

用于炎症性肠病诊断的微流控界面 电容式生物传感器

王天麒, 张 鉴, 戚昊琛, 吕 丽

(温州大学 电气与电子工程学院, 浙江 温州 325035)

摘要: 目前用于炎症性肠病诊断的肠镜和活检等技术存在侵入性, 且难以进行定量评估和准确诊断, 为此提出一种非介入、快速、易操作的微流控免疫传感器, 将微流控富集技术和界面电容传感机制相结合, 通过检测血清中的肠脂肪酸结合蛋白浓度, 以无创方式进行炎症性肠病的诊断。实验结果表明, 传感器可在 30 s 内测定血清中的目标蛋白含量, 在标准品溶液中的检测限低至 5.29×10^{-4} pg/mL, 量程内的响应曲线呈半对数线性关系, 选择比为 8 130:1。将传感器应用于临床受试者血清样本的检测, 并与酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法进行比较, 两者检测结果的平均差异率为 5.01%。本文提出的传感器为炎症性肠病的血清学诊断提供了有效解决方案, 具有较高的无创诊断应用价值。

关键词: 生物传感器; 炎症性肠病; 肠脂肪酸结合蛋白; 界面电容; 微流控富集; 无创诊断
中图分类号: TP212 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1003-1251.2025.06.001

A Microfluidic Interfacial Capacitive Biosensor for Inflammatory Bowel Disease Diagnosis

WANG Tianqi, ZHANG Jian, QI Haochen, LÜ Li

(Wenzhou University, Wenzhou 325035, China)

Abstract: At present, the diagnosis of inflammatory bowel disease (IBD) mainly relies on interventional techniques such as colonoscopy and biopsy, which make it difficult to realize quantitative assessment and accurate diagnosis. A non-invasive, fast, and easy-to-operate microfluidic immunosensor is developed. Combining microfluidic enrichment with interfacial capacitive sensing, the intestinal fatty acid binding proteins in serum are detected for non-invasive diagnosis of IBD. The experimental results show that the sensor can detect the target protein concentration in serum within 30 s, with a detection limit as low as 5.29×10^{-4} pg/mL in standard solutions. The response within the detection range is semi-logarithmic linear, with a selectivity of 8 130:1 against the interference. The clinical deviation in serums is only 5.01% between the results from the sensor and those from the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The developed sensor provides an effective solution for serological diagnosis of IBD and has high noninvasive diagnostic application value.

Key words: biosensor; inflammatory bowel disease; intestinal fatty acid-binding protein; interfacial capacitance; microfluidic enrichment; noninvasive diagnosis

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种慢性、非特异性肠道炎症疾病, 包括溃疡性结肠炎和克罗恩病等类型^[1-2], 具有潜在的癌变风险。目前 IBD 诊断需要根据患者的临床表现, 通过放射学、侵入性的内窥镜和组织学检查结果进行综合判断^[3-4], 这些方法对虚弱病人、孕妇、儿童及敏感人群不甚友好, 极易对肠道造成二次损害。因此, 建立一种非放射性、非介入、快速、低成本的诊断方法, 对实现早期筛查、减少肠道损伤、病程量化判断具有积极的作用, 特别在欠发达地区及对特殊人群更具应用价值。

肠脂肪酸结合蛋白 (intestinal fatty acid-binding protein, I-FABP) 是一种小分子 (相对分子质量为 12 ~ 20 kDa) 胞质蛋白, 约占肠上皮细胞质蛋白的 2%^[5]。健康人体血液中 I-FABP 浓度范围为 57 ~ 310 pg/mL, IBD 造成的肠组织损伤会使 I-FABP 被释放进入血液的数量增加^[6-7]。因此, 血清中的 I-FABP 可作为指示蛋白, 通过检测其浓度变化进行 IBD 诊断, 该检测方法具有非介入、灵敏、易于量化评估等优点。目前 I-FABP 检测以酶联免疫吸附测定 (ELISA) 为主, 检测时间通常需 2 ~ 4 h, 无法满足患者床旁即时评估需求^[8], 较高的成本和专业实验室操作也限制了其在欠发达地区的推广。

本文基于半导体工艺制备的叉指微电极 (interdigitated microelectrode, IDME) 芯片, 结合微流控富集技术和界面电容传感机制, 研制一种可实现快速超痕量 I-FABP 定量检测的微流控免疫传感器。通过富集仿真和功能化表征论证传感器方案的可行性, 通过样品校准和临床实验验证传感器检测的快速响应性、高灵敏性、高准确性和高特异性。本文研发的传感器有助于实现对早期 IBD 非介入、低成本、易操作的实时诊断及该类疾病的血清学定量检验。

1 工作原理

1.1 界面电容传感机制

将 IDME 浸入电解质溶液中, 其表面可视为一个由电容和电阻组成的等效电路, 如图 1 所示。该等效电路由三部分组成, 分别是叉指电极自有电阻、界面阻抗 (电荷转移电阻和界面电容并联)、溶液阻抗 (电解质电阻和电解质电容并联)^[9]。图 1 中: R_{wire} 表示叉指电极自有电阻; R_{ct} 表示电荷

转移电阻; C_{int} 表示界面电容; R_s 表示电解质电阻; C_s 表示电解质电容。

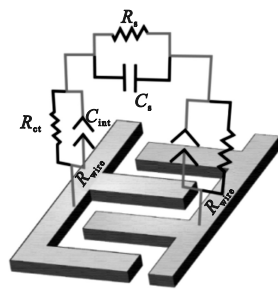


图 1 等效电路

Fig. 1 Equivalent circuit

当工作频率在 100 kHz 时, 上述等效电路可简化为电解质电阻和界面电容的串联连接 (图 1 中灰色线路所示)^[10]。界面电容由界面处的双电层 (electric double layer, EDL) 和沉积叠加的生物分子组成^[11], 其中 EDL 是电极处于电解质溶液中时形成的一种结构, 由电极表面电荷和靠近的反离子电荷组成^[12]。界面电容的大小 (C_{int}) 与界面介电层的厚度有关。当 IDME 为裸电极时, 介电层厚度即为 EDL 的厚度 D_{edl} , 如图 2(a) 所示。当抗体被修饰到 IDME 表面时, 介电层厚度由 D_{edl} 和抗体层厚度 D_p 组成, 如图 2(b) 所示, 此时初始界面电容 $C_{\text{int},s}$ 表达式为

$$C_{\text{int},s} = \frac{A_{\text{int}}}{\frac{D_p}{\varepsilon_p} + \frac{D_{\text{edl}}}{\varepsilon_{\text{edl}}}} \quad (1)$$

式中: A_{int} 为界面电容的有效表面积; ε_p 为抗体的介电常数; ε_{edl} 为溶液的介电常数。

检测过程中, I-FABP 分子向 IDME 表面移动并与抗体结合, 此时电极表面的介电层厚度由 D_{edl} 、 D_p 和靶标层厚度 D_t 组成, 如图 2(c) 所示, 此时界面电容 $C_{\text{int},b}$ 的表达式为

$$C_{\text{int},b} = \frac{A_{\text{int}}}{\frac{D_t}{\varepsilon_t} + \frac{D_p}{\varepsilon_p} + \frac{D_{\text{edl}}}{\varepsilon_{\text{edl}}}} \quad (2)$$

式中 ε_t 为 I-FABP 分子的介电常数。

在检测过程中, 电容的变化 ΔC 可反映抗体与不同浓度 I-FABP 分子结合的程度, 单位时间内目标分子浓度越高, ΔC 越大。为规避因制备批次不同和被测溶液的电性质不一致等因素造成的传感器初始界面电容 ($C_{\text{int},s}$) 不恒定, 采用单位时间内的归一化界面电容变化率 ($\Delta C/C_{\text{int},s}$) 表示 IDME 表面发生的抗原-抗体特异性结合情况, 其计算表达式为

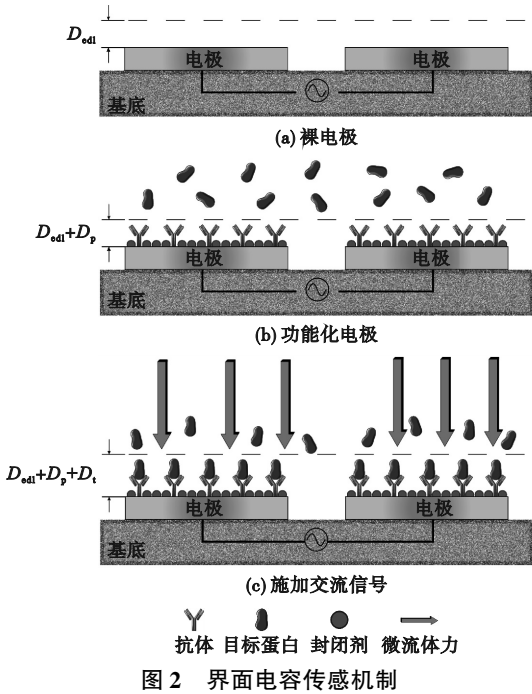


图 2 界面电容传感机制

Fig. 2 Interfacial capacitive sensing mechanism

$$\frac{\Delta C}{C_{int,s}} = \frac{C_{int,b} - C_{int,s}}{C_{int,s}} = - \frac{D_t}{D_t + \frac{\epsilon_t}{\epsilon_p} D_p + \frac{\epsilon_t}{\epsilon_{edl}} D_{edl}} \quad (3)$$

由式(3)可知, $\Delta C/C_{int,s}$ 为负值, 这是由于介

电层厚度增加导致 $C_{int,b}$ 减小。通过上述策略, 可精确检测目标分子 I-FABP 的浓度。

1.2 介电泳富集机制

嵌入在溶液中的粒子在非均匀电场中会被极化, 因其与溶液间存在极化差, 粒子会受到固定方向的驱动力, 这种现象称为介电泳 (DEP) 效应^[13]。介电泳力 F_{DEP} 计算式为

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \epsilon_0 \epsilon_m \text{Re} \left[\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right] \nabla |E|^2 \quad (4)$$

式中: r 为颗粒半径; E 为电场强度; ϵ_0 为介质真空介电常数; ϵ_m 为介质相对介电常数; Re 表示取实部; ϵ_m^* 为介质复介电常数; ϵ_p^* 为颗粒复介电常数。当 $\epsilon_p^* > \epsilon_m^*$ 时, 产生正介电泳力, 粒子朝向电极移动。

根据式(4), 介电泳力与粒子半径的三次方成正比, 本研究的检测目标 I-FABP 归属于大分子生物标志物, 其分子所受介电泳力是其他小分子的数千倍, 故采用介电泳富集机制可在加速靶标富集的同时有效避免非目标分子的干扰^[14-15]。

为验证上述理论, 采用仿真软件 COMSOL Multiphysics 5.5 模拟介电泳效应下 I-FABP 粒子在电极微通道内的运动轨迹, 结果如图 3 所示。

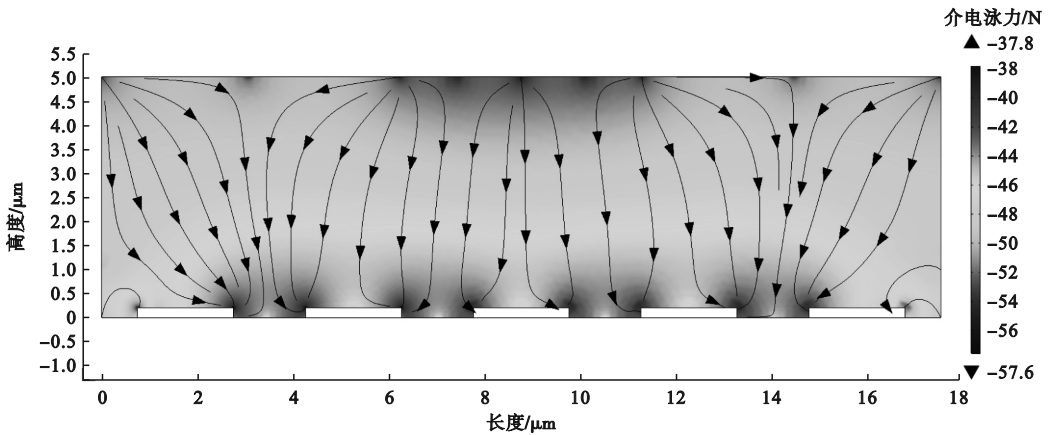


图 3 电极微通道内部流场

Fig. 3 Internal flow field of electrode microchannel

由图 3 可见, 在介电泳力作用下, I-FABP 粒子从电势较低的位置定向移动到更高电势的叉指电极表面, 证明通过介电泳效应对 I-FABP 进行诱导和富集是有效的。

2 实验方案

2.1 实验材料

I-FABP 和兔宿主 I-FABP 抗体, 购自上海信

裕生物科技有限公司, I-FABP 相对分子质量为 18.9 kDa, 纯度大于 90%, 其相应的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 结果如图 4 所示。

组蛋白、人免疫球蛋白 G、白蛋白、乳清蛋白、脂多糖和心型脂肪酸结合蛋白, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 用作验证传感器特异性的干扰物; 6-巯基-1-己醇 (6-MCH) 封闭剂, 购自

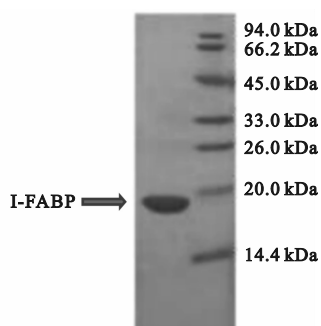


图4 I-FABP的SDS-PAGE条纹

Fig.4 SDS-PAGE stripes of I-FABP

上海阿拉丁生化科技股份有限公司,用于封闭传感器表面的空白位点;磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffer saline, $1 \times$ PBS),购自瑞普生物股份有限公司,用作稀释样品的背景液。

将 I-FABP 抗体和 6-MCH 分别稀释至 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $1 \text{ mmol}/\text{L}$;将 I-FABP 和 6 种干扰物连续稀释至 $0.001 \sim 1 \text{ pg}/\text{mL}$,浓度范围包含 4 个数量级。

6 名 IBD 患者(包括 3 名编号为 UC1 ~ UC3 的溃疡性结肠炎患者和 3 名编号为 CD1 ~ CD3 的克罗恩病患者)、3 名健康对照者(编号 HC1 ~ HC3)的血清样本,由郑州大学第一附属医院提供。

2.2 传感器功能化

商业化 IDME 芯片(KYOCERA 418K,京瓷(中国)商贸有限公司)尺寸为 $5 \text{ mm} \times 3.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$,封装在盖有金属盖的矩形陶瓷室中,如图 5(a)所示。去除盖子后可见石英基板上的镀铝电极阵列,叉指电极宽度为 $2 \mu\text{m}$ 、间隙为 $1.5 \mu\text{m}$,如图 5(b)所示。

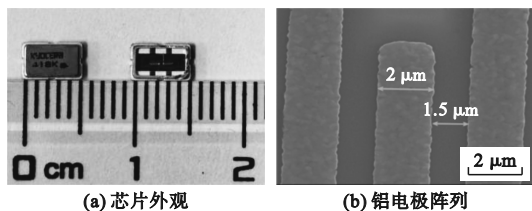


图5 IDME 芯片外观与内部结构

Fig.5 External and internal structures of IDME chip

传感器功能化过程如下:

1) 将腔室中的 IDME 芯片在丙酮中浸泡 20 min ,在异丙醇中浸泡 3 min ,采用去离子水冲洗 10 s ,使用无尘纸去除腔室中残留水分;

2) 使用紫外光照射芯片 40 min ,以增加电极阵列表面亲水性;

3) 将 I-FABP 抗体($10 \mu\text{g}/\text{mL}$, $10 \mu\text{L}$)振荡

摇匀后滴入腔室中,放入 $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育箱中干法培育 10 h ;

4) 加入 6-MCH($1 \text{ mmol}/\text{L}$, $15 \mu\text{L}$),封闭芯片 3 h ;

5) 使用去离子水将 $1 \times$ PBS 稀释为 $0.05 \times$ PBS,用其洗掉芯片表面残留封闭剂。

2.3 传感器检测流程

图 6 所示为传感器检测示意图。将传感器连接到阻抗分析仪(TH2829C 型,常州同惠电子股份有限公司);将 $10 \mu\text{L}$ 待测溶液滴加到腔室中,向传感器施加电压为 100 mV 、频率为 100 kHz 的交流信号;连续记录 30 s 内获取的界面电容值并进行归一化处理,计算电容的百分比变化率(以 $\%/ \text{min}$ 为单位)作为传感器的响应值。使用三个全新传感器对不同浓度下的溶液各检测三次,取平均值。对于临床血清样本,所有检测均在样本制备后 2 h 内完成(室温下),避免样本变质或受到污染。

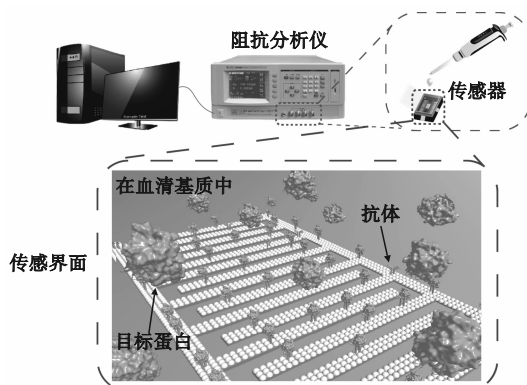


图6 传感器检测示意图

Fig.6 Schematic diagram of sensor detection

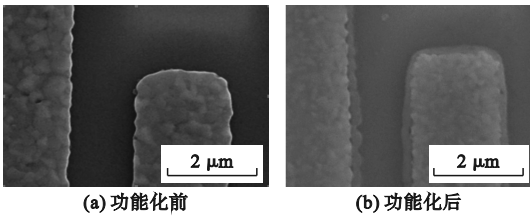
3 结果与分析

3.1 传感器表征

抗体修饰是传感器功能化的关键。通过扫描电子显微镜(JSM-7100F 型,日本电子株式会社)表征功能化前后的传感器电极表面形貌,结果如图 7 所示。可见,与功能化前原始状态的叉指电极相比,功能化后叉指电极四周被抗体均匀包围,说明抗体成功固定在 IDME 表面。

3.2 传感器的动态响应与标定

传感器的动态响应结果,即归一化电容瞬态曲线如图 8 所示。可见:采用 100 mV 测试电压时,传感器可在 30 s 内对 I-FABP 标准液作出应



(a) 功能化前 (b) 功能化后

图 7 传感器电极表面形貌变化

Fig. 7 Surface morphology change of the sensor electrodes

答;不同浓度的归一化电容瞬态曲线具有明显的响应区分度,但浓度为 10 pg/mL 时的响应曲线在 18 s 后较 1 pg/mL 时的响应曲线不降反升,这是由于 I-FABP 浓度过高导致传感器表面产生了吸附饱和现象。因此,传感器的检测范围是 0.001 ~ 1 pg/mL。

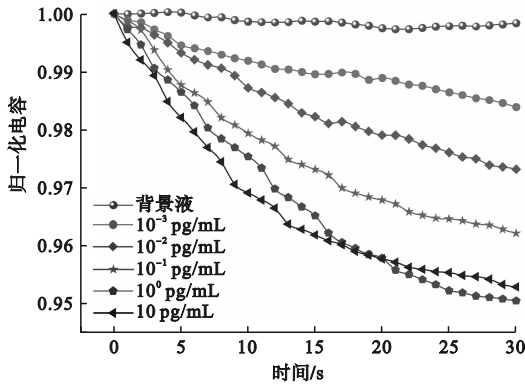


图 8 归一化电容瞬态曲线

Fig. 8 Normalized capacitance transient curves

通过最小二乘线性拟合算法对传感器的剂量响应进行校准,如图 9 所示。校准方程为 $y = -14.57 - 1.81gx$,其中 y 表示归一化电容变化率(单位为 %/min), x 表示浓度(单位为 pg/mL)。线性拟合的可决系数 R^2 为 0.994。

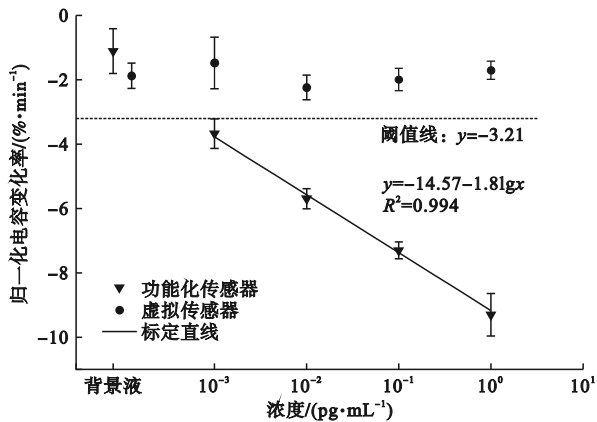


图 9 传感器剂量响应及校准

Fig. 9 Sensor dose response and calibration

通过图 9 中校准线与阈值线($y = -3.21$)的交点可确定传感器具有极低的检测限(5.29×10^{-4} pg/mL),其中阈值由背景液的响应值向下平移三个标准差得到。此外,未经功能化的虚拟传感器检测结果表明其无法对 I-FABP 标准液产生梯度响应,进一步验证了抗体对目标蛋白的识别作用。

3.3 传感器特异性

利用功能化传感器检测六种干扰物,结果如图 10 所示。可见,传感器对干扰物的响应值远小于对同等浓度 I-FABP 的响应值,且不具备浓度响应梯度。干扰物中最大响应值为心型脂肪酸结合蛋白在 1 pg/mL 时的响应值,为 $-2.13\%/min$,等同于 I-FABP 在浓度为 1.23×10^{-4} pg/mL 时产生的响应值,由此可计算得到该传感器的选择比为 8 130:1。

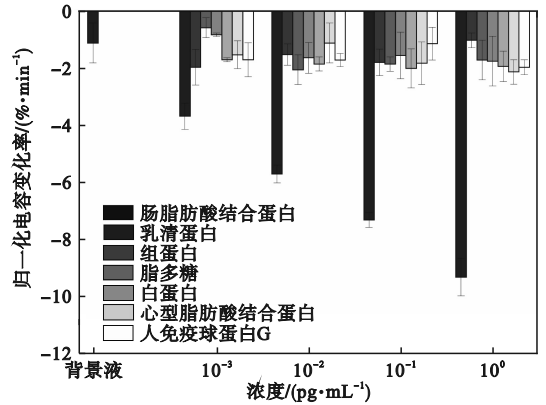


图 10 传感器特异性

Fig. 10 Sensor specificity

3.4 传感器在临床血清检测中的应用

为验证传感器检测血清中 I-FABP 的性能,对 6 名两种类型 IBD 病人的血清样本和 3 名健康人的血清样本进行检测。经过预实验验证,采用 $0.05 \times$ PBS 对血清样本进行 1 000 倍稀释,可使样本中目标物浓度处于传感器的量程范围内。传感器检测结果与 ELISA 检测结果对比如图 11 所示。

由图 11 可知:临床血清样本中浓度检测结果差异率最大的是 HC3,其 ELISA 检测结果为 310.3 pg/mL,传感器检测结果为 338.8 pg/mL,两者差异率为 9.2%;浓度检测结果差异率最小的样本是 UC2,差异率为 -2.5% ;9 个临床样本的 ELISA 与传感器检测结果平均差异率为 5.01%,一致性良好。此外,临床患者血清中 I-FABP 浓度显著高于健康人,这是 IBD 患者典型的病理特征,说明传感器具备良好的临床诊断价值。

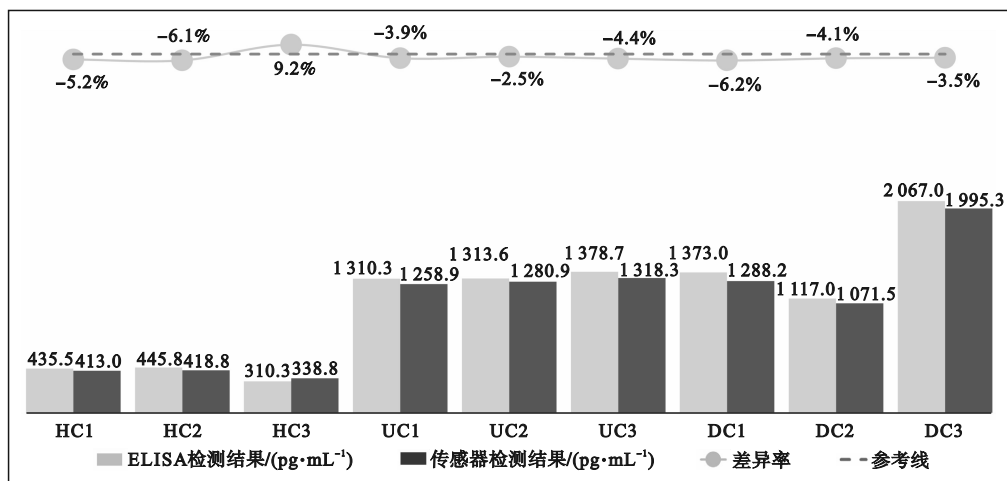


图 11 临床样本的传感器和 ELISA 检测结果对比

Fig. 11 Comparison of sensor and ELISA detection results for clinical samples

4 结束语

基于免疫识别、微流控富集和界面电容传感机制,实现了一种高灵敏度、高特异性、实时响应的 I-FABP 定量检测传感器的研制,通过实验证明了该微流控生物传感器用于 IBD 诊断的高度准确性和可靠性。传感器的重要价值还体现在其无创优势及仅需稀释步骤的操作便利性,半导体工艺的电极加工还具备规模化生产的成本优势。因此,本文提出的传感器及检测方法是一种具有应用前景的肠道疾病检测技术,对于特殊人群以及在资源有限地区将更具优势。

参考文献 (References):

- [1] KIKUT J, MOKRZYCKA M, DROZD A, et al. Involvement of proinflammatory arachidonic acid (ARA) derivatives in Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC)[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2022, 11(7):1861.
- [2] ESTEVINHO M M, MIDYA V, COHEN-MEKELBURG S, et al. Emerging role of environmental pollutants in inflammatory bowel disease risk, outcomes and underlying mechanisms[J]. *Gut*, 2025, 74(3):477-486.
- [3] 刁雯蕙. 炎症性肠病难诊断? 新工具有望实现非侵入式准确检测[N]. *中国科学报*, 2025-01-16(3).
- [4] LI L L, CHENG R, WU Y S, et al. Diagnosis and management of inflammatory bowel disease[J]. *Journal of Evidence-Based Medicine*, 2024, 17(2):409-433.
- [5] SUN D L, CEN Y Y, LI S M, et al. Accuracy of the serum intestinal fatty-acid-binding protein for diagnosis of acute intestinal ischemia: a meta-analysis[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1):34371.
- [6] TYSZKO M, LIPIONSKA-GEDIGA M, LEMAŃSKA-PEREK A, et al. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a prognostic marker in critically ill COVID-19 patients[J].

Pathogens, 2022, 11(12):1526.

- [7] 李荣新, 方源, 宋卫平. 脓毒症合并肠缺血再灌注损伤患者血清肠脂肪酸结合蛋白、D-乳酸和细胞间黏附因子-1 水平与肠黏膜损伤程度和预后的相关性[J]. *临床内科杂志*, 2025, 42(1):39-43.
- LI R X, FANG Y, SONG W P. Correlation of serum intestinal fatty acid binding protein, D-lactic acid and intercellular adhesion molecule-1 levels with intestinal mucosal injury degree and prognosis in patients with sepsis complicated with intestinal ischemia-reperfusion injury[J]. *Journal of Clinical Internal Medicine*, 2025, 42(1):39-43. (in Chinese)
- [8] OLUKA G K, NAMUBIRU P, KATO L, et al. Optimisation and validation of a conventional ELISA and cut-offs for detecting and quantifying anti-SARS-CoV-2 Spike, RBD, and nucleoprotein IgG, IgM, and IgA antibodies in Uganda[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14:1113194.
- [9] OUESLATI R, CHENG C, WU J, et al. Highly sensitive and specific on-site detection of serum cocaine by a low cost aptasensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 108:103-108.
- [10] CHENG C, CUI H C, WU J, et al. A PCR-free point-of-care capacitive immunoassay for influenza A virus[J]. *Microchimica Acta*, 2017, 184(6):1649-1657.
- [11] CUI H C, WU J, EDA S, et al. Rapid capacitive detection of femtomolar levels of bisphenol A using an aptamer-modified disposable microelectrode array[J]. *Microchimica Acta*, 2015, 182(13/14):2361-2367.
- [12] LIN X G, CHENG C, TERRY P, et al. Rapid and sensitive detection of bisphenol a from serum matrix[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 91:104-109.
- [13] ZHANG J, JIANG Y, XIA X, et al. An on-site, highly specific immunosensor for Escherichia coli detection in field milk samples from mastitis-affected dairy cattle[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 165:112366.
- [14] QI H C, HU Z W, YANG Z L, et al. Capacitive aptasensor coupled with microfluidic enrichment for real-time detection of trace SARS-CoV-2 nucleocapsid protein[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(6):2812-2819.
- [15] NIU J Q, LIN S J, XU Y C, et al. A stepwise multi-stage continuous dielectrophoresis separation microfluidic chip with microfilter structures[J]. *Talanta*, 2024, 279:126585.

(责任编辑:宋颖韬)