



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103175820 A

(43) 申请公布日 2013. 06. 26

(21) 申请号 201310135006. 5

(22) 申请日 2013. 04. 18

(71) 申请人 徐云鹏

地址 330096 江西省南昌市高新区高新二路  
18 号高新创业大厦 512

(72) 发明人 徐云鹏 燕春晖

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

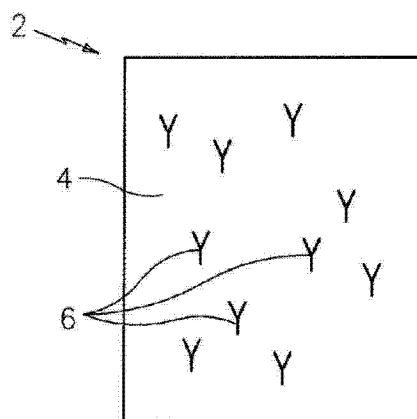
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

### (54) 发明名称

一种对薄膜样品室内低值目标分析物量化的  
生物流体样品进行免疫测定的方法

### (57) 摘要

一种对薄膜样品室内低值目标分析物量化的生物流体样品进行免疫测定的方法, 本发明适用于检测和识别任何含有两种以上抗原的目标分析物, 如 TSH(促甲状腺激素)。将一种生物流体样本样品—最好是血浆或血清—放入一个反应室内, 反应室的表面尺寸应可允许对分析物的分子数量进行最大计数, 反应室底面或顶面由塑料薄膜制成, 甲促腺抗体(以超过所需的数量)粘附在表面上, 以最大量地捕捉目标分析物。捕获抗体必需不可逆转地绑定在固定基质上, 确保在分析过程中抗体不会离开粘结表面, 本发明的有益效果之一是提供一种对分析室内血浆或血清中所含单个分子目标分析物的量化方法; 之二是提供一种对平面薄层样品室表面目标分析分子进行捕获的方法。



1. 一种对薄膜样品室内低值目标分析物量化的生物流体样品进行免疫测定的方法,其特征在于包括步骤如下所述:提供针对各种目标分析物的捕获抗体或腺体,足以将所有增加的目标分析物粘结,与薄膜样品分析室固定或固定在分析室结构上,所述的捕获抗体或腺体仅限于目标分析物分子上的第一抗原表位或抗原(存在于生物流体样本中);

将各种生物流体样品和与抗体(有选择性地与目标分析分子上的第二抗原表位或抗原,存在于上述生物流体样品中)耦合的荧光纳米粒子装入上述样品分析室内;

使样品分析室内的静止样品成像,同时对目标分析物分子进行计数,这些分子可通过所述的固定捕获抗体予以捕获,并且可通过耦合到抗体(与固定目标分析物的第二抗原粘结)上得固定荧光纳米粒子成像,以便于检测。

2. 根据权利要求1所述的一种对薄膜样品室内低值目标分析物量化的生物流体样品进行免疫测定的方法,其特征在于所述的荧光纳米粒子为量子点,因与样品中被捕获的目标分析分子粘结而固定,借助未束缚纳米粒子的运动可将荧光纳米粒子与样品中未束缚的纳米粒子进行光学区分;

所述的束缚性和未束缚标签测定抗体的区分是通过采用图像或扫描分析借助电子方式予以实现的;

所述的方法中,被分析材料未被稀释;

所述的捕获区单位成像面积内可检测离散信号的数量比控制区内单位成像面积内可检测离散信号要多,并且单位区域内的不同量乘以捕获区的数量等于被捕获的目标分析物分子的数量;

所述的反应室包括一个控制区,其中不含有捕获抗体或腺体;

所述的纳米粒子直径范围为 10-100 纳米;

所述的样品体积大于分析室的体积。

## 一种对薄膜样品室内低值目标分析物量化的生物流体样品 进行免疫测定的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种运用成像系统进行检测和量化低浓度目标分析物的方法和装置，具体的说是一种对薄膜样品室内低值目标分析物量化的生物流体样品进行免疫测定的方法。

### 背景技术

[0002] 众所周知诸如荷尔蒙的某些分析物，如 TSH(促甲状腺激素)，其浓度可能低至成千上万分子/微升，针对这种极低浓度的分析物即可采用本发明所述装置来测量分析物的单个分子量。本发明的一大优势是它是一种主要的量化方法，因而无需标准化。

### 发明内容

[0003] 本发明旨在检测和量化某特定目标分析物，如 2 微米~10 微米厚平面室所含的薄膜生物流体样本内的分析物，目标分析物至少含有两种抗原，可将特定目标分析物的单个分子与固定基质粘结，尽管本发明所涉及到的粘结剂可针对一种以上的抗原有效。基质中含有捕获抗体或绑定配体。抗体或配体主要针对目标分析物的第一抗原或所有抗原，并且可固定分析物，以防止扩散。可将目标分析物与基质粘结，然后利用标记探针对绑定的目标分析物进行检测。探针包含与表面粘结的多种抗体或配体，可针对目标分析物的第二抗原表位或抗原。

[0004] 第一和第二抗原位于目标分析物上，其位置必需确保各类抗原的粘结不会防止其它类抗原的粘结。“抗体”和“配体”这两个术语指任何能够与目标抗原有效粘结的物质，包括免疫球蛋白、反映体及类似具有高黏结力的一切生物粘结剂。

[0005] 本发明适用于检测和识别任何含有两种以上抗原的目标分析物，如 TSH(促甲状腺激素)。将一种生物流体样本样品—最好是血浆或血清—放入一个反应室内，反应室的表面尺寸应可允许对分析物的分子数量进行最大计数，具体如下所述。

[0006] 反应室底面或顶面由塑料薄膜制成，甲促腺抗体(以超过所需的数量)粘附在表面上，以最大量地捕捉目标分析物。捕获抗体必需不可逆转地绑定在固定基质上，确保在分析过程中抗体不会离开粘结表面，该区域称为捕获区。

[0007] 将血浆或血清样本添加到反应室内，样本中所有的甲促腺分子与含有捕获抗体的固定基质粘结，从而固定住样本中的所有分子。薄壁厚度(通常小于 10 微米)允许分子以最快的速度垂直扩散，进而确保透过薄壁两层进行快速扩散，从而使得分析物的所有分子与到捕获抗体表面接触。理想情况下，等离子体或其他被检查的生物流体不应含有诸如细胞的粒子，防止对分析物粘结造成干扰或影响到分析信号的检测。

[0008] 同时或经过短暂的初始保温期后，将与抗体粘结的荧光纳米粒子(如抗  $\beta$  甲促腺抗体)加入到样品中(以超过所需的数量)，确保对粘结分子进行最大量地计数。纳米粒子的直径最好为 10-100 纳米，由铈荧光材料或任何可检测的纳米粒子组成，例如量子点或其他

纳米颗粒。这些荧光纳米粒子必需足够小,且浓度大小达到胶态悬浮状,除非其表面粘结的抗体与固定分析物粘结在一起。

[0009] 将含有针对甲促腺分析物的抗体 / 腺体的单个荧光纳米粒子与粘结到基质上的甲促腺分子粘结。未与固定分析物粘结的荧光纳米颗粒将继续处于胶态悬浮状,同时进行布朗运动。为了区分束缚和未束缚的纳米粒子,经培植一段时间后(固定发光纳米粒子发光时,信号大量增加;而移动纳米粒子发光时,会由于未束缚的信号产生纳米粒子而导致背景光的存在)。曝光时间根据测量仪器进行测定,但应最大程度的加以限制,因为这些区域可能没有束缚性纳米粒子的存在。将固定在基质上且必须停留在一个区域内的纳米粒子的光子投射到若干像素内;相对而言,进行布朗运动的纳米粒子的光度分布范围大得多,从而使得固定粒子的检测变得更容易。不含捕获抗体的反应室表面可作为控制区之用。

[0010] 采用本技术时,成像区域内纳米粒子的浓度应足够小,以确保不会导致完全重叠,或降低感应器对固定粒子的区分能力。因此,可区分固定荧光粒子的数量应等于捕获区内捕获抗体上下反应室所含的被分析物分子的数量。由于控制区以上的流量相对于固定捕获抗体或腺体以上的量较小,为了计算反应室或窄道(作为分开控制区和捕获区的扩散屏障的)的总体积,控制区以上的体积可予以忽略不计。实际操作中,可利用不透水层将捕获区域与控制区域区分开来。可测出的分子最大数量由反应室捕获区和像素放大倍数来确定。目标分析物的浓度是所测得的分子数量除以捕获区室壁内的样本量来计算得出。反应室的体积由反应室的已知重量和样本表面积来确定,而样本表面积可由样本区域内像素数量和区域 / 像素放大因子来确定。因此,如反应室重量和放大倍数为已知,那么样本体积也可由分析仪器来确定。束缚粒子相互之间的距离必需确保足够大,以避免被捕获的标签纳米粒子信号不会发生重叠。例如,如果纳米粒子所含信号的荧光度在 3-10 像素的表面上可以测得,并且纳米粒子的成像分离距离至少为上述距离的两倍,或分别相隔 15 像素,且放大成像大小为 0.5 微米 / 像素,那么样本表面积的 1/4 将含有足够的分辨率,以便于对各反应室的最大分子分子量进行检测。理论上可检测的分子量更低,因为受到计数统计学的限制。业内人士认为,反应室越薄,无标签的目标分析物腺体束缚越大,但室内含有的样本量也越小。反应室面积越大,动态范围越大,但进行反应室成像过程所需的时间越长。

[0011] 对于一个高 10 微米、面积 2 平方厘米的反应室,捕获区体积 2 微升,是能够测量到分子的存在性的。这与样本源物质的量浓度敏感性相对应。如需要时可通过缓慢流入 10 微升到 1000 微升来增加样本量(从而捕获该体积内大部分或所有的分子)对装置的敏感度和方法进行线性提高。流动速率为 1-7 微升 / 秒。检测可在此之前进行,但必须将分析室置于样品控制层和浪费层之间,直至流动结束且获得结果之后再加入需测量的纳米粒子。尽管收集室内使用吸水材料能自动促进流动,但仍需将增加的体积样品进行分摊。样品必需流动到捕获区和控制区之上。

[0012] 因此,本发明的有益效果之一是提供一种对分析室内血浆或血清中所含单个分子目标分析物的量化方法;之二是提供一种对平面薄层样品室(至少含有一透明表面,光学上突出被捕获粒子,以便进行光测量计数)表面目标分析分子进行捕获的方法。

#### 附图说明

[0013] 图 1 为分析目标分析物的血浆或血清时所使用的部分薄膜样品检测室示意图,以

促甲状腺为例进行说明。

[0014] 图 2 与图 1 类似,但显示的是加入血浆或血清样品以及各种荧光分析元素之后的检测室。

[0015] 图 3 与图 2 类似,显示的是为确定目标分析物的存在性而进行检测室电子成像。

[0016] 图 4 所示为薄膜样品检测室构成的示意图,包括大容量的样品来源区,复合薄膜检测区,以及样品接收区。

[0017] 图 5 与图 4 类似,但显示的是样品通过薄膜检测区的示意图。

[0018] 图 6 与图 5 类似,但显示的是样品流通后薄膜检测区的成像示意图。

## 具体实施方式

[0019] 如图 1 所示显示了薄膜检测样品室的一部分,由数字 2 进行表示,所分析的检测样品为血浆或血清,可分析 TSH (促甲状腺)的存在性。反应室 2 的表面或墙壁可允许各种腺体的固定。这种情况下腺体 6 仅限于被分析的促甲状腺分子的第一表面抗原。

[0020] 图 2 显示了反应室 2 加入被分析的血浆和荧光检测粒子混合物之后的状态。粒子 8 包括腺体,并且仅限于目标分析物的第二抗原,因而一些粒子在被置入检测室 2 之前即可与目标分析分子粘结。数字 10 表示与目标分析分子 12 所粘结的荧光粒子。未束缚的荧光粒子由数字 8 表示,如图 2 所示。目标分析物,即 TSH,由数字 12 表示,如图 2 所示,显示了若干被捕获到的分析物 12 以及一系列未束缚的荧光粒子 8。未束缚的粒子 8 通常在样品 4 中移动,如箭头 14 所示。当样品室 2 成像时,如图 3 示意图所示,被捕获的粒子(目标分析物上)荧光信号相对较明亮,如图 3 数字 10 所示,且未束缚粒子发出的荧光信号将会相对较暗或模糊,如图 3 中数字 8 所示。

[0021] 因此,样品 4 中被捕获的目标分析物可通过样品 4 成像进行简单地确定。由于样品室 2 的体积得以控制,且反应室 2 内样品 4 的体积为已知,因此目标分析物的数量可按照目标分析物 / 样品体积单位进行推算。

[0022] 如图 4-6 所示,体现了本发明中能够对较大样品量进行分析的装置实例。此实施例包括样品区 16,其中包括需分析的大量血浆或血清样品。区域 16 可容纳 1 毫升的样品,其上表面比较灵活,能够进行压缩,因而可对样品挤压,然后通过样品检测室 2 进行抽取。检测室 2 包括一个控制区 20,其中不含捕获腺体 6,且与样品区 2' 分开。该控制区并未明显标明,相对于捕获区要小得多,并且需要时,可将控制区与捕获区的扩散屏障连接,包括分析物捕获腺体 6。当对区域 16 进行压缩时,样品会按照箭头 A 的方向移动,同时经过样品区 2' 和控制区 20。通过区域 2' 和 20 后,将样品置放在接收区 18,其中可能含有样品吸收剂(如需要时)。

[0023] 图 6 显示了样品到位后,样品区 2' 内的成像结果。该图像将显示出被捕获粒子的光亮图像 10,并且显示出未束缚或未捕获粒子更模糊或暗淡的荧光信号 8。如样品检测有效,那么控制区 20 将仅包括模糊的荧光信号 8。区域 16 和 18 将允许容纳更多的分析样品,因此使得检测结果具有更高的有效性。图 4-6 中的折线 11 显示了样品区 2' 和控制区 20 之间的不透水障碍,起作用防止两个区域间的样品发生交叉。

[0024] 在本发明的描述范围内,可对本发明的有关结构进行若干修改。其分析室区域面积可从 1 平方毫米到 400 平方毫米不等,高度位于 2-10 微米之间。最好将绑定抗体呈一种

均匀的模式置放,使得附近的控制区仅含有未束缚的抗体抑或根本不含有任何抗体。控制区是确保和控制对标签分析物相对应的测定准确度,最好对从控制区到捕获区的样品扩散施加限制,以便对暴露于捕获抗体样品量的体积测定更加准确。同时,如需要时,即当分析室内含有多浓度的已知分析物,并且将其置于同样地条件下进行分析时,也可进行标准的曲线绘制。将已知分析物浓度捕获区内各成像面积所测定的离散信号区域数量减去各成像区域内可检测的离散信号进行绘图分析,以获得标准的绘制曲线。其结果可用来计算未知样品中分析物的浓度,即通过与上述相同的条件下进行分析。

[0025] 探针信号放大技术,如 RCAT(滚动循环放大技术)可用来代替纳米粒子,因为他们具有产生荧光粒子的功效。由于可对本发明所披露的实施案例进行多出修改(只要不违背本发明的概念即可),除非附加声明要求,针对本发明无需施加限制性因素。

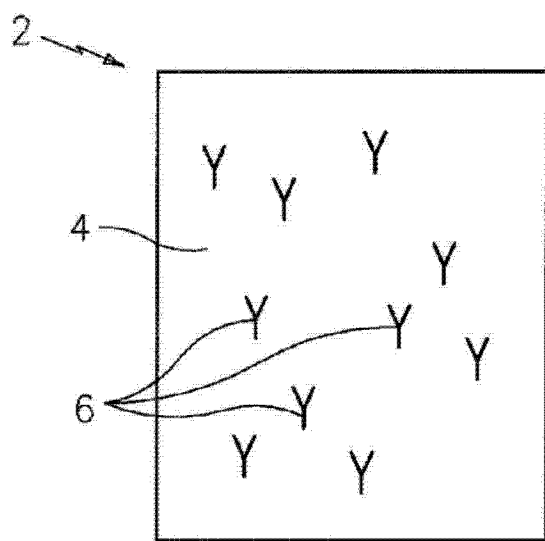


图 1

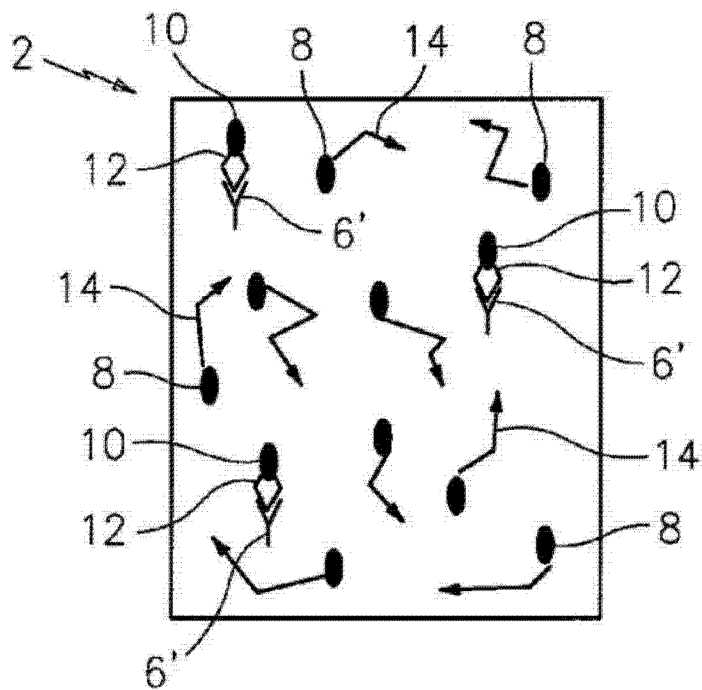


图 2





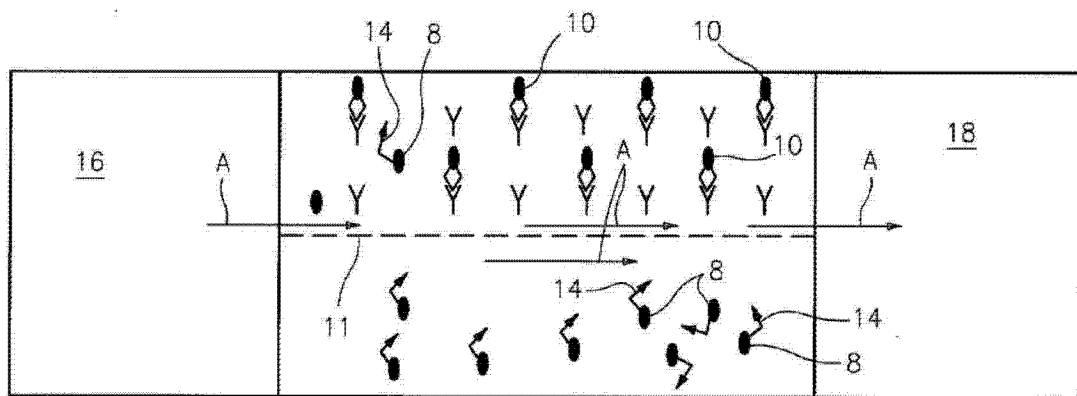


图 5

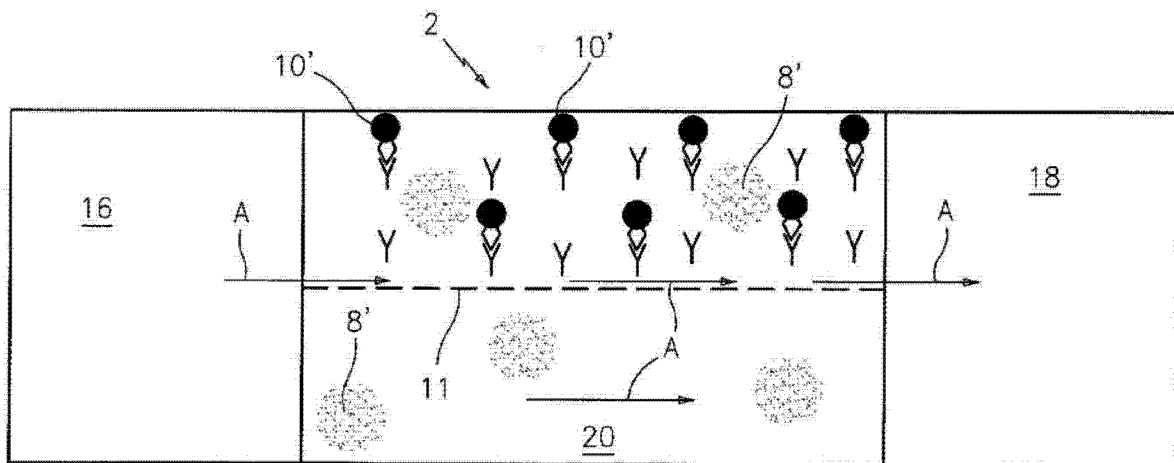


图 6

专利名称(译)	一种对薄膜样品室内低值目标分析物量化的生物流体样品进行免疫测定的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103175820A</a>	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	CN201310135006.5	申请日	2013-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	徐云鹏		
申请(专利权)人(译)	徐云鹏		
当前申请(专利权)人(译)	徐云鹏		
[标]发明人	徐云鹏 燕春晖		
发明人	徐云鹏 燕春晖		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种对薄膜样品室内低值目标分析物量化的生物流体样品进行免疫测定的方法，本发明适用于检测和识别任何含有两种以上抗原的目标分析物，如TSH（促甲状腺激素）。将一种生物流体样本样品—最好是血浆或血清—放入一个反应室内，反应室的表面尺寸应可允许对分析物的分子数量进行最大计数，反应室底面或顶面由塑料薄膜制成，甲促腺抗体（以超过所需的数量）粘附在表面上，以最大量地捕捉目标分析物。捕获抗体必需不可逆转地绑定在固定基质上，确保在分析过程中抗体不会离开粘结表面，本发明的有益效果之一是提供一种对分析室内血浆或血清中所含单个分子目标分析物的量化方法；之二是提供一种对平面薄层样品室表面目标分析分子进行捕获的方法。

