

基于手机的快速电化学检测

我们展示了一个用于快速、定量的生物分子检测的简洁的手机平台。此系统包括一个用于信号检测和数据分析的嵌入式电路，和用于流体处理和生物传感的一次性微流控芯片。毛细状流体被使用在样品装载、处理、抽吸方面以提高操作的便携性和简便性。手机上面显示的单步图解说明帮助操作者完成检测进程。每一步测量完成后，结果会展示在手机屏幕上并能立即进行数据评估，而且数据自动保存在手机内存里以便未来的分析和提取。此装置的验证是通过检测恶性疟原虫富组蛋白2（PfHRP2）来完成的。恶性疟原虫富组蛋白2是一种重要的生物标志物，在人体血清中含量低于16ng/ml。这个简单的检测进程能够通过2步简单的下载来实现，每次测量需要15分钟。由于它的简洁的尺寸和高效的性能，在广泛接纳、医疗点诊断平台，尤其是在远程和农村有很大的潜能。除了它在全球医疗保健方面的影响，这个技术也与其他重要的应用相关，包括食品安全、环境监测和生物安全。

引言

全球健康保健的最大的挑战之一是缺乏对足够的早期疾病诊断检测。传统的生物分子试验，例如酶联免疫吸附测定（ELISA）、蛋白质印记、侧向流动，一般都需要昂贵的设施、器材和专业的技术员，而这些在世界上大部门地方是不实际的，尤其是在发展中国家。微流体使得在提高精度和自动操作的同时，设备尺寸和成本方面都大大减少。这项科技已经促进了完整的微型系统（芯片实验室）的发展，为寻址全球健康优先性提供了新的诊断功能。然而，这些系统仍然需要笨重的组件（泵、样品处理器、光学/电子探测器）和复杂的安装操作。最近，尤其是在发展中国家，由于计划的可行性，运用手机来改善医疗保健的观念已经被提倡。2012年，全世界有60亿手机订阅者（占世界人口的86%），大部分增长发生在发展中国家。此外，到2015年，智能手机市场预计增长到50%，新年度出货量接近十亿部。移动手机还配备了大部分的组件（处理器，显示器，电池）所需的生物传感器。因此，利用移动电话的生物医学应用提供了一个独特的方法来提高诊断测试的可用性和可访问性，尤其是在缺乏足够的资源和实验室设施的发展中国家。

为此，基于手机的血氧仪已经开发了用于测量血液中的氧含量。最近的研究采用基于手机的显微镜用于疾病的诊断和水质监测。这些系统用手机的CCD照相机集成了一个简洁的成像装置，用于检测微生物作为生物检测和诊断的方法。然而，用于检测蛋白质/核酸疾病标志物的装置的适用性是有限的。许多基于光学的免疫只提供定性的（“正”或“负”）或不明确的和难以解释的可视读数。相比之下，生物标志物的定量测量提供用于疾病的预后，诊断和监测的准确和可重复的方式。为了适应这些要求，我们开发了一个基于手机的平台，为生物分子的定量检测。

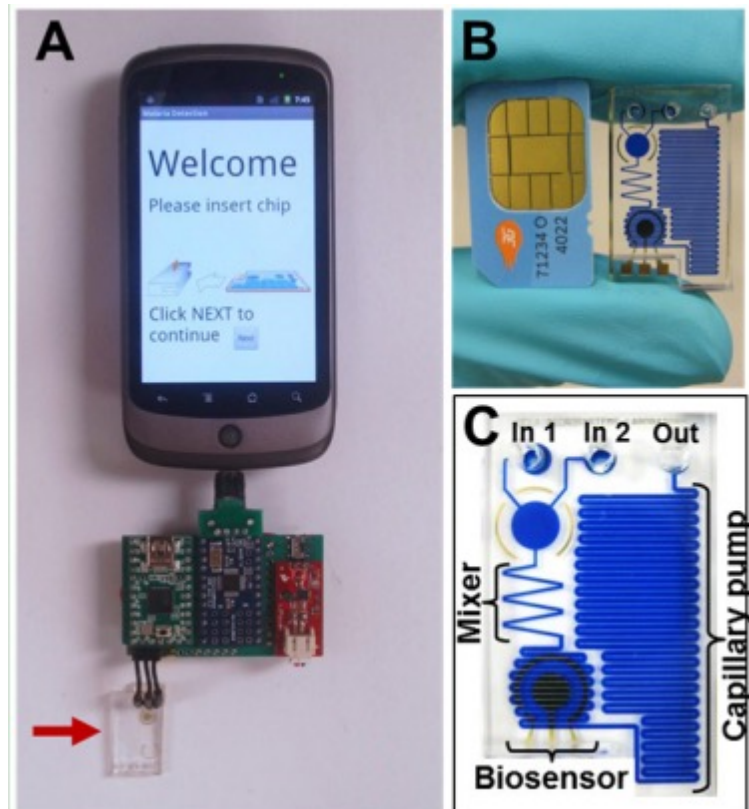


图1 (A) 照片为组装样机设备。箭头指示的是微流体芯片。(B) 该芯片的照片和移动电话的SIM卡进行比较。(C) 有标志的组件的放大的图像。通道被填充有染料用于提高流体网络的可视化。

图1 (A) 展示的是我们设备照片。智能手机功能相当于芯片读卡器，并提供具有互动能力的一个简单的用户界面。该系统采用一个高度敏感的电化学检测方案，检测生物分子的广谱。安培测量是通过插入到手机的微型USB端口的嵌入式电路进行。聚二甲基硅氧烷（PDMS）微流控芯片提供了一个一次性的平台来处理和分析样品，这是由毛细流动增强便携性和改进自动操作。这大大降低了装置的整体大小和省去了泵或外围元件。通过集成和优化我们的系统中每个模块，我们已经开发出一种极其便携，易于使用，并且能够快速测量的装置。为了证明这个系统进行诊断测试的实用性，我们进行研究，以评估检测 PfHRP2蛋白质（疟原虫的主要临床生物标志物）的敏感性和特异性。疟疾是全世界最致命的传染病之一，2010年已造成655,000人死亡。PfHRP2被检测出人血清中的浓度低至16毫微克/毫升。每次试验只要2步装载步骤，在15分钟内完成，从而最大限度地减少了诊断测试花费的时间和复杂性。

结果和讨论

微流控芯片的设计

微流控芯片是专为简化样品装载和小型化的平台上自主的液体输送。图1 (B) 所示，整个芯片有25毫米×15毫米，与手机SIM卡具有相同的大小。有一部分是通过使用能够实现毛细流动的亲和性的PDMS表面涂层来实现的。毛细驱动流具有产生稳定的流量的优点，这主要是由液体与通道壁的接触角和通道几何约束来决定的。因为这些变量在我们的芯片中是确定的，在整体中变量有一个最小值。有两个入口和一个出口，它们是直径1毫米。入口被指定用于装载样品和记者的解决方案，可以分别或同时被加载。由于通道壁的亲和性质，可以分别或同时被加载。由于通道壁的亲和性质，液体在流体网络中自动驱动。样品

装载是使用吸管或滴管分配液体到芯片入口来简单实现。下游的进气口是一个2mm室，它提供了一个区域，使进入一个锯齿形混合器前合并。基于通道的几何形状，计算出样品（0.5 μL ）和记者（2.0 μL ）的适当的流量来同步对芯片内的它们的位置进行随后的流体处理。如果样品和reporter solutions同时加载，它们在腔室同一瞬间被合并。如果分开装入，样品将先分配。由于它的体积较小，样品仅部分地填充该腔室。当大体积的reporter solution被分配，它填补了该室的其余部分，并与样品合并流进混合器。紧接着混频器是一个含有电化学传感器的紧密包装的蛇形通道。从体积计算，当这部分被填充时取样-报告因子混合物停止流动，而使该通道其余部分是空的。而不是包裹该传感器在单个腔室中，我们设计了一个蛇形通道使取样-报告因子混合物在传感器表面有统一的通道。这不仅提高了蛋白质识别和整体检测灵敏度，而且还提供了足够的与PDMS -玻璃粘接表面接触面积。图1（C）提供了信道之间的窄间距（40微米）的视觉参考。该芯片的最后阶段是作为一个毛细泵，并作为废物贮存池的二次蛇形通道。此部分容纳了3,3', 5,5' - 四甲基联苯胺/过氧化氢（TMB/H₂O₂）底物的洗涤和后续安培测量酶促反应。此通道的总有效长度为25厘米，它提供了所有加载到芯片的解决方案所需要的足够的容量。所有的信道是400微米的宽度和100微米高度，这允许快速的液体输送，整个芯片在几分钟内可被填充。

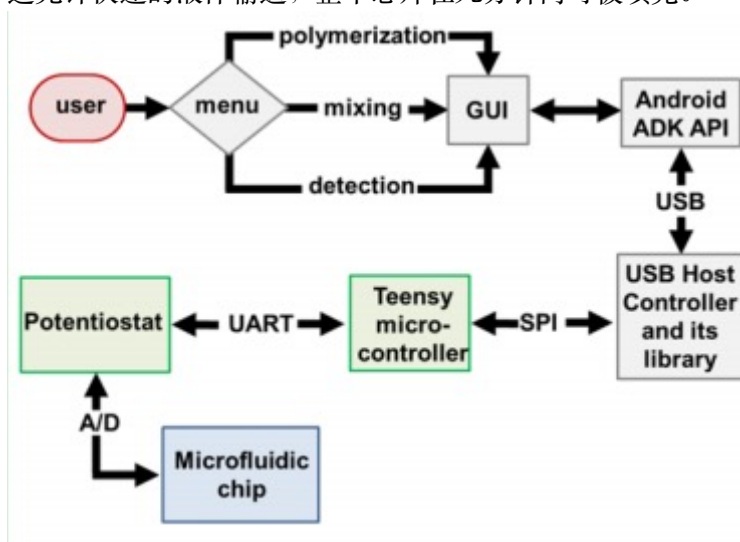


图2 流程图描述了Android界面的用户交互。一个电路获得用户输入到手机的数据，微流控芯片到手机的数据采集。

用户界面和数据交互

该平台提供了一个简化的用户界面，来指导操作者进行检测处理。我们设计了一个定制的Android应用程序（APP），一步一步地指导用户操作。图2 描绘了用户与我们的系统之间的交互的流程图。当插入电路插入手机后，Android操作系统（OS）检测到USB插入信号，然后触发app来启动检测。主屏幕有一个菜单允许用户从进程列表中选择程序。目前，这个app支持三种工艺：电解，电场脉冲混合，安培检测。当选定某个进程后，接着显示第二个菜单调整相关（例如，施加的电压，持续时间）的参数。这些参数的默认值是预先设定的，但是用户可以修改这个参数以用于其他检测。该app通过USB连接发送这些参数给微控制器，配合Android开放设备的协议。在微控制器上预装的USB主机驱动器接受USB连接，并相应地传送信息。一旦手机和微控制器之间建立通信，它接收用户输入的指令，和恒电位仪模块发出的数据请求。这个模块从微流体芯片上测量电压和和电流信号，使用通用异步接收器/发送器（UART）串行通信协议将数据发送到微控制器。微控制器通过重组

消息接收数据包并将其实时传回手机。数据可视化和分析（去噪）是由应用程序在电话上进行。

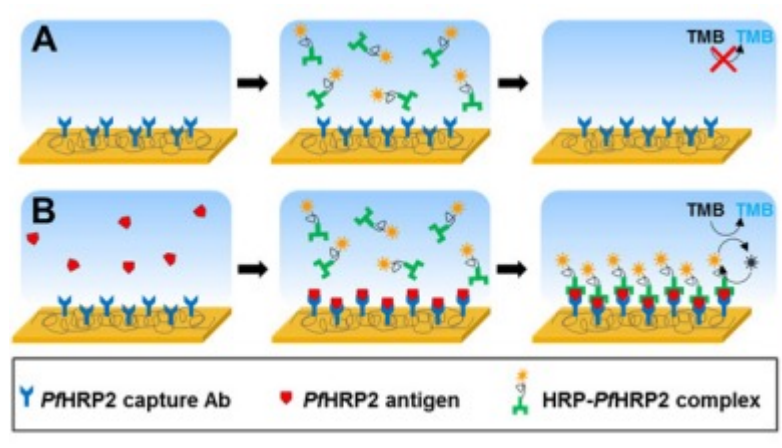


图3 图示在没有（A）和有（B）PfHRP2存在时电化学检测的过程

PfHRP2检测

PfHRP2检测是通过高度特异性蛋白与高灵敏度酶扩增结合来实现。PfHRP2捕捉抗体中的鲁棒聚吡咯基质固定在电极表面。聚合过程的结果是生成了具有厚度为 $27.5\text{nm} \pm 4.5\text{nm}$ 的均匀的表面涂层。报告因子溶液含有在Dulbecco磷酸盐缓冲盐水（DPBS）缀合到辣根过氧化物酶（Px）的PfHRP2检测抗体。没有PfHRP2抗原时，检测抗体不能结合到表面，当TMB/H₂O₂衬底被加载到芯片时会被水冲走（图3A）。当加上电压电位时，产生一个可忽略不计的电化学电流，这是由自发氧化的TMB底物产生的。在PfHRP2抗原存在时，被检测的抗体通过抗原结合到传感器表面（图3B）。带有电动势的TMB/H₂O₂基板的应用在于得到主要电化学电流与PfHRP2蛋白的样品中的浓度成正比。

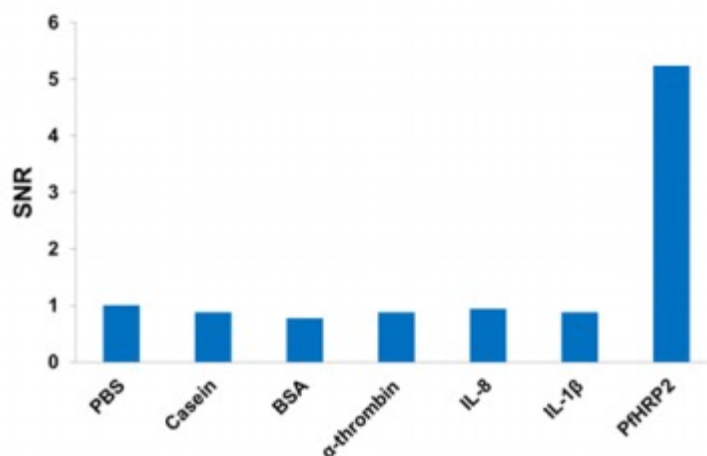


图4 PfHRP2抗原与PfHRP2捕获抗体特异性结合。测量是使用PfHRP2抗原、IL-1 β 、IL-8、 α -凝血酶、在1 $\mu\text{g/ml}$ PBS中稀释的牛血清白蛋白(BSA)、在DPBS中加0.1%酪蛋白和DPBS（空白）。每个柱状图代表在三个独立的测量值的平均值。

该传感器的特异性是用纯化的PfHRP2重组蛋白质和5个不相干靶蛋白在DPBS来确定。在1.0微克/毫升时，PfHRP2抗原产生的信噪比（SNR）为5.3（图4）。相对的，所有的不相关的蛋白质在相同浓度时所产生的信噪比等于DPBS空白对照。为了评估传感器的灵敏度，在人血清中掺入了更高浓度的PfHRP2（4-1,024毫微克/毫升）。

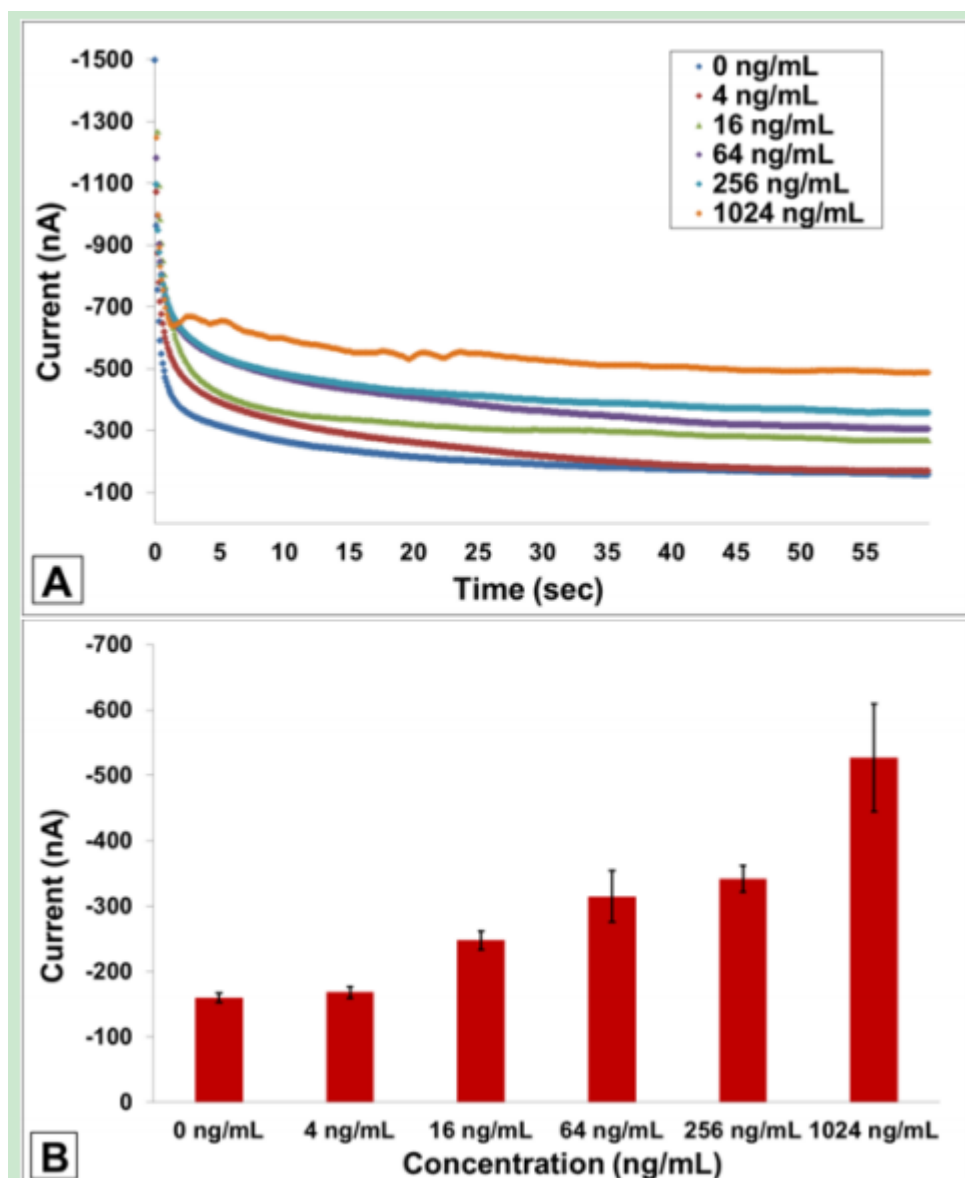


图5 电化学检测人血清中PfHRP2抗原。(A) 在-200 mV时增加PfHRP2抗原浓度的安培测量。(B) 为PfHRP2抗原检测的浓度分布。值为安培测量最后15秒的平均值。每个条代表三个单独的测量值的平均值 \pm 标准偏差。

如图5 (A)，未添加血清 (0ng/ml) 时，所有浓度组产生的电流都是清晰可辨的。所有信号都有最小的噪音的相对平滑的响应曲线。测量是超过60秒后，最后15秒的值平均，以产生16ng/ml的下端的检测限 (LOD) 的剂量反应曲线 (图5B)。这LOD与报道的许多临床相关疾病的生物标记物包括其他PfHRP2安培免疫传感器类似。该测定系统的进一步优化将提高检测的灵敏度。例如，较快的流速可以提高来自传感器的报告因子溶液洗涤，并且有更低的背景噪声。此外，该传感器的灵敏度可以通过使用导电性纳米粒子，以促进信号转导的增强。

材料和方法

制造材料

硅和玻璃晶片 (直径100毫米, 500微米厚), 购自TechGophers公司 (洛杉矶, CA)。
PDMS预聚物和固化剂 (Sylgard184) 从道康宁 (密歇根州米德兰市) 获得。聚乙二醇 (MW200) 购自Sigma-Aldrich公司 (圣路易斯, 密苏里州)。用于流场可视化的有色染料

是从当地供应商处购买。KMPR1050 从MicroChem公司（牛顿，MA）获得。AZ4620光刻胶（希普利，马尔堡，MA），六甲基二硅烷（HDMS），丙酮，异丙醇和甲醇从加州大学洛杉矶分校纳米电子研究机构获得。

微流控芯片的制作

微流控芯片的制造严格遵循与之前报道的PDMS设备。在玻璃基板上制作金电极，并作为电化学传感器。在光刻定义AZ4620光刻胶荫罩下金属蒸发（CHA Mark 40）。Cr和Au在厚度为20nm和200nm左右依次沉淀。拾离在丙酮中经超声处理然后用去离子（DI）水进行冲洗。单个芯片中使用玻璃切割器切断。PDMS模具是由KMPR1050光刻胶在Si晶圆光刻制造。PDMS预聚物和固化剂混合，脱气，并浇注到模具中，并在80°C下固化2小时。单个芯片被切断，入口/出口孔打孔。在PDMS芯片进行亲水性的表面处理，以促进毛细抽吸。简单地说，PDMS表面暴露于空气等离子体（Harrick, Ithaca, NY）90秒。PEG立即被分配到氧化的表面，芯片加热至150°C 25分钟。一冷却，芯片立即用异丙醇和去离子水冲洗，并用纯化的N₂干燥。表面处理后，PDMS通道与玻璃芯片组装在一起。

实验化学品和试剂

PfHRP2抗体和重组PfHRP2抗原来自CTK生物科技有限公司（圣地亚哥，加利福尼亚州）。IL-1 β 和IL-8的重组蛋白购自Sigma-Aldrich公司（圣路易斯，密苏里州）。人 α -凝血酶是从血液学技术公司（Essex Junction, VT）获得。人血清是从Bioreclamation, LLC（Hicksville, NY）获得。牛血清白蛋白（BSA）（含有0.1%酪蛋白的PBS和DPBS）是由热科学（的Tustin, CA）聚吡咯和KCl购自Sigma。TMB/H₂O₂was从Neogen（列克星敦，肯塔基州）获得。离子水（18.3 M Ω ·cm）是用Barnstead Easypure II水体净化系统生成。

电气元件

USB主机屏蔽来自Circuits@Home。Teensy2.0微控制器和3.3电压调节器（部件号MCP1825）来自PJRC.com, LLC（Sherwood, OR）。LiPower电源控制器（零件号PRT-10255），逻辑电平转换器（型号：BOB-08745）和聚合物锂离子电池（型号：PRT-00339）购自SparkFun电子（科罗拉多州博尔德）。恒电位电路从Palm仪器BV公司（万豪敦，荷兰）购买。其它元件（电容，电阻，接点，导线）从Digi-Key（Thief River Falls, MN）购买。

电路的设计和组装

电路的开发是为了提供在微流体芯片和移动电话之间的接口。该电路的主要功能是翻译用户输入到手机中的指令，发送电化学测量所需的参数，并且将传感器接收的检测信号反馈到手机。为了完成这些操作，该电路采用了USB主机，一个可编程微控制器，恒电位仪，逻辑电平转换器，稳压器和电池。用Altium Designer（由Sunstone Circuits (Mulino,OR)）设计了PCB板整合所有电气通信和电源分配的组件。图6为PCB图。PCB的整体尺寸为35毫米×57毫米。连接点为0.1英寸，这允许保持适当的间距和贴片间走线的间距。PCB所需的5V电源线，被设计为0.115英寸宽，可实现对大电流的传输。电路板的顶层上的空白区域充满了铜和地线。底层上的空白区域也充满了铜，但电连接至3.3 V。电路中大部分的元件是3.3 V供电，这是分配电源的有效方法。插针和过孔的直径分别为0.025英寸和0.055英寸，允许充足的间隔为插针调整和装配。各成分通过插针单独焊接，以确保刚性连接。

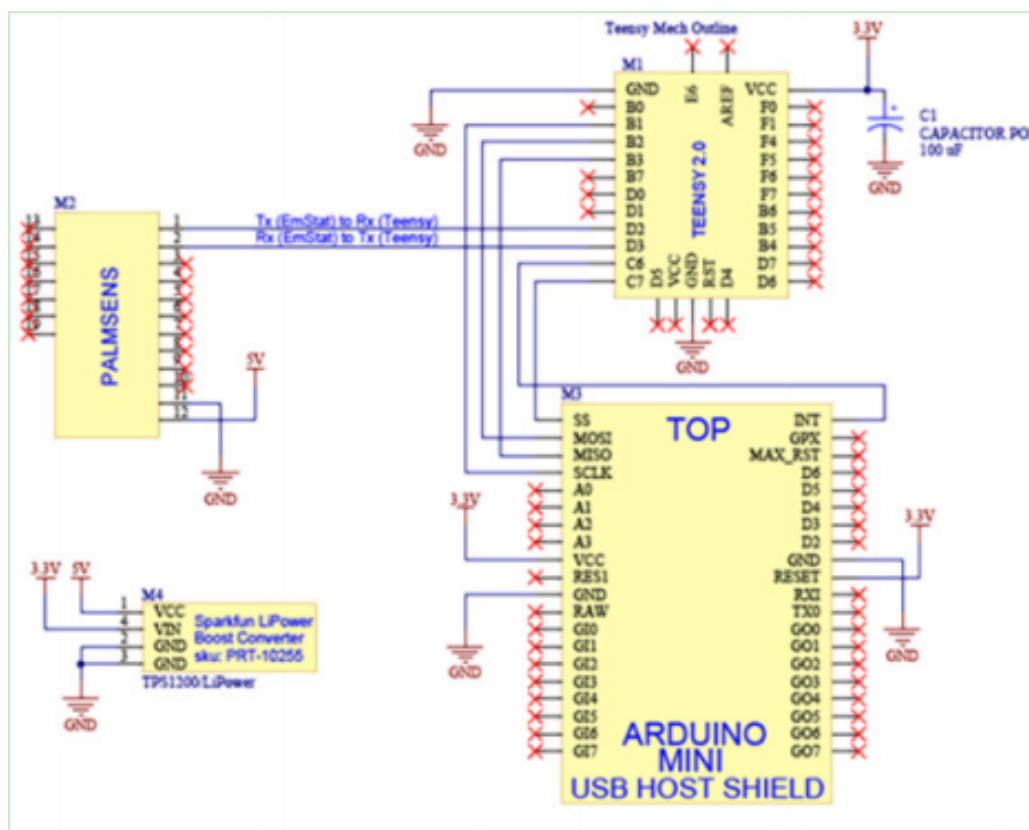


图6 PCB图，描述了各个组件之间的电气连接

在这个原型，我们使用了Nexus One手机上的Android 2.3.4操作系统（OS）上运行。理想情况下，任何有USB连接器的手机都应可以与配备USB配件连接。然而，如果手机在初始的USB识别上可以作为一个USB主机设备，连接才是有效的。旧Android版本和不支持USB主机功能的手机不能与USB接口的配件进行通信。因此，为了使我们的设备与运行在USB客户端的android手机向后兼容，我们使用了一个微控制器和USB主机屏蔽器作为一个USB主机设备，由一个锂离子电池供电。这样，任何具有微型USB端口和Android开放配件的协议的android手机都可以使用我们的电路。为了让微控制器支持USB主机模式，USB主机屏蔽器被用来提供USB连接和USB数据包重新组装。为了使USB主机设备工作，主机设备提供5 V电压来启动USB连接。大多数低成本的可充电电池只能提供 ~ 3.7 V，因此，我们设计了电压调节器，使电压从3.7 V升到5V，以提供自举电压完成USB初始化。提升电压的副作用是数字传输电压发生偏移。为了解决这个问题，我们采用了逻辑电平转换器将微控制器的数字信号转换为相应的电压信号，以保持USB主机盾与微控制器和微控制器与恒电位仪之间的通信。我们开发了包括USB，串口和模拟串口通信库的自定义组件，将所有组件集成在一起。该固件预装在微控制器的非易失性的ROM中，并在电路上电时立即初始化。

电极表面修饰

传感器表面用导电聚吡咯层修饰，促进蛋白质固定化和提高检测灵敏度。在没有显著蛋白质失活情况下观察长达一年发现，抗体固定化带来良好的长期稳定性。出于这个原因，我们设想，这个过程可以在封装芯片之前进行。通过由PffHRP2捕获抗体（10微克/毫升）稀释在含有0.2M KCl和聚吡咯（1:150）的DPBS的聚合物溶液电解生成了聚吡咯层。电解的进行是通过分配20 μ L的聚合物溶液到传感器上并施加9秒，350 mV和1秒、950毫伏

的方波电场。整个过程包括20个循环，随后用超纯去离子水漂洗和用压缩氮气干燥。涂层的厚度使用DEKTAK6轮廓仪测定。

电化学检测过程

所有的电化学测量使用手机平台进行。样品装载前，电路被连接到手机，一个新的微流控芯片插入到设备中。0.5 μL PfHRP2不同浓度的抗原分散到入口1和2.0 μL 报告因子溶液分配到芯片的入口2。为了选择性测量，靶蛋白在DPBS稀释至1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。浓度分布是由人血清PfHRP2抗原稀释得到的。通过毛细流动，将两种溶液流过通道并混合后，穿过锯齿形混合器。当溶液流过传感器填充通道后，一个方波电场（20个周期的9s、-300 mV和1s、200mV）经手机应用程序施加到传感器。这种脉冲场可改善蛋白质识别和结合到电极表面。7.0 μL TMB/H₂O₂衬底分配到入口1，随后在-200 mV测量电流60秒。装样使用吸管，后续流体输送用毛细管流驱动。空白对照测定（无PfHRP2抗原）用新的芯片进行，所有测量均在室温下进行。

总结

我们提出了一个针对手机平台的生物分子分析检测。该装置采用了紧凑的电路进行快速，高灵敏度电化学测量。样品处理，抽水和传感是用无动力流体操作的毛细流动的一次性微流控芯片进行的。我们检测到的恶性疟原虫的HRP2抗原在人血清中是16ng/ml。这个实验证明高特异性PfHRP2蛋白质的信噪比那些不相关的蛋白质多5倍。该系统提供了一个简化的用户界面，通过一个定制的Android的应用程序提供了图形化的，一步一步的指示。与商业上只提供一个正/负读数的侧向流动免疫测定法相反，该平台提供正比于生物标志物的浓度的可量化的测量值。与需要2-3小时的分析时间的商业ELISA试剂盒相反，手机为基础的检测在15分钟内完成，只需要2步装载步骤（如果样品和报告因子溶液被同时装载）。该装置中的直接应用是，快速，灵敏的PfHRP2量化允许对再次发生疟疾感染者的准确诊断。对于未来的应用，我们计划进行现场测试和实现无线数据传输功能。最终，该设备提供了快速，灵敏度高，在完全掌机平台的定量测量的创新手段，并有可能在全球范围内大大提高诊断测试的有效和可访问性，尤其是在偏远的农村地区。