



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103033608 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 10

(21) 申请号 201110305409. 0

(22) 申请日 2011. 10. 10

(71) 申请人 中山大学

地址 510275 广东省广州市新港西路 135 号

(72) 发明人 成志毅 侯风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 21/33 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

B01L 3/00 (2006. 01)

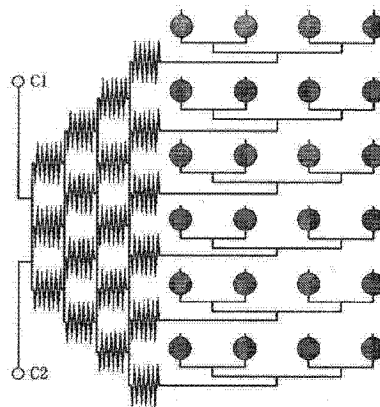
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种用于免疫分析研究的集成化微流控芯片及其应用

(57) 摘要

一种用于免疫分析研究的集成化微流控芯片, 芯片主要由浓度梯度生成单元、等量分配单元和直径为 5. 8mm, 深 100 μ 的微孔反应室矩阵构成, 容积小而比表面积大; 该微孔矩阵的排列与传统的多孔板一致, 可应用在标准的酶标仪上进行分析数据的检测和采集。本发明创新性地将免疫分析操作中抗体、抗原、酶的吸附和固定; 样品不同浓度溶液的配制; 换液、洗涤等操作全部集成在一块芯片上按流程自动化完成, 能显著降低试剂的消耗, 缩短分析时间, 提高效率。与传统的多孔板技术相比, 本发明省去了配制样品溶液、洗涤等繁冗的手工操作, 在检测方法上又与标准的酶标仪兼容。



1. 一种用于免疫分析研究的集成化微流控芯片及其应用,其特征在于:芯片主要由三个功能单元构成,

第一个功能单元为迂回的折线通道组合,这种迂回的折线通道从左至右(或从右至左)逐层分支增加一个,交错排列,作为浓度梯度生成单元;

第二个功能单元由逐层对称增加分支通道组成,作为等量分配单元,每个通道组的上游与第一功能单元的一条分支相连,下游与第三功能单元中的反应室相通;

第三个功能单元由直径为 5.8mm,深 100 的微孔矩阵构成,容积非常小,却提供了较大的有效面积,作为免疫分析之需的抗体、抗原和酶的吸附固定场所和分析检测窗口。

2. 权利要求 1 所述用于免疫分析研究的集成化微流控芯片,其特征在于:第一单元中其最左端(或最右端)设有 2 个入口,试剂、酶和药物等由此入口进入芯片,迂回折线通道增扩至 6 个出口,每条出口与第二单元中的逐层对称增加分支通道组相连;

第二单元中每组逐层对称增加分支通道增扩 4 个出口分别与第三单元中的 4 个反应室相通,该单元中包含 6 组共 24 条出口;

第三单元中共包含 24 个微孔矩阵,排列与传统的多孔板一致,整块集成化微流控芯片的尺寸与标准的酶标仪兼容。

3. 一种用于免疫分析研究的集成化微流控芯片的应用,其特征在于:所有的试剂、抗体、抗原、酶、底物、药物及洗涤液等依次由注射泵经微流控芯片上的输入口注入芯片,只须配制两个最高和最低浓度的样品溶液经输入口注入,可生成所需的不同浓度的样品溶液输出给下一个功能单元;

将这些不同浓度的样品溶液再等量地分配给第三功能单元中同一排的反应室;6 组等量分配通道总共在第三单元中同时自动地形成 24 个样品溶液矩阵;

流入反应室的抗体被吸附滞留,随后抗原、酶依次流入反应室,与其上的抗体相互作用,将酶固定,完成酶的固定化后,底物与药物的混合溶液被注入反应室,再孵育一定时间,待酶催化的反应完成或达到平衡后,拆除芯片上的连接接头及管线;

将芯片装入标准的酶标仪上,检测各反应室的紫外-可见光吸光度或荧光发射强度,采集分析数据。

一种用于免疫分析研究的集成化微流控芯片及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析技术,具体涉及包含一种用于免疫分析研究的集成化微流控芯片及其应用。

背景技术

[0002] 免疫分析方法具有极高的选择性和灵敏度,可广泛用于临床诊断、蛋白质组学、药物研究、生物学研究、环境分析等领域。常规的免疫分析分为均相免疫分析与非均相免疫分析,而酶联免疫吸附试验(ELISA)是最常见的应用最广泛的非均相免疫分析,并且都是在96微孔板中进行。作通常包含包被抗体、抗原,反复洗涤、甩干,封闭、标记抗体,孵育反应等多项操作。传统的ELISA步骤繁琐,且多为手工操作,需要消耗大量昂贵的免疫试剂,分析时间较长,通常需要数小时。

[0003] 微流控芯片,指的是把化学和生物等领域中所涉基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米(甚至更小)的芯片上,由微通道形成网络,以可控流体贯穿整个系统,用以取代常规化学或生物实验室的各种功能。1990年后发展起来的微流控分析技术在微米级结构中操控纳升至皮升体积流体,可执行样品预处理、分离与检测等步骤,具有体积小、比表面积大、反应时间短、分析速度快、试剂和样品用量少、易集成化和自动化等优点。因此,将微流控分析技术与免疫分析结合,可在一定程度上克服传统免疫分析的缺点,近几年来已引起研究者的广泛关注。基于微流控芯片的免疫分析大大改善了常规免疫分析的性能,具体包括:(1)易于集成化,便携化;(2)操作简便,自动化程度高;(3)免疫反应在微通道中进行,由于其体积小,比表面积大,缩短了反应时间,提高了分析效率;(4)大大节约了昂贵的免疫试剂用量。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种用于免疫分析研究的集成化微流控芯片及其应用。本发明集成了样品溶液的分配、浓度梯度的生成、抗体和抗原的包被封闭、酶的吸附固定、冲洗、孵育反应等单元操作,通过连接微量注射泵自动运行,完成操作后可置于普通酶标仪上检测读取数据。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 一种用于免疫分析研究的集成化微流控芯片,芯片主要由三个功能单元构成,其上设置输入输出小孔,在其上装置可拆卸的连接接头,通过细管线与微量注射泵和废液回收池相接。整块集成化微流控芯片的尺寸与标准的多孔板相同(集成化微流控芯片的结构见图1,其功能模块如图2所示)。

[0007] 第一个功能单元为迂回的折线通道组合,这种迂回的折线通道从左至右(或从右至左)逐层分支增加一个,交错排列,作为浓度梯度生成单元;在其最左端(或最右端)设有2个入口,试剂、酶和药物等由此入口进入芯片;迂回的折线通道增扩至6个出口,每条出口与第二功能单元中的逐层对称增加分支通道组相连。

[0008] 第二个功能单元由 6 个逐层对称增加分支通道组成,作为等量分配单元,每个通道组的上游与第一功能单元的一条分支相连,下游与第三功能单元中的 4 个反应室相通。

[0009] 第三个功能单元由 48 个直径为 5.8mm,深 100 μ 的微孔矩阵构成,作为免疫分析之需的抗体、抗原和酶的吸附固定场所和分析检测窗口。该微孔矩阵的排列与传统的多孔板一致,这样可应用在标准的酶标仪上进行分析数据的测定和采集。

[0010] 所述集成化微流控芯片的应用过程如下:

[0011] 所有的试剂、抗体、抗原、酶、底物、药物及洗涤液等依次由注射泵经微流控芯片上的输入口 C1, C2 恒速、定量地注入芯片,当需要一系列不同浓度的样品溶液时,只须配制两个最高和最低的样品溶液经 C1, C2 注入,在流经第一功能单元的逐层增加分支的蛇形通道时,两个不同浓度的样品溶液经历了不断地定量分配、混合;再分配、再混合,最后生成所需的浓度的样品溶液输出给下一个功能单元。第一功能单元的每条分支流向第二功能单元中的一个等量分配单元组,将该浓度的样品溶液等量地分配给第三功能单元中同一排的 4 个反应室。从输入口 C1, C2 注入的两个不同浓度的样品溶液流经第一功能单元和第二功能单元后,在第三功能单元中同时自动地形成 48 个样品溶液矩阵。第三功能单元中的反应室提供了较大的有效面积,特别是比表面积,是传统多孔板的约 23 倍。流入反应室的抗体被吸附滞留,随后抗原、酶依次流入反应室,与其上的抗体相互作用,将酶固定。完成酶的固定化后,底物或底物与药物的混合溶液被注入反应室,再孵育一定时间,待酶催化的反应完成或达到平衡后,拆除芯片上的连接接头及管线。将芯片装入标准的酶标仪,检测各反应室的紫外-可见光吸光度或荧光发射强度,提供分析数据。

[0012] 本发明具有如下优点:

[0013] 1. 本发明只需向第一个功能单元的两个输入口分别注入所需样品的最低浓度和最高浓度的溶液就可以在第一个单元的出口处生成 6 个不同浓度的样品溶液并分别自动进入第二个功能单元的各组的一个等量分配通道。

[0014] 2. 上述所生成的每一种浓度的样品溶液经过第二个功能单元中的各组的等量分配通道后,在第三功能单元中同时自动地形成了 48 个样品溶液矩阵。

[0015] 3. 第三功能单元中的反应室的容积非常小,却提供了较大的有效面积,特别是比表面积,是传统多孔板的约 23 倍。能有效的提高抗体、抗原、酶的吸附和固定,由于所有的溶液都能流动可控,所以换液、洗涤等操作方便快捷。用于本发明的集成化微流控芯片进行免疫分析,能显著降低了昂贵的免疫试剂的消耗,缩短了反应时间,提高了分析效率。

[0016] 4. 本发明的集成化微流控芯片所设计的微孔矩阵的排列与传统的多孔板一致,可应用在标准的酶标仪上进行分析数据的采集。与传统的多孔板技术相比,本发明省去了配制不同浓度样品溶液繁冗操作,同时在检测方法上又与传统的多孔板技术兼容,无需配备专用设备。

附图说明

[0017] 图 1 为集成化免疫分析研究微流控芯片结构示意图,图中 C1 和 C2 为试剂、抗体、抗原、酶、底物、药物及洗涤液等的输入口,当需要生成不同浓度的样品溶液时, C1 和 C2 所输入的分别是最低和最高浓度的溶液。

[0018] 图 2 为免疫分析研究微流控芯片功能模块示意图,每个功能单元用虚线框包围,

I 部分为第一功能单元,即浓度梯度生成单元;II 部分为第二功能单元,即等量分配单元;III 部分为第三功能单元,即反应室。

[0019] 图 3 为聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 材料制成的集成化微流控芯片实物图,其实物中集成了两个微流控芯片系统,可同时进行两个试验,也可裁切成两个独立的芯片系统。图中硬币为芯片实际尺寸参照。

[0020] 图 4 为实施例 1 的实验结果,当药物浓度从 0.0001mM 到 0.10mM 时,荧光强度不断增加并且呈良好的线性关系,但当药物浓度大于 0.1mM 时荧光强度基本不再增强。造成这种结果的可能原因是当酶的浓度一定,药物的起始浓度较低时,酶促反应速度与药物浓度成正比,即随药物浓度的增加而增加。当所有的酶与药物结合生成中间产物后,即使再增加药物浓度,产物浓度也不会增加,因此选用药物浓度为 0.10mM。

[0021] 图 5 为实施例 2 的实验结果,药物进入芯片后 140 秒后检测到的荧光强度不再明显增强,药物的作用已基本达到平衡。

[0022] 图 6 为实施例 3 的实验结果,抑制剂 KH_2PO_4 对 ALP 酶的相对抑制率随着抑制剂浓度的增加而逐渐增加,由实验测得其 IC_{50} 为 0.47mM。

具体实施方式

[0023] 一种用于免疫分析研究的集成化微流控芯片,芯片主要由三个功能单元构成,其上设置输入输出小孔,在其上装置可拆卸的连接街头,通过细管线与微量注射泵和废液回收池相接。整块集成化微流控芯片的尺寸与标准的多孔板相同。

[0024] 第一个功能单元为蛇形通道组合,从左至右(或从右至左)逐层增加分支的浓度梯度生成单元,在其最外端设有试剂、酶和药物等的入口,每个分支的通道为迂回的折线形。

[0025] 第二个功能单元由 6 个逐层增加的对称分支通道组成,作为等量分配单元,每个通道组的上游与第一功能单元的一条分支相连,下游与第三功能单元中的 4 个反应室相通。第三个功能单元由 48 个直径为 5.8mm,深 100 μ 的微孔矩阵构成,该微孔矩阵的排列与传统的多孔板一致,这样可应用在标准的酶标仪上进行分析数据的采集。

[0026] 具体操作时,抗体、抗原、酶、底物、药物及洗涤液等依次由注射泵经微流控芯片上的输入口 C1, C2 恒速、定量地注入芯片,需要 6 个不同浓度的样品溶液时,配制两个最高和最低的样品溶液经 C1, C2 注入,在流经第一功能单元的逐层增加分支的蛇形通道时,两个不同浓度的样品溶液经历了不断地定量分配、混合;再分配、再混合,最后生成所需的 6 个不同浓度的样品溶液输出给下一个功能单元。第一功能单元的每条分支流向第二功能单元中的一个等量分配单元组,将该浓度的样品溶液等量地分配给第三功能单元中同一排的 4 个反应室。从输入口 C1, C2 注入的两个不同浓度的样品溶液流经第一功能单元和第二功能单元后,在第三功能单元中同时自动地形成 48 个样品溶液矩阵。第三功能单元中的反应室提供了较大的有效面积,特别是比表面积,是传统多孔板的约 23 倍。流入反应室的抗体被吸附滞留,随后抗原、酶依次流入反应室,与其上的抗体相互作用,将酶固定。完成酶的固定化后,底物或底物与药物的混合溶液被注入反应室,再孵育一定时间,待酶催化的反应完成或达到平衡后,拆除芯片上的连接接头及管线。将芯片装入标准的酶标仪,检测各反应室的荧光发射强度,提供分析数据。

[0027] 实施例 1

[0028] 微流控芯片进行药物最适浓度的研究应用。图 3 所示的芯片经过 BSA-戊二醛-蛋白 A 的表面修饰后,在 pH9.4, 温度 37℃, 药物溶液流速为 10 μ l/min, 其他液流速为 50 μ l/min 的体系中,将 5 μ g/ml 的抗体通入 PDMS 通道内静置 60min, 然后通入 TBS 缓冲液冲掉未被固定的抗体。将 5 μ g/ml 的抗原通入通道内并静置 20min, 然后通入 TBS 缓冲液冲掉未被固定的抗原。将 5 μ g/ml 的二抗通入通道内并静置 20min, 然后通入 TBS 缓冲液冲掉未被固定的二抗。通入药物浓度为 0.0001mmol/l 的 4-MUP 反应 3min, 然后置于酶标仪下检测荧光强度(激发波长与发射波长分别为 365nm 与 448nm)。重复以上操作, 分别改变药物 4-MUP 的浓度为 0.001, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.15, 0.20mmol/l 进行实验, 每次实验重复三次。实验结果如图 4 所示, 当药物浓度从 0.0001mM 到 0.10mM 时, 荧光强度不断增加并且呈良好的线性关系, 但当药物浓度大于 0.1mM 时荧光强度基本不再增强。造成这种结果的可能原因是当酶的浓度一定, 药物的起始浓度较低时, 酶促反应速度与药物浓度成正比, 即随药物浓度的增加而增加。当所有的酶与药物结合生成中间产物后, 即使再增加药物浓度, 产物浓度也不会增加, 因此选用药物浓度为 0.10mM。

[0029] 实施例 2

[0030] 微流控芯片进行药物作用时间的研究应用。图 3 所示的芯片经过 BSA-戊二醛-蛋白 A 的表面修饰后,在 pH9.4, 在温度 37℃, 药物溶液流速为 10 μ l/min, 其他液流速为 50 μ l/min 的体系中,将 5 μ g/ml 的抗体通入 PDMS 通道内静置 60min, 然后通入 TBS 缓冲液冲掉未被固定的抗体。将 5 μ g/ml 的抗原通入通道内并静置 20min, 然后通入 TBS 缓冲液冲掉未被固定的抗原。将 5 μ g/ml 的二抗通入通道内并静置 20min, 然后通入 TBS 缓冲液冲掉未被固定的二抗。通入药物浓度为 0.10mmol/l 的 4-MUP 后置于酶标仪下检测荧光强度(激发波长与发射波长分别为 365nm 与 448nm) 实验结果如图 5 所示。

[0031] 实施例 3

[0032] 微流控芯片进行酶抑制剂抑制率的研究应用。图 3 所示的芯片经过 BSA-戊二醛-蛋白 A 的表面修饰后,在 pH9.4, 在温度 37℃, 药物溶液流速为 10 μ l/min, 其他液流速为 50 μ l/min 的体系中,将 5 μ g/ml 的抗体通入 PDMS 通道内静置 60min, 然后通入 TBS 缓冲液冲掉未被固定的抗体。将 5 μ g/ml 的抗原通入通道内并静置 20min, 然后通入 TBS 缓冲液冲掉未被固定的抗原。将 5 μ g/ml 的二抗通入通道内并静置 20min, 然后通入 TBS 缓冲液冲掉未被固定的二抗。芯片一个入口通入 0.10mM 的 4-MUP 和抑制剂 KH_2PO_4 的缓冲液, 另一入口通入 0.10mM 的 4-MUP 和 1mM 的 KH_2PO_4 反应 3min, 然后置于酶标仪下检测荧光强度(激发波长与发射波长分别为 365nm 与 448nm)。实验结果如图 6 所示, 抑制剂 KH_2PO_4 对 ALP 的相对抑制率随着抑制剂浓度的增加而逐渐增加, 由实验可得 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.47mM。

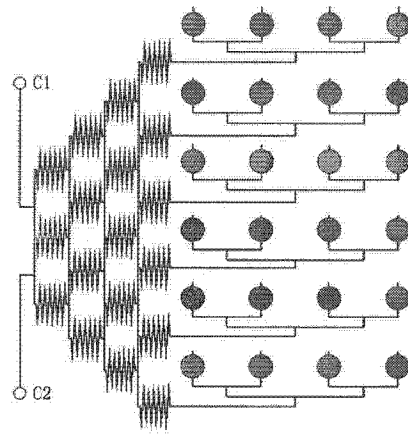


图 1

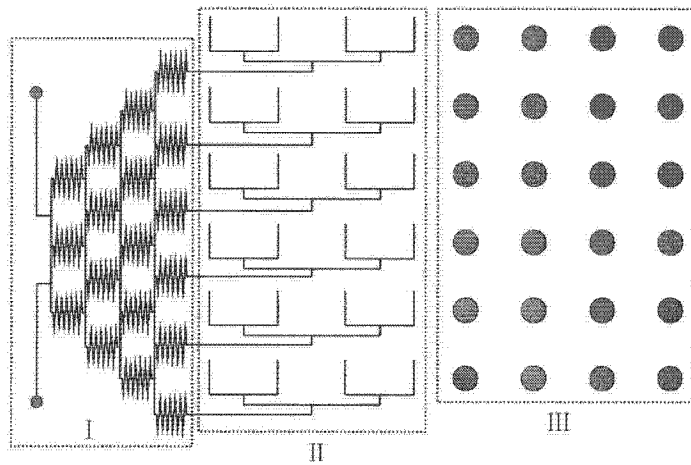


图 2

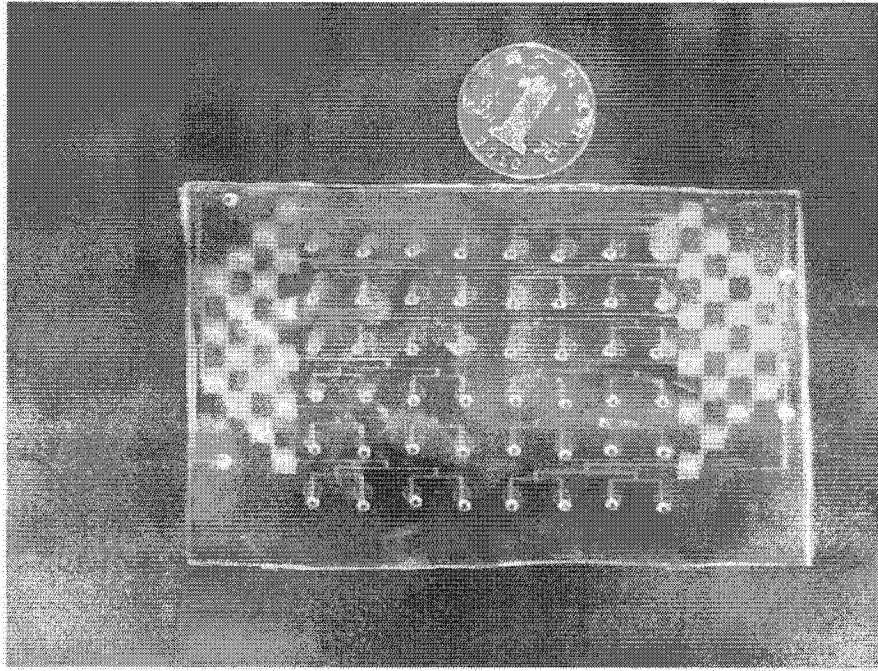


图 3

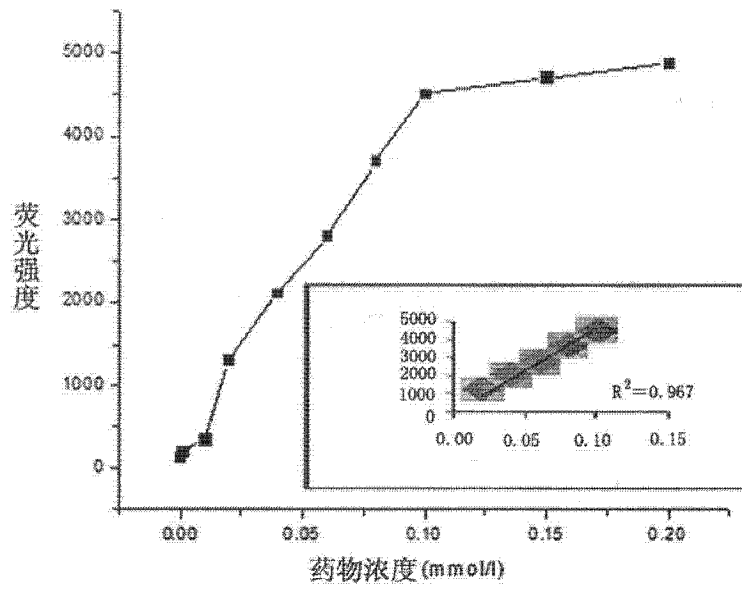


图 4

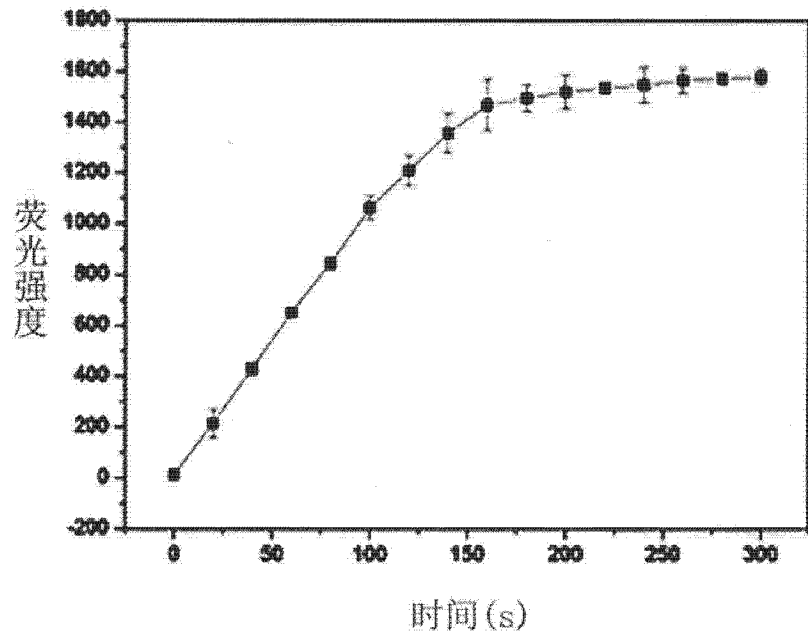


图 5

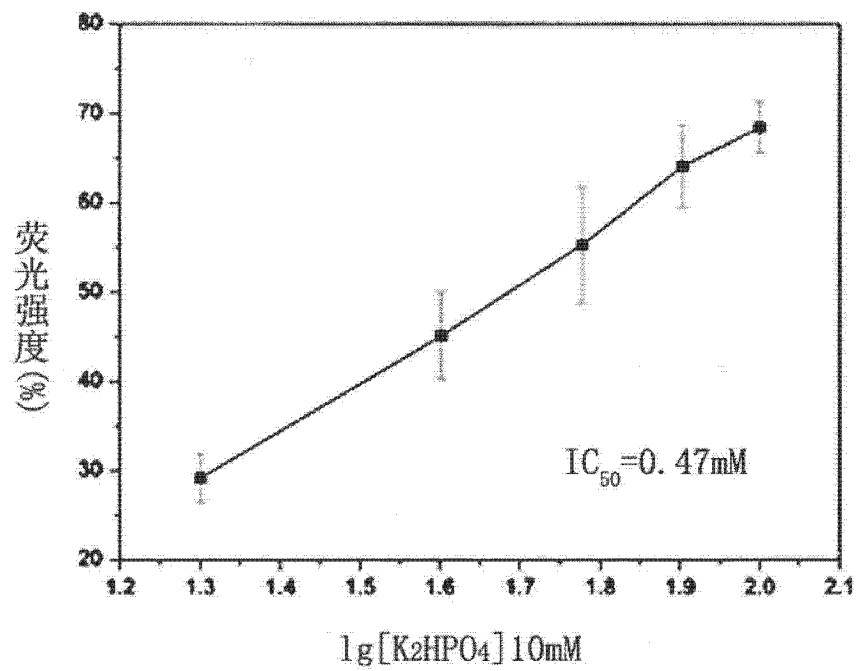


图 6

专利名称(译)	一种用于免疫分析研究的集成化微流控芯片及其应用		
公开(公告)号	CN103033608A	公开(公告)日	2013-04-10
申请号	CN201110305409.0	申请日	2011-10-10
[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	成志毅 侯凤华		
发明人	成志毅 侯凤华		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/33 G01N21/64 B01L3/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于免疫分析研究的集成化微流控芯片，芯片主要由浓度梯度生成单元、等量分配单元和直径为5.8mm，深100μm的微孔反应室矩阵构成，容积小而比表面积大；该微孔矩阵的排列与传统的多孔板一致，可应用在标准的酶标仪上进行分析数据的检测和采集。本发明创新性地将免疫分析操作中抗体、抗原、酶的吸附和固定；样品不同浓度溶液的配制；换液、洗涤等操作全部集成在一块芯片上按流程自动化完成，能显著降低试剂的消耗，缩短分析时间，提高效率。与传统的多孔板技术相比，本发明省去了配制样品溶液、洗涤等繁冗的手工操作，在检测方法上又与标准的酶标仪兼容。

