

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021 年 10 月 21 日 (21.10.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/208366 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 21/64 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/117629

(22) 国际申请日: 2020 年 9 月 25 日 (25.09.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010289512.X 2020年4月14日 (14.04.2020) CN

(71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(72) 发明人: 戴永东(DAI, Yongdong); 中国浙江省杭州
市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

刘璐璐(LIU, Lulu); 中国浙江省杭州市西湖区
余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 张松
英(ZHANG, Songying); 中国浙江省杭州市西湖
区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 童
晓媚(TONG, Xiaomei); 中国浙江省杭州市西湖
区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 林
小娜(LIN, Xiaona); 中国浙江省杭州市西湖区
余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 林翔
(LIN, Xiang); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘
路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 沈永行(SHEN,
Yonghang); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘
路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 北京高沃律师事务所(BEIJING GAOWO
LAW FIRM); 中国北京市海淀区彩和坊路11
号6层602室, Beijing 100080 (CN)。

(54) **Title:** REACTIVE OXYGEN SPECIES CONTENT AUTOMATIC DETECTION SYSTEM SUITABLE FOR CELL MICROENVIRONMENT

(54) 发明名称: 一种适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统

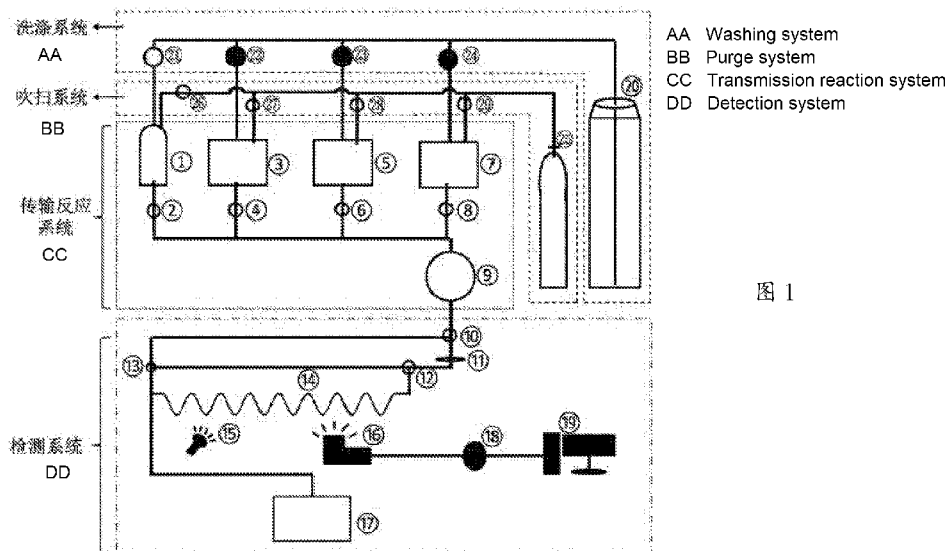


图 1

(57) **Abstract:** A reactive oxygen species content automatic detection system, comprising a sample transmission reaction system and a detection system that are in communication in sequence by means of a light-proof pipeline, a washing system connected to the sample transmission reaction system by means of a water pipeline, and a purge system connected to the sample transmission reaction system by means of an air pipeline, wherein the sample transmission reaction system comprises a sample injector (1) and a DCFH supply bin (3) connected in parallel and then communicating with a reaction bin (9) by means of the light-proof pipeline; injection valves (2, 4) are equipped between the sample injector (1) and the DCFH supply bin (3) and the reaction bin (9), respectively; and the detection system comprises a light-transmitting microfluidic pipe (14) and a waste liquid collector (17) that communicate with the reaction bin (9) by

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

means of the light-proof pipeline, and a fluorescence detector (16) equipped with a light source (15) is used to detect a sample in the light-transmitting microfluidic pipe (14). The system can implement the rapid, accurate and automatic detection of the reactive oxygen species content of a large number of samples in small volumes.

(57) 摘要: 一种活性氧含量自动检测系统, 包括: 通过避光管路依序连通的样品传输反应系统、检测系统, 通过水管管路接通样品传输反应系统的洗涤系统, 通过气管管路接通样品传输反应系统的吹扫系统; 所述样品传输反应系统包括并联后再通过避光管路连通反应仓(9)的进样器(1)与DCFH供应仓(3); 进样器(1)及DCFH供应仓(3)分别与反应仓(9)之间配有进样阀(2,4); 检测系统包括通过避光管路连通反应仓(9)的透光微流管(14)和废液收集器(17), 采用配有光源(15)的荧光检测器(16)对透光微流管(14)中的样品进行检测。可实现活性氧含量大量样品微量体积的快速、准确、自动检测。

一种适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统

技术领域

本发明涉及一种生化检测仪器，具体是自动检测细胞、组织及器官的微环境微量液体中活性氧含量的仪器。

背景技术

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是指在有氧生物体中，进入线粒体内的氧气通过新陈代谢过程而转化成的具有强还原性和强氧化性过氧化物和含氧自由基等。常见的活性氧有过氧化氢(H_2O_2)、次氯酸/次氯酸根离子($HClO/ClO^-$)、过氧亚硝酸根离子($ONOO^-$)、羟基自由基($\cdot OH$)、一氧化氮($NO\cdot$)、超氧阴离子($O_2^{\cdot -}$)、脂质过氧化自由基($ROO\cdot$)。ROS在机体内不断的产生，也会不断被体内一些抗氧化剂清除，保持着一个动态平衡水平并影响着多种生理和病理过程。体内的活性氧自由基保持在一个低平衡、无害的水平对正常的生理过程有着至关重要的作用：参与调节细胞生长中的增值、分化过程，参与细胞的信号传导和能量合成，参与体内一些核苷酸、蛋白质等重要物质的合成过程。过高水平的ROS引起细胞产生氧化应激(Oxidative Stress, OS)反应，从而破坏其基因结构和正常的功能，严重损伤细胞，进一步诱导细胞癌变、死亡和一系列疾病，例如动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、心脑血管病、白内障、神经疾病、肿瘤等疾病。过高ROS可损害体内的包括DNA、生物膜、蛋白质等生物大分子。

细胞、组织及器官微环境包括胸腔液、腹腔液、脑脊液、羊水、卵泡液、细胞培养液等均有一定浓度的ROS水平。报道发现细胞膜上的氧化磷酸化系统的氧化作用是细胞外ROS的主要来源，但也有研究认为这些ROS分子来自于细胞内扩散，因此细胞微环境ROS水平可反映细胞内ROS水平。检测细胞微环境中ROS含量有助于我们认识细胞内ROS含量，而对患者胸腔液、腹腔液、脑脊液、羊水、卵泡液等体液的ROS水平的检测为我们认识疾病提供了新的指标，为疾病的防治提供基础；对细胞培养液ROS水平的检测，有助于我们认识细胞ROS水平的动态变化，对细胞生物学活动及分子信号通路调控的认识提供新思路。

目前检测细胞ROS水平的方法有化学发光法、比色法、荧光法和电化学荧光法。DCFH-DA荧光探针法检测细胞ROS水平的方法，由于化学反应快、价格便宜、产物荧光强度高、灵敏度高、检测简单方便等优点，被广泛开发成成熟试剂盒用于细胞ROS的检测。DCFH-DA本身没有荧光，可以自由穿过细胞膜，进入细胞后，可以被细胞内的酯酶水解生成DCFH。而DCFH

不能通透细胞膜，从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF，且 DCFH 与 ROS 分子的反应没有特异性，因此通过检测 DCF 的荧光可以判定细胞内 ROS 的总体水平。由于细胞微环境体液中不含有酯酶，因此 DCFH-DA 用于检测细胞外液体 ROS 时，需提前将 DCFH-DA 用碱性法或脱酯酶法获得 DCFH 液；又由于 DCFH 对空气和光敏感，容易发生自氧化，影响检测准确性，因此 DCFH 反应液需要新鲜配置，且需要用已知浓度的 H_2O_2 ，在辣根过氧化酶 HRP 的作用下，进行反应体系和检测系统的校准。

基于化学发光法、比色法、荧光法和电化学荧光法的 ROS 检测中，常用的仪器包括流式细胞仪、多功能酶标仪、荧光显微镜等，由于样品中 ROS 暴露在空气不稳定，而现有的检测方法均需要通过探针装载、孵育、洗涤、上机等多个步骤，因此上述仪器均难以实现大量样品的快速、准确、自动检测 ROS 的目的，故现有临床检验中无可用的 ROS 水平检测方法。所以，设计制作一种可适用于细胞微环境活性氧含量的快速自动检测系统，对认识包括人类在内生物体的生理和病理过程具有重大实践意义。

发明内容

本发明的目的是克服上述背景技术的不足，提供一种针对胸腔液、腹腔液、脑脊液、羊水、卵泡液、细胞培养液等细胞、组织及器官微环境，实现 ROS 含量大量样品微量体积的快速、准确、自动检测系统。

为实现上述目的，本发明采用的技术方案是：

一种适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统，其特征在于：该自动检测系统包括：通过避光管路依序连通的样品传输反应系统、检测系统，通过水管管路接通样品传输反应系统的洗涤系统，通过气管管路接通样品传输反应系统的吹扫系统；

所述样品传输反应系统包括并联后再通过避光管路连通反应仓的进样器与 DCFH 供应仓；进样器及 DCFH 供应仓分别与反应仓之间配有进样阀；

所述洗涤系统包括供水仓以及使供水仓分别连通进样器及 DCFH 供应仓且带有洗涤泵的水管管路；

所述吹扫系统包括气源以及使气源分别连通进样器及 DCFH 供应仓且带有气压阀的气管管路；

所述检测系统包括通过避光管路系统连通反应仓的透光微流管和废液收集器，另外采用配

有光源的荧光检测器对透光微流管中的样品进行检测；所述荧光检测器获得的信号通过光电转化器转换后，输至数据处理终端。

所述样品传输反应系统还包括通过避光管路并联接入反应仓的 HRP 供应仓以及 H_2O_2 标准液供应仓，HRP 供应仓以及 H_2O_2 标准液供应仓与反应仓之间分别配有进样阀；所述洗涤系统还包括使供水仓分别连通 HRP 供应仓及 H_2O_2 标准液供应仓且带有洗涤泵的水管管路；所述吹扫系统还包括使气源分别连通 HRP 供应仓及 H_2O_2 标准液供应仓且带有气压阀的气管管路。

所述避光管路系统包括通过避光管路依序导通以实现针对反应仓、过滤器(11)和透光微流管不同部件进行冲洗(以实现液流流速控制)的第一三通阀、过滤器、第二三通阀和第三三通阀；透光微流管的一端接入第二三通阀，透光微流管的另一端接入第三三通阀与废液收集器之间的管路中；还通过另一避光管路将第一三通阀与第三三通阀旁通。目的是针对不同部件进行冲洗；对不同部件进行冲洗时，流速可以改变。比如针对反应仓冲洗时，关闭第一三通阀过滤器侧，开放第三三通阀侧，此时由于管路阻力小，冲洗压力可以调至最大；针对过滤器进行冲洗，是机器在使用一段时间后，过滤器可能有一定的堵塞，但又不至于要更换，可以对过滤器进行冲洗，此时液压适中；每个样品检测前需要进行对透光微流管进行冲洗和吹扫，对透光微流管进行冲洗时，液压应调至最小，避免损害透光微流管。

所述气源为 CO_2 钢瓶或 N_2 钢瓶。

所述光源为发光二极管、氙气灯或激光。

所述荧光检测器为光电倍增管或固态光电倍增管。

所述光源处配置有可滤过 485 - 500nm 波长光源的滤光片，有效激发光的波长为 485 - 500nm。所述荧光检测器前配置有可滤过 515 - 530nm 波长光源的滤光片，以过滤掉 485 - 500nm 的激发光，荧光检测器接收待检测光的波长为 515 - 530nm；

所述避光管路采用聚四氟乙烯、聚二甲基硅氧烷、聚甲基丙烯酸甲酯或避光材料包裹的石英毛细管。

所述透光微流管采用液芯光纤、石英毛细管或玻璃毛细管。

所述进样阀的定量体积为 20-2000 μ l。

所述反应仓的反应温度为 4 度-40 度。

本发明的有益效果是：本发明包含的各个子系统布局紧凑、设备轻巧；结构简单、便于维护、可长时间自动运行、可定期自动校准，结合液流微控技术检测速度快、灵敏度高。本发明提供的检测系统与应用场景方面明显优于与现有检测手段(现有仪器设备和试剂只能满足科研实验室的需求，基本无法满足临床应用的需求)；由于本发明的检测系统具有灵敏度和精确度高、检测速度快、操作简便等特点，可针对胸腔液、腹腔液、脑脊液、羊水、卵泡液、

细胞培养液等细胞、组织及器官微环境液体，实现 ROS 含量大量样品微量体积的快速、准确、自动检测。故在科研实验和临床检查中均具有较好的应用前景。

附图说明

图 1 是本发明的系统连接关系示意图。

具体实施方式

以下结合附图所示的实施例进一步说明。

附图所示的适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统中：样品传输反应系统通过避光管路连通检测系统，洗涤系统通过水管管路接通样品传输反应系统(简称传输反应系统)，吹扫系统通过气管管路接通样品传输反应系统。

所述样品传输反应系统中，进样器 1、DCFH 供应仓 3、HRP 供应仓 5 以及 H_2O_2 标准液供应仓 7 的输出端并联后接通反应仓 9，然后再接通检测系统；进样器、DCFH 供应仓、HRP 供应仓以及 H_2O_2 标准液供应仓与检测系统之间分别配有进样阀(由图可知：进样器与检测系统之间配有第一进样阀 2；DCFH 供应仓与检测系统之间配有第二进样阀 4；HRP 供应仓与检测系统之间配有第三进样阀 6； H_2O_2 标准液供应仓与检测系统之间配有第四进样阀 8)。使用时，可根据需要开启相关的进样阀即可输入目标样品。

所述洗涤系统中，供水仓 20 通过分别串接着洗涤泵的水管管路，接通进样器、DCFH 供应仓、HRP 供应仓以及 H_2O_2 标准液供应仓(由图可知：供水仓通过串接着第一洗涤泵 21 的水管管路接通进样器，通过串接着第二洗涤泵 22 的水管管路接通 DCFH 供应仓，通过串接着第三洗涤泵 23 的水管管路接通 HRP 供应仓，通过串接着第四洗涤泵 24 的水管管路接通 H_2O_2 标准液供应仓)。

所述吹扫系统中，气源 25(气源优选 CO_2 钢瓶或 N_2 钢瓶)通过串接着气压阀的气管管路接通进样器、DCFH 供应仓、HRP 供应仓以及 H_2O_2 标准液供应仓(由图可知：气源通过串接着第一气压阀 26 的气管管路接通进样器，通过串接着第二气压阀 27 的气管管路接通 DCFH 供应仓，通过串接着第三气压阀 28 的气管管路接通 HRP 供应仓，通过串接着第四气压阀 29 的气管管路接通 H_2O_2 标准液供应仓)。

所述检测系统包括通过避光管路(所述避光管路优选采用聚四氟乙烯等高分子材料制作)依序导通的第一三通阀 10、过滤器 11、第二三通阀 12、第三三通阀 13 以及废液收集器 17；又将透光微流管 14 的一端接入第二三通阀 12(即接入过滤器 11 与第三三通阀之间的管路中)，透光微流管 14 的另一端接入第三三通阀与废液收集器之间的管路中；还通过避光管路将第一三通阀与第三三通阀旁通。另外，还采用配有光源 15(所述光源优选为发光二极管、氙气灯

或激光)的荧光检测器 16(所述荧光检测器优选为光电倍增管或固体倍增管)对透光微流管中的样品进行检测;所述荧光检测器测得的信号通过光电转化器 18,将光信号转化为电信号输至数据处理终端 19(计算机)处理。

1、本装置的理化原理为:DCFH-DA(2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐)脱酯后获得 DCFH,且 DCFH-DA 和 DCFH 均无荧光,在活性氧的作用下,反应料 DCFH 可被氧化成强荧光的 DCF 物质。DCFH 是一种成熟的活性氧的检测染料,氧化后所得 DCF 的激发波长为 485-500nm,发射波长为 515-530nm。

2、本系统检测活性氧含量的 DCF 荧光强度检测所采用的光源可为发光二极管、氙气灯、激光,光源处同时配置可滤过 485-500nm 波长光源的滤光片,有效激发光的波长为 482-500nm。

3、本系统检测活性氧含量的 DCF 荧光强度检测所采用的荧光检测器可为光电倍增管或固体倍增管,光信号接收前配置可滤过 515-530nm 波长光源的滤光片,荧光检测器接收的待检光的波长为 515-530nm,可有效过滤去除激发光。

4、本系统检测活性氧含量的 DCF 荧光强度检测系统的透光微流管,可采用液芯光纤、石英毛细管或玻璃毛细管。液芯光纤可有效收集发射光信号,增强光强检测的灵敏度,这是为了克服细胞外 ROS 水平低于胞内 ROS 水平以致普通方法难以准确检测的问题。当入射光进入液芯光纤后,由于光纤的折射率比样品的折射率低,使得激发光能在光纤内部全反射,并一直沿着光纤往前传输,有助于增加激发光通过样品的光程,从而提高光信号强度和最终的检测灵敏度。而用毛细管或玻璃毛细管作为透光微流管时,则可采用通过对透光微流管盘绕或往返的方式增加发光信号的面积,达到增强光强检测的灵敏度。

5、本系统的细胞微环境活性氧含量检测,以可来源于第三方提供的标准液 H_2O_2 进行系统自检及校准,可有效排除不同批次反应料差异和不同仪器状态引起的数据漂移。此外本系统可设置间隔特定时间(如 4 小时)进行自动校准,基于该基线值对样本 ROS 含量计算活性氧分子当量,引入“相对 H_2O_2 ROS 当量”有利于数据准确性的维持,且有助于多中心检测时数据的可比较性。

6、本系统的反应料 DCFH 液体和 HRP(辣根过氧化物酶)液体为新鲜配制,且 DCFH 液体可由 NaOH 碱性脱酯法获得,也可由脱酯酶催化所得。DCFH 对空气和光敏感,容易发生自氧化,影响检测准确性,因此新鲜配制、避光保存均为关键,同时系统间隔特定时间(如 4 小时)自动校准以及引入“相对 H_2O_2 ROS 当量”也是确保系统准确性的关键。

7、本系统荧光强度检测后,配制了光电转换器,有效将光强信号转换成电信号,且电信

号在匹配的控制软件与数据处理终端中转换成数字信号，数据处理软件通过与此前的校准参数比对后，计算出相对氧活性浓度并保存，相对活性氧浓度的特征在于以第三方标准液 H_2O_2 的活性为相对当量，确保检测的稳定性和数据的准确性。

8、本系统可实现微量液体活性氧含量自动化检测，在于装置的样品传输反应系统、检测系统和洗涤系统均以微流控技术为基础，机电集成和中央系统控制相结合。

9、本系统所述的所有样品和反应料相关的管路均为避光管路，可应用包括聚四氟乙烯等高分子材料制作，可在最大程度上减缓 DCFH 光敏化学反应，从而降低非特异性信号。

10、本系统中第一进样阀、第二进样阀、第三进样阀和第四进样阀，可实现微量液体的精准控制，定量体积可设定为 20-2000 μ l。

11、本系统配置可自动混合液体的反应仓，以确保样品充分混匀，且反应温度为 4 度-40 度，反应时间可根据样品活性氧浓度高低进行调节，恒温及定时的前提下，可确保反应的可重复性，以及数据的准确性。

12、本系统所述透光微流管和反应仓之间设有可更换的过滤器，有效过滤反应液中微量的固体物质，以防堵塞透光微流管。

13、本系统所述过滤器后设有三通阀，以实现仪器在非检测循环中可快速洗涤样品传输反应系统的管路和仓室。此外反应仓和过滤器之间设有三通阀，可实现设备在冲洗过程不通过过滤器，延长过滤器使用寿命。

14、本系统配置了以超纯水为洗涤液的洗涤系统，且第一洗涤泵、第二洗涤泵、第三洗涤泵、第四洗涤泵均可实现增压冲洗的功能，当用去垢剂替代超纯水时可实现深度洗涤的功能。

15、本系统配置了以 CO_2 或 N_2 等气体进行吹扫的部件，有效除去管路和仓室中残留微量氧气，防止影响氧化反应，提高检测的准确性。

16、本系统检测反应基于无荧光的 DCFH 氧化形成荧光物质 DCF，用 DCF 荧光强度反映样品中 ROS 的含量。该反应原理虽然与市场现有主流 ROS 检测试剂盒相同，但现有的试剂盒均需依赖于流式细胞仪、荧光显微镜、多功能酶标仪等设备进行检测，未能实现全自动一体化微量液体检测的目的。本系统相关工艺参数包括：DCFH 浓度与体积、HRP 浓度与体积、标准液 H_2O_2 浓度与体积、缓冲液的 pH 值，DCFH、HRP、 H_2O_2 的保存条件和有效期限、反应温度和反应时间、洗涤液压强和洗涤时间、吹扫气压与吹扫时间。

本发明所述系统可对如下各模式进行组合调用，并完成相应功能，模式调用功能(控制终端软件系统默认程序或自选功能操作)集成于数据处理终端中。

1、开机

打开设备电源和控制终端电源

2、自检

控制终端识别设备，确认各进样阀、三通阀、洗涤泵、气压阀均处于关闭状态，确认电
5 路控制系统和电机系统处于待机状态、确认管路通畅、确认反应仓预热至最佳反应温度、确
认 DCFH 供应仓、HRP 供应仓、 H_2O_2 标准液供应仓的液体体积不低于最低量，确认供水仓和
气体钢瓶储水储气不低于最低值，确认废液收集器废液体积不高于最高量。上述状态均确认
无误时自检完成，否则设备各部件恢复到相应状态或提示人工更改相应状态(如添加超纯水、
倒弃废液等)。

3、校准

打开第三进样阀向反应仓注入定量 HRP 液，关闭第三进样阀；打开第四进样阀向反应仓
注入定量 H_2O_2 标准液，关闭第四进样阀；混合反应仓液体，等待反应；打开第二进样阀向
反应仓注入定量 DCFH 液，关闭第二进样阀；混合反应仓液体，等待反应；打开第一三通阀过
15 滤器侧阀门，打开第二三通阀透光微流管侧阀门，打开光源，荧光检测器检测荧光信号，光
电转换，数据处理并标准化。完成校准后自动运行进样器普通冲洗模式和吹扫模式。

4、检测

人工将样品加入进样器，设备自动打开第一进样阀向反应仓注入定量待测样品，关闭第
一进样阀；打开第二进样阀向反应仓注入定量 DCFH 液，关闭第二进样阀；混合反应仓液体，
等待反应；打开第一三通阀过滤器侧阀门，打开第二三通阀透光微流管侧阀门，打开光源，
20 荧光检测器检测荧光信号，光电转换，数据处理并在标准化基础上计算待测样品“相对 H_2O_2
ROS 当量”。完成检测后自动运行进样器普通冲洗模式和吹扫模式。

5、冲洗

1) 进样器普通冲洗模式

打开第一进样阀、第一三通阀过滤器侧阀门、第二三通阀透光微流管侧阀门，打开第一
25 洗涤泵对进样仓进行定时冲洗，关闭第一洗涤泵、第一进样阀、第一三通阀过滤器侧阀门、
第二三通阀透光微流管侧阀门。本冲洗模式主要对进样仓、反应仓、过滤器、透光微流管和
串联管路进行冲洗。

2) 进样器过滤器冲洗模式

打开第一进样阀、第一三通阀过滤器侧阀门、第二三通阀非透光微流管侧阀门、第三三
30 通阀废液收集侧阀门，打开第一洗涤泵对进样仓进行定时冲洗，关闭第一洗涤泵、第一进样

阀、第一三通阀过滤器侧阀门、第二三通阀非透光微流管侧阀门、第三三通阀废液收集侧阀门。本冲洗模式主要对进样仓、反应仓、过滤器和串联管路进行冲洗，不对透光微流管进行冲洗，本模式主要在不需对透光微流管进行冲洗时运行，可适当加快冲洗速度，并减小对透光微流管的损伤。

5 3) 进样器管路快速冲洗模式

打开第一进样阀、第一三通阀非过滤器侧阀门、第三三通阀废液收集侧阀门，打开第一洗涤泵对进样仓进行定时冲洗，关闭第一洗涤泵、第一进样阀、第一三通阀非过滤器侧阀门、第三三通阀废液收集侧阀门。本冲洗模式主要对进样仓、反应仓和串联管路进行冲洗，不对过滤器和透光微流管进行冲洗，本模式主要在不需对过滤器和透光微流管进行冲洗时运行，可以最快冲洗速度对进样仓、反应仓和串联管路进行冲洗，并减小对过滤器和透光微流管的损伤。本冲洗模式默认为设备关闭前的必须进行的冲洗模式。

4) DCFH 供应仓、HRP 供应仓、 H_2O_2 标准液供应仓的冲洗模式

打开第二或第三或第四进样阀、第一三通阀非过滤器侧阀门、第三三通阀废液收集侧阀门，打开第二或第三或第四洗涤泵对 DCFH 供应仓、HRP 供应仓、 H_2O_2 标准液供应仓进行定时冲洗，关闭第二或第三或第四洗涤泵、第二或第三或第四进样阀、第一三通阀非过滤器侧阀门、第三三通阀废液收集侧阀门。本冲洗模式主要在更换 DCFH 液、HRP 液或 H_2O_2 标准液前对 DCFH 供应仓、HRP 供应仓、 H_2O_2 标准液及其相关管路进行快速冲洗，该冲洗模式不对过滤器和透光微流管进行冲洗。

5) 进样器深度清洗模式

供水仓中用去垢剂替换超纯水，打开第一进样阀、第一三通阀非过滤器侧阀门、第三三通阀废液收集侧阀门，打开第一洗涤泵对进样仓进行低压缓流通夜，关闭第一洗涤泵、第一进样阀、第一三通阀非过滤器侧阀门、第三三通阀废液收集侧阀门。本清洗模式是对设备进行定期保养进行的深度洗涤，主要对进样仓、反应仓和串联管路进行深度清洗，不对过滤器和透光微流管进行洗涤。完成进样器深度清洗后，设备自动进行 5 个重复的进样器管路快速冲洗模式和 1 个重复的进样仓普通冲洗模式。

6、吹扫

1) 进样器吹扫模式

打开第一进样阀、第一三通阀过滤器侧阀门、第二三通阀透光微流管侧阀门，打开第一气压阀对进样仓进行定时吹扫，关闭第一气压阀、第一进样阀、第一三通阀过滤器侧阀门、第二三通阀透光微流管侧阀门。本吹扫模式主要对进样仓、反应仓、过滤器、透光微流管和

串联管路进行吹扫。

2) DCFH 供应仓、HRP 供应仓、 H_2O_2 标准液供应仓的吹扫模式

打开第二或第三或第四进样阀、第一三通阀非过滤器侧阀门、第三三通阀废液收集侧阀门，打开第二或第三或第四气压阀对进样仓进行定时吹扫，关闭第二或第三或第四气压阀、

- 5 第二或第三或第四进样阀、第一三通阀非过滤器侧阀门、第三三通阀废液收集侧阀门。本吹扫模式主要在更换 DCFH 液、HRP 液或 H_2O_2 标准液前对 DCFH 供应仓、HRP 供应仓、 H_2O_2 标准液及其相关管路进行快速吹扫。

7、关机

- 10 设备运行进样器普通冲洗模式 1 次后，运行进样器管路快速冲洗模式 3 次，确认各进样阀、三通阀、洗涤泵、气压阀均处于关闭状态，断开电路控制系统和电机系统的电源，关闭设备电源，关闭控制终端及其电源。

权利要求书

1. 一种适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统，其特征在于：该自动检测系统包括：通过避光管路依序连通的样品传输反应系统、检测系统，通过水管管路接通样品传输反应系统的洗涤系统，通过气管管路接通样品传输反应系统的吹扫系统；

5 所述样品传输反应系统包括并联后再通过避光管路连通反应仓(9)的进样器(1)与 DCFH 供应仓(3)；进样器及 DCFH 供应仓分别与反应仓之间配有进样阀；

所述洗涤系统包括供水仓(20)以及使供水仓分别连通进样器及 DCFH 供应仓且带有洗涤泵的水管管路；

10 所述吹扫系统包括气源(25)以及使气源分别连通进样器及 DCFH 供应仓且带有气压阀的气管管路；

所述检测系统包括通过避光管路系统连通反应仓的透光微流管(14)和废液收集器(17)，另外采用配有光源(15)的荧光检测器(16)对透光微流管中的样品进行检测；所述荧光检测器获得的信号通过光电转化器(18)转换后，输至数据处理终端(19)。

2. 根据权利要求 1 所述的适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统，其特征在于：
15 所述样品传输反应系统还包括通过避光管路并联接入反应仓的 HRP 供应仓(5)以及 H_2O_2 标准液供应仓(7)，HRP 供应仓以及 H_2O_2 标准液供应仓与反应仓之间分别配有进样阀；所述洗涤系统还包括使供水仓分别连通 HRP 供应仓及 H_2O_2 标准液供应仓且带有洗涤泵的水管管路；所述吹扫系统还包括使气源分别连通 HRP 供应仓及 H_2O_2 标准液供应仓且带有气压阀的气管管路。

20 3. 根据权利要求 2 所述的适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统，其特征在于：所述避光管路系统包括通过避光管路依序导通的第一三通阀(10)、过滤器、第二三通阀(12)和第三三通阀(13)；透光微流管的一端接入第二三通阀，透光微流管的另一端接入第三三通阀与废液收集器之间的管路中；还通过另一避光管路将第一三通阀与第三三通阀旁通；以实现针对反应仓、过滤器和透光微流管的冲洗。

25 4. 根据权利要求 3 所述的适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统，其特征在于：所述气源为 CO_2 钢瓶或 N_2 钢瓶。

5. 根据权利要求 4 所述的适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统，其特征在于：所述光源为发光二极管、氙气灯或激光。

30 6. 根据权利要求 5 所述的适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统，其特征在于：所述荧光检测器为光电倍增管或固态光电倍增管。

7. 根据权利要求 6 所述的适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统，其特征在于：
所述荧光检测器光配置有可滤过 515 - 530nm 波长光源的滤光片，以接收待波长为 515 - 530nm 检测光；所述光源处配置有可滤过 485 - 500nm 波长光源的滤光片，有效激发光的波长为 485 - 500nm。

5 8. 根据权利要求 7 所述的适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统，其特征在于：
所述避光管路采用聚四氟乙烯、聚二甲基硅氧烷、聚甲基丙烯酸甲酯或避光材料包裹的石英毛细管。

9. 根据权利要求 8 所述的适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统，其特征在于：
所述透光微流管采用液芯光纤、石英毛细管或玻璃毛细管。

10 10. 根据权利要求 9 所述的适用于细胞微环境的活性氧含量自动检测系统，其特征在于：
所述进样阀的定量体积为 20-2000 μ l。

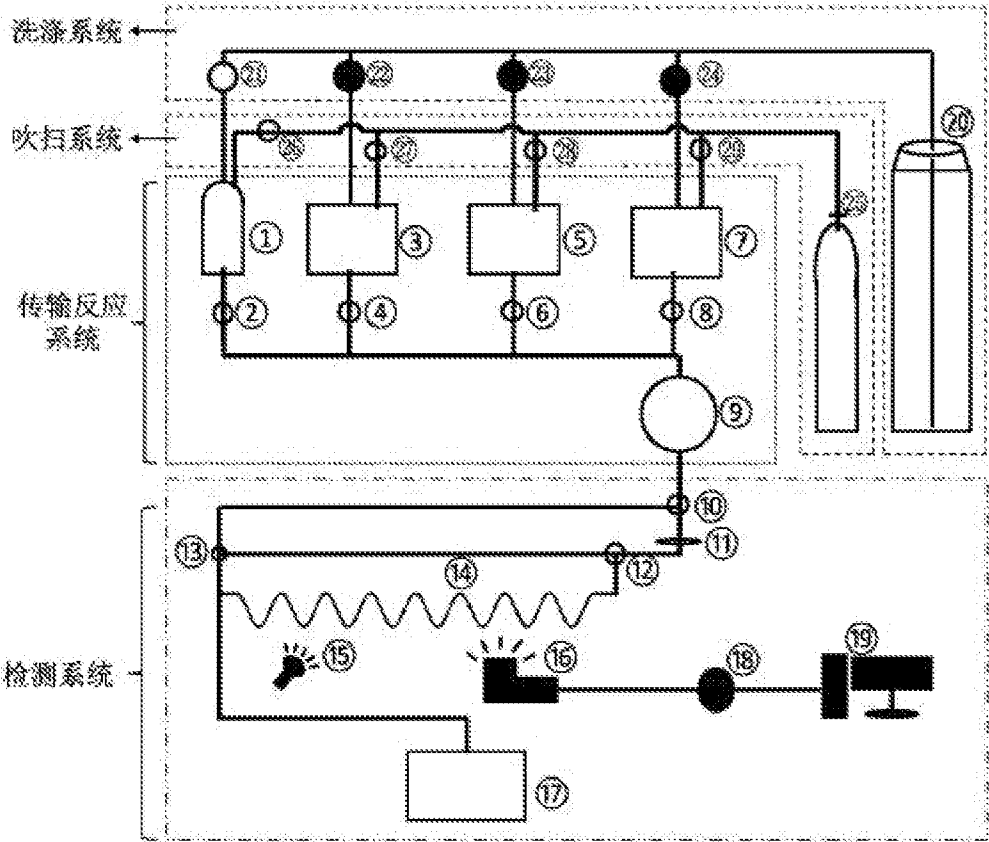


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/117629

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/64(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 21/-; G01N 35/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, VEN: 活性氧, ROS, 荧光, 光纤, 二氯荧光黄, DCFH, 自动, 在线, react+ oxygen specie?, fluorescen+, fiber, fibre, automatic, on line

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 111426663 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 17 July 2020 (2020-07-17) claims 1-10, description paragraphs 0007-0023, 0027-0047, figure 1	1-10
X	CN 110346341 A (SOUTH CHINA INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL SCIENCE, MEE) 18 October 2019 (2019-10-18) description, paragraphs 0030-0044, figure 1	1-10
A	CN 103424383 A (GRADUATE SCHOOL OF THE CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 04 December 2013 (2013-12-04) entire document	1-10
A	CN 110441203 A (SOUTH CHINA INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL SCIENCE, MEE) 12 November 2019 (2019-11-12) entire document	1-10
A	CN 110554010 A (NANJING XINDA INSTITUTE OF METEOROLOGICAL SCIENCE & TECHNOLOGY CO., LTD.) 10 December 2019 (2019-12-10) entire document	1-10
A	CN 109459401 A (PEKING UNIVERSITY) 12 March 2019 (2019-03-12) entire document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 2020

Date of mailing of the international search report

18 January 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/117629**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016191342 A1 (AVEDRO INC et al.) 01 December 2016 (2016-12-01) entire document	1-10
A	GB 2265709 A (BLAKE DAVID RUSSELL et al.) 06 October 1993 (1993-10-06) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/117629

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111426663	A	17 July 2020	None			
CN	110346341	A	18 October 2019	None			
CN	103424383	A	04 December 2013	None			
CN	110441203	A	12 November 2019	None			
CN	110554010	A	10 December 2019	None			
CN	109459401	A	12 March 2019	None			
WO	2016191342	A1	01 December 2016	EP	3297589	A4	06 March 2019
				US	10028657	B2	24 July 2018
				US	2016338588	A1	24 November 2016
				EP	3297589	A1	28 March 2018
GB	2265709	A	06 October 1993	GB	9206503	D0	06 May 1992

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/117629

A. 主题的分类 G01N 21/64(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																										
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) G01N 21/-; G01N 35/- 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNTXT, VEN:活性氧, ROS, 荧光, 光纤, 二氯荧光黄, DCFH, 自动, 在线, react+ oxygen specie?, fluore-scen+, fiber, fibre, automatic, on line																										
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 111426663 A (浙江大学) 2020年 7月 17日 (2020 - 07 - 17) 权利要求1-10, 说明书0007-0023、0027-0047段, 图1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 110346341 A (生态环境部华南环境科学研究所) 2019年 10月 18日 (2019 - 10 - 18) 说明书0030-0044段, 图1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103424383 A (中国科学院研究生院) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110441203 A (生态环境部华南环境科学研究所) 2019年 11月 12日 (2019 - 11 - 12) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110554010 A (南京信大气象科学技术研究院有限公司) 2019年 12月 10日 (2019 - 12 - 10) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109459401 A (北京大学) 2019年 3月 12日 (2019 - 03 - 12) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016191342 A1 (AVEDRO INC等) 2016年 12月 1日 (2016 - 12 - 01) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 111426663 A (浙江大学) 2020年 7月 17日 (2020 - 07 - 17) 权利要求1-10, 说明书0007-0023、0027-0047段, 图1	1-10	X	CN 110346341 A (生态环境部华南环境科学研究所) 2019年 10月 18日 (2019 - 10 - 18) 说明书0030-0044段, 图1	1-10	A	CN 103424383 A (中国科学院研究生院) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 全文	1-10	A	CN 110441203 A (生态环境部华南环境科学研究所) 2019年 11月 12日 (2019 - 11 - 12) 全文	1-10	A	CN 110554010 A (南京信大气象科学技术研究院有限公司) 2019年 12月 10日 (2019 - 12 - 10) 全文	1-10	A	CN 109459401 A (北京大学) 2019年 3月 12日 (2019 - 03 - 12) 全文	1-10	A	WO 2016191342 A1 (AVEDRO INC等) 2016年 12月 1日 (2016 - 12 - 01) 全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
PX	CN 111426663 A (浙江大学) 2020年 7月 17日 (2020 - 07 - 17) 权利要求1-10, 说明书0007-0023、0027-0047段, 图1	1-10																								
X	CN 110346341 A (生态环境部华南环境科学研究所) 2019年 10月 18日 (2019 - 10 - 18) 说明书0030-0044段, 图1	1-10																								
A	CN 103424383 A (中国科学院研究生院) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 全文	1-10																								
A	CN 110441203 A (生态环境部华南环境科学研究所) 2019年 11月 12日 (2019 - 11 - 12) 全文	1-10																								
A	CN 110554010 A (南京信大气象科学技术研究院有限公司) 2019年 12月 10日 (2019 - 12 - 10) 全文	1-10																								
A	CN 109459401 A (北京大学) 2019年 3月 12日 (2019 - 03 - 12) 全文	1-10																								
A	WO 2016191342 A1 (AVEDRO INC等) 2016年 12月 1日 (2016 - 12 - 01) 全文	1-10																								
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																										
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 </td> <td style="vertical-align: top;"> “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件 </td> </tr> </table>			* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																						
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																									
国际检索实际完成的日期 2020年 11月 25日		国际检索报告邮寄日期 2021年 1月 18日																								
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 周宏卉 电话号码 86-(010)-62089913																								

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	GB 2265709 A (BLAKE DAVID RUSSELL等) 1993年 10月 6日 (1993 - 10 - 06) 全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/117629

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111426663	A	2020年 7月 17日	无			
CN	110346341	A	2019年 10月 18日	无			
CN	103424383	A	2013年 12月 4日	无			
CN	110441203	A	2019年 11月 12日	无			
CN	110554010	A	2019年 12月 10日	无			
CN	109459401	A	2019年 3月 12日	无			
WO	2016191342	A1	2016年 12月 1日	EP	3297589	A4	2019年 3月 6日
				US	10028657	B2	2018年 7月 24日
				US	2016338588	A1	2016年 11月 24日
				EP	3297589	A1	2018年 3月 28日
GB	2265709	A	1993年 10月 6日	GB	9206503	D0	1992年 5月 6日