



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105334325 A

(43) 申请公布日 2016.02.17

(21) 申请号 201510770178.9

(22) 申请日 2015.11.12

(71) 申请人 国家纳米科学中心

地址 100080 北京市海淀区中关村北一条
11号

(72) 发明人 蒋兴宇 陈翊平 吴景

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002

代理人 王文君

(51) Int. Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图6页

(54) 发明名称

基于生物素和链霉亲和素系统的微流控免疫
芯片分析方法

(57) 摘要

本发明提供一种基于生物素和链霉亲和素系统的微流控免疫芯片分析方法,包括如下步骤:
(1) 取第一张微流控芯片与基底密封,将包被物质通入通道中包被,去掉第一张芯片;(2) 取第二张微流控芯片与基底密封,通入待测物,孵育后用缓冲液进行冲洗;(3) 通入以生物素或链霉亲和素标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体;(4) 通入链霉亲和素或生物素标记的HRP,孵育后用缓冲液进行冲洗;(5) 去掉第二张微流控芯片,向反应区域加入HRP催化发光的化学反应液,以化学发光仪读取数据。本发明的免疫分析方法具有灵敏度高、信号读出方式简单、检测线性范围宽、分析速度快、检测成本低、可以实现高通量检测等优势。

1. 一种基于生物素和链霉亲和素系统的微流控免疫芯片分析方法,其特征在于,其包括如下步骤:

(1) 取第一张微流控芯片与基底密封,使通道 I 的表面与基底紧密贴合,将包被物质通入通道 I 中以包被在基底上,包被完成后去掉第一张微流控芯片;

(2) 取第二张微流控芯片与基底密封,使通道 II 的表面与基底紧密贴合且通道 II 的排布方向与通道 I 的方向垂直,向通道 II 中通入待测物,孵育后用缓冲液进行冲洗;

(3) 向通道 II 中通入以生物素或链霉亲和素标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体;

(4) 向通道 II 中通入链霉亲和素或生物素标记的 HRP,孵育后用缓冲液进行冲洗;

(5) 去掉第二张微流控芯片,向反应区域加入 HRP 催化发光的化学反应液,以化学发光仪读取数据;

其中,所述通道 I 为第一张微流控芯片的通道,所述通道 II 为第二张微流控芯片的通道;

当待测物为完全抗原时,所述包被物质为能够与所述完全抗原对应结合且与所述二抗具有不同抗原结合位点的抗体,当待测物为抗体时,所述包被物质为与所述抗体对应的完全抗原或与所述抗体对应的由半抗原分子与蛋白质载体偶联形成的人工抗原;

当步骤 (3) 中加入以生物素标记的二抗时,则步骤 (4) 中加入以链霉亲和素标记的 HRP;当步骤 (3) 中加入以链霉亲和素标记的二抗时,则步骤 (4) 中加入以生物素标记的 HRP。

2. 根据权利要求 1 所述的微流控免疫芯片分析方法,其特征在于,所述的基底为固相反应基底;所述基底的材质选自聚苯乙烯、聚二甲基硅氧烷和聚甲基丙烯酸甲酯,更佳地为聚苯乙烯。

3. 根据权利要求 1 所述的微流控免疫芯片分析方法,其特征在于,步骤 (2) 中,所述孵育为将反应体系置于 4 ~ 40℃放置 0.5 ~ 12 小时。

4. 根据权利要求 1 所述的微流控免疫芯片分析方法,其特征在于,步骤 (2) 中,所述缓冲液为 PBS 缓冲液,更优选含有 1%吐温 -20 的 PBS 缓冲液,所述千分比指体积千分比。

5. 根据权利要求 1 所述的微流控免疫芯片分析方法,其特征在于,步骤 (3) 中,所述孵育为将反应体系置于 4 ~ 40℃放置 0.5 ~ 12 小时。

6. 根据权利要求 1 所述的微流控免疫芯片分析方法,其特征在于,步骤 (3) 中,所述缓冲液为 PBS 缓冲液,更优选含有 1%吐温 -20 的 PBS 缓冲液,所述千分比指体积千分比。

7. 根据权利要求 1 所述的微流控免疫芯片分析方法,其特征在于,步骤 (4) 中,所述孵育为将反应体系置于 4 ~ 40℃放置 0.5 ~ 12 小时。

8. 根据权利要求 1 所述的微流控免疫芯片分析方法,其特征在于,步骤 (4) 中,所述缓冲液为 PBS 缓冲液,更优选含有 1%吐温 -20 的 PBS 缓冲液,所述千分比指体积千分比。

9. 根据权利要求 1 所述的微流控免疫芯片分析方法,其特征在于,所述的 HRP 催化发光的化学反应液为鲁米诺试剂。

10. 权利要求 1 ~ 9 任一项所述的微流控免疫芯片分析方法在免疫检测领域的应用。

基于生物素和链霉亲和素系统的微流控免疫芯片分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,具体涉及一种基于生物素和链霉亲和素信号放大系统的微流控免疫芯片分析方法及其应用。

背景技术

[0002] 构建高灵敏分析方法一直是分析化学领域追求的目标之一。高灵敏分析方法推动了分析化学的发展及其在临床诊断、环境监测、食品安全、生物成像等领域的应用。在重大传染病、细菌或病毒感染、癌症等疾病的早期诊断以及食品和环境痕量有毒物质的筛查中,高灵敏分析方法尤为重要。以抗体-抗原特异性识别为基础的免疫生物标记分析方法是一种将生物标记技术的高灵敏性和免疫反应的高度特异性结合在一起的分析方法,具有灵敏度高、特异性好、分析快速等优点。酶联免疫是其中的代表,该方法具有特异性强、重复性好、操作简单、成本低、易于商品化和自动化等优点。但传统的酶联免疫分析方法一般都是基于免疫标记酶和底物之间的一次酶促信号放大,其灵敏度只能达到 ng/mL。同时,酶联免疫分析方法反应时间长,劳动强度大。在需要高灵敏度、临床快速诊断的分析领域,传统的酶联免疫分析方法很难满足需要,因此,如何实现简单便捷快速的高灵敏免疫分析仍是分析化学领域的重要挑战之一。

[0003] 近年来,毒品的泛滥给世界各国人民的生命财产构成重大的威胁,因此世界各国对禁毒工作十分重视,而毒品的检测对于打击毒品犯罪、抑制毒品流行具有重要的意义,并且可以为执法工作人员提供直接的证据。然而,由于毒品的种类及数量逐渐增加,这对于毒品检测鉴定提出了更高的要求。国内对于毒品及代谢物的快速分析,一类主要利用进口的免疫检测试剂盒,该方法不需要复杂的样品前处理,简单、快速,可很方便的进行筛选和现场分析,但是此方法的缺点是干扰因素多,经常出现假阳性,并且只能定性筛检使用,并不能确定尿液中毒品的含量,所以在作出阳性结论之前应用更精确更特异的方法确证。另一类国内比较传统的定量分析毒品的的方法是借助于色谱类检测方法,例如气-质联用法(GC/MS)、液相色谱法(HPLC)、液-质联用法(LC-MS)等,此类方法的灵敏度较高,能给出较为准确的数据信息,对毒品可以进行定量分析,但是尿液样本需要经过前处理、萃取、衍生化等复杂过程,并且需要大型仪器以及专业人员进行检测,检测周期较长,不适合现场、快速的检测。

[0004] 作为细菌感染早期发病专属性的生物标志物,降钙素原(procalcitonin, PCT)近年来已经在临床诊断中得到了广泛的关注和应用。降钙素原在正常人血清中的含量很低($< 0.05\text{ng/mL}$),当细菌、寄生虫感染以及脓毒症和多脏器功能衰竭时,PCT在血清中的含量会升高,其含量可以反映出机体被细菌等感染的程度,并且大量研究结果表明PCT含量变化对细菌感染的敏感度和响应速度优于传统的炎症生物标记物(如超敏C-反应蛋白),因此,快速、高灵敏地分析血清中的PCT含量对细菌感染早期诊断和合理使用抗生素具有十分重要的意义。目前检测血清中降钙素原的方法主要有酶联免疫分析方法、胶体金免疫层析试纸条、化学发光免疫分析方法、放射性免疫分析方法等。胶体金免疫层析试纸条具有

快速,简单,成本低等优点,但该方法最大的缺点是灵敏度低。传统的酶联免疫分析方法具有操作相对简单,检测成本比较低等优点,但灵敏度相对偏低,反应时间较长,难以检测到血清中痕量的PCT,因此很难实现早期诊断。化学发光免疫分析方法的灵敏度比传统的酶联免疫分析方法提高了1-2个数量级,其灵敏度达到0.01ng/mL-0.1ng/mL水平,目前此方法已经得到了广泛的应用,但对于早期感染或者患者自身血清中的超痕量PCT,该方法的灵敏度还有待提高。放射免疫分析方法灵敏度高,可以满足超痕量PCT检测的需要,但是该方法具有放射性污染,操作过程复杂,检测时间也比较长(8-16h),限制了该方法在PCT检测中的应用。

[0005] 微流控芯片技术是近年来发展起来的一种微型反应操作技术,该检测方法通过某种材质加工成的微型管道芯片,制备成微型的反应区域,最突出的优点是使用的样本量及试剂量非常少,并可实现高通量,多样本同时检测,检测的时间比传统微孔板方法大大缩短,是一种非常适合快速现场检测的技术平台。然而,微流控免疫芯片并没有从本质上解决传统酶联免疫分析灵敏度低的问题。

[0006] 综上所述,本领域很有必要研究开发检测灵敏度更高、检测更为方便、适合于快速现场检测的免疫检测分析新技术。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对目前的免疫分析方法在检测灵敏度、分析速度和信号读出方式等方面不能满足实际应用需求的情况,而提供一种基于生物素和链霉亲和素系统的微流控免疫芯片分析方法及其应用。本发明的免疫分析方法具有灵敏度高、信号读出方式简单、检测线性范围宽、分析速度快、检测成本低、可以实现高通量检测等优势。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供下述技术方案。

[0009] 本发明提供的技术方案之一是:一种基于生物素和链霉亲和素系统的微流控免疫芯片分析方法,其包括如下步骤:

[0010] (1) 取第一张微流控芯片与基底密封,使通道I的表面与基底紧密贴合,将包被物质通入通道I中以包被在基底上,包被完成后去掉第一张微流控芯片;

[0011] (2) 取第二张微流控芯片与基底密封,使通道II的表面与基底紧密贴合且通道II的排布方向与通道I的方向垂直,向通道II中通入待测物,孵育后用缓冲液进行冲洗;

[0012] (3) 向通道II中通入以生物素或链霉亲和素标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体;

[0013] (4) 向通道II中通入链霉亲和素或生物素标记的HRP,孵育后用缓冲液进行冲洗;

[0014] (5) 去掉第二张微流控芯片,向反应区域加入HRP催化发光的化学反应液,以化学发光仪读取数据;

[0015] 其中,所述通道I为第一张微流控芯片的通道,所述通道II为第二张微流控芯片的通道;

[0016] 当待测物为完全抗原时,所述包被物质为能够与所述完全抗原对应结合且与所述二抗具有不同抗原结合位点的抗体,当待测物为抗体时,所述包被物质为与所述抗体对应的完全抗原或与所述抗体对应的由半抗原分子与蛋白质载体偶联形成的人工抗原;

[0017] 当步骤 (3) 中加入以生物素标记的二抗时,则步骤 (4) 中加入以链霉亲和素标记的 HRP ;当步骤 (3) 中加入以链霉亲和素标记的二抗时,则步骤 (4) 中加入以生物素标记的 HRP。

[0018] 本发明中,步骤 (1) 为取第一张微流控芯片与基底密封,使通道 I 的表面与基底紧密贴合,将包被物质通入通道 I 中以包被在基底上,包被完成后去掉第一张微流控芯片。

[0019] 所述的微流控芯片为本领域常规,普通市售的微流控芯片均适用于本发明,其一般都具有多个并列的通道,可以用于同时检测多个样本或者多个指标。

[0020] 所述的基底为本领域常规所指,一般指固相反应基底。所述基底的材质为本领域常规,较佳地选自聚苯乙烯、聚二甲基硅氧烷和聚甲基丙烯酸甲酯,更佳地为聚苯乙烯。

[0021] 如本领域常规,所述的包被物质为捕获物质,一般是抗体,如果是半抗原分子,则将半抗原分子与蛋白质载体偶联后再进行包被。所述的包被物质能够特异性结合步骤 (2) 中所述的待测物。

[0022] 所述的将包被物质通入通道 I 中以包被在基底上是本领域的常规操作,即将包被物质包被于基底上之后,于合适温度孵育一段时间(如室温下 30min),以使包被物质牢固吸附于基底即可。

[0023] 本发明中,步骤 (2) 为取第二张微流控芯片与基底密封,使通道 II 的表面与基底紧密贴合且通道 II 的排布方向与通道 I 的方向垂直,向通道 II 中通入待测物,孵育后用缓冲液进行冲洗。

[0024] 其中,所述待测物为待检测的物质,其为完全抗原、抗体或半抗原分子,其与步骤 (1) 中所述的包被物质能够发生特异性的结合。当待测物为抗体时,其来源没有特别限制,如可以是将步骤 (1) 中所述的包被物质免疫各类哺乳动物而获得的抗体,如鼠抗或兔抗,其类型也没有特殊要求,既可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。

[0025] 所述孵育是本领域的常规操作,一般是将反应体系置于合适的温度条件下放置数小时,待通道中的物质牢固吸附于基底即可。优选地,所述孵育为将反应体系置于 4 ~ 40℃ 放置 0.5 ~ 2 小时。

[0026] 所述缓冲液为本领域常规,各类在免疫检测领域用于冲洗过量包被物质的缓冲液均适用于本发明,具体可以视不同的检测反应体系而进行选择。优选地,所述缓冲液为 PBS 缓冲液,更优选含有 1%吐温 -20 的 PBS 缓冲液,所述千分比指体积千分比。

[0027] 本发明中,步骤 (3) 为向通道 II 中通入以生物素或链霉亲和素标记的二抗,孵育后用缓冲液进行冲洗,所述二抗为抗待测物的抗体。

[0028] 所述二抗为抗待测物的抗体。所述二抗的来源没有特别限制,如可以是将步骤 (2) 中所述的待测物免疫各类哺乳动物而获得的抗体,如羊抗、马抗等,其类型也没有特殊要求,既可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。

[0029] 所述孵育同步步骤 (2),其是本领域的常规操作,一般是将反应体系置于合适的温度条件下放置数小时,待通道中的物质牢固吸附于基底即可。优选地,所述孵育为将反应体系置于 4 ~ 40℃ 放置 0.5 ~ 12 小时。

[0030] 所述缓冲液同步步骤 (2),其为本领域常规,各类在免疫检测领域用于冲洗过量包被物质的缓冲液均适用于本发明,具体可以视不同的检测反应体系而进行选择。优选地,所述缓冲液为 PBS 缓冲液,更优选含有 1%吐温 -20 的 PBS 缓冲液,所述千分比指体积千分比。

[0031] 本发明中,步骤(4)为向通道 II 中通入链霉亲和素或生物素标记的 HRP,孵育后用缓冲液进行冲洗。

[0032] 所述的 HRP 指辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)。

[0033] 所述孵育同步步骤(2),其是本领域的常规操作,一般是将反应体系置于合适的温度条件下放置数小时,待通道中的物质牢固吸附于基底即可。优选地,所述孵育为将反应体系置于 4 ~ 40℃放置 0.5 ~ 2 小时。

[0034] 所述缓冲液同步步骤(2),其为本领域常规,各类在免疫检测领域用于冲洗过量包被物质的缓冲液均适用于本发明,具体可以视不同的检测反应体系而进行选择。优选地,所述缓冲液为 PBS 缓冲液,更优选含有 1%吐温-20 的 PBS 缓冲液,所述千分比指体积千分比。

[0035] 本发明中,步骤(5)为去掉第二张微流控芯片,向反应区域加入 HRP 催化发光的化学反应液,以化学发光仪读取数据。

[0036] 本发明的分析方法的原理示意图如图 1 所示。图 1 中,①、②、③和④依次表示通入微流控芯片管道中的物质。

[0037] 所述的 HRP 催化发光的化学反应液为本领域常规,较佳地是鲁米诺试剂。

[0038] 本发明提供的技术方案之二是:前述方法在免疫检测领域的应用。

[0039] 本发明的应用范围很广,比如可以用于尿液中毒品小分子和血清中肺炎支原体、降钙素原等的检测。

[0040] 利用双抗夹心法原理将本发明的方法用于特异性地对降钙素原进行检测的反应机理如下:首先,通过包被降钙素原捕获抗体,将抗体固定在微流控反应基底上,然后含有降钙素原的溶液与基质上的捕获抗体进行反应,接下来生物素连接的标记抗体与基质上的抗原抗体混合物进行反应从而形成捕获“抗体-抗原-标记抗体”双抗夹心形式,最后链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶会与基质上形成的双抗夹心复合物进行反应,因此标记在基质上的酶的量随着待检物浓度的增加而增加,从而酶催化的化学发光值也随之升高,根据待检物的浓度与化学发光值之间的关系可以建立相应的检测标准曲线,从而可以对降钙素原进行定量检测。

[0041] 本发明还可同时对多种物质建立高通量快速现场检测,如可以对人体尿液中的可卡因、吗啡和甲基安非他命同时进行检测,其原理示意图如图 2 所示。

[0042] 必须说明的是,上述应用可能涉及医学领域所指的疾病诊断和治疗,也可能涉及非疾病的诊断和治疗的情况,比如检测环境中的微生物、检测食品中有害物质的含量等,本发明对应的权利要求仅限于非疾病的诊断和治疗方法的范围,涉及疾病的诊断和治疗方法的技术方案不在本发明所请求保护的范围内。

[0043] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0044] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0045] 本发明的积极进步效果在于:

[0046] 相比传统的免疫分析方法,本发明的基于生物素和链霉亲和素系统的微流控免疫芯片分析方法具有如下优势:

[0047] 本发明利用生物素与 HRP 酶标记的链霉亲和素分子高特异性的结合,使大量酶分子积聚于抗原-抗体复合物周围,使每个抗体携带的酶分子显著增加,并且与高灵敏度的

化学发光法结合起来,可以大大提高检测的灵敏度。同时微流控芯片具有样本量少,多样本、多指标可同时定量检测,特异性强,灵敏度高,价格低廉,读取结果可量化、快捷和直观等优势,操作简便,不需要复杂的仪器设备和专业操作人员,适用于现场、快速检测。因此,本发明将为小分子和生物大分子的检测提供一个有力的工具。

附图说明

- [0048] 图 1 为本发明的分析方法的原理示意图。
- [0049] 图 2 为应用本发明的分析方法同时检测可卡因、吗啡和甲基安非他命的原理示意图。
- [0050] 图 3 为实施例 2 中反映可卡因浓度的标准曲线。
- [0051] 图 4 为实施例 3 中反映吗啡浓度的标准曲线。
- [0052] 图 5 为实施例 4 中反映甲基安非他命浓度的标准曲线。
- [0053] 图 6 为实施例 5 中同时检测可卡因、甲基安非他命和吗啡的反应芯片的结果图。
- [0054] 图 7 为实施例 5 中反映可卡因浓度的标准曲线。
- [0055] 图 8 为实施例 5 中反映甲基安非他命浓度的标准曲线。
- [0056] 图 9 为实施例 5 中反映吗啡浓度的标准曲线。
- [0057] 图 10 为实施例 6 中降钙素原的浓度曲线。

具体实施方式

[0058] 以下实施例用于说明本发明,但并不用来限制本发明的范围。除特殊说明的之外,各实施例中所用的设备和试剂均常规市售可得。

[0059] 各实施例中,部分材料和试剂的来源如下:

[0060] 可卡因、吗啡和甲基安非他命以及它们对应的完全抗原和抗体来自北京沫之东生物科技有限公司;

[0061] Streptavidin 标记的 HRP 偶联物:购自美国 Abcam 公司;

[0062] Sulfo-NHS-LC-Biotinylation:ThermoFisher Scientific 公司;

[0063] 牛血清白蛋白:北京索莱宝生物技术有限公司;

[0064] PS 基底:Corning;

[0065] PDMS 芯片基质、固化剂:道康宁;

[0066] 高温干燥箱:上海一恒科技有限公司;

[0067] PBS:北京化工有限公司;

[0068] 化学发光液:milipore;

[0069] 化学发光仪:国家纳米科学中心研制;

[0070] 涡旋振荡器:IKA 公司。

[0071] 实施例 1 吗啡、可卡因以及甲基安非他命抗体生物素化

[0072] 将 3 种抗体通过 10Kd 的超滤管进行超滤纯化,然后溶于 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲液中,按照抗体与生物素摩尔比 1:20 混合,在涡旋振荡器上震荡反应 1h,然后通过 10Kd 的超滤管进行超滤将过量的生物素进行分离,10000r,10min,随后加入 400uL PBS 进行清洗、离心 3 次,最后将生物素化的抗体保存于 -20℃。

[0073] 实施例 2 可卡因的检测

[0074] 本发明所述微流控检测芯片在可卡因检测中的应用。

[0075] 所述微流控芯片检测可卡因的操作步骤如下：

[0076] (1) 可卡因抗原原液稀释, 包被: 取 1 μL 可卡因抗原加入 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中, 稀释至最佳包被浓度, 混匀; 取一张多通道芯片与基底密封; 将稀释后的蛋白溶液由加样孔通入三条管道中, 室温, 包被 30min。

[0077] (2) 封闭: 用 PBS 缓冲液配置 3% 的 BSA 封闭液。揭去第一片芯片, 风干后, 贴上第二片芯片, 使第二片芯片上的管道与第一片芯片的管道放置方向垂直, 密封; 然后用移液器向管道均通入 20 μL BSA 封闭液, 室温 30min; 将封闭完毕的 BSA 取出。

[0078] (3) 不同浓度待检液与生物素化的抗体的制备及混合: 取 1 μL 可卡因抗体加入 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中, 稀释至最佳反应浓度; 将可卡因用 PBS 缓冲液稀释成不同浓度梯度的样品; 取 10 μL 的生物素化抗体稀释液与 10 μL 不同浓度的可卡因检测溶液混合, 室温反应 20min。

[0079] (4) 混合液与固相抗原竞争反应: 将步骤 (3) 中已经反应完毕的可卡因与其抗体的混合液, 通入芯片管道中, 15 μL / 通道, 室温反应 30min 后, 吸出, 使用洗涤液洗涤 3 次; 则未与可卡因反应的可卡因抗体会与基质上包被的抗原发生免疫反应。

[0080] (5) 基于链霉亲和素 -HRP 偶联物的信号放大过程: 取 1 μL 链霉亲和素 -HRP 酶用 PBS 稀释 200 倍; 向每个管道中通入 20 μL 稀释液, 室温反应 30min 后抽出反应液, 洗液洗涤 4-5 次。

[0081] (6) 信号读出: 揭掉上层芯片, 先芯片表面反应区域加入商品化的化学发光液, 放入化学发光仪中, 使用分析软件进行数据分析。

[0082] (7) 标准曲线建立: 以可卡因稀释浓度取 \lg 对数为横坐标, 空白对照与样品的化学发光值之差为纵坐标建立标准曲线, 结果如图 3 所示。

[0083] 实施例 3 吗啡的检测

[0084] 本发明所述微流控检测芯片在吗啡检测中的应用。

[0085] 所述微流控芯片检测吗啡的操作步骤如下：

[0086] (1) 吗啡抗原原液稀释, 包被: 取 1 μL 吗啡抗原加入 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中, 稀释至最佳包被浓度, 混匀; 取一张多通道芯片与基底密封; 将稀释后的蛋白溶液由加样孔通入三条管道中, 室温, 包被 30min。

[0087] (2) 封闭: 用 PBS 缓冲液配置 3% 的 BSA 封闭液。揭去第一片芯片, 风干后, 贴上第二片芯片, 使第二片芯片上的管道与第一片芯片的管道放置方向垂直, 密封; 然后用移液器向管道均通入 20 μL BSA 封闭液, 室温 30min; 将封闭完毕的 BSA 取出。

[0088] (3) 不同浓度待检液与生物素化抗体的制备及混合: 取 1 μL 生物素化吗啡抗体加入 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中, 稀释至最佳反应浓度; 将吗啡用 PBS 缓冲液稀释成不同浓度梯度的样品; 取 10 μL 的抗体稀释液与 10 μL 不同浓度的吗啡检测溶液混合, 室温反应 20min。

[0089] (4) 混合液与固相抗原竞争反应: 将步骤 (3) 中已经反应完毕的吗啡与其抗体的混合液, 通入芯片管道中, 15 μL / 通道, 室温反应 30min 后, 吸出, 使用洗涤液洗涤 3 次; 则未与吗啡反应的抗体会与基质上包被的抗原发生免疫反应。

[0090] (5) 基于链霉亲和素-HRP 偶联物的信号放大过程：取 1 μL 链霉亲和素-HRP 酶用 PBS 稀释 200 倍；向每个管道中通入 20 μL 稀释液，室温反应 30min 后抽出反应液，洗液洗涤 4-5 次。

[0091] (6) 信号读出：揭掉上层芯片，先芯片表面反应区域加入商品化的化学发光液，放入化学发光仪中，使用分析软件进行数据分析。

[0092] (7) 标准曲线建立：以吗啡稀释浓度取 1g 对数为横坐标，空白对照与样品的化学发光值之差为纵坐标建立标准曲线，结果如图 4 所示。

[0093] 实施例 4 甲基安非他命的检测

[0094] 本发明所述微流控检测芯片在甲基安非他命检测中的应用。

[0095] 所述微流控芯片检测甲基安非他命的操作步骤如下：

[0096] (1) 甲基安非他命抗原原液稀释，包被：取 1 μL 甲基安非他命抗原加入 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中，稀释至最佳包被浓度，混匀；取一张多通道芯片与基底密封；将稀释后的蛋白溶液由加样孔通入三条管道中，室温，包被 30min。

[0097] (2) 封闭：用 PBS 缓冲液配置 3% 的 BSA 封闭液。揭去第一片芯片，风干后，贴上第二片芯片，使第二片芯片上的管道与第一片芯片的管道放置方向垂直，密封；然后用移液器向管道均通入 20 μL BSA 封闭液，室温 30min；将封闭完毕的 BSA 取出。

[0098] (3) 不同浓度待检液与生物素化的抗体的制备及混合：取 1 μL 吗啡抗体加入 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中，稀释至最佳反应浓度；将甲基安非他命用 PBS 缓冲液稀释成不同浓度梯度的样品；取 10 μL 的抗体稀释液与 10 μL 不同浓度的甲基安非他命检测溶液混合，室温反应 20min。

[0099] (4) 混合液与固相抗原竞争反应：将步骤 (3) 中已经反应完毕的甲基安非他命与其抗体的混合液，通入芯片管道中，15 μL /通道，室温反应 30min 后，吸出，使用洗涤液洗涤 3 次；则未与甲基安非他命反应的抗体会与基质上包被的抗原发生免疫反应。

[0100] (5) 基于链霉亲和素-HRP 偶联物的信号放大过程：取 1 μL 链霉亲和素-HRP 酶用 PBS 稀释 200 倍；向每个管道中通入 20 μL 稀释液，室温反应 30min 后抽出反应液，洗液洗涤 4-5 次。

[0101] (6) 信号读出：揭掉上层芯片，先芯片表面反应区域加入商品化的化学发光液，放入化学发光仪中，使用分析软件进行数据分析。

[0102] (7) 标准曲线建立：以甲基安非他命稀释浓度取 1g 对数为横坐标，空白对照与样品的化学发光值之差为纵坐标建立标准曲线，结果如图 5 所示。

[0103] 实施例 5 同时检测可卡因、吗啡和甲基安非他命

[0104] 同时检测尿液中可卡因、吗啡和甲基安非他命的制备方法具体步骤如下：

[0105] (1) 可卡因、吗啡和甲基安非他命三种抗原的包被：取一张多通道芯片与基底密封：

[0106] 取 1 μL 可卡因抗原原液加入 PBS (PH7.2-7.4) 缓冲溶液中，稀释至最佳包被浓度，混匀；取 1 μL 吗啡抗原原液加入 PBS (PH7.2-7.4) 缓冲溶液中，稀释至最佳包被浓度，混匀；取 1 μL 甲基安非他命抗原原液加入 PBS (PH7.2-7.4) 缓冲溶液中，稀释至最佳包被浓度，混匀；将稀释后的三种抗原溶液各通入两条不同的管道中；室温，包被 30min。

[0107] (2) 封闭：用 PBS 缓冲液配置 3% 的 BSA 封闭液。揭去第一片芯片，风干后，贴上第

二、三、四片芯片,使这三片芯片上的管道与第一片芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向管道均通入 20 μ L BSA 封闭液,室温 30min。

[0108] (3) 三种生物素化抗体分别于三种毒品溶液的制备及反应:不同浓度的可卡因溶液与定量的吗啡和甲基安非他命溶液混合配制成溶液 1,不同浓度的吗啡溶液与定量的可卡因和甲基安非他命溶液混合配制成溶液 2,不同浓度的甲基安非他命溶液与定量的吗啡和可卡因溶液混合配制成溶液 3;取 1 μ L 生物素化可卡因抗体加入 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳反应浓度,取 1 μ L 生物素化的吗啡抗体加入 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳反应浓度,取 1 μ L 甲基安非他命抗体加入 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳反应浓度;取稀释好的生物素化可卡因抗体溶液 10 μ L 与 10 μ L 不同浓度的溶液 1 混匀,室温反应 20min,取稀释好的生物素化的吗啡抗体溶液 10 μ L 与 10 μ L 不同浓度的溶液 2 混匀,室温反应 20min,取稀释好的生物素化甲基安非他命抗体溶液 10 μ L 与 10 μ L 不同浓度的溶液 3 混匀,室温反应 20min。

[0109] (4) 固相抗原与剩余抗体反应:将封闭完毕的 BSA 取出,加入 (3) 中已经反应完毕的三种混合液,室温反应 30min。

[0110] (5) 基于链霉亲和素-HRP 偶联物的信号放大过程:取 1 μ L 链霉亲和素-HRP 酶用 PBS 稀释 200 倍;将 (4) 中反应后的液体移出,洗液洗涤 3 次,然后向每个管道中通入 20 μ L 稀释液,室温反应 30min 后抽出反应液,洗液洗涤 4-5 次。

[0111] (6) 信号读出:揭掉上层芯片,先芯片表面反应区域加入商品化的化学发光液,放入化学发光仪中,使用分析软件进行数据分析。

[0112] (7) 标准曲线建立:以可卡因、吗啡和甲基安非他命稀释浓度取 1g 对数为横坐标,空白对照与样品的化学发光值之差为纵坐标建立标准曲线,结果如图 6、图 7、图 8 和图 9 所示。其中,图 6 为反应芯片的结果图。图 7 为可卡因的标准曲线,图 8 为甲基安非他命的标准曲线,图 9 为吗啡的标准曲线。

[0113] 实施例 6 检测降钙素原

[0114] 双抗夹心法检测降钙素原,具体步骤如下:

[0115] (1) 降钙素原捕获抗体 (PCT-M7402) 原液稀释包被:取 1 μ L 捕获抗体加入 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中,稀释至最佳包被浓度,混匀;取一张多通道芯片与基底密封;将稀释后的蛋白溶液由加样孔通入三条管道中,室温,包被 30min。

[0116] (2) 封闭:用 PBS 缓冲液配置 3% 的 BSA 封闭液。揭去第一片芯片,风干后,贴上第二片芯片,使第二片芯片上的管道与第一片芯片的管道放置方向垂直,密封;然后用移液器向管道均通入 20 μ L BSA 封闭液,室温 30min;将封闭完毕的 BSA 取出。

[0117] (3) 不同浓度待检液的制备:取 1 μ L 降钙素原加入到 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲溶液中稀释成不同浓度梯度的样品,然后将待测样品通入芯片管道中,15 μ L/ 通道,室温反应 30min,吸出,使用洗涤液洗涤 3 次。

[0118] (4) 生物素化的标记抗体 (PCT-M7413) 的制备及反应:取 1 μ L 的生物素化抗体加入到 PBS (pH7.2-7.4) 缓冲液中,稀释至最佳反应浓度,然后将稀释液加入到管道中,室温反应 30min,吸出, PBST 清洗 3 次。

[0119] (5) 基于链霉亲和素-HRP 偶联物的信号放大过程:取 1 μ L 链霉亲和素-HRP 偶联物用 PBS 稀释 200 倍;向每个管道中通入 20 μ L 稀释液,室温反应 30min 后抽出反应液,洗

液洗涤 4-5 次。

[0120] (6) 信号读出 : 揭掉上层芯片, 先芯片表面反应区域加入商品化的化学发光液, 放入化学发光仪中, 使用分析软件进行数据分析。

[0121] (7) 化学发光值 - 浓度曲线 : 以降钙素原稀释浓度取 Lg 对数为横坐标, 样品的化学发光值纵坐标建立浓度曲线, 具体结果如图 7 所示。

[0122] 虽然, 上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验, 对本发明作了详尽的描述, 但在本发明的基础上, 可以对之作一些修改或改进, 这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此, 在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进, 均属于本发明要求保护的范畴。

- ④ 链霉亲和素-HRP
- ③ 生物素抗体与不同浓度的毒品小分子
- ② BSA

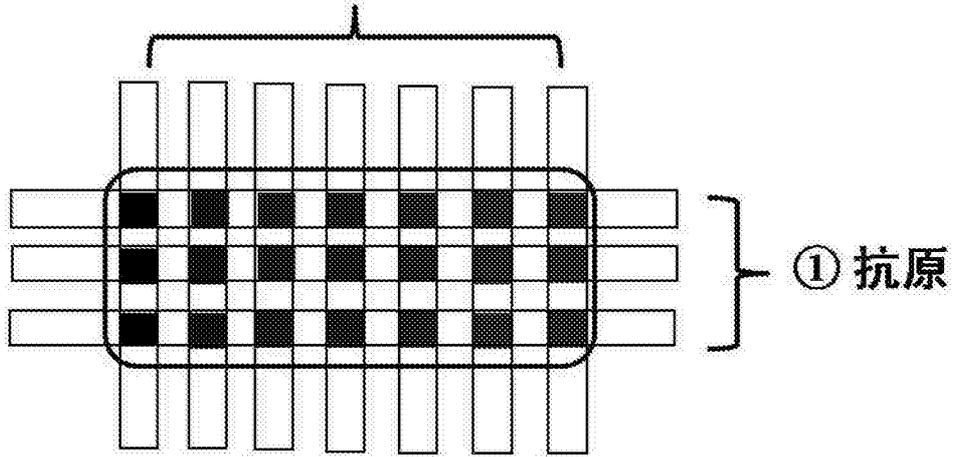


图 1

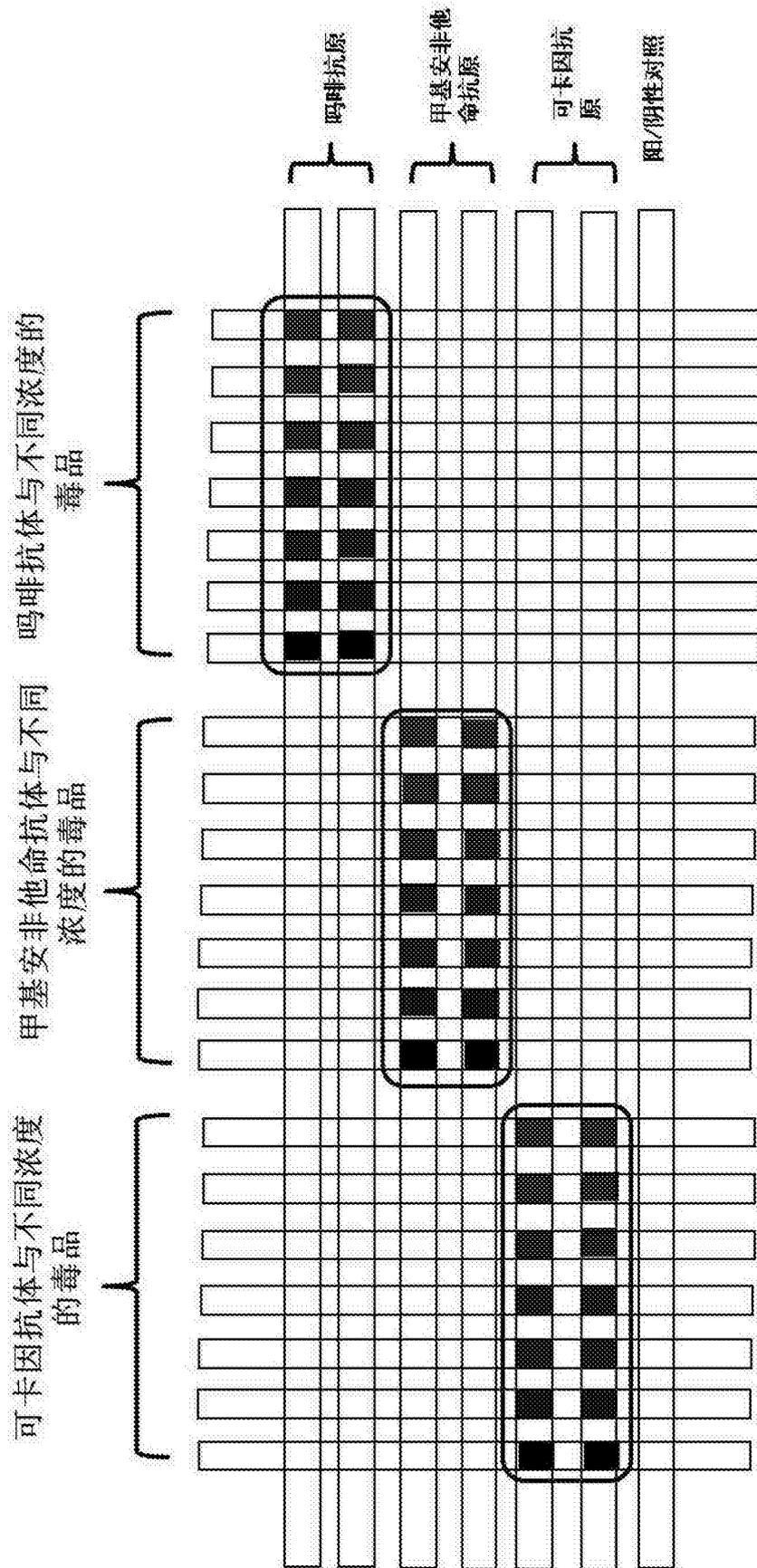


图 2

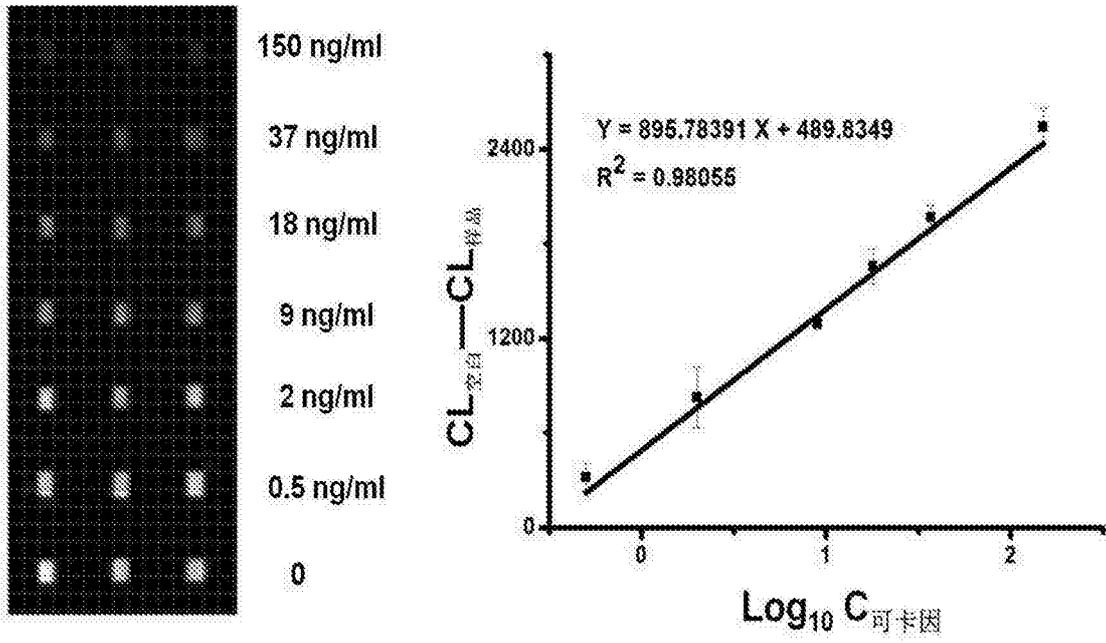


图 3

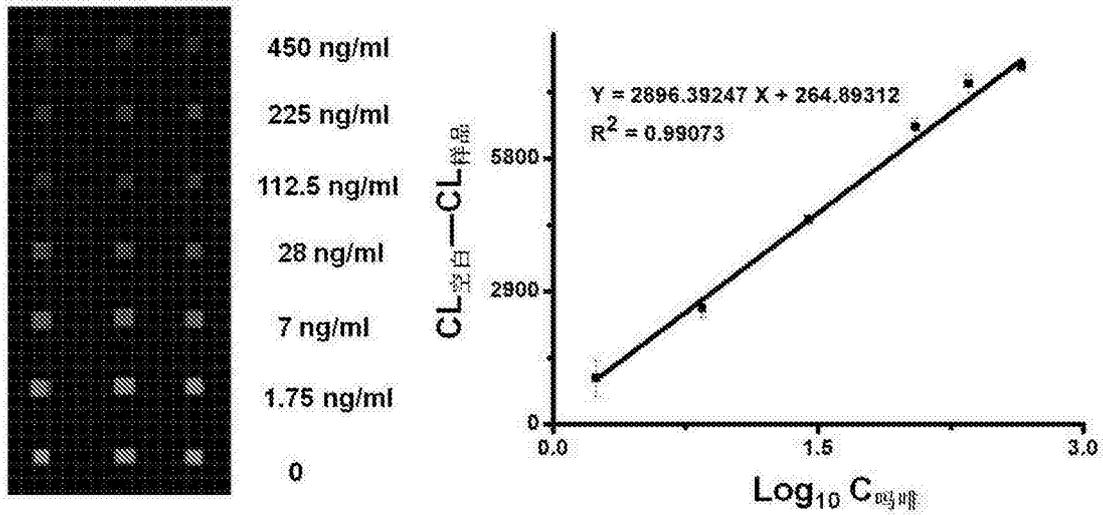


图 4

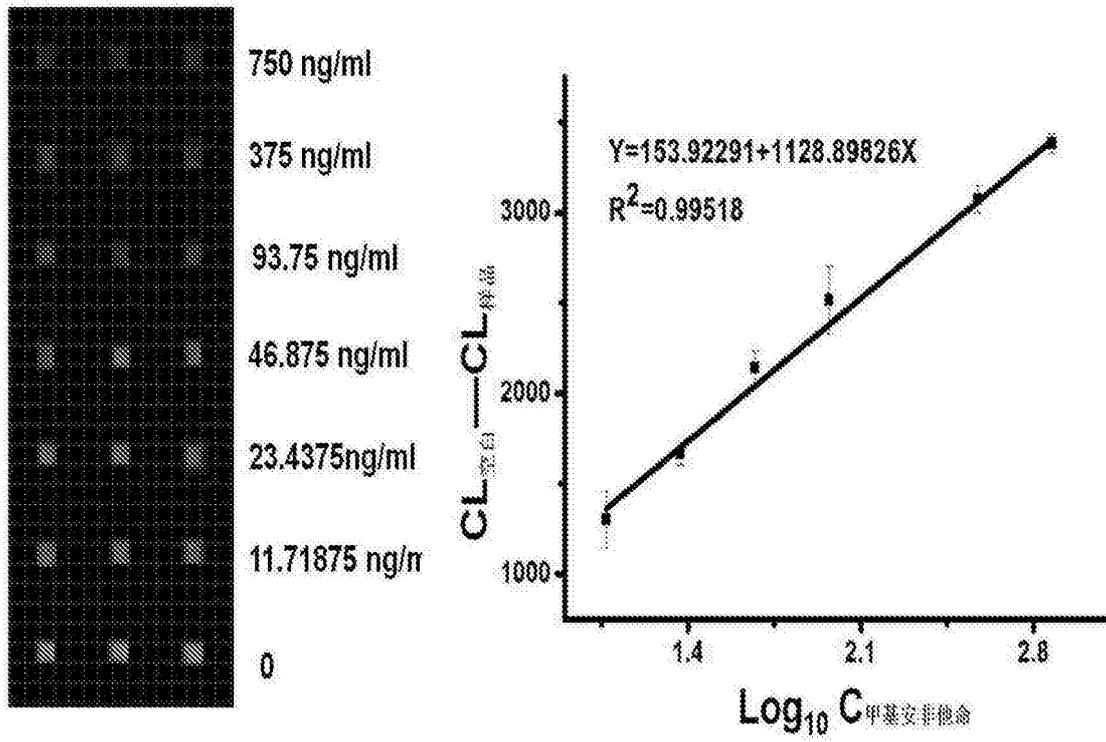


图 5

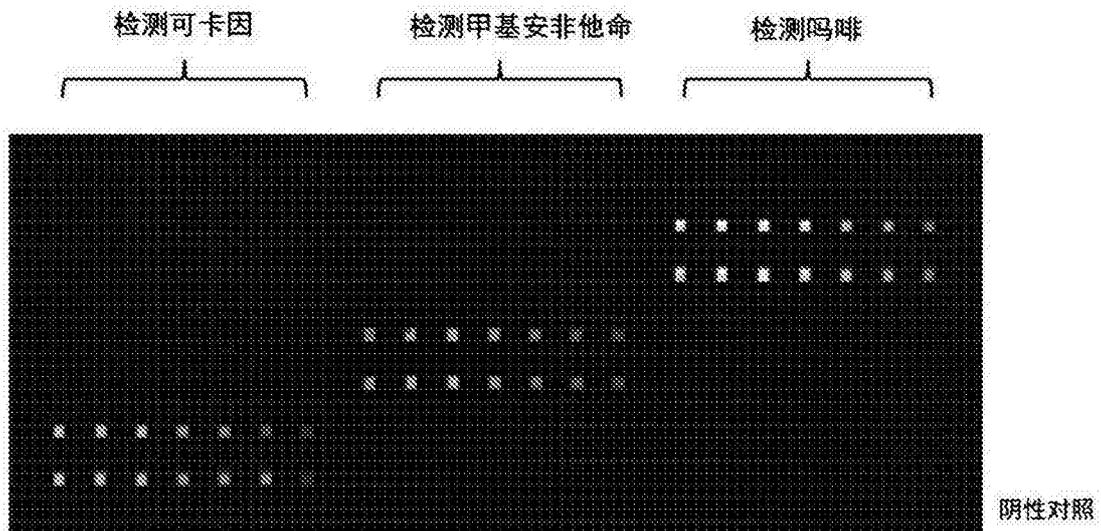


图 6

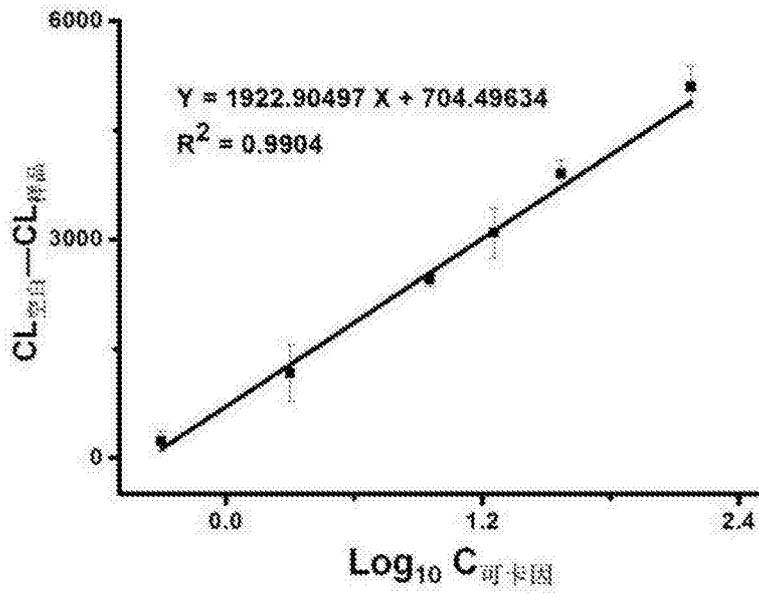


图 7

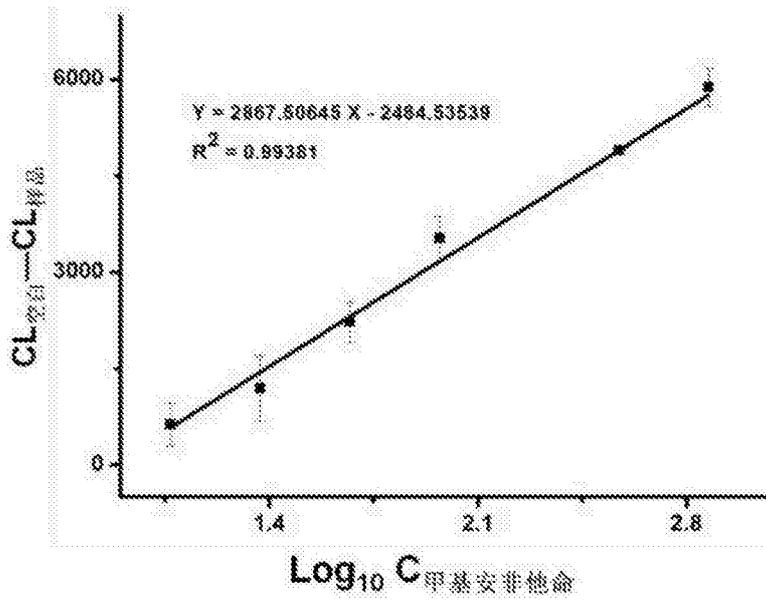


图 8

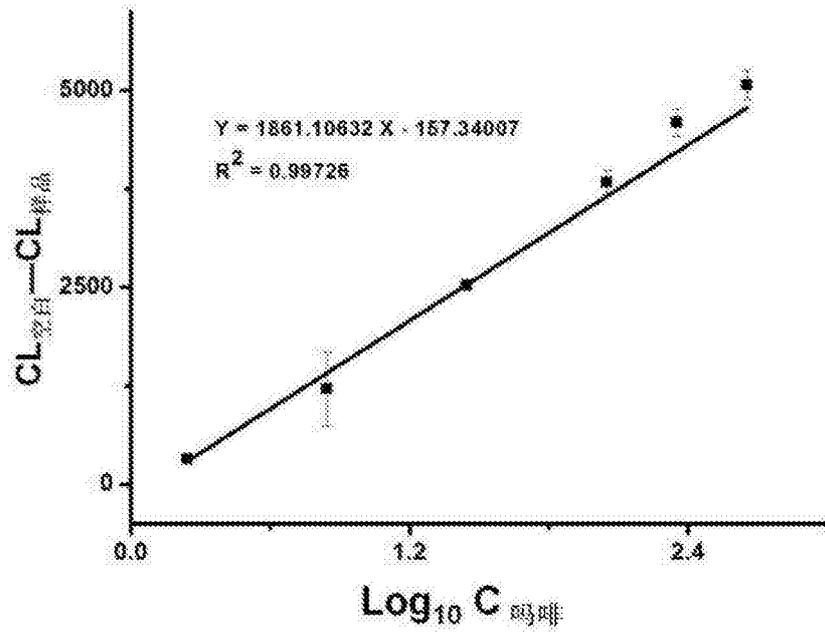


图 9

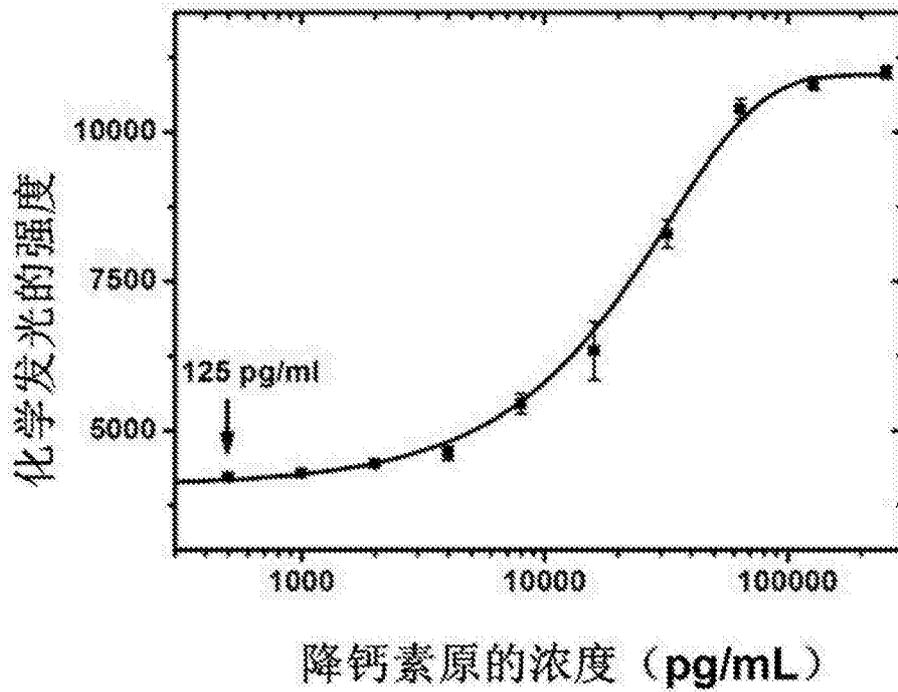


图 10

专利名称(译)	基于生物素和链霉亲和素系统的微流控免疫芯片分析方法		
公开(公告)号	CN105334325A	公开(公告)日	2016-02-17
申请号	CN201510770178.9	申请日	2015-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
[标]发明人	蒋兴宇 陈翊平 吴景		
发明人	蒋兴宇 陈翊平 吴景		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/536 G01N33/53 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/536 G01N21/763 G01N33/5302 G01N33/581		
代理人(译)	王文君		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于生物素和链霉亲和素系统的微流控免疫芯片分析方法，包括如下步骤：(1)取第一张微流控芯片与基底密封，将包被物质通入通道中包被，去掉第一张芯片；(2)取第二张微流控芯片与基底密封，通入待测物，孵育后用缓冲液进行冲洗；(3)通入以生物素或链霉亲和素标记的二抗，孵育后用缓冲液进行冲洗，所述二抗为抗待测物的抗体；(4)通入链霉亲和素或生物素标记的HRP，孵育后用缓冲液进行冲洗；(5)去掉第二张微流控芯片，向反应区域加入HRP催化发光的化学反应液，以化学发光仪读取数据。本发明的免疫分析方法具有灵敏度高、信号读出方式简单、检测线性范围宽、分析速度快、检测成本低、可以实现高通量检测等优势。

