



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109507414 A

(43)申请公布日 2019. 03. 22

(21)申请号 201810852641.8

(22)申请日 2018.07.30

(71)申请人 烟台芥子生物技术有限公司

地址 264003 山东省烟台市高新区科技大道39号

(72)发明人 张屹 刘枫

(74)专利代理机构 北京慧诚智道知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
11539

代理人 殷炳蕾

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

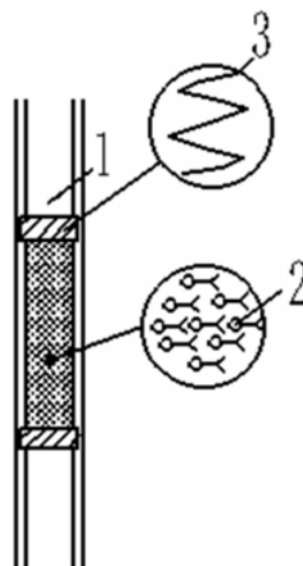
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

腔体内固定有微珠的微柱及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供了一种在透光性微柱的腔体内固定微珠的方法,包括:1)将光聚合组合物加入所述微柱的腔体内,所述光聚合组合物为包含预聚物和光引发剂的水性溶液,所述光引发剂用于产生自由基以促进所述预聚物的聚合;2)在光掩模协助下,用光照射填充有所述光聚合组合物的至少一部分腔体,使得所述预聚物固化在所述至少一部分腔体内,形成多孔挡板;3)清洗所述微柱,以除去未反应的残余物;4)加入待固定的微珠;5)重复步骤1)至3),以将所述微珠固定在所述多孔挡板之间,形成微珠段。本发明还提供了通过该方法制备的微柱以及该微柱在免疫检测方面的应用。本发明的微柱采用微珠原位固定方式,具有预先包埋、位置固定、方便运输和易于保存等优点。



1. 一种在透光性微柱的腔体内固定微珠的方法,包括:
 - 1) 将光聚合组合物加入所述微柱的腔体内,所述光聚合组合物为包含预聚物和光引发剂的水性溶液,所述光引发剂用于产生自由基以促进所述预聚物的聚合;
 - 2) 在光掩模协助下,用光照射填充有所述光聚合组合物的至少一部分腔体,使得所述预聚物固化在所述至少一部分腔体内,形成多孔挡板;
 - 3) 清洗所述微柱,以除去未反应的残余物;
 - 4) 加入待固定的微珠,
 - 5) 重复步骤1)至3),以将所述微珠固定在所述多孔挡板之间,形成微珠段。
2. 如权利要求1所述的方法,还包括采用另一种或更多种微珠重复进行步骤4)和5),以在所述微柱内形成多个微珠段。
3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述微珠表面偶联有捕获分子。
4. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述预聚物为ENTG3800,所述光引发剂为2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮。
5. 如权利要求4所述的方法,其中ENTG3800在所述光聚合组合物中的体积比为10%至70%,2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮在所述光聚合组合物中的体积比为1%至10%。
6. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述微柱的内径在0.1mm至10mm。
7. 如权利要求5所述的方法,其中所述光照射采用365nm波长的紫外光,以100mW/cm²照射2分钟。
8. 权利要求1至7中任一项所述的方法制备的在腔体内固定有微珠的微柱。
9. 权利要求8所述的微柱在免疫检测中的应用。

腔体内固定有微珠的微柱及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微柱及其制备方法,尤其是可应用于免疫学微量检测和快速检测的微柱及其制备方法。

背景技术

[0002] 免疫检查是医院广泛开展的检测项目,通过抗原与抗体的相互作用,检测血清或血浆中的生物标志物。目前使用较多的有酶免、放免、时间分辨荧光、磁珠化学发光等方法。其中,微珠由于其具有比表面积大的优点已广泛用于免疫反应。但是,目前微珠在免疫反应中的使用多为悬浮式反应,如在磁珠化学发光中,磁珠通过物理的随机碰撞,将偶联在其表面的捕获分子与反应体系中的待测样品进行结合。这种反应方式,所需要的反应时间较长,而且很难进行绝对的充分反应。如果将微球紧密地固定于一个狭长的反应通道中,由于微珠间缝隙较小,且反应通道有一定长度,此时将样品缓慢依次通过这个通道,就会使捕获分子与待测样品的碰撞几率大大提高,可以缩短反应时间和提高检测灵敏度。

[0003] 微反应体系具有需要的样品量少的优点。这可以减少患者痛苦,特别是对于需要反复采血的患者。因此,微反应体系是免疫检测的一个重要发展方向。微纳米级别的反应柱(即微柱)可以很好地用于微反应体系的建立。但是,制备微纳米级别的反应柱具有一定难度。传统的柱床式装柱方法,是在通道尽头设置一个多孔的大坝结构用来阻挡填料的溢出。但由于目前的微加工技术最小加工精度通常在 $10\mu\text{m}$ 左右,即通道末端大坝孔径最小为 $10\mu\text{m}$ 左右,为了保证微珠不会溢出通道,要求使用的微珠直径至少在 $20\mu\text{m}$ 以上。微珠直径越大,比表面积就越小,而常用的高灵敏度的免疫微珠的直径在 0.3 至 $3\mu\text{m}$ 之间,因此传统的柱床式微柱无法用于一些灵敏度较高的检测项目。

发明内容

[0004] 为克服上述问题,在一方面,本发明提供了一种在透光性微柱的腔体内固定微珠的方法,包括:

[0005] 1) 将光聚合组合物加入所述微柱的腔体内,所述光聚合组合物为包含预聚物和光引发剂的水性溶液,所述光引发剂用于产生自由基以促进所述预聚物的聚合;

[0006] 2) 在光掩模协助下,用光照射填充有所述光聚合组合物的至少一部分腔体,使得所述预聚物固化在所述至少一部分腔体内,形成多孔挡板;

[0007] 3) 清洗所述微柱,以除去未反应的残余物;

[0008] 4) 加入待固定的微珠,

[0009] 5) 重复步骤1)至3),以将所述微珠固定在所述多孔挡板之间,形成微珠段。

[0010] 在一些实施方案中,该方法还包括采用另一种或更多种微珠重复进行步骤4)和5),以在所述微柱内形成多个微珠段。

[0011] 在一些实施方案中,所述微珠表面偶联有捕获分子。

[0012] 在优选的实施方案中,所述预聚物为ENTG3800,所述光引发剂为2-羟基-4'-(2-羟

乙氧基)-2-甲基苯丙酮。

[0013] 在更优选的实施方案中, ENTG3800在所述光聚合组合物中的体积比为10%至70%, 2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮在所述光聚合组合物中的体积比为1%至10%。

[0014] 在一些实施方案中, 所述微柱的内径在0.1mm至10mm。

[0015] 在一些实施方案中, 所述光照射采用365nm波长的紫外光, 以100mW/cm²照射2分钟。

[0016] 在另一方面, 本发明还提供了通过上述方法制备的在腔体内固定有微珠的微柱。

[0017] 在另一方面, 本发明还提供了所述微柱在免疫检测中的应用。

[0018] 本发明的微柱采用微珠原位固定方式, 具有预先包埋、位置固定、方便运输和易于保存等优点。

附图说明

[0019] 图1显示了本发明微柱的一个实施方案的示意图, 在该微柱中包含一个微珠段。

[0020] 图2显示了本发明微柱的另一实施方案的示意图, 在该微柱中包含多个微珠段。

[0021] 图3显示了以本发明微柱来检测C反应蛋白 (CRP) 的曲线图。

具体实施方式

[0022] 除非另有说明, 本文使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员所通常理解的含义。

[0023] 如图1所示, 本发明提供的微柱包括腔体1、微柱段2和多孔挡板3 (图中还示意性地显示了微柱段2和多孔挡板3的部分放大结构)。微珠段2和多孔挡板3位于腔体1中, 并且微珠段2位于两多孔挡板3之间。腔体1本身也是待检样品、洗涤液等的流动通道。微珠段2的长度一般在1mm至10mm, 多孔挡板3的长度一般在0.1mm至10mm之间。

[0024] 在另一个实施方案中, 如图2所示, 本发明提供的微柱包括多个微柱段2, 每个微珠段2可以包括不同的微珠, 例如这些微珠带有不同的捕获分子 (例如抗体)。

[0025] 制备微柱的材料可以是环烯烃共聚物 (COC)、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、聚苯乙烯 (PS) 等透光性较好的光学材料。微柱在形态上可以为两端开口的细长管状物, 或者可以是在上述材料上形成的一个或多个两个开口的细长通道。微柱的腔体1的横切面可以是圆形、正方形、长方形等可以容纳液体的规则形状。腔体1的长度可以为1mm至10cm。

[0026] 微珠段2由填充在腔体1中两多孔挡板3之间的微珠形成。该微珠可以是磁性微球、乳胶微球、二氧化硅微球等生物学常用的微型小球。微珠直径范围是可以在500nm至100μm之间。微珠表面一般偶联有捕获分子, 例如抗体和包含链霉亲和素在内的蛋白等。偶联方法通常包括羧基、羟基、氨基、甲苯磺酸基等偶联方式, 以及物理吸附。这些捕获分子用于将样品中的待测物质捕获至微珠表面, 然后使用相应的表征方法进行定性或定量分析。

[0027] 多孔挡板3由光聚合组合物形成。该光聚合组合物为包含预聚物和光引发剂的水性溶液。预聚物指能发生自由基固化反应并产生多孔通道的部分聚合化合物。这些化合物的特点是其在分子末端含有双键, 例如ENTG3800。预聚物的使用比例为10%至70% (体积比), 预聚物的比例越高, 所形成的多孔挡板的孔越致密, 所需要的光聚合时间也越短。引发

剂是一些能经紫外光照射而产生自由基的化合物,如2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮。引发剂使用比例为1%至10%(体积比),引发剂用量越大,光聚合时间越短。该光聚合物其它成分例如为水、磷酸缓冲盐水(PBS)、生理盐水等。紫外光可通过紫外光发生器来产生,例如可以将发射的波长设置为365nm。所设置的功率越高,光聚合时间就越短。通过调整预聚物的使用比例,可以形成具有不同孔径的多孔挡板。就本发明的目的而言,所形成的多孔挡板的孔径大小在一方面可以防止微珠穿过,另一方面应允许生物大分子如蛋白等自由通过。

[0028] 本发明的微柱可通过如下方式制成。先将光聚合物加入微柱的腔体1内,采用光掩模仅将需要固化的微柱位置暴露于紫外光下,光聚合物组合物在此位置固化(即形成多孔挡板3)后,洗去未反应的残余物,然后将需要固定的微珠填充至该多孔挡板3的一侧,微珠填充完毕,在微珠的开放侧(即无多孔挡板侧)再形成一多孔挡板3,从而将微珠固定于两多孔挡板3之间,形成微珠段2。当提及微珠时,本文的用词“固定”指通过多孔挡板3将微珠群体总体上保持在微柱的特定位置,它们不会穿过多孔挡板3而溢出,但对于每个具体的微珠而言,它们可以在微珠段2内移动。可以按此方式形成多个微珠段2,这些微珠段2可以是连续的,即它们仅由多孔挡板3隔开,也可以是不连续的,即除了多孔挡板3之外,它们之间还包括一段空白腔体。具有多个微珠段2的微柱可用于样品中多个项目的联合检测。

[0029] 这里提到的光掩模例如可以是一种可以用于打印的透明材料,将需要避光的部分用打印机处理成黑色,也可以是一种能被微加工成具有镂空结构的不透明材料,将需要曝光的部分刻成镂空的结构。

[0030] 本发明的微柱可以配合进样器和检测器,进行手动加样、洗涤和检测,也可以集成至全自动仪器的免疫分析模块中使用。

[0031] 以下结合具体实施例来阐述本发明。

[0032] 实施例1多孔挡板的制备

[0033] 通过本实施例来比较相同用量的引发剂2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮与不同用量的预聚物ENTG3800(购买自日本关西涂料)所制备的多孔挡板的通透性。首先,准备两组光聚合物组合物:高浓度组(引发剂体积比:3%,预聚物体积比:45%,剩余补充PBS)和低浓度组(引发剂体积占比:3%,预聚物体积占比:7%,剩余体积补充PBS)。接着从微柱一端加入5 μ l该组合物,并使用镂空的锡箔纸作为光掩模遮盖于上述微柱上,使镂空位置(1mm \times 1mm)对准需要聚合的位置。然后使用紫外固化设备(波长:365nm,功率:100mW/cm²)照射处理2min。最后用微量进样器,以5 μ l/min的流速用PBS洗涤多孔挡板30min,以除去未固化的组分。

[0034] 以荧光标记抗体检测多孔挡板的通透性:将上述制备好的两种带有多孔挡板的微柱,分别使用微流控进样器从一端进样0.1 μ g/ml DyLight650标记的CRP抗体GR26(购买自厦门同仁心生物技术有限公司)(缓冲液:含1%BSA的PBS),进样速度为5 μ l/min。进样5min,并从微柱的另一端连续收集20 μ l流穿液。将流穿液转移至96孔板中,使用多功能荧光酶标仪的620nm/680nm滤光片检测并记录荧光值,同时使用相同体积的0.1 μ g/ml DyLight650标记抗体和PBS作为对照组。检测结果如表1所示,两组多孔挡板的荧光抗体流穿液的荧光值都与DyLight650标记抗体对照组无明显差异,说明抗体均可以自由通过上述两组多孔挡板。

[0035] 以粒径400nm的绿色荧光微球检测多孔挡板的通透性:将上述制备好的两种带有多孔挡板的微柱,分别从一端进样1 μ g/ml粒径400nm的绿色荧光微球(购自苏州为度,缓冲液:含1%BSA的PBS),进样速度为5 μ l/min。进样5min,从微柱的另一端连续收集20 μ l流穿液。将流穿液转移至96孔板中,使用多功能荧光酶标仪的485nm/525nm滤光片检测并记录荧光值,同时使用相同体积的1 μ g/ml绿色荧光微球和PBS作为对照组。检测结果如表1所示,高浓度组多孔挡板由于预聚物含量较高,形成的挡板孔洞小,致使流穿液中未检测到荧光微球,即高浓度组挡板孔径应<400nm,可以成功截留400nm及以上直径的微球。而低浓度组由于挡板孔洞较大,使得绝大部分400nm微球可以自由通过,即低浓度组挡板孔洞平均直径>400nm。

[0036] 表1多孔挡板通透性分析

[0037]

	DyLight 标记抗体(荧光强度)			绿色荧光微球(荧光强度)		
	荧光标记抗体对照	流穿液	PBS 对照	绿色荧光微球对照	流穿液	PBS 对照
高浓度组	35854	35456	4856	54572	3841	3780
低浓度组		34475			51847	

[0038] 实施例2免疫检测微柱制备及C反应蛋白(CRP)检测分析

[0039] 取实施例1中制备的一端带有高浓度组的小孔径挡板的微柱,使用微流控进样器从另一端进样1 μ g/ml链霉亲合素包被磁珠(磁珠购自Thermo,直径:1 μ m,缓冲液:含1%BSA的PBS),进样速度5 μ l/min,直到磁珠充满整个微柱(稍微留些余量用于制备另一多孔挡板)时停止进样,然后采用实施例1的高浓度组多孔挡板的制备方法,在微珠的另一侧(无多孔挡板侧)形成多孔挡板,最后以5 μ l/min的流速用PBS洗涤微珠30min,以除去未固化的组分。

[0040] 将生物素标记的CRP抗体GR25(购买自厦门同仁心生物技术有限公司)(浓度:1 μ g/ml,缓冲液:含1%BSA的PBS),使用微流控进样器进样至上述两端带有多孔挡板、中间装有链霉亲合素包被磁珠的微柱腔体中,进样速度5 μ l/min,进样2min。进样结束,使用PBST以相同的流速洗涤2min。将梯度稀释CRP抗原(起始浓度:500ng/ml,2倍梯度稀释,共10个浓度,缓冲液:含1%BSA的PBS),以5 μ l/min的流速向上述含有生物素化抗体的反应通道中进样,共进样2min。进样结束,使用PBST以相同的流速洗涤2min。洗涤结束,以相同的流速进样1 μ g/ml DyLight650标记的CRP抗体GR26(缓冲液:含1%BSA的PBS),进样2min。进样结束,使用PBST以相同的流速洗涤2min。洗涤结束,在激光共聚焦荧光显微镜下拍照记录,使用ImageJ软件进行荧光强度分析,结果如表2和图3所示,CRP检测范围为1ng/ml至500ng/ml。

[0041] 表2 CRP检测结果分析

CRP (ng/ml)	荧光强度		
	数值 1	数值 2	平均值
500	228384	245197	236790.5
250	150731	149455	150093
125	89578	88382	88980
62.5	45094	48623	46858.5
31.3	25748	25136	25442
15.6	14811	14055	14433
7.8	10206	10632	10419
3.9	7798	7617	7707.5
2.0	6581	6578	6579.5
1.0	6038	6087	6062.5
0	5705	5708	5706.5

[0043] 在免疫检测应用中,为了联合检测多个项目,可以使用带有多个微珠段的微柱。这些微珠段含有偶联有不同捕获分子的微珠。这些捕获分子可以直接结合样品中的待检分子,或者可以通过中间分子(例如,实施例2中的生物素标记的CRP抗体GR25)来结合待检分子。

[0044] 以上通过具体实施例对本发明进行了详细说明,应当指出,对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明精神和范围前提下,还可以对这些实施例或实施方案作出若干改动,它们也应视为在本发明的保护范围内。

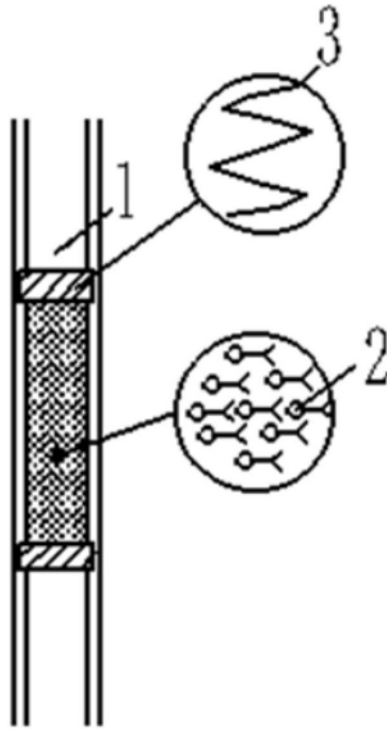


图1

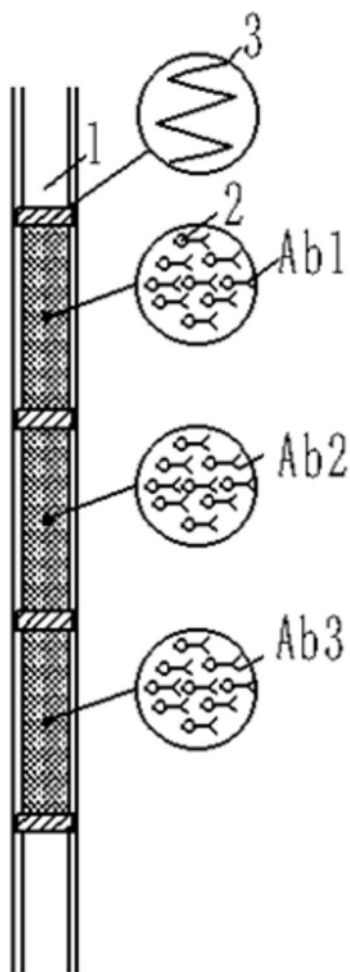


图2

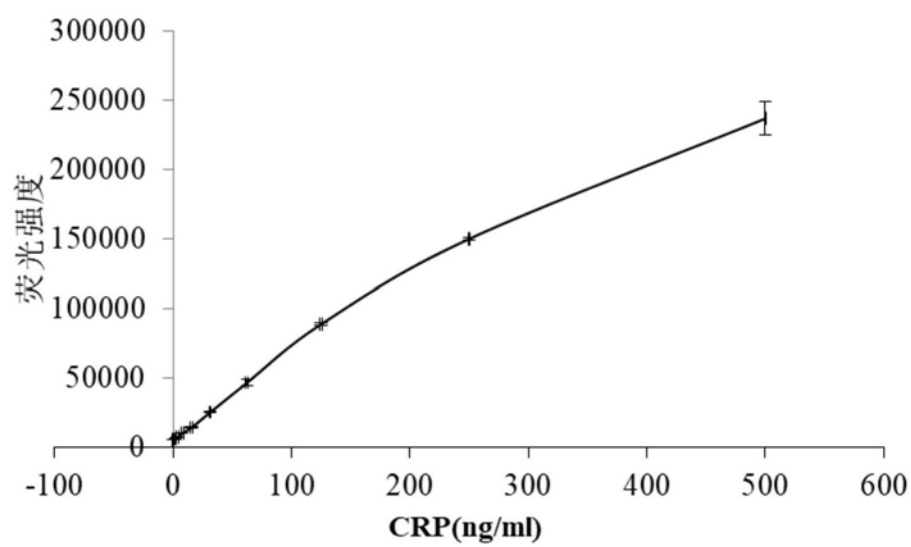


图3

专利名称(译)	腔体内固定有微珠的微柱及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109507414A	公开(公告)日	2019-03-22
申请号	CN201810852641.8	申请日	2018-07-30
[标]发明人	张屹 刘枫		
发明人	张屹 刘枫		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N2333/4737		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种在透光性微柱的腔体内固定微珠的方法，包括：1)将光聚合组合物加入所述微柱的腔体内，所述光聚合组合物为包含预聚物和光引发剂的水性溶液，所述光引发剂用于产生自由基以促进所述预聚物的聚合；2)在光掩模协助下，用光照射填充有所述光聚合组合物的至少一部分腔体，使得所述预聚物固化在所述至少一部分腔体内，形成多孔挡板；3)清洗所述微柱，以除去未反应的残余物；4)加入待固定的微珠；5)重复步骤1)至3)，以将所述微珠固定在所述多孔挡板之间，形成微珠段。本发明还提供了通过该方法制备的微柱以及该微柱在免疫检测方面的应用。本发明的微柱采用微珠原位固定方式，具有预先包埋、位置固定、方便运输和易于保存等优点。

