[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
G01N 33/53
G01N 33/543
G01N 27/72

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01116362.3

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1208621C

[22] 申请日 2001.4.10 [21] 申请号 01116362.3

[30] 优先权

[32] 2000. 4.10 [33] EP [31] 00302993.1

[71] 专利权人 兰道克斯实验有限公司

地址 英国安特里姆

[72] 发明人 彼得·霍金斯

理查德·威廉·勒克司顿

审查员 刘 铭

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

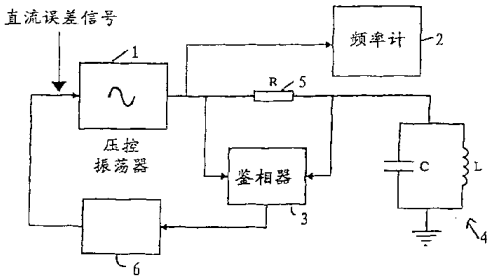
代理人 杜日新

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 10 页

[54] 发明名称 磁性粒子测定方法和设备及利用磁性粒子测定进行结合试验的方法

[57] 摘要

磁性粒子测定方法和设备及利用磁性粒子测定进行结合试验的方法，应用具有电容器(C)与线圈(L)的调谐电路测定样品中磁粒子数的方法。 此方法包括：a)测定样品暴露于和不暴露于此线圈产生的磁场下时两种情形中的调谐电路的谐振频率差；b)利用此谐振频率差来测定样品中的磁粒子数。




ISSN1008-4274

1. 一种磁粒子测定方法，是用具有电容器与线圈的调谐电路测定样品中磁粒子数，此方法包括：a）测定样品暴露于此线圈产生的磁场下和样品未暴露于此线圈产生的磁场下时所述调谐电路的谐振频率差；b）利用此谐振频率差来确定样品中的磁粒子数。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中的步骤 a）包括：i）将样品暴露于该线圈产生的磁场下；ii）测定此调谐电路的谐振频率；iii）从该线圈产生的磁场中取出样品；iv）测定此调谐电路的谐振频率。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中用于测定谐振频率的步骤包括：a）给此调谐电路施加驱动信号；b）测量此驱动信号与自该调谐电路得到的输出信号间的相位差；c）调节所加驱动信号的频率直到它与该输出信号间不存在相位差。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中所述驱动信号具有高于 200KHz 的频率。

5. 根据上述任一项权利要求所述的方法，其中所述磁粒子包括顺磁粒子。

6. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法，其中所述线圈是螺线管、环形线圈与扁平线圈中之一。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中当线圈是螺线管时，所述将样品暴露于磁场下的方法包括将样品置于此螺线管内。

8. 根据权利要求 6 所述的方法，其中当线圈是扁平线圈时，所述方法包括将样品置于此线圈的邻边。

9. 一种利用磁粒子测定进行结合试验的方法，此方法包括：a）将第一种分子层固定于基片上；b）提供一个或多个磁粒子作为标记；c）应用此分子层进行反应，使一些磁粒子结合到基片上；d）通过测定基片暴露和不暴露于线圈产生的磁场下两种情形中调谐电路的谐振频率差，来测定结合到此基片上的磁粒子数。

10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述磁粒子是结合到相应个

数的、与所述第一种分子不相同的第二种分子上，而所述反应则将此第二种分子与所述第一种分子粘合从而将磁粒子结合到基片上。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述结合试验是免疫测定试验，所述第一种分子层是抗体/抗原，当所述第一种分子层是抗原时，所述第二种分子是抗体；当所述第一种分子层是抗体时，所述第二种分子是抗原。

12. 根据权利要求 9～11 中任一项所述的方法，其中所述基片包括塑料片。

13. 根据权利要求 9～11 中任一项所述的方法，其中所述线圈是螺线管、环形线圈与扁平线圈中之一。

14. 根据权利要求 9～11 中任一项所述的方法，其中所述测定磁粒子数的方法包括依据权利要求 1～8 中任一项所述的方法。

15. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述调谐电路连接于一锁相环电路，该锁相环电路包括：驱动器，用于产生驱动力所述调谐电路的驱动信号，和相位比较器，用于确定所述驱动信号和所述调谐电路输出信号之间的相位差，谐振频率差通过监示所述锁相环电路的工作而确定。

16. 一种测定样品中磁粒子数的设备，此设备包括：a）具有电容器与线圈的调谐电路；b）产生用于驱动调谐电路的驱动信号的驱动器；c）探测此调谐电路谐振频率的探测器，

其中当样品暴露和不暴露于该线圈产生的磁场下两种情形中调谐电路的谐振频率差，表示此样品中的磁粒子数。

17. 根据权利要求 16 所述的设备，其中所述探测器包括用来测定此驱动信号与从该调谐电路获得的输出信号之间相位差的相位比较器。

18. 根据权利要求 16 所述的设备，其中所述驱动器包括压控振荡器。

19. 根据权利要求 18 所述的设备，其中所述探测器包括用来测定此驱动信号与从该调谐电路获得的输出信号之间相位差的相位比较器，其中，所述压控振荡器响应上述相位比较器，改变驱动信号的频率直至不存在相位差时。

20. 根据权利要求 16 或 17 所述的设备，其中此设备形成锁相环振荡器电路。

21. 根据权利要求 16 或 17 所述的设备，其中所述磁粒子是顺磁粒子。

22. 根据权利要求 16 或 17 所述的设备，其中所述线圈是螺线管、环形线圈与扁平线圈中之一。

23. 根据权利要求 22 所述的设备，其中当线圈是形成于为平面上的扁平线圈时，将此样品置于此线圈邻近使样品暴露于磁场之下。

24. 根据权利要求 22 所述的设备，其中当线圈是螺线管时，将此样品置于螺线管内使样品暴露于磁场之下。

25. 根据权利要求 24 所述的设备，其中所述螺线管具有椭圆形横剖面。

26. 根据权利要求 22 所述的设备，其中当线圈为环形线圈时，将此样品置于此环形线圈的环隙中使此样品暴露于磁场之下。

27. 根据权利要求 16 或 17 所述的设备，其中所述驱动信号具有高于 200KHz 的频率。

# 磁性粒子测定方法和设备及利用磁性粒子测定进行结合试验的方法

## 技术领域

本发明涉及用于测定样品中磁粒子数的方法与设备。例如用于免疫测定中的测定磁粒子数的方法。

## 背景技术

这种方法允许将涂层的顺磁粒子（PMP）用作标记，采用新颖的电子电路设计来探测它们。

PMP 的直径通常为 2.8μm，包括顺磁材料芯料涂以适当的聚合物层，而在聚合物层上则根据 PMP 的具体应用附有抗体/抗原层。当前，这些磁粒子的主要应用是免疫测定中的样品分离、提纯与用作固相。

在典型的免疫测定法中，PMP 以蛋白质涂层，使之能用作可于其上发生免疫反应的固相材料。这种免疫反应用酶、荧光或化学反光分子为标记进行探测与定量化。PMP 并非永磁化的而是被吸引到永磁铁上允许进行简单的洗涤处理，因此洗涤这种已涂层的 PMP 不要求进行过滤或离心处理。在洗涤步骤之后，用适当的方法探测已涂层的 PMP 表面上固定的标记。

将铁磁粒子用作免疫测定法中的标记的方法已为 Kriz 等在两篇论文中描述到。这两篇论文是“磁性免疫测定法的进展”，Biosensors and Bioelectronics 13（1998），pp817～823; “生物分析与生物传感器中的磁导率的测量，Analgfical Chemistry 1996, 68, 1966～1970。但在这些方法中，铁磁粒子是由置于 Maxwell 电桥中的简单测量线圈进行探测，允许测量拟制备的样品的磁导率。然后用此磁导率为指示数去测定此样品物质中的粒子数。

发明内容

本发明的目的是提供新的磁性粒子测定方法和设备及利用磁性粒子测定进行结合试验的方法。

根据本发明的第一方面，提供了磁性粒子测定方法，用具有电容器与线圈的调谐电路来测定样品内的磁粒子数，此方法包括:

a. 测定此样品在和不在该线圈中时，上述谐振电路的谐振频率差;

b. 应用此谐振频率差来测定磁粒子的浓度。

根据本发明的第二方面，提供了用来测定样品内磁粒子浓度的设备，此设备包括:

a. 具有电容器与线圈的调谐电路;

b. 产生用于驱动调谐电路的驱动信号的驱动器;

c. 探测此调谐电路谐振频率的探测器，样品在和不在线圈中时此谐振频率的差即表示 PMP 的浓度。

据此，本发明提供了用来测定样品中的磁粒子数的方法与设备。本发明利用了这样一个事实: 磁粒子如顺磁粒子、铁磁粒子或类似粒子的存在，将导致样品中磁导率的固有变化。由于线圈的自感取决于线圈中材料的磁导率，将含有磁粒子的样品置于线圈中会导致线圈自感的变化。本发明通过测量包含线圈的 LC 电路的谐振频率，求得线圈自感的指示数来利用上述效应。样品置于线圈内与将样品自此线圈中取出时，上述电路的谐振频率是不同的。因此，通过测量 LC 电路中谐振频率，就能测定样品中的磁粒子数。此外，通过将这种线圈选择为螺线管、环形线圈与扁平线圈之一，就有助于使线圈与样品间的静压减至最少，由此可以保证获得最佳信号。

通常，测定调谐电路的谐振频率差包括: 将样品置于线圈内; 测定此调谐电路的谐振频率; 从线圈中取出样品; 再测定此调谐电路的谐振效率。最好是去测定有样品在然后除去样品时的调谐电路的谐振频率，以解决此线圈谐振频率的长期变化影响。这种长期变化通常是由于周围环境中的温度变化以及其他这类因素造成。但由于这类变

化通常是长期地发生达几个小时之久，于是通过使样品存在而随即便除去样品来进行此后的测量，就可以保证所测谐振频率的变化唯一的原因是由于样品的存在和/或不存在所致。于是，这将有助于防止线圈固有谐振频率的变化影响到测量结果。但应认识到，要是能提供足够稳定的调谐电路，则可以只需对无样品的调谐电路的谐振频率测量一次，然后以之用于所有的继后测量中即可。

测定此谐振频率的步骤一般包括：对调谐电路施加驱动信号；测量此驱动信号与取自调谐电路的输出信号间的相位差；然后调节所加信号的频率，直至所加信号与输出信号间无相位差。也可以采用其他的适当方法，但上述方法的优点是能用反馈机构调节电路而使此电路能自动确定该谐振频率。

此驱动信号所具的频率通常大于 200KHz，而最好是大于 500KHz。这是由于在较高的频率下时，线圈电感的一定变化会造成调谐电路谐振频率的显著变化。因此，使电路在较高频率下运行会提高系统的灵敏度。

通常所用的磁粒子是顺磁粒子，但也可采用铁磁粒子或任何其他磁性粒子。

用于探测调谐电路谐振频率的探测器可以包括相位比较器，用以测定驱动信号和从调谐电路取得的输出信号之间的相位差，同时还包括用于将驱动信号施加到调谐电路上的驱动器，此驱动器则包括压控振荡器（VCO）。这样的设备结构有利于让比较的相位直接耦合 VCO，使此 VCO 能响应相位比较器，改变驱动信号的频率直至不存在相位差。

上述设备最好包括锁相环振荡器电路。这是特别有利的，因为如上所述，这样能允许精确定测定调谐电路的谐振频率而不受人为的干扰。这是一种能获得高精确结果的自动化方法。

本发明特别适用于免疫测定。但它也可用于其他类型的样品，如瓶罐与其他容器、标记等。

根据本发明的第三方面，提供了利用磁性粒子测定进行结合试

验的方法，此方法包括：

a. 将第一分子层固定于基片上；

b. 提供一个或多个磁粒子作为标记；

c. 用分子层进行反应，以使一些磁粒子结合到基片上。

d. 通过测定基片暴露于线圈产生的磁场之下和基片未暴露于线圈产生的磁场下时调谐电路的谐振频率差，由此来测定结合到基片上的磁粒子数。

因此，本发明还提供了用磁粒子为标记进行试验的方法。实现这项试验时是用上面固定有适于此项试验的分子层的基片。试验的反应设计成，使得磁粒子上的涂层与基片上的固定层之间形成结合。因此，通过测定此基片在和不在线圈内时调谐电路的谐振频率，就能测定结合到基片上的磁粒子数。

通常，磁粒子是结合到相应个数的第二种分子上，其中的反应使第二种分子与该分子层结合而使磁粒子结合到基片上。但也可用另一种方式，即将磁粒子设计成与结合到基片上的分子直接反应。

这种反应可以是任何反应形式，例如 DNA 杂交反应。此时，第一种与第二种分子将包含部分 DNA。但这种结合试验最好是这样一种免疫测定试验，其中的分子层是抗体/抗原层而第二种分子是抗原或抗体。因此，磁粒子可以耦合到此抗原或抗体上，然后结合到基片上形上的抗体/抗原层上。

如上所述，当样品设在基片上时，最好是使线圈与样品间的静压最小化。为此，较为理想的是使调谐电路是螺线管、环线线圈与扁平线圈中的一种。这时，如果线圈是螺线管，此方法一般涉及到将样品置于此种线圈内而暴露于磁场之下。此外，这种线圈最好具有椭圆形剖面，虽然矩形剖面也是可以采用的。或者，可以采用扁平线圈而把样品置于线圈邻边使之暴露于磁场之下。

应该认识到，本发明的第三方面可以有利地利用本发明的第一与第二方面来实施。因此，可以用前述的电子电路来产生与基片上固定的 PMP 直接相关的输出。在此方法中，PMP 粒子此时被用作标记

物，而不需用独立的荧光的、放射性的、化学发光的或其他的标记物。这样就能显著地减少分析步骤数和缩短试验所需的时间。此外，这种电子电路在形体上小到足以允许开发手持式仪器。

采用荧光或类似标记物的当前的分析式免疫测定系统需用昂贵的专门设备，把它们制造成手持式系统是不实际的。当前市售的仅有的手持式系统是采用利用颜色标记的测杆工艺。这种系统主要用于近乎病人的试验例如怀孕试验，而这种试验的结果只会是阳性或阴性的。它们一般不适用于测定物质的实际浓度。

下面参考附图说明本发明的实施例。

附图说明

图 1A 是调谐电路第一例子的示意图；

图 1B 是调谐电路第二例子的示意图；

图 2 是传统的振荡器电路的示意图；

图 3 是本发明的电路的示意图；

图 4 是曲线图，示明在图 3 的电路中，频率相对于所得到的磁粒子浓度减少而下降；

图 5 是适用于图 3 电路中的振荡器的电路图；

图 6 是曲线图，示明探测出的 PMP 粒子数相对于调谐电路谐振频率的变化；

图 7 是用于图 3 的调谐电路中的线圈第二例的示意图；

图 8 是曲线图，示明在图 7 的线圈下，所探测到的 PMP 数相对于调谐电路的谐振频率的变化；

图 9 是用于图 3 中调谐电路的线圈的第三例的示意图；

图 10 是曲线图，示明探测出的 PMP 粒子数相对于调谐电路谐振频率的变化；

图 11A 与 11B 例示了用于图 3 的调谐电路中的两种扁平线圈构型；

图 12 是曲线图，示明在图 7 的线圈下，所探测到的 PMP 数相

对于调谐电路的谐振频率的变化;

图 13 是依据本发明的免疫测定反应的示意图。

具体实施方式

在本发明的一个例子中，为了测定塑料片上涂层的顺磁粒子数，将此塑料片置于绝缘导线的线圈中，同时观察这些顺磁粒子的存在对线圈自感 L 的影响。假设只是这种粒子的高的磁导率才会对线圈自感的变化才有显著影响。

大匝数的均匀螺旋形线圈的自感给定为:

$$L \approx \mu \mu_0 m^2 l A \quad (1)$$

式中: $\mu_0$=真空的磁导率（$4\pi \times 10^{-7} Hm^{-1}$）;

$\mu$=（线圈）芯的相对磁导率;

m=每单位长度的匝数;

l=长度;

A=线圈的横剖面积。

当上面附有 n 个顺磁粒子的塑料片置于线圈内时，此线圈的 $\mu$ 的有效值是某个与塑料片中塑料磁导率 $\mu_v$、塑料片上任何残余缓冲液的磁导率 $\mu_s$、顺磁粒子的磁导率 $\mu_p$ 以及线圈中空气间隙的磁导率 $\mu_A$ 有关的值。此时的自感成为

$$L=\{C_v \mu_v+C_A \mu_A+C_s \mu_s+nC \mu_p\} \mu_0 m^2 l A$$

$$=\{C_v \mu_v+C_A \mu_A+C_s \mu_s\} \mu_0 m^2 l A+nC \mu_p \mu_0 m^2 l A \quad (2)$$

式中: $C_v$=塑料片中塑料的有效量;

$C_s$=塑料片上缓冲液的有效量;

$C_A$=线圈中空气的有效量;

C =使各个粒子的磁导率与它们对总的磁导率的影响相关的常数。

由于这些顺磁粒子与线圈内容积相比极其之小，各粒子周围的磁场是不均匀的，但由于这些粒子的形状与粒度（2.8μm 直径）都相同，它们对总的有效磁导率的影响都相等。对这些研究中的所有样

品来说，各塑料片均有一致的结构，而缓冲液残余物的体积可以假定为常数。于是第一项中所有的值为常数或小到可忽略的程度，从而式（1）可以改写为：

$$L=L_0+kn \quad (3)$$

式中：$k=C\mu_p\mu_0m^2lA$=常数，

$L_0=\{C_v\mu_v+C_A\mu_A+C_s\mu_s\}\mu_0m^2lA$

=包含着上面只有缓冲液残余物而无粒子的塑料片的线圈的电感相对应的另一常数。

于是，线圈的电感随塑料片上顺磁粒子数的增加而变得均匀。为使 n 对于 L 的影响最大而由此提高探测系统的灵敏度，$L_0$ 应尽可能地小而 k 应尽可能地大。通过减小线圈的内部尺寸使之大到刚好足以盛纳下此样品片使线圈中的静空间保持到最小，这样就将减小 $C_A$，从而减小 $L_0$。这也同样保证了线圈中有更多的电磁场通过磁粒子，从而提高了 C 与 k。

顺磁粒子对线圈电感的影响是通过将样品片置于与并联电容器形成谐振电路的线圈中进行测定（图 1A）。

图 1A 中电路的谐振频率给定为

$$f=\{2\pi(LC)^{1/2}\}^{-1} \quad (4)$$

由式（3）与（4）得到

$$f=\{2\pi C^{1/2}(L_0+kn)^{1/2}\}^{-1}=\{2\pi(L_0C)^{1/2}\}^{-1}\{1+(k/L_0)n\}^{-1/2}$$

$$f=f_0\{1+(k/L_0)n\}^{-1/2} \quad (5)$$

式中，$f_0$=包含着上面只有剩余缓冲液而无磁粒子的塑料片的电路的谐振频率。

用二项式定理展开式（5），得

$$f=f_0\{1-1/2(k/L_0)n+\cdots\}$$

$$f=f_0\{1-1/2(k/L_0)n\} \quad (略去了高次项)(6)$$

式（6）表明 LC 调谐电路的振荡频率将随塑料片存在的顺磁粒子数的增加作线性的减少。

在实际的 LC 电路中，如图 1B 中例示，此线圈具有内阻 $R_L$ 而

电容器具有漏泄电阻 $R_C$，同时有杂散电容 $C_L$ 主要存在于线圈中的各绕组间。对于优质的电容器，$R_C$ 很大，对电路性能的影响可略去不计。这种杂散电容在绝大程度上取决于线圈的结构而会减少电路的谐振频率。要是线圈具有刚性结构，$C_L$ 将不保不变而其存在可以基本上忽略。当把空白的塑料片插入线圈内时常可以观察到谐振频率略有减少，这是由于此塑料片较它移走的空气有较高的介电常数使 $C_L$ 增加所致。内阻 $R_L$ 由于它会减小谐振频率可能具有最大的影响：

$$f=\{1-(R_L^2C/L)\}^{1/2}\{2\pi(LC)^{1/2}\}^{-1} \qquad (7)$$

对于 L=130μH、C=4.7nF 和 $R_L$=17Ω 的典型线圈而言，$R_L$ 能使谐振频率从 f=203.61KHz（式 4）减少到 f=202.54KHz（式 7），即谐振频率下降了 1.07KHz。

实际的 LC 电路的谐振频率与温度关系至为密切。图 1B 中所示各元件的值在某种程度上都会随温度变化，因而会影响到谐振频率随温度漂移。线圈是由薄铜丝制成，这就加大了它的电阻随温度升高而增加的特性。此外，线圈的尺寸与电容器 C 的电容也随温度而改变。

于是，LC 电路的振荡频率，从而塑料片上的顺磁粒子数，是由采用 LC 电路来控制振荡器电路的振荡而决定的。试验结果表明，当把上面载有磁粒子的塑料片置于在约 250KHz 下振荡的线圈中时，谐振频率通常只减少几个 Hz。因此上述振荡器电路必须非常稳定。

传统的振荡器电路例如图 2 所示的 Colpitts 振荡器并未见稳定到足以可靠地测出这样小的频率变化。性能如此差的可能原因是此电路是在式 7 给定的频率下振荡，因而谐振频率受到 LC 电路内阻的影响。在图 2 所示的电路中，晶体管 TR1 的输入阻抗也会影响 LC 电路的谐振频率，而由于此阻抗也是温度函数，它将加大振荡器的不稳定性。

为此需要有全新的方法，业已发现，最稳定的振荡器电路乃是基于锁相环（PLL）的振荡器电路，它的一个例子示明于图 3。

图 3 所示电路包括压控振荡器（VCO）1，它的输出端耦连到频率计 2 与鉴相器 3 上。VCO 1 的输出端也通过电阻器 5 与包括线圈 L 和电容器 C 的调谐电路 4 耦连，如图所示。鉴相器 3 除与 VCO 1 的

输出端耦连外还与调谐电路 4 耦连。鉴相器 3 的输出经由环路滤波器 6 传送给 VCO 1。

工作时，用 VCO 1 产生一经电阻器 5 施加给调谐电路 4 的驱动信号，驱使调谐电路 4 振荡。

当调谐电路 4 振荡时，L 与 C 的电位差由于它们的振荡完全相同但相互 180°（π弧度）异相而互消。LC 电路在谐振时的阻抗完全是电阻的（在图 1B 中约等于 $R_L$），而在电路中流过的电流则与所加电压同相。与 LC 电路串联的电阻器两端的电位差与在此电路谐振时所加的电压同相。发生这种情形的频率由式（4）给定但用 $C+C_L$ 取代了 C。这一频率在很大程度上与 $R_L$（它可能是影响 LC 电路不稳定性的最主要因素之一）无关。

这样，鉴相器 3 与 VCO 1 的输出端耦连来测定驱动信号的相位，同时与调谐电路耦连来测定调谐电路振荡的相位。然后此鉴相器 3 产生一 DC 信号来代表输出给环路滤波器 6 的振荡相位差。上述信号经此环路滤波器滤波后返回到 VCO 1。

VCO 1 经控制成当施加 DC 误差信号时将改变其输出频率，直至此驱动信号与调谐电路振荡间不存在相位差而由鉴相器 3 无误差信号输出时。

VCO 的输出频率由频率计测量。上述电路显著提高了频率稳定性，在谐振频率 200～300KHz 范围内可以测出的频率变化小于 1Hz。

适用于 PLL VCO 的电路给出于图 5 中。IC1 是具有正弦波输出的 VCO，可以在 10KΩ的预设定下从约 18KΩ变化到 38KΩ。VCO 的输出经 10KΩ的电阻器馈送给 LC 电路。OP1 是比较器，它从 VCO 输出的正弦波导出方波，同时驱动 IC2 这一 D 型的触发器。此 LC 电路上的正弦波电压经高输入阻抗缓冲放大器（OP2）传送给第二比较器（OP3）与触发器（IC3）。这些触发器接合 NAND（“与非”）门（IC4）和二极管 D1 与 D4，形成了边缘敏感的超前-滞后（Ⅱ型）相敏检测器。在 PSD 输出端的 ±dC 误差信号由高增益低通滤波器（$f_{3dB}$=16Hz）OP4 放大。为了加速接通后的锁定过程，由二极管 D3

与 D4 将上述误差信号限制为约 ±0.6V。经缓冲放大器（OP5）将 dC 误差信号反馈给 VCO，使上述环路闭合。

为了形成这种电路，首先必须用式（4）计算 LC 电路的谐振频率的近似值（此值必需在 VCO 的输出频率范围内）。现在对这种预设定进行调节，直至 IC1 的输出约为此近似值。存在预设定的调节范围，其中的输出频率几乎无变化。这表明 PLL 锁定到 LC 电路的谐振频率上。

图 3 所示 PLL 电路的性能最初是用包含有大量悬浮的 PMP 的样品进行研究的。所用的样品具有悬浮于缓冲液中已知浓度的 PMP（0、1.03、2.11、4.19、6.22 与 8.21mg/ml）。这些样品盛放于 30mm 直径与 47mm 高的密封圆柱形塑料瓶中。这种瓶含 20ml 的乳浊液。将瓶剧烈摇晃保证其均匀混合，然后放入接附于锁相环电路（图 5）的线圈（50 匝，24SWG 的漆包铜线，电感≈75μH）中，测量振荡频率。此时除去样品瓶，观察频率的增加。对于所有的瓶重复该试验 10 次，如图 4 所示，相对于瓶中粒子的浓度标绘出两种读数的差。

结果清楚地表明，正如式（6）所示，LC 调谐电路的谐振频率的减少与瓶中乳浊液内的粒子数直接相关。业已发现，这种方法是很可靠的，能将瓶中未知的磁粒子浓度测定到优于 1%的精度。

从上述试验所得到的另一项重要发现是，尽管此振荡电路具有良好的短期稳定性，但仍然存在着主要因环境温度变化致线圈电感改变而导致频率普遍的长期漂移。经过一昼夜的时间，室温的变化可能导致基线频率漂移大于 ±50Hz。但是发现，这对于样品从线圈中取出时所产生的频率改变几乎无影响。于是，下面的测量方法有利于进行这种试验观察。

· 将样品插入线圈中；

· 测量频率；

· 从线圈中快速地取出样品；

· 再次测量频率并记录频率的增加结果。

这样，在整个测量时间内所提供的记录下频率的变化大于基线

频率的漂移，于是所得结果与基线频率无关。这一测量方法大大消除了温度对所得结果的任何影响。因此，不必要对电子电路与线圈进行精致的温度控制，而这在手持式电池供电的仪器中则是需要重点考虑的因素，其中的控温包装本身就将消耗颇多的电功率。

当线圈 L 符合下述条件时，以此线圈 L 置于图 3 的 PLL 电路中而样品瓶含有顺磁粒子（PMP）时得到了最佳的总体性能：

· 所具的内径刚好大到足以置纳下样品而使静区的量保持到最小；

· 刚性；

· 在约 200～300KHz 发生谐振。

此种系统可以用于测量结合在基片上的许多 PMP，例如在免役测定法中所出现的情形。

在此情形中，应用与上述相同的操作方法，将上面载有未知数量的 PMP 的塑料片置于线圈内，观察电路的振荡频率。当此塑料片从线圈中快速地取出后可观察到频率增加了，这可以用来测定塑料片上 PMP 数量的标记。

然后，通过生产许多基片（在此情形下为塑料片，例如免疫测定法中所用的），上面载有未知数量的 PMP，由此来校正上述系统。然后用它们来测定在一定磁粒子数下所得到的频率变化。

所用的磁粒子是 Dynal H-280，直径为 2.8μm。样品中磁粒子的浓度通过计算已知容积中的粒子数来测定。这可以用一种 New Neubauer 血细胞计来完成，这种血细胞计具有在玻璃载片上蚀刻出的校准过的方格和已知的深度。知道浓度后，可计算出加到塑料片上的粒子数。将这些磁粒子在塑料片上干燥。对于在 $3.33\times10^{6}$～$1.68\times10^{5}$ 的磁粒子数制定了若干标准，这些标准已被用于仪器响应的校准中。

采用基本线圈构型测定了图 3 中 PLL 电路对标准塑料片的响应。所用方法与前述的相同。将上面载有已知数量的 PMP 的试验片插入线圈 L 中测量调谐电路 4 的谐振频率。然后从线圈 L 中取出样

品再测量其谐振频率。任意此谐振频率的变化。用同一测试片将此试验重复 10 次。再用另外的测试片重复此试验。将此结果示明于如图 6 所示的 PMP 数目相对于谐振频率变化的曲线图中。

上述结果标明于 log-log 轴上，用线性回归法确定出最佳的直线。图中的点表示的是各样品读数的平均值，而误差条则表示此平均的标准误差。此 PLL 电路如式（6）所示对于增多的粒子数具有良好的线性响应，灵敏度约为 $0.16Hz/10^5$ 粒子。

这些结果中的某些分散值可能是由于样品在所有的测试片上未能设置于完全同一的位置上，以及样品在各次测量中未能每次总是在线圈中确切的同一位置上所致。

但是，为了改进这种系统，采用了若干较小的线圈以便减小线圈内的静区，从而提高线圈 L 在图 3 中 PLL 电路上的灵敏度。业已确定，最优的线圈乃是具有椭圆形横剖面的且免疫测定法中所用的样品基片能恰好配合于其中的螺线管。

这类线圈易用下述方法构成：

· 将 4～6 层管工用 PTFE 螺纹带卷绕到空白塑料片上；

· 将线圈绕到 PTFE 带的顶部上；

· 用速固的环氧树脂给线圈作厚的涂层；

· 让此环氧树脂硬化；

· 仔细地牵引此塑料片将其从线圈中撤出；

· 从线圈中取出 PTFE 带。

结果得到了内部尺寸恰好大到足以容纳此测试塑料片的刚性线圈。还可以在线圈内侧涂布环氧树脂，用以保护导线不受意外损伤。

线圈的电感随线圈有效横剖面积以及线圈中匝数的增加而增加。减小线圈的横剖面积就意味着必须增多线圈中的匝数来产生具有所需电感的线圈。为此，最好使线圈的长度恰好稍大于样品的长度。这就是说，导线必须很细，不然就需生产出很厚的多层式线圈。

于是生产了图 7 所示的线圈 L，具有 2.5×7mm 的椭圆形剖面和 7mm 长。用市售的最细漆包铜线（42SWG）绕制线圈。采用了 4 层

导线，最终的线圈 L=131μH 而 R=17.18Ω。此线圈与 C=3.3nF 的电容器并联，在 217KHz 下谐振。

然后如上所述，于图 3 的 PLL 电路中测试此线圈。结果示于图 8 的曲线图中。

上述线圈装置用于 PLL 电路中时，与测试塑料片上有约 0.4Hz/$10^5$ 粒子的先有线圈设计相比，具有良好的线性响应和改进了的灵敏度。误差条也较小，这表明此电路一般较为稳定。若将线圈制备得更小而使线圈与样品间的静区甚至更小，则可能进一步提高线圈装置的灵敏度。更小的线圈将需要比上述结构所用 42SWG 还要细的导线。用手来精确地绕制线圈对于这样细的导线是很困难的，因而需要某种绕线机。

最近的观察结果也指出，用于线圈结构中的部件应具有低的介电常数以提高调谐电路 4 的 Q 值。

这种线圈结构的进一步发展形式示明于图 9 中。它包括铁氧体环 20，上面绕有绕组 20。铁氧体是电的绝缘体，有很高的磁导率，可以在很高的频率下工作。这说明具有铁氧体磁心的线圈需要较少的匝数以具有高的电感。

上述铁氧体环 20 包括厚约 1mm 的环隙 21。此铁氧体环两端间的间隙小到由线圈产生的电磁场几乎无损耗地通过置于此环隙中的样品片。与前述例子相同，样品中顺磁粒子的存在将加大线圈的电感，因而这种构型能用作调谐电路 4 中的线圈 L。对此系统再次进行了测试，结果标绘于图 10 所示的曲线中。这时的铁氧体环具有下述尺寸：外径=23.6mm，内径=13.4mm，高=7.6mm。将 40SWG 漆包铜线的 120 匝线圈绕到此环上并涂以厚的环氧树脂层（L=880μH,R=4.6Ω，$f_o$=206KHz 而 C=680pF）。

当将此线圈用于图 3 中的 PLL 电路中时，再次获得了对磁粒子数的良好线性反应。此线圈的灵敏度约为 0.3Hz/$10^5$ 粒子，低于图 7 中椭圆形线圈结构的灵敏度。但此线圈装置的性能，可以通过采用能够与这种用途更好配合的铁氧体材料且具有宽度（约 0.25mm）刚好

足以接纳此样品的较窄环隙，得到改进。

还可以采用以圆形或方形螺旋装置为基础的全扁平线圈(图 11A 与 11B)。这种设计比前述装置有许多优越之处。此种线圈可以与样品紧密接触而减小样品与线圈间的静区，而且能用光刻法或类似技术大规模生产有重显性的线圈。要是将两个线圈串联而将样品与它们相互面对的方式置于其间，则当样品中存在顺磁粒子时将增大此线圈对的电感。

正如以前所述，这种线圈一般是在约 200～300KHz 间的频率下工作。这种频率范围当电路结合其中含有大量悬浮于水性缓冲液的 PMP 的瓶子使用时，已由试验证明乃是最佳的工作频率范围。但水的存在会使此电路在较高频率下工作时的稳定性差。

业已发现，在极高的频率下能工作得更好。图 12 示明以椭圆形剖面的线圈在 529KHz 下工作时的电路响应。

在上述情形下，当线圈是在 217KHz 下工作时，与 $0.4Hz/10^5$ 粒子相比，灵敏度增加到 $1.2Hz/10^5$。一般性的技术表明，在更高的频率下可以提高灵敏度。但图 5 中的 VCO 电路却不能可靠地在远高于 519KHz 的频率下工作，这是由于所用到的一些部件受到了限制。为使其能在较高的频率下工作，就必须采用能在这种频率下工作的部件来改进此电路。

为了证明这种顺磁粒子探测器具有实用性，用 PMP 为标记开发了一种模型试验系统。此系统是基于用于铁传递蛋白的双抗体夹层试验的。将这种模型试验发展成能使免疫反应发生于塑料膜的表面上，同时能将测试区域容易地引到此探测器上。用于探测固定的免疫复合物的标记是涂有适当抗体的 PMP，这于图 13 中示意地表明。

使不同抗体层的浓度最优化，以在工作的铁传递蛋白范围给出最大的响应。对此模型试验产生出剂量响应曲线，用显微镜的手工计数和用探测器两种方法确定磁粒子的数量。

先前的结果表明，铁传递蛋白剂量响应曲线的上部区域（约有 $1.3\times10^5$ 粒子）处在磁探测器的下部校准范围内，而在由手工计数测

定的测试塑料片上所结合的 PMP 数与用磁探测器测定的数之间有良好的一致性。

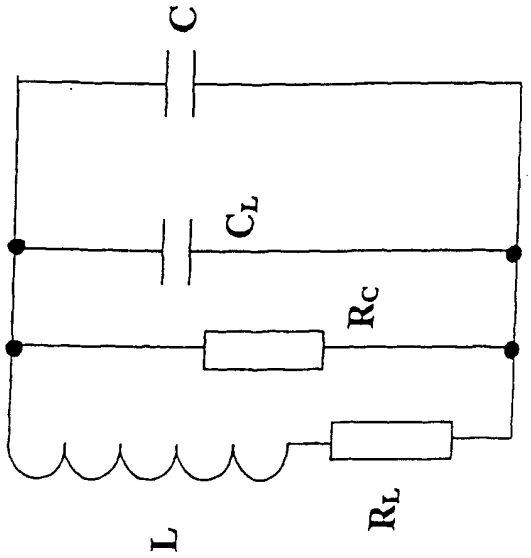



图1B

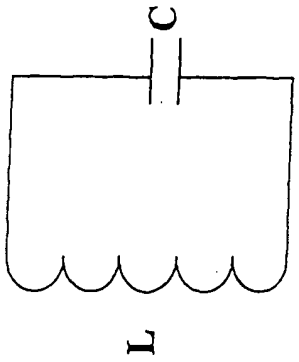



图1A

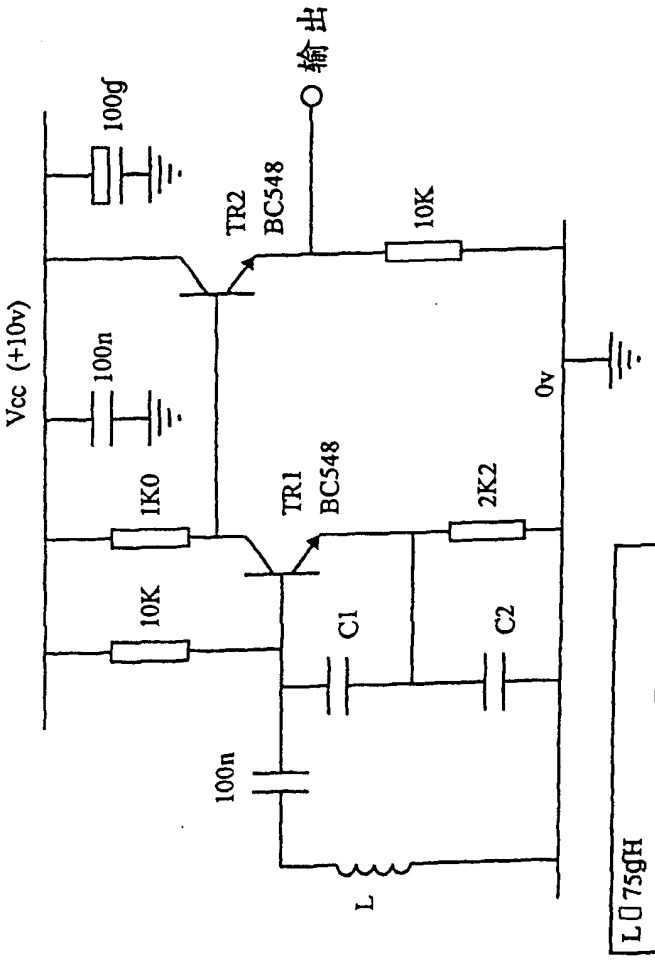

输出
100g
TR2
BC548
10K
Vcc (+10v)
100n
0v
1K0
TR1
BC548
2K2
10K
C1
C2
100n
L
L 75gH
C1=1n5, c2=4n7 for f 400kHz
C1=470p, C2=1n5 for f 870kHz

图 2

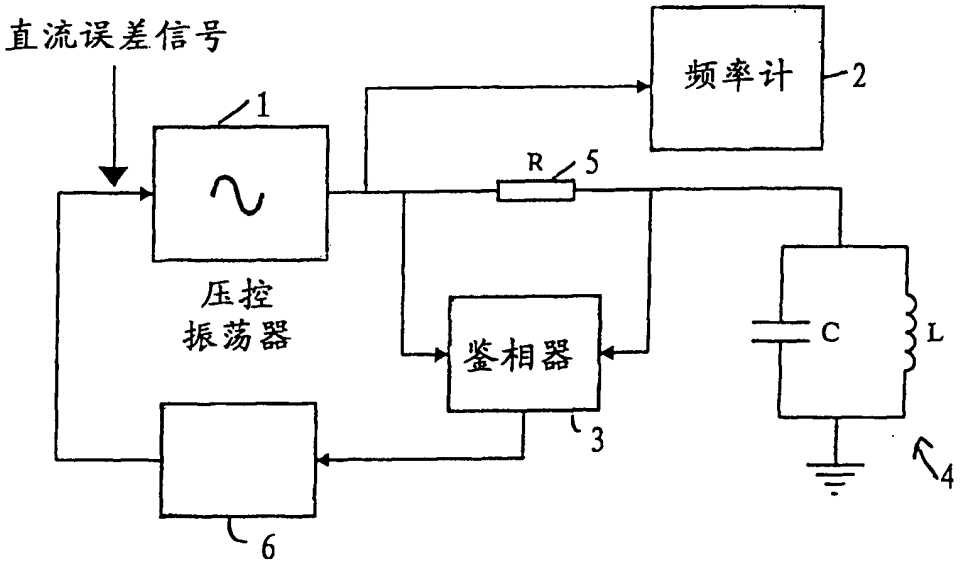

直流误差信号
1
频率计
2
R
5
压控
振荡器
鉴相器
3
C
L
4
6

图3

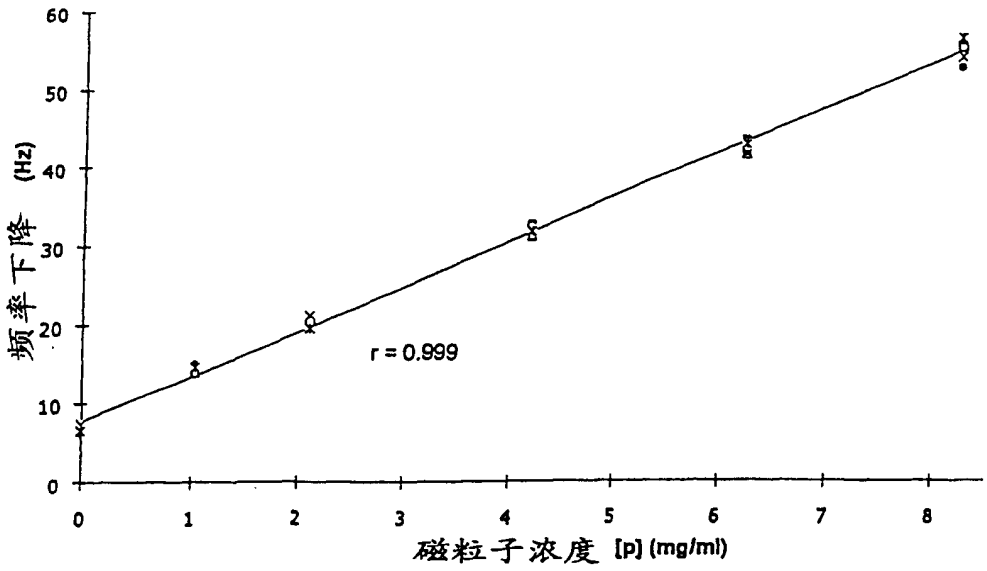

60
50
40
30
20
10
0
频率下降 (Hz)
r = 0.999
0
1
2
3
4
5
6
7
8
磁粒子浓度 [p] (mg/ml)

图4

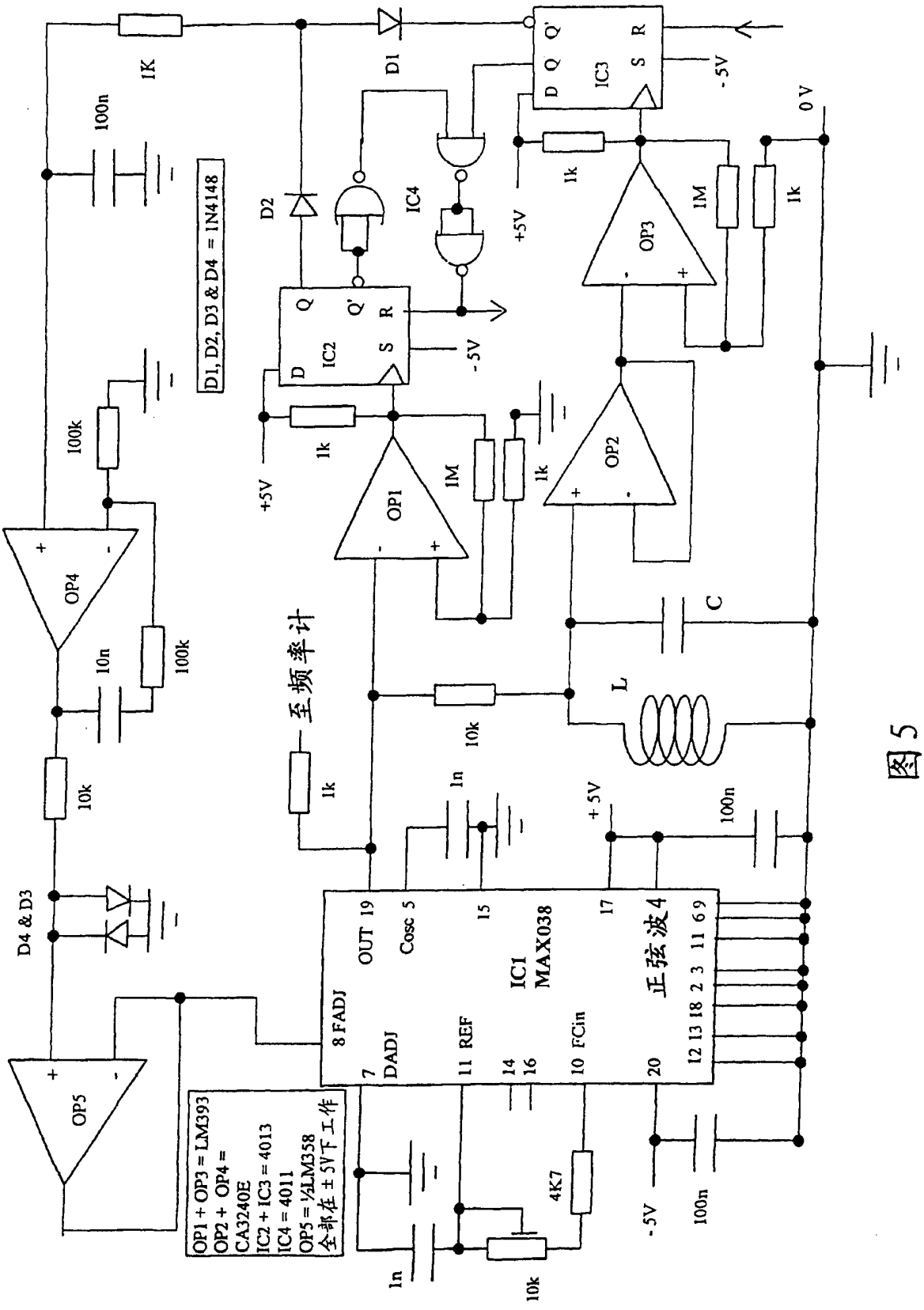

1K
100n
D1
D2
IC4
IC3
IC2
D Q Q' R S
-5V
0 V
+5V
1k
1M
OP3
OP1
OP2
OP4
OP5
100k
10n
10k
C
L
至频率计
1n
+5V
100n
D4 & D3
D1, D2, D3 & D4 = 1N4148
OUT 19
Cosc 5
15
17
8 FADJ
7 DADJ
11 REF
14
16
10 FCin
20
IC1
MAX038
正弦波4
12 13 18 2 3 11 6 9
4K7
10k
OP1 + OP3 = LM393
OP2 + OP4 =
CA3240E
IC2 + IC3 = 4013
IC4 = 4011
OP5 = ½LM358
全部在±5V下工作

图 5

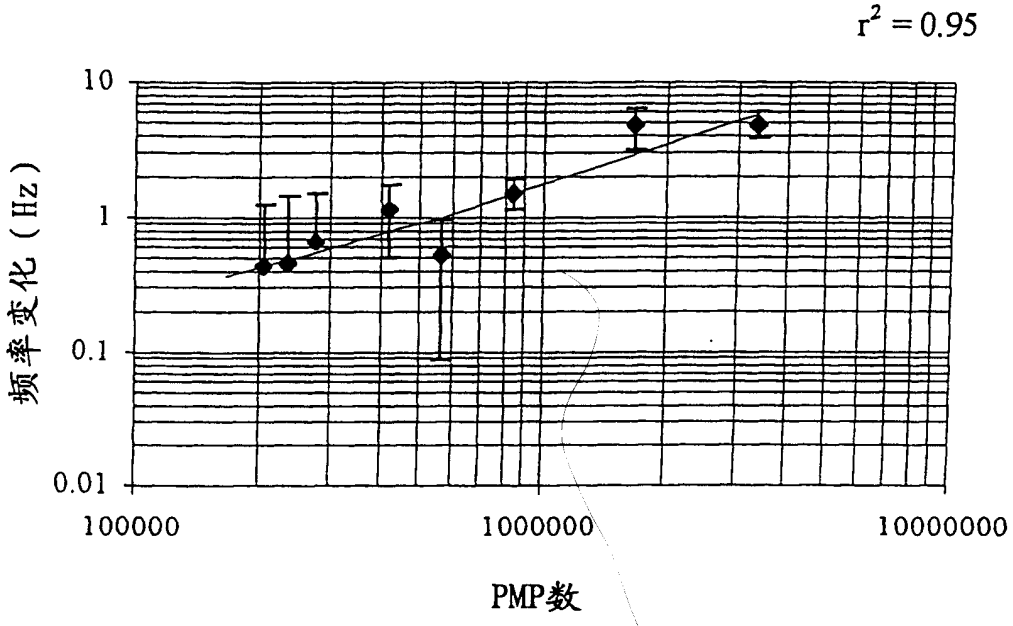



图6

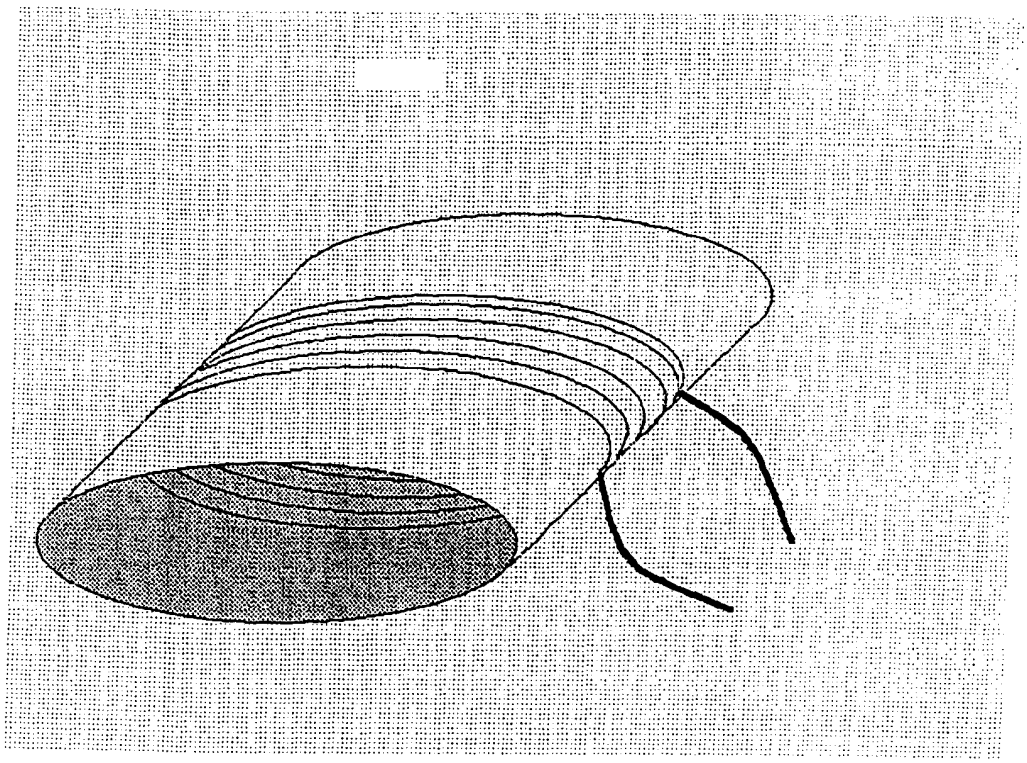


图7

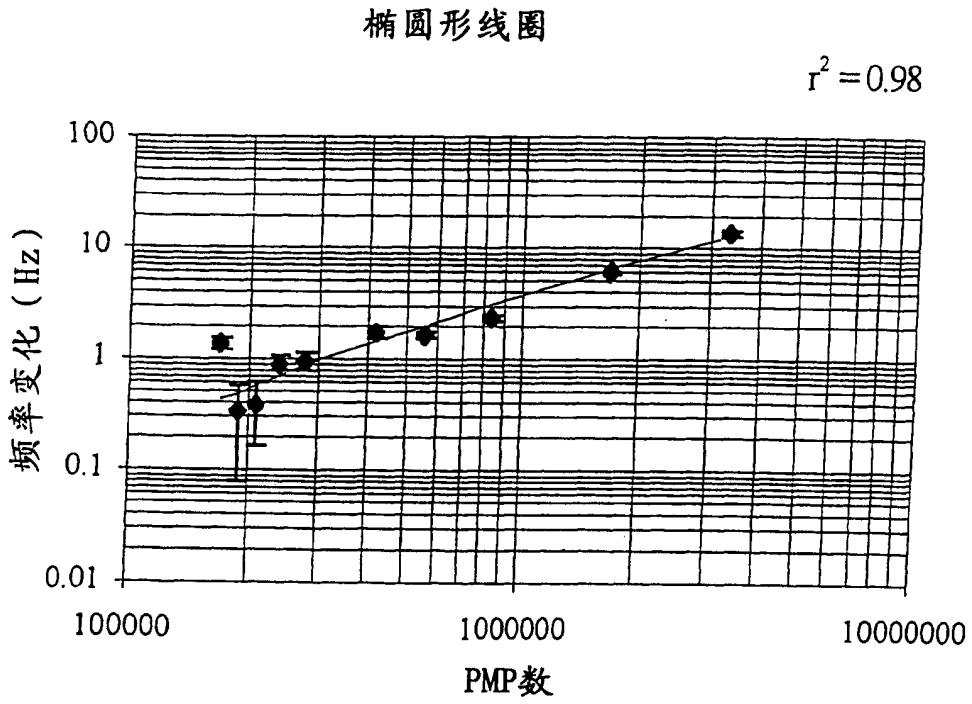

椭圆形线圈
$r^2=0.98$
100
10
1
0.1
0.01
频率变化（Hz）
100000
1000000
10000000
PMP数

图8

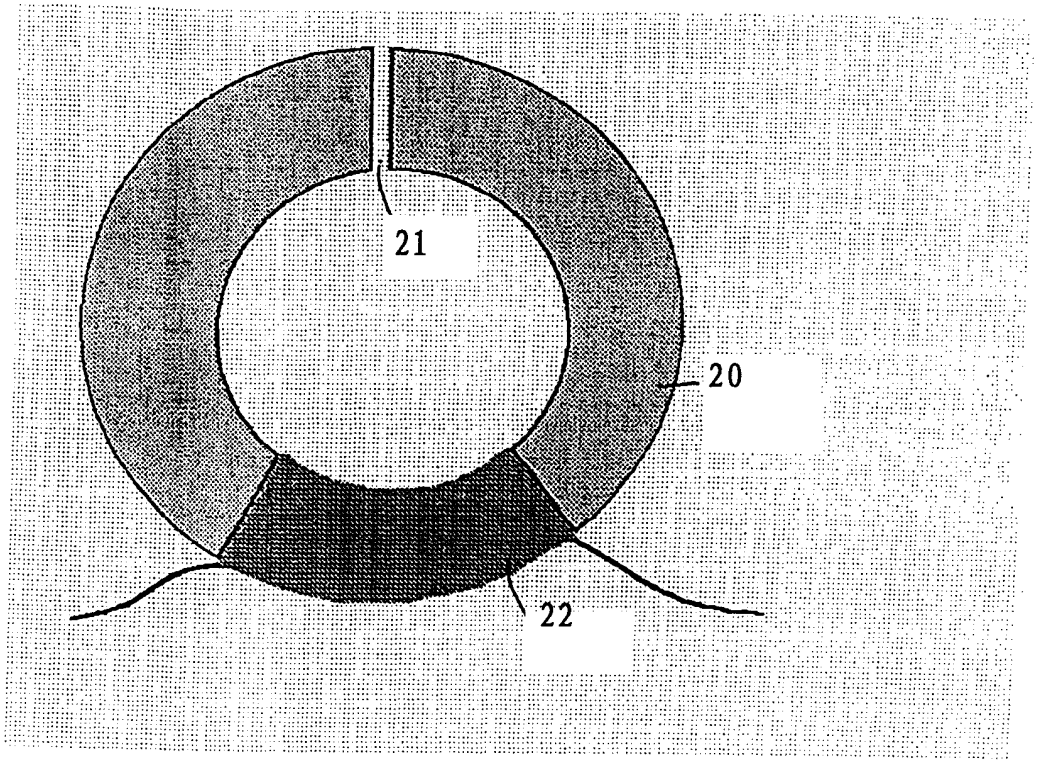

21
20
22

图9

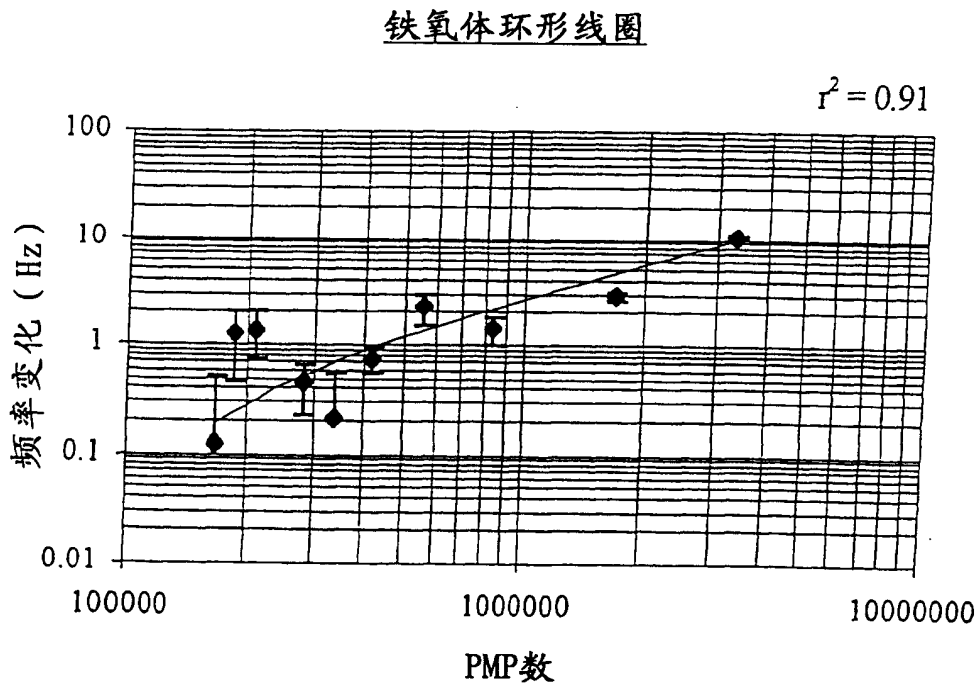
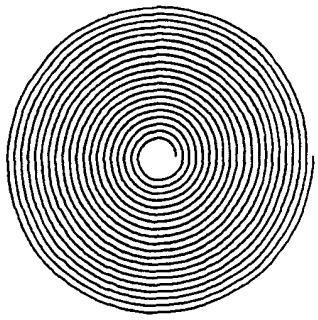

铁氧体环形线圈
$r^2 = 0.91$
100
10
1
0.1
0.01
频率变化（Hz）
100000
1000000
10000000
PMP数

图10

(A)



(B)

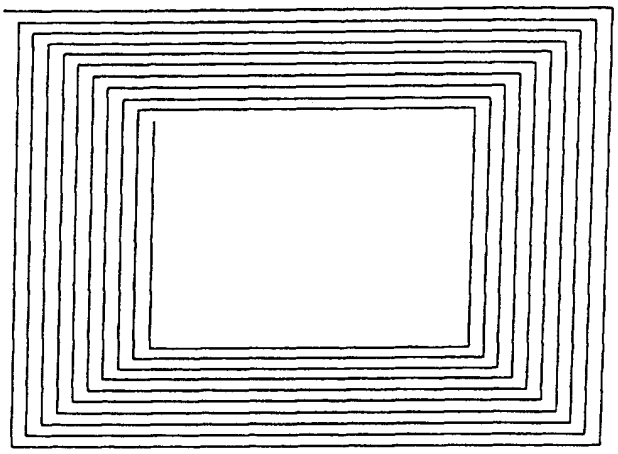


图11

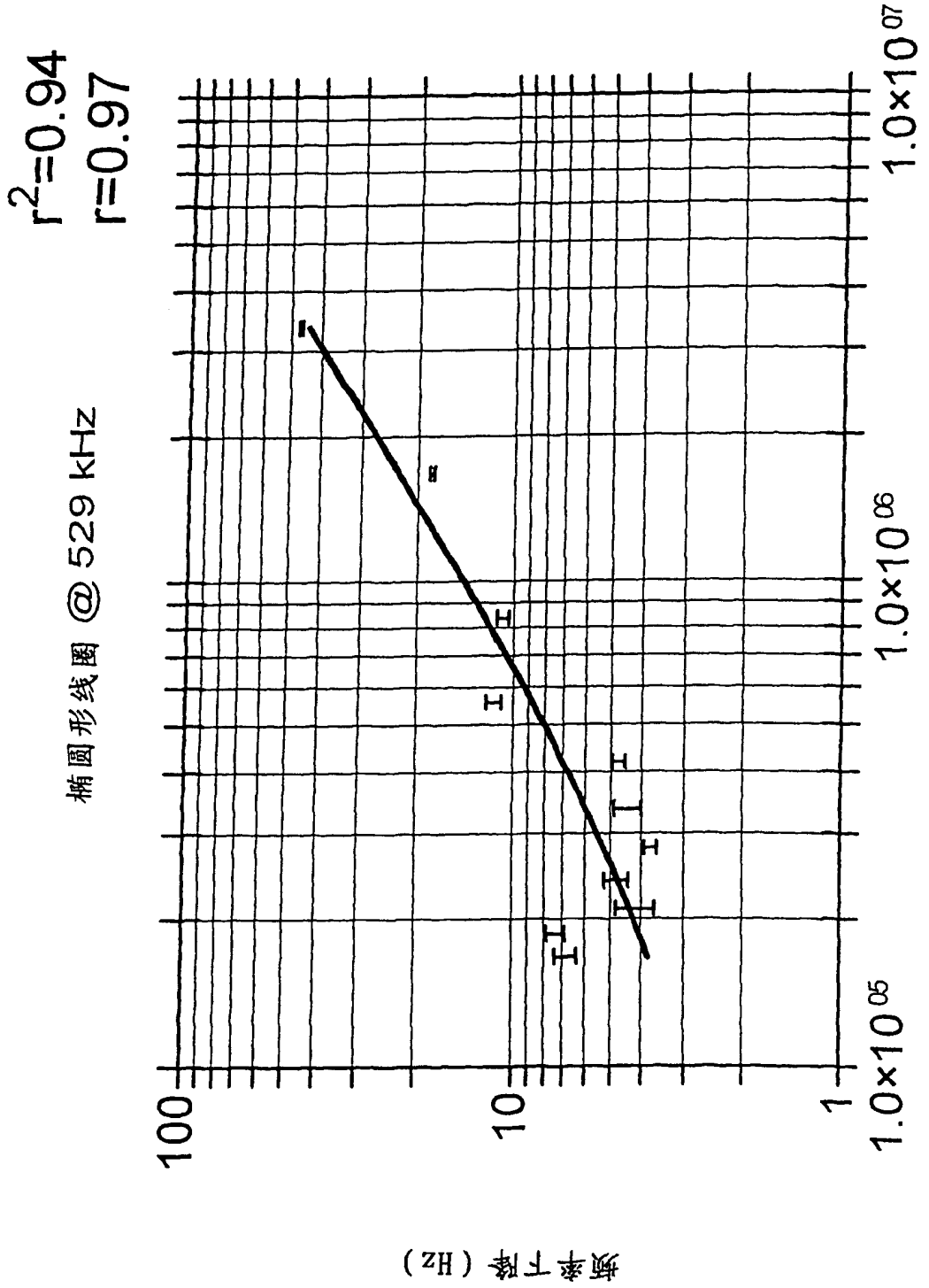

$r^2$=0.94
r=0.97
椭圆形线圈 @ 529 kHz
100
10
1
1.0×10^07
1.0×10^06
1.0×10^05
磁粒子数
频率下降 (Hz)

图12

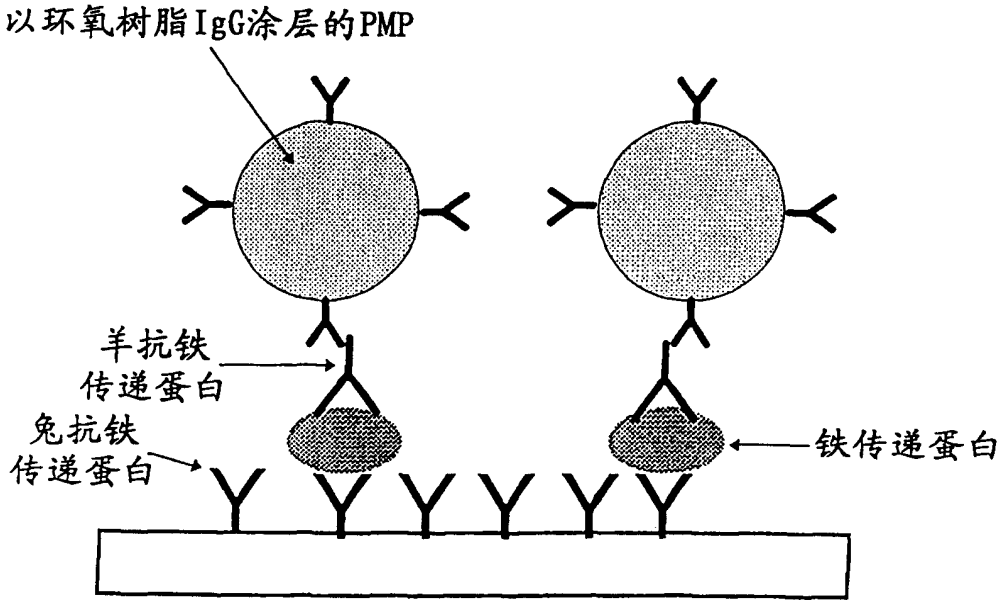



图13