



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115754276 A

(43) 申请公布日 2023.03.07

(21) 申请号 202211372104.6

G01N 33/53 (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.03

(71) 申请人 深圳市伯劳特生物制品有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区南山街道月亮湾大道2076号高科集团大楼6楼604、605、607、608、611、612、615、618

(72) 发明人 马伟民 陈娜娜 许元峰 梁香禄

(74) 专利代理机构 深圳市深佳知识产权代理事务所(普通合伙) 44285

专利代理师 陈彦如

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

膜溶解液及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,尤其涉及膜溶解液及其制备方法和应用。本发明提供了膜溶解液,包括丙酮、无水乙醇;所述丙酮和所述无水乙醇的体积比为1:7。本发明提供了膜溶解液,使用该膜溶解液将NC膜溶解后铺在微孔板内,因其众多微小孔隙,总体表积极大,有强大的吸附能力,对于低浓度的抗体,用NC膜铺板的比未处理的发光强度高出了190%,反应信号更强,灵敏度提高。

1. 膜溶解液,其特征在於,包括丙酮、无水乙醇;所述丙酮和所述无水乙醇的体积比为1:7。
2. 如权利要求1所述的膜溶解液在溶解硝酸纤维素膜中的应用。
3. 如权利要求1所述的膜溶解液在制备微孔板中的应用。
4. 微孔板的制备方法,其特征在於,取硝酸纤维素膜溶解、铺板、包被、封闭后,获得所述微孔板;所述溶解采用如权利要求1所述的膜溶解液。
5. 如权利要求4所述的制备方法,其特征在於,所述硝酸纤维素膜和所述膜溶解液的质量体积比为(0.3~0.7):(20~80)。
6. 如权利要求4或5所述的制备方法,其特征在於,所述铺板的体积为30~100 $\mu$ L/孔。
7. 如权利要求4至6任一项所述的制备方法,其特征在於,所述包被采用IgG抗体;所述IgG抗体的浓度为0.1563~5 $\mu$ g/mL。
8. 如权利要求4至7任一项所述的制备方法,其特征在於,所述封闭的时间为2h。
9. 如权利要求4至8任一项所述制备方法获得的微孔板。
10. 如权利要求1所述膜溶解液或如权利要求9所述的微孔板在蛋白或核酸检测中的应用。

## 膜溶解液及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及膜溶解液及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 抗体或抗原的固相化是固相免疫测定的前提,应用最广的固相化方法是被动吸附,但其有难以避免的缺陷,然而蛋白A:抗体,链亲合素:生物素化抗体等间接非共价吸附方法的出现,大为提高了抗体或抗原固相化的有序性和均一性。共价吸附一是利用聚苯乙烯表面的烯基,氨基等基团在水溶性碳二亚胺或戊二醛等存在下与抗体或抗原等生物分子的氨基反应而成,尤为适用于多肽等分子量相对较小的生物分子的固相化。

[0003] 现在最常用的抗体或抗原固相化是酶联免疫吸附试验(ELISA),ELISA具有操作简便,已广泛使用于医疗、科研等领域。但ELISA通常使用的板材中,如聚苯乙烯板,由于其较低的蛋白吸附能力,导致需要用紫外照射等方法来提高其蛋白吸附能力;且需要通过延长包被时间来提高吸附量。聚苯乙烯板在吸附脂多糖、糖蛋白方面均不理想。

[0004] 因此,需要一种可以提高蛋白吸附能力的板材至关重要。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明提供了膜溶解液及其制备方法和应用。本发明提供了膜溶解液,使用该膜溶解液将NC膜溶解后铺在微孔板内,因其众多微小孔隙,总体表积极大,有强大的吸附能力,对于低浓度的抗体,用NC膜铺板的比未处理的发光强度高出了190%,反应信号更强,灵敏度提高。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了膜溶解液,包括丙酮、无水乙醇;所述丙酮和所述无水乙醇的体积比为1:7。

[0008] 在本发明的一些实施方案中,上述膜溶解液中,还包括吐温20,所述吐温20的体积分数为0.1%。

[0009] 本发明还提供了上述膜溶解液在溶解硝酸纤维素膜中的应用。

[0010] 本发明还提供了上述膜溶解液在制备微孔板中的应用。

[0011] 本发明还提供了微孔板的制备方法,取硝酸纤维素膜溶解、铺板、包被、封闭后,获得所述微孔板;所述溶解采用上述膜溶解液。

[0012] 在本发明的一些实施方案中,上述制备方法中所述硝酸纤维素膜和所述膜溶解液的质量体积比为(0.3~0.7):(20~80)。

[0013] 在本发明的一些实施方案中,上述制备方法中所述硝酸纤维素膜的质量为0.3~0.7g。

[0014] 在本发明的一些实施方案中,上述制备方法中所述铺板的体积为30~100 $\mu$ L/孔。

[0015] 在本发明的一些实施方案中,上述制备方法中所述包被采用IgG抗体;所述IgG抗体的浓度为0.1563~5 $\mu$ g/mL。

[0016] 在本发明的一些实施方案中,上述制备方法中,所述IgG抗体的浓度为0.1563 $\mu$ g/mL、0.625 $\mu$ g/mL、2.5 $\mu$ g/mL或5 $\mu$ g/mL。

[0017] 在本发明的一些实施方案中,上述制备方法中,所述包被为2~8 $^{\circ}$ C过夜。

[0018] 在本发明的一些实施方案中,上述制备方法中所述封闭的时间为2h。

[0019] 本发明还提供了上述制备方法获得的微孔板。

[0020] 本发明还提供了上述膜溶解液或上述微孔板在蛋白或核酸检测中的应用。

[0021] 本发明提供了膜溶解液,包括丙酮、无水乙醇;所述丙酮和所述无水乙醇的体积比为1:7。

[0022] 本发明提供了膜溶解液,使用该膜溶解液将NC膜溶解后铺在微孔板内,因其众多微小孔隙,总体表积极大,有强大的吸附能力,对于低浓度的抗体,用NC膜铺板的比未处理的发光强度高出了190%,反应信号更强,灵敏度提高。

### 附图说明

[0023] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0024] 图1示验证例中实施例与对照组实验结果图;其中:从上到下依次为实施例1、实施例2、实施例3、实施例4、实施例5、对照组;从左至右为复孔检测。

### 具体实施方式

[0025] 本发明公开了膜溶解液及其制备方法和应用。

[0026] 应该理解,表述“……中的一种或多种”单独地包括每个在所述表述后叙述的物体以及所述叙述的物体中的两者或更多者的各种不同组合,除非从上下文和用法中另有理解。与三个或更多个叙述的物体相结合的表述“和/或”应该被理解为具有相同的含义,除非从上下文另有理解。

[0027] 术语“包括”、“具有”或“含有”,包括其语法同义语的使用,通常应该被理解为开放性和非限制性的,例如不排除其他未叙述的要素或步骤,除非另有具体陈述或从上下文另有理解。

[0028] 应该理解,只要本发明仍可操作,步骤的顺序或执行某些行动的顺序并不重要。此外,两个或更多个步骤或行动可以同时进行。

[0029] 本文中的任何和所有实例或示例性语言如“例如”或“包括”的使用,仅仅打算更好地说明本发明,并且除非提出权利要求,否则不对本发明的范围构成限制。本说明书中的任何语言都不应解释为指示任何未要求保护的要素对于本发明的实践是必不可少的。

[0030] 此外,用以界定本发明的数值范围与参数皆是约略的数值,此处已尽可能精确地呈现具体实施例中的相关数值。然而,任何数值本质上不可避免地含有因个别测试方法所致的标准偏差。因此,除非另有明确的说明,应当理解本公开所用的所有范围、数量、数值与百分比均经过“约”的修饰。在此处,“约”通常是指实际数值在一特定数值或范围的正负10%、5%、1%或0.5%之内。

[0031] 本发明提供了NC膜微孔板制备的制备方法,包括以下步骤:

[0032] (1) 硝酸纤维素膜溶解:取0.3~0.7g 0.45 $\mu$ m硝酸纤维素膜于丙酮:无水乙醇(3:

1)的膜溶解液中溶解,溶解后加入0.1%T-20混匀,用无水乙醇稀释5倍。

[0033] (2)铺板:将步骤(1)稀释后的液体均匀地铺到微孔板内,每孔加入30~100 $\mu$ L,铺板后在37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中,直至烘干。烘干后用洗涤液(PBST)洗2遍,洗完后在37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘1小时。

[0034] (3)包被:使用蛋白芯片点样仪将浓度为5、2.5、0.625、0.1563 $\mu$ g/mL人IgG喷点至步骤(2)获得的实验组硝酸纤维素膜处理后微孔板和对照组未处理的微孔板上,于2~8 $^{\circ}$ C包被过夜。

[0035] (4)封闭:每孔加200 $\mu$ L封闭液封闭2h,封闭后将液体甩干,放37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘干。烘干后封装放入2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0036] 本发明实施例1~实施例5和验证例中,所用原料及试剂均可由市场购得。

[0037] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0038] 实施例1NC膜微孔板制备

[0039] (1)取0.3g 0.45 $\mu$ m硝酸纤维素膜于4mL丙酮:无水乙醇(3:1)的膜溶解液中溶解,溶解后加入0.1%T-20混匀,用无水乙醇稀释至20mL。

[0040] (2)将步骤(1)稀释后的液体均匀地铺到微孔板内,每孔30 $\mu$ L,将液体铺到微孔板内,置于37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘1h,然后用PBST洗2遍,烘干。

[0041] (3)使用蛋白芯片点样仪将浓度为5、2.5、0.625、0.1563 $\mu$ g/mL人IgG喷点至步骤(2)获得的微孔板和未处理的微孔板上,包被过夜。

[0042] (4)每孔加200 $\mu$ L封闭液封闭2h,封闭后将液体甩干,放37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘干,烘干后封装放入2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0043] 实施例2NC膜微孔板制备

[0044] (1)取0.5g 0.45 $\mu$ m硝酸纤维素膜于4mL丙酮:无水乙醇(3:1)的膜溶解液中溶解,溶解后加入0.1%T-20混匀,用无水乙醇稀释至20mL。

[0045] (2)将步骤(1)稀释后的液体均匀地铺到微孔板内,每孔30 $\mu$ L,将液体铺到微孔板内,置于37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘1h,然后用PBST洗2遍,烘干。

[0046] (3)使用蛋白芯片点样仪将浓度为5、2.5、0.625、0.1563 $\mu$ g/mL人IgG喷点至步骤(2)获得的微孔板和未处理的微孔板上,包被过夜。

[0047] (4)每孔加200 $\mu$ L封闭液封闭2h,封闭后将液体甩干,放37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘干,烘干后封装放入2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0048] 实施例3NC膜微孔板制备

[0049] (1)取0.7g 0.45 $\mu$ m硝酸纤维素膜于4mL丙酮:无水乙醇(3:1)的膜溶解液中溶解,溶解后加入0.1%T-20混匀,用无水乙醇稀释至20mL。

[0050] (2)将步骤(1)稀释后的液体均匀地铺到微孔板内,每孔30 $\mu$ L,将液体铺到微孔板内,置于37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘1h,然后用PBST洗2遍,烘干。

[0051] (3)使用蛋白芯片点样仪将浓度为5、2.5、0.625、0.1563 $\mu$ g/mL人IgG喷点至步骤(2)获得的微孔板和未处理的微孔板上,包被过夜。

[0052] (4)每孔加200 $\mu$ L封闭液封闭2h,封闭后将液体甩干,放37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘干,烘干后封装放入2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0053] 实施例4NC膜微孔板制备

[0054] (1) 取0.3g 0.45 $\mu$ m硝酸纤维素膜于4mL丙酮:无水乙醇(3:1)的膜溶解液中溶解,溶解后加入0.1%T-20混匀,用无水乙醇稀释至20mL。

[0055] (2) 将步骤(1)稀释后的液体均匀地铺到微孔板内,每孔50 $\mu$ L,将液体铺到微孔板内,置于37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘1h,然后用PBST洗2遍,烘干。

[0056] (3) 使用蛋白芯片点样仪将浓度为5、2.5、0.625、0.1563 $\mu$ g/mL人IgG喷点至步骤(2)获得的微孔板和未处理的微孔板上,包被过夜。

[0057] (4) 每孔加200 $\mu$ L封闭液封闭2h,封闭后将液体甩干,放37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘干,烘干后封装放入2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0058] 实施例5NC膜微孔板制备

[0059] (1) 取0.3g 0.45 $\mu$ m硝酸纤维素膜于4mL丙酮:无水乙醇(3:1)的膜溶解液中溶解,溶解后加入0.1%T-20混匀,用无水乙醇稀释至20mL。

[0060] (2) 将步骤(1)稀释后的液体均匀地铺到微孔板内,每孔100 $\mu$ L,将液体铺到微孔板内,置于37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘1h,然后用PBST洗2遍,烘干。

[0061] (3) 使用蛋白芯片点样仪将浓度为5、2.5、0.625、0.1563 $\mu$ g/mL人IgG喷点至步骤(2)获得的微孔板和未处理的微孔板上,包被过夜。

[0062] (4) 每孔加200 $\mu$ L封闭液封闭2h,封闭后将液体甩干,放37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱烘干,烘干后封装放入2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0063] 验证例NC膜微孔板灵敏度试验

[0064] (1) 实验组:实施例1~实施例5经硝酸纤维素膜铺板后点样获得的微孔板;对照组:未经处理微孔板直接点样的微孔板

[0065] (2) 测试:测试前需先将板、样稀、酶结合物取出平衡至室温(18 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)。用全自动生物芯片阅读器检测,设备开机后先进行自检,自检完成后安装试剂(样本稀释液、稀释2k酶结合物),项目设置中对需要修改的各项参数进行修改,样本反应10min,洗涤三次,酶结合物反应5min,洗涤三次,加入底物开始拍照读数。对项目参数确认无误后启动仪器开始检测。

[0066] 表1

人 IgG	0.625 $\mu$ g/mL			灵敏度提升百分比	0.1563 $\mu$ g/mL			灵敏度提升百分比	
	3079	3112	均值		514	524	均值		
对照组	3079	3112	3079		514	524	519		
实验组	实施例 1	4194	3722	3958	29%	854	1128	991	91%
	实施例 2	5314	5524	5419	76%	1004	1111	1057.5	104%
	实施例 3	6521	6574	6547.5	113%	1520	1534	1527	194%
	实施例 4	6734	6387	6734	119%	1524	1504	1514	192%
	实施例 5	5079	5112	5079	65%	1011	997	1004	93%

[0068] 实验结果如表1和图1所示,实验组与对照组相比,总体发光强度提升,灵敏度均有

不同程度提升,高浓度点最少提高29%,低浓度点最少提高91%。

[0069] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

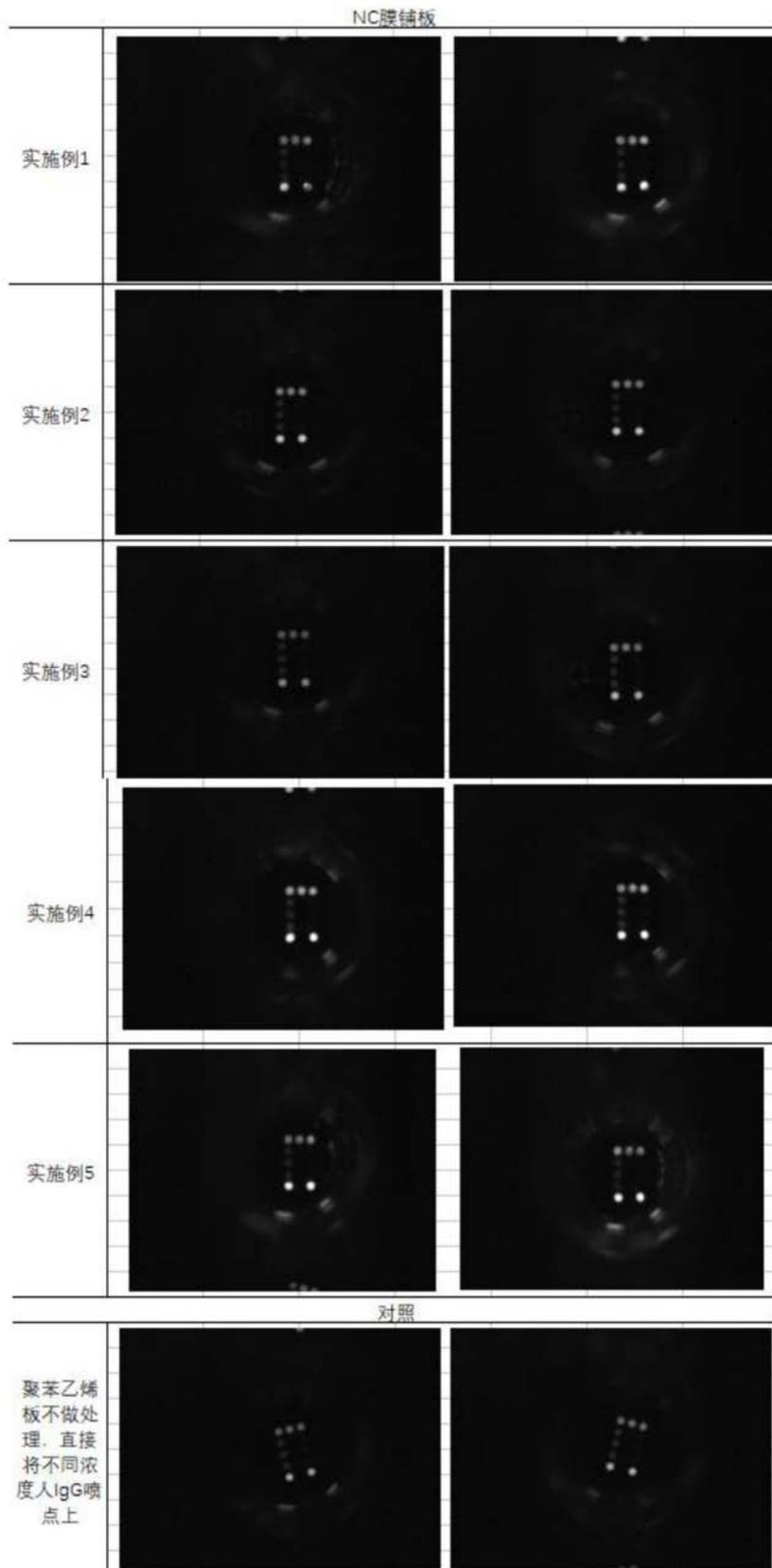


图1