



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105424922 B

(45)授权公告日 2018.01.19

(21)申请号 201510900358.4

审查员 胡新芬

(22)申请日 2015.12.09

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105424922 A

(43)申请公布日 2016.03.23

(73)专利权人 北京乐普医疗科技有限责任公司

地址 102200 北京市昌平区超前路37号3号楼

(72)发明人 胡飞 熊晶 张单单 邱笑违

余占江

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 胡彬

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

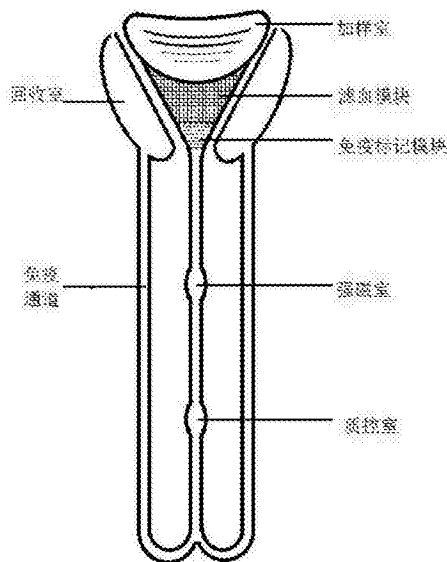
权利要求书1页 说明书15页 附图1页

(54)发明名称

基于磁珠包被抗体的微流控芯片及捕获心肌标志物的方法

(57)摘要

本发明实施例公开了一种基于磁珠包被抗体的微流控芯片及捕获心肌标志物的方法,应用于免疫磁珠包被结合抗体领域,防止包被抗体复溶于流体系统及被流体中抗原捕获脱离包被基材。所述微流控芯片包括:加样室、Y型结构通道和回收室;Y型结构通道分为上部的漏斗状通道和下部的柱形通道;所述漏斗状通道的底部为免疫标记模块;免疫标记模块上部为滤血模块;下部的柱形通道底端分岔为一对并行的免疫通道;每个免疫通道末端连接一个回收室;柱形通道设置上下两个腔室,上部腔室为强磁室,下部腔室为质控室。



1. 一种微流控芯片,其特征在于,包括:
加样室、Y型结构通道和回收室;
Y型结构通道分为上部的漏斗状通道和下部的柱形通道;所述漏斗状通道的底部为免疫标记模块;免疫标记模块上部为滤血模块;所述滤血模块中间部位还包括结合抗体的免疫磁珠,所述免疫磁珠经过活化剂活化;
下部的柱形通道底端分岔为一对并行的免疫通道;每个免疫通道末端连接一个回收室;
柱形通道设置上下两个腔室,上部腔室为强磁室,下部腔室为质控室。
2. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述滤血模块为玻纤或无纺布材料。
3. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述滤血模块以兔抗人红细胞蛋白与凝集素按质量比2:1处理,冻干制得。
4. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述微流控芯片强磁室处的底部嵌有强磁片。

基于磁珠包被抗体的微流控芯片及捕获心肌标志物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫磁珠包被结合抗体领域,尤其涉及一种基于磁珠包被抗体的微流控芯片及捕获心肌标志物的方法。

背景技术

[0002] 目前,微流控技术在生化分析、免疫诊断、环境检测等领域具有重要进展,如在精细控制流速的前提下,控制抗原抗体反应,从而达到对免疫反应的高灵敏度控制。通过范德华力、静电吸附、高分子包埋等手段心肌抗体被包被于反应微室中,进行抗原捕获。为达到即时检测的目的,微通道中通过高传质达到免疫底物充分的混合,进而存在包被抗体复溶于流体系统及被流体中抗原捕获脱离包被基材等问题。

发明内容

[0003] 本专利目的是提供一种基于磁珠包被抗体的微流控芯片及捕获心肌标志物的方法,高灵敏度地捕获样本中心肌标志物(抗原)的存在。通过对样本进行预处理和平衡,如红细胞的去除、pH平衡、本底背景消除,最后获得体系相似的反应体系进入检测室进行目标捕获,防止包被抗体复溶于流体系统及被流体中抗原捕获脱离包被基材。

[0004] 为达到以上目的,本申请采用免疫磁珠捕获法,实现微流控芯片和基于该芯片的捕获心肌标志物的方法。免疫磁珠捕获法是一种将磁珠磁场响应能力与免疫特异性相结合的新型免疫学技术。免疫磁珠具有固相化试剂特质及免疫学反应高灵敏度、高专一性等优点,在免疫学检测、微生物检测、细胞分离等领域广泛应用。利用合成结构含铁,免疫磁珠可被磁场牵引,其表层具有特异性功能团,可与具有生物活性蛋白进行化学基团的共价结合,作为抗体承载体。免疫反应中磁珠包被抗体与具有契合决定簇的抗原结合,从血浆等复杂体系中高效地分离,并且被标记有标识物的抗体所识别定量检测。

[0005] 本发明第一方面提供一种微流控芯片,包括:

[0006] 加样室、Y型结构通道和回收室;

[0007] Y型结构通道分为上部的漏斗状通道和下部的柱形通道;所述漏斗状通道的底部为免疫标记模块;免疫标记模块上部为滤血模块;

[0008] 下部的柱形通道底端分岔为一对并行的免疫通道;每个免疫通道末端连接一个回收室;

[0009] 柱形通道设置上下两个腔室,上部腔室为强磁室,下部腔室为质控室。

[0010] 优选的,所述滤血模块为玻纤或无纺布材料。

[0011] 优选的,所述滤血模块以兔抗人红细胞蛋白与凝集素按质量比2:1处理,冻干制得。

[0012] 优选的,所述滤血模块中间部位还包括结合抗体的免疫磁珠,所述免疫磁珠经过活化剂活化。

[0013] 优选的,所述微流控芯片强磁室处的底部嵌有强磁片。

[0014] 本发明第二方面提供一种捕获心肌标志物的方法,所述方法应用于上述任一实施例所述的微流控芯片,所述方法包括:

[0015] 制作包被有能与血液中心肌标志物特异性结合的抗体的免疫磁珠;

[0016] 对所述心肌标志物的对位抗体标记免疫标识物;

[0017] 将包被抗体的免疫磁珠输入所述芯片的滤血模块,将标记对位抗体的免疫标识物输入免疫标记模块;

[0018] 将一定量心肌标记物样本与平衡液的混合液加至加样室;

[0019] 启动检测设备,反应预设时间,对预定检测项目结果进行检测。

[0020] 优选的,不同的心肌标志物具有不同的磁珠包被体系。

[0021] 优选的,不同的心肌标志物具有不同的标识物;

[0022] 所述标识物包括:量子点、荧光微球和胶体金。

[0023] 优选的,所述心肌标志物包括:心肌肌钙蛋白cTnI、肌红蛋白MYO、C反应蛋白CRP、心脏型脂肪酸结合蛋白FABP、N端脑钠肽前体NT-proBNP、髓过氧化物酶MPO。

[0024] 优选的,所述心肌标志物为心肌肌钙蛋白cTnI时,包被抗体的免疫磁珠的制备包括:

[0025] 免疫磁珠平衡MES缓冲液至所述MES缓冲液的pH为4~5,离子强度为0.1M;

[0026] 在平衡PH后的溶液中,分别加入EDC和NHS,至EDC与NHS在溶液中的浓度均为1mg/mL,反应20分钟后离心弃上清;

[0027] 以所述平衡前的MES缓冲液复溶弃上清后的沉淀物;

[0028] 复溶得到的溶液中加入抗体8E10至所述抗体8E10的浓度为0.5mg/mL;

[0029] 混合包被1小时,加入BSA至所述BSA的浓度为1%终止反应。

[0030] 优选的,所述心肌标志物为心肌肌钙蛋白cTnI时,所述心肌标志物标记免疫标识物包括:

[0031] 1mg量子点平衡pH为7.5~8.5、浓度0.01M的PBS缓冲液至所述量子点的浓度为0.1mg/mL;

[0032] 在平衡后的溶液中,分别加入EDC与NHS,至所述EDC和NHS的浓度均为0.5mg/mL,活化30分钟后离心弃上清;

[0033] 以所述平衡前的PBS缓冲液复溶弃上清后的沉淀物;

[0034] 在复溶后的溶液中,加入抗体7G2,标记20分钟,加入BSA至所述BSA的浓度为1%终止反应。

[0035] 优选的,所述心肌标志物为肌红蛋白MYO时,包被抗体的免疫磁珠的制备包括:

[0036] 免疫磁珠平衡PB缓冲液至缓冲液的pH为7~8,离子强度为0.1M;

[0037] 在平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS,至所述EDC与NHS的浓度均为1mg/mL,反应20分钟后离心弃上清;

[0038] 以所述平衡前的PB缓冲液复溶弃上清后沉淀物;

[0039] 在复溶得到的溶液中,加入抗体4E2至所述抗体4E2的浓度为0.5mg/mL,混合包被1小时,加入BSA至所述BSA的浓度为1%终止反应。

[0040] 优选的,所述心肌标志物为肌红蛋白MYO时,所述心肌标志物标记免疫标识物包括:

- [0041] 1mg荧光微球平衡pH为7~9、浓度0.01M的PBS缓冲液至荧光微球的浓度为0.1mg/mL;
- [0042] 在平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS,至所述EDC与NHS的浓度均为0.5mg/mL,活化30分钟后离心弃上清;
- [0043] 以所述平衡前的PBS缓冲液复溶弃上清后的沉淀物;
- [0044] 在复溶后的溶液中,加入抗体MYO,标记20分钟,加入BSA至所述BSA的浓度为1%终止反应。
- [0045] 优选的,所述心肌标志物为C反应蛋白CRP时,包被抗体的免疫磁珠的制备包括:
- [0046] 免疫磁珠平衡MES缓冲液至pH为4.5~5.5,离子强度为0.1M;
- [0047] 在平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS,至所述EDC与NHS的浓度均为1mg/mL,反应20分钟后离心弃上清;
- [0048] 以所述平衡前的MES缓冲液复溶弃上清后的沉淀物,加入抗体CRP135至所述抗体CRP135在复溶后的溶液中的浓度为0.5mg/mL;
- [0049] 混合包被1小时,加入BSA至所述BSA在复溶后的溶液中的浓度为1%终止反应。
- [0050] 优选的,所述心肌标志物为C反应蛋白CRP时,所述心肌标志物标记免疫标识物包括:
- [0051] 40nm胶体金溶液以K₂CO₃溶液平衡至胶体金溶液pH为8.5-9.5;
- [0052] 在平衡后的溶液中加入抗体CRP36,标记1小时;
- [0053] 标记1小时后,在溶液中加入BSA至所述BSA的浓度为1%终止反应;
- [0054] 终止反应后离心,以离子强度为0.1M、pH为7~9的PBS缓冲液复溶至终止反应时溶液体积的0.1倍。
- [0055] 优选的,所述标志物为心脏型脂肪酸结合蛋白FABP时,包被抗体的免疫磁珠的制备包括:
- [0056] 免疫磁珠平衡MES缓冲液至缓冲液pH为4~5,离子强度0.1M;
- [0057] 平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS,至所述EDC和NHS的浓度均为1mg/mL,反应20分钟后离心弃上清;
- [0058] 以所述平衡前的MES缓冲液复溶弃上清后的沉淀物,在复溶后的溶液中加入抗体FABP 5B5至浓度为1.0mg/mL,混合包被1小时,加入BSA至BSA浓度为1%终止反应。
- [0059] 优选的,所述标志物为心脏型脂肪酸结合蛋白FABP时,所述心肌标志物标记免疫标识物包括:
- [0060] 1mg量子点平衡pH为7~8、浓度为0.01M的PBS溶液至量子点浓度为0.1mg/mL;
- [0061] 在平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS,至EDC与NHS在溶液中的浓度均为0.5mg/mL,活化30分钟后,离心弃上清;
- [0062] 将弃上清之后的沉淀物以所述平衡前的PBS溶液复溶,加入抗体FABP 28标记20分钟;
- [0063] 加入BSA至所述BSA浓度为1%终止反应。
- [0064] 优选的,所述心肌标志物为N端脑钠肽前体NT-proBNP时,包被抗体的免疫磁珠的制备包括:
- [0065] 免疫磁珠平衡PBS缓冲液至缓冲液的pH为6~7,离子强度为0.01M;

- [0066] 在平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS,至所述EDC与NHS在溶液中的浓度均为1mg/mL,反应20分钟后离心弃上清;
- [0067] 以所述平衡前的PBS缓冲液复溶弃上清后的沉淀物,加入抗体18H5至所述抗体18H5在复溶后的溶液中的浓度为1mg/mL;
- [0068] 混合包被1小时,加入BSA至所述BSA复溶后的溶液中的浓度为1%终止反应。
- [0069] 优选的,所述心肌标志物为N端脑钠肽前体NT-proBNP时,所述心肌标志物标记免疫标识物包括:
- [0070] 1mg量子点平衡pH为7.5-8.5、浓度为0.01M的PBS缓冲液至量子点的浓度0.1mg/mL;
- [0071] 在平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS,至所述EDC和NHS的浓度分别为0.5mg/mL,活化30分钟后离心弃上清;
- [0072] 以所述平衡前的PBS缓冲液复溶弃上清之后的沉淀物,加入抗体15F11,标记30分钟,加入BSA至所述BSA在复溶后的溶液中的浓度为1%终止反应。
- [0073] 优选的,所述心肌标志物为髓过氧化物酶MPO时,包被抗体的免疫磁珠的制备包括:
- [0074] 免疫磁珠平衡PB缓冲液至溶液pH为7.5~8.5,离子强度0.01M;
- [0075] 在平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS,至EDC与NHS在溶液中的浓度均为1mg/mL,反应20分钟后离心弃上清;
- [0076] 以所述平衡前的PB缓冲液复溶弃上清后的沉淀物,在复溶后的溶液中加入抗体19H2至所述抗体19H2的浓度为0.5mg/mL;
- [0077] 混合包被1小时,加入BSA至所述BSA的浓度1%终止反应。
- [0078] 优选的,所述心肌标志物为髓过氧化物酶MPO时,所述心肌标志物标记免疫标识物包括:
- [0079] 1mg荧光微球平衡pH为6.5~7.5、浓度为0.1M的PBS溶液至荧光微球的浓度为0.1mg/mL;
- [0080] 在平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS,至EDC与NHS在溶液中的浓度均为0.5mg/mL,活化30分钟后,离心弃上清;
- [0081] 以所述平衡前的PBS溶液复溶弃上清后的沉淀物,在复溶后的溶液中加入抗体18B7,标记20分钟,加入BSA至所述BSA的浓度为1%终止反应。
- [0082] 本发明第三方面提供一种捕获心肌标志物的方法,所述方法应用于上述任一实施例所述的微流控芯片,所述方法包括:
- [0083] 制作包被有能与血液中心肌标志物特异性结合的抗体的免疫磁珠;
- [0084] 对所述心肌标志物的对位抗体标记免疫标识物;
- [0085] 将标记对位抗体的免疫标识物输入免疫标记模块;
- [0086] 将一定量心肌标记物样本与平衡液的混合液加至加样室,所述平衡液中包含所述包被抗体的免疫磁珠;
- [0087] 启动检测设备,反应预设时间,对结果进行检测。
- [0088] 与现有技术相比,本发明提供的技术方案具有以下优点:
- [0089] 本发明提供技术方案中,通过免疫磁珠包被抗体捕捉样本中抗原,磁珠与包被抗

体的共价结合,具有高灵敏度、高特异性、低背景噪音等特点。基于微流控检测芯片,通过精细稳定地控制免疫反应过程,达到有效地控制微反应的变异系数。强力磁场对目标体系的高捕获能力,可以在既定区域内控制免疫磁珠均匀分布,保证标记信号被检测设备识别。通过对样本进行预处理和平衡,如红细胞的去除、pH平衡、本底背景消除,最后获得体系相似的反应体系进入检测室进行目标捕获,防止包被抗体复溶于流体系统及被流体中抗原捕获脱离包被基材。

[0090] 进一步的,根据多类心肌标识物的不同特性,优选不同反应体系,诸如免疫磁珠存放位置,标识物种类及标记系统,从而达到良好的操控效果和移植效果。

附图说明

[0091] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作一简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0092] 图1为本发明提供的较优的一种微流控芯片结构示意图;

[0093] 图2为本专利的一个较优的一种磁珠包被抗体的微流控免疫反应示意图。

具体实施方式

[0094] 为了使本技术领域的人员更好地理解本发明方案,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分的实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都应当属于本发明保护的范围。

[0095] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细公开的描述。

[0096] 参考图1所示,为本发明提供的一种基于磁珠包被抗体的微流控芯片,该芯片的结构如下:

[0097] 加样室、Y型结构通道和回收室;

[0098] Y型结构通道分为上部的漏斗状通道和下部的柱形通道;所述漏斗状通道的底部为免疫标记模块;免疫标记模块上部为滤血模块;

[0099] 下部的柱形通道底端分岔为一对并行的免疫通道;每个免疫通道末端连接一个回收室;

[0100] 漏斗状通道底端与柱形通道底端之间设置上下两个腔室,上部腔室为强磁室,下部腔室为质控室。

[0101] 其中,优选的,所述滤血模块可以采用玻纤或无纺布材料。以免抗人红细胞蛋白与凝集素按质量比2:1处理,冻干制得;

[0102] 免疫磁珠可以在样品加样至该芯片之前与心肌标志物结合,优选的,根据不同的心肌标志物的特点,还可以在所述滤血模块中间部位设置结合抗体后的磁珠,所述磁珠经过活化剂活化。在所述微流控芯片强磁室处的底部嵌有强磁片,免疫磁珠流经强磁室时被捕获。

[0103] 基于上述微流控芯片检测心肌标志物的方法主要有以下两种方式,对于本领域的技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些方法获得其它方法。

[0104] 第一种:制作包被有能与血液中心肌标志物特异性结合的抗体的免疫磁珠;

[0105] 对所述心肌标志物的对位抗体标记免疫标识物;

[0106] 将包被抗体的免疫磁珠输入所述芯片的滤血模块,将标记对位抗体的免疫标识物输入免疫标记模块;

[0107] 将一定量心肌标记物样本与平衡液的混合液加至加样室;

[0108] 启动检测设备,反应预设时间,对预定检测项目结果进行检测。

[0109] 基于上述方法的实际操作举例:

[0110] 步骤1:样本(血浆75 μ L或全血100 μ L)与平衡液混合均匀,备用;

[0111] 步骤2:取样本与平衡液混合液100 μ L加样于加样室,混合液经通道进入滤血模块,滤除血细胞,并与包被抗体的免疫磁珠接触,形成反应液离开;

[0112] 步骤3:反应液经过通道浸出强磁室,95%~100%的磁珠被捕获,废液经通道离开强磁室;

[0113] 步骤4:废液通过通道进入质控室,体系中未被捕获的免疫标识物被捕获,指示反应液顺利通过强磁室;

[0114] 步骤5:废液通过免疫通道进入回收室,15分钟后通过既定检测仪对结果进行定量检测。

[0115] 第二种:制作包被有能与血液中心肌标志物特异性结合的抗体的免疫磁珠;

[0116] 对所述心肌标志物的对位抗体标记免疫标识物;

[0117] 将标记对位抗体的免疫标识物输入免疫标记模块;

[0118] 将一定量心肌标记物样本与平衡液的混合液加至加样室,所述平衡液中包含所述包被抗体的免疫磁珠;

[0119] 启动检测设备,反应预设时间,对结果进行检测。

[0120] 上述方法的实际操作举例:

[0121] 步骤I:样本(血浆75 μ L或全血100 μ L)与平衡液(包含包被抗体的免疫磁珠)混合均匀1分钟,备用;

[0122] 步骤II:取样本与平衡液混合液100 μ L加样于加样室,混合液经通道进入滤血模块,滤除血细胞,离开本系统;

[0123] 步骤III:反应液经过通道浸出强磁室,95%~100%的磁珠被捕获,废液经通道离开强磁室;

[0124] 步骤IV:废液通过通道进入质控室,体系中未被捕获的免疫标识物被捕获,指示反应液顺利通过强磁室;

[0125] 步骤V:废液通过免疫通道进入回收室,15分钟后通过既定检测仪对结果进行定量检测。

[0126] 不同的心肌标志物具有不同的磁珠包被体系。不同的心肌标志物可以采用不同的标记体系。对于不同的心肌标志物可以采用不同的标识物,主要包括量子点、荧光微球和胶体金。通过免疫磁珠包被抗体捕捉样本中抗原,磁珠与包被抗体的共价结合,具有高灵敏度、高特异性、低背景噪音等特点。基于微流控检测芯片,通过精细稳定地控制免疫反应过

程,可以达到有效地控制微反应的变异系数。利强力磁场对目标体系的高捕获能力,可以在既定区域内控制免疫磁珠均匀分布,保证标记信号被检测设备识别。根据多类心肌标识物的不同特性,优选不同反应体系,诸如免疫磁珠存放位置,标识物种类及标记系统,从而达到良好的操控效果和移植效果。

[0127] 下面以具体的心肌标志物为例,进行具体说明,以下实施例中所述的输入免疫标记模块的被标记的抗体即为对位抗体。

[0128] 实施例1

[0129] 本实施例中针对心肌肌钙蛋白I (cTnI) 进行说明。

[0130] 1) 制作包被抗体的免疫磁珠,包被有能与血液中cTnI蛋白特异性结合的抗体的免疫磁珠的制作包括:

[0131] 免疫磁珠 (Cat.:LSKMAGA10,Merck Millipore) 经MES缓冲液 (2-(N-吗啡啉) 乙磺酸) 平衡,至溶液pH为4-5 (优选4.5)、离子强度0.1M。平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS,至EDC与NHS在溶液中的浓度均为1mg/mL,反应20分钟后离心弃上清;

[0132] 以所述MES缓冲液 (平衡前的) 复溶弃上清后的沉淀物,加入抗体8E10 (Cat.:4T13, Hytest) 至8E10的浓度为0.5mg/mL;

[0133] 混合包被1小时,然后加入BSA (Cat.:10735108001,Roche) 至BSA的浓度为1%,终止反应。

[0134] 2) 针对cTnI抗原标记标识物量子点 (Cat.:F122270,aIaddin) 标记,包括:

[0135] 1mg量子点平衡pH为8.0、浓度为0.01M的PBS溶液至量子点的终浓度为0.1mg/mL;然后分别加入EDC与NHS,至EDC与NHS在溶液中的终浓度均为0.5mg/mL,活化30分钟后,离心弃上清。

[0136] 将弃上清之后的沉淀物以所述PBS溶液复溶,加入抗体7G2 (Cat.:4T20,Hytest),标记20分钟,加入BSA至其浓度为1%终止反应。

[0137] 3) 采用免疫微流控芯片结构如图1所示,微流控芯片制备:PMMA经注塑、压印、改性、功能输入、键合成型,其中功能输入包括,包被8E10免疫磁珠输入滤血模块,标记7G2量子点输入免疫标记模块。

[0138] 芯片尺寸81mm×32mm×3mm,微流控室内满液量为500μL。

[0139] 4) 样品检测:cTnI抗原 (Cat.:8RTI7,hytest) 被稀释为0.1ng/mL~50ng/mL,稀释后的cTnI抗原分别与平衡液混合均匀,备用。

[0140] 取100μL上样至加样室,并启动检测设备,计时15分钟,分别检测线性相关性以及各浓度变异系数。

[0141] 5) 在相同的条件下实验10次,得到线性相关性及变异系数的统计结果如下:

[0142] 表1不同浓度的cTnI抗原线性相关性及变异系数的统计结果

cTnI 抗原浓度(ng/mL)	0.1	1	10	25	50
检出值 1 (mV)	55.12	83.21	300.78	841.27	1232.12
检出值 2 (mV)	62.72	79.94	327.17	831.02	1323.21
检出值 3 (mV)	51.83	93.23	349.21	813.83	1499.23
检出值 4 (mV)	55.93	87.12	369.12	827.12	1289.31
检出值 5 (mV)	67.54	83.32	307.27	809.31	1411.05
检出值 6 (mV)	68.34	93.65	346.19	887.21	1332.93
[0143] 检出值 7 (mV)	62.83	76.53	395.12	746.12	1299.22
检出值 8 (mV)	59.12	83.46	329.81	812.99	1483.02
检出值 9 (mV)	51.83	92.04	382.23	931.22	1291.07
检出值 10 (mV)	59.01	77.55	353.23	964.91	1678.93
AVERAGE (平均值)	59.43	85.01	346.01	846.5	1384.01
STDEV (标准差)	5.91	6.31	30.7	64.25	135.38
CV% (变异系数)	9.94%	7.42%	8.87%	7.59%	9.78%
线性相关性 R ²	0.9910				

[0144] 实施例2

[0145] 本实施例以肌红蛋白MYO为例进行说明。

[0146] 1) 包被有能与血液中MYO蛋白特异性结合的抗体的免疫磁珠制作包括：

[0147] 免疫磁珠经PB(磷酸缓冲液, phosphate buffer solution)缓冲液平衡, 至溶液pH为7.4(7.0-8.0均可)、离子强度0.1M。

[0148] 在平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS, 至EDC与NHS在溶液中的浓度均为1mg/mL, 反应20分钟后离心弃上清。

[0149] 以所述PB缓冲液(平衡前的)复溶弃上清后的沉淀物, 在复溶后的溶液中加入抗体(Cat.: 4M23, Hytest)至4E2浓度为0.5mg/mL, 混合包被1h, 加入BSA(牛血清蛋白)至BSA最终浓度为1%, 终止反应。

[0150] 2) 针对MYO抗原标记标识物荧光微球(Cat.: BM551, Bangs Laboratories)标记, 包括：

[0151] 1mg荧光微球平衡至pH为8.0、浓度0.01M的PBS溶液至荧光微球浓度为0.1mg/mL。

[0152] 然后分别加入EDC(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺)与NHS(N-羟基琥珀酰亚胺), 至EDC与NHS在溶液中的浓度均为0.5mg/mL, 活化30分钟后, 离心弃上清。

[0153] 对弃上清之后的沉淀物以PBS(磷酸缓冲盐溶液, phosphate buffer saline)溶液复溶, 加入抗体MYO(Cat.: 8M50, Hytest), 标记20分钟, 加入BSA至BSA的浓度为1%, 终止反

应。

[0154] 3) 免疫微流控芯片同实施1。微流控芯片制备:PMMA经注塑、压印、改性、功能输入、键合成型,其中功能输入包括,包被4E2免疫磁珠输入滤血模块,标记MY0荧光微球输入免疫标记模块。

[0155] 4) 样品检测:MY0抗原 (Cat.:8M50,hytest) 被稀释为50ng/mL~1000ng/mL,分别与平衡液混合均匀;

[0156] 取100 μ L上样至加样室,并启动检测设备,计时15分钟,分别检测线性相关性以及各浓度变异系数。

[0157] 5) 在相同的条件下实验10次,得到线性相关性及变异系数的统计结果如下:

[0158] 表2不同浓度的MY0抗原线性相关性及变异系数的统计结果

MYO 抗原浓度 (ng/mL)	50	100	250	500	1000
检出值 1 (mV)	78.33	192.12	572.21	1492.12	2523.94
检出值 2 (mV)	83.49	180.47	518.27	1489.25	2554.7
检出值 3 (mV)	82.56	205.41	583.99	1338	2625.41
检出值 4 (mV)	82.69	203.68	660.38	1486.82	2136.15
检出值 5 (mV)	80.59	208.7	538.29	1358.66	2533.13
检出值 6 (mV)	78.49	171.13	608.44	1518.12	2173.44
[0159] 检出值 7 (mV)	83.1	171.33	670.02	1671.23	2492.16
检出值 8 (mV)	80.41	170.13	636.47	1558.8	2593.53
检出值 9 (mV)	76.7	203.11	572.45	1518	2393.04
检出值 10 (mV)	81.06	191.91	564.18	1446.07	2138.88
AVERAGE (平均值)	80.74	189.8	592.47	1487.71	2416.44
STDEV (标准差)	2.27	16.35	53.02	100.86	202.3
CV% (变异系数)	2.81%	8.61%	8.95%	6.78%	8.37%
线性相关性 R^2	0.9821				

[0160] 实施例3

[0161] 本实施例针对C反应蛋白进行说明。

[0162] 1) 包被有能与血液中CRP蛋白特异性结合的抗体的免疫磁珠制作包括:免疫磁珠经MES缓冲液平衡,至溶液pH至4.5-5.5 (优选为5)、离子强度0.1M;

[0163] 然后分别加入EDC与NHS,至EDC与NHS的终浓度均为1mg/mL,反应20分钟后。离心弃上清,并以所述PBS缓冲液 (平衡前) 复溶弃上清之后的沉淀物,加入抗体CRP135 (Cat.:4C28,Hytest) 至CRP135的最终浓度为0.5mg/mL,混合包被1h,加入BSA至BSA的最终浓度为

1%，终止反应。

[0164] 2) 针对CRP抗原标记标识物胶体金(自制)标记:40nm胶体金溶液以K₂CO₃溶液平衡至pH为9(8.5-9.5内均可),加入抗体CRP36(Cat.:4C28,Hytest),标记1小时,加入BSA至所述BSA在溶液中的最终浓度为1%终止反应,终止反应后离心;

[0165] 以离子强度为0.1M、pH为8.0的PBS缓冲液复溶离心后的沉淀物,直至复溶后的溶液体积为终止反应时的0.1倍。

[0166] 3) 免疫微流控芯片同实施1。微流控芯片制备:PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)经注塑、压印、改性、功能输入、键合成型,其中功能输入包括,包被CRP135免疫磁珠输入滤血系统,标记CRP36标记胶体金输入免疫标记模块。

[0167] 4) 样品检测:CRP抗原(Cat.:8C72,hytest)被稀释为5ng/mL~250ng/mL,分别与平衡液混合均匀,取100μL上样至加样室,并启动检车设备,计时15分钟,分别检测线性相关性以及各浓度变异系数。

[0168] 5) 在相同的条件下实验10次,得到线性相关性及变异系数的统计结果如下:

[0169] 表3不同浓度的CRP抗原线性相关性及变异系数的统计结果

CRP 抗原浓度 (ng/mL)	5	10	50	100	250
检出值 1 (mV)	24.64	50.96	355.2	611.84	1171.07
检出值 2 (mV)	27.97	46.36	351.09	606.96	1029.32
检出值 3 (mV)	27.36	51.71	362.22	580.52	1178.03
检出值 4 (mV)	26.7	53.72	281.4	623.51	1059.57
检出值 5 (mV)	28.67	43.88	291.06	512.65	1101.97
检出值 6 (mV)	30.82	58.2	295.02	548.45	1215.63
检出值 7 (mV)	30.79	50.99	279.35	505.81	1111.03
检出值 8 (mV)	25.44	55.21	292.61	602.69	1223.82
检出值 9 (mV)	23.17	43.74	351.89	499.16	987.41
检出值 10 (mV)	25.23	43.84	309.39	539.84	1209.75
AVERAGE (平均值)	27.08	49.86	316.92	563.14	1128.76
STDEV (标准差)	2.55	5.17	33.96	47.72	83.7
CV% (变异系数)	9.42%	10.37%	10.72%	8.47%	7.42%
线性相关性 R ²	0.9858				

[0172] 实施例4

[0173] 本实施例针对心脏型脂肪酸结合蛋白(FABP)举例说明。

- [0174] 1) 包被有能与血液中FABP特异性结合的抗体的免疫磁珠制作包括:
- [0175] 免疫磁珠经MES缓冲液平衡,至溶液pH为4-5(优选为4.5)、离子强度0.1M;
- [0176] 平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS,至EDC与NHS的浓度均为1mg/mL,反应20分钟后。离心弃上清,对弃上清之后的沉淀物以所述MES缓冲液(平衡前)复溶,加入抗体FABP 5B5 (Cat.:4F29,Hytest)至FABP 5B5浓度为1.0mg/mL,混合包被1小时,加入BSA至BSA浓度为1%,终止反应。
- [0177] 2) 针对FABP抗原标记标识物量子点标记:包括:1mg量子点平衡pH为7.4、浓度为0.01M的PBS溶液至量子点终浓度为0.1mg/mL;
- [0178] 然后分别加入EDC与NHS,至EDC与NHS的终浓度均为0.5mg/mL,活化30分钟后,离心弃上清。将弃上清之后的沉淀物以所述PBS溶液(平衡前)复溶之,加入抗体FABP 28 (Cat.:4F29,Hytest),标记20分钟,加入BSA至BSA浓度为1%终止反应。
- [0179] 3) 免疫微流控芯片同实施1。微流控芯片制备:PMMA经注塑、压印、改性、功能输入、键合成型,其中功能输入包括,包被FABP 5B5免疫磁珠输入滤血系统,标记FABP 28标记胶体金输入免疫标记模块。
- [0180] 4) 样品检测:FABP抗原 (Cat.:8F65,hytest) 被稀释为2.5ng/mL~50ng/mL,分别与平衡液混合均匀,取100 μ L上样至加样室,并启动检车设备,计时15分钟,分别检测线性相关性以及各浓度变异系数。
- [0181] 5) 在相同的条件下实验10次,得到线性相关性及变异系数的统计结果如下:
- [0182] 表4不同浓度的FABP抗原线性相关性及变异系数的统计结果

[0183]

FABP 抗原浓度 (ng/mL)	2.5	5	10	25	50
检出值 1 (mV)	2.04	5.99	11.98	23.12	58.12
检出值 2 (mV)	2.71	5.53	12.01	21.32	51.23
检出值 3 (mV)	2.32	5.34	10.32	24.53	48.12
检出值 4 (mV)	2.65	4.88	9.96	26.11	47.12
检出值 5 (mV)	2.12	5.54	9.89	23.92	53.43
检出值 6 (mV)	2.43	4.72	11.23	22.83	46.21
检出值 7 (mV)	2.23	4.98	12.08	21.01	48.64
检出值 8 (mV)	2.69	5.12	9.86	20.39	57.32
检出值 9 (mV)	2.22	5.34	10.72	22.83	57.12
检出值 10 (mV)	2.64	5.66	11.21	26.78	55.27
AVERAGE	2.405	5.31	10.926	23.284	52.258
STDEV	0.253	0.39	0.903	2.108	4.574
CV%	10.52%	7.34%	8.27%	9.06%	8.75%
线性相关性 R ²	0.9958				

[0184] 实施例5

[0185] 本实施例针对N端脑钠肽前体 (NT-proBNP) 为例说明。

[0186] 1) 包被有能与血液中NT-proBNP蛋白特异性结合的抗体的免疫磁珠制作包括:

[0187] 免疫磁珠平衡PBS缓冲液至pH为6-7 (优选的PH选择为6.5), 离子强度0.01M;

[0188] 在平衡后的溶液中分别加入EDC与NHS, 至所述EDC与NHS的浓度均为1mg/mL, 反应20分钟后离心弃上清;

[0189] 将离心去上清之后的沉淀物以所述PBS缓冲液 (平衡之前) 复溶, 在复溶之后的溶液中加入抗体18H5 (Cat.: 4NT1, Hytest) 至18H5浓度为1mg/mL, 混合包被1小时, 加入BSA至 (BSA) 浓度为1%, 终止反应。

[0190] 2) 针对NT-proBNP标记标识物量子点标记: 1mg量子点平衡至pH为7.5-8.5 (优选为8.0)、浓度0.01M的PBS溶液, 至量子点终浓度为0.1mg/mL, 平衡后分别加入EDC与NHS, 至EDC和NHS的浓度均为0.5mg/mL, 活化30分钟后, 离心弃上清。对弃上清之后的沉淀物以所述PBS溶液复溶, 加入抗体15F11 (Cat.: 4NT1, Hytest), 标记30分钟, 加入BSA至BSA的浓度为1%, 终止反应。

[0191] 3) 免疫微流控芯片同实施1。微流控芯片制备: PMMA经注塑、压印、改性、功能输入、

键合成型,其中功能输入包括,包被18H5免疫磁珠输入滤血系统,标记15F11量子点输入免疫标记模块。

[0192] 4) 样品检测:NT-proBNP抗原(Cat.:8NT2,hytest)被稀释为150pg/mL~9000pg/mL,将NT-proBNP抗原与平衡液混合均匀,取100μL上样至加样室,并启动检车设备,计时15分钟,分别检测线性相关性以及各浓度变异系数。

[0193] 5) 在相同的条件下实验10次,得到线性相关性及变异系数的统计结果如下:

[0194] 表5不同浓度的NT-proBNP抗原线性相关性及变异系数的统计结果

NT-proBNP 抗原浓度 (pg/mL)	100	500	1000	5000	9000
检出值 1 (mV)	23.25	73.53	129.28	563.73	754.83
检出值 2 (mV)	23.21	65.29	130.83	510.59	771.56
检出值 3 (mV)	27.34	66.06	129.61	469.68	720.81
检出值 4 (mV)	24.28	69.82	136.41	540.52	819.67
检出值 5 (mV)	26.56	75.99	113.69	534.88	758.67
检出值 6 (mV)	23.98	78.83	129.5	570.45	849.97
检出值 7 (mV)	20.12	74.69	119.63	522.42	781.62
检出值 8 (mV)	23.21	70.18	147.53	627.18	781.57
检出值 9 (mV)	21.54	69.41	125.65	507.42	717.04
检出值 10 (mV)	19.99	87.05	132.5	553	716.51
AVERAGE (平均值)	23.35	73.09	129.46	539.99	767.23
STDEV (标准差)	2.42	6.51	9.1	42.77	44.1
CV% (变异系数)	10.36%	8.91%	7.03%	7.92%	5.75%
线性相关性 R^2	0.982				

[0195] 实施例6

[0196] 本实施例针对髓过氧化物酶(MPO)为例说明。

[0197] 1) 包被有能与血液中MPO蛋白特异性结合的抗体的免疫磁珠制作包括:

[0198] 免疫磁珠平衡PB缓冲液至pH为7.5-8.5,离子强度为0.01M;

[0199] 在平衡后的溶液中,分别加入EDC与NHS,直至EDC与NHS的浓度均为1mg/mL,反应20分钟后离心弃上清,对去上清剩余的沉淀物以所述PB缓冲液复溶,在复溶得到的溶液中加入抗体19H2(Cat.:4M43,Hytest)至抗体19H2的浓度为0.5mg/mL,混合包被1小时,然后加入BSA至BSA浓度为1%,终止反应。

[0200] 2) 针对MPO抗原标记标识物荧光微球:1mg荧光微球平衡pH为6.5-7.5(优选的的PH

可以选择7)、浓度0.1M的PBS溶液至所述荧光微球的浓度为0.1mg/mL,然后分别加入EDC与NHS至所述EDC和NHS的浓度均为0.5mg/mL,活化30分钟后,离心弃上清。

[0202] 将弃上清后的沉淀物以所述PBS溶液(平衡之前的PBS溶液)复溶,在复溶得到的溶液中加入抗体18B7(Cat.:4M43,Hytest),标记20分钟,然后加入BSA至BSA的浓度1%,终止反应。

[0203] 3) 免疫微流控芯片同实施1。微流控芯片制备:PMMA经注塑、压印、改性、功能输入、键合成型,其中功能输入包括,包被19H2免疫磁珠输入滤血模块,标记18B7荧光微球输入免疫标记模块。

[0204] 4) 样品检测:MP0抗原(Cat.:8M80,hytest)被稀释为浓度范围为25ng/mL~500ng/mL,稀释后的抗原分别与平衡液混合均匀,取100 μ L上样至加样室,并启动检车设备,计时15分钟,分别检测线性相关性以及各浓度变异系数。

[0205] 5) 在相同的条件下实验10次,得到线性相关性及变异系数的统计结果如下:

[0206] 表6不同浓度的MP0抗原线性相关性及变异系数的统计结果

MPO 抗原浓度(ng/mL)	25	50	100	250	500
检出值 1 (mV)	99.86	328.07	674.73	1467.3	2292.63
检出值 2 (mV)	111.58	288.65	750.74	1220.02	2194.31
检出值 3 (mV)	96.39	263.99	683.94	1486.57	2128.76
检出值 4 (mV)	92.14	265.66	739.85	1322.13	2948.63
检出值 5 (mV)	89.7	350.37	636.92	1463.02	2014.77
检出值 6 (mV)	126.01	342.91	781.62	1433.45	2432.14
检出值 7 (mV)	99.97	278.64	706.56	1251.94	2497.4
检出值 8 (mV)	96.17	290.55	659.14	1476.35	2571.94
检出值 9 (mV)	97.01	274.93	669.28	1413.66	2809.78
检出值 10 (mV)	92.39	298.11	672.01	1465.24	2737.61
AVERAGE (平均值)	100.12	298.19	697.48	1399.97	2462.8
STDEV (标准差)	10.92	31.47	46.04	98.75	309
CV% (变异系数)	10.91%	10.55%	6.60%	7.05%	12.55%
线性相关性 R ²	0.989				

[0209] 本发明中,样品与包被抗体的磁珠混合进入微流控通道,经通道缓冲后与对位抗体的免疫标识物结合形成“抗原抗体三明治结构”(参考图2所示,其中标记抗体即为对位抗体),进入强磁室被强磁体磁化,样品中检测目标被捕获,本系统基于毛细力作用,依靠流体

驱动提供磁珠富集过程,完成对目标的检测。本发明能够为包被抗体提供基于共价键的唯一结合途径,高灵敏度地控制反应的进行,提供精准即时检测方案。

[0210] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

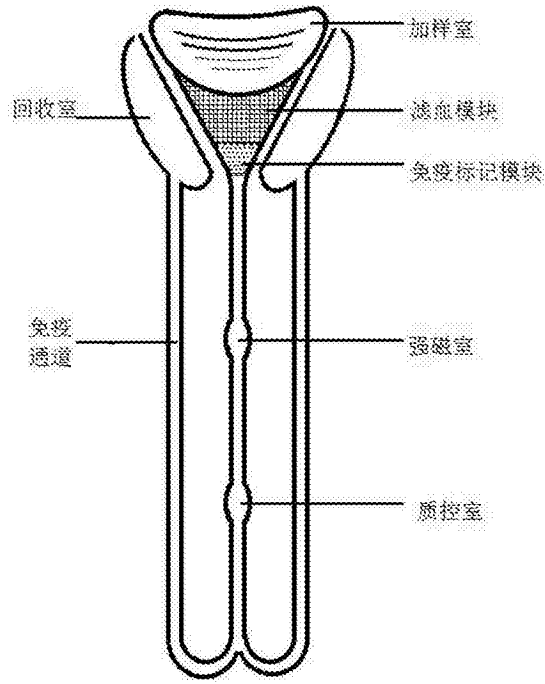


图1

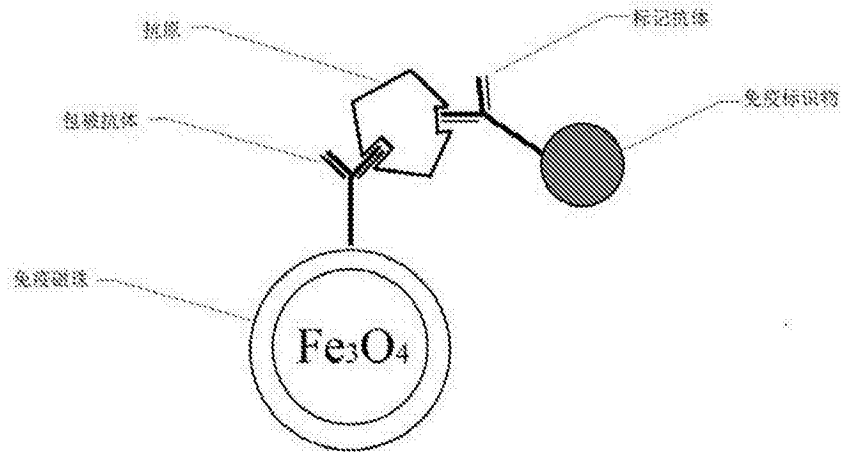


图2

专利名称(译)	基于磁珠包被抗体的微流控芯片及捕获心肌标志物的方法		
公开(公告)号	CN105424922B	公开(公告)日	2018-01-19
申请号	CN201510900358.4	申请日	2015-12-09
[标]申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
[标]发明人	胡飞 熊晶 张单单 邱笑违 余占江		
发明人	胡飞 熊晶 张单单 邱笑违 余占江		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	胡彬		
其他公开文献	CN105424922A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明实施例公开了一种基于磁珠包被抗体的微流控芯片及捕获心肌标志物的方法，应用于免疫磁珠包被结合抗体领域，防止包被抗体复溶于流体系统及被流体中抗原捕获脱离包被基材。所述微流控芯片包括：加样室、Y型结构通道和回收室；Y型结构通道分为上部的漏斗状通道和下部的柱形通道；所述漏斗状通道的底部为免疫标记模块；免疫标记模块上部为滤血模块；下部的柱形通道底端分岔为一对并行的免疫通道；每个免疫通道末端连接一个回收室；柱形通道设置上下两个腔室，上部腔室为强磁室，下部腔室为质控室。

