

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410051944.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2006年4月26日

[11] 公开号 CN 1763532A

[22] 申请日 2004.10.19

[21] 申请号 200410051944.8

[71] 申请人 深圳依诺金生物科技有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区高新中一道深圳高新区生物孵化器大楼1-204

[72] 发明人 曹雯雯 梁培华 丁野青 杜纲国
魏球英

[74] 专利代理机构 深圳睿智专利事务所

代理人 周惠来

权利要求书2页 说明书11页

[54] 发明名称

任意组合式多项目并行免疫检测方法及其所用试剂盒

[57] 摘要

一种任意组合式多项目并行免疫检测方法，包括步骤：用同一抗体固相化在微孔板/条的至少两个微孔上；加入待检测标本，各微孔的待检测标本和/或检测项目可不同；加入检测抗原，各检测抗原均带有相同的特定标记；加入抗体示踪物结合物，该结合物能与所述特定标记结合；依据所述检测抗原、待检测标本以及抗体示踪物结合物与预包被板/条的结合情况，进行各个检测项目的定量分析/定性判断。一种试剂盒，包括：其上至少两个微孔固相化有同一抗体的预包被板/条，以及能够与检测过程所用各种检测抗原所共有的特定标记相结合的抗体示踪物结合物。采用本检测方法及试剂盒，降低了生产难度及成本，提高了使用的方便性、灵活性以及选择性。

- 1、一种任意组合式多项目并行免疫检测方法，其特征在于，包括步骤：
 - a、用同一抗体固相化在微孔板/条的至少两个微孔上；
 - b、加入待检测标本，一个微孔对应一个检测项目，各微孔中加入的待检测标本可不同，而各微孔的检测项目也可不同；
 - c、加入检测抗原，它是一种基因工程表达抗原/人工合成抗原，一个检测项目对应一种检测抗原，但各种检测抗原均带有相同的特定标记；
 - d、加入抗体示踪物结合物，该结合物具备与所述特定标记结合的能力；
 - e、依据所述检测抗原、待检测标本以及抗体示踪物结合物与预包被板/条的结合情况，进行各个检测项目的定量分析/定性判断。
- 2、如权利要求1所述的任意组合式多项目并行免疫检测方法，其特征在于：

所述用于固相化的同一抗体指抗抗体。
- 3、如权利要求1所述的任意组合式多项目并行免疫检测方法，其特征在于：

所述特定标记是指在基因工程表达抗原/人工合成抗原上存在的肽、多肽或蛋白。
- 4、如权利要求3所述的任意组合式多项目并行免疫检测方法，其特征在于：

所述特定标记，是指 His、SOD、GST 或 Pre-S1。
- 5、如权利要求3所述的任意组合式多项目并行免疫检测方法，其特征在于：

所述免疫检测方法包括酶免疫检测，时间分辨荧光免疫分析和化学发光检测；并且针对酶免疫检测方法，所述抗体示踪物结合物是指用辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶标记的抗体；

针对时间分辨荧光免疫分析法，所述抗体示踪物结合物是指用镧、钆系元素标记的抗体；

针对化学发光检测方法，所述抗体示踪物结合物是指用鲁米诺及其衍生物或吡啶酯类发光标记物标记的抗体。
- 6、如权利要求1至5所述的任一任意组合式多项目并行免疫检测方法，其特征在于：

所述待检测标本指人体血清/体液，而检测项目包括对至少两项不同抗体的检测。
- 7、一种用以实现权利要求1所述方法的试剂盒，其特征在于，包括：

其上至少两个微孔固相化有同一抗体的预包被板/条；以及

能够与检测过程所用各种检测抗原所共有的特定标记相结合的抗体示踪物结合物。
- 8、如权利要求7所述方法的试剂盒，其特征在于，还包括：

阴性质控，它是指不含待测物的与标本同质的样品；和/或

阳性质控，它是指至少含有一种与待测物相同/同类的、稀释或未稀释的样品。

9、如权利要求7所述的试剂盒，其特征在于，还包括：

溶液 A，用来配合所述抗体示踪物结合物，给出特定项目的定量分析/定性判断指示；
和/或 溶液 B，用来分离未与微孔板/条结合者；和/或 溶液 C，用来把抗体示踪物结合物和抗原、抗体配制成工作液；和/或 溶液 D，用来稀释标本。

10、如权利要求7至9所述的任一试剂盒，其特征在于：

所述待检测标本指人体血清/体液，而检测项目包括对至少两项不同抗体的检测；所述特定标记为 His、GST 或 PreS1，所述抗体示踪物结合物指用辣根过氧化酶或碱性磷酸酶标记的 His、GST 或 PreS1 抗体。

任意组合式多项目并行免疫检测方法及其所用试剂盒

技术领域

本发明涉及生物物质的测试和分析方法及所用物质，尤其涉及生物物质的免疫检测方法及其所用试剂盒。

背景技术

免疫标记技术检测方法是指用酶、化学(或生物)发光剂、荧光素、放射性核素、铁蛋白及胶体金等作为示踪物，对抗体或抗原标记后进行的抗原抗体反应，借助于酶标检测仪、发光测定仪、荧光显微镜、射线测量仪等精密仪器，对实验结果进行观察或进行自动化测定，可用于测定蛋白质、激素、抗生素、药物、病原体等多种抗原和抗体。常用的固相免疫检测方法有酶标记免疫检测方法、化学发光检测方法和时间分辨荧光免疫分析法等。酶免疫检测通常又称为 ELISA (Enzymelinked Immuosorbent Assay, 酶联免疫吸附测定)，其基础是抗原/抗体固相化以及抗原/抗体的酶标记，在测定过程中，待测标本(需要测定其中的特定抗原/抗体)与固相载体表面的抗原/抗体起反应，之后用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开，再加入酶标记的抗原/抗体，通过反应而结合在固相载体上，最后保留固相载体上的酶量与标本中受检物质的量之间有一定的比例关系，加上酶反应的底物后，底物被酶催化成有色产物，从而根据呈色情况可以实现对受检物质的定性或定量分析，根据试剂的来源和标本的情况以及检测的具体条件，可以设计多种检测方法，常用的有：夹心法、间接法、竞争法、捕获夹心法。

伴随免疫检测方法的广泛应用，对检测过程的方便、快速、灵敏以及降低生产检测成本的要求日益高涨，也有多种多样的技术方案被提出来，如中国专利 ZL00120798 公开的一种高信息量免疫检测方法及其专用检测板，采用在一块板上的不同微孔中分别包被上不同的抗原/抗体来实现多项目的同时检测，中国专利 ZL99114528 公开的一种酶免疫试剂盒，可以实现一次同时检出 4 中 TORCH 病原体的 IgM，中国专利申请 00123730 公开的一种抗体酶免联检试剂盒，采用抗人 IgM 抗体包被板，TORCH 多项组合抗原和多项组合酶标记物来实现 TORCH IgM 抗体的联合检测，美国专利 US2004171087 公开的一种免疫试剂盒，可用来简化整个检测所采用的试剂种类以及所需的检测步骤。这些现有技术，基本上都必须采用不同的抗体/抗原进行包被，采用不同的抗体/抗原酶结合物，或增加了生产难度、生产成本，或使用时无法根据情况选择检测项目，失去了灵活性：即在给定的试剂盒上用户无法根据实际情况进行检测项目的选择。

另一方面,在使待测生物物质上带上预先设计的一TAG(特定标签),然后通过针对该TAG的特定检测物质,即从标本中把特定的待测生物物质给检测出来,该项技术在一些具有商业价值的采用基因工程技术制备特殊蛋白/肽方面得到了广泛应用,如美国专利申请US20040180380中公开了TAG,以及它在蛋白修饰分析方面的使用方法。

但是,如何应用基本试剂把免疫检测方法与TAG技术结合起来,提高生物物质的检测效率、降低检测成本,即从生产者的角度来讲,可以更简便地、更多种类地(不仅有检测抗体类还有检测抗原类)生产检测用试剂盒,从使用者的角度来讲,可以方便、灵活、多选择地完成检测任务,是本方法及试剂盒特别之处。

发明内容

本发明的目的在于,在免疫检测方法中运用共用的基本试剂,降低生产难度及成本,提高使用的方便性、灵活性以及检测效率,实现任意组合的多项目并行检测。

本发明所述多项目并行检测是指多个检测项目通过一个检测过程完成,所述任意组合式是指在限定的多个检测项目上,可选择一项或多项以及多项排列方式。

本发明实现以上目的所采用的具体技术方案包括,提出一种任意组合式多项目并行免疫检测方法,包括步骤:

- a、用同一抗体固相化在微孔板/条的至少两个微孔上;
- b、加入待检测标本,一个微孔对应一个检测项目,各微孔中加入的待检测标本可以不同,而各微孔的检测项目也可以不同;
- c、加入检测抗原,它是一种基因工程表达抗原/人工合成抗原,一个检测项目对应一种检测抗原,但各种检测抗原均带有相同的特定标记;
- d、加入抗体示踪物结合物,该结合物具备与所述特定标记结合的能力;
- e、依据所述检测抗原、待检测标本以及抗体示踪物结合物与预包被板/条的结合情况,进行各个检测项目的定量分析/定性判断。

所述用于固相化的同一抗体指抗抗体。

所述特定标记是指在基因工程表达抗原/人工合成抗原上存在的肽、多肽或蛋白。

所述特定标记,是指His、SOD、GST或Pre-S1。

所述免疫检测方法包括酶免疫检测,时间分辨荧光免疫分析和化学发光检测;并且

针对酶免疫检测方法,所述抗体示踪物结合物是指用辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶标记的抗体;

针对时间分辨荧光免疫分析法,所述抗体示踪物结合物是指用镧、钆系元素标记的抗体;

针对化学发光检测方法，所述抗体示踪物结合物是指用鲁米诺及其衍生物或吡啶酯类发光标记物标记的抗体。

特别地，所述待检测标本指人体血清/体液，而检测项目包括对至少两项不同抗体的检测。

本发明实现以上目的所采用的具体技术方案还包括，生产制造一种用来帮助实现上述任意组合式多项目并行免疫检测方法的试剂盒，它包括：其上至少两个微孔固相化有同一抗体的预包被板/条；以及能够与检测过程所用各种检测抗原所共有的特定标记相结合的抗体示踪物结合物。

还包括：阴性质控，它是指不含待测物的与标本同质的样品；和/或

阳性质控，它是指至少含有一种与待测物相同/同类的、稀释或未稀释的样品；和/或

溶液 A，用来配合所述抗体示踪物结合物，给出特定项目的定量分析/定性判断指示；和/或

溶液 B，用来分离未与微孔板/条结合者；和/或

溶液 C，用来把抗体示踪物结合物配制成工作液。

特别地，所述待检测标本指人体血清/体液，而检测项目包括对至少两项不同抗体的检测；所述特定标记为 His、GST、PreS1，所述抗体示踪物结合物指用辣根过氧化酶或碱性磷酸酶或葡萄糖氧化酶标记过的 His、GST、PreS1 抗体。

同现有技术相比，采用本发明的任意组合式多项目并行免疫检测方法及其所用试剂盒，为降低生产难度及成本，提高使用的方便性、灵活性以及检测效率提供了可能。

具体实施方式

以下对本发明予以详尽说明。

本发明的任意组合式多项目并行免疫检测方法，通过在微孔反应板或条的全部/多个微孔固相化上相同的配体，该配体可与后续的抗原、抗体、受体等发生反应，经过配体之间反应后，加入检测抗原，该检测抗原带有一段肽或蛋白，用可与该肽或蛋白发生结合反应的物质标记上可用于信号检测的标记物，该标记物可直接或加入相应的溶液后进行信号检测和收集。

本发明方法，可在相同的反应板或条上加入不同的一种试剂如检测不同的 IgM 抗体或加入二种不同的试剂如检测不同的抗原，以降低制备试剂的难度及成本，增加检测通量和用户使用的灵活性和可选择性。

实施例一

以现有技术的捕获法测定人血清 TORCH（弓形虫、风疹病毒、单疱 I 型病毒、单疱 II 型病毒、巨细胞病毒）IgM 抗体：

一、试剂盒的制备

制备风疹 IgM 抗体试剂盒，包括：1、预包被微孔板 2、风疹抗原工作液 3、抗风疹抗体-辣根酶标记物工作液 4、阴性对照 5、阳性对照 6、底物液 A 7、底物液 B 8、终止液 9、洗涤液 10、稀释液，下面对上述各成分的制备予以分别说明：

1、预包被微孔板（抗 u 微孔板）

包被：用 PH9.0-9.6 的碳酸缓冲液稀释抗 u 抗体，0.1-10ug/ml，100ul/孔，4℃16-24hr，甩去液体，拍干；

封闭：含 1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液，100ul/孔，4℃16-24hr，甩去液体，拍干；

干燥：37 度 4-24 小时。

2、风疹抗原工作液制备：按棋盘滴定方法选择最佳抗原浓度，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液稀释，抗原可以是提取的，也可以是人工的。

3、抗风疹抗体辣根酶标记物工作液：按棋盘滴定方法选择最佳标记物浓度，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液稀释。

4、阳性对照：风疹病毒 IgM 抗体阳性血清用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白的稀释液稀释。

5、阴性对照：HbsAg (-)，抗-HIV (-)，抗-HCV (-) 的正常人血清，风疹病毒 IgM 抗体阴性，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白的稀释液稀释。

6、底物液 A：0.05%H₂O₂ 的枸橼酸缓冲液，PH4.5-5.5。

7、底物液 B：0.1-1ug/LTMB 枸橼酸-乙酸钠缓冲液，PH3.0-4.0。

8、终止液：2N H₂SO₄ 或 HCl 或 NaOH 溶液。

9、洗涤液：0.5%T-20 的磷酸盐缓冲液。

10、稀释液：1%-2%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

制备弓形虫、单疱 I 型病毒、单疱 II 型病毒、巨细胞病毒 IgM 抗体试剂盒，只需将上述关于风疹的描述改为弓形虫、单疱 I 型病毒、单疱 II 型病毒、巨细胞病毒，其它同上，不再赘述。

二、使用试剂盒进行检测的过程

风疹 IgM 抗体试剂盒使用方法：

1、加样：标本用稀释液 1:1000 稀释，100ul/孔，加阴阳性对照各 2 孔 100ul/孔，37℃，1hr。

2、洗板：加洗涤液，300ul/孔，静止 1 分钟，甩去。如此四遍。

3、加风疹抗原工作液和抗风疹抗体辣根酶标记物工作液：风疹抗原工作液 50ul/孔，抗风疹抗体辣根酶标记物 50ul/孔，37℃，1hr

4、洗板同 2

- 5、显色：加底物液 A50u1/孔，底物液 B50u1/孔 37℃, 10 分钟
- 6、加终止液：50u1/孔
- 7、酶标仪判读或肉眼观察。

弓形虫、单疱 I 型病毒、单疱 II 型病毒、巨细胞病毒 IgM 抗体试剂盒使用方法，只需将上述关于风疹的描述改为弓形虫、单疱 I 型病毒、单疱 II 型病毒、巨细胞病毒，其它同上，不再赘述。

由于不同 IgM 试剂盒不得交叉使用，TORCH 五项需测定 5 次，使用 5 个不同的试剂盒。

实施例二

以本发明方法测定人血清 TORCH (弓形虫、风疹病毒、单疱 I 型病毒、单疱 II 型病毒、巨细胞病毒) IgM 抗体：

一、试剂盒的制备

制备 TORCH IgM 抗体试剂盒，包括：1、预包被微孔板 2、检测抗原工作液：a, 风疹抗原工作液 b, 弓形虫抗原工作液 c, 单疱 I 型病毒抗原工作液 d, 单疱 II 型病毒抗原工作液 e, 巨细胞病毒抗原工作液 3、抗 His-辣根酶标记物工作液 4、阴性质控 5、阳性质控 6、底物液 A 7、底物液 B 8、终止液 9、洗涤液 10、稀释液 11、阳性对照。

- 1、预包被微孔板 (抗 u 微孔板)：与实施例一中所述相同。
- 2、检测抗原工作液：选择最佳的 TORCH 五项中各抗原浓度，这些抗原每种都带有 6-His，并分别用含有小牛血清或牛血清白蛋白的稀释液稀释。
- 3、抗 His-辣根酶标记物工作液：选择最佳的抗-His-辣根过氧化酶浓度，并用含小牛血清或牛血清白蛋白的稀释液稀释。
- 4、阴性质控：HbsAg (-)，抗-HIV (-)，抗-HCV (-) 的正常人血清，风疹病毒 IgM 抗体、弓形虫、单疱 I 型病毒、单疱 II 型病毒、巨细胞病毒 IgM 抗体阴性血清，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白的稀释液稀释，混合。
- 5、阳性质控 1：抗-HBV-IgM (+) 人血清，取一定的量加入 HBV 核心抗原 (该抗原带有 His Tag) 5-10 倍摩尔浓度，4 度结合 16 小时，滴定出合适浓度，用含有小牛血清或牛血清白蛋白稀释液稀释。
- 6、阳性质控 2：风疹病毒 IgM 抗体、弓形虫、单疱 I 型病毒、单疱 II 型病毒、巨细胞病毒 IgM 抗体阳性血清，滴定出合适浓度，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白的稀释液稀释，混合。
- 7、底物液 A：与实施例一中所述相同。
- 8、底物液 B：与实施例一中所述相同。

- 9、终止液：与实施例一中所述相同。
- 10、清洗液：与实施例一中所述相同。
- 11、稀释液：与实施例一中所述相同。

二、使用试剂盒进行检测的过程

测定一份标本 TORCH 五项：

- 1、标记：取微孔板标记，如第 1 孔巨细胞病毒、第 2 孔风疹病毒、第 3 孔弓形虫、第 4 孔单疱 I、第 5 孔单疱 II。
- 2、加样：标本用稀释液 1: 1000 稀释，100ul/孔，加阴阳性质控各 2 孔 100ul/孔，37℃1hr。
- 3、洗板：与实施例一中所述相同。
- 4、加检测抗原工作液和抗 His-辣根酶标记物工作液：第 1 孔、第 2 孔、第 3 孔、第 4 孔、第 5 孔分别加入巨细胞病毒检测抗原、风疹病毒检测抗原、弓形虫检测抗原、单疱 I 型、单疱 II 型病毒检测抗原，较纯的抗原 50ul/孔后加入抗-His 的辣根酶标记物 37℃1hr，不太纯的抗原可 100ul/孔 37℃1hr 洗板同前，再加抗-His 的辣根酶标记物 100ul/孔 37℃1hr。
- 5、洗板：与实施例一中所述相同。
- 6、加显色液 A、B：与实施例一中所述相同。
- 7、加终止液：见原方法
- 8、酶标仪判读或肉眼观察

只要改变加入的带 His 的检测抗原，就可以检测多种多样的 IgM 抗体，并可同时检测。

抗 His 抗体制备及过氧化物酶标记属于现有成熟之技术，具体可参见由湖北科学技术出版社出版的“现代免疫学实验技术”其出版号为 ISBN 7-5352-2093-2，不再赘述。

实施例三

以现有技术测人分泌物肺炎衣原体、沙眼衣原体、肺炎支原体 IgA 抗体

一、试剂盒的制备：测人分泌物肺炎衣原体 IgA 抗体试剂盒包括 1、预包被微孔板 2、抗人 IgA 抗体辣根酶标记物工作液 4、阴性对照 5、阳性对照 6、底物液 A 7、底物液 B 8、终止液 9、洗涤液 10、稀释液，下面对上述各成分的制备予以分别说明：

- 1、预包被微孔板肺炎衣原体抗原：与实施例一中所述相同。
- 2、抗人 IgA 抗体辣根酶标记物工作液：按棋盘滴定方法选择最佳标记物浓度，并分别用含有小牛血清或牛血清白蛋白的稀释液稀释
- 3、阳性对照：肺炎衣原体 IgA 抗体阳性分泌物用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白的稀释液稀释。

- 4、阴性对照：肺炎衣原体 IgA 抗体阴性分泌物，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白的稀释液稀释。
- 5、底物液 A：与实施例一中所述相同。
- 6、底物液 B：与实施例一中所述相同。
- 7、终止液：与实施例一中所述相同。
- 8、清洗液：与实施例一中所述相同。
- 9、稀释液：与实施例一中所述相同。

制备沙眼衣原体、肺炎支原体 IgA 抗体，只需将上述关于肺炎衣原体的描述改为沙眼衣原体、肺炎支原体，其它同上，不再赘述。

二、试剂盒的使用

- 1、加样：标本用稀释液 1: 10 稀释，100ul/孔，加阴阳性对照各 2 孔，100ul/孔，37℃, 1hr。
- 2、洗板：与实施例一中所述相同。
- 3、抗人 IgA 抗体辣根酶标记物工作液：100ul/孔，37℃, 1hr
- 4、洗板同 2
- 5、显色：加底物液 A50ul/孔，底物液 B50ul/孔 37℃, 10 分钟
- 6、加终止液：50ul/孔
- 7、酶标仪判读或肉眼观察。

沙眼衣原体、肺炎支原体 IgA 抗体试剂盒使用方法，只需将上述关于肺炎衣原体的描述改为沙眼衣原体、肺炎支原体，其它同上，不再赘述。

实施例四

采用本发明方法，运用时间分辨荧光技术，测人分泌物肺炎衣原体、沙眼衣原体、肺炎支原体 IgA 抗体，

一、试剂盒的制备

- 1、预包被微孔板包被抗人 IgA 抗体，
- 2、检测抗原工作液：选择最佳的肺炎衣原体、沙眼衣原体、肺炎支原体各表达抗原浓度，这些抗原每种都带有 GST，并分别用含有小牛血清或牛血清白蛋白的稀释液稀释
- 3、抗 GST-Eu3+标记物工作液：选择最佳的抗 GST- Eu3+标记物浓度，并用含 0.2%BSA，0.9% NaCl 的 50mmol/L pH7.5 Tris-HCl 的稀释液稀释。
- 4、阴性质控：HbsAg (-)，抗-HIV (-)，抗-HCV (-) 的正常人唾液，肺炎衣原体、沙眼衣原体、肺炎支原体 IgA 抗体阴性分泌物，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白的稀释液稀释，

混合。

5、阳性质控 1: 抗沙眼衣原体 IgA(+)样品,取一定的量加入沙眼衣原体(该抗原带有 GST Tag)1-2 倍摩尔浓度,4 度结合 16 小时,滴定出合适浓度,用含有小牛血清或牛血清白蛋白稀释液稀释

6、阳性质控 2: 肺炎衣原体、沙眼衣原体、肺炎支原体 IgA 抗体阳性分泌物分别用含有 25% 小牛血清或 2%牛血清白蛋白的稀释液稀释,混合。

7、洗涤液: 0.5%T-20 的磷酸盐缓冲液

8、荧光增强液: 取磷酸二甲酸氢钾 1.3g,三辛基磷化氢的氧化物(TOPO) 19.33mg, 2-萘酰三氟丙酮(2-NTA) 6mg, 冰醋酸 6ml, Triton X-100 1ml, 加重蒸馏水 800ml, 微温至溶后加重蒸馏水至 1000ml, Ph2.8-3.5。

注: 3 种带有 GST 标记的检测抗原的制备: 扩增 3 种抗原的基因片段,分别克隆入 Amrad 公司出品的 pGEX 中,分别表达带有 GST 标记的 3 种检测抗原, GST 蛋白的表达与纯化具体可参见科学出版社出版的“精编分子生物学实验指南” ISBN 7-03-006408-9; 抗 GST 抗体制备: 具体可参见湖北科学技术出版社出版的“现代免疫学实验技术” PP23-38; 而抗体-Eu3+标记物制备: 具体可参见湖北科学技术出版社出版的“现代免疫学实验技术” P133。

二、试剂盒的使用

- 1、标记: 取微孔板标记,如第 1 孔肺炎衣原体、第 2 孔沙眼衣原体、第 3 孔肺炎支原体。
- 2、加样: 标本用稀释液 1: 10 稀释,100u1/孔,加阴阳性质控各 2 孔 100u1/孔, 室温 2hr。
- 3、洗板: 与实施例一中所述相同。
- 4、加检测抗原工作液和抗 GST-Eu3+标记物工作液: 第 1 孔、第 2 孔、第 3 孔分别加入肺炎衣原体、沙眼衣原体、肺炎支原体检测抗原工作液,较纯的抗原 50u1/孔后加入抗 GST-Eu3+标记物,室温 2hr,不太纯的抗原可 100u1/孔室温 2hr 洗板同前,再加抗 GST-Eu3+标记物工作液 100u1/孔室温 2hr。
- 5、洗板: 与实施例一中所述相同。
- 6、每孔荧光增强液 200u1,缓慢震荡 5min,用时间分辨荧光仪测量荧光强度,每孔测定 1 秒。

实施例五

以现有技术化学发光法测定人血清 Pre-s1 抗原和 Pre-s2 抗原

一、试剂盒的制备

制备检测 Pre-s1 试剂盒,包括: 1、预包被微孔板 2、AMPPD 标记物 3、阴性对照 4、阳性对照 5、底物液 6、洗涤液。

- 1、Pre-s1 预包被微孔板：用抗 Pre-s1 代替抗 u 抗体，其余见模式 1 原方法中的预包被微孔板制备
- 2、抗 Pre-s1-AMPPD 标记物：抗 Pre-s1 的 AMPPD 标记物，按棋盘滴定方法选择最佳标记物浓度，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液稀释
- 3、阴性对照：HbsAg (-)，抗-HIV (-)，抗-HCV (-) 的正常人血清
- 4、阳性对照：阳性血清标本用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液稀释而成
- 5、底物液：含 0.05% H_2O_2 ，pH10 的 0.2M NaOH 溶液
- 5、清洗液：0.05M Tris-HCl , 0.5%T-20

制备检测 Pre-s2 试剂盒，包括：1、预包被微孔板 2、抗 Pre-s2 -AMPPD 标记物 3、阴性对照 4、阳性对照 5、底物液 6、洗涤液。

- 1、Pre-s2 预包被微孔板：用抗 Pre-s2 代替抗 u 抗体，其余见模式 1 原方法中的预包被微孔板制备。
- 2、抗 Pre-s2 -AMPPD 标记物：抗 HBeAg 的 AMPPD 标记物，按棋盘滴定方法选择最佳标记物浓度，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液稀释。
- 3、阴性对照：HbsAg (-)，抗-HIV (-)，抗-HCV (-) 的正常人血清。
- 4、阳性对照：阳性血清标本用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液稀释而成。
- 6、底物液：含 0.05% H_2O_2 ，pH10 的 0.2M NaOH 溶液。
- 7、清洗液：0.05M Tris-HCl , 0.5%T-20。

二、试剂盒的使用

测定 Pre-S1

- 1、加样：取 Pre-s1 预包被微孔板，加样品 50ul/孔，阴阳性对照各 2 孔 50ul/孔，
- 2、加抗 Pre-s1 AMPPD 标记物：50ul /孔，37℃1hr
- 3、洗板：与实施例一中所述相同。
- 4、底物液 100ul,10min。化学发光测定仪测定。

测定 Pre-s2 抗原

- 1、加样：取 Pre-s2 预包被微孔板，加样品 50ul/孔，阴阳性对照各 2 孔 50ul/孔，
- 2、加抗 Pre-s2 酶标记物：50ul /孔，37℃1hr
- 3、洗板：与实施例一中所述相同。
- 4、底物液 100ul,10min。化学发光测定仪测定。

实施例六

以本发明方法，采用化学发光技术，测定人血清 Pre-s1 抗原和 Pre-s2 抗原

一、试剂盒的制备

包括：1、预包被微孔板 2、鼠抗 Pre-S1 单克隆抗体工作液 3、鼠抗 Pre-s2 单克隆抗体工作液 4、Pre-S1—His + Pre-s2—His 检测抗原 工作液 5、抗 His-AMPPD 工作液 6、阴性质控 7、阳性质控 8、底物液 9、洗涤液。

- 1、预包被微孔板：用羊抗鼠抗体代替抗 u 抗体，其余与实施例一中所述相同。
- 2、鼠抗 Pre-S1 单克隆抗体工作液：选择最佳浓度，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液稀释。
- 3、鼠抗 Pre-s2 单克隆抗体工作液：选择最佳浓度，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液稀释。
- 4、Pre-S1—His + Pre-s2—His 检测抗原工作液：选择最佳 Pre-S1—His 和 Pre-s2—His 浓度，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液稀释，混合。
- 5、抗 His-AMPPD 工作液，抗体 AMPPD 标记物制备采用 N-羟基琥珀酰亚胺法进行标记。并按棋盘滴定方法选择最佳浓度，用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液稀释。
- 6、阴性质控：HbsAg (-)，抗-HIV (-)，抗-HCV (-) 的正常人血清。
- 7、阳性质控：用 Pre-S1 和 Pre-s2 阳性血用含有 25%小牛血清或 2%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液稀释。
- 8、洗涤液：0.05M Tris-HCl , 0.5%T-20。
- 9、底物液：含 0.05% H_2O_2 ，pH10 的 0.2M NaOH 溶液。

二、试剂盒的使用

1. 标记：取羊抗鼠抗体预包被微孔板，标记测 Pre-S1 和测 Pre-s2 孔做上不同的记号
2. 加抗体：测 Pre-S1 和测 Pre-S2 孔分别加入抗-Pre-S1 和抗-Pre-S2 鼠单克隆抗体，37℃ 1hr。
3. 洗板：与实施例一中所述相同。
4. 加样：每孔加 50ul 标本，加 50ul Pre-S1—His + Pre-s2—His 检测抗原工作液，37℃ 1hr 。
3. 洗板：与实施例一中所述相同。
4. 加抗 His-AMPPD 标记物工作液：每孔加 100ul 37℃ 1hr
5. 洗板：与实施例一中所述相同。
6. 底物液 100ul, 10min。化学发光法测定仪测定。

实施例七

带有 his 标记的 HPV6b L1 检测抗原的制备

- 1、扩增带有 EcoR I 和 BamH I 酶切位点的 HPV6b L1 基因片段: 50ul 反应体积, HPV6b 模板 1ng, P1、P2 引物各 0.5umol/L (R: 5'-CGG AAT TCT TAC CTT TTA GTT TTG GCG C-3' L: 5'-CGG GAT CCT GGC GGC CTA GCG ACA GCA C-3'), Taq DNA 聚合酶 1U, 10mmol/L dNTP 贮备液 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 10mmol/L), PCR 缓冲液 (50mmol KCl、4mmol/L MgCl₂、10mmol/L Tris-HCl、pH 8.5), 加入 H₂O 至 50 ul 反应体积, 加入 50 μl 石蜡油, 将反应管置 PCR 扩增仪上, 95℃ 变性 1min, 循环参数为 95℃ 60s, 55℃ 60s, 72℃ 60s 循环 30 次, 最后 72℃ 延伸 2min。
- 2、酶切基因片段和酶切 Prset (Prset 是带有 His 标记的载体): A: 0.2ug 纯化的 HPV6b L1 基因片段, 2u EcoR I 和 2u BamH I, 1ul 10x 缓冲液, 10ul 反应体积, 37℃ 10 min。 B: 0.5ug pRSET 载体, 2u EcoR I 和 2u BamH I, 1ul 10x 缓冲液, 10ul 反应体积, 37℃ 10 min。
- 3、酶切基因片段与 pRSET 载体连接, 1u T4DNA 连接酶, 1ul 10x 连接缓冲液, 0.1ug 酶切基因片段+1/2 摩尔的酶切 pRSET 载体, 16℃ 12hr。
- 4、转化感受态细菌, 表达带有 his 标记的 HPV6b L1 蛋白及纯化见 Invitrogen Corporation 的 Xpress System: Protein Expression pRSET 和 Protein Purification。

以上所述之最佳实施例意在具体说明本发明的思路: 用同一抗体进行至少两个微孔的预包被, 用带同一特定标记的检测抗原, 用同一抗体示踪物结合物来实现多项目检测的并行处理。本发明之实施, 并不限于以上最佳实施例所公开的方式, 凡基于本发明之设计思路, 进行简单推演与替换, 得到的具体的任意组合式多项目并行免疫检测方法及其所用试剂盒, 都属于本发明的实施。

专利名称(译)	任意组合式多项目并行免疫检测方法及其所用试剂盒		
公开(公告)号	CN1763532A	公开(公告)日	2006-04-26
申请号	CN200410051944.8	申请日	2004-10-19
[标]发明人	曹雯雯 梁培华 丁野青 杜纲国 魏球英		
发明人	曹雯雯 梁培华 丁野青 杜纲国 魏球英		
IPC分类号	G01N33/547 G01N21/31 G01N33/532		
代理人(译)	周惠来		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种任意组合式多项目并行免疫检测方法，包括步骤：用同一抗体固相化在微孔板/条的至少两个微孔上；加入待检测标本，各微孔的待检测标本和/或检测项目可不同；加入检测抗原，各检测抗原均带有相同的特定标记；加入抗体示踪物结合物，该结合物能与所述特定标记结合；依据所述检测抗原、待检测标本以及抗体示踪物结合物与预包被板/条的结合情况，进行各个检测项目的定量分析/定性判断。一种试剂盒，包括：其上至少两个微孔固相化有同一抗体的预包被板/条，以及能够与检测过程所用各种检测抗原所共有的特定标记相结合的抗体示踪物结合物。采用本检测方法及其试剂盒，降低了生产难度及成本，提高了使用的方便性、灵活性以及选择性。