

基于离心式微流控技术的 乙肝病毒检测新方法

穆莉莉¹, 周晓俊¹, 叶嘉明^{* 2}

(1. 安徽理工大学, 淮南 232000; 2. 浙江清华长三角研究院, 嘉兴 314006)

摘要: 基于传统的酶联免疫吸附测定(ELISA)原理,提出了一种基于离心式微流控技术的乙肝病毒检测新方法。设计制作的一次性芯片集成进样、酶联免疫反应、显色反应及检测单元。选用乙肝表面抗原作为实验对象,在芯片上提前包被检测抗体,分三个阶段完成待检样品中乙肝表面抗原的检测。将芯片上测试结果使用 Origin 软件拟合,相关系数 R^2 达到 0.99212,芯片能够在 60 min 内实现对乙肝病毒表面抗原的快速精准检测,对乙肝表面抗原加标回收率为 95% ~ 102.3%,制作的芯片在一个月内的稳定性好。与传统乙肝检测方法比较,离心式微流控芯片检测方法具有检测速度快、稳定性好、检测线性好和操作简单等优点。

关键词: 微流控芯片; 乙肝病毒; 酶联免疫吸附测定(ELISA); 快速检测

中图分类号: R319; TH776 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2018)03-0316-07

Study on new method for the detection of hepatitis B virus based on centrifugal microfluidics

MU Li-li¹, ZHOU Xiao-jun¹ and YE Jia-ming^{* 2} (1. Anhui University of Science & Technology, Huainan 232000; 2. Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314006)

Abstract: Based on the conventional principle of ELISA, a new method for Hepatitis B virus detection based on centrifugal microfluidic technology is proposed. The disposable centrifugal chip designed in this paper integrated the units of injection, enzyme-linked immunoassay, reaction and detection. In this paper, HBV surface antigen was chosen as the experimental object. The antibody was coated on the chip in advance, and the detection of hepatitis B surface antigen was completed in three stages. Then, the results obtained on the chip were fitted with Origin, which showed that the correlation coefficient R^2 reaches 0.99212. Rapid and accurate detection of HBV can be achieved within 60 min, and standard recovery rate of Hepatitis B surface antigen ranges from 95% to 102.3%. The chip can assure its stability in a month. Compared with the traditional hepatitis B virus antigen detection, microfluidic chip has the advantages of fast detection, good stability, high accuracy and simple operation.

Keywords: Microfluidic chip; Hepatitis B virus; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Rapid detection

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种严重危害人类健康的病毒,该病毒可以造成慢性肝炎,患者死于肝硬化和肝癌的风险极高。目前,乙肝病毒已经成为全球性公共卫生难题,并且不同的

地区其流行性有很多差异。对乙型肝炎的及时诊断、预防和治疗具有重要的意义^[1-3]。

目前,用于乙肝病毒表面抗原的检测方法主要包括两大类:一类是基于酶联免疫吸附测定

收稿日期: 2017-06-20

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1308085ME75)、安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2013A086)和浙江省科技计划项目(2016C32035)资助

* 通信作者, E-mail: yejiaming727@126.com.

(ELISA)的血清特异性抗原抗体检测;另一类是基于核酸测定的乙肝病毒基因检测,主要包括斑点杂交法和PCR法^[4,5]。目前临床上最先进的乙肝病毒DNA检测方法是实时荧光定量PCR法,能够检测出乙肝病毒在体内存在的数量、是否感染、传染性有多强。但是此方法技术要求较高,目前只有少数大型医院有条件使用,无法获得推广。ELISA是一种在免疫酶技术的基础上发展起来的一种新型的免疫测定技术,其试剂易于保存、结果判断较为客观,是目前实验室检测抗原抗体最经济、最普遍的实验诊断方法。与乙肝病毒基因检测相比,常用的ELISA操作相对简单,但是仍然存在诸多不足之处,例如过程冗长;准确率、重复性还有待提高;此外还需要专业人员操作。

微流控分析芯片是通过微加工技术将微管道、微泵、微阀、微储液器、微电极、微检测元件、窗口和连接器等功能元器件,像集成电路一样集成在芯片材料上的微全分析系统。与传统的分析方法比较,微流控芯片分析技术具有微型化、集成化、高通量、低成本的显著优点,因此在医疗诊断、环境监测、食品安全快速检测等领域,具有重大的基础研究和应用研究价值^[6,7]。离心式微流控芯片作为微流控芯片中的一员,其流体驱动简单,不需外部额外的液泵或气泵,能在一张芯片上实现复杂的生化反应过程,成为微流控芯片领域中的一个研究热点^[8]。

本文提出一种基于离心式微流控芯片技术的乙肝检测新方法,将传统的ELISA方法与离心式微流控技术结合,针对乙肝病毒快速精确检测的离心式微流控芯片进行设计,在乙肝病毒五项检测中选择乙肝病毒表面抗原作为实验对象,通过芯片上的生物学实验来确定芯片乙肝检测的方法步骤,并验证离心式微流控芯片技术乙肝检测新方法的可行性。本文所述的新方法旨在使用一次性的高聚物芯片,结合自行研制的离心式芯片流体控制器及现有的光学检测仪,基于吸光度检测法,实现对乙肝病毒的现场、快速、准确、低成本的检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芯片材料:光学级聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)板材,0.5,1 mm两种厚度规格;光学级双面胶,0.1 mm厚度(上海佰芯生物科技有限公司);光学级聚苯乙烯板材,1 mm(衢州创昱机电有限公司)。

检验标准品:乙肝表面抗原(135IU/L,厦门慧佳生物科技有限公司)。

试剂:小鼠单克隆抗体(5 mg/mL,北京博尔西科技有限公司);酶标试剂,终止液(2 mol/L H₂SO₄),TMB显色液(底物A液)和底物缓冲液(底物B液),(厦门慧佳生物科技有限公司);Na₂CO₃, NaHCO₃, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, KCl, NaCl(国药集团化学试剂公司);牛血清蛋白(BSA);0.05% Tween-20。

包被缓冲液:分别称取1.59 g Na₂CO₃与2.93 g NaHCO₃,加蒸馏水至1000 mL,用时加入0.1% BSA;PBS缓冲液:分别称取KH₂PO₄0.24 g, Na₂HPO₄1.44 g, NaCl 8 g与KCl 0.2 g,加蒸馏水至1000 mL;PBST洗涤缓冲液:0.05% Tween-20取0.5 mL加到PBS缓冲液1000 mL中;封闭缓冲液:称取牛血清蛋白(BSA)2 g加洗涤缓冲液100 mL;稀释液:牛血清白蛋白0.1 g加PBS缓冲液100 mL。

1.2 仪器与设备

离心式芯片流体控制器,实验室自主研制;YoungLaser-V12型二氧化碳激光芯片雕刻机(苏州扬清芯片科技公司);HH-4数显恒温水浴锅(常州智博瑞仪器制造公司);FA1604电子天平(上海精科实业公司);Milli-Q超纯水系统(18 MΩ,美国Millipore公司);U2900紫外可见分光光度计(日立高新技术公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 芯片的设计与制作 如图1A所示,本实验所设计的圆盘形微流控芯片由三层基片组成,直径110 mm,盖板为厚度0.5 mm的PMMA基片,中间为厚度2 mm的PMMA材质的通道层,底板为厚度1 mm的聚苯乙烯基片。单张芯片集成5个乙肝病毒检测单元(可用于同时检测5个样品)。每个检测单元由加样口、清洗液池、底物液池、终止液池、反应池、废液池和通气孔构成(图1B),其中清洗液池的体积为200 μL,底物液池体积80 μL,终止液池体积40 μL,反应池体积125 μL。芯片的制作过程如下:首先,用Solidworks软件设计芯片各层的结构图案;其次,通过CO₂激光雕刻机直接在PMMA基材上加工反应池和微通道,同时切割获得0.5 mm的PMMA顶层基片和1 mm的聚苯乙烯底层基片;最后将顶层基片、刻有通道图案的基片和底层基片使用双面胶进行逐层键合,制得一次性的离心式乙肝病毒检测芯片^[9]。

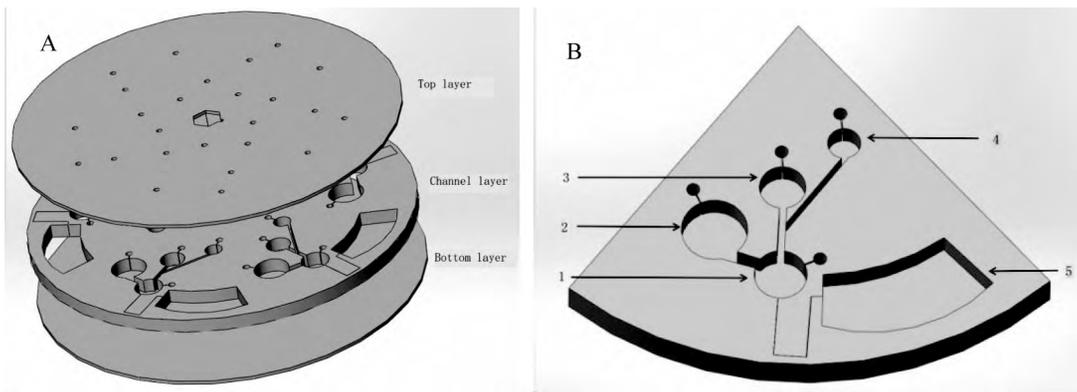


图 1 离心式微流控乙肝检测芯片结构示意图 (A) 和结构单元示意图 (B)

Fig. 1 Schematic illustration of the centrifugal microfluidic chip for detection of HBV (A) and construction unit (B)

1 - reaction pool; 2 - washing buffer pool; 3 - substrate pool; 4 - stop buffer pool; 5 - waste pool

1.3.2 试剂预存储 芯片键合前,在图 1B 所示的芯片的反应池中提前固定好与待检样品中抗原相对应的乙肝表面抗体,具体操作方法如下:在芯片的反应池中加入 $70\mu\text{L}$ 最佳包被浓度的抗体,冰箱 4°C 过夜。次日弃去反应池内溶液,洗涤液冲洗 3 次;反应池中加入 $100\mu\text{L}$ 封闭液,置于恒温水浴锅 37°C 温育 2 h,洗涤。

1.3.3 流体的操控 微流控芯片的基本特征和最大优势是多种操作单元在整体可控的微小平台上灵活组合、规模集成。为满足乙肝病毒的高通量、快速和精确检测,本文通过离心式微流控芯片平台,实现了乙肝病毒表面抗原检测过程涉及的多个操作单元,包括待检抗原与抗体结合、酶标抗体与抗原抗体结合体反应和显色反应,其技术是微量液体在芯片内部的精密、可控转移。

如图 2 所示,用于乙肝病毒表面抗原检测的离心式微流控芯片工作过程分为三个阶段。第一阶段为样品中待检抗原的捕获,使用移液枪将 $40\mu\text{L}$ 待检样品加入反应池和 $200\mu\text{L}$ 清洗液加入清洗液池,待检样品中乙肝表面抗原与提前包被在反应池中的抗体反应,形成抗原抗体结合体,通过调节离心模块旋转的转速和时间,样品废液进入废液池,清洗液清洗反应池后进入废液池;第二阶段为酶标试剂与抗原抗体结合体结合,再次使用移液枪将 $40\mu\text{L}$ 的酶标抗体加入反应池和 $200\mu\text{L}$ 清洗液加入清洗液池,酶标试剂与抗原抗体结合体反应,通过调节离心模块旋转的转速和时间,酶标废液进入废液池,清洗液清洗反应池后进入废液池;第三阶段为显色反应,使用移液枪将 $80\mu\text{L}$ 的底物 A、B 混合液和 $40\mu\text{L}$ 的终止液分别加入底物液池和终止

液池,通过调节离心模块旋转的转速和时间,底物 A、B 混合液先进入反应池开始显色反应,终止液其后进入反应池终止反应^[10,11]。

1.4 检测抗体最佳包被浓度的测定

微流控芯片底板选用与 96 孔板相同的材料,故在 96 孔板上进行所购得的检测抗体最佳包被浓度的测定试验。用方阵滴定法^[12,13]将小鼠抗 HBsAg 单克隆抗体用 pH9.6 的包被缓冲液倍比稀释包被到 96 孔酶标板的 A~G 排 4°C 过夜,并在 37°C 孵育 1 h 后,用 PBST 洗涤缓冲液洗板 3 次,每次 5 min;将 7.5IU/L 的标准品抗原作为弱阳性样品, 90IU/L 的标准品抗原作为强阳性样品,将 1 列作为阳性对照,分别将弱阳性样品和强阳性样品加入 2、3 列,以强阳性样品的 $D_{450\text{nm}}$ 值在 0.8 左右,阴性对照的 $D_{450\text{nm}}$ 值 <0.1 为检测抗体的最佳包被浓度。

1.5 乙肝检测芯片的验证及与传统方法之间的对比

取乙肝表面抗原标准品,配制系列浓度梯度作为待测标准液,吸取 $40\mu\text{L}$ 上述标准液加入芯片,标准品与提前包被的抗体结合,按照 1.3.3 所述的步骤进行乙肝表面抗原的检测,将反应结束后的试剂从芯片中取出,加入自制的与芯片厚度相同的比色皿,分光光度计测 OD 值,对检测所得结果进行标准曲线拟合。按照传统 ELISA 方法,分别配制一系列浓度梯度的标准品,吸取 $100\mu\text{L}$ 上述标准液加入到 96 孔板中进行实验,将反应结束后的试剂从芯片中取出,加入自制的与芯片厚度相同的比色皿,分光光度计测 OD 值,对检测所得结果进行标准曲线拟合。

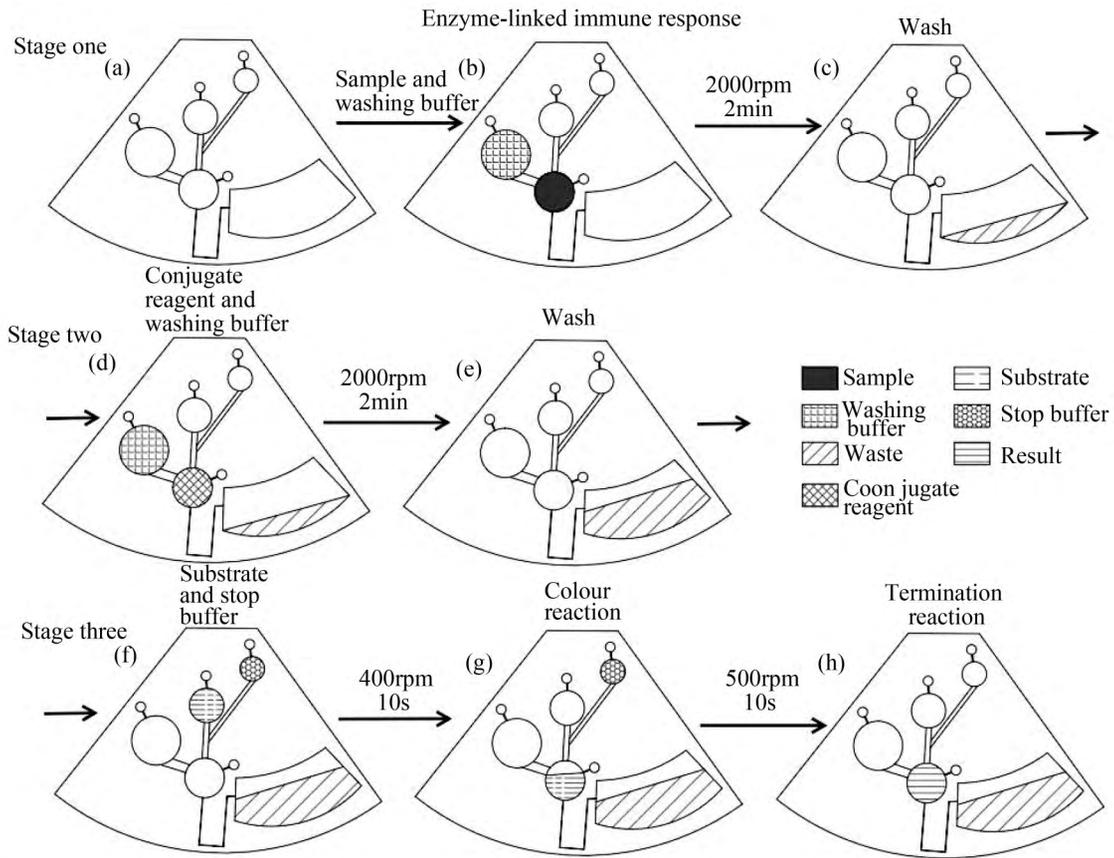


图 2 离心式微流控芯片流体驱动过程

Fig. 2 Fluid driving process of centrifugal microfluidic chip

(a) Detection chip coated with Hepatitis B virus surface antibody; (b) add sample into the reaction pool, and the washing buffer goes into the washing buffer pool; (c) while the reaction finished, set the rotation speed at 2000 r/min and time at 2 min. Sample waste goes into the waste pool and washing buffer cleans the reaction pool, and then goes into the waste pool; (d) add conjugate into the reaction pool and washing buffer into the washing buffer pool. Conjugate react with antigen antibody binding; (e) while reaction finished, set the rotation speed at 2000 r/min and time at 2 min. Conjugate waste goes into the waste pool and washing buffer cleans the reaction pool, then goes into the waste pool; (f) substrate and stop buffer were added into the related pool; (g) colour reaction: set rotation speed at 400r/min and time at 10s, active the device, substrate into the reaction pool; (h) termination reaction: set rotation speed at 500r/min and time at 10s, active the device, stop buffer goes into the reaction pool to stop the reaction

2 结果与分析

2.1 芯片的结构设计

根据 ELISA 原理检测乙肝病毒表面抗原,在芯片上设计了清洗池、底物混合液池、终止液池、反应池和废液池。反应池底部固定有检测样品所需的抗体,试剂池与反应池间、废液池与反应池间以短通道连接,其中,清洗液池与反应池之间为清洗液通道,底物液池与反应池之间为底物液通道,终止液池与反应池之间为终止液通道。短通道起到对流体的扼制与通过的作用。

设计的关键部分是反应池与废液池之间的通道,该通道作为“毛细管阀”起到控制流体作用^[14]。更具体地,在离心速度低速运行($\leq 800r/min$)运行状态下,溶液被限定于反应池

中;当离心速度高速($> 1500r/min$)运行时,溶液将完全通过“毛细管阀”进入到下一级废液池。根据在离心式芯片驱动器上的实验,将反应池与废液池之间的通道设计成宽度 0.2 mm,深度 1 mm,长度 26.3 mm;该设计能够保证在 2000r/min 的离心速度下,清洗液直接进入废液池,在 400r/min 的离心速度的情况下,旋转 10s,底物液进入反应池显色,并停留在反应池中,而不通过废液通道进入废液池(图 3A);在 500r/min 的离心速度的情况下,旋转 10s,终止液进入反应池终止反应,并且停留在反应池中(图 3B)。

根据在离心式芯片驱动器上的流体试验,设计了其余各微储液池之间的通道几何尺寸及所相对应的流体控制条件(表 1)。

表 1 各通道尺寸设计与离心所需时间和转速

Table 1 Design of each channel and centrifugation time and speed

Channel	Length/mm	Width/mm	Depth/mm	Rotate speed/(r/min)	Time/s
Washing buffer channel	4	2	2	360	50
Substrate channel	7.2	1.1	2	400	10
Stop buffer channel	19	0.8	2	500	0
Waste channel	26.3	0.2	1	> 1500	200

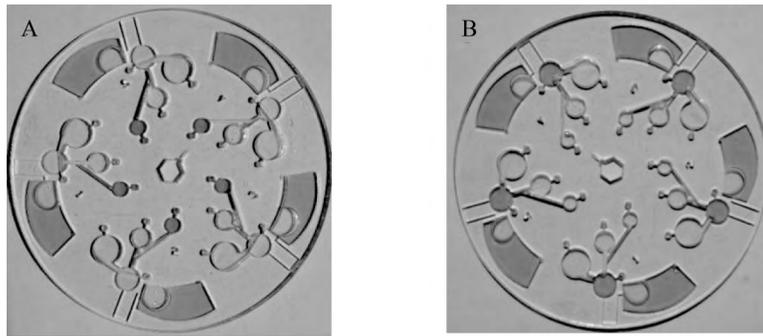


图 3 废液通道所起到的“毛细管阀”作用

Fig. 3 The ‘capillary valve’ role played by waste channel

(A) The liquid was trapped in the reaction cell at a centrifugal speed of 400r/min and time at 10s; (B) The liquid was trapped in the reaction cell at a centrifugal speed of 500r/min and time at 10s.

2.2 检测抗体最佳包被浓度的确定

将小鼠抗 HBsAg 单克隆抗体用 pH9.6 的包被缓冲液稀释包被到 96 孔板, 抗体稀释梯度见表 2, 当抗体稀释倍数为 1: 20000 时, 阴性样品的 $D_{450\text{ nm}}$ 值为 0.096, 满足阴性样品 $D_{450\text{ nm}} < 0.1$ 的要求, 强阳性样品的 $D_{450\text{ nm}}$ 为 0.752, 符合 1.4 所述的测定标准。因此根据试验结果确定小鼠抗 HBsAg 单克隆抗体的最佳稀释倍数为 1: 20000。

表 2 检测抗体最佳包被浓度的方阵实验($D_{450\text{ nm}}$)

Table 2 Determination of the optimal antibody concentration

Dilution gradient	Negative sample	Weakly positive sample	Strong positive sample
1: 10000	0.187	0.496	0.978
1: 15000	0.148	0.422	0.846
1: 20000	0.096	0.394	0.752
1: 25000	0.081	0.358	0.674
1: 30000	0.060	0.316	0.650
1: 40000	0.051	0.216	0.524
1: 80000	0.049	0.136	0.296

2.3 乙肝表面抗原标准品检测

分别配制 90, 60, 30, 15, 7.5IU/L 的乙肝表

面抗原标准溶液, 按照传统 ELISA 和文中所述的步骤进行检测。通过将实验测得的 OD 值与乙肝表面抗原标准品浓度取自然对数, 并用 Origin 软件线性拟合, 两种方法的标准曲线结果如图 4 所示, 根据拟合而来的方程可以计算出乙肝表面抗原标准品所对应的浓度。如图 4A 所示的是在 96 孔板上进行的乙肝表面抗原实验结果, 相关系数 $R^2 = 0.99299$; 图 4B 为在离心式微流控芯片上的乙肝表面抗原检测实验结果, 相关系数 R^2 为 0.99212。与传统检测方法相比, 微流控芯片检测乙肝表面抗原的结果同样具有较好的检测线性, 因此, 本实验所制备乙肝表面抗原检测芯片具有较好的应用前景。

2.4 回收率测定实验结果

为考察方法的可靠性, 进行了回收率实验, 以未加入乙肝表面抗原标准品的稀释液为例, 向稀释液中加入定量的 7.5IU/L 乙肝表面抗原标准品^[15]。回收率实验测定了 5 组样品, 每组测定 6 次, 测得乙肝表面抗原标准品的回收率在 95% ~ 102.3% 之间, 结果见表 3。

2.5 芯片的稳定性实验结果

将制备的乙肝表面抗原检测芯片分别在 4℃ 和 25℃ 密封存放, 30d 后测得的芯片中预先包被的抗体活体分别为 96.4%、80.5%。由此可以看出,

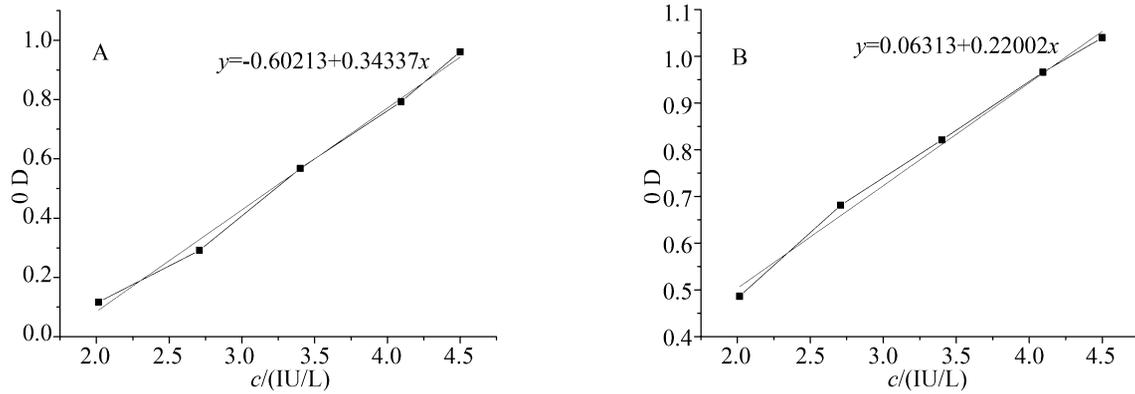


图4 乙肝表面抗原标准品检测结果

Fig. 4 Results of hepatitis B virus surface antigen standard solution

(A) Results of hepatitis B virus surface antigen in the 96-well plate; (B) Results of hepatitis B virus surface antigen on the centrifugal microfluidic chip

表3 加标检测结果

Table 1 Results of recoveries of the spiked samples

Standard addition I/(IU/L)	Standard measurement I/(IU/L)	Recovery /%
3.75	3.70	98.7
7.5	7.32	97.6
15	15.35	102.3
30	28.5	95
60	58.8	98

本实验制备的乙肝表面抗原检测芯片比较稳定^[16], 满足实际应用要求。

2.6 方法对比

为了验证方法的可靠性, 取同一未知浓度的乙肝表面抗原样品, 选用传统的ELISA方法与本实验的微流控芯片快速检测方法对比, 二者的综合特性比较见表4。

表4 本实验与传统ELISA方法对比

Table 4 Comparison of the developed method with centrifugal microfluidic chip

Detection method	Testing time t/min	Sample volume V/ μ L	Reagent consumption V/ μ L	Standard	
				c/(IU/L) (n=6)	RSD/%
Microfluidic chip	60	40	360	76.4	2.4
Traditional Elisa method	145	100	750	74.5	3.6

从表4可以看出, 对比传统的ELISA方法, 本实验提出的微流控芯片检测方法分三个阶段对乙肝病毒进行检测, 检测时间由145 min缩短为60 min; 样本及试剂消耗量降至常规检测的2/5; 操作简便, 检测精度、重复性与准确性能够满足乙肝病毒的快速检测和稳定检测的需求。

3 结论

本实验基于酶联免疫(ELISA)检测原理, 设计了一种用于乙肝病毒检测的离心式微流控芯片, 通过生物学实验确定了芯片上乙肝病毒检测的方法, 验证了基于离心微流控芯片技术的乙肝检测新方法的可行性。通过与自制离心式芯片驱动仪器和光度分析方法的结合, 实现对乙肝病

毒的现场、低成本、快速、准确的检测。相对于现有的乙肝检测方法, 本实验研制的离心式微流控芯片检测方法优点包括: 1) 试剂、样品的消耗量小; 2) 免疫反应在微通道内完成, 时间从原来的145 min降至目前的60 min; 3) 在芯片内部实现试剂添加、生化反应及检测, 最大程度地减少人工操作步骤; 4) 使用高聚物作为芯片制作材料, 芯片成本低、易批量化生产, 适合一次性乙肝病毒检测需求。

本文工作中, 实验结果的测定需要将反应结束的试剂从芯片取出, 加入自制的比色皿, 再放入分光光度计中检测。未来工作将进一步将离心式微流控芯片乙肝病毒检测新方法中的流体控制与检

测装置集成化,开发出适用于乙肝病毒检测芯片的便携式、全自动检测装置,真正实现乙肝检测的快速、现场、全集成检测。

综上所述,离心式微流控芯片乙肝病毒检测新

方法具有稳定性好、检测线性较好、操作简单、保存时间长、反应时间短等优点,特别适用于医疗站、疫情爆发点、社区医院等基层单位开展现场、快速和高通量测量。

参考文献

- [1] Li A W, Jiang X, Li F, *et al.* Shaanxi Medical J, 2011 40(9):709
李爱武,蒋霞,李芳等. 陕西医学杂志 2011 40(6):709
- [2] Xia Y, Stadler D, Lucifora J *et al.* Gastroenterology, 2016, 150(1):194
- [3] Liu P, Zhao X H. Labeled Immunoassays Clin Med 2016 23(11):1275
- [4] Wang R N, Wang P L, An Y, *et al.* Chin. J. Anal. Lab. 2015 33(7):770
王日楠,王培龙,安悦等. 分析试验室 2015 33(7):770
- [5] Fu J H, Liu W. Chin. J. Anal. Lab. 2014 33(11):1345
付舰航,刘威. 分析试验室 2014 33(11):1345
- [6] Fang Z L. Fabrication and Application of Microfluidic Chip. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 28
方肇伦. 微流控分析芯片的制作及应用. 北京:化学工业出版社 2005: 28
- [7] Lin B C, Cai J H. Chinese J Chromatogr, 2005 23(5):456
林炳承,秦建华. 色谱 2005 23(5):456
- [8] Feng Y Y, Zhou Z Y, Ye X Y, *et al.* Adv Mech. 2002 32(1):1
- [9] Yoon-Kyoung Cho, Jeong-Gun Lee, Jong-Myeon Park, *et al.* Lab on a Chip. 2007, 7: 565
- [10] Gorkin R, Park J, Siegrist J, *et al.* Lab on a Chip. 2010, 10(4):1758
- [11] BeomSeok Lee, Yang Ui Lee, Han-Sang Kim, *et al.* Lab on a Chip. 2011, 11: 70
- [12] Xie X X, Li X R, Li Y *et al.* Acta Agr Zhejiangensis 2014 26(1):135
谢星星,李祥瑞,李银等. 浙江农业学报 2014 26(1):135
- [13] Fan X J, Shen J, Cai P W *et al.* Labeled Immunoassays Clin Med 2016 23(1):78
- [14] Yang R Y, Yuan W Z, He Y, Micronano Electr Technol, 2014,
杨儒元,苑伟政,何洋. 微纳电子技术 2014 51(3):156
- [15] Wang Y. Studies on Optical Detection Technology of CD-Like Microfluidic Biochemical Analysis System. University of Chinese Academy of Science 2015
王宇. CD-Like 微流控生化分析系统光探测技术研究. 中国科学院大学, 2015
- [16] F. Stumpf, F. Schwemmer, T. Hutzenlaub, D. *et al.* Lab on a Chip. 2016. 16: 199