

微流控分析芯片在医学领域的应用

Application of Microfluidic-chip in Biomedicine

毕颖楠¹, 张惠静^{1*}

BI Ying-Nan¹ and ZHANG Hui-Jing^{1*}

第三军医大学医学检验系分析化学教研室, 重庆 400038

Faculty of Medical Laboratory Science, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

摘 要 微全分析系统(μ -TAS)又称为芯片实验室, 自从 Manz 等于 20 世纪 90 年代首次提出这一概念以来, 经过十余年的发展 μ -TAS 已成为生物分析的一个独立领域并被学术界所认可。微流控分析芯片作为 μ -TAS 发展的主要方向以其快速、高效分析, 低消耗和微型化等特点发展非常迅速。在此结合微流控分析芯片在医学领域的应用状况, 着重从基因检测、蛋白质分析和细胞分析等方面, 对该技术在医学领域里的应用及其未来发展趋势作一综述。

关键词 微流控分析芯片, 基因检测, 蛋白质分析, 细胞分析

中图分类号 Q819 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)01-0167-05

Abstract As a novel analytical technology, the research of Micro total analysis systems (μ -TAS) has been spreading rapidly. μ -TAS has been widely used to perform chemical and biochemical analysis. Microfluidic-based analytical system as μ -TAS's mainly direction develops very fast in terms of its reaction speed, reagent consumption, miniaturization, cost, and automation. After having proven the value of microfluidics for genetic, proteomic and cytomics analysis, this article also anticipates the development tendency of this technology in the biology medicine domain. It has demonstrated that a truly, easy-to-handle Microfluidic-based analytical device will be emerged in the future.

Key words Microfluidic-chip, gene detection, protein analysis, cytomics

微全分析系统(Miniaturized total analysis system, 或 Micro total analysis system, μ -TAS)又称为芯片实验室(Lab-on-a-chip), 该技术是将化学、生物学等领域所涉及的样品制备、生物与化学反应、分离和检测等过程缩微或基本缩微到一块几平方厘米的芯片上, 用以完成不同的生物或化学反应过程, 并对其产物进行分析的技术, 是一个微而全的系统。目前, 微全分析系统可分为芯片式与非芯片式两大类, 其中芯片式是该技术的发展重点。根据芯片结构和芯片的工作机理又可分为微阵列芯片(Microarray chip)和微流控分析芯片(Microfluidic chip)。微阵列芯片也称生物芯片, 主要以生物技术为基础, 采用光导原位合

成或微量点样等技术, 将生物大分子如核酸片段、多肽分子等生物样品有序地固化于支持物(如玻片、硅片、高分子聚合物等)的表面, 组成密集的二维分子排列, 然后与已标记的待测生物样品中的靶分子杂交, 从而判断样品中靶分子的数量。DNA 微阵列芯片(DNA Microarray)是这类芯片中最重要的一种。另一类芯片, 即微流控分析芯片则主要以生物化学和分析化学为基础, 以微机电加工技术(MEMS)为依托, 以微管道网络为结构特征, 将整个分析实验室的功能, 包括采样、样品的前处理、反应、分离、检测等集成在微芯片上。通过对样品全分析过程的缩微化和集成化, 达到高灵敏快速检测, 样品耗量低, 高通

量输出以及可在线自动化操作的目的。纵观两种芯片的性能,由于微阵列芯片是将样品固定于支持物表面,所以目前的生物芯片一般是一次性使用,并且有很强的生物专用性。而微流控分析芯片系统则把整个分析过程,即样品的采集、预处理、反应、分离、分析的过程集成于微芯片上,从而可多次重复使用,因此,较生物芯片具有更广泛的实用性和应用前景。

目前,有关微流控分析芯片的组装、微通道的选择、反应体系的优化以及相关基本理论等已有不少文章进行了报道^[1,2,3],本文在此将结合近年来微流控分析芯片在医学领域的应用状况,从基因检测、蛋白质和细胞分析三方面对该技术在医学领域里的应用及其未来发展趋势作一综述。

1 基因检测

随着人类基因组计划的提前完成,基因检测技术作为一种高效的研究工具在生物医学领域有着举足轻重的地位,尤其是在遗传物质水平上揭示疾病的发病机理、病程、预后等有着重要的意义。基因检测是微流控芯片应用最早的领域。经过近年来的发展,微流控分析芯片在基因检测方面的研究已由最初分离结构简单的寡核苷酸,发展到复杂基因序列 PCR 扩增检测和基因测序。

在基因检测方面,目前以分析核酸为基础的微流控芯片技术发展最为成熟。1994 年 Manz 等^[4]首次应用微流控芯片毛细管电泳技术在有效分离长度 3.8cm、进样量为 90 μ L、2300V/cm 的电场强度下,45s 内成功分离了寡核苷酸混合物——硫逐磷酸酯寡核苷酸盐(PSPd)。近十年来,随着微流控分析芯片在技术上的不断完善和发展,微流控分析芯片系统所能分离的 DNA 片段的长度在逐步扩大,可完成对 DNA 片段的测序和遗传物质的分离、分析,并且出现了可同时进行平行分析的多通道阵列芯片。Mathies 等^[5]在直径 150mm 的圆盘式玻璃芯片上刻蚀了 96 条长 16cm 的透迤型毛细管电泳阵列通道,完成了四色 M13 标准 DNA 的平行分离检测,测序长度可达 500 个 bp,分离时间却小于 30min。随后的许多研究对芯片的构造进行优化,使核酸分析的准确性和灵敏度有很大程度的提高。例如,采用分离长度仅为 4.5cm 的芯片系统,在 13min 内对 320bp 的标准 DNA 片段的分析准确率达 99.1%^[6]。Cady 等^[7]在硅芯片微通道中,蚀刻了一些堤坝,把通道的表面积增大了 300%~600%,通过扩大通道表面积可有效地去除来自于细胞碎片中的蛋白质,提高

DNA 的纯度。这种纯化 DNA 的方式,对于在微流控芯片上实施核酸分析,特别是在芯片上进行 PCR 扩增有着重要的意义。

常规的 PCR 过程需要制样、扩增及检测等步骤,既费时又费力。而微流控芯片技术用于 PCR 扩增及相关检测时,操作步骤可大大简化,并能显著提高检测效率。1996 年 Kopp 等^[8]首次提出了连续流动式微流控 PCR 芯片,其核酸的扩增过程均在流动中进行,流动式芯片下面分别有 95 $^{\circ}$ C、72 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 3 个不同的恒温区域,样品流经此 3 个区域即会实现自动变温,从而在同一块芯片上完成 PCR 的变性、退火、延伸三步反应,缩短了扩增时间,所需的反应试剂也比传统的 PCR 少。在此之后,很多科学家在这项研究的基础上,对连续流动式 PCR 技术进行了改良,优化了微流控 PCR 的反应条件及芯片结构等,使其更加微型化。由于采用激光诱导的荧光检测方法,提高了检测的灵敏度。由开始只能进行扩增逐渐发展为集成化的分析系统,不仅能以 DNA 为模板在芯片上完成 DNA 的扩增,而且还能实现以 RNA 为模板的扩增。Obeid 等^[9]结合激光诱导的荧光检测设计了连续流动式 PCR 扩增反应的微流控芯片,检测 DNA 和 RNA。该研究将大小为 40mm \times 45mm \times 0.55mm 的硅硼酸盐玻璃基底片蚀刻为 4 个区域,其中 3 个区域用于 DNA 的 PCR 扩增,即变性、退火和延伸,另一个区域用于逆转录 mRNA 的反应。此设计在同一芯片上既可以完成以 DNA 为模板的扩增,又可以完成以 RNA 为模板的扩增,实现了被测样本的多元化。另外,这个试验的整个分析过程均是由计算机控制,从而实现了操作的自动化以及被测物扩增和检测的一体化。

芯片 PCR 的变性、退火、延伸过程不只是传统 PCR 在温度和时间上的转换来完成 DNA 扩增,它通过空间上的转换来实现温度和反应时间的变动,这样便使芯片上流体的流动控制显得尤为重要。在这一方面电驱动就相对简单,通过对施加电压的变化来进行对液流的控制,相反如果采用机械式的泵驱动,增加了芯片加工技术(MEMS)的难度和复杂性。

2 蛋白质分析

蛋白质是生物体最基本的生物活性物质。随着后基因时代的到来,蛋白质分子检测已成为临床疾病诊断不可或缺的一个新内容。传统的蛋白质分析步骤包括蛋白质提取、分离、酶切以及对蛋白质的消解产物——多肽或氨基酸混合物的分析。这些传统

的方法大都是由手工操作进行,不仅操作相当繁琐,而且容易引入人为造成的干扰因素。利用微流控分析芯片系统对蛋白质样品进行分析,其分析步骤(如蛋白质的纯化、分离、消化和分析等)均可以在几平方厘米的分析芯片上进行,能够有效地减少分析过程中人为因素造成的干扰。另外,微流控芯片检测技术所需要的试剂及反应物的量均较少,对于一些微量蛋白质的检测以及实验中贵重试剂的消耗都具有十分重要的意义。

电泳是主要的蛋白质分析技术,由于电泳更容易小型化,因此,毛细管电泳芯片是微流控技术中发展最快的一项芯片技术。1993年 Effenhauser 等^[10]在有效分离长度为 24mm,电场强度为 1kV/cm 的十字型毛细管电泳芯片上,15s 内实现了 Arg、Glu、Phe、Asn、Ser 和 Gly 六种氨基酸的分离。毛细管电泳技术在微流控分析芯片上的成功应用奠定了其能够进行蛋白质分析的基础。目前,毛细管电泳芯片已由能够分离分析氨基酸发展到可以分析多肽和蛋白质,而且在微流控分析芯片上进行蛋白质的分离分析所花费的时间要远远少于常规的凝胶电泳技术。Jin 等^[11]设计了一种以电渗泵作为驱动方式的蛋白质分解消化芯片,在这种芯片上能够在 12min 内完成 β -酪氨酸,细胞色素 C 和牛血清白蛋白的分解消化。

Yakovleva 等^[12]在含有 42 条多孔渗水通道 ($235\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$),大小为 $13.1\text{mm} \times 3.2\text{mm}$ 的硅芯片上建立了以化学发光为检测方法的分析系统,此研究以免疫吸附理论为基础,将葡萄球菌 Portein A 和 Portein G 固定吸附于通道表面,采用辣根过氧化物酶和 luminol/*p*-iodophen 化学发光系统检测。由于建立的化学发光系统没有外界因素干扰,检测灵敏度得到了显著提高。目前常用于微流控芯片蛋白质分析检测的方法还有荧光检测、质谱检测和显微热成像技术等,由于微流控芯片分析体系中检测物和试剂的需要量都很小,所以就要求具有更高灵敏度的检测方法应用于微流控芯片分析系统的检测。

由于芯片的通道非常细小,在芯片上进行电泳分离时,若施加的电压过大场强过高,产生的热量释放不出来积聚在溶液中,会使蛋白质样品变性,失去功能,使检测不稳定。以免疫为基础的芯片蛋白质分析是要将抗原或者抗体吸附固定于通道表面,在通道中进行抗原抗体反应时,微小的体积提供了充足的结合面,反应的传质发生改变,使反应更加充分、完全,反应时间比常规体系中的抗原抗体反应短

很多,但是另一方面修饰后的通道直径比修饰之前更加狭小,这样就增加了通道吸附堵塞的机率。

3 在细胞学上的应用

细胞学的研究在探索生物学进程方面有很大的实用价值。随着基因组学和蛋白质组学的飞速发展和广泛应用,微流控分析芯片技术正不断地向细胞组学的研究领域进行渗透。由于微流控分析芯片中微通道尺寸非常微小,相对于细胞的微小尺寸,微流控芯片则更加适用于操控单细胞。在微通道中,使用很小的电压,就能获得比较大的电场强度,这样有利于细胞在微通道中的移动。然而能否分析活的单细胞(如药物对细胞的影响;外部刺激对细胞行为的影响),能否把更多的分析项目融合到同一芯片上进行,并使操作更加简单化、自动化以及能否同时处理大量的细胞,是目前应用微流控分析芯片系统进行细胞分析所面临的主要问题。

3.1 细胞操纵和细胞分离

目前常用于微流控分析芯片的细胞操纵方法有两种,一种是机械式的方法,一种是电学的方法。如何在物理性质复杂的样本中进行细胞操纵和细胞分离(例如用机械法对白细胞进行诱捕和筛选或者从血液中筛选不同类型的细胞等),是微流控芯片技术在细胞学应用中的首要技术难题。目前,已有一些文章报道了微型机械式的细胞筛选装置,这些筛选装置通常由并行排列在芯片上具有一定长度和深度的通道组成,当样本超过通道尺寸时被阻挡,从而依据通道大小实现对不同大小细胞的分离^[13];另一种是采用静水压力驱动,使样本通过相互交叉成网络的通道。例如,对血液样本中的细胞进行分离筛选,由于红细胞的体积远远小于白细胞,且黏附性比白细胞小,当血液样本由压力驱动通过交叉成网络的通道时,红细胞会以很快的速度通过,白细胞随后才非常缓慢地黏附于通道表面,从而实现了红细胞、白细胞的分离^[14]。其他的机械方法还有采用硅坝结构对细胞进行筛选和诱捕^[13,15],这些硅坝在通道中组成了一系列并排的围堰样的结构,当流体通过这些围堰样硅坝时会产生分流现象,细胞可以随着分流的流体进行分离,完成对细胞的筛选。

由于大多数的生物细胞都有类似电泳的性质,在微芯片上利用电泳或电渗作用已经被广泛应用于转移和分离生物大分子或细胞。双向电泳技术(DEP)已经成功地被用于在微芯片上筛选、操纵和分离生物细胞。例如,在微通道中,采用 DEP 技术

在稀释的溶液中收集 *E. coli* 或外周血中的单核细胞,也可以在全血中对白细胞进行浓缩,浓缩倍数可达 30 倍^[16]。Gascoyne 等^[17]把 DEP-FFF(双向电泳-场流分级)技术应用于分离感染了疟原虫的病态红细胞。研究者在 $300\text{mm} \times 25\text{mm} \times 400\mu\text{m}$ 的 DEP-FFF 分离腔内每隔 $50\mu\text{m}$ 放置一个宽为 $50\mu\text{m}$ 的电极,电极连接电压为 5V,频率为 $40 \sim 250\text{kHz}$ 的正旋交流电源,采用泵制动使腔内的液体以 1.5mL/min 的流速留出分离腔。由于红细胞感染疟原虫后,细胞膜表面的蛋白质发生了变化,导致细胞等电点发生了变化,所以 DEP 技术可以在全血中分离感染疟原虫的细胞,然而 FFF(场流分级)技术的应用能够把被分离出来的细胞移出分离腔。在许多操纵细胞的技术中,以电场为基础的方法非常适合小型化。用电驱动的芯片在移动速度、可操控性、适应性、自动化等方面均提供了较大的优势。电场的操作依赖于生物分子的自然属性,不同类型的细胞应用不同的电场,例如,直流电泳可以操纵大分子,非均衡的交流电场用于双向电泳(DEP)或可极化的(带电的或电中性的)大分子,交流电和直流电相结合可以操控带电的和电中性的的大分子。

虽然芯片上的细胞操纵是也是一种间接的、借助工具(借助液体的流动)的操纵技术,但相对于宏观的手工借助一系列的细胞操纵机械工具(毛细吸管等)的操作要柔和得多,且提供了一个相对独立的环境,对细胞不会产生太大的外部刺激,这样在进行单细胞研究时就避免了一些人为产生的干扰因素。当然,在选择电驱动方式时同样要注意避免施加的电压过高时产生的焦耳热影响刺激细胞。

3.2 细胞分析

快速的细胞分析在生物学、医学和药物筛选中均具有重要的意义。在进行细胞分析时,同一样源的细胞从形态学上观察通常都具有相同的形态结构,但是事实上在化学组成和生物学活性上可能是完全不同的,所以检测细胞的化学成分和影响细胞生物活性的因素非常重要。细胞分析主要包括细胞预处理和对细胞内或细胞膜上的物质进行分析。预处理的方式主要是细胞的溶解。传统的细胞溶解方法包括酶溶解、化学溶解(如去垢剂)和机械溶解(如超声波降解)等,采用的是宏观的处理方法,并不完全适合在微流控芯片的通道中使用。目前常用于微通道中溶解细胞的方法是电溶解和化学溶解。电溶解是采用电动力学的原理将细胞溶膜^[18],化学溶解则是在通道中注入去垢剂,使通道中的细胞溶膜。

在芯片上使用化学溶解可使细胞在 1s 以内溶膜,而电溶解溶胞的速度则更快。

采用微流控芯片完成对细胞的分析,优势在于减少了细胞和试剂的消耗,缩短了分析所用的时间。Ferrance 等^[19]应用微流控分析芯片对杜兴氏肌营养不良综合征(DMD)进行诊断。该实验采用 $60\mu\text{m} \times 400\mu\text{m} \times 2.0\text{cm}$ 的单通道芯片在全血中分离提取 DNA,在另一芯片上将 IR-mediated system^[20]与 DNA 分离通道相结合,从而使 PCR 扩增与扩增产物的电泳分离在同一芯片上完成。Matsubara 等^[21]在 PDMS 微流控分析芯片上对巨噬细胞的过敏反应的应答进行观察。这种 PDMS 芯片由细胞室($d = 10\text{mm}$)、加样通道($70\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$)、样品池和检测池组成,并采用微泵作为样品转移的制动方式,液体的流速为 $20\mu\text{L/min}$ 。为了对试验的免疫应答进行监测,奎纳克林作为试验的荧光指示剂被引入 RBL-2H3 细胞内。试验中,研究者们先用抗 DNP-IgE 使细胞室中培养的 RBL-2H3 细胞致敏,然后将奎纳克林导入致敏细胞的隔室中,最后使用 DNP-BSA 作为抗原对细胞室中处理过 RBL-2H3 细胞进行刺激应答,当试验中的免疫应答反应被激活,奎纳克林便随着 RBL-2H3 细胞脱颗粒的过程,由细胞隔室连同其它的炎性介质一齐被释放。由于微流控芯片的体积微小,很快就能达到热平衡状态,所以微流控芯片技术在细胞培养中存在相当的优势。但是由于微流控芯片的微通道体积狭小,在细胞培养的中后期狭小的体积妨碍了细胞的生长,所以采用芯片技术进行细胞培养同时也存在缺点。另外,微芯片的材质构成也会影响细胞的培养。

微流控分析芯片在进行细胞分析时一方面减少了手工操作,避免了人为操作产生的误差,另一方面这样的分析系统在分析一些具有感染性的样品时减少了操作者被感染的机会,同时检测时间也比传统的方法少,是一个自动化的微而全的分析系统。

4 发展与展望

经过十几年的发展,研究者们对微流控芯片的研究已经逐渐由注重它的硬件组成、检测方法优化和提高检测灵敏度等逐渐向应用性、实用性转变。从近年来发表的很多关于微流控芯片应用的文章可以看出,微流控分析芯片系统在生物医学领域的应用有着广阔的前景,微流控分析芯片系统正朝着能够分析处理复杂生物学样品以及能够处理多元化样品的方向发展。

但是在一项新的技术高速发展的时候,它既存在着优势,也面临着很多问题:如由于芯片通道过小,在实验过程中极易被堵塞,堵塞物有的是来自于空气或者是缓冲液中的灰尘,有的是来自于样品分析时的细胞碎片、大分子物质等;在进行复杂生物体系的分析时应如何保持生物体系的活性等。

μ -TAS 技术是一把双刃剑,如何更好地利用现有的 MEMS 技术和 μ -TAS 技术,发展实用性的芯片分析平台,如何避免 μ -TAS 所带来的一系列的问题,充分发挥它的优势等,这些都是科学家近些年所热衷解决的问题。相信在不远的将来,以微流控分析芯片为核心的检测技术将逐渐取代现行的临床诊断设备,并且能够平行测定来自于不同个体的样本,实现分析样品的多元化、分析仪器小型化,使操作更加简便,真正实现便携式的小型实验室。微流控分析芯片系统的建立,将对临床微创分析诊断的发展以及疾病早期诊断起着重要的作用。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Jessamine Ng Lee, Cheolmin Park, George M Whitesides. Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. *Anal Chem*, 2003, **75**(23):6544 - 6554
- [2] Christopher J Backhouse, Ania Gajdal, Linda M Pilarski *et al*. Improved resolution with microchip-based enhanced field inversion electrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, **24**(11):1777 - 1786
- [3] Lian Jijin, Jerome Ferrance, Joshua C Sanders *et al*. A microchip-based proteolytic digestion system driven by electroosmotic pumping. *Lab on a Chip*, 2003, **3**(1):11 - 18
- [4] Carlo S Effenhauser, Aran Paulus, Andreas Manz *et al*. High-speed separation of antisense oligonucleotides on a micromachined capillary electrophoresis device. *Anal Chem*, 1994, **66**(18):2949 - 2953
- [5] Medintz IL, Paegel BM, Mathies RA. Microfabricated capillary array electrophoresis DNA analysis systems. *J Chromatography A*, 2001, **924**(1 - 2):265 - 270
- [6] Yining Shi, Rolfe C Anderson. High-resolution single-stranded DNA analysis on 4.5cm plastic electrophoretic microchannels. *Electrophoresis*, 2004, **24**(19 - 20):3371 - 3377
- [7] Nathaniel C Cady, Scott Stelick, Carl A Batt. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, **19**(1):59 - 66
- [8] Kopp MU, deMello AJ, Manz A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. *Science*, 1998, **280**(5366):1046 - 1048
- [9] Pierre J Obeid, Theodore K Christopoulos. Continuous-flow DNA and RNA amplification chip combined with laser-induced fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 2003, **494**(1 - 2):1 - 9
- [10] Carlo S Effenhauser, Andreas Manz, H Michael Widmer. Glass chips for high-speed capillary electrophoresis separations with submicrometer plate heights. *Anal Chem*, 1993, **65**(19):2637 - 2642
- [11] Jin LJ, Ferrance J, Sanders JC *et al*. A microchip-based proteolytic digestion system driven by electroosmotic pumping. *Lab on a Chip*, 2003, **3**(1):11 - 18
- [12] Julia Yakovleva, Richard Davidsson, Martin Bengtsson *et al*. Microfluidic enzyme immunosensors with immobilised protein A and G using chemiluminescence detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, **19**(1):31 - 34
- [13] Peter Wilding, Larry J Kricka, Jing Cheng *et al*. Integrated cell isolation and polymerase chain reaction analysis using silicon microfilter chambers. *Anal Biochem*, 1998, **257**(2):95 - 100
- [14] Robert H Carlson, Christopher V Gabel, Shirley S Chan. Self-sorting of white blood cells in a Lattice. *Phys Rev Lett*, 1997, **79**(11):2149 - 2152
- [15] Nicholas J Panaro, Xing Jian Lou, Paolo Fortina *et al*. Micropillar array chip for integrated white blood cell isolation and PCR. *Biomolecular Engineering*, 2005, **21**(6):157 - 162
- [16] Ying Huang, Karla I. Ewalt, Marcus Tirado *et al*. Electric manipulation of bioparticles and macromolecules on microfabricated electrodes. *Anal Chem*, 2001, **73**(7):1549 - 1559
- [17] Peter Gascoyne, Jutamaad Satayavivad, Mathuros Ruchirawat. Microfluidic approaches to malaria detection. *Acta Tropica*, 2004, **89**(3):357 - 369
- [18] Waters LC, Jacobson SC, Kroutchinina N *et al*. Microchip device for cell lysis, multiplex PCR amplification, and electrophoretic sizing. *Anal Chem*, 1998, **70**(1):158 - 162
- [19] Jerome P Ferrance, Wu Qirong, Braden Giordano *et al*. Developments toward a complete micro-total analysis system for Duchenne muscular dystrophy diagnosis. *Analytica Chimica Acta*, 2003, **500**(1 - 2):233 - 236
- [20] Giordano BC, Ferrance J, Swedberg S *et al*. Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds. *Anal Biochem*, 2001, **291**(1):124 - 132
- [21] Yasutaka Matsubara, Yuji Murakami, Masaaki Kobayashi *et al*. Application of on-chip cell cultures for the detection of allergic response. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, **19**(7):741 - 747