



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00819869.1

[43] 公开日 2004 年 6 月 2 日

[11] 公开号 CN 1502042A

[22] 申请日 2000.8.16 [21] 申请号 00819869.1
 [86] 国际申请 PCT/IN2000/000075 2000.8.16
 [87] 国际公布 WO02/014868 英 2002.2.21
 [85] 进入国家阶段日期 2003.3.3
 [71] 申请人 科学与工业研究委员会
 地址 印度新德里
 [72] 发明人 普拉迪普·纳哈尔 乌特帕尔·布拉
 盖恩达·拉尔·夏尔马

[74] 专利代理机构 北京金信联合知识产权代理有
 限公司
 代理人 朱 梅

权利要求书 3 页 说明书 23 页

[54] 发明名称 一种用于以微波为媒介的酶联免疫
吸附测定的速测法

[57] 摘要

本发明涉及一种用于进行以微波为媒介的酶联免疫吸附测定 (MELISA) 的快速而有效的方法, 用于检测微量的生物分子, 例如抗原、抗体等。本发明尤其涉及一种以微波为媒介将抗原和抗体固定在活化后的表面上, 随后采用可控的微波辐射进行随后的 ELISA 步骤。本发明的工艺能够将 ELISA 所需的总时间从数小时到几天显著地降低到不到 10 分钟。本发明的 ELISA 工艺具有快速、经济、再现、简单的优点, 并具有自动化的潜力。其在临床诊断、分子生物、农业、食品工艺、环境科学、生物医学研究以及其他相关领域进行 ELISA 方面非常有用。

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

1. 一种用于以微波为媒介的酶联免疫吸附测定的速测法，其特征在于采用了一种活化后的载体，其中所述的方法包括：

- 5 (a) 提供一种活化后的载体；
- (b) 通过将一种选自于一种抗原或抗体中的生物分子溶解在一种涂敷缓冲液而将所述的生物分子装载在所述载体的活化后的孔眼中，并将所述孔眼置于一微波炉中，随后采用频率范围为2300-2500MHz 输出功率为 600-900 瓦的微波对所述孔眼辐射
- 10 50-100 秒，之后采用适当的冲洗缓冲液对该孔眼进行全面地冲洗；
- (c) 通过将封堵液加载到所述孔眼中而采用如上述步骤 (b) 所获得的一种固定生物分子将孔眼的自由位置封堵住，并在频率范围为2300-2500MHz 输出功率为 600-800 瓦的微波炉中对其辐射 5-20
- 15 秒，并采用适当的冲洗缓冲液对该孔眼进行冲洗；
- (d) 将溶解在一种缓冲液中的相应的抗体或抗原装载在固定有如上述步骤 (c) 所获得的抗原或抗体的孔眼中，随后在 2300-2500MHz 输出功率为 50-200 瓦的微波炉中对所述孔眼辐射 90-200 秒，之后采用冲洗缓冲液进行冲洗；
- 20 (e) 将溶解在一种适当的缓冲液中的一种适当的酶结合体由上述步骤 (d) 所获得的上述孔眼中，并在一种频率 2300-2500MHz 输出功率为 100-300 瓦的微波炉中对所述孔眼辐射 50-150 秒，随后采用冲洗缓冲液进行冲洗；
- (f) 将一基质染色缓冲液添加到如上述步骤 (e) 所获得的上述孔眼中并将其置于暗处大约 4-10 分钟，随后添加阻化剂 (stop
- 25 solution)，并通过分光光度计以一种适当的波长测量溶液的光密度 (optical density)。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所用的载体的构成材料选自于由聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、玻璃、纤维素、硝化纤维素、硅胶、聚氯乙烯、

聚苯胺以及类似物构成的组中。

3. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 该载体优选采用聚苯乙烯。

4. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 该载体可以选择任何外形, 形式和尺寸, 例如片、板, 试验粒子如珠和微球体、试管、试杆、试片、孔眼、
5 ELISA 板、微纤板或模块。

5. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 用于固定生物分子的该载体选自于任何具有至少一种活性官能团的任何载体, 该官能团选自于由卤化物、乙酰、环氧化物、琥珀酰胺、异硫氰酸酯、酰基叠氮以及类似物构成的组中。

6. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 该官能团可以自身存在于载体中,
10 或者通过传统的化学或光化学方法或其他现有的方法引入载体中。

7. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 抗原引起免疫响应或具有潜在的引起免疫响应的物质等。

8. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 微波辐射是在能产生微波的装置或腔室中进行的, 该装置选自于家用微波炉、专门设计的微波炉或任何能够
15 产生微波的其他装置。

9. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 用于抗原结合、封堵、抗体结合以及结合体结合所需的总时间为 195-470 秒。

10. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 封堵试剂选自于包括牛血清清蛋白、脱脂奶粉、动物胶的组。

11. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 该涂敷缓冲液选自于碳酸盐、磷酸盐, 该缓冲液的 PH 值的范围为 6.5-11, 体积摩尔浓度范围为 0.005M-0.1M。
20

12. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 所使用的冲洗缓冲液是一种磷酸盐缓冲液和一种范围在 0.05%-3%之间的非离子活性剂 20 (tween20) 的混合物, 该磷酸盐缓冲液的 PH 值的范围为 6.5-11, 体积摩尔浓度范围为
25 0.005M-0.1M。

13. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 所采用的结合体选自于具有与一种酶结合的抗体或抗原的生物分子, 所述的酶选自于过氧化物酶或碱性磷酸酶。

14. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 除了象直接 ELISA、间接 ELISA、
30 夹层 ELISA (sandwich ELISA) 等不同类型的 ELISA 之外, 该方法还可以实

施的测定包括放射免疫分析、放射免疫吸收测试、放射过敏性吸收剂测试、生物素-抗生物素蛋白/抗生物素蛋白链菌素免疫测定、免疫吸色 (immunoblotting)、免疫染色 (immunostaining) 等。

5 15. 一种用于进行以微波为媒介的酶联免疫吸附测定 (MELISA) 的装置, 该装置包括:

- (a) 加载腔, 用于通过一细管和一适当的泵自动地将样本或试剂从一个特定的瓶中加载到活化后的聚苯乙烯板/模块上;
- (b) 反应腔, 包括磁控管、排气扇以及光焦点等, 用于实施的步骤为: 在权利要求 1 所要求的预定的时间内, 采用微波辐射进行抗原结合、封堵、抗体结合以及抗体酶结合体结合和在室温下进行的酶底物反应;
- (c) 冲洗连同干燥腔, 用于在 MELISA 工艺的每一步骤之后通过一预先编制好的命令自动地冲洗和干燥所述 ELISA 板或模块;
- (d) 检测腔, 用于借助于分光光度计对色度进行检测;
- 15 (e) 移动平台, 用于将 ELISA 板/模块从一个腔运送到另一个腔;
- (f) 基于微处理器的计算装置, 用于通过适当的硬件和软件控制如权利要求 1 所述的 MELISA 方法。

一种用于以微波为媒介的酶联免疫吸附测定的速测法

技术领域

5 本发明涉及一种速测法,用于进行以微波为媒介的酶联免疫吸附测定(MELISA)。本发明尤其涉及一种用于以微波为媒介进行酶联免疫吸附测定(MELISA)的快速而有效的方法,其中,ELISA的所有主要步骤都可在短时间内在微波辐射条件下完成。该方法用于临床诊断、分子生物、农业、食品工艺、环境科学等领域

10 本发明的ELISA方法简单省时,并且消除了费时而又令人厌烦的工艺。该方法具有自动化的潜力。

该方法具有优于现有ELISA方法的优点,现有的ELISA方法通常会花费长达几个小时到2天的时间,而本发明的方法却只需花费不到10分钟。这在需要很快获得结果的疾病诊断方面尤其有效。

15 背景技术

酶联免疫吸附测定(MELISA)是一种用于对某种抗原和抗体的浓度进行半定量测定或定量测定的非常敏感的技术。ELISA在动植物的疾病诊断方面已经变成一种有用的工具。除此之外,它的其他用途包括:在其生产过程中筛选单克隆抗体(Douillard, J. Y. 以及 Hoffman, T. 1983)、农作物产品上的农药残留物检测(Van Emon, J. M. 以及 Lopez-Avila, V. 1992)以及象土壤和水等环境样本上的农药残留物检测(Linde, D. G. 以及 Goh, K. S. 1995)、组织培养中死细胞的检测(Salgame, P. et al, 1996)。在进行ELISA时普遍采用聚苯乙烯微纤板,因为这种聚苯乙烯微纤板透明、干净并且易于获得,能够模制成任何所需的形状,并且具有吸收结合蛋白的能力。传统的ELISA
25 方法的原理是,通过吸收将抗原或抗体固定到聚苯乙烯微纤板的孔眼表面上。这属于生物分子和聚苯乙烯表面之间的非共价相互作用。

不过,吸收通常不是一种有较高生产量的有效工艺,并且并不总是以一种依赖于剂量的方式进行。为了克服传统方法的这种低效率性,许多人已经开始进行将生物分子以共价方式固定到微纤板(Satoh, A. et al, 1999)。

也曾经有报道说可以将免疫原共价结合到接枝塑料表面 (Larsson, P.H. et al, 1987)。尽管如此, 采用传统 ELISA 方法来完成测定需要几个小时到 2 天的非常长的时间。这是基于吸收方式或基于共价结合的不同 ELISA 方法的主要缺点。万一发生需要紧急用药情况, 就会在能够给予病人药物之前在诊断过程中丧失宝贵的时间。在农业中, ELISA 对于检测农作物产品或环境样本中的农药残留物比较有效。由于 ELISA 方法的阻碍会耽搁农作物产品的出口和上市, 这回导致宝贵的外汇损失。

本申请人已经开发了一种新颖而独特的方法, 该方式使得 ELISA 能够采用微波快速地进行。用微波来加速免疫组织化学已经为人知晓大约有十年了 (Boon, M. E. and Kok, L. P., 1992; Boon, M. E. et al, 1989; Boon, M. E. et al, PCT patent application W089/03038; Chiu, K. Y. and Chan, K. W., 1987; Hjerpe, A. et al, 1988)。

到目前为止, 还不曾有报道说采用微波辐射将抗原或抗体共价固定到聚苯乙烯表面上的做法。事实上, 现有技术中还没有出现通过测量光密度来在如此短的时间内使得 ELISA 的所有主要步骤进行微波辐射来检测微量抗原和抗体的做法。

不过, 现有一些人尝试通过微波辐射来完成 ELISA 的其中一个步骤 (Hjerpe, A. et al, 1988), 其需要通过在 4°C 下孵化一整夜而首先在聚苯乙烯 ELISA 板上涂敷兔型抗癌胚抗原, 随后孵化该原 (CEA)。在随后的步骤中, 即在添加酶联抗体之后, 作者研究了微波辐射对抗原抗体反应的作用效果。

在由同一作者所做的另一个试验中, 通过在 4°C 下孵化一整夜而首先在 ELISA 板上覆盖上正常老鼠免疫血清, 随后采用非标记兔型抗鼠免疫球蛋白进行整夜的孵化。在随后的步骤中, 他们加入了鼠 PAP (过氧化物酶-抗过氧化物添加剂) 复合体并确定微波辐射对该最后一步的的反应的反应常量的影响。

在第三个试验中, Hjerpe 等人首先在该板上涂敷上非特定的老鼠血清, 随后采用晚期微生物马抗鼠免疫球蛋白 G (biotinylated horse-anti-mouse IgG)。然后采用该板来研究微波对于随后进行的生物素——抗生物素蛋白 (biotin-avidin) 复合体的结合的影响。

与那些在不受微波刺激的条件下受到处理的样本相比，上述所有试验中的反应产量都小于受到微波辐射的样本中的反应产量。这些试验表明，微波是导致反应性损失的主要原因，与在微波炉外进行的传统试验相比，该总产率大约为 10%-15%。根据作者认识，采用微波技术所造成的所减少的值可能是由于那些孔中的温度过高造成的，尽管事实上是采用了一水负载（一杯吸收过量微波能的水）和冷却后的底板作为防范措施。

在另一个 ELISA 试验中，作者（Koh 以及 Boon, 1992）采用了一种光纤温度计来将温度限制在 40℃ 以下。在此也采用了 200ml 的自来水作为水负载。此外，借助于插入这些孔眼中的细小的塑料尖端将空气缓慢地吹过该溶液而搅动孔眼中的流体。在一个试验中，作者仅仅有两步在作者实施时是通过微波进行辐射，持续 6 分钟，每次功率为 150 瓦，这两步为抗体和共轭体结合步骤。

在另一个试验中，抗体、抗原以及共轭体结合步骤持续的时间分别在 15、30 以及 30 分钟，每一步采用 45-50%微波功率。

这两个试验中的剩下的步骤采用传统的工艺进行。

但是研究发现上述试验中的 ELISA 值比传统方法要小得多。

根据作者所述，所给的暴光时间越长，消光值（ELISA 值）越高，但是赢得的时间并没有吸引力。实际上，当所使用的暴光时间为 30 分钟或更长时，就不存在任何益处。暴光时间太短导致消光值太低并不能采用。

所述的采用微波暴光的 ELISA 方法具有以下几个缺点，例如，（1）结果值（ELISA 值）比传统工艺要少的多，（2）所赢得的时间没有吸引力，在相同的时间内通过在微波炉之外进行 ELISA 也可能获得差不多的结果值（ELISA 值），（3）该工艺需要水负载，（4）其需要冷却装置或冷却底板，（5）其需要在微纤板的孔眼中设置搅动系统，（6）并不是所有的步骤都在微波能下进行并且所述的 ELISA 工艺几乎或完全没有潜在的自动化能力。

本发明的申请人已经克服了所有上述缺点。实际上，类似的热能微波也能够增加或减少生物分子的活性。如果没有适当的条件，微波可能会导致生物分子的部分或全部死亡，这就会导致 ELISA 值较低或不理想。在本发明的工艺中，研究发现适当的条件大部分与所报道的方法相反或者现有技术中未曾记载。在本发明的方法中，除了显色之外所有的步骤都在微波刺激下进行。

在该公开工艺中，阻挡步骤没有在微波辐射下进行，因为该步骤给出的是非特定的结合，而本申请人已经发明了一种方法，在该方法中，实施该阻挡步骤时也在较短时间内进行微波辐射。尽管在所报道的方法中微波暴光时间越长 ELISA 值越高，但是在本发明的方法中，这将导致材料的死亡或非特定结合。这可能是因为在所报道的方法中所采用的水负载或冷却装置吸收了大量的微波能，因此和在传统方法中一样，所赋予的微波影响最小而对时间造成显著影响。相反，本发明的方法不需要任何水负载、冷却装置或搅动装置。而且，在本发明方法中，进行 ELISA 所需的时间（不包括显色步骤）比那种传统的具有相对还算好或者甚至较好的 ELISA 值的传统方法所花的时间要少大约 200 倍。因此，它还具有巨大的自动化趋势。

所报道的 ELISA 是在一种没有通过共价键与生物分子结合的微纤板上进行的。实际上，微波会很容易地影响非共价次级结合（noncovalent secondary bonding）的完整性，这些次级结合例如为氢键结合、疏水性相互作用以及范德瓦尔斯相互作用。

15 发明目的

本发明的主要目的是为了提供一种用于进行酶联免疫吸附测定的快速而有效的方法，以便采用分光光度测定技术来确定微量抗原或抗体，从而快速诊断疾病。

本发明的另一个目的是为了提供一种技术工艺，该技术工艺简单而具有再现性，并不需要额外的专长或昂贵的设备。

本发明还有一个目的是为了提供一种快速的工艺技术，该技术工艺具有用于自动化的潜力，并且能够使得那种通常由于人员不同而导致的人为误差最小化。

发明概述

25 为了实现这些目的并克服现有的 ELISA 方法的缺陷，提供了一种快速而有效的用于以微波为媒介的 ELISA (MELISA) 方法，该方法包括的步骤为：(i) 通过微波辐射将抗原或抗体共价固定在活化的固体表面；(ii) 通过简短的微波辐射，采用封堵剂封堵该自由表面；(iii) 通过控制微波辐射使得抗体或抗原结合；(iv) 通过控制微波辐射使得结合体结合；(v) 将染色基体添加到所述孔眼中以及 (vi) 记录该吸收值 (absorbance value)。

以微波为媒介的 ELISA (MELISA) 工序在非常短的时间 (大约为 10 分钟) 内在一活性表面进行, 并且其功效和在 37°C 下在 16-18 小时的时间内进行的传统的 ELISA 所获得功效一样。

本发明具有使得 ELISA 工艺自动化或半自动化的潜力。

5 现在已经知道微波能对非共价次级结合的完整性产生影响, 这些次级结合例如为氢键结合、疏水性相互作用以及范德瓦尔斯相互作用。

为了克服该问题, 本申请人在使用之前对微纤孔眼的表面进行活化。该活化表面经过短暂暴露在微波下而通过共价键而使得抗原固定。这种通过共价键方式固定的抗原稳定到足以抵抗反复而短暂暴露在微波下, 这种反复而短暂地暴露在微波下是进行 ELISA 的随后步骤所必须的。在该 ELISA 工艺中随后进行的生物分子结合步骤是通过非共价结合方式进行, 该非共价结合对于微波能比较敏感。这些问题可以通过控制每步中的微波辐射时间和微波辐射能量而得以克服。

15 本发明的新颖之处在于 ELISA 是在一种能够与蛋白质向心配合体形成共价键的活性表面上进行。

本发明的另一新颖之处在于, 生物分子, 尤其是抗原或抗体, 是采用微波为媒介共价固定在该活性表面上的。

对 ELISA 工艺的每一步中的微波辐射进行控制是本方法的另一新颖之处。

20 在本发明的工艺中, ELISA 的所有步骤, 例如抗原结合、阻挡、抗体以及结合体结合, 都是在微波辐射下进行的, 而只有酶基片反应是在室温下在微波炉外进行的。本发明的 ELISA 工艺与传统的方法相比能以相对好或甚至更好的 ELISA 值非常快地进行。

25 本发明的另一新颖之处在于本发明的 ELISA 工艺并不需要任何水负载或搅动装置。

本发明的另一新颖之处在于, 本发明的 ELISA 工艺采用专门设计的装置可以使其全部或部分自动化。

30 本发明的另一个新颖之处在于, 除了象直接 ELISA、间接 ELISA、夹层 ELISA (sandwich ELISA) 等不同类型的 ELISA 之外, 本发明的工艺还能够用于其他免疫测定, 例如放射免疫分析、放射免疫吸收测试、放射过敏性吸

收剂测试、生物素-抗生物素蛋白/抗生物素蛋白链菌素免疫测定、免疫吸色 (immunoblotting)、免疫染色 (immunostaining) 等。

本发明的详细说明

5 本发明提供了一种用于在一种活性微纤板、模块或孔眼上通过暴露在微波下进行酶联免疫吸附测定的新方法。通过微波辐射，活性表面通过共价结合固定抗原。这种通过共价键方式固定的抗原稳定到足以抵抗反复而短暂暴露在微波下，这种反复而短暂地暴露在微波下是进行 ELISA 的随后步骤所必须的。ELISA 是一种多步骤而精确的工艺，任何步骤中的条件不恰当都会对整个结果造成不良的影响。

10 在本发明的工艺中，惰性固体表面，例如聚苯乙烯，采用可光敏化的化合物在干燥的条件下通过光化学反应而被活化。通过将涂敷有可光敏化的化合物的载体置于 UV 辐射下或置于明亮的太阳光线下而使得该载体活化。这种活化后的载体用于以微波为媒介的 LEISA (MELISA) 中并用来控制 ELISA，以便检测抗体，例如对痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 以及烟曲霉 (15 *Aspergillus fumigatus*) 的抗体。如果采用未经处理过的载体，生物分子就不能在微波辐射下在如此短的时间下结合起来。

微波辐射在一种家用微波炉 (BPL-Sanyo, 印度) 中进行，该微波炉在大约 2450MHz 的频率下工作。

20 根据公开的工艺 (Sawhney, S 等, 1980; Sharma, G.L 等 1, 1984)，可以通过培养痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 获得阿米巴抗原。根据 Lowry 等的方法 (Lowry, O.H.等, 1951)，测定得出该抗原的蛋白质浓度为每毫升 1.54 毫克。在进行 LEISA 之前对抗原进行稀释，且用于涂敷孔眼的每孔眼中的浓度为 1.0 μ g。

采用 PH 为 7.2 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为涂敷缓冲液。

25 采用 PH 为 7.2 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 以及 0.1% 的非离子活性剂 20 (tween 20) 一起作为冲洗缓冲液。

通过将 2% 的 BSA 溶解在 PH 为 7.2 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 可以制成阻挡溶液。

30 通过将 0.067% 的 O-苯二胺和 0.043% 的 H₂O₂ 加入 PH 为 4.5 的 0.01M 的磷酸盐柠檬酸盐缓冲液 (phosphate citrate buffer) 中可以制成基质溶液

(substrate solution)。

按照 Sawhney 等人的方法 (Sawhney 等人, 1980), 可以在新西兰的白兔身上培养针对痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 的超免疫血清 (Hyperimmune sera)。在这种血清中的抗体值采用凝胶扩散试验进行检测。

5 在进行 ELISA 之前对抗体 (阳性血清 (+ve sera)) 进行稀释, 且将 1:300 的稀释比例的 PBS 用于该试验。

在向兔子注射免疫剂量的痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 抗原之前先从其耳部静脉抽血以便获得阴性对照血清 (-ve sera)。对每个孔眼使用 100 μ l 的稀释 (1:300) 后的阴性血清。

10 可以从 Sigman 购买结合辣根过氧化物酶的抗兔免疫球蛋白 G (IgG) 作为冻干的粉剂。

在恢复原状后, 经研究发现经过挡板滴定确定的最佳稀释比为 **1:4000**, 这将用于该试验中。

ELISA 为一个 5 步工艺, 即, 抗原结合、阻挡、抗体结合、结合体结合以及显色。MELISA 的每一步都通过传统的 ELISA 工艺实施随后的步骤而得以最佳化。传统 ELISA 实施如下: 在 4 $^{\circ}$ C 下通宵向活化后的孔眼涂敷抗原, 在 37 $^{\circ}$ C 下在 2 个小时内将孔眼堵住, 随后在 37 $^{\circ}$ C 下对抗体结合和抗原结合各进行 2 小时, 以及显色, 显色就是在室温下进 5 分钟的酶底物反应, 并随后读出吸收度。

20 在本发明的工艺中, 进行的 ELISA 的第一步就是在 700 瓦的微波辐射下在不同的持续时间内将阿米巴性抗原以共价方式固定到活化后的聚苯乙烯微纤板上。即使是在 10 秒内都可检测到的结合会随着辐射时间的增加 (见表 1) 而增加。在 90 秒时的抗原结合基本上和进行 70 秒的微波辐射相同。因此, 进行抗原固定所花的最佳时间为 70 秒。在温度为 37 $^{\circ}$ C 下进行的持续时间同样为 70 秒的对照试验中, 就观察不到抗原与活化后的聚苯乙烯表面相结合。

在 MELISA 的第二步中, 在输出功率为 700 瓦的微波炉中采用 2% 的 BSA 进行 10 秒阻挡, 从而将活化后的表面的自由表面堵住。而且, 辐射时间的增加显示出非特定的结合 (表 2)。

30 在 MELISA 的第三步中, 在 155 瓦的微波下将抗体结合到该固定后的抗

原上并持续 100 秒。这是一个严格的步骤，其中象过长的时间或较高的输出功率这样的苛刻条件导致表 3 中所示的非特异性结合。在 155 瓦的微波下持续 50 秒和 100 秒，就观察不到非特异性结合。尽管在 50 秒内观察到的观测数据非常低，但是却发现在 100 秒处的观测数据比较优秀，所产生的阴性血清和阳性血清的比例较高。将持续时间增加到 150 秒则会增加非特异性结合（表 4）。

在 MELISA 的第四步中，结合体结合是在 155 瓦的微波辐射下进行的，持续时间可以不同。在 100 秒内可以获得优秀的结果（表 6）。象过长的时间或 700 瓦的较高能量这样的苛刻条件会导致非特异性结合（表 5）。

在每一步，都在微波炉外在相同的持续时间内进行相同的试验以便进行对照试验。在所有这些试验中，会获得可以忽略不计或不理想的 ELISA 值（非特异性结合）。

在使得 MELISA 的每步达到最佳化之后，申请人在最佳化的微波辐射条件下实施所有的步骤而不会损坏生物分子。为了达到这一点，申请人在 70 秒内将抗原固定在活化后的孔眼上，在 10 秒内进行阻挡，在 100 秒内进行抗体结合，并在辐射 100 秒处进行结合体结合。本发明的方法进行这些步骤所需的总的的时间只有 280 秒，而传统 ELISA 要做到这些需要 18 小时。

在相同的条件下多次反复进行 MELISA 和 ELISA 来检测痢疾内阿米巴(*E. Histolytica*) 抗体，研究发现这些结果具有相当高的再现性，如表 7 所示。

还可以通过检测病人血清中的以及烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 的抗体来验证 MELISA 工艺。曲霉菌抗原可以按照公开的工艺根据静态培养获得 (Banerjee, B., 等, 1990)。

研究发现采用 Lowry 等人的方法 (Lowry 等人, 1951) 确定该抗原中的蛋白质浓度为每毫升 (ml) 12.5 毫克 (mg)。可以采用在新西兰白兔身上培养的超免疫血清来核实该抗原的免疫反应性。

从 10 个患有过敏性支气管肺曲霉病 (ABPA) 的病人身上获取血清样本。所有这些病人都达到以前所描述 (Rosenberg, M., 等人, 1997) 的 ABPA 的临床标准。

阴性对照血清样本取自于 10 个明显健康并且不具有呼吸疾病或其他疾病的自愿者。

汇集后的阳性和阴性血清作为对照用于 ELISA，研究发现这些对照在 MELISA 和传统的 ELISA 中相类似。

可以从 Sigman 购买结合辣根过氧化物酶的抗人免疫球蛋白 G (IgG) 作为冻干的粉剂。在恢复原状后，经研究发现该结合体的最佳稀释比为 1:4000，
5 如经过挡板滴定确定的那样。

通过本发明方法检测到的（存在于病人血清中的）烟曲霉（*A. Fumigatus*）抗体与传统 ELISA 工艺（表 8）一致。

在不同试验中获得结果采用相对登记表示如下：

	优秀	=	++++
10	良好	=	+++
	好	=	++
	差	=	+
	不理想或没有结果	=	-

进行 MELISA 所需的总时间不多于 10 分钟。不过，根据在生物分子不同
15 而能够通过对反应条件进行微小的改动而获得优秀的结果，因此每步的时间可以有所变化，这些反应条件的微小的改动就是在辐射的持续时间和辐射能量方面的微小变化。

因此，本发明提供了一种用于以微波为媒介的酶联免疫吸附测定的速测法，其特征在于采用了一种活化后的载体，其中所述的方法包括：

- 20 (a) 提供一种活化后的载体；
- (b) 通过将一种选自于一种抗原或抗体中的生物分子溶解在一种涂敷缓冲液而将所述的生物分子装载在所述载体的活化后的孔眼中，并将所述孔眼置于一微波炉中，随后采用频率范围为 2300-2500MHz 输出功率为 600-900 瓦的微波对所述孔眼辐射
25 50-100 秒，之后采用适当的冲洗缓冲液对该孔眼进行全面地冲洗；
- (c) 通过将封堵液加载到所述孔眼中而采用如上述步骤 (b) 所获得的一种固定生物分子将孔眼的自由位置封堵住，并在频率范围为 2300-2500MHz 输出功率为 600-800 瓦的微波炉中对其辐射
30 5-20 秒，并采用适当的冲洗缓冲液对该孔眼进行冲洗；

- (d) 将溶解在一种缓冲液中的相应的抗体或抗原装载在固定有如上述步骤(c)所获得的抗原或抗体的孔眼中,随后在2300-2500MHz输出功率为50-200瓦的微波炉中对所述孔眼辐射90-200秒,之后采用冲洗缓冲液进行冲洗;
- 5 (e) 将溶解在一种适当的缓冲液中的一种适当的酶结合体由上述步骤(d)所获得的上述孔眼中,并在一种频率2300-2500MHz输出功率为100-300瓦的微波炉中对所述孔眼辐射50-150秒,随后采用冲洗缓冲液进行冲洗;
- 10 (f) 将一基质染色缓冲液添加到如上述步骤(e)所获得的上述孔眼中并将其置于暗处大约4-10分钟,随后添加阻化剂(stop solution),并通过分光光度计以一种适当的波长测量溶液的光密度(optical density)。

在本发明的一个实施例中,所用的载体的构成材料选自于下列材料构成的材料组中,这些材料为:聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、玻璃、纤维素、硝

15 化纤维素、硅胶、聚氯乙烯、聚苯胺以及类似材料。

在本发明的一个实施例中,该载体优选采用聚苯乙烯。

在另一实施例中,载体可以设定成任何外形,形式和尺寸,例如片、板,试验粒子如珠和微球体、试管、试杆、试片、孔眼、ELISA板、微纤板或模块。

20 在本发明的一实施例中,用于固定生物分子的载体选自于任何具有至少一种活性官能团的任何载体,该官能团能够通过共价方式使得向心配合体分子结合。

在本发明的另一实施例中,该官能团选自于:卤化物、乙酰、环氧化物、琥珀酰胺、异硫氰酸酯、酰基叠氮以及类似物。

25 在本发明的另一实施例中,该官能团可以自身存在于载体中,或者通过传统的化学或光化学方法或其他现有的方法引入载体中。

在本发明的另一实施例中,该官能团是采用可光敏化的化合物在干燥条件下通过光化学反应引入载体中的,该可光敏化的化合物选自于4-氟-3-硝基叠氮基苯(4-fluoro-3-nitroazidobenzene)、N-硫代羟基-琥珀酰亚胺4-叠氮苯甲酸盐(N-hydroxysulfo-succinimidyl4-azidobenzoate)、N-硫代

30

羟基 - 琥珀酰亚胺 4-叠氮水杨酸
(N-hydroxysulfo-succinimidyl4-azidosalicylic acid) 以及类似物。

在本发明的另一实施例中，该聚苯乙烯表面通过涂敷上 1-氟-2-硝基-叠氮基苯 (1-fluoro-2-nitro-azidobenzene) 并将涂敷后的载体在干燥条件下暴露在波长为 365nm 的 UV 射线下进行活化。

在本发明的另一实施例中，用来进行光化学反应的光源可以从 UV 灯、激光束、明亮的太阳光或类似光源中进行选择。

在本发明的另一实施例中，用来进行光致反应以活化载体的时间为 10 秒到 10 小时。

10 在本发明的另一实施例中，微波辐射是在微波装置中进行的，该微波装置选自于家用微波炉、专门设计的微波炉或任何能够产生微波的其他装置以及类似装置。

在本发明的另一优选实施例中，ELISA 的第一步是这样进行的，即，通过频率范围为 2300-2500MHz 输出功率为 600-900 瓦的微波辐射 50-100 秒，使得抗原或抗体以共价方式结合到活化后的板上。

在本发明的另一优选实施例中，ELISA 的第二步，就是封堵步骤是在频率范围为 2300-2500MHz 输出功率为 600-800 瓦的微波下辐射 5-20 秒的较短时间内进行的。

在本发明的另一优选实施例中，ELISA 的第三步，就是通过频率范围为 2300-2500MHz 输出功率为 50-200 瓦的微波下辐射 90-200 秒而进行抗体或抗原的结合。

在本发明的另一优选实施例中，ELISA 的第四步，就是通过频率范围为 2300-2500MHz 输出功率为 100-300 瓦的微波下辐射 50-150 秒而进行酶结合体的结合。

25 在本发明的另一优选实施例中，用于抗原结合、封堵、抗体结合以及结合体结合所需的总时间为 195-470 秒，其中传统方法所需的总时间为 10 小时到 24 小时。

在本发明的另一优选实施例中，该抗原可以溶解在一种具有适当成分的合适的涂敷缓冲液中，该缓冲液的 PH 值的范围为 6.5-11，体积摩尔浓度范围为 0.005M-0.1M，并与该抗原相容，该缓冲液例如为碳酸盐、磷酸盐以及

30

类似物。

在本发明的另一优选实施例中，所使用的冲洗缓冲液是一种磷酸盐缓冲液和一种范围在 0.05%-3%之间的非离子活性剂 20 (tween20) 的混合物，该磷酸盐缓冲液的 PH 值的范围为 6.5-11，体积摩尔浓度范围为 0.005M-0.1M。

5 在本发明的另一优选实施例中，封堵试剂选自于牛血清清蛋白、脱脂奶粉、动物胶以及类似物。

在本发明的另一优选实施例中，生物分子选自于抗原或抗体。抗原可以为任何生物分子、微生物、那些引起免疫响应或具有潜在的引起一种免疫响应的物质等。

10 在本发明的另一优选实施例中，抗体选自于任何由宿主寄主响应特定抗原而产生并具有与抗原以特定方式相结合的能力的生物分子。

在本发明的另一优选实施例中，结合体是一种具有与一种酶结合的抗体或抗原特定生物分子，所述的酶选自于过氧化物酶或碱性磷酸酶。

15 在本发明的另一优选实施例中，酶可以由一种选自于发色团、荧光团等便于起测定的标记物来替代。

在本发明的另一优选实施例中，除了象直接 ELISA、间接 ELISA、夹层 ELISA (sandwich ELISA) 等不同类型的 ELISA 之外，本发明的工艺可以用于其他免疫测定，例如例如放射免疫分析、放射免疫吸收测试、放射过敏性吸收剂测试、生物素-抗生物素蛋白/抗生物素蛋白链菌素免疫测定、免疫吸
20 色 (immunoblotting)、免疫染色 (immunostaining) 等。

本发明还提供了一种装置，用于进行以微波为媒介的酶联免疫吸附测定 (MELISA)，该装置包括 (a) 加载腔，用于通过适当的泵自动地将样本或试剂从一特定的瓶中并经一细管加载到活化后的聚苯乙烯板/模块上；(b) 一反应腔，包括磁控管、排气扇等，用于实施所有的步骤，例如通过微波辐射
25 进行的抗原结合、封堵、抗体结合以及抗体酶结合体结合以及在预定的时间内在室温下不采用微波刺激进行的酶底物反应；(c) 冲洗连同干燥腔，用于在 MELISA 工艺的每一步骤之后通过一预先编制好的命令自动地冲洗和干燥所述 ELISA 板或模块；(d) 检测腔，借助于分光光度计用于对色度进行进行检测；(e) 移动平台：用于将 ELISA 板/模块从一个腔运送到另一个腔；(f)
30 基于微处理器的计算装置，用于通过适当的硬件和软件控制 MELISA 方法。

本发明将借助于下面的实例得到进一步解释,但这种举例并不应被看作是对本发明范围的限制。

实例 1

载体的活化

5 模块的孔眼(12孔眼聚苯乙烯模块, Dynatech, USA)加载在 1.82mg 的 1-氟-2-硝基-叠氮基苯(1-fluoro-2-nitro-azidobenzene)(FNAB)上,溶解在每孔眼的 100 μ l 的甲醇中,并在黑暗中适当地进行干燥。随后在一种 UVStrtalinker2400(Stratagen®, USA)中采用波长为 365nm 的 UV 光线对涂有 FNBA 的孔眼照射 10 分钟或置于明亮的阳光下 1 小时。然后采用甲醇对这些孔眼冲洗几次以便清除掉非结合衔接物并在室温下进行干燥。模块的这些活化后的孔眼用于在本发明的工艺中固定抗原或抗体。

实例 2

通过微波辐射固定痢疾内阿米巴(**Entamoeba Histolytica**)抗原

15 稀释在 100 μ l 的 PBS 中的痢疾内阿米巴(*E. Histolytica*)抗原(1 μ g)被加载在一模块的一活化后的孔眼中,并在一微波炉(BPL-Sanyo, 印度)中经受 10 秒钟的微波辐射,该微波炉的工作频率大约为 2450MHz,最大输出功率为 700 瓦。辐射是在最大功率设定值为 10 的微波炉中进行,也就是说,磁控管负载循环(magnetron duty cycle)达到 100%时输出功率为 700 瓦。

20 采用冲洗缓冲液对孔眼进行全面冲洗以便清除掉未结合的抗原。采用传统步骤来实施随后的步骤。因此,采用封堵液(200 μ l)进行封堵、抗体(100 μ l)的结合以及抗兔免疫球蛋白 G(IgG)——辣根过氧化物酶结合体(100 μ l)的结合都是在 37 $^{\circ}$ C 下通过孵化进行的,每步都持续 2 个小时。在每步之后都采用冲洗液对孔眼进行全面冲洗。显色是采用 100 μ l 的基质溶液进行的。在一种 ELISA 读数器(Spectramax 190 microplate spectrophotometer, 25 Molecular Devices Corporation, California 94089)中读到孔眼为 490nm 并记下吸光率值(absorbance value)。所有这些实验都在一式三份的孔眼中进行。采用阴性血清进行相似的实验。

30 采用未处理过的孔眼以相似的方式进行一种采用微波的对照实验。另一个对照实验是利用活化后的孔眼通过在 37 $^{\circ}$ C 下在和采用微波下进行时所持续的时间一样长的时间内孵化抗原进行。在这两个对照反应中没有抗原的固

定。

整个实验通过改变抗原结合所需的时间而反复独立进行，即每次的时间为 30、50、70 以及 90 秒。

对采用微波辐射的抗原结合的优选结果如表 1 所示。

5 实例 3

在微波辐射下采用封堵剂封堵自由表面

10 如上所述，通过微波将痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 抗原固定在一模块的一活化后的孔眼中。在采用冲洗液进行全面冲洗后，将 200 μ l 的冲洗液添加到该孔眼中并采用 700 瓦的微波照射 10 秒。随后的抗体和结合体的结合步骤都与实例 2 中所描述的那样在微波炉外进行。显色和读吸光率 (absorbance) 也和实例 2 中所述的一样进行。

采用阴性血清进行相似的实验。

15 为了核实封堵的最佳时间，除了微波暴光时间之外，采用相同的方式实施两个不同的实验，暴光时间增加为 40 和 60 秒。所有的实验都在在一式三份的孔眼中进行。

在微波辐射下对封堵时间的优化结果如表 2 所示。

实例 4

在较高能量等级的微波辐射下的抗体结合

20 在持续 70 秒的 700 瓦的微波下将痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 抗原固定在一模块的一活化后的孔眼中，随后如实例 3 一样，在持续 10 秒的 700 瓦的微波下采用封堵剂将自由表面封堵住。将抗阿米巴性抗体 (100 μ l) 加载到该孔眼中。随后将该孔眼暴露在 700 瓦的微波下持续 10 秒。在采用冲洗缓冲液对孔眼进行适当的冲洗后，和在实例 3 中一样进行结合体结合和随后的显色。采用阴性血清进行相似的实验。通过将抗体结合所需的时间改变为 30、50、70 以及 90 秒而反复进行该实验。所有的实验都在在一式三份的孔眼中进行。

在较高能量等级的微波辐射下的进行抗体结合的结果如表 3 所示。

实例 5

在较低能量等级的微波辐射下的抗体结合

30 如实例 4 中描述的一样，相同的条件下在此进行用于抗体结合的实验，

不同之处在于抗体结合步骤是在功率为 155 瓦的较低能量等级下进行的。对于四套不同的实验，其微波暴光时间分别为 10、50、100 以及 150 秒。

在较低能量等级的微波辐射下的进行抗体结合的结果如表 4 所示。

实例 6

5 在较高能量等级的微波辐射下的结合体结合

在持续 70 秒的 700 瓦的微波下将痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 抗原固定在一活化后的孔眼中，随后如实例 5 一样，在持续 10 秒的 700 瓦的微波下进行封堵并在 100 秒内采用 155 瓦的微波进行抗体结合。

10 将 100 μ l 抗兔免疫球蛋白 G (IgG) ——辣根过氧化物酶结合体加载到该孔眼中并经受 700 瓦的微波的辐射。对于四套不同的实验，其微波暴光时间分别为 5、10、15 以及 20 秒，除了时间不同外，其他条件都和实例 5 中相同。所有的实验都在一式三份的孔眼中进行。

在较高能量等级的微波辐射下的进行结合体结合的结果如表 5 所示。

实例 7

15 在较低能量等级的微波辐射下的抗体结合

如实例 6 中描述的一样，相同的条件下在此进行用于第二抗体——结合体结合的实验，不同之处在于第二抗体——结合体结合步骤是在功率为 155 瓦的较低能量等级下进行的。对于四套不同的实验，其微波暴光时间分别为 50、100 以及 120 秒。

20 在较低能量等级的微波辐射下的进行结合体结合的结果如表 6 所示。

实例 8

采用以微波为媒介的酶联免疫吸附测定 (MELISA) 和酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 抗体

25 如上述实例所描述的那样，在持续 70 秒的 700 瓦的微波下将痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 抗原固定在该活化后的孔眼中，并在持续 10 秒的 700 瓦的微波下采用封堵溶液进行封堵，在持续 100 秒的 155 瓦的微波下进行抗体结合，随后在持续 100 秒的 155 瓦的微波下进行抗体——结合体结合。所有的实验都在一式三份的孔眼中进行并重复 5 次。在每步之后都采用冲洗缓冲液进行全面冲洗。

30 采用相同的试剂、底物以及缓冲液进行传统的 ELISA，不同之处在于所

有这些步骤都是在没有微波刺激下进行的。因此 ELISA 这样实施，即，在 4℃ 下通过一通宵在活化后的孔眼上涂敷抗原，随后进行封堵，在 37℃ 下进行抗体结合和结合体结合，各持续 2 小时。本发明和传统工艺的显色相同。

采用以微波为媒介的酶联免疫吸附测定 (MELISA) 和酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来检测痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 抗体的结果如表 7 所是示。

实例 9

采用以微波为媒介的酶联免疫吸附测定 (MELISA) 和酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测烟曲霉 (*A. Fumigatus*) 抗体

如上述实例 8 所描述的那样，采用以微波为媒介的酶联免疫吸附测定 (MELISA) 和酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来检测病人血清中的烟曲霉 (*A. Fumigatus*) 抗体，该实例的不同在于，抗原为烟曲霉 (*A. Fumigatus*)，抗体来自于 10 个不同的病人血清，具有非特定抗体的对照血清来自于 10 个不同的健康自愿者，切结合体是抗人类免疫球蛋白 G (IgG) — 过氧化物酶。所有的实验都在一式三份的孔眼中进行。

采用以微波为媒介的酶联免疫吸附测定 (MELISA) 和酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来检测烟曲霉 (*A. Fumigatus*) 抗体的结果如表 8 所是示。

表 1. 通过实施 MELISA 的第一步和 ELISA 工艺的剩余步骤检测痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 抗体。

MELISA: 步骤-1. 通过在表中所示的不同时间内采用微波辐射将抗原固定到活化后的孔眼上，对照实验为：37℃，70 秒。

ELISA: (步骤 2-5) 传统工艺

时间 (秒)	阳性血清			阴性血清			评价
10	0.188	0.196	0.191	0.002	0.004	0.003	++
30	0.208	0.193	0.198	0.005	0.001	0.002	++
50	0.226	0.211	0.214	0.006	0.002	0.004	+++
70	0.363	0.355	0.358	0.005	0.001	0.003	++++
90	0.370	0.360	0.367	0.001	0.003	0.004	++++
对照	0.003	0.001	0.004	0.006	0.004	0.002	-

表 2.通过实施 MELISA 的开始两步和 ELISA 工艺的剩余步骤检测痢疾内阿米巴 (E. Histolytica) 抗体。

MELISA: 步骤-1. 抗原结合条件: 70 秒, 700 瓦。步骤-2. 封堵—时间变化如表中所示, 700 瓦。

ELISA: (步骤 3-5) 传统工艺。

时间 (秒)	阳性血清			阴性血清			评价
10	0.270	0.288	0.273	0.006	0.005	0.008	++++
40	0.352	0.377	0.367	0.098	0.092	0.094	++
60	0.293	0.290	0.287	0.283	0.270	0.276	-

表 3 通过实施 MELISA 的开始三步和 ELISA 工艺的剩余步骤检测痢疾内阿米巴 (E. Histolytica) 抗体。

MELISA: 步骤-1. 抗原结合条件: 70 秒, 700 瓦。步骤-2. 封堵条件: 10 秒, 700 瓦。步骤-3. 抗体结合—时间变化如表中所示, 700 瓦。ELISA: (步骤 4-5) 传统工艺。

时间 (秒)	阳性血清			阴性血清			评价
10	0.216	0.203	0.211	0.087	0.123	0.098	+
30	0.392	0.353	0.388	0.100	0.137	0.114	-
50	1.413	1.177	1.213	0.194	0.180	0.194	++
70	1.313	1.253	1.276	1.263	1.279	1.275	-
90	1.287	1.239	1.238	1.288	1.248	1.234	-

15

表 4 通过实施 MELISA 的开始三步和 ELISA 工艺的剩余步骤检测痢疾内阿米巴 (E. Histolytica) 抗体。

MELISA: 步骤-1. 抗原结合条件: 70 秒, 700 瓦。步骤-2. 封堵条件: 10

秒，700 瓦。步骤-3. 抗体结合—时间变化如表中所示，155 瓦。

ELISA: (步骤 4-5) 传统工艺

时间 (秒)	阳性血清			阴性血清			评价
10	0.010	0.014	0.010	0.004	0.003	0.004	-
50	0.079	0.087	0.82	0.003	0.006	0.005	+
100	0.511	0.524	0.530	0.014	0.027	0.020	++++
150	0.256	0.276	0.289	0.218	0.221	0.223	-

5 表 5 通过实施 MELISA 的开始四步和传统工艺的最后一步检测痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 抗体。

MELISA: 步骤-1. 抗原结合条件: 70 秒, 700 瓦。步骤-2. 封堵条件: 10 秒, 700 瓦。步骤-3. 抗体结合条件: 100 秒, 155 瓦。步骤-4. 结合体结合—时间变化如表中所示, 700 瓦。步骤 5. 显色: 在室温下持续 5 分钟。

10

时间 (秒)	阳性血清			阴性血清			评价
5	0.147	0.136	0.138	0.032	0.020	0.23	++
10	0.166	0.166	0.168	0.087	0.093	0.85	+
15	0.192	0.171	0.183	0.110	0.119	0.116	-
20	0.388	0.503	0.446	0.312	0.288	0.293	-

表 6 通过实施 MELISA 的开始四步和传统工艺的最后一步检测痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 抗体。

15 MELISA: 步骤-1. 抗原结合条件: 70 秒, 700 瓦。步骤-2. 封堵条件: 10 秒, 700 瓦。步骤-3. 抗体结合条件: 100 秒, 155 瓦。步骤-4. 结合体结合—时间变化如表中所示, 155 瓦。步骤 5. 显色: 在室温下持续 5 分钟。

时间 (秒)	阳性血清			阴性血清			评价
50	0.205	0.189	0.192	0.021	0.018	0.022	++
100	0.558	0.532	0.543	0.036	0.031	0.032	++++
120	0.145	0.193	0.157	0.023	0.014	0.023	+

表 7 检测痢疾内阿米巴 (*E. Histolytica*) 抗体: 对 MELISA 工艺和 ELISA 工艺进行比较。

MELISA: 步骤-1. 抗原结合条件: 70 秒, 700 瓦。步骤-2. 封堵条件: 10 秒, 700 瓦。步骤-3. 抗体结合条件: 100 秒, 155 瓦。步骤-4. 结合体结合: 100 秒, 155 瓦。步骤 5. 显色: 在室温下持续 5 分钟。

ELISA: 步骤-1. 抗原结合条件: 4℃下一通宵。步骤-2. 封堵条件: 37℃下 2 小时。步骤-3. 抗体结合条件: 37℃下 2 小时。步骤-4. 结合体结合: 37℃下 2 小时。步骤 5. 显色: 在室温下持续 5 分钟。

顺序 号	阳性血清				阴性血清			
	MELISA		ELISA		M0.070ELISA		ELISA	
1	0.567	0.556	0.539	0.560	0.036	0.070	0.046	0.040
2	0.531	0.556	0.538	0.534	0.096	0.056	0.064	0.070
3	0.541	0.563	0.549	0.547	0.098	0.053	0.064	0.050
4	0.558	0.545	0.574	0.544	0.052	0.080	0.074	0.110
5	0.557	0.564	0.558	0.540	0.049	0.079	0.056	0.090
评价	可再现		可再现		可再现		可再现	

10

表 8 检测烟曲霉 (*A. Fumigatus*) 抗体: 对 MELISA 工艺和 ELISA 工艺进行比较。

采用如表 7 中所描述的步骤

15

顺序号	阳性血清				阴性血清			
	MELISA		ELISA		M0.070ELISA		ELISA	
1	0.334	0.356	0.339	0.320	0.036	0.070	0.116	0.130
2	0.331	0.356	0.438	0.380	0.096	0.056	0.094	0.110
3	0.351	0.380	0.379	0.410	0.098	0.053	0.164	0.150
4	0.498	0.525	0.574	0.520	0.052	0.080	0.174	0.170
5	0.685	0.664	0.658	.0641	0.049	0.079	0.056	0.080
6	0.367	0.375	0.372	0.390	0.063	0.047	0.093	0.110
7	0.430	0.449	0.412	0.400	0.114	0.131	0.110	0.150
8	0.550	0.560	0.527	0.510	0.090	0.077	0.098	0.100
9	2.204	2.081	1.984	2.300	0.058	0.061	0.073	0.120
10	0.346	0.341	0.327	0.310	0.039	0.037	0.142	0.160
评价	两者差不多				在 MELISA 中非特异性结合较少			

用于 MELISA 的装置

用于 MELISA 的装置可由下述部件构成：

- 5 (a) 加载腔：用于通过一细管和一适当的泵自动地将样本或试剂从一特定的瓶中加载到活化后的聚苯乙烯板/模块上；
- (b) 反应腔：包括磁控管、排气扇等，用于实施所有的步骤，例如通过微波辐射进行的抗原结合、封堵、抗体结合以及抗体酶结合体结合以及在室温下在预定的时间内进行的酶底物反应；
- 10 (c) 冲洗连同干燥腔：用于在 MELISA 工艺的每一步骤之后通过一预先编制好的命令自动地冲洗和干燥所述 ELISA 板或模块；
- (d) 检测腔：借助于分光光度计用于对色度进行进行检测；
- (e) 移动平台：用于将 ELISA 板/模块从一个腔运送到另一个腔；
- 15 (f) 控制单元：具有基于微处理器的计算装置，用于通过适当的硬件和软件控制 MELISA 方法。

本发明的优点

传统的 ELISA 方法完成一遍通常要花费几个小时到 2 天,这对于一种广泛应用于包括临床诊断在内的不同领域的工艺来说是一个主要的缺陷。万一发生需要紧急用药情况,就会在能够给予病人药物之前在诊断过程中丧失宝贵的时间。因此,在此发明的一种快速的 ELISA 工艺将会对疾病的诊断、生物医学研究以及其他相关领域非常有利而实用。本发明的 ELISA 工艺的主要优点在于:

1. 本发明的工艺比现有的 ELISA 方法快得多。
2. 本发明的方法所需的总的时间少于 10 分钟。因此其消除了费时而又令人厌烦的工序。
3. 本发明的工艺非常敏感且对珍贵的抗原或抗体的需要量极少。
4. 由于酶底物反应是在溶液中进行并采用分光光度计进行定量,因此本发明的工艺非常精确。
5. 本发明的工艺简单且并不需要任何额外的专长或试剂来实施它。
6. 本发明的工艺具有较高的成本效益,且除了家用微波炉外不需要额外的设备,而家用微波炉在大多数实验室都很普通。
7. 本发明的工艺具有再现性,这对于 ELISA 是一个重要的标准。
8. 该工艺所产生的非特异性结合最小或者可以忽略不计。
9. 该工艺本具有自动化的潜力,这能够使得那种通常由于人员不同而导致的人为误差最小化。
10. 本发明的工艺,除了象直接 ELISA、间接 ELISA、夹层 ELISA (sandwich ELISA) 等不同类型的 ELISA 之外,本发明的工艺还能够用于其他免疫测定,例如放射免疫分析、放射免疫吸收测试、放射过敏性吸收剂测试、生物素-抗生物素蛋白/抗生物素蛋白链菌素免疫测定、免疫吸色 (immunoblotting)、免疫染色 (immunostaining) 等。

因此,本发明的 ELISA 工艺具有快速、经济、再现、简单的优点,并具有自动化的潜力。其将会有益于人类,因为其在临床诊断、分子生物、农业、食品工艺、环境科学、生物医学研究以及其他相关领域变得日益重要。

参考文献:

1. Douillard, J.Y. and Hoffman, T. (1983) *Method in Enzymology* 92, 168-174.
2. Van Emon, J.M. and Lopez-Avila, V. (1992) *Analytical Chemistry*, 64. 79 A-88A.
3. Linde, D.G. and Goh, K.S. (1995) *Pesticide Outlook*, 18-23
4. Salgame, P., Varadhacary, A.S, Primiano, L.L., Finke, J.E., Muller, S. and Monestier, M. (1996) *Nucleic Acids Res.* 25, 680-681
5. Satoh, A. Fukui, S., Yoshino, S. Shinoda, M., Kozoma, K. and Matsumoto, I. (1999) *Analytical Biochemistry* 275, 231-235.
6. Larsson, P.H. Johansson, S.G.O., Hult, A. and Gothe, S. (1987) *Journal of Immunological Methods* 98, 129-135.
7. Boon, M.E. and Kok, L.K. (1992) *Microwave Irradiation in immunostaining*, p. 256-285. In *Microwave Cookbook of Pathology: The Art of Microscopic Visualisation*. 3rd. Ed. Columbia press Leyden, Leiden.
8. Boon, M.E. and Kok, L.K., Moorlag, H.E. and Suurmeijer (1989). *Am. J. Clin. Pathol.* 92:137-143.
9. Chiu, K.Y. and K.W. Chan, 1987. *J. Clin. Pathol.* 40:689-396.
10. Hjerpe, A., Boon, M.E. and Kok, L.P. (1988). *Histochem. J.* 20:388-396.
11. Koh, L.P. and Boon, M.E. (1992) *Microwave Cookbook for Microscopists: Art and Science of Visualization, Third Edition*. Columbia press Leyden: The Netherlands
12. Sawhney, S., Chakravarti, R.N., Jain, P. and Vinayak, V.K. 1980, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 26-29
13. Sharma, G.L, Naik, S.R. and Vinayak, V.K. 1984, *Aust. J. Med. Sc.* 62: 117-133;
14. Lowry, O.H. Rosegrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.

- 1951, J. Biol. Chem. 193: 265.
15. Voller A., Bidwell D, Bartett A. Microplate ELISA and its application, In Immunoenzymatic Assay Techniques. Malvano R. ed. The Hague Martinus Nijhoff Publ. 1980, p104-115;
- 5 16. Banerjee, B., Cheety, A., Joshi, A.pP., and Sarnma, P.U., 1990, Asian Pacific J Allergy immunol. 8: 13-18
17. Rosenberg, M., Patterson, R., Mintzer, R., Cooper, B.J., Roberts, M. and Harris, K.E., Am Inern Med 1997, 86:405-414

10

其它参考文献

专利文献

Apr., 1989 Boon, M.E. et al, PCT patent application
W089/03038

专利名称(译)	一种用于以微波为媒介的酶联免疫吸附测定的速测法		
公开(公告)号	CN1502042A	公开(公告)日	2004-06-02
申请号	CN00819869.1	申请日	2000-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	科学与工业研究理事会		
申请(专利权)人(译)	科学与工业研究委员会		
当前申请(专利权)人(译)	科学与工业研究委员会		
[标]发明人	普拉迪普纳哈尔 乌特帕尔布拉 盖恩达拉尔夏尔马		
发明人	普拉迪普·纳哈尔 乌特帕尔·布拉 盖恩达·拉尔·夏尔马		
IPC分类号	G01N1/44 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N1/44 G01N33/54366 G01N33/54393		
代理人(译)	朱梅		
其他公开文献	CN100338466C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于进行以微波为媒介的酶联免疫吸附测定(MELISA)的快速而有效的方法，用于检测微量的生物分子，例如抗原、抗体等。本发明尤其涉及一种以微波为媒介将抗原和抗体固定在活化后的表面上，随后采用可控的微波辐射进行随后的ELISA步骤。本发明的工艺能够将ELISA所需的总时间从数小时到几天显著地降低到不到10分钟。本发明的ELISA工艺具有快速、经济、再现、简单的优点，并具有自动化的潜力。其在临床诊断、分子生物、农业、食品工艺、环境科学、生物医学研究以及其他相关领域进行ELISA方面非常有用。

时间 (秒)	阳性血清			阴性血清			评价
	0.188	0.196	0.191	0.002	0.004	0.003	
10	0.188	0.196	0.191	0.002	0.004	0.003	++
30	0.208	0.193	0.198	0.005	0.001	0.002	++
50	0.226	0.211	0.214	0.006	0.002	0.004	+++
70	0.363	0.355	0.358	0.005	0.001	0.003	+++
90	0.370	0.360	0.367	0.001	0.003	0.004	+++
对照	0.003	0.001	0.004	0.006	0.004	0.002	-