



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111077297 A

(43)申请公布日 2020.04.28

(21)申请号 201811224856.1

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2018.10.19

G01N 21/64(2006.01)

G01N 21/29(2006.01)

(71)申请人 上海快灵生物工程有限公司

地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)

自由贸易试验区芳春路40号1幢3层

申请人 上海快灵生物科技有限公司

(72)发明人 马校卫 常晓依 周新红 周中人

(74)专利代理机构 上海华工专利事务所(普通

合伙) 31104

代理人 赵孟琴 缪利明

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/76(2006.01)

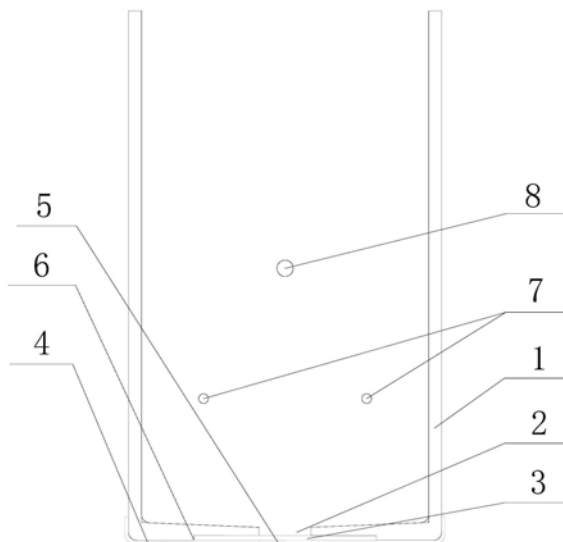
权利要求书2页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯、微孔板条及其检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,微孔杯底部的中部设置一通孔,杯内底面以通孔中心为轴成一定锥形倾斜角度;通孔表面贴合了微孔膜;微孔杯内设置至少一种直径均匀且大于微孔膜孔径的包被微球、固定于包被微球表面的捕获试剂、以及直径小于微孔膜孔径的标记试剂;捕获试剂及标记试剂具有互为直接或间接配位体关系的物质;含待测物质的样品溶液加入时发生反应,在包被微球表面形成配位体反应复合物。在溶液穿越微孔膜流出时,游离的标记试剂流出,配位体反应复合物的标记试剂及包被微球被微孔膜截留在表面,形成聚集浓缩效果。本发明还公开了由若干所述微孔杯排列成的微孔板条和所述微孔杯、微孔板条的检测方法。



1. 一种微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,其特征在於,为容积不超过500微升的开口微孔杯,微孔杯的底部中心位置设置了一个面积小于12平方毫米的通孔,底部表面以通孔中心为轴、为最低点设置成一定倾斜角度的锥形面;在通孔的表面贴合了孔径基本均匀且孔径范围在0.02-1.2 μm 的微孔膜。

2. 如权利要求1所述的微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,其特征在於,微孔杯中设置至少一种直径均匀且大于所述微孔膜孔径的包被微球、固定于包被微球表面的捕获试剂、以及直径小于微孔膜孔径的标记试剂;捕获试剂及标记试剂中具有互为直接或间接的配位体关系的物质。

3. 如权利要求1所述的微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,其特征在於,微孔杯底的通孔的下方设置沉孔,所述沉孔的形状与所述微孔膜相匹配,深度与微孔膜的厚度一致。

4. 如权利要求3所述的微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,其特征在於,所述沉孔设置在微孔杯的底部,沉孔容纳微孔膜后,微孔膜的下方与微孔杯底的下表面基本平齐,微孔膜的下方设置有具有导热作用的保护膜片,所述保护膜片的一部分与微孔杯底部贴合,另一部分与微孔膜贴合;所述保护膜片的中部设有一开口,所述开口位于微孔杯的通孔的正下方。

5. 如权利要求4所述的微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,其特征在於,所述保护膜片的材质为金属箔或有机导热膜。

6. 如权利要求1所述的微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,其特征在於,所述包被微球具备水溶液溶解悬浮特征,选自聚苯乙烯微球、磁微球、硅微球、以及以纳米材料为核心而表面被亲水修饰的微球中的一种或几种。

7. 如权利要求1所述的微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,其特征在於,所述标记试剂包括了具有特定光谱信号的荧光物质或肉眼直接可见的颜色微粒,所述颜色微粒选自纳米胶体金、乳胶微球、炭黑微粒、以及其他带颜色信号的纳米颗粒中的一种或几种;所述荧光物质选自荧光分子及其微球、量子点微粒及其微球、上转换发光微粒及其微球、时间分辨荧光分子及其微球、以及荧光蛋白中的一种或几种。

8. 如权利要求7所述的微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,其特征在於,还包括从微孔杯上部对微孔杯底部微孔膜表面集聚的标记试剂的光谱信号进行至少一重波长信号光学探测的检测设备。

9. 如权利要求1-8任一项所述的微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,其特征在於,微孔杯的横截面呈圆形,微孔杯的外壁下部对称设置有至少一对高度一致的下凸点,微孔杯的外壁上部对称设置有至少一对高度一致的上凸点,微孔杯的上凸点与下凸点与固相集聚免疫检测用的穿孔板相匹配。

10. 如权利要求1所述的微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,其特征在於,微孔杯中的包被微球与标记试剂的微观尺寸关系如下:

当游离包被微球、与标记试剂形成反应复合物的包被微球在微孔膜表面形成堆积时,游离的标记试剂能从堆积的包被微球之间的孔隙被溶液携带从微孔膜的微孔中再次穿越流出,不会形成阻截残留。

11. 一种用于微孔膜截留微球的微孔板条,其特征在於,包括若干个如权利要求1-9任一项所述的微孔杯,若干所述的微孔杯高度一致、间距一致,且相邻两微孔杯之间通过外壁

之间的连结点相联,每条微孔板条的首尾两微孔杯的外侧各向外延伸一平台,所述平台与微孔板上的卡槽相匹配。

12.如权利要求11所述的微孔膜截留微球的微孔板条,其特征在于,所述微孔杯的横截面呈圆形,微孔杯的外壁下部对称设置有至少一对高度一致的下凸点,微孔杯的外壁上部分对称设有至少一对高度一致的上凸点,且所述上凸点和下凸点分别设置于与微孔板条垂直的方向上,所述上凸点与下凸点与固相集聚免疫检测用的穿孔板相匹配。

13.一种如权利要求11或12所述的微孔膜截留微球的微孔板条的检测方法,其特征在于,所述微孔杯加入样品溶液且将样品溶液从贴合微孔膜的通孔流尽后,另加入洗涤溶液将集聚在微孔膜上的包被微球洗涤并悬浮起来,随后将洗涤溶液从微孔膜的通孔流尽后对再次集聚在微孔膜表面的微球进行光谱信号检测。

14.一种如权利要求11或12所述的微孔膜截留微球的微孔板条的样品前处理方法,其特征在于,将所述样品溶液预先通过进行孔径不大于微孔杯内与通孔表面贴合的微孔膜的过滤膜将大颗粒的杂质过滤后,再将过滤好的溶液添加进入微孔杯,将包被试剂和标记试剂溶解进行相关反应检测。

微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯、微孔板条及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学诊断领域的液相免疫或配位体检测技术,具体地说,是关于一种微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯、微孔板条及其检测方法。

背景技术

[0002] 免疫分析技术是其利用抗原与抗体之间高特异性产生的识别和结合反应实现生物分子的检测,具备灵敏度高、特异性强、适用面广、所需设备简单、线性范围较宽等优点,已成为当今最具竞争力和挑战性的分析测试技术之一,在生命科学、临床医学以及环境、食品、药物等领域得到广泛应用。免疫标记分析技术主要包括:放射物标记、酶标记、发光标记、荧光标记等方法。用放射物标记抗原或抗体发展的放射免疫分析(radio immunoassay,RIA)是美国科学Yalow和Berson于1959年创立的一种微量分析法,它是将具有高灵敏度的放射性核素示踪技术和特异性免疫化学技术相结合而建立的新方法。该技术利用核素标记物的放大效应,改善了待测物的检测下限,同时以抗体或抗原作为结合试剂,大大提高了检测方法的特异性。

[0003] 以荧光标记的荧光免疫分析(fluorescein immunoassay,FIA)是由Conn等首创于20世纪40年代的一种标记免疫学技术,其所用标记物是荧光素和荧光染料,是将抗原或抗体标记以荧光物质与相应抗原或抗体结合,在荧光显微镜或紫外线照射下,检测荧光强度和荧光现象的一种检测方法。荧光标记免疫法灵敏度高,但荧光素常会产生生物学毒性,导致抗体或抗原的灵敏度和选择性下降。

[0004] 酶标记分析技术是继免疫荧光抗体技术和放射免疫分析之后发展起来的一大新型的血清学技术。1966年,Nakane等和Avrameas等分别报道用酶代替荧光素标记抗体,建立了酶标抗体技术(enzyme-labelled antibody technique),用于生物组织中抗原的定位和鉴定。1971年,Engvall Van Weemen等报道了酶联免疫吸附试验,从而建立了酶标抗体的定量检测技术。20世纪80年代,基于酶标记抗体检测和鉴定蛋白质分子的免疫转印技术问世。目前,免疫酶标记技术已成为免疫诊断、检测和分子生物学研究中应用最广泛的免疫学方法之一。

[0005] 发光标记分析是20世纪80年代末,国外开始用化学发光试剂来标记抗原或抗体,从而建立了发光免疫分析技术。狭义的发光免疫分析LIA主要是指化学发光免疫分析CLIA,另外还有酶放大化学发光免疫分析和电化学发光免疫分析ECLIA。CLIA是Sohrocler和Halman在20世纪70年代末期建立的,该方法兼有发光分析的高灵敏度和免疫反应的特异性。其基本原理同酶标记分析法,是用化学发光反应的试剂(可以是发光剂或催化剂等)标记抗原或抗体,标记后的抗原和抗体与待测物经过一系列的免疫反应和理化步骤(如离心分离、洗涤等),最后以测定发光强度形式测定。

[0006] 目前免疫分析技术主要采用以微孔板为实验平台的非均相分析模式,需要包埋、洗脱、分离等多步操作,分析过程繁琐,分析时间长,不能满足快速检测和诊断的要求。生物反应中通过微孔膜进行不同分子量的蛋白及微粒微球的穿越,是一个很常用的技术手

段,尤其是在蛋白纯化中常用的离心滤管。但离心滤管一般是溶液手动加入,离心后添加复溶液将穿越的蛋白溶解回收。

[0007] 国内专利文献CN201310228708.8公开了一种基于纤维膜捕集分离的定量检测装置及其检测方法:将标记蛋白的包被微球放入深孔滤板,与标记试剂进行静态的混合 孵育反应,随后通过离心力作用将样品溶液及洗涤溶液从滤板的滤膜流尽,标记试剂 等小分子或小粒径的物质随溶液流出了深孔滤板,包被微球则在穿越底部滤膜时被部 分截留,随后通过光学对膜表面进行检测得到相关检测信号的实验。这个方法的意义 在于免疫反应试剂在均相环境中进行了静态孵育,可以降低对免疫抗体抗原的亲和力 要求;同时孵育反应后溶液中承载着反应复合物的包被微球被集聚到滤膜中,起到了 良好的反应物质浓缩作用。但是,该专利文献中的包被微球的粒径与滤膜的孔径的关 系没有明确界定,微球将渗入滤膜一定深度,这将导致部分微球穿越滤膜,从而导致 检测结果不准确。同时,也将导致滤膜不同深度的微球反射的光谱信号的差异。

发明内容

[0008] 本发明的第一个目的是提供一种微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯;以解决 现有的包被微球粒径与滤膜的孔径的关系没有明确界定,从而导检测结果不准确的问 题。本发明的第二个目的是提供一种微孔膜截留集聚微球的微孔板条。本发明的第 三个目的是提供一种微孔膜截留微球的微孔板条的检测方法。本发明的第四个目的 是提供一种微孔膜截留微球的微孔板条的样品前处理方法。

[0009] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0010] 一种微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯,为容积不超过500微升的开口微孔杯, 微孔杯的底部中心位置设置了一个面积小于12平方毫米的通孔,底部表面以通孔中 心为轴、为最低点设置成一定倾斜角度的锥形面;在通孔的表面贴合了孔径基本均匀 且孔径范围在0.02-1.2 μm 的微孔膜。

[0011] 根据本发明,微孔杯中设置至少一种直径均匀且大于所述微孔膜孔径的包被微 球、固定于包被微球表面的捕获试剂、以及直径小于微孔膜孔径的标记试剂;捕获试 剂及标记试剂中具有互为直接或间接的配位体关系的物质。

[0012] 根据本发明,微孔杯底的通孔的下方设置沉孔,所述沉孔的形状与所述微孔膜相 匹配,深度与微孔膜的厚度一致。

[0013] 进一步的,所述沉孔设置在微孔杯的底部,沉孔容纳微孔膜后,微孔膜的下方与 微孔杯底的下表面基本平齐,微孔膜的下方设置有具有导热作用的保护膜片,所述保 护膜片的一部分与微孔杯底部贴合,另一部分与微孔膜贴合;所述保护膜片的中部设 有一开口,所述开口位于微孔杯的通孔的正下方。

[0014] 进一步的,所述保护膜片的材质为金属箔或有机导热膜,具有良好的导热性能, 该保护膜的导热作用有利于对所述微孔杯进行温度控制,使得各孔免疫反应的温度准 确且一致,所得结果精密性更好。

[0015] 根据本发明,所述包被微球具备水溶液溶解悬浮特征,选自聚苯乙烯微球、磁微 球、硅微球、以及以纳米材料为核心而表面被亲水修饰的微球等中的一种或几种。

[0016] 根据本发明,所述标记试剂包括了具有特定光谱信号的荧光物质或肉眼直接可见

的颜色微粒,所述颜色微粒选自纳米胶体金、乳胶微球、炭黑微粒、以及其他带颜色 信号的纳米颗粒等中的一种或几种;所述荧光物质选自荧光分子及其微球、量子点微 粒及其微球、上转换发光微粒及其微球、时间分辨荧光分子及其微球、以及荧光蛋白 等中的一种或几种。

[0017] 根据本发明,还包括从微孔杯上部对微孔杯底部微孔膜表面集聚的标记试剂的光谱信号进行至少一重波长信号光学探测的检测设备。

[0018] 根据本发明,微孔杯的横截面呈圆形,微孔杯的外壁下部对称设置有至少一对高度一致的下凸点,微孔杯的外壁上部对称设有至少一对高度一致的上凸点,微孔杯的 上凸点与下凸点与固相集聚免疫检测用的穿孔板相匹配。

[0019] 根据本发明,其特征在于,微孔杯中的包被微球与标记试剂的微观尺寸关系如下:

[0020] 当游离包被微球及其与标记试剂形成反应复合物的包被微球在微孔膜表面形成堆积时,游离的标记试剂能从堆积的包被微球之间的孔隙被溶液携带从微孔膜的微孔 中再次穿越流出,不会形成阻截残留。

[0021] 作为本发明的第二个方面,一种用于微孔膜截留微球的微孔板条,包括若干个上述所述的微孔杯,若干所述的微孔杯高度一致、间距一致,且相邻两微孔杯之间通过 外壁之间的连结点相联,每条微孔板条的首尾两微孔杯的外侧各向外延伸一平台,所 述平台与微孔板上的卡槽相匹配,以便于取下微孔板条。

[0022] 根据本发明,所述微孔杯的横截面呈圆形,微孔杯的外壁下部对称设置有至少一对高度一致的下凸点,微孔杯的外壁上部对称设有至少一对高度一致的上凸点,且所 述上凸点和下凸点分别设置于与微孔板条垂直的方向上,所述上凸点与下凸点与固相 集聚免疫检测用的穿孔板相匹配。

[0023] 进一步的,所述微孔杯的上凸点、下凸点在该微孔板条的横向外壁面;两个上凸点或下凸点在圆形外壁的相对位置,即与圆形外壁的中心点成180度角分布。

[0024] 作为本发明的第三个方面,一种上述所述的微孔膜截留微球的微孔板条的检测方法,所述微孔杯加入样品溶液且将样品溶液从贴合微孔膜的通孔流尽后,另加入洗涤 溶液将集聚在微孔膜上的包被微球和反应复合物洗涤并悬浮起来,随后将洗涤溶液从 微孔膜的通孔流尽后对再次集聚在微孔膜表面的微球和反应复合物进行光谱信号检 测。

[0025] 作为本发明的第四个方面,一种上述所述的微孔膜截留微球的微孔板条的样品前处理方法,将所述样品溶液预先通过进行孔径不大于微孔杯内与通孔表面贴合的微孔 膜的过滤膜将大颗粒的杂质过滤后,再将过滤好的溶液添加进入微孔杯,将包被试剂 和标记试剂溶解进行相关反应检测。

[0026] 本发明的微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯、微孔板条及其检测方法,其有益效果是:

[0027] 1、使用所述微孔杯只需要加两种液体:待测样品和洗涤液,操作简便,可 实现两种溶液两步操作的快速反应方法,将免疫反应的步骤简化为抗体抗原的静态孵 育,随后洗涤液对反应区域进行洗涤后就能进行信号检测;同时静态孵育免疫反应中 形成免疫反应微球复合物到达滤膜截留区域时,直径小于滤膜孔径的标记试剂能自由 穿越滤膜,但粒径大于滤膜孔径的包被微球及其免疫反应复合物却被截留下来并浓缩 集聚在滤膜表面,因此能大大提高免疫反应的效率及灵敏度;

- [0028] 2、抽滤洗涤操作对反应复合物的分离效果好,因此其检测效果好;
- [0029] 3、保护膜片的设置,可以控制各反应条件的一致性,保证结果的精密度,而且 所述水溶性微球表面的反应更接近于液相,有利于蛋白保持天然构象,可能有利于 特异性结合反应。

附图说明

- [0030] 图1为本发明的微孔杯的结构示意图。
- [0031] 图2为本发明的微孔杯的俯视图示意图。
- [0032] 图3为微孔板条的仰视示意图。
- [0033] 图4为微孔杯与穿孔板配合的结构示意图。
- [0034] 图5为穿孔板的俯视图示意图。
- [0035] 图6为本发明用于表征对应物质含量。
- [0036] 图号说明:
- [0037] 1、微孔杯;2、通孔;3、微孔膜;4、保护膜片;5、开口;6、沉孔;7、下凸点;8、上凸点;9、平台;10、穿孔板。

具体实施方式

[0038] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合说明书附图对本发明的具体实施方式做详细的说明,显然所描述的实施例是本发明的一部分实施例,而不是全部实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通人员在没有做出创造性 劳动前提下所获得的所有其他实施例,都应当属于本发明的保护的 范围。

[0039] 在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明,但是本发明还可以采用其他不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内 涵的情况下做类似推广,因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

[0040] 其次,本发明结合示意图进行详细描述,在详述本发明实施例时,为便于说明,表示器件结构的剖面图会不依一般比例作局部放大,而且所述示意图只是示例,其在此不应限制本发明保护的 范围。此外,在实际制作中应包含长度、宽度及深度的三维 空间尺寸。

[0041] 同时在本发明的描述中,需要说明的是,术语中的“上、下、内和外”等指示的 方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系,仅是为了便于描述本发明和简化 描述,而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造 和操作,因此不能理解为对本发明的限制。此外,术语“第一、第二或第三”仅用于 描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性。

[0042] 如图1和图2所示,为本发明的一种微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯:微孔杯 1 的容积不超过500微升,其底部中心位置设置了一个面积小于12平方毫米的通孔2, 通孔2的面积和形状(圆形)与检测光斑匹配;底部平面以通孔2中心为轴、为最低 点设置成一定锥形倾斜角度,当微孔杯1中有溶液被压力驱动从通孔流出时,微孔杯 1的底面设置成锥形倾斜角度可以确保溶液能全部流出;在微孔杯1底部的通孔表面 贴合了孔径基本均匀的微孔膜3,溶液只能从微孔膜3流出所述通孔2;在通孔2的 表面贴合了孔径基本均匀且孔径范围在0.02-1.2um的微孔膜3。

[0043] 微孔杯1中设置至少一种直径均匀且大于所述微孔膜3孔径的包被微球、固定于包被微球表面的捕获试剂、以及直径小于微孔膜孔径的标记试剂;捕获试剂及标记试剂中具有互为直接或间接的配位体关系的物质。

[0044] 检测时,将含待测物质的样品溶液加入微孔杯时,捕获试剂、标记试剂和含待测物质的样品溶液在溶液中发生特异性反应,在包被微球表面形成配位体反应复合物。溶液从微孔膜穿越流走后微孔膜表面截留的微球反应复合物可表征待测样品含量。

[0045] 所述微孔杯用于免疫检测,免疫检测的反应在液相孵育完成,被检测的微球反应复合物随溶液流动穿越微孔膜后被杯底通孔表面的微孔膜截留集聚在微孔膜表面,而且所述微球反应复合物可经过悬浮和充分洗涤,只留下粒径大于微孔膜孔径的微球,其余部分穿越微孔膜流走,不会被截留在微孔膜表面或滞留在微孔膜内部。

[0046] 当溶液穿越微孔膜3流出时,游离的标记试剂流出,形成配位体反应复合物的包被微球及包被微球被微孔膜3截留在表面,形成聚集浓缩效果,不但实现了从液体到膜表面的浓缩效果,还在检测区的截面实现了面积的浓缩效果,达到了良好的提高灵敏度的效果。可见,本发明可实现两种溶液两步操作的快速反应方法,将免疫反应的步骤简化为抗体抗原的静态孵育,随后洗涤液对反应区域进行洗涤后就能进行信号检测。同时静态孵育免疫反应中形成免疫反应微球复合物到达滤膜截留区域时,直径小于滤膜孔径的标记试剂能自由穿越滤膜,但粒径大于滤膜孔径的包被微球及其免疫反应复合物却被截留下来并浓缩集聚在滤膜表面,因此该发明能大大提高免疫反应的效率及灵敏度。应理解,本发明的微孔杯的外形完全可以与酶标微孔杯一样,只是微孔杯的底部中心设置了一个直径2.1mm的通孔2,底部表面以通孔2中心为轴、为最低点设置成一定倾斜角度的锥形面;在通孔2的下表面贴合了孔径基本均匀且孔径为0.1 μ m的硝酸纤维素滤膜。

[0047] 在竞争免疫反应中,捕获试剂可以是包被在微球上的竞争抗原如偶联了载体蛋白的小分子抗原,标记试剂则是标记了荧光或其他光谱信号的待测物质的抗体;当溶液中的游离抗原在溶液中与全部标记试剂反应后,则捕获试剂将不再有免疫反应复合物,因此被截留在微孔膜表面的将是游离的包被微球;当溶液中的游离抗原在溶液中与部分标记试剂反应后,捕获试剂将产生部分的免疫反应复合物,因此被截留在微孔膜表面的将是游离的包被微球及部分带有免疫反应复合物的微球。

[0048] 在免疫夹心法反应中,捕获试剂可以是包被在PS微球上的抗体A,标记试剂则是标记了荧光或其他光谱信号的抗体B;当溶液中的抗原在溶液中同时被抗体A及抗体B捕获后,截留在微孔膜表面的将是游离的PS微球及带有免疫反应复合物的PS微球。以双抗体检测表面乙肝抗原为例说明如下:微孔杯中添加了至少一种直径均匀且粒径为800nm的包被微球、固定于包被微球表面的表面乙肝抗原的单抗A、以及粒径为20nm的量子点微粒及其表面标记的表面乙肝抗原的单抗B;当表面乙肝抗原的样品溶液加入该微孔杯时,包被微球及单抗A,标记量子点微粒的单抗一起进入溶液检测区进行混合孵育反应。当溶液受到驱动力时将穿越通孔滤膜从出口流出,直径小于滤膜孔径的量子点微粒标记的单抗B能自由穿越滤膜,但粒径大于滤膜孔径的包被微球及单抗A、抗体免疫反应复合物(包被微球及量子点微粒)却被截留下来并浓缩集聚在滤膜表面。鉴于包被微球及量子点微粒的粒径差异关系,游离包被微球及反应复合物微球在微孔膜表面形成堆积时,游离的量子点微粒能从堆积的微球之间的孔隙被溶液携带从堆积的微球间隙中穿越后再次穿越微孔膜流

出,不会形成阻截残留,因此微孔膜表面截留的量子点微粒属于反应复合物,当荧光被激发时,荧光强度与该蛋白的含量存在特定的对应关系。

[0049] 驱动微孔杯内溶液流出的方式可以是离心力将溶液从中心孔甩干净,也可以是与微孔杯底部密闭吸附的真空吸嘴将溶液从底部抽吸干净。

[0050] 如图1和图2所示,微孔杯底的通孔的下方设置沉孔6,所述沉孔6设于通孔2的下端,所述沉孔6内容纳所述微孔膜3,所述沉孔6的直径为3mm,形状与所述微孔膜3一致,深度与微孔膜3的厚度一致。使用时,将微孔膜3放入沉孔6通过特殊树脂粘合在沉孔底面,此时微孔膜的下表面与微孔杯的底面基本平齐。

[0051] 如图1和图2所示,所述沉孔6设于微孔杯的底部,沉孔6内的微孔膜3的表面贴合了具有导热作用的保护膜片4,保护膜片4的一部分与沉孔6的周边微孔杯底面贴合,一部分与微孔膜3贴合,即,所述微孔膜3夹持于保护膜片4与沉孔6表面之间;所述保护膜片4的中部设有一开口5,所述开口5位于微孔杯的通孔的正下方。当微孔膜3的下表面与微孔杯1的底面基本平齐时,保护膜片4比较容易保护微孔膜3,使微孔膜3不容易脱落,同时也让微孔杯1的溶液只能从通孔2下方的微孔膜3穿越流出。

[0052] 所述保护膜片4的材质为金属箔或有机导热膜。当微孔杯底部受到温浴时,这样导热的保护膜片4能快速吸收热量,并通过微孔杯底部传递到内部的溶液,达到良好的温浴效果。

[0053] 如图1和图2所示,所述保护膜片4上设有一开口5,所述开口5位于微孔杯底面的通孔2的正下方,能让微孔杯1中的溶液从通孔流出后,经过微孔膜3后从该开口5流出。

[0054] 所述微孔杯底面周边设圆导角,使所述微孔杯的底面再注塑模具成型中便于保持底面平整,与金属浴完整接触并传热。所述包被微球具备水溶液溶解悬浮特征,包括聚苯乙烯微球、磁微球、硅微球、以及以纳米材料为核心而表面被亲水修饰的微球。

[0055] 所述标记试剂包括了具有特定光谱信号的荧光物质或肉眼直接可见的颜色微粒。所述颜色微粒包括纳米胶体金、乳胶微球、炭黑微粒、以及其他带颜色信号的纳米颗粒;所述荧光物质包括荧光分子及其微球、量子点微粒及其微球、上转换发光微粒及其微球、时间分辨荧光分子及其微球、以及荧光蛋白。

[0056] 本发明的微孔杯1,还包括从微孔杯上部对微孔杯底部微孔膜表面集聚的标记试剂的光谱信号进行光学探测的检测设备,如果微孔膜表面同时截留集聚了多种标记试剂,则包括同时进行多重波长信号光学探测的检测设备。

[0057] 如图1、图2和图5所示,微孔杯1的横截面呈圆形,微孔杯1的外壁下部对称设置有至少一对高度一致的下凸点7,微孔杯1的外壁上部对称设置有至少一对高度一致的上凸点8,微孔杯的上凸点8与下凸点7与固相集聚免疫检测用的穿孔板10相匹配(如图5所示)。使用时,通过上、下凸点与穿孔板10配合,能对每个微孔杯进行单独的高度一致的固定,能通过一个平面对微孔杯底部进行温浴接触及其他接触,如通过真空吸嘴对微孔杯底部进行溶液抽取。当将微孔杯插入一个与微孔杯外形相匹配的穿孔板10时,所述微孔杯1能被上凸点8悬挂起来;当将微孔杯1旋转一定角度后,所述微孔杯的下凸点7与穿孔板10的下表面接触,上凸点8与穿孔板10的上表面接触,此时微孔杯不能下降,也不能拔出,起到固定微孔杯的作用。固定微孔杯的位置的精密度和准确度对自动操作中的抽滤效果很重要。穿孔板的固定作用决定微孔杯排列整齐、位置精密度好。

[0058] 如图4所示,为本发明的一种微孔板条,包括若干个上述所述的微孔杯1,且各微孔杯1的高度一致,相邻两微孔杯1之间的间距一致,且相邻两微孔杯1之间通过外壁之间的连结点相联,如图3所示,每条微孔板条的首尾两微孔杯1的外侧各向外延伸一平台9,所述平台9与酶标微孔板的卡槽相匹配。应理解,微孔板条的形状就如常规的酶标板条,能8个一组装配到卡槽中,很容易进行批量样品溶液的检测分析。

[0059] 本实施例的其微球及标记试剂的微观尺寸关系是:当游离包被微球及其与标记试剂形成反应复合物在微孔膜表面形成堆积时,游离的标记试剂能从堆积的包被微球之间的孔隙被溶液携带从微孔膜的微孔中再次穿越流出,不会形成阻截残留。

[0060] 例如:将克伦特罗竞争抗原蛋白包被在直径大于800nm的PS微球上,把它固化在样品垫上;将克伦特罗单抗标记了直径小于300nm的荧光粒子,把它固化在试剂结合垫中;当将样品溶液添加在样品垫上时,样品溶液先与包被了克伦特罗竞争抗原蛋白的包被微球混合反应,然后溶液侧向流动穿越孔径均匀且为450nm的样品前处理膜,逐步将试剂结合垫上的标记了克伦特罗单抗的荧光粒子溶解并混合流向前方,经过一定长度层析膜的混合反应,溶液中的游离克伦特罗在溶液中如果与全部标记试剂反应后,则包被微球的捕获试剂将不再有免疫反应复合物,因此被截留在微孔膜表面的将是游离的PS微球;当溶液中的游离克伦特罗在溶液中与部分标记试剂反应后,捕获试剂将产生部分的免疫反应复合物,因此被截留在微孔膜表面的将是游离的包被微球及部分带有克伦特罗免疫反应复合物的PS微球。

[0061] 将HCG单抗A包被在直径大于800nm的PS微球上,把它固化在样品垫上;将HCG单抗B标记了直径小于300nm的荧光粒子,把它固化在试剂结合垫中;当将样品溶液添加在样品垫上时,样品溶液先将包被了HCG单抗A的PS微球溶解混合,然后溶液侧向流动穿越孔径均匀且为450nm的样品前处理膜,逐步将试剂结合垫上的标记了HCG单抗B的荧光粒子溶解并混合流向前方,经过层析膜的混合反应,当溶液中的HCG蛋白在溶液中同时被抗体A及抗体B捕获形成免疫反应复合物后,截留在微孔膜表面的将是游离的包被微球及带有免疫反应复合物的微球。

[0062] 所述微孔杯加入样品溶液且将样品溶液从贴合微孔膜的通孔流尽后,另加入洗涤溶液将集聚在微孔膜上的微球洗涤并悬浮起来,随后将洗涤溶液从微孔膜的通孔流尽后对再次集聚在微孔膜表面的微球进行光谱信号检测。一般的操作中,微孔杯底部已经包被固化了相关的抗体蛋白,样品溶液加入后将其彻底溶解,随后通过一段时间的温浴反应,就能在外力的作用下驱使溶液从通孔流出。如果样品溶液的粘度过高或杂质较多,为了确保游离的标记试剂能全部从微孔膜流出去,可以再添加一定容量的洗涤溶液对微孔膜上的免疫复合物等进行悬浮混合,随后再次驱使洗涤溶液从通孔流出。

[0063] 所述样品溶液预先通过进行孔径不大于微孔杯内与通孔表面贴合的微孔过滤膜将大颗粒的杂质过滤后,再将过滤好的溶液添加进入微孔杯,将包被试剂和标记试剂溶解进行相关反应检测。这是为了确保样品溶液中可能带入的杂质被截留干净后,再加入微孔杯进行反应,能确保游离标记试剂能全部从微孔膜流出去,提高反应的稳定性。

[0064] 实施例1

[0065] 如图1和图2所示,为本发明的一种微孔膜截留微球的微孔杯,为外形与容积完全与酶标微孔杯相同的微孔杯1,微孔杯1的底部中部位置设置了一个直径2mm的通孔2,底部

平面以通孔2中心为轴设置成倾斜角度为3度的锥形斜坡,当微孔杯中有溶液被压力驱动从通孔2流出时,微孔杯1的底面设置成锥形倾斜角度可以让溶液尽量全部流出,避免残留;在微孔杯底部的通孔下表面设置了直径3.2mm、深度0.12mm的沉孔,沉孔6内贴合孔径为0.22um的的微孔膜3,微孔膜3下方贴合了铝箔不干胶膜片,该铝箔不干胶膜片一部分与沉孔6的周边微孔杯底面贴合,一部分与微孔膜3贴合;所述铝箔不干胶膜片的中部设有一开口5,所述开口5位于微孔杯通孔2的正下方,该开口5的形状与通孔2基本相同,面积不小于通孔2。

[0066] 在微孔杯1底部添加并固化一种直径均匀且平均粒径在800nm的包被微球、在包被微球表面包被了乙肝表面抗原的单抗A,还在微孔杯底部添加并固化粒径围50nm的量子点标记微球且微球包被了乙肝表面抗原的单抗B。

[0067] 当向微孔杯中添加样品溶液时,乙肝表面抗原的单抗A,溶液中待测的乙肝表面抗原,乙肝表面抗原的单抗B反应形成免疫复合物。当溶液被离心力驱动时,溶液从通孔流出,包被微球将被通孔底部的微孔膜截留在表面形成多层堆积,游离的标记微球能从堆积的包被微球之间的孔隙被溶液携带从微孔膜的微孔中再次穿越流出,不会形成阻截残留,集聚在微孔膜表面的微球反应复合物可表征表面乙肝抗原的含量。

[0068] 实施例2

[0069] 如图3和图4所示,一种用于固相集聚免疫检测的微孔板条,包括若干个实施例1所述的微孔杯,通常情况下,每条微孔板条上设有8个或12个微孔杯,且这8个或12个微孔杯的高度一致、间距一致,并排列成一条微孔板条。相邻两微孔杯之间通过外壁之间的连结点相联,每条微孔板条的首尾两微孔杯的外侧各向外延伸一平台9,所述平台9呈圆形或方形。通常情况下,一个平台9为圆形,一个平台9为方形。所述平台9与微孔板上的卡槽相匹配,用于对每条微孔板条进行定位。

[0070] 如图5所示,所述微孔杯1的横截面呈圆形,微孔杯1的外壁下部对称设置有至少一对高度一致的下凸点7,微孔杯的外壁上部对称设有至少一对高度一致的上凸点8,且所述上凸点8和下凸点7分别设置于与微孔板条垂直的方向上,所述上凸点8与下凸点7与固相集聚免疫检测用的穿孔板10相匹配。

[0071] 微孔杯1的横截面呈圆形,微孔杯1的外壁下部对称设置有至少一对高度一致的下凸点7,微孔杯1的外壁上部对称设有至少一对高度一致的上凸点8,微孔杯1的上凸点8与下凸点7与固相集聚免疫检测用的穿孔板10相匹配(如图4和图5所示)。当将微孔杯1插入一个与微孔杯1外形相匹配的穿孔板时,所述微孔杯1能被上凸点8悬挂起来;当将微孔杯1旋转一定角度后,所述微孔杯的下凸点7与穿孔板的下表面接触,上凸点8与穿孔板的上表面接触,此时微孔杯1不能下降,也不能拔出,起到固定微孔杯1的作用。

[0072] 实施例3

[0073] 检测牛奶等中的黄曲霉素的含量

[0074] A、准确吸取500μL牛奶(样本1)、酸奶(样本2)于15mL离心管中,加入9.5mL 35%甲醇水;振荡混匀,5000rpm室温离心5min;取上清50μL用于分析。

[0075] B、取出微孔杯,放置至室温,分别加入标准品和待测样本。

[0076] C、将反应容器放置37℃孵育15min。

[0077] D、放入反应容器超滤系统中,抽滤20s。

[0078] E、将反应容器从微孔杯超滤系统中取出,加入300uL洗液。

[0079] F、放入反应容器超滤系统中,抽滤45s。

[0080] G、放入荧光检测系统中读取荧光值。

[0081] 实验结果如表1所示。

[0082] 表1荧光值

标准品浓度 (ppb)	原始 OD		平均 OD
0	8756	8684	8720
0.008	5462	5451	5456.5
0.04	2865	2885	2875
0.2	1532	1526	1529
1	841	832	836.5
5	409	401	405
样本 1	6561	6579	6570
样本 2	4351	4366	4358.5

[0083] 接着,将标准品OD值与平均OD值做曲线得到如下方程 $y = -0.3999x + 2.9025$, $R^2 = 0.9991$,结果如图6所示。

[0084] 根据曲线方式计算得到样本浓度为 (ppb)。

[0085] 经计算,样本1的黄曲霉素的浓度为0.005074ppb,样本2中黄曲霉素的浓度为0.014189ppb。

[0086] 结论:采用本发明的微孔膜截留集聚检测装置进行免疫检测试验具有良好的线性,说明该检测装置及检测的一致性,准确性好。本实施例的检测浓度0.005ppb 并能检测的低限。

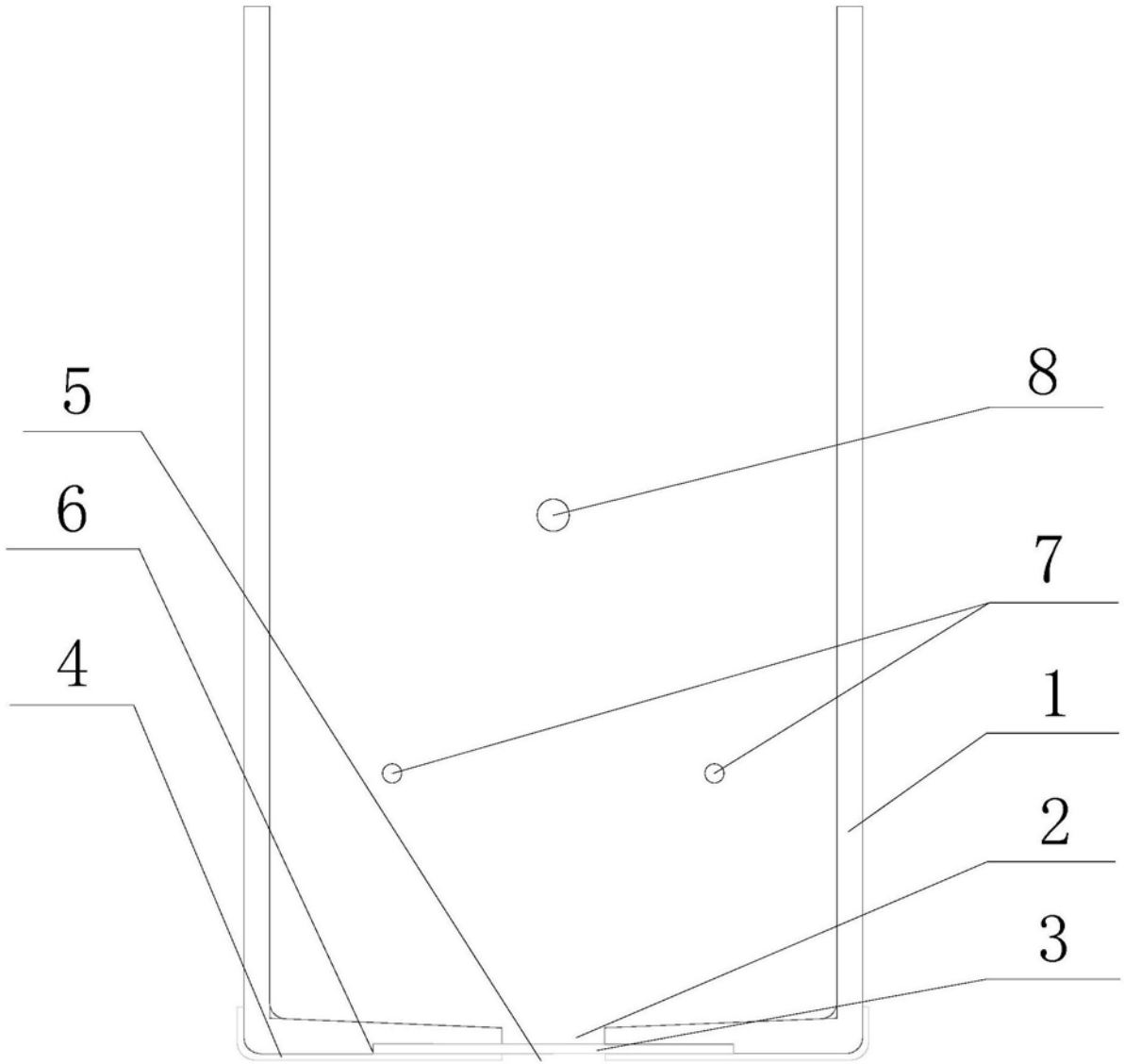


图1

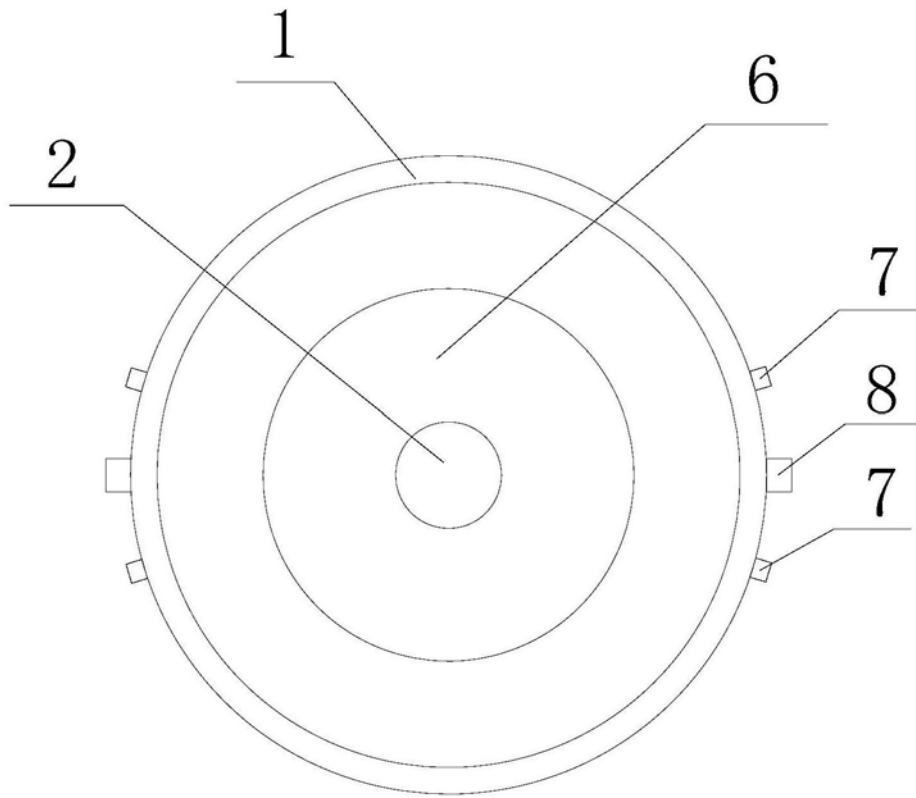


图2

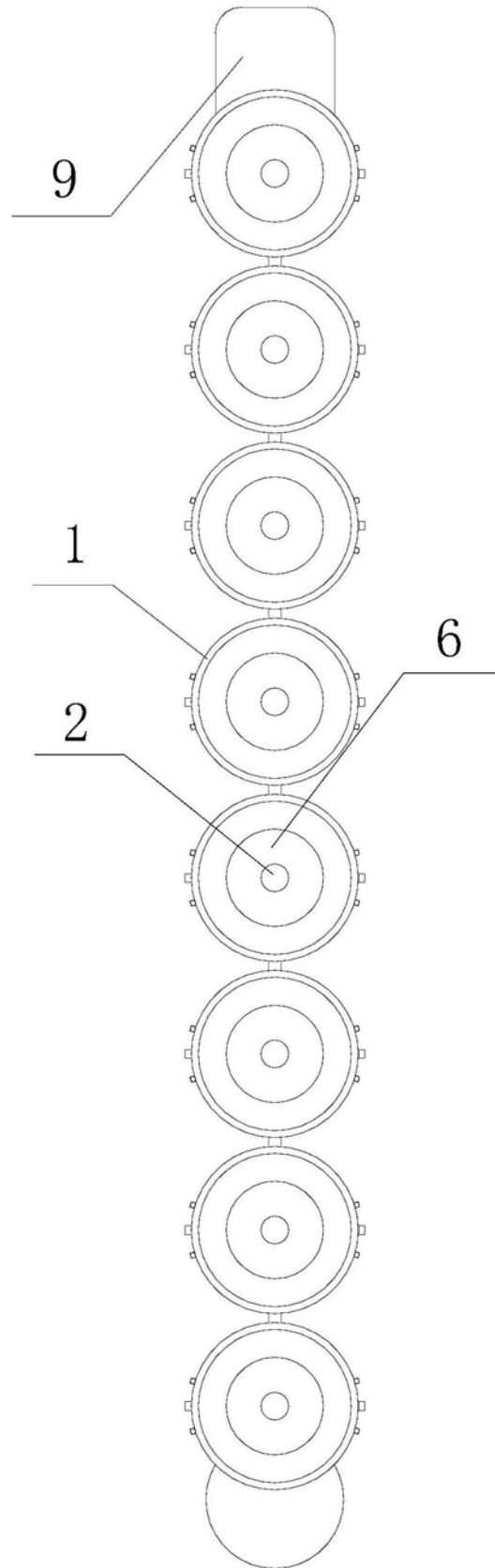


图3

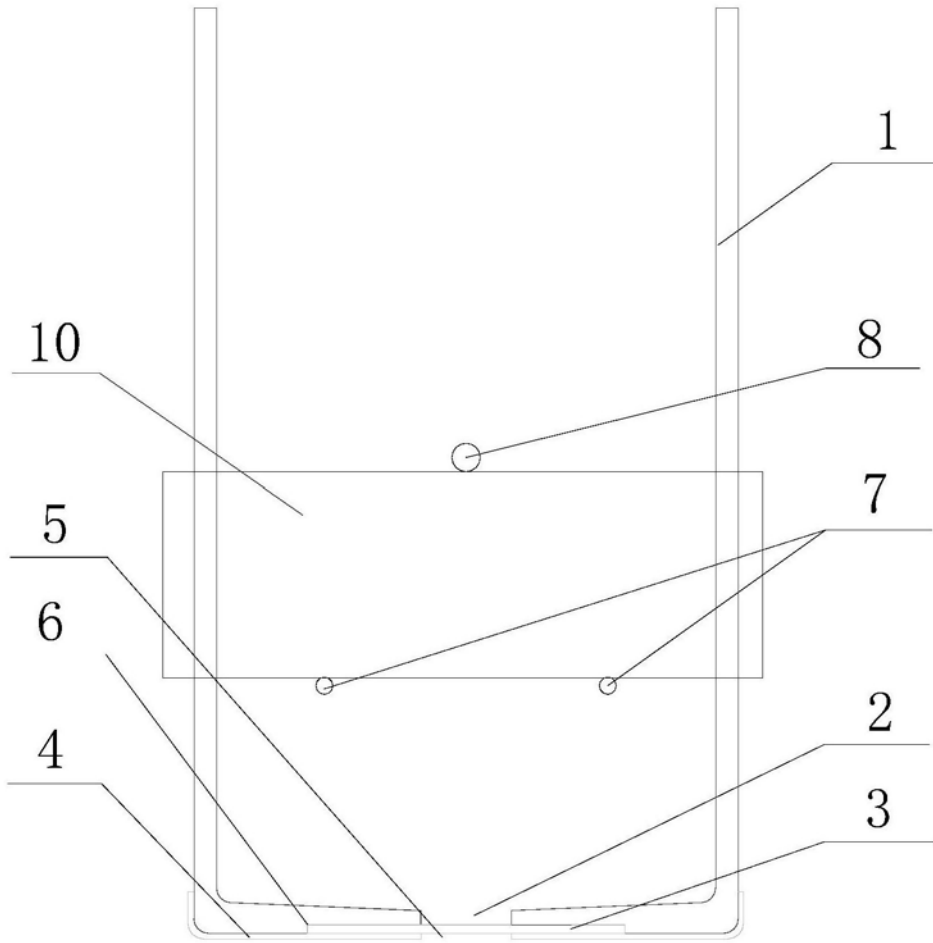


图4

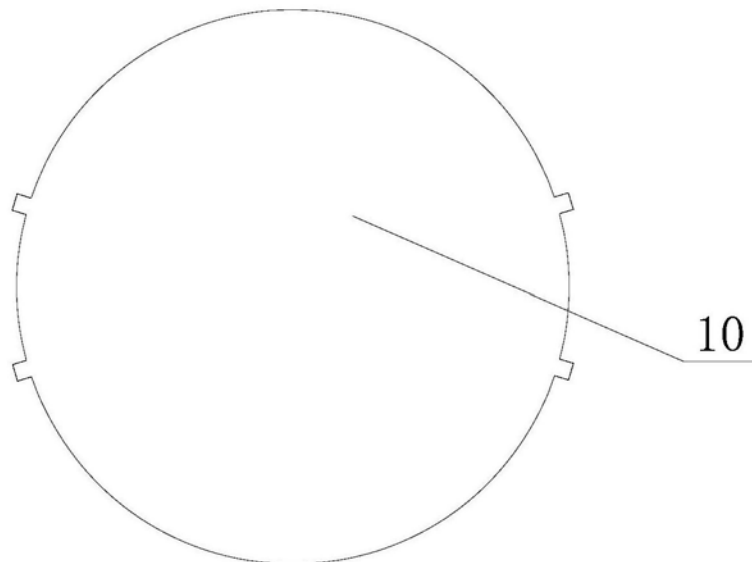


图5

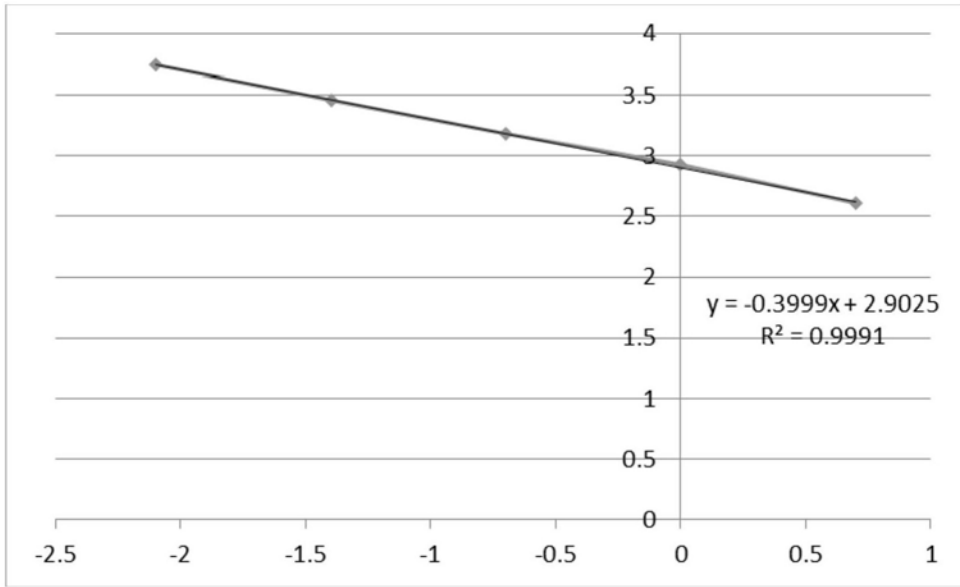


图6

专利名称(译)	微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯、微孔板条及其检测方法		
公开(公告)号	CN111077297A	公开(公告)日	2020-04-28
申请号	CN201811224856.1	申请日	2018-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	上海快灵生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海快灵生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海快灵生物科技有限公司		
[标]发明人	马校卫 常晓依 周新红 周中人		
发明人	马校卫 常晓依 周新红 周中人		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/76 G01N33/533 G01N21/64 G01N21/29		
CPC分类号	G01N21/29 G01N21/6408 G01N21/6486 G01N33/5302 G01N33/5304 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/76		
代理人(译)	缪利明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种微孔膜截留集聚微球的免疫微孔杯，微孔杯底部的中部设置一通孔，杯内底面以通孔中心为轴成一定锥形倾斜角度；通孔表面贴合了微孔膜；微孔杯内设置至少一种直径均匀且大于微孔膜孔径的包被微球、固定于包被微球表面的捕获试剂、以及直径小于微孔膜孔径的标记试剂；捕获试剂及标记试剂具有互为直接或间接配位体关系的物质；含待测物质的样品溶液加入时发生反应，在包被微球表面形成配位体反应复合物。在溶液穿越微孔膜流出时，游离的标记试剂流出，配位体反应复合物的标记试剂及包被微球被微孔膜截留在表面，形成聚集浓缩效果。本发明还公开了由若干所述微孔杯排列成的微孔板条和所述微孔杯、微孔板条的检测方法。

