



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108993621 A

(43)申请公布日 2018.12.14

(21)申请号 201810744796.X

(22)申请日 2018.07.09

(71)申请人 浙江大学

地址 310013 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72)发明人 牟颖 孙敬敬

(74)专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 曹兆霞

(51)Int.Cl.

B01L 3/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

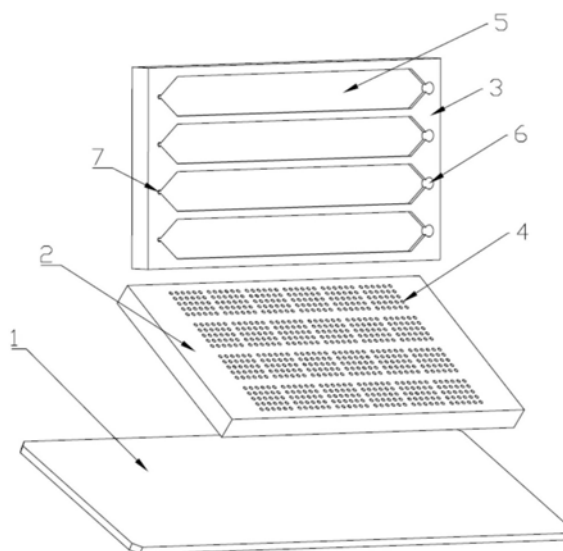
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片及方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片,包括小室基板,叠放在所述小室基板上的盖板,其特征在于,所述小室基板为透明且具有透气性储气性的疏水材料,且上表面开设有微小室阵列,所述盖板的下表面开设有多凹槽,该凹槽与小室基板形成用于微球悬浮液流通的通道,所述盖板的一端部设有进样口,该进样口与凹槽的一端连接,引导微球悬浮液流入到通道内,所述盖板的另一端部设有出样口,该出样口与凹槽的另一端连接,引导微球悬浮液流出通道。该微小室阵列微流控芯片结构简单,微小室的疏水性强,微球悬浮液极易进入微小室,微小室利用率高达60%。



1. 一种用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片, 包括小室基板, 叠放在所述小室基板上的盖板, 其特征在于, 所述小室基板为透明且具有透气性储气性的疏水材料, 且上表面开设有微小室阵列, 所述盖板的下表面开设有多個凹槽, 该凹槽与小室基板形成用于微球悬浮液流通的通道, 所述盖板的一端部设有进样口, 该进样口与凹槽的一端连接, 引导微球悬浮液流入到通道内, 所述盖板的另一端部设有出样口, 该出样口与凹槽的另一端连接, 引导微球悬浮液流出通道。

2. 如权利要求1所述的用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片, 其特征在于, 所述微小室的內径大于1倍的微球直径且小于2倍的微球直径。

3. 如权利要求1或2所述的用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片, 其特征在于, 所述小室基板为聚二甲基硅氧烷。

4. 如权利要求1所述的用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片, 其特征在于, 所述盖板的另一端部设有与凹槽数量相同的出样口, 每个出样口与一个凹槽的另一端连接, 引导微球悬浮液流出通道。

5. 如权利要求4所述的用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片, 其特征在于, 所述进样口和出样口为圆孔或方孔。

6. 如权利要求1所述的用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片, 其特征在于, 所述盖板的材料为玻璃、聚甲基苯烯酸甲酯、聚二甲基硅氧烷或聚碳酸酯。

7. 如权利要求1~6所述的用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片, 其特征在于, 所述小室基板的下表面上设有支撑板, 所述支撑板的材料为玻璃、聚甲基苯烯酸甲酯或聚碳酸酯。

8. 一种利用权利要求1~7任一所述的微小室阵列微流控芯片进行数字酶联免疫检测的方法, 包括以下步骤:

(1) 将微小室阵列微流控芯片的进样口和出样口封闭后, 置于提供真空环境的仪器设备, 对微小室阵列微流控芯片进行脱气处理;

(2) 将微球悬浮液从经脱气处理的微小室阵列微流控芯片的进样口注入到通道内, 在微小室材料的储气性作用下, 微球悬浮液被吸入到微小室内;

(3) 将氟油从经脱气处理的微小室阵列微流控芯片的进样口注入到通道内, 在微小室材料的疏水性作用下, 氟油将微小室内的微球悬浮液冲出;

(4) 利用荧光成像设备采集微小室阵列微流控芯片的图像, 对阳性小室的数量和磁珠小室的数量进行计数, 计算阳性小室与有磁珠小室数量的比值, 实现对数字酶联免疫的检测。

一种用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测领域,具体地,涉及一种用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片及方法。

背景技术

[0002] 生物标志物,特别是蛋白质生物标志物,被广泛用于疾病的临床诊断。人类蛋白质组大约由超过20,000个基因转录翻译而来,与核酸相比蛋白质生物标志物包含了更多下游信息。人类在循环系统中有超过4000种分泌蛋白,其中的375种分泌蛋白可以通过实验检测到,在这些可检测的蛋白质中171种被美国食品药品监督管理局(Food and drug administration,FDA)批准用于临床诊断。由此可以看出蛋白质标志物对人类健康的重要意义,同时只有小部分分泌蛋白是可检测的昭示着在蛋白质检测领域还面临着很大的挑战。目前免疫测定法由于有较好的特异性和灵敏度是检测蛋白质标志物的主要方法,免疫测定法主要包括酶联免疫吸附法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay,ELISA)、化学发光法、电化学发光法等方法。传统的ELISA通过抗原抗体反应用酶标抗体上的酶分解荧光底物产生荧光进行信号放大,最低检测限能达到 10^{-13} mol/L。但是当待测分子浓度低于 10^{-13} mol/L时,酶分解荧光底物的量太少产生的荧光分子浓度太低而不能被传统的显微镜检测到。由于在疾病诊断的早期蛋白质生物标志物的量常低于 10^{-13} mol/L,因此Rissin等第一次提出来了数字ELISA,在单分子水平上检测蛋白质分子。

[0003] 数字计数方法最早用于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR),PCR技术是目前最常用的进行核酸检测的技术。数字PCR技术是将待测的核酸在多孔板中进行稀释,使得每个孔中有1个或0个核酸分子,随后在分隔开的单孔中进行PCR反应对单拷贝模板进行扩增。数字PCR技术可以从最低限度稀释的样品中扩增单个的DNA分子,从而将从传统PCR反应获得的指数型模拟信号转变为线性的数字信号,能够做到真正意义上的绝对定量。数字计数单个蛋白质分子对基因组学、蛋白质组学,细胞分析、医疗诊断有重要意义。数字ELISA与数字PCR技术都是将单个分子限定在一个较小的空间里,将信号放大到现有技术能检测到的程度,通过直接统计单个分子的信号得到单分子的绝对数量。与数字PCR技术不同的是,由于蛋白质不能进行扩增,因此在数字ELISA技术中我们使用酶标抗体上的酶分解荧光底物进行信号放大。单个酶分子分解的荧光底物要在足够小的反应小室中聚集才能被现有的成像仪器采集到,因此数字ELISA技术的难点在于制作大规模的微小室阵列以及将单个蛋白质分子分散到单个小室中。

[0004] 可以利用微球将单个蛋白质分子分散到单个小室。将表面修饰了功能集团的微球表面偶联抗体或适配体,用来捕获样品中的目标分子,当样品中的目标分子远少于微球的数量时,根据泊松分布原理,此时一个微球上只捕获了1个目标分子或0个目标分子,然后在目标分子上连接酶标抗体。将微球单个分散至单个小室中,荧光信号只产生在含有微球-目标分子-酶复合物的小室中,采集荧光图像,统计出有荧光的小室的数量,荧光小室的数量/小室中所有微球的数量与目标分子浓度是线性关系。

[0005] 微流控芯片是指将传统生物化学实验室中进行的实验操作集成到一块几平方厘米的芯片上,通过芯片结构的设计、多种功能单元的配合,实现试剂的操控、生化反应的进行以及反应结果的检测等。微流控芯片由于其消耗样本少、成本低、操作简单等优点,也被应用到了数字ELISA中。目前的可以生成微反应单元的数字ELISA微流控芯片有化学刻蚀、注塑、制作亲水小室底面疏水小室外壁、以及制作液滴芯片等方法。Rissin等在光纤上化学蚀刻出飞升级小室然后利用离心力将磁珠单分散至小室中,但是这种方式在刻蚀光纤制作中用到多种化学试剂工艺复杂并且需要提供离心力。在这种方法的基础上,Illumina公司制作了基于磁珠能高通量数字计数检测核酸的平台,但是其基于蒸发的磁珠加载方式会导致蛋白质变性和酶失活因此并不适用于蛋白质和酶的检测。Kan等用注塑环烯烃聚合物的方式制作了圆盘型的小室阵列,Quanterix公司基于此制作了商业产品SiMoA,SiMoA的小室阵列有亲水的小室底面和疏水的小室外壁,微球悬浮液加入后,微球由于重力作用沉降在小室中,使得微球可以单分散并被氟油封闭在小室内部,由于液相难以进入疏水的小室,所以需要使用真空将液相引入,并且每个小室外壁有7-10度的倾斜,以便于液相进入,这无疑增加了装置的复杂度和芯片的制作难度。Decrop等利用凸起的PDMS印章制作了飞升级小室,首先在玻璃表面涂覆一层疏水且能紫外固化的材料OSTE,将PDMS印章印在上面,经过紫外照射后将PDMS印章揭掉得到有亲水的底疏水外壁的小室阵列,由于小室内壁亲水使得液相容易进入小室内部,但是制作这种类型的芯片往往需要多步复杂的操作,限制了它的应用。Shim等发明了一种生成飞升级液滴的装置,可以生成32fL的液滴,生成液滴的频率可达到 $3.5 \times 10^5 \text{ Hz}$,为了能对单层液滴进行成像,并且避免液滴在成像时位置的变化,此装置用了三个气动阀在成像时将液滴固定在成像区域里,尽管此装置实现了目前最快速的飞升级液滴生成,但是由于液滴的位置不易固定,所以成像过程设计比较复杂。因此,新的使用更为简便,制作更简单的具有微小室阵列的微流控芯片需要被提出。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片及方法,该微小室阵列微流控芯片结构简单,微小室的疏水性强,微球悬浮液极易进入微小室,微小室利用率高达60%。

[0007] 为实现上述发明目的,提供以下技术方案:

[0008] 一种用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片,包括小室基板,叠放在所述小室基板上的盖板,所述小室基板为透明且具有透气性储气性的疏水材料,且上表面开设有微小室阵列,所述盖板的下表面开设有多个凹槽,该凹槽与小室基板形成用于微球悬浮液流通的通道,所述盖板的一端部设有进样口,该进样口与凹槽的一端连接,引导微球悬浮液流入到通道内,所述盖板的另一端部设有出样口,该出样口与凹槽的另一端连接,引导微球悬浮液流出通道。

[0009] 本发明提供的微小室阵列微流控芯片的微小室是透明且具有透气性储气性的疏水材料,这样在进行测试时,注入的微球悬浮液直接能够在储气性的作用下,直接进入微小室内,通过氟油时,在微小室材料的疏水性作用下,氟油能够将微小室内的微球悬浮液冲出,避免了施加额外的磁力或离心力,精简了测试步骤。

[0010] 优选地,所述小室基板为聚二甲基硅氧烷(PDMS),该PDMS透明,具有很强的透气性

储气性,且还具有疏水性,既能够吸进微球悬浮液,通入氟油后,还能冲出微球悬浮液,特别适用于作为微小室材料。

[0011] 所述微小室可以由光刻法制作模具再脱模制作而成,小室的形状可以是但不限于正方形、圆形、三角形,小室的大小根据所使用的微球而决定,一般情况下,所述微小室的内径大于1倍的微球直径且小于2倍的微球直径。

[0012] 盖板的材料为玻璃、聚甲基苯丙烯酸甲酯(PMMA)、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚碳酸酯(PC)等透明易塑性材料。通道的形状可以是但不限于正方形、长方形、圆形、菱形、三角形。

[0013] 优选地,所述盖板的一端部上所述盖板的另一端部设有与凹槽数量相同的出样口,每个出样口与一个凹槽的另一端连接,引导微球悬浮液流出通道。其中,所述进样口和出样口为圆孔或方孔,这样设置,能够很容易地将微球悬浮液排除。

[0014] 根据小室基板与盖板的材料,小室基板与盖板的封接方法可以是热键合、胶粘合、热压封接、等离子体处理等封接办法。小室基板与盖板根据具体实例可选择不同的上下位置关系。

[0015] 优选地,所述小室基板的下表面上设有支撑板,所述支撑板的材料为玻璃、聚甲基苯丙烯酸甲酯(PMMA)或聚碳酸酯(PC),该支撑板能够支撑小室基板与盖板,使其更易于移动。特别是当小室基板为弹性材料时,更需要支撑板对小室基本进行支撑。支撑板的形状可以是但不限于长方形、圆形、正方形。

[0016] 一种利用上述的微小室阵列微流控芯片进行数字酶联免疫检测的方法,包括以下步骤:

[0017] (1)将微小室阵列微流控芯片的进样口和出样口封闭后,置于提供真空环境的仪器设备,对微小室阵列微流控芯片进行脱气处理;

[0018] (2)将微球悬浮液从经脱气处理的微小室阵列微流控芯片的进样口注入到通道内,在微小室材料的储气性作用下,微球悬浮液被吸入到微小室内;

[0019] (3)将氟油从经脱气处理的微小室阵列微流控芯片的进样口注入到通道内,在微小室材料的疏水性作用下,氟油将微小室内的微球悬浮液冲出;

[0020] (4)利用荧光成像设备采集微小室阵列微流控芯片的图像,对阳性小室的数量和磁珠小室的数量进行计数,计算阳性小室与有磁珠小室数量的比值,实现对数字酶联免疫的检测。

[0021] 本发明具有的有益效果为:

[0022] (1)本发明提供的微小室阵列微流控芯片一次成型,制备相对简单,在应用时,无需进行亲水疏水等表面修饰对其进行处理,且由于小室基板为具有透气性储气性的疏水材料,这样利用负压进样,小室在数秒内就会被液相充满,无需施加离心力等外界力。

[0023] (2)本发明提供的微小室阵列微流控芯片的小室数量可达到百万级,通过注射氟油的方法封闭每个小室,相当于在数秒内得到百万个位置固定的液滴,便于成像,可以与生成飞升级液滴最快的液滴芯片媲美,且具有较高的小室利用率,加入磁珠后静置2min,小室利用率即可达到60%,检测限最低可达到1aM,与传统的ELISA相比降低了5个数量级。

附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现

有技术描述中所需要使用的附图做简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动前提下,还可以根据这些附图获得其他附图。

[0025] 图1是本实施例提供的用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片的结构示意图;

[0026] 图2是图1中微小室阵列微流控芯片的爆炸图;

[0027] 图3是图1中微小室阵列微流控芯片的爆炸图;

[0028] 图4是图1中微小室阵列微流控芯片的盖板的仰视图;

[0029] 图5是图4中盖板沿A-A的剖视图;

[0030] 图6是实施例中用于检测人类肿瘤坏死因子- α 结果的荧光图。

具体实施方式

[0031] 为使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例对本发明进行进一步的详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施方式仅仅用以解释本发明,并不限定本发明的保护范围。

[0032] 如图1~图5所示,本发明提供的微小室阵列微流控芯包括依次叠放的支撑板1、小室基板2、盖板3。小室基板2上开设有微小室阵4、盖板3上设有凹槽5,该凹槽5与小室基板2形成通道、通道的一端设有进样口6,另一端设有出样口7。

[0033] 其中,小室基板2由模塑法制成,为PDMS材料,每个通道对应区域有 $1*015*680$ 个圆形微小室,每个微小室直径 $4.5\mu\text{m}$,高 $3\mu\text{m}$,圆心间的间隔为 $10\mu\text{m}$,每个微小室的体积约为 47fL 。根据需求不同,微小室也可制作成方形或三角形,微小室的直径深度亦可根据微球的大小进行调整。

[0034] 盖板3同样由模塑法制成,为 3mm 厚的PDMS材料。具体地,采用光刻法制作有凹槽的模具,在模具上固化PDMS得到盖板3,盖板3长 50mm ,宽 24mm ,上面有四条凹槽(即通道),凹槽长 41.91mm ,宽 2.86mm ,高 $130\mu\text{m}$,凹槽间的间隔为 2.14mm 。小室的数量及凹槽的形状可根据实际情况进行更改变换。

[0035] 具体地,盖板3的一端部上设有与凹槽数量相同的进样口6,每个进样口6与一个凹槽的一端连接,引导微球悬浮液流入通道。盖板3的另一端部上设有与凹槽数量相同的出样口7,每个出样口7与一个凹槽的另一端连接,引导微球悬浮液流出通道,其中,出样口7为圆孔状。

[0036] 使用时,将芯片整个放进能提供真空环境中至少 3min ,取出后,揭去表面的胶带,使用移液枪将微球悬浮液通过进样口注射入通道中,由于小室层PDMS材料的储气性及透气性,飞升级小室中迅速被液相充满,静止一段时间,微球由于重力作用沉入小室。

[0037] 然后通过进样口用注射器注入氟油,氟油将多余的微球和液相冲走,并将每个小室单独分隔开。

[0038] 利用上述的微小室阵列微流控芯片进行实验的具体过程为:

[0039] (1) 取偶联了捕获抗体的超顺磁珠(直径 $2.7\mu\text{m}$),加入 1.5mL 离心管,用 $400\mu\text{L}$ PBS+ 0.1% BSA+ 0.1% Tween 20冲洗3次,用 $100\mu\text{L}$ 重新悬浮;

[0040] (2) 加入 $100\mu\text{L}$ 待测样品(Human TNF- α Protein),旋转孵育 2h , 23°C ;

- [0041] (3) 用500μL 5×PBS+0.1%Tween 20清洗3次;
- [0042] (4) 加入500μL 0.1μg/mL生物素标记的检测抗体(Human TNF-αBiotinylated Antibody)旋转孵育60min 23℃;
- [0043] (5) 用500μL 5×PBS+0.1%Tween 20清洗3次;
- [0044] (6) 加入500μL 35pM链霉亲和素偶联的β半乳糖苷酶(streptavidin,β-galactosidase conjugate,SβG),旋转孵育30min,23℃;
- [0045] (7) 用500μL 5×PBS+0.1%Tween20清洗3次,PBS+0.1%Tween 20清洗1次,用15μL酶的荧光底物FDG (Fluoresceinβ-D-galactopyranoside) 将磁珠重新悬浮;
- [0046] (8) 将芯片放入冷冻干燥机脱气5min,然后揭掉表面的胶带,用移液枪将磁珠悬浮液注射进入芯片,静置2min;
- [0047] (10) 用注射器注入氟油FC40,23℃反应30min后用倒置荧光显微镜拍摄图片,如图6所示。
- [0048] (11) 用软件image J对阳性小室的数量和有磁珠小室的数量进行计数,计算阳性小室与有磁珠小室数量的比值。
- [0049] 采用此方法,由于磁珠静置的时间可以更长,所以可以获得更高的小室利用率。
- [0050] 以上所述的具体实施方式对本发明的技术方案和有益效果进行了详细说明,应理解的是以上所述仅为本发明的最优选实施例,并不用于限制本发明,凡在本发明的原则范围内所做的任何修改、补充和等同替换等,均应包含在本发明的保护范围之内。

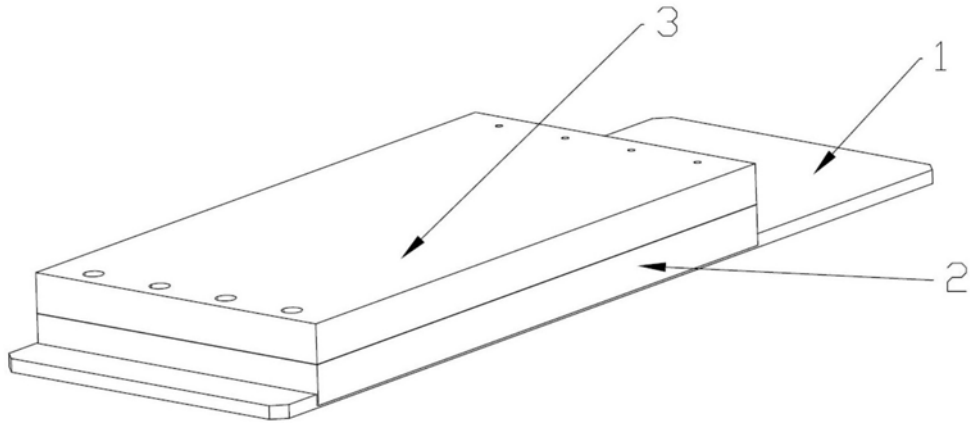


图1

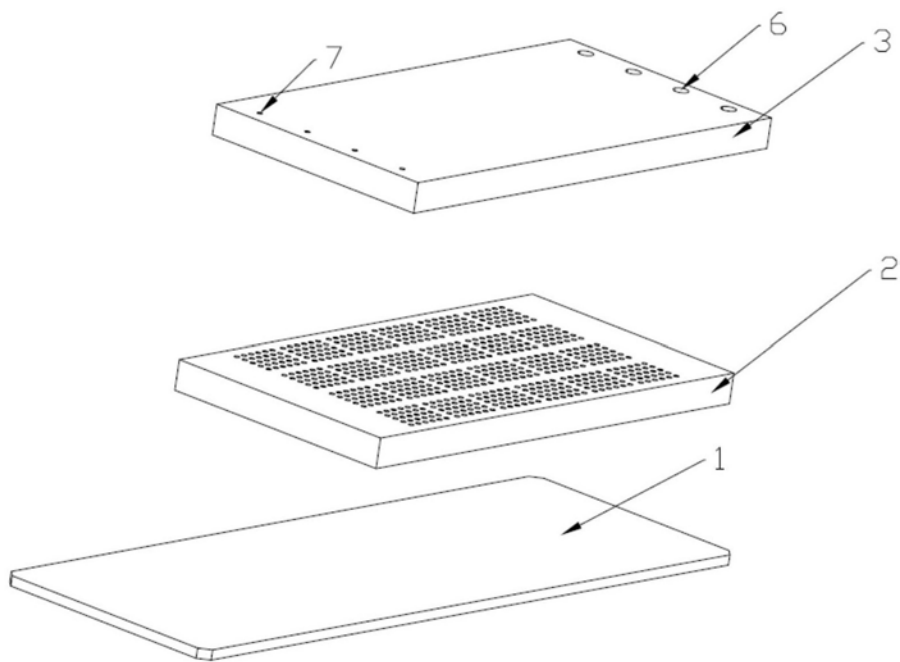


图2

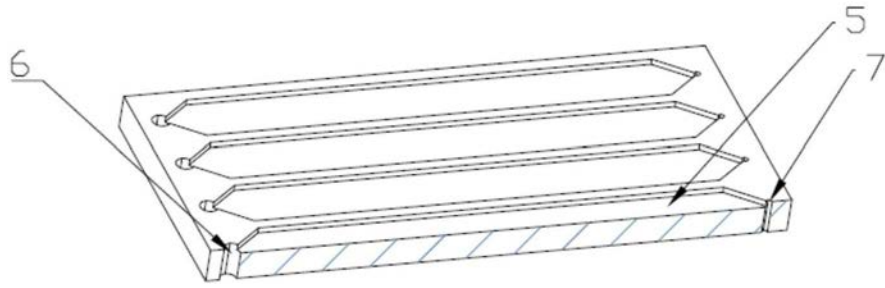


图5



图6

专利名称(译)	一种用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片及方法		
公开(公告)号	CN108993621A	公开(公告)日	2018-12-14
申请号	CN201810744796.X	申请日	2018-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	牟颖 孙敬敬		
发明人	牟颖 孙敬敬		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/53		
CPC分类号	B01L3/5027 B01L3/502707 B01L2200/0647 B01L2300/08 B01L2300/12 G01N33/53		
代理人(译)	曹兆霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于数字酶联免疫检测的微小室阵列微流控芯片，包括小室基板，叠放在所述小室基板上的盖板，其特征在于，所述小室基板为透明且具有透气性储气性的疏水材料，且上表面开设有微小室阵列，所述盖板的下表面开设有多多个凹槽，该凹槽与小室基板形成用于微球悬浮液流通的通道，所述盖板的一端部设有进样口，该进样口与凹槽的一端连接，引导微球悬浮液流入到通道内，所述盖板的另一端部设有出样口，该出样口与凹槽的另一端连接，引导微球悬浮液流出通道。该微小室阵列微流控芯片结构简单，微小室的疏水性强，微球悬浮液极易进入微小室，微小室利用率高达60%。

