



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110244065 A

(43)申请公布日 2019. 09. 17

(21)申请号 201910406003.8

(22)申请日 2019.05.16

(71)申请人 北京化工大学

地址 100029 北京市朝阳区北三环东路15号

(72)发明人 魏芸 石勇

(74)专利代理机构 北京东岩跃扬知识产权代理
事务所(普通合伙) 11559

代理人 谷岳

(51)Int.Cl.

G01N 33/76(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

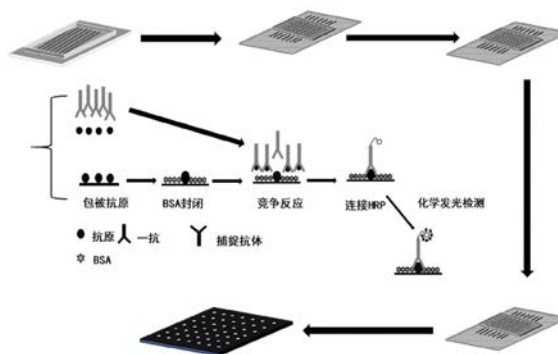
权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54)发明名称

一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白PGRMC1的微流控免疫分析芯片及其制备方法和应用;本微流控免疫分析芯片由芯片和固相反应基底及包被在固相反应基底上的特异性抗原PGRMC1组成;芯片为带有并行微流管道的片状结构,固相反应基底上的特异性抗原PGRMC1为并行条状平面结构,与所述芯片微流管道相互垂直,交叉角度为 90° ;PGRMC1是与孕激素相关乳腺癌的可能潜在标志物,通过检测全血中的PGRMC1的含量,可为乳腺癌早期诊断提供可能;该检测方法将微流控免疫分析芯片和化学发光相结合,兼具了微流控免疫分析芯片的快速、高效和样品用量小,化学发光特异性好、操作简单、成本低、高通量等优点,具有乳腺癌的早期诊断应用前景。



1. 一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片,其特征在于:本微流控免疫分析芯片由芯片和固相反应基底及包被在固相反应基底上的特异性抗原PGRMC1组成;芯片为带有并行微流管道的片状结构,固相反应基底上的特异性抗原PGRMC1为并行条状平面结构,与所述芯片微流管道相互垂直,交叉角度为 90° ;所述芯片为经手工翻模或注塑而成的带有并行微流管道的片状结构;所述微流管道长度为3-5cm,所述微流管道直径500-600 μm 高度500-600 μm ,所述微流管道的间距为1-3mm;

所述固相反应基底选自聚苯乙烯、聚二甲基硅氧烷、聚甲基丙烯酸甲酯的一种或多种。

所述包被在固相反应基底上的特异性抗原PGRMC1为并行条状平面结构,长度为3-5cm,间距为1-3mm,与所述芯片微流管道相互垂直,交叉角度为 90° 。

2. 根据权利要求1所述的一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片,其特征在于:所述芯片带有3-21条并行微流管道。

3. 一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片制备方法,其特征在于:

将芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的微流管道,向所述微流管道中分别注入20 μL ,浓度范围为3 $\mu\text{g/mL}$ -20 $\mu\text{g/mL}$ 特异性抗原PGRMC1,所述特异性抗原PGRMC1包被在固相反应基底上,包被好以后,抽出包被液,揭去所述的芯片,并贴上另一芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,交叉角度为 90° ,并将其与固相反应基底密封后,向微流管道通入BSA封闭液,封闭后抽出封闭液。

4. 根据权利要求3所述的一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片制备方法,其特征在于:所述的特异性抗原PGRMC1包被液的制备:取1 μL 浓度为0.358 mg/mL 的PGRMC1加入17-119 μL 的PBS缓冲溶液中制备PGRMC1包被液,稀释PGRMC1包被液浓度为3 $\mu\text{g/mL}$ -20 $\mu\text{g/mL}$,混匀,pH7.2-7.4。

5. 一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片的应用,其特征在于:

(1) 向所述的微流控免疫分析芯片的微流管道加样孔中加入20 μL 待检测物,孵育20-60min,用含有0.05%吐温-20的洗涤液进行洗涤;

(2) 向步骤(1)所述微流管道中加入酶标记的检测抗体10 μL ,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

(3) 向步骤(2)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20 μL ,通过化学发光检测仪进行检测。

6. 根据权利要求5所述的一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片的应用,其特征在于:所述酶标记的检测抗体为HRP标记的羊抗兔抗体。

7. 根据权利要求5所述的一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片的应用,其特征在于:所述待检测物为血液与抗原PGRMC1对应抗体K1反应后的溶液。

8. 根据权利要求5所述的一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片的应用,其特征在于:所述的待检测物的制备:取1 μL 浓度为1.35 mg/mL 抗体K1,加入500 μL 的3%BSA封闭液中,稀释成2.7 $\mu\text{g/mL}$,等体积加入血液或者血清,反应20-60min。

一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析 芯片及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物分析技术领域,具体涉及一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 构建高灵敏分析方法一直是分析化学及生命学科追求的目标之一。高灵敏分析方法推动了分析化学的发展及其在临床诊断、环境监测、食品安全、生物成像等领域的应用。在重大传染病、细菌或病毒感染、癌症等疾病的早期诊断以及食品和环境痕量有毒物质的筛查中,高灵敏分析方法尤为重要。以抗体-抗原特异性识别为基础的免疫生物标记分析方法是一种将生物标记技术的高灵敏性和免疫反应的高度特异性结合在一起的分析方法,具有灵敏度高、特异性好、分析快速等优点。酶联免疫是其中的代表,该方法具有特异性强、重复性好、操作简单、成本低、易于商品化和自动化等优点。但传统的酶联免疫分析方法一般都是基于免疫标记酶和底物之间的一次酶促信号放大,其灵敏度只能达到ng/mL。同时,酶联免疫分析方法反应时间长,劳动强度大。在需要高灵敏度、临床快速诊断的分析领域,传统的酶联免疫分析方法很难满足需要,因此,研究建立简单便捷快速的高灵敏高通量技术方法是至关重要的。

[0003] 在全球女性群体中,乳腺癌已经成为最常见的浸润性癌症之一,女性一生中罹患乳腺癌的概率为1/8。2015年中国肿瘤新发病例数为429.2万,其中女性乳腺癌发病人数为26.86万,占到女性新发肿瘤的15%,其中45~59岁的发病率为23%。这个年龄阶段正是女性的围绝经或绝经阶段。激素治疗是目前治疗绝经相关症状最有效的方法,它对维持绝经妇女身体健康、提高生活质量具有其他任何单一药物不能取代的作用。但是目前有研究认为,激素治疗会使乳腺癌发生风险增加。妇女经过5年以上的雌/孕激素联合治疗,乳腺癌风险将增加(HR=1.24,95%CI:1.01~1.54)。此外,也有大部分的临床研究显示,激素治疗超过5年,乳腺癌的发病风险增加。有研究发现,健康女性乳腺内存在恶性细胞的概率是40%,有一部分女性即使在内源性雌激素、孕激素的刺激下,乳腺恶性细胞也可能会发生快速增生而发展为临床乳腺癌。如能早期检测雌激素、孕激素相关乳腺癌风险,筛选出乳腺癌高危患者并采取相应措施,对减少激素治疗的乳腺癌风险具有重要指导意义。但是直到现在,临床上关于乳腺癌风险血清学标志物均缺乏一定的敏感度、特异度。在最近十几年,发现了一些新的孕激素受体膜组分,其中孕激素受体膜组分1(progesterone receptor membrane components 1, PGRMC1),雌激素、孕激素联合治疗可以明显促进PGRMC1表达阳性的乳腺癌细胞的增生,体外研究显示,体外雌激素、孕激素对MCF7/PGRMC1与未转染PGRMC1的乳腺癌细胞(MCF7)增生作用有明显不同,雌激素和某些孕激素明显增加了转染了PGRMC1的乳腺癌细胞的增生,并可能参与了肿瘤发生。近几年陆续有关于PGRMC1在实体瘤中表达情况的报道,但研究结果不一致,同时这些临床数据比较零散,研究样本量小,绝大部分研究集中于评估乳腺癌组织中特定的细胞结构而无法对患者血液中PGRMC1的表达进行检测和评估,而

后者对于激素治疗前的常规风险筛查十分必要。

[0004] 综上所述,本领域有必要筛选确定PGRMC1是否作为一种新的、合适的乳腺癌肿瘤标记物,同时很有必要研究开发检测灵敏度高、检测更为简单方便、高通量,适合于快速现场检测的免疫检测分析新技术新方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片及其制备方法和应用。解决目前的免疫分析方法在检测灵敏度、分析速度和信号读出方式等方面不能满足实际应用需求的情况。本发明的免疫分析方法具有灵敏度高、信号读出方式简单、检测线性范围宽、分析速度快、检测成本低、可以实现高通量检测等优势。

[0006] 本发明所述的一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片及其制备方法和应用采用的技术方案如下:

[0007] 本发明所述的一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片,由芯片和固相反应基底及包被在固相反应基底上的特异性抗原PGRMC1组成;

[0008] 本发明所述芯片为经手工翻模或注塑而成的带有并行微流管道的片状结构;优选,所述芯片带有3-21条并行微流管道;所述微流管道长度为3-5cm,所述微流管道直径500-600 μ m高度500-600 μ m,所述微流管道的间距为1-3mm;所述包被在固相反应基底上的PGRMC1为并行条状平面结构,长度为3-5cm,间距为1-3mm,与所述芯片微流管道相互垂直,交叉角度为90°。

[0009] 本发明所述的一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片的制备方法:

[0010] 将芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的微流管道,向所述微流管道中分别注入20 μ L,浓度范围为3 μ g/mL-20 μ g/mL特异性抗原PGRMC1,所述特异性抗原PGRMC1包被在固相反应基底上,包被好以后,抽出包被液,揭去所述的芯片,并贴上另一芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,交叉角度为90°,并将其与固相反应基底密封后,向微流管道通入BSA封闭液,封闭后抽出封闭液。

[0011] 特异性抗原PGRMC1包被溶液的制备:取1 μ L浓度为0.358mg/mL的PGRMC1加入17-119 μ L的PBS缓冲溶液中制备PGRMC1包被液,稀释PGRMC1包被液浓度为3 μ g/mL-20 μ g/mL,混匀,PBS的pH7.2-7.4。

[0012] 本发明所述固相反应基底为聚苯乙烯、聚二甲基硅氧烷、聚甲基丙烯酸甲酯的一种或多种,优选为聚苯乙烯。

[0013] 本发明所述的一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片的应用:

[0014] (1) 向所述的微流控免疫分析芯片的微流管道加样孔中加入20 μ L待检测物,孵育20-60min,用含有0.05%吐温-20的洗涤液进行洗涤;

[0015] (2) 向步骤(1)所述微流管道中加入酶标记的检测抗体10 μ L,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;酶标记的检测抗体优选HRP标记的羊抗兔抗体;

[0016] (3) 向步骤(2)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20 μ L,通过化学发光检测仪进行检测。

[0017] 本发明所用包被物质是特异性抗原PGRMC1蛋白,可以包被在固相基底上,所用抗体是购买或制备与特异性抗原PGRMC1蛋白对应的抗体K1,能避免非特异性反应,可特异性的识别全血中PGRMC1,并与之发生免疫反应。

[0018] 本发明步骤(1)所述待检测物为血液与抗原PGRMC1对应抗体K1的反应后的溶液。本发明采用的血液为全血或者血清,能够快速、准确地诊断出人血液中PGRMC1的浓度,以期实现乳腺癌早期诊断。

[0019] 本发明步骤(1)所述孵育时间优选为30min。本发明步骤(3)所述化学发光液为鲁米诺化学发光底物,该底物可被HRP酶催化。本发明所述洗涤用的洗涤液为含有0.05%吐温-20的洗涤液,采用该洗涤液可以降低微管道非特异性吸附造成的干扰背景。

[0020] 作为优选技术方案,本发明包括以下步骤:

[0021] (1)微流控免疫分析芯片的制作:将7孔道芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的微流管道,向所述微流管道中分别注入20uL,浓度为17.9ug/mL特异性抗原PGRMC1,所述特异性抗原PGRMC1包被在基底上,包被好以后,抽出包被液,揭去所述的芯片,并贴上另一芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,并将其与固相反应基底密封后,向微流管道通入BSA封闭液,封闭后抽出封闭液;

[0022] (2)向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中每个管道加入20uL待检测物,孵育30min,用含有0.05%吐温-20的洗涤液进行洗涤,每个管道加入20uL洗涤液,然后吸出,重复三次进行洗涤;

[0023] (3)向步骤(2)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,每个管道加入20uL,用含有0.05%吐温-20洗涤液,每个管道加入20uL,然后吸出,重复三次的洗涤液进行洗涤;

[0024] (4)向步骤(3)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物,每个管道加入20uL,通过化学发光检测仪进行检测。

[0025] 所述的特异性抗原PGRMC1包被液的制备:取1μL浓度为0.358mg/mL的PGRMC1加入17-119uL的PBS (pH7.2-7.4)缓冲溶液中制备PGRMC1包被,稀释PGRMC1包被浓度3ug/mL-20ug/mL,混匀。

[0026] 所述的待检测物的制备:取1μL浓度为1.35mg/mL抗体加入500uL的3%BSA封闭液中,稀释成2.7ug/mL,加入血液或者血清,反应60min。

[0027] 阐述本文中所使用的术语定义如下:

[0028] 术语“PBS”是指:磷酸缓冲盐溶液。

[0029] 术语“BSA”是指:牛血清白蛋白。

[0030] 术语“HRP”是指:辣根过氧化物酶。

[0031] 术语“PGRMC1”是指:孕激素受体膜组分1(progesterone receptor membrane components1)

[0032] PBS缓冲溶液(0.01mol/L)配制:4.0g NaCl,0.1g KH₂PO₄,1.48g Na₂HPO₄·12H₂O,溶于500mL蒸馏水中,调整pH至7.4

[0033] PBST洗涤液(浓度0.05%)配制:0.01mol/L PBS加入0.05%Tween-20:将50uL Tween-20溶于100mL的0.01mol/L磷酸盐缓冲液中,震荡混匀。

[0034] 本发明的检测原理在于:

[0035] 在制备好的微流控免疫分析芯片中,向微管道加样孔中加入待检测物(待检测物

为全血或者血清与抗原PGRMC1对应抗体K1的反应后溶液),血液或血清中的抗原PGRMC1已经与过量的抗体反应结束,剩下的抗体则结合到包被抗原上,从而形成抗原-抗体复合物,然后向微流控通道中加入酶标记的抗体。从而形成抗原-抗体-酶标记的抗体结合物,再通入发光液与酶发生催化反应并产生发光信号,信号就会被化学发光分析仪检测到并给出数值。

[0036] 与现有技术相比,本发明至少具有以下有益效果:

[0037] 1、本发明借助微流控免疫分析芯片并选择全血或者血清作为样品,通过一次性操作即检测出多个样本中PGRMC1的含量,具有样本量少、高通量检测,特异性强,灵敏度高,价格低廉,读取结果量化和直观等优点;

[0038] 2、本发明将抗原固定时间,抗原抗体反应时间缩短;并将整个免疫反应时间缩短,包括抗原固定、抗体反应、二抗反应,实现了快速检测;

[0039] 3、本发明不需要复杂的仪器设备,也不需要实验人员的经验判断,避免了不同操作人员的主观因素,检测结果的符合率较高,适合于临床早期诊断。

附图说明

[0040] 图1为本发明同时检测几个样本的结果示意图

[0041] 图2为本发明微流控芯片免疫检测的流程图

[0042] 图3为抗原浓度与化学发光强度关系曲线

[0043] 图4为抗原的浓度的对数与化学发光强度的标准曲线

具体实施方式

[0044] 实施例中所用的试剂仪器设备来源:

[0045] (1) 孕激素受体膜组分1蛋白:德泰生物科技(南京)有限公司或圣克鲁斯生物技术有限公司;

[0046] (2) PGRMC1蛋白抗体:德泰生物科技(南京)有限公司或Genetimes Technology, Inc.

[0047] 吉泰生物科技(集团)公司或圣克鲁斯生物技术有限公司;

[0048] (3) 羊抗兔抗体:Proteintech或圣克鲁斯生物技术有限公司;

[0049] (4) 芯片(PS)基底:corning

[0050] (5) PDMS芯片基质、固化剂:道康宁184

[0051] (6) 高温干燥箱:上海一恒科技有限公司

[0052] (7) PBS:北京化工有限公司或北京普京康利有限公司

[0053] (8) 化学发光液:milipore (经销商北京普京康利有限公司)

[0054] (9) 化学发光仪:国家纳米科学中心研制或迈瑞尔实验设备(上海)有限公司

[0055] 实施例1

[0056] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将七管道芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的7个微流管道,然后取1 μ L浓度为0.358mg/mL的PGRMC1加入19 μ L的PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中制备PGRMC1包被溶液,稀释PGRMC1包被溶液浓度为17.9 μ g/mL,混匀;将稀释后PGRMC1包被溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭溶液(称取0.03g的BSA,然

后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20 μ L BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4℃保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0057] (2) 待检测物准备:取1 μ L浓度为1.35mg/mL抗体加入500 μ L的3%BSA封闭液中,稀释成2.7 μ g/mL,加入血液或者血清,反应一个小时。

[0058] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20 μ L,孵育60min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20 μ L,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0059] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0060] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20 μ L,通过化学发光检测仪进行检测。

[0061] (6) 放入化学发光仪中,使用分析软件进行数据分析;结果判断:检测结果如图1所示,通入样本后,在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0062] 表1健康人全血中PGRMC1含量

[0063]

编号	C1	C2	C3	C4	C5
浓度 (pg/mL)	22.46 \pm 6	22.69 \pm 5.2	25.40 \pm 4.8	21.18 \pm 5.6	18.82 \pm 4.2

[0064] 实施例2

[0065] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将7管道芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的7个微流管道,然后取1 μ L浓度为0.358mg/mL的PGRMC1加入39 μ L的PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中制备PGRMC1包被溶液,稀释PGRMC1包被溶液浓度为8.95 μ g/mL,混匀;将稀释后PGRMC1包被溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭溶液(称取0.03g的BSA,然后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20 μ L BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4℃保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0066] (2) 待检测物准备:取1 μ L浓度为1.35mg/mL抗体加入500 μ L的3%BSA封闭液中,稀释成2.7 μ g/mL,加入待检测的血液或者血清,反应一个小时。

[0067] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20 μ L,孵育60min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20 μ L,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0068] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0069] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20 μ L,通过化学发光检测仪进行检测。

[0070] (6) 在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0071] 表2健康人全血中PGRMC1含量

[0072]

编号	1	2	3	4	5
浓度 (pg/mL)	25.46 ±5.42	30.69 ±5.6	26.40 ±3.4	27.38 ±4.6	33.82 ±8.2

[0073] 实施例3

[0074] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将7管道芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的7个微流管道,然后取1 μ L浓度为0.358mg/mL的PGRMC1加入79 μ L的PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中制备PGRMC1包被溶液,稀释PGRMC1包被溶液浓度为17.9ug/mL,混匀;将稀释后PGRMC1包被溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭溶液(称取0.03g的BSA,然后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20 μ L BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4℃保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0075] (2) 待检测物准备:取1 μ L浓度为1.35mg/mL抗体加入500 μ L的3%BSA封闭液中,稀释成2.7ug/mL,加入血液或者血清,反应一个小时。

[0076] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20 μ L,孵育60min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20 μ L,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0077] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0078] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20 μ L,通过化学发光检测仪进行检测。

[0079] (6) 在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0080] 表3病人全血中PGRMC1含量

[0081]

编号	103	105	100	101	102
浓度 (pg/mL)	55.46 ±10.2	100.69 ±15. 6	88.40 ±12	127.38 ±19.3	50.82 ±12.3

[0082] 实施例4

[0083] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将7管道芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的7个微流管道,然后取1 μ L浓度为0.358mg/mL的PGRMC1加入79 μ L的PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中制备PGRMC1包被溶液,稀释PGRMC1包被溶液浓度为17.9ug/mL,混匀;将稀释后PGRMC1溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭溶液(称取0.03g的BSA,然后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20 μ L BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4℃保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0084] (2) 待检测物准备:取1 μ L浓度为1.35mg/mL抗体加入500 μ L的3%BSA封闭液中,稀

释成2.7ug/mL,加入血液或者血清,反应一个小时。

[0085] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20uL,孵育60min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20uL,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0086] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0087] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20uL,通过化学发光检测仪进行检测。

[0088] (6) 在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0089] 表4病人全血中PGRMC1含量

[0090]

编号	103	105	100	101	102
浓度 (pg/mL)	55.46 ±10.2	100.69 ± 15. 6	88.40 ±12	127.38 ±19.3	50.82 ±12.3

[0091] 实施例5

[0092] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将7管道芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的7个微流管道,然后取1μL浓度为0.358mg/mL的PGRMC1加入79uL的PBS (pH7.2-7.4) 稀释溶液中制备PGRMC1包被溶液,稀释PGRMC1包被溶液浓度为17.9ug/mL;将稀释后PGRMC1溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭溶液(称取0.03g的BSA,然后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20μL BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4℃保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0093] (2) 待检测物准备:取1μL浓度为1.35mg/mL抗体加入500uL的3%BSA封闭液中,稀释成2.7ug/mL,加入血液或者血清,反应一个小时。

[0094] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20uL,孵育60min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20uL,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0095] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0096] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20uL,通过化学发光检测仪进行检测。

[0097] (6) 在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0098] 表5病人全血中PGRMC1含量

[0099]

编号	108	109	110	112	113
浓度 (pg/mL)	66.46 ±12.2	104.69 ± 12. 6	84.40 ±14	54.38 ±9.3	52.82 ±8.3

[0100] 实施例6

[0101] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将3管道芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的3个微流管道,然后取1 μ L浓度为0.358mg/mL的PGRMC1加入79 μ L的PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中制备PGRMC1包被溶液,稀释PGRMC1包被溶液浓度为17.9 μ g/mL;将稀释后PGRMC1溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭溶液(称取0.03g的BSA,然后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20 μ L BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4 $^{\circ}$ C保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0102] (2) 待检测物准备:取1 μ L浓度为1.35mg/mL抗体加入500 μ L的3%BSA封闭液中,稀释成2.7 μ g/mL,加入血液或者血清,反应一个小时。

[0103] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20 μ L,孵育60min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20 μ L,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0104] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0105] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20 μ L,通过化学发光检测仪进行检测。

[0106] (6) 在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0107] 表6病人全血中PGRMC1含量

[0108]	编号	108	109
	浓度 (pg/mL)	65.46 \pm 11.	103.49 \pm 12.
		5	1

[0109] 实施例7

[0110] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将9管道芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的9个微流管道,然后取1 μ L浓度为0.358mg/mL的PGRMC1加入79 μ L的PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中制备PGRMC1包被溶液,稀释PGRMC1包被溶液浓度为17.9 μ g/mL;将稀释后PGRMC1溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭溶液(称取0.03g的BSA,然后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20 μ L BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4 $^{\circ}$ C保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0111] (2) 待检测物准备:取1 μ L浓度为1.35mg/mL抗体加入500 μ L的3%BSA封闭液中,稀释成2.7 μ g/mL,加入血液或者血清,反应一个小时。

[0112] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20 μ L,孵育60min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20 μ L,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0113] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0114] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20 μ L,通过化学发光检测

仪进行检测。

[0115] (6) 在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0116] 表7病人全血中PGRMC1含量

[0117]

编号	103	105	100	101	102	112	113
浓 度 (pg/mL)	57.68 \pm 11.6	102.39 \pm 12.6	88.38 \pm 2.1	125.38 \pm 17.2	52.85 \pm 1.9	56.38 \pm 0.3	53.82 \pm .3

[0118] 实施例8

[0119] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的21个微流管道,然后取1 μ L浓度为0.358mg/mL的PGRMC1加入79 μ L的PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中制备PGRMC1包被溶液,稀释PGRMC1包被溶液浓度为17.9 μ g/mL;将稀释后PGRMC1溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭溶液(称取0.03g的BSA,然后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20 μ L BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4 $^{\circ}$ C保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0120] (2) 待检测物准备:取1 μ L浓度为1.35mg/mL抗体加入500 μ L的3%BSA封闭液中,稀释成2.7 μ g/mL,加入血液或者血清,反应一个小时。

[0121] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20 μ L,孵育30min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20 μ L,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0122] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0123] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20 μ L,通过化学发光检测仪进行检测。

[0124] (6) 在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0125] 实施例9

[0126] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的15个微流管道,然后取1 μ L浓度为0.358mg/mL的PGRMC1加入79 μ L的PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中制备PGRMC1包被溶液,稀释PGRMC1包被溶液浓度为17.9 μ g/mL;将稀释后PGRMC1溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭溶液(称取0.03g的BSA,然后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20 μ L BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4 $^{\circ}$ C保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0127] (2) 待检测物准备:取1 μ L浓度为1.35mg/mL抗体加入500 μ L的3%BSA封闭液中,稀释成2.7 μ g/mL,加入血液或者血清,反应一个小时。

[0128] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20 μ L,孵育40min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20 μ L,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0129] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0130] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20uL,通过化学发光检测仪进行检测。

[0131] (6) 在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0132] 实施例10

[0133] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的15个微流管道,将3ug/mL的PGRMC1溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭液(称取0.03g的BSA,然后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20μL BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4℃保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0134] (2) 待检测物准备:取1μL浓度为1.35mg/mL抗体加入500uL的3%BSA封闭液中,稀释成2.7ug/mL,加入血液或者血清,反应一个小时。

[0135] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20uL,孵育60min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20uL,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0136] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0137] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20uL,通过化学发光检测仪进行检测。

[0138] (6) 在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0139] 实施例11

[0140] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的12个微流管道,将20ug/mL的PGRMC1溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭液(称取0.03g的BSA,然后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20μL BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4℃保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0141] (2) 待检测物准备:取1μL浓度为1.35mg/mL抗体加入500uL的3%BSA封闭液中,稀释成2.7ug/mL,加入血液或者血清,反应一个小时。

[0142] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20uL,孵育60min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20uL,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0143] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0144] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20uL,通过化学发光检测仪进行检测。

[0145] (6) 在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0146] 实施例12

[0147] (1) 微流控免疫分析芯片的制作:将芯片与固相反应基底贴合后形成封闭的12个微流管道,将10ug/mL的PGRMC1溶液通入微流控管道中。用PBS缓冲溶液配制3%的BSA封闭溶液(称取0.03g的BSA,然后加PBS至10mL)。揭去第一块芯片,风干后,在基底上贴上第二块芯片,使第二块芯片上的管道与原第一块芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向每个管道均通入20μL BSA封闭液,室温30min;抽出封闭液,干燥后,放入密封袋,4℃保存,即制得微流控免疫分析芯片。

[0148] (2) 待检测物准备:取1μL浓度为1.35mg/mL抗体加入500uL的3%BSA封闭液中,稀释成2.7ug/mL,加入血液或者血清,反应一个小时。

[0149] (3) 向步骤(1)所述微流控免疫分析芯片中的微流管道加样孔中加入待检测液,每个管道加入20uL,孵育60min,用含有0.05%吐温的洗涤液,每孔加入20uL,然后吸出,重复三次,进行洗涤;

[0150] (4) 向步骤(3)所述微流管道中加入HRP标记的羊抗兔抗体,用含有0.05%吐温的洗涤液进行洗涤;

[0151] (5) 向步骤(4)所述微流管道中加入鲁米诺化学发光底物20uL,通过化学发光检测仪进行检测。

[0152] (6) 在芯片上产生发光信号,经化学发光分析仪读取发光信号的cutoff数值。

[0153] 虽然,上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验,对本发明作了详尽的描述,但在本发明的基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的

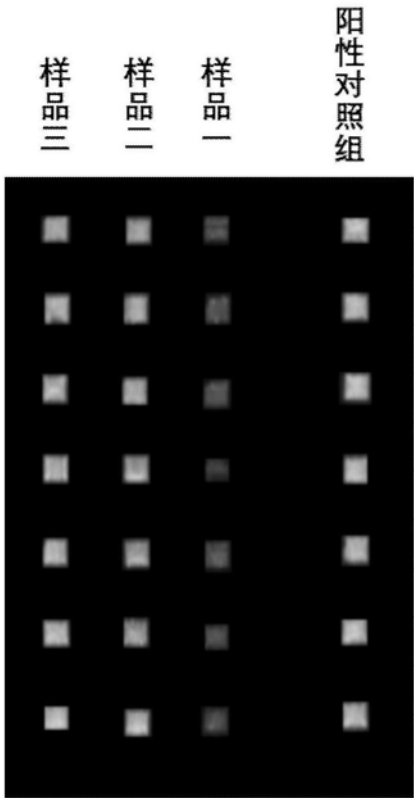


图1a

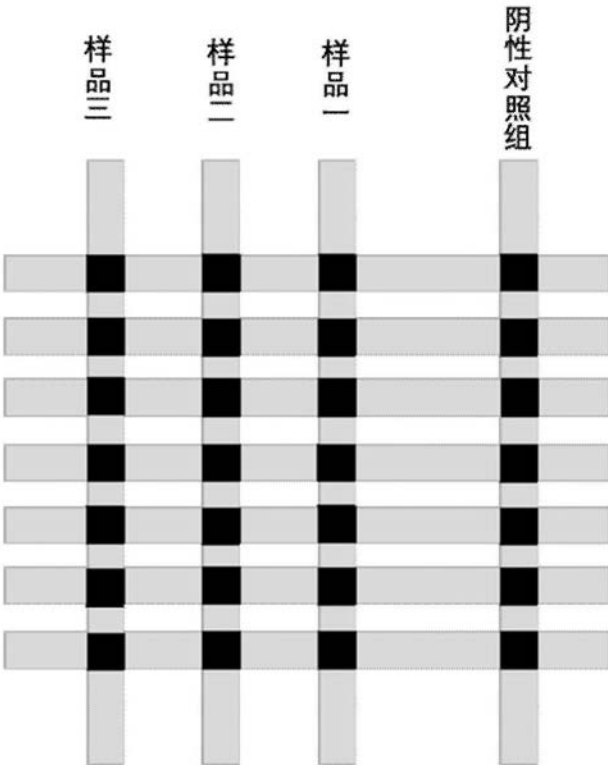


图1b

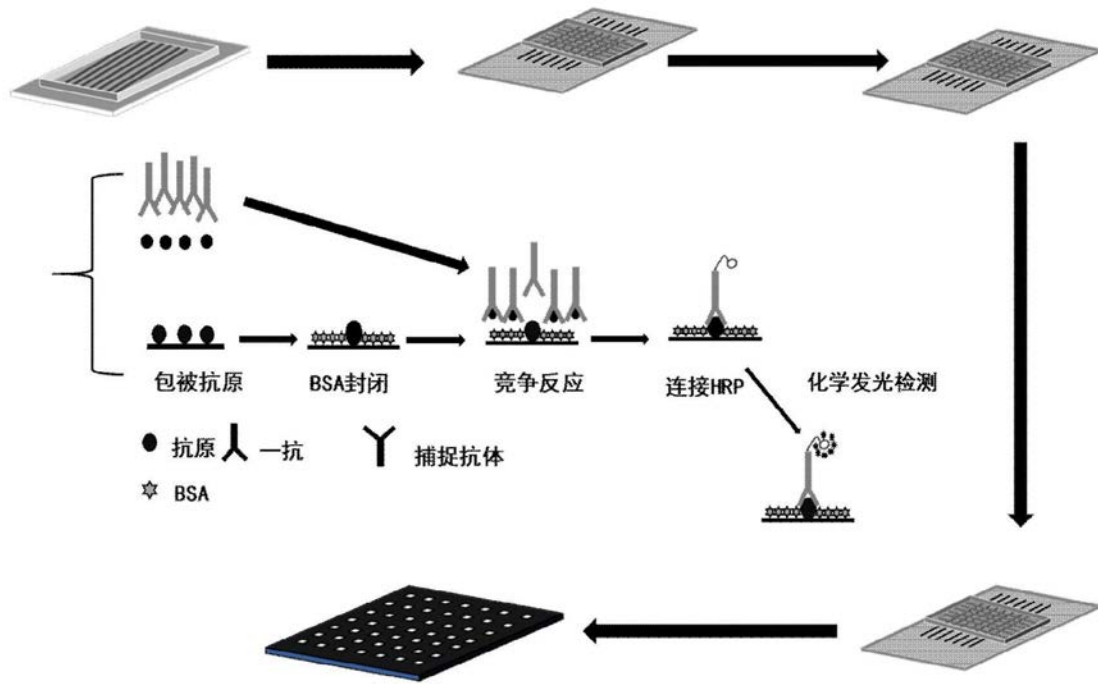


图2

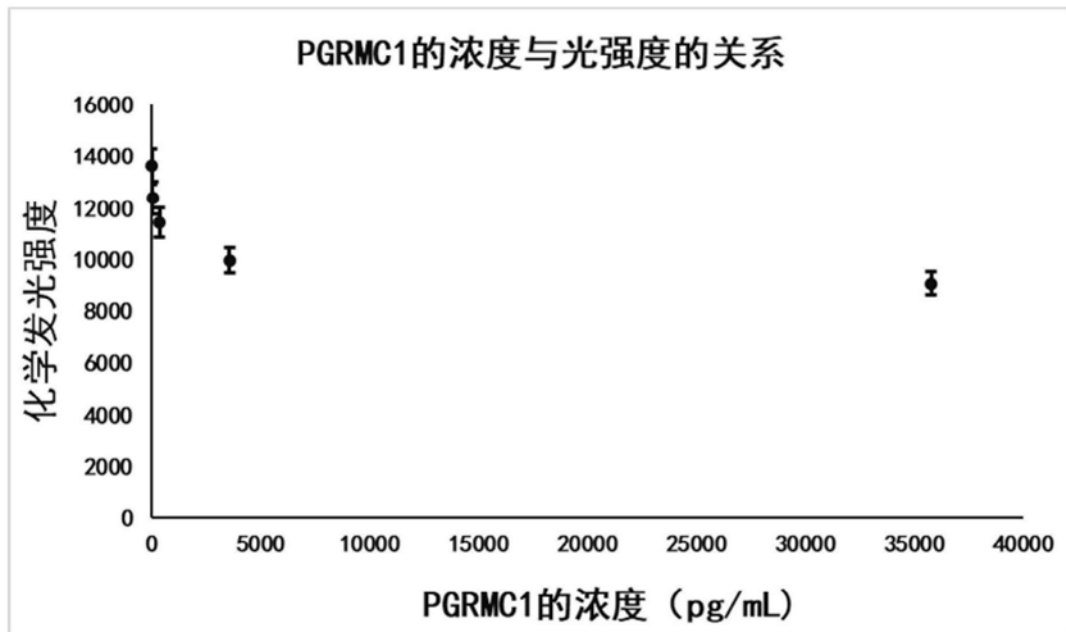


图3

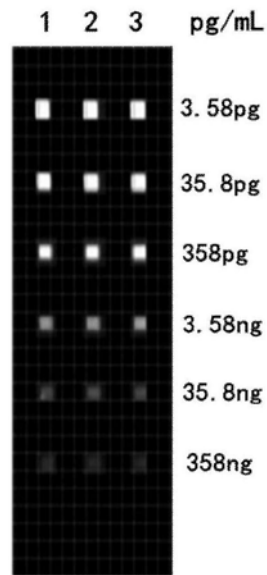


图4a

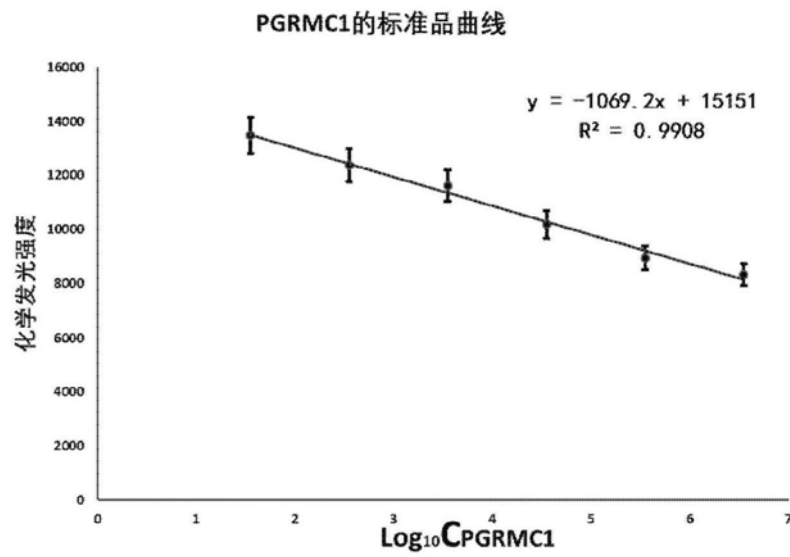


图4b

专利名称(译)	一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白的微流控免疫分析芯片及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN110244065A	公开(公告)日	2019-09-17
申请号	CN201910406003.8	申请日	2019-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	北京化工大学		
申请(专利权)人(译)	北京化工大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京化工大学		
[标]发明人	魏芸 石勇		
发明人	魏芸 石勇		
IPC分类号	G01N33/76 G01N33/535 G01N33/543 B01L3/00		
CPC分类号	B01L3/502707 G01N33/535 G01N33/54306 G01N33/76		
代理人(译)	谷岳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测血液中孕激素受体膜组分1蛋白PGRMC1的微流控免疫分析芯片及其制备方法和应用；本微流控免疫分析芯片由芯片和固相反应基底及包被在固相反应基底上的特异性抗原PGRMC1组成；芯片为带有并行微流管道的片状结构，固相反应基底上的特异性抗原PGRMC1为并行条状平面结构，与所述芯片微流管道相互垂直，交叉角度为90°；PGRMC1是与孕激素相关乳腺癌的可能潜在标志物，通过检测全血中的PGRMC1的含量，可为乳腺癌早期诊断提供可能；该检测方法将微流控免疫分析芯片和化学发光相结合，兼具了微流控免疫分析芯片的快速、高效和样品用量小，化学发光特异性好、操作简单、成本低、高通量等优点，具有乳腺癌的早期诊断应用前景。

