



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110773246 B

(45) 授权公告日 2021.12.14

(21) 申请号 201911060541.2

(22) 申请日 2019.11.01

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110773246 A

(43) 申请公布日 2020.02.11

(73) 专利权人 上海速创诊断产品有限公司
地址 201318 上海市浦东新区紫萍路908弄
9号、1号3层
专利权人 上海速芯生物科技有限公司

(72) 发明人 方雪恩 刘丽玲 吴静 钱江洪
孔继烈

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277
代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 108663531 A, 2018.10.16

CN 101641157 B, 2012.08.29

CN 109507422 A, 2019.03.22

CN 108375559 A, 2018.08.07

US 2012196767 A1, 2012.08.02

CN 204544220 U, 2015.08.12

CN 108414773 A, 2018.08.17

审查员 罗典

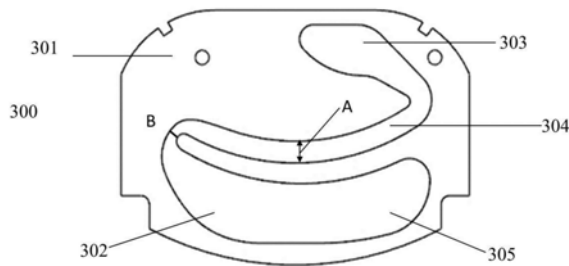
权利要求书1页 说明书14页 附图5页

(54) 发明名称

一种微流控芯片及用于高敏肌钙蛋白检测的试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种微流控芯片及用于高敏肌钙蛋白检测的试剂盒,所述微流控芯片包含叠置的三层,所述芯片上层包含加样区,芯片下层设有凹槽,芯片中间层为双面胶层,在所述双面胶层上用有胶区和无胶区分隔出样本流动通道,所述样本流动通道包括流道检测区,所述流道检测区为弧形,所述流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽度小于流道检测区流道中间弧形段的宽度。本发明通过微流控技术进一步提升了免疫层析试剂性能,本发明获得了分析灵敏度高和精密度高的高敏肌钙蛋白定量检测系统。



1. 一种微流控芯片,其特征在于,所述微流控芯片包含叠置的三层,芯片上层包含加样区,芯片下层设有凹槽,芯片中间层为双面胶层,在所述双面胶层上用有胶区和无胶区分隔出样本流动通道,所述样本流动通道包括加样孔区、流道检测区、废液槽区,其中所述加样孔区与所述芯片上层的加样区相对应,所述废液槽区至少覆盖所述芯片下层的凹槽,所述流道检测区为弧形,所述流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽度小于流道检测区流道中间弧形段的宽度,所述流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽度比流道中间弧形段宽度=1:1.5~2.5;所述芯片上层朝向所述芯片中间层的一侧表面经过磨砂处理;所述芯片上层朝向所述芯片中间层的一侧表面为平均表面粗糙度Ra在0.05~0.15范围内的磨砂表面;所述芯片下层还设有加样孔,在所述加样孔内预包埋表面活性剂和封闭剂。

2. 根据权利要求1所述的微流控芯片,其特征在于,所述流道中间弧形段宽度为2-4mm,所述拐弯处流道宽度为1-2mm。

3. 根据权利要求1或2所述的微流控芯片,其特征在于,所述流道中间弧形段宽度为2.5-4mm,所述拐弯处流道宽度为1-1.5mm。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的微流控芯片在制备高敏肌钙蛋白检测试剂盒中的用途。

5. 一种高敏肌钙蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒内包括一个或多个如权利要求1-3任一项所述的微流控芯片。

6. 如权利要求5所述的试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 抗体-荧光微球标记复合物的制备:将心肌肌钙蛋白T单克隆抗体加入到经活化处理的荧光微球溶液中,混匀,加入淬灭剂、封闭剂,离心清洗;

2) 微流控芯片制备:i) 通过激光在双面胶层刻蚀样本流体通道,刻蚀时减小流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽度,使其小于流道检测区流道中间弧形段的宽度;ii) 配制加样孔处理液,喷在芯片下层的加样孔处,干燥处理;iii) 制备点样试剂;iv) 将配制好的点样试剂点在步骤ii)干燥处理后的芯片下层上;v) 将点样完成的芯片下层干燥处理,贴上步骤i)制备得到的双面胶层,盖上芯片上层,压紧;所述芯片上层朝向所述双面胶层的一侧表面经过磨砂处理。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述加样孔处理液包括磷酸盐缓冲液、海藻糖、曲拉通-100和牛血清白蛋白。

8. 根据权利要求6或7所述的制备方法,其特征在于,所述制备点样试剂步骤iii)包括制备双T区点样试剂。

一种微流控芯片及用于高敏肌钙蛋白检测的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于医疗检测领域,尤其涉及一种微流控芯片及用于高敏肌钙蛋白检测的试剂盒。

背景技术

[0002] 肌钙蛋白(cTn)是目前诊断心肌梗死和对急性冠状动脉综合征(ACC)危险分层最好的黄金标志物。传统的cTn检测方法灵敏度、精密度相对不高,难以被检测发现,基本无法在表面健康人群中检测出来,在缺血症状或心电图改变不典型时,这有可能导致延迟诊断甚至误诊,不利于早期诊断、风险评估和预后判断。

[0003] 近年来,随着各种高敏肌钙蛋白(hs-cTn)定量检测系统的问世与临床应用,一方面为临床更早诊断AMI、识别更多处于疾病潜在危险的患者提供了依据,从而大大提高了AMI的检出率;同时,也使得分析评估健康人群cTn水平成为可能。传统肌钙蛋白免疫分析的灵敏度只能做到ng/mL($\mu\text{g/L}$)级的肌钙蛋白检测,而高敏免疫分析的灵敏度高达10ng/L。传统肌钙蛋白免疫分析由于分析灵敏度的限制,在心肌梗死发病后4-6小时之内不能检测出肌钙蛋白浓度的变化,作出诊断则通常需要7小时。而高敏肌钙蛋白免疫分析在3-4小时之内即可作出诊断,未来更是可能研发出可在病人心肌梗死发病后1小时内作出诊断的高敏肌钙蛋白免疫分析仪器和试剂,将极大地促进急性心肌梗死的早诊断早治疗,为挽救病人的生命赢得宝贵的时间,降低心肌梗死对病人心脏的永久性损伤。随着其广泛深入的临床应用,高敏肌钙蛋白定量检测应用的范围会越来越广。hs-cTn的定义需要满足2个条件:①正常人群的第99百分位值处的变异系数 $<10\%$;②在健康人群中,低于第99百分位值的检出率要超过50%(最佳状态 $>50\%$)。hs-cTn需要更高的灵敏度和精密度。

[0004] 目前市场上已有多种检测肌钙蛋白的诊断试剂。从技术上来看,主要有免疫层析试剂条,也有部分酶联免疫化学发光技术平台。其中免疫层析试剂条难以克服其本身基材的固有缺陷,如硝酸纤维素膜对蛋白固定能力有限、手工组装步骤多等因素带来的人为误差导致精密度较大、灵敏度较低等缺点,在实际临床检验中存在很多问题。酶联免疫技术成熟度较高,但操作复杂、检测时间长,对操作者有一定技术要求,该方法逐渐被取代。化学发光平台的优点是定量精确,灵敏度和特异性高,检测范围宽,便于实现高通量自动化,是中心实验室最常用的检测方法,但这种检测仪器昂贵,且占地比较大,不适用于在急诊、ICU、胸痛中心等科室的使用。

[0005] 基于现有心肌标志物检测平台的固有缺陷和不足,免疫检测微流控技术应运而生并不断发展壮大。该技术是一种以在微米尺度空间对流体进行操控为主要特征的科学技术,具有样本需求量少、灵敏度高、反应时间短、成本低等优势。微流控芯片技术作为当前分析科学的重要发展前沿,其核心是微流控芯片的微型化、集成化、自动化的特点使其成为POCT方向的研究热点。

[0006] 专利文献1:CN106807461A公开一种用于荧光免疫检测的微流控芯片及其制备方法,其包括芯片基板,基板上开设微流控通道,微流控通道包括依次连通的样本滴加区、全

血过滤区、抗体包被区、反应区、检测区、质控区和废液收集区,全血过滤区设有红细胞滤血膜。检测时,在离心力驱动下,全血样本经过过滤区去除血细胞随后进行检测。该方案一方面全血过滤膜分离时会带来检测干扰和样本浪费,另一方面蛇形管道状的反应区很容易残留样本,对检测灵敏度产生不利的影 响。此外,直接在基板上开设通道的制备方法加工成本较高,且单纯用离心力控制液体可能液体流速过快,不利于层析反应的进行。

[0007] 专利文献2:CN108414769A公开了一种用于心衰标志物检测的蛋白芯片,蛋白芯片的制备方法包括(1)黑玻片预处理;(2)抗体溶液点样;(3)封闭工艺制得所述蛋白芯片。该发明实现联合检测心肌标志物芯片诊断试剂盒。黑玻片要在NaOH预处理液中浸泡16~24h,纯化水清洗2~8次,再硅烷水溶液中浸泡20~60min。处理工序非常复杂,费时费工,产生大量废水,不利于环保。且处理批次之间差异大,不利于批量化生产,同时也导致了芯片生产成本较高。

[0008] 专利文献3:CN108375559A公开了基于微流控芯片的心肌肌钙蛋白试剂盒及制备和检测方法。其采用双抗体夹心法进行测定。但该发明免疫反应需要加入显色液,显色液进入芯片内部可能存在反应不充分或者显色后读数不及时的问题,且反应后还需要进一步使用清洗液,增加了检测步骤,操作尤为复杂。

[0009] 专利文献4:CN205323796U公开了一种定量检测全血中肌钙蛋白I的磁微粒化学发光微流控芯片,其将抗cTnI抗体修饰酶,抗cTnI抗体修饰在磁颗粒上,利用抗原抗体作用进行检测。该芯片的制备方法也相对复杂,微流控芯片在检测中需要设备电磁铁牵引芯片中磁颗粒运动,对设备复杂性要求高。此外,过滤区包含滤血膜,也会存在检测干扰和样本浪费等问题。

[0010] 由上可见,现有技术多数文献是采用微流控芯片进行肌钙蛋白的传统检测分析,对高敏肌钙蛋白(hs-cTn)定量检测方法研究的较少。专利文献5:CN109709323A使用生物素标记的抗cTnI多克隆抗体作为捕获抗体,两株针对不同cTnI抗原表位的吡啶酯标记的抗cTnI单克隆抗体以质量比1:1混合作为标记抗体,对cTnI抗原的多个表位进行识别,提高了分析灵敏度和精密度,提供了一种适用于高敏cTnI化学发光免疫分析临床应用的检测试剂盒。但是其未采用微流控技术,相对而言需要较多的人为操作,试剂消耗量大,检测时间长。

[0011] 之前申请人研发出一种微流控检测芯片及其制备方法、固定装置和离心式检测装置(专利文献6:CN108414773A)。该发明设计的自驱动和短时离心相结合微流控检测芯片技术,可以解决传统纸基材的固有问题,进一步提高免疫检测中样本利用率以及检测速度和检测灵敏度,芯片制备和组装简单,对检测设备要求低,能方便地应用于临床检验。但由于其所需离心时间较长,将其用于高敏肌钙蛋白定量检测时,发现其较难到达灵敏度和精密度的要求。

[0012] 因此,开发研制出分析灵敏度高和精密度高的高敏肌钙蛋白(hs-cTn)定量检测系统极为必要。

发明内容

[0013] 发明要解决的问题

[0014] 为了解决现有技术的上述问题,本发明提供了一种微流控芯片,并利用其进一步实现高敏肌钙蛋白检测试剂盒的开发,通过微流控技术进一步提升了免疫层析试剂性能,

获得了分析灵敏度高和精密度高的高敏肌钙蛋白定量检测系统。

[0015] 用于解决问题的方案

[0016] 经过本发明发明人潜心研究,发现通过如下技术方案,能够解决上述技术问题:

[0017] [1].本发明提供了一种微流控芯片,所述微流控芯片包含叠置的三层,所述芯片上层包含加样区,芯片下层设有凹槽,芯片中间层为双面胶层,在所述双面胶层上用有胶区和无胶区分隔出样本流动通道,所述样本流动通道包括加样孔区、流道检测区、废液槽区,其中所述加样孔区与所述芯片上层的加样区相对应,所述废液槽区至少覆盖所述芯片下层的凹槽,所述流道检测区为弧形,所述流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽度小于流道检测区流道中间弧形段的宽度,进一步优选地,前者的宽度比后者的宽度=1:1.5~2.5,更进一步优选为1:2。

[0018] [2].根据[1]所述的微流控芯片,所述流道中间弧形段宽度为2-4mm,进一步优选所述流道中间弧形段宽度为2.5-4mm,所述拐弯处流道宽度为1-2mm,进一步优选1-1.5mm。

[0019] [3].根据[1]或[2]所述的微流控芯片,所述芯片上层朝向所述芯片中间层的一侧表面经过磨砂处理。

[0020] [4].根据[1]-[3]任一项所述的微流控芯片,所述芯片上层朝向所述芯片中间层的一侧表面为平均表面粗糙度Ra在0.05~0.15范围内的磨砂表面。

[0021] [5].根据[1]-[4]任一项所述的微流控芯片,所述芯片下层还设有加样孔,在所述加样孔内预包埋表面活性剂和封闭剂。

[0022] [6].本发明还提供了根据[1]-[5]任一项所述的微流控芯片在制备高敏肌钙蛋白检测试剂盒中的用途。

[0023] [7].本发明还提供了一种高敏肌钙蛋白检测试剂盒,所述试剂盒内包括一个或多个如[1]-[5]任一项所述的微流控芯片。

[0024] [8].本发明进一步提供了如[7]所述的试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0025] 1) 抗体-荧光微球标记复合物的制备:将心肌肌钙蛋白T单克隆抗体加入到经活化处理的荧光微球溶液中,混匀,加入淬灭剂、封闭剂,离心清洗;

[0026] 2) 微流控芯片制备:i) 通过激光在双面胶层刻蚀样本流体通道,刻蚀时减小流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽度,使其小于流道检测区流道中间弧形段的宽度;ii) 配制加样孔处理液,喷在芯片下层的加样孔处,干燥处理;iii) 制备点样试剂;iv) 将配制好的点样试剂点在步骤ii)干燥处理后的芯片下层上;v) 将点样完成的芯片下层干燥处理,贴上步骤i)制备得到的双面胶层,盖上芯片上层,压紧。

[0027] [9].根据[8]所述的制备方法,所述芯片上层朝向所述双面胶层的一侧表面经过磨砂处理。

[0028] [10].根据[8]或[9]所述的制备方法,所述加样孔处理液包括磷酸盐缓冲液、海藻糖、曲拉通-100和牛血清白蛋白。

[0029] [11].根据[8]-[10]任一项所述的制备方法,所述制备点样试剂步骤ii)包括制备双T区点样试剂。

[0030] 发明的效果

[0031] 本发明的微流控芯片可以获得分析灵敏度高和精密度高的高敏肌钙蛋白定量检测系统。通过对芯片双面胶的结构优化,减小流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽

度,使离心后的废液完全停留在废液槽内;通过对芯片上盖表面进行磨砂处理,可以解决液体流速不均以及贴壁流动问题,无需对芯片表面再进行亲水处理即可达到液体在通道均匀流动,同时粗糙的通道表面能提高液体混匀效率;将表面活性剂和封闭剂预包埋在加样孔,无需对芯片表面进行亲水处理,进一步解决样本不稀释情况下的流动问题和样本非特异性干扰问题,同时减小因前处理不均匀导致CV变大,减少因芯片处理带来的繁琐工艺;在检测区创新性包被双T线,有效再结合没有被充分反应的抗原,能够进一步提高试剂灵敏度。上述结构的改进使得采用本发明的微流控芯片制备得到的高敏肌钙蛋白T检测试剂盒批内精密度和批间精密度高(CV均 $\leq 10\%$)、最低检测限不高于5ng/L,小于第99百分位的参考上限(第99百分位为6ng/L)定量检测范围为5~50000ng/L,线性相关系数 $R \geq 0.999$,测试血浆、全血和血清3种样本,相关性系数 $R > 0.98$,斜率在0.9-1.0范围内试剂性能良好。同时本发明的微流控芯片制备工艺简单,无需对芯片表面进行亲水处理,无需配合微泵微阀等,对检测设备要求较小,可以非常方便的应用于免疫学单项目或多项目测定。将本发明开发的高敏肌钙蛋白检测试剂盒与干式离心免疫荧光检测仪(如专利文献6公开的离心式检测装置)作为一个检测系统,一次可实现3个样本的测试,测试所需的离心时间较短,仅需10秒,提高了检测效率,且可以同时测试血清、血浆和全血样本,样本类型齐全,满足急诊、胸痛中心、ICU等紧急使用场景的快检需求。

附图说明

- [0032] 图1:本发明提供的微流控芯片的磨砂芯片上层结构示意图。
- [0033] 图2:本发明提供的微流控芯片的芯片中间层结构示意图。
- [0034] 图3:本发明提供的微流控芯片的加样孔经处理的芯片下层结构示意图。
- [0035] 图4:本发明提供的微流控芯片的芯片下层点样区域结构示意图。
- [0036] 图5:cTnT的标准曲线。
- [0037] 图6:cTnT线性相关性曲线。
- [0038] 图7:35例cTnT血浆相关性曲线。
- [0039] 图8:30例cTnT全血相关性曲线。
- [0040] 图9:30例cTnT血清相关性曲线。
- [0041] 附图标记说明
- [0042] 芯片上层 100
- [0043] 芯片下层 200
- [0044] 芯片中间层 300
- [0045] 加样区 101
- [0046] 磨砂表面 102
- [0047] 芯片下层的凹槽 201
- [0048] 芯片下层的加样孔 202
- [0049] 有胶区 301
- [0050] 无胶区 302
- [0051] 加样孔区 303
- [0052] 流道检测区 304

- [0053] 废液槽区 305
- [0054] 流道检测区流道中间弧形段的宽度 A
- [0055] 流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽度 B
- [0056] 包被抗体的荧光微球点样区 4
- [0057] 质控抗体点样区 5
- [0058] 检测抗体第一点样区 6
- [0059] 检测抗体第二点样区 7

具体实施方式

[0060] 以下,针对本发明的内容进行详细说明。以下所记载的技术特征的说明基于本发明的代表性的实施方案、具体例子而进行,但本发明不限于这些实施方案、具体例子。

[0061] 需要说明的是:

[0062] 本说明书中,使用“数值A~数值B”表示的数值范围是指包含端点数值A、B的范围。

[0063] 本说明书中,使用“可以”表示的含义包括了进行某种处理以及不进行某种处理两方面的含义。

[0064] 本说明书中,“任选的”或“任选地”是指接下来描述的事件或情况可发生或可不发生,并且该描述包括该事件发生的情况和该事件不发生的情况。

[0065] 本说明书中,所提及的“一些具体/优选的实施方式”、“另一些具体/优选的实施方式”、“实施方式”、“实施方案”等是指所描述的与该实施方式有关的特定要素(例如,特征、结构、性质和/或特性)包括在此处所述的至少一种实施方式中,并且可存在于其它实施方式中或者可不存在于其它实施方式中。另外,应理解,所述要素可以任何合适的方式组合在各种实施方式中。

[0066] 本发明的说明书和权利要求书及上述附图中的术语“包括”以及它们任何变形,意图在于覆盖不排他的包含。例如包含一系列步骤或单元的过程、方法或系统、产品或设备没有限定于已列出的步骤或单元,而是可选地还包括没有列出的步骤或单元,或可选地还包括对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤或单元。

[0067] <微流控芯片>

[0068] 本发明提供了一种微流控芯片,所述微流控芯片包含叠置的三层:芯片上层、芯片下层、芯片中间层。芯片的形状可以是类椭圆形、方形、长方形、多边形或者圆形,优选地,其形状为类椭圆形以实现更好地握持。在本发明的一个具体实施方式中,芯片上下层的厚度均为1.5~2.5mm,如果厚度太薄,则芯片加载样本量过小并且容易变形,如果厚度太厚,透光性会受到影响,影响检测结果,同时也不符合芯片小型化的需求。芯片中间层的厚度为0.05~0.5mm。芯片上层和下层之间靠中间层粘贴或者中间层粘贴和卡扣共同进行密合固定。

[0069] 芯片上层和芯片下层的材料选自聚苯乙烯、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、玻璃或聚碳酸酯中的一种;优选的,所述芯片上层和芯片下层的材料选自聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯或聚碳酸酯;所述芯片中间层为聚对苯二甲酸乙二醇酯或聚甲基丙烯酸甲酯。

[0070] 芯片上层主要用于将样本引入检测区域,所述芯片上层包含加样区,在其上设有

用于添加样本的孔,孔可设计成可与生物实验中常规实验的标准规格的移液枪枪头严密匹配的圆形,直径可在2mm~3mm之间,通过孔添加的样本可以沿着样本流动通道流动。由于本发明采用的重力和毛细管作用自驱动和短时离心相结合,本发明的加样区中无需固定有全血过滤装置如全血滤膜等,可以减少样本浪费,提高样本利用效率。加样区的形状与芯片中间层的加样孔区形状相对应,芯片上层加样区上添加样本的孔与芯片下层的加样孔相对应。在一种可能的实施方式中,加样区为不规则扇形。芯片上层还包括通气孔,即加样区通气孔和废液池通气孔。所述通气孔为与大气相通的通孔,优选是圆形通孔以改善样本溶液的流动性,直径可在0.5~2.0mm范围内。在一种可能的实施方式中,芯片上层设置1个加样区通气孔和1个废液池通气孔。在另一种可能的实施方式中,加样区通气孔可以设置多个,取决于加样区的个数。为了有利于芯片的组装和固定,芯片上层还可以设置安装定位孔,在本发明的一个具体实施方式中设置2个安装定位孔。

[0071] 为了改善液体在样本流动通道中的流动状态,在本发明的一个优选的实施方式中,通过对芯片上层与样本接触的表面进行表面粗糙处理来实现。芯片材料本身具有不均一的亲水性,液体流经芯片表面时,由于接触角大小不一致,使得接触角较小的液滴快速向前扩张流动,而接触角较大的液滴流速较慢,液体会迅速汇入接触角较小的液体中,导致液体在通道中分布不均,流速差异大。将芯片上层接触液体样本的表面设置为粗糙表面后,由于其具有许多微小突出,突出之间存在较多沟壑,液体在表面流动时受到张力和重力作用,使得液体在进入体积较小的沟壑中时压强较大,迅速向四周扩散释放压力,通道会被快速充满,同时液体在沟壑中不断接触交汇、相互牵制,速度趋于一致,直至流过通道。本领域技术人员可以根据样本流动情况确定所需的粗糙程度。在本发明的多个实施方式中,采用磨砂处理的方式,芯片上层的一个表面为平均表面粗糙度Ra在0.05~0.15范围内的磨砂表面,采用该范围的粗糙程度,可以保证样本流速合适且流动均匀,另外也不会对透光性有过多影响,保证检测结果,如果超过上限,则会导致流动阻力的增大。优选地,芯片上层的一个表面为平均表面粗糙度Ra在0.05~0.10范围内,进一步优选0.05~0.08范围内,更优选0.06的磨砂表面。所述平均表面粗糙度Ra是指用表面粗糙度测量仪对芯片表面粗糙度进行测量,测量50片,同时用显微镜配合显微标尺复核,取平均值。在本发明的一个具体实施方式中,使用经表面粗糙处理的磨砂模具制备得到具有磨砂表面的芯片上层。具体地,使用高精密喷砂工具在普通上盖模具表面均匀喷射,模具成型后,材料注塑,便可以形成芯片粗糙表面。

[0072] 本发明的芯片中间层为双面胶层,在所述双面胶层上用有胶区和无胶区分隔出样本流动通道,所述样本流动通道包括加样孔区、流道检测区、废液槽区,其中所述加样孔区与所述芯片上层的加样区相对应,所述废液槽区至少覆盖所述芯片下层的凹槽(即芯片下层的废液槽),所述流道检测区为弧形。当将芯片上下层和中间层密合后,所述废液槽区的主要作用在于存储废液,即相当于废液池。本发明对双面胶层进行了结构优化,减小流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽度,使其小于流道检测区流道中间弧形段的宽度,这样就使得即使施加短的离心时间时离心后的废液也能够完全停留在废液槽内,提高了高敏心肌蛋白检测准确度。在本发明中流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽度是指拐弯处的平均宽度,在本发明的一个具体实施方式中采用游标卡尺测试拐弯处流道宽度10次,取平均值。流道检测区流道中间弧形段的宽度指的也是平均宽度。优选地,流道检测区与废

液槽区交接的拐弯处流道宽度比流道检测区流道中间弧形段的宽度=1:1.5~2.5,进一步优选为1:2。在本发明的一个具体实施方式中,流道检测区的弯曲半径25~35mm(参见专利文献6,以固定装置的旋转托盘离心轴心为圆心的半径),弧度在1.8~2.2rad范围内,所述流道中间弧形段宽度为2-4mm,进一步优选所述流道中间弧形段宽度为2.5-4mm,所述拐弯处流道宽度为1-2mm,进一步优选1-1.5mm。

[0073] 本发明的芯片下层设有凹槽(即芯片下层的废液槽)以便于收集离心时流道检测区甩出的残余废液,凹槽对应于芯片中间层的废液槽区的下半部分,为异形,深度在1-2mm。在一个优选的实施方式中,芯片下层还包括一个加样孔,该加样孔对应于芯片上层加样区内用于添加样品的孔,在所述加样孔内预包埋表面活性剂和封闭剂,这样就无需提前稀释样本,减少因前处理不均匀导致CV变大,简化芯片处理工艺。在本发明的一个具体实施方式中,加样孔为圆形,直径在2mm~3mm之间。在本发明的芯片下层对应于芯片中间层流道检测区的位置处进行点样,通过固定荧光微球-抗体标记物和抗体以进行免疫指标检测,通过设立质控抗体点样区以减少产品批间和/或批内变异,提高产品质量。在本发明的一个优选实施方式中,顺着样本流动的方向,依次设置检测抗体第二点样区、检测抗体第一点样区和质控抗体点样区,通过创新性包被双T线,有效再结合未被充分反应的抗原,可以进一步提高试剂灵敏度。

[0074] <高敏肌钙蛋白检测试剂盒>

[0075] 本发明进一步提供了一种高敏肌钙蛋白检测试剂盒,所述试剂盒内包括一个或多个本发明前述的微流控芯片。

[0076] 本发明的高敏肌钙蛋白检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0077] 1) 抗体-荧光微球标记复合物的制备:将心肌肌钙蛋白T单克隆抗体加入到经活化处理的荧光微球溶液中,混匀,加入淬灭剂、封闭剂,离心清洗;

[0078] 2) 微流控芯片制备:i) 通过激光在双面胶层刻蚀样本流体通道,刻蚀时减小流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽度,使其小于流道检测区流道中间弧形段的宽度;ii) 配制加样孔处理液,喷在芯片下层的加样孔处,干燥处理;iii) 制备点样试剂;iv) 将配制好的点样试剂点在步骤ii)干燥处理后的芯片下层上;v) 将点样完成的芯片下层干燥处理,贴上步骤i)制备得到的双面胶层,盖上芯片上层,压紧。

[0079] 在本发明的一个实施方式中,步骤1)荧光微球活化处理的方法为:取羧基修饰的荧光微球于MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)缓冲溶液(0.05-0.1M,pH=6~7)中,充分混匀,洗涤一次,2-8℃、12000-15000rpm条件下离心20-30分钟后去上清,然后加入MES缓冲液,超声,再加入EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)溶液和sulfo-NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)溶液,充分混匀,避光反应。在本发明的一个具体实施方式中,稀土纳米时间分辨荧光微球的粒径为200-300nm,固含量为1%,可商购获得,EDC和sulfo-NHS溶液浓度均为1mg/mL,以50uL荧光微球量,加入量分别为0.02-0.1ml和0.05-0.5mL。

[0080] 在本发明的一个实施方式中,步骤1)的淬灭剂为Gly缓冲液(甘氨酸缓冲液)或乙醇胺。在本发明的一个具体实施方式中,在抗体和荧光微球反应之后,加入0.1mL Gly buffer(0.5M,pH8.0)或1-5uL乙醇胺中的一种淬灭剂,20-37℃条件下,置于摇摆混匀仪上避光反应30min。

[0081] 在本发明的一个实施方式中,先用缓冲液稀释心肌肌钙蛋白T单克隆抗体(cTnT单

克隆抗体),可选的缓冲液包括MES buffer (0.05-0.1M, pH6.1)、硼砂-硼酸缓冲溶液(0.05-0.2M, pH8.0)或Borax(硼砂)(0.05-0.2M, pH8.0)。cTnT单克隆抗体相对于荧光微球溶液(固含量为1%)的添加量为:0.02-0.2mg:0.03-0.06mL。

[0082] 在本发明的一个实施方式中,步骤1)的封闭剂为牛血清白蛋白(BSA)。具体地,在加入淬灭剂反应之后,使用0.1mL10%BSA封闭30-60分钟。

[0083] 在本发明的一个实施方式中,步骤1)的离心清洗步骤包括2-8℃、12000-15000rpm条件下离心20-30分钟后去上清,沉淀用甘氨酸的缓冲溶液重悬,缓冲溶液中含有0.05-0.1M甘氨酸(pH8-9),同时含有1-3%BSA、1-3%海藻糖;或用HEPES缓冲溶液重悬,缓冲液中含有0.05-0.1M HEPES(pH7.4),同时含有1-3%BSA、1-3%海藻糖,超声分散均匀,制备好的荧光微球2-8℃条件下避光保存备用。

[0084] 在本发明的一个实施方式中,步骤2)的i)步骤可以采用激光雕刻机对双面胶层进行刻蚀,可以提高生产效率、降低生产成本且制备时候减少对环境的污染。

[0085] 在本发明的一个实施方式中,步骤2)的ii)步骤中所述加样孔处理液包括磷酸盐缓冲液、海藻糖、曲拉通-100(即曲拉通X-100)和牛血清白蛋白。在本发明一个具体实施方式中,所述加样孔处理液是含有1-5%海藻糖、1-5%曲拉通-100、1-5%BSA的磷酸盐缓冲液(0.5M, pH7.4)。

[0086] 在本发明的一个优选实施方式中,步骤2)的iii)步骤包括:配制C、T点样稀释液;按实际浓度取适量cTnT单克隆检测抗体用上述稀释液将抗体稀释至浓度为0.5-2.0mg/mL,为T1、T2区点样试剂,设置两个T区点样试剂有助于进一步提高试剂灵敏度;按照实际浓度取适量羊抗鼠质控抗体用上述稀释液将抗体稀释至浓度为0.5-2.0mg/mL,用于C区点样试剂;配制抗体-荧光微球复合物点样试剂稀释液,稀释cTnT抗体-荧光微球标记复合物溶液,命名为R点样试剂。在本发明的一个具体实施方式中,C、T点样稀释液为磷酸盐缓冲液(0.02M,含1-3%海藻糖,含0.05-0.1%曲拉通-100)。在本发明的另一个具体实施方式中,抗体-荧光微球复合物点样试剂稀释液为3%海藻糖+1%BSA稀释液。

[0087] 在本发明的一个实施方式中,步骤2)的iv)步骤包括用点样仪将配制好的T1、T2、C、R试剂点在步骤ii)干燥处理后的芯片下层相应的位置。其中C、T1、T2区点样量为0.2-2.0μL/点,R点样量为0.5-8.0μL/点。

[0088] 在本发明的一个实施方式中,步骤2)的v)步骤将点样完成的芯片下层干燥处理12-24小时,贴上步骤i)制备得到的双面胶层,盖上芯片上层,压紧。进一步地,为了保证样本流速合适且流动均匀,本发明优选对芯片上层朝向所述双面胶层的一侧表面进行磨砂处理。在本发明的一个优选实施方式中,使用高精密喷砂工具在普通上盖模具表面均匀喷射,模具成型后,材料注塑,形成平均表面粗糙度Ra在0.05~0.15范围内的磨砂表面。

[0089] <微流控芯片的用途>

[0090] 本发明的微流控芯片可用于制备高敏肌钙蛋白检测试剂盒。在本发明的微流控芯片使用时,可以将本发明的微流控芯片放置到离心检测装置的微流控模块中,离心检测装置参见专利文献6。直接将新鲜血液80-300μL滴加进样,无需进行稀释前处理,也无需对芯片表面进行亲水处理,样本在重力作用和毛细管作用下在样本流动通道内流动,先与包被了捕获抗体的荧光微球混合,之后与检测抗体和多抗反应,产生荧光信号。在本发明中可以将3个芯片固定在同一固定装置上,施加短时离心力(比如10秒-30秒),转速在2000-

6000rpm范围内,目的在于甩干流道检测区的残余废液。之后读取检测区内检测质控抗体点样区和检测抗体点样区的荧光强度,通过检测标准品拟合定标曲线,即可以计算出样本中肌钙蛋白的含量。本发明的检测方法离心时间短,仅离心10秒;检测时间短,10-15分钟出结果;灵敏度和精密度高。

[0091] 实施例

[0092] 以下说明本发明的实施例,但本发明不限于下述的实施例。

[0093] 实施例1制备微流控芯片

[0094] 一、制备芯片三层结构

[0095] 采用模具制备得到芯片上层和下层,采用激光雕刻机对双面胶层进行刻蚀获得芯片中间层。

[0096] 如图1-3所示,实施例1所使用的微流控芯片包含如下三层结构:芯片上层100、芯片下层200、芯片中间层300。

[0097] 芯片上层100的材质是PMMA,形状为类椭圆形,上层100的厚度为2.0mm。如图1所示,芯片上层100包含加样区101,加样区101的形状为不规则扇形。芯片上层具有两个表面,其中与液体样本接触的表面102为平均表面粗糙度Ra约0.06的磨砂表面。

[0098] 芯片中间层300为双面胶层,材质为PET胶,厚度为0.05mm。采用激光雕刻机对双面胶层进行刻蚀,用有胶区301和无胶区302分隔出样本流动通道(即无胶区302),如图2所示。所述样本流动通道可细分为加样孔区303、流道检测区304、废液槽区305三个区域,其中所述加样孔区303与所述芯片上层的加样区101形状相同,所述废液槽区305完全覆盖所述芯片下层的凹槽201,其面积大于凹槽的面积。流道中间弧形段宽度A为3mm,长度为30mm,所述流道检测区的弯曲半径32mm,弧度2.09rad,流道检测区与废液槽区交接的拐弯处流道宽度B为1.2mm,该宽度采用游标卡尺测试拐弯处流道宽度10次,取平均值,参见表1。

[0099] 表1:拐弯处流道宽度测试结果

[0100]

测试次	流道宽度 (mm)
1	1.2
2	1.2
3	1.1
4	1.3
5	1.3
6	1.2
7	1.2
8	1.1
9	1.2
10	1.2
AVE	1.2

[0101] 芯片下层200的材质是PMMA,形状与芯片上层相匹配,芯片下层200的厚度为2.0mm。如图3所示,芯片下层200包括一收集离心时残余废液的凹槽201,为异形,长宽深的最大尺寸为32mm×3.3mm×1.5mm。芯片下层还包括芯片下层的加样孔202,该加样孔对应于芯片上层加样区内用于添加样品的孔,加样孔202为圆形,直径在2mm之间。

[0102] 二、抗体-荧光微球标记复合物的制备

[0103] 2.1取0.05mL羧基修饰的荧光微球(粒径为300nm,固含量为1%)于0.95mL MES buffer (0.05M, pH6.1) 中,充分混匀,洗涤1次,2-8℃、15000rpm条件下离心30分钟后去上清;

[0104] 2.2在2.1中加入1mL MES buffer (0.05M, pH6.1), 20%功率下超声1分钟(超1秒停1秒),再分别加入1mg/mL的EDC溶液0.02mL和1mg/mL的sulfo-NHS溶液0.05mL,充分混匀,37℃条件下,置于摇摆混匀仪上避光反应30min;

[0105] 2.3 2-8℃、15000rpm条件下离心30分钟后去上清,再加入0.5mL MES buffer (0.05M, pH6.1) 超声重悬。

[0106] 2.4取0.05mg的cTnT单克隆捕获抗体,加入到0.5mLMES buffer (0.05M, pH6.1) 稀释;

[0107] 2.5将2.3加入到2.4稀释好的抗体中,快速充分混匀,37℃条件下,置于摇摆混匀仪上避光反应3小时;

[0108] 2.6然后在2.5中加入0.1mL Gly buffer (0.5M, pH8.0) 淬灭剂,37℃条件下,置于摇摆混匀仪上避光反应30min;

[0109] 2.7然后在2.6中加入封闭剂0.1mL 10%BSA封闭60min;

[0110] 2.8 2-8℃、15000rpm条件下离心30分钟后去上清,沉淀用HEPES缓冲溶液重悬,缓冲液中含有0.1M HEPES (pH7.4),同时含有1%BSA、2%海藻糖溶液悬浮,超声分散均匀,制备好的荧光微球2-8℃条件下避光保存备用。

[0111] 三、芯片下层的加样孔处理工艺

[0112] 3.1配制磷酸盐缓冲液 (0.5M, pH7.4, 含1%海藻糖、2%曲拉通-100、3%BSA) 作为加样孔处理液;

[0113] 3.2用点样仪将上述磷酸盐缓冲液喷在芯片下层的加样孔处点,10μL喷量;

[0114] 3.3将上述处理好的芯片置于37℃干燥箱内干燥2小时,用于后续点样工序。

[0115] 四、C、T线包被液的制备

[0116] 4.1制C、T点样稀释液:PB buffer (0.02M, 含2%海藻糖,含0.05%曲拉通-100);

[0117] 4.2实际浓度取适量cTnT单克隆检测抗体用4.1稀释液将抗体稀释至浓度为1.0mg/mL,为T1、T2区点样试剂;

[0118] 4.3按照实际浓度取适量羊抗鼠质控抗体用4.1稀释液将抗体稀释至浓度为1.0mg/mL,用于C区点样试剂。

[0119] 五、抗体-荧光微球复合物点样试剂稀释液的配制

[0120] 用3%海藻糖+1%BSA稀释液将1.7所获得的cTnT抗体-荧光微球标记复合物溶液稀释至800倍,命名为R点样试剂。

[0121] 六、点样包被

[0122] 用点样仪将配制好的T1、T2区点样试剂、C区点样试剂、R点样试剂点在3.3处理好的芯片下层相应的位置,参见图4,R点样试剂点在包被抗体的荧光微球点样区4,C区点样试剂点在质控抗体点样区5,T1区点样试剂点在检测抗体第一点样区6,T2区点样试剂点在检测抗体第二点样区7。其中C、T1、T2区点样试剂的点样量为0.5μL/点,R点样试剂的点样量为6.6μL/点。将点样包被完成的芯片下层置于37℃干燥箱内干燥12-18小时。

[0123] 七、芯片组装工艺

[0124] 干燥好的芯片下层置于组装治具上,依次贴上前述(一)获得的双面胶层,盖上前述(一)获得带有磨砂表面的芯片上层,压卡仪压紧,得到微流控芯片,用铝箔袋密封保存备用。

[0125] 应用例1

[0126] 使用实施例1制备高敏肌钙蛋白T检测试剂盒。

[0127] 一、标准曲线的制备

[0128] 1. 系列浓度参考品的制备:

[0129] 用人基质阴性血清稀释cTnT抗原,按照稀释比例不高于1:9的比例逐级将抗原稀释,配制系列梯度的混合参考品,cTnT终浓度分别为:5、20、100、300、1000、5000、10000、50000ng/L,以人基质阴性血清作为0ng/mL。

[0130] 2. 系列浓度参考品的测试:

[0131] 取100 μ L样本直接加样到上述实施例1制备得到的微流控芯片上,反应10分钟,将微流控芯片装在干式离心免疫检测仪的固定装置中(如采用专利文献6的图6所述的固定装置),施加3000rpm逆时针离心力10秒,观察离心后微流控芯片的样品,发现即使施加很短的离心时间也可以使离心后的废液完全停留在废液槽内。然后通过荧光读数仪,读取T/C信号值。每个参考品浓度检测三次,取信号均值。

[0132] 3. 标准曲线的拟合

[0133] 横坐标表示测试系列参考品的浓度,纵坐标表示T/C信号值,拟合标准曲线。cTnT原始数据均值见表2,标准曲线见图5, $R^2=0.99978 \geq 0.999$,标准曲线拟合度较好。

[0134] 表2:cTnT标准曲线原始数据

编号	cTnT参考品浓度 (ng/L)	T/C均值
1	50000	2.521
2	10000	1.812
3	5000	1.351
4	1000	0.556
5	300	0.215
6	100	0.121
7	20	0.052
8	5	0.037
9	0	0.011

[0136] 二、性能效果测试

[0137] 1. 精密度:

[0138] 各重复10次测试100ng/L和1000ng/L两个水平的参考品,计算变异系数CV均不大于10%,本发明试剂盒精密度良好。精密度测试结果见表3。

[0139] 表3:精密度测试结果

测试次数	100ng/L	1000ng/L
1	105.1	1128
2	98.51	1017

3	110.1	1037
4	88.75	1010
5	95.06	910.2
6	110.1	912.1
7	101.1	1110
8	103.2	939.9
9	89.98	1000
10	98.18	989.1
平均	100.008	1005.391
STD	7.440	74.215
CV	7.4%	7.4%

[0141] 2. 线性范围:

[0142] 浓度参考品, 每个参考品浓度检测三次, 计算平均值, 以参考品浓度为横坐标, 测试均值结果为纵坐标, 进行直线拟合, 计算相关稀释R, 在5-50000ng/L线性范围内R=1, 绝对偏差和相对偏差性能均良好。测试结果见表4和图6。

[0143] 表4: 线性范围测试结果

cTnT 参考品浓度 (ng/L)	测试 1	测试 2	测试 3	平均	估计值	绝对偏差 (ng/L)	相对偏差
50000	49830	51071	48992	49964.333	50772.735		-1.6%
10000	10397	10276	9875	10182.430	10148.735		0.3%
5000	5053	4945	5004	5000.330	5070.735		-1.4%
1000	1070	1037	971.8	1026.310	1008.335		1.8%
300	297.1	278.3	311.1	295.533	297.415		-0.6%
100	96.51	110.1	96.15	100.903	94.295		7.0%
20	18.84	19.12	22.35	20.103	13.047	7.056	
5	4.15	5.23	6.11	5.163	-2.187	7.350	
0	<5	<5	<5	<5	-7.265		
R	1						

[0144] 三、样本测试

[0145] 测试从上海市东方医院收集的并用罗氏肌钙蛋白T试剂盒赋值的血浆样本35例, 同源全血样本30例, 测试结果见表5, 血浆相关性见图7, $R^2=0.9878$ 、全血相关性见图8, $R^2=0.9811$; 血清样本30例, 测试结果见表6, 相关性见图9, $R^2=0.9887$ 。由三种样本类型的检测结果可见, 本发明高敏肌钙蛋白试剂盒检测临床血浆、全血和血清样本与罗氏测试结果相关性良好。

[0146] 表5: 35例血浆样本和30例同源全血样本测试结果

样本编号	罗氏赋值浓度 (ng/mL)	血浆测试结果 (ng/mL)	全血测试结果 (ng/mL)
1	0.005	0.011	0.012
2	0.005	0.017	—
3	0.005	0.004	0.006
4	0.007	0.003	—
5	0.007	0.004	0.006
6	0.008	0.012	0.012
7	0.009	0.035	0.037
8	0.009	0.015	0.017
[0148] 9	0.011	0.025	0.027
10	0.012	0.028	—
11	0.025	0.013	0.014
12	0.031	0.068	0.069
13	0.056	0.039	0.040
14	0.077	0.039	—
15	0.091	0.136	0.137
16	0.166	0.126	0.178
17	0.196	0.313	0.365
18	0.361	0.219	0.271
19	0.204	0.122	0.175
20	0.521	0.601	0.654
21	0.796	0.766	—
22	0.878	0.997	1.053
23	0.207	0.198	0.251
24	0.591	0.499	0.551
25	2.375	1.511	1.563
26	0.826	0.528	0.580
[0149] 27	0.647	0.642	0.695
28	0.703	0.779	0.831
29	0.515	0.407	0.460
30	1.037	0.792	0.844
31	1.125	1.572	1.622
32	8.791	9.124	9.151
33	3.13	3.703	3.754
34	6.701	5.861	8.542
35	9.674	9.903	9.951

[0150] 表6:30例血清样本测试结果

样本编号	罗氏赋值浓度 (ng/mL)	血清测试结果 (ng/mL)
[0151] S-1	0.005	0.004
S-2	0.006	0.006
S-3	0.006	0.007
S-4	0.008	0.004
S-5	0.009	0.005
S-6	0.022	0.017

S-7	0.028	0.019
S-8	0.053	0.043
S-9	0.074	0.061
S-10	0.088	0.122
S-11	0.268	0.257
S-12	0.298	0.410
S-13	0.463	0.345
S-14	0.306	0.381
S-15	0.623	0.521
S-16	0.898	1.031
S-17	0.98	1.121
S-18	0.309	0.412
S-19	0.693	0.759
S-20	2.477	3.021
S-21	0.928	1.152
S-22	0.749	0.514
S-23	0.805	0.611
S-24	0.617	0.507
S-25	1.139	1.612
S-26	1.227	1.013
S-27	8.893	8.911
S-28	3.232	4.202
S-29	6.803	7.081
S-30	9.776	9.173

[0152] 以上已经描述了本公开的各实施例,上述说明是示例性的,并非穷尽性的,并且也不限于所披露的各实施例。在不偏离所说明的各实施例的范围和精神的情况下,对于本技术领域的普通技术人员来说许多修改和变更都是显而易见的。本文中所用术语的选择,旨在最好地解释各实施例的原理、实际应用或对市场中的技术的改进,或者使本技术领域的其它普通技术人员能理解本文披露的各实施例。

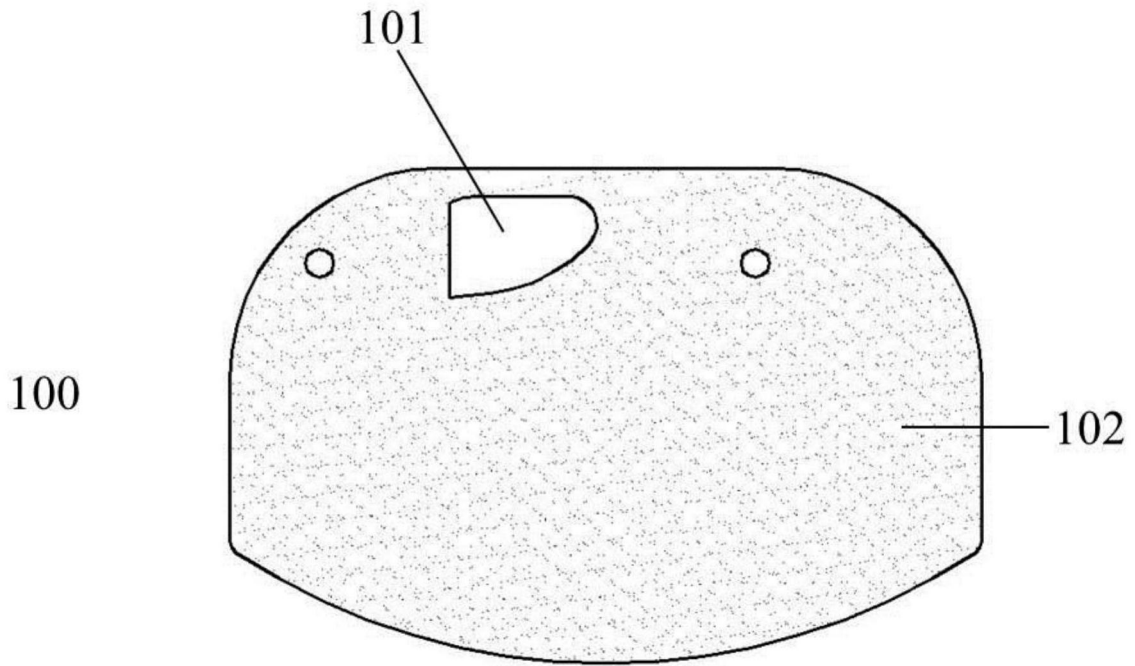


图1

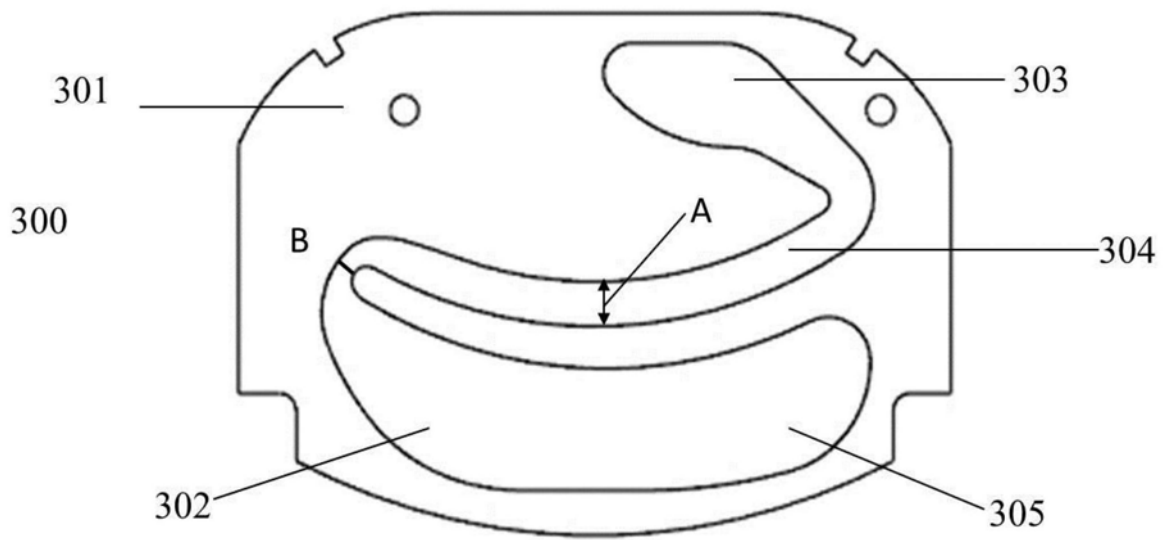


图2

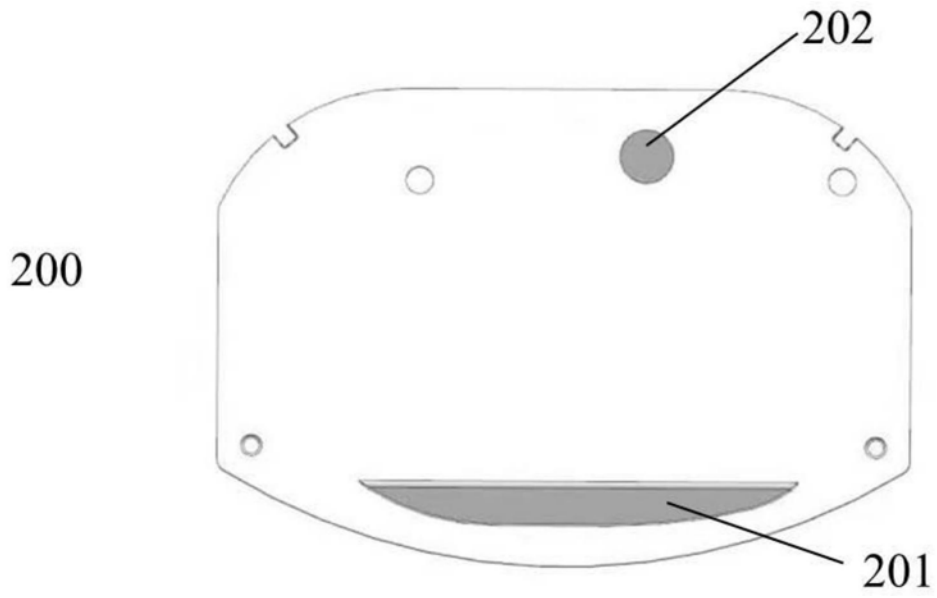


图3

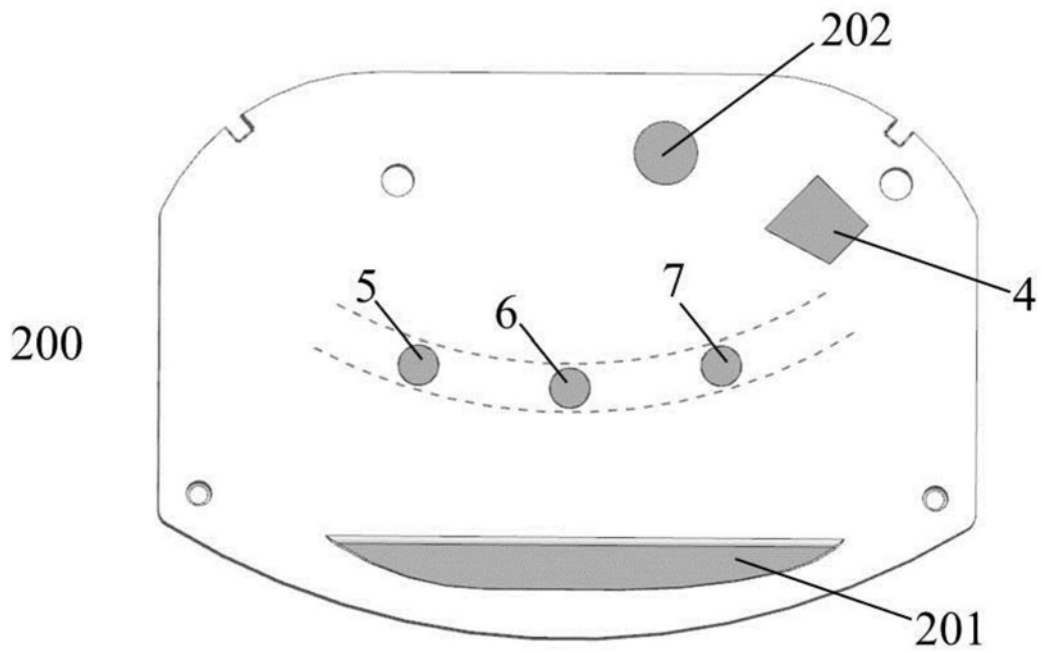


图4

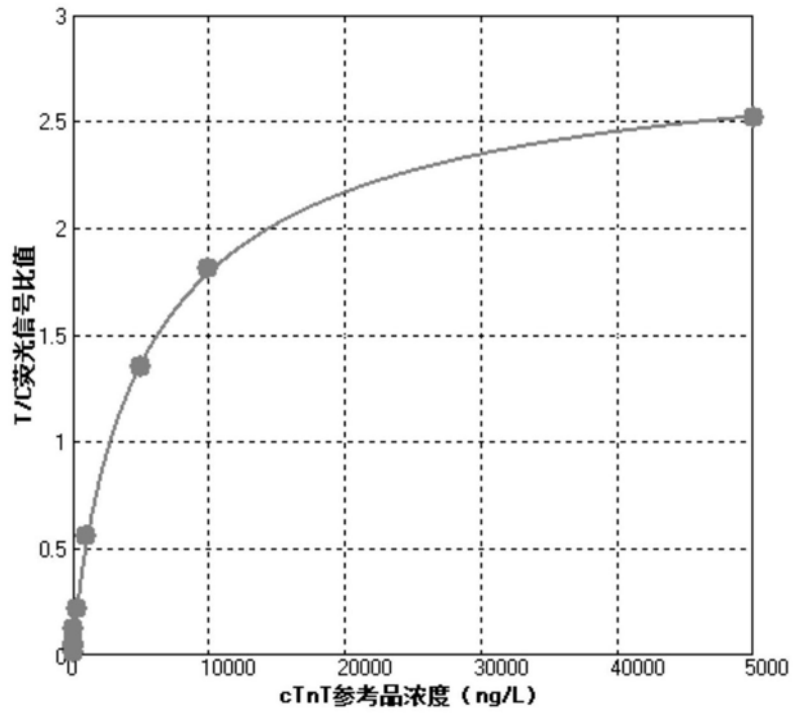


图5

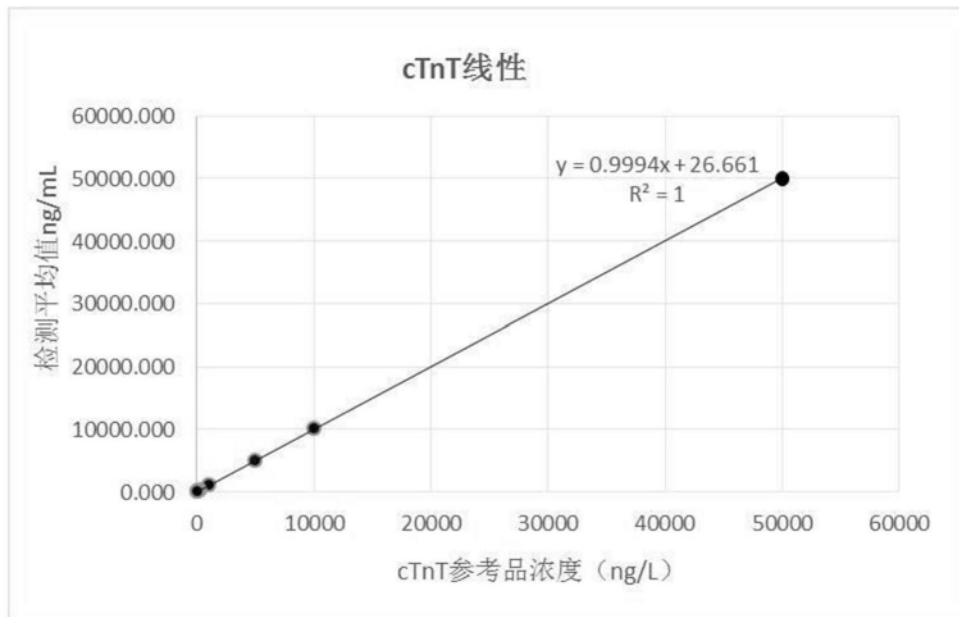


图6

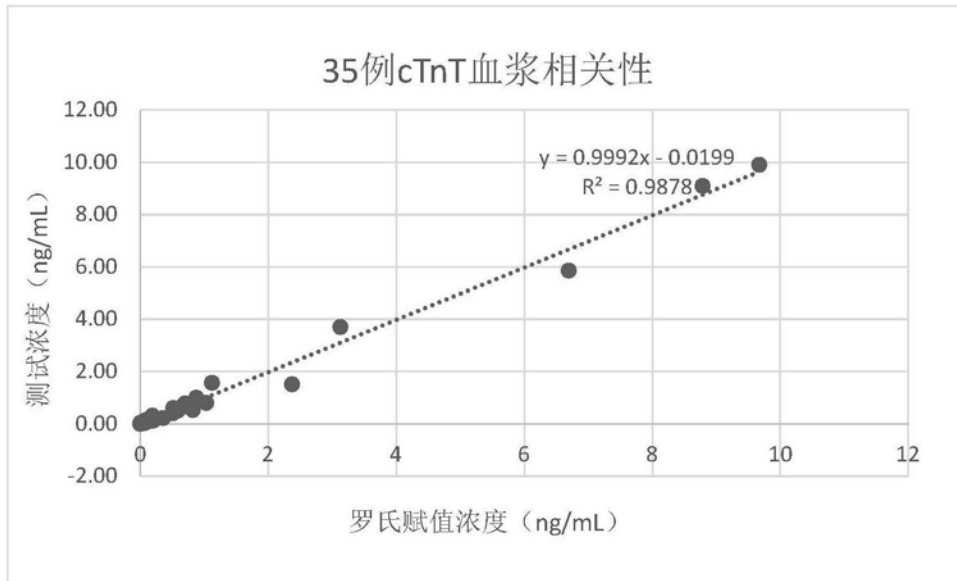


图7

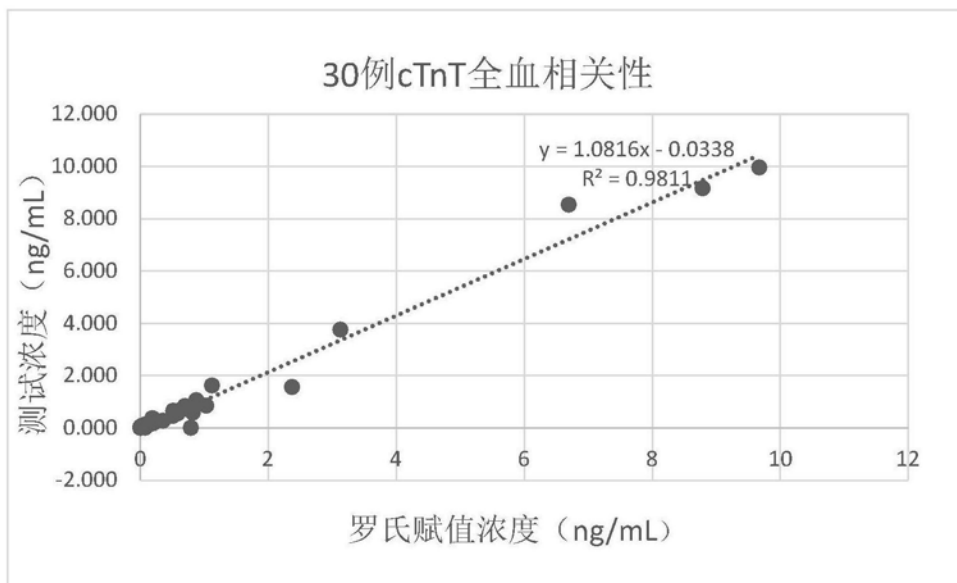


图8

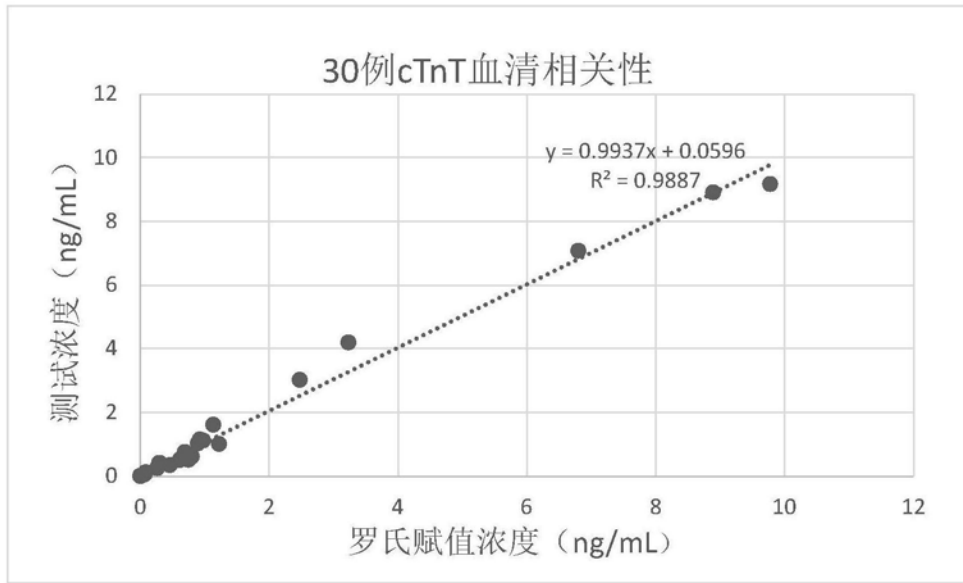


图9