

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/533 G01N 21/64



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03115114.0

[43] 公开日 2003 年 7 月 23 日

[11] 公开号 CN 1431504A

[22] 申请日 2003.1.23 [21] 申请号 03115114.0

[71] 申请人 上海交通大学

地址 200030 上海市华山路 1954 号

[72] 发明人 赵海鹰 于常青 窦晓鸣 黄梅珍
殷光中 袁 波

[74] 专利代理机构 上海交达专利事务所

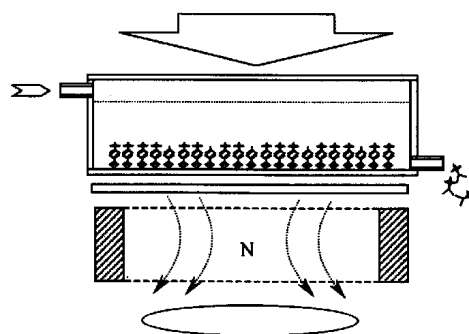
代理人 毛翠莹

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

[54] 发明名称 磁分离型荧光成像免疫反应检测装置及检测方法

[57] 摘要

一种磁分离型荧光成像免疫反应检测装置及检测方法，检测装置主要由免疫反应槽和磁极构成，使用包被有抗体的磁性粒子作为反应底物，用特异性荧光抗体显示抗原，形成抗体-抗原-荧光抗体反应生成物。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，使被检测抗原分布在反应槽底部，用激发光源照射反应槽，可以得到反应生成物的荧光图像。本发明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，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。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种磁分离型荧光成像免疫反应检测装置，其特征在于反应槽（1）下方放置滤光片（4），反应槽（1）的侧板上开有进液口（2），与之相对的另一侧开有出液口（3），滤光片（4）的下方放置磁极（5），磁极（5）的下方放置成像物镜（6）。

2、一种利用权利要求 1 所说的磁分离型荧光成像免疫反应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，投入反应槽（1）中，加入被检测抗原溶液，充分反应后再加入荧光标记抗体，之后加上磁极（5），使磁性粒子被吸附在反应槽（1）底部，用缓冲液将溶液中游离的荧光抗体清洗掉，再用激发光照射反应槽（1）底部，用成像物镜将反应槽底部的荧光图像成像于光电传感器，通过记录荧光强度和（或）荧光点个数，来计算被检测抗原的含量。

磁分离型荧光成像免疫反应检测装置及检测方法

技术领域:

本发明涉及一种磁分离型荧光成像免疫反应检测装置及检测方法，是一种在磁性粒子表面吸附抗体，进行抗原-抗体免疫反应，再用此抗原的特异性荧光抗体与结合在磁性粒子表面抗体上的抗原结合，实现免疫反应的定性、定量荧光成像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:

免疫荧光检测技术在免疫学、微生物学、细胞和组织学、病理学、肿瘤学以及临床检验学等生物学和医学许多方面得到广泛应用。免疫荧光检测技术具有特异性高、敏感性强以及应用范围广泛等特点，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项重要技术。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，该测定方法灵敏度高，可以进行荧光成像检测，但是需要复杂的常规 B-F 分离过程，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，从而测定由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荧光成像免疫反应检测装置，能实现实时、灵敏和准确的免疫测定，提高检测样本的利用率，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荧光成像免疫反应检测装置的基本结构由免疫反应槽和磁极构成，使用包被有抗体的磁性粒子作为反应底物，用特异性荧光抗体显示抗原，形成抗体-抗原-荧光抗体反应生成物。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，使被检测抗原分布在反应槽底部。用激发光源照射反应槽，可以得到反应生成物的荧光图像。

本发明的免疫反应槽底板由可见光波段透明的材料做成平板状，四周和顶部粘结玻璃挡板。顶板对近紫外及可见光波段透明。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。

磁极由磁铁或通电线圈构成，放置于免疫反应槽的正上方或正下方，在使用时，可以根据要求施加和撤掉磁场。

利用荧光标记抗体标记抗原进行荧光成像检测的技术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，使被标记的抗原集中分布在反应槽底部，借以提高检测灵敏度。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，本发明方法在反应槽底部的荧光强度远大于后者。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，加入被检测抗原溶液使之发生充分免疫反应之后，再加入特异性荧光标记抗体（荧光素可使用异硫氰酸、四乙基罗丹明和四甲基异硫氰酸罗丹明等），在反应池底部施加磁场，磁性粒子携带吸附在其上的抗体-抗原-荧光标记抗体反应生成物被吸附到样品池底部。用缓冲液清洗反应槽，将溶液中游离的荧光标记抗体清洗掉，与抗原发生反应的荧光标记抗体由于磁场对磁性粒子的吸附作用而保留在反应槽底部。这样，原来溶液中的被检测抗原集中地分布在反应槽底部，而抗原上的荧光标记抗体的荧光强度（或荧光亮点个数）与抗原含量有线性关系。此时用处于荧光素的吸收波段的激发光照射反应槽底部，滤光片将滤除激发光。用成像物镜将荧光图像成像于光电传感器上，通过计算荧光强度来得到溶液中抗原的含量。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。

本发明的检测装置结构简单，利用荧光标记技术结合磁性分离技术，实现了实时、灵敏、准确和灵活多样的免疫反应检测，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 为本发明的磁分离型荧光成像免疫反应检测装置结构示意图。

图1中，1、反应槽，2、进液口，3、出液口，4、滤光片，5、磁极，6、成像物镜。

图2 在反应槽中投入包被抗体的磁性粒子溶液。

图3 在含有包被抗体的磁性粒子溶液的反应槽中投入抗原。

图4 再加入被检测抗原的荧光标记抗体，充分反应。

图5 加磁极，缓冲液冲洗后，荧光成像检测。

图6 去掉磁极，清洗反应槽。

具体实施方式:

下面结合附图和实施例对本发明的技术方案作进一步说明。

如图 1 所示，本发明检测装置的基本结构由反应槽 1、滤光片 4 和磁极 5 构成，反应槽 1 下方依次放置滤光片 4、磁极 5 和成像物镜 6。反应槽 1 某一侧挡板上部开有进液口 2，与之相对的反应槽 1 另一侧挡板下部开有出液口 3。

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（2）投入反应槽（1）中，见图 2。
2. 在反应槽（1）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，使之充分反应，见图 3。反应后用缓冲液将溶液中游离的抗原清洗掉。
3. 加入被检测抗原的荧光标记抗体，充分反应，见图 4。
4. 加上磁极（5），则包被有鼠免疫球蛋白 G 的磁性粒子协同被检测抗体和附着在其上的荧光标记抗体被吸附在反应槽底部（图 5），用缓冲液清洗过剩的荧光标记抗体，荧光成像，记录荧光强度和（或）荧光亮点个数，见图 5。
5. 检测结束后，撤去磁极（5），用高压水流清洗反应槽（图 6），该检测装置可重复使用。

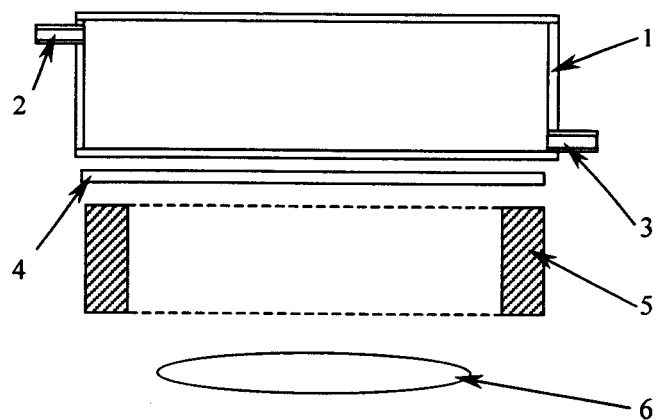


图 1

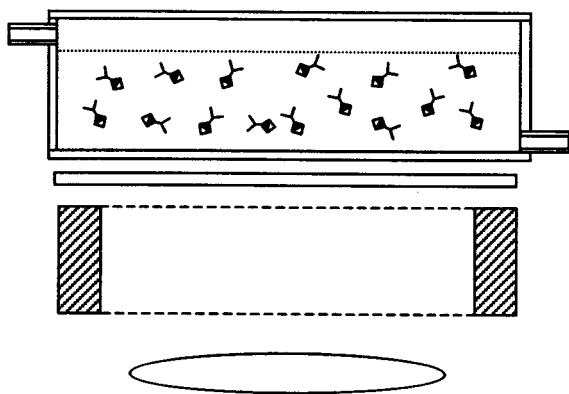


图 2

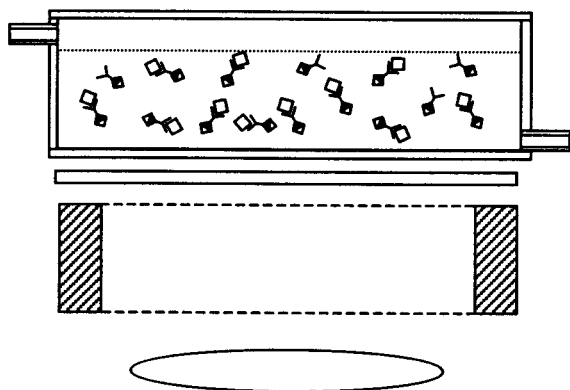


图 3

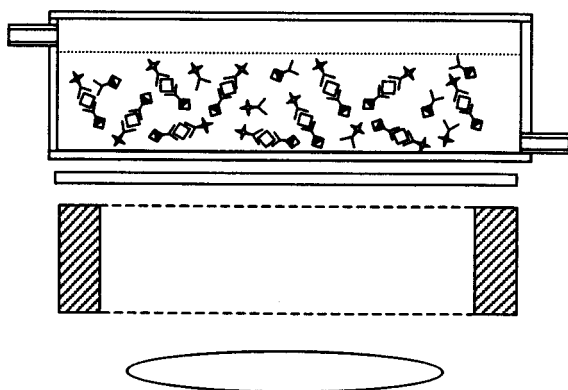


图 4

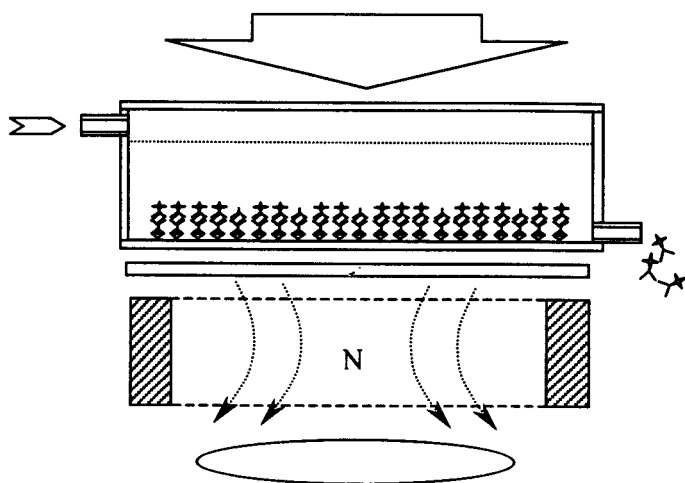


图 5

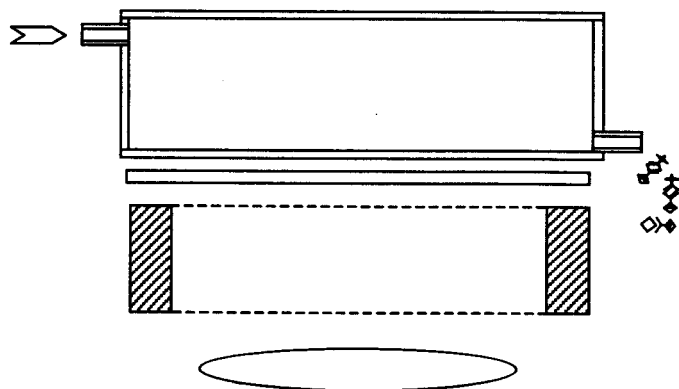


图 6

专利名称(译)	磁分离型荧光成像免疫反应检测装置及检测方法		
公开(公告)号	CN1431504A	公开(公告)日	2003-07-23
申请号	CN03115114.0	申请日	2003-01-23
[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	赵海鹰 于常青 窦晓鸣 黄梅珍 殷光中 袁波		
发明人	赵海鹰 于常青 窦晓鸣 黄梅珍 殷光中 袁波		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/537		
其他公开文献	CN1185491C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种磁分离型荧光成像免疫反应检测装置及检测方法，检测装置主要由免疫反应槽和磁极构成，使用包被有抗体的磁性粒子作为反应底物，用特异性荧光抗体显示抗原，形成抗体 - 抗原 - 荧光抗体反应生成物。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，使被检测抗原分布在反应槽底部，用激发光源照射反应槽，可以得到反应生成物的荧光图像。本发明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，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。

