



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107478631 B

(45)授权公告日 2019.10.11

(21)申请号 201710852160.2

(22)申请日 2017.09.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107478631 A

(43)申请公布日 2017.12.15

(73)专利权人 南京工业大学

地址 210009 江苏省南京市鼓楼区新模范
马路30号

(72)发明人 于海东 焦钰翠 李林 张承武

刘志鹏 刘金华 黄维 欧阳启然

赖琼宇 郭雪英 宗丽君 朱成显

(74)专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 吴频梅

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

(56)对比文件

CN 104267182 A,2015.01.07,

CN 103364550 A,2013.10.23,

CN 101661034 A,2010.03.03,

CN 106226523 A,2016.12.14,

CN 103760209 A,2014.04.30,

CN 206082558 U,2017.04.12,

CN 102980998 A,2013.03.20,

CN 103954751 A,2014.07.30,

CN 106706916 A,2017.05.24,

US 2011111517 A1,2011.05.12,

WO 2004038413 A1,2004.05.06,

范一强等.3D打印微流控芯片技术研究进展.《分析化学》.2016,第44卷(第4期),第551-561页.

M.Omair Noor等.Paper-Based Solid-Phase Nucleic Acid Hybridization Assay Using Immobilized Quantum Dots as Donors in Fluorescence Resonance Energy Transfer.《Analytical Chemistry》.2012,第1860-1867页.

Syrena C.Fernandes等.Fabrication of Three-dimensional Paper-based Microfluidic Devices for Immunoassays.《Journal of Visualized Experiments》.2017,第1-10页.

审查员 余莲莲

权利要求书2页 说明书5页 附图5页

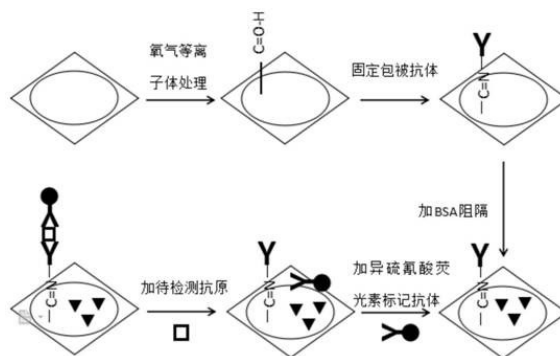
(54)发明名称

一种同时检测多种肿瘤标志物的3D折叠纸基微流体荧光检测装置

(57)摘要

本发明涉及一种同时检测多种肿瘤标志物的3D折叠纸基微流体荧光检测装置,属于生物检测技术领域。该检测装置可用于同时对多种肿瘤标志物的检测。本发明包括以下步骤:(1)纸基微流体芯片的制作;(2)纸基微流体芯片的预处理;(3)三维纸基同时检测的免疫反应程序;(4)荧光分析检测。本发明将纸基微流体分析平台与荧光检测结合起来,用于多种肿瘤标志物的同时检测。这种检测装置简单,便宜,便携,一次性,易于使用,为发展中国家和资源有限和偏远地区提供

了有利的平台。



CN 107478631 B

1. 一种同时检测多种肿瘤标志物的3D折叠纸基微流体荧光检测装置,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 纸基微流体芯片的制作;

在计算机上设计出3D纸基的图形,构成可折叠的三维亲水和疏水区域,用于同时检测多种肿瘤标志物,在纸基2、3两层增加检测区域孔的数目为2-5,即可增加同时检测的标志物种类数为2-5,并用喷蜡打印机打印,放进烘箱烘烤一段时间,取出冷却至室温,将纸基沿着打印区域剪下,并进行三维折叠;

(2) 纸基微流体芯片的预处理;

将烘烤好的纸基微流体芯片的第3层用等离子清洗机进行氧气等离子体处理,使纸表面的碳自由基形成氧自由基,导致醛基的产生,此目的是便于抗体在纸上的固定;

(3) 三维纸基同时检测的免疫反应程序;

首先在等离子体处理过的纸基微流体芯片的第3层分别固定2-5种肿瘤标志物的包被抗体,然后用阻隔液阻隔纸上的结合位点,在纸基微流体芯片的第2层加入对应的2-5种肿瘤标志物的异硫氰酸荧光素标记抗体,将纸基微流体芯片的1、2两层对叠,在纸基微流体芯片的第1层样品区加入待测抗原混合液,最后将三层全部对叠,进行免疫反应;

(4) 荧光分析检测;

将纸基微流体芯片的第3层置于特定的激发光源下,根据可视化的荧光强弱评估2-5种肿瘤标志物浓度,将第3层的纸基微流体芯片用荧光分光光度计测定发射波长峰值,可精确得出检测的2-5种肿瘤标志物浓度。

2. 根据权利要求1所述的的同时检测多种肿瘤标志物的3D折叠纸基微流体荧光检测装置,其特征在于:在纸基2、3两层增加检测区域孔的数目为3,可同时检测的标志物种类数3种。

3. 根据权利要求2所述的的同时检测多种肿瘤标志物的3D折叠纸基微流体荧光检测装置,其特征在于:

(1) 纸基微流体芯片的制作,使用的是规格为20cm×20cm的沃特曼1号色谱纸;

(2) 纸基微流体芯片的预处理,将烘烤完成第3层纸基微流体芯片,放入等离子清洗机进行表面改性4min,利用氧气表面等离子体处理使纸的表面带上醛基便于抗体固定,在等离子体条件下,纸基纤维素上的碳自由基 $\cdot\text{CH}-\text{OH}$ 上的羟基会失去氢原子,从而形成氧自由基 $\cdot\text{O}-\text{CH}_2-$,然后,该氧自由基上的单个电子与碳上的电子结合,导致醛基的产生;

(3) 在荧光免疫反应程序中,首先在醛基改性过的纸基微流体芯片第3层G、H、I上分别固定4 μL 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的3种肿瘤标志物的包被抗体,J作为空白对照,在室温下反应30min后,用20 μL 、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次,然后再依次加入0.5%的BSA阻隔纸上未与抗体结合的特异性位点,室温下反应15min后用20 μL 、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次,在纸基微流体芯片第2层C、D、E上分别加入4 μL 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对应的三种肿瘤标志物的异硫氰酸荧光素标记抗体,2min后将纸基微流体芯片的1、2两层对叠,在纸基微流体芯片第1层的A孔中加入20 μL 的待测肿瘤标志物混合液,反应2min后将三层全部对叠,并在纸基微流体芯片第1层的A孔中加入40 μL 、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液将抗原与标记抗体复合物冲到3层;反应4min后用40 μL 、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次,并用吸收垫吸收废液;

(4) 将纸基微流体芯片放到波长为470nm的激发光源下照射,可根据黄绿色荧光的强弱

与比色卡进行比较视觉读出读数;将纸基微流体芯片放入样品板,用荧光分光光度计在波长为470nm的激发光下进行扫描,可根据荧光光谱的峰值精确地分别得出各种肿瘤标志物的浓度。

一种同时检测多种肿瘤标志物的3D折叠纸基微流体荧光检测装置

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测装置,尤其是一种能对多种肿瘤标志物进行同时检测的3D折叠纸基微流体荧光检测装置,属于生物检测技术领域。

背景技术

[0002] 根据世界卫生组织和国际癌症研究机构(IARC)发布的“世界癌症报告”,癌症是全球死亡的主要原因,早期检测多种肿瘤标志物便于诊断癌症和治疗监测,并显着提高了治疗效率和存活率。然而,仅检测单个肿瘤标志物通常不足以准确诊断癌症,因为大多数标志物不对特定肿瘤具有特异性。为了提高癌症诊断的准确性,有必要结合多种肿瘤标志物的检测,因为它可以显着提高诊断特异性。

[0003] 已经提出了多种方法来在过去几年中同时检测多种肿瘤标志物。例如,电化学免疫测定,无标记方法,介导电泳测定,化学发光分析,生物标记的扫描测定,光子悬浮阵列。但是所有这些技术都不适合进行点对点测试,因为它们需要大型和复杂的仪器,复杂的操作,长时间的分析时间和高技能的人员进行操作。有限的设备和没有足够培训的人员可能会限制偏远和农村地区早期筛查肿瘤。因此,在不使用实验室或经过培训的人员的情况下,可以同时检测多个肿瘤标志物的易于快速和低成本的分析方法的需求是迫切需要的。近年来,免疫标记与纸基微流体结合的试纸越来越受到重视,因为它具有操作简便,分析物体积小,分析时间短,成本低,多分析分析的优点,不需要专业以及实现护理点测试的能力。然而,这些方法多是酶联免疫,酶联免疫反应中需要加底物与终止液,使反应程序更复杂;而且酶联需要适宜的温度与PH以免影响酶的活性,不适合快速随时随地检测。而荧光材料是很好的选择,因为光信号是敏感的,并且具有荧光标记的免疫分析具有量化多分析物的潜力。异硫氰酸荧光素(FITC)是一种发强黄绿色荧光的染料,它量子产率高、荧光寿命长,用FITC来标记抗体进行荧光免疫分析来检测肿瘤标志物是一种便捷有效、准确性高的检测方法。

发明内容

[0004] 本发明解决的技术问题是:提出一种同时检测多种肿瘤标志物的3D折叠纸基微流体荧光检测装置,低成本便携式的纸基荧光检测装置,并应用到对多种肿瘤标志物的同时检测中。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明提出的技术方案是:一种同时检测多种肿瘤标志物的3D折叠纸基微流体荧光检测装置,包括以下步骤:

[0006] (1) 纸基微流体芯片的制作;

[0007] 在计算机上设计出3D纸基的图形,构成可折叠的三维亲水和疏水区域,用于同时检测多种肿瘤标志物,在纸基2、3两层增加检测区域孔的数目为1-5,即可增加同时检测的标志物种类数为1-5,并用喷蜡打印机打印,放进烘箱烘烤一段时间,取出冷却至室温,将纸

基沿着打印区域剪下,并进行三维折叠;

[0008] (2) 纸基微流体芯片的预处理;

[0009] 将烘烤好的纸基芯片的第3层用等离子清洗机进行氧气等离子体处理,使纸表面的碳自由基形成氧自由基,导致醛基的产生,此目的是便于抗体在纸上的固定;

[0010] (3) 三维纸基同时检测的免疫反应程序;

[0011] 首先在等离子体处理过的第3层分别固定1-5种肿瘤标志物的包被抗体,然后用阻隔液阻隔纸上的结合位点,在第2层加入对应的1-5种肿瘤标志物的异硫氰酸荧光素标记抗体,将1、2两层对叠,在1层样品区加入待测抗原混合液,最后将三层全部对叠,进行免疫反应;

[0012] (4) 荧光分析检测;

[0013] 将第3层的纸基微流体芯片至于特定的激发光源下,根据可视化的荧光强弱评估1-5种肿瘤标志物浓度,将第3层的纸基微流体芯片用荧光分光光度计测定发射波长峰值,可精确得出检测的1-5种肿瘤标志物浓度。

[0014] 优选的,在纸基2、3两层增加检测区域孔的数目为3,可同时检测的标志物种类数3种。

[0015] 优选的,(1) 纸基微流体芯片的制作,使用的是规格为20cm×20cm的沃特曼1号色谱纸;

[0016] (2) 纸基微流体芯片的预处理,将烘烤完成第3层纸基微流体芯片,放入等离子清洗机进行表面改性4min,利用氧气表面等离子体处理使纸的表面带上醛基便于抗体固定,在等离子体条件下,纸基纤维素上的碳自由基-•CH-OH上的羟基会失去氢原子,从而形成氧自由基-•O-CH₂-,然后,该氧自由基上的单个电子与碳上的电子结合,导致醛基的产生;

[0017] (5) 在荧光免疫反应程序中,首先在醛基改性过的第3层纸基G、H、I上分别固定4μL、40μg/mL的3种肿瘤标志物的包被抗体,J作为空白对照,在室温下反应30min后,用20μL、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次,然后再依次加入0.5%的BSA阻隔纸上未与抗体结合的特异性位点,室温下反应15min后用20μL、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次,在第二层纸基C、D、E上分别加入4μL、40μg/mL对应的三种肿瘤标志物的异硫氰酸荧光素标记抗体,2min后将1、2两层对叠,在1层的A孔中加入20μL的待测肿瘤标志物混合液,反应2min后将三层全部对叠,并在1层的A孔中加入40μL、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液将抗原与标记抗体复合物冲到3层。反应4min后用40μL、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次,并用吸收垫吸收废液。

[0018] (6) 将纸基微流体芯片放到波长为470nm的激发光源下照射,可根据黄绿色荧光的强弱与比色卡进行比较视觉读出读数;将纸基微流体芯片放入样品板,用荧光分光光度计在波长为470nm的激发光下进行扫描,可根据荧光光谱的峰值精确地分别得出各种肿瘤标志物的浓度。

[0019] 本发明的有益效果:

[0020] (1) 将纸折叠为3D的模型便于携带,不受条件和地域限制,可用于随时随地的自检快测。

[0021] (2) 3D折叠纸基分别在后两层加抗体,直接在顶层加待测样品,无需加样后再加试剂操作,既简化了操作步骤,又实现了加入待测样品即可读结果的实用型检测装置。

[0022] (3) 纸基微流体与荧光免疫相结合,省去了大型的医疗检测仪器或电化学工作站等大型的仪器,荧光免疫分析可以视觉读数简单方便。

[0023] (4) 等离子体处理使纸,表面改性带上醛基便于抗体结合,简单省时并且有效。在等离子体条件下,纸基纤维素上的碳自由基($-\cdot\text{CH}-\text{OH}$)上的羟基可能会失去氢原子,从而形成氧自由基($-\cdot\text{O}-\text{CH}_2-$)。然后,该氧自由基上的单个电子与碳上的电子结合,导致醛基的产生。

[0024] (5) 整个纸基微流体荧光检测装置制备过程简单,检测快速且灵敏度高,可同时对多种肿瘤标志物进行检测,可用于肿瘤的快速检测与癌症的早期筛查。

[0025] (6) 纸基微流体分析装置具有简单性,便携性,一次性,低成本,无毒无害,可随时随地进行自检快测等优点。本发明将纸基微流体分析平台与荧光检测结合起来,用于多种肿瘤标志物的同时检测。这种检测装置简单,便宜,便携,一次性,易于使用,为发展中国家和资源有限和偏远地区提供了有利的平台。

附图说明

[0026] 下面结合附图对本发明的作进一步说明。

[0027] 图1是3D折叠纸基微流体荧光检测装置的平面展开图。其中1层为样品加入层,2层为标记抗体加入层,3层为检测层。A为加样区,B为样品流动区,C、D、E分别为三种肿瘤标志物对应的标记抗体的加入区,F为空白对照对照区。G、H、I分别为三种标志物的检测区,J为对照区。

[0028] 图2是3D折叠纸基微流体荧光检测装置的使用折叠顺序图。首先将纸基微流体芯片由I图折叠成II图所示,然后在等离子处理后的3层固定包被抗体并加BSA阻隔,在纸的2层加入标记抗体。再将纸折叠成如图III所示,往1层的样品区加入待检测抗原混合液,使1、2层对叠。最后折叠成如图IV所示,使1、2、3层都对叠,进行免疫反应。

[0029] 图3是纸基免疫荧光检测的原理示意图。

[0030] 图4是用3D折叠纸基微流体荧光检测装置检测糖类抗原724 (CA724) 一种肿瘤标志物浓度与信号强度关系图。

[0031] 图5是用3D折叠纸基微流体荧光检测装置检测糖类抗原125 (CA125)、糖类抗原153 (CA153) 两种肿瘤标志物浓度与信号强度关系图。

[0032] 图6是用3D折叠纸基微流体荧光检测装置同时检测癌胚抗原 (CEA)、甲胎蛋白 (AFP)、糖类抗原199 (CA199) 三种肿瘤标志物浓度与信号强度关系图。

具体实施方式

[0033] 实施例1

[0034] 3D折叠纸基微流体检测装置对糖类抗原724 (CA724) 一种肿瘤标志物进行检测。

[0035] 本实施例的具体步骤,包括:

[0036] (1) 在计算机上设计出3D纸基图案,并进行喷蜡打印。

[0037] (2) 将纸放入烘箱中150度烘烤150秒取出。

[0038] (3) 待纸基冷却至室温后,折叠成三维形状,并将第三层进行氧气表面等离子体处理4分钟,使纸的表面修饰上醛基。

- [0039] (4) 用异硫氰酸荧光素标记CA724肿瘤标志物对应的标记抗体。
- [0040] (5) 第3层纸基G上固定4 μ l、40 μ g/ml的CA724肿瘤标志物对应的包被抗体,G、I、J作为空白对照,在室温下反应30min后,用20 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次。
- [0041] (6) 然后再依次加入0.5%的BSA阻隔第3层纸上未与抗体结合的特异性位点,室温下反应15min后用20 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次。
- [0042] (7) 在第二层纸基C孔加入4 μ l、40 μ g/ml对应的CA724的种肿瘤标志物的异硫氰酸荧光素标记抗体,反应2min。
- [0043] (8) 将1、2两层对叠,在1层的A孔中加入20 μ l的待测肿瘤标志物混合液,反应2min。
- [0044] (9) 将三层全部对叠,并在1层的A孔中加入40 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液将抗原与标记抗体复合物冲到3层。反应4min后用40 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次,并用吸收垫吸收废液。
- [0045] (10) 将纸基微流体芯片放到波长为470nm的激发光源下照射,可根据黄绿色荧光的强弱与比色卡进行比较视觉读出读数。将纸基微流体芯片放入样品板,用荧光分光光度计在波长为470nm的激发光下进行扫描,可根据荧光光谱的峰值精确地分别得出肿瘤标志物的浓度。
- [0046] 实施例2
- [0047] 3D折叠纸基微流体检测装置同时对糖类抗原125 (CA125)、糖类抗原153 (CA153) 两种肿瘤标志物进行检测。
- [0048] 本实施例的具体步骤,包括:
- [0049] (1) 在计算机上设计出3D纸基图案,并进行喷蜡打印。
- [0050] (2) 将纸放入烘箱中150度烘烤150秒取出。
- [0051] (3) 待纸基冷却至室温后,折叠成三维形状,并将第三层进行氧气表面等离子体处理4分钟,使纸的表面修饰上醛基。
- [0052] (4) 用异硫氰酸荧光素标记CA125、CA153两种肿瘤标志物对应的标记抗体。
- [0053] (5) 第3层纸基G、H上分别固定4 μ l、40 μ g/ml的CA125、CA153两种肿瘤标志物对应的包被抗体,I、J作为空白对照,在室温下反应30min后,用20 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次。
- [0054] (6) 然后再依次加入0.5%的BSA阻隔第3层纸上未与抗体结合的特异性位点,室温下反应15min后用20 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次。
- [0055] (7) 在第二层纸基C、D上分别加入4 μ l、40 μ g/ml对应的CA125、CA153的两种肿瘤标志物的异硫氰酸荧光素标记抗体,反应2min。
- [0056] (8) 将1、2两层对叠,在1层的A孔中加入20 μ l的待测肿瘤标志物混合液,反应2min。
- [0057] (9) 将三层全部对叠,并在1层的A孔中加入40 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液将抗原与标记抗体复合物冲到3层。反应4min后用40 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次,并用吸收垫吸收废液。
- [0058] (10) 将纸基微流体芯片放到波长为470nm的激发光源下照射,可根据黄绿色荧光的强弱与比色卡进行比较视觉读出读数。将纸基微流体芯片放入样品板,用荧光分光光度计在波长为470nm的激发光下进行扫描,可根据荧光光谱的峰值精确地分别得出各种肿瘤标志物的浓度。

[0059] 实施例3

[0060] 3D折叠纸基微流体检测装置同时对癌胚抗原 (CEA)、甲胎蛋白 (AFP)、糖类抗原199 (CA199) 三种肿瘤标志物进行检测。

[0061] 本实施例的具体步骤,包括:

[0062] (1) 在计算机上设计出3D纸基图案,并进行喷蜡打印。

[0063] (2) 将纸放入烘箱中150度烘烤150秒取出。

[0064] (3) 待纸基冷却至室温后,折叠成三维形状,并将第三层进行氧气表面等离子体处理4分钟,使纸的表面修饰上醛基。

[0065] (4) 用异硫氰酸荧光素标记CEA、AFP、CA199三种肿瘤标志物对应的标记抗体。

[0066] (5) 第3层纸基G、H、I上分别固定4 μ l、40 μ g/ml的CEA、AFP、CA199三种肿瘤标志物对应的包被抗体,J作为空白对照,在室温下反应30min后,用20 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次。

[0067] (6) 然后再依次加入0.5%的BSA阻隔第3层纸上未与抗体结合的特异性位点,室温下反应15min后用20 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次。

[0068] (7) 在第二层纸基C、D、E上分别加入4 μ l、40 μ g/ml对应的CEA、AFP、CA199的三种肿瘤标志物的异硫氰酸荧光素标记抗体,反应2min。

[0069] (8) 将1、2两层对叠,在1层的A孔中加入20 μ l的待测肿瘤标志物混合液,反应2min。

[0070] (9) 将三层全部对叠,并在1层的A孔中加入40 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液将抗原与标记抗体复合物冲到3层。反应4min后用40 μ l、0.01molPH=7.4的磷酸缓冲液冲洗3次,并用吸收垫吸收废液。

[0071] (10) 将纸基微流体芯片放到波长为470nm的激发光源下照射,可根据黄绿色荧光的强弱与比色卡进行比较视觉读出读数。将纸基微流体芯片放入样品板,用荧光分光光度计在波长为470nm的激发光下进行扫描,可根据荧光光谱的峰值精确地分别得出各种肿瘤标志物的浓度。

[0072] 本发明的不局限于上述实施例所述的具体技术方案,凡采用等同替换形成的技术方案均为本发明要求的保护范围。

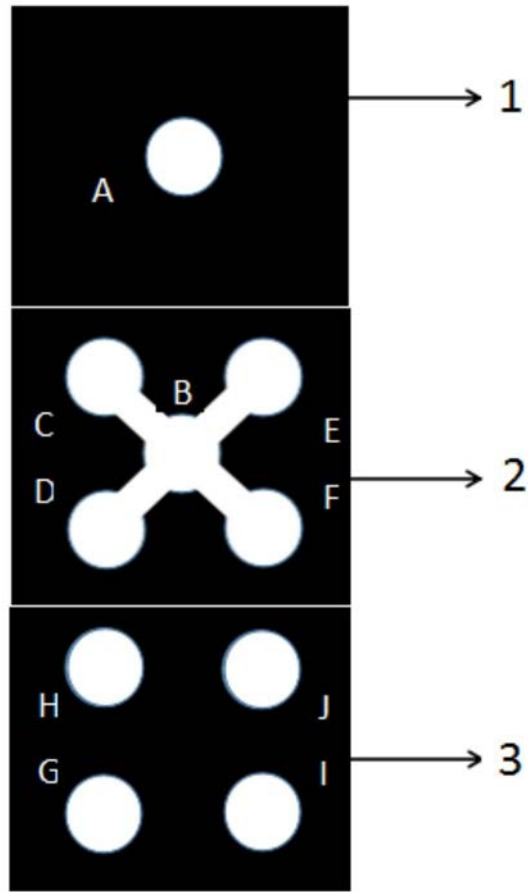
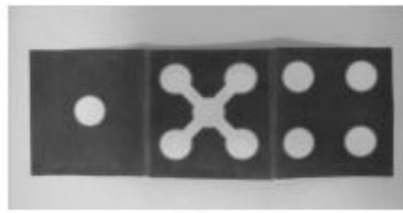


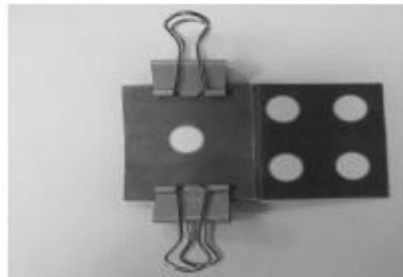
图1



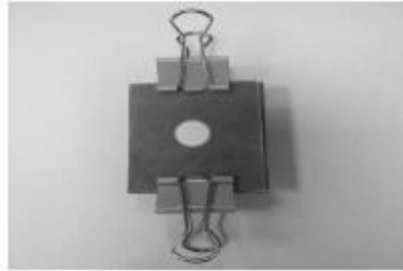
I



II



III



IV

图2

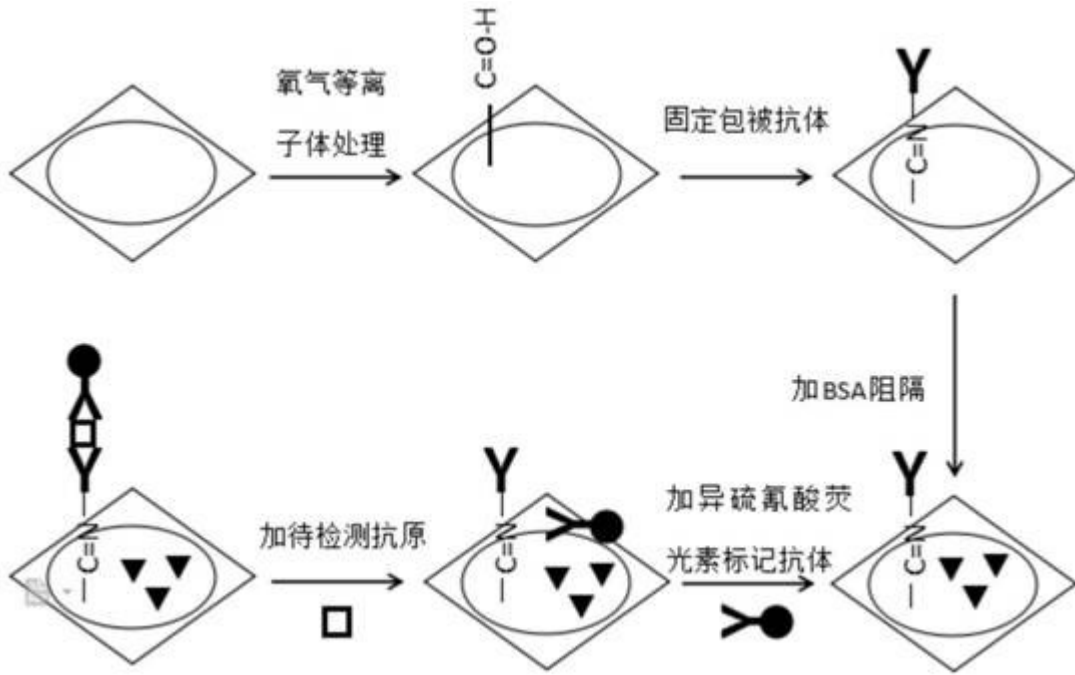


图3

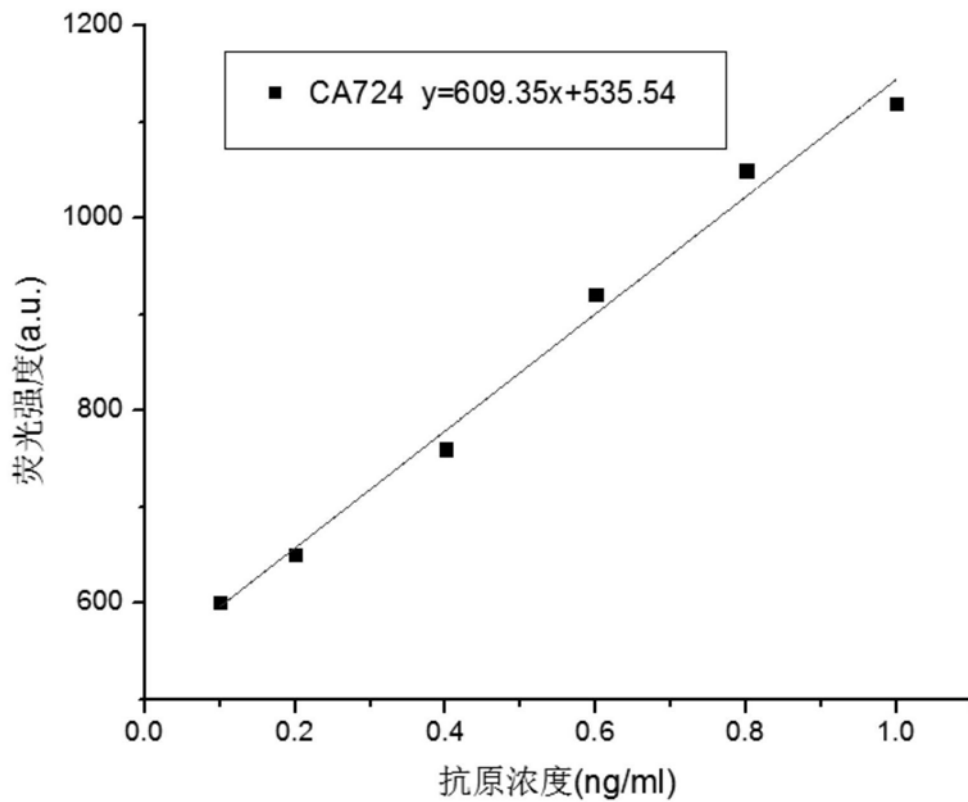


图4

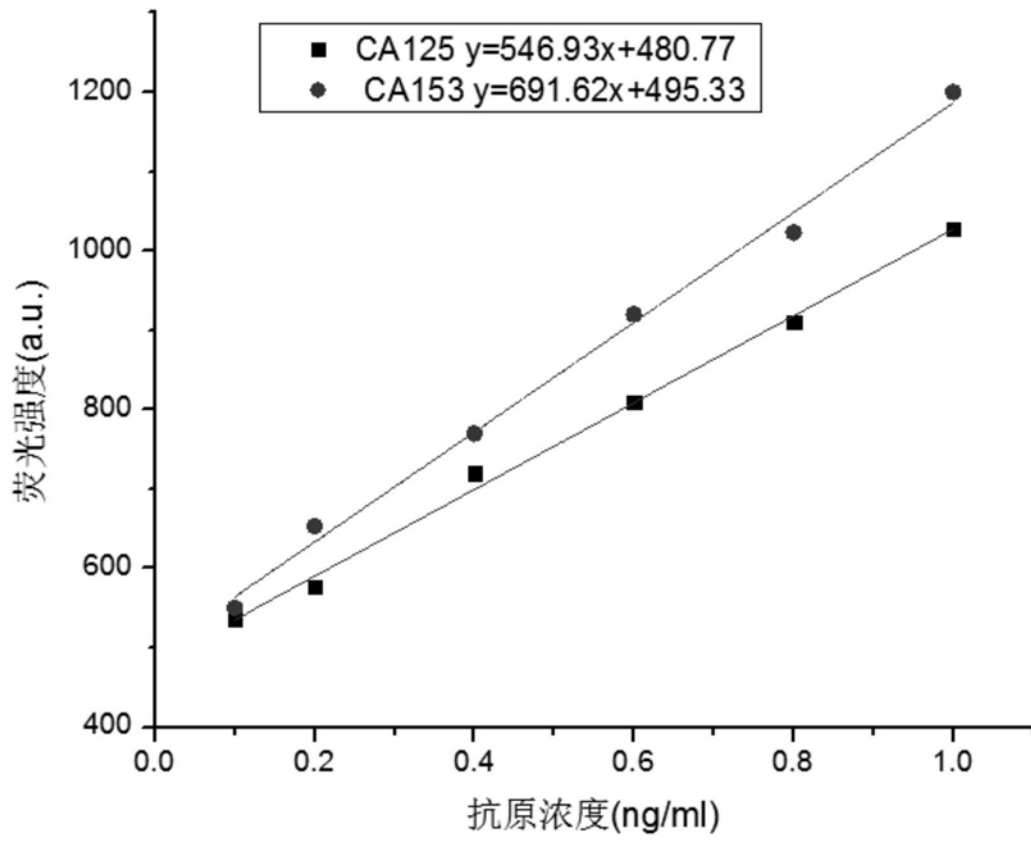


图5

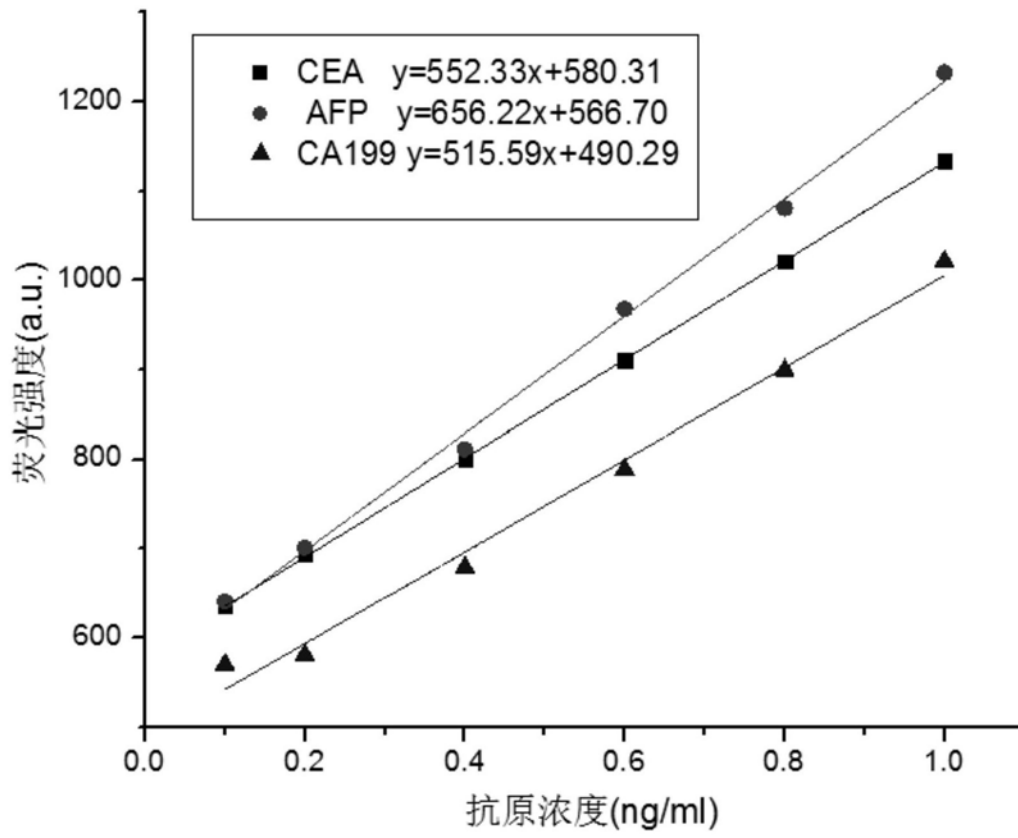


图6

专利名称(译)	一种同时检测多种肿瘤标志物的3D折叠纸基微流体荧光检测装置		
公开(公告)号	CN107478631B	公开(公告)日	2019-10-11
申请号	CN2017110852160.2	申请日	2017-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
[标]发明人	于海东 焦钰翠 李林 张承武 刘志鹏 刘金华 黄维 欧阳启然 赖琼宇 郭雪英 宗丽君 朱成显		
发明人	于海东 焦钰翠 李林 张承武 刘志鹏 刘金华 黄维 欧阳启然 赖琼宇 郭雪英 宗丽君 朱成显		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533 G01N33/574		
其他公开文献	CN107478631A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种同时检测多种肿瘤标志物的3D折叠纸基微流体荧光检测装置，属于生物检测技术领域。该检测装置可用于同时对多种肿瘤标志物的检测。本发明包括以下步骤：(1)纸基微流体芯片的制作；(2)纸基微流体芯片的预处理；(3)三维纸基同时检测的免疫反应程序；(4)荧光分析检测。本发明将纸基微流体分析平台与荧光检测结合起来，用于多种肿瘤标志物的同时检测。这种检测装置简单，便宜，便携，一次性，易于使用，为发展中国家和资源有限和偏远地区提供了有利的平台。

