

基于微流控阻抗传感器检测番茄环斑病毒

李琛¹, 许庆铎¹, 边勇²

(1. 中国计量大学质量与安全工程学院, 杭州 310018; 2. 中国海关科学技术研究中心, 北京 100026)

摘要:为实现番茄环斑病毒(Tomato Ringspot Virus, ToRSV)高效、准确的快速检测,采用内嵌金叉指阵列微电极的微流控阻抗传感器对ToRSV进行特异性检测。通过将ToRSV抗体固定于金叉指阵列微电极表面免疫结合ToRSV以引起阻抗变化,得到电化学阻抗谱,并建立等效电路分析阻抗变化机理,建立ToRSV浓度和阻抗之间的定量线性关系。等效电路分析表示,ToRSV能造成溶液电阻 R_s 、电极表面电子转移电阻 R_{et} 的显著增加和双电层电容 C_{dl} 的减小,从而引起阻抗增加。结果显示在最佳检测频率10.7 Hz下,ToRSV浓度在0.001~10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内检测到的阻抗值范围为248.8~687.2 k Ω ,ToRSV浓度与阻抗值具有良好线性关系, R^2 为0.98。测试该方法的检出限时,阻抗值显示为307.05 k Ω ,得到检出限为0.003 4 $\mu\text{g/mL}$ 。试验结果证明该传感器具有检测灵敏度高、特异性好、快速方便等优点,能够实现对ToRSV的特异性定性检测,对于其他植物病毒检测具有可推广性。

关键词:病害;传感器;微流控芯片;番茄环斑病毒;定量检测;电化学阻抗谱

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.16.018

中图分类号: Q503; TH79

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2020)-16-0142-07

李琛, 许庆铎, 边勇. 基于微流控阻抗传感器检测番茄环斑病毒[J]. 农业工程学报, 2020, 36(16): 142-148. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.16.018 <http://www.tcsae.org>

Li Chen, Xu Qingduo, Bian Yong. Detection of tomato ring spot virus based on microfluidic impedance sensor[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2020, 36(16): 142-148. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.16.018 <http://www.tcsae.org>

0 引言

近年来,随着中国对外贸易持续扩大、国际旅游更加便捷及跨境电商不断发展,中国国门生物安全形势日趋严峻。外来有害生物的数量和种类出现前所未有的增加,危害着中国农业、生态环境,乃至破坏经济、社会的稳定,威胁国家安全。番茄环斑病毒(Tomato Ringspot Virus, ToRSV)作为一种重要的作物病原体,能够感染大豆、番茄、烟草、葡萄、苹果等150多种农作物,导致严重的病害^[1-2]。目前,ToRSV已成为中国禁止入境的I类检疫性病毒^[3]。

国内外检验ToRSV的常用方法是聚合酶链式反应PCR。如赵文军等^[4]采用荧光RT-PCR在2 h内实现了ToRSV的检测;余澍琼等^[5]在PCR的基础上采用逆转录环介导等温扩增技术(RT-LAMP)检测出ToRSV,相比荧光RT-PCR缩短了近一倍时间;易汪雪等^[6]采用多重RT-PCR检测大豆种子中的ToRSV,得到0.58 $\mu\text{g/mL}$ 的低检出限。基于PCR的检测方法能够实现ToRSV的有效准确检测,但设计特异性引物、扩增测序等操作需要专业人员进行,不适用于现场的快速检测^[7]。近年来备受关注的微流控技术则能够很好的弥补这一不足。微流控技术将病毒富集、捕获、检测、分析等过程集成到一块

几平方厘米的芯片中^[8-10]。1992年,Manz等^[11]在玻璃上设计微通道,从而开创了微流控技术,Gomez等^[12]基于微流控技术集成制造了第一个白金叉指阵列电极的硅基微流控芯片,结合阻抗法研究细胞的代谢活性。近来,微流控技术与电化学阻抗检测方法结合的微流控阻抗传感器愈来愈多应用于生物检测,且方法创新多样,如基于微叉指阵列电极^[13-14]、基于介电泳技术(Dielectrophoresis, DEP)^[15-16]和基于纳米材料(如纳米粒子^[17-18]、纳米孔膜^[19-20]和石墨烯^[21]等)。不同纳米材料联用产生的协同效应使得微流控阻抗传感器在高效捕获病菌病毒和放大阻抗信号方面的优势更为显著^[22],成为近来微流控阻抗传感器在生物检测领域的研究热点。总之,微流控阻抗传感器具有快速性、特异性、试剂消耗少、无标记检测、操作简便和易于微型化和自动化的仪器设备开发的特点,是实现生物病毒现场检测的理想方法^[23-25]。本文针对ToRSV的检测问题,设计制作了嵌有金叉指阵列微电极的微流控芯片,搭建了面向ToRSV检测的微流控阻抗传感器检测平台,根据电化学检测原理得到阻抗谱,利用等效电路阐释阻抗产生及变化机理,并进行特异性检测试验。最后,建立ToRSV浓度和阻抗之间的定量关系模型,为ToRSV的现场检测提供了理论依据和技术支撑。

1 微流控阻抗检测原理及方法

1.1 微流控阻抗检测原理

微流控阻抗检测技术是基于微流控芯片系统,将生物病毒浓度转换为电化学阻抗信号并进行快速检测的方法,其检测原理是以微流控芯片系统为平台,首先将生

收稿日期: 2020-04-09 修订日期: 2020-07-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC0809200);浙江省基础公益研究计划项目(LGF19G030004)

作者简介: 李琛,副教授,从事安全检测技术、微流体理论研究。

Email: lichen@cjlu.edu.cn

物病毒抗体分子固定在微流控芯片中的导电换能器(金叉指阵列微电极)表面,然后将生物病毒的抗原溶液注入到介观尺度的微流道中,病毒抗原抗体在微流道内发生反应后形成特异性复合物并附着在导电换能器上,使得导电换能器的阻抗特性发生变化。因此,建立阻抗信号的变化情况和检测物浓度之间的定量关系以达到检测的目的^[26]。

1.2 番茄环斑病毒样本溶液制备

1) 先于 1.5 mL 离心管中加入 500 μL 植物蛋白提取液 A、4 μL 蛋白稳定剂和 2 μL 蛋白酶抑制剂(以上试剂来自植物蛋白提取试剂盒 C500053, 生工生物工程(上海)股份有限公司生产),用恒温混匀仪(型号 MSC-100, 杭州奥盛仪器有限公司)混匀备用;

2) 往研钵中倒入液氮,加入带番茄环斑病毒的植物叶片研磨充分,装入上述备好的 1.5 mL 离心管中;

3) 将离心管放入 4 $^{\circ}$ 混匀仪中,速度 800 r/min,振荡 1 h,随后放入 4 $^{\circ}$ 冷冻离心机(型号 5418R, 德国 Eppendorf 公司)中,速度 12 000 r/min,离心 15 min;

4) 提取离心管中的上清液到一个新的 1.5 mL 离心管中,取 1 μL 分离的上清液,使用超微量分光光度计(型号 Nanodrop 2000, 美国赛默飞公司)测定番茄环斑病毒浓度为 26.6 mg/mL,用磷酸盐缓冲液 PBS (0.1 mol/L, pH 值 7.4) 分别稀释至 10、1、0.1、0.01 和 0.001 $\mu\text{g/mL}$,于 -80 $^{\circ}$ 保存备用。

1.3 微流控阻抗检测芯片和系统

本文设计的微流控阻抗检测芯片分为三层:基底层、通道层和盖片层,如图 1 所示。

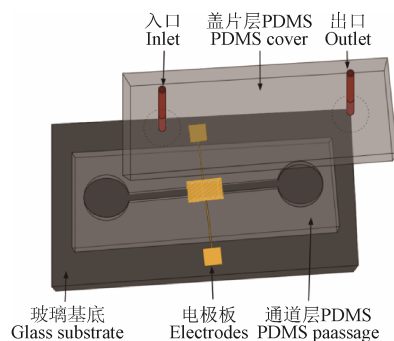


图 1 微流控芯片示意图

Fig.1 Schematic of microfluidic chip

基底层采用玻璃材质,并在玻璃基底表面通过磁控射频溅射法喷射 Cr 层,其厚度为 10 nm,用以提高金箔与玻璃的粘结效率^[27];在 Cr 层表面再喷射金箔层,其厚度为 100 nm,并采用湿法蚀刻技术雕刻出微叉指阵列电极的图案。通道层采用聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)材质,并利用 SU-8 阳膜刻蚀出介观尺度的微流道;通道层包括微通道、储液池和废液池,微通道与金叉指电极在同一空间内形成微反应室,抗体与抗原免疫结合及电极检测阻抗信号均在该区域进行。盖片层采用 PDMS 材质,将其覆盖在通道层之上,保障反应空间的密封。

金叉指阵列微电极设计图如图 2 所示,其设计参数

为:金叉指微电极对数 20 对、电极高 100 nm、长 0.6 mm、宽 15 μm 、电极间距 15 μm 。微通道的设计参数为:长 7 mm、宽 0.5 mm、深 100 μm ;储液池和废液池的参数为:直径 3 mm,深 100 μm ;微反应室的体积为:1.2 mm \times 0.5 mm \times 0.1 mm=0.06 mL。在盖片层对应储液池和废液池的中心打孔,直径为 0.5 mm,连接导管用于试剂的输入和排出。

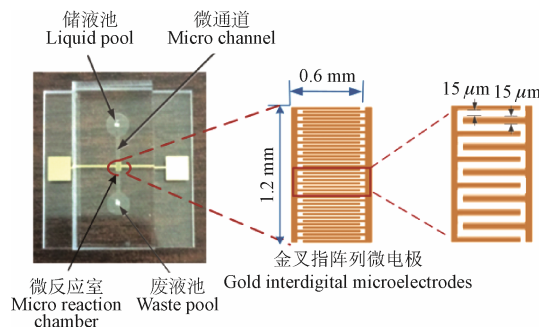


图 2 金叉指阵列微电极设计图

Fig.2 Schematic of gold interdigital microelectrodes

微流控芯片阻抗检测系统示意图如图 3 所示,主要包括驱动模块、反应模块和检测模块。驱动模块为微量注射泵(型号 Harvard, 美国 Harvard Apparatus 公司),注射泵通过直径为 0.5 mm 的钢针和软导管与微流控芯片的入口相连,以便将病毒检测样品及相关试剂按规定速率注入微流控芯片中;反应模块包括微流控芯片、金叉指电极,为样品从捕捉到免疫反应过程中现象的产生,以及阻抗变化信号产生提供反应平台;检测模块包括电化学工作站(型号 CS350, 武汉科斯特科技有限公司)和计算机,电化学工作站与微流控芯片的金叉指微电极连接,对金叉指电极上产生的阻抗变化信号进行检测,数据通过计算机配套软件进行分析。

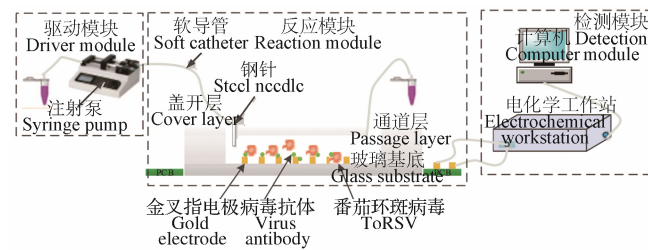


图 3 微流控阻抗检测系统示意图

Fig.3 Schematic diagram of the microfluidic impedance detection system

1.4 试验方法

将注射泵注入流速设定为 10 $\mu\text{L/min}$,电化学工作站阻抗测试参数设定为:交流激励电压为 100 mV,测试频率为 1~100 kHz。按照下列步骤进行试验:

1) 裸电极测量:注入 PBS 缓冲液测量裸电极的阻抗值,测量完成后持续注入超纯水 3 min 清洗微通道及微电极;

2) 抗体固定:注入 15 μL 浓度为 0.5 mg/mL 的 ToRSV 单克隆抗体(GenScript USA Inc 生产)使之充满微通道,静置 2 h。此时, PBS 缓冲溶液的 pH 值为 7.4、离子浓度

为 0.1 mol/mL, 该条件下的 PBS 缓冲液具有盐平衡和稳定 H^+ 的作用, 抗体蛋白在吸附过程中不会受 pH 和离子浓度的影响, 从而会被稳定地非特异性吸附在金电极表面。因此, 在此条件下蛋白对固体材料的吸附性较好, 抗体会被非特异性地吸附在金电极表面。2 h 之后用超纯水清洗除去未吸附的抗体, 注入 PBS 缓冲液测量阻抗值, 测量完成后重复清洗操作。

3) BSA 封闭: 注入 15 μ L 1%BSA 溶液 (北京索莱宝科技有限公司生产), 静置 30 min, 其作用为封闭未被抗体附着的金电极表面, 以免产生多余的干扰信号。30 min 后清洗掉多余的 BSA, 注入 PBS 缓冲液测量阻抗值, 测量完成后重复清洗操作。

4) ToRSV 检测: 注入 15 μ L 的 ToRSV 样品, 静置 30 min, 测量阻抗值, 测量完成后重复清洗操作, 直至阻抗与裸电极测量时相似。

2 结果与分析

2.1 阻抗值与相角分析

利用 CS350 电化学工作站在 1~100 kHz 的频率范围内测得 50 个点的阻抗值和相位值, 得到如下阻抗与检测频率以及相角与检测频率关系曲线, 如图 4 所示。

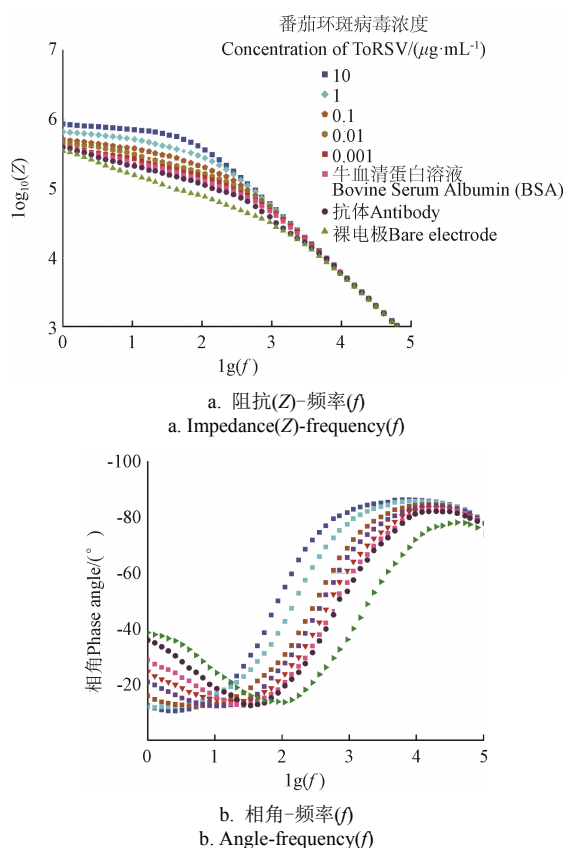


图 4 不同溶液的阻抗(Z)-频率(f)、相角-频率(f)曲线
Fig.4 Impedance(Z)-frequency(f) and phase angle-frequency(f) curves of different solutions

图 4 为不同阶段的阻抗-频率、相角-频率关系曲线。图 4a 中, 检测频率范围为 1~10⁵Hz, 分别测得裸电极、抗体固定、BSA 封闭电极等不同阶段、不同病毒浓度对应的阻抗值。由于检测频率对阻抗的影响, 阻抗-频率呈

现如下趋势: 在 1~10³Hz 的低频范围内, 阻抗值随着频率的降低逐渐趋于平稳; 在 1~100 kHz 的高频范围内, 阻抗值随着频率的降低呈线性增加的趋势, 并且各步骤下所测的阻抗值大小并无明显区别。此外, 相比于裸电极而言, 在对单一 PBS 缓冲液、抗体固定后以及 BSA 封闭电极后的电极阻抗进行测量时发现, 电极阻抗进一步提高, 说明抗体成功固定在电极表面, 且 BSA 成功封闭电极中的裸露区域; 当抗体捕获 ToRSV 并发生反应后, 使得电极阻抗值进一步增加, 且 ToRSV 浓度越高, 阻抗值增幅也越大。阻抗值增加的原因是由于电极表面的抗体免疫结合病毒抗原, 导致电极指间离子流动和电子转移受阻, 且病毒浓度与阻碍能力成正比, 病毒浓度越高, 离子流动和电子转移能力受阻程度越大, 因此导致电极阻抗增加。

图 4b 检测频率的范围为 1~10⁵Hz, 在裸电极、抗体固定、BSA 封闭电极等不同阶段时, 不同病毒浓度的相角变化曲线。相位角为 -90° 时说明该体系是纯电容体系, 相位角为 0° 时说明该体系是纯电阻体系^[28]。如图 4 所示, 在低频范围内 (1~10³Hz) 相位角最低为 -10° 至 -40°, 在高频范围内 (1~100 kHz) 相位角最高能接近 -90°, 说明阻抗的产生在高频区由容抗 (电容特性) 占主导, 在低频区由阻抗 (电阻特性) 占主导。

2.2 等效电路

2.2.1 等效电路的建立

为了更好地分析高、低频区下的电化学阻抗谱, 建立了面向 ToRSV 检测的等效电路模型。等效电路模型如图 5 所示, 包括: 溶液电阻 (R_s)、电子转移电阻 (R_{et})、双电层电容 (C_{dl}) 和介电电容 (C_{di})。当电极浸入电解液中时, 电极表面与溶液表面如同电容极板, 同时在电极表面产生两层电荷, 从而构成双电层电容 C_{dl} , 双电层电容 C_{dl} 表征离子对电极、溶液界面处电容的影响; 电子转移电阻 R_{et} 表征电极表面上电子转移到溶液时生成的电阻; 双电层电容 C_{dl} 与电子转移电阻 R_{et} 并联, 表征金叉指电极表面与溶液之间的界面所形成的阻抗。 R_s 表征测试溶液电阻, 与双电层电容 C_{dl} 和电子转移电阻 R_{et} 的并联电路串联; C_{di} 表征测试溶液的介电电容, 与溶液电阻 R_s 、双电层电容 C_{dl} 和电子转移电阻 R_{et} 的电路并联。

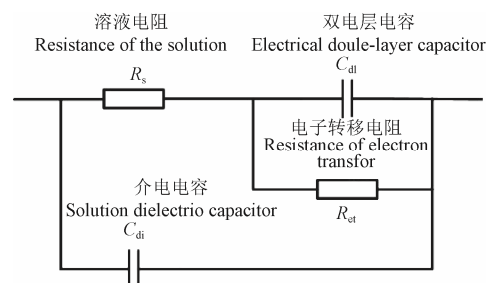


图 5 等效电路图

Fig.5 Diagram of equivalent circuit

2.2.2 等效电路的拟合

采用 ZView 电化学阻抗分析软件建立等效电路模型, 并利用复杂非线性最小二乘法, 对 50 个数据点进行

等效电路拟合, 拟合采用 Levenberg-Marquardt 迭代拟合, 得到的拟合曲线为公式 (1)、(2)。在拟合值与实测值的比较中发现, 不同浓度的拟合曲线和实测点切合度较高, 因此选取 $10 \mu\text{g/mL}$ 浓度病毒抗原的阻抗值和相角实测数据与等效电路拟合曲线加以分析该等效电路的有效性, 如图 6 所示。拟合曲线和实测曲线比较可得, 阻抗值的误差绝对值的平均值为 0.8% , 最大误差为 11.9% ; 相角的误差绝对值的平均值为 0.7° , 最大误差为 5.5° 。依次对浓度为 1 、 0.1 、 0.01 和 $0.001 \mu\text{g/mL}$ 的病毒抗原进行实测试验与拟合试验, 阻抗值误差绝对值的平均值分别为 0.6% 、 1.1% 、 1.2% 、 0.5% , 相角拟合误差绝对值的平均值分别为 0.8° 、 0.8° 、 0.5° 、 0.8° 、 1.4° 。试验结果表明, 拟合曲线的拟合效果良好, 本文设计的等效电路模型与微流控阻抗传感器具有较好的拟合一致性。

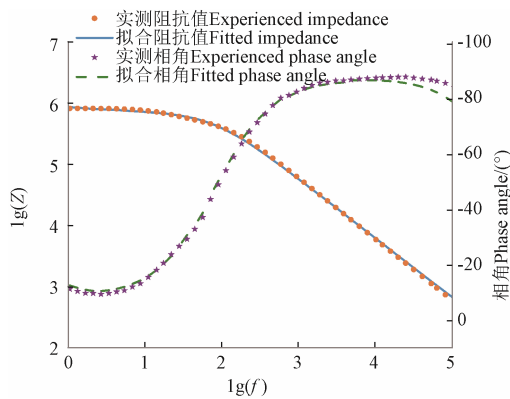


图 6 $10 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ToRSV 阻抗、相角拟合图

Fig.6 Fitted curves of impedance and phase angle of $10 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ToRSV

等效电路中的 2 条支路 $R_s + R_{et} + C_{dl}$ 和 C_{di} 在 2 个不同的频率范围内控制着电流的流动。在低频区 ($1 \sim 1 \text{ kHz}$), 施加的电压频率不足以使电流通过病毒外壳的脂膜, 因此捕获的病毒相当于绝缘体。等效电路中相当于电流不经过介电电容 C_{di} 这条支路, 介电电容 C_{di} 不做功, 阻抗的产生由 $R_s + R_{et} + C_{dl}$ 支路占主导, 其阻抗值计算符合公式 (2)。在高频区 ($1 \sim 100 \text{ kHz}$), 施加的电压频率足以使电流通过病毒外壳的脂膜, 从而电流流经 C_{di} 支路, 此时 $R_s + R_{et} + C_{dl}$ 支路不做功, 阻抗的产生由 C_{di} 支路占主导, 其阻抗值计算符合公式 (3)。

电子转移电阻与双电层电容 $R_{et} // C_{dl}$ 的并联元件阻抗值计算符合电阻和电容并联时的阻抗计算公式^[29]

$$Z = R_{et} / \sqrt{(1 + 2\pi f R_{et} C_{dl})^2} \quad (1)$$

式中 Z 表示阻抗值, Ω ; f 表示频率, Hz ; R_{et} 为电子转移电阻, Ω ; C_{dl} 为双电层电容, nf 。

在低频时, $2\pi f R_{et} C_{dl}$ 远小于 1, $R_{et} // C_{dl}$ 的并联元件阻抗值 Z 可等同于 R_{et} , 因此溶液电阻 R_s 与 $R_{et} // C_{dl}$ 的串联电路产生的阻抗值计算等同于 2 个电阻元件阻抗值相加, 公式如 (2); 由介电电容 C_{di} 产生的阻抗值计算公式如 (3)

$$Z_1 = R_s + R_{et} // C_{dl} = R_s + R_{et} / \sqrt{(1 + 2\pi f R_{et} C_{dl})^2} \quad (2)$$

$$Z_2 = 1 / (2\pi f C_{di}) \quad (3)$$

式中 Z_1 表示低频区内由 $R_s + C_{dl} + R_{et}$ 支路所产生的阻抗, Ω ;

Z_2 表示高频区内 C_{di} 支路所产生的阻抗, Ω 。

2.2.3 等效电路元件对阻抗值的影响分析

为了研究阻抗变化机理, 本文对等效电路各元件对阻抗值的影响进行模拟。等效电路元件在不同检测工况下的模拟值如表 1 所示, 同时将 BSA 封闭电极后检测 PBS 缓冲液的实验作为阴性对照组。

表 1 不同等效电路各元件模拟值

Table 1 Analog values of each component with different equivalent circuits

番茄环斑病毒浓度 ToRSV concentration ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	溶液电阻 Resistance of the solution R_s /k Ω	电子转移电阻 Resistance of electron transfer R_{et} /k Ω	双电层电容 Electrical double-layer capacitor C_{dl} /nf	溶液介电电容 Solution dielectric capacitor C_{di} /nf
对照 Control	200.71	67.23	194.03	2.78
0.001	203.20	77.42	142.13	2.83
0.01	219.04	160.17	100.18	2.91
0.1	276.87	183.86	61.08	3.02
1	352.07	217.28	41.53	2.70
10	559.78	251	31.22	2.69
对照与最大浓度的差值	359.07	183.77	-162.81	-0.09

由表 1 可得, 与对照试验相比, 当病毒浓度增加至 $10 \mu\text{g/mL}$ 时, 溶液电阻 R_s 从 200.71 增加到 $559.78 \text{ k}\Omega$, 变化量为 $359.07 \text{ k}\Omega$, 较对照值 $200.71 \text{ k}\Omega$ 相比, 变化率为 178.9% ; 电子转移电阻 R_{et} 从 67.23 增加到 $251 \text{ k}\Omega$, 变化量为 $183.77 \text{ k}\Omega$, 变化率为 273.3% ; 双电层电容 C_{dl} 从 194.03 减少到 31.22 nf , 变化量为 $-162.81 \text{ k}\Omega$, 变化率为 -83.9% ; 溶液介电电容 C_{di} 的变化量为 -0.09 nf , 变化率为 -3.2% 。

在高频区, 阻抗的产生主要由溶液介电电容 C_{di} 占主导, 而溶液介电电容 C_{di} 的值基本不变, 在低频区, 虽然双电层电容 C_{dl} 随着捕获病毒浓度增加而减少, 其平均阻抗变化值约 $38.9 \text{ k}\Omega$, 约占总阻抗值变化的 7.2% , 表明双电层电容的变化对阻抗值的变化有微小的影响。溶液电阻 R_s 和电子转移电阻 R_{et} 随着捕获病毒浓度增加而显著增加, 且占总阻抗值变化的 92.8% , 表明阻抗的变化由溶液电阻 R_s 和电子转移电阻 R_{et} 占主导作用。造成溶液电阻 R_s 及电子转移电阻 R_{et} 增加的因素是一致的, 即: ToRSV 抗体捕捉病毒, 使电极表面与溶液交界处、电极指间电子转移和离子流动受阻。

2.3 ToRSV 浓度检测

ToRSV 检测浓度由某一检测频率下的阻抗响应关系决定, 选择合适的检测频率能够得到较好的阻抗响应, 从而优化传感器的检测灵敏度。在相邻频率梯度内, 阻抗差值越大则表明检测频率越佳。

图 7 为各病毒浓度的平均阻抗差值 ΔZ 变化曲线, ΔZ 是基于 3 次重复测试下病毒样品的阻抗值减去阴性对照试验所测的阻抗值计算均值所得。 ΔZ 的变化具有相同的趋势: 在低频区内 ($1 \sim 1 \text{ kHz}$), ΔZ 先增加后减少, 最大平均阻抗差值落在 10.7 Hz 频率上, 且该频率下各相邻浓度之间 ΔZ 的变化幅度也最大; 在高频区内 ($1 \sim 100 \text{ kHz}$), ΔZ 几乎重合且接近于 0; 综上认为 10.7 Hz 是本文设计的微流控阻抗传感器检测 ToRSV 的最佳检测频率。

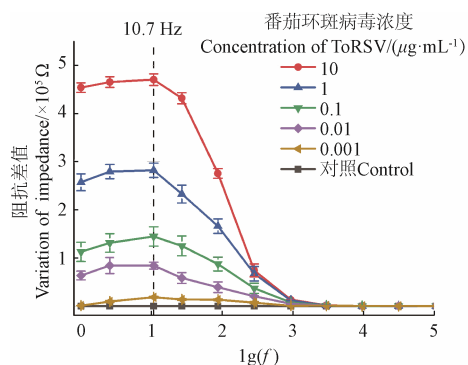


图7 不同浓度病毒的阻抗差值

Fig.7 Variation of impedance of different concentrations of virus

图8显示了在最佳检测频率 10.7 Hz 时各病毒浓度与阻抗值 Z 的对应关系, 在 0.001~10 $\mu\text{g/mL}$ 病毒浓度范围内, 病毒浓度 C 和阻抗值 Z 可表达为

$$Z = 109.6 \log(C) + 577.6 \quad (R^2=0.98) \quad (4)$$

检测限设为空白信号+3 倍信噪比, 其中噪声定义为控制对照组的标准偏差, 得到此微流控阻抗传感器的检测限为 0.003 4 $\mu\text{g/mL}$, 对应的阻抗值为 307.05 k Ω 。

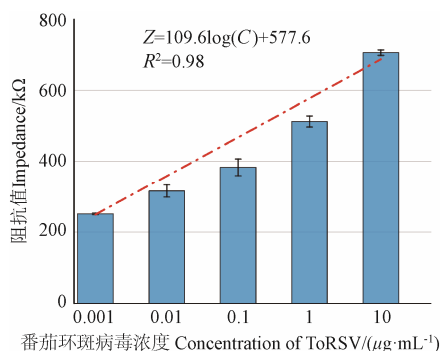


图8 最佳检测频率 (10.7 Hz) 下的浓度-阻抗关系

Fig.8 Concentration-impedance at the optimal detection frequency

表2总结了番茄环斑病毒 ToRSV 的其他检测方法, 相比之下, 基于微流控阻抗传感器检测 ToRSV 具有快速、简便和高灵敏度的优势。

表2 ToRSV 的检测方法比较^[30-32]

Table 2 Comparison of ToRSV detection methods

方法 Methods	检测时间 Detection time	检出限 Detection limit	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
纳米荧光颗粒试纸条 Nano fluorescent particle test strip	5~20 min	6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	快速、成本低	特异性和灵敏度差
实时荧光 PCR Real-time fluorescent PCR	0.5~2 h	2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	快速	假阴性率高
杂交诱捕反转录PCR酶联免疫法 HC-RT-PCR-ELISA	5 h	10 μg	特异性好	耗时、灵敏度差
半巢式反转录聚合酶链式反应法 SN-RT-PCR	3 h	10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	快速、特异性和灵敏性好	成本高、操作复杂
多重反转录聚合酶链式反应法 Multiplex-RT-PCR	1.5 h	4 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	快速、特异性和灵敏度高	成本高、操作复杂
微流控阻抗传感器法 Microfluidic impedance sensor	10~15 min	4 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	快速、痕量、特异性好	前处理复杂

2.4 特异性检验

本文使用南方菜豆花叶病毒 (Southern Bean Mosaic Virus, SBMV)、南芥菜花叶病毒 (Arabis Mosaic Virus, ArMV) 和烟草环斑病毒 (Tobacco Ringspot Virus, TRSV) 作为非靶向病毒来验证 ToRSV 的检验特异性。分别对 10 $\mu\text{g/mL}$ SBMV 溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ ArMV 溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ TRSV 溶液和 10 $\mu\text{g/mL}$ 混合 SBMV、ArMV、TRSV、ToRSV 4 种病毒的溶液进行 3 次重复检测试验, 仍以 BSA 封闭电极后测 PBS 缓冲液的阻抗作为阴性对照得到阻抗差值。

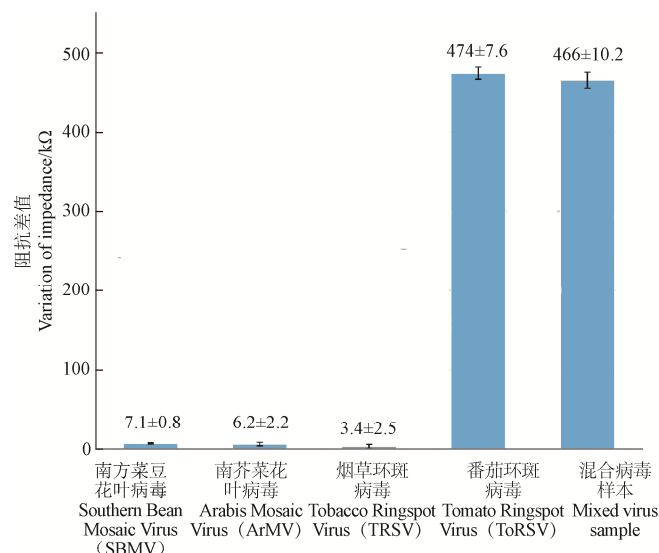


图9 不同病毒的阻抗差值

Fig.9 Variation of impedance of different viruses

不同病毒的阻抗差值图如图9所示, 混合4种病毒溶液的阻抗差值与 ToRSV 溶液的阻抗差值接近; 而同浓度 SBMV 溶液、ArMV 溶液和 TRSV 溶液的阻抗值接近于对照组, 与 ToRSV 溶液阻抗值相差较大。试验结果表明: 本文设计的面向 ToRSV 检测的微流控阻抗传感器能够从 ToRSV 单一溶液及含有 ToRSV 的多种混合溶液中检测出 ToRSV, 同时对其他病毒检测无效。因此, 证明了该传感器对 ToRSV 具有较好的检测特异针对性和有效性。

3 结论

1) 本文设计了一种面向 ToRSV 检测的微流控阻抗传感器。将 ToRSV 抗体固定于微流控芯片流道中的金叉指阵列微电极表面, 通过抗体与 ToRSV 的免疫结合引起阻抗变化, 并构建电化学阻抗谱;

2) 针对阻抗产生及变化机理的研究, 提出了一种新的面向 ToRSV 检测的等效电路模型, 并对浓度为 1、0.1、0.01 和 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 的病毒抗原分别进行实测试验与拟合试验, 阻抗值平均误差分别为 0.6%、1.1%、1.2%、0.5%, 相角拟合平均误差分别为 0.8°、0.8°、0.5°、0.8°、1.4°, 证明了等效电路模型与所设计的微流控阻抗传感器具有较好的拟合一致性。

3) 利用阻抗差值显著性区分最佳频率的方法, 确定了 ToRSV 浓度检测的最佳频率为 10.7 Hz, 建立了 ToRSV

浓度 C 与阻抗值 Z 的计算模型, 并对检测特异性进行检验。试验结果表明, 所设计的微流控阻抗传感器检测限为 $0.0034\text{ }\mu\text{g/mL}$, 且具有较好的检测特异性和有效性。

[参 考 文 献]

- [1] 李鑫, 刘卉秋, 胡强, 等. 番茄环斑病毒纳米荧光颗粒试纸条的研制[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(6): 852-854.
Li Xin, Liu Huiqiu, Hu Qiang, et al. Preparation of tomato ring spot virus nano fluorescent particle test strip[J]. Biotechnology Newsletter, 2014, 25(6): 852-854. (in Chinese with English abstract)
- [2] Walker M, Chisholm J, Wei T et al. Complete genome sequence of three tomato ringspot virus isolates: Evidence for reassortment and recombination[J]. Archives of Virology, 2015, 160(2): 543-547.
- [3] 严俊杰. 番茄环斑病毒研究进展综述[J]. 当代化工研究, 2016(7): 152-153.
Yan Junjie. Review of research progress on tomato ringspot virus[J]. Contemporary Chemical Research, 2016(7): 152-153. (in Chinese with English abstract)
- [4] 赵文军, 陈红运, 朱水芳, 等. 杂交诱捕实时荧光 PCR 检测番茄环斑病毒[J]. 植物病理学报, 2007(6): 666-669.
Zhao Wenjun, Chen Hongyun, Zhu Shuifang, et al. Detection of tomato ringspot virus by hybrid trap real-time PCR[J]. Journal of Plant Pathology, 2007(6): 666-669. (in Chinese with English abstract)
- [5] 余澍琼, 张吉红, 张慧丽. 番茄环斑病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 植物检疫, 2013, 27(4): 44-47.
Yu Shuqiong, Zhang Jihong, Zhang Huili. Establishment of RT-LAMP detection method for ToRSV[J]. Phytosanitary, 2013, 27(4): 44-47. (in Chinese with English abstract)
- [6] 易汪雪, 宋绍祯, 吴东妮, 等. 单管多重 RT-PCR 同时检测大豆种子中三种检疫性植物病毒[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 113-117.
Yi Wangxue, Song Shaoyi, Wu Dongni, et al. Single tube multiplex RT-PCR for simultaneous detection of three quarantine plant viruses in soybean seeds[J]. Plant Protection, 2016, 42(5): 113-117. (in Chinese with English abstract)
- [7] 谢晶, 刘骁, 杨茜, 等. PCR 结合表型鉴定对超高压处理后的冷藏带鱼细菌菌相分析[J]. 农业工程学报, 2016, 32(5): 307-314.
Xie Jing, Liu Xiao, Yang Qian, et al. Analysis of bacterial phases of cold-striped carassius auratus after UHP treatment by PCR and phenotypic identification[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(5): 307-314. (in Chinese with English abstract)
- [8] Kant K, Shahbazi M, Dave V P. Microfluidic devices for sample preparation and rapid detection of foodborne pathogens[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(4): 1003-1024.
- [9] 杨宁, 李振, 毛罕平, 等. 基于纸基微流控芯片的农药残留光电检测方法[J]. 农业工程学报, 2017, 33(3): 294-299.
Yang Ning, Li Zhen, Mao Hanping, et al. Photoelectric detection method for pesticide residues based on paper-based microfluidic chip[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2017, 33(3): 294-299. (in Chinese with English abstract)
- [10] 杨宁, 王盼, 张荣标, 等. 基于富集微流控芯片的稻曲病菌孢子光电检测方法[J]. 农业工程学报, 2017, 33(20): 161-168.
Yang Ning, Wang Pan, Zhang Rongbiao, et al. Photoelectric detection method for spores of *Aspergillus oryzae* based on enriched microfluidic chip[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2017, 33(20): 161-168. (in Chinese with English abstract)
- [11] Manz A, Graber N, Widmer MH. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing[J]. Sensors & Actuators B: Chemical, 1990(1): 244-248.
- [12] Gomez R, Bashir R, Bhunia A K. Microscale electronic detection of bacterial metabolism[J]. Sensors and Actuators B Chemical, 2002, 86(2): 198-208.
- [13] Dastider S, Barizuddin S, Dweik M, et al. A micromachined impedance biosensor for accurate and rapid detection of *E. coli* O157: H7[J]. Rsc Advances, 2013, 3(48): 26297-26306.
- [14] 杨宁, 左志强. 快速检测病原菌含量的简易微流控系统[J]. 仪器仪表学报, 2017, 38(6): 1554-1560.
Yang Ning, Zuo Zhiqiang. A simple microfluidic control system for rapid detection of pathogen content[J]. Journal of instrumentation, 2017, 38(6): 1554-1560. (in Chinese with English abstract)
- [15] Kim M, Jung T, Kim Y, et al. A microfluidic device for label-free detection of *Escherichia coli* in drinking water using positive dielectrophoretic focusing, capturing, and impedance measurement[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 74: 1011-1015.
- [16] Paezaviles C, Juanolafeliu E, Puntervillagrasa J, et al. Combined dielectrophoresis and impedance systems for bacteria analysis in microfluidic on-chip platforms[J]. Sensors, 2016, 16(9): 1514.
- [17] Tássia R d O, Diego H M, Ronaldo C F. Simple disposable microfluidic device for *Salmonella typhimurium* detection by magneto-immunoassay[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255: 684-691.
- [18] Wiederoder M S, Misri I, Devoe D L. Impedimetric immunosensing in a porous volumetric microfluidic detector[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 234: 493-497.
- [19] Tan F, Leung P H M, Liu Z B, et al. A PDMS microfluidic impedance immunosensor for *E. coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* detection via antibody-immobilized nanoporous membrane[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 159(1): 328-335.
- [20] Tian F, Jing L, Shi J, et al. A polymeric microfluidic device integrated with nanoporous alumina membranes for simultaneous detection of multiple foodborne pathogens[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 225: 312-318.
- [21] Pandey C M, Tiwari I, Singh V N, et al. Highly sensitive electrochemical immunosensor based on graphene-wrapped copper oxide-cysteine hierarchical structure for detection of pathogenic bacteria[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 238: 1060-1069.
- [22] Singh C, Ali M A, Reddy V, et al. Biofunctionalized graphene oxide wrapped carbon nanotubes enabled microfluidic immunochip for bacterial cells detection[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 255: 2495-2503.
- [23] 彭金兰, 徐溢, 吴永杰, 等. 微流控芯片上大肠杆菌的电化学阻抗检测方法研究[J]. 分析化学, 2011, 39(9): 1307-1312.
Peng Jinlan, Xu Yi, Wu Yongjie, et al. Research on electrochemical impedance detection of *E. coli* on microfluidic chip[J]. Analytical chemistry, 2011, 39(9): 1307-1312. (in Chinese with English abstract)
- [24] Chen Q, Wang D, Cai G, et al. Fast and sensitive detection of foodborne pathogen using electrochemical impedance analysis, urease catalysis and microfluidics[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 86: 770-776.
- [25] Yao L, Wang L, Huang F, et al. A microfluidic impedance biosensor based on immunomagnetic separation and urease catalysis for continuous-flow detection of *E. coli* O157: H7[J].

- Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 259: 1013-1021.
- [26] Liu J, Jasim I, Shen Z, et al. A microfluidic based biosensor for rapid detection of Salmonella in food products[J]. Plos one, 2019, 14: e216873.
- [27] Gomez R, Morissette D T, Bashir R. Impedance microbiology-on-a-chip: Microfluidic bioprocessor for rapid detection of bacterial metabolism[J]. Journal of Microelectromechanical Systems, 2005, 14(4): 829-838.
- [28] Varshney M, Li Y. Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle-antibody conjugates for detection of Escherichia coli O157: H7 in food samples[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2007, 22(11): 2408-2414.
- [29] 钟晓航. 基于阻抗谱技术的猪肉新鲜度检测方法研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2015.
- Zhong Xiaohang. Study on Detection Method of Pork Freshness Based Impedance Spectroscopy[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2015. (in Chinese with English abstract)
- [30] 李鑫, 刘卉秋, 胡强, 等. 番茄环斑病毒纳米荧光颗粒试纸条的研制[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(6): 852-854.
- Li Xin, Liu Huiqiu, Hu Qiang, et al. Development of tomato ring spot virus nanometer fluorescent particle strip[J]. Biotechnology Communications, 2014, 25(6): 852-854. (in Chinese with English abstract)
- [31] 赵文军, 安德荣, 朱水芳, 等. 番茄环斑病毒 HC-RT-PCR-ELISA 检测[J]. 微生物学报, 2003(2): 174-179.
- Zhao Wenjun, An Derong, Zhu Shuifang et al. Detection of tomato ringspot virus by HC-RT-PCR-ELISA[J]. Journal of Microbiology, 2003(2): 174-179. (in Chinese with English abstract)
- [32] 闻伟刚, 崔俊霞, 盛蕾. 烟草环斑病毒和番茄环斑病毒的半巢式 RT-PCR 检测[J]. 植物保护学报, 2007(1): 61-66.
- Wen Weigang, Cui Junxia, Sheng Lei. Detection of tobacco ringspot virus and tomato ringspot virus by semi-nested RT-PCR[J]. Journal of plant protection, 2007(1): 61-66. (in Chinese with English abstract)

Detection of tomato ring spot virus based on microfluidic impedance sensor

Li Chen¹, Xu Qingduo¹, Bian Yong²

(1. College of Quality and Safety Engineering, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. Science and Technology Research Center of China Customs, Beijing 100026, China)

Abstract: Risk of virus propagation is constantly rising in recent years, as the great development of increasing international trade and cross-border electronic commerce service around the world. Therefore, it is necessary for national customs and other health institutes to find an effective way to detect viruses quickly and accurately. In this study, a microfluidic impedance sensor embedded with gold interdigitated array microelectrodes was designed to rapidly detect tomato ring spot virus (ToRSV). The antibodies of ToRSV were fixed on the surface of gold interdigitated array microelectrodes, in order to immunologically bind to the viruses, and thus to trigger the changes in the impedance value. After that, an electrochemical impedance spectrum was measured, while an equivalent circuit was established according to the measurement. Specific electrochemistry tests were carried out to study the influence of each component on the variation of impedance, and thereby to analyze the mechanism of impedance change. An obtained fitting line was formed to verify the correctness of the equivalent circuit. Furthermore, the equivalent circuit analysis showed that the combination of ToRSV and the antibodies can cause a significant increase in the solution resistance R_s , the electron transfer resistance R_{et} , whereas, a relatively decrease in the capacitance of electric double layer C_{dl} . It infers that the impedance has a rising trend during the experiment. As such, a simplified formula was established based on the equivalent circuit analysis, showing the relationship between the value of impedance Z and the values of these circuit components. Specifically, there are critical parameters to the circuit in low-frequency area, including the solution resistance, R_s , the electron transfer resistance, R_{et} , and the decrease in the electric double layer capacitance C_{dl} . In contrast, in high-frequency area, the solution dielectric capacitor C_{di} played a main role in the circuit. Therefore, a proper detecting frequency is necessary to make the obvious impedance response in the certain circuit system. In order to improve the accuracy of detecting system, the samples of the ToRSV in different concentrations were tested three times for the reproducibility, and then to calculate the average values and standard errors for the accurate evaluation of the optimal detecting frequency, indicating the optimum value of 10.7 Hz. Under this detecting frequency, a quantitative linear relationship between ToRSV concentration and impedance was established via different experimental evaluation. The results showed that the ToRSV concentration in the range of 0.001~10 $\mu\text{g/mL}$ can have a good linear relationship with the impedance value, where the corresponding impedance values were in the range of 248.8~687.2 k Ω . The R^2 values was 0.98, while the detection limit was 0.0034 $\mu\text{g/mL}$, of which the corresponding impedance value was 307.05 k Ω . The effects of different methods to detect ToRSV, such as nano fluorescent particle test strip, real-time fluorescent PCR, HC-RT-PCR-ELISA, and SN-RT-PCR, were then compared with that of the microfluidic impedance sensor. The comparison demonstrated that the microfluidic impedance sensor can serve as an effective and convenient tool to detect ToRSV. In addition, the southern bean mosaic virus (SBMV), Arabis mosaic virus (ArMV) and tobacco ringspot virus (TRSV) were employed as untargeted viruses, to verify the specificity of this detecting system to ToRSV. The samples were separately tested in three times, particularly from the SBMV, ArMV, TRSV, and the mixed solution of all four viruses with the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. The impedance values of these single-virus samples barely changed, while, that of the mixed solution changed obviously, indicating that the variation was nearly as the same as that of the ToRSV sample. It infers that the detecting system can accurately detect the ToRSV. The detecting system of microfluidic impedance sensor has demonstrated the several advantages, such as high detection sensitivity, good specificity, effectiveness, and convenience. Thus, the proposed detecting method can provide a sound specific reference for the identification of various virus from other plants.

Keywords: diseases; sensor; microfluidic chip; tomato ring spot virus; quantitative detection; electrochemical impedance spectroscopy