



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101846672 A

(43) 申请公布日 2010. 09. 29

(21) 申请号 201010165666. 4

G01N 33/571 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 05. 07

G01N 33/68 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(71) 申请人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路 92 号天津大学

(72) 发明人 常津 李云红 张琦 宋涛
逯超亮

(74) 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事务所 12201

代理人 王丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

G01N 33/576 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

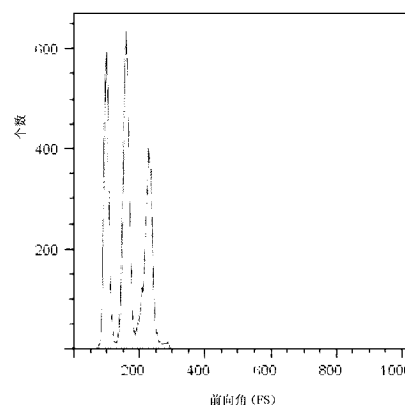
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 4 页

(54) 发明名称

基于聚合物微球变化的编码检测方法

(57) 摘要

本发明是基于聚合物微球变化的编码检测方法。采用表面偶联特异性的抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段的一系列不同粒径和内部结构的聚合物微球,通过免疫或基因杂交反应特异性识别待测样品中的抗原、抗体、DNA 或 RNA 片段;用表面携带荧光物质的分子探针与待测抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段特异性偶联;在检测仪器中检测荧光信号,与阴性和阳性对照标本或已知浓度的标准品对比,判断待测样品是阴性或阳性;在检测仪器中对微球粒径和内部结构进行表征,根据微球粒径和内部结构与检测信息的一一对应关系,从而对待测物质进行准确判断。本发明是建立在免疫以及基因杂交特异性反应的基础上,对编码技术的创新,可同时实现多个待测样本或指标的检测,简单、快速、可靠。



1. 基于聚合物微球变化的编码检测方法,其特征在于采用表面偶联特异性抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段的一系列不同粒径和内部结构的聚合物微球,通过免疫反应或基因杂交反应特异性地识别待测样品中的抗原、抗体、DNA 或 RNA 片段;用表面携带荧光物质的分子探针与待测的抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段特异性偶联,使得微球表面呈现荧光颜色;在检测仪器中检测荧光信号,与阴性和阳性对照标本或已知浓度的标准品对比,判断待测样品是阴性或是阳性;在检测仪器中对微球粒径和内部结构进行表征,根据微球粒径和内部结构与检测信息的一一对应关系,从而对待测物质进行准确判断。

2. 如权利要求 1 所述编码检测方法的聚合物微球,其特征不在于聚合物微球是不同交联度的致密微球、介孔或微孔球;微球的粒径为 $2 \sim 30 \mu\text{m}$,相邻编码微球粒径间隔在 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ 。

3. 如权利要求 2 所述的聚合物微球,其特征不在于聚合物微球微球的粒径优选 $4 \sim 16 \mu\text{m}$ 。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的聚合物微球,其特征不在于聚合物微球为聚苯乙烯类微球、聚丙烯酸酯类微球、聚苯乙烯-丙烯酸共聚微球或聚甲基丙烯酸甲酯-丙烯酸共聚微球,分散系数低于 15%。

5. 如权利要求 1 所述的检测方法,其特征不在于微球表面带有氨基、羧基或氯甲基官能团,表面官能团负载率为 $0.5 \sim 1.5\text{mmol/g}$;与蛋白或基因结合成为诊断微球,从而建立不同微球与不同蛋白或基因的一一对应关系。

6. 如权利要求 1 所述的检测方法,其特征不在于所述的抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段是抗结核杆菌抗体、抗乙肝病毒抗体抗微生物抗体中的一种或几种;类风湿因子、抗甲状腺球蛋白抗体自身抗体中的一种或几种;抗小鼠抗体、抗兔二抗第二抗体中的一种或几种;小鼠血清、兔血清动物血清抗原类中的一种或几种;猪流感病毒 NS₁ 基因、胰岛素基因微生物体内的特异基因、人体或动物体内基因的转录产物其中的一种或几种。

7. 如权利要求 1 所述的检测方法,其特征不在于表面偶联抗体的编码微球和荧光标记的同种抗体,对应检测待测样品中的抗原;表面偶联抗原的编码微球和荧光标记的同种抗原,对应检测待测样品中的抗体;表面偶联 DNA 片段或 RNA 片段的编码微球和荧光标记相同的 DNA 或 RNA 片段,对应检测待测样品中的 DNA 或 RNA 片段。

8. 如权利要求 1 所述的检测方法,其特征不在于检测仪器是分辨聚合物微球不同粒径和致密与介孔微球的散射光信号。

9. 如权利要求 8 所述的检测方法,其特征不在于所述的检测仪器为流式细胞仪,流式细胞仪检测信号的变异系数在 20% 以下;前向角散射光信号最小分辨尺寸为 $0.3 \mu\text{m}$;侧向角散射光信号反映微球密微球与介孔微球的散射信号强;将检测信号检转化为直观显示的一维直方图和二维散点图,以精确识别不同微球,通过一一对应的关系确定待测物质的信息。

基于聚合物微球变化的编码检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医用检测技术领域,主要涉及一种基于聚合物微球变化的编码检测方法。本发明是建立在免疫反应以及基因杂交特异性反应的基础上,对编码技术的创新,可同时实现多个待测样本或指标的检测,简单、快速、可靠。

背景技术

[0002] 在生物医学领域中,人们对生命现象的观察和研究已经深入到单细胞、单分子水平。生物医学检测技术是现代生命科学与医学发展的重要手段和实验工具,尤其是对感染性疾病、遗传性疾病和恶性肿瘤等的临床诊断具有极其重要的作用。

[0003] 流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 是一种在功能水平上对细胞或其他生物粒子定量检测和分选的分析方法,在生物床医学领域应用广泛。细胞或粒子在激光束的照射下产生散射光和激发荧光,这两种光信号同时被前向光电二极管和 90° 方向的光电倍增管 (PMT) 接收。光散射信号在前向小角度进行检测,称为前向散射 (forward scatter, FSC), 这种信号反映了微球粒径或体积的大小;90° 散射光又称侧向散射 (side scatter, SSC), 是指与激光束-液流平面垂直的散射光,其信号强度可反映微球内部复杂程度。检测后的信号经计算机处理后即转化为可直观观察的一维直方图或二维散点图。流式细胞仪的分辨率主要取决于仪器本身,常用变异系数 (Cv) 来表示, $Cv = d/m \times 100\%$ (d 是分布的标准偏差, m 是分布的平均值)。近年来,流式细胞仪在技术原理和设计研制方面无突破性进展,但在各种功能上却有了很大提高,尤其是荧光探针的不断推陈出新,使流式细胞仪新的参量分析方面不断有新的发展,并使仪器不断向小型化,操作自动化、简单化方向发展。顾忠泽等 (CN1595149A) 发明一种基于编码微球的微流控生物芯片,是基于流式细胞术原理发展的一种新的检测技术。

[0004] 编码技术是目前用于医学检测以及科学研究的关键技术,是将待检测的信息转换为微球颜色、粒径或者磁性等能快速、准确检测的信号,便于判断和筛选。Chandler 等 (美国专利, US626822) 利用聚苯乙烯纳米微球,溶胀吸附荧光物质实现了编码。颜晓梅等 (CN101392172A) 制得了粒径均一的、羧基化荧光编码微球。苏星光等 (CN101530766A) 发明了磁性荧光编码微球,集磁响应与荧光编码于一身,在应用方面具有很大优势。但是由于荧光物质本身发光效率和稳定性难控制、不同波长荧光效率差别显著等引发的问题仍然存在。目前应用较多微球聚合方法主要包括分散聚合、悬浮聚合、乳液聚合、种子聚合、SPG 膜乳化法等。20 世纪八十年代 Ugelstad 等开发了种子溶胀聚合法,通过引入惰性溶剂和单体一起溶胀单分散种子微球,可以用来制备单分散的聚合物微球。目前对种子溶胀聚合的理论和方法已经相当成熟,通过二步种子溶胀聚合可以获得不同系列粒径、高度均匀的功能化微球,不仅可以获得高交联度的致密微球,还能获得介孔或微孔球。由于微球表面带有功能基团,特别是羧基基团,可以与抗体、抗原以及基因片段结合成为诊断微球。诊断微球基于免疫反应或基因杂交特异性反应,特异地识别待测物质,通过流式细胞仪检测即可准确判断样品中是否含有该物质或诊断患者是否患有某种疾病。

[0005] 目前很多液相生物芯片的载体微球采用荧光微球,由于微球荧光负载不均匀、稳定性差、容易发生泄漏、不同荧光波长的荧光效率不同,且荧光染料的成本较高、过程复杂,在生物医学检测方面应用受限;对微球的要求高,不但要求微球高度均匀,表面官能团富集而且能有效、稳定的包埋小分子。如何既能实现高通量同时检测、又能使操作简单、检测信号稳定性强、区分度高,且成本低廉的编码技术,一直受到研究人员的广泛关注。

发明内容

[0006] 本发明旨在提供一种易于检测、准确区分,同时实现高通量检测的基于聚合物微球变化的编码检测方法,可广泛应用于生物学、临床医学、免疫学、药学等生物医学检测领域。

[0007] 本发明提供了基于聚合物微球变化的编码检测方法:

[0008] 本发明采用表面偶联特异性的抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段的一系列不同粒径和内部结构的聚合物微球,通过免疫反应或基因杂交反应特异性识别待测样品中的抗原、抗体、DNA 或 RNA 片段;用表面携带荧光物质的分子探针与待测的抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段特异性偶联,使得微球表面呈现荧光颜色;在检测仪器中检测荧光信号,与阴性和阳性对照标本或已知浓度的标准品对比,判断待测样品是阴性或是阳性;在检测仪器中对微球粒径和内部结构进行表征,根据微球粒径和内部结构与检测信息的一一对应关系,从而对待测物质进行准确判断。

[0009] 所述的聚合物微球是不同交联度的致密微球、介孔或微孔球;微球的粒径为 $2 \sim 30 \mu\text{m}$,相邻编码微球粒径间隔在 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ 。

[0010] 所述的聚合物微球微球的粒径优选 $4 \sim 16 \mu\text{m}$ 。

[0011] 所述的聚合物微球为聚苯乙烯类微球、聚丙烯酸酯类微球、聚苯乙烯-丙烯酸共聚微球或聚甲基丙烯酸甲酯-丙烯酸共聚微球,分散系数低于 15%。

[0012] 所述的微球表面带有氨基、羧基或氯甲基官能团,表面官能团负载率为 $0.5 \sim 1.5 \text{mmol/g}$;与蛋白或基因结合成为诊断微球,从而建立不同微球与不同蛋白或基因的一一对应关系。

[0013] 所述的抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段是抗结核杆菌抗体、抗乙肝病毒抗体抗微生物抗体中的一种或几种;类风湿因子、抗甲状腺球蛋白抗体自身抗体中的一种或几种;抗小鼠抗体、抗兔二抗第二抗体中的一种或几种;小鼠血清、兔血清动物血清抗原类中的一种或几种;猪流感病毒 NS₁ 基因、胰岛素基因微生物体内的特异基因、人体或动物体内基因的转录产物其中的一种或几种。

[0014] 所述的一一对应关系是表面偶联抗体的编码微球和荧光标记的同种抗体,对应检测待测样品中的抗原;表面偶联抗原的编码微球和荧光标记的同种抗原,对应检测待测样品中的抗体;表面偶联 DNA 片段或 RNA 片段的编码微球和荧光标记相同的 DNA 或 RNA 片段,对应检测待测样品中的 DNA 或 RNA 片段。

[0015] 所述的检测仪器可分辨聚合物微球不同粒径和致密与介孔微球的散射光信号,优选流式细胞仪。

[0016] 所述的检测仪器其检测信号的变异系数在 20% 以下;其前向角散射光信号最小分辨尺寸为 $0.3 \mu\text{m}$;其侧向角散射光信号反映微球密微球与介孔微球的散射信号强;将检

测信号检转化为直观显示的一维直方图和二维散点图,以精确识别不同微球,通过一一对应的关系确定待测物质的信息。

[0017] 所述的编码微球包括:

[0018] 1) 采用一系列粒径为 $2\ \mu\text{m}$ 、 $4\ \mu\text{m}$ 、 $6\ \mu\text{m}$ 、 $8\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$ 、 $12\ \mu\text{m}$ 、 $14\ \mu\text{m}$ 、 $16\ \mu\text{m}$ 、 $18\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ 、 $22\ \mu\text{m}$ 、 $24\ \mu\text{m}$ 、 $26\ \mu\text{m}$ 、 $28\ \mu\text{m}$ 、 $30\ \mu\text{m}$ 的致密微球,通过检测谱图能明显区分,可同时实现 16 种不同待测物质的同时检测。

[0019] 2) 采用一系列粒径为 $2\ \mu\text{m}$ 、 $4\ \mu\text{m}$ 、 $6\ \mu\text{m}$ 、 $8\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$ 、 $12\ \mu\text{m}$ 、 $14\ \mu\text{m}$ 、 $16\ \mu\text{m}$ 、 $18\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ 、 $22\ \mu\text{m}$ 、 $24\ \mu\text{m}$ 、 $26\ \mu\text{m}$ 、 $28\ \mu\text{m}$ 、 $30\ \mu\text{m}$ 的致孔微球,通过检测谱图能明显区分,可同时实现 16 种不同待测物质的同时检测。

[0020] 3) 采用 $4\ \mu\text{m}$ 、 $6\ \mu\text{m}$ 、 $8\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$ 、 $12\ \mu\text{m}$ 、 $14\ \mu\text{m}$ 、 $16\ \mu\text{m}$ 粒径的微球,可编码 7 种诊断微球,分别采用致密、致孔两种不同内部结构的微球,可使得微球种类增加一倍;当采用不同交联度微球时,能使得编码微球种类增加多倍,可实现多通量检测。

[0021] 根据编码微球的粒径以及内部结构信息确定的检测标准,在生物反应前后偏差范围在 $0.2\ \mu\text{m}$ 左右,对检测信号影响很小,能够保证诊断微球标准粒径和内部结构信息的可靠性。

[0022] 总之,与现有的编码检测技术相比,本发明涉及的编码检测方法具有微球粒径分散系数小于 8%,内部结构多样;检测图谱峰半峰宽窄,重叠程度小于 10%,检测信号区分度高,能够实现多个待测样本、多个指标的同时检测;微球表面富集官能团,偶联生物分子能力强,能有效地诊断疾病、判断药物疗效以及实现对抗体、抗原、DNA 或 RNA 等的标记和识别。

附图说明

[0023] 图 1:双抗夹心法检测的原理图

[0024] 图 2:A) $4\ \mu\text{m}$ 、 $5\ \mu\text{m}$ 、 $6\ \mu\text{m}$ 致密微球的前向角-侧向角二维散点图;

[0025] B) $4\ \mu\text{m}$ 、 $5\ \mu\text{m}$ 、 $6\ \mu\text{m}$ 致密微球的前向角-个数一维直方图。

[0026] 图 3:A) $5.7\ \mu\text{m}$ 、 $9.8\ \mu\text{m}$ 、 $12.3\ \mu\text{m}$ 致孔微球的前向角-侧向角二维散点图;

[0027] B) $5.7\ \mu\text{m}$ 、 $9.8\ \mu\text{m}$ 、 $12.3\ \mu\text{m}$ 致孔微球的前向角-个数一维直方图。

[0028] 图 4:A) $5.7\ \mu\text{m}$ 致密微球、 $7.3\ \mu\text{m}$ 致孔微球、 $12.3\ \mu\text{m}$ 致密微球的前向角-侧向角二维散点图;

[0029] B) $5.7\ \mu\text{m}$ 致密微球、 $7.3\ \mu\text{m}$ 致孔微球、 $12.3\ \mu\text{m}$ 的前向角-个数一维直方图。

[0030] C) $5.7\ \mu\text{m}$ 致密微球、 $7.3\ \mu\text{m}$ 致孔微球、 $12.3\ \mu\text{m}$ 的侧向角-个数一维直方图。

具体实施方式

[0031] 下面给出本发明的实施例,是对本发明的进一步说明,而不是限制本发明的范围。

[0032] 一、编码微球检测方法

[0033] 聚合物微球制备方法可以是分散聚合、乳液聚合、SPG 膜乳化法、悬浮聚合、种子聚合,优选二步种子溶胀聚合,通过改变种子微球粒径或适当改变溶胀聚合过程的单体和添加剂的比例以获得粒径范围宽的系列微球。微球表面带有功能基团,可以是氨基、羧基、氯甲基,优选羧基,羧基与生物小分子结合能力强。如分散聚合、乳液聚合、二步种子溶胀聚合、SPG 膜乳化法等均可制备粒径范围在 $2\sim 30\ \mu\text{m}$ 的微球,可以是聚甲基丙烯酸-丙烯酸、

聚苯乙烯-衣康酸微球、聚苯乙烯-丙烯酸微球、聚丙烯酸-二乙胺微球、聚苯乙烯-氯甲基苯乙烯微球,表面官能团负载率为 0.5~1.5mmol/g。编码微球优选采用二步种子溶胀聚合,粒径范围优选 4-16 μ m,表面官能团负载率优选 0.7-1.0mmol/g 的聚苯乙烯-丙烯酸微球。

[0034] 实施例 1

[0035] 选取 4 μ m 致密聚苯乙烯-丙烯酸微球,分散系数为 7.1%,表面功能基团负载率为 0.505mmol/g;5 μ m 致密聚苯乙烯-丙烯酸微球,分散系数为 5.0%,表面功能基团负载率为 0.571mmol/g;6 μ m 致密聚苯乙烯-丙烯酸微球,分散系数为 5.5%,表面功能基团负载率为 0.585mmol/g 三种高交联度的微球,各 5mg,分别用 100 μ L PBS 缓冲液分散然后超声,标号为 1、2、3。将 1、2、3 混合后,超声分散,用流式细胞仪进行检测,得到一维直方图和二维散点图,保存并打印结果,如附图 2。

[0036] 实施例 2

[0037] 选取 5.7 μ m 致孔的聚苯乙烯-丙烯酸微球,分散系数为 6.4%,表面功能基团负载率为 0.597mmol/g;9.8 μ m 致孔的聚苯乙烯-丙烯酸微球,分散系数为 5.2%,表面功能基团负载率为 0.633mmol/g;12.3 μ m 致孔的聚苯乙烯-丙烯酸微球,分散系数为 7.7%,表面功能基团负载率为 0.693mmol/g,各 5mg,分别用 100 μ L PBS 缓冲液分散然后超声,标号为 1、2、3。将 1、2、3 混合后,超声分散,用流式细胞仪进行检测,得到一维直方图和二维散点图,保存并打印结果,如附图 3。

[0038] 实施例 3

[0039] 选取 5.7 μ m 致密聚苯乙烯-丙烯酸微球,分散系数为 5.0%,表面功能基团负载率为 0.670mmol/g;7.3 μ m 致孔的聚苯乙烯-丙烯酸微球,分散系数为 5.2%,表面功能基团负载率为 0.633mmol/g;12.3 μ m 致密聚苯乙烯-丙烯酸微球,分散系数为 5.5%,表面功能基团负载率为 0.700mmol/g;各 5mg,分别用 100 μ L PBS 缓冲液分散然后超声,标号为 1、2、3,混合在一起后超声分散,用流式细胞仪进行检测,得到一维直方图和二维散点图,保存并打印结果。如附图 4。

[0040] 二、活性生物分子检测

[0041] 实施例 5

[0042] 采用免疫夹心法,即采用表面偶联不同检测蛋白或基因的聚合物微球(简称检测基元),与血液中的蛋白或基因相互作用,再用带有荧光标记的检测蛋白或基因(简称报告基元)识别,通过流式细胞仪进行检测,根据粒径和内部结构的信息判断血液中含有何种蛋白或基因,并且根据流式一维直方图或二维散点图显示,可以建立微球个数与待测物质的定量关系。

[0043] 1) 选取 2 μ m 致密聚苯乙烯-丙烯酸微球,偶联类风湿因子制备了诊断微球 A。诊断微球 A 用以检测样品中的变性 IgG。

[0044] 2) 选取 16 μ m 致密聚苯乙烯-丙烯酸微球,偶联抗甲状腺蛋白抗体制备了诊断微球 B。诊断微球 B 用以检测样品中的抗甲状腺蛋白。

[0045] 3) 选取 30 μ m 致密聚苯乙烯-丙烯酸微球,偶联抗神经原抗体制备了诊断微球 B。诊断微球 C 用以检测样品中的抗神经元蛋白。

[0046] 将 A、B 两种种诊断微球混合后对待测样品采用免疫夹心法检测,根据所带的荧光

颜色,与阴性和阳性对照标本比较、判断。根据流式谱图信息,若测得 $2\mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有变性 IgG;若测得 $16\mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有抗甲状腺蛋白,若测得 $30\mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有抗神经元蛋白,。若同时检测到 $2\mu\text{m}$ 、 $16\mu\text{m}$ 和 $30\mu\text{m}$ 微球的信息,则证明同时含有三种物质。检测图谱半峰宽较窄,很容易分辨。

[0047] 实施例 6

[0048] 1) 选取 $4\mu\text{m}$ 致密聚苯乙烯-丙烯酸微球,偶联抗结核杆菌抗体制备了诊断微球 A。诊断微球 A 用以检测样品中的结核杆菌,判断待测样品中是含有结核杆菌。

[0049] 2) 选取 $10\mu\text{m}$ 致密聚苯乙烯-丙烯酸微球,偶联抗艾滋病病毒抗体制备了诊断微球 B。诊断微球 B 用以检测样品中的艾滋病病毒,判断待测样品中是含有艾滋病病毒。

[0050] 3) 选取 $16\mu\text{m}$ 致密聚苯乙烯-丙烯酸微球,偶联抗乙肝病毒抗体制备了诊断微球 C。诊断微球 C 用以检测样品中的乙肝病毒,判断待测样品中是含有乙肝病毒。

[0051] 将 A、B、C 三种诊断微球混合后对血液样本采用免疫夹心法检测,根据所带的荧光颜色,与阴性和阳性对照标本比较、判断。根据流式谱图信息,若测得 $4\mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有结核杆菌;若测得 $10\mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有艾滋病病毒;若测得 $16\mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有乙肝病毒。若同时检测到 $4\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 、 $16\mu\text{m}$ 的信息,则证明同时含有三种物质。检测图谱半峰宽较窄,很容易分辨。

[0052] 实施例 7

[0053] 检测原理同上。

[0054] 1) 选取 $4.1\mu\text{m}$ 聚苯乙烯-衣康酸微球,偶联小鼠血清制备了诊断微球 A。诊断微球 A 用以检测样品中的抗鼠抗体。

[0055] 2) 选取 $6.6\mu\text{m}$ 聚苯乙烯-衣康酸微球,偶联兔血清制备了诊断微球 B。诊断微球 B 用以检测样品中的抗兔抗体。

[0056] 将 A、B 两种种诊断微球混合后对待测样品采用免疫夹心法检测,根据所带的荧光颜色,与阴性和阳性对照标本比较、判断。根据流式谱图信息,若测得 $4.1\mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有抗鼠抗体;若测得 $6.6\mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有抗兔抗体。若同时检测到 $4.1\mu\text{m}$ 、 $6.6\mu\text{m}$ 的信息,则证明同时含有两种生物分子。检测图谱半峰宽较窄,很容易分辨。

[0057] 实施例 8

[0058] 检测原理同上。

[0059] 1) 选取 $2\mu\text{m}$ 聚甲基丙烯酸甲酯-丙烯酸微球,偶联抗乙肝病毒抗体制备了诊断微球 A。诊断微球 A 用以检测样品中的乙肝病毒。

[0060] 2) 选取 $10\mu\text{m}$ 聚甲基丙烯酸甲酯-丙烯酸微球,偶联类风湿因子制备了诊断微球 B。诊断微球 B 用以检测样品中的变性 IgG。

[0061] 将 A、B 两种种诊断微球混合后对待测样品采用免疫夹心法检测,根据所带的荧光颜色,与阴性和阳性对照标本比较、判断。根据流式谱图信息,若测得 $2\mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有乙肝病毒;若测得 $10\mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有抗兔抗体。若同时检测到 $2\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 的信息,则证明同时含有两种生物分子。检测图谱半

峰宽较窄,很容易分辨。

[0062] 实施例 9

[0063] 检测原理同上。

[0064] 1) 选取 $5\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯-氯甲基苯乙烯微球,偶联抗乙肝病毒抗体制备了诊断微球 A。诊断微球 A 用以检测样品中的乙肝病毒。

[0065] 2) 选取 $13\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯-氯甲基苯乙烯微球,偶联类风湿因子制备了诊断微球 B。诊断微球 B 用以检测样品中的变性 IgG。

[0066] 将 A、B 两种种诊断微球混合后对待测样品采用免疫夹心法检测,根据所带的荧光颜色,与阴性和阳性对照标本比较、判断。根据流式谱图信息,若测得 $5\ \mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有乙肝病毒;若测得 $13\ \mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有变性 IgG。若同时检测到 $5\ \mu\text{m}$ 、 $13\ \mu\text{m}$ 的信息,则证明同时含有两种生物分子。检测图谱半峰宽较窄,很容易分辨。

[0067] 实施例 10

[0068] 检测原理同上。

[0069] 1) 选取 $4\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯-丙烯酸微球,表面官能团负载率为 0.5mmol/g ,偶联抗乙肝病毒抗体制备了诊断微球 A。诊断微球 A 用以检测样品中的乙肝病毒。

[0070] 2) 选取 $10\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯-丙烯酸微球,表面官能团负载率为 0.7mmol/g ,偶联抗甲状腺球蛋白制备了诊断微球 B。诊断微球 B 用以检测样品中的甲状腺球蛋白。

[0071] 将 A、B 两种种诊断微球混合后对待测样品采用免疫夹心法检测,根据所带的荧光颜色,与阴性和阳性对照标本比较、判断。根据流式谱图信息,若测得 $4\ \mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有乙肝病毒;若测得 $10\ \mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有甲状腺球蛋白。若同时检测到 $4\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$ 的信息,则证明同时含有两种生物分子。检测图谱半峰宽较窄,很容易分辨。

[0072] 实施例 11

[0073] 检测原理同上。

[0074] 1) 选取 $4\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯-丙烯酸微球,表面官能团负载率为 1.0mmol/g ,偶联抗乙肝病毒抗体制备了诊断微球 A。诊断微球 A 用以检测样品中的乙肝病毒。

[0075] 2) 选取 $10\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯-丙烯酸微球,表面官能团负载率为 1.5mmol/g ,偶联抗结核杆菌抗体制备了诊断微球 B。诊断微球 B 用以检测样品中的结核杆菌。

[0076] 将 A、B 两种种诊断微球混合后对待测样品采用免疫夹心法检测,根据所带的荧光颜色,与阴性和阳性对照标本比较、判断。根据流式谱图信息,若测得 $4\ \mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有乙肝病毒;若测得 $10\ \mu\text{m}$ 粒径和内部结构信息,则证明样品中含有结核杆菌。若同时检测到 $4\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$ 的信息,则证明同时含有两种生物分子。检测图谱交叉重叠少,易于分辨。

[0077] 实施例 12

[0078] 检测原理同上。

[0079] 选取 $3\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯-二乙胺微球,偶联抗小鼠二抗制备了诊断微球 A;选取 $13\ \mu\text{m}$ 聚苯乙烯-二乙胺微球,偶联抗兔二抗制备了诊断微球 B,将两种诊断微球混合在一起。对待测样品采用免疫夹心法检测,根据所带的荧光颜色,与阴性和阳性对照标本比较、判断。

根据流式图谱能很好的区分 A、B, A 和 B 粒径不同, 差别显著。

[0080] 实施例 13

[0081] 检测原理同上。

[0082] 分别制备了表面偶联猪流感病毒 NS₁ 基因片段的 5.7 μm 致密聚苯乙烯 - 丙烯酸微球 A、表面偶联胰岛素基因片段的 5.7 μm 致孔聚苯乙烯 - 丙烯酸微球 B, 将两种诊断微球混合在一起。对待测样品采用免疫夹心法检测, 根据所带的荧光颜色, 与阴性和阳性对照标本比较、判断。根据流式图谱能很好的区分 A、B, A 和 B 粒径相同但内部结构差别显著。

[0083] 若测得 5.7 μm 粒径和致孔结构信息, 则证明样品中含有互补的猪流感病毒基因片段; 若测得 5.7 μm 粒径和致密结构信息, 则证明样品中含有互补的胰岛素基因片段。若同时检测到两种内部结构的信息, 则证明同时含有两种生物分子。检测图谱半峰宽较窄, 很容易区分。

[0084] 实施例 14

[0085] 检测原理同上。

[0086] 分别选取粒径为 2 μm、4 μm、6 μm、8 μm、10 μm、12 μm、14 μm、16 μm、18 μm、20 μm、22 μm、24 μm、26 μm、28 μm、30 μm 的致密聚苯乙烯 - 丙烯酸微球, 表面分别偶联 16 种不同的抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段, 得到 16 种不同的诊断微球, 建立粒径和内部结构与抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段的一一对应关系, 可同时检测 16 种不同待测物质, 在检测图谱能明显区分。

[0087] 实施例 15

[0088] 检测原理同上。

[0089] 分别选取粒径为 2 μm、4 μm、6 μm、8 μm、10 μm、12 μm、14 μm、16 μm、18 μm、20 μm、22 μm、24 μm、26 μm、28 μm、30 μm 的致孔聚苯乙烯 - 丙烯酸微球, 表面分别偶联 16 种不同的抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段, 得到 16 种不同的诊断微球, 建立粒径和内部结构与抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段的一一对应关系, 可同时检测 16 种不同待测物质, 在检测图谱能明显区分。

[0090] 实施例 16

[0091] 检测原理同上。

[0092] 分别选取粒径为 4 μm、8 μm、12 μm、16 μm 的致密和致孔微球, 表面分别偶联 8 种不同的抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段, 得到 8 种不同的诊断微球, 建立粒径和内部结构与抗体、抗原、DNA 或 RNA 片段的一一对应关系, 可同时检测 8 种不同待测物质。粒径间隔较大且内部结构区别显著, 容易区分。

[0093] 实施例 17

[0094] 检测原理同上。

[0095] 制备了表面偶联类风湿因子的 5.7 μm 致密聚苯乙烯 - 丙烯酸微球分别对两份含有不同浓度的变异 IgG 的样品 1 和 2, 进行双抗夹心法检测。根据流式图谱显示, 两份样品检测粒径均在 5.7 μm 左右, 但是变异 IgG 的浓度高的样品谱峰明显高于浓度低的样品。根据这一特点, 可制得标准样品, 以不同浓度的待测样和标样的比较判断患者所处的时期。

[0096] 本发明公开和揭示粒径和内部结构编码微球的检测技术, 可通过借鉴本文公开内容。尽管本发明的基于聚合物微球粒径和内部结构的编码检测方法已通过较佳实施例进行

了描述,但是本领域技术人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法改动,更具体地说,所有相类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,他们都被视为包括在本发明精神、范围和内容中。

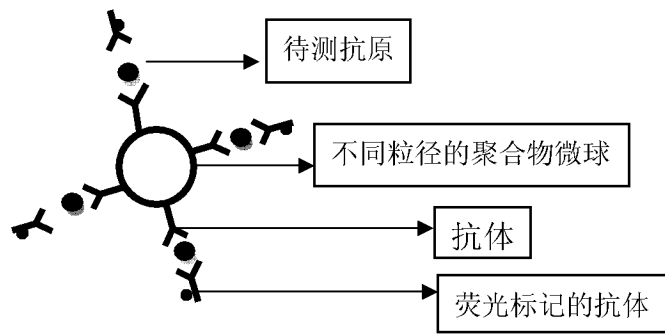


图 1

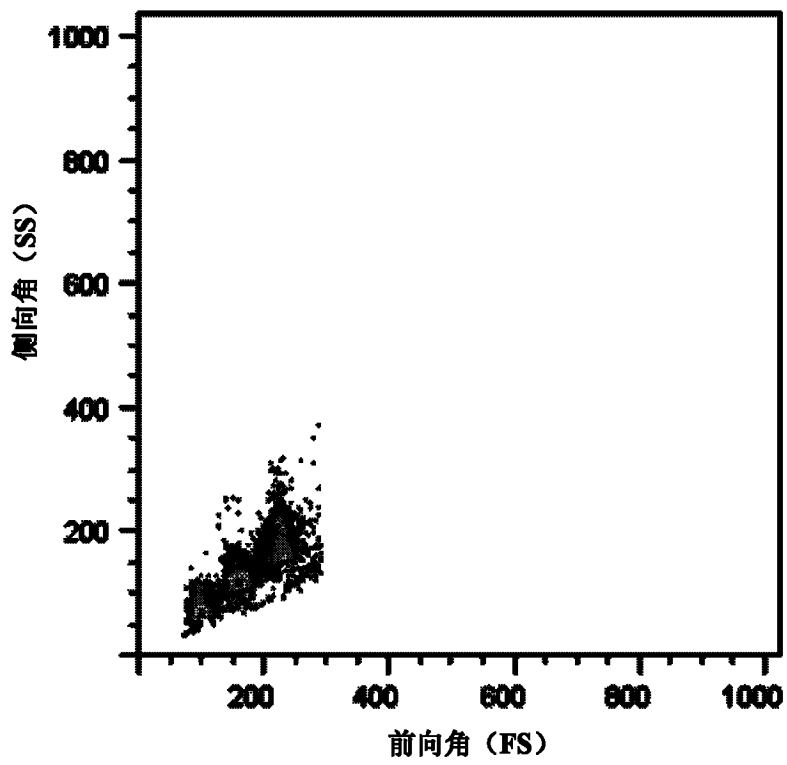


图 2a

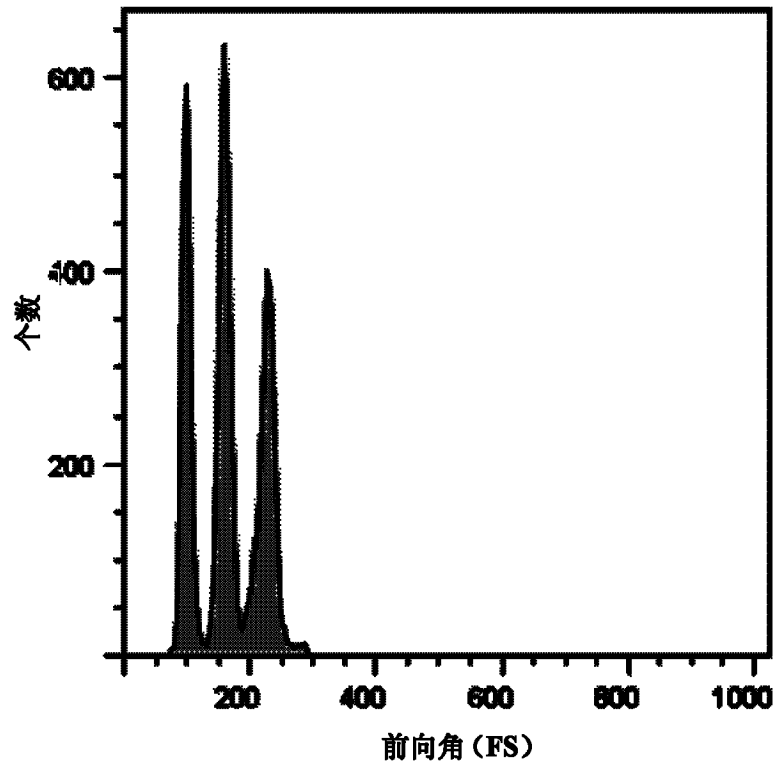


图 2b

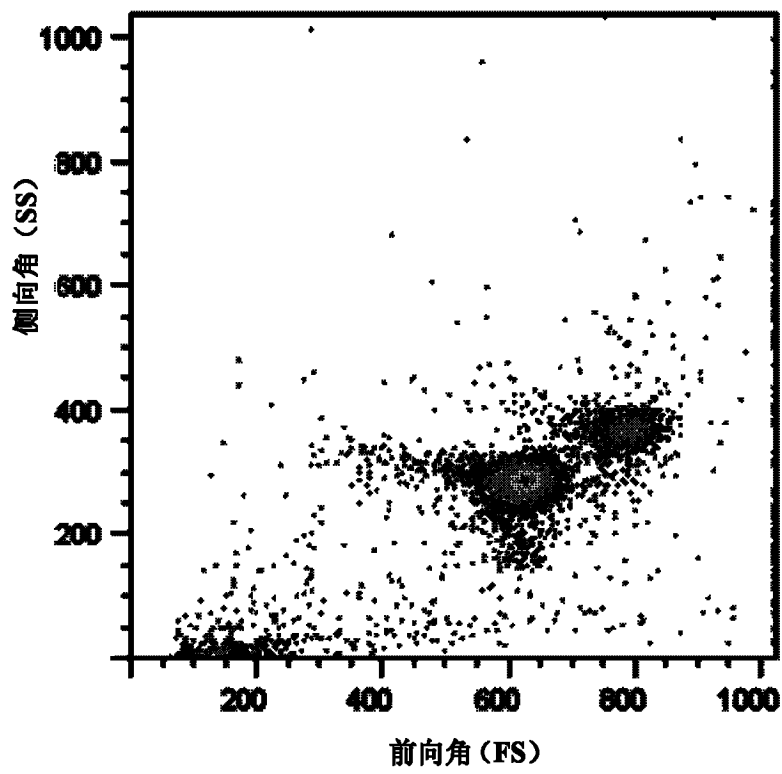


图 3a

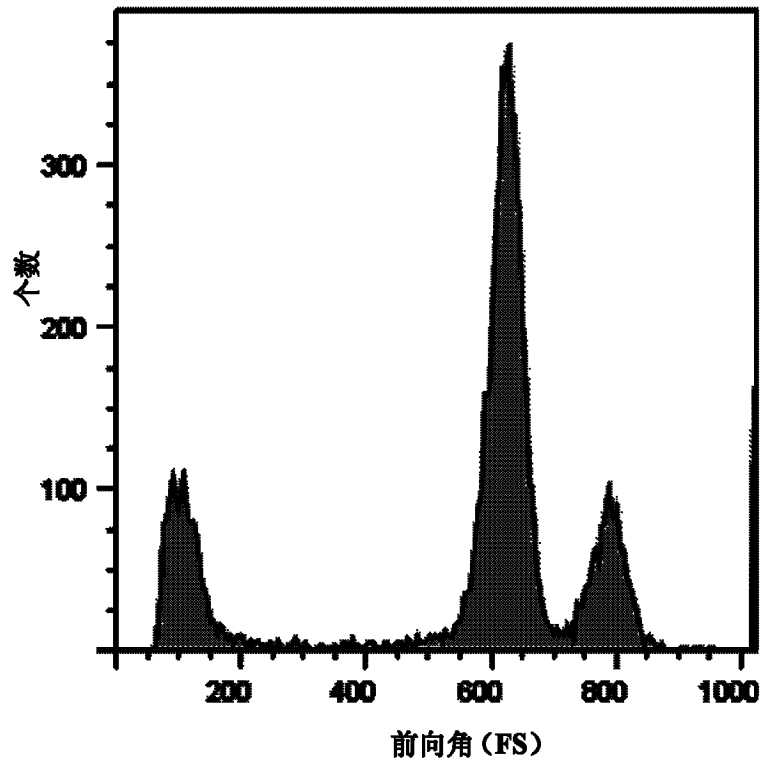


图 3b

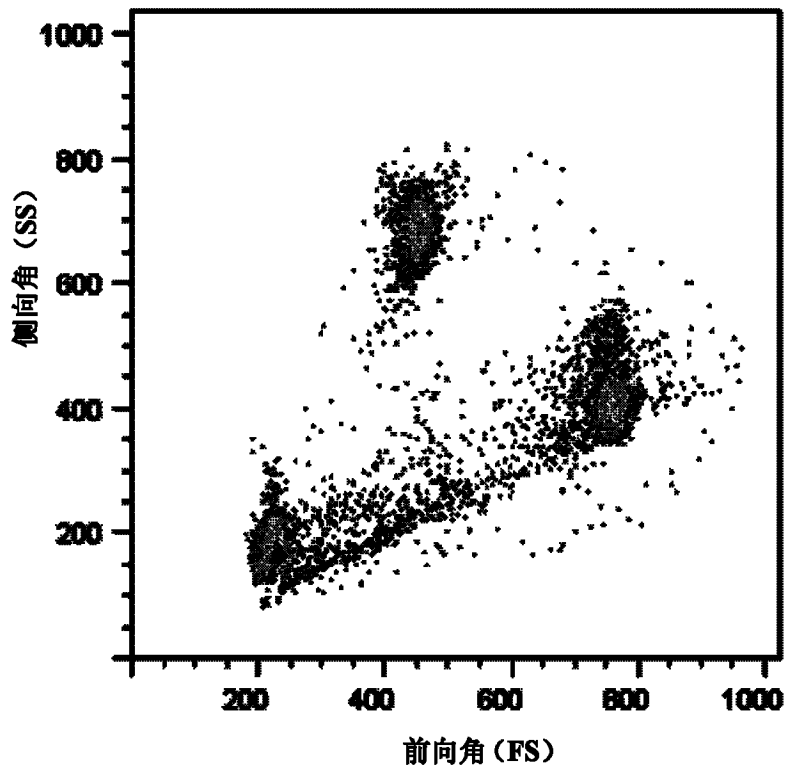


图 4a

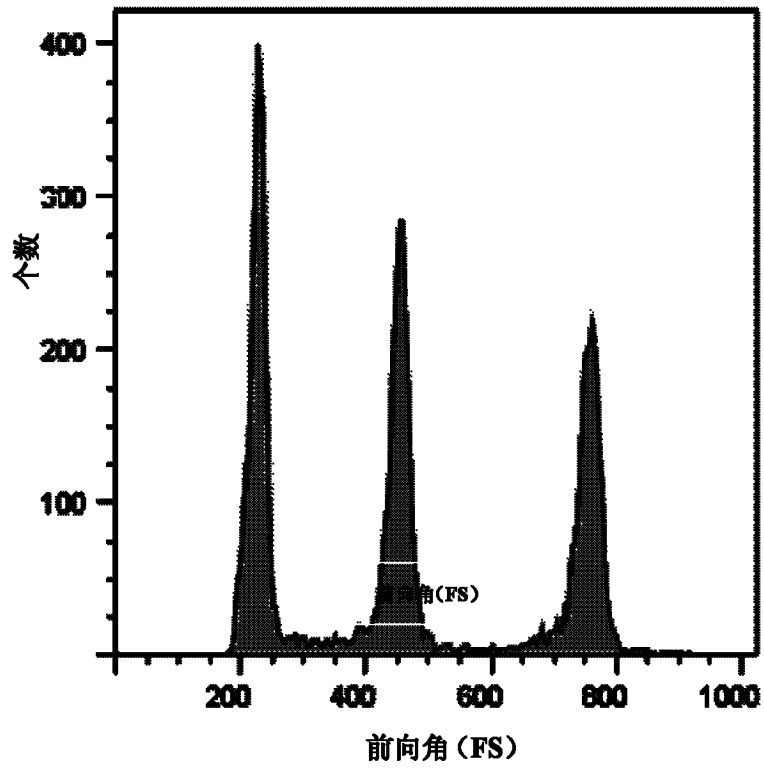


图 4b

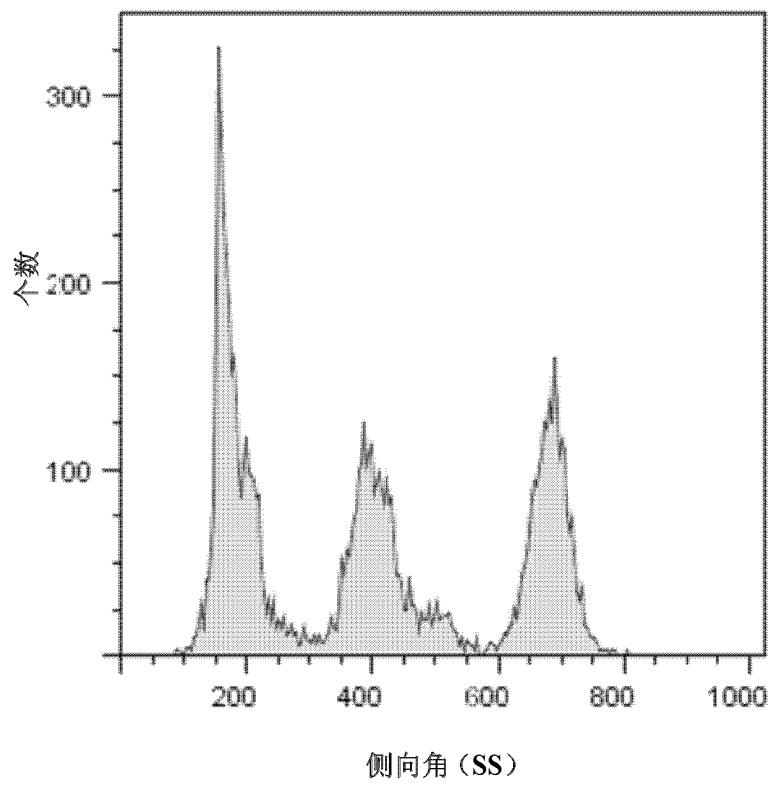


图 4c

专利名称(译)	基于聚合物微球变化的编码检测方法		
公开(公告)号	CN101846672A	公开(公告)日	2010-09-29
申请号	CN201010165666.4	申请日	2010-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	天津大学		
申请(专利权)人(译)	天津大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津大学		
[标]发明人	常津 李云红 张琦 宋涛 逯超亮		
发明人	常津 李云红 张琦 宋涛 逯超亮		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/576 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/68 C12Q1/68		
代理人(译)	王丽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是基于聚合物微球变化的编码检测方法。采用表面偶联特异性的抗体、抗原、DNA或RNA片段的一系列不同粒径和内部结构的聚合物微球，通过免疫或基因杂交反应特异性识别待测样品中的抗原、抗体、DNA或RNA片段；用表面携带荧光物质的分子探针与待测抗体、抗原、DNA或RNA片段特异性偶联；在检测仪器中检测荧光信号，与阴性和阳性对照标本或已知浓度的标准品对比，判断待测样品是阴性或阳性；在检测仪器中对微球粒径和内部结构进行表征，根据微球粒径和内部结构与检测信息的一一对应关系，从而对待测物质进行准确判断。本发明是建立在免疫以及基因杂交特异性反应的基础上，对编码技术的创新，可同时实现多个待测样本或指标的检测，简单、快速、可靠。

