



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104203808 B

(45)授权公告日 2017.06.09

(21)申请号 201280071882.X

R·马修

(22)申请日 2012.03.13

(74)专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有限公司 11012

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104203808 A

代理人 黄泽雄 陈悦军

(43)申请公布日 2014.12.10

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.26

H01L 31/0216(2014.01)

B82Y 40/00(2011.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/051170 2012.03.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/136115 EN 2013.09.19

(56)对比文件

US 6673533 B1,2004.01.06,

CN 101098956 A,2008.01.02,

WO 2011/131795 A1,2011.10.27,

WO 2006/045628 A1,2006.05.04,

US 6673533 B1,2004.01.06,

(73)专利权人 德赛诊断印度私人有限公司

地址 印度孟买

审查员 周洁

(72)发明人 V·马图尔 V·内夫埃克尔

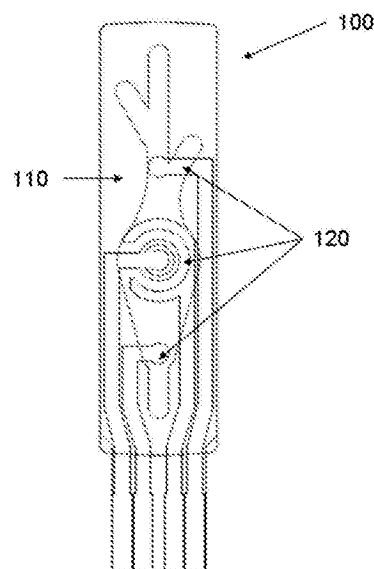
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

具有纳米结构电极的生物传感器

(57)摘要

本发明提供了一种用于微流控设备的基底,其包括:聚合物基板;至少一个传感器,所述传感器形成于所述聚合物基板上用于检测样品中所含的至少一种目标分析物,其中所述传感器包括至少一个工作电极和至少一个参比电极;沉积在所述工作电极上的多个纳米结构用于增加所述工作电极的表面积,以及至少一个与所述纳米结构结合或沉积在所述纳米结构上的识别元件。本发明的微流控设备是一种用于快速筛选和诊断多种疾病标识物的即时检测、自校准、独立的手持式设备。



1. 一种微流控设备,其包括:

具有至少一个传感器的基底,用于检测样品中所含的至少一种目标分析物,

加入流体路径的垫片;

试剂组件,所述试剂组件包括用于含有至少一种分析物的样品的至少一个入口点、用于储存至少一种试剂的至少一个储存室和用于处理使用过的至少一种试剂的废料室;并且其中所述试剂组件还加入槽,其用于定位附着于垫片的基底;并且

其中垫片的流体路径限定了用于所述样品和用于至少一种所述试剂从所述至少一个储存室到所述至少一个基底的传感器的路径,并且

其中所述试剂组件还加入至少一个隔片,其设置为通过至少一个针刺穿以使压缩空气进入以置换来自试剂组件的至少一种试剂从而便于其流到所述基底的至少一个传感器。

2. 根据权利要求1所述的微流控设备,其中,所述基底由金属涂覆的聚合物基板制成。

3. 根据权利要求1所述的微流控设备,其中,使用激光烧蚀在所述金属涂覆的聚合物基板上形成所述传感器。

4. 根据权利要求2所述的微流控设备,其中,通过溅射将金属涂覆于所述聚合物基板上。

5. 根据权利要求2所述的微流控设备,其中,所述聚合物基板由选自金、铱或铂的贵金属涂覆。

6. 根据权利要求1所述的微流控设备,其中,所述至少一个传感器包括至少一个工作电极和至少一个参比电极;多个纳米结构,所述多个纳米结构沉积在所述工作电极上,用于增加所述工作电极的表面积,以及识别元件,所述识别元件与所述纳米结构结合或沉积在所述纳米结构上。

7. 根据权利要求2所述的微流控设备,其中,使用聚合物制成所述聚合物基板;其中,所述聚合物选自聚酯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚醚氨酯、聚砜、聚碳酸酯、氟化聚合物、选自聚氯乙烯的氯化聚合物、聚乙烯或聚丙烯。

8. 根据权利要求6所述的微流控设备,其中,所述工作电极为同心弧、圆、螺旋形或多边形的形式。

9. 根据权利要求8所述的微流控设备,其中,所述工作电极的所述同心弧为山-谷型排列。

10. 根据权利要求8所述的微流控设备,其中,所述工作电极具有2mm至8mm范围内的直径。

11. 根据权利要求6所述的微流控设备,其中,所述纳米结构选自碳纳米管或金纳米颗粒。

12. 根据权利要求11所述的微流控设备,其中,所述金纳米颗粒通过电沉积沉积在所述工作电极上。

13. 根据权利要求11所述的微流控设备,其中,所述碳纳米管为羧化的。

14. 根据权利要求13所述的微流控设备,其中,所述碳纳米管的羧化百分比为3%至5%。

15. 根据权利要求6所述的微流控设备,其中,所述识别元件选自抗原、抗体、酶、适体酶或适体。

16. 根据权利要求6所述的微流控设备,其中,所述传感器任选地包括对电极。

17. 根据权利要求1至权利要求16中的任一项所述的微流控设备,其中,所述基底任选地包括至少一个流体检测传感器和至少一种读取试剂和反应试剂,所述至少一个流体检测传感器形成于所述聚合物基板上,用于检测样品的存在。

18. 根据权利要求1所述的微流控设备,还包括至少一个用于将所述试剂从所述储存室分配至所述基底的导管。

19. 根据权利要求1所述的微流控设备,其中,所述基底作为电化学传感器和所述微流控设备的底层。

20. 根据权利要求1所述的微流控设备,其中,所述垫片为双面压敏粘合剂。

21. 根据权利要求20所述的微流控设备,其中,将所述垫片被激光切割以限定所述流体路径。

22. 根据权利要求1所述的微流控设备,其中,所述垫片的厚度为100 μm 至400 μm 之间,用于所述样品通过所述流体路径的自由流动。

23. 根据权利要求22所述的微流控设备,其中,所述垫片的厚度为 $\geq 200\mu\text{m}$ 。

24. 根据权利要求1所述的微流控设备,其中,所述含有目标分析物的样品选自全血、血清或尿液。

25. 根据权利要求1所述的微流控设备,其中,所述设备为预先校准的并且在所述设备上记载所述校准值。

26. 根据权利要求1所述的微流控设备用于进行化学和生物分析中的至少一种。

27. 根据权利要求26所述的微流控设备,其中,所述设备被用于进行免疫测定。

具有纳米结构电极的生物传感器

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于微流控设备的电化学免疫测定。更具体地,本发明涉及一种用于微流控设备的基底,所述微流控设备用于在生物或化学测定中的检测目标分析物。

背景技术

[0002] 微流控设备,首先开发于20世纪90年代初,最初使用改变自微电子产业的光刻和蚀刻技术在硅和玻璃中制作,这样的微流控设备精确但价格昂贵并且不灵活。这一趋势最近已经走向应用基于印刷和成型有机材料的软光刻制造方法。微流控是指一组控制微量液体流或气体流的技术,通常在小型化的系统中以纳升和皮升测量。哈佛大学的化学与化学生物学马林克罗特教授(Mallinckrodt Professor)乔治怀特塞兹(George Whitesides)说:“不像微电子,其目前的重点在于降低晶体管的尺寸,微流控的重点在于使通道体系更加复杂具有更精细的流体处理能力。”

[0003] 微流控设备可被表征为具有一个或多个通道,所述通道具有至少一个小于1mm的维度。微流控设备中使用的一般流体包括全血样品、细菌细胞悬浮液、蛋白质或抗体溶液及各种缓冲剂。微流控设备可被用来获得各种有趣的测量,包括分子的扩散系数、流体粘度、pH值、化学结合系数和酶反应动力学。微流控设备的其它应用包括毛细管电泳、等电聚焦、免疫测定、流式细胞术、用于通过质谱法分析的蛋白质样品注射、PCR扩增、DNA分析、细胞操作、细胞分离、细胞图形化和化学梯度的形成。这些应用中很多都具有临床诊断的应用。

[0004] 近年来,化学和生化工具的小型化已成为一个扩大的领域。使用微流控设备来进行生物医学研究并产生临床上有用的技术具有许多显著优点。鼓励微流控设备发展的主要因素是对降低分析物的消耗、快速分析和改善自动化能力的需求。进行的越来越多的测定突出了限制分析物消耗的需要。为降低成本,并且限制废物的产生,需要将用于分析的反应物的使用保持尽可能小。

[0005] 此外,传统的检测要求采样,然后转移到实验室。较新的设备提供了可用于进行测定而无需实验室仪器的手持设备。

[0006] 欧洲专利申请公开号1391241公开了一种用于检测目标分析物的微流控设备。所述微流控设备采用固体支持物,其具有样品入口、存储室和微流体通道,将所述固体支持物与所述样品入口和所述存储室连接。印刷的电路板被用作固体支持物,在所述固体支持物上设置检测电极。通过自组装单层设置所述检测电极,所述自组装单层是专用于特定基底的,例如硫醇类。

[0007] PCT申请公开号W02010020574公开了一种用于测定试样(特别是生物样品)的微流控系统。所述微流控系统被配置成允许两种样品(例如测试样品和对照样品)在相同的反应条件下没有交叉污染地进行处理。本发明还涉及包含微流控系统的盒系统,并涉及使用微流控系统或盒系统进行的分析。所述微流控系统包括两个反应槽、将试剂输送到所述反应槽的试剂输送通道、废料通道和用于将一种或多种试剂保持在各反应区的装置,例如磁性的或可磁化的。所述反应槽与废料室连接。所述反应槽具有互连的存储加工成分和样品制

备成分的室。因此,所述设备有太多的互连,非常复杂。

[0008] 美国专利第7419821号公开了一种使用电化学免疫传感器或其它配体/配体受体基的生物传感器测定生物样品中的分析物的单次使用的一次性盒。所述盒包括盒盖、基体和被设置在所述基体和所述盒盖之间的薄膜粘合垫片。在涂覆分析物传感器的液体薄膜中进行分析物测量,并且这样的薄膜测定是通过测量电流进行的。由诸如金、铂或铱的非反应性金属的基体传感器微制造包括免疫传感器的所述盒。

[0009] PCT申请公开号W02004/061418描述了用于进行多个生化分析的盒。所述盒包括具有入口、出口和检测室的流动池。所述入口、出口和检测室限定了通过流动池的流动路径。所述检测室包括多个电极,包括专用工作电极、专用对电极和两个或更多个双用(dual-role)电极,其中每个所述双用电极被用作用于测量测定从属信号的工作电极,并且随后作为用于在所述多个电极中不同的一个电极处测量不同的测定从属信号的对电极。采用适合于盒体材料的制作方法,例如立体光刻、化学/激光蚀刻、整体模制、机加工、层压等在所述盒中形成流体网络。

[0010] 市场上可用的微流控设备是通过使用微机械加工和研磨技术制造的,因此,这些微流控设备昂贵。因此,有必要开发一种廉价的手持式微型测定设备,它可以高敏感和特异地分析一个或多个目标分析物,并对低浓度的分析物提供定性和定量测量。

发明内容

[0011] 本发明提供了一种用于快速筛选和诊断多种疾病的标识物的即时检测、自校准、独立的手持式设备。

[0012] 本发明提供了一种用于微流控设备的基底,所述基底包括聚合物基板;至少一个传感器,所述传感器形成于所述聚合物基板上,并用于检测样品中所含的至少一种目标分析物,其中所述传感器包括至少一个工作电极和至少一个参比电极;沉积在所述工作电极上的多个纳米结构以及与所述纳米结构结合或沉积在所述纳米结构上的识别元件。

[0013] 本发明还提供了包含所述基底的微流控设备,其中所述基底作为微流控设备的底层和电化学传感器。

[0014] 本发明还提供了一种微流控设备,其中本发明的微流控设备还包括试剂组件和用于将基底附着至所述试剂组件的垫片,所述试剂组件由用于含有至少一种分析物的样品的至少一个入口点、用于储存试剂的至少一个储存室和用于处理使用过的试剂的废料室组成。

附图说明

[0015] 为了进一步阐明本发明的上述和其它优点和特征,本发明的更具体的描述将通过参照被示于附图中的其具体实施方式来说明。可以理解的是这些附图只描述了示出的本发明的实施方式,并且因此不应被认为是对其范围的限制。将通过使用附图来描述和说明本发明的附加特征和细节,附图中:

[0016] 图1示出了用于根据本发明的一种实施方式的微流控设备的基底的示意图。

[0017] 图2示出了一种垫片的示意性剖视图,所述垫片附着至用于根据本发明的一种实施方式的微流控设备的基底。

[0018] 图3示出了根据本发明的一种实施方式的微流控设备的等距视图。

[0019] 图4示出了生产的产品的电流测量中所产生的电流(0.2秒)对HbA1c百分比的标准曲线。

[0020] 与下面的描述一起,这些附图说明并解释了微流控设备的原理和在生物或化学测定中使用微流控设备的方法。为清楚起见可以扩展附图中示出的微流控设备的组件的厚度和构造。在不同的附图中的相同附图标记代表相似的、始终必然相同的组件。

具体实施方式

[0021] 定义

[0022] 在详细描述本发明之前,必须理解的是:本发明并不限于本申请中所描述的具体实施方式。也可以理解的是:本文所使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不是意图限制的。

[0023] 如用在说明书和权利要求书中所使用的那样,除非上下文另有明确说明,包括但不限于“一个”、“一种”和“所述”的单数形式术语包括复数形式。除非上下文另有明确说明,复数形式术语包括单数形式。除非另有定义,本文所用的所有科技术语具有本发明所属的技术领域的普通技术人员通常所理解相同含义。

[0024] 根据本发明,术语“纳米结构”指的是具有纳米尺寸并具有部分或完全的纳米效应(如表面效应、尺寸效应)的结构。

[0025] 根据本发明,术语“纳米颗粒(NP)”指的是固体颗粒,其在三维空间中至少有一维的尺寸小于500nm、优选小于100nm、最优地小于50nm。

[0026] 根据本发明,术语“纳米管(NT)”具体指的是直径小于10nm的空心纳米结构。

[0027] 根据本发明,术语“目标分析物”是指其存在、不存在或其量有待测定并且能够与识别元件相互作用的具体物质。可以被检测的所述目标包括但不限于:分子、化合物、复合物、核酸、蛋白质(例如酶和受体)、病毒、细菌、细胞和组织以及它们的成分或片段。示例性地,含有目标分析物的样品包括但不限于:全血样品、血清、尿液、粪便、粘液、唾液和组织等。

[0028] 为了更好地理解,使用具体的示例性细节说明本文所述的本发明。然而,本领域技术人员可以在不使用或通过明显变动如下文所讨论的具体细节的情况下使用所公开的本发明。

[0029] 虽然本发明已被描述为具有具体的设计,本发明可以在本文公开的实质内容和范围内进行进一步改动。因此,本申请意在覆盖使用本发明的大致原理的本发明的任何变化、用途或改动。此外,本申请意在覆盖本发明所涉及领域中的已知或惯例做法范围内所出现的相对于本文公开内容的偏离。

[0030] 本发明涉及一种微流控设备的基底,所述基底包括聚合物基板;至少一个传感器,所述传感器形成于所述聚合物基板上,用于检测样品中所含的至少一种目标分析物,其中所述传感器包括至少一个工作电极和至少一个参比电极;沉积在所述工作电极上的多个纳米结构;以及与所述纳米结构结合或沉积在所述纳米结构上的识别元件。所述纳米结构沉积在所述工作电极上,用于增加所述工作电极的表面积。图1示出了一种微流控设备的基底(用数字100表示)。

[0031] 根据本发明的一个实施方案,如图1中所示的那样,基底(100)包括聚合物基板(用数字110表示)和传感器(用数字120表示),所述传感器形成于所述聚合物基板上,用于检测样品中所含的至少一种目标分析物。

[0032] 根据本发明的一个实施方案,用于聚合物基板(110)的聚合物选自聚酯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚醚氨酯、聚砜、聚碳酸酯或氟化聚合物或氯化聚合物(例如聚氯乙烯)、聚乙烯和聚丙烯。其它的聚合物包括聚烯烃(例如聚丁二烯)、聚二氯丁二烯、聚异戊二烯、聚氯丁二烯、聚偏卤乙烯、聚偏乙烯碳酸盐和多氟化乙烯。也可以使用包括苯乙烯/丁二烯、 α -甲基苯乙烯/二甲基硅氧烷或其它聚硅氧烷(例如聚二甲基硅氧烷、聚苯基甲基硅氧烷和聚三氟丙基甲基硅氧烷)的共聚物。其它替代物包括聚丙烯腈或含丙烯腈的聚合物(例如聚 α -丙烯腈共聚物)、醇酸树脂或萘类树脂、和聚亚烷基聚磺酸酯。然而,用于形成聚合物基板的材料不限于上面列出的那些材料,可以是具有化学和生物稳定性和可加工性的任何材料。

[0033] 根据本发明的一个实施方案,所述传感器包括至少一个工作电极,至少一个参比电极和任选的对电极。这些电极通过使用激光技术(例如激光烧蚀)形成于金属涂覆的聚合物基板上。根据本发明的一个实施方案,通过溅射技术将金属涂覆于聚合物基板(110)上。所述传感器也可以使用丝网印刷技术形成于聚合物基板上。然而,使用本领域中任何其它已知的合适的技术代替溅射法对于本领域的技术人员而言是显而易见的。

[0034] 根据本发明的一个实施方案,涂覆于所述聚合物基板上的贵金属选自金、铂或钯。根据本发明的一个实施方案,用金溅射所述聚合物基板(110),并且使用激光技术将所述传感器烧蚀在所述基板(110)上。可选地,使用丝网印刷将所述传感器印刷在所述聚合物基板。

[0035] 根据本发明的一个实施方案,将多个纳米结构沉积在包括工作电极的所述传感器(120)上,这增加了所述工作电极的表面积。所述工作电极的表面积的增加提高了将要进行的对甚至非常低量的目标分析物测定的灵敏度和准确度。根据本发明的非限制性的示例性纳米结构选自碳纳米管(CNT)或金纳米颗粒。

[0036] 根据本发明的一个实施方案,所述纳米结构为使用电沉积技术沉积于所述工作电极上的金纳米颗粒。在一个实施方案中,所述纳米结构为羧化碳纳米管,并且所述碳纳米管的羧化百分比为3%至5%。

[0037] 根据本发明的一个实施方案,所述传感器的工作电极(120)被烧蚀成同心弧、圆、螺旋形、螺旋或任何多边形的形式以增加纳米结构的沉积。所述“多边形”形状是多边的、封闭的平面形状。所述多边形可以包括三角形(或三角形)、四角形(或四边形)、五边形、六边形、七边形、八边形等等。四角形可以包括正方形和矩形,其具有在四个直角处相连的四条边。四角形也可以包括菱形(例如菱形多边形或平行四边形),其不包括四个直角。根据本发明的一个实施方案,所述工作电极被烧蚀成同心弧的形式。所述工作电极的同心弧以山-谷型排列,提供了更好的纳米结构沉积。所述工作电极具有2mm至8mm范围的直径。

[0038] 沉积于所述工作电极的纳米管进一步与识别元件结合或沉积有。使用偶联化学(例如1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)的偶联化学)将所述识别元件结合于纳米管。所述识别元件的非限制性的实例为抗原、抗体、酶、适体酶和适体。

[0039] 根据本发明的一个实施方案,包含目标分析物的样品选自包含全血、血清和尿的

组。

[0040] 根据本发明的一个实施方案,所述基底任选地包括至少一个流体检测传感器和至少一种试剂,所述至少一个流体检测传感器形成于所述聚合物基板上,用于检测分析物的存在,所述至少一种试剂包括读取试剂或反应试剂。

[0041] 所述读取试剂是用于酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的诸如羰基磷酸酯的电化学基底溶液。所述反应试剂是用于ELISA中的酶标记的含有共轭物或二级抗体的试剂。

[0042] 计时电流法是电化学测量技术,由此将适当电压施加于工作电极和参比电极,并且测量所述工作电极和所述参比电极之间电化学反应所产生的电流。

[0043] 本发明还涉及一种包含根据本发明的基底、试剂组件和用于将所述基底附着至所述试剂组件的垫片的微流控设备。

[0044] 根据本发明的另一个实施方案,所述微流控设备(用数字300表示)表示于图3中。所述微流控设备的基底(100)提供双重目的,其中所述基底作为用于微流控设备的底层并且也作为电化学传感器。

[0045] 根据本发明的另一个实施方案,图2表示将所述基底(100)附着至所述试剂组件的垫片。根据本发明,所述垫片为双面压敏粘合剂。将所述垫片激光切割以限定样品和所述试剂通过所述基底上的微流体通道从所述组件到所述基底(100)的所述传感器(120)的流体路径。所述垫片作为所述试剂组件和沿着用于所述样品流的微流体通道的基底之间的间隔物。所述垫片的厚度为100 μ m至400 μ m之间。在本发明的一个实施方案中,所述垫片的厚度为 $\geq 200\mu$ m。通过所述基底上的微流体通道和所述垫片的所述样品(用数字210表示)、所述试剂的流动是通过毛细作用。

[0046] 根据本发明的另一个实施方案,所使用的试剂和所述样品随后通过转储(用数字240表示)被分配到微流控设备的废料室中。

[0047] 所述基底的连接器区域(用数字250表示)有助于将微流控设备中的基底定位于微流控设备的槽之中。

[0048] 图2中示出的附着于垫片一侧的基底(100)被定位于为试剂组件(用数字310表示)中的基底所设置的槽之中。所述试剂组件包括用于含有至少一种目标分析物的样品的入口点(用数字315表示)、用于存储试剂的储存室(用数字320表示)、以及用于处置用过的试剂的废料室(用数字325表示)。

[0049] 表示微流控设备的图3包括两个储存室,第一储存室(320)和在所述第一储存室的另一侧的第二储存室;一个储存室用于储存反应试剂,另一个用于储存读取试剂。所述第一储存室和所述第二储存室通过将反应试剂和读取试剂分开的分隔物而形成。然而,根据将要进行的测定的类型,可以有一种以上的反应试剂和读取试剂。此外,可能有一个以上用于存储反应试剂的储存室。对于储存室的数量或位置,本发明不限制。所述布置可以根据将要进行的测定而变化,这对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0050] 根据本发明的另一个实施方案,所述微流控设备还包括至少一个用于将试剂从储存室分配至基底的导管。如图3中所示的微流控设备包括两个导管,用于将所述反应试剂和所述读取试剂分配至所述基底的各一个。第一导管(用数字330表示)用于将来自第一储存室(320)的反应试剂分配至所述基底,并且第二导管被定位于所述第一导管的后面并用于将来自第二储存室的读取试剂分配至所述基底。

[0051] 根据本发明的另一个实施方案,所述微流控设备还包括用针刺穿的压缩空气入口隔片(用数字335表示)。所述压缩空气置换存储在储存室中的试剂,并允许所述试剂通过所述导管流进所述基底。

[0052] 根据本发明的另一个实施方案,所述微流控设备还包括试剂室中的孔,所述基底被设置为(用数字305表示)用于样品(用数字340表示)、反应试剂(用数字345表示)和读取试剂(用数字350表示)的进入。

[0053] 根据本发明的另一个实施方案,含有目标分析物的样品、反应试剂和读取试剂流过所述试剂室中的各孔,通过由所述垫片提供的微流体通道至所述基底上的(多个)所述传感器。存在于样品中的目标分析物与结合在纳米结构上的识别元件结合,并产生信号,其可以用于定量地和/或定性地检测分析物。用于检测目标分析物的方法将根据检测的类型而有所不同,这对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0054] 根据本发明的实施方案,能够从样品中检测多种目标分析物。根据感兴趣的目标分析物选择识别元件。

[0055] 根据本发明,所述“识别元件”是指任何能够与目标分子相互作用的化学品、分子或化学系统。所述识别元件可以是,例如,但不限于,抗体、抗体片段、肽、蛋白质、糖蛋白、酶、核酸(例如寡核苷酸、适体、DNA、cDNA和RNA)、有机和无机分子、糖类、多肽和其它化学品。

[0056] 根据本发明的实施方案,本发明的微流控设备是自校准的。基底上的每个传感器都是预先校准的并且在所述设备上将记载(各)校准值。

[0057] 根据另一个实施方案,本发明涉及使用所述微流控设备进行至少一种化学和生物分析的用途。

[0058] 根据一个实施方案,所述微流控设备被用于进行免疫测定。

[0059] 免疫测定结合了对于感兴趣的分析物的具体和灵敏的检测的化学和免疫学的原理。这种测定的基本原理是抗体-抗原反应的特异性。在诸如血清或尿的生物液体(样品)中的分析物通常通过免疫测定方法进行检测。在本质上,该方法依赖于以下事实:已知所讨论的分析物会经历与第二种物质的独特的免疫反应,所述第二种物质被用来确定分析物的存在和量。这种类型的反应涉及一种类型的分子(所述抗原)与第二种类型分子(所述抗体)的结合。免疫测定被广泛地用于使用抗体检测分析物。大多数免疫测定是异相的:抗原-抗体复合物结合于固体基底,并且通过洗涤去除游离的抗体。在均相免疫测定中,游离的抗体和结合的抗体不需要通过固体基底进行分离。这些类型的程序将洗涤步骤和流体处理最小化,但是它们需要游离的抗体和抗原结合的抗体显示出不同的电泳迁移率。均相免疫测定的微型化提供了一些优点,但对于异相免疫测定小型化已做的工作多于均相免疫测定。

[0060] 在酶联免疫吸附测定(ELISA)开发之前,使用放射性标记的抗原或抗体的放射免疫分析曾是唯一可用的进行免疫测定的选择。Elisa是一种“湿实验室”型分析生物化学测定的普遍形式,其使用一种亚型的异相、固相酶免疫测定(EIA)来检测液体样品或湿样品中的物质的存在。通常在96孔或384孔的聚苯乙烯板中进行Elisa,所述聚苯乙烯板将被动地结合抗体和蛋白质。试剂的结合和固定化使Elisa很容易设计和进行。固定于微孔板表面的Elisa反应物使得将结合材料从未结合材料分离变得容易,使得Elisa成为测量粗制剂中的特定分析物的有力工具。

[0061] 因此,本文下面将简要描述制备由捕获抗体固定的用于分析的传感器的方法:

[0062] 步骤I:清洁传感器

[0063] 使用金清洗液(GCS)清洗激光烧蚀的传感器。为了清洗,将传感器浸入GCS:DI水(1:1)的溶液中5分钟,然后用脱矿质水(DI水)彻底清洗。

[0064] 步骤II:用传导剂涂覆传感器,即将COOH-CNT滴涂于金溅射的传感器表面上

[0065] 将COOH-CNT加入至0.1M的二乙醇胺缓冲液中制备多壁羧化碳纳米管(COOH-CNT)溶液,以得到20mg/ml的最终浓度。将6 μ l的COOH-CNT溶液滴涂于所述传感器的金表面(其被用作参比电极)上。将COOH-CNT在60℃下干燥10分钟。

[0066] 步骤III:捕获Mc Hb的固定化

[0067] 将捕获抗体(单克隆抗Hb抗体)通过EDC-NHS偶联固定在COOH-CNT上。首先,通过用EDC-NHS处理COOH-CNT表面30分钟接着加入30 μ l的捕获抗体(50mg/ml)来激活COOH-CNT表面。在室温下进行3小时抗体固定化。在室温下用Stabilcoat或1%的BSA封闭30分钟。除去过量的Stabilcoat,用磷酸盐缓冲液清洗,并在N₂气氛下2-8℃下存储,直到进一步使用。

[0068] 实施例

[0069] 制备用于微流控设备的基底

[0070] 用金溅射聚酯的聚合物基板。使用激光烧蚀在聚合物基板上形成包括工作电极、参比电极和对电极的传感器。工作电极形成为2mm至8mm直径的同心弧形状。将含有CNT的溶液(3-5 μ l)倒在传感器上,并干燥所述溶液。使用偶联化学将CNT结合到所述工作电极上,其中CNT的羧基基团与识别元件(例如HbA1c抗体)耦合。将基底通过连接器装配于微流控设备中。

[0071] 使用微流控设备的HbA1c测试

[0072] 将稀释的血液样品(100 μ l)(通过制造商的稀释剂将1 μ l的血液样品稀释至100 μ l)倾倒在包括基底的微流控设备。使含有HbA1c抗原的血液样品通过毛细管作用流进微流体通道并与已经存在于基底上的HbA1c抗体反应,所述HbA1c抗体与所述羧化纳米管耦合。使血液样品温育5分钟,而后将反应试剂通过微型电磁泵设备泵入。然后泵入读取试剂以得到电化学读数。基底上的流体检测传感器使所述设备知道血液样品或反应试剂或读取试剂存在于电化学传感器的前面。

[0073] HbA1c的测定

[0074] 使用HbA1c对照

[0075] 将2 μ l的HbA1c对照样品(例如L1(4.78%浓度的HbA1c)、L2(7.37%浓度的HbA1c))与198 μ l的裂解剂混合。在这种情况下使用在磷酸盐缓冲液中制备的1mM的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)。

[0076] 使用全血样品

[0077] 将2 μ l的全血样品与198 μ l的裂解剂混合。在这种情况下使用在磷酸盐缓冲液中制备的1mM的CTAB。

[0078] 将50 μ l的稀释样品加到所述传感器上,并在室温下温育5分钟。

[0079] 用PBT(磷酸盐缓冲液,pH 7.0,含有0.002%的吐温20)洗涤传感器两次。

[0080] 将30 μ l的共轭二级抗体(10mg/ml Mc HbA1c)加到所述传感器上,并在室温下温育5分钟。

- [0081] 随后用PBT (磷酸盐缓冲液, pH 7.0, 含有0.002%的吐温20) 洗涤传感器两次。
- [0082] 将50 μ l的基底、10mM的对萘基磷酸盐加到所述传感器上, 并在室温下温育2分钟。
- [0083] 记录生产出来的产品 (萘酚) 的电流测量值。
- [0084] 所产生的电流 (在0.2秒) 对HbA1c%的标准曲线被绘制在图4中。
- [0085]

对照-HbA1c%	在0.2秒的平均电流 (μ A)
4.78	13.930
7.37	17.620
11.1	28.565
15.1	32.910

[0086] 本发明的微流控设备是一种用于快速筛选和诊断多种疾病标识物的自校准的、独立的手持式设备。它也是在灵敏度和特异性方面具有高性能的设备, 这增加了定量测量全血/血清中低浓度的疾病标识物的优势。此外, 本发明的设备不昂贵, 因为它不需要任何用于生产设备的微处理。本发明的设备是“盒上的实验室”, 因为它执行了实验室仪器的所有功能。

[0087] 在以上描述中, 所公开的实施方案的一些具体细节, 诸如具体的材料、设计等是出于解释的目的而不是限制而列出的, 以便提供对于本发明的清楚和透彻的理解。然而, 本领域技术人员应当容易地理解: 可在其它实施方案中实施本发明而不背离由所附的权利要求所阐明的本公开的实质内容和范围。

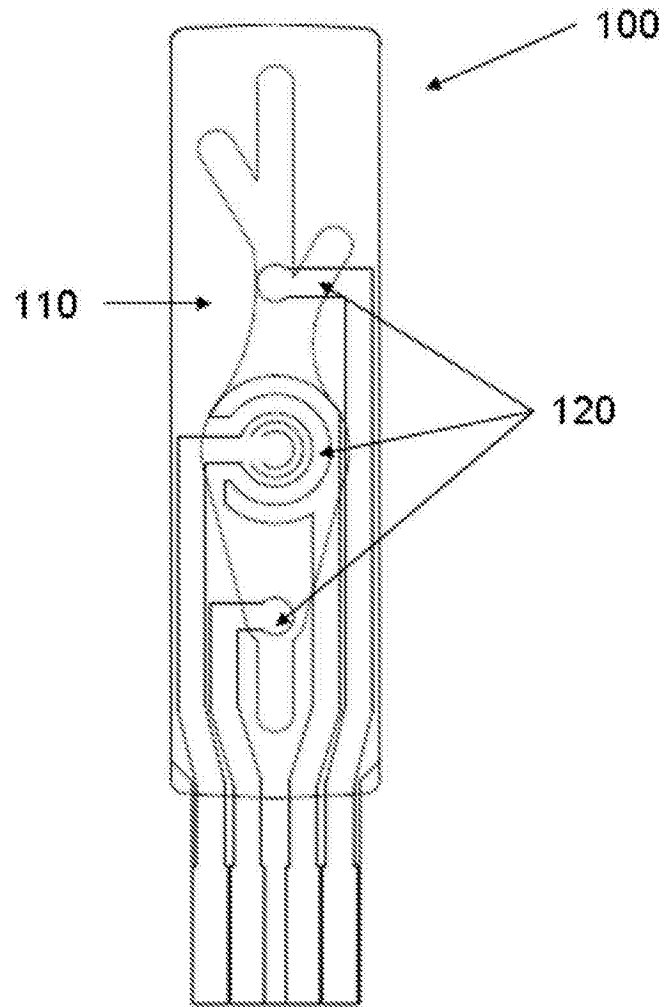


图1

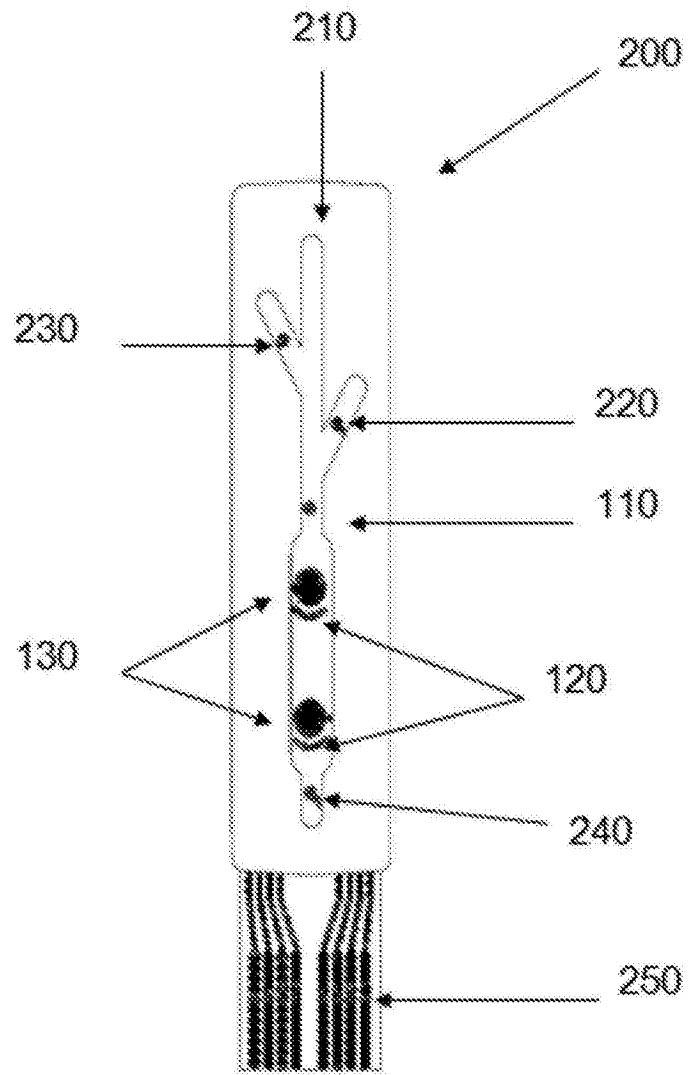


图2

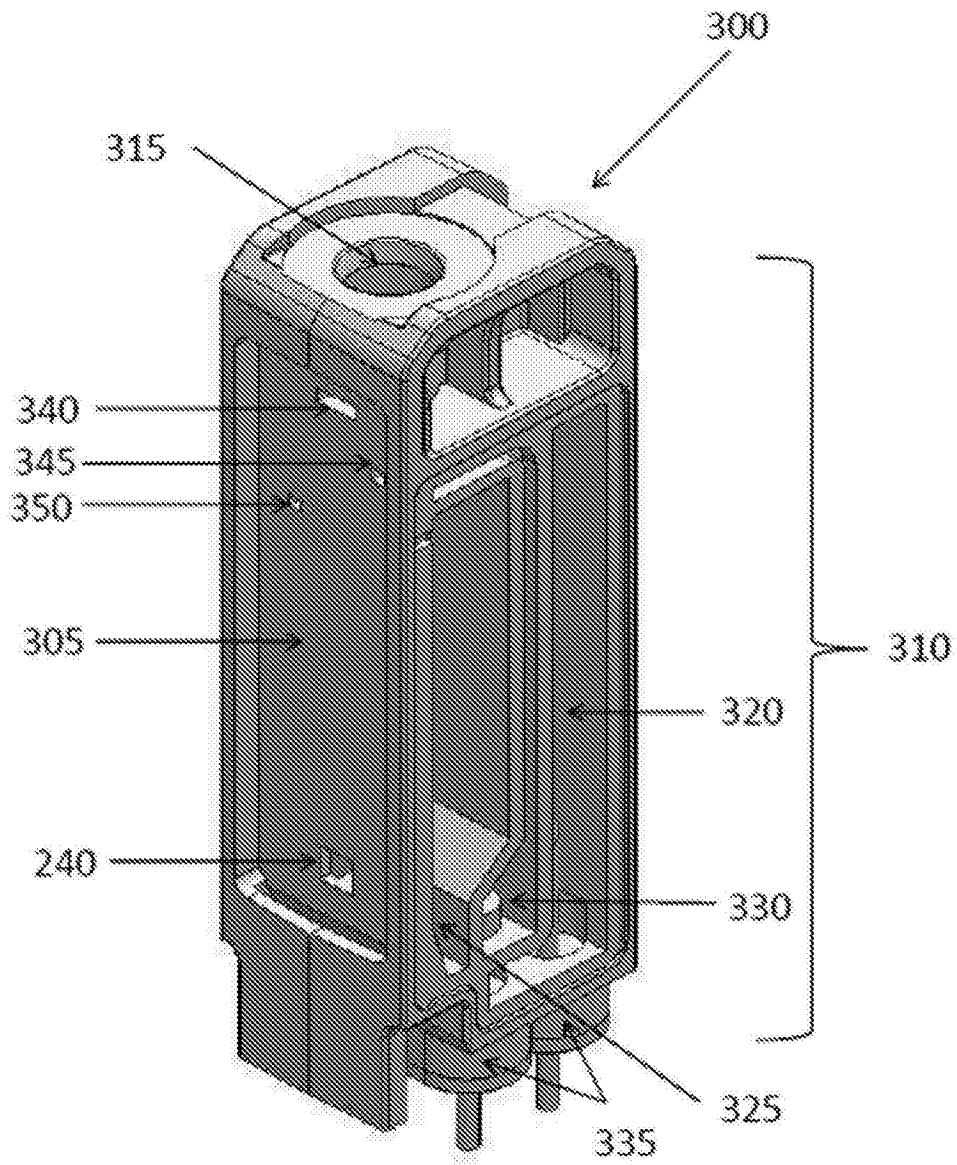


图3

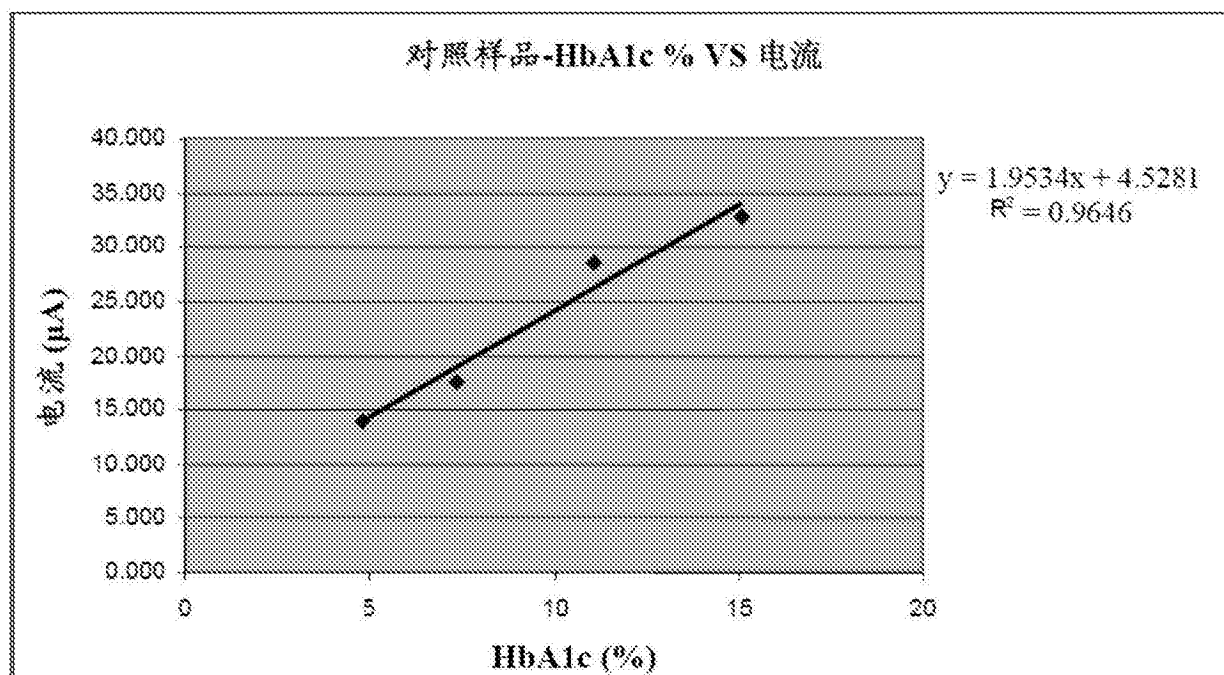


图4