(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109499634 A
(43)申请公布日 2019.03.22

(21)申请号 201811523924.4

(22)申请日 2018.12.13

(71)申请人 迪亚莱博(张家港)生物科技有限公司

地址 215634 江苏省苏州市张家港保税区新兴产业育成中心A栋211室(迪亚莱博)

(72)发明人 顾悦 蒋理国

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有限公司 32103

代理人 孙仿卫

(51)Int.Cl.

B01L 3/00(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)

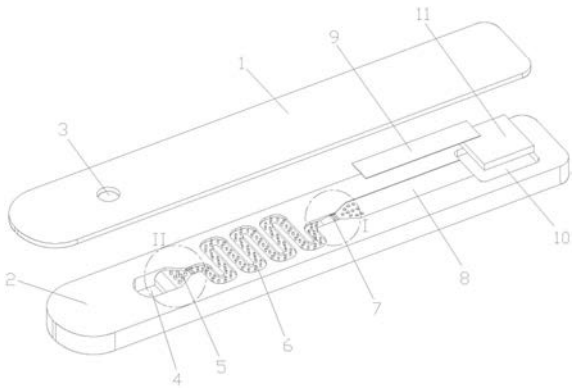
权利要求书2页 说明书12页 附图3页

(54)发明名称

一种微流控芯片及其制备方法和检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种微流控芯片及其制备方法和检测方法,其中微流控芯片包括芯片基板和芯片盖板,所述芯片盖板上开设有用于添加检测样本的加样口,所述芯片基板上依次开设有位于所述加样口下方的反应腔、与所述反应腔相连通的混匀管道、与所述混匀管道相连通的检测管道以及废液槽,所述混匀管道中包被有用于提供荧光检测信号的荧光微球标记试剂,所述检测管道中装载有载体膜,所述载体膜上包被有至少一种捕获抗体试剂。本发明的微流控芯片能够实现试剂复溶体积以及反应时间严格可控,提高了检测可重复性;封装简单,极大地简化芯片生产工艺,提高芯片产量;在载体膜中不同的区域可以包被一种以上捕获抗体,实现多项目联合检测。



CN 109499634 A

1.一种微流控芯片,包括芯片基板和芯片盖板,其特征在于,所述芯片盖板上开设有用于添加检测样本的加样口,所述芯片基板上依次开设有位于所述加样口下方的反应腔、与所述反应腔相连通的混匀管道、与所述混匀管道相连通的检测管道以及废液槽,所述混匀管道中包被有用于提供荧光检测信号的荧光微球标记试剂,所述检测管道中装载有载体膜,所述载体膜上包被有至少一种捕获抗体试剂。

2.根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述混匀管道与所述检测管道之间还设置有超疏水管道;所述超疏水管道包括凹槽微结构以及微米结构的第一微米柱,所述凹槽微结构的表面具有超疏水试剂。

3.根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述混匀管道内设置有微米结构的第二微米柱,所述荧光微球标记试剂包被在所述第二微米柱上。

4.根据权利要求3所述的微流控芯片,其特征在于,所述荧光微球标记试剂为采用荧光微球标记的检测抗体。

5.根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述捕获抗体试剂为采用聚苯乙烯微球标记的捕获抗体。

6.根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述混匀管道与所述反应腔之间设置有过渡管道,所述过渡管道内设置有微米结构的第三微米柱以及凸台。

7.根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述载体膜为硝酸纤维素膜。

8.一种根据权利要求1所述的微流控芯片的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

步骤1)荧光微球标记试剂的制备:采用荧光微球对检测抗体原料进行标记,并收集荧光微球标记物即为荧光微球标记试剂;

步骤2)捕获抗体试剂的制备:将捕获抗体原料标记于纳米聚苯乙烯微球上,制备成捕获抗体试剂;

步骤3)芯片表面材料超亲水改性:采用真空等离子体轰击或大气等离子体轰击的方法对芯片表面材料进行超亲水改性;

步骤4)封闭液的喷涂和烘干:将微流控芯片表面喷涂一层封闭液进行表面封闭,然后将芯片进行烘干处理;

步骤5)超疏水管道的制备:在凹槽微结构上覆盖超疏水试剂,对芯片中凹槽微结构的表面进行超疏水改性,然后将芯片进行烘干处理,得到超疏水管道;

步骤6)荧光微球标记试剂的干燥:将步骤1)中收集的荧光微球标记物添加至芯片基板中的混匀管道中,然后进行烘干,使荧光微球标记物干燥于芯片中并包被在第二微米柱上;

步骤7)捕获抗体的固定:将步骤2)中制备的捕获抗体试剂包被于载体膜上,然后进行烘干,使聚苯乙烯微球标记的捕获抗体固定于载体膜上,并将该包被有捕获抗体试剂的载体膜放置于芯片基板的检测管道上;

步骤8)微流控芯片封装:在废液槽中放入吸水纸,并将芯片盖板与芯片基板进行组装并键合,得到微流控芯片。

9.根据权利要求8所述的微流控芯片的制备方法,其特征在于,所述封闭液包含0.05%-0.5%BSA、0.01%-0.5%Tween 20和10mM-200mM PBS。

10.一种根据权利要求1所述的微流控芯片的检测方法,其特征在于,所述检测方法包

括以下步骤：

步骤A．加样混匀：吸取检测样本加入微流控芯片的加样孔，随后将加样完成的微流控芯片放置入检测仪器的卡槽内，微流控芯片的加样孔与检测仪器的驱动装置结合，控制驱动装置在加样孔产生交替的正压和负压，驱动检测样本在芯片中的反应腔和混匀管道中来回流动，复溶混匀管道中的荧光微球标记试剂的同时与之均匀混合，混匀完成后停止产生正压或负压，并对混合溶液进行孵育使之发生免疫复合反应，形成荧光微球标记的抗体/抗原复合物；

步骤B．抗体/抗原复合物的捕获：驱动装置在加样孔产生一个高正压，驱动含有抗体/抗原复合物的混匀样本流过超疏水管道之后，将高正压降低为低正压，驱动混匀样本流入芯片检测管道中的载体膜中，同时包被在该载体膜中的捕获抗体试剂与混匀样本中的抗体/抗原复合物进行免疫反应，形成捕获抗体-抗原-标记抗体复合物，未被捕获的物质流入废液槽中；

步骤C．数据读取：检测仪器的光学装置读取微流控芯片中载体膜上的荧光强度，计算出捕获抗体-抗原-标记抗体浓度并生成检测结果。

一种微流控芯片及其制备方法和检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于医疗器械体外诊断技术领域，具体涉及一种用于进行床旁诊断(POCT)的微流控芯片以及该微流控芯片的制备方法和检测方法。

背景技术

[0002] 床旁诊断(Point of Care Testing,POCT)即通过借助小型化或适中的桌面式设备或试剂对患者进行现场快速诊断。由于POCT检测方法具有操作简单便捷、检测系统易维护、可以随时随地进行检测、检测成本低等特点，POCT检测产品逐渐被市场所接受以及推广。

[0003] 现有技术中用于疾病诊断的POCT检测产品按照检测方法学或产品材料大致可以分为两类：层析POCT检测技术和微流控POCT检测技术。

[0004] 层析POCT检测技术已经有三十多年发展历史，目前市场上POCT检测的主导产品就是基于层析技术开发。基于层析技术开发的POCT产品虽然技术成熟技术门槛低，但是由于其结构不封闭导致检测易受到外界环境干扰，并且样本流动不受控制，检测个体之间差异大，从而影响到检测灵敏度和检测重复性，无法满足检验科医生对临床诊断的检测性能要求。

[0005] 微流控芯片POCT检测技术是近十年发展起来的快速检测技术。由于微流控技术拥有样本流动控制、芯片封闭、管道微小、可控性强等特点，使得微流控芯片POCT检测技术的检测灵敏度和检测重复性相比于层析POCT检测技术均有不同程度提升，因此微流控芯片POCT检测技术越来越受到市场的青睐。

[0006] 现有技术中微流控芯片POCT检测产品根据样本驱动方式不同大致可以分为两类：一类是被动式微流控检测芯片，即通过芯片中的微小管道来提供毛细力而驱动样本在芯片中的流动。被动式微流控芯片POCT虽然检测方式简单，对检测系统要求低，但是整个样本检测反应控制性不强，试剂反应随机性大。被动式微流控芯片中含有的试剂反应腔预先填埋有干燥的反应试剂，当样本流入该试剂腔后复溶所干燥的试剂。该复溶过程随机，样本复溶体积和复溶过程不可控，从而导致检测重复性不佳，其检测重复性与层析POCT检测技术相比并无明显改善。

[0007] 另一类微流控芯片POCT检测产品则是主动式微流控检测芯片，即通过外部作用力如气压力、机械力、离心力、电动力等方式驱动样本在芯片中的流动。主动式微流控芯片POCT则对检测样本和试剂的流动和混匀反应过程精准控制，从而大大提高试剂检测重复性和检测灵敏度。但是以整合磁微粒检测技术的主动式微流控芯片POCT，由于包被不同抗体的磁微粒不能通过磁场进行分离，因此该检测技术最主要的缺陷是只能进行单项目检测，在单通道微流控芯片中不能同时进行多项目检测。以整合压力阀的主动式微流控芯片POCT，由于需要在芯片中整合弹性薄膜，而使得整个芯片封装工艺变得极为复杂，导致芯片制造产量低下。

发明内容

[0008] 有鉴于此，为了克服现有技术中的缺陷，本发明的目的之一是提供了一种能够实现现场快速、准确、高灵敏且多项目定量检测的微流控芯片。

[0009] 为了达到上述目的，本发明采用以下的技术方案：

[0010] 一种微流控芯片，包括芯片基板和芯片盖板，所述芯片盖板上开设有用于添加检测样本的加样口，所述芯片基板上依次开设有位于所述加样口下方的反应腔、与所述反应腔相连通的混匀管道、与所述混匀管道相连通的检测管道以及废液槽，所述混匀管道中包被有用于提供荧光检测信号的荧光微球标记试剂，所述检测管道中装载有载体膜，所述载体膜上包被有至少一种捕获抗体试剂。在一些实施例中，检测管道的深度为50μm-1000μm；废液槽的深度为0.2mm-2mm。

[0011] 在微流控芯片具体使用时，加样口可以连接到驱动装置，驱动装置的驱动方式可以是气压、液压或电动等方式，该驱动装置提供所加检测样本在芯片的管道中来回流动的驱动力，以使样本与管道中的试剂充分反应。

[0012] 根据本发明的一些优选方面，所述混匀管道与所述检测管道之间还设置有超疏水管道。所述超疏水管道包括凹槽微结构以及微米结构的第一微米柱，所述凹槽微结构的表面具有超疏水试剂。超疏水管道可以起到检测样本与试剂反应形成反应复合物以及反应复合物流动至检测管道的过渡功能。凹槽微结构中每个凹槽的深度为20-500μm、宽度为50-4000μm；第一微米柱的直径为20-500μm，高度为20-500μm；超疏水试剂为溶解在电子氟化液中的氟硅烷。

[0013] 超疏水管道由凹槽微结构、第一微米柱以及覆盖在凹槽微结构表面超疏水试剂组成，超疏水试剂以及凹槽微结构形成的超疏水表面能够实现被动式流动阻断阀，当检测样本受到驱动力而流动至该超疏水表面时，能有效阻挡液体继续流动，液体会留在凹槽中不会铺开，必须提高驱动力才能驱动液体继续向前流动，使得对液体流动的可控性进一步增强。

[0014] 根据本发明的一些优选方面，所述混匀管道内设置有微米结构的第二微米柱，所述荧光微球标记试剂包被在所述第二微米柱上。第二微米柱的直径为10-500μm，高度为10-500μm。

[0015] 混匀管道和反应腔相连通，并能够提供检测样本来回流动空间，检测样本复溶包被的荧光微球标记试剂的同时与之均匀混合，使之发生液体匀相免疫反应形成反应复合物。检测样本进入混匀管道后，先是对荧光微球标记试剂进行复溶，之后检测样本与荧光微球标记试剂之间混匀，最后检测样本与荧光微球标记试剂之间孵育反应，其中复溶和混匀基本发生在混匀管道中，孵育主要发生在反应腔内。即反应腔可以存储检测样本，并提供检测样本与试剂的反应场所。

[0016] 更加优选地，所述荧光微球标记试剂为采用荧光微球标记的检测抗体。

[0017] 更加优选地，所述捕获抗体试剂为采用纳米聚苯乙烯微球标记的捕获抗体。

[0018] 根据本发明的一些优选方面，所述混匀管道与所述反应腔之间设置有过渡管道，所述过渡管道内设置有微米结构的第三微米柱以及凸台。过渡管道中的第三微米柱以及凸台能够对在反应腔和混匀通道之间流动的液体进一步起到混匀的作用，使得检测样本与试剂之间的反应更加充分。第三微米柱的直径为20-500μm，高度为20-500μm；凸台的高度为

20-1000μm，宽度为100-4000μm。

[0019] 所述载体膜为硝酸纤维素膜。如果载体膜内只包被有一种捕获抗体试剂，那该捕获抗体试剂可以随意分散在载体膜内；若载体膜内包被有两种或两种以上的捕获抗体试剂，则需要将载体膜分为几个区域，在不同的区域内包被有不同的捕获抗体试剂。这样在最后的检测中，才能分辨出对应不同区域的复合物产生的荧光信号。

[0020] 本发明还提供了一种如上所述的微流控芯片的制备方法，具体包括以下步骤：

[0021] 步骤1)荧光微球标记试剂的制备：采用时间分辨荧光微球分析法对已纯化的检测抗体原料进行标记，并收集荧光微球标记物即为荧光微球标记试剂；

[0022] 步骤2)捕获抗体试剂的制备：采用稀释液对已纯化的捕获抗体原料进行稀释，并将稀释后的捕获抗体原料标记于纳米聚苯乙烯微球上，制备成捕获抗体试剂；

[0023] 步骤3)芯片表面材料超亲水改性：采用真空等离子体轰击或大气等离子体轰击的方法对芯片表面材料进行超亲水改性；

[0024] 步骤4)封闭液的喷涂和烘干：步骤3)中芯片表面超亲水改性完成后，将微流控芯片表面喷涂一层封闭液进行表面封闭，然后将芯片进行烘干处理；

[0025] 步骤5)超疏水管道的制备：步骤4)中芯片烘干后，使用精密点样仪和超疏水试剂，对芯片中特定管道表面即凹槽微结构的表面进行超疏水改性，然后将芯片进行烘干处理，得到超疏水管道；

[0026] 步骤6)荧光微球标记试剂的干燥：步骤5)中芯片烘干后，将步骤1)中收集的荧光微球标记物添加至芯片基板中的混匀管道中，然后进行烘干，使荧光微球标记物干燥于芯片中并包被在第二微米柱上；

[0027] 步骤7)捕获抗体的固定：步骤6)中芯片烘干后，采用精密点样仪将步骤2)中制备的捕获抗体试剂包被于载体膜上，然后进行烘干，使聚苯乙烯微球标记的捕获抗体固定于载体膜上，并将该包被有捕获抗体试剂的载体膜放置于芯片基板的检测管道上；

[0028] 如果载体膜内只包被有一种捕获抗体试剂，那该捕获抗体试剂可以随意分散在载体膜内；若载体膜内包被有两种或两种以上的捕获抗体试剂，则需要将载体膜分为几个区域，在不同的区域内包被有不同的捕获抗体试剂，这样在最后的检测中，才能分辨出对应不同区域的复合物产生的荧光信号；

[0029] 步骤8)微流控芯片封装：在废液槽中放入吸水纸，并将芯片盖板与芯片基板进行组装并键合，得到微流控芯片。芯片基板与所述盖板通过压力胶、超声波、激光等方式键合在一起，形成封闭地床旁诊断的微流控芯片。

[0030] 优选地，所述封闭液包含0.05％-0.5％BSA、0.01％-0.5％Tween 20和10mM-200mM PBS；所述稀释液为10mM PBS。其中BSA为牛血清蛋白，优选其质量与封闭液的总体积比为0.1％；Tween 20为表面活性剂，优选其体积与封闭液的总体积比为0.01％；PBS为缓冲液，优选其浓度为10mM。

[0031] 本发明还提供了一种如上所述的微流控芯片的检测方法，具体包括以下步骤：

[0032] 步骤A.加样混匀：移液枪加样，吸取检测样本加入上述键合完成的微流控芯片的加样孔内，随后将加样完成的微流控芯片放置入检测仪器的卡槽内，微流控芯片的加样孔与仪器的气路驱动装置结合，控制气路驱动装置在加样孔产生交替的正压和负压，驱动检测样本在芯片中的反应腔和混匀管道中来回流动，复溶混匀管道中的荧光微球标记试剂的

同时与之均匀混合，混匀完成后停止产生正气压或负气压，并对混合溶液进行孵育使之发生免疫复合反应，形成荧光微球标记的抗体/抗原复合物；

[0033] 步骤B.抗体/抗原复合物的捕获：步骤A完成后，气路驱动装置在加样孔产生一个高正气压，驱动含有抗体/抗原复合物的混匀样本流过超疏水管道之后，将高正气压降低为低正气压，驱动混匀样本流入芯片检测管道中的载体膜中，同时包被在该载体膜中的捕获抗体试剂与混匀样本中的抗体/抗原复合物进行免疫反应，形成捕获抗体-抗原-标记抗体复合物，未被捕获的其他物质随着液体流入废液槽中并被吸水纸吸收；

[0034] 步骤C.数据读取：步骤B完成后，检测仪器的光学装置读取微流控芯片中载体膜上的荧光强度，计算出捕获抗体-抗原-标记抗体浓度并生成检测结果。

[0035] 上述检测步骤中驱动装置产生的正压、负压以及高正压、低正压的大小以及时间根据实际需求进行设定。

[0036] 由于以上技术方案的实施，本发明的微流控芯片与现有技术相比具有如下优点：

[0037] 1、本发明的微流控芯片设计了固定反应体积的反应腔和混匀管道，结合主动驱动方式，驱动检测样本和试剂在管道中流动，精准控制样本与试剂的复溶和混匀过程，从而实现试剂复溶体积以及反应时间严格可控，大大提高检测可重复性；

[0038] 2、本发明的微流控芯片设计的超疏水管道形成被动式流动阻断阀，封装简单，极大地简化芯片生产工艺，提高芯片产量；

[0039] 3、本发明的微流控芯片在载体膜中不同的区域包被一种以上捕获抗体，实现多项目联合检测。

附图说明

[0040] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案，下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0041] 图1为本发明优选实施例1中的微流控芯片的立体图；

[0042] 图2为本发明优选实施例1的微流控芯片的层叠图；

[0043] 图3为图2中I部的放大图；

[0044] 图4为图2中II部的放大图；

[0045] 附图中：芯片盖板-1，芯片基板-2，加样口-3，反应腔-4，过渡管道-5，第三微米柱-51，凸台-52，混匀管道-6，第二微米柱-61，超疏水管道-7，第一微米柱-71，凹槽微结构-72，检测管道-8，载体膜-9，废液槽-10，吸水纸-11。

具体实施方式

[0046] 为了使本技术领域的人员更好地理解本发明的技术方案，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分的实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都应当属于本发明保护的范围。

[0047] 需要说明的是，本文中的术语“第一”、“第二”目的在于便于区分多个对象，没有限定作用。此外，术语“包括”和“具有”以及他们的任何变形，意图在于覆盖不排他的包含，例如，包含了一系列步骤或单元的过程、方法、装置、产品或设备不必限于清楚地列出的那些步骤或单元，而是可包括没有清楚地列出的或对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤或单元。

[0048] 实施例1微流控芯片

[0049] 如图1-4所示，本实施例的一种微流控芯片，包括芯片基板2和芯片盖板1，芯片盖板1上开设有用于添加检测样本的加样口3，芯片基板2上依次开设有位于加样口3下方的反应腔4、与反应腔4相连通的混匀管道6、与混匀管道6相连通的检测管道8以及废液槽10，废液槽10中转载有与其相配合的吸水纸11。本实施例中检测管道8的深度为200μm，废液槽10的深度为1mm；其他的实施例中检测管道8的深度范围为50μm-1000μm，废液槽10的深度范围为0.2mm-2mm。

[0050] 混匀管道6中包被有用于提供荧光检测信号的荧光微球标记试剂，检测管道8中装载有载体膜9，载体膜9上包被有至少一种捕获抗体试剂。其中，荧光微球标记试剂为采用荧光微球标记的检测抗体，捕获抗体试剂为采用纳米聚苯乙烯微球标记的捕获抗体。

[0051] 混匀管道6和反应腔4相连通，并能够提供检测样本来回流动的空间，检测样本复溶包被的荧光微球标记试剂的同时与之均匀混合，使之发生液体匀相免疫反应形成反应复合物。检测样本进入混匀管道6后，先是对荧光微球标记试剂进行复溶，之后检测样本与荧光微球标记试剂之间混匀，最后检测样本与荧光微球标记试剂之间孵育反应，其中复溶和混匀基本发生在混匀管道6中，孵育主要发生在反应腔4内。反应腔4可以存储检测样本，并提供检测样本与试剂的反应场所。

[0052] 如图2-3所示，本实施例中混匀管道6与检测管道8之间还设置有超疏水管道7。超疏水管道7包括凹槽微结构72以及微米结构的第一微米柱71，凹槽微结构72的表面具有超疏水试剂。超疏水管道7可以起到检测样本与试剂反应形成反应复合物以及反应复合物流动至检测管道8的过渡功能。本实施例中凹槽微结构72中每个凹槽的深度为50μm、宽度为4mm；第一微米柱71的直径为100μm，高度为100μm；超疏水试剂为溶解在电子氟化液中的氟硅烷。其他的实施例中，凹槽微结构72中每个凹槽的深度范围为20-500μm、宽度范围为50-4000μm；第一微米柱71的直径范围为20-500μm，高度范围为20-500μm。

[0053] 超疏水试剂以及凹槽微结构72形成的超疏水表面能够实现被动式流动阻断阀，当检测样本受到驱动力而流动至该超疏水表面时，能有效阻挡液体继续流动，液体会留在凹槽中不会铺开，必须提高驱动力才能驱动液体继续向前流动，使得对液体流动的可控性进一步增强。

[0054] 如图2-3所示，混匀管道6内设置有微米结构的第二微米柱61，荧光微球标记试剂包被在第二微米柱61上。本实施例中第二微米柱61的直径为200μm，高度为200μm。在其他的实施例中，第二微米柱61的直径范围为10-500μm，高度范围为10-500μm。

[0055] 如图2和4所示，本实施例中在混匀管道6与反应腔4之间设置有过渡管道5，过渡管道5内设置有微米结构的第三微米柱51以及凸台52。过渡管道5中的第三微米柱51以及凸台52能够对在反应腔4和混匀通道6之间流动的液体进一步起到混匀的作用，使得检测样本与试剂之间的反应更加充分。第三微米柱51的直径为200μm，高度为200μm；凸台52的高度为

200μm宽度为200μm。在其他的实施例中，第三微米柱51的直径范围为20-500μm，高度范围为20-500μm；凸台52的高度范围为20-1000μm，宽度范围为100-4000μm。

[0056] 本实施例中的载体膜9为硝酸纤维素膜。载体膜9内只包被有一种捕获抗体试剂，那该捕获抗体试剂可以随意分散在载体膜9内；若载体膜9内包被有两种或两种以上的捕获抗体试剂，则需要将载体膜9分为几个区域，在不同的区域内包被有不同的捕获抗体试剂。这样在最后的检测中，才能准确分辨出对应不同区域的复合物产生的荧光信号。

[0057] 在本实施例中的微流控芯片具体使用时，加样口可以连接到驱动装置，驱动装置的驱动方式可以是气压、液压或电动等方式，该驱动装置提供所加检测样本在芯片的管道中来回流动的驱动力，以使检测样本与管道中的试剂充分反应。

[0058] 本实施例中的微流控芯片设计了固定反应体积的反应腔和混匀管道，结合主动驱动方式，驱动检测样本和试剂在管道中流动，精准控制样本与试剂的复溶和混匀过程，从而实现试剂复溶体积以及反应时间严格可控，大大提高检测可重复性；设计了超疏水管道形成被动式流动阻断阀，封装简单，极大地简化芯片生产工艺，提高芯片产量；在载体膜中不同的区域可以包被一种以上捕获抗体，实现多项目联合检测。

[0059] 实施例2微流控芯片的制备方法

[0060] 本实施例提供了一种基于实施例1所述的微流控芯片的制备方法，具体包括以下步骤：

[0061] 步骤1)荧光微球标记试剂的制备

[0062] 采用时间分辨荧光微球分析法对已纯化的检测抗体原料进行标记，并收集荧光微球标记物即为荧光微球标记试剂。

[0063] 步骤2)捕获抗体试剂的制备

[0064] 采用稀释液对已纯化的捕获抗体原料进行稀释，并将稀释后的捕获抗体原料标记于纳米聚苯乙烯微球上，制备成捕获抗体试剂。

[0065] 本实施例中的稀释液为10mM PBS。

[0066] 步骤3)芯片表面材料超亲水改性

[0067] 采用真空等离子体轰击或大气等离子体轰击的方法对芯片表面材料进行超亲水改性。

[0068] 步骤4)封闭液的喷涂和烘干

[0069] 步骤3)中的芯片表面超亲水改性完成后，将微流控芯片表面喷涂一层封闭液进行表面封闭，然后将芯片进行烘干处理。

[0070] 本实施例中的封闭液包括0.1％BSA、0.01％Tween 20和10mM PBS。其中BSA为牛血清蛋白，Tween 20为表面活性剂，PBS为缓冲液。

[0071] 步骤5)超疏水管道的制备

[0072] 步骤4)中的芯片烘干后，使用精密点样仪和超疏水试剂，对芯片中特定管道表面即凹槽微结构的表面进行超疏水改性，然后将芯片进行烘干处理，得到超疏水管道。

[0073] 步骤6)荧光微球标记试剂的干燥

[0074] 步骤5)中芯片烘干后，将步骤1)中收集的荧光微球标记物添加至芯片基板中的混匀管道中，然后进行烘干，使荧光微球标记物干燥于芯片中并包被在第二微米柱上。

[0075] 步骤7)捕获抗体的固定

[0076] 步骤6)中芯片烘干后,采用精密点样仪将步骤2)中制备的捕获抗体试剂包被于载体膜上,然后进行烘干,使聚苯乙烯微球标记的捕获抗体固定于载体膜上,并将该包被有捕获抗体试剂的载体膜放置于芯片基板的检测管道上。

[0077] 如果载体膜内只包被有一种捕获抗体试剂,那该捕获抗体试剂可以随意分散在载体膜内;若载体膜内包被有两种或两种以上的捕获抗体试剂,则需要将载体膜分为几个区域,在不同的区域内包被有不同的捕获抗体试剂,这样在最后的检测中,才能分辨出对应不同区域的复合物产生的荧光信号。

[0078] 步骤8)微流控芯片封装

[0079] 在废液槽中放入吸水纸,并将芯片盖板与芯片基板进行组装并键合,得到微流控芯片。

[0080] 芯片基板与盖板通过压力胶、超声波、激光等方式键合在一起,形成封闭地床旁诊断的微流控芯片。

[0081] 实施例3微流控芯片的检测方法

[0082] 本实施例提供了基于实施例1所述的微流控芯片的检测方法,具体包括以下步骤:

[0083] 步骤A.加样混匀

[0084] 移液枪加样,吸取检测样本加入上述键合完成的微流控芯片的加样孔内,随后将加样完成的微流控芯片放置入检测仪器的卡槽内,微流控芯片的加样孔与仪器的气路驱动装置结合,控制气路驱动装置在加样孔产生交替的正压和负压,驱动检测样本在芯片中的反应腔和混匀管道中来回流动,复溶混匀管道中的荧光微球标记试剂的同时与之均匀混合,混匀完成后停止产生正气压或负气压,并对混合溶液进行孵育使之发生免疫复合反应,形成荧光微球标记的抗体/抗原复合物。

[0085] 步骤B.抗体/抗原复合物的捕获

[0086] 步骤A完成后,气路驱动装置在加样孔产生一个高正气压,驱动含有抗体/抗原复合物的混匀样本流过超疏水管道之后,将高正气压降低为低正气压,驱动混匀样本流入芯片检测管道中的载体膜中,同时包被在该载体膜中的捕获抗体试剂与混匀样本中的抗体/抗原复合物进行免疫反应,形成捕获抗体-抗原-标记抗体复合物,未被捕获的其他物质随着液体流入废液槽中并被吸水纸吸收。

[0087] 步骤C.数据读取

[0088] 步骤B完成后,检测仪器的光学装置读取微流控芯片检测管道上的荧光强度,计算出捕获抗体-抗原-标记抗体浓度并生成检测结果。

[0089] 上述检测步骤中驱动装置产生的正气压、负气压以及高正气压、低正气压的大小以及时间根据实际需求进行设定。

[0090] 实施例4微流控芯片对降钙素原(PCT)的检测

[0091] (一)抗体标记

[0092] A.荧光微球标记检测抗体

[0093] 1、配制20mg/ml EDC、10mM PBS溶液。

[0094] 2、取90ul 10mM PBS缓冲液,加入10ul的300nm荧光微球,震荡混匀。

[0095] 3、取5ul的EDC活化溶液加入到步骤2中制备得到的包含荧光微球的缓冲液中,震荡混匀,置于摇床15min(室温或20℃,250rpm)。

[0096] 4、配制100ul标记抗体:用10mM PBS缓冲液配制PCT检测单克隆抗体和兔IgG抗体溶液,终浓度为0.5mg/ml。

[0097] 5、将步骤3制备得到的活化后的荧光微球溶液置于离心机中,15000rpm,离心15min,弃上清。

[0098] 6、将步骤4中制备得到的0.5mg/ml的PCT抗体和兔IgG抗体溶液加入至步骤5中得到的离心后的活化荧光微球溶液中,震荡混匀。超声2-3min,震荡混匀后置于摇床孵育2小时,孵育条件:室温,250rpm。

[0099] 7、取20ul封闭液(1%牛血清白蛋白)加入步骤6得到的溶液中,置于摇床封闭2小时,封闭条件:室温,250rpm。

[0100] 8、将步骤7得到的溶液置于离心机中,15000rpm,离心15min,弃上清。

[0101] 9、将500ul 10mM PBS缓冲液加入至步骤8得到的物质中,复溶荧光微球,震荡混匀后置于离心机,15000rpm,离心15min,弃上清。

[0102] 10、加入200ul微球保存液(0.1%BSA、5%蔗糖,10mM PBS)至步骤9得到的物质中,震荡混匀并超声3min,置于2-8℃保存。

[0103] B.聚苯乙烯微球标记捕获抗体

[0104] 1、配制20mg/ml EDC、10mM PBS溶液。

[0105] 2、取90ul 10mM PBS缓冲液,加入10ul的150nm聚苯乙烯微球,震荡混匀。

[0106] 3、取5ul的EDC活化溶液加入到步骤2中制备得到的具有聚苯乙烯微球的缓冲液中,震荡混匀,置于摇床15min(室温或20℃,250rpm)。

[0107] 4、配制100ul捕获抗体:用10mM PBS缓冲液配制PCT包被单克隆抗体和羊抗兔IgG抗体溶液,终浓度为0.5mg/ml。

[0108] 5、将步骤3制备的活化后的聚苯乙烯微球溶液置于离心机中,15000rpm,离心15min,弃上清。

[0109] 6、将步骤4中制备的0.5mg/ml的PCT抗体和羊抗兔IgG抗体溶液加入至步骤5得到的物质中,震荡混匀。超声2-3min,震荡混匀后置于摇床孵育2小时,孵育条件:室温,250rpm。

[0110] 7、取20ul封闭液(1%牛血清白蛋白)加入步骤6制备得到的物质中,置于摇床封闭2小时,封闭条件:室温,250rpm。

[0111] 8、将步骤7制备得到的物质置于离心机中,15000rpm,离心15min,弃上清。

[0112] 9、将500ul 10mM PBS缓冲液加入至步骤8制备得到的物质中,复溶聚苯乙烯微球,震荡混匀后置于离心机,15000rpm,离心15min,弃上清。

[0113] 10、加入200ul 10mM PBS至步骤9制备得到的物质中,震荡混匀并超声3min,置于2-8℃保存。

[0114] (二)微流控芯片组装

[0115] 1、采用真空等离子体轰击或大气等离子体轰击的方法对芯片基片表面材料进行超亲水改性。

[0116] 2、芯片表面超亲水改性完成后,将微流控芯片表面喷涂一层封闭液进行表面封闭,然后将芯片进行烘干处理。封闭液包含0.1%BSA、0.01%Tween 20和10mM PBS。

[0117] 3、步骤2的芯片烘干后,使用精密点样仪和超疏水试剂,对芯片中特定管道表面即

凹槽微结构的表面进行超疏水改性，然后将芯片进行烘干处理，得到超疏水管道。

[0118] 4、步骤3的中芯片烘干后，将步骤(一)中收集的荧光微球标记的PCT单克隆抗体和兔IgG抗体添加至芯片基板中的混匀管道中，然后进行烘干，使荧光微球标记物干燥于芯片的混匀管道中。

[0119] 5、步骤4的中芯片烘干后，采用精密点样仪将步骤(一)中制备的聚苯乙烯微球标记的PCT捕获抗体试剂和羊抗兔IgG抗体试剂包被于载体膜上，然后进行烘干，使聚苯乙烯微球标记的捕获抗体固定于载体膜上，并将该包被有捕获抗体试剂的载体膜放置于芯片基板的检测管道上。

[0120] 6、在废液槽中放入吸水纸，将芯片盖板与芯片基板进行组装并通过压力胶键合，得到微流控芯片。

[0121] (三)样本检测

[0122] 1、移液枪加样含PCT抗原的血清样本，吸取150μL检测样本加入上述键合完成的微流控芯片的加样孔内，随后将加样完成的微流控芯片放置入检测仪器的卡槽内，微流控芯片的加样孔与仪器的气路驱动装置结合，控制气路驱动装置在加样孔产生交替的正压和负压，驱动检测样本在芯片中的反应腔和混匀管道中来回流动，复溶混匀管道中的荧光微球标记PCT单克隆抗体和兔IgG抗体试剂的同时与之均匀混合，混匀完成后停止产生正气压或负气压，并对混合溶液进行孵育使之发生免疫复合反应，形成荧光微球标记的PCT单克隆抗体/PCT抗原复合物。

[0123] 2、步骤1完成后，气路驱动装置在加样孔产生一个高正气压，驱动含有PCT抗体/PCT抗原复合物的混匀样本流过超疏水管道之后，将高正气压降低为低正气压，驱动混匀样本流入芯片检测管道中的载体膜中，同时包被在该载体膜中的聚苯乙烯标记PCT捕获抗体试剂和羊抗兔IgG抗体试剂分别与混匀样本中的PCT标记抗体/PCT抗原复合物和兔IgG抗体进行免疫反应，形成PCT捕获抗体-PCT抗原-PCT标记抗体复合物和兔IgG-羊抗兔IgG抗体复合物，未被捕获的其他物质随着液体流入废液槽中并被吸水纸吸收。

[0124] 3、步骤2完成后，检测仪器的光学装置读取微流控芯片检测管道上的PCT捕获抗体-PCT抗原-PCT标记抗体复合物荧光强度(T1值)和兔IgG-羊抗兔IgG抗体复合物荧光强度(C值)，得出荧光强度比值(T/C值)，再通过校准曲线计算出PCT捕获抗体-PCT抗原-PCT标记抗体浓度并生成检测结果。

[0125] 上述检测步骤中驱动装置产生的正气压、负气压以及高正气压、低正气压的大小以及驱动时间根据实际需求进行设定。

[0126] 对比例1

[0127] 本对比例提供一种传统的被动式床旁诊断微流控芯片。本对比例提供的微流控芯片与实施例1基本相同，区别点在于本对比例中没有超疏水管道和载体膜。本对比例的微流控芯片包括芯片基板和芯片盖板，芯片盖板上开设有用于添加检测样本的加样口，芯片基板上开设有与加样口相连通的反应腔、与反应腔相连通的检测管道以及与检测管道相连通的废液槽。本对比例在反应腔中包被有用于提供荧光检测信号的荧光微球标记试剂，所述检测管道中包被有聚苯乙烯标记的捕获抗体试剂。

[0128] (一)抗体标记

[0129] A.荧光微球标记检测抗体

[0130] 1、配制20mg/ml EDC、10mM PBS溶液。

[0131] 2、取90ul 10mM PBS缓冲液，加入10ul的300nm荧光微球，震荡混匀。

[0132] 3、取5ul的EDC活化溶液加入到步骤2中制备得到的包含荧光微球的缓冲液中，震荡混匀，置于摇床15min(室温或20℃，250rpm)。

[0133] 4、配制100ul标记抗体：用10mM PBS缓冲液配制PCT检测单克隆抗体和兔IgG抗体溶液，终浓度为0.5mg/ml。

[0134] 5、将步骤3制备得到的活化后的荧光微球溶液置于离心机中，15000rpm，离心15min，弃上清。

[0135] 6、将步骤4中制备得到的0.5mg/ml的PCT抗体和兔IgG抗体溶液加入至步骤5中得到的离心后的活化荧光微球溶液中，震荡混匀。超声2-3min，震荡混匀后置于摇床孵育2小时，孵育条件：室温，250rpm。

[0136] 7、取20ul封闭液(1％牛血清白蛋白)加入步骤6得到的溶液中，置于摇床封闭2小时，封闭条件：室温，250rpm。

[0137] 8、将步骤7得到的溶液置于离心机中，15000rpm，离心15min，弃上清。

[0138] 9、将500ul 10mM PBS缓冲液加入至步骤8得到的物质中，复溶荧光微球，震荡混匀后置于离心机，15000rpm，离心15min，弃上清。

[0139] 10、加入200ul微球保存液(0.1％BSA、5％蔗糖，10mM PBS)至步骤9得到的物质中，震荡混匀并超声3min，置于2-8℃保存。

[0140] B.聚苯乙烯微球标记捕获抗体

[0141] 1、配制20mg/ml EDC、10mM PBS溶液。

[0142] 2、取90ul 10mM PBS缓冲液，加入10ul的150nm聚苯乙烯微球，震荡混匀。

[0143] 3、取5ul的EDC活化溶液加入到步骤2中制备得到的具有聚苯乙烯微球的缓冲液中，震荡混匀，置于摇床15min(室温或20℃，250rpm)。

[0144] 4、配制100ul捕获抗体：用10mM PBS缓冲液配制PCT包被单克隆抗体和羊抗兔IgG抗体溶液，终浓度为0.5mg/ml。

[0145] 5、将步骤3制备的活化后的聚苯乙烯微球溶液置于离心机中，15000rpm，离心15min，弃上清。

[0146] 6、将步骤4中制备的0.5mg/ml的PCT抗体和羊抗兔IgG抗体溶液加入至步骤5得到的物质中，震荡混匀。超声2-3min，震荡混匀后置于摇床孵育2小时，孵育条件：室温，250rpm。

[0147] 7、取20ul封闭液(1％牛血清白蛋白)加入步骤6制备得到的物质中，置于摇床封闭2小时，封闭条件：室温，250rpm。

[0148] 8、将步骤7制备得到的物质置于离心机中，15000rpm，离心15min，弃上清。

[0149] 9、将500ul 10mM PBS缓冲液加入至步骤8制备得到的物质中，复溶聚苯乙烯微球，震荡混匀后置于离心机，15000rpm，离心15min，弃上清。

[0150] 10、加入200ul 10mM PBS至步骤9制备得到的物质中，震荡混匀并超声3min，置于2-8℃保存。

[0151] (二)微流控芯片组装

[0152] 1、采用真空等离子体轰击或大气等离子体轰击的方法对芯片基片表面材料进行

超亲水改性。

[0153] 2、芯片表面超亲水改性完成后，将微流控芯片表面喷涂一层封闭液进行表面封闭，然后将芯片进行烘干处理。封闭液包含0.1％BSA、0.01％Tween 20和10mM PBS。

[0154] 3、步骤2的芯片烘干后，将步骤(一)中收集的荧光微球标记的PCT单克隆抗体和兔IgG抗体添加至芯片基板中的反应腔中，然后进行烘干，使荧光微球标记物干燥于芯片中的反应腔中。

[0155] 4、步骤3的中芯片烘干后，采用精密点样仪将步骤(一)中制备的聚苯乙烯标记的PCT捕获抗体和羊抗兔IgG抗体试剂包被于芯片基板中的微米柱检测通道，然后进行烘干，使聚苯乙烯微球标记的捕获抗体固定于微米柱检测通道上。

[0156] 5、将芯片盖板与芯片基板进行组装并通过压力胶键合，得到微流控芯片。

[0157] (三)样本检测

[0158] 1、移液枪加样含PCT抗原的血清样本，吸取150μL检测样本加入上述键合完成的微流控芯片的加样孔内，随后将加样完成的微流控芯片放置入检测仪器的卡槽内，检测样本通过毛细吸力作用流入反应腔，复溶反应腔中的荧光微球标记PCT单克隆抗体和兔IgG抗体试剂的同时与之发生免疫复合反应，形成荧光微球标记的PCT单克隆抗体/PCT抗原复合物。

[0159] 2、随后含有PCT抗体/PCT抗原复合物的混匀样本通过毛细力自驱动流入芯片的检测管道中，同时包被在该管道中的聚苯乙烯微球标记的PCT捕获抗体和羊抗兔IgG抗体分别与样本中的PCT抗体/PCT抗原复合物和兔IgG抗体进行免疫反应，形成PCT捕获抗体-PCT抗原-PCT标记抗体复合物和兔IgG-羊抗兔IgG抗体复合物，未被捕获的其他物质随着液体流入废液槽中。

[0160] 3、步骤2完成后，检测仪器的光学装置读取微流控芯片检测管道上的PCT捕获抗体-PCT抗原-PCT标记抗体复合物荧光强度(T1值)和兔IgG-羊抗兔IgG抗体复合物荧光强度(C值)，得出荧光强度比值(T/C值)，再通过校准曲线计算出PCT捕获抗体-PCT抗原-PCT标记抗体浓度并生成检测结果。

[0161] 实施例5结果与分析

[0162] 采用实施例4和对比例1制备的微流控芯片对同一份PCT浓度为0.05ng/mL的检测样本进行10次测试，其性能检测和分析对比见下表：

[0163] 表1检测结果对照表

[0164]

对比例1测试结果				实施例4测试结果			
	T1值	C值	T/C值		T1值	C值	T/C值
#1	392	1691	0.231815	#1	1204	3354	0.358974
#2	278	1582	0.175727	#2	1379	3477	0.396606
#3	270	1618	0.166873	#3	1252	3547	0.352974
#4	358	1795	0.199443	#4	1298	3562	0.364402
#5	146	1182	0.123519	#5	1235	3393	0.363985
#6	273	1637	0.166768	#6	1220	3476	0.350978
#7	312	1707	0.182777	#7	1278	3653	0.349849
#8	256	1626	0.157442	#8	1089	3472	0.313652
#9	319	1609	0.19826	#9	1147	3423	0.335086
#10	279	1626	0.171587	#10	1152	3631	0.317268
		T/C均值	0.177			T/C均值	0.350
		标准差	0.029			标准差	0.024
		变异系数	16.24%			变异系数	6.91%

[0165] 表1中的实验结果显示，当用同一份检测样本进行测试时，采用实施例1中的主动式微流控芯片以及对应的实施例4中的检测方法与对比例1中的被动式微流控芯片及其检测方法对比，实施例1中的主动式微流控芯片的检测结果从T/C值可以看出在检测灵敏度方面提升显著，从检测变异系数可以看出检测重复性可以大大改善。

[0166] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点，其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施，并不能以此限制本发明的保护范围，凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

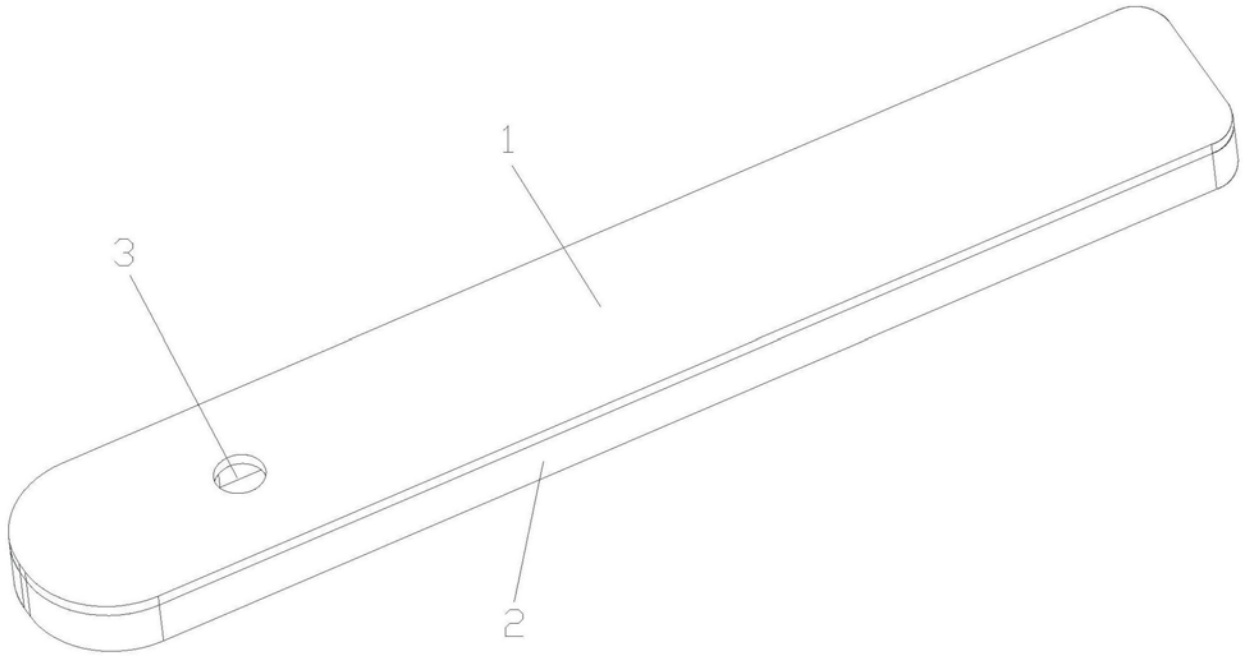


图1

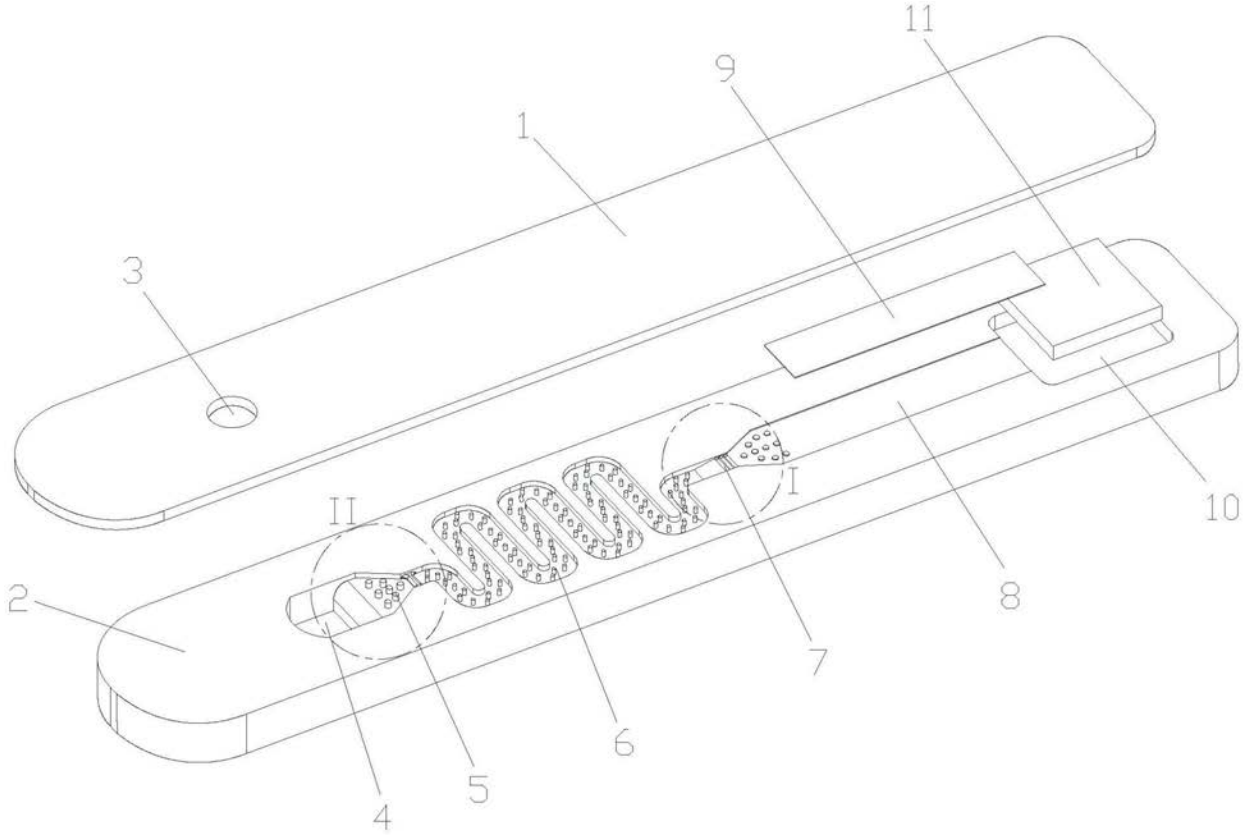


图2

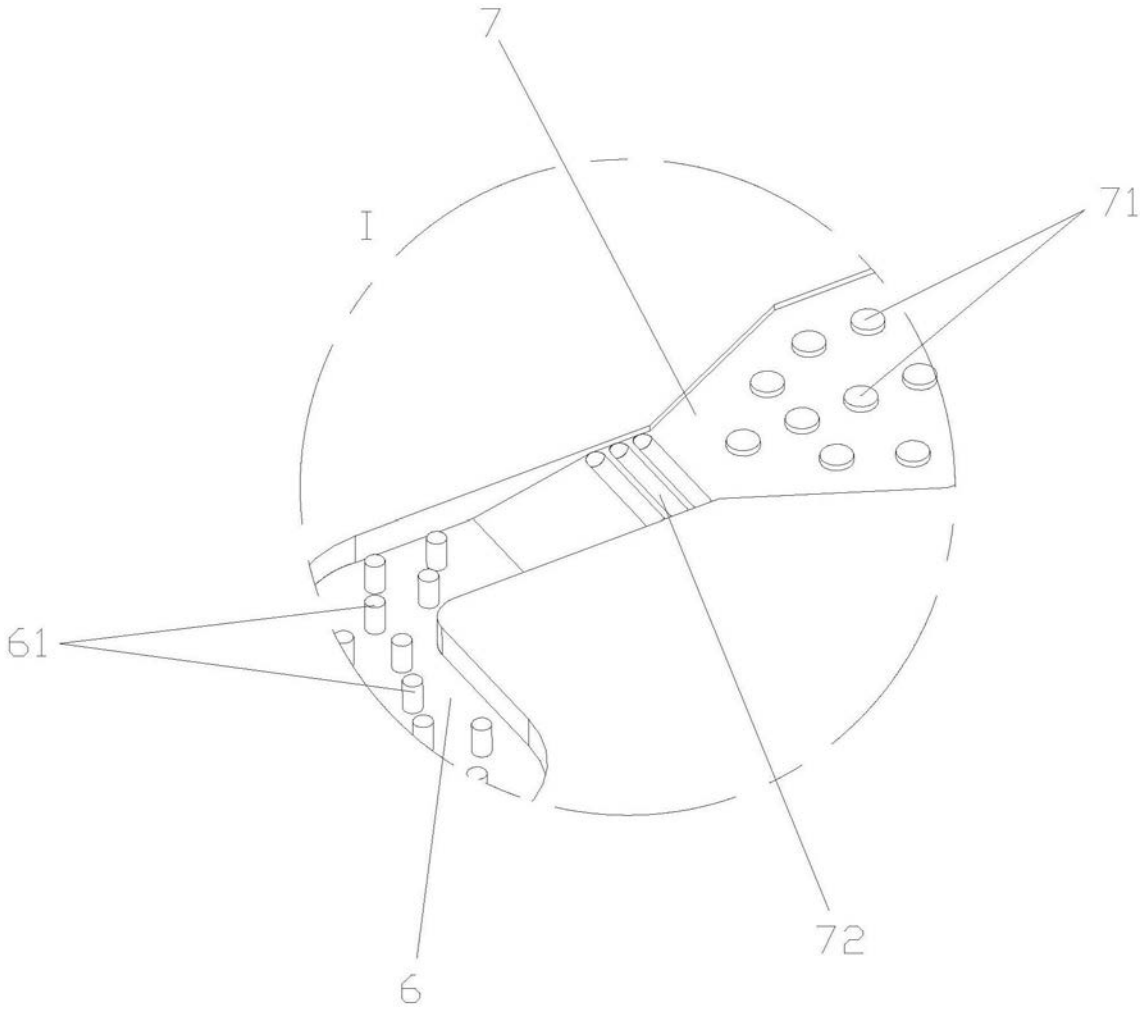


图3

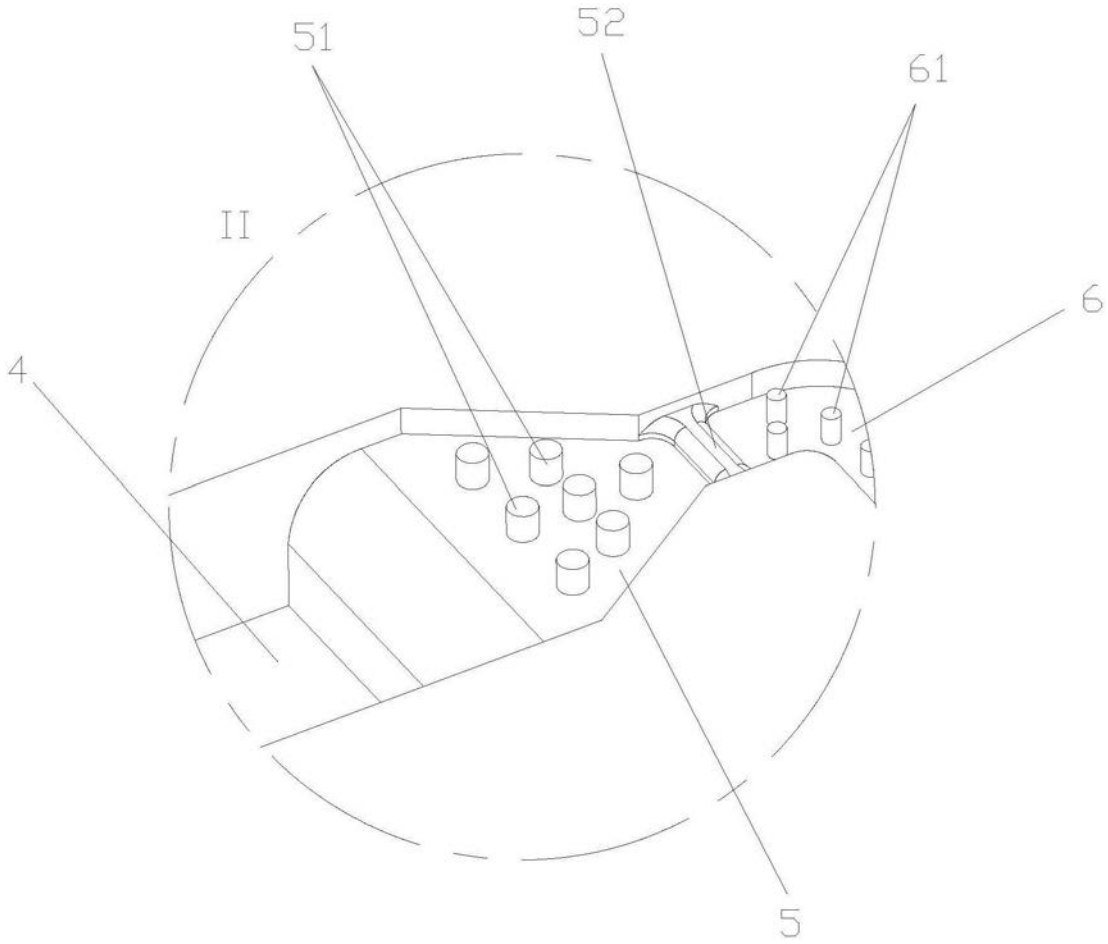
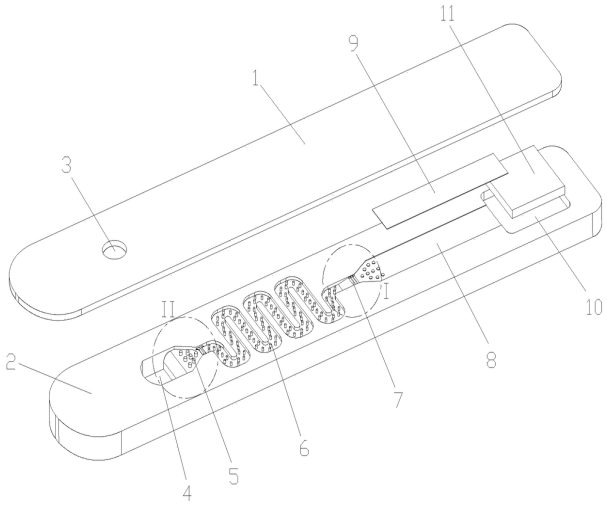


图4

专利名称(译)	一种微流控芯片及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	CN109499634A	公开(公告)日	2019-03-22
申请号	CN201811523924.4	申请日	2018-12-13
[标]发明人	顾悦 蒋理国		
发明人	顾悦 蒋理国		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/533 G01N33/577		
CPC分类号	B01L3/5027 B01L2200/10 G01N33/533 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种微流控芯片及其制备方法和检测方法，其中微流控芯片包括芯片基板和芯片盖板，所述芯片盖板上开设有用于添加检测样本的加样口，所述芯片基板上依次开设有位于所述加样口下方的反应腔、与所述反应腔相连通的混匀管道、与所述混匀管道相连通的检测管道以及废液槽，所述混匀管道中包被有用于提供荧光检测信号的荧光微球标记试剂，所述检测管道中装载有载体膜，所述载体膜上包被有至少一种捕获抗体试剂。本发明的微流控芯片能够实现试剂复溶体积以及反应时间严格可控，提高了检测可重复性；封装简单，极大地简化芯片生产工艺，提高芯片产量；在载体膜中不同的区域可以包被一种以上捕获抗体，实现多项目联合检测。