



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102928596 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 13

(21) 申请号 201210397979. 1

(22) 申请日 2012. 10. 18

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 周勇 陈翔 雷冲 王韬

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 郭国中

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

B81C 1/00(2006. 01)

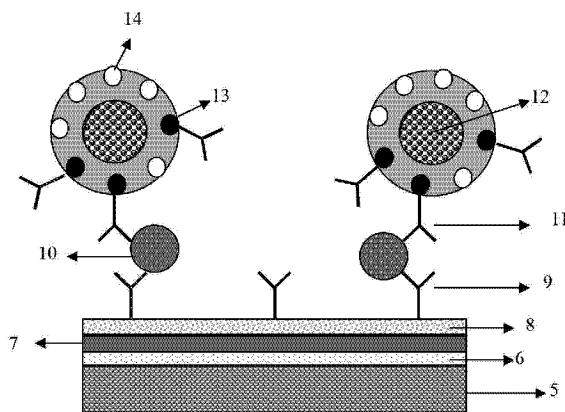
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器

(57) 摘要

本发明提供一种血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器。该生物传感器由位于玻璃基片上的巨磁阻抗效应传感器、绝缘层、Au 膜、生物敏感膜、磁性标签及信号采集系统组成。巨磁阻抗效应传感器由位于玻璃基片上的 NiFe/Cu/NiFe 多层膜构成, 并采用 MEMS 工艺制作。绝缘层为三氧化二铝, Au 膜为溅射的 Cr/Au 薄膜, 生物敏感膜为纳米级厚度的自组装膜, 生物敏感膜可以连接各种单克隆抗体。磁性标签为链霉亲和素修饰的磁性纳米粒子或由磁性纳米粒子构成的磁珠, 可以和经生物素修饰的单克隆抗体或多克隆抗体相结合。本发明传感器检测原理是采用双抗夹心法, 检测灵敏度可以检测血清肿瘤标志物高达 1ng/ml 的抗原。



1. 一种血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器,其特征在于包括位于玻璃基片上的巨磁阻抗效应传感器、位于巨磁阻抗效应传感器上的绝缘层、位于绝缘层上的 Au 膜、位于 Au 膜上的生物敏感膜、位于生物敏感膜上的磁性标签,以及与巨磁阻抗效应传感器连接的信号采集系统;其中:所述巨磁阻抗效应传感器由位于玻璃基片上的 NiFe/Cu/NiFe 多层膜构成;所述生物敏感膜为一层纳米级厚度的自组装膜。

2. 根据权利要求 1 所述的血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器,其特征在于,所述巨磁阻抗效应传感器外形呈曲折形结构,并采用 MEMS 工艺制作,所述 NiFe/Cu/NiFe 多层膜中 NiFe 薄膜厚度为 2-6 μm , Cu 膜厚度为 1-6 μm , NiFe 薄膜和 Cu 膜均采用电镀工艺制作。

3. 根据权利要求 1 所述的血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器,其特征在于,所述绝缘层为三氧化二铝,其厚度小于 1 μm ,采用溅射工艺制作的。

4. 根据权利要求 1 所述的血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器,其特征在于,所述 Au 膜为溅射的 Cr/Au 薄膜,其厚度为 100-500nm,用于修饰自组装膜。

5. 根据权利要求 1 所述的血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器,其特征在于,所述生物敏感膜为 11- 巯基十一烷酸,然后经 EDC+NHS 活化形成的,生物敏感膜可以连接各种单克隆抗体,单克隆抗体可以和被检测的抗原结合。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器,其特征在于,所述的磁性标签为链霉亲和素修饰的磁性纳米粒子或由磁性纳米粒子构成的磁珠,可以和经生物素修饰的单克隆抗体或多克隆抗体相结合,生物素修饰的单克隆抗体或多克隆抗体可以和被检测的抗原结合。

7. 根据权利要求 6 所述的血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器,其特征在于,所述的生物传感器,采用自组装膜技术固定单克隆抗体,单克隆抗体与抗原结合,带有链霉亲和素的磁性标签与生物素化的多克隆抗体结合,由于抗原-抗体的免疫反应,磁性标签被标记到传感器的表面上,一旦有极微量的被检测生物分子存在时,在外磁场作用下,磁性标签产生的弥散磁场将导致传感器的磁阻抗的变化,这种变化直接转变为电压信号,从而实现对相应生物分子的高灵敏度检测。

8. 根据权利要求 1-5 任一项所述的血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器,其特征在于,所述的信号采集系统为 HP 公司的 4194A 阻抗分析仪或 Agilent 公司生产的 4294A 阻抗分析仪。

血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器

技术领域

[0001] 本发明涉及生物传感器,具体地,涉及一种血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器,属于医学检测方法与磁性传感技术领域。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤是当今威胁人类健康和生命的主要疾病之一,且发病率有逐年上升的趋势。目前临床主要的肿瘤检测手段包括:

[0003] [1] 实验室检查:主要包括血、尿、大便的常规检查、生化及免疫检查、病理学检查等。

[0004] [2] 放射学检查:主要包括 X 光透视、X 光摄片、X 光造影检查、CT 扫描、核磁共振成像等。

[0005] [3] 放射性核素检查:即同位素检查,包括功能测定检查、扫描及伽玛照射检查、放射免疫分析等。

[0006] [4] 超声波检查:包括 A 型、B 型超声波检查。

[0007] [5] 内窥镜检查:包括各种硬性或光学纤维镜。

[0008] 在肿瘤的研究和临床实践中,早期发现、早期诊断、早期治疗是关键。目前常规的影像方法如 X 线、CT、核磁共振、B 超等仅能发现 0.5cm 以上的肿块,这时部分肿瘤已经处于中晚期,有的肿瘤已经发生了转移,多数病人已经丧失了最佳的治疗时机。血清肿瘤标志物在肿瘤普查、诊断、判断预后和转归、评价治疗疗效等方面都具有较大的实用价值。血清肿瘤标志物检测已经成为早期发现肿瘤的方法之一,目前已经发展了多种血清肿瘤标志物检测技术并不断地应用于临床如免疫放射分析法、酶标记免疫分析技术、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法、液体芯片检测技术等,这些方法各有其优点,如液体芯片一次能检查出多种肿瘤标志物,和多次检测相比降低了成本。但这些方法的不足之处在于缺乏灵活性,单项指标敏感性低、特异性较差。在检测速度、准确率和检测费用方面均存在缺陷,因此利用多学科交叉的优势研制新型肿瘤标志物检测的生物传感器技术显得尤为重要。

[0009] 生物传感器是利用生物活性材料(如酶、蛋白质、DNA、抗体、抗原、生物膜等)与物理化学换能器(如电化学、光学、机械、电、磁等)有机结合构成的一种生物信息检测分析工具。由于生物传感器在医疗保健、疾病诊断、食品安全检测等具有广泛的用途,受到了世界各国科学家的深入研究和大力研发;然而仍存在一些因素限制了生物传感器的大规模应用和推广,如传统生物传感器的分析操作步骤太多、分析周期长、价格昂贵、体积大、昂贵的光学检测设备及需要训练有素的专业人员才能完成等。近年来,由于免疫磁珠技术的不断进展和微传感器技术的发展,科学家们提出了将微磁传感器并结合磁性标签研制用于生物学、医学、遗传学、毒物学等生物信息探测的新一代生物传感器。利用微磁传感器并结合磁性标签用于探测生物分子的理念最早是由美国海军实验室的 Baselt 等 [Baselt D. R., Lee G. U., Natesan M., Metzger S. W., Sheehan P. E., Colton R., A biosensor based on magnetoresistance technology, Biosens. Bioelectr. 17(1998)731.] 于 1998 年提出

的,由此开启了磁生物传感器研究的热潮。目前已报道的用于磁性纳米粒子(磁珠)检测的微磁传感器,主要有电磁感应式传感器、磁阻(AMR)传感器、霍尔传感器、巨磁电阻(GMR)传感器和巨磁阻抗(GMI)传感器等。巨磁阻抗(GMI)效应传感器是一种新型的磁场传感器,其原理是利用交流电流通过磁性材料时其阻抗(Z)随外磁场(H)灵敏变化的这一特征,GMI传感器具有磁场灵敏度高(4—100%/ $0e$)、功耗少、响应速度快,偏置磁场小等优点,非常适合于磁性纳米粒子的探测,其优势在于:1)GMI传感器具有较高的磁场灵敏度,适合于磁性纳米粒子(或磁珠)的检测;2)传感器的制造技术可与大规模集成电路技术相兼容,易于批量化生产,成本低、价格便宜;3)传感器的信号测评电路可通过CMOS集成电路处理得到,具有体积小、成本低等特点;4)GMI效应的产生不需要很大的驱动磁场。由于GMI效应是唯一的一种利用交流效应做检测的,并与传统的设备和检测手段相兼容,因此在磁场检测与生物医学检测方面展示出广阔的应用前景。

[0010] 经对现有技术的文献检索发现,Kurlyandskaya等(Kurlyandskaya G. V., Sanchez M. L., Hernando B.)在《Appl. Phys. Lett.》(美国应用物理快报)《Vol. 82, pp. 3053, 2003》首次提出使用GMI传感器来探测磁性纳米粒子,并利用CoFeMoSiB非晶带材制备了探测装置,成功实现了对商业Ferrofluid®液体中磁性纳米粒子以及Dynabeads® M-450磁珠的探测。2007年,Kurlyandskaya等(A. Kumar, S. Mohapatra, V. F. Miyar, A. Cerdeira, J. A. Garcia, H. Srikanth, J. Gass and G. V. Kurlyandskaya)在《Appl. Phys. Lett.》(美国应用物理快报)《Vol. 91, pp. 143902, 2007》报道了利用GMI传感器对吞噬Fe₃O₄纳米粒子的人体胚肾细胞(HEK293)进行检测,证明了GMI效应在生物医学检测领域的可行性,但该研究工作只是得到了GMI传感器对Fe₃O₄磁性纳米粒子的响应,没有实现对细胞样品的标记和分型检测。

[0011] 随着微机电系统(MEMS)技术的发展,利用MEMS技术制备的微流控芯片已应用于生物与医学检测领域,而MEMS技术同样可用来制造小型化、集成化的GMI传感器。将生物信息的固定与小型化GMI传感器相结合构建新型血清肿瘤标志物检测系统,利用磁性纳米粒子标签对血清肿瘤标志物进行检测,具有重要的研究意义和临床价值。通过文献和专利检索,没有发现关于将GMI效应传感器用于血清肿瘤标志物检测的相关研究成果。

发明内容

[0012] 针对现有技术中的缺陷,本发明的目的是提供一种血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器。该生物传感器采用MEMS加工工艺制作,能够与配套的检测电路制作在一起,实现整个系统的小型化、低成本,并使检测系统具有高灵敏度和响应速度,且易于大批量生产。该生物传感器的检测灵敏度可以检测血清肿瘤标志物高达1ng/ml的抗原。

[0013] 为了实现上述目的,本发明所述血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器包括位于玻璃基片上的巨磁阻抗效应传感器、位于巨磁阻抗效应传感器上的绝缘层、位于绝缘层上的Au膜、位于Au膜上的生物敏感膜、位于生物敏感膜上的磁性标签,以及与巨磁阻抗效应传感器连接的信号采集系统。

[0014] 优选地,上述的巨磁阻抗效应传感器由位于玻璃基片上的NiFe/Cu/NiFe多层膜构成,传感器外形呈曲折形结构,并采用MEMS工艺制作,NiFe薄膜厚度为2-6 μ m,Cu膜厚度为1-6 μ m,NiFe薄膜和Cu膜均采用电镀工艺制作,具有批量生产的优势。

- [0015] 优选地,上述的绝缘层为三氧化二铝,其厚度为小于 1 μ m,采用溅射工艺制作的。
- [0016] 优选地,上述的 Au 膜为溅射的 Cr/Au 薄膜,其厚度为 100–500nm,用于修饰自组装膜。
- [0017] 优选地,上述的生物敏感膜为一层纳米级厚度的自组装膜,自组装膜为 11- 巯基十一烷酸,然后经 EDC+NHS 活化形成,生物敏感膜可以连接各种单克隆抗体,单克隆抗体可以和被检测的抗原结合。
- [0018] 优选地,上述的磁性标签为链酶亲和素修饰的磁性纳米粒子或由磁性纳米粒子构成的磁珠。可以和经生物素修饰的单克隆抗体或多克隆抗体相结合。生物素修饰的单克隆抗体或多克隆抗体可以和被检测的抗原结合。
- [0019] 本发明提供的生物传感器,其检测抗原的原理是采用双抗夹心法。采用自组装膜技术固定单克隆抗体,单克隆抗体与抗原结合,带有链酶亲和素的磁性标签与生物素化的多克隆抗体结合,由于抗原-抗体的免疫反应,磁性标签被标记到传感器的表面上。一旦有极微量的被检测生物分子(抗原)存在时,在外磁场作用下,磁性标签产生的弥散磁场将导致传感器的磁阻抗的变化,这种变化直接转变为电压信号,从而实现对相应生物分子的高灵敏度检测。
- [0020] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:
- [0021] (1) 磁传感器的制备技术可与半导体的 CMOS 技术兼容,从而可实现集成磁传感器阵列,成本低、价格便宜,易于批量生产;
- [0022] (2) 磁阻抗变化的信号可通过集成的 CMOS 电路得到处理,直接将生物信息转换为电信号,可实现即时分析,并具有很高的检测灵敏度;
- [0023] (3) 生物样品本身不带磁性,能提供一个很低噪声的磁测量环境,相对于荧光分子、放射性同位元素、酶等标签,磁性标签非常稳定;
- [0024] (4) 在单一化验中,阵列传感器可实现对多目标分析物的同时检测,具有快速、高灵敏探测的优势。
- [0025] (5) 本发明中的血清肿瘤标志物检测系统具有检测速度快、可重复使用、无特殊环境和存放要求、体积小、灵敏度高优点;不需要依赖于操作人员的生物学医学经验以及庞杂、昂贵的荧光检测设备,就可实现特定的生化分析或疾病诊断,这将有利于实现便携式、成本低廉、快速诊断的生物医学疾病检测系统。

附图说明

- [0026] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:
- [0027] 图 1 为本发明一实施例结构示意图;
- [0028] 图 2 为图 1 所示沿 AB 方向的截面图;
- [0029] 图 3 为本发明传感器检测原理图。
- [0030] 图中: NiFe 薄膜 1、玻璃基片 2、Cu 膜 3、引脚 4、巨磁阻抗效应传感器 5、绝缘层 6、Au 膜 7、生物敏感膜 8、单克隆抗体 9、抗原 10、单克隆抗体或多克隆抗体 11、磁珠 12、生物素 13、链酶亲和素 14。

具体实施方式

[0031] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0032] 本实施例提供一种血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器。该生物传感器由位于玻璃基片上的巨磁阻抗效应传感器 5、绝缘层 6、Au 膜 7、生物敏感膜 8、磁性标签及信号采集系统组成。

[0033] 本实施例中,所述巨磁阻抗效应传感器 5 由位于玻璃基片 2 上的 NiFe 薄膜 1、Cu 膜 3、NiFe 薄膜 1 构成的多层膜及引脚 4 构成,其中 Cu 膜的宽度小于 NiFe 薄膜的宽度,并采用 MEMS 工艺制作,NiFe 薄膜 1 厚度为 2-6 μm ,Cu 膜 3 厚度为 1-6 μm ,NiFe 薄膜和 Cu 膜均采用电镀工艺制作,具有批量生产的优势。

[0034] 本实施例中,在巨磁阻抗效应传感器上面有绝缘层 6,该绝缘层 6 为三氧化二铝,其厚度为小于 1 μm ,采用溅射工艺制作的,用来保护传感器并与 Au 膜 7 绝缘。

[0035] 本实施例中,绝缘层 6 的上面为 Au 膜 7,Au 膜 7 为溅射的 Cr/Au 薄膜,其厚度为 100-500nm,用于修饰自组装膜。

[0036] 本实施例中,Au 膜 7 的上面为生物敏感膜 8,生物敏感膜 8 为一层纳米级厚度的自组装膜,自组装膜为 11- 巯基十一烷酸,然后经 EDC+NHS 活化形成的,生物敏感膜可以连接各种单克隆抗体 9,单克隆抗体可以和被检测的抗原 10 结合。

[0037] 本实施例中,磁性标签为链酶亲和素 14 修饰的磁性纳米粒子或由磁性纳米粒子构成的磁珠 12,可以和经生物素 13 修饰的单克隆抗体或多克隆抗体 11 相结合,生物素修饰的单克隆抗体或多克隆抗体 11 可以和被检测的抗原 10 结合。

[0038] 本实施例上述的生物传感器制作流程如下:

[0039] (1) 巨磁阻抗效应传感器由位于玻璃基片上的 NiFe/Cu/NiFe 多层膜构成,制作方法采用现有技术,比如专利号为 200510026607.8 中国专利中记载的方法。

[0040] (2) 在 GMI 传感器上面采用溅射工艺制作绝缘层三氧化二铝。甩光刻胶、烘干、曝光、显影、刻蚀三氧化二铝、去胶,使传感器引脚暴露在外面。

[0041] (3) 溅射 Cr/Au 薄膜,甩光刻胶、烘干、曝光、显影、刻蚀 Cr/Au 膜、去胶,使传感器的引脚和传感器敏感部分带有 Au 膜,并暴露在外面。

[0042] (4) Au 膜上生物敏感膜的制备。生物敏感膜为一层纳米级厚度的自组装膜,自组装膜为 11 巯基十一烷酸,然后经 EDC+NHS 活化形成的。

[0043] (5) 肿瘤标志物单克隆抗体的固定。将适当浓度的肿瘤标志物单克隆抗体溶液滴入传感器 Au 膜上面,放入冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;然后用 PBS 溶液清洗、BSA 溶液封闭,最后用 PBS 溶液清洗、室温干燥。

[0044] (6) 抗原点样。将适当浓度的抗原溶液滴入传感器表面,室温下 22 $^{\circ}\text{C}$ 培育或在蒸汽浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培育,然后用 PBS 溶液清洗,室温下干燥。

[0045] (7) 生物素化抗体的固定。将适当浓度的生物素化抗体溶液滴入传感器表面,室温 22 $^{\circ}\text{C}$ 培育,然后用 PBS 溶液清洗,室温下干燥。

[0046] (8) 磁性标签固定。磁性标签为链酶亲和素修饰的磁性纳米粒子或由磁性纳米粒

子构成的磁珠。将适当浓度的磁性标签滴入传感器表面,室温下培育,然后用 PBS 溶液清洗,室温干燥。

[0047] 本实施例中,生物传感器的信号采集系统为 HP 公司的 4194A 阻抗分析仪或 Agilent 公司生产的 4294A 阻抗分析仪,通过在传感器外部施加的磁场获得检测抗原的灵敏度。将巨磁阻抗效应传感器连接至 HP4194 阻抗分析仪,阻抗分析仪产生恒定交流电流幅值 10mA、频率 0.5-20MHz 的交流电流并通过传感器构成测试的闭合回路。沿着传感器的长度方向施加大小为 1-1000e 的直流磁场,对抗原存在的传感器进行巨磁阻抗变化测试。当传感器有磁性标记的抗原存在时,磁性标签被标记在传感器上,由于巨磁阻抗效应传感器的高灵敏性,会观测出磁性标签有无情况下的 GMI 效应,其 GMI 效应的差异可表达抗原的存在,从而实现对待测血清肿瘤标志物的检测。

[0048] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改,这并不影响本发明的实质内容。

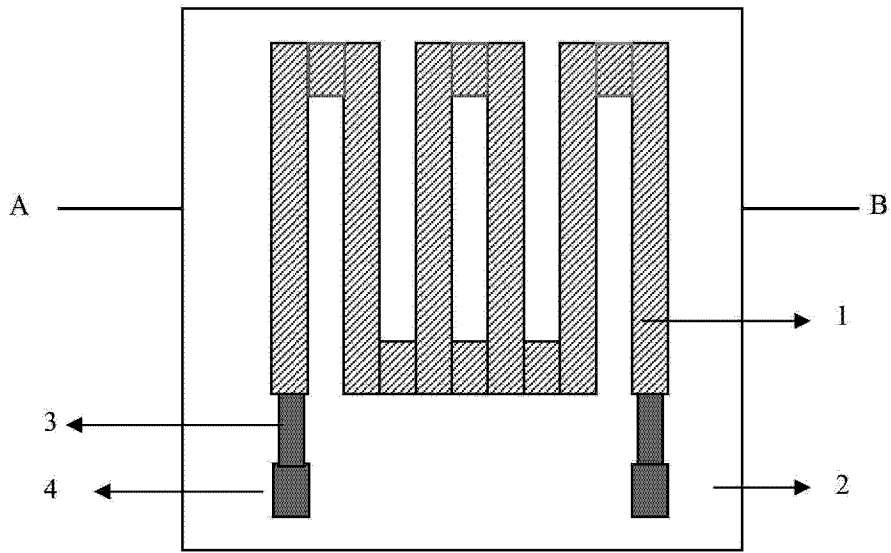


图 1

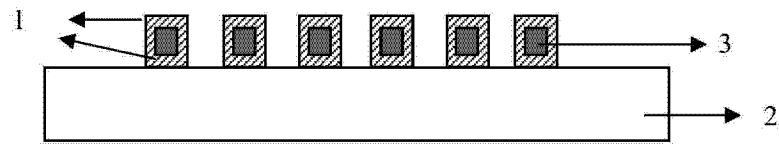


图 2

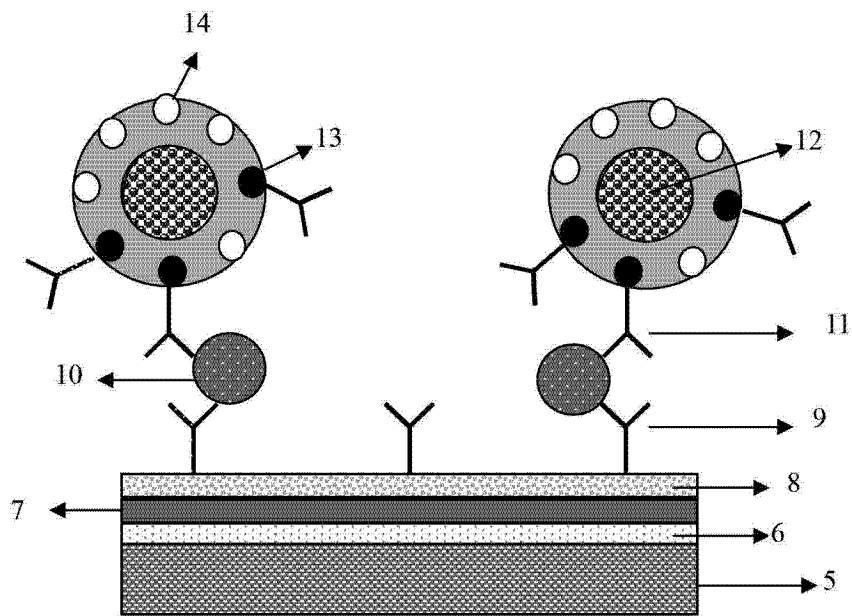


图 3

专利名称(译)	血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器		
公开(公告)号	CN102928596A	公开(公告)日	2013-02-13
申请号	CN201210397979.1	申请日	2012-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	周勇 陈翔 雷冲 王韬		
发明人	周勇 陈翔 雷冲 王韬		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 B81C1/00		
其他公开文献	CN102928596B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种血清肿瘤标志物检测的巨磁阻抗效应生物传感器。该生物传感器由位于玻璃基片上的巨磁阻抗效应传感器、绝缘层、Au膜、生物敏感膜、磁性标签及信号采集系统组成。巨磁阻抗效应传感器由位于玻璃基片上的NiFe/Cu/NiFe多层膜构成，并采用MEMS工艺制作。绝缘层为三氧化二铝，Au膜为溅射的Cr/Au薄膜，生物敏感膜为纳米级厚度的自组装膜，生物敏感膜可以连接各种单克隆抗体。磁性标签为链霉亲和素修饰的磁性纳米粒子或由磁性纳米粒子构成的磁珠，可以和经生物素修饰的单克隆抗体或多克隆抗体相结合。本发明传感器检测原理是采用双抗夹心法，检测灵敏度可以检测血清肿瘤标志物高达1ng/ml的抗原。

