



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110031622 A

(43)申请公布日 2019.07.19

(21)申请号 201910371420.3

(22)申请日 2019.05.06

(71)申请人 中山大学

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路135号

(72)发明人 李攻科 董建伟 杨佳妮 夏凌

(74)专利代理机构 广州骏思知识产权代理有限公司 44425

代理人 卢娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

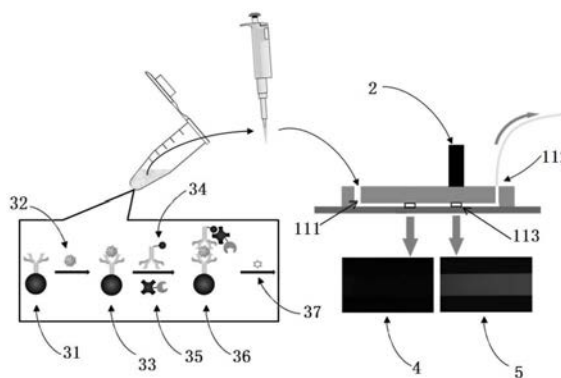
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置及检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置及其检测方法。所述检测装置,包括微流控芯片,所述微流控芯片包括至少一条微通道,所述微通道包括用于加入磁性免疫复合物与酶底物的样品池、检测区和出样口;所述磁性免疫复合物为生物样品通过特异性免疫反应与磁珠及酶相连形成;还包括磁铁,所述磁铁设置在检测区的上方;本发明还提供一种使用该装置的检测方法。通过本发明的微尺度磁富集原位检测方法,将用于免疫分析的样品富集在微流控通道的检测区中,并利用微尺度下报告分子快速传质的特性,降低目标样品检出限两个数量级以上。



1. 一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置, 包括微流控芯片, 其特征在于: 所述微流控芯片包括至少一条微通道, 所述微通道呈“一”字型且在芯片上平行排列, 所述微通道包括用于加入磁性免疫复合物与酶底物的样品池、检测区和出样口; 所述磁性免疫复合物为样品通过特异性免疫反应与磁珠及酶相连形成;

还包括磁铁, 所述磁铁设置在检测区的上方;

注射泵, 所述注射泵与出样口连接。

2. 根据权利要求1所述的一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置, 其特征在于: 所述芯片材料为聚二甲基硅氧烷 (PDMS)、环烯烃共聚物 (COC)、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 或玻璃中的任意一种。

3. 根据权利要求1所述的一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置, 其特征在于: 所述芯片上平行排列4-8条所述微通道, 用于4-8个样品的同时测定。

4. 根据权利要求1所述的一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置, 其特征在于: 所述微通道的宽度为50-500 μm , 长度为10-40mm, 深度为10-100 μm ; 所述样品池直径为2-5mm, 检测区长度为0.1-2mm, 出样口直径为0.8-1.5mm。

5. 根据权利要求1所述的一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置, 其特征在于: 所述磁铁为钕铁硼磁铁, 长度为20-40mm, 宽度为5-20mm, 高度为1-4mm。

6. 根据权利要求1所述的一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置, 其特征在于: 所述微通道出样口与注射泵用聚四氟乙烯或硅胶毛细管连接。

7. 根据权利要求1所述的一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置, 其特征在于: 所述免疫分析对象类型为蛋白质、外泌体和细胞; 所述磁珠粒径范围为300nm-6.5 μm ; 所述酶为辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶或碱性磷酸酶中的一种; 所述酶底物为10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪 (Amplex Red)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS)、邻苯二胺 (OPD) 或荧光素二磷酸 (FDP) 中的一种。

8. 一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测方法, 其特征在于: 包括如下步骤,

1)、固载有抗体的磁珠通过特异性免疫反应与样品中的待测抗原结合;

2)、被吸附在磁珠表面的抗原与酶标抗体通过特异性免疫反应形成磁性免疫复合物;

3)、将磁性免疫复合物与酶底物混合均匀, 加入权利要求1所述的微通道一端的样品池中;

4)、开启注射泵, 采用抽取模式将样品引入微通道;

5)、进样完毕后, 用胶带封住样品池和出样口, 在磁铁下方的检测区拍照记录报告分子随时间的变化规律。

9. 根据权利要求8所述的一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测方法, 其特征在于: 所述样品体积为1-100 μL ; 所述的进样流速度为5-30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微流控免疫分析技术领域,具体涉及一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置及检测方法。

背景技术

[0002] 免疫测定是一种利用抗原-抗体特异性反应评估溶液中目标分子存在与否或浓度高低的生化测试,也是临床诊断及研究领域最常用的检测方法之一。包含酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)在内的免疫测定因其快速、灵敏、选择性好、高性价比等优点,被广泛应用于生物标志物的检测。但是,许多传统的免疫测定仍属于劳动密集型的,检测时间长、样品和溶剂损耗高,这些都限制了免疫测定的应用范围。

[0003] 微流控平台上实现的微型化免疫测定可以克服传统免疫测定的一些限制,并在基于免疫测定的现场即时诊断工具开发方面显示了巨大的潜力。在微流控装置上进行的免疫测试可将样品消耗量降至1 μ L,操作时间缩短为5-30min。尽管部分微流控平台上免疫测定的结果已能与传统方法相媲美,多数微型化免疫测定的灵敏度仍然有待提高。因此,开发用于低丰度目标分子检测的富集策略和检测方法是微流控免疫测定亟待解决的问题。

[0004] 目前,提高免疫测定检出限(limit of detection,LOD)的方法主要有预富集目标分子,富集免疫复合物和富集/改良报告分子三种。以磁珠作为免疫测定的固体载体,不仅可以从复杂基质中捕获目标分子,还能在检测过程中起到富集免疫复合物的作用。与96孔板等平面固体载体相比,磁珠具有更大的比表面积,增大了其表面免疫复合物与试剂的相互作用,从而提高反应速率。将固定有免疫复合物的磁珠引入微流控芯片,利用外加磁场将磁珠富集在微通道的一定区域内进行免疫测定,一方面通过磁富集提高了免疫复合物的局部浓度,另一方面,产生的信号分子被限制在微小的空间内并在微通道横截面方向迅速完成传质过程。利用免疫复合物磁富集和微尺度下信号分子的迁移行为双重作用,开发低LOD的微流控免疫测定方法具备可行性。基于以上分析,本领域中需要提出可用于低丰度生物样品分析的微流控免疫分析方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对传统酶联免疫方法灵敏度较低、无法满足低丰度重要生物样品的检测与监控需求,提供一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置及检测方法,该技术适用于样品中痕量蛋白质、外泌体及稀有癌细胞等的检测,可降低检测限两个数量级以上,能有效地降低检出限,并且操作简单、耗样品量少、微芯片制作要求和成本低。

[0006] 为达到上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置,包括微流控芯片,所述微流控芯片包括至少一条微通道,所述微通道呈“一”字型且在芯片上平行排列,所述微通道包括用于加入磁性免疫复合物与酶底物的样品池、检测区和出样口;所述磁性免疫复合物为样品通过特异性免疫反应与磁珠及酶相连形成;还包括磁铁,所述磁铁设置在检测区的上方;注射

泵,所述注射泵与出样口连接。

[0008] 与现有技术相比,本发明的用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置,样品通过特异性免疫反应与磁珠及酶相连,形成磁性免疫复合物;磁性免疫复合物与酶底物同时加入所述样品池中,通过注射泵形成压力驱动将样品引流至微通道,因为磁铁产生的磁场使得磁性免疫复合物在检测区停留进行检测,而磁性免疫复合物与所述酶底物反应生成的报告分子在所述微通道横截面上的迅速完成传质过程,保证了所述检测区中信号的稳定性。本发明操作简单、耗样品量少、微芯片制作要求和成本低。

[0009] 进一步地,所述芯片材料为聚二甲基硅氧烷(PDMS)、环烯烃共聚物(COC)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)或玻璃中的任意一种。

[0010] 进一步地,所述芯片上平行排列4-8条所述微通道,用于4-8个样品的同时测定。

[0011] 进一步地,所述微通道的宽度为50-500 μ m,长度为10-40mm,深度为10-100 μ m;所述样品池直径为2-5mm,检测区长度为0.1-2mm,出样口直径为0.8-1.5mm。

[0012] 进一步地,所述磁铁为钕铁硼磁铁,长度为20-40mm,宽度为5-20mm,高度为1-4mm。

[0013] 进一步地,所述微通道出样口与注射泵用聚四氟乙烯或硅胶毛细管连接。

[0014] 进一步地,所述免疫分析对象类型为蛋白质、外泌体和细胞;所述磁珠粒径范围为300nm-6.5 μ m;所述酶为辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶或碱性磷酸酶中的一种;所述酶底物为10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪(Amples Red)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、邻苯二胺(OPD)或荧光素二磷酸(FDP)中的一种。本发明的检测装置适用于生物样品中痕量蛋白质、外泌体及稀有癌细胞等的检测。

[0015] 本发明还提供一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测方法,包括如下步骤,

[0016] 1)、固载有抗体的磁珠通过特异性免疫反应与样品中的待测抗原结合;

[0017] 2)、被吸附在磁珠表面的抗原与酶标抗体通过特异性免疫反应形成磁性免疫复合物;

[0018] 3)、将磁性免疫复合物与酶底物混合均匀,加入上述的微通道一端的样品池中;

[0019] 4)、开启注射泵,采用抽取模式将样品引入微通道;

[0020] 5)、进样完毕后,用胶带封住样品池和出样口,在磁铁下方的检测区拍照记录报告分子随时间的变化规律。

[0021] 进一步地,所述样品体积为1-100 μ L;所述的进样流速度为5-30 μ L/min。

[0022] 本发明所述的一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测方法,通过本发明的微尺度磁富集原位检测方法,将用于免疫分析的样品富集在微流控通道的检测区中,并利用微尺度下报告分子快速传质的特性,降低目标样品检出限两个数量级以上。本发明的微尺度磁富集原位检测方法可在癌症标志物检测和循环肿瘤细胞检测中得到良好应用。

[0023] 为了更好地理解和实施,下面结合附图详细说明本发明。

附图说明

[0024] 图1为本发明为本发明的检测装置结构示意图;

[0025] 图2为本发明的检测方法的操作流程示意图;

[0026] 图3为本发明实施例1不同磁珠大小的微尺度磁富集信号放大效果图;

[0027] 图4为本发明实施例2不同浓度癌胚抗原检测信号放大效果图;

[0028] 图5为本发明实施例3不同浓度前列腺特异抗原检测信号放大效果图;

[0029] 图6为本发明实施例4不同浓度人乳腺癌细胞检测信号放大效果图。

[0030] 图中,1、微流控芯片;11、微通道;111、样品区;112、出样口;113、检测区;2、磁铁;31、捕获抗体标记磁珠;32、目标抗原;33、抗原-抗体-磁珠复合物;34、生物素标记检测抗体;35、链霉亲和素-HRP;36、磁性免疫复合物;37、酶底物;4、非富集区;5、磁富集区。

具体实施方式

[0031] 下面结合实施例对本发明作进一步详细描述

[0032] 如图1所示,图1为本发明使用的检测装置的结构示意图,本发明提供基于芯片的微尺度磁富集检测装置及其检测方法,本发明的检测装置是在放置有磁铁的聚二甲基硅氧烷(PDMS)微流控芯片1上实现的,也可以为玻璃、环烯烃共聚物(COC)或聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)芯片中的任意一种。所述微流控芯片1包括至少一条微通道11,所述微通道呈“一”字型且在芯片上平行排列。所述微通道11包括用于加入磁性免疫复合物与酶底物的样品池111、检测区113和出样口112;所述磁性免疫复合物为样品通过特异性免疫反应与磁珠及酶相连形成。还包括磁铁2和注射泵(图中未示出),所述磁铁设置在检测区的上方;所述注射泵与出样口用聚四氟乙烯或硅胶毛细管连接。

[0033] 优选的,所述芯片上平行排列4-8条微通道,用于4-8个样品的同时测定。所述“一”字型微通道的宽度为50-500 μm ,长度为10-40mm,深度为10-100 μm 。优选的,通道宽度为200 μm ,长度为20mm,深度为40 μm 。所述样品池直径为2-5mm,检测区长度为0.1-2mm,出样口直径为0.8-1.5mm。

[0034] 所述磁铁2为钕铁硼磁铁,长度为20-40mm,宽度为5-20mm,高度为1-4mm。优选的,长度为28mm,宽度为10mm,高度为3mm。

[0035] 具体的,所述免疫分析对象类型为蛋白质、外泌体和细胞;所述磁珠粒径范围为300nm-6.5 μm ;所述酶为辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶或碱性磷酸酶中的一种;所述酶底物为10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪(Amples Red)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、邻苯二胺(OPD)或荧光素二磷酸(FDP)中的一种。

[0036] 如图2所示,本发明提供的用于免疫分析的微尺度磁富集检测方法,包括如下步骤,

[0037] 1)固载有抗体的磁珠31通过特异性免疫反应与样品中的待测抗原32(目标抗原)结合,形成抗原-抗体-磁珠复合物33;

[0038] 2)被吸附在磁珠表面的抗原即抗原-抗体-磁珠复合物33与酶标抗体通过特异性免疫反应形成磁性免疫复合物36;

[0039] 3)将磁性免疫复合物36与酶底物37混合均匀,加入微通道一端的样品池中;

[0040] 4)开启注射泵,采用抽取模式将样品引入微通道;

[0041] 5)进样完毕后,用胶带封住样品池和出样口,在磁铁下方的检测区拍照记录报告分子随时间的变化规律。

[0042] 在微通道的中,磁铁的下方形成磁富集区5,其余均为非富集区4。

[0043] 所述步骤4)中,通道出样口与注射泵用聚四氟乙烯或硅胶毛细管连接。

[0044] 所述步骤4)中,所述样品体积为1-100 μ L;优选的,样品体积为10 μ L。所述的液体进样流速为5-30 μ L/min;优选的,进样流速为10 μ L/min。

[0045] 通过本发明的微尺度磁富集原位检测方法,将用于免疫分析的样品富集在微流控通道的检测区中,并利用微尺度下报告分子快速传质的特性,降低目标样品检出限两个数量级以上。本发明的微尺度磁富集原位检测方法可在癌症标志物检测和循环肿瘤细胞检测中得到良好应用。

[0046] 下面通过四个实施例来说明本发明的用于生物样品免疫分析的微尺度磁富集原位检测方法及应用。

[0047] 实施例1:微尺度磁富集的信号放大效果评价

[0048] 本实施例以辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的磁珠作为模拟磁性免疫复合物,用来评价本发明的效果,具体检测方法如下:

[0049] (1) 模拟磁性免疫复合物 (HRP标记磁珠) 的制备:在一干净的10mL离心管中,加入0.5mL不同粒径 (0.5 μ m、2.5 μ m、5.6 μ m) 核壳型磁性微球悬浮液 (5mg/mL) 和7mL 2.5%戊二醛溶液,混合器上混合30s,封口,室温摇晃3h;将离心管置于磁力架上磁分离,弃去上清液,用超纯水洗涤两次后,加入5mL含有10mg/mL HRP的PBS缓冲溶液,混合均匀,封口,室温摇晃12h,使磁性微球充分悬浮,保证HRP能够均匀的标记上去;将离心管置于磁力架上磁分离,弃去上清液,用PBS充分洗涤除去未标记上的HRP,加入1mL 10mg/mL牛血清白蛋白 (BSA) 封闭表面可能未反应的醛基结合位点。3h后,磁分离,弃去上清液,加入2mL PBS缓冲溶液 (含有1mg/mL BSA, PH 7.4), 4 $^{\circ}$ C下保存备用。

[0050] (2) 免疫分析测试:将10 μ L HRP标记的磁珠与10 μ L 500 μ M H₂O₂以及10 μ L 50 μ M酶底物10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪 (Amplex Red) 均匀混合,取10 μ L混合物加入微通道一端的样品池中;开启注射泵,采用抽取模式以10 μ L/min的流速将样品引入微通道;进样完毕后,用胶带封住样品池和出样口,在磁铁下方的检测区拍照记录报告分子试卤灵随时间的变化规律。

[0051] 微尺度磁富集信号放大效果如图3所示。三种粒径的磁珠在加磁铁和不加磁铁的操作条件下,微通道检测区中标记了HRP的磁珠浓度都与其催化反应的速率呈良好的线性关系。同一粒径的磁珠使用本发明检测方法能获取两个数量级以上的信号放大效果。其中2.5 μ m磁珠磁富集倍数为269,由线性回归方程 $y=71.273x+0.478$ (磁富集) 和 $y=0.265x+0.073$ (无富集) 计算得到;4.5 μ m磁珠磁富集倍数为160,由线性回归方程 $y=18.143x-0.495$ (磁富集) 和 $y=0.1137x-0.1103$ (无富集) 计算得到;6.5 μ m磁珠磁富集倍数为135,由线性回归方程 $y=14.888x+0.333$ (磁富集) 和 $y=0.1103x+0.203$ (无富集) 计算得到。

[0052] 实施例2:血清中癌胚抗原的检测

[0053] 本实施例以血清中的癌胚抗原 (CEA) 为目标物,所述微尺度磁富集原位检测方法如下:

[0054] (1) 样品预处理:取血清样品,用PBS进行适当稀释;同时配制一系列不同浓度的CEA标准液。

[0055] (2) 磁性免疫复合物的制备:在干净的0.5mL灭菌离心管中,加入50 μ L标准液或稀释的血清样品32和50 μ L捕获抗体标记磁珠31,室温下以820rpm的转速培育2h;将离心管置于磁力架上,1min后弃去液体,加入100 μ L洗涤液,静置1min后再次弃去液体,此洗涤操作重

复三次;向离心管中加入50 μ L生物素化检测抗体34,室温下以820rpm的转速培育1h,洗涤三次;然后加入50 μ L链霉亲和素偶联HRP35,再次以820rpm的转速室温下培育30min,洗涤三次。

[0056] (3) 免疫分析测试:向离心管中加入6 μ L 500 μ M H_2O_2 以及6 μ L 50 μ M酶底物37Amplex Red,均匀混合,取10 μ L混合物加入微通道一端的样品池中;开启注射泵,采用抽取模式以10 μ L/min的流速将样品引入微通道;进样完毕后,用胶带封住样品池和出样口,在磁铁下方的检测区拍照记录报告分子试卤灵随时间的变化规律。

[0057] 采用本发明的微尺度磁富集原位检测方法对CEA标准液进行测试,所得结果如图4所示。CEA在0.31pg/mL-76.1pg/mL的浓度范围内与酶催化反应速率即斜率成线性关系,线性回归方程为 $y=0.1108x+0.776$ ($r=0.995$)。无磁富集条件下,CEA检测的线性范围为56.4pg/mL-4566.7pg/mL,对应线性回归方程为 $y=0.0015x+0.8103$ ($r=0.993$)。由此可计算本发明对CEA的检测信号放大约74倍。本发明对CEA的检出限为96.9fg/mL,是商业化Luminex assay试剂盒检出限的1/133。说明了本发明可实现生物标志物的高灵敏检测。

[0058] 采用本发明的微尺度磁富集原位检测方法对分别对六个实际血清样品中的CEA进行测试,所得结果和ELISA标准方法一致。利用三个水平浓度标准品(2.5、25和50pg/mL)进行加标回收率实验,回收率范围为87.1%-108%,RSD范围0.35%-9.7%。

[0059] 实施例3:血清中的前列腺特异抗原的检测

[0060] 本实施例以血清中的前列腺特异抗原(PSA)为目标物,所述微尺度磁富集原位检测方法如下:

[0061] (1) 样品预处理:取血清样品,用PBS进行适当稀释;同时配制一系列不同浓度的PSA标准液。

[0062] (2) 磁性免疫复合物的制备:在干净的0.5mL灭菌离心管中,加入50 μ L标准液或稀释的血清样品和50 μ L捕获抗体标记磁珠,室温下以820rpm的转速培育2h;将离心管置于磁力架上,1min后弃去液体,加入100 μ L洗涤液,静置1min后再次弃去液体,此洗涤操作重复三次;向离心管中加入50 μ L生物素化检测抗体,室温下以820rpm的转速培育1h,洗涤三次;然后加入50 μ L链霉亲和素偶联HRP,再次以820rpm的转速室温下培育30min,洗涤三次。

[0063] (3) 免疫分析测试:向离心管中加入6 μ L 500 μ M H_2O_2 以及6 μ L 50 μ M酶底物Amplex Red,均匀混合,取10 μ L混合物加入微通道一端的样品池中;开启注射泵,采用抽取模式以10 μ L/min的流速将样品引入微通道;进样完毕后,用胶带封住样品池和出样口,在磁铁下方的检测区拍照记录报告分子试卤灵随时间的变化规律。

[0064] 采用本发明的微尺度磁富集原位检测方法对PSA标准液进行测试,所得结果如图5所示。PSA在0.096pg/mL-7.8pg/mL的浓度范围内与酶催化反应速率即斜率成线性关系,线性回归方程为 $y=1.2799x+0.2175$ ($r=0.997$)。无磁富集条件下,PSA检测的线性范围为4.81pg/mL-390.0pg/mL,对应线性回归方程为 $y=0.014x+0.8685$ ($r=0.994$)。由此可计算本发明对PSA检测信号放大约91倍。本发明对PSA的检出限为34.3fg/mL,是商业化Luminex assay试剂盒检出限的1/241,说明了本发明可实现生物标志物的高灵敏检测。

[0065] 采用本发明的微尺度磁富集原位检测方法对分别对六个实际血清样品中的PSA进行测试,所得结果和ELISA标准方法一致。利用三个水平浓度标准品(0.5、2.0和5.0pg/mL)进行加标回收率实验,回收率范围为87.4-112.0%,RSD范围0.46%-8.1%。

[0066] 实施例4:人乳腺癌细胞的检测

[0067] 本实施例以人乳腺癌细胞(MCF-7)为目标物,所述微尺度磁富集原位检测方法如下:

[0068] (1)细胞预处理:体外培养的MCF-7细胞加入胰酶消化后,依次用4%多聚甲醛固定30min,0.2%Triton X-100透膜5min,3% H_2O_2 封闭内源性HRP酶活性20min,用10%的山羊血清封闭30min。

[0069] (2)磁性免疫复合物的制备:在3%BSA封闭的1.5mL灭菌离心管中,加入100 μ L(约 2×10^5 个)MCF-7细胞、50 μ L 1:200稀释的细胞角蛋白(Pan-CK)兔多克隆抗体,混合均匀,4 $^{\circ}$ C反应过夜;37 $^{\circ}$ C复温30min,2090rpm离心8min,弃去上清液,加入500 μ L PBS,混合均匀,静止5min后2090rpm离心8min,弃去上清液;向离心管中加入100 μ L 1:1000稀释的HRP标记的山羊抗兔抗体,混合均匀后,37 $^{\circ}$ C避光反应30min,2090rpm离心8min,弃去上清液,加入500 μ L PBS,混合均匀,静止5min后2090rpm离心8min,弃去上清液;向离心管中加入100 μ L 1:25稀释的抗上皮细胞黏着分子(EpCAM)抗体磁珠(已经含10%山羊血清和3%BSA的PBS溶液封闭过夜),混合均匀后,室温避光反应1h;将离心管置于磁力架上静止15min,弃去上清液,加入450 μ L 0.1%磷酸盐吐温缓冲液洗涤,混合均匀后静止5min,重复洗涤4次;梯度稀释配制不同浓度的磁性免疫复合物样品溶液。

[0070] (3)免疫分析测试:向0.5mL灭菌离心管中加入5 μ L待测MCF-7细胞磁性免疫复合物样品、5 μ L 500 μ M H_2O_2 以及5 μ L 50 μ M酶底物Amplex Red,均匀混合,取10 μ L混合物加入微通道一端的样品池中;开启注射泵,采用抽取模式以10 μ L/min的流速将样品引入微通道;进样完毕后,用胶带封住样品池和出样口,在磁铁下方的检测区拍照记录报告分子试卤灵随时间的变化规律。

[0071] 采用本发明的微尺度磁富集原位检测方法对不同浓度MCF-7细胞进行测试,所得结果如图6所示。MCF-7细胞数在31-500范围内与酶催化反应速率即斜率成线性关系,线性回归方程为 $y=0.00379x+0.0106$ ($r=0.978$)。微通道内无磁富集条件下,MCF-7细胞检测的线性范围为250-4000个,对应线性回归方程为 $y=0.00005x-0.000113$ ($r=0.993$)。96孔板ELISA中,MCF-7细胞检测的线性范围为250-4000个,对应线性回归方程为 $y=0.000035x+0.000539$ ($r=0.994$)。由此可计算在微通道中,本发明对MCF-7细胞检测信号放大约76倍。与传统96孔板中ELISA测试结果相比,本发明对MCF-7细胞检测信号放大约108倍。说明了本发明可实现MCF-7细胞的高灵敏检测。

[0072] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

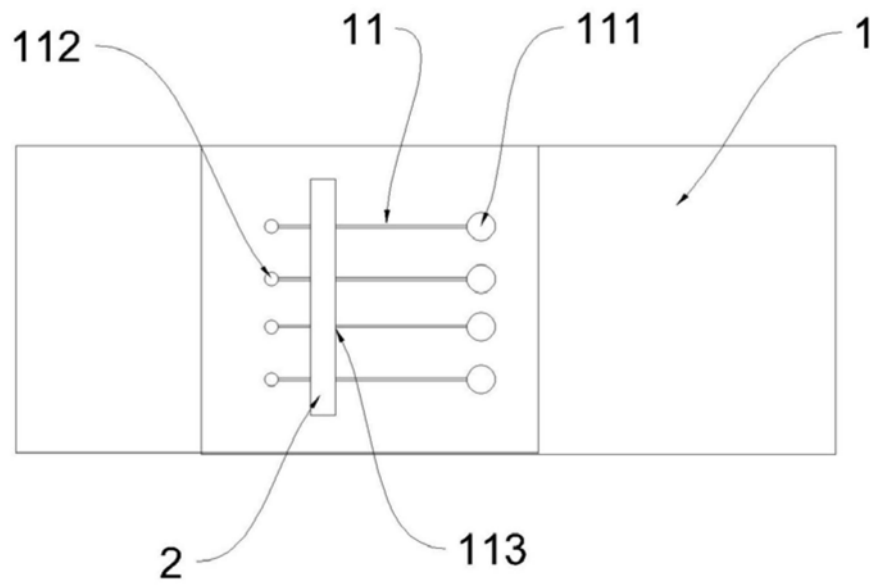


图1

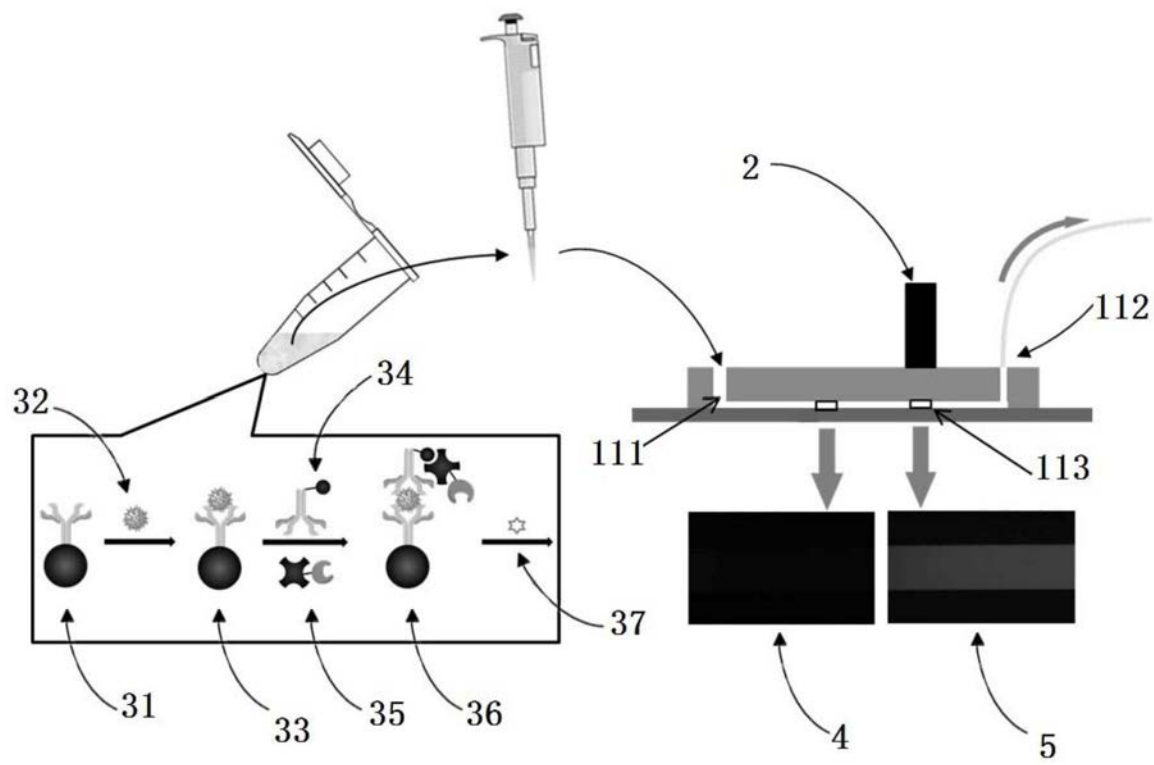


图2

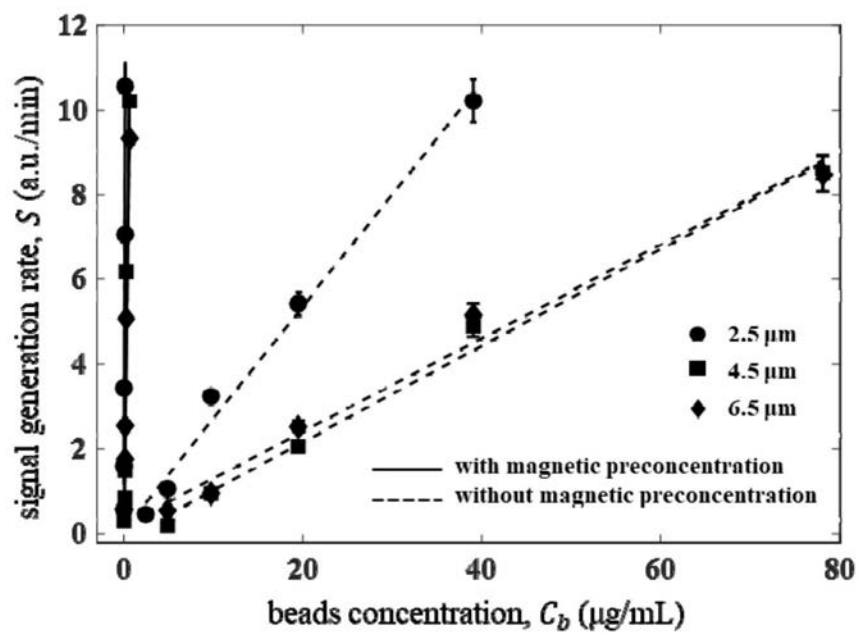


图3

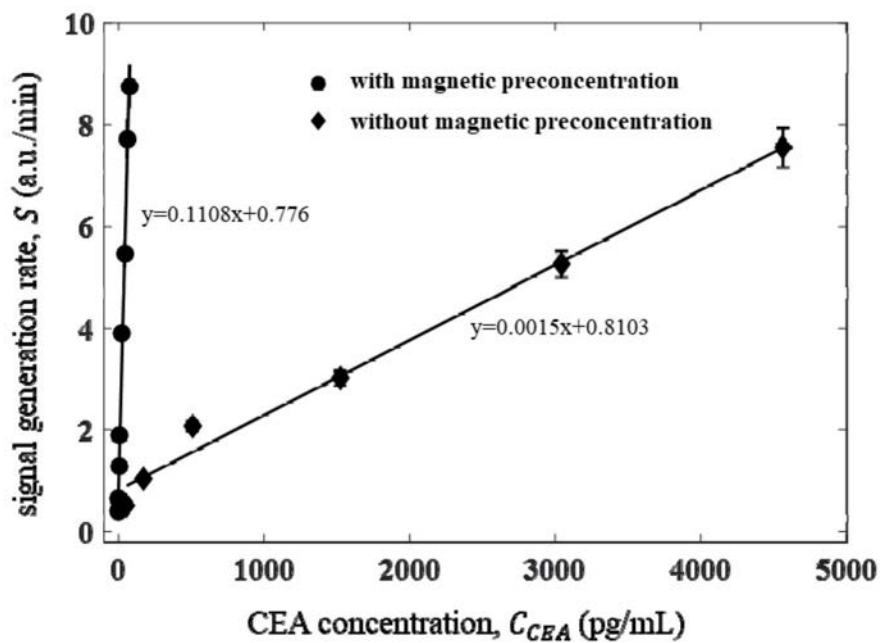


图4

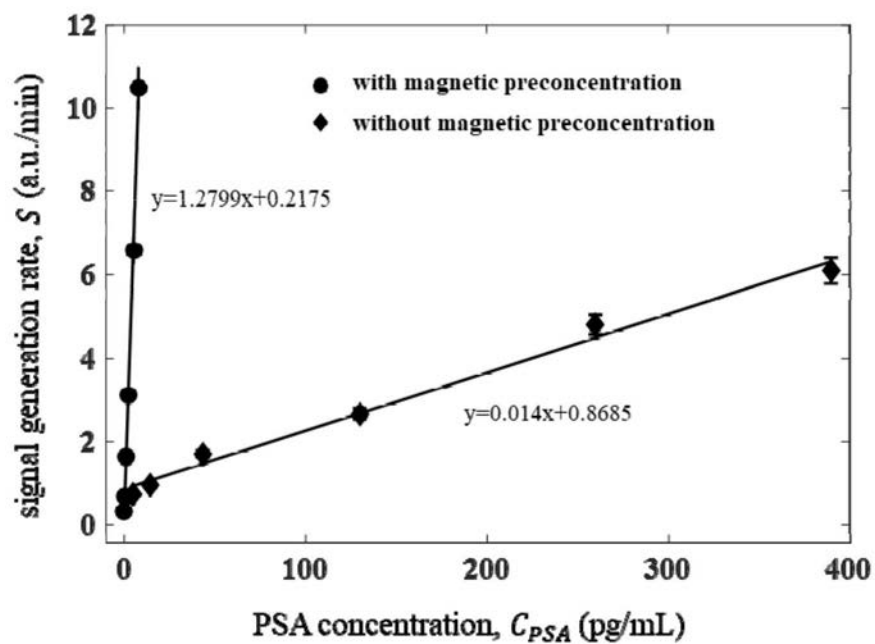


图5

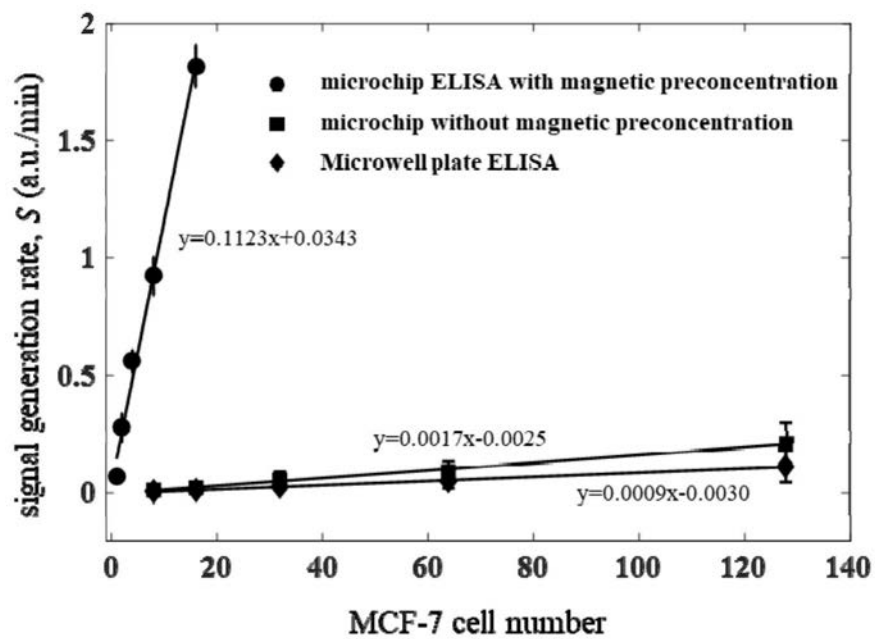


图6

专利名称(译)	一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置及检测方法		
公开(公告)号	CN110031622A	公开(公告)日	2019-07-19
申请号	CN201910371420.3	申请日	2019-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学		
申请(专利权)人(译)	中山大学		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学		
[标]发明人	李攻科 董建伟 杨佳妮 夏凌		
发明人	李攻科 董建伟 杨佳妮 夏凌		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54326		
代理人(译)	卢娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于免疫分析的微尺度磁富集检测装置及其检测方法。所述检测装置，包括微流控芯片，所述微流控芯片包括至少一条微通道，所述微通道包括用于加入磁性免疫复合物与酶底物的样品池、检测区和出样口；所述磁性免疫复合物为生物样品通过特异性免疫反应与磁珠及酶相连形成；还包括磁铁，所述磁铁设置在检测区的上方；本发明还提供一种使用该装置的检测方法。通过本发明的微尺度磁富集原位检测方法，将用于免疫分析的样品富集在微流控通道的检测区中，并利用微尺度下报告分子快速传质的特性，降低目标样品检出限两个数量级以上。

