



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104931688 B

(45)授权公告日 2019.05.17

(21)申请号 201510222096.0

(22)申请日 2015.04.30

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104931688 A

(43)申请公布日 2015.09.23

(73)专利权人 南开大学  
地址 300071 天津市南开区卫津路94号

(72)发明人 周文远 晏敏 李志莉 刘艳格  
田建国

(51)Int.Cl.  
G01N 33/543(2006.01)  
C12M 1/34(2006.01)

(56)对比文件  
CN 101206215 A,2008.06.25,  
CN 103344753 A,2013.10.09,  
CN 101493411 A,2009.07.29,  
CN 103616362 A,2014.03.05,  
CN 201060167 Y,2008.05.14,  
US 7142758 B1,2006.11.28,  
EP 1345069 A2,2003.09.17,  
Kristyna Pospiskova et al.,.Magnetic

particles-based biosensor for biogenic amines using an optical oxygen sensor as a transducer.《Microchim Acta》.2012,第180卷

代方 等.基于纳米磁珠放大的高灵敏度纳米光纤生化传感器.《光学学报》.2014,第34卷(第12期),

但德忠 等.新型荧光光纤免疫磁珠流动分析系统研究.《分析测试学报》.2000,第19卷(第2期),

YU ZHAO et al.,.Simultaneous Detection of Multifood-Borne Pathogenic Bacteria Based on Functionalized Quantum Dots Coupled with Immunomagnetic Separation in Food Samples.《J. Agric. Food Chem.》.2009,第57卷

Xiao-Li Su and Yanbin Li.Quantum Dot Biolabeling Coupled with Immunomagnetic Separation for Detection of Escherichia coli O157:H7.《Anal. Chem.》.2004,第76卷

审查员 杨玉路

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

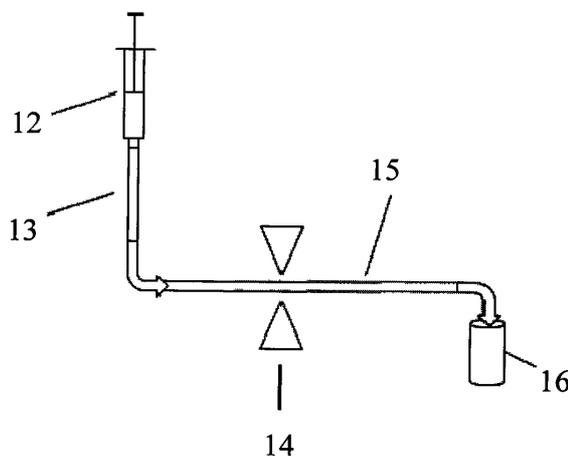
## (54)发明名称

一种微结构光纤生物芯片及其制作方法

## (57)摘要

本发明涉及一种在空芯微结构光纤纤芯环壁内表面上利用纳米磁珠分段固定生物分子探针的一维生物芯片及其制作方法,可以用来检测蛋白质、核酸等生物分子。本发明所述的微结构光纤生物芯片由空芯微结构光纤、纳米磁珠和探针构成。所述的空芯微结构光纤包含一个中心空气孔和至少一圈外围空气孔构成,中心空气孔的环壁厚度在纳米量级,所述纳米磁珠直径在100nm以下,所述生物分子探针可以包括DNA、RNA、抗原或抗体等。其制作步骤包括:1)纳米磁珠和光纤预处理;2)纳米磁珠偶联分子探针;3)利用磁场和流体在微结构光纤纤芯环壁上依次

分段固定纳米磁珠;4)修饰、清洗和固化;5)保存。主要优势是可以受激辐射荧光进行检测,大幅度提高检测灵敏度。



1. 一种微结构光纤生物芯片,其特征在于,所述的微结构光纤生物芯片包括,空芯微结构光纤,纳米磁珠和生物分子探针,纳米磁珠连接生物分子探针,连接有不同生物分子探针的纳米磁珠被依次分段固定在微结构光纤纤芯环壁的内表面上,形成一维生物芯片;所述的空芯微结构光纤包含一个中心空气孔和至少一圈外围空气孔构成,中心空气孔的环壁厚度小于1微米。

2. 根据权利要求1所述的微结构光纤生物芯片,其特征在于,所述纳米磁珠直径在100nm以下。

3. 根据权利要求1所述的微结构光纤生物芯片,其特征在于,所述的生物分子探针包括DNA、RNA、抗原或抗体。

4. 一种如权利要求1所述微结构光纤生物芯片的制作方法,其特征在于,该方法的实现步骤包括:1) 纳米磁珠清洗和稀释;2) 对微结构光纤进行选择性填充,仅保留纤芯孔畅通;3) 纳米磁珠偶联特定的分子探针;4) 在磁场和流体作用下,将连接有上述分子探针的纳米磁珠固定到微结构光纤纤芯环壁的选定位置;5) 更换分子探针和磁场光纤位置,重复步骤3和步骤4,直至形成预先设定的分子探针阵列;6) 对生成的探针阵列进行进一步的修饰和清洗;7) 固化;8) 保存。

## 一种微结构光纤生物芯片及其制作方法

### 所属技术领域

[0001] 本发明涉及生物芯片领域,特别是微结构光纤生物芯片。

### 技术背景

[0002] 生物芯片技术是近年来生命科学领域发展起来的一项新技术,生物芯片的出现引起了国际上的广泛关注。常见的生物芯片包括基因芯片、蛋白质芯片、芯片实验室、细胞芯片、组织芯片、糖芯片及其他类型生物芯片等。生物芯片技术是将微加工技术、微电子技术和分子生物学相结合,在固相介质表面构建微型阵列结构的生物化学分析系统,通过将待测未知目标与芯片上已知探针“杂交”,通过空间分辨确定未知分子。与传统的分析技术相比,生物芯片技术具有明显的优势。生物芯片上集成了成千上万密集排列的分子探针阵列,可以一次性对样品中多种不同物质进行检测和分析,具有高效率、高通量、高速度和并行检测优势,检测效率是传统检测手段的成千上万倍。生物芯片技术被认为是继20世纪大规模集成电路之后的又一次具有深远意义的科学技术革命。在实际应用方面,生物芯片技术广泛应用于基因测序、疾病诊断和治疗、药物筛选、法鉴定、检验检疫、环境检测等许多领域。但是现有的生物芯片技术也存在一些亟待解决的问题,包括技术复杂成本高,重复性差,检测灵敏度低等缺点。现有的二维阵列生物芯片的检测需要高速精密二维扫描,无法保证足够多的探测积分时间以提高信噪比;激发光和发射光之间呈零度,带来严重的背景噪声;荧光的发射来自于自发辐射效应,荧光的转换效率非常低。在本发明中,我们将生物芯片技术与微结构光纤技术相结合,公开了一种新型的微结构光纤生物芯片。

[0003] 微结构光纤(microstructured optical fiber,MOF)也称空洞光纤,包括光子晶体光纤,是十几年前出现并快速发展起来的一种十分引人注目的新型光纤。它可以由单一介质构成,并且它在横截面方向上有紧密排列的波长量级空气孔,它们构成光纤的微结构包层,而且在光纤轴向基本保持不变。由于其灵活多变的空气孔包层分布,使它具有普通光纤所无法比拟的许多“奇异”特性。特别是纤芯及包层的空气孔为光与物质的相互作用、波导与材料科学的有机结合提供了空间和条件,这使得它在光与物质相互作用特殊环境构建、各种物质性质研究、光传感等领域具有非常广阔的应用空间。在传感领域,通过毛细管效应或外部压力将被测样品填充到MOF内部的空气孔中,被测样品可以和光波以非常大的交叠截面和非常长的作用距离进行相互作用,从而极大地增加光学检测灵敏度。微结构光纤的另一个突出优势是它具有受激辐射放大能力,可以大幅度提高荧光的转换效率。

[0004] 在微结构光纤内部构建类似于二维生物芯片的分子探针点阵,通过空间分辨进行分子识别目前未见报道。因为微结构光纤的空气孔的直径通常在几微米至几十微米之间,通过点样的方式在这样小的尺度下进行探针固定是不可行的。由于微结构光纤的基质材料主要是石英,在探针固定之前必须对其进行活化处理,以便于探针的固定,提高探针与被测分子之间的特异性结合效率,减少被测分子与孔壁之间的非特异性结合机会。由于微结构光纤空气孔的直径非常小,在微结构光纤内部进行活化处理的效果难以达到要求,从而直接影响了在纤芯环壁内表面上固定探针的可靠性。用微珠固定探针后再填充到光纤内部是

另一种可选择方案。但是这种微珠的直径通常很大,对于激发光有很强的散射作用,给最终的光学检测带来严重的背景噪声。更重要的是这种基于微珠的探针固定技术不能将探针置于纤芯环壁100纳米之内,形成有效的光学隔离,更无法产生微腔效应形成受激辐射放大,检测灵敏度难以提高。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的是针对上述情况,提出一种微结构光纤生物芯片,提供一种高激发效率、高荧光转换效率,低背景干扰,易检测的新型一维生物芯片。

[0006] 本发明所述的微结构光纤生物芯片,是一种在空芯微结构光纤纤芯环壁内表面上利用纳米磁珠分段固定生物分子探针的一维生物芯片,可以用来检测蛋白质、核酸等生物分子。本发明的微结构光纤生物芯片由空芯微结构光纤、纳米磁珠和分子探针构成。所述的空芯微结构光纤包含一个中心空气孔和至少一圈外围空气孔构成,中心空气孔的环壁厚度在纳米量级,优选100纳米-500纳米,能够产生微腔受激辐射效应;所述纳米磁珠直径在100纳米以下,材料优选四氧化三铁,能够在磁场和流体的作用下附着在纤芯环壁的内表面,被微结构光纤中传播的倏逝波激发,同时避免对激发光的散射;所述生物分子探针包括DNA、RNA、抗原或抗体等,分子探针被链接到纳米磁珠上,并进一步借助于纳米磁珠固定到微结构光纤纤芯环壁的内表面上。

[0007] 其中微结构光纤中心空气孔的直径不做特别限制,推荐10微米-30微米;微结构光纤的外径和长度不做特别限制。首先用纳米磁珠作为固相载体,链接生物分子探针。在磁场和流体作用下,将链接有不同分子探针的磁珠依次按照预先设定的次序分段固定在空芯微结构光纤纤芯环壁的内表面上,形成一系列一维的敏感段阵列,段与段之间留有间隔,构成一维生物芯片。检测时将由荧光探针标记的被测样品以一定速度流入该生物芯片的光纤中心孔,分子探针与未知分子之间产生特异性反应并产生富集效应,进一步通过检测不同敏感段上反应后的荧光强度,确定未知样品的含量。

[0008] 本发明具有如下优点:

[0009] 1) 激发光能够以倏逝波方式激发荧光,可降低背景干扰两个数量级以上。

[0010] 2) 激发光与被测样本之间相互作用的交叠积分大,距离长,光波能量高度集中,激发效率高。

[0011] 3) 具有光学隔离功能。由于倏逝波的作用范围仅仅局限在微结构光纤纤芯附近介质表面波长范围内并按指数规律衰减,于是在探测溶液中自动形成了一种光学隔离,简化了传统生化检测中繁冗复杂的清洗步骤,加快了探测速度。

[0012] 4) 光学信号检测只做一维扫描即可,检测方便、检测仪器成本低,灵敏度高。

[0013] 5) 能够利用微结构光纤的纤芯环壁产生谐振腔,实现受激辐射放大,显著提高荧光转换效率,从而大幅度提高检测灵敏度。

[0014] 6) 因为分子探针固定在光纤内部,因此易保存,可靠性好,不易损坏。同时操作方便,干扰小,便于集成到微流路系统中。

## 附图说明

[0015] 图1微结构光纤生物芯片的示意图;

- [0016] 图2是一种简易型空心微结构光纤的横截面图；
- [0017] 图3是微结构光纤生物芯片的纳米磁珠-分子探针阵列局部放大示意图。
- [0018] 图4是微结构光纤生物芯片检测示意图。
- [0019] 图5是一种微结构光纤生物芯片制备方法过程图
- [0020] 图中：1是基质材料；2是外围空气孔；3是中心空气孔（纤芯）；4是中心空气孔环壁（纤芯环壁）；5是纳米磁珠-分子探针一维阵列；6是纳米磁珠；7是分子探针A；8是分子探针B；9是被测分子a；10是被测分子b；11是荧光分子；12是重力灌流器；13是聚四氟乙烯微管；14是磁场装置；15是微结构光纤；16是废液收集器。

### 具体实施方式

- [0021] 下面结合附图对本发明做进一步描述。
- [0022] 本发明所说的一种微结构光纤生物芯片（参见说明书附图1）是在微结构光纤纤芯环壁内表面上固定探针，形成一维探针阵列5；所说的微结构光纤在基质材料1上包含有多个沿轴向延伸的空气孔，包括中心空气孔3和至少一圈外围空气孔2；在中心空气孔和外围空气孔之间包含一层纳米量级的纤芯环壁4；所说的纳米磁珠-分子探针就固定在纤芯环壁4的内表面上。所说的纳米磁珠6的直径在100纳米以下，磁珠上修饰有分子探针7和8；被测分子9和10分别能与7和8产生特异性反应，被测分子和荧光分子11相结合，形成靶标；含有靶标的待测溶液通过压力或毛细效应流入微结构光纤的纤芯内部，与探针相结合并形成富集效应，将分子含量信息转化为可空间分辨的光强信息，从而检测出被测样品的含量。
- [0023] 下面通过实例对本发明进行说明。
- [0024] 实施例1：
- [0025] HLA-DRB寡核苷酸微结构光纤生物芯片及其制备
- [0026] 1) 光纤的准备
- [0027] 取一段微结构光纤，采用选择性填充方法将外围空气孔堵住，只保留中心空气孔畅通。
- [0028] 2) 纳米磁珠的准备
- [0029] 取羧基化的直径为15纳米的磁珠1毫克，清洗3次，调整PH值到等电位点，使纳米磁珠充分分散。
- [0030] 3) 将纳米磁珠与探针偶联
- [0031] 将设计并合成好的HLA-DRB探针与纳米磁珠充分混合反应，洗脱未反应的试剂。
- [0032] 4) 微结构光纤生物芯片的制作
- [0033] 将反应好的纳米磁珠-分子探针溶液加入重力灌流器12，经聚四氟乙烯微管13流入微结构光纤15的纤芯孔。在微结构光纤的特定位置通过磁场装置14产生高度集中的磁场分布，使纳米磁珠停留在该位置，干燥后可牢固吸附。更换分子探针并移动磁场位置，可以制作出另一个探针点，依次类推。然后依次经过修饰、清洗、干燥固化和保存等手续，实现最终的微结构光纤生物芯片。
- [0034] 5) 样本预处理
- [0035] 在本发明中基因组DNA样本经过混合、扩增、荧光标记等预处理过程，在外力或毛细作用下流入微结构光纤生物芯片内，进行杂交反应。

[0036] 6) 检测

[0037] 杂交反应后,经过进一步清洗,将激发光耦合到光纤中,依次检测生物芯片阵列上不同点的荧光信号大小,确定样本的HLA-DRB基因亚型。

[0038] 实施例2

[0039] HbsAg检测微结构光纤生物芯片

[0040] 在上面的纳米磁珠与探针偶联的实施步骤3中,采用类夹心法的磁联免疫分析方法,借助磁性颗粒为固相载体,通过链霉亲和素和生物素结合作用,以量子点为标记物。链霉亲和素和生物素之间是一种特殊的作用力,它们之间的结合力极强,结合速度快且结合效率高。首先将磁珠与链霉亲和素偶联,抗HbsAg与生物素偶联,通过链霉亲和素和生物素结合作用将磁珠和抗HbsAg固定在一起。在上面的样本预处理的步骤5中,用量子点标记被测样本,然后通过抗原抗体反应检测样品中是否存在被测物质。

[0041] 虽然结合目前认为最实际且最佳的实施例描述了本发明,不过本发明不限于所公开的实施例,而意在覆盖所附权利要求的精神和范围之内所包括的多种变形和等效装置。

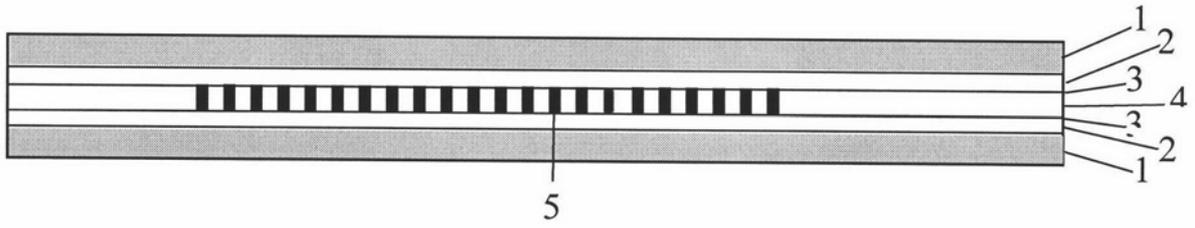


图1

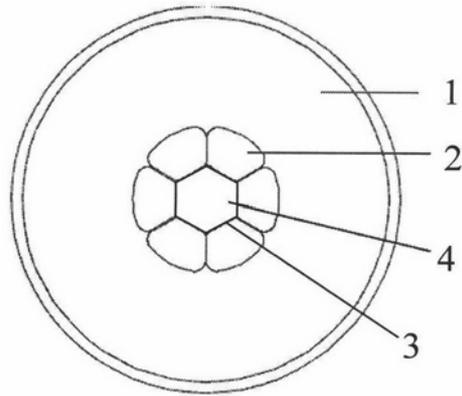


图2

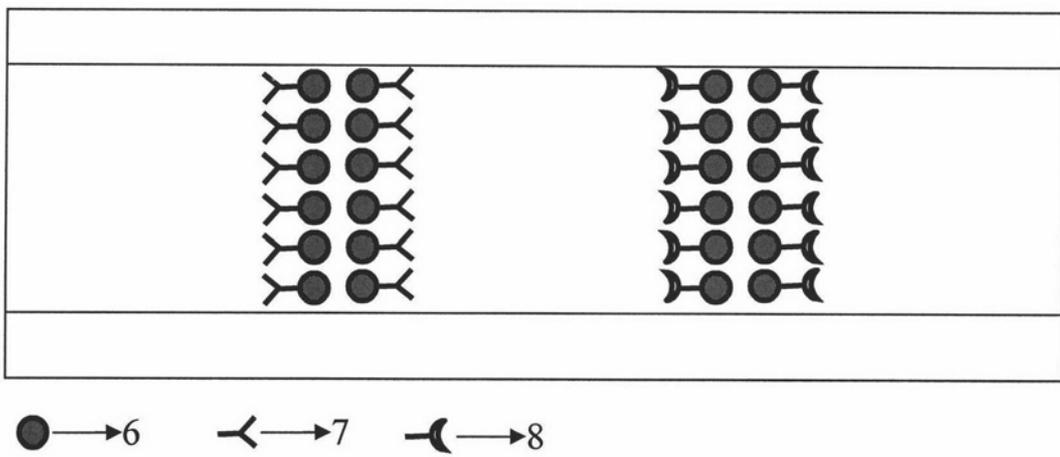


图3

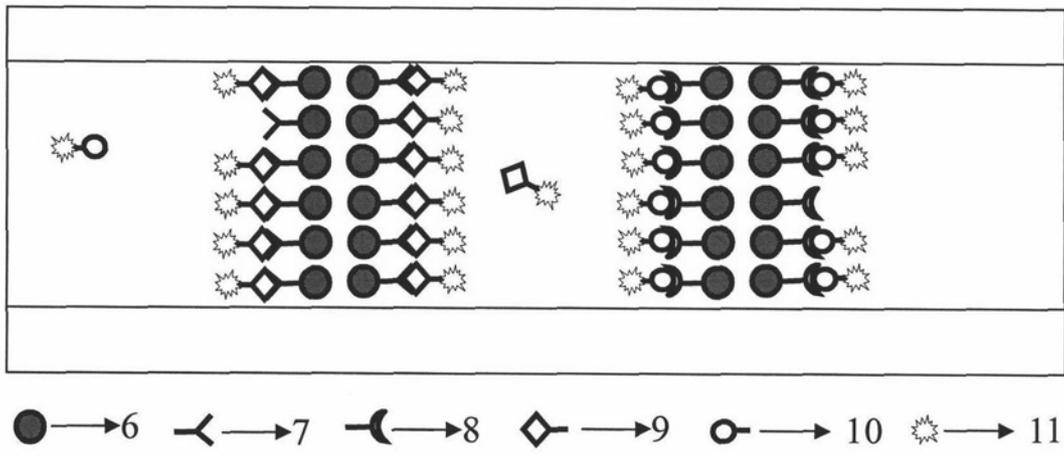


图4

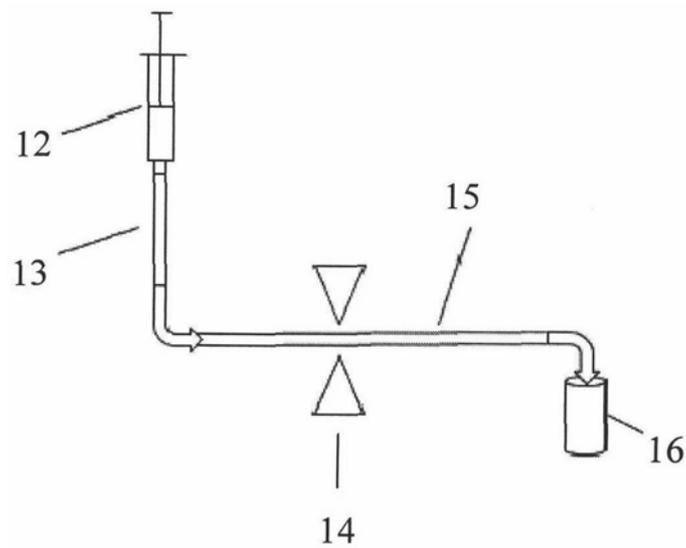


图5