[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
G01N 33/53
G01N 33/535 G01N 33/558

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03135655.9

[43] 公开日 2004 年 4 月 14 日

[11] 公开号 CN 1488942A

[22] 申请日 2003.8.21 [21] 申请号 03135655.9

[71] 申请人 严家定

地址 650118 云南省昆明市白马西区 17 幢 1 单元 201 号

[72] 发明人 严家定

[74] 专利代理机构 昆明正原专利代理有限责任公司

代理人 金耀生

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称 酶联免疫吸附试验固化酶结合物及其制备

[57] 摘要

本发明是一种酶联免疫吸附试验固化酶结合物及其制备。 固化酶结合物按以下方法制备得到：1)制备酶结合物稀释液：用 0.1～2.0%BSA、0.1～3.0%PEG6000、0.01mol/L TBS(pH7.2～7.5)(TBS：三羟甲基氨基甲烷－盐酸、0.15mol/L 氯化钠)、余量为水；2)稀释酶结合物：用酶结合物稀释液将液相酶结合物作 1∶10～1∶500 的稀释，然后直接加入固相支持物上，每个固相支持物上加 5～50ul；3)低温冷冻干燥：－20～－50℃低温冷冻数小时后，抽真空数小时即可冻干。 真空包装即得固化酶结合物。 液相酶结合物采用低温冷冻干燥技术，制备成固化的酶结合物后，使酶结合物的稳定性有了很大的提高；在同等的条件下，冻干的酶结合物可保存一年以上不失活；而传统的液相的酶结合物保存期一般小于 6 个月。 使用固化酶结合物后，即简化了操作，又可减小操作误差及交叉污染，操作人员可放心操作。

ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

1、一种酶联免疫吸附试验固化酶结合物，其特征在于按以下方法制备得到：

1）制备酶结合物稀释液：用 0.1～2.0%BSA、0.1～3.0%PEG6000、0.01mol/L TBS（pH7.2～7.5）、余量为水；（TBS：三羟甲基氨基甲烷-盐酸、0.15mol/L 氯化钠）

2）稀释酶结合物：用酶结合物稀释液将液相酶结合物作 1:10～1:500 的稀释，然后直接加入固相支持物上，每个固相支持物上加 5～50ul；

3）低温冷冻干燥：-20～-50℃低温冷冻数小时后，抽真空数小时即可冻干。真空包装即得固化酶结合物。

2、根据权利要求 1 所述的酶联免疫吸附试验固化酶结合物，其特征在于所述的制备方法中的固相支持物为：由若干个小柱体（1）组成多孔板条，或该小柱体与现有的 8 孔、１２孔、１６孔的酶标板条配合构成，该小柱体内下部为通孔（2），上部为与下孔隔断的凹孔（3）。

酶联免疫吸附试验固化酶结合物及其制备

技术领域

本发明涉及酶联免疫吸附试验（ELISA）固化酶结合物及其制备。

背景技术

自从 1971 年 Engvall 和 Perlmann 发表了酶联免疫吸附测定（enzymelinkedimmunosorbentassay，ELISA）用于 IgG 定量测定的文章以来，使得 1966 年开始用于抗原定位的酶标抗体技术发展成液体标本中微量物质的测定方法。这一方法的基本原理是：①使抗原或抗体结合到某种固相载体表面，并保持其免疫活性。②使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体，这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性，又保留酶的活性。在测定时，把受检标本（测定其中的抗体或抗原）和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开，最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化变为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据颜色反应的深浅来定性或定量分析。由于酶的催化频率很高，故可极大地放大反应效果，从而使测定方法达到很高的敏感度。

ELISA 可用于测定抗原，也可用于测定抗体。在这种测定方法中，有 3 种必要的试剂：①固相的抗原或抗体，②酶标记的抗原或抗体，③酶作用的底物。根据试剂的来源和标本的性状以及检测的具备条件，可设计出各种不同类型的检测方法。

1、双抗体夹心法：

双抗体夹心法（图 1）是检测抗原最常用的方法，操作步骤如下：

（1）将特异性抗体与固相载体连接，形成固相抗体：洗涤除去未结合的抗体及杂质；

（2）加受检标本：使之与固相抗体接触反应一段时间，让标本中的抗原与固相载体上的抗体结合，形成固相抗体-抗原复合物。洗涤除去其他未结合的物质；

（3）加酶标抗体：使固相免疫复合物上的抗原与酶标抗体结合。彻底洗

涤未结合的酶标抗体。此时固相载体上带有的酶量与标本中受检物质的量正相关；

（4）加底物：夹心式复合物中的酶催化底物成为有色产物。根据颜色反应的程度进行该抗原的定性或定量。

根据同样原理，将大分子抗原分别制备固相抗原和酶标抗原结合物，即可用双抗原夹心法测定标本中的抗体。

2、双位点一步法：

在双抗体夹心法测定抗原时，如应用针对抗原分子上两个不同抗原决定簇的单克隆抗体分别作为固相抗体和酶标抗体，则在测定时可使标本的加入和酶标抗体的加入两步并作一步（图 2）。这种双位点一步不但简化了操作，缩短了反应时间，如应用高亲和力的单克隆抗体，测定的敏感性和特异性也显著提高。单克隆抗体的应用使测定抗原的 ELISA 提高到新水平。

在一步法测定中，应注意钩状效应（hookeffect），类同于沉淀反应中抗原过剩的后带现象。当标本中待测抗原浓度相当高时，过量抗原分别和固相抗体及酶标抗体结合，而不再形成夹心复合物，所得结果将低于实际含量。钩状效应严重时甚至可出现假阴性结果。

3、间接法测抗体：

间接法（图 3）是检测抗体最常用的方法，其原理为利用酶标记的抗抗体以检测已与固相结合的受检抗体，故称为间接法。操作步骤如下：

（1）将特异性抗原与固相载体连接，形成固相抗原：洗涤除去未结合的抗原及杂质。

（2）加稀释的受检血清：其中的特异抗体与抗原结合，形成固相抗原-抗体复合物。经洗涤后，固相载体上只留下特异性抗体。其他免疫球蛋白及血清中的杂质由于不能与固相抗原结合，在洗涤过程中被洗去。

（3）加酶标抗抗体：与固相复合物中的抗体结合，从而使该抗体间接地标记上酶。洗涤后，固相载体上的酶量就代表特异性抗体的量。例如欲测人对某种疾病的抗体，可用酶标羊抗人 IgG 抗体。

（4）加底物显色：颜色深度代表标本中受检抗体的量。

本法只要更换不同的固相抗原，可以用一种酶标抗抗体检测各种与抗原

相应的抗体。

4、竞争法：

竞争法（图 4）可用于测定抗原，也可用于测定抗体。以测定抗原为例，受检抗原和酶标抗原竞争与固相抗体结合，因此结合于固相的酶标抗原量与受检抗原的量呈反比。操作步骤如下：

（1）将特异抗体与固相载体连接，形成固相抗体，洗涤。

（2）待测管中加受检标本和一定量酶标抗原的混合溶液，使之与固相抗体反应。如受检标本中无抗原，则酶标抗原能顺利地与固相抗体结合。如受检标本中含有抗原，则与酶标抗原以同样的机会与固相抗体结合，竞争性地占去了酶标抗原与固相载体结合的机会，使酶标抗原与固相载体的结合量减少。参考管中只加酶标抗原，保温后，酶标抗原与固相抗体的结合可达最充分的量。洗涤。

（3）加底物显色：参考管中由于结合的酶标抗原最多，故颜色最深。参考管颜色深度与待测管颜色深度之差，代表受检标本抗原的量。待测管颜色越淡，表示标本中抗原含量越多。

5、捕获法检测 IgM 抗体：

血清中针对某些抗原的特异性 IgM 常和特异性 IgG 同时存在，后者会干扰 IgM 抗体的测定。因此测定 IgM 抗本多用捕获法（图 5 ），先将所有血清 IgM（包括异性 IgM 和非特异性 IgM）固定在固相上，在去除 IgG 后再测定特异性 IgM。操作步骤如下：

（1）将抗人 IgM 抗体连接在固相载体上，形成固相抗人 IgM。洗涤。

（2）加入稀释的血清标本：保温反应后血清中的 IgM 抗体被固相抗体捕获。洗涤除去其他免疫球蛋白和血清中的杂质成分。

（3）加入特异性抗原试剂：它只与固相上的特异性 IgM 结合。洗涤。

（4）加入针对特异性的酶标抗体：使之与结合在固相上的抗原反应结合。洗涤。

（5）加底物显色：如有颜色显示，则表示血清标本中的特异性 IgM 抗体存在，是为阳性反应。

6、应用亲和素和生物素桥联法 ABC-ELISA(avidinbiotincomplex-ELISA)

夹心法测定抗原：

亲和素是一种糖蛋白，可由蛋清中提取。分子量60kD，每个分子由4个亚基组成，可以和4个生物素分子亲密结合。现在使用更多的是从链霉菌中提取的链霉和素（strepavidin）。生物素（biotin）又称维生素H，分子量244.31，存在于蛋黄中。用化学方法制成的衍生物，生物素－羟基琥珀亚胺酯（biotin-hydroxysuccinimide，BNHS）可与蛋白质、糖类和酶等多种类型的大小分子形成生物素化的产物。亲和素与生物素的结合，虽不属免疫反应，但特异性强，亲和力大，两者一经结合就极为稳定。由于1个亲和素分子有4个生物素分子的结合位置，可以连接更多的生物素化的分子，形成一种类似晶格的复合体。因此把亲和素和生物素与ELISA偶联起来，就可大提高ELISA的敏感度。

亲和素－生物素系统在ELISA中的应用有多种形式，可用于间接包被，亦可用于终反应放大。可以在固相上先预包被亲和素，原用吸附法包被固相的抗体或抗原与生物素结合，通过亲和素－生物素反应而使生物素化的抗体或抗在相化。这种包被法不仅可增加吸附的抗体或抗原量，而且使其结合点充分暴露。另外，在常规ELISA中的酶标抗体也可用生物素化的抗体替代，然后连接亲和素－酶结合物，以放大反应信号。桥联法ABC-ELISA（avidinbiotincomplex-ELISA）夹心法测抗原的过程见图6。

在上述酶联免疫吸附测定操作过程中，都少不了加液相的酶标抗体（抗原）结合物（即酶结合物），使操作人员工作量加大，操作繁琐，可造成加样的误差及交叉污染，影响测定结果的准确性。

发明内容

本发明的目的是提供一种酶联免疫吸附试验（ELISA）固化酶结合物及其制备。即将上述的液相酶标记抗体（抗原）结合物采用现代低温冷冻干燥技术固化到特制的固相支持物上，制成８只／条、１２只／条、１６只／条，与现有的８孔/条、１２孔/条、１６孔/条的酶标板条配合使用。

本发明的技术方案为：将固化的酶标抗体（抗原）结合物放入已加待测液相样品中时，固化的酶标抗体（抗原）结合物迅速溶化，与固相抗体-抗原复合物特异性结合，生成固相的抗体（抗原）－抗原（抗体）－酶标抗体（抗

原）复合物，然后加酶底物显色；此时固相载体上带有的酶量与标本中受检物质的量正相关。固化酶结合物的制备工艺如下：

1）制备酶结合物稀释液：用 0.1～2.0%BSA、0.1～3.0%PEG6000、0.01mol/L TBS（pH7.2～7.5）、余量为水；（TBS：三羟甲基氨基甲烷-盐酸、0.15mol/L 氯化钠）

2）稀释酶结合物：用酶结合物稀释液将液相酶结合物作 1:10～1:500 的稀释，然后直接加入固相支持物上，每个固相支持物上加 5～50ul；

3）低温冷冻干燥：-20～-50℃低温冷冻数小时后，抽真空数小时即可冻干。真空包装。

在双抗体夹心法测定抗原时，如应用针对抗原分子上两个不同抗原决定簇的单克隆抗体分别作为固相抗体和酶标抗体，则在测定时可使标本的加入和酶标抗体的加入两步并作一步（图 2）。这种双位点一步法不但简化了操作，缩短了反应时间，如应用高亲和力的单克隆抗体，测定的敏感性和特异性也显著提高。

本发明制备的固化酶结合物的优点为：

1）液相酶结合物采用低温冷冻干燥技术，制备成固化的酶结合物后，使酶结合物的稳定性有了很大的提高；在同等的条件下，冻干的酶结合物可保存一年以上不失活；而传统的液相的酶结合物保存期一般小于 6 个月。

2）固化酶结合物在出厂时就已经固化在固相支持物（见图）上，使用时只须将其放入相应的酶标板条的反应孔内即可。

3）使用固化酶结合物后，即简化了操作，又可减小操作误差及交叉污染，操作人员可放心操作。

附图说明

图 1 双抗体夹心法测定抗原示意图；

图 2 双位点一步法示意图；

图 3 间接法测抗体示意图；

图 4 竞争法测抗原示意图；

图 5 捕获法测 IgM 抗体示意图；

图 6 桥连法 ABC-ELISA 夹心法测抗原示意图；

图 7 为本发明的固化酶结合物的固相支持物。

具体实施方式：

实施例：

制备固化酶结合物：液相酶结合物采用低温冷冻干燥技术制备成固化的酶结合物（应用于前面所叙述的所有的方法类型中的酶结合物），具体方法是：

1）用液相的酶标抗体（抗原）结合物—液相酶结合物；

2）制备酶结合物稀释液：0.1～2.0%BSA、0.1～3.0%PEG6000 、0.01mol/L TBS（pH7.2～7.5）、余量为水；（TBS：三羟甲基氨基甲烷-盐酸、0.15mol/L氯化钠）；

3）稀释酶结合物：用酶结合物稀释液将酶结合物作 1:10～1:500 的稀释，然后直接加入固相支持物上，每个固相支持物上加 5～50ul；固相支持物为由若干个小柱体 1 组成多孔板条，或该小柱体与现有的 8 孔/条、1 2 孔/条、1 6 孔/条的酶标板条配合构成，该小柱体内下部为通孔 2，上部为与下孔隔断的凹孔 3，如图 7 所示；

4）低温冷冻干燥：-20～-50℃低温冷冻数小时后，抽真空数小时即可冻干。

5）包装：装入铝塑包装袋，真空封口包装；2～8℃保存。

在实验操作时：加受检标本和固化酶结合物：使之与固相抗体（抗原）接触反应一段时间（10～30 分钟），让标本中的抗原（抗体）与固化的酶标记抗体（抗原）结合、同时与固相载体上的抗体（抗原）结合，形成固相抗体-抗原-抗体- E（酶）复合物；彻底洗涤未结合的酶结合物，此时固相载体上带有的酶量与标本中受检物质的量正相关；

加底物显色：夹心式复合物中的酶催化底物成为有色产物，根据颜色反应的程度进行该抗原（抗体）的定性或定量测定。

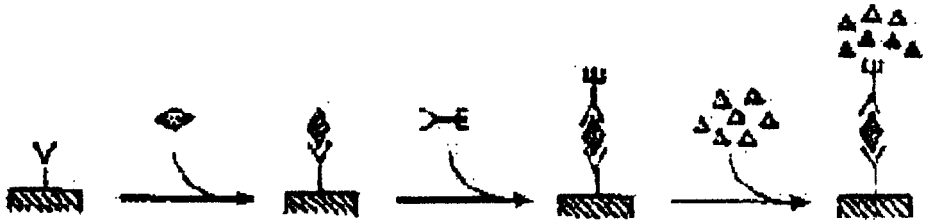


图1

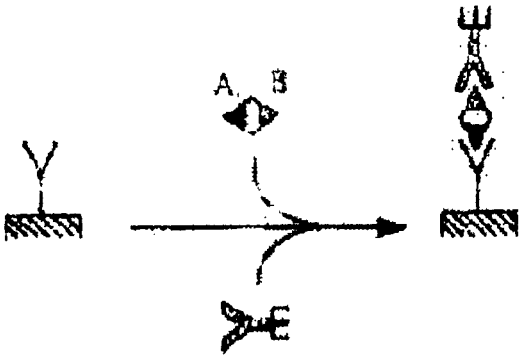


图2

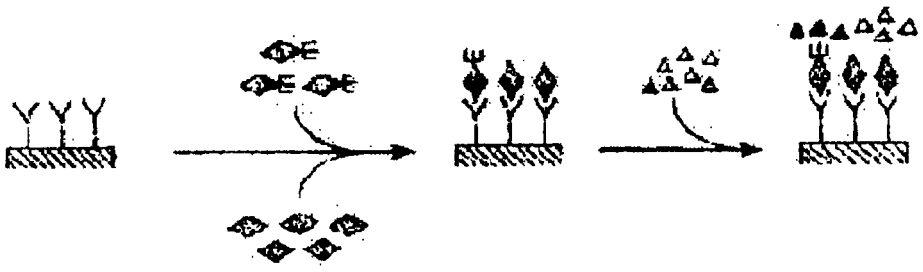


图3

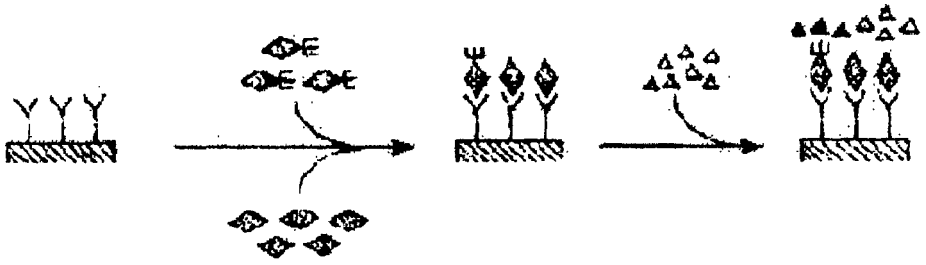


图4

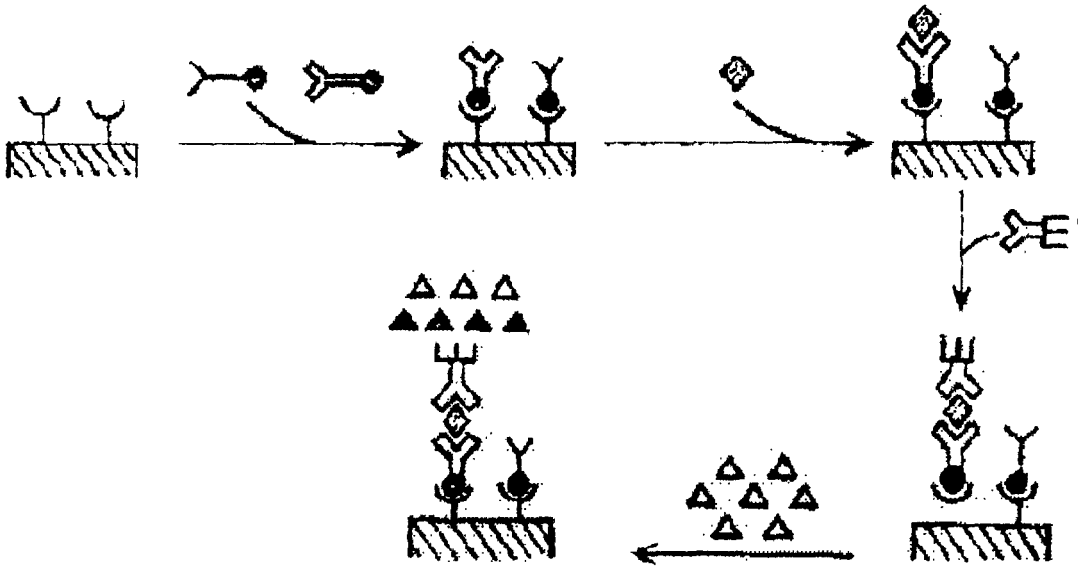


图5

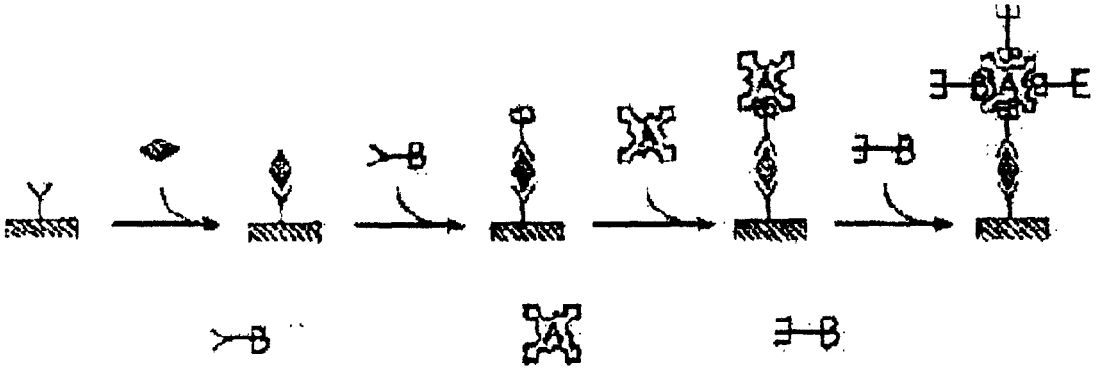


图6

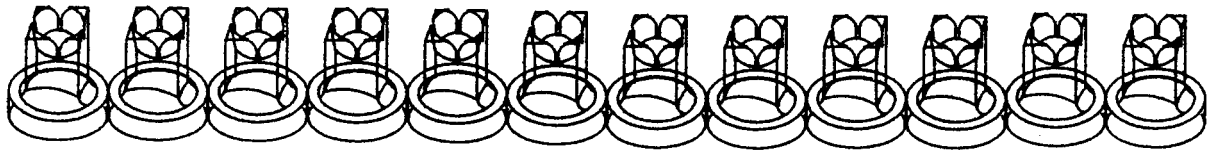
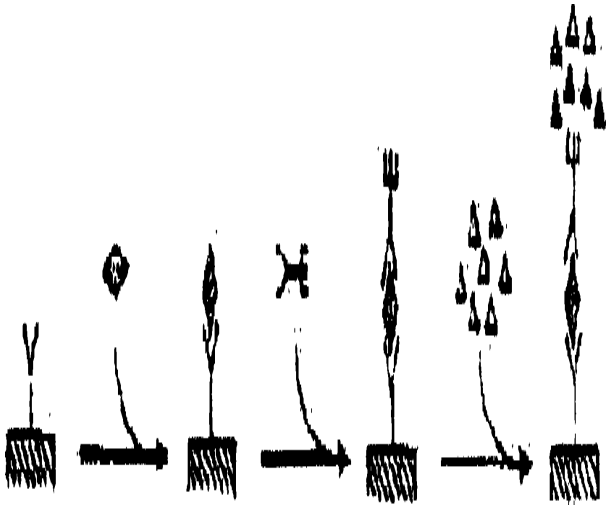


图7

专利名称(译)	酶联免疫吸附试验固化酶结合物及其制备		
公开(公告)号	CN1488942A	公开(公告)日	2004-04-14
申请号	CN03135655.9	申请日	2003-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	严家定		
申请(专利权)人(译)	严家定		
当前申请(专利权)人(译)	严家定		
[标]发明人	严家定		
发明人	严家定		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种酶联免疫吸附试验固化酶结合物及其制备。固化酶结合物按以下方法制备得到：1)制备酶结合物稀释液：用0.1～2.0%BSA、0.1～3.0%PEG6000、0.01mol/LTBS(pH7.2～7.5)(TBS：三羟甲基氨基甲烷－盐酸、0.15mol/L氯化钠)、余量为水；2)稀释酶结合物：用酶结合物稀释液将液相酶结合物作1:10～1:500的稀释，然后直接加入固相支持物上，每个固相支持物上加5～50ul；3)低温冷冻干燥：－20～－50℃低温冷冻数小时后，抽真空数小时即可冻干。真空包装即得固化酶结合物。液相酶结合物采用低温冷冻干燥技术，制备成固化的酶结合物后，使酶结合物的稳定性有了很大的提高；在同等的条件下，冻干的酶结合物可保存一年以上不失活；而传统的液相的酶结合物保存期一般小于6个月。使用固化酶结合物后，即简化了操作，又可减小操作误差及交叉污染，操作人员可放心操作。