



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108097340 B

(45)授权公告日 2019.03.19

(21)申请号 201810159999.2

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2018.02.26

G01N 33/573(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/574(2006.01)

申请公布号 CN 108097340 A

G01N 33/533(2006.01)

(43)申请公布日 2018.06.01

审查员 庄海民

(73)专利权人 北京华科泰生物技术股份有限公司

地址 101111 北京市通州区科创东五街2号  
14幢4层F4E

(72)发明人 林斯

(74)专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 张瑾

(51)Int.Cl.

B01L 3/00(2006.01)

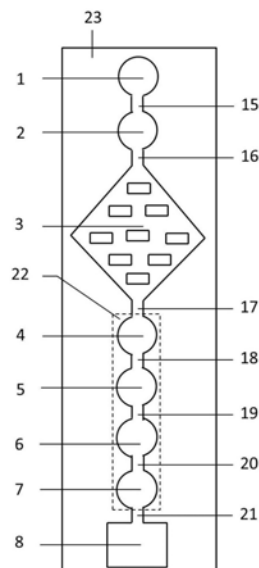
权利要求书3页 说明书10页 附图5页

(54)发明名称

一种用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明涉及一种用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片,包括:芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片,所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、第一检测区、第二检测区、第三检测区、质控区及废液收集区;所述上层盖片上设有加样孔、第一检测窗口、第二检测窗口、第三检测窗口、质控窗口、通气孔,并且与所述加样区、第一检测区、第二检测区、第三检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应。本发明还提供了上述联合微流控芯片的制备方法和用途。本发明能够实现PGI、PG II、G-17项目的联合检测,对能够全面准确的进行胃功能疾病筛查有着极大的临床诊断价值。



1. 一种用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片,其特征在于,包括:芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片,

所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、第一检测区、第二检测区、第三检测区、质控区及废液收集区;

所述上层盖片上设有加样孔、第一检测窗口、第二检测窗口、第三检测窗口、质控窗口、通气孔,并且与所述加样区、第一检测区、第二检测区、第三检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应;

其中,抗体包被区预存储有荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人PG II单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的混合物;

所述第一检测区、第二检测区或第三检测区中分别预存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体、磁性微球标记的另一株鼠抗人PG II单克隆抗体或磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体中的一种且三个检测区中所预存储的物质各不相同。

2. 根据权利要求1所述的用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述第一检测区、第二检测区、第三检测区和质控区的下侧设有由永磁铁或电磁铁提供的磁场区域。

3. 根据权利要求1所述的用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人PG II单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的摩尔比为1:1:1:(0.1~4)。

4. 根据权利要求1所述的用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述第一检测区、第二检测区或第三检测区中磁性微球与另一株鼠抗人PGI单克隆抗体的质量比为10:(0.05~2);所述第一检测区、第二检测区或第三检测区中磁性微球与另一株鼠抗人PG II单克隆抗体的质量比为10:(0.05~2);所述第一检测区、第二检测区或第三检测区中磁性微球与另一株鼠抗人G-17单克隆抗体的质量比为10:(0.05~2)。

5. 根据权利要求4所述的用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述磁性微球为磁性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co微球,或者为磁性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与无机物或有机物形成的核/壳结构或掺杂结构的微球,所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co与所述无机物或有机物的重量百分比为1:(0.001-1000);所述磁性微球的粒径大小为0.05-5 $\mu\text{m}$ 。

6. 根据权利要求1所述的用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述质控区预存储有磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体。

7. 根据权利要求1所述的用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片,其特征在于,所述第一检测区、第二检测区、第三检测区和质控区的表面设置为粗糙结构,所述粗糙结构为向下凹的半圆结构、锯齿形结构、凹凸的小矩形结构或其他不规则结构;

所述微混合区为棱形、圆形或矩形,并且其内部设有n个交错设置的矩形、棱形或圆形的柱体;或者所述微混合区为至少一个矩形串联结构,并且每个矩形中设有一个矩形柱体;或者所述微混合区为锯齿形结构;或者所述微混合区为至少一个正三角形或倒三角形串联结构,并且每个三角形中设置有一个相应正三角或者倒三角形柱体;或者所述微混合区为

至少一个棱形结构串联,并且棱形结构中设置有一个棱形或圆形柱体;或者所述微混合区为至少一个圆形结构串联,并且圆形结构中设置有一个圆形柱体。

8. 权利要求1~7任一项所述的用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 在芯片基板上开设一个微流控检测通道;

2) 将荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人PG II单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG进行混合,将混合物预存储在抗体包被区中,干燥;

3) 将磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体、磁性微球标记的另一株鼠抗人PG II单克隆抗体及磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体分别任意地预存储在第一检测区、第二检测区及第三检测区中且三个检测区中所预存储的物质各不相同,干燥;

4) 将磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体预存储在质控区中,干燥;

5) 将上层盖片盖合于芯片基板的上方;

6) 在芯片基板的下方对应所述微流控芯片的第一检测区、第二检测区、第三检测区和质控区设置磁场。

9. 一种权利要求1~7任一项所述的用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片的应用方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要启动,使第一、第二及第三检测区和质控区中的免疫磁性微球平铺固定到相应区域的底面;

2) 从加样孔加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区,复溶预存储在抗体包被区中的荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人PG II单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区,在微混合区样本中的PGI与荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的PGI免疫复合物,样本中的PG II与荧光微球标记的一株鼠抗人PG II单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的PG II免疫复合物,样本中G-17与荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的G-17免疫复合物,且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

4) 步骤3)中反应后形成的荧光微球标记的PGI免疫复合物、荧光微球标记的PG II免疫复合物、荧光微球标记的G-17免疫复合物和未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道进入到第一、第二、第三检测区和质控区内,荧光微球标记的PGI免疫复合物与磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体的检测区内,荧光微球标记的PG II免疫复合物与磁性微球标记的另一株PG II单克隆抗体发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的一株PG II单克隆抗体的检测区内,荧光微球标记的G-17免疫复合物与磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体的检测区内;荧光微球标记的兔IgG与质控区中磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体发生免疫反应而停留在质控区中,剩余液体流入废液收集区中;

5) 第一、第二及第三检测区和质控区的荧光微球均显示一定的荧光信号,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与PGI的浓度具有正相关性,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人PG II单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与PG II的浓度具有正相关性,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与G-17浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出PGI、PG II和G-17的浓度。

## 一种用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断领域,具体涉及一种用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 胃蛋白酶原(PG)是由胃部分泌的参与消化的胃蛋白酶的前体,是分子质量为42kDa的单链多肽。其大部分分泌入胃腔,一小部分通常约1%的PG可通过胃黏膜进入血液循环,在胃内转变为具有活性的胃蛋白酶,水解蛋白质和多肽。PG有七种同工酶,分为PGI、PG II两个亚群,均可在血液中检出。PGI由5种同工酶组成,主要由胃底的主细胞和黏液颈细胞分泌。PG II由2种同工酶组成,除了由胃底的主细胞和黏液颈细胞分泌外,还可由幽门腺、贲门腺和十二指肠上段的Brunner腺分泌。血清胃蛋白酶原可以较为准确地显示胃黏膜的状态和功能。

[0003] 胃泌素是一种重要的胃肠道肽类激素。胃泌素由位于胃窦及十二指肠近端黏膜的G细胞合成及分泌。其合成经历了由胃泌素原、甘氨酸延伸型胃泌素到成熟胃泌素的阶段,前两种胃泌素合成的中间产物是未酰胺化的胃泌素,而成熟胃泌素是酰胺化的胃泌素,人体中95%以上的活性胃泌素为 $\alpha$ -酰胺胃泌素。酰胺化胃泌素包括G17、G34、G14、G6、G52、G71,其中G17是胃窦中胃泌素的主要形式,为进餐后血液中胃泌素的主要形式。胃泌素与胃泌素受体结合后通过一系列信号转导而发挥生物学效应。

[0004] 近年来许多国家和地区已经开始通过检测PGI、PG II或G-17来诊断胃炎和胃癌等胃功能性疾病。然而,目前临床上对胃功能疾病诊断主要是对单个项目进行检测,导致在疾病诊断方面存在一定的局限性。或者为了获得准确的检测结果,临床上采用对不同项目的试剂盒进行联合检测,样本用量多,检测周期长,工作量大,效率低。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途。

[0006] 为了达到上述的目的,本发明提供了一种用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片,包括:芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片,

[0007] 所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、第一检测区、第二检测区、第三检测区、质控区及废液收集区;

[0008] 所述上层盖片上设有加样孔、第一检测窗口、第二检测窗口、第三检测窗口、质控窗口、通气孔,并且与所述加样区、第一检测区、第二检测区、第三检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应;

[0009] 其中,抗体包被区预存储有荧光微球标记的一株鼠抗人胃蛋白酶原I(PGI)单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人胃蛋白酶原II(PG II)单克隆抗体、荧光微球标记的一株

鼠抗人胃泌素17 (G-17) 单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的混合物；

[0010] 所述第一检测区、第二检测区或第三检测区中分别预存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体、磁性微球标记的另一株鼠抗人PG II 单克隆抗体或磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体中的一种且三个检测区中所预存储的物质各不相同。

[0011] 进一步地,其中所述第一检测区、第二检测区、第三检测区和质控区的下侧设有由永磁铁或电磁铁提供的磁场区域。

[0012] 进一步地,其中所述荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人PG II 单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的摩尔比为1:1:1:(0.1~4)。

[0013] 进一步地,其中所述第一检测区、第二检测区或第三检测区中磁性微球与另一株鼠抗人PGI单克隆抗体的质量比为10:0.05~2;所述第一检测区、第二检测区或第三检测区中磁性微球与另一株鼠抗人PG II 单克隆抗体的质量比为10:0.05~2;所述第一检测区、第二检测区或第三检测区中磁性微球与另一株鼠抗人G-17单克隆抗体的质量比为10:0.05~2。

[0014] 进一步地,其中所述磁性微球为磁性的 $Fe_3O_4$ 、 $\gamma-Fe_2O_3$ 、Pt、Ni或Co微球,或者为磁性的 $Fe_3O_4$ 、 $\gamma-Fe_2O_3$ 、Pt、Ni或Co与无机物或有机物形成的核/壳结构或掺杂结构的微球,所述 $Fe_3O_4$ 、 $\gamma-Fe_2O_3$ 、Pt、Ni或Co与所述无机物或有机物的重量百分比为1:(0.001-1000);所述磁性微球的粒径大小为0.05-5 $\mu m$ 。

[0015] 进一步地,其中所述质控区预存储有磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体。

[0016] 进一步地,其中所述第一检测区、第二检测区、第三检测区和质控区的表面设置为粗糙结构,所述粗糙结构为向下凹的半圆结构、锯齿形结构、凹凸的小矩形结构或其他不规则结构;

[0017] 所述微混合区为棱形、圆形或矩形,并且其内部设有n个交错设置的矩形、棱形或圆形的柱体;或者所述微混合区为至少一个矩形串联结构,并且每个矩形中设有一个矩形柱体;或者所述微混合区为锯齿形结构;或者所述微混合区为至少一个正三角形或倒三角形串联结构,并且每个三角形中设置有一个相应正三角或者倒三角形柱体;或者所述微混合区为至少一个棱形结构串联,并且棱形结构中设置有一个棱形或圆形柱体;或者所述微混合区为至少一个圆形结构串联,并且圆形结构中设置有一个圆形柱体。

[0018] 本发明还提供了上述用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片的制备方法,包括如下步骤:

[0019] 1) 在芯片基板上开设一个微流控检测通道;

[0020] 2) 将荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人PG II 单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG进行混合,将混合物预存储在抗体包被区中,干燥;

[0021] 3) 将磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体、磁性微球标记的另一株鼠抗人PG II 单克隆抗体及磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体分别任意地预存储在第一检测区、第二检测区及第三检测区中且三个检测区中所预存储的物质各不相同,干燥;

[0022] 4) 将磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体预存储在质控区中,干燥;

[0023] 5) 将上层盖片盖合于芯片基板的上方;

[0024] 6) 在芯片基板的下方对应所述微流控芯片的第一检测区、第二检测区、第三检测区和质控区设置磁场。

[0025] 本发明进一步提供了上述用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片的应用方法,包括如下步骤:

[0026] 1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要启动,使第一、第二及第三检测区和质控区中的免疫磁性微球平铺固定到相应区域的底面;

[0027] 2) 从加样孔加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道流入抗体包被区,复溶预存储在抗体包被区中的荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人PG II单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

[0028] 3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道流入到微混合区,在微混合区样本中的PGI与荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的PGI免疫复合物,样本中的PG II与荧光微球标记的一株鼠抗人PG II单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的PG II免疫复合物,样本中G-17与荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的G-17免疫复合物,且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

[0029] 4) 步骤3)中反应后形成的荧光微球标记的PGI免疫复合物、荧光微球标记的PG II免疫复合物、荧光微球标记的G-17免疫复合物和未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道进入到第一、第二、第三检测区和质控区内,荧光微球标记的PGI免疫复合物与磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体的检测区内,荧光微球标记的PG II免疫复合物与磁性微球标记的另一株PG II单克隆抗体发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的一株PG II单克隆抗体的检测区内,荧光微球标记的G-17免疫复合物与磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体的检测区内;荧光微球标记的兔IgG与质控区中磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体发生免疫反应而停留在质控区中,剩余液体流入废液收集区中;

[0030] 5) 第一、第二及第三检测区和质控区的荧光微球均显示一定的荧光信号,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与PGI的浓度具有正相关性,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人PG II单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与PG II的浓度具有正相关性,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与G-17浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出PGI、PG II和G-17的浓度。

[0031] 本发明的有益效果在于:

[0032] 1. 本发明设置的微混合区便于待测物质与相应抗原或抗体之间进行充分结合,提高检测的灵敏度;

[0033] 2. 本发明在检测区和质控区中分别设有免疫磁微球,在检测区和质控区的下方设置了磁场区域,便于将待测物质固定到相应检测区内,并且检测区和质控区表面设置成粗糙结构,用于增大摩擦力,防止磁珠滚动;降低非特异性造成的干扰,提高检测灵敏度;

[0034] 3. 本发明在免疫反应前将免疫磁珠平铺固定到检测区或质控区表面,免疫反应后

使荧光微球均置于免疫磁珠的上表面,避免了磁性微球遮挡荧光微球而对荧光信号造成干扰;

[0035] 4. 本发明能够实现PGI、PG II、G-17项目的联合检测,对能够全面准确的进行胃功能疾病筛查有着极大的临床诊断价值,并且本微流控芯片检测时样本用量少、检测周期短、检测效率高。

### 附图说明

[0036] 图1A为本发明的用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片中芯片基板的结构示意图;

[0037] 图1B为本发明的用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片中上层盖片的结构示意图;

[0038] 图2为本发明的免疫磁性微球与检测区或质控区的粗糙表面的接触示意图,其中,(1) 免疫磁性微珠与向下凹的半圆结构的粗糙表面接触;(2) 免疫磁性微珠与锯齿形结构的粗糙表面接触;(3) 免疫磁性微珠与凹凸的矩形结构的粗糙表面接触;

[0039] 图3为本发明的用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片的微混合区结构示意图,其中,(1) 棱型结构,并且内部设有多个交错设置的棱形柱体;(2) 棱型结构,并且内部设有多个交错设置的圆形柱体;(3) 棱型结构,并且内部设有多个长条形柱体;(4) 两个矩形串联结构,并且每个矩形中设有一个矩形柱体;(5) 三个正三角形串联结构,并且每个正三角形中设有一个正三角形柱体;(6) 三个倒三角形串联结构,并且每个倒三角形中设有一个倒三角形柱体;(7) 锯齿形结构;(8) 三个棱型串联结构,并且每个棱型中设置一个棱型柱体;(9) 三个棱型串联结构,并且每个棱型中设置一个棱型柱体;

[0040] 图4为PGI的标准曲线;

[0041] 图5为PG II的标准曲线;

[0042] 图6为G-17的标准曲线。

### 具体实施方式

[0043] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好的理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

[0044] 结合图1A及图1B所示,本发明提供了一种用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片,包括:芯片基板23及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片24,所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区1、抗体包被区2、微混合区3、第一检测区4、第二检测区5、第三检测区6、质控区7、废液收集区8;上层盖片上设有加样孔9、第一检测窗口10、第二检测窗口11、第三检测窗口12、质控窗口13、通气孔14,并且与芯片基板中加样区1、第一检测区4、第二检测区5、第三检测区6、质控区7、废液收集区8的位置依次对应。第一检测区4、第二检测区5、第三检测区6和质控区7的下侧设有磁场区域22,磁场由永磁铁或电磁铁提供。

[0045] 其中,加样区1和抗体包被区2通过第一毛细管微通道15连通,抗体包被区2和微混合区3通过第二毛细管微通道16连通,微混合区3与第一检测区4通过第三毛细管微通道17连通,第一检测区4和第二检测区5通过第四毛细管微通道18连通,第二检测区5和第三检测区6通过第五毛细管微通道19连通,第三检测区6和质控区7通过第六毛细管微通道20连通,

质控区7和废液收集区8通过第七毛细管微通道21连通；

[0046] 抗体包被区2预存储有荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人PG II单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的混合物；

[0047] 第一检测区4中预存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体，第二检测区5中预存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人PG II单克隆抗体，第三检测区6中预存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体，质控区7中预存储有羊抗兔多克隆抗体。

[0048] 所述荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人PG II单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的摩尔比为1:1:1:1。

[0049] 所述第一检测区中磁性微球与另一株鼠抗人PGI单克隆抗体的质量比为10:0.4；所述第二检测区中磁性微球与另一株鼠抗人PG II单克隆抗体的质量比为10:0.4；所述第三检测区中磁性微球与另一株鼠抗人G-17单克隆抗体的质量比为10:0.4。

[0050] 所述磁性微球为磁性的 $Fe_3O_4$ 、 $\gamma-Fe_2O_3$ 、Pt、Ni或Co微球，或者为磁性的 $Fe_3O_4$ 、 $\gamma-Fe_2O_3$ 、Pt、Ni或Co与无机物或有机物形成的核/壳结构或掺杂结构的微球，所述 $Fe_3O_4$ 、 $\gamma-Fe_2O_3$ 、Pt、Ni或Co与所述无机物或有机物的重量百分比为1:(0.001-1000)；所述磁性微球的粒径大小为0.05-5 $\mu m$ 。

[0051] 结合图2所示，所述第一检测区4、第二检测区5、第三检测区6和质控区7的表面设置为粗糙结构。所述粗糙结构为向下凹的半圆结构、锯齿形结构、凹凸的小矩形结构或其他不规则结构。

[0052] 结合图3所示，所述微混合区3为棱形、圆形或矩形，并且其内部设有n个交错设置的矩形、棱形或圆形的柱体；或者所述微混合区3为至少一个矩形串联结构，并且每个矩形中设有一个矩形柱体；或者所述微混合区为锯齿形结构；或者所述微混合区3为至少一个正三角形或倒三角形串联结构，并且每个三角形中设置有一个相应正三角或者倒三角形柱体；或者所述微混合区3为至少一个棱形结构串联，并且棱形结构中设置有一个棱形或圆形柱体；或者所述微混合区3为至少一个圆形结构串联，并且圆形结构中设置有一个圆形柱体；

[0053] 制备上述用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片的方法，包括如下步骤：

[0054] 1) 在芯片基板上开设一个所述微流控检测通道；

[0055] 2) 将荧光微球标记的一株鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人PG II单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG进行混合，将混合物预存储在抗体包被区2中，干燥；

[0056] 3) 将磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体、磁性微球标记的另一株鼠抗人PG II单克隆抗体及磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体分别相应地预存储在第一检测区4、第二检测区5及第三检测区6中，干燥；

[0057] 4) 将磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体预存储在质控区7中，干燥；

[0058] 5) 将上层盖片24盖合于芯片基板23的上方；

[0059] 6) 在芯片基板的下方对应所述微流控芯片的第一检测区4、第二检测区5及第三检测区6和质控区7设置磁场。

[0060] 以下通过具体实施例对本发明进行进一步说明。

[0061] 1、抗体包被区的处理

[0062] 1.1 荧光微球标记鼠抗人PGI单克隆抗体

[0063] 取5mL 0.01g/mL的乳胶荧光微球放入小离心管中,按照12000r/min的转速离心20min,移除上层清液后,用5mL的碳酸盐缓冲溶液进行复溶,随后加入5mg的碳二亚胺(EDC)、5mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1mL鼠抗人PGI单克隆抗体在25℃下搅拌6h,继续加入2.5mg的赖氨酸在室温下搅拌20min,将混合物放入透析袋中在4℃下透析12h;透析结束后将混合溶液在12000r/min的转速下离心10min,移去上层清液,最后用20mL的LM缓冲溶液复溶,待用;

[0064] 1.2 荧光微球标记鼠抗人PG II单克隆抗体

[0065] 取5mL 0.01g/mL的乳胶荧光微球放入小离心管中,按照12000r/min的转速离心20min,移除上层清液后,用5mL的碳酸盐缓冲溶液进行复溶,随后加入5mg的EDC、5mg的NHS和1mL鼠抗人PG II单克隆抗体在25℃下搅拌6h,继续加入2.5mg的赖氨酸在室温下搅拌20min,将混合物放入透析袋中在4℃下透析12h;透析结束后将混合溶液在12000r/min的转速下离心10min,移去上层清液,最后用20mL的LM缓冲溶液复溶,待用;

[0066] 1.3 荧光微球标记鼠抗人G-17单克隆抗体

[0067] 取5mL 0.01g/mL的乳胶荧光微球放入小离心管中,按照12000r/min的转速离心20min,移除上层清液后,用5mL的碳酸盐缓冲溶液进行复溶,随后加入5mg的EDC、5mg的NHS和1mL鼠抗人G-17单克隆抗体在25℃下搅拌6h,继续加入2.5mg的赖氨酸在室温下搅拌20min,将混合物放入透析袋中在4℃下透析12h;透析结束后将混合溶液在12000r/min的转速下离心10min,移去上层清液,最后用20mL的LM缓冲溶液复溶,待用;

[0068] 1.4 荧光微球标记兔IgG

[0069] 取5mL 0.01g/mL的乳胶荧光微球放入小离心管中,按照12000r/min的转速离心20min,移除上层清液后,用5mL的碳酸盐缓冲溶液进行复溶,随后加入5mg的EDC、5mg的NHS和1mL兔IgG在25℃下搅拌6h,继续加入2.5mg的赖氨酸在室温下搅拌20min,将混合物放入透析袋中在4℃下透析12h;透析结束后将混合溶液在12000r/min的转速下离心10min,移去上层清液,最后用20mL的LM缓冲溶液复溶,待用;

[0070] 1.5 抗体包被区的处理

[0071] 将上述制备的荧光微球标记鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记鼠抗人PG II单克隆抗体、荧光微球标记鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG按照摩尔比为1:1:1:1进行混合,取3μL混合溶液滴于抗体包被区2中,在湿度<30%的环境中干燥6h;

[0072] 2、检测区的处理

[0073] 2.1 磁性微球标记鼠抗人PGI单克隆抗体

[0074] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液(0.05% Tween 20, 10mM MES, pH=5.5)洗涤两次;取600μL的MES(10mM, Ph=5.5)重悬磁性微球后,依次向体系中加入1mg的EDC和1mg的NHS,在37℃下置于旋转混合器上活化0.5h;磁分离后,移除上层清液,用500μL的MEST缓冲溶液洗涤两次,用PBST溶液(0.01% Tween 20, 0.01mol/L PBS, pH=7.4)重悬后加入40μg鼠抗人PGI单克隆抗体在4℃下搅拌12h;将偶联产物与乙醇胺(2%, V/V)在37℃下活化0.5h,最后用PBST缓冲溶液洗涤两次后加入1mL PBST重悬,取3μL

磁性微球标记另一株鼠抗人PGI单克隆抗体置于第一检测区4中,在湿度<30%环境中干燥6h;

[0075] 2.2磁性微球标记鼠抗人PG II单克隆抗体

[0076] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液(0.05%Tween 20,10mM MES,pH=5.5)洗涤两次;取600 $\mu$ L的MES(10mM,Ph=5.5)重悬磁性微球后,依次向体系中加入1mg的EDC和1mg的NHS,在37 $^{\circ}$ C下置于旋转混合器上活化0.5h;磁分离后,移除上层清液,用500 $\mu$ L的MEST缓冲溶液洗涤两次,用PBST溶液(0.01%Tween 20,0.01mol/L PBS,pH=7.4)重悬后加入40 $\mu$ g鼠抗人PG II单克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下搅拌12h;将偶联产物与乙醇胺(2%,V/V)在37 $^{\circ}$ C下活化0.5h,最后用PBST缓冲溶液洗涤两次后加入1mL PBST重悬,取3 $\mu$ L磁性微球标记另一株鼠抗人PG II单克隆抗体置于第一检测区5中,在湿度<30%环境中干燥6h;

[0077] 2.3磁性微球标记鼠抗人G-17单克隆抗体

[0078] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液(0.05%Tween 20,10mM MES,pH=5.5)洗涤两次;取600 $\mu$ L的MES(10mM,Ph=5.5)重悬磁性微球后,依次向体系中加入1mg的EDC和1mg的NHS,在37 $^{\circ}$ C下置于旋转混合器上活化0.5h;磁分离后,移除上层清液,用500 $\mu$ L的MEST缓冲溶液洗涤两次,用PBST溶液(0.01%Tween 20,0.01mol/L PBS,pH=7.4)重悬后加入40 $\mu$ g鼠抗人G-17单克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下搅拌12h;将偶联产物与乙醇胺(2%,V/V)在37 $^{\circ}$ C下活化0.5h,最后用PBST缓冲溶液洗涤两次后加入1mL PBST重悬,取3 $\mu$ L磁性微球标记另一株鼠抗人G-17单克隆抗体置于第一检测区6中,在湿度<30%环境中干燥6h;

[0079] 3、质控区的处理

[0080] 3.1磁性微球标记羊抗兔多克隆抗体

[0081] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液(0.05%Tween 20,10mM MES,pH=5.5)洗涤两次;取600 $\mu$ L的MES(10mM,Ph=5.5)重悬磁性微球后,依次向体系中加入1mg的EDC和1mg的NHS,在37 $^{\circ}$ C下置于旋转混合器上活化0.5h;磁分离后,移除上层清液,用500 $\mu$ L的MEST缓冲溶液洗涤两次,用PBST溶液(0.01%Tween 20,0.01mol/L PBS,pH=7.4)重悬后加入40 $\mu$ g羊抗兔多克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下搅拌12h;将偶联产物与乙醇胺(2%,V/V)在37 $^{\circ}$ C下活化0.5h,最后用PBST缓冲溶液洗涤两次后加入1mL PBST重悬,取3 $\mu$ L磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体置于质控区7中,在湿度<30%环境中干燥6h;

[0082] 4、微流控芯片联合检测

[0083] 1) 将微流控芯片置于配套的仪器中,启动电磁铁,若为永磁铁则不需要启动,使第一检测区4、第二检测区5及第三检测区6和质控区7中的免疫磁性微球平铺固定到相应区域的底面;

[0084] 2) 从加样孔9加入检测样本,该检测样本通过毛细管微通道15流入抗体包被区2,复溶预储存在抗体包被区2中的荧光微球标记的鼠抗人PGI单克隆抗体、荧光微球标记的鼠抗人PG II单克隆抗体、荧光微球标记的鼠抗人G-17单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

[0085] 3) 随后,步骤2)中得到的混合物通过毛细管微通道16流入到微混合区3,在微混合区3样本中的PGI与荧光微球标记的鼠抗人PGI单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记

的PGI免疫复合物,PG II 与荧光微球标记的鼠抗人PG II 单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的PG II 免疫复合物,G-17与荧光微球标记的鼠抗人G-17单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的G-17免疫复合物,且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

[0086] 4) 步骤3) 中反应后形成的荧光微球标记的PGI免疫复合物、反应后形成的荧光微球标记的PG II 免疫复合物、反应后形成的荧光微球标记的G-17免疫复合物和未参加反应的荧光微球标记的兔IgG通过毛细管微通道依次进入到第一检测区4、第二检测区5、第三检测区6和质控区7内,荧光微球标记的PGI免疫复合物与第一检测区4中磁性微球标记的另一株鼠抗人PGI单克隆抗体发生免疫反应而停留在第一检测区4内,荧光微球标记的PG II 免疫复合物与第二检测区5中磁性微球标记的另一株鼠抗人PG II 单克隆抗体发生免疫反应而停留在第二检测区5内,荧光微球标记的G-17免疫复合物与第三检测区6中磁性微球标记的另一株鼠抗人G-17单克隆抗体发生免疫反应而停留在第三检测区6内,荧光微球标记的兔IgG与质控区7中磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体发生免疫反应而停留在质控区7中,剩余液体流入废液收集区8;

[0087] 5) 第一检测区4、第二检测区5及第三检测区6和质控区7的荧光微球均显示一定的荧光信号,第一检测区4与质控区7荧光信号的比值与PGI的浓度具有正相关性,第二检测区5与质控区7荧光信号的比值与PG II 的浓度具有正相关性,第三检测区6与质控区7荧光信号的比值与G-17浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出PGI、PG II 和G-17的浓度。

[0088] 5、标准曲线的建立

[0089] 配置浓度为0、10、25、50、100、200ng/mL的PGI校准品用于建立PGI标准曲线(如图4),检测灵敏度为10ng/mL,检测范围为10~200ng/mL;配置浓度为0、2、4、8、16、32ng/mL的PG II 校准品用于建立PG II 标准曲线(如图5),检测灵敏度为2ng/mL,检测范围为2~32ng/mL;配置浓度为0、20、80、160、320、1000pg/mL的G-17校准品用于建立G-17标准曲线(如图6),检测灵敏度为20pg/mL,检测范围为20~1000pg/mL,检测结果如表1所示。

[0090] 表1

[0091]

PGI (ng/mL)	0	10	25	50	100	200
----------------	---	----	----	----	-----	-----

[0092]

T <sub>1</sub> /C 值	0.0008	0.1466	0.3852	0.6824	1.0710	1.4758
PGII (ng/mL)	0	2	4	8	16	32
T <sub>2</sub> /C 值	0.0000	0.0446	0.1462	0.3510	0.6944	0.9996
G-17 (pg/mL)	0	20	80	160	320	1000
T <sub>2</sub> /C 值	0.0000	0.0234	0.1549	0.3666	0.9130	2.6038

[0093] 6、精密度的测定

[0094] 取浓度为25ng/mL和100ng/mL的PGI校准品、浓度为4ng/mL和16ng/mL的PG II 校准品、浓度为80pg/mL和320pg/mL的G-17校准品进行精密度的测定,每个样本重复测定10次,

计算批间平均偏差和批内平均偏差CV%值,测定结果如表2中所示,批间差和批内差均小于15%。

[0095] 表2

[0096]

检测项目		检测次数	批内 CV%	批间 CV%
PGI (ng/mL)	25	10	8.3	7.9
	100	10	3.2	3.6
PGII (ng/mL)	4	10	10.9	11.4
	16	10	7.4	7.7
G-17 (pg/mL)	80	10	6.7	8.3
	320	10	2.4	3.1

[0097] 附:所需溶液配制

[0098] (1) 碳酸钠缓冲溶液

[0099] 碳酸钠 4.33g

[0100] 碳酸氢钠 2.96g

[0101] 纯化水定容至 1000mL;

[0102] (2) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液(LM)

[0103] 柠檬酸三钠 7.33g

[0104] 柠檬酸 4.44g

[0105] 氢氧化钠 1g

[0106] 纯化水定容至 1000mL;

[0107] (3) MEST缓冲溶液

[0108] 磷酸氢二钠 6.59g

磷酸二氢钠 24.21g

[0109] 2-吗啉乙磺酸(MES) 1.95g

Tween20 0.5g

[0110] 纯化水定容至 1000mL;

[0111] (4) MES缓冲溶液

[0112] 磷酸氢二钠 6.59g

[0113] 磷酸二氢钠 24.21g

[0114] 2-吗啉乙磺酸(MES) 1.95g

[0115] 纯化水定容至 1000mL;

[0116] (5) PBST缓冲溶液

[0117] 磷酸氢二钠 43.42g

[0118] 磷酸二氢钠 5.24g

[0119] Tween20 0.1g

[0120] 纯化水定容至 1000mL。

[0121] 以上所述仅为本发明的优选实施例,并不用于限制本发明,对于本领域技术人员

而言,本发明可以有各种改动和变化。凡在本发明的精神和原理之内所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

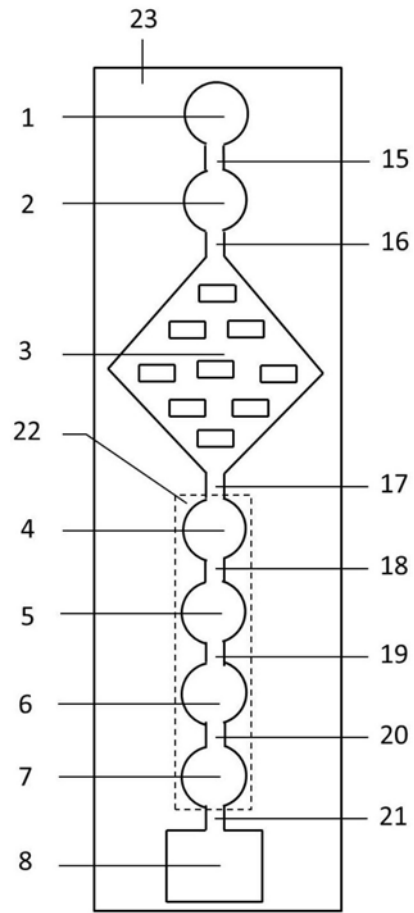


图1A

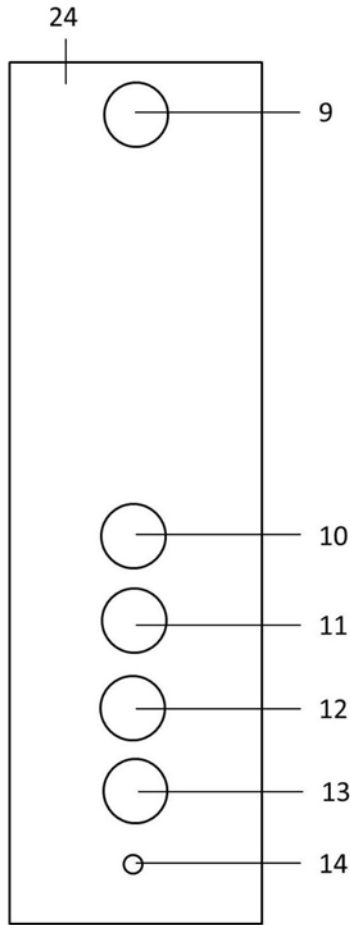


图1B

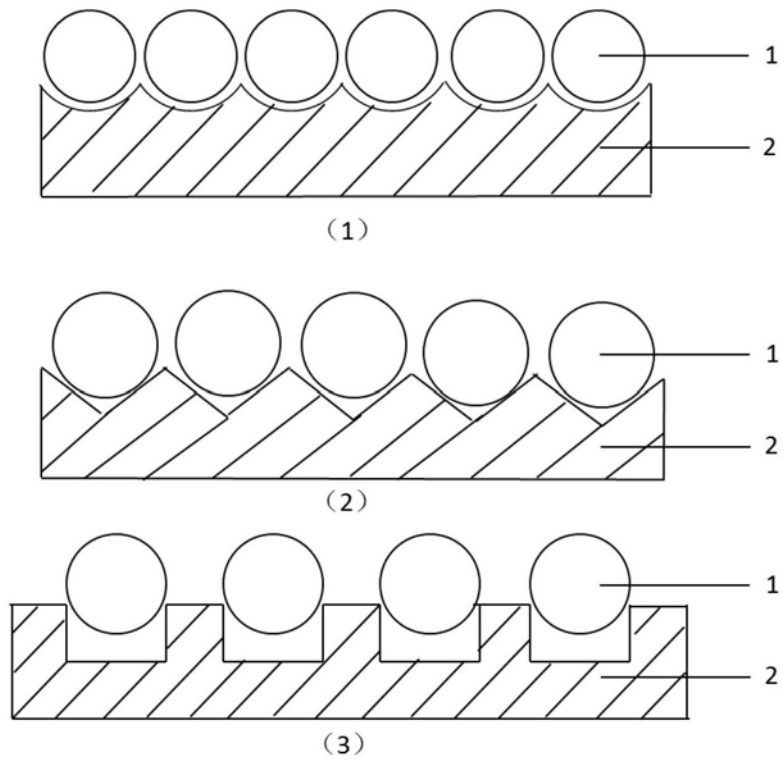


图2

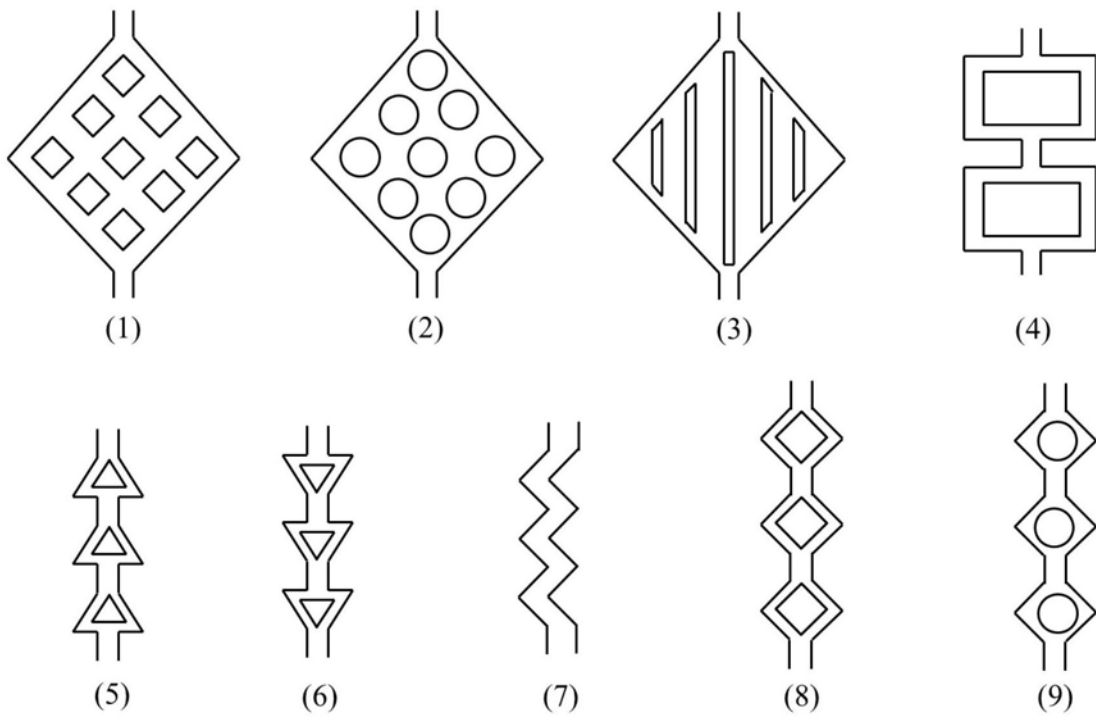


图3

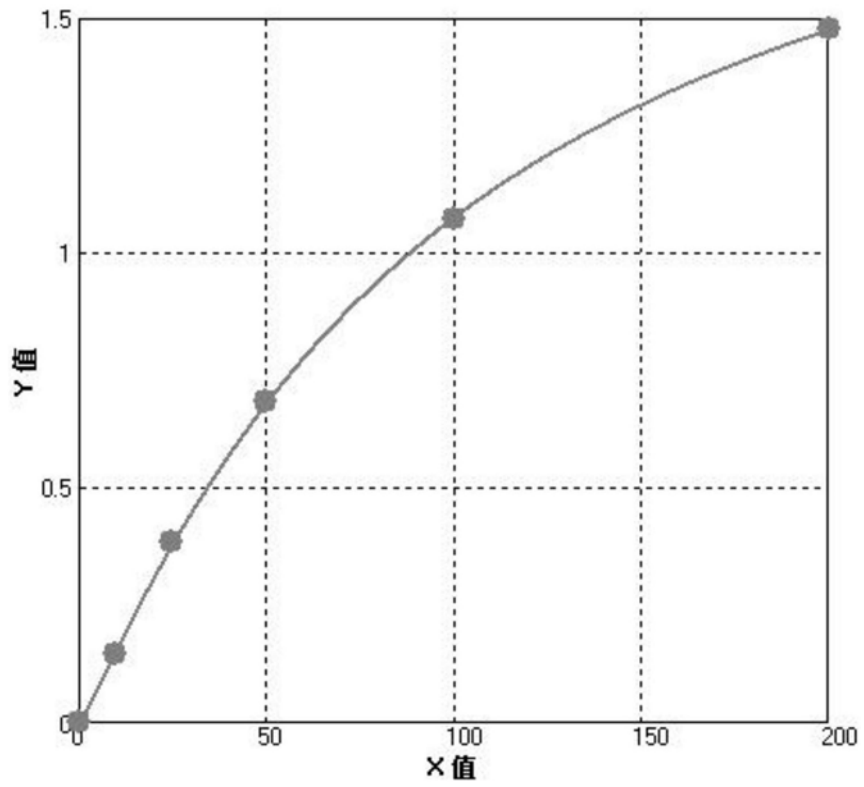


图4

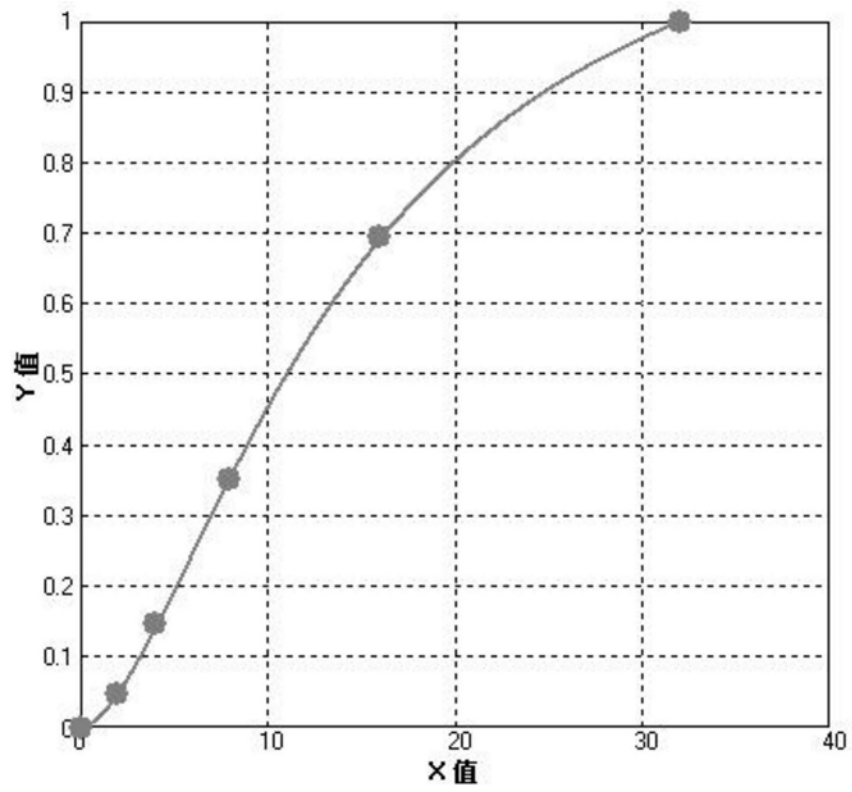


图5

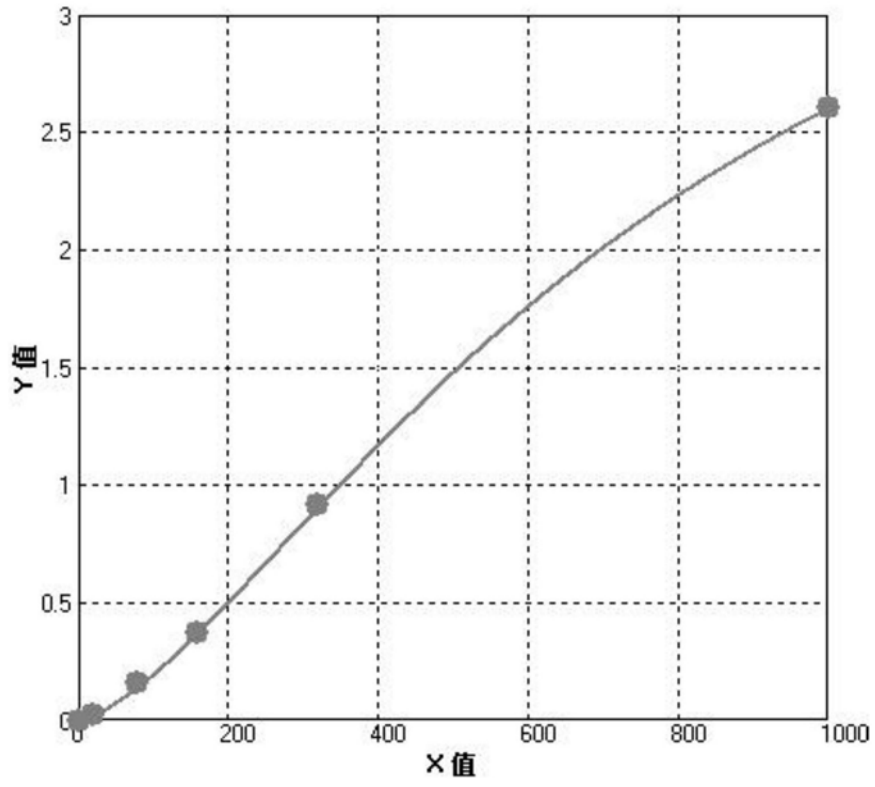


图6

专利名称(译)	一种用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN108097340B</a>	公开(公告)日	2019-03-19
申请号	CN201810159999.2	申请日	2018-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京华科泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京华科泰生物技术有限公司		
[标]发明人	林斯		
发明人	林斯		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/577 G01N33/573 G01N33/574 G01N33/533		
CPC分类号	B01L3/5027 B01L2200/10 B01L2300/0861 B01L2300/0887 G01N33/533 G01N33/573 G01N33/57446 G01N33/577 G01N2333/96477 G01N2800/062 G01N2800/7028		
代理人(译)	张瑾		
其他公开文献	CN108097340A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种用于胃功能疾病筛查的联合检测微流控芯片，包括：芯片基板及盖合于所述芯片基板上方的上层盖片，所述芯片基板上设有依次通过毛细管微通道连通的加样区、抗体包被区、微混合区、第一检测区、第二检测区、第三检测区、质控区及废液收集区；所述上层盖片上设有加样孔、第一检测窗口、第二检测窗口、第三检测窗口、质控窗口、通气孔，并且与所述加样区、第一检测区、第二检测区、第三检测区、质控区、废液收集区的位置依次对应。本发明还提供了上述联合微流控芯片的制备方法和用途。本发明能够实现PGI、PGII、G-17项目的联合检测，对能够全面准确的进行胃功能疾病筛查有着极大的临床诊断价值。

