



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110118875 B

(45)授权公告日 2020.08.28

(21)申请号 201910385312.1

G01N 21/59(2006.01)

(22)申请日 2019.05.09

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 106645067 A,2017.05.10

申请公布号 CN 110118875 A

US 2003222222 A1,2003.12.04

(43)申请公布日 2019.08.13

CN 1431500 A,2003.07.23

CN 106896095 A,2017.06.27

(73)专利权人 量准(武汉)生命科技有限公司

审查员 刘莉丹

地址 430073 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新大道666号光谷生物城B1栋五楼506、507室

(72)发明人 胡文君

(74)专利代理机构 北京金蓄专利代理有限公司

11544

代理人 洪涛

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

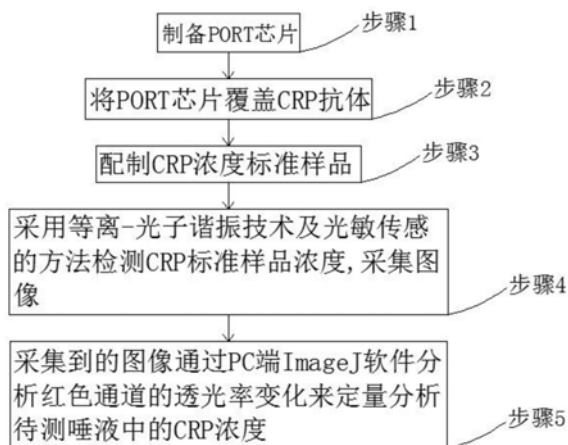
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法及装置

(57)摘要

本发明实施例公开了一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法,所述方法包括以下步骤:步骤1、制备PORT芯片,用于产生等离光子谐振耦合效应的设备;步骤2、将PORT芯片覆盖CRP抗体,用来特异性检测CRP蛋白的量;步骤3、配制CRP浓度标准样品,用于测量样品中的CRP浓度;步骤4、采用等离-光子谐振技术及光敏传感的方法检测CRP标准样品浓度;将PORT芯片固定在光学显微镜中,然后将100 μ l在CRP浓度标准样品溶液滴到PORT芯片,通过光学显微镜观察;以全波段LED光源、离光子谐振耦合芯片传感器件以及和光学显微镜链接的数码相机组成的图像采集系统;步骤5、采集到的图像通过PC端ImageJ软件分析红色通道的透光率变化来定量分析待测唾液中的CRP浓度。



1. 一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

步骤1、制备PORT芯片,用于产生等离光子谐振耦合效应的设备;

步骤2、将PORT芯片覆盖CRP抗体,用来特异性检测CRP蛋白的量;

步骤3、配制CRP浓度标准样品,用于测量样品中的CRP浓度;

步骤4、采用等离-光子谐振技术及光敏传感的方法检测CRP标准样品浓度;将PORT芯片固定在光学显微镜中,然后将100 $\mu$ l在CRP浓度标准样品溶液滴到PORT芯片,通过光学显微镜观察;以全波段LED光源、离光子谐振耦合芯片传感器件以及和光学显微镜链接的数码相机组成的图像采集系统;

步骤5、采集到的图像通过PC端ImageJ软件分析红色通道的透光率变化来定量分析待测唾液中的CRP浓度。

2. 根据权利要求1所述的一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法,其特征在于,制备PORT芯片采用复制成形工艺。

3. 根据权利要求2所述的一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法,其特征在于,制备PORT芯片方法如下,利用激光干涉光刻在石英基板上制作锥形纳米柱图案,然后将紫外光固化聚合物NOA-61均匀散布在模具上,顶部以聚对苯二甲酸乙二醇酯支撑;用紫外光进行2分钟固化处理,然后将聚对苯二甲酸乙二醇酯基板连同周期性纳米孔道图案从模具上仔细剥离;通过电子束蒸发沉积形成一个钛粘附层和一个黄金层,以实现等离激元器件成形,然后利用射频等离子体溅射沉积二氧化钛谐振腔层,而后通过15nm钛粘附层和顶部黄金层的电子束蒸发形成纳米谐振腔。

4. 根据权利要求3所述的一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法,其特征在于,所述钛黏附层、黄金层和二氧化钛谐振腔层的厚度分别是15nm、210nm和170nm。

5. 根据权利要求1所述的一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法,其特征在于,PORT芯片覆盖CRP抗体的方法如下,在室温条件下将PORT芯片置于1mM11-巯基十一烷酸溶液中24小时,用70%乙醇清洗后以氮气吹干;加入400 $\times$ 10<sup>-3</sup>M1-乙烷基-3-3-二甲基氨基丙基碳化二亚胺和100 $\times$ 10<sup>-3</sup>MN-羟基丁二酰亚胺的1:1混合液中培养30分钟;磷酸缓冲盐溶液清洗一次后立即放入30 $\mu$ g/ml单克隆抗CRP抗体内室温培养2小时,PBS清洗一次后用氮气吹干;加入30 $\mu$ g/ml牛血清白蛋白阻断液中室温培养30分钟,去除牛血清白蛋白阻断液并加入10%乙醇胺溶液室温培养30分钟,以覆盖未反应的NHS酯;超纯水清洗一次后,氮气吹干后放置于干燥环境中;需要使用时将芯片粘于光学显微镜观察部位。

6. 根据权利要求1所述的一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法,其特征在于,配制CRP浓度标准样品的方法如下,采用250ng/ml的CRP蛋白溶液稀释配制为不同浓度梯度的CRP标准样品溶液;稀释底液为人工唾液缓冲液。

7. 根据权利要求1所述的一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法,其特征在于,红色通道的波长区域为580-625nm。

## 一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法及装置

### 技术领域

[0001] 本发明实施例涉及检测技术领域,具体涉及一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法及装置。

### 背景技术

[0002] CRP是机体受到微生物入侵或组织损伤等炎症性刺激时肝细胞合成的急性相蛋白,CRP蛋白是感染或炎症的早期血液信号,可作为多种疾病的生物标记。健康受试者体内血清CRP正常水平低于 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ,其浓度在外来抗原出现几个小时后显著提高,随后48小时内甚至高可达 $300\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0003] 目前,血液检测CRP已广泛应用于各种疾病和机能失调的临床决策。但是采血检测是一种侵入性手段程序,必须由技术熟练的专业人员操作,有时甚至需要静脉穿刺。后续检测部分也离不开实验室设备和高昂的成本。

[0004] 唾液检测是一种非侵入性无痛方法,可作为替代性方法对较大量样本的CRP进行评估。但是唾液中CRP浓度较血液中低,但是,现有的检测方式检测成本高,显示不够直观。

### 发明内容

[0005] 为此,本发明实施例提供一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法及装置,以解决现有技术中CRP检测成本较高的问题。

[0006] 为了实现上述目的,本发明实施例提供如下技术方案:

[0007] 一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法,所述方法包括以下步骤:步骤1、制备PORT芯片,用于产生等离光子谐振耦合效应的设备;步骤2、将PORT芯片覆盖CRP抗体,用来特异性检测CRP蛋白的量;步骤3、配制CRP浓度标准样品,用于测量样品中的CRP浓度;步骤4、采用等离-光子谐振技术及光敏传感的方法检测CRP标准样品浓度;将PORT芯片固定在光学显微镜中,然后将 $100\mu\text{l}$ 在CRP浓度标准样品溶液滴到PORT芯片,通过光学显微镜观察;以全波段LED光源、离光子谐振耦合芯片传感器件以及和光学显微镜链接的数码相机组成的图像采集系统;步骤5、采集到的图像通过PC端ImageJ软件分析红色通道的透光率变化来定量分析待测唾液中的CRP浓度。

[0008] 发明实施例的特征还在于,制备PORT芯片采用复制成形工艺。

[0009] 发明实施例的特征还在于,制备PORT芯片方法如下,利用激光干涉光刻在石英基板上制作锥形纳米柱图案,然后将紫外光固化聚合物(NOA-61,Sigma)均匀散布在模具上,顶部以聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)支撑;用紫外光进行2分钟固化处理,然后将聚对苯二甲酸乙二醇酯基板连同周期性纳米孔道图案从模具上仔细剥除;通过电子束蒸发沉积形成一个钛(Ti)粘附层和一个黄金层,以实现等离激元器件成形,然后利用射频等离子体溅射沉积二氧化钛谐振腔层,而后通过 $15\text{nm}$ 钛粘附层和顶部黄金层的电子束蒸发形成纳米谐振腔。

[0010] 发明实施例的特征还在于,所述钛黏附层、黄金层和二氧化钛谐振腔层的厚度分

别是15nm、210nm和170nm。

[0011] 发明实施例的特征还在于,PORT芯片覆盖CRP抗体的方法如下,在室温条件下将PORT芯片置于1mM 11-巯基十一烷酸溶液(乙醇溶液)中24小时,用70%乙醇清洗后以氮气吹干;加入 $400 \times 10^{-3} \text{M}$  1-乙烷基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)和 $100 \times 10^{-3} \text{M}$  N-羟基丁二酰亚胺(NHS)的1:1混合液中培养30分钟;磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)清洗一次后立即放入 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 单克隆抗CRP抗体内室温培养2小时,PBS清洗一次后用氮气吹干;加入 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 牛血清白蛋白(Bovine serum albumin,BSA)阻断液中室温培养30分钟,去除BSA阻断液并加入10%乙醇胺溶液室温培养30分钟,以覆盖未反应的NHS酯。超纯水(DDW)清洗一次后,氮气吹干后放置于干燥环境中;需要使用时将芯片粘于(32)光学显微镜观察部位。

[0012] 发明实施例的特征还在于,配制CRP浓度标准样品的方法如下,采用 $250 \text{ng}/\text{ml}$ 的CRP蛋白溶液稀释配制为不同浓度梯度的CRP标准样品溶液;稀释底液为人工唾液缓冲液。

[0013] 发明实施例的特征还在于,红色通道的波长区域为580-625nm。

[0014] 一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的装置,所述装置包括光学显微镜和与光学显微镜配合使用的数码相机以及与数码相机数据传输的PC端电脑。

[0015] 发明实施例的特征还在于,所述PC端电脑包含有ImageJ软件。

[0016] 本发明实施例具有如下优点:利用普通光学显微镜实现透射成像检测,该器件可最大限度减少仪表需求。具有选择性好、敏感度高等优点,且无需额外的检测标记物质,简化了检测过程,降低了检测成本;芯片在580-625nm段透射光强度的改变而对表面折射率的变化有极高的敏感性。本设计利用普通的显微镜对芯片进行透射成像检测,通过ImageJ软件分析红色通道(覆盖580-625nm波长区域)的透光率变化来定量分析待测唾液中的CRP浓度;在PC端能够很直观的观察得到成像结果,提高检测效率。

## 附图说明

[0017] 为了更清楚地说明本发明的实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。显而易见地,下面描述中的附图仅仅是示例性的,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图引伸获得其它的实施附图。

[0018] 本说明书所绘示的结构、比例、大小等,均仅用以配合说明书所揭示的内容,以供熟悉此技术的人士了解与阅读,并非用以限定本发明可实施的限定条件,故不具技术上的实质意义,任何结构的修饰、比例关系的改变或大小的调整,在不影响本发明所能产生的功效及所能达成的目的下,均应仍落在本发明所揭示的技术内容得能涵盖的范围内。

[0019] 图1为本发明实施例提供的一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法步骤流程图;

[0020] 图2为本发明实施例提供的特定折光率样品示意图;

[0021] 图3为本发明实施例提供的检测不同浓度的CRP结果图;

[0022] 图4为本发明实施例提供的检测不同受试者血液及唾液中CRP对应关系图。

## 具体实施方式

[0023] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围;本说明书中所引用的如“上”、“下”、“左”、“右”、“中间”等的用语,亦仅为便于叙述的明了,而非用以限定本发明可实施的范围,其相对关系的改变或调整,在无实质变更技术内容下,当亦视为本发明可实施的范畴。

[0024] 实施例1

[0025] 本发明实施例1提供的一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的方法,请参阅图1所示,方法包括以下步骤:

[0026] 步骤1、制备PORT芯片,用于产生等离光子谐振耦合效应的设备;

[0027] 步骤2、将PORT芯片覆盖CRP抗体,用来特异性检测CRP蛋白的量;

[0028] 步骤3、配制CRP浓度标准样品,用于测量样品中的CRP浓度;

[0029] 步骤4、采用等离-光子谐振技术及光敏传感的方法检测CRP标准样品浓度;将PORT芯片固定在光学显微镜中,然后将100 $\mu$ l在CRP浓度标准样品溶液滴到PORT芯片,通过光学显微镜观察;以全波段LED光源、离光子谐振耦合芯片传感器件以及和光学显微镜链接的数码相机组成的图像采集系统;

[0030] 步骤5、采集到的图像通过PC端ImageJ软件分析红色通道的透光率变化来定量分析待测唾液中的CRP浓度。

[0031] 需要说明的是,制备PORT芯片采用复制成形工艺。

[0032] 进一步的,请参阅图2所示,制备PORT芯片方法如下,利用激光干涉光刻在石英基板上制作锥形纳米柱图案,然后将紫外光固化聚合物NOA-61均匀散布在模具上,顶部以聚对苯二甲酸乙二醇酯支撑;用紫外光进行2分钟固化处理,然后将聚对苯二甲酸乙二醇酯基板连同周期性纳米孔道图案从模具上仔细剥除;通过电子束蒸发沉积形成一个钛粘附层和一个黄金层,以实现等离激元器件成形,然后利用射频等离子体溅射沉积二氧化钛谐振腔层,而后通过15nm钛粘附层和顶部黄金层的电子束蒸发形成纳米谐振腔。

[0033] 需要说明的是,钛黏附层、黄金层和二氧化钛谐振腔层的厚度分别是15nm、210nm和170nm。

[0034] 进一步的,PORT芯片覆盖CRP抗体的方法如下,在室温条件下将PORT芯片置于1mM 11-巯基十一烷酸溶液中24小时,用70%乙醇清洗后以氮气吹干;加入 $400 \times 10^{-3}$ M 1-乙烷基-3-3-二甲基氨丙基碳化二亚胺和 $100 \times 10^{-3}$ M N-羟基丁二酰亚胺的1:1混合液中培养30分钟;磷酸缓冲盐溶液清洗一次后立即放入30 $\mu$ g/ml单克隆抗CRP抗体内室温培养2小时,PBS清洗一次后用氮气吹干;加入30 $\mu$ g/ml牛血清白蛋白阻断液中室温培养30分钟,去除牛血清白蛋白阻断液并加入10%乙醇胺溶液室温培养30分钟,以覆盖未反应的NHS酯;超纯水清洗一次后,氮气吹干后放置于干燥环境中;需要使用时将芯片粘于光学显微镜观察部位。

[0035] 进一步的,配制CRP浓度标准样品的方法如下,采用250ng/ml的CRP蛋白溶液稀释配制为不同浓度梯度的CRP标准样品溶液;稀释底液为人工唾液缓冲液。

[0036] 需要说明的是,红色通道的波长区域为580-625nm。

[0037] 如:请参阅图3所示,采用250ng/ml的CRP蛋白溶液稀释配制为6种浓度梯度的CRP标准样品溶液,分别为1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml和100ng/ml;稀释底液为人工唾液缓冲液。

[0038] 检测CRP浓度标准样品信号:采用等离光子谐振技术及光敏传感的方法检测CRP标准样品浓度;向底部已粘有芯片的样本采集槽内加入125 $\mu$ l在CRP浓度标准样品溶液,以全波段LED光源件、离光子谐振耦合芯片以及光学显微镜链接的数码相机组成的检测系统;光学检测为图像储存,每次记录图像时保持光源亮度一致;

[0039] 建立标准浓度-透射强度曲线;在样本采集槽中分别加入不同浓度梯度的CRP标准样品,依次重复步骤4,获得红色通道的波段(580-625nm)的透射强度,包括起始时与检测时透射波段的差值,得到CRP浓度与光学透射强度曲线,构成标准响应曲线 $Y=5.309*lgX-0.68$ ,X为CRP蛋白浓度,Y为光学透射峰强度变化相对值, $R^2=0.98$ ;

[0040] 在样本采集槽内加入待测的患者唾液或未知浓度CRP溶液,以LED光源件、离光子谐振耦合芯片和光学显微镜以及与光学显微镜配合使用的数码相机采集图像,将采集的图像传输到PC端上,通过PC端ImageJ软件分析红色通道的透光率变化来定量分析待测唾液中的CRP浓度。

[0041] 利用普通光学显微镜实现透射成像检测,该器件可最大限度减少仪表需求。具有选择性好、敏感度高等优点,且无需额外的检测标记物质,简化了检测过程,降低了检测成本;芯片在580-625nm段透射光强度的改变而对表面折射率的变化有极高的敏感性。本设计利用普通的显微镜对芯片进行透射成像检测,通过ImageJ软件分析红色通道(覆盖580-625nm波长区域)的透光率变化来定量分析待测唾液中的CRP浓度;在PC端能够很直观的观察到成像结果,提高检测效率。

[0042] 通过数据检测验证该方法的可行性,取不同受试者的血液与唾液,检测CPR浓度进行对比,如图4所示可知,基本相同,因此此法可行。

[0043] 实施例2

[0044] 本发明实施例2提供的一种人类唾液中C型反应性蛋白彩色成像的装置,其特征在于,装置包括光学显微镜和与光学显微镜配合使用的数码相机以及与数码相机数据传输的PC端电脑,PC端电脑包含有ImageJ软件。

[0045] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

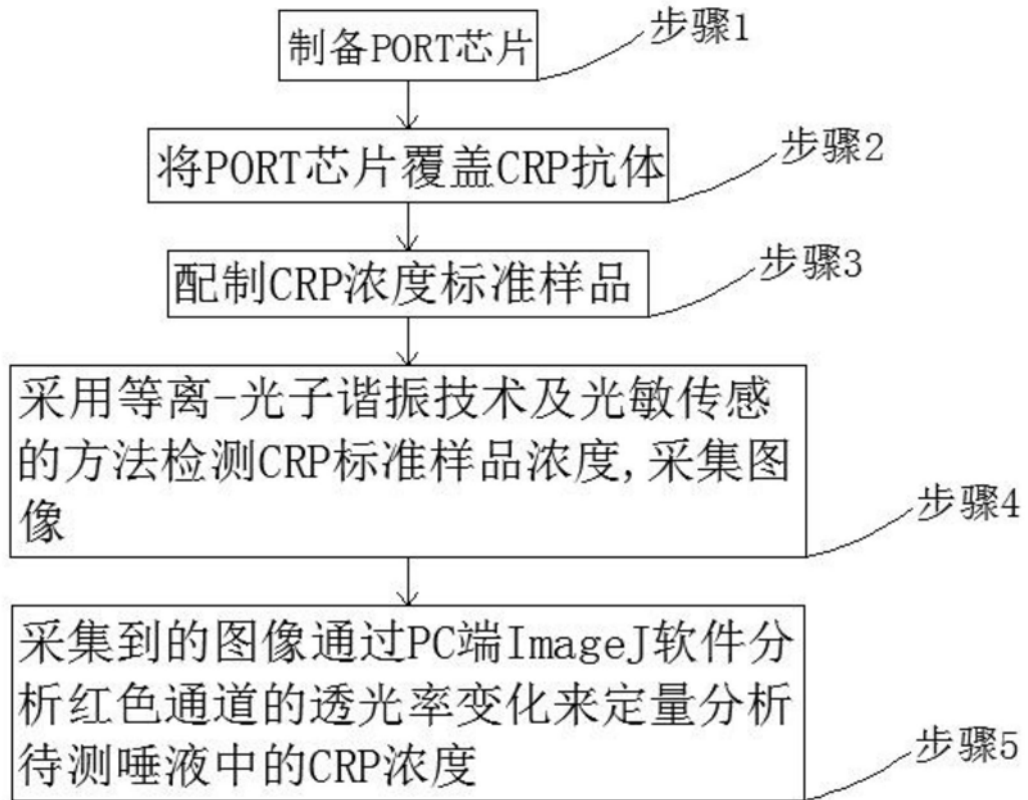


图1

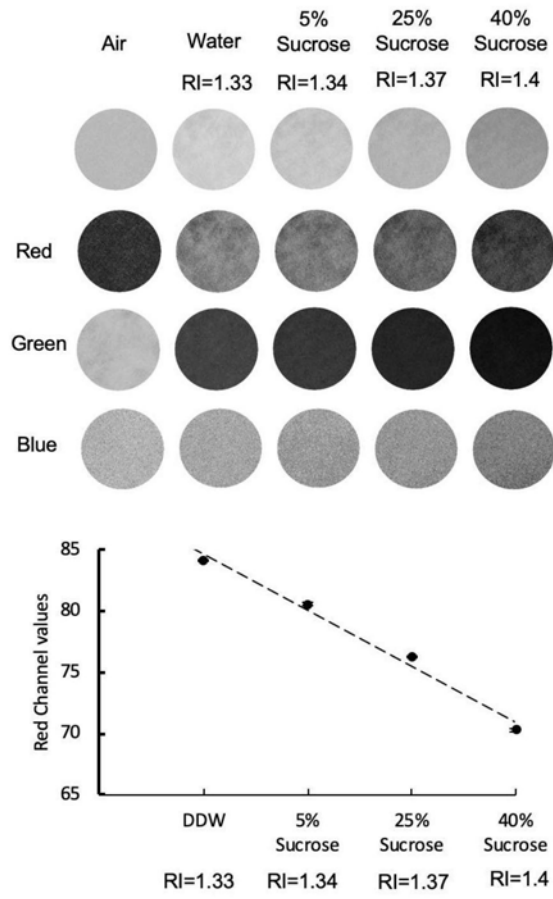


图2

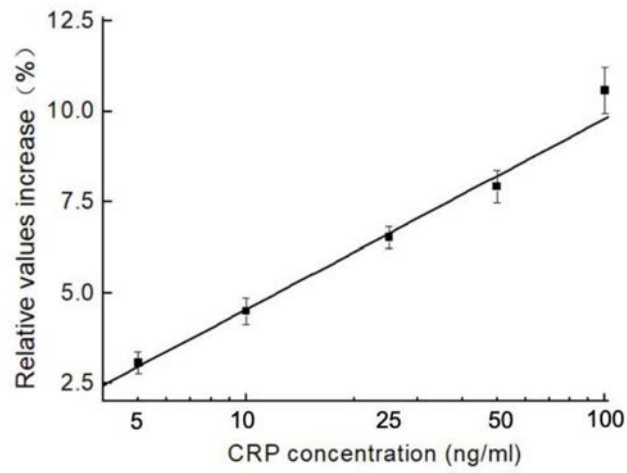


图3



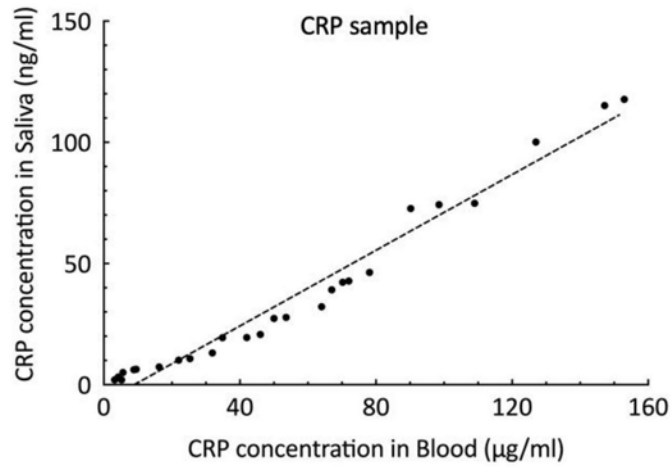


图4