

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/543 G01N 33/533



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02112229.6

[43] 公开日 2003年2月26日

[11] 公开号 CN 1399132A

[22] 申请日 2002.6.25 [21] 申请号 02112229.6

[71] 申请人 上海晶泰生物技术有限公司

地址 200233 上海市桂箐路69号25栋6楼

[72] 发明人 张涛 李宾 彭永济 邓富桥

任一萍 葛海鹏

[74] 专利代理机构 上海东亚专利代理有限公司

代理人 董梅

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

[54] 发明名称 多元免疫测定板

[57] 摘要

本发明多元免疫测定板涉及一种酶免疫测定中的芯片反应装置，广泛应用于医疗检测、分析等领域。多元免疫测定板，是将抗原(或抗体)点阵于孔板的每一个孔中，抗原(或抗体)通过化学键连接于孔板上而被固定，作为固相载体的孔板表面经过封闭后，加入待测样品，与孔板上固定的生物分子进行杂交反应，洗去未结合的物质后，加入标记过的二抗(或抗原)再进行杂交，洗去未结合的物质后检测标记信号。可以多指标同时检测；利用96孔板拆卸、拼装的灵活，可以随意的按需随时进行检测与诊断；节省了待测样品的量；可以使用已成熟和普及的酶免疫测定商品化的自动或半自动仪器设备如洗衣机、ELISA全自动反应设备等，节省资金。

ISSN 1008-4274

- 1, 一种多元免疫测定板, 是将抗原(或抗体)点阵于孔板的每一个孔中, 特征在于: 抗原(或抗体)通过化学键连接于孔板上而被固定, 作为固相载体的孔板表面经过封闭后, 加入待测样品, 与孔板上固定的生物分子进行杂交反应, 洗去未结合的物质后, 加入标记过的二抗(或抗原)再进行杂交, 洗去未结合的物质后检测标记信号。
- 2, 根据权利要求1所述的多元免疫测定板, 特征在于所述孔板是96孔板, 此96孔板的底部可以是聚苯乙烯塑料、或表面带有活化基团的玻璃片、醋酸纤维薄膜、硝酸纤维薄膜、尼龙膜、硅片、钢片、陶瓷片、塑料片及底部贴有或带有醋酸纤维薄膜、硝酸纤维薄膜、尼龙膜、硅片、钢片、陶瓷片、塑料片等的一种。
- 3, 根据权利要求1、2所述的多元免疫测定板, 特征在于所述的待测样品可以是血清、体液、组织液、组织的细胞裂解液中的一种或一种以上。
- 4, 根据权利要求3所述的多元免疫测定板, 特征在于所述二抗或抗原的标记物可以是荧光染料或化学发光物质。
- 5, 根据权利要求3所述的多元免疫测定板的制备方法, 特征在于第一点样方法: (1) 用高速点样机器人, 根据抗原的种类确定点阵的排列方式和点样位置; (2) 点样针从多孔板取出样品后直接点阵于96孔板的底部; (3) 室温过夜或37℃温育1小时, 以固定样品; (4)

在载体表面加上封闭液，37℃温育 1 小时；（5）用缓冲液充分洗涤并室温干燥；第二步，二抗的标记：用荧光染料或化学发光物质标记二抗，除去未结合成分后，4℃保存备用。

6，根据权利要求 5 所述的多元免疫测定板的制备方法，特征在于其杂交反应是将样品加入点好样的 96 孔板反应孔，37℃温育约 30 分钟，使待检测物质结合于固相底部，再滴加标记二抗或者抗原，37℃避光温育 30 分钟，洗净并室温晾干后，利用专业的阅读分析系统进行结果的判读。

## 多元免疫测定板

### 技术领域

本发明多元免疫测定板涉及一种酶免疫测定中的芯片反应装置，广泛应用于医疗检测、分析等领域。

### 背景技术

1971年 Engvall 和 Perlmann 发表了酶联免疫吸附分析测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 用于 IgG 定量测定的文章，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

色反应的深浅进行定性或定量分析。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。

酶免疫测定具有高度的敏感性和特异性，几乎所有的可溶性抗原抗体系统均可用以检测。它的最小可测值达 ng 甚至 pg 水平。与放射免疫分析相比，酶免疫测定的优点是标记试剂比较稳定，且无放射性危害。因此，酶免疫测定的应用日新月异，酶免疫测定的新方法、新技术不断发展。ELISA 应用广泛，可用于检测的项目包括以下几个方面：1. 病原体及其抗体：广泛应用于传染病的诊断。2. 蛋白质：各种免疫球蛋白、补体组分、肿瘤标志物，各种血浆蛋白质、同工酶、激素。3. 非肽类激素：如 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、雌激素、皮质醇等。4. 药物和毒品：如地高辛、苯巴比妥、庆大霉素、吗啡等。

但酶免疫测定在医学检验中的普及应归功于商品试剂盒和自动或半自动检测仪器的问世。商品 ELISA 试剂盒中包含包被好的固相载体、酶结合物底物和洗涤液等。ELISA 所有仪器除定量测定中必需的出色仪（专用的称为 ELISA 测读仪）外，洗涤板也极有用。洗涤机的使用不仅省时省工，而且也利于操作标准化，对中小型实验室是实用且易于接受的。半自动和自动化 ELISA 分析仪亦趋成熟，并在大中型临床检验实验室中取得应用。前者适用于所有的 96 孔板的 ELISA 测定；后者只与特定试剂配套使用。

虽然，ELISA 具有高度的敏感性和特异性，应用广泛，种类繁多，但现在使用的商品化 ELISA 试剂盒其 96 孔板每孔只包被一种抗

原或抗体，所以一种试剂盒只能检测一种抗原或抗体。如需检测几种不同的指标，则需用不同的试剂盒重复几乎相同的试验步骤，浪费人力物力，也延长了诊断的时间。

## 发明内容

本发明的目的在于：提供一种多元免疫测定板，即一种新的 96 孔板结构，使之在每孔能包被几种不同的抗原(或抗体)，从而使实验更省时省力。

本发明的目的可通过下述技术方案实现：一种多元免疫测定板，是将抗原(或抗体)点阵于孔板的每一个孔中，抗原(或抗体)通过化学键连接于孔板上而被固定，作为固相载体的孔板表面经过封闭后，加入待测样品，与孔板上固定的生物分子进行杂交反应，洗去未结合的物质后，加入标记过的二抗(或抗原)再进行杂交，洗去未结合的物质后检测标记信号。检测到的标记信号的强弱与样品中待测成分的含量成一定正相关。其原理参见图 1 多元免疫测定板检测抗原原理图，及图 2 多元免疫测定板检测抗体原理图所示。

其中,所述孔板是 96 孔板，此 96 孔板的底部可以是聚苯乙烯塑料、或表面带有活化基团的玻璃片、醋酸纤维薄膜、硝酸纤维薄膜、尼龙膜、硅片、钢片、陶瓷片、塑料片及底部贴有或带有醋酸纤维薄膜、硝酸纤维薄膜、尼龙膜、硅片、钢片、陶瓷片、塑料片等的一种。

待测样品可以是血清、体液、组织液、组织的细胞裂解液中的一种或一种以上。

所述二抗或抗原的标记物可以是荧光染料或化学发光物质。

本发明多元免疫测定板的制备方法，包括：第一，点样方法：

(1) 用高速点样机器人，根据抗原的种类确定点阵的排列方式和点样位置；(2) 点样针从多孔板取出样品后直接点阵于 96 孔板的底部；(3) 室温过夜或 37℃温育 1 小时，以固定样品；(4) 在载体表面加上封闭液，37℃温育 1 小时；(5) 用缓冲液充分洗涤并室温干燥；第二步，二抗的标记：用荧光染料或化学发光物质标记二抗，除去未结合成分后，4℃保存备用。

杂交反应：样品加入点好样的 96 孔板反应孔，37℃温育大约 30 分钟后，使待检测物质结合于固相底部，再滴加标记二抗或者抗原，37℃避光温育 30 分钟。洗净并室温晾干。

最后，结果的检测：反应结束后，利用专业的阅读分析系统进行结果的判读。

本发明的特点、优点、使用效果：第一，多指标同时检测，此 96 孔板由于将几种不同的抗原(或抗体)点阵于固相载体 96 孔板上的每一个孔中，因而可以每孔同时检测几种不同的指标。摒弃了以往 ELISA 检测几种不同指标时重复操作的烦琐，节省了人力物力，也缩短了诊断的时间。第二，可以灵活地检测样品。利用 96 孔板拆卸、拼装的灵活，可以随意的按需随时进行检测与诊断，以最快的

速度得到结果，为病人和医生争取宝贵的治疗时间。第三，更节省待测样品的量。由于能同时进行几种不同指标的检测，不需用几种不同的试剂盒几次检测，因而大大节省了待测样品的量。第四，可以节省大量的资金。因本发明 96 孔板外观与以前的 96 孔板相同，已成熟和普及的酶免疫测定商品化的自动或半自动仪器设备如洗涤机、ELISA 全自动反应设备等都可以被使用，所以不用重新购置仪器。

### 附图说明

附图 1，多元免疫测定板检测抗原原理图。

附图 2，多元免疫测定板检测抗体原理图。

附图 3，同时进行多种疾病的检测示意图。

### 具体实施方式：

如图 3 同时进行多种疾病的检测示意图所示，用荧光标记的二抗检测血清中的肝炎抗体。点样阵列为  $4 \times 4$ 。左图为抗原点阵方式 A1-A4 为甲型肝炎抗原，B1-B4 为乙型肝炎表面抗原，C1-C4 为丙型肝炎抗原，D1-D4 为丁型肝炎抗原；右图为检测肝炎抗体结果，结果显示为乙型肝炎表面抗体阳性、丁型肝炎抗体阳性，甲型肝炎抗体与丙型肝炎抗体阴性，荧光的强弱代表抗体含量的高低。



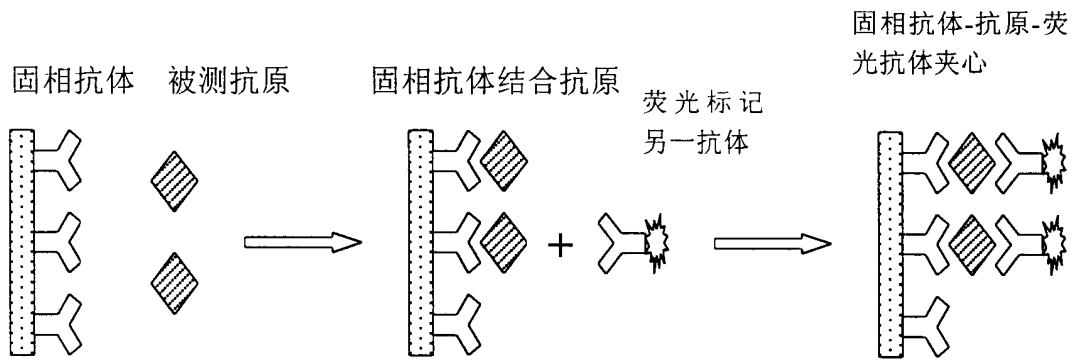


图 1

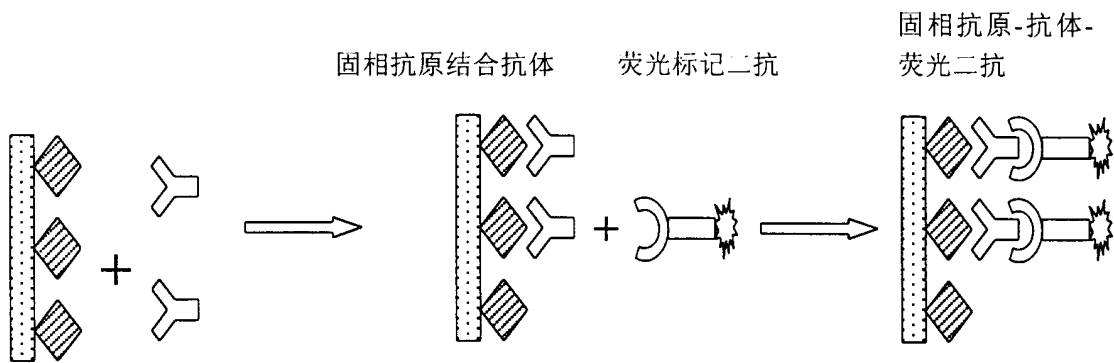


图 2

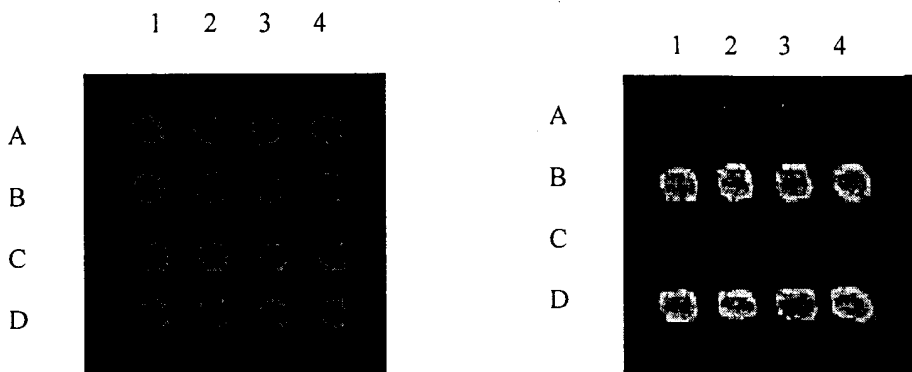


图 3