

仪器分析化学实验：降钙素原快速定量微流控芯片检测

辜敏¹, 熊桢文¹, 刘丽玲², 孔继烈¹, 方雪恩^{1,*}

¹复旦大学化学系, 上海 200433

²上海速芯生物科技有限公司, 上海 201321

摘要: 本文设计了一个基于微流控芯片技术检测降钙素原含量的蛋白免疫分析实验, 通过溶液的配制、微流控芯片的制备、标准曲线的绘制和未知液样本测试等实验过程, 让学生了解微流控芯片技术这一新兴科学研究领域, 增强学生的动手能力, 锻炼学生的科研思维, 在培养化学研究兴趣的同时提升创新思维和知识融会贯通的能力。

关键词: 微流控芯片; 降钙素原; 仪器分析化学实验

中图分类号: G64; O6

Rapid Quantitative Detection of Procalcitonin by Microfluidics: An Instrumental Analytical Chemistry Experiment

Min Gu¹, Huiwen Xiong¹, Liling Liu², Jilie Kong¹, Xueen Fang^{1,*}

¹ Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China.

² Shanghai Suxin Biotechnology Co. Ltd., Shanghai 201321, China.

Abstract: In this paper, we designed a protein immunoassay using microfluidic technology to quantitatively detect procalcitonin (PCT). The experiment involved various steps such as solution preparation, microfluidic chip assembly, standard curve drawing, testing of unknown liquid samples, and other experimental processes. By conducting these experiments, students can gain a deeper understanding of the emerging scientific research field of microfluidics. Furthermore, this training helps to foster their scientific thinking, ability to innovate, and integrate knowledge.

Key Words: Microfluidic chip; Procalcitonin (PCT); Instrumental analytical chemistry experiment

微流控芯片具有快速、低耗以及高通量等优点, 因此它为生物分析提供了一种极具潜力的方法, 特别适用于实时监控和快速检测, 极大地提高了获取生命分析等相关重要信息和数据的效率。微流控芯片技术目前已被用于疾病的早期诊断和临床检测, 如细胞水平、基因水平及蛋白质药靶的研究, 另外还有细菌和病毒快速检测等^[1-3]。

在新型冠状病毒全球大流行的大背景下, 人们认识到即时诊断(POCT)技术的重要性。微流控芯片技术能很好地满足POCT的要求, 是最具潜力的POCT解决方案之一^[4]。正是由于微流控芯片技术的重要作用, 我校分析化学课程于2010年在再版教材中引入了“微流控分析技术”这一章^[5], 并从2018年起将该技术引入我校仪器分析实验中, 在实验运行至今的五年时间里, 通过带教教师与学生的不断沟通和完善, 最终设计了“降钙素原快速定量微流控芯片检测”这一实验^[6]。该实验项目时长

收稿: 2023-10-31; 录用: 2023-12-05; 网络发表: 2023-12-20

*通讯作者, Email: fxech@fudan.edu.cn

基金资助: 教育部基础学科拔尖学生培养计划2.0 (20222064); 复旦大学本科教学内涵提升计划及本科教学研究与改革实践项目 (FD2023A223126); 普化实验上海市级重点课程项目

6小时左右,实验过程包含溶液的配制、微流控芯片的制备、标准曲线的绘制和未知液样本测试等环节,拓展了学生对微流控芯片技术这一新兴科学研究领域的认知,激发并提升了学生学习化学的积极性和创造性,达到了该实验项目的教学目标,为科学研究训练实验奠定了扎实的基础^[7-9]。

1 实验目的

- (1) 掌握免疫荧光分析原理。
- (2) 学习并了解免疫微流控芯片工作原理及组装工艺。
- (3) 学会利用微流控-免疫荧光分析仪实现降钙素原定量检测。
- (4) 培养学生动手能力、灵活运用知识的能力以及科学思维方式。

2 实验原理

蛋白免疫分析(immunoassay, IA)是应用免疫学技术测定标本的检测方法,其基本原理是抗原、抗体的特异性识别。在临床检验中主要是通过抗原、抗体之间的特异性结合反应实现检测机体中的抗体或抗原性物质。微流控蛋白免疫检测相较于常规的蛋白免疫检测的优势是微流控蛋白免疫常用聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)、聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA)、聚苯乙烯(polystyrene, PS)、聚碳酸酯(polycarbonate, PC)等基材,该基材对蛋白具有较强吸附力,再利用流道毛细管作用力或施加驱动力,引导液体流动,可以方便地实现免疫层析反应,再结合检测设备可以方便地对样本中待测物质进行定量测定,同时也能很好地提高检测灵敏度。

降钙素原(procalcitonin, PCT)是降钙素的激素原,是一种无激素活性的糖蛋白,也是一种内源性非类固醇类抗炎物质,非感染情况下由甲状腺产生。发生全身性感染时,很多器官的不同类型细胞在受到促炎症反应刺激后分泌降钙素原,特别是受到细菌感染时,其代谢很少或几乎不依赖肾脏功能,肾功能衰竭患者其清除率并不受影响,同时PCT代谢也不受类固醇激素影响。降钙素原作为一种细菌感染和败血症的标记物,用于临床上检测细菌感染。PCT浓度与细菌感染严重程度之间的关系见图1,可见,PCT对于快速鉴别感染与非感染所致的炎症反应具有重要的意义,在临床上使用广泛。

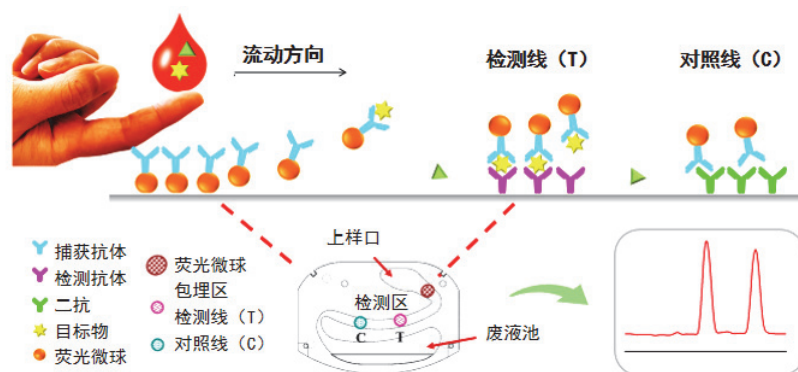


图1 PCT检测原理示意图

微流控技术是指在微米甚至纳米尺度的低维通道结构中控制体积为pL- μ L的流体进行流动并传热、传质的技术,可广泛应用于免疫检测、核酸分析及细胞研究等领域。微流控技术能够解决常规免疫分析的液体处理过程繁琐、分析时间长和试剂成本高的问题,并且加强了反应效率。微流控技术的优势是其具有体积小、试剂消耗少、分析速度快、分析过程自动化、易于集成化以及高通量等优点。

本实验以PC为微流控基材,将新型稀土纳米荧光微球标记物(稀土铈荧光微球)和微流控免疫层

析技术结合, 采用双抗体夹心法定量检测人全血、血浆、血清中PCT的浓度。当样本加入上样孔中, 通过毛细作用在微流控通道中流动, 若是阳性, 流到荧光微球包埋区, 样本中的PCT会与荧光微球标记的捕获抗体结合, 形成抗原-捕获抗体复合物继续流动, 到达检测区(T区)时, 复合物再与PCT检测抗体形成检测抗体-抗原-捕获抗体的三明治复合物, 然后被固定在检测区, 样本中的降钙素原越多, 检测区的复合物越多, 荧光信号越强, 反之则信号越弱。剩余的液体继续流经质控区, 与包埋的非特异性抗体(二抗)相结合, 形成对照线C, 反应10 min后在离心作用下液体全部流入废液区(图1)。然后用干式免疫荧光分析仪MI300读取检测T线和C线出复合物的荧光强度。以标准溶液的浓度为横坐标, 以T/C荧光值之比为纵坐标, 拟合制作标准曲线。最终可通过换算, 推导出样本中降钙素原的浓度。

3 实验

3.1 仪器与试剂

3.1.1 仪器

超声波分散仪(宁波新芝生物科技股份有限公司, SCIENTZ-750F), 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂, TGL-20bR), 旋转混匀器(美国精骐有限公司, TR-02U), 干燥箱, 点样治具, 贴双面胶治具, 压盖治具, 微流控芯片(图2a-d), 干式免疫荧光分析仪MI300 (上海速芯生物科技有限公司, 图2e), 移液器(2.5 μL 、10 μL 、100 μL 、1 mL各一支), 涡旋混匀仪。

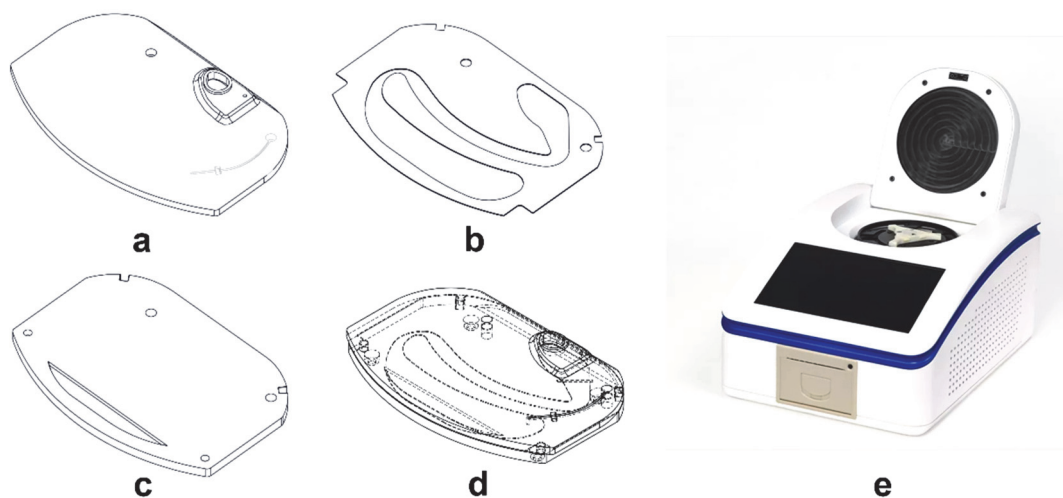


图2 微流控芯片的上盖(a), 中间双面胶层(b), 下盖(c)和组合示意图(d)以及干式免疫荧光分析仪MI300 (e)

3.1.2 试剂

超纯水, PCT捕获抗体(鼠抗人PCT单克隆抗体, 广州市艾佰益生物科技有限公司), 荧光微球(上海毅科生物科技有限公司), PCT检测抗体($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 羊抗人PCT多克隆抗体, 广州市艾佰益生物科技有限公司), 非特异性抗体($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 羊抗鼠多克隆抗体, 长沙博优生物科技有限公司), PCT标准品母液($75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 人基质血清, 微流控芯片套装(上海速芯生物科技有限公司), 2-(*N*-吗啉代)乙烷磺酸钠盐(MES), *N*-(2-羟乙基)哌嗪-*N'*-(2-乙磺酸)钠盐(HEPES), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC), *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 牛血清白蛋白(BSA), 海藻糖, 磷酸氢二钠(无水, 分析纯), 二水合磷酸二氢钠(分析纯), 乙醇胺(分析纯), 曲拉通-100, 氯化钠(分析纯)。

3.2 实验过程

该实验总课时为6 h, 除3.2.1部分试剂配制以及荧光微球-捕获抗体标记物的制备由预备室教师

完成,其他部分实验均由学生完成。该实验每9位同学组成一个小组,3.2.2部分C、T线包被工作液由小组同学共同配制,3.2.3微流控芯片准备部分由每位同学分别制备,3.2.4部分标准曲线的绘制所用6个微流控芯片使用小组同学在上一步中制备的6个芯片,3.2.5部分未知液样本的测试使用该组同学制备剩下的3个芯片。

3.2.1 试剂配制以及荧光微球-捕获抗体标记物的制备

试剂配制以及荧光微球-捕获抗体标记物的制备由预备室教师完成。

需要配制的试剂主要包括:0.05 mol·L⁻¹ MES缓冲液(直接配制)、0.1 mol·L⁻¹ HEPES缓冲液(直接配制)、10 mg·mL⁻¹ EDC溶液(用0.05 mol·L⁻¹ MES缓冲液将EDC溶液稀释至10 mg·mL⁻¹)、10 mg·mL⁻¹ NHS溶液(用0.05 mol·L⁻¹ MES缓冲液将NHS溶液稀释至10 mg·mL⁻¹)、10% BSA溶液(直接配制)、10%海藻糖溶液(直接配制)。利用这些试剂,预备室教师需要提前配制以下溶液,供学生使用。

荧光微球包埋区稀释溶液(溶液A)的配制:取1 mL 10% BSA溶液,2 mL 10%海藻糖溶液,加入去离子水,定容至10 mL,置于2-8 °C储存,有效期1个月。

C、T线点样缓冲液(溶液B)的配制:取40.5 mL 0.2 mol·L⁻¹磷酸氢二钠溶液,9.5 mL 0.2 mol·L⁻¹磷酸二氢钠,3 g氯化钠,0.2 g曲拉通-100,充分溶解,调节pH约为7.4,然后定容至100 mL,置于2-8 °C保存。

样本稀释液(溶液C)的配制:取8.1 mL 0.2 mol·L⁻¹磷酸氢二钠溶液,1.9 mL 0.2 mol·L⁻¹磷酸二氢钠,1 g海藻糖,0.05 g曲拉通-100,充分溶解,调节pH约为7.4,然后定容至100 mL,置于2-8 °C保存。

荧光微球包埋区工作液的制备:取40 μL荧光微球原料于离心管中,加入400 μL 0.05 mol·L⁻¹ MES缓冲液,混匀。离心弃去上清液,加入400 μL 0.05 mol·L⁻¹ MES缓冲液超声打散2 min。在该溶液中分别加入24 μL 10 mg·mL⁻¹ EDC溶液、56 μL 10 mg·mL⁻¹ NHS溶液,混匀。旋转混匀仪混匀30 min,后离心30 min并弃去上层清液。加入200 μL 0.05 mol·L⁻¹ MES缓冲液,超声2 min。将0.06 mg PCT抗体加入200 μL MES溶液混匀,与上一步荧光微球溶液混合,旋转混匀仪混匀2.5 h。加入2.5 μL乙醇胺,旋转混匀仪混匀30 min。加入50 μL 10% BSA溶液,旋转混匀仪混匀1 h。13000 r·min⁻¹离心30 min,弃去上层清液。加入0.4 mL 0.1 mol·L⁻¹ HEPES缓冲液溶解,超声打散2 min。离心30 min后弃去上清液。加入0.2 mL 0.1 mol·L⁻¹ HEPES缓冲液,再加入0.2 mL超纯水溶解,超声打散2 min;即可得到体积为0.4 mL,固含量0.1%的降钙素原荧光微球抗体母液。取5 μL标记好的固含量0.1%的降钙素原荧光微球抗体母液于离心管内,再加入195 μL溶液A稀释,混匀并用超声波分散仪超声打散2 min,即为荧光微球包埋区工作液(记号R)。

3.2.2 C、T线包被工作液的配制

C、T线包被工作液由学生配制。

T线包被工作液:取80 μL溶液B于离心管内,再取20 μL PCT检测抗体于离心管内,用涡旋混匀仪充分混匀即为100 μL 1 mg·mL⁻¹的T区包被工作液(记号T)。

C线包被工作液:取90 μL溶液B于离心管内,再取10 μL非特异性抗体(二抗)于离心管内,用涡旋混匀仪充分混匀即为100 μL 0.5 mg·mL⁻¹的C区包被工作液(记号C)。

3.2.3 微流控芯片的制备

首先进行点样:将微流控芯片下盖放置在点样治具上,然后将0.5 μL的T、0.5 μL的C和3 μL的R三种试剂依次点在微流控芯片下盖上。点样完成后水平拿到37 °C干燥箱干燥15 min。

接下来进行微流控芯片的组装:先将微流控芯片上盖放置在贴双面胶治具上,然后根据孔位将中间双面胶层有胶的一面贴在上盖上,从治具上取下。将已贴好的双面胶上盖的蓝色保护层撕下,并将之前点样并干燥过的下盖按照孔位将上下盖合起来,按照定位孔放在压盖治具上,并用压盖治具压1 min后取出。组装完成后置于37 °C干燥箱内干燥架上加热烘30 min,老化使包埋试剂进一步稳定吸附在芯片上。

3.2.4 标准曲线的绘制

首先配制系列梯度标准品。用人基质血清将标准品母液逐级梯度稀释至75、30、10、2、0.5、0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准品。

准备6个离心管，分别做好标记1–6号，分别取60 μL 不同浓度的标准品于各离心管内，再分别加入240 μL 溶液C充分混匀即为待测标准品。

将芯片从烘箱取出恢复至室温。MI300开机预热，并设置参数：离心转速2500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，离心时间30 s。对不同浓度样品进行检测，将制备好的微流控芯片加入80 μL 样品，水平放置开始计时，反应10 min后放入MI300中进行测试，仪器自动读取T和C的荧光值，并且给出T/C值。所有标准品都测试完成后，统计测试结果，并绘制标准曲线。

以标准品的浓度为横坐标 x ，以T/C值为纵坐标 y ，用logistic四参数曲线拟合标准曲线。相关系数 $R > 0.99$ 为相关性良好。

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$

3.2.5 未知液样本测试

取20 μL 的未知液样本于离心管内，用移液器移取80 μL 溶液C于离心管内，充分混匀后然后取80 μL 混合液于芯片加样口内。芯片保持水平放置，反应10 min后置于MI300中进行测试，将未知液样本的T/C值带入标准曲线，可求得降钙素原的浓度，重复以上操作三次，求得平均值，即为该未知液样本中降钙素原的浓度。

3.3 实验注意事项

- (1) 该实验涉及生物安全，相关溶液配制以及使用过程中请注意佩戴防护眼镜以及防护手套。
- (2) 微流控芯片制备过程中，相关治具上请教师提前做好标记，并请教师提醒学生在各自芯片组件进行干燥前记住放置位置，以防搞混。
- (3) 在微流控芯片点样过程中，三种试剂的点样位置、顺序以及量一定不要搞错，尤其C和T的顺序一定不能反。

4 实验结果

4.1 微流控芯片的组装与制作

微流控芯片的组装和制备需要在教师指导和监督下完成。在教师的指导下，学生使用移液枪将0.5 μL 的T、0.5 μL 的C和3 μL 的R三种试剂依次点在点样治具上的定位位置上，这里教师务必提醒学生C和T的顺序一定不能反(图3a, b)。给微流控芯片上盖粘贴双面胶时，需要用手指碾压至双面胶没有气泡(图3c)。组装完成后水平拿到37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱干燥30 min即得到老化完成的微流控芯片(图3d)。

4.2 标准曲线的绘制

对配制的6组不同浓度的标准品进行检测，记录MI300给出每组样品的T/C值。如表1所示，以下数据为一组学生测得的不同浓度标准品的T/C值。

得到数据后，教师需要给学生讲解如何使用Origin软件绘制logistic四参数曲线。利用Origin软件(注意在拟合模型中选择Logistic曲线拟合2(四参数))，以标准品的浓度为横坐标 x ，以T/C值为纵坐标 y ，用logistic四参数曲线拟合标准曲线(图4)。

4.3 未知液样本降钙素原浓度的确定

将未知液样本重复三次测试，得到三组不同T/C值带入标准曲线得到降钙素原的浓度，求平均值即为未知液样本降钙素原的浓度。

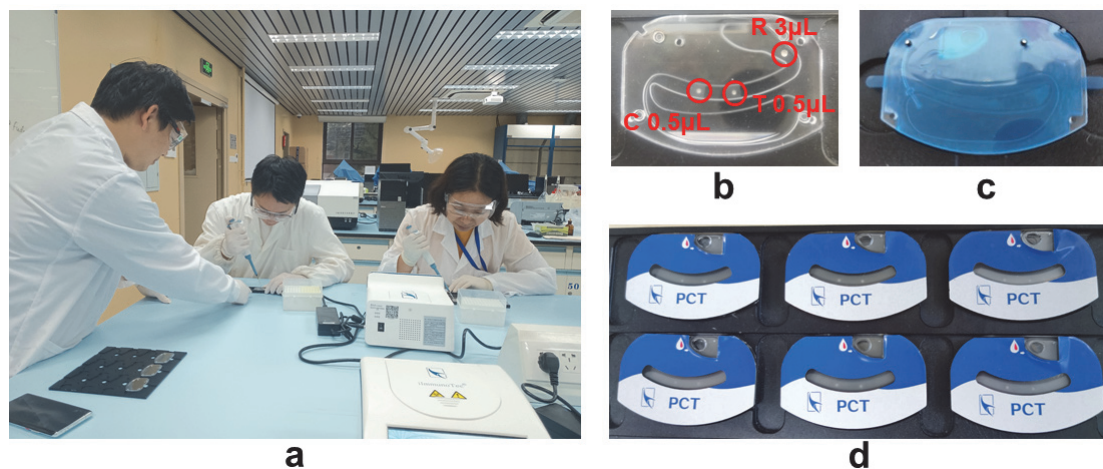


图3 (a) 教师指导学生进行点样; (b) 微流控芯片下盖点样位置; (c) 粘贴好双面胶的微流控芯片的上盖; (d) 组装并老化完成的微流控芯片

表1 不同浓度标准品检测得到的T/C值

标准品浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	T/C值	标准品浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	T/C值
0	0.021	10	0.554
0.5	0.085	30	0.924
2	0.190	75	1.113

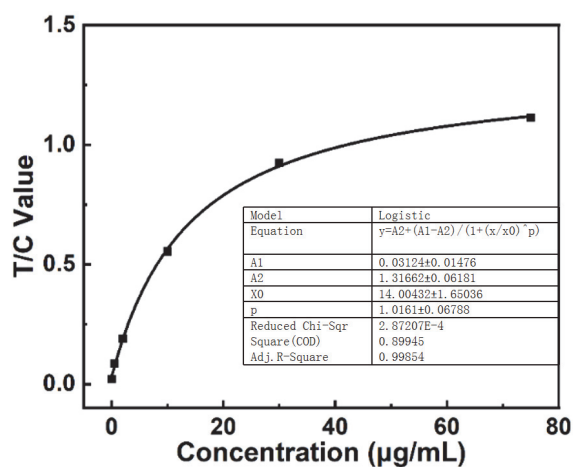


图4 Logistic四参数曲线拟合标准曲线

5 实验组织方案思考

本实验重在介绍微流控芯片技术, 让学生了解这一科学前沿, 通过讲解微流控芯片技术的原理让学生体会该技术的设计思路。

5.1 实验教学安排建议

本实验并不是简单的让学生按部就班地重复讲义里的操作步骤完成实验, 而是基于精心设计的教学安排通过课前预习、实验讲解以及课后思考培养学生动手能力、灵活运用知识的能力以及科学思维方式, 具体实验教学安排如下:

(1) 本实验总课时为6小时, 其中, 教师讲解1小时, 溶液配制和微流控芯片制作1.5小时, 标准曲线的绘制1.5小时, 未知液样本测试1.5小时, 另外0.5小时为机动时间。实验评分指标分为实验预

习、实验操作以及实验报告三部分组成, 分别占比20%、50%、30%。

(2) 本实验主要目的是将微流控芯片技术介绍给学生, 教师在将微流控芯片的设计原理和检测方式讲解给学生的同时, 可在其中增加提问环节以检查学生对实验的预习情况。比如: ① 如何根据已知抗体原浓度和需要制备的体积与浓度配制CT包被工作液, ② 如何根据血清样本测试的T/C值和标准曲线的公式计算出该血清样本的PCT浓度值。

(3) 课后思考题的目的是指导学生分析和讨论实验中出现的现象、问题以及实验结果, 检验学生对实验的掌握程度, 引导学生去查阅文献、拓宽知识面。为考查学生对实验的理解和掌握, 本实验可设置如下思考题: ① 包埋试剂时, 为何C和T顺序一定不能反; ② 人体炎症反应的生物学指标还有哪些? 有何区别? ③ 未知液样本需要测试三次求平均值确定降钙素原的浓度, 实验中三组T/C值分别代入方程求三组降钙素原的浓度再求平均值来确定, 是否可以将得到三组T/C值求平均再代入方程确定呢, 为什么?

5.2 实验教学策略建议

本实验从开设运行至今已有五年, 在对整个教学过程不断完善的同时, 我们还通过引入课程思政元素并对现有实验进行拓展, 以提升实验教学效果:

(1) 为发挥化学专业知识体系中蕴含的思想政治教育功能, 我们在该实验的实验设计中尝试引入了课程思政元素。教师在实验背景讲解中可以首先介绍在新型冠状病毒肆虐全球时, 中国积极应对, 国内疫情得到有效遏制, 增强学生的爱国情怀。在应对方针中, 快速准确的诊断是非常重要的, 而这正是微流控技术的重要应用之一。教师结合实事, 将微流控技术的重要性贯穿于讲解过程中, 培养学生对国家和社会的责任感。

(2) 本实验是基于微流控芯片技术设计的针对降钙素原的蛋白免疫分析实验。通过改变免疫分析的蛋白, 我们可以对该实验进行蛋白种类进行扩展, 比如心肌肌钙蛋白(cardiac troponin, cTn)的检测。心肌损伤标志物主要为心肌肌钙蛋白、N端脑钠肽前体(NT-proBNP)和D-二聚体(DD)。一般来说, 心脏标志物应在60分钟内(一般为30分钟内)做出诊断。而大量研究表明, 与中心实验室相比, 床旁分析仪检测周转时间有巨大的优势。因此, 免疫微流控芯片在心肌标记物快速检测中具有重要的价值, 具有应用前景。

6 结语

我们设计了一个基于微流控芯片技术检测降钙素原含量的蛋白免疫分析实验, 该实验自开设至今五年来, 通过不断调整实验方案以及讲解方式, 增加与学生的互动, 教学相长, 最终形成了现在这个6课时的分析化学实验。通过这个实验, 让学生了解微流控技术的同时, 培养学生的动手能力, 激发并提升学生学习化学的兴趣。

参 考 文 献

- [1] 林炳承, 秦建华. 图解微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2008: 20-25.
- [2] Whitesides, G. M. *Nature* **2006**, 442, 27.
- [3] 宋扬, 林金明. 中国科学: 化学, **2023**, 53 (8), 1472.
- [4] 李风云, 周雷, 张琳, 蒲巧生. 大学化学, **2023**, 38 (9), 89.
- [5] 吴性良, 孔继烈. 分析化学原理. 北京: 化学工业出版社, 2010: 600-609.
- [6] 雷杰, 高翔, 马林, 张晋芬, 庄继华. 大学化学, **2012**, 27 (1), 16.
- [7] 蔡龙飞, 徐春秀. 大学化学, **2012**, 27 (2), 17.
- [8] Chen, S. K.; Ju, X. J.; Wei, J.; Wang, W.; Chu, L. Y. *J. Chem. Educ.* **2023**, 100, 3526.
- [9] 丁宗庆, 曹俊, 黄巧雨. 化学教育, **2022**, 43 (6), 66.