

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/543

G01N 33/535

G01N 33/547

G01N 21/78

[21] 申请号 200410104265.2

[43] 公开日 2005 年 9 月 28 日

[11] 公开号 CN 1673745A

[22] 申请日 2004. 12. 18

[21] 申请号 200410104265.2

[30] 优先权

[32] 2003. 12. 20 [33] CN [31] 200310114530.0

[71] 申请人 苏冬梅

地址 266071 山东省青岛市湛山四路 2 号警官接待站

[72] 发明人 苏冬梅

[74] 专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有限公司

代理人 李伦波

权利要求书 2 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法，包括下列顺序步骤：将两种或两种以上的特异性抗体或抗原包被在同一酶联板孔中，吸附后 4℃ 阴干；提取病人的标本加入酶联板孔中；对应特异性抗体或抗原的数量和种类，将同等数量、种类的、用不同酶标记的已知的抗原或抗体加入到酶联板孔中，然后洗板；对应不同酶加入一种底物，显色并与对照组进行比较检测后洗板，之后对应另一种酶加入另一种底物检测，依次至检测完毕。该方法可通过一次操作配制，同步检测多项免疫指标，检测速度快，节省人力、物力，降低检测成本。符合快速、简单、明了的方法，易于推广，能满足基层需要，并适用于流行病学调查。

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

1、一种酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法，包括下列顺序步骤：

制备检测样品和对照组：

（一）制备检测样品：

(1) 将两种或两种以上的特异性抗体包被在同一酶联板孔中，吸附后 4℃ 阴干；

(2) 提取病人的标本加入酶联板孔中；

(3) 对应步骤（1）中特异性抗体的种类和数量，将用不同种酶标记的相同的种类和数量的已知抗体加入到酶联板孔中，充分反应后洗板；

（二）制备对照组

(1) 方法与制备检测样品的步骤（1）相同；

(2) 对应步骤（1）中特异性抗体的种类和数量，将相同的种类和数量的已知抗原加入到酶联板孔中，

(3) 方法与制备检测样品的步骤（3）相同；

（三）对照检测

对应检测样品和对照组步骤（3）中的一种酶同时先加入一种底物，显色比较检测后洗板，之后对应另一种酶加入另一种底物，显色比较检测后洗板，依次至检测完毕。

2、一种酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法，包括下列顺序步骤：

制备检测样品和对照组：

（一）制备检测样品：

(1) 将两种或两种以上的特异性抗体包被在同一酶联板孔中，吸附后 4℃ 阴干；

(2) 提取病人的标本加入酶联板孔中，并同时

(3) 对应步骤（1）中特异性抗体的种类和数量，将用不同种酶标记的相同

的种类和数量的已知抗原加入到酶联板孔中，充分反应后洗板；

(二) 制备对照组

(1) 方法与制备检测样品的步骤 (1) 相同；

(2) 方法与制备检测样品的步骤 (3) 相同；

(三) 对照检测

对应检测样品步骤 (3) 和对照组步骤 (2) 中的一种酶同时先加入一种底物，显色比较检测后洗板，之后对应另一种酶加入另一种底物，显色比较检测后洗板，依次至检测完毕。

3、一种酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法，包括下列顺序步骤：

制备检测样品和对照组：

(一) 制备检测样品：

(1) 将两种或两种以上的抗原病原体包被在同一酶联板孔中，吸附后 4℃ 阴干；

(2) 提取病人的标本加入酶联板孔中；

(3) 对应步骤 (1) 中抗原病原体的种类和数量，将用不同种酶标记的相同的种类和数量的已知特异性抗体加入到酶联板孔中，充分反应后洗板；

(二) 制备对照组

(1) 方法与制备检测样品的步骤 (1) 相同；

(2) 方法与制备检测样品的步骤 (3) 相同；

(三) 对照检测

对应检测样品步骤 (3) 和对照组步骤 (2) 中的一种酶同时先加入一种底物，显色比较检测后洗板，之后对应另一种酶加入另一种底物，显色比较检测后洗板，依次至检测完毕。

4、根据权利要求 1、2 或 3 所述的酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法，其特征在于：所述酶联板为聚苯乙烯板。

酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法

技术领域

本发明涉及到医学微生物与医学免疫学检测技术，具体地说涉及一种通过酶联免疫吸附试验（ELISA）测定免疫指标的方法，更为具体地说，涉及一种通过酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法

背景技术

酶联免疫吸附试验（ELISA）是国内外临床和实验研究的一类重要技术，涉及到医学、生物学、遗传学、免疫等许多科学，其基本原理是利用抗原、抗体的特异性反应，用已知的抗原或抗体检测未知的抗体或抗原，在疾病的诊断和疗效的观察及预防医学方面尤为广泛，如医学上用以诊断和鉴别诊断肝炎病毒（甲、乙、丙、丁、戊、庚型肝炎病毒），爱滋病诊断及其它细菌、衣原体、原虫感染的诊断。

确诊用酶联 Elisa 法检测病原体是 WHO 规定的方法，该方法通常为竞争法或夹心法。

现有的双抗体夹心法是将特异性抗体（单克隆、多克隆）与 Elisa 板形成固相抗体、利用酶标记的相同抗体（单克隆、多克隆）结合检测一种抗原的方法：基本操作步骤如下：

1、抗体包被。将特异性抗体与载体结合，形成固相抗体后，洗去未结合抗体及杂质，4℃阴干。

2、加入未知抗原标本：让标本抗原与固相抗体充分反应，之后洗去未结合物质。

3、加酶标抗体，让已知酶标记抗体与固相复合物中抗原的另一些游离决定簇结合（本法不适于检测半抗原、单价抗原）。

4、检测：对应酶标记抗体中的酶加入显色底物，并与对照组进行比较，根据底物显色的深浅，判断有无抗原。

现有的竞争法可用于测定抗原，亦可用于测定抗体，但多用于测定小分子抗原，基本操作步骤如下：

1、抗体包被：将特异性抗体与载体结合，形成固相抗体后，洗去未结合抗体及杂质。

2、加入病人未知标本；

3、加入酶标的已知抗原，未知标本抗原与经酶标记的已知抗原竞争性地同固相抗体结合，洗去未结合物质。

4、检测：对应酶标记抗原中的酶加入显色底物，并与对照组进行比较，根据底物显色的深浅有无，判断有无抗原。

上述 Elisa 法中，为判断未知标本中是否含有病原体（抗原），应当同时配制对照组，在竞争法对照组的配制方法中，仅省去了向包被好的酶联板中加入未知标本的步骤，其余步骤相同。在夹心法对照组的配制方法中，将步骤 2：加入未知抗原标本的步骤，变为向包被好的酶联板孔中加入已知的抗原，其余步骤相同。在检测时，则同时向对照组中加入与检测样品相同的检测底物，通过对照组和检测样品间的颜色深浅的差异，即可判断待检测的未知标本中是否含有病原体。

以上两种方法显色后可通过酶标仪来测定 OD 值，或者通过肉眼根据颜色的深浅直接判断结果。

现有的上述夹心法和竞争法一次只能测定一种病原体，如要检测多种病原体，需要分别进行多次配制，对抗原或抗体进行分别检验，步骤繁琐，检测时间长，费时费力，检测成本高。

发明内容

本发明克服了现有的酶联免疫吸附试验（ELISA）一次只能检测一种病原体，当检测多种病原体时，只能分别操作、配制、检验的缺点，提供了一种酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法，该方法可通过一次操作配制，同步检测多项免疫指标，检测速度快，节省人力、物力，降低检测成本。

为实现本发明的目的，本发明采用的下述技术方案。

本发明公开了一种酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法，即双抗体法，包括下列顺序步骤：

制备检测样品和对照组：

（一）制备检测样品：

(1) 将两种或两种以上的特异性抗体包被在同一酶联板孔中，吸附后 4℃ 阴干；

(2) 提取病人的（抗原病原体）标本加入酶联板孔中；

(3) 对应步骤（1）中特异性抗体的种类和数量，将用不同种酶标记的相同的种类和数量的已知抗体加入到酶联板孔中，然后洗板；

（二）制备对照组

(1) 方法与制备检测样品步骤（1）相同；

(2) 对应步骤（1）中特异性抗体的种类和数量，将相同的种类和数量的已知抗原同时加入到酶联板孔中，

(3) 方法与制备检测样品步骤（3）相同，即对应步骤（1）中特异性抗体的种类和数量，将用不同种酶标记的相同的种类和数量的已知抗体加入到酶联板孔中，充分反应后洗板；

（三）对照检测

对应检测样品和对照组步骤（3）中的一种酶同时先加入一种底物，显色比较检测后洗板，之后对应另一种酶加入另一种底物，显色比较检测后洗板，依次至检测完毕。

本发明同时公开了另一种酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法，即竞争法，包括下列顺序步骤：

制备检测样品和对照组：

（一）制备检测样品：

(1) 将两种或两种以上的特异性抗体包被在同一酶联板孔中，吸附后 4℃ 阴干；

(2) 提取病人的（抗原病原体）标本加入酶联板孔中，并同时

(3) 对应步骤（1）中特异性抗体的种类和数量，将用不同种酶标记的相同的种类和数量的已知抗原加入到酶联板孔中，充分反应后洗

板；

(二) 制备对照组

(1)方法与制备检测样品的步骤(1)相同；

(2)方法与制备检测样品的步骤(3)相同,即对应步骤(1)中特异性抗体的种类和数量,将用不同种酶标记的相同的种类和数量的已知抗原加入到酶联板孔中,充分反应后洗板；

(三) 对照检测

对应检测样品步骤(3)和对照组步骤(2)中的一种酶同时先加入一种底物,显色比较检测后洗板,之后对应另一种酶加入另一种底物,显色比较检测后洗板,依次至检测完毕。

本发明进一步公开了另一种酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定多项免疫指标的方法,包括下列顺序步骤:

制备检测样品和对照组:

(一) 制备检测样品:

(1)将两种或两种以上的抗原病原体包被在同一酶联板孔中,吸附后 4℃ 阴干;

(2)提取病人的标本加入酶联板孔中;

(3)对应步骤(1)中抗原病原体的种类和数量,将用不同种酶标记的相同的种类和数量的已知特异性抗体加入到酶联板孔中,充分反应后洗板;

(二) 制备对照组

(1)方法与制备检测样品的步骤(1)相同;

(2)方法与制备检测样品的步骤(3)相同;

(三) 对照检测

对应检测样品步骤(3)和对照组步骤(2)中的一种酶同时先加入一种底物,显色比较检测后洗板,之后对应另一种酶加入另一种底物,显色比较检测后洗板,依次至检测完毕。

上述技术方案中，在第一和第二种方法中，在包板过程中即将两种或两种以上的特异性抗体包被在酶联板孔中，如将轮状病毒特异性抗体和腺病毒特异性抗体包被在酶联板孔中，吸附后，4℃阴干；之后提取病人的标本加入酶联板孔中。

当采用酶联免疫吸附 ELISA 中的夹心法时，在加入病人的未知标本后，对应步骤(1)中特异性抗体的数量和种类将相同的数量和种类的、用不同酶标记的已知的抗体加入到酶联板孔中，如将经不同酶标记的轮状病毒抗体和腺病毒抗体加入到酶联板孔中，充分反应后，洗去未结合物质。

当采用竞争法时，在加入病人的未知标本后，对应步骤(1)中特异性抗体的数量将相同的数量和种类的、用不同酶标记的已知的抗原加入到酶联板孔中，如将经不同酶标记的轮状病毒抗原和腺病毒抗原加入到酶联板孔中，未知标本抗原与经酶标记的已知抗原竞争性地同固相抗体结合，充分反应后，洗去未结合物质。

为判断未知标本中是否含有病原体，需要配制对照组，夹心法中，对照组的配制方法为：将与检测样品相同的两种或两种以上的特异性抗体包被在同一酶联板孔中，吸附后 4℃阴干；对应特异性抗体的种类和数量，将同等种类和数量的已知抗原加入到酶联板孔中；对应特异性抗体的种类和数量，将用不同种酶标记的相同的种类和数量的已知抗体加入到酶联板孔中，充分反应后洗板。

竞争法中，对照组的配制方法为：将与检测样品相同的两种或两种以上的特异性抗体包被在同一酶联板孔中，吸附后 4℃阴干；对应特异性抗体的种类和数量，将用不同种酶标记的相同的种类和数量的已知抗原加入到酶联板孔中，充分反应后洗板。

上述两种方法中，在检测样品和对照组配制完成后，对应检测样品和对照组多种酶中的一种酶同时先加入一种底物，显色比较检测后洗板，之后对应另一种酶加入另一种底物，显色比较检测后洗板，依次至检测完毕。

如在竞争法中，对照组中不加未知标本，加已知不同酶底物显色

后，对照组和测定组比较，未加标本的对照孔中，颜色最深，检测孔与对照孔颜色深度之差，反映了标本中抗原量，也就是说检测孔颜色越淡，说明标本中抗原（病原体）含量越多。根据显色深浅及颜色不同，判定标本中未知病原体存在及含量。

在第三种方法中，在包被过程中，将两种或两种以上的抗原病原体包被在同一酶联板孔中，如将风疹病毒抗原和疱疹病毒抗原包被在酶联板中，加入病人的血清标本后，对应抗原病原体的种类和数量，将用不同种酶标记的相同的种类和数量的已知特异性抗体加入到酶联板孔中，充分反应后洗板，加入不同酶标记底物后，导致不同显色反应，并与对照组比较即可检测病人标本。

上述技术方案中，在配制对照组时，仅通过一次配制过程，即可对应检测样品实现多次对照检测，因此省事、省力，缩短检测时间和成本。

以上三种方法显色后可通过酶标仪来测定 OD 值，或者通过肉眼根据颜色的有无、深浅直接判断结果。

而将三种或四种特异性抗体或抗原包被在酶联板孔中，之后对应加入的三种或四种已知的经酶标记的抗体或抗原，依次加入三种或四种底物，可实现对两种以上病原体进行检测。

本发明中，微孔板可为聚氯乙烯微孔板或聚苯乙烯微孔板，优选采用聚苯乙烯微孔板。

上述检测步骤中，与现有技术中相同，每一步均设置有洗板步骤。

本发明中只需作一次实验，则能测得二种或二种以上的病原体，大大的节省了人力物力，降低了成本，达到快速诊断的目的，该方法不但对医学微生物病原的诊断有价值，而且对流行病学调查、筛选、临床诊断有十分重要的意义。

具体实施方式

具体实施方式 1

酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定轮状病毒和腺病毒病原体的方法（夹心法），包括下列顺序步骤：配制检测样品和对照组：

（一）配制检测样品：

(1) 将轮状病毒特异性抗体和腺病毒特异性抗体包被在同一聚苯乙烯酶联板孔中，4℃阴干；

(2) 提取病人的（抗原）标本加入检测样品的酶联板孔中；

(3) 将用 HRP（辣根过氧化物酶）标记的轮状病毒抗体和碱性磷酸酶标记的腺病毒抗体加入到检测样品的酶联板孔中，充分反应后洗板。

（二）配制对照组

(1) 将轮状病毒特异性抗体和腺病毒特异性抗体包被在同一聚苯乙烯酶联板孔中，4℃阴干；

(2) 将轮状病毒抗原和腺病毒抗原加入上述酶联板孔中；

(3) 将用 HRP（辣根过氧化物酶）标记的轮状病毒抗体和碱性磷酸酶标记的腺病毒抗体加入到酶联板孔中，充分反应后洗板。

（三）对照检测

在检测样品和对照组中同时加入检测碱性磷酸酶的底物（PNPP），充分反应后，检测样品与对照组显相同黄色，则证明未知标本中含有腺病毒病原体；充分反应后，检测样品无色、对照样品显黄色，证明未知标本中不含有腺病毒病原体。充分清洗酶联板孔，将底物清洗干净（如显色，即将酶联板孔洗至无色），之后在检测样品和对照组中加入检测 HRP（辣根过氧化物酶）的底物（TMB），检测样品与对照组均显相同深兰色，则证明未知标本中含有轮状病毒；充分反应后，检测样品无色、对照样品显黄色，证明未知标本中不含有轮状病毒病原体，终止反应。

具体实施方式 2

酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定轮状病毒和腺病毒病原体的方法（竞争法），包括下列顺序步骤：

配制检测样品和对照组：

（一）配制检测样品：

(1) 将轮状病毒特异性抗体和腺病毒特异性抗体包被在同一聚苯乙烯

乙烯酶联板孔中，4℃阴干；

(2) 提取病人的标本（抗原）加入检测样品的酶联板孔中；

(3) 将用 HRP（辣根过氧化酶）标记的轮状病毒和碱性磷酸酶标记的腺病毒抗原同时加入到检测样品的酶联板孔中，充分反应后洗板；

（二）配制对照组

(1) 将轮状病毒特异性抗体和腺病毒特异性抗体包被在同一聚苯乙烯酶联板孔中，4℃阴干；

(2) 将用 HRP（辣根过氧化酶）标记的轮状病毒抗原和碱性磷酸酶标记的腺病毒抗原同时加入到对照组的酶联板孔中，充分反应后洗板；

（三）对照检测

在检测样品和对照组中加入检测碱性磷酸酶的底物（PNPP），充分反应后，检测样品和对照样品显相同的黄色，则证明未知标本中没有腺病毒；充分反应后，检测样品无色、对照样品显黄色，证明未知标本中含有腺病毒病原体。充分清洗酶联板孔，将底物清洗干净（如显色，即将酶联板孔洗至无色），之后在检测样品和对照组中加入检测 HRP（辣根过氧化酶）的底物（TMB），检测样品和对照样品显相同兰色，则证明未知标本中没有轮状病毒；充分反应后，检测样品无色，对照样品显兰色，证明未知标本中含有轮状病毒。终止反应。

具体实施方式 3

酶联免疫吸附 ELISA 同步快速测定风疹病毒和疱疹病毒的方法，包括下列顺序步骤：配制检测样品和对照组：

（一）配制检测样品：

(1) 将风疹病毒抗原和疱疹病毒抗原包被在同一聚苯乙烯酶联板孔中，4℃阴干；

(2) 提取病人的标本（特异性抗体）如血清等加入检测样品的酶联板孔中；

(3) 将 HRP 标记的风疹病毒抗体和碱性磷酸酶标记的疱疹病毒抗

体加入到检测样品的酶联板孔中,充分反应后洗板。

(二) 配制对照组

(1)将风疹病毒抗原和疱疹病毒抗原包被在同一聚苯乙烯酶联板孔中,4℃阴干;

(2)将 HRP 标记的风疹病毒抗体和碱性磷酸酶标记的疱疹病毒抗体加入到检测样品的酶联板孔中,充分反应后洗板。

(三) 对照检测

在检测样品和对照组中同时加入检测碱性磷酸酶的底物(PNPP),充分反应后,检测样品与对照组显相同黄色,则证明未知标本中不含有风疹病毒病原体抗体;充分反应后,检测样品无色、对照样品显黄色,证明未知标本中含有风疹病毒病原体抗体。充分清洗酶联板孔,将底物清洗干净(如显色,即将酶联板孔洗至无色),之后在检测样品和对照组中加入检测 HRP(辣根过氧化物酶)的底物(TMB),检测样品与对照组均显相同深兰色,则证明未知标本中不含有疱疹病毒抗体;充分反应后,检测样品无色、对照样品显兰色,证明未知标本中含有疱疹病毒抗体。终止反应。

具体实施方式 1、2、3 中,通过一组与检测样品对应的对照组,通过包被有多种已知抗体或抗原在同一酶联板孔,实现未知标本中多种指标的检验。根据不同的酶底物,显色不同,判断未知标本中(抗原)病原微生物或抗体的种类及含量。

本方法可通过一次操作配制,同步检测多项免疫指标,检测速度快,节省人力、物力,降低检测成本,易于在基层推广。

专利名称(译)	酶联免疫吸附ELISA同步快速测定多项免疫指标的方法		
公开(公告)号	CN1673745A	公开(公告)日	2005-09-28
申请号	CN200410104265.2	申请日	2004-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	苏冬梅		
申请(专利权)人(译)	苏冬梅		
当前申请(专利权)人(译)	苏冬梅		
[标]发明人	苏冬梅		
发明人	苏冬梅		
IPC分类号	G01N21/78 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/547		
代理人(译)	李伦波		
优先权	200310114530.0 2003-12-20 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种酶联免疫吸附ELISA同步快速测定多项免疫指标的方法，包括下列顺序步骤：将两种或两种以上的特异性抗体或抗原包被在同一酶联板孔中，吸附后4°C阴干；提取病人的标本加入酶联板孔中；对应特异性抗体或抗原的数量和种类，将同等数量、种类的、用不同酶标记的已知的抗原或抗体加入到酶联板孔中，然后洗板；对应不同酶加入一种底物，显色并与对照组进行比较检测后洗板，之后对应另一种酶加入另一种底物检测，依次至检测完毕。该方法可通过一次操作配制，同步检测多项免疫指标，检测速度快，节省人力、物力，降低检测成本。符合快速、简单、明了的方法，易于推广，能满足基层需要，并适用于流行病调查。