



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101769923 A

(43) 申请公布日 2010.07.07

(21) 申请号 201010103698.1

(22) 申请日 2010.02.01

(71) 申请人 陶正杰

地址 226100 江苏省海门市海门镇沙东村  
四十组 21 号

申请人 夏晶

(72) 发明人 陶正杰 夏晶

(74) 专利代理机构 南京众联专利代理有限公司  
32206

代理人 郭俊玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

一种基于酶联免疫法的快速检测系统

(57) 摘要

本发明公开了一种基于酶联免疫法的快速检测系统,包括以下组件:a、检测构件;b、用于放置目标样品的空瓶;c、装有经冷冻干燥后抗体的试剂瓶;d、装有酶标标记物的试剂瓶;e、装有用于是定性的底物的试剂瓶;f、装有用于是定量的底物的试剂瓶;g、装有缓冲溶液的试剂瓶;本发明公开了该系统的检测方法,还公开了可以同时吸附或共价连接各种不同分子量的反应物的固相载体,其基质主体为聚羟基丁酸酯,所述基质里还嵌入带有活性功能团的聚氨基酸,该嵌入的聚氨基酸与聚羟基丁酸酯基质的质量比为(0.1-8):100。本发明不需要前期的样品制备,且制成的检测棒体系亦可适用于单个样品,小巧便携,有现场可操作性,效果比传统酶联免疫试剂盒更方便准确。

1. 一种基于酶联免疫法的快速检测系统,其特征是包括置于一个检测盒中的以下组件:a、检测构件;b、用于放置目标样品的空瓶;c、装有经冷冻干燥后抗体的试剂瓶;d、装有酶标记物的试剂瓶;e、装用于定性的底物的试剂瓶;f、装用于定量的底物的试剂瓶;g、装有缓冲溶液的试剂瓶。

2. 根据权利要求1所述的一种基于酶联免疫法的快速检测系统,其特征是所述检测构件为包被有抗体的固相载体,所述固相载体套有一个比色杯。

3. 根据权利要求2所述的一种基于酶联免疫法的快速检测系统,其特征是所述固相载体的基质主体为聚羟基丁酸酯,所述基质里还嵌入有带活性功能团的化合物。

4. 根据权利要求3所述的一种基于酶联免疫法的快速检测系统,其特征是所述带活性功能团的化合物为聚氨基酸,所述嵌入的聚氨基酸与聚羟基丁酸酯基质的质量比为(0.1-8):100。

5. 根据权利要求4所述的一种基于酶联免疫法的快速检测系统,其特征是所述聚氨基酸为聚天门冬氨酸、聚赖氨酸或聚谷氨酸。

6. 根据权利要求3、4或5所述的一种基于酶联免疫法的快速检测系统,其特征是所述以聚羟基丁酸酯为基质主体的固相载体形状为棒状,即检测棒。

7. 根据权利要求6所述的一种基于酶联免疫法的快速检测系统,其特征是所述检测棒的制备方法为:将聚氨基酸与聚羟基丁酸酯按(0.1-8):100的质量比混合均匀后,送入压塑机在110-210℃的加工温度下进行压塑并制成珠粒状,然后再将珠粒状压塑物通过常规工艺制成棒状,即得。

8. 根据权利要求1或2所述的一种基于酶联免疫法的快速检测系统,其特征是所述抗体可为任何种类的免疫球蛋白IgG,所述抗体的包被方法为:首先将抗体以20μg/ml溶于磷酸盐缓冲溶液,将固相载体浸入到抗体溶液中,放入冰箱冷藏过夜;然后取出固相载体,再将其浸入封闭液中,封闭液为溶有体积浓度1%的Tween20的磷酸盐缓冲溶液,室温下静置两小时后,取出自然晾干;固相载体套入比色杯中,2-8℃冷藏保存,所述固相载体为检测棒。

9. 根据权利要求1所述的一种基于酶联免疫法的快速检测系统,其特征是所述装有经过冷冻干燥后的抗体的试剂瓶的制备方法为:将抗体以1mg/ml溶于磷酸盐缓冲溶液,取20μl注入试剂瓶中,放入冷冻干燥器中过夜冻干,取出后2-8℃冷藏保存;

所述装有酶标记物试剂瓶的制备方法为:将1mg金黄色葡萄球菌蛋白A偶联碱性磷酸酶保存于1ml的 $50 \times 10^{-3}$ mol/L Tris溶液中,然后再加入氯化镁、氯化锌、牛血清蛋白、甘油和叠氮化钠,使氯化镁达到 $1.0 \times 10^{-3}$ mol/L、氯化锌达到 $0.1 \times 10^{-3}$ mol/L、牛血清白蛋白的体积浓度达到1%、甘油的体积浓度达到50%和叠氮化钠达到 $15 \times 10^{-3}$ mol/L,调pH值为8.0,即得工作浓度为1mg/ml的金黄色葡萄球菌蛋白A偶联碱性磷酸酶;取0.4μl注入试剂瓶中,2-8℃冷藏保存;

所述用于定性测量的底物为5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐(BCIP)与氯化硝基四氮唑蓝(NBT)的混合液,所述装有底物试剂瓶的制备方法为:将摩尔浓度为 $4.8 \times 10^{-4}$ mol/L的BCIP和摩尔浓度为 $5.1 \times 10^{-4}$ mol/L NBT混合,然后取1ml混合液注入试剂瓶中,2-8℃冷藏并避光保存;

所述用于定量测量的底物为溶于体积浓度为10%的二羟乙基胺的硝基苯磷酸盐,所述

硝基苯磷酸盐的质量浓度为 1.0mg/ml,所述溶液的 pH 值为 9.5,然后取 1ml 混合液注入试剂瓶中,2-8℃冷藏并避光保存;

所述装有缓冲溶液试剂瓶的制备方法:将牛血清白蛋白溶于磷酸盐缓冲溶液中使牛血清白蛋白的体积浓度达到 1%,然后取 5ml 注入试剂瓶中,2-8℃冷藏保存即得。

10. 一种基于酶联免疫法的快速检测系统的检测方法,其特征是包括以下步骤:

(1) 测试材料为固体适当研磨或打碎,液体无需制样,按体积比 1 : 1 加入权利要求 9 中制得的缓冲溶液并均匀混合,充分震荡;取震荡后的悬浮液注入权利要求 1 中用于放置目标样品的空试剂瓶,液面至试剂瓶一半体积处为 0.7-0.9ml,然后将检测棒插入装有样品液试剂瓶中,室温下静置 30 分钟后,将检测棒取出,用水冲洗;

(2) 取缓冲溶液 1ml 注入装有冻干抗体的试剂瓶,震荡让其中的冻干抗体溶解后,将检测棒插入其中,室温下静置 30 分钟后,将检测棒取出,用水冲洗;

(3) 取缓冲溶液 1ml 注入装有酶标标记物的试剂瓶,混合均匀后将检测棒插入其中,室温下静置 20 分钟后,将检测棒取出,用水冲洗;

(4) 用于快速定性检测:将装用于定性的底物的试剂瓶中的底物 1ml 注入套装所配的比色杯中,将检测棒插入比色杯等待显色反应,10 分钟后,取出检测棒观察;

(5) 用于快速定量检测:将装用于定量的底物的试剂瓶中的底物 1ml 注入套装所配的比色杯中,将检测棒插入比色杯,10 分钟后,取出检测棒,将比色杯放入分光光度计中测量吸光值,通过对标准样品和目标样品吸光值的测定,对目标样品进行定量分析。

11. 一种可包被反应物的固相载体,其特征是所述固相载体的基质主体为聚羟基丁酸酯,所述基质里还嵌入有聚氨基酸,所述嵌入的聚氨基酸与聚羟基丁酸酯基质的质量比为 (0.1-8) : 100。

12. 根据权利要求 11 所述的一种可包被反应物的固相载体,其特征是所述聚氨基酸为聚天门冬氨酸、聚赖氨酸或聚谷氨酸。

13. 根据权利要求 11 所述的一种可包被反应物的固相载体,其特征是所述固相载体的外形可为棒状、微球状、管状、梳齿状或微孔板状;所述固相载体可包被的反应物分子量范围为 100Da-2000000Da,所述反应物可为蛋白质、多肽、寡核苷酸、寡聚糖或低分子半抗原。

## 一种基于酶联免疫法的快速检测系统

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于酶联免疫法的快速检测系统及其检测方法,本发明还涉及一种可包被反应物的固相载体。

### 背景技术

[0002] 本发明的基本理论体系是利用酶联免疫法(ELISA)中的双抗体夹心法测定未知抗原。将抗原免疫动物获得的抗体吸附于固相表面,加抗原,形成抗原-抗体复合物;加与前一步同样的抗体,形成抗体-抗原-抗体复合物,再加入酶标标记物;加入底物,结果判定;有色产物的生成量与抗原量成正相关。

[0003] 现有酶联免疫试剂盒的基本特征是:将抗原或抗体固定在固相载体上制成微孔板,利用酶标记的抗原或抗体及底物,检测样品中与固相载体上的抗原或抗体相应的抗原或抗体。传统材质一般采用聚苯乙烯作为免疫吸附的载体,具有一定的局限性,其包埋率及亲水性都有限,所以对样品的前期处理要求严格,耗费大量时间,需要专业的技术人员和实验室环境,在产品的使用操作和检测灵敏度方面都受到了很大的限制,而且作为不可降解的传统聚苯乙烯塑料,不利于环保。试剂盒通常设计为96孔或48孔的板状,微孔板在操作上十分不便,样品容易混淆,用肉眼辨别微孔上的变化容易误判,若样品数量较少则会造成微孔的闲置浪费。并且所有操作不能为普通使用者所掌握。

### 发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种基于酶联免疫法的快速检测系统。

[0005] 本发明的第二个目的是提供上述检测系统的检测方法。

[0006] 本发明的第三个目的是提供一种可包被反应物的固相载体。

[0007] 本发明采用的技术方案是:

[0008] 一种基于酶联免疫法的快速检测系统,包括置于一个检测盒中的以下组件:a、检测构件;b、用于放置目标样品的空瓶;c、装有经冷冻干燥后抗体的试剂瓶;d、装有酶标标记物的试剂瓶;e、装有用于定性的底物的试剂瓶;f、装有用于定量的底物的试剂瓶;g、装有缓冲溶液的试剂瓶。

[0009] 所述检测构件为包被有抗体的固相载体,并套有一个比色杯。

[0010] 该固相载体的基质主体为聚羟基丁酸酯,其基质里还嵌入带有活性功能团的化合物。

[0011] 此化合物为聚氨基酸,嵌入的聚氨基酸与聚羟基丁酸酯基质的质量比为(0.1-8):100。

[0012] 聚氨基酸为聚天门冬氨酸、聚赖氨酸或聚谷氨酸。

[0013] 所述以聚羟基丁酸酯为基质主体的固相载体形状为棒状,即检测棒。

[0014] 所述检测棒的制备方法为:将聚氨基酸与聚羟基丁酸酯按(0.1-8):100的质量比混合均匀后,送入压塑机在110-210℃的加工温度下进行压塑并制成珠粒状,然后再将珠

粒状压塑物通过常规工艺制成棒状,即得。

[0015] 所述抗体可为任何种类的免疫球蛋白 IgG,所述抗体的包被方法为:首先将抗体以  $20 \mu\text{g/ml}$  溶于磷酸盐缓冲溶液,将检测棒浸入到抗体溶液中,放入冰箱冷藏过夜;然后取出检测棒,再将其浸入封闭液中,封闭液为溶有体积浓度 1% 的 Tween20 的磷酸盐缓冲溶液,室温下静置两小时后,取出自然晾干;检测棒套入比色杯中,2-8℃ 冷藏保存。

[0016] 所述装有经过冷冻干燥后的抗体的试剂瓶的制备方法为:将抗体以  $1\text{mg/ml}$  溶于磷酸盐缓冲溶液,取  $20 \mu\text{l}$  注入试剂瓶中,放入冷冻干燥器中过夜冻干,取出后 2-8℃ 冷藏保存;

[0017] 所述装有酶标记物试剂瓶的制备方法为:将  $1\text{mg}$  金黄色葡萄球菌蛋白 A 偶联碱性磷酸酶保存于  $1\text{ml}$  的  $50 \times 10^{-3}\text{mol/L}$  Tris 溶液中,然后再加入氯化镁、氯化锌、牛血清蛋白、甘油和叠氮化钠,使氯化镁达到  $1.0 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ 、氯化锌达到  $0.1 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ 、牛血清蛋白的体积浓度达到 1%、甘油的体积浓度达到 50% 和叠氮化钠达到  $15 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ ,调 pH 值为 8.0,即得工作浓度为  $1\text{mg/ml}$  的金黄色葡萄球菌蛋白 A 偶联碱性磷酸酶;取  $0.4 \mu\text{l}$  注入试剂瓶中,2-8℃ 冷藏保存;

[0018] 所述用于定性测量的底物为 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐 (BCIP) 与氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 的混合液,所述装有底物试剂瓶的制备方法为:将摩尔浓度为  $4.8 \times 10^{-4}\text{mol/L}$  的 BCIP 和摩尔浓度为  $5.1 \times 10^{-4}\text{mol/L}$  NBT 混合,然后取  $1\text{ml}$  混合液注入试剂瓶中,2-8℃ 冷藏并避光保存;

[0019] 所述用于定量测量的底物为溶于体积浓度为 10% 的二羟乙基胺的硝基苯磷酸盐,所述硝基苯磷酸盐的质量浓度为  $1.0\text{mg/ml}$ ,所述溶液的 pH 值为 9.5,然后取  $1\text{ml}$  混合液注入试剂瓶中,2-8℃ 冷藏并避光保存;

[0020] 所述装有缓冲溶液试剂瓶的制备方法:将牛血清白蛋白溶于磷酸盐缓冲溶液中使牛血清白蛋白的体积浓度达到 1%,然后取  $5\text{ml}$  注入试剂瓶中,2-8℃ 冷藏保存即得。

[0021] 一种基于酶联免疫法的快速检测系统的检测方法包括以下步骤:

[0022] (1) 测试材料为固体适当研磨或打碎,液体无需制样,按体积比 1 : 1 加入权利要求 9 中制得的缓冲溶液并均匀混合,充分震荡;取震荡后的悬浮液注入用于放置目标样品的空试剂瓶,液面至试剂瓶一半体积处为  $0.7\text{--}0.9\text{ml}$ ,然后将检测棒插入装有样品液试剂瓶中,室温下静置 30 分钟后,将检测棒取出,用水冲洗;

[0023] (2) 取缓冲溶液  $1\text{ml}$  注入装有冻干抗体的试剂瓶,震荡让其中的冻干抗体溶解后,将检测棒插入其中,室温下静置 30 分钟后,将检测棒取出,用水冲洗;

[0024] (3) 取缓冲溶液  $1\text{ml}$  注入装有酶标记物的试剂瓶,混合均匀后将检测棒插入其中,室温下静置 20 分钟后,将检测棒取出,用水冲洗;

[0025] (4) 用于快速定性检测:将装用于定性测量的底物的试剂瓶中的底物  $1\text{ml}$  注入套装所配的比色杯中,将检测棒插入比色杯等待显色反应,10 分钟后,取出检测棒观察。

[0026] 此方法用于定性检测,其中棒上显示为蓝紫色,棒上颜色均匀的为阴性;棒的下半部分颜色明显深于上半部分,并明显呈现深浅两极的为阳性;呈阳性的棒,根据棒下半部分颜色深浅的比对也可进行半定量的估算。

[0027] (5) 用于快速定量检测:将装用于定量测量底物的试剂瓶中的底物  $1\text{ml}$  注入套装所配的比色杯中,将检测棒插入比色杯,10 分钟后,取出检测棒。碱性磷酸酶对该底物的

酶解产物呈可溶性黄色,最大吸收值在 410nm,可直接将比色杯放入分光光度计中测量吸光值,通过对标准样品和目标样品吸光值的测定,对目标样品进行定量分析。

[0028] 一种可包被反应物的固相载体,其基质主体为聚羟基丁酸酯,其基质里还嵌入有聚氨基酸,所嵌入的聚氨基酸与聚羟基丁酸酯基质的质量比为 (0.1-8) : 100。

[0029] 上述嵌入的聚氨基酸为聚天门冬氨酸、聚赖氨酸或聚谷氨酸。所述固相载体的外形可为微球状、管状、梳齿状或微孔板状;其可包被反应物的分子量范围为 100Da-200000Da,所述反应物可为蛋白质、多肽、寡核苷酸、寡聚糖或低分子半抗原。

[0030] 本发明的聚羟基丁酸酯分子式为:

[0031]  $H-(O-CH(CH_3)CH_2COO-)_nOH$ 。

[0032] 本发明的优点是:采用新型的可再生的聚羟基丁酸酯作为免疫吸附的载体基质,聚羟基丁酸酯是一种生物大分子,其聚合物和单体都是生物细胞的代谢产物,具有生物相容性,无毒无害,可生物降解,非常环保。用此种新材料为基质包埋亲水性的活性功能团,可以粘着吸附抗体分子,其表面结构优于酶联免疫法所用的传统聚苯乙烯材料,对抗体的包埋容量极高且具有高亲水性,使反应更加灵敏,因此不需要样品的前期制备。由此制成的检测棒体系亦可适用于单个样品,小巧便携,可携带至现场进行检测,快速定性不需要专业的技术人员和实验室环境,也能够在实验室进行快速定量分析。本发明能够脱离实验仪器设备和专业技术人员,有现场可操作性,检测过程简单快速,效果比传统酶联免疫试剂盒更方便准确。快速检测棒体系应用的范围非常广泛,检测棒可以包被任何种类的免疫球蛋白 IgG 抗体,对各种状态(固体或液体)的样品进行快速检测,该固相载体可应用免疫学、生物化学及医学的相关实验中。

## 具体实施方式

[0033] 以下实施例用以说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0034] 实施例 1 至 3 为本发明一种基于酶联免疫法的快速检测系统的制备实施例,检测构件仅以套有一个比色杯的包被有抗体的检测棒作为实施例说明,但本发明的检测构件不限于下述的三个实施例,检测构件可以是包被有抗体的固相载体,固相载体的外形可为棒状、微球状、管状、梳齿状或微孔板状等等。

[0035] 实施例 1

[0036] 一种基于酶联免疫法的快速检测系统,包括置于一个检测盒中的以下组件:a、套有一个比色杯的包被有抗体的检测棒;b、用于放置目标样品的空瓶(1.5ml);c、装有经冷冻干燥后抗体的试剂瓶(1.5ml);d、装有酶标标记物的试剂瓶(1.5ml);e、装有用于定性的底物的试剂瓶(1.5ml);f、装有用于定量的底物的试剂瓶(1.5ml);g、装有缓冲溶液的试剂瓶(5ml)。

[0037] a、检测棒的制备

[0038] 检测棒的基质主体为聚羟基丁酸酯,并在其基质里嵌入带有活性功能团的化合物聚天门冬氨酸,检测棒套有一个比色杯。

[0039] 将聚天门冬氨酸与聚羟基丁酸酯按 0.1 : 100 的质量比混合均匀后,送入压塑机在 110-210℃ 的加工温度下进行压塑并制成珠粒状,然后再将珠粒状压塑物通过常规工艺制成棒状,即得检测棒。

[0040] 蛋白质抗体在检测棒上的包被：

[0041] 首先将蛋白质抗体以  $20 \mu\text{g/ml}$  溶于磷酸盐缓冲溶液，将检测棒浸入到蛋白质抗体溶液中，放入冰箱冷藏过夜；然后取出检测棒，再将其浸入封闭液中，封闭液为溶有体积浓度 1% 的 Tween20 的磷酸盐缓冲溶液，室温下静置两小时后，取出自然晾干；检测棒套入比色杯中， $2-8^{\circ}\text{C}$  冷藏保存。

[0042] c、装有经过冷冻干燥后的蛋白质抗体的试剂瓶的制备方法为：

[0043] 将蛋白质抗体以  $1\text{mg/ml}$  溶于磷酸盐缓冲溶液，取  $20 \mu\text{l}$  注入试剂瓶中，放入冷冻干燥器中过夜冻干，取出后  $2-8^{\circ}\text{C}$  冷藏保存；

[0044] d、装有酶标记物试剂瓶的制备方法为：

[0045] 将  $1\text{mg}$  金黄色葡萄球菌蛋白 A 偶联碱性磷酸酶保存于  $1\text{ml}$  的  $50 \times 10^{-3}\text{mol/L}$  Tris 溶液中，然后再加入氯化镁、氯化锌、牛血清蛋白、甘油和叠氮化钠，使氯化镁达到  $1.0 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ 、氯化锌达到  $0.1 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ 、牛血清白蛋白的体积浓度达到 1%、甘油的体积浓度达到 50% 和叠氮化钠达到  $15 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ ，调 pH 值为 8.0，即得工作浓度为  $1\text{mg/ml}$  的金黄色葡萄球菌蛋白 A 偶联碱性磷酸酶；取  $0.4 \mu\text{l}$  注入试剂瓶中， $2-8^{\circ}\text{C}$  冷藏保存。

[0046] e、所述用于定性测量的底物为 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐 (BCIP) 与氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 的混合液，所述装有底物试剂瓶的制备方法为：将摩尔浓度为  $4.8 \times 10^{-4}\text{mol/L}$  的 BCIP 和摩尔浓度为  $5.1 \times 10^{-4}\text{mol/L}$  NBT 混合，然后取  $1\text{ml}$  混合液注入试剂瓶中， $2-8^{\circ}\text{C}$  冷藏并避光保存；

[0047] f、所述用于定量测量的底物为溶于体积浓度为 10% 的二羟乙基胺的硝基苯磷酸盐，所述硝基苯磷酸盐的质量浓度为  $1.0\text{mg/ml}$ ，所述溶液的 pH 值为 9.5，然后取  $1\text{ml}$  混合液注入试剂瓶中， $2-8^{\circ}\text{C}$  冷藏并避光保存；

[0048] g、装有缓冲溶液试剂瓶的制备方法：

[0049] 将牛血清白蛋白溶于磷酸盐缓冲溶液中使牛血清白蛋白的体积浓度达到 1%，然后取  $5\text{ml}$  注入试剂瓶中， $2-8^{\circ}\text{C}$  冷藏保存即得。

[0050] 实施例 2

[0051] 一种基于酶联免疫法的快速检测系统，包括置于一个检测盒中的以下组件：a、套有一个比色杯的包被有抗体的检测棒；b、用于放置目标样品的空瓶 ( $1.5\text{ml}$ )；c、装有经冷冻干燥后抗体的试剂瓶 ( $1.5\text{ml}$ )；d、装有酶标记物的试剂瓶 ( $1.5\text{ml}$ )；e、装有用于定性的底物的试剂瓶 ( $1.5\text{ml}$ )；f、装有用于定量的底物的试剂瓶 ( $1.5\text{ml}$ )；g、装有缓冲溶液的试剂瓶 ( $5\text{ml}$ )。

[0052] a、检测棒的制备

[0053] 检测棒的基质主体为聚羟基丁酸酯，并在其基质里嵌入带有活性功能团的化合物聚赖氨酸，检测棒套有一个比色杯。

[0054] 将聚赖氨酸与聚羟基丁酸酯按 5 : 100 的质量比混合均匀后，送入压塑机在  $110-210^{\circ}\text{C}$  的加工温度下进行压塑并制成珠粒状，然后再将珠粒状压塑物通过常规工艺制成棒状，即得检测棒。

[0055] 其余步骤同实施例 1。

[0056] 实施例 3

[0057] 一种基于酶联免疫法的快速检测系统，包括置于一个检测盒中的以下组件：a、套

有一个比色杯的包被有抗体的检测棒 ;b、用于放置目标样品的空瓶 (1.5ml) ;c、装有经冷冻干燥后抗体的试剂瓶 (1.5ml) ;d、装有酶标标记物的试剂瓶 (1.5ml) ;e、装有用以定性的底物的试剂瓶 (1.5ml) ;f、装有用以定量的底物的试剂瓶 (1.5ml) ;g、装有缓冲溶液的试剂瓶 (5ml)。

[0058] a 检测棒的制备

[0059] 检测棒的基质主体为聚羟基丁酸酯,并在其基质里嵌入带有活性功能团的化合物聚谷氨酸,检测棒套有一个比色杯。

[0060] 将聚谷氨酸与聚羟基丁酸酯按 8 : 100 的质量比混合均匀后,送入压塑机在 110-210℃ 的加工温度下进行压塑并制成珠粒状,然后再将珠粒状压塑物通过常规工艺制成棒状,即得检测棒。

[0061] 其余步骤同实施例 1。

[0062] 实施例 4

[0063] 一种基于酶联免疫法的快速检测系统用于定性测量的步骤 :

[0064] (1) 测试材料为固体适当研磨或打碎,液体无需制样,加入缓冲溶液以体积比 1 : 1 均匀混合,充分震荡 ;取震荡后的悬浮液注入空的试剂瓶,液面至试剂瓶一半体积处为 0.8ml,然后将检测棒插入装有样品液中,室温下静置 30 分钟后,将检测棒取出,用水冲洗 ;

[0065] (2) 取缓冲溶液 1ml 注入装有冻干抗体的试剂瓶,震荡让其中的冻干抗体溶解后,将检测棒插入其中,室温下静置 30 分钟后,将检测棒取出,用水冲洗 ;

[0066] (3) 取缓冲溶液 1ml 注入装有底物的试剂瓶,混合均匀后将检测棒插入其中,室温下静置 20 分钟后,将检测棒取出,用水冲洗 ;

[0067] (4) 将装有底物的试剂瓶中的底物 1ml 注入套装所配的比色杯中,将检测棒插入比色杯等待显色反应,10 分钟后,取出检测棒观察 ;

[0068] 根据以上的检测步骤,如果棒上显示为蓝紫色,棒上颜色均匀的为阴性 ;棒的下半部分颜色明显深于上半部分,并明显呈现深浅两极的为阳性 ;呈阳性的棒,根据棒下半部分的颜色深浅的比对也可进行半定量的估算 ;

[0069] 实施例 5

[0070] 一种基于酶联免疫法的快速检测系统用于定量测量的步骤 :

[0071] 定量测量仅需替换所用底物,其它步骤与实施例 4 中的定性测量步骤相同。新的底物为 1mg 硝基苯磷酸盐溶于 1ml 体积浓度为 10% 的二羟乙基胺, pH 值为 9.5 ;碱性磷酸酶对该底物的酶解产物呈可溶性黄色,最大吸收值在 410nm,可直接将比色杯放入分光光度计中测量吸光值,通过对标准样品和目标样品吸光值的测定,对目标样品进行定量分析。

[0072] 实施例 6

[0073] 一种可包被反应物的固相载体,其基质主体为聚羟基丁酸酯,基质里还嵌入有聚天门冬氨酸,该嵌入的聚天门冬氨酸与聚羟基丁酸酯基质的质量比为 1 : 100。该固相载体的外形可为微球状,该固相载体的包被反应物分子量范围为 100Da-200000Da,蛋白质的分子量在 600Da-1000000Da,多肽、寡核苷酸、寡聚糖或低分子半抗原的分子量普遍小于 2000Da,在此固相载体上可以实现大分子的非特异性吸附及特异性共价固定和小分子反应物的特异性共价固定。

**[0074] 实施例 7**

**[0075]** 一种可包被反应物的固相载体,其基质主体为聚羟基丁酸酯,基质里还嵌入有聚赖氨酸,该嵌入的聚赖氨酸与聚羟基丁酸酯基质的质量比为 5 : 100。该固相载体的外形为管状,该固相载体的包被反应物分子量范围为 100Da-200000Da,蛋白质的分子量在 600Da-1000000Da,多肽、寡核苷酸、寡聚糖或低分子半抗原的分子量普遍小于 2000Da,在此固相载体上可以实现大分子的非特异性吸附及特异性共价固定和小分子反应物的特异性共价固定。

**[0076] 实施例 8**

**[0077]** 一种可包被反应物的固相载体,其基质主体为聚羟基丁酸酯,基质里还嵌入有聚谷氨酸,该嵌入的聚谷氨酸与聚羟基丁酸酯基质的质量比为 8 : 100。该固相载体的外形为梳齿状,该固相载体的包被反应物分子量范围为 100Da-200000Da,蛋白质的分子量在 600Da-1000000Da,多肽、寡核苷酸、寡聚糖或低分子半抗原的分子量普遍小于 2000Da,在此固相载体上可以实现大分子的非特异性吸附及特异性共价固定和小分子反应物的特异性共价固定。

**[0078]** 本发明在聚羟基丁酸酯中嵌入带有活性功能团的化合物聚赖氨酸或聚天门冬氨酸或聚谷氨酸形成的固相载体,可以共价连接不同的分子。

**[0079]** 聚羟基丁酸酯是一种生物大分子,其聚合物和单体都是生物细胞的代谢产物,具有生物相容性,无毒无害,可生物降解,非常环保。用此种新材料为基质包埋亲水性的活性功能团的化合物聚赖氨酸或聚天门冬氨酸或聚谷氨酸,以此制成固相载体,可以同时吸附或共价连接各种不同分子量的反应物。传统的以基苯乙烯材料为固相载体进行包被时,反应物会吸附在固相载体的表面,这种连接固定的方式是非特异性的,也是很常见的。吸附连接通常只需要反应物的分子量大于 2000Da,而小分子则不能以吸附的方式固定在载体上。但在很多应用领域(医学,环境分析及药学中的半抗原或短肽的分子量通常约 1500Da),小分子与固相载体的连接对定量检测也十分重要。固相载体聚羟基丁酸酯基质里嵌入带有活性功能团的化合物赖氨酸或聚天门冬氨酸或聚谷氨酸,可以实现大分子的非特异性吸附及特异性共价固定和小分子反应物的特异性共价固定。活性功能团可以是氨基或羧基,氨基可以与反应物分子的羧基共价形成酰胺键,同理羧基可以与反应物分子的氨基共价形成酰胺键。因此除了大分子反应物的吸附固定及特异性共价固定外,难以进行吸附固定的小分子反应物也可以共价连接固定。因此可被包被的反应物的分子量范围可以达到 100Da 至 200000Da,反应物可为蛋白质、多肽、寡核苷酸、寡聚糖或低分子半抗原。

**[0080]** 反应物分子在聚羟基丁酸酯为基质的固相载体上获得功能团来形成共价键,由此被固定在载体上。与传统的方法不同在于如今的载体不仅通过吸附而且通过特定的共价键来固定包被反应物分子。因而在使用时,蛋白质、多肽、寡核苷酸、寡聚糖或低分子半抗原都可以连接在载体表面。由此血液内含物质,水溶的农药,饲料和食品中的毒素或药物残留,细菌,病毒等都可以被检测。而且使用范围也可扩展至多肽和核苷酸的检测,它们在医学和基因研究中是必不可少的。聚羟基丁酸酯成品通常为粗颗粒状。含功能团的化合物聚天门冬氨酸或聚赖氨酸或聚谷氨酸可以占聚羟基丁酸酯质量比为 (0.1-8) : 100 加入到聚羟基丁酸酯粗颗粒中,进入压塑机进行压塑,制成珠状。加工温度在 110-210℃。得到的产品通过常规工艺制成棒状。

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种基于酶联免疫法的快速检测系统                               |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101769923A</a>                   | 公开(公告)日 | 2010-07-07 |
| 申请号            | CN201010103698.1                               | 申请日     | 2010-02-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 陶正杰<br>夏晶                                      |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 陶正杰<br>夏晶                                      |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 陶正杰<br>夏晶                                      |         |            |
| [标]发明人         | 陶正杰<br>夏晶                                      |         |            |
| 发明人            | 陶正杰<br>夏晶                                      |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/544 G01N33/535 G01N21/31                |         |            |
| 代理人(译)         | 郭俊玲                                            |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种基于酶联免疫法的快速检测系统，包括以下组件：a、检测构件；b、用于放置目标样品的空瓶；c、装有经冷冻干燥后抗体的试剂瓶；d、装有酶标记物的试剂瓶；e、装有助于定性的底物的试剂瓶；f、装有助于定量的底物的试剂瓶；g、装有缓冲溶液的试剂瓶；本发明公开了该系统的检测方法，还公开了可以同时吸附或共价连接各种不同分子量的反应物的固相载体，其基质主体为聚羟基丁酸酯，所述基质里还嵌入带有活性功能团的聚氨基酸，该嵌入的聚氨基酸与聚羟基丁酸酯基质的质量比为(0.1-8):100。本发明不需要前期的样品制备，且制成的检测棒体系亦可适用于单个样品，小巧便携，有现场可操作性，效果比传统酶联免疫试剂盒更方便准确。