[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 33/53
G01N 33/551 G01N 21/55
G01N 21/59

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02160691.9

[43] 公开日 2003 年 6 月 18 日

[11] 公开号 CN 1424584A

[22] 申请日 2002.12.30 [21] 申请号 02160691.9

[71] 申请人 上海交通大学
地址 200030 上海市华山路 1954 号
共同申请人 苏州市第二人民医院
[72] 发明人 窦晓鸣 于常青 赵海鹰 黄梅珍
殷光中

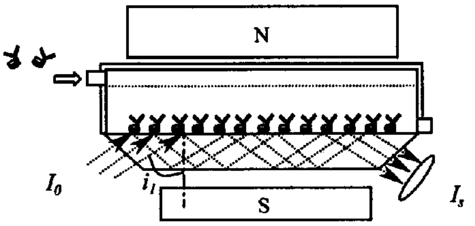
[74] 专利代理机构 上海交达专利事务所
代理人 毛翠莹

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

[54] 发明名称 磁分离型免疫反应光学检测装置及检测方法

[57] 摘要

一种磁分离型免疫反应光学检测装置及检测方法，检测装置主要由底板光波导、免疫反应池和磁极构成，使用包被有抗体的磁性粒子作为反应底物，样品中抗原的含量通过检测波导中光强度在抗原—抗体免疫反应前后的比值或免疫反应前后的全反射临界角的变化得到。 本发明由于磁极的作用，磁性粒子协同免疫反应生成物被吸附在免疫反应池底部，在有限溶质(例如抗原)存在情况下，使溶液浓度(例如抗原浓度)在反应池底部发生最大变化，提高了样本的检测灵敏度，实现了实时、灵敏、准确和灵活多样的免疫反应检测，无需荧光标记，B/F 分离过程简单，提高了使用效费比，具有明显的经济效益和社会效益。



ISSN1008-4274

1、一种磁分离型免疫反应光学检测装置，其特征在于反应池（2）底部与梯形结构的底板光波导（1）相连，反应池（2）的侧板上开有进液口（3），与之相对的另一侧开有出液口（4），免疫反应池（2）的下方和上方放置磁极（5），石英底板光波导（1）的出光处放置聚光镜（6）。

2、一种利用权利要求 1 所说的磁分离型免疫反应光学检测装置的检测方法，其特征在于先将抗体包被在磁性粒子上组成溶液，投入反应池（2）中，加上磁极（5），使磁性粒子被吸附在反应池底部，再用激光照射底板光波导（1），调整入射角度，使光波在光波导表面发生全反射，在聚光镜（6）后面探测波导此时的出射光强作为光背景入射光强，然后在反应池中投入含有抗原的溶液，反应后用缓冲液将溶液中游离的抗原清洗掉，检测波导的出射光强，根据反射光强与入射光强的比值计算溶液折射率，并计算溶液中抗原浓度。

3、一种利用权利要求 1 所说的磁分离型免疫反应光学检测装置的检测方法，其特征在于先将抗体包被在磁性粒子上组成溶液，投入反应池（2）中，加上磁极（5），使磁性粒子被吸附在反应池底部，再用激光照射底板光波导（1），调整入射角度，使光波在光波导表面发生全反射，在聚光镜（6）后面探测波导此时的出射光强作为光背景入射光强，然后在反应池中投入含有抗原的溶液，反应后用缓冲液将溶液中游离的抗原清洗掉，改变激光入射角度，使入射光在此时发生全反射，根据两次全反射角度差计算溶液折射率，并计算溶液中抗原浓度。

磁分离型免疫反应光学检测装置及检测方法

技术领域:

本发明涉及一种磁分离型免疫反应光学检测装置 及检测方法，是一种在磁性粒子表面吸附抗体，进而进行抗原-抗体免疫反应的定性、定量检测的光学检测装置，并利用这种新型检测装置进行免疫反应检测的方法。

背景技术:

免疫反应检测一直是生物医学中的重要研究课题 ，也是分子生物学、医学基础研究、临床诊断、新药开发、食品卫生监督和生物武器战争等领域中的一个重要手段。对免疫反应检测的要求是特异性的定量检测 ，并且要求检测灵敏度高、样品量小、检测过程迅速。目前，实时快速的抗原-抗体免疫反应测定装置大多基于测量免疫复合物的吸收或散射的光学测定法 、荧光免疫测定法和发光免疫测定法。

利用散射光的方法（即单相免疫测定法）是一种既不需要 B-F 分离也不需要洗涤的简单方法，但是，利用散射光（包括瑞利散射和米氏散射 ）的方法在测定低浓度的物质时存在检测灵敏度低和测定精度差等缺点。

荧光免疫测定法和发光免疫测定法都是利用光物质或化学发光物质标记的抗原与抗体反应，产生标记有荧光物质分子的抗原 -抗体反应的免疫复合物 ，通过测定来自标记物的荧光或发光，测定靶物质的含量。这两种方法都需要用荧光或发光物质分子标记抗原或抗体的复杂的化学处理过程 。而且，多数是多相免疫测定法，该测定方法必然需要 B-F 分离，以便通过大量的分析步骤使发生抗原 -抗体反应的免疫复合物 （B）与未发生抗原-抗体反应的抗原或抗体 （F）分离并进行洗涤。

有一种荧光免疫测定装置 ，是将抗体固定在全反射棱镜的表面上 ，然后，通过抗原-抗体反应使样品中所含的抗原结合到抗体上 ，再通过抗原-抗体反应使一种利用荧光物质标记的抗体再结合到这个抗原上。其后进行 B-F 分离以除去利用荧光物质标记的未反应的抗体 ，然后将激发光导入全反射棱镜中以激发束缚在全

反射棱镜表面上的被标记的抗原-抗体免疫复合物，从而测定出荧光物质所产生的荧光。这种方法虽然简化了B-F分离过程，但是，仍需要复杂的荧光标记过程，又由于抗体是固定在全反射镜表面上的，每进行一次免疫反应后，都要重新更换全反射镜，使用成本高、灵活性差。

发明内容:

本发明的目的在于针对现有技术的不足，提供一种新型磁分离型免疫反应光学检测装置及检测方法，能实现实时、灵敏和准确的免疫测定，无需荧光标记，简化B/F分离过程。

为实现这样的目的，本发明提出的磁分离型免疫反应光学检测装置的基本结构由底板光波导、免疫反应池和磁极构成，使用包被有抗体的磁性粒子作为反应底物。由于磁极的作用，磁性粒子协同免疫反应生成物被吸附在免疫反应池底部，在有限溶质存在情况下，使溶液浓度在反应池底部发生最大变化。通过检测波导中光强度在抗原-抗体免疫反应前后的比值或免疫反应前后的全反射临界角的变化得到样品中抗原的含量。

本发明免疫反应池底板为梯形石英平板波导结构，四周和顶部粘结玻璃挡板组成反应池。在反应池四周挡板中任选一面，在该面靠近顶部的位置开一个垂直于该挡板的通孔，在该通孔中粘结一段玻璃管，作为免疫反应池的进液口；在与进液口所在挡板相对的反应池另一侧的挡板下方靠近反应池底部，按照制作进液口的方法制作出液口。反应池底板（即石英平板波导）为梯形结构，其中可以传播近紫外光、可见光和近红外光，通过调整适当的光入射角，在波导的上下表面形成全反射。

磁极由磁铁或通电线圈构成，N 极和 S 极分别放置于免疫反应池的正上方和正下方，在使用时，可以根据要求施加和撤掉磁场。

利用溶液浓度变化而导致的溶液折射率变化，采用全反射光学检测方法测定溶液浓度是一项较为成熟的技术。本发明延续使用这种检测方法，创新之处在于使用磁性粒子，借助于磁场作用，在有限溶质（例如抗原）存在情况下，使溶液浓度（例如抗原浓度）在反应池底部发生最大变化。如果不使用磁性粒子，则溶质（例如抗原）均匀地分散在溶液中。两者相比较，在使用同样多的溶质情况下，本发明方法在反应池底部产生的浓度变化远大于后者，折射率的变化也是如此。

其结果是，本发明方法的检测灵敏度高于后者。

在使用本发明的装置进行免疫测定时，先在反应池中投入含有包被抗体的磁性粒子（例如永磁铁氧体、钡铁氧体、合金磁粉和稀土永磁材料等磁性粒子）溶液，在反应池底部施加磁场，磁性粒子携带吸附在其上的抗体被吸附到样品池底部。再投入含有抗原的溶液，发生抗原-抗体免疫反应。这样，反应池底部区域的溶液折射率发生很大变化，波导中传播的光能量更多地耦合入反应池中的溶液，因此，从波导中出射光的强度减弱。另外，由于反应池底部的折射率变化，导致入射光的全反射临界角改变。因此，利用这两个特性，可以进行低浓度的抗原-抗体免疫反应定量分析。检测结束后，撤去磁场，加高压水清洗反应池，本发明的装置可被反复使用。

本发明装置有两种检测途径，即检测全反射临界角或反射光强度与溶液折射率的变化关系。下面具体说明本发明的检测原理。

光从光密媒质（石英波导）向光疏媒质（溶液）传输时，在两媒质界面可能发生全反射，发生全反射的条件是：

$$i_c = acr\sin\left({}^{n_2}\!\!/_{n_1}\right) \qquad (1)$$

其中i_c是临界角（发生全反射的最小入射角），n_1和n_2分别是波导和溶液的折射率。公式（1）所示，当$n_1 > n_2$时，i_c才有实值，即要求溶液折射率n_2小于波导折射率n_1。溶液的折射率与其浓度一般存在如下关系：

$$n_2 = \alpha C \qquad (2)$$

其中C为液体浓度，α是与液体性质有关的常数，公式（1）和（2）建立了溶液浓度C和临界角i_c的关系：

$$C = \frac{n_1}{\alpha}\sin i_c \qquad (3)$$

由公式（1）和（3）可知，测得溶液折射率的变化即可知道溶液浓度的变化，因此，测量浓度归结为测量折射率。

入射光在界面的反射光强I_s与溶液折射率n_2的关系可以通过菲涅耳公式来计算得到。菲涅耳公式中，光波垂直方向振幅反射率系数表示为：

$$r_s = \frac{n_1\cos i_1 - n_2\cos i_2}{n_1\cos i_1 + n_2\cos i_2} \qquad (4)$$

其中，i_1和i_2分别为入射角和折射角。反射光强为：

$$I_s = I_0 r_s^2 \qquad (5)$$

其中I_0是入射光强。溶液的折射率与入射临界角是一一对应关系，我们取溶液某一折射率n_2^0所对应的临界角i_c^0为固定的入射角i_1，折射角i_2可由斯奈尔公式（6）求出。

$$n_1 \sin i_1 = n_2 \sin i_2 \qquad (6)$$

联合公式（4）（5）（6），可得到光波垂直方向振幅分量反射光强I_s与溶液折射率n_2的关系式

$$I_s = I_0 \left(\frac{n_1 \cos i_c^0 - \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 i_c^0}}{n_1 \cos i_c^0 + \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 i_c^0}} \right)^2 \qquad (7)$$

本发明的检测装置结构简单，在免疫反应池的底部使用平板波导，波导的入射光角度可以调节，使光在波导中产生全反射，并利用磁性分离技术，实现了实时、灵敏、准确和灵活多样的免疫反应检测，无需荧光标记，B/F分离过程简单，并具有较高的精度，因此，提高了使用效费比，具有明显的经济效益和社会效益，利于普及推广和应用。

附图说明

图1 本发明磁分离型免疫反应光学检测装置的结构示意图。

图1中，1、底板光波导，2、免疫反应池，3、进液口，4、出液口，5、磁极，6、聚光镜。

图2 将包被有抗原的磁性粒子吸附在免疫反应池底部。

图3 抗原投入发生免疫反应后，清洗掉游离抗原。

图4 抗原—抗体反应复合物检测。

图5 清洗免疫反应池。

图6 光波垂直方向振幅分量反射光强与溶液折射率关系曲线。

图7 溶液折射率与全反射临界角的关系曲线。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明的技术实施过程作进一步说明。

如图 1 所示，本发明检测装置的基本结构由底板光波导 1、免疫反应池 2 和

磁极 5 构成，反应池 2 底部与梯形结构的底板光波导 1 相连，反应池 2 某一侧挡板上部开有进液口 3，与之相对的反应池 2 另一侧挡板下部开有出液口 4，磁极 5 的 N 极和 S 极分别位于反应池 2 正下方和正上方，聚光镜 6 位于底板光波导 1 出光处，垂直于出光方向放置。

在本发明的一个实施例中，首先按图 1 所示的结构图组成系统，检测过程为：

1. 将抗体（例如鼠免疫球蛋白 G）包被在磁性粒子上，组成溶液，将固定体积的混合溶液通过进液口（3）投入反应池（2）中。
2. 加上磁极（5），则包被有鼠免疫球蛋白 G 的磁性粒子被吸附在反应池底部（图 2）。
3. 用固定波长（λ）和强度（I_0）的激光（偏振方向垂直于入射光和反射光决定的平面）照射底板光波导，调整入射角度为 i_c^0，使得光波在光波导表面发生全反射，这时入射光强 I_0 与波导出射光强 I_s^0 相等。在聚光镜（6）后面探测波导此时的出射光强 I_s^0 作为光背景(入射光强)。记录此时的全反射临界角 i_c^0 并计算折射率 n_2^0。
4. 在反应池中投入固定浓度和体积的含有抗原（例如鼠球蛋白 G）的溶液，反应后用缓冲液将溶液中游离的抗原清洗掉。(图 3)
5. 检测波导的出射光强 I_s（图 4）。
6. 如果用反射光强检测法，则用这时的光强度 I_s 除以光背景 I_0，再用公式（7）计算溶液折射率。图 6 给出了 $n_2^0 = 1.34$，$n_1 = 1.458$，对应的临界角 $i_c^0 = 66.8°$ 时反射光强与入射光强的比值与溶液折射率变化的关系曲线。图中可见，溶液折射率在 1.34-1.36 范围的微小变化，会引起反射光强度的剧烈衰减。因此，根据反射光强度的减小可以测定溶液折射率（浓度）变化量。如果使用全反射临界角检测法，则改变此时的光入射角为 i_c，使得这时的输出光强度等于入射光强度 （光背景），再用公式（1）计算溶液折射率。计算曲线见图 7，图中画出了两种波导材料（折射率分别为 1.458 和 1.54）的情况。
7. 用得到的溶液折射率代入公式（3）计算溶液中抗原浓度。
8. 检测结束后，撤去磁极（5），用高压水流对反应池进行清洗（图 5），该检测装置可重复使用。

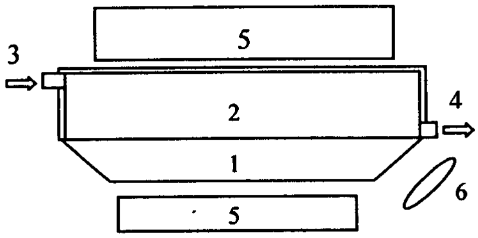


图 1

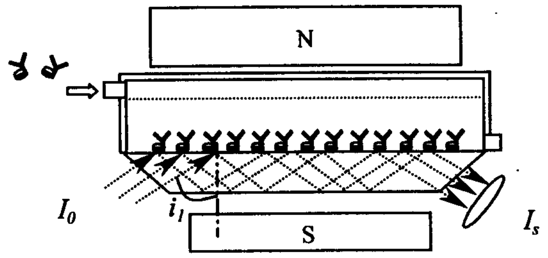


图 2

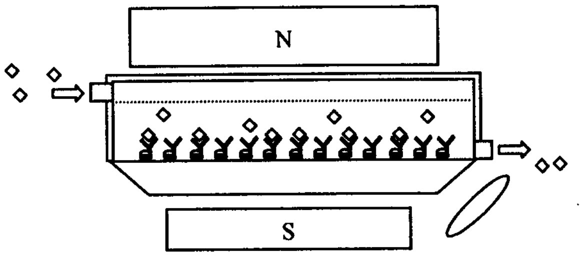


图 3

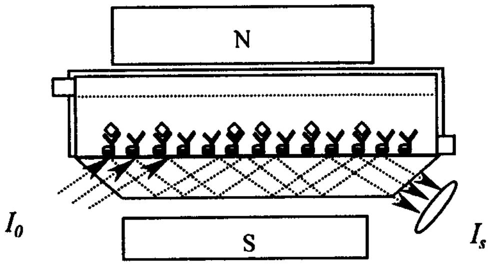


图 4

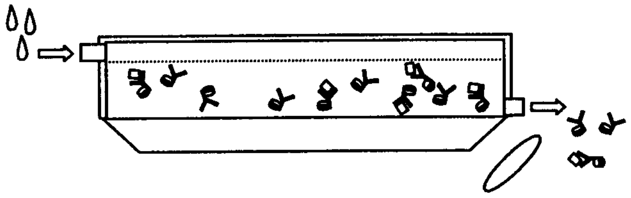


图 5

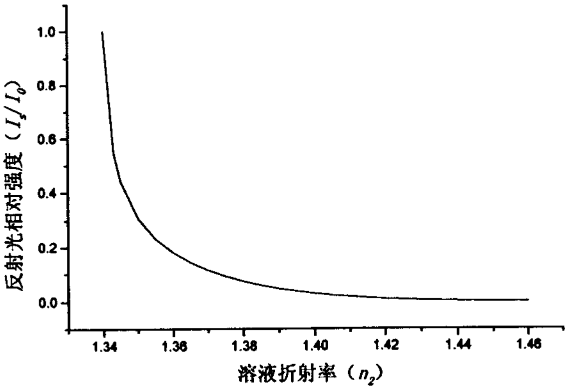

反射光相对强度（I_s/I_0）
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1.34
1.36
1.38
1.40
1.42
1.44
1.46
溶液折射率（n_2）

图6

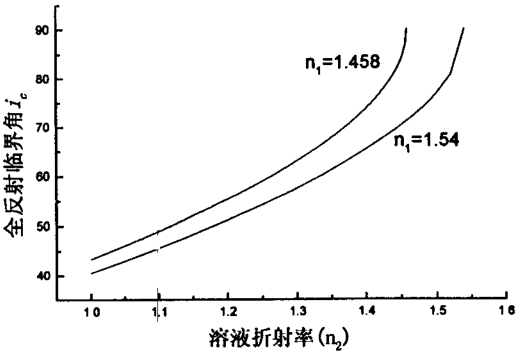
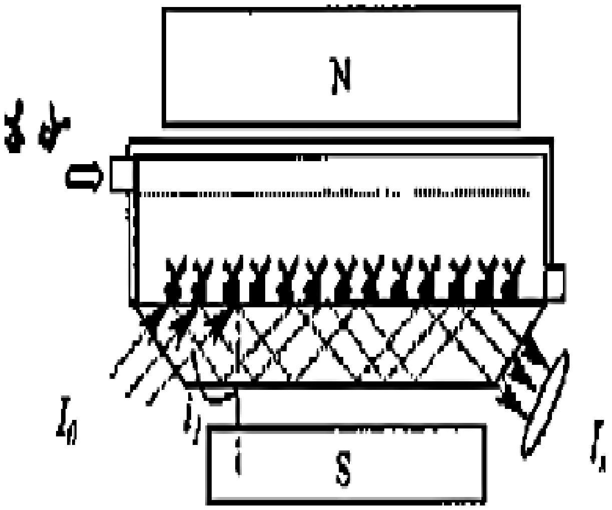

全反射临界角i_c
90
80
70
60
50
40
n_1=1.458
n_1=1.54
1.0
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
1.6
溶液折射率(n_2)

图7

专利名称(译)	磁分离型免疫反应光学检测装置及检测方法		
公开(公告)号	CN1424584A	公开(公告)日	2003-06-18
申请号	CN02160691.9	申请日	2002-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	窦晓鸣 于常青 赵海鹰 黄梅珍 殷光中		
发明人	窦晓鸣 于常青 赵海鹰 黄梅珍 殷光中		
IPC分类号	G01N21/55 G01N21/59 G01N33/53 G01N33/537 G01N33/551		
其他公开文献	CN1184482C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种磁分离型免疫反应光学检测装置及检测方法，检测装置主要由底板光波导、免疫反应池和磁极构成，使用包被有抗体的磁性粒子作为反应底物，样品中抗原的含量通过检测波导中光强度在抗原－抗体免疫反应前后的比值或免疫反应前后的全反射临界角的变化得到。本发明由于磁极的作用，磁性粒子协同免疫反应生成物被吸附在免疫反应池底部，在有限溶质(例如抗原)存在情况下，使溶液浓度(例如抗原浓度)在反应池底部发生最大变化，提高了样本的检测灵敏度，实现了实时、灵敏、准确和灵活多样的免疫反应检测，无需荧光标记，B/F分离过程简单，提高了使用效费比，具有明显的经济效益和社会效益。