

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/533 G01N 33/543

G01N 33/551 G01N 21/64

G01N 21/25



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03134319.8

[43] 公开日 2005 年 3 月 23 日

[11] 公开号 CN 1598579A

[22] 申请日 2003.9.18 [21] 申请号 03134319.8

[71] 申请人 陕西西大北美基因股份有限公司

地址 710069 陕西省西安市西北大学科学楼
12 层

[72] 发明人 崔亚丽 陈 超

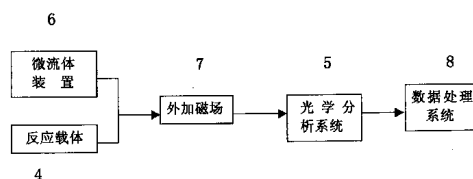
[74] 专利代理机构 西安新思维专利事务所有限公
司
代理人 徐 平

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 3 页

[54] 发明名称 以磁性微球介导的微流体分析系统
及其检测方法

[57] 摘要

一种以磁性微球介导的微流体分析系统，包括微流体装置、光学分析系统和设置于光学分析系统输出端的数据分析系统，微流体装置内设置有反应载体，光学分析系统所包括的检测器，反应通道和检测通道的连接处设置有阀门；反应载体为磁性微球或磁性荧光微球。本发明可在反应和清洗过程中可利用磁性微球的磁性控制其过程的准确进行；由于反应和检测过程可控，因此，反应载体可根据需求选择粒径不同的磁性微球或磁性荧光微球。可根据需要将检测器设置在系统的不同位置，检测器可使用 CCD 拍摄图像的方式分析结果，通过光谱仪进行比色测定，也可使用激光光源系统对磁性荧光微球以及微球表面的荧光信号进行结果的确定。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种以磁性微球介导的微流体分析系统，包括微流体装置 6、光学分析系统 8 和设置于光学分析系统 8 输出端的数据分析系统 9，所述的微流体装置 6 内设置有反应载体 4，所述的光学分析系统 8 所包括的检测器 5，其特征在于：所述的反应通道 1 和检测通道 11 的连接处设置有阀门 10；所述的反应载体 4 为磁性微球或磁性荧光微球。

2. 如权利要求 1 所述的以磁性微球介导的微流体分析系统，其特征在于：所述的微流体装置 6 采用的基体材料包括：硅、石英玻璃、PMMA，通道截面是矩形、梯形、三角形或非标准圆形。

3. 如权利要求 1 所述的以磁性微球介导的微流体分析系统，其特征在于：所述的微流体分析系统中的阀门 10 为气流、动力方式主动或被动控制的阀门。

4. 如权利要求 1 所述的以磁性微球介导的微流体分析系统，其特征在于：所述的反应通道 1 设置有可控制的外加磁场 7。

5. 如权利要求 2 所述的以磁性微球介导的微流体分析系统，其特征在于：所述的外加磁场 7 设置于反应通道 1 的外部，置于反应通道 1 的上部或下部。所述的外加磁场 7 为稀土永磁材料的钕铁硼永磁铁或电磁铁。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的以磁性微球介导的微流体分析系统，其特征在于：所述的微球反应载体为磁性高分子微球或磁性高分子荧光微球；所述的微球反应载体粒径是微米级或纳米级。

7. 如权利要求 4 所述的以磁性微球介导的微流体分析系统，其特征在于：所述的反应通道 1 之前设置有样品预处理槽或样品处理通道。

8. 如权利要求 5 所述的以磁性微球介导的微流体分析系统，其特征在于：所述的检测器 5 设置于检测通道 11 的上方，或设置于反应通道 1 的上方，并通过检测口与微流体通道连接。

9. 如权利要求 6 所述的以磁性微球介导的微流体分析系统，其特征在于：所述的检测器 5 为 CCD 图像拍摄仪、光谱仪、荧光光度计、集成式微型光谱仪或激光光源系统。

10. 一种采用如权利要求 1 所述以磁性微球介导的微流体分析系统的检测方法，其特征在于：该方法的检测包括

1]反应，关闭阀门，反应载体 4 在反应通道 1 内与反应物进行生物化学反应，反应载体 4 表面包覆或共价结合生物活性分子或小分子配体；

2]清洗，反应结束后，加外磁场 7，开启阀门 10，对反应后反应载体 4 表面的非特异性结合物质进行反复清洗；

3] 检测，通过检测器 5 对反应载体 4 进行识别，并对反应载体 4 表面发生的生物或化学反应结果进行检测；

11. 如权利要求 10 所述以磁性微球介导的微流体分析系统的检测方法，其特征在于：所述的对反应载体 4 进行清洗时，先加上外加磁场 7，再开启阀门 10。

12. 如权利要求 10 或 11 所述以磁性微球介导的微流体分析系统的检测方法，其特征在于：所述的检测反应结果或将检测器 5 置于反应通道的上方，通过测定微球反应载体 4 表面荧光信号或反应后溶液中的颜色，确定被测物质的含量；或将检测器 5 设置于检测通道 1 上方，通过流式计数的方法对每一种微球反应载体 4 进行识别，并对每一种微球反应载体 4 表面的生物化学反应进行确定。

13. 如权利要求 12 所述以磁性微球介导的微流体分析系统的检测方法，其特征在于：所述的对被测物质的检测包括基于免疫学反应原理的检测包括，包括 1]酶联免疫学检测，通过测定反应后溶液颜色的变化，确定被测物质的含量；包括 2]荧光免疫学检测，通过测定磁性微球表面荧光物质的强度值，确定被测物质的含量。

14. 如权利要求 13 所述以磁性微球介导的微流体分析系统的检测方法，其特征在于：所述的采用检测器 5 检测反应结果是 CCD 拍摄图像分析结果，通过光谱仪进行比色测定，或采用激光光源系统对磁性荧光微球以及微球表面的荧光信号进行结果的确定。

以磁性微球介导的微流体分析系统及其检测方法

技术领域

本发明涉及一种以磁性微球介导的微流体分析系统及其检测方法。

背景技术

2000年，日本东京大学的 Kitamori 领导的研究组发表了一种基于微球的微流体芯片检测装置，该法用高分子聚苯乙烯微球作为生物学反应载体，标记在二抗上的纳米金作为检测信号，利用一个在微流体通道加工有隔挡的微流体反应和检测装置，通过热力显微镜在隔挡附近微球上方对标记在微球表面的纳米金颗粒进行结果观察。其检测系统见附图 1。Kitamori 利用该系统进行肿瘤标志物免疫学检测，方法准确、灵敏，与目前常用的 ELISA 相比，可将反应时间从几十小时缩短至几十分钟，但该系统仍存在以下缺点：

1. 该系统在 $100\mu\text{m}$ 深度的反应通道 1 中设置了一个 $90\mu\text{m}$ 高的隔挡 2，在反应通道 1 中隔挡 2 的上部留有 $10\mu\text{m}$ 的间隙 3。由于间隙 3 的设计，在整个检测过程中，会存在以下问题：无法准确控制反应和清洗过程；少部分加入反应通道 1 中的反应液未在聚苯乙烯微球反应载体 4 表面反应即直接被冲出通道之外；在反应及清洗过程中反应通道 1 存在死角即死体积，这样不但使反应物在微球反应载体 4 表面反应不充分，还会因为清洗不彻底造成一些反应物在死角留存，影响测定结果的准确度。

2. 由于隔挡 2 高度的限制，需要粒径较大的微球作为反应载体 4，研究中使用约 $45\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯高分子微球，与同样质量的小粒径微球相比，可以进行固相反应的表面积相对较小，不是理想的反应载体；若使用粒径较小的微球作反应载体 4，检测时易在隔挡 2 处形成微球的堆积，则仅以最上层高分子微球反应载体 4 上所带的纳米金颗粒作为信号记录，下层积累微球的检测信号无法被热力显微镜捕获，因此该方法只可用于定性检测若定量会影响结果的准确度。

3. 由于检测微球反应载体 4 表面的反应信号时，检测器 5 采用热显微镜，只能定位在隔挡 2 附近反应载体 4 聚集的地方，其目前仅用于对微球反应载体 4 表面标记的纳米金进行检测，而未用于对荧光标记物进行检测和酶对底物催化后引起的颜色变化进行比色测定；

4. 研究中已经采用加工多通道同时对四个样品进行检测的方法，但该方法仍无法满足几十甚至上百个反应的高通量检测。

发明内容

本发明解决了背景技术结构不合理，只可用于定性检测，无法满足高通量检测的技术问题。

本发明的技术解决方案是：

一种以磁性微球介导的微流体分析系统，包括微流体装置 6、光学分析系统 8 和设置于光学分析系统 8 输出端的数据分析系统 9，所述的微流体装置 6 内设置有反应载体 4，所述的光学分析系统 8 所包括的检测器 5，其特殊之处在于：所述的反应通道 1 和检测通道 11 的连接处设置有阀门 10；所述的反应载体 4 为磁性微球或磁性荧光微球。

上述微流体装置 6 采用的基体材料可包括：硅、石英玻璃、PMMA，通道截面是矩形、梯形、三角形或非标准圆形。

上述微流体分析系统中的阀门 10 可为气流、动力方式主动或被动控制的阀门。

上述反应通道 1 可设置可控制的外加磁场 7。

上述外加磁场 7 可设置于反应通道 1 的外部，置于反应通道 1 的上部或下部。所述的外加磁场 7 为稀土永磁材料的钕铁硼永磁铁或电磁铁。

上述微球反应载体可为磁性高分子微球或磁性高分子荧光微球；所述的微球反应载体粒径是微米级或纳米级。

上述反应通道 1 之前可设置样品预处理槽或样品处理通道。

上述检测器 5 可设置于检测通道 11 的上方，或设置于反应通道 1 的上方，并通过检测口与微流体通道连接。

上述检测器 5 可为 CCD 图像拍摄仪、光谱仪、荧光光度计、集成式微型光

谱仪或激光光源系统。

一种采用如权利要求 1 所述以磁性微球介导的微流体分析系统的检测方法，其特殊之处在于：该方法的检测包括

1]. 反应，关闭阀门，反应载体 4 在反应通道 1 内与反应物进行生物化学反应，反应载体 4 表面包覆或共价结合生物活性分子或小分子配体；

2]. 清洗，反应结束后，加外磁场 7，开启阀门 10，对反应后反应载体 4 表面的非特异性结合物质进行反复清洗；

3]. 检测，通过检测器 5 对反应载体 4 进行识别，并对反应载体 4 表面发生的生物或化学反应结果进行检测；

上述对反应载体 4 进行清洗时，可先加上外加磁场 7，再开启阀门 10。

上述检测反应结果或将检测器 5 可置于反应通道的上方，通过测定微球反应载体 4 表面荧光信号或反应后溶液中的颜色，确定被测物质的含量；或将检测器 5 设置于检测通道 1 上方，通过流式计数的方法对每一种微球反应载体 4 进行识别，并对每一种微球反应载体 4 表面的生物化学反应进行确定。

上述对被测物质的检测可包括基于免疫学反应原理的检测包括，包括 1] 酶联免疫学检测，通过测定反应后溶液颜色的变化，确定被测物质的含量；包括 2] 荧光免疫学检测，通过测定磁性微球表面荧光物质的强度值，确定被测物质的含量。

上述采用检测器 5 检测反应结果为是 CCD 拍摄图像分析结果，通过光谱仪进行比色测定，或采用激光光源系统对磁性荧光微球以及微球表面的荧光信号进行结果的确定。

本发明具有以下优点：

1. 微流体芯片据需要可加工成两种不同深宽比的反应通道和检测通道。在

反应通道 1 和检测通道的连接口处设置可控制的阀门，当进行生物或化学反应时，阀门关闭，清洗时，阀门开启，反应和清洗更充分、更彻底；在微流体芯片装置中设置有外加磁场，可在反应和清洗过程中对磁性微球进行控制；

2. 微球反应载体 4 采用磁性高分子微球或磁性高分子荧光微球。在反应和清洗过程中可利用磁性微球的磁性控制其过程的准确进行；由于反应和检测过程可控，因此，反应载体 4 可根据需求选择粒径不同的磁性微球或磁性荧光微球；根据微球直径的大小，可设计较小的检测通道，以适应对小粒径微球的计数，并对其表面发生的反应进行检测；

3. 检测系统。可根据需要将检测器设置在系统的不同位置，如可在检测通道的阀门附近设置检测口，通过读取微球反应载体 4 表面或反应后溶液中的颜色确定结果；也可将检测器设置在检测通道内，通过流式计数的方法对每一种微球反应载体 4 进行识别，并对每一种微球反应载体 4 表面的生物化学反应进行确定；检测器可使用 CCD 拍摄图像的方式分析结果，通过光谱仪进行比色测定，也可使用激光光源系统对磁性荧光微球以及微球表面的荧光信号进行结果的确定；

4. 应用该系统装置，可对基于免疫学反应原理的检测、核酸杂交检测以及化学小分子物质进行测定。总之，本发明具有检测灵敏、准确、快速和装置便携等特点，系统是利用磁性微球或磁性荧光微球的超顺磁性、可识别性以及反应载体的特点与，微流体分析系统结合的便携式检测装置，并将其扩展用于食品安全性检测、兴奋剂检测、生物战剂检测和药物筛选等领域。

附图说明

图 1 为现有技术中基于聚苯乙烯微球载体的微流体芯片检测装置的结构示意图；

图 2 为本发明的原理框图；

图 3、4 为本发明微流体装置通过在反应溶液的比色测定确定单个物质含量的检测过程示意图；

图 5、6 为本发明微流体装置采用流式细胞计数仪的原理对磁性荧光微球识别并确定被测物质含量的工作示意图。

具体实施方式本发明针对不同的反应，如抗原-抗体反应、核酸杂交反应、受体-配体的反应等原理，在磁性微球或磁性荧光微球表面固定一种生物活性分子，在微流体芯片中完成整个的反应、清洗过程，并进一步通过设计在微流体芯片上方的光学检测系统实现生物活性分子的单通量或多通量检测。

参见图 2，本发明的微流体分析系统由微流体装置 6、反应载体 4、可控制的外加磁场 7 及光学分析系统 8 和数据分析系统 9 组成，反应载体 4 可采用磁性高分子微球或磁性高分子荧光微球。

图 3、4 表明了微流体装置的结构以及用该装置进行生物分子检测的过程示意图。其中微流体装置 6 可选择耐热玻璃、硅、二氧化硅及相关有机高分子聚合材料加工制作；反应通道 1 和检测通道 11，可根据反应载体 4 的大小加工不同直径的通道。微流体装置 6 中的阀门 10 可设计为气流、动力、磁流体等方式控制的阀门。除反应通道 1 和检测通道 11 外，根据检测过程的需要，反应通道 1 也可兼作样品的预处理通道。

反应载体 4 可采用磁性微球，即磁性高分子微球或磁性高分子荧光微球。磁性微球可使用商品化的磁性高分子微球，也可利用化学合成方法制备的磁性微球或磁性荧光微球作为反应载体。。

外加磁场 7 可采用稀土永磁材料的钕铁硼永磁铁，以可移动磁场为宜，通过设置与撤去可控制反应和清洗过程。也可使用电磁铁，通过对线圈的通电与断电来控制磁性微球在微流体装置中的清洗和洗涤过程。

光学分析系统 8 可采用新型滤光技术原理的光谱仪、光纤化学传感技术原理的荧光光度计以及通过微细加工制作集成式微型光谱仪等。

数据分析系统 9 可通过商业化分析软件或自行研制的分析软件等进行分析。

图 3 所示利用表面包覆或共价结合有生物活性分子或小分子配体的反应载体 4 即磁性高分子微球，对反应完成后的溶液进行比色测定的示意图。整个检测过程可分为反应步骤、清洗步骤和检测步骤三个阶段，而在检测过程中可选择两种模式进行检测。

图 5、6 为本发明微流体装置采用流式细胞计数仪的原理对磁性高分子荧光微球识别并确定被测物质进行多通量检测的示意图。磁性高分子荧光微球作为反应和检测载体 4，每种微球表面或内部结合有特征的荧光物质，表面还包覆或共价结合有生物活性分子或小分子配体。通过外加磁场 7 以及阀门 10 的控制，以及检测系统对微球的识别对微球表面发生的生物或化学反应结果进行多通量检测。与图 3 不同的是，测定结果可由荧光光度计对多种荧光微球表面所发生生物化学反应的荧光强度值进行确定。

本发明可用于生物和化学分子的单通量或多通量检测。

单个样品的检测：微流体芯片集样品的预处理、分离、纯化与检测为一体，

如该分析系统可与固相萃取技术联用, 如将内壁表面经过一定处理的微萃取管埋入微流体通道中, 结合后续基于磁性微球的微流体分析系统, 将食物标本的处理和分析检测系统整合在一块芯片上。以瘦肉精检测为例, 其检测原理及过程的描述如下:

检测原理: 基于抗原—抗体结合反应的竞争性酶联免疫学检测。用兔 IgG 的羊抗体固定于磁性微球表面, 加入羊抗克伦特罗抗体, 室温孵育洗涤后后加入克伦特罗酶结合物、克伦特罗标准液或样品液, 游离的克伦特罗与克伦特罗酶结合物竞争抗克伦特罗结合位点 (竞争酶联免疫吸附试验), 没有结合的酶结合物被洗去, 再向反应通道中加入酶反应底物 (过氧化物) 和色原 (邻苯二胺), 在酶的作用下将其转化为有色产物, 加入终止液, 颜色由蓝变黄, 于 450nm 波长下在检测通道测量吸光值, 吸光值与样品中克伦特罗含量成反比。提供试剂: 每套试剂盒中所带试剂足以满足 96 个测量单位用。

检测过程:

磁性微球表面抗体的固定化方法: 羧基末端的磁性微粒和氨基末端的磁性微粒表面抗体可分别采用碳二亚胺和戊二醛作为偶联剂, 将市售或自制的兔 IgG (Clenbuterol 抗体) 的羊抗体在磁性微球表面进行固定化。具体检测过程:

- 1) . 具有双通道微流体检测芯片中标明标准品和样品的通道位置;
- 2) . 加入同样量 50~100 μ L 已经包覆有抗体的磁性微球;
- 3) . 在两个通道中分别加入稀释兔抗盐酸克伦特罗抗体 50~100 μ l, 室温下孵育 15min;
- 4) . 加外磁场, 打开反应通道的阀门, 排出反应残余溶液, 用 250~300 μ L 的水反复清洗 2~3 次;
- 5) . 将 10~20 μ l 标准品或准备好的样品分别按平行孔 (双份) 要求加入微检测分析系统地反应通道中;
- 6) . 在平行的两通道中加入 50~100 μ l 稀释后的酶结合物, 室温下孵育 30 分钟;
- 7) . 同 4) 操作反复洗涤 2 次以上;
- 8) . 关闭阀门, 两通道中加入 25~50 μ l 过氧化物和 25~50 μ l 显色液, 充分混匀后室温暗盒中孵育 15 分钟;
- 9) . 两通道各加入 50~100 μ l 终止液, 加磁场, 通过检测装置于 450nm 波长下测量每管的吸光值。

1. 当样品需要前期处理时, 可先在样品反应通道进行预处理, 然后再进行

反应和检测。

2. 1). 酶联免疫学检测：通过测定反应后溶液颜色的变化，确定被测物质的含量；2). 荧光免疫学检测：通过测定磁性微球表面荧光物质的强度值，确定被测物质的含量。

3. 受体-配体检测体系：也和用于 PCR-ELISA 检测体系。

4. 可用于检测小分子化合物，也可检测蛋白、抗体、核酸等大分子物质。

5. 可用于食品安全、兴奋剂检测、生物战剂检测等。

6. 可用于人类基因的 SNP 检测、食品中多种农药的残留量、临床诊断中对多种细菌或病毒的同时确定、战地对可能生物战剂的实地检测等。

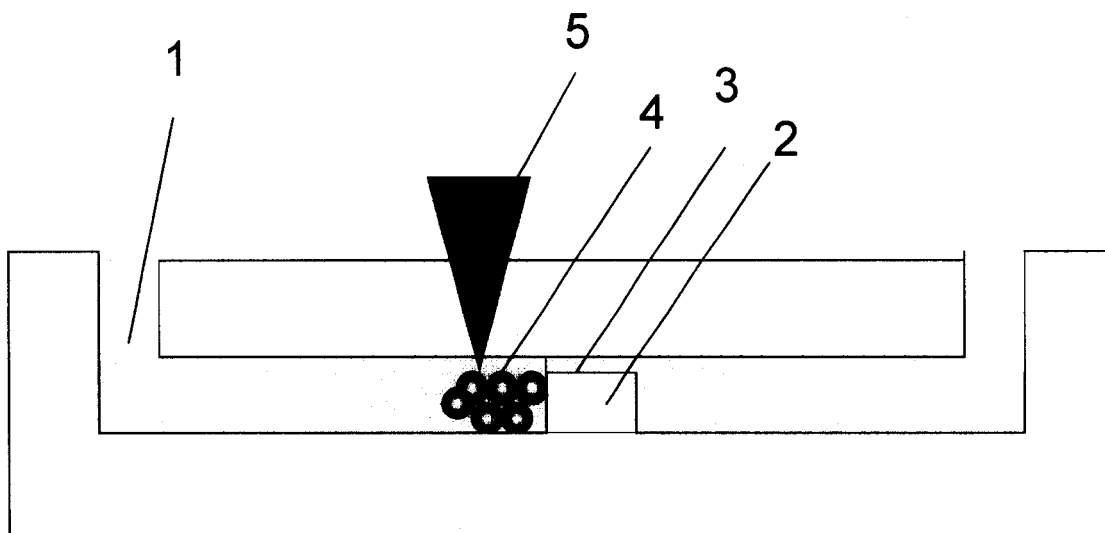


图 1

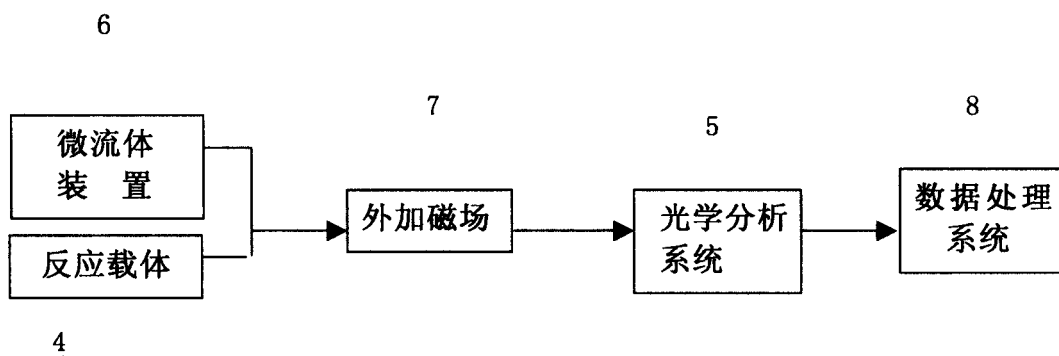


图 2

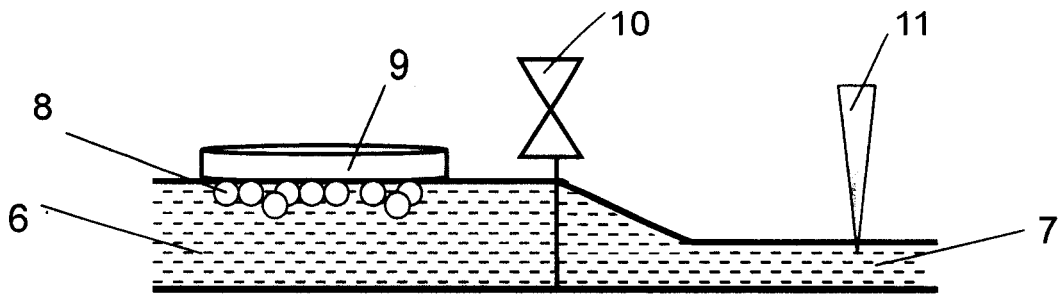


图 3

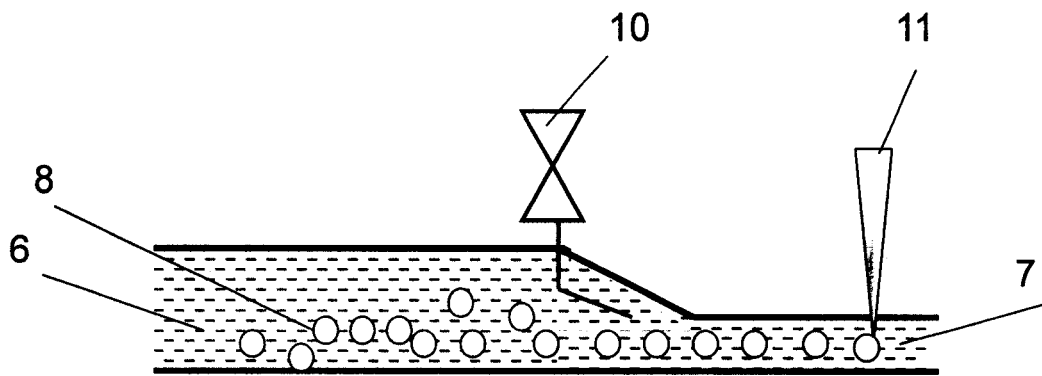


图 4

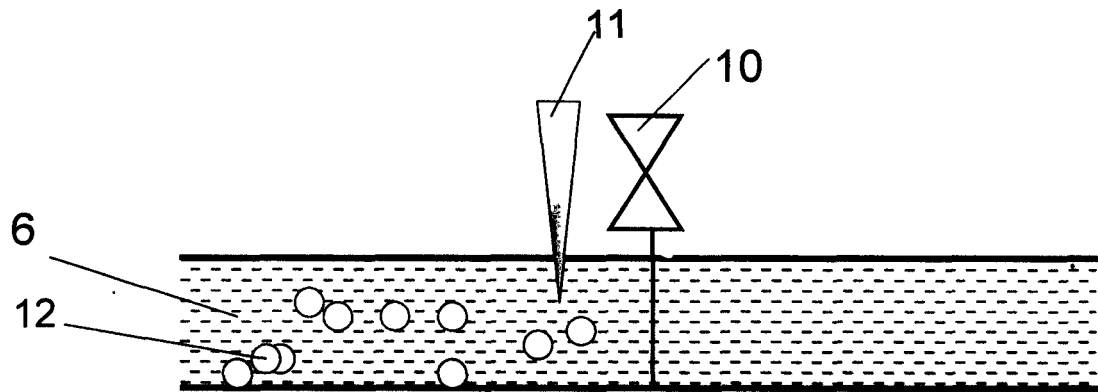


图 5

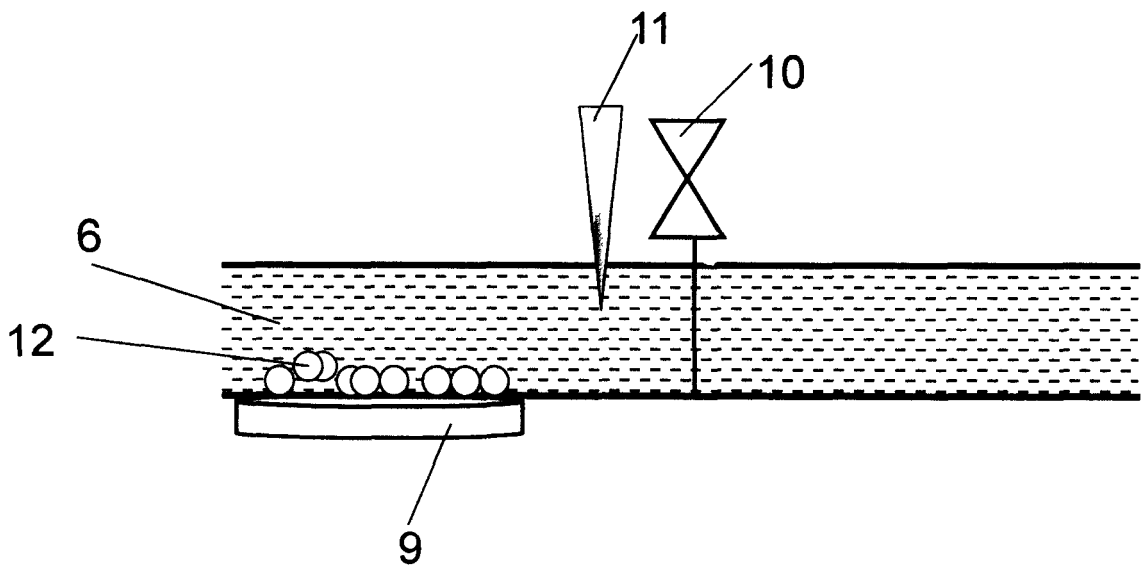


图 6

专利名称(译)	以磁性微球介导的微流体分析系统及其检测方法		
公开(公告)号	CN1598579A	公开(公告)日	2005-03-23
申请号	CN03134319.8	申请日	2003-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	陕西西大北美基因股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	陕西西大北美基因股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	陕西西大北美基因股份有限公司		
[标]发明人	崔亚丽 陈超		
发明人	崔亚丽 陈超		
IPC分类号	G01N21/25 G01N21/64 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/551		
代理人(译)	徐平		
其他公开文献	CN100480702C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种以磁性微球介导的微流体分析系统，包括微流体装置、光学分析系统和设置于光学分析系统输出端的数据分析系统，微流体装置内设置有反应载体，光学分析系统所包括的检测器，反应通道和检测通道的连接处设置有阀门；反应载体为磁性微球或磁性荧光微球。本发明可在反应和清洗过程中可利用磁性微球的磁性控制其过程的准确进行；由于反应和检测过程可控，因此，反应载体可根据需求选择粒径不同的磁性微球或磁性荧光微球。可根据需要将检测器设置在系统的不同位置，检测器可使用CCD拍摄图像的方式分析结果，通过光谱仪进行比色测定，也可使用激光光源系统对磁性荧光微球以及微球表面的荧光信号进行结果的确定。

