

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 27/49 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780012898.2

[43] 公开日 2009 年 4 月 29 日

[11] 公开号 CN 101421616A

[22] 申请日 2007.3.29

[21] 申请号 200780012898.2

[30] 优先权

[32] 2006.4.10 [33] GB [31] 0607205.2

[86] 国际申请 PCT/EP2007/002793 2007.3.29

[87] 国际公布 WO2007/115694 英 2007.10.18

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.10

[71] 申请人 迪埃诺斯维斯股份有限公司

地址 瑞士蒙泰

共同申请人 比奥梅里欧股份有限公司

[72] 发明人 F·雷蒙德 J·S·罗西亚

P·莫里尔

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 余颖

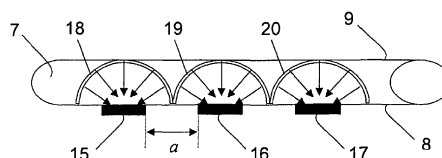
权利要求书 10 页 说明书 40 页 附图 15 页

[54] 发明名称

安培计检测优化的小型化生物传感器

[57] 摘要

一种优化微型系统中安培计测量检测的方法，包括将检测限制在待测分析物的扩散层(18-20)维持小于微型通道(7)高度的时间内。还可考虑在安培计测量第二部分期间测得的电荷量(其对应于在相应时间内测得电流的积分值)，从而能除去电容电流的作用，如果适用还能除去检测开始时电极上方凹陷中分析物分子还原或氧化产生的电流。执行此方法的微流体安培计测量传感器包含具有至少一个电极(15-17)的至少一个微型通道(7)，所述电极集成在该微型通道的一个壁中，此微型通道的特征性长度或半径小于其高度的一半。



1. 一种确定微流体传感器中分析物存在、含量和/或浓度的安培计测量方法，其特征在于，该方法包括以下步骤：

a) 提供包含至少一个微型结构的微流体传感器，此微型结构含有至少一个以精确尺寸和位置集成于所述微型结构的一个壁部中的工作电极，所述微型结构在所述集成工作电极上方的高度是所述集成工作电极的特征长度—就圆形电极而言为其半径 r 的至少二倍；

b) 用要分析的样品液充满所述微流体传感器；

c) 施加由安培计测量法直接或间接检测所述分析物所需的电势达短于比值 r^2/D 的时间，其中 r 以米计， D 是所述分析物以 m^2/s 计的扩散系数；并且测定此时间期间所述集成工作电极处结果产生的氧化或还原电流，如此使得安培计测量期间只有被呈送至所述至少一个集成工作电极上方的半球形或半圆柱形扩散领域的分析物分子被检测到；并且任选地

d) 通过在长于比值 r^2/D 的一半的弛豫时间后重复步骤 c) 来进行连续安培计测量。

2. 一种确定微流体传感器中分析物的存在、含量和/或浓度的安培计测量方法，其特征在于，该方法包括以下步骤：

a) 提供包含至少一个微型结构的微流体传感器，此微型结构含有至少一个以精确尺寸和位置集成于所述微型结构的一个壁部中的集成工作电极，所述微型结构在所述集成工作电极上方的高度是所述集成工作电极的特征长度—就圆形电极而言为半径 r (米) 的至少二倍；并且所述微型结构在所述至少一个集成工作电极上方显现高度为 L (米) 的凹陷；

b) 用要分析的样品液充满所述微流体传感器；

c) 施加由安培计测量法直接或间接检测所述分析物所需的电势达短于比值 $(r+L)^2/D$ 的时间，其中 D 是所述分析物以 m^2/s 计的扩散系数；并且测定此时间期间所述集成工作电极处结果产生的氧化或还原电流，如此使得安培计测量期间只有被呈送至所述微型结构内的半球形或半圆柱形扩散领域的分析物分子被检测到；并且任选地

d) 在长于比值 $(r+L)^2/D$ 的一半的弛豫时间后重复步骤 c)以进行连续安培计测量。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的安培计测量方法，其特征在于，在所述至少一个集成工作电极处所述电势被施加——并且相关的电流被测量——的时间不超过约 10 秒钟。

4. 如权利要求 3 所述的安培计测量方法，其特征在于，在所述至少一个集成工作电极处所述电势被施加——并且相关的电流被测量——的时间不超过约 2 秒钟。

5. 如权利要求 1—4 任何一项所述的安培计测量方法，其特征在于，分隔连续安培计测量的弛豫时间长于约 1 秒钟而短于约 1 分钟。

6. 如权利要求 1—5 任何一项所述的安培计测量方法，其特征在于，确定所述微流体传感器中分析物的存在、浓度和/或含量所考虑的有效检测信号被只限于在步骤 c)和任选地在步骤 d)期间所测得的电流的部分，所述测得电流的所述部分是选择在电容性电流相对于感应电流而言能被视为恒定并且只有被呈递至半球形或半圆柱形扩散领域的分析物分子被检测到的时间段上。

7. 如权利要求 6 所述的安培计测量方法，其特征在于，在步骤 c)和可任选地在步骤 d)中电势施加的第一部分期间测得的电流被排除并且不被视为所述有效检测信号；所述电势施加的第一部分具有至少为 1 秒的持续时间，或当所述至少一个集成工作电极具有长度为 L 的凹陷时，则其具有至少等于比值 $L^2/2D$ 的持续时间。

8. 如权利要求 1—7 任何一项所述的安培计测量方法，其特征在于，所述有效检测信号的获得，是通过将步骤 c)和可任选地在步骤 d)期间所测得的电流在所述电势施加期的部分上积分，如此获得与检测到只被呈送至半球形或半圆柱形扩散领域的分析物分子得到的 Q 库仑电荷值相对应的检测信号，并且所述分析物的存在、含量和/或浓度是从此电荷量值 Q 来确定的。

9. 如权利要求 8 所述的安培计测量方法，其特征在于，所述检测信号的获得是通过排除在至少第 1 秒钟的电势施加期间测得的电流，或对于具

有长度为 L 的凹陷的集成工作电极是通过排除在持续时间至少等于 $L^2/2D$ 的第一电势施加期间测得的电流，并通过考虑与所述电势施加的其余持续时间上测得的电流的基本相对应的电荷 Q 。

10. 如从属于权利要求 4 的权利要求 9 所述的安培计测量方法，其特征在于，所述检测信号是通过考虑与时间区间 $t = \sim 1$ 秒和 $t = \sim 2$ 秒上测得的电流的积分相对应的电荷 Q 而获得的。

11. 如权利要求 8—10 任何一项所述的安培计测量方法，其特征在于，分析物的存在、含量和/或浓度是从所述电荷 Q 在连续安培计测量上的时间演变来确定的。

12. 如权利要求 11 所述的安培计测量方法，其特征在于，分析物的存在、含量和/或浓度是从代表所述电荷量 Q 在连续安培计测量上的时间演变的曲线原点处的斜率来确定的。

13. 如以上任何一项权利要求所述的安培计测量方法，其特征在于，被检测的分析物分子在连续安培计测量期间，和/或在分隔二次连续安培计测量的弛豫时间期间被部分地或全部地再生。

14. 如权利要求 13 所述的安培计测量方法，其特征在于，被检测的分析物分子在分隔二次连续安培计测量的弛豫时间期间被部分地或全部地再生，是通过将施加在所述至少一个集成工作电极处的电势逆转至能将被检分子相应地还原或氧化回然后在下一次安培计测量期间能被检测的分析物分子。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的安培计测量方法，其特征在于，被检测的分析物分子是在集成在所述微型结构的至少一个壁部中的至少一个对电极处被部分地或全部地再生的。

16. 如权利要求 13—15 任何一项所述的安培计测量方法，其特征在于，分析物的存在、含量和/或浓度是通过考虑从所述安培计测量和所述被检分子的再生两者所得到的电流来确定的。

17. 如以上任何一项权利要求所述的安培计测量方法，其特征在于，所述方法被适应成检测多种分析物的存在、含量和/或浓度。

18. 如权利要求 17 所述的安培计测量方法，其特征在于，各种分析物

是通过使用不同的施加电势来氧化和/或还原来检测的。

19. 如以上任何一项权利要求所述的安培计测量方法，其特征在于，所述微流体传感器包含多个微型结构，此系列中的每一微型结构作用于检测一种或多种不同分析物。

20. 一种安培计微流体传感器，其特征在于，此传感器包含至少一个微型结构，此微型结构含有至少一个以精确尺寸和位置集成于所述微型结构的一个壁部中的工作电极，所述微型结构在所述集成工作电极上方的高度是所述集成工作电极的特征长度—就圆形电极而言为半径— r 的至少二倍；并且可任选地，所述微型结构在所述至少一个集成电极上方显现凹陷，所述安培计微流体传感器被适应成检测仅缘于被呈递至所述至少一个集成工作电极上方的半球形或半圆柱形扩散领域的分析物分子的信号。

21. 如权利要求 20 所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构和所述至少一个集成工作电极的形状和尺寸被适应成使超过与所述集成工作电极上方的微型结构高度相对应最大距离处感兴趣的分析物耗尽。

22. 如权利要求 20 或 21 所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构高度与所述至少一个集成工作电极的特征长度—或半径—的比例包括在 2 与 5 之间。

23. 如权利要求 20—22 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构高度小于约 500 微米，所述至少一个集成工作电极的特征长度—或半径—小于约 200 微米。

24. 如权利要求 20—23 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构高度小于约 100 微米，所述至少一个集成工作电极的特征长度—或半径—小于约 50 微米。

25. 如权利要求 20—24 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构在所述至少一个集成工作电极上方显现凹陷，所述凹陷的高度 L 小于所述集成工作电极的特征长度—或半径—。

26. 如权利要求 20—25 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构和所述至少一个集成工作电极的形状和尺寸界定的检

测容量在安培计测量的时间量程上不超过 500 pL, 最优选 不超过 200 pL。

27. 如权利要求 20—26 任何一项所述的安培计微流体传感器, 其特征在于, 所述微型结构还包含以精确尺寸和位置集成于所述微型结构的一个壁部中的对电极、参比电极、和/或伪参比电极中的至少一者。

28. 如权利要求 20—27 任何一项所述的安培计微流体传感器, 其特征在于, 所述集成工作电极、对电极、参比电极、和/或伪参比电极由导电垫支承。

29. 如权利要求 28 所述的安培计微流体传感器, 其特征在于, 所述导电垫安置在所述微型结构的相对侧上的用作微型结构支承的材料上; 并且所述集成工作电极、对电极、参比电极、和/或伪参比电极是通过去除所述微型结构支承的在所述微型结构底部的材料如此在所述微型结构底部产生凹陷电极来制造的。

30. 如权利要求 29 所述的安培计微流体传感器, 其特征在于, 一个导电垫包含多个电极。

31. 如权利要求 29 或 30 所述的安培计微流体传感器, 其特征在于, 所述集成电极上方的凹陷包含有机相。

32. 如权利要求 27—31 任何一项所述的安培计微流体传感器, 其特征在于, 所述集成工作电极、对电极、参比电极、和/或伪参比电极中至少有一者是用涂布有电化学惰性材料, 例如但不限于: 金、铂、银或银/氯化银的铜制成的。

33. 如权利要求 20—32 任何一项所述的安培计微流体传感器, 其特征在于, 所述的至少一个集成工作电极是其特征长度—或半径—不超过约 50 微米, 最优选 不超过约 25 微米的微电极。

34. 如权利要求 20—33 任何一项所述的安培计微流体传感器, 其特征在于, 所述微型结构支承还包括电连接垫和/或迹线, 用于提供外部电测仪如稳压器或电源与所述集成工作电极、对电极、参比电极、和/或伪参比电极中的任何一者之间的电连接。

35. 如权利要求 20—34 任何一项所述的安培计微流体传感器, 其特征在于, 所述微型结构含有多个以精确尺寸和位置集成于所述微型结构的一

个壁部中的工作电极，所述微型结构在所述集成工作电极上方的高度是所述集成工作电极的特征长度—就圆形电极而言为半径 r 的至少二倍；并且二个毗邻集成工作电极之间的距离等于或大于它们特征长度—就圆形电极而言为半径 r 的二倍。

36. 如权利要求 20—36 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构的尺寸被设计成容纳不超过约 500 nL 液体，最优选不超过约 150 nL 液体。

37. 如权利要求 20—36 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构包括含有至少一个集成工作电极的被覆盖的微通道，或各自包含至少一个集成工作电极的有覆盖微型通道的阵列或网络。

38. 如权利要求 20—37 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型通道、或微型通道阵列或网络是由层压层覆盖的。

39. 如权利要求 20—38 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构和/或所述至少一个集成工作电极是采用物理或化学刻蚀、注模、激光烧蚀、聚合物浇铸、UV-LIGA、浮雕、硅技术、系列层装配中的任何一种，或其任何组合来制作的。

40. 如权利要求 20—39 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述用作微型结构支承的材料是聚合物、玻璃或石英。

41. 如权利要求 20—40 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构支承包括用于所述电极之间电连接的导电迹线。

42. 如权利要求 20—41 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构支承的厚度小于约 500 微米，优选小于约 100 微米。

43. 如权利要求 20—42 任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述微型结构、所述微通道、或所述微通道阵列或网络的入口和/或出口围绕有贮存小室。

44. 如权利要求 43 所述的安培计微流体传感器，其特征在于，所述参比电极或伪参比电极安置在所述微型结构、所述微通道、或所述微通道阵列或网络的入口和/或出口处的贮存小室中。

45. 如以上权利要求任何一项所述的安培计微流体传感器，其特征在

于,所述微型结构和/或围绕所述微型结构入口或出口的所述贮存小室包括生物材料和化学化合物或试剂的至少一者。

46. 如权利要求 45 所述的安培计微流体传感器,其特征在于,所述生物材料或者化学化合物或试剂被干燥和/或被可逆或不可逆地或者直接固定在所述贮存小室内和/或所述微型结构的至少一部分内,诸如其壁部上或所述集成工作电极上;或者固定于或放在所述贮存小室内和/或所述微型结构的至少一部分内的支承材料如膜、凝胶、液体凝胶或珠上。

47. 如权利要求 45 或 46 所述的安培计微流体传感器,其特征在于,所述生物材料是酶、抗原、抗体、亲和试剂、细胞、病原体、蛋白质、病毒、DNA、DNA 株、寡核苷酸、肽之一,和它们的任何组合。

48. 如权利要求 20—47 任何一项所述的安培计微流体传感器,其特征在于,所述微型结构支承的末端为尖头形状,并且所述微型结构的尖端之一位于所述支承的边沿上。

49. 如权利要求 48 述的安培计微流体传感器,其特征在于,所述尖头被适应成从所述微型结构支承的边沿摄取、撤除和/或分配液体、样品或试剂。

50. 如权利要求 48 或 49 所述的安培计微流体传感器,其特征在于,所述尖头被适应成用于以合需的穿透力刺破固体材料如膜、薄聚合物箔片或组织如皮肤,如此能直接摄取、撤除和/或分配液体、样品或试剂。

51. 如权利要求 20—50 任何一项所述的安培计微流体传感器,其特征在于,所述传感器是集成的样品获取系统和/或分析测量装置的部件。

52. 一种制造安培计微流体传感器的方法,其特征在于,所述传感器包含至少一个微型结构,此微型结构含有至少一个以精确尺寸和位置集成于所述微型结构的一个壁部中的工作电极,所述微型结构在所述集成工作电极上方的高度是所述集成工作电极的特征长度—就圆形电极而言为半径— r 的至少二倍;并且,可任选地,所述微型结构在所述至少一个集成电极上方显现凹陷,所述的安培计微流体传感器被适应成检测仅缘于被呈递至所述至少一个集成工作电极上方的半球形或半圆柱形扩散领域的分析物分子的信号。

53. 如权利要求 52 所述的安培计微流体传感器的制造方法, 其特征在于, 对电极、参比电极和/或伪参比电极中至少有一者进一步以精确尺寸和位置集成在所述微型结构的一个壁部中。

54. 如权利要求 52 或 53 所述的安培计微流体传感器的制造方法, 其特征在于, 所述集成工作电极、对电极、参比电极、和/或伪参比电极由导电垫支承。

55. 如权利要求 54 所述的安培计微流体传感器的制造方法, 其特征在于, 所述导电垫安置在所述微型结构的相对侧上的用作微结构支承的材料上; 并且所述集成工作电极、对电极、参比电极、和/或伪参比电极是通过去除所述微型结构支承在所述微型结构底部的材料如此使得在所述微型结构底部产生凹陷的电极来制造的。

56. 如权利要求 55 所述的安培计微流体传感器的制造方法, 其特征在于, 一个导电垫包含多个电极。

57. 如权利要求 52—56 任何一项所述的安培计微流体传感器制造方法, 其特征在于, 在所述集成的电极上方的凹陷中放置了有机相。

58. 如权利要求 52—57 任何一项所述的安培计微流体传感器制造方法, 其特征在于, 所述集成工作电极、对电极、参比电极、和/或伪参比电极中至少有一者是用涂布有电化学惰性材料, 例如但不限于: 金、铂、银或银/氯化银的铜制成的。

59. 如权利要求 52—58 任何一项所述的安培计微流体传感器制造方法, 其特征在于, 所述用作微型结构支承的材料是聚合物、玻璃或石英。

60. 如权利要求 52—59 任何一项所述的安培计微流体传感器制造方法, 其特征在于, 所述微型结构和/或所述至少一个集成工作电极是采用物理或化学刻蚀、注模、激光烧蚀、聚合物浇铸、UV-LIGA、浮雕、硅技术、系列层装配等方法中的任何一者, 或其任何组合来制作的。

61. 如权利要求 52—60 任何一项所述的安培计微流体传感器制造方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

- a. 提供用导电层保护的支承材料;
- b. 在所述导电层中产生用作制造合需微型结构的掩模的结构;

c. 用刻蚀和/或光烧蚀工艺显微加工所述支承材料以产生所述合需微型结构;

d. 去除所述保护导电层的至少数部分以产生电连接网络;

e. 可任选地, 通过二次刻蚀和/或光烧蚀工艺进一步刻蚀所述支承材料, 以向所述微型结构曝露出所述保护导电层的明确界定且精确定位的部分;

f. 可任选地, 用惰性金属包盖所述保护导电层的其余部分而产生电极;

g. 通过向所述微型结构施加覆盖层来封住所述微型结构。

62. 如权利要求 61 所述的安培计微流体传感器的制造方法, 其特征在于, 所述至少一个集成工作电极是通过在合需部位去除所述微型结构支承, 以将所述微型结构的底部与导电垫分离来制作的。

63. 如权利要求 62 所述的安培计微流体传感器的制造方法, 其特征在于, 从所述微型结构支承去除材料是通过从所述微型结构的底部机械钻削、通过化学或物理刻蚀、通过光烧蚀或它们的任何组合而实现的。

64. 如权利要求 52—63 任何一项所述的安培计微流体传感器制造方法, 其特征在于, 所述微型结构通过施加覆盖层, 如层压层来被覆盖。

65. 如权利要求 52—64 任何一项所述的安培计微流体传感器制造方法, 其特征在于, 所述微型结构和/或围绕所述微型结构入口或出口的贮存小室包括生物材料、化学化合物或试剂中的至少一者。

66. 如权利要求 65 所述的安培计微流体传感器的制造方法, 其特征在于, 所述生物材料或者化学化合物或试剂被干燥和/或被可逆或不可逆地或者直接固定在所述贮存小室内和/或所述微型结构的至少一部分内, 如其壁部上或所述集成工作电极上; 或者被固定在或位于所述贮存小室内和/或所述微型结构的至少一部分内部的支承材料如膜、凝胶、液体凝胶或珠上。

67. 如权利要求 65 或 66 所述的方法, 其特征在于, 所述生物材料是酶、抗原、抗体、亲和试剂、细胞、病原体、蛋白质、病毒、DNA、DNA 株、寡核苷酸、肽之一, 和它们的任何组合。

68. 如权利要求 52—67 任何一项所述的方法, 其特征在于, 所述微型结构支承的末端为尖头形状, 所述微型结构的尖端之一被制作在所述支承

的边沿上。

69. 将权利要求 20—51 任何一项所述的安培计微流体传感器与权利要求 1—19 任何一项所述的安培计测量法联合使用的应用方法，所述方法用于进行液体中化学和/或生物学反应——特别是与合成有关的反应，和/或用于进行化学和/或生物学分析——尤其是与化学和/或生物学试验有关的分析，例如但不限于：蛋白质试验、亲和力试验、免疫试验、酶试验、酶联免疫吸附试验、细胞试验、病毒试验、病原体试验、DNA 试验、杂交试验、寡核苷酸试验、物理-化学特征分析试验、亲脂性试验、可溶性试验或渗透力试验。

70. 将权利要求 20—51 任何一项所述的安培计测量微流体传感器与权利要求 1—19 任何一项所述的安培计测量法联合用于对蛋白质、肽、抗体、抗原、酶、寡核苷酸、病原体、病毒、DNA、DNA 株或细胞进行分析的应用方法。

71. 一种包括权利要求 20—51 任何一项所述的安培计测量微流体器件和根据权利要求 1—19 任何一项所述的安培计测量法进行生物学或化学分析所需试剂的试剂盒。

72. 一种适应成与连接到权利要求 20—51 任何一项所述的安培计测量微流体传感器的外部电测仪如稳压器通信并按照权利要求 1—19 任何一项所述安培计测量法执行化学和/或生物学分析的软件产品。

安培计检测优化的小型化生物传感器

发明领域

本发明涉及分析和检测小体积样品中生物和化学化合物的安培计传感器和这种传感器的制造与使用方法。

发明背景

分析仪器的小型化在分析化学领域变得非常吸引人主要有二个不同原因，即减少了每次分析所需的时间和降低了样品和试剂的体积以及废物的量。近年来，制造微流体装置和利用它们开发各种类型的试验已取得了许多进展。

小型化的瓶颈之一是虽然微流体装置的容量甚小因而这些系统中存在的分子少但也要确保检测下限。已成功实施了不同的检测方法，包括光学、质谱、或电化学检测法，虽然检测的是浓度颇高的分析物。例如许多检测葡萄糖的现有分析系统已明显倾向于减少(所需)样品的体积。实际上，Therasense (见 US 2004/0225230 A1)开发的一种电化学葡萄糖感应器已可认为是一种小型化装置，因为它能在只有 0.3 微升的毛细管血中进行葡萄糖的库仑检测(coulometric detection)。但这些葡萄糖传感器只适合用于纯的酶促反应(无需液体操作，除装填毛细管外)且局限于高浓度分析物。实际上，在如此小的样品容积中，所述库仑检测比其它电化学检测技术更精确，因为它能检测样品中所有可能的分析物。实际上大多数血糖监测系统采用安培计技术，该技术只能检测血液样品中的葡萄糖组分，从而限制了可从小体积样品获得的信号。因为库仑检测强烈依赖于装置的几何形状，因此对于许多分析应用，优选安培计传感器具有足够灵敏度和准确性来探测、监测或测定小体积(样品)中感兴趣分析物的含量。

检测低浓度分析物需要优化微流体装置的几何形状及检测方法。检测窗口的几何形状和路径长度直接影响着光检测依赖性系统的灵敏度，而检

测性能直接取决于电极的形状和位置以及取决于电化学传感器中电极周围的几何环境。这些因素代表了小型化分析系统，特别是电化学传感器性能的重要限制因素，通常认为与荧光检测系统相比电化学微型传感器的灵敏度相对较低。

影响电化学微型传感器性能的一种重要参数是因为缺乏自然对流一般不能在电极上建立扩散层。与电极表面正交的微系统维度不是无限的，因此电流不可能达到恒定值(稳态电流)而总是随时间推移而衰减。由于电极处电活性物质的消耗导致浓度的整体情况不断演变，从而导致溶液(电流)减弱，可测量的电流因此降低。这限制了检测的灵敏度，因此本发明的目的是通过优化微型系统的几何形状和/或安培计检测方法从而提供能检测最大可能电流的电化学微型传感器和方法。

鉴于葡萄糖检测中电化学传感器已被广泛接受(显然是由于此种装置易于操作)，进行试验所需的基础结构相对简单及平行分析的广泛可能性，和鉴于因出结果的时间短、体积消耗低及多样化能力高而对采用微型化系统有着广泛兴趣，若能开发出能对低浓度分析物执行精确灵敏分析的电化学微型芯片是非常理想和方便的。还优选开发能优化可检测信号因而提高试验检测下限、提高检测重现性的微型芯片电化学传感器的制造和使用方法。

发明概述

本发明提供通过安培计测量来检测或定量测定小体积分析物的新型方法，以及优化分析物的安培计检测的微型芯片电化学传感器。一般说，本发明的方法和装置能检测出包含微型结构(通常是微型通道)的微流体系统中低浓度的电活性化合物，所述微型结构的一个壁中至少有一个工作电极，该电极与所述微型结构中的液体直接接触。本发明还包括适合提供优化安培计检测的小型化微流体传感器的制造方法。本发明的分析装置可用于生物和/或化学分析中的许多领域，它们特别适合酶、抗原、抗体、蛋白质、肽、免疫学、寡核苷酸、DNA、细胞、病毒或病原体试验。

本发明中，所述术语的定义如下：

本文所用的“微型芯片”、“芯片”、“微系统”或“微流体装置”是包含至少一个小型化结构(或“微型结构”)的任何系统,所述微型结构是一种反应室或分离室或导管,例如微孔、微型通道、毛细管、微洞等等,大小与形状无限制,但能进行微流体操作;可采用任何方法制造此种微型结构,例如,浮雕、注模、化学刻蚀、等离子体刻蚀、激光烧蚀、聚合物浇铸、紫外连接、两种材料层之间的间隔臂整合,或它们的任何组合;在一优选实施方式中,微型芯片由多层体组成,所述多层体包含其中制造了微型结构的至少一层(下文称为“芯片载体”或“微型结构载体”),连接电极的电传导通道槽和/或垫,以及用于密封该微型结构的覆盖层(例如层压层、聚合物箔片或载玻片);在一较优选的实施方式中,微型芯片包含用聚合物材料(如聚乙烯、聚苯乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚甲基丙烯酸酯甲酯、聚酰亚胺、聚碳酸酯、聚氨酯、液晶聚合物或聚烯烃)制成的芯片载体和也用聚合材料制成的覆盖层,而电传导通道槽和/或垫用金属(如铜,涂覆或不涂覆金)或导电油墨(electrically conductive ink)(或掺加银和/或氯化银的碳油墨)制成;在另一实施方式中,此种微型芯片包含多个微型结构(如微型通道阵列、微型通道网络,或一系列微孔或微洞)。

“微型结构的高度”是在其壁部分的至少一个中包含集成电极的微型结构表面与该微型结构的相对壁之间的距离;以凹陷电极为例,凹陷的高度不包括在微型结构的高度中。

“微电极”是指一种电极,其特征性尺寸-下文也称为特征性长度-(即微圆盘或微半球的直径,微条带的带宽)为几十微米或更小的数量级。

“工作电极”是在氧化还原介质帮助或不帮助下,通过在电极与分析物之间转移电子而氧化或还原分析物的电极。

“反电极”是与工作电极配对的电极,通过该电极的电化学流与通过工作电极的电流幅度相同但符号相反。

参比电极是在电化学检测中用于固定电势的电极。

“假参比电极”是还起到反电极作用的参比电极(即反/参比电极),本文所用的术语“参比电极”还可延伸至包括假参比电极,除非说明书中另有表述。

“分析物”是样品中存在的，借助例如化学或生物学报告分子，象抗原、抗体、酶、寡核苷酸等直接或间接地定性或定量检测或监测的任何感兴趣化合物。

“安培计测量术(amperometry)”是一种检测工作电极处还原和/或氧化所产生电流的电化学检测技术；因此“安培计测量术”包括记时安培计测量术(chrono-amperometry)、脉冲电位测量术(pulse voltammetry)和 Cottrell-型测量。在安培计测量术中，利用稳压器迫使电流通过工作电极直到所述工作电极与参比电极之间的电势达到此稳压器中设置的所需电势值；为简单化，当需要电极处达到某给定电势值时，我们在下文中说是“施加电势”，按照常用的电化学行话，下文通常说是通过稳压器向工作电极施加此电势。

“电化学微型传感器”或“电化学微型芯片”是设计的适合通过电化学氧化和/或还原反应测量分析物的浓度和/或检测其是否存在的一种装置。这些反应转换成可能与分析物的含量或浓度相关的电信号。

当化合物捕获在，或通过物理或化学方法结合在表面上时，其被“固定”在表面上。

本文将“消耗层”定义为毗邻电极处，由于需要还原和/或氧化分析物而在该电极处施加电势后致使该分析物消耗而产生的分析物浓度梯度的空间(volume)，越过此消耗层后，分析物的浓度维持恒定，而当还原和/或氧化反应刚发生时电极表面分析物的浓度为零；电极处无氧化还原反应时，微型传感器中的分析物浓度均匀，只有通过电极处反应的分析物分子扩散时才产生浓度梯度。

本文将“消耗层的厚度” l 定义为施加电势后电极处因分析物消耗所致浓度梯度的长度；因此，消耗层的厚度随时间而变，这取决于装置的几何构型；由于扩散是各向同性的，消耗层的厚度决定了毗邻电极处分析物浓度梯度的空间；因此，电极表面与氧化物质浓度和还原物质浓度分别与它们的原始浓度相等位置之间的距离给出了消耗层的厚度，即施加氧化还原反应所需电势时的浓度。

在分子通量(molecular flux)受扩散控制(即移动和强制对流(forced convection)为零或可忽略不计时)的微系统中，施加电势期间集成电极处分

析物的消耗产生了随时间连续演变的浓度梯度。包围这种浓度梯度的空间确定了电极表面上分析物浓度不同于其原始浓度的消耗层，即不同于诱导分析物在电极处还原或氧化而施加所需电势时的分析物浓度。与将微电极置于无限(infinite)或半无限(semi-infinite)环境时发生的相类似，此消耗层在微圆盘和微半球电极中为半球形，而在微条带电极中为半圆柱形。然而在微系统中，电极上方的高度限于几十微米或更少(因此电极周围的溶液体积限于几 nL 或更少)，因而没有足够空间产生自然对流。因此不可能通过自然对流更新分析物分子，从而不可能建立扩散层。结果，测量的电流达不到稳态，而会因电极处的消耗而随时间持续衰减。

电极处分析物分子的消耗产生了随时间演变的浓度梯度，其中分析物分子向电极扩散。此种浓度梯度确定了电极周围分析物浓度与其原始浓度不同的空间。与无限或半无限环境中扩散层的熟知见解相似，电极上方浓度梯度所确定的空间在下文中称为“消耗层”，此消耗层代表了其中施加诱导还原或氧化分析物所需电势期间分析物被消耗的空间。

由于所述浓度梯度受扩散控制，消耗层的厚度 l 可用能斯特-爱因斯坦方程(Nernst-Einstein equation)计算：

$$l = 2 (D t)^{1/2} \quad \text{方程 1}$$

其中 D 是分析物分子的扩散系数(以 m^2/s 计)， t 是时间(以秒计)，其对应于施加还原或氧化电极处分析物所需电势的持续时间。

由于纯粹受扩散控制，微电极处分析物的消耗在电极上方诱导的球形扩散通量依据微电极的几何形状(与大电极相比，导致质量转移大大增加，因而可测电流增加)而具有半圆柱形或半球形。微系统中微电极上方的消耗层遵循这种球形扩散方式，因此在微圆盘或微球形电极中为半球形，或在微条带电极中为半圆柱形。

另外，当电极凹陷时，涉及二种扩散几何形态：一方面，在凹陷电极上方凹陷确定的微原柱(或原锥形)中为线形扩散；另一方面，在微原盘电极上获得的半球形扩散。这种构型中，消耗层按这二种扩散方式和安培计测量的时间范围(time scale)演变，可认为凹陷微原盘电极的性能类似于扩散层表观厚度为 $l_{\text{app}} = L + l$ 的微电极， L 是电极上方凹陷的高度。

在含集成电极的微型结构如微型通道中，电极上方的液体空间有限，因此消耗层的等浓度曲线从电极上方的半球形或半原柱形迅速变化为对应于微型通道截面的曲线，由于检测期间分析物逐渐消耗，从而导致电极上方整个空间的耗尽。因此，扩散方式从电极上方的球形改变成沿微型通道长度的线形，从而减少了质量转移，减少了对着电极的还原或氧化分析物通量所以减少了可测电流。因此传感器的灵敏度受到检测期间微型结构中分析物消耗的限制，和半球形与线形扩散方式之间混合的限制。因而本发明的目的是提供一种电化学微型传感器，其微型结构的几何形状和集成的工作电极适合于通过在电极上方诱导厚度小于这些电极上方微型结构高度的消耗层来检测经历半球形或半原柱形扩散的分析物分子。当该传感器包括多个集成电极时，这些电极的安置方式还使毗邻电极上方的消耗层不重叠。此外，本发明提供通过使分析物分子对着电极的扩散通量最大化而能测量可能的最大电流的方法。在一优选方法中，本发明适合递送不受电容电流(capacitive current)影响的电化学信号。当这种传感器包含集成的凹陷电极时，本发明方法还适合减除检测开始时检测凹陷中存在的分析物分子产生的信号。因此，本发明提供尽可能最大所检测电流的方法，从而优化传感器灵敏度，同时降低背景信号和由于电容电流和/或检测电极上方凹陷中存在的分析物分子所致的重现性错误。

因此，本发明传感器提供基于微型芯片的分析系统，包括至少一种微型结构(最优选覆盖的微型通道)，其几何特征能优化电活性分析物，即易受还原或氧化反应(氧化还原反应)分析物的安培计测量。本发明另一目的是提供最大灵敏度地用安培计检测微型芯片中分析物的方法。

在第一方面，本发明提供的微型芯片系统包含至少一个微型结构，所述微型结构含有至少一个大小和定位精确的工作电极，所述工作电极界定与含待检测电活性分析物的溶液直接接触的该微型结构的壁部分。此微型结构的形状和集成在此微型结构中的工作电极的定位和大小适合于显著消耗此微型结构内部液体区段(具体是工作电极周围几微米)中存在的分析物，和避免检测时间范围内通道高度(中的分析物)完全消耗，从而一直维持半球形或原柱形扩散方式，以及在微型通道检测中防止电化学信号受到线形扩

散的限制。

在一优选实施方式中，此种微型结构是一种覆盖的微型通道，或覆盖的微型通道的阵列或网络，将所述微型通道的形状和维度，以及集成在所述微型通道中的工作电极的尺寸、形状和位置设计和配置方式应使在安培计检测步骤的时间范围期间只能检测工作电极处经历半球形扩散的电活性分析物。换言之，所选择的微型通道和集成工作电极的技术和几何特征使得安培计测量期间只有部分微型通道中(的分析物被)消耗，并且没有足够时间沿微型通道长度建立线形扩散方式。在另一优选实施方式中，微型通道和工作电极的形状和维度使得在安培计测量期间电活性分析物在对应于电极上方微型通道高度的最大距离上被消耗。在还有一优选实施方式中，微型通道的高度是集成工作电极“特征性高度”(“或特征性维度”) r (即微圆盘或微半球形电极直径，微条带电极带宽，等等)的至少二倍。在另一优选实施方式中，微型通道高度与工作电极特征性维度的比例在 2—5 之间。在最优选实施方式中，微型通道高度小于约 500 微米，集成工作电极的特征性维度小于约 200 微米。如以下所示，本发明的设备含有直径 50 微米的集成工作电极和高度 60 微米的微型通道，从而能在测定电流时只用 2 秒钟优化安培计检测。

本发明装置的上述具体特征也可应用于凹陷的集成工作电极，只要凹陷的高度 L 小于电极的特征性维度。

在一实施方式中，本发明的微型结构大小可容纳不超过约 500 nL 的液体，更优选不超过约 200 nL 的液体，最优选不超过约 100 nL 的液体。在另一实施方式中，所述微型结构包括至少一个(界定)此微型结构壁部分的集成工作电极，此电极是微圆盘状，直径不超过约 100 微米，更优选不超过约 50 微米，最优选不超过约 25 微米，因而形成的测量区域在试验的安培计检测步骤期间可探测的液体容量不超过约 500 pL，分别而言，优选不超过 200 pL，最优选不超过约 100 pL(因此检测持续时间不到 10 秒，最优选不到 2 秒)。当该微型结构包含多个集成的工作电极时，各电极形成的测量区域在试验的安培计检测期间可探测的溶液容量不超过约 500 pL，分别而言，优选不超过 200 pL，最优选不超过约 100 pL。在这种构型中，可沿微型通道

长度的一部分安置集成的工作电极，分隔距离至少等于电极直径，从而能通过加入在各电极处检测的电流来给出最终检测信号。以此方式，试验中可探测该微型结构中溶液体积的较大部分，同时通过改进微型结构和电极维度以及施加电势的时间对安培计测量进行优化，如此可确保分析物分子一直经历半球形或球形扩散，并确保电极上方消耗层的厚度始终小于微型通道的高度。

在一优选实施方式中，所述微型结构是在通道的一端具有入口，在另一端具有出口的覆盖的微型通道。入口和/或出口可围绕有贮存池以利于样品和试剂的操作。在另一优选实施方式中，该微型结构中的集成电极是一系列的工作电极(互连的或各自可寻址的)。在许多应用中，本发明的微型芯片优选具有安置在微型通道外侧，例如微型通道入中或出口处的参比电极，但此参比电极可与溶液接触。在双电极系统中，此参比电极也起着反电极作用，因此构成了假参比电极。在三电极系统中，可将反电极集成在该微型结构的壁中，这样该微型结构同时包含工作和反电极。在一优选实施方式中，工作电极面向反电极。此种配置中，工作电极例如可安置在微型结构的底部(如由安置在微型结构载体一侧的导电材料形成)，而将反电极安置在微型结构的上部(如由安置在微型结构载体相对侧的导电材料形成)。在另一实施方式中，工作电极与反电极毗邻，采用多个电极时，它们可形成在工作电极与反电极之间交替的交叉电极阵列。

在另一实施方式中，本发明的微型芯片装置还包括电连接垫和/或通道槽以提供各电极(工作、参比和/或反电极)与测电仪如稳压器或电源之间的电接触。

在另一实施方式中，集成的工作电极由安置在该微型结构相对侧的微型芯片载体处电连接垫的界限明确部分构成，所述界限明确部分可接触微型结构底部的溶液。本发明装置优选包括有沿微型结构安置的一系列电连接垫制造的一系列这种集成电极。在另一实施方式中，本发明的装置还可包括在一个电连接垫中制备的互连集成电极的阵列。

在本发明中，电连接通道槽或垫以及各电极可用任何导电材料制造。在一优选实施方式中，电极用导电油墨(如碳油墨)制成，或用金属或金属合

金(例如金、铂、银、钨、钛、铬等)制成。在还有一优选实施方式中,电连接通道槽或垫以及电极用金属,如涂覆了电化学惰性金属如金、铂、银等薄层的铜制成。在某些应用中,可将(例如)镍制成的补充层加入铜与惰性金属之间以防止铜扩散入惰性金属层而妨碍电极正常工作。或者,可将电连接通道槽或垫配置和安置成能使一个或多个微型结构中的一个或多个电极相接触。在一优选实施方式中,本发明的微型芯片是其中制造了微型结构的一种印制电路板。

也可将本发明的微型芯片安置成使微型通道的一末端位于微型芯片载体的边缘。在某些实施方式中,可利用此末端装填入含样品和/或试剂的微型通道中。相对于此末端,可将该微型结构的另一末端连接于能泵送或抽取微型通道中样品(及试剂)的机械装置。在这种构型中,可将微型芯片的载体安置成尖头形,从而有利于将液体、样品或试剂引入微型通道和/或将液体、样品或试剂排出微型通道,或分配液体、样品或试剂。这种微型结构优选将其末端之一安置在微型结构载体尖头形的中部,以适合于从微型结构载体的边缘引入、排出和/或分配液体、样品或试剂。还可改进微型结构的尖头使之具有所需穿透力以刺穿固体材料如膜,薄的聚合物箔片,或组织如皮肤,因此能直接引入、排出和/或分配液体、样品或试剂。

在一实施方式中,本发明的微型芯片传感器可用化学化合物(如羧基、N-羟基琥珀酰亚胺或任何感兴趣的分子)或生物材料(如酶、抗原、抗体、亲和试剂、肽、寡核苷酸、DNA、DNA 株、细胞、病原体、病毒等)功能化。例如可通过微型通道表面和/或集成电极的至少一部分的固定化(例如通过吸附、物理吸附、化学吸附、离子结合和/或共价结合)来实施微型芯片的功能化。在含有多个集成电极的微型芯片中,可将不同的化学材料或不同的生物材料(如不同的抗体、抗原、不同的 DNA 株等)固定在该系列的每个电极上,从而能进行多分析物测试。对于某些应用,此微型结构也可包含干的试剂。优选通过在微型结构中引入样品或其它溶液后直接溶解该干试剂而减少试验步骤。

在另一实施方式中,可将本发明传感器的微型结构的制造成该微型结构的至少一部分可接受介质,如液体、固体、凝胶或溶胶。作为一个例子,

微型结构可含有膜、胶凝的液体，如可塑性有机相，或珠。可利用一种或多种化学化合物或生物材料功能化(如通过可逆或不可逆固定)此种介质。此种介质也可以是固体结构，例如，提供分离手段或改变或阻止微型结构内给定部位处液体流动的障碍或限制的层析介质。

在一具体实施方式中，本发明的传感器在微型结构的至少一部分中还可包含有机相(液体或胶凝形式)，例如可利用凹陷集成电极实现，此凹陷可容纳与电极接触的有机相，而微型结构的其余部分可填充水溶液如样品溶液。例如，在传感器的微型结构中掺入有机相可用于涉及同时存在有机相和水相的许多用途。具有此种特征，本发明传感器便能执行涉及物质在有机相与水相之间转运或流通的小型化大规模分析，例如离子转运反应(可借助或不借助离子载体)的安培计测量，或化合物的理化特性如渗透性、溶解性和/或亲脂性试验。本发明的传感器能降低样品体积和减少分析时间，同时简化操作且易于平行检测，这对于不得不处理经常以小量产生许多样品或大化合物库的诊断学和药学研究极有兴趣。

这里要指出本发明的微型芯片也可包含样品、试剂、缓冲液等的贮存室，除电极外的反应小室、检测小室(如紫外-可见光、荧光或任何发光小室)，例如可将它们沿微型通道制造并安置成能与该装置的安培计传感器部分连接，从而能提供第二种检测器件。本发明的微型芯片也可包含能集成在微型芯片中的其它元件，如贮存小室、样品制备室、预处理或分离通道、注射环或其它功能元件。可分别制造和/或显微机械加工(micromachine)所有这些元件，将这些元件组合在可包含例如以下部分的完整系统中：支持传感器的微型通道和电极的集成电路板，和支持贮存器、电连接销钉或其它感兴趣的附加元件的仪器模块(instrument block)，二部分的安置方式应能提供精确的连接从而易于操作。例如，可将包含贮存室和允许微型芯片上诸电极(例如，印制电路板)电连接的出入孔的机械加工(machined)或注射模制部分粘合在微型芯片载体上，或利用该载体上的所需掩模(mask)注射，从而在通道入口和出口处产生贮存小室以及在用于连接诸电极的接触垫上产生开口之时包裹它。

可将本发明微型芯片传感器制造成一次性装置，它适合许多应用，如

必须避免交叉污染和/或假阳性假阴性结果的体外和体内诊断、工业控制、药学研究或环境分析。本发明的微型芯片传感器也适合于划算地自动分析大量样品及进行高通量筛选。此外，本发明的微型芯片能减少昂贵样品和/或试剂的体积和用量，可在非常短时间内提供定量结果。通过以下本发明优选实施方式的详述和说明这些实施方式的实施例及权利要求书也可明白本发明的其它特征和优点。

在第二方面，本发明提供了用微型芯片实施试验的方法，其中用安培计测量术检测感兴趣分析物的方式是，在施加电压和同时进行安培计测量期间微型通道区段的显著部分被消耗掉，但时间不足以沿微型通道建立线性扩散方式。因此，本发明提供安培计测量包含至少一个微型结构(优选覆盖的微型通道，或覆盖的微型通道的阵列或网络)的微系统中电活性分析物浓度的方法，所述微型结构含有至少一个特征性长度小于此微型结构二倍高度的集成工作电极，所述方法的特征是：向集成工作电极施加电势，和检测短于 r^2/D 比值的时期内的相关电流，其中 r 是此集成工作电极的特征性维度， D 是电活性分析物的扩散系数，从而使得安培计测量术只检测半球形消耗层(其厚度小于电极上方微型通道的高度)中存在的分析物分子。

在一优选实施方式中，本发明的方法包括以下步骤：a) 提供包含至少一个微型结构(优选覆盖的微型通道，或覆盖的微型通道的阵列或网络)的微型芯片，所述微型结构在其一个壁上含有至少一个集成的工作电极；b) 用含有感兴趣分析物的样品装填所述微型芯片；c) 在短于 r^2/D 比值的时间期间内施加安培计测量术检测所述分析物所需的电势及检测工作电极处的相应电流；和任选地 d) 在经过长于 r^2/D 比值一半的弛豫时间后重复步骤 c)。

在另一实施方式中，实施本发明试验的方法还包括积分步骤 c) 和 d) 在检测期第二半程时间内测到的电流，以获得该检测期第二半程时间期间工作电极处氧化还原反应产生的电荷 Q 值，并从此电荷值确定感兴趣分析物的存在、含量或浓度。在一优选实施方式中，本发明方法包括在不到 10 秒钟的时间内，通过在集成的工作电极处施加还原或氧化待安培计测量的分析物所需的电势实施微型芯片中分析物的安培计测量，通过积分不超过检测的最后 2 秒钟的电流来考虑分别因还原或氧化反应产生的电荷从而测定

感兴趣分析物的存在、含量和/或浓度。在最优选实施方式中，本发明的方法包括在仅约 2 秒时间内施加所需电势实施微型芯片中分析物的安培计测量，并通过考虑积分在最后 1 秒检测期间检测的电流而产生的电荷来测定感兴趣分析物的存在、含量或浓度。

在另一实施方式中，本发明方法包括在不同时间重复安培计测量，并根据在连续安培计测量期间测到的电荷的时间演变来测定感兴趣分析物的存在、含量或浓度。在一优选实施方式中，本发明方法包括通过考虑在不同连续安培计测量期间测到的电荷的时间演变的斜率来测定感兴趣分析物的存在、含量或浓度的步骤。

在一实施方式中，采用本发明方法在微型芯片中实施试验，试验中用安培计测量术检测的集成工作电极处分析物的浓度或含量随时间而变化(例如常规亲和力或免疫试验中酶反应所产生的电活性物质，或化学或生物学反应，如 DNA 试验中导致产物扩增)。此时，在一系列安培计测量步骤中测得的电荷随时间而变化。根据考虑连续安培计测量所推导出的电荷随时间演变的斜率的本发明方法能优化微型芯片的安培计测量。实际上，本发明方法通过只检测经历半球形或球形扩散而在电极上方产生厚度小于微型结构高度的消耗层的分析物分子，因而总能测到可能的最大电流。积分安培计测量的第二部分期间测得的这种电流也最大程度减少了由于电容电流导致的误差和差异，考虑这种电荷随时间演变的斜率(即在反复安培计测量期间这种电荷的演变)从而能不必考虑测得的电流和/或电荷的绝对值，而只提供根据信号随时间的演变因而依据所测得电流和/或电荷的相对值的最终结果。

借助凹陷电极，利用从安培计测量的最后部分推导的电荷的方法也可以不考虑电极凹陷的空间中存在的分析物分子消耗所产生的电流，而只考虑朝着该电极进行球形或半球形扩散的分析物分子通量所产生的电流。以此方式，微传感器递送的结果基于最高扩散通量，因而基于可能检测到的最大电流，从而提供优化的电化学信号，因此具有可能最高的灵敏度。

在还有一实施方式中，本发明提供用连续安培计测量进行试验的方法，其中，在安培计测量期间还原或氧化的电活性物质是电化学可逆的，因此

可再生。在双电极系统中，可通过在隔开二次连续安培计测量的间隔期间逆转强加在工作电极上的电势来再生电活性物质。在三电极系统中，优选将反电极安置在足够靠近工作电极处，使之能够再生电活性物质。

在还有一实施方式中，可改进本发明方法以适合同时检测多种分析物，例如通过向集成的工作电极施加不同的电势，或在微型芯片传感器中包含多个微型结构而在不同的微型结构中施加不同电势。在某些应用中，本发明的微传感器也可用多种化学或生物学化合物(如多种抗体、抗原、蛋白、DNA 株等等)功能化，使之能同时进行多种测试。与微阵列采用产生的生物探针小斑点来特异性捕获感兴趣分析物相类似，可用所需系列试验要求的化学或生物学化合物来特异性功能化(例如通过固定)该微型结构的诸部分。以同样方式，可用另一种化学或生物学分子功能化集成的各工作电极以产生捕获位点阵列，例如但不限于 DNA、蛋白质或细胞阵列，其中各电极专门用于某特定试验，从而能进行平行和/或多重试验。

在第三方面，本发明提供制造包含至少一个微型结构(优选覆盖的微型通道，或覆盖的微型通道的阵列或网络)的微型芯片系统的方法，所述微型结构包含至少一个特征性长度小于该微型结构二倍高度的集成工作电极。

本发明的微型芯片可用任何显微制造方法制备，例如但不限于：浮雕、注模、化学刻蚀、物理刻蚀如等离子刻蚀、激光烧蚀、聚合物浇铸、UV 连接、硅基技术(silicon-based technique)、两种材料层之间的空间臂整合，或它们的任何组合。在一优选实施方式中，微型芯片由多层体组成，所述多层体包含其中制造了微型结构的至少一层(下文称为“芯片载体”或“微型结构载体”)，连接电极的电传导通道槽和/或垫，及用于覆盖或密封该微型结构的第二层(例如层压叠层、聚合物箔片或载玻片)；在一较优选的实施方式中，微型芯片包含用聚合物材料(如聚乙烯、聚苯乙烯、聚对苯二甲酸乙二酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚酰亚胺、聚碳酸酯、聚氨酯、液晶聚合物或聚烯烃)制成的芯片载体和用聚合材料制成的覆盖层，而电传导通道槽和/或垫可用金属(如具有或不具有惰性金属如金、铂，银等涂层的铜)或导电油墨油墨(如碳油墨，可含有银或氯化银)制成，可将它们用筛网印制在微型芯片载体上。在一实施方式中，所述微型结构载体也可用玻璃或石英制成。在还

有一实施方式中,所述微型结构载体的厚度小于约 500 微米,最优选小于约 100 微米(如微型通道阵列或微型通道网络,或一系列微孔或微洞)。

在一实施方式中,所述至少一个集成工作电极由安置在该微型结构相对侧的微型芯片载体处电连接垫的界限明确部分构成,从而使得所述界限明确部分接触微型结构内的溶液;例如可通过除去安置于微型结构底部与电连接垫之间的微型芯片载体的材料而实现与工作电极的接触。例如去除固相载体的材料可通过从微型结构底部机械钻孔,化学或物理刻蚀,光解切除,或任何其它方法,或方法组合而实现。

对于本发明微型芯片的应用,优选将该装置颠倒,这样芯片载体构成了该装置的上部,而覆盖层构成了该装置的底部。当传导通道槽和/或垫位于微型结构下面的芯片载体相对侧时,颠倒该装置有利于接近传导通道槽和/或垫,因此有利于该装置与外部的电子仪表如稳压器连接。

本发明的微流体传感器可以是集成的样品获取装置和/或分析物测定系统的一部分,可以构成仪器如用于诊断应用、药学研究、或高通量筛选平台的集成自动装置的消耗性部件。另一方面,本发明的微流体传感器可以是手提式或便携式系统的一次性使用部件或消耗性部件,如用于实地测试(field testing)、定点护理测试(point-of-care testing)或自我护理测试(self-care testing)的那些仪器中。本发明的微流体传感器也可以是装有实施专门分析所需溶液和/或试剂的试剂盒中的部件。

附图简述

通过实施例,并参见附图进一步说明本发明,附图中的参考数字和字母表明通过几种视角的相应结构和特征。其中:

图 1 是以垂直于微电极表面的方向安置在半无限环境中的固相载体(2)的壁表面上微圆盘电极(1)处建立的半球形扩散层(3)的示意图,其中微电极中的自然对流(4)使得该溶液均匀化。

图 2 是安培计测量期间微电极处的常规电流与时间反应,其中,反应的第一部分显示由于电容电流所致的强烈电流衰减,反应的第二部分显示对应于图 1 所示环境下微电极处发生的氧还反应感应电流所产生的稳态电

流 (5)的平坦曲线模式。

图 3 是掺入底壁(8)和顶部(9)组成的覆盖的微型通道(7)的壁部分中的微电极(6)示意图, 其中微电极(6)上方的消耗层(10, 10', 10'', 10''') 随时间而扩大, 其从对应于以电极表面正交方向半球形扩散的形状(图 3A 和 3B)变化至在半球形与线形扩散方式之间的混合形状 (图 3C), 然后其形状对应于沿微型通道长度的线形扩散 (图 3D)。

图 4 显示分别在开放的, 即不覆盖的微型通道(11)和覆盖的微型通道(12)中检测二茂铁获得的计时安培计测量反应, 二种微型通道包含一系列整合在微型通道底壁中的 24 个微圆盘工作电极。

图 5 显示在测量的前 10 秒钟, 图 4 所示时间-安培计测量反应。

图 6 显示在约 100 nL 容量和约 60 微米高的微型通道(含有 4 个 50 微米直径的微圆盘电极)中, 在 pH 7.4 的磷酸盐水缓冲液中通过计时安培计测量术检测 500 μM 二茂铁氧化的电流的不同贡献; 此图说明: 所得电流(14)是快速衰减至可忽略不计的电容电流 (13)和集成工作电极处氧化反应产生的感应电流(13')之和; 本发明的方法中, 考虑通过积分时间间隔 t_1 至 t_2 (即安培计测量期间的第二部分, 此时的电容电流可忽略不计, 或至少在实验之间大致恒定)期间的电流获得电荷 Q 来测定集成工作电极周围空间中感兴趣分析物的存在、浓度或含量。

图 7 显示积分在连续安培计测量对氨基苯酚的氧化期间获得的电流反应第二部分所产生电荷的演变, 所述对氨基苯酚是在含有直径约 50 微米的集成微电极的覆盖微型通道中, 用碱性磷酸酶(ALP)对对氨基苯基磷酸酯进行酶促反应产生的, ; 此连续的安培计测量进行 2 秒钟, 并在停滞 50 秒后重复, 通过更新微型通道中的对氨基苯基磷酸酯(在时间 t_{a1} 和 t_{a2} 泵入新鲜溶液, 在时间 t_{b1} 和 t_{b2} 分别关闭泵, 以使 ALP 将氨基苯基磷酸酯转化成对氨基苯酚, 然后在不同时间点用安培计测量术检测 2 秒钟)重复整个检测三次。

图 8 是含有多个间隔距离为 α 的电极(15, 16 和 17)的覆盖微型通道(7)的示意图, 所述距离 α 对应于各电极上方分析物扩散层(分别为 18, 19 和 20)厚度的二倍, 对应于工作电极特征性长度的二倍, 因此安培计测量反应

不取决于微型通道的几何构型，而只取决于电极的几何构型。

图 9 是含有多个电极(15', 16' 和 17')的覆盖微型通道(7)的示意图，其中电极间的距离使得各电极上方的消耗层(分别为 18', 19' 和 20')在安培计测量时间范围内重叠，因此该安培计测量反应取决于微型通道和电极的几何构型。

图 10 显示安培计测量覆盖的微型通道中长度给定但数目增加的集成工作电极的电流反应的理论(21)和实际(22)演变；一旦各电极上的消耗层与毗邻电极上的消耗层重叠，有限的扩散电流(即最大可检测电流)不再随电极数目而线性增长，而变得越来越饱和。

图 11 显示在微型芯片中用安培计检测 pH 7.4 磷酸缓冲盐水配制的 500 μM 二茂铁溶液所得电流的演变，所述微型芯片用 75 微米厚聚酰亚胺箔片制成、含有 1cm 长的微型通道，所述微型通道长 1 cm、高约 60 微米，具有与下图 20 所示高约 60 微米的半圆柱形，通过聚乙烯/聚对苯二甲酸乙二醇酯层压密封，含有一系列分别隔开 850 μm 、350 μm 、150 μm 和 50 μm 的 6、12、24 或 48 个涂覆金的铜电极。

图 12 显示积分在连续安培计测量微型通道中酶促反应所产生的电活性分析物的氧化或还原期间所得电流反应的第二部分导致的电荷的演变，在两次安培计测量之间再生 (23) 或不再生 (24) 分析物。

图 13 是微型通道示意图，所述微型通道含有安置在微型通道(7)的顶部(9)并与此微型通道中溶液相接触的导电部件(25)，注意其是第三个反电极，可用来降低检测大强度电流时的欧姆电阻(也称为 iR 下跌)和/或再生安培计测量期间工作电极(15-17)处消耗的分析物分子。

图 14 显示积分在连续安培计测量微型通道中酶促反应所产生的电活性物质的氧化或还原所得电流反应的第二部分导致的电荷的演变，所述微型通道含有 24 个直径 50 微米的集成工作电极，该覆盖微型通道的顶部安置(26)或没有安置(27)导电部件，其与微型通道中的溶液电接触。

图 15 是含有安置在微型通道(7)的顶部(9)并与微型通道中液体接触的导电部件(25)的微型结构的纵向截面(A)和沿轴 x 的横截面 (B)的示意图，其是第三微条带反电极，在该处再生分析物分子沿微型通道长度建立半圆

柱形扩散梯度(28),从而可用其它可检测分析物分子补充集成的微圆盘工作电极(15-17)上方的消耗层 (18''-20'')。

图 16 显示在含有一个或一系列微圆盘工作电极和在微型通道内侧(29)或外侧(30)分别安置第三反电极的覆盖微型通道中以三电极模式预计的计时-安培计测量反应。

图 17 显示采用在微型通道中安置(31)或不安置(32)第三反电极的安培计测量术检测酶促反应。

图 18 显示本发明微型芯片(100)的示范性例子,其中在芯片载体(102)的一侧上制造微型通道(7),所述载体在另一侧包括导电垫(103),其含有与微型通道中溶液相接触的工作电极或工作电极阵列,以及微型通道末端之一(入口或出口端)处的参比电极和/或反电极(104),和用于将不同电极与外部电子仪表如稳压器连接的导电通道槽(105)和垫(106)。

图 19 显示与图 18 所示相似芯片的侧视图,其中微型通道(7)用覆盖层(9)密封并包含出口和入口 (109 和 109'),所述微型通道在芯片载体(102)中制造,此载体包含用例如铜制成的导电垫(103)并支持用例如沉积在导电垫(103)上(如镀在铜垫上的金)的金属层(107)制成的一系列工作电极,所述电极显示相对微型通道壁有凹陷(108)。

图 20 显示图 19 所示微型芯片侧视图的沿 y 轴示意横截面,其中微型通道(7)具有半圆柱形,导电垫(103)支持集成的工作电极(107),并显示相对于微型通道的底壁有凹陷(108)。

图 21 显示位于在聚酰亚胺芯片载体(102)中产生的微型通道(7)底部的 50 μm 金微圆盘电极的 SEM 图像的线性图(图 21A),和位于微型通道(7)底部、间隔 50 μm 的一系列 50 μm 金圆盘电极的显微镜照片(图 21B);图 21 所示微型通道壁的形状是用各向同性方法,例如等离子蚀刻产生的微型通道的典型形状;此例中,通过在微型通道底部产生凹陷(例如通过激光烧蚀、化学刻蚀或其它适合的方法)以除去铜导电垫上的聚酰亚胺材料,并用电镀方法在铜垫暴露部分沉积金来制造电极。

图 22 是本发明微型芯片(100)的示意图,其包含 8 个独立可寻址微型通道的阵列,它们各自含有导电载体(103)以支持集成的工作电极以及独立可

寻址连接垫(106)，从而通过连接槽(105)将电极与外部电子仪表如稳压器相连接。

图 23 是本发明微型芯片装置(100)的线性图，其包含用等离子刻蚀在聚酰亚胺芯片载体(102)上制造的 8 个独立可寻址微型通道(7)的阵列，各微型通道在其诸末端含有入口(109)和出口(109')以及用涂覆了金的铜载体(103)制造的一系列 4 个金涂覆铜集成工作电极，这些电极通过与导电垫(104)相连的导电通道槽(105)相互连接，从而有利于连接外部稳压器；芯片载体(102)在微型通道(7)的入口(109) 和出口(109')附近也含有补充垫 (104)，其用作反电极或假参比电极从而通过补充性导电槽(105)和垫(106)与外部相连。

图 24 显示用 2 秒钟连续安培计测量后，用固定在微型通道壁上的抗碱性磷酸酶(抗体)捕捉不同浓度的碱性磷酸酶的免疫试验结果，其中将电荷(从积分 $t=1$ 秒至 $t=2$ 秒时间内测得电流获得)绘制为时间的函数；在包含 8 个平行微型通道的微型芯片上同时进行安培计测量，更新酶底物溶液两次以核查此项测量的重现性。

图 25 显示用本发明方法检测全血中 FSH 获得的校准曲线(用已知浓度的 10% FSH 溶液和 90%掺加肝素以防凝固的血制备)，其中在 2 秒连续安培计测量期间，对长 1cm、高约 60 微米的聚酰亚胺微型通道中将对氨基苯酚氧化成醌酰亚胺获得电荷随时间演变的斜率，该微型通道用等离子刻蚀 75 微米厚的聚酰亚胺箔片制成，以层压的 PE/PET 层密封，包含一系列 4 个直径约 50 微米的金微圆盘电极和约 15 微米的凹陷。

优选实施方式的详述

半无限环境中的微电极(现有技术)

电化学领域熟知微电极(1)比大电极更灵敏，因为其扩散电流与电容电流的比例有利。如图 1 所示，对于半无限环境，采用安置在固相壁表面(2)的微圆盘电极(1)诱导半球形扩散层(3)，从而优化了靠近感应区域(称为电极表面区)的溶解分子的检测。如图 1 所示，半球形扩散层(3)的厚度局限于圆形微电极的半径 (例如参见 H.H. Girault, *Analytical and physical*

electrochemistry (分析和物理电化学), EPFL 出版社, 2004, 洛桑 (瑞士), 282-286 页)。在扩散层上方的半无限平面中, 自然对流(4)使得溶液均匀化, 因而能以恒定的分子通量不断补充扩散层(3)。这种现象意味着在短的平衡时间后, 扩散层的梯度变得恒定, 因而此系统快速达到稳态电流(因此电流值恒定)(5), 从而易于监测溶解的氧还分子的浓度, 如图 2 中在半无限环境中获得的这种微圆盘电极的计时-安培计测量反应的典型形状所示例。

有限(finite)环境中的单电极和现有技术的局限性

图 3 显示微型通道(7)中微电极(6)的用途, 此微型通道由确定所定义体积的底部壁(8)和顶部(9)(下文也称为覆盖层或密封层)组成, 其遵循略为不同的规律。实际上, 在检测中随着分析物分子的消耗, 电极周围溶液部分中的这种分析物被耗尽。在缺乏移动和强制对流时, 如本发明微传感器的检测步骤那样, 这种消耗受分析物分子扩散的控制, 这些分子在微圆盘和微半球形电极处使消耗层具有半球形。然而, 自然对流不能使溶液均匀化从而不能产生扩散层, 因为顶部(9)和微型结构壁构成界定有限环境的物理屏障。在此情况中, 消耗层不能达到给定厚度(在半无限环境中, 此厚度对应于扩散层的厚度), 但由于缺乏对流而随时间不断增加。如图 3A 所示, 在集成微圆盘电极处施加氧化或还原感兴趣分析物所需的电势后, 消耗层首先具有对应于电极周围的半球形扩散梯度的半球形。当消耗层达到微型结构的顶部(9)时(图 3B 中消耗层 10'所示的情况), 它不能以与电极正交的方向进一步演变, 因而不断改变其形状(见图 3C 中消耗层 10''所示)直到变得只依赖沿微型通道长度的线形扩散(见图 3D 中消耗层 10'''的形状)。在此情况中, 电流反应达不到稳态, 但因在通道长度方向上施加的次级、线形扩散方式而不断衰减。线形扩散方式的电流强度(对应于朝向电极表面的氧还分子通量)远小于同样电极在半球形或半圆柱形扩散或半无限环境中如在开放的微型通道中可以获得的。因此, 同样的微传感器在覆盖的微型通道中, 或当在开放的微型通道或半无限环境中经历线形扩散时, 其固有灵敏度较低。因此本发明提供的微传感器装置和检测方法通过制造含集成电极的微型结构来优化这种电流反应, 所述集成电极的几何参数适合确保在检测时间范围内建立半球形或半圆柱形扩散, 并限定只检测经历这种半

圆柱形或半球形扩散方式的分析物分子的方法。以此种方式，传感器的覆盖的微型结构中的电流反应取决于电极的形状和维度，但不受该微型结构维度的轻微变化的影响，而这种轻微变化是许多生产过程的不可再现性所致。因此，本发明的微传感器不仅能提供比常规微系统更优化的信号，而且可提高微传感器之间结果的重现性，因为我们的微传感器设计成使得电化学反应不依赖于集成电极上方微型结构高度的变化。

如扩散方式对测定电流的影响所示，图 4 比较了在覆盖的微型通道中用微圆盘电极获得的安培计测量反应与同一微电极在几何结构与覆盖的微型通道相同的开放的微型通道中获得的反应。开放的微型通道(11)中的安培计测量反应显示在施加电压后几秒钟获得了类稳态电流。相反，覆盖的微型通道(12)内的安培计测量反应达不到稳态，但显示电流随时间而显著下降。电流强度的这种下降意味着在覆盖的微型通道构型中此试验的灵敏度，特别是在长时间实验后会显著降低。此外，电流的这种下降表示微电极周围的扩散方式从半球形扩散改变为沿覆盖的微型通道的线形扩散，这意味着深度不同的二种微型通道将显示不同的电流值。在此情况中，电流因而直接依赖于微型通道本身的几何维度(不仅依赖电极的维度)，类似于库仑测量时发生的。

因此，为提高电化学生物传感器，特别是小型化安培计传感器的灵敏度，必须具有能获得最大值感应电流(但电容电流仍低)的系统。还优选具有安培计测量反应不依赖于反应和/或检测部位的几何特征的系统。如上所述，这通常要求具有开放的微型通道的微系统。然而，分析中对开放装置无甚兴趣，由于操作问题难以想象能将其用作微流体传感器。这种缺点使人们将电化学系统看作低灵敏度装置，的确阻碍了将它们开发应用于高灵敏度分析，如免疫学或 DNA 测试(一般优选光学系统)中。本发明提供的安培计微传感器(尽管是用覆盖的微型结构制成)克服了这种限制。

本发明的目的

在本发明中，我们公开了安培计微传感器，其中，选择电极的几何特征和微型通道维度以使电流反应最大，进行安培计测量的方式是只检测经历半球形或半圆柱形扩散的分析物分子。本文也公开了特定的安培计测量

方法以显示如何去除电容电流，这种电流不能给出有关氧还过程和关于溶液中感兴趣分析物浓度的感兴趣信息。以此方式，本发明的装置和组合方法提供了检测性能优化的安培计测量微传感器。发现这些系统在生物学和化学分析等不同领域中有许多用途，例如但不限于：免疫学、寡核苷酸、DNA、细胞或酶试验，或化合物的理化表征，特别感兴趣的应用是所有的分析领域，如医学诊断、环境分析、工业控制、食品安全、战剂(warfare agent)、水控制、农业领域等等。

本发明的一个目的是提供基于微型芯片的分析系统，该系统的几何特征能优化对电活性分析物，即易发生还原或氧化反应(氧还反应)的分析物的安培计测量。本发明的另一个目的是提供以最大灵敏度安培计测量检测覆盖的微型通道传感器中分析物浓度的方法。本发明的第三个目的是提供制造这种安培计测量微传感器的方法。

本发明的微系统在覆盖的微型通道内包含至少一个大小和位置精确的工作电极，从而能显著消耗该微型通道中分析物溶液区段，但能避免完全消耗通道高度，从而总能在该集成工作电极上方维持半球形或半圆柱形扩散方式，并防止电化学信号受到沿该微型通道方向线形扩散的限制。

选择微传感器的形状，微型结构中电极的设计和安置方式应能用安培计测量方法检测电活性分析物(即氧还化合物)的浓度，从而能以第一扩散方式(称为半球形或半圆柱形扩散方式)消耗微型结构中的分析物，并防止其进入沿通道方向的第二线形扩散方式。在一优选实施方式中，所述微型结构是微型通道，此微型通道的高度是集成工作电极特征性长度的至少二倍，这样消耗层厚度能总保持小于微型通道的高度。当需要同时或连续检测多种分析物时，微型通道高度可以是最大消耗层厚度的至少二倍，即对应于扩散系数最大的分析物的消耗层厚度的二倍。在另一优选实施方式中，微型通道高度正好是集成工作电极特征性长度的二倍，安培计测量的持续时间限于消耗层的厚度保持小于集成工作电极上方微型通道高度的时间。

本发明中进行计时-安培计测量检测的方式是，在施加电压和同时进行安培计测量期间，微型通道区段的显著部分被消耗，但没有足够的时间建立沿微型通道的线形扩散。对于扩散系数为 D 的化合物，检测电流(或施加

氧化或还原待检测分析物所需电势)的持续时间 t_a 应限制于低于 $t_a = r^2/D$ 的值, 其中 r 是工作电极的特征性长度。

例如, 在微型通道壁的部分中包含半径 25 微米的环形或微圆盘形微电极的 70 微米高微型通道中, 对于扩散系数为 $2.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ 的分析物, 安培计测量的持续时间应少于 2.5 秒。在单纯扩散(即在单纯扩散控制系统中)中, 这种测量时间足够能消耗掉微型通道区段中的大部分, 还能降低计时-安培计测量开始时施加电势后产生的电容电流, 但时间又足够短从而能防止因扩散方式改变(从电极表面的球形变为沿微型通道方向的线形)所致的电流衰减。此实施例中, 安培计测量结束时消耗层的厚度实际约为 50 微米(即 $2 \times (2.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1} \times 2.5 \text{ s})^{1/2}$), 小于微型通道的高度并对应于约二倍的电极特征性长度。

图 5 显示了在直径 70 微米的覆盖的微型通道内部或宽 70 微米的开放的微型通道内部及垂直于微电极表面的无边壁(infinite wall)中直径 50 微米的微电极的计时-安培计测量反应的详细情况。在开始施加电势后的前 2 秒时间, 覆盖和开放的通道所测到的电流强度形状几乎相同。因此, 将计时-安培计测量限制于如此短暂的时间, 可能使电流强度最大, 因为这非常类似于在开放通道中获得的(如以上所述, 理论上可以获得最高强度)。

因此, 本发明另一目的是提供用安培计测量术检测微系统, 优选覆盖的微型通道, 或覆盖的微型通道的阵列或网络中电活性分析物浓度的方法, 此方法的特征是监测时间短于 r^2/D 比值(其中 r 是集成在微系统中并用于测量电流的工作电极的特征性长度)期间的电流, 从而能以安培计测量术检测只经历半球形或半圆柱形扩散方式因而存在于厚度小于微型结构高度的消耗层中的分析物分子。

在本发明一实施方式中, 通过去除最初含有电容电流贡献的第一检测部分, 并考虑只在安培计测量的第二时间部分的电流值(其与所测信号的感应电流相关, 而电容电流可忽略不计)来测定分析物的浓度或含量。图 6 显示在体积约 100 nL、高约 60 微米、包含 4 个直径约 50 微米的微圆盘电极的微型通道中, 氧化用 pH 7.4 磷酸缓冲盐水配的 500 μM 二茂铁获得的计时-安培计测量电流, 测得的电流(14)是主要依赖于电极材料和维度及微系

统几何结构的电容电流(13),与集成工作电极处氧化反应所产生的感应电流(13')之和,在2秒钟实验中接近恒定值;在本发明一实施方式中,此检测方法包括,通过将在电容电流起的作用可忽略不计,而感应电流不显著衰减的时间窗口获得的电流视作检测信号,从而优化安培计测量反应;以此时间间隔,感应电流达到最大可测量值,感应电流与电容电流之比也最大。在本发明的此方法中,考虑积分时间间隔 t_1 至 t_2 期间的电流所获得的电荷 Q (图6中用双短线表示)来测定集成工作电极周围空间中感兴趣分析物的存在、浓度或含量。考虑此电荷量 Q 实际上有很大优点,因为此参数不大依赖于可能影响实验期间所测电流的各种变化(电子器件产生的噪声、尖峰信号(spike)等)。

当所述微型结构包含凹陷的集成电极时,优选改进包括去除测量的最初部分在内的本方法以确保也去除了氧化或还原电极凹陷处分析物分子产生的感应电流,从而只需考虑该微型结构内凹陷上方建立的半球形或半圆柱形消耗层产生的电流作为检测信号。因此可改进本发明方法使之适于去除检测信号中对应于电极上方凹陷所限定空间所含的分析物分子通过扩散到达电极表面所需时间的部分。例如,在含有集成工作电极的微传感器中,所述工作电极距该微型结构表面凹陷15微米,去除第1秒钟的测量值,不将其视作扩散系数为 $2.5 * 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ 的分析物的检测信号。以此方式,开始测定时存在于凹陷处的分析物分子的氧还反应所致电流在最终检测结果中不予考虑。虽然凹陷处分析物分子的含量或浓度在各次实验之间有所不同,但本方法不受这种变化的影响,因此能提高检测的重现性。

在包括产生和/或消耗待安培计测量术检测的分析物的反应的应用(如酶产生要检测的活性分析物)中,最优选重复上述计时-安培计测量术检测方法几次,从而能获得集成工作电极处氧还反应产生的电荷的值,因而能测定其随时间的演变。因此,优选以理想的时间间隔重复该检测方法几次。此方法对需要放大的试验,如酶联免疫吸附试验(ELISA)具有很大优点,其中分析物浓度(即,ELISA实例中酶反应的产物)随时间而增加。在此情况中,电荷(本方法通过积分连续安培计测量第二部分测得的感应电流而获得)作为酶促反应速率的函数而随时间增加,然后通过监测的电荷与时间曲线的

斜率测定被捕获的抗原或抗体的浓度。通过测量只存在于半球形或半圆柱形扩散层中的分析物的氧化反应产生的电流，和去除电容电流，本发明方法防止了电容电流对扩散电流的任何掩盖作用，从而能提高检测的灵敏度。用此检测方法可获得 pM(浓度)检测下限，而常规检测方法灵敏度限于纳摩尔，或甚至微摩尔浓度范围。

本发明方法还有一优点是最终检测结果不依赖于所测电流的绝对值，如终点检测方法那样，因此不大依赖于噪音和背景电流从而具有更好的可重现性。此外，考虑了连续安培计测量期间的电流或相应电荷的优点是能顺应信号随时间的演变。实际上，在包括扩增待检测分析物的试验，如酶试验或免疫试验中，连续安培计测量期间获得的电流或相应电荷的演变遵循酶促反应的动力学规律，这样检测信号就不依赖于强烈依赖于测定时间的独特值。相反，遵循电荷随时间演变能按预计(如遵循酶促反应中的 Michaelis-Menten 行为)控制信号的演变，并减少噪声的影响以及与测量的有效起始点相关的误差。在本发明的该方法中，通过考虑连续安培计测量后电荷随时间演变的曲线的斜率来测定分析物的存在、含量或浓度。在免疫试验中，这种斜率与酶标计的第二抗原或抗体揭示的被捕获分析物(如抗体或抗原)的浓度直接成比例，所用的酶可将化合物(如对氨基苯基磷酸酯)转化为电活性物质(如对氨基苯酚)，然后可在集成的电极处被还原或氧化以便通过安培计测量术检测。由于只利用这种斜率来测定感兴趣分析物的存在、浓度或含量，与只在一个时间点检测电流获得的结果相比，背景信号或噪声很少影响结果的质量。实际上，在某些情况下，空白实验测得的电流可能大于低浓度分析物获得的电流(例如由于二种实验所用各微传感器的几何结构和电极大小的差异)。然而，认为即使分析物浓度低，在连续安培计测量过程中电荷的演变也应显示随时间而增加，而空白实验获得的电荷应维持恒定。因此，即使分析物浓度低也应获得正斜率，而空白实验应维持为零。故本发明方法能检测含量或浓度甚至非常低的分析物，还能获得非常低的检测下限。

还应注意，在例如非特异性吸附情况中，该情况能产生某些电活性分析物，从而诱导能通过降低检测下限而干扰试验灵敏度的信号，空白实验

获得的斜率可能是略微的正值。然而相反，当在安培计测量期间和/或安培计测量之间集成电极处待测的电活性分析物不再生时，或当其不是电化学可逆性化合物时，检测期间分析物的浓度将下降，从而导致连续安培计测量获得的电荷的时间演变斜率为负值。如果电活性分析物稳定性差并在检测时间范围内轻微降解，此现象的确明显。本发明方法以此方式测定负斜率能区分空白测量(或零校准点)与有效测量(应显示正斜率)，从而提供优化检测限度的强有力方法。实际上，一旦斜率为零或负，试验结果表明缺乏感兴趣的分析物，而无论此负斜率可能有误差。因噪声、背景信号或其它干扰破坏了测量的质量，当接近检测限度时测量误差增加，由于检测的分析限度通常由显示其标准偏差低于 20%的分析物含量或浓度决定，本发明方法能将此限度推向更低的分析物含量或浓度。

前两段描述的方法提供了提高试验灵敏度的非常令人感兴趣的方法，更具体说是依据电化学的分析，因此分析领域对此会有极大兴趣。与常规电化学生物传感器相比，组合本发明的该方法与微系统(经改进以适合优化安培计测量术)，使此平台成为非常灵敏的工具。

图 7 显示了上述计时安培计测量术检测方法的一个例子，在给定的时间内，向微型通道中涂覆金的铜电极施加电压，以检测感兴趣分析物的氧化反应产生的电流。此实施例中，采用本发明的计时安培计测量法测定样品中碱性磷酸酶(ALP)的浓度。为此目的，首先用抗-碱性磷酸酶(抗-ALP)包被含有宽 120 微米、深 60 微米、长 1cm 的微型通道的聚酰亚胺微型芯片，再用牛血清白蛋白(BSA)封闭以防止非特异性吸附。然后将含有 ALP 的样品充填入微型通道，培育 5 分钟，从而形成 ALP/抗-ALP 复合物。洗涤步骤后，用对氨基苯基磷酸酯(PAPP，此地用作酶底物)充填微型通道检测复合物 ALP/抗-ALP。ALP 将 PAPP 转变为对氨基苯酚(PAP)，它是电活性化合物，在 200 mV 和 Ag/AgCl、pH 9 时可氧化成醌酰亚胺。因此，可用这种电化学微系统进行计时-安培计测量以测定小量样品中的 ALP 浓度(此实施例的微型通道体积不到 100 nL，在安培计测量时间范围内电极上方的检测空间不到 500 pL)。

为了达到理想的灵敏度，可如下所示利用本发明的计时-安培计测量

法：在 250 mV 和 Ag/AgCl 极化微型通道内的电极 2 秒钟，记录此时的电流。为了去除电容电流，通过考虑 $t = 1$ 秒与 $t = 2$ 秒之间测得的总电荷 Q (即 $t = 1$ 秒与 $t = 2$ 秒之间测得电流的积分值，为简化起见，通常可用 $Q = I \Delta t$ 的关系来估计)，本检测方法只考虑此时间间隔期间检测的电流。然后通过以给定时间间隔重复以上计时-安培计测量不难测定样品液中的 ALP 浓度，从而能测定微型通道中测得的电荷 Q 随时间的演变和 PAP 浓度。在本实验的本实施例，两次时间-安培计测量之间的时间间隔(下文称为“弛豫时间”)固定在 40 秒钟，从而使得电极上方的溶液充分均匀化。实际上，由于安培计测量期间一部分 PAP 被氧化，电极周围产生了浓度梯度，然后这种梯度在此 40 秒钟内因扩散而消除。对于采用可逆性氧化还原反应底物的安培计测量，还可通过逆转电势而回收安培计测量期间消耗的分子(在此例中，在弛豫期将电势设置为约 200 mV 和 Ag/AgCl，从而能将在安培计测量期间产生的醌酰亚胺转化成 PAP)。因此，该测量方法能消除电容电流，防止了待用安培计测量法检测的电活性分析物被消耗 (和/或甚至在二次连续测量之间更新它)，检测的只是电极周围厚度小于微型结构高度的消耗层中的此电活性物质。当氧化还原反应产物随时间而降解或分解时此方法也可能特别优选。

如图 7 所示，测得的电荷随时间增加，这与被捕获的 ALP 将 PAPP 不断转变为 PAP 相一致，所以 PAP 浓度随时间而升高，其氧化成为醌酰亚胺而产生的电流也升高。此实验中，进行连续计时-安培计测量的总时间为 500 秒，各次测量时间为 2 秒，弛豫时间 40 秒。500 秒后 (见图 7 的时间 t_{a1})，通过微型通道泵入新鲜的 PAPP 溶液更新酶底物溶液直到时间 t_{b1} 停止溶液流动。如图 7 所示，PAPP 溶液更新后测得的电荷立即下降，然后在微型通道中无液流时再次升高。实验 1000 秒后重复这种 PAPP 溶液更新 (见图 7 时间 t_{a2} 和 t_{b2})，获得的信号清楚表明，三次检测测得电荷的时间演变相似。

多电极系统

在另一实施方式中，所述微型结构可包含多个电极。为了获得最大电流，这些电极应如此安置，即电极之间的消耗层不重叠。因此，在本发明的装置中，电极安置的距离应能防止二个毗邻电极上的消耗层不会显著串

话并防止检测变成库仑测定。实际上,如果检测花费时间太久,或如果电极之间的距离太短,安培计测量优点微型结构中存在的分子完全消耗。例如 Therasense (艾博特实验室公司(Abbott Laboratories company), 艾博特帕克市(Abbott Park), 伊利诺斯州, 美国)的 FreeStyle 葡萄糖传感器中所用的库仑检测系统发生的情况。我们的例子中,我们要避免这种类型的检测,因为这种检测更依赖于微型通道体积,而基本上不依赖于安培计测量时氧还分子的浓度。

本发明的微型传感器包含多个集成的工作电极,电极安置的方式是彼此分开的距离至少等于安培计测量结束时消耗层的最终厚度。因为安培计测量时期固定为消耗层的最终厚度是集成工作电极特征性长度的约二倍的时间,故电极间的距离至少是此特征性长度的至少二倍。如图 8 所示,电极分开的距离 α 大于各电极上方消耗层(18-20)的最终厚度。以此方式,各电极产生了自己的半球形消耗层,不会受到毗邻电极处分析物消耗所诱导的分析物耗尽的干扰。以此方式,各电极处的电流可完全相加,该微型传感器的信号与电极数目直接成比例。

如图 9 所示,如果不优化检测时间和电极间的距离,各电极(15'-17')上方的消耗层(18'-20')重叠或部分混合,这样总电流不再与工作电极数成比例,从而导致灵敏度显著丧失。图 10 分别显示当二毗邻电极间的距离维持大于消耗层的厚度时(曲线 21),和当集成电极超过特定数目时此距离变得小于上消耗层厚度时(曲线 22),总电流值如何随集成的工作电极数目而增加。此图说明当电极之间的距离变得太小时总电流较低。

因此,本发明的一个目的是提供具有多个电极的微流体安培计测量传感器,其中多个电极的安置方式使各电极的消耗层在计时-安培计测量期间不重叠。因此,在本发明的一实施方式中,此种微型芯片传感器包含多个集成的工作电极,其消耗层的厚度小于微型通道高度并小于二毗邻工作电极之间的距离。以此方式,用上述本发明方法可获得优化的安培计测量,即检测这些电极处的电流,检测的时间足够长从而能除去电容电流但时间又足够短从而只能检测各电极上方经历半球形或半圆柱形扩散的分析物分子。

此外,关于多个集成的工作电极,也存在着这种检测将耗尽微型通道总体积中氧还分子的风险,然后与微型通道中存在的分析物分子数成比例,与安培计中发生的情况相反,而不再与分析物浓度成比例。在集成的工作电极代表了微型通道的大部分表面的情况中,或作为另一个例子,在只有一个集成电极覆盖微型通道的全长的情况中会发生这种情形,安培计测量传感器中必须避免这种情况,因为此时容积的轻微改变将导致不同的安培计测量反应,和导致无重现性的结果。

在另一实施方式中,本发明还提供能检测与电极数目成比例增加的信号的检测方法,例如在深 75 微米的微型通道中直径 50 微米的各电极间隔 100 微米的情况中可用 2 秒钟安培计测量进行检测。如图 11 对本发明方法的说明,其显示在集成工作电极数目增加(即 6, 12, 24 和 48 个电极)的不同微型通道中检测 100 μM 二茂铁。所测得电流与电极数目成比例,表明检测的方法和装置是最优的。如果安培计测量的时间太长(例如 10 秒),电流不再与电极数目成比例,导致灵敏度丧失。

在另一实施方式中,本发明公开了制造安培计测量微型传感器的方法,此传感器包含至少一个微型结构(优选微型通道或微型通道的阵列或网络),所述微型结构的至少一个壁中的精确部位集成了多个工作微电极,其安排方式是二个毗邻电极之间的距离至少等于它们的特征性长度的二倍(即微圆盘电极半径的二倍,或条带电极带宽的二倍)。在一优选实施方式中,集成工作电极隔开的距离至少等于其特征性长度的二倍,但不长于它们特征性长度的 5 倍。在另一优选实施方式中,本发明的微型传感器包含高度在 10 与 250 微米之间的覆盖微型通道,和直径 20—100 微米的一系列集成微圆盘工作电极。此时,工作电极必须分开,间隔距离从至少 20-100 微米到最大 100-500 微米不等。

在另一实施方式中,所述制造方法包括是在安置于微型结构(优选一个或多个微型通道)底部的导电垫中制造一个或多个工作电极,所述微型结构在相对于一旦封闭即构成此微型结构的沟槽或凹陷的微型芯片载体一侧。电极的制造包括从该微型结构的壁中去除(例如通过化学或物理刻蚀、光解切除或任何适合的方法)分隔导电垫的部分支持材料,从而暴露导电垫

的相应部分，所述部分即构成在此例中显示凹陷的所述集成电极，其高度对应于分隔该微型结构底部与导电垫的微型芯片载体的厚度。为产生电极，优选用例如惰性金属涂覆该导电垫，例如可通过电镀实现。

受检分析物的回收

如果安培计检测时间长，与整个微型结构体积相比，检测体积显著，则电极处被氧化(或还原)的分析物分子部分不能忽略不计。因此，安培计检测结束时，集成工作电极处的氧还反应消耗了显著部分的分析物分子，从而难以使得分析物浓度再次变得均匀(与短时间安培计测量电极上只有小消耗层被消耗，从而诱导非常少部分的分析物分子被消耗，因此微型结构中分析物浓度只有轻微变化的情况相反)。因此，对于某些应用，本方法的最大优点是再生已被还原或氧化的分析物分子，从而能回收利用不得不在下一安培计测量阶段中检测的分析物分子。

为此，要检测的分析物必须是可逆的，或至少是半可逆的氧还分子。以此方式，安培计检测时的氧还反应产物(即已被氧化或被还原的分析物)可转变回原分析物(分别通过还原或氧化)。

图 12 显示分析物再生如何影响分析物浓度随时间而升高(例如在酶扩增反应时酶不断产生要检测的分析物)的系统中获得的分析反应。实际上，图 12 显示了连续安培计测量后，安培计电流反应推导的电荷如何随时间演变，二次测量之间再生或不再生分析物。弛豫期间再生分析物时所测到的电流(曲线 23)总是比休息时分析物不再生(曲线 24)的大，因为一系列安培计测量的每一次开始时分析物的浓度维持在其可能的最高水平。

为了进行这种再生，图 13 说明了能更新或再生电活性分析物的装置。此实施例中，一系列工作电极 (15-17)分布在微型通道(7)的一侧，从而能通过这些电极周围消耗层中的分析物分子的氧化(或还原)来检测。为了能再生已氧化(或还原)的分析物分子，该微型传感器在工作电极附近还包括补充电极(25)。此电极或用作工作电极的反电极，或在能使与工作电极处发生的反应相对的反应发生的电势下极化(即工作电极处原先已氧化的分析物分子还原，或工作电极处原先已还原的分析物分子氧化)。为简化起见，在以下描述中，将补充电极(25)称作反电极，因为用其再生时，优选整合了再生与

反电极二种功能。

在某些实施方式中，还可通过在两次安培计测量之间的弛豫期直接逆转施加在工作电极处的电势而实现检测期间被还原或氧化的分析物分子再生(因此不需要补充的反电极)。

对于图 13 所示的装置，工作电极处已被氧化(或还原)的分析物分子扩散到反电极处，所述反电极安置和配置成能还原扩散的氧化分析物分子(或能氧化扩散的还原分析物分子)，从而再生分析物。

图 13 所示的实施例中，反电极位于微型结构(此处为微型通道)相反侧上，工作电极的前方，从而确保与溶液接触，通常具有顶部(9)用于密封该微型结构。取决于应用和芯片制作工艺，反电极例如可安置在工作电极的同一侧，例如在相互交叉电极系统中。当微型芯片包含多个工作电极时，优选具有较大的反电极或多个反电极，以优化分析物的再生(例如工作电极的安置与反电极等距离，从而确保各工作电极处氧化(或还原)的分析物同等再生)。

为了在实验的时间范围内，能有效再生已氧化(或还原的分析物分子)，工作电极与反电极之间的距离应足够小以确保重要部分的氧化(或还原)的分析物分子有时间扩散到反电极处。本发明通过将检测持续时间限制为电极上方消耗层的厚度小于微型结构高度的时间来优化安培计测量，因此，工作电极与反电极之间的距离优选低于或明显等于该微型结构的高度。

如果在该微型结构中进行酶反应，待测物质(即酶反应产物)的浓度将随时间而升高。然而，如果检测时溶液中分析物的消耗快于酶反应产生分析物分子，待测浓度将停滞不变或甚至随时间而下降。图 14 说明了这种例子，显示(曲线 27)分析物消耗与酶产生等速时测得的电流。如果能够再生，部分或全部再生工作电极处消耗掉的分析物分子，其浓度将持续升高，如曲线 26 所示。实际上，微型结构中将存在再生分子，从而能作进一步检测，如此增加了酶产生的分析物分子从而增加了可检测分子的总数。再生的整合意味着能增强试验的可测电流和检测下限，因而提高本发明微型传感器的灵敏度。

没有酶反应发生时，检测恒定浓度的分子更好地说明了再生的兴趣。

此时,只有微型结构中的分子被消耗,不生成可能影响检测电流的新的可检测物质。图 15 显示当反电(25)起作用时,微型通道中消耗层分布随微型通道内分析物分子的给定浓度而演变。除了微型通道体积全部消耗和靠近电极的分析物浓度降低外,朝向反电极(25)产生了第二扩散层(28),它能阻止工作微电极(15-17)上的半球形消耗层达到通道上部。此时,如图 16 的曲线 29 所示,对于恒定浓度建立了稳态并检测恒定电流。在没有再生已氧化(或还原)的分析物分子的反电极时,如图 16 中的曲线 30 所示,电流不能达到稳态而是持续下降,因为半球形消耗层达到了通道上部并沿通道长度方向按照线形方式扩散而进一步发展。第二扩散层(28)的形状也取决于反电极的形状。在图 15 的例子中,反电极是沿微型通道长度安置的薄条带,扩散方式是半圆柱形,因此分析物分子向反电极移动与向工作电极移动基本上一样快。因此,随着集成的反电极处分析物分子的再生,使工作电极处分析物分子的消耗与反电极处已氧化(或还原)分析物分子的再生之间建立了平衡。

最后,即使酶产生产物非常快,因集成的反电极而导致所检测分析物分子的这种再生也是有利的,因为它能优化微型通道中可检测分子的数量。如图 17 所示,酶反应产生分析物时,工作电极处测得的电流实际上总是大于无再生的(分别见曲线 31 和 32),因为再生的分析物分子加入到酶反应产生的分子中。

在另一实施方式中,除检测产生,即工作电极处电活性分析物的氧化(或还原)产生的电流外,通过考虑检测的分析物分子再生产生的电流来改进本发明方法以增加检测信号。实际上,检测的分析物分子再生产生的电流仍能表示微型结构中感兴趣分析物的存在、含量和/或浓度,因为这种再生电流来自感兴趣分析物可逆性氧化还原反应的反向部分。由于检测和再生产生的电流设计同一实体,它们均可用作检测信号。在某些应用中,甚至优选考虑这二种信号(通过加入检测和再生电流的绝对值,或考虑检测电流与已氧化或还原分析物分子再生产生的电流之间的差异)。

为此,实施安培计测量可首先在工作电极处施加氧化(或还原)分析物分子所需的电势,其时间足够短从而只能检测电极上方经历半球形或半圆柱

形扩散的分析物分子，其次在相同时间内施加再生分析物所需的电势（即还原或氧化所检测分析物分子所需的电势）。任选重复这二步安培计测量，例如遵循酶反应的动力学。然后将两步安培计测量测得电流的绝对值相加，或通过将积分这两步安培计测量后半时的电流产生的电荷的绝对值相加，即可得出最终的检测信号。以此方式，用于测得感兴趣分析物含量和/或浓度的信号可能增加，因为也考虑了每步安培计测量时工作电极处已氧化(或还原)的电活性分子再生所产生的信号。就电活性可逆的分析物(如碳酸或对氨基苯酚)而言，在理论上采用本方法可能使信号加倍，因为所有检测的分子均可再生。向工作电极施加电势进行本明的连续安培计测量，该电势从分析物分子可被氧化(或还原)的值改变到通过还原(或氧化)再生分析物分子的值，例如可用偶联的对氨基苯酚/醌酰亚胺实现，从而获得提高需高灵敏度的试验的检测下限到所的高有力方法。

所述装置的制造

本发明的还有一个目的是提供在微型结构中集成有微电极的电化学微型传感器的制造方法，以此方式它们能优化一种或多种感兴趣分析物的安培计测量。因此，该目的是在微型结构中制造电极、或电极的阵列、或电极的网络，以此方式该微型结构和电极的维度及它们各自的形状能优化安培计测量。所述电极、或电极的阵列或网络优选具有几微米或更小的维度，其安置在微型结构(优选微型通道或微型通道的网络或阵列)的顶部或底部。

本发明中，可采用显微制造方法(例如刻蚀、模铸、浮雕、烧蚀、机械钻孔、紫外连接(UV-LIGA)、光聚合等等)在支持材料(玻璃、陶瓷、聚合物、弹性体等)上制造这种微型结构(微型通道、出入口、凹陷、贮存小室、中空通道，以及它们的组合)。本发明的微型传感器含有至少一个集成在微型结构一个壁中的电极。在优选实施方式中，这种电极安置在微型结构的底部或顶部。可以凹进或突出于该微型结构底部或顶部界定的平面。

除了集成在微型结构的一个壁中的电极外，该微型结构还包含与该集成电极相连接的至少一个导电垫或一个导电通道槽，从而能进行电连接(例如与稳压器、波形发生器、电源等相连)。

图 18 显示了本发明微型芯片(100)的示意图，其中微型通道 (7)制造在

芯片载体(102)的一侧,所述载体在另一侧包含导电垫(103),其含有与微型通道中溶液相接触的工作电极或工作电极阵列;以及位于微型通道末端之一(入口或出口)的参比电极和/或反电极(104);还有导电通道槽(105)和垫(106),它们的作用是连接各电极与外部电子仪表如稳压器。

取决于制造工艺,集成的电极可显示图 19 和 20 所示的凹陷(108)。可利用此特征,例如来防止在试验的部分时间中(例如用抗原、抗体、寡核苷酸、DNA、细胞等包被该微型结构期间)水溶液接触微电极表面,直到洗涤剂润湿电极表面。例如,优选这样使用以避免检测前溶液中的某些成分污染电极表面。

在另一实施方式中,可用导电材料(如电镀的金属)充填集成电极上的凹陷以防气泡截留在凹陷电极的转角。此法还能通过促进电极周围的纯半球形扩散和去除沿凹陷的线形扩散而增强电流。

在另一实施方式中,可将凹陷的壁机械加工成漏斗状,以促进分子从集成电极侧的扩散。这可用钻孔烧蚀法(trepan ablation mode)制造凹陷而得以实施,此法能改变微电极表面和凹陷的壁之间的角度,从而产生,例如圆锥形的凹陷。在某些实施方式中,可用钻孔法激光机械加工或加工后再经刻蚀步骤破坏尖角使之更平滑。在某些实施方式中,可优选利用此特点来改善凹陷的可润湿性并促进充填凹陷,从而使整个电极能接触微型结构中的溶液。

为了能处理和连接这种微流体传感器装置,可用各种必须由电绝缘材料(例如但不限于聚合物、陶瓷、玻璃等)制成的载体制造该系统。在某些实施方式中,如图 18 所示,本发明的微型芯片装置(100)可用载体(102)、优选聚合物箔片或多层聚合物装配体制造,含有至少一个微型结构(本例为制造在芯片载体(102)一侧的微型通道(7),所述支持载体的另一侧包含至少一个导电垫(103),其含有设计成与微型通道中溶液相接触的工作电极或工作电极阵列。该芯片载体(102)在微型通道末端之一(入口或出口)还包含参比电极和/或反电极(104),以及导电通道槽(105)和垫(106),它们的作用是连接各电极与外部电子仪表如稳压器。此导电垫含有与导电通道槽(105)和垫(106)相同的材料制成的工作电极 (103)。在某些实施方式中,可制造与

用于支持工作电极的那些类似的导电垫以支持参比电极和/或反电极，从而有助于集成在微型结构的壁中。

图 19 是说明图 18 所示装置沿微型通道长度的横截面图，其中可用适合电化学检测的涂覆剂(107)，如另一种金属层、导电油墨或导电有机溶剂电镀、涂覆或覆盖支持工作电极的导电垫(103)油墨。在一优选实施方式中，支持工作电极的导电垫(103)以及导电通道槽(105)和垫(106)用铜制成，涂覆剂(107)是金，将其涂覆(例如通过电镀)在所有暴露的铜表面，不仅是支持工作电极的导电垫(103)，而且包括导电通道槽(105)和垫(106)，从而提供金涂覆的铜电极。在另一优选实施方式中，参比电极(104)部分或全部涂覆有银或银/氯化银(如沉积的银或银/氯化银油墨斑点)。

如图 19 所示，在可也含有用作微型通道入口和出口的出入孔(109 和 109')的基材(102)上制造微型结构。此例中，通过制造穿透芯片载体(102)全部厚度的孔产生这些入口和出口；用于覆盖微型通道的层(9)也能密封这些通孔的一端，从而产生微型通道的出入口，随后用于液体的分配和/或排出。在某些实施方式中，微型通道的入口和/或出口可优选围绕贮存小室，从而以利于样品的存放/取出和液体操作。

本发明装置的微型结构的形状没有限制，它们可以用各向异性制造方法，如激光烧蚀、浮雕或注模法制造的直壁。类似地，图 20 显示了沿图 19 微型芯片 y 轴的横截面，此微型结构也显示了用各向同性显微制造方法，如等离子刻蚀或湿刻蚀工艺产生的一种半环形。

图 21 提供了覆盖微型结构前，集成在本发明微型芯片装置中的微电极的例子。这些例子中，芯片载体(102)是厚 75 微米聚酰亚胺箔片，用等离子刻蚀法在其中制作沟槽，从而形成宽约 100 微米、高约 50 微米的开放微型通道(7)。图 21A 是反映扫描电子显微镜图象的素描图，其显示直径为 50 微米是微电极集成在微型通道底部，电极的可见部分为镀金的表面(107)。图 21B 是反映显微镜图片的素描图，其呈现类似的芯片装置，其中集成有微电极的阵列。此例中，电极直径约 50 微米，相距约 50 微米。这些开放的微型通道为半圆柱形，是各向同性刻蚀制造工艺典型的。如果需要，可采用其它显微制造技术，如注模、浮雕、加入连接壁隔开的诸层等以产生

具有直壁并显示较大纵横比的微型结构。

图 21B 显示集成多个微电极的最大优点是提高传感器的灵敏度。此外，这类装置尤其受益于本发明的短时安培计测量方法，因为在此检测时间范围内消耗层不重叠，从而可能在电极周围产生分析物浓度的最大可能梯度，诱导了分析物分子向电极的最大可能通量，因此产生了最大可能的电流。在这种构型中，各电极固有的灵敏度对于短时安培计测量最理想，因为检测期间各电极上方被消耗的体积小于微型结构高度所限定的，从而在检测的时间范围内各电极仍保留了最大数量的可用分析物分子。

对于许多应用，优选用电化学微型芯片传感器执行多种分析。为此，可在同一芯片载体中制造本发明安培计测量装置的阵列。图 22 显示了包含任意数目(8 个)平行微型通道阵列的这种芯片(100)的示意图。

本发明的证明

为了证明本发明的几种实施方式，设计和制造了各种安培计测量微型芯片传感器，还实施了用这些装置优化安培计测量的方法。为了说明本发明，以下描述了装置、检测方法的实施例和各种分析的结果。

微型芯片的描述

如图 22 所示，用于演示如何用优化的安培计测量进行分析的电化学微型芯片传感器(100)的例子包括由 8 个独立可寻址微型通道(7)构成的阵列。本例中，微型通道为借助等离子刻蚀在用作微型芯片载体的 75 或 100 微米厚聚酰亚胺基材上制作的沟槽。各微型通道构成了本发明的安培计测量传感器，在线形沟槽的两端包含一个入口和一个出口，沟槽的大致维度为：深 60-70 微米，宽 120 微米，长 1cm。因此，一旦被覆盖，这些维度就将微型通道限定为高 60—70 微米，集成的电极显示在 75 微米厚聚酰亚胺载体中凹陷 5-15 微米，和 100 微米厚聚酰亚胺载体中凹陷 30-40 微米。

本例中，通过提供在两侧覆盖有铜层的聚酰亚胺基材制成的多层体(作为芯片载体)来产生所述微型结构(即，这里的沟槽，入口和出口)，如下所示制造具有与最终沟槽和出口/入口的所需几何结构和形状相对应的图案的掩膜：a) 将光致抗蚀剂在铜层上图案化，b) 通过光接触除去与所需掩膜相对应位置的光致抗蚀剂，从而暴露出相应的铜部位，c) 用湿刻法去除暴露的

铜部位从而使对应于所需图案的聚酰亚胺部位暴露,和任选 d)去除其余的光致抗蚀剂。然后可利用该掩膜,通过化学或物理刻蚀法,分别以湿刻或等离子刻蚀工艺在聚合物载体中刻蚀所需微型结构。本例中,将聚酰亚胺体与其铜掩膜一起置于等离子体炉中(例如可根据要刻蚀的材料,刻蚀表面的理化特性使用氧、氮、氩、 CF_4 的等离子体或它们的任何组合)。等离子体攻击基材的暴露部分产生所需的微型结构。第二步,通过去除不需要的铜制造导电通道槽(105)和垫(106)。然后通过去除芯片支持材料的少量明确限定且位置明确的部分,从而使得用于支持电极的铜垫(103)的所需部位暴露而将微电极集成在微型通道底部。第二次等离子体刻蚀步骤与上述相似,或者如用于演示本发明的实施例所示,可用例如激光烧蚀产生微电极。由于铜不太适合电化学检测目的,还要采用,例如电镀方法用惰性金属如金涂覆铜表面,从而提供金涂覆的铜制成的集成电极,以及金涂覆铜的导电通道槽(105)和垫(106),它们的一部分可用作置于该微型结构外但与微型结构出口/入口处的分析物溶液相接触的参比电极和/或反电极。本例中,通过将 Ag/AgCl 油墨斑点沉积在微型结构出口处的连接通道槽上制备参比电极,图 18 详细说明了参比电极(104)。最后的制造步骤是,例如用聚乙烯/聚对苯二甲酸乙二醇酯制成的塑料层层压来覆盖微型结构的沟槽,从而形成能够进行微流体操作的密封微型通道。

本说明实施例制造的微型芯片装置包含不同数目的集成工作微电极。在图 23 反映了用于执行以下图 24 和 25 所示试验的芯片照片,在图 23 所示的构型中,微型通道中掺入了各金涂覆的铜载体(103)支持的一系列 4 个工作微电极,通过安置在芯片支持层边缘、用于连接外部稳压器的金涂覆铜通道槽(105)和垫(106)相互连接。这些电极直径约 50 微米,间隔约 2mm。在微型通道入口和出口附近制造反电极和/或假参比电极(104),从而确保能与通常放在微型通道入口附近的增补贮存小室中的分析物溶液接触。在此种微型芯片装置中,电极上方的消耗层厚度略小于微型通道的高度,所以本发明的快速安培计测量方法能只检测各电极上经历半球形或半圆柱形扩散的分析物分子,从而获得优化的检测。

在另一种芯片构型中,用一个垫支持集成的工作微电极,其中制造了

最多 72 个电极。对于再生或不再生分析物的以下 TSH 试验所提供的试验结果,此微型通道包含 48 个直径约 50 微米、间隔距离约 50 微米的工作微电极,从而提供在检测的时间范围内,电极上方最大消耗层厚度基本上等于微型通道高度和电极间距的微流体装置。

为实施试验,借助夹持器将 8-微型通道阵列芯片与稳压器相连(每个微型通道有一个工作电极和一个假参比电极),所述夹持器通过弹簧提供 16 个连接点,以及在微型通道出口处的 8 个流体连接部件。通过该夹持器的微流体连接部件将各通道用软管与多蠕动泵(IPC-N-8 型,伊斯莫泰克(Ismatec),瑞士)相连,各电极通过一种能转换稳压器端口的多路盒(multiplexing box)与多稳压器(帕默森斯(Palmsens),荷兰)相连,从而在各微型通道中提供连续测定(见以下有关检测的章节)。在微型通道另一末端,将聚苯乙烯贮存小室胶粘在聚酰亚胺芯片基材上,从而能分配体积最多 50 微升的溶液(样品、试剂、洗涤溶液等)。此贮存小室中,银/氯化银(Ag/AgCl)油墨斑点沉积在贮存室入口底部的导电垫上,从而提供总是可与待分析溶液相接触的假参比电极。

将溶液从贮存小室吸入微型通道,然后进入蠕动泵后的废物池进行微流体操作。指示流速设置为 0.4 或 1 $\mu\text{L}/\text{分}$,但此处必须注意,采用蠕动泵,因为泵的滚轴诱导固有脉冲会造成溶液的线性流速不恒定。

免疫试验的芯片功能化

为了显示本发明微型芯片装置和方法应用的实施例,进行免疫试验。为此,采用了二种方法在微型芯片中固定抗体。首先,采用单纯物理吸附将抗体固定在第一系列的微型芯片中。将抗碱性磷酸(抗-ALP)抗体稀释到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度,置于 8 个微型通道芯片的贮存室中,然后在室温下,1 小时期间以 0.4 $\mu\text{L}/\text{分}$ 的流速通过微型通道泵送。在平行实验中,预先酸化芯片在聚合物微型通道表面产生羧基;然后加入 N-羟基琥珀酰亚胺形成能共价连接抗体的活化基团。

完成这二种不同固定方法后,用 0.1%吐温 20 稀释的 5%牛血清白蛋白(BSA)溶液封闭芯片,在 30 分钟期间以 0.4 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ 通过微型通道泵送。然后用水洗涤芯片,空气干燥后用于试验。

试验程序和安培计测量

以不同持续时间泵入不同浓度的碱性磷酸酶(ALP)溶液以评估本发明微型芯片装置和安培计测量方法可能获得的检测下限。室温培育此磷酸酶样品溶液后排出室中过多的溶液,再次洗涤微型通道。然后将碱性磷酸酶的底物溶液(即本例中为对氨基苯基磷酸酯(PAPP),用 pH 9 三乙醇胺(TEA)缓冲液配制)放入贮存小室,依靠多蠕动泵平行引入芯片装置的 8 个平行微型通道中。然后在静置条件下(溶液不流动)培育底物溶液几秒钟,从而由被固定的抗-ALP 抗体捕获的 ALP 分子将 PAPP 水解成为对氨基苯酚(PAP)。随后通过在工作电极与参比电极之间施加 250 mV 的电势差和 Ag/AgCl 将 PAP 氧化成醌酰亚胺来检测对氨基苯酚。也可用新鲜的底物液更新微型通道来执行连续安培计测量。为此,可将所需量的底物溶液通过微型通道灌洗 2 秒钟,然后在检测时关闭泵。

在本发明中,计时-安培计测量可用如下方式进行,例如遵循酶反应的动力学规律,即通过检测作为时间函数的分析物浓度的升高(即,酶反应产物的浓度与被捕获 ALP 分子的含量直接相关,从而提供此试验所找寻的信息)。另外,在计时-安培计测量步骤中,工作电极处氧化反应不断消耗酶反应的产物,因此其浓度(和由此检测的电流)升高不快。为了优化安培计测量反应,通过施加仅仅 2 秒钟的电压并检测该时间内的电流而实施短时计时-安培计测量。然后设置 40 秒的弛豫时间以使酶反应提高分析物浓度,然后再进行 2 秒钟安培计测量,重复这种操作 5-10 分钟,从而获得所测电流和由此的分析物浓度(这里是酶反应产物)的时间演变情况。

由于在施加电势的第 1 秒钟电容电流(对于例如酶试验或免疫试验等实验没有信息价值)急剧下降,为了去除检测开始时检测电极上方凹陷空间中分析物分子产生的信号,只将计时-安培计测量的 $t = 1$ 秒与 $t = 2$ 秒之间测到的电流视作检测信号,积分此时间间隔的该信号获得得到的电荷,然后将各微型通道和连续安培计测量对时间作图。检测结束时,获得 8 个试验的 8 幅电流-时间曲线图。绘图曲线起始处的斜率直接反映了各微型通道内的酶活性,和被固定在这些微型通道壁上的抗-ALP 抗体捕获的 ALP 分子数目。此方法也能检测部分水解的酶底物(即不需要的分析物)但不太灵敏,

因为本发明检测方法只考虑二个测量点之间的对氨基苯酚浓度差异(不是该 PAP 浓度的绝对值)。

图 24 提供了这种检测的一个例子,用图 23 所示的装置进行 8 个平行试验和检测。在 8 个微型通道芯片(每个浓度用 2 个通道)中培育 4 种不同浓度(即 0, 1, 2 和 10 pM) 的碱性磷酸酶。如上所述进行检测,用新鲜底物液进行 2 秒钟的第一系列安培计测量,450 秒,将在 $t=1$ 秒与 $t=2$ 秒之间各通道中检测的电流产生的电荷报道为各微型通道的时间函数。450 秒后,用新鲜底物再次充填微型通道,此时 ALP 酶仍与固定在通道壁上的抗体结合。然后再次通过安培计测量检测酶反应。应注意,只是每隔 40 秒在各微型通道中实施安培计测量,从而使得酶反应能够产生和提高集成的工作微电极处待测分子的浓度。40 秒弛豫时间后,各电极只极化 2 秒钟,此期间酶反应产物被氧化。然后积分时间间隔 $t=1$ 秒至 $t=2$ 秒期间去除电容电流后的电流值,得到的电荷报道为连续安培计测量的时间函数。从图 24 可推导出,此实施例全部检测程序进行了三次,不难从这三次检测的每一次起始时的斜率推导出不同微型通道中的有效 ALP 浓度。

为了证明本发明的装置和方法可用于临床分析如体外诊断,在与图 23 所示相似的 8-通道芯片中进行了类似实验来检测全血中的促卵泡激素(FSH)。用抗-FSH 抗体包被微型芯片传感器,在不同通道中注入含 4 种不同浓度 FSH 的血样品。然后除去样品液,将偶联碱性磷酸酶的 FSH 抗体液注入不同通道中,从而能与先前已被固定在微型通道壁上的抗-FSH 捕获的 FSH 分子形成复合物。用缓冲液洗涤微型通道,然后再注入酶底物的 PAPP 溶液,该底物可产生安培计测量可检测的 PAP。与获得图 24 所示结果所用相同的安培计测量方法显示能检测血样品中存在的低浓度 FSH 分子,如图 25 所示,其显示从不同样品中作为有效 FSH 浓度的函数的电荷-时间曲线获得的原始斜率值。

为显示微型通道中集成了反电极时可以预期的信号,用等离子体刻蚀在聚酰亚胺箔片中制造了在微型通道壁部分中容纳有这种反电极的微型芯片传感器装置。为了证明反电极再生所测分析物的作用,进行了两次免疫试验检测血浆浓度已知为 56.1 uUI/mL 的促甲状腺激素(TSH),第一次采用

图 19 和 20 的芯片，其含有一系列 48 个集成的工作电极，在微型通道出口处有一个假参比电极；第二次采用的微型芯片传感器在沿微型通道长度上还容纳了反电极。为了用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆样品中的 TSH 浓度，先用抗-TSH 抗体包被微型通道，再用小牛血清溶液阻断非特异性吸附。培育 TSH 样品后，将标记了 ALP 的抗-TSH 偶联物溶液注入微型通道。然后用与上述图 25 所示结果相关的同样安培计测量法，用 PAPP 作为酶底物进行检测。通过将积分时间间隔 $t=1$ 秒至 $t=2$ 秒期间 2 秒钟安培计测量测得的电流产生的电荷报道为以 30 秒弛豫时间隔开的连续安培计测量期间的时间函数，其清楚表明(结果没显示)，没有反电极时电流和由此的电荷达到平台水平(plateau level)，意味着酶反应产物的消耗与沿微型通道的阻抗(iR 下跌)组合作用限制了信号的升高。对于含有集成反电极的芯片，在连续安培计测量期间测得的电荷不受限制而持续升高，表明至少一部分氧化产物(本例为酞酰亚胺)再生为 PAP。

还采用液晶聚合物(LCP)作为芯片载体进行了其它实验。此种材料的箔片厚 50 微米，微型通道高度减至 40 微米，电极半径维持约 25 微米。此特征能研究通道几何结构与上述不同的微型传感器中的电化学反应。在相等的免疫试验条件和相同的 2 秒钟安培计测量检测顺序下，与用较大通道获得的电流相比，这些小通道由于表面-体积比较高而可产生较高的电流。考虑到维度不同，所以 LCP 和聚酞亚胺的试验性能相似，因此 LCP 提供了利用本发明装置进行安培计测量试验的替代材料。

现已参考各种具体和优选的实施方式和技术对本发明进行了描述。然而本领域普通技术人员明白可对此作出改进，但这些改进仍属于随附的权利要求书所确定的本发明范围内。

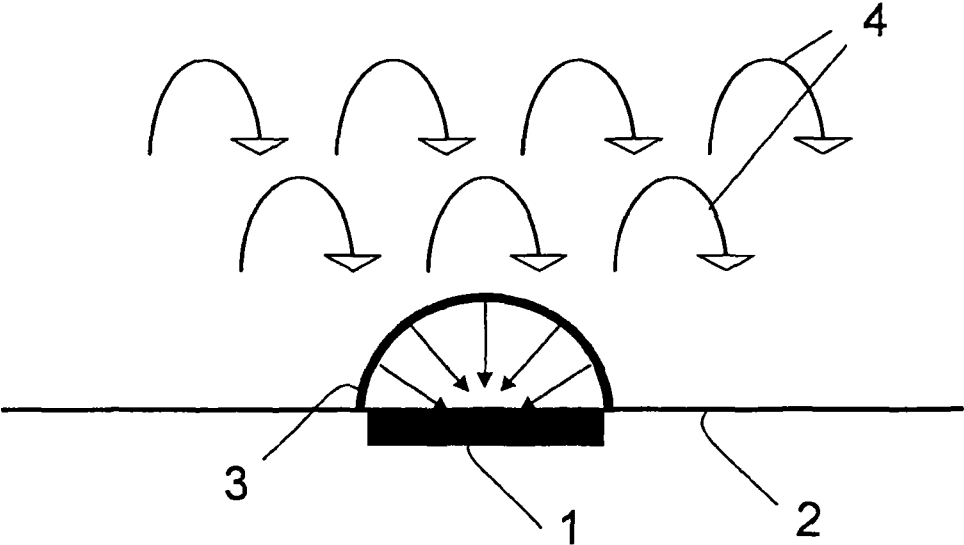


图 1 (现有技术)

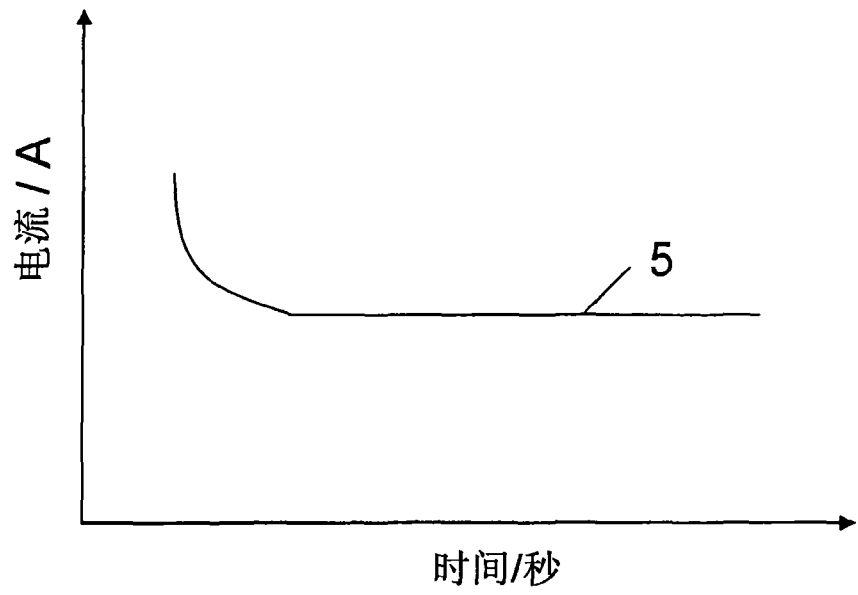


图 2 (现有技术)

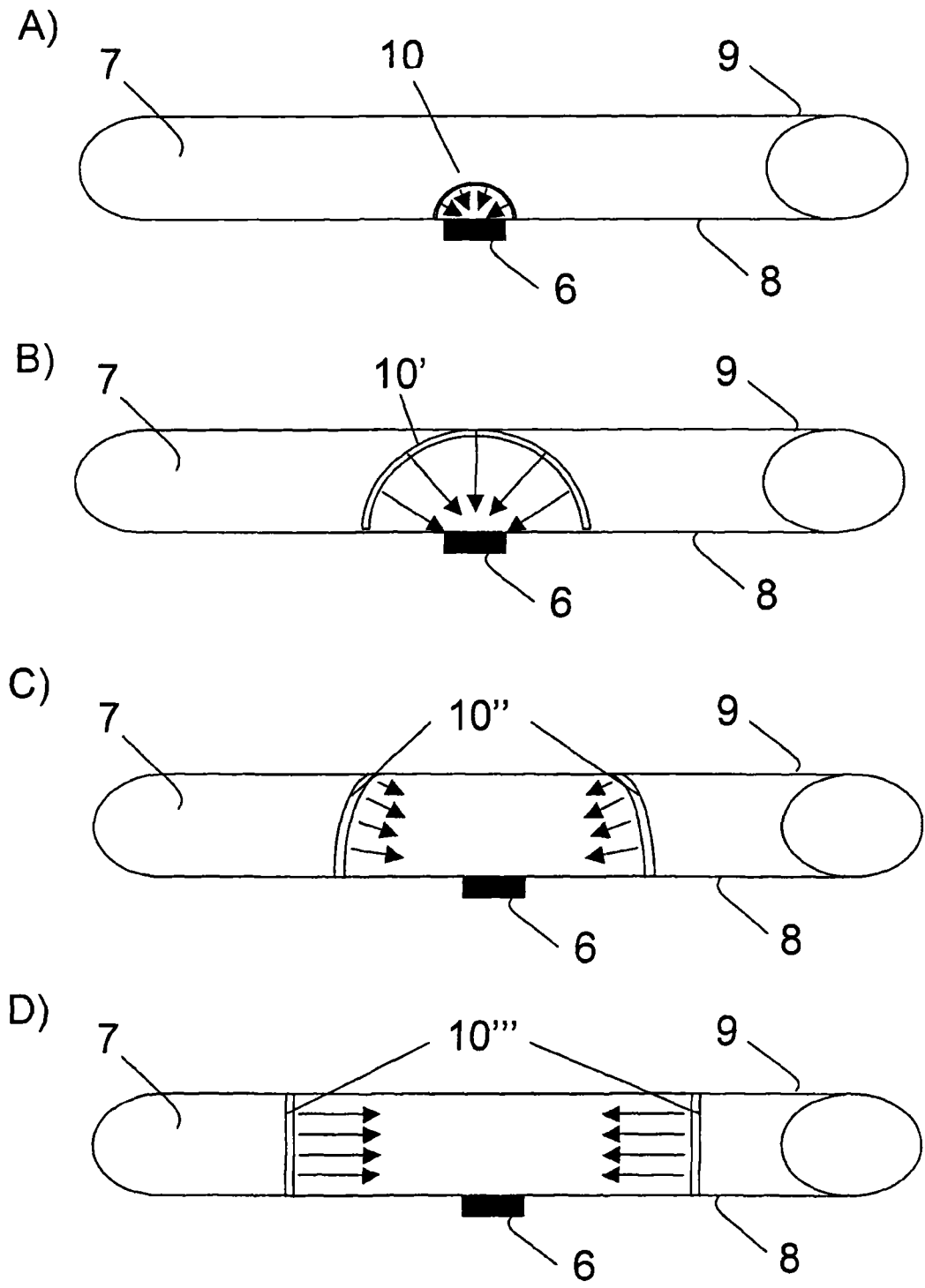


图 3(现有技术)

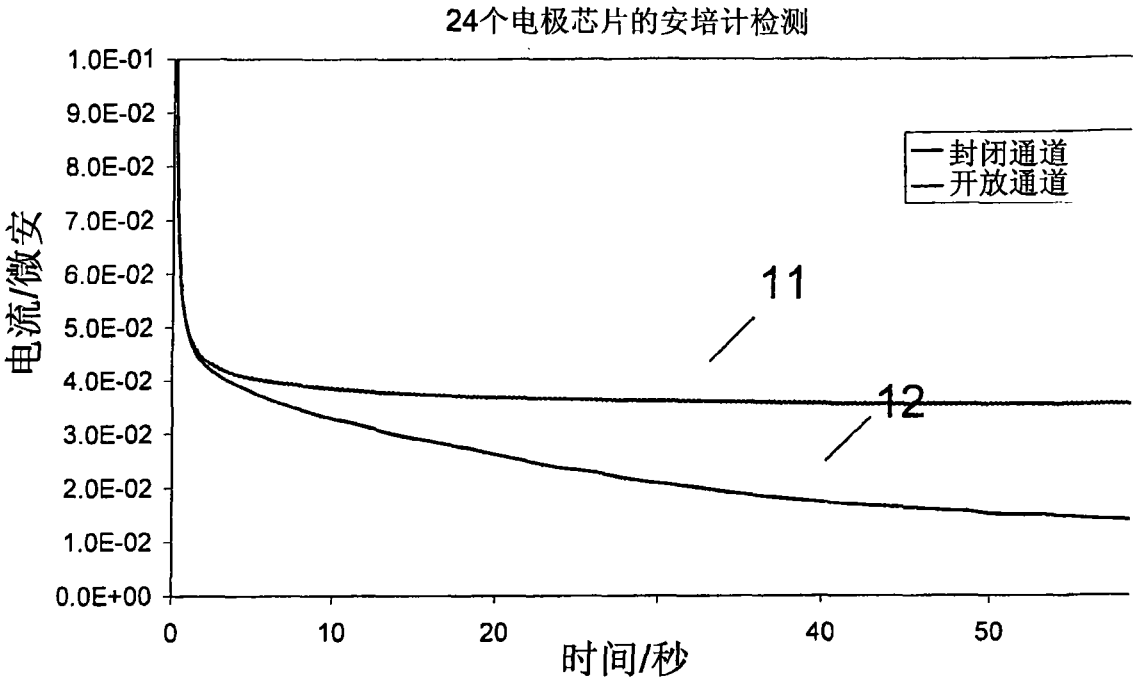


图 4

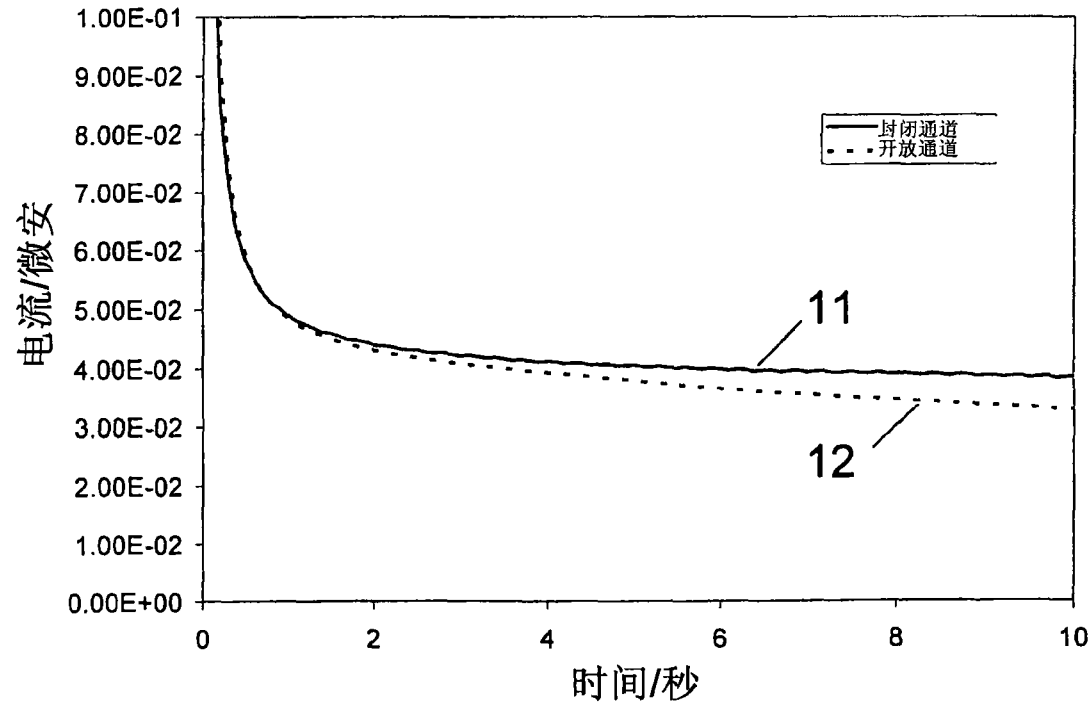


图 5

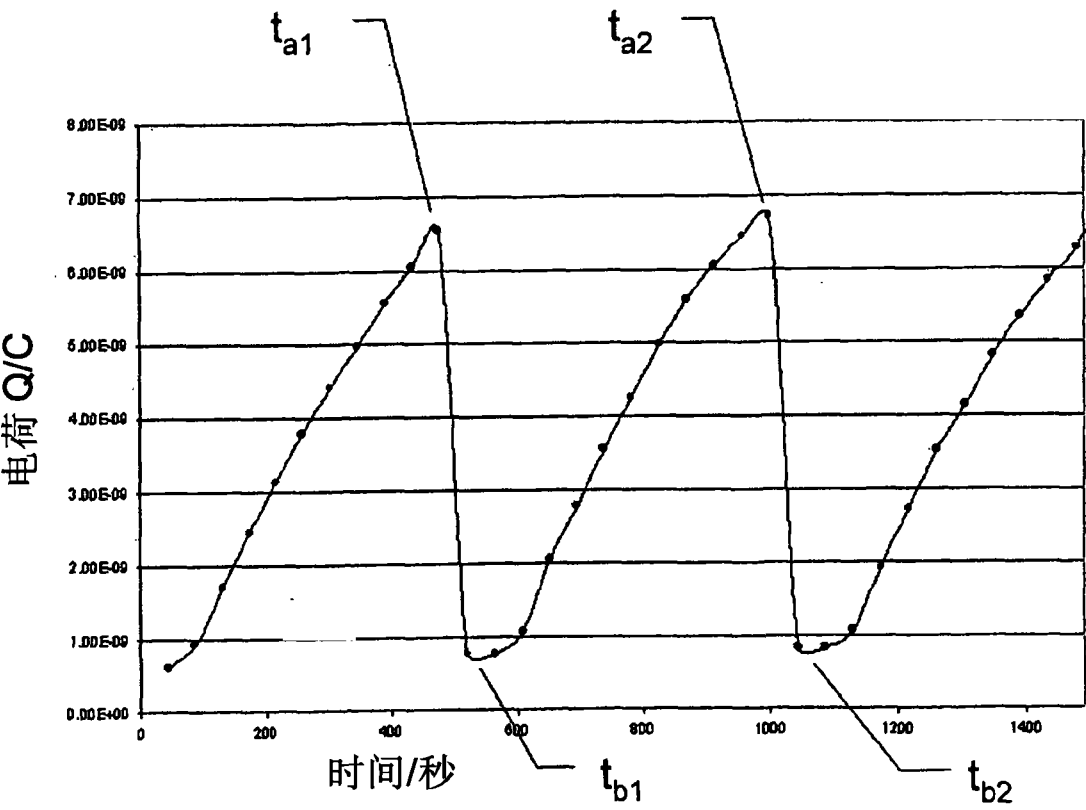


图 7

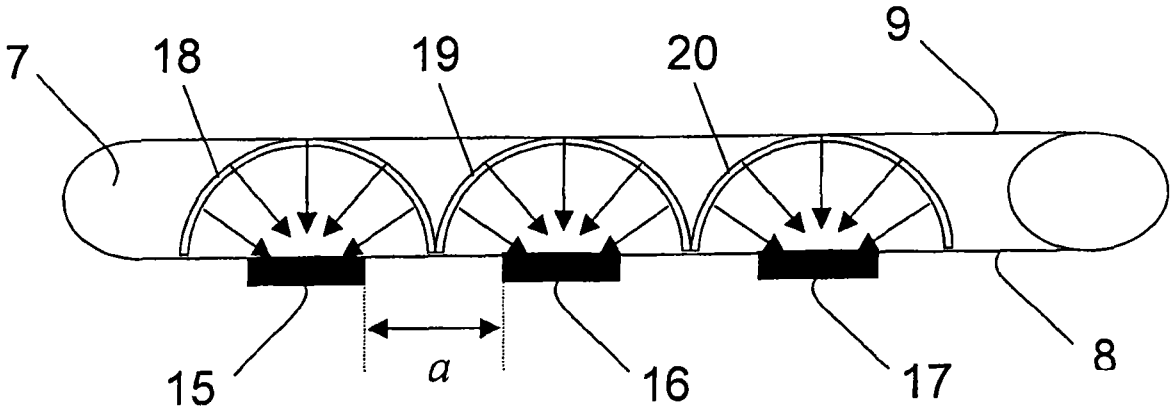


图 8

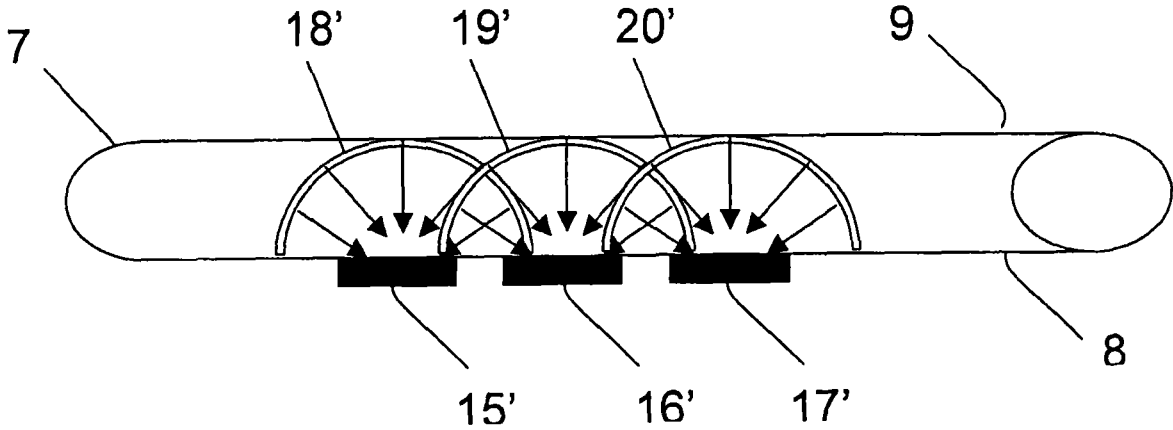


图 9

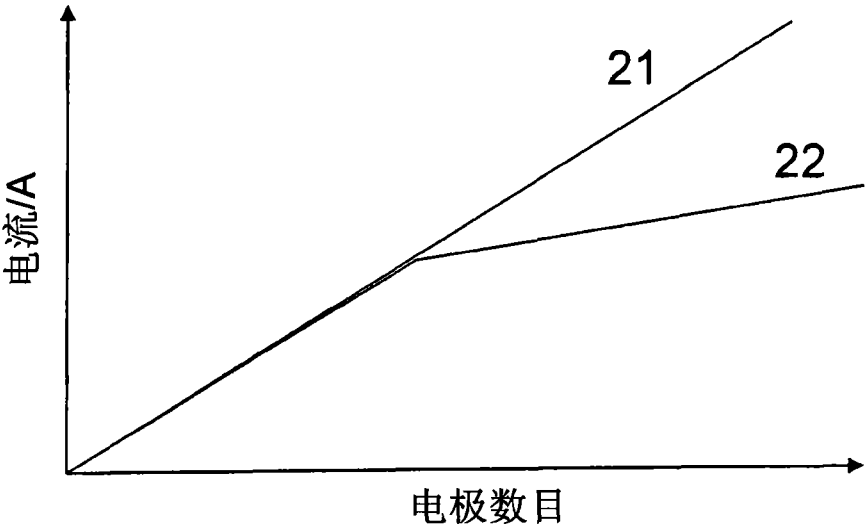


图 10

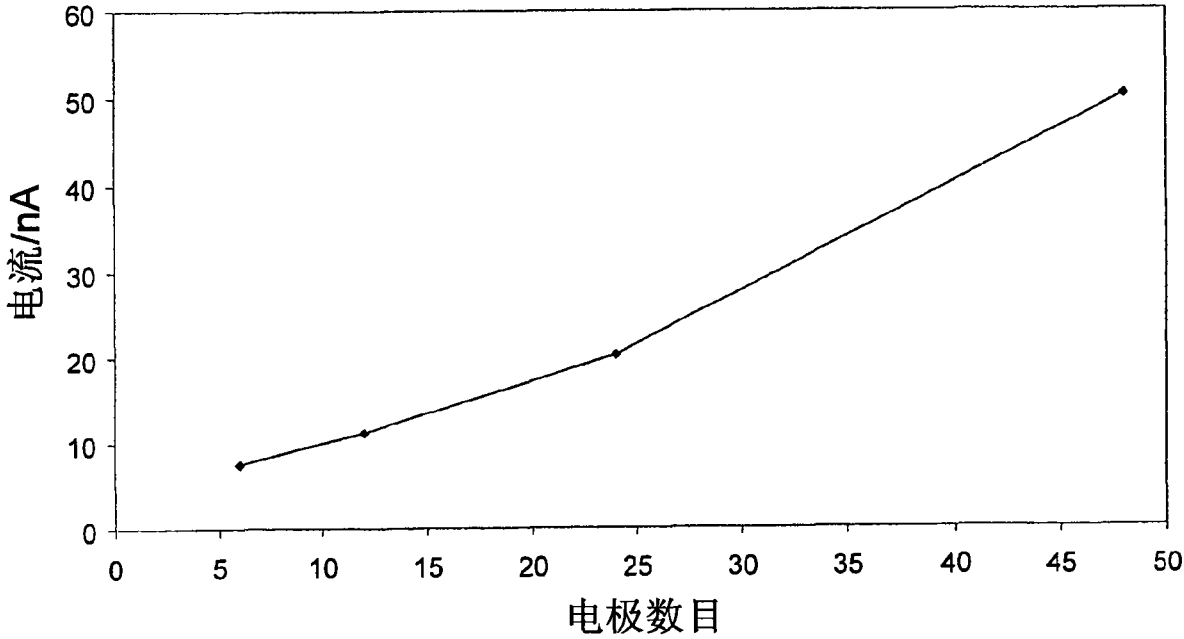


图 11

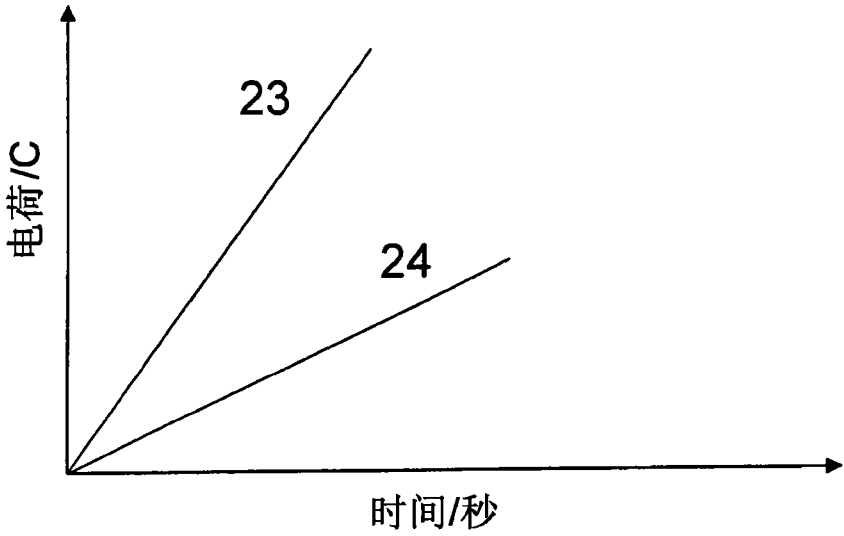


图 12

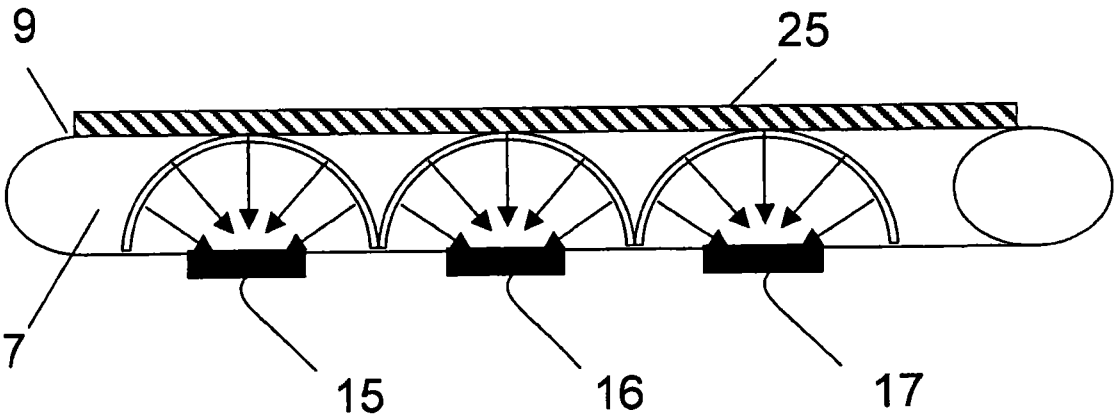


图 13

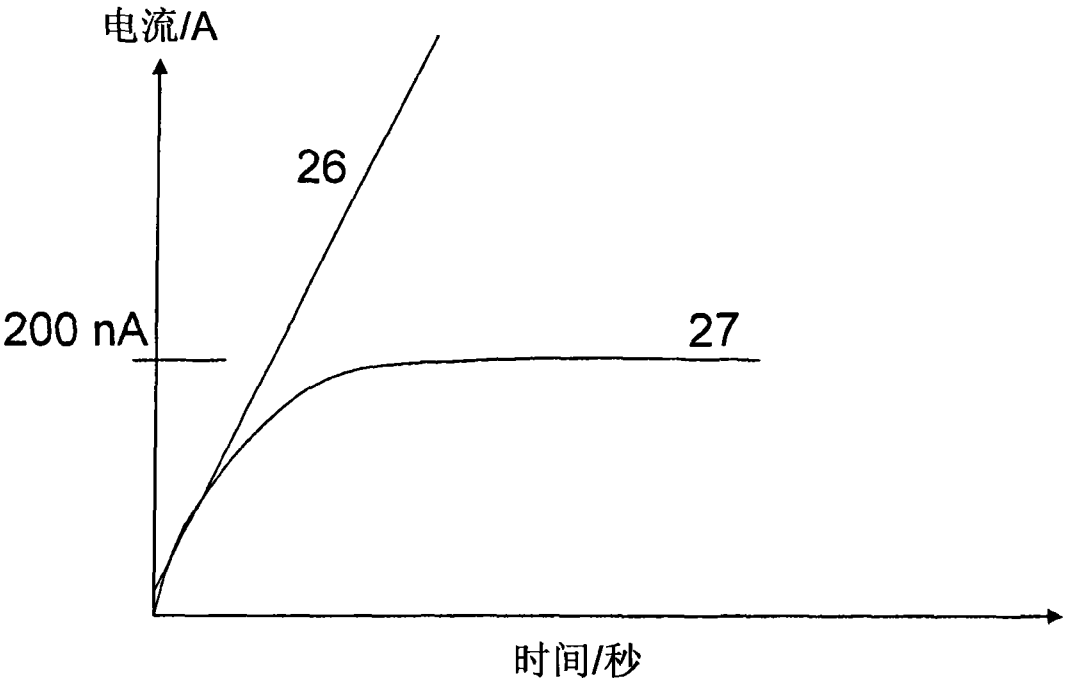


图 14

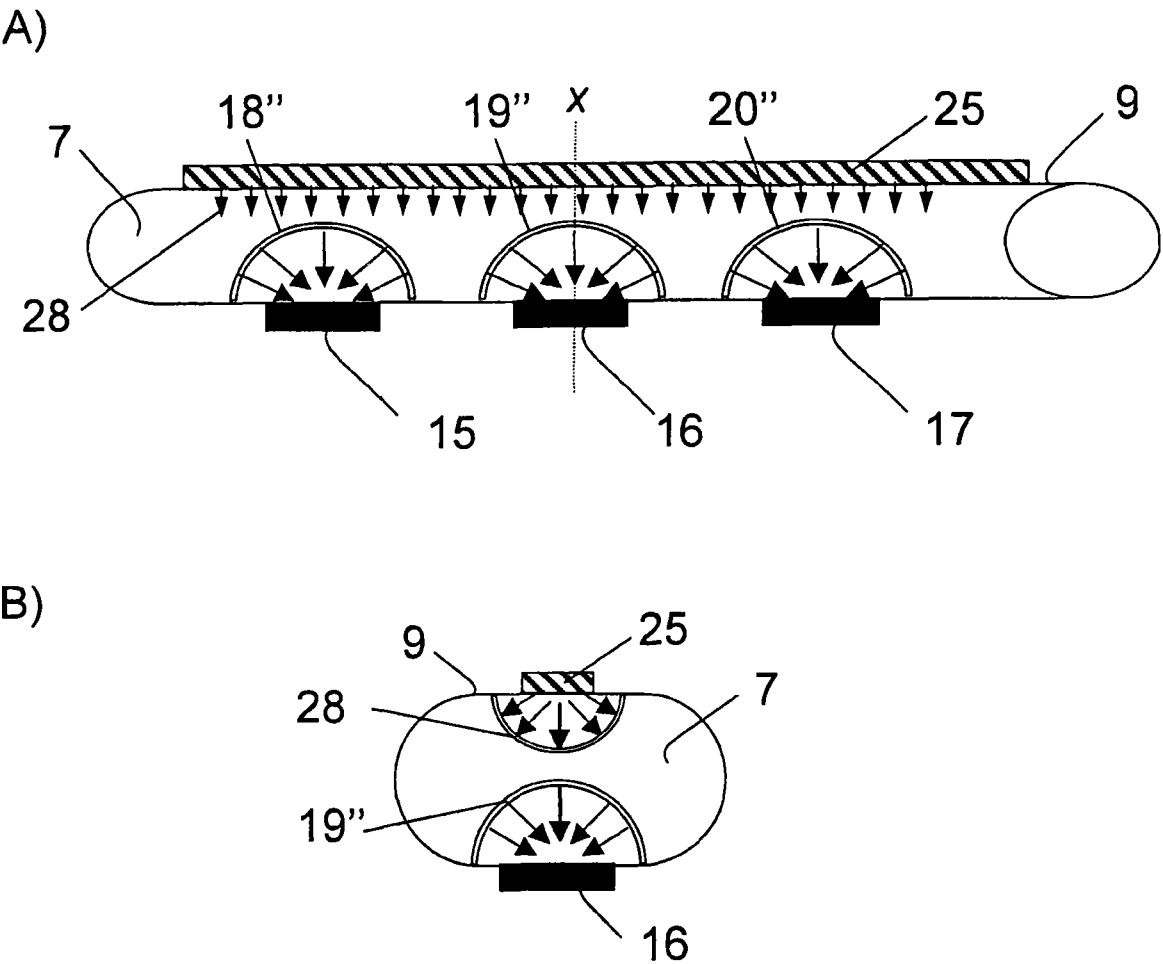


图 15

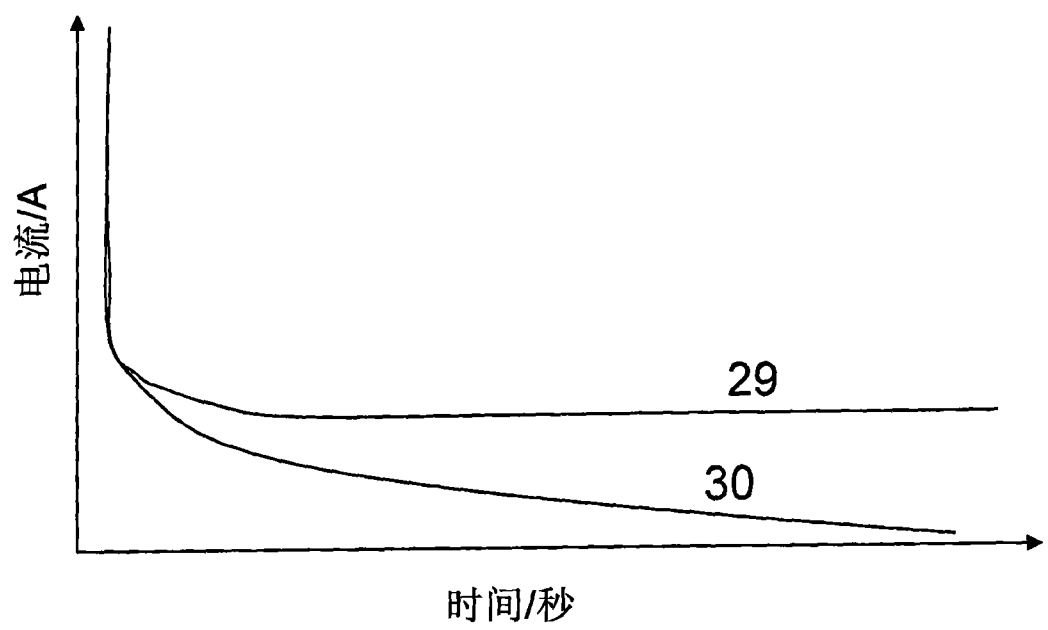


图 16

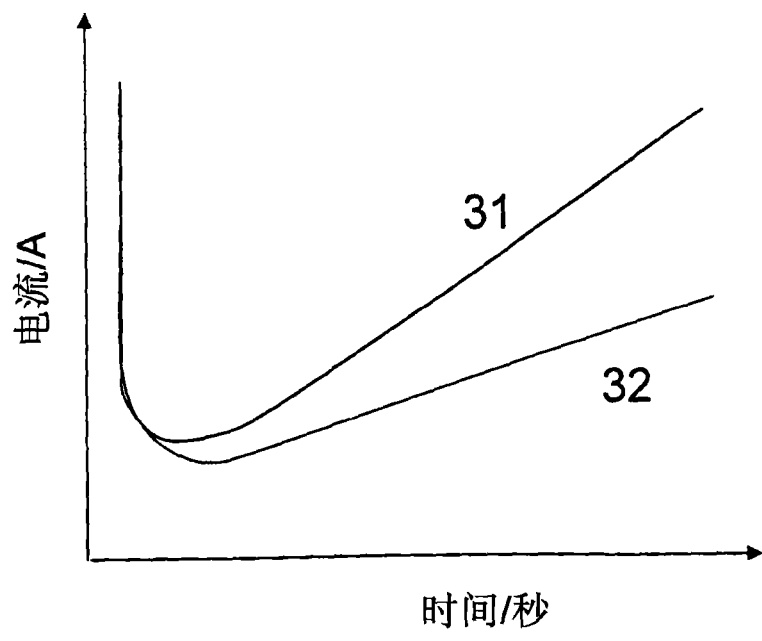


图 17

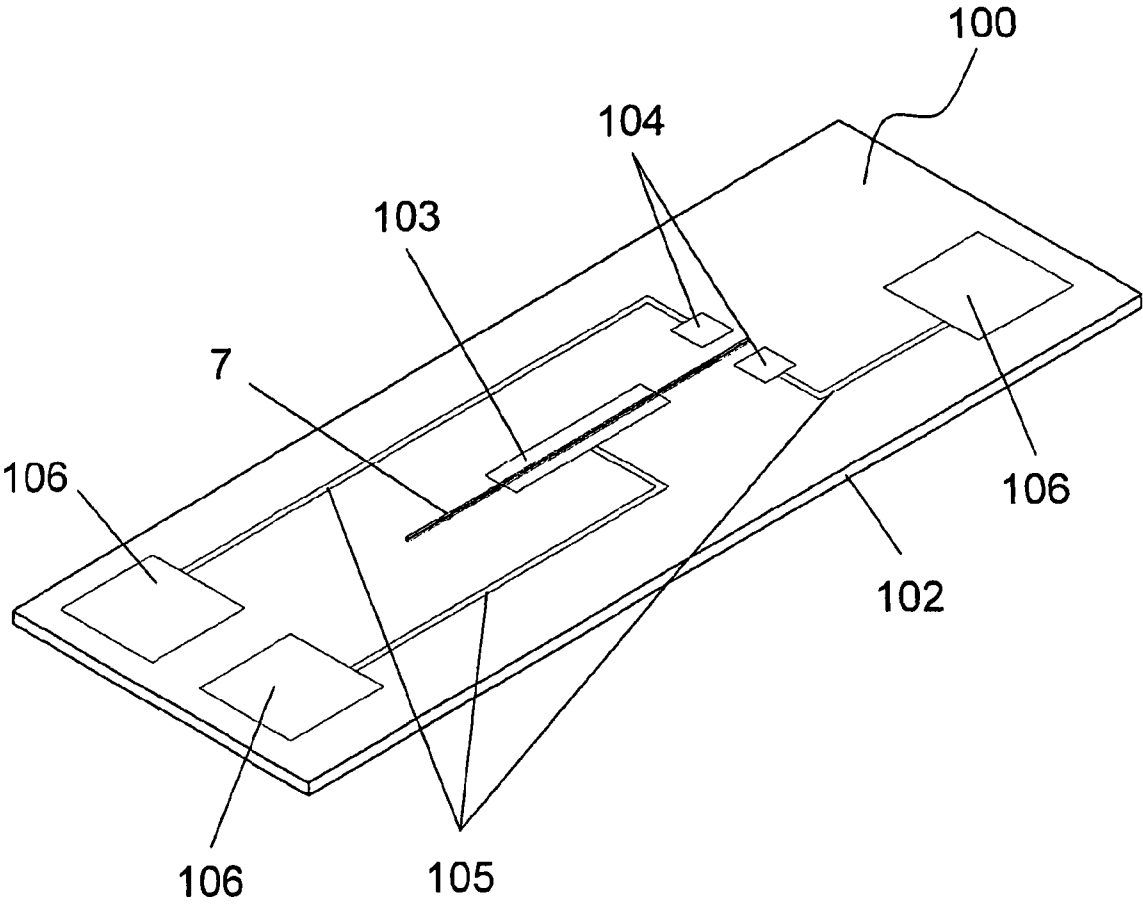


图 18

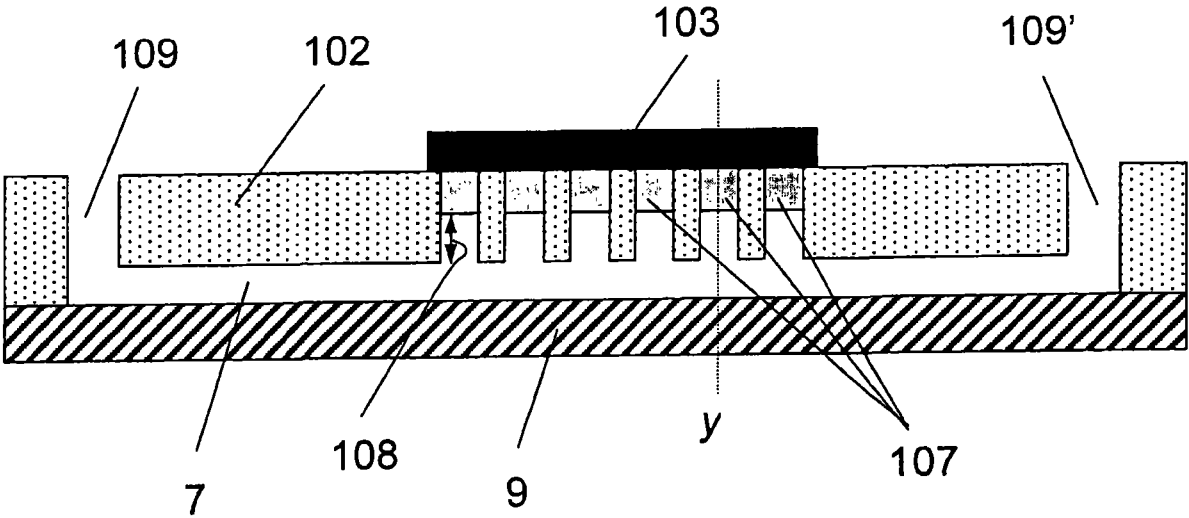


图 19

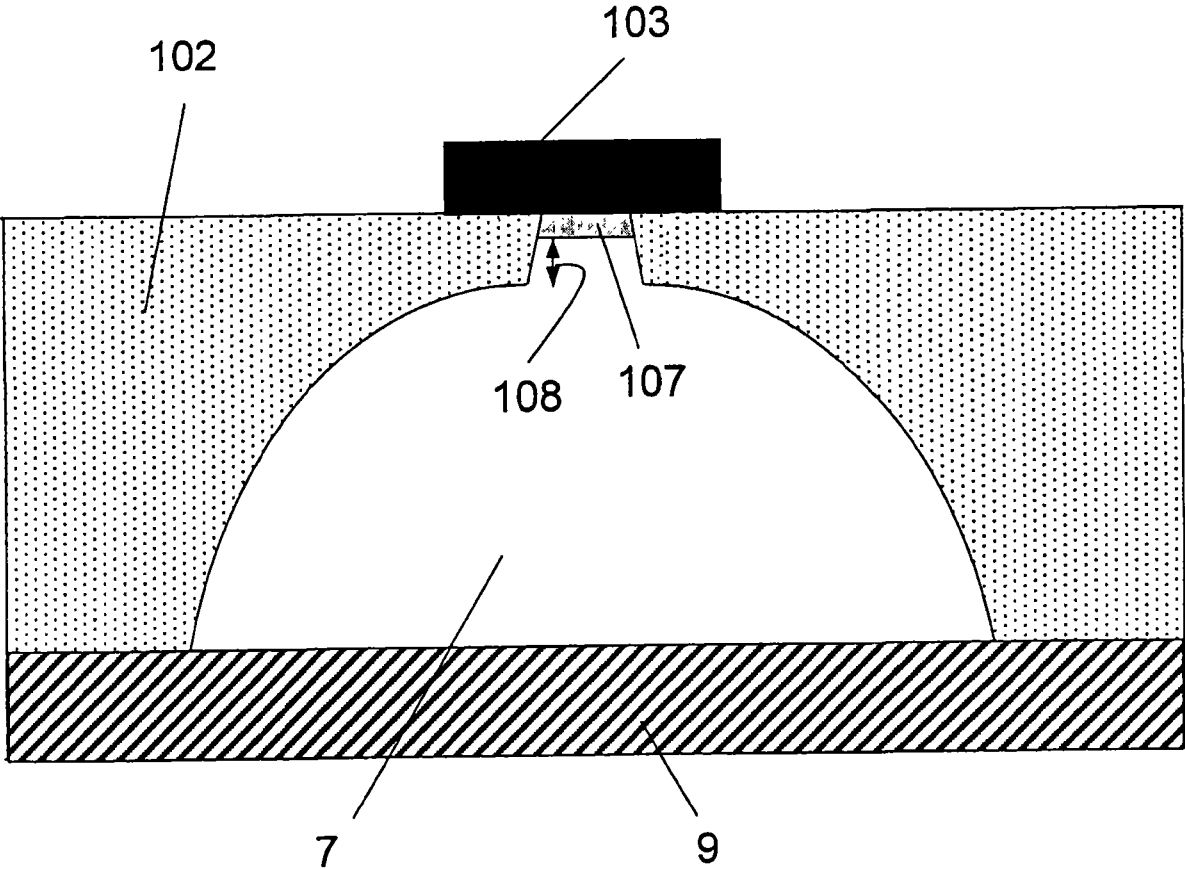


图 20

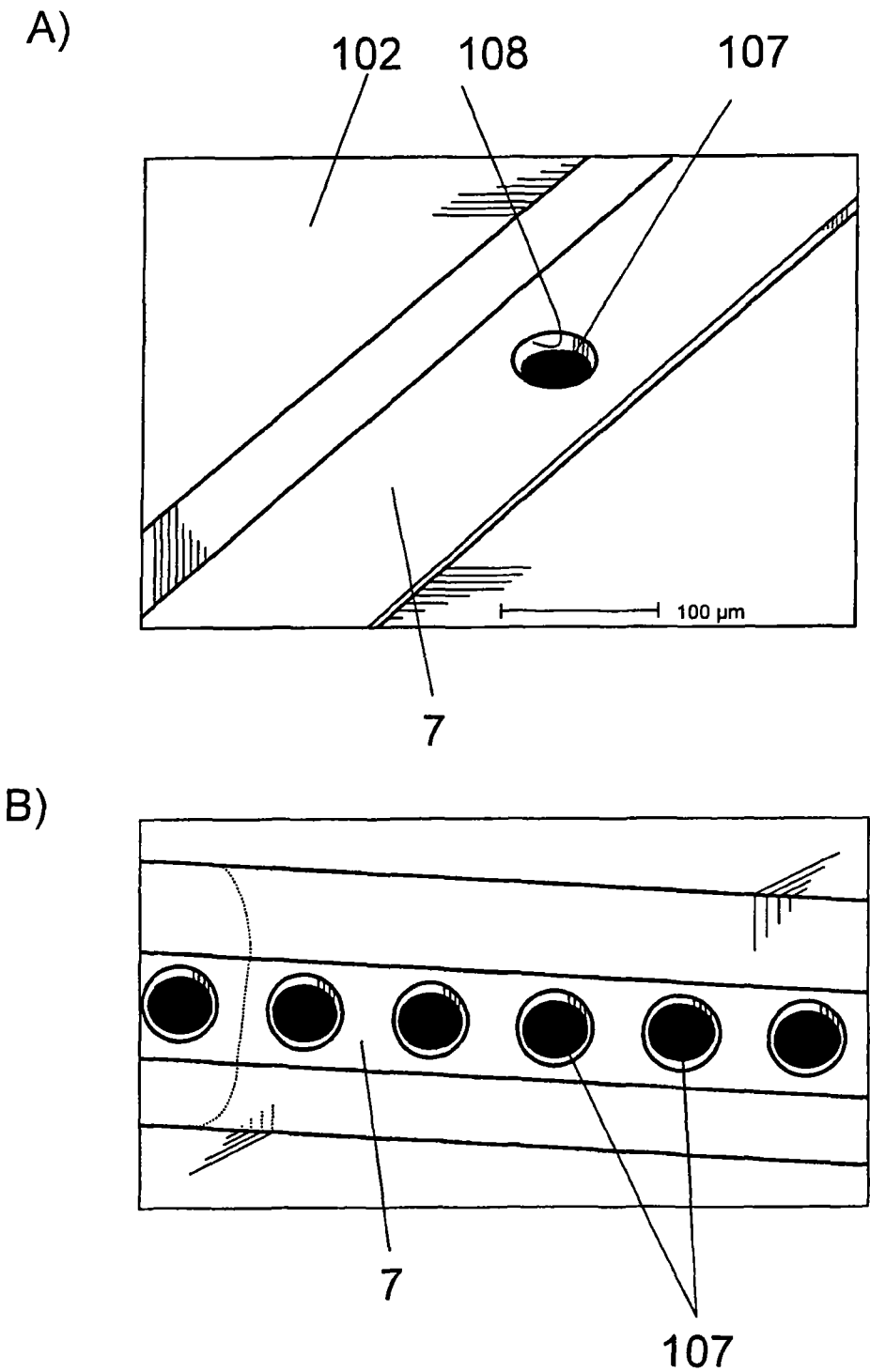


图 21

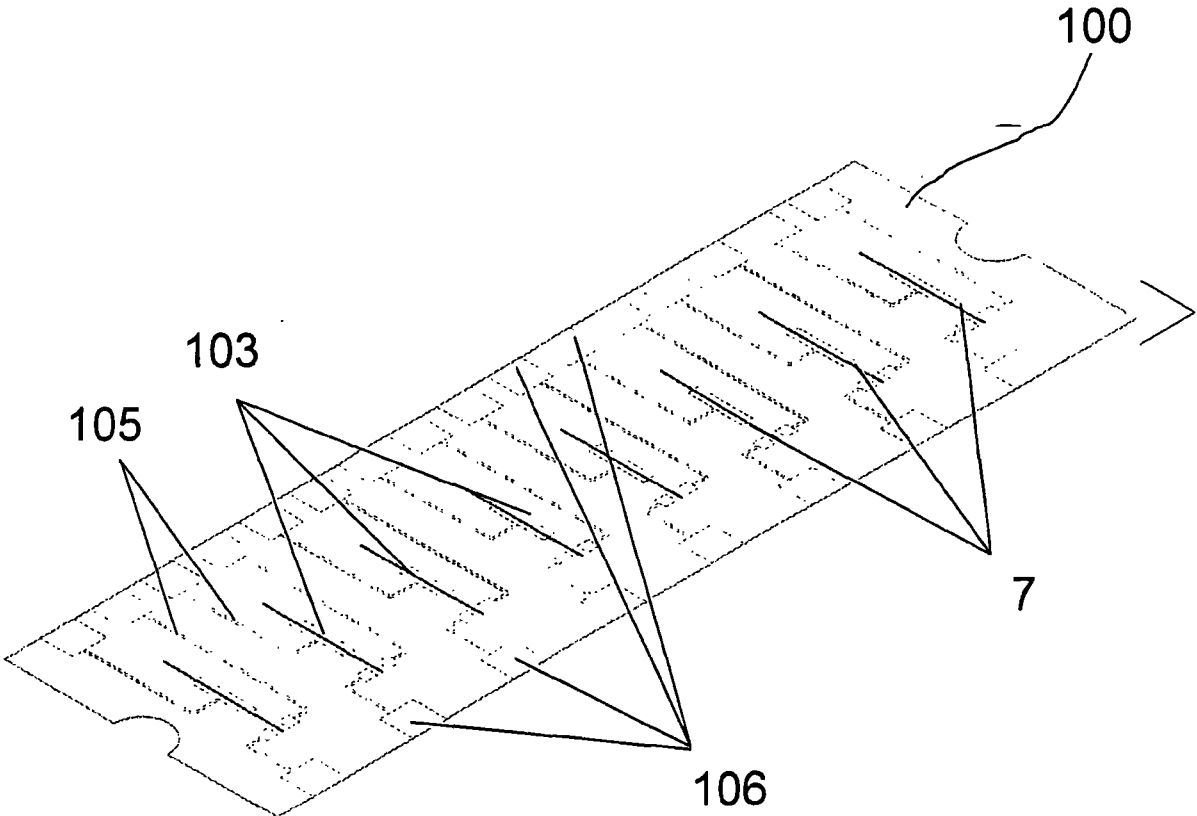


图 22

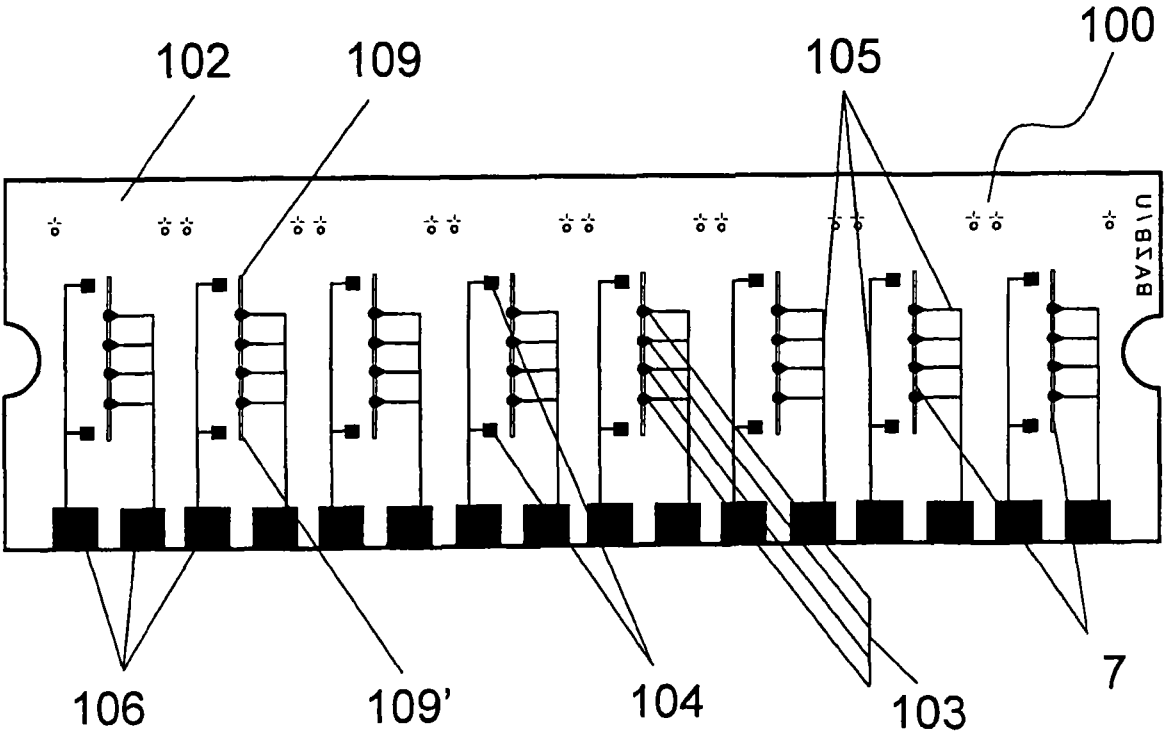


图 23

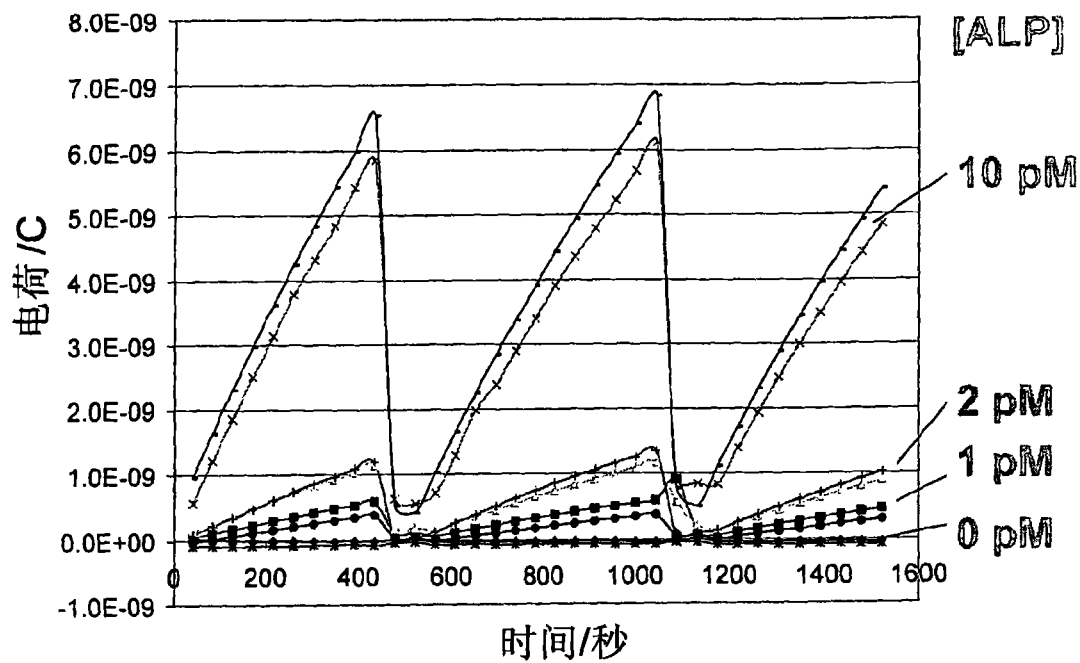


图 24

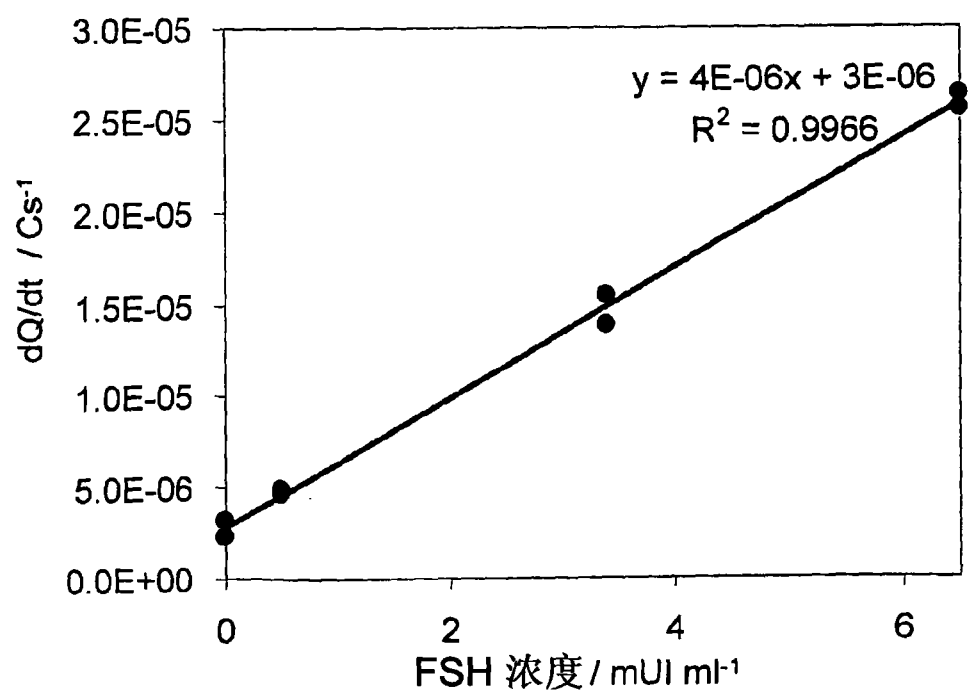


图 25