



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105241871 A

(43) 申请公布日 2016.01.13

(21) 申请号 201510696706.0

(22) 申请日 2015.10.26

(71) 申请人 深圳华迈兴微医疗科技有限公司

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽茶光路 1089 号深圳集成电路设计应用产业园 106-1、107

(72) 发明人 王东 李泉

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于全血样品检测的磁微粒化学发光微流控芯片

(57) 摘要

本发明公开了一种用于全血样品检测的磁微粒化学发光微流控芯片,所述芯片由顶部胶带(12)、芯片基板(1)和底部胶带(15)构成,其中芯片基板上的过滤区(2)、包被区(3)、反应区(5)、清洗区(6)、检测区(7)、液体释放通道(8)依次连接,芯片基板上标记配体存储池(4)与反应区(5)连接,检测区(7)分别与清洗液存储池(9)和发光基底液存储池(10)通过液体释放通道(8)连接,顶部胶带包含加样口(13);所述包被区(3)中包被磁颗粒标记配体;标记配体存储池(4)存储酶或发光剂标记配体。

1. 一种用于全血样品检测的磁微粒化学发光微流控芯片,其特征在于,所述芯片由顶部胶带(12)、芯片基板(1)和底部胶带(15)构成,其中芯片基板上的过滤区(2)、包被区(3)、反应区(5)、清洗区(6)、检测区(7)、液体释放通道(8)依次连接,芯片基板上标记配体存储池(4)与反应区(5)连接,检测区(7)分别与清洗液存储池(9)和发光基底液存储池(10)通过液体释放通道(8)连接,顶部胶带包含加样口(13);所述包被区(3)中包被磁颗粒标记配体;标记配体存储池(4)存储酶或发光剂标记配体。

2. 如权利要求1所述的芯片,其特征在于,所述发光基底液存储池(10)由发光基底液存储池A(16)和发光基底液存储池B(17)替代,发光基底液存储池A(16)和发光基底液存储池B(17)通过发光液预混合通道(18)连接。

3. 如权利要求1或2所述的微流控芯片,其特征在于,所述过滤区包含滤血膜,其中滤血膜可通过物理孔径或生物、化学试剂使液体与细胞分离,所述生物、化学试剂为凝血剂。

4. 如权利要求1或2所述的芯片,其特征在于,所述磁铁可置于微流控芯片的顶部胶带之上或底部胶带之下。

5. 如权利要求1或2所述的芯片,其特征在于,所述磁颗粒标记配体使用的磁颗粒包含三氧化二铁和四氧化三铁化合物,磁颗粒尺寸为 $0.1 \sim 10 \mu\text{m}$ ,与磁珠匹配的磁铁磁感应强度为 $500 \sim 30000$ 高斯。

6. 如权利要求5所述的芯片,其特征在于,所述磁颗粒标记配体使用的磁颗粒包含三氧化二铁和四氧化三铁化合物,磁颗粒尺寸为 $0.5 \sim 3 \mu\text{m}$ ,与磁珠匹配的磁铁磁感应强度为 $1000 \sim 8000$ 高斯。

7. 如权利要求1或2所述的芯片,其特征在于,所述磁颗粒标记配体、酶或发光剂标记配体使用的配体包含核酸、抗原、单克隆抗体、多克隆抗体和激素受体,所述分析物包括DNA、小分子(药物或毒品)、抗原、抗体、激素、抗生素、细菌或病毒及其他生化标志物。

8. 如权利要求1或2所述的芯片,其特征在于,所述清洗液存储池(9)预存储清洗液,所述清洗液包含缓冲体系、蛋白质和表面活性剂,其中缓冲体系选自硼酸盐、磷酸盐、Tris-HCl、醋酸盐中的一种;蛋白质选自牛血清白蛋白、酪蛋白中的一种;表面活性剂选自吐温20、吐温80、曲拉通X-100、聚乙二醇和聚乙烯基吡咯烷酮中的一种。

9. 如权利要求1或2所述的芯片,其特征在于,所述微流控芯片测试流程如下:

步骤1) 将微流控芯片放入配套仪器,把样本滴入加样口(13)后,开始测试,样本经过滤区(2)后,溶解包被区(3)固定的磁颗粒标记配体,样本中分析物与磁颗粒标记配体反应,磁铁收集磁颗粒,标记配体存储池(4)释放溶液,磁铁将磁颗粒移至反应区(5),磁铁搅拌加速反应,充分反应后收集磁颗粒;

步骤2) 清洗液存储池(9)释放溶液,磁颗粒清洗后,被移至检测区(7),发光基底液存储池(10)释放溶液,检测区产生化学发光信号,仪器检测系统检测发光信号强度,进而实现分析物的定量检测。

10. 如权利要求9所述的芯片,其特征在于,芯片检测的样本体积为 $20 \sim 100 \mu\text{l}$ ;芯片配套仪器为小型便携设备,包含挤压存储池,磁铁移动,发光检测系统等功能,芯片放入仪器后,点击开始测试,仪器可自动完成所有操作。

## 一种用于全血样品检测的磁微粒化学发光微流控芯片

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用磁微粒化学发光技术和微流控芯片技术实现分析物高灵敏定量检测的芯片,同时公开了一种用于全血样品检测的磁微粒化学发光微流控芯片,可实现病原体、重大疾病(如肿瘤、心血管疾病)、违禁药品、毒品检测、食品安全等分析物的准确、高灵敏定量检测,属于微流控芯片化学发光免疫检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 目前,体外诊断(IVD)主要有两种发展趋势:一种是自动化、一体集成化,即利用大型医院配套的中心实验室的全自动化、高灵敏的大型仪器设备,实现高精度的疾病分析诊断;另一种小型化、床旁化,即通过掌上小型简易设备,实现现场快速分析诊断。小型医院资金不足、样本量少,并不适合购买价格昂贵的大型设备。现阶段小型快速检测设备主要是试纸条及其配套设备,但试纸条只能实现定性或半定量检测,检测灵敏度低、特异性差、重复性差、受干扰明显。由于中国人口众多,老龄化加剧,发病率剧增,单纯依靠大型医院已不堪重负。因此研制操作简便、灵敏度高、重复性好和定量准确的快速检测方法和设备变得极为迫切。

[0003] 化学发光是指化学反应过程中的反应中间体、反应产物或外加发光试剂将化学能转变为光能的现象。与荧光和吸收光相比,化学发光没有外来激发光源背景信号干扰,交叉干扰小,具有灵敏度高、线性范围宽等优点。由此建立的化学发光分析已广泛应用于临床诊断等领域。化学发光仪是 IVD 主要的大型分析检测设备。

[0004] 微流控芯片技术是把生物、化学、医学分析过程的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成到一块微米尺度的芯片上,自动完成分析全过程。由于它在生物、化学、医学等领域的巨大潜力,已经发展成为一个生物、化学、医学、流体、材料、机械等多学科交叉的研究领域,被应用于生物医学研究、生化检测、司法鉴定等领域。如中国专利 201110006837.3 描述了一种可定位的微流控芯片,该微流控芯片由围栏阵列层、底片和盖层组成,可用于体外受精、检测神经胶质细胞对神经元作用、构建神经网络和检测细胞生长状态等。

[0005] 但将化学发光和微流控芯片结合起来的资料及文献并不多,实用及可产业化的更少,如中国专利 200910114403.8 描述了一种微流控芯片化学发光测定人单个红细胞内物质的方法,其需依赖显微镜平台或透镜和滤光片组成的复杂光路;中国专利 200910154432.7 公开了毛细管电泳分离和化学发光检测的微流控芯片,其流路结构单一,进样未经充分混合从而导致反应效率较低,无法达到最大发光强度。

[0006] 故现有技术主要存在如下缺点:

[0007] 1) 现有快速诊断方法主要定性或半定量的试纸条,其灵敏度低、重复性差、受干扰明显。

[0008] 2) 现有化学发光微流控芯片结构设计简单,检测时操作复杂,检测时间长,所需试剂多通过外部压力注入芯片。

[0009] 3) 现有化学发光微流控芯片其检测系统依赖大型设备,如显微镜平台、生物芯片扫描仪等。

## 发明内容

[0010] 本发明要解决的技术问题为针对现有快速诊断方法灵敏度低、重复性差、受干扰明显,以及现有化学发光微流控芯片配套仪器昂贵、检测时间长的问题,提供一种微流控磁微粒化学发光免疫检测芯片,通过集成化芯片(把除测试样本外所有组分均集成到芯片内)并配套小型便携设备,从而实现现场样本中分析物的快速、准确、高灵敏定量检测。

[0011] 为解决上述技术问题,本发明提供的技术方案为:

[0012] 一种用于全血样品检测的磁微粒化学发光微流控芯片,其特征在于,所述芯片由顶部胶带(12)、芯片基板(1)和底部胶带(15)构成,其中芯片基板上过滤区(2)、包被区(3)、反应区(5)、清洗区(6)、检测区(7)、液体释放通道(8)依次连接,芯片基板上标记配体存储池(4)与反应区(5)连接,检测区(7)分别与清洗液存储池(9)和发光基底液存储池(10)通过液体释放通道(8)连接,顶部胶带包含加样口(13);所述包被区(3)中包被磁颗粒标记配体;标记配体存储池(4)存储酶或发光剂标记配体。

[0013] 发光基底液存储池(10)也可以由发光基底液存储池A(16)和发光基底液存储池B(17)替代,发光基底液存储池A(16)和发光基底液存储池B(17)通过发光液预混合通道(18)连接。

[0014] 具体地,所述过滤区包含滤血膜,其中滤血膜可通过物理孔径或生物、化学试剂使液体与细胞分离,所述生物、化学试剂为凝血剂。

[0015] 具体地,所述磁铁可置于微流控芯片的顶部胶带之上或底部胶带之下。

[0016] 具体地,所述磁颗粒标记配体使用的磁颗粒包含三氧化二铁和四氧化三铁化合物,磁颗粒尺寸为 $0.1 \sim 10 \mu\text{m}$ ,与磁珠匹配的磁铁磁感应强度为 $500 \sim 30000$ 高斯。

[0017] 优选地,所述磁颗粒标记配体使用的磁颗粒包含三氧化二铁和四氧化三铁化合物,磁颗粒尺寸为 $0.5 \sim 3 \mu\text{m}$ ,与磁珠匹配的磁铁磁感应强度为 $1000 \sim 8000$ 高斯。

[0018] 具体地,所述磁颗粒标记配体、酶或发光剂标记配体使用的配体包含核酸、抗原、单克隆抗体、多克隆抗体和激素受体,所述分析物包括DNA、小分子(药物或毒品)、抗原、抗体、激素、抗生素、细菌或病毒及其他生化标志物。

[0019] 具体地,所述清洗液存储池(9)预存储清洗液,所述清洗液包含缓冲体系、蛋白质和表面活性剂,其中缓冲体系选自硼酸盐、磷酸盐、Tris-HCl、醋酸盐中的一种;蛋白质选自牛血清白蛋白、酪蛋白中的一种;表面活性剂选自吐温20、吐温80、曲拉通X-100、聚乙二醇和聚乙烯基吡咯烷酮中的一种。

[0020] 本发明所述芯片的制备方法如下:

[0021] 步骤1) 酶或发光剂标记可与分析物结合或竞争的一种配体,形成标记配体;磁颗粒标记可与分析物结合或竞争的另一种配体,形成磁颗粒标记配体,所述这两种配体可相同或不同;

[0022] 步骤2) 将磁颗粒标记配体溶液放入包被区中,干燥,然后将标记配体溶液放入标记配体存储池中,密封,将清洗液和发光基底液分别注入清洗液存储池和发光基底液存储池中,密封,组装微流控芯片;

[0023] 本发明提供一种微流控芯片测试流程如下：

[0024] 步骤 1) 将微流控芯片放入配套仪器,把样本滴入加样口 (13) 后,开始测试,样本经过滤区后,到达包被区,溶解磁颗粒标记配体,磁铁加速样本中分析物与磁颗粒标记配体反应,磁铁收集磁颗粒,标记配体存储池释放溶液,磁铁将磁颗粒移至反应区,磁铁搅拌加速反应,充分反应后收集磁颗粒；

[0025] 步骤 2) 清洗液存储池释放溶液,磁颗粒清洗后,被移至检测区,发光基底液存储池释放溶液,检测区产生化学发光信号,仪器检测系统检测发光信号强度,进而实现分析物的定量检测。

[0026] 本发明芯片检测的样本体积为  $20 \sim 100 \mu\text{l}$  ;芯片配套仪器为小型便携设备,包含挤压存储池,磁铁移动,发光检测系统等功能,芯片放入仪器后,点击开始测试,仪器可自动完成所有操作。

[0027] 本发明提供微流控芯片是一种以化学发光为基础、在微流控芯片上实现分析物快速、准确、高灵敏检测的微流控芯片。这种芯片是将分析物的配体 (如抗原、抗体等) 修饰酶,分析物的另一配体修饰在磁颗粒上,利用配体作用,如双抗体夹心法原理结合磁颗粒富集、化学发光检测样本中是否含有分析物。

[0028] 本发明微流控芯片用于定量样本中的分析物。分析物包括小分子 (药物和毒品)、抗原、抗体、激素、抗生素、细菌和病毒及其他生化标志物。其中其他生化标志物包括心血管标志物、肿瘤标志物和自身免疫性疾病标志物。

[0029] 本发明用于全血样品检测的磁微粒化学发光微流控芯片能够解决现有化学发光技术中仪器昂贵、检测时间长的不足和缺陷,解决现有微流控芯片中结构设计简单,检测时操作复杂,检测时间长等不足和缺陷,可实现对微量样本的检测。由于化学发光灵敏度高,其灵敏度是荧光检测方法的 100 倍以上。

[0030] 本发明中所述酶,包含但不限于过氧化氢酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (ALP),发光基底液为对应的发光底物 (如鲁米诺或金刚烷) 和发光增强液 (如碱性液或苯衍生物等增强剂),其中发光底物和发光增强液可合并,如图 1 所示混合均匀后注入一个发光基底液存储池 (10);但当混合液保质期少于 1 年时应分开,如图 4 所示分别注入发光基底液存储池 A(16) 和发光基底液存储池 B(17),通过发光液预混合通道 (18) 混合均匀。本发明一个实施例采用过氧化氢酶,另一个实施例采用了碱性磷酸酶。

[0031] 本发明所述发光剂,包含但不限于吡啶酯和吡啶磺酰胺。吡啶酯与发光液作用后,不需酶的催化作用,直接参与发光反应。

[0032] 本发明采用的标记方法包含物理吸附、化学交联或生物分子间特异性作用将分析物的配体连接到酶或磁颗粒表面,得到配体标记的酶或配体标记的磁颗粒,其中配体能与分析物特异性结合或竞争。

[0033] 本发明中所述物理吸附主要为通过颗粒与配体的表面电荷差异,非特异性吸附到颗粒表面,形成配体与磁颗粒的复合物。

[0034] 本发明中所述化学交联为:当磁颗粒或酶表面有活性基团,可与配体或质控分子直接反应时,不需用化学交联剂,反之用化学交联剂把配体修饰到磁颗粒表面或酶上。

[0035] 在本发明的实施例中采用化学交联法对磁颗粒进行蛋白质分子修饰的方法为:利用 1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺 (EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、戊二醛等

交联剂将磁颗粒表面的官能团（如羧基、氨基）与蛋白质分子（如抗原、抗体等）表面的官能团（如氨基、羧基、醛基等）连接。

[0036] 在本发明的实施例中采用化学交联法对酶进行蛋白质分子修饰的方法为：利用 1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺 (EDC)N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、戊二醛等交联剂将酶标记到蛋白质分子（如抗原、抗体等）上。

[0037] 作为优选，在本发明的一个实施例中，采用 EDC/NHS 交联法对磁颗粒进行修饰，一般步骤为：将磁颗粒溶液与 EDC 和 NHS 混合，混合比例为 1 : 100 : 100 ~ 1 : 10000 : 20000，优选混合摩尔比例为 1 : 100 : 100 ~ 1 : 2000 : 5000。然后加入一定量的蛋白质分子，其中磁颗粒与蛋白质分子摩尔比例为 1 : 100 ~ 1 : 108，优选摩尔比例为 1 : 1000 ~ 1 : 106，以 pH7.4 磷酸盐缓冲液为反应介质，培育 4h，加入 L-甘氨酸封闭，以透析、色谱、层析柱或超滤离心等方式纯化，从而得到蛋白修饰的磁颗粒。

[0038] 本发明中所述生物分子间特异性作用包括生物素-亲和素系统和抗原-抗体系统。作为优选，在本发明的另一个实施例中，采用生物素-亲和素系统结合方式对分析物配体进行磁颗粒修饰，该结合方式具有放大信号的作用，具体为：以 EDC 将链霉亲和素连接到磁颗粒表面，生物素连接到蛋白质分子表面，通过亲和素-生物素间的相互作用，把配体连接到磁颗粒表面。其中亲和素标记的磁颗粒和生物素化配体摩尔比例为 1 : 10 ~ 1 : 108，优选 1 : 1000 ~ 1 : 106。

[0039] 本发明的分析物配体包含抗原、半抗原、单克隆抗体、多克隆抗体和激素受体。该配体可与分析物结合（如双抗体夹心法）或者与分析物竞争（如竞争法）。其中酶标记的抗体与磁颗粒标记的抗体可以相同，也可以不同。

[0040] 作为优选，在本发明的一个实施例中，选择两种不同抗体，分别标记酶和磁颗粒，以双抗体夹心法检测分析物。本发明的另一个实施例中，选择一种抗原和一种抗体，分别标记酶和磁颗粒，以竞争法检测分析物。

[0041] 本发明的标记配体溶液和磁颗粒标记配体溶液包含缓冲液、蛋白质、表面活性剂及防腐剂。其中 HRP 标记的配体，缓冲体系中不能含有 NaN<sub>3</sub>；ALP 标记配体，缓冲体系不能是磷酸体系。作为优选，在本发明的实施例中，HRP 标记抗体溶液为包含牛血清白蛋白、吐温 20 和 Proclin300 的 pH7.4 磷酸缓冲液；磁颗粒标记抗体溶液为包含牛血清白蛋白、酪蛋白、吐温 20 和 Proclin300 的 pH7.4 磷酸缓冲液。在另一个实施例中，ALP 标记抗体溶液为包含牛血清白蛋白、吐温 20 和 Proclin300 的 pH7.4 Tris-HCl 缓冲液；磁颗粒标记抗原溶液为包含牛血清白蛋白、酪蛋白、吐温 20 和 Proclin300 的 pH7.4 Tris-HCl 缓冲液。

[0042] 本发明的微流控芯片根据配套仪器采用磁铁行程的差异，可分为直线磁铁操控（图 3）和平面磁铁操控（图 1）两种，其中磁铁可置于微流控芯片的顶部胶带之上或底部胶带之下。其中微流控芯片由顶部胶带、芯片基板和底部胶带构成。成型材料为聚合物，包括但不限于聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、环氧树脂等。如图 1 所述，芯片基板由过滤区 (2)、包被区 (3)、标记配体存储池 (4)、反应区 (5)、清洗区 (6)、检测区 (7)、液体释放通道 (8)、清洗液存储池 (9)、发光基底液存储池 (10) 和废液池 (11) 组成。其中检测区分别与清洗液存储池和发光基底液存储池通过液体释放通道 (8) 连接。

[0043] 本发明的存储池为液体密封池，所用密封材料包含玻璃、塑料、橡胶、铝箔和高阻隔薄膜，其中密封材料可为同种材料组成，也可为多种材料组合而成。在物理挤压下，存储

池可局部破裂,从而把密封的液体释放出来。其中酶标配体存储池、清洗液存储池、发光基底液存储池可采用相同或不同材料和方法制作。在本发明的一个实施例中,酶标配体存储池、清洗液存储池、发光基底液存储池均采用塑料和弹性橡胶密封而成。本发明的另一个实施例中,酶标配体存储池采用塑料和弹性橡胶密封而成,而清洗液存储池、发光基底液存储池采用高阻隔薄膜密封而成。

[0044] 本发明的过滤区包含滤血膜,其中滤血膜可通过物理孔径或生物/化学试剂使液体与细胞分离,实现血浆与红细胞分离,血浆流到磁颗粒包被区,而红细胞停留在滤血膜上,从而减少红细胞对试验结果的干扰。其中所述生物/化学试剂包含凝血剂等,可使红细胞间连接,形成凝块,增大尺寸,更容易被滤血膜的网状结构阻挡。

[0045] 本发明的微流控芯片,当发光基底液由发光底物和发光增强液组成,且不能混合并长时间保存时,可分别注入发光基底液存储池 A(16) 和发光基底液存储池 B(17) 中,并在芯片上增加预混合通道(18),该预混合通道可为蛇形通道或上下结构混合通道,如图 4 所示。

[0046] 在一个实施例中,存储池封入 HRP 标记抗体,包被区包被磁颗粒标记抗体,以双抗体夹心法检测 cTnI。另一个实施例中,存储池封入 ALP 标记抗原,包被区包被磁颗粒标记抗体,以竞争法检测他克莫司。

[0047] 本发明的实施例中所用样本为全血,但本发明样本不限于全血,所用样本还包含血清、血浆、唾液、尿液、粪便和其他液态组织样本。

[0048] 本发明的样本体积在  $10 \sim 500 \mu\text{l}$ , 优选  $20 \sim 100 \mu\text{l}$ 。作为优选,在实施例中加样体积为  $50 \mu\text{l}$ 。

[0049] 本发明的微流控芯片为快速检测,检测时间应小于 30 分钟,作为优选,实施例中采用 15 分钟。

[0050] 本发明的配体仪器包含挤压存储池,磁铁移动,发光检测系统等功能,应可包含挤压装置、磁铁及移动装置、检测系统、控制分析模块和软件系统。

[0051] 本发明可广泛应用于病原体、重大疾病(如肿瘤、心血管疾病等)、违禁药品、毒品检测、食品安全等多种分析物的定量检测。

[0052] 本发明的核心是采用磁微粒化学发光免疫检测技术在微流控芯片实现目标物的快速、高灵敏度、准确定量检测。

[0053] 微流控芯片技术是把生物、化学、医学分析过程的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成到一块微米尺度的芯片上,自动完成分析全过程。

[0054] 本发明的微流控芯片将检测过程所需的所有试剂组分(酶标配体、磁颗粒标记配体、清洗液、发光基底液等)均集成、内置到微流控芯片中,并通过巧妙沟道设计,在配套仪器的操作下,实现微流控芯片的一键式检测(只需按开始键就能实现检测,无需复杂操作),实现全血分离、免疫反应、清洗分离、化学发光检测,从而避免了现有微流控芯片中结构设计简单、检测时操作复杂等不足和缺陷。还克服了传统化学发光仪只能进行血清或血浆检测,而不能对全血样本进行检测的缺点。

[0055] 由于磁颗粒易沉淀,传统化学发光仪采用手工混合,并以持续振荡维持磁颗粒的悬浮状态,但微流控芯片内磁颗粒混匀操作难以在小型便携仪器中实现。

[0056] 本发明将磁颗粒包被、干燥于微流控芯片沟道中,并设计了磁铁主动驱动磁颗粒

(而传统微流控芯片一般采用流体驱动或电驱动),从而使磁颗粒复溶,并在微流控芯片不同区域实现免疫反应、清洗、发光。此设计不仅解决了磁颗粒应用于微流控芯片时易沉淀、重复性差等问题,还实现了更可控的免疫反应和物理清洗,提高了灵敏度和重复性。其中磁铁磁性和磁颗粒尺寸对检测效果有明显影响,本发明选择磁铁磁感应强度为 500-30000 高斯,优选 1000-8000 高斯;磁颗粒尺寸为 0.1-10  $\mu\text{m}$ ,优选 0.5-3  $\mu\text{m}$ 。

[0057] 本发明中微流控芯片配套仪器与微流控芯片无液体接触,无需要清洗的部件,避免了传统大型化学发光仪需要搅拌或加样、清洗等操作而产生的交叉干扰及污染。

[0058] 所以本发明并非简单叠加磁微粒化学发光技术和微流控芯片技术,而是通过液体密封设计、沟道设计,把检测所需所有化学组分集成、内置到微流控芯片中,并以磁铁主动驱动,实现一键式的磁微粒化学发光免疫检测,从而在便携配套仪器中实现全血中分析物的快速、高灵敏度、准确定量检测。

[0059] 本发明的主要优点如下:

[0060] 1) 本发明采用化学发光方法,具有背景低、灵敏度高、线性范围宽的优点。

[0061] 2) 本发明采用磁颗粒技术,具有磁富集功能,增强并放大信号;并能利用磁铁把磁颗粒转移区域(如由包被区-清洗区-检测区),减少样本基质的影响。

[0062] 3) 本发明采用微流控芯片技术,把样本混合、反应、分离和检测集成在芯片上,并把反应所需的所有试剂组分集成到芯片上。

[0063] 4) 本发明操作简便,检测时,只需加入样本,盖上盖子,把芯片放入小型便携配套仪器中即可。

[0064] 5) 本发明配套仪器是小型便携仪器,仪器只与芯片发生物理接触,芯片内液体不与仪器接触,不会污染仪器而产生交叉干扰。

## 附图说明

[0065] 图 1 为微流控芯片基板示意图,其中 1 为芯片基板,2 为过滤区,3 为包被区,4 为标记配体存储池,5 为反应区,6 为清洗区,7 为检测区,8 为液体释放通道,9 为清洗液存储池,10 为发光基底液存储池,11 为废液池。

[0066] 图 2 为微流控芯片整体结构示意图,其中 1 为芯片基板,12 为顶部胶带,13 为加样口,14 为发光基底液和清洗液存储池让位孔,15 为底部胶带。

[0067] 图 3 为微流控芯片基板示意图,其中 1 为芯片基板,2 为过滤区,3 为包被区,4 为标记配体存储池,5 为反应区,6 为清洗区,7 为检测区,8 为液体释放通道,9 为清洗液存储池,10 为发光基底液存储池,11 为废液池。

[0068] 图 4 为双发光基底液存储池的微流控芯片基板示意图,其中 16 为发光基底液存储池 A,17 为发光基底液存储池 B,18 为预混合通道。

## 具体实施方式

[0069] 本发明公开了一种用于全血样品检测的磁微粒化学发光微流控芯片,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内

对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0070] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案,下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明。

[0071] 实施例 1:双抗体夹心测定超敏肌钙蛋白 T(cTnT)

[0072] (一) 抗体标记

[0073] 取 5  $\mu$ g HRP 溶解于 1mL 蒸馏水中,再加入 0.2mL 0.1M 新配  $\text{NaIO}_4$  溶液,室温避光反应 20min 后,以 1mM pH4.4 醋酸钠缓冲液透析纯化溶液。再以 0.2M pH9.5 碳酸盐缓冲液调节 pH 至 9.0,加入 10  $\mu$ g 抗 cTnT 单抗,室温避光反应 2h。加 0.1mL 新配的 4mg/mL  $\text{NaBH}_4$  液,混匀,于 4 $^\circ\text{C}$  反应 2h。将上述溶液装入透析袋,以 0.15M pH7.4 PBS 透析,4 $^\circ\text{C}$  过夜,得到 HRP 标记 cTnT 抗体。

[0074] 向 1ml 10mM pH7.4 磷酸缓冲液中加入 1mg 磁颗粒(尺寸为 2  $\mu$ m)、10  $\mu$ g EDC 和 15  $\mu$ g NHS 溶液和 15  $\mu$ g 抗 cTnT 单抗(与 HRP 标记的抗体不同)溶液,混合均匀并于室温下反应 4h,加入 1mg 甘氨酸封闭。以磁铁富集,去除未反应的抗 cTnT 单抗,得到磁颗粒标记 cTnT 抗体。

[0075] (二) 微流控芯片组装

[0076] HRP 标记 cTnT 抗体溶液中含 0.1% 牛血清白蛋白、0.1% 吐温 20 和 0.01% Proclin300 的 pH7.4 磷酸缓冲液;磁颗粒标记 cTnT 抗体溶液为包含 0.5% 牛血清白蛋白、0.1% 酪蛋白、0.2% 吐温 20 和 0.01% Proclin300 的 pH7.4 磷酸缓冲液。

[0077] 清洗液为包含 0.2% BSA、0.5% 吐温 20 和 0.01% Proclin300 的 pH7.4 磷酸缓冲液。发光基底液分 A 液和 B 液,A 液为含鲁米诺的酸性溶液,B 液为含苯衍生物的碱性溶液。

[0078] 将 HRP 标记抗体溶液放入顶板酶标配体存储池(4)中,密封。将磁颗粒标记抗体溶液放入底板包被区(3)中,室温干燥。将清洗液注入清洗液存储池(9)中,将发光基底液的 A 液和 B 液分别注入发光基底液存储池 A(16)和发光基底液存储池 B(17),密封。按图 1 所示,将滤血膜粘入底板过滤区中,将存储池内置入底板。然后按图 2 所示,组装成微流控芯片。装入铝箔袋中,密封 4 $^\circ$  保存。

[0079] (三) 样本检测

[0080] 用正常人血浆作稀释液,将 cTnT 标准品稀释成如下浓度:0pg/ml、5pg/ml、50pg/ml、500pg/ml、1ng/ml 和 10ng/ml。

[0081] 将微流控芯片放入配套仪器(磁铁磁感应强度为 6000 高斯)中,往加样口滴入 50  $\mu$ l 样本。样本过滤后,到达微通道,溶解磁颗粒并反应,然后磁铁收集磁颗粒。存储池释放 HRP 标记单抗,并使磁颗粒复合物和 HRP 标记单抗反应,形成夹心结果复合物。清洗液存储池释放清洗液,将磁颗粒清洗后,发光基底液释放,仪器检测系统检测发光信号强度。总检测时间 15min。每个样本分别用 3 个微流控芯片测定 3 次,取平均值,绘制标准曲线。

[0082] 将 50  $\mu$ l 全血样本滴加到加样口,15 分钟内仪器检测系统检测发光信号强度,依据标准曲线获得样本中 cTnT 浓度。

[0083] 检测原理为:当全血加入微流控芯片后,经过滤区后,到达微通道,血浆溶解磁标记抗体,磁铁加速样本反应,然后磁铁收集磁颗粒。存储池释放 HRP 标记单抗,并使磁颗粒复合物和 HRP 标记单抗反应,当血样中含有 cTnT,则形成 HRP 标记抗体-cTnT-磁颗粒标记抗体的三明治结构(双抗体夹心法)。经清洗后,在发光基底液作用下发光,仪器检测系统

测试发光信号。依据配套仪器获取的标准曲线,进而分析血样中 cTnT 浓度。样本中 cTnT 含量越高,则发光信号越强。

[0084] 结果表明,其最低检测限为 5pg/ml,最低定量限为 30pg/ml,定量检测范围为 5 ~ 10000pg/ml,线性相关系数  $R^2 > 0.99$ ;在检测范围内,未出现 HOOK 效应;且批内与批间重复性均小于 10%。可为心梗心衰疾病诊断提供参考。

[0085] 实施例 2:竞争法测定他克莫司血药浓度

[0086] (一) 抗体 / 抗原标记

[0087] 称取 ALP0.1mg 溶于 0.1ml 12.5%戊二醛的 pH6.8 0.1M PBS 溶液中,室温过夜。反应后的酶溶液经 SephadexG-25 层析柱,用生理盐水洗脱,收集棕色液。搅拌下将 22.5  $\mu$ g 抗他克莫司抗体逐滴加入酶溶液中,反应 3h。加 0.2M 赖氨酸封闭,混匀后,置室温 2h。在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置 4 $^{\circ}$ C 1h。3000rpm/min 离心 30min,弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于 0.15M pH7.4 PBS 中。将上述溶液装入透析袋中,对 0.15M pH7.4 PBS 缓冲液透析,去除铵离子后,10000rpm/min 离心除沉淀,上清液即为 ALP 标记抗他克莫司抗体。

[0088] 向 1ml 10mM pH7.4 磷酸缓冲液中加入 1mg 磁颗粒(尺寸为 0.5  $\mu$ m)、10  $\mu$ g EDC 和 15  $\mu$ g NHS 溶液和 20  $\mu$ g 链霉亲和素,混合均匀并于室温下反应 4h,加入 1mg 甘氨酸封闭。以磁铁吸附富集,去除未反应的链霉亲和素,得到磁颗粒标记链霉亲和素。

[0089] 将 10  $\mu$ g 他克莫司抗原加入 5  $\mu$ L 0.25mg/mL Sulfo-NHS-LC-biotin 溶液中,反应 1h。以超滤离心管纯化,去除未反应的生物素。得到生物素化的抗原。

[0090] 通过亲和素 - 生物素间的相互作用,把抗原连接到磁颗粒表面。其中亲和素标记的磁颗粒和生物素化的抗体比例为 1 :  $10^4$ 。

[0091] (二) 微流控芯片组装

[0092] ALP 标记抗他克莫司抗体溶液中含 0.1%牛血清白蛋白、吐温 20 和 Proclin300 的 pH7.4 Tris-HCl 缓冲液;磁颗粒标记配体溶液包含 0.5%牛血清白蛋白、0.2%酪蛋白、0.1%吐温 20 和 0.02% Proclin300 的 pH7.4 Tris-HCl 缓冲液。

[0093] 清洗液为包含 0.2% BSA、0.5%吐温 20、0.5%曲拉通 X-100 和 0.01% Proclin300 的 pH7.4Tris-HCl 缓冲液。发光基底液分 A 液和 B 液,A 液为含金刚烷的酸性溶液,B 液为碱性溶液。

[0094] 将 ALP 标记抗体溶液放入顶板酶标配体存储池 (5) 中,密封。将他克莫司标记的磁颗粒溶液放入底板包被区 (7) 中,室温干燥。将清洗液注入清洗液存储池 (9) 中,将发光基底液的 A 液和 B 液分别注入发光基底液存储池 A(16) 和发光基底液存储池 B(17),密封。按图 1 所示,将滤血膜粘入底板过滤区中,将存储池内置入底板。然后按图 2 所示,组装成微流控芯片。装入铝箔袋中,密封 4 $^{\circ}$  保存。

[0095] (三) 样本检测

[0096] 用磷酸缓冲液作稀释液,将他克莫司标准品配制系列浓度标准品溶液如下:0ng/mL、0.1ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL。

[0097] 将微流控芯片放入配套仪器(磁铁磁感应强度为 2000 高斯)中,往加样口滴入 50  $\mu$ l 标准品,样本过滤后,到达微通道,溶解磁颗粒并反应,然后磁铁收集磁颗粒。存储池释放 ALP 标记他克莫司,并与磁颗粒复合物反应,ALP 标记他克莫司竞争与他克莫司结合的

磁颗粒标记抗体。清洗液存储池释放清洗液,将磁颗粒清洗后,发光基底液释放,仪器检测系统检测发光信号强度。总检测时间 15min。每个样本分别用 3 个微流控芯片测定 3 次,取平均值,绘制标准曲线。

[0098] 将 50  $\mu$ l 全血样本滴入加样口,15 分钟内仪器检测系统检测发光信号强度,依据标准曲线获得样本中他克莫司浓度。

[0099] 检测原理为:当样本加入微流控芯片,经过滤区后到达微通道,样本溶解磁颗粒标记抗体。当样本中含有他克莫司,则他克莫司与磁颗粒标记抗体反应。磁铁收集磁颗粒。存储池释放 ALP 标记他克莫司,ALP 标记他克莫司竞争与他克莫司结合的磁颗粒标记抗体(竞争法)。经清洗后,在发光基底液作用下发光,仪器检测系统测试发光信号。依据配套仪器获取的标准曲线,进而分析样本中他克莫司浓度。样本中他克莫司含量越高,则发光信号越弱。

[0100] 结果表明,他克莫司最低检测限为 0.1ng/mL,最低定量限为 0.2ng/mL,检测范围内的线性相关系数  $R^2 > 0.96$ ,在定量检测范围内,未出现 HOOK 效应;且批内与批间重复性均小于 12%,可用于他克莫司血药浓度检测。

[0101] 实施例 3:磁微粒颗粒尺寸筛选

[0102] 其他的实验条件参见实施例 1,磁颗粒尺寸和磁铁磁感应强度按照以下方案进行。

[0103] 颗粒尺寸为 0.1  $\mu$ m、0.5  $\mu$ m、1.1  $\mu$ m、1.5  $\mu$ m、2.5  $\mu$ m、3  $\mu$ m、10  $\mu$ m。磁铁磁感应强度为 500 高斯、1000 高斯、4000 高斯、8000 高斯、12000 高斯、30000 高斯。分别以这六种磁铁分别驱动七种尺寸的磁颗粒。

[0104] 实验结果显示:0.1  $\mu$ m 磁颗粒和 500 高斯磁铁组合时,其最低检测限为 50pg/ml,定量检测范围为 50 ~ 5000pg/ml,线性相关系数  $R^2 > 0.90$ ;批内与批间重复性均小于 20%。即:化学发光信号较弱,灵敏度不高,重复性较差。

[0105] 10  $\mu$ m 磁颗粒和 30000 高斯磁铁组合时,其最低检测限为 100pg/ml,定量检测范围为 100 ~ 5000pg/ml,线性相关系数  $R^2 > 0.92$ ;批内与批间重复性均小于 20%。即:阴性样本信号较高(清洗不充分),线性范围不宽。

[0106] 0.5 ~ 3  $\mu$ m 的磁颗粒为和 1000 ~ 8000 高斯的磁铁组合使用时,其最低检测限均小于 20pg/ml,定量检测范围可达到 10 ~ 10000pg/ml,线性相关系数  $R^2 > 0.97$ ;批内与批间重复性均小于 12%。满足为临床心梗心衰疾病诊断提供参考的需要。

[0107] 根据以上结果,磁颗粒尺寸优选 0.5 ~ 3  $\mu$ m,磁铁磁感应强度优选 1000 ~ 8000 高斯。可根据磁颗粒所用尺寸,进一步确定磁铁磁感应强度。

[0108] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

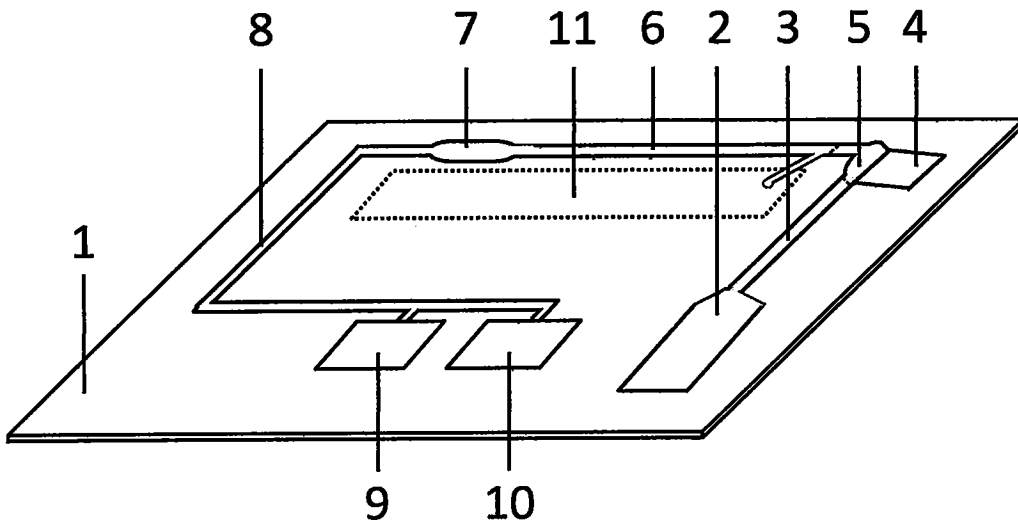


图 1

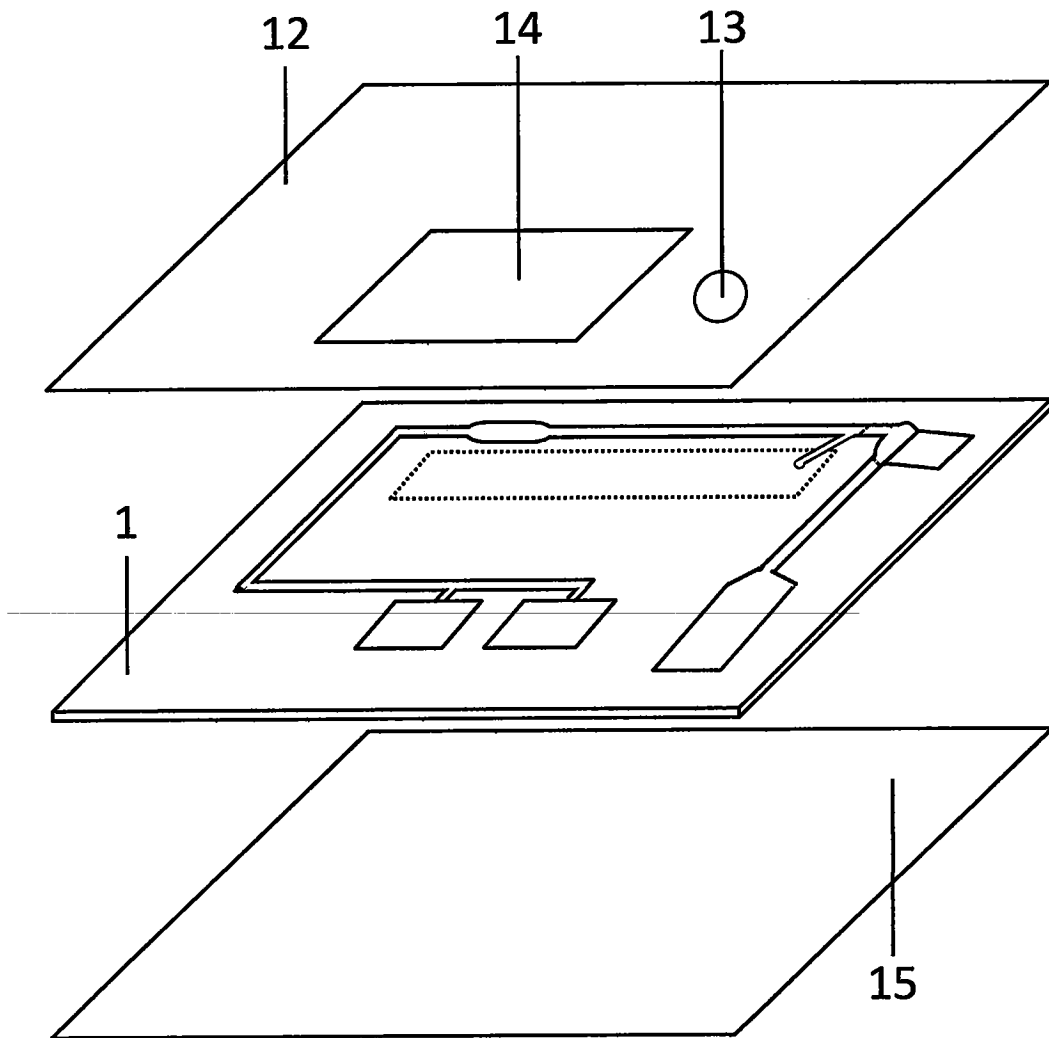


图 2

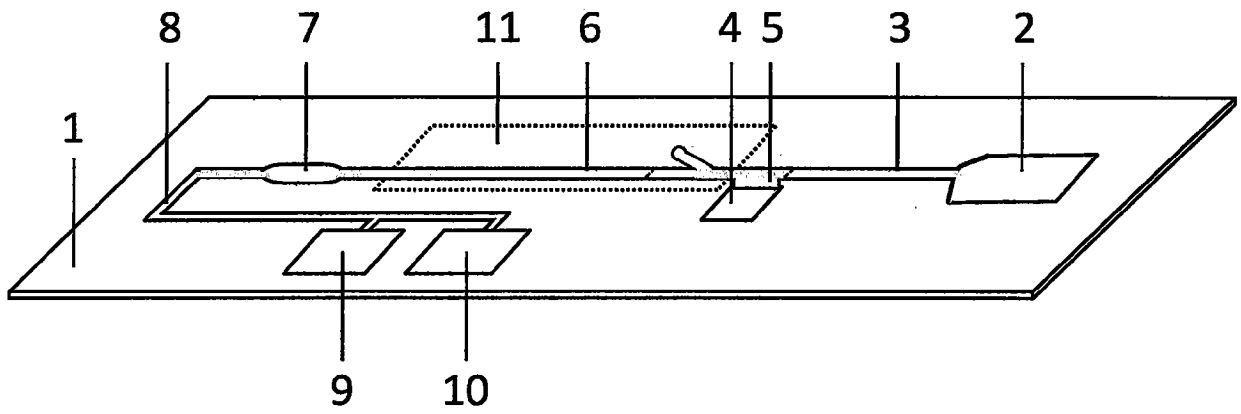


图 3

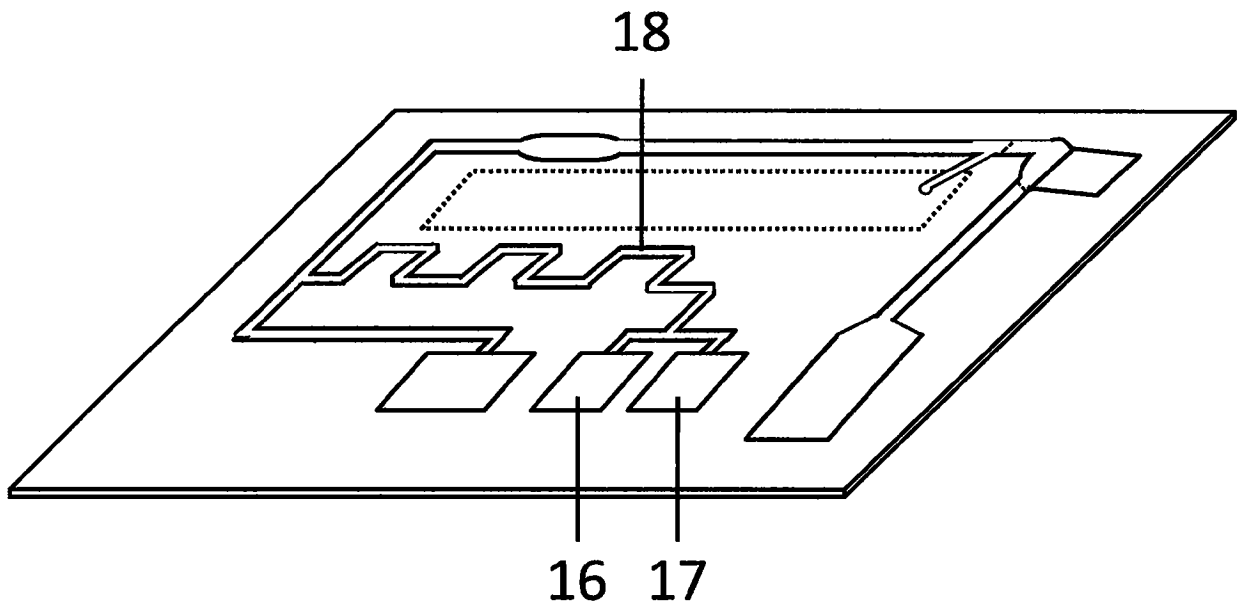


图 4

专利名称(译)	一种用于全血样品检测的磁微粒化学发光微流控芯片		
公开(公告)号	<a href="#">CN105241871A</a>	公开(公告)日	2016-01-13
申请号	CN201510696706.0	申请日	2015-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	深圳华迈兴微医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳华迈兴微医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳华迈兴微医疗科技有限公司		
[标]发明人	王东 李泉		
发明人	王东 李泉		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/53		
其他公开文献	CN105241871B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种用于全血样品检测的磁微粒化学发光微流控芯片，所述芯片由顶部胶带(12)、芯片基板(1)和底部胶带(15)构成，其中芯片基板上的过滤区(2)、包被区(3)、反应区(5)、清洗区(6)、检测区(7)、液体释放通道(8)依次连接，芯片基板上标记配体存储池(4)与反应区(5)连接，检测区(7)分别与清洗液存储池(9)和发光基底液存储池(10)通过液体释放通道(8)连接，顶部胶带包含加样口(13)；所述包被区(3)中包被磁颗粒标记配体；标记配体存储池(4)存储酶或发光剂标记配体。

