



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108169495 A

(43)申请公布日 2018.06.15

(21)申请号 201810149379.0

B01L 3/00(2006.01)

(22)申请日 2018.02.13

(71)申请人 苏州仁端生物医药科技有限公司

地址 215200 江苏省苏州市吴江经济技术
开发区长安路650号

(72)发明人 周小进

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

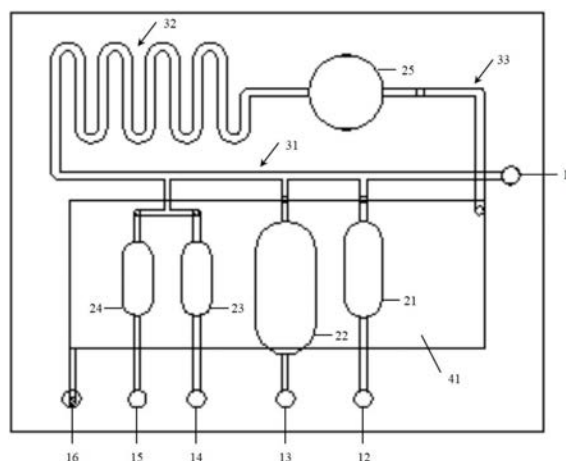
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

一种微流控芯片及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种微流控芯片及其应用,所述微流控芯片包括从上到下依次层叠设置的顶板层(1)、第一腔体层(2)、流道层(3)、第二腔体层(4)和底板层(5);所述顶板层(1)设置有至少一个加样孔和至少一个透气孔(16);所述第一腔体层(2)设置有至少一个储液腔和至少一个反应腔(25);所述第二腔体层(4)设置有至少一个废液腔(41);所述流道层(3)设置有流道,用于将顶板层(1)、第一腔体层(2)和第二腔体层(4)连通。本发明的微流控芯片检测速度快、自动化程度高、过程可控、成本较低,可用于分子检测。



1. 一种微流控芯片, 其特征在于, 所述微流控芯片包括从上到下依次层叠设置的顶板层(1)、第一腔体层(2)、流道层(3)、第二腔体层(4)和底板层(5);

所述顶板层(1)设置有至少一个加样孔和至少一个透气孔(16);

所述第一腔体层(2)设置有至少一个储液腔和至少一个反应腔(25);

所述第二腔体层(4)设置有至少一个废液腔(41);

所述流道层(3)设置有流道, 用于将顶板层(1)、第一腔体层(2)和第二腔体层(4)连通。

2. 根据权利要求1所述的微流控芯片, 其特征在于, 所述储液腔装载有检测试剂;

优选地, 所述检测试剂包括检测抗体、清洗液或发光反应液中的任意一种或至少两种的组合;

优选地, 所述反应腔(25)包被有捕获抗体;

优选地, 所述检测抗体为镧离子单克隆抗体;

优选地, 所述捕获抗体为抗小鼠IgG抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的微流控芯片, 其特征在于, 所述流道层(3)包括第一流道(31)、第二流道(32)和第三流道(33);

优选地, 所述加样孔(11)与所述储液腔通过第一流道(31)连通;

优选地, 所述第二流道(32)呈回形针形状;

优选地, 所述第二流道(32)与所述第三流道(33)之间设置有反应腔(25);

优选地, 所述反应腔(25)与所述废液腔(41)通过第三流道(33)连通。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的微流控芯片, 其特征在于, 所述废液腔(41)与所述透气孔(16)相连。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的微流控芯片, 其特征在于, 所述微流控芯片由高分子材料制备得到;

优选地, 所述高分子材料包括晶体硅、玻璃、聚二甲基硅氧烷、聚甲基丙烯酸甲酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯或聚酯中的任意一种或至少两种的组合, 优选为聚二甲基硅氧烷;

优选地, 所述储液腔和流道层(3)由不透光高分子材料制备得到, 优选为不透光聚二甲基硅氧烷;

优选地, 所述顶板层(1)和底板层(5)由透光高分子材料制备得到, 优选为透光聚二甲基硅氧烷。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的微流控芯片, 其特征在于, 所述镧离子单克隆抗体修饰有发光标记物;

优选地, 所述发光标记物包括吖啶酯、异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、镧系螯合物或藻红蛋白中的任意一种或至少两种的组合, 优选为吖啶酯。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的微流控芯片, 其特征在于, 所述镧离子单克隆抗体由镧离子完全抗原免疫动物制备得到;

优选地, 所述镧离子完全抗原为镧离子、螯合剂与载体蛋白的复合物;

优选地, 所述螯合剂包括乙二胺四乙酸、二乙三胺五乙酸、二乙三胺五乙酸衍生物、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N,N,N-四乙酸或1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯中的任意一种或至少两种的组合, 优选为1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯;

优选地,所述载体蛋白包括多聚赖氨酸、人血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白或牛血清白蛋白中的任意一种或至少两种的组合,优选为多聚赖氨酸;

优选地,所述镉离子完全抗原为镉离子-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯-多聚赖氨酸复合物。

8.一种采用如权利要求1-6任一项所述的微流控芯片制定标准曲线的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)配置至少6份已知的不同浓度的镉离子标准液;

(2)步骤(1)所述的镉离子标准液由加样孔(11)进入第一流道(31),与吖啶酯标记镉离子单克隆抗体混合孵育,得到抗原抗体复合物,进入反应腔(25);

(3)预先包被在反应腔(25)的抗小鼠IgG抗体捕获步骤(2)所述的抗原抗体复合物;

(4)清洗后,化学发光反应液进入反应腔(25),测定反应腔(25)的化学发光强度;

(5)以化学发光强度为纵坐标,镉离子标准液的浓度为横坐标,绘制化学发光强度与镉离子浓度的关系四参数曲线图,得到所述标准曲线。

9.一种检测镉离子的方法,其特征在于,所述方法采用如权利要求1-7所述的微流控芯片;

优选地,所述方法包括以下步骤:

(1')待测样本由加样孔(11)进入第一流道(31),与吖啶酯标记镉离子单克隆抗体的混合孵育,得到抗原抗体复合物,进入反应腔(25);

(2')预先包被在反应腔(25)的抗小鼠IgG抗体捕获步骤(1')所述的抗原抗体复合物;

(3')清洗后,化学发光反应液进入反应腔(25),测定反应腔(25)的化学发光强度;

(4')根据标准曲线,计算得到所述待测样本中镉离子的浓度。

10.一种如权利要求1-7任一项所述的微流控芯片用于分子检测,优选为用于重金属离子检测;

优选地,所述重金属离子包括镉离子、铁离子、锰离子、铜离子、锌离子、铬离子、汞离子、镍离子、铅离子或砷离子中的任意一种或至少两种的组合,优选为镉离子。

一种微流控芯片及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析领域,涉及一种微流控芯片及其应用,尤其涉及一种镉离子检测微流控芯片及其应用。

背景技术

[0002] 重金属镉(Cd)是一种常见的环境污染物,主要来源于采矿和冶炼等工业活动。释放到环境中的镉富集于土壤的镉经农作物和水中的水生动植物中,最终通过饮食进入人体。胃肠道对镉的吸收率约为5-10%,而肺对镉的吸收率则高达10-50%。镉在人体内的生物半衰期长达10-30年,对肝、肾、肺、骨骼、心血管系统、免疫系统和神经系统均具有损害作用。镉的主要危害包括肾毒性和骨毒性。其中,肾脏是镉暴露的主要靶器官,镉通过诱导氧化应激使肾小管细胞发生浊肿、凋亡、坏死、增生和管腔萎缩,造成肾小管重吸收功能紊乱;高剂量的镉通过与钙竞争直接抑制细胞对钙的转运,同时通过影响肾功能导致1,25-二羟维生素D3合成下降而间接影响骨钙代谢,最终导致骨钙缺失,引起骨质疏松。近期研究结果证明,镉也是动脉粥样硬化、高血压等心血管疾病的危险因素之一。此外,长期暴露于高浓度的镉可能会诱发癌症,国际癌症研究机构(IARC)已将镉列入“人类致癌物质”。

[0003] 传统的重金属离子检测法包括原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱法、伏安法、离子色谱法和电热原子化原子吸收光谱法等,然而这些检测方法必须采用大型分析仪器,无法用于现场检测,且受检费用高、处理量有限、检测时间长、准确度受仪器限制,不利于在日常生活中推广应用。微流控芯片具有特异性强、灵敏度高、速度快、成本低的优点,检测仪器便于携带,逐渐成为检测领域的常用技术。

[0004] CN 105424784 A公开了一种水中重金属离子检测微流控芯片与检测方法,所述微流控芯片包括微通道和微阀;所述微通道包括参照微通道、离子印迹微通道、电泳进样微通道、电泳分离微通道、连接微通道、废液排出微通道和缓冲液排出微通道;所述微阀包括参照端出口微阀、离子印迹出口微阀、废液出口微阀、缓冲液截止微阀和进样截止微阀。然而,所述微流控芯片的准确性较低,不能进行重金属离子的自动化定量检测,过程繁琐,耗时较长。

[0005] 因此,提供一种灵敏度高、特异性强、准确性好、检测过程自动化的微流控芯片,在分子检测领域具有重要意义。

发明内容

[0006] 针对现有技术的不足,本发明提供一种微流控芯片及其应用,所述微流控芯片检测速度快、自动化程度高、过程可控、成本较低,可用于分子检测。

[0007] 为达此目的,本发明提供以下技术方案:

[0008] 第一方面,本发明提供了一种微流控芯片,所述微流控芯片包括从上到下依次层叠设置的顶板层1、第一腔体层2、流道层3、第二腔体层4和底板层5;

[0009] 所述顶板层1设置有至少一个加样孔和至少一个透气孔16;

- [0010] 所述第一腔体层2设置有至少一个储液腔和至少一个反应腔25；
- [0011] 所述第二腔体层4设置有至少一个废液腔41；
- [0012] 所述流道层3设置有流道，用于将顶板层1、第一腔体层2和第二腔体层4连通。
- [0013] 本发明的微流控芯片通过流道将储液腔、反应腔和废液腔连通，实现了分子的自动化可控检测，同时在顶板层设置加样孔，可以向储液腔中添加检测试剂，是一种安全、无污染、高效的自动化检测装置。
- [0014] 优选地，所述储液腔装载有检测试剂。
- [0015] 优选地，所述检测试剂包括检测抗体、清洗液或发光反应液中的任意一种或至少两种的组合。
- [0016] 本发明的检测试剂根据种类的不同装载在不同的储液腔中，储液腔的出口处设置有泵阀系统，保证了检测试剂不回流，避免了污染，延长了检测试剂的保质期。
- [0017] 本发明中，储液腔的形状和个数可以任意设定，本领域技术人员可以根据实际需求和检测试剂的种类调整储液腔的形状和个数，本发明的微流控芯片包括4个筒状储液腔用于装载检测试剂。
- [0018] 优选地，所述反应腔25包被有捕获抗体。
- [0019] 本发明中，反应腔内表面包被的捕获抗体将待测物质固定于反应腔中，通过测定反应腔的信号值进行待测物质的检测。
- [0020] 优选地，所述检测抗体为镉离子单克隆抗体。
- [0021] 本发明中，镉离子单克隆抗体作为检测抗体，特异性强、灵敏度高，微流控芯片可以用于测定食品、土壤、水源、动物及人体体液中重金属镉离子的含量。
- [0022] 优选地，所述捕获抗体为抗小鼠IgG抗体。
- [0023] 本发明中，抗小鼠IgG抗体是镉离子单克隆抗体的二抗，可以与镉离子单克隆抗体发生抗体-抗原反应。
- [0024] 本发明中，清洗液为含有0.2mol/L NaCl和0.1% Tween-20的pH=7.2的25mmol/L Tris-HCl缓冲液，化学发光激发液包括化学发光预激发液A和化学发光激发液B，其中，化学发光预激发液A为H₂O₂和HNO₃的混合液，H₂O₂的质量分数为0.1-5%，HNO₃的浓度为0.1-5mol/L，化学发光激发液B为Triton X-100和NaOH的混合液，其中Triton X-100的浓度为0.1-2.0mol/L，NaOH的浓度为0.1-1.0mol/L。
- [0025] 优选地，所述流道层3包括第一流道31、第二流道32和第三流道33。
- [0026] 优选地，所述加样孔11与所述储液腔通过第一流道31连通。
- [0027] 优选地，所述第二流道32呈回形针形状。
- [0028] 本发明中，将第二流道设置为回形针形状，增加了待测样本的流动路径，延长了待测样本在流道中的时间，保证了待测样本在到达反应腔之前与检测抗体充分反应，提高了微流控芯片的检测准确性。
- [0029] 优选地，所述第二流道32与所述第三流道33之间设置有反应腔25。
- [0030] 优选地，所述反应腔25与所述废液腔41通过第三流道33连通。
- [0031] 优选地，所述废液腔41与所述透气孔16相连。
- [0032] 优选地，所述微流控芯片由高分子材料制备得到。
- [0033] 优选地，所述高分子材料包括晶体硅、玻璃、聚二甲基硅氧烷、聚甲基丙烯酸甲酯、

聚对苯二甲酸乙二醇酯或聚酯中的任意一种或至少两种的组合,优选为聚二甲基硅氧烷。

[0034] 优选地,所述储液腔和流道层3由不透光高分子材料制备得到,优选为不透光聚二甲基硅氧烷。

[0035] 优选地,所述顶板层1和底板层5由透光高分子材料制备得到,优选为透光聚二甲基硅氧烷。

[0036] 本发明中,为了保证微流控芯片内部的储液腔和流道中的反应产物不受外界可见光与检测光源的干扰,采用不透光聚二甲基硅氧烷构建储液腔和流道,反应腔需要对检测光通透,因此,顶板层和底板层由透光聚二甲基硅氧烷组成。

[0037] 优选地,所述镉离子单克隆抗体修饰有发光标记物。

[0038] 优选地,所述发光标记物包括吖啶酯、异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、镧系螯合物或藻红蛋白中的任意一种或至少两种的组合,优选为吖啶酯。

[0039] 本发明中,发光标记物直接修饰于镉离子单克隆抗体上,不对镉离子单克隆抗体的构象造成影响,作为信号放大系统,增强微流控芯片的检测灵敏性。

[0040] 本发明中优选采用化学发光标记物标记镉离子单克隆抗体,化学发光体系简单,反应在碱性环境中即可迅速进行,不需要催化剂,吖啶酯容易与蛋白质结合,光子产率不受构象影响,产生的光子能级高,信号强,信噪比高,稳定性好,激发液成本低。

[0041] 优选地,所述镉离子单克隆抗体由镉离子完全抗原免疫动物制备得到。

[0042] 优选地,所述镉离子完全抗原为镉离子、螯合剂与载体蛋白的复合物。

[0043] 优选地,所述螯合剂包括乙二胺四乙酸、二乙三胺五乙酸、二乙三胺五乙酸衍生物、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N,N,N-四乙酸或1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯中的任意一种或至少两种的组合,优选为1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0044] 优选地,所述载体蛋白包括多聚赖氨酸、人血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白或牛血清白蛋白中的任意一种或至少两种的组合,优选为多聚赖氨酸。

[0045] 本发明中,镉离子半抗原通过螯合剂与载体蛋白形成具有免疫原性和免疫反应性的镉离子完全抗原。

[0046] 优选地,所述镉离子完全抗原为镉离子-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯-多聚赖氨酸复合物。

[0047] 本发明中,优选1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯(DOTA-NHS)作为螯合剂,DOTA-NHS的NHS反应基团与载体蛋白的氨基定位反应,杂环的氮原子与重金属镉离子配位生成稳定的配合物,偶联稳定性更强,多聚赖氨酸(PLL)作为载体蛋白,不仅增强了镉离子的免疫原性,而且产生的抗体对镉离子具有较高的效价。

[0048] 本发明中,所述微流控芯片的工作过程如下:

[0049] (1)待测样本由加样孔11进入第一流道31,同时,储液腔21内的吖啶酯标记镉离子单克隆抗体进入第一流道31,与待测样本混合孵育,形成抗原抗体复合物,流经第二流道32和第三流道33,进入反应腔25;

[0050] (2)预先包被在反应腔25内表面的抗小鼠IgG抗体捕获抗原抗体复合物,使抗原抗体复合物固定于反应腔25中;

[0051] (3)采用储液腔22内的清洗液清洗反应腔,去除反应腔中未结合的物质后,储液腔

23和24中的化学发光激发液A和化学发光激发液B进入反应腔25,激发镉离子单克隆抗体上的吡啶酯发光;

[0052] (4) 测定反应腔25的化学发光强度,测定待测样本中的镉离子。

[0053] 第二方面,本发明提供了一种采用如第一方面所述的微流控芯片制定标准曲线的方法,包括以下步骤:

[0054] (1) 配置至少6份已知的不同浓度的镉离子标准液;

[0055] (2) 步骤(1)所述的镉离子标准液由加样孔11进入第一流道31,与吡啶酯标记镉离子单克隆抗体混合孵育,得到抗原抗体复合物,进入反应腔25;

[0056] (3) 预先包被在反应腔25的抗小鼠IgG抗体捕获步骤(2)所述的抗原抗体复合物;

[0057] (4) 清洗后,化学发光反应液进入反应腔25,测定反应腔25的化学发光强度;

[0058] (5) 以化学发光强度为纵坐标,镉离子标准液的浓度为横坐标,绘制化学发光强度与镉离子浓度的关系四参数曲线图,得到所述标准曲线。

[0059] 本发明中,采用3%硝酸(v/v)将浓度为1mg/mL的镉离子储备液稀释为浓度分别为0.2ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、5ng/mL和10ng/mL的镉离子标准液。

[0060] 第三方面,本发明提供了一种检测镉离子的方法,所述方法采用如第一方面所述的微流控芯片。

[0061] 优选地,所述方法包括以下步骤:

[0062] (1') 待测样本由加样孔11进入第一流道31,与吡啶酯标记镉离子单克隆抗体的混合孵育,得到抗原抗体复合物,进入反应腔25;

[0063] (2') 预先包被在反应腔25的抗小鼠IgG抗体捕获步骤(1')所述的抗原抗体复合物;

[0064] (3') 清洗后,化学发光反应液进入反应腔25,测定反应腔25的化学发光强度;

[0065] (4') 根据标准曲线,计算得到所述待测样本中镉离子的浓度。

[0066] 第四方面,本发明提供了一种如第一方面所述的微流控芯片用于分子检测,优选为用于重金属离子检测。

[0067] 优选地,所述重金属离子包括镉离子、铁离子、锰离子、铜离子、锌离子、铬离子、汞离子、镍离子、铅离子或砷离子中的任意一种或至少两种的组合,优选为镉离子。

[0068] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0069] (1) 本发明的微流控芯片通过设置微流道将储液腔、反应腔和废液腔连通,实现了分子的自动化可控检测,同时设置加样孔,建立了一种安全、无污染、高效的自动化检测装置;

[0070] (2) 在本发明的微流控芯片中,利用吡啶酯标记镉离子单克隆抗体作为检测抗体,抗小鼠IgG抗体作为捕获抗体,将抗体-抗原反应的高度特异性与化学发光体系的高度灵敏度相结合,实现了镉离子的快速准确检测;

[0071] (3) 本发明的镉离子检测微流控芯片特异性强,对与镉离子相似的重金属离子不产生交叉反应,灵敏度高,最低检测0.01ng/mL。

附图说明

[0072] 图1为微流控芯片俯视图,其中,11-待测液加样孔,12-检测抗体加样孔,13-清洗

液加样孔,14-化学发光激发液A加样孔,15-化学发光激发液B加样孔,16-透气孔,21-检测抗体储液腔,22-清洗液储液腔,23-化学发光激发液A储液腔,24-化学发光激发液B储液腔,25-反应腔,31-第一流道,32-第二流道,33-第三流道,41-废液腔;

[0073] 图2为顶板层俯视图,其中,1-顶板层,11-待测液加样孔,12-检测抗体加样孔,13-清洗液加样孔,14-化学发光激发液A加样孔,15-化学发光激发液B加样孔,16-透气孔;

[0074] 图3为第一腔体层俯视图,其中,2-第一腔体层,21-检测抗体储液腔,22-清洗液储液腔,23-化学发光激发液A储液腔,24-化学发光激发液B储液腔,25-反应腔;

[0075] 图4为流道层俯视图,其中,3-流道层,16-透气孔,25-反应腔,31-第一流道,32-第二流道,33-第三流道;

[0076] 图5为第二腔体层俯视图,其中,4-第二腔体层,41-废液腔;

[0077] 图6为底板层俯视图,其中,5-底板层。

具体实施方式

[0078] 为进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果,以下结合实施例和附图对本发明作进一步地说明。可以理解的是,此处所描述的具体实施方式仅仅用于解释本发明,而非对本发明的限定。

[0079] 实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

[0080] 实施例1镉离子完全抗原的制备

[0081] (1) 将10mg双功能螯合剂1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸-N-羧基琥珀酰亚胺酯(DOTA-NHS)溶于1mL二甲亚砜(DMSO)中形成金属螯合剂溶液,30mg多聚赖氨酸(PLL)溶于1mL 4-羧乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液中;

[0082] (2) 室温下将DOTA-NHS溶液缓慢滴入载体蛋白溶液中,边滴边搅拌,调节pH至9.0,室温搅拌过夜,隔天反应液呈无色或微黄透明状,使用15mL离心超滤管超滤,HEPES缓冲液洗涤3次,浓缩至2mL,即为双功能螯合剂与蛋白的偶联化合物;

[0083] (3) 将双功能螯合剂与蛋白的偶联化合物用HEPES缓冲液稀释5倍后,缓慢滴入1mL浓度为1mg/mL的重金属镉离子溶液中,室温搅拌反应5小时,用15mL离心超滤管超滤,HEPES缓冲液洗涤3次,得到镉离子完全免疫原Cd-DOTA-PLL。

[0084] 实施例2镉离子单克隆抗体的制备

[0085] (1) 将60μg镉离子完全免疫原Cd-DOTA-PLL溶于200μL无菌生理盐水中,与200μL完全弗氏佐剂混合,充分乳化后向Balb/c雌性小鼠腹部皮下进行多点注射;两周后采用免疫原Cd-DOTA-PLL与不完全弗氏佐剂的混合液,进行加强免疫,免疫部位为颈背部皮下,从第三次免疫开始,免疫后一周从小鼠眼眶采血检测血清效价;第四次免疫不添加佐剂,直接采用免疫原Cd-DOTA-PLL进行腹腔免疫;

[0086] (2) 免疫结束3天后,将免疫小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤融合,经过3次以上亚克隆,筛选得到能够稳定分泌抗重金属镉离子单克隆抗体的杂交瘤细胞,收集杂交瘤细胞培养上清,离心去除细胞碎片,于-20℃保存备用;

[0087] (3) 挑选经产Balb/c小鼠,腹腔注射0.5mL液体石蜡,将不完全培养液中的细胞浓

度调至 $10^6/\text{mL}$,每只预处理的小鼠七天后腹腔注射1mL阳性克隆杂交瘤细胞,待7-10天后,小鼠腹部明显增大,刺穿腹腔,采集腹水;

[0088] (4) 将腹水离心,弃脂肪层和细胞层,收集中间的澄清层,用辛酸-硫酸铵盐析法粗提腹水,用protein G柱子亲和层析法进一步纯化,获得纯化的镆离子单克隆抗体。

[0089] 实施例3吡啶酯标记的镆离子单克隆抗体的制备

[0090] (1) 将镆离子单克隆抗体置于透析袋中,在不少于1L的标记缓冲液(0.1mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液, $\text{pH}=10$)中进行透析,期间缓冲液更换至少3次;

[0091] (2) 称取 0.52mg 吡啶酯(NSP-DMAE-NHS),溶于 $894\mu\text{L}$ 二甲基甲酰胺(DMF)中,配成 1mmol/L 的NSP-DMAE-NHS DMF溶液;

[0092] (3) 将 $500\mu\text{g}$ 经过透析的镆离子单克隆抗体置于离心管内,加入 $100\mu\text{L}$ 浓度为 1mmol/L 的NSP-DMAE-NHS DMF溶液,加入标记缓冲液补齐体积至 $1000\mu\text{L}$,避光室温下反应 30min ,加入 $100\mu\text{L}$ 10%赖氨酸,继续反应 40min ,终止反应,得到标记有吡啶酯的镆离子单克隆抗体(NSP-DMAE-NHS-Ab);

[0093] (4) 采用Sephadex G-50柱($1\times 25\text{cm}$)分离NSP-DMAE-NHS-Ab和游离NSP-DMAE-NHS,用纯化缓冲液(0.1mol/L PBS, $\text{pH}=6.3$)平衡洗脱层析柱;

[0094] (5) 分离过程中用色谱仪检测蛋白峰,分别测量流出液的化学发光强度和 280nm 吸光度值;

[0095] (6) 收集光度值高且吸光度大的洗脱液,加入1%BSA后分装,得到纯化的标记有吡啶酯的镆离子单克隆抗体。

[0096] 实施例4微流控芯片的构造

[0097] 本实施例的微流控芯片的俯视图如图1所示,顶板层1的俯视图如图2所示,第一腔体层2的俯视图如图3所示,流道层3的俯视图如图4所示,第二腔体层4的俯视图如图5所示,底板层5的俯视图如图6所示。

[0098] 所述微流控芯片包括从上到下依次层叠设置的顶板层1、第一腔体层2、流道层3、第二腔体层4和底板层5;

[0099] 所述顶板层1设置有5个加样孔和1个透气孔16,其中,加样孔分别为待测样本加样孔11、吡啶酯标记镆离子单克隆抗体加样孔12、清洗液加样孔13、化学发光激发液A加样孔14和化学发光激发液B加样孔15;

[0100] 所述第一腔体层2设置有4个储液腔和1个反应腔25,其中,储液腔分别为吡啶酯标记镆离子单克隆抗体储液腔21、清洗液储液腔22、化学发光激发液A储液腔23和化学发光激发液B储液腔24,反应腔25内表面包被有抗小鼠IgG抗体;

[0101] 所述第二腔体层4设置有1个废液腔41;

[0102] 所述流道层3设置有流道,用于将顶板层1、第一腔体层2和第二腔体层4连通;

[0103] 所述流道层3包括第一流道31、第二流道32和第三流道33;

[0104] 所述加样孔11与所述储液腔通过第一流道31连通;

[0105] 所述第二流道32呈回形针形状;

[0106] 所述第二流道32与所述第三流道33之间设置有反应腔25;

[0107] 所述反应腔25与所述废液腔41通过第三流道33连通;

[0108] 所述废液腔41与所述透气孔16相连。

[0109] 本发明的微流控芯片的工作过程如下：

[0110] (1) 待测样本由加样孔11进入第一流道31,同时,储液腔21内的吡啶酯标记镉离子单克隆抗体进入第一流道31,与待测样本混合孵育,形成抗原抗体复合物,流经第二流道32和第三流道33,进入反应腔25;

[0111] (2) 预先包被在反应腔25内表面的抗小鼠IgG抗体捕获抗原抗体复合物,使抗原抗体复合物固定于反应腔25中;

[0112] (3) 采用储液腔22内的清洗液清洗反应腔,去除反应腔中未结合的物质后,储液腔23和24中的化学发光激发液A和化学发光激发液B进入反应腔25,激发镉离子单克隆抗体上的吡啶酯发光;

[0113] (4) 测定反应腔25的化学发光强度,测定待测样本中的镉离子。

[0114] 实施例5待测样本镉离子浓度的测定

[0115] 本实施例采用如实施例4所述的微流控芯片进行镉离子浓度的检测,具体步骤为:

[0116] (1) 采用微流控芯片制定标准曲线:配置6份浓度分别为0.2ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、5ng/mL和10ng/mL的镉离子标准液,由加样孔11进入第一流道31,与吡啶酯标记镉离子单克隆抗体混合孵育,得到抗原抗体复合物,进入反应腔25,通过抗小鼠IgG抗体固定在反应腔25内,清洗液清洗反应腔后,化学发光激发液A和化学发光激发液B进入反应腔25,测定反应腔25的化学发光强度,以化学发光强度为纵坐标,镉离子标准液的浓度为横坐标,绘制化学发光强度与镉离子浓度的关系四参数曲线图,得到标准曲线;

[0117] (2) 由加样孔11加入待测样本,以同样的方法测定反应腔25的化学发光信号,根据标准曲线计算得到待测样本中镉离子的浓度。

[0118] 本实施例中,标准曲线的方程为:

[0119] $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$ ($R^2 = 0.998$)

[0120] 其中, $A = 885443.1666$, $B = -1.25923$, $C = 1.98661$, $D = 18963.13843$ 。

[0121] 10个待测样本中镉离子的浓度如表1所示。

[0122] 表1

样本编号	发光值	镉离子浓度 (ng/mL)
1	94446	0.31
2	25022	0.04
3	54522	0.16

[0123]

[0124]

4	93608	0.30
5	99979	0.33
6	30076	0.06
7	103389	0.34
8	27777	0.05
9	68491	0.21
10	35008	0.08

[0125] 实施例6微流控芯片的特异性评价

[0126] 采用实施例4的微流控芯片与镉离子相似的重金属离子铁离子、锰离子、铜离子、锌离子、铬离子、汞离子、镍离子、铅离子和砷离子进行检测,制作交叉反应曲线,评价微流控芯片的特异性。

[0127] 结果如表2所示,实施例4的微流控芯片对镉离子具有较高的特异性,对其他重金属离子均无交叉反应。

[0128] 表2

[0129]

化合物	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率 (%)
Cd ²⁺ -EDTA	4.36	100
Fe ²⁺ -EDTA	$>1 \times 10^3$	<0.1
Mn ²⁺ -EDTA	$>1 \times 10^3$	<0.1
Cu ²⁺ -EDTA	$>1 \times 10^3$	<0.1
Zn ²⁺ -EDTA	$>1 \times 10^3$	<0.1
Cr ³⁺ -EDTA	$>1 \times 10^3$	<0.1
Hg ²⁺ -EDTA	$>1 \times 10^3$	<0.1

[0130]

Ni^{2+} -EDTA	$>1 \times 10^3$	<0.1
Pb^{2+} -EDTA	$>1 \times 10^3$	<0.1
As^{3+} -EDTA	$>1 \times 10^3$	<0.1

[0131] 实施例7微流控芯片的灵敏性评价

[0132] 采用实施例4的微流控芯片对镉离子零标准溶液进行20次重复测试,测定结果取平均值加2倍标准偏差,即为微流控芯片的灵敏度。

[0133] 结果显示:实施例4的微流控芯片对镉离子的灵敏度为0.01ng/mL。

[0134] 综上所述,本发明的微流控芯片通过设置微流道将储液腔、反应腔和废液腔连通,实现了分子的自动化可控检测,同时设置加样孔,建立了一种安全、无污染、高效的自动化检测装置;在本发明的微流控芯片中,利用吡啶酯标记镉离子单克隆抗体作为检测抗体,抗小鼠IgG抗体作为捕获抗体,将抗体-抗原反应的高度特异性与化学发光体系的高度灵敏度相结合,制备的镉离子检测微流控芯片特异性强,灵敏度高,过程简单,检测时间短,成本低,在重金属离子检测领域具有重要意义。

[0135] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法,但本发明并不局限于上述详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

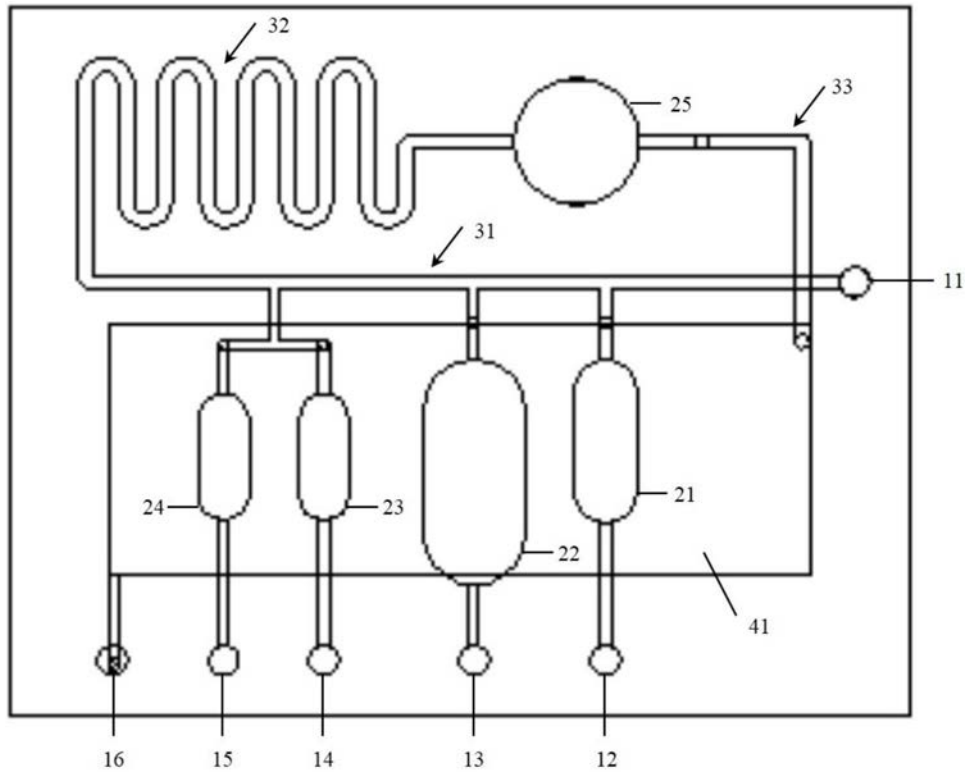


图1

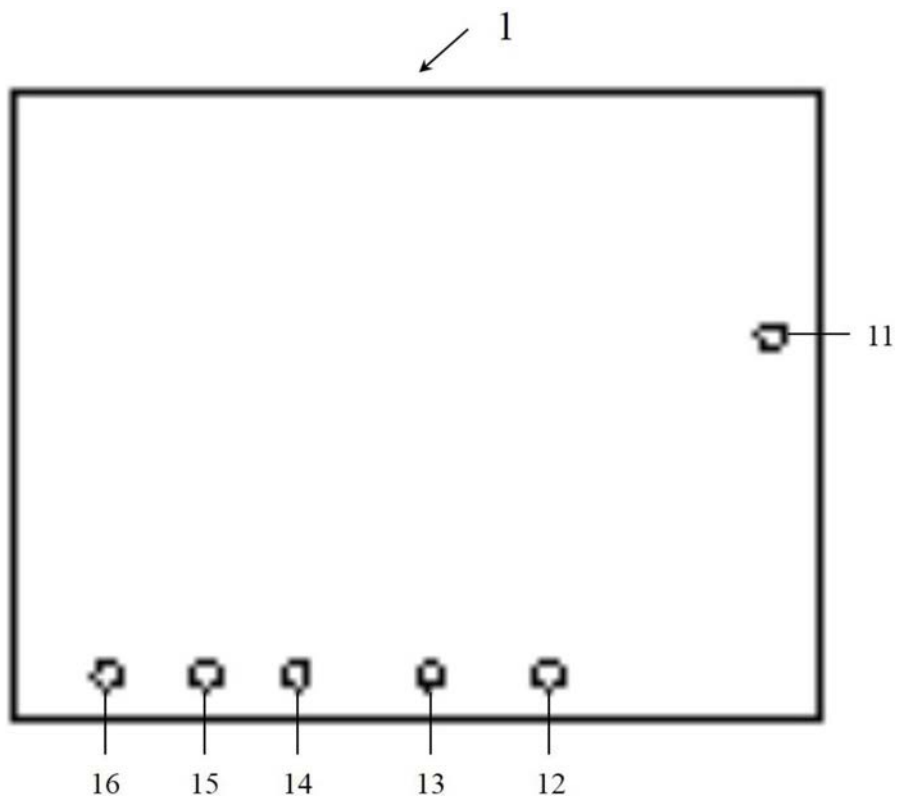


图2

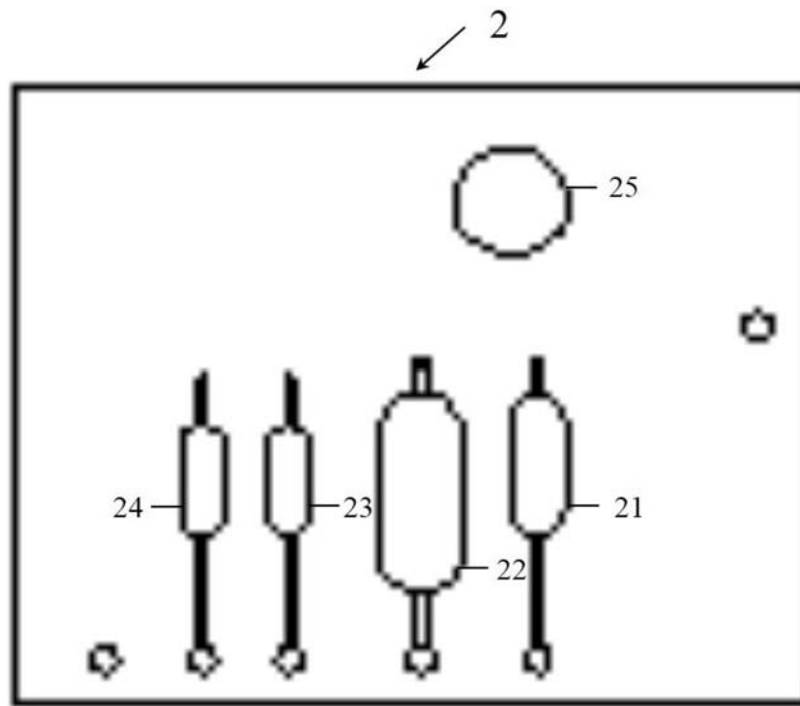


图3

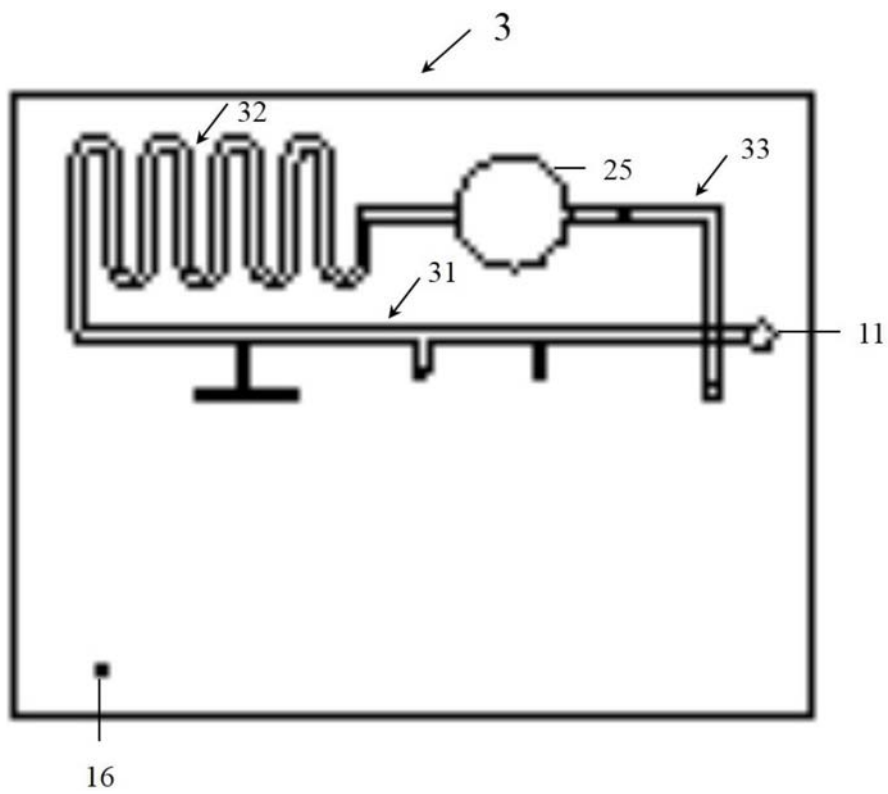


图4

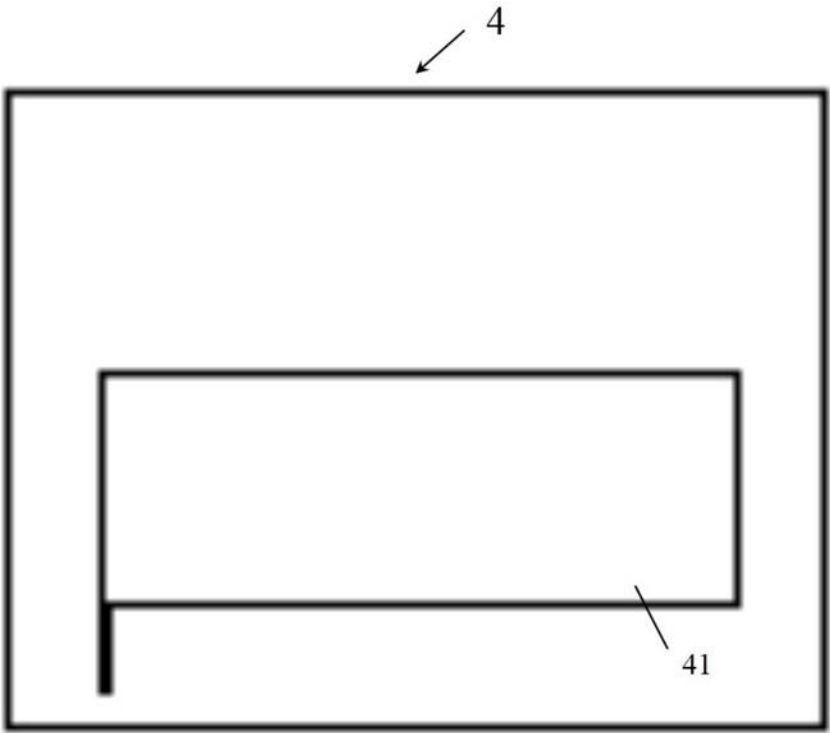


图5

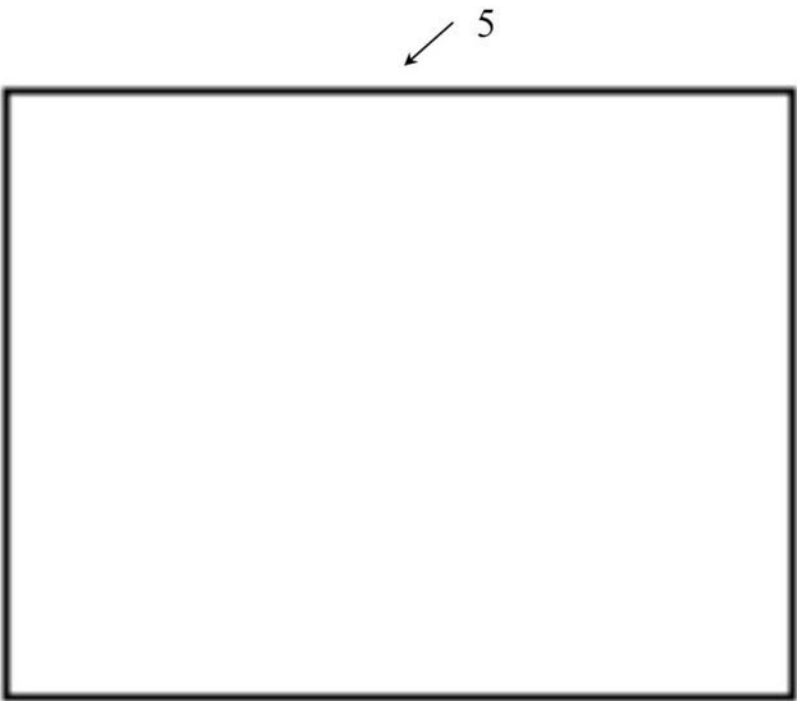


图6

专利名称(译)	一种微流控芯片及其应用		
公开(公告)号	CN108169495A	公开(公告)日	2018-06-15
申请号	CN201810149379.0	申请日	2018-02-13
[标]发明人	周小进		
发明人	周小进		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/532 G01N33/544 G01N21/76 B01L3/00		
CPC分类号	G01N33/6854 B01L3/5027 B01L2200/10 B01L2300/0861 B01L2300/0887 G01N21/76 G01N21/763 G01N33/532 G01N33/544 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种微流控芯片及其应用，所述微流控芯片包括从上到下依次层叠设置的顶板层(1)、第一腔体层(2)、流道层(3)、第二腔体层(4)和底板层(5)；所述顶板层(1)设置有至少一个加样孔和至少一个透气孔(16)；所述第一腔体层(2)设置有至少一个储液腔和至少一个反应腔(25)；所述第二腔体层(4)设置有至少一个废液腔(41)；所述流道层(3)设置有流道，用于将顶板层(1)、第一腔体层(2)和第二腔体层(4)连通。本发明的微流控芯片检测速度快、自动化程度高、过程可控、成本较低，可用于分子检测。

