



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109239326 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811018170.7

(22)申请日 2018.09.03

(71)申请人 国家纳米科学中心

地址 100190 北京市海淀区中关村北一条  
11号

(72)发明人 蒋兴宇 阎锡蕴 陈翊平 段德民

(74)专利代理机构 北京市英智伟诚知识产权代  
理事务所(普通合伙) 11521

代理人 刘丹妮

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

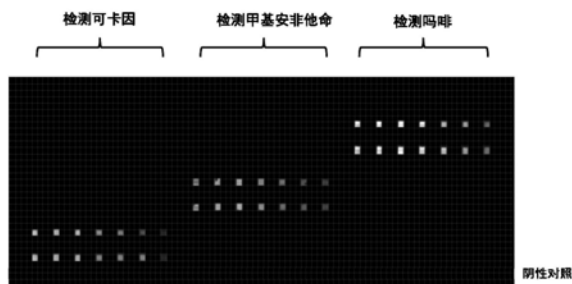
权利要求书2页 说明书11页 附图6页

## (54)发明名称

基于磁颗粒纳米酶的微流控免疫芯片分析方法及应用

## (57)摘要

本发明提供了一种基于磁颗粒纳米酶的微流控免疫芯片分析方法及应用。本发明利用磁颗粒纳米酶类酶活性,将其作为HRP的替代品,可以使传统的微流控免疫芯片的稳定性得到很大的提高。并且与高灵敏度的化学发光法结合起来,可以大大提高检测的灵敏度。同时微流控芯片具有样本量少,多样本、多指标可同时定量检测,特异性强,灵敏度高,价格低廉,读取结果可量化、快捷和直观等优势,操作简便,不需要复杂的仪器设备和专业操作人员,适用于现场、快速检测。因此,本发明将为小分子和生物大分子的检测提供一个有力的工具。



1. 一种基于磁颗粒纳米酶的微流控免疫芯片分析方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 取第一张微流控芯片与基底密封,使通道I的表面与基底紧密贴合,将包被物质通入通道I中以包被在基底上,包被完成后去掉第一张微流控芯片;

(2) 取第二张微流控芯片与基底密封,使通道II的表面与基底紧密贴合且通道II的排布方向与通道I的方向垂直,向通道II中通入待测物,孵育后用缓冲液进行冲洗;

(3) 向通道II中通入以磁颗粒纳米酶标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体;

(4) 去掉第二张微流控芯片,向反应区域加入化学反应液,以化学发光仪读取数据;

其中,所述通道I为第一张微流控芯片的通道,所述通道II为第二张微流控芯片的通道;

当待测物为完全抗原时,所述包被物质为能够与所述完全抗原对应结合且与所述二抗具有不同抗原结合位点的抗体,当待测物为抗体时,所述包被物质为与所述抗体对应的完全抗原或与所述抗体对应的由半抗原分子与蛋白质载体偶联形成的人工抗原。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述微流控芯片具有多个并列的通道。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的基底为固相反应基底;所述基底的材质选自以下一种或多种:聚苯乙烯、聚二甲基硅氧烷和聚甲基丙烯酸甲酯,优选为聚苯乙烯。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述的包被物质能够发生特异性的结合;优选地,将步骤(1)中所述的包被物质免疫各类哺乳动物而获得的抗体。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)进一步包括以下步骤:将包被物质包被于基底上之后,孵育以使包被物质牢固吸附于基底;优选地,所述孵育条件为室温下孵育30min。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)中,所述待测物选自以下一种或多种:完全抗原、抗体、半抗原分子;和/或

所述步骤(2)和步骤(3)中,所述孵育条件为将反应体系置于4~40℃放置0.5~2小时;所述缓冲液为PBS缓冲液,优选为含有1%体积比的吐温-20的PBS缓冲液。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤(3)中,所述磁颗粒纳米酶的制备方法包括以下步骤:

(I) 将所述磁颗粒纳米酶原料反应物通过乙二醇处理,搅拌至完全溶解;

(II) 加入无水NaAc和PAA,搅拌,置于反应釜中150~300℃反应,优选为200℃;

(III) 降温,磁分离并去除上清,超声,干燥。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤(4)中,所述化学反应液为鲁米诺试剂。

9. 一种基于磁颗粒纳米酶的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

磁颗粒纳米酶;

微流控芯片;

基底;

缓冲液;和  
化学发光液。

10. 权利要求1至8中任一项所述的方法或权利要求9所述的试剂盒在制备免疫检测产品中的应用;优选地,所述免疫检测产品为尿液中毒品小分子和血清中肺炎支原体、降钙素原的检测产品;更优选地,所述毒品小分子选自以下一种或多种:可卡因、吗啡、甲基安非他命。

## 基于磁颗粒纳米酶的微流控免疫芯片分析方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,具体涉及一种基于磁颗粒纳米酶信号读出系统的微流控免疫芯片分析方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 构建简单,稳定、灵敏的分析方法一直是分析化学领域追求的目标之一。简单,稳定、灵敏的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中的痕量有毒物质的筛查中,简单,快速的分析方法尤为重要。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,生物酶不稳定,很难适应现场,快速检测的需要。因此,如何实现稳定、便捷快速、稳定性好的免疫分析仍是分析化学领域的重要挑战之一。

[0003] 近年来,毒品的泛滥给世界各国人民的生命财产构成重大的威胁,因此世界各国对禁毒工作十分重视,而毒品的检测对于打击毒品犯罪、抑制毒品流行具有重要的意义,并且可以为执法工作人员提供直接的证据。然而,由于毒品的种类及数量逐渐增加,这对于毒品检测鉴定提出了更高的要求。国内对于毒品及代谢物的快速分析,一类主要利用进口的免疫检测试剂盒,该方法不需要复杂的样品前处理,简单、快速,可很方便的进行筛选和现场分析,但是此方法的缺点是干扰因素多,经常出现假阳性,并且只能定性筛检使用,并不能确定尿液中毒品的含量,所以在作出阳性结论之前应用更精确更特异的方法确证。另一类国内比较传统的定量分析毒品的方法是借助于色谱类检测方法,例如气-质联用法(GC/MS)、液相色谱法(HPLC)、液-质联用法(LC-MS)等,此类方法的灵敏度较高,能给出较为准确的数据信息,对毒品可以进行定量分析,但是尿液样本需要经过前处理、萃取、衍生化等复杂过程,并且需要大型仪器以及专业人员进行检测,检测周期较长,不适合现场、快速的检测。

[0004] 作为细菌感染早期发病专属性的生物标志物,降钙素原(procalcitonin,PCT)近年来已经在临床诊断中得到了广泛的关注和应用。降钙素原在正常人血清中的含量很低( $<0.05\text{ng/mL}$ ),当细菌、寄生虫感染以及脓毒症和多脏器功能衰竭时,PCT在血清中的含量会升高,其含量可以反映出机体被细菌等感染的程度,并且大量研究结果表明PCT含量变化对细菌感染的敏感度和响应速度优于传统的炎症生物标记物(如超敏C-反应蛋白),因此,快速、高灵敏地分析血清中的PCT含量对细菌感染早期诊断和合理使用抗生素具有十分重要的意义。目前检测血清中降钙素原的方法主要有酶联免疫分析方法、胶体金免疫层析试纸条、化学发光免疫分析方法、放射性免疫分析方法等。胶体金免疫层析试纸条具有快速,简单,成本低等优点,但该方法最大的缺点是灵敏度低。传统的酶联免疫分析方法具有操作

相对简单,检测成本比较低等优点,但灵敏度相对偏低,反应时间较长,难以检测到血清中痕量的PCT,因此很难实现早期诊断。化学发光免疫分析方法的灵敏度比传统的酶联免疫分析方法提高了1-2个数量级,其灵敏度达到0.01ng/mL-0.1ng/mL水平,目前此方法已经得到了广泛的应用,但对于早期感染或者患者自身血清中的超痕量PCT,该方法的灵敏度还有待提高。放射免疫分析方法灵敏度高,可以满足超痕量PCT检测的需要,但是该方法具有放射性污染,操作过程复杂,检测时间也比较长(8-16h),限制了该方法在PCT检测中的应用。

[0005] 微流控芯片技术是近年来发展起来的一种微型反应操作技术,该检测方法通过某种材质加工成的微型管道芯片,制备成微型的反应区域,最突出的优点是使用的样本量及试剂量非常少,并可实现高通量,多样本同时检测,检测的时间比传统微孔板方法大大缩短,是一种非常适合快速现场检测的技术平台。然而,微流控免疫芯片并没有从本质上解决传统酶联免疫分析灵敏度低,生物酶稳定性差的问题。因此,很有必要开发出一种稳定性好,催化效率高的标记酶来取代生物酶。

[0006] 最近基于纳米颗粒酶催化活性的纳米酶引起了广泛的关注,相比生物酶,纳米酶具有稳定性好,成本低等优势。在众多的纳米酶中,基于磁颗粒纳米酶的纳米酶则具有更多的优势。2007年,研究者发现磁纳米颗粒具有内在的模拟酶的活性,可以替代过氧化物酶进行免疫检测。磁纳米颗粒表面偶联上蛋白质,依然具有酶的活性。这种催化活性和辣根过氧化物酶相似,在双氧水的存在下,磁纳米颗粒可以催化辣根过氧化物酶的显色底物,例如四甲基联苯胺(TMB)显蓝色,也可以催化辣根过氧化物酶的化学发光底物,鲁米诺发光。磁纳米颗粒催化的活性受到pH,温度、过氧化氢浓度和其自身粒径的影响。

[0007] 相比于蛋白质生物酶,磁纳米颗粒作为纳米酶具有如下的优势:(1)稳定性好;(2)成本低;(3)具有磁分离的特点,可以和酶活性有机结合起来。

[0008] 因此,将磁纳米颗粒纳米酶和微流控免疫芯片结合起来,可以实现稳定,快速,灵敏的检测,可以极大地促进微流控免疫分析技术在分析科学领域的应用。

## 发明内容

[0009] 因此,本发明的目的在于克服现有技术中的缺陷,提供一种基于磁颗粒纳米酶的微流控免疫芯片分析方法及应用。

[0010] 在阐述本发明内容之前,定义本文中所使用的术语如下:

[0011] 术语“PBS”是指:磷酸缓冲盐溶液。

[0012] 术语“BSA”是指:牛血清白蛋白。

[0013] 术语“HRP”是指:辣根过氧化物酶。

[0014] 术语“PAA”是指:聚丙烯酸。

[0015] 为实现上述目的,本发明的第一方面提供了一种基于磁颗粒纳米酶的微流控免疫芯片分析方法,所述方法包括以下步骤:

[0016] (1)取第一张微流控芯片与基底密封,使通道I的表面与基底紧密贴合,将包被物质通入通道I中以包被在基底上,包被完成后去掉第一张微流控芯片;

[0017] (2)取第二张微流控芯片与基底密封,使通道II的表面与基底紧密贴合且通道II的排布方向与通道I的方向垂直,向通道II中通入待测物,孵育后用缓冲液进行冲洗;

[0018] (3)向通道II中通入以磁颗粒纳米酶标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述

二抗为抗待测物的抗体；

[0019] (4) 去掉第二张微流控芯片，向反应区域加入化学反应液，以化学发光仪读取数据；

[0020] 其中，所述通道I为第一张微流控芯片的通道，所述通道II为第二张微流控芯片的通道；

[0021] 当待测物为完全抗原时，所述包被物质为能够与所述完全抗原对应结合且与所述二抗具有不同抗原结合位点的抗体，当待测物为抗体时，所述包被物质为与所述抗体对应的完全抗原或与所述抗体对应的由半抗原分子与蛋白质载体偶联形成的人工抗原。

[0022] 根据本发明第一方面的方法，其中，所述微流控芯片具有多个并列的通道。

[0023] 根据本发明第一方面的方法，其中，所述的基底为固相反应基底；所述基底的材质选自以下一种或多种：聚苯乙烯、聚二甲基硅氧烷和聚甲基丙烯酸甲酯，优选为聚苯乙烯。

[0024] 根据本发明第一方面的方法，其中，所述步骤(1)中，所述的包被物质能够发生特异性的结合；优选地，将步骤(1)中所述的包被物质免疫各类哺乳动物而获得的抗体。

[0025] 根据本发明第一方面的方法，其中，所述步骤(1)进一步包括以下步骤：将包被物质包被于基底上之后，孵育以使包被物质牢固吸附于基底；优选地，所述孵育条件为室温下孵育30min。

[0026] 根据本发明第一方面的方法，其中，所述步骤(2)中，所述待测物选自以下一种或多种：完全抗原、抗体、半抗原分子；和/或

[0027] 所述步骤(2)和步骤(3)中，所述孵育条件为将反应体系置于4~40℃放置0.5~2小时；

[0028] 所述缓冲液为PBS缓冲液，优选为含有1%体积比的吐温-20的PBS缓冲液。

[0029] 根据本发明第一方面的方法，其中，所述步骤(3)中，所述磁颗粒纳米酶的制备方法包括以下步骤：

[0030] (I) 将所述磁颗粒纳米酶原料反应物通过乙二醇处理，搅拌至完全溶解；

[0031] (II) 加入无水NaAc和PAA，搅拌，置于反应釜中150~300℃反应，优选为200℃；

[0032] (III) 降温，磁分离并去除上清，超声，干燥。

[0033] 根据本发明第一方面的方法，其中，所述步骤(4)中，所述化学反应液为鲁米诺试剂。

[0034] 本发明的第二方面提供了一种基于磁颗粒纳米酶的免疫检测试剂盒，所述试剂盒包括：

[0035] 磁颗粒纳米酶；

[0036] 微流控芯片；

[0037] 基底；

[0038] 缓冲液；和

[0039] 化学发光液。

[0040] 本发明的第三方面提供了第一方面所述的方法或按照第二方面所述的试剂盒在制备免疫检测产品中的应用；优选地，所述免疫检测产品为尿液中毒品小分子和血清中肺炎支原体、降钙素原的检测产品；更优选地，所述毒品小分子选自以下一种或多种：可卡因、吗啡、甲基安非他命。

[0041] 本发明的目的是针对目前的免疫分析方法在检测灵敏度、稳定性、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,而提供一种基于磁颗粒纳米酶催化的微流控免疫芯片分析方法及其应用。本发明的免疫分析方法具有稳定性好、分析速度快、检测成本低、可以实现高通量检测等优势。

[0042] 为实现上述目的,本发明提供下述技术方案。

[0043] 本发明提供的技术方案之一是:一种基于磁颗粒纳米酶的微流控免疫芯片分析方法,其包括如下步骤:

[0044] (1) 取第一张微流控芯片与基底密封,使通道I的表面与基底紧密贴合,将包被物质通入通道I中以包被在基底上,包被完成后去掉第一张微流控芯片;

[0045] (2) 取第二张微流控芯片与基底密封,使通道II的表面与基底紧密贴合且通道II的排布方向与通道I的方向垂直,向通道II中通入待测物,孵育后用缓冲液进行冲洗;

[0046] (3) 向通道II中通入以磁颗粒纳米酶标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体;

[0047] (4) 去掉第二张微流控芯片,向反应区域加入化学反应液,以化学发光仪读取数据;

[0048] 其中,所述通道I为第一张微流控芯片的通道,所述通道II为第二张微流控芯片的通道;

[0049] 当待测物为完全抗原时,所述包被物质为能够与所述完全抗原对应结合且与所述二抗具有不同抗原结合位点的抗体,当待测物为抗体时,所述包被物质为与所述抗体对应的完全抗原或与所述抗体对应的由半抗原分子与蛋白质载体偶联形成的人工抗原;

[0050] 本发明中,步骤(1)为取第一张微流控芯片与基底密封,使通道I的表面与基底紧密贴合,将包被物质通入通道I中以包被在基底上,包被完成后去掉第一张微流控芯片。

[0051] 所述的微流控芯片为本领域常规,普通市售的微流控芯片均适用于本发明,其一般都具有多个并列的通道,可以用于同时检测多个样本或者多个指标。

[0052] 所述的基底为本领域常规所指,一般指固相反应基底。所述基底的材质为本领域常规,较佳地选自聚苯乙烯、聚二甲基硅氧烷和聚甲基丙烯酸甲酯,更佳地为聚苯乙烯。

[0053] 如本领域常规,所述的包被物质为捕获物质,一般是抗体,如果是半抗原分子,则将半抗原分子与蛋白质载体偶联后再进行包被。所述的包被物质能够特异性结合步骤(2)中所述的待测物。

[0054] 所述的将包被物质通入通道I中以包被在基底上是本领域的常规操作,即将包被物质包被于基底上之后,于合适温度孵育一段时间(如室温下30min),以使包被物质牢固吸附于基底即可。

[0055] 本发明中,步骤(2)为取第二张微流控芯片与基底密封,使通道II的表面与基底紧密贴合且通道II的排布方向与通道I的方向垂直,向通道II中通入待测物,孵育后用缓冲液进行冲洗。

[0056] 其中,所述待测物为待检测的物质,其为完全抗原、抗体或半抗原分子,其与步骤(1)中所述的包被物质能够发生特异性的结合。当待测物为抗体时,其来源没有特别限制,如可以是将步骤(1)中所述的包被物质免疫各类哺乳动物而获得的抗体,如鼠抗或兔抗,其类型也没有特殊要求,既可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。

[0057] 所述孵育是本领域的常规操作,一般是将反应体系置于合适的温度条件下放置数小时,待通道中的物质牢固吸附于基底即可。优选地,所述孵育为将反应体系置于4~40℃放置0.5~2小时。

[0058] 所述缓冲液为本领域常规,各类在免疫检测领域用于冲洗过量包被物质的缓冲液均适用于本发明,具体可以视不同的检测反应体系而进行选择。优选地,所述缓冲液为PBS缓冲液,更优选含有1‰吐温-20的PBS缓冲液,所述千分比指体积千分比。

[0059] 本发明中,步骤(3)为向通道II中通入以磁颗粒纳米酶标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体。

[0060] 所述二抗为抗待测物的抗体。所述二抗的来源没有特别限制,如可以是将步骤(2)中所述的待测物免疫各类哺乳动物而获得的抗体,如羊抗、马抗等,其类型也没有特殊要求,既可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。

[0061] 所述孵育同步步骤(2),其是本领域的常规操作,一般是将反应体系置于合适的温度条件下放置数小时,待通道中的物质牢固吸附于基底即可。优选地,所述孵育为将反应体系置于4~40℃放置0.5~12小时。

[0062] 所述缓冲液同步步骤(2),其为本领域常规,各类在免疫检测领域用于冲洗过量包被物质的缓冲液均适用于本发明,具体可以视不同的检测反应体系而进行选择。优选地,所述缓冲液为PBS缓冲液,更优选含有1‰吐温-20的PBS缓冲液,所述千分比指体积千分比。

[0063] 本发明中,步骤(3)为向通道II中通入磁颗粒纳米酶标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗。

[0064] 所述孵育同步步骤(2),其是本领域的常规操作,一般是将反应体系置于合适的温度条件下放置数小时,待通道中的物质牢固吸附于基底即可。优选地,所述孵育为将反应体系置于4~40℃放置0.5~2小时。

[0065] 所述缓冲液同步步骤(2),其为本领域常规,各类在免疫检测领域用于冲洗过量包被物质的缓冲液均适用于本发明,具体可以视不同的检测反应体系而进行选择。优选地,所述缓冲液为PBS缓冲液,更优选含有1‰吐温-20的PBS缓冲液,所述千分比指体积千分比。

[0066] 本发明中,步骤(4)为去掉第二张微流控芯片,向反应区域加入HRP催化发光的化学反应液,以化学发光仪读取数据。

[0067] 本发明的分析方法的原理示意图如图1所示。图1中,①、②、③和④依次表示通入微流控芯片管道中的物质。

[0068] 所述的催化发光的化学反应液为本领域常规,较佳地是鲁米诺试剂。

[0069] 本发明提供的技术方案之二是:前述方法在免疫检测领域的应用。

[0070] 本发明的应用范围很广,比如可以用于尿液中毒品小分子和血清中肺炎支原体、降钙素原等的检测。

[0071] 利用双抗夹心法原理将本发明的方法用于特异性地对降钙素原进行检测的反应机理如下:首先,通过包被降钙素原捕获抗体,将抗体固定在微流控反应基底上,然后含有降钙素原的溶液与基质上的捕获抗体进行反应,接下来磁纳米颗粒-标记二抗抗体与基质上的抗原抗体混合物进行反应从而形成捕获“抗体-抗原-磁颗粒纳米酶-抗体”双抗夹心形式,因此被捕获的磁颗粒纳米酶的量随着被检测对象浓度的增加而增加,因为磁颗粒纳米酶具有类似HRP酶的活性,可以催化鲁米诺化学发光。

[0072] 根据待检物的浓度与化学发光值之间的关系可以建立相应的检测标准曲线,从而可以对降钙素原进行定量检测。

[0073] 本发明还可同时对多种物质建立高通量快速现场检测,如可以对人体尿液中的可卡因、吗啡和甲基安非他命同时进行检测,其原理示意图如图2所示。

[0074] 必须说明的是,上述应用可能涉及医学领域所指的疾病诊断和治疗,也可能涉及非疾病的诊断和治疗的情况,比如检测环境中的微生物、检测食品中有害物质的含量等,本发明对应的权利要求仅限于非疾病的诊断和治疗方法的范围,涉及疾病的诊断和治疗方法的技术方案不在本发明所请求保护的范围内。

[0075] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0076] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0077] 本发明的积极进步效果在于:

[0078] 相比传统的免疫分析方法,本发明的基于磁颗粒纳米酶催化酶的活性和微流控芯片免疫分析方法可以具有但不限于以下有益效果:

[0079] 本发明利用磁颗粒纳米酶类酶活性,将其作为HRP的替代品,可以使传统的微流控免疫芯片的稳定性得到很大的提高。并且与高灵敏度的化学发光法结合起来,可以大大提高检测的灵敏度。同时微流控芯片具有样本量少,多样本、多指标可同时定量检测,特异性强,灵敏度高,价格低廉,读取结果可量化、快捷和直观等优势,操作简便,不需要复杂的仪器设备和专业操作人员,适用于现场、快速检测。因此,本发明将为小分子和生物大分子的检测提供一个有力的工具。

## 附图说明

[0080] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0081] 图1示出了本发明的分析方法的原理示意图。

[0082] 图2示出了应用本发明的分析方法同时检测可卡因、吗啡和甲基安非他命的原理示意图。

[0083] 图3示出了实施例2中反映可卡因浓度的标准曲线。

[0084] 图4示出了实施例3中反映吗啡浓度的标准曲线。

[0085] 图5示出了实施例4中反映甲基安非他命浓度的标准曲线。

[0086] 图6示出了实施例5中同时检测可卡因、甲基安非他命和吗啡的反应芯片的结果图。

[0087] 图7示出了实施例5中反映可卡因浓度的标准曲线。

[0088] 图8示出了实施例5中反映甲基安非他命浓度的标准曲线。

[0089] 图9示出了实施例5中反映吗啡浓度的标准曲线。

[0090] 图10示出了实施例6中降钙素原的浓度曲线。

## 具体实施方式

[0091] 下面通过具体的实施例进一步说明本发明,但是,应当理解为,这些实施例仅仅是用于更详细具体地说明之用,而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

[0092] 本部分对本发明试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。本领域技术人员清楚,在上下文中,如果未特别说明,本发明所用材料和操作方法是本领域公知的。

[0093] 以下实施例中使用的试剂和仪器如下:

[0094] 试剂:

[0095] 可卡因、吗啡和甲基安非他命以及它们对应的完全抗原和抗体来自北京沫之东生物科技有限公司;

[0096] 磁颗粒纳米酶:实验室自制;

[0097] Sulfo-NHS-LC-Biotinylation:ThermoFisher Scientific公司;

[0098] 牛血清白蛋白:北京索莱宝生物技术有限公司;

[0099] PS基底:Corning;

[0100] PDMS芯片基质、固化剂:道康宁;

[0101] 高温干燥箱:上海一恒科技有限公司;

[0102] PBS:北京化工有限公司;

[0103] 化学发光液:milipore。

[0104] 仪器:

[0105] 化学发光仪:国家纳米科学中心研制;

[0106] 涡旋振荡器:IKA公司。

[0107] 实施例1

[0108] 本实施例用于说明本发明免疫芯片的制备方法。

[0109] (1)取第一张微流控芯片与基底密封,使通道I的表面与基底紧密贴合,将包被物质通入通道I中以包被在基底上,包被完成后去掉第一张微流控芯片;

[0110] (2)取第二张微流控芯片与基底密封,使通道II的表面与基底紧密贴合且通道II的排布方向与通道I的方向垂直,向通道II中通入待测物,孵育后用缓冲液进行冲洗;

[0111] (3)向通道II中通入以磁颗粒纳米酶标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体;

[0112] (4)去掉第二张微流控芯片,向反应区域加入化学反应液,以化学发光仪读取数据;

[0113] 其中,所述通道I为第一张微流控芯片的通道,所述通道II为第二张微流控芯片的通道;

[0114] 当待测物为完全抗原时,所述包被物质为能够与所述完全抗原对应结合且与所述二抗具有不同抗原结合位点的抗体,当待测物为抗体时,所述包被物质为与所述抗体对应的完全抗原或与所述抗体对应的由半抗原分子与蛋白质载体偶联形成的人工抗原。

[0115] 本实施例中使用的磁颗粒纳米酶为 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒,其制备方法如下:

[0116] 在王水浸泡过的烧杯中,分别加入0.3g的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.675g的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和20mL的乙二醇,搅拌至完全溶解;加入1.5g无水NaAc,0.15g PAA,继续搅拌30min;置于反应釜中 $200^\circ\text{C}$ 反应14h;降温,将其中溶液倒入离心管中,磁分离并去除上清,加入乙醇超声洗4次, $50\text{--}60^\circ\text{C}$ 干燥,制备的磁颗粒MNP颗粒径约350nm左右。

[0117] 实施例2

[0118] 本实施例用于说明吗啡、可卡因以及甲基安非他命抗体和磁颗粒纳米酶偶联的步骤。

[0119] 将3种抗体通过10Kd的超滤管进行超滤纯化,然后溶于PBS (pH7.2-7.4)缓冲液中。首先往100 $\mu$ L,5mg/mL的磁颗粒纳米酶中加入10 $\mu$ L,20mg/mL的EDC和NHS偶联试剂,然后反应20min后,磁分离,用PBS溶液重悬,然后加入100 $\mu$ L 1mg/mL的抗体,在室温下反应2h,然后磁分离,去掉多余的抗体,然后将磁颗粒-抗体的偶联物保存在4度冰箱。

[0120] 实施例3可卡因的检测

[0121] 本实施例用于说明本发明所述微流控检测芯片在可卡因检测中的应用。

[0122] 所述微流控芯片检测可卡因的操作步骤如下:

[0123] (1) 可卡因抗原原液稀释,包被:取1 $\mu$ L可卡因抗原加入PBS (pH7.2-7.4)缓冲溶液中,稀释至最佳包被浓度,混匀;取一张多通道芯片与基底密封;将稀释后的蛋白溶液由加样孔通入三条管道中,室温,包被30min。

[0124] (2) 封闭:用PBS缓冲液配置3%的BSA封闭液。揭去第一片芯片,风干后,贴上第二片芯片,使第二片芯片上的管道与第一片芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向管道均通入20 $\mu$ L BSA封闭液,室温30min;将封闭完毕的BSA取出。

[0125] (3) 不同浓度待检液与磁颗粒纳米酶-抗体混合:取1 $\mu$ L可卡因抗体加入PBS (pH7.2-7.4)缓冲溶液中,稀释至最佳反应浓度;将可卡因用PBS缓冲液稀释成不同浓度梯度的样品;取10 $\mu$ L的磁颗粒纳米酶-抗体偶联物与10 $\mu$ L不同浓度的可卡因检测溶液混合,室温反应20min。

[0126] (4) 混合液与固相抗原竞争反应:将步骤(3)中已经反应完毕的可卡因与磁颗粒纳米酶-抗体的混合液,通入芯片管道中,15 $\mu$ L/通道,室温反应30min后,吸出,使用洗涤液洗涤3次;则未与可卡因反应的可卡因抗体会与基质上包被的抗原发生免疫反应。

[0127] (5) 信号读出:揭掉上层芯片,先芯片表面反应区域加入商品化的化学发光液,放入化学发光仪中,使用分析软件进行数据分析。

[0128] (6) 标准曲线建立:以可卡因稀释浓度取lg对数为横坐标,空白对照与样品的化学发光值之差为纵坐标建立标准曲线,结果如图3所示。

[0129] 实施例4吗啡的检测

[0130] 本实施例用于说明本发明所述微流控检测芯片在吗啡检测中的应用。

[0131] 所述微流控芯片检测吗啡的操作步骤如下:

[0132] (1) 吗啡抗原原液稀释,包被:取1 $\mu$ L吗啡抗原加入PBS (pH7.2-7.4)缓冲溶液中,稀释至最佳包被浓度,混匀;取一张多通道芯片与基底密封;将稀释后的蛋白溶液由加样孔通入三条管道中,室温,包被30min。

[0133] (2) 封闭:用PBS缓冲液配置3%的BSA封闭液。揭去第一片芯片,风干后,贴上第二片芯片,使第二片芯片上的管道与第一片芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向管道均通入20 $\mu$ L BSA封闭液,室温30min;将封闭完毕的BSA取出。

[0134] (3) 不同浓度待检液与生物素化抗体的制备及混合:取1 $\mu$ L生物素化吗啡抗体加入PBS (pH7.2-7.4)缓冲溶液中,稀释至最佳反应浓度;将吗啡用PBS缓冲液稀释成不同浓度梯度的样品;取10 $\mu$ L的抗体稀释液与10 $\mu$ L不同浓度的吗啡检测溶液混合,室温反应20min。

[0135] (4) 混合液与固相抗原竞争反应:将步骤(3)中已经反应完毕的吗啡与磁颗粒纳米酶-抗体的混合液,通入芯片管道中,15uL/通道,室温反应30min后,吸出,使用洗涤液洗涤3次;则未与吗啡反应的抗体会与基质上包被的抗原发生免疫反应。

[0136] (5) 信号读出:揭掉上层芯片,先芯片表面反应区域加入商品化的化学发光液,放入化学发光仪中,使用分析软件进行数据分析。

[0137] (6) 标准曲线建立:以吗啡稀释浓度取lg对数为横坐标,空白对照与样品的化学发光值之差为纵坐标建立标准曲线,结果如图4所示。

#### [0138] 实施例5甲基安非他命的检测

[0139] 本实施例用于说明本发明所述微流控检测芯片在甲基安非他命检测中的应用。

[0140] 所述微流控芯片检测甲基安非他命的操作步骤如下:

[0141] (1) 甲基安非他命抗原原液稀释,包被:取1μL甲基安非他命抗原加入PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳包被浓度,混匀;取一张多通道芯片与基底密封;将稀释后的蛋白溶液由加样孔通入三条管道中,室温,包被30min。

[0142] (2) 封闭:用PBS缓冲液配置3%的BSA封闭液。揭去第一片芯片,风干后,贴上第二片芯片,使第二片芯片上的管道与第一片芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向管道均通入20μL BSA封闭液,室温30min;将封闭完毕的BSA取出。

[0143] (3) 不同浓度待检液与磁颗粒纳米酶-抗体偶联物混合:取1μL吗啡抗体加入PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳反应浓度;将甲基安非他命用PBS缓冲液稀释成不同浓度梯度的样品;取10μL的磁颗粒纳米酶-抗体稀释液与10μL不同浓度的甲基安非他命检测溶液混合,室温反应20min。

[0144] (4) 混合液与固相抗原竞争反应:将步骤(3)中已经反应完毕的甲基安非他命与其磁颗粒纳米酶-抗体的混合液,通入芯片管道中,15uL/通道,室温反应30min后,吸出,使用洗涤液洗涤3次;则未与甲基安非他命反应的磁颗粒纳米酶-抗体会与基质上包被的抗原发生免疫反应。

[0145] (5) 信号读出:揭掉上层芯片,先芯片表面反应区域加入商品化的化学发光液,放入化学发光仪中,使用分析软件进行数据分析。

[0146] (6) 标准曲线建立:以甲基安非他命稀释浓度取lg对数为横坐标,空白对照与样品的化学发光值之差为纵坐标建立标准曲线,结果如图5所示。

#### [0147] 实施例6同时检测可卡因、吗啡和甲基安非他命

[0148] 本实施例用于说明同时检测尿液中可卡因、吗啡和甲基安非他命的制备方法具体步骤如下:

[0149] (1) 可卡因、吗啡和甲基安非他命三种抗原的包被:取一张多通道芯片与基底密封:

[0150] 取1μL可卡因抗原原液加入PBS (PH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳包被浓度,混匀;取1μL吗啡抗原原液加入PBS (PH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳包被浓度,混匀;取1μL甲基安非他命抗原原液加入PBS (PH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳包被浓度,混匀;将稀释后的三种抗原溶液各通入两条不同的管道中;室温,包被30min。

[0151] (2) 封闭:用PBS缓冲液配置3%的BSA封闭液。揭去第一片芯片,风干后,贴上第二、三、四片芯片,使这三片芯片上的管道与第一片芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移

液器向管道均通入20 $\mu$ L BSA封闭液,室温30min。

[0152] (3) 三种磁颗粒纳米酶-抗体偶联物分别于三种毒品溶液的制备及反应:不同浓度的可卡因溶液与定量的吗啡和甲基安非他命溶液混合配制成溶液1,不同浓度的吗啡溶液与定量的可卡因和甲基安非他命溶液混合配制成溶液2,不同浓度的甲基安非他命溶液与定量的吗啡和可卡因溶液混合配制成溶液3;取1 $\mu$ L磁颗粒纳米酶-可卡因抗体偶联物加入PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳反应浓度,取1 $\mu$ L磁颗粒纳米酶-吗啡抗体加入PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳反应浓度,取1 $\mu$ L甲基安非他命抗体加入PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳反应浓度;取稀释好的磁颗粒纳米酶-可卡因抗体偶联物溶液10 $\mu$ L与10 $\mu$ L不同浓度的溶液1混匀,室温反应20min,取稀释好的磁颗粒纳米酶-吗啡抗体偶联物溶液10 $\mu$ L与10 $\mu$ L不同浓度的溶液2混匀,室温反应20min,取稀释好的磁颗粒纳米酶-甲基安非他命抗体偶联物溶液10 $\mu$ L与10 $\mu$ L不同浓度的溶液3混匀,室温反应20min。

[0153] (4) 固相抗原与剩余抗体反应:将封闭完毕的BSA取出,加入(3)中已经反应完毕的三种混合液,室温反应30min。

[0154] (5) 信号读出:揭掉上层芯片,先芯片表面反应区域加入商品化的化学发光液,放入化学发光仪中,使用分析软件进行数据分析。

[0155] (6) 标准曲线建立:以可卡因、吗啡和甲基安非他命稀释浓度取lg对数为横坐标,空白对照与样品的化学发光值之差为纵坐标建立标准曲线,结果如图6、图7、图8和图9所示。其中,图6为反应芯片的结果图。图7为可卡因的标准曲线,图8为甲基安非他命的标准曲线,图9为吗啡的标准曲线。

#### [0156] 实施例7检测降钙素原

[0157] 双抗夹心法检测降钙素原,具体步骤如下:

[0158] (1) 降钙素原捕获抗体 (PCT-M7402) 原液稀释包被:取1 $\mu$ L捕获抗体加入PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳包被浓度,混匀;取一张多通道芯片与基底密封;将稀释后的蛋白溶液由加样孔通入三条管道中,室温,包被30min。

[0159] (2) 封闭:用PBS缓冲液配置3%的BSA封闭液。揭去第一片芯片,风干后,贴上第二片芯片,使第二片芯片上的管道与第一片芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向管道均通入20 $\mu$ L BSA封闭液,室温30min;将封闭完毕的BSA取出。

[0160] (3) 不同浓度待检液的制备:取1 $\mu$ L降钙素原加入到PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中稀释成不同浓度梯度的样品,然后将待测样品通入芯片管道中,15 $\mu$ L/通道,室温反应30min,吸出,使用洗涤液洗涤3次。

[0161] (4) 磁颗粒纳米酶-标记抗体 (PCT-M7413) 的制备及反应:取100 $\mu$ L的5mg/mL的磁颗粒纳米酶,然后往里面加入一定量的EDC和NHS偶联反应试剂,反应20分钟后,磁分离,然后加入100 $\mu$ L 1mg/mL的抗体,用PBS溶液悬浮,整个反应2h,然后磁分离,去掉多余的抗体,得到磁颗粒纳米酶-抗体的偶联物。然后将这个合成的磁颗粒纳米酶-抗体偶联物通入到微流控芯片的管道里面,反应半个小时,和抗原、包被抗体组成三明治的结构。

[0162] (5) 信号读出:揭掉上层芯片,先芯片表面反应区域加入商品化的化学发光液,放入化学发光仪中,使用分析软件进行数据分析。

[0163] (6) 化学发光值-浓度曲线:以降钙素原稀释浓度取Lg对数为横坐标,样品的化学发光值纵坐标建立浓度曲线,具体结果如图7所示。

[0164] 尽管本发明已进行了一定程度的描述,明显地,在不脱离本发明的精神和范围的条件下,可进行各个条件的适当变化。可以理解,本发明不限于所述实施方案,而归于权利要求的范围,其包括所述每个因素的等同替换。

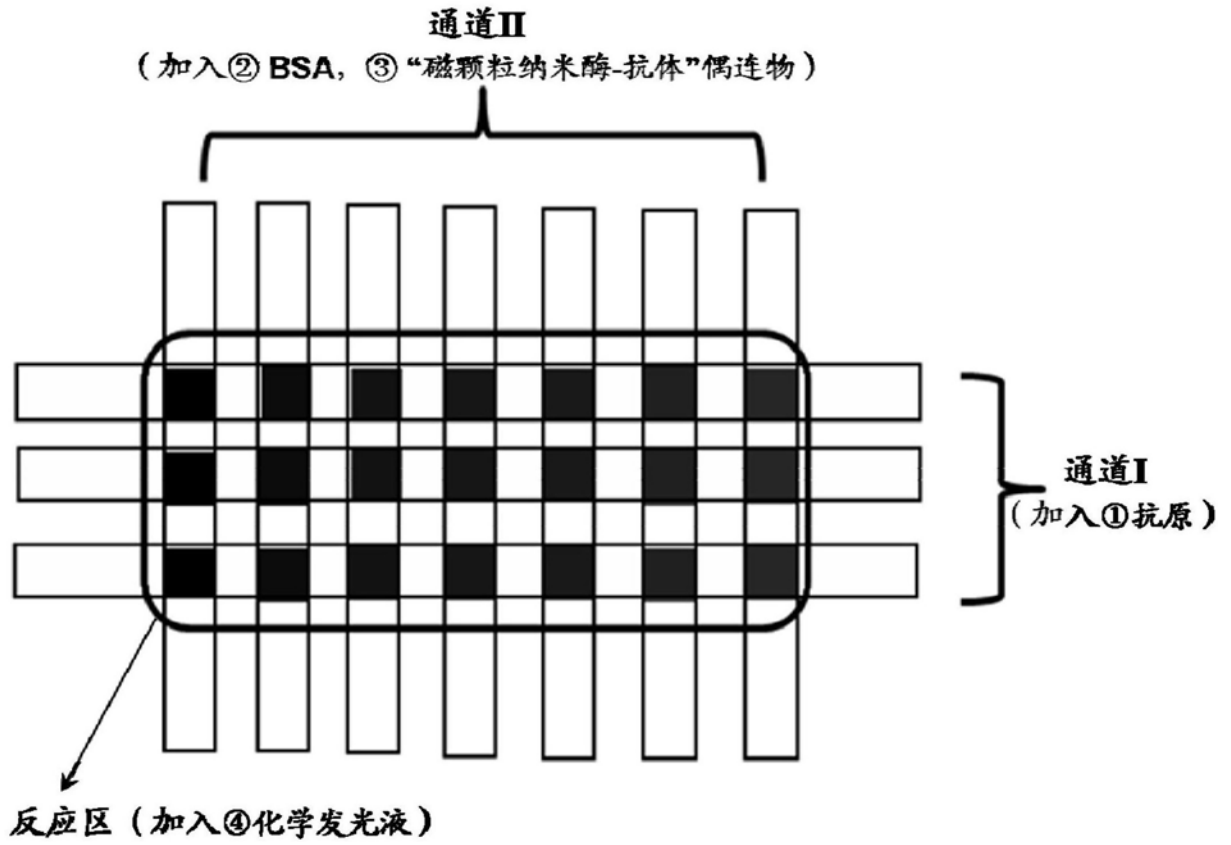


图1

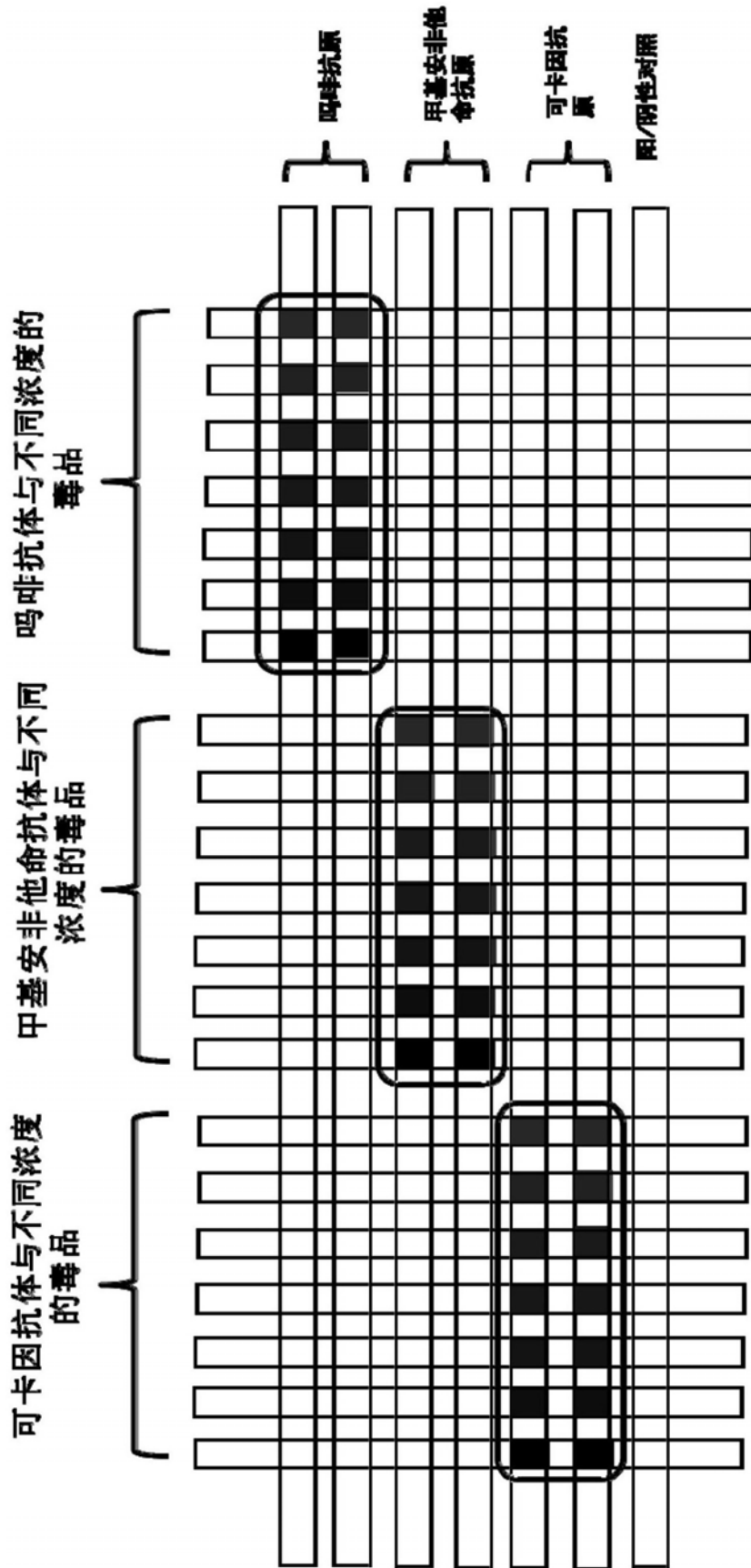


图2

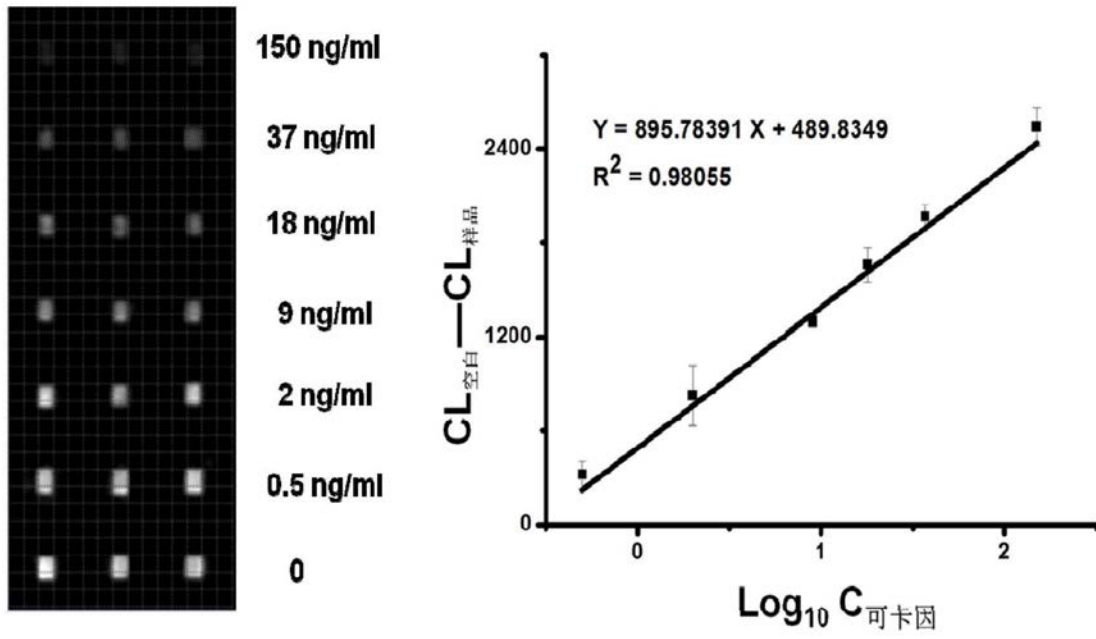


图3

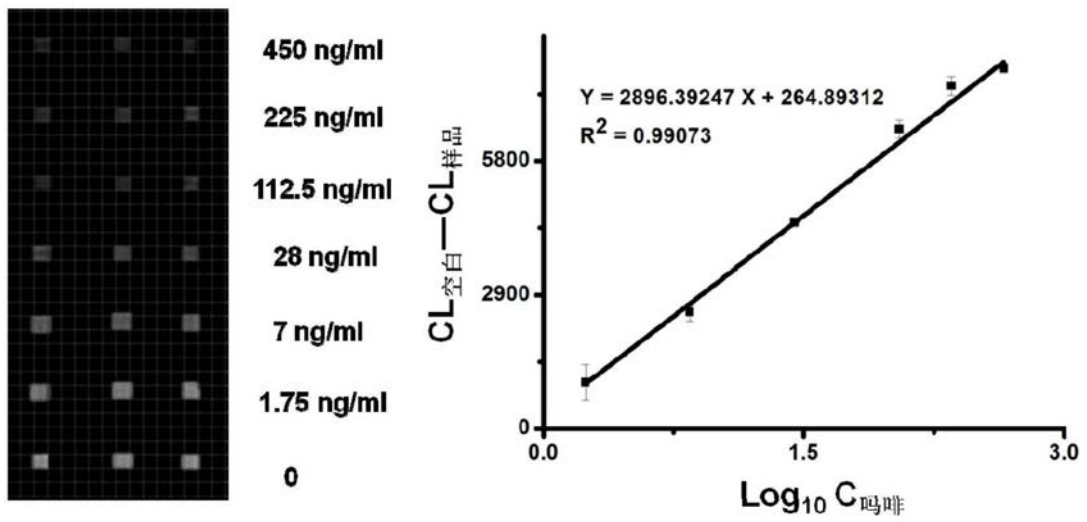


图4

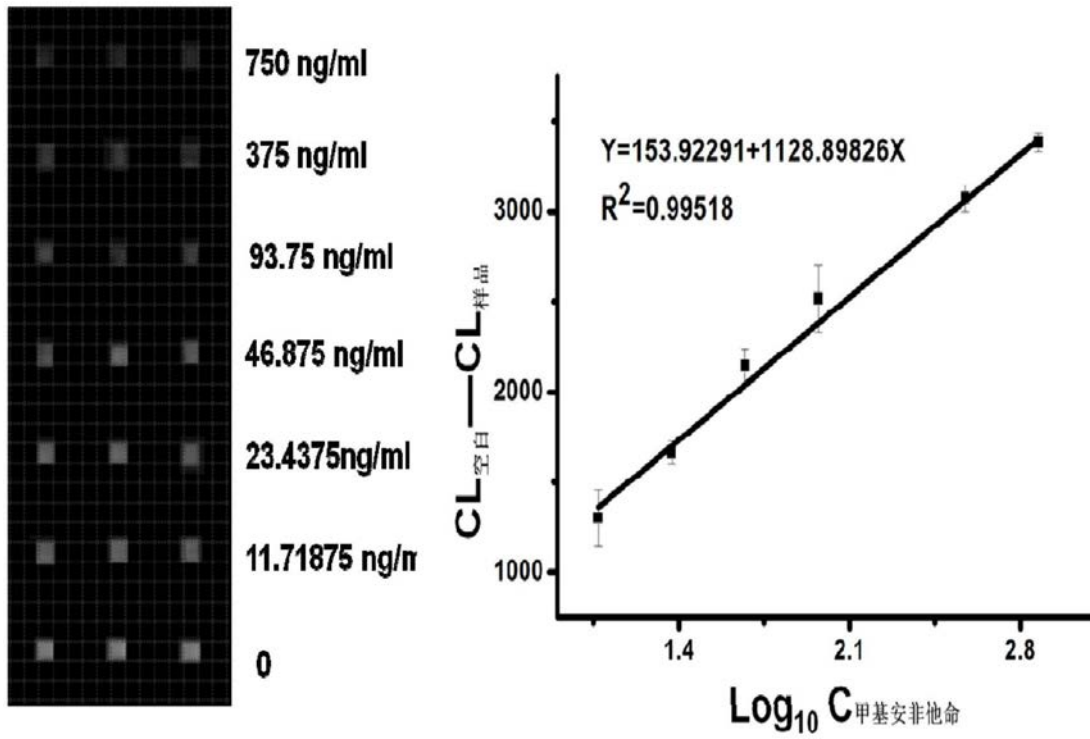


图5

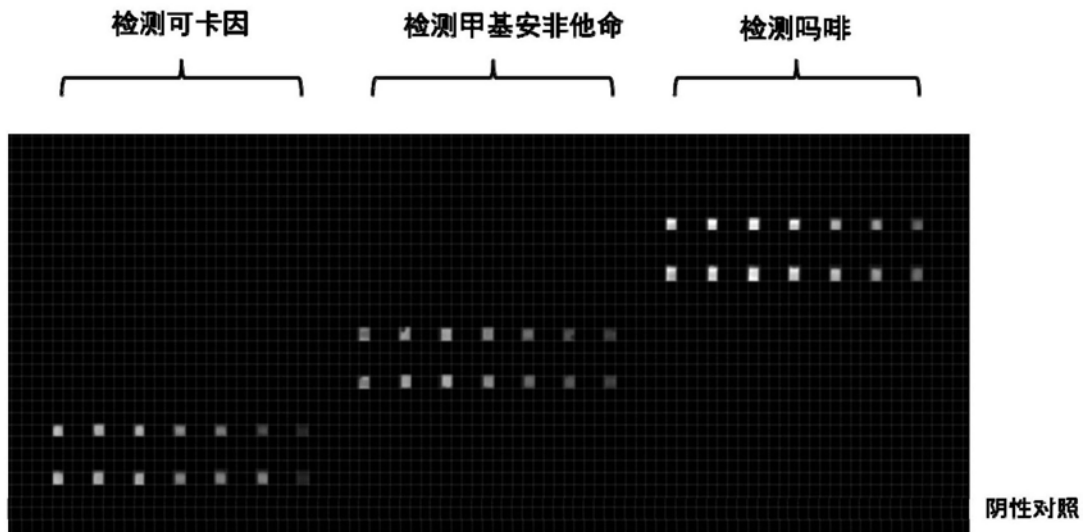


图6

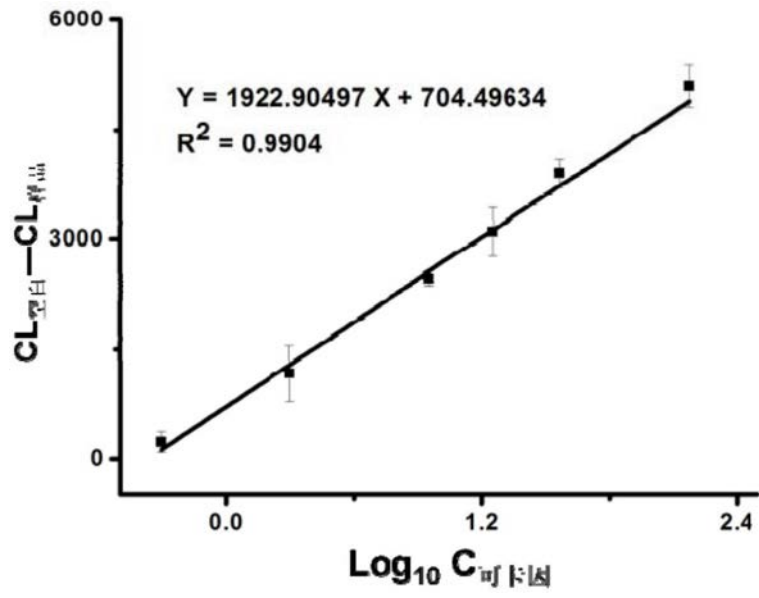


图7

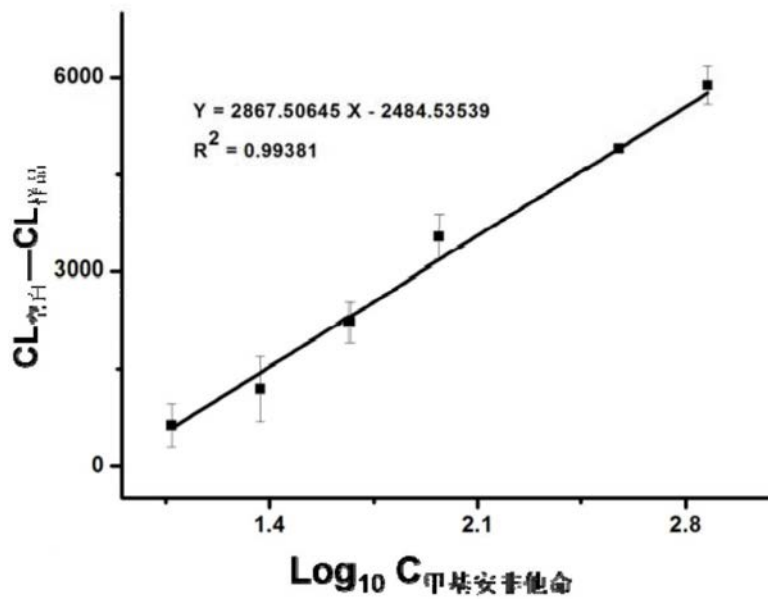


图8

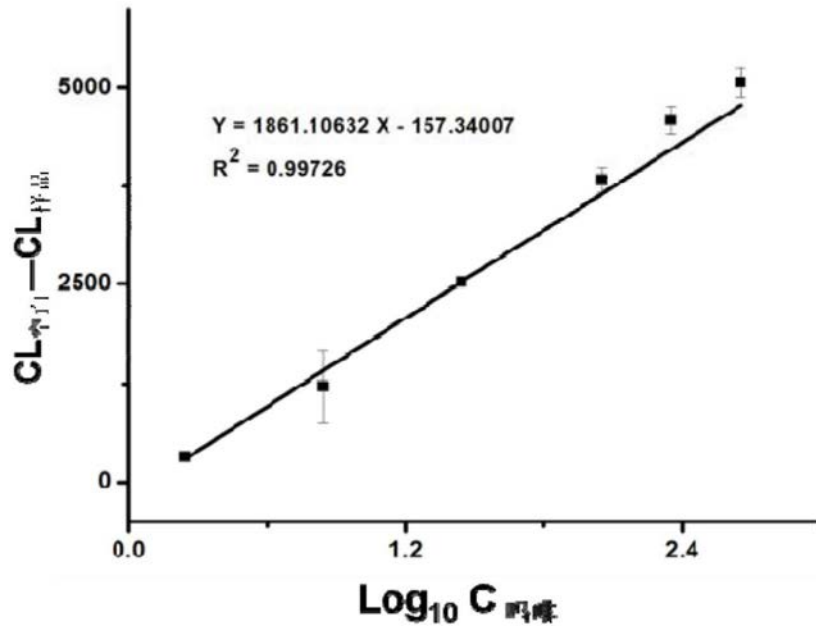


图9

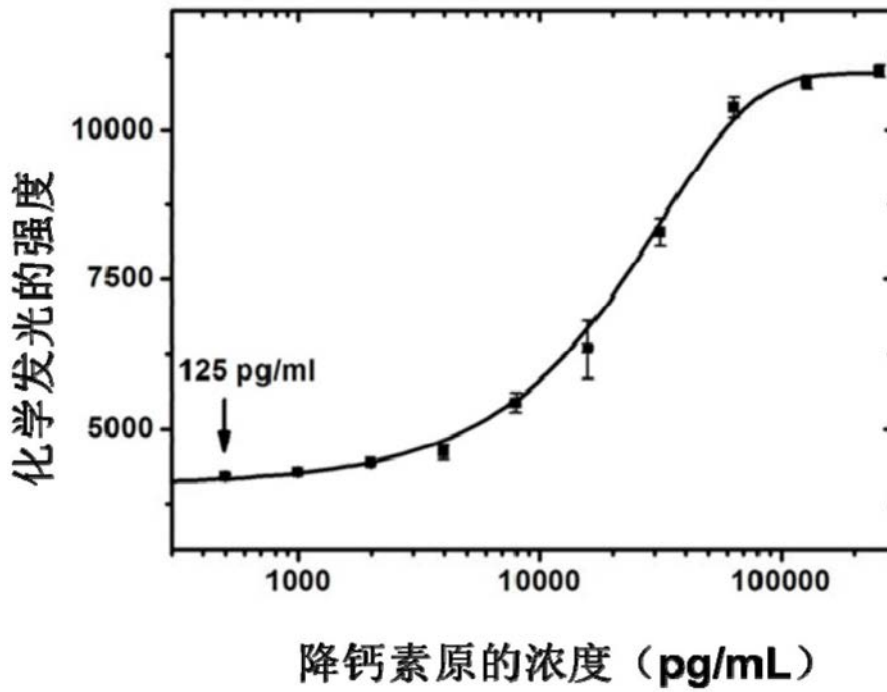


图10

专利名称(译)	基于磁颗粒纳米酶的微流控免疫芯片分析方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109239326A</a>	公开(公告)日	2019-01-18
申请号	CN201811018170.7	申请日	2018-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
[标]发明人	蒋兴宇 阎锡蕴 陈翊平 段德民		
发明人	蒋兴宇 阎锡蕴 陈翊平 段德民		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/53 G01N21/76 B01L3/00		
CPC分类号	G01N33/535 B01L3/502707 B01L2200/10 G01N21/763 G01N33/5304 G01N33/54326 G01N33/54346 G01N2446/84 G01N2446/90		
代理人(译)	刘丹妮		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种基于磁颗粒纳米酶的微流控免疫芯片分析方法及应用。本发明利用磁颗粒纳米酶类酶活性，将其作为HRP的替代品，可以使传统的微流控免疫芯片的稳定性得到很大的提高。并且与高灵敏度的化学发光法结合起来，可以大大提高检测的灵敏度。同时微流控芯片具有样本量少，多样本、多指标可同时定量检测，特异性强，灵敏度高，价格低廉，读取结果可量化、快捷和直观等优势，操作简便，不需要复杂的仪器设备和专业操作人员，适用于现场、快速检测。因此，本发明将为小分子和生物大分子的检测提供一个有力的工具。

