



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102175848 A

(43) 申请公布日 2011.09.07

(21) 申请号 201110002499.6

(22) 申请日 2011.01.07

(71) 申请人 武汉伊艾博科技有限公司

地址 430074 湖北省武汉市东湖开发区关东园路2-2号光谷国际商会大厦1栋A座17层10号

(72) 发明人 李学斌

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 涂洁

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

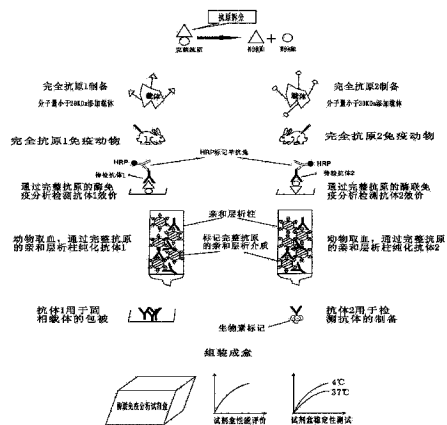
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

(54) 发明名称

双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒及其生产方法

(57) 摘要

本发明涉及一种双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒及其生产方法,解决了现有双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒制作复杂、周期长、成本高、难以避免钩状效应、检测范围小、稳定性差的问题。技术方案包括抗原拆分、动物免疫及其检测、亲和层析提取、制备检测抗体和固相载体及试剂盒组装等步骤。本发明方法制备方法简单、成本低、周期短,本发明方法生产的试剂盒检测灵敏度高、误差小、检测范围广、无标准曲线的钩状效应。



1. 一种双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒的生产方法,包括以下步骤:

(1) 抗原拆分:将含有两个以上抗原表位的完整抗原拆分成两个部分,每个部分为至少包含一个完整的有效抗原表位的完全抗原;

(2) 动物免疫及其检测:将上述两个完全抗原分别进行动物免疫,并采用酶联免疫分析法检测动物免疫效果,分别得到两份相应的 ELISA 效价不低于 1 : 100,000 的动物免疫血清;

(3) 亲和层析提取:将上述两份动物免疫血清分别通过完整抗原亲和层析方法提取出两份针对各自完全抗原的抗体;

(4) 制备检测抗体和固相载体:将其中一份抗体经过生物素标记用于制备检测抗体,另一份抗体用于制备固相载体。

(5) 按照双抗体夹心酶联免疫分析法要求以完整抗原为标准品组装试剂盒。

2. 如权利要求 1 所述的生产方法,其特征在于,所述步骤 (1) 中完整抗原拆分的方法为:对于蛋白质抗原可以通过多肽合成、分段重组表达或蛋白酶切方法实现蛋白质抗原的拆分;对于化合物大分子抗原可以通过化学合成或化学分解实现化合物大分子抗原拆分。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的生产方法,其特征在于,所述步骤 (1) 中拆分后的两部分中任一部分分子量小于 20kDa 时,则通过添加载体制备成完全抗原后再进入步骤 (2)。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的生产方法,其特征在于,所述步骤 (2) 中酶联免疫分析法为:以未拆分的完整抗原作为包被抗原制备固相载体,免疫血清稀释后与包被有完整抗原的固相载体共同反应,反应结束后洗涤,加抗被免疫动物的酶标抗体,底物显色,终止后读取吸光值判断抗体效价。

5. 一种双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒,其特征在于,由权利要求 1-4 任一项生产方法制得。

双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒及其生产方法

技术领域

[0001] 本发明属于酶联免疫分析 (ELISA) 技术领域, 具体的说是一种双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒及其生产方法。

背景技术

[0002] 酶联免疫分析法 (又称酵素免疫分析法, Enzyme-linkedimmunoassay, 简称 ELISA) 是利用抗原抗体之间专一性键结之特性, 对检体进行检测, 主要以夹心法 (sandwich)、间接法 (indirect)、以及竞争法 (Competitive) 三种为主。

[0003] 双抗体夹心法是检测抗原最常用的 ELISA 方法, 适用于检测分子中具有至少两个抗原决定簇的多价抗原的定量检测, 而不能用于小分子半抗原的检测。其基本工作原理是: 利用连接于固相载体上的抗体和酶标抗体分别与样品中被检测抗原分子上两个抗原决定簇结合, 形成固相抗体 - 抗原 - 酶标抗体免疫复合物。由于反应系统中固相抗体和酶标抗体的量相对于待测抗原是过量的, 因此复合物的形成量与待测抗原的含量成正比 (在方法可检测范围内)。测定复合物中的酶作用于加入的底物后生成的有色物质 (OD 值), 即可确定待测抗原含量。若固相载体上的抗体和酶标抗体分别与样品中被检测抗原分子上两个不同的抗原决定簇结合, 则属于双位点夹心法。

[0004] 双抗体夹心法主要有三种, 传统的双多抗夹心法 (A 法) 所需检测抗体和固相载体包被抗体都是多抗, 制备简单, 在一定范围内检测灵敏度高, 信号显示强, 很难避免钩状效应, 其主要问题在于: 固相载体上的抗体和检测抗体都为针对完整抗原所有抗原结合位点多克隆抗体, 抗原浓度比较低的时候, 固相支持物上的抗体几乎跟抗原上所有位点结合, 结合力强, 空余位点少, 检测抗体与抗原位点少, 结合力弱, 只要固相支持物上的抗体未与抗原结合饱和, 抗原量与最后信号显示部呈线性关系; 随着抗原量的增加, 固相支持物上的抗体与抗原结合饱和, 空余位点越来越多, 检测抗体与抗原的空余位点结合, 信号显示与实际抗原增长呈几何倍数增长, 同样不呈线性关系; 随着抗原量的增加, 固相载体上的抗体与每个抗原的结合位点很少, 结合力很弱, 而过量的检测抗体与其结合位点增多, 结合力增强, 因为抗原抗体结合本来就是一个动态可逆的反应过程 (抗原 + 抗体 \rightleftharpoons 抗原 · 抗体), 一旦从固相载体上抗体与抗原解离下来的时候, 位点立即被检测抗体结合, 形成抗原抗体复合物沉淀, 在洗涤过程中被洗掉, 随着抗原量的增加, 而信号反而降低, 就是所谓的钩状效应。此时反应后显色的吸光值 (位于抗原过剩带上) 与标准曲线 (位于抗体过剩带上) 某一抗原浓度的吸光值相同, 如按常法测读, 所得结果将低于实际的含量, 因为标准曲线到达高峰后呈钩状弯落。钩状效应严重时, 反应甚至可不显色而出现假阴性结果。因此采用传统双多抗夹心法 (A 法) 不适用于测定标本中含量可异常增高的物质 (例如血清中 HBsAg、AFP 和尿液 HCG 等)。

[0005] 用高亲和力的单克隆抗体对 (C 法即检测抗体和固相载体包被抗体都用单克隆抗体,) 生产此类试剂盒可削弱钩状效应, 由于固相载体上的抗体和检测抗体结合的不是相同的位点, 所以不形成竞争关系, 一般情况下不会形成钩状效应, 但是单克隆抗体制备周期

长,成本高,特别是高亲和力的配对抗体更是不容易得到,同时,由于固相载体上抗体和检测抗体都是单位点与抗原结合,所以结合力弱,信号显示值低,敏感性差,稳定性也不好。

[0006] 针对上述问题,国外很多公司以单抗作包被抗体制备固相载体,以多抗作检测抗体(B法),由于抗原抗体结合位点竞争效应不强,不会产生钩状效用,检测信号强度介于A法和C法之间,稳定性也介于A法和C法之间,但是该法需要生产至少一个单抗,生产周期长,成本高;但相对于C法而言,由于B法只需要生产一个单抗,并且不需要配对筛选,其成本和技术难度都相对较低。

发明内容

[0007] 本发明的目的是为了解决上述技术问题,提供一种制备方法简单、成本低、周期短的双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒的生产方法。

[0008] 本发明还提供一种由上述方法生产得到的检测灵敏度高、误差小、无标准曲线的钩状效应的双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒。

[0009] 一种双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒的生产方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 抗原拆分:将含有两个以上抗原表位的完整抗原拆分成两个部分,每个部分为至少包含一个完整的有效抗原表位完全抗原;

[0011] (2) 动物免疫及其检测:将上述两个完全抗原分别进行动物免疫,并采用酶联免疫吸附分析法检测动物免疫效果,分别得到两份相应的ELISA效价不低于1:100,000的动物免疫血清;

[0012] (3) 亲和层析提取:将上述两份动物免疫血清分别通过完整抗原亲和层析方法提取出两份针对各自完全抗原的抗体;

[0013] (4) 制备检测抗体和固相载体:将其中一份抗体经过生物素标记用于制备检测抗体,另一份抗体用于制备固相载体。

[0014] (5) 按照双抗体夹心酶联免疫分析法要求以完整抗原为标准品组装试剂盒。

[0015] 所述步骤(1)中完整抗原拆分的方法为:对于蛋白质抗原可以通过多肽合成、分段重组表达或蛋白酶切方法实现蛋白质抗原的拆分;对于化合物大分子抗原可以通过化学合成或化学分解实现化合物大分子抗原拆分。

[0016] 所述步骤(1)中拆分后的两部分中任一部分分子量小于20kd时,则通过添加载体制备成完全抗原后再进入步骤(2),所述的添加载体是指将拆分抗原附着或者藕联在载体上制备成可以用于动物免疫产生较好免疫效果的完全抗原,实现方法包括:化学藕联,物理吸附,或者是重组表达时直接与载体融合表达。

[0017] 所述步骤(2)中酶联吸附实验方法为:以未拆分的完整抗原作为包被抗原制备固相载体,免疫血清稀释后与包被有完整抗原的固相载体共同反应,反应结束后洗涤,加抗被免疫动物的酶标抗体,底物显色,终止后读取吸光值判断抗体效价。

[0018] 本发明双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒由上述生产方法制得。

[0019] 本领域技术人员可参照选择的具体抗原合理确定完整抗原拆分成两部分的方法,可以使用但不限于下述方法:对于蛋白质抗原可以通过多肽合成、分段重组表达或蛋白酶切方法实现蛋白质抗原的拆分;对于化合物大分子抗原可以通过化学合成或化学分解实现化合物大分子抗原拆分。其详细步骤为现有技术,不作赘述。所述动物免疫方法也可参照

现有的动物免疫方法进行。所述双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒内除了包括有上述固相载体、标准品、经过生物素标记的检测抗体外,根据需要还配有例如稀释液、洗涤液、链霉亲和素酶标记复合物、显色液,显色终止液等试剂盒检测需要的各种辅助试剂。

[0020] 本发明通过将含有两个以上抗原表位的抗原(如蛋白质,多肽或其他的大分子物质)拆分并制备成两部分(要求每一部分至少包含一个完整的表位,而又不含有另外一部分的活性表位)完全抗原,再分别进行动物免疫,利用完整抗原检测是否产生抗体并监测抗体效价,当抗体效价满足实验要求时取血,通过亲和层析提取动物血清中的特异性抗体,分别用于固相载体包被和生物素标记的检测抗体。由于拆分后得到的两部分完全抗原各自至少包含一个完整的表位,而又不含有另外一部分的活性表位,因而由本发明方法得到的用作固相载体包被的特异性抗体是针对其中一个拆分抗原的多抗,用作检测抗体的特异性抗体是针对另一拆分抗原的多抗,进而以完整抗原为标准品进行夹心酶联免疫分析时,这两部分的特异性抗体能够分别针对各自对应的抗原表位,由于检测抗体不与固相载体上的抗体竞争表位,因此抗原的量与最后信号显示的结果呈很好的线性关系,不会因为抗原过量反而造成信号减低的现象,检测时也不会出现钩状效应,同时,由于多抗的结合力比较强,所以不同抗原浓度的信号值拉得开距离,扩大了检测范围,大大提高了检测的灵敏度。

[0021] 本发明方法生产的试剂盒比传统双多抗夹心法(A法)线性好,无标准曲线的钩状效应。与单抗作包被抗体、多抗作检测抗体的夹心法(B法)相比,敏感性更高。与双单抗的夹心法(C法)相比制备更简单,生产周期更短(比C法生产周期短2个月)、试剂盒更稳定(稳定性周期可以提高半年到一年以上)、成本更低廉(多抗的生产成本只有单抗的1/3)、检测范围广(以人原癌基因B-myb蛋白试剂盒为例,C法检测范围0.32-10ng/mL,而本法制备的试剂盒的检测范围可达0.15-12ng/mL,)。

[0022] 表1 几种双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒的比较

[0023]

	用作固相载体包被的抗体	用作检测抗体的抗体	工艺方法及试剂盒比较
A 法 (同一个多抗)	针对完整抗原的多抗	针对完整抗原的多抗	制备简单, 成本低; 试剂盒稳定; 在很窄的范围内检测灵敏度高, 钩状效应严重。
B 法	针对完整抗原的一个单克隆抗体	针对完整抗原的多抗	单抗制备步骤繁琐, 成本高; 试剂盒较不稳定; 无钩状效应, 检测灵敏度较高。
C 法 (配对单抗)	针对完整抗原的一个单克隆抗体	针对完整抗原的一个单克隆抗体 (需要与用作固相载体包被抗体配对)	单抗制备步骤繁琐, 成本高; 试剂盒较很不稳定; 无钩状效应, 检测灵敏度不高。
D 法 (本发明方法)	针对拆分抗原的多抗	针对另一拆分抗原的多抗	制备步骤简单, 成本低; 试剂盒稳定; 无钩状效应, 检测灵敏度高。

[0024]

附图说明

[0025] 图 1 为本发明的技术流程图;

[0026] 图 2 采用本法生产的人原癌基因 B-myb 蛋白酶联免疫分析试剂盒与传统方法生产的试剂盒曲线图比较;

[0027] 图 3 采用本法生产的人原癌基因 B-myb 蛋白酶联免疫分析试剂盒与传统方法生产的试剂盒稳定性比较。

具体实施方式

[0028] 下面以制备人原癌基因 B-myb 蛋白双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒为例对本发明作进一步的阐述, 但是不作为本发明内容的限制。

[0029] 一、抗原的拆分:

[0030] 将完整抗原 (人原癌基因 B-myb 蛋白) 根据已有文献记载或噬菌体展示表位筛选法得到的实验数据 (拆分的部位内含有有效的抗原表位的实验结果) 拆分为两个部分 (拆分抗原 1 和拆分抗原 2, 要求每一部分至少包含一个完整的表位, 而又不含有另外一部分的

活性表位)：本实施例中拆分抗原 1 可通过多肽合成人原癌基因 B-myb 蛋白 C 端 678-692 位氨基酸序列：QEKARQLLGRLLKPSH，然后藕联载体牛血清白蛋白制备成完全抗原 1；拆分抗原 2 通过大肠杆菌重组蛋白表达实现：表达序列为人原癌基因 B-myb 蛋白的 601-700 位氨基酸序列 TLPKSLSLPTTAPSNSSSLTSGIKEDNSLLNQGFLQAKPEKAAVAQKPRSHFTTPAPMSSAWKTVACGGTRDQLFMQEKARQLLGRLLKPSHTSRTLILS，并且在其 C-端融合 26KDa 的 GST 以增大其分子量制备成完全抗原 2。

[0031] 其中，完全抗原 1 的制备方法（碳二亚胺法或 EDC 法）如下：

[0032] 1. 将碳二亚胺盐酸盐平衡到室温；

[0033] 2. 将 2 毫克冻干的牛血清白蛋白、卵清白蛋白或血蓝蛋白溶解到 200 微升藕联缓冲液 (0.1M MES, Ph4.5-5.0) 中；

[0034] 3、将 2 毫克的拆分抗原 1 加入到 500 微升藕联缓冲液 (0.1M MES, Ph4.5-5.0) 中；同时将上一步骤制得的溶液与其混合；

[0035] 4、将 10 毫克碳二亚胺盐酸盐溶解于 1 毫升去离子水，并迅速取 100 微升加入到步骤 3 的混合液中；

[0036] 5、磁力搅拌器室温搅拌反应 4 小时；

[0037] 6、用脱盐柱纯化所得反应物即为完全抗原 1。

[0038] 二、动物免疫及其检测

[0039] 将完全抗原 1 及 2 分别进行动物免疫及免疫效果检测，方法如下：(1) 动物免疫

[0040] 选择适龄的健康雄性动物进行免疫，小鼠的首次免疫剂量为 50 μ g ~ 400 μ g/次，大鼠为 100 μ g ~ 1000 μ g/次，兔为 200 μ g ~ 1000 μ g/次，采用多点皮下注射方法，每间隔 3 周，进行加强免疫，剂量为首免的一半，每次免疫前耳静脉取血监测抗体效价，直到血清抗体 ELISA 效价达到 1 : 1,000,000 以上。免疫佐剂为佛氏佐剂，首免用佛氏完全佐剂，以后用佛氏不完全佐剂，每次免疫前将完全抗原与佐剂按照同体积混合后通过超声波乳化。本实施例以家兔为免疫动物。

[0041] (2) 免疫效果检测（抗体效价监测）

[0042] 将完整抗原用包被稀释液稀释到 1 μ g/mL, 100 μ L/孔，包被于 96 孔酶标板中，4 $^{\circ}$ C 过夜；拍干板孔中的液体，封闭液（含 1% BSA 的 0.01M TBS(8.5)），150 μ L/孔，室温封闭 4 小时；用 TBS/Tween-20(0.05%) 洗板后，待检血清与未免疫动物空白血清平行从 1 : 1,000 倍比稀释后，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟；用 TBS/Tween-20(0.05%) 洗板后，将 HRP 标记羊抗兔 (1 : 1,000 稀释，武汉伊艾博科技有限公司生产)，100 μ L/孔加入，37 $^{\circ}$ C 孵育 45 分钟后，TBS/Tween-20(0.05%) 洗板 3 次后，加入即用型 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 显色液 (Sigma)，室温反应 10 分钟，每孔加 100 μ L 显色终止液 (2M H₂SO₄) 终止反应，通过酶标仪读取 450nm 吸光值 (OD₄₅₀)。待检血清某个稀释度的 450nm 吸光值是空白血清的 3 倍时，该稀释度定义为该抗体的 ELISA 效价。

[0043] 三、抗体制备

[0044] 当完全抗原 1 和完全抗原 2 免疫的动物血清效价达到实验要求后，分别采用颈动脉放血，收集全血，37 $^{\circ}$ C 放置 1 小时后，4 $^{\circ}$ C 过夜，离心分离血清；血清中加入 0.01% 叠氮化钠，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0045] 将完整抗原藕联到琼脂糖凝胶 4B(GE Healthcare, 17-0430-01) 上制备亲和层析

介质,层析介质装配成层析柱,从以上分离的血清中通过完整抗原亲和层析的方法提取针对该抗原的特异性抗体,分别得到针对完全抗原 1 和完全抗原 2 的特异性抗体(即抗体 1 和抗体 2),藕联方法与亲和层析纯化方法参照琼脂糖凝胶 4B 的产品说明书进行。

[0046] 四、试剂盒中包被有该抗原特异性抗体固相载体和检测抗体的制备

[0047] 将步骤五纯化得到的抗体 1 和抗体 2 分别用 0.01M PBS 透析 2 天后,选择抗体 1 包被固相载体,包被方法:特异性抗体 1 稀释到 $1 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{L/孔}$,包被于 96 孔酶标板中, 4°C 过夜;拍干板孔中的液体,封闭液(含 1% BSA 的 0.01M TBS(8.5)), $150 \mu\text{L/孔}$,室温封闭 4 小时;排干后孔中液体,自然晾干,铝箔袋真空密封包装, -20°C 保存,装盒备用。

[0048] 将步骤五纯化得到的抗体 2 标记生物素,制备成检测抗体(标记方法参照 Sigma B2643 产品说明书)。

[0049] 五、试剂盒组装与使用方法

[0050] 试剂盒组装:本试剂盒包括固相载体(包被有抗体 1 的 96 孔酶标板)1 块、标准品(完整抗原即人原癌基因 B-myb 蛋白的冻干标准品,临用前用去离子水稀释到 1 毫升,然后样品稀释液作连续倍比稀释)2 支、生物素标记的检测抗体 ($120 \mu\text{L}$,临用前稀释 100 倍即为检测抗体工作液)1 支,链霉亲和素酶标记复合物 ($120 \mu\text{L}$,PIERCE 公司产品分装,临用前稀释 100 倍即为链霉亲和素酶标记复合物工作液)1 支,即用型 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液 (12mL ,Sigma T0440 产品分装)1 支,显色终止液 (10mL 2M H_2SO_4)1 支,样品稀释液 (20mL)1 支,检测抗体稀释液 (10mL)1 支,浓洗涤液 (30mL ,使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍)1 瓶,酶标板覆膜 5 张,使用说明书 1 份。

[0051] 试剂盒使用方法:实验开始前,各试剂均应平衡至室温,试剂不能直接在 37°C 溶解;试剂或样品配制时,均需充分混匀,混匀时尽量避免起泡。实验前应预测样品含量,如样品浓度过高时,应对样品进行稀释,以使稀释后的样品符合试剂盒的检测范围,计算时再乘以相应的稀释倍数。

[0052] 1、加样:分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 $100 \mu\text{L}$,标准孔加稀释好的标准品 $100 \mu\text{L/孔}$,待测样品孔加待测样品 $100 \mu\text{L/孔}$,注意不要有气泡,加样时将样品加于酶标板底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀,酶标板加上盖或覆膜, 37°C 温育 2 小时。为保证实验结果有效性,每次实验最好使用新的标准品溶液。

[0053] 2、弃去液体,甩干,不用洗涤。每孔加检测抗体工作液 $100 \mu\text{L}$ (临用前配制),酶标板加上覆膜, 37°C 温育 1 小时。

[0054] 3、弃去液体,甩干,洗板 5 次,每次浸泡 1-2 分钟。每孔加链霉亲和素酶标记复合物工作液 $100 \mu\text{L}$,酶标板加上覆膜, 37°C 温育 1 小时。

[0055] 4、弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次,每次浸泡 1-2 分钟,大约 $400 \mu\text{L/每孔}$,甩干(也可轻拍将孔内液体拍干)。

[0056] 5、每孔加 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液 $90 \mu\text{L}$,酶标板加上覆膜 37°C 避光显色(反应时间控制在 15-30 分钟,当标准孔的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色,后 3-4 孔梯度不明显时,即可终止)。

[0057] 6、每孔加显色终止溶液 $50 \mu\text{L}$,终止反应,此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与显色液的加入顺序相同。

[0058] 7、立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度值 (OD_{450} 值)。

[0059] 八、本法生产的试剂盒与传统各种方法生产的试剂盒性能比较

[0060] 以人原癌基因 B-myb 蛋白双抗体夹心法试剂盒为比较对象,比较不同生产方法得到试剂盒的标准曲线和稳定性(参见图 2)。其中 A 法、B 法、C 法为背景技术中介绍的三种现有方法得到的试剂盒,D 法为本发明制备方法得到的试剂盒。

[0061] 由图 2 可知,以上各法最佳检测范围分别为:

[0062] A 法 :3.20-9.00ng/mL ;B 法 :0.25-11.00ng/mL

[0063] C 法 :0.32-10.00ng/mL ;D 法 :0.15-12ng/mL。

[0064] 说明:图 3 中曲线 A, B, C, D 为试剂盒生产后立即实验结果,曲线 A', B', C', D' 为 37°C 放置一周后实验结果。

[0065] 结果:由比较实验得出,本发明方法生产的试剂盒较现有其它方法制得的试剂盒性检测范围更广,灵敏度更高,更为稳定。

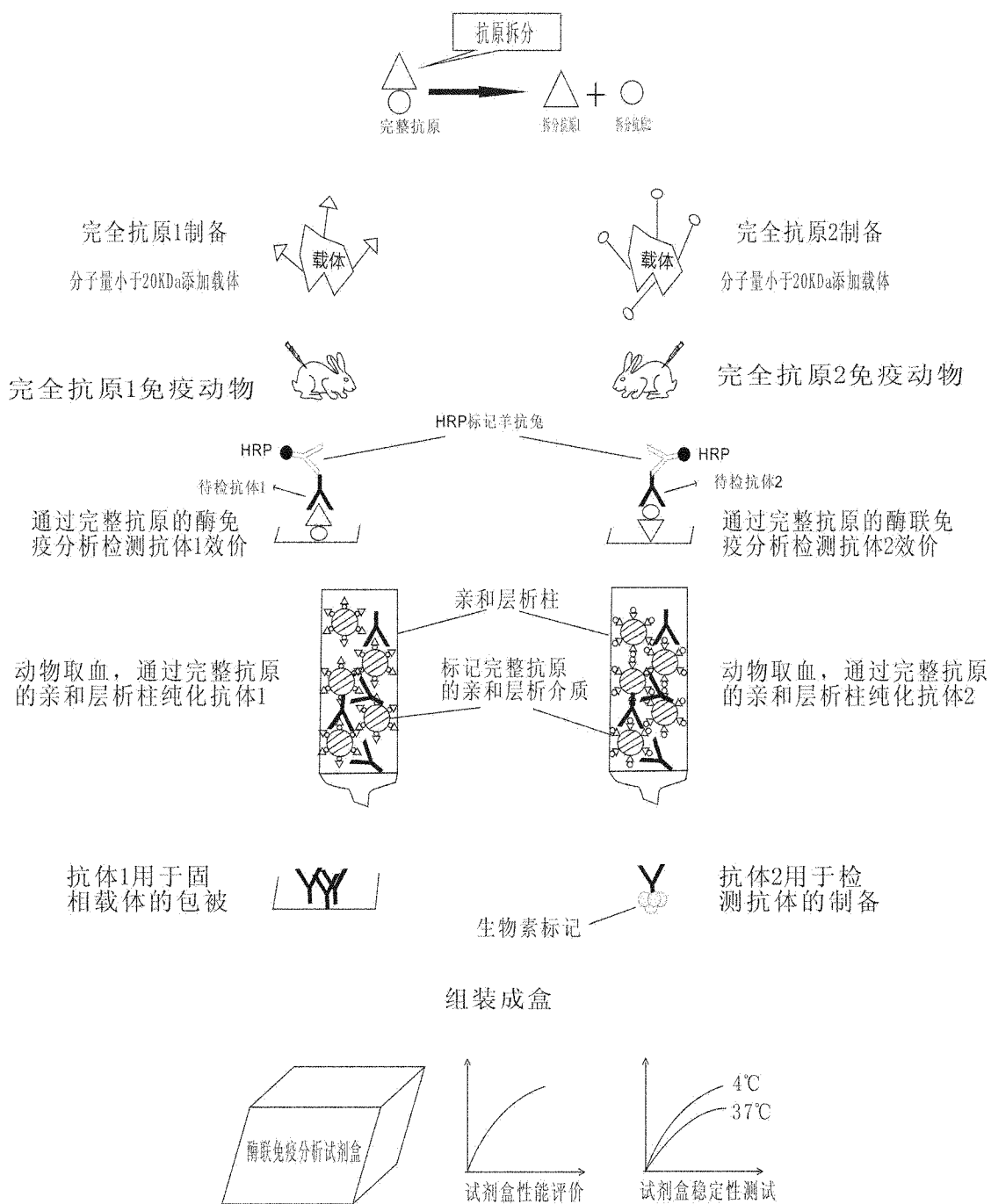


图 1

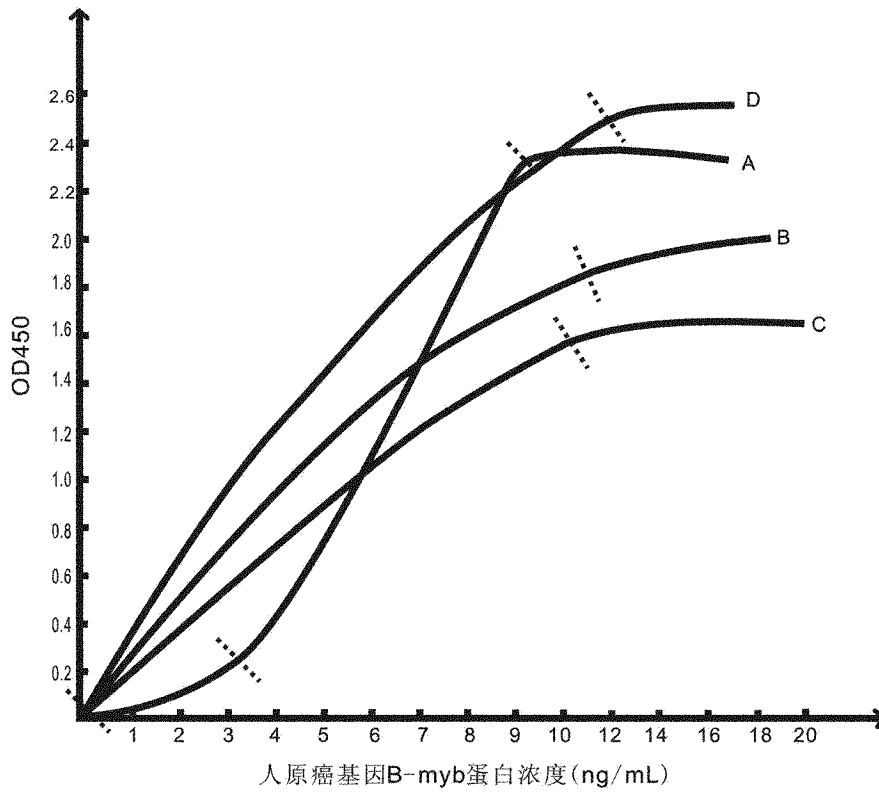


图 2

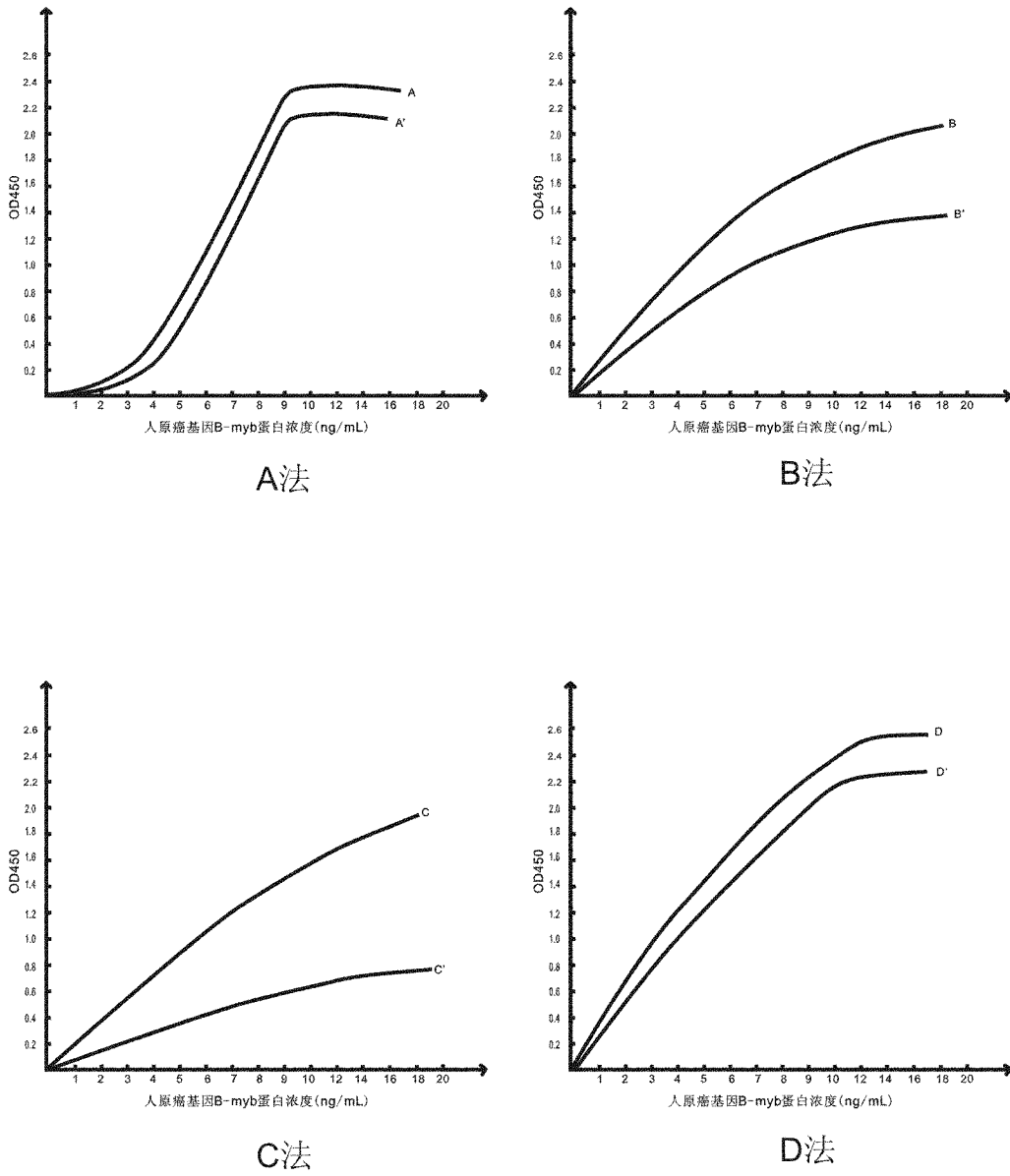


图 3

专利名称(译)	双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒及其生产方法		
公开(公告)号	CN102175848A	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	CN201110002499.6	申请日	2011-01-07
[标]发明人	李学斌		
发明人	李学斌		
IPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	涂洁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒及其生产方法，解决了现有双抗体夹心酶联免疫分析试剂盒制作复杂、周期长、成本高、难以避免钩状效应、检测范围小、稳定性差的问题。技术方案包括抗原拆分、动物免疫及其检测、亲和层析提取、制备检测抗体和固相载体及试剂盒组装等步骤。本发明方法制备方法简单、成本低、周期短，本发明方法生产的试剂盒检测灵敏度高、误差小、检测范围广、无标准曲线的钩状效应。

