

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 27/04 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710009521.3

[43] 公开日 2009 年 3 月 11 日

[11] 公开号 CN 101382539A

[22] 申请日 2007.9.5

[21] 申请号 200710009521.3

[71] 申请人 王占科

地址 330002 江西省南昌市井冈山大道解放军九四医院

[72] 发明人 王占科 雷万生 祝仲珍 柴长春
冯青青 熊晓平 潘小清 王 志
肖 群 钟 莹 朱 皓

[74] 专利代理机构 江西省专利事务所
代理人 李卫东

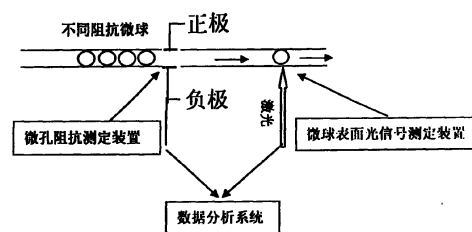
权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 2 页

[54] 发明名称

无限制通量诊断微球定量测定系统及其在生物医学中用途

[57] 摘要

本发明涉及阻抗变量无限制通量免疫微球及其制备方法和检测方法以及在生物医学中的用途。项目采用无数种阻抗微球编码无数种待测物质种类，即无限制通量，微球表面光信号强度代表待测物质含量，利用同时检测微球阻抗和微球表面光信号装置，借助软件分析系统，同时检测一份样本中无数种待测物质，满足日益发展的临床诊断和生物医学科研的无限要求。项目属于建立在免疫学反应和核酸分子杂交反应基础上的一种新的技术平台，是世界范围内的生物医学领域一次技术革命，广泛用于诊断疾病、判断药物疗效以及基因组学、蛋白质组学等生物医学研究等领域。



1、一种阻抗变量无限制通量免疫微球，包括乳胶微球，其特征在于：免疫微球含不同浓度的导电物质，包括金属和碳粉末，导电物质和乳胶原料是按任意比例进行混合。

2、如权利要求 1 所述阻抗变量无限制通量免疫微球，其特征在于：1) 不同阻抗系列免疫微球表面共价结合不同特异性抗原、抗体或特异 DNA 片段，2) 相同阻抗系列免疫微球表面共价结合相同特异性抗原、抗体或特异 DNA 片段，3) 不同阻抗系列免疫微球表面共价结合的特异性抗原、抗体或特异 DNA 或 RNA 片段，是针对正常人或患者机体内具有诊断、判断疗效和科研价值的待测相应抗体，抗原、DNA 或 RNA 片段。

3、如权利要求 1 或 2 所述的阻抗变量无限制通量免疫微球的制备方法，其特征在于：1) 将导电物质和乳胶原料按任意比例进行混合，生产出不同电阻特征的乳胶微球，2) 按不同阻抗数值或范围的微球代表不同待测物质，制订不同阻抗微球编码不同待测物质对应表，3) 按照不同阻抗微球代表不同待测物质对应表，将不同阻抗微球表面，标记不同的特异性抗原、抗体、特异 DNA 或 RNA 片段。

4、如权利要求书 3 所述的不同阻抗数值或范围的微球代表不同待测物质，其特征在于：1) 待测物质为生物医学领域，包括诊断疾病，观察药物疗效以及科研需要的待测物质或未知物质；2) 制备无数种不同阻抗微球可代表或编码无数种不同待测物质；3) 微球阻抗不同范围系列可代表不同系列待测物质种类。

5、一种如权利要求 1 或 2 所述的阻抗变量无限制通量免疫微球的检测方法，其特征在于：1) 将不同阻抗系列免疫微球与待测样品混合，进行抗原抗体特异结合和核酸分子杂交，然后用磷酸缓冲液洗涤微球；2) 将洗涤后微球与荧光或其它发光物标记的特异抗体、抗原或 DNA 片段，进行特异结合，使不同阻抗免疫微球表面出现荧光或发光，荧光或发光微球经离心后，再用磷酸缓冲液洗涤重新悬浮；3) 洗涤后不同阻抗系列免疫荧光或发光微球，通过微球阻抗分析，以判断检测物质种类；4) 洗涤后不同阻抗系列免疫荧光或发光微球，通过微球表面光信号强度分析，根据已知标准品浓度，计算待测物质含量。

6、如权利要求 5 所述的检测方法，其特征在于：将 10%浓度的无数种不同阻抗系列免疫微球，放入离心管中，加入足量待测样品或标准品，35--39°C 温育，2000g 离心 5--8 分钟，用磷酸缓冲液洗涤 2 次，弃去上清液，用磷酸缓冲液重悬；再加入荧光或发光素标记的抗体、抗原或 DNA 片段，35--39°C 温育 30--60 分钟，2000g 离心 5--8 分钟，弃去上清液，留取离心管底部微球，用磷酸缓冲液进行重悬，再离心，再用磷酸缓冲液重悬。

7、如权利要求5所述的检测方法，其特征在于：对结合荧光或发光物质的不同阻抗系列免疫微球，经磷酸缓冲液洗涤重悬后，加入荧光或发光测定试剂，通过微球阻抗测定装置测定其阻抗，随后进入微球表面荧光或发光强度检测装置检测荧光或发光强度；微球阻抗测定判断待测物质种类，荧光或发光信号强度测定判断待测物质含量。

8、阻抗变量无限制通量免疫微球在生物学中的用途，其特征在于：利用一种同时检测无数种不同阻抗系列免疫微球阻抗大小和微球表面荧光或发光信号强度的装置，该装置包括三个部分，第一部分是微球阻抗定量测定装置，能测定通过微孔的单个微球电阻大小；第二部分是微球表面荧光或发光信号定量检测装置，能测定无数种不同阻抗系列单个微球表面光信号强度；第三部分是软件分析系统，能先后接收微球阻抗信号以及该微球表面荧光或发光信号，根据不同阻抗微球编码不同待测物质对应关系，判断待测物质种类，根据已知标准品含量微球光信号强度，计算待测物质含量。

9、如权利要求书8所述的一种同时检测无数种不同阻抗系列免疫微球阻抗大小和微球表面荧光或发光信号强度的装置，其特征在于：1)微球阻抗定量测定装置，微球表面荧光或发光信号定量检测装置，以及软件分析系统，是统一而不是分离的系统装置；2)所述软件分析系统是首先预设不同系列微球阻抗范围编码不同系列测定项目，不同微球阻抗数值编码不同待测物质种类，然后根据微球阻抗值判断待测物质，根据微球表面荧光或发光信号，以标准物做参比，计算待测物质含量，并将数据传输给打印机，自动打印无数种待测物质含量结果报告。

10、如权利要求7所述的阻抗变量无限制通量免疫微球在生物学中的用途，其特征在于：可同时定量测定同一份标本中无数种用于诊断疾病,观察药物疗效和科研的抗原类，抗体类或核酸类等待测物质或未知物质。

无限制通量诊断微球定量测定系统及其在生物医学中用途

所属技术领域

本发明属于生物医学技术产业开发及用途领域。具体涉及无数种不同阻抗免疫微球制作、无数种阻抗编码无数种待测物质种类，免疫微球检测方法及其检测装置以及其在生物医学领域中的用途。

背景技术

目前建立在抗原抗体反应基础上的检测技术，包括酶联免疫吸附试验（ELISA）技术，放射免疫技术、发光免疫技术、胶体金免疫技术、荧光免疫技术、发光免疫技术、蛋白质芯片技术和生物蛋白质传感技术等。

建立在核酸分子碱基配对原理技术上的检测技术，包括 Northern blot 技术、Southern blot 技术和原位杂交技术和聚合链反应技术（PCR 技术）等。

我们以 ELISA 技术为例一般存在以下不足：①是一种试剂只能测定一个项目。比如测定乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）的试剂只能测定 HBsAg,而不能同时测定乙型肝炎病毒表面抗体（HbsAb）。医院检验科或科研技术人员每次实验只能测定一项指标，要检测某种疾病的相关物质，就要进行大量的重复性工作（如乙型肝炎两对半系列），花费大量的人力，物力和资源，增加检验成本。②是质量控制比较困难。我们不可能对一批试剂盒的测定板的每个测定孔，逐一进行质量检查。质量控制部门，只能从一批 ELISA 测定板中，进行随机抽样检查，这很难保证标本测定结果的准确性。这也是 ELISA 技术很难象液体试剂测定血糖那样，对质量进行有效监督的原因。③是准确定量比较困难，灵敏度不高，操作复杂。ELISA 技术最终以测定孔液体颜色深浅作为阳性判读标准，由于受到显色时间的影响，使结果很难做到准确定量。此外该技术测定步骤烦琐，需要时间长，存在人为误差等缺点。

除了 ELISA 技术之外，其他技术也各有各的缺点和不足，有的技术虽然快速，但只能定性、不能定量；有的技术虽然能够定量，但检测成本很高，且难以进行质量控制。固体生物芯片（包括蛋白质和基金芯片）技术，同时可以测定上千种物质，但一般用于定性（判断阴性和阳性）而难以用于定量测定。

建立在不同颜色微球基础上的液态芯片技术，该技术用不同颜色编码不同测定项目，解决了可以同时定量测定上千种物质的难题，但也存在以下不足：

一是最多只能得到 100 种比较稳定的不同颜色微球，这无法满足日益增多的检验科检测

和医学科研项目的要求，属于有限通量测定技术。

二是检测设备对颜色种类精细判读，可能存在误差，不可能同时检测无数种待测物质，

三是是微球颜色对微球表面的光信号测定，会产生干扰。

四是不同颜色微球，因保存时间长，可能会出现脱色。

五是测定设备要求条件高。需要高灵敏的颜色判断和可以消除微球自身颜色的微球表面光信号定量测定设备，对该液态芯片技术，进行测定。这在技术不太发达的国家，很难开发和生产出这种测定设备，不利于国家要求的实验诊断设备和试剂国产化发展要求。

发明内容

本发明的阻抗变量液态芯片技术是在美国传统液态芯片技术上的一次全新改良和创新，是设计上的一次飞跃。微球阻抗变量与颜色编码不同，阻抗微球编码可以做到无限多，决定了本发明在生物医学领域具有更广泛的用途。

蛋白质组学和基因组学需要测定无数种待测物质。疾病诊断和疗效观察也需要越来越多的检测指标。本发明最终目的是，阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统，取代目前医院检验科或医学科研院校所有 ELISA 项目、放射免疫项目和基因检测项目等建立在抗原抗体反应和核酸分子杂交技术上的所有项目。彻底改变医院实验室的项目分工和仪器配置，未来医院和研究机构只需一台阻抗变量液态生物芯片技术测定仪，即可以测任何抗原、抗体和未知基因片段，还可以进行细胞计数。液态生物芯片测定仪，是一台多功能的实验诊断设备。

为了达到以上目的，本发明分以下几个步骤。

1) 按照本发明的方法，生产阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统。包括（1）制作不同阻抗微球，（2）将抗原、抗体和已知 DNA 片段包被在不同阻抗微球上，（3）其它配套试剂。

2) 按照本发明的方法和设计原理，生产阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统测定设备。包括（1）国家有关部门对不同阻抗微球代表不同测定项目的认可和标准化制订。

（2）一种同时可以测定微球阻抗和微球表面光信号设备的设计，开发和生产。

3) 向国内外医院和科研机构推广使用。包括（1）基因组学中无数种未知 DNA 序列测定鉴定，（2）蛋白质组学无数种大量蛋白质抗原物质测定，（3）疾病诊断中无数种指标测定，（4）疾病疗效观察和判断中无数种指标测定。

本发明的技术方案为：

1. 本发明的阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统整体技术方案可行性论证。

很多发明专利因技术要求过高，而难以进行开发和推广。颜色分辨技术要求高，超过100种颜色，一般技术难以实现，研制出一种分辨无数种颜色的设备，更不可能。

电阻大小可以用连续的定量数值表示，理论上可以有无限多个电阻大小微球编码无数种不同的待测物质种类。本发明专利技术要求相对低，结果更可靠。凡是能生产出血球细胞计数仪和流式细胞仪的厂家，均能开发出本发明所设计的阻抗变量无限通量免疫微球定量分析系统。

1.1 微球无数种不同阻抗测定技术可行性分析

血球计数仪的基本原理，就是测定血液各细胞的阻抗不同而进行分类计数的。微孔电阻测定原理能够检测到微球阻抗的微小变化，目前成熟的技术完全能够满足对微球阻抗变量的检测。

此外，不同阻抗微球（阻抗变量微球）生产工艺成熟，采用导电物质（如金属粉末，聚苯胺等）与合成微球原料（如聚苯乙烯等）混合的方法，可生产无数种阻抗变量微球。由于导电成分可以与合成微球原料按任意比例混合，从理论上可以生产出无数种电阻大小不同的微球，合成的微球经羧基化或胺基化处理后，与抗原、抗体、DNA 或 RNA 的共价连接，生产出无数种不同阻抗免疫微球。

1.2 本发明的阻抗变量无限通量免疫微球研制技术可行性分析。

无数种不同阻抗微球表面通过羧基化和胺基化处理，可通过共价键牢固连接不同的蛋白质抗原、抗体或 DNA 上，制作本发明的阻抗变量无限通量免疫微球，该技术是成熟的技术。

1.3 本发明的阻抗变量无限通量免疫微球定量分析技术可行性分析。

只要同时能检测微球电阻大小变化和微球表面荧光或发光信号强弱的仪器，即可满足本发明的设备要求。在原理上是血球计数仪和流式细胞仪的有机结合，也是成熟的技术。

2. 本发明内容分两部分。一是阻抗变量无限通量免疫微球定量分析系统的研制，二是阻抗变量无限通量免疫微球定量分析系统在生物学中的应用。

2.1 阻抗变量无限通量免疫微球定量分析系统的研制

(1)生产无数种不同阻抗大小的体积相同的免疫微球

电阻是物质的一种属性，电阻大小在数学上属于连续变量。不同化学成分微球，具有不同的电阻。本发明的创新之处是将导电物质（如金属粉末和聚苯胺等）和合成微球的原料（如苯乙烯）按任意比例进行混合，可生产出无数种不同阻抗特征的体积相同的微球如图1所示。

以苯乙烯为原料合成乳胶微球为例，首先将导电高分子材料聚苯胺与苯乙烯，按不同比例混合，控制反应条件通过成熟的乳胶生产工艺，生产出符合要求的不同阻抗聚苯乙烯乳胶微球。导电高分子材料聚苯胺含量可以任意变化，可生产出无数种阻抗大小不同的微球（表 2）。

表 2：不同阻抗聚苯乙烯乳胶微球的生产配方

苯乙烯（克）	100	100	100	100	100	100	
聚苯胺（克）	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	

注：本表只起示意作用。具体配方不限于本表数据和原料物质。

为了保证掺入金属成分不影响乳胶微球表面的活性，本发明第 2 创新之处，是制作“双心乳胶”如图 2 所示。首先生产出还有金属成分的核心，然后外面再包裹一层不含金属成分的乳胶外壳，形成“双心乳胶”微球。这种“双心乳胶”微球不影响乳胶微球的表面活性，不会影响已知抗原、抗体和 DNA 包被在乳胶表面的效果。

(2)生产无数种不同阻抗大小的体积不相等的微球

同样电阻率（或电导率）材料微球，微球体积越大，电阻越大。为了从外观上区分不同阻抗的微球，同样的微球原料，根据成熟的技术严格控制条件，可以制作成不同体积大小的微球，微球体积越大，电阻就越大。

(3)制备无数种不同阻抗免疫微球

购买或自己研制的无数种不同阻抗微球，按照成熟的技术和文献对微球表面进行化学处理，制作无数种不同阻抗系列的羧化或胺化聚苯乙烯乳胶微球，可共价牢固连接抗原、抗体和 DNA 化学分子，制备无数种不同阻抗系列免疫微球如图 3 所示。

(4) 无数种不同阻抗大小微球编码无数种待测物质或未知物质项目种类。

i 确定不同微球电阻与测定成分一一对应,制定不同阻抗微球编码不同待测物质对应表。由于微球电阻变化无限性，也决定着待测项目的无限性。不同电阻微球包括不同成分的相同体积微球和相同成分的不同体积微球。a1,a2,a3 等代表生物学某个领域项目（如疾病诊断项目），b1,b2,b3 等代表生物学另外一个领域（如基因组学或蛋白质组学测定项目）见表 3。

表 3：不同阻抗微球与待测成分对应表

微球阻抗（欧姆）	1	2	3		10	20	30
待测物质	a1	a2	a3		b1	b2	b3

注：本表只起示意作用。具体阻抗和项目对应数据不限于本表数据

ii 将不同阻抗编码的不同待测物质种类信息,输入阻抗变量无限通量免疫微球定量分析装置软件处理系统。软件处理系统自动分析不同阻抗(项目)微球表面光信号。

(5)生产阻抗变量无限通量免疫微球。

采用成熟的化学共价标记技术,将用于测定不同项目的特异性抗体、特异性抗原或已知 DNA)化学交联在相对应的不同电阻微球表面,生产出一系列阻抗变量无限通量免疫微球。具体操作方法可在相关资料和教材中查阅,这里不再详细描述。

(6)配制阻抗变量无限通量免疫微球定量分析所需的配套试剂。

根据待测物质或未知物质的性质不同,设计出不同的配套试剂。

①待测成分为蛋白质、多糖类、脂类抗原物质。

这类物质包括,a)在疾病诊断和疾病疗效观察领域中的已知或未知的细菌、支原体、衣原体、病毒等表面特异抗原(属于确诊性诊断)、多种肿瘤标记物、体内蛋白质多肽物质(如C反应蛋白,激素、类风湿因子等)。b)在生物医学科研领域(如基因组学,蛋白质组学)无数种蛋白质、多糖类、脂类抗原物质等。

检测这类物质成分,需要微球表面包被其特异性抗体,进行测定。以乳胶微球表面为反应平台,采用双抗夹心法加以说明,这类测定项目的配套试剂包括以下几种成分。

- (1) 游离相应多种特异性抗体溶液
- (2) 荧光或发光物标记的第二抗体(抗抗体)溶液
- (3) 抗原抗体结合反应缓冲液
- (4) 乳胶微球洗涤缓冲液
- (5) 荧光或发光反应缓冲液

以上缓冲液均可在公开的资料文献或教材上,找到配方,这里不再详述。特异单克隆抗体和标记第二抗体可以通过购买获得或自行生产。

② 待测物质为蛋白质抗体。这类物质主要包括 a)在疾病诊断和疾病疗效观察领域中,由于患者感染了细菌、支原体、衣原体、病毒,而产生的特异抗体。此外,某些疾病也会诊断自身物质产生的病理性抗体。b)在生物医学科研领域(如基因组学,蛋白质组学),需要测定的无数种蛋白质抗体物质等。

这类检测项目,需要乳胶微球表面标记相对应的特异抗原成分,进行测定。这类测定项目的配套试剂包括以下几种成分。

- (1) 游离相应荧光或发光物标记多种特异性抗原溶液
- (2) 抗原抗体结合反应缓冲液

(3) 乳胶微球洗涤缓冲液

(4) 荧光或发光反应缓冲液

以上缓冲液均可在公开的资料文献或教材上,找到配方,这里不再详述。特异单克隆抗体和抗原(细菌特征蛋白、病毒颗粒),标记第二抗体可以通过购买获得或自行生产。

③待测物质为 DNA 或 RNA。这类物质主要包括,a)在疾病诊断和疾病疗效观察领域中,体内微生物尤其是病毒的特异 DNA 或 RNA 片段(确诊性诊断),b)在生物医学科研领域(如基因组学,蛋白质组学),需要测定的无数种 DNA 或 RNA 等。

这类项目的检测需要乳胶微球表面包被相对应的 DNA 或 RNA 片段,进行分析。这类项目的配套试剂包括以下几种成分。

(1) 游离用荧光或发光物标记的 DNA 片段(基因探针)溶液

(2) 杂交反应缓冲液

(3) 乳胶微球洗涤缓冲液

(4) 荧光或发光反应缓冲液

以上试剂来源方便,制作技术成熟。这里不再详细说明。

(7) 组装阻抗变量液态生物芯片试剂盒。

将已包被无数种抗原、抗体和 DNA(RNA)的无数种微球(阻抗变量无限通量免疫微球)及其配套试剂,组合包装成为阻抗变量无限通量免疫微球定量分析试剂盒。试剂盒内有多少种不同电阻的免疫微球,就代表能同时测定多少种项目。

(8) 阻抗变量无限通量免疫微球检测方法和装置。

阻抗变量无限通量免疫微球检测方法为,首先,同时或先后测定阻抗变量无限通量免疫微球的电阻大小和微球表面光信号强度。然后,根据不同阻抗微球对应的不同项目种类,判断标本中那些待测物质阴性,那些待测物质阳性以及含量。最后,打印结果报告。阻抗变量无限通量免疫微球检测方法原理见图 4。

本发明的阻抗变量无限制通量免疫微球测定方法,借助配套试剂盒及装置进行。配套试剂盒如同前述。阻抗变量无限通量免疫微球测定装置,包括 2 个测定装置和 1 套数据处理软件如图 5 所示。

第一个测定装置就是微孔阻抗测定装置。该装置能准确测定通过微孔的微球的电阻大小,其原理与细胞计数仪的工作原理基本相同。根据不同阻抗编码的项目种类,微孔阻抗测定装置可以准确判读微球的测定项目类别。

第二个测定装置是对通过微孔的微球表面的荧光或发光信号,进行定量检测装置。其

原理与流式细胞仪工作原理基本相同。

本发明的微球液态生物芯片测定技术，从本质上就是全自动血细胞计数技术和流式细胞测定技术的有机结合，该装置技术成熟，某些高档次的血球计数仪，已经具备该项功能，在这里不再详细描述。

第三个软件分析系统，就是对先后或同时接收的微球电阻信号以及该微球表面光信号，按照阻抗编码项目表，准确分析出在无数种测定项目中，那些物质阴性，那些物质阳性，并在标准参比条件下进行定量如图 6 所示。

软件分析系统首先预设微球阻抗值（或范围）代表的测定项目（表 3），然后，分析不同阻抗微球（测定项目）表面的荧光或光信号强度（物质含量），以标准物做参比，计算待测物质含量，最后将数据传输给打印机，打印结果报告。

表 3：不同乳胶微球阻抗代表不同测定项目

微球电阻（欧姆）	1	2	3...	10	20	30...	100	200	300
测定物质	HBV	HCV	HDV...	AFP	CEA	CA-153...	胰岛素	T3	T4

值得说明的是，如果我们设定某阻抗为人体血液白细胞、红细胞和血小板的电阻特征值，本装置可以同时具备血球计数仪的功能。

阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统在生物医学领域的用途

1. 疾病相关抗原类测定

疾病诊断和观察疗效需要测定机体内多种抗原物质。随着对疾病发生机理的研究深入，越来越多的疾病相关抗原被发现，常规方法包括颜色编码的免疫微球定量测定系统一次也只能完成 100 种左右抗原物质测定，远远不能满足医院实验诊断未来发展的需要。发明人采用阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统一次可以同时测定无数种待测抗原。

发明人以同时测定 n 种（ n 大于 1 且小于正无穷）疾病相关抗原类为例，加以说明。

1)自己生产或购买 n 种不同阻抗的可用来化学共价键标记的乳胶微球。

1) 将乳胶微球按阻抗从小到大进行分类并编码 n 种不同疾病相关抗原。

2) 制定 n 种不同阻抗微球编码待测抗原对应表。

4) 自己购买或自己生产针对 n 种抗原的单克隆抗体。

5) 按照不同阻抗微球编码待测抗原对应表,将 n 种单克隆抗体，分别共价键结合在 n 种不同阻抗的微球表面，制作免疫微球，1500g 离心，10 分钟，弃去游离未标记的抗体。 n 种免疫微球用磷酸缓冲液洗涤后，按等比例混合，用磷酸缓冲液重悬，制成每升含 10^5 个微球浓度的 n 元阻抗免疫微球混合液。

4) 将 250 微升 n 元阻抗免疫微球混合液放入 1 毫升的 EF 离心管内, 再加 250 微升血清或其他测定标本, 充分混匀, 37°C 震荡保温 1 分钟~2 小时, 使微球表面抗体和样品中待测抗原充分结合。

5) 离心管 $1500g$ 离心 10 分钟, 弃去上清, 用 PBS 重悬, 再离心, 再去上清, 对 n 元阻抗免疫微球进行洗涤, 彻底洗去离心管中游离的待测物质。

6) 加入含有抗 n 种抗原的 n 种单克隆抗体磷酸缓冲液 500 毫升, 37°C 震荡保温 30 分钟~1 小时, 使它们分别与结合在微球上的待测物质反应, 重复第 5) 步, 对微球进行洗涤, 弃去上清液。

7) 加入荧光标记的抗人免疫球蛋白抗体(抗抗体) 500 毫升, 37°C 震荡保温 45 分钟, 与结合在微球表面的抗体结合, 重复步骤 5), 彻底洗涤, 留微球沉淀。

8) 将微球荧光测定缓冲液重悬微球沉淀, 使用能同时测定微球阻抗和微球表面荧光强度的设备, 进行微球阻抗(测定项目)和微球表面荧光强度(物质含量)测定。

9) 结果判读: 如果 $n1$ 阻抗微球表面荧光阳性, 说明血清 $n1$ 抗原阳性, 荧光强度与 $n1$ 抗原浓度呈正比。采用 $n1$ 抗原标准浓度做参比测定, 可对 $n1$ 进行准确定量。如果 n 种阻抗微球, 只有 $n1, n2, n3, n4, n5$ 等五种阻抗微球表面荧光同时阳性, 说明血液内同时存在 $n1, n2, n3, n4, n5$ 五种抗原物质, 其他 $n-5$ 种抗原均阴性。如果 n 种阻抗微球表面荧光信号均阳性, 说明血液中同时存在 n 种抗原物质。依次类推。

本发明技术方案也适用于生物医学蛋白质组学中无数种待测抗原的测定。

如果要测 n 种抗原物质, 需要 n 种不同电阻的微球, 操作同上。上述技术方案只起示范作用, 具体详见有关技术资料。

2. 疾病相关抗体类测定

测定体内某些物质的抗体, 能间接说明体内感染了某些物质, 疾病诊断和观察疗效需要测定机体内多种抗体物质。随着对疾病发生机理的研究深入, 越来越多的疾病相关抗体被发现, 常规方法包括颜色编码的免疫微球定量测定系统一次也只能完成 100 种左右抗体物质测定, 远远不能满足医院实验诊断未来发展的需要。发明人采用阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统一次可以同时测定无数种待测抗体,

发明人以同时测定 n 种 (n 大于 1 且小于正无穷) 疾病相关抗体类为例, 加以说明。

1) 自己生产或购买 n 种不同阻抗的可用来化学共价键标记的乳胶微球。

2) 将乳胶微球按阻抗从小到大进行分类并编码 n 种不同疾病相关抗体。

3) 制定 n 种不同阻抗微球编码待测抗体对应表。

4) 自己购买或自己生产针对 n 种抗体的抗抗体或相对应抗原。

5) 按照不同阻抗微球编码待测抗体对应表, 将 n 种可与 n 种待测抗体结合的 n 种抗抗体或相对应抗原, 分别共价键结合在 n 种不同阻抗的微球表面, 制作免疫微球, 1500g 离心, 10 分钟, 弃去游离未标记的抗抗体或相对应抗原。 n 种免疫微球用磷酸缓冲液洗涤后, 按等比例混合, 用磷酸缓冲液重悬, 制成每升含 10^5 个微球浓度的 n 元阻抗免疫微球混合液。

6) 将 250 微升 n 元阻抗免疫微球混合液放入 1 毫升的 EF 离心管内, 再加 250 微升血清或其他测定标本, 充分混匀, 37°C 震荡保温 1 分钟~2 小时, 使微球表面和样品中待测抗体充分结合。

7) 离心管 1500g 离心 10 分钟, 弃去上清, 用 PBS 重悬, 再离心, 再去上清, 对 n 元阻抗免疫微球进行洗涤, 彻底洗去离心管中游离的待测物质。

8) 加入含有抗 n 种抗体的 n 种抗抗体或相对应抗原磷酸缓冲液 500 毫升, 37°C 震荡保温 30 分钟~1 小时, 使它们分别与结合在微球上的待测物质反应, 重复第 5) 步, 对微球进行洗涤, 弃去上清液。

9) 加入荧光标记的抗 n 种抗抗体或相对应抗原的抗体 500 毫升, 37°C 震荡保温 45 分钟, 与结合在微球表面的抗体结合, 重复步骤 5), 彻底洗涤, 留微球沉淀。

10) 将微球荧光测定缓冲液重悬微球沉淀, 使用能同时测定微球阻抗和微球表面荧光强度的设备, 进行微球阻抗(测定项目)和微球表面荧光强度(物质含量)测定。

11) 结果判读: 如果 $n1$ 阻抗微球表面荧光阳性, 说明血清 $n1$ 抗体阳性, 荧光强度与 $n1$ 抗体浓度呈正比。采用 $n1$ 抗体标准浓度做参比测定, 可对 $n1$ 进行准确定量。如果 n 种阻抗微球, 只有 $n1, n2, n3, n4, n5$ 等五种阻抗微球表面荧光同时阳性, 说明血液内同时存在 $n1, n2, n3, n4, n5$ 五种抗体物质, 其他 $n-5$ 种抗体均阴性。如果 n 种阻抗微球表面荧光信号均阳性, 说明血液中同时存在 n 种抗体物质。依次类推。

如果要测 n 种抗体物质, 需要 n 种不同电阻的微球, 操作同上。上述技术方案只起示范作用, 具体详见有关技术资料。

3. 疾病相关核酸类物质测定

测定某微生物的特异核酸片段, 能够特异诊断该微生物的存在。常规方法包括颜色编码的免疫微球定量测定系统一次也只能完成 100 种左右核酸片段测定, 远远不能满足医院实验诊断未来发展的需要。发明人采用阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统一次可以同时测定无数种特异核酸片段。

发明人以同时测定 n 种 (n 大于 1 且小于正无穷) 疾病相关 DNA 或 RNA 片段为例,

加以说明。

1)自己生产或购买 n 种不同阻抗的可用来化学共价键标记的乳胶微球。

2)将乳胶微球按阻抗从小到大进行分类并编码 n 种不同疾病相关 DNA 或 RNA 片段。

3)制定 n 种不同阻抗微球编码待测 DNA 或 RNA 片段对应表。

4)自己购买或自己生产针对 n 种待测 DNA 或 RNA 片段的互补 DNA 片段。

5)按照 n 种不同阻抗微球编码不同疾病相关 DNA 或 RNA 片段对应表,将 n 种可与 n 种待测 DNA 或 RNA 片段特异结合的 n 种不同互补 DNA 片段,分别共价键结合在 n 种不同阻抗的微球表面,制作免疫微球,1500g 离心,10 分钟,弃去游离未标记的互补 DNA 片段。 n 种免疫微球用磷酸缓冲液充分洗涤后,按等比例混合,用磷酸缓冲液重悬,制成每升含 10^5 个微球浓度的 n 元阻抗微球 DNA 探针混合液。

6)将 250 微升 n 元阻抗微球 DNA 探针混合液放入 1 毫升的 EF 离心管内,再加 250 微升血清或其他测定标本,充分混匀,37°C 震荡保温 1 分钟~12 小时,使微球表面和样品中待测 DNA 或 RNA 充分结合。

7)离心管 1500g 离心 10 分钟,弃去上清,用磷酸缓冲液重悬,再离心,再去上清,对 n 元阻抗微球 DNA 探针混合液进行洗涤,彻底洗去离心管中游离的待测物质。

8)加入含有荧光或发光标记的可与待测 DNA 或 RNA 互补序列结合的 DNA 片段磷酸缓冲液 500 毫升,37°C 震荡保温 30 分钟~12 小时,使它们分别与结合在微球上的待测 DNA 或 RNA 互补 DNA 片段充分结合,重复第 5)步,对微球进行洗涤,弃去上清液。

9)将微球荧光测定缓冲液重悬微球沉淀,使用能同时测定微球阻抗和微球表面荧光强度的设备,进行微球阻抗(测定项目)和微球表面荧光强度(物质含量)测定。

10)结果判读:如果 n_1 阻抗微球表面荧光阳性,说明血清 n_1 待测 DNA 或 RNA 片段阳性,荧光强度与 n_1 待测 DNA 或 RNA 片段浓度呈正比。采用 n_1 待测 DNA 或 RNA 片段标准浓度做参比测定,可对 n_1 待测 DNA 或 RNA 片段进行准确定量。如果 n 种阻抗微球,只有 n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 等五种阻抗微球表面荧光同时阳性,说明血液内同时存在 n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 五种待测 DNA 或 RNA 片段,其他 $n-5$ 种待测 DNA 或 RNA 片段均阴性。如果 n 种阻抗微球表面荧光信号均阳性,说明血液中同时存在 n 种待测 DNA 或 RNA 片段。依次类推。

本发明技术方案也适用于生物医学蛋白质组学中无数种待测 DNA 或 RNA 测定。

如果要测 n 种待测 DNA 或 RNA 片段,需要 n 种不同电阻的微球,操作同上。上述技术方案只起示范作用,具体详见有关技术资料。

4. 生物医学科研领域应用

阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统具有同时测定无数种待测物质或未知物质。在人类后基因年代,人体内大量成千上万种的 DNA, RNA 片段以及无数种已知抗原或抗体需要测定。人体内 DNA, RNA 以及抗原物质和抗体物质复杂多样,常规方法包括颜色编码的免疫微球定量测定系统一次也只能完成 100 种左右物质测定,远远不能满足科研发展的需要。

阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统一次操作可以同时测定无数种待测物质,借助庞大的计算机处理系统,将大大降低科研工作人员劳动强度,提高科研工作效率。

7.4.1 现以测定人类某种细胞内全部已知 mRNA 种类为例,说明阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统在基因组学中的应用。

1)假设该细胞基因组共有 n 种(n 可为任意整数)基因表达,且碱基序列明确。

2)购买或自己生产 n 种不同阻抗可供核酸标记的乳胶微球,并设定 n 种不同阻抗微球分别编码和代表 n 种待测 mRNA。

3)制定 n 种不同阻抗微球编码 n 种不同待测 mRNA 对应表。

4)购买或自己合成 n 种待测 mRNA 的互补碱基序列 DNA。

5)按照制定 n 种不同阻抗微球编码 n 种不同待测 mRNA 对应表,将购买或自己合成的 n 种待测 mRNA 的互补碱基序列 DNA 片段,分别共价结合在相应 n 种阻抗微球表面。1500g 离心 10 分钟,弃去游离未标记的 DNA 片段,用磷酸缓冲液重悬,1500g 再离心 10 分钟,弃上清,保留沉淀中的免疫微球。 n 种不同阻抗免疫微球分别用磷酸缓冲液洗涤,按等比例混合,用含杂交缓冲液进行重悬,制成每升含 10^5 个微球浓度的 n 种微球 DNA 探针。

6)取 n 种不同阻抗微球等体积混合均匀,制作 n 种不同阻抗微球 DNA 探针。

7)取 n 种不同阻抗免疫微球 250 微升放入 1 毫升的 EF 离心管内,再加 250 微升细胞总 RNA 提取物,充分混匀,37°C 震荡保温 1 分钟~20 小时,使微球表面已知 DNA 和样品中待测 RNA 充分杂交结合。

8) 1500g 离心 10 分钟,弃去上清,用磷酸缓冲液重悬,再离心,再去上清,对 n 种阻抗微球进行洗涤,彻底洗去离心管中未与微球表面 DNA 结合的游离待测 RNA 片段。

9)加入含有荧光或发光标记的针对待测 DNA 或 RNA 互补 DNA 片段的杂交缓冲液 500 毫升,37°C 震荡保温 30 分钟~1 小时,使它们分别与结合在微球上的待测 RNA 杂交结合,重复第 7) 步,对微球进行彻底洗涤,弃去上清液未杂交上的游离荧光或发光物质 DNA 片段,保留微球沉淀。

10) 将微球荧光或发光测定缓冲液,重悬微球沉淀,使用能同时测定微球阻抗和微球表

面荧光或发光强度的设备,进行微球阻抗(n 种测定项目)和微球表面荧光强度(待测 RNA 含量)测定。

11) 结果判读: 如果 n_1 阻抗微球表面光信号阳性, 说明该细胞 a_1 基因阳性表达。 n_2 阻抗微球表面光信号阳性, 表明该细胞 a_2 基因阳性表达, 依次类推。如果, n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 等阻抗微球表面光信号全部阳性, 表明肝细胞内 a_1, a_2, a_3, a_4, a_5 基因同时阳性表达, 而其他 $n-5$ 种基因表达均阴性。依次类推。

如果要测更多种 mRNA 物质, 需要更多种不同电阻的微球, 操作同上。

以上操作事例只起示范作用, 具体详见有关技术资料 and 文献。

以上方案也用于测定生物医学研究领域无数种特异 DNA 片段, 抗原或抗体片段。

7.4.2 现以测定人类正常细胞内未知 mRNA 为例, 说明阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统在基因组学中的应用。

最近研究发现, 人类基因虽然数量庞大, 但是有限的, 而人类蛋白质的数量几乎是无限的。由于基因转录后的加工和修饰等作用, 编码蛋白的信使 RNA (mRNA) 数量也远远大于基因数量。大部分 mRNA 和基因序列人类并不清楚, 如何发现未知基因、未知 mRNA 和未知蛋白质是人类后基因组时代面临的技术难题。

阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统同时可以检测无数种 DNA 或 RNA 片段, 为解决直接寻找未知基因提供实验手段。发明人以寻找人类某种细胞内未知基因 (mRNA) 为例, 说明阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统在寻找未知基因中的用途。

用无数种随机探针 (已标记的已知 DNA 片段) 在细胞 cDNA 文库中, 直接筛选出未知基因, 目前技术均难以做到。本发明用无数种不同电阻微球, 采用计算机编码无数种待测基因, 制备无数种随机探针, 就能从理论上筛选出所有的未知基因。

本发明的技术具有无限通量的特征, 正好满足用无数个随机探针在细胞 cDNA 文库中筛选未知基因的技术要求。阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统筛选未知基因的方法如下:

- 1) 分无数次进行, 每次生产 n 种 (n 为任意整数) 不同阻抗微球,
- 2) 计算机自动将微球从阻抗数值从小到大记录。
- 3) 每次合成 n 种 7 个以上的随机寡核苷酸片段。
- 4) 计算机按阻抗大小排序, 并分别编码 n 种人工自动合成的随机寡核苷酸片段所对应的目的基因片段。
- 5) 按照阻抗编码对照表, 将随机合成的 n 种 7 个以上的寡核苷酸片段分别标记在 n

种不同阻抗的微球表面。

6)通过阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析仪，分析微球表面阳性信号，并根据阻抗数值确定未知 cDNA 片段。

7)重复步骤 1)到步骤 6)，直到筛选出未知基因片段。

生产不同阻抗微球，微球表面标记寡核苷酸片段，以及微球表面阳性信号及阻抗数值判断等操作均可以自动完成。阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统可用于筛选未知基因。

本发明适合目前和未来生物学领域包括医院、科研机构等建立在抗原抗体反应和核酸分子杂交技术上的所有项目（如 ELISA 项目，放射或发光免疫项目和基因检测项目等）的测定。应用领域涉及蛋白质组学、基因组学以及各种疾病实验诊断和疗效观察所需要测定的机体自身产生或外来的各种蛋白质、多肽和脂类和糖类物质测定。

本发明的阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统（阻抗变量液态生物芯片）是建立在微球表面平台检测技术上的一次革命，不同阻抗微球代表不同测定项目使本发明测定项目无限多，微球光信号强度代表测定物质含量，使定量准确易于质量控制。微球阻抗测定和微球表面光信号测定原理简单，诊断试剂盒研制和实验诊断设备开发技术成熟，是一项值得在生物学领域进行推广应用的新发明。本发明及其应用满足了生物学领域不断增长的待测物质种类要求。具有快速准确，定量，易于质量控制等优点。

本发明用阻抗变量微球替代颜色变量微球，使微球特征更稳定，由于微球电阻变化信息量从理论上是无限的，从而提高芯片检测项目的无限性，是真正意义上的生物芯片。测定微球电阻的技术比判读微球颜色技术，要成熟和简单，目前国内试剂和仪器开发产业，能完全满足本发明的液态芯片技术的测定原理，完全能够制造出测定试剂盒和相应的检测设备，为让全世界能够生产出液态芯片高科技技术，打破发达国家技术垄断，面向全世界医疗卫生行业推广，创造条件。

本发明是一种实用性的巨大创新，最大特点是：

1) 无限通量。采用不同阻抗表示（编码）不同测定项目，阻抗变量无限多，决定同时测定的项目无限多，保证科研和临床需要的无限通量测定技术要求。无数种待测物质或未知物质一次操作完成。

2) 稳定性好。微球电阻测定技术成熟，实验误差小，结果精密度高。

3) 易于保存。生产的不同阻抗微球比不同颜色微球保存更稳定，制作工艺更简单，来源更方便。

4)灵敏度高。微球本身不带颜色，不会干扰微球表面光信号的定量测定，极微量荧光信号就能检测到阳性信号。

5)易于生产和推广。微球电阻及表面荧光信号测定技术成熟。见表 1。

表 1：本发明的阻抗变量液态芯片是与美国发明的颜色变量液态芯片技术比较

技术指标评价	阻抗变量液态芯片	颜色变量液态芯片
测定项目判读	不同阻抗乳胶微球代表不同测定物质，电阻变化信息量更大且易检测。	不同颜色微球代表不同测定物质，信息量相对小，颜色判读易出现误差，要求技术高。
测定项目种类	阻抗可以用量边式，微球阻抗变化无限，决定项目无限数量	100 种颜色左右
待测物质定量	微球表面光信号不受微球阻抗干扰	微球表面光信号受微球颜色干扰。
所需设备	微球阻抗测定和微球表面光信号测定装置，技术要求相对较低。	微球颜色判读和微球表面光信号测定装置，技术要求相对较高。
芯片制作难度	不同阻抗微球生产方便	不同颜色微球生产困难
微球变量判读	微孔阻抗测定	颜色判断测定
开发前景	相对容易，成本较低，市场好	相对难，成本高，落后地区市场小

本发明优点和用途如下：

本发明的液态生物芯片与国内成熟的固态生物芯片技术、ELISA 技术和放射免疫（RIA）技术比较，具有无一替代的优良品质（见表 3）。主要表现在以下几个方面：

1 不同阻抗乳胶微球，稳定，保存时间长。

2 乳胶阻抗大小判读简单。用微孔阻抗法血球计数仪即可进行测定。在微孔两端加一个电压，当微球进入微孔的时候，就会产生一个电流脉冲，不同阻抗的微球产生的电流脉冲不同。

3 合成乳胶原料与导电物质比例不同，微球电阻从理论上可以有无数种变化，决定着本发明的电阻变量微球液态生物芯片从理论上也可以同时测定无数种待测物质。

4 微球表面光信号检测技术成熟。普通流式细胞仪就可以完成对微球表面光信号的

定量测定。

5 本发明的微球阻抗变量液态生物芯片测定所需要的设备，在机械设计和工作原理上，是细胞计数仪和流式细胞仪的结合，该设备在国内能够完成开发和生产。

表 3：本发明的技术与国内成熟的技术比较

方法学比较	阻抗变量液态芯片	固 态 芯 片 技 术	ELISA 技术	RIA 技术
反应原理	抗原抗体反应 核酸分子杂交	抗原抗体反应 核酸分子杂交	抗原抗体反 应	抗原抗体反应
反应体系	液相	固相和液相	液相	液相
反应平台	液相游离微球表面	支持物表面	液相游离分 子	液相游离分子
测定项目	无限	有限	单一	单一
项目标示	不同电阻微球代表不 同测定项目	不同坐标位置 表示不同测定 项目	一种试剂盒 测定一种物 质	一种试剂盒测定 一种物质
能否定量	能	不能	能	能
是否易于质量控 制	容易	难	难	容易
检测方法	测定不同阻抗微球表 面的光信号	测定不同位置 上的光信号	观察显色	放射性强度测定
所需仪器	血球计数仪和流式细 胞仪相结合的设备 (微孔阻抗流式微球 细胞仪)	荧光显微镜	酶标仪	全自动放射免疫 分析仪
开发技术要求	低	高	低	低
推广前景	好	较好	好	好
国产化前景	好	好	好	好

本发明方法操作简单，所需技术均成熟可靠。专利转让对象为

1. 国内外诊断试剂研究和开发人员。
2. 国内外实验诊断设备研究和开发人员。

3. 血球计数仪生产厂家。
4. 流式细胞分析仪生产厂家。
5. 乳胶合成与生产厂家。
6. 乳胶诊断试剂生产厂家。
7. 医院检验科。
8. 医学院校科研单位。
9. 计算机软件研究与开发人员。
10. 综合具备上面所有专业的单位和个人实体。

附图说明

图 1 是含有不同导电物质浓度的微球示意图。导电物质含量越高，电阻越小，反之亦然。

图 2 是双心微球示意图。同样体积微球中导电核心体积越大，阻抗越小，反之亦然。

图 3 是不同阻抗系列免疫微球。不同电阻微球表面携带不同特异性抗体、抗原、DNA 或 RNA 物质。● 代表不同的抗体、抗原、DNA 或 RNA 物质。

图 4 是阻抗变量无限制通量免疫微球检测方法原理示意图。

图 5 是阻抗变量无限制通量免疫微球检测装置工作原理示意图。

图 6 是阻抗变量无限制通量免疫微球软件分析系统工作原理示意图。 Ω 表示微球阻抗大小，不同阻抗编码不同待测物质。坎德拉(cd,candela)表示微球表面光信号强度，光信号强度代表待测物质含量。

具体实施例

实施例 1、疾病相关抗原类测定

疾病诊断和观察疗效需要测定机体内多种抗原物质。随着对疾病发生机理的研究深入，越来越多的疾病相关抗原被发现，常规方法包括颜色编码的免疫微球定量测定系统一次也只能完成 100 种左右抗原物质测定，远远不能满足医院实验诊断未来发展的需要。发明人采用阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统一次可以同时测定无数种待测抗原。发明人以同时测定乙型肝炎病毒三项抗原物质(HBsAg, HBeAg, HbcAg)为例，加一说明。

- 1) 自己生产或购买不同阻抗的可用来化学共价键标记的乳胶微球。
- 2) 将乳胶微球分为低阻抗，中阻抗和高阻抗三种。
- 3) 自己购买或自己生产抗 HBsAg, HBeAg 和 HbcAg 三种单克隆抗体。

4) 将抗 HBsAg, HBeAg 和 HbcAg 三种单克隆抗体, 分别共价键结合在低、中、高三种不同阻抗的微球表面, 制作免疫微球, 1500g 离心, 10 分钟, 弃去游离未标记的抗体。三种免疫微球用磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤, 按等比例混合, 用含抗原抗体反应 PBS 缓冲液进行重悬, 制成每升含 10^5 个微球浓度的三元微球液态芯片。

4) 将 250 微升三元微球芯片放入 1 毫升的 EF 离心管内, 再加 250 微升血清或其他测定标本, 充分混匀, 37°C 震荡保温 1 分钟~2 小时, 使微球表面抗体和样品中待测抗原充分结合。

5) 离心管 1500g 离心 10 分钟, 弃去上清, 用 PBS 重悬, 再离心, 再去上清, 对三元阻抗微球芯片进行洗涤, 彻底洗去离心管中游离的待测物质。

6) 加入含有抗 HBsAg, HBeAg 和 HbcAg 三种单克隆抗体 PBS 溶液 500 毫升, 37°C 震荡保温 30 分钟~1 小时, 使它们分别与结合在微球上的待测物质反应, 重复第 5) 步, 对微球进行洗涤, 弃去上清液。

7) 加入荧光标记的抗人免疫球蛋白抗体 (抗抗体) 500 毫升, 37°C 震荡保温 45 分钟, 与结合在微球表面的抗体结合, 重复步骤 5), 彻底洗涤, 留微球沉淀。

8) 将微球荧光测定缓冲液重悬微球沉淀, 使用能同时测定微球阻抗和微球表面荧光强度的设备, 进行微球阻抗 (测定项目) 和微球表面荧光强度 (物质含量) 测定。

9) 结果判读: 如果低阻抗微球表面荧光阳性, 说明血清 HBsAg 阳性, 荧光强度与 HBsAg 浓度呈正比。采用标准 HBsAg 浓度做参比测定, 可对 HBsAg 进行准确定量。如果低阻抗和高阻抗表面荧光同时阳性, 说明血液内同时存在 HBsAg 和 HbcAg, 依次类推。

以上操作事例只起示范作用, 具体详见有关技术资料。如果要测 n 种抗原物质, 需要 n 种不同电阻的微球, 操作同上。

实施例 2、疾病相关抗体类测定

测定体内某些物质的抗体, 能间接说明体内感染了某些物质, 疾病诊断和观察疗效需要测定机体内多种抗体物质。随着对疾病发生机理的研究深入, 越来越多的疾病相关抗体被发现, 常规方法包括颜色编码的免疫微球定量测定系统一次也只能完成 100 种左右抗体物质测定, 远远不能满足医院实验诊断未来发展的需要。发明人采用阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统一次可以同时测定无数种待测抗体, 我们以同时测定甲型肝炎病毒 (HAV) 抗体、乙型肝炎病毒 (HBV) 抗体和丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体和爱滋病病毒 (HIV) 抗体为例, 进行说明。

1) 购买或自己生产 4 种不同阻抗 (n_1, n_2, n_3, n_4) 特征的可供共价交联抗原蛋白质的乳

胶微球。

2) 购买或自己生产基因工程产品 HAV、HBV、HCV、HIV 特异抗原片段或灭活病毒蛋白颗粒。

3) 预设 n1,n2,n3,n4 阻抗 乳胶微球分别代表测定 HAV、HBV、HCV、HIV 四种抗体。

4) 分别将 HAV、HBV、HCV、HIV 抗原片段化学共价标记在 n1,n2,n3,n4 四种阻抗乳胶微球表面。制作四元免疫微球, 1500g 离心, 10 分钟, 弃去游离未标记的抗原。四种免疫微球用磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤, 按等比例混合, 用含抗原抗体反应 PBS 缓冲液进行重悬, 制成每升含 10^5 个微球浓度的四元微球液态芯片。

4) 将 250 微升四元微球芯片放入 1 毫升的 EF 离心管内, 再加 250 微升血清或其他测定标本, 充分混匀, 37°C 震荡保温 1 分钟~2 小时, 使微球表面抗原和样品中待测抗体充分结合。

5) 1500g 离心 10 分钟, 弃去上清, 用 PBS 重悬, 再离心, 再去上清, 对四元阻抗微球芯片进行洗涤, 彻底洗去离心管中游离的待测抗体。

6) 加入含有荧光或发光物质特异标记的 HAV、HBV、HCV、HIV 四种特异抗原的 PBS 溶液 500 毫升, 37°C 震荡保温 30 分钟~1 小时, 使它们分别与结合在微球上的待测抗体反应, 重复第 5) 步, 对微球进行彻底洗涤, 弃去上清液, 保留微球沉淀。

7) 将微球荧光或发光测定缓冲液, 重悬微球沉淀, 使用能同时测定微球阻抗和微球表面荧光或发光强度的设备, 进行微球阻抗 (测定项目) 和微球表面荧光强度 (物质含量) 测定。

9) 结果判读: 如果 n1 阻抗微球表面荧光阳性, 说明血清 HAV 抗体阳性, 荧光强度与 HAV 抗体浓度呈正比。采用 HAV 抗体标准浓度做参比测定, 可对 HAV 抗体进行准确定量。如果 n2、n3 和 n3 阻抗微球表面荧光同时阳性, 说明血液内同时存在 HAV 抗体、HBV 抗体、HCV 抗体和 HIV 抗体, 依次类推。

以上操作事例只起示范作用, 具体详见有关技术资料 and 文献。如果要测 n 种抗体物质, 需要 n 种不同电阻的微球, 操作同上。

实施例 3、疾病相关核酸类物质测定

测定某微生物的特异核酸片段, 能够特异诊断该微生物的存在。常规方法包括颜色编码的免疫微球定量测定系统一次也只能完成 100 种左右核酸片段测定, 远远不能满足医院实验诊断未来发展的需要。发明人采用阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统一次可以同时测定无数种特异核酸片段。发明人以同时测定乳头瘤状病毒、衣原体、支原体特异

DNA 片段为例, 进行说明。

4) 购买或自己生产不同阻抗可供核酸 (DNA) 标记的乳胶微球。

5) 设定不同阻抗 (n_1, n_2, n_3 和 n_4) 分别代表乳头瘤状病毒、衣原体、支原体和乙肝病毒特异 DNA 片段测定项目。

6) 购买或自己合成乳头瘤状病毒、衣原体、支原体和乙肝病毒特异 DNA 片段互补碱基序列 DNA。

7) 将乳头瘤状病毒、衣原体、支原体和乙肝病毒特异 DNA 片段互补碱基序列 DNA 片段, 共价结合在相应阻抗微球表面, 制作基因诊断微球。

5) 1500g 离心, 10 分钟, 弃去游离未标记的抗原。四种免疫微球用磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤, 按等比例混合, 用含抗原抗体反应 PBS 缓冲液进行重悬, 制成每升含 10^5 个微球浓度的四元微球液态芯片。

4) 将 250 微升四元微球基因芯片放入 1 毫升的 EF 离心管内, 再加 250 微升血清或其他测定标本 (如阴道分泌物与生理盐水 1: 1 混合), 充分混匀, 37°C 震荡保温 1 分钟~2 小时, 使微球表面已知 DNA 和样品中待测 DNA 充分杂交结合。

5) 1500g 离心 10 分钟, 弃去上清, 用 PBS 重悬, 再离心, 再去上清, 对四元阻抗微球基因芯片进行洗涤, 彻底洗去离心管中未与乳胶表面 DNA 杂交上的游离待测 DNA 片段。

6) 加入含有荧光或发光物质特异标记的乳头瘤状病毒、衣原体、支原体和乙肝病毒特异 DNA 片段 (多元探针) 的杂交缓冲液 500 毫升, 37°C 震荡保温 30 分钟~1 小时, 使它们分别与结合在微球上的待测 DNA 杂交, 重复第 5) 步, 对微球进行彻底洗涤, 弃去上清液未杂交上的游离探针, 保留微球沉淀。

7) 将微球荧光或发光测定缓冲液, 重悬微球沉淀, 使用能同时测定微球阻抗和微球表面荧光或发光强度的设备, 进行微球阻抗 (测定项目) 和微球表面荧光强度 (DNA 含量) 测定。

9) 结果判读: 如果 n_1 阻抗微球表面荧光阳性, 说明血清人类乳头瘤状病毒 DNA 阳性, 荧光强度与 DNA 浓度呈正比。采用人类乳头瘤状病毒 DNA 片段标准浓度做参比测定, 可对人类乳头瘤状病毒 DNA 进行准确定量。如果 n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 阻抗微球表面荧光同时阳性, 说明血液内同时存在人类乳头瘤状病毒、衣原体、支原体和乙肝病毒特异 DNA 片段, 依次类推。

以上操作事例只起示范作用, 具体详见有关技术资料 and 文献。如果要测 n 种基因物质, 需要 n 种不同电阻的微球, 操作同上。以上方案也可测定特异 RNA 片段。

实施例 4、生物医学科研领域应用

阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统具有同时测定无数种待测物质或未知物质。在人类后基因年代，人体内大量成千上万种的 DNA，RNA 片段以及无数种已知抗原或抗体需要测定。人体内 DNA，RNA 以及抗原物质和抗体物质复杂多样，常规方法包括颜色编码的免疫微球定量测定系统一次也只能完成 100 种左右物质测定，远远不能满足科研发展的需要。

阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统一次操作可以同时测定无数种待测物质，借助庞大的计算机处理系统，将大大降低科研工作人员劳动强度，提高科研工作效率。

现以测定人类正常肝细胞内全部已知 mRNA 种类为例，说明阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统在肝脏基因组学中的应用。

1)假设肝细胞基因组共有 100 万个基因表达，且碱基序列明确。

2)购买或自己生产 100 万种不同阻抗可供核酸标记的乳胶微球，并设定 100 万种不同阻抗 ($n_1, n_2, n_3, \dots$) 微球分别代表 100 万种待测 mRNA ($a_1, a_2, a_3, \dots$)。

3)购买或自己合成 100 万种待测 mRNA 的互补碱基序列 DNA。

4)将购买或自己合成 100 万种待测 mRNA 的互补碱基序列 DNA 片段，共价结合在相应 100 万种阻抗微球表面。1500g 离心 10 分钟，弃去游离未标记的 DNA 片段，用磷酸缓冲液重悬，1500g 再离心 10 分钟，弃上清，保留沉淀中的免疫微球。100 万种不同阻抗免疫微球分别用磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤，按等比例混合，用含抗原抗体反应 PBS 缓冲液进行重悬，制成每升含 10^5 个微球浓度的 100 万种微球诊断试剂。

5)取 100 万种每升含 10^5 个微球浓度不同阻抗微球等体积混合均匀，制作阻抗变量 100 万通量免疫微球。

6)取阻抗变量 100 万通量免疫微球 (每升含 10^5 个微球浓度) 250 微升放入 1 毫升的 EF 离心管内，再加 250 微升肝细胞总 RNA 提取物，充分混匀，37°C 震荡保温 1 分钟~2 小时，使微球表面已知 DNA 和样品中待测 RNA 充分杂交结合。

7) 1500g 离心 10 分钟，弃去上清，用磷酸缓冲液重悬，再离心，再去上清，对阻抗变量 100 万通量免疫微球进行洗涤，彻底洗去离心管中未与乳胶表面 DNA 杂交上的游离待测 RNA 片段。

8) 加入含有 100 万种荧光或发光物质特异标记的待测 mRNA 的互补碱基序列 DNA 片段的杂交缓冲液 500 毫升，37°C 震荡保温 30 分钟~1 小时，使它们分别与结合在微球上的待测 RNA 杂交，重复第 7) 步，对微球进行彻底洗涤，弃去上清液未杂交上的游离荧光或

发光物质特异标记的待测 mRNA 的互补碱基序列 DNA 片段，保留微球沉淀。

9) 将微球荧光或发光测定缓冲液，重悬微球沉淀，使用能同时测定微球阻抗和微球表面荧光或发光强度的设备，进行微球阻抗（100 万种测定项目）和微球表面荧光强度（RNA 含量）测定。

10) 结果判读：如果 n1 阻抗微球表面光信号阳性，说明肝细胞 a1 基因阳性表达。n2 阻抗微球表面光信号阳性，表明肝细胞 a2 基因阳性表达，依次类推。如果，n1,n2 阻抗微球表面光信号全部阳性，表明肝细胞内 a1,a2 基因同时阳性表达。如果，n1,n2,n3....100 万种微球表面光信号均阳性，表明肝细胞内 a1,a2,a3,... 等 100 万种基因均阳性表达。

以上操作事例只起示范作用，具体详见有关技术资料 and 文献。如果要测更多种 mRNA 物质，需要更多种不同电阻的微球，操作同上。

以上方案也用于测定无数种特异 DNA 片段,抗原或抗体片段。

实施例 5、现以测定人类正常肝细胞内未知 mRNA 为例，说明阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统在肝脏基因组学中的应用。

最近研究发现，人类基因虽然数量庞大，但是有限的，而人类蛋白质的数量几乎是无限的。由于基因转录后的加工和修饰等作用，编码蛋白的信使 RNA（mRNA）数量也远远大于基因数量。大部分 mRNA 和基因序列人类并不清楚，如何发现未知基因、未知 mRNA 和未知蛋白质是人类后基因组时代面临的技术难题。

阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统同时可以检测无数种 DNA 或 RNA 片段，为解决直接寻找未知基因提供实验手段。发明人以寻找肝细胞内未知基因（mRNA）为例，说明阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统在寻找未知基因中的用途。

一般技术难以做到，用无数个随机探针（已标记的已知 DNA 片段）在细胞 cDNA 文库中，筛选出未知基因。对于一种随机探针筛选出未知基因的概率无疑是“大海捞针”，但用无数种随机探针，就能从理论上筛选出所有的未知基因。

本发明的技术具有无限通量的特征，正好满足用无数个随机探针在细胞 cDNA 文库中筛选未知基因的技术要求。阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统筛选未知基因的方法如下：

- 1)每次生产 100 万不同阻抗的微球，分无数次进行。
- 2)计算机自动将微球从阻抗数值从小到大记录。
- 3)每次随机合成 100 万种 7 个以上的寡核苷酸片段。
- 4)计算机按阻抗大小排序并分别编码 100 万种人工自动合成的不同寡核苷酸片段所

代表的目的基因片段。

5)按阻抗编码，将随机合成的 100 万种 7 个以上的寡核苷酸片段分别标记在 100 万不同阻抗的微球表面。

6)通过阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析仪，分析微球表面阳性信号，并根据阻抗数值确定未知 cDNA 片段。

7)重复步骤 1)到步骤 6)，直到筛选出未知基因片段。

生产不同阻抗微球，微球表面标记寡核苷酸片段，以及微球表面阳性信号及阻抗数值判断等操作均可以自动完成。阻抗变量无限制通量免疫微球定量分析系统可用于筛选未知基因。



图 1

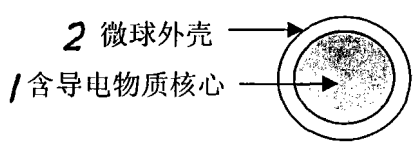


图 2

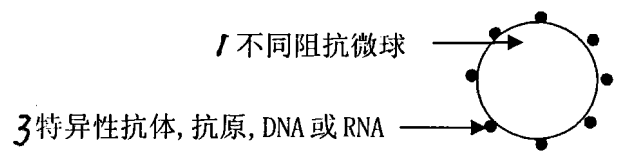


图 3

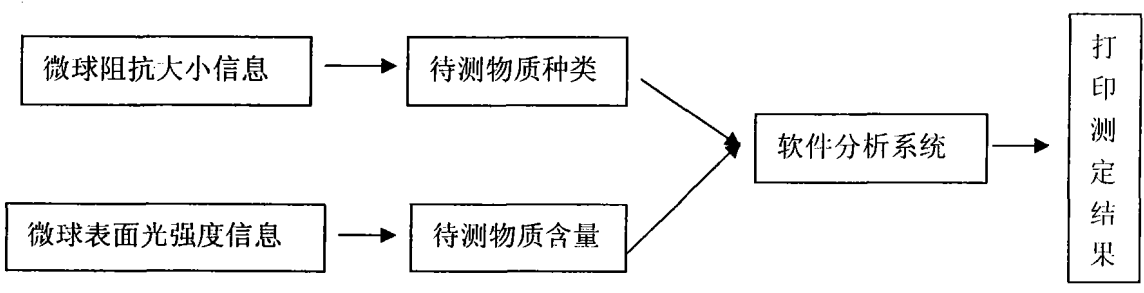


图 4

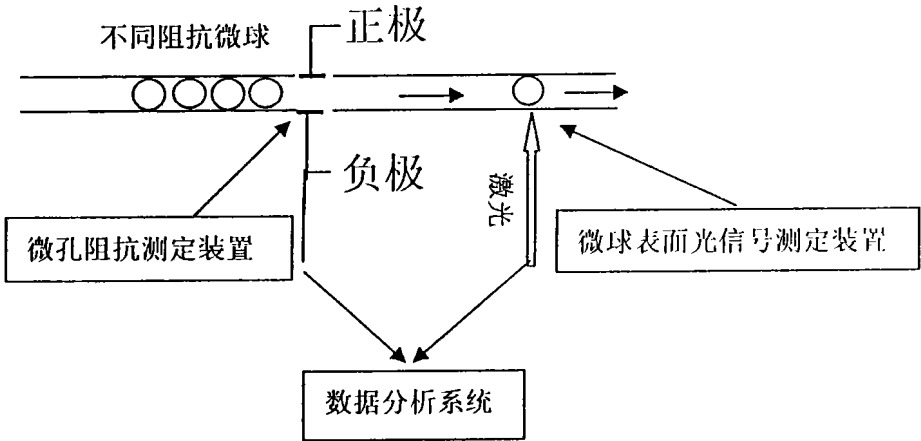


图 5

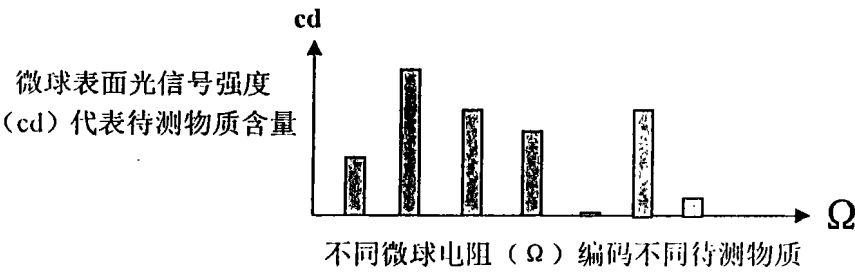


图 6

专利名称(译)	无限制通量诊断微球定量测定系统及其在生物医学中用途		
公开(公告)号	CN101382539A	公开(公告)日	2009-03-11
申请号	CN200710009521.3	申请日	2007-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	王占科		
申请(专利权)人(译)	王占科		
当前申请(专利权)人(译)	王占科		
[标]发明人	王占科 雷万生 祝仲珍 柴长春 冯青青 熊晓平 潘小清 王志 肖群 钟莹 朱皓		
发明人	王占科 雷万生 祝仲珍 柴长春 冯青青 熊晓平 潘小清 王志 肖群 钟莹 朱皓		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/04 G01N21/76		
代理人(译)	李卫东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及阻抗变量无限制通量免疫微球及其制备方法和检测方法以及在生物医学中的用途。项目采用无数种阻抗微球编码无数种待测物质种类，即无限制通量，微球表面光信号强度代表待测物质含量，利用同时检测微球阻抗和微球表面光信号装置，借助软件分析系统，同时检测一份样本中无数种待测物质，满足日益发展的临床诊断和生物医学科研的无限要求。项目属于建立在免疫学反应和核酸分子杂交反应基础上的一种新的技术平台，是世界范围内的生物医学领域一次技术革命，广泛用于诊断疾病、判断药物疗效以及基因组学、蛋白质组学等生物医学研究等领域。

