

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510041973.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 33/546 (2006.01)
C09K 11/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年11月1日

[11] 公开号 CN 1854735A

[22] 申请日 2005.4.19

[21] 申请号 200510041973.0

[71] 申请人 林 远

地址 710061 陕西省西安市高新区电子正街
紫薇城市花园 15-1-12 号

[72] 发明人 林 远

权利要求书 5 页 说明书 22 页 附图 3 页

[54] 发明名称

流式细胞仪—微载体临床诊断芯片

[57] 摘要

本发明涉及使用流式细胞仪—微载体技术对多种疾病进行快速诊断的技术，材料，和药盒。具体实施方式包括：(1)将不同的生物分子(例如抗原/抗体)分别固定于至少一种直径的微载体，然后用不同强度的荧光标记而形成一个荧光梯度(以下称自身荧光)；(2)将至少一种微载体—生物分子，与标本培养，结合待测配体。再用荧光标记的抗—配体免疫球蛋白标记结合的配体(以下称探测荧光)；(3)在流式细胞仪收获时，用正向光衍射比电子密度来确定不同大小的微载体；并使用设定的程序，在同一试管内顺序收获不同直径区间的微载体；(4)在流式细胞仪分析时，选择不同大小微载体，用自身荧光对比探测荧光测定待测配体；(5)提供高选择性流式细胞仪—微载体临床诊断药盒，用于(但不限于)以下范围：感染性疾病、过敏性疾病、

自身免疫性疾病、移植排异反应、肿瘤、以及疫苗效价检测。

1. 一种流式细胞-微载体临床诊断芯片的技术、材料和药盒，其特征是：一种微载体-生物分子的自身荧光梯度制备技术；一种程序化、多价流式细胞仪-微载体分析技术；高选择性疾病诊断药盒。

2. 根据权利要求1所述的高聚分子微粒-生物分子，其特征是：高聚分子微粒通过共价键与多种生物分子结合，形成稳定的高聚分子微粒-生物分子复合物（图1）。

(a) 高聚分子微粒是表面可携带活性基团（例如胺基、醛基或羰基等）的微粒，包括（但不限于）乳胶、硅、树脂和脂质微粒，以及各种可塑性聚合材料（包括由苯乙烯、溴苯乙烯、丙烯酸、丙烯酸胺、甲基丙烯酸盐、氯化乙烯、氯化苯乙烯、乙烯醋酸盐等）制成的聚亚胺脂和聚合性单体。

(b) 高聚分子微粒的直径一般选择1-100微米，1-50微米较好，最理想的是1-20微米。

(c) 生物分子包括蛋白分子（抗原、抗体）、多糖、多肽、核酸，以及半抗原（例如化学合成分子，合成药物和试剂）等。

(d) 高聚分子微粒通过共价键与多种生物分子结合。这一过程主要是通过高聚分子微粒上的胺基、醛基或羰基等活性基团来完成。还可通过含有胺基、巯基等基团的中间分子（例如琥珀酰酯）来间接完成。

3. 根据权利要求1所述的一种微载体-生物分子的自身荧光梯度制备技术，其特征是：使至少一种直径的高聚分子微粒，携带不同的生物分子和不同强度的自身荧光，形成一个区分不同的微载体-生物分子的自身荧光梯度（图1）。

(a) 不同强度的荧光染料，通过生物分子的活性基团（胺基、巯基、或羰基等），共价连接到至少一种直径的高聚分子微粒上的不同的生物分子。

(b) 荧光染料包括所有能发光的生物、化学和晶体材料，例如荧光素异硫氰酸（Fluorescein isothiocyanate; FITC），藻红素蛋白（*R*-phycoerythrin; PE），羧基荧光素乙酰乙酸盐琥珀酰酯（Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester; CFSE）和纳米硅。

4. 根据权利要求1所述的一种微载体-生物分子的自身荧光梯度制备技术，其替代途径是，高聚分子微粒在结合生物分子之前，经中间分子桥（如琥珀酸脂或乙二胺）交叉联接不同强度的荧光染料，行成可区分

的自身荧光梯度。携带不同自身荧光强度的高聚分子微粒通过共价键分别结合至少一种生物分子。

5. 根据权利要求1所述的一种程序化、多价流式细胞仪-微载体分析技术，其特征是：同步同时或分步同时测定一个试管内的不同直径和不同特异性的微载体-生物分子。

(a) 携带至少一种特异性的微载体-生物分子，与待测标本培养，结合特异性配体。再用携带与自身荧光波长不同的荧光-抗配体抗体，标记结合到微载体的配体（图1）。

(b) 在收获高聚分子微粒时，用正向光衍射（forward scatter）比电子密度（side scatter）确定高聚分子微粒的大小。同时收获至少六种不同直径的高聚分子微粒（图2）。

(c) 设置可切换的正向光衍射比电子密度收获程序，使其自动、顺序接收不同区间的高聚分子微粒群。

例如1微米到3微米之间的6种直径的微粒在一个收获参数下收获；3微米到5微米之间的6种直径的微粒在另一个收获参数下收获。从而使单一试管内的检测指标成倍提高，而技术的复杂程度降低（图2）。

(d) 在流式细胞仪分析时，用正向光衍射比电子密度确定高聚分子微粒的大小（图3A）。选择单一直径的高聚分子微粒，进行二种颜色荧光分析（如红色荧光比绿色荧光）（图3B和C），测定结合在不同荧光梯度的高聚分子微粒上的不同配体。

(e) 使用适当的对照，可对以上检测结果进行半定量和定量分析。

8. 根据权利要求1所述的待测标本，包括（但不限于）血浆、血清、组织液、细胞提取液和培养液。

9. 根据权利要求1所述的抗配体抗体，指所有能与配体结合的蛋白分子、单链核糖核酸等。

10. 根据权利要求1所述的荧光标记的抗配体抗体，指所用与自身荧光不同波长的生物、化学和晶体荧光材料标记的抗配体抗体或待测物配体。

11. 根据权利要求1所述的高选择性疾病诊断药盒，其特征是：在同一试管内同时测定与某一疾病或某一临床症状有密切关系的数个因素，为临床诊断和鉴别诊断提供依据。

(a) 感染性疾病诊断药盒，用于（但不限于）以下疾病的诊断：疱疹病毒感染（单纯疱疹病毒1/2、水痘病毒、E-B病毒、巨细胞病毒、人类疱疹病毒-6/8）、呼吸病毒感染（流感病毒A or B、付流感病毒、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒、腺病毒、非典病毒）、肝炎(A,B,C,D,E型)、病毒性肺炎（流感病毒A, B、腺病毒、

呼吸道合胞病毒、付流感病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒)、病毒性咽炎(流感病毒 A、B、腺病毒、呼吸道合胞病毒、付流感病毒、肠道病毒、鼻病毒)、病毒性结膜炎(肠病毒、腺病毒、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、麻疹病毒、EB 病毒)、感染性单核细胞增多症(EB 病毒、巨细胞病毒、人类免疫缺陷病毒、人类疱疹病毒 6、人类疱疹病毒 8、腺病毒)、带状疱疹(单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、肠病毒、巨细胞病毒、腺病毒)、小儿急疹(麻疹病毒、风疹病毒、肠病毒、腺病毒、巨细胞病毒、人类疱疹病毒 6、登革热病毒、EB 病毒、细小病毒)、心肌/心包膜炎(肠病毒、巨细胞病毒、流感病毒、腺病毒)、胃肠炎(轮状病毒、Norwalk 病毒、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、麻疹病毒、E-B 病毒)、骨髓抑制(EB 病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、细小病毒、人类风疹病毒 6、病毒性血液巨嗜细胞综合症(EB 病毒、细小病毒、人类风疹病毒、巨细胞病毒、带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒、抗腺病毒)、溶血性贫血(EB 病毒、乙肝病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、巨细胞病毒)、非典型淋巴细胞症(甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、EB 病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、细小病毒、巨细胞病毒)、脑炎(虫媒病毒、流行性乙脑病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、FSME/TBEV 病毒、E-B 病毒、狂犬病毒、巨细胞病毒、带状疱疹病毒、腺病毒)、脑脊髓膜炎(虫媒病毒、E-B 病毒、腮腺炎病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、肠病毒、单纯疱疹病毒)、流行性出血热、脊髓灰质炎, 非典, HIV、禽流感, 麻疹, 风疹, 腮腺炎, 狂犬病、百日咳、破伤风、梅毒、细菌性肺炎、脑膜炎球菌感染、百日咳杆菌感染、大肠杆菌感染、白喉、结核、伤寒和斑疹伤寒、支原体肺炎、布鲁氏菌感染、螺旋体感染(Burgdorferi 螺旋体、流产螺旋体 *Borrelia abortus*、幽门螺旋体 *Helicobacter pylori*)、兔弓形体感染、结核、棘球蚴感染、真菌感染(曲霉菌 *Aspergillus fumigatus*、白色念珠菌 *Candida albicans*、隐球菌 *Cryptococcus*、酵母菌 *Blastomycosis*、组织球孢子菌 *Coccidioidomycosis* *Histoplasmosis*、类球孢子菌 *Paracoccidioidomycosis*、青霉菌 *Penicilliosis*)。

(b) 过敏性疾病诊断药盒: 用于检测总 IgE 和过敏原特异性 IgE。过敏原包括(但不限于)以下范围: 猫毛发皮屑(Cat dander/epithelium)、牛毛发皮屑(Cow Dander)、狗毛发皮屑(Dog dander/epithelium)、鹅毛(Goose feather)、鸡毛(Chicken feather)鸭毛(Duck feather)、青霉菌(*Penicillium notatum*)、分支孢子菌(*Cladosporium herbarum*)、烟曲霉菌 *Aspergillus fumigatus*、白霉菌(*Mucor racemosus*)、

白色念珠菌 (*Candida albicans*)、带状链格孢菌 (*Alternaria tenuis*) 蠕虫孢子 (*Helminthosporium halodes*)、百幕大草 (*Bermuda grass*)、牛毛草 (*Fescue meadow*)、蒂幕西草 (*Timothy*)、红陀螺 (*Red top*)、詹森草 (*Johnson grass*)、蟹 (*Crab*)、虾 (*Shrimp*)、龙虾 (*Lobster*)、蛤 (*Clam/scallop*)、牡蛎 (*Oyster*)、鳕鱼 (*Codfish*)、金枪鱼 (*Tuna*)、大麻哈鱼 (*Salmon*)、河鲈鱼 (*Perch*)、鲑鱼 (*Trout*)、鲭鱼 (*Mackerel*)、橘子 (*Orange*)、苹果 (*Apple*)、香蕉 (*Banana*)、梨 (*Pear*)、桃 (*Peach*)、葡萄 (*Grape*)、小麦 (*Wheat*)、黑麦 (*Rye*)、大麦 (*Barley*)、燕麦 (*Oat*)、玉米 (*Corn*)、大米 (*Rice*)、花生 (*Peanut*)、黄豆 (*Soybean*)、杏仁 (*Almond*)、山核桃 (*Pecan*)、黑胡桃 (*Black walnut*)、猪肉 (*Pork*)、牛肉 (*Beef/veal*)、鸡肉 (*Chicken*)、蛋混合物 (*Egg mix*)、火鸡 (*Turkey*)、豌豆 (*Pea*)、西红柿 (*Tomato*)、胡萝卜 (*Carrot*)、马铃薯 (*Potato*)、洋葱 (*Onion*)、芹菜 (*Celery*)、棉籽 (*Cotton seeds*)、乳胶 (*Latex*)、豆科灌木 (*Mesquite*)、艾蒿 (*Mugwort*)、花粉混合物 (*pollen mix*)。

(c) 自身免疫性疾病诊断药盒：用于检测针对(但不限于)以下靶抗原的自身免疫抗体：双链 DNA (*dsDNA*)、组蛋白 (*Histone*)、心磷脂 (*Cardiolipin*)、核仁抗原 (*Nucleolar antigen*)、着丝粒抗原 (*Centromere antigen*)、髓过氧化物酶 (*Myeloperoxidase (MPO)*) 蛋白激酶 3 (*Proteinase 3 (PR-3)*)、核蛋白 (*Ribonucleoprotein (RNP)*)、‘史密斯’抗原 (*‘Smith’ antigen (Sm)*)、Jo-1 抗原、Scl-70 抗原、Sjogren’ s 综合症 A 抗原 (*SS-A*)、Sjogren’ s 综合症 B 抗原 (*SS-B*)、甲状腺球蛋白 (*Thyroglobulin*)、线粒体抗原 (*Mitochondrial antigen*)、心肌抗原 (*Myocardial antigen*)、平滑肌抗原 (*Sooth muscle antigen*)、肾小球基底膜抗原 (*Glomerular basement membrane antigen (GBA)*)、胶原 I-IV (*Collagen I-IV*)、髓磷脂基本蛋白 (*Myelin basic protein (MBP)*)、蛋白脂质蛋白 (*Proteolipid protein (PLP)*)、髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白 (*Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)*)、类风湿因子结合抗原 (*human IgG*)。

(d) 移植免疫排斥反应诊断药盒：用于检测血液中与排斥反应相关的因子：游离 CD23、游离 CD30、游离淋巴介素 2 受体 (*IL-2R*)、游离 ICAM-1、游离 VCAM-1、游离 E-selectin、肿瘤坏死因子- α (*TNF- α*)、游离肿瘤坏死因子- α 受体 (*TNF- α R*)、淋巴介素 6 (*IL-6*)、淋巴介素 8 (*IL-8*)、淋巴介素 1 (*IL-1*)、 β 2 微球蛋白、

抗-HLA (A, B, C, DR, DP, DQ)抗体、抗 Gal (1, 3) α -gal 抗体、游离 C1q、游离 C3、游离 C5b-9。

(e) 肿瘤抗原诊断药盒：用于（但不限于）以下肿瘤抗原的检测：癌抗原 27.29 (CA27.29)、癌胚抗原(CEA)、癌抗原 19.9(CA19.9)、甲胎球蛋白(AFP)、b 绒毛膜促性腺激(b-hCG)、癌抗原 125(CA125)、抗-前列腺癌特异性抗原(PSA)。

(f) 疫苗效价测定药盒：用于（但不限于）以下疫苗效价的检测：牛痘疫苗、脊髓灰质炎疫苗、麻疹疫苗、腺病毒疫苗、黄热病疫苗、风疹疫苗、腮腺炎疫苗、甲型肝炎疫苗、流感疫苗、水痘疫苗、轮状病毒疫苗、乙型脑炎疫苗、狂犬病疫苗、流行性出血热疫苗、卡介苗、伤寒疫苗、斑疹伤寒疫苗、霍乱疫苗、布氏菌疫苗、炭疽疫苗、痢疾疫苗、百日咳疫苗、鼠疫疫苗、肺炎链球菌疫苗、沙门 Vi 多糖疫苗、脑膜炎球菌 A/C 疫苗、痢疾疫苗、百日咳疫苗、鼠疫疫苗、肺炎链球菌疫苗、沙门 Vi 多糖疫苗、脑膜炎球菌 A/C 疫苗、流感嗜血杆菌疫苗、白喉疫苗，SARS 疫苗。

12. 根据权利要求 1 所述的流式细胞仪-微载体临床诊断芯片的技术、仪器和药盒，可用于对心血管、神经、内分泌等系统疾病的诊断。

13. 根据权利要求 1 所述的流式细胞仪-微载体临床诊断芯片的技术、仪器和药盒，可用于对细胞内信号蛋白、转录因子、核酸复制的检测，以及药物靶蛋白的筛选。

流式细胞仪-微载体临床诊断芯片**所属技术领域**

本发明涉及使用流式细胞仪-微载体技术对多种疾病进行快速诊断的技术、材料、和药盒。

背景技术

准确快速的抗原-抗体检测对许多疾病的临床诊断和治疗具有重要意义，特别是对那些发病率高、对人类生命构成威胁的疾病更是如此。例如感染性疾病、过敏性疾病、免疫性疾病和肿瘤。很多感染性疾病的诊断在很大程度上依赖病原体的分离和抗体的血清学检查。直接法抗原检测对早期诊断具有重要价值。但在很多情况下，首先需要对标本进行培养，扩增病原体，即间接法抗原检测。血清学抗体测定对很多感染具有重要的诊断价值，如人类免疫缺陷病毒（HIV）感染、非典、和流行性出血热等。

过敏性反应是由过敏原引起的免疫反应，涉及多种炎性细胞及其释放的炎性介质，例如过敏原特异性抗体 IgE。由于引起过敏性反应的物质种类繁多，确认过敏原是诊断和治疗该疾病的关键。美国 Pharmacia 公司生产的 CAP 系统是目前最常用地检测 IgE 总量和过敏原特异性 IgE 方法。原理是用一种顺应性很强的亲水性聚合物薄膜作为过敏原的吸附载体，用“三明治”酶联免疫法测 IgE 抗体。

自身免疫性疾病的病因复杂，特征是伴有多种抗自身抗原抗体（临床称抗细胞核抗体或抗核抗体）。对抗核抗体的测定方法根据抗原的化学和免疫特征而异。常用的如酶联免疫法，放射免疫法，或 Western blot。临床一般需要根据数种抗核抗体的组合，建立诊断和鉴别诊断。

准确快速测定血液中与排异反应有关的因子，对器官移植手术前病例选择，及手术后排异反应的早期诊断和治疗有重要价值。近年来研究发现，除了产生抗-人类淋巴系统抗原（HLA）的抗体外，受体血中游离的分子 sCD23、sCD30、sTNF- α 受体、sIL-2、sICAM-1 等的水平的升高，与排异反应有关。是诊断排异反应的重要的微创性检查方法之一。随着异种移植进入临床，血清中抗异种抗原（如 α -gal）免疫球蛋白水平，是诊断抗异种排异反应的一项重要指标。

单克隆抗体已被用于检测血液中某些肿瘤的特异性抗原，为临床提供重要的诊断价值。癌抗原（CA）

27.29 用于诊断和监测转移性乳腺癌对治疗的反应；癌胚抗原用与诊断直肠癌及其复发；CD19.9 用与诊断胰腺肿瘤；CD125 用与诊断卵巢肿瘤；甲胎球蛋白用与诊断肝脏肿瘤和肝癌易发人群的普查。前列腺癌特异性抗原(PSA) 用与前列腺癌地筛选和普查。

传统的免疫测定方法已被成功的应用于临床抗原/抗体检测。这些方法包括：补体结合试验，血凝抑制实验，酶联反应，放射免疫测定，微粒凝集实验，免疫荧光测定，酶联免疫吸附实验(ELISA)，蛋白转移膜技术(Western blot)，和反向DNA转录技术(RT-PCR)。但是，每种方法都有一定的局限性。例如，ELISA 96孔板，每孔只能测一个指标；放射免疫测定对人体和环境有害。总的来说，这些方法耗时，工作量大，且操作者需要相当的实验室经验。

近几年来，有学者用高聚分子微粒(例如聚苯乙烯或乳胶微粒)作为载体，经流式细胞仪测定游离的生物分子。例如，用该技术测定病毒，细菌，和真菌(U.S. Patent No. 6, 159, 719; 6, 225, 046 B1)；测定蛋白分子(U.S. Patent No. 6, 696, 304)；测定核酸顺序、核酸配体、及抗核抗体(U.S. Patent No. 5, 853, 984; 6, 355, 431; 6, 159, 748)；测定抗磷脂抗体(U.S. Patent No. 5, 840, 587)；更近一些时间，流式细胞-微载体技术被用于测定抗HLA抗体(U.S. Patent No. 6, 514, 714; 5, 948, 627; 6, 150, 122) Th1/Th2 细胞介素(美国BD公司；美国Luminex公司)。而且，使用不同荧光染料着色或不同大小的高聚分子微粒的混合，可同时同步测定一个试管内的多项不同指标，称之为多价分析。当这些同时同步测定的指标达到一定数量时，即称之为‘高通量’(High-throughput)分析。

然而，流式细胞-微载体技术至今尚未对传统的免疫测定方法构成真正挑战，原因主要有以下方面：对高聚分子微粒表面作化学荧光涂料处理(美国BD公司；美国Luminex公司)，技术复杂，而且会影响其作为载体对生物分子的亲和力；使用多价收获和分析时，数种，数十种不同的高聚分子微粒出现在同一个二维坐标图，往往出现重叠，混淆等复杂情况；更重要的是对临床疾病的有效诊断，不仅需要大量随机地，而且是选择性地对有关因子进行筛选。所以，研发以流式细胞仪-微载体技术为手段的简单实用的、高选择性诊断药盒，对临床诊断水平的提高有重要意义。本发明提供流式细胞仪-微载体临床诊断芯片技术，材料和药盒，对多种疾病进行高选择性和“高通量”式筛选。另外，该技术可用于疫苗效价、细胞内信号

蛋白和转录因子的测定，以及药物靶蛋白的筛选。

发明内容

本发明涉及流式细胞-微载体临床诊断芯片的技术，材料和药盒，对多种疾病的特异性因子进行准确、快速和“高通量”式筛选。

本发明的具体实施方式之一，是使用不同直径的高聚分子微粒，例如从 2 微米到 20 微米的乳胶微粒作为载体。至少一种直径的高聚分子微粒通过共价键分别结合至少一种已知生物分子（例如抗原或抗体）。后者通过自身的活性基团（胺基、巯基或羰基），共价连接不同强度的荧光染料（例如 FITC, CFSE 或 PE），在不同高聚分子微粒之间行成可区分的自身荧光梯度。

作为该步骤的替换，高聚分子微粒在结合已知抗原或抗体之前，经中间分子桥（如琥珀酸脂，）交叉联接不同强度的荧光染料，行成可区分的自身荧光梯度。携带不同自身荧光的高聚分子微粒分别通过共价键结合至少一种已知抗原或抗体。

本发明的另一具体实施方式，是将携带特定的生物分子（例如抗原或抗体）的高聚分子微粒分别或混合后与待测样本（如血清）培养，结合待测配体。再用荧光标记的抗配体免疫球蛋白，标记结合在高聚分子微粒上的配体，供流式细胞分析。

本发明的另一具体实施方式，是在收获高聚分子微粒时，用正向光衍射（forward scatter）比电子密度（side scatter）确定高聚分子微粒的大小；设制自动切换的收获程序，使其自动、顺序接收不同大小的高聚分子微粒群。例如 1 微米 到 3 微米之间的 6 种直径的微粒在一个收获参数下收获， 3 微米 到 5 微米之间的 6 种直径的微粒在另一个收获参数下收获。从而使单一试管内的检测指标成倍提高，形成高通量式测定模式。

本发明的另一具体实施方式，是在流式细胞分析时，用正向光衍射（forward scatter）比电子密度（side scatter）确定高聚分子微粒的大小。选择单一直径的高聚分子微粒，进行二种颜色荧光分析（如红色荧光比绿色荧光）（图），测定结合在不同自身荧光强度的高聚分子微粒上的不同配体。使用适当的对照，可对以上结果进行半定量和定量分析。

本发明的另一具体实施方式，是提供高选择性流式细胞-微载体芯片临床诊断药盒。用于（但不限于）多种疾病的诊断（例如感染性疾病、过敏性疾病、自身免疫性疾病、移植排异反应和肿瘤），以及疫苗效价检测。

附图说明

图 1. 微载体-生物分子（抗原/抗体）、及其自身荧光的制备。至少一种直径的微载体共价结合不同的抗原；用不同浓度的荧光染料共价结合微载体上的抗原，形成一个自身荧光梯度（0-5 级）；将至少一种微载体-生物分子与待测血清共培育，结合抗原特异性抗体（配体）；用荧光标记的抗配体抗体标记配体。

图 2. 程序化、多价流式细胞仪-微载体收获技术。在设定的程序下，根据的微载体直径（正向光衍射比电子密度），顺序收获不同直径区间的微载体（例如 1-3 微米）；每个直径区间至少包含 6 种不同大小的微载体。

图 3. 程序化、多价流式细胞仪-微载体分析技术及临床诊断药盒。用正向光衍射比电子密度确定微载体大小（图 3A）；选择某一直径的微载体（圆形区），用自身荧光比检测荧光测定待测配体（图 3B 和 C）。这里的试验标本来自流行性出血热患者血清，发热 3 天。结果显示抗出血热病毒抗体（IgM）强阳性（图 3B）。抗乙肝表面抗原抗体（IgM）亦呈阳性（图 3C），原因待查。其它检测项目结果未描述。

具体实施方式

本发明的具体实施方式是使用携带不同生物分子（例如抗原/抗体）、标记有自身荧光的高聚分子微粒，程序化、多价流式细胞仪-微载体分析技术和高选择性疾病诊断药盒，对多种疾病提供诊断和鉴别诊断资料。

本发明的具体实施方式之一，是使用不同直径的高聚分子微粒，例如从 2 微米到 20 微米的乳胶微粒作为载体。至少一种直径的高聚分子微粒通过共价键分别结合至少一种已知的生物分子（例如抗原或抗体）。结合在高聚分子微粒上的生物分子，通过自身的活性基团（例如胺基、巯基或羰基等），共价连接不同强度的荧光染料（例如荧光素异硫氰酸 Fluorescein isothiocyanate; FITC；羧基荧光素乙酰乙酸盐琥珀酰

酯 Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester; CFSE 或藻红素蛋白 *R*-phycoerythrin; PE)。在不同高聚分子微粒之间行成可区分的自身荧光梯度。作为该步骤的替换，高聚分子微粒在结合已知抗原或抗体之前，经中间分子桥（如琥珀酸脂或乙二胺）交叉联接不同强度的荧光染料，行成可区分的自身荧光梯度。携带不同自身荧光的高聚分子微粒通过共价键结合至少一种已知抗原或抗体。将携带特定已知抗原或抗体的高聚分子微粒分别或混合后与待测样本（如血清）培养，结合待测配体。再用荧光标记的抗配体免疫球蛋白，标记结合在高聚分子微粒上的配体，供流式细胞仪分析。

本发明的另一具体实施方式，是在流式细胞仪收获高聚分子微粒时，用正向光衍射（forward scatter）比电子密度（side scatter）确定高聚分子微粒的大小，同时收获数个不同直径的高聚分子微粒（例如 6 种直径的微粒）；设制自动切换的收获参数，使其自动、顺序接收不同大小的高聚分子微粒群。例如 1 微米到 3 微米之间的 6 种直径的微粒在一个收获参数下收获，3 微米到 5 微米之间的 6 种直径的微粒在另一个收获参数下收获。从而使单一试管内的检测指标成倍提高，形成高通量式测定模式。

本发明的另一具体实施方式，是在流式细胞仪分析时，用正向光衍射（forward scatter）比电子密度（side scatter）确定高聚分子微粒的大小（图）。选择单一直径的高聚分子微粒，进行二种颜色荧光分析（如红色荧光比绿色荧光）（图），测定结合在不同高聚分子微粒上的配体。使用适当的对照，可对以上检测结果进行半定量和定量分析。

本发明的最理想的具体实施方式，是提供高选择性流式细胞仪-微载体芯片临床诊断药盒，用于多种疾病的诊断（例如感染性疾病、过敏性疾病、自身免疫性疾病、移植排斥反应和肿瘤），以及疫苗效价检测。

微载体-生物分子（抗原/抗体）的制备

制备微载体-抗原/抗体的复合体，涉及将抗原/抗体等蛋白分子通过共价键结合与高聚分子微粒表面。高聚分子微粒的直径可在 1-100 微米，1-50 微米较好，最理想的是 1-20 微米。高聚分子微粒的材料可根据需要而异，例如，乳胶、硅、树脂，以及各种可塑性聚合材料，包括由苯乙烯，溴苯乙烯，丙烯酸，丙烯酸胺，甲基丙烯酸盐，氯化乙烯，氯化苯乙烯，乙烯醋酸盐等制成的聚亚胺脂和聚合性单体。高聚分子微粒与抗原/抗体的共价键结合，通过环氧基树脂、乙醛、碳二胺等基团完成。还可通过携带胺基或其

它活性基团的中间分子（例如琥珀酰酯）来完成。未结合的抗原/抗体经洗涤、离心去除。

微载体-生物分子自身荧光梯度的制备

用梯度稀释的荧光染料经共价键连接到微载体上的生物分子，形成微载体-生物分子的自身荧光梯度，用于区分微载体-生物分子的特异性。荧光染料包括荧光素异硫氰酸（FITC）、四甲基若丹明（red tetramethylrhodamine），藻红素蛋白（PE），Cy-色素（Cy-chrome），硫氰酸（Allophycocyanin），PerCP，羧基荧光素乙酰乙酸盐琥珀酰酯（CFSE），碘化物（Propidium Iodide; PI），硅纳米微粒，等其它任何生物或非生物发光染料。

作为该方法的替代，可将梯度稀释的荧光染料，同过带有胺基或其它活性基团的中间分子，共价键连接到微载体表面。然后将已知的生物分子（抗原/抗体）结合到不同自身荧光强度的微载体表面。

精确的自身荧光梯度通过递增性稀释来建立。例如，将微载体-生物分子与浓度由 $1\mu\text{M}$ 到 $10\mu\text{M}$ 的PE染料共培养。离心洗除未结合的PE染料后，形成一个荧光梯度（例如从0级到5级）。该荧光梯度可区分不同特异性（例如从0级到5级的六种）的微载体-生物分子（抗原/抗体）制备物。

流式细胞仪分析

在收获高聚分子微粒时，用正向光衍射（forward scatter）比电子密度（side scatter）确定高聚分子微粒的大小；设制自动切换的收获程序。使其自动、顺序接收不同大小的高聚分子微粒群。例如1微米到3微米之间的6种直径的微粒在一个收获参数下收获（图），3微米到5微米之间的6种直径的微粒在另一个收获参数下收获。从而使单一试管内的检测指标成倍提高，形成高通量式测定模式。例如，在五种参数下收获五组微载体，每组有六种不同直径的高聚分子微粒，每种高聚分子微粒有六种不同强度的自身荧光。则可对一个试管中的 $5 \times 6 \times 6 = 180$ 项指标同时进行分析。

在流式细胞仪分析时，用正向光衍射（forward scatter）比电子密度（side scatter）确定高聚分子微粒的大小（图）。选择单一直径的高聚分子微粒，进行二种颜色荧光分析（如红色荧光比绿色荧光）（图），测定结合在不同荧光梯度的高聚分子微粒上的不同配体。使用适当的对照（阴性、阳性和标准），可对以上检测结果进行半定量和定量分析。

高选择性流式细胞仪-微载体芯片临床诊断药盒

本发明提供高选择性流式细胞-微载体芯片临床诊断药盒。与随机性检测不同，高选择性临床诊断药盒根据可能引起某种疾病的不同因素而设置，因而特异性强、检测阳性率高。适用于多种疾病的诊断（例如感染性疾病、过敏性疾病、自身免疫性疾病、移植排异反应和肿瘤），以及疫苗效价检测。

例一 感染性疾病检测系统

根据本发明的具体实施方式之一，一种直径的乳胶微粒分别经共价键结合至少6种纯化的病原体抗原或抗体。再将六种乳胶微粒上结合的蛋白分子分别标记不同强度的自身荧光（如PE从1 μ M到10 μ M），形成一个荧光梯度（如从0级到5级）。将至少一种自身荧光的乳胶微粒，或至少一种直径的乳胶微粒与生物样本（如人血清，培养液）培养，结合待测配体。再用FITC-羊抗人IgG/IgM/IgA标记结合在乳胶微粒上的待测配体。用电子密度（纵轴）比正向光衍射（横轴）确定乳胶微粒的大小。选择单一直径的乳胶微粒，进行二种颜色荧光分析，如红色荧光（自身荧光）比绿色荧光（测定荧光），测定结合在乳胶微粒上的配体。如果一个试管内不同大小的高聚分子微粒的数量较大（例如超过6种），则在收获高聚分子微粒时，设立自动变换的收获程序，每次收获至少6种不同直径的高聚分子微粒。设立阴性（如正常血清）阳性（如感染血清）或标准（已知浓度的待测配体）对照，可进行半定量和定量分析。

表 1-1. 疱疹病毒诊断药盒 (Herpesviruses detection kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μ m	0	单纯疱疹病毒 1 (HSV 1)	抗-人 IgM, IgA or IgG-FITC
	1	单纯疱疹病毒 2 (HSV 2)	
	2	水痘病毒 (VZV)	
	3	EB 病毒 (EBV-EA /NA /VCA)	
	4	巨细胞病毒 (MCV)	
	5	人类疱疹病毒-6/8 (HHV)	

表 1-2. 呼吸病毒诊断药盒 Respiratory viruses detection kit

乳胶微粒	自身荧光	微载体-抗原/抗体	探测抗体
------	------	-----------	------

(直径)	(级别)		
1-20 μm	0	流感病毒 A or B(Flu A or B)	抗-人 IgM, IgA or IgG-FITC
	1	付流感病毒 (Parainfluenza)	
	2	呼吸道合胞病毒 (RSV)	
	3	麻疹病毒 (Measles)	
	4	腺病毒 (Adenovirus)	
	5	非典病毒 (SARS)	

表 1-3. 肝炎检测药盒 (Hepatitis kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	甲肝病毒抗原 (Hepatitis A)	抗-人 IgM or IgG-FITC
	1	乙肝病毒表面抗原 (HbsAg)	
	2	乙肝病毒核心抗原 (HbcAg)	
	3	乙肝病毒 e 抗原 (HbeAg)	
	4	丙肝病毒抗原 (Hepatitis C)	
	5	D 肝病毒抗原 (Hepatitis D)	
1-20 μm	0	抗-甲肝病毒 (Hepatitis A)	抗 - Hepatitis A IgM /IgG-FITC
	1	抗-乙肝病毒表面抗原 (HbsAg)	抗-HbsAg-IgM /IgG-FITC
	2	抗-乙肝病毒核心抗原 (HbcAg)	抗-HbcAg-IgM /IgG-FITC
	3	抗-乙肝病毒 e 抗原 (HbeAg)	抗-HbeAg-IgM /IgG-FITC
	4	抗-丙肝病毒抗原 (Hepatitis C)	抗 - Hepatitis C IgM /IgG-FITC
	5	抗- D 肝病毒抗原 (Hepatitis D)	抗 - Hepatitis D IgM /IgG-FITC

表 1-4. 病毒性肺炎检测药盒 (Pneumonia diagnostic kit)

乳胶微粒	自身荧光	微载体-抗原/抗体	探测抗体
------	------	-----------	------

(直径)	(级别)		
1-20 μm	0	抗-流感病毒 A, B	抗-流感病毒 A, B -FITC
	1	抗-腺病毒 (adenovirus)	抗-腺病毒-FITC
	2	抗-呼吸道合胞病毒 (RSV)	抗-呼吸道合胞病毒-FITC
	3	抗-付流感病毒 (Parainfluenza)	抗付流感病毒-FITC
	4	抗-巨细胞病毒 (CMV)	抗-巨细胞病毒-FITC
	5	抗单纯疱疹病毒 (HSV)	抗单纯疱疹病毒-FITC

表 1-5. 病毒性咽炎检测药盒 (Pharyngitis diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	抗-流感病毒 A, B	抗-流感病毒 A, B-FITC
	1	抗-腺病毒	抗-腺病毒-FITC
	2	抗-呼吸道合胞病毒	抗-呼吸道合胞病毒-FITC
	3	抗-付流感病毒	抗-付流感病毒-FITC
	4	抗-肠道病毒	抗-肠道感病毒-FITC
	5	抗-鼻病毒	抗-鼻病毒-FITC
1-20 μm	0	E-B 病毒	抗-人 IgM or IgG-FITC

表 1-6. 结膜炎诊断药盒 (Conjunctivitis diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	抗-肠病毒	抗-肠病毒-FITC
	1	抗-腺病毒	抗-腺病毒-FITC
	2	抗-单纯疱疹病毒	抗-单纯疱疹病毒-FITC
	3	抗-带状疱疹病毒	抗-带状疱疹病毒-FITC
	4	抗-麻疹病毒	抗-麻疹病毒-FITC
	5	抗-EB 病毒	抗-EB 病毒-FITC

表 1-7. 感染性单核细胞增多症诊断药盒 (Infectious mononucleosis diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	EB 病毒	抗-人 IgM/IgG-FITC

	1	巨细胞病毒	
	2	人类免疫缺陷病毒 (HIV)	
	3	人类疱疹病毒 6 (HHV6)	
	4	人类疱疹病毒 8 (HHV8)	
1-20 μm	0	抗-腺病毒	抗-腺病毒-FITC

表 1-8. 胞状溃疡诊断药盒 (Vesicular/ulcerative diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	单纯疱疹病毒	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	带状疱疹病毒	
	2	肠病毒	
	3	巨细胞病毒	
	4	腺病毒	

表 1-9. 小儿急疹诊断药盒 (Exanthematous diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	麻疹病毒 (Measles)	抗人 IgM/IgG-FITC
	1	风疹病毒 (Rubella)	
	2	肠病毒 (Enterovirus)	
	3	腺病毒 (Adenovirus)	
	4	巨细胞病毒 (CMV)	
1-20 μm	0	抗-麻疹病毒	抗-麻疹病毒-FITC
	1	抗-风疹病毒	抗-风疹病毒-FITC
	2	抗-细小病毒 (Parvovirus)	抗-细小病毒-FITC
	3	抗-人类疱疹病毒 6 (HHV6)	抗-人类疱疹病毒 6-FITC
	4	抗-登革热病毒 (Dengue)	抗-登革热病毒-FITC
	5	抗-EB 病毒	抗-EB 病毒-FITC

表 1-10. 心肌/心包膜炎诊断药盒 (Myocarditis/pericarditis diagnostic kit)

乳胶微粒	自身荧光	微载体-抗原/抗体	探测抗体
------	------	-----------	------

(直径)	(级别)		
1-20 μm	0	抗-肠病毒 (Enterovirus)	抗-肠病毒-FITC
	1	抗-巨细胞病毒 (CMV)	抗-巨细胞病毒-FITC
	2	抗-流感病毒 (Influenza)	抗-流感病毒-FITC
	3	抗-腺病毒 (Adenovirus)	抗-腺病毒-FITC

表 1-11. 胃肠炎诊断药盒 (Gastroenteritis/Colitis diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	抗-轮状病毒 (rotavirus)	抗-轮状病毒-FITC
	1	抗-Norwalk 病毒	抗-Norwalk 病毒-FITC
	2	抗单纯疱疹病毒 (HSV)	抗单纯疱疹病毒-FITC
	3	抗带状疱疹病毒 (VZV)	抗带状疱疹病毒-FITC
	4	抗麻疹病毒 (measles)	抗麻疹病毒-FITC
	5	抗-E-B 病毒	抗-EB 病毒-FITC

表 1-12. 骨髓抑制诊断药盒 (Bone marrow suppression diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	EB 病毒 (EBV)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	甲肝病毒 (Hepatitis A)	
	2	乙肝病毒 (Hepatitis B)	
	3	丙肝病毒 (Hepatitis C)	
		细小病毒 (Parvovirus)	
		人类风疹病毒 6 (HHV6)	
1-20 μm	0	抗-巨细胞病毒 (CMV)	抗-巨细胞病毒-FITC
	1	抗-流感病毒 (influenza)	抗-流感病毒-FITC
	2	抗腺病毒 (adenovirus)	抗-腺病毒-FITC

Table 1-13. 病毒性血液巨嗜细胞综合症诊断药盒 (Virus associated hemophagocytic syndrome diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
--------------	--------------	-----------	------

1-20 μm	0	EB 病毒 (EBV)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	细小 (Parvovirus)	
	2	人类风疹病毒 (HHV6)	
1-20 μm	0	抗-巨细胞病毒 (CMV)	抗-巨细胞病毒-FITC
	1	抗带状疱疹病毒 (VZV)	抗-带状疱疹病毒-FITC
	2	抗单纯疱疹病毒 (HSV)	抗-单纯疱疹病毒-FITC
	3	抗腺病毒 (Adenovirus)	抗-腺病毒-FITC

表 1-14. 溶血性贫血诊断药盒 (Hemolytic anemia diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	EB 病毒 (EBV)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	乙肝病毒 (Hepatitis B)	
	2	麻疹病毒 (Measles)	
	3	腮腺炎病毒 (Mumps)	
	4	风疹病毒 (Rubella)	
	5	巨细胞病毒 (CMV)	

表 1-15. 非典型淋巴细胞症诊断药盒 (Atypical lymphocytes diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	甲肝病毒 (Hepatitis A)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	乙肝病毒 (Hepatitis B)	
	2	丙肝病毒 (Hepatitis C)	
	3	EB 病毒 (EBV)	
	4	麻疹病毒 (Measles)	
	5	腮腺炎病毒 (Mumps)	
1-20 μm	0	风疹病毒 (Rubella)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	细小病毒 (Parvovirus)	
	2	巨细胞病毒 (CMV)	

表 1-16. 脑炎诊断药盒 (Encephalitis diagnostic kits)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	虫媒病毒 (Arbovirus)	Anti-人 IgM/IgG-FITC
	1	流行性乙脑病毒 (JBEV)	
	2	麻疹病毒 (Measles)	
	3	腮腺炎病毒 (Mumps)	
	4	风疹病毒 (Rubella)	
	5	FSME/TBEV 病毒	
1-20 μm	0	E-B 病毒 (E-BV)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	狂犬病毒 (Rabies)	
1-20 μm	0	抗-巨细胞病毒 (CMV)	抗-巨细胞病毒-FITC
	1	抗-带状疱疹病毒 (VZV)	抗-带状疱疹病毒-FITC
	2	抗-腺病毒 (Adenovirus)	抗-腺病毒-FITC
	3	抗-流感病毒 (Influenza)	抗-流感病毒-FITC
	4	抗-肠病毒 (Enterovirus)	抗-肠病毒-FITC
	5	抗-多瘤病毒 (BKV)	抗-多瘤病毒-FITC

1-17. 表 1-18. 脑脊髓膜炎诊断药盒 (Meningitis diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	虫媒病毒 (Arbovirus)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	E-B 病毒 (E-BV)	
	2	腮腺炎病毒 (Mumps)	
	3	淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCM)	
	4	肠病毒 (Enterovirus)	
	5	单纯疱疹病毒 (HSV)	

表 1-18. 多价病毒诊断药盒 (Hemorrhage fever diagnostic kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	脊髓灰质炎病毒 (Poliovirus)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	流行性乙脑病毒 (JBEV)	
	2	出血热病毒 (Hemorrhage fever V.)	

	3	多价禽流感病毒 (Bird influenza)	
	4	HIV1/2	
	5	多价非典病毒 (SARS)	
	6	狂犬病毒 (Rabies)	

表 1-19 多价病原体检测药盒 (Multi-microorganism test kits)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	脑膜炎球菌 A/C	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	布鲁氏菌 (Brucella)	
	2	破伤风杆菌 (Tetanus)	
	3	梅毒 (Syphilis)	
	4	肺炎支原体 (Mycoplasma Pneumonia)	
	5	兔弓形体 (Toxoplasma gondii)	
1-20 μm	0	百日咳杆菌 (Bordetella Pertussis)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	多价肺炎球菌 (Pneumococcus)	
	2	多价大肠杆菌 (Escherichia coli)	
	3	多价白喉杆菌 Diphtheria	
	4	结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)	
	5	伤寒杆菌 (Typhoid)	
1-20 μm	0	肺炎支原体 (Chlamydia pneumoniae)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	沙眼支原体 (Chlamydia trachomatis)	
	2	棘球蚴 (Echinococcus)	
	3	曲霉菌 (Aspergillus fumigatus)	
	4	白色念珠菌 (Candida albicans)	
	5	隐球菌 (Cryptococcosis)	
1-20 μm	0	酵母菌 (Blastomycosis)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	组织球孢子菌 (Coccidioidomycosis Histoplasmosis)	
	2	类球孢子 (Paracoccidioidomycosis)	

	3	青霉菌 (Penicilliosis)	
	4	流产螺旋体 (Borrelia abortus)	
	5	流感嗜血杆菌	
1-20 μm	0	幽门螺旋体 (Helicobacter pylori)	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	Burgdorferi 螺旋体	

例二. 过敏性疾病诊断系统 (Allergic test system)

根据本发明的另一具体实施方式, 一种直径的乳胶微粒分别经共价键结合 6 种纯化的过敏原。再将六种结合在乳胶微粒上的蛋白分子分别标记不同强度的自身荧光 (如 PE 从 $1\mu\text{M}$ 到 $10\mu\text{M}$), 形成一个荧光梯度 (如从 0 级到 5 级)。将至少一种自身荧光的乳胶微粒, 或至少一种直径的乳胶微粒与生物样本 (如人血清) 培养, 以结合特异性配体-抗过敏原 IgE。再用 FITC-羊抗人 IgE 标记结合在乳胶微粒上的抗过敏原 IgE。流式细胞分析见例一。

表 2. 过敏原筛选药盒 (Allergic screening kits)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	抗-人 IgE	抗-人 IgE-FITC
1-20 μm	0	猫毛发皮屑 (Cat dander/epithelium)	抗-人 IgE-FITC
	1	牛毛发皮屑 (Cow Dander)	
	2	狗毛发皮屑 (Dog dander/epithelium)	
	3	鹅毛 (Goose feather)	
	4	鸡毛 (Chicken feather)	
	5	鸭毛 (Duck feather)	
1-20 μm	0	青霉菌 (Penicillium notatum)	抗-人 IgE-FITC
	1	分支孢子菌 (Cladosporium herbarum)	
	2	烟曲霉菌 Aspergillus fumigatus	
	3	白霉菌 (Mucor racemosus)	
	4	白色念珠菌 (Candida albicans)	
	5	带状链格孢菌 (Alternaria tenuis)	
	6	蠕虫孢子 (Helminthosporium halodes)	
1-20 μm	0	百幕大草 (Bermuda grass)	抗-人 IgE-FITC

	1	牛毛草 (Fescue meadow)	
	2	蒂幕西草 (Timothy)	
	3	红陀螺 (Red top)	
	5	詹森草 (Johnson grass)	
1-20 μm	0	蟹 (Crab)	抗-人 IgE-FITC
	1	虾 (Shrimp)	
	2	龙虾 (Lobster)	
	3	蛤 (Clam/scallop)	
	4	牡蛎 (Oyster)	
1-20 μm	0	鳕鱼 (Codfish)	抗-人 IgE-FITC
	1	金枪鱼 (Tuna)	
	2	大麻哈鱼 (Salmon)	
	3	河鲈鱼 (Perch)	
	4	鲑鱼 (Trout)	
	5	鲭鱼 (Mackerel)	
1-20 μm	0	橘子 (Orange)	抗-人 IgE-FITC
	1	苹果 (Apple)	
	2	香蕉 (Banana)	
	3	梨 (Pear)	
	4	桃 (Peach)	
	5	葡萄 (Grape)	
1-20 μm	0	小麦 (Wheat)	抗-人 IgE-FITC
	1	黑麦 (Rye)	
	2	大麦 (Barley)	
	3	燕麦 (Oat)	
	4	玉米 (Corn)	
	5	大米 (Rice)	
1-20 μm	0	花生 (Peanut)	抗-人 IgE-FITC
	1	黄豆 (Soybean)	
	2	杏仁 (Almond)	
	3	山核桃 (Pecan)	

	4	黑胡桃 (Black walnut)	
1-20 μm	0	猪肉 (Pork)	
	1	牛肉 (Beef/veal)	
	2	鸡肉 (Chicken)	
	3	蛋混合物 (Egg mix)	
	4	火鸡 (Turkey)	
1-20 μm	0	豌豆 (Pea)	
	1	西红柿 (Tomato)	
	2	胡萝卜 (Carrot)	
	3	马铃薯 (Potato)	
	4	洋葱 (Onion)	
	5	芹菜 (Celery)	
1-20 μm	0	棉籽 (Cotton seeds)	
	1	乳胶 (Latex)	
	2	豆科灌木 (Mesquite)	
	3	艾蒿 (Mugwort)	
	4	花粉混合物 (pollen mix)	

例三 自身免疫性疾病诊断系统 (Autoimmune disease test system)

根据本发明的另一具体实施方式，一种直径的乳胶微粒分别经共价键结合至少6种纯化的核抗原。再将六种结合在乳胶微粒上的蛋白分子分别标记不同强度的自身荧光（如PE从 $1\mu\text{M}$ 到 $10\mu\text{M}$ ），形成一个荧光梯度（如从0级到5级）。将至少一种自身荧光的乳胶微粒，或至少一种直径的乳胶微粒与生物样本（如人血清）培养，以结合特异性配体-抗核抗体。再用FITC-羊抗人IgM或IgG标记结合在乳胶微粒上的抗核抗体。流式细胞分析方法见例一。

表3. 自身免疫性疾病诊断药盒 (Autoimmune disease test kits)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	双链 DNA (dsDNA)	抗-人 IgM or IgG-FITC
	1	组蛋白 (Histone)	
	2	心磷脂 (Cardiolipin)	
	3	核仁抗原 (Nucleolar antigen)	
	4	着丝粒抗原 (Centromere antigen)	
1-20 μm	0	髓过氧化物酶 (Myeloperoxidase (MPO))	Anti-human IgM, or IgG-FITC
	1	蛋摆激酶 3 (Proteinase 3 (PR-3))	
1-20 μm	0	核蛋白 (Ribonucleoprotein (RNP))	Anti-human IgM or IgG-FITC
	1	'史密斯' 抗原 ('Smith' antigen (Sm))	
	2	Jo-1 抗原	
	3	Scl-70 抗原	
	4	Sjogren' s 综合症 A 抗原 (SS-A)	
	5	Sjogren' s 综合症 B 抗原 (SS-B)	

1-20 μm	0	甲状腺球蛋白 (Thyroglobulin)	Anti-human IgM, IgA or IgG-FITC
	1	线粒体抗原 (Mitochondrial antigen)	
	2	心肌抗原 (Myocardial antigen)	
	3	平滑肌抗原 (Smooth muscle antigen)	
	4	肾小球基底膜抗原 (Glomerular basement membrane antigen (GBA))	
1-20 μm	0	胶原 I-IV (Collagen I-IV)	Anti-human IgM, IgA or IgG-FITC
	1	髓磷脂基本蛋白 (Myelin basic protein (MBP))	
	2	蛋白脂质蛋白 (Proteolipid protein (PLP))	
	3	髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白 (Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG))	
1-20 μm	0	类风湿因子结合抗原 (human IgG)	Anti-human IgM

例 四. 移植免疫排斥反应诊断系统 (Transplant rejection-risk factor detection system)

根据本发明的另一具体实施方式, 一种直径的乳胶微粒分别经共价键结合至少 6 种纯化的与排斥反应有关的抗原或抗体。再将六种结合在乳胶微粒上的蛋白分子分别标记不同强度的自身荧光 (如 PE 从 $1\mu\text{M}$ 到 $10\mu\text{M}$), 形成一个荧光梯度 (如从 0 级到 5 级)。将至少一种自身荧光的乳胶微粒, 或至少一种直径的乳胶微粒与生物样本 (例如人血清) 培养, 结合特异性配体-抗原/抗体。再用 FITC-抗配体抗体标记结合在乳胶微粒上的抗核抗体。流式细胞分析方法见例一。

表 4. 移植免疫排斥反应诊断药盒 (Transplant rejection-risk factor detection kits)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μm	0	抗-CD23	抗-CD23-FITC
	1	抗-CD30	抗-CD30-FITC
	2	抗-淋巴介素 2 受体(IL-2R)	抗-淋巴介素 2 受体-FITC
	3	抗-ICAM-1	抗-ICAM-1-FITC
	4	抗-VCAM-1	抗-VCAM-1-FITC
	5	抗-E-selectin	抗-E-selectin-FITC
1-20 μm	0	抗-肿瘤坏死因子- α (TNF- α)	抗-TNF- α -FITC
	1	抗-肿瘤坏死因子- α 受体(TNF- α R)	抗-TNF- α R-FITC
	2	抗-淋巴介素 6(IL-6)	抗-IL-6-FITC
	3	抗-淋巴介素 8(IL-8)	抗-IL-8-FITC
	4	抗-淋巴介素 1(IL-1)	抗-IL-1-FITC
	5	抗- β 2 微球蛋白	抗- β 2 微球蛋白-FITC
1-20 μm	0	HLA A 抗原	抗-人 IgM/IgG-FITC
	1	HLA B 抗原	
	2	HLA C 抗原	
	3	HLA DR 抗原	
	4	HLA DQ 抗原	
	5	HLA DP 抗原	
1-20 μm	0	Gal (1, 3) α -gal	抗-人 IgM/IgG-FITC

1-20 μm	0	Gal (1, 3) α -gal	抗-人 IgM/IgG-FITC
1-20 μm	0	抗-C1q	抗-C1q-FITC
	1	抗-C3	抗-C3-FITC
	2	抗-C5b-9	抗-C5b-9-FITC

例 五. 肿瘤抗原诊断系统 (Tumor antigen detection system)

根据本发明的另一具体实施方式, 一种直径的乳胶微粒分别经共价键结合至少 6 种抗肿瘤相关抗原抗体。再将六种结合在乳胶微粒上的蛋白分子分别标记不同强度的自身荧光 (如 PE 从 1 μM 到 10 μM), 形成一个荧光梯度 (如从 0 级到 5 级)。将至少一种自身荧光的乳胶微粒, 或至少一种直径的乳胶微粒与

生物样本（如人血清）培养，结合特异性配体-肿瘤相关抗原。再用 FITC-抗配体抗体标记结合在乳胶微粒上的肿瘤相关抗原。流式细胞分析方法见例一。

表 5. 肿瘤抗原诊断药盒 (Tumor antigen test kit)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μ m	0	抗-癌抗原 27.29 (CA27.29)	抗-癌抗原 27.29-FITC
	1	抗-癌胚抗原(CEA)	抗-癌胚抗原-FITC
	2	抗-癌抗原 19.9(CA19.9)	抗-癌抗原 19.9-FITC
	3	抗-甲胎球蛋白(AFP)	抗-甲胎球蛋白-FITC
	4	抗-b 绒毛膜促性腺激(b-hCG)	抗-b 绒毛膜促性腺激- FITC
	5	抗-癌抗原 125(CA125)	抗-癌抗原 125-FITC
5 μ m	0	抗-前列腺癌特异性抗原(PSA)	抗-前列腺癌特异性抗原 -FITC

例 六. 疫苗效价测定系统 (Vaccine titer detection kits)

根据本发明的另一具体实施方式，一种直径的乳胶微粒分别经共价键结合至少 6 种单价或多价疫苗。再将六种结合在乳胶微粒上的蛋白分子分别标记不同强度的自身荧光（如 PE 从 1 μ M 到 10 μ M），形成一个荧光梯度（如从 0 级到 5 级）。将至少一种自身荧光的乳胶微粒，或至少一种直径的乳胶微粒与生物样本（如人血清）培养，结合特异性配体-抗疫苗抗体。再用 FITC-抗配体抗体标记结合在乳胶微粒上的抗疫苗抗体。流式细胞分析方法见例一。

表 6. 疫苗效价测定药盒 (Vaccine titer detection kits)

乳胶微粒 (直径)	自身荧光 (级别)	微载体-抗原/抗体	探测抗体
1-20 μ m	0	牛痘疫苗	抗-人 IgM /IgG-FITC
	1	脊髓灰质炎疫苗	
	2	麻疹疫苗	
	3	腺病毒疫苗	
	4	黄热病疫苗	
	5	风疹疫苗	
1-20 μ m	0	腮腺炎疫苗	抗-人 IgM /IgG-FITC

	1	甲型肝炎疫苗	
	2	流感疫苗	
	3	水痘疫苗	
	4	轮状病毒疫苗	
	5	乙型脑炎疫苗	
1-20 μ m	0	狂犬病疫苗	抗-人 IgM /IgG-FITC
	1	流行性出血热疫苗	
1-20 μ m	0	卡介苗	抗-人 IgM /IgG-FITC
	1	伤寒疫苗	
	2	斑疹伤寒疫苗	
	3	霍乱疫苗	
	4	布氏菌疫苗	
	5	炭疽疫苗	
1-20 μ m	0	痢疾疫苗	抗-人 IgM /IgG-FITC
	1	百日咳疫苗	
	2	鼠疫疫苗	
	3	肺炎链球菌疫苗	
	4	沙门 Vi 多糖疫苗	
	5	脑膜炎球菌 A/C 疫苗	
	0	流感嗜血杆菌疫苗	抗-人 IgM /IgG-FITC
	1	白喉疫苗	
	2	SARS 疫苗	

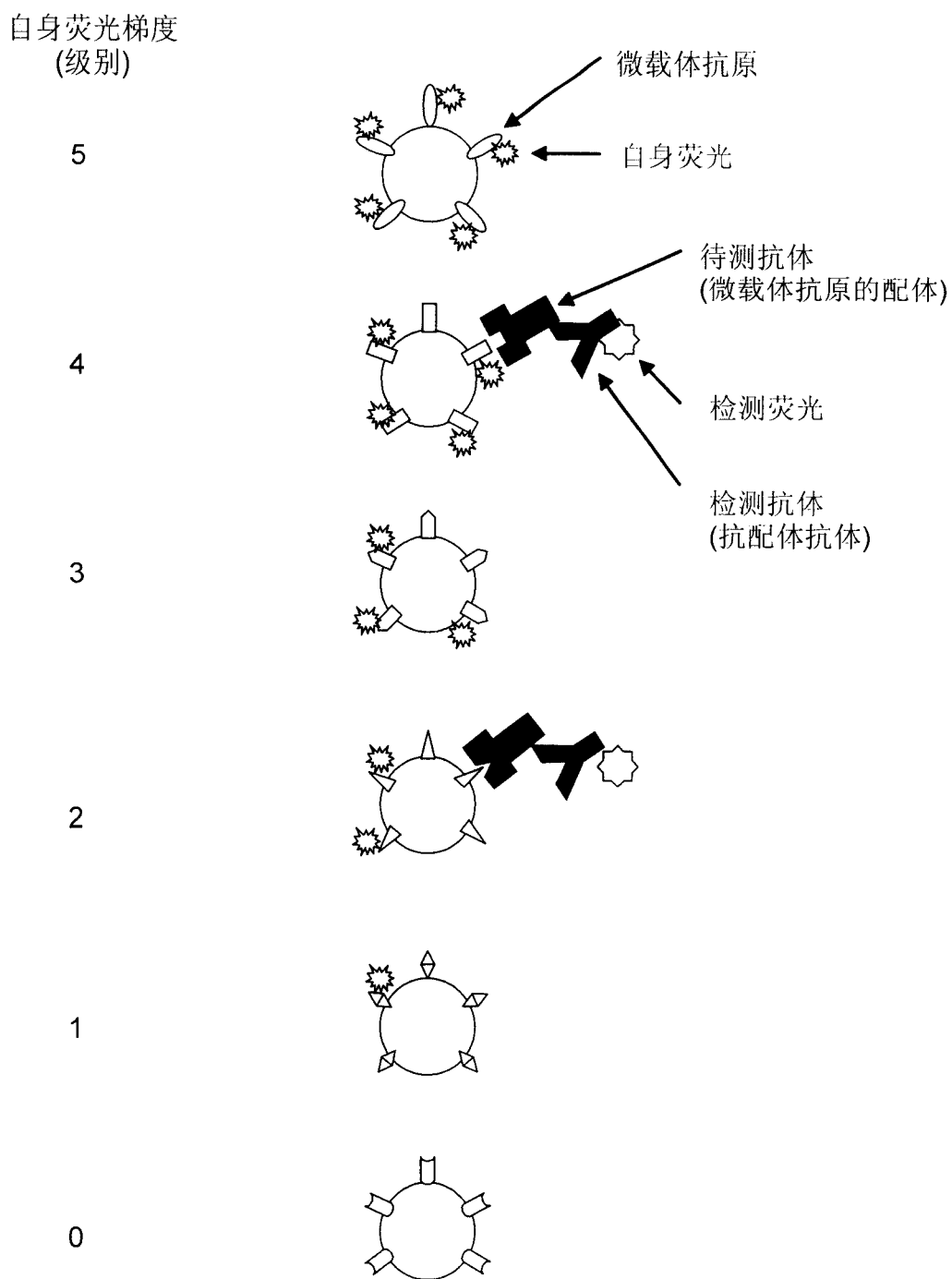


图1

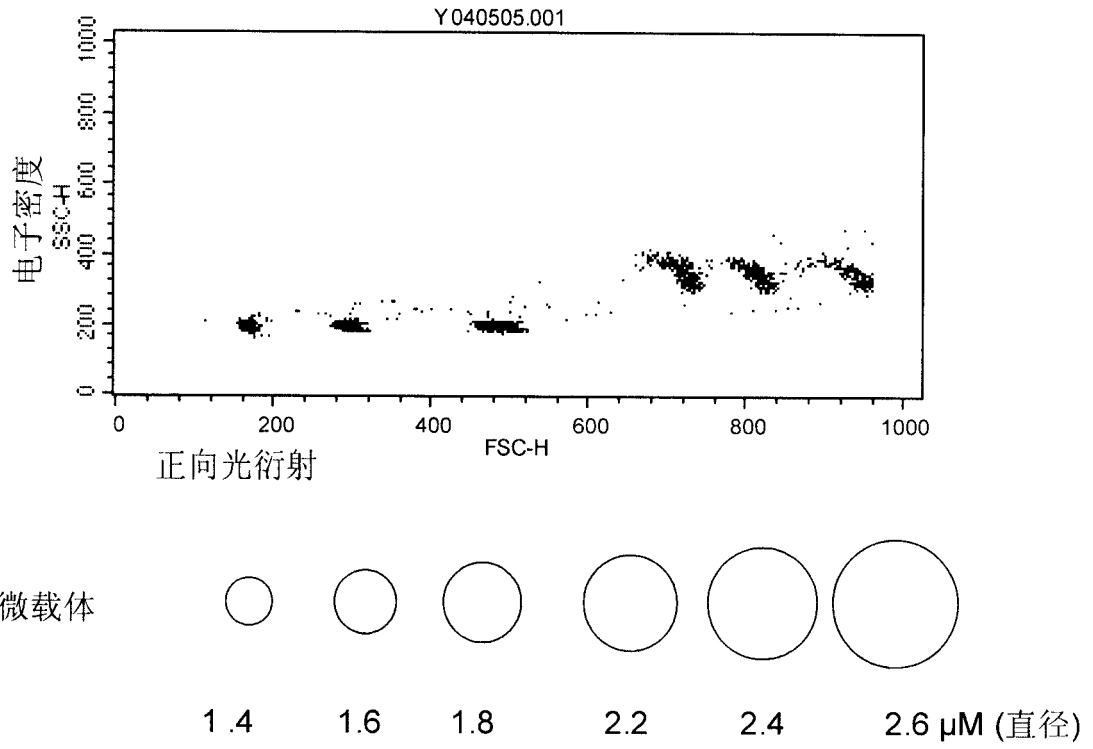


图2

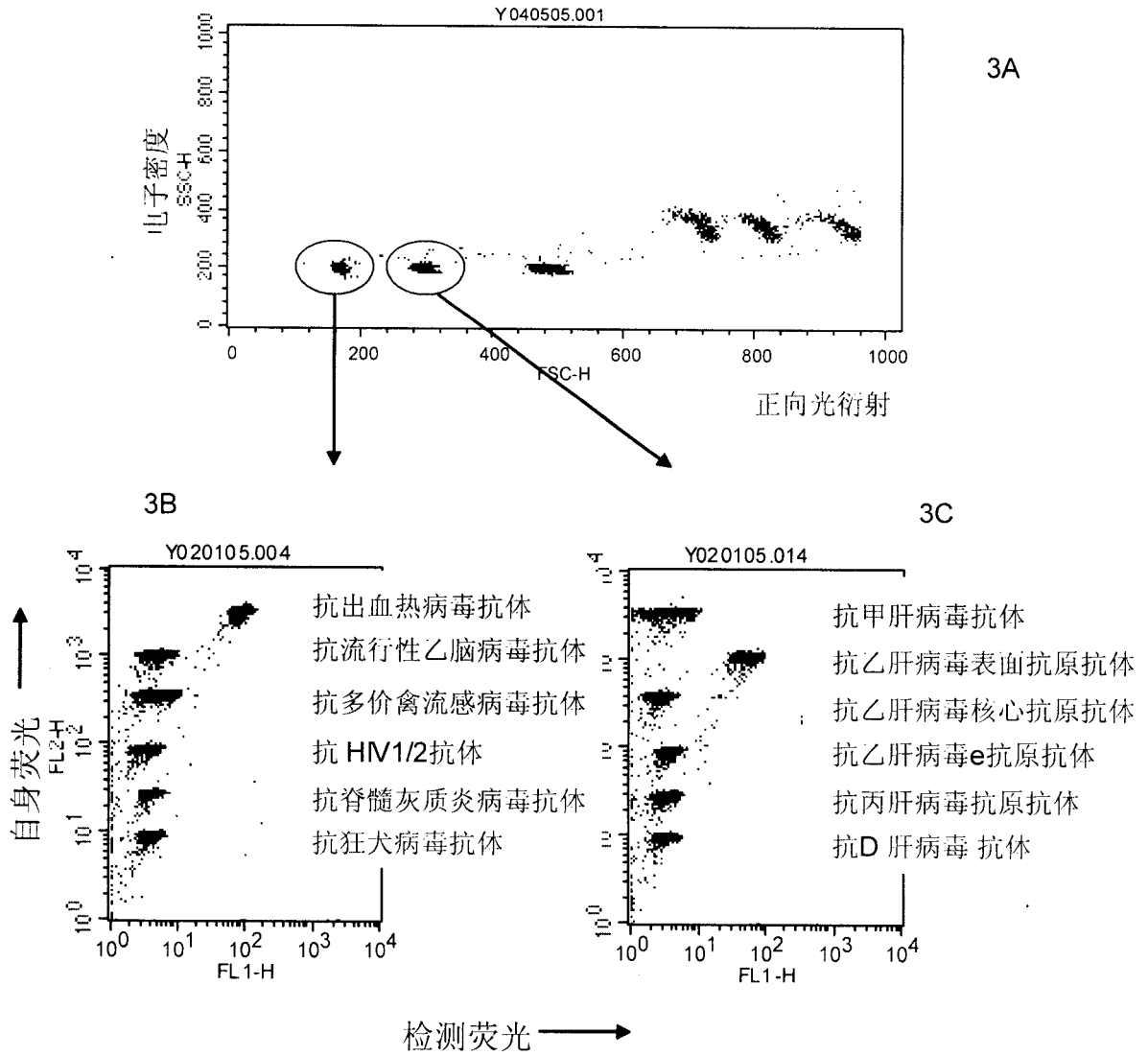


图3

专利名称(译)	流式细胞仪—微载体临床诊断芯片		
公开(公告)号	CN1854735A	公开(公告)日	2006-11-01
申请号	CN200510041973.0	申请日	2005-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	林远		
申请(专利权)人(译)	林远		
当前申请(专利权)人(译)	林园		
[标]发明人	林远		
发明人	林远		
IPC分类号	G01N33/53 C09K11/00 G01N33/533 G01N33/546		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及使用流式细胞仪 - 微载体技术对多种疾病进行快速诊断的技术，材料，和药盒。具体实施方式包括：(1)将不同的生物分子(例如抗原/抗体)分别固定于至少一种直径的微载体，然后用不同强度的荧光标记而形成一荧光梯度(以下称自身荧光)；(2)将至少一种微载体 - 生物分子，与标本培养，结合待测配体。再用荧光标记的抗 - 配体免疫球蛋白标记结合的配体(以下称探测荧光)；(3)在流式细胞仪收获时，用正向光衍射比电子密度来确定不同大小的微载体；并使用设定的程序，在同一试管内顺序收获不同直径区间的微载体；(4)在流式细胞仪分析时，选择不同大小微载体，用自身荧光对比探测荧光测定待测配体；(5)提供高选择性流式细胞仪 - 微载体临床诊断药盒，用于(但不限于)以下范围：感染性疾病、过敏性疾病、自身免疫性疾病、移植排异反应、肿瘤、以及疫苗效价检测。

