



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109870567 A

(43)申请公布日 2019.06.11

(21)申请号 201910126434.9

(22)申请日 2019.02.20

(71)申请人 广州睿辰生物科技有限公司
地址 510000 广东省广州市广州高新技术产业开发区科学城开源大道11号B10栋3层306房

(72)发明人 周辉

(74)专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限公司 34107
代理人 朱圣荣

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)

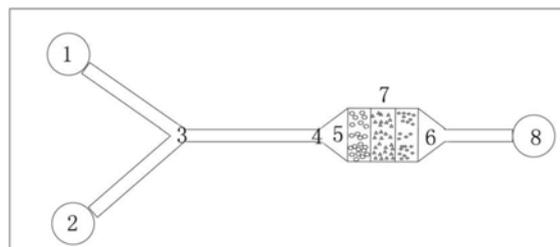
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

基于免疫法分选ApoE蛋白的微流控芯片及其分选方法

(57)摘要

本发明揭示了一种基于免疫法分选ApoE蛋白的微流控芯片,由基片和盖片夹持构成独立的腔体分别为样本池、缓冲液池、捕获区和废液池,由基片和盖片夹持构成独立的通道,其中三个通道一端分别连通样本池、缓冲液池和捕获区的一端,所述三个通道的另一端交汇连通,所述捕获区的另一端通过通道连通废液池。本发明通过微流控技术控制待测样品的流速和流量,从而减少误差,增加反应灵敏度,并且操作简单、检测时间短、储存简单,易推广使用,节约了成本。



1. 基于免疫法分选ApoE蛋白的微流控芯片,其特征在於:由基片和盖片夹持构成独立的腔体分别为样本池、缓冲液池、捕获区和废液池,由基片和盖片夹持构成独立的通道,其中三个通道一端分别连通样本池、缓冲液池和捕获区的一端,所述三个通道的另一端交汇连通,所述捕获区的另一端通过通道连通废液池,所述捕获区沿液体流动方向依次设有至少一个矩形捕获槽,每个所述矩形捕获槽底部密布圆形槽孔,每个所述矩形捕获槽的圆形槽孔内包埋有ApoE蛋白构型的抗体,所述盖片位于样本池、缓冲液池和捕获区处设有加样口,缓冲液加样口和观测口。

2. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在於:所述捕获区位于样本池、缓冲液池、废液池的中间位置,所有通道构成Y型结构。

3. 根据权利要求2所述的微流控芯片,其特征在於:所述通道以及样本池、缓冲液池、废液池、捕获区均由基板上的凹陷结构构成,所述盖片为封盖在基板上的平板,所述基片和盖片的材质为PDMS,所述盖片的观测口通过透明玻璃密封。

4. 根据权利要求1、2或3所述的微流控芯片,其特征在於:所述捕获区两端分别通过喇叭口状结构的上三角形区域和下三角形区域连通通道,所述喇叭口状结构均朝向捕获区开口逐渐变大,朝向通道开口逐渐变小。

5. 根据权利要求4所述的微流控芯片,其特征在於:所述捕获区沿液体流动方向依次设有三个矩形捕获槽,三个所述矩形捕获槽内分别包埋有ApoE蛋白三种不同构型的抗体。

6. 根据权利要求5所述的微流控芯片,其特征在於:三个所述矩形捕获槽分别包埋有ApoE2, ApoE3, ApoE4蛋白相应的抗体。

7. 根据权利要求1或6所述的微流控芯片,其特征在於:所述通道以及样本池、缓冲液池、废液池、捕获区的凹陷结构构成深度相同,所述捕获区长度为5-7mm,宽度为2-4mm,所述圆形槽孔的孔径为8-12 μm ,所述三个通道中连通样本池和缓冲液池的两个通道长度相同为6-10mm,另一个通道的长度为8-12mm。

8. 基于权利要求1-7中任一项所述微流控芯片的分选方法,其特征在於,包括以下步骤:

步骤1、血液样本处理;

步骤2、将处理的血液样本加入样本池,之后将缓冲液加入缓冲液池,最后向将缓冲液池加入荧光标记的第二抗体;

步骤3、在观测口观察荧光显色区域判断ApoE蛋白的类型。

9. 根据权利要求8所述的分选方法,其特征在於:所述步骤1将血液样本中加入EDTA进行抗凝处理,之后通过离心处理取出上清液作为样本。

10. 根据权利要求8或9所述的分选方法,其特征在於:所述步骤2,将步骤1收集到的上清液以6-9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度从样本池进样,待上清液流入捕获区ApoE蛋白在捕获区与包埋的抗体相结合,之后从缓冲液池以6-9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度加入缓冲液,冲洗捕获区表面残留物质,再从缓冲液池以5-7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度加入荧光标记的第二抗体,待标记的第二抗体在捕获区与第一抗体结合,最后从缓冲液池加入缓冲液充分冲洗捕获区。

基于免疫法分选ApoE蛋白的微流控芯片及其分选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微流控芯片技术,尤其是对老年痴呆症标志蛋白ApoE蛋白进行分选检测的微流控芯片及其使用方法。

背景技术

[0002] 老年痴呆即阿尔兹海默症,是一种中枢神经系统变性病,病程呈现出缓慢加重的过程,是老年痴呆最常见的一种类型,其主要表现为渐进性记忆障碍,认知功能障碍,人格改变以及语言障碍等精神症状,严重影响患者的日常生活。据统计,目前我国老年痴呆患者大约900万,占全世界的四分之一,而且患者数会随着人口老龄化的加剧而激增,全球每7秒就有一个人被确诊为老年痴呆患者,且老年痴呆患者呈现出年轻化的趋势,阿尔兹海默症逐渐成为我国老年人健康的最大障碍,同时也对世界各国老年人的健康造成威胁。老年痴呆已经成为社会中的一种普遍现象,然而关于阿尔茨海默症的发病机制尚未完全明确,目前为止医学界也尚未找到根治的有效方法。因此早期诊断及及时进行干预,延缓病情的发展成为AD治疗的关键。

[0003] 近年来对老年痴呆的早期诊断已经引起许多研究者的注意,寻找到一种可靠,灵敏有效,非侵入式的生化检测手段成为研究者共同的目的。载脂蛋白E(ApoE)就是其中的一种公认的阿尔兹海默症准风险因子。

[0004] 载脂蛋白E位于人19号染色体,其共有3种等位基因,分别为2/3/4基因型,由于每个人有一对等位基因,共有6种表型,在蛋白质层面最后主要有三个表现型:E2表型,包括 $\epsilon 2/\epsilon 2$ 、 $\epsilon 2/\epsilon 3$,约占人类的7%,APOE2具有保护性,可以降低淀粉样蛋白的积累,此类表型的个体不易患AD;E3表型,包括 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 、 $\epsilon 2/\epsilon 3$,约占人类的78%,APOE3扮演无功无过的角色,对患病风险几乎没有影响;E4表型,包括 $\epsilon 3/\epsilon 4$ 、 $\epsilon 4/\epsilon 4$,约占人类的15%,ApoE4极大地促进了 β 淀粉样蛋白在大脑中的沉积,个体易患AD。因此,对APOE蛋白进行检测可以在一定程度上判断AD的发生,为有效预防迟发型AD的发生提供指导。

[0005] 微流控芯片以微加工技术为基础,在芯片上制作多种功能单元,使得多种实验技术可以在方寸大小的芯片上实现,可称之为芯片上的实验室,其具有分析速度快,分离效率高,减少试剂盒样本的消耗量等优点。随着微流控芯片技术的进一步发展,特别是检测灵敏度的提高,微流控对各种大分子的应用日益得到重视,微流控芯片结合免疫方法检测大分子物质的原理是在微流控通道中设置相应的捕获区,捕获区中包埋相应的抗体,,待检测物质流经捕获区时,由于抗原抗体的特异性反应从而使特定的物质得以捕获。

[0006] 目前,针对APOE蛋白的检测主要为体外进行免疫检测,但是该方法操作步骤繁琐,耗费时间较长,所需的血液样本较多,因此寻找一种简单快速对APOE蛋白类型进行检测的方法成为急需解决的问题。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是实现一种基于免疫学,使用微流控技术对ApoE蛋白

进行检测分型的方法。

[0008] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案为:基于免疫法分选ApoE蛋白的微流控芯片,由基片和盖片夹持构成独立的腔体分别为样本池、缓冲液池、捕获区和废液池,由基片和盖片夹持构成独立的通道,其中三个通道一端分别连通样本池、缓冲液池和捕获区的一端,所述三个通道的另一端交汇连通,所述捕获区的另一端通过通道连通废液池,所述捕获区沿液体流动方向依次设有至少一个矩形捕获槽,每个所述矩形捕获槽底部密布圆形槽孔,每个所述矩形捕获槽的圆形槽孔内包埋有ApoE蛋白构型的抗体,所述盖片位于样本池、缓冲液池和捕获区处设有加样口,缓冲液加样口和观测口。

[0009] 所述捕获区位于样本池、缓冲液池、废液池的中间位置,所有通道构成Y型结构。

[0010] 所述通道以及样本池、缓冲液池、废液池、捕获区均由基板上的凹陷结构构成,所述盖片为封盖在基板上的平板,所述基片和盖片的材质为PDMS,所述盖片的观测口通过透明玻璃密封。

[0011] 所述捕获区两端分别通过喇叭口状结构的上三角形区域和下三角形区域连通通道,所述喇叭口状结构均朝向捕获区开口逐渐变大,朝向通道开口逐渐变小。

[0012] 所述捕获区沿液体流动方向依次设有三个矩形捕获槽,三个所述矩形捕获槽内分别包埋有ApoE蛋白三种不同构型的抗体。

[0013] 三个所述矩形捕获槽分别包埋有ApoE2,ApoE3,ApoE4蛋白相应的抗体。

[0014] 所述通道以及样本池、缓冲液池、废液池、捕获区的凹陷结构构成深度相同,所述捕获区长度为5-7mm,宽度为2-4mm,所述圆形槽孔的孔径为8-12 μm ,所述三个通道中连通样本池和缓冲液池的两个通道长度相同为6-10mm,另一个通道的长度为8-12mm。

[0015] 基于所述微流控芯片的分选方法,包括以下步骤:

[0016] 步骤1、血液样本处理;

[0017] 步骤2、将处理的血液样本加入样本池,之后将缓冲液加入缓冲液池,最后向将缓冲液池加入荧光标记的第二抗体;

[0018] 步骤3、在观测口观察荧光显色区域判断ApoE蛋白的类型。

[0019] 所述步骤1将血液样本中加入EDTA进行抗凝处理,之后通过离心处理取出上清液作为样本。

[0020] 所述步骤2,将步骤1收集到的上清液以6-9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度从样本池进样,待上清液流入捕获区ApoE蛋白在捕获区与包埋的抗体相结合,之后从缓冲液池以6-9 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度加入缓冲液,冲洗捕获区表面残留物质,再从缓冲液池以5-7 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度加入荧光标记的第二抗体,待标记的第二抗体在捕获区与第一抗体结合,最后从缓冲液池加入缓冲液充分冲洗捕获区。

[0021] 本发明通过微流控技术控制待测样品的流速和流量,从而减少误差,增加反应灵敏度,并且操作简单、检测时间短、储存简单,易推广使用,节约了成本。

附图说明

[0022] 下面对本发明说明书中每幅附图表达的内容及图中的标记作简要说明:

[0023] 图1为微流控芯片基片通道结构示意图;

[0024] 图2为微流控芯片盖片结构示意图;

[0025] 上述图中的标记均为:1、样本池;2、缓冲液池;3、上交叉点;4、下交叉点;5、上三角形区域;6、下三角形区域;7、捕获区;8、废液池。

具体实施方式

[0026] 下面对照附图,通过对实施例的描述,本发明的具体实施方式如所涉及各构件的形状、构造、各部分之间的相互位置及连接关系、各部分的作用及工作原理、制造工艺及操作使用方法等,作进一步详细的说明,以帮助本领域技术人员对本发明的发明构思、技术方案有更完整、准确和深入的理解。

[0027] 基于免疫法分选ApoE蛋白微流控芯片,包括基片和盖片,基片和盖片的材质优选为PDMS,基片上设有凹陷结构,构成样本池1、缓冲液池2、捕获区7、废液池8,以及连通这些凹陷结构的通道,通过通道连通的凹陷结构整体呈Y型,如图1所示。

[0028] 样本池1和缓冲液池2位于两个独立的通道一端,这两个通道在上交叉点3处交汇连通,上交叉点3为一个通道的始端,该通道的末端为下交叉点4,并在下交叉点4处与捕获区7连通,捕获区7底部密布圆形槽孔,圆形槽孔用于包埋ApoE蛋白抗体,优选方案为捕获区7上直流动方向包括三个矩形捕获槽,每个矩形捕获槽内都密布有圆形槽孔,每个矩形捕获槽包埋不同的抗体,例如第一个矩形捕获槽的圆形槽孔内包埋ApoE2蛋白相应的抗体,第二个矩形捕获槽的圆形槽孔内包埋ApoE3蛋白相应的抗体,第三个矩形捕获槽的圆形槽孔内包埋ApoE4蛋白相应的抗体。

[0029] 捕获区7和废液池8之间通过通道连通,使用时,需要将基板倾斜放置,使液体能够自样本池1和缓冲液池2利用重力通过通道流经捕获区7,最后流至废液池8。

[0030] 盖片包括加样口、缓冲液加样口、观测口;加样口,缓冲液加样口,观测口的位置在样本池1、缓冲液池2、捕获区7的正上方,捕获区7与观测口的材质为玻璃,加样口、缓冲液加样口为开口结构,方便向样本池1、缓冲液池2滴入液体。

[0031] 此外,捕获区7前后两端分别设有上三角形区域5和下三角形区域6,并通过三角形区域5和下三角形区域6连通通道,三角形区域5和下三角形区域6用于控制流体流速的目的。

[0032] 捕获区7为圆角矩形结构,长度为6mm,宽度为3mm,槽的深度与微流控通道深度相同,拐角处为圆弧。捕获区7密布的圆形槽孔为截面尺寸为圆形,直径为10 μ m。上交叉点3和下交叉点4之间的距离为10mm,加样池、缓冲液池2与上交叉点3之间的距离为8mm。

[0033] 所述微流控芯片的分选方法,包括如下步骤:

[0034] (1) 血液样本处理:血液样本中加入EDTA进行抗凝处理,然后1500g、15min离心,取上清液进行检测;

[0035] (2) 样本加入微流控芯片进行检测:将收集到的上清液以8 μ l/min的速度从样本池11进样,样本在进入倒三角区域4时流速减慢,ApoE蛋白在捕获区7与其表面包埋的特异性抗体相结合,样本加样结束后从缓冲液池2以8 μ l/min的速度加入缓冲液,冲洗表面残留物质,再从缓冲液池2以6 μ l/min的速度加入荧光标记的第二抗体,标记的第二抗体在捕获区7与第一抗体结合,之后从缓冲液池2加入缓冲液充分冲洗;

[0036] (3) 检测结果分析:冲洗之后,ApoE蛋白流通至玻璃区,观察荧光显色区域判定ApoE蛋白的类型。

[0037] 上面结合附图对本发明进行了示例性描述,显然本发明具体实现并不受上述方式

的限制,只要采用了本发明的方法构思和技术方案进行的各种非实质性的改进,或未经改进将本发明的构思和技术方案直接应用于其它场合的,均在本发明的保护范围之内。

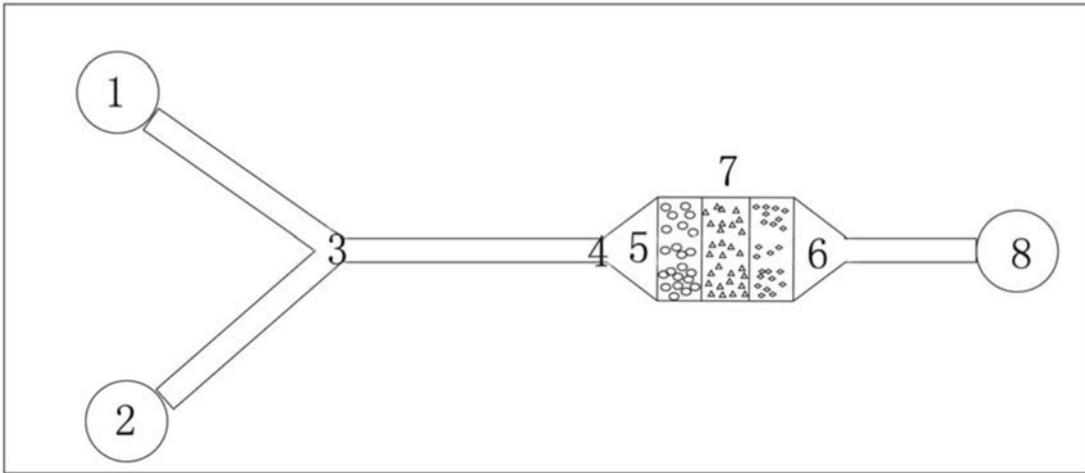


图1

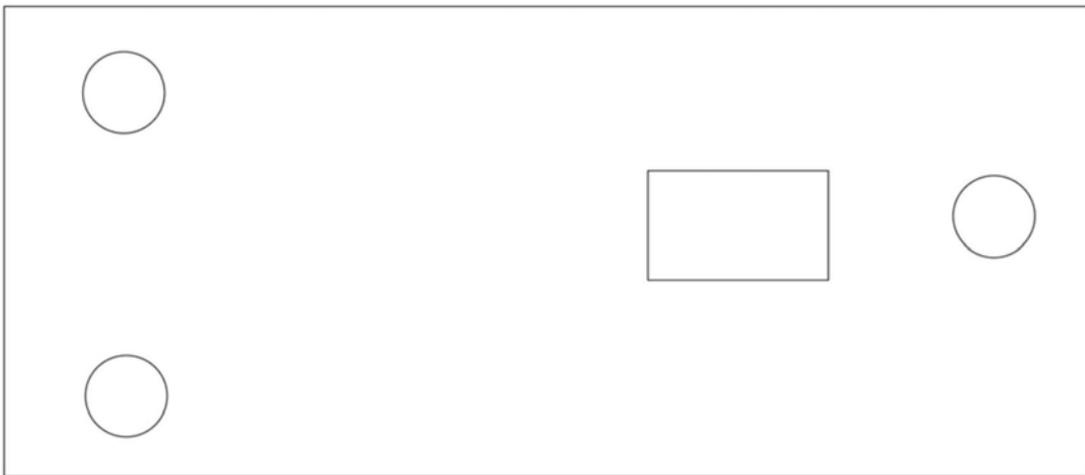


图2

专利名称(译)	基于免疫法分选ApoE蛋白的微流控芯片及其分选方法		
公开(公告)号	CN109870567A	公开(公告)日	2019-06-11
申请号	CN201910126434.9	申请日	2019-02-20
[标]发明人	周辉		
发明人	周辉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/533		
代理人(译)	朱圣荣		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明揭示了一种基于免疫法分选ApoE蛋白的微流控芯片，由基片和盖片夹持构成独立的腔体分别为样本池、缓冲液池、捕获区和废液池，由基片和盖片夹持构成独立的通道，其中三个通道一端分别连通样本池、缓冲液池和捕获区的一端，所述三个通道的另一端交汇连通，所述捕获区的另一端通过通道连通废液池。本发明通过微流控技术控制待测样品的流速和流量，从而减少误差，增加反应灵敏度，并且操作简单、检测时间短、储存简单，易推广使用，节约了成本。

