



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106383238 A

(43)申请公布日 2017.02.08

(21)申请号 201610736139.1

(22)申请日 2016.08.26

(71)申请人 周辉

地址 241000 安徽省芜湖市经济技术开发区
区科创中心软件园0123室

(72)发明人 周辉

(74)专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限公司 34107

代理人 项磊

(51)Int.Cl.

G01N 33/76(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

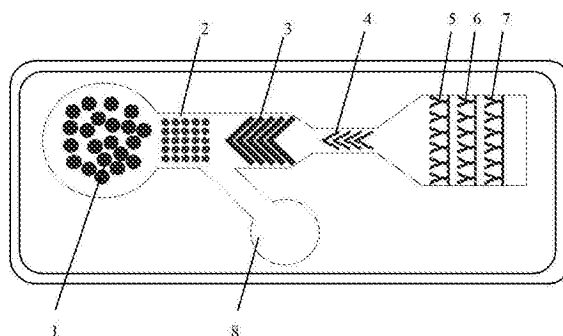
权利要求书3页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种定量检测卡及其制备方法和检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种定量检测卡及其制备方法和检测方法,包括底卡和面卡,底卡上设有加样区,结合区,微通道,时间阀,检测区以及废液区,加样区连接结合区且加样区与结合区位于微通道的一端,检测区通过时间阀连接微通道的另一端;面卡上设有加样孔和观察孔,加样孔的位置与底卡加样区对应,观察孔的位置与底卡检测区对应。利用免疫荧光技术检测不同时间抗体变化,再根据变化曲线换算待测样品中抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素的浓度,达到定量检测的水平;本发明操作简单、检测时间短、储存简单,易推广使用。



1. 一种定量检测卡,其特征在于,包括底卡和面卡,其中,
所述底卡上设有加样区,结合区,微通道,时间阀,检测区以及废液区,所述加样区连接结合区且加样区与结合区位于微通道的一端,所述检测区通过时间阀连接微通道的另一端;
所述面卡上设有加样孔和观察孔,加样孔的位置与底卡加样区对应,观察孔的位置与底卡检测区对应。
2. 如权利要求1所述的定量检测卡,其特征在于,所述检测区包被抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素,使定量检测卡用于同时检测抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体,所述结合区喷涂荧光微球标记的抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体。
3. 如权利要求1或2所述的定量检测卡,其特征在于,所述加样区覆盖圆形滤纸。
4. 如权利要求1-3所述的定量检测卡,其特征在于,所述的底卡和面卡材质为PDMS塑料。
5. 如权利要求1-4所述的定量检测卡,其特征在于,所述结合区和时间阀分别设置于微通道的两端并直接连接至并联微通道,所述废液区连接至结合区和/或微通道,所述底卡和面卡的背面扣合连接。
6. 如权利要求1-5所述的定量检测卡,其特征在于,所述微通道包括第一微通道和第二微通道,所述第一微通道连接时间阀用于待测激素能够进入时间阀,所述第二微通道连接废液区。
7. 如权利要求1-6所述的定量检测卡,其特征在于,所述圆形滤纸直径1.5-2.0cm、孔径为1-3 μm ;所述微通道通过软光刻技术和微流控技术制备,所述第一微通道孔径为5 μm ,用于待测激素能够进入时间阀,所述第二微通道孔径10 μm ,用于红细胞等从此通过进入废液区;所述时间阀的孔径为3 μm ;所述检测区设有通道结构,其孔径为5 μm 。
8. 如权利要求1-7所述定量检测卡的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - (1) 底卡的制备:
 - (1-1) 制图;
 - (1-2) 掩模;
 - (1-3) 光刻;
 - (1-4) 再铸模;
 - (1-5) 软光刻;
 - (2) 抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的制备;
 - (3) 荧光微球的制备与标记抗体;
 - (4) 喷涂荧光微球标记的抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体;
 - (5) 抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的包被;
 - (6) 滤纸覆盖加样区;
 - (7) 抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体定量检测卡的制备。
9. 如权利要求8所述定量检测卡的制备方法,其特征在于,

步骤(1)中包括:(1-1)制图:微通道图形按照设计通过绘图软件绘制掩膜版图;(1-2)掩模:制成掩膜版图后,打印在透明胶片上制得光刻掩模板,利用此掩模板通过光刻工艺制作硅片模具;(1-3)光刻:在基片表面镀上一层阻挡层,再用甩胶机在阻挡层上均匀地甩上一层光敏材料-光刻胶;在光掩模上制备所需的通道图案;将光掩模复盖在基片上,用紫外光照射涂有光刻胶的基片,光刻胶发生光化学反应;用光刻胶配套显影液通过显影的化学方法除去经曝光的光刻胶;烘干后,利用未曝光的光刻胶的保护作用,采用化学腐蚀的方法在阻挡层上精确腐蚀出底片上平面二维图形,制成所需硅片模具;(1-4)再铸模:通过将弹性材料涂于光刻形成的硅片模具表面,干燥后取下则硅片模具表面上图形转移到弹性材料上形成印模;(1-5)软光刻:将PDMS前聚体与固化剂按10:1比例混合,搅拌混匀后,置于真空箱内脱除气泡,然后在印模上浇注,PDMS前聚体在印模上完全摊平后,将其连同印模一起放入烘箱内进行固化,置于80℃烘箱固化约48小时,之后将PDMS基片从印模上剥离下来;和/或,

步骤(2)中,用17 α -羟孕酮作为免疫原注入小鼠体内,免疫剂量为150 μ g/只,使其产生抗血清;取产生特异性抗体的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔;利用有限稀释法对阳性孔进行克隆,得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株;取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存;复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养;采用体内诱生法,将小鼠腹腔注入灭菌石蜡油,7-14天后腹腔注射杂交瘤细胞,7-10天后采集腹水;经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,纯度经SDS-PAGE电泳鉴定,小瓶分装,-20℃保存;和/或,

步骤(3)中,无皂液法制备荧光微球:称取0.009g过硫酸钾,0.004gNaHCO₃溶于7ml去离子水,将1mg荧光染料溶于2ml无水乙醇及1ml苯乙烯,加入到水溶液中,摇匀,通氮气5min,放入70℃恒温水浴震荡24h,取出,离心分离出的聚合物分别再用乙醇、去离子水离心洗涤3次,即得到荧光染料标记的聚苯乙烯荧光微球;得到的荧光微球直径为50-100nm;

将1mg包裹荧光染料的荧光微球在1000rpm $\times$ 15min,收集沉淀,用0.01M pH4.8的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为OD₄₅₀=0.2;然后加入90 μ L50mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC),150 μ L5mg/mL氮经基琥珀酰亚胺(NHS),振荡混匀,室温孵育10-30min后,离心,沉淀再用0.01M pH4.8的硼酸盐缓冲液溶解,并调节微球浓度为OD₄₅₀=0.2;将0.1mL荧光微球中加入1-10 μ L17 α -羟孕酮单抗,充分混匀后,室温搅拌反应3h,分别用超纯水洗涤离心3次后,沉淀用0.01M pH7.2的PBS溶液复溶沉淀至起始体积后,即为制备好的荧光标记的抗17 α -羟孕酮抗体;和/或,

步骤(4)中,用喷金机将荧光微球标记的抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体按照5-10 μ l的体积均匀喷涂在结合区上三个固定的位置,30℃真空干燥12h,放于室温环境中备用;和/或,

步骤(5)中,用0.01M PBS缓冲液调节抗体浓度为0.5mg/ml,将包被后的溶液按照1-3 μ l的体积均匀喷涂在检测区上三个固定的位置,A为抗17 α -羟孕酮抗体、B为抗黄体生成激素抗体、C为抗促卵泡生成激素抗体,30℃真空干燥12h,放于室温环境中备用;和/或,

步骤(6)中,将直径1.5-2.0cm、孔径为1-3 μ m的圆形滤纸覆盖在加样区;和/或,

步骤(7)中,将面卡和制备号的底卡合在一起,压紧。

10. 如权利要求1-7所述定量检测卡的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

a. 绘制标准曲线:将血清标准品配制成5个以上的一系列浓度,用同一批次的数张检测卡检测各浓度的标准品溶液,以检测线的荧光强度为纵坐标,血清标准品溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线并将标准曲线保存在多色荧光分析仪中;

b. 样品检测:平放检测卡,待测血清平衡至室温后,用已灭菌的胶头滴管吸取一定量血清加入加样孔中,立即将检测卡放入多色荧光检测仪中,记录荧光微球在最佳激发光源的激发下所发出的荧光值;

c. 将所得数值代入已保存在多色荧光分析仪中的标准曲线,根据公式计算得到样本中待测物的浓度。

一种定量检测卡及其制备方法和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微流控技术和免疫荧光微球免疫层析技术相结合的技术领域,具体涉及一种定量检测卡及其制备方法和检测方法。

背景技术

[0002] 17 α -羟孕酮(17 α -OH-Progesterone, 17 α -OHP)是肾上腺糖皮质激素及性类固醇合成过程中产生的一种内源性孕激素,新生儿期主要来源于肾上腺皮质。在胆固醇代谢途径中,17 α -OHP在21-羟化酶的催化下转变为11-脱氧皮质醇,最终生成皮质醇。21-羟化酶由CPY21A2编码,是位于肾上腺皮质内质网的一种细胞色素酶。21-羟化酶缺陷使阻碍皮质醇的合成,经负反馈作用促使促肾上腺皮质激素增加,导致肾上腺皮质增生,产生过量的皮质醇前体,这些前体的堆积和异常代谢可产生一系列的临床症状。CAH是一组肾上腺皮质激素合成过程中某种酶先天性缺陷所引起的常染色体隐性遗传疾病。临床上可出现肾上腺皮质功能减退症状,受累女性新生儿可有外生殖器男性化体征,男性则出现假性性早熟;并发的醛固酮缺失可引起发育停滞、血容量减少及新生儿肾上腺危象、休克为特征的失盐症状,严重者甚至危及生命。若早期开展CAH筛查,可降低新生儿死亡率;预防过多雄性激素造成的身材矮小和女性患儿外生殖器男性化造成的性别误判所致的心理、生理发育障碍。

[0003] 人促黄体生成素(human luteinizing hormone, hLH)是垂体前叶嗜碱性细胞所分泌的激素,为一种糖蛋白,相对分子质量约为30 000。hLH分子由两条非共价连接的不同肽链(α 和 β)组成, α 链与人促甲状腺激素(TSH)、人促卵泡激素(FSH)及人绒毛膜促性腺激素(hCG)相似,但 β 链的氨基酸顺序和组成不同,使其具有特异性,决定hLH的生物活性。在有卵泡刺激素存在下,与其协同作用,刺激卵巢雌激素分泌,使卵泡成熟与排卵,使破裂卵泡形成黄体并分泌雌激素和孕激素;对于男性主要是促进睾丸间质细胞增生,促进睾酮的合成与分泌。在健康月经周期女性中,hLH浓度变化受排卵周期的影响,因此测定血清中hLH浓度可以预测女性排卵状况。此外,hLH的浓度变化和体内很多疾病的发生也有直接的联系,定量检测出血清中hLH的浓度对临床疾病的诊断有重要意义。

[0004] 人促卵泡激素(human follicle-stimulating hormone, hFSH)由垂体前叶分泌,为单链多肽激素。hFSH的增高多见于原发性睾丸衰竭、睾丸精原细胞瘤、先天性睾丸发育不全、先天性卵巢发育不全、原发性闭经、原发性性腺功能低下、更年期综合征;其降低常见于女性不孕症,长期服用避孕药,大量应用性激素等。因此定量检测血清中hFSH的浓度对临床疾病的诊断有重要意义。

[0005] 微流控技术(Microfluidics)是指在至少有一维为微米甚至纳米尺度的低维通道结构中控制体积为皮升至纳升的流体进行流动并传质、传热的技术。实现微流控操控的主要方法就是将流体限制在一个微米甚至纳米尺度的通道中,流体在微流控的微通道中具有独特的流体性质,如层流、液滴等等。当微通道在微米甚至纳米尺度时,微通道表面积与其内部体积比很大,通道的结构、形状和壁面性质都对流体的流动状态产生极大影响。因此,微流控可以实现一系列常规方法难以完成的微加工和微操作。时间阀的作用就是在固定的

时间内控制通过微通道的流体的流速和流量,可以严格控制整个反应的时间并且控制进入检测区的流体的量。

[0006] 荧光微球是指将荧光团通过包埋、共价键连接等方式引入有机或无机纳米粒子中,并让纳米粒子承担有机小分子荧光染料的检测、标记等功能,具有相对稳定的形态结构以及发光行为。荧光微球免疫层析技术是继胶体金免疫层析技术后,在荧光染料标记技术上发展起来的,作为一种免疫学检测方法,它是免疫亲和技术、免疫标记技术、免疫层析技术的结合,与胶体金免疫层析技术一样具有快速、操作简便等优点

[0007] 目前检测17 α -羟孕酮、hLH和hFSH的进口或国产试剂,其采用的检测方法多为时间分辨免疫荧光法、ELISA法和化学发光法,时间分辨免疫荧光法是一种基于以镧系稀土离子作为标记物来标记抗原或抗体的高灵敏度定量免疫检测技术,镧系稀土离子价格昂贵,制作成本高,产生的污染大。ELISA法采用蛋白包被反应板,加待测标本及酶标二抗底物显色,阳性显色,此方法操作复杂,且影响因素较多,检测结果易受外界因素的干扰。电化学发光法直接用发光物质稀土元素钆标记抗原和抗体,用链霉亲和素包被的磁颗粒作结合/游离(B/F)分离,利用电极板上的氧化还原反应在电极上施加电压产生化学发光光谱来进行分析测定。但是,目前国内尚未见到用电化学发光法测定过人性激素的正常参考值的报道,国外参考值范围太大,对临床应用缺乏指导意义。这几种方法均是定性或者半定量的检测方法,无法检测到血液或者尿液中17 α -羟孕酮、hLH和hFSH的含量水平。

发明内容

[0008] 针对以上现有技术问题,本发明的目的在于提供一种定量检测卡及其制备方法和检测方法,灵敏度高、操作简单、携带方便且制备成本低,可定量检测17 α -羟孕酮抗体、促黄体生成激素和促卵泡生成激素检测卡及其制备方法。本发明使用的荧光微球基本不受外界环境介质变化的影响,稳定性好,染料荧光猝灭大大减少。同时检测抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素的定量检测卡由底卡和面卡组成。底卡上依次覆盖滤纸的加样区、喷涂荧光微球标记的抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的结合区、微通道、时间阀、包被抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素并且具有微通道的检测区、废液区。面卡预留加样孔和检测孔,加样孔的位置底卡加样区对应,观察孔的位置与底卡检测区对应。具体技术方案如下:

[0009] 一种定量检测卡,包括底卡和面卡,其中,所述底卡上设有加样区,结合区,微通道,时间阀,检测区以及废液区,所述加样区连接结合区且加样区与结合区位于微通道的一端,所述检测区通过时间阀连接微通道的另一端;所述面卡上设有加样孔和观察孔,加样孔的位置与底卡加样区对应,观察孔的位置与底卡检测区对应。

[0010] 进一步地,所述检测区包被抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素,使定量检测卡用于同时检测抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体,所述结合区喷涂荧光微球标记的抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体。

[0011] 进一步地,所述加样区覆盖圆形滤纸。

[0012] 进一步地,所述的底卡和面卡材质为PDMS塑料。

[0013] 进一步地,所述结合区和时间阀分别设置于微通道的两端并直接连接至并联微通

道,所述废液区连接至结合区和/或微通道,所述底卡和面卡的背面扣合连接。

[0014] 进一步地,所述微通道包括第一微通道和第二微通道,所述第一微通道连接时间阀用于待测激素能够进入时间阀,所述第二微通道连接废液区。

[0015] 进一步地,所述圆形滤纸直径1.5-2.0cm、孔径为1-3 μm ;所述微通道通过软光刻技术和微流控技术制备,所述第一微通道孔径为5 μm ,用于待测激素能够进入时间阀,所述第二微通道孔径10 μm ,用于红细胞等从此通过进入废液区;所述时间阀的孔径为3 μm ;所述检测区设有通道结构,其孔径为5 μm 。

[0016] 上述定量检测卡的制备方法,包括如下步骤:

[0017] (1) 底卡的制备:

[0018] (1-1) 制图;

[0019] (1-2) 掩模;

[0020] (1-3) 光刻;

[0021] (1-4) 再铸模;

[0022] (1-5) 软光刻;

[0023] (2) 抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的制备;

[0024] (3) 荧光微球的制备与标记抗体;

[0025] (4) 喷涂荧光微球标记的抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体;

[0026] (5) 抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的包被;

[0027] (6) 滤纸覆盖加样区;

[0028] (7) 抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体定量检测卡的制备。

[0029] 进一步地,步骤(1)中包括:(1-1)制图:微通道图形按照设计通过绘图软件绘制掩膜版图;(1-2)掩模:制成掩膜版图后,打印在透明胶片上制得光刻掩模板,利用此掩模板通过光刻工艺制作硅片模具;(1-3)光刻:在基片表面镀上一层阻挡层,再用甩胶机在阻挡层上均匀地甩上一层光敏材料-光刻胶;在光掩模上制备所需的通道图案;将光掩模复盖在基片上,用紫外光照射涂有光刻胶的基片,光刻胶发生光化学反应;用光刻胶配套显影液通过显影的化学方法除去经曝光的光刻胶;烘干后,利用未曝光的光刻胶的保护作用,采用化学腐蚀的方法在阻挡层上精确腐蚀出底片上平面二维图形,制成所需硅片模具;(1-4)再铸模:通过将弹性材料涂于光刻形成的硅片模具表面,干燥后取下则硅片模具表面上图形转移到弹性材料上形成印模;(1-5)软光刻:将PDMS前聚体与固化剂按10:1比例混合,搅拌均匀后,置于真空箱内脱除气泡,然后在印模上浇注,PDMS前聚体在印模上完全摊平后,将其连同印模一起放入烘箱内进行固化,置于80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱固化约48小时,之后将PDMS基片从印模上剥离下来;和/或,

[0030] 步骤(2)中,用17 α -羟孕酮作为免疫原注入小鼠体内,免疫剂量为150 μg /只,使其产生抗血清;取产生特异性抗体的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔;利用有限稀释法对阳性孔进行克隆,得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株;取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存;复苏时取出冻存管,立即放入37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中速融,离心去除

冻存液后,移入培养瓶内培养;采用体内诱生法,将小鼠腹腔注入灭菌石蜡油,7-14天后腹腔注射杂交瘤细胞,7-10天后采集腹水;经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,纯度经SDS-PAGE电泳鉴定,小瓶分装,-20℃保存;和/或,

[0031] 步骤(3)中,无皂液法制备荧光微球:称取0.009g过硫酸钾,0.004gNaHCO₃溶于7ml去离子水,将1mg荧光染料溶于2ml无水乙醇及1ml苯乙烯,加入到水溶液中,摇匀,通氮气5min,放入70℃恒温水浴震荡24h,取出,离心分离出的聚合物分别再用乙醇、去离子水离心洗涤3次,即得到荧光染料标记的聚苯乙烯荧光微球;得到的荧光微球直径为50-100nm;

[0032] 将1mg包裹荧光染料的荧光微球在1000rpm×15min,收集沉淀,用0.01M pH4.8的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为OD₄₅₀=0.2;然后加入90μL50mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC),150μL5mg/mL氮经基嘧啶拍酞亚胺(NHS),振荡混匀,室温孵育10-30min后,离心,沉淀再用0.01M pH4.8的硼酸盐缓冲液溶解,并调节微球浓度为OD₄₅₀=0.2;将0.1mL荧光微球中加入1-10μL17α-羟孕酮单抗,充分混匀后,室温搅拌反应3h,分别用超纯水洗涤离心3次后,沉淀用0.01M pH7.2的PBS溶液复溶沉淀至起始体积后,即为制备好的荧光标记的抗17α-羟孕酮抗体;和/或,

[0033] 步骤(4)中,用喷金机将荧光微球标记的抗17α-羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体按照5-10μl的体积均匀喷涂在结合区上三个固定的位置,30℃真空干燥12h,放于室温环境中备用;和/或,

[0034] 步骤(5)中,用0.01M PBS缓冲液调节抗体浓度为0.5mg/ml,将包被后的溶液按照1-3μl的体积均匀喷涂在检测区上三个固定的位置,A为抗17α-羟孕酮抗体、B为抗黄体生成激素抗体、C为抗促卵泡生成激素抗体,30℃真空干燥12h,放于室温环境中备用;和/或,

[0035] 步骤(6)中,将直径1.5-2.0cm、孔径为1-3μm的圆形滤纸覆盖在加样区;和/或,

[0036] 步骤(7)中,将面卡和制备号的底卡合在一起,压紧。

[0037] 上述定量检测卡的检测方法,包括如下步骤:

[0038] a.绘制标准曲线:将血清标准品配制成5个以上的一系列浓度,用同一批次的数张检测卡检测各浓度的标准品溶液,以检测线的荧光强度为纵坐标,血清标准品溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线并将标准曲线保存在多色荧光分析仪中;

[0039] b.样品检测:平放检测卡,待测血清平衡至室温后,用已灭菌的胶头滴管吸取一定量血清加入加样孔中,立即将检测卡放入多色荧光检测仪中,记录荧光微球在最佳激发光源的激发下所发出的荧光值;

[0040] c.将所得数值代入已保存在多色荧光分析仪中的标准曲线,根据公式计算得到样本中待测物的浓度。

[0041] 与目前现有技术相比,本发明通过微流控技术控制待测样品的流速和流量,从而减少误差,增加反应灵敏度;本发明利用免疫荧光技术检测不同时间抗体变化,再根据变化曲线换算待测样品中抗17α-羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素的浓度,达到定量检测的水平;本发明操作简单、检测时间短、储存简单,易推广使用。具体来说:

[0042] (1)通过微流控技术和时间阀控制待测样品的流速和流量,从而减少误差,增加反应灵敏度;

[0043] (2)利用免疫荧光技术检测不同时间抗体变化,再根据变化曲线换算待测样品中抗17α-羟孕酮抗体的浓度、抗促黄体生成激素抗体的浓度和抗促卵泡生成激素抗体的浓

度,达到定量检测的水平;

[0044] (3) 荧光微球表面包裹了聚苯乙烯,实现了对荧光物质的保护,减少了外界环境的干扰,荧光微球的稳定性增强;

[0045] (4) 本发明操作简单、检测时间精确、储存简单。非专业人士均可操作,因而适用范围广,易推广使用。

附图说明

[0046] 图1是一种同时检测抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素的定量检测卡的底卡结构示意图

[0047] 图2是一种同时检测抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素的定量检测卡的面卡结构示意图

具体实施方式

[0048] 下面根据附图对本发明进行详细描述,其为本发明多种实施方式中的一种优选实施例。

[0049] 在一个优选实施例中,一种同时检测抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素的定量检测卡及其制备方法,由底卡和面卡组成。底卡上依次覆盖滤纸的加样区、喷涂荧光微球标记的抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的结合区、微通道、时间阀、包被抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素并且具有微通道的检测区、废液区。面卡预留加样孔和检测孔,加样孔的位置底卡加样区对应,观察孔的位置与底卡检测区对应。

[0050] 所述荧光微球采用无皂液法制作,具体处理方式如下:

[0051] (1) 取0.1ml荧光微球A(10mg/ml、粒径0.51 μ m、激发波长660nm、发射波长690nm)加入6 μ l 17 α -羟孕酮抗体,充分混匀后,室温搅拌反应3小时,分别用超纯水洗涤离心3次后,沉淀用0.01M的PBS溶液(磷酸盐缓冲液,pH7.4,其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶沉淀0.1ml,待用;

[0052] (2) 取0.1ml荧光微球B(10mg/ml、粒径0.52 μ m、激发波长480nm、发射波长520nm)加入6 μ l抗促黄体生成激素抗体,充分混匀后,室温搅拌反应3小时,分别用超纯水洗涤离心3次后,沉淀用0.01M的PBS溶液(磷酸盐缓冲液,pH7.4,其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶沉淀0.1ml,待用;

[0053] (3) 取0.1ml荧光微球C(10mg/ml、粒径0.51 μ m、激发波长360nm、发射波长420nm)加入6 μ l抗促卵泡生成激素,充分混匀后,室温搅拌反应3小时,分别用超纯水洗涤离心3次后,沉淀用0.01M的PBS溶液(磷酸盐缓冲液,pH7.4,其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶沉淀0.1ml,待用;

[0054] 所述的底卡和面卡材质为PDMS(Polydimethylsiloxane,聚二甲基硅氧烷)塑料,底卡加样区覆盖圆形滤纸,直径1.5-2.0cm、孔径为1-3 μ m,底卡中包含通过软光刻技术和微流控技术制备的微通道,一种微通道孔径为5 μ m,保证待测三种激素能够进入时间阀,另一种微通道孔径10 μ m,红细胞等从此通过进入废液区,所述的底卡在5 μ m孔径的微通道与检测区相连接处设置时间阀,该时间阀的孔径为3 μ m,底卡检测区包含通过软光刻技术和微流控

技术制备的微通道结构,微通道孔径为 $5\mu\text{m}$ 。

[0055] 检测方法,包括以下步骤:

[0056] (1) 绘制标准曲线:将血清标准品配制成一系列浓度(5个以上),用同一批次的数张检测卡检测各浓度的标准品溶液。以检测线的荧光强度为纵坐标,血清标准品溶液浓度为横坐标,绘制一条标准曲线。将标准曲线保存在多色荧光分析仪中。

[0057] (2) 样品检测:平放检测卡,待测血清平衡至室温后,用已灭菌的胶头滴管吸取一定量血清加入加样孔中,立即将检测卡放入多色荧光检测仪中。记录荧光微球在最佳激发光源的激发下所发出的荧光值。

[0058] (3) 将所得数值代入已保存在多色荧光分析仪中的标准曲线,根据公式计算即得到样本中待测物的浓度。

[0059] 在另一个优选实施例中,可以采用如下方案:一种同时检测抗 17α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素的定量检测卡及其制备方法,由底卡和面卡组成。底卡上依次覆盖滤纸的加样区、喷涂荧光微球标记的抗 17α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的结合区、微通道、时间阀、包被抗 17α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素并且具有微通道的检测区、废液区。面卡预留加样孔和检测孔,加样孔的位置底卡加样区对应,观察孔的位置与底卡检测区对应。

[0060] 所述荧光微球采用无皂液法制作,具体处理方式如下:

[0061] (1) 取 0.1ml 荧光微球A(10mg/ml 、粒径 $0.51\mu\text{m}$ 、激发波长 660nm 、发射波长 690nm)加入 $6\mu\text{l}$ 17α -羟孕酮抗体,充分混匀后,室温搅拌反应3小时,分别用超纯水洗涤离心3次后,沉淀用 0.01M 的PBS溶液(磷酸盐缓冲液, $\text{pH}7.4$,其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶沉淀 0.1ml ,待用;

[0062] (2) 取 0.1ml 荧光微球B(10mg/ml 、粒径 $0.52\mu\text{m}$ 、激发波长 480nm 、发射波长 520nm)加入 $6\mu\text{l}$ 抗促黄体生成激素抗体,充分混匀后,室温搅拌反应3小时,分别用超纯水洗涤离心3次后,沉淀用 0.01M 的PBS溶液(磷酸盐缓冲液, $\text{pH}7.4$,其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶沉淀 0.1ml ,待用;

[0063] (3) 取 0.1ml 荧光微球C(10mg/ml 、粒径 $0.51\mu\text{m}$ 、激发波长 360nm 、发射波长 420nm)加入 $6\mu\text{l}$ 抗促卵泡生成激素,充分混匀后,室温搅拌反应3小时,分别用超纯水洗涤离心3次后,沉淀用 0.01M 的PBS溶液(磷酸盐缓冲液, $\text{pH}7.4$,其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶沉淀 0.1ml ,待用;

[0064] 所述的底卡和面卡材质为PDMS。所述的底卡加样区覆盖圆形滤纸,直径 $1.5\text{--}2.0\text{cm}$ 、孔径为 $1\text{--}3\mu\text{m}$ 。所述的底卡中包含通过软光刻技术和微流控技术制备的微通道,一种微通道孔径为 $5\mu\text{m}$,保证待测三种激素能够进入时间阀,另一种微通道孔径 $10\mu\text{m}$,红细胞等从此通过进入废液区。所述的底卡在 $5\mu\text{m}$ 孔径的微通道与检测区相连接处设置时间阀,该时间阀的孔径为 $3\mu\text{m}$ 。所述的底卡检测区包含通过软光刻技术和微流控技术制备的微通道结构,微通道孔径为 $5\mu\text{m}$ 。

[0065] 详细制备方法包括如下步骤:

[0066] 一、底卡的制备:

[0067] 本发明底卡采用PDMS材质,利用光刻机制备,经制图、掩模、光刻、再铸模、软光刻等工艺完成底卡的制备。

[0068] 1.制图:微通道图形自行设计,然后通过使用绘图软件绘制掩膜版图。

[0069] 2.掩模:制成掩膜版图后,使用高分辨率激光打印机(分辨率12000dpi)打印在透明胶片上制得光刻掩模板,然后利用此掩模板通过光刻工艺制作硅片模具。

[0070] 3.光刻:在干净的基片表面镀上一层阻挡层,例如铬、二氧化硅、氮化硅等;再用甩胶机在阻挡层上均匀地甩上一层光敏材料-光刻胶;然后在光掩模上制备所需的通道图案。将光掩模复盖在基片上,用紫外光照射涂有光刻胶的基片,光刻胶发生光化学反应;用光刻胶配套显影液通过显影的化学方法除去经曝光的光刻胶;烘干后,利用未曝光的光刻胶的保护作用,采用化学腐蚀的方法在阻挡层上精确腐蚀出底片上平面二维图形,制成所需硅片模具。

[0071] 4.再铸模:通过将弹性材料涂于光刻形成的硅片模具表面,干燥后取下则硅片模具表面上图形转移到弹性材料上形成印模。

[0072] 5.软光刻:将PDMS前聚体与固化剂按10:1比例(增加固化剂会使交联的结构增多,导致形成的弹性体硬度增大,减少固化剂则作用相反)混合,搅拌混匀后,置于真空箱内脱除气泡,然后在印模上浇注,厚度控制约6mm。为了有利于PDMS薄片制好后与印模分离,应先将印模在二氯二甲基硅烷气体中处理约5min,然后将彻底脱除气泡的PDMS前聚体浇铸在印模图形之上,这个过程中需要保持印模底片水平,并注意不要让PDMS前聚体溢出。PDMS前聚体在印模上完全摊平后,将其连同印模一起放入烘箱内进行固化。加温是为了加快固化的过程,置于80℃烘箱固化约48小时,之后小心地将PDMS基片从印模上剥离下来。

[0073] 二、抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的制备

[0074] 本发明用17 α -羟孕酮作为免疫原注入小鼠体内,免疫剂量为150 μ g/只,使其产生抗血清。取产生特异性抗体的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆,得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。采用体内诱生法,将小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油,7-14天后腹腔注射杂交瘤细胞,7-10天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,纯度经SDS-PAGE电泳鉴定,小瓶分装,-20℃保存。

[0075] 抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的制备同上。

[0076] 三、荧光微球的制备与标记抗体

[0077] 无皂液法制备荧光微球:称取0.009g过硫酸钾,0.004gNaHCO₃溶于7ml去离子水,将1mg荧光染料溶于2ml无水乙醇及1ml苯乙烯,加入到水溶液中,摇匀,通氮气5min,放入70℃恒温水浴震荡24h,取出,离心(10000rpm $\times$ 10min)分离出的聚合物分别再用乙醇、去离子水离心洗涤3次,即得到荧光染料标记的聚苯乙烯荧光微球。得到的荧光微球直径为50-100nm。

[0078] 将1mg包裹荧光染料的荧光微球在1000rpm $\times$ 15min,收集沉淀,用0.01M pH4.8的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为OD₄₅₀=0.2。然后加入90 μ L50mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC),150 μ L5mg/mL氮经基嘧啶拍酞亚胺(NHS),振荡混匀,室温孵育10-30min后,离心(1000rpm $\times$ 15min),沉淀再用0.01M pH4.8的硼酸盐缓冲液溶解,并调节微球浓度为OD₄₅₀=0.2。将0.1mL荧光微球中加入1-10 μ L17 α -羟孕酮单抗,充分混匀后,室温搅拌反应3h,分

别用超纯水洗涤离心3次后,沉淀用0.01M pH7.2的PBS溶液(其中包含5%蔗糖和0.05% Tween-20)复溶沉淀至起始体积后,即为制备好的荧光标记的抗17 α -羟孕酮抗体。

[0079] 抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的制备同上。标记的荧光染料选三种不同颜色,抗原抗体发生免疫反应后显示不同的颜色,容易区分。

[0080] 四、喷涂荧光微球标记的抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体

[0081] 用喷金机将荧光微球标记的抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体按照5-10 μ l的体积均匀喷涂在结合区上三个固定的位置,30℃真空干燥12h,放于室温环境中备用。

[0082] 五、抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的包被

[0083] 用0.01M PBS缓冲液(磷酸盐缓冲液,pH 7.4,含有5%蔗糖溶液金和0.05% Tween-20)调节抗体浓度为0.5mg/ml,将包被后的溶液按照1-3 μ l的体积均匀喷涂在检测区上三个固定的位置,A为抗17 α -羟孕酮抗体、B为抗黄体生成激素抗体、C为抗促卵泡生成激素抗体,30℃真空干燥12h,放于室温环境中备用。

[0084] 六、滤纸覆盖加样区:

[0085] 将直径1.5-2.0cm、孔径为1-3 μ m的圆形滤纸覆盖在加样区。

[0086] 七、抗17 α -羟孕酮抗体、抗黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体定量检测卡的制备:

[0087] 将面卡和制备号的底卡合在一起,压紧,再将组装后的检测卡装入铝箔袋中,加入干燥剂封口保存,在室温下可保存一年。

[0088] 如图1所示,该一种同时检测抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素的定量检测卡的底卡包括1.覆盖滤纸的加样区、2.喷涂荧光微球标记的抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素的结合区、3.微通道、4.时间阀、5-7.包被抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素并且具有微通道结构的检测区、8.废液区。面卡上设有加样孔9和观察孔10,加样孔9的位置与底卡加样区1对应,观察孔10的位置与底卡检测区对应

[0089] 如图2所示,一种同时检测抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素的定量检测卡的面卡,包括加样孔和检测孔。

[0090] 优选实施例中:1、标准曲线的绘制:将血清标准品配制成一系列浓度(5个以上),用同一批次的数张一种同时检测抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素抗体的定量检测卡检测各浓度的标准品溶液。以检测线的荧光强度为纵坐标,血清标准品溶液浓度为横坐标,绘制一条标准曲线。将标准曲线保存在多色荧光分析仪中。

[0091] 2、样品检测:平放检测卡,待测血清平衡至室温后,用已灭菌的胶头滴管吸取一定量血清加入加样孔中,立即将检测卡放入多色荧光检测仪中。记录荧光微球在最佳激发光源的激发下所发出的荧光值。

[0092] 3、结果分析:将所得数值代入已保存在多色荧光分析仪中的标准曲线,根据以下公式计算待测血清中抗17 α -羟孕酮抗体的浓度:

[0093] $A_1 = (B' - A') / V * (t_B - t_A)$

[0094] 即得到样本中待测物的浓度。

[0095] A_1 表示待测血清中的抗17 α -羟孕酮抗体的浓度, A' 、 B' 表示A、B荧光值所对应的抗17 α -羟孕酮抗体的浓度值, V 表示在微通道中血清流体的流速, t_A 、 t_B 表示荧光微球达到A、B荧光值时对应的流体通过微通道的时间。

[0096] 抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素检测同上。

[0097] 上面结合附图对本发明进行了示例性描述,显然本发明具体实现并不受上述方式的限制,只要采用了本发明的方法构思和技术方案进行的各种改进,或未经改进直接应用于其它场合的,均在本发明的保护范围之内。

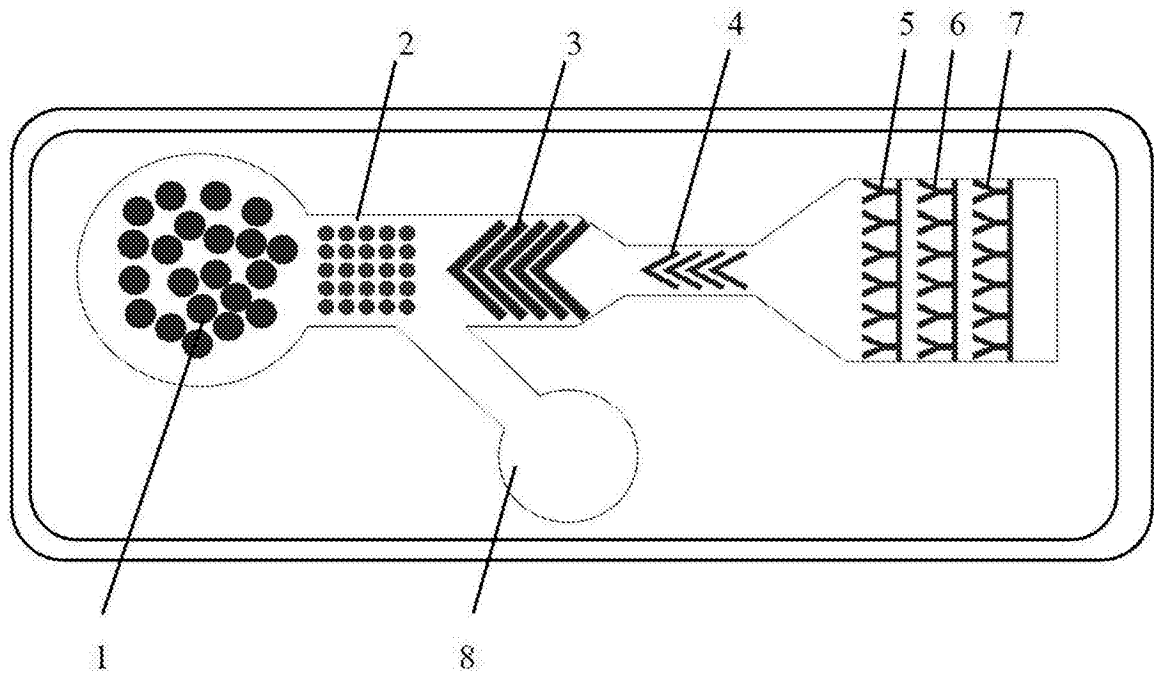


图1

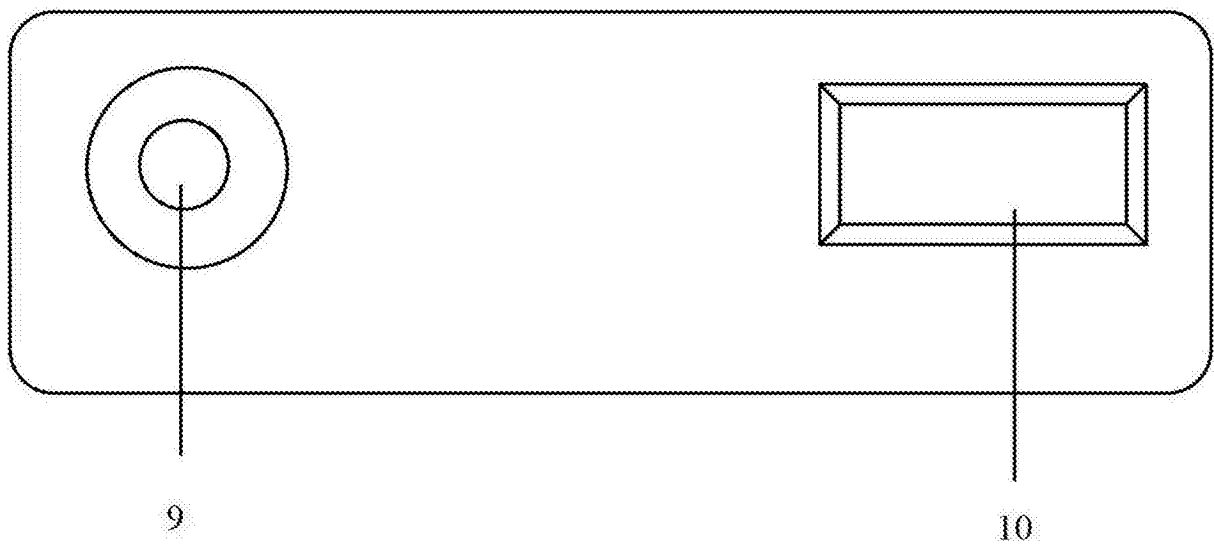


图2

专利名称(译)	一种定量检测卡及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	CN106383238A	公开(公告)日	2017-02-08
申请号	CN201610736139.1	申请日	2016-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	周辉		
申请(专利权)人(译)	周辉		
当前申请(专利权)人(译)	周辉		
[标]发明人	周辉		
发明人	周辉		
IPC分类号	G01N33/76 G01N33/74 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/74 G01N33/76		
代理人(译)	项磊		
其他公开文献	CN106383238B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种定量检测卡及其制备方法和检测方法，包括底卡和面卡，底卡上设有加样区，结合区，微通道，时间阀，检测区以及废液区，加样区连接结合区且加样区与结合区位于微通道的一端，检测区通过时间阀连接微通道的另一端；面卡上设有加样孔和观察孔，加样孔的位置与底卡加样区对应，观察孔的位置与底卡检测区对应。利用免疫荧光技术检测不同时间抗体变化，再根据变化曲线换算待测样品中抗17 α -羟孕酮抗体、抗促黄体生成激素抗体和抗促卵泡生成激素的浓度，达到定量检测的水平；本发明操作简单、检测时间短、储存简单，易推广使用。

