

# 微流控芯片技术在心肌标志物检测中的应用综述

王小英 游 璠 李芳芳 周树民

(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

**摘要** 心肌标志物的检测异常,是急性心肌梗死的重要诊断指标之一。对心肌标志物的监测可直接影响心血管疾病患者的临床诊断、危险分层、治疗方案选择和预后判断。微流控芯片集进样、预处理、分离和检测于一体,具有样品需求量小、便携、分析快速等特点,是理想的心肌标志物检测平台。文章根据检测方法的不同,综述了近年来利用微流控芯片平台对心肌标志物的检测。已有检测方法中主要是光学和电学方法。随着传感器技术的发展,更多检测方法被采用。通过及时的综述概括,既可对已有技术和方法起到归纳作用,又可促进微流控芯片在心肌标志物即时诊断领域的发展。

**关键词** 心肌标志物;微流控芯片;光学;电学;即时诊断

**中图分类号** O 657 **文献标志码** A

## Review of the Application of Microfluidic Chips to the Detection of Cardiac Markers

WANG Xiaoying YOU Fan LI Fangfang ZHOU Shumin

(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

**Abstract** The abnormal detection of cardiac markers is an important diagnostic index of acute myocardial infarction. Monitoring the cardiac markers can directly affect the clinical diagnosis, risk stratification, treatment options and prognosis of the patients with cardiovascular disease. The procedures, including sampling, pre-treatment, separation and detection, can be combined in one set by microfluidic chips. The microfluidic chip is an ideal platform for the detection of cardiac markers with several remarkable characteristics, such as the demand for less sample, portable and rapid detection. The review will focus on recent research developments of microfluidic platform for the detection of cardiac markers, which are detected by optical and electrical method. More detection methods can be used with the development of the sensor technology. It is necessary to timely summarize the existing technologies and approaches, so that the development of the microfluidic chips in the field of point-of-care-test of cardiac markers will be promoted.

**Keywords** cardiac markers; microfluidic chip; optical method; electrical method; point-of-care-test

收稿日期: 2013-11-1

作者简介: 王小英, 研究助理, 研究方向为生物医学; 游璠(通讯作者), 副研究员, 研究方向为检验医学, E-mail: fan.you@siat.ac.cn; 李芳芳, 研究助理, 研究方向为分析化学; 周树民, 研究员, 研究方向为计算机技术。

## 1 引言

急性心肌梗死(Acute Myocardial Infarction, AMI)、慢性心力衰竭和动脉粥样硬化等心血管疾病是严重危害人类健康的常见疾病。心血管检验是整个心血管领域中的“瓶颈”学科,只有在尽可能短的时间内正确诊断疾病,才能及时有效地将先进的治疗手段用于临床,使患者受益。自 50 年代以来,动态测定一些代谢酶活性,如乳酸脱氢酶和谷草转氨酶等,一直是诊断 AMI 的金标准。但由于这些代谢酶在人体的其他器官和肌肉中也大量存在,除 AMI 外,运动、炎症也可引起乳酸脱氢酶和谷草转氨酶等的升高,所以对他们的检测不具有提示患有 AMI 的特异性。近几年来,一些新的具有高度特异性和敏感性的心肌标志物检测指标被普遍用于临床实验室诊断,如心肌肌钙蛋白 T(cTnT)或心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、肌红蛋白(Myo)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、B 型尿钠肽(BNP)和超敏 C 反应蛋白(CRP)等。正确应用这些新的心肌标志物,为临床准确诊断、鉴别诊断和判断治疗效果起到了革命性的作用。微流控芯片(Microfluidic Chip)技术作为近年来发展迅速,集生物、化学、医学、流体、电子、材料和机械等于一体的崭新研究领域,具有液体流动可控、消耗试样和试剂极少、分析速度快和高通量测试等特点,可以在几分钟甚至更短的时间内进行上百个样品的同时分析,并且可以在线实现样品的预处理及分析全过程,是进行心肌标志物检测的理想平台。随着即时诊断(Point-of-Care-Test)概念和需求在临床应用中的发展,微流控芯片在心肌标志物检测中的应用得到了研究者的广泛关注,本文就这一领域作简要综述。

## 2 微流控芯片光学方法检测心肌标志物

目前对于心肌标志物的检测,大多是基于抗原抗体的免疫反应。生物学家通常利用荧光物质标记抗原或抗体或酶标抗体,然后从反应生成物的荧光强度、反应底物比色和捕获化学发光底物微光来定量被检测物的浓度。底物可见光比色法因灵敏度相对较低,一般无法满足低浓度心肌标志物的检测需求,应用较少。而荧光免疫方法因具高灵敏度而被多数研究者采纳。

对于微流控芯片微米级的检测通道,荧光免疫方法有时并不能满足低浓度心肌标志物的检测要求。为此,Shin 等<sup>[1]</sup>创造性地设计了浓缩荧光标记物的反应池和嵌入式光电倍增管检测装置,实现了对 C 反应蛋白(C-Reactive Protein, CRP)的低浓度检测。其具体实验过程如下:首先制作了带  $1\text{ mm} \times 0.8\text{ mm} \times 30\text{ }\mu\text{m}$  预浓缩反应池的 T 型聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)芯片,在反应池中设计物理微结构富集 CRP 抗体包被的磁珠;然后将荧光标记的 CRP 抗原和待检测 CRP 抗原注入反应池,孵育后洗脱荧光标记;最后在反应池下游微通道利用嵌入式光电倍增管检测荧光信号,结果测得 CRP 最低检测限为  $1.4\text{ nmol/L}$ 。该方法有效地提高了检测的灵敏度,但缺点在于磁珠修饰抗体和荧光标记抗原等操作都必须在芯片外进行,检测时间相对较长。

利用微流控芯片平台分析生物标志物时,常需各种进样泵和驱动泵等,使平台极其复杂。Hosokawa 等<sup>[2]</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。该芯片具有结构简单、使用方便等优点。在实验过程中,他们对竞争法和夹心法非均

相免疫分析都进行了研究,操作如下:通过先将抗体修饰于内壁,再利用荧光法检测兔 IgG 和人 CRP。最终结果显示:样品消耗为 1  $\mu\text{L}$ ,免疫分析时间为 20 min,检测限分别为 0.21 nmol/L 和 0.42 nmol/L。以上表明该方法具有样本消耗少、分析时间短和检测灵敏度较高等优势。

微球免疫分析通常能增大抗原抗体的结合面积,缩短抗原抗体所需要的反应时间,提高检测灵敏度。Christodoulides 等<sup>[3]</sup>在硅片上加工出微室阵列,将共价键合抗体的琼脂凝胶微珠装入微室中,通过毛细管引入各种反应试剂,然后利用荧光或可见光比色检测唾液中 CRP,最终 12 min 完成检测,最低检测限达 5 fg/mL,而在 10 fg/mL~10 pg/mL 间有较好的线性相关性,检测灵敏度优于商品化超敏 CRP ELISA 检测试剂盒。这种微球分析与微流控结构相结合的系统,灵活减小了分析设备体积,实现了唾液中微量 CRP 的超灵敏检测。

芯片表面的亲疏水性直接影响芯片的检测效果。表面改性一直是微流控芯片的重点研究领域。Jonsson 等<sup>[4]</sup>对环烯共聚物(Cycloolefin Copolymer, COP)芯片表面性质进行改性:分别用氧等离子体氧化、3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)硅烷化和右旋糖酐修饰来增加其表面亲水性,进而易于捕获抗体结合。该改性手段稳定可靠,结合免疫检测方法,实现了对血液中 CRP 的低浓度检测,最低检测限达 2.6 ng/mL。

利用微流控芯片平台高通量分析心肌及其他生物标志物,可以节约检测成本和时间,是未来的发展趋势。Caulim 等<sup>[5]</sup>结合非竞争免疫分析、裂解标记免疫分析(Cleavable Tag Immunoassay, CTI)和胶束电动色谱(Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC),同时分析了 AMI 的 CK-MB、cTnT、cTnI 和 Myo 四种心肌标志物。

作者通过对以上四种心肌标志物抗体进行不同荧光物质标记,使反应后被切割的荧光标签在芯片 MEKC 中层析分离,而每种荧光标记在芯片 MEKC 中有不同的迁移率,通过定量不同荧光标签量来定量各组标志物浓度。利用该平台对 CK-MB、cTnT、cTnI 和 Myo 的检测限分别为 3 ng/mL、25 pg/mL、2 ng/mL 和 5 ng/mL。该研究的局限在于 CTI 和 MEKC 分开进行,未能整合在一块芯片上实现。故该研究组还在研究芯片在线 CTI,将芯片在线 CTI 与芯片 MEKC 结合,真正实现微流控芯片的高通量分析,促进即时诊断产业的发展。

荧光共振能量转移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)是距离很近的两个荧光分子间产生的一种能量转移现象,通常用于检测某一细胞中两个蛋白质分子是否存在直接的相互作用。Stringer 等<sup>[6]</sup>结合 FRET 和液芯波导技术(Liquid Core Waveguide, LCW),实现了 cTnI 的高灵敏度快速检测。作者分别检测了磷酸盐缓冲液和血液样本中的 cTnI 浓度,最低检测限分别达到 32 nM 和 50 nM。微流控芯片与 LCW 相结合是实现高灵敏度生物标志物检测的有效手段。但该方法的 LCW 装置较复杂,不利于开发适合即时诊断的产品。

化学发光免疫分析是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合的检测技术。相比传统荧光和可见光比色方法,化学发光法能检测血液中更痕量的 cTnI。由于传统试纸条侧向流胶体金染色方法只可定性,不能定量检测标志物,故无法满足临床需求。Cho 等<sup>[7]</sup>构建了纸芯片-ELISA 平台,调整加样方向,实现抗原抗体垂直侧向流扩散,酶底物水平侧向流扩散,节省了反应时间。该化学发光微流控系统检测 cTnI 最低检测限达 0.027 ng/mL,线性范围:

0.1~100 ng/mL, 变异系数<16%。该方法的缺点在于检测手段为电荷耦合装置 CCD 拍照, 检测装置成本较高。

Bhattacharyya 等<sup>[8]</sup>通过热压法制作含八通道的塑料微流控芯片, 利用辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase) 标记二抗, 鲁米诺为化学发光底物, 实现了在一块芯片上同时进行标准曲线和 CRP 样本的检测, 检测时间仅为 25 min, 大大节约了检测成本和时间。该方法的缺点在于检测灵敏度有待进一步提高。

Yang 等<sup>[9]</sup>设计了含液体通道层、气动层和预留空气层的三层 PDMS 芯片, 芯片上整合有微泵、微阀和微混合器。利用该系统测定血样中 CRP 时, 最低检测限为 0.0125 mg/mL, 检测时间为 25 min, 与医院现有方法相比, 检测灵敏度和时间都得到很大改善。

### 3 微流控芯片电化学方法检测心肌标志物

与光学检测方法相比, 电化学方法具有灵敏度高、反应快、电极微型化、对芯片材质没有特殊要求等特点。电化学方法已慢慢成为当今微流控平台的主要检测手段<sup>[10,11]</sup>。

随着微电极加工技术的发展, 研究者经常采用一些特殊技术结合电化学检测方法来达到痕量检测。如, Wang 等<sup>[12]</sup>利用自组装单层膜技术结合电化学检测方法, 检测了 Myo 和血红蛋白。该研究中工作电极是 1 cm×2 cm 的金修饰硅片, 其表面修饰有自组装单层膜, 当待测样本结合到膜上时, 工作电极与参比电极间电位发生改变, 通过检测电势变化而测定样本中蛋白浓度。将此技术与微流控芯片相结合, 减少待测样本体积和检测时间, 增加反应灵敏度, 是理想的即时诊断平台。Zhou 等<sup>[13]</sup>利用量子点标记抗体结合方波溶出伏安法 (Square-Wave Anodic Stripping

Voltammetry) 同时检测了两种心肌标志物 cTnI 和 CRP。作者通过 SWASV 与微流控平台结合, 利用微通道电泳浓缩并输送金属离子。当 cTnI 和 CRP 分别在 0.01~50 μg/L 和 0.5~200 μg/L 范围内时, 检测电流与检测物浓度具有较好的线性一致性。该方法检测 cTnI 和 CRP 的最低检测限分别为 0.004 μg/L 和 0.22 μg/L。Abad 等<sup>[10]</sup>通过极谱电流时间曲线法监测电子转移, 实现了对 cTnT 的超灵敏检测。作者加工了具有多个电极的 COP 微流控芯片, 该芯片含一个捕获磁珠带、两个参比电极和一个工作电极, 可同时独立检测六个样本。作者用该系统检测了溶解在 PBS 中的 cTnT 和真实血样中的 cTnT 含量, 最低检测限分别达 0.017 ng/mL 和 0.02 ng/mL, 灵敏度大大超过传统手段。

另外, 离心微流控磁盘因其自动化、可一次性使用、不用注射泵、没有复杂的流体相互联系、仅靠离心力驱动样本等特点<sup>[11]</sup>, 在微流控芯片领域广受欢迎。Kim 等<sup>[11]</sup>以聚碳酸酯为芯片材料, 制成微流控磁盘, 将 CRP 抗体修饰的聚苯乙烯微球预封闭在磁盘的一个微池内, 通过离心实现样本中抗原的捕获, 利用安培法检测 CRP 浓度, 最低检测限达 4.9 pg/mL。

### 4 其他微流控芯片检测手段检测心肌标志物

随着传感器技术的迅速发展, 越来越多的检测手段被用在对心肌标志物的检测。如, Kurita 等<sup>[14]</sup>设计与玻片键合的 T 型 PDMS 芯片, 同时在玻片上加工两块镀金薄膜 A 和 B。在他的研究中, 样本中的 BNP 通过 EDC/NHS 系统先与薄膜 A 结合, 之后加入乙酰胆碱酯酶修饰的抗 BNP 抗体, 然后再加入硫代乙酰胆碱, 硫代乙酰胆碱在乙酰胆碱酯酶的催化下变成硫代胆碱并流动至薄膜 B 上聚集。而薄膜 B 处有表面等离子体共振



(SPR)检测装置, 硫代胆碱在薄膜 B 处的聚集可引起 SPR 角度改变。之后根据硫代胆碱的浓度与上游加入薄膜 A 上的 BNP 浓度成反比, 进而可通过 SPR 角度改变来测定 BNP 浓度。结果表明该系统检测 BNP 时, 在 5 pg/mL~100 ng/ml 具有较好的灵敏度, 检测时间仅为 30 min。

Zhang 等<sup>[15]</sup>采用光子晶体全反射系统(PC-TIR), 设计一个独特的敞开光学微腔, 以便功能化微腔表面, 使抗原抗体更好地结合。作者用四氢呋喃、APTES、羧甲基右旋糖酐等处理传感器表面并固定 Myo 抗体在其上, 利用 PDMS 加工的微通道输送待测样本和对照液体 PBS 到传感器部位。当待测样本中目标抗原 Myo 与传感器表面抗体结合后, 共振波长反射泡发生漂移, 波长的偏移值与待检测的 Myo 浓度成正比。该法检测限达 70 ng/mL, 在 70~1000 ng/mL 范围内有较好的线性一致性。

## 5 结语与展望

光学法检测心肌标志物主要包括荧光和化学发光两种方法。荧光法需要外加光源激发分子产生能级跃迁, 进而发光。由于生物样品中的蛋白质、氨基酸等分子也会产生背景荧光, 故需选择合适的荧光试剂和样品处理方法, 减少非特异性吸附蛋白的影响, 降低背景干扰。而化学发光是自身发光, 无需外加光源, 背景干扰小, 灵敏度更高, 但需暗室及进行冷发光检测, 其检测器体积相对较大。电化学分析法可分为电导分析法、电位分析法、伏安法、极谱分析法、电解和库仑分析法等。这些方法分析灵敏度和准确度较高、测量范围宽、仪器设备简单、价格低廉, 运用于微流控芯片检测平台时, 对芯片材质没有特殊要求, 并可以将电极微型化以减小平台体积。与光学法相比, 电化学法在心肌标志物检测方面具有更广阔的应用前景。寻找合适的发光试剂以减少

背景干扰, 提高检测灵敏度, 同时精简检测设备体积, 是光学法基于微流控即时诊断平台检测心肌标志物的发展趋势; 寻找合适的、特异性强的电化学检测方法, 将各种电极微型化并整合于微流控芯片上, 是电化学法基于微流控即时诊断平台检测心肌标志物的发展趋势。理想的微流控芯片即时诊断平台要求检测方法准确度和灵敏度高、分析时间短、检测设备简单、价格低廉且易于与整个检测平台整合。

对于前文综述的各种检测方法, 无论是光学法、电化学法, 还是其他传感技术, 各有其利弊, 研究者对多种检测方法的探索都是为了更好地对心肌标志物及时准确检测。微流控芯片作为一门新兴学科, 可以集进样、预处理、分离和检测于一体, 具有样品需求量小、便携、分析快速等特点, 是理想的心肌标志物检测平台。研究和发​​展适应于心肌标志物即时诊断的微流控芯片产品, 符合检验医学自动化和简单化的发展趋势, 适应当今社会高效、快节奏的工作方式, 满足心血管疾病患者在时间上快速检测的要求, 可使患者尽早得到诊断治疗。

## 参考文献

- [1] Shin KS, Lee SW, Han KC, et al. Amplification of fluorescence with packed beads to enhance the sensitivity of miniaturized detection in microfluidic chip [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(9-10): 2261-2267.
- [2] Hosokawa K, Omata M, Sato K, et al. Power-free sequential injection for microchip immunoassay toward point-of-care testing [J]. *Lab on a Chip*, 2006, 6(2): 236-241.
- [3] Christodoulides N, Mohanty S, Langub MC, et al. Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva [J]. *Lab on a Chip*, 2005, 5(3): 261-269.
- [4] Jönsson C, Aronsson M, Rundström G, et al. Silane-dextran chemistry on lateral flow polymer chips for

- immunoassays [J]. *Lab on a Chip*, 2008, 8(7): 1191-1197.
- [5] Caulum MM, Murphy BM, Ramsay LMR, et al. Detection of cardiac biomarkers using micellar electrokinetic chromatography and a cleavable tag immunoassay [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(14): 5249-5256.
- [6] Stringer RC, Hoehn D, Grant SA. Quantum dot-based biosensor for detection of human cardiac troponin I using a liquid-core waveguide [J]. *IEEE Sensors Journal*, 2008, 8(3): 295-300.
- [7] Choa IH, Paekb EH, Kim YK, et al. Chemiluminometric enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-on-a-chip biosensor based on cross-flow chromatography [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 632(2): 247-255.
- [8] Bhattacharyya A, Klapperich CM. Design and testing of a disposable microfluidic chemiluminescent immunoassay for disease biomarkers in human serum sample [J]. *Biomed Microdevices*, 2007, 9(2): 245-251.
- [9] Yanga YN, Lin HI, Wang JH, et al. An integrated microfluidic system for C-reactive protein measurement [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(10): 3091-3096.
- [10] Abad L, Francisco Javier del CF, Muñoz FX, et al. Design and fabrication of a COP-based microfluidic chip: chronoamperometric detection of troponin T [J]. *Electrophoresis*, 2012, 33(21): 3187-3194.
- [11] Kim TH, Kameel AS, Sunkara V, et al. Flow-enhanced electrochemical immunosensors on centrifugal microfluidic platforms [J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(18): 3747-3754.
- [12] Wang YT, Zhou YX, Jonathon S, et al. A potentiometric protein sensor built with surface molecular imprinting method [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24(1): 162-166.
- [13] Zhou F, Lu M, Wang W, et al. Electrochemical immunosensor for simultaneous detection of dual cardiac markers based on a poly dimethylsiloxane-gold nanoparticles composite microfluidic chip: a proof of principle [J]. *Clinical Chemistry*, 2010, 56(11): 1701-1707.
- [14] Kurita R, Yokota Y, Sato Y, et al. On-chip enzyme immunoassay of a cardiac marker using a microfluidic device combined with a portable surface plasmon resonance system [J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(15): 5525-5531.
- [15] Zhang BL, Tamez-Vela JM, Solis S, et al. Detection of myoglobin with an open-cavity-based label-free photonic crystal biosensor [J]. *Journal of Medical Engineering*, 2013, Article ID 808056, 7 pages.