

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410086251.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 5 月 3 日

[11] 公开号 CN 1766622A

[22] 申请日 2004.10.28

[21] 申请号 200410086251.2

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

[72] 发明人 王保民 赵 静 俞彩霞 何素平

李召虎 李 刚 何钟佩

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法。其目的是提供一种简化的检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法。该检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法，由以下步骤组成：1) 包被；2) 洗板；3) 依次加入标准样品和待测样品，酶标二抗和小分子物质特异性抗体；4) 洗板；5) 加底物显色和终止反应。本发明的检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法中，采用了加入酶标二抗之后立即加入小分子物质特异性抗体的步骤，与现有的方法相比，不但省去了一步洗板的步骤，而且节省了酶标二抗与抗体结合所需的半小时，使测定时间缩短半小时以上，而且提高了检测灵敏度 3-5 倍。

1、一种检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法，由以下步骤组成：

- 1) 包被；
- 2) 洗板；
- 3) 依次加入标准样品和待测样品，酶标二抗和小分子物质特异性抗体；
- 4) 洗板；
- 5) 加底物显色和终止反应。

2、根据权利要求 2 所述的间接竞争酶联免疫吸附测定法，其特征在于：所述载体蛋白为卵清白蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白或血兰蛋白。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的间接竞争酶联免疫吸附剂测定法，其特征在于：所述小分子物质与载体蛋白的偶联物是将小分子物质和载体蛋白用过碘酸钠法或戊二醛法偶联得到。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的间接竞争酶联免疫吸附剂测定法，其特征在于：所述用于标记二抗的酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

5、根据权利要求 4 所述的间接竞争酶联免疫吸附剂测定法，其特征在于：所述用于标记二抗的酶为辣根过氧化物酶。

6、根据权利要求 5 所述的间接竞争酶联免疫吸附剂测定法，其特征在于：所述辣根过氧化物酶用戊二醛法或过碘酸钠法交联在二抗上；所述二抗为抗鼠或抗兔抗体。

一种检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法

技术领域

本发明涉及一种酶联免疫吸附测定法，特别是涉及一种检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法。

背景技术

酶联免疫吸附测定法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）可用于测定抗原，也可用于测定抗体。间接竞争 ELISA 法是检测小分子物质常用的方法之一，其原理为将小分子物质的标准样品与载体蛋白的偶联物作为包被抗原吸附于固相载体上，加入待测样品和小分子物质特异性抗体，待测样品中的小分子物质和固相载体上的小分子物质竞争特异性抗体，再加入酶标二抗，显色后终止，测定样品吸光值，该值与样品中小分子物质含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出待测样品中小分子物质的含量。检测小分子物质的间接 ELISA 法一般由以下步骤组成：1) 包被；2) 洗板；3) 加标准样品或待测样品、小分子物质特异性抗体；4) 洗板；5) 加酶标二抗；6) 洗板；7) 加底物显色和终止反应。

发明内容

本发明的目的是提供一种简化的检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法。

本发明所提供的检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法由以下步骤组成：1) 包被；2) 洗板；3) 依次加入标准样品和待测样品，酶标二抗和小分子物质特异性抗体；4) 洗板；5) 加底物显色和终止反应。

本发明方法中所加入的酶标二抗和小分子物质特异性抗体的量与常规方法相比，酶标二抗浓度增加 6 到 8 倍左右，小分子抗体浓度增加 1 到 2 倍。

该方法中的包被、洗板、显色和终止步骤、以及制备包被抗原、酶标二抗等方法均可按照本领域的常规方法进行。

所述包被步骤为将小分子物质与载体蛋白的偶联物固定于固相载体表面；所述载体蛋白为卵清白蛋白、牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白或血兰蛋白，优选为卵清白蛋白(OVA)；所述小分子物质与载体蛋白的偶联物是小分子物质和载体蛋白用过碘酸钠法或其它方法进行偶联得到；所述固定方法可采用物理吸附或共价交联的方法；所述固相载体可为聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯等多种材料制成的微量反应板，优

选为聚苯乙烯材料的微量反应板。

所述用于标记二抗的酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶，优选为辣根过氧化物酶，辣根过氧化物酶可通过戊二醛法或过碘酸钠法交联在二抗上；所述二抗可为抗鼠或抗兔抗抗体。

本发明的检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附剂测定法中，采用了加入酶标二抗之后立即加入小分子物质特异性抗体的步骤，与现有的方法（加入小分子物质特异性抗体，然后洗板，再加入酶标二抗）相比，不但省去了一步洗板的步骤，而且节省了酶标二抗与一抗温育结合所需的半小时，使测定时间缩短半小时以上，且能提高灵敏度 3-5 倍。该法更为简便、快捷、灵敏，具有较高的实际应用价值。

附图说明

图 1 为常规间接竞争酶联免疫吸附测定法检测玉米素核苷（ZR）结果的标准曲线

图 2 为简化的间接竞争酶联免疫吸附测定法检测玉米素核苷（ZR）结果的标准曲线

具体实施方式

材料、试剂和仪器

1、包被抗原

所用的载体蛋白为卵清白蛋白，将玉米素核苷（ZR）和卵清白蛋白采用过碘酸钠法进行偶联，得到联接物（ZR-OVA），用蒸馏水稀释成 1mg/ml 作为包被抗原。

2、抗体

一抗：用 ZR-BSA（用过碘酸钠法偶联）免疫新西兰大耳白兔制备的抗玉米素核苷（ZR）的多克隆抗体。

酶标抗体（二抗）：辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG（辣根过氧化物酶用过碘酸钠法与羊抗兔 IgG 交联）。

3、底物溶液

A 液：过氧化脲 1.0g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8g，柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 10.3g，Tween -80 100 μl ，加 1000ml 蒸馏水，4℃ 保存备用。

B 液：TMB 700mg，DMSO 40ml，充分溶解，然后加蒸馏水 960ml，柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 10.3g，4℃ 保存备用。

4、底物缓冲液：取 B 液，再和相同体积的 A 液混合得到底物缓冲液。

5、包被缓冲液：称取 1.5g Na_2CO_3 和 2.93g NaHCO_3 ，溶于 1000 ml 蒸馏水，pH 9.6。

6、磷酸盐缓冲液（PBS）：称取 8.0g NaCl ，0.2g KH_2PO_4 ，2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，用蒸馏水定容至 1000 ml，pH 7.5。

7、样品稀释液：1000 ml PBS 中加入 1 ml Tween-20，1g 明胶（稍加热溶解）。

8、洗涤液：1000ml PBS 中加入 1ml Tween-20。

9、终止液：2mol/L 的硫酸溶液。

10、酶标板（Costar）

11、酶联免疫分光光度计（MULTISKAN MK3, Thermo）

12、待测样品处理

称取 1.0g 新鲜棉花叶片，加 2ml 样品提取液（80%甲醇内含 1mM 的二叔丁基对甲酚），在冰浴下研磨成匀浆，转入 10ml 试管，再用 2ml 样品提取液分次将研钵冲洗干净，一并转入试管中，摇匀后放置在 4℃冰箱中。4℃下提取 4h，1 000g 离心 15min，取上清液。沉淀中加 1ml 提取液，搅匀，置 4℃下再提取 1h，离心，合并上清液并记录体积，残渣弃去。上清液过 C-18 固相萃取柱。具体步骤是：80%甲醇（1ml）平衡柱→上样→收集样品→移开样品后用 100%甲醇（5ml）洗柱→100%乙醚（5ml）洗柱→100%甲醇（5ml）洗柱→循环。将过柱后的样品转入 5ml 塑料离心管中，真空浓缩干燥或用氮气吹干，除去提取液中的甲醇，用样品稀释液定容至 1.5ml，待测。

实施例 1、用间接竞争酶联免疫吸附测定法检测小分子物质

1、常规的间接酶联免疫吸附测定法检测玉米素核苷（ZR）

检测过程包括以下步骤：

1）包被：将包被抗原按 1：4000 的比例用包被缓冲液稀释、混匀后，在酶标板的每孔中加入稀释后的抗原 200 μ l，然后将酶标板放入内铺湿纱布的带盖瓷盘，37℃温育 3hr。

2）洗板：将包被好的酶标板取出，放在室温下平衡，甩掉包被液，用乳胶管将洗涤液均匀加入酶标板使每孔充满洗涤液，放置约 0.5min，甩掉洗涤液，洗 4 次，最后将板内残留的洗涤液在吸水纸上甩干。

3）竞争：a)加标准 ZR 样品和待测样品：先将 ZR 标准物用样品稀释液稀释成 2000ng/ml，再将其依次稀释为 500ng/ml, 100ng/ml, 20ng/ml, 4ng/ml, 2ng/ml, 1ng/ml 和 0ng/ml，共 8 个浓度，再将上述不同浓度的溶液加入 96 孔酶标板中，每个浓度平行做 6 个孔，每孔 20 μ l；在另外 48 孔中每孔加入 20 μ l 待测样品；b)加抗体：将 ZR 抗体（一抗）按 1：7200 的比例用样品稀释液稀释、混匀后，向每孔中各加 180 μ l。然后将酶标板放入内铺湿纱布的带盖瓷盘，37℃温育 0.5hr。

4）洗板：方法同步骤 2），洗 4 次。

5）加酶标二抗：将辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 用样品稀释液按 1：3000 的比例稀释、混匀后，向酶标板每孔中各加 200 μ l，然后将其放入内铺湿纱布的带盖

瓷盘，37℃温浴 0.5hr。

6) 洗板：方法同步骤 2)，洗 5 次。

7) 显色：将底物缓冲液加入到酶标板中，每孔 200 μ l，常温下显色 15min，然后向每孔中加入 100 μ l 2mol/L 硫酸溶液终止反应。

8) 结果测定：用酶联免疫分光光度计依次测定各浓度标准物的 OD_{450} 值。并将测定结果绘制成曲线图（图 1），图 1 中，纵坐标表示 ZR 标准样品的浓度（ng/ml），横坐标表示 B/B_0 （ B_0 表示 0ng/ml 浓度标准样品的显色值，B 表示其它各浓度标准样品的显色值）。根据图 1 得到曲线方程： $y = 34823e^{-10.035x}$ ，相关系数 $R^2 = 0.9808$ ，由曲线得知 I_{50} 为 230.69ng/ml， I_{80} 为 11.37ng/ml，检测极限为 11.37 ng/ml。待测样品的 OD 值为 0.622，根据标准曲线算出待测样品中含有 51.83ng/ml 的 ZR。

2、本发明的简化的间接竞争酶联免疫吸附测定法检测玉米素核苷（ZR）

检测过程包括以下步骤：

1) 包被：将包被抗原按 1: 4000 的比例用包被缓冲液稀释、混匀后，在酶标板的每孔中加入稀释后的抗原 200 μ l，然后将酶标板放入内铺湿纱布的带盖瓷盘，37℃温浴 3hr。

2) 洗板：将包被好的酶标板取出，放在室温下平衡，甩掉包被液，用乳胶管将洗涤液均匀加入酶标板使每孔充满洗涤液，放置约 0.5min，甩掉洗涤液，洗 4 次，最后将板内残留的洗涤液在吸水纸上甩干。

3) 竞争：a) 加标准 ZR 样品和待测样品：先将 ZR 标准物用样品稀释液稀释成 2000ng/ml，再将其依次稀释为 500ng/ml, 100ng/ml, 20ng/ml, 4ng/ml, 2ng/ml, 1ng/ml 和 0ng/ml，共 8 个浓度，再将上述不同浓度的溶液加入 96 孔酶标板中，每个浓度平行做 6 个孔，每孔 20 μ l；在另外 48 孔中每孔加入 20 μ l 待测样品；b)：加酶标二抗：将辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 用样品稀释液按 1: 900 的比例稀释、混匀后，向酶标板每孔中各加 90 μ l；c) 加抗体：将 ZR 抗体（一抗）按 1: 1800 的比例用样品稀释液稀释、混匀后，向每孔中各加 90 μ l。然后将加入了标准样品、酶标二抗和抗体的酶标板放入内铺湿纱布的带盖瓷盘，37℃温浴 0.5hr。

4) 洗板：方法同步骤 2)，洗 5 次。

5) 显色：将底物缓冲液加入到酶标板中，每孔 200 μ l，常温下显色 15 分钟，然后向每孔中加入 100 μ l 2mol/L 硫酸溶液终止反应。

6) 结果测定：用酶联免疫分光光度计依次测定各浓度标准物的 OD_{450} 值。并将测定结果绘制成曲线图（图 2），图 2 中纵坐标表示 ZR 标准样品的浓度（ng/ml），横坐标表示 B/B_0 （ B_0 表示 0ng/ml 浓度标准样品的显色值，B 表示其它各浓度标准样品的

显色值)。根据图 2 得到曲线方程: $y = 7345.9e^{-10.014x}$, 相关系数为 $R^2 = 0.987$, 由曲线得知 I_{50} 为 49.17ng/ml, I_{80} 为 2.44ng/ml, 检测极限为 2.44ng/ml。待测样品的 OD 值为 0.742, 根据标准曲线算出待测样品中含有 51.59ng/ml 的 ZR, 与常规方法的结果一致, 说明本发明方法的准确度可靠。

整个过程与步骤 1 的方法相比, 节省了酶标二抗与一抗结合所需的 0.5 小时。

上述实验结果表明常规的间接酶联免疫吸附测定法与简化后的间接酶联免疫吸附测定法的检测极限提高 3 到 5 倍, 证明简化后的间接酶联免疫吸附测定法可更好的用于小分子物质的免疫检测。

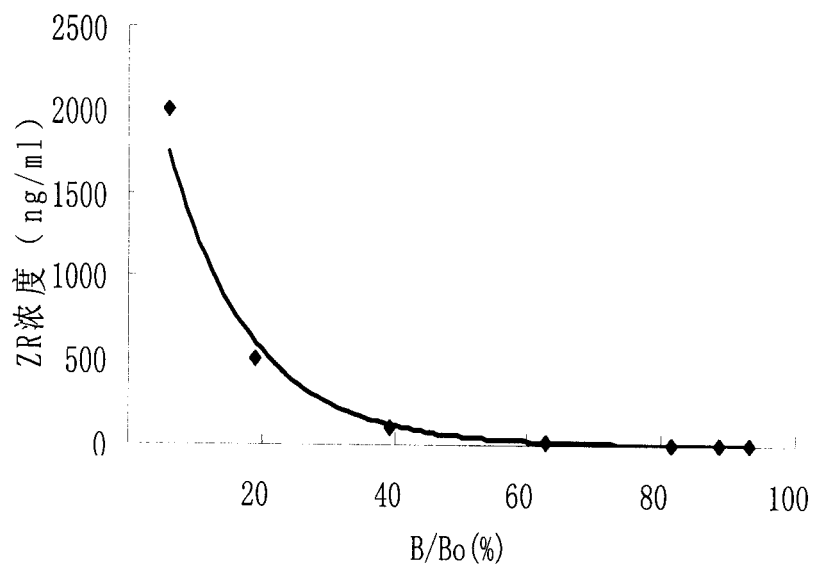


图 1

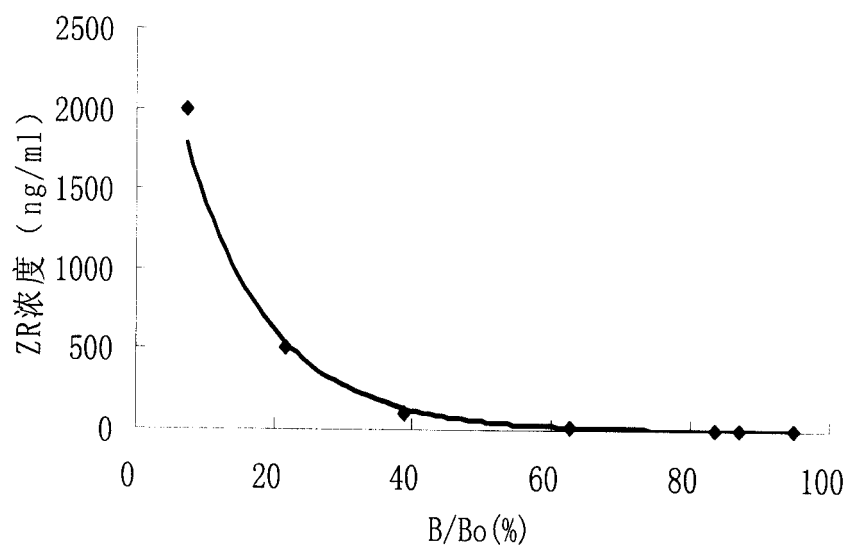


图 2

专利名称(译)	一种检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法		
公开(公告)号	CN1766622A	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200410086251.2	申请日	2004-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学学报		
[标]发明人	王保民 赵静 俞彩霞 何素平 李召虎 李刚 何钟佩		
发明人	王保民 赵静 俞彩霞 何素平 李召虎 李刚 何钟佩		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/531 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法。其目的是提供一种简化的检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法。该检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法，由以下步骤组成：1)包被；2)洗板；3)依次加入标准样品和待测样品，酶标二抗和小分子物质特异性抗体；4)洗板；5)加底物显色和终止反应。本发明的检测小分子物质的间接竞争酶联免疫吸附测定法中，采用了加入酶标二抗之后立即加入小分子物质特异性抗体的步骤，与现有的方法相比，不但省去了一步洗板的步骤，而且节省了酶标二抗与抗体结合所需的半小时，使测定时间缩短半小时以上，而且提高了检测灵敏度3 - 5倍。

