

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/531 G01N 33/533

G01N 33/558

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02114413.3

[43] 公开日 2002 年 8 月 7 日

[11] 公开号 CN 1362623A

[22] 申请日 2002.1.21 [21] 申请号 02114413.3

[71] 申请人 陕西超英生物医学研究开发有限公司

地址 710061 陕西省西安市长安南路 29 号

[72] 发明人 李 军 刘永军 刘文康

王伟华 刘 儒

[74] 专利代理机构 西安新思维专利事务所有限公司

代理人 黄秦芳

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 一种多元免疫微球、该多元免疫微球的制备技术以及对该多元免疫微球进行检测的方法

[57] 摘要

本发明涉及生物医学研究及临床应用领域,具体涉及一种多元免疫微球、该多元免疫微球的制备技术以及对该多元免疫微球进行检测的方法。本发明的优点是:一次检测即可获得待测样品中多种抗原或抗体的含量,以便用于各种相关疾病如肿瘤、各种炎症以及自身免疫性疾病等的诊断、鉴别诊断或早期发现。本发明采用的技术方案是:将抗原性物质或特异性抗体吸附在不同大小的乳胶微球上制成多元免疫微球,与待测样品混合,通过抗原抗体反应,将各种待测样本中的特异性抗原或抗体全部吸附到多元免疫微球上,再使用流式细胞仪分析待测样品中相关抗原和抗体的含量。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权利要求书

1、一种多元免疫微球，包括乳胶微球，其特征在于：所述乳胶微球的直径在 1 微米~30 微米之间、按照直径间隔大于 0.3 微米制成，其外包被着不同的特异性抗原或特异性抗体。

2、如权利要求书 1 所述的一种多元免疫微球，其特征在于：所述包被的抗原或特异性抗体是与各种疾病相关的标志物，如肿瘤标志物、自身抗体、各种病原微生物抗原或抗体、各种细胞因子、各种细胞的可溶性表面标记或各种可溶性受体分子。

3、如权利要求书 1 所述的一种多元免疫微球的制备技术，其特征在于：选取直径间隔大于 0.3 微米、直径在 1 微米~30 微米之间的乳胶微球制成直径大小不同的乳胶微球，在同一直径的乳胶微球的表面包被一种特异性抗原或抗体制成一种免疫微球；将制备好的免疫微球用 PBS 洗涤后，将表面包被有不同特异性抗原或抗体的免疫微球进行混合，即制成多元免疫微球。

4、如权利要求书 1 所述的一种多元免疫微球的检测方法，其特征在于：
①将多元免疫微球与待测样品混合进行抗原和抗体的特异性结合，再将多元免疫微球用 PBS 进行洗涤；②对多元免疫微球进行二次结合反应，再用 PBS 洗涤后重新悬浮；③用流式细胞仪进行检测、分析，通过检测免疫微球的大小及其发光强度或荧光强度的强弱得出相应的待测抗原或抗体的含量。

5、如权利要求书 4 所述的一种多元免疫微球的检测方法，其特征在于：针对用抗原包被过的多元免疫微球，在第②步中二次结合反应是指加入经化学发光物质或荧光色素标记过的相应的抗抗体进行反应。

6、如权利要求书 5 所述的一种多元免疫微球的检测方法，其特征在于：所述第①步是将表面包被有不同特异性抗原的多元免疫微球放入离心管中，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，离心完毕后弃去上清液，加入足量待测血清或其他待测标本进行重悬，37℃孵育 30 分钟~2 小时，在反应过程中

可使用摇床或定时摇动，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，用 PBS 洗涤 2 次，弃去上清液，用 PBS 进行重悬；所述第②步是加入标记有特定荧光素的抗 Ig 抗体，37℃孵育 10 分钟~60 分钟；反应过程中应使用摇床或定时摇动，3000 转/分~5000 转/分，离心 3 分钟~5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液后，再用 PBS 进行重悬。

7、如权利要求书 4 所述的一种多元免疫微球的检测方法，其特征在于：所述第②步中针对用抗体包被的多元免疫微球，二次结合反应是指先加与微球上吸附的抗体具有相同特异性的抗体进行反应，用 PBS 洗涤后重悬；然后加入标记有特定荧光素的抗 Ig 抗体进行反应。

8、如权利要求书 7 所述的一种多元免疫微球的检测方法，其特征在于：所述第①步是将表面标记有不同特异性抗体的多元免疫微球放入离心管中，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，弃去上清液，加入足量待测血清或其他待测标本进行重悬，37℃孵育 30 分钟~2 小时，在反应过程中应使用摇床或定时摇动，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，用 PBS 洗涤 2 次，弃去上清液，用 PBS 进行重悬；所述第②步先加入与免疫微球上所标记抗体的特异性完全相同的鼠单克隆抗体，37℃孵育 10 分钟~60 分钟，在反应过程中要使用摇床或定时摇动，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，用 PBS 洗涤 2 次，弃去上清液，用 PBS 进行重悬，然后加入标记有特定荧光素的抗鼠 Ig 抗体，37℃孵育 10 分钟~60 分钟，在反应过程中使用摇床或定时摇动，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液后，再次用 PBS 进行重悬；所述第③步是加入流式细胞仪进行检测和分析。

说明书

一种多元免疫微球、该多元免疫微球的制备技术 以及对该多元免疫微球进行检测的方法

所属技术领域：

本发明涉及生物医学研究及临床应用领域，具体涉及一种检测体液中特异性抗原或抗体含量的多元免疫微球、该多元免疫微球的制备技术以及对该多元免疫微球进行检测的方法。

背景技术：

研究发现，在肿瘤生长的不同阶段患者血清中会出现一些与肿瘤相关的标志物，通过酶联免疫分析（ELISA）或放射免疫分析（RIA）等方法均可对肿瘤标志物的含量进行检测，然后用于肿瘤的诊断、鉴别诊断或早期发现，1981年，由 Dunn 和 Tyrer，研究证实 FITC-标记的乳胶微球使用流式细胞仪可用于检测吞噬作用。一年后，经 Stenart 和 Steinkamp 研究并在 Cytometry 2, 238 中发表了有关使用荧光微球作为血细胞计数的标准检测方法的报道。但每种技术都有相应的不足，如 ELISA、RIA 和荧光微球技术每次都仅能检测一项指标；这样一来，要检测与肿瘤相关的各种标志物就要进行大量的重复性工作，还要花费大量的时间，人力、物力和财力，且实验条件不统一，批间误差较大，所以大大限制了肿瘤早期诊断的相关研究，导致目前临床上早期发现的肿瘤病例仍然较少，从而使临床治疗面临较大压力。

本发明的目的之一是提供一种成倍甚至成百倍的提高可容纳信息含量的多元免疫微球，目的之二是提供一种简单的多元免疫微球的制备技术，目的之三是提供一种操作简便、可以准确迅速地检测血清或其他体液中特异性抗原或的对多元免疫微球进行检测的方法，特异性抗原包括各种疾病标志物、细胞因子和可溶性细胞表面标记等，特异性抗体包括自身抗肿瘤抗体、自身抗核抗体等。

为了实现上述目的，本发明采取的技术方案是：一种多元免疫微球，包括乳胶微球，其特殊之处在于：所述乳胶微球的直径在 1 微米~30 微米之间、按照直径间隔大于或等于 0.3 微米制成，其外包被有不同的特异性抗原或特异性抗体。

上述特异性抗原或特异性抗体可以是与各种疾病相关的标志物，如肿瘤标志物、自身抗体、各种病原微生物抗原或抗体、各种细胞因子、各种细胞的可溶性表面标记、各种可溶性受体分子等。

一种多元免疫微球的制备技术，其特殊之处在于：选取直径间隔大于或等于 0.3 微米、直径在 1 微米~30 微米之间的乳胶微球制成直径大小不同的乳胶微球，在同一直径的乳胶微球的表面包被一种特异性抗原或特异性抗体制成一种免疫微球；将制备好的免疫微球用 PBS 洗涤后，将表面包被有不同特异性抗原或抗体的免疫微球进行混合，即制成多元免疫微球。

一种对多元免疫微球进行检测的方法，其特殊之处在于：①将多元免疫微球与待测样品混合进行抗原和抗体的特异性结合，再将多元免疫微球用 PBS 进行洗涤；②对多元免疫微球进行二次结合反应，再用 PBS 洗涤后重新悬浮；③用流式细胞仪进行分析、检测，通过检测免疫微球的大小及其发光强度或荧光强度的强弱得出相应的待测抗原或抗体的含量。

上述方案中，针对用抗原包被过的多元免疫微球，在第②步中二次结合反应是指加入经化学发光物质或荧光色素标记过的相应的抗抗体，如抗人 Ig 抗体进行反应。

上述方案中，①将表面标记有不同特异性抗原的多元免疫微球放入离心管中，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，离心完毕后弃去上清液，加入足量待测血清或其他待测标本进行重悬，37℃孵育 30 分钟~2 小时，在反应过程中可使用摇床或定时摇动，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，用 PBS 洗涤 2 次，弃去上清液，用 PBS 进行重悬；②加入标记有特定荧光素的抗 Ig

抗体，37℃孵育 10 分钟~60 分钟，在反应过程中应使用摇床或定时摇动，3000 转/分~5000 转/分，离心 3 分钟~5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液后，再次用 PBS 进行重悬；③加入流式细胞仪进行检测和分析。该方案适用于检测体液种各种特异性抗体。

上述方案中，针对用抗体包被的多元免疫微球，在第②步中二次结合反应是指先加与微球上吸附的抗体具有相同特异性的抗体，如鼠单克隆抗体进行反应，用 PBS 洗涤后重悬；然后再加入标记有特定荧光素的抗 Ig 抗体进行反应。

上述方案中，①将表面标记有不同特异性抗体的多元免疫微球放入离心管中，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，弃去上清液，加入足量待测血清或其他待测标本进行重悬，37℃孵育 30 分钟~2 小时，在反应过程中应使用摇床或定时摇动，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，用 PBS 洗涤 2 次，弃去上清液，用 PBS 进行重悬；②先加入与免疫微球上所标记抗体的特异性完全相同的鼠单克隆抗体，37℃孵育 10 分钟~60 分钟，在反应过程中要使用摇床或定时摇动，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，用 PBS 洗涤 2 次，弃去上清液，用 PBS 进行重悬，然后加入标记有特定荧光素的抗鼠 Ig 抗体，37℃孵育 10 分钟~60 分钟，在反应过程中使用摇床或定时摇动，3000 转/分~5000 转/分离心 3 分钟~5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液后，再次用 PBS 进行重悬；③加入流式细胞仪进行检测和分析。该方案适用于检测体液种各种特异性抗原。

使用以上方法制备的多元免疫微球可用于人及各种动物体液中各种疾病相关的特异性抗原或抗体含量的检测，如肿瘤标志物、自身抗体、各种病原微生物抗原或抗体、各种细胞因子、各种细胞的可溶性表面标记、各种可溶性受体分子等。检测人的标本，就用抗人的抗体；检测动物的标本，就用抗动物的抗体。

与现有技术相比，本发明的优点是：

1、制作简单，信息量大，一组多元免疫微球上可容纳数十种、数百种的抗原或特异性抗体的信息，其检测结果的信息含量成倍甚至成百倍的提高，仅用一次检测即可获得待测样品中多种抗原或抗体的含量；

2、检测方法简便快速：由于利用多元免疫微球上的数十种、数百种抗原或特异性抗体对被测样品进行检测，其操作步骤仅需两步即可完成，在 1 小时内即可给出检测结果；

3、敏感性高：可以检测出待测样品中极其微量的抗原或抗体的含量；

4、特异性强：因为是特异性的抗原和抗体反应，因而具有很高的特异性；

5、可靠性好：各项试验流程易于标准化，一次完成检测，试验误差小，重复性好，可有效保证检测结果的准确可靠；

6、成本低、减轻患者负担：试剂消耗少，设备的重复使用减少，有效降低检测成本；血清用量小，有利于患者的身体复原，因此可广泛应用于临床检测及进行研究。

具体实施方式：

发明人给出了以下的实施例，但本发明不限于这些实施例。

在本发明多元免疫微球的制备中，作为原料的乳胶微球和不同特异性的羊或兔多克隆抗体，可以自行制备或外购。乳胶微球相邻规格之间直径相差大于或等于 0.3 微米即可，上限应当保证直径在 1 微米~30 微米之间的乳胶微球的不同规格数量应能满足检测需要；本发明的检测方法中，在经过最后一步加入流式细胞仪进行分析、检测，根据微球的大小和荧光信号的强弱计算出待测样品中相关的各种标志物的含量后，即可根据其含量的不同和变化，辅助判断体内肿瘤的有无，组织类型、病情的发展、变化、转归、预后、治疗方式的选择及治疗效果的判定等。

实施例 1、使用多元免疫微球进行胃癌标志物的检测：

准备直径在 $5\mu\text{m}$ ~ $25\mu\text{m}$ 之间的 25 种规格的乳胶微球，同时准备 25 种不同特异性的羊或兔多克隆抗体，再用这些多克隆抗体分别标记不同乳胶微球，这些多克隆抗体包括：抗 CA50 抗体，抗 CA199 抗体，抗 CA724 抗体，抗 SA 抗体，抗 Fer 抗体，抗 CA494 抗体，抗 CAMD1 抗体，抗 IAPP 抗体，抗 CA19-5 抗体，抗 CEA 抗体，抗 CD44 抗体，抗 γ -谷氨酰转移酶抗体，抗醛缩酶抗体，抗谷胱甘肽转移酶抗体，抗肌酸激酶抗体，抗 α -L 岩藻糖苷酶抗体，抗核糖核酸酶抗体，抗己糖激酶抗体，抗转化生长因子抗体，抗 β_2 -微球蛋白抗体，抗丙酮酸激酶抗体，抗 5'-核苷酸酶抗体，抗 C 多肽抗体，抗铜蓝蛋白抗体，抗 SIMA 抗体。不同规格的乳胶微球被上述不同的多克隆抗体包被之后即形成不同特异性的免疫微球，将这些免疫微球混合即形成检测胃癌相关标志物含量的多元免疫微球。

检测方法是：第①步将这些多元免疫微球放入微量离心管中 3000 转/分离心 5 分钟，弃去上清液，加入 $100\mu\text{l}$ 待测血清进行重悬， 37°C 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，加入抗上述胃癌相关标志物的鼠单克隆抗体 37°C 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，第②步加入荧光色素标记的羊抗鼠多克隆抗体， 37°C 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，用 $100\mu\text{l}$ PBS 进行重悬；第③步加入流式细胞仪进行检测和分析。

实施例 2、使用多元免疫微球进行肺癌标志物的检测：

准备直径在 $1\mu\text{m}$ ~ $30\mu\text{m}$ 之间的 31 种规格的乳胶微球，同时准备 31 种不同特异性的羊或兔多克隆抗体，再用这些多克隆抗体分别标记不同规格的乳胶微球，这些多克隆抗体包括：抗 P53 蛋白、nm23 蛋白、CD44v6、神经元特异性烯醇化酶、细胞角蛋白 19 可溶性片段、组织多肽抗原、细胞角蛋白 18 可溶性片段 M_3 抗原决定簇、癌胚抗原、表皮生长因

子、表皮生长因子受体、肌酸激酶同功酶、总唾液蛋白、降钙素、Fer、CEA、醛缩酶、谷胱甘肽转移酶、肌酸激酶、核糖核酸酶、己糖激酶、转化生长因子、丙酮酸激酶、5'-核苷酸酶、铜蓝蛋白、tsgf、cd34、st-4-39、grp、CK20、TPS、CYFRA21-1 抗体。不同规格的乳胶微球被上述不同的多克隆抗体包被之后即形成不同特异性的免疫微球，将这些免疫微球混合即形成检测肺癌相关标志物含量的多元免疫微球。

检测方法是：第①步将上述多元免疫微球放入微量离心管中 3000 转/分离心 5 分钟，弃去上清液，加入 100 μ l 待测血清进行重悬，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；第②步先加入抗上述肺癌相关标志物的鼠单克隆抗体 37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；然后加入荧光色素标记的羊抗鼠多克隆抗体，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，用 100 μ l PBS 进行重悬；第③步加入流式细胞仪进行检测和分析。

实施例 3、使用多元免疫微球进行肝癌标志物的检测：

准备直径在 5 μ m~25 μ m 之间的 26 种规格的乳胶微球，同时准备 26 种不同特异性的羊或兔多克隆抗体，再用这些多克隆抗体分别标记不同规格的乳胶微球，这些多克隆抗体包括：抗 P53 蛋白、nm23 蛋白、CD44v6、癌胚抗原、表皮生长因子、表皮生长因子受体、肌酸激酶同功酶、总唾液蛋白、Fer、CEA、醛缩酶、谷胱甘肽转移酶、肌酸激酶、核糖核酸酶、己糖激酶、转化生长因子、丙酮酸激酶、5'-核苷酸酶、铜蓝蛋白、tsgf、cd34、st-4-39、grp、AFP、 γ -谷氨酰转移酶及其同功酶 2、 α -L 岩藻糖苷酶抗体。不同规格的乳胶微球被上述不同的多克隆抗体包被之后即形成不同特异性的免疫微球，将这些免疫微球混合即形成检测肝癌相关标志物含量的多元免疫微球。

检测方法是：第①步将这些多元免疫微球放入微量离心管中 3000 转/分离

心 5 分钟，弃去上清液，加入 100 μ l 待测血清进行重悬，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；第②步先加入抗上述肝癌相关标志物的鼠单克隆抗体 37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；然后再加入荧光色素标记的羊抗鼠多克隆抗体，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，用 100 μ l PBS 进行重悬；第③步加入流式细胞仪进行检测和分析。

实施例 4、使用多元免疫微球进行乳腺癌标志物的检测：

准备直径在 5 μ m~25 μ m 之间的 25 种规格的乳胶微球，同时准备 25 种不同特异性的羊或兔多克隆抗体，再用这些多克隆抗体分别标记不同规格的乳胶微球，这些多克隆抗体包括：抗 p16 蛋白、C-erb-2 蛋白、CA-153、CEA、CD44、p53 蛋白、CA549、HCG、nm23 蛋白、CD44v6、癌胚抗原、表皮生长因子、表皮生长因子受体、肌酸激酶同工酶、总唾液蛋白、Fer、醛缩酶、谷胱甘肽转移酶、肌酸激酶、核糖核酸酶、己糖激酶、转化生长因子、丙酮酸激酶、5'-核苷酸酶、铜蓝蛋白抗体。不同规格的乳胶微球被上述不同的多克隆抗体包被之后即形成不同特异性的免疫微球，将这些免疫微球混合即形成检测乳腺癌相关标志物含量的多元免疫微球。

检测方法是：第①步将这些多元免疫微球放入微量离心管中 3000 转/分离心 5 分钟，弃去上清液，加入 100 μ l 待测血清进行重悬，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；第②步先加入抗上述乳腺癌相关标志物的鼠单克隆抗体 37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；然后再加入荧光色素标记的羊抗鼠多克隆抗体，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，用 100 μ l PBS 进行重悬；第③步加入流式细胞仪进行检测和分析。

实施例 5、使用多元免疫微球进行胰腺癌标志物的检测：

准备直径在 5 μ m~25 μ m 之间的 23 种规格的乳胶微球，同时准备 23 种

不同特异性的羊或兔多克隆抗体，再用这些多克隆抗体分别标记不同规格的乳胶微球，这些多克隆抗体包括：抗 CA19-9、CA494、CA242、CAMD1、IAPP、CA50、p16 蛋白、CD44、p53 蛋白、nm23 蛋白、CD44v6、癌胚抗原、肌酸激酶同功酶、总唾液蛋白、Fer，醛缩酶、谷胱甘肽转移酶、肌酸激酶、核糖核酸酶、己糖激酶、转化生长因子、丙酮酸激酶、5'-核苷酸酶抗体。不同规格的乳胶微球被上述不同的多克隆抗体包被之后即形成不同特异性的免疫微球，将这些免疫微球混合即形成检测胰腺癌相关标志物含量的多元免疫微球。

检测方法是：第①步将这些多元免疫微球放入微量离心管中 3000 转/分离心 5 分钟，弃去上清液，加入 100 μ l 待测血清进行重悬，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；第②步先加入抗上述胰腺癌相关标志物的鼠单克隆抗体 37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；然后再加入荧光色素标记的羊抗鼠多克隆抗体，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，用 100 μ l PBS 进行重悬；第③步加入流式细胞仪进行检测和分析。

实施例 6、使用多元免疫微球进行卵巢癌标志物的检测：

准备直径在 5 μ m~25 μ m 之间的 20 种乳胶微球，同时准备 20 种不同特异性的羊或兔多克隆抗体，再用这些多克隆抗体分别标记不同规格的乳胶微球，这些多克隆抗体包括：抗 CA125、IAPP、p16 蛋白、 β_2 -微球蛋白、CD44、p53 蛋白、nm23 蛋白、CD44v6、癌胚抗原、肌酸激酶同功酶、总唾液蛋白、Fer，醛缩酶、谷胱甘肽转移酶、肌酸激酶、核糖核酸酶、己糖激酶、转化生长因子、丙酮酸激酶、5'-核苷酸酶抗体。不同规格的乳胶微球被上述不同的多克隆抗体包被之后即形成不同特异性的免疫微球，将这些免疫微球混合即形成检测卵巢癌相关标志物含量的多元免疫微球。

检测方法是：第①步将这些多元免疫微球放入微量离心管中 3000 转/分离

心 5 分钟，弃去上清液，加入 100 μ l 待测血清进行重悬，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；第②步先加入抗上述卵巢癌相关标志物的鼠单克隆抗体 37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；然后再加入荧光色素标记的羊抗鼠多克隆抗体，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，用 100 μ l PBS 进行重悬；第③步加入流式细胞仪进行检测和分析。

实施例 7、使用多元免疫微球进行多种肿瘤标志物的检测：

准备直径在 1 μ m~30 μ m 之间的 51 种规格的乳胶微球，同时准备 51 种不同特异性的羊或兔多克隆抗体，再用这些多克隆抗体分别标记不同规格的乳胶微球，这些多克隆抗体包括：抗 CA50、CA19-9、CA724、SA、Fer、POA、PSA、CA494、CA27.29、DU-PAN-2、CA242、CAMD1、IAPP、C 多肽单抗、铜蓝蛋白、CK19、tsgf、cd34、st-4-39、grp、p53 蛋白、CK20、TPA、TPS、NSE、CYFRA21-1、p16 蛋白、p21 蛋白、p15 蛋白、C-erb-2 蛋白、CA-153、CA19-5、CEA、CD44、CA549、AFP、SIMA、 γ -谷氨酰转移酶、醛缩酶、谷胱甘肽转移酶、肌酸激酶、 α -L 岩藻糖苷酶、核糖核酸酶、己糖激酶、转化生长因子、 β_2 -微球蛋白、丙酮酸激酶、5'-核苷酸酶、CA125、HCG、SIXE、CA19 抗体。不同规格的乳胶微球被上述不同的多克隆抗体包被之后即形成不同特异性的免疫微球，将这些免疫微球混合即形成检测体液中各种肿瘤标志物含量的多元免疫微球。

检测方法是：第①步将这些多元免疫微球放入微量离心管中 3000 转/分离心 5 分钟，弃去上清液，加入 100 μ l 待测血清进行重悬，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；第②步先加入抗上述体液中各种肿瘤标志物的鼠单克隆抗体，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；然后再加入荧光色素标记的羊抗鼠多克隆抗体，37℃ 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，用 100 μ l PBS 进行重悬；第③步加入流式细胞仪进行检测和分析。

实施例 8、使用多元免疫微球进行细胞因子含量的检测：

准备直径在 $5\mu\text{m}$ ~ $25\mu\text{m}$ 之间的、相互之间直径相差 0.3 微米的 30 种规格的乳胶微球，同时准备 30 种不同特异性的羊或兔多克隆抗体，再用这些多克隆抗体分别标记不同规格的乳胶微球，这些多克隆抗体包括：抗 IL-1、IL-2、IL-3 一直到 IL-20、IFN、TNF、各种生长因子抗体。不同规格的乳胶微球被上述不同的多克隆抗体包被之后即形成不同特异性的免疫微球，将这些免疫微球混合即形成检测体液中各种细胞因子含量的多元免疫微球。

检测方法是：将这些多元免疫微球放入微量离心管中 3000 转/分离心 5 分钟，弃去上清液，加入 $100\mu\text{l}$ 待测血清进行重悬， 37°C 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；第②步先加入抗上述体液中各种细胞因子的鼠单克隆抗体， 37°C 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液；然后再加入荧光色素标记的羊抗鼠多克隆抗体， 37°C 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，用 $100\mu\text{l}$ PBS 进行重悬；第③步加入流式细胞仪进行检测和分析，。

实施例 9、使用多元免疫微球进行自身免疫性抗体的检测：

准备直径在 $1\mu\text{m}$ ~ $30\mu\text{m}$ 之间的 30 种不同规格的乳胶微球，同时准备 30 种特异性抗原，再用这些抗原分别标记不同规格的乳胶微球，这些抗原包括：各种微生物抗原、自身核抗原等。不同规格的乳胶微球被上述不同的抗原包被之后即形成不同的免疫微球，将这些免疫微球混合即形成检测体液中各种自身抗体含量的多元免疫微球。

检测方法是：将这些多元免疫微球放入微量离心管中 3000 转/分离心 5 分钟，弃去上清液，加入 $100\mu\text{l}$ 待测血清进行重悬， 37°C 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，第②步加入荧光色素标记的兔抗人抗体， 37°C 孵育 30 分钟，3000 转/分离心 5 分钟，用 PBS 清洗 2 次，弃去上清液，用 $100\mu\text{l}$ PBS 进行重悬；第③步加入流式细胞仪进行检测和分析。

专利名称(译)	一种多元免疫微球、该多元免疫微球的制备技术以及对该多元免疫微球进行检测的方法		
公开(公告)号	CN1362623A	公开(公告)日	2002-08-07
申请号	CN02114413.3	申请日	2002-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	陕西超英生物医学研究开发有限公司		
申请(专利权)人(译)	陕西超英生物医学研究开发有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	陕西超英生物医学研究开发有限公司		
[标]发明人	李军 刘永军 刘文康 王伟华 刘镭		
发明人	李军 刘永军 刘文康 王伟华 刘镭		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物医学研究及临床应用领域,具体涉及一种多元免疫微球、该多元免疫微球的制备技术以及对该多元免疫微球进行检测的方法。本发明的优点是一次检测即可获得待测样品中多种抗原或抗体的含量,以便用于各种相关疾病如肿瘤、各种炎症以及自身免疫性疾病等的诊断、鉴别诊断或早期发现。本发明采用的技术方案是:将抗原性物质或特异性抗体吸附在不同大小的乳胶微球上制成多元免疫微球,与待测样品混合,通过抗原抗体反应,将各种待测样本中的特异性抗原或抗体全部吸附到多元免疫微球上,再使用流式细胞仪分析待测样品中相关抗原和抗体的含量。