



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108236972 A

(43)申请公布日 2018.07.03

(21)申请号 201810159499.9

(22)申请日 2018.02.26

(71)申请人 北京华科泰生物技术有限公司
地址 101111 北京市通州区科创东五街2号
14幢4层F4E

(72)发明人 林斯

(74)专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 张瑾

(51) Int. Cl.

B01L 3/00(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

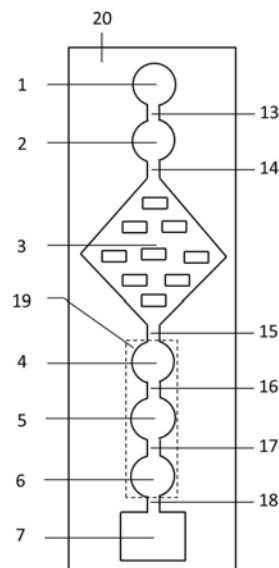
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

一种用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明涉及一种用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片,包括:芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片,所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、第一检测区、第二检测区、质控区及废液收集区;所述上层盖片上设有加样孔、第一检测窗口、第二检测窗口、质控窗口、通气孔,并且与所述加样区、第一检测区、第二检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应。本发明还提供了上述联合微流控芯片的制备方法和用途。本发明能够实现中性粒细胞明胶酶和微量白蛋白项目的联合检测,对能够全面准确的诊断早期肾损伤有着极大的临床诊断价值。



1. 一种用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片,其特征在于,包括:芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片,

所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、第一检测区、第二检测区、质控区及废液收集区;

所述上层盖片上设有加样孔、第一检测窗口、第二检测窗口、质控窗口、通气孔,并且与所述加样区、第一检测区、第二检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应;

其中,所述抗体包被区预存储有荧光微球标记的一株鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的混合物;

所述第一检测区中预存储磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体或磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体中的一种;所述第二检测区中预存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体或磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体中的另一种。

2. 根据权利要求1所述的用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述第一检测区、第二检测区和质控区的下侧设有由永磁铁或电磁铁提供的磁场区域。

3. 根据权利要求1所述的用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述荧光微球标记的鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的摩尔比为1:1:(0.1~4)。

4. 根据权利要求1所述的用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述第一检测区或第二检测区中磁性微球与另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体的质量比为10:(0.05~2);所述第一检测区或第二检测区中磁性微球与另一株鼠抗人MAU单克隆抗体的质量比为10:(0.05~2)。

5. 根据权利要求4所述的用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述磁性微球为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co微球,或者为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与无机物或有机物形成的核/壳结构或掺杂结构的微球,所述 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与所述无机物或有机物的重量百分比为1:(0.001-1000);所述磁性微球的粒径大小为0.05-5 μm 。

6. 根据权利要求1所述的用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述质控区预存储有磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体。

7. 根据权利要求1所述的用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述第一检测区、第二检测区和质控区的表面设置为粗糙结构,所述粗糙结构为向下凹的半圆结构、锯齿形结构、凹凸的小矩形结构或其他不规则结构;

所述微混合区为棱形、圆形、方形或矩形,并且其内部设有n个交错设置的矩形、棱形、方形或圆形的柱体;或者所述微混合区为至少一个矩形串联结构,并且每个矩形中设置有一个矩形柱体;或者所述微混合区为锯齿形结构;或者所述微混合区为至少一个正三角形或倒三角形串联结构,并且每个三角形中设置有一个相应正三角或者倒三角形柱体;或者所述微混合区为至少一个棱形结构串联,并且棱形结构中设置有一个棱形或圆形柱体;或者所述微混合区为至少一个圆形结构串联,并且圆形结构中设置有一个圆形柱体。

8. 权利要求1~7任一项所述的用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

- 1) 在芯片基板上开设一个所述微流控检测通道；
- 2) 将荧光微球标记的一株鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG进行混合,将混合物预存储在抗体包被区中,干燥；
- 3) 将磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体、磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体分别任意地预存储在第一检测区、第二检测区中且两个检测区中所预存储的物质各不相同,干燥；
- 4) 将磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体预存储在质控区中,干燥；
- 5) 将上层盖片盖合于芯片基板的上方；
- 6) 在芯片基板的下方对应所述微流控芯片的待第一检测区、第二检测区和质控区设置磁场。

9. 一种权利要求1~7任一项所述的用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片的应用方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要启动,使第一、第二检测区和质控区中的免疫磁性微球平铺固定到相应区域的底面；

2) 从加样孔加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区,复溶预存储在抗体包被区中的荧光微球标记的一株鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物；

3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区,在微混合区样本中的NGAL与荧光微球标记的一株鼠抗人NGAL单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的NGAL免疫复合物,样本中MAU与荧光微球标记的一株鼠抗人MAU单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的MAU免疫复合物,且荧光微球标记的兔IgG未参加反应；

4) 步骤3)中反应形成的荧光微球标记的NGAL免疫复合物、荧光微球标记的MAU免疫复合物以及未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道进入到第一检测区、第二检测区和质控区内,NGAL免疫复合物与磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体的检测区中,MAU免疫复合物与磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体的相应检测区中,荧光微球标记的兔IgG与质控区中磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体发生免疫反应而停留在质控区中,剩余液体流入废液收集区；

5) 第一、第二检测区和质控区的荧光微球均显示一定的荧光信号,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与NGAL的浓度具有正相关性,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与MAU的浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出NGAL和MAU的浓度。

一种用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断领域,具体涉及一种用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)分子量约为25kDa,共价结合于中性粒细胞明胶酶,主要参与早期肾脏上皮的发生、生长。在正常组织包括肾脏、肺、胃及结肠的上皮组织中NGAL的表达量较低。在发生缺血性和毒性肾损伤过程中,肾小管上皮细胞中的NGAL将显著增加,在开始的两小时内,血液和尿液中的NGAL水平将大幅度增加,因此NGAL作为反映肾功能损伤的标志物有显著的临床意义。适用于慢性肾病(CKD)、糖尿病肾病、狼疮肾病、IgA肾小管间质性损伤、心肾综合征(CRS)等的检测。

[0003] 尿微量白蛋白(MAU)是一种非糖基化白蛋白,分子量66000道尔顿,是肾脏功能损伤,心血管损伤的早期临床标志。研究表明,及时的治疗干预可降低尿微量白蛋白(MAU)的水平,改善原发疾病的预后。因此,定量检测尿微量白蛋白(MAU)对于糖尿病,心血管病,肾病等疾病的早期诊断,早期治疗具有重要的参考价值 and 临床意义。

[0004] 随着研究的不断深入,NGAL和MAU项目的检测卡逐渐上市,但是,目前临床上对肾功能的诊断主要是对单个项目进行检测,导致疾病的诊断方面存在一定的局限性。或者为了获得准确的检测结果,临床上采用对不同项目的试剂盒进行联合检测,样本用量多,检测周期长,工作量大,效率低。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途。

[0006] 为了达到上述的目的,本发明提供了一种用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片,包括:芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片,

[0007] 所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、第一检测区、第二检测区、质控区及废液收集区;

[0008] 所述上层盖片上设有加样孔、第一检测窗口、第二检测窗口、质控窗口、通气孔,并且与所述加样区、第一检测区、第二检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应;

[0009] 其中,所述抗体包被区预存储有荧光微球标记的一株鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的混合物;

[0010] 所述第一检测区中预存储磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体或磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体中的一种;所述第二检测区中预存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体或磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体中的另一种。

[0011] 进一步地,其中所述第一检测区、第二检测区和质控区的下侧设有由永磁铁或电磁铁提供的磁场区域。

[0012] 进一步地,其中所述荧光微球标记的鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的摩尔比为1:1:(0.1~4)。

[0013] 进一步地,其中所述第一检测区或第二检测区中磁性微球与另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体的质量比为10:0.05~2;所述第一检测区或第二检测区中磁性微球与另一株鼠抗人MAU单克隆抗体的质量比为10:0.05~2。

[0014] 进一步地,其中所述磁性微球为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma-Fe_2O_3$ 、Pt、Ni或Co微球,或者为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma-Fe_2O_3$ 、Pt、Ni或Co与无机物或有机物形成的核/壳结构或掺杂结构的微球,所述 Fe_3O_4 、 $\gamma-Fe_2O_3$ 、Pt、Ni或Co与所述无机物或有机物的重量百分比为1:(0.001-1000);所述磁性微球的粒径大小为0.05-5 μm 。

[0015] 进一步地,其中所述质控区预存储有磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体。

[0016] 进一步地,其中所述第一检测区、第二检测区和质控区的表面设置为粗糙结构,所述粗糙结构为向下凹的半圆结构、锯齿形结构、凹凸的小矩形结构或其他不规则结构;

[0017] 所述微混合区为棱形、圆形、方形或矩形,并且其内部设有n个交错设置的矩形、棱形、方形或圆形的柱体;或者所述微混合区为至少一个矩形串联结构,并且每个矩形中设有一个矩形柱体;或者所述微混合区为锯齿形结构;或者所述微混合区为至少一个正三角形或倒三角形串联结构,并且每个三角形中设置有一个相应正三角或者倒三角形柱体;或者所述微混合区为至少一个棱形结构串联,并且棱形结构中设置有一个棱形或圆形柱体;或者所述微混合区为至少一个圆形结构串联,并且圆形结构中设置有一个圆形柱体。

[0018] 本发明还提供了上述用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片的制备方法,包括如下步骤:

[0019] 1) 在芯片基板上开设一个所述微流控检测通道;

[0020] 2) 将荧光微球标记的一株鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG进行混合,将混合物预存储在抗体包被区中,干燥;

[0021] 3) 将磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体、磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体分别任意地预存储在第一检测区、第二检测区中且两个检测区中所预存储的物质各不相同,干燥;

[0022] 4) 将磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体预存储在质控区中,干燥;

[0023] 5) 将上层盖片盖合于芯片基板的上方;

[0024] 6) 在芯片基板的下方对应所述微流控芯片的待第一检测区、第二检测区和质控区设置磁场。

[0025] 本发明进一步提供了上述用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片的应用方法,包括如下步骤:

[0026] 1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要启动,使第一、第二检测区和质控区中的免疫磁性微球平铺固定到相应区域的底面;

[0027] 2) 从加样孔加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区,复溶预存储在抗体包被区中的荧光微球标记的一株鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

[0028] 3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区,在微混合区样本中的NGAL与荧光微球标记的一株鼠抗人NGAL单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的NGAL免疫复合物,样本中MAU与荧光微球标记的一株鼠抗人MAU单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的MAU免疫复合物,且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

[0029] 4) 步骤3)中反应形成的荧光微球标记的NGAL免疫复合物、荧光微球标记的MAU免疫复合物以及未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道进入到第一检测区、第二检测区和质控区内,NGAL免疫复合物与磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体的检测区中,MAU免疫复合物与磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体的相应检测区中,荧光微球标记的兔IgG与质控区中磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体发生免疫反应而停留在质控区中,剩余液体流入废液收集区;

[0030] 5) 第一、第二检测区和质控区的荧光微球均显示一定的荧光信号,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与NGAL的浓度具有正相关性,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与MAU的浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出NGAL和MAU的浓度。

[0031] 本发明的有益效果在于:

[0032] 1. 本发明设置的微混合区便于待测物质与相应抗原或抗体之间进行充分结合,提高检测的灵敏度;

[0033] 2. 本发明在检测区和质控区中分别设有免疫磁微球,在检测区和质控区的下方设置了磁场区域,便于将待测物质固定到相应检测区内,并且检测区和质控区表面设置成粗糙结构,用于增大摩擦力,防止磁珠滚动;降低非特异性造成的干扰,提高检测灵敏度;

[0034] 3. 本发明在免疫反应前将免疫磁珠平铺固定到检测区或质控区表面,免疫反应后使荧光微球均置于免疫磁珠的上表面,避免了磁性微球遮挡荧光微球而对荧光信号造成干扰;

[0035] 4. 本发明能够实现NGAL和MAU项目的联合检测,对能够全面准确的诊断早期肾损伤有着极大的临床诊断价值,并且本微流控芯片检测时、检测周期短、检测效率高。

附图说明

[0036] 图1A为本发明的用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片中芯片基板的结构示意图;

[0037] 图1B为本发明的用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片中上层盖片的结构示意图;

[0038] 图2为本发明的免疫磁性微球与检测区或质控区的粗糙表面的接触示意图,其中,(1)免疫磁性微珠与向下凹的半圆结构的粗糙表面接触;(2)免疫磁性微珠与锯齿形结构的粗糙表面接触;(3)免疫磁性微珠与凹凸的矩形结构的粗糙表面接触;

[0039] 图3为本发明的用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片的微混合区结构示意图,其中,(1)棱型结构,并且内部设有多个交错设置的棱形柱体;(2)棱型结构,并且内部设有多个交错设置的圆形柱体;(3)棱型结构,并且内部设有多个长条形柱体;(4)两个矩形

串联结构,并且每个矩形中设有一个矩形柱体;(5)三个正三角形串联结构,并且每个正三角形中设有一个正三角形柱体;(6)三个倒三角形串联结构,并且每个倒三角形中设有一个倒三角形柱体;(7)锯齿形结构;(8)三个棱型串联结构,并且每个棱型中设置一个棱型柱体;(9)三个棱型串联结构,并且每个棱型中设置一个棱型柱体;

[0040] 图4为NGAL的标准曲线;

[0041] 图5为MAU的标准曲线。

具体实施方式

[0042] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好的理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

[0043] 结合图1A及图1B所示,本发明提供了一种用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片,包括:芯片基板20及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片21,所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区1、抗体包被区2、微混合区3、第一检测区4、第二检测区5、质控区6、废液收集区7;上层盖片上设有加样孔8、第一检测窗口9、第二检测窗口10、质控窗口11、通气孔12,并且与芯片基板中加样区1、第一检测区4、第二检测区5、质控区6、废液收集区7的位置依次对应。第一检测区4、第二检测区5和质控区6的下侧设有磁场区域19,磁场由永磁铁或电磁铁提供。

[0044] 其中,加样区1和抗体包被区2通过第一毛细管微通道13连通,抗体包被区2和微混合区3通过第二毛细管微通道14连通,微混合区3与第一检测区4通过第三毛细管微通道15连通,第一检测区4和第二检测区5通过第四毛细管微通道16连通,第二检测区5和质控区6通过第五毛细管微通道17连通,质控区6和废液收集区7通过第六毛细管微通道18连通;

[0045] 抗体包被区2预存储有荧光微球标记的一株鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的混合物;

[0046] 第一检测区4中预存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体,第二检测区5中预存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体,质控区6中预存储有磁性微球标记的一株羊抗兔多克隆抗体。

[0047] 所述荧光微球标记的鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG抗体的摩尔比为1:1:1。

[0048] 所述第一检测区4或第二检测区5中磁性微球与另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体的质量比为10:0.4;所述第一检测区4或第二检测区5中磁性微球与另一株鼠抗人MAU单克隆抗体的质量比为10:0.4。

[0049] 所述磁性微球为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co微球,或者为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与无机物或有机物形成的核/壳结构或掺杂结构的微球,所述 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与所述无机物或有机物的重量百分比为1:(0.001-1000);所述磁性微球的粒径大小为0.05-5 μm 。

[0050] 结合图2所示,所述第一检测区4、第二检测区5和质控区6的表面设置为粗糙结构。所述粗糙结构为向下凹的半圆结构、锯齿形结构、凹凸的小矩形结构或其他不规则结构。

[0051] 结合图3所示,所述微混合区3为棱形、圆形、方形或矩形,并且其内部设有n个交错设置的矩形、棱形、方形或圆形的柱体;或者所述微混合区3为至少一个矩形串联结构,并且

每个矩形中设有一个矩形柱体;或者所述微混合区为锯齿形结构;或者所述微混合区3为至少一个正三角形或倒三角形串联结构,并且每个三角形中设置有一个相应正三角或者倒三角形柱体;或者所述微混合区3为至少一个棱形结构串联,并且棱形结构中设置有一个棱形或圆形柱体;或者所述微混合区3为至少一个圆形结构串联,并且圆形结构中设置有一个圆形柱体;

[0052] 制备上述用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片的方法,包括如下步骤:

[0053] 1) 在芯片基板上开设一个所述微流控检测通道;

[0054] 2) 将荧光微球标记的一株鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG进行混合,将混合物预存储在抗体包被区2中,干燥;

[0055] 3) 将磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体、磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体分别相应地预存储在第一检测区4、第二检测区5中且两个检测区中所预存储的物质各不相同,干燥;

[0056] 4) 将磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体预存储在质控区6中,干燥;

[0057] 5) 将上层盖片21盖合于芯片基板20的上方;

[0058] 6) 在芯片基板20的下方对应所述微流控芯片的待第一检测区4、第二检测区5和质控区6设置磁场。

[0059] 以下通过具体实施例对本发明进行进一步说明。

[0060] 1. 抗体包被区的处理

[0061] 1.1 荧光微球标记鼠抗人NGAL单克隆抗体

[0062] 荧光微球标记鼠抗人NGAL单克隆抗体:取5mL 0.01g/mL的乳胶荧光微球放入小离心管中,按照12000r/min的转速离心20min,移除上层清液后,用5mL的碳酸盐缓冲溶液进行复溶,随后加入5mg的碳二亚胺(EDC)、5mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1mL鼠抗人NGAL单克隆抗体在25℃下搅拌6h,继续加入2.5mg的赖氨酸在室温下搅拌20min,将混合物放入透析袋中在4℃下透析12h;透析结束后将混合溶液在12000r/min的转速下离心10min,移去上层清液,最后用20mL的LM缓冲溶液复溶,待用;

[0063] 1.2 荧光微球标记鼠抗人MAU单克隆抗体

[0064] 取5mL 0.01g/mL的乳胶荧光微球放入小离心管中,按照12000r/min的转速离心20min,移除上层清液后,用5mL的碳酸盐缓冲溶液进行复溶,随后加入5mg的EDC、5mg的NHS和1mL鼠抗人MAU单克隆抗体在25℃下搅拌6h,继续加入2.5mg的赖氨酸在室温下搅拌20min,将混合物放入透析袋中在4℃下透析12h;透析结束后将混合溶液在12000r/min的转速下离心10min,移去上层清液,最后用20mL的LM缓冲溶液复溶,待用;

[0065] 1.3 荧光微球标记兔IgG

[0066] 取5mL 0.01g/mL的乳胶荧光微球放入小离心管中,按照12000r/min的转速离心20min,移除上层清液后,用5mL的碳酸盐缓冲溶液进行复溶,随后加入5mg的EDC、5mg的NHS和1mL兔IgG在25℃下搅拌6h,继续加入2.5mg的赖氨酸在室温下搅拌20min,将混合物放入透析袋中在4℃下透析12h;透析结束后将混合溶液在12000r/min的转速下离心10min,移去上层清液,最后用20mL的LM缓冲溶液复溶,待用;

[0067] 1.5 抗体包被区的处理

[0068] 将上述制备的荧光微球标记鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG按照摩尔比为1:1:1进行混合,取3 μ L混合溶液滴于抗体包被区,在湿度<30%的环境中干燥6h;

[0069] 2.检测区的处理

[0070] 2.1磁性微球标记鼠抗人NGAL单克隆抗体

[0071] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液(0.05% Tween 20,10mM MES,pH=5.5)洗涤两次;取600 μ L的MES(10mM, Ph=5.5)重悬磁性微球后,依次向体系中加入1mg的EDC和1mg的NHS,在37 $^{\circ}$ C下置于旋转混合器上活化0.5h;磁分离后,移除上层清液,用500 μ L的MEST缓冲溶液洗涤两次,用PBST溶液(0.01% Tween 20,0.01mol/LPBS, pH=7.4)重悬后加入40 μ g鼠抗人NGAL单克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下搅拌12h;将偶联产物与乙醇胺(2%,V/V)在37 $^{\circ}$ C下活化0.5h,最后用PBST缓冲溶液洗涤两次后加入1mLPBST重悬,取3 μ L磁性微球标记的NGAL单克隆抗体置于第一检测区4中,在湿度<30%环境中干燥6h。

[0072] 2.2磁性微球标记鼠抗人MAU单克隆抗体

[0073] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液(0.05% Tween 20,10mM MES,pH=5.5)洗涤两次;取600 μ L的MES(10mM, Ph=5.5)重悬磁性微球后,依次向体系中加入1mg的EDC和1mg的NHS,在37 $^{\circ}$ C下置于旋转混合器上活化0.5h;磁分离后,移除上层清液,用500 μ L的MEST缓冲溶液洗涤两次,用PBST溶液(0.01% Tween 20,0.01mol/LPBS, pH=7.4)重悬后加入40 μ g鼠抗人MAU单克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下搅拌12h;将搅拌后得到的偶联产物与乙醇胺(2%,V/V)在37 $^{\circ}$ C下活化0.5h,最后用PBST缓冲溶液洗涤两次后加入1mL PBST重悬,取3 μ L磁性微球标记的MAU单克隆抗体置于第二检测区5中,在湿度<30%环境中干燥6h。

[0074] 3.质控区的处理

[0075] 3.1磁性微球标记羊抗兔多克隆抗体

[0076] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液(0.05% Tween 20,10mM MES,pH=5.5)洗涤两次;取600 μ L的MES(10mM, Ph=5.5)重悬磁性微球后,依次向体系中加入1mg的EDC和1mg的NHS,在37 $^{\circ}$ C下置于旋转混合器上活化0.5h;磁分离后,移除上层清液,用500 μ L的MEST缓冲溶液洗涤两次,用PBST溶液(0.01% Tween 20,0.01mol/LPBS, pH=7.4)重悬后加入40 μ g羊抗兔多克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下搅拌12h;将偶联产物与乙醇胺(2%,V/V)在37 $^{\circ}$ C下活化0.5h,最后用PBST缓冲溶液洗涤两次后加入1mL PBST重悬,取3 μ L磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体置于质控区6中,在湿度<30%环境中干燥6h。

[0077] 4.微流控芯片联合检测

[0078] 1)将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要启动,使第一检测区4、第二检测区5和质控区6中的免疫磁性微球平铺固定到相应区域的底面;

[0079] 2)从加样孔8加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道13流入抗体包被区2,复溶预储存在抗体包被区2中的荧光微球标记的鼠抗人NGAL单克隆抗体、荧光微球标记的鼠抗人MAU单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

[0080] 3)随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道14流入到微混合区3,在微混合区样本中的NGAL与荧光微球标记的鼠抗人NGAL单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标

记的NGAL免疫复合物,样本中MAU与荧光微球标记的鼠抗人MAU单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的MAU免疫复合物,且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

[0081] 4) 步骤3) 反应后形成的荧光微球标记的NGAL免疫复合物、荧光微球标记的MAU免疫复合物以及未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道依次进入到第一检测区4、第二检测区5和质控区6内,NGAL免疫复合物与第一检测区4中磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体发生免疫反应而停留在第一检测区4中,MAU免疫复合物与第二检测区5中磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体发生免疫反应而停留在第二检测区5中,荧光微球标记的兔IgG与质控区6中磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体发生免疫反应而停留在质控区6中,剩余液体流入废液收集区7;

[0082] 5) 第一检测区4、第二检测区5和质控区6的荧光微球显示一定的荧光信号,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人NGAL单克隆抗体的第一检测区4和质控区6荧光信号的比值与NGAL的浓度具有正相关性,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人MAU单克隆抗体的第二检测区5和质控区6的荧光信号的比值与MAU的浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出样本中NGAL和 MAU的浓度。

[0083] 5. 标准曲线的建立

[0084] 配置浓度为0、10、20、100、500、1500ng/mL的NGAL校准品用于建立 NGAL标准曲线(如图4),NGAL检测灵敏度为10ng/mL,检测范围为10~ 1500ng/mL;配置浓度为0、10、20、50、100、200 μ g/mL的MAU校准品用于建立MAU标准曲线(如图5),检测灵敏度为10 μ g/mL,检测范围为10~ 200 μ g/mL,检测结果如表1所示。

[0085] 表1

[0086]

NGAL (ng/mL)	0	10	20	100	500	1500
T ₁ /C 值	0.0018	0.0425	0.0675	0.2905	1.2025	1.7835
MAU (μ g/mL)	0	10	20	50	100	200
T ₂ /C 值	0.0398	0.1448	0.2358	0.4692	0.7254	0.9958

[0087] 6. 精密度的测定

[0088] 取浓度为20ng/mL和500ng/mL的NGAL校准品、浓度为20 μ g/mL和100 μ g/mL的MAU校准品进行精密度的测定,每个样本重复测定10次,计算批间平均偏差和批内平均偏差CV%值,测定结果如表2中所示,批间差和批内差均小于15%。

[0089] 表2

[0090]

检测项目		检测次数	批内 CV%	批间 CV%
NGAL (ng/mL)	20	10	9.8%	10.5%
	500	10	1.1%	2.3%
MAU (μ g/mL)	20	10	6.9%	8.7%
	100	10	5.4%	4.6%

[0091] 附:所需溶液配制

[0092] (1) 碳酸钠缓冲溶液

[0093]	碳酸钠	4.33g
[0094]	碳酸氢钠	2.96g
[0095]	纯化水定容至1000mL;	
[0096]	(2) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 (LM)	
[0097]	柠檬酸三钠	7.33g
[0098]	柠檬酸	4.44g
[0099]	氢氧化钠	1g
[0100]	纯化水定容至1000mL;	
[0101]	(3) MEST缓冲溶液	
	磷酸氢二钠	6.59g
	磷酸二氢钠	24.21g
[0102]	2-吗啉乙磺酸(MES)	1.95g
	Tween20	0.5g
[0103]	纯化水定容至1000mL;	
[0104]	(4) MES缓冲溶液	
[0105]	磷酸氢二钠	6.59g
[0106]	磷酸二氢钠	24.21g
[0107]	2-吗啉乙磺酸 (MES)	1.95g
[0108]	纯化水定容至1000mL;	
[0109]	(5) PBST缓冲溶液	
[0110]	磷酸氢二钠	43.42g
[0111]	磷酸二氢钠	5.24g
[0112]	Tween20	0.1g
[0113]	纯化水定容至1000mL。	

[0114] 以上所述仅为本发明的优选实施例,并不用于限制本发明,对于本领域技术人员而言,本发明可以有各种改动和变化。凡在本发明的精神和原理之内所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

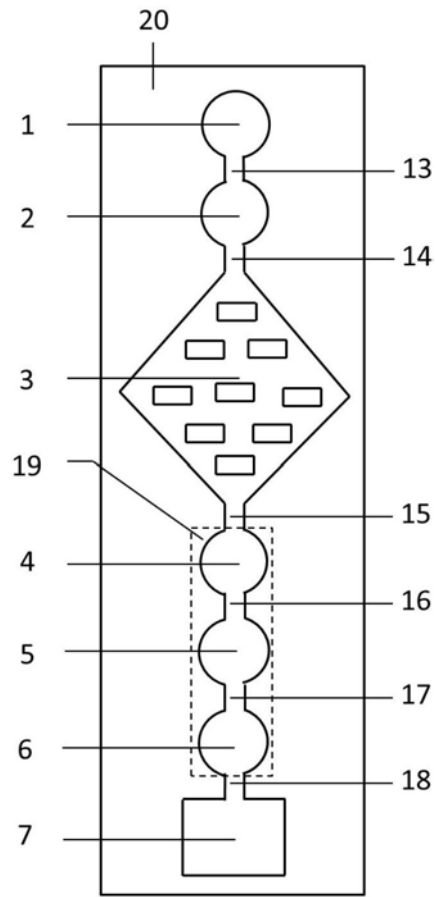


图1A

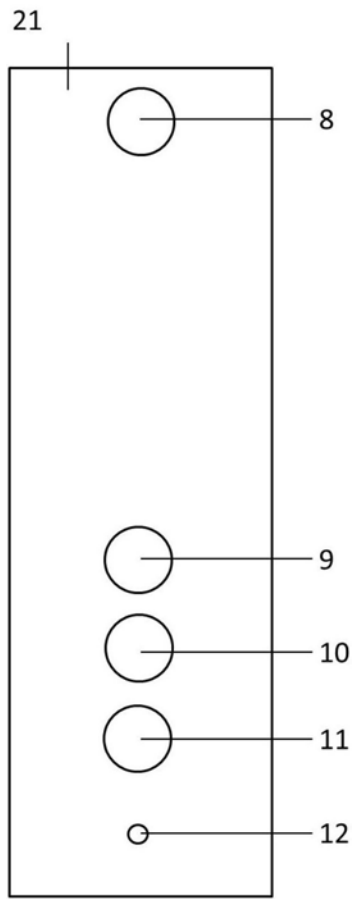


图1B

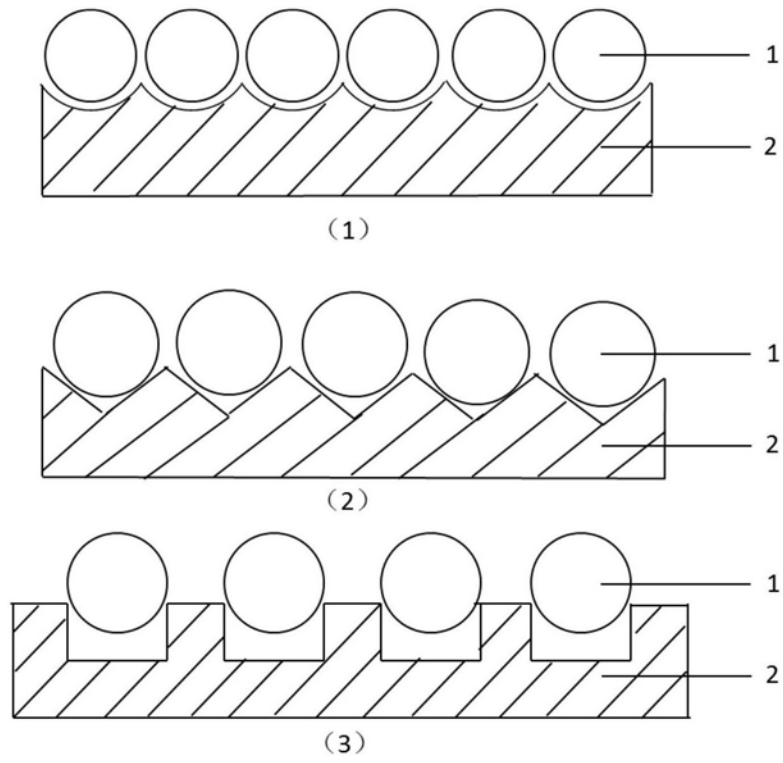


图2

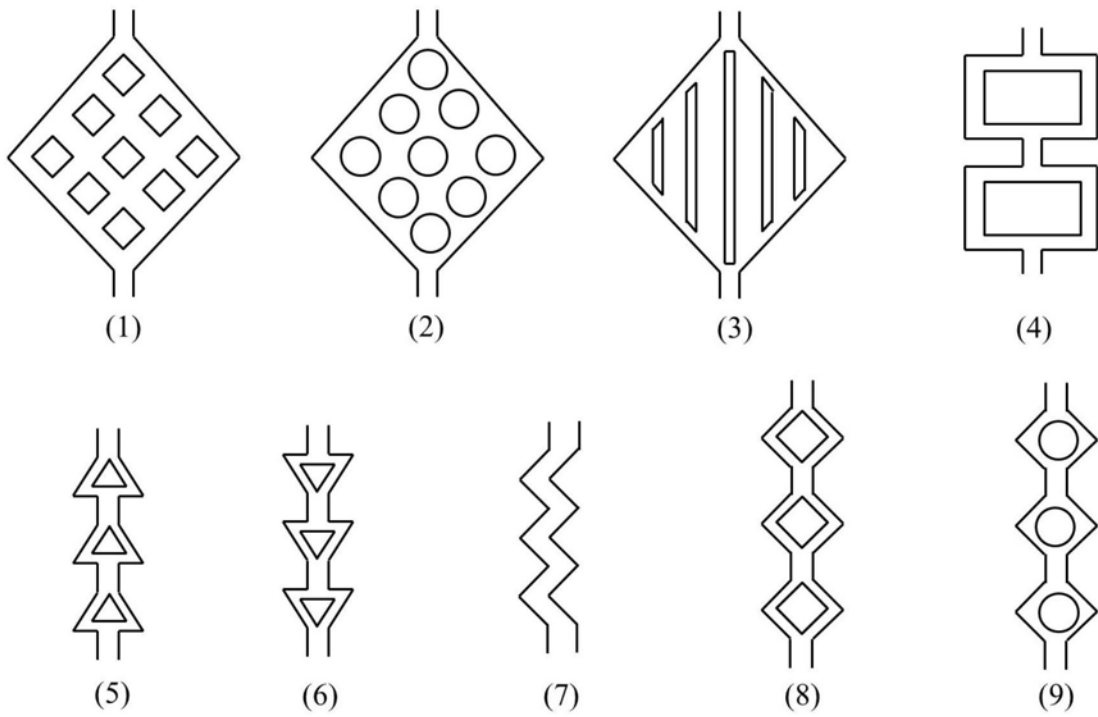


图3

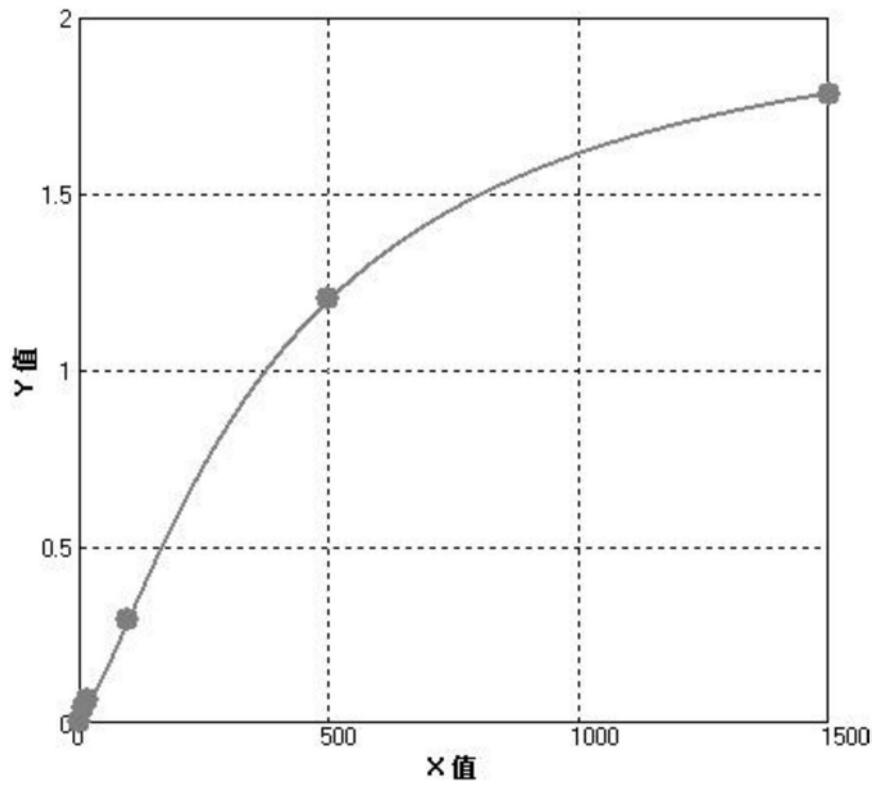


图4

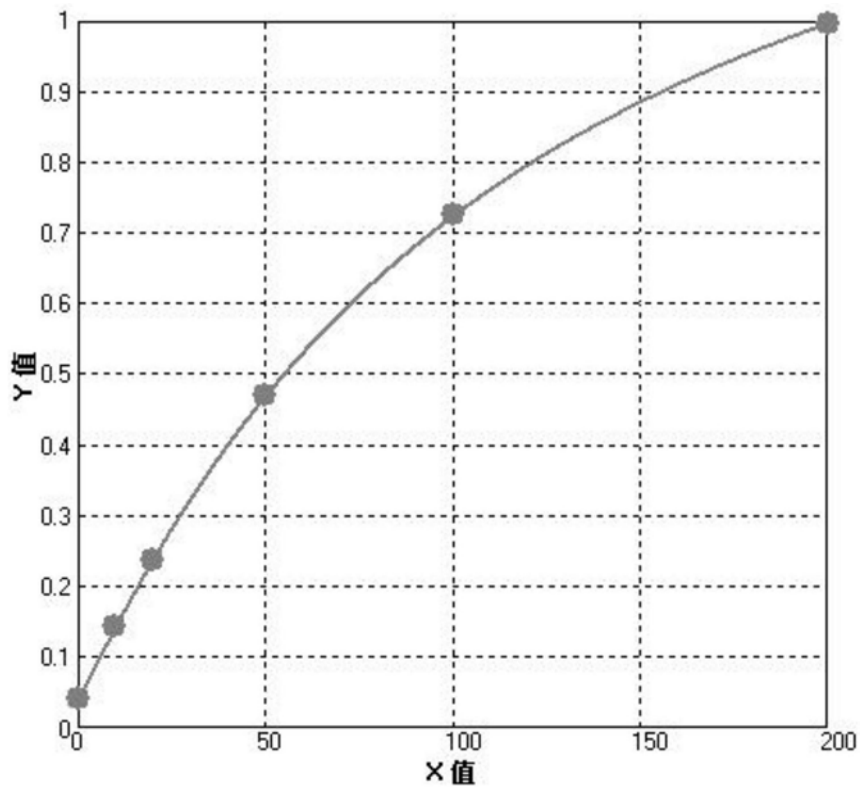


图5

专利名称(译)	一种用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN108236972A	公开(公告)日	2018-07-03
申请号	CN201810159499.9	申请日	2018-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京华科泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京华科泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京华科泰生物技术有限公司		
[标]发明人	林斯		
发明人	林斯		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	B01L3/5027 B01L2200/10 B01L2300/0861 B01L2300/0887 B01L2300/12 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2800/347		
代理人(译)	张瑾		
其他公开文献	CN108236972B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于早期诊断肾损伤的联合检测微流控芯片，包括：芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片，所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、第一检测区、第二检测区、质控区及废液收集区；所述上层盖片上设有加样孔、第一检测窗口、第二检测窗口、质控窗口、通气孔，并且与所述加样区、第一检测区、第二检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应。本发明还提供了上述联合微流控芯片的制备方法和用途。本发明能够实现中性粒细胞明胶酶和微量白蛋白项目的联合检测，对能够全面准确的诊断早期肾损伤有着极大的临床诊断价值。

