



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109847818 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201910176349.3

(22)申请日 2019.03.08

(71)申请人 北京理工大学

地址 100044 北京市海淀区中关村南大街5号

(72)发明人 吕雪飞 赵可心 李永瑞 邓玉林

(74)专利代理机构 北京宣言律师事务所 11509

代理人 李知伦

(51)Int.Cl.

B01L 3/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/541(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

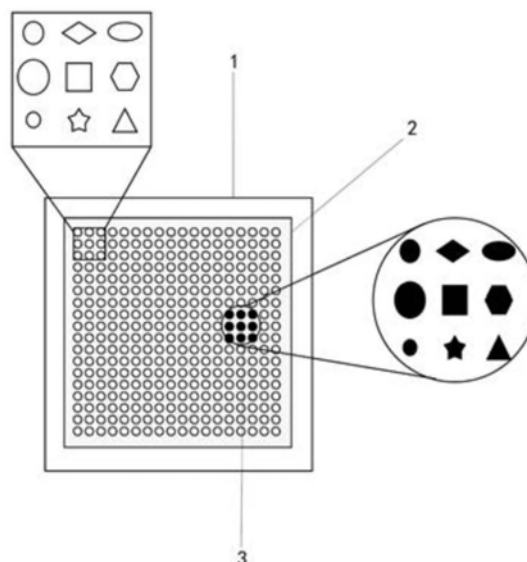
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种高通量微阵列检测芯片及其制备方法、应用方法

(57)摘要

本发明提供了一种高通量微阵列芯片及其制备方法、应用方法,由下至上依次包括多孔薄膜基底层和有机聚合物阵列层,有机聚合物阵列层内排布微孔,微孔里容置与微孔形状适应的检测微颗粒,检测微颗粒包被有抗体。本发明的微阵列芯片以结合了检测微颗粒的微阵列芯片替代传统的微量点样方法,增大了待测物与探针分子的结合面积,可以实现更快更灵敏的生物分子检测,可用于低浓度目标物的检测,有效提高芯片的灵敏度和准确度。



1. 一种高通量微阵列芯片, 其特征在于, 由下至上依次包括多孔薄膜基底层和有机聚合物阵列层, 所述有机聚合物阵列层内排布微孔, 所述微孔里容置与微孔形状适应的检测微颗粒, 所述检测微颗粒包被有抗体。

2. 根据权利要求1所述的高通量微阵列芯片, 其特征在于, 所述微孔设置为圆形、星形、三角形、圆角矩形、椭圆形、矩形、多边形中的一种或几种。

3. 根据权利要求1所述的高通量微阵列芯片, 其特征在于, 所述微孔的水平长宽为15-300 μm *15-300 μm ; 微孔的深度为15-80 μm , 相邻两微孔的间距为1-5倍微孔的最大直径, 所述检测微颗粒高度与微孔深度相同, 水平长宽约为微孔的110%。

4. 根据权利要求1所述的高通量微阵列芯片, 其特征在于, 所述多孔薄膜基底层为PET薄膜, 多孔薄膜基底层以在对应有机聚合物阵列层的微孔下方位置至少设有一个孔隙的方式分布, 多孔薄膜基底层的孔隙的孔径为0.4 μm 、1 μm 、3 μm 或8 μm ;

所述有机聚合物阵列层为光固化材料, NOA系列光胶或热固化材料: 聚二甲基硅氧烷(PDMS)、环氧基树脂;

所述检测微颗粒系由NOA系列光胶、聚苯乙烯PS、聚乙二醇二丙烯酸酯PEG-DA或SU-8系列光刻胶有机预聚物溶液固化而成。

5. 根据权利要求4所述的高通量微阵列芯片, 其特征在于, 所述检测微颗粒由体积百分数为40-70%的PEG-DA、15-30%的3 \times tris-EDTA、5-10%的光引发剂和10-20%的0.5mg/mL荧光染料组成的有机预聚物溶液, 经紫外光固化而成。

6. 一种根据权利要求1所述的高通量微阵列芯片的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤,

步骤一: 将多孔薄膜基底放置在透气性热塑胶上, 在透气性热塑胶下垫有载具, 将底面按照微孔阵列图案设有凸起的PDMS模具放置有多孔薄膜基底上方;

步骤二: 在PDMS模具上开设进样孔, 在进样孔位置滴加用于制备有机聚合物阵列层的待固化液体, 覆盖进样孔, 真空保持后解除真空, 将待固化液体充满模具;

步骤三: 加热或紫外光照射固化, 在多孔薄膜基底层上方形成具有微孔结构的有机聚合物阵列层;

步骤四: 将检测微颗粒悬浮液滴加在有机聚合物阵列层上方, 在多孔薄膜基底层下方放置吸水纸, 在毛细驱动力作用下, 微颗粒装配至光胶层的微孔内。

7. 一种利用权利要求4所述的高通量微阵列芯片进行检测微颗粒转移回收的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤一: 将待光固化的有机预聚物溶液倾倒在装配有检测微颗粒的所述微阵列芯片上, 使其自由蔓延覆盖芯片表面, 上面放置一层与所述有机预聚物溶液相同成分并已固化的基底;

步骤二: 通过紫外光照射对目标区域进行固化, 微阵列芯片上装配的检测微颗粒与固化后的有机预聚物之间形成共价结合, 分离所述微阵列芯片检测微颗粒转移, 并保留微颗粒在微阵列芯片上的相对位置。

8. 一种利用权利要求1所述的高通量微阵列芯片进行双抗体夹心法免疫检测的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤一将包被有链霉亲和素的微颗粒悬浮液与生物素标记的捕获抗体溶液共同孵育,

形成包被捕获抗体的检测微颗粒悬浮液；

步骤二将检测微颗粒悬浮液滴加在有机聚合物阵列层上，在多孔薄膜基底层下方放置吸水纸，检测微颗粒装配后冲洗有机聚合物阵列层表面除去未装配的检测微颗粒，用氮气吹干，用显微镜观察并拍摄记录装配的检测微颗粒的位置；

步骤三将待测蛋白溶液滴加在有机聚合物阵列层上方，孵育后，冲洗芯片，除去非特异性吸附，用氮气吹干；

步骤四在芯片上方滴加荧光标记的检测抗体溶液进行孵育，冲洗芯片，除去未结合的抗体，在荧光显微镜下成像，分析荧光强度。

9. 一种利用权利要求1所述的高通量微阵列芯片进行多抗原免疫检测的方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤一根据待测抗原类型，将包被有链霉亲和素的微颗粒悬浮液分别与生物素标记的不同捕获抗体溶液共同孵育，形成多种包被捕获抗体的检测微颗粒悬浮液；

步骤二将第一种检测微颗粒悬浮液滴加在有机聚合物阵列层上，在多孔薄膜基底层下方放置吸水纸，检测微颗粒装配后冲洗有机聚合物阵列层表面除去未装配的检测微颗粒，用氮气吹干，用显微镜观察并拍摄记录装配的第一种检测微颗粒的位置，重复本步骤，依次装配其余检测微颗粒，每次装配后均记录该种检测微颗粒的位置；

步骤三将多种待测蛋白的混合溶液滴加在有机聚合物阵列层上方，孵育后冲洗芯片，除去非特异性吸附，用氮气吹干；

步骤四在芯片上方滴加荧光标记的检测抗体溶液进行孵育，冲洗芯片，除去未结合的抗体，在荧光显微镜下成像，分析荧光强度。

10. 根据权利要求9所述的高通量微阵列芯片进行多抗原免疫检测的方法，其特征在于，所述待测蛋白为血清蛋白疾病标志物。

11. 根据权利要求10所述的高通量微阵列芯片进行多抗原免疫检测的方法，其特征在于，所述待测蛋白为肿瘤标志物、心肌损伤标志物：甲胎蛋白AFP、癌胚抗原CEA、前列腺特异抗原PSA、神经元特异性烯醇化酶NSE、一型心肌肌钙蛋白cTnI、肌红蛋白Mb、心肌肌钙蛋白T cTnT、肌酸激酶MB型同工酶CK-MB、心脏型脂肪酸结合蛋白H-FABP中的一种或几种。

一种高通量微阵列检测芯片及其制备方法、应用方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学检测领域,具体涉及一种高通量微阵列芯片及其制备方法、应用方法。

背景技术

[0002] 对多种疾病标志物的并行检测能够揭示关于某种复杂疾病的关键信息,并为临床诊断提供重要依据,而这些信息难以从检测单一目标物来获得。例如对血清中的不同蛋白标志物的分析就可作为癌症、心脏病和囊包性纤维症等疾病诊断的重要依据,但传统的ELISA和免疫荧光检测的方法对样品和试剂的需求量大,操作复杂,影响反应因素较多,因此难以同时对多种目标分子实现简便、快速的检测。

[0003] 微阵列芯片以高密度阵列为特征,通过平面微加工技术将高密度的生物识别分子(核酸、抗原、抗体、细胞或组织等)以某种方式排列并固定于一种载体(硅片、玻璃片或聚合物材料)表面,从而形成由分子探针组成的、可寻址的微阵列芯片。然后利用生物分子特有的亲和反应(如抗原-抗体/核酸适配体之间的特异性结合),实现生物样本中特定目标分子的定性或定量检测。它的本质是生物信号的平行分析,把大量生物信息密码集中到一小片固相基质上,从而使一些传统的生物学分析手段能够在尽量小的空间范围内,以尽量少的试剂消耗和尽量快的速度完成。

[0004] 现有的微阵列芯片多为平面型芯片,平面微阵列受限于只有一种类型的表面,因此只能放置一种类型的探针分子,而对微阵列芯片同时、快速地检测多种不同类别生物分子检测目标的需求日益增多。此外,传统平面微阵列芯片还存在扩散现象,出现非特异性吸附的假阳性概率,对检测精度受到一定影响。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术上的问题,本发明提供一种结合了固体微粒的微阵列芯片及其芯片的制备方法和应用方法,结构简单,能够实现高效、精确、高通量的生物分子检测,有效地辅助临床诊断过程。

[0006] 本发明提供以下技术方案:

[0007] 一种高通量微阵列芯片,由下至上依次包括多孔薄膜基底层和有机聚合物阵列层,所述有机聚合物阵列层内排布微孔,所述微孔里容置与微孔形状适应的检测微颗粒,所述检测微颗粒包被有抗体。

[0008] 进一步地,所述微孔设置为圆形、星形、三角形、圆角矩形、椭圆形、矩形、多边形中的一种或几种。

[0009] 进一步地,所述微孔的水平长宽为 $15-300\mu\text{m} \times 15-300\mu\text{m}$;微孔的深度为 $15-80\mu\text{m}$,相邻两微孔的间距为1-5倍微孔的最大直径,所述检测微颗粒高度与微孔深度相同,水平长宽约为微孔的110%。

[0010] 进一步地,所述多孔薄膜基底层为PET薄膜,多孔薄膜基底层以在对应有机聚合物

阵列层的微孔下方位置至少设有一个孔隙的方式分布,多孔薄膜基底层孔隙的孔径为 $0.4\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$ 、 $3\mu\text{m}$ 或 $8\mu\text{m}$;

[0011] 所述有机聚合物阵列层为光固化材料,NOA系列光胶或热固化材料:聚二甲基硅氧烷(PDMS)、环氧基树脂;

[0012] 所述检测微颗粒系由NOA系列光胶、聚苯乙烯PS、聚乙二醇二丙烯酸酯PEG-DA或SU-8系列光刻胶有机预聚物溶液固化而成。

[0013] 进一步地,所述检测微颗粒由体积百分数为40-70%的PEG-DA、15-30%的 $3\times\text{tris-EDTA}$ 、5-10%的光引发剂和10-20%的 0.5mg/mL 荧光染料组成的有机预聚物溶液,经紫外光固化而成。

[0014] 一种高通量微阵列芯片的制备方法,包括以下步骤,

[0015] 步骤一:将多孔薄膜基底放置在透气性热塑胶上,在透气性热塑胶下垫有载具,将底面按照微孔阵列图案设有凸起的PDMS模具放置在多孔薄膜基底上方;

[0016] 步骤二:在PDMS模具上开设进样孔,在进样孔位置滴加用于制备有机聚合物阵列层的待固化液体,覆盖进样孔,真空保持后解除真空,将待固化液体充满模具;

[0017] 步骤三:加热或紫外光照射固化,在多孔薄膜基底层上方形成具有微孔结构的有机聚合物阵列层;

[0018] 步骤四:将检测微颗粒悬浮液滴加在有机聚合物阵列层上方,在多孔薄膜基底层下方放置吸水纸,在毛细驱动力作用下,微颗粒装配至光胶层的微孔内。

[0019] 一种利用高通量微阵列芯片进行检测微颗粒转移回收的方法,包括以下步骤:

[0020] 步骤一:将待光固化的有机预聚物溶液倾倒在装配有检测微颗粒的所述微阵列芯片上,使其自由蔓延覆盖芯片表面,上面放置一层与所述有机预聚物溶液相同成分并已固化的基底;

[0021] 步骤二:通过紫外光照射对目标区域进行固化,微阵列芯片上装配的检测微颗粒与固化后的有机预聚物之间形成共价结合,分离所述微阵列芯片检测微颗粒转移,并保留微颗粒在微阵列芯片上的相对位置。

[0022] 一种利用高通量微阵列芯片进行双抗体夹心法免疫检测的方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0023] 步骤一将包被有链霉亲和素的微颗粒悬浮液与生物素标记的捕获抗体溶液共同孵育,形成包被捕获抗体的检测微颗粒悬浮液;

[0024] 步骤二将检测微颗粒悬浮液滴加在有机聚合物阵列层上,在多孔薄膜基底层下方放置吸水纸,检测微颗粒装配后冲洗有机聚合物阵列层表面除去未装配的检测微颗粒,用氮气吹干,用显微镜观察并拍摄记录装配的检测微颗粒的位置;

[0025] 步骤三将待测蛋白溶液滴加在有机聚合物阵列层上方,孵育后,冲洗芯片,除去非特异性吸附,用氮气吹干;

[0026] 步骤四在芯片上方滴加荧光标记的检测抗体溶液进行孵育,冲洗芯片,除去未结合的抗体,在荧光显微镜下成像,分析荧光强度。

[0027] 一种利用高通量微阵列芯片进行多抗原免疫检测的方法,包括以下步骤:

[0028] 步骤一根据待测抗原类型,将包被有链霉亲和素的微颗粒悬浮液分别与生物素标记的不同捕获抗体溶液共同孵育,形成多种包被捕获抗体的检测微颗粒悬浮液;

[0029] 步骤二将第一种检测微颗粒悬浮液滴加在有机聚合物阵列层上,在多孔薄膜基底层下方放置吸水纸,检测微颗粒装配后冲洗有机聚合物阵列层表面除去未装配的检测微颗粒,用氮气吹干,用显微镜观察并拍摄记录装配的第一种检测微颗粒的位置,重复本步骤,依次装配其余检测微颗粒,每次装配后均记录该种检测微颗粒的位置;

[0030] 步骤三将多种待测蛋白的混合溶液滴加在有机聚合物阵列层上方,孵育后冲洗芯片,除去非特异性吸附,用氮气吹干;

[0031] 步骤四在芯片上方滴加荧光标记的检测抗体溶液进行孵育,冲洗芯片,除去未结合的抗体,在荧光显微镜下成像,分析荧光强度。

[0032] 进一步地,所述待测蛋白为血清蛋白疾病标志物。

[0033] 进一步地,待测蛋白为肿瘤标志物、心肌损伤标志物:甲胎蛋白AFP、癌胚抗原CEA、前列腺特异抗原PSA、神经元特异性烯醇化酶NSE、一型心肌肌钙蛋白cTnI、肌红蛋白Mb、心肌肌钙蛋白T cTnT、肌酸激酶 MB型同工酶CK-MB、心脏型脂肪酸结合蛋白H-FABP中的一种或几种。

[0034] 采用上述技术方案,本发明具有如下有益效果:

[0035] 1、本发明的高通量微阵列检测芯片,使用结合了检测微颗粒的微阵列芯片替代传统的微量点样方法制作的微阵列芯片,增大了待测物与探针分子的结合面积,可以实现更快更灵敏的生物分子检测。

[0036] 2、本发明的高通量微阵列检测芯片,使用液体可以自由通过的多孔薄膜作为微阵列芯片的基底,因此在固体颗粒装配时,可以在多孔薄膜基底层下方放置一张吸水纸来快速吸收阵列上方的多余溶液,省去等待溶液完全蒸发所需的时间,加速颗粒的装配并提升稳定性,且检测微颗粒容置在微孔内,检测微颗粒的体积略大于微孔,保证装配稳固。

[0037] 3、本发明的高通量微阵列芯片,可根据特定细胞的形态与尺寸调整微孔的形状与大小,使微孔只能容纳单个细胞,从而实现后续的单细胞研究,如细胞筛选、单细胞测序等。

[0038] 4、本发明的高通量微阵列检测芯片,可以装配结合了多种探针分子的固体颗粒,从而实现不同种类的生物分子的并行检测,检测不同目标物的检测微颗粒的形状大小可以不同,从而进行有效区分,增加检测精确率。

[0039] 5、本发明的高通量微阵列检测芯片,可以通过生物素-亲和素系统实现探针分子与微颗粒的牢固结合,减少扩散现象,降低假阳性和假阴性出现的概率。

[0040] 6、本发明的高通量微阵列检测芯片,可以装配结合了多种抗体、小分子、抗生素等的微型颗粒,实现对微生物的趋化研究。

[0041] 7、本发明的高通量微阵列检测芯片,所需阵列点样的样品量极少,降低了常规微阵列芯片的成本,可用于微小含量检测目标的精准检测。

附图说明

[0042] 图1是本发明高通量微阵列检测芯片结构示意图;

[0043] 图2是本发明实施例中高通量微阵列检测芯片制备方法的流程图;

[0044] 图3是本发明实施例中高通量微阵列芯片进行检测微颗粒转移回收的方法流程图。

[0045] 其中:1-多孔薄膜基底层、2-有机聚合物阵列层、3-检测微颗粒、4-底部设有凸起

的PDMS模具、5-制备有机聚合物阵列层的待固化液体、6-多孔薄膜基底层、7-透气性热塑胶、8-固化后的有机聚合物阵列层、9- 包被捕获抗体的检测微颗粒悬浮液、10-装配检测微颗粒的高通量微阵列检测芯片、11-荧光颗粒检测抗体偶联物、12-含目标蛋白的高通量微阵列检测芯片、13-装配检测微颗粒的高通量微阵列检测芯片、14-紫外光、15- 预先完成固化的有机预聚物、16-待光固化的有机预聚物溶液、17-检测微颗粒整体转移后组成的高通量微阵列检测芯片

具体实施方式

[0046] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,下面结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的结构图及具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0047] 实施例1

[0048] 如图1所示,本发明提供一种高通量微阵列芯片,由下至上依次包括多孔薄膜基底层1和有机聚合物阵列层2,有机聚合物阵列层内排布微孔,微孔里容置与微孔形状适应的检测微颗粒3,检测微颗粒包被有抗体。

[0049] 一块微阵列芯片为一个芯片单区域,多个单区域可以集成为超高通量检测芯片。微阵列芯片单区域大小可以为(5-100) mm*(5-100) mm,其大小可根据微阵列通量适当调整,单个区域通量大小可以为1-10000个,其通量数与芯片大小相适应。

[0050] 在有机聚合物阵列层内排布的微孔,可以设置为圆形、星形、三角形、圆角矩形、椭圆形、矩形、多边形中的一种或几种,微孔的大小可以相同或不相同,芯片通量与形状和形状大小相关,这样的设置可以便于区分不同检测目标物。

[0051] 微孔的水平长宽为15-300 μ m*15-300 μ m;微孔的深度为15-80 μ m,相邻两微孔的间距为1-5倍微孔的最大直径,检测微颗粒高度与微孔深度相同,水平长宽约为微孔的110%,这样能够将检测微颗粒有效地固定在微孔之中,避免微颗粒脱落。

[0052] 其中,多孔薄膜基底层为PET薄膜,多孔薄膜基底层以在对应有机聚合物阵列层的微孔下方位置至少设有一个孔隙的方式分布,多孔薄膜基底层的孔隙的孔径为0.4 μ m、1 μ m、3 μ m或8 μ m。

[0053] 有机聚合物阵列层为光固化材料,NOA系列光胶或热固化材料:聚二甲基硅氧烷(PDMS)、环氧基树脂。

[0054] 检测微颗粒为NOA系列光胶、聚苯乙烯PS、聚乙二醇二丙烯酸酯 PEG-DA或SU-8系列光刻胶的有机预聚物溶液。

[0055] 检测微颗粒由体积百分数为70-40%的PEG-DA、15-30%的3 \times tris-EDTA、5-10%的光引发剂和10-20%的0.5mg/mL荧光染料溶液经光固化而成。

[0056] 实施例2

[0057] 图2提供了一种高通量微阵列检测芯片制备方法的流程图,如图2所示,包括以下步骤:

[0058] 步骤一:将多孔薄膜基底6放置在透气性热塑胶7上,在透气性热塑胶下垫有载具,将底面按照微孔阵列图案设有凸起的PDMS模具4放置在多孔薄膜基底上方;

[0059] 步骤二:在PDMS模具上开设进样孔,打孔的位置在微孔阵列外,打孔结束将PDMS模

具进行等离子清洗。在进样孔位置滴加用于制备有机聚合物阵列层的待固化液体5(如NOA81光胶),覆盖进样孔,真空保持,这时PDMS模具内的空气会从进样孔逸出,逸出的空气在进样孔附近的待固化液体中形成气泡,然后破裂,待固化液体重新封闭进样孔,解除真空,在模具内外压力差的作用下,将待固化液体充满模具;

[0060] 步骤三:加热或紫外光照射固化,分离PDMS模具,去除透气性热塑胶,获得在多孔薄膜基底层上方形成具有微孔结构的有机聚合物阵列层8;

[0061] 步骤四:将检测微颗粒悬浮液9滴加在有机聚合物阵列层上方,在多孔薄膜基底层下方放置吸水纸,在毛细驱动力作用下,微颗粒装配至光胶层的微孔内。使用一个塑料挤瓶产生水流来冲洗未装配的微粒,重复装配与冲洗过程完成微颗粒的装配,见图2中的编号10。

[0062] 在步骤一之前制作PDMS模具,方法如下:

[0063] 单晶硅片表面的羟基化处理:将清洗干净的硅片放入(体积比)浓硫酸:双氧水7:3的溶液中加热、洗净、氮气吹干,备用。甩胶:在暗室中,向硅片上倒入SU8-2050紫外光刻胶,利用匀胶机在硅片表面形成均匀的光刻胶涂层,在65℃下加热3min,在95℃下加热6min。光刻:使用AI绘图软件绘制微孔阵列并打印到菲林掩膜上,将菲林掩膜覆盖于硅片上,通过光刻机紫外(365nm)固化,之后65℃加热1min,95℃加热6min。显影:将硅片放入显影液中轻轻震荡,异丙醇清洗,去除残余光胶,清洗氮气吹干。硅片表面的硅烷化处理:10μL C₂H₆Cl₂Si与硅片一同抽真空,使试剂气化沉降于硅片表面。模塑:将PDMS和固化剂混合,真空除气泡,以PDMS混合液浇铸硅片,加热固化PDMS除取硅片,得到PDMS模具。

[0064] 在步骤三中,微颗粒的制备方法如下:

[0065] 金属基片的制作:在表面光滑的玻璃片抛光片上用等离子溅射铬金属涂层,清洗备用。注液:在金属基片上设置掩膜围堰,向围堰内注入占体积60%PEG-DA(Mn=700),20%3×tris-EDTA,5%光引发剂,15%的0.5mg/mL罗丹明B丙烯酸酯的PEG(Mn=200)溶液。光刻:将印有微颗粒图案的菲林掩膜覆盖于围堰上,光刻机紫外(365nm)固化,形成微颗粒。清洗:将微颗粒从金属基片上取下后,用丙酮和乙醇体积比4:1的混合液清洗,去除未反应的光固化材料。

[0066] 实施例3

[0067] 图3提供了本发明的一种高通量微阵列芯片进行检测微颗粒转移回收的方法,如图3所示,包括以下步骤:

[0068] 步骤一:将待光固化的有机预聚物溶液16倾倒在装配有检测微颗粒的微阵列芯片13上,使其自由蔓延覆盖芯片表面,上面放置一层与有机预聚物溶液相同成分并已固化的基底15;

[0069] 步骤二:通过紫外光14照射对目标区域进行固化,微阵列芯片上装配的检测微颗粒与固化后的有机预聚物16之间形成共价结合,分离微阵列芯片检测微颗粒转移,并保留微颗粒在微阵列芯片上的相对位置。

[0070] 通过将装配在微阵列检测芯片上的检测微颗粒进行转移回收,使微阵列检测芯片的阵列层具有可重复使用的特性,能够完成多次免疫检测。完成转移后的微粒具有更大的流体接触面积,可以结合更多的待测物与荧光分子,因此固化后的有机预聚物和与其共价结合的检测微颗粒同样可组成高通量微阵列检测芯片17,并应用于多种生物分子的高通

量、并行性检测。

[0071] 实施例4

[0072] 本发明提供了一种利用高通量微阵列芯片进行双抗体夹心法免疫检测的方法,包括以下步骤:

[0073] 步骤一将包被有链霉亲和素的微颗粒悬浮液与生物素标记的捕获抗体溶液共同孵育,形成包被捕获抗体的检测微颗粒悬浮液;

[0074] 步骤二将检测微颗粒悬浮液滴加在有机聚合物阵列层上,在多孔薄膜基底层下方放置吸水纸,检测微颗粒装配后冲洗有机聚合物阵列层表面除去未装配的检测微颗粒,用氮气吹干,用显微镜观察并拍摄记录装配的检测微珠的位置;

[0075] 步骤三将待测蛋白溶液滴加在有机聚合物阵列层上方,孵育后,冲洗芯片,除去非特异性吸附,用氮气吹干;

[0076] 步骤四在芯片上方滴加荧光标记的检测抗体溶液进行孵育,冲洗芯片,除去未结合的抗体,在荧光显微镜下成像,分析荧光强度。

[0077] 应当理解的是,本发明提供了采用双抗体夹心法的免疫检测方法,本发明的高通量微阵列芯片也可以用于抗原-抗体直接法的免疫检测。

[0078] 实施例5

[0079] 本发明提供了一种利用高通量微阵列芯片进行多抗原免疫检测的方法,如图2所示,包括以下步骤:

[0080] 步骤一根据待测抗原类型,将包被有链霉亲和素的微颗粒悬浮液分别与生物素标记的不同捕获抗体溶液共同孵育,形成多种包被捕获抗体的检测微颗粒悬浮液;

[0081] 步骤二将第一种检测微颗粒悬浮液滴加在有机聚合物阵列层上,在多孔薄膜基底层下方放置吸水纸,检测微颗粒装配后冲洗有机聚合物阵列层表面除去未装配的检测微颗粒,用氮气吹干,用显微镜观察并拍摄记录装配的第一种检测微珠的位置,重复本步骤,依次装配其余检测微颗粒,每次装配后均记录该种检测微颗粒的位置;

[0082] 步骤三将多种待测蛋白的混合溶液滴加在有机聚合物阵列层上方,孵育后冲洗芯片,除去非特异性吸附,用氮气吹干;

[0083] 步骤四在芯片上方滴加荧光标记的检测抗体溶液进行孵育,冲洗芯片,除去未结合的抗体,在荧光显微镜下成像,分析荧光强度。

[0084] 其中,待测蛋白为血清蛋白疾病标记物,优选地,可以选用多种肿瘤标志物、心肌损伤标志物:甲胎蛋白AFP、癌胚抗原CEA、前列腺特异抗原PSA、神经元特异性烯醇化酶NSE、一型心肌肌钙蛋白cTnI、肌红蛋白Mb、心肌肌钙蛋白T cTnT、肌酸激酶MB型同工酶CK-MB、心脏型脂肪酸结合蛋白H-FABP中的一种或几种。

[0085] 以甲胎蛋白AFP、癌胚抗原CEA、心肌损伤标志物心肌肌钙蛋白I cTnI 三种蛋白为例,进行同时检测,方法如下:

[0086] 步骤一:抗体包被检测微颗粒的制作:直径15 μ m的链霉亲和素包被的聚苯乙烯微珠经PBS-B-T(1 \times PBS,1%BSA,0.05%Tween 20)洗涤两次后,重悬于PBS-B-T中(\sim 8000个/ μ L),然后与等体积的生物素标记抗体PBS溶液(抗体浓度0.1mg/mL)混合并于室温下孵育2h。随后用 PBS-B-T洗涤微珠三次,并将其重悬于PBS溶液中于4 $^{\circ}$ C储存。

[0087] 步骤二:为实现对上述三种疾病标志物蛋白的同时检测,要将包被有这三种蛋白

质的特异性抗体的检测微颗粒分别装配到微阵列检测芯片上,操作方法为:

[0088] a) 将1 μ L包含步骤一所述检测微颗粒(包被抗AFP抗体)的PBS溶液(\sim 100个/ μ L)滴加到同一块微阵列检测芯片上。可在芯片下方放一块吸水纸,加速检测微颗粒的装配。

[0089] b) 用PBS溶液沿一个方向冲洗芯片,去除没有完成固定的检测微颗粒,然后用吸水纸在芯片下方吸收多余溶液,用氮气吹干。

[0090] c) 用显微镜观察并记录装配成功的检测微颗粒的位置。

[0091] d) 重复(a) (b),将包被抗CEA抗体和包被抗cTnI抗体的检测微颗粒也装配到同一块芯片上,每次装配完成后都在显微镜下观察,区别并记录三种不同检测微颗粒的位置。

[0092] 步骤三:待测蛋白与抗体包被检测微颗粒的结合

[0093] a) 将目标物(AFP、CEA和cTnI)加入FBS制成不同浓度的待检测样品,取3 μ L上述样品滴加到芯片上,并于室温和100%相对湿度下孵育 40min。

[0094] b) 用PBS-T (1 \times PBS,0.05%Tween 20)沿一个方向冲洗芯片,去除大部分残留的样品溶液。

[0095] c) 将芯片放入一个干净的培养皿中,并加入20ml PBS-T,振荡5min,来完全去除非特异性吸附到检测微颗粒表面上的样品成分。芯片取出后用 0.1 \times PBS冲洗并用氮气吹干。

[0096] 步骤四:加入荧光标记的检测抗体并观察:在芯片上滴加3 μ L检测抗体的1 \times PBS溶液(0.1mg/mL),并于室温和100%相对湿度下孵育40min。然后重复步骤三(c)来去除过量的检测抗体。经过上述免疫分析的微阵列芯片,可以使用荧光显微镜进行成像,根据荧光强度大小来确定样品中待测物的浓度。

[0097] 以上所述实施例仅表达了本发明的实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为本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。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

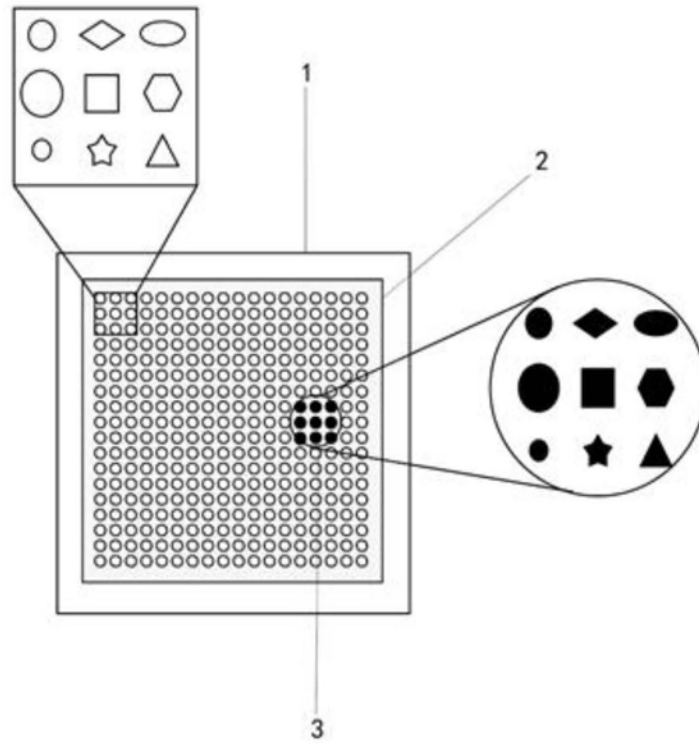


图1

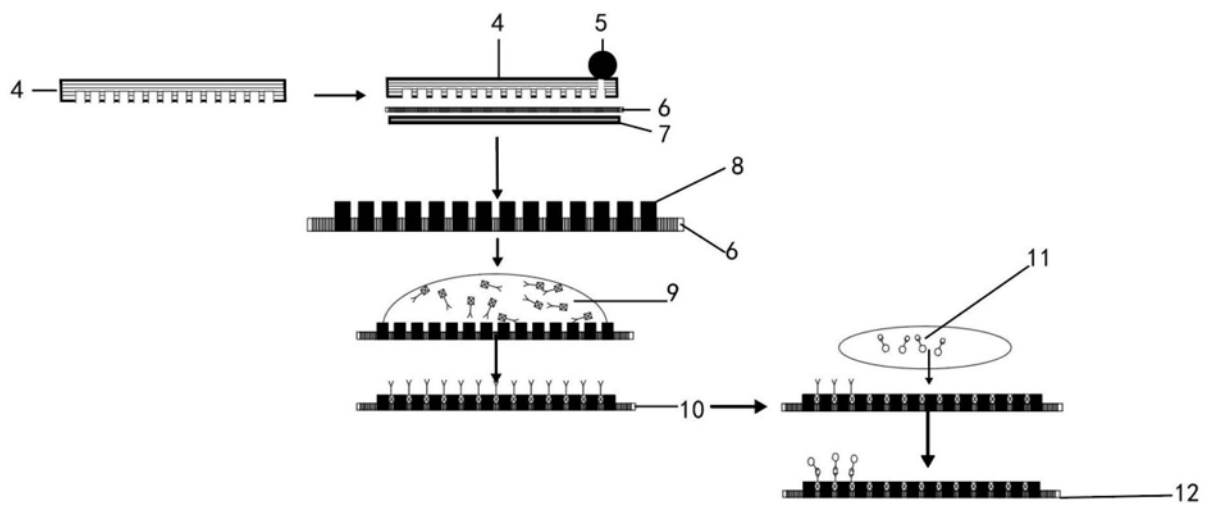


图2

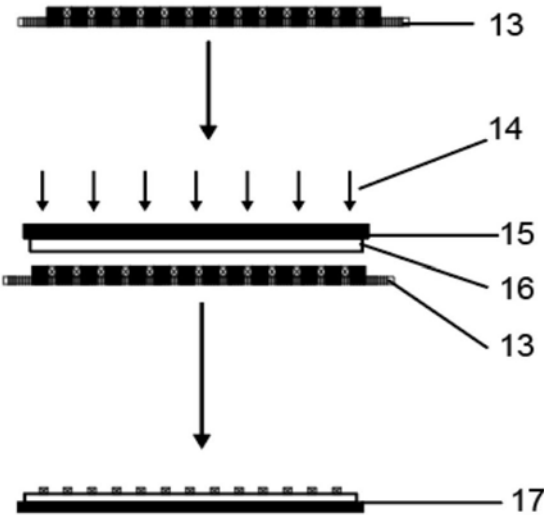


图3

专利名称(译)	一种高通量微阵列检测芯片及其制备方法、应用方法		
公开(公告)号	CN109847818A	公开(公告)日	2019-06-07
申请号	CN201910176349.3	申请日	2019-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	北京理工大学		
申请(专利权)人(译)	北京理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京理工大学		
[标]发明人	吕雪飞 赵可心 李永瑞 邓玉林		
发明人	吕雪飞 赵可心 李永瑞 邓玉林		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/53 G01N33/541 G01N33/58		
代理人(译)	李知伦		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种高通量微阵列芯片及其制备方法、应用方法，由下至上依次包括多孔薄膜基层和有机聚合物阵列层，有机聚合物阵列层内排布微孔，微孔里容置与微孔形状适应的检测微颗粒，检测微颗粒包被有抗体。本发明的微阵列芯片以结合了检测微颗粒的微阵列芯片替代传统的微量点样方法，增大了待测物与探针分子的结合面积，可以实现更快更灵敏的生物分子检测，可用于低浓度目标物的检测，有效提高芯片的灵敏度和准确度。

