

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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

G01N 33/546

G01N 33/53 G01N 27/413



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410053802.5

[43] 公开日 2005年3月2日

[11] 公开号 CN 1588071A

[22] 申请日 2004.8.16

[21] 申请号 200410053802.5

[71] 申请人 上海市胸科医院

地址 200030 上海市淮海西路 241 号

[72] 发明人 于方治

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

代理人 包兆宜

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种酶标记免疫电化学检测方法

[57] 摘要

本发明属电化学和临床化学分析领域，涉及一种酶标记免疫电化学检测方法，本发明利用磁性微球(珠)分离酶标记免疫反应结合物，在裸电极表面作用于酶的底物，测定电极表面电位或电流的改变，实现生物大分子物质或半抗原的定性与定量分析。本发明具有如下优点：结构简单，无需光学检测系统；裸电极从理论上无使用寿命限制；检测成本可明显降低；适于检测自动化；结合微电子和微电极技术，有广阔的应用前景。

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

- 1、一种酶标记免疫电化学检测方法，其特征是利用磁性微球（珠）分离酶标记免疫反应结合物，在裸电极表面作用于酶的底物，测定电极表面电位或电流的改变，实现生物大分子物质或半抗原的定性与定量分析。
- 2、根据权利要求1所述的酶标记免疫电化学检测方法，其特征是所述的方法包括下述步骤，
  - 1) 取酶结合物工作液，标准品，磁珠悬液置试管，混匀，室温下反应60分钟，
  - 2) 将试管置于磁性板上，使磁珠沉积，去上清，用含0.05% TWEEN 20的生理盐水洗涤磁珠，后用生理盐水悬浮，
  - 3) 将悬浮的磁珠移入电解池，将柱形磁铁置于电解池下，使磁珠沉积，吸弃生理盐水，加入底物应用液，参比电极和对电极插入液面，分别连接至电化学分析仪，扫描测定。
- 3、根据权利要求1或2所述的酶标记免疫电化学检测方法，其特征是所述的所述磁性微球（珠）为通用的磁珠试剂。
- 4、根据权利要求1或2所述的酶标记免疫电化学检测方法，其特征是所述的底物为四甲基联苯胺。
- 5、根据权利要求1或2所述的酶标记免疫电化学检测方法，其特征是所述的参比电极为Ag/AgCl电极；对电极为铂电极。
- 6、根据权利要求2所述的酶标记免疫电化学检测方法，其特征是所述的电解池采用聚苯乙烯材质制备，底部为矩形金片金电极，经导线联至池外，为工作电极，池底面粘固铁片，磁铁可吸附其上，无须另行固定。

## 一种酶标记免疫电化学检测方法

### 技术领域

本发明属电化学和临床化学分析领域，涉及一种酶标记免疫电化学检测方法，具体涉及一种检测过氧化物酶及其底物反应系统的电化学方法

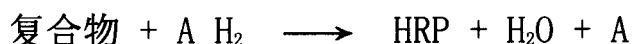
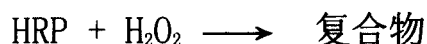
### 背景技术

1971年 Engvall 等建立了酶联免疫吸附分析（ELISA）技术，用于检测生物标本中的抗体或抗原。利用过氧化物酶（HRP）作为标记物的 ELISA 的基本原理是，将 HRP 与抗体或抗原交联，得到酶结合物，它与待测物中的抗原或抗体结合，分离并弃除游离的酶结合物后，加入 HRP 的底物，经化学反应，形成有色的产物，用酸中止反应后，经光度计在一定波长下比色，根据吸光度的高低，与标准比较，计算待测物的量。上述技术后经不断改进和完善，现在已成为一项广泛应用的光学免疫测定技术。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种灵敏、稳定、结构简单、低消耗、适于自动化的酶标记免疫电化学检测方法。具体涉及一种检测过氧化物酶及其底物反应系统的电化学方法。

已知技术酶标记免疫原理，HRP 作用于底物的反应过程是，



式中  $\text{H}_2\text{O}_2$  可以是过氧化氢，也可以是过氧化氢尿素、sodium perborate 等； $\text{A H}_2$  则是一类供氢体的通式，如邻苯二胺、四甲基联苯胺、5-氨基水杨酸、邻联苯甲胺、ABTS 等。

本发明利用磁性微球（珠）分离酶标记免疫反应结合物，在裸电极表面作用于酶的底物，测定电极表面电位或电流的改变，实现生物大分子物质或半抗原的定性与定量分析。

本发明所述磁性微球（珠）为通用的磁珠试剂，所述底物为四甲

基联苯胺(TMB)，参比电极为 Ag/AgCl 电极；对电极为铂电极；电化学分析仪为上海辰华仪器公司生产的 CHI 830 电化学分析仪，使用 3 电极系统。测量时，反应液加在反应池内，参比电极和对电极插入液面下，分别连接至电化学分析仪，进行检测。

所述的反应池即电解池，采用聚苯乙烯材质制备，底部为矩形金片金电极 1，经导线联至池外，是为工作电极 2，反应池底面粘固铁片 3，磁铁 4 可在需要时吸附其上，而无须另行固定。

本发明电化学检测法借助于磁性微珠将过氧化物酶 (HRP) - 过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) - 供氢体 ( $H_2A$ ) 反应体系浓聚于裸电极表面进行电化学检测。具有如下优点：结构简单，无需光学检测系统；裸电极从理论上无使用寿命限制；检测成本可明显降低；适于检测自动化；结合微电子和微电极技术，有广阔的应用前景。

#### 附图说明

图 1. 电解池结构示意图，

其中，1 金电极，2 工作电极，3 铁片，4 磁铁。

图 2. 差分脉冲伏安法扫描图

其中，a、b、c、d 为标准品标号。

图 3. 循环伏安法扫描图

其中，a、b、c、d 为标准品标号。

#### 具体实施方式

实施例 1 磁珠分离的 ELISA 在裸电极表面的电化学测定

采用瑞士 ROCHE 公司的“Enzymum-Test® CA 72-4”试剂盒（内附标准品，由低到高共 4 瓶，标号分别为 a、b、c、d）和“Elecsys®”试剂盒中通用的磁珠（包被有链霉亲和素）试剂，和上海科华实业有限公司的肝炎标志物检测试剂盒中底物（“SUBSTRATE A”和“SUBSTRATE B”，临用前等量混合后应用）。

电化学分析仪为上海辰华仪器公司生产的 CHI 830 电化学分析仪，使用 3 电极系统。

测量时，反应液加在反应池内，参比电极和对电极插入液面下约 2mm，分别连接至电化学分析仪。

参比电极为 Ag/AgCl 电极；对电极为铂丝电极；电解池采用材质

为厚约 1mm 的聚苯乙烯，底部为约 0.2mm 厚的矩形金片，经导线联至池外，为工作电极，反应池底下面粘固一铁片，柱形磁铁在需要时吸附其上，而无须另行固定。

取

酶结合物工作液 0.700ml

标准品 0.035ml

磁珠悬液 0.100ml

混匀，室温下反应 60 分钟，其间混匀 1-2 次。

将试管置于磁性板上，使磁珠沉积，倾去上清液，并用吸水纸吸去管口残余液滴，用含 0.05% TWEEN 20 的生理盐水同法洗涤磁珠 5 次，后用生理盐水悬浮。

用滴管将悬浮的磁珠移入电解池，将柱形磁铁置于电解池下，使磁珠沉积，吸弃生理盐水，加入底物应用液 0.500ml，立即将参比电极和对电极插入液面，开始扫描测定。

测试所用的标准品浓度是：a. 2.1 U/ml； b. 20.3 U/ml； c. 51.8 U/ml； d. 94.9 U/ml。用差分脉冲伏安法和循环伏安法均可明确加以检测和区分。

实验结果表明，本发明方法能实现磁珠分离的 ELISA 在裸电极表面的电化学测定。

图 1

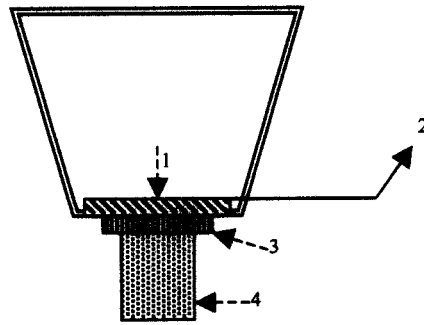


图 2

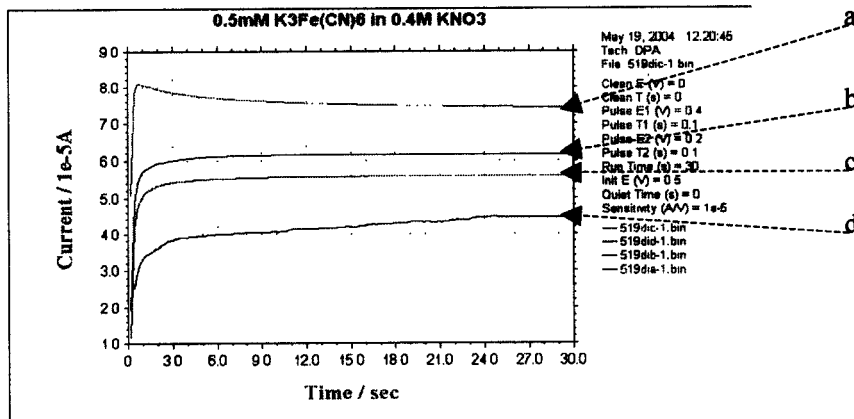
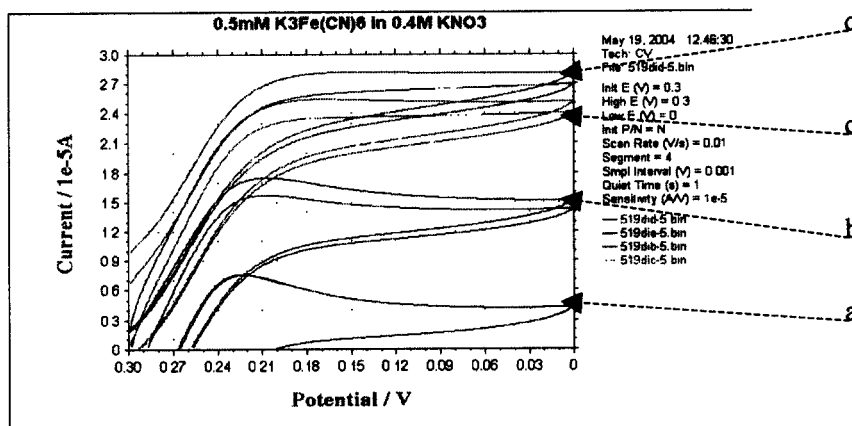


图 3.



专利名称(译)	一种酶标记免疫电化学检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1588071A</a>	公开(公告)日	2005-03-02
申请号	CN200410053802.5	申请日	2004-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	上海市胸科医院		
申请(专利权)人(译)	上海市胸科医院		
当前申请(专利权)人(译)	上海市胸科医院		
[标]发明人	于方治		
发明人	于方治		
IPC分类号	G01N27/413 G01N33/53 G01N33/546		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属电化学和临床化学分析领域，涉及一种酶标记免疫电化学检测方法，本发明利用磁性微球(珠)分离酶标记免疫反应结合物，在裸电极表面作用于酶的底物，测定电极表面电位或电流的改变，实现生物大分子物质或半抗原的定性与定量分析。本发明具有如下优点：结构简单，无需光学检测系统；裸电极从理论上无使用寿命限制；检测成本可明显降低；适于检测自动化；结合微电子和微电极技术，有广阔的应用前景。

