[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
G01N 33/53
B03C 1/00
B01J 19/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02821759.4

[43] 公开日 2005 年 8 月 3 日

[11] 公开号 CN 1650162A

[22] 申请日 2002.8.6 [21] 申请号 02821759.4
[30] 优先权
[32] 2001. 8.31 [33] US [31] 09/944,816
[86] 国际申请 PCT/US2002/024850 2002.8.6
[87] 国际公布 WO2003/044528 英 2003.5.30
[85] 进入国家阶段日期 2004.4.29
[71] 申请人 巴特尔纪念研究院
地址 美国华盛顿州
[72] 发明人 J·W·格拉特
C·J·布鲁克纳 - 李
D·A·霍尔曼

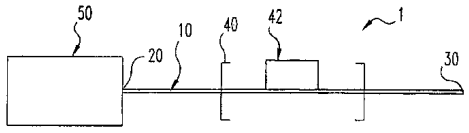
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘继富 孟凡宏

权利要求书 7 页 说明书 36 页 附图 11 页

[54] 发明名称 流量控制的磁性颗粒处理

[57] 摘要

发明的方法和设备(1，2)对于在一个或多个磁场中收集磁性颗粒并将颗粒再悬浮在分散介质中，并通过控制流经流体流动通道(10)的流体流的方向和速度，有选择地在相同或不同介质中有选择地重复进行一次或多次收集/再悬浮是有用的。 该方法提供用于测试样品和试剂接触衍生颗粒、过量试剂的去除、磁性材料的冲洗、和在其它用途中再悬浮以用于分析。 该方法适用于宽范围的对磁性标记包括例如细胞、病毒、低聚核苷酸、蛋白质、荷尔蒙、受体 - 配合体的络合物、环境污染物等敏感的化合物和生物材料。



ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

1、一种方法，包括：

提供流体流动通道，该流体流动通道具有第一和第二端，能有效地、可变化地在流动通道上施加正的或负的压力，以使受控制的流体沿第一或第二方向以预定的速度流经流体流动通道的流体流动控制器；以及介于第一和第二端之间的捕获区，其中一个固定的磁场与流体流动通道在捕获区相交；

在流体流动通道内提供第一混合物，其包括多个分散在载体介质中的固体磁性颗粒；

使第一混合物以第一预定捕获速度穿过捕获区，由此通过磁场力使大部分的磁性颗粒在捕获区被捕获并由此从载体介质中分离，从而形成第一磁性颗粒隔离体；

用第一分散介质灌注第一磁性颗粒隔离体；以及

用脉冲使第一分散介质以第一预定分散速度通过捕获区，有效地将第一磁性颗粒隔离体从捕获区移走，从磁场移走磁性颗粒以及在第一分散介质中悬浮磁性颗粒以提供第二混合物。

2、根据权利要求1所述的方法，其中在所述第一混合物经过、所述灌注、所述脉冲发生和所述第二混合物经过期间，该固定磁场的强度基本上是恒定的。

3、根据权利要求1所述的方法，其中该固定磁场由与流体流动通道具有固定的相互关系的永磁体提供。

4、根据权利要求1所述的方法，其中该固定磁场由与流体流动通道具有固定的相互关系并能够产生固定的磁场的电磁体提供。

5、根据权利要求1所述的方法，其中该磁性颗粒包括对于目标物质具有有选择的亲和性的表面粘附的选择性药剂。

6、根据权利要求5所述的方法，其中带有表面粘附的选择性药剂的该磁性颗粒对于在样品中有选择地留存化合物或生物物质是有效的。

7、根据权利要求1所述的方法，其中该磁性颗粒包括适于通过非特定的交互作用吸附多种目标物质的性质。

8、根据权利要求7所述的方法，其中该非特定的交互作用从以下由静电交互作用、范德华交互作用、偶极子-偶极子交互作用和氢键交

互作用构成的组中进行选择。

9、根据权利要求 6 所述的方法，其中该第一分散介质包括样品。

10、根据权利要求 6 所述的方法，其中该选择性药剂有效地将生物物质留存在样品中，且其中该选择性药剂从以下由抗原、抗体、蛋白质受体、配位体、低聚核苷酸、链式抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、生物素和外源凝集素构成的组中进行选择。

11、根据权利要求 10 所述的方法，其中该选择性药剂为抗体。

12、根据权利要求 6 所述的方法，其中该样品包括用于酶联免疫吸附化验（ELISA）的分析物样品；其中该选择性药剂为有选择地留存分析物的抗体；且其中该样品进一步包括分析物-酶的轭合物。

13、根据权利要求 12 所述的方法，其中该分析物-酶的轭合物包括一种具有特定催化活性和对分析试剂具有专一性的酶。

14、根据权利要求 6 所述的方法，其中该载体介质包括样品。

15、根据权利要求 14 所述的方法，其中该混合物被培养第一段时间，以有效地使选择性药剂接触并存留在该物质中。

16、根据权利要求 15 所述的方法，其中该第一分散介质为第一洗液。

17、根据权利要求 16 所述的方法，进一步包括使第二混合物以第二预定捕获速度穿过捕获区，在该速度下通过磁场力大部分的磁性颗粒在捕获区被捕获并由此从第一分散介质中去除，从而形成第二磁性颗粒隔离体。

18、根据权利要求 17 所述的方法，进一步包括：

用第二分散介质灌注第二磁性颗粒隔离体；以及

用脉冲使第二分散介质以第二预定分散速度通过捕获区，有效地将第二磁性颗粒隔离体从捕获区移走，从磁场移动磁性颗粒以及在第二分散介质中悬浮磁性颗粒以提供第三混合物。

19、根据权利要求 18 所述的方法，其中该第二分散介质包括分析试剂。

20、根据权利要求 19 所述的方法，进一步包括使第三混合物以第三预定捕获速度穿过捕获区，在该速度下通过磁场力大部分的磁性颗粒在捕获区被捕获并由此从第二分散介质中去除，从而形成第三磁性颗粒隔离体。

21、根据权利要求 20 所述的方法，其中该流动通道进一步包括一个一个检测区，且其中定位一个检测器以检测该检测区中的流体的物理或化学性能；且进一步包括在使第三混合物穿过捕获区之后，检测从以下由第二分散介质和第三磁性颗粒隔离体构成的组中选择的构件的物理或化学性能。

22、根据权利要求 21 所述的方法，其中该分析试剂为着色剂；且其中该检测器为光学检测器。

23、根据权利要求 22 所述的方法，进一步包括：使第二溶液穿过检测区；并测定第二溶液的性质。

24、根据权利要求 18 所述的方法，其中该第二分散介质包括第二洗液。

25、根据权利要求 24 所述的方法，进一步包括使第三混合物以第三预定捕获速度穿过捕获区，在该速度下通过磁场力大部分的磁性颗粒在捕获区被捕获并由此从第二分散介质中去除，从而形成第三磁性颗粒隔离体。

26、根据权利要求 25 所述的方法，进一步包括：

用第三分散介质灌注第三磁性颗粒隔离体；以及

用脉冲使第三分散介质以第三预定分散速度通过捕获区，有效地将第三磁性颗粒隔离体从捕获区移走，从磁场移动磁性颗粒以及在第三分散介质中悬浮磁性颗粒以提供第四混合物。

27、根据权利要求 26 所述的方法，进一步包括使第四混合物以第四预定捕获速度穿过捕获区，在该速度下通过磁场力大部分的磁性颗粒在捕获区被捕获并由此从第三分散介质中去除，从而形成第四磁性颗粒隔离体。

28、根据权利要求 27 所述的方法，其中该流动通道进一步包括一个一个检测区，且其中定位一个检测器以检测该检测区中的流体的物理或化学性能；且进一步包括在使第四混合物穿过捕获区之后，检测从以下由第三分散介质和第四磁性颗粒隔离体构成的组中选择的构件的物理或化学性能。

29、根据权利要求 28 所述的方法，其中该第二分散介质包括分析试剂。

30、根据权利要求 29 所述的方法，其中该分析试剂为着色剂；且

其中该检测器为光学检测器。

31、根据权利要求 1 所述的方法，其中该磁场在捕获区中具有从约 0.1 至约 2 千高斯/厘米的磁场梯度。

32、根据权利要求 1 所述的方法，其中该流动通道具有从约 0.01 至约 50 微升的体积。

33、根据权利要求 1 所述的方法，其中该流动通道具有从约 0.001 至约 5 毫米的平均直径。

34、根据权利要求 1 所述的方法，其中该第一预定捕获速度大小为约 1.0-约 13 毫米/秒。

35、根据权利要求 1 所述的方法，其中该第一预定分散速度大小为约 250-约 2500 毫米/秒。

36、根据权利要求 1 所述的方法，其中该流动通道为微通道。

37、根据权利要求 1 所述的方法，其中所述第一混合物的穿过包括沿第一方向穿过；其中所述第一分散介质的穿过包括沿与第一方向相反的第二方向穿过；且其中所述第二混合物的穿过包括沿第一方向穿过。

38、根据权利要求 1 所述的方法，其中该流量控制器包括:

包括一个一级端口和多个二级端口的多端口选择阀，其中第一个二级端口与流体流动通道的入口流体相连;

具有一个近端和一个远端的保持线圈，其中该远端与该选择阀的一级端口流体相连;

具有与该保持线圈的近端流体相连的第一端口；与该变速可倒转泵流体相连的第二端口；和与洗液组分源流体相连的第三端口的三向阀。

39、根据权利要求 38 所述的方法，其中该变速可倒转泵为步进电机驱动的注射泵。

40、根据权利要求 38 所述的方法，其中该多端口选择阀、三向阀和泵由预编程序的计算机进行控制。

41、根据权利要求 1 所述的方法，其中在捕获区中的该流动通道基本上没有固定的可磁化的固体基体结构。

42、一种设备，包括:

流体流动通道，该流体流动通道具有第一和第二端以及介于第一

和第二端之间的捕获区；

流体流动控制器，其有效地，可变化地在流动通道上施加正的或负的压力，以引起受控制的流体沿第一或第二方向以预定的速度流经流体流动通道；

产生固定磁场的磁场源，该源相对于流体流动通道固定，由此该场与流体流动通道在捕获区相交；以及

用于检测流动通道内的流体的物理或化学性能的检测器。

43、根据权利要求 42 所述的设备，其中该检测器为光学检测器。

44、根据权利要求 42 所述的设备，其中该固定磁场源包括永磁体。

45、根据权利要求 42 所述的设备，其中该固定磁场源包括电磁体。

46、根据权利要求 42 所述的设备，其中该磁场具有从约 0.1 至约 2 千高斯/厘米的场强。

47、根据权利要求 42 所述的设备，其中在捕获/分散区域内的该流动通道具有从约 1 至约 50 微升的体积。

48、根据权利要求 42 所述的设备，其中该流动通道具有从约 0.1 至约 5 毫米的平均直径。

49、根据权利要求 42 所述的设备，其中该流体流量控制器有效地在流体流动通道中任一方向上提供最高达约 2500 毫米/秒的流速。

50、根据权利要求 42 所述的设备，其中该控制器包括一个与流体流动通道流体连通的可倒转泵。

51、根据权利要求 42 所述的设备，其中该流量控制器包括：

包括一个一级端口和多个二级端口的多端口选择阀，其中第一个二级端口与流体流动通道的入口流体相连；

具有一个近端和一个远端的保持线圈，其中该远端与该选择阀的主端口流体相连；

具有与该保持线圈的近端流体相连的第一端口；与该变速可倒转泵流体相连的第二端口；和与洗液组分源流体相连的第三端口的三向阀。

52、根据权利要求 42 所述的设备，其中该变速可倒转泵为步进电机驱动的注射泵。

53、根据权利要求 42 所述的设备，其中该多端口选择阀、三向阀和泵由预编程序的计算机进行控制。

54、根据权利要求 42 所述的设备，其中在捕获区中的该流动通道基本上没有固定的可磁化的固体基体结构。

55、一种设备，包括：

一条流体流动通道，该流体流动通道具有第一和第二端以及介于第一和第二端之间的捕获区；

一个流体流动控制器，其有效地，可变化地在流动通道上施加正的或负的压力，以引起受控制的流体沿第一或第二方向以预定的速度流经流体流动通道；以及

多个磁场源，每一磁场源产生固定磁场，且每一磁场源相对于流体流动通道以固定关系定位，由此每一磁场与流体流动通道在捕获区相交；

其中每一捕获区通过一个基本没有磁场的区域与一个或多个其它捕获区分离开。

56、一种设备，包括：

具有第一和第二端以及介于第一和第二端之间的捕获区的流体流动通道装置；

用于在流体流动通道中提供包括有分散在载体介质中的多个固体磁性颗粒的第一混合物的装置；

用于可变化地在流体流动通道装置上施加正的或负的压力，以引起受控制的流体沿第一或第二方向以预定的速度流经流体流动通道的装置；以及

用于提供与流体流动通道在捕获区相交的固定磁场的装置。

57、一种方法包括：

使包括有分散在载体介质中的多个固体磁性颗粒的混合物以第一预定捕获速度穿过延伸通过固定磁场的管道，由此磁性颗粒在该磁场作用下被捕获并由此从载体介质中分离，从而形成磁性颗粒隔离体；

使分散介质进入该管道并与磁性颗粒隔离体相接触；以及

用脉冲使分散介质以第一预定分散速度通过该管道，有效地在磁场中移动磁性颗粒以及在分散介质中悬浮磁性颗粒。

58、一种方法包括：

使包括有分散在载体介质中的多个固体磁性颗粒的第一混合物以第一预定捕获速度穿过延伸通过固定磁场的管道，由此磁性颗粒在该

磁场作用下被捕获并由此从载体介质中分离，从而形成磁性颗粒隔离体；

通过用脉冲使分散介质以第一预定分散速度通过该管道，从磁场中释放磁性颗粒隔离体，以有效地在磁场中移动磁性颗粒以及在分散介质中悬浮磁性颗粒，以提供第二混合物；以及

通过使第二混合物沿与所述第一混合物运动相反的方向以第二预定捕获速度通过该磁场，再捕获磁性颗粒，由此磁性颗粒在该磁场作用下被捕获并由此从载体介质中分离，从而形成磁性颗粒隔离体。

59、根据权利要求 58 所述的方法，其中该第一混合物具有与第二混合物不同的成分。

流量控制的磁性颗粒处理

本发明根据美国能源部提供的合同号 DE-AC0676RLO1830 在政府支持下进行。政府在本发明中拥有某些权利。

技术领域

本发明涉及用于磁响应颗粒（在此被称为“磁性颗粒”）的磁性收集系统，以及其后的颗粒受控分散。特别是，本发明涉及通过目标物质与磁性颗粒的选择性交互作用，对目标物质例如化学物质和/或生物物质如生物化学制品、细胞、细胞成分、细菌、病毒、毒素、核酸、荷尔蒙、蛋白质、受体－配体的络合物、其它络合分子，或以上组合进行检测、隔离、分离和/或处理。所用的磁性颗粒能够从介质中分离，并随后能再悬浮以便进一步分析、隔离或用于其它用途。

背景技术

作为本发明的背景，涉及在流体介质中如体液、培养液或环境样本中识别、分离和/或处理目标实体如细胞或微生物的许多技术已为人所知并被用于现有工艺。人们已经注意到：这些技术常常需要多个清洗和粘合步骤。在许多这样的技术中由繁重的手工吸液和移注步骤或通过使用大型的、非现场便携式的自动机器人系统来实施这些步骤。这样的识别、分离和/或处理技术可能会涉及如分析样本以确定是否存在具体的污染物、毒素或其它物质，并且如果存在的话，确定存在的量；从样本中提取具体的目标物质，如核酸片段、蛋白质、酶或其它类似物质以便随后的处理或使用；或用于其它类似目的。人们已经注意到：为了提供精确且有用的信息或为了在隔离技术中提供合适的试样，这种技术常常必须具有显著的灵敏度，尤其是当目标物质以痕量存在时。

涉及分离、隔离或其它处理痕量有机分子的一种技术的实例为用抗体作为分析试剂的免疫测定技术。人们已经了解免疫测定的原理。抗体通过遵循特定的交互作用识别具体的分析物。对于低分子量的分析物，如药物或代谢物，习惯上进行竞争免疫测定。典型地，允许固定的、有限量的特定抗体与已知浓度的标记分析物和可能含有一些未知浓度的那种分析物的样本一起培养。与抗体相关的标记的量与测试

样品中的分析物的量成反比。

尽管有许多免疫测定技术，只有少数被广泛应用。其中有间接技术，其通过与一种免疫试剂共轭的标记物种来测量分析物。为了定量，习惯上进行结合/自由分离，使得能够检测到与抗体相关的被标记的分析物。如果免疫反应的成分之一被固定在固相上（非均匀化验），实验方法被简化。涉及分析物与酶标记分析物和抗体的竞争结合的非均匀免疫测定被称为酶联免疫吸附化验（ELISA）。

对于具有至少两种可区别的抗原定子的分析物，一种更简单更精确的方法就是进行夹心免疫测定，其用针对一种抗原位点的第一抗体作为捕获抗体，并用针对另一特征定子的第二抗体作为信号产生抗体。因此，如果从溶液中分离捕获抗体或将其结合在某种固体载体上，能够将信号抗体结合在固体载体上或从溶液中分离的唯一方法就是通过分析物。夹心测试的优点为：（1）信号与分析物曲线的低端的分析物浓度直接成比例；（2）在低浓度端可以获得极高的灵敏度；（3）夹心化验是“过量”化验，因为捕获抗体和标记抗体的量通常都超过了分析物的量，因此误差主要与样品输入有关；以及（4）可能进行宽范围（范围宽至 10^4～10^5）的动态分析物检测。夹心化验技术，与竞争化验相似，采用了宽范围的系统进行结合/自由分离。通常在这样的化验中，所关心的分析物的抗体以很高的精度放置在固体载体上，以允许分析物在结合抗体上发生结合。接着，加入溶液，其使未结合的和非特定结合的分析物从结合区离开。然后加入第二被标记的抗体，加入溶液以清洗未结合的第二抗体。如果第二抗体是用酶标记的，则加入酶基体以产生可检测信号（如变色、荧光、导电率改变），其与特定结合的酶（因此和分析物）的量成比例。

用特定的固定在固相上的结合物质进行结合/自由分离有许多途径，如利用吸附在试管内侧或与试管内侧共价相连的抗体（覆盖试管化验），或者，更新的，利用固定在可移动的固相上如可浸没在液体中并随后能被抽出的伸长结构，或是小珠，其能够用过滤器或磁性进行离心或分离。典型地，分离系统应该具有这样的特点：即可以轻松进行分离，可以轻松去除过量试剂，以及非特定结合分析物能够被清洗，同时不能清洗掉固定的抗体及其特定结合的标记分析物。

通过不同的技术，可以实现如上所述的化验中的信号或辐射能响

应的检测。实例之一就是荧光标记的抗体、分析物或其它可能与分析物有关的小分子的荧光检测。如果系统成分不受被检测的放射性辐射的影响，还可以进行放射性检测。脂质体中可能含有的与抗体或分析物相关的染料的比色检测也是可能的。化学发光的、生物发光的、电化学发光的或酶的检测也是可能的，只要在结合/自由分离之后可以获得检测反应所用的基体即可。因此，有多种方法可以获得可读信号或其它辐射能响应。

使用固定结合物质的一大问题就是化学选择表面的寿命有限，特别是那些包括生物分子（通常被称为“生物传感器”）的表面。室温下水溶液中的许多生物分子会随时间化学降解，通常只有几小时到约一周的寿命。因此，将生物传感器表面连续长时间地浸泡在水溶液中使用是不可行的。溶液的成分也会影响生物传感器的寿命。生物分子的结构和功能以及生物材料对于环境条件如盐浓度、pH 和温度，敏感。溶液成分和温度的改变能够不可逆地改变蛋白质的本性，使得它们不再结合特定的配合体。在传感器系统中使用整个细胞也面临着问题，因为细胞需要正确混合代谢物以保持其能生存，并且溶液成分和溶液的流速也影响活细胞的生长速度。许多生物特殊交互作用的专一性以及因此不可逆的特性也限制了生物传感表面的寿命。选择性交互作用，如抗体-抗原交互作用在几分钟的时间内基本不可逆。可能需要使用苛刻的试剂来去除结合抗原（和非特定结合分子）；但是，这降低了抗体自身随后的结合活性，使得再生的传感表面不如新鲜传感表面有效，消极影响了化验精度和可靠性。而且，由于样本基体中的材料非特定结合在生物传感器表面上导致传感器表面“结垢”，经常使得生物传感器的寿命有限。

这些问题导致了生物传感中可再生表面的大量使用，其中化学选择性的化学变化发生在小颗粒的表面。衍生颗粒的新鲜等分试样因此能用于每次分析。在这样的分析之后，衍生颗粒可以从系统中冲洗掉，并用新的颗粒进行随后的分析。

当衍生颗粒是磁性颗粒时，用磁性分离或较大梯度磁性分离（HGMS）可以在分析过程中将颗粒从介质中隔离。在本文中，术语“磁性的”是指颗粒的一种性能，通过给它施加一个磁场可以在其上施加一个力。在磁性分离中，相对较大尺寸的颗粒（如直径大约为 0.5 微

米或更大的颗粒）被捕获或分离，而在较大梯度磁性分离中，较小的颗粒如胶体磁性颗粒，被分离。

在过去的几年间，亚毫米级的自动流动分析器和化学检测器芯片已经达到了商业化需要的技术水平。为了获得更紧凑的诊断分析器以用于自动免疫测定、DNA 净化和放大、细胞分离、环境污染物检测和其它类似用途的，研发还在继续。

根据这一背景，有进一步研发用于磁性颗粒的磁性选择以及随后受控制的颗粒再悬浮的系统的需要。特别是，需要进一步研发通过目标物质与磁性颗粒的选择性交互作用进行特殊检测、隔离、分离和/或处理目标物质的系统，所用的磁性颗粒能够从介质中分离，并随后能够再悬浮以便进一步分析、隔离或用于其它用途。本发明即针对这些需求。

发明内容

本发明提供了在一种或多种流体介质中进行磁性颗粒分离和再悬浮的新系统。根据本发明的一个方面，通过控制经过捕获区的流体流动的速度来控制磁性颗粒的捕获和释放，该捕获区穿过一个固定的磁场。以低流速穿过捕获区时，可重复并定量地捕获颗粒。以高流速穿过捕获区时，可以将颗粒从磁场中转移。

本发明提供了这样的系统，其通过在目标物质结合在磁性颗粒上的过程中和之后提供处理磁性颗粒的方法，促进了目标物质的隔离。如果需要，随后可用一种或多种检测或分析系统如发光检测器、分光光度分析、荧光计、质谱仪、流动血细胞计数器、血液分析器，或其它细胞计数或分析装置测试目标物质。

本文所用的术语“目标物质”指的是生物学、医学或环境学所关心的许多不同的物质，他们可以单独或分组测量。实例包括：细胞、真核的（例如白血球、红血球或真菌类）和原核的（例如细菌、原生动物或支原体）、病毒、细胞成分、分子（例如蛋白质）、大分子（例如核酸－RNA,DNA）及化学制品（例如杀虫剂、除草剂、炸药）。与细胞相关的目标物质包括，例如细胞膜、细胞质或细胞核的成分。在这些与细胞相关的结构中有：膜结合蛋白质或醣蛋白，包括主细胞或病毒源的细胞表面的抗原，组织相容性抗原，或膜受体。这些目标物质可以作为离散实体或以复合体或集合体的形式被结合。通过本发明的

方法可以实现这样的分离，其依赖于结合物质与至少一种特征目标物质或所关心的分析物的交互作用。

目标物质与磁性颗粒的结合由磁性颗粒的表面化学性质控制。磁性颗粒的化学性质可用于通过非特定的交互作用如静电交互作用，范德华交互作用，偶极子-偶极子交互作用和/或氢键交互作用，结合目标物质。例如，当需要隔离样品中所有的或几乎所有的带正电的蛋白质时，根据本发明，利用带负电的磁性小珠即可实现。相似地，带正电的磁性小珠可用于结合样品中所有的或几乎所有的 DNA（其带负电）。另一种选择是，磁性颗粒可以经过化学改性以包括特定的结合物质，其与目标物质发生选择性的交互作用。根据本发明，可用于结合物质的代表性实例包括抗原、抗体、蛋白质受体、配位体、低聚核苷酸、链式抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、生物素和外源凝集素。用于与目标物质发生选择性交互作用的一类特定的结合物质为能够免疫具体识别抗原的抗体类。本文所用术语“抗体”包括免疫球蛋白、单细胞系的或多细胞系的以及免疫反应的免疫球蛋白片段。因此，特征目标物质及其特定结合物质为：受体—荷尔蒙，受体—配合体、促效药—拮抗剂、RNA 或 DNA 低聚体—互补序列、鼠免疫免疫球蛋白的局部受体—蛋白质 A，抗生物素蛋白—生物素、以及病毒-受体。对于本领域的技术人员，用本发明的方法可以确定其它的特定结合对组合是显而易见的。

当用于免疫测定时，本发明提供了很高的灵敏度，但系统收集分析物的范围还相对较小。用少量来实现相对低成本的分析物的测试，对于所有需要的结合、清洗以及混合步骤而言，收集和再悬浮的速度和重现性是重要特征。当用于免疫测定或其它这样的分析时，本发明有可能使各种样品的量显著减少，从而获得目标实体的更高的浓度，因此允许用更短的分析时间。实现这一点无需移动、倒转或减小用于捕获磁性颗粒的磁场。

因此，根据本发明的一方面，提供了从含有磁性颗粒的非磁性的载体介质中分离磁性颗粒并随后使分离出的磁性颗粒在合适的分散介质中再悬浮的方法。载体介质和分散介质可以相同或不同。该方法最初涉及提供流体流动通道，其延伸穿过磁场源，并将载体介质/磁性颗粒混合物引入流体流动通道。一个磁场与流体流动通道相交，并在混

合物流经捕获区时，以预定的捕获速度捕获流体流动通道中的磁性颗粒。只有当相同或不同的介质以更高的速度流经捕获区、有效地从捕获区移动颗粒时，磁性颗粒才能被释放。

根据本发明的方法包括：（1）提供流体流动通道，其具有第一和第二端和流体流动控制器，该控制器能有效地、可变化地在流动通道上施加正的或负的压力，以引起受控制的流体沿第一或第二方向以预定的速度流经流体流动通道；以及介于第一和第二端之间的捕获区，其中一个固定的磁场与流体流动通道在捕获区相交；（2）在流体流动通道内提供了第一混合物，其包括多个分散在载体介质中的固体磁性颗粒；（3）第一混合物以第一预定捕获速度穿过捕获区，由此通过磁场力使大部分的磁性颗粒在捕获区被捕获并从载体介质中分离，从而形成第一磁性颗粒隔离体；（4）用第一分散介质灌注第一磁性颗粒隔离体；以及（5）用脉冲使第一分散介质以第一预定分散速度经过捕获区，有效地将第一磁性颗粒隔离体从捕获区移走，从磁场移走磁性颗粒以及在第一分散介质中悬浮磁性颗粒以提供第二混合物。如果需要，可以多次捕获和释放磁性颗粒。该步骤能够被用于加强混合，并且因此提高在少量流体中的分子捕获效率。而且，相同的流体可被用作载体介质和分散介质。因此，第一和第二混合物可能相同。在捕获和释放操作过程中，通过倒转流体流经捕获区的方向，可以在相同量的流体中发生捕获和释放。

另一种选择是，捕获和释放可以在流经捕获区的新鲜流体中进行。

根据本发明的另一方面，提供了一种用于从含有磁性颗粒的非磁性的流体中分离磁性颗粒的设备。该设备包括：（1）流体流动通道，该流体流动通道具有第一和第二端以及介于第一和第二端之间的捕获区；（2）流体流动控制器，其有效地，可变化地在流动通道上施加正的或负的压力，以引起受控制的流体沿第一或第二方向以预定的速度流经流体流动通道；（3）产生固定磁场的磁场源，该源相对于流体流动通道固定，由此该场与流体流动通道在捕获区相交；以及（4）用于检测流动通道内的流体的物理或化学性能的检测器。

本发明的目的就是要提供用于捕获和再悬浮磁性颗粒的新系统和方法，其为现有工艺提供了可选择的系统和方法。

本发明的其它的形式、实施方案、目的、优点、好处、方面和特征将结合附图作详细的描述。

附图说明

虽然在权利要求中特别指出了本发明的特点特征，但是，结合以下构成本发明一部分的附图可更好地理解本发明自身，及其制造和使用方法。其中：

图 1 是根据本发明的系统的第一实施方案的示意图；

图 2 是根据本发明的系统的第二实施方案示意图；

图 3 是根据本发明的流量控制器的一个实施方案的示意图；

图 4 是根据本发明的流量控制器的另一实施方案的示意图；

图 5 是根据本发明的系统的第三实施方案的示意图；

图 6 是根据本发明的系统的第四实施方案的示意图；

图 7 是根据本发明的系统的第五实施方案的示意图；

图 8 是根据本发明的系统的第六实施方案的示意图；

图 9 是根据本发明的系统的第七实施方案的示意图；

图 10 是如实施例中所述的 TNT 的多个标准浓度峰的曲线图；

图 11 是如实施例中所述的，在时间长度为 43 天中单独 8 天的 118 半自动方法试验结果，峰面积与 TNT 的标准浓度的关系曲线；

图 12 是如实施例中所述的自动校准数据的曲线图。

具体实施方式

为了增进对本发明原理的理解，现在引用优选实施方案并使用专用语言对优选实施方案进行说明。然而，应理解由此不意味着限制本发明的范围，如对本发明的改动和进一步修改，在此所述的本发明原理的其它应用被认为对于与本发明相关的本领域普通技术人员来说是正常的。

本发明围绕通过控制通过收集区的流体流动速度，用于从流体介质中分离出磁性颗粒且在相同或不同的介质中使颗粒一次或多次再悬浮的流体流动系统。根据本发明，磁场在收集区内截取（截断、相交）流体流动通道以实现分离。在某些优选实施方案中的磁场为固定磁场，该术语在此指的是在收集和再悬浮磁性颗粒的过程中基本上保持不变的磁场。在某些实施方案中，该固定磁场被设置成永磁体与流体流动通道呈固定关系定位。例如通过将永磁体直接固定在限定流体流

动通道的管路上，或另一种选择是，通过将永磁体固定在不相对于流体流动通道产生移动的构件上可实现这种关系。在其它实施方案中，该固定磁场由与流体流动通道呈固定关系定位的，且被构造以在发明系统中收集和再悬浮磁性颗粒过程中产生具有相当恒定场强的磁场的电磁体设置。

对于实施不仅需要从介质中分离磁性颗粒，而且还需要在一个或更多连续步骤中在相同或不同介质中使颗粒再悬浮的方法，本发明的系统有广泛的应用。通过控制选择进入流体流动通道的流体以及控制流体流动的速度和方向，在应用于大量不同的化验和其它需要基体与不同的流体按照预定的顺序接触的技术中，发明的系统具有优势。本发明尤其适于和自动流体流动系统如，但并不局限于被称为连续注入分析（SIA）的方法，一起使用。通过使发明的流体流动分离系统自动化，利用相对较少的试剂和其它材料即可快速且可重复地获得精确测量。

参见图 1，系统 1 包括具有一个第一端 20 和一个第二端 30 的流体流动通道 10 和流体流量控制器 50。系统 1 还包括在第一端 20 和第二端 30 之间的收集区 40。收集区 40 与流动通道 10 的区别在于磁场在收集区 40 内与流动通道 10 相交。通过定位磁场源 42，使其与流动通道 10 呈固定关系而设置磁场。控制器 50 有效地在流动通道上施加可变正压或负压，以使受控流体流以变化的速度在第一或第二方向通过流体流动通道 10。在某些实施方案中的控制器 50 还被构造以从不同源处吸出介质进入流动通道 10。流动通道 10 可由如在实施例中的实施方案中所述的一根管限定，或另一种选择是可由微孔道限定。微孔道的内径通常小于约 100 微米，例如可通过机加工、微型装配或现有的模制技术成形。用于成形微孔道的方法和技术例如，如美国专利 Nos. 5611214、5811062、6129973、6192596 和 6200536 所述。

按照使用系统 1 的方式，在流动通道中设置第一混合物，该混合物包括分散在载体介质中的多个固体磁性颗粒。该第一混合物，也可被称作悬浮体或浆料，可以多种方式被设置在流动通道中，在下文中对其非限制性的实施例进行详细说明。一旦该第一混合物被定位在流体流动通道 10 之内，流量控制器 50 在该混合物上施加正压或负压，以该混合物以预定速度（在此被称为“收集速度”）通过收集区 40，

由此磁性颗粒的主要部分受到磁场力的作用被截留在收集区 40 内，并由此从载体介质中分离出以形成第一磁性颗粒分离物。术语“主要部分”在此指的是在可接受的精度范围内在给定的分离方法中获得所需结果的必要部分。例如，当发明系统被用于进行酶联免疫吸附化验时，在下文中对其实施例进行更加详细地说明，当该混合物通过收集区以确保化验结果在可接受的误差范围内时，通过磁场力收集的磁性颗粒最好至少约占 90％重量百分比，至少约 95％重量百分比更佳。应理解当发明系统被用在不同类型的方法中时，最好有不同范围的收集效率。

在使用系统 1 的方法中，在流动通道内提供第一混合物，该混合物包括分散在载体介质中的多个固体磁性颗粒。该第一混合物，其还能被称为悬浮液或浆体，可以许多不同的方式在流动通道内提供，下文中更详细地列出了其非限制性的实例。一旦第一混合物放置在流体流动通道 10 内，流动控制器 50 在该混合物上施加一个正的或负的压力，以引起该混合物以预定的速度（本文称为“捕获速度”）穿过捕获区 40，由此磁性颗粒的大部分被收集在捕获区 40 内，从而形成第一磁性颗粒隔离群。本文所用术语“大部分”指的是在可接受的精度范围内，在给定的分离方法中获得所需结果所必需的部分。例如，当发明的系统被用于进行 ELISA 化验，下文中列出了更详细的实施例，更适宜地，至少磁性颗粒的重量的 90%，更适宜的，至少磁性颗粒的重量的 95%在混合物穿过捕获区时被磁力捕获，以确保化验结果在可接受的误差范围以内。应该了解的是：当发明的系统被用于不同类型的方法时，捕获效率可以有首选的不同的范围。

预定的捕获速度是足够低的流动速度，使得作用在混合物中的颗粒上的磁性吸引力超过了由载体介质的移动所赋予的粘性力和重力。在这样的流动速度，当载流体离开捕获区时，那些颗粒在捕获区被约束或捕获。例如，在下文中所描述的一个系统中，其中流体流动通道具有大约 0.02 英寸的内径（～0.5 毫米），而颗粒直径大约为 0.5 微米，该实施例的首选捕获速度小于或等于大约 13 毫米/秒（2.5μl/秒）。更适宜地，该实施例的捕获速度介于 1.0 至 13 毫米/秒。本领域的普通技术人员已经意识到首选速度会根据给定系统的不同特征如颗粒尺寸、颗粒磁敏感性、磁场强度、磁场源的位置以及流动通道结

构（直径、壁厚、管道系统或路径材料等等）而变化，并且如果有必要，能够对捕获流动速度进行调整以获得适宜的颗粒捕获度。

一旦磁性颗粒隔离群被捕获，分散介质被引入捕获区 40 并且磁性颗粒隔离群被分散介质完全覆盖。灌注之后，分散介质以预定的速度（本文称为“分散速度”）脉动经过捕获区 40，该速度能有效地使磁性颗粒隔离群从捕获区移开；将磁性颗粒从磁场移走，并使磁性颗粒悬浮在分散介质中以提供第二混合物。在预定的分散流动速度，经过流体流动通道的更高速度的流动允许流体的粘性力从捕获区移开被捕获的颗粒。某个实施方案中的发明的系统甚至能够从载流体中非破坏性地分离易碎的颗粒，如完整的血细胞。应该了解的是：在不同的实施方案中，该脉动可以从捕获区在任一方向内移动磁性颗粒。

例如，如下文所详细描述的，在一个具有直径大约为 0.02 英寸的流体流动通道的系统中，首选的脉动流动速度介于 250 至 2500 毫米/秒（在所述系统中，200μl/s=1018mm/s，500μl/s=2500mm/s，50μl/s=250mm/s）之间。更适宜地，这样的直径的流动通道内的脉动速度介于大约 750 至 1250mm/s 之间。本领域的普通技术人员已经意识到首选速度会根据给定系统的其它特征而变化，并且能够对分散速度进行调整以获得适宜的颗粒分散度。

在还需要将磁性颗粒从分散介质中分离的地方，第二混合物接着以预定的捕获速度穿过捕获区以再次在捕获区内约束大部分的磁性颗粒，并由此从第一分散介质中分开以形成第二磁性颗粒隔离群。应该了解的是：在只有一个捕获区的流动通道内，使第二混合物穿过捕获区需要在流体流动通道内的流体流动方向逆转。这样的流体流动转向通过流动控制器 50 实现，其在混合物上施加反向的压力以引起流体以预定的速度沿相反的方向流经流动通道。

通过由捕获区 40 内的固定磁场控制流体流动速度，如上所述，本发明提供了这样的系统，其不同于现有工艺的分离/再悬浮之处在于：例如通过物理移动永磁体离开流动通路，或者，当用电磁体时，通过关闭电磁体或实现磁场波动或转向，消除移动磁场的需要。而且，由于发明的系统中精确控制的流体流动，用相当少量的试剂、样品，选择性表面及其它相似物质即可获得精确的结果。在某个优选实施方案中，捕获区中的流体流动通道基本上没有被台架、棒或其它可磁化的

基体结构中断，并且可以只是被捕获在流动通道管道侧。在另一优选实施方案中，铁磁性结构被放置在流动通道内以产生较大的场梯度。这样的结构对于捕获如纳米颗粒常常是有用的。

载流体和磁性颗粒的成分可以根据所实施的方法的细节变化。例如，可以获得许多商业酶联免疫吸附试验箱，其包括具有选择化学性质的磁性颗粒（固定的抗体），以及其它用于特定化验的试剂。因此，在一个实施方案中，载流体和磁性颗粒包括酶联免疫吸附化验材料。如一个代表性的实施例，由战略诊断（STRATEGIC DIAGNOSTICS）（纽约、特拉华州）销售的 TNT RaPID 化验™工具箱，其包括 TNT－辣根过氧化酶（TNT-HRP），一种彩色的生长溶液（3,3',5,5'-N 四甲联苯胺和 H2O2），以及不规则的直径为 0.5 微米的磁性颗粒的悬浮液，其带有固定的抗 TNT 抗体。正如另一实施例，可以获得这样的颗粒，其与特定的？捕获探针共价相连。这样的颗粒能被用于生物样品的核酸碎片的选择性净化。本文所用术语“核酸”指的是 DNA 核苷酸和 RNA 核苷酸，以及任何含有 DNA 核苷酸或 RNA 核苷酸的长聚合体。

尽管上述的载体介质可以是仅仅为输送磁性颗粒到达捕获区而选择的惰性介质，在本发明的某些实施方案中，载体介质包括测试样品，即，其中特定分析物的存在和/或数量需要确定的样品。因此，颗粒和载体介质的最初接触启动了培育期，其只有当磁性颗粒如上所述从载体介质中分离时才终止。当然，在某些化验中，如竞争免疫测定，载体介质还可以包括一种或更多种另外的试剂。

本领域的普通技术人员容易理解：为了提供可接受的结果，许多化学和生物化验需要一个或更多的清洗步骤，其中未反应的试剂和/或未与磁性颗粒结合的目标物质被从颗粒上清洗掉。因此，在上述方法中，分散介质可以是清洗液。还要了解的是：常常希望进行多次清洗步骤以提高测试或化验的精确性。因此，在本发明的某些实施方案中，磁性颗粒的再悬浮和再捕获可以如上文所述进行多次。

许多这样的测试或化验还需要特定试剂中（本文称为“分析试剂”）的隔离群的悬浮液。例如，在某种酶联免疫测定方法中，被隔离的物质与一种物质接触或悬浮在该物质中，该物质与相联的酶作用时发生变色。因此，某个发明的方法包括用含有分析试剂的分散介质灌注磁性颗粒隔离群，使该介质脉动经过捕获区以便将磁性颗粒隔离

群从捕获区移开，将磁性颗粒从磁场移开，使磁性颗粒悬浮在含有分析试剂的介质中。在悬浮液被允许培养预定的时间周期后，该悬浮液随后穿过捕获区以便从悬浮液中再次捕获磁性颗粒，使得含有分析试剂的介质或磁性颗粒隔离群自身的一种或更多种的物理和/或化学性能能够被测量。

参看图 2，示出了流体流动系统 2，其包括检测区 60 和检测器 62。检测器 62 与流体流动通道进行流体交换或构成流体流动通道的一部分，并被安装以检测检测区中的流体的物理或化学性能。检测区 60 可以从捕获区 40 分离（如图 2 所示），或者检测和捕获区可以部分或完全交叠。本发明希望在本发明的不同应用中使用许多不同的检测器，包括但不局限于光学检测器、pH 检测器、辐射检测器、粘性检测器及其它检测器。

依据本发明所用的检测器类型可以根据所进行的分析的特定类型变化，并且本领域的普通技术人员了解依据本发明选择和设定适宜的检测器备用。例如，一种化验依靠分析试剂颜色的变化来辨认分析物并量化分析物。对于这样的化验，检测器可以是分光计或其它光学检测器，其被设置为传递特定波长的光或其它电磁辐射经过溶液以测量颜色的变化程度。例如，下文中所详细介绍的检测器包括一个 U 形的透射流槽，其由氟化乙丙烯橡胶（McMaster-Carr，洛山矶，加州）加工而成并被用于在被捕获的磁性颗粒的下游进行吸光率测量。该光通道为 1 厘米长，并用海洋光学（Dunedin，佛罗里达）纤维光纤分光光度计和钨卤灯进行吸光率测量。用 400 微米的石英纤维进行检测。图 8 示出了包括永磁体和光学检测器的实施方案。

对于需要附加灵敏度的化验，人们可能希望用其它的检测方案如化学发光或脂质体基的免疫测定改进化验，其使灵敏度提高了几个数量级。可以使用宽范围的标记（如放射性同位素、生色或发光物质等），本领域的普通技术人员能够为许多这种化验选择并制成适宜的检测器。

依据本发明流体流动控制器 50 可以有许多不同的结构。在一实施方案中，如图 3 所示，流动控制器 50 包括：多端口选择阀 51；保持线圈 54 和变速可倒转泵。在该实施方案中，多端口选择阀 51 包括第一端口 52 和多个第二端口 53。第二端口之一与流体流动通道 10 流体相

连，并且第一端口 52 与保持线圈 54 流体相连。其它第二端口 53 可选择地分别与用于特定分离/再悬浮方法的不同流体源流体相连。其它端口还能用于将空气吸入保持线圈或从系统驱散废物，如下文所详细描述的。保持线圈 54 的近端 55 与变速可倒转泵 58 流体相连。在一实施方案中，泵 58 为包括分档电动机的清洗泵，其在相关领域已广为人知。当然本发明并不局限于这种泵，应该了解的是：本领域的普通技术人员可能用其它的泵设计。保持线圈 54 被用作保持样品、提取材料或试剂的贮藏处。在连续的注入方法的每个步骤中，液体或浆体通过选择阀端口被吸入保持线圈，接着该阀被转向流动通道端口，以及线圈中的物质被注入流动通道。空气分离器防止珠浆体、样品及其它溶液在保持线圈内混合或分散。

在另一实施方案中，如图 4 至 6 所示，流动控制器 50 还包括位于保持线圈和变速可倒转泵之间的多端口阀 57，其与保持线圈和变速可倒转泵流体相连。在该实施方案中，保持线圈 54 的近端 55 与阀的第一端口相连，而阀的第二端口与变速可倒转泵相连。阀的第三端口能够方便地与清洗液源 59 或完成特定化验后用于冲洗和/或清洁流体流动通道的其它试剂相连。因此，在该实施方案中，在特定系列的分离/再悬浮后，阀 57 转向与泵 58 和源 59 流体相连，并且泵 58 从源 59 浆流体吸入贮藏处 59a。吸入需要量的流体后，阀 57 再次转向与泵 58 和保持线圈 54 流体相连，并且泵 58 将流体推过保持线圈、选择阀 51 和流动通道 10，从而从中冲洗掉任何残留的磁性颗粒和/或试剂。

在采用该系统的进行分离/再悬浮方法的一种方式中，第二端口 53 与载体介质中的磁性颗粒源流体相连。选择阀 51 被安装以便在第一端口 52 和颗粒/介质混合源之间提供流体交换，泵 58 施加负压力，从而将混合物吸入保持线圈 54。选择阀 51 接着移动以便在保持线圈 54 和流体流动通道 10 之间提供流体交换。在进一步培育所需的时间之后(如果在特定方法中必须有另外的时间)，泵 58 施加正压力，从而将混合物推过选择阀 51，进入流体流槽 10 并穿过捕获区 40。穿过捕获区 40 的流动速度足够慢，以允许混合物中磁性颗粒的大部分被磁场力捕获在捕获区 40。当磁性颗粒是衍生的磁性颗粒并且载体介质包括待测试特定分析物的存在和量的样品，要了解的是：颗粒必需在仔细控制的的一段时间内与介质保持接触以提供可接受的化验结果。因此，在颗

粒和样品之间的接触要保持特定长度的时间的方法中，从最初接触的时间开始定时顺序是很重要的。

在自动化的系统中，载体介质是惰性载体，并且磁性颗粒保持与测试样品分离直到在保持线圈或流体流槽内发生混合。在该实施方案中，如果需要，测试样品和其它试剂被分开放置或放置在预先混合的溶液中，与另一个第二端口 53 中的一个或更多个进行流体交换。

在磁性颗粒和测试样品的混合要发生在保持线圈中的情况下，通过选择阀 51 和泵 58 的协同运动，磁性颗粒悬浮液、测试样品和其它试剂，分别或以某种预先混合组合的形式被交替地吸入保持线圈。随着一定数量的各种物质被交替吸入保持线圈（以形成“堆垛区”），这些物质被混合，从而开始了保持线圈的“堆垛”过程中的培育期。在颗粒/样品/试剂被堆积在保持线圈内（在这种情况下没有空气分离）之后，选择性地，在进一步培育一段预期的时间之后（如果在特定的分析中需要另外的时间），选择阀 51 移动以在保持线圈 54 和流动通道 10 之间提供流体交换，并且泵在流体上施加反向压力以便使流体经过选择阀 51，进入流动通道 10，并以上述的预定捕获速度经过捕获区，以便将磁性颗粒从其它流体中分离。

在混合发生在流槽中的情况下，首先通过选择阀 51 和泵 58 的协同运动将惰性载体中的磁性颗粒悬浮液吸入保持线圈，并首先被吸入流动通道并以预定的捕获速度经过捕获区，从而提供磁性颗粒隔离群，其中颗粒的选择性表面还没有反应。接着，测试样品和其它试剂，分别地或以某种预先混合组合的形式经过流动通道 10，以覆盖隔离群和再悬浮的颗粒。对于特定分析所需要的特定顺序的接触，当然要了解：流体被吸入流动通道 10 的顺序由选择阀 51 和泵 58 的协同控制来控制。而且，如果需要另外的流体混合作为发明方法的中间步骤，要了解：通过上述的选择阀 51 和泵 58 的协同控制在保持线圈内制造“堆垛区”，可以在保持线圈内混合再悬浮磁性颗粒或其它流体。

一旦通过从载体介质中分离磁性颗粒形成了磁性颗粒隔离群，用分散介质如清洗液，灌注磁性颗粒隔离群。在某实施方案中，在混合“之后”已经在贮藏处 59a 或保持线圈 54 内存有分散介质。在另一实施方案中，如图 4 所示，可以通过阀 57 的移动接近分散介质源，以在泵 58 和源 59 之间提供流体交换，将分散介质吸入贮藏处 59a，移动阀

57 以在泵 58 和保持线圈 54 之间提供流体交换，并且由泵 58 施加反向的压力以引起分散介质流过线圈 54，经过选择阀 51，并进入流动通道 10。在这样的实施方案中，无需选择阀 51 的更多移动即能将分散介质吸入或分配进入流槽 10。在另一实施方案中，通过选择阀 51 的一个第二端口 53 可接近分散介质源。在这样的实施方案中，通过首先将分散介质吸入保持线圈 54 将分散介质吸入流槽 10。在这样的实施方案在中，保持线圈 54 和分散介质源之间的流体交换由选择阀 51 的移动来提供，泵 58 施加负压力，从而将一定量的分散介质吸入保持线圈 54。选择阀 51 随后移动以再次在保持线圈 54 和流体流动通道 10 之间提供流体交换，并且泵 58 施加正压力，从而将介质推过选择阀 51，进入流体流槽 10，并经过捕获区 40。流过捕获区的速度最初足够慢以防止磁性颗粒隔离群的分裂。在一些分散介质覆盖隔离群之后，泵 58 短期地施加更大的压力（正的或负的）以引起捕获区内的流体流动脉动具有足够高的流动速度，足以使磁性颗粒隔离群从捕获区离开，从磁场中移走磁性颗粒，并使磁性颗粒悬浮在分散介质中以提供第二混合物。

如上所述，可以将磁性颗粒从分散体中分离，并在相同或不同的介质一次或多次地再悬浮和再分离。或者，第二混合物能够经过检测区 60 以检测一种或多种物理或化学特征，或者能够被收集以用于进一步的其它类型的处理。

在本发明的特别的优选实施方案中，选择阀 51，泵 58 和阀 57（存在的情况下）由预先设定程序的序列发生器 70 控制，如图 7 所示。序列发生器 70 控制阀的运动以在所需的流槽之间提供流体交换；并控制泵以在适当的时刻提供所需大小的正或负压力（上文中讨论了该实施例），由此协调流经流体流动通道 10 的流体的运动。在另一实施方案中，例如，在序列发生器 70 是计算机的情况下，该计算机还可以被设置成接收来自检测器 62 和分析物的信息，对这样的信息进行制表、解释和/或展示。

序列发生器 70 可以包括一个或多个元件，其被设置成单个的单元。或者，当是多元件的形式时，序列发生器 70 可以具有一个或多个元件，其远离其它元件，或者可以具有分布在整个系统中的元件。序列发生器 70 可以是可编程的，状态逻辑机或其它类型的专用硬件，或者是可编程和专用硬件的混合组合。序列发生器 70 的一个或多个元件

可以是电子类的，如数字电路、模拟电路或二者兼有。作为电子电路的附加或选择对象，序列发生器 70 可以包括一个或多个机械的、水力的、气动的或光学控制的元件。

在一个包括电子电路的实施方案中，程序装置 70 基于可访问一个或多个固体存储器装置（未示出）的固态集成微处理器或微控制器。这种存储器最好包含可由微处理器或微控制器执行，且设置用于根据由程序装置 70 执行的一个或多个程序读写数据的编程指令。在另一个实施方案中，程序装置 70 为一具有定制的软件和硬件以实施本发明的工业级加固抗震程序控制个人计算机。这一优选构造可包括通讯界面如调制解调器或网络链路，以及用于容纳可更换介质如紧致磁盘（CDs）或软盘的子系统。虽然处理器优选易于被软件可重编程序，它也可由固件编程，或被构造成集成状态机，或使用这些技术的组合。在另外一种形式中，程序装置 70 设有一个或多个可编程逻辑控制器（PLC）。

与程序装置 70 相关的任何存储器可包括一个或多个类型的固态电子存储器且另外或另一种选择是可包括磁性或光学类型。例如，该存储器可包括固态电子随机存取存储器（RAM）、串行可存取存贮器（SAM）（如先入先出（FIFO）法或后进先出（LIFO）法）、可编程序只读存储器（PROM）、电可编程序只读存储器（EPROM）、或电可擦可编程只读存储器（EEPROM）；光盘存储器（如 CD ROM）、磁编码硬盘、软盘、磁带或盒式磁盘介质或这些品种的组合。同时该存储器可以是易失型，或非易失型，或易失和非易失的组合型。

程序装置 70 还可包括控制时钟、界面、信号调节器、过滤器、限幅器、模数（A/D）转换器、数模（D/A）转换器、通讯端口或本领域的普通技术人员可使用以实施本发明的其它类型的执行机构。

使用如上所述的流量控制器用于顺序注入对于免疫测定来说具有多种优点。使用顺序注入得到的高度可再现的同步使得如有需要，在非常短的时限内可对非平衡测量进行准确分析，这是使用手工技术所不能实现的。注入的样品体积可以非常小，且试剂的消耗量也非常小。

如上所述，可通过一个与流动通道 10 具有固定位置关系的永磁体或与流动通道 10 具有固定位置关系且产生基本恒定的场强的电磁体来设置该与捕获区 40 相交的固定磁场。永磁体的一个优点在于在工作过

程中其不会产生可能会对分析产生干扰的热量。当由永磁体提供磁场时，该磁体可具有多种构造，包括通常被称为马蹄形的构造或标准条形构造。例如，该永磁体或多个永磁体可具有矩形横截面，且在某些实施方案中其可被胶粘或通过机械装置固定在流体流动管道或非磁性支架上以形成永磁体组件。在另一实施方案中，该组件可包括一个容纳该磁体或多个磁体且增强和聚焦磁场的铁磁性装具。该磁体的磁力线最好沿垂直于流动通道的纵轴取向。也可以预想相对于该容器的交错的横截面形状、取向和磁极取向。

此外，永磁体可具有多种成分。最好使用表面场强度在几百高斯至几千高斯范围内的稀土合金永磁体。在一个实施方案中，该永磁体为由钕-铁-硼或钐-钴合金制成的具有高磁能积的永磁体。这种永磁体，和适合本发明使用相关的其它多种永磁体已商业化销售。各种构造和成分被包括在在此使用的术语“永磁体”中。

在标准条形磁体中，当其从北极移动至南极时，由于磁力线是非线性的且“成扇形展开”或鼓起，如图 6 和 8 示意性示出，而存在梯度。这些效应通常在高性能实验室用磁体中产生 0.1-1.5 千高斯/厘米的梯度。尽管对于本发明不必要，但是本领域的普通技术人员会意识到通过对磁回路进行处理以压缩或增加磁力线密度可使这些梯度增大。例如，如果在条形磁体一个极的强度不够，与第一磁体相反移动具有相同磁场的第二条形磁体将在这两个磁体之间产生排斥。虽然磁力线根数保持不变，但是随着这两个磁体受力越来越靠近，磁力线将被压缩。由此导致磁场梯度增大。向这一偶极构造加入反向场磁体以形成四极可进一步增大高梯度区的尺寸。其它构造如反向场的相邻磁体也可以产生高于在相当强度条形磁体中梯度的梯度。在外场装置中增加梯度的另一种方法是改变磁极片设计。例如，若通过将磁体之一制成尖形磁体改变标准偶极磁体的构造，那么围绕该区域的梯度将显著增大。

根据本发明，在流体流动通道的捕获区中的磁场具有的强度将会以相对较低的流速（如从约 1 至约 13 毫米/秒的流速）捕获根据本发明用途选择的磁性颗粒，且该强度不足以将该颗粒保留在相对较高流速（如从约 250 至约 2500 毫米/秒的流速）的流体流中。易于理解即优选磁场强度取决于多种因素会发生变化，这些因素包括，但不限于

在捕获区中或其它位置处流动单元的内部尺寸，在给定方法中使用的磁性颗粒的尺寸和敏感性，以及分离和灌注的所需速度，若给定方法对此有要求的话。考虑到本说明书，本领域的普通技术人员可在其范围内为发明体系的广泛应用选择适当的磁场源，无论是永磁体还是电磁体。在一个优选实施方案中，该捕获区包括 0.1-2 千高斯/厘米的平均磁场梯度。在另一个优选实施方案中，铁磁性材料被放置在流体通道内或紧靠流体通道位置处，以产生用于捕获较小的或磁性较弱的颗粒的较大磁场梯度。

现在转向磁性颗粒本身，在此所使用的术语“磁性颗粒”指的是对磁场有反应的颗粒。根据本发明选择使用的磁性颗粒最好包括铁磁性材料，超顺磁材料更佳。不考虑其尺寸（通常范围为 25 纳米至 100 微米），当被放入磁场中时，超顺磁材料仅具有磁性的性质。一旦磁场被撤去，其磁性失效且通常被分散成悬浮物。超顺磁行为的基础在于这种材料含有尺寸小于 20-25 纳米的磁性材料，其尺寸被估计小于磁畴尺寸。磁畴是永磁偶极子存在的最小体积单元。因此，这些材料是由不能保持永磁偶极子的一个或多个单元或单元集合成形的。这种磁性颗粒通常为含有少量铁磁性物质如铁基氧化物，例如磁石、过渡金属或稀土元素的聚合材料，该聚合材料使以上物质能够被磁场捕获。虽然也可以使用其它过渡元素氧化物及其混合物，在此所选择的磁性材料为磁石。

在本发明的许多优选应用中，磁性材料的表面涂敷有配合体或受体，例如抗体、外源凝集素、低聚核苷酸或其它生物活性分子，其可将混合物中的目标物质与其它物质结合。由于在目标物质和磁性颗粒表面之间存在静电交互作用，范德华交互作用，偶极子-偶极子交互作用或氢键交互作用，因此磁性颗粒的表面化学性质也可被用于捕获目标物质。磁性颗粒特别是在卫生保健如免疫测定、细胞分离、和分子生物学中已被用于多种用途，且许多这种颗粒商业有售。对实施这些方法有用的超顺磁颗粒应具有用于吸附或共价连接特定的一亲合结合对如配合体和受体的一个元件足够的结合表面能力。

一些磁性颗粒由球形聚合材料制成，在其中已沉积出磁性晶体。由于其磁石含量和尺寸，这些材料易于在相对较低的磁场（0.5-2 千高斯/厘米）中被分离出来，该磁场可很容易地由开放场梯度产生。另一

相似种类的材料是通常生产出的尺寸范围在约 0.5-约 0.75 微米内的颗粒。另一种适合的材料包括尺寸约 1 微米的磁石晶体簇，其上涂覆有可连接生物受体的氨基硅烷聚合物。这种强磁性材料在相对较低的梯度（如梯度小于 0.5 千高斯/厘米）易于被分离，且由于其尺寸，其可长期保持悬浮。

根据本发明所使用的磁性颗粒的优选直径为 0.1-300 微米。如今具有或无能够结合抗体或 DNA 分子或含有其它结合位置例如净化的官能团的磁性颗粒在许多地方商业有售。合适的超顺磁颗粒在以下公司商业有售，这些公司是 Lake Success, N.Y. 的 Dynal Inc.; Cambridge, Mass. 的 Perspective Diagnostics, Inc; 和 San Leandro, Calif. 的 Cortex Biochem Inc.。

根据本发明可使用的另一种类型的磁性材料为纳米尺寸的胶体（参见，例如 Molday 的美国专利 No. 4452773, Owen 等的美国专利 No. 4795698, Yudelson 的美国专利 No. 4965007; 以及 LIberti 等的美国专利申请 No. 07/397106）。纳米尺寸的胶体通常由涂覆有聚合材料的磁石的单晶到多晶凝聚物构成，该凝聚物为其提供水相容性。单个晶体的尺寸可为约 8-约 15 纳米。这些材料的涂层与水溶液具有足够的相互作用，以使其差不多保持胶体状态，否则永久地。本领域的普通技术人员意识到由于其尺寸和其与溶剂水之间存在相互作用，需要相当大的磁性梯度以分离纳米尺寸的胶体。因此，在使用这种胶体的体系中，最好使用更强的磁场。

本发明的一个有利特征在于可以精确地控制调节在给定试剂或其它介质中磁性颗粒的悬浮时间。此外，发明方法允许实施在微摩尔级浓度范围内更快更灵敏的自动免疫测定。本发明的一个特别有利应用是用于进行使用自动顺序注入方法的酶联免疫吸附化验，该方法利用表面被衍生的磁性颗粒确定在测试样品中进行竞争免疫测定分析物的量。

使用被磁性颗粒结合的抗体和被酶增强的检测的竞争免疫测定法涉及诸多步骤。例如在使用 TNT 作为分析物时，第一步是混合 TNT 样品、TNT-酶轭合物和固定抗体。在根据本发明的半自动方法中，这些成分例如在聚丙烯小瓶中进行混合，用于竞争结合。使用固定在磁性颗粒上的抗体易于在随后的步骤中从粘附有抗体的成分中分离出溶液

成分。一旦已分离或洗出颗粒，就加入分析纯显色溶液。它包含用于将基体酶催化转变成便于检测出的有色物质的试剂。在精确的反应时间后，进行吸收性能测试。

典型的顺序如下：（1）在分析物上涂覆有抗体的磁性颗粒与包括该分析物和分析物-酶轭合物的测试样品进行混合，其中酶起到产生颜色的着色试剂的作用，且培养预定的一段时间；（2）这种混合物被吸入流体流动单元中并通过固定磁场中的捕获区，于是磁场捕获流动通道中的颗粒以形成磁性颗粒隔离体；（3）该磁性颗粒隔离体通过吸入和用脉冲输送洗液一次或多次再悬浮，通过逆流和再悬浮颗粒以捕获流速通过捕获区，在捕获区中进行交替再捕获；（4）被冲洗的磁性颗粒隔离体通过吸入和脉冲输送试剂再悬浮在着色试剂中；（5）在预定长度的反应时间后，通过逆流和试剂与颗粒以捕获流速通过捕获区，磁性颗粒在捕获区中被再捕获；（6）该着色试剂通过一个用于显色检测的光学单元；和（7）洗液以相对较高的速度通过流动单元，以从流动单元中冲洗出任何剩余的颗粒和/或试剂，以限定用于后面方法的体系条件。

同样地，在一个实施方案中，本发明提供一种使操作人员介入最小化的自动 ELISA 仪器。这种 ELISA 系统如手动方法一样运行，但是试剂体积较小、反应时间较短，且由此可被构造用于提供能够可靠地和可再现地分析测试样品的现场便携式的仪器。该方法是通用的和灵活的，且由此可适用于许多种不同的用途。用过的磁性颗粒可在每次分析之后可被放电。这消除了反应表面不稳定的问题，消除了为了不仅节省时间和增加采样频率，而且向单个采样周期提供磁性颗粒的新鲜和均匀的部分，传统上要求固体反应相再生所需要的附加时间。该用过的磁性颗粒被离线收集，并可在以后再生。减少样品处理的所要求的小体积和本发明方法精确的可再现性已显示出对于改进麻烦的、耗时的、使用大量劳力的和半定量的传统免疫测定有用。

除上述实施方案之外，多种其它可选择构造的所述系统均在本发明的范围之内。如一个实施例，本发明设想一个系统，其中流动通道包括多个捕获区。在这一实施方案中，可实施一种方法，其中在流动通道中的流体流是不定向的。在具有多个捕获区的系统中，磁性颗粒可在第一捕获区中从通常如上所述的载体介质中被分离出去，以提供

第一磁性颗粒隔离体。然后通过沿第二捕获区方向的分散介质的脉冲，使该第一隔离体再悬浮，以提供第二混合物。如有需要，然后停止流体流，以在捕获区之间提供一段时间的培养期，然后重新沿相同方向使第二混合物通过第二捕获区以从分散介质中分离出磁性颗粒，并由此形成第二磁性颗粒隔离体。然后可在流体流动通道上的更多捕获区中或在同一捕获区中同时还使用逆流执行更多的再悬浮/再捕获步骤。例如当多个捕获/再悬浮步骤对于一给定的化验或其它方法必要时，可以使用这种系统。

在另一个实施方案中，通过加入用于多项化验的试剂与多端口选择阀 51 的第二端口 53 流体相连通，并在大量相同样品上顺序进行不同的化验，可在相同测试样品上可进行多项化验。例如可希望在一个样品上进行一项化验，然后在相同样品上进行不同的分析。在这一实施方案中，在完成化验且使用洗液或其它清洗试剂清洗完系统之后，该系统可被构造以自动混合测试样品、具有连接于其上的不同选择性官能团的磁性颗粒和可能的其它试剂，以顺序进行其它化验。

针对于某些化验的特定要求可设想出其它变型。例如应理解当被暴露于光线中时，某些显色溶液会经历光催化作用。同样地，在使用显色试剂的实施方案中，限定流体流动通道和传输显色试剂的其它流体传输通道的管道由不透明材料制成，或被覆盖有不透明材料例如一层胶带，以防止显色剂暴露于光或其它电磁辐射中。应理解胶带或其它不透明材料也可被用于覆盖可能含有或输送其它光敏试剂的流体管线。

相似地，应理解本发明的某些用途涉及温度敏感的材料，包括但不限于 DNA、蛋白质及其组合。同样地，发明系统可有选择地包括用于生物分子的样品处理的温度控制。温度控制对优化 DNA 杂交和洗脱的结合和洗脱速度以及使用聚合酶链式反应（PCR）或其它要求热循环的酶的增强方法进行的 DNA 扩展是有用的。高温可通过或是在从样品中提取分析物过程中，或是在后续清洗步骤中除去干扰物，有助于净化样品。正好在本领域的普通技术人员的认识范围内，在发明的设备中加入温度控制元件，并且在预定可控温度条件下在实施发明的方法。

通过参考以下具体实施例对本发明作进一步说明。应理解这些实施例本质上还是示例性的，而不是限制性的。

实施例

实施例 1

使用一种与酶相关连的免疫吸附剂化验法对在水中的 TNT 顺序注入分析

进行一个试验以说明在发明系统中的磁性颗粒的捕获或再悬浮情况，如下：

化学药品：TNT RaPID 化验™工具箱提供 ELISA 试剂（Strategic Diagnostics, Newark, DE）。所使用的试剂是 TNT－辣根过氧化酶（TNT-HRP）轭合物，显色溶液（3,3',5,5'-N 四甲联苯胺和 H_2O_2）和具有固定的抗-TNT 抗体的不规则 0.5 微米直径磁性颗粒的悬浮液。该显色试剂溶液含有生色基底 3,3',5,5'-N 四甲联苯胺（TMB）和 H_2O_2。具体配方是私有的，但是最佳的试剂配方已被发表用于相似的使用辣根过氧化酶-莠去津轭合物的莠去津（atrazine）酶联免疫吸附化验中。文献参见 TMB. C. S. Hottenstein, F. M. Rubio, D. P. Herzog, J. R. Fleeker and T. S. Lawruk, "Determination of trace atrazine levels in water by a sensitive magnetic particle-based enzyme immunoassay"（"通过以磁性敏感颗粒为基的酶的免疫测定确定水中的莠去津的痕量水平"）, J. Agrc. Food Chem., 44(11), (1996) 3576-3581。

洗液由 pH 6.2 0.033 M 的磷酸盐、0.033 M 的 NaCl 和 0.1%聚山梨醇酯 20（P20）（BiaCore, Piscataway, NJ）非离子型表面活化剂组成。洗液在流动系统中还起到载体溶液的作用。DNA Zap™溶液来自 Ambion 公司（Austin, TX）。Supelco 公司的乙腈中 1000 微克/毫升 TNT 的 TNT 标准溶液被稀释以制备含 pH 6.2 0.033 M 的磷酸盐、0.033 M 的 NaCl 和 0.007% P20 的 TNT 溶液。

设备：使用在图 9 中提出的流动系统，其中 FiaLab 3000 系统（FIAlab Instrument, Inc., Bellevue, WA）为步进电机驱动的注射泵设有一个内置三向阀（Carvo, Sunnyvalve, CA）和一个 10 端口 Cheminert®选择阀(Valco, Houston, TX)。冲洗入口、显色入口和废物出口处为 0.030 英寸同前的氟化乙丙烯（FEP）管道(Valco)。显色入口通过热缩塑料包管遮蔽光线。保持线圈和单元出口处也遮蔽光线。该 600 微升的保持线圈为 0.030 英寸同前的聚醚醚酮（PEEK），

其来自 Upchurch Scientific(Oak Habor, WA)。与磁体接触的、自阀门向光学单元延伸的流送管为 0.02 英寸同前的聚醚醚酮（PEEK）。从阀门到磁性区中央的体积为 22 微升，且从磁性区中央到光学单元的体积为 18 微升。

一个 1/2×1/4×5/8 英寸的 NdFeB 永磁体由 Dexter Magnetic Technologies(Winsdor Locks, CT)购得。该磁体的 1/4*5/8 英寸面为其磁极。一个磁极被放置靠在磁性区管道上，该管道沿 5/8 英寸长度方向延伸。通过精锉 0.062 英寸外径 0.02 英寸内径聚醚醚酮(PEEK)管的一侧直至总厚度为 0.045 英寸，该管道被减薄以产生一个磁体平表面。原则上，这样在通道和磁体之间留下了 0.004 英寸的管壁。但是由于管道通道中心的变化，实际距离可能稍大于或小于该厚度。

一个透射探测元件被钻出 FEP（McMaster-Carr, Los Angeles, CA）。如图 9 所示，入口、出口和探测器的光学路径成型在 U 形通道中。该入口和出口被设计以容纳 Upchurch 管道配件。通过光学路径的流动通道为 1 厘米长且直径为 1 毫米。发光纤维（illumination fiber）为 400 微米，而收集纤维为 200 微米。这两种纤维均为含在 0.062 英寸外径不锈钢端部的石英。纤维端部摩擦配合进入流动单元。FEP 的透明度使得在研发方法过程中流动通道是可见的。在实际运转过程中，在该单元上覆盖胶带以防止显色溶液产生光催化作用。该 LS-1 型钨卤灯和 SD-2000 型电荷耦合器件(CCD)阵列分光计来自 Ocean Optics(Dunedin, FL)。有必要使用一个 NG5 型滤光器（Schott Glass Technologies, Inc., Duryea, PA）减弱灯光。使用该滤光器，CCD 的积分时间被设置为每次扫描 75 毫秒，以保持远离在 630 纳米光饱和的一个安全限度。吸光度是在酶制品相对于在 730 纳米监测的基准线的λmax 即 630 纳米处监测到的，以修正仪器变量和混合在光学路径中的折射率。

使用 Visual C++(Microsoft, Redmond, WA)和用于控制 CCD 分光计的 OOIWinIP 动态链接库(Ocean Optics)写入系统软件。

方法，半自动方法:

流体和磁性颗粒处理：使用酶催化增强的在磁性颗粒上的竞争免疫测定需要多个流体和颗粒处理步骤。以下对于一种半自动方法顺序进行说明，其中竞争免疫测定在一个小瓶中进行，以如下顺序依次加

入100微升的含有分析物的样品、200微升的具有表面固定抗体的磁性颗粒的悬浮液和100微升的分析物-酶轭合物。

所述的该半自动方法在测试小瓶中混合好竞争性化验混合物之后开始。该仪器定时培养时间以使手动调节不必要，且麻烦的手动分离被在磁性流动单元中的自动颗粒捕获，以及洗液和后面的显色溶液的流体输送所取代。显色反应时间不再依赖于手动定时和不需要使用停止溶液。取而代之的是，该仪器在一精确时间后自动输送有色制品至检测器。

在该半自动方法中，最初的手动步骤被用于按照如下顺序将 TNT 溶液、磁性颗粒悬浮液和酶的轭合物注入到聚丙烯小瓶中，随后进行10秒钟的混合。在4分钟的培养时间后，使用如图9所示的顺序注入系统执行如表 1 所示的顺序注入方法。为了清楚地说明，省略了标准实施细节，即在流体之间使用10升的空气分离器，并在每一次注入之前加载流体进入保持线圈。在每次注射移动后确定有至少 0.5 秒的延迟以允许在转换选择阀前达到压力平衡。这有助于保持空气部分处于大气压下。在流动系统中的载体溶液与洗液相同。较小的空气部分最好被用于在流量控制器中将试剂从载体溶液中隔离出来，然而，必须小心不要灌注试剂的最后部分和通过流动通道的空气分离器，这是由于空气气泡会干扰光学检测。

程序化步骤被用于将竞争化验混合物引入体系中，捕获具有 TNT 和连接至反-TNT 抗体的酶的轭合物的混合物的磁性颗粒，冲洗该颗粒，将该颗粒与用于酶催化产生有色物质的试剂进行混合，保持该颗粒一段精确的显色时间，再捕获该颗粒，并输送有色溶液通过用于吸光度测量的透射单元。吸光度测量的峰值面积被用于定量化。表 1 对标准参考半自动方法进行了更详尽的说明。在这一方法中，显色时间为 4 分钟。从混合物培养时间到吸光度测量、去除颗粒、去除混合物和空气的显色入口完成，整个过程耗时17.2分钟。这一过程与超过40分钟的手动方法化验时间相比较。

表 1 顺序注入 ELISA 方法

方法步骤		溶液	端口	体积，微升	流速，微升/秒
1	初始化混合入口	小球，酶，样品	混合		
2	将混合物吸入保持线圈	小球，酶，样品	混合	325	40
3	将混合物注入单元中并捕获小球	小球，酶，样品	单元	-320	2.5
4	将小球分散在 5 微升中	小球，悬浮在酶+样品中	单元	5	200
5	在保持线圈中遗弃残余混合物和空气部分进入混合型入口	洗液，空气分离器	混合	-100	200
6	将小球分散在 15 微升中	小球，悬浮在酶+样品中	单元	15	200
7	捕获和清洗小珠洗液	洗液	单元	-115	2.5
8	将小球分散在 15 微升洗液中	小球，悬浮在洗液中	单元	15	200
9	捕获和清洗小珠	洗液	单元	-115	2.5
10	将小球分散在 5 微升中	小球，悬浮在洗液中	单元	5	200
11	初始化显色入口				
12	吸入保持线圈	显色试剂	显色	200	40
13	在捕获小珠的同时注入显色试剂	显色试剂	单元	-80	2.5
14	将小球分散在 15 微升中	小球，悬浮在显色试剂中	单元	15	200
15	培养几分钟显色时间				
16	在将显色注入光学单元的同时捕获小珠	反应的显色试剂	单元	-157	1
17	通过流动单元遗弃废物	洗液，水，显色，小球	单元	-240	200
18	恢复显色入口				
19	恢复混合型入口				
20	冲洗保持线圈	洗液	单元	-80	50

初始条件和入口管线准备。在化验流程的开始，入口被设置以含有 20 微升洗液，并自阀门端口向外延伸（这有助于防止在阀门转换过程中进入不必要的空气），其管子的剩余部分含有空气。为了在将溶液引入保持线圈前初始化端口，管子的体积（以前测量得到的，在程序中是一个参数）加上 5 微升被引入保持线圈中，然后这一体积外加 30 微升的洗液被排废。这就将入口管中充满了溶液。在化验后，混合和显色端口被复原回初始条件。

竞争性混合物的处理和磁性颗粒的捕获。在引入混合物或显色溶液前，10 微升空气部分被引入至保持线圈中。对于竞争性混合物溶液，以 40 微升/秒的速度将 325 微升的混合物引入保持线圈，使用 10 微升的空气部分将混合物从载体介质中分离出来。然后将 320 微升的样品以 2.5 微升/秒的速度推进以捕获在磁性捕捉单元管壁上的磁性颗粒。该空气部分和被拖动的洗液在混合物端口以 200 微升/秒的速度被遗弃。速度低于 200 微升/秒对于从 0.03 英寸的 FEP 管壁上除去空气是不可靠的。至少 0.007%的表面活性剂如 P20 的存在防止空气在憎水性表面上中止。

清洗步骤。通过首先使用 15 微升溶液将其以 200 微升/秒的将颗粒向多端口阀门拉回的脉冲速度再悬浮在溶液中，对被捕获的磁性颗粒进行清洗。因此，悬浮颗粒存在于在该阀门和磁性捕获区之间的这 22 微升的区域内。然后该悬浮颗粒以 2.5 微升/秒的速度被推回磁性捕获区，捕获颗粒并向其灌注洗液。清洗步骤向前推进 115 微升溶液。在标准方法中有两个这样的清洗步骤。其中之一完成了推进竞争性混合物溶液通过磁性单元，随后是清洗溶液；其中之二将该颗粒再悬浮在洗液中，再捕获和再向其灌注洗液。

显色和检测。使用 5 微升溶液以 200 微升/秒的脉冲速度将该颗粒再悬浮在磁性单元和阀门之间。初始化显色端口，并如上所述设置空气部分；然后将 200 微升的显色试剂溶液引入保持线圈中。从保持线圈向流动单元以 2.5 微升/秒的速度推入 80 微升的显色试剂，以再捕获磁性颗粒并向其灌注溶液。然后，使用 15 微升溶液以 200 微升/秒的脉冲速度将该颗粒再悬浮在试剂溶液中，再次将颗粒留在阀门与磁性捕获区之间的 22 微升的区域中。这些颗粒存在于此用于显色时间，在其后当溶液以 1 微升/秒的速度被推进通过透射光学单元时，他们自

动被再捕获在磁性单元中（后面的步骤使用了 157 微升注入，使用大多数依旧能推进显色峰通过光学单元的显色试剂溶液）。

清洗和复原步骤。在每一半自动运行周期结束时，混合物和显色端口的入口管线通过将空气推出而进行清洗。在运行之间，设置该入口至如前所述的开始状态，并通过排出额外的载体溶液（洗液）清洗保持线圈。

图 10 示出了 TNT 的多个标准浓度峰。在这一竞争性化验中，无 TNT 的样品产生最大峰，且随 TNT 的浓度增大，峰值变小。527 和 5000 纳克/毫升条件下的试验结果是不能辨别得出的且被视为浓度无限大（∞）。注意该∞峰面积为非零。使用缓冲溶液代替 TNT-HRP 轭合物进行的试验导致峰面积半自动方法得到的∞峰面积，考虑到该∞基准线不是由于剩余酶的活度。颗粒含有铁，这应该是在含有 H_2O_2 的显色溶液中通过 Fenton 反应形成一些着色的原因。当在空白试验中使用缓冲溶液代替颗粒悬浮液时，则不出现峰值。

图 11 示出了在时间长度为 43 天中单独 8 天的 118 半自动方法试验结果，峰面积与 TNT 的标准浓度的关系曲线。它示出了校准曲线预期的反曲形状和在长时间内的校准的稳定性。

这种类型的免疫测定数据的吸光度峰面积 B 通常适合于方程式 1 和 2 之中的反曲关系之一。文献出处如下：Fare, T.L.; Sandberg, R.G.; Herzog, D.P.; "Considerations in immunoassay calibration"（"在免疫检定校准中需要考虑的事项"）; In Environmental Immunochemical Methods; Emon, J.M.V., Gerlach, C.L., Johnson, J.C.; American Chemical Society: Washington, DC, 1996; ACS Symposium Series 646; pp.240-253。

$$B/B_0 = \{1 + (C/C_{0.5})^b\}^{-1} \qquad (1)$$

$$(B-d)/(a-d) = \{1 + (C/C_{0.5})^b\}^{-1} \qquad (2)$$

参数 B_0 给出了空白样品的峰面积，因此 B/B_0 是作为响应量度的样品与空白样品的峰面积比值。C 是样品浓度，而 $C_{0.5}$ 是 B/B_0 为 50%时的

样品浓度。参数“b”则是与曲线线性区域的斜率相关的拟合参数。当峰面积在无限浓度条件下为非零时，如图 10 中的情况所示，使用方程式 2 中的关系式。左侧为“修正的”B/B_0。参数“d”是无限浓度峰面积的拟合值，而参数“a”是 B_0 的拟合值。图 11 示出了使用该半自动方法得到的这些数据的拟合曲线。

我们的结果与经销商具有非常合理的一致性，特别考虑了在免疫检定中在拟合反曲校对曲线时公认的不确定性。我们的方法以与经销商建议使用方法相同的比率混合抗体（在磁性颗粒上）和 TNT-HRP 轭合物。我们的拟合给出了在峰面积为空白样品的峰面积（进行无限浓度峰面积的修正）的 50%时，TNT 浓度值为 1.51 纳克/毫升，而经销商文献中的数值为 1.44。当峰面积为 90%时，TNT 浓度值为 0.16 纳克/毫升，而经销商宣称的数值为 0.07。经销商使用这一标准限定检测下限。文献参见 C.S.Hottenstein, F.M.Rubio, D.P.Herzog, J.R.Fleeker and T.S.Lawruk, “Determination of trace atrazine levels in water by a sensitive magnetic particle-based enzyme immunoassay”（“通过以磁性敏感颗粒为基的酶的免疫测定确定水中的莠去津的痕量水平”）, J.Agrc. Food Chem., 44(11), (1996)3576-3581。

表 3 列出了每一测试浓度的标准偏差和相对标准偏差。

表 3 用于半自动方法的每一测试浓度的标准偏差和相对标准偏差。

浓度 纳克/毫升	平均峰面积， 吸光度	标准偏差， 吸光度	相对标准偏差，%	点数
空白	0.1087	0.0099	9.1	38
0.4681	0.0849	0.0057	6.7	14
0.917	0.0736	0.0049	6.7	12
1.817	0.0567	0.014	25	7
4.265	0.0350	0.0027	7.7	10
9.345	0.0270	0.0025	9.4	8
18.76	0.0212	0.00073	3.4	8
47.55	0.0143	0.0017	11.8	4
110.4	0.0138	0.0012	8.9	4
527.1	0.0120	0.00096	8.0	5
5000	0.0113	0.00048	4.3	5

两个相对于重复的空白试验平均值的标准偏差是用于限定检测极限的另一种措施，文献参见 C.S.Hottenstein, F.M.Rubio, D.P.Herzog, J.R.Fleeker and T.S.Lawruk, "Determination of trace atrazine levels in water by a sensitive magnetic particle-based enzyme immunoassay"（"通过以磁性敏感颗粒为基的酶的免疫测定确定水中的莠去津的痕量水平"）, J.Agrc. Food Chem., 44(11), (1996)3576-3581,且其还被报导为一种工业标准方法。文献参见 Deshpande, S.S. Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development（酶的免疫检定：从概念到产品研发）; Chapman & Hall: New York, 1996, p.323。空白和标准试验的绝大多数数据是在平均值的两个标准偏差之内。使用这一标准，我们的数据得到检测极限值为 0.4 纳克/毫升。再次值得注意的是我们的结果是基于 43 天的数据，而不是在一天内重复试验得到的数据。

43 天再现性试验是相当严格的。对于这种 TNT 化验工具箱，经销商报导化验中的%CV，且在每 5 天的 5 次重复化验中（25 个样品）%CV 在 3-8%之间，并规定%CV 为 10%。%CV 是变化系数（标准偏差/平均值乘以 100），在免疫检定文献中被用于相对标准偏差。文献参见 Deshpande, S.S. Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development（酶的免疫检定：从概念到产品研发）; Chapman & Hall: New York, 1996, p.314。我们的 43 天再现性试验结果中%CV 通常为 6-9%，这一结果相当好，并与经销商的说明书合理地保持一致。一个浓度（1.8 纳克/毫升，标准偏差为 25%）显然是非正常值，而几个浓度为 3-4%。为进行附加比较，在草不绿的 ELISA 化验中 Young 等使用一种自动微板系统。（参考文献：Young B.S.; Parsons, A.; Vampola, C.; Wang, H.; "Evaluation of an automated immunoassay system for quantitative analysis of atrazine and alachlor in water samples"（"对水样品中的莠去津和草不绿进行定量分析的自动免疫检定系统的评价"）; In Environmental Immunochemical Methods; Emon, J.M.V., Gerlach, C.L., Johnson, J.C.; American Chemical Society: Washington, DC, 1996; ACS Symposium Series 646; pp.183-190），报导每一五天的重复标准试验的%CV 为 2-9%。为在单

独的五天使 spiked Milli-Q 水样品增至三倍，%CV 值大于 7%。对于以磁性颗粒为基础的莠去津的免疫检定，已报导重复超过 5 天的%CV 值为 5-10%。文献参见 C.S.Hottenstein, F.M.Rubio, D.P.Herzog, J.R.Fleeker and T.S.Lawruk, "Determination of trace atrazine levels in water by a sensitive magnetic particle-based enzyme immunoassay"（"通过以磁性敏感颗粒为基的酶的免疫测定确定水中的莠去津的痕量水平"），J.Agrc. Food Chem., 44, (1996)3576-3581。由此我们得出结论：我们的 43 天再现性试验的精确性非常好。

与手动方法对比：

上述该方法被设计如手动方法一样操作，只是具有较小的试剂体积和较短的反应时间。抗体与酶的轭合物之比与手动方法中的相同，但是我们使用 200 微升颗粒悬浮液和 100 微升 TNT-HRP 轭合物，而在手动方法中分别使用 500 微升和 250 微升。分别为 4 分钟的培养时间和显色时间明显比在手动方法中 15 分钟的培养时间和 20 分钟的显色时间短。我们的较短的时间足以得到足够的峰面积，虽然该较短的时间并不会明显缩短整个分析时间。

自动控制减少了由于在手动方法中的不一致性而产生的可变性，如培养时间和显色时间。本发明对半自动和自动方法进行了说明，且在 43 天再现性试验中显示出良好的结果。

显色数据的分析：

显色时间的增加如预期增加了产品的产生，如下表 4 中空白样品数据（使用标准参考半自动方法）与显色时间的关系所示。

表 4 显色时间的影响作用

时间，分钟	空白峰面积
0.5	0.0157
1	0.0335
2	0.0647
4	0.109
8	0.196

较长的显色时间可以获得较大的峰面积，但是这样做没有明显的

优势。应该注意的是在手动方法中使用 500 微升显色溶液，然后加入 500 微升（中止溶液）stop solution 进行稀释。该有色溶液被均匀分配为 1 毫升。在流动系统中，具有轭合的酶的磁性颗粒在 22 微升管道区内，且该有色峰以大约 50 微升泵送体积通过光学单元。无疑的是 1 毫米（约 0.04 英寸）流动单元直径。因此，该有色产品比手动方法中至少浓 20 倍。此外，我们已注意到在酸溶液中，中性 pH 的蓝色产品比黄色产品具有更高的吸光度峰值。

培养时间的增长增加了空白样品和标准样品二者的峰面积，如表 5 所示。

表 5 竞争性混合培养时间的影响作用

时间，分钟	空白峰面积，B_o	标准峰面积，B	B/B_o
0.5	0.0765	0.0289	0.378
1	0.0782	0.0308	0.394
2	0.0948	0.0351	0.370
4	0.109	0.0350	0.322
8	0.160	0.0470	0.294
16	0.224	0.0531	0.237

在培养时间长于 1 分钟时，用 B/B_0 表示的响应随时间略减小，如图 5 所示。例如，对于使用 4.3 纳克/毫升样品，B/B_0 值在试验过程中从 4 分钟至 8 分钟由 0.32 变至 0.29。从 4 分钟至 16 分钟斜率未发生变化。由于化验在经销商建议的 15 分钟内不能达到平衡态，因此竞争性混合物的选择是有些任意的。以注意到非平衡态化验的应用。参考文献：Deshpande, S.S. Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development（酶的免疫检定：从概念到产品研发）; Chapman & Hall: New York, 1996, p.309。不能控制培养时间可影响分析的重现性。在我们的半自动化验中，培养期是自动定时的。

我们检验了其它一些能够影响校准重现性的因素。在方法实施全过程中为显色溶液遮蔽光线使得分析的峰面积产生相当的差异，且这一点对于重现性很重要。当使用光学洁净的管道时，通过显色溶液的

光反应，室内照明已被证明对化验基准线有影响作用。尽管不是十分必要，该抗体-衍生磁性颗粒、TNT-酶的轭合物和显色试剂溶液还是被小心地保持在 0°C。试剂经销商实际上已说明即：在使用前，酶的轭合物和颗粒必须达到室温。作为一个测试，酶和抗体溶液被有意地至于室温中 8.25 小时且在室温中被使用。空白样品和 4.265 纳克/毫升 TNT 的峰面积正好位于如下所述且如图 11 所示的校准重现性试验的误差容许范围内（该图实际包括这些室温试验）。

实施例 2

在化验之间的设备清洗

携带物清洗：为从样品中去除携带物，使用丙酮采用如表 2 中所示的步骤对系统进行清洗。这一冲洗步骤需要进行两分钟。

表 2 在运行之间的用于清洗的顺序注入方法

方法步骤		溶液	端口	体积，微升	流速，微升/秒
1	将丙酮小瓶放置在混合型入口处				
2	初始化混合型入口	丙酮	混合		
3	吸入	丙酮	混合	90	50
4	充满单元	丙酮	单元	-85	200
5	吸入	丙酮	混合	450-入口体积	50
6	移去丙酮小瓶				
7	清空入口管道	丙酮	混合	入口体积	50
8	浸泡 60 秒				
9	通过单元遗弃	丙酮	单元	-450	50
10	冲洗混合型入口	洗液	混合	-入口体积	50
11	清空入口管道	洗液	混合	-入口体积	50
12	冲洗该单元	洗液	单元	-入口体积-150	200
13	复原混合型入口				

表 2 中概述的自动丙酮清洗方法对于从达到和包括 5000 纳克/毫升 TNT 的最大测试浓度的半自动方法中去除 TNT 携带物是有效的。未清洗时该携带物误差的特征在于，测试一系列标准样品，随后是空白样品：9.3，空白样品，110，空白样品，527，空白样品，5000 纳克/毫升，空白样品。基于得出的峰面积，空白样品的表观浓度为 0.1、0.6、1.2 和 1.1 纳克/毫升。使用丙酮清洗方法后，就没有可测到的携带物了。

实施例 3

方法，全自动方法

除了通过将样品、颗粒悬浮液和 TNT-HRP 溶液以叠层的方式拉入保持线圈而自动进行样品和试剂的混合外，该自动方法与半自动方法相同。叠层体积例如，颗粒和 TNT-HRP 分别为 10 微升、15 微升和 15 微升，且该层重复叠置 10 次以输出总体积为 100、150 和 150 微升的溶液。半自动方法和自动方法的重要差别在于在自动方法中，自由样品 TNT 被拉入流动系统中且可受到管道或阀门表面的吸引。在半自动方法中，TNT 在流动系统中进行处理之前，有机会粘到磁性颗粒上。

在层叠后，该由三部分构成的混合物立即被注入捕获单元中。因此，自动方法中的竞争性化验培养时间由要求用于层叠的时间加上在磁体处捕获颗粒的时间(总共为 4.25 分钟)限定。整个方法要耗时 15.8 分钟，以将溶液吸入保持线圈为开始，并以排出颗粒为结束。

校准稳定性测试－自动方法：

为评价自动方法并测试校准的稳定性，使用自动方法在 14 天时间长度上面对 83 个校准样品，从空白样品到 100 纳克/毫升进行测试。这些自动校准数据如图 12 所示。

在两个星期的测试中，校准基本稳定，但是在最高测试浓度 100 纳克/毫升进行的一些测试完成后，很明显存在携带物，低于下一样品的预期结果。这些点被包含在图 12 中，在曲线上带有“X”标记，在 100 纳克/毫升进行测试后空白样品的测试是特别值得注意的。这些点未被包括在统计数据中。

在无清洗的测试中，100 纳克/毫升在后面的空白样品中引起携带效应，但是在低浓度条件下不行。使用 DNA-zap，而不是丙酮作为清洗溶液实施该自动方法，且这样不会阻止在 100 纳克/毫升条件下产生

携带物问题（DNA-zap™是一种由两部分构成且在混和前和反应后无害的试剂，这使得将其作为流动系统清洁剂很具有吸引力。其专有的配方的作用是：通过断开磷酸盐－糖的连接进行在聚合酶链式反应增强之前消除表面上的DNA污染物）。

在两星期校准调节的结尾，测试一个5000纳克/毫升的样品，这会带来持久的携带物，其不能使用DNA-zap或丙酮清洗去除。拆除和清洁阀门对于解决携带物是有必要的。这与半自动方法形成十分鲜明的对比，在半自动方法中，常规可使用丙酮清洗对5000纳克/毫升的样品进行测试，并在后面无清洗的空白样品测试中产生仅为1.1纳克/毫升的表观TNT浓度。

在方法研发过程中，至少使用96次由0.3 M KOH和0.03 M Na_2SO_3组成的水溶液混合物，以通过形成具有氢氧化物和亚硫酸盐的可溶阴离子型TNT加合物进而去除TNT携带物。这种方法通常是令人满意的，但是取代它的丙酮法更加可靠。

实施例4

颗粒捕获和再悬浮评价

通过以不同的流速使一个50微升的颗粒悬浮区通过磁性捕获区和测量吸光度下游对颗粒捕获进行评价。相对于无磁体存在的峰面积，在对流速变化进行修正后，混浊度峰面积在2.5微升/秒时，为0.6%；在5微升/秒时，为7%；在10微升/秒时，为60%。因此在2.5微升/秒时，99％的磁性颗粒被捕获。在以下所述的校准稳定性结果中，颗粒捕获和释放的重现性是明显的。

流速从零到200微升/秒的突然变化被用于从磁性单元管壁上置换出被捕获的颗粒。已发现200和400微升/秒的流速对于颗粒的释放均是有效的。在随后的空白样品测试中无携带物酶的活性。然而，以200微升/秒流速分散的颗粒少于400微升/秒流速，因此作为优选。颗粒的释放沿两个方向进行。在完成化验之后，颗粒被释放向前通过透射光学单元并被排出。在这种方法中，颗粒以5微升或15微升的脉冲以200微升/秒的速度被释放返回阀门，以将其再悬浮在磁体和阀门之间的22微升的区域中。这种方法对于在试剂溶液中悬浮颗粒用于显色特别有用，但是它也被用于冲洗步骤中。在显色之后，当推动溶液以1微升/秒的速度通过透射光学单元时，颗粒在捕获区被再捕获。与将颗

粒留在靠在磁性单元壁上的层中相比，颗粒再悬浮为冲洗和催化步骤提供了更好的表面可达性。此外，再悬浮防止形成颗粒凝聚体，如果磁性颗粒留在磁性区中的时间过长，这将产生问题。这就是为什么刚刚在排出空气部分和显色入口初始化步骤前，在表 1 的步骤 4 和步骤 10 中使用 5 微升脉冲将颗粒再悬浮的原因所在。空气部分被用于分离如上所述的被拉入保持线圈（竞争性混合和显色试剂溶液）的溶液。

实施例 5

另一种可选的方法

考虑两种其它方法。其中之一是：首先加入没有标签的分析物，一种用于增加敏感性的顺序性方法。参考文献：Deshpande, S.S. Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development（酶的免疫检定：从概念到产品研发）; Chapman & Hall: New York, 1996, p.309。在加入 TNT-HRP 前，当 4.265 纳克/毫升的 TNT 样品与抗体颗粒被培养 16 分钟时，得到的峰面积与混合有 3 种试剂而无附加培养的情况相同。对于这种改变了的 4.265 纳克/毫升的测试，预测的峰面积为 4.3 纳克/毫升。

在逆向实验中，颗粒与 TNT-HRP 一起进行培养，被冲洗三次、并与 TNT 一起进行培养。化验的显色部分被用作在培养后剩余的粘结 TNT-HRP 的一个量度。当 TNT 样品被培养 16 分钟时，TNT-HRP 的置换仅在微克/毫升的范围内是有意义的。一个 5000 纳克/毫升的 TNT 样品导致形成空白样品峰面积的 71.7%（重复三次的试验结果的平均值）。在竞争性化验中，这一浓度表示无限的 TNT 浓度，其完全消除了在显色步骤中的 HRP 的活度。

进行一个另外可选的实验，其中莠去津 - HRP 轭合物（同样也来自 Strategic Diagnostics）取代 TNT-HRP 被用在空白样品测试中，产生空白样品峰面积为得到的 TNT-HRP 峰面积的 17%。这些结果表明：涂覆有抗体的磁性颗粒还可以粘结莠去津 - HRP，建议不考虑轭合的分析物或分析物-类似物，可存在一些 HRP 亲和力。

被引用或列在本发明书中的全部参考文献，包括出版物、专利和专利申请在此作为参考被加入，这就好象每一单个参考文献逐一地和单独地被指向作为参考被加入并在此整体被列出。此外，任何理论、建议的操作机制、或在此所陈述的发现均意味着进一步增强对本发明

的理解，且不是以任何方式将本发明限制在这种理论、建议的操作机制、或发现中。

尽管在附图和前面的说明中已详细示出并对本发明进行了说明，应认为在性质上它是示例性的，而非限制性的。应该理解仅示出优选实施例并对优选实施例进行了说明，在本发明精神范围内进行任何改动或变化是受到保护的。

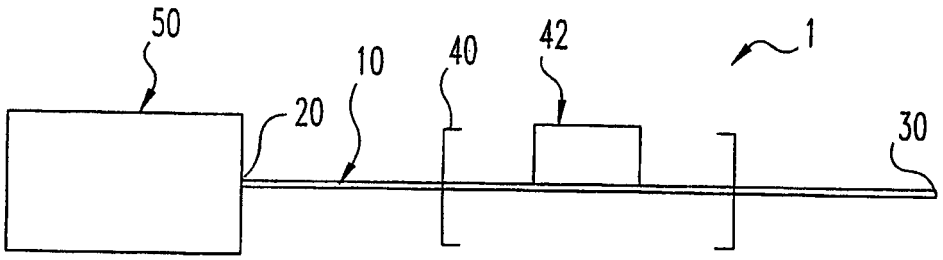


图 1

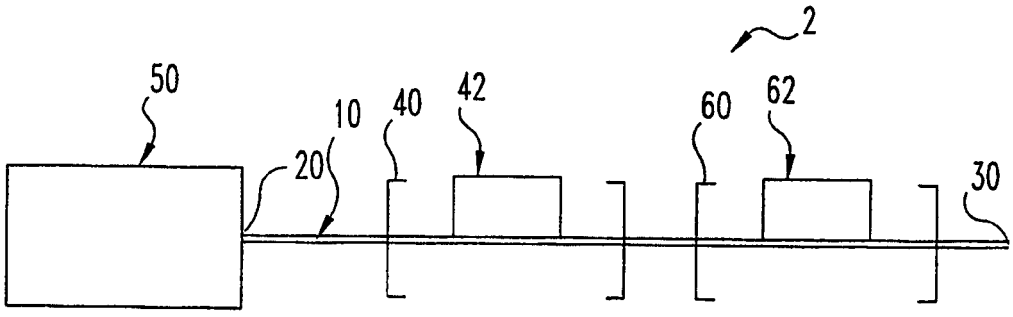


图 2

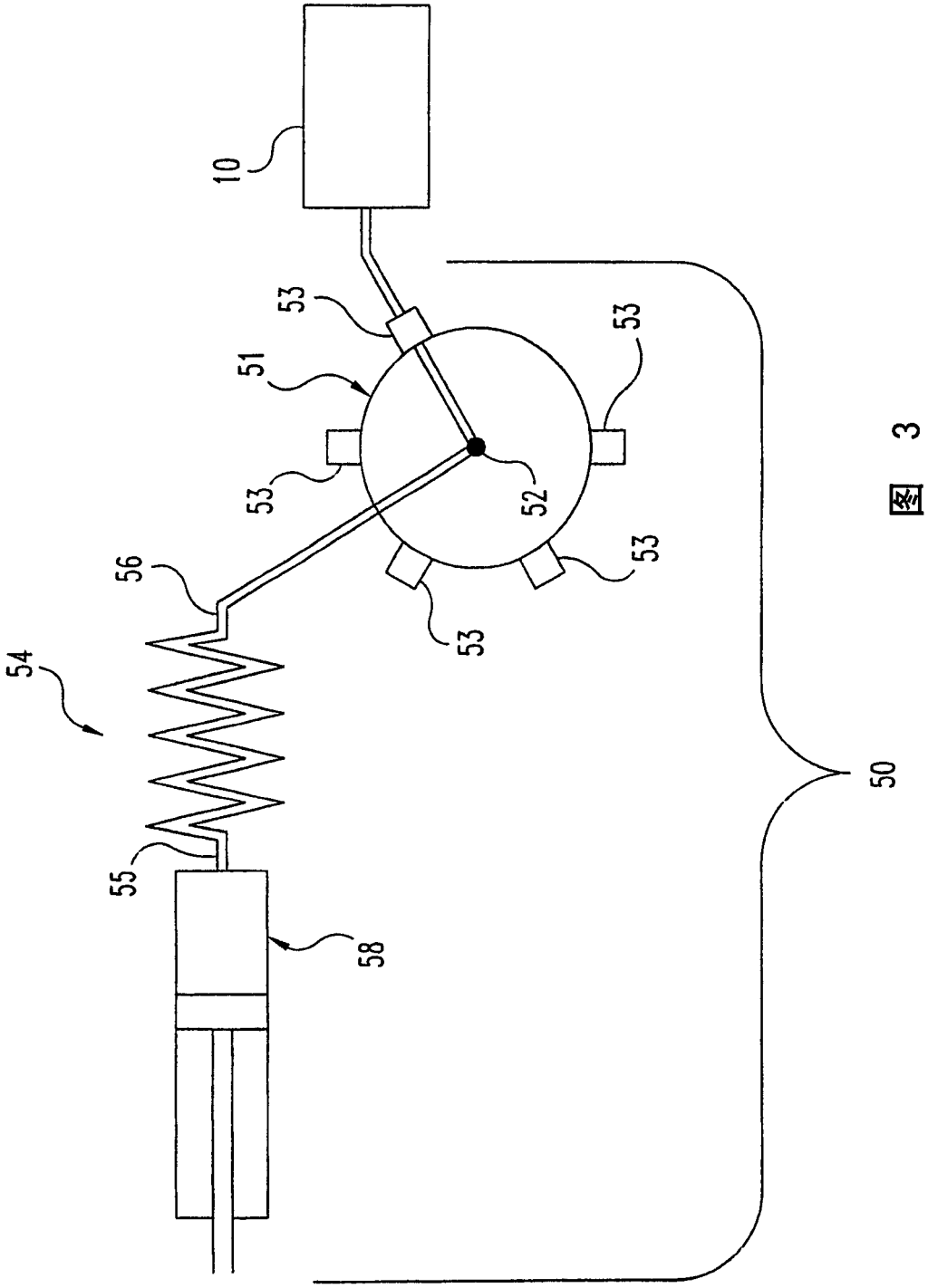


图 3

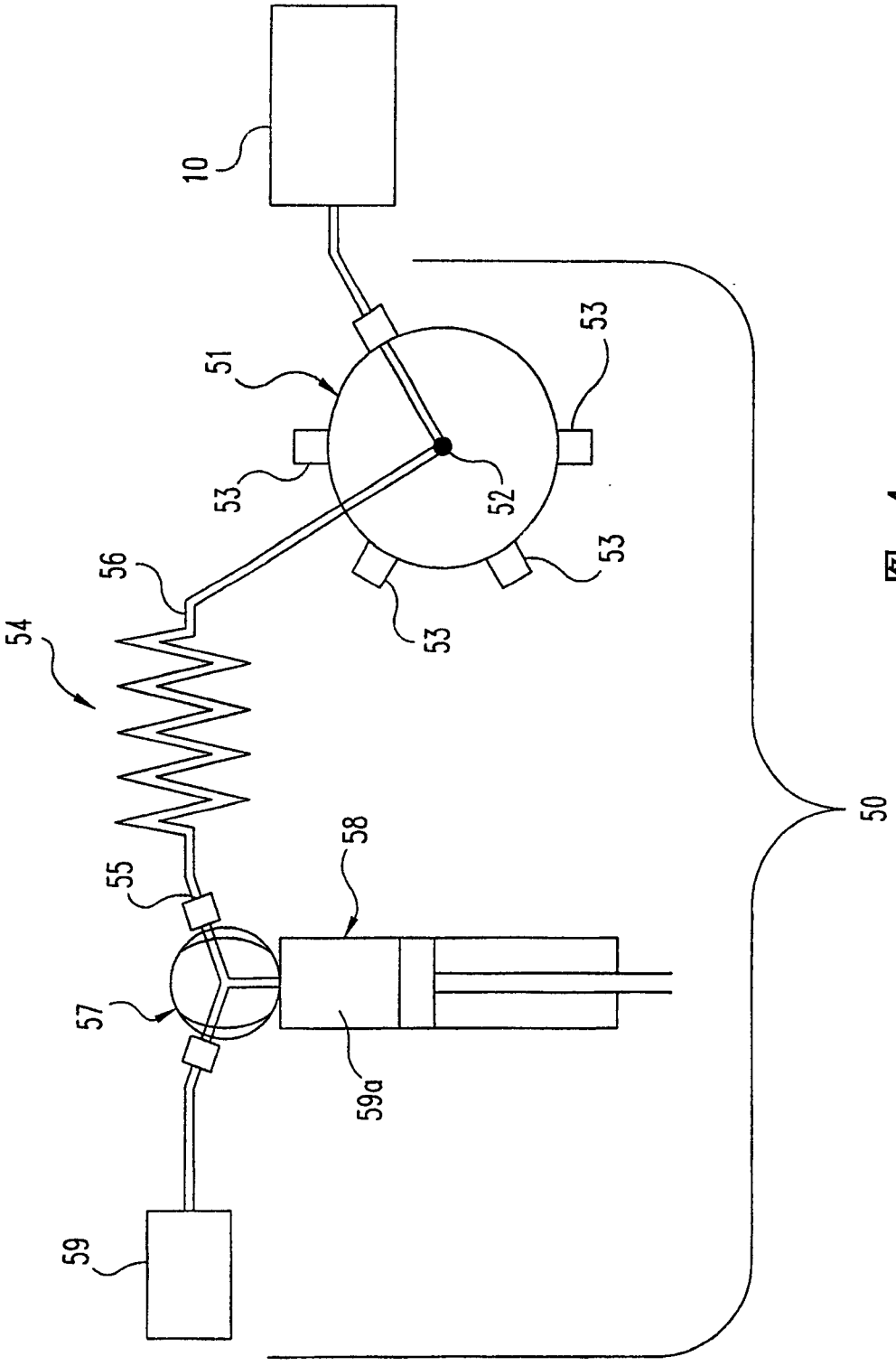


图 4

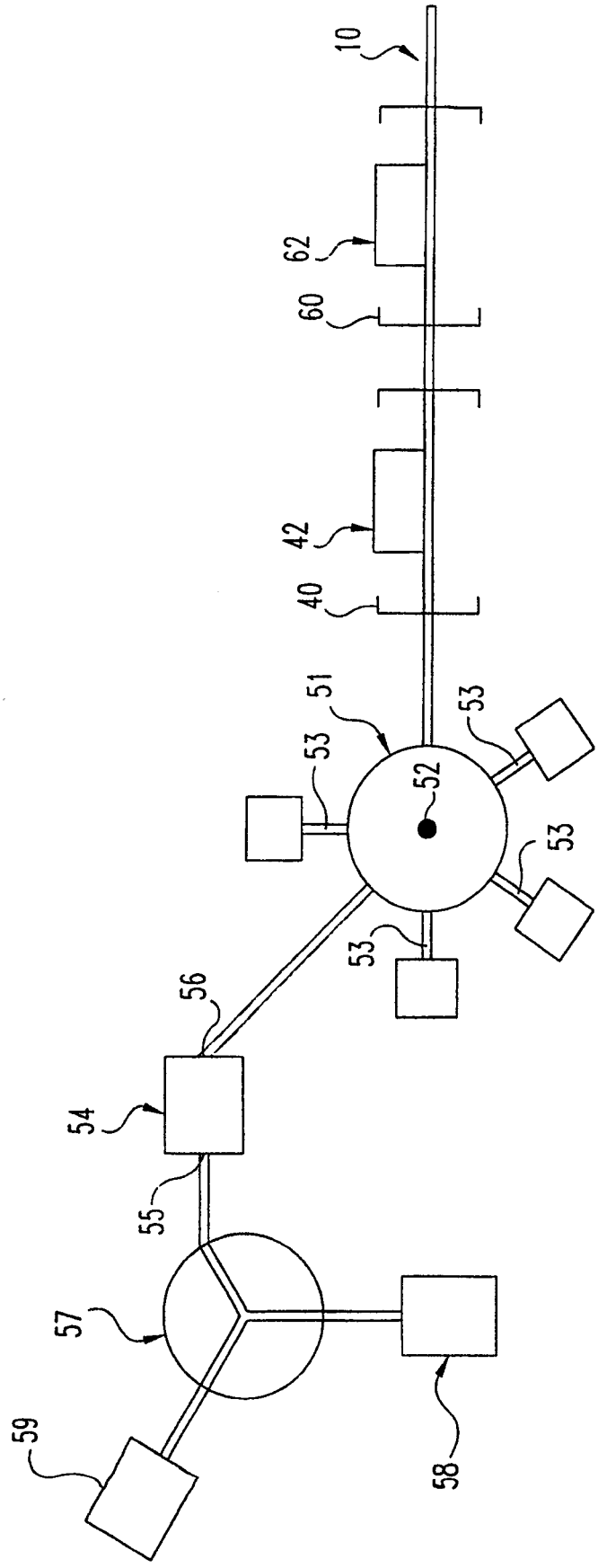


图 5

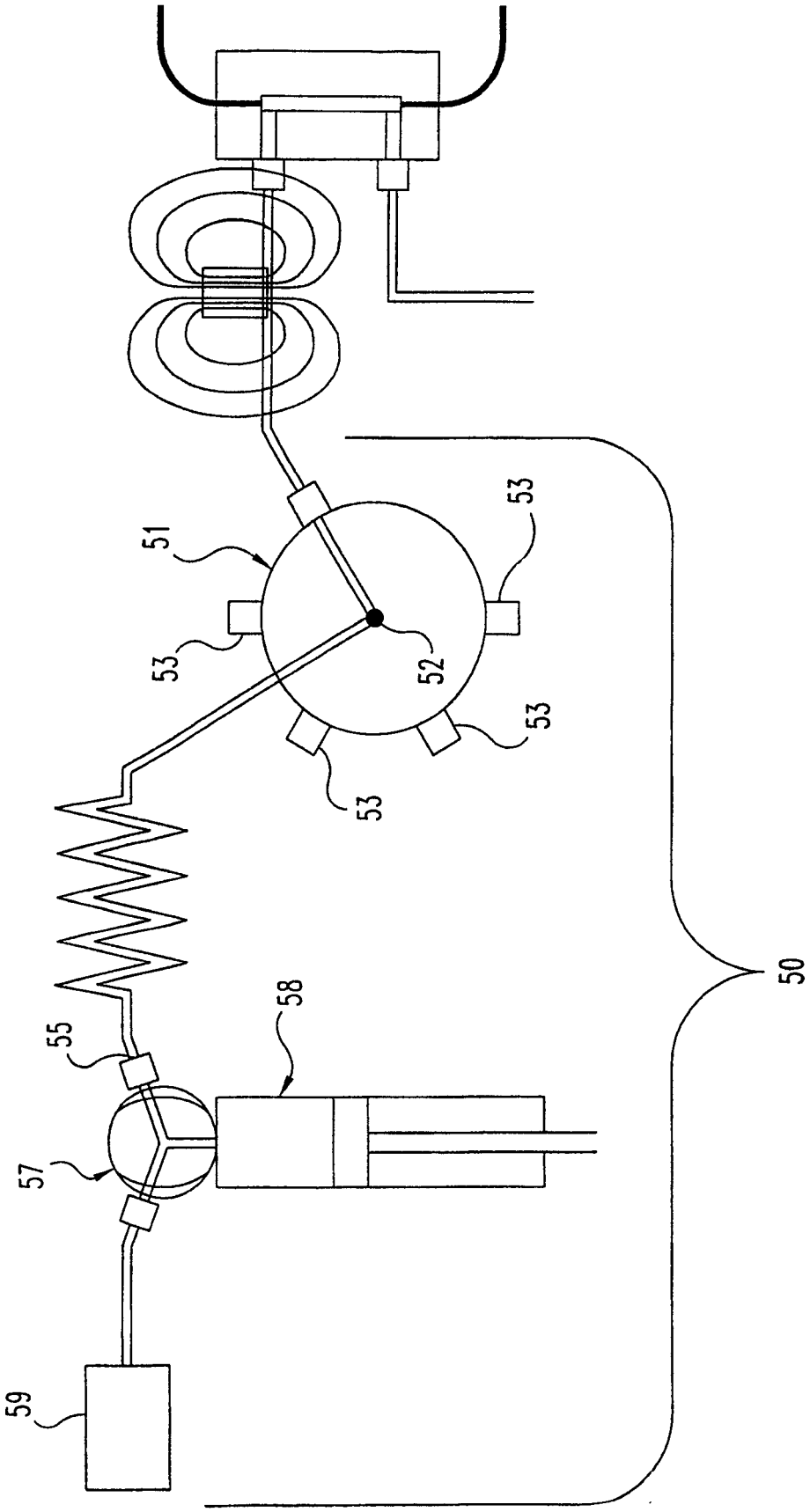


图 6

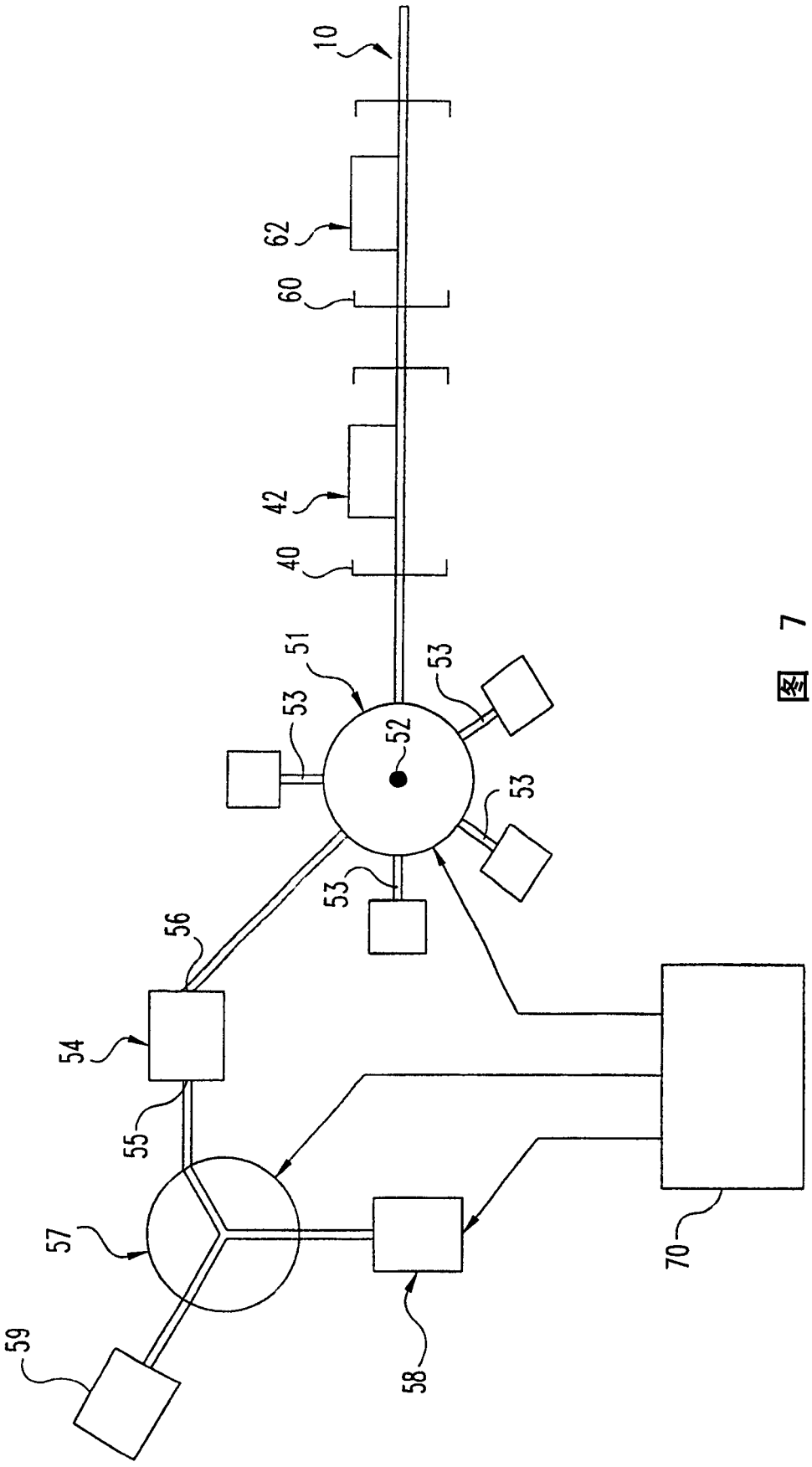


图 7

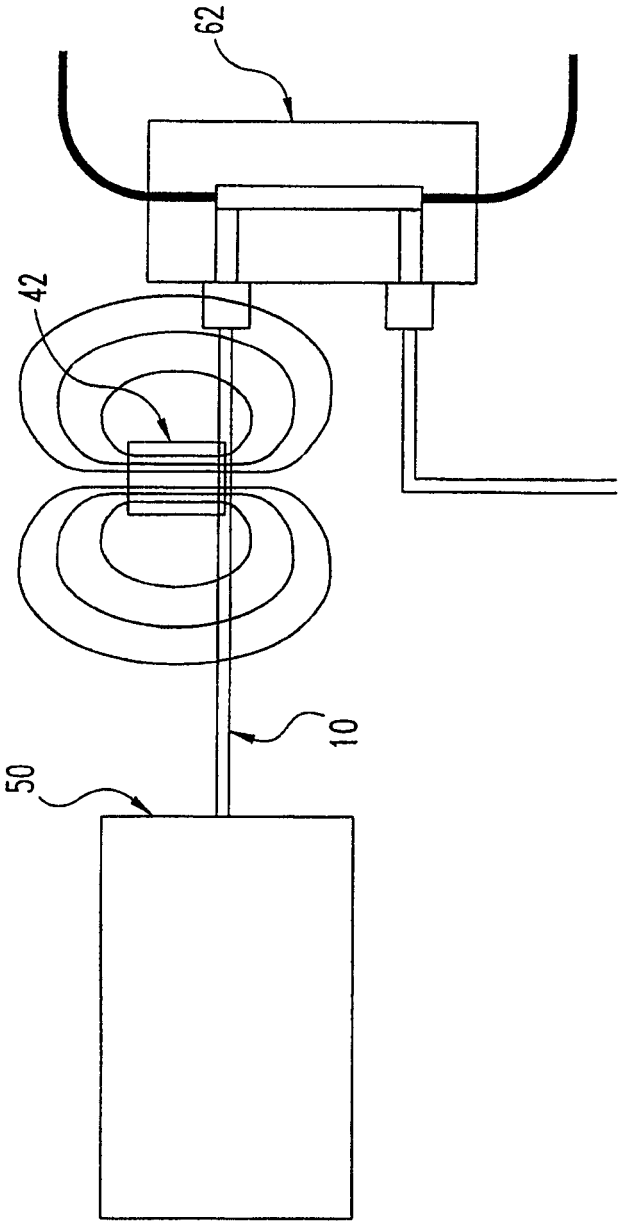


图 8

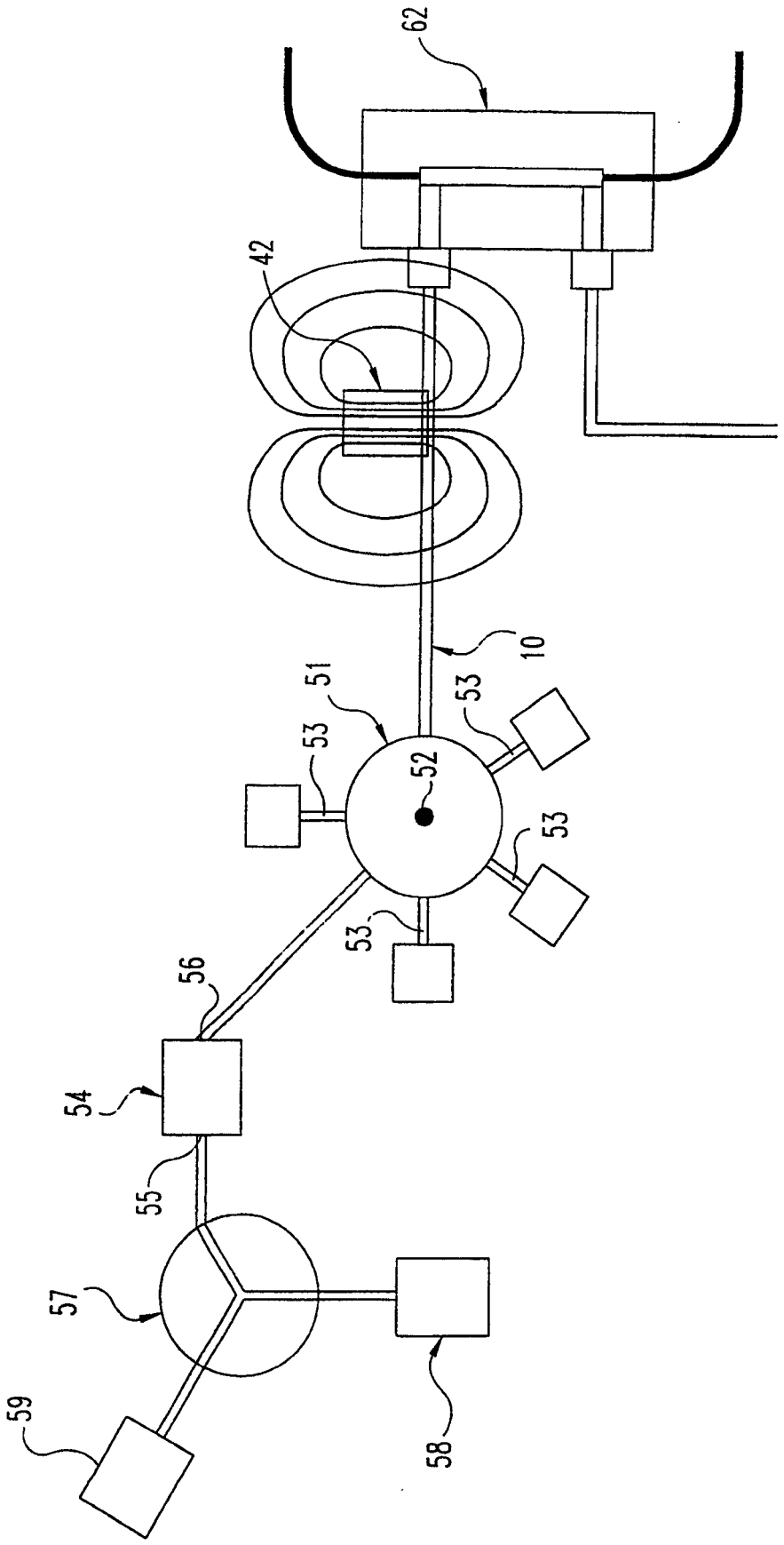


图 9

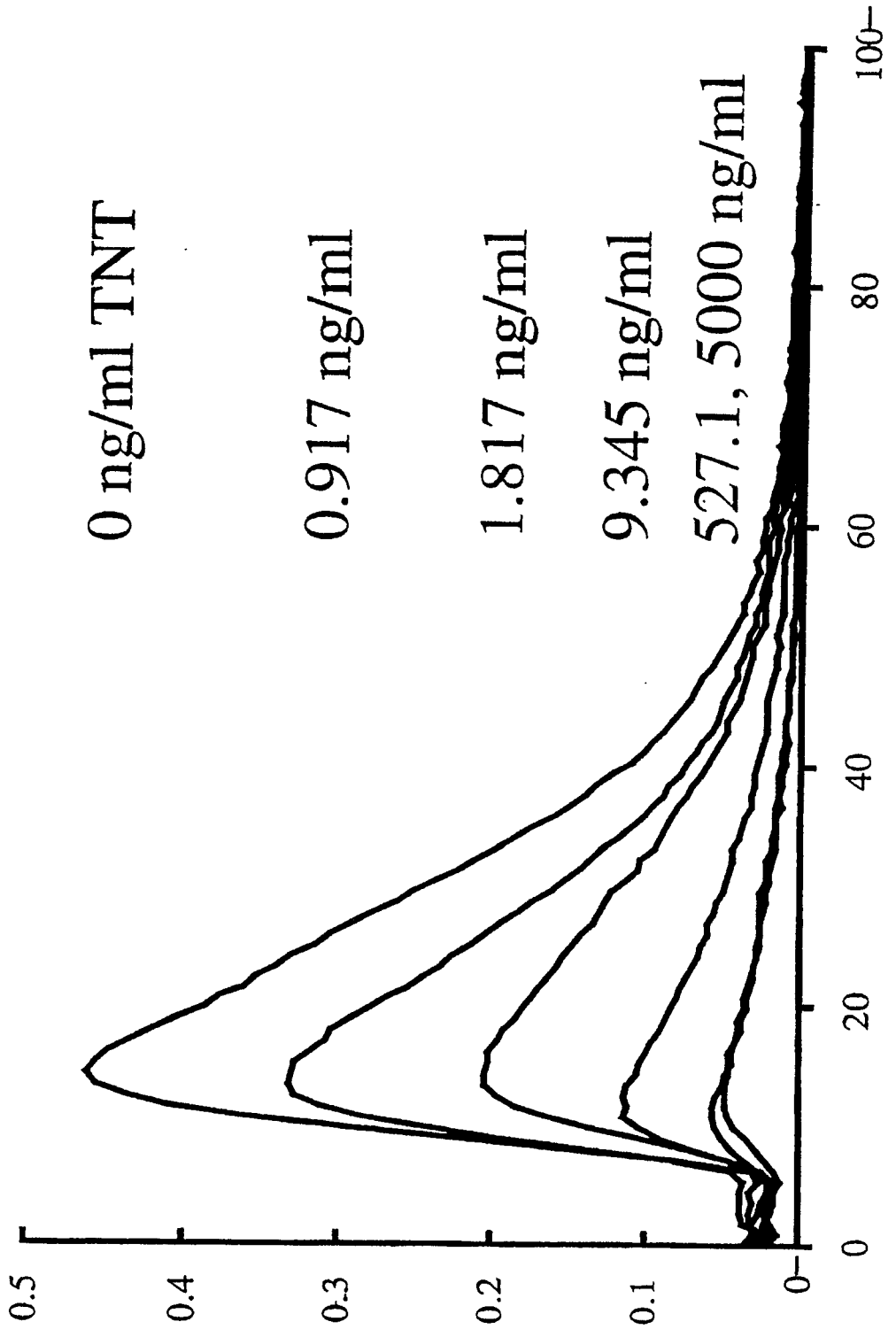

0 ng/ml TNT
0.917 ng/ml
1.817 ng/ml
9.345 ng/ml
527.1, 5000 ng/ml
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
20
40
60
80
100
注入的体积 / μl

图 10

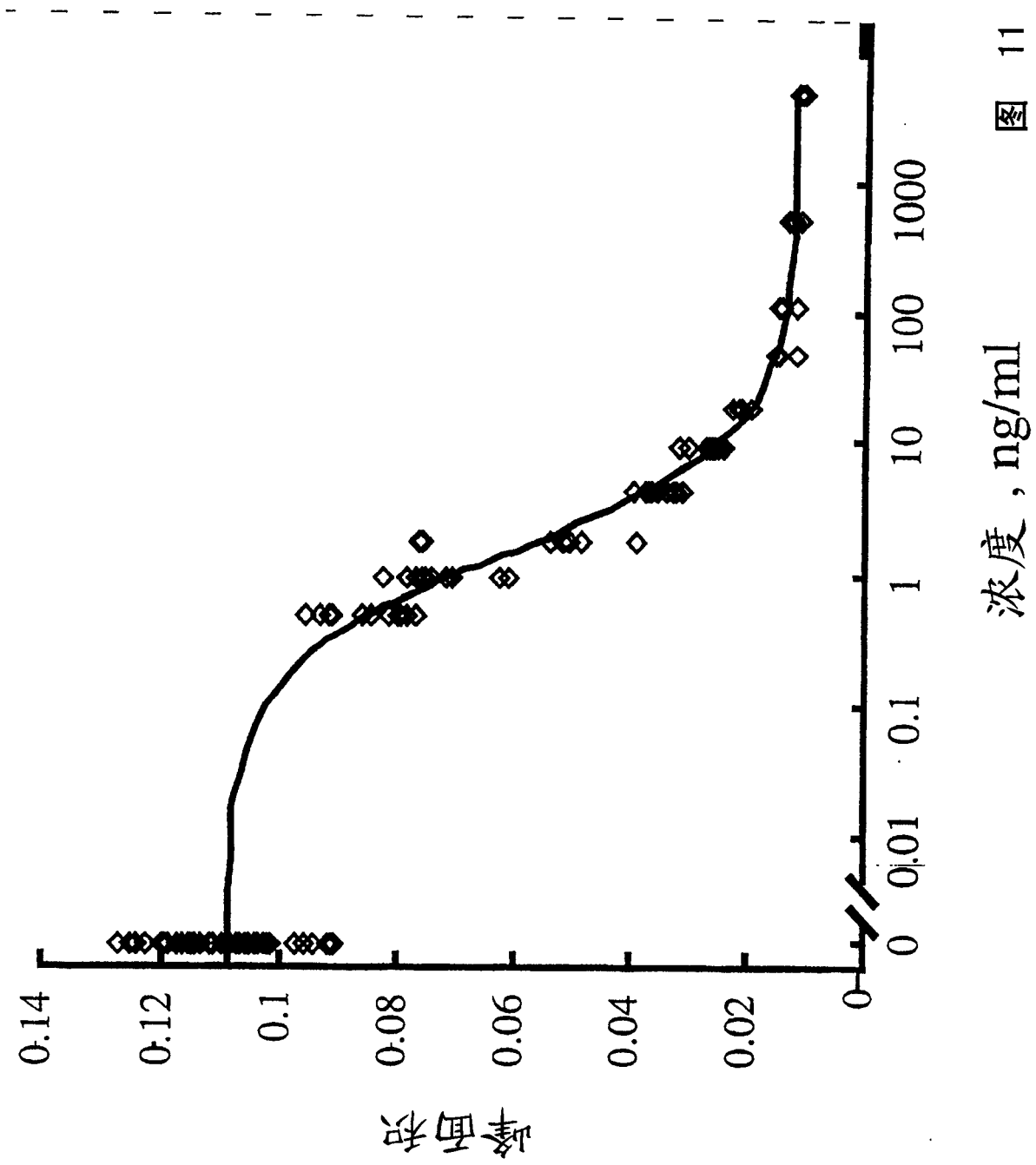


图 11

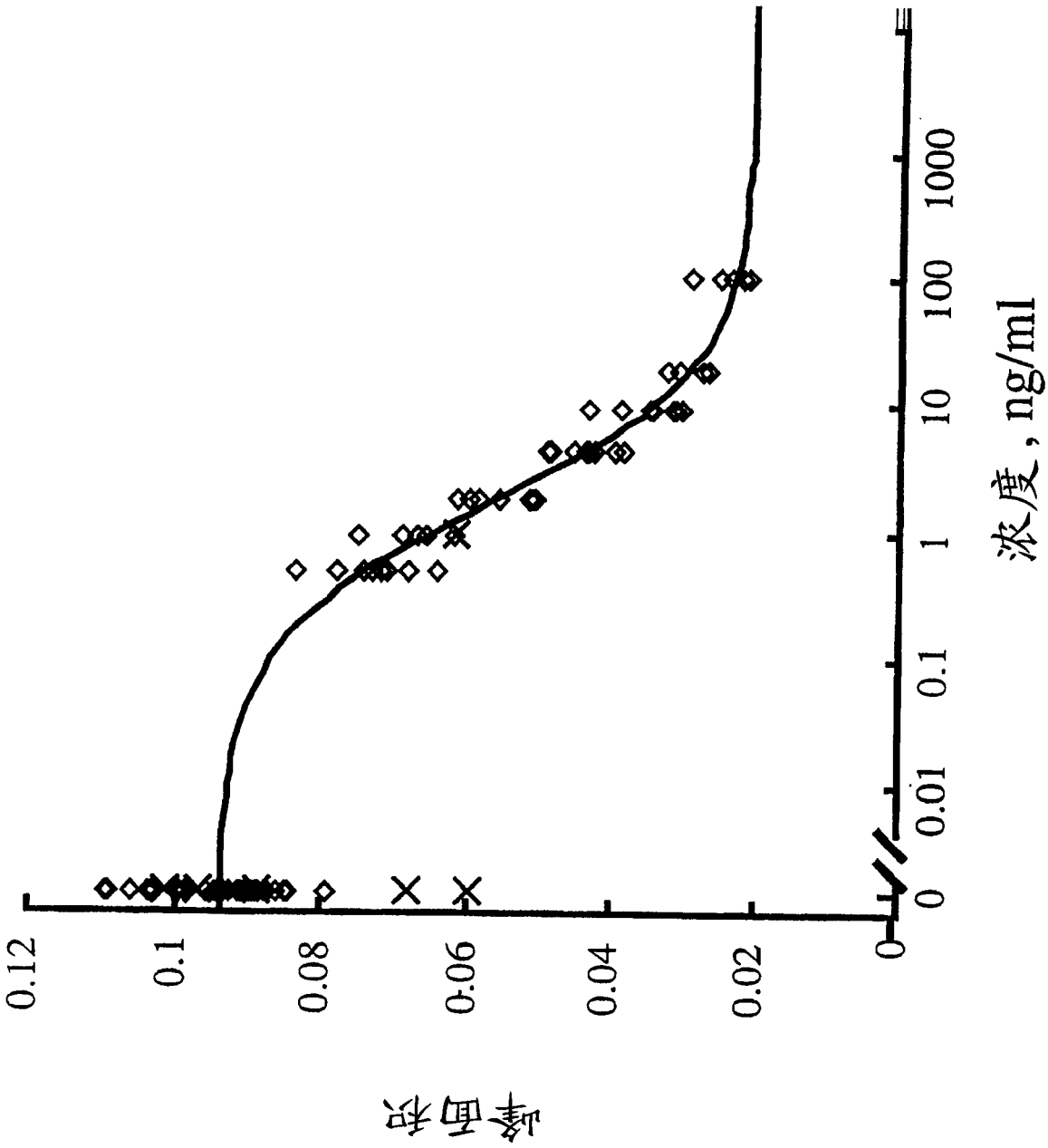
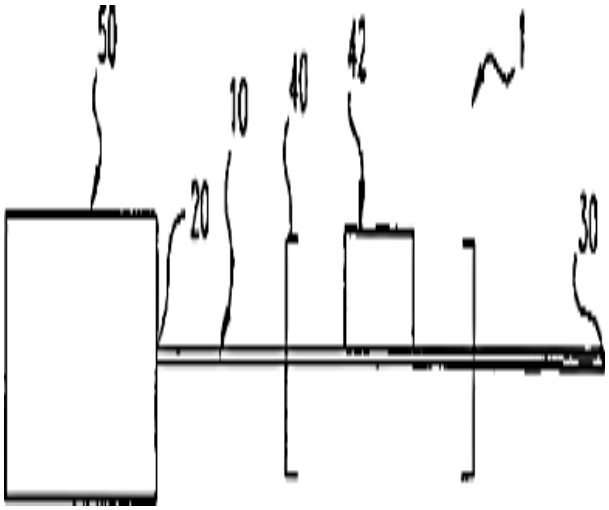


图 12

专利名称(译)	流量控制的磁性颗粒处理		
公开(公告)号	CN1650162A	公开(公告)日	2005-08-03
申请号	CN02821759.4	申请日	2002-08-06
[标]申请(专利权)人(译)	巴特勒记忆研究所		
申请(专利权)人(译)	巴特尔纪念研究院		
当前申请(专利权)人(译)	巴特尔纪念研究院		
[标]发明人	JW格拉特 CJ布鲁克纳 李 DA霍尔曼		
发明人	J·W·格拉特 C·J·布鲁克纳 - 李 D·A·霍尔曼		
IPC分类号	B01L3/00 B03C1/00 C12M1/34 C12M1/42 C12Q1/25 G01N33/543 G01N35/00 G01N35/08 G01N33/53 B01J19/00		
CPC分类号	B01J2219/00743 B01L3/5027 B01J2219/00722 B01J2219/005 Y10T436/11 G01N33/54333 Y10T436/112499 B03C1/00 G01N2035/00237 Y10T436/111666 B01J2219/00725 G01N27/745 G01N35/0098 G01N35/08		
优先权	09/944816 2001-08-31 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

发明的方法和设备(1，2)对于在一个或多个磁场中收集磁性颗粒并将颗粒再悬浮在分散介质中，并通过控制流经流体流动通道(10)的流体流的方向和速度，有选择地在相同或不同介质中有选择地重复进行一次或多次收集/再悬浮是有用的。该方法提供用于测试样品和试剂接触衍生颗粒、过量试剂的去除、磁性材料的冲洗、和在其它用途中再悬浮以用于分析。该方法适用于宽范围的对磁性标记包括例如细胞、病毒、低聚核苷酸、蛋白质、荷尔蒙、受体 - 配合体的络合物、环境污染物等敏感的化合物和生物材料。