



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101884941 B

(45) 授权公告日 2012. 08. 22

(21) 申请号 200910247555. 5

(22) 申请日 2009. 12. 30

(73) 专利权人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

(72) 发明人 隋国栋 刘思秀 赵望 刘超
张金玲

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

31200

代理人 陆飞 盛志范

(51) Int. Cl.

B01L 3/00(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2007/0014690 A1, 2007. 01. 18, 说明书第 0042-0120 段和附图 1-22.

CN 1570616 A, 2005. 01. 26, 说明书第 2 页第 2-6 段.

WO 03/034041 A1, 2003. 04. 24, 说明书第 11 页第 13 行至第 20 页第 19 行.

CN 101804367 A, 2010. 08. 18, 实施例 1.

CN 101223101 A, 2008. 07. 16, 实施例 1 和附图 1-27.

审查员 王春晖

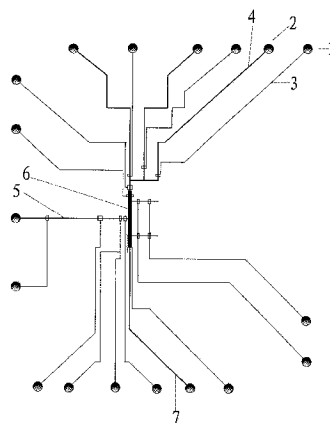
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

基于免疫反应的生物检测微流控芯片及其制备方法

(57) 摘要

本发明属生物分析检测技术领域, 具体为一种基于免疫反应的生物检测微流控芯片及其制备方法。该芯片以光学透明的聚二甲基硅氧烷为材料, 由样品通道层, 阀门控制层及基片层构成。芯片内含样品富集及免疫分析模块, 该模块由一个或几个纳升体积的免疫色谱柱微分析室组成, 每个分析室固定有抗体蛋白或抗原, 实现对多种抗原样品如: 细菌、病毒、各种毒素的快速现场检测。本发明具有快速、高效、便携、低价和易自动化控制的特点, 可完成自动信号采集、远程传输和信号分析, 适合于存在商业化抗体的多种抗原的现场快速检测及大范围内遥控检测。



1. 一种基于免疫反应的生物检测微流控芯片,其特征在于该芯片以光学透明材料为基材,由样品通道层,阀门控制层及基片层构成,其中,样品通道层内含样品富集及免疫分析模块,该样品富集免疫分析模块由一个,或几个并联或串联的纳升体积的免疫色谱柱微分析室组成,每个微分析室通过聚合填料键合固定有抗体蛋白或抗原,以便发生双抗夹心、直接或间接竞争免疫反应;阀门控制层含有气压控制阀门,控制样品通道层相关孔道的开关;其中:

所述的光学透明材料选自无机材料:石英、玻璃,硬质高分子聚合物:聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚苯乙烯、聚丙烯,弹性聚合物:聚二甲基硅氧烷;基片为硅片。

2. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于阀门控制层的阀门通过气压或电子元件控制,其通道直径为1-30 μm 。

3. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于免疫色谱柱为整体柱或聚合填料灌注,聚合填料为硅胶填料。

4. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于免疫分析模块的键合物为二抗或抗原,免疫分析信号由标记的反应物实现,标记物为各种染料或荧光。

5. 如权利要求1所述的微流控芯片的制备方法,其特征在于采用模塑法,具体步骤如下:

(1) 基片准备:将硅片放入 Piranha 溶液去氧化后用氮气吹干,用 SU-82050 系列经旋涂机甩涂,在恒温加热板上软烘;

(2) 曝光和烘焙:将设计好的样品通道层,阀门控制层的硅片模板分别放置在甩涂好的基片上,应用紫外曝光机曝光,之后在加热板上烘焙;

(3) 显影:将硅片放入显影液中显影,之后分别用异丙醇和去离子水清洗干净,并用氮气吹干;

(4) 硬烘:在热板上缓慢加热固定;

(5) 浇注:聚二甲基硅氧烷单体及固化剂按质量配比5:1至20:1混合均匀,分别倒在相应的硅片模具上,在烘箱内固化,剥离;

(6) 键合:将两层聚二甲基硅氧烷芯片校准键合形成微通道腔,再与基片层键合。

6. 如权利要求1所述的微流控芯片的在基于免疫反应的生物检测分析中的应用,其特征在于,样品溶液由所述微流控芯片的进样口进入芯片,芯片微分析室中的抗体蛋白或抗原与样品中的抗原发生特异性免疫反应,免疫分析信号由标记的反应物实现,经过多次洗涤之后,免疫标记信号产生的变化被信号采集模块采集分析;信号采集模块由紫外LED和荧光光敏器件阵列组成,抗体/藻类毒素间的特异性结合导致的光学信号都可被光敏器件阵列采集并传至到微处理器中和数据库相比较,来分析样品所含毒素的浓度。

基于免疫反应的生物检测微流控芯片及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物分析检测技术领域,具体涉及一种用于现场快速生物检测分析的微流控芯片,并提供该芯片的制备方法。

背景技术

[0002] 上世纪 70 年代末和 80 年代初,基于抗原-抗体特异性反应与高灵敏度的标记免疫分析方法得到迅速发展,应用放射免疫分析原理,以酶、荧光染料、发光剂等非放射性示踪物替代放射性元素标记抗原或抗体,出现了一些新的标记免疫分析技术。根据所标记探针与相应检测方式的不同,可分为酶联免疫吸收分析、荧光免疫分析、化学发光免疫分析、电化学免疫分析、胶体金标记免疫分析等。这些新的标记免疫技术克服了放射免疫分析对操作人员的健康危害,因此逐渐取代了传统的放射免疫分析,成为免疫分析的主流。近年来,随着生物传感器技术的发展,免疫分析在临床诊断、环境监测、食品安全、药物分析与微生物检验等领域得到了广泛的应用。

[0003] 酶联免疫分析 (ELISA) 的原理是把抗原或抗体的固相化的同时,也将抗原或抗体用酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性,酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性,又保留酶的活性。在测定时,受检标本(测定其中的抗体或抗原)与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体,也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化成为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高,间接地放大了免疫反应的结果,使测定方法达到很高的敏感度。

[0004] 但是 ELISA 常规免疫分析通常需要数小时甚至一天以上,操作过程复杂,需消耗大量昂贵的免疫试剂。而且检测设备较大,并且经常伴随着非特异性吸附等诸多缺点,难以满足现场检验要求。20 世纪 90 年代发展起来的微流体学科是指操作微小网络通道(5-500 微米)中流体的科学技术。是分子生物学技术、微加工技术、机械制造技术、计算机技术等现代技术的发展与融合。是基于大规模平行处理生物信息分子原理的微型装置,具有信息通量大、自动化、系统化的特点。微流体芯片用于操作,传输微升(10^{-6} L)至毫微微升(10^{-15} L)量级的流体。可将生化反应的若干步骤包括分析、洗涤、检测等集成在一块或几块微流体芯片上,其微通道孔径只有微米级大小,具有浓缩和富集的作用,可以加速反应缩短测试时间,从而大大降低了测试成本。和常规的实验技术相比,该技术极大降低了试剂的消耗量(至少 3 个数量级)、同时分析产生的废液极少。在微小范围内的能量传递、物质分散更快更均匀,热能传导快,也更易实现各种操控,因此反应快、收率高,污染少、成本低。微流控芯片已从分离检测发展为包括复杂试样前处理的高功能全分析系统;从分析工具发展到包括在线检测的微型化学反应与合成手段。在微流控芯片上进行免疫分析,将微流控芯片的分析能力和抗原-抗体反应的特异性相结合,能有效的克服常规免疫分析的缺点,使得

反应效率提高,操作步骤简化,检验时间缩短,样品、试剂和能量消耗大大降低。用于免疫分析的微流控芯片是运用微加工技术建立微米级的免疫反应空间,由于尺寸上的减小,加快了反应动力学过程,使得基于生物大分子扩散控制的免疫反应速度提高几个数量级。微流控芯片多种功能结合与集成化的特点也使微流控芯片上的免疫分析与常规免疫分析相比有很多潜在的优势,因此受到越来越多的关注。

[0005] 新一代的微流体芯片由高分子材料,例如硅酮 polydimethylsiloxane (PDMS),制成(见附图 1),材料造价低廉(少于 10 美金/片),制造周期短(少于 24 小时),所需设备为少数常规设备,不需要大型机密仪器,适合于大规模生产,可用于生产一次性使用产品。同常规方式相比,它的主要特点是:

[0006] 1) 低价,因为使用的试剂的量极其微量,完成测试需要的费用极低;

[0007] 2) 高效,在微流体芯片中反应速度快,传热传质效率高,测试速度快;

[0008] 3) 应用模版技术制造,适用于大规模生产;

[0009] 4) 容易集成,不同目标的测试模块可很方便的集成到一块芯片中,完成多目标并行分析;

[0010] 5) 自动化程度高,它可以很方便和现代电子技术结合,不仅使芯片分析测试自动,而且信号传输以及信号分析也可以自动完成。

[0011] 6) 兼容性好,其他的微分析技术,例如微电极技术,生物传感器技术也可以整合到微流体芯片技术中。

发明内容

[0012] 本发明的目的在于提供一种基于免疫反应原理的专门用于现场快速生物检测分析的微流控芯片。该芯片同现行的检测技术相比具有高效、低价、便携和自动化的特点。

[0013] 本发明提供的基于免疫反应原理的专门用于现场快速生物检测分析的微流控芯片,以光学透明材料为基材,由样品通道层,阀门控制层及基片层构成,其中,样品通道层内含样品富集及免疫分析模块,该样品富集及免疫分析模块由一个,或几个并联或串联的纳升体积的免疫色谱柱微分析室所组成。每个分析室连接有多个进样口和出样口由控制层的气阀,每个分析室通过聚合填料键合固定有抗体蛋白或抗原,能够和样品混合物中的抗原发生特异性免疫反应,免疫分析信号由标记的反应物(抗体或抗原)实现,经过多次洗涤之后,免疫标记信号的产生变化如荧光强度的变化可以被信号采集模块采集分析;信号采集模块由紫外 LED 和荧光光敏器件阵列组成,抗体/藻类毒素间的特异性结合导致的光学信号都可被光敏器件阵列采集并传至到微处理器(计算机)中和数据库相比较,来分析样品所含毒素的浓度。

[0014] 本发明用于现场生物检测分析的免疫微流控芯片的光学透明材料选自无机材料:石英、玻璃,硬质高分子聚合物:聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚对本二甲酸乙二醇酯、聚苯乙烯、聚丙烯,弹性聚合物:聚二甲基硅氧烷;模具材料为硅片。

[0015] 本发明中样品通道层中有免疫色谱柱微分析室。阀门控制层含有气压控制阀门,控制样品通道层相关孔道的开关。阀门控制层的阀门通过气压或电子元件控制,阀门通道的直径为 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ 。

[0016] 本发明微流控芯片的免疫色谱柱微分析室为整体柱或聚合填料灌柱,聚合填料为

硅胶填料或其它有机聚合物。

[0017] 本发明微流控芯片的微分析室中可根据检测目的的不同,灌注已键合不同抗原或抗体的填料。

[0018] 本发明的免疫色谱柱微分析室的个数可由实际情况确定,如样品数及其中各成分的性质差别,在本发明的具体实施中制备了一个单样品的微流控芯片,可根据实际情况将该单通道以不同方式并联、串联。

[0019] 本发明提供的上述微流控芯片的制备方法,具体步骤如下:

[0020] (1) 基片准备:将硅片放入 Piranha 溶液去氧化后用氮气吹干,用 SU-82050 系列经旋涂机甩涂,在恒温加热板上软烘;

[0021] (2) 曝光和烘焙:将设计好的不同硅片模板放置在甩涂好的基片上,应用紫外曝光机曝光,之后在加热板上烘焙;

[0022] (3) 显影:将硅片放入显影液中显影,之后分别用异丙醇和去离子水清洗干净,并用氮气吹干;

[0023] (4) 硬烘:在热板上缓慢加热固定。

[0024] (5) 浇注:PDMS(聚二甲基硅氧烷)单体及固化剂按质量配比 5 : 1 至 20 : 1 混合均匀,倒在硅片模具上,在烘箱内固化,剥离

[0025] (6) 键合:将两层 PDMS 芯片校准键合形成微通道腔。

[0026] 本发明中,先将已键合抗原或抗体的填料灌注到上述免疫微分析室中后,再进行检测。

[0027] 整个测试系统控制硬件部分主要由控制部分(计算机),操作系统(集成化微流体芯片,数控界面)和数据采集,数据分析部分(计算机)。软件系统主要包括 LABVIEW 程序(控制)和 ImagePro 程序(数据分析)。

附图说明

[0028] 图 1 基于免疫反应原理的现场快速生物检测分析微流控芯片设计图

[0029] 图 2 基于免疫反应原理的现场快速生物检测分析微流控芯片具体实施示意图

[0030] 图中标号:1 气阀气体入口,2 样品入口,3 气阀气体通道,4 样品通道,5 填料进/出口,6 微分析室,7 样品出口。

具体实施方式

[0031] 1. 基片准备。将硅片放入 Piranha 溶液(98%浓硫酸:30%双氧水=7:3)煮沸清洗 15min。用去离子水冲洗 5 遍后用氮气吹干,并在 200℃烘焙 30min。

[0032] 2. 甩涂。将 Microchem 公司的 SU-8 胶(下同)倒在硅片中央,用手握住硅片边缘使之倾斜并缓慢旋转,使 SU-8 覆盖住硅片大部分区域。静置 15min,使 SU-8 初步平坦化,同时消除掉倾倒过程中产生的气泡。用旋涂机(Spin-Coater KW-4A,Chemat Technology, Inc.)进行两次递进式甩涂:500 转/min 旋涂 15s,3000 转/min 旋涂 30s,使胶分布较为均匀,静置 10min 缓解边缘突起效应。

[0033] 3. 软烘。软烘的目的是使 SU-8 光刻胶中的溶剂挥发,工艺控制的关键是使溶剂挥发以可控的速率进行。在热板上以 5℃/min 的速率逐步升到 95℃,期间在 65℃和 95℃分

别保持 3min 和 6min。之后以 0.5℃ /min 的速率缓慢降至室温。

[0034] 4. 曝光。采用接触式曝光机（波长 365nm），这是因为 SU-8 胶在 365nm 的紫外光波段吸收少，可以获得很好的曝光一致。

[0035] 5. 曝光后烘焙（PEB, post exposure bake）。再热板上以 5℃ /min 的速率由室温逐步升到 95℃，期间在 65℃ 和 95℃ 分别保持 1min 和 5min。之后以 0.5℃ /min 的速率缓慢降至室温。

[0036] 6. 显影在通风橱中进行，显影液的主要成分是丙二醇甲醚醋酸酯（PGMEA）。在 SU-8 模具与显影液分别静置达到室温后，将模具放入显影液中显影 6min，之后分别用异丙醇和去离子水清洗干净，并用氮气吹干。

[0037] 7. 硬烘。在热板上缓慢加热到 200℃，保持 30min，再缓慢降至室温。

[0038] 8. 浇注聚二甲基硅氧烷（PDMS）聚合物成型。将把采用光刻法制作的微通道 PDMS 印章分别用丙酮、无水乙醇分别超声 5min，清除通道印章上的水分，把清洗好的印章 60℃ 烘箱烘烤 4h。PDMS 单体与固化剂按照 5 : 1 的质量配比混合均匀，除净气泡。倒在经三甲基氯硅烷处理过的 SU-8 模具上，在调整好的水平热板上 65℃ 保持 2h 固化。形成上层具有反应微通道层的基片。

[0039] 9. 具有控制通道的 PDMS 层制作。在硅片上甩涂光刻胶，经紫外曝光、显影，制成硅基光阳模，并于 120℃ 退火 30min，使光刻胶软化，阳模突起部分锐利的边角变得光滑。硅基光胶阳模用三甲基氯硅烷在气相中处理 7min，使其表面硅烷化，以防止在注塑过程中 PDMS 的粘附。并且具有控制通道的 PDMS 层单体与固化剂的比例为 20 : 1，相对较软。在甩胶机上 2000 转 /min 甩涂 35s。形成下层具有控制阀门通道的基片。

[0040] 10. 键合及接口制作。将上层基片打孔，在接缝附近用环氧胶密封。下层基片打孔用于控制通道。上下两片仔细对合，80℃ 过夜固化。再最后将具有控制通道的一面用乙醇淋洗后，与玻璃盖片热键和。即制成了 PDMS 芯片。

[0041] 11. 若免疫微分析室色谱柱为聚合物材料填充柱，可经图 1 三个进样通道中任一个将聚合物材料填料灌注装柱，闭合柱底阀门，控制阀门气压不超过 20psi，同时控制装柱速度，待填料装满后进缓冲液平衡色谱柱，包被二抗或抗原，实际样品溶液、特异性抗体及标记竞争物经图一中任一进样孔进入色谱柱，温育 10-20 分钟，进洗涤缓冲液洗去过量的抗体及标记竞争物，加入显色缓冲液显色，抗体 / 抗原间的特异性结合导致的光学信号都可被信号采集模块的光敏器件阵列采集并传至到微处理器（计算机）中和数据库相比较，来分析样品所含抗原的浓度。整个测试系统控制硬件部分主要由控制部分（计算机），操作系统（集成化微流体芯片，数控界面）和数据采集，数据分析部分（计算机）。软件系统主要包括 LABVIEW 程序（控制）和 ImagePro 程序（数据分析）如图 2 所示。

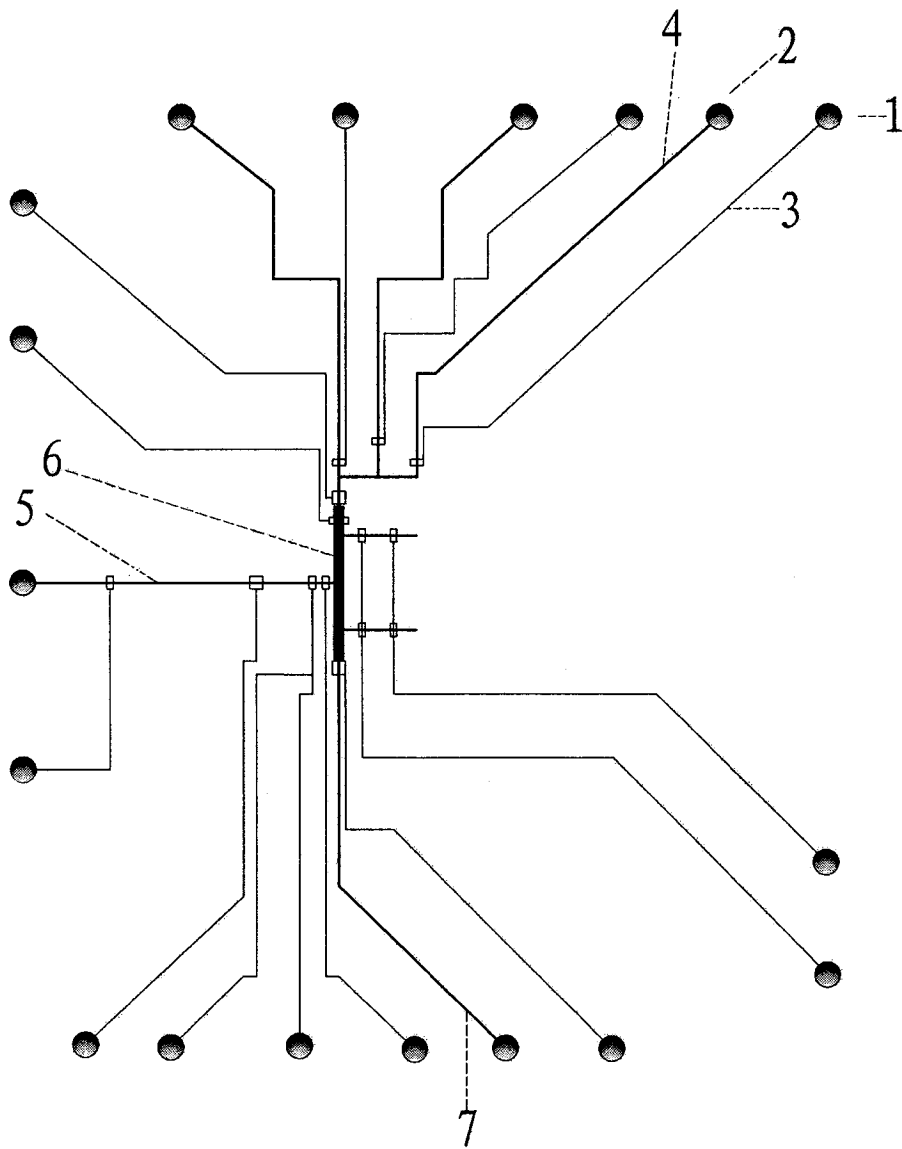


图 1

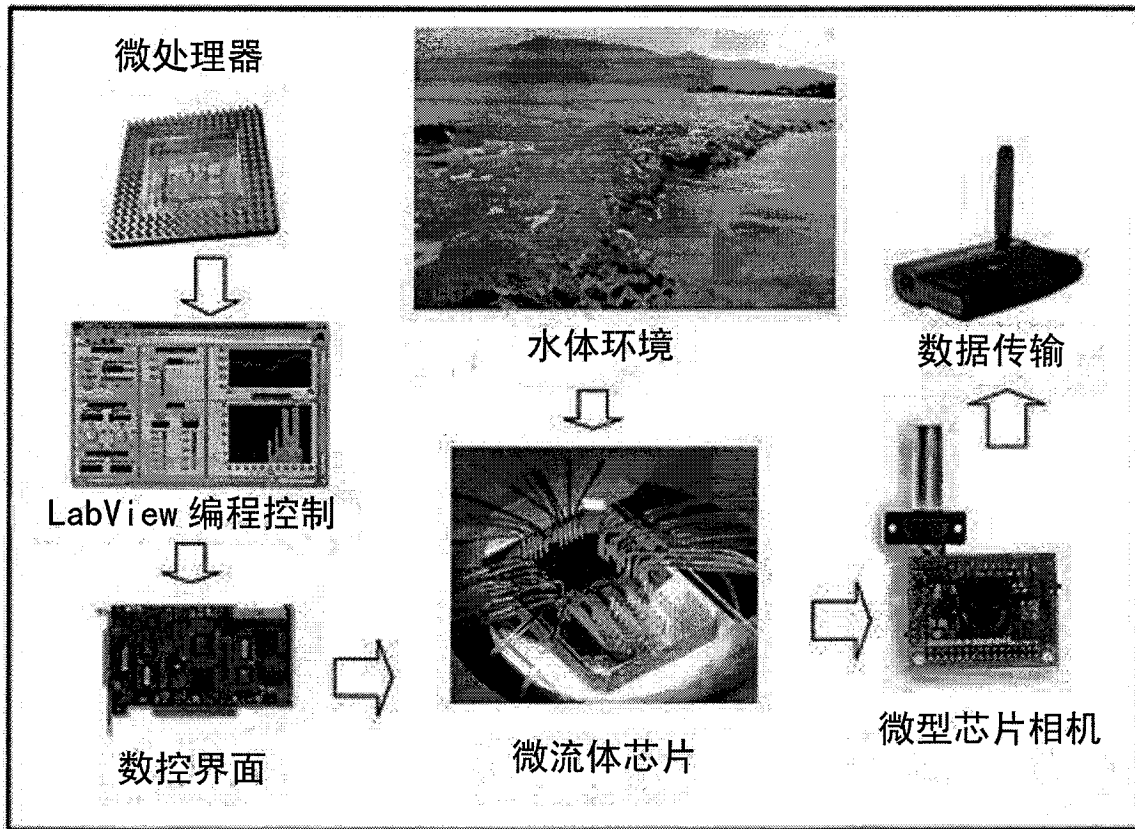


图 2

专利名称(译)	基于免疫反应的生物检测微流控芯片及其制备方法		
公开(公告)号	CN101884941B	公开(公告)日	2012-08-22
申请号	CN200910247555.5	申请日	2009-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	隋国栋 刘思秀 赵望 刘超 张金玲		
发明人	隋国栋 刘思秀 赵望 刘超 张金玲		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/53		
代理人(译)	陆飞		
审查员(译)	王春晖		
其他公开文献	CN101884941A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属生物分析检测技术领域，具体为一种基于免疫反应的生物检测微流控芯片及其制备方法。该芯片以光学透明的聚二甲基硅氧烷为材料，由样品通道层，阀门控制层及基片层构成。芯片内含样品富集及免疫分析模块，该模块由一个或几个纳升体积的免疫色谱柱微分析室组成，每个分析室固定有抗体蛋白或抗原，实现对多种抗原样品如：细菌、病毒、各种毒素的快速现场检测。本发明具有快速、高效、便携、低价和易自动化控制的特点，可完成自动信号采集、远程传输和信号分析，适合于存在商业化抗体的多种抗原的现场快速检测及大范围内遥控检测。

