



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108273575 A

(43)申请公布日 2018.07.13

(21)申请号 201810160018.6

(22)申请日 2018.02.26

(71)申请人 北京华科泰生物技术有限公司

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)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

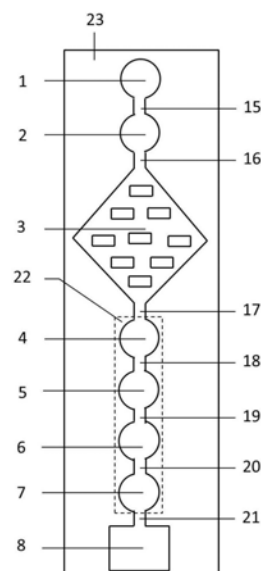
权利要求书3页 说明书10页 附图5页

(54)发明名称

一种用于诊断贫血性疾病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诊断贫血性疾病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。本发明能够实现铁蛋白、叶酸、维生素B12项目的联合检测,对能够全面准确的诊断贫血性疾病有着极大的临床诊断价值。



1. 一种用于诊断贫血性疾病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,所述抗体包被区预存储有荧光微球标记的一株VB12完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人Fer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一株鼠抗人VB12单克隆抗体、磁性微球标记的一株FA完全抗原或磁性微球标记的另一株鼠抗人Fer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所述的用于诊断贫血性疾病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所述的用于诊断贫血性疾病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VB12完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人Fer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所述的用于诊断贫血性疾病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一株鼠抗人VB12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一株FA完全抗原的质量比为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Fer单克隆抗体的质量比为10:(0.05~2)。

5. 根据权利要求4所述的用于诊断贫血性疾病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 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co微球,或者为磁性的 Fe_3O_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 Fe_3O_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 μm 。

6. 根据权利要求1所述的用于诊断贫血性疾病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所述的用于诊断贫血性疾病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;

所述微混合区为菱形、圆形、方形或矩形,并且其内部设有n个交错设置的矩形、菱形、方形或圆形的柱体;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菱形结构串联,并且菱形结构中设置有一个菱形或圆形柱体;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任一项所述的用于诊断贫血性疾病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所述微流控检测通道;

2) 将荧光微球标记的一株VB12完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人Fer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) 将磁性微球标记的一株鼠抗人VB12单克隆抗体、磁性微球标记的一株FA完全抗原及磁性微球标记的另一株鼠抗人Fer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待第一检测区、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任一项所述的用于诊断贫血性疾病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VB12完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人Fer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VB12不与荧光微球标记的VB12完全抗原发生反应,样本中的FA与荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的FA免疫复合物,样本中Fer与荧光微球标记的一株鼠抗人Fer单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的Fer免疫复合物,且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

4) 步骤3)中未参加反应的VB12及荧光微球标记的一株VB12完全抗原、反应后形成的荧光微球标记的FA免疫复合物、未参加反应的荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的Fer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,样本中的VB12和荧光微球标记的一株VB12完全抗原分别竞争与磁性微球标记的一株鼠抗人VB12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鼠抗人VB12单克隆抗体的检测区内,未参加反应的荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体与磁性微球标记的一株FA完全抗原发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的一株FA完全抗原的检测区内,荧光微球标记的Fer免疫复合物与磁性微球标记的另一株鼠抗人Fer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Fer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

微球标记的一株鼠抗人VB12单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与VB12的浓度具有负相关性,存储有磁性微球标记的一株FA完全抗原的检测区与质控区荧光信号的比值与FA的浓度具有负相关性,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人Fer单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与Fer浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出VB12、FA和Fer的浓度。

一种用于诊断贫血性疾病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,具体涉及一种用于诊断贫血性疾病的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 血清铁蛋白(Fer)是血液内结合状态的铁,在临床上测定铁蛋白的含量常用于缺铁性贫血的诊断。低下的铁蛋白水平同时伴有小细胞低色素性贫血,则提示铁缺乏;铁蛋白水平升高并同时可排除铁分布紊乱的可能性,则表示体内铁含量过高。

[0003] 叶酸(FA)是一种水溶性维生素,分子量为441.4g/mol,是人体必不可少的营养物质,对人体具有重要的生理功能。叶酸帮助蛋白质的代谢,并与维生素B12共同促进红细胞的生成和成熟,是制造红血球不可缺少的物质有促进骨髓中幼细胞成熟的作用,人体缺少叶酸可导致红血球的异常,未成熟细胞的增加,贫血以及白血球减少,所以测定叶酸对叶酸缺乏引起的营养性和巨幼细胞性贫血的辅助诊断具有重要意义。

[0004] 维生素B12(VB12)是体内主要的维生素之一,它参与体内的甲基转换反应,是N5-甲基四氢叶酸转移酶的辅酶。体内维生素B12缺乏时,叶酸代谢受阻,影响DNA合成和幼红细胞分裂而导致恶性贫血。测定血清维生素B12浓度对贫血的辅助诊断及血液系统某些疾病的病情演变和动态观察均有重要意义。

[0005] 综上所述,联合检测Fer、FA、VB12对贫血性疾病的诊断具有非常大的临床诊断价值。然而,目前临床上对贫血性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

[0006] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种用于诊断贫血性疾病的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途。

[0007] 为了达到上述的目的,本发明提供了一种用于诊断贫血性疾病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,

[0008] 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;

[0009] 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;

[0010] 其中,所述抗体包被区预存储有荧光微球标记的一株VB12完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人Fer单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的混合物;

[0011] 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一株鼠抗人VB12单克隆抗体、磁性微球标记的一株FA完全抗原或磁性微球标记的另一株鼠抗人Fer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。

[0012] 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。

[0013] 进一步地,其中所述荧光微球标记的一株VB12完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人Fer单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG抗体的摩尔比为1:1:1:(0.1~4)。

[0014] 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一株鼠抗人VB12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一株FA完全抗原的质量比为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Fer单克隆抗体的质量比为10:0.05~2。

[0015] 进一步地,其中所述磁性微球为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co微球,或者为磁性的 Fe_3O_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 Fe_3O_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 μm 。

[0016] 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。

[0017] 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;

[0018] 所述微混合区为棱形、圆形、方形或矩形,并且其内部设有n个交错设置的矩形、棱形、方形或圆形的柱体;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。

[0019] 本发明还提供了上述用于诊断贫血性疾病的联合检测微流控芯片的制备方法,包括如下步骤:

[0020] 1) 在芯片基板上开设一个所述微流控检测通道;

[0021] 2) 将荧光微球标记的一株VB12完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人Fer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;

[0022] 3) 将磁性微球标记的一株鼠抗人VB12单克隆抗体、磁性微球标记的一株FA完全抗原及磁性微球标记的另一株鼠抗人Fer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;

[0023] 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;

[0024] 5) 将上层盖片盖合于芯片基板的上方;

[0025] 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。

[0026] 本发明进一步提供了上述用于诊断贫血性疾病的联合检测微流控芯片的应用方法,包括如下步骤:

[0027] 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;

[0028] 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VB12完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人Fer单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

[0029] 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VB12不与荧光微球标记的一株VB12完全抗原发生反应,样本中FA与荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的FA免疫复合物,样本中Fer与荧光微球标记的一株鼠抗人Fer单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的Fer免疫复合物,且荧光微球标记的兔IgG未参加反应;

[0030] 4) 步骤3)中未参加反应的VB12及荧光微球标记的一株VB12完全抗原、反应后形成的荧光微球标记的FA免疫复合物、未参加反应的荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的Fer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、第二、第三检测区和质控区内,样本中的VB12和荧光微球标记的VB12完全抗原分别竞争与磁性微球标记的一株鼠抗人VB12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鼠抗人VB12单克隆抗体的检测区内,未参加反应的荧光微球标记的鼠抗人FA单克隆抗体与磁性微球标记的FA完全抗原发生免疫反应而停留在存储有磁性微球标记的FA完全抗原的检测区内,荧光微球标记的Fer免疫复合物与磁性微球标记的另一株鼠抗人Fer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Fer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;

[0031] 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一株鼠抗人VB12单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与VB12的浓度具有负相关性,存储有磁性微球标记的一株FA完全抗原的检测区与质控区荧光信号的比值与FA的浓度具有负相关性,存储有磁性微球标记的另一株鼠抗人Fer单克隆抗体的检测区与质控区荧光信号的比值与浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出样本中VB12、FA和Fer的浓度。

[0032] 本发明的有益效果在于:

[0033] 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;

[0034] 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;

[0035] 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;

[0036] 4. 本发明能够实现铁Fer、FA、VB12项目的联合检测,对能够全面准确的诊断贫血性疾病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

[0037] 图1A为本发明的用于诊断贫血性疾病的联合检测微流控芯片中芯片基板的结构示意图;

[0038] 图1B为本发明的用于诊断贫血性疾病的联合检测微流控芯片中上层盖片的结构示意图;

[0039] 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;

[0040] 图3为本发明的用于诊断贫血性疾病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;

[0041] 图4为VB12的标准曲线;

[0042] 图5为FA的标准曲线;

[0043] 图6为Fer的标准曲线。

具体实施方式

[0044] 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。

[0045] 结合图1A及图1B所示,本发明提供了一种用于诊断贫血性疾病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。

[0046] 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;

[0047] 抗体包被区2预存储有荧光微球标记的一株VB12完全抗原、荧光微球标记的一株

鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人Fer单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG的混合物；

[0048] 第一检测区4中预存储有磁性微球标记的一株鼠抗人VB12单克隆抗体，第二检测区5中预存储有磁性微球标记的一株FA完全抗原，第三检测区6中预存有磁性微球标记的另一株鼠抗人Fer单克隆抗体，质控区7中预存储有羊抗兔多克隆抗体。

[0049] 所述荧光微球标记的一株VB12完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人FA 单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人Fer单克隆抗体和荧光微球标记的兔 IgG抗体的摩尔比为1:1:1:0.1~4。

[0050] 所述第一检测区中磁性微球与一株鼠抗人VB12单克隆抗体的质量比为 10:0.05~2；所述第二检测区中磁性微球与一株FA完全抗原的质量比为10: 0.05~2；所述第三检测区中磁性微球与另一株鼠抗人Fer单克隆抗体的质量比为10:0.05~2。

[0051] 所述磁性微球为磁性的 Fe_3O_4 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、Pt、Ni或Co微球，或者为磁性的 Fe_3O_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 Fe_3O_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 μm 。

[0052] 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。

[0053] 结合图3所示，所述微混合区3为棱形、圆形、方形或矩形，并且其内部设有n个交错设置的矩形、棱形、方形或圆形的柱体；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；

[0054] 制备上述用于诊断贫血性疾病的联合检测微流控芯片的方法，包括如下步骤：

[0055] 1) 在芯片基板上开设一个所述微流控检测通道；

[0056] 2) 将荧光微球标记的一株VB12完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人 FA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人Fer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；

[0057] 3) 将磁性微球标记的一株鼠抗人VB12单克隆抗体、磁性微球标记的一株FA完全抗原及磁性微球标记的另一株鼠抗人Fer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；

[0058] 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；

[0059] 5) 将上层盖片24盖合于芯片基板23的上方；

[0060] 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。

[0061] 以下通过具体实施例对本发明进行进一步说明。

[0062] 1、抗体包被区的处理

[0063] 1.1 荧光微球标记 VB12 完全抗原

[0064] 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 的碳酸钠缓冲溶液进行复溶,随后加入 5mg 的碳二亚胺 (EDC)、5mg 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 1mL VB12 完全抗原在 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。

[0065] 1.2 荧光微球标记鼠抗人 FA 单克隆抗体

[0066] 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 的碳酸钠缓冲溶液进行复溶,随后加入 5mg 的 EDC、5mg 的 NHS 和 1mL 鼠抗人 FA 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。

[0067] 1.3 荧光微球标记鼠抗人 Fer 单克隆抗体

[0068] 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 的碳酸钠缓冲溶液进行复溶,随后加入 5mg 的 EDC、5mg 的 NHS 和 1mL 鼠抗人 Fer 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。

[0069] 1.4 荧光微球标记兔 IgG

[0070] 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 的碳酸钠缓冲溶液进行复溶,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;

[0071] 1.5 抗体包被的处理

[0072] 将上述制备的荧光微球标记的一株 VB12 完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人 FA 单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人 Fer 单克隆抗体和荧光微球标记的兔 IgG 抗体按照摩尔比为 1:1:1:1 进行混合,取 3μL 混合溶液滴于抗体包被区,在湿度 <30% 的环境中干燥 6h。

[0073] 2、检测区的处理

[0074] 2.1 磁性微球标记鼠抗人 VB12 单克隆抗体

[0075] 取 1mg 羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用 1mL 的 MEST 缓冲溶液洗涤两次;取 600μL 的 MES 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 溶液重悬后加入 40μg 鼠抗人 VB12 单克隆抗体在 4℃ 下搅拌 12h;将搅拌后得到的偶联产物与乙醇胺 (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 1 mL PBST 重悬,取 3μL 磁性微球标记的 VB12 单克隆抗体置于第一检测区 4 中,在湿度 <30% 环境中干燥 6h。

[0076] 2.2磁性微球标记FA完全抗原

[0077] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液洗涤两次;取600μL的MES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溶液重悬后加入40μ gFA完全抗原在4℃下搅拌12h;将搅拌后得到的偶联产物与乙醇胺(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1mLPBST重悬,取3μL磁性微球标记的FA完全抗原置于第二检测区5中,在湿度<30%环境中干燥6h。

[0078] 2.3磁性微球标记鼠抗人Fer单克隆抗体

[0079] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液洗涤两次;取600μL的MES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溶液重悬后加入40μ g鼠抗人Fer单克隆抗体在4℃下搅拌12h;将搅拌后得到的偶联产物与乙醇胺(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磁性微球标记的Fer单克隆抗体置于第三检测区6中,在湿度<30%环境中干燥6h。

[0080] 3、质控区的处理

[0081] 3.1磁性微球标记羊抗兔多克隆抗体

[0082] 取1mg羧基功能化的磁性微球置于离心管中,用1mL的MEST缓冲溶液洗涤两次;取600μL的MES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溶液重悬后加入40μ g羊抗兔多克隆抗体在4℃下搅拌12h;将搅拌后得到的偶联产物与乙醇胺(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1mLPBST 重悬,取3μL磁性微球标记的羊抗兔多克隆抗体置于质控区中,在湿度<30%环境中干燥6h。

[0083] 4.微流控芯片联合检测

[0084] 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),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;

[0085] 2) 从加样孔1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一株VB12完全抗原、荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、荧光微球标记的一株鼠抗人 Fer单克隆抗体和荧光微球标记的兔IgG,得到混合物;

[0086] 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,在微混合区样本中的VB12不与荧光微球标记的VB12完全抗原发生反应,样本中FA与荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的FA免疫复合物,样本中Fer与荧光微球标记的一株鼠抗人Fer单克隆抗体进行充分反应形成荧光微球标记的Fer免疫复合物,且荧光微球标记的兔 IgG未参加反应;

[0087] 4) 步骤3)中未参加反应的VB12及荧光微球标记的VB12完全抗原、反应后形成的FA免疫复合物、未参加反应的荧光微球标记的一株鼠抗人FA单克隆抗体、Fer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,样本中的VB12和荧光微球标记的VB12完全抗原分别竞争与第

一检测区4中磁性微球标记的一株鼠抗人VB12单克隆抗体发生免疫反应而停留在第一检测区4内,未参加反应的荧光微球标记的鼠抗人FA单克隆抗体与第二检测区5中磁性微球标记的FA完全抗原发生免疫反应而停留在第二检测区5内,荧光微球标记的Fer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Fer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;

[0088] 5) 第一检测区4、第二检测区5、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,并且第一检测区4与质控区7荧光信号的比值与VB12 的浓度具有负相关性,第二检测区5与质控区7荧光信号的比值与FA的浓度具有负相关性,第三检测区6与质控区7荧光信号的比值与Fer的浓度具有正相关性,通过标准曲线计算即可得出样本中VB12、FA和Fer的浓度。

[0089] 5. 标准曲线的建立

[0090] 配置浓度为0、150、250、500、1000、2000pg/mL的VB12校准品用于建立VB12标准曲线(如图4),检测灵敏度为150pg/mL,检测范围为150~2000 pg/mL;配置浓度为0、2.5、5、10、20、50ng/mL的FA校准品用于建立FA 标准曲线(如图5),检测灵敏度为2.5ng/mL,检测范围为2.5~50ng/mL;配置浓度为0、10、40、100、250、500ng/mL的Fer校准品用于建立Fer标准曲线(如图6),检测灵敏度为10ng/mL,检测范围为10~500ng/mL,检测结果如表1所示。

[0091] 表1

[0092]

VB12 (pg/mL)	0	150	250	500	1000	2000
T ₁ /C 值	0.7417	0.5479	0.4510	0.3462	0.2547	0.1404
FA	0	2.5	5	10	20	50

[0093]

(ng/mL)						
T ₂ /C 值	1.3962	0.9285	0.6908	0.5222	0.3167	0.1904
Fer (ng/mL)	0	10	40	100	250	500
T ₂ /C 值	0.0599	0.1498	0.4004	0.8534	2.2139	4.2128

[0094] 6. 精密度的测定

[0095] 取浓度为250pg/mL和1000pg/mL的VB12校准品、浓度为5ng/mL和20 ng/mL的FA校准品、浓度为40ng/mL和250ng/mL的Fer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%(行业标准为批内差小于15%,批间差小于20%)。

[0096] 表2

[0097]

检测项目		检测次数	批内 CV%	批间 CV%
VB12 (pg/mL)	250	10	6.3	7.7
	1000	10	1.7	6.1
FA (ng/mL)	5	10	8.4	10.2
	20	10	6.9	4.3
Fer (ng/mL)	40	10	9.6	7.5
	250	10	4.9	2.4

[0098] 附：所需溶液配制

[0099] (1) 碳酸钠缓冲溶液

[0100] 碳酸钠 4.33g

[0101] 碳酸氢钠 2.96g

[0102] 纯化水定容至1000mL；

[0103] (2) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 (LM)

柠檬酸三钠 7.33 g

柠檬酸 4.44 g

[0104] 氢氧化钠 1 g

纯化水定容至 1000 mL；

[0105] (3) MEST缓冲溶液

磷酸氢二钠 6.59g

磷酸二氢钠 24.21g

[0106] 2-吗啉乙磺酸(MES) 1.95g

Tween20 0.5g

[0107] 纯化水定容至 1000mL；

[0108] (4) MES缓冲溶液

磷酸氢二钠 6.59g

磷酸二氢钠 24.21g

[0109] 2-吗啉乙磺酸(MES) 1.95g

纯化水定容至 1000mL；

[0110] (5) PBST缓冲溶液

磷酸氢二钠 43.42g

磷酸二氢钠 5.24g

[0111] Tween20 0.1g

纯化水定容至 1000mL。

[0112] 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。

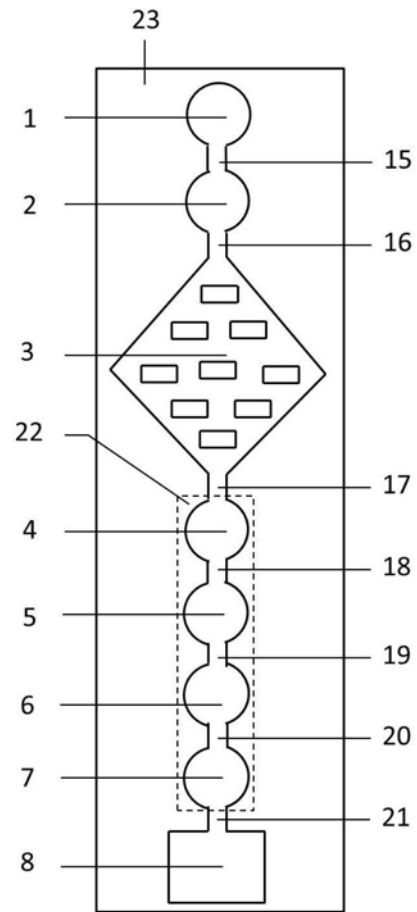


图1A

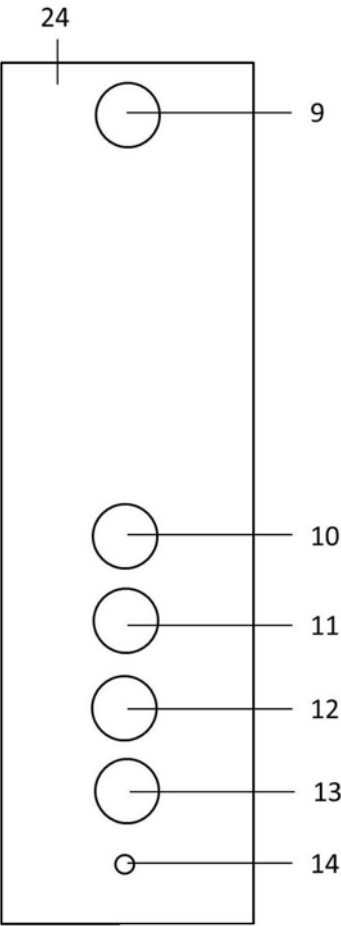


图1B

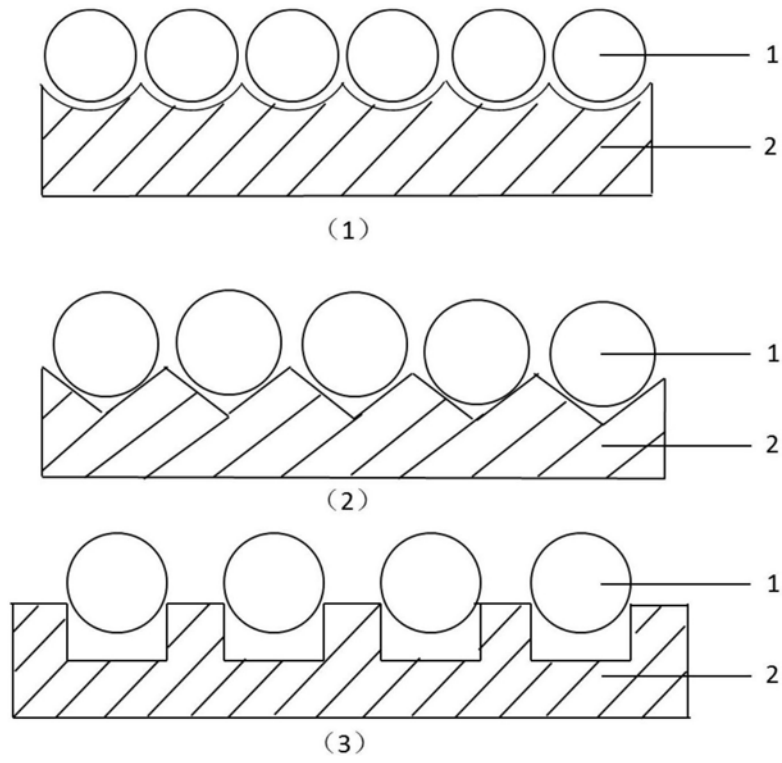


图2

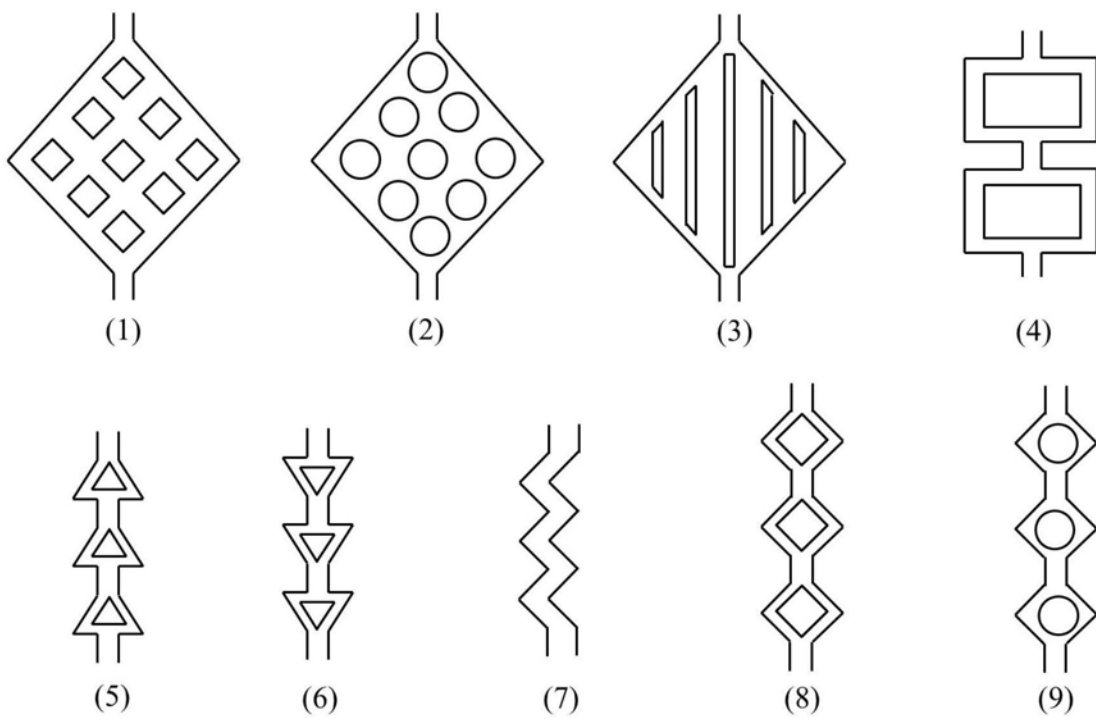


图3

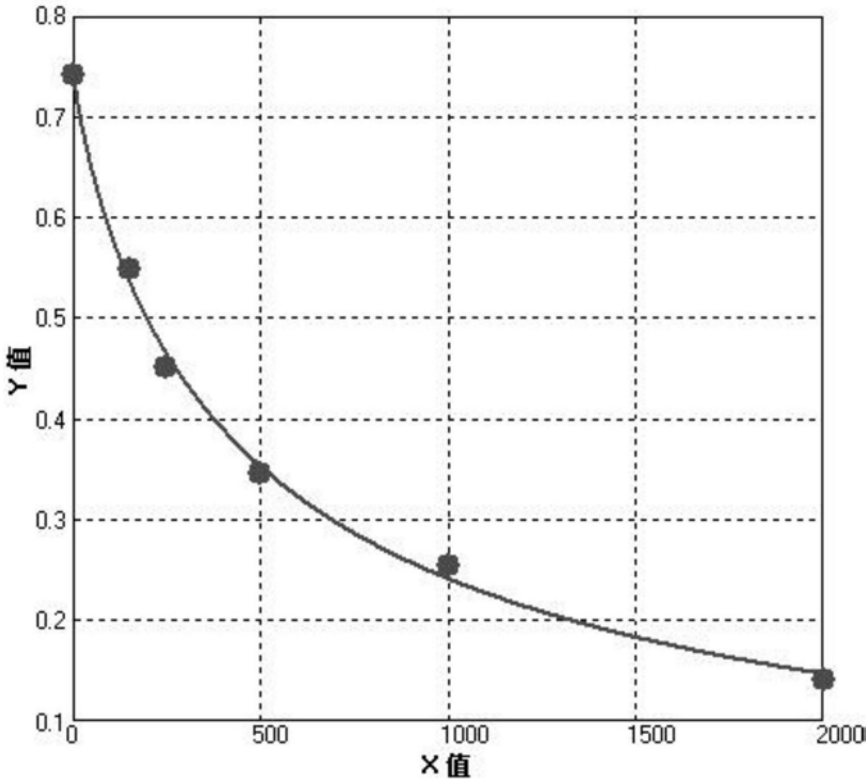


图4

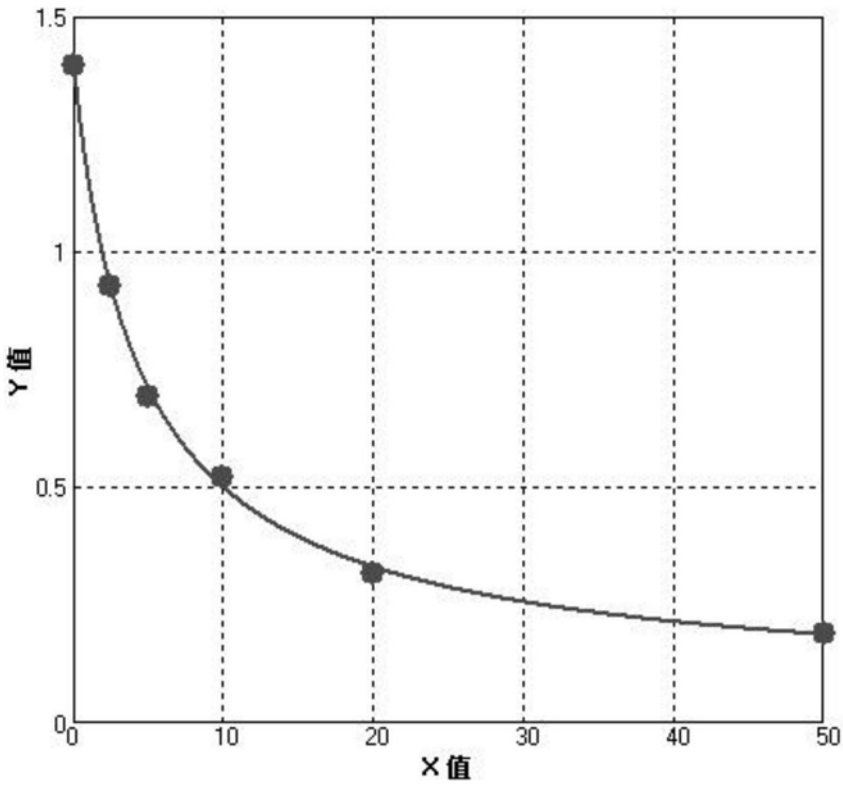


图5

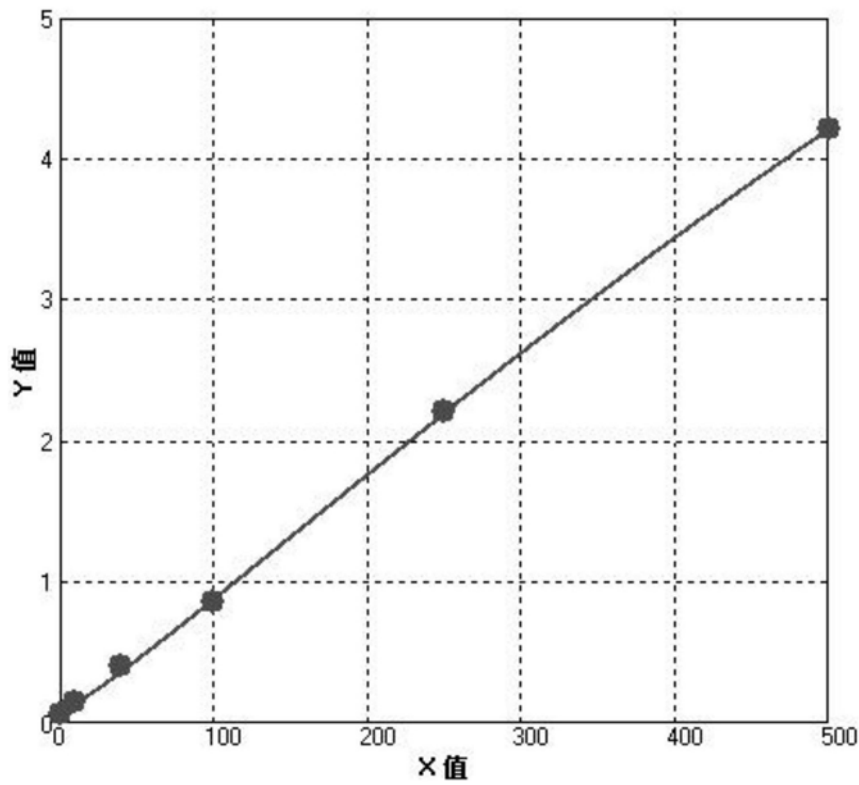


图6

专利名称(译)	一种用于诊断贫血性疾病的联合检测微流控芯片及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN108273575A	公开(公告)日	2018-07-13
申请号	CN201810160018.6	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		
当前申请(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 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	B01L3/5027 B01L2200/10 B01L2300/0861 B01L2300/0887 B01L2300/12 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2800/22		
代理人(译)	张瑾		
其他公开文献	CN108273575B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于诊断贫血性疾病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。本发明能够实现铁蛋白、叶酸、维生素B12项目的联合检测，对能够全面准确的诊断贫血性疾病有着极大的临床诊断价值。

