

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410060857.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/546 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 27/04 (2006.01)

G01J 1/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年4月25日

[11] 授权公告号 CN 1312477C

[22] 申请日 2004.9.13

[21] 申请号 200410060857.9

[73] 专利权人 王占科

地址 330001 江西省南昌市井冈山大道解放军九四医院

[72] 发明人 王占科 胡新勇 祝仲珍 柴长春
冯青青 杨莉萍 李国辉 雷万生

[56] 参考文献

CN1290721A 2001.4.11
US5976426A 1999.11.2
US5686252A 1997.11.11
US4358388A 1982.11.9
CN1362623A 2002.8.7
CN1475805A 2004.2.18
US5073498A 1991.12.17

US5620903A 1997.4.15

US4774189A 1988.9.27

磁分离酶联免疫技术测定 FT3 FT TSH 李兴鑫,实用临床医学,第5卷第5期 2004

磁性高分子微球的制备和应用研究进展丁小斌等,化工通报,第1期 1997

免疫磁性微球的研究进展 徐辉等,化工工业与工程,第20卷第1期 2003

免疫磁珠技术在肿瘤学中的研究进展 肿瘤防治杂志,肿瘤防治杂志,第11卷第4期 2004

免疫磁珠技术在肿瘤学中的应用 路丹等,哈尔滨医科大学学报,第36卷第5期 2002

审查员 倪晓红

权利要求书1页 说明书8页

[74] 专利代理机构 江西省专利事务所

代理人 李卫东

[54] 发明名称

不同阻抗系列免疫微球及制备方法、以及对其进行检测的方法与装置

[57] 摘要

本发明涉及医院检验诊断试剂及仪器开发应用领域,本发明技术方案包括:1)制备不同阻抗系列微球。2)将已知抗原、抗体和DNA片段包被在不同阻抗微球上,制成诊断微球芯片,3)加入荧光或发光物标记的第二抗体或DNA片段,使不同阻抗的诊断微球表面带有光信号,4)对微球进行阻抗判读和光信号量分析。其优点是一种测定试剂盒可同时检测多种待测物质。本发明的阻抗变量微球液态生物芯片,阻抗变量的无限性决定测定项目的无限性,使测定项目更多,灵敏度更高。此外,不同阻抗诊断微球可以长期保存,测定设备技术要求相对较低,更易产业化和推广。

1、一种不同阻抗系列免疫微球，包括乳胶微球，其特征在于：免疫微球含不同浓度的金属和碳粉末导电成分，导电物质和乳胶原料是按 1: 10—1: 100000000 的重量份进行混合，免疫微球直径为 50—100 微米。

2、如权利要求 1 所述不同阻抗系列免疫微球，其特征在于：1) 不同阻抗系列免疫微球表面共价结合不同特异性抗原、抗体或特异 DNA 片段，2) 相同阻抗系列免疫微球表面共价结合相同特异性抗原、抗体或特异 DNA 片段，3) 不同阻抗系列免疫微球表面共价结合的特异性抗原、抗体或特异 DNA 片段，是针对正常人或患者机体内具有诊断价值的待测相应抗体，抗原、特异 DNA 片段。

3、如权利要求 1 或 2 所述的不同阻抗系列免疫微球的制备方法，其特征在于：1) 将导电物质和乳胶原料是按 1: 10—1: 100000000 进行混合，生产出不同电阻特征的乳胶微球，2) 按不同阻抗数值微球代表不同待测物质，不同阻抗数值段微球代表不同系列待测物质，将不同阻抗微球表面，标记不同的特异性抗原、抗体和特异 DNA 片段。

4、一种如权利要求 1 或 2 所述的不同阻抗系列免疫微球的检测方法，其特征在于：1) 将不同阻抗系列免疫微球与待测样品混合，进行抗原抗体特异结合和核酸分子杂交，然后用磷酸缓冲液洗涤微球；2) 将洗涤后微球与荧光标记的特异抗体、抗原或 DNA 片段，进行特异结合，使不同阻抗系列免疫微球表面出现荧光或发光，荧光或发光微球经离心后，再用磷酸缓冲液洗涤重新悬浮；3) 洗涤后不同阻抗系列免疫荧光或发光微球，首先通过血球记数仪，进行微球阻抗分析，判断检测物质种类，然后通过流式细胞仪，进行不同微球表面荧光或发光强度分析，根据已知标准品浓度，计算待测物质含量。

5、如权利要求 4 所述的检测方法，其特征在于：将 10%浓度的不同阻抗系列免疫微球，放入离心管中，加入足量待测样品或标准品，35—39°C 温育，2000g 离心 5—8 分钟，用磷酸缓冲液洗涤 2 次，弃取上清液，用磷酸缓冲液重悬；再加入荧光或发光素标记的抗体、抗原或 DNA 片段，35—39°C 温育 30—60 分钟，2000g 离心 5—8 分钟，弃取上清液，留取离心管底部微球，用磷酸缓冲液进行重悬，再离心，再用磷酸缓冲液重悬。

6、如权利要求 4 所述的检测方法，其特征在于：对结合荧光或发光物质的不同阻抗系列免疫微球，经磷酸缓冲液洗涤重悬后，加入荧光或发光测定试剂，首先通过微球阻抗测定装置测定其阻抗，随后进入微球表面荧光或发光强度检测装置检测荧光或发光强度；微球阻抗测定判断待测物质种类，荧光或发光信号强度测定判断待测物质含量。

7、如权利要求 6 所述的一种同时检测不同阻抗系列免疫微球的阻抗大小和微球表面荧光或发光信号强度的装置，其特征在于：该装置包括三个部分，第一部分是微孔阻抗测定装置，能测定通过微孔的单个微球电阻大小；第二部分是对已经通过微孔的微球表面荧光或发光信号，进行定量检测装置；第三部分是软件分析系统，能先后接收微球电阻信号以及该微球表面光信号，准确分析出不同阻抗微球表面的荧光或发光信号强度，并在标准参比条件下进行定量；三部分为统一而不是分离的系统装置，所述的软件分析系统是首先设定微球阻抗值代表的测定项目，然后分析不同阻抗即测定项目的微球表面的荧光或光信号强度即物质含量，以标准物做参比，计算待测物质含量，并将数据传输给打印机，打印结果报告。

不同阻抗系列免疫微球及制备方法、以及对其进行检测的方法与装置

技术领域

本发明属于生物医学检验技术领域。具体涉及不同阻抗系列免疫微球及其制备方法、以及对其进行检测的方法与装置。

技术背景

目前建立在抗原抗体反应基础上的实验诊断技术，包括酶联免疫吸附试验（ELISA）技术，放射免疫技术、发光免疫技术、胶体金免疫技术、荧光免疫技术、发光免疫技术、蛋白质芯片技术和生物传感技术等。建立在核酸分子杂交技术上的实验诊断技术，包括 Northern blot 技术、Southern blot 技术和原位杂交技术等。这些技术是医学检验工作中常见的技术，但都存在一些缺点。

我们以 ELISA 技术为例，说明目前建立在抗原抗体反应基础上的实验诊断技术一般存在以下不足：1、是一种试剂只能测定一个项目。比如测定乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）的试剂只能测定 HBsAg，而不能同时测定乙型肝炎病毒 e 抗原（HbeAg）。医院检验科或科研技术人员每次实验只能测定一项指标，要检测某种疾病的相关物质，就要进行大量的重复性工作（如乙型肝炎两对半系列），花费大量的人力，物力和资源，增加检验成本。2、是质量控制比较困难。人们不可能对一批试剂盒中的所有测定板上的所有测定孔，逐一进行质量监测。质量控制部门，只能从一批 ELISA 测定板中，随机抽样检查，这很难保证标本测定结果的准确性。3、是准确定量比较困难，灵敏度不高，操作复杂。ELISA 技术最终以测定孔液体颜色深浅作为阳性判读标准，由于受到显色时间的影响，使结果很难做到准确定量。此外该技术测定步骤烦琐，需要时间长，存在人为误差等缺点。

除了 ELISA 技术之外，其它技术也各有各的缺点和不足，有的技术虽然快速，但只能定性、不能定量；有的技术虽然能够定量，但检测成本很高，且难以同时对多种物质同时进行测定。固体生物芯片（包括蛋白质和基因芯片）技术，可以同时测定上千种物质，但一般用于定性（判断阴性和阳性）而难以用于定量测定。

20 世纪 80 年代国外开发出流式细胞技术，对人体血液内细胞表面标记物进行检测，并已经用于白血病的诊断与分类。最近，国外也开发出建立在不同颜色微球基础上的液态芯片技术，其制作方法为，不同颜色微球代表不同测定物质，微球表面荧光强度代表物质含量。该技术解决了可以同时定量测定 100 种以内的待测物质的难题，是固态生物芯片技术的一次飞跃，被认为是一场世界范围内检验技术革命。

但是，建立在不同颜色微球基础上的液态芯片技术，也存在不足，主要表现在以下几个方面：

1、不同颜色代表不同测定物质，但能被仪器准确识别颜色变化并不是无限的。因此该技术测定物质种类还不是真正意义上的无限多。

2、不同颜色微球，因保存时间长，可能会出现脱色。

3、微球颜色对微球表面的光信号测定，会产生干扰。

4、测定设备要求条件高。需要高灵敏的颜色判断和可以消除微球自身颜色的微球表面

光信号定量测定设备。

5、检测设备对颜色种类精细判读,可能存在误差,不可能同时检测无数种待测物质,根据资料报道,最多只能得到100种比较稳定的不同颜色微球,这无法满足日益增多的检验科检测和医学科研项目的要求。

6、发展中国家独自开发和生产出这种测定设备,在技术上尚不成熟。

本发明是颜色变量免疫微球液态芯片基础上的一次革命性创新,具有同时测定项目更广,检测结果更可靠,发展中国家技术能满足其检测装置的技术要求等特点。

发明内容

本发明目的是,用不同阻抗系列免疫微球液态生物芯片技术,取代目前医院检验科或医学院校所有ELISA项目、放射免疫项目和基因检测项目,以及最近从国外进口的不同颜色免疫微球液态生物芯片技术。不同阻抗微球液态芯片可以对传统建立在抗原抗体反应和核酸分子杂交原理上的所有项目,进行定量测定。本发明的技术创新是,用不同阻抗免疫微球代表不同测定项目,用微球表面荧光或发光信号强度代表待测物质的含量。本发明为医学检验技术产业部门和临床检验试剂盒开发部门,提供不同阻抗系列免疫微球及其制备方法、以及对其进行检测的方法与装置。

本发明的一种不同阻抗系列免疫微球,包括乳胶微球,其主要特征如下:

1) 不同阻抗系列免疫微球含不同浓度的金属和碳粉末导电物质,导电物质浓度越高,微球电阻率越小,反之依然。

2) 不同阻抗系列免疫微球大小体积不同。同样电阻率微球,体积越大,阻抗越大,反之依然。最大微球直径不大于100微米,最小微球直径不小于最大微球直径的一半。

3) 由于微球电阻率不同,同样电阻率的微球体积不同,可以形成无数种稳定的不同阻抗系列微球。

4) 不同阻抗段免疫微球,代表不同系列测定物质,如1至10欧姆代表乙型肝炎抗原系列,10欧姆至20欧姆代表肿瘤标记物系列等,不同具体阻抗数值代表不同具体测定物质,如1欧姆代表HbsAg测定,2欧姆代表HbeAg测定,4欧姆代表HbcAg测定。微球阻抗变量的无限性,代表同时测定的物质种类的无限性。

5) 不同阻抗免疫微球表面共价结合不同特异性抗原、抗体或特异DNA片段,相同阻抗免疫微球表面共价结合相同特异性抗原、抗体或特异DNA片段。

6) 不同阻抗免疫微球表面共价结合的特异性抗原、抗体或特异DNA片段,是针对正常人或患者机体内具有诊断价值的待测相应抗体,如抗甲型肝炎病毒抗体,抗HAV抗体,抗原,如乙型肝炎病毒表面抗原,HBsAg或特异DNA片段如乙型肝炎病毒DNA的互补特异性抗原、抗体或特异DNA片段。

2、本发明所述的不同阻抗系列免疫微球的制备方法如下:

第一步:制备不同阻抗系列的微球,包括乳胶微球。

将导电物质,如金属粉末和碳粉末和乳胶原料,按1:10--1:100000000进行混合,按照成熟的工艺,控制实验条件,生产出相同导电物质浓度的不同大小体积的乳胶微球,然后采用微孔滤膜小于100 μm 且大于50 μm .过滤再通过密度梯度离心,分离不同大小体积的乳胶微球。因为同一配方生产的乳胶微球电阻率相同,因此分离出来的体积相同的微球,其

阻抗也相同。

为了从外观上可以区分不同阻抗的乳胶微球，我们使用相同电阻率的不同体积微球用于不同物质的测定，乳胶体积越大，电阻越大，微球体积越小，电阻越小。乳胶微球直径不超过 100 微米，是为了保证普通阻抗型血球记数仪，能够完成本发明的微球阻抗大小测定。最小微球体积不小于最大微球体积一半，是为了保证不让 2 个微球同时进入阻抗测定微孔。不同阻抗微球经测试后，注明阻抗数值，保存备用。

以苯乙烯为原料合成乳胶微球为例，首先将金属银粉末与苯乙烯，按 1: 10---1: 100000000 混合，通过成熟工艺，生产出符合要求的不同阻抗系列的羧化或胺化聚苯乙烯乳胶微球，这种乳胶微球可共价牢固连接抗原、抗体和 DNA 化学分子如表 1 所示。生产出的不同阻抗系列羧化或胺化聚苯乙烯乳胶微球，通过孔径为 100 μ m 尼龙膜过滤，过滤后乳胶微球通过密度梯度离心，10000 转/分钟 20 分钟，不同体积微球停留在不同位置，精确吸取不同体积的乳胶微球，最后，用显微镜标尺测定微球体积，把同体积的微球放置同一个试管内保存。同体积大小微球通过微孔阻抗测定装置，精确测定阻抗大小，并计算该批乳胶产品的电阻率，电阻率=微球阻抗/微球体积。对于同一批乳胶微球产品导电物质浓度相同、电阻率相同。微球阻抗大小取决于微球体积大小，同体积大小微球，阻抗相同。

表 1: 不同阻抗聚苯乙烯乳胶微球的生产配方。

苯乙烯(克)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
银粉末(毫克)	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5

本发明所指的导电物质，包含能改变乳胶微球导电率变化的其它一切物质。

第二步：制备不同阻抗系列免疫诊断乳胶微球生物芯片。

首先，确定不同乳胶微球阻抗与测定成分一一对应。不同阻抗微球代表不同测定项目。一个阻抗范围即阻抗段，代表一个测定系列项目如乙肝测定系列，肿瘤标记物测定系列等。不同具体阻抗数值代表不同具体待测物质如 HBsAg, HBeAg, HBcAg 等。由于微球电阻变化无限性，也决定着待测项目的无限性，如表 2 所示。我们将不同阻抗对应的待测物质，输入计算机软件，供判断阻抗免疫微球代表的待测物质种类分析。

表 2: 不同乳胶微球阻抗代表不同测定项目。

微球电阻(欧姆)	1	2	3...	11	12 ...	101	102...
测定物质	HbsAg	HbeAg	HBcAg...	AFP	CEA ...	T3	T4...

然后，根据阻抗大小与待测物质种类对应表，采用成熟的化学共价标记技术，将成千上万种不同特异性抗体、特异性抗原或特异性已知 DNA 片段，标记在成千上万种相对应的不同阻抗乳胶微球表面，做成不同阻抗系列微球液态生物芯片。

最后，配制不同阻抗微球系列液态生物芯片所需的配套试剂，根据待测物质的性质不同，设计不同配套试剂。

①待测成分为蛋白质抗原。这类物质包括细菌、支原体、衣原体、病毒等表面特异抗原、多种肿瘤标记物、体内蛋白质多肽物质如 C 反应蛋白，激素、类风湿因子等。这类项目的检测需要乳胶微球表面包被相对应的特异性抗体，进行分析。

测定这类物质成分试剂盒，需要以下配套试剂。

(1) 游离的相应抗体及其缓冲液

- (2) 荧光或发光物标记的第二抗体（抗抗体）及其缓冲液
- (3) 抗原抗体结合反应缓冲液
- (4) 乳胶微球洗涤液
- (5) 荧光或发光测定试剂

② 待测物质为蛋白质抗体。这类物质主要包括由于患者感染了细菌、支原体、衣原体、病毒，而产生的特异抗体。此外，某些疾病也会诊断自身物质产生的病理性抗体。这类项目的检测需要乳胶微球表面包被相对应的蛋白质抗原，进行分析。

测定这类物质成分，需要以下配套试剂。

- (1) 游离的相应荧光或发光物标记的第二抗体（抗抗体）及其缓冲液
- (2) 抗原抗体结合反应缓冲液
- (3) 乳胶微球洗涤液
- (4) 荧光或发光测定试剂

③ 待测物质为 DNA 或 RNA。这类物质主要包括体内微生物尤其是病毒的特异 DNA 或 RNA 片段，以及用于科学研究的某些 DNA 或 RNA 的检测与分析。这类项目的检测需要乳胶微球表面包被相对应的 DNA 或 RNA 片段，进行分析。测定这类物质，需要以下配套试剂。

- (1) 游离的荧光或发光物标记的 DNA 片段（基因探针）及其缓冲液
- (2) 杂交反应液
- (3) 乳胶微球洗涤液
- (4) 荧光或发光测定试剂

以上缓冲液均可在公开的资料文献或教材上，找到配方，这里不再详述。

第三步：组装阻抗变量液态生物芯片试剂盒。

将已标记的不同抗原、抗体和 DNA 的不同阻抗乳胶诊断微球和配套试剂，组合包装成为阻抗变量液态生物芯片试剂盒。试剂盒内有多少种不同电阻的诊断微球，就代表能同时测定多少种项目，但某种抗原和该抗原对应的抗体测定微球不能同时在一个试剂盒内存在，如 HBsAg 和 HBsAb 不能同时测定。不同阻抗诊断乳胶微球可以冻干保存，其它配套试剂可以 5 °C 冰箱保存。

试剂盒内含有以下几种试剂：

- 1) 不同冻干阻抗诊断微球
- 2) 不同测定物质浓度标准品
- 3) 各种反应液
- 4) 各种缓冲液
- 5) 各种稀释液和洗涤液
- 6) 荧光和发光物质测定试剂

3、本发明不同阻抗系列免疫微球，阻抗变量微球液态生物芯片的检测方法如下：

1) 待测物质为抗原类：

第一步：将不同阻抗系列标记有不同相应抗体的免疫微球与待测样品中的待测抗原混合，进行第一次抗原抗体特异结合，离心后用 PBS 洗涤微球。

第二步：将洗涤后微球与游离的相应抗体进行二次结合反应，离心后用 PBS 洗涤微球。

第三步：将洗涤后微球与荧光或发光物标记的抗原抗体进行第三次结合反应，微球经离心后，再用 PBS 洗涤，弃取游离的荧光或发光标记的抗原抗体，微球重新悬浮待测。如果样品中有待测抗原，不同阻抗系列免疫微球表面出现荧光或发光。

2) 待测物质为抗体类：

第一步：将不同阻抗系列标记有不同相应抗原的免疫微球与待测样品中的待测抗体混合，进行第一次抗原抗体特异结合，离心后用 PBS 洗涤微球。

第二步：将洗涤后微球与荧光或发光物标记的抗原抗体进行第二次结合反应，微球经离心后，再用 PBS 洗涤，弃取游离的荧光或发光标记的抗原抗体，微球重新悬浮待测。如果样品中有待测抗体，不同阻抗系列免疫微球表面出现荧光或发光。

3) 待测物质为 DNA 或 RNA 类：

第一步：将不同阻抗系列标记有与不同待测 DNA 或 RNA 部分互补的 DNA 片段的免疫微球与待测样品中的待测 DNA 或 RNA 混合，进行第一次核酸分子杂交反应，离心后用 PBS 洗涤微球。

第二步：将洗涤后微球与荧光或发光物标记的与待测 DNA 或 RNA 部分互补的 DNA，进行第二次核酸分子杂交反应，微球经离心后，再用 PBS 洗涤，弃取游离的荧光或发光标记 DNA 片段，微球重新悬浮待测。如果样品中有待测 DNA 或 RNA，不同阻抗系列免疫微球表面出现荧光或发光。

以上洗涤后不同阻抗系列免疫荧光或发光微球，通过阻抗变量微球液态生物芯片检测装置，进行微球阻抗分析判别待测物质，以及微球表面荧光或发光信号强度分析，根据标准浓度的微球荧光或发光强度大小，计算待测物质含量。

4、不同阻抗系列免疫微球检测装置。

本发明的阻抗变量免疫微球液态生物芯片检测装置，包括 2 个测定装置和一套软件分析系统。两个测定装置是指微球阻抗检测装置和微球表面光信号测定装置，一套软件分析系统指对微球阻抗大小及其表面光信号进行处理分析的系统。2 个测定装置和一个软件分析系统是一个统一的整体，是微孔阻抗测定技术和微球表面光信号测定技术的有机结合。

第一部分是微孔阻抗测定装置，能测定通过微孔的单个微球电阻大小；微孔直径不超过最小微球直径的 2 倍。其技术原理与细胞记数仪的工作原理基本相同。

第二部分是对通过微孔的微球表面荧光或发光信号，进行定量检测装置；其原理与流式细胞仪工作原理基本相同。

第三部分是软件分析系统，能接收微球阻抗信号以及该微球表面光信号，通过预设的技术参数，分析微球阻抗大小以判定待测物质种类，分析该阻抗微球表面荧光或发光信号强度，并以标准品做参比，计算出该待测物质的含量，并打印报告。

本发明的阻抗变量免疫微球液态生物芯片测定装置软件分析系统至少需预设技术参数包括：①阻抗变量免疫微球液态生物芯片的不同微球阻抗数值代表的待测物质种类，②多种标准品浓度。

5 本发明的优点如下：

1)、不同阻抗微球代表不同测定物质，阻抗变化信息量更大，从理论上做到同时测定无限多个检测项目。

- 2)、不同阻抗微球容易被判读,一般血球细胞记数仪工作原理,能满足本发明要求。
- 3、微球表面待测物质光信号,不受微球阻抗干扰。
- 4、不同阻抗微球,稳定,可以长期保存,且容易生产。
- 5、所需设备的技术相对低,血球记数仪和流式细胞仪技术结合,即可完成本发明技术要求。

具体实施例

实施例 1

测定体内某些物质抗原,能直接说明体内感染了某些物质。发明人以同时测定乙型肝炎病毒三项抗原物质(HBsAg, HBeAg, HbcAg)为例,加以说明抗原类物质测定的操作步骤。

- 1)将导电物质和乳胶原料,按 1: 1000、1: 2000、1: 3000 的重量份进行混合、制作不同阻抗的可用化学共价键标记的乳胶微球。
 - 2)将乳胶微球分为低阻抗 n1, 中阻抗 n2 和高阻抗 n3 三种,并预设阻抗 n1, n2 和 n3 分别代表 HBsAg, HBeAg 和 HbcAg 测定,并将该对应信息输入阻抗变量微球液态生物芯片检测装置软件系统。三种乳胶微球直径分别为 60 μ m, 80 μ m 和 100 μ m。
 - 3)制作抗 HBsAg, HBeAg 和 HbcAg 三种单克隆抗体。
 - 4)将抗 HBsAg, HBeAg 和 HbcAg 三种单克隆抗体,分别共价键结合在低、中、高三不同阻抗的微球表面,制作免疫微球,2000g 离心 5 分钟,弃去游离未标记的抗体。
 - 5)三种免疫微球用磷酸缓冲液(PBS)洗涤,离心后,弃取上清液,用含抗原抗体反应缓冲液进行重悬,制成 10%微球浓度的三元诊断微球液态芯片。
 - 6)将 250 微升三元微球芯片放入 1 毫升的 EF 离心管内,再加 250 微升血清或其他测定标本,充分混匀,37 $^{\circ}$ C 震荡保温 50 分钟,使微球表面三种抗 HBsAg, HBeAg 和 HBcAg 三种单克隆抗体分别与样品中待测的 HBsAg, HBeAg 和 HBcAg 三种不同抗原充分结合。
 - 7)离心管 1500g 离心 10 分钟,弃取上清,用 PBS 重悬,再离心,再去上清,对三元阻抗微球芯片进行洗涤,彻底洗去离心管中游离的待测物质。
 - 8)加入含有游离抗 HBsAg, HBeAg 和 HBcAg 三种单克隆抗体 PBS 溶液 500 毫升,37 $^{\circ}$ C 震荡保温 30 分钟,使它们分别与结合在微球上的待测 HBsAg, HBeAg 和 HBcAg 充分结合,重复第 7)步,对三元诊断微球进行洗涤,离心弃取上清液。
 - 9)加入荧光标记的抗人免疫球蛋白抗体(抗抗体)500 毫升,37 $^{\circ}$ C 震荡保温 45 分钟,与结合在微球表面的抗 HBsAg, HBeAg 和 HBcAg 三种单克隆抗体充分结合,重复步骤 7),彻底洗涤,离心,留取微球沉淀。
 - 10)将微球荧光测定缓冲液重悬微球沉淀,使用阻抗变量微球液态生物芯片检测装置,进行微球阻抗(测定项目)和微球表面荧光强度(物质含量)测定,通过数据分析软件系统,分析 HBsAg, HBeAg 和 HBcAg 的含量。
 - 11)结果判读:如果低阻抗微球表面荧光阳性,说明血清 HBsAg 阳性,荧光强度与 HBsAg 浓度呈正比。采用标准 HBsAg 浓度做参比测定,可对 HBsAg 进行准确定量。如果低阻抗和高阻抗表面荧光同时阳性,说明血液内同时存在 HBsAg 和 HBcAg,依次类推。
- 以上操作事例只起示范作用,具体详见有关技术资料。如果要测 n 种抗原物质,需要 n 种不同电阻的微球,操作同上。

实施例 2

测定体内某些物质的抗体，能间接说明体内感染了某些物质。发明人以同时测定甲型肝炎病毒（HAV）抗体、乙型肝炎病毒（HBV）抗体和丙型肝炎病毒（HCV）抗体和丁型肝炎病毒（HDV）抗体为例，加以说明抗体类物质测定的操作步骤。

1) 将导电物质和乳胶原料，按 1: 100、1: 200、1: 300、1: 400 的重量份进行混合，制作 4 种不同阻抗 (n_1, n_2, n_3 和 n_4) 特征的可供共价结合抗原蛋白质的乳胶微球。

2) 生产基因工程产品 HAV、HBV、HCV 和 HDV 特异抗原片段或灭活病毒蛋白颗粒。

3) 预设 n_1, n_2, n_3, n_4 四种阻抗乳胶微球分别代表抗 HAV、HBV、HCV、HDV 四种抗体测定，并将该对应信息输入阻抗变量微球液态生物芯片检测装置软件系统。

4) 分别将 HAV、HBV、HCV、HDV 抗原片段分别化学共价标记在 n_1, n_2, n_3, n_4 四种阻抗乳胶微球表面，制作四元免疫微球。2000g 离心 5 分钟，弃去游离未标记的抗原。

5) 四种免疫微球用磷酸缓冲液（PBS）洗涤，用含抗原抗体反应 PBS 缓冲液进行重悬，制成 10% 微球浓度的四元诊断微球液态芯片。

6) 将 250 微升四元微球芯片放入 1 毫升的 EF 离心管内，再加 250 微升血清或其他测定标本，充分混匀，37°C 震荡保温 40 分钟，使微球表面的 HAV、HBV、HCV、HDV 抗原和样品中待测相应抗体充分结合。

7) 2000g 离心 5 分钟，弃取上清，用 PBS 重悬，再离心，再去上清，对四元阻抗微球芯片进行洗涤，彻底洗去离心管中游离的待测抗体。

8) 加入含有荧光标记的抗抗体（抗人类免疫球蛋白抗体）PBS 溶液 500 毫升，37°C 震荡保温 40 分钟，使它们分别与结合在微球上的待测抗体反应，重复第 7) 步，对微球进行彻底洗涤，弃取上清液，保留微球沉淀。

9) 将微球荧光测定试剂，重悬微球沉淀，使用阻抗变量微球液态生物芯片检测装置，进行微球阻抗（测定项目）和微球表面荧光强度（物质含量）测定，通过数据分析软件系统，分析抗 HAV、HBV、HCV 和 HDV 四种抗体的含量。

10) 结果判读：如果 n_1 阻抗微球表面荧光阳性，说明血清 HAV 抗体阳性，荧光强度与 HAV 抗体浓度呈正比。采用 HAV 抗体标准浓度做参比测定，可对 HAV 抗体进行准确定量。如果 n_2, n_3 和 n_4 阻抗微球表面荧光同时阳性，说明血液内同时存在 HAV 抗体、HBV 抗体、HCV 抗体和 HDV 抗体，依次类推。

以上操作事例只起示范作用，具体详见有关技术资料 and 文献。如果要测 n 种抗体物质，需要 n 种不同电阻的微球，操作同上。

实施例 3

测定某微生物的特异核酸（DNA 或 RNA）片段，能够特异诊断机体存在该微生物感染。核酸能够按照碱基互补结合原理，进行特异杂交。发明人以同时测定甲型肝炎病毒（HAV）、乙型肝炎病毒（HBV）、丙型肝炎病毒（HCV）和丁型肝炎病毒（HDV）特异 DNA 或 RNA 片段为例，加以说明 DNA 或 RNA 类物质测定的操作步骤。

1) 将导电物质和乳胶原料，按 1: 10000、1: 20000、1: 30000、1: 40000 的重量份进行混合，制作 4 种不同阻抗可供核酸（DNA）标记的胺化乳胶微球。

2) 预设不同阻抗 (n_1, n_2, n_3 和 n_4) 分别代表 HAV、HBV、HCV 和 HDV 特 RNA 或 DNA 片

段测定项目，将阻抗与待测物质对应信息，输入阻抗变量微球液态生物芯片检测装置软件系统。

3) 购买或自己合成 HAV, HBV, HCV 和 HDV 病毒特异 DNA 或 RNA 的互补碱基序列 DNA。

4) 将 HAV, HBV, HCV 和 HDV 病毒特异 DNA 的互补碱基序列 DNA 片段，分别共价结合在 n1, n2, n3 和 n4 不同阻抗微球表面，制作四元基因诊断微球芯片。

5) 2000g 离心 5 分钟，弃去游离未标记上的 HAV, HBV, HCV 和 HDV 病毒特异 DNA 的互补碱基序列 DNA 片段。四种免疫微球用磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤，离心后用核酸分子杂交液进行重悬，制成 10% 微球浓度的四元基因诊断液态芯片。

6) 将 250 微升四元微球基因芯片放入 1 毫升的 EF 离心管内，再加 250 微升血清或其他测定标本，充分混匀，37°C 震荡保温 1 小时，使微球表面已知 DNA 和样品中待测 DNA 或 RNA 分子充分杂交结合。

7) 2000g 离心 5 分钟，弃取上清，用 PBS 重悬，再离心，再去上清，对四元阻抗微球基因芯片进行洗涤，彻底洗去离心管中未与乳胶表面 DNA 杂交上的游离待测 DNA 或 RNA 片段。

8) 加入含有荧光物质标记的 HAV, HBV, HCV 和 HDV 病毒特异 DNA 或 RNA 的互补 DNA 片段 (多元探针, 该互补序列不同用于标记的 DNA 序列) 的杂交缓冲液 500 毫升，37°C 震荡保温 1 小时--12 小时，使它们分别与结合在微球上的待测 DNA 或 RNA 杂交，重复第 7) 步，对微球进行彻底洗涤，弃取上清液未杂交上的游离多元探针，保留微球沉淀。

9) 将微球荧光或发光测定试剂，重悬微球沉淀，使用阻抗变量微球液态生物芯片检测装置，进行微球阻抗 (测定项目) 和微球表面荧光强度 (物质含量) 测定，通过数据分析软件系统，分析 HAV、HBV、HCV 和 HDV 特异 DNA 或 RNA 含量。

10) 结果判读：如果 n2 阻抗微球表面荧光阳性，说明血清 HBV 病毒 RNA 阳性，荧光强度与 DNA 浓度呈正比。采用 HBV 病毒 DNA 标准浓度做参比测定，可对 HBV 病毒 DNA 进行准确定量。如果 n1、n2、n3 和 n4 阻抗微球表面荧光同时阳性，说明血液内同时存在 HAV 病毒特异 RNA、HBV 病毒特异 DNA、HCV 病毒特异 RNA 和 HDV 病毒特异 RNA 片段，依次类推。

以上操作事例只起示范作用，具体详见有关技术资料和文献。如果要测 n 种微生物 DNA 或 RNA 物质，需要 n 种不同电阻的微球，操作同上。

专利名称(译)	不同阻抗系列免疫微球及制备方法、以及对其进行检测的方法与装置		
公开(公告)号	CN1312477C	公开(公告)日	2007-04-25
申请号	CN200410060857.9	申请日	2004-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	王占科		
申请(专利权)人(译)	王占科		
当前申请(专利权)人(译)	王占科		
[标]发明人	王占科 胡新勇 祝仲珍 柴长春 冯青青 杨莉萍 李国辉 雷万生		
发明人	王占科 胡新勇 祝仲珍 柴长春 冯青青 杨莉萍 李国辉 雷万生		
IPC分类号	G01N33/546 G01N33/553 G01N21/64 G01N27/04 G01J1/00 G01N33/533 G01N33/547		
代理人(译)	李卫东		
其他公开文献	CN1588072A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医院检验诊断试剂及仪器开发应用领域，本发明技术方案包括：1)制备不同阻抗系列微球。2)将已知抗原、抗体和DNA片段包被在不同阻抗微球上，制成诊断微球芯片，3)加入荧光或发光物标记的第二抗体或DNA片段，使不同阻抗的诊断微球表面带有光信号，4)对微球进行阻抗判读和光信号量分析。其优点是一种测定试剂盒可同时检测多种待测物质。本发明的阻抗变量微球液态生物芯片，阻抗变量的无限性决定测定项目的无限性，使测定项目更多，灵敏度更高。此外，不同阻抗诊断微球可以长期保存，测定设备技术要求相对较低，更易产业化和推广。

表1: 不同阻抗聚苯乙烯乳胶微球的生产配方。

苯乙烯(克)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
银粉末(毫克)	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5

本发明所指的导电物质，包含能改变乳胶微球导电率变化的其它一切物质