

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 1 月 25 日 (25.01.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/014719 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 27/327 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/091435

(22) 国际申请日: 2017 年 7 月 3 日 (03.07.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201620769829.2 2016 年 7 月 20 日 (20.07.2016) CN

(71) 申请人: 广州易活生物科技有限公司 (GUANGZHOU EZLIFE SCI & TECH CO., LTD.)
[CN/CN]; 中国广东省广州市黄埔区玉岩

路 12 号冠昊科技园一期办公楼三楼 302 室, Guangdong 510700 (CN)。

(72) 发明人: 廖玮 (LIAO, Wei); 中国北京市海淀区颐和园路 5 号, Beijing 100871 (CN)。郭才华 (GUO, Caihua); 中国广东省深圳市罗湖区金稻田路 2053 号, Guangdong 518019 (CN)。张晨光 (ZHANG, Chenguang); 中国北京市宣武区南纬路 27 号, Beijing 510610 (CN)。莫亚勤 (MO, Yaqin); 中国广东省广州市越秀区沿江西路 107 号, Guangdong 510610 (CN)。钟华 (ZHONG, Hua); 中国广东省乐昌市小洞村委会黄联组 22 号, Guangdong 100025 (CN)。

(74) 代理人: 北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司 (HAIHONG JIACHENG INTELLECTUAL

(54) Title: DETECTION ELECTRODE STRUCTURE, DETECTION APERTURE PLATE, AND PREFABRICATED DETECTION APERTURE PLATE

(54) 发明名称: 检测电极结构及检测孔板与预制检测孔板

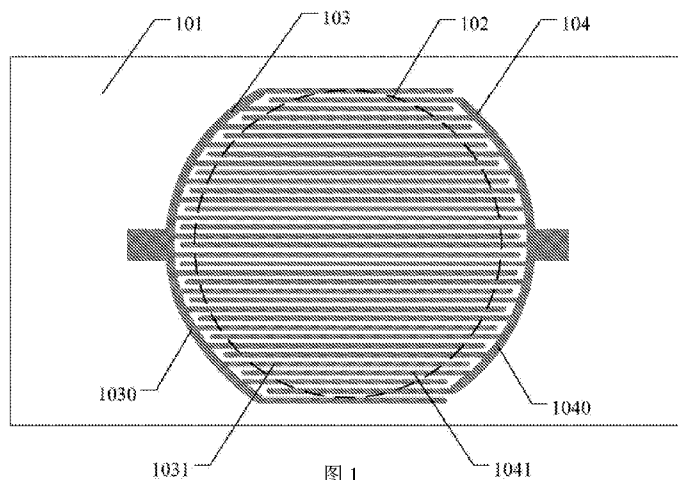


图 1

(57) Abstract: A detection electrode structure, a detection aperture plate, and a prefabricated detection aperture plate, comprising: a base substrate (101), which comprises at least one detection area (102); a working electrode, which is disposed on the base substrate and which is configured to apply a voltage to form an electric field; and a counter electrode (104), which is disposed on the base substrate (101) and which is configured to acquire a detection signal and output said detection signal. The working electrode (103) comprises at least one first linear portion (1031) having a uniform width, the counter electrode (104) comprises at least one second linear portion (1041) having a uniform width; the first linear portion (1031) and the second linear portion (1041) are disposed in the detection area (102) and are alternately arranged at equal intervals.

(57) 摘要: 一种检测电极结构及检测孔板与预制检测孔板, 包括衬底基板 (101), 衬底基板 (101) 包括至少一个检测区域 (102); 工作电极 (103), 工作电极 (103) 设置在所述衬底基板 (101) 上并配置为施加电压以形成电场; 以及对置电极 (104), 对置电极 (104) 设置在所述衬底基板 (101) 上并配置为获取检测信号并输出所述检测信号; 工作电极 (103) 包括至少一个宽度均匀的第一线状部 (1031), 对置电极 (104) 包括至少一个宽度均匀的第二线状部 (1041), 第一线状部 (1031) 和第二线状部 (1041) 设置在检测区域 (102) 并且相互交替等距间隔设置。

PROPERTY & PARTNERS); 中国北京市海淀区海淀南路21号中关村知识产权大厦B座9层, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

检测电极结构及检测孔板与预制检测孔板

技术领域

本发明涉及电化学检测技术的耗材技术，特别是一种检测电极结构及检测孔板与预制检测孔板。

背景技术

液体活检是指使用人体体液，例如血浆、唾液、脑脊液、尿液、眼泪以及母乳等，通过遗传或表观遗传的信息来评估组织的生理或病理状态。

孔板是生物领域一种常用用于培养、存储、测量或分析的容器。孔板通常包括 96 个微孔，因此也被称为 96 孔板。孔板通常采用透明的材料制成，以便于观察和测量。孔板可应用于液体活检，然而，使用通常的孔板进行液体活检的反应时间较长、成本较高、灵敏度较低并且对实施的环境要求较高，因此其应用的范围较窄，无法满足市场的需求。

发明内容

本发明提供一种检测电极结构以及检测孔板。该检测电极结构可通过 工作电极施加电压以形成电场，从而可使带电标靶物质移动、富集，通过对置电极可获取如标靶物质的浓度等检测信号并输出该检测信号，从而可实现对标靶物质的快速、准确检测。另外，通过将工作电极和对置电极设置为宽度均匀的线状结构，并将第一线状部和第二线状部在检测区相互交替且等距间隔设置可形成稳定均一的电场，并且可检测到细微的电流，从而可提高检测精度。

本发明至少一个实施例提供一种检测电极结构，其包括：衬底基板，所述衬底基板包括至少一个检测区；工作电极，所述工作电极设置在所述衬底基板上并配置为施加电压以形成电场；以及对置电极，所述对置电极设置在所述衬底基板上并配置为获取检测信号并输出所述检测信号，所述工作电极包括至少一个宽度均匀的第一线状部，所述对置电极包括至少一个宽度均匀的第二线状部，所述第一线状部和所述第二线状部设置在所述检测区并且相互交替等距间隔设置。

例如，在本发明一实施例中，在该检测电极结构中，所述工作电极包括弧状的第一主体部以及与从所述第一主体部延伸而出的多个相互平行的所述第一线状部，所述对置电极包括弧状的第二主体部以及与从所述第二主体部延伸出的多个相互平行的所述第二线状部，所述第一主体部与所述第二主体部相对设置，所述多个第一线状部与所述多个第二线状部交替间隔等距设置。

例如，在本发明一实施例中，在该检测电极结构中，所述工作电极包括螺旋状排列的所述第一线状部，所述对置电极包括螺旋状排列的所述第二线状部，所述第一线状部与所述第二线状部同心交替间隔等距设置。

例如，在本发明一实施例中，在该检测电极结构中，所述第一线状部和所述第二线状部的宽度范围为 3-20mil。

例如，在本发明一实施例中，在该检测电极结构中，所述第一线状部和所述第二线状部的间距为 3-20mil。

例如，在本发明一实施例中，在该检测电极结构中，还包括：参考电极，所述参考电极设置在所述检测区边缘。

例如，在本发明一实施例中，在该检测电极结构中，所述工作电极和所述对置电极的材料包括金。

例如，在本发明一实施例中，在该检测电极结构中，所述工作电极和所述对置电极设置在同一平面内。

本发明至少一个实施例提供一种检测孔板，其包括：箱体，所述箱体包括多个通孔；以及多个检测电极结构，所述检测电极结构设置在所述箱体的底部，所述检测电极结构为上述任一项所述的检测电极结构，并且，所述检测区设置在所述通孔的底部并将所述通孔的底部密封。

例如，在本发明一实施例中，在该检测孔板中，所述通孔为圆柱形通孔并且成矩阵排列在所述箱体中，所述通孔的数量为四的倍数，四个相邻的所述通孔对应的检测电极结构中的四个所述工作电极电性相连。

例如，在本发明一实施例中，该检测孔板还包括电路板，所述电路板与所述检测电极结构电性相连。

在本发明进一步提供一种用于电化学方法检测靶标分子的预制检测孔板，其特征在于，在权利要求上述任一所述的检测孔板的检测区固定有用于结合或捕获所述靶标分子的捕捉物。

在本发明一实施例中，所述捕捉物是与导电聚合物和离子化合物混合成混合液后加到所述检测区，通过所述工作电极施加方波电场将所述捕捉物固定在检测区制成；

所述方波电场的参数为：电压 A：-200~-500mV，1-5s；电压 B：800~1500mV，1s；3~10 个循环。

在本发明至少一个实施例中，所述导电聚合物选自吡咯、苯胺和噻吩组成的组。

在本发明至少一个实施例中，每 1mL 所述混合液中含超纯水 885 μ L，3mol/L 所述离子化

合物 100 μ L, 导电聚合物 5 μ L, 100 μ M 的捕捉物 10 μ L。

在本发明至少一个实施例中, 所述捕捉物为核酸探针。本领域技术人员可以根据靶标分子的种类选择或设计合适的捕捉物, 例如捕捉物还可以是抗体。

本发明还提供上述预制检测孔板的制备方法, 其特征在于包括以下步骤和参数:

(1) 预备捕捉物与导电聚合物和离子化合物混合成的混合液;

(2) 将所述混合液加入到上述任一所述的检测孔板的检测区中, 通过所述工作电极产生的第一方波电场将所述探针固定在反应孔内底部表面制成;

所述第一方波电场的参数为: 电压 A: -200-500mV, 1-5s; 电压 B :800~1500mV, 1s; 3~10 个循环。

在一些实施例中, 所述第一方波电场的参数设置在软件程序中, 通过软件程序控制所述工作电极实现所述第一方波电场。

本发明还提供一种用于检测靶标分子的试剂盒, 其特征在于, 包含上述任一预制检测孔板。进一步地, 还包含用于检测靶标分子的其它常规试剂。

附图说明

为了更清楚地说明本公开实施例的技术方案, 下面将对实施例的附图作简单地介绍, 显而易见地, 下面描述中的附图仅仅涉及本公开的一些实施例, 而非对本公开的限制。

图 1.为本发明一实施例提供的一种检测电极结构的平面示意图;

图 2.为本发明一实施例提供的另一种检测电极结构的平面示意图;

图 3.为本发明一实施例提供的另一种检测电极结构的平面示意图;

图 4.为本发明一实施例提供的另一种检测电极结构的平面示意图;

图 5a.为本发明一实施例提供的一种检测孔板的立体示意图;

图 5b.为本发明一实施例提供的一种检测孔板的平面示意图;

图 6.为本发明一实施例提供的一种检测孔板的局部立体示意图;

图 7.为本发明一实施例提供的另一种检测孔板的局部立体示意图;

图 8.为本发明一实施例提供的另一种检测孔板的局部立体示意图;

图 9.为本发明一实施例提供的一种检测孔板的局部侧视示意图。

具体实施方式

为使本公开实施例的目的、技术方案和优点更加清楚, 下面将结合本公开实施例的附图,

对本公开实施例的技术方案进行清楚、完整地描述。显然，所描述的实施例是本公开的一部分实施例，而不是全部的实施例。基于所描述的本公开的实施例，本领域普通技术人员在无需创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例，都属于本公开保护的范围。

除非另外定义，本公开使用的技术术语或者科学术语应当为本公开所属领域内具有一般技能的人士所理解的通常意义。本公开中使用的“第一”、“第二”以及类似的词语并不表示任何顺序、数量或者重要性，而只是用来区分不同的组成部分。“包括”或者“包含”等类似的词语意指出现该词前面的元件或者物件涵盖出现在该词后面列举的元件或者物件及其等，而不排除其他元件或者物件。“连接”或者“相连”等类似的词语并非限定于物理的或者机械的连接，而是可以包括电性的连接，不管是直接的还是间接的。

在液体活检领域中，液体活检因为捕获靶标分子的反应时间较长、成本较高、灵敏度较低等原因，其应用的范围较窄。并且，由于进行液体活检通常需要在洁净室(cleanroom)内进行，使得液体活检很难进入消费市场。本申请的发明人想到利用电极产生电场来使标靶物质移动并聚集，然后利用电信号来分析标靶物质的浓度等信息，并且利用精密的电极图案设计，从而可迅速、准确地进行液体活检检测。

本发明实施例提供一种检测电极结构以及检测孔板。该检测电极结构包括衬底基板，该衬底基板包括至少一个检测区；设置在衬底基板上的工作电极，该工作电极配置为施加电压以形成电场；以及设置在衬底基板上的对置电极，该对置电极配置为获取检测信号并输出所述检测信号。工作电极包括至少一个宽度均匀的第一线状部，对置电极包括至少一个宽度均匀的第二线状部，第一线状部和第二线状部设置在检测区并且相互交替且等距间隔设置。该检测电极结构可通过工作电极施加电压以形成电场，从而可使带电标靶物质移动、富集，通过对置电极可获取如标靶物质的浓度等检测信号并输出该检测信号，从而可实现对标靶物质的快速、准确检测。另外，通过将工作电极和对置电极设置为宽度均匀的线状结构，并将第一线状部和第二线状部在检测区相互交替且等距间隔设置可形成稳定均一的电场，并且可检测到细微的电流，从而可提高检测精度。

下面结合附图对本发明实施例提供的检测电极结构和检测孔板进行说明。

实施例一

本实施例提供一种检测电极结构，图1示出一种检测电极结构的平面示意图，该检测电极结构包括：衬底基板101，衬底基板101包括至少一个检测区域102；工作电极103，工作电极103设置在衬底基板101上并配置为施加电压以形成电场；以及对置电极104，对置电极104设置在衬底基板101上并配置为获取检测信号并输出所述检测信号。例如，这里的工

作电极 103 和对置电极 104 均设置在衬底基板的同一表面上，因此，工作电极 103 和对置电极 104 可以是位于同一平面内。如图 1 所示，工作电极 103 包括至少一个宽度均匀的第一线状部 1031；对置电极 104 包括至少一个宽度均匀的第二线状部 1041；第一线状部 1031 和第二线状部 1041 设置在检测区 102 内并且相互交替等距间隔设置。需要说明的是，上述的工作电极 103 和对置电极 104 的结构相同，因此，位于图 1 右侧的电极 104 可配置为施加电压以形成电场的工作电极；位于图 1 左侧的电极 103 可配置为获取检测信号并输出所述检测信号的对置电极，本公开在此不作限定。另外，该检测电极结构可通过设置多个检测区域 102 以进行多组检测，进行对照以进一步提高检测精度。

在本实施例提供的检测电极结构中，工作电极 103 可施加电压产生电场来使靶物质移动并聚集，例如，工作电极 103 可施加方波交变电压，先使得待检测液体中包括靶物质的带电的物质向工作电极 103 移动富集，使得靶物质可与工作电极 103 上探针(可与靶物质结合的物质，例如 DNA 聚合分子)结合，然后转变电压的极性，使得带电的物质中其他没有与探针结合的物质远离工作电极 103(电场对靶物质的作用力设置为小于靶物质与探针的结合力)；然后，对置电极 104 可获取关于靶物质的检测信号并将检测信号输出，例如，与探针结合的靶物质会与特定的试剂发生反应而产生电流，因此对置电极 104 可通过检测电流来获取关于靶物质的检测信号并将检测信号输出；然后，通过分析输出的检测信号可得出关于靶物质的信息(例如靶物质的浓度)，从而可迅速、准确地进行检测。由于第一线状部 1031 和第二线状部 1041 是宽度均匀的线状结构，并且在检测区 102 内，第一线状部 1031 和第二线状部 1041 在检测区 102 内相互交替等距间隔设置，由此，工作电极 103 的第一线状部 1031 可在检测区 102 产生均匀的电场，对置电极 104 的第二线状部 1041 可在检测区 102 可检测到细微的电流，因此可提高检测的精度。另外，由于工作电极 103 的第一线状部 1031 与第二线状部 1041 交替间隔设置，从而可控制形成在工作电极 103 上探针的密度和均匀度，不会使得探针过密，从而给靶物质与探针的结合提供空间，提高靶物质与探针的结合的效率，从而既可提高液体活检的反应速度，又可进一步提高检测的精度。

需要说明的是，本实施例提供的检测电极结构不仅可以检测核酸，还可以检测蛋白质等生物分子。因此，本实施例提供的检测电极结构可以适用于针对 ctDNA、基因组 DNA、RNA(包含非编码 RNA，如 microRNA、lncRNA、circRNA 等)、SNP、外泌体等生物标记物的检测试剂盒，以满足临床的不同需求。另外，本实施例提供的检测电极结构还可应用于液体活检(ctDNA 检测)以及病原微生物核酸检测以及非编码 RNA(microRNA)、外泌体检测及药物代谢酶和药物作用靶点基因等的生物检测方面。

例如，在本实施例一示例提供的检测电极结构中，如图 1 所示，检测区 102 的形状为圆

形，工作电极 103 可包括弧状的第一主体部 1030 以及与从第一主体部 1030 延伸而出的多个相互平行的第一线状部 1031。对置电极 104 包括弧状的第二主体部 1040 以及与从第二主体部 1040 延伸出的多个相互平行的第二线状部 1041。第一主体部 1030 与第二主体部 1040 相对设置，多个第一线状部 1031 与多个第二线状部 1041 设置在检测区 102 内并交替间隔等距设置。也就是说，工作电极 103 和对置电极 104 呈梳齿状结构，并且工作电极 103 和对置电极 104 互相交叉以形成插指状结构。需要说明的是，检测区的范围可包括多个第一线状部与多个第二线状部，还可包括第一主体部和第二主体部，本公开在此不作限制。另外，本实施例中的工作电极可不设置与探针直接接触的固定部，因此第一线状部可做成宽度均匀的线状，从而提供更均匀的电场，使得探针的排列更规则，从而提高检测的效率和精度。

例如，图 2 示出了另一种检测电极结构的平面示意图，检测区 102 的形状为圆形，工作电极 103 包括螺旋状排列的第一线状部 1031，对置电极 104 包括螺旋状排列的第二线状部 1041，第一线状部 1031 与第二线状部 1041 设置在检测区 102 内并且交替间隔等距设置。

例如，在本实施例一示例提供的检测电极结构中，第一线状部的宽度与第二线状部的宽度相同，从而可提高检测的精度；另外，第一线状部和第二线状部的宽度范围可为 3-20mil (千分之一英寸)。

例如，在本实施例一示例提供的检测电极结构中，第一线状部和第二线状部的间距范围可为 3-20mil (千分之一英寸)。

例如，在本实施例一示例提供的检测电极结构中，第一线状部的宽度与第二线状部的宽度等于第一线状部和第二线状部的间距。由此，从而可进一步提高电场的均匀度以及检测的均匀度，从而可提高检测的精度。

例如，图 3 是另一种检测电极结构的平面示意图，图 4 是另一种检测电极结构的平面示意图；如图 3 或图 4 所示，本实施例一示例提供的检测电极结构还包括设置在检测区边缘的参考电极，由于参考电极设置在检测区边缘，第一线状部和第二线状部的外侧，因此参考电极在获取关于标靶物质的检测信号的过程中可提供对照，可消除工作电极的极性误差，从而进一步提高检测的精度。

例如，在本实施例一示例提供的检测电极结构中，工作电极和对置电极的材料包括金。由于金元素化学性质稳定不与待检测液体反应并且具有较低的阻抗，从而可进一步提高检测的精度。当然，本发明实施例包括但不限于此，也可采用其他导电物质，例如铂或氧化铟锡等。

实施例 二

本实施例提供一种检测孔板，该检测孔板包括：盒体 200 以及检测电极结构 100。如图 5a 和图 5b 所示，盒体 200 包括多个通孔 211。通孔的尺寸可参照通常的 96 孔板的设计，当然，本公开包括但不限于此，通孔的尺寸可根据待检测液体的浓度和种类进行设计。如图 6 和 7 所示，检测电极结构 100 设置在盒体 200 的底部，检测电极结构 100 可为上述实施例一中任一的检测电极结构，并且，检测区 102 设置在通孔 211 的底部并将通孔 211 的底部密封。另外，检测电极结构 100 的衬底基板 101 与盒体 200 可采用同样的材料制作。由此，可在由检测区 102 和通孔 211 组成的容置空间中盛放待检测液体，从而对待检测液体进行检测。例如，工作电极 103 可施加方波交变电压，以形成垂直于通孔 211 底面的垂直电场，先使得待检测液体中包括靶标物质的带电的物质从通孔 211 的各个位置向通孔 211 的底部运动，并向工作电极 103 移动富集，使得靶标物质可与工作电极 103 上探针(可与靶标物质结合的物质，例如 DNA 聚合分子)结合，然后转变电压的极性，使垂直于通孔 211 底面的垂直电场的方向反转，使得待检测液体中的带电的物质中其他没有与探针结合的物质从通孔 211 的底部向通孔 211 的上部运动，从而使得带电的物质中其他没有与探针结合的物质远离工作电极 103 (电场对靶标物质的作用力设置为小于靶标物质与探针的结合力)；然后，对置电极 104 可获取关于靶标物质的检测信号并将检测信号输出，例如，与探针结合的靶标物质会与特定的试剂发生反应而产生电流，因此对置电极 104 可通过检测电流来获取关于靶标物质的检测信号并将检测信号输出；然后，通过分析输出的检测信号可得出关于靶标物质的信息 (例如靶标物质的浓度)。因为本实施例提供的检测孔板包括上述实施例一中任一的检测电极结构，因此也具有与该检测电极结构对应的技术效果，重复之处在此不再赘述。

例如，在本实施例提供的检测孔板中，如图 5b 所示，多个通孔 211 成矩阵排列在盒体 200 中。如图 6 或图 7 所示，多个通孔 211 为圆柱形通孔。需要说明的是，本发明实施例包括但不限于此，多个通孔 211 的形状还可为方形柱体、三角形柱体或其他柱体。

例如，在本实施例提供的检测孔板中，多个通孔 211 的数量为四的倍数，如图 8 所示，四个相邻的通孔 211 对应的检测电极结构中的四个工作电极 103 电性相连。例如，衬底基板 101 上形成有导线 111 以及导线 112，导线 111 将四个工作电极 103 电性相连；导线 112 分别与四个对置电极 104 电性相连以将对置电极 104 的电信号引出。由此，这四个相邻的通孔可作为一个检测组，在该检测组内，由于四个工作电极电性相连，施加在四个工作电极上的电压一致，四个相邻的通孔可更好地进行对照实验，因此可进一步提高检测精度。当然，本发明实施例包括但不限于此，还可将任意个数的通孔对应的检测电极结构中的任意个数的工作电极电性相连，以提供一致的电压。

例如，如图 9 所示，本实施例提供的检测孔板还包括：电路板 110，电路板与检测电极结构电性相连。电路板 110 上可设置放大电路以放大对置电极或参考电极输出的电信号，以提高检测精度；电路板 110 上也可设置稳压电路以向工作电极提供稳定的电压，以提高检测精度。当然，本公开包括但不限于此，电路板 110 上还可设置过流、过压保护电路等。

例如，如图 9 所示，电路板 110 可设置在衬底基板 101 下，从而更合理地利用空间，当然，电路板 110 也可设置在其他位置，本公开在此不做限制。

实施例三 预制检测孔板及其试剂盒

本实施例提供一种用于检测特定靶标物的预制检测孔板，在实施例二的检测孔板的检测区固定捕捉物。以下示例用于解释预制检测孔板的制备步骤。

示例. 用于检测 HPV 16 亚型和 HPV 18 亚型的预制检测孔板及试剂盒

步骤 1 配制吡咯（pyrrole）与捕获探针的混合液：取 1 个 1.5 mL 离心管，依次加入超纯水 885 μ l，100 μ l 3M KCl，涡旋震荡混匀，离心；加入 5 μ l pyrrole，涡旋震荡混匀，离心；加入 10 μ l 100 μ M CP（第一捕获探针或第二捕获探针）；涡旋震荡混匀后离心，分别得到第一捕获探针的混合液和第二捕获探针的混合液，备用。

步骤 2. 在检测孔板上，每个孔加入 30 μ l 的已配制好的 pyrrole 与捕获探针的混合液，检测 16 亚型组的反应孔加入第一捕获探针的混合液，检测 18 亚型组的反应孔加入第二捕获探针的混合液。

第一捕获探针的碱基序列为：

5' -CGCTTCGGTTGTGCGTACAA-3' (SEQ ID NO.3)

第二捕获探针的碱基序列为：

5' -TGTGTTGTAAGTGTGAAGCC-3' (SEQ ID NO.6)。

步骤 3. EFIRM 电场处理

在 EFIRM 软件上选择进行实验的对应列，第一方波电场参数设置为：电压 A：350mV，1s；电压 B：950mV，1s；进行 9 个循环。电场处理完毕，立刻取出，清洗 E-plate 板得到预制检测孔板。EFIRM 技术的仪器及软件采用“Electrochemical Sensor for Multiplex Biomarkers Detection, Clin Cancer Res. 2009 Jul 1; 15(13): 4446–4452.中公开的。

试剂盒包装：包括上述预制检测孔板，和
第一引物对和 / 或第二引物对。

包括用于检测 HPV 16 亚型的第一核酸组合和用于检测 HPV 18 亚型的第二核酸组合：

其中，第一核酸组合包括第一引物对和第一捕获探针。

第一引物对用于检测 HPV 16 亚型，包括：

上游引物，其碱基序列为：5' -GAGCCCATACAAATATTGTA-3' (SEQ ID NO.1)；

下游引物，其 5' 端带有生物素标记，碱基序列为：
Biotin-5' -GTCTTCCAAAGTACGAATGTCTACGTGTGTGCT-3' (SEQ ID NO.2)。

第一捕获探针与第一引物对所扩增出的第一靶核酸片段 (SEQ ID NO.7) 的靶区域 (5' -TTGTACGCACAACCGAAGCG-3') 反向互补。

第二引物对包括：

上游引物，其碱基序列为：5' -AACATTTACCAGCCCGACGA-3' (SEQ ID NO.4)；

下游引物，其 5' 端带有生物素 (Biotin) 标记，其碱基序列为：

Biotin-5' -GGAAGTGTCTGCTGAGCTTTCTACTACTAGCTCAATTCT-3' (SEQ ID NO.5)。

第二捕获探针与第二引物对所扩增出的第二靶核酸片段 (SEQ ID NO.8) 的靶区域 (5' -GGCTTCACACTTACAACACA-3') 反向互补。

有以下几点需要说明：

(1) 本发明实施例附图中，只涉及到与本发明实施例涉及到的结构，其他结构可参考通常设计。

(2) 为了清晰起见，在用于描述本发明的实施例的附图中，层或微结构的厚度和尺寸被放大。可以理解，当诸如层、膜、区域或基板之类的元件被称作位于另一元件“上”或“下”时，该元件可以“直接”位于另一元件“上”或“下”，或者可以存在中间元件。

(3) 在不冲突的情况下，本发明同一实施例及不同实施例中的特征可以相互组合。

[0054] 以上所述，仅为本公开的具体实施方式，但本公开的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本公开揭露的技术范围内，可轻易想到变化或替换，都应涵盖在本公开的保护范围之内。因此，本公开的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

权利要求书

10

1.一种检测电极结构，其特征在于，包括：

衬底基板，所述衬底基板包括至少一个检测区；

工作电极，所述工作电极设置在所述衬底基板上并配置为施加电压以形成电场；以及 对置电极，所述对置电极设置在所述衬底基板上并配置为获取检测信号并输出所述检测信号，

所述工作电极包括至少一个宽度均匀的第一线状部，所述对置电极包括至少一个宽度均匀的第二线状部，所述第一线状部和所述第二线状部设置在所述检测区并且相互交替等距间隔设置。

2. 根据权利要求 1 所述的检测电极结构，其特征在于，所述工作电极包括弧状的第一主体部以及与从所述第一主体部延伸而出的多个相互平行的所述第一线状部，所述对置电极包括弧状的第二主体部以及与从所述第二主体部延伸出的多个相互平行的所述第二线状部，所述第一主体部与所述第二主体部相对设置，所述多个第一线状部与所述多个第二线状部交替间隔等距设置。

3. 根据权利要求 1 所述的检测电极结构，其特征在于，所述工作电极包括螺旋状排列的所述第一线状部，所述对置电极包括螺旋状排列的所述第二线状部，所述第一线状部与所述第二线状部同心交替间隔等距设置。

4.根据权利要求 1-3 任一项所述的检测电极结构，其特征在于，所述第一线状部和所述第二线状部的宽度范围为 3-20mil。

5. 根据权利要求 1-3 任一项所述的检测电极结构，其特征在于，所述第一线状部和所述第二线状部的间距为 3-20mil。

6. 根据权利要求 1-3 任一项所述的检测电极结构，其特征在于，还包括：参考电极，所述参考电极设置在所述检测区边缘。

7. 根据权利要求 1-3 任一项所述的检测电极结构，其特征在于，所述工作电极和所述对置电极的材料包括金。

8. 根据权利要求 1-3 任一项所述的检测电极结构，其特征在于，所述工作电极和所述对置电极设置在同一平面内。

9.一种检测孔板，其特征在于，包括： 箱体，所述箱体包括多个通孔；以及 检测电极结构，所述检测电极结构设置在所述箱体的底部，所述检测电极结构为上述权利要求 1-8 任一项所述的检测电极结构，并且，所述检测区设置在所述通孔的底部并将所述通孔的底部密封。

10. 根据权利要求 9 所述的检测孔板，其特征在于，所述通孔为圆柱形通孔并且成矩阵排列在所述箱体中，所述通孔的数量为四的倍数，四个相邻的所述通孔对应的检测电极结构中的

四个所述工作电极电性相连。

11. 根据权利要求 9 所述的检测孔板，其特征在于，还包括：电路板，所述电路板与所述检测电极结构电性相连。

12. 一种用于电化学方法检测靶标分子的预制检测孔板，其特征在于，在权利要求 9-11 任一所述的检测孔板的检测区固定有用于结合或捕获所述靶标分子的捕捉物。

13. 根据权利要求 12 所述的预制检测孔板，其特征在于：所述捕捉物是与导电聚合物和离子化合物混合成混合液后加到所述检测区，通过所述工作电极施加方波电场将所述捕捉物固定在检测区制成；

所述方波电场的参数为：电压 A：-200~-500mV，1-5s；电压 B：800~1500mV，1s；3~10 个循环。

14. 根据权利要求 13 所述的预制检测孔板，其特征在于：所述导电聚合物选自吡咯、苯胺和噻吩组成的组。

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的预制检测孔板，其特征在于：每 1mL 所述混合液中含超纯水 885 μ L，3mol/L 所述离子化合物 100 μ L，导电聚合物 5 μ L，100 μ M 的捕捉物 10 μ L。

16. 根据权利要求 15 所述的预制检测孔板，其特征在于：所述捕捉物为核酸探针。

17. 权利要求 12-16 任一所述的预制检测孔板的制备方法，其特征在于包括以下步骤和参数：

(1) 预备捕捉物与导电聚合物和离子化合物混合成的混合液；

(2) 将所述混合液加入到权利要求 9-11 任一所述的检测孔板的检测区中，通过所述工作电极产生的第一方波电场将所述探针固定在反应孔内底部表面制成；

所述第一方波电场的参数为：电压 A：-200-500mV，1-5s；电压 B：800~1500mV，1s；3~10 个循环。

18. 根据权利要求 17 所述的制备方法，其特征在于：所述第一方波电场的参数设置在软件程序中，通过软件程序控制所述工作电极实现所述第一方波电场。

19. 一种用于检测靶标分子的试剂盒，其特征在于，包含权利要求 12-16 任一所述的预制检测孔板。

20. 根据权利要求 19 所述的试剂盒，其特征在于，还包含用于检测靶标分子的其它常规试剂。

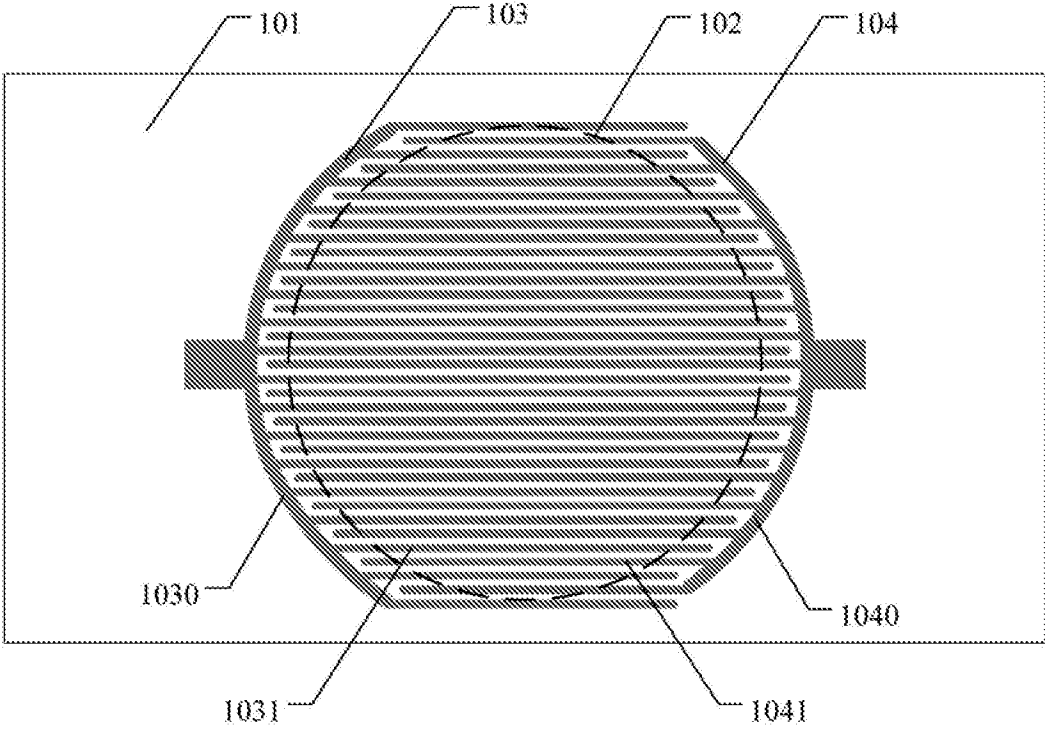


图 1

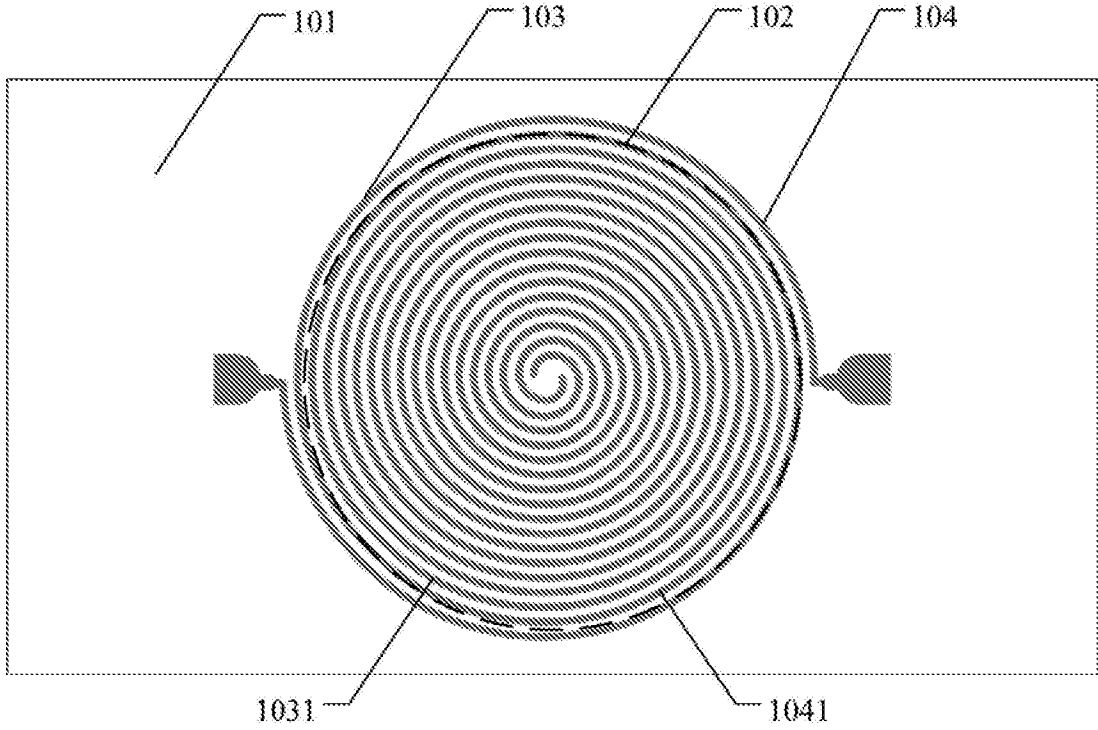


图 2

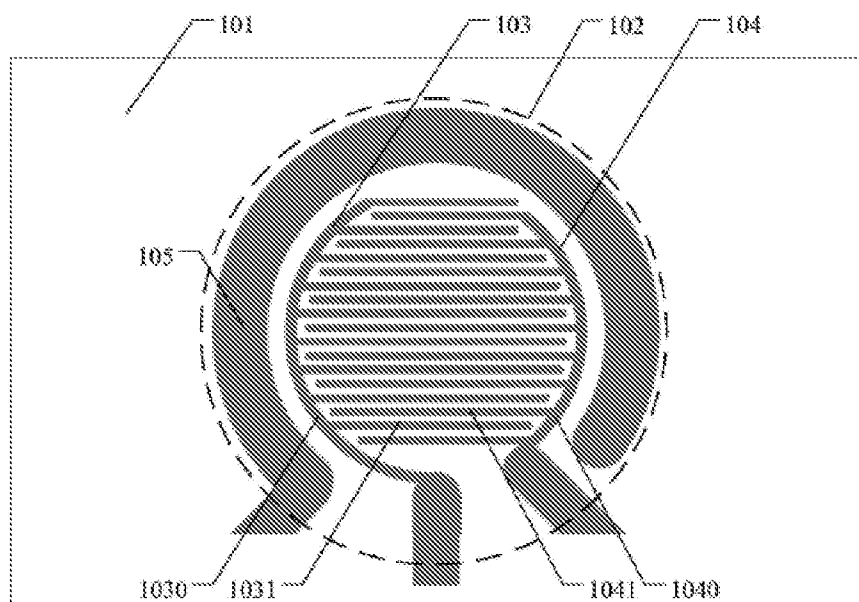


图3

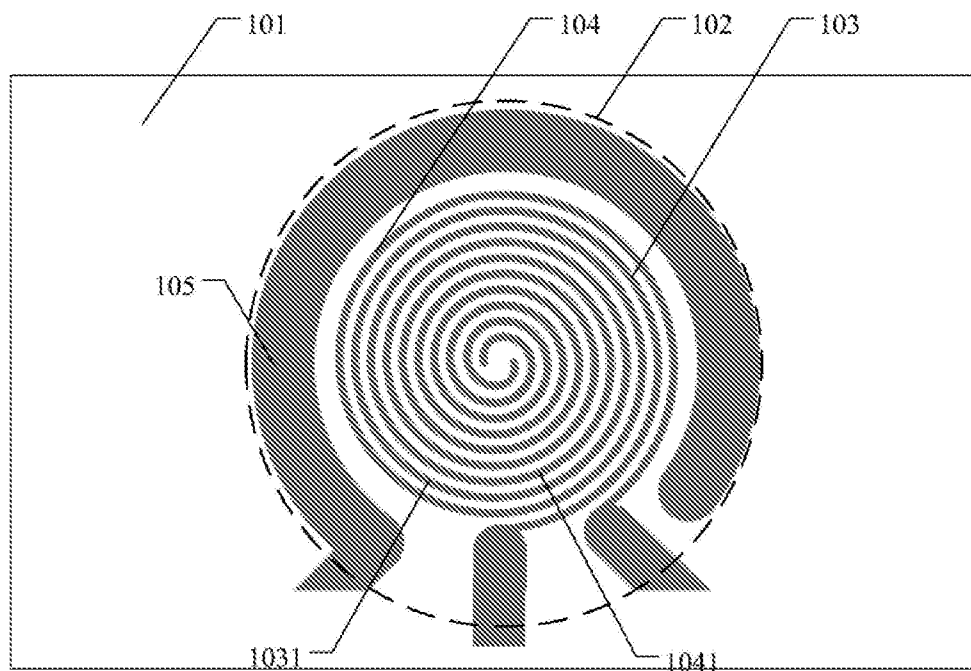


图 4

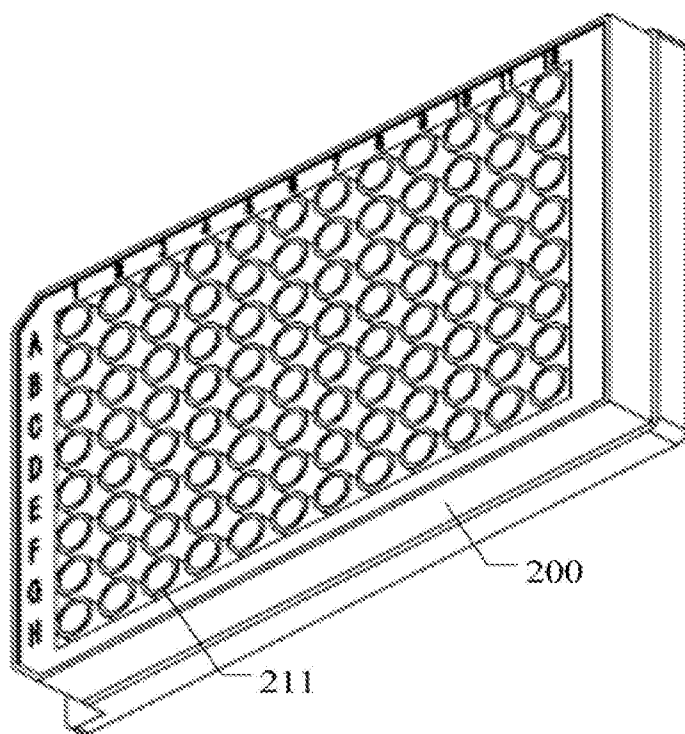


图 5a

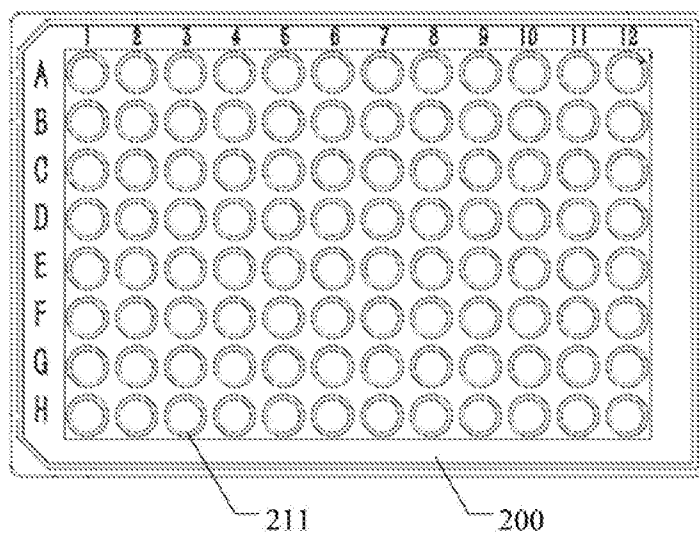


图 5b

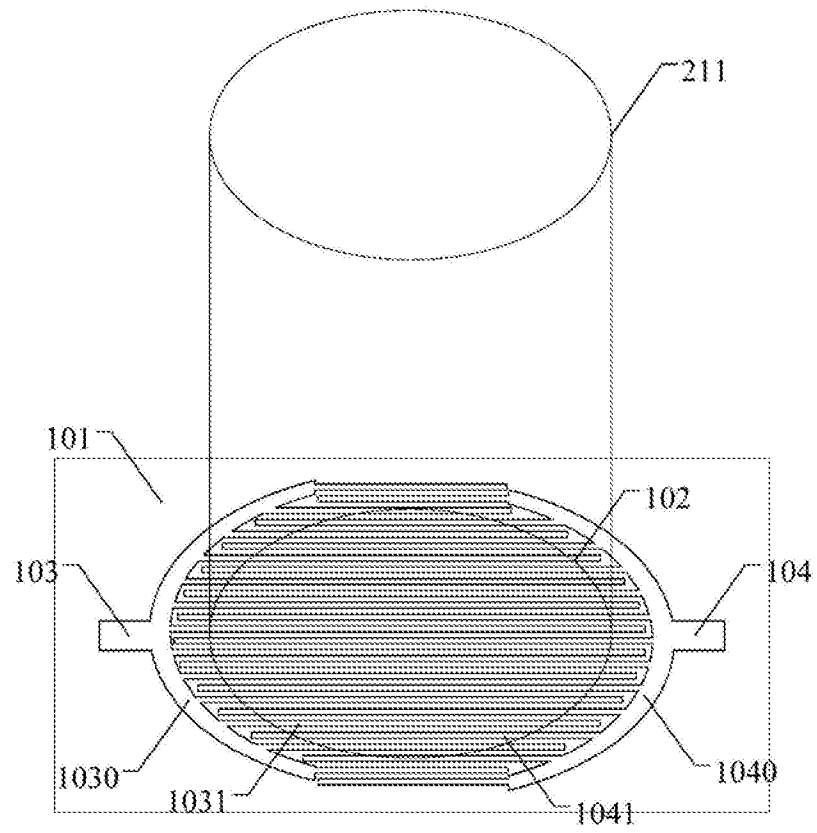


图 6

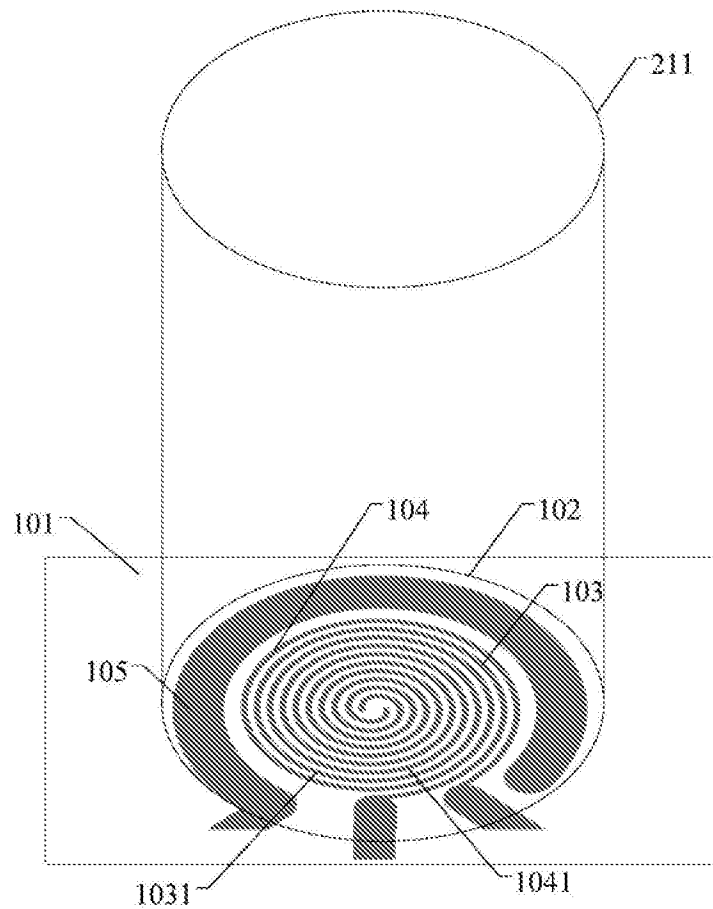


图 7

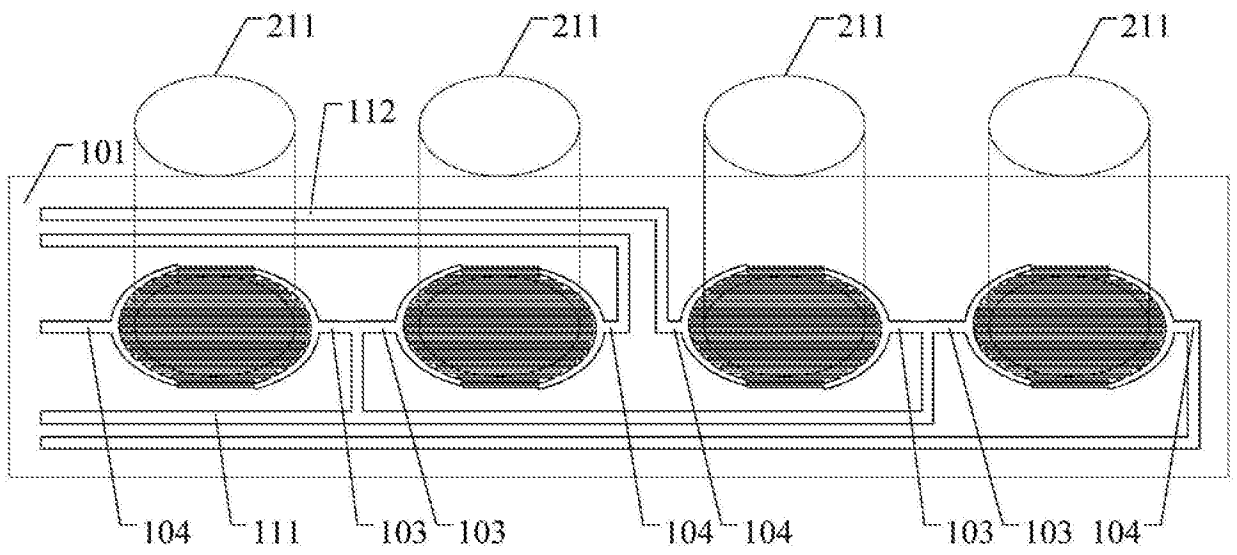


图 8

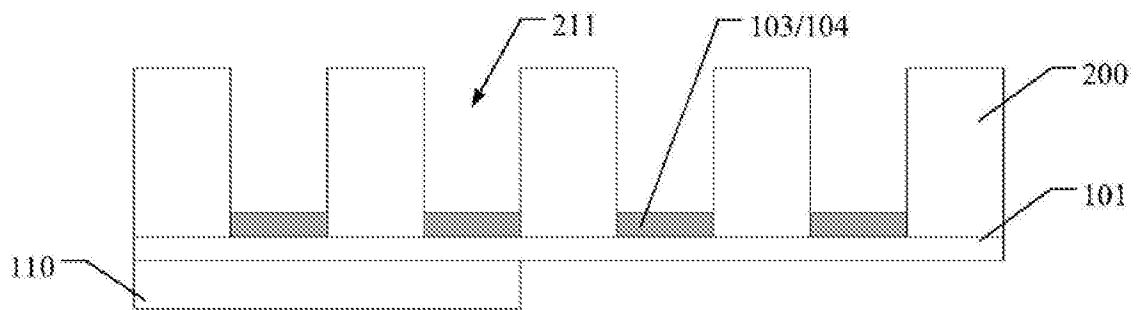


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/091435

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 27/327 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 27/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRSABS; CNTXT; CNABS; WPI; EPODOC; CNKI: GUANGZHOU EZLIFE SCI&TECH CO., LTD., sub+, electro+, pole+, prob?,
screw, test+, interdigital electrode, hole board

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 205844251 U (GUANGZHOU EZLIFE SCI&TECH CO., LTD.) 28 December 2016 (28.12.2016) claims 1-11	1-11
X	CN 105067695 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 18 November 2015 (18.11.2015) description, paragraphs [0026]-[0035], and figure 1	1-8
X	CN 103472102 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 25 December 2013 (25.12.2013) description, paragraphs [0010]-[0013], and figures 1 and 2	1-8
X	CN 105651837 A (INSTITUTE OF SEMICONDUCTORS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 08 June 2016 (08.06.2016) description, paragraphs [0021]-[0033], and figures 1-3	1-8
X	CN 103946698 A (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.) 23 July 2014 (23.07.2014) description, paragraphs [0024]-[0031], and figure 2	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 11 August 2017	Date of mailing of the international search report 27 September 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer HE, Mengke Telephone No. (86-10) 62413491

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2017/091435

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105510398 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 20 April 2016 (20.04.2016) description, paragraphs [0026]-[0039], and figure 1	1, 4-8
Y	CN 105067695 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 18 November 2015 (18.11.2015) description, paragraphs [0026]-[0035], and figure 1	9-20
Y	CN 101793858 A (GUO, Min et al.) 04 August 2010 (04.08.2010) description, paragraphs [0015]-[0019], and figure 1	9-20
A	CN 1322843 A (ZHU, Xuejun) 21 November 2001 (21.11.2001) the whole document	1-20
A	CN 102692439 A (INSTITUTE OF ELECTRONICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 26 September 2012 (26.09.2012) the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/091435

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 205844251 U	28 December 2016	None	
CN 105067695 A	18 November 2015	None	
CN 103472102 A	25 December 2013	CN 103472102 B	12 August 2015
CN 105651837 A	08 June 2016	None	
CN 103946698 A	23 July 2014	JP 2015501931 A	19 January 2015
		WO 2013078127 A1	30 May 2013
		EP 2769210 A1	27 August 2014
		CA 2856380 A1	30 May 2013
		US 2014367255 A1	18 December 2014
		AU 2012340870 B2	30 July 2015
		IN 3248DEN2014 A	22 May 2015
		JP 6133320 B2	24 May 2017
		AU 2012340870 A1	08 May 2014
		CN 103946698 B	30 March 2016
		KR 20140096150 A	04 August 2014
CN 105510398 A	20 April 2016	None	
CN 101793858 A	04 August 2010	None	
CN 1322843 A	21 November 2001	CN 1204267 C	01 June 2005
CN 102692439 A	26 September 2012	CN 102692439 B	03 June 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/091435

A. 主题的分类 G01N 27/327(2006.01) i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																													
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) G01N27/- 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CPRSABS;CNTXT;CNABS;WPI;EPODOC;CNKI:广州易活生物科技有限公司, 基板, 电极, 叉指电极, 螺旋, 核酸探针, 检测, 孔板, sub+, electro+, pole+, prob?, screw, test+;																													
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 205844251 U (广州易活生物科技有限公司) 2016年 12月 28日 (2016 - 12 - 28) 权利要求1-11</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105067695 A (浙江大学) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 说明书第[0026]-[0035]段, 图1</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 103472102 A (浙江大学) 2013年 12月 25日 (2013 - 12 - 25) 说明书第[0010]-[0013]段, 图1-图2</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105651837 A (中国科学院半导体研究所) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 说明书第[0021]-[0033]段, 图1-图3</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 103946698 A (西门子医疗保健诊断公司) 2014年 7月 23日 (2014 - 07 - 23) 说明书第[0024]-[0031]段, 图2</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105510398 A (浙江大学) 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20) 说明书第[0026]-[0039]段, 图1</td> <td>1、4-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 105067695 A (浙江大学) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 说明书第[0026]-[0035]段, 图1</td> <td>9-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101793858 A (郭旻 等) 2010年 8月 4日 (2010 - 08 - 04) 说明书第[0015]-[0019]段, 图1</td> <td>9-20</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 205844251 U (广州易活生物科技有限公司) 2016年 12月 28日 (2016 - 12 - 28) 权利要求1-11	1-11	X	CN 105067695 A (浙江大学) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 说明书第[0026]-[0035]段, 图1	1-8	X	CN 103472102 A (浙江大学) 2013年 12月 25日 (2013 - 12 - 25) 说明书第[0010]-[0013]段, 图1-图2	1-8	X	CN 105651837 A (中国科学院半导体研究所) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 说明书第[0021]-[0033]段, 图1-图3	1-8	X	CN 103946698 A (西门子医疗保健诊断公司) 2014年 7月 23日 (2014 - 07 - 23) 说明书第[0024]-[0031]段, 图2	1-8	X	CN 105510398 A (浙江大学) 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20) 说明书第[0026]-[0039]段, 图1	1、4-8	Y	CN 105067695 A (浙江大学) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 说明书第[0026]-[0035]段, 图1	9-20	Y	CN 101793858 A (郭旻 等) 2010年 8月 4日 (2010 - 08 - 04) 说明书第[0015]-[0019]段, 图1	9-20
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																											
PX	CN 205844251 U (广州易活生物科技有限公司) 2016年 12月 28日 (2016 - 12 - 28) 权利要求1-11	1-11																											
X	CN 105067695 A (浙江大学) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 说明书第[0026]-[0035]段, 图1	1-8																											
X	CN 103472102 A (浙江大学) 2013年 12月 25日 (2013 - 12 - 25) 说明书第[0010]-[0013]段, 图1-图2	1-8																											
X	CN 105651837 A (中国科学院半导体研究所) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 说明书第[0021]-[0033]段, 图1-图3	1-8																											
X	CN 103946698 A (西门子医疗保健诊断公司) 2014年 7月 23日 (2014 - 07 - 23) 说明书第[0024]-[0031]段, 图2	1-8																											
X	CN 105510398 A (浙江大学) 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20) 说明书第[0026]-[0039]段, 图1	1、4-8																											
Y	CN 105067695 A (浙江大学) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 说明书第[0026]-[0035]段, 图1	9-20																											
Y	CN 101793858 A (郭旻 等) 2010年 8月 4日 (2010 - 08 - 04) 说明书第[0015]-[0019]段, 图1	9-20																											
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																													
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																													
国际检索实际完成的日期 2017年 8月 11日		国际检索报告邮寄日期 2017年 9月 27日																											
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 何孟珂 电话号码 (86-10)62413491																											

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1322843 A (朱学军) 2001年 11月 21日 (2001 - 11 - 21) 全文	1-20
A	CN 102692439 A (中国科学院电子学研究所) 2012年 9月 26日 (2012 - 09 - 26) 全文	1-20

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/091435

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	205844251	U	2016年 12月 28日	无			
CN	105067695	A	2015年 11月 18日	无			
CN	103472102	A	2013年 12月 25日	CN	103472102	B	2015年 8月 12日
CN	105651837	A	2016年 6月 8日	无			
CN	103946698	A	2014年 7月 23日	JP	2015501931	A	2015年 1月 19日
				WO	2013078127	A1	2013年 5月 30日
				EP	2769210	A1	2014年 8月 27日
				CA	2856380	A1	2013年 5月 30日
				US	2014367255	A1	2014年 12月 18日
				AU	2012340870	B2	2015年 7月 30日
				IN	3248DEN2014	A	2015年 5月 22日
				JP	6133320	B2	2017年 5月 24日
				AU	2012340870	A1	2014年 5月 8日
				CN	103946698	B	2016年 3月 30日
				KR	20140096150	A	2014年 8月 4日
CN	105510398	A	2016年 4月 20日	无			
CN	101793858	A	2010年 8月 4日	无			
CN	1322843	A	2001年 11月 21日	CN	1204267	C	2005年 6月 1日
CN	102692439	A	2012年 9月 26日	CN	102692439	B	2015年 6月 3日