

本文引用: 薛冰洁, 檀鑫, 鄢健, 等. 基于塑料薄片建立一步式心血管损伤标志物即时检测免疫分析系统[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(5): 395-402.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-05-0395-08

· 实验研究 ·

基于塑料薄片建立一步式心血管损伤标志物 即时检测免疫分析系统

薛冰洁^{1,2}, 檀鑫², 鄢健³, 王雪², 赵长稳³, 王媛², 杜杰^{1,2}

(1. 天津医科大学生理学及病理生理学系 天津医学表观遗传学协同创新中心, 天津市 300070; 2. 首都医科大学附属北京安贞医院 北京市心肺血管疾病研究所血管生物研究室 教育部重塑相关心血管疾病重点实验室 心血管重大疾病防治协同创新中心, 北京市 100029; 3. 北京化工大学生物医用材料北京实验室, 北京市 100029)

[关键词] 蛋白质芯片; 光接枝; 免封闭; 一步式即时检测

[摘要] **目的** 建立一种简便快速的一步式心血管疾病标志物蛋白质即时检测(POCT)芯片系统。**方法** 利用光化学反应,在环烯烃共聚物薄片(COC)上合成具有抗非特异性吸附的聚乙二醇甲醚甲基丙烯酸酯(PEGMEMA)层,在接枝后的表面进行非接触式的喷墨打印,形成抗体微阵列。使用紫外光进行引发,探索了不同光照时间和不同聚合物单体浓度下改性 COC 薄片表面的接触角角度以及聚合物接枝密度的变化。利用原子力显微镜和红外光谱表征了光化学反应改性后 COC 薄片表面的微观形貌和化学结构,并对比了光化学反应改性前后薄片表面的非特异性蛋白吸附情况。进一步探索了合适的抗体喷墨打印浓度及辅剂条件,并在接枝后的表面打印了心血管损伤生物标志物生长刺激表达基因 2 蛋白(ST2)的固定型捕获抗体和荧光标记的可溶解型抗体。**结果** 当聚合物单体的质量分数为 30%,光照时长为 4 min 时,接触角降到最低为 38.5°,接枝密度达到最大为 68.47 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。原子力显微镜和红外光谱表征均证明了 PEGMEMA 层的成功引入。表面接枝 PEGMEMA 层降低了 COC 薄片非特异性蛋白吸附量。当固定型捕获抗体为 80 mg/L 时,固定效率最高。与不同相对分子质量的聚乙二醇(PEG)相比,海藻糖作为辅剂时可溶解型检测抗体与固定型捕获抗体的识别效率更高。当 ST2 为 10 mg/L 时,可以观察到溶解后固定斑处有检测抗体结合。**结论** 通过光化学反应,在 COC 薄片表面接枝了抗非特异性吸附的 PEGMEMA,在接枝后的薄片表面喷墨打印检测所需的抗体试剂,用简易快捷的方法制备形成了一种能够实现一步式检测的蛋白质芯片,可灵活应用于多种场景下心血管疾病标志物蛋白的快速检测,助力心血管精准医学发展。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Establishment of an one-step point-of-care immunoassay system of cardiovascular biomarkers based on plastic sheets

XUE Bingjie^{1,2}, TAN Xin², YAN Jian³, WANG Xue², ZHAO Changwen³, WANG Yuan², DU Jie^{1,2}

(1. Department of Physiology and Pathophysiology of Tianjin Medical University & Collaborative Innovation Center of Tianjin for Medical Epigenetics, Tianjin 300070, China; 2. Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital Medical University & Department of Vascular Biology, Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Disease & Key Laboratory of Remodeling-related Cardiovascular Diseases, Ministry of Education & Collaborative Innovation Center for Cardiovascular Disorders, Beijing 100029, China; 3. Beijing Laboratory of Biomedical Materials, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] protein chips; photografting; blocking-free; one-step POCT

[ABSTRACT] **Aim** To establish a rapid and convenient cardiovascular biomarker protein one-step point-of-care testing (POCT) chip system. **Methods** A polyethylene glycol methyl ether methacrylate layer (PEGMEMA) with anti-nonspecific adsorption property was synthesized on the cyclic olefin copolymer (COC) sheet by photochemical reaction, and

[收稿日期] 2022-01-13

[修回日期] 2022-03-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81870341)

[作者简介] 薛冰洁, 硕士研究生, 研究方向为生物学, E-mail 为 F14SH_0528@163.com。通信作者杜杰, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管病因学及转化医学, E-mail 为 jiedu@yahoo.com。

non-contact inkjet printing was performed on the modified surface to form antibody microarrays. The contact angles and grafting densities of the surface were explored with several monomer concentrations after irradiated under UV light for certain time periods. The modified surface structure was characterized by atomic force microscopy and infrared spectroscopy, and the protein adsorption on the surface before and after photochemical reaction was compared. The appropriate antibody inkjet printing concentration and adjuvant conditions were further explored. Finally immobilized antibodies and fluorescently labeled soluble antibodies of the growth-stimulated expression gene 2 protein (ST2), a biomarker of cardiovascular damage, were printed on the modified surface. **Results** When the PEGMEMA monomer concentration was 30% by mass and the illumination time was 4 min, the contact angle reached the minimum as 38.5° , and the grafting density was up to $68.47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Atomic force microscopy and infrared spectroscopy showed that carbonyl and ether groups were successfully introduced into the surface. The amount of non-specific protein adsorption was reduced after surface grafting of PEGMEMA. The highest immobilization efficiency was obtained when the immobilized antibody concentration was 80 mg/L. Compared with polyethylene glycol (PEG) with several molecular weights, the effective binding efficiency of soluble antibody onto immobilized antibody microarray was higher when trehalose was used as an excipient. When the ST2 concentration was 10 mg/L, the binding of the soluble antibody on the immobilized antibody microarray after dissolution could be observed. **Conclusion** The anti-nonspecific adsorption of PEGMEMA was modified on the surface of the COC plastic sheet by photochemical reaction, and physically immobilized antibodies and the fluorescently labeled soluble antibodies were printed on the modified sheet surface, fabricated a protein chip system which is convenient to rapidly detect cardiovascular biomarkers, to advance cardiovascular precision medicine.

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 已经成为世界人口死亡的主要原因,也是患病率最高的一类疾病^[1],包括很多急危重症,需要得到及时的鉴别和分型诊断^[2]。即时检测 (point-of-care test, POCT) 是可以在患者床旁进行的诊断检测^[3],不受环境场所约束,并且能够在资源有限的环境下加速精准医学临床决策和医疗治疗,可以通过使用多种分析技术实现^[4-12],其中酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 应用广泛,是免疫分析方法的金标准,但是人工操作步骤繁琐,耗费时间成本;而自动化的 ELISA 需要固定的大型实验仪器设备,耗费物质成本。目前研发的基于免疫分析的新型 POCT 技术^[8],包括侧流免疫层析法^[6,13-14]、基于纸张的微流控器件^[15-18]和基于芯片的微流控器件等^[19-21]。然而侧流免疫层析法多为定性和半定量,信号强度低,量化判别性能较差^[13]。基于纸张的微流控器件信噪比较低,且机械强度欠佳^[17]。基于芯片的微流控器件通常需要复杂的流体控制装置,如微泵和微阀^[4]。最近有研究团队报道了一个微阵列型 POCT 免疫分析平台^[22],在玻璃芯片表面的纳米级聚合物刷^[23]上喷墨打印抗体微阵列。当样品液体接触到芯片,荧光基团标记的检测抗体从芯片表面溶解释放,特异性地结合待检测物,待检测物又结合到固定端的捕获抗体上,完成免疫分析。该平台可检测全血分析物,灵敏度与 ELISA 相当。然而其较为复杂的制备过程可能会限制该免疫分析平台的应用^[24-26]。

根据需求对芯片进行表面改性是制备生物芯片过程中的一个关键步骤。由光引发的表面改性技术具有处理速度快、反应条件温和、时空可控等优点,且形成聚合物的接枝机制简单,基于夺氢机制,因此已被证明非常适合用于表面富含碳-氢 (C-H) 键的聚合物材料的功能化^[27]。聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 刷状聚合物或 PEG 水凝胶是提高表面抗非特异性吸附性能的有效途径^[28]。本研究以光引发的表面改性技术在高度透明的塑料环烯烃共聚物 (cyclic olefin copolymer, COC) 薄片上接枝形成了具有抗非特异性吸附性能的聚合物层,即聚乙二醇甲醚甲基丙烯酸酯 (poly (ethylene glycol) methyl ether methacrylate, PEGMEMA),并在接枝后的表面进行非接触式的喷墨打印,形成的抗体微阵列干燥后通过非共价作用吸附在 PEGMEMA 层上,以此简化了微阵列的制造工艺。PEGMEMA 能抵抗蛋白的非特异性吸附,可以降低背景荧光噪音,提升信噪比。在这些基础上验证性地进行了心血管损伤生物标志物生长刺激表达基因 2 蛋白 (growth stimulation expressed gene 2, ST2) 的快速检测。图 1 为蛋白质芯片的检测过程示意图。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

二苯甲酮 (benzophenone, BP) 及吐温-20 (Tween-20) (Alfa Aesar Chemicals 公司,中国天津); PEGMEMA

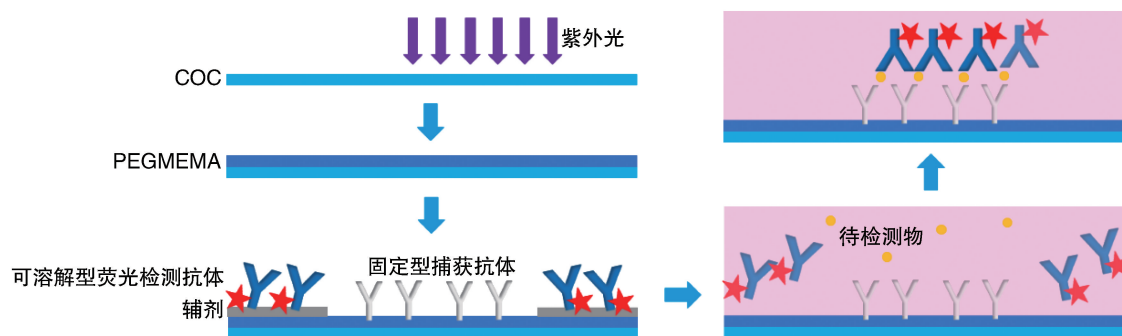


图 1. 蛋白质芯片检测过程示意图

Figure 1. Schematic illustration of the detection work flow of the protein chip

单体相对分子质量约为 2080) 及环烯烃共聚物 (cyclic olefin copolymer, COC) 薄片 (Topas Advanced Polymers, 德国); 双向拉伸聚丙烯 (biaxially oriented polypropylene, BOPP) 薄膜 (厚度约为 30 μm) 和 Cy3-兔抗山羊 IgG (BOSTER 公司, 中国武汉); Alexar Fluor™ 647 偶联山羊抗兔 IgG (H+L) (AF647-山羊抗兔 IgG, Thermo Fisher Scientific 公司, 中国上海); 牛血清白蛋白 BSA (Solarbio 公司, 中国北京), 0.1 mol/L 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) (Solarbio 公司, 中国北京), 并加入质量分数 0.1% 的 Tween-20 制备成洗涤液待用; 原子力显微镜 (Dimension FastScan from Bruker, 德国); LuxScan-10K/A 扫描仪和 PersonalArrayer 16 系统 (CapitalBio 公司, 中国)。

1.2 光接枝对芯片表面改性引入 PEGMEMA

实验中用到的所有 COC 薄片和 BOPP 薄膜, 实验前都经过大量丙酮超声洗涤, 室温晾干后使用。首先, 用丙酮配制质量分数为 30% 的二苯甲酮溶液作为光引发剂, 将配好的液体滴在 COC 薄片表面, 上面覆盖 BOPP 薄膜。通过在顶部放置石英板 (质量约为 200 g) 施加一定压力, 形成薄的平坦溶液层。然后, 将该夹心装置在室温下接受一定时长的紫外线照射 (光强 9 mW/cm^2 , 波长为 254 nm), 取出后用大量丙酮超声洗涤。随后, 用丙酮配制混合一定浓度 (质量分数为 20% 和 30%) 的 PEGMEMA 单体溶液, 滴加在上一步洗涤后干燥的 COC 表面, 并按上述条件重复紫外照射步骤完成接枝。最后, 将完成接枝的 COC 薄片用大量丙酮超声洗涤, 并置于丙酮中继续浸泡 4 h, 取出后自然晾干, 得到表面接枝 PEGMEMA 层的 COC 薄片 (COC-g-PEGMEMA)。使用原子力显微镜检测改性前后的表面粗糙度。使用来自 DataPhysics 的 OCA 20 系统记录水接触角

数据。

COC-g-PEGMEMA 的抗非特异性吸附性能测试: 将空白 COC 薄片和 COC-g-PEGMEMA 薄片分别在 200 mg/L 的 AF647-山羊抗兔 IgG 中孵育 4 h, 然后浸泡洗涤液, 清洗 1 h, 使用 LuxScan-10K/A 扫描仪对蛋白质芯片进行成像, 对比观察表面红色荧光残留。

1.3 喷墨打印抗体微阵列

抗体、海藻糖和 PEG 皆使用 0.1 mol/L 的 PBS (pH=7.4) 稀释。可溶解型荧光标记检测抗体使用作为辅剂的 0.25 g/L 的海藻糖或者 1 g/L 不同相对分子质量的 PEG 稀释。使用 PersonalArrayer 16 系统以非接触式打印模式进行抗体微阵列的喷墨打印。首先打印 Cy3-兔抗山羊 IgG 作为固定型捕获抗体微阵列, 打印完成后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存过夜, 然后扫描检测洗涤前、后的荧光强度。随后在固定型捕获抗体微阵列的外围再次打印可溶解型荧光标记检测抗体微阵列, 打印完成后扫描检测荧光强度。通过 LuxScan-10K/A 扫描仪扫描获得荧光信号, 并测算荧光强度。

在制备随后的心血管疾病标志物 ST2 检测芯片时, 首先打印无荧光标记的固定型捕获抗体微阵列, 洗涤后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜保存固定, 随后在此固定型捕获抗体微阵列的外围再次打印可溶解型荧光标记检测抗体微阵列, 打印完成后扫描检测荧光强度, 完成荧光检测后备用。

1.4 统计学处理分析

所有数据使用 Prism 7.0 进行统计, 柱形图使用平均值和标准差作图。连续变量的组间差异分析选择非配对 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COC 表面接枝及接枝后的抗非特异性吸附性能

抗非特异性吸附在蛋白质芯片的使用过程中起着重要作用,因为非特异性蛋白质吸附会严重增强荧光背景信号。由于蛋白质本质上是疏水性的,亲水性的增加提供了更好的蛋白质抗非特异性吸附性能^[29]。本研究探索了不同光照时间(1 min、2 min、3 min、4 min 和 5 min)及不同聚合物单体浓度(质量分数为 20% 和 30%)下表面光接枝后的接触角以及接枝密度的变化。结果表明,随着光照射时间增加,接触角逐渐减小,但达到最小值后将反

弹,逐渐增加。当单体质量分数从 20% 增加为 30% 时,接触角减小。当光照时间为 4 min,单体质量分数为 30% 时,接触角最小,为 38.5°,亲水性最强,此时的接枝密度最大,为 68.47 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (图 2A 和 2B)。原子力显微镜结果(图 2C)显示了表面接枝前后表面粗糙度的变化,红外光谱仪(图 2D)表征了表面接枝前后的化学结构,位于 1722 cm^{-1} 处的吸收峰属于 PEGMEMA 中酯基的共拉伸振动,1150 cm^{-1} 处的吸收峰归因于醚键的伸缩振动。对比了表面接枝前后的非特异性蛋白吸附量,与空白 COC 相比,COC-g-PEGMEMA 非特异性蛋白吸附量降低 17.0% (图 2E)。

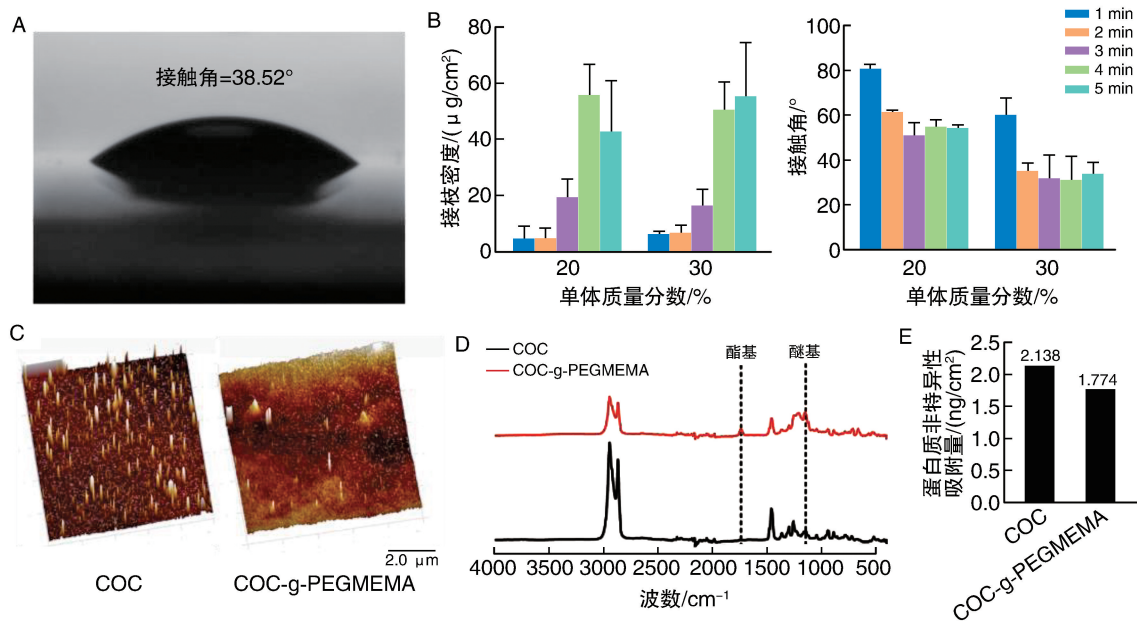


图 2. COC 表面进行光接枝修饰后的基本性能表征

A 为接枝后表面的接触角;B 图中左图为单体质量分数和光照时间对接枝密度的影响,右图为单体质量分数和光照时间对接触角的影响;
C 为原子力显微镜展示接枝前后的表面形貌;D 为 ATR-红外光谱表明接枝后形成了新的基团;
E 为统计荧光强度对比抗荧光标记蛋白吸附情况。

Figure 2. Representation of basic characteristics after photo-grafting modification

2.2 喷墨打印抗体微阵列并验证免疫识别

在 COC-g-PEGMEMA 上进行非接触式喷墨打印 Cy3-兔抗山羊 IgG,对比清洗前后的荧光强度,计算不同浓度的固定效率,即(洗涤后荧光/洗涤前荧光)% ,确定固定效率最高的抗体质量浓度。抗体质量浓度分别为 20 mg/L、40 mg/L、60 mg/L、80 mg/L、100 mg/L、120 mg/L、160 mg/L 和 200 mg/L,完成打印并过夜储存后检测洗涤前荧光信号,进行洗涤后再次检测荧光信号(图 3A)。分析发现抗体质量浓度为 20 mg/L 和 80 mg/L 时,固定效率较高,最高分别达到 36.66% 和 31.64% (图 3B)。由于抗体质量

浓度为 20 mg/L 时,洗涤后荧光信号较弱,因此选择 80 mg/L 作为打印抗体的质量浓度。随后在 COC-g-PEGMEMA 表面打印 80 mg/L 的 Cy3-兔抗山羊 IgG,4 $^\circ\text{C}$ 避光过夜保存固定,洗涤后孵育体积约 17 μL 的 AF647-山羊抗兔 IgG(质量浓度为 80 mg/L),完成孵育后洗涤,并检测两个通道的荧光信号。在绿色荧光的位置,可以观察到红色荧光信号,二者完全重叠。将红色和绿色两个通道同时打开,可以观察到与红色和绿色通道独立激发时完全重合的黄色荧光(图 3C)。以上结果证实,在 COC-g-PEGMEMA 表面喷墨打印形成的 Cy3-兔抗山羊 IgG 微

阵列与 AF647-山羊抗兔 IgG 可以特异性识别。

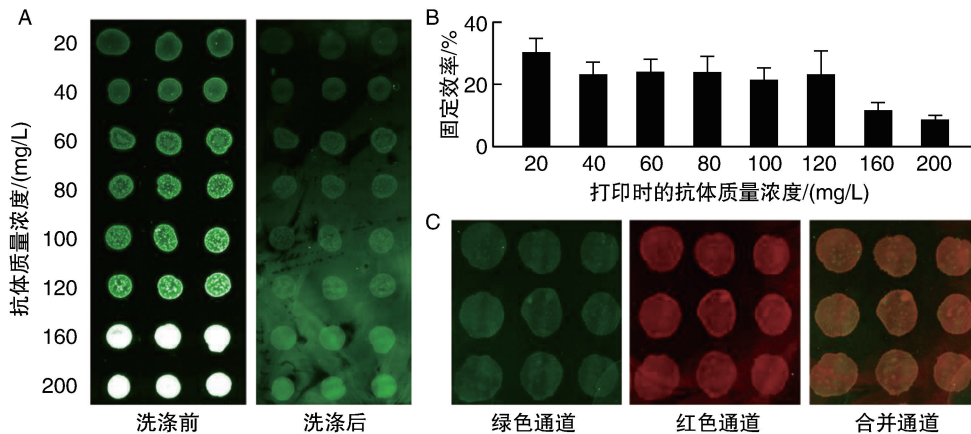


图 3. 在接枝后的芯片表面喷墨打印固定型捕获抗体
A 为喷墨打印后的荧光抗体微阵列及其洗涤后的局部展示;B 为抗体固定效率;C 为固定后的 Cy3-兔抗山羊 IgG(绿色通道)与 AF647-山羊抗兔 IgG(红色通道)识别的荧光图。

Figure 3. Inkjet printed immobilized capture antibodies on grafted surface

2.3 探索可溶解型抗体微阵列的辅剂配方

为构建一步式即时检测蛋白质芯片,将检测所需的荧光检测抗体以可溶解的微阵列形式喷墨打印并存储在芯片表面。在打印好 Cy3-兔抗山羊 IgG 后,将 AF647-山羊抗兔 IgG 与易于溶解的辅剂打印在 Cy3-兔抗山羊 IgG 微阵列的周围。尝试使用相对分子质量分别为 10 000、20 000、100 000 的 PEG 和海藻糖作为辅剂,与蛋白 AF647-山羊抗兔 IgG 混合溶解后,打印在 COC-g-PEGMEMa 表面,蛋白质量浓度为 80 mg/L。分析对比溶解前后荧光信号以评估溶解效率,PEG-10 000 溶解效率最高,溶解效率

为 98.27%。

为探索不同辅剂是否影响 AF647-山羊抗兔 IgG 与 Cy3-兔抗山羊 IgG 的识别,测试对比了混合不同辅剂情况下各自的识别效率。海藻糖作为非晶体的玻璃样稳定剂,能够协助维持干燥状态下蛋白质的活性结构^[30],因此选择海藻糖和 PEG-10 000 分别作为打印 AF647-山羊抗兔 IgG 的辅剂,分别评估溶解效率与识别效率。通过计算分析得到:当 PEG-10 000 作为辅剂时荧光抗体的溶解效率稍高一些,但是海藻糖的识别效率显著更佳(图 4)。因此选择海藻糖作为打印可溶解型抗体微阵列的辅剂。

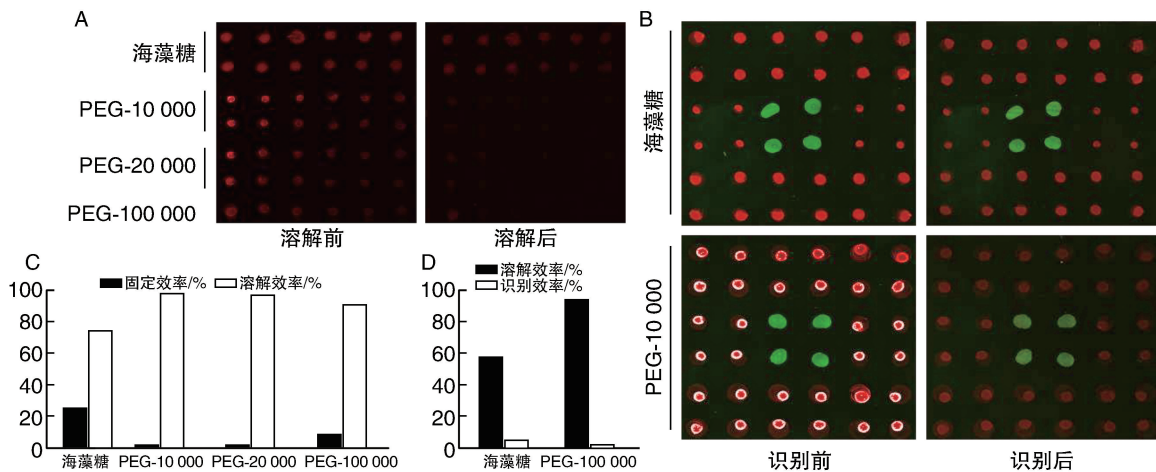


图 4. 在接枝后的芯片表面喷墨打印可溶解型荧光标记的检测抗体
A 为荧光抗体混合不同辅剂的溶解效果;B 为荧光抗体混合不同辅剂的溶解并与固定型捕获抗体识别的效果,以可溶解形式喷墨打印的山羊抗兔 IgG(红色通道)与固定的兔抗山羊 IgG(绿色通道)能够成功识别;
C 为 A 中固定与溶解效率统计;D 为 B 中溶解与识别效率统计。

Figure 4. Inkjet printed soluble fluorescence-labeled detection antibodies on grafted surface

2.4 验证性检测心血管疾病生物标志物 ST2

按照前述方法制备心血管疾病生物标志物蛋白 ST2 的检测芯片, 尝试以 100 mg/L 和 200 mg/L 分别打印无荧光固定型捕获抗体和可溶解型荧光抗体。当加入了待检测标志物 ST2 的质量浓度为 10 mg/L 溶液时, 可以观察到: 原本无荧光的固定捕获抗体点阵, 现在产生了明显的荧光, 意味着荧光

检测抗体识别了抗原 ST2, 并被固定抗体在此处捕获(图 5), 柱形图为对比识别前后 LuxScan-10K/A 扫描仪所检测到的荧光强度相对值(其单位 a. u., 意为任意单位), 识别前检测到的少量荧光信号为基础背景信号。由此验证了本平台有能力实现心血管疾病生物标志物蛋白质的一步式快速检测。

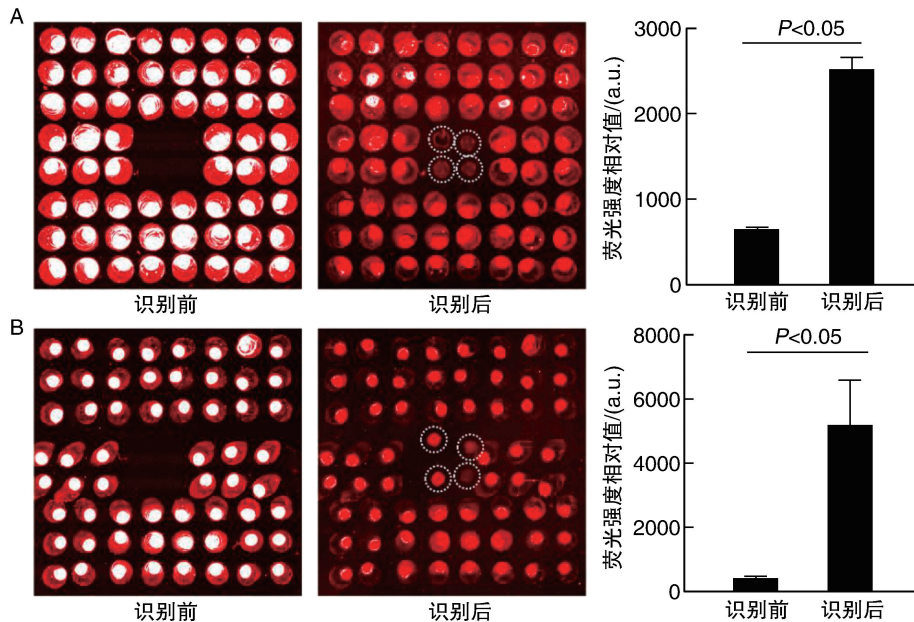


图 5. 一步式即时检测心血管疾病生物标志物 ST2

A 为可溶解型荧光抗体微阵列的打印质量浓度为 200 mg/L, 无荧光固定型捕获抗体的打印质量浓度为 100 mg/L, 待检测 ST2 的质量浓度为 10 mg/L 时, 识别前后对比荧光图及荧光强度统计; B 为可溶解型荧光抗体微阵列的打印质量浓度为 100 mg/L, 无荧光固定型捕获抗体的打印质量浓度为 200 mg/L, 待检测 ST2 质量浓度为 10 mg/L 时, 识别前后对比荧光图及荧光强度统计。荧光图中的识别结果由白色虚线圈出。

Figure 5. One-step POCT of cardiovascular biomarker ST2

3 讨论

本研究利用光接枝技术, 快速、可控地实现在环烯烃共聚物薄片上接枝形成抗非特异性吸附的聚合物 PEGMEMA, 在接枝后的表面喷墨打印固定型捕获抗体和辅剂混合的荧光标记可溶解型抗体, 形成蛋白质芯片。表面改性阶段使用紫外光进行引发, 探索了不同光照时间及单体质量浓度下表面的接触角以及接枝密度, 利用原子力显微镜和红外光谱表征了接枝后的表面形貌及化学结构, 并对比了光化学反应前后表面的蛋白吸附情况; 微阵列喷墨打印阶段探索得到了固定效率相对最高的抗体喷墨打印浓度及其他条件, 以及利于溶解的辅剂条件, 以配合得到完整的标志物快速检测平台。

ST2 涉及心力衰竭的纤维化与重塑过程, 是急

慢性心力衰竭患者管理的新兴标志物^[31]。2013 年 ACCF/AHA 心力衰竭指南已将 ST2 引入推荐的生物标志物^[32], 2014 年中国心力衰竭诊断和治疗指南指出, 反映心肌纤维化的可溶性 ST2 等指标在急性心力衰竭的危险分层可能提供额外信息^[33], 2017 年 ACCF/AHA 更新推荐 ST2 作为急性心力衰竭危险分层和评估预后的生物标志物之一, 在心房钠尿肽之外提供额外的预后信息^[34]。2018 年中国心力衰竭诊断和治疗指南指出, 可溶性 ST2 有助于心力衰竭患者的危险分层和预后评估, 并且联合使用多项生物标志物是未来的发展方向^[35-36]。2020 年心力衰竭生物标志物中国专家共识中认为, ST2 对急性失代偿性心力衰竭的诊断有重要的辅助作用, 具有较高的阴性预测值, 同时可作为心力衰竭患者预后评估的参考, 重复测量出现动态升高者

提示预后差^[37]。对于急性心肌梗死患者,入院时升高的血浆 sST2 水平有助于评估患者出院后 90 天发生主要不良心血管事件(major adverse cardiovascular event, MACE)的风险^[38]。我们实验室前期研究结果表明,在急性胸痛患者中,ST2 对急性主动脉夹层合并冠心病的诊断与治疗策略中国专家共识指出 ST2 作为辅助诊断及鉴别诊断的生物标志物^[40]。本研究综合探索了聚合物表面光接枝及抗体微阵列喷墨打印条件后,在高度透明的塑料薄片表面打印了心血管疾病生物标志物 ST2 的固定型捕获抗体和荧光标记的可溶解型抗体。当 ST2 质量浓度为 10 mg/L 时,可以观察到溶解后捕获抗体处有检测抗体结合,为临床提供了一种非常有应用潜力的 ST2 快速检测方法。

本研究利用光接枝表面改性技术,制备了蛋白质生物标志物的一步式 POCT 芯片,芯片表面通过喷墨打印“驻留”了免疫检测生物标志物所需的全部试剂,包含捕获抗体和报告荧光信号的检测抗体,相较于需要经过多次孵育和洗涤的传统免疫学检测方法,可以直接添加待检测样本进行检测,支持“样本进-结果出”的操作,最大程度减少操作步骤,从而降低因人工操作产生的干扰,在资源有限的环境中获得蛋白质生物标志物的高灵敏度检测;当配合 LuxScan-10K/A 扫描仪来检测识别结果时,相比常规的荧光显微镜或共聚焦显微镜,可大幅降低读取荧光强度所需的时间成本;芯片的制作流程简便,光接枝和喷墨打印的过程经济成本低,且高度可定制,根据需求更换相应抗体即可检测不同生物标志物;且有潜力进行多通道的检测,同时检测多个生物标志物,达到联合检测的效果,灵活适用于多种检测场景。建立相比之下更加经济、实用性强的生物大分子检测方法,不依赖于特殊或者昂贵的实验试剂或者实验仪器,对于精准医学的发展有重要意义。

本研究建立的蛋白质快速检测平台仍有改进和提升空间。首先,目前的检测结果仅为定性验证,进一步探索其定量检测的能力会大幅提高其应用价值;其次,尚未验证确定其最佳存储条件以及保质期;最后,为使其更加适应多种检测场景,可加入与芯片匹配的便携式荧光检测设备,使得读取检测结果更加方便,不受场地基础设施约束。

[参考文献]

[1] THOMAS H, DIAMOND J, VIECO A, et al. Global Atlas

of cardiovascular disease 2000-2016: the path to prevention and control[J]. *Glob Heart*, 2018, 13(3): 143-163.

- [2] HU J, CUI X, GONG Y, et al. Portable microfluidic and smartphone-based devices for monitoring of cardiovascular diseases at the point of care[J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(3): 305-320.
- [3] DRAIN P K, HYLE E P, NOUBARY F, et al. Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(3): 239-249.
- [4] CHRISTODOULEAS D C, KAUR B, CHORTI P. From point-of-care testing to eHealth diagnostic devices (eDiagnostics)[J]. *ACS Cent Sci*, 2018, 4(12): 1600-1616.
- [5] FERREIRA C R, YANNELL K E, JARMUSCH A K, et al. Ambient ionization mass spectrometry for point-of-care diagnostics and other clinical measurements [J]. *Clin Chem*, 2016, 62(1): 99-110.
- [6] FU X, CHENG Z, YU J, et al. A SERS-based lateral flow assay biosensor for highly sensitive detection of HIV-1 DNA [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 78: 530-537.
- [7] INAN H, POYRAZ M, INCI F, et al. Photonic crystals: emerging biosensors and their promise for point-of-care applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(2): 366-388.
- [8] KAISTI M. Detection principles of biological and chemical FET sensors[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 98: 437-448.
- [9] LIU D, WANG J, WU L, et al. Trends in miniaturized biosensors for point-of-care testing[J]. *Trends Analyt Chem*, 2020, 122: 115701.
- [10] NAYAK S, BLUMENFELD N R, LAKSANASOPIN T, et al. Point-of-care diagnostics: recent developments in a connected age[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(1): 102-123.
- [11] NGUYEN H V, NGUYEN V D, NGUYEN H Q, et al. Nucleic acid diagnostics on the total integrated lab-on-a-disc for point-of-care testing [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 141: 111466.
- [12] ZHANG D, LIU Q. Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 75: 273-284.
- [13] BAHADIR E B, SEZGINTÜRK M K. Lateral flow assays: principles, designs and labels[J]. *Trends Analyt Chem*, 2016, 82: 286-306.
- [14] POSTHUMA-TRUMPIE G A, KORF J, VAN AMERONGEN A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393(2): 569-582.
- [15] DRAZ M S, MOAZENI M, VENKATARAMANI M, et al. Hybrid paper-plastic microchip for flexible and high-performance point-of-care diagnostics[J]. *Adv Funct Mater*, 2018, 28(26): 1707161.
- [16] XIA Y, SI J, LI Z. Fabrication techniques for microfluidic

- paper-based analytical devices and their applications for biological testing: a review[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 774-789.
- [17] YANG Y, NOVIANA E, NGUYEN M P, et al. Paper-based microfluidic devices: emerging themes and applications[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(1): 71-91.
- [18] YETISEN A K, AKRAM M S, LOWE C R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices [J]. *Lab Chip*, 2013, 13(12): 2210-2251.
- [19] CHIN C D, LAKSANASOPIN T, CHEUNG Y K, et al. Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world[J]. *Nat Med*, 2011, 17(8): 1015-1019.
- [20] CHIN C D, LINDER V, SIA S K. Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices [J]. *Lab Chip*, 2012, 12(12): 2118-2134.
- [21] YE H E C, FU C C, HU L, et al. Self-powered integrated microfluidic point-of-care low-cost enabling (SIMPLE) chip [J]. *Sci Adv*, 2017, 3(3): e1501645.
- [22] JOH D Y, HUCKNALL A M, WEI Q, et al. Inkjet-printed point-of-care immunoassay on a nanoscale polymer brush enables subpicomolar detection of analytes in blood [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(34): E7054-E7062.
- [23] HUCKNALL A, KIM D H, RANGARAJAN S, et al. Simple fabrication of antibody microarrays on nonfouling polymer brushes with femtomolar sensitivity for protein analytes in serum and blood [J]. *Adv Mater*, 2009, 21(19): 1968-1971.
- [24] HEGGESTAD J T, FONTES C M, JOH D Y, et al. In pursuit of Zero 2.0: recent developments in nonfouling polymer brushes for immunoassays[J]. *Adv Mater*, 2020, 32(2): e1903285.
- [25] SHARMA S, JOHNSON R W, TA D S. Evaluation of the stability of nonfouling ultrathin poly(ethylene glycol) films for silicon-based microdevices[J]. *Langmuir*, 2004, 20(2): 348-356.
- [26] WEI Q, QI H, LUO W, et al. Fluorescent imaging of single nanoparticles and viruses on a smart phone [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(10): 9147-9155.
- [27] YAN J, ZHAO C, MA Y, et al. Three-dimensional protein microarrays fabricated on reactive microsphere modified COC substrates[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(2): 293-301.
- [28] LIN Z, MA Y, ZHAO C, et al. An extremely simple method for fabricating 3D protein microarrays with an anti-fouling background and high protein capacity [J]. *Lab Chip*, 2014, 14(14): 2505-2514.
- [29] RANA D, MATSUURA T. Surface modifications for anti-fouling membranes [J]. *Chem Rev*, 2010, 110(4): 2448-2471.
- [30] OHTAKE S, WANG Y J. Trehalose: current use and future applications [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(6): 2020-2053.
- [31] 叶刘, 葛平. 可溶性ST2是心力衰竭理想的生物标志物吗? [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2018, 10(8): 1019-1021.
- [32] YANCY C W, JESSUP M, BOZKURT B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(16): e147-e239.
- [33] 张健, 张宇辉. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014 [J]. *中华心血管病杂志*, 2014, 42(2): 98-122.
- [34] YANCY C W, JESSUP M, BOZKURT B, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on clinical practice guidelines and the Heart Failure Society of America [J]. *J Card Fail*, 2017, 23: 628-651.
- [35] 王华, 梁延春. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. *中华心血管病杂志*, 2018, 46(10): 760-789.
- [36] 黄峻. 心力衰竭 2019: 进展和思考 [J]. *中华心力衰竭和心肌病杂志*, 2020, 4(1): 52-59.
- [37] 中国医疗保健国际交流促进会循证医学分会, 海峡两岸医药卫生交流协会老年医学专业委员会. 心力衰竭生物标志物中国专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(2): 130-141.
- [38] 杨树涵, 陈红伟, 刘艳宾, 等. 可溶性生长刺激表达因子 2 对急性心肌梗死患者近期临床预后的预测价值 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(9): 783-786, 801.
- [39] YUAN W, XIN T, HAI G, et al. Magnitude of soluble ST2 as a novel biomarker for acute aortic dissection [J]. *Circulation*, 2018, 137(3): 259-269.
- [40] 中华医学会心血管病学分会大血管学组, 中华心血管病杂志编辑委员会. 急性主动脉夹层合并冠心病的诊断与治疗策略中国专家共识 [J]. *中华心血管病杂志*, 2021, 49(11): 1074-1081.

(此文编辑 许雪梅)