



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101769918 A

(43) 申请公布日 2010.07.07

(21) 申请号 200810237015.4

(22) 申请日 2008.12.31

(71) 申请人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路 1 号重
庆医科大学 103 信箱

(72) 发明人 熊兴良

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/21 (2006.01)

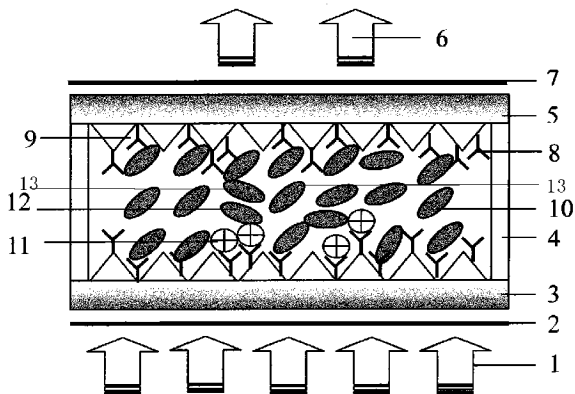
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

(54) 发明名称

基于液晶取向变化的免疫检测方法

(57) 摘要

一种基于液晶取向变化的免疫检测方法。利用共价固定方法将抗体（或抗原）固定到硅烷化玻璃基底上并通过摩擦机摩擦其表面形成沟槽，使液晶分子在该基底上呈整齐均一的取向排列，造成偏振光不能通过。当外来特异性抗原（或抗体）与基底上固定的抗体（或抗原）发生免疫反应引起整齐均一取向的液晶分子发生取向变化，造成取向变化的区域偏振光通过。偏振光通过量的大小与抗原（或抗体）浓度呈正相关。偏振光通过量的大小采用图像加权平均灰度值表征。利用图像加权平均灰度值定量分析抗原（或抗体）的浓度。该方法提供了一种简便、灵敏、非标记的光学免疫检测方法。



1. 一种基于液晶取向变化的免疫检测方法。其特征在于利用特异性的免疫反应引起液晶取向改变造成偏光图像的差异,利用这种差异检测免疫分子。

2. 根据权利要求 1 所述的一种基于液晶取向变化的免疫检测方法,其特征在于利用共价固定方法将抗体(或抗原)固定到硅烷化玻璃基底上并通过摩擦机摩擦其表面形成沟槽,使液晶分子在该基底上呈整齐均一的取向排列,造成偏振光不能通过。当外来特异性抗原(或抗体)与基底上固定的抗体(或抗原)发生免疫反应引起整齐均一取向的液晶分子发生取向变化,造成取向变化的区域偏振光透射通过。

3. 根据权利要求 1 所述的一种基于液晶取向变化的免疫检测方法,其特征在于偏振光通过量的大小与抗原(或抗体)浓度呈正相关。偏振光通过量的大小采用图像加权平均灰度值表征。利用图像加权平均灰度值定量分析抗原(或抗体)的浓度。

4. 根据权利要求 1 所述的一种基于液晶取向变化的免疫检测方法,其特征在于所述图像加权平均灰度值的计算算法为首先进行两副图像相减,然后计算整幅图像中某一灰度值乘该灰度值的相应像素数并求出总和,利用上述结果除以整幅图像的总像素数即得到图像加权平均灰度值。

基于液晶取向变化的免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明为一种免疫检测方法,尤其涉及基于免疫反应引起液晶取向变化的免疫学检测方法。

技术背景

[0002] 免疫物质(如抗体、抗原)的分析检测对于临床诊断、医学基础研究具有重要的意义。对抗原和抗体进行特殊标记是免疫检测技术的关键。常规的免疫技术包括荧光免疫技术、放射免疫技术和酶联免疫技术。放射免疫技术虽然灵敏度高,但存在放射污染以及放射物处理等问题;酶联免疫技术虽然避免了放射污染,但灵敏度却达不到放射免疫技术的水平;荧光免疫技术由于检测手段复杂,发光时间短,导致应用范围窄,灵敏度不高。上述三种免疫技术都属于典型的实验室检测方法,即:需要昂贵的检测设备;需专业人员操作;需要复杂的标记技术等。

[0003] 液晶为物质第四态,其分子排列有取向序(具有光学各向异性),而无位置序(具有流动性)。这种中间相使得液晶介于固态晶体(同时拥有位置序和取向序)和各向同性液体(没有长程位置序)之间,由于液晶这种兼具液体与晶体的性质使得液晶材料具有对物理、化学以及生物刺激反应极其敏感(非常容易引起液晶内分子取向的变化,造成指向失紊乱)和光学信号的放大作用(与晶体相比在相同刺激下更易引起光的折射率等光学参数的变化),所以非常适合用于生物分子的检测。

[0004] 液晶无论是用于平板显示器,还是用于检测温度、压力、位移等物理量或化学分子、生物分子时,其液晶分子的取向排列技术都是非常重要的一环。利用液晶作为传感材料检测化学物质和生物物质已有一些报道(Gupta V K. Science, 1998, 279:2077-2080),但其液晶分子的取向排列技术采用在玻璃基底表面制作金纳米沟槽的方法在制作上和工艺上具有很高的难度,采用制作金微米沟槽的方法(赵建军,分析化学,2006,34(10):1401-1405)也存在相同的问题。另外,在定量检测方面采用测量透过液晶层的透光强度的方法增加了测量的复杂性。

发明内容

[0005] 本发明目的在于克服现有方法的不足,提供一种无须标记、操作简单、灵敏度高的免疫检测方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明结合免疫反应的特异性、液晶取向排列技术、图像处理技术。采用的具体技术方案为:采用3-氨基丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyltriethoxysilane, 3-APTES)硅烷化玻璃基底,然后采用戊二醛(glutaraldehyde, GA)交联法将抗体(或抗原)固定化在玻璃基底上,接着利用摩擦机对固定化抗体(或抗原)的玻璃基底进行摩擦以产生沟槽,最后采用两片经上述处理的玻璃基底中间以开孔聚酯片间隔组装为液晶盒,液晶盒内灌注热致液晶。液晶在玻璃基底上沿沟槽方向呈沿面水平的整齐均一取向,这种取向造成正交偏振光不能透过液晶盒,从而在

出射光处形成一幅全黑的图像。当外来特异性抗原（或抗体）与基底上固定的抗体（或抗原）发生免疫反应使沟槽消失引起原先为整齐均一取向的液晶分子发生取向改变（液晶指向失发生紊乱），造成液晶取向变化的区域偏振光通过液晶盒，从而在出射光处形成一幅有亮斑分布的的图像。代表偏振光通过量的亮斑大小及数量与抗原（或抗体）浓度呈正相关。偏振光通过量的大小采用图像加权平均灰度值表征，利用图像加权平均灰度值定量分析抗原（或抗体）的浓度。

[0007] 图像加权平均灰度值的计算算法为：首先采集一幅液晶盒内未发生免疫反应时的初始状态图像（称为图像 A）；然后采集一幅液晶盒内免疫反应进行了一段时间后的图像（称为图像 B）；接着将两副图像做算术相减运算（图像 B- 图像 A）得到一幅新图像（称为图像 C），最后对图像 C 做加权平均灰度值计算。其具体计算公式如下：

$$[0008] \quad g_w = \frac{\sum_{i=0}^{255} i \times T_i}{T} \quad (1)$$

[0009] 式中： g_w - 图像 C 的加权平均灰度值

[0010] i - 图像 C 中某一灰度值

[0011] T_i - 图像 C 中灰度值为 i 的像素数

[0012] T - 图像 C 的总像素数

[0013] 采用免疫反应前后两幅图像相减可以克服由于液晶排列不完全整齐均一情况以及灰尘或其他非特异性吸附带来的测量误差。

[0014] 本发明的优点：

[0015] (1) 免疫物质不需要做任何标记处理；

[0016] (2) 检测时只需将待测样品加入液晶盒并置于正交偏光条件下采集图像，测量步骤简单；

[0017] (3) 采用粘度小的液晶材料，响应时间快；

[0018] (4) 液晶具有特殊的光学放大效应，响应灵敏度高。

[0019] (5) 采用图像加权平均灰度值定量待测物浓度，无须额外的光学检测设备。

附图说明

[0020] 本发明有如下附图：

[0021] 附图 1 玻璃基底表面抗体（或抗原）固定化过程示意图；

[0022] 图 1 中：1 为玻璃基底；2 为 3- 氨基丙基三乙氧基硅烷（3-aminopropyltriethoxysilane, 3-APTES）；3 为戊二醛（glutaraldehyde, GA）；4 为抗体（或抗原）。

[0023] 附图 2 摩擦处理后的玻璃基底示意图；

[0024] 附图 3 液晶在摩擦处理后的玻璃基底上的取向示意图；

[0025] 图 2 和图 3 中：1 为玻璃基底；2 为抗体（或抗原）；3 为液晶；4 为沟槽；5 为液晶的指向矢。

[0026] 附图 4 聚酯片加工结构；

[0027] 图 4 中：1 为聚酯片；2 为方孔；3 为液晶灌注孔

[0028] 附图 5 液晶盒结构示意图；

[0029] 附图 6 基于液晶取向变化的免疫检测方法原理（未发生免疫反应）示意图；

[0030] 附图 7 基于液晶取向变化的免疫检测方法原理（发生免疫反应）示意图；

[0031] 图 5、图 6 和图 7 中：1 为入射光；2 为下偏振片；3 为下玻璃基底；4 为聚酯片；5 为上玻璃基底；6 为出射光；7 为上偏振片；8 为抗体（或抗原）；9 为沟槽；10 为整齐均一取向的液晶；11 为待测抗原（或抗体）；12 为取向发生改变的液晶；13 为取向发生改变的邻近液晶。

[0032] 附图 8 液晶处于整齐均一取向情况下的光学图像；

[0033] 附图 9 液晶取向发生改变情况下的光学图像。

具体实施方式

[0034] 本发明的实施结合附图 1-9 说明如下：

[0035] 使用本发明提供的方法需要制作液晶盒，同时还需要一套偏光系统以及图像采集和处理系统来辅助完成。

[0036] 一、液晶盒的结构与制作

[0037] 图 5 为本发明所涉及的液晶盒的结构，由上下两个玻璃基底（5 和 3）、中间间隔一层聚酯片（4）。其中：玻璃基底上有摩擦机摩擦出的沟槽（9）和固定化的抗体（或抗原）（8）。结合图 4 说明聚酯片的加工结构及尺寸，厚度为 $5\mu\text{m}$ ，长宽与玻璃基底完全相同，材料采用杜邦公司的 Mylar 系列产品，Mylar 聚酯片中间开一方孔（2），方孔尺寸为 $1.5\text{cm}\times 1.5\text{cm}\times 5\mu\text{m}$ ，用于容纳液晶（10），与方孔连通的为液晶灌注孔（1），该孔的宽度取 $0.1\sim 0.2\text{cm}$ 为宜。

[0038] 下面结合图 1、图 2、图 3、图 4 和图 5 详细介绍液晶盒的制作步骤：

[0039] 1、玻璃基底的预处理

[0040] 玻璃基底采用显微镜用载玻片，将其切割成长宽分别为 $2\text{cm}\times 2\text{cm}$ 的尺寸；然后用热 Piranha 溶液（含 $70\%\text{H}_2\text{SO}_4$ 和 $30\%\text{H}_2\text{O}_2$ ）清洗约 1h；接着用去离子水清洗 5-6 次；接着用氮气吹干；清洗干净后的玻片置于 120°C 烘箱干燥至少 3h。玻璃片进行表面处理有两个目的，一是去除玻璃基底表面的污垢；二是使玻璃基底富含羟基。

[0041] 2、抗体（或抗原）固定化

[0042] 结合图 1 说明抗体（或抗原）在玻璃基底上的固定化步骤。将经预处理后玻璃基底（1）置于含 10% 的 3-氨丙基三乙氧基硅烷（2）的醋酸钠-醋酸缓冲溶液（ 10mM , $\text{pH} 5.0$ ）在 80°C 下反应 3h，使玻璃基底成为氨丙基化的玻璃基底（3）；然后用去离子水洗涤干净氨丙基化的玻璃基底再置于 120°C 烘箱干燥 3h 左右；接着将该玻璃基底浸入 30°C 0.3mol/L 戊二醛溶液（4）约 30min，使氨丙基化的玻璃基底醛基化（5），再用水清洗后空气中晾干；然后将醛基化玻璃基底浸入 5mL 抗体（或抗原）溶液（6）中，在 30°C 下反应 60min，接着用磷酸盐缓冲液（PBS, $\text{pH} = 7.2$ ）和去离子水清洗后，于空气中晾干。最后用 0.1g/L BSA 封闭未反应的醛基，清洗晾干。这样就得到一个固定化抗体（或抗原）的玻璃基底（7）。

[0043] 3、摩擦

[0044] 将上述固定化了抗体（或抗原）的玻璃基底利用摩擦机（液晶显示器生产用的玻片摩擦机，如 RL04-1 型）摩擦其表面，摩擦机参数调节为：摩擦材料采用绒布；走布速度

4.0mm/s;压力为 10^3Pa ;摩擦时间为1min。经摩擦处理后的玻璃基底结构如图2所示,对图2需要进一步说明的是:该图为示意图,图中玻璃基底(1)、抗体(或抗原)(2)以及沟槽(4)的比例不是实际比例,玻璃基底尺寸为厘米数量级;抗体(或抗原)是纳米数量级;而沟槽尺寸为亚微米数量级。

[0045] 4、液晶盒的封装

[0046] 取两片按上述方法处理好的玻璃基底(图2)使摩擦面面对面的重合并确保摩擦方向一致,中间以Mylar聚酯片(图4)间隔。Mylar聚酯片四周用环氧树脂密封仅留一小孔(图4中1)用于灌注液晶。这样在两玻片之间形成一个 $1.5\text{cm}\times 1.5\text{cm}\times 5\mu\text{m}$ 空间用于容纳液晶。

[0047] 5、液晶材料的灌注

[0048] 为了保证本方法提供的方法具有响应快和不需要附加恒温装置等优点。在液晶材料的选择上需选择粘度小($\eta_0 < 1.8$);材料处于液晶态的温度范围在 $10^\circ\text{C}\sim 40^\circ\text{C}$ 之间;液晶材料中的官能基团能与抗体(或抗原)形成弱结合力。较佳的选择是4-腈基-4'-戊基联苯液晶。

[0049] 液晶的灌注方法为:将4-腈基-4'-戊基联苯液晶加热至 38°C 使之成为各向同性的液态,用玻璃管移液器取几滴该液体利用毛细作用力将液体从液晶灌注孔(图4中3)灌注入两玻璃基底与Mylar聚酯片之间形成的方孔内,直到空间充满为止。移去玻璃管移液器,使液体自然冷却。一旦冷却后,5CB液晶材料就从各向同性的液态转变为向列型的液晶态。此时由于沟槽的作用以及抗体(抗原)与液晶的腈基之间的弱结合力使液晶沿沟槽方向水平取向(图3)。图3中的5代表液晶的指向矢。由于液晶与邻近液晶之间又通过长程力以及范得瓦尔斯力使整个液晶层($5\mu\text{m}$)呈沿沟槽的方向水平取向(如图5所示的液晶取向情况)。

[0050] 二、检测方法

[0051] 本发明用于免疫检测时可通过两种途径进行免疫反应。

[0052] 1、用移液枪取 $10\text{--}20\mu\text{L}$ 待测抗原(或抗体)溶液从液晶盒的液晶灌注孔轻轻推射入液晶层内,静置一段时间使待测液中的抗原(或抗体)扩散到玻璃基底并与基底上的抗体(或抗原)发生免疫反应

[0053] 2、将一片经过抗体(或抗原)固定化和摩擦处理后的玻璃基底置于待测抗原(或抗体)溶液中反应数分钟后,取出用去离子水洗涤3-5次后氮气吹干,按上述液晶盒制作步骤制作成液晶盒。

[0054] 将经过免疫反应后的液晶盒置于偏光系统中,偏光系统采用偏光显微镜也可以自行设计,但自行设计的偏光系统必须保证具有偏光显微镜的基本功能。另外,为了保证本发明的检测效果,检测时最好在暗室或光线很微弱的环境中进行。

[0055] 结合图6、图7、图8和图9说明具体的检测方法。以采用偏光显微镜为例,首先要求偏光显微镜必须配备数码相机(像素不低于400万像素)作为图像采集,系统还须配备计算机作为图像处理之用。首先将未作免疫反应处理的液晶盒放置在显微镜载物台上,调整两偏振片(2和7)使之呈正交状态,此时,入射光(1)入射情况下,由于液晶呈整齐均一的水平取向排列,阻挡了入射光从液晶盒上面出射,位于液晶盒上的数码相机将拍摄到一张全黑的图像(图8)。接着将发生免疫反应后的液晶盒放置在显微镜载物台上,保持两偏

振片 (2 和 7) 呈正交状态, 此时, 入射光 (1) 入射情况下, 由于玻璃基底上发生的免疫反应使沟槽消失引起原先为整齐均一取向的液晶分子发生取向改变 (12), 由于液晶分子之间仅靠长程力、范德瓦尔斯力等弱相互作用力维持整齐取向, 一旦有液晶分子取向发生变化, 立即会引起邻近液晶分子 (13) 也会发生取向改变, 形如多米诺骨牌效应, 造成一个局部区域液晶指向失的紊乱而液晶取向变化的区域偏振光能通过液晶盒 (6), 从而位于液晶盒上方的数码相机将拍摄到一张有亮斑分布的图像 (图 9)。少数液晶分子取向改变造成邻近一个大区域的液晶分子取向的变化即为液晶的光学放大效应, 这也是本发明检测灵敏度高的关键所在。

[0056] 图像 (图 9) 的亮斑多少与待测抗原 (或抗体) 浓度呈正相关, 亮斑多少采用图像加权平均灰度值表征, 利用图像加权平均灰度值定量分析抗原 (或抗体) 的浓度。

[0057] 三、检测方法的标定

[0058] 配置不同浓度梯度的抗原 (或抗体), 利用前述方法计算该浓度下图像加权平均灰度值 (g_w)。对同一浓度反复做 5-6 次并计算的平均值 (G_w)。按上述步骤完成所有浓度下的 G_w 的计算。利用 G_w 作为纵坐标, 抗原 (或抗体) 浓度作为横坐标, 即得到该检测方法的标定曲线。

[0059] 四、定量检测

[0060] 按前述方法计算出待测抗原 (或抗体) 的 G_w , 利用内插法找到标定曲线中相应 G_w 对应的抗原 (或抗体) 的浓度值, 即可得到待测抗原 (或抗体) 的浓度值。

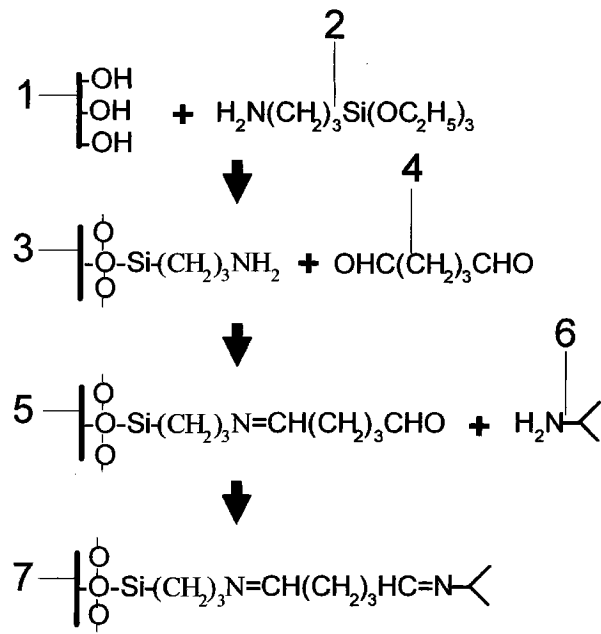


图 1

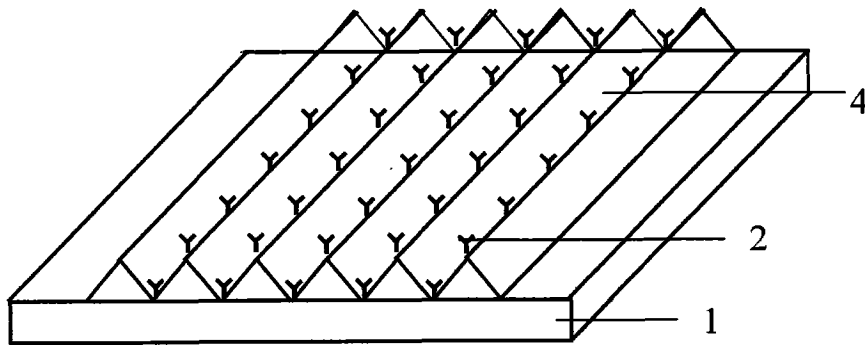


图 2

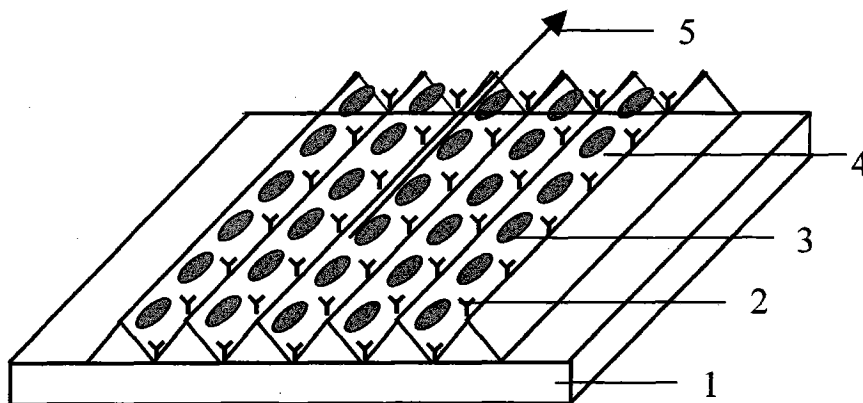


图 3

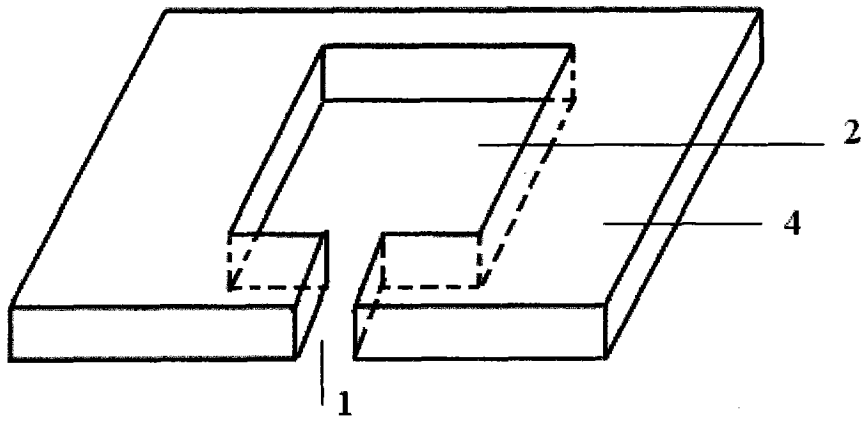


图 4

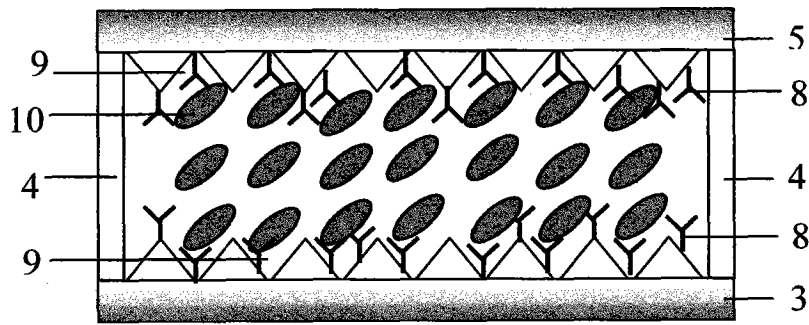


图 5

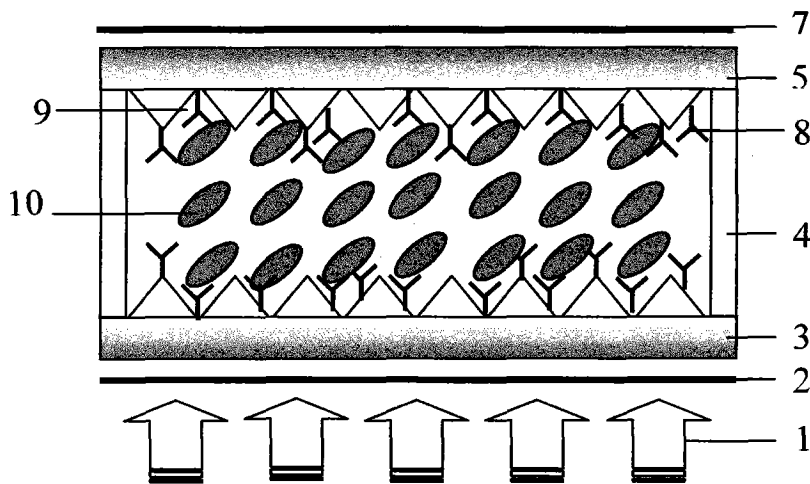


图 6

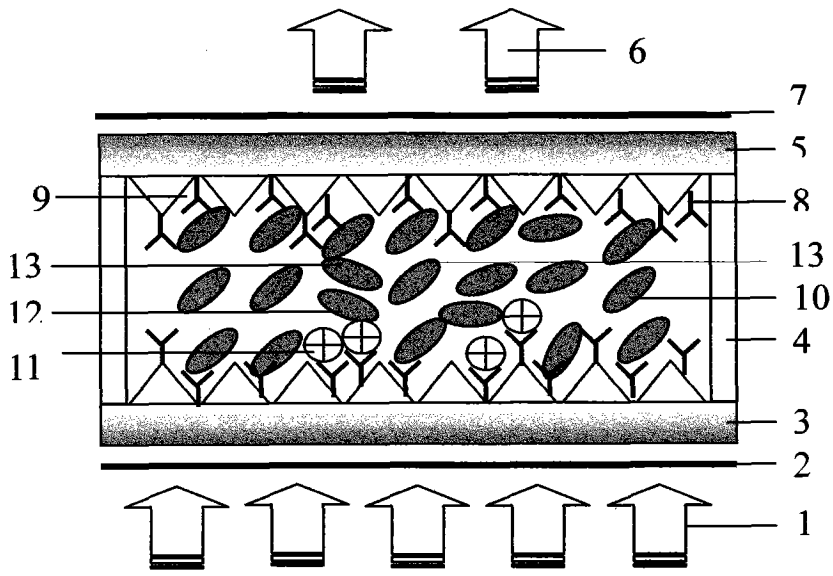


图 7

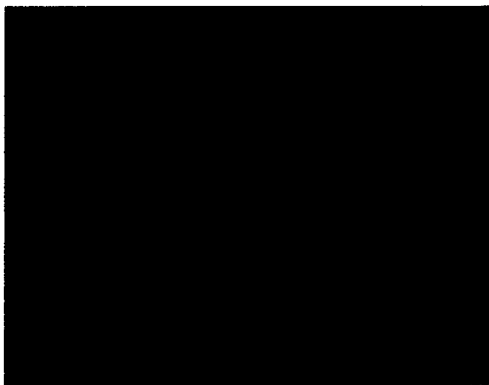


图 8

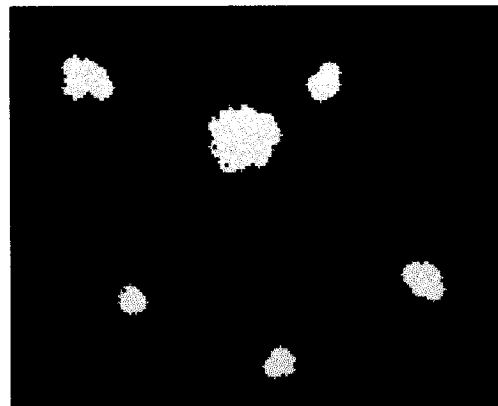


图 9

专利名称(译)	基于液晶取向变化的免疫检测方法		
公开(公告)号	CN101769918A	公开(公告)日	2010-07-07
申请号	CN200810237015.4	申请日	2008-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
[标]发明人	熊兴良		
发明人	熊兴良		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/21		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种基于液晶取向变化的免疫检测方法。利用共价固定方法将抗体(或抗原)固定到硅烷化玻璃基底上并通过摩擦机摩擦其表面形成沟槽，使液晶分子在该基底上呈整齐均一的取向排列，造成偏振光不能通过。当外来特异性抗原(或抗体)与基底上固定的抗体(或抗原)发生免疫反应引起整齐均一取向的液晶分子发生取向变化，造成取向变化的区域偏振光通过。偏振光通过量的大小与抗原(或抗体)浓度呈正相关。偏振光通过量的大小采用图像加权平均灰度值表征。利用图像加权平均灰度值定量分析抗原(或抗体)的浓度。该方法提供了一种简便、灵敏、非标记的光学免疫检测方法。

