



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108872613 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201810437142.2

(22)申请日 2018.05.09

(71)申请人 南京岚煜生物科技有限公司

地址 211122 江苏省南京市江宁区乾德路2号

(72)发明人 许行尚 杰弗瑞·陈 朱宗哲

(74)专利代理机构 南京正联知识产权代理有限公司 32243

代理人 王素琴

(51)Int.Cl.

G01N 33/78(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

### (54)发明名称

基于微流控芯片检测总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒及制备和检测方法

### (57)摘要

本发明公开了一种基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒及制备和检测方法,该试剂盒的制备方法,包括以下步骤:(1)微流控芯片包被;(2)荧光微球标记;(3)微流控芯片组装;(4)定标品的制备;(5)得基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒。制备得到的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒采用竞争法进行测定,选取高灵敏度的时间分辨荧光物作为标记物,在荧光微球上进行抗原的标记,利用免疫竞争反应进行分析检测,所制备的试剂性能可达同等化学发光试剂的水平。免疫反应后,使用清洗液将多余组分完全去除后,对免疫反应结合上的荧光微球进行检测读数,避免了引入显色液进入芯片内部反应不充分或者显色后读数不及时的问题。

1. 一种基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 微流控芯片包被:取三碘甲状腺原氨酸T3抗体PAB<T3>S IgG 1mg,加50mM pH9.6的CB缓冲液至1mL,按照单个芯片25μL加入微流控芯片反应腔室内,温浴2小时后对芯片进行清洗;

(2) 荧光微球标记:取三碘甲状腺原氨酸T3抗原Triiodothyronine加入至荧光微球溶液中,并涡旋混匀,其中,荧光微球是经过活化处理的,反应结束后,加入终止液对反应进行终止,后离心清洗,加入封闭液进行封闭,封闭后的荧光微球进行离心清洗,使用微球储存液进行保存;

(3) 微流控芯片组装:向微流控芯片的反应腔室预先进行封闭处理,封闭液添加后在烘箱中进行烘干处理,在封闭后的中层芯片背部反应腔室下部内加入所述步骤(2)中的荧光微球溶液,于真空烘箱中真空干燥,荧光微球在芯片中呈现小液滴形态,不发生扩散;

芯片准备完毕后采用超声键合的方式,依据芯片结构依次将滤血垫,加样密封垫,导电橡胶,吸水纸以及密封圈加入芯片内部,将三层芯片按照超声键合线完成合并;

(4) 定标品的制备:定标品由A组分和B组分构成;

根据抗原浓缩液的估算浓度,用定标品稀释液将抗原浓缩液稀释作为定标品抗原母液备用;

定标品稀释液即为定标品A组分,浓度为0.5ng/mL,2-8℃保存;

定标品B组分:用定标品稀释液将总三碘甲状腺原氨酸TT3抗原母液稀释至2ng/mL,2-8℃保存;

(5) 得基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒。

2. 根据权利要求1所述的基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒的制备方法,其特征在于,在所述步骤(2)中,所述荧光微球活化处理的方法为:称取EDC使用Mes缓冲液配置成为10mg/mL的溶液,后使用Mes缓冲液进一步稀释成为1mg/mL的溶液,量取1mg羧基荧光微球,微球固型物含量为10mg/mL,体积计算为100μL,置于EP管中,加入0.45mL Mes缓冲液稀释,从1mg/mL的EDC活化剂溶液中取5μL迅速加入微球溶液中,涡旋混匀,于超声清洗器中超声10min,后置于滚轴混匀器上震荡反应20min,总反应时间为30min。

3. 根据权利要求1所述的基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒的制备方法,其特征在于,在所述步骤(3)中,所述封闭液含有2%BSA、0.5%Tween-20、10%海藻糖以及0.2%甘露醇。

4. 根据权利要求3所述的基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒的制备方法,其特征在于,在所述步骤(3)中,封闭处理的方法为:向微流控芯片的反应腔室预先进行封闭处理,其中第二层芯片的背面反应腔室内需要添加6μL+6μL的封闭液进行封闭,第三层正面的反应腔室内,分别需要添加5μL+5μL+5μL的封闭液进行封闭。

5. 根据权利要求1所述的基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒的制备方法,其特征在于,在所述步骤(3)中,所述微流控芯片为三片式结构,包括由上到下依次层叠的上层芯片、中层芯片以及下层芯片;上层芯片、中层芯片以及下层芯片两两之间均通过定位柱、定位孔配合连接的方式实现相互间的层叠。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的基于微流控芯片的总甲状腺素TT4试剂盒的制备方

法,其特征在于,还包括有样本处理液制备步骤,所述样本处理液为100mM的Tris缓冲液,pH为7.5,每升样本处理液中还包含有1.1g吐温表面活性剂以及0.8g的8-苯氨基-1-萘磺酸铵盐ANS作为甲状腺素的解离剂。

7.一种基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒,包括有微流控芯片,其特征在于,还包括有定标品,所述定标品由A组分和B组分构成,其中,定标品稀释液即为定标品A组分,浓度为0.5ng/mL;定标品B组分为用所述定标品稀释液将总三碘甲状腺原氨酸TT3抗原母液稀释至2ng/mL;三碘甲状腺原氨酸T3抗原Triiodothyronine标记的荧光微球在所述微流控芯片内进行干燥处理;另一三碘甲状腺原氨酸T3抗体PAB<T3>S IgG包被在微流控芯片反应腔内;还包括有样本处理液,所述样本处理液为100mM的Tris缓冲液,pH为7.5,每升样本处理液中还包含有1.1g吐温表面活性剂以及0.8g的8-苯氨基-1-萘磺酸铵盐ANS作为甲状腺素的解离剂。

8.一种基于微流控芯片检测总三碘甲状腺原氨酸TT3的方法,其特征在于,采用权利要求1-6任一项所述的基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒的制备方法得到的试剂盒,包括以下步骤:

(1) 样本处理:待检血清样本需加入样本处理液进行样本处理,再加样到芯片上进行检测;所述样本处理液为100mM的Tris缓冲液,pH为7.5,每升样本处理液中还包含有1.1g吐温表面活性剂以及0.8g的8-苯氨基-1-萘磺酸铵盐ANS作为甲状腺素的解离剂;

(2) 移液器加样,吸取100 $\mu$ L的经所述步骤(1)处理后的样本加入加样孔内,将微流控芯片进入检测仪器内,气路装置缓慢充气,推动样本往前移动,气体由透气口流出,液体在以PS为基材的微流控芯片内流入反应腔室内,样本接触反应腔室末端的导电橡胶,电容变化会触动,关闭流道阀门,同时关闭气路开关,停止加压;

(3) 仪器开启超声装置,超声混匀3-10分钟,超声探头置于三层芯片底部,位于反应腔室的中间部分,避免直接超声对芯片内的包被抗体产生影响,反应结束后气体推动样本进行向前移动,吹干加样孔和流道样本,清洗液路装置启动,进入反应腔室内,混匀1-3分钟,进行清洗;加样口处的气体推动清洗液继续进行移动,吹干反应腔室和流道液体;

(4) 开启激发光源,对免疫反应结合固定的荧光微球进行测定,仪器读取芯片反应腔室的下面部分荧光强度,获得数据后通过计算并给出相应结果报告。

## 基于微流控芯片检测总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒及制备和检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测领域,尤其是涉及一种基于微流控芯片检测总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒及制备和检测方法。

### 背景技术

[0002] 微流控芯片技术是以微管道网络为结构特征,采用微加工技术在几平方厘米大小的芯片上刻蚀出微管道网络和其它功能单元,从而制备出包含进样、反应、分离、检测于一体的快速、高效、低耗的微型分析装置。微流控芯片在检测平台中具有试剂消耗少,反应时间短,自动化程度高的特点。在目前的研究中,芯片的微型化却给前期样品分离和配套集成带来不少困难,同时在样品固定,洗脱等方面也存在不少问题。

[0003] 微流控芯片检测主要有以下几点优势:

[0004] 1) 器件微小且没有对人为操作,试剂消耗量很少;

[0005] 2) 通过设计不同微流路实现在同一芯片中不同试剂的混合反应,减少繁琐的生物实验操作缩短检测所需时间;

[0006] 3) 微流控芯片可与电路接合实现自动化控制;

[0007] 4) 微流控芯片以及配套检测设备体积小,易于便携。

[0008] 总三碘甲状腺原氨酸(TT3)是直接由甲状腺合成和分泌(占大约20%)的,以及外围甲状腺素T4转化为T3(占大约80%)的一种激素。T3是应答脑垂体激素TSH(促甲状腺激素)而分泌并进入血液循环的。T3的分泌受甲状腺、脑垂体和下丘脑参与的负反馈机制的调节。尽管T3的血清浓度很低,但是T3的生理功效远远大于T4。

[0009] 在循环中,99.7%结合在运转蛋白上的T3是可逆的,其中主要是与甲状腺素结合球蛋白(TBG)和少量的白蛋白以及甲状腺结合前蛋白(TBPA)结合。不与运转蛋白结合或者游离状态的T3具有代谢活性,而与运转蛋白结合的T3则不具有代谢活性,作为游离T3的储备物存在。

[0010] 健康人体内的甲状腺素结合球蛋白(TBG)水平相对保持恒定,但是正常怀孕,过量雌性激素,雄激素,合成代谢类固醇以及肾上腺糖皮质激素可以影响甲状腺素结合球蛋白(TBG)的水平,并且可能在甲状腺功能检测中造成甲状腺检测结果不真实。因此在上述情形中,T3的水平不能准确地反应出甲状腺的真实状态。

[0011] 甲状腺功能失调可引起T3和T4分泌的过量(甲状腺功能亢进)或不足(甲状腺功能减退)。此外,由于甲状腺功能直接受TSH(促甲状腺激素)的影响,如果脑垂体或下丘脑功能失调的话,也会影响甲状腺的功能。因此只要甲状腺-脑垂体-下丘脑系统中任何一部分发生疾病,血液中的T3、T4水平都会受到影响。从诊断角度上说,T3浓度变化对于某些甲状腺疾病较T4更为灵敏。如果说T4浓度是甲状腺功能减退的敏感指标的话,则血液中T3的浓度更有利于鉴别甲状腺功能亢进。

[0012] 因为血清中T3浓度变化比T4迅速和明显,所以无论在刺激性实验还是在抑制性实

验中,T3水平总是作为判定甲状腺功能的一个最佳指标。在强烈刺激甲状腺的条件下,T3水平还可以很好的估计人体内的甲状腺储备量。

[0013] 在中国专利文献CN104614521A中公开了一种微流控芯片,包括柔性聚合物层和基片,柔性聚合物层和基片键合在一起,所述芯片中设有微沟道系统,所述微沟道系统包括缓冲液入口、样品入口、磁珠入口、废液出口、微阀、微泵区、磁珠塞区、循环区及检测区。

[0014] 上述技术方案采用灵敏度较低的比浊法,检测免疫磁珠和待测物之间的免疫反应所形成的络合物进行反应物前后的浊度变化,来进行判定待测物的浓度。相对而言,在采用免疫比浊这一方法学来说,由于不需要额外的配对抗体以及发光标记物,因此整体芯片结构设计较为简单。通过磁场在芯片沟道中形成的特定区域富集磁珠,样品持续通过此部分磁珠塞后与另一测磁珠结合,从而形成两个以上的磁珠团聚。

[0015] 采用其他现有技术或(1)芯片的结构过于复杂,无法对反应做出精确的调控,清洗步骤以及液体传导存在较大的污染;或(2)使用了多个液体腔室和固相载体(磁珠以及荧光微球同时使用),试剂整体设计过于复杂;或(3)免疫反应采用了非均相反应,意为固相载体与固相载体的表面进行反应,反应不充分,灵敏度和重复性受到限制。

## 发明内容

[0016] 本发明要解决的技术问题是提供一种选取高灵敏度的时间分辨荧光物作为标记物,在荧光微球上进行抗原的标记,利用免疫竞争反应进行分析检测,所制备的试剂性能可达同等化学发光试剂的水平,免疫反应效率更高更充分的基于微流控芯片检测总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒的制备方法。

[0017] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是,该基于微流控芯片检测总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0018] (1)微流控芯片包被:取三碘甲状腺原氨酸T3抗体PAB<T3>S IgG 1mg,加50mM pH9.6的CB缓冲液至1mL,按照单个芯片25 $\mu$ L加入微流控芯片反应腔室内,温浴2小时后对芯片进行清洗;

[0019] (2)荧光微球标记:取三碘甲状腺原氨酸T3抗原Triiodothyronine加入至荧光微球溶液中,并涡旋混匀,其中,荧光微球是经过活化处理的,反应结束后,加入终止液对反应进行终止,后离心清洗,加入封闭液进行封闭,封闭后的荧光微球进行离心清洗,使用微球储存液进行保存;

[0020] (3)微流控芯片组装:向微流控芯片的反应腔室预先进行封闭处理,封闭液添加后在烘箱中进行烘干处理,在封闭后的中层芯片背部反应腔室下部内加入所述步骤(2)中的荧光微球溶液,于真空烘箱中真空干燥,荧光微球在芯片中呈现小液滴形态,不发生扩散;

[0021] 芯片准备完毕后采用超声键合的方式,依据芯片结构依次将滤血垫,加样密封垫,导电橡胶,吸水纸以及密封圈加入芯片内部,将三层芯片按照超声键合线完成合并;

[0022] (4)定标品的制备:定标品由A组分和B组分构成;

[0023] 根据抗原浓缩液的估算浓度,用定标品稀释液将抗原浓缩液稀释作为定标品抗原母液备用;

[0024] 定标品稀释液即为定标品A组分,浓度为0.5ng/mL,2-8℃保存;

[0025] 定标品B组分:用定标品稀释液将总三碘甲状腺原氨酸TT3抗原母液稀释至2ng/

mL, 2-8℃保存;

[0026] (5)得基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒。

[0027] 在本发明中,定标品稀释液主要为Tris-HCl的缓冲体系,浓度为50mM,pH8.5,包含牛血清、BSA、表面活性剂RPE1740、RPE2520以及叠氮钠;

[0028] 在所述步骤(3)中,稀释标记三碘甲状腺原氨酸T3抗原Triiodothyronine微球,预先将微球水浴超声混匀,取20微升微球+80微升抽干保存液,混匀水浴超声,在封闭好的芯片下层反应槽正中间加5微升荧光微球溶液,于45℃真空烘箱中真空干燥30min,将处理好的芯片组装起来,超声键合,最后铝箔袋保存并加入干燥剂。

[0029] 在上述技术方案中,试剂基于微流控芯片作为载体,在微流控芯片内部的微流道反应器中进行免疫检测反应,单个芯片供单人份测试使用;制备得到的试剂盒进行检测,在手动加样后,仪器实现待测物在微流控芯片内的液体流动控制,免疫反应的调控以及反应结束后的清洗步骤,仪器通过收集荧光信号并计算出具体反应值;血清中T3浓度变化比T4迅速和明显,所以无论在刺激性实验还是在抑制性实验中,该试剂可用于判定甲状腺功能,还可以很好的估计人体内的甲状腺储备量;本发明技术方案制备得到的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒采用竞争法进行测定,患者血样中的T3与一种T3类似物竞争数量有限的,包被于芯片内部的T3抗体,上述T3类似物预先标记在荧光微球上,并进行抽干处理。血样进入芯片内部后,溶解抽干微球,血样中T3组分与标记有荧光微球的T3类似物共同参与免疫反应,待反应结束清洗除去多余未结合的T3和荧光微球,通过对芯片在360nm波长下激发,检测捕获的荧光微球在615nm下的荧光,测定其产生的荧光信号,以相对发光单位(RLU)进行表示。样本中的T3浓度与仪器测定的RLU成反比关系,通过自动计算获得浓度值。

[0030] 此外,上述制备方法中采用的微流控芯片为在中国专利文献CN107219360A中公布的技术方案,申请人在此予以引入;选取高灵敏度的时间分辨荧光物作为标记物,在荧光微球上进行T3类似物的标记,利用抗体捕获血样中T3以及荧光微球上T3类似物进行免疫竞争反应进行分析检测,所制备的试剂性能可达同等化学发光试剂的水平。反应采用均相反应,在微流控芯片腔室内通过超声混合,避免了单线程的层析流动反应,使得反应效率更高更充分。免疫反应后,使用清洗液将多余组分完全去除后,对免疫反应结合上的荧光微球进行直接检测读数,避免引入显色液进入芯片内部反应不充分或者显色后读数不及时等问题。

[0031] 在微流控芯片的中层芯片中段固定荧光标记物,在下层芯片包被抗体,微流控芯片预先使用隔离缓冲液进行涂覆并烘干,在塑料芯片的表层形成一层保护膜后再加入荧光微球标记物,两者均通过烘干的方式固定在芯片内部,在加入样本以及稀释液后,可重新复溶并与待测物反应,而隔离组分(即封闭液)不参与反应,并且可放置荧光标记物以及免疫磁珠,在烘干过程中保持生物活性,并避免与芯片发生非特异结合。

[0032] 进一步的改进在于,在所述步骤(2)中,所述荧光微球活化处理的方法为:称取EDC使用Mes缓冲液配置成为10mg/mL的溶液,后使用Mes缓冲液进一步稀释成为1mg/mL的溶液,量取1mg羧基荧光微球,微球固型物含量为10mg/mL,体积计算为100μL,置于EP管中,加入0.45mL Mes缓冲液稀释,从1mg/mL的EDC活化剂溶液中取5μL迅速加入微球溶液中,涡旋混匀,于超声清洗器中超声10min,后置于滚轴混匀器上震荡反应20min,总反应时间为30min。

[0033] 进一步的改进在于,在所述步骤(3)中,所述封闭液含有2%BSA、0.5%Tween-20、10%海藻糖以及0.2%甘露醇。

[0034] 进一步的改进在于,在所述步骤(3)中,封闭处理的方法为:向微流控芯片的反应腔室预先进行封闭处理,其中第二层芯片的背面反应腔室内需要添加6 $\mu$ L+6 $\mu$ L的封闭液进行封闭,第三层正面的反应腔室内,分别需要添加5 $\mu$ L+5 $\mu$ L+5 $\mu$ L的封闭液进行封闭。

[0035] 进一步的改进在于,在所述步骤(3)中,所述微流控芯片为三片式结构,包括由上到下依次层叠的上层芯片、中层芯片以及下层芯片;上层芯片、中层芯片以及下层芯片两两之间均通过定位柱、定位孔配合连接的方式实现相互间的层叠。

[0036] 进一步的改进在于,还包括有样本处理液制备步骤,所述样本处理液为100mM的Tris缓冲液,pH为7.5,每升样本处理液中还包含有1.1g吐温表面活性剂以及0.8g的8-苯氨基-1-萘磺酸铵盐(ANS)作为甲状腺素的解离剂。

[0037] 具体的制备方法为先准备好100mM的Tris缓冲液,按照每升样本处理液中还包含有1.1g吐温表面活性剂以及0.8g的8-苯氨基-1-萘磺酸铵盐(ANS),往内添加试剂,pH为7.5;其中8-苯氨基-1-萘磺酸铵盐(ANS)作为置换剂来使用。

[0038] 本发明要解决的另一个问题是提供一种基于微流控芯片检测总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒,包括有微流控芯片,还包括有定标品,所述定标品由A组分和B组分构成,其中,定标品稀释液即为定标品A组分,浓度为0.5ng/mL;定标品B组分为用所述定标品稀释液将总三碘甲状腺原氨酸TT3抗原母液稀释至2ng/mL;三碘甲状腺原氨酸T3抗原Triiodothyronine标记的荧光微球在所述微流控芯片内进行干燥处理;另一三碘甲状腺原氨酸T3抗体PAB<T3>S IgG包被在微流控芯片反应腔内;还包括有样本处理液,所述样本处理液为100mM的Tris缓冲液,pH为7.5,每升样本处理液中还包含有1.1g吐温表面活性剂以及0.8g的8-苯氨基-1-萘磺酸铵盐(ANS)作为甲状腺素的解离剂。

[0039] 上述技术方案中的试剂盒即是采用本发明方法制备得到的基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒,总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒采用竞争法进行测定,患者血样中的T3与一种T3类似物竞争数量有限的、包被于芯片内部的T3抗体,上述T3类似物预先标记在荧光微球上,并进行干燥处理,可用于判定甲状腺功能,还可以很好的估计人体内的甲状腺储备量。

[0040] 本发明要解决的另一个问题是提供一种基于微流控芯片检测总三碘甲状腺原氨酸TT3的方法,采用前述的基于微流控芯片检测总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒的制备方法得到的试剂盒,包括以下步骤:

[0041] (1) 样本处理:待检血清样本需加入样本处理液进行样本处理,再加样到芯片上进行检测;所述样本处理液为100mM的Tris缓冲液,pH为7.5,每升样本处理液中还包含有1.1g吐温表面活性剂以及0.8g的8-苯氨基-1-萘磺酸铵盐ANS作为甲状腺素的解离剂;

[0042] (2) 移液器加样,吸取100 $\mu$ L的经所述步骤(1)处理后的样本加入加样孔内,将微流控芯片进入检测仪器内,气路装置缓慢充气,推动样本往前移动,气体由透气口流出,液体在以PS为基材的微流控芯片内流入反应腔室内,样本接触反应腔室末端的导电橡胶,电容变化会触动,关闭流道阀门,同时关闭气路开关,停止加压;

[0043] (3) 仪器开启超声装置,超声混匀3-10分钟,超声探头置于三层芯片底部,位于反应腔室的中间部分,避免直接超声对芯片内的包被抗体产生影响,反应结束后气体推动样本进行向前移动,吹干加样孔和流道样本,清洗液路装置启动,进入反应腔室内,混匀1-3分钟,进行清洗;加样口处的气体推动清洗液继续进行移动,吹干反应腔室和流道液体;

[0044] (4) 开启激发光源,对免疫反应结合固定的荧光微球进行测定,仪器读取芯片反应腔室的下面部分荧光强度,获得数据后通过计算并给出相应结果报告。

[0045] 样本或样本稀释液通过加样口(微流控芯片的中层)进入微流控芯片内部,对加样口附加一定的压力,液体流入反应腔室后,预先接触烘干状态的荧光微球标记物,通过导电橡胶控制反应腔室内的液体总量,停止加样口的压力,对芯片的反应舱室进行超声处理,使得芯片上包被抗体与荧光微球标记物待测物质进行混合反应,反应时间在5-10分钟即可达到反应的平台期;反应结束后,通过微流控芯片的侧口对芯片内部注入清洗液,将多余的样本以及荧光标记物清洗至废液回收区,清洗后,再由芯片侧口注入一段空气,排除腔室内的清洗液;清洗步骤重复三次,待清洗结束后,直接对芯片进行激光激发检测,通过计算免疫反应结合上的荧光微球含量,推算出样本中待测物的含量,因此可以分析计算样本中待测物的浓度。

### 具体实施方式

[0046] 下面结合本发明的实施方式进一步详细说明:

[0047] 本发明的基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒,包括有微流控芯片,还包括有定标品,所述定标品由A组分和B组分构成,其中,定标品稀释液即为定标品A组分,浓度为0.5ng/mL;定标品B组分为用所述定标品稀释液将总三碘甲状腺原氨酸TT3抗原母液稀释至2ng/mL;三碘甲状腺原氨酸T3抗原Triiodothyronine(生产厂家Fitzgerald,30-AT53)标记的荧光微球在所述微流控芯片内进行干燥处理;另一三碘甲状腺原氨酸T3抗体PAB<T3>S IgG(生产厂家Roche,10907332103)包被在微流控芯片反应腔内;还包括有样本处理液,所述样本处理液为100mM的Tris缓冲液,pH为7.5,每升样本处理液中还包含有1.1g吐温表面活性剂以及0.8g的8-苯氨基-1-萘磺酸铵盐(ANS)作为甲状腺素的解离剂。

[0048] 在本实施例中,上述基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸(TT3)试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0049] (1) 微流控芯片包被:

[0050] 取三碘甲状腺原氨酸(T3)抗体PAB<T3>S IgG 1mg,加50mM pH9.6的CB缓冲液至1mL,按照单个芯片25μL加入微流控芯片反应腔室内,温浴2小时后对芯片进行清洗;

[0051] 关于包被液的选择:在本实施例中,使用下面三种不同的包被液,测试6份不同浓度的样本,考察相关性等参数,具体数据如下表1:

[0052] 表1



[0053]

样本浓度 (nmol/L)	发光值			
	CB 缓冲液包被	PB 缓冲液包被	Mes 缓冲液包被	醋酸缓冲液包被
本底	378440	295508	226514	315106
0.3	328683	259736	197332	279993
0.6	265950	186197	99187	166595
1.8	220860	176020	117209	194791
2.13	136496	92577	45575	111181
4.3	111630	98180	74011	96741
9.92	57335	31572	16389	43768
相关性	0.9869	0.9453	0.8573	0.8430
结合率	0.2950	0.3322	0.3267	0.3070

[0054] 综上,采用CB缓冲液包被具有明显优于其他两种的功能,相关性达到0.9869,结合率也较低,符合试剂盒开发的要求,因此选择CB缓冲液进行T3项目的微流控芯片包被。

[0055] (2) 荧光微球标记:

[0056] 称取EDC使用Mes缓冲液配置成为10mg/mL的溶液,后使用Mes缓冲液进一步稀释成为1mg/mL的溶液。使用200 $\mu$ L移液器量取1mg羧基荧光微球,微球固型物含量为10mg/mL,体积计算为100 $\mu$ L,置于EP管中,加入0.45mL Mes缓冲液稀释。从1mg/mL的EDC活化剂溶液中取5 $\mu$ L迅速加入微球溶液中,涡旋混匀,与超声清洗器中超声10min,后置于滚轴混匀器上震荡反应20分钟,总反应时间为30min。此步骤产生的沉淀属于正常现象,通常在与目标抗原偶联后消失,活化比(微球比活化剂)为1:0.01;活化结束,不离心处理直接取三碘甲状腺原氨酸(T3)抗原Triiodothyronine(根据抗原浓度,质量与微球比为0.2:1)加入荧光微球溶液,并立刻涡旋混匀。反应5min后,微球产生较为明显的沉淀现象,使用探头超声,功率5W,超声3S,间隔3S。超声5min后,置于滚轴混匀反应2小时。反应结束,加入500 $\mu$ L终止液对反应进行终止,滚轴反应20min后离心清洗,加入0.5mL的封闭液进行封闭,封闭1小时。封闭后的微球,进行离心清洗,转速15000rpm,离心时间45min,清洗一次,以0.5mL的微球储存液进行保存。微球在使用前对其进行探头式超声重悬分散,超声功率为5%,超声时间10min,超声工作3S,暂停3S;

[0057] 在本实施例中,使用下面三种不同的微球,测试6份不同浓度的样本,考察相关性等参数,具体数据如下表2:

[0058] 表2

[0059]

样本浓度 (nmol/L)	发光值		
	Bangs 微球 100nm	Bangs 微球 200nm	Thermo 微球 100nm
本底	382777	184397	113290
0.3	349587	279040	154463
0.6	271658	224282	113162
1.81	208377	111443	74110
2.11	161082	104133	48425
4.33	92853	51798	46487
9.92	55797	49651	35165
相关性	0.9895	0.9226	0.9276
结合率	0.2426	0.2809	0.4103

[0060] 综上,Bangs微球100nm具有明显优于其他两种微球的功能,相关性达到0.9895,结合率也较低,符合试剂盒开发的要求,因此选择Bangs微球100nm作为T3项目的微球固型物。

[0061] (3) 微流控芯片组装:

[0062] 向微流控芯片的反应腔室预先进行封闭处理(封闭液含有2%BSA、0.5%Tween-20、10%海藻糖以及0.2%甘露醇),其中第二层芯片的背面反应腔室内需要添加6 $\mu$ L+6 $\mu$ L的封闭液进行封闭,第三层正面的反应腔室内,分别需要添加5 $\mu$ L+5 $\mu$ L+5 $\mu$ L的封闭液进行封闭。封闭液添加后在45℃烘箱中进行烘干处理5min,在封闭后的第二层芯片背部反应腔室下部内加入5 $\mu$ L的荧光微球溶液,于45℃真空烘箱中真空干燥30min,荧光微球在芯片中呈现小液滴形态,不发生扩散。

[0063] 芯片准备完毕后采用超声键合的方式,依据芯片结构依次将滤血垫,加样密封垫,导电橡胶,吸水纸以及密封圈加入芯片内部,将三层芯片按照超声键合线完成合并。

[0064] (4) 定标品的制备

[0065] 根据抗原浓缩液的估算浓度,用定标品稀释液将抗原浓缩液稀释至一定浓度(如500ng/mL),作为定标品抗原母液备用。抗原母液-20℃以下保存,有效期十二个月。

[0066] 取定标品抗原母液,将其用定标品稀释液以一定的稀释比例稀释,稀释比例至少为2个以上(如稀释比例为1:10,1:100)。将上述配制好的两个总三碘甲状腺原氨酸(TT3)定标品抗原母液稀释度用参比体系的试剂进行定值或上一批次总三碘甲状腺原氨酸(TT3)校准品建立的曲线测定定标品抗原母液各稀释度的总三碘甲状腺原氨酸(TT3)浓度,测定至少复孔,将结果乘以各自的稀释倍数后得出各自的定标品抗原母液浓度,将所有定标品抗原母液浓度结果取平均值后得到定标品抗原母液的估算浓度。

[0067] 定标品A的制备:

[0068] 定标品稀释液即为定标品A,浓度为0.5ng/mL,2-8℃保存;

[0069] 定标品B的制备:

[0070] 用定标品稀释液将总三碘甲状腺原氨酸(TT3)抗原母液稀释至2ng/mL,2-8℃保存。

[0071] 在本实施例中,定标品稀释液主要为Tris-HCl的缓冲体系,浓度为50mM,pH8.5,包含牛血清、BSA、表面活性剂RPE1740、RPE2520以及叠氮钠;

[0072] 在所述步骤(3)中,所述微流控芯片为三片式结构,包括由上到下依次层叠的上层芯片、中层芯片以及下层芯片;上层芯片、中层芯片以及下层芯片两两之间均通过定位柱、定位孔配合连接的方式实现相互间的层叠。

[0073] 在所述步骤(3)中,稀释标记三碘甲状腺原氨酸(T3)抗原Triiodothyronine微球,预先将微球水浴超声混匀,取20微升微球+80微升抽干保存液,混匀水浴超声,在封闭好的芯片下层反应槽正中间加5微升荧光微球溶液,真空干燥30min,将处理好的芯片组装起来,超声键合,最后铝箔袋保存并加入干燥剂。

[0074] 基于微流控芯片检测总三碘甲状腺原氨酸TT3的方法,采用上述方法制备得到的试剂盒,具体的有:

[0075] (1)样本处理:待检血清样本需加入样本处理液进行样本处理,再加样到芯片上进行检测;所述样本处理液为100mM的Tris缓冲液,pH为7.5,每升样本处理液中还包含有1.1g吐温表面活性剂以及0.8g的8-苯氨基-1-萘磺酸铵盐ANS作为甲状腺素的解离剂;

[0076] 置换剂的选择:由于在样本中绝大多数的T3是以蛋白结合的状态存在,直接使用T3的抗体无法与蛋白结合状态的T3直接反应,导致无法准确检测到样本中的T3浓度,因此检测之前要对结合状态的T3进行预处理,即使用置换剂将T3从蛋白结合状态分离出来,直接以游离的形式存在于样本中,这样才能够准确的被T3抗体检测到。因此置换剂的选择对T3检测试剂盒的影响至关重要。选择合适的置换剂也是关键的技术难点。我们购买了三种常用的置换剂,ANS、三氯乙酸钠、水杨酸钠。分别在T3项目上进行测试,考察其相关性,发光值等参数:

[0077] 使用上述的三种置换剂进行处理样本,在T3项目上测试6份不同浓度的样本,考察相关性等参数,具体数据如下表3:

[0078] 表3

[0079]

样本浓度 (nmol/L)	发光值		
	ANS	三氯乙酸钠	水杨酸钠
本底	406223	189554	160752
0.3	282209	171919	150057
0.6	242048	208291	131558
1.81	218380	186348	145794
2.12	157167	98594	62224
4.31	112240	77643	48525
9.97	61837	43512	28689
相关性	0.9913	0.9587	0.9698
结合率	0.2763	0.4096	0.3019

[0080] 综上,置换剂ANS在置换结合状态的T3具有明显优于其他两种置换剂的功能,相关性达到0.9913,结合率也较低,符合试剂盒开发的要求,因此选择ANS作为T3项目的置换剂。

[0081] (2) 移液器加样,吸取100 $\mu$ L的样本加入加样孔内,将微流控芯片进入检测仪器内,气路装置缓慢充气,推动样本往前移动,气体由透气口流出,液体在以PS为基材的微流控芯片内流入反应腔室内,样本接触反应腔室末端的导电橡胶,电容变化会触动,关闭流道阀门,同时关闭气路开关,停止加压;

[0082] (3) 仪器开启超声装置,超声混匀3-10分钟,超声探头置于三层芯片底部,位于反应腔室的中间部分,避免直接超声对芯片包被抗体的影响,反应结束后气体推动样本进行向前移动,吹干加样孔和流道样本,清洗液路装置启动,进入反应腔室内,混匀1-3分钟,进行清洗;加样口处的气体推动清洗液继续进行移动,吹干反应腔室和流道液体;

[0083] (4) 开启激发光源,对免疫反应结合固定的荧光微球进行测定,仪器读取芯片反应腔室的下面部分荧光强度,获得数据后通过计算并给出相应结果报告。

[0084] 在本实施例中,使用微流控芯片作为检测平台,进行了总三碘甲状腺原氨酸TT3项目的检测,与免疫层析平台的总三碘甲状腺原氨酸TT3项目对比,检测试剂的灵敏度有极大的提高,并且由于免疫反应采用了均相的反应体系,避免了层析释放不均匀以及反应线性单一的问题,在检测准确度上有了极大的改善;将荧光微球标记抗原试剂在芯片内进行干燥存放,采用了独有的隔离缓冲液组分,可以有效隔断液体试剂,使其不易发生随意的流动,同时在加入样本以及稀释液时可以迅速溶解并保持原有的生物活性。隔离缓冲液同时还起到防止荧光标记物在芯片内的吸附的作用,荧光标记物由于不直接与芯片接触,因此降低了非特异性的吸附。

[0085] 使用了探头超声作为微流控芯片的混匀方法,超声作用于芯片的左侧方,在不影响芯片的光洁度的光学性能前提上,超声的能量传递又将在反应腔室内将荧光微球标记抗原进行复溶并反应,在单一腔室内单一液体的反应保证了无交叉污染。超声处理的作用可

将免疫反应的效率大大的提高,由常规反应的30分钟或以上降低至5-10分钟即达反应的平台期。

[0086] 在微流控芯片上使用了侧路清洗以及添加增强液的加样模式,使用密封垫圈,在保证侧口不发生漏液的前提下,通过外压将清洗液或者增强液注入反应芯片腔室内部的方法,一方面简化了芯片的结构,避免芯片内出现多个腔室,另一方面对微流控芯片内的反应腔室起到充分清洗的作用,避免了液体的回流以及样本的污染;采用时间分辨荧光作为荧光标示物,检测信号相较传统的免疫检测试剂有了极大的提高,芯片反应腔室的设计采用透明的光学器件,可以有效的检测光信号,且荧光分子稳定存在,不受时间和激发次数的影响。

[0087] 采用时间分辨荧光作为荧光标示物,检测信号在受到外界光源时才产生荧光信号,因此检测步骤与清洗混匀步骤可以独立存在,互相不受影响。时间分辨荧光物质的荧光强度以及量子产率不受激发次数影响,可以多次读数。芯片反应腔室的设计采用透明的光学器件,无需额外添加搅拌子就可实现混匀效果,可以有效的检测光信号。此外,采用的微流控芯片将试剂的废液舱集成在芯片内部,反应结束后,无需额外的废液收集瓶或者排水装置,大大降低了样本的污染性,并且缩小了仪器的体积;全血过滤的加样口,通过水滴形的滤血纸以及通孔回气装置,全血样本可以有效过滤形成血浆样本进行检测,避免了额外的离心对血样的处理步骤。

[0088] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征及优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

专利名称(译)	基于微流控芯片检测总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒及制备和检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108872613A</a>	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201810437142.2	申请日	2018-05-09
[标]发明人	许行尚 杰弗瑞陈 朱宗哲		
发明人	许行尚 杰弗瑞·陈 朱宗哲		
IPC分类号	G01N33/78 G01N33/532 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/78 G01N33/532 G01N33/533		
代理人(译)	王素琴		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒及制备和检测方法，该试剂盒的制备方法，包括以下步骤：(1)微流控芯片包被；(2)荧光微球标记；(3)微流控芯片组装；(4)定标品的制备；(5)得基于微流控芯片的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒。制备得到的总三碘甲状腺原氨酸TT3试剂盒采用竞争法进行测定，选取高灵敏度的时间分辨荧光物作为标记物，在荧光微球上进行抗原的标记，利用免疫竞争反应进行分析检测，所制备的试剂性能可达同等化学发光试剂的水平。免疫反应后，使用清洗液将多余组分完全去除后，对免疫反应结合上的荧光微球进行检测读数，避免了引入显色液进入芯片内部反应不充分或者显色后读数不及时的问题。

样本浓度 (nmol/L)	发光值			
	CB 缓冲液包被	PB 缓冲液包被	Mes 缓冲液包被	醋酸缓冲液包被
本底	378440	295508	226514	315106
0.3	328683	259736	197332	279993
0.6	265950	186197	99187	166595
1.8	220860	176020	117209	194791
2.13	136496	92577	45575	111181
4.3	111630	98180	74011	96741
9.92	57335	31572	16389	43768
相关性	0.9869	0.9453	0.8573	0.8430
结合率	0.2950	0.3322	0.3267	0.3070