

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410041176.8

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1323296C

[22] 申请日 2004.7.5

[21] 申请号 200410041176.8

[73] 专利权人 江苏省肿瘤医院

地址 210008 江苏省南京市玄武区百子亭

共同专利权人 南京大学

[72] 发明人 严 枫 林洁华 鞠焜先

[56] 参考文献

CN - 1097468A 1995.1.18

WO - 9003425A 1990.4.5

US - 5648252A 1997.7.15

JP - 200156286A 2001.2.27

US - 5208166A 1993.5.4

US - 5648208A 1997.7.15

WO - 02059579A 2002.8.1

JP - 6321561A 1988.1.29

CN - 1441905A 2003.9.10

US - 5389523A 1995.2.14

流动注射化学发光免疫分析研究 张新, 化学学报, 第 52 卷第 1 期 1994

流动注射免疫分析法 邓安平等, 国外医学临床生物化学与检验学分册, 第 18 卷第 1 期 1997

流动注射协同增强化学发光免疫分析法测定胰岛素 骆建新等, 中华检验医学杂志, 第 24 卷第 4 期 2001

审查员 石剑平

[74] 专利代理机构 南京苏高专利事务所

代理人 成立珍

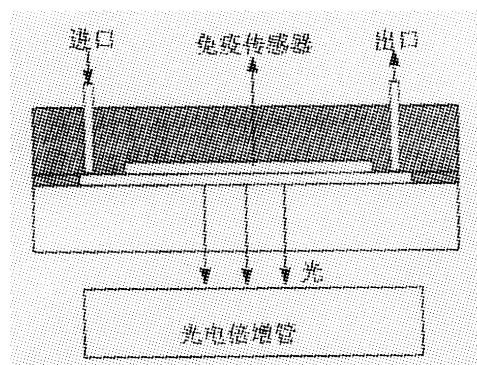
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池及制备方法

[57] 摘要

硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池: 将该传感器与化学发光流动池结合, 制备流动注射化学发光免疫检测池; 化学发光流动池是由上层的塑料板、下层透明板和硅橡胶垫圈构成; 在上层的塑料板开有二个通道, 作为液体传输的进口和出口; 在其内侧刻有一凹槽, 用来嵌入免疫传感器; 下层板为透光性较好玻璃或有机玻璃板, 并直接放置在光电倍增管上方; 中间采用硅橡胶垫圈形成反应池, 免疫反应和发光检测均在此反应池中发生; 免疫传感器的构造为在硅烷化载体表面制备壳聚糖膜, 固定抗原分子, 构造新型免疫传感器。本发明分析速度更快速, 适用于临床在线快速检测; 重现性好。



1、硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池:其特征是将该传感器与化学发光流动池结合,制备流动注射化学发光免疫检测池;化学发光流动池是由上层的塑料板、下层透明板和硅橡胶垫圈构成;在上层的塑料板开有二个通道,作为液体传输的进口和出口;在上层的塑料板内侧刻有一凹槽,用来嵌入免疫传感器;下层板为透光性较好玻璃或有机玻璃板,并直接放置在光电倍增管上方;中间采用硅橡胶垫圈形成反应池,免疫反应和发光检测均在此反应池中发生;免疫传感器的构造为在硅烷化载体表面制备壳聚糖膜,固定抗原分子,抗原分子为肿瘤相关抗原 CA19-9,构造免疫传感器。

2、由权利要求 1 所述的硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池:其特征是上层的塑料板为聚四氟乙烯板,上层塑料板的内侧刻有一凹槽 20 mm×10 mm×1.5 mm,长和宽的尺寸正负 3mm,高的尺寸正负 1mm,用来嵌入修饰有抗原分子功能膜的载玻片即免疫传感器。

3、硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池的制备方法:检测池由上层的塑料板、下层透明板和硅橡胶垫圈构成,在上层的塑料板内侧刻有一凹槽,用来嵌入免疫传感器;其特征是免疫传感器的制备为先对玻片载体表面进行预处理,配置环氧丙烷基三甲氧基硅烷 GPS 溶液,然后移取溶液滴于载体表面,干燥;滴壳聚糖醋酸溶液于 GPS 硅烷化处理过的玻片上,再干燥硅烷交联壳聚糖膜;将待测抗原溶解于缓冲溶液;将肿瘤相关抗原 CA19-9 溶液滴于硅烷交联壳聚糖膜上,在 0-10°C 条件下缓慢挥发;用血清白蛋白溶液滴于上述步骤所得膜上,封闭活性点,得免疫功能膜,并置于流动化学发光流动池沟槽内得免疫传感器。

4、由权利要求 3 所述的硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池的制备方法:其特征是玻片处理时用二次水和丙酮分别进行洗涤,用 1%GPS 溶液,内含 3:1 乙醇/水混合溶剂放置 60 分钟后使其充分水解,然后移取 40-60 微升溶液滴于玻璃片上,在 93°C 下加热 60 分钟,使 GPS 和玻璃表面发生硅烷偶联反应;移取 40-60 微升 1%壳聚糖醋酸溶液于 GPS 硅烷化处理过的玻片上,再在 105°C 下加热 60 分钟,此时壳聚糖上的氨基与玻片上的硅烷偶联剂通过 GPS 的环氧丙烷基官能团交联。

5、由权利要求 3 所述的硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池的制备方法:其特征是免疫功能膜制备:取 40-60 微升的 120 U/ml 肿瘤相关抗原 CA19-9 溶液,滴于上述交联壳聚糖膜上,在 4°C 冰箱内缓慢挥发、过夜,之后再用上述同样步骤用牛血清白蛋白来封闭活性点。

6、由权利要求 5 所述的硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池

的制备方法：其特征是将覆盖有 CA19-9/壳聚糖膜的玻片置于聚四氟乙烯板的沟槽内，下层为有机玻璃板，中间采用垫圈来形成反应池。

7、由权利要求 6 所述的硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池的制备方法：其特征是实验完毕后，将免疫传感器用 0.1 M pH 7.0 PBS 缓冲液充满，在 4°C 下保存。

硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池及制备方法

技术领域

本发明涉及一种流动注射化学发光免疫测定分析方法，尤其是硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池及制备的方法。

背景技术

近几十年来，免疫分析技术结合了抗原、抗体分子间的特异性识别反应和电化学、光谱学、声学等技术的灵敏、方便等特性，以其对肿瘤标志物等分析物的高选择性和高灵敏性，成为临床，生物化学，环境分析等各个领域重要的分析手段之一。常规的免疫分析方法主要有：放射免疫分析法，酶联免疫分析法，荧光免疫分析法，化学发光免疫分析法等。这些方法主要通过抗体上标记放射性同位素、酶分子、荧光物质等，当待测抗原与标记抗体经过特异性反应、洗板分离后，测定标记的放射性同位素或荧光物质的信号，或是测定标记酶作用于底物所产生的电活性物质、发光物质等的信号而获得待测物的浓度；操作步骤主要包括第一抗体对测定抗原识别、洗涤，与标记二抗反应、洗板，加入底物测定等。这些常规分析方法操作步骤繁琐，分析时间较长，样品消耗量大，测定成本较高。目前，一些结合或改进这些方法的自动化仪器已被广泛应用于临床检测。

化学发光检测具有无放射污染、所需仪器简单、检测限低、灵敏度高和宽的动力学范围等优点，能够和多种不同的模式灵活地相结合；而流动注射分析方法具有操作简便灵活、分析速度快、易于自动化和准确度高等优点。将流动注射技术与免疫分析和化学发光检测方法相结合而发展起来的流动注射免疫分析技术已被证明是一种有力的分析工具，并广泛地应用于环境监测、药物分析、食品检验和临床分析。

为了制备流动注射化学发光免疫检测池，很多固相材料包括无机材料、有机高分子聚合物和一些商品化的材料（如二氧化硅、琼脂糖、葡聚糖和聚苯乙烯包被的磁性微球）已被尝试。在实际应用中，成本低和材料价廉、易得也是固相载体选择的重要因素。

发明内容

本发明目的是，研制一种利用硅烷交联壳聚糖膜固定抗原的新型免疫传感器，提供一种新型的流动注射化学发光免疫检测池及其制备的方法。可成功地用于肿瘤标志物的检测。

本发明利用硅烷化试剂交联壳聚糖，在硅烷化试剂处理的载体表面交联壳聚糖膜，固定抗原分子，构造新型免疫传感器，将该传感器与化学发光流动池结合，制备流动注射化学发光免疫检测池。化学发光流动池是由塑料板如聚四氟乙烯板、透明板如有机玻璃和硅橡胶垫圈构成。在上层的塑料板开有二个通道，作

为液体传输的进口和出口；在其内侧刻有一凹槽，用来嵌入免疫传感器；下层为透光性较好玻璃或有机玻璃板，并直接放置在光电倍增管上方；中间采用硅橡胶垫圈形成反应池，免疫反应和发光检测均在此反应池中发生。

本发明构造新型免疫传感器的方法是：对玻片载体表面进行预处理，配置环氧丙烷基三甲氧基硅烷（GPS）溶液，然后移取溶液滴于载体表面，干燥；滴壳聚糖醋酸溶液于 GPS 硅烷化处理过的玻片上，再干燥硅烷交联壳聚糖膜；将待测抗原溶解于缓冲溶液；将抗原溶液滴于硅烷交联壳聚糖膜上，在 0-10℃ 条件下缓慢挥发；用血清白蛋白溶液滴于上述步骤所得膜上，封闭活性点，得免疫功能膜。将上述免疫功能膜置于化学发光流动池的沟槽内得免疫传感器。

本发明的应用是：该检测池的检测过程是首先将待测样品与稍过量的辣根过氧化物酶标记抗体离线温育，而后将此免疫混合物通入检测池，前一步温育中未结合的酶标抗体被免疫传感器中固定的抗原捕获，而待测抗原—酶标抗体免疫复合物则被冲出。基于捕获的酶标抗体对鲁米诺-H₂O₂ 化学发光反应的催化作用进行化学发光检测。典型的酶标抗体为辣根过氧化物酶标记。

本发明的有益效果是：本发明装置及应用方法利用特异性免疫反应和流动注射化学发光分析相结合的技术，发展了基于交联壳聚糖膜固定抗原的新颖的非竞争法流动注射化学发光免疫分析技术，并制备了免疫传感器。该方法较现有的免疫分析方法，具有以下优点：

- 1) 分析速度更快速，适用于临床在线快速检测；
- 2) 重现性好，样品的注入和分析过程均采用自动化操作，减少了人为误差分析，并且简化了免疫分析的操作步骤；
- 3) 利用壳聚糖这种天然高分子材料固定抗原分子，材料价廉易得、无毒、生物相容性好；
- 4) 该传感器表现出很好的精确性，重复性和稳定性，制备方法简单，可发展成为免疫测定传感器并向市场推广。

本发明将具有操作简便灵活、分析速度快、易于自动化和准确度高等优点的流动注射免疫分析技术和非竞争免疫分析方法相结合，简化分析步骤，缩短分析时间，减少试剂消耗，进而降低测定成本，以实现临床上的在线快速分析。采用经过硅烷化试剂交联后的壳聚糖膜来固定抗原分子，制得的免疫测定膜具有良好的生物相容性，以此为基础研制的流动注射化学发光免疫检测池，可方便、廉价地用于流动注射免疫分析技术免疫分析。

附图说明

图 1 为本发明化学发光流动池实物图

图 2 为本发明化学发光检测池剖面图

具体实施方式

1. 化学发光流动池

如图 1 所示, 该化学发光流动池是由聚四氟乙烯板、有机玻璃板和硅橡胶垫圈构成。在上层的聚四氟乙烯板 (45 mm×30 mm×8 mm) 上凿二个通道, 作为液体传输的进口和出口; 在其内侧刻有一凹槽 (20 mm×10 mm×1.5 mm), 长和宽的尺寸正负 3mm, 高的尺寸正负 1mm。用来嵌入修饰有抗原分子功能膜的载玻片即免疫传感器 (图 2; 下层为透光性较好有机玻璃板 (45 mm×30 mm×8 mm), 直接放置在光电倍增管上方; 中间采用硅橡胶垫圈来形成反应池, 免疫反应和发光检测均在此回路中发生。

2. 免疫传感器的制备

(1) 将待测抗原溶解于缓冲溶液, 所选择的缓冲溶液因抗原种类而异, 标准是使免疫反应的活性和化学发光信号响应最大。

(2) 对玻片载体表面进行预处理, 得到平整, 干净, 亲水性的表面。

(3) 配置一定浓度环氧丙烷基三甲氧基硅烷 (GPS) 溶液, 放置 60 分钟使其充分水解, 然后移取 50 微升溶液滴于载体表面, 在 93℃ 下加热 60 分钟。滴 50 微升 1% 壳聚糖醋酸溶液于 GPS 硅烷化处理过的玻片上, 再置于烘箱中在 105℃ 下加热 60 分钟, 得硅烷交联壳聚糖膜。

(4) 将 50 微升抗原溶液滴于硅烷交联壳聚糖膜上, 在 4℃ 冰箱内缓慢挥发、过夜。

(5) 用 50 微升血清白蛋白溶液滴于 (4) 步骤所得膜上, 封闭活性点, 得免疫功能膜。

(6) 将上述免疫功能膜置于上图所示的化学发光流动池的沟槽内得免疫传感器。

影响所获得的免疫功能膜和免疫传感器性能的主要因素有三个方面:

(1) 时间: 足够的时间使 GPS 水解反应充分。

(2) 免疫传感器的制备受交联壳聚糖膜表面形貌结构的影响, 这主要取决于制备过程中 GPS 和壳聚糖的用量, 只有用量配比合适, 才能得到规则、均匀, 呈现网孔状结构的交联膜, 从而制备出稳定性高、性能好的免疫功能膜。

(3) 缓冲溶液的 pH 值: 只有在一定酸度下, 抗原才具有最佳活性。如果酸度偏离这一数值, 将影响免疫功能膜和免疫传感器的性能。

3. 待测抗原的测定

(1) 免疫测定条件的优化。

(2) 在最佳测定条件下, 将含不同浓度抗原标准溶液或样品和固定量酶标记抗体溶液离线温育 30 min 后, 通过流动注射流动体系注入到免疫传感器中, 前期温育免疫反应中未被结合的游离酶标抗体被传感器中固定的抗原捕获, 免疫结合物则被带出反应池。当化学发光底物注入传感器时, 被捕获的酶标抗体对化学

发光体系进行催化反应,得到发光信号,绘制测定的标准曲线,并由标准曲线得到样品中抗原浓度。

免疫测定条件的优化包括以下三个方面:

(1) 温育时间:免疫反应(抗原、抗体间的识别、结合)通常需要一定时间来完成,为保证测定的准确性和灵敏性,要求控制一定的反应时间。

(2) 反应溶液中酶标抗体的量:该测定采用非竞争免疫分析方法,即将待测抗原和固定量酶标记抗体的反应溶液离线温育,免疫反应结束后通过固定在免疫传感器上的抗原来分离结合的和游离的酶标抗体,由固定在免疫传感器上的抗原捕获的酶标抗体催化化学发光反应,从而产生信号降低来间接测定待测抗原的量。反应溶液中酶标抗体的量的优化以获得最大检测范围且检测最灵敏为标准。若酶标抗体的量小于该值,会使检测范围缩小;若酶标抗体的量大于该值,会使背景信号增大,测定结果偏小。

(3) 温育后免疫复合物流过免疫传感器的流速:免疫复合物在传感器滞留的时间越长,即流速越慢,则固定在免疫传感器上的抗原捕获的游离酶标抗体的量越多,分离效果就越好;反之则游离酶标抗体的捕获量就少,分离的效果就差一些。兼顾到临床上快速检测的需求,温育后免疫复合物流过免疫传感器的流速对结合的和游离的酶标抗体分离效果的影响进行了优化。

检测应用实施例

1. CA19-9 免疫传感器的制备

选择载玻片(20 mm×10 mm×1.0 mm)作载体基质,以肿瘤相关抗原 CA19-9 为例作为固定对象:

(a) 玻片处理:用二次水和丙酮分别进行洗涤。1%GPS 溶液(3:1 乙醇/水混合溶剂)放置 60 分钟后使其充分水解,然后移取 40-60 微升、如 50 微升溶液滴于玻璃片上,在 93°C 下加热 60 分钟,使 GPS 和玻璃表面发生硅烷偶联反应;移取 40-60 微升、如 50 微升 1%壳聚糖醋酸溶液于 GPS 硅烷化处理过的玻片上,再在 105°C 下加热 60 分钟,此时壳聚糖上的氨基与玻片上的硅烷偶联剂通过 GPS 的环氧丙烷基官能团交联。

(b) 免疫功能膜制备:取 40-60 微升、如 50 微升的 120 U/ml CA19-9 溶液,滴于上述交联壳聚糖膜上,在 4°C 冰箱内缓慢挥发、过夜。之后再用上述同样步骤用牛血清白蛋白来封闭活性点。

(c) 将覆盖有 CA19-9/壳聚糖膜的玻片置于聚四氟乙烯板的沟槽内,下层为有机玻璃板,中间采用垫圈来形成反应池。实验完毕,将免疫传感器用 0.1 M pH 7.0 PBS 缓冲液充满,在 4°C 下保存。

当然,在本发明尺寸条件下,选取 40-60 微升溶液是合适的选择,而在本实施例选取范围外的情形并没有超出本发明的范围。

2. 检测过程

(d) 采用非竞争流动注射免疫反应模式, 50 微升 1:7.5 稀释的辣根过氧化物酶标记的 CA19-9 抗体溶液和 50 微升 CA19-9 标准溶液或血清样品混合, 在室温下 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) 温育 30 分钟。将此混合液注入到流路中, 以 0.1 ml/min 的流速流过免疫传感器, 同时鲁米诺和对碘苯酚、过氧化氢也用一三通管道进行混合。在温育时未被结合的游离酶标抗体被传感器中固定的抗原捕获而滞留在传感器中, 结合物被冲出。此时将 100 微升化学发光底物注入反应池中, 被捕获的酶标抗体催化化学发光反应, 从而检测到化学发光信号。检测完毕, 用 0.1 M pH 2.2 的甘氨酸-HCl 洗脱液对免疫传感器再生 1 分钟, 再用 0.1 M pH 7.0 PBS 缓冲液冲洗, 平衡 1 分钟。下一轮新的实验就可以开始了。

3. CA19-9 的测定

(a) 测定条件的优化: 分别改变温育时间、反应溶液中辣根过氧化物酶标记 CA19-9 抗体的量及温育后免疫复合物流过免疫传感器的流速, 选择最大化学发光响应时相应的量作为最佳测定条件, 实验结果显示, 当在室温 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) 下温育 30 min, 选择以 0.1 M pH 7.0 PBS 缓冲液稀释的 1:5 的 HRP 标记 CA19-9 抗体溶液, 免疫混合液以 0.1 ml/min 的流速流过免疫传感器时得到最大的化学发光信号响应。

(b) CA19-9 的测定: 在优化实验条件下, 利用非竞争免疫分析方法, 测定一系列标准 CA19-9 抗原浓度, 确定 CA19-9 测定的标准曲线, 再利用标准曲线法, 测定样品中 CA19-9 抗原的浓度。

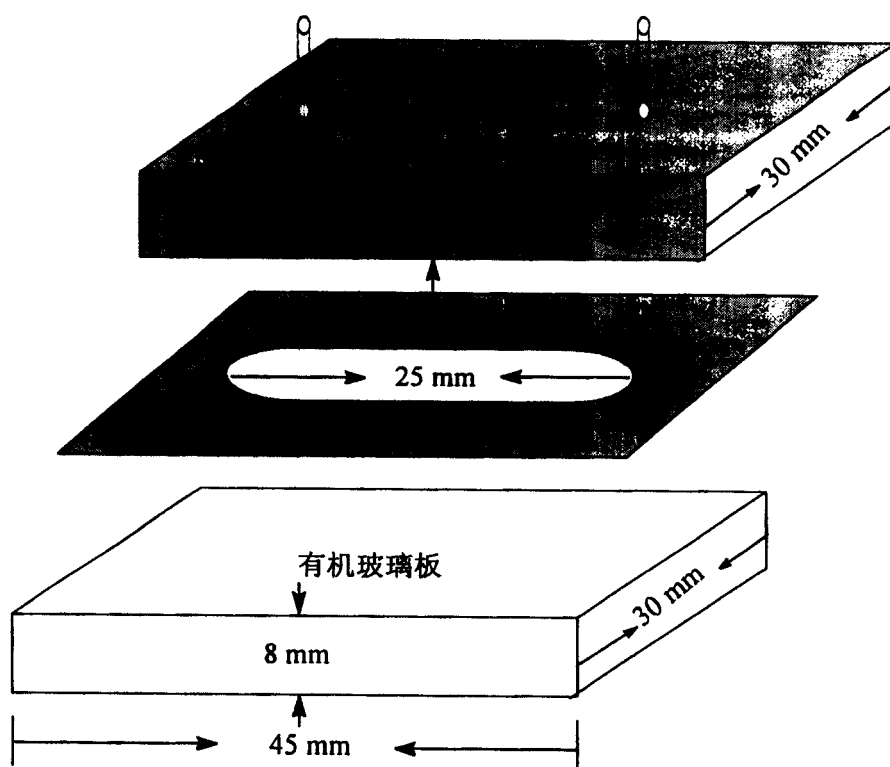


图 1

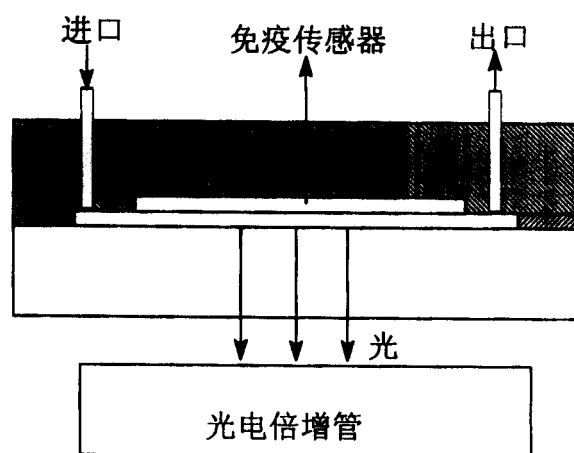


图 2

专利名称(译)	硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池及制备方法		
公开(公告)号	CN1323296C	公开(公告)日	2007-06-27
申请号	CN200410041176.8	申请日	2004-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省肿瘤医院 南京大学		
申请(专利权)人(译)	江苏省肿瘤医院 南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省肿瘤医院 南京大学		
[标]发明人	严枫 林洁华 鞠焜先		
发明人	严枫 林洁华 鞠焜先		
IPC分类号	G01N33/552 G01N33/52 G01N21/76 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/547		
代理人(译)	成立珍		
其他公开文献	CN1595160A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

硅烷交联壳聚糖膜基的流动注射化学发光免疫检测池：将该传感器与化学发光流动池结合，制备流动注射化学发光免疫检测池；化学发光流动池是由上层的塑料板、下层透明板和硅橡胶垫圈构成；在上层的塑料板开有二个通道，作为液体传输的进口和出口；在其内侧刻有一凹槽，用来嵌入免疫传感器；下层板为透光性较好玻璃或有机玻璃板，并直接放置在光电倍增管上方；中间采用硅橡胶垫圈形成反应池，免疫反应和发光检测均在此反应池中发生；免疫传感器的构造为在硅烷化载体表面制备壳聚糖膜，固定抗原分子，构造新型免疫传感器。本发明分析速度更快速，适用于临床在线快速检测；重现性好。

