



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102854304 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201210232297. 5

(22) 申请日 2012. 07. 06

(73) 专利权人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山武汉大学

(72) 发明人 张志凌 张瑞巧 李安珺 庞代文

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 42222

代理人 汪俊锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101135690 A, 2008. 03. 05, 权利要求1-6, 说明书第1页第19行-第2页第14行.

CN 102435746 A, 2012. 05. 02,

CN 102174383 A, 2011. 09. 07, 全文.

WO 01/07889 A2, 2001. 02. 01, 全文.

Yan-Jun Liu, et al.. Integration of minisolenoids in microfluidic device for magnetic bead-based immunoassays.. 《Journal of Applied Physics》. 2007, 第102卷(第8期),

审查员 张绚

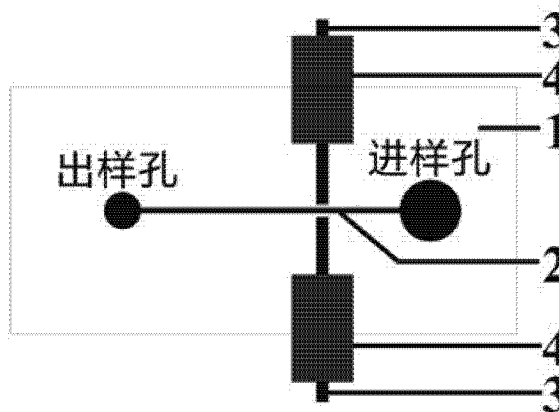
权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54) 发明名称

一种基于微流控芯片的病原体检测方法

(57) 摘要

本专利涉及一种基于微流控芯片的病原体检测方法。该方法以集成微磁场的微流控芯片作为反应的容器,磁球作为固相载体,链酶亲和素修饰的量子点(SA-QDs)作为荧光标记物,在微磁场的作用下,在芯片通道中特定部位捕获磁球,形成了微反应区,通过夹心免疫反应捕获病原体,通过生物素与链酶亲和素的相互作用,实现对病原体的荧光免疫定量分析。该检测方法将微流控芯片、磁免疫分析及荧光检测相结合,兼具了微流控芯片的快速、高效和样品用量小,磁免疫分析的高特异性、强可操纵性,及量子点优异的光学性质等优点,是一种多目标的,实时的病原体检测方法。



1. 一种基于微流控芯片的病原体检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 集成微磁场的微流控芯片的制作:用软刻蚀的方法制得微流控芯片的阳模;将两个导磁棒固定于阳模微通道的两侧,导磁棒之间的夹角是 $0 \sim 180^\circ$,导磁棒所形成的平面与微芯片的平面之间的夹角是 90° ;采用原位反应成型法,将液态预聚物倒在固定导磁棒的阳模上,反应固化后,脱模成型,打进样孔和出样孔,然后与盖片键合,即得到集成微磁场的微流控芯片;

(2) 修饰有抗特定病原体表面蛋白单抗的磁球制备:用乙基-[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺混合物活化磁球表面的羧基,然后加入抗待测病原体表面蛋白的单抗,后将连有抗体的磁球分散在含有叠氮化钠、BSA 的 PBS 缓冲液中,保存备用;

(3) 生物素化的抗病原体表面蛋白单抗的制备:采用生物素化的试剂盒在抗病原体表面蛋白单抗上修饰生物素,用脱盐柱进行纯化;

(4) 在芯片上进行磁性夹心免疫荧光反应检测病原体:首先用 BSA 溶液封闭芯片通道,同时在芯片的导磁棒上各放一块永磁铁,然后依次向通道中注入修饰有抗特定病原体表面蛋白单抗的磁球、特定病原体、生物素化的抗该病原体表面蛋白单抗、链酶亲和素修饰的量子点,每步反应后都用 PBS 缓冲液冲洗通道,洗掉未反应的药品,最后通过荧光显微镜与光纤光谱仪进行荧光检测。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,制备微流控芯片的材料为聚二甲基硅氧烷或聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯、聚苯乙烯。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,制作微流控芯片用的阳模为金属基阳模、单晶硅阳模或玻璃阳模。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,制作导磁棒材料为氧化铁或硅钢类软磁性材料。

一种基于微流控芯片的病原体检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于微流控芯片的病原体检测方法,属于化学及生物医学领域。

背景技术

[0002] 近年来,连续爆发非典、禽流感、手足口病、甲型 H1N1 流感。每一次严重传染性疾病的流行都给社会、经济造成了巨大的损失,给人的生命带来了极大威胁。目前常用的病原体检测方法有 PCR 技术、培养技术、免疫酶技术 (EIA)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等。这些技术在临床诊断中已发挥了巨大的作用,但仍存在一些缺点,大多比较耗时,处理过程复杂且成本高。建立一种快速、灵敏、特异的检测病原体的方法是预防和控制传染病的重要保证。

[0003] 微流控芯片技术是在一块几平方厘米的芯片上构建化学或生物实验室,将化学和生物实验中涉及到的各种样品处理,反应,分离,检测等集成到一起,具有微型化、自动化、样品消耗量小、检测效率高等优点。磁性粒子作为一个固相载体,在靶向物质识别,分离,控制给药,分选细胞等方面具有广泛的用途。在微流控芯片上结合磁珠技术是当前研究的热点问题之一。

[0004] 由于量子点具有独特又优越的光学性能,如消光系数大,量子产率高,激发光谱宽,发射光谱窄,亮度比传统的荧光染料高 10-100 倍,光稳定性比传统的荧光染料高 100-1000 倍等特点,目前已被广泛应用于生物荧光标记。

[0005] 我们将微流控芯片、磁免疫分析及荧光检测相结合,建立了一种快速、高效、低耗,高特异性、高灵敏度、实时的病原体检测方法,为病原体的现场检测提供了强有力的工具。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种快速、高效的病原体的检测方法。

[0007] 以集成微磁场的微流控芯片作为反应的容器,磁球作为固相载体,链酶亲和素修饰的量子点 (SA-QDs) 作为荧光标记物,在微磁场的作用下,在芯片通道中特定部位捕获磁球,形成了微反应区,通过夹心免疫反应捕获病原体,通过生物素与链酶亲和素的相互作用,实现对病原体的荧光免疫定量分析。在芯片上实现了病原体的分离、富集、免疫反应、分析检测。

[0008] 具体的技术方案包括如下步骤:

[0009] (1) 集成微磁场的微流控芯片的制作:用软刻蚀的方法制得微流控芯片的阳模;将两个导磁棒固定于阳模微通道的两侧,导磁棒之间的夹角是 $0 \sim 180^\circ$,导磁棒所形成的平面与微芯片的平面之间的夹角是 90° ;采用原位反应成型法,将液态预聚物倒在固定导磁棒的阳模上,反应固化后,脱模成型,打进样孔和出样孔,然后与盖片键合,即得到集成微磁场的微流控芯片(如图 1、2 所示);

[0010] (2) 修饰有抗特定病原体表面蛋白单抗的磁球制备:用乙基-[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺(EDAC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合物活化磁球表面的羧基,然后加入

抗待测病原体表面蛋白的单抗,后将连有抗体的磁球分散在含有叠氮化钠、BSA 的 PBS (pH 7.4) 缓冲液中,保存备用;

[0011] (3) 生物素化的抗病原体表面蛋白单抗的制备:采用生物素化的试剂盒在 HA 单抗上修饰生物素,用脱盐柱进行纯化;

[0012] (4) 在芯片上进行磁性夹心免疫荧光反应检测病原体:首先用 BSA 溶液封闭芯片通道,同时在芯片的导磁棒上各放一块永磁铁,然后依次向通道中注入修饰有抗特定病原体表面蛋白单抗的磁球、特定病原体、生物素化的抗该病原体表面蛋白单抗、链酶亲和素修饰的量子点(SA-QDs),每步反应后都用 PBS 缓冲液冲洗通道,洗掉未反应的药品,最后通过荧光显微镜与光纤光谱仪进行荧光检测。

[0013] 上述方案中:步骤(1)中制备微流控芯片的材料为弹性体聚合物如聚二甲基硅氧烷(PDMS)和热塑性材料如聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚碳酸酯(PC)、聚苯乙烯(PS)等;制作微流控芯片用的阳模为金属基阳模、单晶硅阳模或玻璃阳模;制作导磁棒材料为氧化铁或硅钢类软磁性材料。

[0014] 本发明建立了一种基于微流控芯片、磁球、量子点的简单快速检测病原体的磁性荧光免疫检测方法。将微流控芯片、磁免疫分析及荧光检测相结合,兼具了微流控芯片的快速、高效和样品用量小,磁免疫分析的高特异性、强可操纵性,及量子点优异的光学性质等优点,是一种简单、快速、高效、便携、适合于现场检测的方法。本发明可更广泛地应用于生物和医学科学等领域。

附图说明

[0015] 图 1 为实施例 1 中的微流控芯片结构示意图,图中 1. 微流控芯片基片、2. 微通道、3. 导磁棒、4. 永磁铁、5. 盖片。

[0016] 图 2 为实施例 1 中的纵剖面结构示意图,图中 1. 微流控芯片基片、2. 微通道、3. 导磁棒、4. 永磁铁、5. 盖片。

[0017] 图 3 为实施例 1 中的芯片上磁性荧光免疫检测病原体的流程示意图。

[0018] 图 4 为实施例 2 中的不同浓度 H9N2 磁性荧光免疫检测的荧光图片(a),与对应的光谱图(b)。

[0019] 图 5 为实施例 2 中的不同浓度 H9N2 与荧光强度的变化趋势图(a),与标准曲线图(b),与图 4 对应。

[0020] 图 6 为实施例 2 中的检测 H9N2 磁性夹心免疫荧光检测方法的特异性分析,包括试剂空白及阴性对照的荧光图片(a),与对应的光谱图(b)。

[0021] 图 7 为实施例 2 中的检测 H9N2 磁性夹心免疫荧光检测方法的特异性分析,包括试剂空白及阴性对照的柱状图,与图 6 对应。

[0022] 图 8 为实施例 3 中的不同浓度 NDV 磁性荧光免疫检测的荧光图片(a),与对应的标准曲线(b)。

[0023] 图 9 为实施例 3 中的检测 NDV 磁性夹心免疫荧光检测方法的特异性分析,包括试剂空白及阴性对照的荧光图片(a),与对应的柱状图(b)。

具体实施方式

[0024] 实施例 1

[0025] (1) 集成芯片的制作方法

[0026] 运用标准的软光刻制作技术,在洁净平整的硅片表面甩上一层 AZ50XT 的光刻胶,得到一个 40 μm 左右的厚度,在打印的胶片掩膜的遮蔽下用紫外线曝光,显影,得到一个标准的凸出于硅片表面的掩膜。将两个自制导磁棒固定于阳模微通道的两侧,导磁棒之间的夹角是 $0 \sim 180^\circ$,导磁棒所形成的平面与微芯片的平面之间的夹角是 90° ,调和聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 的预聚物质量比为 10 :1 (质量比),真空排除气泡,倾倒在掩膜之上,然后在烘箱中 75°C 烘 3-4 小时,固化后,用手术刀切开,从掩膜上面揭起,图案就复制到 PDMS 上,用一个平头的打孔针打进样和出样口;将洁净的载玻片和具有流体通道的 PDMS,放于氧等离子体中处理 70s 活化 PDMS 表面,产生大量羟基自由基,取出,将朝上的两面扣在一起,在烘箱中 75°C 烘 10 分钟,实现永久键合。

[0027] (2) 修饰有抗特定病原体表面蛋白单抗的磁球 (Master Beads Carboxylic Acid 0215, 500 nm diameter) 制备

[0028] 10 μL 表面为羧基功能团的超顺磁性球(首先用 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 洗三次。然后将磁球分散在含 0.10 mol/L EDAC 和 0.1 mol/L NHS 的 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 溶液中, 37°C 摇床上振荡反应 30 min,活化磁性球表面的羧基。接着用 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 洗三次后,将其分散在 180 μL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 溶液中,然后加入 20 μL 0.59 mg/mL 的抗特定病原体表面蛋白单抗溶液,摇床上振荡反应 2 h。反应后用 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 洗三次,除去没有反应的链霉亲和素,然后将其分散在 1 mL 2% 的 BSA 中,封闭 30 min。最后用 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 洗三次,将其分散在含 0.05 % 叠氮化钠 2% BSA 的 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 中, 4°C 储存备用。

[0029] (3) 生物素化的抗特定病原体表面蛋白单抗的制备

[0030] 利用生物素化试剂 Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo),通过与该病原体表面蛋白单抗的氨基反应,将生物素连接到抗体上。具体操作如下:取 0.1mg 生物素化试剂 Sulfo-NHS-LC-Biotin,加入到 80 μL 超纯水中,然后再加入 20 μL 0.59 mg/mL 的抗该病原体表面蛋白单抗溶液,室温摇床反应 2h。多余的生物素化试剂利用 NAP-5 (GE Healthcare) 的脱盐柱除掉,获得体积为 500 μL 标记好的抗该病原体表面蛋白单抗溶液。

[0031] (4) 在芯片上进行磁性夹心免疫荧光反应检测病原体。

[0032] 实验方案如图 3 所示,首先用 BSA 溶液封闭通道,30min 后,用 PBS 缓冲液洗 1min,同时在集成芯片的导磁棒上各放一块永磁铁(“NS”磁极对),然后注入 2 μL 修饰有抗特定病原体表面蛋白单抗修饰的磁球(图 3 - a),在微磁场的作用下形成了微反应区(图 3 - b);PBS 缓冲液洗后,再注入 2 μL 该病原体颗粒(图 3 - c),停流孵育 5min (图 3 - d);接着 PBS 缓冲液洗通道,注入 2 μL 生物素化的抗该病原体表面蛋白的单抗(图 3 - e),停流孵育 5min (图 3 - f);PBS 缓冲液洗通道,然后注入 2 μL 链酶亲和素修饰的量子点(图 3 - g),停流孵育 5min (图 3 - h);最后用 PBS 缓冲液洗掉没有反应上的 SA-QDs,通过荧光显微镜与光纤光谱仪进行荧光检测。整个实验过程中泵的流速为 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

[0033] 该技术可以快速、高效实现对很多病原体的检测。如 H9N2 (实施例 1),新城疫 (Newcastle Disease Virus NDV) (实施例 2),H1N1, H5N1 等病毒颗粒。

[0034] 实施例 2 :

[0035] 利用实施例 1 的方法制作了集成芯片,制备了修饰有抗 H9N2 禽流感病毒表面蛋白 HA 单抗的磁球和生物素化的抗 H9N2 禽流感病毒表面蛋白 HA 单抗。然后在芯片上进行磁性夹心免疫荧光反应检测 H9N2。图 4 为不同浓度 H9N2 磁性荧光免疫检测的荧光图片(a),与对应的光谱图(b)。图 5 为不同浓度 H9N2 与荧光强度的变化趋势图(a),与标准曲线图(b),与图 4 对应。图 6 为检测 H9N2 磁性夹心免疫荧光检测方法的特异性分析,荧光图片(a),与对应的光谱图(b)。图 7 为检测 H9N2 磁性夹心免疫荧光检测方法的特异性分析,包括试剂空白及阴性对照的柱状图,与图 6 对应。

[0036] 实施例 3:

[0037] 利用实施例 1 的方法制作了集成芯片,制备了修饰有抗新城疫病毒(NDV)表面蛋白 HA 单抗的磁球和生物素化的抗新城疫病毒表面蛋白 HA 单抗。然后在芯片上进行磁性夹心免疫荧光反应检测 H9N2。图 8 为不同浓度 NDV 磁性荧光免疫检测的荧光图,光谱图,标准曲线。图 9 为检测 NDV 磁性夹心免疫荧光检测方法的特异性分析,包括试剂空白及阴性对照的荧光图,光谱图,柱状图。

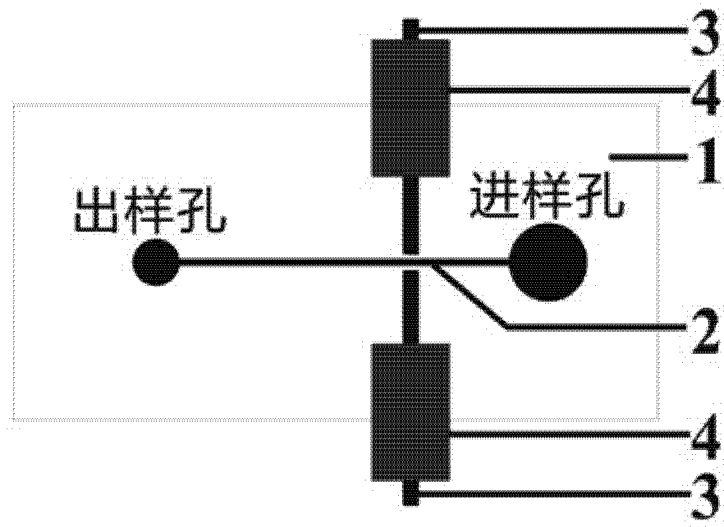


图 1

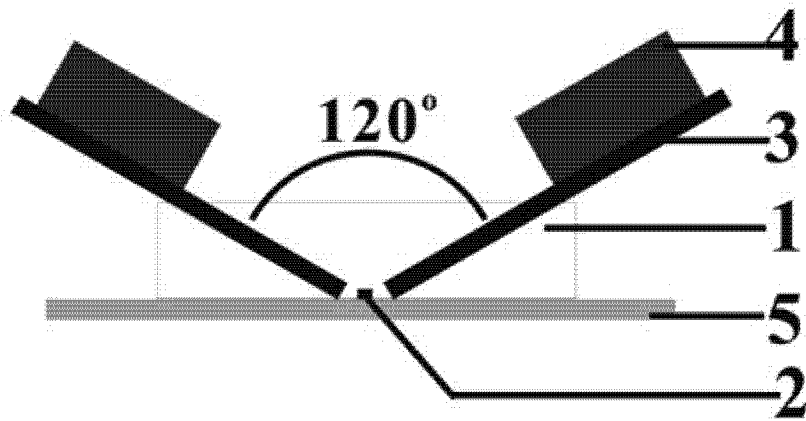


图 2

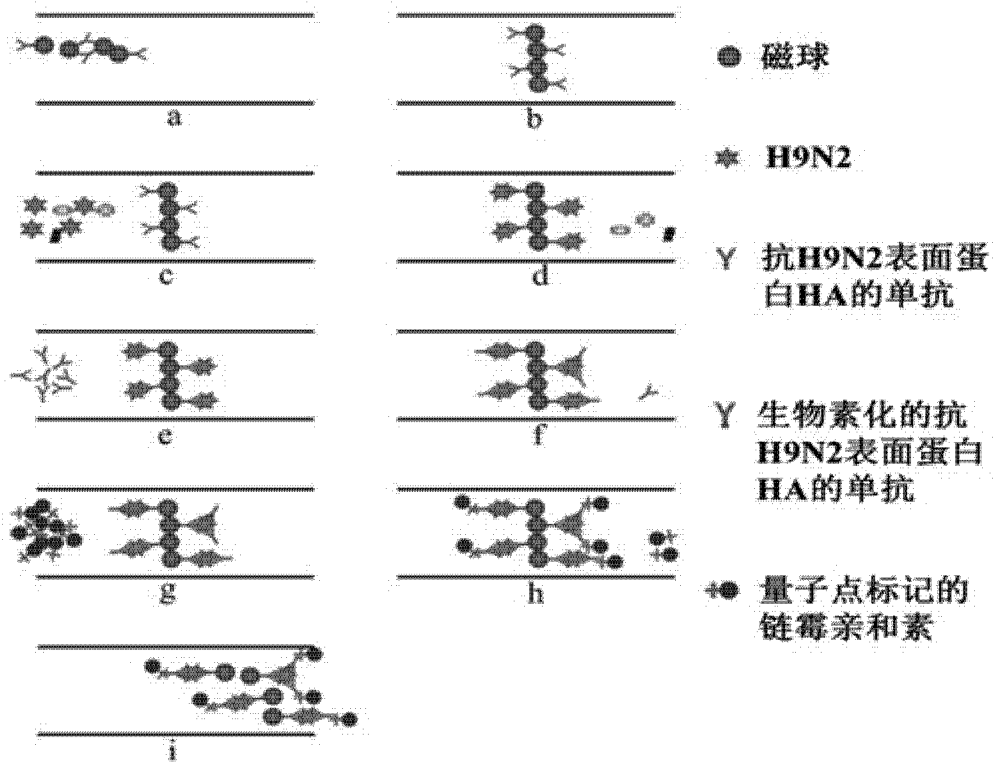


图 3

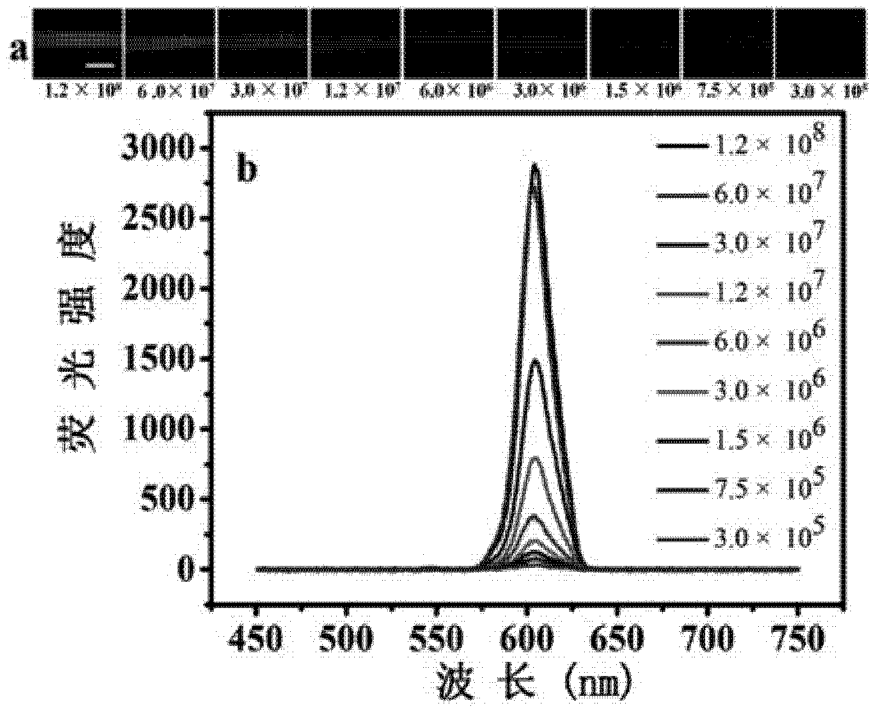


图 4

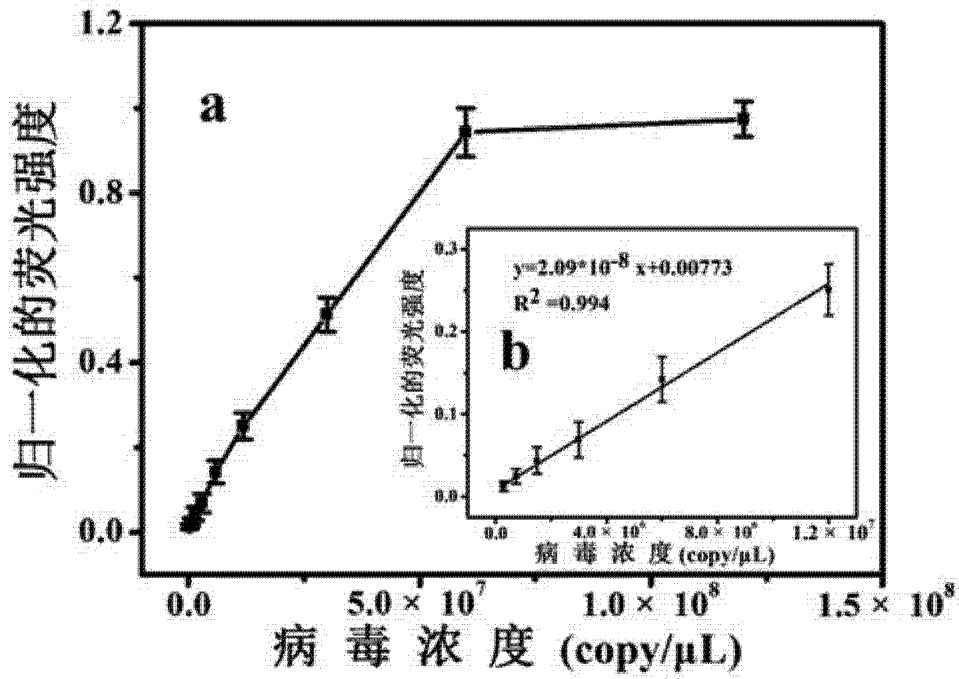


图 5

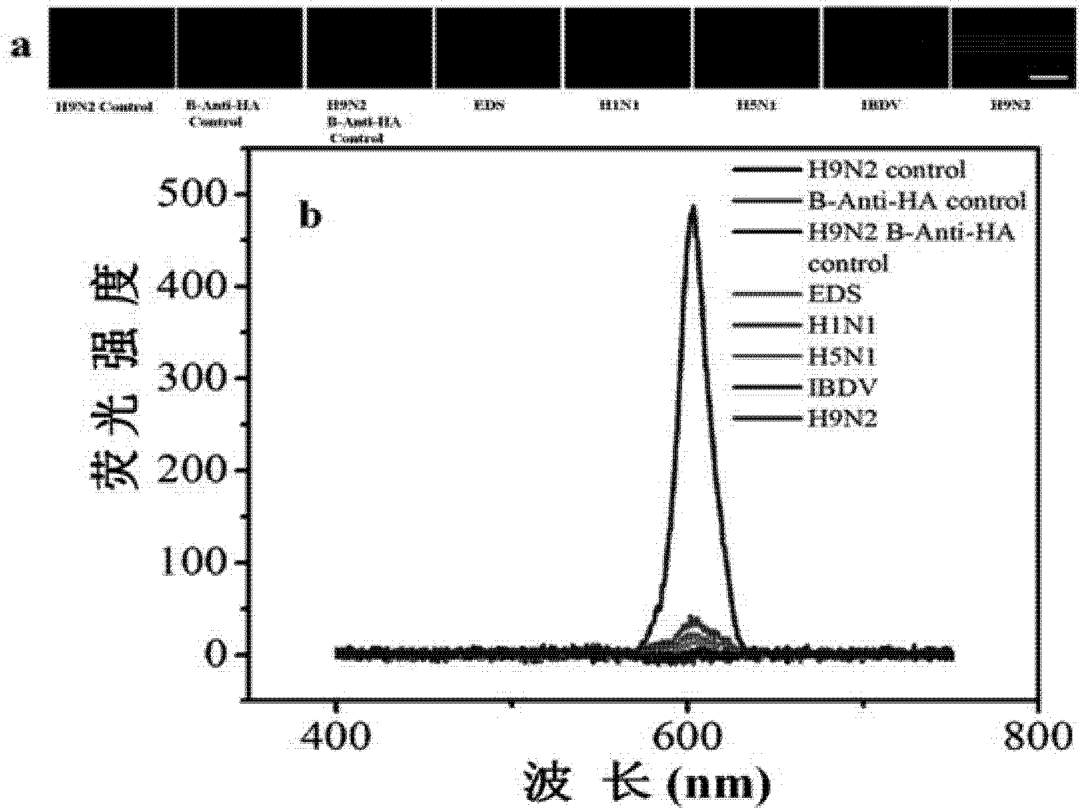


图 6

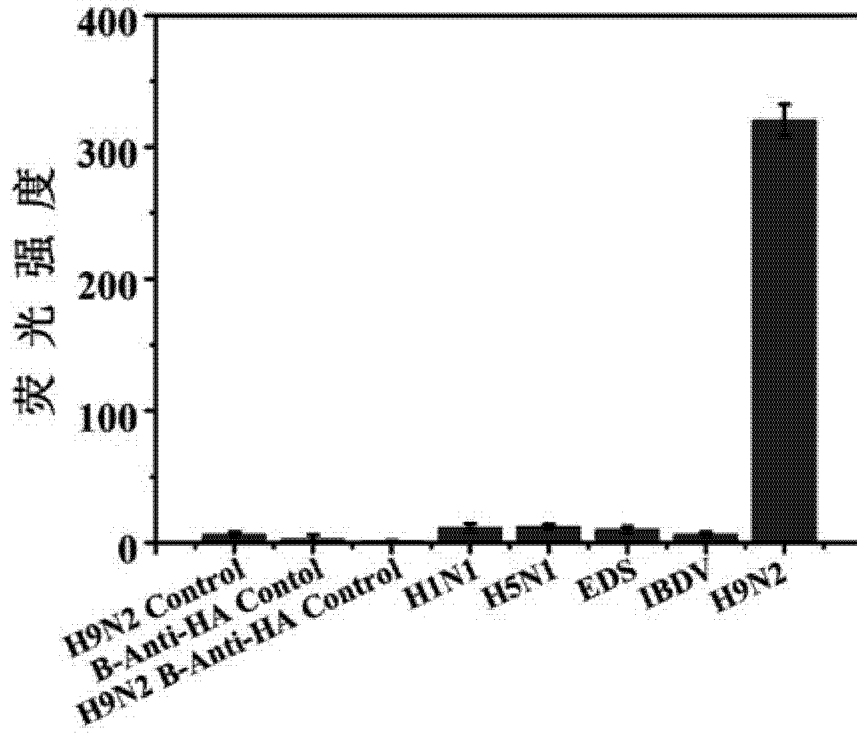


图 7

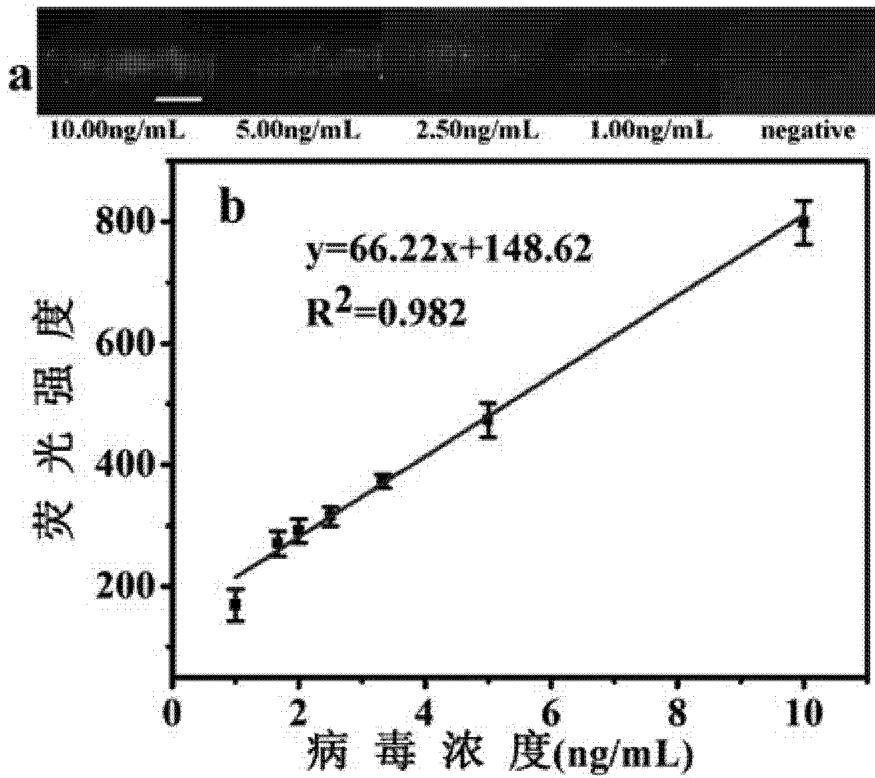


图 8

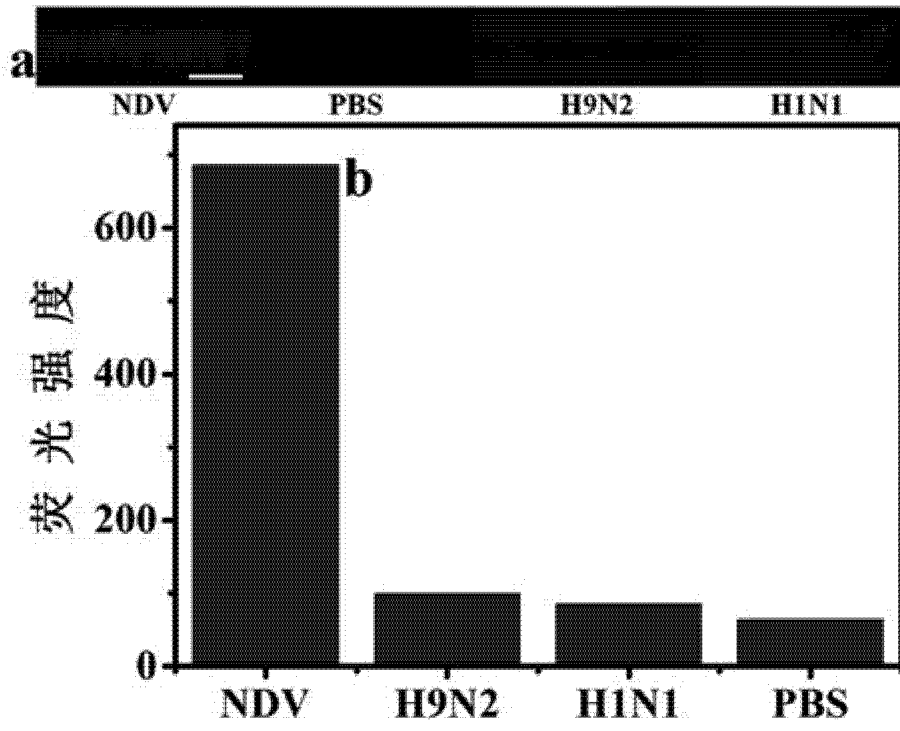


图 9

专利名称(译)	一种基于微流控芯片的病原体检测方法		
公开(公告)号	CN102854304B	公开(公告)日	2015-09-16
申请号	CN201210232297.5	申请日	2012-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	武汉大学		
申请(专利权)人(译)	武汉大学		
当前申请(专利权)人(译)	武汉大学		
[标]发明人	张志凌 张瑞巧 李安璐 庞代文		
发明人	张志凌 张瑞巧 李安璐 庞代文		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	汪俊锋		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN102854304A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本专利涉及一种基于微流控芯片的病原体检测方法。该方法以集成微磁场的微流控芯片作为反应的容器，磁球作为固相载体，链酶亲和素修饰的量子点(SA-QDs)作为荧光标记物，在微磁场的作用下，在芯片通道中特定部位捕获磁球，形成了微反应区，通过夹心免疫反应捕获病原体，通过生物素与链酶亲和素的相互作用，实现对病原体的荧光免疫定量分析。该检测方法将微流控芯片、磁免疫分析及荧光检测相结合，兼具了微流控芯片的快速、高效和样品用量小，磁免疫分析的高特异性、强可操作性，及量子点优异的光学性质等优点，是一种多目标的，实时的病原体检测方法。

