



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108080042 A

(43)申请公布日 2018.05.29

(21)申请号 201711112748.0

(22)申请日 2017.11.13

(71)申请人 成都微康生物科技有限公司

地址 610064 四川省成都市高新区科园南路88号天府生命科技园c1-502

(72)发明人 唐勇

(74)专利代理机构 北京元本知识产权代理事务所 11308

代理人 黎昌莉

(51)Int.Cl.

B01L 3/00(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

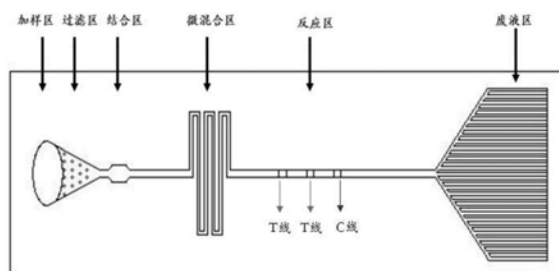
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

结合时间分辨荧光技术的微流控芯片及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明属于免疫学领域,具体涉及一种结合时间分辨荧光技术的微流控芯片及其制备方法和应用。本发明的结合时间分辨荧光技术的微流控芯片包括加样区、过滤区、时间分辨荧光微球抗体或抗体复合物结合区、微混合器、反应区和废液区。该微流控芯片采用时间分辨荧光纳米颗粒标记抗原或抗体,光稳定性强,灵敏度高,能有效避免样品自身的干扰;微流控芯片上可同时标记多个待检测项目的抗原或抗体,因而能实现单一样品的多个项目同时检测,提高效率,节约样品成本和时间成本;该微流控芯片的制备方法简单,在检测中精确性高,保证了批间差异小,稳定性高,通过检测荧光强度可实现样品的全定量检测。



1. 结合时间分辨荧光技术的微流控芯片,其特征在于,所述微流控芯片包括加样区、过滤区、时间分辨荧光微球抗体或抗体复合物结合区、微混合器、反应区和废液区。

2. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述微流控芯片的反应区微通道宽度为 $50\mu\text{m}$ – 5mm 。

3. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述微流控芯片的微混合器由S型往复的微通道组成,微通道宽度为 $10\mu\text{m}$ – 2mm 。

4. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述微流控芯片的废液区由阵列排布的微通道或微柱的组成,微通道宽度为 $10\mu\text{m}$ – 2mm ,通道与通道间的间隔为 $10\mu\text{m}$ – 2mm ;微柱直径为 $10\mu\text{m}$ – 5mm ,柱之间的距离为 $10\mu\text{m}$ – 5mm 。

5. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述微流控芯片的过滤区由由阵列排布的微柱结构组成,微柱直径为 $10\mu\text{m}$ – 2mm ,柱之间的距离为 $10\mu\text{m}$ – 5mm 。

6. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述反应区设置有检测线(T线)和质控线(C线);所述检测线设置有1个或多个。

7. 根据权利要求6所述的微流控芯片,其特征在于,T线与T线、T线与C线之间相隔2– 8mm 。

8. 权利要求1–7任一项所述微流控芯片的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 微流控芯片的制备:将基片和盖片统一生产后进行表面改性,得亲水性的微流控芯片;

2) 时间分辨荧光微球抗体或抗原复合物的制备:取稀土荧光微球溶液经活化后加入抗体或抗原进行标记;对标记抗体的微球进行封闭处理后再经清洗、重悬,得时间分辨荧光微球抗体复合物;

3) 将时间分辨荧光微球抗体或抗原复合物点样至微流控芯片基片上的结合区,并干燥;

4) 取未标记的抗体或抗原在反应区点样,干燥后将微流控芯片键合好,得结合时间分辨荧光技术的微流控芯片。

9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,步骤2)中稀土荧光微球的直径为 10nm – $10\mu\text{m}$;所述稀土荧光微球为含有稀土元素Eu或Tb或Sm的荧光微球。

10. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,步骤2)中时间分辨荧光微球抗体或抗原复合物为标记一种或同时标记多种抗体或抗原后复合物。

11. 利用结合时间分辨荧光技术的微流控芯片定量检测分析物的方法,其特征在于,在所述微流控芯片的加样区加待测物后,利用结合区的抗原抗体反应,通过微混合器结构控制流速和反应区的固定抗体或抗原结合,并利用时间分辨荧光检测仪检测反应区的荧光强度,利用标准曲线,确定待测物中抗原或抗体的浓度。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述分析物包括小分子物质、抗原、抗体、激素、抗生素、细菌和病毒及中的一种或多种;所述小分子物质包括小分子药物、毒品。

13. 结合时间分辨荧光技术的微流控芯片在抗原抗体免疫检测中的应用。

结合时间分辨荧光技术的微流控芯片及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学领域,具体涉及一种结合时间分辨荧光技术的微流控芯片及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 目前体外诊断产品(in vitro diagnostic products, IVD)市场上的检测试剂盒大都是利用抗原和抗体特异性结合的原理,用不同的荧光素作为标记抗体或抗原,与固定相的抗体或抗原,特异性的和待检测样本中的抗原或抗体,形成复合体,最后检测复合体的荧光强度来完成测定样本中待测物的浓度。但是这种普通的荧光素(如FITC、Alexa Fluor 647等)存在着stock位移小,激光光和发射光不容易区分,需要特殊的窄带滤波片来区分激发光和发射光,滤波片一方面降低了光强,一方面增加了成本。同时这些荧光素很容易被光漂白,荧光强度弱等问题,造成了这些检测试剂盒的灵敏度不高,稳定性不强的问题。

[0003] 时间分辨荧光免疫分析(Timeresolved Fluoroimmunoassay, TRFIA)是一种非同位素免疫分析技术,它把镧系元素和配基结合起来形成螯合物,这些螯合物的发光特点,荧光寿命较长,可达1~2ms,同时有很强的荧光效率,能够满足测量要求。时间分辨荧光分析法,是关闭激发光后再测定荧光强度的分析方法,用时间分辨技术测量荧光,同时检测波长和时间两个参数进行信号分辨,可有效地排除非特异荧光的干扰,极大地提高了分析灵敏度。

[0004] 目前市场上产品均是采用解离增强镧系元素荧光免疫分析(Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay, DELFIA)是时间分辨荧光分析中的一种。它采用具有双功能基团结构的螯合剂,使其一端与铕(Eu³⁺)连接,另一端与抗体/抗原分子上的自由氨基连接,形成Eu³⁺标记的抗体/抗原,经过免疫反应之后生成免疫复合物。由于这种复合物在水中的荧光强度非常弱,因此需加入一种解离增强液,首先把Eu³⁺从复合物上解离下来,然后自由Eu³⁺与解离增强液中荧光增强物(螯合剂)螯合进入胶束的疏水内核,使Eu³⁺的荧光成行万倍增加。采用这种解离增强步骤分析方法,被称为解离增强镧系元素荧光免疫分析。

[0005] 当前时间分辨荧光在IVD领域的应用主要还集中在纸层析法,纸层析法的最大缺点在于由于载体层析纸很难做到孔径以及分布的均一性,因而不能主动控制流速;由于每一张层析纸不能完全做到可重复,因而批次间检测结果也存在极大的不可重复性;此外,纸层析法更没办法做到单一样品的多通道检测。

[0006] 随着微流控技术的发展,越来越多的微流控芯片被应用在IVD临床检测领域。微流控芯片结构的精密性及可重复性保证了微流控芯片批间差异小,结果可重复;其微通道保证所需样本量极少,只需微升级别的样品;同时其通道的分布可以保证在单一芯片上完成多种项目的同时检测,大大提高了检测效率。但目前市面上临床检测领域的微流控芯片还主要是普通的荧光素与检测抗原或抗体相标记后检测待检样品。目前并没有在微流控芯片上运用时间分辨荧光来完成检测的微流控免疫芯片。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种结合时间分辨荧光技术的微流控芯片,该微流控芯片采用时间分辨荧光纳米颗粒标记抗体或抗原,灵敏度高,能有效避免样品自身的干扰,能实现单一样品的多个项目同时检测。

[0008] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0009] 结合时间分辨荧光技术的微流控芯片,所述微流控芯片包括加样区、过滤区、时间分辨荧光微球抗体或抗体复合物结合区、微混合器、反应区和废液区。

[0010] 本发明的微流控芯片包括但不仅限于加样区、过滤区、时间分辨荧光微球抗体或抗体复合物结合区、微混合器、反应区和废液区。

[0011] 时间分辨荧光分析法(TRFIA)实际上是利用了发射荧光的波长与其激发光波长的巨大差异(Stokes位移较大)克服了激发光对发射荧光的背景影响,由于镧系元素和其配基形成的螯合物的发射荧光的波长在很狭窄光谱范围内,同时,其荧光寿命又较长,这样特点就解决激发光的杂散光和外界短寿命光对发射荧光影响,从而大幅度提高了光学分析的灵敏度。因此TRFIA具有很高的分析灵敏度、宽阔的测量范围、优良的分析精密性和对多个待测物同时检测的能力,成为方法学上颇具优势的非放射免疫分析技术之一。

[0012] 时间分辨荧光分析是以稀土离子标记抗原或抗体、核酸探针和细胞等为特征的超灵敏度检测技术,它克服了酶标记物的不稳定、化学发光仅能一次发光且易受环境干扰、电化学发光的非直接标记等缺点。使非特异性信号降低到可以忽略的程度,达到了极高的信噪比,从而大大地超过了放射性同位素所能达到的灵敏度,且还具有标记物制备简便、储存时间长、无放射性污染、检测重复性好、操作流程短、标准曲线范围宽、不受样品自然荧光干扰和应用范围十分广泛等优点,成为继放射免疫分析之后标记物发展的一个新里程碑。

[0013] 本发明将时间分辨荧光技术结合到微流控芯片上提高了检测的精确性、灵敏度、检测效率和稳定性。

[0014] 进一步,所述微流控芯片的反应区微通道宽度为 $50\mu\text{m}$ – 5mm 。

[0015] 作为一种优选,所述微流控芯片的反应区微通道宽度为 $50\mu\text{m}$ – 1mm 。

[0016] 进一步,所述微流控芯片的微混合器由S型往复的微通道组成,微通道宽度为 $10\mu\text{m}$ – 2mm 。

[0017] 作为一种优选,所述微流控芯片的微混合器由S型往复的微通道组成,微通道宽度为 $100\mu\text{m}$ – 1mm 。

[0018] 进一步,所述微流控芯片的废液区由阵列排布的微通道或微柱的组成,微通道宽度为 $10\mu\text{m}$ – 2mm ,通道与通道间的间隔为 $10\mu\text{m}$ – 2mm ;微柱直径为

[0019] $10\mu\text{m}$ – 5mm ,柱之间的距离为 $10\mu\text{m}$ – 5mm 。

[0020] 进一步,所述微流控芯片的过滤区由阵列排布的微柱结构组成,微柱直径为 $10\mu\text{m}$ – 2mm ,柱之间的距离为 $10\mu\text{m}$ – 5mm 。

[0021] 进一步,所述反应区设置有检测线(T线)和质控线(C线);所述检测线设置有1个或多个。

[0022] 进一步,T线与T线、T线与C线之间相隔 $2\text{--}8\text{mm}$ 。

[0023] 作为一种优选,T线与T线、T线与C线之间相隔 $4\text{--}8\text{mm}$ 。

[0024] 本发明的目的之二在于提供一种所述结合时间分辨荧光技术的微流控芯片的制备方法,包括以下步骤:

[0025] 1) 微流控芯片的制备:将基片和盖片统一生产后进行表面改性,得亲水性的微流控芯片;

[0026] 2) 时间分辨荧光微球抗体或抗原复合物的制备:取稀土荧光微球溶液经活化后加入抗体或抗原进行标记;对标记抗体的微球进行封闭处理后再经清洗、重悬,得时间分辨荧光微球抗体复合物;

[0027] 3) 将时间分辨荧光微球抗体或抗原复合物点样至微流控芯片基片上的结合区,并干燥;

[0028] 4) 取未标记的抗体或抗原在反应区点样,干燥后将微流控芯片键合好,得结合时间分辨荧光技术的微流控芯片。

[0029] 所述制备方法简单,在微流控芯片上可定量标记一个或多个抗体或抗原,因而能实现单一样品的多个项目同时检测,提高效率,通过检测荧光强度可实现样品的全定量检测。

[0030] 作为一种优选,步骤1)中的基片和盖片的成型材料为聚合物,包括但不限于聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚碳酸酯聚二甲基硅氧烷、聚甲基丙烯酸甲酯、环烯烃类共聚物、环氧树脂等。

[0031] 作为一种优选,步骤1)中的基片或盖片的成型方法包括但不限于热压成型、注塑成型、雕刻成型、3d打印成型等。

[0032] 进一步,步骤2)中稀土荧光微球的直径为10nm-10 μ m;所述稀土荧光微球为含有稀土元素Eu或Tb或Sm的荧光微球。荧光微球由聚苯乙烯、二氧化硅、四氧化三铁等材料中的一种或多种聚合形成。

[0033] 作为一种优选,步骤2)中的荧光微球表面包括但不限于带有羧基、氨基修饰或不带有修饰的微球。

[0034] 作为一种优选,步骤2)中的对荧光微球的活化,包括但不限于使用EDC、戊二醛等对微球进行活化。

[0035] 进一步,步骤2)中时间分辨荧光微球抗体或抗原复合物为标记一种或同时标记多种抗体或抗原的复合物。

[0036] 作为一种优选,步骤3)中干燥的方法包括但不限于烘箱烘干、冷冻干燥、真空干燥等。

[0037] 作为一种优选,步骤4)中,取未标记的抗体或抗原在反应区点样,点样并固定的方法包括但不限于被动吸附、共价偶联、亲和吸附等方法。

[0038] 作为一种优选,步骤4)中干燥的方法包括但不限于自然风干、烘箱烘干、冷冻干燥、真空干燥等。

[0039] 作为一种优选,步骤4)中芯片基片和盖片键合的方法包括但不限于热压键合、双面胶键合、胶水键合、溶剂键合、超声键合、激光键合等。

[0040] 本发明的目的之三在于提供一种利用结合时间分辨荧光技术的微流控芯片定量检测分析物的方法,在所述微流控芯片的加样区加待测物后,利用结合区的抗原抗体反应,通过微混合器结构控制流速和反应区的固定抗体或抗原结合,并利用时间分辨荧光检测仪

检测反应区的荧光强度,利用标准曲线,确定待测物中抗原或抗体的浓度。

[0041] 在检测中时间分辨荧光在激发光激发后到检测之间存在约200-300ms的时间差,因而可有效避免样品本身自发荧光带来的干扰。

[0042] 进一步,所述分析物包括小分子物质、抗原、抗体、激素、抗生素、细菌和病毒及中的一种或多种;所述小分子物质包括小分子药物、毒品。。所述分析物包括但不限于小分子物质(药物、毒品)、抗原、抗体、激素、抗生素、细菌和病毒。

[0043] 本发明的目的还在于提供一种结合时间分辨荧光技术的微流控芯片在抗原抗体免疫检测中的应用。

[0044] 本发明的目的还在于提供一种时间分辨荧光在微流控芯片检测上的应用。

[0045] 目前并没有在微流控芯片上运用时间分辨荧光来完成检测的微流控免疫芯片,本发明填补了这一空白,在抗原抗体免疫检测应用中能大大提高了检测的准确性和效率。

[0046] 本发明的有益效果在于:

[0047] 1) 本发明提供的结合时间分辨荧光技术的微流控芯片采用时间分辨荧光纳米颗粒标记抗原或抗体,光稳定性强,灵敏度高,能有效避免样品自身的干扰。

[0048] 2) 微流控芯片上可同时标记多个待检测项目的抗体或抗原,因而能实现单一样品的多个项目同时检测,提高效率,节约样品成本和时间成本。

[0049] 3) 该微流控芯片的制备方法简单,在检测中精确性高,保证了批间差异小,稳定性高,通过检测荧光强度可实现样品的全定量检测。

附图说明

[0050] 图1为本发明的结合时间分辨荧光技术的微流控芯片示意图。

[0051] 图2为用本发明的微流控荧光定量进行测定的标准曲线示意图。

具体实施方式

[0052] 以下将参照附图,对本发明的优选实施例进行详细描述。优选实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,所举实施例是为了更好地对本发明的内容进行说明,但并不是本发明的内容仅限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整,仍属于本发明的保护范围。

[0053] 实施例1结合时间分辨荧光技术的降钙素原(PCT)微流控芯片

[0054] 结合时间分辨荧光技术的PCT微流控芯片,所述微流控芯片包括加样区、过滤区、时间分辨荧光微球抗体或抗体复合物结合区、微混合器、反应区和废液区。如图1所示。

[0055] 实施例2结合时间分辨荧光技术的PCT微流控芯片的制备方法

[0056] 1) 微流控芯片的制备:微流控芯片由亲水的基片和盖片组成,将基片和盖片统一注塑生产后进行表面改性,得微流控芯片;

[0057] 2) 时间分辨荧光微球抗体或抗原复合物的制备:

[0058] a. 取1mg稀土荧光微球(购置bangslabs,货号:),离心后去除上清,用400u1包被缓冲液洗涤两次。包被缓冲液配方:称量9.76g MES,溶于1L蒸馏水,用5M NaOH调节PH=6.0;

[0059] b. 活化:在洗涤后的微球中分别加入50u1的EDC(浓度为0.1mg/ML),室温震荡1小时;

[0060] c. 标记抗体:活化后的胶乳,离心去上清,用10mMPB缓冲液洗涤两次,加入适当量的PCT抗体1,室温震荡2h,完成抗体标记;

[0061] d. 标记抗体1的微球中加入50Mm的羟胺,震荡30min,通过离心,去除上清,加入封闭缓冲液,室温震荡30min。封闭缓冲液配方:1%BSA,10mM PB;

[0062] e. 清洗重悬:封闭好后的微球离心去上清,用10mM PBS清洗三次;清洗好后的微球离心去上清,加入400ul微球储存液,保存于4度,得时间分辨荧光微球抗体复合物;微球储存液配方:1%BSA,0.1%Tween-20,0.05%叠氮钠,10mM PB;

[0063] 3) 时间分辨荧光微球固定:吸取1ul包被了抗体1的时间分辨荧光微球,点至微流控芯片基片上的结合区,在37℃烘箱中,放置1h烘干;

[0064] 4) 捕获抗体偶联:将表面修饰后的盖片浸泡入5%戊二醛溶液中,室温反应30min后,用水清洗后,37度烘干10min;吸取0.5ul的PCT抗体2,点样在对应反应区,在湿盒中抚育1h后,用10mM PBS清洗后在37度烘干10min;将盖片放入1%BSA 10Mm PBS溶液中,封闭30min;用10mM PBS清洗后,在37度烘箱中烘干10min;

[0065] 5) 芯片键合:本实施例采用双面胶键和的方式,将按照芯片通道结构加工好的双面胶取出,按通道结构将双面胶贴于基片上后,撕开双面胶的表面膜后,将盖片对准基片后,压紧,组成完整的芯片,如图1所示。

[0066] 实施例3灵敏度检测

[0067] 将1mg/ml的PCT抗原,用10mM PBS进行梯度稀释,得到(10ng/ml、5ng/ml、1ng/ml、0.1ng/ml、0.01ng/ml)的梯度校准品。吸取30ul梯度校准品加入微流控芯片中,反应5min后,用微流控荧光定量分析仪进行测定后,得到荧光强度值和浓度梯度的对应的一组数据,并制备成标准曲线: $y = -7E-15x^3 + 2E-09x^2 + 8E-05x + 0.0064$,见图2。

[0068] 吸取30ul的10mM PBS的缓冲液,加入到微流控芯片中,反应5min后,进行测定得到浓度为0时的荧光强度值,反复加样测定20次,得到检测结果。

[0069] 将20组检测结果的平均值+2倍SD带入标准曲线进行计算后,得到的浓度值为微流控芯片的分析灵敏度。最后测定得到分析灵敏度为3.453pg/ml。

[0070] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

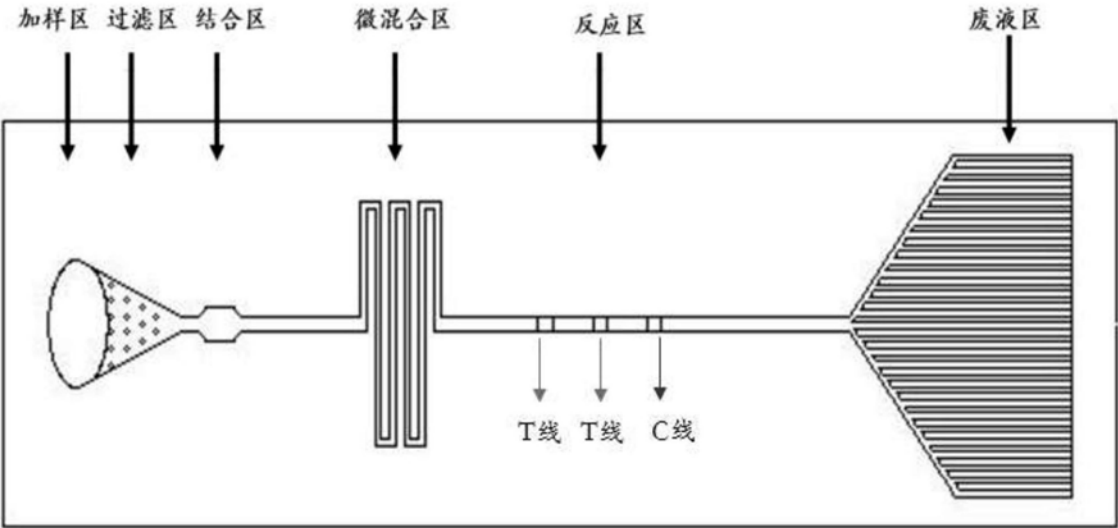


图1

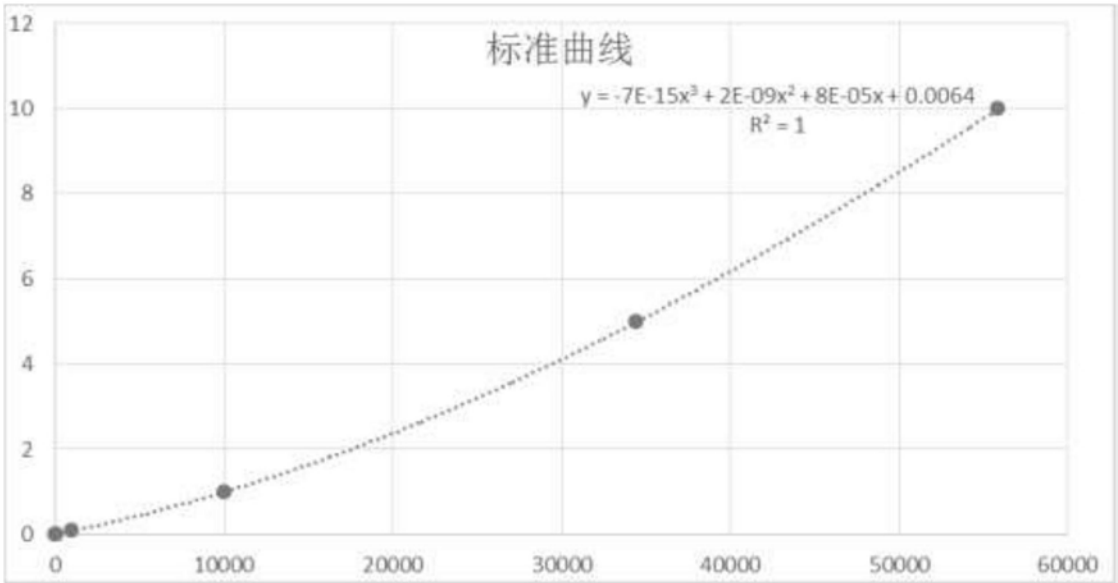


图2

专利名称(译)	结合时间分辨荧光技术的微流控芯片及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108080042A	公开(公告)日	2018-05-29
申请号	CN201711112748.0	申请日	2017-11-13
[标]发明人	唐勇		
发明人	唐勇		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/533		
代理人(译)	黎昌莉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫学领域，具体涉及一种结合时间分辨荧光技术的微流控芯片及其制备方法和应用。本发明的结合时间分辨荧光技术的微流控芯片包括加样区、过滤区、时间分辨荧光微球抗体或抗体复合物结合区、微混合器、反应区和废液区。该微流控芯片采用时间分辨荧光纳米颗粒标记抗原或抗体，光稳定性强，灵敏度高，能有效避免样品自身的干扰；微流控芯片上可同时标记多个待检测项目的抗原或抗体，因而能实现单一样品的多个项目同时检测，提高效率，节约样品成本和时间成本；该微流控芯片的制备方法简单，在检测中精确性高，保证了批间差异小，稳定性高，通过检测荧光强度可实现样品的全定量检测。

