



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101865912 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 20

(21) 申请号 200910029449. X

(22) 申请日 2009. 04. 14

(71) 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路 22 号南  
京大学化学化工学院

申请人 江苏省肿瘤医院

(72) 发明人 刘宏 严枫 鞠焜先

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 21/76 (2006. 01)

G01N 33/551 (2006. 01)

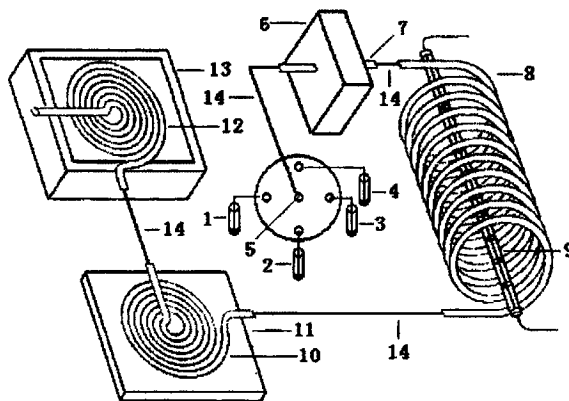
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

快速的化学发光免疫检测系统及分析方法

### (57) 摘要

一种快速的化学发光免疫检测系统及分析方法。该检测系统的溶液传输系统由小试管 (1-4)、多位阀 (5)、蠕动泵 (6) 和硅橡胶管 (7) 组成;温育系统由玻璃螺旋管 (8) 和真空红外加热管 (9) 组成;磁分离系统由玻璃盘管 (10) 和永磁铁 (11) 组成;信号采集系统由玻璃盘管 (12) 和光电倍增管 (13) 组成。各系统间由聚四氟乙烯管连接。该方法是基于磁珠表面的夹心法免疫分析和流动注射系统,通过对免疫分析的温育过程进行红外加热-湍流混合双重加速的方法,使整个分析过程降为 3 分钟,并可自动化控制检测过程。该方法具有快速、简便、重现性好、灵敏度高和成本低等特点,可应用于临床诊断、环境监测、食品安全等领域。



1. 一种快速的化学发光免疫检测系统及分析方法,其特征在于该系统由溶液传输系统、温育系统、磁分离系统、信号采集系统构成。其中溶液传输系统由小试管(1-4)、多位阀(5)、蠕动泵(6)和硅橡胶管(7)所组成。小试管(1)装有待测样品、酶标记抗体和表面固定了抗体的磁珠混合物,小试管(2)装有洗涤缓冲液,小试管(3)装有化学发光底物液,小试管(4)装有盐酸溶液。四个小试管分别连接到多位阀(5)的四个入口,而多位阀出口连接到蠕动泵(6)的硅橡胶管(7),由蠕动泵(6)结合多位阀(5)实现不同溶液的传输。温育系统由玻璃螺旋管(8)和真空红外加热管(9)组成,温育混合物溶液在蠕动泵的推动下在玻璃螺旋管(8)中来回流动,以加速免疫试剂的混合,同时由真空红外加热管(9)将螺旋管中温育混合物溶液快速加热到 37℃,并在温育过程中保持此温度。磁分离系统由玻璃盘管(10)和永磁铁(11)组成,永磁铁(11)放在玻璃盘管(10)下,可捕获温育过后的磁珠及其表面形成的复合物。信号采集系统由玻璃盘管(12)和光电倍增管(13)组成。玻璃盘管(12)置于光电倍增管(13)的光窗前,当待检测的溶液区带流过玻璃盘管时,其化学发光信号可被光电倍增管(13)采集。

2. 根据权利要求1所述的检测系统,其特征在于所述的多位阀(5)可通过转动实现不同流路的切换。多位阀(5)的转动由计算机控制。

3. 根据权利要求1所述的检测系统,其特征在于所述的蠕动泵(6)的转速、流体流速和流动方向通过计算机进行自动调节。

4. 根据权利要求1所述的检测系统,其特征在于所述的温育系统可使温育混合物溶液在玻璃螺旋管(8)中来回流动,以加速免疫试剂的混合。同时由真空红外加热管(9)将螺旋管中温育混合物溶液快速加热到 37℃,并在温育过程中保持此温度。这样就通过混合和加热的方法实现了免疫反应的双重加速。

5. 根据权利要求1所述的检测系统,其特征在于所述的永磁铁(11)用于收集温育反应后在玻璃盘管(10)内悬浮液中的磁珠。玻璃盘管(10)可有效地防止磁珠的聚集并且便于磁珠的重新混合。

6. 根据权利要求1所述的检测系统,玻璃盘管(12)可用于增强待检测溶液区带的混合,从而增强化学发光,增加检测器所能接受的光信号。

7. 一种快速的化学发光免疫检测系统及分析方法,其分析步骤如下:

①将样品、固定了捕获抗体的磁珠与辣根过氧化物酶标记的抗体加入到溶液传输系统的小试管(1)中,用蠕动泵(6)提供动力将小试管(1)中温育混合物溶液经由多位阀(5)和硅橡胶管(7)通入螺旋玻璃管(8)中,并在螺旋玻璃管(8)中来回流动,同时用真空红外石英管将温育混合物溶液快速加热到 37℃,并在温育过程中保持此温度;

②将温育混合物溶液通入玻璃盘管(10),用永磁铁(11)收集温育反应后的悬浮液中的磁珠,并转动多位阀(5),通入小试管(2)中的洗涤缓冲液对磁珠进行洗涤;

③转动多位阀(5),通入小试管(3)中的化学发光底物液与磁珠混合,由磁珠表面免疫复合物上标记的辣根过氧化物酶引发化学发光反应,将磁珠与化学发光底物液的混合溶液通入玻璃盘管(12),由光电倍增管收集化学发光信号

④转动多位阀(5),通入小试管(4)中的盐酸溶液消除残留信号,并对系统通道进行洗涤,转动多位阀(5),通入小试管(2)中的洗涤缓冲液对系统通道进行洗涤,为下一次检测做准备。

⑤最后收集磁珠,用再生缓冲液再生,可重复使用。

8. 根据权利要求 8 所述的分析方法,其特征在于步骤②和④中的洗涤缓冲液为 0.01M 磷酸盐缓冲液, pH 7.4, 含 0.05% 吐温 -20 ;步骤④中的盐酸溶液为 0.1M 盐酸溶液。

9. 根据权利要求 8 所述的分析方法,其特征在于步骤③中的底物液为鲁米诺、双氧水和对碘苯酚溶液。

10. 根据权利要求 8 所述的分析方法,其特征在于步骤⑤中使用的再生缓冲液为 0.1M 甘氨酸 / 盐酸缓冲液, pH 2.0。

## 快速的化学发光免疫检测系统及分析方法

### 一、技术领域

[0001] 本发明为快速化学发光免疫分析技术,涉及红外加热和湍流混合对免疫分析温育过程的双重加速。使用磁珠作为免疫反应载体,基于表面夹心法免疫分析和流动注射化学发光分析技术。本发明还涉及用于快速化学发光免疫分析的自动化检测仪器系统。

### 二、背景技术

[0002] 免疫分析具有选择性高、灵敏度高、普适性好等优点,在食品安全、环境监测、临床诊断、药物分析和微生物检验等领域具有广泛的应用。将免疫应用于实际领域时,常常需要对大量样品进行快速、低成本和自动化的筛查。如对于疾病的早期诊断,食品安全检验以及环境监控等,都需要快速、低成本、高通量和自动化的免疫分析方法。

[0003] 自动化流动注射分析系统已被用于建立自动化的基于磁性微珠表面夹心法免疫分析方法(Soh N, Nishiyama H, Asano Y, Imato T, Masadomeb T, Kurokawa Y. Chemiluminescence sequential injection immunoassay for vitellogenin using magnetic microbeads. Talanta 2004 ;64 :1160-1168.)。但这些方法存在以下缺点:(1) 通常流动注射分析系统的管道内径为1毫米左右,所以在低流速下,管道内流体为层流。因此依靠分子扩散来传质。由于免疫试剂为大分子蛋白质,扩散速率小,这就大大降低了免疫反应反应的速度,需要很长的温育时间;(2) 较长的温育时间会导致免疫试剂在管道内壁的吸附,就增加了不同测定之间的信号交叉;(3) 磁珠在磁性分离的过程中会团聚,其夹带的一些多余的免疫试剂会对彻底的洗涤造成困难,并且也阻碍了磁珠与溶液的重新混合;(4) 依靠分子扩散的传质过程大大限制了酶与底物的混合效率,从而降低了检测的灵敏度。因此,常规的自动化流动注射免疫方法存在分析时间长,样品通量低,重现性不好或者灵敏度低等问题。

[0004] 提高分析速度和样品通量可通过对免疫试剂混合物进行磁力搅拌和水浴加热的方法来实现(Liu H, Fu ZF, Yang ZJ, Yan F, Ju HX. Sampling-resolution strategy for one-way multiplexed immunoassay with sequential chemiluminescent detection Anal. Chem. 2008 ;80 :5654-5655.)。但由于水浴加热的升温速度很慢,并且需要配置水浴磁力搅拌器,增加了成本,在一定程度上限制了快速和低成本免疫分析方法的发展。

### 三、发明内容

[0005] 本发明的内容是:基于磁珠表面的夹心法免疫分析和流动注射系统,通过对免疫分析的温育过程进行红外加热-湍流混合双重加速,使整个分析过程降为3分钟;本发明的另一个目的还在于提供一套自动化的快速化学发光多组分免疫检测系统。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

[0007] 一种快速的化学发光免疫检测系统及分析方法,其特征在于该系统由溶液传输系统、温育系统、磁分离系统、信号采集系统构成。其中溶液传输系统由小试管(1-4)、多位阀(5)、蠕动泵(6)和硅橡胶管(7)所组成。小试管(1)装有待测样品、酶标记抗体和表面固

定了抗体的磁珠混合物,小试管(2)装有洗涤缓冲液,小试管(3)装有化学发光底物液,小试管(4)装有盐酸溶液。四个小试管分别连接到多位阀(5)的四个入口,而多位阀出口连接到蠕动泵(6)的硅橡胶管(7),由蠕动泵(6)结合多位阀(5)实现不同溶液的传输。温育系统由玻璃螺旋管(8)和真空红外加热管(9)组成,温育混合物溶液在蠕动泵的推动下在玻璃螺旋管(8)中来回流动,以加速免疫试剂的混合,同时由真空红外加热管(9)将螺旋管中温育混合物溶液快速加热到 37℃,并在温育过程中保持此温度。磁分离系统由玻璃盘管(10)和永磁铁(11)组成,永磁铁(11)放在玻璃盘管(10)下,可捕获温育过后的磁珠及其表面形成的复合物。信号采集系统由玻璃盘管(12)和光电倍增管(13)组成。玻璃盘管(12)置于光电倍增管(13)的光窗前,当待检测的溶液区带流过玻璃盘管时,其化学发光信号可被光电倍增管(13)采集。

[0008] 上述的温育系统可使温育混合物溶液在玻璃螺旋管(8)中来回流动,以加速免疫试剂的混合。同时由真空红外加热管(9)将螺旋管中温育混合物溶液快速加热到 37℃,并在温育过程中保持此温度。这样就通过混合和加热的方法实现了免疫反应的双重加速。

[0009] 上述的多位阀(5)可通过转动实现不同流路的切换。多位阀(5)的转动由计算机控制。

[0010] 上述的蠕动泵(6)的转速、流体流速和流动方向通过计算机进行自动调节。上述的永磁铁(11)用于收集温育反应后玻璃盘管(10)内悬浮液中的磁珠。玻璃盘管(10)可有效地防止磁珠的聚集并且便于磁珠的重新混合。

[0011] 上述的检测系统,玻璃盘管(12)可用于增强待检测溶液区带的混合,从而增强化学发光,增加检测器所能接受的光信号。

[0012] 一种快速的化学发光免疫检测系统及分析方法,其分析步骤如下:

[0013] ①将样品、固定了捕获抗体的磁珠与辣根过氧化物酶标记的抗体加入到溶液传输系统的小试管(1)中,用蠕动泵(6)提供动力将小试管(1)中温育混合物溶液经由多位阀(5)和硅橡胶管(7)通入螺旋玻璃管(8)中,并在螺旋玻璃管(8)中来回流动,同时用真空红外石英管将温育混合物溶液快速加热到 37℃,并在温育过程中保持此温度;

[0014] ②将温育混合物溶液通入玻璃盘管(10),用永磁铁(11)收集温育反应后的悬浮液中的磁珠,并转动多位阀(5),通入小试管(2)中的洗涤缓冲液对磁珠进行洗涤;

[0015] ③转动多位阀(5),通入小试管(3)中的化学发光底物液与磁珠混合,由磁珠表面免疫复合物上标记的辣根过氧化物酶引发化学发光反应,将磁珠与化学发光底物液的混合溶液通入玻璃盘管(12),由光电倍增管收集化学发光信号。

[0016] ④转动多位阀(5),通入小试管(4)中的盐酸溶液消除残留信号,并对系统通道进行洗涤,转动多位阀(5),通入小试管(2)中的洗涤缓冲液对系统通道进行洗涤,为下一次检测做准备。

[0017] ⑤最后收集磁珠,用再生缓冲液再生,可重复使用。

[0018] 上述步骤②和④中的洗涤缓冲液为 0.01M 磷酸盐缓冲液, pH 7.4, 含 0.05% 吐温-20;步骤④中的盐酸溶液为 0.1M 盐酸溶液。

[0019] 上述步骤③中的底物液为鲁米诺、双氧水和碘苯酚溶液。

[0020] 上述步骤⑤中使用的再生缓冲液为 0.1M 甘氨酸 / 盐酸缓冲液, pH 2.0。

[0021] 上述检测系统和全部分析过程,包括进样、温育、洗涤、检测及排出磁珠皆由计算

机进行自动化控制,测得化学发光信号值亦从计算机中输出。

[0022] 本检测系统的工作原理:

[0023] 本检测系统基于磁珠表面的夹心法免疫分析和流动注射技术。使用红外辐射技术和压力驱动的流动注射系统,发展了一种对免疫反应双重加速的快速化学发光免疫分析方法。分别用三维螺旋玻璃管和两个玻璃盘管进行免疫试剂混合、磁性分离以及化学发光检测。在螺旋玻璃管中流动免疫试剂混合物溶液可产生湍流,加速混合,并且混合物溶液可以被红外线加热并保持在 37℃。由于大大改善了传质过程和反应动力学,双重加速的免疫反应可在 90 秒内完成。温育后在磁珠表面形成的标记有辣根过氧化物酶的免疫夹心复合物可以在盘管中被永磁铁捕获,经过洗涤,可与化学发光底物(鲁米洛、过氧化氢和对碘苯酚)混合触发化学发光反应。再将此混合物区带流过光电倍增管光窗前面的玻璃盘管进行检测。测定一个通道的信号完成后,以盐酸洗涤液,以及洗涤缓冲液洗涤检测通道并且排出磁珠,以进行下一个样品的检测。

[0024] 所有分析步骤由电脑控制,可在 3 分钟内完成。排出的磁珠统一收集后以再生缓冲液处理,可实现免疫磁珠的反复使用。分析过程中,所有溶液由蠕动泵上的连接管传输进入分析系统,通过阀实现不同溶液的切换,全过程由计算机进行程序化自动控制,信号亦由软件自动读出和记录。相对于其它多组分免疫分析方法,具有以下特点:

[0025] (1) 操作简单,全分析过程在流动体系完成,以计算机及软件进行自动化控制,手工操作极少,无需熟练操作人员。

[0026] (2) 分析时间短,全过程包括进样、温育、洗涤、检测和准备下一次检测的步骤仅需 3 分钟,大大增加了样品通量,是目前最快速的免疫分析方法之一。

[0027] (3) 仪器设备简单,成本低廉,整个分析系统由廉价的蠕动泵、阀、聚四氟乙烯连接管、磁铁、真空红外管和化学发光检测器所组成,无需其它昂贵设备。

[0028] (4) 检测后的磁珠用再生缓冲液处理,可以反复使用,与常规免疫分析方法相比,大大节约了昂贵的抗体,进一步降低了分析成本。

[0029] (5) 由于采用了在玻璃盘管中流动的检测方法,大大改善了酶催化化学发光反应的传质过程,使得本方法有较高的灵敏度,可以检测出极低浓度的样品。

[0030] (6) 由于采用了自动化的流动分析技术和盘管磁性分离的方法避免磁珠的聚集,使得本方法的重现性相对于传统手动操作大为提高,有利于相关标准的制定。

#### 四、附图说明:

[0031] 图 1 快速的化学发光免疫检测系统得结构示意图

[0032] 1,2,3,4- 小试管,5- 多位阀,6- 蠕动泵,7- 硅橡胶管,8- 玻璃螺旋管,9- 真空红外管,10- 玻璃盘管,11- 永磁铁,12- 玻璃盘管,13- 光电倍增管,14- 聚四氟乙烯管。

#### 五、具体实施方式:

[0033] 实施例 1 结合附图 1 对快速化学发光检测系统作进一步说明:

[0034] 该系统由溶液传输系统、温育系统、磁分离系统、信号采集系统构成。其中溶液传输系统由小试管(1-4)、多位阀(5)、蠕动泵(6)和硅橡胶管(7)所组成。小试管(1)装有待测样品、酶标记的抗体和表面固定了捕获抗体的磁珠混合物,小试管(2)装有 0.01M 磷酸盐

洗涤缓冲液 (pH 7.4, 含 0.05% 吐温 -20), 小试管 (3) 装有化学发光底物液 (鲁米诺、过氧化氢和对碘苯酚), 小试管 (4) 装有 0.1M 盐酸溶液。四个小试管分别连接到多位阀 (5) 的四个入口, 而多位阀出口连接到蠕动泵 (6) 的硅橡胶管 (7), 由蠕动泵 (6) 结合多位阀 (5) 实现不同溶液的传输。温育系统由玻璃螺旋管 (8) 和真空红外加热管 (9) 组成, 温育混合物溶液在蠕动泵的推动下在玻璃螺旋管 (8) 中来回流动, 以加速免疫试剂的混合, 同时由真空红外加热管 (9) 将螺旋管中温育混合物溶液快速加热到 37℃, 并在温育过程中保持此温度。磁分离系统由玻璃盘管 (10) 和永磁铁 (11) 组成, 永磁铁 (11) 放在玻璃盘管 (10) 下, 可捕获温育过后的磁珠及其表面形成的免疫夹心复合物。信号采集系统由玻璃盘管 (12) 和光电倍增管 (13) 组成。玻璃盘管 (12) 置于光电倍增管 (13) 的光窗前, 当待检测的溶液区带流过玻璃盘管时, 其化学发光信号可被光电倍增管 (13) 采集。排出的磁珠统一收集后以再生缓冲液处理。全分析系统由计算机自动控制。

[0035] 实施例 2 快速化学发光免疫分析方法

[0036] 具体分析流程如表 1 所示。

[0037]

表 1. 具体分析过程

| 步骤号 | 步骤                                                                                                            | 开始时间  |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1   | 将各 50 微升样品、固定了捕获抗体的磁珠与辣根过氧化物酶标记的抗体加入小试管, 混合通入玻璃螺旋管中, 并在螺旋玻璃管中来回流动, 同时用真空红外石英管将温育混合物溶液快速加热到 37℃, 并在温育过程中保持此温度; | 00:00 |
| 2   | 将温育混合物溶液通入玻璃盘管, 用永磁铁收集温育反应后的悬浮液中的磁珠, 并转动多位阀, 通入洗涤缓冲液对磁珠进行洗涤;                                                  | 1:30  |
| 3   | 将化学发光底物液通入玻璃盘管与磁珠混合, 由磁珠表面免疫复合物上标记的辣根过氧化物酶引发化学发光反应, 立即将此混合溶液通入玻璃盘管, 由光电倍增管收集化学发光信号;                           | 2:30  |
| 4   | 通入盐酸溶液消除残留信号, 并对系统通道进行洗涤, 再转动多位阀, 通入洗涤缓冲液对系统通道进行洗涤, 为下一次检测做准备。                                                | 2:35  |
| 5   | 将仪器恢复到初始状态, 进入下一分析流程。                                                                                         | 3:00  |

[0038] 所有分析步骤由计算机进行程序化自动控制, 测得化学发光信号从计算机中输出。分析步骤完成后统一收集固定了抗体的磁珠, 浸泡在 pH 2.2 的甘氨酸 / 盐酸缓冲液中 10 分钟, 并用 0.01M 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 洗涤, 以备再次使用。

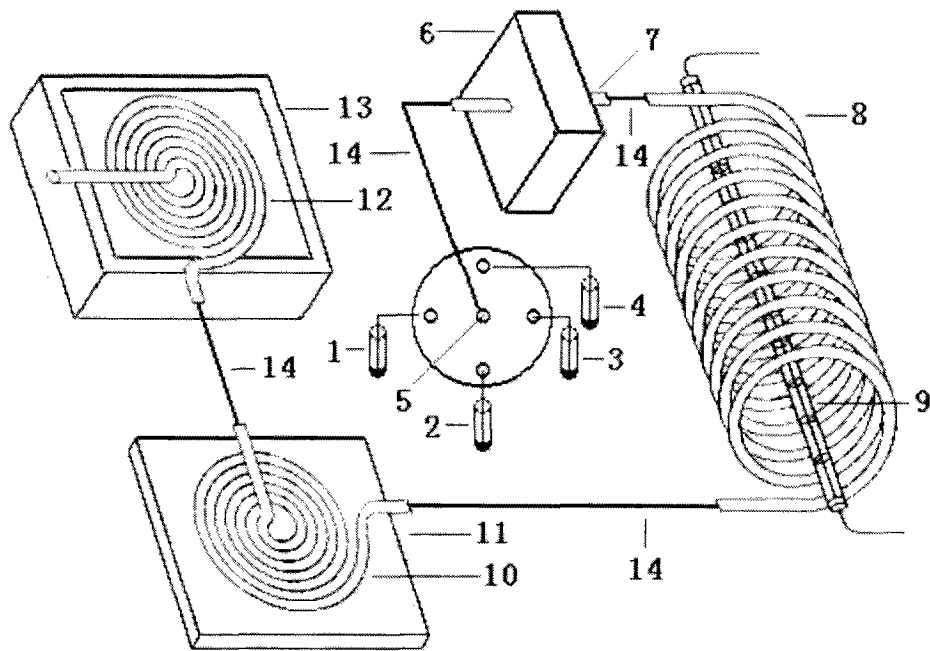
[0039] 实施例 3

[0040] 以在肿瘤的临床诊断上有显著意义的标志物: 甲胎蛋白 (AFP) 为例, 说明该自动

化进样分辨化学发光多组分免疫分析方法的应用。

[0041] 使用环氧基活化的磁珠作为免疫反应的载体,共价固定了鼠单克隆 AFP 抗体,以牛血清白蛋白封闭残余活性位点。示踪抗体为辣根过氧化物酶标记的羊多克隆 AFP 抗体。

[0042] 如表 1 所示流程,以临床血清样品中肿瘤标志物 AFP 为检测对象,进行快速的化学发光免疫分析,得出待测样品中 AFP 的浓度,为快速的临床筛查以及诊断提供了一种可行方法。



|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 快速的化学发光免疫检测系统及分析方法                             |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101865912A</a>                   | 公开(公告)日 | 2010-10-20 |
| 申请号            | CN200910029449.X                               | 申请日     | 2009-04-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 南京大学<br>江苏省肿瘤医院                                |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 南京大学<br>江苏省肿瘤医院                                |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 南京大学<br>江苏省肿瘤医院                                |         |            |
| [标]发明人         | 刘宏<br>严枫<br>鞠焜先                                |         |            |
| 发明人            | 刘宏<br>严枫<br>鞠焜先                                |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N21/76 G01N33/551                 |         |            |
| 其他公开文献         | CN101865912B                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

一种快速的化学发光免疫检测系统及分析方法。该检测系统的溶液传输系统由小试管(1-4)、多位阀(5)、蠕动泵(6)和硅橡胶管(7)组成；温育系统由玻璃螺旋管(8)和真空红外加热管(9)组成；磁分离系统由玻璃盘管(10)和永磁铁(11)组成；信号采集系统由玻璃盘管(12)和光电倍增管(13)组成。各系统间由聚四氟乙烯管连接。该方法是基于磁珠表面的夹心法免疫分析和流动注射系统，通过对免疫分析的温育过程进行红外加热-湍流混合双重加速的方法，使整个分析过程降为3分钟，并可自动化控制检测过程。该方法具有快速、简便、重现性好、灵敏度高和成本低等特点，可应用于临床诊断、环境监测、食品安全等领域。

