



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106324236 A

(43) 申请公布日 2017. 01. 11

(21) 申请号 201510366837. 2

(22) 申请日 2015. 06. 28

(71) 申请人 上海市第一人民医院

地址 200080 上海市虹口区武进路 85 号

(72) 发明人 彭志海 于洋

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所 (普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/573(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

基于纳米均相时间分辨荧光免疫与液滴微流控技术的检测生物大分子的方法

(57) 摘要

本发明属于微流控芯片领域,涉及一种检测生物大分子方法,本发明中将 Alpha-LISA 技术与 droplet-based microfluidics 技术联合优化制备微流控芯片液以及提供一种新的高灵敏度的生物大分子检测方法;本发明中采用三相混合技术,利用被动混合结构使反应液充分混匀,并采用十字聚焦形成液滴,使生成的液滴体积更小,反应更为迅速;以及对样品浓度要求低,反应特异、灵敏、快速、充分,并无需反应后清洗,可检测完整蛋白质、酶复合体、噬菌体等非常复杂的复合物,本方法能克服现有商业化液相芯片的技术瓶颈,实现对于临床生物大分子的快速检测,且能提高检测灵敏度及特异度,降低对样本量的需求。

1. 基于纳米均相时间分辨荧光免疫与液滴微流控技术的检测生物大分子的方法, 其特征在于, 其包括: 利用微流控芯片将生物大分子与 AlphaLISA 供体受体微珠之间的液-液独立反应体系离散成约 105 个纳升级乳液, 每个乳液在管道内流动并进行反应, 在出口处被探测器检测; 按下述步骤:

1) 开启微流控芯片油相阀门, 待 5min 油相充满反应管道;

2) 开启微流控芯片液相阀门, 在制得的三个液相通道中分别加入: ①待测血浆样品或标准品、②以分析缓冲液稀释的已连接抗体的受体微球稀释的生物素化抗体、③链霉亲和素化的供体微球;

3) 三相液体汇合后, 在被动混合结构中进一步混合与反应, 当混合液体流至被动混合结构末端遇油相形成液滴微反应器, 并在反应管道中进一步反应;

4) 当液滴流至荧光检测装置时, 使用 680nm 光激发, 检测每个微反应器中的 615nm 发射光, 后将每个液滴的发射光信号叠加, 通过信号叠加强度计算待测生物大分子的浓度, 余液经废液管排出。

2. 按权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 其中所述的微流控芯片采用微机电加工中的硅深刻蚀技术制作硅模具, 或在基底片上旋涂光刻胶, 通过光刻显影后形成光刻胶模具; 或通过激光加工、精机械加工的方法制作金属模具; 在阳板模具表面修饰特氟龙涂层, 热固化后随炉冷却; 将 PDMS 迅速浇筑在阳板模具上, 负压抽真空后加热, 固化后自然冷却; 将 PDMS 从模具上揭下; 将 PDMS 芯片与拨片可逆键合, 制得液滴微流控芯片; 所述的芯片包括:

1) 进样和混合部分;

2) 离散化形成纳升级微小液滴部分;

3) 流动反应及检测部分。

3. 按权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 其中所述的微流控芯片的 1) 进样和混合部分中: 待测样品、供体微珠与受体微珠分别三向液相流入管道后, 通过鱼骨状被动混合结构, 快速混合均匀。

4. 按权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 其中所述的微流控芯片的 2) 离散化形成纳升级微小液滴部分中: 采用十字聚焦形成液滴, 将已混合的待测样品与试剂, 离散成约 105 个纳升级微反应乳液。

5. 按权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 其中所述的微流控芯片的 3) 流动反应及检测部分中, 每个已离散的乳液在蜿蜒管道流动的同时进一步行 Alpha-LISA 反应, 最终流经出口处的荧光检测装置, 通过叠加检测到的荧光值信号, 计算待测样品的浓度。

6. 按权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 其中所述的生物大分子选自蛋白质、核酸、脂类、糖类中的一种。

基于纳米均相时间分辨荧光免疫与液滴微流控技术的检测 生物大分子的方法

技术领域

[0001] 本发明属生物医学研究及临床应用领域,涉及生物大分子的检测方法;具体涉及一种基于纳米均相时间分辨荧光免疫与液滴微流控技术的微流控芯片及检测生物大分子的方法。

背景技术

[0002] 现有技术公开了液相芯片技术是在以功能基因组学与蛋白组学为研究对象的后基因组学的背景下发展起来的现代生物芯片技术。该技术利用抗原-抗体高特异性识别能力和高强度的结合能力,捕获特异性靶目标进行进一步定性定量研究,如蛋白质标志物的检测,肿瘤细胞的捕获等。相比传统的基于 ELISA 原理的固相芯片,所述液相芯片具有通量大、灵活性好、特异度高、动力学范围广等优点,其在分子生物检测领域的使用价值已被认可。然而,传统的基于 ELISA 技术的固液两相芯片存在如下缺点:1、抗体需固定在芯片板上,这将导致芯片制作需增加抗体固定步骤,2、由于该反应为固液两相反应,故反应仅在液体腔室固定有抗体的底面进行,反应效率大打折扣;3、数次反应后,抗体被消耗殆尽,不利于芯片的重复利用;4、固液芯片应用过程中,需至少 6 步洗涤,过程繁琐;

[0003] 作为液相芯片的代表产品, Flexmap 3D, 是一种在 xMAP 技术的基础上联合运用全新的设备进行生物分子检测的装置(由 Luminex 公司研制新一代液相芯片检测平台),该方法与现有的固相芯片临床使用方法(如 ELISA 法)比较,固然有特异性高、高通量、高敏感、重复性好、检测血清用量少等优点,但与此同时也存在如下缺点:1、Flexmap 3D 液相芯片在抗原抗体反应之后,需要洗涤未能特异性结合的抗体,而洗涤步骤不但会增加测试时间,过程繁琐,更有可能在操作某些稀有抗原的检测时,不慎将已经固定的抗原清洗掉,产生假阴性,严重影响检测结果的真实性;2、由于整个检测反应体系庞大,因此需要较大体积的抗原抗体参与反应,因此增加了检测试剂的额外消耗,并且不利于稀有样本的检测,同时反应体系庞大还迫使抗体孵育较长时间以保障反应的充分进行,导致整体反应时间延长,不利于该设备运用于大规模临床样本的筛选。

[0004] 基于现有技术的液相芯片具有的,如,特异性较低、检测步骤繁琐、检测误差大、反应速率慢、消耗试剂与样本大等缺陷,本申请的发明人拟提供一种基于纳米均相时间分辨荧光免疫与液滴微流控技术的微流控芯片及检测生物大分子的方法。

[0005] 与本发明相关的现有技术有:

[0006] 1. Bay JT; Garred P Rapid bead-based immunoassay for measurement of mannose-binding lectin[外文期刊]2009(06);

[0007] 2. Arellano-Garcia ME; Hu S; Wang J Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva 2008(08);

[0008] 3. Livingston AD; Campbell CJ; Wagner EK Biochip sensors for the rapid and sensitive detection viral disease 2005(06);

- [0009] 4.Linkov F;Yurkovetsky Z;Lokshin A Hormones as biomarkers:practical guide to utilizing Luminex technologies for biomarker research 2009;
- [0010] 5.Kricha LJ Human anti-animal antibody interferences in immunological assays 2004;
- [0011] 6.Waterboer T;Sehr P;Pawlita M Suppression of non-specific binding in serological Luminex assay[外文期刊]2006(1-2);
- [0012] 7,妊娠相关血清蛋白 A 光激化学发光免疫分析法的建立。

发明内容

[0013] 本发明的目的是为克服现有技术液相芯片的技术所存在的缺陷与不足,提供新的高灵敏度生物大分子检测方法,具体涉及一种基于纳米均相时间分辨荧光免疫与液滴微流控技术的微流控芯片检测生物大分子的方法。

[0014] 本发明采用纳米均相时间分辨荧光免疫技术 (amplified luminescent proximity homogeneous assay, Alpha-LISA) 与液滴微流控 (droplet-based microfluidics) 技术结合优化改进传统的液相芯片,其中,对于 AlphaLISA 的反应平台进行改进;AlphaLISA 技术在供体与受体微珠在小于 200nm 的范围内都可以被检测到,故可以检测完整蛋白质、酶复合体、噬菌体等非常复杂的复合物,本发明中将 Alpha-LISA 技术与 droplet-based microfluidics 技术联合优化制备微流控芯片液,进一步,提供一种新的高灵敏度的生物大分子检测方法;同时,本发明中采用三相混合技术,利用被动混合结构使反应液充分混匀,并采用十字聚焦形成液滴,使生成的液滴体积更小,反应更为迅速;以及对样品浓度要求低,反应特异、灵敏、快速、充分,并无需反应后清洗。

[0015] 本发明中,涉及的 Alpha-LISA 技术是一种超微量检测技术,其中采用均相体系化学发光检测技术,参与免疫反应的一个抗体上包被了感光珠 (sensibead),内含酞菁(鲁米诺类化学发光物质);另一个抗体上包被了发光珠 (chemibead),内含二甲基噻吩衍生物及 Eu 螯合物,在目标抗原存在的情况下,形成夹心免疫复合物,目标抗原可使两个抗体上标记的感光珠和发光珠紧密的连接在一起,在 680nm 激发光下,发射出 615nm 的发射光,从而完成鲁米诺氧途径化学发光过程,被誉为免洗的 ELISA,具有快速、均相(免洗)、灵敏性高、特异性强和操作简便等特点。

[0016] 本发明中,液滴微流控 (droplet-based microfluidics) 是在封闭的微通道网络中生成和操控纳升至皮升级液滴的技术,其原理是将每个待反应的分子用水包裹,置于与其不相容的油性反应溶剂中,使其单独成为一个反应体系,由于液滴彼此分离且受到油相保护,每一个液滴都可以被看作是一个正在进行反应的微型反应体系,因此被称作液滴微流控;与连续流动的 luminex 单相液相微流控技术相比,所述的液滴微流控具有下述诸多优点:(1) 液滴被与之不互溶的另一相间隔,每个液滴皆可作为独立的微反应器;(2) 短时间内可以生成大量的微反应器(最高可达数千赫兹),适合高通量的生物和化学分析;(3) 液滴的体积可小至皮升或飞升,大大降低了样品与试剂的消耗;(4) 混合速度较连续流动的微流控系统明显加快,反应时间大大减少;因此,液滴微流控又称“液滴实验室”(lab-in-a-drop)。

[0017] 本发明为了解决现有技术存在的问题,如:运用 AlphaLISA 技术进行检测仍存在

如下不足：1、由于待测物与抗体均需要自由扩散运动以达到空间上的接触，从而发生抗原抗体的特异性结合，但整个 AlphaLISA 反应体系唯一，约为 50 μ L，故降低了反应速率，无论是一步还是两步 AlphaLISA 检测法，均需共计 90min 的孵育时间；2、对于极低浓度样本的检测灵敏度仍有所欠缺；3、检测试剂消耗相对较多、对样本需求量相对较大等，对现有技术的 AlphaLISA 的反应平台进行改进。

[0018] 本发明通过结合 AlphaLISA 技术与 droplet-based microfluidics 技术制备液滴芯片用以临床监测生物大分子，其包括生物大分子与抗体反应的独立体系的形成：利用微流控芯片将生物大分子与 AlphaLISA 供体受体微珠之间的液-液独立反应体系离散成约 10^5 个纳升级乳液，每个乳液在管道内流动并进行反应，在出口处被探测器检测，并换算成样品浓度。

[0019] 本发明中，所述的芯片通过快速成型技术设计与制作 (whitesides 的 rapid prototyping)，包括：采用微机电加工中的硅深刻蚀技术制作硅模具，或在基底片上旋涂光刻胶，通过光刻显影后形成光刻胶模具；或通过激光加工、精机械加工的方法制作金属模具等；在阳板模具表面修饰特氟龙涂层，热固化后随炉冷却；将 PDMS 迅速浇筑在阳板模具上，负压抽真空后加热，固化后自然冷却；将 PDMS 从模具上用镊子小心揭下；将 PDMS 芯片与拨片可逆键合，得到液滴微流控芯片；

[0020] 所述的芯片包括：

[0021] 1) 进样和混合部分：

[0022] 待测样品、供体微珠与受体微珠分别三向液相流入管道后，通过鱼骨状被动混合结构，快速混合均匀；

[0023] 2) 离散化形成纳升级微小液滴部分：

[0024] 采用十字聚焦形成液滴，将已混合的待测样品与试剂，离散成约 10^5 个纳升级微反应乳液；

[0025] 3) 流动反应及检测部分，

[0026] 每个已离散的乳液在蜿蜒管道流动的同时进一步行 Alpha-LISA 反应，最终流经出口处的荧光检测装置，通过叠加检测到的荧光值信号，计算待测样品的浓度。

[0027] 更具体的，本发明的基于纳米均相时间分辨荧光免疫与液滴微流控技术的检测生物大分子的方法，包括如下步骤：

[0028] 1, 芯片设计与制作：

[0029] 采用微机电加工中的硅深刻蚀技术制作硅模具，或在基底片上旋涂光刻胶，通过光刻显影后形成光刻胶模具；或通过激光加工、精机械加工的方法制作金属模具等；在阳板模具表面修饰特氟龙涂层，热固化后随炉冷却；将 PDMS 迅速浇筑在阳板模具上，负压抽真空后加热，固化后自然冷却；将 PDMS 从模具上用镊子小心揭下；将 PDMS 芯片与拨片可逆键合，得到液滴微流控芯片；所述的芯片包括：

[0030] 1) 进样和混合部分：

[0031] 待测样品、供体微珠与受体微珠分别三向液相流入管道后，通过鱼骨状被动混合结构，快速混合均匀；

[0032] 2) 离散化形成纳升级微小液滴部分：

[0033] 采用十字聚焦形成液滴，将已混合的待测样品与试剂，离散成约 10^5 个纳升级微

反应乳液；

[0034] 3) 流动反应及检测部分，

[0035] 每个已离散的乳液在蜿蜒管道流动的同时进一步行 Alpha-LISA 反应，最终流经出口处的荧光检测装置，通过叠加检测到的荧光值信号，计算待测样品的浓度；

[0036] 4) 用于检测时；

[0037] ①待测品（标准品）、供体微球及其缓冲液、受体微球由所述芯片的三向液相流入管道；

[0038] ②三向管道汇合处末端接被动混合结构；

[0039] ③被动混合结构末端两侧垂直接入油相流入通道，通过改变油相的流速从而改变油相剪力，故可在该水油两相汇合处形成体积可变的液滴微反应器；

[0040] ④被动混合结构顺延为蜿蜒盘曲的反应管道，反应时所有液滴微反应器内的试剂将在此处进一步反应，上述所有管道直径均为 $20 \sim 500 \mu\text{m}$ ；

[0041] ⑤反应管道末端分别接荧光检测装置与废液排出系统。

[0042] 2、检测生物大分子，按下述步骤：

[0043] 1)，开启油相阀门，待 5min 油相充满反应管道；

[0044] 2)，开启液相阀门，在制得的三个液相通道中分别加入：①待测血浆样品（生物大分子）或标准品、②以分析缓冲液稀释的已连接抗体的受体微球稀释的生物素化抗体、③链霉亲和素化的供体微球；

[0045] 3)，三相液体汇合后，在被动混合结构中进一步混合与反应，当混合液体流至被动混合结构末端遇油相形成液滴微反应器，并在反应管道中进一步反应；

[0046] 4)，当液滴流至荧光检测装置时，使用 680nm 光激发，检测每个微反应器中的 615nm 发射光，后将每个液滴的发射光信号叠加，通过信号叠加强度计算待测生物大分子的浓度，余液经废液管排出。

[0047] 本发明中，生物大分子选自蛋白质、核酸、脂类、糖类中的一种。

[0048] 本发明中，采用制备的微流控芯片进行生物大分子检测，结果显示：相较于传统的 ELISA 检测方法，二者特异度均高，但本发明方法灵敏度可达 10^{-17}mol ，由于是均相反应，故省略了传统 ELISA 法中的 6 步洗涤，且样体积需求较少（ $5 \mu\text{L}$ ），无需固定抗体，检测范围跨越 3-5 个数量级，对抗体的要求也相对较低。另外，应用液滴微流控技术可将检测时间可缩短至 0.5h（如表 1 所示）。

[0049] 表 1 采用本微流控芯片与传统 ELISA 法对比

[0050]

	本发明方法	传统 ELISA 法
特异度	高	高
灵敏度	10^{-17} mol	10^{-10} mol
检测时间	<0.5h	3h
检测性致	均相, 免洗	非均相, 至少需要 6 步洗涤
样本体积	小, 5 μ L	大, 100 μ L
需要固定抗体	否	是
检测范围	3-5 个数量级	2 个数量级
抗体要求	高/低亲和力抗体均可应用	需要高亲和力抗体

[0051] 本发明中液滴的微反应体系生成,使抗体与生物大分子的反应更为特异,反应接触面积增大,反应更加快速充分,而应用 AlphaLISA 技术可使得反应灵敏度增高,且无需清洗。同时应用十字聚焦方式形成液滴,相较于传统的 T 型聚焦法所生成的液滴更小,单体系反应速率更快。采用被动混合结构,可使待测分子、供体微珠、受体微珠在形成液滴前充分混合,加快整体反应时间。

[0052] 本发明能克服现有技术下述缺陷:现有液相芯片在抗原抗体反应之后,需要洗涤未能特异性结合的抗体,而洗涤步骤不但会增加测试时间,过程繁琐,更有可能在操作某些稀有抗原的检测时,不慎将已经固定的抗原清洗掉,产生假阴性,严重影响检测结果真实性;由于整个检测反应体系庞大,因此需要较大体积的抗原抗体参与反应,增加了检测试剂的额外消耗,并且不利于稀有样本的检测,同时反应体系庞大还迫使抗体孵育较长时间以保障反应的充分进行,导致整体反应时间延长,不利于该设备运用于大规模临床样本的筛检。

[0053] 本发明通过结合 Alpha-LISA 技术与 droplet-based microfluidics 技术制备液滴芯片见检测的方法的优点有:

[0054] 1、使用 Alpha-LISA 技术,为液-液反应体系,反应接触面积大,故反应快速;其次基于 Alpha-LISA 技术特有的发光原理,降低了反应假阳性的可能性,故大大提高了反应相对于传统 ELISA 法的特异性;最后,由于 Alpha-LISA 技术为均相反应,因此反应免洗,大大减少了检测的操作步骤,节约了时间,且不会使目标生物大分子被清洗掉。

[0055] 2、使用 droplet-based microfluidics 技术,显著降低了对检测样品数量的需求,且每个生物大分子独自成为一个反应体系,增加了反应效率,并且无生物扩散,样品间无交叉污染,可以显著提高反应的特异性。

[0056] 3、改传统的单相液相芯片为多相的液滴芯片,更有利于下游的高灵敏度捕获检测。

[0057] 4、液相混合时添加被动混合结构(如鱼骨状被动混合结构),使待测样品与供体受体短时间内充分反应

[0058] 5、使用十字聚焦生成的液滴,相比于传统的 T 型聚焦生成液滴较小,可使单个反应体系速度更快。

[0059] 为了便于理解,以下将通过具体的附图对本发明的通过结合 Alpha-LISA 技术与 droplet-based microfluidics 技术制备液滴芯片的方法进行详细描述。需要特别指出的是,具体和实施只是为了说明,显然本领域的普通技术人员可以根据本文说明,在本发明的范围内对本发明做出各种各样的修正和改变,这些修正和改变也纳入本发明的范围内。

附图说明

[0060] 图 1:本发明芯片制作示意图,其中,A 供体微珠+缓冲液,B 待测样本,C 受体微珠,D 鱼骨状被动混合结构,E 加油相,F 反应管道,G 荧光检测装置,H 废液管道。

[0061] 图 2:鱼骨状被动混合结构示意图。

[0062] 图 3:Alpha-LISA 技术原理示意图。

[0063] 图 4,本发明的方法检测结果表明具有良好的剂量反应线性关系。

具体实施方式

[0064] 结合附图所示的液滴微流控芯片在各个步骤中的剖面结构,以及本发明方法的主要步骤,进行详细地描述本发明的内容。

[0065] 实施例 1:

[0066] 结合如图 1、图 2 所示 Alpha-LISA 技术与 droplet-based microfluidics 技术制备抗人癌胚抗原 (carcino-embryonic antigen, CEA, 市购) 液滴微流控芯片:

[0067] 1、微流控芯片的设计,如图 1 所示包括如下几部分:

[0068] ①待测品(标准品)、供体微球及其缓冲液、受体微球三向液相流入管道(图 1 中 A、图 1 中 B、图 1 中 C);

[0069] ②三向管道汇合处末端接鱼骨状被动混合结构(图 1 中 D、图 2);

[0070] ③被动混合结构末端两侧垂直接入油相流入通道,反应时将在该水油两相汇合处形成液滴微反应器(图 1 中 E);

[0071] ④被动混合结构顺延为蜿蜒盘曲的反应管道,反应时所有液滴微反应器内的试剂将在此处进一步反应(图 1 中 F),上述所有管道直径均为 50 μ m;

[0072] ⑤反应管道末端分别接荧光检测装置与废液排出系统(图 1 中 G、图 1 中 H);

[0073] 2、制备液滴微流控芯片

[0074] (1) 制备光刻胶模板

[0075] 首先采用 SU-8-100 型负性光刻胶(美国 Micro Chem 公司),已 2500r/min 的转速再单面抛光的硅片上甩胶,获得厚度为 80 μ m 的光刻胶,前烘条件为 10min 从室温升至 65 $^{\circ}$ C,保温 10min,然后 30min 升至 95 $^{\circ}$ C,并保温 35min,随炉冷却,曝光采用德国 Karl Suss 公司 MA6 型光刻机,曝光时间为 60s,后烘条件为 30min 从室温升至 90 $^{\circ}$ C,并保温 10min,随炉冷却。采用 Micro Chem 公司专用的 SU-8 显影液,显影时间为 6min,显影后用异丙醇清洗,氮气吹干,即获得所需的光刻胶模板;

[0076] (2) 模板表面特氟龙处理

[0077] 将光刻胶版置于甩涂机上(美国 Micro Chem 公司),均匀滴加特氟龙溶液,200rpm 预转 10s,500rpm 转 30s,将处理后的光刻胶模板置于烘箱内,180 $^{\circ}$ C 热烘 2 小时,随炉冷却;

[0078] (3) PDMS 浇筑

[0079] PDMS 前体与固化剂（牌号：sygard 184, 美国道康宁公司的产品）按 10 : 1 质量比进行物理混合，充分搅拌，真空脱气 20min，模具上液滴水分升华后取出，将 PDMS 快速浇筑于芯片上，负压抽真空 30min，随后置于 90℃ 烘箱热烘 20min，自然冷却；

[0080] (4) 流道成型

[0081] 用刀片及镊子小心将 PDMS 芯片从模具上揭下，流道成型；

[0082] (5) 键合

[0083] 将 PDMS 与洁净玻片可逆键合，得到液滴微流控检测芯片；

[0084] 3、临床样本 CEA 的检测

[0085] (1) 受体微球与抗体连接

[0086] 将 0.2mg CEA 抗体加入超离心管，以 9 000r/min 离心 8min，用 200 μ L 缓冲液 (pH6.2、0.05M MES 溶液) 重复洗涤 6 次后收集抗体，在抗体溶液中加入 1mg 受体微球、10 μ L 25mg/mL NaBH_3CN 、1.25 μ L 10% Tween-20，而后用缓冲液将体积补充到 200 μ L，37℃ 避光振荡反应 48h，最后加入 10 μ L 65mg/mL CM0 37℃ 避光孵育 1h 封闭未结合位点，离心洗涤，得到已连接抗体的受体微球，调整受体微球浓度为 5mg/mL；

[0087] (2) 生物素与抗体连接

[0088] 将 0.4mg 抗体加入超离心管，以 9000r/min 离心 8min，每次用 200 μ L 缓冲液 (pH9.5、0.1M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 溶液)，重复洗涤 6 次后收集抗体，调整抗体浓度为 20mg/mL，在抗体溶液中加入 2 μ L 22mg/mL 生物素，室温振荡孵育 4h，用 PBS (pH7.4) 4℃ 透析 24h，每 6h 换液，收集透析袋中液体，并将其抗体浓度调整为 1mg/mL；

[0089] (3) 样本的制备

[0090] 清晨空腹抽取患者和正常人肘静脉血 2mL，紧贴管壁注入 EDTA 抗凝试管，EDTA 抗凝管置离心机中 3 000r*min⁻¹ 离心 10min，制得含 CEA 的血浆，收集分装于 1.5mL EP 管中，血浆均置 -80℃ 低温冰箱中避光冻存，所有标本于采集后 1 周内测量完成；

[0091] (4) 目的蛋白的检测

[0092] ①，开启 E 处的油相阀开关通入油相 (FC40)，待 5min 油相充满反应管道；

[0093] ②将 10 μ L 标准品或待检测血浆由 B 孔加入，并在 A 孔中加入以分析缓冲液 1 : 100 比例稀释已连接抗体的受体微球 10 μ L 及 1 : 400 比例稀释的生物素化抗体 10 μ L，同时由 C 孔中加入链霉亲和素化的供体微球 70 μ L；

[0094] ③，三相在 D 鱼骨状被动混合结构中进一步混合（如图 2 所示），当混合液体流至被动混合结构末端遇油相形成液滴，并在反应管道中 F 进一步反应；

[0095] ④，当液滴流至荧光检测装置 G 时，使用 680nm 光激发，检测每个微反应器中的 615nm 发射光，后将每个液滴的发射光信号叠加，估算待测 CEA 的浓度，其余液体经废液管 H 排出。

[0096] 结果显示，以自制试剂中参考标准品浓度的对数为横坐标，信号值 1×10^3 计数的对数为纵坐标，由双对数数学模型 Log-Log 函数处理，测得 CEA 试剂剂量 - 反应曲线线性相关系数 (r) 为 0.99972，表明该基于纳米均相时间分辨荧光免疫与液滴微流控技术的检测生物大分子的方法具有良好的剂量反应线性关系（如图 4 所示）。

[0097] 本实施例显示了本发明具有如下优点、：

[0098] 1、使用液-液反应体系 Alpha-LISA 技术，反应接触面积大，反应快速；基于

Alpha-LISA 技术特有的发光原理,降低了反应假阳性的可能性,明显提高反应相 的特异性 ;反应免洗,减少检测的操作步骤,节约时间,不会使目标生物大分子被清洗掉 ;

[0099] 2、明显降低了对检测样品数量的需求,且每个生物大分子独自成为一个反应体系,增加了反应效率,并且无生物扩散,样品间无交叉污染,显著提高反应的特异性。

[0100] 3、改传统的单相液相芯片为多相的液滴芯片,更有利于下游的高灵敏度捕获检测。

[0101] 4、液相混合时添加被动混合结构 (如鱼骨状被动混合结构),使待测样品与供体受体短时间内充分反应。

[0102] 5、使用十字聚焦生成的液滴,相比于传统的 T 型聚焦生成液滴较小,可使单个反应体系速度更快。

[0103] 本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于上述的实施例。

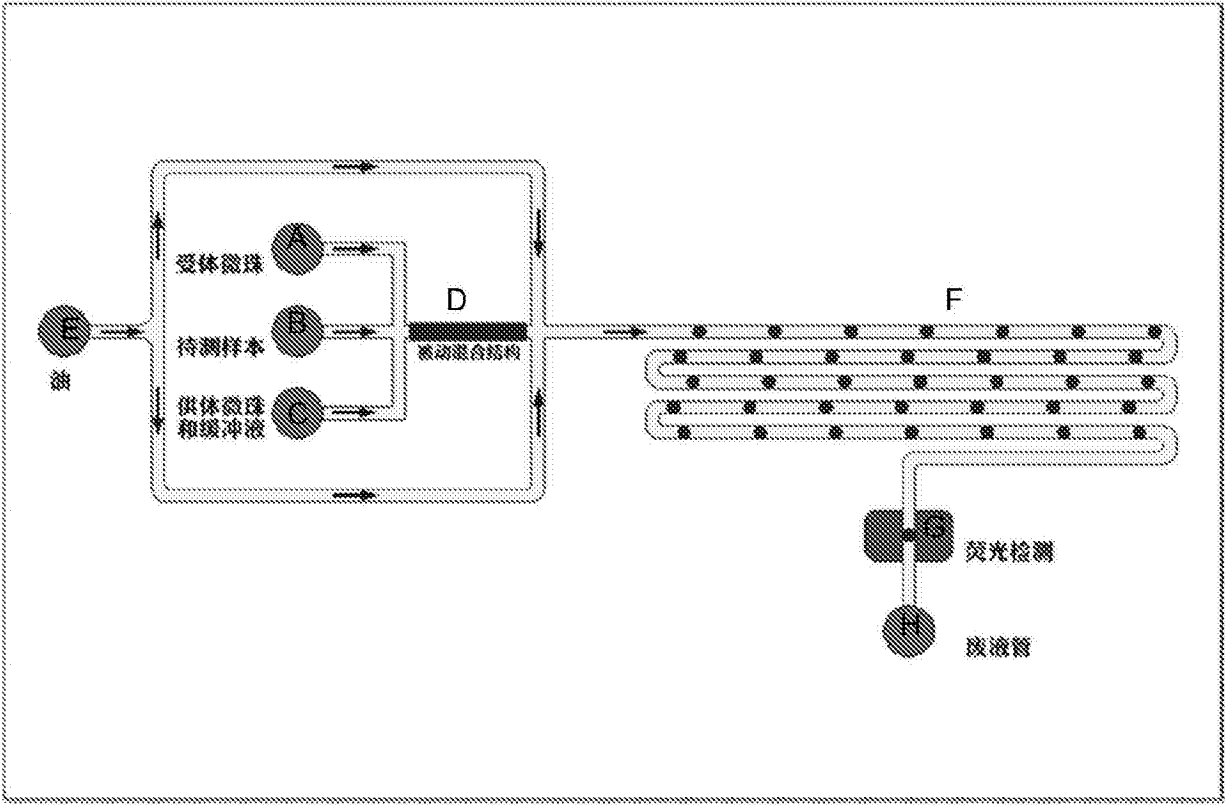


图 1

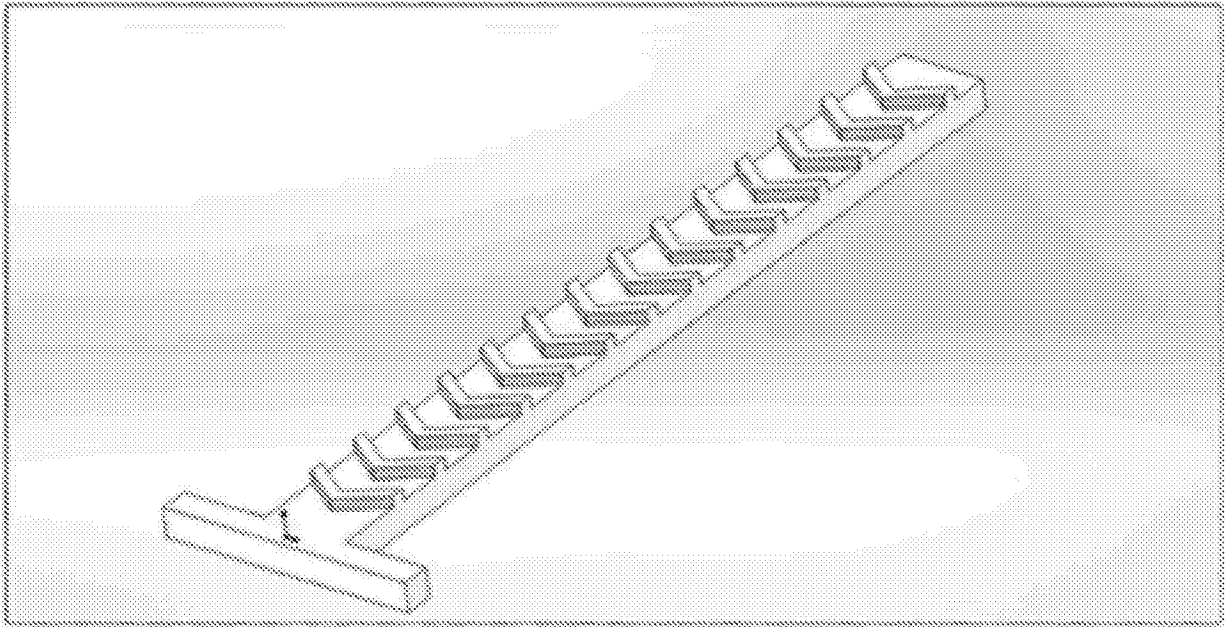


图 2

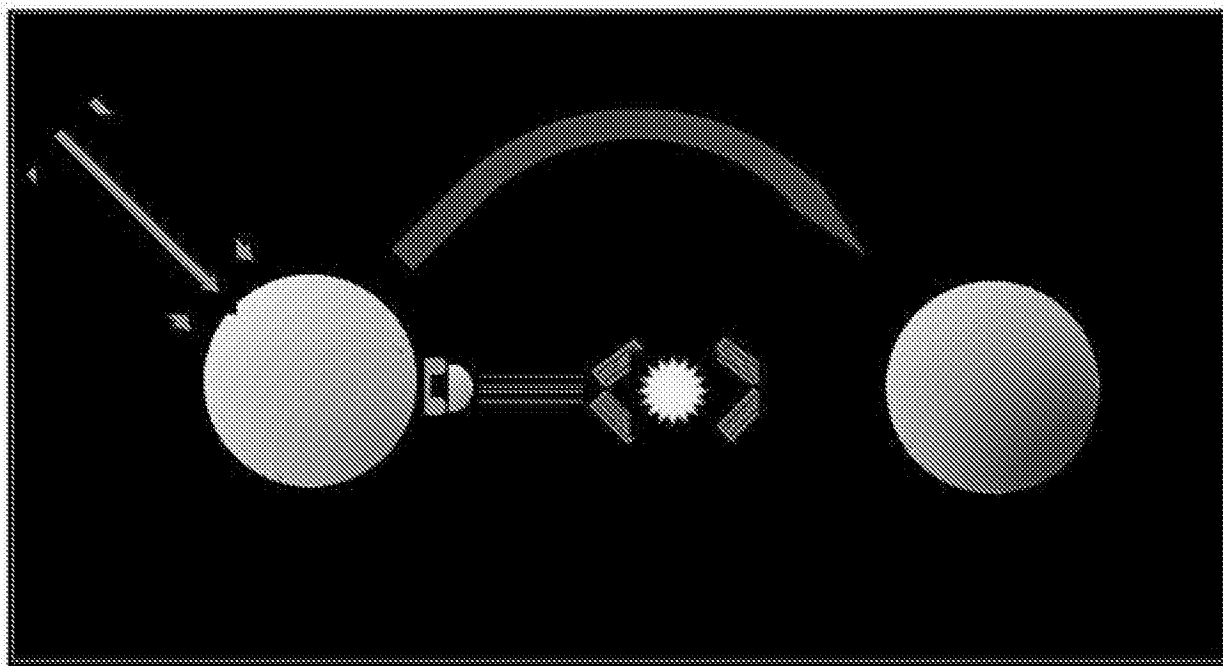


图 3

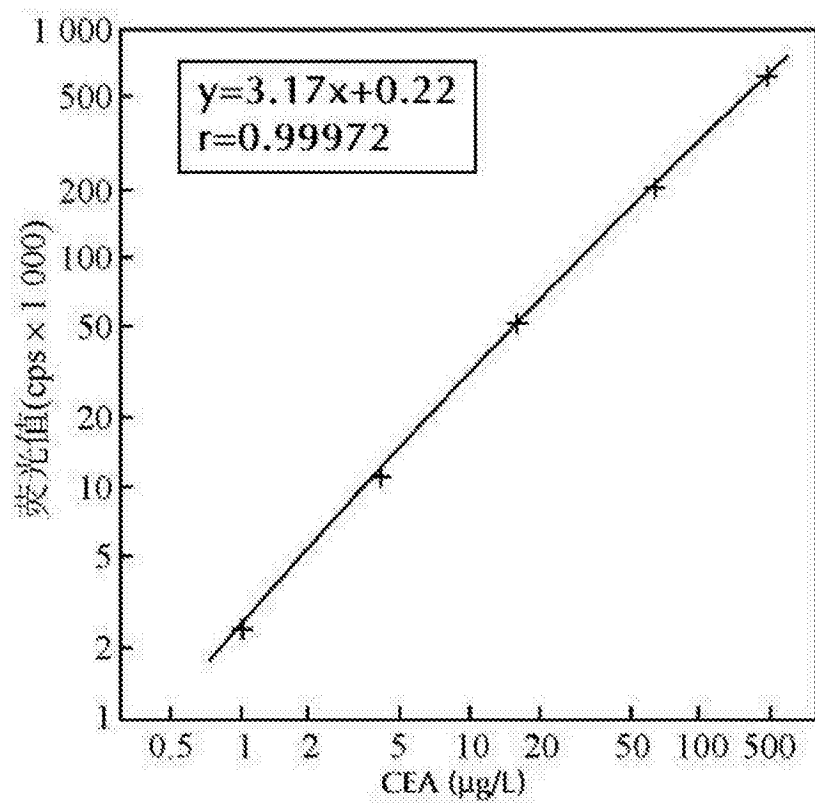


图 4

专利名称(译)	基于纳米均相时间分辨荧光免疫与液滴微流控技术的检测生物大分子的方法		
公开(公告)号	CN106324236A	公开(公告)日	2017-01-11
申请号	CN201510366837.2	申请日	2015-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	上海市第一人民医院		
申请(专利权)人(译)	上海市第一人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	上海市第一人民医院		
[标]发明人	彭志海 于洋		
发明人	彭志海 于洋		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/573 G01N33/68		
代理人(译)	吴桂琴		
其他公开文献	CN106324236B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	本发明方法	传统 ELISA 法
本发明属于微流控芯片领域，涉及一种检测生物大分子方法，本发明中将Alpha-LISA技术与droplet-based microfluidics技术联合优化制备微流控芯片液以及提供一种新的高灵敏度的生物大分子检测方法；本发明中采用三相混合技术，利用被动混合结构使反应液充分混匀，并采用十字聚焦形成液滴，使生成的液滴体积更小，反应更为迅速；以及对样品浓度要求低，反应特异、灵敏、快速、充分，并无需反应后清洗，可检测完整蛋白质、酶复合体、噬菌体等非常复杂的复合物，本方法能克服现有商业化液相芯片的技术瓶颈，实现对于临床生物大分子的快速检测，且能提高检测灵敏度及特异度，降低对样本量的需求。	特异度	高
	灵敏度	10^{-11} mol
	检测时间	<0.5h
	检测性致	均相，免洗
	样本体积	小，5 μ L
	需要固定抗体	否
	检测范围	3-5 个数量级
	抗体要求	高/低亲和力抗体均可应用
		传统 ELISA 法
		高
		10^{-10} mol
		3h
		非均相，至少需要 6 步洗涤
		大，100 μ L
		是
		2 个数量级
		需要高亲和力抗体