



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112698024 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 26

(21) 申请号 202011422402.2

(22) 申请日 2020.12.08

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112698024 A

(43) 申请公布日 2021.04.23

(73) 专利权人 华中农业大学
地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72) 发明人 陈翊平 周阳 王知龙

(74) 专利代理机构 武汉智嘉联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 42231
代理人 徐绍新

(51) Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/546 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)
G01N 15/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 111398137 A, 2020.07.10
CN 108485972 A, 2018.09.04
CN 104941704 A, 2015.09.30
CN 109689212 A, 2019.04.26
CN 101349690 A, 2009.01.21
CN 208239338 U, 2018.12.14
CN 104011866 A, 2014.08.27
US 6437551 B1, 2002.08.20
孙颜振. 基于微流控芯片的线虫计数和分类.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)基础科学辑》.2017, (第06期), A006-245.
Jaan Ojarand等.Multichannel Electrical Impedance Spectroscopy Analyzer with Microfluidic Sensors.《Sensors》.2019, 第19卷(第8期), 第1-28页.

(续)

审查员 刘莉丹

权利要求书1页 说明书9页 附图4页

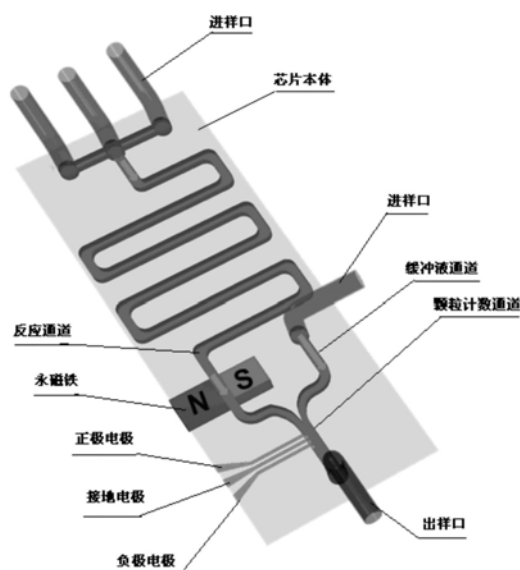
(54) 发明名称

一种基于差分阻抗颗粒计数的免疫分析方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于差分阻抗颗粒计数的免疫分析方法,包括以下步骤:1)以高分子绝缘微球为信号探针,将生物识别分子与绝缘微球偶联,然后将待测目标物与生物识别分子进行免疫反应,使绝缘微球的粒径和数量发生变化;2)将反应液注入颗粒计数通道,同时向通道内高速注入缓冲液,基于流体力学原理形成层流,使反应液中的绝缘微球稳定有序地通过计数通道;3)在颗粒计数通道的两端设置正、负电极,收集电势信号,经放大、滤波处理后对绝缘微球的粒径和数量进行分析,进而得到待测目标物的含量。本发明具有检测成本低、操作便利,不会造成通道堵塞,无需反复清洗排堵等优点,极大地提高了检测效率,而且还具有较好的准确性和抗干扰能力。

CN 112698024 B



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

周侗.旁通型微流控阻抗脉冲颗粒检测研究.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)工程科技II辑》.2020,(第06期),C036-162.

Song, Yongxin等.Counting bacteria on a microfluidic chip.《ANALYTICA CHIMICA ACTA》.2010,第681卷(第1-2期),第82-86页.

吴志成等.基于微流控技术的细胞分析仪研

制及其应用.《集成技术》.2020,第9卷(第06期),第13-20页.

David Holmes等.Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry.《LAB ON A CHIP》.2009,第9卷(第20期),第2881-2889页.

1. 一种基于差分阻抗颗粒计数的免疫分析方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 以高分子绝缘微球为信号探针,将生物识别分子与高分子绝缘微球偶联,然后将待测目标物与其对应的生物识别分子进行免疫反应,使高分子绝缘微球的粒径和数量发生变化;

2) 将反应液注入颗粒计数通道,同时向颗粒计数通道内高速注入缓冲液,基于流体力学原理形成层流,使反应液中的高分子绝缘微球稳定有序地通过颗粒计数通道;

3) 在颗粒计数通道的两端设置正、负电极,高分子绝缘微球通过时导致电极间的阻抗变化,进而导致电极间的电势信号发生变化,收集电势信号,经放大、滤波处理后对高分子绝缘微球的颗粒粒径和数量进行分析,进而得到待测目标物的含量,

所述高分子绝缘微球的粒径为1 μm 或3 μm ,高分子绝缘微球是聚苯乙烯微球或聚丁二烯微球或聚异戊二烯微球;所述颗粒计数通道的内径为10-100 μm ;

所述颗粒计数通道内,缓冲液的流速是反应液的5-7倍,所述反应液的流速为5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$;

当待测目标物的基质成分简单时,将待测目标物与其对应的生物识别分子进行均相免疫反应并将反应液直接注入颗粒计数通道,其中,当待测目标物为生物大分子时,所述生物识别分子为与待测目标物对应的捕获抗体和检测抗体;当待测目标物为农兽药小分子时,所述生物识别分子为与待测目标物对应的抗体和完全抗原;

当待测目标物的基质成分复杂时,将与待测目标物对应的捕获抗体和检测抗体分别与纳米磁颗粒和高分子绝缘微球偶联,进行免疫反应并将反应液经磁分离后再注入颗粒计数通道。

2. 如权利要求1所述基于差分阻抗颗粒计数的免疫分析方法,其特征在于:当所述信号探针的直径为3 μm 时,纳米磁颗粒与信号探针的质量比为3:1;当所述信号探针的直径为1 μm 时,纳米磁颗粒与信号探针的质量比为2:1。

3. 如权利要求1所述基于差分阻抗颗粒计数的免疫分析方法,其特征在于:所述免疫反应和颗粒计数均在微流控芯片上进行,所述微流控芯片上设有反应通道和缓冲液通道,所述反应通道的内径为50-500 μm 。

4. 如权利要求1所述基于差分阻抗颗粒计数的免疫分析方法,其特征在于:所述反应通道呈S形。

一种基于差分阻抗颗粒计数的免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全、体外诊断、环境监测领域，涉及免疫分析方法，尤其是一种基于差分阻抗颗粒计数的免疫分析方法。

背景技术

[0002] 食品安全、体外诊断和环境监测与民生安全和生活水平息息相关，因此改善食品安全、体外诊断和环境检测等领域的检测方法手段，具有极其重要的现实意义。传统的食品安全、体外诊断和环境监测所用仪器具有精度高、准确性好等特点，但是绝大部分仪器设备造价昂贵且携带不便，在进行检测之前需要对样本进行复杂的前处理，对使用仪器设备的人员也需要经过专业培训。因此，传统的仪器检测方法，存在成本高、效率低、便携性差等特点，制约了其进一步的发展。

[0003] 免疫学分析方法在食品安全和体外诊断领域已得到广泛应用。其中，传统的酶联免疫吸附法(ELISA)具有精度高、操作简单和成本低等优点，使用酶标仪即可直接完成检测读数。但整个实验操作繁琐且耗时长，实验过程中诸多因素均会对检测结果产生影响。为解决上述问题，使快检方法更加“快、稳、准”，均相免疫反应应运而生。该方法比传统ELISA方法步骤少、操作简单且成本低，只需要通过一步反应，即可得出检测结果。

[0004] 前期的工作中，我们将小孔电阻颗粒计数和免疫分析技术相结合，采用高分子绝缘微球作为信号探针，实现了高灵敏度与准确检测。库尔特电阻法在颗粒计数的仪器设备中应用众多，实现形式多为微通道和微孔，工作原理为在通道两段施加一定数值的恒压电源，微电极设置在微孔两侧，当颗粒通过微孔时由于微电极间电阻变化而引起电势变化，通过对微电极电势变化的信号进行收集、放大、分离等处理，从而分析出待测颗粒的数量与粒径。该方法稳定性好、颗粒识别效率高，但是基于库尔特计数法的颗粒计数器造价昂贵且携带不便，使用过程中需要反复清洗消除背景干扰，当颗粒数过多或颗粒粒径大于微孔孔径时，会发生堵塞且不易清洗排堵，极大的干扰了检测结果和降低了检测效率。

[0005] 本发明选用差分阻抗法作为颗粒计数方法，在计数通道上摒弃了易堵塞且难以清洗的微孔而选用了通道计数。基于流体动力学原理，高流速的PBS缓冲液与低流速的待检测颗粒液体在颗粒计数通道内形成稳定的层流，待计数颗粒匀速稳定的依次通过芯片内部的金电极，实现信号收集。与之前工作相比，本发明可结合免疫反应与差分阻抗法颗粒计数技术，将传统易堵塞的小孔计数改进为基于流体动力学原理的差分阻抗通道计数法，与传统的基于库尔特电阻法颗粒计数器相比，用更宽的颗粒计数通道代替小孔实现不堵塞，免去了反复清洗等繁琐过程，提高了检测效率和准确性，芯片制造成本低廉，可以实现一次性使用，随用随换，根据实际需求可以应用于多种场景的快速检测，如食品安全快速检测、体外诊断、环境监测等。

发明内容

[0006] 本发明根据实际需求和现有设备存在的缺陷，提供了一种基于差分阻抗颗粒计数

的免疫分析方法,该方法不仅可以在微流控芯片内部完成免疫反应,还可实现无堵塞、免清洗的颗粒计数与粒径分析,从而能更好地用于多种目标物的免疫检测。

[0007] 本发明采用的技术方案是:

[0008] 一种基于差分阻抗颗粒计数的免疫分析方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 以高分子绝缘微球为信号探针,将生物识别分子与高分子绝缘微球偶联,然后将待测目标物与其对应的生物识别分子进行免疫反应,使高分子绝缘微球的粒径和数量发生变化;

[0010] 2) 将反应液注入颗粒计数通道,同时向颗粒计数通道内高速注入缓冲液,基于流体力学原理形成层流,使反应液中的高分子绝缘微球稳定有序地通过颗粒计数通道;

[0011] 3) 在颗粒计数通道的两端设置正、负电极,高分子绝缘微球通过时导致电极间的阻抗变化,进而导致电极间的电势信号发生变化,收集电势信号,经放大、滤波处理后对高分子绝缘微球的颗粒粒径和数量进行分析,进而得到待测目标物的含量。

[0012] 本发明的检测原理如下:首先将高分子绝缘微球与生物识别分子(抗体和完全抗原、检测抗体和捕获抗体等)偶联,然后将待测目标物与其对应的生物识别分子进行生物免疫反应(竞争免疫反应、双抗夹心免疫反应等),反应生成复合物使信号探针的粒径增加,目标物的含量与复合物的数量或未参与反应的信号探针数量相关,因此可通过检测复合物的数量或未反应的信号探针数量计算目标物含量。

[0013] 反应液进入颗粒计数通道后,由于绝缘微球信号探针的存在会导致通道内部的电阻值变化,电阻值变化又会导致检测电极间产生电势变化,且绝缘微球信号探针的粒径越大,则电阻值变化越大,电极间产生的电势变化幅值越大。因此可通过检测电势变化并将信号做放大、滤波等处理从而实现颗粒计数与粒径区分,处理后的每一个电势变化均代表一个颗粒,且电势变化幅度越大表明通过的颗粒粒径越大。

[0014] 为了使待计数的绝缘微球信号探针稳定有序的通过检测电极且不发生堵塞,本发明利用了流体动力学原理,当雷诺数、液体密度和流速满足一定条件时,不同流层的液体不会发生混合而会形成稳定层流,因此在计数的同时向通道内高速注入缓冲液,结果表明该方式检测到的颗粒数量与待测目标物浓度呈良好的线性关系。

[0015] 优选地,所述高分子绝缘微球的粒径为0.1-50 μm ,高分子绝缘微球可以是聚苯乙烯微球、聚丁二烯微球或聚异戊二烯微球。

[0016] 优选地,所述颗粒计数通道的内径为10-100 μm 。

[0017] 优选地,所述颗粒计数通道内,缓冲液的流速是反应液的2-10倍。

[0018] 进一步优选地,所述缓冲液的流速是反应液的5-7倍,所述反应液的流速为5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

[0019] 本发明适合各种目标物的检测,包括细胞、生物标志物、抗生素分子、农药分子、兽药分子、生物毒素、细菌等,且不仅限于这些目标物。

[0020] 本发明还适合各种基质成分的检测对象,例如全血、血清、牛奶、饮料、等,且不仅限于这些检测对象。当待测目标物的基质成分简单时(例如血清),将待测目标物与其对应的生物识别分子进行均相免疫反应并将反应液直接注入颗粒计数通道,其中,当待测目标物为生物大分子时,所述生物识别分子为与待测目标物对应的捕获抗体和检测抗体;当待测目标物为农兽药小分子时,所述生物识别分子为与待测目标物对应的抗体和完全抗原。

[0021] 而当待测目标物的基质成分复杂时(例如全血),将与待测目标物对应的捕获抗体和检测抗体分别偶联在纳米磁颗粒和信号探针上,进行免疫反应并将反应液经磁分离后再注入颗粒计数通道,从而可提高检测的准确性和可操作性。

[0022] 当使用磁分离的非均相免疫检测时,绝缘微球信号探针与纳米磁颗粒的比例对检测结果的准确性具有影响,其中,当信号探针的直径为 $3\mu\text{m}$ 时,纳米磁颗粒与信号探针的质量比为3:1;当所述信号探针的直径为 $1\mu\text{m}$ 时,纳米磁颗粒与信号探针的质量比为2:1。

[0023] 进一步地,为了更好地实现低成本、易携带和免清洗的检测目的,该方法是在微流控芯片予以实现,具体是通过在微流控芯片上设置微通道,使所述的免疫反应和颗粒计数均在微通道中进行,其中,用于进行免疫反应的微通道其内径为 $50-500\mu\text{m}$,用于注入缓冲液的微通道其内径略小于颗粒计数通道,并且为了延长反应时间,将所述反应通道设置为呈S形。

[0024] 本发明的有益效果是:

[0025] (1) 传统库尔特小孔颗粒计数器的灵敏度和测量误差与小孔制造精度有关,而传统激光打孔对小孔的制造精度较难控制,从而产生测量误差较大。与现有技术尤其是申请人前期研发的基于库尔特电阻原理的小孔颗粒计数的免疫分析方法相比,本发明最大的优势是将颗粒计数在具有一定内径的微通道内进行,不会造成堵塞,不需要反复清洗排堵,光刻微通道或者精密注塑的制造精度更高误差更小,从而提高检测精度和抗干扰能力。同时本发明可通过改变缓冲液流速进而改变颗粒通过检测电极速度,提高检测效率与检测灵敏度。

[0026] (2) 本发明还能将生物免疫反应和颗粒计数集成到同一装置上进行,免去了复杂繁琐的前处理和反应产物的分离,可适合各种免疫方法如双抗夹心法、竞争免疫法,均相免疫法等检测,也适合各种目标物如细胞、细菌、兽药分子、农药分子、抗生素分子、血清和全血中生物标志物等的检测,具有广泛的适用性。

[0027] (3) 微流控芯片具有体积小、自动化程度高、检测成本低等优点,只需少量样本即可用于检测,且具有一次性使用、随用随弃等特点。

附图说明

[0028] 图1为本发明中免疫分析微流控芯片的结构示意图。

[0029] 图2为本发明中差分阻抗颗粒计数装置的电路原理图。

[0030] 图3为待检测颗粒通过检测金电极的局部放大图以及对应颗粒产生的电势变化。

[0031] 图4为高分子绝缘微球数量与全血中降钙素原浓度之间的线性关系,A为粒径为 $1\mu\text{m}$ 的绝缘微球,B为粒径为 $3\mu\text{m}$ 的绝缘微球,每个粒径下分别测了四个纳米磁颗粒与高分子绝缘微球比例。

[0032] 图5为基于磁分离的双抗夹心法检测全血中降钙素原浓度与绝缘微球颗粒个数之间的线性关系曲线图。

[0033] 图6为基于磁分离的双抗夹心法检测菌沙门氏菌浓度与绝缘颗粒个数之间的线性关系曲线图。

[0034] 图7为基于磁分离的免疫竞争法检测毒死蜱浓度与绝缘颗粒个数之间的线性关系曲线图。

[0035] 图8为基于磁分离的免疫竞争法检测氯霉素浓度与绝缘颗粒个数之间的线性关系曲线图。

[0036] 图9为基于均相免疫法检测血清中降钙素原浓度与绝缘颗粒个数之间的线性关系曲线图。

具体实施方式：

[0037] 以下结合附图与实施例对本发明的实施例做进一步详细说明。

[0038] 本实施例提供一种基于差分阻抗颗粒计数的免疫分析方法，该方法使用的装置主体为微流控芯片。

[0039] 参见图1所示，该微流控芯片包括芯片本体，由两块聚二甲基硅氧烷基板制成，先通过光刻与丝网印刷在芯片下基板蚀刻出微通道和嵌入金电极，然后与上基板一次性密封成型。

[0040] 所述微通道由呈Y形分布的反应通道、颗粒计数通道、缓冲液通道三部分组成，所述反应通道和缓冲液通道分别与颗粒计数通道相连通，所述反应通道和缓冲液通道的顶端设有进样口，所述颗粒计数通道的末端设有出样口，其中，所述反应通道的顶端设有三个进样口，所述进样口上均设有蠕动泵。

[0041] 所述反应通道呈S形，用于延长反应时间，其内径为50-500 μm ，所述颗粒计数通道的内径为10-100 μm ，所述缓冲液通道的内径略小于颗粒计数通道。

[0042] 参见图2所示，所述颗粒计数通道上设有差分阻抗颗粒计数装置，所述差分阻抗颗粒计数装置包括三个金电极，分别为正极电极、负极电极和外部感应电极、所述金电极的一端设在颗粒计数通道的内部，另一端位于芯片本体的外部且与信号发生器、信号放大器、锁相放大器、滤波器和示波器连接。其中，正极电极和负极电极分别位于颗粒计数通道的两端，用于收集颗粒通过时产生的电势信号，外部感应电极位于颗粒计数通道的中间并与信号发生器连接同时接地，用于发出正弦激励信号。施加到外部感应电极的正弦激励信号驱动电流流经溶液到达正极电极和负极电极，正极电极、负极电极将电势信号传输到AD630一级放大器，AD630一级放大器对电势信号进行一级放大，随后通过锁相放大器、低通滤波器LPF与高通滤波器HPF进行锁相和对高低频无关的噪声信号进行过滤去除，最后通过AD630二级放大器对一次放大过滤后的信号进行二次放大，接入示波器观察波形。示波器将模拟信号转换成数字信号导入计算机，通过计算机MATLAB软件对数字信号进行绘图与分类，能更好地实现颗粒计数与粒径区分。

[0043] 该装置可用于无需进行磁分离的均相免疫检测，检测原理如下：针对不同的目标物，将其对应的生物识别分子（抗体和完全抗原、检测抗体和捕获抗体等）分别偶联在绝缘微球表面。待测物与上述偶联物分别通过反应通道前端的三个进样口进样，三者反应通道内发生免疫反应并生成信号探针复合物。由于信号探针复合物的粒径远大于未反应的绝缘微球信号探针，而目标物的含量又与未反应的绝缘微球信号探针数量负相关，与信号探针复合物的数量正相关，因此可通过检测未反应的绝缘微球信号探针或信号探针复合物的数量确定目标物含量。

[0044] 当反应液流经颗粒计数通道时，由于绝缘微球信号探针的存在会导致通道内部的电阻值变化，电阻值变化又会导致检测电极间产生电势变化，且信号探针的粒径越大，则电

阻值变化越大,电极间产生的电势幅值越大。通过信号放大器配合滤波器和锁相器,对收集信号处理后导入计算机软件,通过MATLAB对信号进行二次处理,则每一个电势变化均为一个颗粒,且电势变化幅度越大表明通过的颗粒粒径越大,从而实现颗粒计数与粒径区分。

[0045] 参见图3所示,为颗粒计数的局部放大图与颗粒通过检测电极时的电势变化图。高流速的PBS缓冲液通过缓冲液通道前端的进样口进样,与低流速的绝缘微球信号探针同时汇入颗粒计数通道内,基于流体动力学原理,当雷诺数、液体密度和流速满足一定条件时,不同流层的液体不会发生混合而会形成稳定层流,待计数的绝缘微球信号探针会稳定有序的通过检测电极,检测电极传递信号完成反馈,从而实现绝缘微球粒径的区分和计数。

[0046] 在颗粒计数局部放大图中,待检测绝缘微球信号探针1、2、3、4、5、6和7依次有序通过检测金电极,当绝缘微球信号探针通过电极时发生电势变化,每个颗粒对应电势变化参见图3,当颗粒通过电极时,颗粒计数完成,电势变化结束。

[0047] 上述装置适合待测物基质干扰少的目标物检测,属于一种均相免疫分析方法,也就是在不对反应产物进行分离的前提下直接进行颗粒计数从而得到目标物含量。

[0048] 该芯片也适合用于基质干扰大的目标物检测,在对这类物质进行检测时,仅需在芯片本体外位于反应通道和颗粒计数通道的连接部设一个永磁铁即可。

[0049] 需要进行磁分离的非均相免疫检测,检测原理如下:针对不同的目标物,将其对应的检测抗体和捕获抗体分别偶联在磁颗粒和绝缘微球信号探针表面。待测物与上述偶联抗体的磁颗粒和信号探针分别通过反应通道前端的三个进样口进样,三者反应通道内发生免疫反应并生成信号探针复合物,接着通过永磁铁对生成的信号探针复合物进行磁分离,剩下的溶液中仅含未反应的绝缘微球信号探针。由于目标物的含量与未反应的绝缘微球信号探针数量呈负相关,因此可通过检测未反应的信号探针的数量确定目标物的含量。

[0050] 以下通过全血及血清中降钙素原(PCT)、细菌(沙门氏菌)、农药分子(毒死蜱)和抗生素分子(氯霉素)5个实施例进行详细说明。

[0051] 实施例1基于磁分离的双抗夹心法检测全血中降钙素原(PCT)

[0052] (1) 制备磁颗粒-降钙素原捕获抗体偶联物

[0053] 取2mg羧基偶联的磁性纳米颗粒(1 μ m,10mg/mL),用MES缓冲液(pH=6.0)洗涤两次,用MES缓冲液重悬后加入50 μ L EDC(10mg/mL)和25 μ L NHS(10mg/mL),混匀后在室温下活化15分钟。

[0054] 活化完成后用PBS缓冲液洗涤两次,用PBS缓冲液重悬后加入0.2mg降钙素原捕获抗体,室温下反应2-4小时;反应结束后,用1%BSA溶液封闭30分钟,封闭完成后用PBST缓冲液洗涤2次,磁颗粒-捕获抗体偶联物用PBS缓冲液重悬后保存于4 $^{\circ}$ C待用。

[0055] (2) 制备聚苯乙烯微球-降钙素原检测抗体偶联物

[0056] 取2mg羧基偶联的聚苯乙烯微球(1 μ m和3 μ m,100mg/mL),用MES缓冲液(pH=6.0)洗涤两次,用MES缓冲液重悬后加入100 μ L EDC(10mg/mL)和50 μ L NHS(10mg/mL),混匀后在室温下活化15分钟。

[0057] 活化完成后用PBS缓冲液洗涤两次,用PBS缓冲液重悬后加入0.15mg降钙素原检测抗体,室温下反应2-4小时;反应结束后,用1%BSA溶液封闭30分钟,封闭完成后用PBST缓冲液洗涤2次,聚苯乙烯微球-检测抗体偶联物用PBS缓冲液重悬后保存于4 $^{\circ}$ C待用。

[0058] 图4所示为不同粒径大小高分子绝缘微球信号探针与全血中降钙素原(PCT)浓度

关系变化图。在选用双抗夹心法检测全血中降钙素原 (PCT) 时,对制备磁颗粒-降钙素原捕获抗体偶联物的浓度和聚苯乙烯微球-降钙素原检测抗体偶联物的直径进行了优化。具体实施方式如下,其中微流控芯片免疫反应通道内径为100 μm ,颗粒计数通道内径为60 μm ,金电极在颗粒计数通道内伸出长度为30 μm ,全血样本、磁颗粒-捕获抗体和聚苯乙烯微球-检测抗体通过注射泵注入芯片速度为8 $\mu\text{L}/\text{min}$,PBS缓冲液通过注射泵注入芯片速度为48 $\mu\text{L}/\text{min}$,外部感应电极所施加的初始电压为DC 30V。纳米磁颗粒与绝缘微球信号探针的质量比分别为1:2、1:1、2:1和3:1 (绝缘微球信号探针直径为1 μm) 和1:1、2:1、3:1、4:1 (绝缘微球信号探针直径3 μm) 时测得的颗粒数值,从实验结果中可以看出,绝缘微球信号探针与磁性纳米颗粒的比例对实验结果具有显著影响,实验表明当绝缘微球信号探针的直径为3 μm ,磁性纳米颗粒与绝缘微球信号探针的比例为3:1时线性最佳 (图4B);当绝缘微球信号探针的直径为1 μm ,磁性纳米颗粒与绝缘微球信号探针的比例为2:1时线性最佳 (图4A)。

[0059] 通过双抗夹心法检测全血中降钙素原 (PCT) 检测方法的原理如下:将全血样本、磁颗粒-捕获抗体、聚苯乙烯微球-检测抗体分别通过注射泵注入微流控芯片,三者于芯片内弯折的反应通道处汇合,在流动过程中发生双抗夹心免疫反应。当注入的全血样品中存在降钙素原 (PCT) 时,磁颗粒-捕获抗体、聚苯乙烯微球-检测抗体和全血中的降钙素原 (PCT) 会结合形成免疫复合物,使得芯片内未反应结合的聚苯乙烯微球数量减少。当全血样品中降钙素原浓度越高,则芯片内未反应结合的聚苯乙烯微球数量越少,免疫反应结合的免疫复合物数量越多。因此,全血样品中降钙素原 (PCT) 含量浓度与芯片内未反应结合的聚苯乙烯微球数量呈现负相关。将免疫复合物通过磁分离与未反应结合的聚苯乙烯微球分离,通过差分阻抗法对未结合的聚苯乙烯微球进行颗粒计数,从而间接计算得出全血中降钙素原 (PCT) 浓度。

[0060] (3) 免疫检测全血中降钙素原

[0061] 将含降钙素原的全血样本、磁颗粒-捕获抗体、聚苯乙烯微球-检测抗体同时注入微流控芯片中,三者微通道中进行免疫反应,反应结束后,在磁分离的作用下,未结合的聚苯乙烯微球-检测抗体可用于颗粒计数。以未结合的3 μm 聚苯乙烯微球-检测抗体颗粒个数为纵坐标,降钙素原浓度为横坐标,得到两者之间的相互关系可用于降钙素原的定量检测。如图5所示,在0.1~100ng/mL范围内,颗粒个数与降钙素原浓度之间具有良好的线性关系,线性方程为 $Y = -102.2X + 742.8$ (X 为降钙素原浓度的对数值), $R^2 = 0.989$ 。

[0062] 表1采用标准加入法对全血中的降钙素原 (PCT) 进行检测的结果

基质	标准加入量 (ng/mL)	实际测得量 (ng/mL)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
[0063] 全血	0.1	0.886	88.6	5.89
	10	9.55	95.5	6.72
	100	93.62	93.62	4.99

[0064] 将本实验方法与传统的小孔颗粒计数法对比,对比结果如表2所示,结果表明本实验方法与传统的小孔计数法相比灵敏度高且相对标准偏差 (RSD) 小。传统的小孔颗粒计数法准确度与小孔和待测颗粒之间宽径比相关,待检测颗粒直径与小孔孔径越接近准确度越高,而本方法采用通道阻抗差分法颗粒计数无需小孔,直接收集待检测颗粒信号,检测结果

更加准确。

[0065] 表2本方法和小孔颗粒计数法对全血中降钙素原检测分析性能对比

	分析性能	检出限(ng/mL)	RSD (%)
[0066]	本方法	0.05	<5
	小孔颗粒计数法	0.5	<12

[0067] 将本实验方法中不同缓冲液流速下的检出限与检测时间进行对比,对比结果如表3所示,结果表明通过改变缓冲液流速可以改变颗粒通过检测电极速度,从而缩短检测时间,提高检测效率与检测灵敏度。

[0068] 表3不同缓冲液流速下的检出限与检测时间对比

	缓冲液流速 (mL/min)	检出限(ng/mL)	检测时间 (min)
[0069]	48	0.05	<7
	32	0.12	<11

[0070] 实施例2基于磁分离的双抗夹心法检测致病菌沙门氏菌

[0071] (1) 制备磁颗粒-沙门氏菌捕获抗体偶联物

[0072] 取5mg羧基偶联的磁性纳米颗粒(1 μ m, 10mg/mL),用MES缓冲液(pH=6.0)洗涤两次,用MES缓冲液重悬后加入100 μ L EDC(10mg/mL)和50 μ L NHS(10mg/mL),混匀后在室温下活化15分钟。

[0073] 活化完成后用PBS缓冲液洗涤两次,用PBS缓冲液重悬后加入0.2mg沙门氏菌捕获抗体,室温下反应2-4小时;反应结束后,用1%BSA溶液封闭30分钟,封闭完成后用PBST缓冲液洗涤2次,磁颗粒-捕获抗体偶联物用PBS缓冲液重悬后保存于4 $^{\circ}$ C待用。

[0074] (2) 制备聚苯乙烯微球-沙门氏菌检测抗体偶联物

[0075] 取2mg羧基偶联的聚苯乙烯微球(6 μ m, 50mg/mL),用MES缓冲液(pH=6.0)洗涤两次,用MES缓冲液重悬后加入100 μ L EDC(10mg/mL)和50 μ L NHS(10mg/mL),混匀后在室温下活化15分钟。

[0076] 活化完成后用PBS缓冲液洗涤两次,用PBS缓冲液重悬后加入0.4mg沙门氏菌检测抗体,室温下反应2-4小时;反应结束后,用1%BSA溶液封闭30分钟,封闭完成后用PBST缓冲液洗涤2次,聚苯乙烯微球-检测抗体偶联物用PBS缓冲液重悬后保存于4 $^{\circ}$ C待用。

[0077] (3) 免疫检测沙门氏菌

[0078] 将一定浓度的沙门氏菌、磁颗粒-捕获抗体、聚苯乙烯微球-检测抗体同时注入微流控芯片中,三者微通道中进行均相免疫反应,反应结束后,在磁分离的作用下,未结合的聚苯乙烯微球-检测抗体可用于颗粒计数。以未结合的聚苯乙烯微球-检测抗体颗粒个数为纵坐标,降钙素原浓度为横坐标,得到两者之间的相互关系。如图6所示,在 $10^3 \sim 10^6$ CFU/mL范围内,颗粒个数与沙门氏菌浓度之间具有良好的线性关系,线性方程为 $Y = -63.7X + 873.6$ (X为沙门氏菌浓度的对数值), $R^2 = 0.998$,可以很好地用于沙门氏菌的定量检测。

[0079] 实施例3基于磁分离的竞争法检测农药分子毒死蜱

[0080] (1) 制备磁颗粒-毒死蜱抗体偶联物

[0081] 取2mg羧基偶联的磁性纳米颗粒(1 μ m, 10mg/mL),用MES缓冲液(pH=6.0)洗涤两

次,用MES缓冲液重悬后加入50 μ L EDC (10mg/mL) 和25 μ L NHS (10mg/mL),混匀后在室温下活化15分钟。

[0082] 活化完成后用PBS缓冲液洗涤两次,用PBS缓冲液重悬后加入0.1mg毒死蜱抗体,室温下反应2-4小时;反应结束后,用1%BSA溶液封闭30分钟,封闭完成后用PBST缓冲液洗涤2次,磁颗粒-抗体偶联物用PBS缓冲液重悬后保存于4 $^{\circ}$ C待用。

[0083] (2) 制备聚苯乙烯微球-毒死蜱完全抗原偶联物

[0084] 取2mg羧基偶联的聚苯乙烯微球(1 μ m,100mg/mL),用MES缓冲液(pH=6.0)洗涤两次,用MES缓冲液重悬后加入50 μ L EDC (10mg/mL) 和25 μ L NHS (10mg/mL),混匀后在室温下活化15分钟。

[0085] 活化完成后用PBS缓冲液洗涤两次,用PBS缓冲液重悬后加入0.2mg毒死蜱完全抗原,室温下反应2-4小时;反应结束后,用1%BSA溶液封闭30分钟,封闭完成后用PBST缓冲液洗涤2次,聚苯乙烯微球-毒死蜱完全抗原用PBS缓冲液重悬后保存于4 $^{\circ}$ C待用。

[0086] (3) 免疫检测毒死蜱

[0087] 将一定浓度的毒死蜱、磁颗粒-抗体、聚苯乙烯微球-完全抗原偶联物同时注入微流控芯片中,三者微通道中进行免疫反应,反应结束后,在磁分离的作用下,未结合的聚苯乙烯微球-完全抗原偶联物可用于颗粒计数。以未结合的聚苯乙烯微球-完全抗原偶联物颗粒个数为纵坐标,毒死蜱浓度为横坐标,得到两者之间的线性关系。如图7所示,在5~1000ng/mL范围内,颗粒个数与毒死蜱浓度之间具有良好的线性关系,线性方程为 $Y=105.3X+485.4$ (X为毒死蜱浓度的对数值), $R^2=0.992$,能够用于毒死蜱的定量检测。

[0088] 实施例4基于磁分离的竞争法检测抗生素分子氯霉素

[0089] (1) 制备磁颗粒-氯霉素抗体偶联物

[0090] 取2mg羧基偶联的磁性纳米颗粒(1 μ m,10mg/mL),用MES缓冲液(pH=6.0)洗涤两次,用MES缓冲液重悬后加入50 μ L EDC (10mg/mL) 和25 μ L NHS (10mg/mL),混匀后在室温下活化15分钟。

[0091] 活化完成后用PBS缓冲液洗涤两次,用PBS缓冲液重悬后加入0.1mg氯霉素抗体,室温下反应2-4小时;反应结束后,用1%BSA溶液封闭30分钟,封闭完成后用PBST缓冲液洗涤2次,磁颗粒-抗体偶联物用PBS缓冲液重悬后保存于4 $^{\circ}$ C待用。

[0092] (2) 制备聚苯乙烯微球-氯霉素完全抗原偶联物

[0093] 取2mg羧基偶联的聚苯乙烯微球(1 μ m,100mg/mL),用MES缓冲液(pH=6.0)洗涤两次,用MES缓冲液重悬后加入50 μ L EDC (10mg/mL) 和25 μ L NHS (10mg/mL),混匀后在室温下活化15分钟。

[0094] 活化完成后用PBS缓冲液洗涤两次,用PBS缓冲液重悬后加入0.2mg氯霉素完全抗原,室温下反应2-4小时;反应结束后,用1%BSA溶液封闭30分钟,封闭完成后用PBST缓冲液洗涤2次,聚苯乙烯微球-氯霉素完全抗原用PBS缓冲液重悬后保存于4 $^{\circ}$ C待用。

[0095] (3) 免疫检测氯霉素

[0096] 将一定浓度的氯霉素、磁颗粒-抗体、聚苯乙烯微球-完全抗原偶联物同时注入微流控芯片中,三者微通道中进行均相免疫反应,反应结束后,在磁分离的作用下,未结合的聚苯乙烯微球-完全抗原偶联物可用于颗粒计数。以未结合的聚苯乙烯微球-完全抗原偶联物颗粒个数为纵坐标,氯霉素浓度为横坐标,得到两者之间的线性关系。如图8所示,在10

~10000pg/mL范围内,颗粒个数与氯霉素浓度之间具有良好的线性关系,线性方程为 $Y=150.5X+215.2$ (X 为氯霉素浓度的对数值), $R^2=0.996$,能够用于氯霉素的定量检测。

[0097] 实例5采用均相免疫法检测血清中降钙素原

[0098] (1) 制备聚苯乙烯微球-降钙素原捕获抗体和检测抗体偶联物

[0099] 分别取2mg羧基偶联的聚苯乙烯微球(3 μ m,100mg/mL),用MES缓冲液(pH=6.0)洗涤两次,用MES缓冲液重悬后加入100 μ L EDC(10mg/mL)和50 μ L NHS(10mg/mL),混匀后在室温下活化15分钟。

[0100] 活化完成后用PBS缓冲液洗涤两次,用PBS缓冲液重悬后分别加入0.15mg降钙素原捕获抗体和检测抗体,室温下反应2-4小时;反应结束后,用1%BSA溶液封闭30分钟,封闭完成后用PBST缓冲液洗涤2次,聚苯乙烯微球-捕获抗体和检测抗体偶联物分别用PBS缓冲液重悬后保存于4 $^{\circ}$ C待用。

[0101] (2) 免疫检测血清中降钙素原

[0102] 将含降钙素原的血清样本、聚苯乙烯微球-捕获抗体、聚苯乙烯微球-检测抗体同时注入微流控芯片中,三者微通道中进行均相免疫反应,反应结束后,进行颗粒计数。以3 μ m微球颗粒个数为纵坐标,降钙素原浓度为横坐标,得到两者之间的相互关系可用于降钙素原的定量检测。如图9所示,在0.2~50ng/mL范围内,颗粒个数与降钙素原浓度之间具有良好的线性关系,线性方程为 $Y=-89.26X+1028.4$ (X 为降钙素原浓度的对数值), $R^2=0.997$ 。

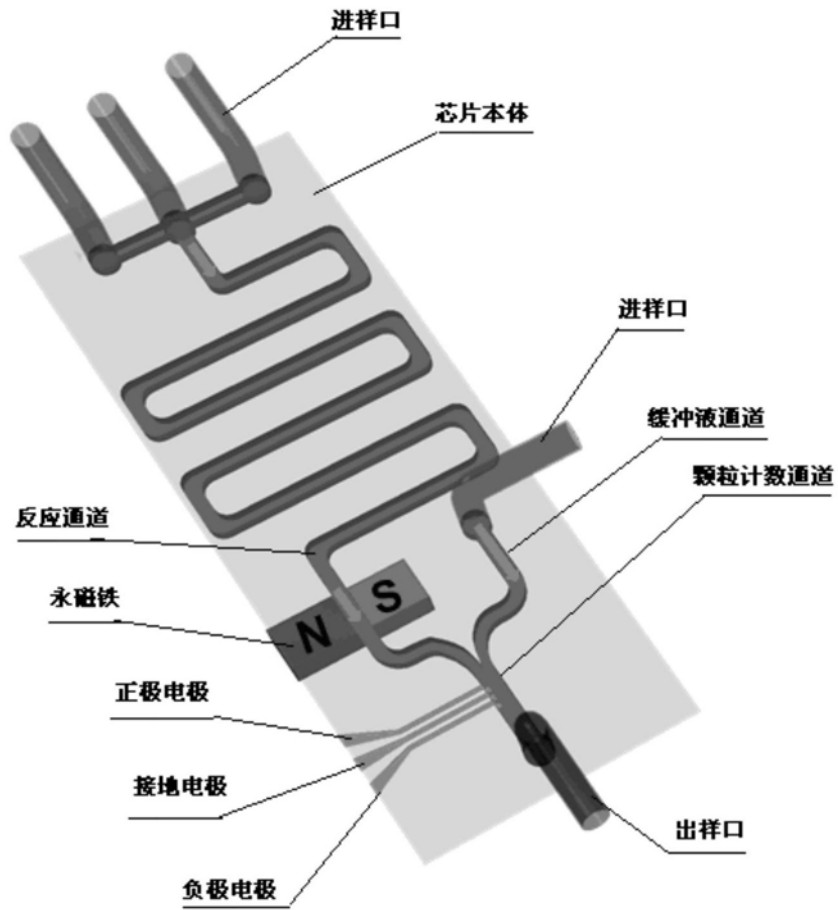


图1

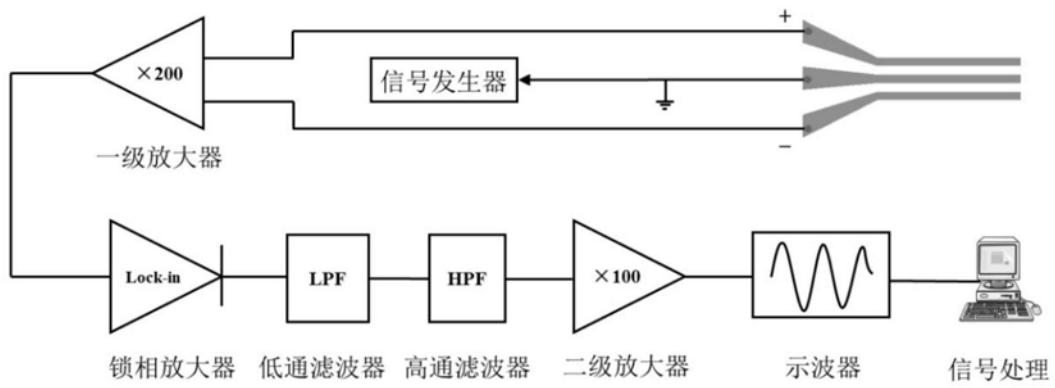


图2

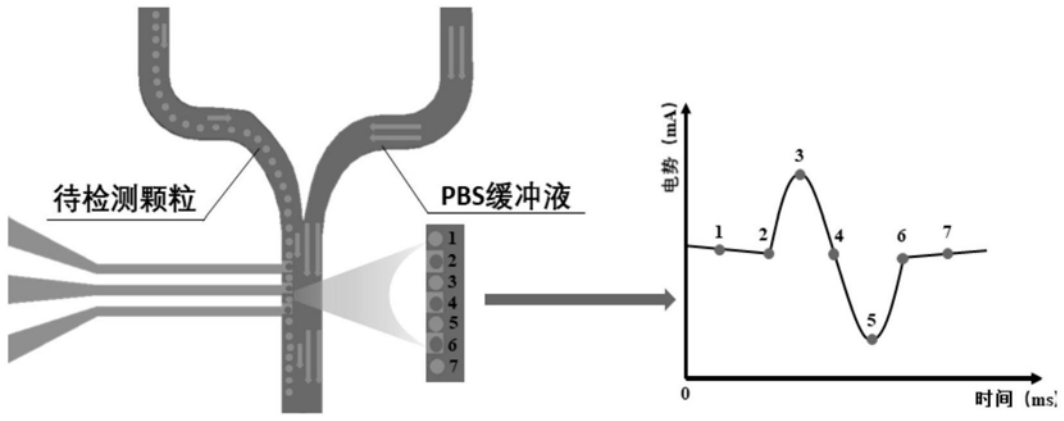


图3

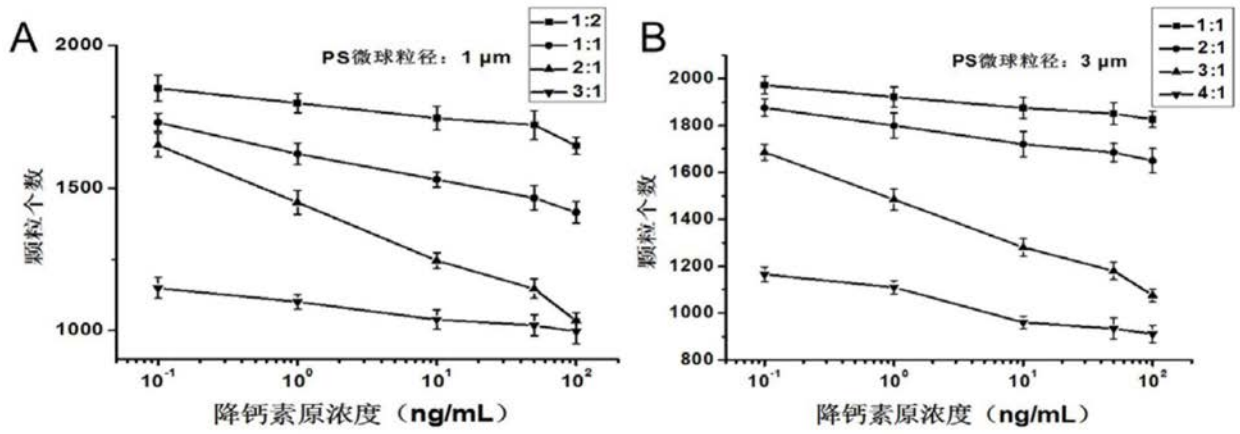


图4

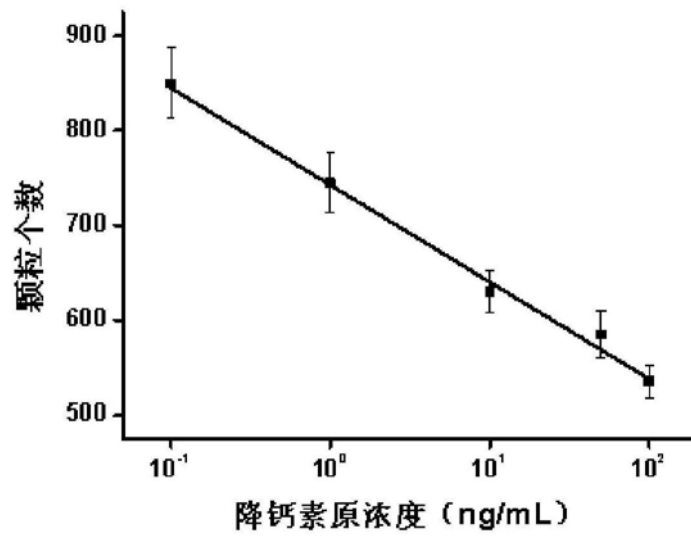


图5

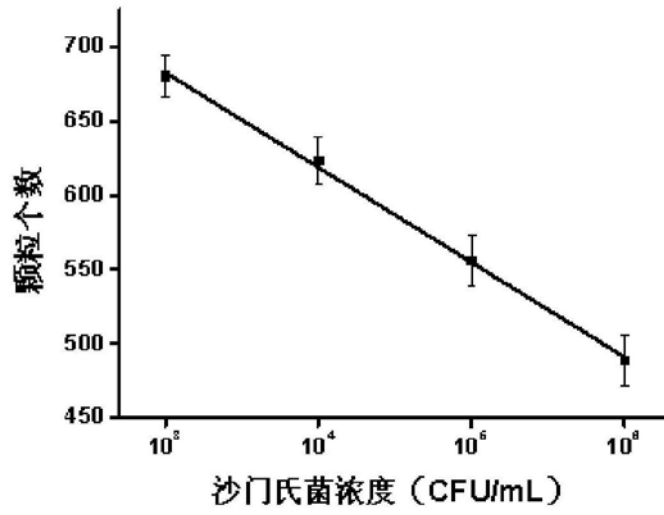


图6

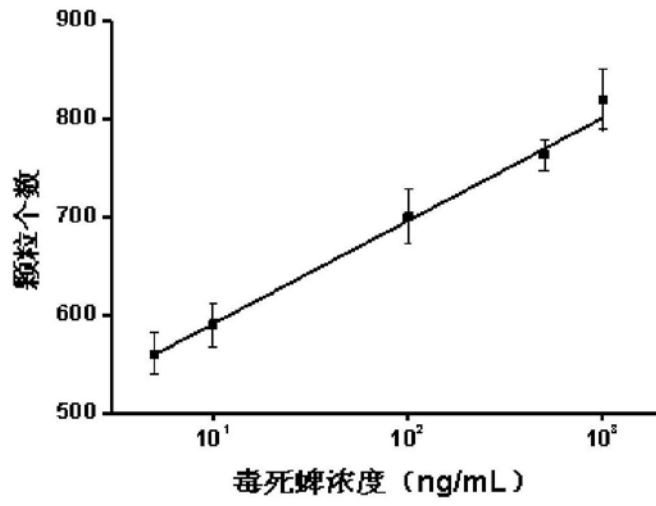


图7

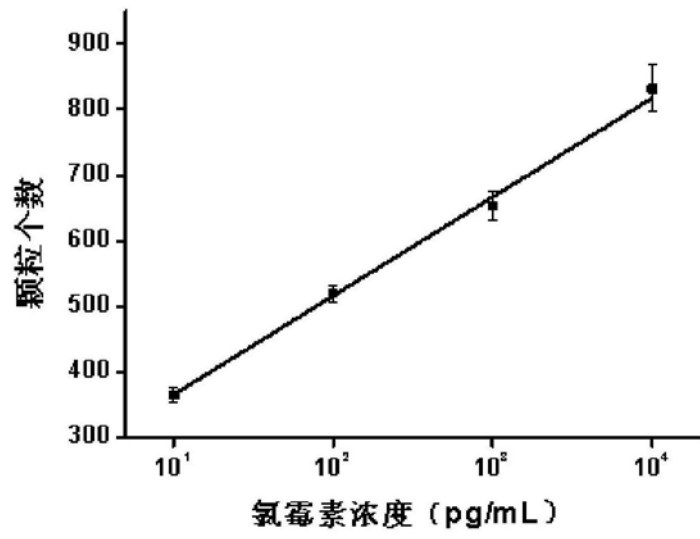


图8

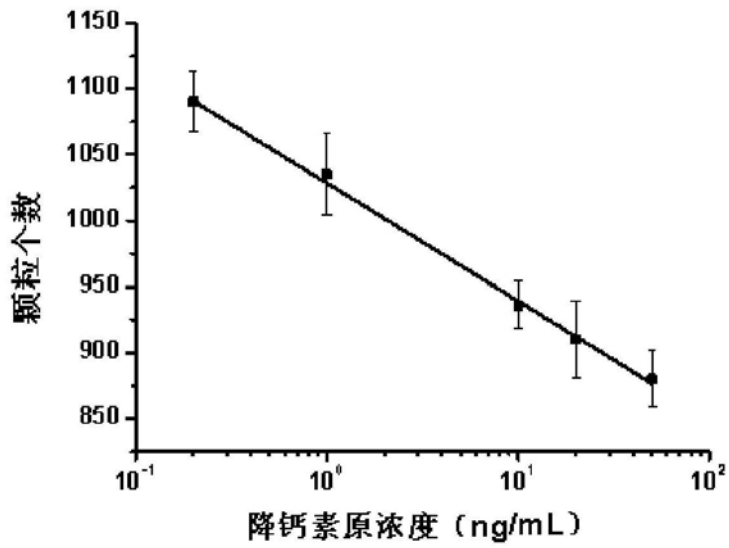


图9