



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101672841 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 08

(21) 申请号 200810211904. 3

CN 101021530 A, 2007. 08. 22, 全文.

(22) 申请日 2008. 09. 09

审查员 张全红

(73) 专利权人 北京万德高科技发展有限公司

地址 100039 北京市海淀区玉泉路东采石路
5号1号楼265室

(72) 发明人 赵唯宇 罗志勇 高振宇

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

G01N 1/40(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 9857152 A1, 1998. 12. 17, 全文.

CN 1908663 A, 2007. 02. 07, 全文.

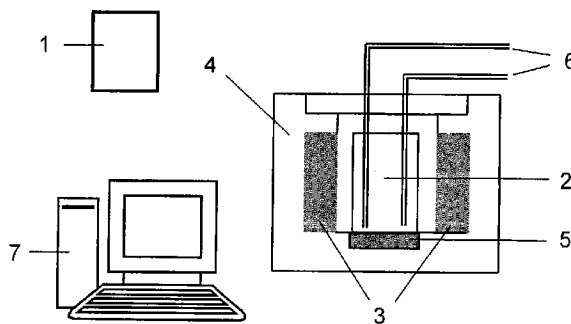
权利要求书2页 说明书14页 附图6页

(54) 发明名称

用于生物样品的检测仪器和检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种检测仪器和采用该检测仪器的检测方法。本发明的检测仪器包括样品池、富集系统、检测系统、连接样品池、富集系统的导管和用于将样品输送到富集系统中的驱动装置,其特征在于,所述富集系统包括毛细管和磁铁,其中毛细管为样品流动通道和富集场所,磁铁紧邻毛细管,并且产生垂直于样品流动方向的磁场;所述检测系统是荧光检测系统。采用本发明的检测仪器的检测方法可用于检测微量及痕量生物样品,包括细菌、病毒或细胞类待测物样品和小分子半抗原类待测物样品。



1. 一种检测仪器,包括样品池、富集系统、检测系统、连接样品池和富集系统的导管以及用于将溶液样品输送到富集系统中的驱动装置,其特征在于,所述富集系统包括毛细管和磁铁,其中毛细管为样品流动通道和富集场所,磁铁紧邻毛细管,并且产生垂直于样品流动方向的磁场;所述检测系统是荧光检测系统,其中所述的荧光检测系统包括光源系统、聚焦系统、分光系统和光信号检测系统,用于检测被富集于毛细管内壁上的样品,其中入射光路和检测光路系统与毛细管成垂直方向。

2. 根据权利要求1所述的检测仪器,其中还用导管将毛细管的流出端与样品池连通,为流经毛细管的溶液形成循环回路。

3. 根据权利要求1所述的检测仪器,其中所述的毛细管是光学玻璃毛细管,并且所述的磁铁包括永磁铁和电磁铁。

4. 根据权利要求1所述的检测仪器,其中所述的驱动装置是蠕动泵。

5. 根据权利要求1所述的检测仪器,其还包括恒温系统。

6. 根据权利要求1所述的检测仪器,其还包括在样品池和富集系统之间的控制装置,用于控制待测溶液样品、淋洗液或基准物溶液的选择输运。

7. 根据权利要求6所述的检测仪器,其中所述的控制装置是多位阀。

8. 根据权利要求1-7中任何一项所述的检测仪器,其还包括计算机控制系统和数据分析系统,所述计算机控制系统和数据分析系统包括计算机、软件、单板机控制系统,用于自动控制样品池的温度、样品的流动、富集系统的开关、荧光检测系统的激发波长与检测波长选择、信号采集与数据分析。

9. 一种用于非疾病诊断目的的检测方法,该方法采用权利要求1所述的检测仪器,其中以毛细管作为样品流动通道、富集及检测的场所,并且利用紧邻毛细管的磁铁,在样品在毛细管中流动的过程中进行磁富集,然后用荧光检测在毛细管中富集的样品。

10. 根据权利要求9所述的检测方法,其用于细菌、病毒或细胞类待测物样品的免疫检测,包括:

将待测物样品、表面带有可以识别待测物的抗体的免疫磁珠、荧光标记的对待测物有特异性结合能力的抗体,即荧光探针,进行孵育,形成“免疫磁珠-待测物-荧光探针”复合物,使上述复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠-待测物-荧光探针”复合物进行荧光检测和分析;

或者

将待测物样品、表面带有可以识别待测物的抗体的免疫磁珠进行孵育,形成“免疫磁珠-待测物”复合物,使“免疫磁珠-待测物”复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,在富集后,使荧光标记的对待测物有特异性结合能力的抗体,即荧光探针,流经毛细管,对被富集在毛细管内壁的磁珠表面的待测物进行有效识别,然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠-待测物-荧光探针”复合物进行荧光检测和分析;

或者

将含有多种微生物待测物样品、表面同时或分别带有上述多种待测微生物相对应的抗体的免疫磁珠、不同荧光标记的对上述多种类待测物有特异性结合能力的抗体,即荧光探

针,进行孵育,形成“免疫磁珠-待测物-荧光探针”复合物,使上述复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠-待测物-荧光探针”复合物进行荧光检测和分析,其中,用于标记不同抗体的荧光物质,其荧光中心发射峰位的波长差 $> 40\text{nm}$;

或者

将含有多种微生物的待测样品、表面同时或分别带有上述多种待测微生物相对应的抗体的免疫磁珠进行孵育,形成“免疫磁珠-待测物”复合物,使该复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,在富集后,使不同荧光标记的对不同待测物有特异性结合能力的抗体,流经毛细管,对被富集在毛细管内壁的磁珠表面的待测物进行有效识别,然后对形成的“免疫磁珠-待测物-荧光探针”复合物进行荧光检测和分析,其中用于标记不同抗体的荧光物质的荧光中心发射峰位的波长差 $> 40\text{nm}$ 。

11. 根据权利要求 10 所述的检测方法,其中所述多种微生物是两种微生物。

12. 根据权利要求 9 所述的检测方法,其用于小分子类待测物样品的免疫检测,包括:

将待测小分子样品、表面带有小分子半抗原抗体或小分子半抗原的免疫磁珠、荧光标记的小分子半抗原或小分子人工抗原或荧光标记的小分子半抗原抗体,即荧光探针,进行孵育,形成“免疫磁珠-荧光探针”复合物,使上述复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠-荧光探针”复合物进行荧光检测;然后,将表面带有小分子半抗原抗体或小分子半抗原的免疫磁珠、相同浓度的荧光标记的小分子半抗原或人工抗原或荧光标记的小分子半抗原抗体进行孵育,形成“免疫磁珠-荧光探针”复合物,使该复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠-荧光探针”复合物进行荧光检测;将两次检测到的荧光强度信号进行对比分析,得到待测小分子样品的浓度信息;

或者

将表面带有小分子半抗原抗体或小分子半抗原的免疫磁珠、荧光标记的小分子半抗原或人工抗原或荧光标记的小分子半抗原抗体进行孵育,形成“免疫磁珠-荧光探针”复合物,或者将表面带有小分子半抗原或人工抗原的免疫磁珠、抗小分子半抗原一抗及荧光标记的抗小分子半抗原一抗的二抗进行孵育,形成“免疫磁珠-一抗-二抗荧光探针”复合物,使形成的复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠-荧光探针”复合物或“免疫磁珠-一抗-二抗荧光探针”复合物进行荧光检测;然后,使待测物样品溶液流经毛细管,以便与富集在毛细管中的“免疫磁珠-荧光探针”复合物或“免疫磁珠-一抗-二抗荧光探针”复合物竞争结合,之后进行荧光检测;将两次检测到的荧光强度信号进行对比分析,得到待测小分子样品的浓度信息。

用于生物样品的检测仪器和检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于分析仪器领域,具体涉及生物样品的检测仪器和检测方法,尤其适用于微量与痕量生物样品的检测仪器和检测方法,其中将免疫磁富集技术、免疫荧光光谱分析技术及微流技术集成于一体,利用荧光波长分辨方法实现单一组分及两种以上组分生物样品的微量与痕量分析。

背景技术

[0002] 生物样品的微量与痕量分析在基础医学、临床医学、生命科学研究中具有十分重要的意义,同时在食品科学、环境科学乃至进出口检验检疫领域中具有重要的应用价值。在临床医学、食品科学及进出口检验检疫的应用中,往往需要对多种生物目标分子进行联合检测,如:如艾滋病诊断需要对 9 种标志物进行检测,又如:在食品安全中,通常需要对多种微生物进行检测;再如:在进出口检验检疫中往往需要对多种病原进行联合检测。

[0003] 采用传统的生物分析方法,每个检测流程一般只能实现对一种生物组分的测定,因此在复杂多组分生物样品检测中,采用传统的检测方法需要执行多个检测流程,因此耗时长,成本高。

[0004] 近年来发展的多组分生物分析技术,即在同一检测流程中同时实现对多种待测物的检测,克服了传统分析方法的缺点。到目前为止所发展建立的多组分生物分析技术可概括地分为两种检测模式。第一类为多标记物模式,其原理是以不同的示踪物,如具有不同荧光发射波长的荧光物质来识别标记不同的待测物,通过对示踪物信号的识别和检测实现对多个待测组分的同时检测。该检测方法的检测灵敏度主要取决于检测器对用于识别标记待测物的示踪信号的检测和区分能力。该技术的优点是检测仪器相对简单,成本低。其缺点是传统的示踪物不适合上述检测方法在高通量生物分析方面的应用,但最近十多年发展的荧光量子点材料则很好地满足了上述检测的需要,见 Goldman ER, Clapp AR, et al, Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. Anal. Chem. 2004, 76, 684, 但有效实现量子点在定量生物分析中的应用仍然面临一定的挑战,主要是要解决量子点在不同化学环境中的荧光稳定性问题,见 Yang, Y. et al, Coating Aqueous Quantum Dots with Silica via Reverse Microemulsion Method: Towards Size-controllable and Robust Fluorescent Nanoarticles, Chem. Mater., 2007, 19, 4123。第二类多组分生物分析技术的检测模式是空间分辨模式,即通过相同种类示踪物与待测组分在生化反应器的不同区域反应,以阵列检测器如电荷耦合器件 CCD 或二维扫描方式,通过对待测物与示踪物的识别作用,对不同组分进行同时检测。从理论上讲,该方法只需采用一种示踪物就可以实现多组分生物检测,见专利 (CN101021530A) 发明的基于空间分辨的通道分辨技术。采用该技术的检测组分数目受到检测器件或扫描单元的分辨能力的限制,同时也受通道数及光敏面积限制,且检测仪器一般比较昂贵。此外,上述方法在待测样品未经扩增的情况下,检测灵敏度相对较低。

发明内容

[0005] 发明目的：

[0006] 针对上述问题，本发明提供一种检测仪器，该检测仪器集免疫磁富集、免疫荧光光谱技术及微流技术于一体，实现对微量及痕量生物样品的检测分析。本发明还提供采用该检测仪器进行检测分析的检测方法。

[0007] 技术方案：

[0008] 具体而言，本发明提供一种检测仪器，包括样品池、富集系统、荧光检测系统、连接样品池和富集系统的导管和用于将样品输送到富集系统中的驱动装置。在本发明的检测仪器中，富集系统包括毛细管和磁铁，其中毛细管为样品流动通道和富集场所，磁铁紧邻毛细管，并且产生垂直于样品流动方向的磁场。

[0009] 在本发明的检测仪器中，驱动装置是蠕动泵，毛细管是光学玻璃毛细管，磁铁包括永磁铁和电磁铁。荧光检测系统包括光源系统、聚焦系统、分光系统和光信号检测系统，用于检测被富集于毛细管内壁上的样品，其中入射光路和检测光路系统与毛细管成垂直方向。

[0010] 在本发明的检测仪器中，还用导管将毛细管的流出端与样品池或废液瓶连接，前者可为流经毛细管的溶液形成循环回路。

[0011] 本发明的检测仪器还包括恒温系统。

[0012] 本发明的检测仪器还包括在样品池和富集系统之间的控制装置，用于控制待测样品、淋洗液或基准物溶液的选择输运，其中控制装置是多位阀。

[0013] 在本发明的检测仪器中，还包括计算机控制系统和数据分析系统，所述计算机控制系统和数据分析系统包括计算机、软件、单板机控制系统，用于自动控制样品池的温度、样品的流动、富集系统的开关、荧光检测系统的激发波长与检测波长的选择、信号采集与数据分析。

[0014] 本发明还提供采用该检测仪器进行检测分析的检测方法，该方法采用毛细管作为样品流动通道、富集及检测的场所，并且利用紧邻毛细管的磁铁，使样品在毛细管中流动的过程中得到磁富集，然后用荧光方法检测分析在毛细管中被富集的样品。

[0015] 本发明的检测方法可用于检测微量及痕量生物样品，包括细菌、病毒或细胞类待测物样品和小分子类待测物样品，

[0016] 其中对于细菌、病毒或细胞类待测物样品，将待测物样品、表面带有可以识别待测物的抗体的免疫磁珠、荧光标记的对待测物有特异性结合能力的抗体，即荧光探针，进行孵育，形成“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物，使上述复合物溶液流经毛细管，同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置，然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物进行荧光检测和分析；或者

[0017] 将待测物样品、表面带有可以识别待测物的抗体的免疫磁珠进行孵育，形成“免疫磁珠—待测物”复合物，使“免疫磁珠—待测物”复合物溶液流经毛细管，同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置，在富集后，使荧光标记的对待测物有特异性结合能力的抗体，即荧光探针，流经毛细管，对被富集在毛细管内壁的磁珠表面的待测物进行有效识别，然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物进行荧光检测和分析。

[0018] 其中对于小分子类待测物样品,将待测小分子样品、表面带有小分子半抗原抗体(或小分子半抗原)的免疫磁珠、荧光标记的小分子半抗原或小分子人工抗原(或荧光标记的小分子半抗原抗体),即荧光探针,进行孵育,形成“免疫磁珠—荧光探针”复合物,使上述复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠—荧光探针”复合物进行荧光检测;然后,将表面带有小分子半抗原抗体的免疫磁珠、相同浓度的荧光标记的小分子半抗原或人工抗原进行孵育,形成“免疫磁珠—荧光探针”复合物,使该复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠—荧光探针”复合物进行荧光检测;将两次检测到的荧光强度信号进行对比分析,得到待测小分子样品的浓度信息;或者

[0019] 将表面带有小分子半抗原抗体(或小分子半抗原)的免疫磁珠、荧光标记的小分子半抗原或人工抗原(或荧光标记的小分子半抗原抗体)进行孵育,形成“免疫磁珠—荧光探针”复合物,或者将表面带有小分子半抗原或人工抗原的免疫磁珠、抗小分子半抗原一抗及荧光标记的抗小分子半抗原一抗的二抗进行孵育,形成“免疫磁珠—一抗—二抗荧光探针”复合物,使形成的复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠—荧光探针”复合物或“免疫磁珠—一抗—二抗荧光探针”复合物进行荧光检测;然后,使待测物样品流经毛细管,以便与富集在毛细管中的“免疫磁珠—荧光探针”复合物或“免疫磁珠—一抗—二抗荧光探针”复合物竞争结合,之后进行荧光检测;将两次检测到的荧光强度信号进行对比分析,得到待测小分子样品的浓度信息。

[0020] 本发明的检测方法还可以用于检测多组分生物样品,

[0021] 将含有两种或多种微生物待测物样品、表面同时或分别带有上述两种或多种待测微生物相对应的抗体的免疫磁珠、不同荧光标记的对上述两种或多种类待测物有特异性结合能力的抗体,即荧光探针,进行孵育,形成“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物,使上述复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,然后对富集在毛细管中的“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物进行荧光检测和分析。其中,用于标记不同抗体的荧光物质,其荧光中心发射峰位的波长差 $>40\text{nm}$;

[0022] 或者

[0023] 其中将含有两种或多种微生物的待测样品、表面同时或分别带有上述两种或多种待测微生物相对应的抗体的免疫磁珠进行孵育,形成“免疫磁珠—待测物”复合物,使该复合物溶液流经毛细管,同时利用磁铁产生的磁场使其富集在毛细管的指定位置,在富集后,使不同荧光标记的对不同待测物有特异性结合能力的抗体,流经毛细管,对被富集在毛细管内壁的磁珠表面的待测物进行有效识别,然后对形成的“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物进行荧光检测和分析,其中用于标记不同抗体的荧光物质的荧光中心发射峰位的波长差 $>40\text{nm}$ 。

[0024] 技术效果:

[0025] 本发明的生物样品分析检测仪器和检测方法具有以下优点:1) 采用磁富集联用技术,由于在生物样品检测中无需传统扩增过程,因此检测过程耗时被大大缩短,可在 2h 甚至更短时间内完成检测,而传统的细菌培养检测法至少需要 48h;2) 采用毛细管作为样

品富集及检测的场所,样品在流动过程中得到富集,因此更有利于对微量及痕量生物样品的检测;3) 结合不同种类的示踪物,如具有不同荧光发射波长的荧光材料来识别待测物可有效地实现对两种以上生物组分样品的联合检测。其中,可同时检测的生物样品的种类数目仅取决于示踪标记物的信号差异及信号检测器对示踪信号的分辨能力。针对荧光示踪物来讲,就是指不同种类荧光标记物荧光发射波长的差别及光学探测器的对该差别的分辨能力;4) 结合荧光光谱分辨程序可提高待检测组分的数目。

[0026] 因此,本发明的生物样品分析检测仪器和检测方法以磁珠为载体,将免疫磁富集、免疫荧光光谱技术及微流技术集成于一体,实现了微量及痕量生物样品分析的自动化分析,具有快速,高通量及小型化的特点,因此在基础医学、临床医学、生命科学研究以及食品科学、环境科学乃至进出口检验检疫领域中具有巨大的应用前景。

附图说明

[0027] 图 1 是样品池的恒温系统结构图

[0028] 图 2 是检测仪器的简化结构图

[0029] 图 3 是荧光检测系统简化结构图

[0030] 图 4 是图 3 中荧光检测部分的荧光光纤束及光耦合简化框图

[0031] 图 5 分光系统中采用的滤光片转盘及驱动示意图

[0032] 图 6 是基于光子计数光电转换器件的信号放大采集系统简化结构图

[0033] 图 7 是基于常规光电转换器件的信号放大采集系统简化结构图

[0034] 图 8 是单板机控制系统简化结构图。

[0035] 图 9 是微处理控制器(单板机)的程序框图

[0036] 图 10 是计算机的程序框图

[0037] 其中,主要组件符号说明如下:

[0038] 1—温度控制仪;2—样品池;3—电加热元件及循环水冷系统;4—保温箱体;5—温度传感器;6—导管;7—计算机;8—多位阀;9—多位阀 8 通向样品池 2 的入口;10—多位阀 8 通向淋洗缓冲液 14 的入口;11—多位阀 8 通向基准物质样品池 15 的入口;12—多位阀 8 通向蠕动泵 13 的出口;13—蠕动泵;14—缓冲液;15—基准物质样品池;16—富集—检测毛细管;17—(电)磁铁;18—光源系统;19—荧光检测系统;20—多位阀;21—多位阀 20 入口;22—多位阀 20 通向废液瓶 24 的出口;23—多位阀 20 通向样品池 2 的出口;24—废液瓶;25—荧光分光及光学系统;26—光电转换;27—放大器;28—信号采集;29—激发光;30—聚焦透镜(其中,30(1)为入射光聚焦透镜;30(2)为荧光聚焦透镜);31—激发光光纤;32—信号光纤;33—信号光准直系统;34—荧光;35—滤光片转盘;36—滤光片;37—遮光孔;38—轴承;39—固定杆;40—传动齿轮;41—电机轴;42—步进电机;43—前置高速放大器;44—高速比较放大器;45—脉冲整形器;46—计数器;47—锁存寄存器;48—单板机控制系统;49—前置放大器;50—第二级放大器;51—ADC(模拟/数字转换器);52—通信口;53—微处理控制器;54—受控部件(在该专利中包括:温度控制仪、多位阀、蠕动泵、电磁铁、步进电机、计数器、锁存寄存器);55—控制信号流;56—控制/状态信息流;57—数据流。

具体实施方式

[0039] 下面结合附图对本发明的检测仪器和检测方法进行详细描述。

[0040] 检测仪器

[0041] 图 2 显示了本发明的检测仪器的构筑模块图。本发明的检测仪器可以包括样品池、恒温系统、微流系统、富集分离系统、荧光检测系统、计算机分析与控制系统等构筑模块。下面就各个部分作进一步说明。

[0042] 样品池：

[0043] 样品池 2 既是进样池，又是免疫磁珠及荧光探针与待测样品的免疫识别反应的反应池。样品池 2 可根据反应物体积灵活选择不同体积的玻璃容器。

[0044] 恒温系统：

[0045] 恒温系统提供免疫磁珠及荧光探针与待测样品识别反应所需温度，该系统包括：温度控制仪、加热元件、保温箱体、循环水冷系统、温度传感器等，其中恒温系统所能提供的恒温范围是 20 ~ 95℃。图 1 是恒温系统的剖面图示意图。箱体 4 采用发泡聚苯乙烯制成的热绝缘材料。内部空腔为 40×40×40(mm)，内衬金属板。电加热元件 3 采用四片硅胶电加热板，夹在内衬金属板和热绝缘箱体之间。温度传感器 5 为 Pt100 温敏电阻，位于底部金属板下面。温度控制仪为商品仪器，通过 232 口接收计算机控制。

[0046] 微流系统：

[0047] 微流系统用于选择溶液、控制溶液流速和流向。微流系统包括导管 6、多位阀 8、蠕动泵 13、光学玻璃毛细管 16 和废液瓶 24 等。多位阀 8 用于待测样品、缓冲液 14 和基准物质 15 的选择输送；多位阀 20 用于控制样品流向。蠕动泵用于流速控制。微流系统的多位阀的转动、蠕动泵的启动和停止以及转动速度由计算机 7 控制。

[0048] 典型的微流系统由一个转速连续可调的蠕动泵 13、一个三入口一出口的进样控制多位阀 8、一个一入口两出口的残液控制多位阀 20 和若干内径为 0.8mm 的硅橡胶导管 6 组成。多位阀 8 的样品入口 9 与样品池 2 相连，入口 10 与淋洗缓冲液 14 相连，入口 11 与基准物质样品池 15 相连。待测样品流经毛细管 16 后，由多位阀 20 的入口 21 经出口 23 通向样品池 2 或经出口 22 通向废液瓶 24。

[0049] 蠕动泵 13 的转速决定了样品的流速，蠕动泵的转速受计算机 7 控制。蠕动泵 13 的入口通过导管 6 和多位阀 8 的出口 12 相连，出口通过导管 6 和富集—检测毛细管 16 的入口相连。

[0050] 多位阀 20 的转动用于实现残液不同流路的切换。多位阀 20 有一个入口 21 两个出口 22, 23。入口 21 通过导管 6 和富集—检测毛细管 16 的出口相连。多位阀 20 的出口 23 通过导管 6 和样品池 2 相连。多位阀 20 的出口 22 通过导管 6 和废液瓶 24 相连。多位阀 20 的转动由计算机 7 控制。

[0051] 荧光检测系统：

[0052] 图 3 是荧光检测系统简化的结构框图。荧光检测系统由激发光源 18、荧光分光及光学系统 25、光电转换 26、信号放大器 27、信号采集 28 及计算机 7 组成。其中，激发光源 18 用于激发样品中的荧光物质产生荧光。光电转换 26 可以采用光电倍增管 PMT 或雪崩光电二极管 APD 将荧光信号转换为电信号。根据量子效率来分，它们又可分为光子计数型和普通型。光子计数型和普通型的光电转换器所要求的放大器及数据采集器是不相同的。光

子计数型适合对极微弱信号检测,具有很高的灵敏度。放大器 27 由两级以上的放大元件组成。第一级为前置放大器,将光电转换器的微弱电流信号放大;第二级将前级的输出电压信号进一步放大到所需的水平,并提供足够的输出电流。信号采集 28 将放大器的信号输出转化为计算机所能识别的数字信号。信号采集工作状态由计算机 7 控制。激发光路与荧光检测光路与毛细管 16 成垂直方向。激发光源为氙灯、发光二极管或激光。

[0053] 图 4 是图 3 中荧光检测部分的荧光光纤束及光耦合简化框图。位于光纤束中心的石英激发光纤 31 传导激发光 29;周围的光纤 32 传导荧光 34。激发光 29 通过透镜 30(1) 聚焦耦合进入激发光纤 31。在出射端经过透镜 30(2) 聚焦激发样品,样品荧光被透镜 30(2) 收集聚焦耦合进入信号光纤 32,在另一端出射后经过准直系统 33 变成准直光 34 经过荧光分光及光学系统 25 后被光电转换 26 成电信号。

[0054] 图 5 是分光系统中采用的滤光片转盘及驱动示意图,负责选择激发及荧光波长。滤光片转盘 35 直径为 40mm,上面均匀分布有五个直径为 5mm 的通孔,其中四个通孔用于放置不同波长的滤光片 36,此外还有一遮光板 37。转盘边缘有可与传动齿轮 40 相啮合的轮齿。38 是轴承,39 是固定杆。41 是电机轴,42 是直流步进电机。受计算机 7 控制。计算机发出的步进信号使步进电机转动相应的角度,带动滤光片转盘转动,选取需要的滤光片。

[0055] 图 6 是基于光子计数型 PMT 或 APD 的放大和数据采集系统的简化框图。43 是高速前置放大器。PMT 输出的电信号 V_{in} 经隔直耦合电容 C、50 欧姆匹配电阻 R1 进入前置放大器 43,电阻 R_f 、 R_g 构成反馈网络,决定放大器放大倍数。第二级放大器 44 是高速比较放大器,将前置放大器的模拟脉冲信号转化为数字脉冲信号。R2 是电位器,调节灵敏度和本底值。脉冲整形器 45 将高速比较放大器 44 输出脉冲变成宽度恒定的脉冲信号。计数器 46 对脉冲整形器 45 的脉冲信号进行计数。检测时间到后将计数值打入锁存寄存器 47,通过单板机控制系统 48,将结果送入计算机 7。计数值的大小对应光强的大小。单板机控制系统 48 还接收来自计算机的控制命令,控制计数器以及锁存寄存器的工作。

[0056] 图 7 是基于常规 PMT 或 APD 的放大和数据采集的简化框图。前置放大器 49 将光电转换器的微弱电流信号转化为电信号。电阻 R3 决定前放 49 的伏安 V/A 增益倍数。电阻 R_g 和 R_f 构成反馈网络,决定第二级放大器 50 的放大倍数,使信号被放大到合适的输出电压和电流。电位器 R8 调零,消除本底。放大器输出的模拟信号经 ADC 模拟 / 数字转换器 51 转换为数字信号,转换结果送入锁存寄存器 47,通过单板机控制系统 48,将结果送入计算机 7。单板机控制系统 48 还接收来自计算机的控制命令,控制 ADC 模拟 / 数字转换器 51 及锁存寄存器 47 的工作。

[0057] 图 8 是单板机控制系统 48 的简化框图。计算机 7 和微处理控制器 53 通过串行通信口 RS23250(52) 传送控制信号流 55。微处理控制器根据计算机的控制命令,发出相应的控制信号,结合个受控部分的工作状态,启动、停止计数器 46 或模拟 / 数字转换器 51 工作、启动锁存寄存器 47 传送数据以及多位阀 8 和 20 的转动、蠕动泵 13 转动、滤光片 36 的选择及磁富集系统 17 的开启和关闭。56 是微处理控制器和锁存寄存器、模拟 / 数字转换器、计数器之间的控制 / 状态信息流;57 是数据流。

[0058] 图 9 是微处理控制器的程序框图,每测量一个组分启动一次该程序。

[0059] 图 10 是计算机的程序框图。它们相互配合完成整个测量过程。

[0060] 生物样品的检测方法:

[0061] 下面详细描述利用本发明仪器进行生物样品检测的过程。

[0062] 本发明采用的试剂有免疫磁珠（如：**Dynabeads**[®]产品）和荧光探针（如：**Qdots**[®]公司的量子点荧光产品及**Molecular Probes**[®]公司的荧光染料产品）。其中，免疫磁珠担当待测样品的富集试剂；荧光探针担当待测样品的检测试剂。

[0063] 本发明的检测方法可用于检测微量及痕量生物样品，包括细菌、病毒或细胞类待测物样品和小分子类待测物样品。

[0064] 针对细菌、病毒或细胞类待测物，其结构特征是表面可以结合多个抗体分子，具体的检测步骤如下：

[0065] 1) 将免疫磁珠（即表面带有可以识别待测物的抗体）、待测样品及荧光探针（即荧光标记的对待测物有特异性结合能力的抗体）导入恒温样品池进行孵育，孵育温度为37℃，孵育时间为2分钟～8小时，优选5分钟～30分钟；或孵育温度为25℃，孵育时间为2分钟～8小时，优选10分钟～1小时，形成含“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物；

[0066] 2) 利用蠕动泵驱动上述复合物溶液流经毛细管，流速为0.1mL/min～20mL/min，优选1～5mL/min；

[0067] 3) 在上述复合物溶液流经毛细管的同时，启动电磁场使“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物富集在毛细管的指定位置，其中磁场强度为0.01T～1.5T，优选0.5T；

[0068] 4) 用生化缓冲液（PBS磷酸缓冲液）淋洗被富集的复合物，淋洗时间为1分钟～1小时，优选5分钟～20分钟，流速为0.1mL/min～20mL/min，优选0.5～2mL/min；

[0069] 5) 启动荧光检测系统检测富集在毛细管中的“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物，根据检测到的荧光信号对待测物进行分析；

[0070] 或

[0071] 1) 将表面带有可以识别待测物的抗体的免疫磁珠、待测物样品导入恒温样品池进行孵育，孵育温度为25℃，孵育时间为2分钟～8小时，优选10分钟～1小时；或孵育温度为37℃，孵育时间为2分钟～8小时，优选5分钟～30分钟，形成含“免疫磁珠—待测物”复合物；

[0072] 2) 利用蠕动泵驱动上述复合物溶液流经毛细管，流速为0.1mL/min～20mL/min，优选1～5mL/min；

[0073] 3) 在上述复合物溶液流经毛细管的同时，启动电磁场使“免疫磁珠—待测物”复合物富集在毛细管的指定位置，其中磁场强度为0.01T～1.5T，优选0.5T；

[0074] 4) 用生化缓冲液（PBS磷酸缓冲液）淋洗被富集的磁珠，淋洗时间为1分钟～1小时，优选5分钟～20分钟，流速为0.1mL/min～20mL/min，优选0.5～2mL/min；

[0075] 5) 利用蠕动泵驱动荧光探针（荧光标记的对待测物有特异性结合能力的抗体）溶液流经毛细管，使荧光探针与被富集并固定在毛细管内壁的磁珠表面的待测分子进行有效识别，流速为0.01mL/min～2mL/min，优选0.01mL/min～0.1mL/min，时间为1分钟～20分钟，优选5分钟。视荧光探针的量，可启动探针循环流动系统，以避免浪费；

[0076] 6) 用生化缓冲液（PBS磷酸缓冲液）淋洗富集在毛细管中的“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物，淋洗时间为1分钟～1小时，优选5分钟～20分钟，流速为0.1mL/min～20mL/min，优选0.5～2mL/min；

[0077] 7) 启动荧光检测系统检测“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物,根据检测到的荧光信号对待测物进行分析;

[0078] 或

[0079] 1) 将含有两种或多种微生物的待测样品、表面同时或分别带有上述两种或多种待测微生物相对应的抗体的免疫磁珠、不同荧光标记的对上述两种或多种类待测物有特异性结合能力的抗体,即荧光探针,导入恒温样品池进行孵育,孵育温度为 25℃,孵育时间为 2 分钟~8 小时,优选 10 分钟~1 小时;或孵育温度为 37℃,孵育时间为 2 分钟~8 小时,优选 5 分钟~30 分钟,形成含“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物,其中,用于标记不同抗体的荧光物质的荧光中心发射峰位的波长差 >40nm;

[0080] 2) 利用蠕动泵驱动上述复合物溶液流经毛细管,流速为 0.1mL/min ~ 20mL/min,优选 1 ~ 5mL/min;

[0081] 3) 在上述复合物溶液流经毛细管的同时,启动电磁场使“免疫磁珠—待测物”复合物富集在毛细管的指定位置,其中磁场强度为 0.01T ~ 1.5T,优选 0.5T;

[0082] 4) 用生化缓冲液(PBS 磷酸缓冲液)淋洗富集在毛细管中的“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物,淋洗时间为 1 分钟~1 小时,优选 5 分钟~20 分钟,流速为 0.1mL/min ~ 20mL/min,优选 0.5 ~ 2mL/min;

[0083] 5) 启动波长分辨荧光检测系统检测“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物,根据检测到的荧光信号对待测物进行分析。

[0084] 或

[0085] 1) 将含有两种或多种微生物的待测样品、表面同时或分别带有上述两种或多种待测微生物相对应的抗体的免疫磁珠导入恒温样品池进行孵育,孵育温度为 25℃,孵育时间为 2 分钟~8 小时,优选 10 分钟~1 小时;或孵育温度为 37℃,孵育时间为 2 分钟~8 小时,优选 5 分钟~30 分钟,形成含“免疫磁珠—待测物”复合物;

[0086] 2) 利用蠕动泵驱动上述复合物溶液流经毛细管,流速为 0.1mL/min ~ 20mL/min,优选 1 ~ 5mL/min;

[0087] 3) 在上述复合物溶液流经毛细管的同时,启动电磁场使“免疫磁珠—待测物”复合物富集在毛细管的指定位置,其中磁场强度为 0.01T ~ 1.5T,优选 0.5T;

[0088] 4) 利用蠕动泵驱动不同荧光标记的对待测物有特异性结合能力的抗体流经毛细管,其中用于标记不同待测物抗体的荧光物质的荧光中心发射峰位的波长差 >40nm,流速为 0.01mL/min ~ 2mL/min,优选 0.01 ~ 0.1mL/min,时间为 1 分钟~20 分钟,优选 5 分钟。视荧光探针的量,可启动探针循环流动系统,以避免浪费;

[0089] 5) 用生化缓冲液(PBS 磷酸缓冲液)淋洗富集在毛细管中的“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物,淋洗时间为 1 分钟~1 小时,优选 5 分钟~20 分钟,流速为 0.1mL/min ~ 20mL/min,优选 0.5 ~ 2mL/min;

[0090] 6) 启动波长分辨荧光检测系统检测“免疫磁珠—待测物—荧光探针”复合物,根据检测到的荧光信号对待测物进行分析。

[0091] 针对小分子类待测物样品的检测分析的具体步骤如下:

[0092] 1) 将表面带有小分子半抗原的抗体(或小分子半抗原)的免疫磁珠、荧光标记的小分子半抗原或小分子人工抗原(或荧光标记的小分子半抗原的抗体)及待测小分子样品

导入恒温样品池进行孵育,孵育温度为 25℃,孵育时间为 2 分钟~8 小时,优选 10 分钟~1 小时;或孵育温度为 37℃,时间为 2 分钟~8 小时,优选 10 分钟~30 分钟;

[0093] 2) 利用蠕动泵驱动“免疫磁珠—荧光探针”形成复合物溶液流经毛细管,流速为 0.1mL/min~20mL/min,优选 1~5mL/min;

[0094] 3) 在上述复合物溶液流经毛细管的同时,启动电磁场,富集被悬浮的磁珠,使“免疫磁珠—荧光探针”复合物富集在毛细管的指定位置,其中磁场强度为 0.01T~1.5T,优选 0.5T;

[0095] 4) 用生化缓冲液(PBS 磷酸缓冲液)淋洗被富集的磁珠,淋洗时间为 1 分钟~1 小时,优选 5 分钟~20 分钟,流速为 0.1mL/min~20mL/min,优选 0.5~2mL/min;

[0096] 5) 启动荧光检测系统;

[0097] 6) 对检测到的荧光信号进行分析;

[0098] 7) 将表面带有小分子半抗原的抗体(或小分子半抗原)的免疫磁珠、及与步骤 1 中浓度相同的荧光标记小分子半抗原或小分子人工抗原(或荧光标记的小分子半抗原抗体)导入恒温样品池进行孵育,孵育温度为 25℃,孵育时间为 2 分钟~8 小时,优选 10 分钟~1 小时;或孵育温度为 37℃,时间为 2 分钟~8 小时,优选 5 分钟~30 分钟;

[0099] 8) 利用蠕动泵驱动“免疫磁珠—荧光探针”形成复合物溶液流经毛细管,流速为 0.01mL/min~2mL/min,优选 0.01~0.1mL/min;

[0100] 9) 在上述复合物溶液流经毛细管的同时,启动电磁场富集功能,富集被悬浮的磁珠,使“免疫磁珠—荧光探针”复合物富集在毛细管的指定位置,其中磁场强度为 0.01T~1.5T,优选 0.5T;

[0101] 10) 用生化缓冲液(PBS 磷酸缓冲液)淋洗被富集的磁珠,淋洗时间为 1 分钟~1 小时,优选 5 分钟~20 分钟,流速为 0.1mL/min~20mL/min,优选 0.5~2mL/min;

[0102] 11) 启动荧光检测系统;

[0103] 12) 对步骤 11 和 6 检测到的荧光强度信号进行对比分析,得到待测小分子样品的浓度。

[0104] 或

[0105] 1) 将表面带有小分子半抗原抗体(或小分子半抗原)的免疫磁珠、荧光标记的半抗原或人工抗原(或荧光标记的小分子半抗原抗体)导入恒温样品池进行孵育,孵育温度为 25℃,孵育时间为 2 分钟~8 小时,优选 10 分钟~1 小时;或孵育温度为 37℃,时间为 2 分钟~8 小时,优选 5 分钟~30 分钟;

[0106] 2) 利用蠕动泵驱动“免疫磁珠—荧光探针”形成复合物的溶液流经毛细管,流速为 0.01mL/min~2mL/min,优选 0.01~0.1mL/min;

[0107] 3) 在上述复合物溶液流经毛细管的同时,启动电磁场富集功能,富集被悬浮的磁珠,使“免疫磁珠—荧光探针”复合物富集在毛细管的指定位置,其中磁场强度为 0.01T~1.5T,优选 0.5T;

[0108] 4) 用生化缓冲液(PBS 磷酸缓冲液)淋洗被富集的磁珠,淋洗时间为 1 分钟~1 小时,优选 5 分钟~20 分钟,流速为 0.1mL/min~20mL/min,优选 0.5~2mL/min;

[0109] 5) 启动荧光检测系统;

[0110] 6) 对荧光信号进行检测分析;

[0111] 7) 利用蠕动泵驱动待测样品流经毛细管,此时,待测分子以及半抗原或人工抗原竞争结合小分子半抗原的抗体,流速为 0.01mL/min ~ 2mL/min,优选 0.01 ~ 0.1mL/min;

[0112] 8) 用生化缓冲液(PBS 磷酸缓冲液)淋洗被富集的磁珠,淋洗时间为 1 分钟~ 1 小时,优选 5 分钟~ 20 分钟,流速为 0.1mL/min ~ 20mL/min,优选 0.5 ~ 2mL/min;

[0113] 9) 启动荧光检测系统;

[0114] 10) 对步骤 9 和 6 检测到的荧光强度信号进行对比分析,得到待测小分子样品的浓度;

[0115] 或

[0116] 1) 将免疫磁珠即表面带有小分子半抗原、抗小分子半抗原一抗及荧光标记的抗小分子半抗原一抗的二抗导入恒温样品池进行孵育,孵育温度为 25℃,孵育时间为 2 分钟~ 8 小时,优选 10 分钟~ 1 小时;或孵育温度为 37℃,时间为 2 分钟~ 8 小时,优选 5 分钟~ 30 分钟;

[0117] 2) 利用蠕动泵驱动“免疫磁珠—一抗—二抗荧光探针”形成复合物的溶液流经毛细管,流速为 0.01mL/min ~ 2mL/min,优选 0.01 ~ 0.1mL/min;

[0118] 3) 在上述复合物溶液流经毛细管的同时,启动电磁场富集功能,富集被悬浮的磁珠,使复合物富集在毛细管的指定位置,其中磁场强度为 0.01T ~ 1.5T,优选 0.5T;

[0119] 4) 用生化缓冲液(PBS 磷酸缓冲液)淋洗被富集的磁珠,淋洗时间为 1 分钟~ 1 小时,优选 5 分钟~ 20 分钟,流速为 0.1mL/min ~ 20mL/min,优选 0.5 ~ 2mL/min;

[0120] 5) 启动荧光检测系统;

[0121] 6) 利用蠕动泵导入待测物溶液,此时,待测物以及免疫磁珠表面的抗原竞争结合小分子半抗原一抗,流速为 0.01mL/min ~ 2mL/min,优选 0.01 ~ 0.1mL/min;时间为 1 分钟~ 20 分钟,优选 5 分钟;

[0122] 7) 用生化缓冲液(PBS 磷酸缓冲液)淋洗被富集的磁珠,淋洗时间为 1 分钟~ 1 小时,优选 5 分钟~ 20 分钟,流速为 0.1mL/min ~ 20mL/min,优选 0.5 ~ 2mL/min;

[0123] 8) 再次检测磁珠的荧光强度

[0124] 9) 对步骤 8 和 5 检测到的荧光强度信号进行对比分析,得到待测小分子样品的浓度。

[0125] 下面,以第一套细菌、病毒类或病变细胞类待测物的检测流程为例,具体描述仪器各个部件的工作流程。

[0126] 1) 将免疫磁珠(即表面带有可以识别待测物的抗体)、待测样品及荧光探针(即荧光标记的对待测物有特异性结合能力的抗体)导入恒温样品池 2,恒温孵育。

[0127] 2) 将多位阀 8 切换到入口 9,启动电磁铁 17,开启蠕动泵 13,将磁珠分散液经多位阀 8 的出口 12 输送到富集—检测毛细管 16,电磁铁 17 产生的磁场将磁珠固定到 16 的特定部位。将多位阀 20 切换到出口 22,残液经出口 22 排出到废液瓶 24;

[0128] 3) 将多位阀 8 切换到入口 10,电磁铁 17 保持通电,多位阀 20 切换到出口 22,用缓冲液淋洗磁珠表面非特异性吸附的荧光标记抗体,废液经多位阀 20 出口 22 排出到废液瓶 24;

[0129] 4) 启动光源系统 18,通过荧光分光及光学系统 25 选择合适的荧光波长,进行荧光检测。

[0130] 5) 荧光信号经光电转换器 26, 放大器 27 及信号采集系统 28, 将被转换的电信号传送到计算机 7 进行处理。

[0131] 6) 计算机 7 分析得到所测组分的浓度, 并输出结果。

[0132] 7) 将多位阀 8 切换到入口 10, 多位阀 20 切换到出口 22, 关闭电磁铁 17, 启动蠕动泵 13, 用缓冲液将纳米磁珠从富集—检测毛细管中排出, 完成检测全过程。

[0133] 本发明集成了免疫磁珠的磁富集技术、免疫荧光分析及微流技术, 在计算机控制下可实现样品的微量及痕量自动分析, 尤其适用于生物样品的分析。该设备及技术的优点如下:

[0134] 1) 待测样品的富集、分离、检测过程全部为自动化过程, 因此, 操作简单, 检测快速。

[0135] 2) 仪器结构简单, 成本低廉, 采用成熟及高灵敏度的荧光分析技术, 重复性好。

[0136] 3) 通过蠕动泵、进样控制多位阀、残液控制多位阀, 可使溶液样品构成回路, 可大大提高免疫荧光探针的利用效率, 从而降低成本。

[0137] 实施例 1

[0138] 将含有大肠杆菌 0157:H7 的待检测样品 10mL、耦联有大肠杆菌单克隆抗体的免疫磁珠 (购于 **Dynabeads[®]**) 200 μ L 及异硫氰酸荧光素 (FITC, 购于 **Molecular Probes[®]**) 标记的大肠杆菌特异性抗体 20 μ L 导入恒温样品池 2, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 10min; 将多位阀 8 切换到入口 9, 多位阀 20 切换到出口 22, 开启蠕动泵 13 驱动“免疫磁珠—待测物—荧光探针”形成复合物的溶液流经毛细管 16, 蠕动泵 13, 流速设为 1mL/min, 与此同时, 启动电磁铁 17 富集溶液中悬浮的磁珠, 残液经多位阀 20 的出口 22 流出至废液瓶 24; 待测液中的磁珠被富集完毕后, 将多位阀 8 切换到入口 10, 此时蠕动泵 13 驱动缓冲液 14 淋洗被富集的磁珠, 除去未与大肠杆菌结合的多余 FITC 标记的抗体; 10min 后, 停止蠕动泵, 启动荧光分光及光学系统 25, 于 520nm 处检测荧光, 并对信号强度进行分析, 计算待测样品中大肠杆菌浓度。采用此方法检测大肠杆菌的灵敏度为 5CFU/mL。

[0139] 实施例 2

[0140] 将含有大肠杆菌 0157:H7 的待检测样品 10mL、耦联有大肠杆菌单克隆抗体的免疫磁珠 (购于 **Dynabeads[®]**) 200 μ L 导入恒温样品池 2, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 10min; 将多位阀 8 切换到入口 9, 多位阀 20 切换到出口 22, 开启蠕动泵 13 驱动“免疫磁珠—待测物”形成复合物的溶液流经毛细管 16, 蠕动泵 13 流速设为 1mL/min, 与此同时, 启动电磁铁 17 富集溶液中的悬浮磁珠, 残液经多位阀 20 流出的出口 22 至废液瓶 24; 待测液中的磁珠被富集完毕后, 向恒温样品池 2 中加入 20 μ L FITC 标记的大肠杆菌特异性抗体及 3mL 的 PBS 磷酸缓冲液, 此时蠕动泵 13 驱动荧光标记抗体流经毛细管 16, 将多位阀 20 切换到出口 23, 将蠕动泵 13 流速调至 0.6mL/min, 此时荧光标记抗体可多次流经毛细管 16, 提高识别效率; 10min 后, 将多位阀 8 切换到入口 10, 同时将多位阀 20 的出口切换到 22, 此时蠕动泵 13 驱动缓冲液 14 淋洗被富集的磁珠, 除去与大肠杆菌非特异性结合的 FITC 标记抗体; 10min 后, 停止蠕动泵, 启动荧光分光及光学系统 25, 于 520nm 处检测荧光, 并对信号强度进行分析, 计算待测样品中大肠杆菌浓度。采用此方法检测大肠杆菌的灵敏度为 5CFU/mL。

[0141] 实施例 3

[0142] 将耦联有可识别“瘦肉精”克伦特罗抗体的免疫磁珠 (购于 **Dynabeads[®]**) 200 μ L、

以及耦联有克伦特罗人工抗原的量子点（发射波长 610nm, 购于 Qdots®）100 μ L 导入恒温样品池 2, 25°C 下孵育 15min; 将多位阀 8 切换到入口 9, 多位阀 20 切换到出口 22, 开启蠕动泵 13 驱动“免疫磁珠—荧光探针”形成复合物的溶液流经毛细管 16, 蠕动泵 13 流速设为 1mL/min, 与此同时, 启动电磁铁 17 富集溶液中的悬浮磁珠, 溶液经多位阀 20 流出至废液瓶 24; 将多位阀 8 切换到入口 10, 蠕动泵 13 流速设为 1mL/min, 此时蠕动泵 13 驱动缓冲液 14 淋洗被富集的磁珠, 除去未与免疫磁珠结合的多量子点—抗原耦联物; 10min 后, 停止蠕动泵 13, 启动荧光分光及光学系统 25, 检测荧光强度信号; 然后, 将多位阀 8 切换到入口 9, 向恒温样品池 2 中加入含有克伦特罗的待测样品 10mL, 启动蠕动泵 13, 流速设为 1mL/min, 此时待测样品流经毛细管, 与富集在毛细管中的“免疫磁珠—荧光探针”复合物中的量子点—人工抗原耦联物竞争结合标记于免疫磁珠表面的抗体; 同时, 将多位阀 20 切换到出口 23, 待测样品循环经过毛细管, 以提高竞争效率。30min 后, 停止蠕动泵, 启动荧光分光及光学系统 25, 于 610nm 处检测荧光强度信号并进行分析, 通过与之之前测得的荧光强度信号的对比分析, 计算待测样品中克伦特罗的浓度。采用此方法检测克伦特罗的灵敏度为 1ng/mL。

[0143] 实施例 4

[0144] 将耦联有可识别“瘦肉精”克伦特罗抗体的免疫磁珠（购于 Dynabeads®）200 μ L、含有克伦特罗的待测样品 10mL 以及耦联有克伦特罗半抗原的量子点（发射波长 610nm, 购于 Qdots®）100 μ L 导入恒温样品池 2, 25°C 下孵育 10min; 将多位阀 8 切换到入口 9, 多位阀 20 切换到出口 22, 开启蠕动泵 13 驱动“免疫磁珠—荧光探针”复合物的溶液流经毛细管 16, 蠕动泵 13 流速设为 1mL/min, 与此同时, 启动电磁铁 17 富集溶液中的悬浮磁珠, 溶液经多位阀 20 流出至废液瓶 24; 10min 后, 将多位阀 8 切换到入口 10, 此时蠕动泵 13 驱动缓冲液 14 淋洗被富集的磁珠, 除去未与免疫磁珠结合的多量子点—抗原耦联物; 10min 后, 停止蠕动泵 13, 启动荧光分光及光学系统 25, 检测荧光强度信号; 然后, 将多位阀 8 切换到入口 11, 向基准物质样品池 15 中导入预先孵育好的由免疫磁珠和克伦特罗半抗原—量子点耦联物所形成的复合物（其中, 免疫磁珠及量子点标记的克伦特罗半抗原样品的用量同上, 10mL 待测样品用相同体积的 PBS 磷酸缓冲液代替, 温育条件同上）, 开启蠕动泵, 流速设为 1mL/min, 此时“免疫磁珠—荧光探针”复合物溶液流经毛细管, 与此同时, 电磁铁 17 富集溶液中的悬浮磁珠, 残液经多位阀 20 的出口 22 流至废液瓶 24; 待上述富集过程完成后, 将多位阀 8 切换到入口 10, 此时蠕动泵 13 驱动缓冲液 14 淋洗被富集的磁珠, 除去未与免疫磁珠结合的多量子点—抗原耦联物, 淋洗速度为 0.5mL/min; 10min 后, 停止蠕动泵, 启动荧光分光及光学系统 25, 于 610nm 处检测荧光强度信号并与上面测得的信号进行对比分析, 计算待测样品中克伦特罗的浓度。采用此方法检测克伦特罗的灵敏度为 1ng/mL。

[0145] 实施例 5

[0146] 将耦联有“瘦肉精”克伦特罗半抗原的免疫磁珠（购于 Dynabeads®）200 μ L、抗克伦特罗半抗原—抗 300 μ L 及吖啶菁类荧光染料 Cy5（购于 Molecular Probes®）标记的抗克伦特罗半抗原—抗的二抗 20 μ L 导入恒温样品池 2, 加入 10mL PBS 磷酸缓冲液, 25°C 下孵育 20min; 将多位阀 8 切换到入口 9, 多位阀 20 切换到出口 22, 开启蠕动泵 13 驱动“免疫磁珠—抗—荧光标记二抗”复合物的溶液流经毛细管 16, 蠕动泵 13 流速设为 0.8mL/min, 与

此同时,启动电磁铁 17 富集溶液中的悬浮磁珠,残液经多位阀 20 的出口 22 流出至废液瓶 24;富集完毕后,将多位阀 8 切换到入口 10,此时蠕动泵 13 驱动缓冲液 14 淋洗被富集的磁珠,除去未与免疫磁珠结合的一抗及荧光标记二抗;10min 后,停止蠕动泵,启动荧光分光及光学系统 25,于 650nm 处检测荧光强度信号;然后,将多位阀 8 切换到入口 11,向基准物质样品池 15 中加入 3mL 含有“瘦肉精”克伦特罗的待测样品,将蠕动泵流速设为 0.05mL/min,此时待测样品流经毛细管,待测样品在流动过程中与被固定磁珠表面的半抗原竞争结合抗克伦特罗半抗原一抗,使此前结合的一抗及荧光标记二抗产生脱落;30min 后,停止蠕动泵,启动荧光分光及光学系统 25,于 650nm 处检测荧光强度信号,并与此前测得的荧光强度信号进行对比分析,计算待测样品中克伦特罗的浓度。采用此方法检测克伦特罗的灵敏度为 0.5ng/mL。

[0147] 实施例 6

[0148] 将同时含有大肠杆菌 0157:H7 及沙门氏菌的待检测样品 10mL、耦联有大肠杆菌单克隆抗体的免疫磁珠(购于Dynabeads®)及沙门氏菌单克隆抗体的免疫磁珠各 100 μL、20 μL 标记了 610nm 的荧光量子点(购于Qdots®)的大肠杆菌特异性抗体及 20 μL 标记了 530nm 的荧光量子点(购于Qdots®)的沙门氏菌特异性抗体导入样品池 2,于 37℃ 孵育 20min;将多位阀 8 切换到入口 9,多位阀 20 切换到出口 22,开启蠕动泵 13 驱动“免疫磁珠—待测物—荧光探针”形成复合物的溶液流经毛细管 16,蠕动泵 13 流速设为 1mL/min,与此同时,启动电磁铁 17 富集溶液中的悬浮磁珠,残液经多位阀 20 的出口 22 流至废液瓶 24;5 分钟后,将多位阀 8 切换到入口 10,此时蠕动泵 13 驱动缓冲液 14 淋洗被富集的磁珠,除去未与免疫磁珠结合的大肠杆菌、沙门氏菌及被非特异性结合的量子点标记抗体,流速为 1mL/min;10min 后,停止蠕动泵,启动荧光分光及光学系统 25,驱动荧光检测系统中的滤光片转盘 35,选择滤光片 36 分别对待测磁珠在 610nm 及 530nm 处的荧光信号进行检测分析,结合波长分辨程序计算待测样品中大肠杆菌及沙门氏菌浓度。采用此方法同时检测到大肠杆菌及沙门氏菌的灵敏度为 6 ~ 10CFU/mL。

[0149] 实施例 7

[0150] 将同时含有大肠杆菌 0157:H7 及沙门氏菌的待检测样品 10mL、耦联有大肠杆菌单克隆抗体的免疫磁珠(购于Dynabeads®)及沙门氏菌单克隆抗体的免疫磁珠各 100 μL 导入恒温样品池 2,在 37℃ 下孵育 10min;将多位阀 8 切换到入口 9,多位阀 20 切换到出口 22,开启蠕动泵 13 驱动“免疫磁珠—待测物”形成复合物的溶液流经毛细管 16,蠕动泵 13 流速设为 1mL/min,与此同时,启动电磁铁 17 富集溶液中的悬浮磁珠,溶液经多位阀 20 流出至废液瓶 24;富集 5 分钟完毕后,向基准物质样品池 15 中加入 20 μL 标记了 610nm 的荧光量子点(购于Qdots®)大肠杆菌特异性抗体、20 μL 标记了 530nm 的荧光量子点(购于Qdots®)的沙门氏菌特异性抗体及 1mL 的 PBS 磷酸缓冲液;然后,蠕动泵 13 驱动荧光标记抗体流经毛细管 16,将多位阀 20 切换到出口 22,将蠕动泵 13 流速调至 0.05mL/min;10min 后,将多位阀 8 切换到入口 10,同时将蠕动泵 13 流速调至 1mL/min,此时蠕动泵 13 驱动缓冲液 14 淋洗被富集的磁珠,除去未与大肠杆菌及沙门氏菌结合的荧光标记抗体;10min 后,停止蠕动泵,启动荧光分光及光学系统 25,驱动荧光检测系统中的滤光片转盘,选择滤光片分别对待测磁珠在 610nm 及 530nm 处的荧光信号进行检测分析,结合波长分辨程序计算待测样品中大肠杆菌及沙门氏菌浓度。采用此方法同时检测到大肠杆菌及沙门氏菌的灵敏度

为 6 ~ 10CFU/mL。

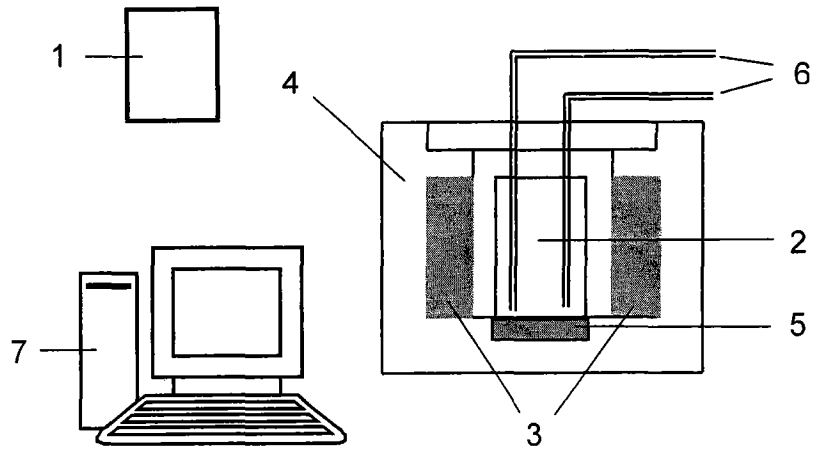


图 1

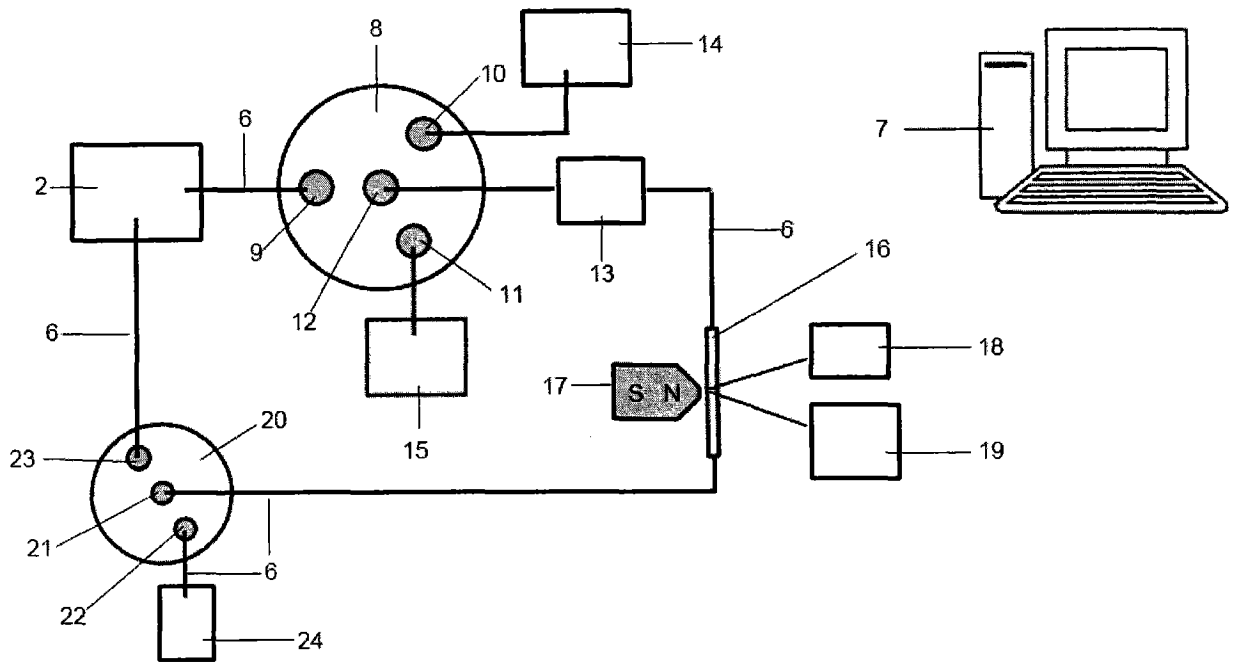


图 2

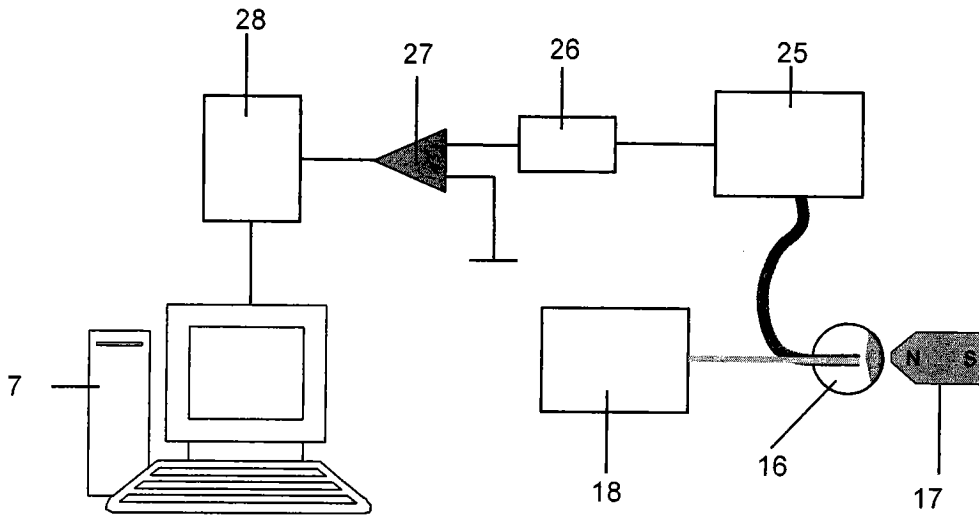


图 3

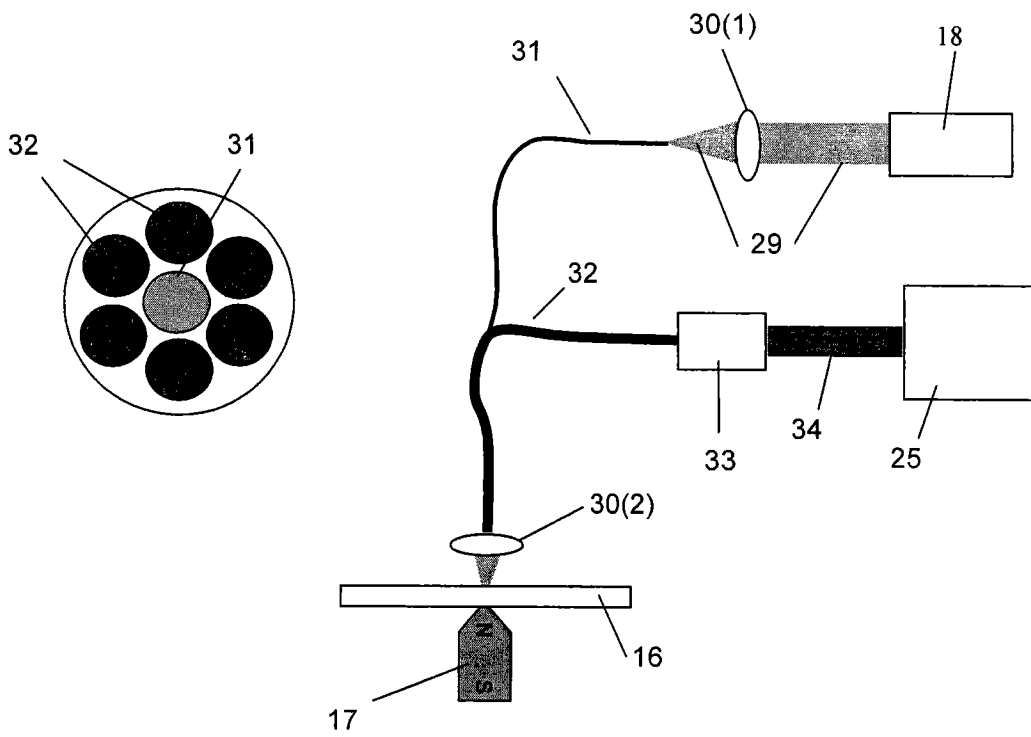


图 4

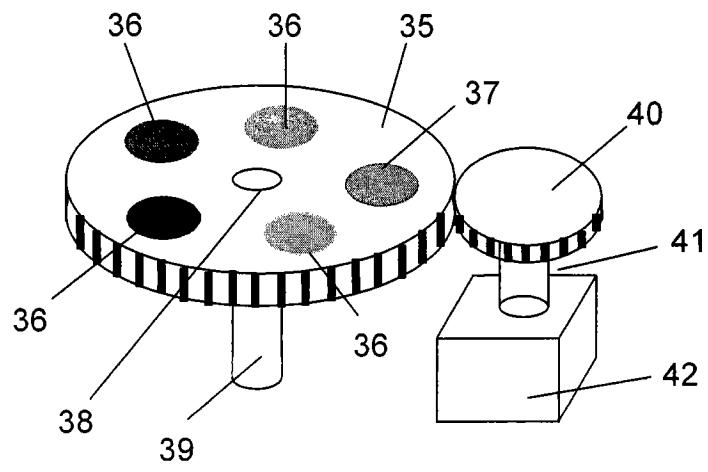


图 5

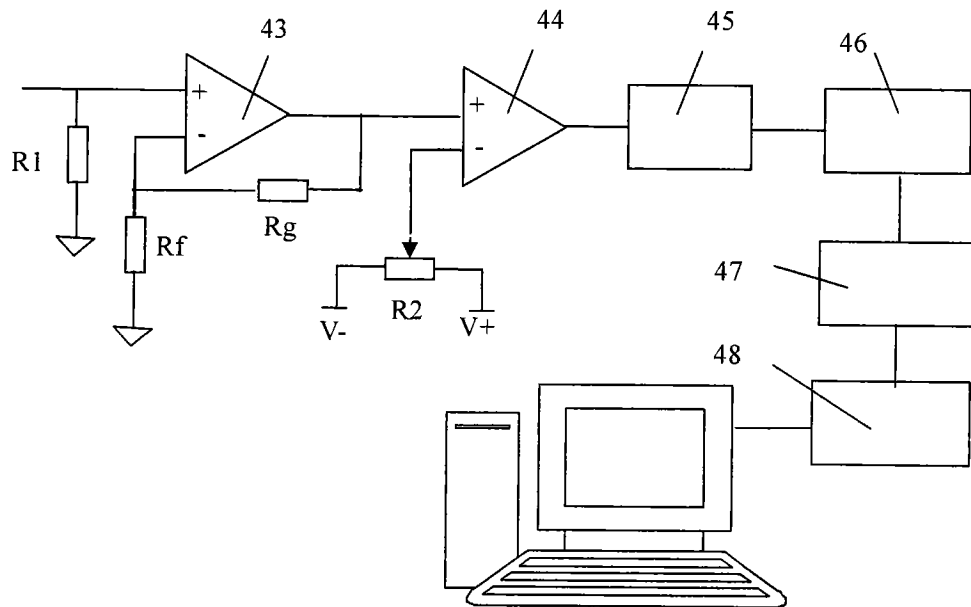


图 6

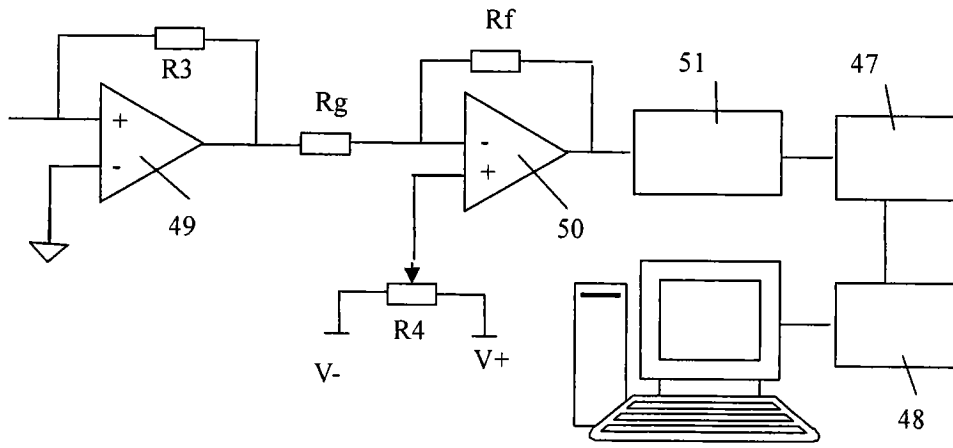


图 7

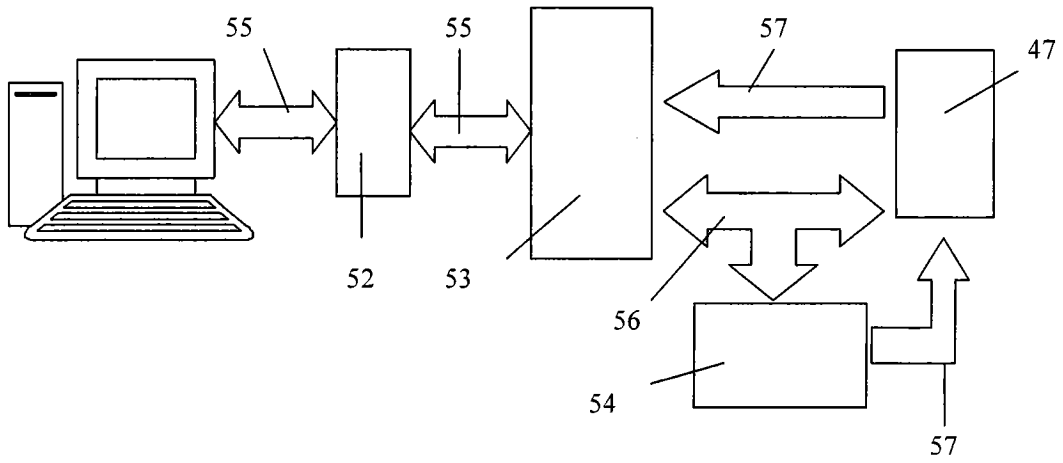


图 8

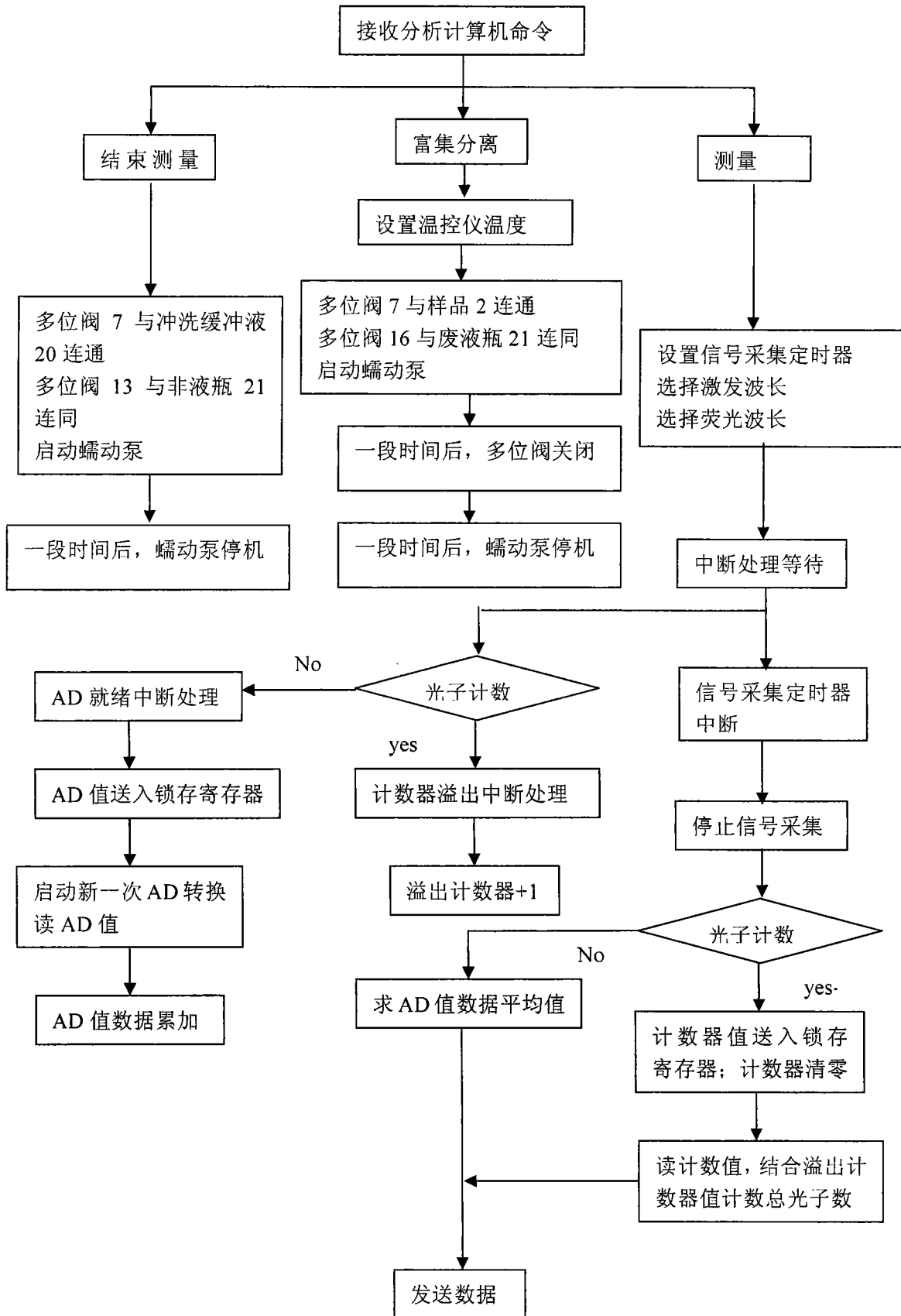


图 9

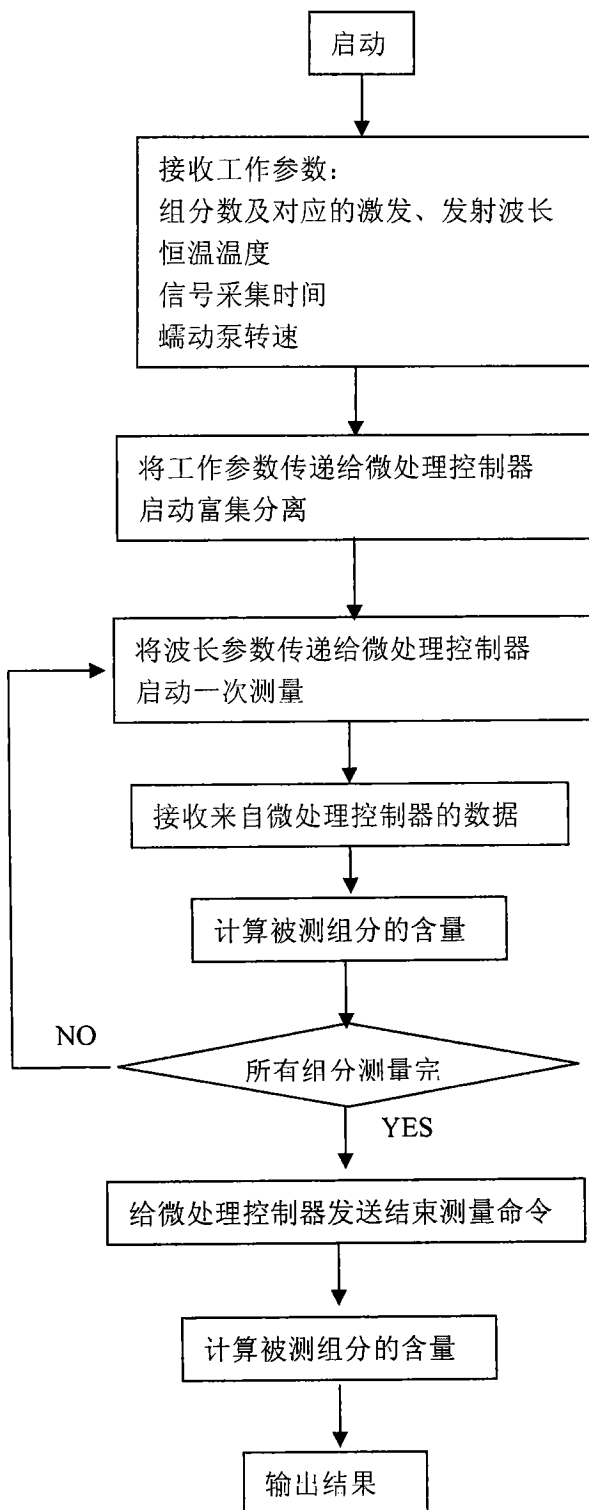


图 10

专利名称(译)	用于生物样品的检测仪器和检测方法		
公开(公告)号	CN101672841B	公开(公告)日	2013-05-08
申请号	CN200810211904.3	申请日	2008-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	北京朔望科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京朔望科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京万德高科技发展有限公司		
[标]发明人	赵唯宇 罗志勇 高振宇		
发明人	赵唯宇 罗志勇 高振宇		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64 G01N1/40 G01N33/569		
代理人(译)	王旭		
审查员(译)	张全红		
其他公开文献	CN101672841A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测仪器和采用该检测仪器的检测方法。本发明的检测仪器包括样品池、富集系统、检测系统、连接样品池、富集系统的导管和用于将样品输送到富集系统中的驱动装置，其特征在于，所述富集系统包括毛细管和磁铁，其中毛细管为样品流动通道和富集场所，磁铁紧邻毛细管，并且产生垂直于样品流动方向的磁场；所述检测系统是荧光检测系统。采用本发明的检测仪器的检测方法可用于检测微量及痕量生物样品，包括细菌、病毒或细胞类待测物样品和小分子半抗原类待测物样品。

