

[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 33/531

G01N 33/543 G01N 33/68

C12Q 1/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03135251.0

[43] 公开日 2004 年 7 月 21 日

[11] 公开号 CN 1514245A

[22] 申请日 2003.6.19 [21] 申请号 03135251.0

[71] 申请人 成都夸常科技有限公司

地址 610041 四川省成都市人民南路四段桐梓林中
路 1 号芳草地中心会所 6 楼

[72] 发明人 邹方霖 陈春生 陈 宁 王建霞

[74] 专利代理机构 成都天元专利事务所

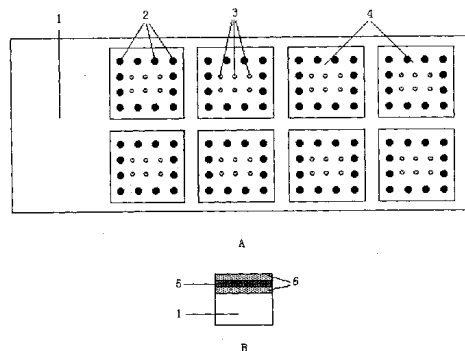
代理人 张 新

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法及装置

[57] 摘要

本发明提供一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法及装置，在提高或不降低灵敏度的条件下，减少检测的操作步骤，从而提高检测效率。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法,其包括下列基本步骤:

a、将目标物或含目标物的物质与检测装置的反应器中的探针接触并发生探针-标记物反应;

b、通过控制缓释标记系统,对步骤 a 所述反应的结果进行标记,所述控制缓释标记系统中所含标记物的控速释放或/和可控滞后完全不或不完全由机械输运系统来控制;

c、检出步骤 b 所述标记的结果;

d、根据步骤 c 所述标记结果分析 a 所述反应结果。

2、根据权利要求 1 所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法,其特征在于:所述标记物的控速释放或/和可控滞后,由控制缓释剂或/和控制缓释结构控制或参与控制。

3、根据权利要求 2 所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法,其特征在于:所述标记物的控速释放,其标记物半释期大于 10 秒、优选方案大于 30 秒;所述标记物的可控滞后,其标记物最大释放时刻晚于所述探针-目标物反应最大时刻。

4、根据权利要求 3 所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法,其特征在于:所述标记物,其标记方法包括化学发光标记,激发发光标记,非选择性光反射标记及选择性光反射标记。

5、根据权利要求 4 所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法,其特征在于:所述标记方法,适用于下述分析之一:生物芯片分析、快速反应试剂条分析、酶联免疫分析及荧光免疫分析。

6、一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:其含有控制缓释标记系统,所述控制缓释标记系统,其标记物半释期大于 10 秒、优选方案大于 30 秒,或/和其标记物最大释放时刻晚于所述探针-目标物反应最大时刻。

7、根据权利要求 6 所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:所述控制缓释标记系统为不置于反应器中的、含有控制缓释剂的外置式控制缓释标记系统,或置于反应器中的、含有反应器控制缓释结构或/和控制缓释剂的内置式控制缓释标记系统。

8、根据权利要求 6 或 7 所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:所述控制缓释剂为水可溶性或水溶液可致崩解的有机物。

9、根据权利要求 8 所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:所述水可溶性或水溶液可致崩解的

有机物包括碳水化合物、植物胶、动物胶、改性纤维素、改性淀粉、聚合物和缩合物。

10、根据权利要求 9 所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:所述水可溶性或水溶液可致崩解的有机物包括多糖、聚多糖及它们的衍生物,植物淀粉,琼胶,阿拉伯胶,骨胶,明胶,带有羧基或羟基的纤维素、带有羧基或羟基的纤维素衍生物。

11、根据权利要求 6-10 之一所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:所述控制缓释标记系统中的标记物与控制缓释剂具有一维或二维或三维的单重或多重夹心结构,所述夹心结构是指标记物浓度分布在内部高于外部的结构。

12、根据权利要求 6-11 之一所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:其控制缓释标记系统中的标记物含有标记物质及配基,所述标记物质包括酶、荧光染料,化学发光催化剂,有色金属或有色金属盐,染料和颜料;所述配基包括抗原,抗体,生物素,药物配基,多肽,DNA、RNA 及其片断。

13、根据权利要求 6-12 之一所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:其为生物芯片或生物芯片试剂盒,或快速检测试剂条或快速检测试剂条试剂盒,或酶联反应酶标板或酶联反应试剂盒。

14、根据权利要求 13 所述的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:所述生物芯片的探针阵列的探针密度大于 5 个/cm²,优选方案大于 10 个/cm²,更优选方案大于 20 个/cm²。

通过控制缓释标记系统对目标物进行 定性和/或定量分析的方法及装置

所属技术领域:

本发明涉及一种生物材料定性定量的分析方法和装置,特别是一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法及装置。

背景技术

对样品中、特别是生物样品中的目标物进行定性和/或定量分析的方法,其范围很广,其中基于探针-目标物特异性反应和特异性标记反应的一类的步骤为:将目标物或含目标物的物质与检测装置的反应器中的探针接触并反应;通过标记系统对上述反应的结果进行标记;检出上述标记的结果;根据上述标记结果分析探针-目标物特异性反应结果。由于所用检测装置、探针-目标物特异性反应或/和标记系统的不同,衍生出很多定性和/或定量分析,例如生物芯片分析、PCR分析、快速检测试剂条分析、ELISA分析、免疫荧光分析等等,也衍生出很多定性和/或定量分析的方法,例如生物芯片分析中的荧光标记法和化学发光标记法等等。

本发明中,“检测装置”是指定性和/或定量分析中含有反应器的装置,例如生物芯片或生物芯片试剂盒、快速检测试剂条、酶联反应酶标板或酶联反应试剂盒,等等。检测装置的必不可少的组成是反应器,反应器的必不可少的组成是探针和用以固定探针的载体。在本发明中,“反应器”是指探针与目标物发生特异性反应的场所及与其连通的其它相关结构,例如生物芯片中的反应器、酶联反应酶标板中的孔、快速检测试剂盒的试剂条等等。本发明中的探针,包括所有可以固定在固相载体上的具有活性、特别是生物活性的物质,例如抗原、抗体、单链和多链DNA、RNA、核苷酸、药物配体、配基、多肽、细胞、组织成分等生物成分。在本发明中,“片基”是指反应器中用作固定探针或/和包含探针的物质的固相载体。例如,抗原包被生物芯片中的探针为包被抗原而片基通常为活化玻片、抗原包被酶联反应酶标板中的探针为包被抗原而片基通常为多孔板、等等。

下面以生物芯片分析为例来简单地说明现有定性和/或定量分析及尚待解决的问题。

在本发明中,“生物芯片”、也简称“芯片”,是指定性和/或定量分析方法中的一种检测装置,其反应器中探针同样品中的目标分子发生特异反应的结果可以以可寻址的方式进行识别。在本发明中,“生物芯片试剂盒”是指包含有生物芯片及标记系统等其它检测反应介质的检测装置。

生物芯片包括基因芯片、多肽芯片、糖芯片、细胞芯片和组织芯片等。目前最常用的生物芯片是多肽芯片和基因芯片。多肽芯片是以多个氨基酸

的序列结构（包括蛋白质）作为探针固定在片基上制备的生物芯片。基因芯片是用待检标本中核酸、核苷酸与互补核酸、互补核苷酸探针杂交，形成杂交体，或与特异性抗体结合，再用呈色反应显示检测结果的芯片。生物芯片有着广泛的应用范围，包括基因表达检测、基因筛选、药物筛选、疾病诊断治疗、环境监测和治理、司法鉴定等领域。

目前的生物芯片，其标记系统在检测操作时基本上是瞬时释放的，或者说在探针-目标物反应的条件下列记物的释放是没有可控滞后的。利用这种标记系统进行生物芯片分析，为避免虎克现象（HOOK effect），其标记物均是在需要时以溶液状态完全由机械系统作用而进入反应位置的。例如，利用目前具有外置标记系统的平面生物芯片和内置标记系统的通道式生物芯片进行生物芯片分析，需要专门的加入标记物溶液的步骤和相应机械系统。换言之，目前的生物芯片分析，其中的标记步骤必须机械系统专门运输标记物，这就往往需要专门的标记物贮存器、标记物输运管道及输运物转换器及转换程序，从而使检测装置的复杂程度居高不下。

目前，基于探针-目标物特异性反应和特异性标记反应的、对样品中、特别是生物样品中的目标物进行定性和/或定量分析的装置，例如酶联反应酶标板，也都有与生物芯片同样的标记物输送问题。而对快检试剂条而言，由于固定在其中的标记物（通常是固体标记物，例如酶标记的胶体金）在探针-目标物反应的条件下列记物的释放是没有可控滞后的，虎克现象（HOOK effect）的存在严重影响了其灵敏度。总之，控制标记物释放的速度或/和滞后，是在提高或不降低灵敏度的条件下，对现有定性和/或定量分析方法和装置进行简化步骤和自动化难度、降低检测成本的一个重要方面。

发明内容

本发明提供一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法及装置，是以在提高或不降低灵敏度的条件下，减少对样品、特别是生物样品中的目标物进行定性和/或定量分析、更特别是生物芯片检测的操作步骤，从而提高检测效率为主要目的。

实际上，我们发现，标记物释放的速度和滞后，是可以在完全不或不完全依赖于机械输运系统的条件下加以控制的。

本发明所述的方法如下：

本发明提供一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法，其包括下列基本步骤：

a、将目标物或含目标物的物质与检测装置的反应器中的探针接触并发生探针-标记物反应；

b、通过控制缓释标记系统，对步骤 a 所述反应的结果进行标记，所述控制缓释标记系统所含标记物的控速释放或/和可控滞后完全不或不全由机械输运系统来控制；

- c、检出步骤 b 所述标记的结果；
- d、根据步骤 c 所述标记结果分析 a 所述反应结果。

本发明所述的控制缓释标记系统是指这样一种标记系统, 其所含标记物的释放的速度或/和滞后是可以控制的, 且所述控制完全不或不完全由机械输运系统来进行。本发明方法与目前所有通过标记系统对目标物进行定性和/或定量分析方法的区别是: 标记不是通过常规的标记系统、而是通过控制缓释标记系统来进行的。

又一方面, 本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法, 其中控制缓释标记系统中标记物的控速释放或/和可控滞后, 由控制缓释剂或/和控制缓释结构控制或参与控制。

本发明所述的控制缓释剂是指反应器中具有控制或参与控制标记物释放的速度和滞后的性质的物质, 例如通过其可控网络密度涨落而释放标记物的扩散控制缓释剂、通过其可控降解而释放标记物的化学反应控制缓释剂、通过其被溶剂可控活化(例如溶解)而释放标记物的溶剂活化控制缓释剂、通过膜内吸水膨胀物质而使包膜胀裂崩解而快速释放出标记物的可控释放剂、等等。

本发明所述的控制缓释结构是指反应器中具有控制或参与控制标记物释放的速度和滞后的性质的结构, 例如标记物或含标记物的物质的所在高度, 等等。控制缓释标记系统的一个例子为程序式释放体系, 其中标记物释放的速率、滞后时间主要由体系自身材料及结构来决定。例如, 由标记物均匀分散或包埋在水溶性适中的聚合物(控制缓释剂)中形成的扩散控制标记系统, 其中标记物释放的速度由聚合物溶胀或溶解速度控制, 以满足检测过程中不同步骤对标记物浓度的不同需要。又例如, 由标记物均匀分散或包埋在可降解的聚合物中(控制缓释剂)形成的化学反应控制标记系统, 其中标记物释放的速度, 在加样时实际上为零, 在标记时由于加入降解剂(例如酶)而使聚合物降解从而使标记物释放出来。又例如, 由标记物与包膜(控制缓释剂)形成的溶剂活化控制标记系统, 其中标记物释放的速度、滞后由包膜溶胀或溶解速度控制。

另一方面, 本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法, 其中控制缓释标记系统中标记物的控速释放, 其标记物半释期大于 10 秒、优选方案大于 30 秒; 其中控制缓释标记系统中标记物的可控滞后, 其标记物最大释放时刻晚于所述探针-目标物反应最大时刻。在本发明中, “标记物半释期”是在标记反应条件下标记物从控制缓释标记系统向反应器中释放 50%所需的时间, “标记物最大释放时刻”是标记物从控制缓释标记系统向反应器中释放速度最大的时刻。

本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法, 其标记物的标记方法包括化学发光标记, 激发发光标记, 非选择性光反射标记及选择性光反射标记。

本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法,其标记物标记的反应结果应用于下述分析之一种:生物芯片分析、快速反应试剂条分析、酶联免疫分析及荧光免疫分析。生物芯片分析、快速反应试剂条分析、酶联免疫分析及荧光免疫分析,分别是指以生物芯片、快速反应试剂条、酶联反应酶标板与荧标板为检测装置对目标物进行的定性和/或定量分析。

本发明所述的装置如下:

本发明提供一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其特征在于:其含有控制缓释标记系统,所述控制缓释标记系统,其标记物半释期大于10秒、优选方案大于30秒,或/和其标记物最大释放时刻晚于所述探针-目标物反应最大时刻。

本发明所述的检测装置,其反应器可为流动式反应器或非流动式反应器,其可为单反应器检测装置又可为多反应器检测装置。

另一方面,本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其控制缓释标记系统为不置于反应器中的、含有控制缓释剂的外置式控制缓释标记系统,或置于反应器中的、含有反应器控制缓释结构或/和控制缓释剂的内置式控制缓释标记系统。在外置式控制缓释标记系统中,控制缓释剂控制或参与控制标记物释放的速度和滞后。外置式控制缓释标记系统的一个例子为生物芯片试剂盒中含有的分装的干燥微胶囊及包埋在其中的荧光标记特异性抗原,使用时可加在样品中一起进入反应器,在抗原探针-抗体目标物反应高峰过后,荧光标记特异性抗原包裹微胶囊崩解释放进行标记。在本发明中,预设于反应器中的控制缓释标记系统显然不与探针重合。在内置式控制缓释标记系统中,控制缓释剂控制或/和控制缓释结构参与控制标记物释放的速度和滞后。内置式标记系统可置于反应器中的不与探针重合的任意位置,例如反应器壁上、反应器通路上、等等。最简单的控制缓释结构的例子,是反应器中固定含标记物的物质的水平面和固定探针的水平面的高度差,当加入小量样品时不溶入标记物,而反应完成后加入较多量的缓冲液,则溶入标记物进行标记。

除了可含有控制缓释结构外,本发明装置中一个重要的方面是可含有控制缓释剂。例如,通过利用扩散控制缓释系统,标记物由于扩散控制缓释剂(例如溶胀性适中的聚合物)网络密度涨落而释放;通过利用化学反应控制缓释系统,标记物由于化学反应控制缓释剂(例如可降解的聚合物)降解而释放;通过利用溶剂活化控制缓释系统,标记物由于溶剂活化控制缓释剂(例如包膜)被溶剂活化(例如溶解)而释放。

又一方面,本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其含有的控制缓释标记系统中的控制缓释剂为水可溶性有机物,例如天然水溶性有机物、半合成水溶性有机物及合成水溶性有机化合物、等等。

本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其控制缓释标记系统中的水溶性有机物包括碳水化合物、植物胶、动物胶、改性纤维素、改性淀粉、水溶性聚合物和缩合物、等等。

本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其控制缓释标记系统中的水溶性有机物包括多糖、聚多糖及它们的衍生物,植物淀粉,琼胶,阿拉伯胶,骨胶,明胶,带有羧基或羟基的纤维素、带有羧基或羟基的纤维素衍生物、等等。

本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其控制缓释标记系统中的标记物与缓释剂具有一维或二维或三维的单重或多重夹心结构。所述一维、二维或三维结构,分别是指具有线型、平面型或立体型空间形状的控制缓释标记系统结构。所述夹心结构,是指标记物和控制缓释剂在空间上不均匀分布。在多重夹心结构中,可以含有一种或多种标记物及一种或多种控制缓释剂,如第一重为标记物第二重为增强剂的结构。

本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其控制缓释标记系统中的标记物含有标记物质及配基,所述标记物质包括酶、荧光染料,化学发光催化剂,有色金属或有色金属盐,染料和颜料;所述配基包括抗原,抗体,生物素,药物配基,多肽,DNA、RNA 及其片段。

本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其为生物芯片或生物芯片试剂盒,或快速检测试剂条或快速检测试剂条试剂盒,或酶联反应酶标板或酶联反应试剂盒。

本发明的一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的装置,其为探针阵列的探针密度大于 $5\text{个}/\text{cm}^2$,优选方案大于 $10\text{个}/\text{cm}^2$,更优选方案大于 $20\text{个}/\text{cm}^2$ 的生物芯片。

本发明方法及装置的优点在于:通过引入控制缓释标记系统,对于受虎克现象影响较大的分析(例如快速检测试剂条分析),可以减小虎克现象影响从而提高检测方法和装置的灵敏度;对于现需专门操作步骤及机械运输系统来减小虎克现象影响的分析(例如生物芯片分析),可以减少专门操作步骤及机械运输系统以提高检测及检测装置的效率,降低了检测自动化的难度,可以降低检测仪器的投资及检测成本。

附图及图面说明

图1 本发明有缓释系统生物芯片的示意图

其中: B 是 A 中的缓释标记物的一个点的示意图

其中: 1 为基片 2 为缓释标记物 3 为探针点 4 为反应池 5 为标记物 6 为缓释层

具体实施方式:

实施例 1, 某些溶剂活化控制缓释系统中标记物的半释期

在本实施例中,控制缓释标记系统由控制缓释剂及赋形剂形成的膜包裹粉状标记物而形成。标记物为酶标记的羊抗人二抗(北京天坛生物制品股份有限公司),控制缓释剂为水溶性有机物(包括淀粉、羟丙基纤维素、阿拉伯胶、明胶、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、硬酯酸),赋形剂为乳糖。溶剂为 PBS 缓冲液,控制缓释系统活化方式为溶解。

将定量的乙肝抗原(北京人民医院肝病研究所)控制缓释标记系统固定于载玻片做成的小池中。在 37℃加入定量的溶剂于控制缓释标记系统,然后在不同时间抽出已溶部分,再测定溶出的标记物而计算出来(表 1)。

表 1 几种溶剂活化控制缓释系统中标记物的半释期

控制缓释剂	半释期(分钟)
淀粉	2
明胶	3
羟丙基甲基纤维素	5
羟丙基纤维素	12
阿拉伯胶	15

实施例2, 控制缓释标记方法及装置(1)

含控制缓释标记系统的生物芯片的制备

本实施例控制缓释标记系统中的标记物为罗丹明标记的羊抗人二抗,控制缓释剂为阿拉伯胶和乙基纤维素。

本实施例制备含控制缓释标记系统的生物芯片,所用片基为氨基改性玻片(自制,参考蒋中华等《生物分子固定化技术及应用》,化学工业出版社,北京,1998),其尺寸为 75X25X1mm。将片基在选定位置涂上高疏水有机硅涂料(成都晨光化工研究院)形成高疏水层隔离结构(参考我们的另一发明《一种反应器隔离结构高度最小化的生物芯片及制备方法》,申请号 03117397.7),从而形成 2 行 8 个反应池,反应池尺寸为 4.5mmX4.5mm。

本实施例制备芯片所用探针为 HCV 抗原(北京人民医院肝病研究所)和 HIV₁₊₂ 抗原(北京人民医院肝病研究所)。将已优化浓度的抗原分别点在同一个反应池中,各点 2 个点,形成 2X2 探针阵列。点样后,用牛血清白蛋白溶液封闭。将适当浓度阿拉伯胶涂在反应池底沿周边形成宽 1mm 的带子,干燥后将含有淀粉赋形的标记物涂在阿拉伯胶带内,干燥后将控制缓释剂涂覆在阿拉伯胶带上,干燥后备用。试验测得控制缓释标记系统的半释期 37℃为 15 分钟。

-利用控制缓释标记系统检测

本实施例 4 种样品分别为 HCV 抗体阳性血清、HIV₁₊₂ 抗体阳性人血清、阳性对照物(HCV 抗体和 HIV₁₊₂ 抗体阳性血清对照物的混合物)和阴性对照物(HCV 抗体和 HIV₁₊₂ 抗体都为阴性的血清对照物)。所有样品的阴、阳性,均预先用酶联反应试剂盒(厦门新创)按其说明书经标准 ELISA 方法检

测确定。

实验时,4种样品分别加入上述含控制缓释标记系统的生物芯片,每种样品加2个反应池。加样时样品作适当稀释,加样量为5ul,孵育温度37℃,孵育时间5分钟。洗涤液每次加入量为15ul,洗涤3次。然后,加入15ul稀释液,孵育温度37℃,孵育时间5分钟。反应后以15ul洗涤液洗涤5次。干燥后进行扫描(Afymetrix公司GMS 418芯片扫描仪),数据处理后得到结果如表2。

表2 检测结果

方 法		标准ELISA法	缓释标记法
HCV抗体阳性血清	HCV抗体	+	+
	HIV抗体	-	-
HIV抗体阳性血清	HCV抗体	-	-
	HIV抗体	+	+
阳性对照物	HCV抗体	+	+
	HIV抗体	+	+
阴性对照物	HCV抗体	-	-
	HIV抗体	-	-

表中,“+”为阳性结果,“-”为阴结果。

实施例3, 控制缓释标记方法及装置(2)

含控制缓释标记系统的酶联反应酶标板的制备

本实施例控制缓释标记系统中的标记物为酶标记的羊抗人二抗(北京天坛生物制品股份有限公司),控制缓释剂为羟丙基甲基纤维素及填充剂乳糖。

本实施例制备含控制缓释标记系统的酶联反应酶标板,所用片基为96孔聚苯乙烯微孔板(中国深圳金灿华实业有限公司)。

本实施例制备含控制缓释标记系统的酶联反应酶标板所用探针为HCV抗原(北京人民医院肝病研究所)。将已优化浓度的抗原包被到聚苯乙烯微孔板孔内。包被后,用牛血清白蛋白溶液封闭。将含有适当浓度控制缓释剂与标记物的混合物涂在反应池内沿周边离池底3-4mm处形成宽1mm的带子,干燥后备用。在加入100ulPBS缓冲液时测得标记物37℃的半释期约5分钟。

-利用控制缓释标记系统检测

所用样品为HCV抗体阳性血清和HCV抗体阴性血清。样品的阴、阳性,均预先用酶联反应试剂盒(厦门新创)按其说明书经标准ELISA方法检测确定(表3)。

实验时 2 种样品 1 比 5 稀释后分别加入上述制备的 2 个酶联反应酶标板中, 每种样品加 4 个反应池, 加样量为 50ul, 反应温度 37℃, 孵育时间 25 分钟。洗板机洗涤 5 次, 每次加入洗涤液量为 60ul。然后加入 150ul 稀释液, 由于液面升高控制缓释标记系统溶解释出标记物, 在 37℃ 孵育 25 分钟后, 加 200ul 洗涤液, 洗涤 5 次。加入底物的反应条件和与经典的 ELISA 法相同。利用酶标仪 (Thermo Labsystems 上海雷勃分析仪器有限公司) 进行比色分析, 4 孔平均结果见表 3。

表3 检测结果

方	法	标准ELISA法	缓释标记法
HCV抗体阳性血清	HCV抗体	+	+
HCV抗体阴性血清	HCV抗体	-	-

表中, “+” 为阳性结果, “-” 为阴结果。

实施例 4, 控制缓释标记方法及装置(3)

含控制缓释标记系统的快检试剂条的制备

本实施例控制缓释标记系统中的标记物为胶体金标记羊抗人二抗, 控制缓释剂为明胶, 并辅以填充剂微晶纤维素。

本实施例制备含控制缓释标记系统的快检试剂条, 所用基片为硝酸纤维素膜条(福建泉州长立生化有限公司)。

本实施例制备含控制缓释标记系统的快检试剂条所用探针为 HCV 抗原(北京人民医院肝病研究所)。

将已优化浓度的 HCV 抗原分别在试剂条上进行点样(检测线), 再按常规方法分别点上兔抗羊 IgG 质控线, 后用牛血清白蛋白溶液封闭, 再组装上加样区、控制缓释标记系统区、吸水区而成。控制缓释标记系统区的制备, 首先将纤维条浸入胶体金标记羊抗人标记物溶液, 干燥后剪成长宽适当的矩形小块, 用适当浓度缓释剂涂覆其上, 干燥后形成适当厚度的缓释层, 再将其固定于试剂条上备用。在加入 300ul 缓冲液时标记物室温的半释期约 10 秒钟。

-利用控制缓释标记系统检测

所用样品为 HCV 抗体阳性血清和 HCV 抗体阴性血清。样品的阴、阳性, 均预先用酶联反应试剂盒(厦门新创)按其说明书经标准 ELISA 方法检测确定(表 4)。

实验时, 2 种样品分别加入 2 个上述快检试纸条。加样时样品作适当稀释, 加样量为 100ul, 加样后接着缓慢加入洗涤液至质控线出现。结果见表 4。

表4 检测结果

方 法		标准ELISA法	缓释标记法
HCV抗体阳性血清	HCV抗体	+	+
HCV抗体阴性血清	HCV抗体	-	-

表中，“+”为阳性结果，“-”为阴结果。

实施例5，控制缓释标记方法及装置(4)

含控制缓释标记系统的流动生物芯片的制备

本实施例控制缓释标记系统中的标记物为罗丹明标记的羊抗人二抗，控制缓释剂为明胶，并辅以填充剂微晶纤维素等。

本实施例制备含控制缓释标记系统的生物芯片，所用片基为与实施例 2 同的氨基改性玻片。

制备流动反应池片基的方法。

本实施例制备芯片所用探针与实施例 2 同(HCV 抗原、HIV_{1,2} 抗原)。将已优化浓度的抗原分别点在同一个反应池中，各点 2 个点，形成 2X2 探针阵列。包被后，用牛血清白蛋白溶液封闭。将适当浓度明胶涂在反应池入液区内并留出宽度 1.0mm 通道，干燥后将含有赋形剂淀粉的标记物涂在明胶带内，干燥后将控制缓释剂涂覆在蔗糖带上，干燥后备用。试验测得控制缓释标记系统的 37℃ 半释期为 3 分钟。

-利用控制缓释标记系统检测

本实施例 4 种样品与实施例 2 同，所有样品的阴、阳性，均预先用酶联反应试剂盒(厦门新创)按其说明书经标准 ELISA 方法检测确定(表 2)。

实验时，4 种样品分别加入上述含控制缓释标记系统的生物芯片，每种样品加 2 个反应池。加样时样品作适当稀释，加样量为 25ul，反应温度 37℃，加样速度 5ul/分钟，100ul 缓冲液流洗。干燥后进行扫描 (Afymetrix 公司 GMS 418 芯片扫描仪)，数据处理后得到结果如表 5。

表5 检测结果

方 法		标准ELISA法	缓释标记法
HCV抗体阳性血清	HCV抗体	+	+
	HIV抗体	-	-
HIV抗体阳性血清	HCV抗体	-	-
	HIV抗体	+	+
阳性对照物	HCV抗体	+	+
	HIV抗体	+	+
阴性对照物	HCV抗体	-	-
	HIV抗体	-	-

表中，“+”为阳性结果，“-”为阴结果。

实施例6, 控制缓释标记方法及装置(5)

含控制缓释标记系统的生物芯片的制备

本实施例控制缓释标记系统中的标记物为罗丹明标记的HCV抗原、HIV_{1,2}抗原, 控制缓释剂为明胶, 并辅以填充剂微晶纤维素等。

本实施例制备含控制缓释标记系统的生物芯片, 所用片基为与实施例 2 同的氨基改性玻片。

制备反应池片基的方法。

本实施例制备芯片所用探针与实施例 2 同。将已优化浓度的 HCV 抗原、HIV_{1,2} 抗原分别点在同一个反应池中, 各点 2 个点, 形成 2X2 探针阵列。包被后, 用牛血清白蛋白溶液封闭。将适当浓度的标记物涂在反应池底部周边, 干燥后备用。试验测得控制缓释标记系统的 37℃ 半释期约为 3 分钟。

-利用控制缓释标记系统检测

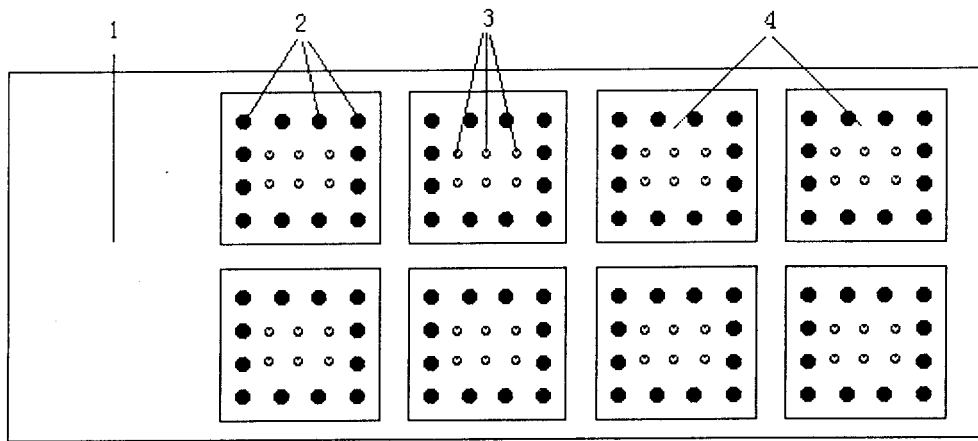
本实施例 4 种样品与实施例 2 同, 所有样品的阴、阳性, 均预先用酶联反应试剂盒(厦门新创)按其说明书经标准 ELISA 方法检测确定(表 2)。

实验时, 50 倍稀释的 4 种样品分别加入上述含控制缓释标记系统的生物芯片, 每种样品加 2 个反应池。加样量为 25ul, 37℃ 孵育 30 分钟, 洗涤 5 次。干燥后进行扫描 (Afymetrix 公司 GMS 418 芯片扫描仪), 数据处理后得到结果如表 5。

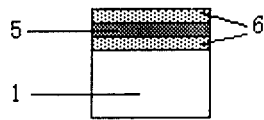
表5 检测结果

方 法		标准ELISA法	缓释标记法
HCV抗体阳性血清	HCV抗体	+	+
	HIV抗体	-	-
HIV抗体阳性血清	HCV抗体	-	-
	HIV抗体	+	+
阳性对照物	HCV抗体	+	+
	HIV抗体	+	+
阴性对照物	HCV抗体	-	-
	HIV抗体	-	-

表中，“+”为阳性结果，“-”为阴结果。



A



B

图 1

专利名称(译)	通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法及装置		
公开(公告)号	CN1514245A	公开(公告)日	2004-07-21
申请号	CN03135251.0	申请日	2003-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	成都夸常科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	成都夸常科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	成都夸常科技有限公司		
[标]发明人	邹方霖 陈春生 陈宁 王建霞		
发明人	邹方霖 陈春生 陈宁 王建霞		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/68		
代理人(译)	张新		
其他公开文献	CN1280629C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种通过控制缓释标记系统对目标物进行定性和/或定量分析的方法及装置，在提高或不降低灵敏度的条件下，减少检测的操作步骤，从而提高检测效率。

