

巨磁阻微流体免疫传感器快速定量检测 *D*-二聚体

高宇哲^{1 #} 张磊^{1 #} 霍卫松^{1 #} 石西增² 廉洁³ 高云华^{* 1}

¹(中国科学院理化技术研究所光化学转换和功能材料重点实验室, 北京 100190)

²(东莞博识生物科技有限公司, 东莞 523808)

³(中国人民公安大学刑事科学技术系, 北京 100038) ⁴(中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要 将巨磁阻(GMR)传感器集成在微流体通道中,以 100 nm 磁颗粒为信号探针,研制了可快速检测血栓标志物 *D*-二聚体的免疫传感器。用 GMR 传感器在线检测免疫反应后被捕捉在芯片上的磁颗粒的信息,测定血浆中 *D*-二聚体的含量。通过对反应条件的优化,建立了 GMR 微流体传感器检测血浆中 *D*-二聚体的方法。本方法的线性检测范围为 5 ~ 6500 ng/mL,检出限为 5 ng/mL。批内相对标准偏差 < 12%; 批间相对标准偏差 < 14%,具有良好的稳定性和重现性。本方法可在 9 min 内完成检测,临床血浆样本的测试结果与日本 Sysmex 公司的 CA1500 血凝仪测试结果一致,具有灵敏度高、检测时间短、检测结果准确等优点。

关键词 巨磁阻效应; 微流体免疫传感器; *D*-二聚体; 磁颗粒

1 引言

巨磁阻(Giant magnetoresistance, GMR)传感器作为硬盘驱动器中的数据读出磁头,在数据存储工业得到广泛应用^[1]。近年来,GMR 传感器被开发应用于生物分子的识别分析^[2~5],即利用生化技术使被测生物分子与纳米磁颗粒结合,再通过 GMR 超敏传感器检测纳米磁颗粒。GMR 传感器相较于其它类型的磁敏传感器,如各向异性磁电阻传感器(Anisotropic magnetoresistance, AMR)具有更高的灵敏度^[2,6],工艺更为简单,集成加工手段也更成熟,由于其体积小,可设计成微阵列,用于高通量的生物检测。而以磁颗粒作为信号供体也有着独特的优势:临床样本中(血浆、血清或尿液等)不含有磁性物质,背景信号低,有助于提高灵敏度;每个传感器区域有独立的检测磁颗粒,不存在类似于光学信号间的相互干扰^[7]。由于 GMR 传感器在灵敏度、可靠性、可集成等方面的优势,越来越多的研究团队致力于 GMR 生物传感器的研究开发^[7~10]。由于 GMR 检测仪器体积可以小型化,将 GMR 传感器与微流体技术相结合,可开发出用于即时检测(Point of care, POCT)的新型仪器。

D-二聚体(*D*-dimer)是血浆中交联纤维蛋白的特异降解产物^[11],正常人体内低于 500 ng/mL^[12],是反映体内凝血-纤溶系统功能的理想指标,可以作为多种血栓类疾病的检测标志物^[13~15]。对于深静脉血栓(Deep vein thrombosis, DVT)以及肺动脉栓塞(Pulmonary embolism, PE),*D*-dimer 是确认可靠的阴性排除标志物。目前,检测 *D*-dimer 方法主要有 ELISA 法^[16~19]、免疫比浊法^[18~20]、胶体金法^[19,20]和乳胶凝集法^[16~19]。这些方法中 ELISA 虽然有较高的灵敏度和准确度,但是操作费时、繁琐,不适于即时检测;而免疫比浊法、胶体金和乳胶凝集法与 ELISA 相比有较快的检测速度,操作简便,但其灵敏度和准确性较差;乳胶凝集法多用于定性检测,免疫比浊法虽与 ELISA 最为接近,但是需要较大型的检测仪器。

本研究将 GMR 生物传感器与微流体集成,实现对人体血浆中的 *D*-dimer 含量的快速、准确磁敏免疫检测。本方法灵敏度高、检测范围宽、操作简便、配套仪器易携带,与现有的临床检测仪器结果相比,具有较高的吻合度,此传感器可以拓展到多靶标的高通量检测,具有广阔的应用前景。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

GMR 生物传感器磁信号读出仪由东莞博识生物科技有限公司研制,配套 GMR 生物传感器测试卡

2015-01-19 收稿; 2015-04-15 接受

本文系国家科技支撑计划(No. 2013BAI03B)资助

* E-mail: yhgao@mail.ipc.ac.cn

(50 mm × 40 mm) 由中国科学院理化技术研究所和东莞博识生物科技有限公司联合研制; 3K15 冷冻离心机(德国 Sigma 公司); 截留分子量 3 kDa 离心超滤管(美国 Millipore 公司); GeSim Nano-Plotter 点样仪(德国 GeSim 公司)。

D-二聚体(*D*-dimer) 抗原标准品、捕获抗体 DD2 和标记抗体 DD41 为两种不同的抗 *D*-dimer 单克隆抗体, 均购自芬兰 Hytest 公司; 抗原稀释液(北京万域美澜生物科技有限公司); *N*-羟基琥珀酰亚胺酯生物素(NHS-Biotin, 美国 Alfa Aesar 公司); 链霉亲和素-超顺磁颗粒(Streptavidin conjugated superparamagnetic beads, 法国 Ademtech 公司); 3-缩水甘油醚氧基丙基三甲氧基硅烷(GPTS, 97%, 美国 Alfa Aesar 公司); Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 (美国 Merck 公司); 实验用水均为超纯水(EASY pure LF, 美国 Barnstead 公司)。

2.2 GMR 生物传感器的测试原理

利用 GMR 传感器检测 *D*-dimer 使用的是夹心免疫一步法, 原理如图 1, 即在芯片上固定捕获抗体, 当血液流过芯片时, 样品中的抗原与抗体结合, 形成捕获抗体-抗原-标记抗体免疫复合物, 标记抗体上含有生物素, 与链霉亲和素标记的超顺磁颗粒(SA-beads) 结合, 磁颗粒的数目与抗原的浓度成正相关, 并通过 GMR 传感器中电阻率的变化实现检测。

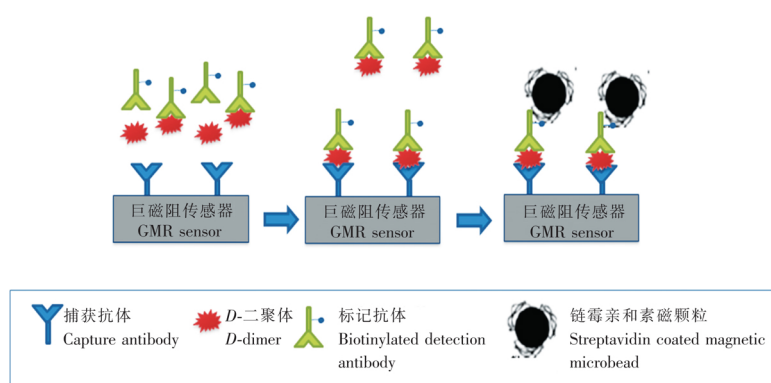


图 1 巨磁阻传感器上免疫反应的原理

Fig. 1 Principle of immunoreaction on giant magnetoresistance (GMR) sensor

2.3 GMR 芯片和微流体测试卡的设计

GMR 芯片含有 12 个规格相同且独立的传感器, 每个传感器的大小为 $120\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$, 在每个传感器上都可以修饰上不同类别的捕获抗体, 从而达到检测不同生化标志物的目的。每个 GMR 芯片上集成一个温度控制器, 使芯片区域的温度在免疫反应期间控制在 37°C 。

将修饰了特定抗体的 GMR 芯片集成到微流体测试卡之内, 从而实现程序化进样、反应和测试。如图 2A 所示, 整个测试卡是由样品舟(Cartridge)、微通道层(PDMS layer)、芯片印制电路板(Printed circuit board with GMR chip, PCB with GMR chip)和底盖(Bottom cap)4 层结构构成。样品舟上有 3 个储液池, 分别是待检测样品(Sample)池(在其底部储存生物素修饰的标记抗体干粉)、清洗液(Rinsing buffer)池和链霉亲和素磁颗粒(Streptavidin beads)溶液池。在 PDMS 层上设计有供液体流动的微通道, 储液池内的液体在微量注射泵的驱动下, 依次从不同的进样口流经传感器上进行反应, 之后进入废液池。

2.4 实验步骤

2.4.1 缓冲溶液及稀释液的配制 (1) 磷酸盐缓冲液的配制: 用 $1.8\ \text{mmol/L}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $10.1\ \text{mmol/L}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $3.0\ \text{mmol/L}\ \text{KCl}$ 和 $135\ \text{mmol/L}\ \text{NaCl}$ 配制磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)。(2) PBST 溶液的配制: 向配制好的 PBS 中以 0.2% 的体积比加入 Tween 20, 配成 PBST。(3) 捕获抗体包被液的碳酸盐缓冲液的配制: 用 $0.05\ \text{mol/L}\ \text{Na}_2\text{CO}_3$ 和 NaHCO_3 配制碳酸盐缓冲液(CB, pH 9.6)。(4) CBT 清洗液的配制: 向配制好的 CB 中以 0.2% 的体积比加入 Tween 20; 配成 CBT 清洗液。(5) PBST-BSA 溶液的配制: 用 PBS 溶液配成含有 0.2% Tween 20 和 0.1% BSA 的溶液作为清洗液、生物素化抗体和 SA-Beads 的稀

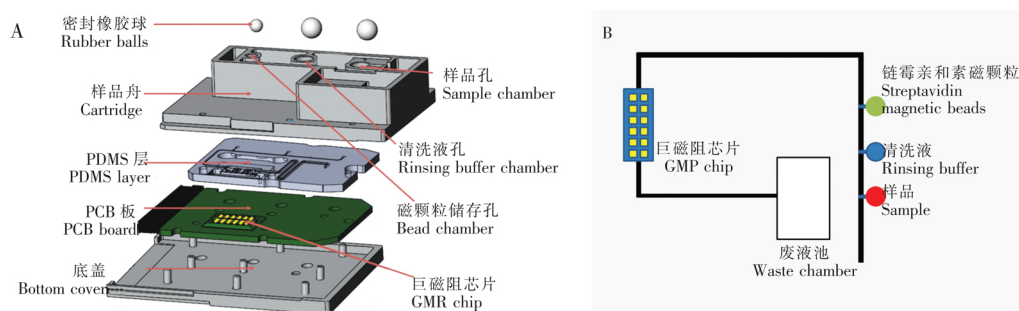


图 2 巨磁阻生物传感器测试卡设计图 (A) 和微流体通道示意图 (B)

Fig. 2 Design sketch of GMR sensor test card (A) and fluidic channel (B)

释液。(6) *D*-dimer 标准溶液的配制: 使用万域美澜公司的抗原稀释液将 *D*-dimer 标准品配制成所需浓度待用。

2.4.2 *D*-dimer 标记抗体的生物素化 使用二甲基甲酰胺 (DMF) 配制 10 mmol/L NHS-Biotin 溶液, 与 *D*-dimer 标记抗体按 20:1 (摩尔比) 进行混合, 在 4℃ 反应 12 h 后, 将混合液转移至超滤管中, 在 4℃, 9000 r/min 超滤 3 次, 每次 10 min, 除去未反应的 NHS-Biotin, 将标记好的抗体稀释至 2 mg/mL, 置于 -20℃ 保存。

2.4.3 微流体测试卡的组装 芯片的表面使用 3-缩水甘油醚氧基丙基三甲氧基硅烷进行处理, 以便使抗体固定在芯片表面。将捕获抗体使用 CB 缓冲液 (pH 9.6) 稀释至 50 μg/mL, 用 Gesim 点样仪将抗体点在焊接于 PCB 板上的 GMR 传感器芯片表面, 将芯片置于 90% 湿度环境下孵育 10 min, 然后将 GMR 芯片组装到测试卡中。将磁颗粒、清洗液加入到相应的储液池中, 并用密封橡胶球密封。高浓度的生物素化的标记抗体 5 μL 冻干储存在样品池底部, 检测时将 40 μL 样品加入样品池中并用橡胶球密封。

2.4.4 免疫分析过程 向测试卡中注入待测样品 40 μL, 由马达驱动密封橡胶球推动样品进入微流体通道中, 样品流经样品池底部时与预先冻干储存的标记抗体混合, 通过位于测试卡下方的马达的运动往复顶起样品池下的 PDMS 膜, 将样品和标记抗体混匀, 将混合液注入到通道中并到达芯片上, 使其与固定在芯片上的捕获抗体反应一段时间后, 注入 80 μL 清洗液, 冲掉未反应的抗原和生物素化标记抗体。注入 30 μL SA-Beads 溶液, 反应一定时间后, 注入 80 μL 清洗液, 冲洗掉未反应的磁颗粒。启动 GMR 传感器磁信号测试程序, 不同浓度的样品会呈现出不同的磁阻变化率 ($\Delta MR/MR$, MR 为磁致电阻, ΔMR 为磁致电阻变化量), 经线性拟合, 进行定量分析 (包括灵敏度、线性范围和检出限等)。进行临床血浆样品测试时, 血浆样品不需要前处理, 直接从采血管中取出血浆加入测试卡中测试。

3 结果与讨论

3.1 分析条件的优化

3.1.1 磁颗粒浓度和反应时间的选择 取 1000, 2500, 5000 及 6500 ng/mL 的 *D*-dimer 进行免疫反应, 加入不同浓度的磁颗粒 (0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 和 2.0 mg/mL), 如图 3A 所示, 当磁颗粒的浓度在 1.0 mg/mL 以上时, 磁颗粒浓度对反应的影响无显著差异。为保证有足够的磁颗粒参与反应, 本实验采用 2.0 mg/mL 磁颗粒进行 *D*-dimer 的检测。图 3B 显示, 当采用 10 μg/mL 生物素化抗体, 加入 2.0 mg/mL 链霉亲和素磁颗粒进行反应, 随着反应时间的延长, 磁阻变化率显著增加, 当反应时间大于 200 s 时, 磁阻变化率的增加明显减缓, 本实验采用 300 s (5 min) 为磁颗粒反应时间。

3.1.2 捕获抗体和标记抗体浓度的优化 在 *D*-dimer 浓度为 5, 500 和 6500 ng/mL 条件下, 考察捕获抗体浓度以及生物素化标记抗体浓度对免疫反应的影响。如图 4A, 在标记抗体为 40 μg/mL 时, 捕获抗体浓度大于 50 μg/mL, 磁阻变化率随捕获抗体浓度增加减缓。如图 4B, 当捕获抗体浓度为 50 μg/mL, 标记抗体浓度大于 20 μg/mL 时, 磁阻变化率的增加速度减缓。因此在后续反应中捕获抗体浓度为 50 μg/mL, 生物素化标记抗体的浓度为 20 μg/mL。

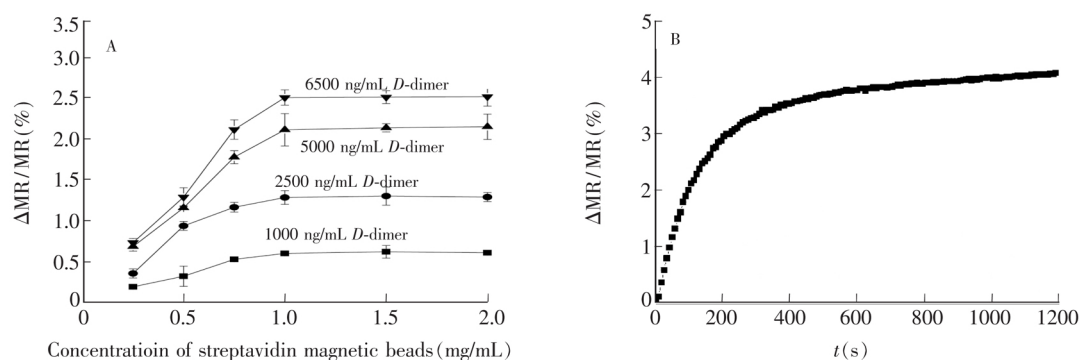


图3 A. 4个浓度水平的 *D*-dimer 与不同浓度的磁颗粒反应; B. 生物素化抗体与链霉亲和素磁颗粒间的反应速率

Fig. 3 (A) Reaction of four concentration levels of *D*-dimer and different concentrations of streptavidin (SA) - beads and (B) reaction rate curve between biotinylated detection antibody and streptavidin-magnetic beads

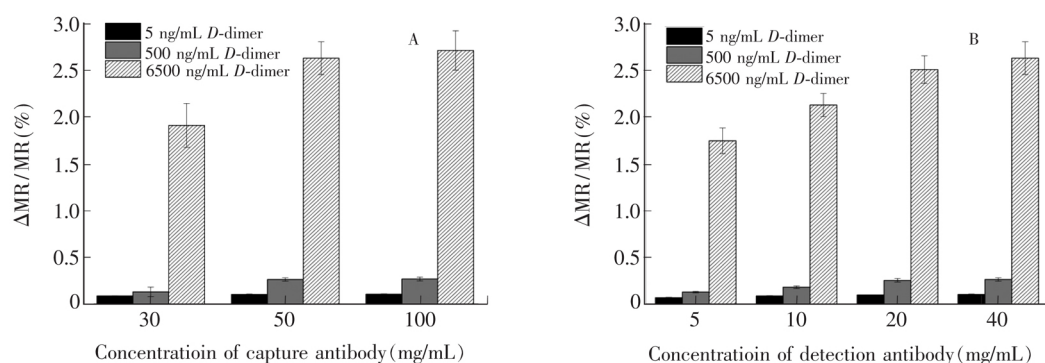


图4 A. 不同捕获抗体浓度下 3 个浓度水平 *D*-dimer 的磁阻变化率; B. 不同标记抗体浓度下 3 个浓度水平 *D*-dimer 的磁阻变化率

Fig. 4 (A) Magnetoresistance change rate of three concentration levels of *D*-dimer with different concentrations of capture antibody and (B) magnetoresistance change rate of three concentration levels of *D*-dimer with different concentrations of detection antibody

3.1.3 抗原抗体反应时间的优化 捕获抗体浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 标记抗体浓度 20 $\mu\text{g/mL}$ 磁颗粒反应时间 5 min 时,如图 5 所示,抗原与抗体反应时间大于 2 min 时,磁阻变化率的增加减缓 2 min 反应时间时能较好地地区分 0, 5 以及 20 ng/mL 的 *D*-dimer,而且 5 ng/mL 具有较高的磁阻变化率。

根据以上实验结果,将测定反应的条件确定为:抗原与抗体反应 2 min,磁颗粒反应 5 min,清洗时间为 2 min,共 9 min 完成测试。

3.1.4 其它影响因素的优化 如表 1 所示,与 PBST 清洗液 (pH 7.4) 相比,使用 CBT 清洗液 (pH 9.6) 可以降低非特异性吸附,能较好地地区分低浓度的 *D*-dimer。

3.2 方法的分析特性

3.2.1 标准曲线 在最佳反应条件下,建立 *D*-dimer

检测的标准工作曲线,如图 6 所示。采用低浓度 (5 ~ 200 ng/mL) 和高浓度 (200 ~ 6500 ng/mL) 两段标

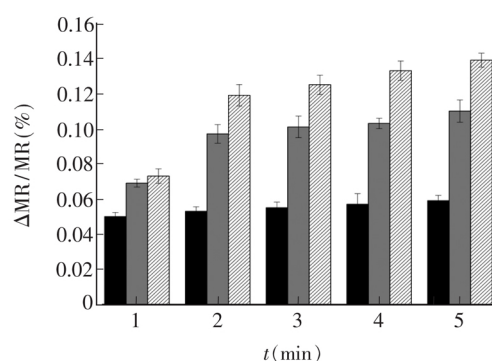


图5 不同抗原与抗体反应时间下低浓度的测试值
Fig. 5 Test values of low concentrations of *D*-dimer at different antigen-antibody reaction time
■ 0 ng/mL *D*-dimer; ■ 5 ng/mL *D*-dimer; ■ 20 ng/mL *D*-dimer.

准曲线进行定量分析,两段标准曲线的相关系数均大于0.99,线性关系良好,可以用于样品的定量测定。以空白溶液 20 次测定的标准偏差的 3 倍对应的浓度确定本方法的检出限为 5 ng/mL。

3.2.2 精密度 根据国家食品药品监督管理局发布的《体外诊断试剂分析性能评估系列指导原则》的要求,考察了 Cut-off 值 (500 ng/mL) 及其临近浓度测试

的批内以及批间精密度,如表 2 所示,批内相对标准偏差小于 12%,批间相对标准偏差均小于 14%,均满足临床上对检测精密度的要求。

表 1 *D*-dimer 低浓度时使用 PBST 及 CBT 作为清洗液的测试结果

Table 1 Test values by using PBST and CBT as rinsing buffer solution at low concentration of *D*-dimer

清洗液 Rinsing buffer solution	<i>D</i> -dimer 低浓度下的 GMR 测试值 Test values at low concentration levels of <i>D</i> -dimer				
	0 ng/mL	5 ng/mL	20 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL
PBST	0.274	0.380	0.327	0.264	0.388
CBT	0.053	0.100	0.121	0.149	0.261

PBST: PBS+Tween 20; CBT: Na₂CO₃+NaHCO₃+Tween 20.

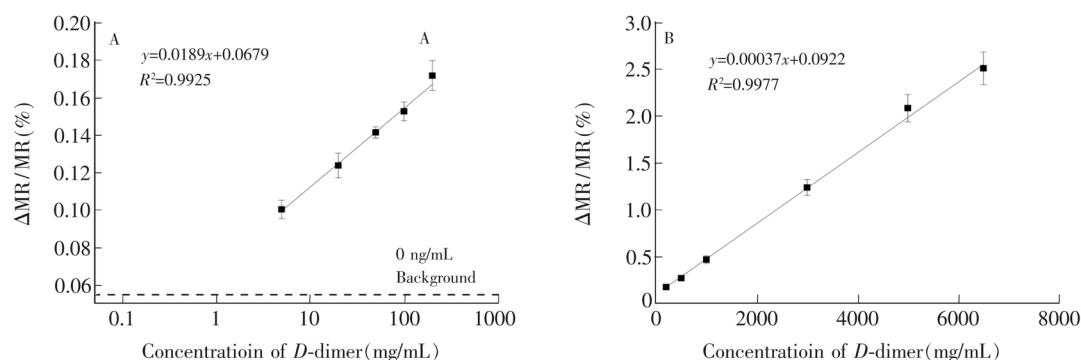


图 6 *D*-dimer 检测的低浓度区段标准曲线 (A) 和高浓度区段标准曲线 (B)

Fig. 6 Standard curve for low-concentration of *D*-dimer (A) and high-concentration of *D*-dimer (B)

表 2 不同浓度水平的批内及批间精密度 ($n=20$)

Table 2 Intra-assay and inter-assay precision (RSD) of *D*-dimer at different concentration levels ($n=20$)

<i>D</i> -dimer 浓度 Concentration of <i>D</i> -dimer	批内精密度 Intra-assay precision (RSD, %)	批间精密度 Inter-assay precision (RSD, %)
100 ng/mL	11.75	13.17
500 ng/mL	11.12	11.53
1000 ng/mL	9.15	10.57
3000 ng/mL	6.21	6.85

3.3 血浆样品的对比研究

使用 GMR 微流体生物传感器测试临床 *D*-dimer 血浆样本(肝素锂抗凝) 30 份(北大深圳医院提供),并与目前临床上使用的乳胶增强免疫比浊法(Sysmex 公司 CA1500 血凝仪)的测试结果进行相关分析。如图 7,两者的相关系数 $R=0.9938$,说明两者测试结果一致。GMR 生物传感器的检出限和检测范围均可达到临床检测要求,具有良好的应用前景。

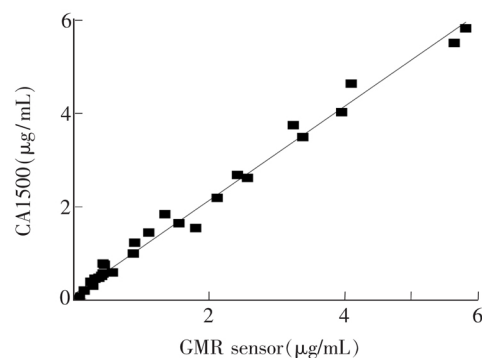


图 7 GMR 生物传感器与 Sysmex 公司 CA1500 血凝仪 *D*-dimer 测试结果的相关性

Fig. 7 Correlation of detection results of *D*-dimer in plasma measured by GMR sensor and CA1500 instrument

References

- Freitas P, Ferreira R, Cardoso S, Cardoso F. *J. Phys.: Condens. Matter*, **2007**, 19(16): 165221
- Lenz J, Edelstein A S. *IEEE Sens. J.*, **2006**, 6(3): 631-649
- Reiss G, Brueckl H, Huettner A, Schotter J, Brzeska M, Panhorst M, Sudfeld D, Becker A, Kamp P B, Puehler A. *J. Mater. Res.*, **2005**, 20(12): 3294-3302
- Wang S X, Li G. *Magnetics, IEEE Transactions on*, **2008**, 44(7): 1687-1702

- 5 Chu Y W , Engebretson D A , Carey J R. *J. Biomed. Nanotechnol.* , **2013** , 9(12) : 1951–1961
- 6 Edelstein A. *J. Phys-Condens. Mat.* , **2007** , 19(16) : 165217
- 7 Hall D , Gaster R , Lin T , Osterfeld S , Han S , Murmann B , Wang S. *Biosens. Bioelectron.* , **2010** , 25(9) : 2051–2057
- 8 Hall D , Gaster R , Osterfeld S , Murmann B , Wang S. *Biosens. Bioelectron.* , **2010** , 25(9) : 2177–2181
- 9 Klein T , Wang Y , Tu L , Yu L , Feng Y , Wang W , Wang J P. *Sens. Actuators A* , **2014** , 216: 349–354
- 10 Wang W , Wang Y , Tu L , Klein T , Feng Y , Wang J P. *Magnetics , IEEE Transactions on* , **2013** , 49(1) : 296–299
- 11 Adam S S , Key N S , Greenberg C S. *Blood* , **2009** , 113(13) : 2878–2887
- 12 Douma R A , Le Gal G , Söhne M , Righini M , Kamphuisen P W , Perrier A , Kruip M J , Bounameaux H , Büller H R , Roy P M. *Bmj* , **2010** , 340: c1475
- 13 Palareti G , Cosmi B , Legnani C , Antonucci E , De Micheli V , Ghirarduzzi A , Poli D , Testa S , Tosetto A , Pengo V. *Blood* , **2014** , 124(2) : 196–203
- 14 Stein P D , Hull R D , Patel K C , Olson R E , Ghali W A , Brant R , Biel R K , Bharadia V , Kalra N K. *Ann. Intern. Med.* , **2004** , 140(8) : 589–602
- 15 Righini M , Perrier A , de Moerloose P , Bounameaux H. *J. Thromb. Haemost.* , **2008** , 6(7) : 1059–1071
- 16 HOU Yin-Jing , QIN Ming-Zhao. *Chinese Journal of Clinicians (Electronic edition)* , **2013** , 7(17) : 7893–7896
侯银静, 秦明照. 中华临床医师杂志(电子版) , **2013** , 7(17) : 7893–7896
- 17 Tripodi A. *Clin. Chem.* , **2011** , 57(9) : 1256–1262
- 18 Shitrit D , Heyd J , Raveh D , Rudensky B. *Thromb. Res.* , **2001** , 102(2) : 125–131
- 19 Neale D , Tovey C , Vali A , Davies S , Myers K , Obiako M , Ramkumar V , Hafiz A. *Emerg. Med. J.* , **2004** , 21(6) : 663–666
- 20 XIA Xun-Sheng , TANG Ning , ZHANG Bi-Yu , CAO Wen-Jing. *Chinese Journal of Thrombosis and Hemostasis* , **2007** , 13(2) : 82–85
夏汛生, 唐宁, 张碧玉, 曹文静. 血栓与止血学 , **2007** , 13(2) : 82–85

An Integrated Giant Magnetoresistance Microfluidic Immuno-Sensor for Rapid Detection and Quantification of D-dimer

GAO Yu-Zhe^{1 #} , ZHANG Lei^{1 #} , HUO Wei-Song^{1 #} , SHI Stone² , LIAN Jie³ , GAO Yun-Hua^{* 1}

¹(Key Laboratory of Photochemical Conversion and Optoelectronic Materials ,

Technical Institute of Physics and Chemistry , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100190 , China)

²(Dongguan Bosh Biotechnologies , LTD , Dongguan 523808 , China)

³(Department of Forensic Science , People's Public Security University of China , Beijing 10038 , China)

⁴(University of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

Abstract A method for rapid detection and quantification of D-dimer as a biomarker of thrombosis was developed by utilizing giant magnetoresistance (GMR) sensor integrated with microfluidic technology and 100 nm magnetic particles (MPs) as signal probes. The MPs binding on the chip through specific immune reaction was measured by the GMR sensor and the concentration of D-dimer was determined at the same time. The linear detection range of this method was from 5 ng/mL to 6500 ng/mL , and the detection limit was 5 ng/mL. The intra-assay precision (RSD) was less than 12% and the inter-assay precision was less than 14% . The whole analysis process could be completed within 9 min , and a good linear correlation between the results of GMR biosensor and Sysmex CA1500 was obtained. This method has the advantages of high sensitivity , fast detection and good accuracy.

Keywords Giant Magnetoresistance; Microfluidic immuno-sensor; D-Dimer; Magnetic particles

(Received 19 January 2015; accepted 15 April 2015)

This work was supported by the National Key Technology R&D Program of China (No. 2013BAI03B)