

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610041334.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 35/08 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 2 月 7 日

[11] 公开号 CN 1908663A

[22] 申请日 2006.8.16

[21] 申请号 200610041334.9

[71] 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路 22 号

[72] 发明人 鞠焜先 付志锋

[74] 专利代理机构 南京苏高专利事务所

代理人 阙如生

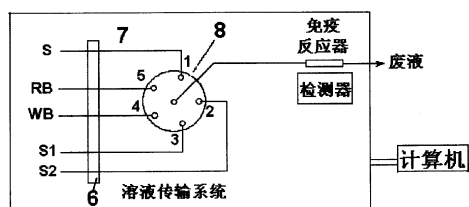
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

底物区带分辨化学发光多组分免疫分析方法
及检测系统

[57] 摘要

一种基于底物区带分辨化学发光的多组分免疫分析新方法 & 检测系统，包括溶液传输系统、免疫反应器、化学发光检测器和计算机；其中传输系统由多通道蠕动泵(6)、连接管(7)和多位选向阀(8)组成。该方法是在免疫反应器中固定多种组分的包被抗体，往免疫反应器中通入样品和酶标抗体后，如两组分分别用辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶标记，形成两种夹心免疫复合物。洗净未结合的过量抗体后，依次通入辣根过氧化物酶的化学发光底物区带、冲洗缓冲液区带和碱性磷酸酶的化学发光底物区带，由信号强度确定组分浓度。检测完成后可再生反应器进入下一分析流程。该方法速度快、成本低、重现性好、灵敏度高，适合于环境监测、临床诊断、食品安全等领域。



1. 一种流通式底物区带分辨多组分化学发光免疫分析检测系统, 其特征在于该系统包括溶液传输系统、免疫反应器、化学发光检测器和计算机; 其中溶液传输系统由多通道蠕动泵(6)、连接管(7)和多位选向阀(8)组成, 五根连接管(7)经过多通道蠕动泵(6)分别连接到多位选向阀(8)的五个阀位口(1)、(2)、(3)、(4)、(5), 入口(1)传输样品 S, 入口(5)传输再生缓冲液 RB, 入口(4)传输冲洗缓冲液 WB, 入口(3)、(2)分别传输两个化学发光底物 S_1 和 S_2 ; 选向阀(8)中心的出口通过连接管(7)与免疫反应器的入口连接, 免疫反应器的出口通过连接管(7)把废液排出, 免疫反应器置于化学发光检测器之上, 溶液传输系统和化学发光检测器均与计算机相连接。

2. 根据权利要求1所述的检测系统, 其特征在于所述的多通道蠕动泵(6)的转速和液体流速是可调的。

3. 根据权利要求1所述的检测系统, 其特征在于所述的多位选向阀(8)可通过转动多位选向阀实现不同流路的切换, 多位选向阀上的五个阀位口(1)、(2)、(3)、(4)、(5)分别与中心的出口相通。

4. 根据权利要求1所述的检测系统, 其特征在于所述的免疫反应器为包被多种抗体的醛基活化的 UltraBind 膜。

5. 根据权利要求1所述的检测系统, 其特征在于所述的再生缓冲液为 0.1 M 氨基酸/盐酸缓冲液, pH 2.0。

6. 根据权利要求1所述的检测系统, 其特征在于所述的冲洗缓冲液为 0.01 M 磷酸盐缓冲液, pH 7.4, 含 0.05% 吐温-20。

7. 一种底物区带分辨化学反光多组分免疫分析方法, 其分析步骤如下:

- (1) 首先将多位选向阀(8)的阀位口切换到(1), 通过连接管(7)将含抗原 1 和抗原 2 的待测样品及分别用辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶进行标记的示踪抗体 1 和抗体 2, 通入免疫反应器, 室温温育, 在免疫反应器中形成两种组分的酶标免疫夹心复合物;
- (2) 然后将阀位口切换到(4), 通过连接管(7)通入冲洗缓冲液 WB 洗去未结合免疫试剂, 冲洗干净后, 把阀位口切换到(3), 通过连接管(7)通入底物区带 S_1 , 辣根过氧化物酶催化底物区带产生强烈的化学发光, 记录发光信号, 得到一种组分的浓度;
- (3) 将阀位口切换到(4), 通过连接管(7)通入冲洗缓冲液 WB, 形成缓冲液区带;
- (4) 把阀位口切换到(2), 通过连接管(7)再通入底物区带 S_2 , 该区带遇碱性磷酸酶后产生强烈发光, 记录发光信号即可得到另一组分的浓度;
- (5) 测定完成后, 依次把阀位口切换到(5)和(4), 先后通入再生缓冲液 RB 和冲洗缓冲液 WB 两个循环, 可使得免疫夹心复合物解离, 免疫反应器再生, 以进入下一个测定循环。

底物区带分辨化学发光多组分免疫分析方法及检测系统

一、技术领域

本发明为底物区带分辨化学发光技术，涉及同一样品中多种组分的同时免疫分析方法，尤其是化学发光与流动分析技术联用的多组分免疫分析方法；本技术还涉及用于双组分化学发光免疫分析的检测系统。

二、背景技术

免疫分析作为一种高选择性和高灵敏度的分析方法，在临床诊断、环境监测、食品安全等领域得到了日益广泛的应用。在实际应用领域中，经常需要测定复杂样品中多种组分的含量，如在肿瘤诊断中，多种肿瘤标志物的联合分析为诊断提供了有力的依据。

目前，为了实现复杂样品中多种组分的联合分析，多采用多次平行单组分分析的模式，即每次只分析其中一种组分，多次执行分析过程，最终得到所有组分的含量。该模式耗费时间长、劳动量大、分析成本高。为了克服这些缺点，近年来出现了一些多组分免疫分析方法，主要包括阵列法和多标记法。阵列法是基于免疫反应区域分开的原理，即在不同的阵列区域检测不同的组分，但该方法仪器装置较为复杂，且需要昂贵的阵列检测器，如多通道电化学工作站和 CCD。目前国内已有厂家推出使用 CCD 阵列检测器的多组分化学发光免疫分析仪，但是由于仪器成本过高，其产品难以得到推广。多标记法的原理是以不同标记物来标记不同组分的免疫试剂，通过检测不同标记物的信号得到各组分的含量，其检测方法包括电化学法、荧光法、光度法和放射法。在电化学检测法中，多以工作电位分辨不同组分；在荧光和光度法中，通常以波长和衰减时间分辨不同组分。目前，多标记法尚不能用化学发光检测，因为化学发光作为一种不考虑波长的检测技术，无法通过波长来分辨不同组分对应的标记物发出的信号。而且在多标记法中，对于不同组分的不同标记物，其最优分析条件往往有很大差别，简单的联合使用多种标记物，往往面临各种标志物分析条件不兼容的问题，使得分析效果大打折扣。

当前，常用免疫分析技术的全过程需要多次加样、温育、洗板以及反应，最后进行仪器检测。操作过程较为繁琐，劳动量大，所需时间多在 2 小时以上，不适合高通量快速分析。美国 Roche Diagnostics GmbH 公司结合流动分析、免疫磁珠与电致发光技术，开发出商品化的 Elecsys 全自动免疫分析仪，实现了自动化快速免疫分析，在临床上得到了应用。但是该仪器及配套试剂盒价格非常昂贵，财力不足的机构难以负担。而且，该仪器也是单组分分析模式，对于复杂样品仍需要多次平行测定。

化学发光分析是近年来快速发展的分析技术，其仪器便宜，操作简便，环境友好，而且是目前最灵敏的分析技术之一，特别适合于痕量物质的检测。流动分析技术具有重现性好，自动化程度高，分析速度快等优点，是实现高通量分析最有效的手段之一。这两种技术与免疫分析的联用，是免疫分析领域近年的一个研究热点，已经取得了令人瞩目的成就。

三、发明内容

本发明的目的是：以多标记法为基础，结合流动分析技术，以化学发光检测，提供一种基于底物区带分辨技术，和自动化高通量的多组分免疫分析方法；本发明的另一个的还在于提供一套自动化的流通式双组分底物区带分辨化学发光免疫分析检测系统。

本发明的目的是通过以下的技术方案来实现：

一种流通式底物区带分辨多组分化学发光免疫分析检测系统，其特征在于该系统包括溶液传输系统、免疫反应器、化学发光检测器和计算机；溶液传输系统由多通道蠕动泵（6）、连接管（7）和多位选向阀（8）组成，五根连接管（7）经过多通道蠕动泵（6）分别连接到多位选向阀（8）的五个阀位口（1）、（2）、（4）、（5），入口（1）传输样品 S，入口（5）传输再生缓冲液 RB，入口（4）传输冲洗缓冲液 WB，入口（3）、（2）分别传输两个化学发光底物 S_1 和 S_2 ；多位选向阀（8）中心的出口通过连接管（7）与免疫反应器的入口连接，免疫反应器的出口通过连接管（7）把废液排出，免疫反应器置于化学发光检测器之上，溶液传输系统和化学发光检测器均与计算机相连接。

上述的多通道蠕动泵（6）的转速和液体流速是可调的。

上述的连接管（7）的内径可用 0.8 mm 的聚四氟乙烯制成。

上述的多位选向阀（8）可通过转动多位选向阀实现不同流路的切换，多位选向阀上的五个阀位口（1）、（2）、（3）、（4）、（5）分别与中心的出口相通。

上述的免疫反应器为包被多种抗体的醛基活化的 UltraBind 膜。

上述的再生缓冲液为 0.1 M 氨基酸/盐酸缓冲液，pH 2.0。

上述的冲洗缓冲液为 0.01 M 磷酸盐缓冲液，pH 7.4，含 0.05 % 吐温-20。

一种底物区带分辨化学反光多组分免疫分析方法，其分析步骤如下：

- （1）先将多位选向阀（8）的阀位口切换到（1），通过连接管（7）将含抗原 1 和抗原 2 的待测样品及分别用辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶进行标记的示踪抗体 1 和抗体 2，通入免疫反应器，室温温育，在免疫反应器中形成两种组分的酶标免疫夹心复合物；

- (2) 然后将阀位口切换到(4), 通过连接管(7)通入 1.0 mL/min 冲洗缓冲液 WB 洗去未结合免疫试剂, 冲洗干净后, 把阀位口切换到(3), 通过连接管(7)通入底物区带 S₁, 辣根过氧化物酶催化底物区带产生强烈的化学发光, 记录发光信号, 得到一种组分的浓度;
- (3) 将阀位口切换到(4), 通过连接管(7)通入冲洗缓冲液 WB, 形成缓冲液区带;
- (4) 把阀位口切换到(2), 通过连接管(7)再通入底物区带 S₂, 该区带遇碱性磷酸酶后产生强烈发光, 记录发光信号即可得到另一组分的浓度;
- (5) 测定完成后, 依次将阀位口切换到(5)和(4), 先后通入再生缓冲液 RB 和冲洗缓冲液 WB 两个循环, 可使得免疫夹心复合物解离, 免疫反应器再生, 以进入下一个测定循环。

流通式多组分化学发光免疫分析检测系统的构成:

本检测系统的结构如图 1 所示, 共包括四个部分: 第一个部分是溶液传输系统, 该传输系统以一个多通道蠕动泵(6)充当传质动力, 以若干聚四氟乙烯管充当传质连接管(7), 以一个多位选向阀(8)控制液流方向, 把不同溶液注入免疫反应器; 第二个部分是免疫反应器, 其中固定了多种组分对应的包被抗体; 第三个部分是化学发光检测器, 用于采集发光信号; 第四个部分是计算机控制系统。

本检测系统的工作原理:

本检测系统把传统的多标记技术与底物区带分辨技术联用, 可以在一个分析流程中测定多种物质。免疫反应为传统的双抗体夹心法。在免疫反应器中固定多种待测物(抗原)所对应的包被抗体。如图 2 所示, 以两种待测抗原为例, 在反应器中固定两种待测物的抗体, 示踪抗体分别用辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶进行标记; 首先把含有这两种抗原的复杂样品与两种酶标抗体混合并通入免疫反应器, 在免疫反应器中形成两种组分的酶标免疫夹心复合物; 然后通入冲洗缓冲液洗去未结合免疫试剂; 冲洗干净后, 先通入底物区带 S₁(鲁米诺、过氧化氢与对碘苯酚混合溶液), 该区带被辣根过氧化物酶催化产生强烈的化学发光, 记录发光信号, 得到一种组分的含量; 以冲洗缓冲液区带 WB 清洗免疫反应器后, 再通入底物区带 S₂(disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl) phenyl phosphate, CSPD), 该区带遇碱性磷酸酶后产生强化学发光, 记录发光信号即可得到另一组分含量。

测定完成后, 依次通入再生缓冲液和冲洗缓冲液两个循环, 可使得免疫夹心复合物解离, 免疫反应器再生, 以进入下一个测定循环。

分析过程中, 所有溶液由蠕动泵上的连接管传输进入分析系统, 通过转动多位选向阀实现不同流路的切换, 全过程由计算机进行程序化自动控制。

本检测系统的测定原理:

当待测样品中存在拟测定的两种抗原物质时,该两种抗原物质与反应器上的相应的固定化包被抗体,以及加入的两种酶标抗体分别形成辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶标记的两种免疫复合物。当以底物区带分辨技术依次通入基于鲁米诺-过氧化氢-对碘苯酚的辣根过氧化物酶化学发光底物以及基于 CSPD 的碱性磷酸酶化学发光底物时,可依次得到两种组分的发光信号,从而换算出两种组分的浓度。

本发明与现有技术相比,具有以下的特点:

本发明结合流动分析技术与化学发光检测,提出了底物区带分辨多组分免疫分析系统,在一个流程中检测多种物质。相对于其他多组分免疫分析方法,具有以下特点:

- (1) 操作简单,全分析过程均在流动体系中完成,以计算机进行程序化自动控制,手工操作极少,无需熟练操作人员。
- (2) 分析时间短,全过程包括加样、温育、冲洗、检测与再生仅需 35 分钟,不仅是目前最快速的多组分免疫分析方法之一,也大大快于普通的单组分免疫分析方法。
- (3) 仪器设备简单,成本低廉,无需多组分免疫分析中常用的昂贵的阵列检测器,整个分析系统由低值的蠕动泵、多位选向阀、聚四氟乙烯管和化学发光检测器组成。
- (4) 免疫反应器可由通入再生缓冲液进行反复再生使用,与常规的免疫分析方法相比,大大节约了昂贵的包被抗体,进一步降低了分析成本。
- (5) 由于其检测模式为极灵敏的酶催化化学发光反应,本方法可测出极低浓度的样品,满足绝大多数的分析需求。
- (6) 由于采用了自动化的流动分析技术,使得由操作人员的操作手法与习惯不同导致的个体差异大为减小,方法的重现性比传统的手工操作方法大为提高,有利于制定相关标准。

四、附图说明

图 1 流通式双组分化学发光免疫分析检测系统的结构示意图

1, 2, 3, 4, 5 为多位选向阀阀位入口, 6-多通道蠕动泵; 7-连接管; 8-多位选向阀; S: 样品; RB: 再生缓冲液; WB: 冲洗缓冲液; S1: 底物 1; S2: 底物 2

图 2 流通式双组分化学发光免疫分析原理示意图

五、具体实施方式

实施例 1 结合附图 1 对流通式双组分化学发光免疫分析检测系统作进一步说明:

流通式底物区带分辨多组分化学发光免疫分析检测系统包括溶液传输系统、免疫反应器、化学发光检测器和计算机。溶液传输系统由多通道蠕动泵 6、内径为 0.8 mm 的聚四氟乙烯的连接管 7 和多位选向阀 8 组成, 五根连接管 7 经过多通道蠕动泵 6 分别连接到多位选向阀 8 的五个阀位口 1、2、4、5, 入口 1 传输样品 S, 入口 5 传输再生缓冲液 RB, 入口 4 传输冲洗缓冲液 WB, 入口 3、2 分别传输两个化学发光底物 S₁ 和 S₂; 每根连接管 7 的一端与选向阀 8 中心的出口连接, 出口与免疫反应器的入口连接, 另一根连接管 7 导出免疫反应器的废液, 免疫反应器置于化学发光检测器之上, 溶液传输系统和化学发光检测器均与计算机相连接。

实施例 2 化学发光与组分免疫分析方法:

具体分析过程如表 1 所示, 所有分析步骤由计算机进行程序化自动控制。再生缓冲液 RB 为 0.1 M 氨基酸/盐酸缓冲液, pH 2.0; 冲洗缓冲液 WB 为含 0.05% 吐温-20 的 0.01 M 磷酸盐缓冲液, pH 7.4; 免疫反应器为包被多种抗体的醛基活化的 UltraBind 膜; S₁ 为 0.5 mmol/l 鲁米诺、3 mmol/l 过氧化氢与 0.5 mmol/l 对碘苯酚混合溶液和 S₂ 为 CSPD 溶液。

表1 具体分析过程

步号	阀位	步骤	开始时间 (分)
1	1	往免疫反应器中注入样品与两种酶标抗体的混合物	00:00
2	1	停流，室温温育	00:30
3	4	以1.0 mL/min的流速通入冲洗缓冲液洗涤免疫反应器	20:30
4	3	注入辣根过氧化物酶的化学发光底物，停流，采集化学发光数据，得到一种组分浓度，	22:00
5	4	以1.0 mL/min的流速通入冲洗缓冲液洗涤免疫反应器	26:30
6	2	注入碱性磷酸酶的化学发光底物，停流，采集化学发光数据，得到另一组分浓度，	27:00
7	5	以0.5 mL/min的流速通入再生缓冲液再生免疫反应器	31:30
8	4	以0.5 mL/min的流速通入冲洗缓冲液调节免疫反应器	33:00
9	5	以同样流速第二次通入再生缓冲液再生反应器	33:30
10	4	以同样流速第二次通入冲洗缓冲液调节免疫反应器	34:30
11	1	进入下一个分析循环	35:00

实施例 3

以两种重要的肿瘤标记物：癌胚抗原（CEA）与癌抗原 125（CA 125）为例，说明该流动式双组分化学发光免疫分析系统的应用。

免疫反应器为醛基活化的 UltraBind 膜，包被了鼠单克隆抗 CEA 与鼠单克隆抗 CA 125，以牛血清白蛋白封闭残余活性位点，固定在 50 微升的流通池中。CEA 的示踪抗体为碱性磷酸酶标记的鼠单克隆抗 CEA，CA 125 的示踪抗体为辣根过氧化物酶标记的鼠单克隆抗 CA 125。

如表 1 所示流程，把阀切换到位置 1，往固定了免疫反应器的流通池中通入 25 微升样品、12.5 微升 CEA 示踪抗体和 12.5 微升 CA 125 示踪抗体的混合物，静态温育 20 分钟。然后把阀位切换到 4，冲洗免疫反应器 1.5 分钟。洗净后把阀位切换到 3，

注入辣根过氧化物酶底物，停流，在第四分钟时采集 CA 125 相应的发光信号。再把阀位切回 4，冲洗半分钟。然后把阀位切换至 2，注入碱性磷酸酶底物，停流 4 分钟，检测 CEA 相应的化学发光信号。检测完成后，把阀在 5 和 4 位间切换，反复通入再生缓冲液与冲洗缓冲液，在 3.5 分钟内再生免疫反应器两个循环，完成全部分析过程。通过一系列浓度样品的信号测定，得到 CEA 和 CA 125 的标准曲线。再利用标准曲线法，得到临床血样中这两种肿瘤标志物的浓度。

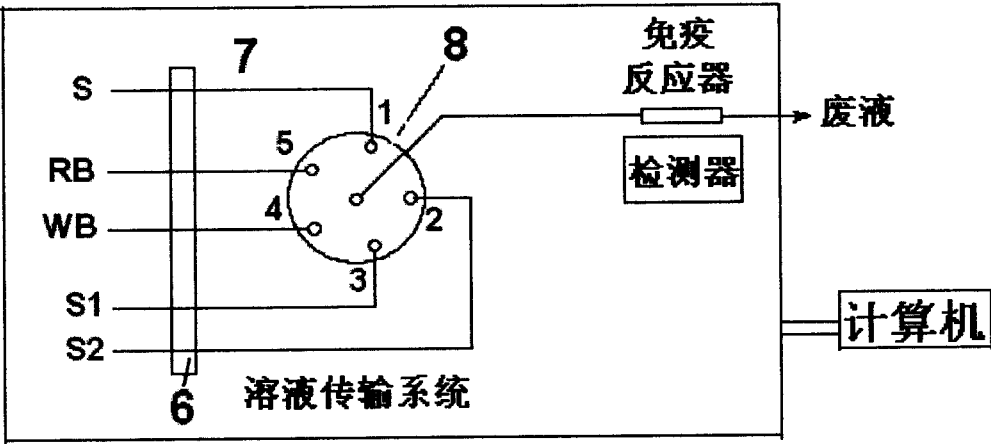


图 1

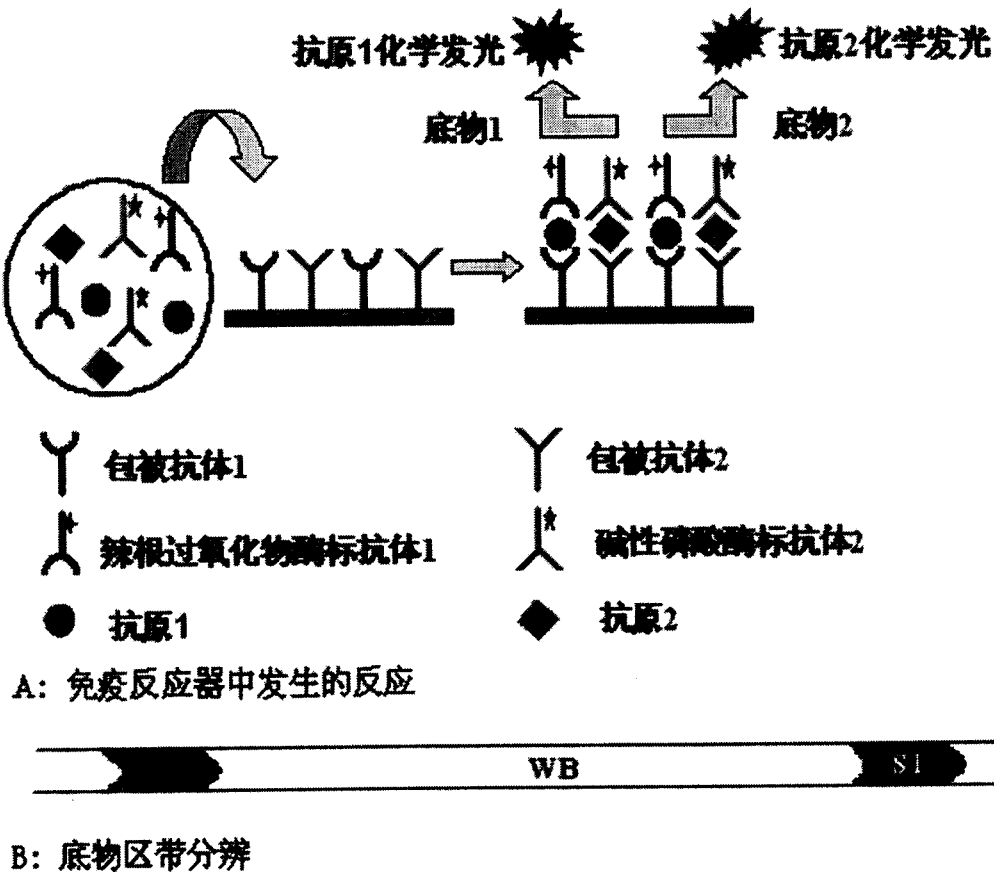


图 2