



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105758835 B

(45)授权公告日 2018.03.27

(21)申请号 201610288302.2

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2016.05.04

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105758835 A

CN 1276871 A,2000.12.13,
JP 特许第4362314号 B2,2009.11.11,
CN 104101586 A,2014.10.15,
CN 104209071 A,2014.12.17,
CN 104530459 A,2015.04.22,
CN 101871937 A,2010.10.27,
CN 104198723 A,2014.12.10,
CN 102411050 A,2012.04.11,

(43)申请公布日 2016.07.13

(73)专利权人 成都爱兴生物科技有限公司
地址 610000 四川省成都市高新区科园南路88号7栋402号

(72)发明人 包德泉

审查员 李乐

(74)专利代理机构 北京细软智谷知识产权代理有限公司 11471

代理人 王金宝

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

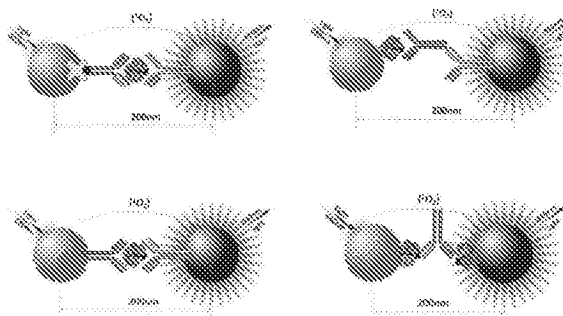
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

一种均相免疫分析POCT检测方法及使用该检测方法的系统

(57)摘要

本发明提供了一种均相免疫分析POCT检测方法及使用该检测方法的系统。所述均相免疫分析POCT检测方法兼有化学发光免疫分析技术的高灵敏度、高精密度和宽范围,同时具有POCT检测技术快速、便携等特点;另外,所述均相免疫分析POCT检测方法由于是纯液相检测,克服了NC膜带来的CV较高的问题,因此检测精密度高,一般CV可控制在5%以内,使POCT检测技术在精密度方面可以达到甚至超过化学发光免疫分析技术的水平。所述使用均相免疫分析POCT检测方法的系统,将试剂卡和POCT分析仪分开设计,使用试剂卡采集待测样品,便于携带。



1. 一种均相免疫分析POCT检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

A、将待测样品与供氧微球试剂混合均匀后;再与受氧微球试剂混合均匀;

B、对步骤A中混合物进行激光照射,同时测量混合物发出的光强度;

C、根据光强度,换算出待测样品的浓度;

所述供氧微球试剂包括供氧微球,所述受氧微球试剂包括受氧微球,所述供氧微球和受氧微球均为聚苯乙烯微球,所述供氧微球的表面包裹有亲水性的醛基葡聚糖,所述受氧微球的表面包裹有亲水性的羧基葡聚糖;

所述待测样品与所述供氧微球和受氧微球之间均能够发生特异性反应;

所使用激光的波长为680nm,光的波长为520-620nm。

2. 根据权利要求1所述的均相免疫分析POCT检测方法,其特征在于,所述供氧微球和所述受氧微球上均分别偶联有生物特异性物质;

所述生物特异性物质包括但不限于抗原、抗体、ProtinA、ProtinG和/或链亲和素;待测样品与分别偶联在所述供氧微球和受氧微球上的生物特异性物质均能够和发生特异性反应。

3. 根据权利要求2所述的均相免疫分析POCT检测方法,其特征在于,所述抗体包括第一抗体和第二抗体。

4. 根据权利要求1所述的均相免疫分析POCT检测方法,其特征在于,步骤A中,先将所述待测样品使用稀释液稀释后,再与所述供氧微球试剂混合。

5. 根据权利要求1所述的均相免疫分析POCT检测方法,其特征在于,步骤A中,先将所述待测样品与第一试剂混合均匀后,再与所述供氧微球试剂混合。

6. 根据权利要求1所述的均相免疫分析POCT检测方法,其特征在于,步骤A中,先将所述待测样品使用稀释液稀释,稀释后与第一试剂混合均匀,再与所述供氧微球试剂混合。

7. 一种使用权利要求1-6任一所述均相免疫分析POCT检测方法的系统,其特征在于,包括配合使用的试剂卡和POCT分析仪:

所述试剂卡上开设有待测样品孔、供氧微球试剂孔和受氧微球试剂孔;所述待测样品孔用来盛装待测样品,所述供氧微球试剂孔用来盛装供氧微球试剂,所述受氧微球试剂孔用来盛装受氧微球试剂;

在检测时,所述试剂卡设置在所述POCT分析仪内,所述POCT分析仪包括温育模块、试剂加样模块、激发光模块、光信号检测模块和电路控制模块;所述温育模块、试剂加样模块、激发光模块、光信号检测模块均与所述电路控制模块电连接;

在电路控制模块的控制下,所述温育模块用于调整所述试剂卡及试剂卡内物质的温度,所述试剂加样模块用于转移所述试剂卡内的物质,所述激发光模块用于发射激光,所述光信号检测模块用于测量混合物发出的光强度。

8. 根据权利要求7所述的系统,其特征在于,所述试剂卡上还开设有稀释液孔,所述稀释液孔用来盛装稀释液;所述待测样品孔、供氧微球试剂孔、受氧微球试剂孔和稀释液孔均覆膜封闭孔口;所述试剂卡上还设有条形码区,所述条形码区内设有条形码;

所述POCT分析仪还包括条码扫描模块,所述条码扫描模块用于识别读取条形码中的信息。

9. 根据权利要求8所述的系统,其特征在于,所述试剂卡上还开设有第一试剂孔,所述

第一试剂孔用来盛装第一试剂,所述第一试剂孔覆膜封闭孔口;所述受氧微球试剂孔能够作为信号检测孔,所述受氧微球试剂孔的侧壁和底部均采用不透明材料制成;

在检测时,所述试剂卡及试剂卡内物质的温度为20-50℃,所述试剂加样模块每次转移的物质为1-500 μ L,所述激发光模块包括激光激发器;所述光信号检测模块包括光子检测器。

10. 根据权利要求7所述的系统,其特征在于,在检测时,所述试剂卡及试剂卡内物质的温度为36-38℃,所述试剂加样模块每次转移的物质为20-100 μ L。

一种均相免疫分析POCT检测方法及使用该检测方法的系统

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析领域,具体涉及一种均相免疫分析POCT检测方法及使用该检测方法的系统。

背景技术

[0002] 现有的化学发光免疫分析技术是临床检验分析的主流技术,以其灵敏度高,分析范围宽等特点受到欢迎。主要存在以下缺点:

[0003] A、仪器系统体积庞大,占地面积大,同时,由于测试通量大,试剂卡采用以100测试为整单位,对实验室样本规模有要求;

[0004] B、仪器系统及试剂价格昂贵,维护成本高,不适用于基层医疗机构;

[0005] C、仪器体积大,不能随身携带进入诊疗现场;

[0006] D、化学发光系统主要采用血清和血浆作为样本,一般不能采用全血,限制了其使用范围。

[0007] 同时,近年来新兴起一种在病人旁边进行的临床检测(床边检测bedside testing)的即时检验(point-of-care testing)技术,简称POCT检测技术,POCT检测技术主流是荧光定量层析或者胶体金,主要是包裹荧光物质的荧光微球或胶体金通过膜层析的方法进行免疫检测的快诊技术。主要存在以下缺点:

[0008] A、由于这两种技术主要是在NC膜上进行释放检测,由于膜本身的CV就有5%以上,因此固相膜法的POCT检测CV一般都要在10%以上,低浓度时CV%甚至会达到20%以上,检测精密度很差,这对于定量分析带来巨大的挑战,对于灵敏度要求很高的项目如cTnI,定量就变得极其困难。

[0009] B、目前POCT检测技术所用的微球都是羧基修饰纯聚苯乙烯表面,该表面具有很强的疏水性,容易和蛋白发生非特异性的吸附,因此检测的抗干扰能力差,检测准确性有所降低。

[0010] C、目前基于磁珠的POCT检测技术由于都是非均相的系统,需要设计复杂的清洗流程。

[0011] D、胶乳比浊类的POCT检测技术,由于是通过测定大量乳胶微球的凝集而发生光散射信号的变化来检测抗原浓度的,所以该测试方法灵敏度低,抗体消耗量大,测定时间久并且很多要求高灵敏度的项目无法通过乳胶凝集法来检测。

[0012] E、胶乳侧向层析类POCT检测技术,使用彩色胶乳代替金颗粒,可以肉眼进行颜色深浅识别,也可以采用小型仪器进行信号采集,但由于采用CCD进行检测,颜色分辨率较低,对于分析范围较高的项目如CRP,会发生区分不开的情况;

[0013] F、采用新型技术如微流控芯片类型POCT检测技术,具有反应速度快,样本需求量小等优点,但也因为反应不充分,造成检测灵敏度低的问题。

发明内容

[0014] 为了解决现有技术存在的上述问题,本发明提供了一种均相免疫分析POCT检测方法及使用该检测方法的系统。所述均相免疫分析POCT检测方法兼有化学发光免疫分析技术的高灵敏度、高精密度和宽范围,同时具有POCT检测技术快速、便携等特点;另外,所述均相免疫分析POCT检测方法由于是纯液相检测,克服了NC膜带来的CV较高的问题,因此检测精密度高,一般CV可控制在5%以内,使POCT检测技术在精密度方面可以达到甚至超过化学发光免疫分析技术的水平。

[0015] 所述使用均相免疫分析POCT检测方法的系统,将试剂卡和POCT分析仪分开设计,集成使用,使用试剂卡采集待测样品,便于携带。

[0016] 本发明所采用的技术方案为:一种均相免疫分析POCT检测方法,包括以下步骤:

[0017] A、将待测样品与供氧微球试剂混合均匀后;再与受氧微球试剂混合均匀;

[0018] B、对步骤A中混合物进行激光照射,同时测量混合物发出的光强度;

[0019] C、根据光强度,换算出待测样品的浓度;

[0020] 所述供氧微球试剂包括供氧微球,所述受氧微球试剂包括受氧微球,所述供氧微球和受氧微球均为聚苯乙烯微球,所述供氧微球的表面包裹有亲水性的醛基葡聚糖,所述受氧微球的表面包裹有亲水性的羧基葡聚糖;

[0021] 所述待测样品与所述供氧微球和受氧微球之间均能够发生特异性反应;

[0022] 所使用激光的波长为680nm,光的波长为520-620nm。

[0023] 所述均相免疫分析POCT检测方法的原理为:待测样品中的待测生物分子与供氧微球和受氧微球反应形成免疫复合物,这种相互作用会将供氧微球和受氧微球拉近,在激光(波长为680nm)的照射下,供氧微球上的光敏剂将周围环境中的氧气转化为更为活跃的单体氧。单体氧扩散至受氧微球,与受氧微球上的化学发光剂反应,进一步激活了同样在受氧微球上的发光基团,使之发出光,波长为520-620nm。单体氧的半衰期为4 μ Sec,在溶液中的扩散距离为200nm左右。如果生物分子不存在相互作用,单体氧无法扩散到受氧微球,则不会有光信号产生。故通过测量混合物发出的光强度,能够计算出待测样品中的待测生物分子的浓度。并且,由于光氧微球组合物表面覆盖了一层水凝胶葡聚糖,从而大大减少了体系中的非特异性的吸附,提高了检测稳定性和准确性。

[0024] 需要说明的是:供氧微球和受氧微球均为高聚物包覆光敏剂(光氧染料),而微球表面有醛基基团或羧基基团,用于共价结合抗原抗体等生物活性物质。所述光敏剂为光氧染料物质亚甲基蓝,玫瑰红,酞菁化合物和叶绿素A中的一种或组合。

[0025] 所述供氧微球和所述受氧微球上均分别偶联有生物特异性物质;

[0026] 所述生物特异性物质包括但不限于抗原、抗体、ProtinA、ProtinG和/或链亲和素;待测样品与分别偶联在所述供氧微球和受氧微球上的生物特异性物质均能够和发生特异性反应。

[0027] 天然蛋白A(Protein A)是一种发现于金黄色葡萄球菌的细胞壁表面蛋白,天然蛋白G(Protein G)是一种分离自G型或C型链球菌属的细胞表面蛋白,二者功能相似,主要通过与免疫球蛋白(Ig)的Fc区相互作用,可结合大多数哺乳动物的IgG。

[0028] 当然,生物特异性物质不局限于抗原、抗体、ProtinA、ProtinG和/或链亲和素,只要在本发明的公开的技术思想下,结合现有技术,任意能够被设计为满足上述微球特异性结合的特异性生物分子都能够作为本发明中的生物特异性物质,在此就不再赘述。

[0029] 所述抗体包括第一抗体和第二抗体。

[0030] 本发明中,所述待测样品包括但不限于体液样本,其中体液样本包括全血、血清、血浆、尿液、唾液、羊水等。

[0031] 为提高最终检测结果的准确性和待测样品的稳定性,优选的技术方案为:步骤A中,先将所述待测样品使用稀释液稀释后,再与所述供氧微球试剂混合。

[0032] 所述稀释液包括缓冲液、蛋白、稳定剂、防腐剂等。所述稀释液具有稀释和缓冲的作用,提高了最终检测结果的准确性和待测样品的稳定性。

[0033] 在本发明公开的技术思想下,特异性反应的检测方法包括但不限于:双抗体夹心法、竞争法、中和竞争法、间接法或捕获法。

[0034] 而使用某些特定的检测方法时,除需要待测样品、供氧微球试剂和受氧微球试剂之外,还需要额外的试剂才能顺利进行或能优化进行,故优选的技术方案是:步骤A中,先将所述待测样品与第一试剂混合均匀后,再与所述供氧微球试剂混合。需要说明的是,本发明中所述的第一试剂,不特指某一类试剂,所述第一试剂是为了保证某些基于特异性反应的检测方法的顺利或优化进行而添加的试剂,所述第一试剂包括但不限于:生物素化的抗原或抗体;FITC标记的抗原或抗体、抗待测生物分子的单克隆抗体或多克隆抗体、中和抗原、抗原。

[0035] 其中,FITC为Fluorescein isothiocyanate isomer I的简写,是生化试剂,主要用于荧光抗体技术中的荧光染料,能和各种抗体蛋白结合,结合后的抗体不丧失与一定抗原结合的特异性,并在碱性溶液中具有强烈的绿色荧光。

[0036] 下面结合具体检测方法分别论述:

[0037] 一、夹心法

[0038] 夹心法根据形成的免疫复合物模式的不同,能够继续细分:

[0039] 1、免疫复合物模式为:供氧微球-链亲和素-生物素-抗体1-抗原-抗体2-受氧微球,此时,第一试剂孔中为生物素化的抗原或抗体;供氧微球试剂孔中为偶联链霉亲和素或中性亲和素的供氧微球;受氧微球试剂孔中为偶联抗原或抗体的受氧微球。

[0040] 2、免疫复合物模式为:供氧微球-抗FITC-FITC-抗体1-抗原-抗体2-受氧微球,此时,第一试剂孔中为FITC标记的抗原或抗体;供氧微球试剂孔中为偶联抗FITC单抗或多抗的供氧微球;受氧微球试剂孔中为偶联抗原或抗体的受氧微球。

[0041] 3、免疫复合物模式为:供氧微球-第二抗体-抗体1-抗原-抗体2-受氧微球,此时,第一试剂孔中为抗待测生物分子的单克隆抗体或多克隆抗体;供氧微球试剂孔中为偶联第二抗体的供氧微球;受氧微球试剂孔中为偶联抗原或抗体的受氧微球。

[0042] 4、当然,夹心法也有不使用第一试剂的情况,如免疫复合物模式为:供氧微球-抗体1-抗原-抗体2-受氧微球,此时,供氧微球试剂孔中为偶联抗体的供氧微球;受氧微球试剂孔中为偶联抗体的受氧微球。

[0043] 二、竞争法,当待测生物分子为抗原时,免疫复合物模式为:供氧微球-抗原-抗体-受氧微球,此时,供氧微球试剂孔中为偶联抗原的供氧微球;受氧微球试剂孔中为偶联抗体的受氧微球。

[0044] 三、中和竞争法,免疫复合物模式为:供氧微球-抗体1-抗原-抗体2-受氧微球,此时,第一试剂孔中为中和抗原;供氧微球试剂孔中为偶联抗体的供氧微球;受氧微球试剂孔

中为偶联抗体的受氧微球。

[0045] 四、间接法,免疫复合物模式为:供氧微球-抗原-抗体-第二抗体-受氧微球,此时,供氧微球试剂孔中为偶联抗原的供氧微球;受氧微球试剂孔中为偶联第二抗体的受氧微球。

[0046] 五、捕获法,当待测生物分子为IGM时,免疫复合物模式为:供氧微球-抗 μ 抗体-抗原-抗体-受氧微球,此时,第一试剂孔中为抗原;供氧微球试剂孔中为偶联抗 μ 抗体的供氧微球;受氧微球试剂孔中为偶联抗体的受氧微球。

[0047] IGM是免疫球蛋白M(Immunoglobulin M)的缩写。

[0048] 为进一步提高最终检测结果的准确性和待测样品的稳定性,优选的技术方案为:步骤A中,先将所述待测样品使用稀释液稀释,稀释后与第一试剂混合均匀,再与所述供氧微球试剂混合。

[0049] 本发明还提供了一种使用所述均相免疫分析POCT检测方法的系统,包括配合使用的试剂卡和POCT分析仪:

[0050] 所述试剂卡上开设有待测样品孔、供氧微球试剂孔和受氧微球试剂孔;所述待测样品孔用来盛装待测样品,所述供氧微球试剂孔用来盛装供氧微球试剂,所述受氧微球试剂孔用来盛装受氧微球试剂;

[0051] 在检测时,所述试剂卡设置在所述POCT分析仪内,所述POCT分析仪包括温育模块、试剂加样模块、激发光模块、光信号检测模块和电路控制模块;所述温育模块、试剂加样模块、激发光模块、光信号检测模块均与所述电路控制模块电连接;

[0052] 在电路控制模块的控制下,所述温育模块用于调整所述试剂卡及试剂卡内物质的温度,所述试剂加样模块用于转移所述试剂卡内的物质,所述激发光模块用于发射激光,所述光信号检测模块用于测量混合物发出的光强度。

[0053] 在电路控制模块的控制下,所述POCT分析仪能够利用现有技术,支持夹心法、竞争法、中和竞争法、间接法或捕获法等反应模式,同时支持Batch mode和random access模式;Batch mode可以支持多个待测样品进行相同分析项目检测,也可以同一待测样品进行多个项目同时分析,也可以支持不同待测样品,不同项目同时进行分析,这样任何一个急诊待测样品可以随时插入进行菜单上任何一个项目的分析;在此就不再赘述。

[0054] 通过通过测量混合物发出的光强度,能够计算出待测样品中的待测生物分子的浓度。

[0055] 当然,为减少人工计算的工作量和提供检测的速率和准确性,优选的技术方案是:所述POCT分析仪还包括软件计算模块,所述软件计算模块能够根据实际需要,进行直线、多次(二次、三次、四次、五次……)方程、幂函数、指数、4参数或5参数Log-Logistic拟合,并具有批次校准等功能,并能够与医院LIS系统连接。

[0056] 使用所述系统的流程为:在所述待测样品孔、供氧微球试剂孔和受氧微球试剂孔分别盛装待测样品、供氧微球试剂和受氧微球试剂后,将所述试剂卡置于所述POCT分析仪中,所述试剂加样模块中的加样针取相应体积待测样品,加入供氧微球试剂孔,经过一定时间反应后,继续取一定体积混合后液体加入入受氧微球试剂孔,所述激发光模块用于发射激光向受氧微球试剂孔照射,经过一定时间反应,所述光信号检测模块测量混合物发出的光强度,通过光强度,计算出待测样品中的待测生物分子的浓度。

[0057] 提高最终检测结果的准确性和待测样品的稳定性,优选的技术方案是,所述试剂卡上还开设有稀释液孔,所述稀释液孔用来盛装稀释液;所述待测样品孔、供氧微球试剂孔、受氧微球试剂孔和稀释液孔均覆膜封闭孔口,以保证其中物质的不被污染;

[0058] 为方便识别和读取待测样品的信息,优选的技术方案是,所述试剂卡上还设有条形码区,所述条形码区内设有条形码;所述条形码为一维或二维码。

[0059] 对应的,所述POCT分析仪还包括条码扫描模块,所述条码扫描模块用于识别读取条形码中的信息。

[0060] 所述条码扫描模块支持IC卡扫描、印刷条形码介质(纸张或试剂卡)扫描,信息读入采用接触式扫描或者是非接触式扫描,其方式可以是红外或射频等方式;所述信息包括但不限于检测分析项目名称、标准曲线、试剂组分、批号、效期、生产商信息。

[0061] 进一步地,所述试剂卡上还开设有第一试剂孔,所述第一试剂孔用来盛装第一试剂,所述第一试剂孔覆膜封闭孔口。

[0062] 需要说明的是,在反应体系中存在稀释液和/或第一试剂时,所述稀释液和第一试剂的添加顺序为:先将所述待测样品与稀释液混合进行稀释操作,稀释完成后,取一定体积稀释后的待测样品加入第一试剂孔,与第一试剂混合之后,继续取一定体积混合后的液体进入供氧微球试剂孔,进行后续流程。

[0063] 所述受氧微球试剂孔能够作为信号检测孔,所述受氧微球试剂孔的侧壁和底部均采用不透明材料制成;所述覆膜为覆高聚塑料膜或硅胶膜,所述高聚塑料膜或硅胶膜与所用试剂具有生物相容性。

[0064] 所述试剂卡的形状为圆形、方形或其他几何形状。所述试剂卡为单人份试剂卡。

[0065] 所述激发光模块包括激光激发器;所述光信号检测模块包括光子检测器(PMT)。

[0066] 在检测时,所述温育模块采用金属浴、水浴或油浴等方式,使所述试剂卡及试剂卡内物质的温度为20-50℃,所述试剂加样模块每次转移的物质为1-500μL。

[0067] 优选地,所述试剂卡及试剂卡内物质的温度为35-45℃,所述试剂加样模块每次转移的物质为5-200μL。

[0068] 进一步地,所述试剂卡及试剂卡内物质的温度为36-38℃,所述试剂加样模块每次转移的物质为20-100μL。

[0069] 本发明的有益效果为:

[0070] 1、所述均相免疫分析POCT检测方法兼有化学发光免疫分析技术的高灵敏度、高精密度和宽范围,同时具有POCT检测技术快速、便携等特点;另外,所述均相免疫分析POCT检测方法由于是纯液相检测,克服了NC膜带来的CV较高的问题,因此检测精密度高,一般CV可控制在5%以内,使POCT检测技术在精密度方面可以达到甚至超过化学发光免疫分析技术的水平。

[0071] 2、本发明中使用的聚苯乙烯微球,由于表面包裹了一层亲水性的醛基葡聚糖,因此可以大大的降低非特异性吸附,减少体系外其他环境因素如pH值及电解质等的影响,从而检测的准确性得到了极大的提高。

[0072] 3、本发明中使用了纳米级微球作为免疫固相,相对于传统免疫固相,如膜、微孔板、塑料珠等,反应面积可以大大提高,可以有效拓展其检测范围,降低Hook效应。相对于目前应用最广泛的磁珠,也更加接近均相反应,可以使反应速度更快,在类似心脏功能标志物

的检测中,具有天然的优势;同时,由于不需要洗涤,可以大大减少整个分析的时间,并有利于实现POCT自动化。

[0073] 4、所述均相免疫分析POCT检测方法使用供氧微球和受氧微球组成的体系,所述供氧微球和受氧微球之间能够进行能量传递产生信号,并能够进行逐级放大,而每个供氧微球可释放出近6万个离子氧,每秒释放10,000,000RLU再通过光电倍增管(PMT)对信号的放大收集。因此所述均相免疫分析POCT检测方法有更高的分析灵敏度,并且所需样本量极少,从而所要消耗的抗体量也更少。从而制得的检测试剂成本更加低廉,具有更高的市场竞争力。

[0074] 5、本发明还提供了一种使用所述均相免疫分析POCT检测方法的系统,将试剂卡和POCT分析仪分开设计,使用试剂卡采集待测样品,便于携带;所述POCT分析仪操作简单,实现了全自动化,避免了清洗带来的干扰,具有检测精密度高的优点。

[0075] 6、所述系统因为没有清洗机构,仪器设计更加小型化并更加稳定,更加便携,拓展了仪器应用领域。

附图说明

[0076] 图1是本发明中的免疫复合物示意图;

[0077] 图2是本发明中一个实施例中的试剂卡的俯视图;

[0078] 图3是图2的主视图。

[0079] 图中:1、待测样品孔;2、稀释液孔;3、供氧微球试剂孔;4、受氧微球试剂孔;5、条形码区。

具体实施方式

[0080] 下面结合实施例,更具体地说明本发明的内容。应当理解,本发明的实施并不局限于下面的实施例,对本发明所做的任何形式上的变通和/或改变都将落入本发明保护范围。

[0081] 在本发明中,若非特指,所有的份、百分比均为重量单位,所有的设备和原料等均可从市场购得或是本行业常用的。下述实施例中的方法,如无特别说明,均为本领域的常规方法。

[0082] 实施例1

[0083] 如图1所示,本发明提供了一种均相免疫分析POCT检测方法,包括以下步骤:

[0084] A、将待测样品与供氧微球试剂混合均匀后;再与受氧微球试剂混合均匀;

[0085] B、对步骤A中混合物进行激光照射,同时测量混合物发出的光强度;

[0086] C、根据光强度,换算出待测样品的浓度;

[0087] 所述供氧微球试剂包括供氧微球,所述受氧微球试剂包括受氧微球,所述供氧微球和受氧微球均为聚苯乙烯微球,所述供氧微球的表面包裹有亲水性的醛基葡聚糖,所述受氧微球的表面包裹有亲水性的羧基葡聚糖;

[0088] 所述供氧微球上偶联有生物特异性物质,所述受氧微球上偶联有所述受氧微球上的生物特异性物质;待测样品与分别偶联在所述供氧微球和受氧微球上的生物特异性物质均能够和发生特异性反应;

[0089] 所使用激光的波长为680nm,光的波长为520-620nm。

[0090] 所述均相免疫分析POCT检测方法的原理为：待测样品中的待测生物分子与供氧微球和受氧微球反应形成免疫复合物，这种相互作用会将供氧微球和受氧微球拉近，在激光（波长为680nm）的照射下，供氧微球上的光敏剂将周围环境中的氧气转化为更为活跃的单体氧。单体氧扩散至受氧微球，与受氧微球上的化学发光剂反应，进一步激活了同样在受氧微球上的发光基团，使之发出光，波长为520-620nm。单体氧的半衰期为4 μ Sec，在溶液中的扩散距离为200nm左右。如果生物分子不存在相互作用，单体氧无法扩散到受氧微球，则不会有光信号产生。故通过测量混合物发出的光强度，能够计算出待测样品中的待测生物分子的浓度。并且，由于光氧微球组合物表面覆盖了一层水凝胶葡聚糖，从而大大减少了体系中的非特异性的吸附，提高了检测稳定性和准确性。

[0091] 实施例2

[0092] 在实施例1的基础上，步骤A中，先将所述待测样品使用稀释液稀释后，再与所述供氧微球试剂混合。

[0093] 所述稀释液包括缓冲液、蛋白、稳定剂、防腐剂等。所述稀释液具有稀释和缓冲的作用，提高了最终检测结果的准确性和待测样品的稳定性。

[0094] 实施例3

[0095] 而使用某些特定的检测方法时，除需要待测样品、供氧微球试剂和受氧微球试剂之外，还需要额外的试剂才能顺利进行或能优化进行，在实施例1或实施例2的基础上，步骤A中，先将所述待测样品与第一试剂混合均匀后，再与所述供氧微球试剂混合。

[0096] 实施例4

[0097] 一种使用所述均相免疫分析POCT检测方法的系统，包括配合使用的试剂卡和POCT分析仪：

[0098] 所述试剂卡上开设有待测样品孔、供氧微球试剂孔和受氧微球试剂孔；所述待测样品孔用来盛装待测样品，所述供氧微球试剂孔用来盛装供氧微球试剂，所述受氧微球试剂孔用来盛装受氧微球试剂；

[0099] 在检测时，所述试剂卡设置在所述POCT分析仪内，所述POCT分析仪包括温育模块、试剂加样模块、激发光模块、光信号检测模块和电路控制模块；所述温育模块、试剂加样模块、激发光模块、光信号检测模块均与所述电路控制模块电连接；

[0100] 在电路控制模块的控制下，所述温育模块用于调整所述试剂卡及试剂卡内物质的温度，所述试剂加样模块用于转移所述试剂卡内的物质，所述激发光模块用于发射激光，所述光信号检测模块用于测量混合物发出的光强度。通过通过测量混合物发出的光强度，能够计算出待测样品中的待测生物分子的浓度。

[0101] 在本实施例中，所述激发光模块包括激光激发器；所述光信号检测模块包括光子探测器（PMT）。

[0102] 在电路控制模块的控制下，所述POCT分析仪能够利用现有技术，支持夹心法、竞争法、中和竞争法、间接法或捕获法等反应模式，同时支持Batch mode和random access模式；Batch mode可以支持多个待测样品进行相同分析项目检测，也可以同一待测样品进行多个项目同时分析，也可以支持不同待测样品，不同项目同时进行分析，这样任何一个急诊待测样品可以随时插入进行菜单上任何一个项目的分析；在此就不再赘述。

[0103] 使用所述系统的流程为：在所述待测样品孔、供氧微球试剂孔和受氧微球试剂孔

分别盛装待测样品、供氧微球试剂和受氧微球试剂后,将所述试剂卡置于所述POCT分析仪中,所述试剂加样模块中的加样针取相应体积待测样品,加入供氧微球试剂孔,经过一定时间反应后,继续取一定体积混合后液体加入受氧微球试剂孔,所述激发光模块用于发射激光向受氧微球试剂孔照射,经过一定时间反应,所述光信号检测模块测量混合物发出的光强度,通过光强度,计算出待测样品中的待测生物分子的浓度。

[0104] 所述温育模块采用金属浴、水浴或油浴等方式,使所述试剂卡及试剂卡内物质的温度为20-50℃,所述试剂加样模块每次转移的物质为1-500μL。

[0105] 实施例5

[0106] 在实施例4的基础上,为减少人工计算的工作量和提供检测的速率和准确性,所述POCT分析仪还包括软件计算模块,所述软件计算模块能够根据实际需要,进行直线、多次(二次、三次、四次、五次……)方程、幂函数、指数、4参数或5参数Log-Logistic拟合,并具有批次校准等功能,并能够与医院LIS系统连接。

[0107] 如图2和图3所示,为提高最终检测结果的准确性和待测样品的稳定性,所述试剂卡上还开设有稀释液孔,所述稀释液孔用来盛装稀释液;所述待测样品孔、供氧微球试剂孔、受氧微球试剂孔和稀释液孔均覆膜封闭孔口,以保证其中物质的不被污染;所述覆膜为覆硅胶膜,所述硅胶膜与所用试剂具有生物相容性。

[0108] 为方便识别和读取待测样品的信息,所述试剂卡上还设有条形码区,所述条形码区内设有条形码;所述条形码为一维或二维码。

[0109] 对应的,所述POCT分析仪还包括条码扫描模块,所述条码扫描模块用于识别读取条形码中的信息。

[0110] 所述试剂卡的形状为圆形或其他几何形状,所述试剂卡为单人份试剂卡。所述试剂卡及试剂卡内物质的温度为35-45℃,所述试剂加样模块每次转移的物质为5-200μL。

[0111] 实施例6

[0112] 在实施例5的基础上,所述受氧微球试剂孔作为信号检测孔,所述受氧微球试剂孔的侧壁和底部均采用不透明材料制成;所述覆膜为覆高聚塑料膜,所述高聚塑料膜与所用试剂具有生物相容性。

[0113] 所述试剂卡的形状为方形或其他几何形状,所述试剂卡为单人份试剂卡。所述试剂卡及试剂卡内物质的温度为36-38℃,所述试剂加样模块每次转移的物质为20-100μL。

[0114] 需要说明的是,在反应体系中存在稀释液和/或第一试剂时,所述稀释液和第一试剂的添加顺序为:先将所述待测样品与稀释液混合进行稀释操作,稀释完成后,取一定体积稀释后的待测样品加入第一试剂孔,与第一试剂混合之后,继续取一定体积混合后的液体进入供氧微球试剂孔,进行后续流程。

[0115] 试验例

[0116] 下面结合具体案例,对本发明中的均相免疫分析POCT检测方法做进一步说明,由于方法可涉及免疫分析的通用技术方案,下述技术路线仅以夹心法进行阐述:

[0117] 一、受氧微球与抗体的共价偶联制备受氧微球试剂

[0118] 1. 按制备量量取10mg的包被有羧基葡聚糖水凝胶的受氧微球于离心管中,10000rpm,离心60min。

[0119] 2. 弃上清,向沉淀中加入2mg的抗体,50μI的Tween-20 (50mg/ml),再补加一定体积

的0.05M MES pH=6.0,使受氧微球终浓度为10mg/ml。

[0120] 3.超声迅速混匀。

[0121] 4.向离心管加入50 μ l的NaBH₃CN (50mg/ml,0.05M MES pH=6.0配制)混匀,37℃置于旋转混合仪反应36-48h。

[0122] 5.封闭:加入1ml的BSA (50mg/ml,0.05M MES pH=6.0配制),37℃置于旋转混合仪反应12-16h。

[0123] 6.清洗:用0.05M MES缓冲液清洗三次。

[0124] 7.取样测定清洗完毕的受氧微球的浓度、粒径、信号值。

[0125] 二、供氧微球与亲和素的共价偶联制备供氧微球试剂

[0126] 1.供氧微球混悬液处理:吸取一定量的供氧微球于高速冷冻离心机中离心,弃去上清,加入一定量MES缓冲液,超声细胞破碎仪上超声至微粒重新悬浮,加入MES缓冲液调节供氧微球浓度至100mg/ml。

[0127] 2.亲和素溶液配制:称量一定量Avidin (也可以是Streptavidin或Neutravidin),加MES缓冲液溶解至8mg/ml。

[0128] 3.混合:将处理好的供氧微球混悬液、8mg/ml的Avidin以及MES缓冲液,以2:5:1的体积比进行混合,迅速混匀,得到反应液。

[0129] 4.反应:MES缓冲液配制25mg/ml的NaBH₃CN溶液,按照与反应液1:25的体积比加入,迅速混匀。37℃旋转反应48小时。

[0130] 5.封闭:MES缓冲液配制75mg/ml的Gly溶液以及25mg/ml的NaBH₃CN溶液,按照与反应液2:1:10的体积比加入上述溶液中,混匀,37℃旋转反应2小时。再加入200mg/ml的BSA溶液(MES缓冲液),其与反应液体积比为5:8,迅速混匀,37℃旋转反应16小时。

[0131] 6.清洗:向反应好的溶液中加入MES缓冲液,高速冷冻离心机离心,弃上清,加入新鲜MES缓冲液超声法重新悬浮,再次离心,如此清洗3次,最后用少量的受氧试剂缓冲液进行悬浮,测定固含量,将受氧试剂缓冲液调节浓度至10mg/ml。

[0132] 三、生物素标记抗体的制备

[0133] 1.抗体处理:将Anti-HBe (可以是任何其他分析项目对应的抗体)透析于0.1M NaHCO₃溶液,测定抗体浓度并调节至1mg/ml。

[0134] 2.用DMSO配制16.17mg/ml的Biotin溶液。

[0135] 3.标记:取处理好的1mg/ml Anti-HBe标记抗体与配制好的Biotin溶液,二者按照10000:54的体积比进行混合,迅速混匀。2-8℃静置反应12-16小时。

[0136] 4.透析:将反应好的生物素标记抗体透析于生物素标记透析缓冲液(pH=8.00)。

[0137] 5.将透析好的生物素化抗体吸出转移至干净离心管中,取样测定抗体浓度。将质检合格的生物素标记抗体浓度调节至0.5mg/ml。

[0138] 四、质控品的制备

[0139] 以新生牛血清为稀释液,将抗原纯品分别稀释为2个不同浓度的工作液,该工作液即为质控品Q1、Q2。取待检测的质控品Q1、Q2在本公司仪器系统上进行三次重复标定。每次测定10孔,并计算总体均值与SD,均值 \pm 3SD即为质控品浓度测定许可范围。

[0140] 五、校准品的制备

[0141] 抗原纯品用小牛血清(含防腐剂)稀释成系列浓度,用免疫测定用国家标准品校准

后,冷冻保存备用。 -20°C 保存时,有效期2年。

[0142] 试剂盒校准品与相应浓度的国家标准品同时进行分析测定,用4参数或其它模型拟合,要求试剂盒校准品剂量-反应曲线相关系数(r)的绝对值应不低于0.9900;同时两条剂量-反应曲线不明显偏离平行(t 检验);以国家标准品为标准,试剂盒校准品的实测效价与标定效价的比应在0.90-1.10之间。

[0143] 六、上机检测

[0144] 在反应孔中分别加入 $25\mu\text{I}$ 血清样本,再依次加入 $25\mu\text{I}$ 受氧试剂(浓度调节为 $50\mu\text{g}/\text{mI}$)和 $25\mu\text{I}$ 生物素化抗体试剂(浓度调节为 $4\mu\text{g}/\text{mI}$)。然后放入仪器(由成都爱兴生物科技有限公司开发的液相POCT发光仪),由仪器自动按以下步骤操作:振动, 37°C 温育5分钟,再自动加入 $175\mu\text{I}$ 亲和素包被的供氧微球试剂(浓度调节为 $60\mu\text{g}/\text{mI}$)后 37°C 温育10分钟。仪器自动产生激光照射微孔计算每孔发光光子量。

[0145] 七、实施检测评价实例

[0146] 1、测定批内精密度

[0147] 待测样品:根据“四、质控品的制备”制备的高低水平质控血清

[0148] 过程:重复检测20次

[0149] 离群点的判定标准: $\geq 3\text{SD}$

[0150] 检测结果如下表:

[0151] 检测表1

[0152]

	HBsAg		Anti-HBs		HBeAg		Anti-HBe		Anti-HBc	
	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H
1	11.76	231.07	23.40	235.06	1.53	25.73	1.25	10.63	5.57	18.07
2	11.56	234.63	22.41	232.77	1.53	25.68	1.19	11.45	5.76	18.59
3	11.64	227.24	23.69	230.45	1.49	24.96	1.29	10.74	5.15	17.71
4	12.25	233.28	24.60	231.32	1.37	25.37	1.25	10.41	5.11	18.23
5	12.11	224.18	24.03	235.95	1.48	24.83	1.46	11.45	5.56	18.34
6	11.25	228.92	22.92	242.31	1.37	24.93	1.28	10.77	5.53	18.71
7	12.46	228.60	23.61	227.90	1.49	25.62	1.32	11.19	5.08	18.02
8	12.00	235.84	23.92	228.60	1.42	25.73	1.38	11.45	5.13	17.80
9	11.57	227.90	24.01	236.54	1.42	24.71	1.23	11.90	5.66	19.02
10	12.32	223.16	24.14	235.83	1.34	24.80	1.37	10.64	5.56	17.80

[0153]

11	11.78	230.98	23.74	232.42	1.45	26.00	1.42	10.98	5.99	18.38
12	12.11	235.86	23.24	231.20	1.37	26.53	1.23	11.68	5.55	18.48
13	12.20	239.25	23.58	247.17	1.47	24.60	1.26	11.43	5.33	18.34
14	12.22	218.85	24.60	239.00	1.48	24.74	1.32	11.40	5.76	18.00
15	12.35	234.38	24.37	243.90	1.59	25.16	1.41	10.77	5.33	18.71
16	11.34	229.96	24.14	225.65	1.48	25.85	1.23	11.00	5.54	19.13
17	12.02	230.03	24.36	224.18	1.46	25.48	1.26	11.07	5.08	18.59
18	13.88	235.91	24.59	232.54	1.51	25.68	1.35	11.25	5.49	18.30
19	11.91	232.35	22.83	225.59	1.48	24.61	1.36	10.67	5.19	17.69
20	12.70	223.67	24.90	236.62	1.53	25.44	1.36	10.91	5.03	18.54
Mean	12.07	230.30	23.85	233.75	1.46	25.32	1.31	11.09	5.42	18.32
SD	0.57	5.16	0.66	6.17	0.07	0.54	0.07	0.40	0.27	0.41
CV %	4.72	2.24	2.77	2.64	4.51	2.12	5.52	3.64	5.06	2.26

[0154] 注:

[0155] HBsAg:乙肝病毒表面抗原;

[0156] Anti-HBs:乙肝病毒表面抗体;

[0157] HBeAg:乙肝病毒e抗原;

[0158] Anti-HBs:乙肝病毒e抗体;

[0159] Anti-HBc:乙肝病毒核心抗体;

[0160] L:低质控;

[0161] H:高质控。

[0162] 结果解释:本组实验仅一组CV%超过5%,结果等同于或超过了化学发光技术,说明本检测方法具有很好的精密度。

[0163] 2、测定分析灵敏度

[0164] 样品:零值标准品

[0165] 过程:重复检测20次,得到RLU(信号值)

[0166] 灵敏度:RLU代入校准曲线

[0167] 检测结果如下表:

[0168] 检测表2

[0169]

	HBsAg	Anti-HBs	HBeAg	Anti-Hbe	Anti-HBc
Mean	610	901	162	66482	29511
SD	35	38	17	2870	2090
CV%	5.69	4.26	10.58	4.32	7.08
Mean+2SD	679	978	197	72223	33691
浓度单位	ng/mL	mIU/mL	PEI U/mL	PEI U/mL	PEI U/mL
计算分析灵敏度	0.03	1.04	0.10	1.17	3.82

[0170] 注:

[0171] PEI U/mL,此单位非WHO标准国际单位,因为HBV五项标志物并没有实现全定量,PEI U/mL为德国PauI-Ehrlich-Institute制定,为目前世界最权威的浓度定量单位;

[0172] 结果解释:本组实验显示得结果,与目前国际主流厂家具有一致性;

[0173] 3、本发明所述的均相免疫分析POCT检测方法与PerkinElmer公司的微球体系检测技术的应用体系比较

[0174] 将PerkinElmer公司的微球体系检测技术与所述的均相免疫分析POCT检测方法依上实例平行进行检测对比

[0175] 检测结果如下表:

[0176] 检测表3

[0177]

检测浓度	空白	6ng/l	50ng/ml	500ng/ ml	5µg/ml	20µg/ml
本发明反应体系信号值	6	1044	7151	72564	812320	2839487
光信号方差	1	40	104	2072	9603	21703
检测不精密度(CV)	25.71%	3.83%	1.45%	2.86%	1.18%	0.76%
PerkinElmer 公司微球反应体系信号值	6	487	3423	35201	487390	1238796
光信号方差	1	28	172	1409	14893	36237
检测不精密度(CV)	25.45%	5.75%	5.03%	4.00%	3.06%	2.93%

[0178] 结果解释:本组实验显示得结果,空白背景,本发明与PerkinElmer公司是相当的,但在各浓度表现了更优的精密度和更高的发光效率;

[0179] 最后所应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,所应理解的是,以上所述仅为本发明的具体实施方式而已,并不用于限定本发明的保护范围,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

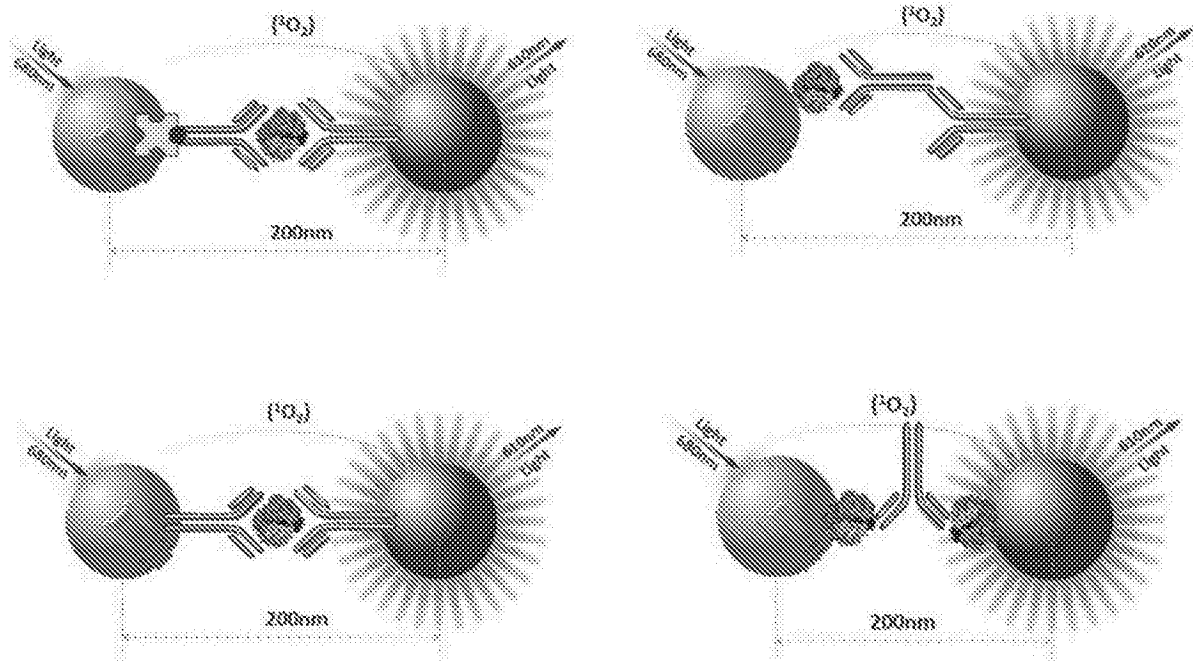


图1

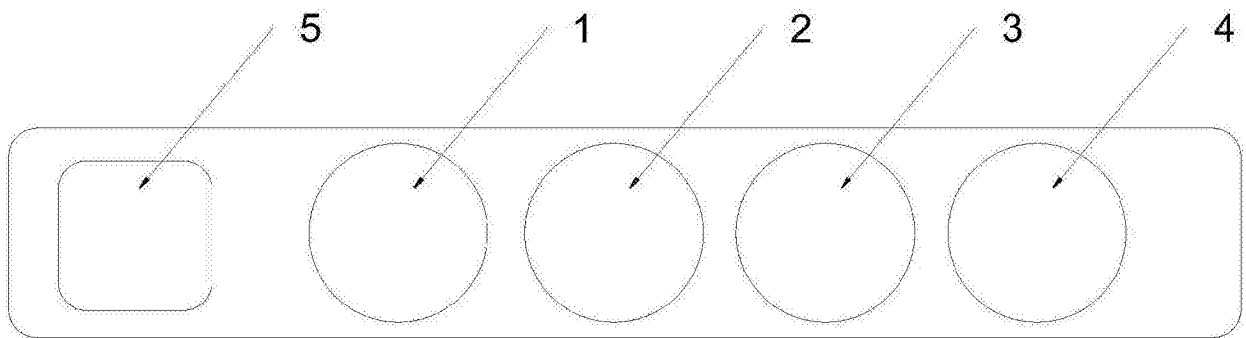


图2

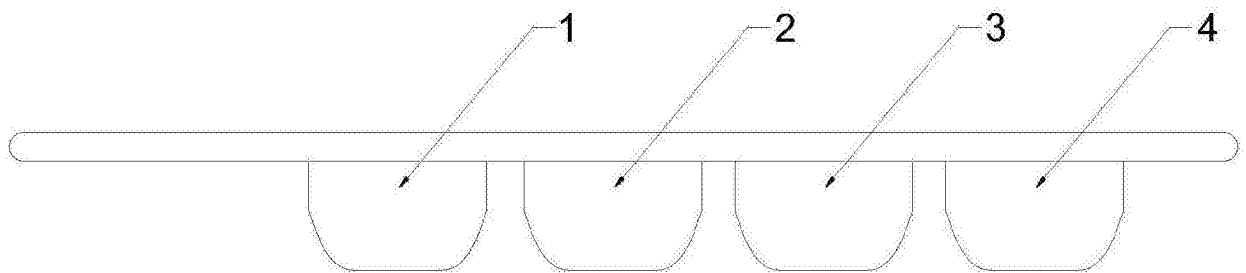


图3

专利名称(译)	一种均相免疫分析POCT检测方法及使用该检测方法的系统		
公开(公告)号	CN105758835B	公开(公告)日	2018-03-27
申请号	CN201610288302.2	申请日	2016-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	成都爱兴生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	成都爱兴生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	成都爱兴生物科技有限公司		
[标]发明人	包德泉		
发明人	包德泉		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	G01N21/6402 G01N33/5302 G01N33/577		
代理人(译)	王金宝		
审查员(译)	李乐		
其他公开文献	CN105758835A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种均相免疫分析POCT检测方法及使用该检测方法的系统。所述均相免疫分析POCT检测方法兼有化学发光免疫分析技术的高灵敏度、高精密度和宽范围，同时具有POCT检测技术快速、便携等特点；另外，所述均相免疫分析POCT检测方法由于是纯液相检测，克服了NC膜带来的CV较高的问题，因此检测精密度高，一般CV可控制在5%以内，使POCT检测技术在精密度方面可以达到甚至超过化学发光免疫分析技术的水平。所述使用均相免疫分析POCT检测方法的系统，将试剂卡和POCT分析仪分开设计，使用试剂卡采集待测样品，便于携带。

