



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108181458 A

(43)申请公布日 2018.06.19

(21)申请号 201810159949.4

(22)申请日 2018.02.26

(71)申请人 北京华科泰生物技术有限公司
地址 101111 北京市通州区科创东五街2号
14幢4层F4E

(72)发明人 林斯

(74)专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 张瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

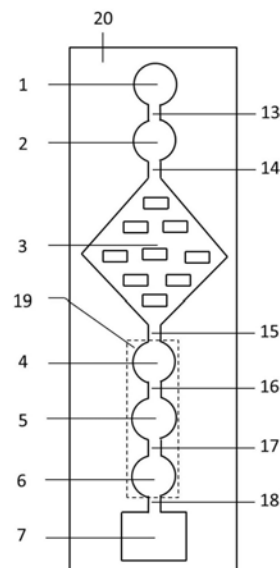
权利要求书3页 说明书10页 附图4页

(54)发明名称

一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明涉及一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片,包括:芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片,所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、至少两个检测区、质控区及废液收集区;所述上层盖片上设有加样孔、至少两个检测窗口、质控窗口、通气孔,并且与所述加样区、检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应。本发明还提供了上述微流控芯片的制备方法和用途。本发明在检测区和质控区设有免疫磁微球,便于将待测物质固定到相应检测区内,降低非特异性造成的干扰,提高灵敏度。



1. 一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片,其特征在于,包括:芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片;

所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、至少两个检测区、质控区及废液收集区;

所述上层盖片上设有加样孔、至少两个检测窗口、质控窗口、通气孔,并且与所述加样区、检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应。

所述检测区和质控区的下侧设有由永磁铁或电磁铁提供的磁场区域。

2. 根据权利要求1所述的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片,其特征在于,所述抗体包被区预存储有荧光微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的一株抗体或抗原和荧光微球标记的兔IgG,所述荧光微球标记的抗体或抗原分别与荧光微球标记的兔IgG的摩尔比为(0.5~4):1;所述质控区预存储有磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片,其特征在于,每个检测区分别预存储有磁性微球标记的相应待测物的另一株抗体或抗原,所述磁性微球与抗原或抗体的质量比为10:0.05~2。

4. 根据权利要求3所述的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片,其特征在于,所述磁性微球为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co微球,或者为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与无机物或有机物形成的核/壳结构或掺杂结构的微球,所述 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与所述无机物或有机物的重量百分比为1:(0.001-1000);所述磁性微球的粒径大小为0.05-5 μm 。

5. 根据权利要求1所述的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片,其特征在于,所述检测区和质控区的表面设置为粗糙结构,所述粗糙结构为向下凹的半圆结构、锯齿形结构、凹凸的小矩形结构或其他不规则结构;

所述微混合区为棱形、圆形、方形或矩形,并且其内部设有n个交错设置的矩形、棱形、方形或圆形的柱体;或者所述微混合区为至少一个矩形串联结构,并且每个矩形中设有一个矩形柱体;或者所述微混合区为锯齿形结构;或者所述微混合区为至少一个正三角形或倒三角形串联结构,并且每个三角形中设置有一个相应正三角或者倒三角形柱体;或者所述微混合区为至少一个棱形结构串联,并且棱形结构中设置有一个棱形或圆形柱体;或者所述微混合区为至少一个圆形结构串联,并且圆形结构中设置有一个圆形柱体。

6. 权利要求1~5任一项所述的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 在芯片基板上开设一个所述微流控检测通道;

2) 将荧光微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的一株抗体和荧光微球标记的兔IgG进行混合,将混合物存储在抗体包被区中,干燥;

3) 将磁性微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的另一株抗体或抗原分别预存储在相应的待测物的检测区中,干燥;

4) 将磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体预存储在质控区中,干燥;

5) 将上层盖片盖合于芯片基板的上方;

6) 在芯片基板的下方对应所述微流控芯片的待测物检测区和质控区设置磁场。

7. 一种权利要求1~5任一项所述的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片在用于夹心

法联合检测、竞争法联合检测或夹心法和竞争法的联合检测中的应用。

8. 一种权利要求1~5任一项所述的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的检测方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

1) 将微流控芯片置于配套的仪器中, 启动电磁铁, 若为永磁铁则不需要启动, 使检测区和质控区中的免疫磁性微球平铺固定到相应区域的底面;

2) 从加样孔加入检测样本, 该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区, 复溶预存储在抗体包被区中的荧光微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的一株抗体和荧光微球标记的兔IgG, 得到混合物;

3) 随后, 步骤2) 中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区, 在微混合区中不同的待测物分别与相应的荧光微球标记的待测物的一株抗体进行充分反应, 形成不同待测物的荧光微球标记的免疫复合物, 且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

4) 步骤3) 中反应后形成的不同待测物的免疫复合物和未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道依次进入到至少两个检测区和质控区内, 不同待测物的荧光微球标记的免疫复合物分别与磁性微球标记的相应待测物的另一株抗体发生免疫反应, 并停留在相应的待测物检测区内; 荧光微球标记的兔IgG与质控区中磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体发生免疫反应而停留在质控区中, 剩余液体流入废液收集区中;

5) 检测区和质控区的荧光微球均显示一定的荧光信号, 并且不同待测物检测区与质控区荧光信号的比值与相应待测物的浓度具有正相关性, 通过标准曲线计算即可得出相应待测物的浓度。

9. 一种权利要求1~5任一项所述的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的检测方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

1) 将微流控芯片置于配套的仪器中, 启动电磁铁, 若为永磁铁则不需要, 使检测区和质控区中的免疫磁性微球平铺固定到相应区域的底面;

2) 从加样孔加入检测样本, 该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区, 复溶预存储在抗体包被区中荧光微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的一株抗体和荧光微球标记的兔IgG, 得到混合物;

3) 随后, 步骤2) 中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区, 在微混合区中不同的待测物分别与相应的荧光微球标记的待测物的一株抗体进行充分反应, 形成不同待测物的荧光微球标记的免疫复合物, 且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

4) 步骤3) 中反应后形成的免疫复合物、未参加反应的不同待测物的荧光微球标记的一株抗体和未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道依次进入到至少两个检测区和质控区内, 未发生免疫反应的不同待测物的荧光微球标记的待测物的一株抗体分别与磁性微球标记的相应待测物的完全抗原发生免疫反应, 并且停留在不同待测物的检测区内; 荧光微球标记的兔IgG与质控区中磁性微球标记的羊抗兔多抗发生免疫反应而停留在质控区内, 剩余液体流入废液收集区中;

5) 检测区和质控区的荧光微球均显示一定的荧光信号, 并且不同待测物检测区与质控区荧光信号的比值与相应待测物的浓度具有负相关性, 通过标准曲线计算即可得出相应待测物的浓度。

10. 一种权利要求1~5任一项所述的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的检测方

法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要,使检测区和质控区中的免疫磁性微球平铺固定到相应区域的底面;

2) 从加样孔加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区,复溶预存储在抗体包被区中荧光微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的一株完全抗原和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区,并且混合物之间不发生反应,均匀混合后继续通过毛细管微通道依次进入到至少两个检测区和质控区内,不同待测物与荧光微球标记的相应待测物的一株完全抗原竞争与磁性微球标记的相应待测物的一株抗体发生免疫反应,并且停留在相应待测物的检测区内;荧光微球标记的兔IgG与质控区中磁性微球标记的羊抗兔多抗发生免疫反应而停留在质控区内,剩余液体流入废液收集区中;

4) 检测区和质控区的荧光微球均显示一定的荧光信号,并且不同待测物检测区与质控区荧光信号的比值与相应待测的浓度具有负相关性,通过标准曲线计算即可得出相应待测物的浓度。

一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断领域,具体涉及一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 近年来,生物分析技术领域得到了快速的发展,出现了很多重要的研究方向。微流控芯片分析技术是其中最活跃的一支,在科研和应用领域都获得了广泛的重视。微流控芯片作为一种新型的分析检测平台,具有高通量、集成化、便携式、易操作、低成本等优点,已经在众多领域中得到了广泛的应用。

[0003] 以往在免疫层析试纸条或微流控中采用的磁分离荧光微球技术,由于在免疫反应和滚动过程中,大量的荧光微球会处于磁性微球的下侧,导致磁性微球遮挡部分荧光信号,使得荧光信号的采集收到的干扰,进而极大的影响检测的灵敏度。

[0004] 此外,以往的微流控芯片都是采用在一个圆盘上开设多条微流控通道来实现联合检测,此方法微流控的制备过程繁琐,并且检测时需要的样品量较大。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片及其制备方法和用途。

[0006] 为了达到上述的目的,本发明提供了一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片,包括:芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片,

[0007] 所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、至少两个检测区、质控区及废液收集区;

[0008] 所述上层盖片上设有加样孔、至少两个检测窗口、质控窗口、通气孔,并且与所述加样区、检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应。

[0009] 进一步地,其中所述检测区和质控区的下侧设有由永磁铁或电磁铁提供的磁场区域。

[0010] 进一步地,其中所述抗体包被区预存储有荧光微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的一株抗体或抗原和荧光微球标记的兔IgG,所述荧光微球标记的抗体或抗原分别与荧光微球标记的兔IgG的摩尔比为(0.5~4):1。

[0011] 进一步地,其中每个检测区分别预存储有磁性微球标记的相应待测物的另一株抗体或抗原,所述磁性微球与抗原或抗体的质量比为10:0.05~2。

[0012] 进一步地,其中所述磁性微球为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co微球,或者为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与无机物或有机物形成的核/壳结构或掺杂结构的微球,所述 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与所述无机物或有机物的重量百分比为1:(0.001-1000);所述磁性微球的粒径大小为0.05-5 μm 。

[0013] 进一步地,其中所述质控区预存储有磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体。

[0014] 进一步地,其中所述检测区和质控区的表面设置为粗糙结构,所述粗糙结构为向下凹的半圆结构、锯齿形结构、凹凸的小矩形结构或其他不规则结构;

[0015] 所述微混合区为棱形、圆形、方形或矩形,并且其内部设有n个交错设置的矩形、棱形、方形或圆形的柱体;或者所述微混合区为至少一个矩形串联结构,并且每个矩形中设置有一个矩形柱体;或者所述微混合区为锯齿形结构;或者所述微混合区为至少一个正三角形或倒三角形串联结构,并且每个三角形中设置有一个相应正三角或者倒三角形柱体;或者所述微混合区为至少一个棱形结构串联,并且棱形结构中设置有一个棱形或圆形柱体;或者所述微混合区为至少一个圆形结构串联,并且圆形结构中设置有一个圆形柱体。

[0016] 本发明还提供了上述基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的制备方法,包括如下步骤:

[0017] 1) 在芯片基板上开设一个所述微流控检测通道;

[0018] 2) 将荧光微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的一株抗体和荧光微球标记的兔IgG进行混合,将混合物存储在抗体包被区中,干燥;

[0019] 3) 将磁性微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的另一株抗体或抗原分别预存储在相应的待测物的检测区中,干燥;

[0020] 4) 将磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体预存储在质控区中,干燥;

[0021] 5) 将上层盖片盖合于芯片基板的上方;

[0022] 6) 在芯片基板的下方对应所述微流控芯片的待测物检测区和质控区设置磁场。

[0023] 本发明还提供了上述基于荧光免疫联合检测的微流控芯片在用于夹心法联合检测、竞争法联合检测或夹心法和竞争法的联合检测中的应用。

[0024] 本发明进一步提供了一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的检测方法,包括如下步骤:

[0025] 1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要启动,使检测区和质控区中的免疫磁性微球平铺固定到相应区域的底面;

[0026] 2) 从加样孔加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区,复溶预存储在抗体包被区中的荧光微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的一株抗体和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

[0027] 3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区,在微混合区中不同的待测物分别与相应的荧光微球标记的待测物的一株抗体进行充分反应,形成不同待测物的荧光微球标记的免疫复合物,且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

[0028] 4) 步骤3)中反应后形成的免疫复合物和未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道依次进入到至少两个检测区和质控区内,不同待测物的荧光微球标记的免疫复合物分别与磁性微球标记的相应待测物的另一株抗体发生免疫反应,并停留在相应的待测物检测区内;荧光微球标记的兔IgG与质控区中磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体发生免疫反应而停留在质控区中,剩余液体流入废液收集区中;

[0029] 5) 检测区和质控区的荧光微球均显示一定的荧光信号,并且不同待测物检测区与质控区荧光信号的比值与相应待测物的浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出相应待测物的浓度。

[0030] 本发明还提供了另一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的检测方法,包括如下步骤:

[0031] 1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要,使检测区和质控区中的免疫磁性微球固定到相应区域的底面;

[0032] 2) 从加样孔加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区,复溶预存储在抗体包被区中荧光微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的一株抗体和荧光微球标记的IgG,得到混合物;

[0033] 3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区,在微混合区中不同的待测物分别与相应的荧光微球标记的待测物的一株抗体进行充分反应,形成不同待测物的荧光微球标记的免疫复合物,且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

[0034] 4) 步骤3)中反应后形成的不同待测物的荧光微球标记的免疫复合物、未参加反应的不同待测物的荧光微球标记的一株抗体和未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道依次进入到至少两个检测区和质控区内,未发生免疫反应的不同待测物的荧光微球标记的待测物的一株抗体分别与磁性微球标记的相应待测物的完全抗原发生免疫反应,并且停留在不同待测物的检测区内;荧光微球标记的兔IgG与质控区中磁性微球标记的羊抗兔多抗发生免疫反应而停留在质控区内,剩余液体流入废液收集区中;

[0035] 5) 检测区和质控区的荧光微球均显示一定的荧光信号,并且不同待测物检测区与质控区荧光信号的比值与相应待测物的浓度具有负相关性,通过标准曲线计算即可得出相应待测物的浓度。

[0036] 本发明还提供了又一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的检测方法,包括如下步骤:

[0037] 1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要,使检测区和质控区中的免疫磁性微球固定到相应区域的底面;

[0038] 2) 从加样孔加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区,复溶预存储在抗体包被区中荧光微球标记的至少两种具有联合检测价值的待测物的一株完全抗原和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

[0039] 3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区,并且混合物之间不发生反应,均匀混合后继续通过毛细管微通道依次进入到至少两个检测区和质控区内,样本中不同的待测物和荧光微球标记的相应待测物的一株完全抗原分别竞争与磁性微球标记的相应待测物的一株抗体发生免疫反应,并且停留在不同待测物的检测区内;荧光微球标记的兔IgG与质控区中磁性微球标记的羊抗兔多抗发生免疫反应而停留在质控区内,剩余液体流入废液收集区中;

[0040] 4) 检测区和质控区的荧光微球均显示一定的荧光信号,并且不同待测物检测区与质控区荧光信号的比值与相应待测物的浓度具有负相关性,通过标准曲线计算即可得出相应待测物的浓度。

[0041] 本发明的有益效果在于:

[0042] 1. 本发明设置的微混合区便于待测物质与相应抗原或抗体之间进行充分结合,提高检测的灵敏度;

[0043] 2. 本发明在检测区和质控区中分别设有免疫磁微球,在检测区和质控区的下方设

置了磁场区域,便于将待测物质固定到相应检测区内,并且检测区和质控区表面设置成粗糙结构,用于增大摩擦力,防止磁珠滚动;降低非特异性造成的干扰,提高检测灵敏度;

[0044] 3.本发明在免疫反应前将免疫磁珠平铺固定到检测区或质控区表面,免疫反应后使荧光微球均置于免疫磁珠的上表面,避免了磁性微球遮挡荧光微球而对荧光信号造成干扰;

[0045] 4.本发明能够实现联合检测,样本用量少,节约时间,提高检测效率。

附图说明

[0046] 图1A为本发明的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片中芯片基板的结构示意图;

[0047] 图1B为本发明的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片中上层盖片的结构示意图;

[0048] 图2为本发明的免疫磁性微球与检测区或质控区的粗糙表面的接触示意图,其中,(1)免疫磁性微珠与向下凹的半圆结构的粗糙表面接触;(2)免疫磁性微珠与锯齿形结构的粗糙表面接触;(3)免疫磁性微珠与凹凸的矩形结构的粗糙表面接触;

[0049] 图3为本发明的基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的微混合区结构示意图,其中,(1)棱型结构,并且内部设有多个交错设置的棱形柱体;(2)棱型结构,并且内部设有多个交错设置的圆形柱体;(3)棱型结构,并且内部设有多个长条形柱体;(4)两个矩形串联结构,并且每个矩形中设有一个矩形柱体;(5)三个正三角形串联结构,并且每个正三角形中设有一个正三角形柱体;(6)三个倒三角形串联结构,并且每个倒三角形中设有一个倒三角形柱体;(7)锯齿形结构;(8)三个棱型串联结构,并且每个棱型中设置一个棱型柱体;(9)三个棱型串联结构,并且每个棱型中设置一个棱型柱体;

[0050] 图4为SAA的标准曲线;

[0051] 图5为CRP的标准曲线。

具体实施方式

[0052] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好的理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

[0053] 结合图1A及图1B所示,本发明提供了一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片,包括:芯片基板20及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片21,所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区1、抗体包被区2、微混合区3、第一检测区4、第二检测区5、质控区6、废液收集区7;上层盖片上设有加样孔8、第一检测窗口9、第二检测窗口10、质控窗口11、通气孔12,并且与芯片基板中加样区1、第一检测区4、第二检测区5、质控区6、废液收集区7的位置依次对应。第一检测区4、第二检测区5和质控区6下侧设有磁场区域19,磁场由永磁铁或电磁铁提供。

[0054] 其中加样区1和抗体包被区2通过毛细管微通道13连通,抗体包被区2和微混合区3通过毛细管微通道14连通,微混合区3与第一检测区4通过毛细管微通道15连通,第一检测区4和第二检测区5通过毛细管微通道16连通,第二检测区5和质控区6通过毛细管微通道17连通,质控区6和废液收集区7通过毛细管微通道18连通;

[0055] 抗体包被区2中预存储有荧光微球标记的第一待测物的一株抗体、荧光微球标记的第二待测物的一株抗体和荧光微球标记的兔IgG;第一检测区4中预存储磁性微球标记的

第一待测物的另一株抗体；第二检测区5中预存储磁性微球标记的第二待测物的另一株抗体；质控区6中预存储磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体；

[0056] 所述磁性微球为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co微球，或者为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与无机物或有机物形成的核/壳结构或掺杂结构的微球，所述 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与所述无机物或有机物的重量百分比为1：(0.001~1000)；所述磁性微球的粒径大小为0.05~5 μm 。

[0057] 结合图2所示，所述第一检测区4、第二检测区5和质控区6的表面设置为粗糙结构。所述粗糙结构为向下凹的半圆结构、锯齿形结构、凹凸的小矩形结构或其他不规则结构。

[0058] 结合图3所示，所述微混合区3为菱形、圆形、方形或矩形，并且其内部设有n个交错设置的矩形、菱形、方形或圆形的柱体；或者所述微混合区3为至少一个矩形串联结构，并且每个矩形中设有一个矩形柱体；或者所述微混合区3为锯齿形结构；或者所述微混合区3为至少一个正三角形或倒三角形串联结构，并且每个三角形中设置有一个相应正三角或者倒三角形柱体；或者所述微混合区3为至少一个菱形结构串联，并且菱形结构中设置有一个菱形或圆形柱体；或者所述微混合区为至少一个圆形结构串联，并且圆形结构中设置有一个圆形柱体；

[0059] 制备上述基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的方法，包括如下步骤：

[0060] 1) 在芯片基板20上开设一个所述微流控检测通道；

[0061] 2) 将荧光微球标记的第一待测物的一株抗体、荧光微球标记的第二待测物的一株抗体和荧光微球标记的兔IgG进行混合，将混合物预存储在抗体包被区2中，干燥；

[0062] 3) 将磁性微球标记的第一待测物的另一株抗体、磁性微球标记的第二待测物的另一株抗体分别预存储在相应的第一检测区4、第二检测区5中，干燥；

[0063] 4) 将磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体预存储在质控区6中，干燥；

[0064] 5) 将上层盖片21盖合于芯片基板20的上方；

[0065] 6) 在芯片基板20的下方对应所述微流控芯片的待测物检测区和质控区6设置磁场。

[0066] 上述基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的检测方法(夹心法检测过程)，包括如下步骤：

[0067] 1) 将微流控芯片置于配套的仪器中，启动电磁铁，若为永磁铁则不需要启动，使检测区和质控区中的免疫磁性微球固定到相应区域的底面；

[0068] 2) 从加样孔加入检测样本，该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区2，复溶预存储在抗体包被区2中的荧光微球标记的第一待测物的一株抗体、荧光微球标记的第二待测物的一株抗体和荧光微球标记的兔IgG，得到混合物；

[0069] 3) 随后，步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区3，在微混合区3中第一、第二待测物分别与相应的荧光微球标记的第一、第二待测物的一株抗体进行充分反应，形成第一、第二待测物的荧光微球标记的免疫复合物，且荧光微球标记的兔IgG未参加反应；

[0070] 4) 步骤3)中反应后形成的第一、第二待测物的免疫复合物和未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道依次进入到第一检测区4、第二检测区5和质控区6内，第一、第二待测物的荧光微球标记的免疫复合物分别与磁性微球标记的第一、第二待测物的

另一株抗体发生免疫反应,并分别停留在第一检测区4、第二检测区5内;荧光微球标记的兔IgG与质控区6中磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体发生免疫反应而停留在质控区6中,剩余液体流入废液收集区7中;

[0071] 5) 第一检测区4、第二检测区5和质控区6的荧光微球均显示一定的荧光信号,并且第一检测区4与质控区6的荧光信号的比值与第一待测物的浓度具有正相关性,第二检测区4与质控区6的荧光信号的比值与第一待测物的浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出第一待测物、第二待测物的浓度。

[0072] 上述基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的检测方法(竞争法检测过程),包括如下步骤:

[0073] 1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要,使第一检测区4、第二检测区5和质控区6中的免疫磁性微球固定到相应区域的底面;

[0074] 2) 从加样孔加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区,复溶预存储在抗体包被区2中荧光微球标记的第一待测物的一株抗体、荧光微球标记的第二待测物的一株抗体和荧光微球标记的IgG,得到混合物;

[0075] 3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区3,在微混合区3中第一、第二待测物分别与相应的荧光微球标记的第一、第二待测物的一株抗体进行充分反应,形成第一、第二待测物的荧光微球标记的免疫复合物,且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

[0076] 4) 步骤3)中反应后形成的第一、第二待测物的荧光微球标记的免疫复合物、未参加反应的第一、第二待测物的荧光微球标记的一株抗体和未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道依次进入到第一检测区4、第二检测区5和质控区6内,未发生免疫反应的荧光微球标记的第一待测物的一株抗体与第一检测区4中预存有磁性微球标记的第一待测物完全抗原反应而停留在第一检测区4中,未发生免疫反应的荧光微球标记的第二待测物的一株抗体与第二检测区5中预存有磁性微球标记的第二待测物完全抗原反应而停留在第二检测区5中,荧光微球标记的兔IgG与质控区6中磁性微球标记的羊抗兔多抗发生免疫反应而停留在质控区6内,剩余液体流入废液收集区7中;

[0077] 5) 第一检测区4、第二检测区5和质控区6的荧光微球均显示一定的荧光信号,并且第一检测区4与质控区6的荧光信号的比值与第一待测物的浓度具有负相关性,第二检测区4与质控区6的荧光信号的比值与第一待测物的浓度具有负相关性,通过标准曲线计算即可得出第一待测物和第二待测物的浓度。

[0078] 上述基于荧光免疫联合检测的微流控芯片的检测方法(竞争法联合检测过程),包括如下步骤:

[0079] 1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要,使检测区和质控区中的免疫磁性微球固定到相应区域的底面;

[0080] 2) 从加样孔加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区2,复溶预存储在抗体包被区2中荧光微球标记的第一待测物的一株完全抗原、荧光微球标记的第二待测物的一株完全抗原和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

[0081] 3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区3,并且混合物之间不发生反应,均匀混合后继续通过毛细管微通道依次进入到第一检测区4和第二检测

区5和质控区6内,第一待测物与荧光微球标记的第一待测物的一株完全抗原竞争与第一检测区4中磁性微球标记的第一待测物的一株抗体发生免疫反应而停留在第一检测区4内;第二待测物与荧光微球标记的第二待测物的一株完全抗原竞争与第二检测区5中磁性微球标记的第二待测物的一株抗体发生免疫反应而停留在第二检测区5内;荧光微球标记的兔IgG与质控区6中磁性微球标记的羊抗兔多抗发生免疫反应而停留在质控区6内,剩余液体流入废液收集区7中;

[0082] 4) 第一检测区4、第二检测区5和质控区6的的荧光微球显示一定的荧光信号,并且第一检测区4与质控区6的荧光信号的比值与第一待测物的浓度具有负相关性,第二检测区4与质控区6的荧光信号的比值与第一待测物的浓度具有负相关性,通过标准曲线计算即可得出第一待测物和第二待测物的浓度。

[0083] 实施例1

[0084] 以下,以用于检测血清淀粉样蛋白A (SAA) 和全程C-反应蛋白 (CRP) 的微流控芯片为例,对本发明进行说明:

[0085] 1、抗体包被区的处理

[0086] 1.1荧光微球标记一株鼠抗人SAA单克隆抗体

[0087] 取5mL 0.01g/mL的乳胶荧光微球放入小离心管中,按照12000r/min的转速离心20min,移除上层清液后,用5mL的碳酸钠缓冲溶液进行复溶,随后加入5mg的碳二亚胺(EDC)、5mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1mL一株鼠抗人SAA单克隆抗体在25℃下搅拌6h,继续加入2.5mg的赖氨酸在室温下搅拌20min,将混合物放入透析袋中在4℃下透析12h;透析结束后将混合溶液在12000r/min的转速下离心10min,移去上层清液,最后用20mL的LM缓冲溶液复溶,待用。

[0088] 1.2荧光微球标记一株鼠抗人CRP单克隆抗体

[0089] 取5mL 0.01g/mL的乳胶荧光微球放入小离心管中,按照12000r/min的转速离心20min,移除上层清液后,用5mL的碳酸钠缓冲溶液进行复溶,随后加入5mg的EDC、5mg的NHS和1mL一株鼠抗人CRP单克隆抗体在25℃下搅拌6h,继续加入2.5mg的赖氨酸在室温下搅拌20min,将混合物放入透析袋中在4℃下透析12h;透析结束后将混合溶液在12000r/min的转速下离心10min,移去上层清液,最后用20mL的LM缓冲溶液复溶,待用。

[0090] 1.3荧光微球标记兔IgG

[0091] 取5mL 0.01g/mL的乳胶荧光微球放入小离心管中,按照12000r/min的转速离心20min,移除上层清液后,用5mL的碳酸钠缓冲溶液进行复溶,随后加入5mg的EDC、5mg的NHS和1mL兔IgG在25℃下搅拌6h,继续加入2.5mg的赖氨酸在室温下搅拌20min,将混合物放入透析袋中在4℃下透析12h;透析结束后将混合溶液在12000r/min的转速下离心10min,移去上层清液,最后用20mL的LM缓冲溶液复溶,待用。

[0092] 1.4抗体包被区的处理

[0093] 将上述制备的荧光微球标记的一株鼠抗人SAA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人CRP单克隆抗体和荧光微球标记的一株兔IgG按照摩尔比为1:1:1进行混合,取3μL混合溶液滴于抗体包被区,在湿度<30%环境中干燥6h。

[0094] 2、检测区的处理

[0095] 2.1磁性微球标记另一株鼠抗人SAA单克隆抗体

[0096] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液洗涤两次;取600 μ L的MES缓冲液重悬磁性微球后,依次向体系中加入1mg的EDC和1mg的NHS,在37 $^{\circ}$ C下置于旋转混合器上活化0.5h;磁分离后,移除上层清液,用500 μ L的MEST缓冲溶液洗涤两次,用PBST缓冲溶液重悬后加入40 μ g另一株鼠抗SAA单克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下搅拌12h;将搅拌后获得的偶联产物与乙醇胺(2%,V/V)在37 $^{\circ}$ C下活化0.5h,最后用PBST缓冲溶液洗涤两次后加入1mLPBST重悬,取3 μ L磁性微球标记另一株鼠抗人SAA单克隆抗体置于第一检测区中,在湿度<30%环境中干燥6h。

[0097] 2.2磁性微球标记另一株鼠抗CRP单克隆抗体

[0098] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液洗涤两次;取600 μ L的MES缓冲液重悬磁性微球后,依次向体系中加入1mg的EDC和1mg的NHS,在37 $^{\circ}$ C下置于旋转混合器上活化0.5h;磁分离后,移除上层清液,用500 μ L的MEST缓冲溶液洗涤两次,用PBST缓冲溶液重悬后加入40 μ g另一株鼠抗CRP单克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下搅拌12h;将搅拌后获得的偶联产物与乙醇胺(2%,V/V)在37 $^{\circ}$ C下活化0.5h,最后用PBST缓冲溶液洗涤两次后加入1mLPBST重悬,取3 μ L磁性微球标记的另一株鼠抗人CRP单克隆抗体置于第二检测区中,在湿度<30%环境中干燥6h。

[0099] 3、质控区的处理

[0100] 磁性微球标记羊抗兔多克隆抗体:取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液洗涤两次;取600 μ L的MES缓冲液重悬磁性微球后,依次向体系中加入1mg的EDC和1mg的NHS,在37 $^{\circ}$ C下置于旋转混合器上活化0.5h;磁分离后,移除上层清液,用500 μ L的MEST缓冲溶液洗涤两次,用PBST缓冲溶液重悬后加入40 μ g羊抗兔多克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下搅拌12h;将搅拌后获得的偶联产物与乙醇胺(2%,V/V)在37 $^{\circ}$ C下活化0.5h,最后用PBST缓冲溶液洗涤两次后加入1mLPBST重悬,取3 μ L磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体置于质控区中,在湿度<30%环境中干燥6h。

[0101] 4、微流控芯片的联合检测

[0102] 1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁(若为永磁铁则不需要),使第一检测区中磁性微球标记另一株鼠抗人SAA单克隆抗体、第二检测区中磁性微球标记的另一株鼠抗人CRP单克隆抗体和质控区中的磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体平铺固定到相应区域的底面;

[0103] 2) 用0.06mol/L LM缓冲溶液将血清样本稀释100倍,从加样孔加入稀释后的样本,样本通过毛细管微通道13流入抗体包被区2中,复溶预储存在抗体包被区2中的荧光微球标记的一株鼠抗人SAA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人CRP单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

[0104] 3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道14流入到微混合区3中,在微混合区3样本中的SAA与荧光微球标记的一株鼠抗人SAA单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的SAA免疫复合物,CRP与荧光微球标记的一株鼠抗人CRP单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的CRP免疫复合物,并且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

[0105] 4) 步骤3)中反应形成的荧光微球标记的SAA免疫复合物、荧光微球标记的CRP免疫复合物和未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道依次进入到第一检测区4、第二检测区5和质控区6内,荧光微球标记的SAA免疫复合物与第一检测区4中磁性微球标记

的另一株鼠抗人SAA单克隆抗体发生免疫反应而停留在第一检测区4中,荧光微球标记的CRP免疫复合物与第二检测区5中磁性微球标记的另一株鼠抗人CRP单克隆抗体发生免疫反应而停留在第二检测区5中,荧光微球标记的兔IgG与质控区6中磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体发生免疫反应而停留在质控区6中,剩余液体流入废液收集区7;

[0106] 5) 第一检测区4、第二检测区5和质控区6的荧光微球均显示一定的荧光信号,并且第一检测区4与质控区6的荧光信号的比值与SAA浓度具有正相关性,第二检测区5与质控区6的荧光信号的比值与CRP的浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出SAA和CRP的浓度。

[0107] 5. 标准曲线的建立

[0108] 配置浓度为0、3、10、30、60、156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的SAA校准品用于建立SAA标准曲线(如图4),检测灵敏度为3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,检测范围为3~156 $\mu\text{g}/\text{mL}$;配置浓度为0、0.5、2、10、50、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CRP校准品用于建立CRP标准曲线(如图5),检测灵敏度为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,检测范围为0.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,检测结果如表1所示。

[0109] 表1

[0110]

SAA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	3	10	30	60	156
T ₁ /C 值	0.0038	0.0656	0.2192	0.5604	0.9656	1.4422
CRP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	0.5	2	10	50	200
T ₂ /C 值	0.0566	0.1508	0.3416	1.1460	4.0911	6.0990

[0111] 6. 精密度的测定

[0112] 取浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的SAA校准品、浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CRP校准品进行精密度的测定,每个样本重复测定10次,计算批间平均偏差和批内平均偏差CV%值,测定结果如表2中所示,批间差和批内差均小于15%,符合行业标准(行业标准为批内差小于15%,批间差小于20%)。

[0113] 表2

[0114]

检测项目		检测次数	批内 CV%	批间 CV%
SAA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	10	10	8.2	9.1
	60	10	4.7	7.5
CRP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2	10	10.1	12.4
	50	10	6.3	8.6

[0115] 附:所需溶液配制

[0116] (1) 碳酸钠缓冲溶液

[0117] 碳酸钠 4.33g

[0118] 碳酸氢钠 2.96g

[0119] 纯化水定容至1000mL;

[0120] (2) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液(LM)

[0121] 柠檬酸三钠 7.33g

[0122]	柠檬酸	4.44g
[0123]	氢氧化钠	1g
[0124]	纯化水定容至1000mL;	
[0125]	(3) MEST缓冲溶液	
	磷酸氢二钠	6.59g
	磷酸二氢钠	24.21g
[0126]	2-吗啉乙磺酸(MES)	1.95g
	Tween20	0.5g
	纯化水定容至 1000mL;	
[0127]	(4) MES缓冲溶液	
[0128]	磷酸氢二钠	6.59g
[0129]	磷酸二氢钠	24.21g
[0130]	2-吗啉乙磺酸(MES)	1.95g
[0131]	纯化水定容至1000mL;	
[0132]	(5) PBST缓冲溶液	
[0133]	磷酸氢二钠	43.42g
[0134]	磷酸二氢钠	5.24g
[0135]	Tween20	0.1g
[0136]	纯化水定容至1000mL。	

[0137] 以上所述仅为本发明的优选实施例,并不用于限制本发明,对于本领域技术人员而言,本发明可以有各种改动和变化。凡在本发明的精神和原理之内所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

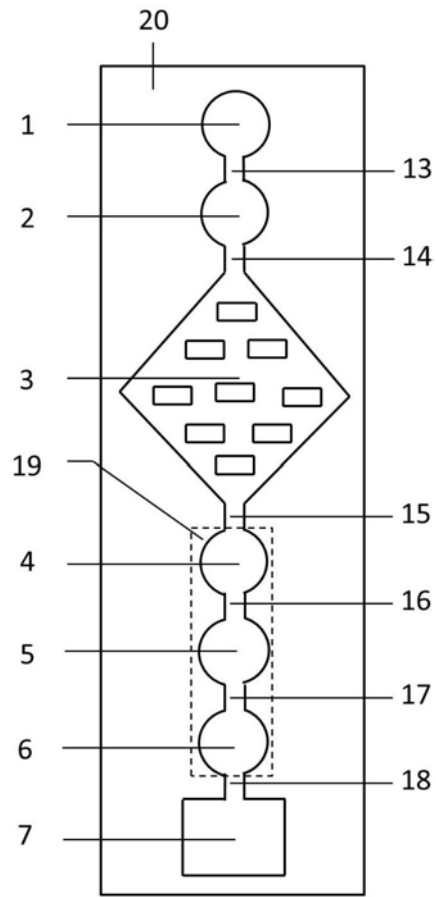


图1A

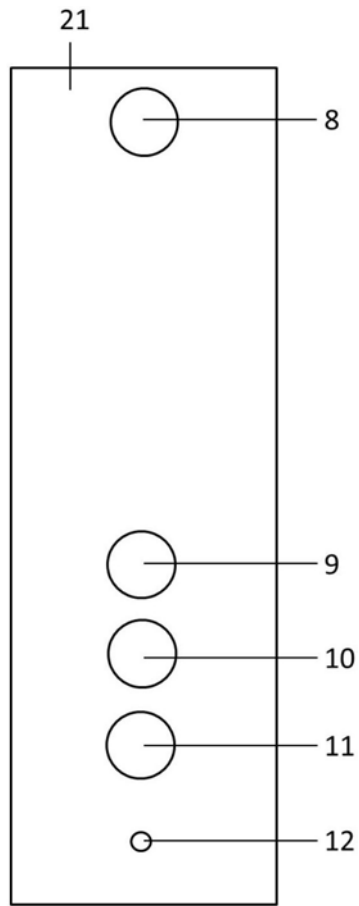


图1B

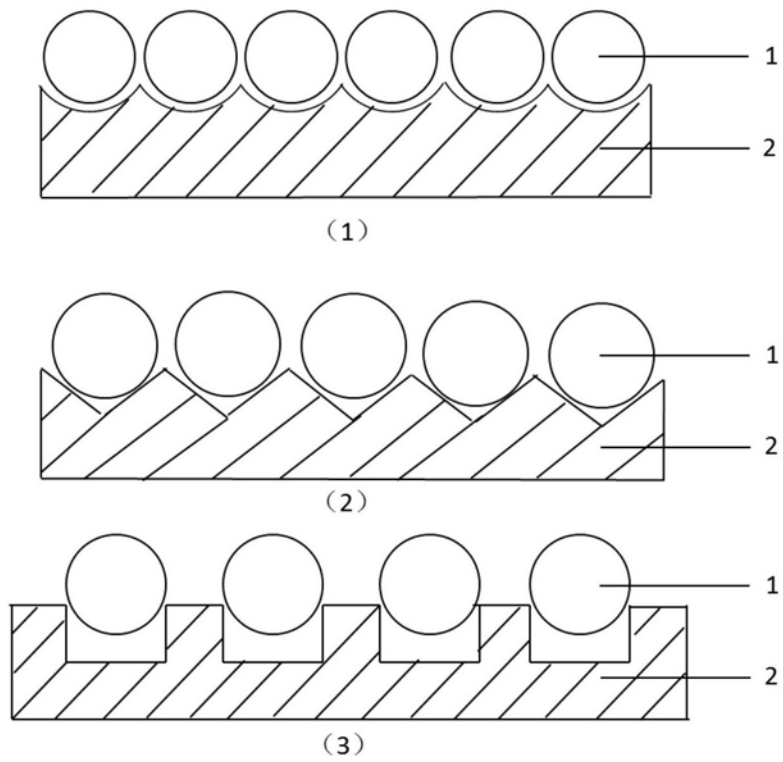


图2

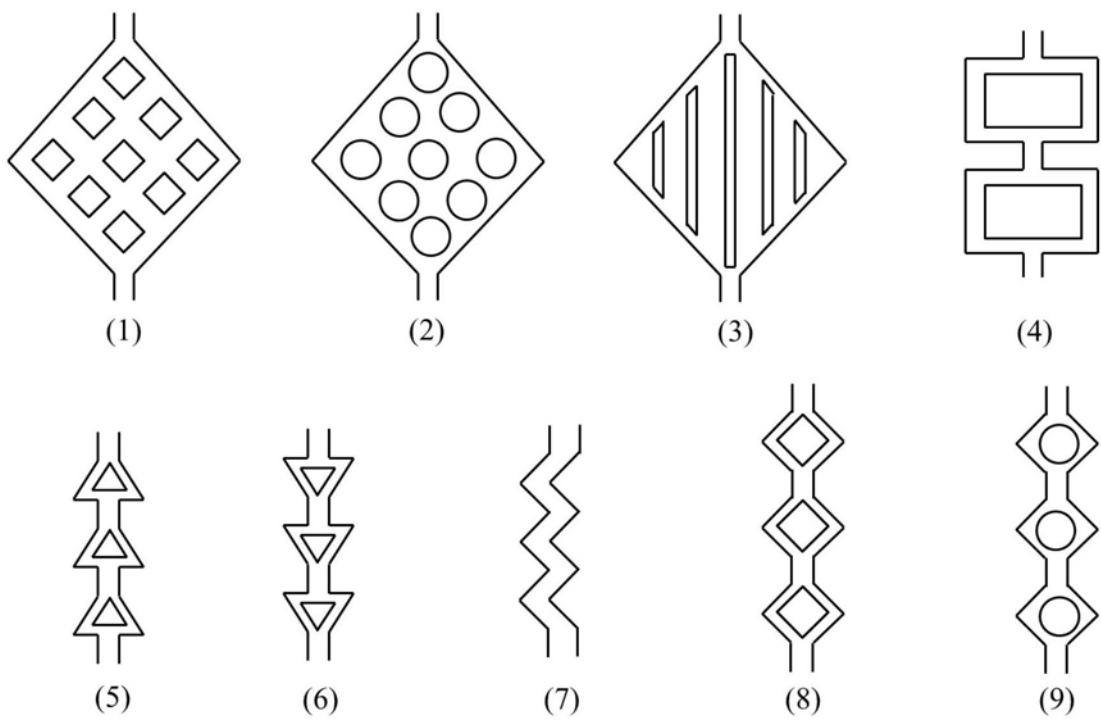


图3

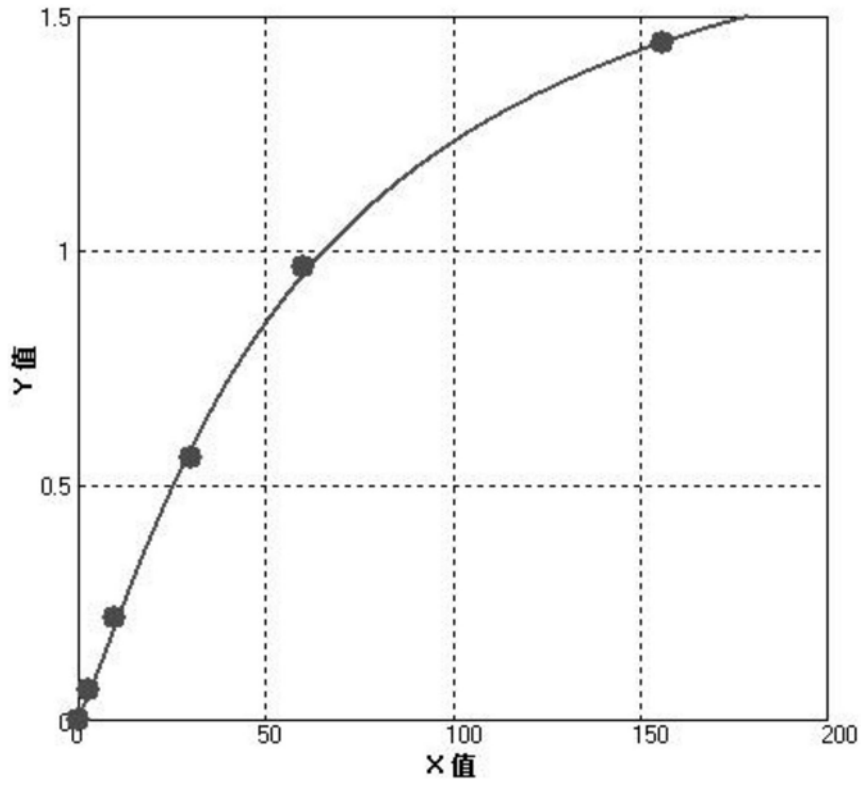


图4

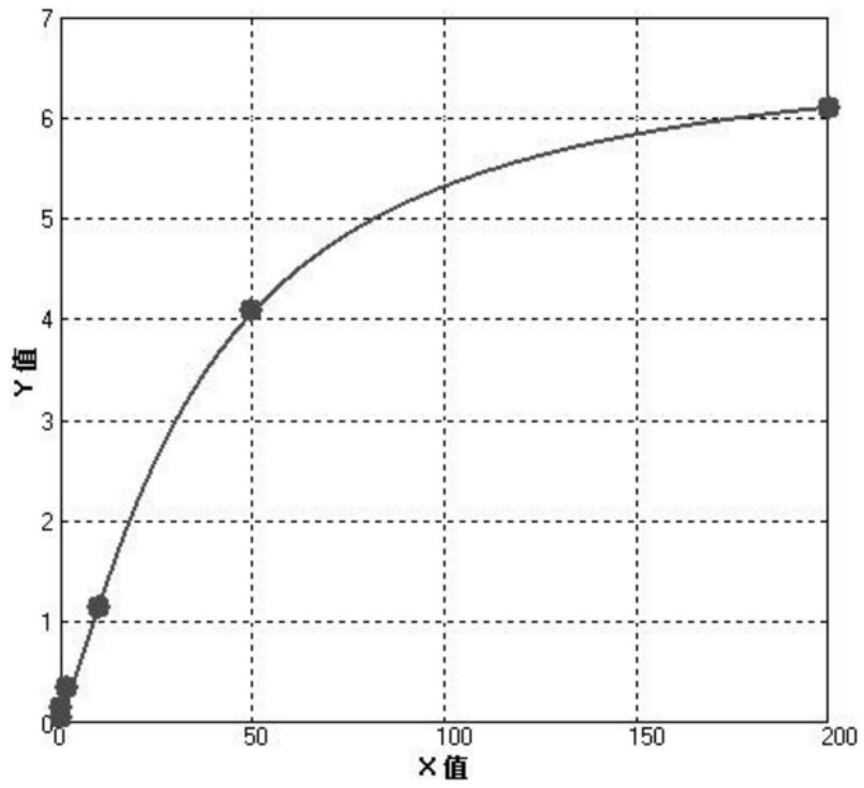


图5

专利名称(译)	一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN108181458A	公开(公告)日	2018-06-19
申请号	CN201810159949.4	申请日	2018-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京华科泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京华科泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京华科泰生物技术有限公司		
[标]发明人	林斯		
发明人	林斯		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/558		
代理人(译)	张瑾		
其他公开文献	CN108181458B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于荧光免疫联合检测的微流控芯片，包括：芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片，所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、至少两个检测区、质控区及废液收集区；所述上层盖片上设有加样孔、至少两个检测窗口、质控窗口、通气孔，并且与所述加样区、检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应。本发明还提供了上述微流控芯片的制备方法和用途。本发明在检测区和质控区设有免疫磁微球，便于将待测物质固定到相应检测区内，降低非特异性造成的干扰，提高灵敏度。

