



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103657749 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 17

(21) 申请号 201310503157. 1

CN 102481574 A, 2012. 05. 30,

(22) 申请日 2013. 10. 23

EP 1712282 A2, 2006. 10. 18,

CN 101884941 A, 2010. 11. 17,

(73) 专利权人 北京纳迅科技股份有限公司

审查员 高秋菊

地址 102299 北京市昌平区南邵镇兴昌路 1 号昌平科技园区东区 1 栋 5 层

(72) 发明人 沈海滢 蒋兴宇 张伟

(74) 专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有限公司 11012

代理人 黄泽雄

(51) Int. Cl.

B01L 3/00(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102614948 A, 2012. 08. 01,

US 2002/0127740 A1, 2002. 09. 12,

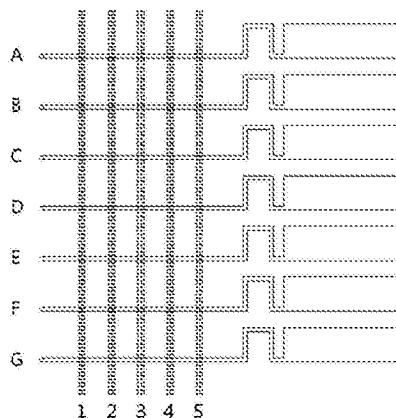
权利要求书2页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

用于免疫检测的集成化微流控芯片、其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于免疫检测的集成化微流控芯片、其制备方法和应用,该集成化微流控芯片,包括固定有捕获蛋白条带的基底层和与所述基底层叠置的功能层,所述功能层的与所述基底层叠置的表面设置至少一个微流控结构单元,每个微流控结构单元包括依次连接的进样口、直线型微流控凹槽、弯曲型微流控凹槽和废液槽,所述直线型微流控凹槽和弯曲型微流控凹槽与所述基底层叠置分别形成直线型微流控管道和弯曲型微流控管道。本发明微流控芯片能够实现液体单向流动,防止液体回流并具有废液槽,在一块芯片上集成多个微流控结构单元,因此可以同时多个样品进行多项检测。本发明的微流控芯片操作简单,节省时间且高效准确。



1. 一种用于免疫检测的集成化微流控芯片,其特征在于,包括固定有捕获蛋白条带的基底层和与所述基底层叠置的功能层,所述功能层的与所述基底层叠置的表面设置至少一个微流控结构单元,每个微流控结构单元包括依次连接的进样口、直线型微流控凹槽、弯曲型微流控凹槽和废液槽,所述直线型微流控凹槽和弯曲型微流控凹槽与所述基底层叠置分别形成直线型微流控管道和弯曲型微流控管道;

其中,所述废液槽通透,连接大气。

2. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述捕获蛋白为抗原和/或抗体。

3. 根据权利要求2所述的微流控芯片,其特征在于,所述抗体为抗蛋白抗体、抗激素抗体、抗核酸抗体和抗小分子抗体中的一种或多种。

4. 根据权利要求3所述的微流控芯片,其特征在于,所述抗体为抗促甲状腺激素抗体、抗催乳素抗体、抗促黄体生成激素抗体、抗生长激素抗体和抗卵泡刺激素抗体中的一种或多种。

5. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述直线型微流控管道与所述捕获蛋白条带垂直。

6. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述基底层和/或功能层的材料为石英、玻璃、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯或聚二甲基硅氧烷。

7. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述基底层的材料为活化处理的材料。

8. 根据权利要求7所述的微流控芯片,其特征在于,所述活化处理为等离子体轰击和/或酸处理。

9. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述直线型微流控管道和弯曲型微流控管道是用封闭剂封闭处理的。

10. 根据权利要求9所述的微流控芯片,其特征在于,所述封闭剂为小牛血清白蛋白、脱脂奶粉和聚乙二醇中的一种或多种。

11. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述基底层与所述功能层紧密贴合在一起。

12. 根据权利要求11所述的微流控芯片,其特征在于,所述基底层与所述功能层通过化学键或粘结剂紧密贴合在一起。

13. 根据权利要求12所述的微流控芯片,其特征在于,所述化学键是通过等离子体轰击使硅氧键打开形成羟基并在界面发生缩合反应生成的。

14. 根据权利要求12所述的微流控芯片,其特征在于,所述粘结剂是环氧树脂、聚氨酯、聚苯乙烯、聚丙烯酸酯、乙烯-醋酸乙烯共聚物中的一种或多种。

15. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述直线型微流控管道和弯曲型微流控管道的横截面呈矩形。

16. 根据权利要求15所述的微流控芯片,其特征在于,所述矩形的长度和宽度均为0.1-0.7mm。

17. 根据权利要求16所述的微流控芯片,其特征在于,所述矩形的长度和宽度均为0.5mm。

18. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述废液槽沿所述功能层的平面

呈矩形。

19. 如权利要求1所述的微流控芯片的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1) 在所述基底层上固定捕获蛋白条带;
- (2) 制备设置至少一个微流控结构单元且每个微流控结构单元包括依次连接的进样口、直线型微流控凹槽、弯曲型微流控凹槽和废液槽的功能层;
- (3) 将所述功能层的设置有微流控结构单元的表面与所述基底层的固定捕获蛋白条带的表面叠置在一起,使二者紧密贴合。

20. 如权利要求19所述的方法,其特征在于,通过机械加工、模塑或刻蚀的方法制备所述功能层。

21. 一种使用如权利要求1所述的微流控芯片进行免疫检测的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (a) 从进样口向微流控管道内通入待检物质液体进行孵育;
- (b) 孵育结束后,通入空气排空待检物质液体,然后通入清洗液清洗并排空;
- (c) 通入荧光分子或酶标记的检测抗体或抗原进行孵育;
- (d) 孵育结束后,进行清洗和排空,然后检测荧光信号或通入化学发光底物检测化学发光信号。

用于免疫检测的集成化微流控芯片、其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析检测技术领域,尤其涉及一种用于免疫检测的集成化微流控芯片、其制备方法及应用。

背景技术

[0002] 微流控(Microfluidics)免疫分析方法是近些年新发展起来的一项技术,该方法以分析化学为主,结合生物化学、物理化学和免疫学等相关学科的成果,在微小结构中操控流体,被称为微型实验室。应用到免疫分析中,对临床疾病诊断具有重要实用价值。例如,在分析样本量非常少的样品时,微流控技术表现出极强的优势,通常需要样品量为几毫升的实验在采用微流控技术后,仅需要几微升的样品量,大大节省了样本和试剂的消耗量,具有广泛的应用前景和重要的应用价值。

[0003] 目前,制约微流控免疫检测芯片广泛应用的一个瓶颈是操作比较繁琐,需要进行大量的液体打入和吸取动作来实现微流控管道内液体的孵育和清洗等目的,影响了微流控芯片的方便使用。因此,有必要将微流控芯片的功能集成方便操作。

发明内容

[0004] 为了解决现有微流控免疫检测技术中操作较为繁琐、操作步骤复杂的问题,本发明提供一种能够实现液体单向流动、防止液体回流及具有废液槽的微流控免疫检测芯片,可以同时多个样品进行多项检测,具有操作简单、节省时间及高效准确的特点。

[0005] 为实现本发明的目的,本发明采用以下技术方案:

[0006] 在第一方面,本发明提供一种用于免疫检测的集成化微流控芯片,包括固定有捕获蛋白条带的基底层和与所述基底层叠置的功能层,所述功能层的与所述基底层叠置的表面设置至少一个微流控结构单元,每个微流控结构单元包括依次连接的进样口、直线型微流控凹槽、弯曲型微流控凹槽和废液槽,所述直线型微流控凹槽和弯曲型微流控凹槽与所述基底层叠置分别形成直线型微流控管道和弯曲型微流控管道。

[0007] 在本发明的微流控芯片中,免疫反应发生在直线型微流控管道内的基底上捕获蛋白条带的位置。弯曲型微流控管道能够防止液体回流,实现液体的单方向流动。

[0008] 在本发明的微流控芯片中,所述捕获蛋白可以是抗原和/或抗体。所述抗体可以是抗蛋白抗体、抗激素抗体、抗核酸抗体和抗小分子抗体中的一种或多种;优选地,所述抗体为抗促甲状腺激素抗体、抗催乳素抗体、抗促黄体生成激素抗体、抗生长激素抗体和抗卵泡刺激素抗体中的一种或多种。

[0009] 在本发明的微流控芯片中,所述直线型微流控管道与所述捕获蛋白条带垂直。

[0010] 在本发明的微流控芯片中,所述基底层和/或功能层的材料可以是石英、玻璃、聚苯乙烯(Polystyrene,PS)、聚碳酸酯(Polycarbonate,PC)、聚甲基丙烯酸甲酯(Polyethyl Methacrylate,PMMA)或聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane,PDMS)。基底层与功能层的材料可以相同,也可以不同。还可以对基底层的材料进行活化处理,比如等离子体轰击

和/或酸处理等,使其以共价键交联生物分子,从而提高包被效率和包被物的稳定性。

[0011] 在本发明的微流控芯片中,直线型微流控管道和弯曲型微流控管道可以用封闭剂进行表面封闭处理,降低管道的内表面对生物分子的吸附性,进而使得样本中的待检物质可以更少量的被管道吸附,从而提高检测灵敏度。所述封闭剂可以是小牛血清白蛋白、脱脂奶粉和聚乙二醇中的一种或多种。

[0012] 在本发明的微流控芯片中,所述基底层与所述功能层紧密贴合在一起。具体地,所述基底层与所述功能层可以通过化学键或粘结剂紧密贴合在一起。所述化学键可以通过等离子体轰击使硅氧键打开形成羟基并在界面发生缩合反应生成的化学键;所述粘结剂可以是环氧树脂、聚氨酯、聚苯乙烯、聚丙烯酸酯、乙烯-醋酸乙烯共聚物中的一种或多种。

[0013] 在本发明的微流控芯片中,所述直线型微流控管道和弯曲型微流控管道的横截面呈矩形。所述矩形的长度和宽度可以分别为0.1-0.7mm,例如0.1mm、0.2mm、0.3mm、0.4mm、0.5mm、0.6mm或0.7mm,优选0.5mm。此外,所述废液槽沿所述功能层的平面呈矩形,并且所述废液槽通透,即连接大气,便于废液排除。

[0014] 在第二方面,本发明提供一种如第一方面所述的微流控芯片的制备方法,包括以下步骤:

[0015] (1)在所述基底层上固定捕获蛋白条带;

[0016] (2)制备设置至少一个微流控结构单元且每个微流控结构单元包括依次连接的进样口、直线型微流控凹槽、弯曲型微流控凹槽和废液槽的功能层;

[0017] (3)将所述功能层的设置有微流控结构单元的表面与所述基底层的固定捕获蛋白条带的表面叠置在一起,使二者紧密贴合。

[0018] 其中,所述功能层可以通过机械加工、模塑或刻蚀的方法制备。这些方法都是比较成熟的技术,比如具体可以参考《微流控分析芯片的加工技术》,殷学锋、方群、凌云扬,现代科学仪器,2001年04期。

[0019] 在第三方面,本发明提供一种使用如第一方面所述的微流控芯片进行免疫检测的方法,包括以下步骤:

[0020] (a)从进样口向微流控管道内通入待检物质液体进行孵育;

[0021] (b)孵育结束后,通入空气排空待检物质液体,然后通入清洗液清洗并排空;

[0022] (c)通入荧光分子或酶标记的检测抗体或抗原进行孵育;

[0023] (d)孵育结束后,进行清洗和排空,然后检测荧光信号或通入化学发光底物检测化学发光信号。

[0024] 在第四方面,本发明提供一种如第一方面所述的微流控芯片在免疫检测中的应用。

[0025] 需要说明的是:本发明第三方面和第四方面可能涉及医学领域的疾病诊断,也可能涉及非疾病诊断的免疫检测,比如检测环境中的微生物等方面,本发明中该部分内容对应的权利要求的保护范围以非疾病诊断的免疫检测为限,排除疾病诊断的情况。

[0026] 本发明的有益效果为:本发明的微流控芯片,包括固定有捕获蛋白条带的基底层和与所述基底层叠置的功能层,所述功能层的与所述基底层叠置的表面设置至少一个微流控结构单元,每个微流控结构单元包括依次连接的进样口、直线型微流控凹槽、弯曲型微流控凹槽和废液槽,所述直线型微流控凹槽和弯曲型微流控凹槽与所述基底层叠置分别形成

直线型微流控管道和弯曲型微流控管道。本发明微流控芯片的上述结构能够实现液体单向流动；弯曲型微流控管道能够防止液体回流；具有废液槽能够将废液及时排除；在一块芯片上集成多个微流控结构单元，因此可以同时多个样品进行多项检测。本发明的微流控芯片操作简单，节省时间且高效准确。

附图说明

[0027] 图1为本发明实施例1的微流控芯片的功能层结构单元结构示意图，其中11表示进样口，12表示直线型微流控凹槽，13表示弯曲型微流控凹槽，14表示废液槽。

[0028] 图2为本发明实施例1的微流控芯片的功能层设计结构示意图，多个功能层结构单元并排集成在微流控芯片上的功能层上。

[0029] 图3为本发明实施例2中用于免疫检测的集成化微流控芯片进行检测的示意图，其中A-G表示7个并排集成在微流控芯片上的功能层结构单元，分别通入不同的待检物质，1-5表示5个不同的捕获蛋白条带。

[0030] 图4为本发明实施例2中用于免疫检测的集成化微流控芯片进行检测的实验结果图，其中A-G表示7个并排集成在微流控芯片上的功能层结构单元，分别通入不同的待检物质，1-5表示5个不同的捕获蛋白条带，图中白色斑表示检测到化学发光信号，亮度表示化学发光信号的强度，证明相应的捕获蛋白与待检物质发生结合。

具体实施方式

[0031] 下面将结合附图并通过具体实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，以下实施例仅为本发明的优选实施例，以便于更好地理解本发明，因而不应视为限定本发明的范围。对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换或改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法；所用的实验材料中抗原、抗体、蛋白购自北京润德康泰生物有限公司，化学试剂购自sigma公司，其它如无特殊说明，均为自常规生化试剂厂商购买得到的。

[0032] 实施例1：用于免疫检测的集成化微流控芯片

[0033] 请参考图1和图2，一种用于免疫检测的集成化微流控芯片，包括固定有捕获蛋白条带的基底层和与所述基底层叠置的功能层，所述功能层的与所述基底层叠置的表面设置至少一个微流控结构单元，每个微流控结构单元包括依次连接的进样口11、直线型微流控凹槽12、弯曲型微流控凹槽13和废液槽14，所述直线型微流控凹槽12和弯曲型微流控凹槽13与所述基底层叠置分别形成直线型微流控管道和弯曲型微流控管道。

[0034] 在本实施例的微流控芯片中，所述直线型微流控管道和弯曲型微流控管道的横截面呈矩形。所述矩形的长度和宽度可以分别为0.5mm。此外，所述废液槽沿所述功能层的平面呈矩形，并且所述废液槽通透，即连接大气，便于废液排除。

[0035] 在本实施例的微流控芯片中，微流控结构单元并排排列，其直线型微流控管道与所述捕获蛋白条带垂直。

[0036] 实施例2：用微流控芯片进行免疫检测

[0037] 按照实施例1的设计，在芯片基底层固定捕获蛋白，形成若干条捕获蛋白条带。将

芯片功能层覆盖在基底层表面,使功能层的直线型微流控管道与基底层的捕获蛋白条带垂直。在微流控管道内依次通入蛋白封闭液,封闭结束后,在微流控管道内通入空气,将蛋白封闭液推入废液槽内,功能层的弯曲型微流控管道能够有效防止废液槽内液体回流。在微流控管道内依次通入待检物质,孵育结束后,在微流控管道内通入空气,将待检物质液体推入废液槽内,功能层的弯曲型微流控管道能够有效防止废液槽内液体回流。清洗后再依次通入检测抗体,在基底层纵横交错的区域即会发生包被抗体-待检物质-检测抗体的结构,包被抗体即捕获蛋白。清洗后进行检测,如果检测抗体上标记有荧光分子,即可以检测荧光进行分析;如果检测抗体上标记有辣根过氧化物(HRP)酶,通入化学发光底物后及可以检测分析。

[0038] 具体地,请参考图3,在芯片基底层上固定不同的捕获蛋白:促甲状腺激素(TSH)、催乳素(PRL)、促黄体生成激素(LH)、生长激素(GH)、卵泡刺激素(FSH)的包被抗体,形成图3所示的1、2、3、4和5这5个蛋白条带。将芯片功能层按照图3所示的位置覆盖在基底层表面,使功能层直线型微流控管道与基底层捕获蛋白条带垂直,芯片功能层(如图2所示)与基底层紧密贴合,形成微流控芯片管道。

[0039] 在微流控芯片管道A、B、C、D、E、F和G内依次从进样口通入蛋白封闭液(小牛血清白蛋白溶液),室温下封闭时间为30分钟;封闭结束后,在微流控芯片管道内通入空气,将蛋白封闭液推入废液槽内,功能层的弯曲型微流控管道能够有效防止废液槽内液体回流。在微流控管道A、B、C、D、E、F和G内依次通入待检物质血清样本进行孵育(室温,半小时),血清样本中含有包被抗体对应的抗原。

[0040] 孵育结束后,在微流控芯片管道内通入空气,将待检物质液体推入废液槽内。然后向微流控芯片管道内通入清洗液(磷酸盐缓冲液,德国默克公司),用空气将清洗液推入到废液槽后,再依次在微流控芯片管道A、B、C、D、E、F和G内通入促甲状腺激素(TSH)、催乳素(PRL)、促黄体生成激素(LH)、生长激素(GH)、卵泡刺激素(FSH)的检测抗体混合液进行孵育(室温,半小时),在基底层纵横交错的区域即会产生包被抗体-待检物质-检测抗体的结构。

[0041] 孵育结束后,在微流控芯片管道A、B、C、D、E、F和G内通入化学发光底物(过氧化氢和鲁米诺),检测抗体上连接有HRP酶,化学发光底物在HRP酶的催化下,产生光信号即可以进行检测分析,实验结果如图4所示,图中白色斑表示检测到化学发光信号,亮度表示化学发光信号的强度,证明相应的捕获蛋白与待检物质发生结合。

[0042] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细特征以及详细方法,但本发明并不局限于上述详细特征以及详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细特征以及详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明选用组分的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

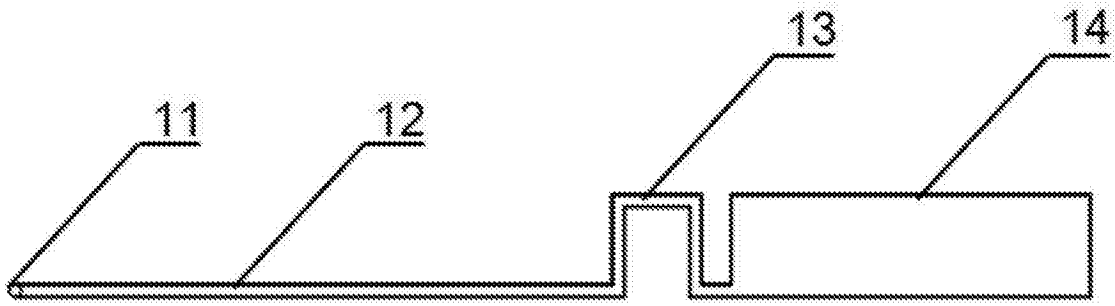


图1

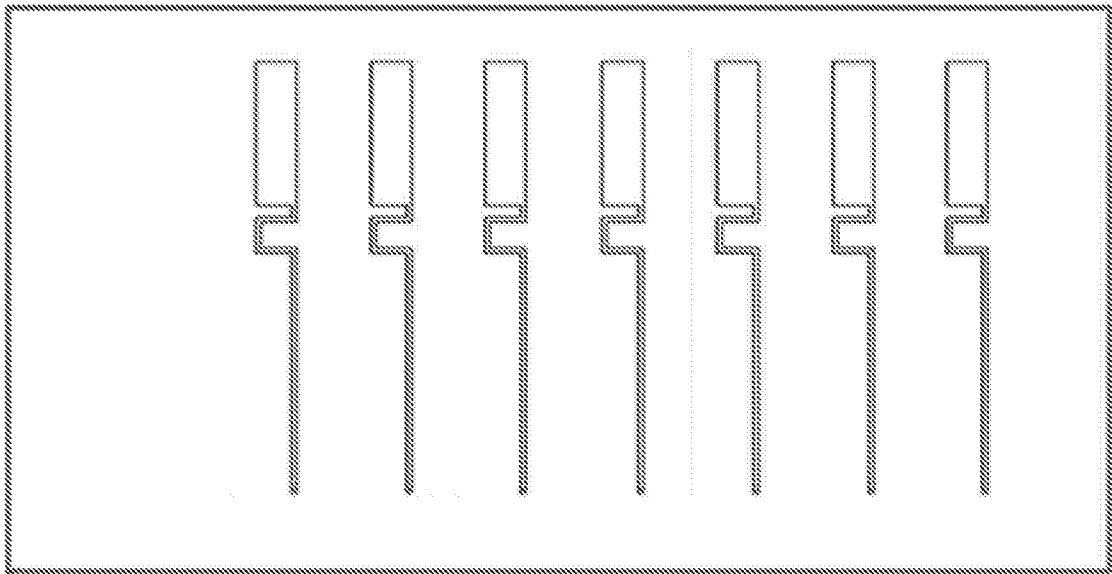


图2

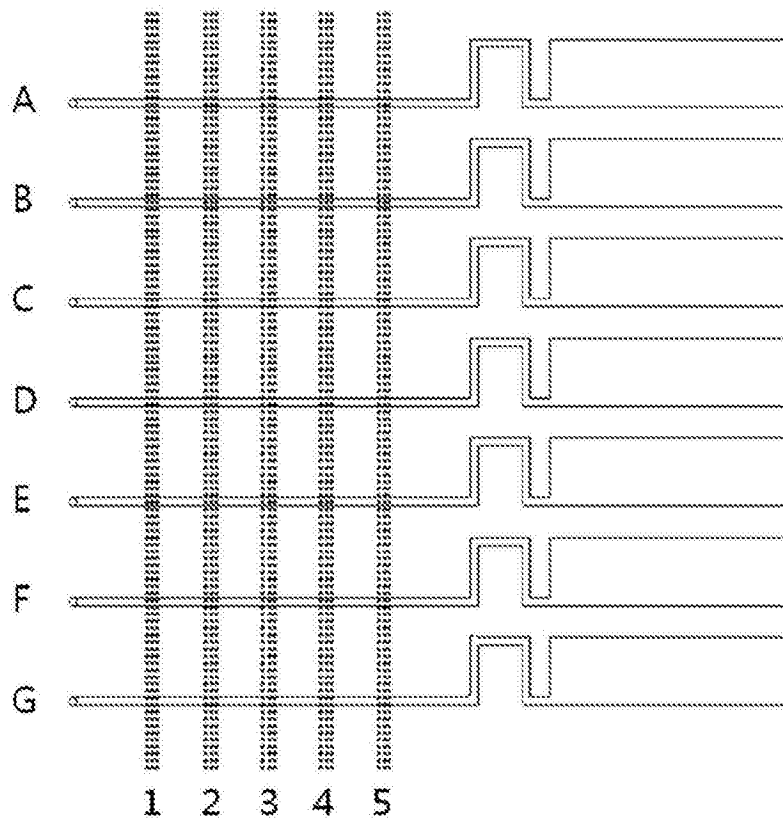


图3

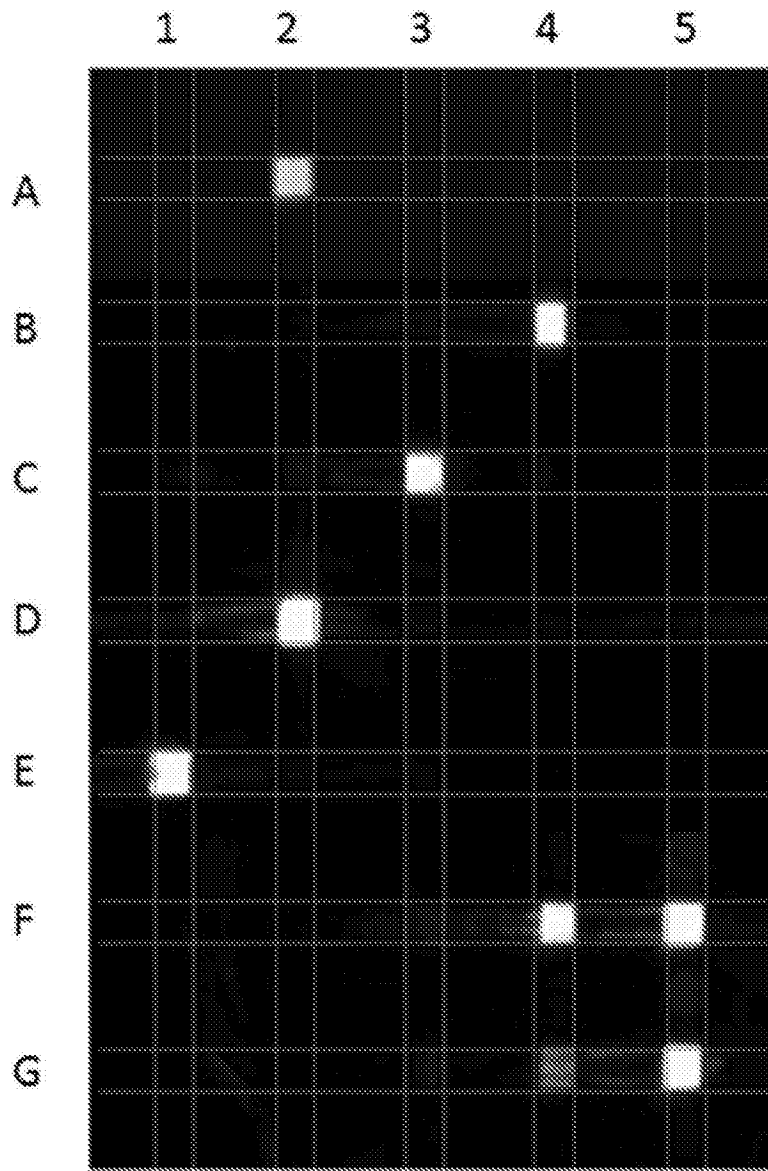


图4

专利名称(译)	用于免疫检测的集成化微流控芯片、其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN103657749B	公开(公告)日	2016-08-17
申请号	CN201310503157.1	申请日	2013-10-23
[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)	北京纳讯科技股份有限公司		
[标]发明人	沈海滢 蒋兴宇 张伟		
发明人	沈海滢 蒋兴宇 张伟		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/53		
代理人(译)	黄泽雄		
审查员(译)	高秋菊		
其他公开文献	CN103657749A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于免疫检测的集成化微流控芯片、其制备方法和应用，该集成化微流控芯片，包括固定有捕获蛋白条带的基底层和与所述基底层叠置的功能层，所述功能层的与所述基底层叠置的表面设置至少一个微流控结构单元，每个微流控结构单元包括依次连接的进样口、直线型微流控凹槽、弯曲型微流控凹槽和废液槽，所述直线型微流控凹槽和弯曲型微流控凹槽与所述基底层叠置分别形成直线型微流控管道和弯曲型微流控管道。本发明微流控芯片能够实现液体单向流动，防止液体回流并具有废液槽，在一块芯片上集成多个微流控结构单元，因此可以同时多个样品进行多项检测。本发明的微流控芯片操作简单，节省时间且高效准确。

