

[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 200810036596.5

[51] Int. Cl.

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 21/63 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 8 日

[11] 公开号 CN 101281137A

[22] 申请日 2008.4.24

[21] 申请号 200810036596.5

[71] 申请人 博阳生物科技(上海)有限公司

地址 201210 上海市浦东新区张江高科技园  
蔡伦路 88 号二号楼五楼东

[72] 发明人 王海蛟 赵卫国

[74] 专利代理机构 上海光华专利事务所

代理人 许亦琳 余明伟

权利要求书 1 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

光激化学发光免疫检测方法

[57] 摘要

本发明涉及光激化学发光技术，公开了一种光激化学发光免疫检测方法，包括下列步骤：以 620 - 700nm 的激发光照射含有发光微粒及感光微粒的反应溶液；检测反应溶液的发射光量，发射光的检测波长为 450 - 650nm。本发明经过研究光激化学发光免疫检测方法中激发光、发射光、检测时间等选择条件，给出了相应参数合适检测的选择范围，及优选的参数范围，从而使得光激化学发光免疫检测方法的可控性更强，灵敏度及精确度得到进一步地提高。

1. 一种光激化学发光免疫检测方法，包括下列步骤：
  - a、以 620-700nm 的激发光照射含有发光微粒及感光微粒的反应溶液；
  - b、检测反应溶液的发射光量，发射光的检测波长选自 450-650nm。
2. 如权利要求 1 所述光激化学发光免疫检测方法，其特征在于，所述步骤 a 以激发光照射反应溶液到步骤 2 检测反应溶液发光量之间有一检测延迟时间，其范围为 10ms-1000ms。
3. 如权利要求 1 所述光激化学发光免疫检测方法，其特征在于，所述步骤 a 以激发光照射反应溶液的时间为 50ms-2000ms。
4. 如权利要求 3 所述光激化学发光免疫检测方法，其特征在于，所述步骤 a 以激发光照射反应溶液的时间为 200ms-1800ms。
5. 权利要求 4 所述光激化学发光免疫检测方法，其特征在于，所述步骤 a 以激发光照射反应溶液的时间为 500-1000ms。
6. 如权利要求 1-5 中任一权利要求所述光激化学发光免疫检测方法，其特征在于，所述激发光的波长范围为 640-680nm。
7. 如权利要求 6 所述光激化学发光免疫检测方法，其特征在于，所述激发光的波长为 660nm。
8. 如权利要求 1-5 中任一权利要求所述光激化学发光免疫检测方法，其特征在于，所述发射光的检测波长范围为 610-620nm。
9. 如权利要求 8 所述光激化学发光免疫检测方法，其特征在于，所述发射光的检测波长为 615nm。
10. 如权利要求 1-5 中任一权利要求所述光激化学发光免疫检测方法，其特征在于，所述激发光光源的功率范围为 5-100mw。
11. 如权利要求 10 所述光激化学发光免疫检测方法，其特征在于，所述激发光光源的功率为 40-60mw。
12. 如权利要求 1-5 中任一权利要求所述光激化学发光免疫检测方法，其特征在于，所述发光微粒及感光微粒包被有抗原或抗体。

## 光激化学发光免疫检测方法

### 技术领域

本发明涉及光激化学发光技术。

### 背景技术

光激化学发光技术是一种以高分子微粒为基础的化学发光技术，它可以通过感光微粒和发光微粒在一定距离范围内结合，产生离子氧能量传递，发出光信号，从而对待测样品进行检测。感光微粒是填充有感光化合物的高分子微粒，发光微粒是填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。光激化学发光技术的核心原理是能量的近距离转移，转移的介质是高能态的离子氧。当红色激光照射感光微粒后，释放单线态氧离子（ $4\mu\text{s}$ ），其传播距离为 200nm 左右，只有当感光微粒和发光微粒的距离足够接近的情况下，感光微粒释放的单线态氧离子才能到达发光微粒，从而产生一系列化学反应，发射出 520~620nm 高能级的光，由于反应体系中，微粒的浓度很低，碰撞几率非常小，因此本底信号微弱，只有感光微粒和发光微粒通过免疫反应结合以后，才会发射出明显的光，因此系统灵敏度很高。相对于传统的酶联免疫分析方法，它具有均相（免冲洗）、灵敏度高和操作简便等特点，并且易于实现自动化，因此其应用前景十分广阔。

本发明正是针对以上技术原理进行了深入的研究，开发出了以上技术原理的应用条件，确定了激发光最优化激发功率及波长，发射光光源的最优化检测波长，发射光最优化检测延迟时间。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种光激化学发光免疫检测方法，从多方面对其检测条件进行优化。

本发明公开了一种光激化学发光免疫检测方法，包括下列步骤：

a.以 620-700nm 的激发光照射含有发光微粒及感光微粒的反应溶液；

b.检测反应溶液的发射光量，发射光的检测波长为 450-650nm。

上述步骤 a 以激发光照射反应溶液到步骤 b 检测反应溶液发光量之间有一检测延迟时间，其范围为 10ms-1000ms。

上述步骤 a 以激发光照射反应溶液的时间为 50ms-2000ms；优选 200ms-1800ms，激发最佳为 500-1000ms。

较佳的，上述激发光的波长范围为 640-680nm，优选 660nm，发射光的检测波长范围为 610-620nm，优选 615nm。

较佳的，激发光光源的功率范围为 5-100mw，优选 40-60mw。

上述发光微粒及感光微粒包被有抗原或抗体。

上述发光微粒是指填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒。发光化合物可以是 Dioxene（二氧杂环己烯）或 thioxene（二甲基噻吩）的衍生物等，镧系元素化合物可以是 Eu (TTA)<sub>3</sub>/TOPO 或 Eu (TTA)<sub>3</sub>/Phen 等，该微粒可由市场上购得。发光微粒的表面官能团可以是任何能联接蛋白质的基团，如羧基，醛基，胺基，环氧乙基或卤代烷基等各种已知的可连接蛋白质的官能团。

上述感光微粒是填充有感光化合物的高分子微粒，在红色激光激发下，可以产生单线态氧离子。当其与发光微粒距离足够近的情况下，单线氧离子传递到发光微粒，与发光微粒中的发光化合物反应，产生紫外光，紫外光再进一步激发镧系元素化合物，产生一定波长的光子。感光化合物可以是酞菁染料等，该微粒也可由市场上购得。

上述反应溶液的溶剂可以是常规的适合抗原抗体反应的溶剂体系，如 HEPES 缓冲体系或 Tris 缓冲体系。溶剂中还可添加起封闭和蛋白保护作用的物质如 BSA 以及防止微粒聚集的稳定试剂如 Tween20，出于对试剂防腐以及长期储存的考虑还可在溶剂中添加防腐剂，如庆大霉素和 Proclin 300。

本发明的关键在于，经过研究光激化学发光免疫检测方法中激发光、发射光、检测时间等选择条件，给出了相应参数合适检测的选择范围，及优选的参数范围，从而使得光激化学发光免疫检测方法的可控性更强，灵敏度及精确度得到进一步地提高。

上述光激化学发光免疫检测方法可以有多种应用，如用于生物活性物质的定性或定量检测。在生物活性物质定性或定量检测中，可采用双抗体夹心法。即可将发光微粒包被抗原或抗体，而后再将待测抗体或抗原，与标记蛋白（如生物素）标记的抗原或抗体一起进行孵育反应，再与包被有抗标记物（如亲和素）的感光微粒混合孵育获得反应液，所谓抗标

记蛋白即为可与标记蛋白特异性结合的蛋白，而后采用前述条件进行激发光照射并检测发射光量，从而达到定性或定量检测目的。反之亦可，即将感光微粒包被抗原或抗体，而后待测抗体或抗原，与标记蛋白标记的抗原或抗体一起进行孵育反应，再与包被有抗标记蛋白的发光微粒混合孵育，而后采用前述条件进行激发光照射并检测发射光量。

上述光激化学发光免疫检测方法还可以用于光激化学发光仪器的质控检验。如可将发光微粒包被标记蛋白（如生物素），感光微粒包被抗标记蛋白（如亲和素），采用前述条件进行激发光照射并检测发射光量。通过保持一种微粒的浓度，调节另一种微粒的浓度、反应温度以及反应时间，来控制反应发射光子数的多少和信号强弱，而后通过对仪器检测数据的统计分析，进行质控检验。

## 具体实施方式

下面结合实施例进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明，而非限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法及未说明配方的试剂均为按照常规条件或者制造商建议的条件进行或配置。

实施例 1—3 为质控检验中的参数选定研究

### 实施例 1：质控微粒的制备

#### 1. 生物素标记的 $\gamma$ -球蛋白（BGG）的制备

用 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 将 BGG（购自 Pel-Freez Biological）配制成 1mg/ml 溶液，采用 DMSO（二甲基甲酰胺）配置 Biotin-X-X-NHS（N-羟基琥珀酰亚胺修饰生物素，生产商：SIGMA，产品号：B3295）溶液至 16.172mg/ml，取 5.4 $\mu$ l Biotin-X-X-NHS 至 1mg BGG 溶液中，混合均匀并在 4 $^{\circ}$ C 下放置过夜。采用 100mM 磷酸缓冲液（pH 7.0）透析纯化蛋白。

#### 2. 采用上述标记蛋白包被醛基修饰的发光微粒

在 1mg 醛基修饰的发光微粒（美国 PentaTek 公司）中加入 12.5 $\mu$ l 1% Tween-20, 0.05mg 上述步骤 1 获得的透析纯化的蛋白以及 10 $\mu$ l 的 NaCNBH<sub>3</sub>（25mg/ml），加 0.1M pH6.0 MES 至总体积为 200 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 48h。加入 10 $\mu$ l 的 0.3M CMO 溶液，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1h。加 190 $\mu$ l pH8.0 的 Tris 溶液。4 $^{\circ}$ C 13000g 离心 30 分钟。弃上清，用 1ml pH8.0 的 Tris 溶液再洗一次。用 200 $\mu$ l pH8.0 的 Tris 溶液悬浮（其浓度为 5mg/ml）。

#### 3. 质控微粒工作液配制

采用 pH8.0 的 Tris 溶液将 (2) 中悬液稀释到 10ug/ml, 分装保存。

### 实施例 2: 亲和素包被的感光微粒试剂的制备

感光微粒: 采用粒径为  $220 \pm 40\text{nm}$  的感光微粒 (美国 PentaTek 公司)

制备方法:

- a、感光微粒混悬液处理: 吸取一定量的感光微粒于高速冷冻离心机中离心, 弃去上清, 加入一定量 MES 缓冲液, 超声细胞破碎仪上超声至微粒重新悬浮, 加入 MES 缓冲液调节感光微粒浓度至 100mg/ml。
- b、亲和素溶液配制: 称量一定量 Avidin, 加 MES 缓冲液溶解至 8mg/ml。
- c、混合: 将处理好的感光微粒混悬液、8mg/ml 的 Avidin 以及 MES 缓冲液, 以 2: 5: 1 的体积比进行混合, 迅速混匀, 得到反应液。
- d、反应: MES 缓冲液配制 25mg/ml 的  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  溶液, 按照与反应液 1: 25 的体积比加入, 迅速混匀。37°C 旋转反应 48 小时。
- e、封闭: MES 缓冲液配制 75mg/ml 的 Gly 溶液以及 25mg/ml 的  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  溶液, 按照与反应液 2: 1: 10 的体积比加入上述溶液中, 混匀, 37°C 旋转反应 2 小时。再加入 200mg/ml 的 BSA 溶液 (MES 缓冲液), 其与反应液体积比为 5: 8, 迅速混匀, 37°C 旋转反应 16 小时。
- f、清洗: 向反应好的溶液中加入 MES 缓冲液, 高速冷冻离心机离心, 弃上清, 加入新鲜 MES 缓冲液超声法重新悬浮, 再次离心, 如此清洗 3 次, 最后用少量的感光试剂缓冲液进行悬浮, 测定固含量, 用感光试剂缓冲液调节浓度至 10mg/ml。

### 实施例 3: 检测的光学条件确定

1. 激发光的波长范围确定:

检测方法:

在反应孔中分别加入 25 $\mu\text{l}$  质控微粒 (10ug/ml), 然后放入仪器—光激化学发光分析系统 (博阳生物/上海北滨光子), 由仪器自动按以下步骤操作: 自动加入 175 $\mu\text{l}$  亲和素包被的感光微粒试剂 (60ug/ml 浓度) 后 37°C 温育 20 分钟。仪器自动产生激光照射微孔计算每孔发光光子量。

激发光波长范围确定：

激发光是指激光器所发射的激光。

设定激发光光源功率为 50mw，将激发光光源波长分别设定为 600nm，620nm，640nm，660nm，680nm，700nm，激发光照射后 1 秒，进行发射光的检测，发射光检测波长设为 620nm，按照上述检测方法每个波长检测质控微粒的光信号 10 孔，求质控微粒光信号均值及 CV 值。

波长 (nm)	600	620	640	660	680	800
信号值						
质控微粒均值	500000	700000	850000	1000000	850000	700000
质控微粒 CV (%)	5.28	5.08	4.25	2.58	3.53	4.51

根据上述结果选用 620—800nm 为激发光光源波长范围，640—680nm 的效果更为理想，660nm 效果最好。

2. 激发光的功率范围确定：

检测方法：

在反应孔中分别加入 25 $\mu$ l 质控微粒 (10ug/ml)，然后放入仪器 (光激化学发光分析系统)，由仪器自动按以下步骤操作：自动加入 175 $\mu$ l 亲和素包被的感光微粒试剂 (60ug/ml 浓度) 后 37 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟。仪器自动产生激光照射微孔计算每孔发光光子量。

激发光功率范围确定：

设定激发光光源波长为 660nm，将激发光功率分别设定为 5mw，10mw，25mw，40mw，60mw，80mw，100mw；按照 1 的方法，激发光照射 1 秒，每个功率做 10 孔重复测定，分别检测质控微粒的光信号，求均值及 CV 值。

功率 (mw)	5	10	25	40	60	80	100
信号值							
质控微粒均值	50000	200000	400000	850000	850000	750000	750000
质控微粒 CV (%)	6.32	6.08	3.68	2.21	1.89	1.88	1.65

根据上述实验结果，优先选择激发光功率范围为 40—60mw。

3. 激发光照射时间范围确定

**检测方法:**

在反应孔中分别加入 25 $\mu$ l 质控微粒 (10ug/ml), 然后放入仪器 (光激化学发光分析系统), 由仪器自动按以下步骤操作: 自动加入 175 $\mu$ l 亲和素包被的感光微粒试剂 (60ug/ml 浓度) 后 37 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟。仪器自动产生激光照射微孔计算每孔发光光子量。

**激发光照射时间范围确定:**

设定激发光光源波长为 660nm, 将激发光功率设定为 50mw, 分别设定照射时间为 50ms, 100ms, 200ms, 400ms, 500ms, 800ms, 1000ms, 1200ms, 1500ms, 1800ms, 2000ms; 按照 1 的方法, 每个照射时间做 10 孔重复测定, 分别检测质控微粒的光信号, 求均值及 CV 值。

照射时间 (ms)	50	100	200	400	500	800	1000	1200	1500	1800	2000
信号值											
质控微粒均值	50000	100000	200000	400000	600000	800000	650000	450000	300000	200000	100000
质控微粒 CV (%)	5.62	4.52	4.12	3.52	2.5	1.03	1.58	2.13	3.52	3.32	3.42

根据上述实验结果, 选择 50ms-2000ms 为激发光照射时间范围; 优选 200ms-1800ms 为激发光照射时间范围, 激发光最佳照射范围为 500-1000ms。

**4. 发射光的波长范围确定:****检测方法:**

在反应孔中分别加入 25 $\mu$ l 质控微粒 (10ug/ml), 然后放入仪器 (光激化学发光分析系统), 由仪器自动按以下步骤操作: 自动加入 175 $\mu$ l 亲和素包被的感光微粒试剂 (60ug/ml 浓度) 后 37 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟。仪器自动产生激光照射微孔计算每孔发光光子量。

**发射光波长范围确定:**

发射光波长范围是指光子计数器采集的光信号波长范围。

设定激发光光源波长为 660nm, 将激发光功率设定为 50mw; 采用滤波片, 激发光照射后 1 秒, 分别检测波长为 580nm, 600nm, 610nm, 615nm, 620nm, 630nm, 650nm 的发射光产生的光子数; 质控微粒的光子计数方法按照上述方法检测, 每个波长检测质控微粒的光信号 10 孔, 求质控微粒光信号均值及 CV 值。

波长 (nm)	450	600	610	615	620	630	650
信号值							
质控微粒均值	50000	60000	600000	800000	650000	70000	60000

质控微粒 CV (%)	4.38	4.83	3.12	2.23	4.02	4.55	4.83
-------------	------	------	------	------	------	------	------

根据上述实验结果，确定用于检测计数的发射光波长范围为 450-650nm，优先选用 610-620nm。

#### 5. 发射光的检测延迟时间范围确定：

##### 检测方法：

在反应孔中分别加入 25 $\mu$ l 质控微粒 (10ug/ml)，然后放入仪器 (光激化学发光分析系统)，由仪器自动按以下步骤操作：自动加入 175 $\mu$ l 亲和素包被的感光微粒试剂 (按实施例 3 的方法制备，60ug/ml 浓度) 后 37 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟。仪器自动产生激光照射微孔计算每孔发光光子量。

##### 发射光的检测延迟时间范围确定：

检测延迟时间，是指在激光器照射后，到光子计数器开始采集光信号的时间。

设定激发光源波长为 660nm，将激发光功率设定为 50mw；检测发射光波长为 615nm，检测延迟时间分别为 50ms，75ms，100ms，200ms，600ms，800ms，1000ms，1200ms，1500ms；

根据上述检测方法检测光信号。

时间 (ms)	50	75	100	200	500	1000	1200	1500
信号值								
质控微粒均值	900000	880000	870000	850000	800000	750000	600000	500000
质控微粒 CV (%)	4.8	4.48	3.58	4.02	3.63	3.55	4.52	3.06

根据实验结果，综合考虑，选择 100-1000ms 作为延迟时间范围。

#### 实施例 4-6 为双抗体夹心法检测中参数选定研究

##### 实施例 4 抗-HBe 抗体包被的发光微粒的制备

##### 制备方法：

1) 发光微粒混悬液处理：吸取一定量的发光微粒于高速冷冻离心机中离心，弃去上清，加入一定量 MES 缓冲液，超声破碎至微粒重新悬浮，加入 MES 缓冲液调节发光微粒浓度至 100mg/ml。

2) 抗体处理：抗-HBe (厦门波生生物有限责任公司) 于 0.05M pH6.0 的 MES 缓冲

液（以下简称 MES 缓冲液）透析，透析完成后测定浓度，并调节浓度至 8mg/ml。

3) MES 缓冲液、100mg/ml 的发光微粒混悬液（MES 缓冲液）和 8mg/ml 的抗-HBe（MES 缓冲液）以及，以 1：2：5 的体积比进行混合，迅速混匀，得到反应液。

4) 用 MES 缓冲液配制 25mg/ml 的 NaBH<sub>3</sub>CN 溶液，按照与反应液 1：25 的体积比加入，迅速混匀，37℃ 旋转反应 48 小时。

5) MES 缓冲液配制 75mg/ml 的 Gly 溶液以及 25mg/ml 的 NaBH<sub>3</sub>CN 溶液，按照与反应液 2：1：10 的体积比加入上述溶液中，混匀，37℃ 旋转反应 2 小时。再加入 200mg/ml 的 BSA 溶液（MES 缓冲液），其与反应液体积比为 5：8，迅速混匀，37℃ 旋转反应 16 小时。

6) 用 MES 缓冲液离心清洗三次，最后用发光试剂缓冲液进行悬浮，测定粒径和固含量，调节浓度至 10mg/ml。

#### 实施例 5 生物素标记抗体的制备

制备方法：

1) 抗体处理：将抗-HBe 透析于 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 溶液，测定抗体浓度并调节至 1mg/ml。

2) 用 DMSO 配制 16.17mg/ml 的 Biotin 溶液。

3) 标记：取处理好的 1mg/ml 抗-HBe 标记抗体与配制好的 Biotin 溶液，二者按照 10000：54 的体积比进行混合，迅速混匀。2~8℃ 静置反应 12~16 小时。

4) 透析：将反应好的生物素标记抗体透析于生物素标记透析缓冲液（pH8.00）。

5) 将透析好的生物素化抗体吸出转移至干净离心管中，取样测定抗体浓度。将质检合格的生物素标记抗体浓度调节至 0.5mg/ml。

#### 实施例 6 检测的光学条件确定

研究中涉及各个参数的检测方法如下：

1. 光信号检测方法：

在反应孔中分别加入 25μl HBeAg 浓度为 5.0PEIU/ml 的样品（使用

Paul-Ehrlich-Institute(Virological standards 10/2001)出品的乙型肝炎 e 抗原定量参考品以新生牛血清为稀释液配制浓度为 5.0PEIU/ml 的溶液)，再依次加入 25 $\mu$ l 发光试剂（实施例 4 制备，浓度调节为 50ug/ml）和 25 $\mu$ l 生物素化抗体试剂（实施例 5 制备，浓度调节为 4ug/ml）。然后放入仪器（光激化学发光分析系统），由仪器自动按以下步骤操作：振动，37 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟，再自动加入 175 $\mu$ l 亲和素包被的感光微粒试剂（实施例 2 制备，浓度调节为 60ug/ml）后 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。仪器自动产生激光照射微孔计算每孔发光光子量。

## 2. 激发光的波长范围确定：

设定激发光光源功率为 50mw，（激发光照射后 1 秒检测波长为 620nm 的发射光）将激发光光源波长分别设定为 600nm, 620nm, 640nm, 660nm, 680nm, 700nm, 每种实验条件做 10 孔重复测定，按照 1 的检测方法检测 QcH 的光信号均值和 CV。

波长 (nm)	600	620	640	660	680	700	800
信号值							
QcH 均值	400000	500000	650000	700000	650000	450000	350000
QcH CV (%)	5.59	4.28	3.54	2.51	3.02	3.58	4.52

\*QcH: HBeAg 浓度为 5.0PEIU/ml 的样品

根据上述结果选用 620—700nm 作为激发光光源波长范围，640-680nm 效果更好，660nm 效果最佳。

## 3. 激发光的功率范围确定：

设定激发光光源波长为 660nm，（激发光照射后 1 秒检测波长为 620nm 的发射光）将激发光功率分别设定为 5mw, 10mw, 25mw, 40mw, 60mw, 80mw, 100mw；每种实验条件做 10 孔重复测定，按照 1 的检测方法检测 QcH 的光信号均值和 CV。

功率 (mw)	5	10	25	40	60	80	100
信号值							
QcH 均值	30000	100000	300000	600000	700000	550000	550000
QcH CV (%)	6.85	5.84	4.58	3.68	2.54	3.02	3.12

根据上述实验结果，优先选择激发光功率范围为 40-60mw。

#### 4.激发光照射时间范围确定

设定激发光光源波长为 660nm,将激发光功率设定为 50mw,分别设定照射时间为 50ms,100ms,200ms,400ms,500ms,800ms,1000ms,1200ms,1500ms,1800ms,2000ms;按照 1 的方法,每个照射时间做 10 孔重复测定,分别检测 QcH 的光信号,求均值及 CV 值。

照射时间(ms)	50	100	200	400	500	800	1000	1200	1500	1800	2000
信号值											
QcH 均值	30000	600000	1500000	3500000	500000	650000	550000	400000	250000	150000	80000
QcH CV (%)	5.62	4.52	4.12	3.52	2.5	1.03	1.58	2.13	3.52	3.32	3.42

根据上述实验结果,选择 50ms-2000ms 为激发光照射时间范围;优选 200ms-1800ms 为激发光照射时间范围,激发光最佳照射范围为 500-1000ms。

#### 5.发射光的波长范围确定:

设定激发光光源波长为 660nm,将激发光功率设定为 50mw;(激发光照射后 1 秒检测)采用滤波片,分别检测波长为 580nm,600nm,610nm,615nm,620nm,630nm,650nm 的发射光产生的光子数,做 10 孔重复测定;QcH 的光子计数方法按照 1 的方法检测。

波长 (nm)	580	600	610	615	620	630	650
信号值							
QcH 均值	40000	60000	400000	600000	550000	60000	50000
QcH CV (%)	6.72	6.02	5.28	3.28	3.32	4.52	4.68

根据上述实验结果,确定用于检测计数的发射光波长范围为 600-630nm,优先选用 610-620nm,最佳为 615nm。

#### 6.发射光的检测延迟时间范围确定:

设定激发光光源波长为 660nm,将激发光功率设定为 50mw;检测发射光波长为 615nm,检测延迟时间分别为 50ms,75ms,100ms,200ms,600ms,800ms,1000ms,1200ms,1500ms;做 10 孔重复测定,根据上述 1 的检测方法检测光信号。

时间 (ms)	50	75	100	200	500	1000	1200	1500
信号值								
QcH 均值	500000	450000	450000	435000	435000	430000	350000	280000

QcH CV(%)	5.84	4.23	3.53	3.02	2.53	2.66	4.53	5.02
-----------	------	------	------	------	------	------	------	------

根据实验结果，综合考虑，选择 100-1000ms 作为延迟时间范围。

光激化学发光法的原理是利用感光微粒是填充有感光化合物的高分子微粒，发光微粒是填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。其核心原理是能量的近距离转移，转移的介质是高能态的离子氧。当红色激光照射感光微粒后，释放单线态氧离子 ( $4\mu\text{s}$ )，其传播距离为 200nm 左右，只有当感光微粒和发光微粒的距离足够接近的情况下，感光微粒释放的单线态氧离子才能到达发光微粒，从而产生一系列化学反应。

根据以上原理认为，感光和发光是由于微粒本身引起的。因此无论感光微粒上包被有何种基团或者抗体，它们对于激发光的波长和功率，应当有共同的反应趋势，而该反应趋势与微粒上所包被的基团或者抗体的种类和类别无关；同样，无论发光微粒上包被有何种基团或者抗体，它们的发射光波长和延迟时间也应具有同样的光谱或者趋势，而与发光微粒上所包被的基团或者抗体的种类和类别无关。

根据以上的原理分析和实施例 3 及实施例 6 的数据基本吻合，因此认为，所选的光激化学发光实验条件是具备通用性的。

专利名称(译)	光激化学发光免疫检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101281137A</a>	公开(公告)日	2008-10-08
申请号	CN200810036596.5	申请日	2008-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
[标]发明人	王海蛟 赵卫国		
发明人	王海蛟 赵卫国		
IPC分类号	G01N21/76 G01N21/63 G01N33/53		
代理人(译)	余明伟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及光激化学发光技术，公开了一种光激化学发光免疫检测方法，包括下列步骤：以620 - 700nm的激发光照射含有发光微粒及感光微粒的反应溶液；检测反应溶液的发射光量，发射光的检测波长为450 - 650nm。本发明经过研究光激化学发光免疫检测方法中激发光、发射光、检测时间等选择条件，给出了相应参数合适检测的选择范围，及优选的参数范围，从而使得光激化学发光免疫检测方法的可控性更强，灵敏度及精确度得到进一步地提高。

波长 (nm)	600	620	640	660	680	800
信号值						
质控微粒均值	500000	700000	850000	1000000	850000	700000
质控微粒 CV (%)	5.28	5.08	4.25	2.58	3.53	4.51