交流电场增强的牛副结核快速血清免疫检测

李姗姗^①, 任玉坤^{①③*}, 刘晓竹^②, 侯珍秀^①, 姜洪源^{①*}

① 哈尔滨工业大学机电工程学院, 哈尔滨 150001;

② 重庆大学光电工程学院, 重庆 400044;

③ 浙江大学流体动力与机电系统国家重点实验室, 杭州 310027

* E-mail: rykhit@hit.edu.cn; jhy_hit@hit.edu.cn

收稿日期: 2013-08-28; 接受日期: 2013-10-08

国家自然科学基金(批准号: 11372093)和浙江大学流体动力与机电系统国家重点实验室开放基金(批准号: GZKF-201107)资助项目

摘要 人/动物发病初期的免疫检测在疾病诊断和防治领域具有重要意义。发病初期病患血清中抗体浓度较低, 而传统检测方法单纯依靠抗体自身的随机运动使之与抗原结合发生特异性免疫反应, 需要数小时甚至更长的时间才能识别出阳性血清, 不利于疾病的快速诊断。因此加快对血清中低浓度抗体的检测速度是提高临床诊断效率的关键因素。本文提出基于交流电热和介电泳技术的血清中低浓度抗体快速检测的新方法, 搭建“硅基底非对称平行电极阵列-PDMS 微通道”微流控测试平台, 以牛副结核为例, 通过对免疫反应过程中“电极/血清”界面双电层电容的实时测量, 以单位时间内电容的相对变化率为指标, 成功分辨出阴性和阳性血清, 检测时间仅为 2 min。结合交流电场下微流体的流动和可极化粒子的介电泳理论, 分析了免疫反应加快的机理。交流电场加速了微通道内抗体分子的对流和传质, 大幅度提高了免疫反应效率, 结合免疫反应方程, 给出了免疫检测过程中微通道内抗体浓度变化的数值仿真, 在理论上证明了快速血清免疫检测新方法的可行性。

关键词

快速免疫检测

双电层

交流电热

介电泳

1 引言

近年来爆发的全球性大规模传染性疾病, 如口蹄疫、传染性非典型肺炎(Severe Acute Respiratory Syndromes, SARS)、血球凝集素第 7 型-神经氨酸酶第 9 型病毒(Hemagglutinin 7 Neuraminidase 9, H7N9)等给人类的生命财产安全带来巨大损失, 同时也对疾病的快速诊断提出了更高要求。然而, 目前疾病检测的高效性、准确性是其发展中的瓶颈。因此, 面向疾病快速检测的相关基础理论和应用研究刻不容缓。免疫检测是疾病诊断和抗体检测的重要手段之一,

该技术以免疫学反应为基础, 将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合的一种敏感性很高的检测技术。由于病患血清中阳性抗体含量通常高于正常值, 所以通过对血清中阳性抗体浓度水平的定量检测是疾病诊断的重要依据。但是, 病患发病初期阳性血清中抗体的浓度较低, 所需检测时间较长, 如目前的肺结核抗体检测一般需耗时约 6 h^[1], 严重影响了疾病诊断效率。因此, 实现检测的快速化是传统血清免疫检测和疾病早期诊断面临的重大难题^[2]。

自然的免疫反应依靠一种分子表面特异性可逆

引用格式: 李姗姗, 任玉坤, 刘晓竹, 等. 交流电场增强的牛副结核快速血清免疫检测. 中国科学: 技术科学, 2014, 44: 219–228

Li S S, Ren Y K, Liu X Z, et al. AC electric field enhanced rapid serum immunoassay for Johne's Disease (in Chinese). Sci Sin Tech, 2014, 44: 219–228, doi: 10.1360/092013-970

的弱结合力进行, 这种结合力只能在极短的距离内才能产生. 发病初期病患的血清中抗体的浓度较低, 单纯依靠抗体自身的随机运动使之与抗原结合发生特异性免疫反应, 需要较长时间, 这是传统的检测方法需要数小时甚至更长的时间才能识别出阳性抗体的根本原因^[3]. 典型的免疫检测过程为: 在固相载体的表面包被一层抗原, 加入阳性/阴性血清, 阳性血清中的抗体与固相表面的抗原结合, 改变了固相表面的物质成分, 而阴性血清中不含抗体或含量甚微, 不会改变固相表面的物质分布. 通过检测固相表面物质的变化, 可以判断血清的阳性/阴性. 检测固相表面物质变化的手段多种多样, 若用荧光检测方法判定血清的阳性/阴性, 则需采用有荧光标记的抗体, 如酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[4], 此方法需要数小时才能使底物显色. 核酸聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增技术可以使目标检测物个数呈指数级增长, 在一定程度上可以缩短检测时间和提高灵敏度, 但不适用于对抗体类物质进行扩增^[5], 因此本文力图寻找针对抗体的快速浓集方法. 若用电化学阻抗法^[6,7]检测阳性/阴性血清, 则无需任何特殊标记处理, 检测的灵敏度和特异性也取得了令人满意的结果, 但检测时间长的问题仍未解决. 针对临床上对疾病早期快速诊断的迫切需求^[8,9], 本文开展对血清快速免疫检测的研究, 具有重要的现实意义.

基于微电极阵列和聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)微通道的微流控芯片技术具有快速高效、节省试剂和易于集成等优点, 极大满足了现代疾病诊断和免疫检测对检测分析速度、便携性和自动化程度等方面的要求^[2,10], 成为当前生命医学、细胞生物学、仪器等领域的研究热点. 微通道内流体的雷诺数很低, 流体流动属于层流, 流体在微通道内的传质扩散效应强于对流^[11], 会在一定程度上促进特异性免疫反应的进行. 如果层流受到扰动, 对流得到加强, 也会促进免疫反应加快. 新兴的微流体驱动技术可以实现抗体分子在微通道内的连续输送, 在加快抗体扩散速度方面独具优势. 通过加强微通道内流体的对流和定向扩散, 将抗体持续不断的输送到抗原附近, 可以促进免疫反应的加快. 研究表明, 流体在交流电场的作用下, 可以产生局部漩涡或宏观流动^[12-16], 这为对微通道内层流的扰动和对流的加强提供了可能.

交流电场作用下流体的流动有两种机制: 一是基

于电极/溶液界面的双电层, 在电场力作用下电极表面反向电荷定向移动, 具有黏滞效应的流体因此沿壁面定向流动, 称为交流电渗流(alternating current electroosmosis, ACEO), 适于 10 kHz 频率下电导率低于 1 mS/m 的流体. 二是基于流体的焦耳热和由于尺度小带来的显著温度梯度而产生的交流电热流(alternating current electrothermal, ACET), 适用于交流频率 100 kHz 以上且电导率大于 100 mS/m 的流体^[17]. 血清、组织液等人体的生理液, 电导率约为 1.64 S/m, 双电层被极度压缩, 交流电渗技术难以驱动. 高电导率的血清经过去离子水高倍稀释可以达到极低的电导率, 在低频电场下的双电层效应明显, 可以形成稳定的交流电渗流. 研究表明, 在交流电渗流的带动下, 血清中的低浓度抗体随流体富集到电极表面^[16], 极大地增加了电极局部位置抗体的浓度, 可以实现交流电渗增强的快速免疫检测. 但此方法存在两个不足: 1) 需要对血清进行高倍稀释(1000 倍以上), 样品预处理过程耗时. 2) 在对血清进行高倍稀释的过程中, 血清中抗体的浓度也相应减少, 限制了抗体浓度的检出下限.

针对交流电渗增强的快速免疫检测技术的不足和血清自身高电导率的特点, 提出基于高电导率流体的焦耳热效应产生的交流电热流来促进免疫反应的方法. 交流电热流的流速大小和流体电导率成正比, 与电场强度的 4 次方成正比, 提高流体的电导率与交流电场电压幅值可以提高交流电热的流速^[17]. 利用交流电场对溶液中可极化粒子(如细胞、蛋白质等)的介电泳(dielectrophoresis, DEP)技术, 可实现粒子在微通道内的聚集/分离/筛选等^[17], 尤其是对粒子的聚集效果可迅速提高粒子的局部浓度, 是快速免疫检测的新手段.

目前国内外学者对于微流体在交流电场下的特殊效应的理论和实验研究已经取得了诸多成果^[18-21]. 利用微流控平台开展免疫检测的研究也是近几年新的研究热点^[10,22-25], 但将两者结合, 充分发挥微流体在交流电场下的 ACEO/ACET/DEP 效应, 在微流控平台进行快速免疫检测基础理论和实验的系统研究才刚起步. 本文首先以牛副结核血清免疫检测为例, 给出交流电场增强的快速免疫检测实验, 然后结合实验结果和 ACET/DEP 理论, 对免疫检测过程中微流体的传质和扩散进行了数值分析, 探讨促进免疫反应加快的主要影响因素, 为后续定量检测和实验参数的优化提供了理论依据.

2 实验材料及实验方法

2.1 实验设备和样品制备

实验采用硅基底镀金非对称平行电极阵列作为检测电极, 电极阵列尺寸为 5-5-25-25 μm , 即窄电极宽 5 μm , 宽电极宽 25 μm , 电极间距 5 μm , 相邻电极对间距 25 μm , 电极厚度 100 nm. 用软光刻工艺加工 PDMS 微通道(通道宽 500 μm , 高 40 μm , 长 1 cm). 搭建好的电极-微通道系统如图 1 所示. 电极/溶液界面的实时电容曲线由高精度阻抗仪(安捷伦 4294 A, 美国)读取: 阻抗仪通过 LAN 口与计算机 Transfer V3.0 程序通信, 记录阻抗/电容数据.

以牛副结核(Johne's Disease)疾病的血清免疫检测为例, 在图 1 所示微流控芯片上进行快速异相免疫检测实验. 致病抗原 MAP(multiple antigen peptide)按照文献所述方法提取^[4], 将血液置于浓度为 10%的 OADC(oleic acid-albumin-dextrose-NaCl)中培养并添加 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 Mycobactin J 灭菌剂(Allied Monitor, 美国). 保持 37°C 静置一段时间直到 600 nm 波长照射光密度达到 0.7. 然后以 2600 $\times g$ 进行离心处理 10 min. 吸取澄清的液体滴加到 80%浓度的乙醚, 室温下搅匀. 2 min 之后再以 2600 $\times g$ 进行离心处理 10 min. 将得到的溶液和 100%乙醚按照体积比 1:80 稀释后得到的溶液作为实验所需的抗原试剂. 阳性血清来自 10 头雌性奶牛(Holstein 农场, 平均年龄 2.8 岁), 分别通过细菌培养和 ELISA 方法确诊奶牛血清为阳性. 阴性抗体来自其他 10 头确诊阴性的雌性奶牛(田纳西 Holstein 农场, 平均年龄 2.4 岁). 缓冲液采用稀释 10 倍之后的磷酸盐(phosphate-buffered saline, PBS)溶液, 记做 0.1 $\times$ PBS. 其 pH 为 7.0, 含有 15 mmol/L 的 NaCl 和 1 mmol/L 磷酸盐, 电导率约为 174 mS/m. 添加 0.5%体积的 Tween 20(Fisher Scientific, 美国), 配制 0.1 $\times$ PBST 溶液用来冲洗通道. 在 0.1 $\times$ PBST 中添加 10% 体积的 Super Block(PIERCE Biotechnology, Rockford, 美国)配制 0.1 $\times$ Buffer B 溶液, 用来对原始血清进行稀释(体积比 1:20, 1:40 等).

2.2 实验方法和步骤

依次用丙酮、酒精和去离子水清洗硅基底金电极芯片, 接着用 N_2 吹干备用. 软光刻法制作 PDMS 微通道, 并将其置于硅芯片电极阵列正上方, 再用导电

胶带引出电极, 实验装置如图 1 所示. 实验过程中要确保微通道无泄漏, 电极连接良好.

在进样口滴加 MAP 抗原 5 μL , 电极上方的微通道内充满了抗原溶液, 多余溶液流经检测电极表面进入废液池, 室温下保持 30 min, 完成抗原在电极表面的包被. 滴加 5 μL 的 0.1 $\times$ PBST 冲洗微通道 2~3 遍, 去除多余抗原以减少非特异性反应和测量过程中的噪声. 然后滴加 5 μL 的 0.1 $\times$ Buffer B 并在室温下保持 30 min, 用以阻断后续滴加的血清中的抗体聚集到未被包被的电极区域影响电极表面的双电层电容, 来提高检测的特异性. 接着滴加 5 μL 的 0.1 $\times$ PBST 冲洗微通道 2~3 遍, 最后滴加滴加 5 μL 的待测血清, 利用阻抗仪对电极/血清界面的阻抗和双电层电容进行实时测量. 测量电压为 500 mVrms, 测量频率 100 kHz, 测量时间为 120 s.

按照上述实验步骤完成预实验, 实验重复 3 次, 分别得到电极/血清界面双电层电容随时间的变化规律. 然后对全部 20 种血清(阴性阳性各 10 种)逐一进行测试, 分别得到双电层电容的变化率, 并根据电容变化率的大小来判别血清是否呈副结核阳性.

3 实验结果

3.1 预实验: 阴/阳性血清对比

以某牛阳性血清(用 0.1 $\times$ Buffer B 按 1:20 倍稀释)为例, 按照标准实验步骤进行预实验, 得到 120 s 内归一化双电层电容(C/C_0)随时间变化的曲线, 如图 2(a)所示. 图 2(a)中阴性血清作为血清参照组, 0.1 $\times$ Buffer B 作为环境溶液参照组, 与阳性血清进行对比, 每组实验重复 3 次, 参照组与阴性血清双电层电容基本保持不变, 而阳性血清组双电层电容随时间呈线性减小趋势. 图 2(b)给出了单位时间内双电层电容的变化率, 环境溶液参照组 0.1 $\times$ Buffer B 双电层电容的变化率约为 0.24%/min, 说明环境溶液双电层的变化率极小; 免疫检测过程中阳性血清对应双电层的变化率可达-4.45%/min, 双电层电容明显减小. 阴性血清采用副结核阴性牛血清, 检测过程中双电层电容无明显变化. 此外, 为表征检测的特异性, 以人肺结核阳性血清为特异性参照组, 得到特异性参照血清对应的双电层变化率仅为-0.36%/min, 说明人类肺结核阳性抗体未与牛副结核 MAP 抗原发生特异性免疫反应, 检测方法具有显著的特异性.

由于电极阵列本身的差异、抗原的包被情况和免疫检测过程中的人为因素, 微型免疫传感器稳定性和一致性会受到干扰, 因此预实验中血清电容初始值略有不同. 环境溶液参照组, 阳性血清和阴性参照血清的初始电容值 C_0 分别为 $(10.913 \pm 0.047) \text{ nF}$, $(3.954 \pm 0.591) \text{ nF}$ 和 $(9.799 \pm 0.001) \text{ nF}$, 以阳性血清的初始值为最小. 在检测过程中, 阴性血清和参照组双电层电容随时间基本保持不变, 而阳性血清在检测过程中双电层电容随时间呈近似线性减小. 这是由于

图1 实验用芯片与微通道

(a) 芯片与微通道实物; (b) 微电极阵列

图2 牛血清免疫检测预实验结果

(a) 归一化电容随时间的变化; (b) 检测的特异性

免疫反应过程中阳性抗体被结合到电极表面的抗原上, 致使双电层厚度增加, 从而引起电容值减小.

采用最小二乘直线拟合的方法得到单位时间内阳性血清双电层电容的变化率 dC/dt 来表征免疫反应的速度和血清中阳性抗体的含量^[26]. 为消除电容初始值对结果的影响, 对电容变化率进行归一化处理, 用拟合直线的斜率与该直线初始值 C_0 的比值 $dC/dt/C_0$ 来衡量特异性免疫反应的速度. 阳性/阴性血清组和参照组实验结果如表1所示, 环境溶液参照组和阴性血清组电容变化率远小于阳性血清组. 实验表明, 此方法可以快速(检测时间仅 120 s)区分阳性血清与阴性血清, 且简单快捷, 具有特异性进而可重复性.

特别值得指出, 该检测过程耗时仅 120 s, 而传统检测则需数小时以便足够多的阳性抗体与抗原发生特异性免疫反应时才能测出电容的变化.

3.2 频率和抗体浓度对实验结果的影响

保持其他实验条件不变, 只改变交流电场的频率, 得到同一阳性血清双电层电容变化率随频率的变化曲线, 如图3所示.

阴性血清参照组的双电层电容基本保持稳定, 基本不超过 0.5%/min. 而阳性血清的双电层变化率在各个频率下差异显著, 在 100 和 300 kHz 时电容的变化率最大, 100 kHz 频率下可达 -6.34%/min 左右. 而在 30 kHz 以下和 1 MHz 以上的频率, 双电层电容变化缓慢. 在 1 MHz 以上的电容敏感频段, 测量噪声稍大.

图4给出了不同抗体浓度下电极/溶液界面双电层电容变化率. 原始浓度血清中 IgG 免疫球蛋白含量为 10~20 mg/mL(约 1 mM), 血清中含有大量血清蛋白干扰实验结果, 1:20 倍稀释具有较好的可检测性^[13], 此浓度下双电层变化率可达 -5.24%/min. 随着血清稀释倍数的增加, 双电层电容的变化率减小, 可检出的浓度下限约为 1:100 倍稀释, 即 100~200 ng/mL(约 10 nM), 远小于血清中抗体含量, 此方法可用于快速免疫检测. 此外, 可通过提高电场强度、电极表面修

表1 血清免疫检测预实验结果

溶液类别	电容初始值 (nF)			电容变化率 (%/min)
参照溶液	10.93	10.97	10.84	-0.2419±0.3413
阳性血清	4.804	3.134	3.925	-4.453±0.4804
阴性血清	9.799	9.800	9.798	0.05529±0.04694

图 3 频率对电容变化率的影响

图 4 血清浓度对检测结果的影响

饰等方法得到更低的检出下限。

3.3 检测方法的稳定性和可重复性

快速免疫检测新方法的稳定性和可重复性尤为重要。图 5 分别给出了不同检测芯片上同一阳性血清(来自同一病牛), 和不同检测芯片上不同阳性血清(来自不同病牛)的检测结果。图 5(a)和(b)中阳性血清双电层电容变化率分别为 $(-4.779 \pm 0.6078)\%/min$ 和 $(-4.9676 \pm 0.6794)\%/min$, 其各组数据 CV(coefficient of variation)值分别为 12.7% 和 12.4%, 表明交流电场增强的牛副结核快速血清免疫检测方法具有稳定性和可重复性。

针对前述全部 10 种阴性血清和 10 种阳性血清, 分别得到 120 s 内双电层电容的变化率, 如图 6 所示。检测过程中阴性血清的双电层电容变化率的平均值为 $(-0.0338 \pm 0.04235)\%/min$, 明显小于阳性血清的电

图 5 检测结果的可重复性

(a) 同一血清在不同芯片; (b) 不同血清在不同芯片

图 6 多组牛血清的免疫检测结果

容变化率 $(-3.608 \pm 0.4208)\%/min$, 由此可以区分测试血清的阳性和阴性, 进行基于血清的快速疾病诊断。各组阳性血清的电容变化率略有不同, 反映了各组血清中阳性抗体的含量差异。电容变化率的大小可以反映出阳性血清中含有抗体的浓度水平, 后续工作中将以此为依据, 开展对血清中阳性抗体的浓度水平进行定量检测的研究。

4 快速免疫检测机理的探讨

4.1 免疫反应过程中的双电层

与传统的 ELISA 和电化学阻抗检测手段相比,

本文提出的利用交流电场下微流体特有性质的快速血清免疫检测方法在检测时间上具有明显优势, 本节结合血清免疫检测的基本原理, 探讨促使免疫反应加快的机理. 图 7 给出了典型的血清免疫反应过程中电极表面双电层的变化. 在固液两相物质的界面上, 由于离子吸附作用, 正负电荷带电离子会在电极表面分别排列成面层^[17,27], 如图 7(a)所示, 液相待检测物待测血清与金属电极之间的带电面会产生成为双电层, 其厚度取决于血清溶液和电极的属性, 由公式 $\lambda_d = \sqrt{D\varepsilon_f / \sigma_f}$ 给出, 其中 $D, \varepsilon_f, \sigma_f$ 分别为血清的扩散系数、介电常数和电导率. 假设抗原抗体的高度分别记为 d_{ag} 和 d_{ab} , 则由电容公式 $C = \varepsilon S / d$, 图 7(a)~(c)中裸电极、覆盖抗原和添加抗体之后的双电层的电容分别为 $C_0 = \varepsilon_f S_0 / \lambda_d$, $C_1 = \varepsilon_f S_1 / (\lambda_d + d_{ag})$ 和 $C_2 = \varepsilon_f S_2 / (\lambda_d + d_{ag} + d_{ab})$, 显然在免疫反应过程中, 电极表面的微观形貌和表面物质发生了变化, 双电层的厚度亦发生了显著改变, 电容数值随之变化. 因此, 可以通过测量双电层电容的变化来研究电极表面的特异性免疫反应.

从实验结果可以看出, 交流电场增强的血清快速检测时间仅为 2 min. 快速检测的实现得益于交流电场下微流体的特殊行为, 微电极阵列提供的高强度非均匀电场和微通道的尺寸效应促进了免疫反应的快速进行: 1) 微通道内部流体的对流和传质加快了抗体在通道内向电极附近的抗原扩散; 2) 正介电泳力将更多的抗体分子带到电极表面. 在流体输送和介电泳力富集的作用下, 单位时间内能有更多抗体和包被在电极表面的抗原结合, 如图 8 所示. 因此, 交流电场致微流体的流动和抗体分子的正介电泳力可能是促使免疫反应加速的源动力.

4.2 对流扩散及介电泳力对免疫反应的促进

如前所述, ACEO 和 ACET 是交流电场致流体流动的主要形式. 其中 ACEO 的流速主要取决于双电层的 zeta 电势 ζ . 前期研究表明, 电极表面微观形貌影响 ACEO 的流速^[28], 考虑电极表面微观形貌影响, 微通道内的时间平均 ACEO 流速为

$$\langle u \rangle = -\frac{\varepsilon \zeta' \text{Re}[\mathbf{E}_t^*]}{2\eta} = \frac{\delta \sigma_q \text{Re}[\mathbf{E}_t^*]}{2\kappa' \eta}, \quad (1)$$

其中 $\kappa' = 1/\lambda_d'$ 为修正后等效双电层厚度的倒数, $\mathbf{E}_t^*$ 为交流电场强度的切向分量, η 为流体的黏度. 本实

图 7 免疫反应过程中双电层的变化
(a)裸电极; (b)抗原包被之后; (c) 特异性免疫反应之后

图 8 ACEK 粒子聚集
(a) 流体致粒子聚集; (b) 正介电泳粒子聚集

验中所用的 1:20 倍稀释血清的电导率约为 174 mS/m, 根据实验条件设置 ACEO 的电场、流场控制方程和边界条件^[28]. 数值计算表明, ACEO 流动速度非常微弱, 局部最大流速仅为 0.1 nm/s 数量级, 因此得出结论, 本实验中的电导率和电场(500 mVrms, 100 kHz)情况下, ACEO 不是促进免疫反应的加快的主要因素.

当电流通过导电性有限的固体或流体时, 材料会发生电阻性损耗, 电能转化为热能, 对于微通道中的流体, 虽然由焦耳热效应导致的绝对温升数值不大, 但在微米尺度下会产成显著的温度梯度, 高电导率流体的 ACET 正是利用了这一尺寸效应来驱动流体形成稳定的交流电热流^[17]. ACET 流速取决于流体在交流电场焦耳热作用下产生的电热体力 F_{et} , 和流体的电导率 σ_f , 电场强度 E , 电场频率 ω , 导热系数 k , 以及流体温度 T 等因素.

$$F_{et} = -0.012 \cdot \nabla T \cdot \sigma_f |E|^2 / [1 + (\omega \tau)^2] + 0.001 \cdot \nabla T \cdot \sigma_f |E|^2. \quad (2)$$

对于温度场 T , 由能量守恒定律和焦耳定律得

$$k\nabla^2 T + 0.5\sigma_f |E|^2 = 0. \quad (3)$$

另外, 微观流体的雷诺系数 $Re = \rho u d / \eta$ 远小于 100, 流体满足 Naiver-Stokes 方程^[29],

$$\rho \partial u / \partial t + \rho (\nabla \cdot u) u - \eta \nabla^2 u + \nabla P = F_{\text{et}}. \quad (4)$$

按照实验中电极和微通道尺寸建立仿真的几何模型, 图 9 给出了 ACET 流场仿真模型和边界划分示意图. 电场、流场、温度场和浓度场的控制方程和边界条件设置如表 2 所示, 用 Comsol Multiphysics 有限元多物理场耦合软件对两对非对称电极进行耦合求解, 可以得到微通道内温度场和 ACET 流场的分布. 本条件下微通道内电极表面 ACET 最大流速可达 4.5 $\mu\text{m/s}$ 以上, 血清沿电极表面有显著的流动, 流向为从窄电极流向宽电极, 可见 ACET 的定向流动是促进免疫反应加快的主要原因之一.

ACET 流速仅取决于流体电导率、电场强度等因素, 和交流电场频率无关. 从图 3 的实验结果可以看出, 双电层的变化率受频率影响极大. 因此, 除 ACET 流动之外, 促进免疫反应加快的还有其他因素. 根据介电泳理论, 流体中极化粒子的介电泳力受电场频率影响. 由此推断, 介电泳力是促进免疫反应加快的主要原因之二.

阳性血清中的抗体作为一种可极化的粒子, 在交流电场作用下会产生极化偶极矩而受到介电泳力的作用^[27], 介电泳力 F_{DEP} 和速度 u_{dep} 满足,

$$F_{\text{DEP}} = 2\pi\epsilon_m a^3 \text{Re} \left[\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right] \nabla |E|^2 = 6a\eta u_{\text{dep}}, \quad (5)$$

其中 ϵ , σ 分别是介电常数和电导率, 下标 m 和 p 分别代表溶液和粒子, a 为粒子半径, $\text{Re}[\]$ 表示取实部运算, $\epsilon^* = \epsilon - j\sigma/\omega$ 是介电常数的复数形式, ω 为交流电场频率, $j = \sqrt{-1}$ 为虚数单位, E 为电场强度. η 为流体黏度. 抗体在 DEP 作用下的最大运动速度发生在电极边缘处, 最高可达 22 $\mu\text{m/s}$.

低雷诺数流体若无外加扰动, 流体始终保持层流状态, 传质过程以扩散为主. 扩散速度 D/h 约为 0.25 $\mu\text{m/s}$, 其中 D 和 h 分别为扩散系数和通道高度. 无外加电场时血清属于层流, 其中的抗体分子在微通道内自然扩散^[29], 抗体浓度 c 满足

$$\partial c / \partial t = D \nabla^2 c. \quad (6)$$

在交流电场的作用下, 微通道中血清的层流状

图 9 仿真模型示意图和边界划分

表 2 多物理场耦合控制方程和边界条件设置

物理场	控制方程	边界条件
电场	$0.5\sigma_f E ^2 = Q$	1,2: $\pm V/2$; 3~8: 绝缘; 6,7: 对称
流体场	方程(4)	1~5, 8: $u=0$; 6,7: $P=0$, 对称
温度场	方程(2) $k\nabla^2 T + Q = 0$	1,2: $T_0=300$ K 3~5: $Q=k_{\text{si}}(T-T_0)$; 6,7: 对流与辐射; 8: $Q=k_{\text{pdms}}(T-T_0)$
浓度场	方程(7)	1~5: 见方程(8)~(9); 6,7: 对流与传质; 8: 隔绝

态受到周期性扰动, 在电极附近会产生漩涡, 流体的宏观流动或局部漩涡都会促进血清中抗体的扩散; 抗体分子在正介电泳力作用下聚集到电极边缘, 流体的流动与抗体分子的正介电泳力综合在一起, 加快了传质过程的进行. 考虑到促进免疫反应加快的两个主要原因 ACET 流动和 DEP 运动^[30], 微通道内抗体的浓度满足

$$\partial c / \partial t + (u_{\text{ac}} + u_{\text{dep}}) \nabla c = D \nabla^2 c, \quad (7)$$

其中 u_{ac} 为交流电场下流场的 ACET 速度. 在 ACET 和 DEP 的带动下, 血清中的抗体被快速输送到包被了抗原的电极表面, 阳性血清中的抗体与电极表面的抗原相遇, 就会发生特异性免疫反应, 两者结合形成“抗原-抗体”复合体. 假设抗原抗体结合比例为 1:1, 则电极表面发生免疫反应的抗体的浓度 B 和微通道中抗体的浓度 c 满足^[15]

$$\partial B / \partial t = k_{\text{on}} c_s (c_0 - c_s) - k_{\text{off}} B, \quad (8)$$

$$\partial c / \partial t = D \nabla^2 c + k_{\text{on}} c_s (b_0 - c_s) - k_{\text{off}} c, \quad (9)$$

其中 k_{on} , k_{off} , c_s , b_0 分别是抗原-抗体结合系数, 抗原-抗体分离系数, 到达电极表面的抗体浓度, 和电极表

面抗原初始浓度.

4.3 免疫反应过程仿真结果

如前所述, 免疫检测过程中微通道内部待检测血清中阳性抗体的浓度变化受交流电场的影响. 图 10(a)中, 电极阵列不施加交流电信号, 血清中的抗体在自然扩散和电极表面抗原的特异性吸附的作用下, 随时间逐渐靠近电极表面并与抗原结合, 导致微通道内部抗体的浓度平稳降低, 浓度场呈现层流形式. 图 10(b)为在 ACET 的作用下血清中抗体的浓度变化, 扩散会随着流体的对流而加强, 原有的层流分布被打破, 浓度场呈现波浪式分布. 比较图 10(a)和 (b), 两种情况下微通道内抗体的最高浓度均为抗体的原始浓度 1 fmol/m^3 , 但后者浓度最低为 9.06 amol/m^3 ,

为前者 9.966 amol/m^3 的 91%, 说明在 ACET 作用下抗体的消耗更快, 免疫反应的速度有一定的提高. 考虑抗体在非均匀电场中受到的正介电泳力作用, 图 10(c)给出了介电泳力作用下抗体的浓度分布. 通道内局部浓度最高值可达到 32.98 fmol/m^3 , 为初始浓度 1 fmol/m^3 的 33 倍, 可见介电泳对抗体的聚集作用非常明显, 能显著提高免疫反应的速度. 注意到微通道中局部抗体浓度最低值呈现负数, 这表明电极表面的抗原不足以与局部的高浓度抗体匹配, 导致局部抗原相对不足, 进一步说明了正介电泳力的聚集作用对免疫反应的强力促进. 为了更加明显的看出电极表面免疫反应过程中抗体浓度的分布, 图 10(d)以对数形式给出了微通道内抗体浓度场, 可见免疫反应最强烈的区域集中在靠近电极上方约 $5 \mu\text{m}$ 以

图 10 不同时刻待检测溶液内阳性抗体的浓度场分布

(a) 自然扩散; (b) ACET 对免疫反应的促进; (c) DEP 对反应的促进-线性形式; (d) DEP 对免疫反应的促进-对数形式

内的狭长区域, 其中又以电极边缘处最强, 这正是正介电泳力最强的区域, 从理论上验证了交流电场增强的快速血清免疫检测新方法的可行性. 对比无交流电场时的自然扩散($0.25 \mu\text{m/s}$)、有交流电场时 ACET($4.59 \mu\text{m/s}$), DEP($22 \mu\text{m/s}$)情况下的抗体在微通道内对流与扩散速度, 可知由于交流电场下 DEP 和 ACET 效应导致的速度远大于自然扩散的速度, DEP 和 ACET 为免疫检测速度的加快做出了主要贡献.

5 结论与展望

人/动物血清中抗体的浓度水平是免疫检测疾病诊断的重要依据. 在异相免疫反应过程中, 电极/血清界面的双电层厚度会随着抗原抗体的特异性结合而发生改变, 通过实时监测双电层电容的变化可以

反映免疫反应的进行情况. 本文提出了以交流电热微流体驱动和介电泳粒子收集理论为基础的快速免疫检测新方法, 通过微通道内流动的对流加快抗体向抗原扩散, 通过介电泳对抗体的聚集效应迅速提高通道内局部抗体浓度, 极大促进了免疫反应的加快. 以牛副结核为例, 用实验的方法验证了快速异相免疫检测技术的可操作性与可重复性, 结果表明, 随着特异性免疫反应的进行, 双电层电容呈减小趋势, 依此可以区分阳性血清和阴性血清. 同时通过理论分析和数值计算, 求解了微通道内抗体的浓度分布, 在理论上证明了交流电热流场和介电泳对快速免疫反应的促进作用. 在实现快速免疫检测的基础上, 如何对血清中阳性抗体的浓度或数目进行定量测试, 有待后续工作进行更加深入的研究.

致谢 感谢美国田纳西大学电子与计算机学院 Jayne Wu 副教授和农学院 Shigetosh Eda 副教授在理论分析和实验设计上的指导和建议, 感谢美国国家疾病控制中心 Ashutosh Wadhwa 博士制备实验样品.

参考文献

- 1 Sarkar S, Tang X L, Das D, et al. A bispecific antibody based assay shows potential for detecting tuberculosis in resource constrained laboratory settings. *PloS One*, 2012, 7: e32340
- 2 Longjam N, Deb R, Sarmah A K, et al. A brief review on diagnosis of foot-and-mouth disease of livestock: Conventional to molecular tools. *Vet Med Int*, 2011, 905768: 1–17
- 3 李战华, 吴健康, 胡国庆, 等. 微流控芯片中的流体流动. 北京: 科学出版社, 2012. 113–115
- 4 Eda S, Bannantine J P, Waters W R, et al. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13: 837–844
- 5 Blacket M J, Robin C, Good R T, et al. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour*, 2012, 12: 456–463
- 6 Barton A C, Collyer S D, Davis F, et al. Labelless AC impedimetric antibody-based sensors with pg/ml sensitivities for point-of-care biomedical applications. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 1090–1095
- 7 Holford T R J, Holmes J L, Collyer S D, et al. Label-free impedimetric immunosensors for psoriasis-Increased reproducibility and sensitivity using an automated dispensing system. *Biosens Bioelectron*, 2013, 44: 198–203
- 8 潘建章, 方群. 微流控床边检验系统的流体操控方法研究进展. *分析化学*, 2012, 40: 11–17
- 9 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. 28–36
- 10 Parida M, Shukla J, Sharma S, et al. Rapid and real-time detection of human viral infections: current trends and future perspectives. *P Natl A Sci India B*, 2012, 82: 199–207
- 11 秦建华, 刘婷姣, 林炳承. 微流控芯片细胞实验室. *色谱*, 2009, 27: 655–661
- 12 Feldman H C, Sigurdson M, Meinhardt C D. AC electrothermal enhancement of heterogeneous assays in microfluidics. *Lab Chip*, 2007, 7: 1553–1559
- 13 Liu X, Yang K, Wadhwa A, et al. Development of an AC electrokinetics-based immunoassay system for on-site serodiagnosis of infectious diseases. *Sens Actuators, A*, 2011, 171: 406–413
- 14 Sigurdson M, Wang D, Meinhardt C D. Electrothermal stirring for heterogeneous immunoassays. *Lab Chip*, 2005, 5: 1366–1373
- 15 Lee H B, Oh K, Yeo W H, et al. Enhanced bioreaction efficiency of a microfluidic mixer toward high-throughput and low-cost bioassays.

- Microfluid Nanofluid, 2012, 12: 143–156
- 16 Hart R, Lec R, Noh H. Enhancement of heterogeneous immunoassays using AC electroosmosis. *Sens Actuators, B*, 2010, 147: 366–375
- 17 Ramos A, Morgan H, Green N G, et al. AC electrokinetics: A review of forces in microelectrode structures. *J Phys, D: Appl Phys*, 1998, 31: 2338
- 18 Olesen L H, Bruus H, Ajdari A. AC electrokinetic micropumps: The effect of geometrical confinement, faradaic current injection, and nonlinear surface capacitance. *Phys Rev E*, 2006, 73: 056313
- 19 Bazant M Z. Induced-charge electrokinetic phenomena. In: *Electrokinetics and Electrohydrodynamics in Microsystems*. Germany: Springer, 2011. 221–297
- 20 Gitlin I, Stroock A D, Whitesides G M, et al. Pumping based on transverse electrokinetic effects. *Appl phys lett*, 2003, 83: 1486–1488
- 21 朱晓璐, 尹芝峰, 高志强, 等. 基于光诱导介电泳的微粒过滤、输运、富集和聚焦的实验研究. *中国科学: 技术科学*, 2011, 41: 334–342
- 22 Wu J, Fu Z, Yan F, et al. Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. *Trends Anal Chem*, 2007, 26: 679–688
- 23 Lee Y F, Lien K Y, Lei H Y, et al. An integrated microfluidic system for rapid diagnosis of dengue virus infection. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25: 745–752
- 24 Choi S, Goryll M, Sin L Y M, et al. Microfluidic-based biosensors toward point-of-care detection of nucleic acids and proteins. *Microfluid Nanofluid*, 2011, 10: 231–247
- 25 Sia S K, Kricka L J. Microfluidics and point-of-care testing. *Lab Chip*, 2008, 8: 1982–1983
- 26 Li S, Yuan Q, Morshed B I, et al. Dielectrophoretic responses of DNA and fluorophore in physiological solution by impedimetric characterization. *Biosens Bioelectron*, 2012, 41: 649–655
- 27 Jiang H, Ren Y, Han X, et al. Manipulation of gold coated microspheres using electrorotation. *Sci China Tech Sci*, 2011, 54: 643–649
- 28 姜洪源, 李姗姗, 侯珍秀, 等. 非对称电极表面微观形貌对交流电渗流速的影响. *物理学报*, 2011, 60: 20702–20702
- 29 刘素芬, 傅新, 杨华勇. 三维交叉导流式微型静态混合器的研究. *机械工程学报*, 2005, 41: 132–136
- 30 Li S, Cui H, Yuan Q, et al. AC electrokinetics-enhanced capacitive immunosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases. *Biosens Bioelectron*, 2014, 51: 437–443

AC electric field enhanced rapid serum immunoassay for Johne's Disease

LI ShanShan¹, REN YuKun^{1,3}, LIU XiaoZhu², HOU ZhenXiu¹, JIANG HongYuan¹

¹ School of Mechatronics Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China;

² College of Optoelectronic Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

³ The State Key Laboratory of Fluid Power Transmission and Control, Hangzhou 310027, China

Early immunoassay is essential at the beginning of human/animal disease diagnosis. Due to limited concentration of antibody and slowly nature diffusion, it takes hours or more time to detect the disease specific antibody in serum using traditional diagnosis methods. A novel approach is proposed to enhance the convection and mass transfer in the micro channel based on AC electrothermal effect and dielectrophoresis, improving the antigen-antibody specific binding efficiency greatly, even the antibody in the serum at low concentration level. A platform with interdigitated electrode array on silicon wafer and PDMS micro channel is developed for bovine paratuberculosis(Johne's Disease) rapid diagnosis. It only takes 2 minutes to distinguish positive serum from negative ones by measuring the change of electrode/serum interfatal electrical double layer capacitance at real time. Ac electric field enhanced rapid serum immunoassay diagnosis mechanism is presented based on AC electrolthermal and dielectrophoresis theory. Convection and mass transfer is greatly enhanced by AC electric field, leading to a rapid specific binding. The change of disease specific antibody concentration in the micro channel is simulated, showing validity of the novel rapid immunoassay diagnosis method.

rapid immunoassay, electric double layer, AC electrothermal, dielectrophoresis

doi: 10.1360/092013-970