

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/00



[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/53 G01N 33/543

G01N 33/68 G01N 21/64

G01N 21/76 C12Q 1/68

[21] 申请号 03142327.2

[43] 公开日 2003 年 12 月 10 日

[11] 公开号 CN 1460855A

[22] 申请日 2003.6.13 [21] 申请号 03142327.2

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路 15 号

[72] 发明人 乐加昌 崔元波 孟涛 徐红

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 姜兆元

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 5 页

[54] 发明名称 一种微流体生物传感器芯片装置及应用

[57] 摘要

本发明用可替换式生物传感芯片技术为核心，及其与其相关连的微反应器和微流池组成的 MEMS 系统进行环境污染测定。当有害分子（如流感或 SARS 病毒）结合到功能芯片后，该受到污染的分子可以将信息储存下来，并在特定的环境中将其释放，其释放的信息与其受到污染的程度成正比关系，释放的信息可用物理技术以高灵敏度方式将其方便地读写出来，从而完成对环境污染的测定。

1、一种方便，快速，灵敏的微流体生物功能芯片微检测系统装置，
5 其特征是在该装置的微流体内安装有可以接受环境污染的信息并将
污染的信息方便地进行储存、传递、阅读和可测定功能的可替换式的生
物传感芯片，和生物传感器，将上述可替换式的传感器与微流体通道板
封装在一起，传感器嵌入与微流体之间的连结用密封的橡胶圈，样品出口
10 的连接一端连接微动力装置。微动力装置与缓冲室的连接分别用乳胶管
连接如图 5 所示，上述可替换式的传感器样品可以将污染的信息记录下来，
对于不同的样品用不同的方式进行快速阅读与记录：如对于抗体抗原
污染的测定可用免疫技术；对于有毒气体的测定可用如示意图图 4 所示的
光合磷酸化技术与弱光测定技术。

2、根据权利要求 1 所述的可替换式生物传感芯片和生物传感器的组
15 成，其特征在于是由一种滤气吸水的高分子材料材料，如：纤维素，作
为固体支架，在该固体支架的正面涂有均匀的带正电荷分子如：多聚赖
氨酸；或硝酸纤微素分子；Protein A 有助于功能性分子在固体支架上
牢固结合的帮助剂，使其生物功能分子能在其上牢固固定，该生物功能
分子可以是生物大分子如：抗体；脂酶体；受体等，固定支架背面与另
20 一聚四氟乙稀滤片相组合。并且在它们双层之间充满缓冲溶液，目的为
了保持生物功能分子提供溶液环境，使该生物芯片在一个连续的气或固
介质界面体系中而保持其具有生理功能。在生物功能分子的正面复盖一
硝酸纤微素滤片。功能芯片的组装如图 1 所示，用聚四氟乙稀薄膜，醋
酸纤微薄膜和硝酸纤微薄膜共同组成的夹芯材料封闭的口袋内装入上述
25 芯片为可替换式生物传感器。

3、根据权利要求 1 所述的该装置的微流体是一种用高分子材料有
机玻璃作为材料制做的，在有机玻璃内设计的流道一侧与样品进口连接，
另一侧为样品的出口孔道，在出口孔道的内部嵌入与生物传感器联结。将
上述可替换式的生物传感器与通道板封装在一起，传感器嵌入与通道之间
30 的连结用密封的橡胶圈，样品出口的连接一端连接微动力装置。微动力

装置与缓冲室的连接分别用乳胶管连接如：图 5 所示的装置。

4、根据权利要求 1、2、3 所述的可替换式生物传感器，是指根据待检样品的不同，在微流体中联结不同的生物传感器。

5、根据权利要求 1 所述的将污染的信息方便地进行储存、传递、阅读和可测定功能的可替换式的生物传感芯片，是指可替换式的传感器样品可以将污染的信息记录下来，对于不同的样品用不同的方式进行快速阅读与记录如：对于抗体抗原污染的测定可用如图 6 所示的免疫技术；对于有毒气体的测定可用其它技术如示意图图 4 所示。

6、根据权利要求 1 所述的微流体生物功能芯片微检测系统装置，在对污染环境中的气体、气車废气、液体、气溶胶化学分子、生物大分子、食品保存监控及风味鑑定、化学毒品、病毒、病原菌中的检测和临床医用药物的筛选中的应用。

7、根据权利要求 2 所述的可替换式生物传感芯片和生物传感器或/和根据权利要求 3 所述的微流体，在对污染环境中的气体、气車废气、液体、气溶胶化学分子、生物大分子、食品保存监控及风味鑑定、化学毒品、病毒、病原菌中的检测和临床医用药物的筛选中的应用。

一种微流体生物传感器芯片装置及应用

5

技术领域:

本发明属于生物传感器技术领域。具体的将涉及一种利用具有不同功能的生物芯片对环境不同污染源进行检测的微系统。利用本发明的检测系统可用于对环境中的化学分子（毒）气、生物大分子，如：病毒分子、病原菌等进行有效的检测。

10

技术背景:

城市居民有 70%的时间在室内度过，室内环境的条件对人们的健康有密切关系。而目前国内外对于环境污染的测定技术虽然有 HPLC、质谱等先进大型仪器，但是面对大量环境污染的测定来说，使用大型仪器不但成本高，而且测定的过程中同时产生大量有机废水的二次污染。因此，面对环境污染的样品浓度较低，数量巨大，而要求测定的技术要求高：即具有快速、灵敏、低成本已成为国际上高技术的难点问题之一。至今，国内外还未见有解决这一难题的技术报道。

15

20

发明内容:

基于对上述存在问题的考虑，本发明的目的在于提供一种有效、快速、灵敏、低成本的环境污染的测定技术，即创建了一种至今国内外还未见报道的微流体生物功能芯片的微检测系统装置，利用该微检测系统对环境中的化学毒品气、液体和生物大分子，如：病毒，包括对流行的 SARS 病毒、病原菌等污染可进行有效的检测。

25

本发明的微流体生物功能芯片的微检测系统装置是由生物功能芯片、传感器和微流体组成。其基本原理如下：当环境中有害分子（或病毒）结合到生物芯片后，该传感器可以将信息储存下来，并在特定的环

境中将储存的信息用物理等技术进行释放，其释放的信息与其受到污染的程度成正比关系,并可以高灵敏度方式将其方便地读写出来，从而完成对环境污染的测定。

5 本发明的微流体生物功能芯片的微检测系统装置可以用于解决环境污染测定关键问题，可使目前的环境检测达到一个新水平。

本发明的技术特征：

（一）本发明的生物芯片具备的功能有：（1）起固定支架功能；（2）功能分子的牢固固定功能；（3）在固定支架上具有功能分子固定的助剂；（4）维持生物分子的活性功能；（5）样品应用范围宽，适应性广，不需要预处理，使用方便，容易实现自动化；（6）它可以接受环境污染的信息，包括：化学有毒气体、液体、生物大分子、抗原病毒、气溶胶、病原菌以及生化武器等并将污染的信息方便地进行储存，传递，和阅读的功能。

15 （二）本发明的传感器的基本功能：过滤性吸水材料作为固定支架，并在该上面附有帮助功能分子牢固固定在支架的助剂。为了维持生物分子的活性功能，将过滤性材料装入一个夹层内，将含有功能分子的面为芯片的正面，朝待测的样品进口方向，背面与聚四氟乙稀滤片相组合。在功能生物芯片与聚四氟乙稀片双层之间充满溶液，目的为了保持生物传感芯片提供溶液，使该生物传感器芯片在一个连续的介质体系中（气，液，固界面）而保持其具有生理功能。在功能分子的芯片正面复盖由硝酸纤维微素滤片。生物传感器芯片可按样品测的对象不同而替换，如图 1 和图 5 所示。当污染样品气体或液体或抗原病毒分子及病原菌通过该芯片时，该芯片的功能分子可以按预先要求选择性地将待测分子结合在上面如抗原，受体，配体等，然后在特定的环境中将其释放与阅读，从而完成对环境污染的测定。样品测定整体示意图为图 3，图 5。

25 本发明将微流体与功能生物芯片两种技术组合在一起提供的一种方便，快速，灵敏的生物传感器芯片为核心技术的微检测系统装置，其特征在于是在其装置的微流体内安装有可替换式的生物功能芯片，和传感器三个主要部分组成：

(1) 生物功能芯片：固体支架由滤气吸水材料如：高分子材料，纤维素等，功能分子固定的助剂和功能分子的牢固定组成。在该固体支架的正面上涂有均匀的带正电荷分子如：多聚赖氨酸；或硝酸纤维素分子；Protein A 等有助于功能性分子在固体支架上牢固结合的帮
5 助剂，并与功能分子的牢固固定。固体支架正面为生物功能分子，该功能分子可以是蛋白质分子如：抗体；脂酶体；受体等，背面与另一聚四氟乙稀滤片相组合。并且在它们双层之间充满溶液，目的是为了保持生物功能分子提供溶液环境，使该生物传感器芯片在一个连续的介质气，固界面体系中而保持其具有生理功能。在功能分子的正面上复盖
10 一硝酸纤维素滤片。功能芯片的组装 kit 如图 1；图 3 和图 5 所示。

(2) 传感器的制备：在上述的滤气吸水材料上制备的功能蛋白质分子芯片称为生物传感器芯片，将该芯片装配成可替换式如图 5 所示：用双层夹芯材料封闭的口袋内装入上述芯片，双层夹芯材料由聚四氟乙稀薄膜，醋酸纤维素薄膜和硝酸纤维素薄膜（NC）和功能分子共同组成的称为传感器。显然，根据待检样品可以制备不同的传感器，可以制
15 备成为系列可替换式的传感器。按照本发明的上述技术制备的具有生物大分子不同生物功能的可替换式的传感器，对于技术领域的普通技术人员是可以实现的。

(3) 微流体的制备和传感器的连接：微流体用高分子材料（有机玻璃）作为材料制备如图 5 所示，在有机玻璃内的流道一侧与样品进口连接，另一侧为样品的出口孔道，在出口孔道的内部嵌入传感器。将
20 上述可替换式的传感器与微流体通道板封装在一起，传感器嵌入与微流体之间的连结用密封的橡胶圈，样品出口的连接一端连接微动力装置。微动力装置与缓冲室的连接分别用乳胶管连接如：图 5 所示。

25 (三) 传感器样品的测定：

上述可替换式的传感器样品可以将污染的信息记录下来，对于不同的样品用不同的方式进行快速阅读与记录：如对于抗体抗原污染的测定可用免疫技术；对于有毒化学气体的测定可用光物理技术如示意图图 4
30 所示。

如上所述的可替换式生物传感芯片、生物传感器和所述的微流体，

在对污染环境中的气体，液体、气溶胶等化学分子、生物大分子，如：病毒、病原菌检测中的应用。同时可以将该技术推广到其它化学毒品污染的测定，如气車废气，也可以开发应用在军事的毒性气体的监测，或是食品保存监控及风味鑑定上，和临床医用药物筛选。

5

附图说明：

图 1 生物传感芯片与微反应器的组装图：

1 芯片表面醋酸纤微素膜； 2 基底芯片（聚四氟乙稀滤片，直径 23mm）；
3 生物传感芯片 NC 膜（固定支架，功能分子和固定支架上具有功能分子
10 固定的助剂）； 4、5 微反应器组装次序；和微反应器组装后的影子图。

图 2 甲醛测定实验结果

C：为对照组； A：在甲醛空气污染环境组 10min.； B：为甲醛空气污
染环境组 20min.；

每个样品为 .10 个平均值；光照条件 150 W 卤素灯经聚焦后，距离样
15 品的 50 cm 处，照 1min.

图 3 样品测定流程图

A：样品（可以是液体或气体）； B：微流体与微反应器； C：为动力
源

A 与 B 或 B 与 C 的联结为普通医用胶管

20 图 4 弱光测定示意图

A：可见光源； B：生物传感器芯片； C：弱光测定仪

图 5 微流体与微反应器组装：

单位：mm 材料：有机玻璃 比例 1：1

（A）上部 （B）底部

25 1 气体进口； 2 微流体上部； 3 密封材料； 4 微反应器与组合生
物传感器芯片； 5 固定支架； 6 微流体底部； 7 为气体出口

A 与 B 的联接处用密封的橡胶圈，并用螺纹旋转密封。

图 6 流感病毒抗原测定（流体测定 A 图；气体测定 B 图）。

30 图 7 液体样品超声气化示意图： 1 进气口； 2 超声罩； 3 连接生物
传感器芯片和抽气装置； 4 样品雾化； 5 超声发生器头部； 6 超声仪。

具体实施方式:

为了更好的理解本发明的生物功能芯片传感器装置及具体检测，通过以下实施例予以进一步的解释，但列举的实施例并非是对本发明的
5 限定。

实施例:1 甲醛污染环境气体的测定:

基本原理: 在过滤性吸水材料(固定支架,用纤维素(1号)过滤纸,直径为6 mm),并在该滤片正面吸附有多聚赖氨酸(5ul/每片,多聚赖氨酸浓度0.01mg/ml)待干燥后,在90°C下烘三小时后,用光合作用复合物
10 体(Chromatophores)(蛋白质复合物)牢固固定在过滤纸上。为了维持光合作用复合物的活性功能,将过滤纸片材料装入一个夹层内,将含有功能分子的面为芯片的正面,朝待测的样品进口方向,背面与聚四氟乙稀滤片相组合。在功能生物芯片与聚四氟乙稀片双层之间充满溶液,目的为了保持生物传感芯片提供溶液,使该生物传感器芯片在一个连续的介质体系
15 中(气,液,固界面)而保持其具有生理功能。在功能分子的芯片正面复盖由硝酸纤维素滤片。功能芯片组装成为可替换式,如图1。当甲醛气体分子通过上述的功能芯片,甲醛分子与光合作用的蛋白(LH1-RC)中的氨基酸结合,该蛋白结合甲醛分子后的信息可以方便地进行储存,传递,并在光照的条件下该光合作用产生磷酸化作用(产生ATP),可用化学发光
20 方法测定,其产生的ATP能力与对照组成明显差别,从而完成对甲醛环境污染的测定。

(一) 光合磷酸化敏感材料载体

Chromatophores 制备:

(1) 光合细菌培养,光合细菌(*R.rubrum*, ATCC NO.11170)的培养与收获:菌的培养温度为 $28\pm 2^{\circ}\text{C}$,强光(4,000Lx)下培养5-7天,5,000g
25 离心收集沉淀,载体(Chromatophores)的提取样品用TS缓冲液(50mM Tricine-NaOH,pH8.0,0.25M 蔗糖,5mM MgCl_2)洗一次,然后再加入15ml的TS buffer悬浮后,加入1mg/ml的溶菌酶,在冰中孵育30分钟,超声10分钟, 4°C ,25,000g离心30分钟,保留上清.再将上清180,000g在 4°C 离心90
30 分钟,沉淀即为载体Chromatophores(称为光合磷酸化功能材料)。

(2) 上述光合磷酸化功能材料制备成生物功能芯片传感器：光合磷酸化材料 (Chromatophores) 约 10ul(蛋白浓度 5mg/ml)均匀分布在纤维素滤片 (6 mm 直径, 厚 0.1 mm) 并牢固地固定在一纤维素滤片中间, (该纤维素滤片预先用 0.01%多聚赖氨酸浸泡 2 小时后, 在 90 °C 维持 3 小时后), 然后加入聚四氟乙稀滤片组合的夹层之间, 并镶嵌在有机玻璃微管内可与微流体配合组装.

(3) 生物功能芯片传感器与微流体的组装如前所述, 见图 5 所示。

(二) 适合于室内空气/液体污染的微流体设计。

(1) 微流体的设计和制造:

10 A. 微流体的流程设计平面图: (图 3)

B. 基材的选择: 用高分子材料如 PMMA (有机玻璃) 具有透光性好、易加工、廉价等优点。

C. 生物功能材料的制备: 将纤维素片装有功能材料并夹在聚四氟乙稀膜之间并使复合夹层装入一个预先制备小池内, 该小池的直径为 15 30mm。(图 5) 在小池的背面装有一网状有机玻璃片作为固定功能材料用。

D. 选择微小型动力源联接微流体的最后接口, 功能材料复合夹层的放入和微流体之间的连结用密封的橡胶圈, 气泵和微流体之间的联接用普通医用胶管, 使室内气体 (或待测的气体, 液体) 从样品的进 20 口处进入通过芯片后从样品出口处流出。

(2) 微流体封装技术和研究光合磷酸化敏感材料与基底的连接技术: 选取 22 毫米直径的微流体, 上部与下底部的联接用螺纹固定, 中间用密封的橡胶圈。其与微流体通道封装在一起。用直径七个 6 毫米功能芯片组成 (图 1)。便于敏感材料复合夹层(Kit)的放入与气泵的联接。

25 (图 3; 图 5)

(三)弱光测定技术

弱光测定: 将功能芯片从微流体取回放入一小皿中, 并加入 Buffer(ATP 合成缓冲液: 50mM Tricine-NaOH (pH 8.0), 5mM MgCl₂, 4mM NaH₂PO₄, 15mM 葡萄糖, 5mM DTT.将离心的 Chromatophores 用上 30 述合成缓冲液悬浮) 加入 2mM ADP 后,用可见光照 1min.后立即加入中

断反应剂(然后加入十分之一体积的 4%TCA (三氯乙酸)终止反应),然后将样品加入荧光素酶 (Luciferase) 和荧光素 (luciferin) 1 μ mol/L,测 ATP 合成的量,用发光检测仪器进行。结果见图 3,当样品暴露在甲醛或空气中分别 10min.后光合磷酸化产生的 ATP 量分别为: 3500 nm 和
5 7000nm.样品十个平均值。并且其测定浓度与暴露在甲醛或空气中时间成正比,当暴露在甲醛时间为 20min.后光合磷酸化产生的 ATP 量分别为 1700nm 从图 3 明显显示本方法对甲醛气体灵敏的测定结果。

实施例 2: 流感病毒抗体抗原的测定

1. 材料: 流感病毒 A (shang hai/7/99) 流感患者中分离出,经
10 9~10 d 龄鸡胚尿囊腔接种增殖,所收获的新鲜尿囊液为实验用病毒。上述毒株在病毒培养液培养经接种 SPF 鸡免疫制备成该感病毒的多克隆抗体。

2. 芯片的预处理如下: NC 膜用 20%甲醇 20 mM 磷酸盐溶液 50mM pH 7.4 二小时浸泡后,用 20 mM 磷酸盐溶液 50mM pH 7.4 洗涤三遍,用 Protein
15 A 1mg/ml 100 ul 碳酸盐溶液 50mM pH9.6, 4 °C 过夜,加入多克隆抗体每孔 10ug 4 °C 过夜后,用 10% BSA 封闭过夜。

3. 荧光技术: 将芯片取出在荧光光谱仪上测定,测定条件: 激发 491nm, 发射 518 nm, 狭缝: Ex:3 nm; Em: 10 nm: 结果如下: 从流体
20 测定 图 6 A 或气体测定 6 B 流感病毒抗体抗原液体或气体测定可看到随抗原的稀释增加荧光信号降低。由此可证明本方法可以推广应用到病毒的抗体抗原测定。

测定过程如下: 分别在上述的预处理后芯片上加病毒抗原(病毒 HA)并稀释成(血凝单位): 4, 2, 1, 0.5 和 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 病毒粒子数。(图 5 中对应为: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)。室温微流体 5 分钟后(流速 1ml/
25 每分钟),用磷酸盐溶液 50mM pH 7.4 洗涤, 10 次,洗去非特异性物质后,加入用 FITC 标记的抗体,微流体室温 5 分钟后(流速 1ml/每分钟),用磷酸盐溶液 50mM pH 7.4 洗涤后,将芯片取出在荧光光谱仪上测定。对于流感病毒气体的测定用超声雾化装置(如图 7)该超声雾化的气体中的病毒立刻被抽滤到图 3 中的微流体内的预处理后芯片内,并特异性吸附,对于非特异性吸附用分子用磷酸盐溶液 50mM pH 7.4 洗涤, 10 次后,加入
30

- 后，加入用 FITC 标记的抗体，微流体室温 5 分钟后（流速 1ml/每分钟），用磷酸盐溶液 50mM pH 7.4 洗涤未结合的 FITC 标记的抗体，将芯片取出在荧光光谱仪上测定，测定条件：激发 491nm，发射 518 nm，狭缝：Ex:3 nm; Em: 10 nm: 结果图 6 A（或 B），流感病毒抗体抗原液体（或气体）
- 5 测定可看到随抗原的稀释增加荧光信号降低。由此可证明本发明可以推广应用到病毒的抗体抗原测定。

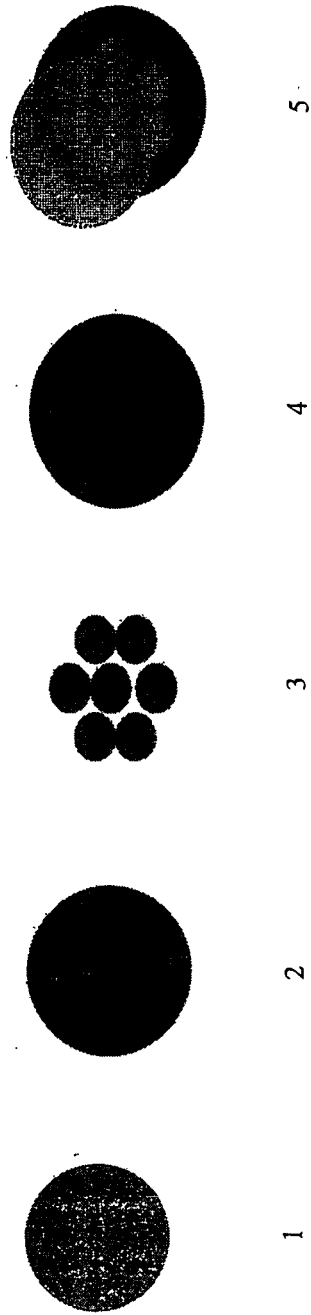


图 1

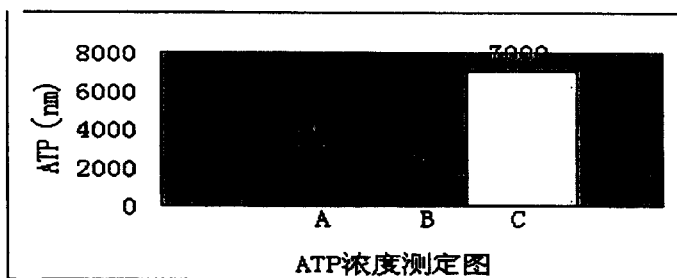


图 2

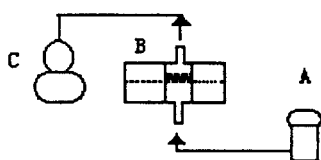


图 3

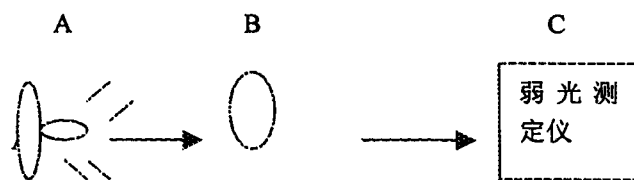


图 4

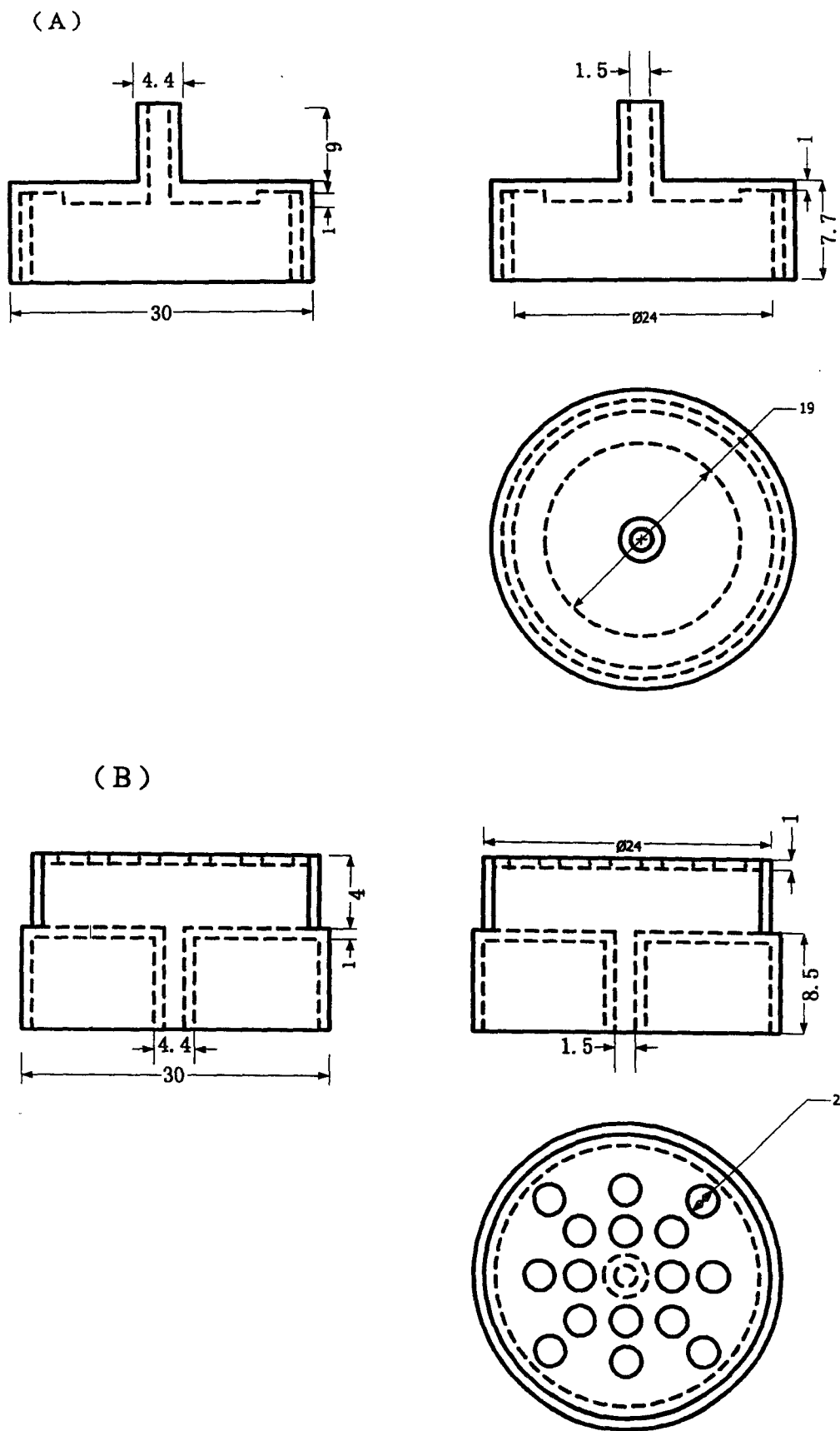


图 5A

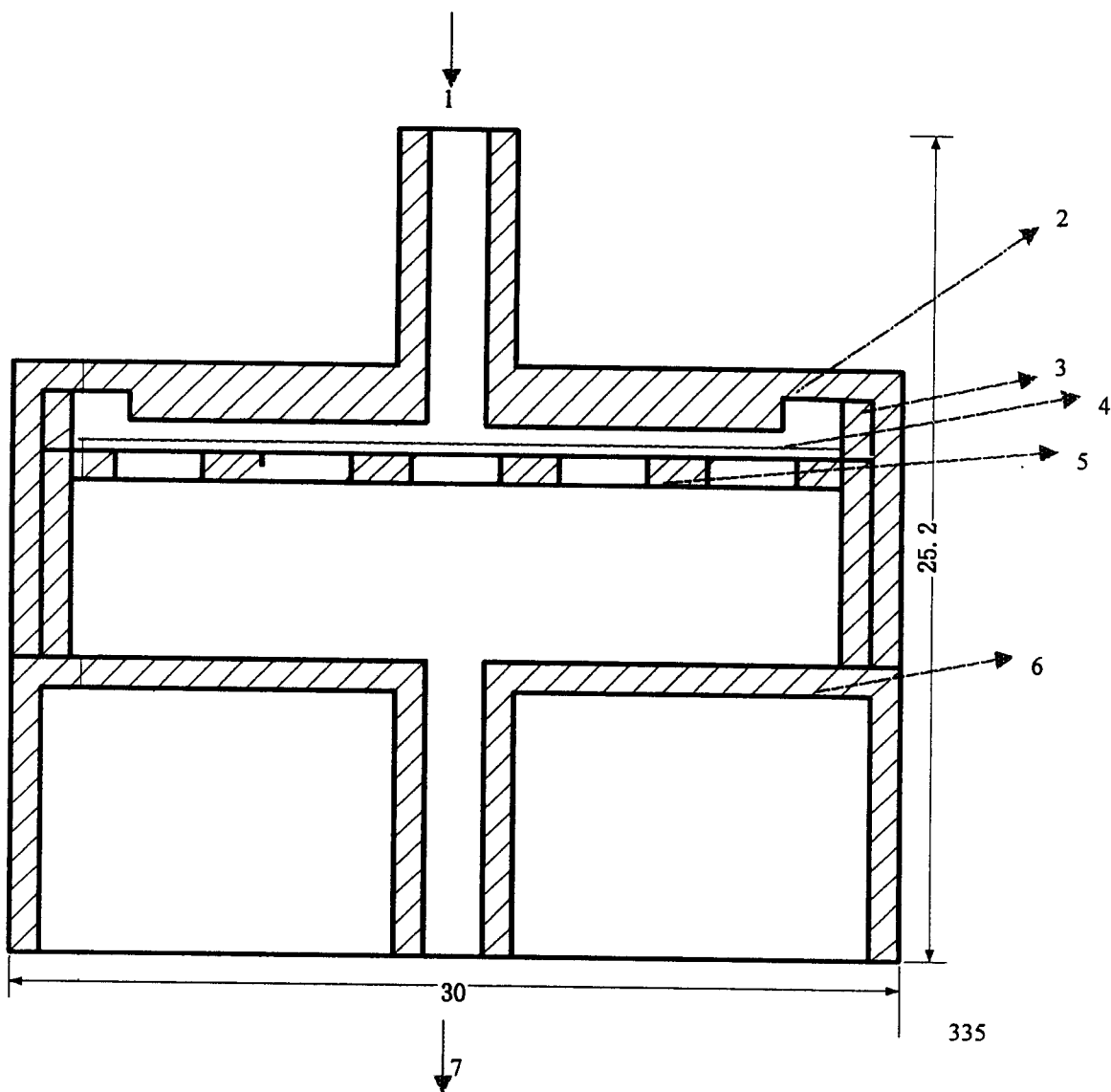


图 5B

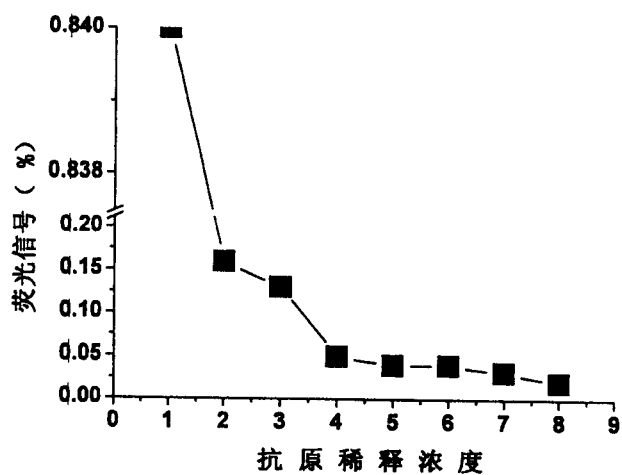


图 6 A

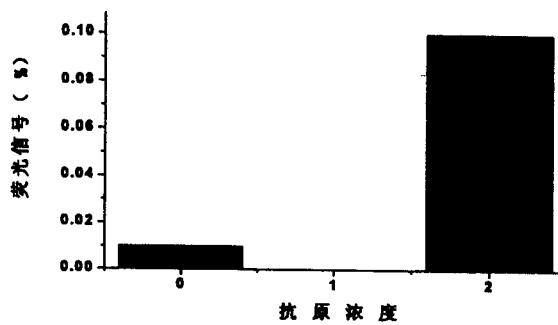


图 6 B

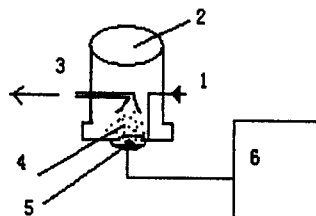


图 7