



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02809555.3

[43] 公开日 2004 年 6 月 23 日

[11] 公开号 CN 1507565A

[22] 申请日 2002.4.26 [21] 申请号 02809555.3  
 [30] 优先权  
 [32] 2001. 5. 10 [33] AT [31] GM370/2001  
 [86] 国际申请 PCT/AT2002/000112 2002. 4. 26  
 [87] 国际公布 WO2002/090983 德 2002. 11. 14  
 [85] 进入国家阶段日期 2003. 11. 7  
 [71] 申请人 医疗诊断系统有限责任公司  
 地址 奥地利维也纳  
 [72] 发明人 I·雷希-魏希塞尔布劳恩  
 M·肖德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
 代理人 谭明胜 徐雁漪

权利要求书 2 页 说明书 15 页

[54] 发明名称 冻干形式的定量一步免疫测定

[57] 摘要

借助于特异性结合配偶体例如抗体、抗原、受体和配体来定性和定量测定样品的免疫测定试剂盒，其中包括具有多个孔的载体或微量滴定板。所述载体或微量滴定板是用第一结合配偶体预包被的，并且结合配偶体作为冻干物施加和固定起来。此外，冻干形式的具有递增稀释度的欲测定样品的系列参照标准物在微量滴定板的一部分孔中。

ISSN 1008-4274

1. 借助于特异性结合配偶体例如抗体、抗原、受体和配体来定性和定量测定样品的免疫测定试剂盒，其中包括具有多个孔并且用第一结合配偶体预包被的载体或微量滴定板，所述结合配偶体作为冻干物以固定形式存在，其特征在于，微量滴定板的一部分孔还包含冻干形式的具有递增稀释度的欲测定样品的系列参照标准物。

2. 权利要求1的免疫测定试剂盒，其特征在于，微量滴定板的孔还含有冻干形式的第二结合配偶体，特别是第二抗体的酶-或生物素-偶联的偶联物，和—当含有生物素-偶联的偶联物时—酶。

3. 权利要求1或2的免疫测定试剂盒，其特征在于，微量滴定板的孔含有冻干形式的样品稀释培养基。

4. 权利要求1、2或3的免疫测定试剂盒，其特征在于，除了预包被的微量滴定板以外，所述测定试剂盒仅包含洗涤缓冲液、底物溶液和停止溶液。

5. 权利要求1-4任一项的免疫测定试剂盒，其特征在于，当包含生物素偶联的第二抗体偶联物时，使用链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶(HRP)作为第二试剂。

6. 权利要求1-5任一项的免疫测定试剂盒，其特征在于，所述测定试剂盒包含过氧化物酶稳定剂和/或常用的裂解保护剂例如蛋白(例如白蛋白(例如BSA)蛋白水解产物(胨、明胶等)酪蛋白)和/或聚合物(例如葡聚糖、PVA、PVP)、糖(例如蔗糖、海藻糖、乳糖、木糖醇、山梨醇、甘露醇、麦芽糖、葡萄糖、肌醇)和/或抑菌剂(例如硫柳汞、proclin)和/或酚类物质和苯胺类物质，包括具有取代基(小的烷基或Cl、Br等)的那些(例如邻甲氧基苯酚、邻甲基苯酚、对甲基苯酚、邻氨基苯酚、邻羟基苯甲酸、(邻、间或对)-羟基苯甲醇、苯胺、对氨基苯甲酸、对甲氧基苯胺、苯甲醇、苯甲酸、对硝基苯酚、苄基胺、1-苯基-1,2-乙二醇、反式-1,2-环己烷二醇、顺式-1,2-环己烷二碳酸、环己基胺)和/或疏水性化合物和/或溶剂(例如DMF、乙二醇、DMSO)和/或洗涤剂(例如吐温20)和/或芳基硼酸化合物(例如苯基硼酸、4-溴苯基硼酸、3-乙酰氨基苯基硼酸、1-萘基硼酸)和/或底物类似物(例如TMB、3-氨基苯二酰一胨)和/或多羟基化合物(例如多元醇、聚乙二醇、甘油)和/或渗透压调节因子(例如(S)-2-甲基-1,4,5,6-四氢嘧啶-

4-甲酸 [THP (B)]、(S, S)- $\beta$ -2-甲基-5-羟基-1, 2, 4, 5, 6-四氢嘧啶-4-甲酸, [THP (A)]和/或离子和/或多价离子(例如金属离子(A1、Zn、Mg、Fe、Cu等))和/或络合剂(例如EDTA)和/或氨基酸(例如甘氨酸、脯氨酸、4-羟基脯氨酸、丝氨酸、谷氨酸、丙氨酸、赖氨酸、肌氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、苯丙氨酸)和/或诸如TRIS、盐、胺、胆酸钠、蔗糖一月桂酸酯和/或2-O- $\beta$ -甘露糖甘油酸酯这样的物质

7. 权利要求1-6任一项的免疫测定试剂盒在下述方面的应用: 在研究诊断和体外诊断中的应用, 在病原体血清学中的应用, 例如用于检测HIV、HepV、EBV、CMV等的感染, 在肿瘤诊断中的应用, 例如用于检测肿瘤标志物或与肿瘤有关的蛋白、血管生成标志物、转移标志物等, 在变应学中的应用, 例如用于检测动物变应原、植物花粉、食物组成等, 在自身免疫诊断中的应用, 例如用于在ANA/ENA、糖尿病/IDDM、甲状腺抗原、自身免疫性肝炎、APS等领域检测自身抗原, 用于检测由炎性过程或感染引起的免疫病症, 例如检测细胞因子、粘着分子、趋化因子等, 用于检测激素平衡中的变化, 例如排卵检测、怀孕检测等, 在治疗监测中的应用, 例如检测治疗性抗体和抗原、有机和无机化合物, 用于检测由细胞程序死亡或坏死引起的细胞死亡和/或用于检测遗传改变和遗传病。

## 冻干形式的定量一步免疫测定

5 本发明涉及借助于特异性结合配偶体例如抗体、抗原、受体和配体来定性和定量测定样品的免疫测定试剂盒，其中包括具有多个孔并且用第一结合配偶体预包装的载体或微量滴定板，所述结合配偶体是作为冻干物以固定形式存在。

人们在常规诊断和研究诊断中使用免疫测定、酶联免疫测定、荧光标记免疫测定、发光标记免疫测定或用任何其它标记物标记的免疫测定来检测和定量测定蛋白例如抗原、配体、受体、抗体以及化合物。根据现有技术，在这样的检测试剂盒中，其中一种结合配偶体与固体载体例如聚苯乙烯平板结合，而进行检测所需的其它试剂作为检测试剂盒的单独组分加入。这些试剂通常包括作为浓缩物或冻干物以定量形式存在的欲检测的蛋白(参照标准样品)，标准培养基和样品稀释培养基，作为浓缩物或工作溶液以偶联形式(偶联物)存在的第二特异性结合配偶体，如果需要的话第二检测系统，以及对于酶标记物，检测所需的底物试剂。加入停止溶液来终止酶反应，并且可使用通常作为浓缩物存在的测定缓冲液来制备用于第二特异性结合配偶体和第二试剂的工作溶液。因为在工作步骤之间需要洗涤步骤，所以常规免疫测定试剂盒含有通常是浓缩形式的洗涤缓冲液。

市售ELISA试剂盒给用户提供了验证的检测系统。这些产品含有进行测定所需的在最佳浓度和量的所有试剂，以及关于如何进行测定的详细说明。各个反应步骤一般是连续进行。对于很多检测系统，被分析物(标准品、样品)和第二抗体与固相(鸡尾酒)的共同培养是可行的。

免疫测定的一个典型实例是夹层ELISA(酶联免疫吸附测定)。

典型地，这样的ELISA试剂盒包括下列组件：

- 用第一抗体预包装、封闭、固定的具有96个孔的微量滴定板；
- 参照物质：确定浓度的被分析物(标准品)，用于建立系列标准物；
- 30 • 酶 - (辣根过氧化物酶)或生物素 - 偶联的第二抗体；
- 如果需用的话，链霉抗生物素蛋白酶(辣根过氧化物酶)；
- 底物溶液(四亚甲基联苯胺)；

- 洗涤缓冲液：盐水溶液，用于在样品培养之前和反应步骤之间洗涤平板；
- 测定缓冲液：用于稀释第二抗体和链霉抗生物素蛋白酶浓度的盐水溶液(制备工作溶液)；
- 5 • 样品稀释培养基：特定液体培养基，用于稀释参照物质以及未知样品；
- 停止溶液，用于终止酶反应。

为了进行测定，使用者必须进行下列工作步骤：

- 制备工作溶液；
- 10 • 通过稀释参照物质建立系列标准物；
- 洗涤微量滴定板；
- 提供样品稀释培养基；
- 施加各参照稀释液(系列标准物)；
- 施加未知样品；
- 15 • 加入酶或生物素偶联的第二抗体；
- 洗涤微量滴定板；
- 任选加入链霉抗生物素蛋白酶；
- 洗涤微量滴定板；
- 加入底物；
- 20 • 加入停止溶液；
- 测定光密度。

本发明的目的是使这样的测定试剂盒容易操作，以及除了定性鉴定以外还能实现定量评定。除了减小实施这种测定所需的工作量和时间以外，本发明的目的还有通过将所需操作步骤减到最少来减小使用者出现差错的可能性。最后，本发明的目的还是通过明显减小试剂盒的重量和体积来减小包装体积和包装成本以及运输费用，和通过提供具有延长的产品保存期限的标准化基本试剂盒而使后勤容易。

为了实现该目的，本发明免疫测定试剂盒的特征在于，微量滴定板的一部分孔还包含冻干形式的具有递增稀释度的欲测定样品的系列参照标准物。由于载体或微量滴定板还包含欲测定样品的系列参照标准物，所以除了纯粹的定性分析以外，通过在连续递增的相邻标准物之间的区域里在确定的测定结果之间内推来进行定量评定和定量测定

是可行的，同时避免了在实验分析期间制备参照物质的工作溶液和各自的系列稀释物的繁重步骤。这样的免疫测定试剂盒设计不需要制备参照物质的工作溶液和向微量滴定板的孔中引入标准物稀释培养基来制备系列标准物，从而使得方法相当合理和简化，以及特别是提供了可精确重复再现的系列标准物，由此大大降低了出差错的可能性。

以特别有利的方式，可进一步加快免疫测定试剂盒的预加工，并且可以进一步减少测定样品所需的步骤。有利起见，将试剂盒的配置设计成这样，即，让微量滴定板的孔还含有冻干形式的第二结合配偶体，特别是第二抗体的酶-或生物素偶联的偶联物，和—当含有生物素偶联的偶联物时—酶。因此，除了以确定的蛋白浓度使用来定量测定欲检测蛋白的系列标准物以外，还引入了用于检测的以冻干形式存在于固相中的与一种上述标记物偶联的第二特异性结合配偶体（滴定浓度的偶联物以及任选第二试剂）和牢固结合在相上的第一结合配偶体，这些组分以冻干形式提供，即在约-30℃低温的脱水形式，其中是将反应动力学冷冻至无需担心参照物质发生预反应的程度。因为高度稀释的工作溶液以及稳定性很差的溶液不是贮存起来，而是仅在临开始测定之前通过加入溶剂或再水化来在载体上制备，所以进一步排除了可能的差错源。

为了进一步改进和进一步减少测定所需的工作步骤的数目，将试剂盒的配置设计成这样，即，让微量滴定板的孔包含冻干形式的样品稀释培养基。可在例如2℃将所需量的特定样品稀释培养基加到各自的微量滴定板孔中，同时可在相同温度下向微量滴定板的所有孔中加入第二抗体-酶偶联物或第二抗体与生物素偶联物的混合物，通过在预冷却至例如-30℃的冷冻干燥装置中通过冷冻干燥方法给装料的微量滴定板施加冷冻干燥。

为了完成测定试剂盒，这样的预装料的载体或预装料的微量滴定板只需要少量其它另外的组分，有利起见，除了预包装的微量滴定板以外，测定试剂盒仅包含洗涤缓冲液、底物溶液和停止溶液。因此，为了测定样品，仅需要通过向系列标准物的孔中以及任选的空白和样品孔中加入确定体积的蒸馏水来将微量滴定板再水合，然后加入未知的样品并培养。在已经洗涤微量滴定板，并且向用于测定的所有微量滴定板的孔中加入底物之后，经过预先确定的一段时间之后，加入停

止溶液，可直接进行测定评价。

有利地是如此设计，即，对于生物素偶联的第二抗体偶联物，使用链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶(HRP)作为第二试剂。

对于使用者来说，依据本发明的配置将测定的实施大体上减至加入未知样品以及酶反应，所有其它步骤都已经由ELISA试剂盒的制造商预先进行过了。因此，制造商用特异性第一抗体将微量滴定板包被，封闭并固定，然后将微量滴定板冷却至例如-20℃，并且制造商以确定的方式进行上述另外的步骤，即引入样品稀释剂的系列标准物以及第二抗体-酶偶联物或第二抗体-生物素偶联物与链霉抗生物素蛋白酶的混合物。所以测定的实施被减至加入欲分析的样品和基于底物的颜色评价测定。

以特别有利的方式按本发明将免疫测定试剂盒设计成这样，即，让测定试剂盒包含过氧化物酶稳定剂和/或常用的裂解保护剂(lyoprotectant)例如蛋白(例如白蛋白(例如BSA)蛋白水解产物(脲、明胶等)酪蛋白)、聚合物(例如葡聚糖、PVA、PVP)、糖(例如蔗糖、海藻糖、乳糖、木糖醇、山梨醇、甘露醇、麦芽糖、葡萄糖、肌醇)、抑菌剂(例如硫柳汞、proclin)，酚类物质和苯胺类物质，包括具有取代基(小的烷基残基或Cl、Br等)的那些(例如邻甲氧基苯酚、邻甲基苯酚、对甲基苯酚、邻氨基苯酚、邻羟基苯甲酸、(邻、间或对)-羟基苯甲醇、苯胺、对氨基苯甲酸、对甲氧基苯胺、苯甲醇、苯甲酸、对硝基苯酚、苄基胺、1-苯基-1,2-乙二醇、反式-1,2-环己烷二醇、顺式-1,2-环己烷二碳酸、环己基胺);疏水性化合物和溶剂(例如DMF、乙二醇、DMSO);洗涤剂(例如吐温20);芳基硼酸化合物(例如苯基硼酸、4-溴苯基硼酸、3-乙酰氨基苯基硼酸、1-萘基硼酸);底物类似物(例如TMB、3-氨基苯二酰一胍);多羟基化合物(例如多元醇、聚乙二醇、甘油);渗透压调节因子(Ectoins)(例如(S)-2-甲基-1,4,5,6-四氢嘧啶-4-甲酸[THP(B)]、(S,S)-β-2-甲基-5-羟基-1,2,4,5,6-四氢嘧啶-4-甲酸,[THP(A)]);离子和/或多价离子(例如金属离子(A1、Zn、Mg、Fe、Cu等));络合剂(例如EDTA);氨基酸(例如甘氨酸、脯氨酸、4-羟基脯氨酸、丝氨酸、谷氨酸、丙氨酸、赖氨酸、肌氨酸、γ-氨基丁酸、苯丙氨酸)和/或诸如TRIS、盐、胺、胆酸钠、蔗糖一月桂酸酯、2-O-β-甘露糖甘油酸酯这样的物质。

由于操作方式特别简单，本发明的免疫测定试剂盒适于很多应用选择。以特别有利的方式，这类免疫测定试剂盒的应用于：在研究诊断和体外诊断中的应用，在病原体 (Erreger) 血清学中的应用，例如用于检测HIV、HepV、EBV、CMV等的感染，在肿瘤诊断中的应用，例如用于检测肿瘤标志物或与肿瘤有关的蛋白、血管生成标志物、转移标志物等，在变应学中的应用，例如用于检测动物变应原、植物花粉、食物组成等，在自身免疫诊断中的应用，例如用于在ANA/ENA、糖尿病/IDDM、甲状腺抗原、自身免疫性肝炎、APS等领域检测自身抗原，用于检测由炎症过程或感染引起的免疫病症，例如检测细胞因子、粘着分子、趋化因子等，用于检测激素平衡中的变化，例如排卵检测、怀孕检测等，在治疗监测中的应用，例如检测治疗抗体和抗原、有机和无机化合物，用于检测由细胞程序死亡或坏死引起的细胞死亡和/或用于检测遗传改变和遗传病。

在下文中通过比较现有技术来更详细地解释本发明，现有技术称为标准试剂盒。

#### 1. ELISA 试剂盒的组成：

##### a) 直接酶偶联的偶联物

	标准试剂盒		本发明的一步试剂盒
1	抗体包被的微量滴定板	1	抗体包被的微量滴定板，包含系列标准物、样品稀释培养基、抗体偶联物
2	标准物		
3	测定缓冲液		
4	抗体偶联物		
5	样品稀释培养基		
6	洗涤缓冲液	2	洗涤缓冲液
7	底物溶液	3	底物溶液
8	停止溶液	4	停止溶液

b) 与生物素偶联的第二抗体、第二试剂链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶 (HRP) 或类似物质

	标准试剂盒		本发明的一步试剂盒
1	抗体包被的微量滴定板	1	抗体包被的微量滴定板, 包含系列标准物、样品稀释培养基、生物素化抗体、链霉抗生物素蛋白-HRP 或类似物质
2	标准物		
3	测定缓冲液		
4	生物素化抗体		
5	链霉抗生物素蛋白-HRP 或类似物质		
6	样品稀释培养基		
7	洗涤缓冲液	2	洗涤缓冲液
8	底物溶液	3	底物溶液
9	停止溶液	4	停止溶液

2. 实施测定的操作步骤:

a) 直接酶偶联的偶联物

	标准试剂盒		本发明的一步试剂盒
1	洗涤抗体包被的微量滴定板		
2	制备参照物质(标准物)的工作溶液		
3	将标准稀释培养基施加入到微量滴定板的孔中以提供系列标准物		
4	以确定浓度对标准物工作溶液进行外或内(平板内)稀释(系列标准物)		
4a	任选将标准稀释物加到相应的微量滴定板孔中		
5	将样品稀释培养基作为零值(空白)施加入到相应的微量滴定板孔中		

6	将所需体积的样品稀释培养基加到相应的微量滴定板孔中	1	再水化微量滴定板(向系列标准物、空白和样品孔中加入确定体积的蒸馏水)
7	施加未知样品	2	施加未知样品
8	制备 HRP 偶联物或类似物质的工作溶液		
9	将 HRP 偶联物(或类似物质)施加到用于测定的所有微量滴定板孔中		
10	培养	3	培养
11	洗涤微量滴定板	4	洗涤微量滴定板
12	将底物施加到用于测定的所有微量滴定板孔中		将底物施加到用于测定的所有微量滴定板孔中
13	加入停止溶液	5	加入停止溶液
14	评价测定	6	评价测定

b) 与生物素偶联的第二抗体、第二试剂链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶(HRP)或类似物质

	标准试剂盒		本发明的一步试剂盒
1	洗涤抗体包被的微量滴定板		
2	制备参照物质(标准物)的工作溶液		
3	将标准稀释培养基施加到微量滴定板的孔中以提供系列标准物		
4	以确定浓度对标准物工作溶液进行外或内(平板内)稀释(系列标准物)		
4a	任选将标准稀释物加到相应的微量滴定板孔中		
5	将样品稀释培养基作为零值(空白)施加到相应的微量滴定板孔中		

6	将所需体积的样品稀释培养基加到相应的微量滴定板孔中	1	再水化微量滴定板(向系列标准物、空白和样品孔中加入确定体积的蒸馏水)
7	施加未知样品	2	施加未知样品
8	制备生物素化抗体的工作溶液		
9	将生物素偶联物施加到用于测定的所有微量滴定板孔中		
10	培养		
11	洗涤微量滴定板		
12	制备链霉抗生物素蛋白-HRP 或类似物质的工作溶液		
13	将链霉抗生物素蛋白-HRP 或类似物质的溶液施加到用于测定的所有微量滴定板孔中		
14	培养	3	培养
15	洗涤微量滴定板	4	洗涤微量滴定板
16	将底物施加到用于测定的所有微量滴定板孔中		将底物施加到用于测定的所有微量滴定板孔中
17	加入停止溶液	5	加入停止溶液
18	评价测定	6	评价测定

5 本发明可用于通过借助于抗体偶联(夹层 ELISA)来检测抗原。同样,通过相应的抗原检测抗体也是可行的。通过各自的结合配偶体检测受体或配体是应用本发明的另一个选择,因此,可提供大量检测模式(Testformaten)。本发明的测定可特别用于检测蛋白、甾族化合物、化合物、药物、核酸和类似物质。

10 反应复合物的检测可通过借助于直接偶联的酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等),经由在第二个步骤发生的酶反应(生物素-链霉抗生物素蛋白-HRP、抗检测抗体的酶偶联的抗体等)来进行。也可以使用适用于免疫测定的任何其它标记物例如荧光染料、化学发光标记物、放射性标记物等。

用于固定第一结合配偶体的载体优选为聚苯乙烯96-孔微量滴定

板, 然而, 也可以使用适用于免疫测定的任何其它载体来进行本发明。

用于测定的所有样品可以是含有被分析物的液体样品, 更具体来说是体液例如血清、血浆制品、局部体液、全血等, 以及细胞培养物上清液、缓冲的被分析物溶液等。

5 在下文中通过具体的应用实施例来更详细地解释本发明。

应用实施例 1

用于检测人 ICAM-1 的夹层 ELISA

A) 制备包含样品稀释培养基、系列标准物、HRP 偶联物的平板

步骤 1:

10 包被:

依据现有技术, 用  $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  抗-ICAM-1 在 PBS 缓冲液中的溶液将 96-孔微量滴定板包被 ( $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ , 在  $4^\circ\text{C}$  培养过夜)。

步骤 2:

封闭:

15 吸出包被溶液, 用洗涤缓冲液 (PBS/吐温) 将平板洗涤一次。为了让聚苯乙烯表面饱和 (防止非特异性结合), 用  $300 \mu\text{l}/\text{孔}$  的 PBS/2% BSA 封闭平板 (2 小时, 室温)。

步骤 3:

固定:

20 吸出封闭溶液, 将平板洗涤 2 次, 向每个孔中加入  $150 \mu\text{l}$  PBS/15% 蔗糖。在室温培养 1 小时后, 倾析出固定溶液。将平板在空气循环干燥器中于  $28^\circ\text{C}$  干燥约 20 小时。将平板冷冻至  $-20^\circ\text{C}$ 。

步骤 4:

引入样品稀释培养基:

25 将包被的平板以冷冻状态使用。将样品稀释培养基冷却至  $2^\circ\text{C}$ 。为了建立系列标准物, 将  $100 \mu\text{l}$  样品稀释培养基加到在微量滴定板前两排的每个孔中。将  $100 \mu\text{l}$  样品稀释培养基加到用于空白测定的各个相应孔中。将  $90 \mu\text{l}$  样品稀释培养基加到用于测定未知样品的各个相应孔中。

30 步骤 5:

建立系列标准物:

在一式两份的测定中, 将参照物质 (重组的人 ICAM-1) 的工作溶液

(20 ng/ml) (2℃)加到在微量滴定板左侧最上面的两个孔中(100 μl/孔)。通过在平板中进行系列 1:2 稀释来制备系列标准物(10 ng/ml; 5 ng/ml; 2.5 ng/ml; 1.25 ng/ml; 0.63 ng/ml)。

步骤6:

5 引入 HRP 偶联物:

将 HRP 偶联物(抗-ICAM-1-HRP)的工作溶液冷却至 2℃, 迅速加到微量滴定板的所有孔中(50 μl/孔)。

步骤7:

冷冻干燥:

- 10 加入所有组分后, 立即用箔片将微量滴定板覆盖起来, 置于预先冷却至-30℃的冷冻干燥装置中。在-30℃进行冷冻干燥约20小时。从冷冻干燥装置中取出后, 立即将干燥的平板与干燥剂一起密封在铝袋中。

B) 实施测定:

- 15 将平板从铝袋中取出来。通过向每个孔中加入 150 μl 蒸馏水将系列标准物和空白再水化, 通过加入 140 μl 水将样品孔再水化。向每个样品孔中加入 10 μl 未知样品。用箔片将平板覆盖起来, 并在室温培养 1 小时。将平板洗涤 3 次, 向平板的每个孔中加入 100 μl 底物溶液。15 分钟后, 加入停止溶液(100 μl)将酶反应停止, 通过光度法评价各个孔中的颜色强度。

应用实施例 2

用于检测人白介素-10 (IL-10)的夹层 ELISA

A) 制备包含样品稀释培养基、系列标准物、生物素偶联物、链霉抗生物素蛋白-HRP 的平板

- 25 步骤 1:

包被:

依据现有技术, 用 5 μg/ml 抗-IL-10 在 PBS 缓冲液中的溶液将 96-孔微量滴定板包被(100 μl/孔, 在 4℃ 培养过夜)。

步骤 2:

- 30 封闭:

吸出包被溶液, 用洗涤缓冲液(PBS/吐温)将平板洗涤 1 次。为了让聚苯乙烯表面饱和(防止非特异性结合), 用 300 μl/孔的 PBS/2% BSA

封闭平板(2小时, 室温)。

步骤3:

固定:

5 吸出封闭溶液, 将平板洗涤2次, 向每个孔中加入150  $\mu$ l PBS/15%蔗糖。在室温培养1小时后, 倾析出固定溶液。将平板在循环空气干燥器中于28 $^{\circ}$ C干燥约20小时。将平板冷冻至-20 $^{\circ}$ C。

步骤4:

引入样品稀释培养基:

10 将包被的平板以冷冻状态使用。将样品稀释培养基冷却至2 $^{\circ}$ C。为了建立系列标准物, 将100  $\mu$ l 样品稀释培养基加到在微量滴定板前两排的每个孔中。将100  $\mu$ l 样品稀释培养基加到用于空白测定的相应孔中。将50  $\mu$ l 样品稀释培养基加到用于测定未知样品的各个孔中。

步骤5:

建立系列标准物:

15 在一式两份的测定中, 将参照物质(重组的人IL-10)的工作溶液(400 pg/ml) (2 $^{\circ}$ C)加到在微量滴定板左侧最上面的两个孔中(100  $\mu$ l/孔)。通过在平板中进行系列1:2稀释来制备系列标准物(200 - 3.1 pg/ml)。

步骤6:

20 引入生物素偶联物和链霉抗生物素蛋白-HRP:

将生物素偶联物(抗-IL-10-BT)与链霉抗生物素蛋白-HRP的混合物的工作溶液冷却至2 $^{\circ}$ C, 迅速加到微量滴定板的所有孔中(50  $\mu$ l/孔)。

步骤7:

25 冷冻干燥:

加入所有组分后, 立即用箔片将微量滴定板覆盖起来, 置于预先冷却至-30 $^{\circ}$ C的冷冻干燥装置中。在-30 $^{\circ}$ C进行冷冻干燥约20小时。从冷冻干燥装置中取出后, 立即将干燥的平板与干燥剂一起密封在铝袋中。

30 B) 实施测定:

将平板从铝袋中取出来。通过向每个孔中加入150  $\mu$ l 蒸馏水将系列标准物和空白再水化, 通过加入100  $\mu$ l 水将样品孔再水化。向每个

样品孔中加入 50  $\mu\text{l}$  未知样品。用箔片将平板覆盖起来，并在室温培养 3 小时。将平板洗涤 3 次，向平板的每个孔中加入 100  $\mu\text{l}$  底物溶液。15 分钟后，加入停止溶液 (100  $\mu\text{l}$ ) 将酶反应停止，通过光度法评价各个孔中的颜色强度。

#### 5 应用实施例 3

用于检测抗 $\alpha$ 干扰素的人抗体 (IFN $\alpha$ ) 的反向夹层 ELISA

A) 制备包含样品稀释培养基、系列标准物、HRP 偶联物的平板

步骤 1:

包被:

- 10 依据现有技术，用 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉抗生物素蛋白在 PBS 缓冲液中的溶液将 96-孔微量滴定板包被 (100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ ，在 4 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜)。

步骤 2:

特异性包被/封闭:

- 15 吸出链霉抗生物素蛋白包被溶液，用洗涤缓冲液 (PBS/吐温) 将平板洗涤 1 次。为了特异性地包被平板和让聚苯乙烯表面饱和 (防止非特异性结合)，分别用 300  $\mu\text{l}/\text{孔}$  的 IFN $\alpha$ -生物素偶联物 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，在 PBS/2% BSA 中) 包被和封闭平板 (2 小时，37 $^{\circ}\text{C}$ )。

步骤 3:

固定:

- 20 吸出包被/封闭溶液，将平板洗涤 2 次，向每个孔中加入 150  $\mu\text{l}$  PBS/15% 蔗糖。在室温培养 1 小时后，倾析出固定溶液。将平板在循环空气干燥器中于 28 $^{\circ}\text{C}$  干燥约 20 小时。将平板冷冻至 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

步骤 4:

引入样品稀释培养基:

- 25 将包被的平板以冷冻状态使用。将样品稀释培养基冷却至 2 $^{\circ}\text{C}$ 。为了建立系列标准物，将 100  $\mu\text{l}$  样品稀释培养基加到在微量滴定板前两排的每个孔中。将 100  $\mu\text{l}$  样品稀释培养基加到用于空白测定的相应孔中。将 75  $\mu\text{l}$  样品稀释培养基加到用于测定未知样品的各个孔中。

步骤 5:

- 30 建立系列标准物:

在一式两份的测定中，将参照物质 (抗人 IFN $\alpha$  抗体) 的工作溶液 (200  $\text{ng}/\text{ml}$ ) (2 $^{\circ}\text{C}$ ) 加到在微量滴定板左侧最上面的两个孔中 (100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ )。通

过在平板中进行系列 1:2 稀释来制备系列标准物 (100-1.6 ng/ml)。

步骤6:

引入 HRP 偶联物:

5 将 HRP 偶联的 IFN $\alpha$  蛋白的工作溶液冷却至 2 $^{\circ}$ C, 迅速加到微量滴定板的所有孔中 (50  $\mu$ l/孔)。

步骤7:

冷冻干燥:

10 加入所有组分后, 立即用箔片将微量滴定板覆盖起来, 置于预先冷却至-30 $^{\circ}$ C的冷冻干燥装置中。在-30 $^{\circ}$ C进行冷冻干燥约20小时。从冷冻干燥装置中取出后, 立即将干燥的平板与干燥剂一起密封在铝袋中。

B) 实施测定:

15 将平板从铝袋中取出来。通过向每个孔中加入 150  $\mu$ l 蒸馏水将系列标准物和空白再水化, 通过加入 125  $\mu$ l 水将样品孔再水化。向每个样品孔中加入 25  $\mu$ l 未知样品。用箔片将平板覆盖起来, 并在室温培养 2 小时。将平板洗涤 3 次, 向平板的每个孔中加入 100  $\mu$ l 底物溶液。15 分钟后, 加入停止溶液 (100  $\mu$ l) 将酶反应停止, 通过光度法评价各个孔中的颜色强度。

应用实施例 4

20 用于检测人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 的 BioLISA (受体-配体结合)

A) 制备包含样品稀释培养基、系列标准物、生物素偶联物、链霉抗生物素蛋白-HRP 的平板

步骤 1:

包被:

25 依据现有技术, 用 1  $\mu$ g/ml 重组 TNF 受体在 PBS 缓冲液中的溶液将 96-孔微量滴定板包被 (100  $\mu$ l/孔, 在 4 $^{\circ}$ C 培养过夜)。

步骤 2:

封闭:

30 吸出包被溶液, 用洗涤缓冲液 (PBS/吐温) 将平板洗涤 1 次。为了让聚苯乙烯表面饱和 (防止非特异性结合), 用 300  $\mu$ l/孔的 PBS/2% BSA 封闭平板 (2 小时, 室温)。

步骤 3:

**固定:**

吸出封闭溶液, 将平板洗涤 2 次, 向每个孔中加入 150  $\mu\text{l}$  PBS/15% 蔗糖。在室温培养 1 小时后, 倾析出固定溶液。将平板在循环空气干燥器中于 28 $^{\circ}\text{C}$  干燥约 20 小时。将平板冷冻至 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

5 **步骤4:****引入样品稀释培养基:**

将包被的平板以冷冻状态使用。将样品稀释培养基冷却至 2 $^{\circ}\text{C}$ 。为了建立系列标准物, 将 100  $\mu\text{l}$  样品稀释培养基加到在微量滴定板前两排的每个孔中。将 100  $\mu\text{l}$  样品稀释培养基加到用于空白测定的相应孔中。将 50  $\mu\text{l}$  样品稀释培养基加到用于测定未知样品的各个孔中。

10 **步骤 5:****建立系列标准物:**

在一式两份的测定中, 将参照物质(重组的人 TNF $\alpha$ )的工作溶液(2000  $\text{pg/ml}$ ) (2 $^{\circ}\text{C}$ )加到在微量滴定板左侧最上面的两个孔中(100  $\mu\text{l}$ /孔)。通过在平板中进行系列 1:2 稀释来制备系列标准物(1000 - 16  $\text{pg/ml}$ )。

15 **步骤6:****引入生物素偶联物和链霉抗生物素蛋白-HRP:**

将生物素偶联物(抗-TNF $\alpha$ -BT)与链霉抗生物素蛋白-HRP 的混合物的工作溶液冷却至 2 $^{\circ}\text{C}$ , 迅速加到微量滴定板的所有孔中(50  $\mu\text{l}$ /孔)。

20 **步骤7:****冷冻干燥:**

加入所有组分后, 立即用箔片将微量滴定板覆盖起来, 置于预先冷却至 -30 $^{\circ}\text{C}$  的冷冻干燥装置中。在 -30 $^{\circ}\text{C}$  进行冷冻干燥约 20 小时。从冷冻干燥装置中取出后, 立即将干燥的平板与干燥剂一起密封在铝袋中。

25 **B) 实施测定:**

将平板从铝袋中取出来。通过向每个孔中加入 150  $\mu\text{l}$  蒸馏水将系列标准物和空白再水化, 通过加入 100  $\mu\text{l}$  水将样品孔再水化。向每个样品孔中加入 50  $\mu\text{l}$  未知样品。用箔片将平板覆盖起来, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。将平板洗涤 3 次, 向平板的每个孔中加入 100  $\mu\text{l}$  底物溶液。

---

15 分钟后，加入停止溶液 (100  $\mu$ l) 将酶反应停止，通过光度法评价各个孔中的颜色强度。

专利名称(译)	冻干形式的定量一步免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">CN1507565A</a>	公开(公告)日	2004-06-23
申请号	CN02809555.3	申请日	2002-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	医疗诊断系统有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	医疗诊断系统有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	医疗诊断系统有限责任公司		
[标]发明人	I雷希 魏希塞尔布劳恩 M肖德		
发明人	I· 雷希 - 魏希塞尔布劳恩 M· 肖德		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/54353 G01N33/54393		
代理人(译)	谭明胜		
优先权	2001037020U 2001-05-10 AT		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

借助于特异性结合配偶体例如抗体、抗原、受体和配体来定性和定量测定样品的免疫测定试剂盒，其中包括具有多个孔的载体或微量滴定板。所述载体或微量滴定板是用第一结合配偶体预包被的，并且结合配偶体作为冻干物施加和固定起来。此外，冻干形式的具有递增稀释度的欲测定样品的系列参照标准物在微量滴定板的一部分孔中。

#### a) 直接酶偶联的偶联物

	标准试剂盒	本发明的一步试剂盒
1	抗体包被的微量滴定板	1 抗体包被的微量滴定板，包含系列标准物、样品稀释培养基、抗体偶联物
2	标准物	
3	测定缓冲液	
4	抗体偶联物	
5	样品稀释培养基	
6	洗涤缓冲液	2 洗涤缓冲液
7	底物溶液	3 底物溶液
8	停止溶液	4 停止溶液