

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 实用新型专利说明书

专利号 ZL 200520122784.1

[45] 授权公告日 2006 年 11 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 2833594Y

[22] 申请日 2005.9.30

[21] 申请号 200520122784.1

[73] 专利权人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 设计人 潘利华 马世盐 苏赛飞 李 珍

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司
代理人 马守忠

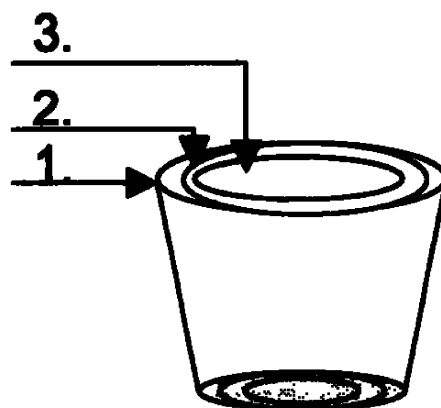
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 实用新型名称

固相白色不透明反射式样品池

[57] 摘要

本实用新型属于固相时间分辨荧光免疫分析技术领域，具体涉及固相白色不透明反射式样品池。它是一个有底的圆台型或圆柱型的杯状体，由基体(1)、中层(2)、内表面层(3)构成；所述的基体(1)是聚苯乙烯(PS)，中层(2)是固定于基体(1)聚苯乙烯(PS)的内表面的 nylon-6 膜层，内表面层(3)是与中层(2)的 nylon-6 膜层以共价结合的多胺基层。以共价化学结合代替物理吸附，增大抗原或抗体的结合量，显著提高结合免疫配基的活性，使免疫检测灵敏度增强。本实用新型既可用于免疫分析，还可以用做亲和层析固相结合剂，且可以反复使用，其功能及成本均比常用的聚丙烯酰胺凝胶为优，具有广泛的应用价值。



1. 一种固相白色不透明反射式样品池，是一个有底的圆台型或圆柱型的杯状体，其特征在于，是由 基体（1）、中层（2）、内表面层（3）构成；所述的基体（1）是聚苯乙烯（PS），中层（2）是联结于基体（1）聚苯乙烯（PS）的内表面的 nylon-6 膜层，内表面层（3）是与中层（2）的 nylon-6 膜层以共价结合的多胺基层。

固相白色不透明反射式样品池

技术领域

本实用新型属于免疫分析技术领域，具体涉及用于固相时间分辨荧光免疫分析技术的固相白色不透明反射式样品池。

本实用新型研制的一种新型的固相白色不透明反射式样品池，可应用于荧光免疫分析、亲和层析、固相酶技术和 DNA 芯片等生物分析领域。

自 1979 年 Soini 和 Hemmila 提出时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 理论，1982 年创立第一台手动测量仪器以来，迄今已发展为多种 TRFIA 体系。其中解离增强 (DELFIA) 体系已经实现了商品化，但由于该体系存在着缺陷：离子解离后不能产生特异的空间信号，并不适于所有的应用，如荧光成像、免疫组化、定位杂交、DNA 芯片或在线检测等。

为了克服 DELFIA 体系的不足，1988 年 Ether 等人建立了以具有增强荧光作用的新型铈螯合剂 4, 7-二氯磺基苯-1, 10 菲啰啉 2, 9-二羧酸 (BCPDA) 作为标记物的激光激发固相时间分辨荧光免疫分析 (DSLFI A) 的新体系，该检测系统带有激光光源和白色不透明反射式样品池。(用新型铈螯合剂 4, 7-二氯磺基苯-1, 10 菲啰啉 2, 9-二羧酸 (BCPDA) 作为标记物的激光激发固相时间分辨荧光免疫分析，分析化学，1988，60，1069-1074。Laser

Excited Time-Resolved Solid

Phase Fluoroimmunoassays with the New Europium Chelate 4, 7-Bis(chlorosulfonyl)-1, 10-phenanthroline-2, 9-dicarboxy Acid as Label. Anal. Chem. 1988, 60, 1069-1074) [1] 为深入开展

DSLFI A 体系开创了检测系统的先河。但是由于试剂和检测系统正在完善之中，尚未达到商品化水平。有关白色不透明反射式样品池技术未见报道。

尼龙(聚己内酰胺)作为可游离出自由氨基的多氨，很早就引起人们的关注。但多数研究都集中于将生物分子偶联于尼龙膜上(嗜热菌蛋白酶固定在多胺膜上，生物技术和生物工程，2003, 82(2) 190-199。

Immobilization of Thermolysin to polyamide Nonwoven Materials. Biotechnol and Bioeng. 2003, 82(2) 190-199.) [2] 可用于斑点免疫分析和免疫印记技术，不适合做酶联免疫分析 (ELSI A) 固相。关于将尼龙结合于聚苯乙烯固相的方法，有人报道预先将生物分子结合与尼龙膜上之后再覆盖于 PS 孔内(半抗原结合的尼龙涂布于聚苯乙烯板作为酶联免疫分析固相，免疫方法学杂志. 1990, 127:43-49. Haptenated nylon - coated polystyrene

plates as a solid phase for ELSIA. J. Immunol Methods.

1990, 127:43-49) [3]. 该法及用该法获得的 PS 微孔板已被证明结合不均匀, 不能耐受尼龙水解释放氨基的强酸处理以及化学偶联中的有机溶剂, 导致聚苯乙烯表面被侵蚀、破坏。分析其原因是由于使用乙酸/间甲酚/二氯甲烷溶解 nylon 导致两个主要问题: 其一, 二氯甲烷快速挥发, 在 nylon 膜留下微孔, 降低了膜的机械强度及对 PS 的结合力; 其二, 盐酸和有机溶剂通过微孔直接于 PS 接触, 前者使 nylon 膜容易断裂, 后者能溶解 PS, 导致 PS 与 nylon 膜混合而掩盖 nylon 的活性基团。故该方法只能预先结合免疫配基, 再覆盖于 PS 表面, 不具备实用价值。

实用新型内容

为了解决上述存在的技术问题, 本实用新型提供了一种在聚苯乙烯样品的表面固定一层白色不透明的尼龙层, 经化学修饰后得到固相白色不透明反射式样品池。该固相白色不透明反射式样品池用于 DSLFIA 技术。

本实用新型提供的固相白色不透明反射式样品池的结构如图 1 所示。它是一个有底的圆台型或圆柱型的杯状体; 是由基体 1、中层 2、内表面层 3 构成; 所述的基体 1 是聚苯乙烯 (PS), 中层 2 是联结于基体 1 聚苯乙烯 (PS) 的内表面的 nylon-6 膜层, 内表面层 3 是与中层 2 的 nylon-6 膜层以共价结合的多胺基层;

所述的基体 1 聚苯乙烯 (PS) 和中层 2 的 nylon-6 膜层的联结是用吡啶/丙酮预先活化处理基体 1 的内表面, 用乙酸/间甲酚/吡啶溶解、活化 nylon-6, 使两者之间发生疏水性相互作用, 同时吡啶兼有活化 PS 和温和的“侵蚀”作用, 可使 nylon-6 快速牢固地联结于 PS 内表面而形成内表面层 2; 对内表面层 2 的尼龙层进行烷基化处理, 可使 nylon-6 表面生成的烷基-OR 很容易地与 2, 6-二氨基己酸的一个氨基共价结合, 形成另一端游离氨基的手臂, 该“手臂”的游离氨基能与蛋白质的游离氨基形成较牢固的共价结合的内表面层 3 是多胺基层, 于是得到固相白色不透明反射式样品池。

下面再详细介绍本实用新型的制造固相白色不透明反射式样品池方法的具体步骤和条件, 以便对本实用新型作进一步地说明。

本实用新型所用试剂:

- A. 基体 1 活化剂: 6.0-8.0%吡啶的丙酮溶液 (V/V)。
- B. 中层 2 的 nylon-6 的活化剂: (0.5-0.9%吡啶) 的乙酸/间甲酚溶液 (V/V)。
- C. 环氧氯丙烷的乙醚溶液: 环氧氯丙烷与乙醚溶液体积比为 1: 9。
- D. 三乙基氧膦四硼酸脂 (TOTFB) 试剂制备: 40ml 5%(v/v)三氟化硼乙

醚(v/v)溶液在持续搅拌下,加入 12.5ml 的环氧氯丙烷的乙醚溶液,在 30 分钟内加完,之后加热回流一小时,室温再搅拌 3 小时,滤出 TOTFB,再用无水乙醚冲洗 3 次,得到的 TOTFB。其产率为 90%--95%以上。

E. TOTFB 二氯甲烷溶液:含 0.01-0.05g/ml TOTFB 三乙基氧翁四氟硼酸酯(TOTFB)二氯甲烷溶液。

F. 戊二醛液:将 0.5M 戊二醛液以 5% (v/v) 相溶于 0.2M 硼酸盐缓冲溶液(pH=7.6)。

G. 1, 6 己二胺溶液:浓度为 0.5M 1, 6 己二胺的(pH=9.5)的碳酸盐缓冲溶液。

本实用新型制备方法的步骤和条件:

1. nylon-6 与 PS 基体 1 的联结

向由 PS 基体 1 池内加入基体 1 活化剂,室温放置 1-3 分钟,弃去溶液后立即加入含 12-18% 聚酰胺-6 粉的中层 2 nylon-6 的活化剂,沿中轴线慢速旋转基体 1,使 nylon-6 快速、坚固、均匀地结合于基体 1 池的内表面,形成 nylon-6 厚度为 0.1-0.2mm 的白色不透明的反射样品池中层 2 的膜层;

2. 尼龙膜表面烷基化

加入 TOTFB 二氯甲烷溶液上述(1)的样品池中,室温放置 4-10 分钟,弃去,用二氯甲烷冲洗 2 次,用二氧六环冲洗 1 次;

3. 修饰尼龙膜表面

将戊二醛溶液加入到上述(2)的样品池中, 37℃温育 15 分钟,弃去,加入 0.2M pH=7.2 磷酸盐(PBS)缓冲溶液冲洗三次, 再加入 1, 6 己二胺(pH=9.5)溶液,室温放置 3 小时, 倒掉,然后用 PBS 溶液冲洗 3 次,即得固相白色不透明反射式样品池。

本实用新型的固相白色不透明反射式样品池的技术上的特点和有益的效果如下:

1. 利用 nylon-6 结合于 PS 的内表面的白色不透明的反射样品池,采用新的溶解多氨技术和特定的 PS 活化剂、多氨凝固剂,使多胺均匀、牢固移植于 nylon-6 的表面,形成白色反射光的多胺基内层。

2. 该多胺内表面固相在室温暴露空气中能长期保存并能耐受强酸、碱、有机溶剂不变形、不脱落。为使 nylon-6 聚己内酰胺结构游离出活性基团,以往用盐酸部分水解法,由于过度水解会使 nylon 结构断裂,控制水解时间又导致游离氨基暴露不充分,故采用 TOTFB 烷化处理尼龙层。该法不会影响

nylon-6 结构, 且能充分暴露活性基团 $\text{—}\overset{\text{OR}}{\underset{|}{\text{C}}}=\text{N}^+\text{—}$ 。利用戊二醛双功能团作用, 一端结合“手臂”上的游离氨基, 另一端游离的醛基结合蛋白质的游离氨基, 提高结合免疫配基的活性。

3. 采用吡啶代替二氯甲烷。因为吡啶不但挥发慢而且能促进溶解状态的 nylon 聚集及与 PS 的结合, 在 PS 表面形成均匀、坚韧、不能透过乙机溶剂的薄膜; 并在其与 PS 结合时, 对活性氨基含量、机械强度及对有机溶剂耐受性等方面收到理想的效果。

4. 用 TOTFB 处理 nylon 表面, 文献中已有报道, 但都是用 nylon 膜反应, 洗脱需经过大量液体浸泡, 本实用新型采用池内冲洗三次, 非特异结合为 3.41%, 实验/非特异=12.9, 显著高于 ELISA 2.1 倍诊断标准。

5. 将固相白色不透明反射式样品池用于放射性标记免疫分析, 配基结合率达 43.98%, 为未处理 PS 样品池的 2.5-13.1 倍。证明本样品池具有较高活性及灵敏度。

6. 本实用新型固相白色不透明反射式样品池的批内误差统计实验及对照组平均 CV=5.0%, 各组 8 个平行样本 CV<10%, 显著高于未处理的 PS 样品池。

7. 本实用新型固相白色不透明反射式样品池的破坏性实验结果证明: 蛋白质完全变性的温度为 65℃, 实验采用 50℃保持加温 48 小时, 样品池偶联抗体的结合率仍保持 41%, 比实验前降低了 4.6%。而未处理 PS 微孔板结合率 5%, 已完全失效。

8. 本实用新型的固相白色不透明反射式样品池的性能可与与丹麦生产的 Nunc Covalink-NH 微孔板相比, 实用性则比其优越 (聚苯乙烯微孔板氨基化: 用于杂交实验中共价移植 DNA 探针。分析生物化学 1996, 236:85-94。Amination of polystyrene Microwell: Application to the covalent Grafting of DNA probe for Hybridization assays. Anal. Biochem. 1996, 236:85-94) [5]。例如 Nunc 板的活性基团为 -NH, 本实用新型为 -NH₂, 该基团联结蛋白质的氨基更容易, 更稳定; Nunc 板售价比 PS 微孔板贵 2 倍。本实用新型因操作简便, 取材容易, 成本只比 PS 微孔板贵 20% 左右, 在市场上有竞争能力。

本实用新型既可用于免疫分析, 还可以用做亲和层析固相结合剂, 即将直径为 5-8 μm PS 微珠按本方法移植活性氨基, 可作为高效能亲和层析材料, 且可以反复使用, 其功能及成本均比常用的聚丙烯酰胺凝胶为优, 具有广泛的应用价值。

附图说明

图1是本实用新型的固相白色不透明反射式样品池的结构示意图。此图也是说明书摘要附图。

具体实施方式

本实用新型实施例所用的试剂及其制备：

A. 基体1活化剂：6.0-8.0%吡啶的丙酮溶液（V/V）。

B. 中层2的 nylon-6 的活化剂：（0.5-0.9%吡啶）的乙酸/间甲酚溶液（V/V）。

C. 环氧氯丙烷的乙醚溶液：环氧氯丙烷与乙醚溶液体积比为1：9。

D. 三乙基氧膦四硼酸酯（TOTFB）试剂制备：40ml 5%（v/v）三氟化硼乙醚（v/v）溶液在持续搅拌下，加入12.5ml 的环氧氯丙烷的乙醚溶液，在30分钟内加完，之后加热回流一小时，室温再搅拌3小时，滤出TOTFB，再用无水乙醚冲洗3次，得到TOTFB。其产率为90%--95%以上。

E. TOTFB 二氯甲烷溶液：含0.01-0.05g/ml TOTFB 三乙基氧膦四氟硼酸酯（TOTFB）二氯甲烷溶液。

F. 戊二醛液：将0.5M 戊二醛液以5%（v/v）相溶于0.2M 硼酸盐缓冲溶液（pH=7.6）。

G. 1,6 己二胺溶液：将的0.5M 的1,6 己二胺溶液（v/v）溶于0.1 M（pH=9.5）的碳酸盐缓冲溶液。

本实用新型的制备方法的步骤和条件：

1. nylon-6 与 PS 基体1 的联结

向由PS基体1池内加入基体1活化剂A，室温放置1-3分钟，弃去溶液后立即加入含12-18% 聚酰胺-6粉的中层2 nylon-6 的活化剂B，沿中轴线慢速旋转基体1，使 nylon-6 快速、坚固、均匀地结合于基体1池的内表面，形成 nylon-6 厚度为0.1-0.2mm 的白色不透明的反射样品池中层2的膜层；

2. 尼龙膜表面烷基化

加入TOTFB 二氯甲烷溶液于上述（1）的样品池中，室温放置4-10分钟，弃去，用二氯甲烷冲洗2次，用二氧六环冲洗1次；

3. 修饰尼龙膜表面

将戊二醛溶液加入到上述（2）的样品池中，37℃温育15分钟，弃去，加入0.2M pH=7.2 磷酸盐（PBS）缓冲溶液冲洗三次，再加入1,6 己二胺（pH=9.5）溶液，室温放置3小时，倒掉，然后用PBS溶液冲洗3次，即得固相白色不透明反射式样品池。

实施例 1:

(1). 向由 PS 构成的基体 1 内加入 400 μ l 基体 1 活化剂, 室温放置 1 分钟, 弃去溶液后立即加入 200 μ l 由中层 2 nylon-6 活化剂溶解的 12% nylon-6 溶液, 沿中轴线慢速旋转 (40 次/分) 基体 1, 使 nylon-6 快速、坚固、均匀地结合于基体 1 的内表面, 形成 nylon-6 膜层厚度为 0.1-0.2mm 的白色不透明的反射样品池中层 2 nylon-6 膜层;

(2). 加入 400 μ l 5% 三乙基氧膦四氟硼酸酯 (TOTFB) 的二氯甲烷溶液到上述 (1) 的样品池中, 室温放置 4-10 分钟, 弃去, 用二氯甲烷冲洗 2 次, 二氧六环冲洗 1 次;

(3). 将 200 μ l 0.5M 戊二醛加入上述 (2) 的样品池中, 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟, 弃去。加入 0.2M pH=7.2 磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液冲洗三次; 再加入 200 μ l 0.058g/ml 的 1, 6 己二胺溶液, 室温放置 3 小时, 倒掉。然后用 PBS 缓冲溶液冲洗 3 次, 即得本实用新型的固相白色不透明反射式样品池。

实施例 2

(1). 向由 PS 构成的基体 1 内加入 400 μ l 基体 1 活化剂, 室温放置 1 分钟, 弃去溶液 后立即加入 200 μ l 用中层 2 nylon-6 活化剂溶解的 13% nylon-6 溶液。沿中轴线慢速旋转 (40 次/分) 基体 1, 使 nylon-6 快速、坚固、均匀地结合于基体 1 的内表面, 形成 nylon-6 厚度为 0.1-0.2mm 的白色不透明的反射样品池中层 2 nylon-6 膜层;

(2). 加入 400 μ l 4% TOTFB 的二氯甲烷溶液到上述 (1) 的样品池中, 室温放置 4-10 分钟, 弃去。用二氯甲烷冲洗 2 次, 二氧六环冲洗 1 次;

(3). 加入 200 μ l 0.5M 戊二醛硼酸盐缓冲溶液到上述 (2) 的样品池中, 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟, 弃去。加入 0.2M pH=7.2 磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液冲洗三次; 再加入 200 μ l 0.5M 的 1, 6 己二胺溶液, 室温放置 3 小时, 倒掉, 然后用 PBS 缓冲溶液冲洗 3 次, 即得到本实用新型的固相白色不透明反射式样品池。

实施例 3

(1). 向由 PS 构成的基体 1 内加入 400 μ l 基体 1 活化剂。室温放置 1 分钟, 弃去溶液后立即加入 200 μ l 由中层 2 nylon-6 活化剂溶解的 14% nylon-6 溶液。沿中轴线慢速旋转 (40 次/分) 基体 1, 使 nylon-6 快速、坚固、均匀地结合于基体 1 的内表面, 形成 nylon-6 膜层厚度为 0.1-0.2mm 的白色不透明的反射样品池中层 2 nylon-6 膜层;

(2). 加入 400 μ l 3% TOTFB 的二氯甲烷溶液到上述 (1) 的样品池中, 室温放置 4-10 分钟, 弃去。用二氯甲烷冲洗 2 次, 二氧六环冲洗 1 次; 所述

的 TOTFB 合成方法是按文献：（酶固定于尼龙的化学，生物化学. J. 1975, 147:593-603 A chemistry for the Immobilization of Enzymes on nylon. Biochem . J. 1975, 147:593-603）合成方法合成；

(3). 将 200 μ l 0.5M 戊二醛硼酸盐溶液加入到上述(2)的样品池中，37℃温育 15 分钟，加入 0.2M pH=7.2 磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液冲洗三次；再加入 200 μ l 0.5M 的 1, 6 己二胺溶液，室温放置 3 小时，倒掉，然后用 PBS 溶液冲洗 3 次，即得本实用新型的固相白色不透明反射式样品池。

实施例 4

(1). 向由 PS 构成的基体 1 内加入 400 μ l 基体 (1) 活化剂，室温放置 1 分钟，弃去 溶液 后立即加入 200 μ l 用中层 2 nylon-6 活化剂溶解的 15% nylon-6 溶液。沿中轴线慢速旋转 (40 次/分) 基体 1，使 nylon-6 快速、坚固、均匀地结合于基体 1 的内表面，形成 nylon-6 厚度为 0.1-0.2mm 的白色不透明的反射样品池中 2 nylon-6 膜层；

(2). 加入 400 μ l 2% TOTFB 的二氯甲烷溶液到上述 (1) 的样品池中，室温放置 4-10 分钟，弃去，用二氯甲烷冲洗 2 次，二氧六环冲洗 1 次；

(3). 将 200 μ l 戊二醛硼酸盐缓冲溶液 (pH=7.6) 的加入到上述 (2) 的样品池中，37℃温育 15 分钟后加入 0.2M pH=7.2 磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液冲洗三次；再加入 200 μ 溶于 0.1 M 碳酸盐缓冲溶液 (pH=9.5) 0.5M 的 1, 6 己二胺溶液，室温放置 3 小时，倒掉，然后用 PBS 溶液冲洗 3 次，即得本实用新型的固相白色不透明反射式样品池。

实施例 5

(1). 向由 PS 构成的基体 1 内加入 400 μ l 基体 1 活化剂。室温放置 1 分钟，弃去溶液后立即加入 200 μ l 由中层 2 nylon-6 活化剂溶解的 16% nylon-6 溶液，沿中轴线慢速旋转 (40 次/分) 基体 1，使 nylon-6 快速、坚固、均匀地结合于基体 1 的内表面，形成 nylon-6 膜层厚度为 0.1-0.2mm 的白色不透明的反射样品池中 2 nylon-6 膜层；

(2). 加入 400 μ l 1% TOTFB 的二氯甲烷溶液到上述 (1) 的样品池中，室温放置 4-10 分钟，弃去。用二氯甲烷冲洗 2 次，二氧六环冲洗 1 次；

(3). 加入 200 μ l 0.5M 戊二醛硼酸盐缓冲溶液到上述 (2) 的样品池中，37℃温育 15 分钟，加入 0.2M pH=7.2 磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液冲洗三次；再加入 200 μ l 0.5M 1, 6 己二胺碳酸盐缓冲溶液 (pH=9.50)，室温放置 3 小时，倒掉。然后用 PBS 溶液冲洗 3 次，即得本实用新型的固相白色不透明反射式样品池。

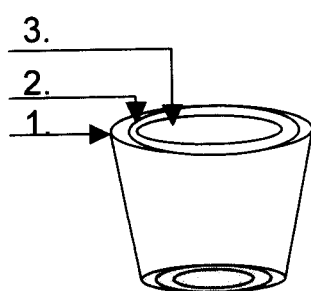


图 1

专利名称(译)	固相白色不透明反射式样品池		
公开(公告)号	CN2833594Y	公开(公告)日	2006-11-01
申请号	CN200520122784.1	申请日	2005-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	长春应用化学研究所中国科学院的		
[标]发明人	潘利华 马世盐 苏赛飞 李珍		
发明人	潘利华 马世盐 苏赛飞 李珍		
IPC分类号	G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型属于固相时间分辨荧光免疫分析技术领域，具体涉及固相白色不透明反射式样品池。它是一个有底的圆台型或圆柱型的杯状体，由基体(1)、中层(2)、内表面层(3)构成；所述的基体(1)是聚苯乙烯(PS)，中层(2)是固定于基体(1)聚苯乙烯(PS)的内表面的nylon - 6膜层，内表面层(3)是与中层(2)的nylon - 6膜层以共价结合的多胺基层。以共价化学结合代替物理吸附，增大抗原或抗体的结合量，显著提高结合免疫配基的活性，使免疫检测灵敏度增强。本实用新型既可用于免疫分析，还可以用做亲和层析固相结合剂，且可以反复使用，其功能及成本均比常用的聚丙烯酰胺凝胶为优，具有广泛的应用价值。

