

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/50

G01N 33/53 G01N 33/558

G01N 33/543 G01N 33/576

G01N 27/26 C12Q 1/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03114887.5

[43] 公开日 2004 年 8 月 4 日

[11] 公开号 CN 1517708A

[22] 申请日 2003.1.14 [21] 申请号 03114887.5

[71] 申请人 周中人

地址 201204 上海市浦东新区牡丹路 225 弄 6
号 602

[72] 发明人 周中人

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 微孔膜介质中层析生物大分子的电磁信号快速定量检测方法

[57] 摘要

在目前的生物大分子分析领域，需要一种操作简单，过程快速，却又能较准确地定量分析的方法。该申请就是解决这样一个问题。分析样品溶液中的被检测生物大分子释放到一种特定组成的微孔膜介质上，借助膜介质与溶液的相互作用力或外界赋予的电磁场作用力，被检测生物大分子在该膜介质中进行自由的迁移运动。迁移运动中的生物大分子可能会与其他生物大分子发生结合反应，并在迁移一定距离后在特定位置与其他生物大分子结合，直接产生或经施加其他生物大分子后产生电磁信号。电磁信号直接传导或通过电极传导到特定的电磁信号检测系统，进行计算显示出溶液中被检测生物大分子的数量结果。从样品释放到显示结果，整个过程很快可以结束。

1. 一种生物大分子的快速定量检测方法。该方法类似胶体金快速免疫层析诊断条的技术，又类似固定化酶及电化学信号进行的酶底物快速定量检测技术，其特征是被检测生物大分子随样品释放到微孔膜介质，在其中迁移运动。溶液中生物大分子在膜介质上发生一定的结合反应，在微孔膜介质特定位置也发生结合并产生电磁信号，信号被传导到特定的电磁信号检测系统，计算后显示出被检测生物大分子的含量。
2. 权利要求1中的样品可以是，如尿，血液，血清，唾液各类溶液，被检测生物大分子可以是抗原，抗体，酶及底物，核酸聚合物，多糖。
3. 权利要求1中的微孔膜介质中的膜可以是硝酸纤维素，醋酸纤维素，尼龙，玻璃纤维，滤纸，及其他高分子聚合物等充满微孔的材料制成，并可能经过处理以获得特定的性能。而且微孔膜介质可由单种或多种以上微孔膜组合在一起。
4. 权利要求1中的生物大分子在微孔膜介质中的迁移运动可以借助微孔膜介质与溶液的相互作用力或外界赋予的电磁场作用力进行。
5. 权利要求1中的溶液中生物大分子在膜介质上可能发生单个或多个结合反应（如抗原与抗体的免疫结合反应），可以在被检测生物大分子与微孔膜介质中的生物大分子间发生，也可以在是微孔膜介质中不同位置的生物大分子相遇后发生的。
6. 权利要求1中的生物大分子在微孔膜介质特定位置，与其他生物大分子结合产生的电磁信号，可以直接产生电磁信号，也可以经施加其他生物大分子后产生电磁信号。
7. 权利要求1中的微孔膜介质上特定位置产生的电磁信号可通过电极传导或直接传导到特定的电磁信号检测系统，进行特定的数学计算后，得出样品中被检测生物大分子的定量结果。为结果精确，可设立参比位点，来检测溶液及膜介质体系中的其他电磁信号。
8. 权利要求要求保护依据本方法设计的其他生物分析检测装置或仪器。

微孔膜介质中层析生物大分子的电磁信号快速定量检测方法

目前在生物大分子分析检测方面，主要采用免疫结合分析方法，核酸探针荧光检测方法，酶反应分析方法。免疫结合分析方法中成功应用的定量分析方法有酶联免疫分析，化学发光(荧光)免疫分析等方法。核酸探针荧光检测方法也可以进行定量分析，但这该类方法实施过程中需要多步骤的洗涤温浴操作，消耗的时间长，而且操作过程中微小的差异可能导致结果较大的误差。目前新出现的胶体金标记免疫层析分析方法克服了这个缺点，只需要简单的操作，在几分钟内就能得到结果，使检测十分方便。该方法的实质是被检测物质通过在硝酸纤维素膜上的迁移运动，在特点位置的进行免疫结合，由结合物携带的标记胶体金颗粒的聚集来呈现红色，显示结果。但该方法局限于定性分析，使应用受到局限。酶反应分析方法目前比较成熟的方法是采用固定化酶技术，直接将样品滴加在酶固定点，检测样品中底物与酶反应时产生电化学信号，经检测计算后，得到定量结果。

本申请是综合以上多种方法的特点，克服各自的缺点，发展出新的生物大分子通过微孔膜类介质迁移并进行电磁信号快速定量检测的方法。该申请中的被检测生物大分子可以是抗原，抗体，酶及底物，核酸聚合物，多糖等。样品来源可以是各类溶液，如尿，血液，血清，唾液等。微孔膜以是硝酸纤维素，醋酸纤维素，尼龙，玻璃纤维，滤纸，及其他高分子聚合物等充满微孔的材料制成，并可能经过处理以获得特定的性能。而且微孔膜介质可由单或多种微孔膜组合在一起。样品释放到微孔膜介质上，其中携带的生物大分子借助膜介质与溶液的相互作用力或外界赋予的电磁场作用力，在该膜介质的微孔中进行自由的迁移运动。在迁移运动中的生物大分子可能会与溶液中或微孔膜介质上的其他生物大分子进行结合(如抗原与抗体结合)，继续一起迁移运动。在迁移运动过程中溶液里的不同结构或大小的生物分子由于与膜介质的相互作用力或受到的电磁场作用力存在差异，可能逐渐分离开。溶液中生物大分子迁移一定距离后到达特定位置，与其他生物大分子进行结合，直接产生电磁信号，或经施加其他生物大分子后产生电磁信号。该位置的电磁信号通过电极传导或直接传导到特定的电磁信号检测系统，进行特定的数学计算后，得出样品中被检测生物大分子的定量结果。为结果精确，可以设立参比位点，来检测溶液及膜介质体系中的其他电磁信号。从样品释放到出结果的时间很快，具体时间取决于生物分子在选择微孔膜介质的迁移特性。

以下结合图示进行说明：



A：样品释放位置。样品可以是各类溶液，如尿，血液，血清，唾液等

B：表示从位置 A 到位置 D 中间的一段，为微孔膜介质，该介质可以由单种或多种膜组合在一起。当样品溶液从位置 A 释放时，进行迁移运动，经过位置 C，到达位置 D。膜介质可以预先进行合适的条件优化处理。该处理中包括可能预先放置且要与其他生物大分子结合的生物大分子。

C：膜介质中生物大分子进行结合反应的一个或多个位置，包括样品中被检测生物大分子与其他生物大分子进行结合反应的位置。

D：表示膜介质的末端。

E：从位置 D 开始到右末端的一段，代表感受位置 C 处结合反应产生的电磁信号并进行电磁信号传导的电极或直接对电磁信号进行检测，经处理计算后显示结果的检测系统。

实施例说明：

1. 血液样品中乙肝表面抗原的夹心法免疫层析反应及其电信号定量检测：

膜介质由 Whatman 公司全血过滤膜，德国 S&S 公司 33 型玻璃纤维膜，德国 S&S 公司 AE99 型硝酸纤维素膜，德国 S&S 公司 470 型吸水滤纸组成。33 型玻璃纤维膜上包被有葡萄糖氧化酶标记的抗乙肝表面抗原的鼠源单抗。AE99 硝酸纤维素膜上固定包被有羊抗乙肝表面抗原的多抗，整片硝酸纤维素膜用 BSA 溶液进行结合位点封闭处理并干燥。在室温为 25 度，相对湿度在 30% 的洁净环境里，将以上四种材料依次搭连着粘贴在美国 G&L 公司生物诊断型 PET 背胶底板上。在 AE99 硝酸纤维素膜包被羊抗乙肝表面抗原的多抗位置，底板上预先开出一个孔，背面粘贴由金属丝组成的电极，电极底端伸出在孔内，紧贴着 AE99 硝酸纤维素膜。在底板的右末端是电极的接触端，可以将检测到的电信号传导到特定的电信号检测系统。

直接以血液样品释放在全血过滤膜上，血细胞被阻挡在过滤膜中，乙肝表面抗原及其他生物大分子向前迁移运动，经过 33 型玻璃纤维膜时，乙肝表面抗原与其中包被的葡萄糖氧化酶标记的抗乙肝表面抗原的鼠源单抗结合，继续迁移运动至硝酸纤维素膜上，与其中固定包被

的羊抗乙肝表面抗原的多抗结合，停留在小孔位置。其他生物大分子则继续迁移运动，最后被 470 型吸水滤纸吸收。然后释放葡萄糖分子到硝酸纤维素小孔部位，与标记在抗乙肝表面抗原的鼠源单抗上的葡萄糖氧化酶发生结合反应，产生电位变化信号。由电极将电信号传导至特定的检测系统，通过计算，得出乙肝表面抗原的含量。全部检测一般在五分钟内结束。

2. 血液样品中抗乙肝表面抗原抗体的间接法免疫层析反应及其电信号定量检测

膜介质由 Whatman 公司全血过滤膜，德国 S&S 公司 33 型玻璃纤维膜，德国 S&S 公司 AE99 型硝酸纤维素膜，德国 S&S 公司 470 型吸水滤纸组成。33 型玻璃纤维膜上包被有葡萄糖氧化酶标记的羊抗人抗体多抗。AE99 硝酸纤维素膜上固定包被有乙肝表面抗原，整片硝酸纤维素膜用 BSA 溶液进行结合位点封闭处理并干燥。在室温为 25 度，相对湿度在 30% 的洁净环境里，将以上四种材料依次搭连着粘贴在美国 G&L 公司生物诊断型 PET 背胶底板上。在 AE99 硝酸纤维素膜上包被乙肝表面抗原的位置，底板上预先开出一个孔，背面粘贴由金属丝组成的电极，电极底端伸出在孔内，紧贴着 AE99 硝酸纤维素膜。在底板的右末端是电极的接触端，可以将检测到的电信号传导到特定的电信号检测系统。

直接以血液样品释放在全血过滤膜上，血细胞被阻挡在过滤膜中，抗乙肝表面抗原抗体及其他生物大分子向前迁移运动，经过 33 型玻璃纤维膜时，抗乙肝表面抗原抗体与其中包被的羊抗人抗体多抗结合，继续迁移运动至硝酸纤维素膜上，与其中固定包被的乙肝表面抗原结合，停留在小孔位置。其他生物大分子则继续迁移运动，最后被 470 型吸水滤纸吸收。然后释放葡萄糖分子到硝酸纤维素小孔部位，与标记在羊抗人抗体多抗上的葡萄糖氧化酶发生结合反应，产生电位变化信号。由电极将电信号传导至特定的检测系统，通过计算，得出乙肝表面抗原抗体的含量。全部检测一般在五分钟内结束。

专利名称(译)	微孔膜介质中层析生物大分子的电磁信号快速定量检测方法		
公开(公告)号	CN1517708A	公开(公告)日	2004-08-04
申请号	CN03114887.5	申请日	2003-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	周中人		
申请(专利权)人(译)	周中人		
当前申请(专利权)人(译)	周中人		
[标]发明人	周中人		
发明人	周中人		
IPC分类号	C12Q1/00 G01N27/26 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/576		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

在目前的生物大分子分析领域，需要一种操作简单，过程快速，却又能够较准确地定量分析的方法。该申请就是解决这样一个问题。分析样品溶液中的被检测生物大分子释放到一种特定组成的微孔膜介质上，借助膜介质与溶液的相互作用力或外界赋予的电磁场作用力，被检测生物大分子在该膜介质中进行自由的迁移运动。迁移运动中的生物大分子可能会与其他生物大分子发生结合反应，并在迁移一定距离后在特定位置与其他生物大分子结合，直接产生或经施加其他生物大分子后产生电磁信号。电磁信号直接传导或通过电极传导到特定的电磁信号检测系统，进行计算显示出溶液中被检测生物大分子的数量结果。从样品释放到显示结果，整个过程很快可以结束。

