磁性微珠也可以作为固相载体,此时可以用磁铁对磁珠进行控制。Hayes 等<sup>[27]</sup>利用磁珠作为固定载体,压力驱动液流,建立了芯片上免疫分析系统。微流控芯片中不需要加工特殊结构,通过磁场将磁性微珠固定于通道表面,进行夹心法免疫分析,免疫反应时间仅为  $10\text{min}$ 。在反应处进行荧光检测,测定结束后撤去磁场,排出微珠。这一方法简化了微流控芯片的加工,操作更方便。Choi 等<sup>[28]</sup>制作了内嵌有电磁铁的微流控芯片通道,先将抗体修饰的磁珠引入微通道,开启磁场,固定磁珠,将不同的抗原流过通道,磁珠上的抗体仅与目标抗原发生特异性反应,洗涤后其它抗原流出;然后加入标记的二抗,与固定在磁珠上的抗原温育反应后,洗涤除去未结合的标记二抗,最后撤去磁场,释放出磁珠,进行检测,

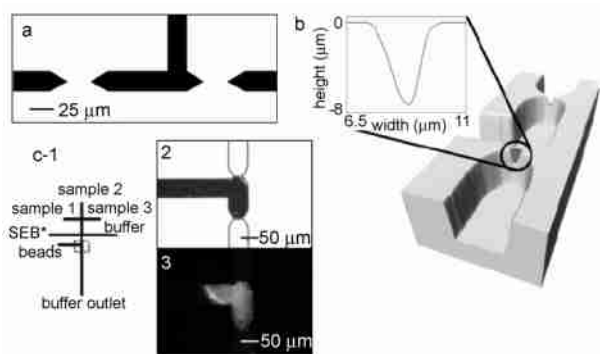


图 5 具有双堰结构的微芯片<sup>[24]</sup>

**Fig. 5** Double-weir structure fabricated in a soda lime glass microchip. (a) Mask design, scale bar equals 25 μm. (b) 3D illustration of the weir structure arbitrarily modified for visualization from profilometry data. The illustration shows the separation channel and side arm for bead loading. (Magnified region) Profilometry cross section of weir structure. The widest opening of the weir is 7.3 μm deep and 2.4 μm wide. (c) Schematic of the microfluidic chip for the displacement immunoassay. (1) Microchip design incorporates reservoirs for three different samples, SEB\*, and bead loading/unloading. Sample 1, sample 2, sample 3, SEB\*, and buffer reservoirs are 2.8 cm from buffer outlet. The dotted box designates the location of the bead bed area. (2) Bright-field image of the double-weir structure. Antibody-functionalized microbeads (diameter, 5.06 μm) are loaded into the bead bed by applying negative pressure at the buffer outlet reservoir. (3) Fluorescently labeled SEB (1 nM SEB\*) binds to the antibody-functionalized microbeads<sup>[24]</sup>

这样可达到从不同种抗原中测定目标抗原的目的,实现分离。Kim 等<sup>[29]</sup>则在芯片外将微珠进行荧光标记,通过夹心法,依次连接抗体、待测抗原和标记过超顺磁性纳米粒子(superparamagnetic nanoparticles)的二抗。充分反应后,用压力进样,将微珠注入通道中。由于磁场方向垂直于通道,有磁性和无磁性的微珠在流动过程中被分开,用荧光检测器进行检测。该微流控芯片实现了对兔 IgG 和鼠 IgG 的同时检测,检测限分别达到 244 pg/ml 和 15.6 ng/ml。但是所有免疫反应均在芯片外进行,步骤多、耗时长(30 min 以上),芯片上仅做了分离和检测,不利于现场检测。Farrell 等<sup>[30]</sup>也用微珠为载体进行夹心法免疫反应,所有反应都在芯片外完成。反应后的微珠注射进芯片中,利用酶催化底物进行电化学检测。

固定抗体多次使用后,其免疫反应活性有时会降低,为了确保分析结果的准确性和重现性,每次使

用后的微珠可回收后进行表面更新,使得每次分析都使用新的抗体修饰微珠。相对其它抗体固定载体,微珠作为抗体固定载体更容易实现表面更新,但微珠的填充与排废操作具有一定的难度。微珠还可能吸附在通道壁或电极上,阻塞通道,减少通道内径或散射光线。

### 3.2.2 利用通道壁作载体

在通道表面固定抗体,具有较高的比表面积。固定方式主要有管壁上直接吸附和共价键连接等。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。为了减少蛋白质分子和小分子在管壁的非特异性吸附,封闭过程和表面改性必不可少。

Dodge 等<sup>[31]</sup>在玻璃芯片通道的局部区域通过物理吸附蛋白 A,利用蛋白 A 与兔免疫球蛋白(rIgG)抗体间较高的亲和力而将抗体连接在通道壁上。该方法避免了直接将抗体修饰在通道壁上其活性位点不能充分暴露在外的缺点,并用直接免疫法和竞争免疫法进行 rIgG 免疫分析。Eteshola 等<sup>[32]</sup>在 PDMS 芯片上实现了羊免疫球蛋白 IgM 的非均相免疫分析:首先用 BSA 吸附在微通道内壁,通入戊二醛活化 PDMS 通道表面,再把蛋白 A 键合到吸附了 BSA 的微通道内壁,进而使捕获的抗体特异性键合到蛋白 A 上。当分析物羊 IgM 通过微通道时,被一抗捕获,用标记了辣根过氧化物酶(HRP)的二抗催化底物对羟基苯丙酮酸(HPPA)氧化,生成荧光物质进行免疫检测,检测限达到 17 nmol/L。Hosokawa 等<sup>[33]</sup>利用空气在 PDMS 中溶解度高和扩散速度快的特性,研制了无动力注射的免疫分析芯片,芯片结构简单,使用方便。他们对竞争法和夹心法异相免疫分析都进行了研究,先将抗体修饰于内壁,再利用荧光法检测兔 IgG 和人 C-反应蛋白(C-reactive protein),样品消耗为 1 μl,免疫分析时间(包含抗体固定时间)为 20 min,检测限分别为 0.21 nmol/L 和 0.42 nmol/L。如果与合适的可携带检测器结合,即可实现可靠的现场检测。由于较快的扩散速度有利于 DNA 杂交过程的进行,这种无动力注射芯片还可用于异相 DNA 微阵列检测。Kurita 等<sup>[34]</sup>在通道表面固定 B 型促尿钠排泄肽(BNP)抗原,捕获免疫反应后混合物中过量的游离酶标抗体,而酶标抗体-抗原复合物则直接流过。被捕获的酶标抗体上的酶催化流经的底物反应,生成的带巯基的产物共价结合于通道内的金膜表面,利用表面等离子体共振技术检测,如图 6 所示,分析时间为 30 min,检测范围为 5 pg/ml—

100ng/ml,覆盖了血液样品中 BNP 的浓度范围。T 型管道结构能够防止待测溶液流过金膜表面,酶催化反应和产物积聚的实时监测同时进行,这种芯片设计可满足对实际生物样品如人血清的检测。如果将微芯片用于现场检测,还必须缩短分析时间,可以通过引入自动化操作流程和优化管道结构实现。对于实际样品,可考虑用膜去除蛋白质大分子后再进行分析。

Rossier 等<sup>[35]</sup>将碳电极嵌在通道内壁上,然后在通道表面固定一抗,利用夹心法进行电化学检测。由于微通道具有较高的比表面积,免疫试剂的扩散距离较小,免疫反应每一步的温育时间仅为 5min。Henares 等<sup>[36]</sup>制作了嵌有毛细管的微流控芯片,可以通过阀的开关实现流体控制,关闭阀后在毛细管中进行免疫分析,并用热透镜进行检测。Du 等<sup>[37]</sup>在芯片通道内壁修饰抗体,捕获细胞表面的抗原,进行了荧光免疫检测。

微马赛克免疫分析芯片可进行多元免疫分析。Bernard 等<sup>[38]</sup>研制了微马赛克免疫分析芯片,目标抗体的流动方向和固定的抗原带垂直。由于它们的特异性反应,芯片上形成了马赛克型的结构,如图 7 所示,有免疫反应发生的地方即可检测到荧光信号,实现了多元免疫分析。

Sandro 等<sup>[39]</sup>则利用夹心法,在芯片上固定一抗,形成带状区域。待测抗原流动方向与一抗区带垂直,标记二抗流动方向与一抗带重合,由此形成马赛克,可通过荧光检测。通过优化芯片设计、温育时间、抗体浓度和荧光基团等,可使该芯片免疫分析得到很高的灵敏度。该方法所需样本量少,检测灵敏度高,能在同一块芯片上实现多个样品的同时分析,大大提高了分析效率。

利用通道壁作固相载体进行免疫分析,必须尽量减少其对蛋白质的非特异性吸附,以降低噪音,提高灵敏度。Dong 等<sup>[40]</sup>将卵磷脂双层膜修饰于 PDMS 表面,蛋白质的非特异性吸附减少至原来的 1/100—1/1 000,如图 8 所示。之后在通道壁上固定 SEB 抗体,用夹心法检测 SEB,检测限达到 0.5ng/ml。用该微流控芯片检测牛奶中的 SEB,得到了与检测 Tis 缓冲液中 SEB 相似的响应与灵敏度,能在数十分钟内可靠而灵敏地检测食物样品中的痕量蛋白毒素,展示了该微流控芯片的应用潜力。

Bai 等<sup>[41]</sup>发展了用聚乙酰亚胺增强抗体在 PMMA 表面结合能力的新方法,从而增加了免疫分析的效果。Yang 等<sup>[42]</sup>将磷脂双分子层涂在通道内

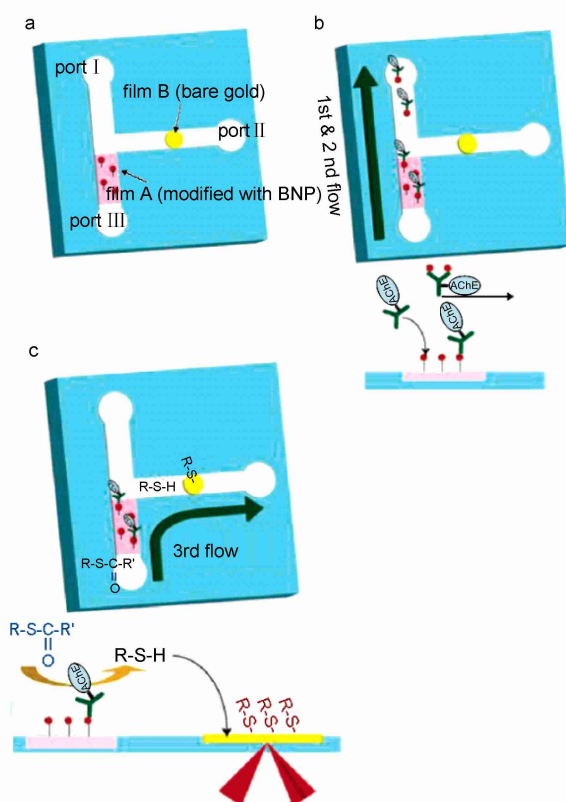


图 6 微通道免疫传感器检测 BNP 的步骤<sup>[34]</sup>

Fig. 6 Schematic diagram of the procedure for BNP determination in the immunosensor. (a) Preparation of the immunosensor. Film A is modified with BNP for the collection of unreacted anti-BNP-AChE. Film B is a bare gold film for the detection of concentrated thiocholine. (b) Introduction of a mixture solution containing BNP and anti-BNP-AChE from port I. The unreacted anti-BNP-AChE is collected on BNP-modified film A during the first flow. Then the channel is rinsed with phosphate buffer during the second flow. (c) Acetylthiocholine is introduced from port I to port II. Thiocholine is produced from acetylthiocholine by the collected anti-BNP-AChE on film A, then the thiocholine accumulated on the film B surface locates downstream in the microchannel, and is monitored by the SPR angle shift during the third flow<sup>[34]</sup>

壁(PDMS 和玻璃表面)。流过的荧光标记抗体浓度和荧光强度成良好线性关系,说明修饰过的内壁已达到排除蛋白质非特异性吸附进行免疫分析的要求。Linder 等<sup>[43]</sup>在 PDMS 通道表面修饰了生物素-中性抗生物素蛋白和生物素标记的右旋糖苷三层(a three layer biotin-neutravidin sandwich coating, made of biotinylated IgG, neutravidin, and biotinylated dextran)以减少非特异性吸附,用羊抗人 IgG 和荧光标记的人 IgG 进行免疫分析,芯片间具有较好的重复性。

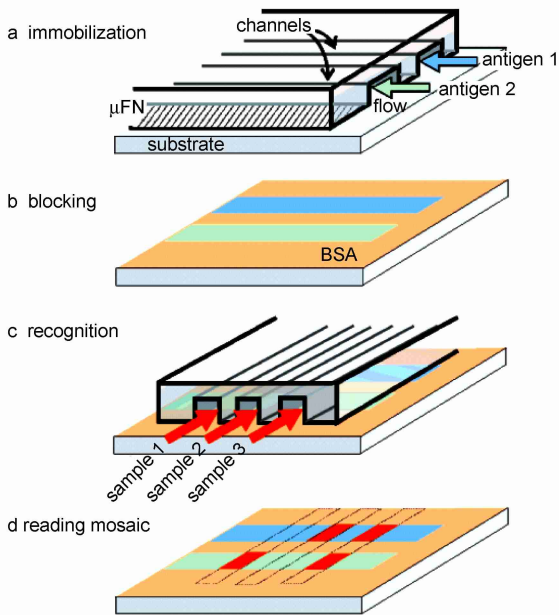


图 7 用微流网络正交传输系列抗原和抗体的微马赛克免疫分析方法<sup>[38]</sup>

**Fig. 7** Strategy for performing a micro-mosaic immunoassay ( $\mu$ MIA) on a surface with microfluidic network ( $\mu$ FN) cross-delivery of a series of antigens and one of antibodies. (a) A  $\mu$ FN patterns different antigen molecules along single lines on a substrate. (b) The area of the substrate left unpatterned during (a) is blocked with BSA to prevent nonspecific binding of proteins in subsequent steps. (c) Antibodies flowing through the channels of a second  $\mu$ FN locally bind to the patterned antigens. (d) Reading the binding mosaic reveals the amount of antibodies present in the samples. A mosaic can be read using a fluorescence microscope. The arrows indicate the direction of flow of the protein solution in the  $\mu$ FN<sup>[38]</sup>

利用微通道为固相载体也有一些理论研究。Golden 等<sup>[44]</sup>在通道表面固定抗体,研究了荧光标记的抗原在不同形状的通道中的传输(delivery)效果。结果表明凹槽状(grooved)的通道比平坦(plain)的通道更有利于抗原的传输。Vijayendran 等<sup>[45]</sup>比较了固定在蜿蜒的通道和直线型通道内壁的蛋白 A 对鼠 IgG 的捕获情况,并通过理论计算,证明了蜿蜒的通道更有利于试剂的混匀。Zimmermann 等<sup>[46]</sup>建立了微通道上固定抗体捕获抗原免疫反应的物理模型(如图 9 所示),通过较系统地理论研究,提出抗原溶液流速的优化可极大地增强免疫分析的效果;同时,抗原-抗体的结合常数和通道表面抗体密度也影响分析性能。通过灵敏度、最小试剂用量和分析时间的理论优化,对微流控免疫分析的发展有一定的指导意义。

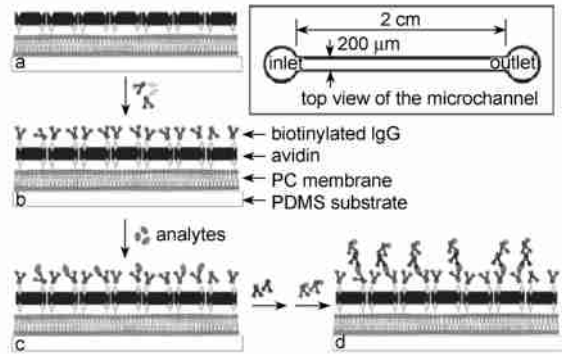


图 8 内壁修饰的 PDMS 微芯片用于 SEB 免疫检测<sup>[40]</sup>

**Fig. 8** A cartoon illustration for the fabrication of an SEB-detecting PDMS microdevice. (a) Streptavidin reinforced phosphatidylcholine supported bilayer membranes (PC SBMs); (b) Surface functionalization with biotinylated anti-SEB IgG; (c) Capture of SEB; (d) SEB-antibody binding followed by incubation with fluorescently labeled secondary antibody to generate a signal. A top view of the microchannel is also shown<sup>[40]</sup>

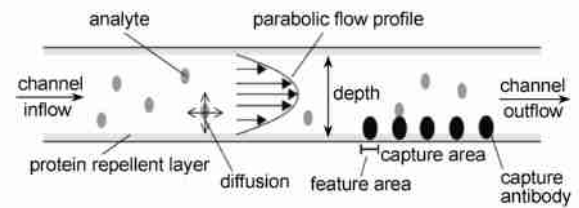


图 9 微通道异相免疫分析的物理模型<sup>[46]</sup>

**Fig. 9** Configuration of a surface immunoassay in a microfluidic channel. The liquid enters the channel at the inlet on the left-hand side and flows through the channel under laminar conditions with a parabolic flow profile. The flowing analyte solution contains molecules which are transported in the channel. The molecules are allowed to diffuse perpendicularly to the flow direction and can be captured by the capture antibodies. Wall elements not covered with capture antibodies are protected against unspecific binding, which in the simulation is regarded as perfect<sup>[46]</sup>

将免疫试剂固定在微通道壁上,反应后可在通道中直接用荧光进行检测。该方法有较高的灵敏度。免疫分析前必须对通道壁加以改性,以减少其对蛋白质的非特异性吸附,从而达到免疫分析的要求。固定抗体的稳定性与固相载体材质、固定方法、分析条件有关。连续重复使用次数多、循环周期短都会影响抗体的稳定性,降低使用寿命。

### 3.2.3 电极表面为固相载体

还有一些微流控免疫分析芯片,其微通道仅用

于流动控制。Aguilar 等<sup>[47]</sup>制作了集成微电极的微流控免疫分析芯片,有效地缩短了分析时间,节约了免疫试剂,并获得了较好的灵敏度。相似地,Dong 等<sup>[48]</sup>制作了嵌有双环形电极(dual-ring electrodes)的免疫分析微芯片。在此基础上,他们又将电极置于一个腔中,组装了内嵌有相似结构的印刷电极的微流控芯片。利用微通道将试剂引入腔中进行分析,如图 10 所示<sup>[49]</sup>。这种芯片集成了整个分析步骤,包括探针(probe)固定、样品注射、温育和电化学检测。用鼠 IgG 为分析物进行夹心法免疫分析,检测限达 10ng/ml (67pM),线性范围为 100ng/ml—10 $\mu$ g/ml。Nashida 等<sup>[50]</sup>研制了用阀控制注射和洗涤的微流控芯片。微通道将液体引入管道的中央进行夹心法免疫反应和电化学检测。这类微芯片的相同点在于,将一抗修饰的电极置于一个腔中,通道将试剂引入这个腔,通过夹心免疫反应,利用电化学方法检测酶催化底物反应的信号,具有很高的灵敏度和选择性;在分析过程中,自动化的流体控制装置简化了操作步骤,提高了分析效率。芯片的制作工艺相对复杂,包括微阀、通道、修饰电极的嵌入等;作为一次性使用,成本较大,若重复使用,则修饰电极的更换操作比较繁琐。另外,在芯片设计上做一些改进,可以实现多通道免疫分析。

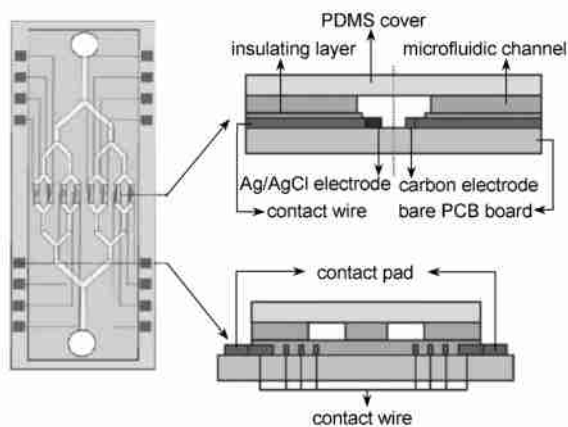


图 10 微流控芯片电化学免疫检测的示意图<sup>[49]</sup>

**Fig. 10** Thick-film fabrication of microfluidic biochip: (left) configuration of the whole device; (right) section figures of the microfluidic device<sup>[49]</sup>

异相免疫分析最常见的方法是夹心法,这种模式包含第二抗体的反应步骤和多步洗涤过程,这对微流控芯片的操作提出了较高的要求。夹心法中,抗原必须同时结合到两个抗体上,因此该方法不能用于小分子或两个活性位点在构象上靠近的分析物的检测。

## 4 展望

虽然微流控芯片上的免疫分析方法研究已取得大量的研究成果,利用化学技术进行的表面改性也得到长足发展,部分免疫分析芯片已经具有很低的检测限和很高的灵敏度,但它离产业化还有相当距离。制作芯片的工艺、表面修饰、免疫反应动力学、检测方法等仍然需要进一步整合和优化,它的可靠性也需要进一步提高。用微流控芯片系统对生物样品进行免疫分析也面临着一些困难。夹心法免疫分析中,待分析物要与两个抗体结合,其分子量必须大于 1 000Da,因此该法无法对一些重要小分子如毒品、杀虫剂或除草剂等进行分析。实际样品组分较复杂,将其直接注入微芯片会造成通道阻塞和强烈的背景噪音,因此需要对样品进行预处理,延长了分析时间,增加了分析成本,并会造成样品的损失。样品中未知的无机盐和蛋白质会降低分析的重现性。样品和缓冲液的离子强度和 pH 的差异也会对信号产生影响,存在的少量酶会催化底物造成信号增大,使得数据准确性降低。样品预处理和检测器的微型化是目前微流控芯片现场检测面临的挑战。通过结合新的分析技术、新的材料和制作工艺,该领域具有广阔的前景:新的工艺节约了制作成本,有些芯片甚至可以一次性使用;新材料与微制作技术的结合,将使微流控芯片继续向微型化、集成化和自动化发展。为了实现商品化和普遍推广使用,微流控免疫分析芯片的标准化也是重要的研究课题。

## 参考文献

- [1] 鞠焜先 (J ū H X), 邱宗荫 (Qiu Z Y), 丁世家 (Ding S J) 等. 生物分析化学 (Analytical Biochemistry). 北京: 科学出版社 (Beijing: Science Press), 2007. 216
- [2] 方肇伦 (Fang Z L) 等. 微流控分析芯片 (Microfluidic Chip). 北京: 科学出版社 (Beijing: Science Press), 2003. 243
- [3] 贾宏新 (Jia H X), 吴志勇 (Wu Z Y), 方肇伦 (Fang Z L). 分析化学 (Chinese J. Anal. Chem.), 2005, 33: 1489—1493
- [4] 潘爱平 (Pan A P), 金庆辉 (Jin Q H), 王惠民 (Wang H M), 赵建龙 (Zhao J L). 检验医学 (Lab. Medicine), 2007, 22: 508—510
- [5] 王立凯 (Wang L K), 冯喜增 (Feng X Z). 化学进展 (Progress in Chem.), 2005, 17: 482—491
- [6] 黄辉 (Huang H). 生物医学工程学杂志 (J. Biomed. Eng.), 2007, 24: 928—931
- [7] Warsinke A, Benkert A, Scheller F W, Fresenius J. Anal. Chem., 2000, 366: 622—634
- [8] Lim C T, Zhang Y. Biosens. Bioelectron., 2007, 22: 1197—1204
- [9] Bange A, Halsall B H, Heineman W R. Biosens. Bioelectron.,

- 2005, 20: 2488—2503
- [10] Bhattacharyya A, Klapperich C M. *Biomed. Microdevices*, 2007, 9: 245—251
- [11] Sato K, Tokeshi M, Odake T, Kimura H, Ooi T, Nakao M, Kitamori T. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 1144—1147
- [12] Sato K, Tokeshi M, Kimura H, Kitamori T. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 1213—1218
- [13] Sato K, Yamanaka M, Takahashi H, Tokeshi M, Kimura H, Kitamori T. *Electrophoresis*, 2002, 23: 734—739
- [14] Vandaveer W R, Pasas-Farmer S A, Fischer D J, Frankenfeld C N, Lunte S M. *Electrophoresis*, 2004, 25: 3528—3549
- [15] Koutny L B, Schmalzing D, Taylor T A, Fuchs M. *Anal. Chem.*, 1996, 68: 18—22
- [16] Chiem N, Harrison D J. *Anal. Chem.*, 1997, 69: 373—378
- [17] Cohen C B, Dixon E C, Jeong S, Nikiforov T T. *Anal. Biochem.*, 1999, 273: 89—97
- [18] Wang J, Ibanez A, Chatrathi M P, Escarpa A. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 5323—5327
- [19] Wang J, Ibanez A, Chatrathi M P. *Electrophoresis*, 2002, 23: 3744—3749
- [20] Chiem N H, Harrison D J. *Clin. Chem.*, 1998, 44: 591—598
- [21] Herr A E, Hatch A V, Throckmorton D J, Huu M T, Brennan J S, Gannobile W V, Singh A K. *PNAS*, 2007, 104: 5268—5273
- [22] Luo C X, Fu Q, Li H, Xu L P, Sun M H, Ouyang Q, Chen Y, Ji H. *Lab Chip*, 2005, 5: 726—729
- [23] Hadd A G, Raymond D E, Halliwell J W, Jacobson S C, Ramsey J M. *Anal. Chem.*, 1997, 69: 3407—3412
- [24] Haes A J, Terray A, Collins G E. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 8412—8420
- [25] 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. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22: 2261—2267
- [26] Yasukawa T, Suzuki M, Sekiya T, Shiku H, Matsue T. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22: 2730—2736
- [27] Hayes M A, Folsom N A, Phayre A N, Garcia A A. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 5896—5902
- [28] Choi J W, Ahn C H, Bhansali S, Henderson H T. *Sens. Actuators B*, 2000, 68: 34—39
- [29] Kim K S, Park J K. *Lab Chip*, 2005, 5: 657—664
- [30] Farrell S, Matsuno N J R, Halsall H B, Heineman W R. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 379: 358—367
- [31] Dodge A, Fluri K, Verpoorte E, Rooij N F. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 3400—3409
- [32] Eteshola E, Leckband D. *Sens. Actuators B*, 2001, 72: 129—133
- [33] Hosokawa K, Omata M, Sato K, Maeda M. *Lab Chip*, 2006, 6: 236—241
- [34] Kurita R, Yokota Y, Sato Y, Mizutani F, Niwa O. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 5525—5531
- [35] Rossier J S, Graut H H. *Lab Chip*, 2001, 1: 153—157
- [36] Henares T G, Funano S I, Terabe S, Mizutani F, Sekizawa R, Hisamoto H. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 589: 173—179
- [37] Du Z, Cheng K H, Vaughn M W, Collie N L, Gollabon L S. *Biomed. Microdevices*, 2007, 9: 35—42
- [38] Bernard A, Michel B, Delamarche E. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 8—12
- [39] Sandro C T, Dernick G, Juncker D, Buurman G, Kropshofer H, Michel B, Fattinger C, Delamarche E. *Lab Chip*, 2004, 4: 563—569
- [40] Dong Y, Phillips K S, Cheng Q. *Lab Chip*, 2006, 6: 675—681
- [41] Bai Y L, Koh C G, Boreman M, Juang Y J, Tang I C, Lee L J, Yang S T. *Langmuir*, 2006, 22: 9458—9467
- [42] Yang T L, Jung S Y, Mao H B, Cremer P S. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 165—169
- [43] Linder V, Verpoorte E, Thormann W, Rooij N F, Sigrist H. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 4181—4189
- [44] Golden J P, Smith T M F, Mott D R, Ligler F S. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22: 2763—2767
- [45] Vijayendran R A, Motsegood K M, Beebe D J, Leckband D E. *Langmuir*, 2003, 19: 1824—1828
- [46] Zimmermann M, Delamarche E, Wolf M, Hunziker P. *Biomed. Microdevices*, 2005, 7: 99—110
- [47] Aguilar Z P, Vandaveer W R, Fritsch I. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 3321—3329
- [48] Dong H, Li C M, Zhou Q, Sun J B, Miao J M. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 22: 621—626
- [49] Dong H, Li C M, Zhang Y F, Cao X D, Gan Y. *Lab Chip*, 2007, 7: 1752—1758
- [50] Nashida N, Satoh W, Fukuda J, Suzuki H. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22: 3167—3173