



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110296944 A

(43)申请公布日 2019.10.01

(21)申请号 201910360498.5

(22)申请日 2019.04.30

(71)申请人 宁波普瑞柏生物技术股份有限公司
地址 315000 浙江省宁波市江北区投资创
业中心C区通惠路999号

(72)发明人 余文娟 吴永菲 范翠翠 涂小宁
许国和

(51)Int.Cl.

G01N 21/31(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

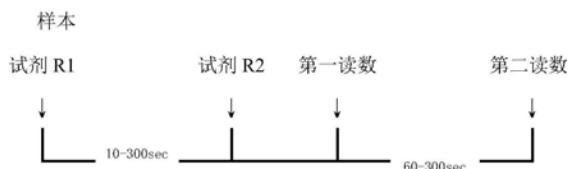
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方
法

(57)摘要

本发明涉及特定蛋白检测技术领域，具体地
说是一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方
法。该提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法是
利用试剂R1、R2及校准品，基于免疫比浊原理利
用透射和散射二合一仪器对同一测试同时获得
透射和散射检测结果的检测方法。



1.一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法,利用试剂R1、R2及校准品,基于免疫比浊原理利用透射和散射二合一仪器对同一测试同时获得透射和散射检测结果,其特征在于:

- (1) 结合同时获得的透射和散射检测结果,利用散射检测结果保证低值区的灵敏度;
- (2) 结合同时获得的透射和散射检测结果,利用透射检测结果保证中、高值区灵敏度;
- (3) 通过调整被测对象的样本量以同时满足透射和散射检测需求并同时获得透射和散射检测结果,更具体地,通过增加常规用于散射检测的样本量或减少常规用于透射检测的样本量,将被测样本的同一测试同时用于透射和散射检测,结合同时获得的透射和散射检测结果,通过散射检测结果提高检测灵敏度,通过透射检测结果提高线性。

2.根据权利要求1所述的一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法,其特征在于:

- (1) 被测对象是抗原或抗体,所述被测对象所处的环境是人的体液,包括血清、血浆、尿液、脑脊液等;
- (2) 透射检测时,样本中的被测对象与其相对应的抗体或抗原结合后,形成免疫复合物,通过测定透射吸光度的变化量,根据校准曲线来确定样本中的被测对象的浓度;
- (3) 散射检测时,样本中的被测对象与其相对应得抗体或抗原结合后,形成免疫复合物,通过检测散射光强度的变化量,根据校准曲线来确定样本中的被测对象的浓度;
- (4) 结合对同一个测试同时获得的透射和散射检测结果,根据已设定的规则通过软件自动进行取舍并报出被测对象的最终浓度。

3.根据权利要求1所述的一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法,其特征在于步骤包括:

- 步骤一,取适量的被测样本、试剂R1加入反应杯,混匀并孵育10sec-300sec;
- 步骤二,取适量的试剂R2加入上述混合溶液中,并混合均匀;
- 步骤三,通过特定蛋白透射和散射二合一仪器在500-800nm处分别读取第一读数点透射吸光度A₁和散射光强度I₁;
- 步骤四,通过特定蛋白透射和散射二合一仪器在500-800nm处分别读取第二读数点透射吸光度A₂和散射光强度I₂;
- 步骤五,分别计算出 $\Delta A = A_2 - A_1$ 和 $\Delta I = I_2 - I_1$ 并根据校准曲线分别计算出被测对象透射和散射检测的结果并根据已设定的规则进行取舍,得出被测对象的最终浓度并报出。

一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及特定蛋白检测技术领域,具体地说是一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法。

背景技术

[0002] 在1959年之前,特定蛋白的检测一直采用经典免疫沉淀法进行检测,该方法存在测定范围窄、灵敏度低、繁琐费时及不能自动化等缺点。1959年,Schultze等报道了免疫透射比浊法,一定波长的光线通过抗原-抗体反应混合物时,被其中的免疫复合物反射或者遮挡、吸收而减弱。在一定范围内,透射光被吸收的量与免疫复合物的量呈正比。这种方法一般样本用量大,低值区灵敏度低,误差大,但高值测定准确,常用于生化指标的测定,用于特定蛋白检测时,存在灵敏度偏低的问题。随着科技的发展,在免疫透射比浊法的基础上又出现了免疫散射比浊法,该方法是利用入射光沿水平轴照射,通过溶液时碰到小颗粒的抗原-抗体免疫复合物时,导致光线被颗粒吸收或折射,发生偏转,其偏转的角度与入射光的波长和复合物颗粒大小和多少有关。散射光的强度与复合物的含量成正比,即待测物越多,形成的复合物越多,散射光就越强。这种方法一般样本用量小,低值灵敏度好,误差小,但线性较窄,高值样本需反复稀释。

[0003] 在临幊上免疫透射比浊主要用于生化检测,免疫散射比浊主要用于特定蛋白检测。目前,特定蛋白检测在国内已经成为常规检测项目,随着越来越多的特定蛋白被应用于临幊,其检测方法也迅速发展,对特定蛋白即时检测的需求也越来越大。但是目前国内的特定蛋白分析仪主要以进口为主,国内只有少数厂家具有生产能力,所有检测系统基本以散射免疫比浊法为主,进口产品对于医院而言存在成本高、负担大的劣势,而国内生产的特定蛋白分析仪存在对高值样本需反复稀释,增加检测成本等缺陷。表1列举了现有免疫透射和散射比浊技术在应用中的优缺点。

[0004] 表1现有透射和散射比浊技术的比较

	现有技术	方法学	优点	缺点	备注
[0005]	现有技术 1	免疫散射比浊法	灵敏度高	线性范围窄,高值样本需稀释, 检测成本高、速度慢	—
	现有技术 2	免疫透射比浊法	单个检测, 适合少量	灵敏度低	—
	现有技术 3	免疫透射比浊法 /免疫散射比浊法	—	—	检测时只能选择一种方法进行, 并不能实现二者同时测定

[0006] 从上表中可以看出仅仅采用透射免疫比浊法或者散射免疫比浊法都存在一定的缺陷,但真正能将透射和散射结合,在同一次测定中,同时能获得透射比浊和散射比浊结果,目前还没有相关仪器,现有技术3虽然实现了将透射比浊和散射比浊组合在一起,但检

测时只能选择一种方法进行,并不能实现二者同时测定。因此,如何规避仅仅采用透射或者散射的不足而实现高灵敏度、宽线性范围检测是新的研究热点和方向,研发出一种实用、高效、简便的检测方法符合市场所需。

发明内容

[0007] 针对上述现有技术的不足之处,本发明提供一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法,它具体有可直接应用于特定蛋白透射和散射比浊二合一仪器,结合对同一测试同时获得的透射和散射检测结果,根据已设定的规则进行取舍并报出被测对象的最终浓度,从而保障检测结果的高灵敏度及宽线性,能够避免单独采用透射或者单独采用散射测定存在的缺陷。

[0008] 一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法,利用试剂R1、R2及校准品,基于免疫比浊原理利用透射和散射二合一仪器对同一测试同时获得透射和散射检测结果,其特征在于:

[0009] (1)结合同时获得的透射和散射检测结果,利用散射检测结果保证低值区的灵敏度;

[0010] (2)结合同时获得的透射和散射检测结果,利用透射检测结果保证中、高值区灵敏度;

[0011] (3)通过调整被测对象的样本量以同时满足透射和散射检测需求并同时获得透射和散射检测结果,更具体地,通过增加常规用于散射检测的样本量或减少常规用于透射检测的样本量,将被测样本的同一测试同时用于透射和散射检测,结合同时获得的透射和散射检测结果,通过散射检测结果提高检测灵敏度,通过透射检测结果提高线性。

[0012] 作为优选的,其检测方法包括:

[0013] (1)被测对象是抗原或抗体,所述被测对象所处的环境是人的体液,包括血清、血浆、尿液、脑脊液等;

[0014] (2)透射检测时,样本中的被测对象与其相对应的抗体或抗原结合后,形成免疫复合物,通过测定透射吸光度的变化量,根据校准曲线来确定样本中的被测对象的浓度;

[0015] (3)散射检测时,样本中的被测对象与其相对应得抗体或抗原结合后,形成免疫复合物,通过检测散射光强度的变化量,根据校准曲线来确定样本中的被测对象的浓度;

[0016] (4)结合对同一个测试同时获得的透射和散射检测结果,根据已设定的规则通过软件自动进行取舍并报出被测对象的最终浓度。

[0017] 作为优选的,其检测方法包括:

[0018] 步骤一,取适量的被测样本、试剂R1加入反应杯,混匀并孵育10sec-300sec;

[0019] 步骤二,取适量的试剂R2加入上述混合溶液中,并混合均匀;

[0020] 步骤三,通过特定蛋白透射和散射二合一仪器在500-800nm处分别读取第一读数点透射吸光度A₁和散射光强度I₁;

[0021] 步骤四,通过特定蛋白透射和散射二合一仪器在500-800nm处分别读取第二读数点透射吸光度A₂和散射光强度I₂;

[0022] 步骤五,分别计算出 $\Delta A = A_2 - A_1$ 和 $\Delta I = I_2 - I_1$ 并根据校准曲线分别计算出被测对象透射和散射检测的结果并根据已设定的规则进行取舍,得出被测对象的最终浓度并报

出。

[0023] 本发明所带来的有益效果是：

[0024] 本发明提供了一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法，其优点在于利用特定蛋白透射和散射比浊二合一仪器，对同一测试同时获得透射和散射的检测结果，结合同时获得的透射和散射检测结果，根据已设定的规则通过软件自动进行取舍并报出被测对象的最终浓度，利用散射检测结果保证低值区的灵敏度，利用透射检测结果保证中、高值区灵敏度，从而提高检测灵敏度和线性，满足临幊上对高灵敏度、宽线性的检测需求。

附图说明

[0025] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明：

[0026] 图1是本发明的一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法的操作步骤示意图；

[0027] 图2-1-1是本发明658nm波长散射光下不同浓度CRP光强度变化；

[0028] 图2-1-2是本发明658nm波长透射光下不同浓度CRP吸光度变化；

[0029] 图2-1-3是本发明的CRP的线性范围测定；

[0030] 图2-1-4本发明CRP检测方法与国内某知名品牌比对试剂/检测方法相关性；

[0031] 图2-2-1是本发明658nm波长散射光下不同浓度SAA光强度变化；

[0032] 图2-2-2是本发明658nm波长透射光下不同浓度SAA吸光度变化；

[0033] 图2-2-3是本发明的SAA的线性范围测定；

[0034] 图2-2-4是本发明SAA检测方法与国际某知名品牌比对试剂/检测方法相关性；

具体实施方式

[0035] 下面结合实施例对本发明作进一步的详述：

[0036] 为使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解，下面结合具体实施方式，进一步阐述本发明。

[0037] 实施例1

[0038] 一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法，利用试剂R1、R2及校准品，基于免疫比浊原理利用透射和散射二合一仪器对同一测试同时获得透射和散射检测结果。

[0039] 具体而言，该一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法包括：

[0040] (1) 结合同时获得的透射和散射检测结果，利用散射检测结果保证低值区的灵敏度；

[0041] (2) 结合同时获得的透射和散射检测结果，利用透射检测结果保证中、高值区灵敏度；

[0042] (3) 通过调整被测对象的样本量以同时满足透射和散射检测需求并同时获得透射和散射检测结果，更具体地，通过增加常规用于散射检测的样本量或减少常规用于透射检测的样本量，将被测样本的同一测试同时用于透射和散射检测，结合同时获得的透射和散射检测结果，通过散射检测结果提高检测灵敏度，通过透射检测结果提高线性。

[0043] 其中：

[0044] (1) 被测对象是抗原或抗体，所述被测对象所处的环境是人的体液，包括血清、血浆、尿液、脑脊液等；

[0045] (2)透射检测时,样本中的被测对象与其相对应的抗体或抗原结合后,形成免疫复合物,通过测定透射吸光度的变化量,根据校准曲线来确定样本中的被测对象的浓度;

[0046] (3)散射检测时,样本中的被测对象与其相对应得抗体或抗原结合后,形成免疫复合物,通过检测散射光强度的变化量,根据校准曲线来确定样本中的被测对象的浓度;

[0047] (4)结合对同一个测试同时获得的透射和散射检测结果,根据已设定的规则通过软件自动进行取舍并报出被测对象的最终浓度。

[0048] 更具体地:

[0049] 步骤一,取适量的被测样本、试剂R1加入反应杯,混匀并孵育10sec-300sec;

[0050] 步骤二,取适量的试剂R2加入上述混合溶液中,并混合均匀;

[0051] 步骤三,通过特定蛋白透射和散射二合一仪器在500-800nm处分别读取第一读数点透射吸光度A₁和散射光强度I₁;

[0052] 步骤四,通过特定蛋白透射和散射二合一仪器在500-800nm处分别读取第二读数点透射吸光度A₂和散射光强度I₂;

[0053] 步骤五,分别计算出 $\Delta A = A_2 - A_1$ 和 $\Delta I = I_2 - I_1$ 并根据校准曲线分别计算出被测对象透射和散射检测的结果并根据已设定的规则进行取舍,得出被测对象的最终浓度并报出。

[0054] 下面分别以C-反应蛋白、血清淀粉样蛋白A作为被测对象为例,进行更详细的说明。

[0055] 实施例2-1

[0056] 见图1所示,一种提高C-反应蛋白免疫比浊检测灵敏度和线性的检测方法,利用C-反应蛋白检测试剂R1、R2及校准品,进行C-反应蛋白检测的方法为:

[0057] 所用检测仪器为:特定蛋白透射和散射二合一仪器

[0058] 分析方法:两点终点法。

[0059] 反应方向为:上升反应;

[0060] 校准方式为:Spline;

[0061] 测定波长:透射(658nm)、散射(658nm);

[0062] 测定温度:37℃;

[0063] 样本:试剂R1:试剂R2=0.25μL:180μL:100μL;

[0064] 方法步骤:

[0065] 步骤一,取0.25μL样本和180μL试剂R1加入反应杯,混匀并孵育3min;

[0066] 步骤二,取100μL试剂R2加入上述混合溶液中,并混合均匀;

[0067] 步骤三,通过特定蛋白透射和散射二合一仪器在658nm处分别读取第一读数点透射吸光度A₁和散射光强度I₁;

[0068] 步骤四,通过特定蛋白透射和散射二合一仪器在658nm处分别读取第二读数点透射吸光度A₂和散射光强度I₂;

[0069] 步骤五,通过软件分别计算出 $\Delta A = A_2 - A_1$ 和 $\Delta I = I_2 - I_1$ 并根据校准曲线分别计算出被测对象透射和散射检测的结果并根据已设定的规则进行取舍,得出C-反应蛋白的最终浓度并报出。

[0070] 在658nm波长散射光下,不同浓度CRP光强度变化如图2-1-1;在658nm波长透射光

下,不同浓度CRP吸光度变化如图2-1-2。当CRP浓度 $\leqslant 50\text{mg/L}$ 时,取散射检测结果,当CRP浓度 $>50\text{mg/L}$ 取透射检测结果。

[0071] 对C-反应蛋白试剂线性范围测定:用CRP校准品配制成高浓度样本,用生理盐水按常规比例分别进行倍比稀释,使用实施例2-1中CRP试剂R1、R2重复测定每个样本3次,计算均值,求出回归方程,并通过回归方程计算出理论值,所得结果详见图2-1-3。从结果可以得出,C-反应蛋白试剂线性范围为0.5-500mg/L,检测灵敏度高且线性宽,满足临床高灵敏度、宽线性的检测需求。

[0072] 将本发明CRP检测方法与国内某知名品牌比对试剂检测方法进行相关性试验,对100例血清样本进行测定,对测定值进行相关性分析,结果如图2-1-4,本发明CRP检测方法与国内某知名品牌比对试剂检测方法相关系数 $R^2=0.9988$,表明本发明检测方法与国内某知名品牌比对试剂检测方法具有良好的相关性。

[0073] 实施例2-2

[0074] 见图1所示,一种提高血清淀粉样蛋白A免疫比浊检测灵敏度和线性的方法,利用血清淀粉样蛋白A检测试剂R1、R2及校准品,进行血清淀粉样蛋白A检测的方法为:

[0075] 所用检测仪器为:特定蛋白透射和散射二合一仪器

[0076] 分析方法:两点终点法。

[0077] 反应方向为:上升反应;

[0078] 校准方式为:Spline;

[0079] 测定波长:透射(658nm)、散射(658nm);

[0080] 测定温度:37℃;

[0081] 样本:试剂R1:试剂R2=0.25μL:120μL:100μL;

[0082] 方法步骤:

[0083] 步骤一,取0.25μL样本和120μL试剂R1加入反应杯,混匀并孵育3min;

[0084] 步骤二,取100μL试剂R2加入上述混合溶液中,并混合均匀;

[0085] 步骤三,通过特定蛋白透射和散射二合一仪器在658nm处分别读取第一读数点透射吸光度 A_1 和散射光强度 I_1 ;

[0086] 步骤四,通过特定蛋白透射和散射二合一仪器在658nm处分别读取第二读数点透射吸光度 A_2 和散射光强度 I_2 ;

[0087] 步骤五,通过软件分别计算出 $\Delta A=A_2-A_1$ 和 $\Delta I=I_2-I_1$ 并根据校准曲线分别计算出被测对象透射和散射检测浓度并根据已设定的规则进行取舍,得出血清淀粉样蛋白A的最终浓度并报出。

[0088] 在658nm波长散射光下,不同浓度SAA光强度变化如图2-2-1;在658nm波长透射光下,不同浓度SAA吸光度变化如图2-2-2。当SAA浓度 $\leqslant 100\text{mg/L}$ 时,取散射检测结果,当SAA浓度 $>100\text{mg/L}$ 取透射检测结果。

[0089] 对血清淀粉样蛋白A试剂线性范围测定:用SAA校准品配制成高浓度样本,用生理盐水按常规比例分别进行倍比稀释,使用实施例2-2中SAA试剂R1、R2重复测定每个样本3次,计算均值,求出回归方程,并通过回归方程计算出理论值,所得结果详见图2-2-3。从结果可以得出,血清淀粉样蛋白A试剂线性范围为3.0-600mg/L,检测灵敏度高且线性宽,满足临床高灵敏度、宽线性的检测需求。

[0090] 本发明SAA检测方法与国际某知名品牌比对试剂检测方法进行相关性试验,对100例血清样本进行测定,对测定值进行相关性分析,结果如图2-2-4,本发明SAA检测方法与国际某知名品牌比对试剂检测方法相关系数 $R^2=0.9986$,表明本发明检测方法与国际某知名品牌比对试剂检测方法具有良好的相关性。

[0091] 以上显示和描述了本发明的基本原理和主要特征和本发明的优点,对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节。

[0092] 发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

[0093] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

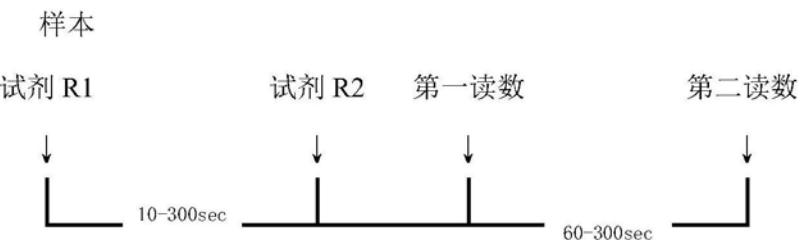


图1

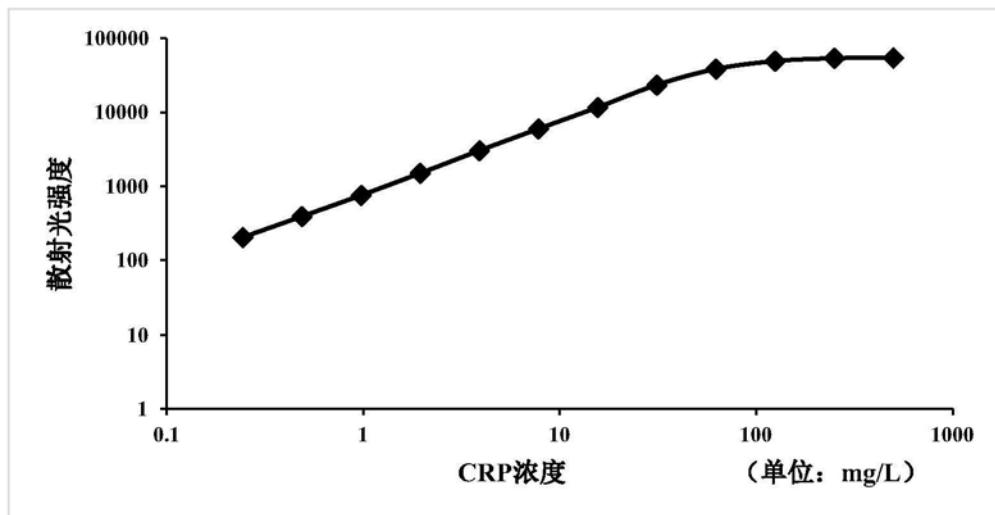


图2-1-1

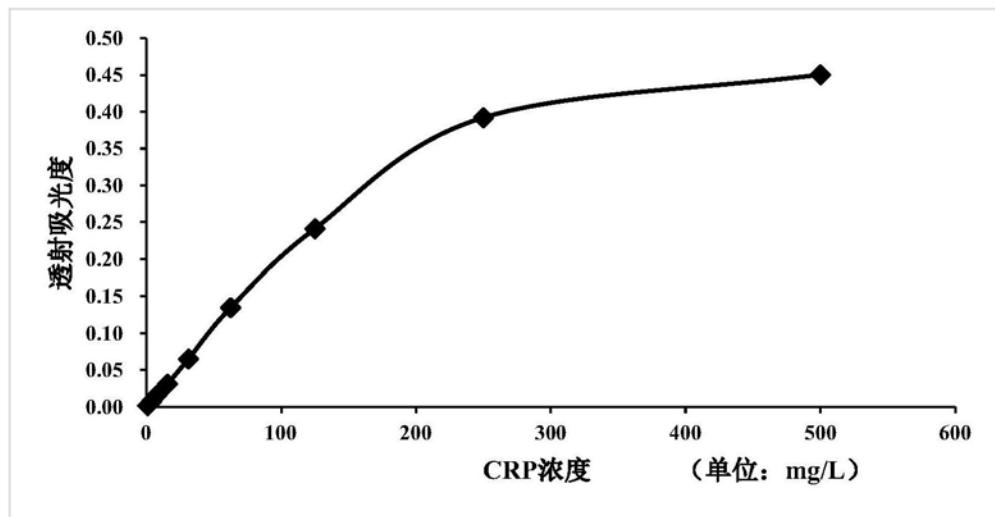


图2-1-2

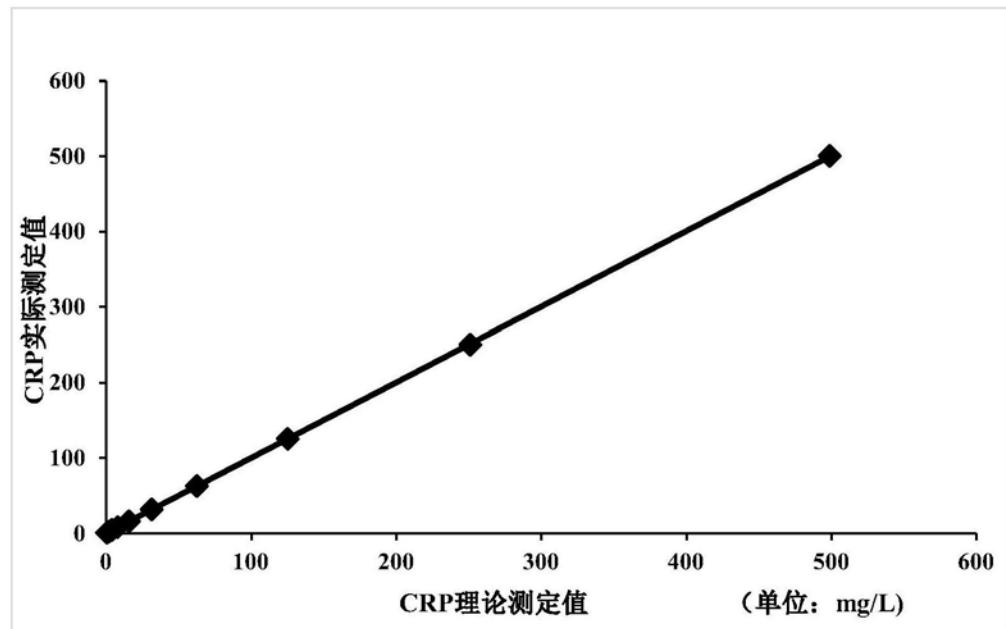


图2-1-3

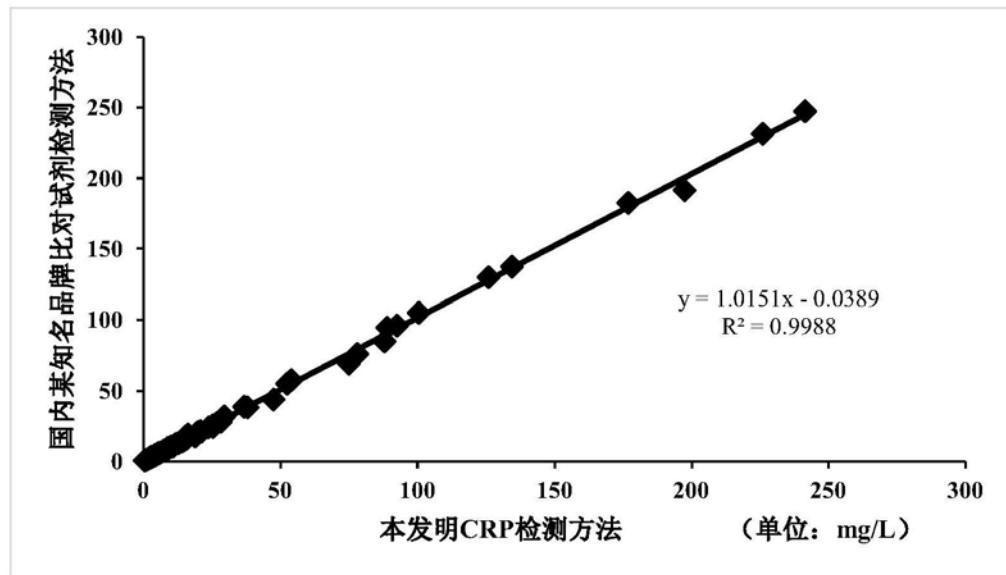


图2-1-4

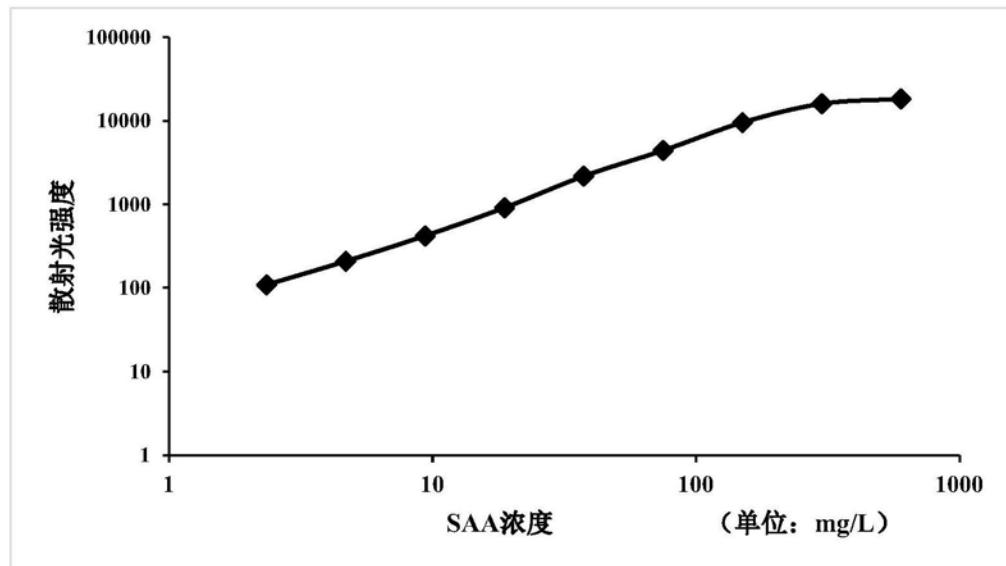


图2-2-1

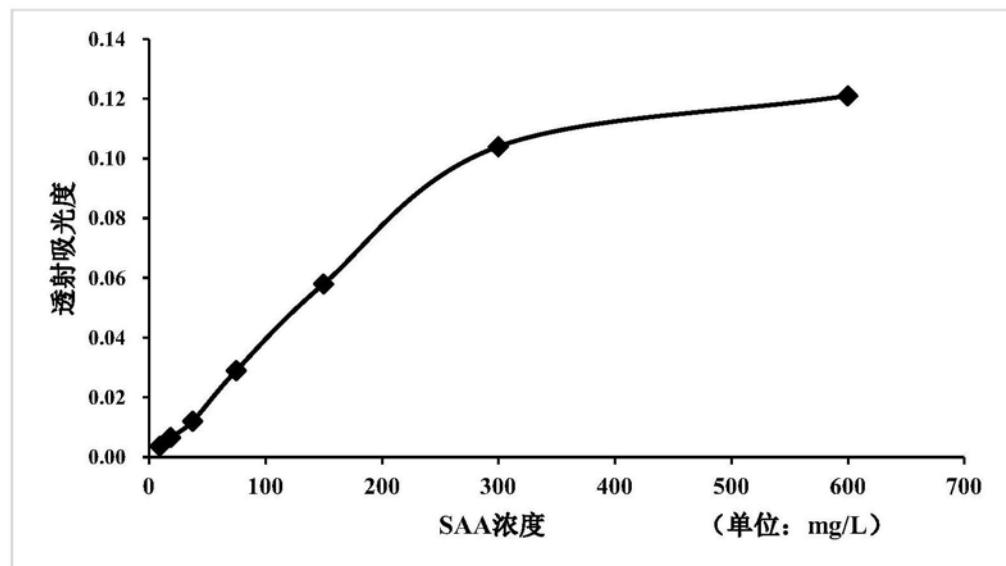


图2-2-2

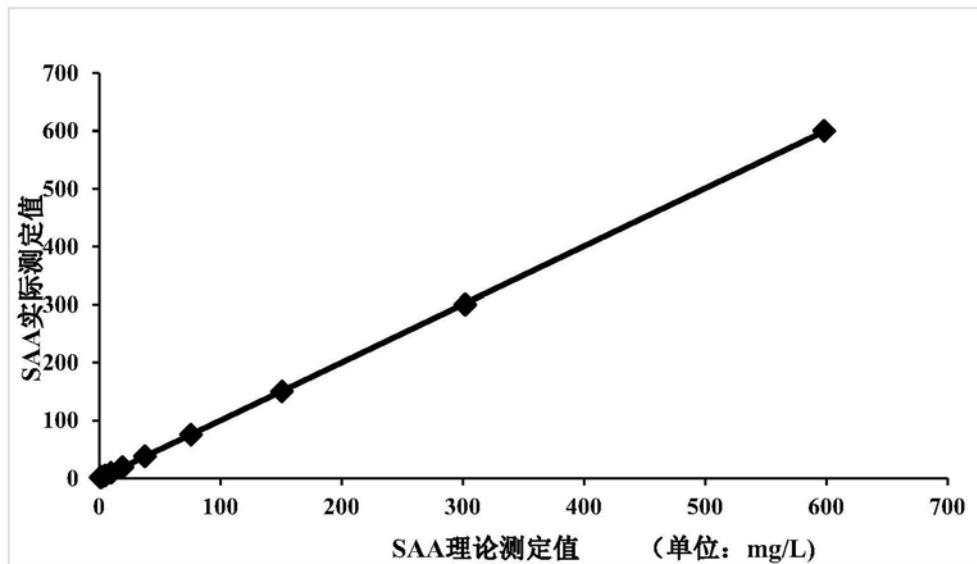


图2-2-3

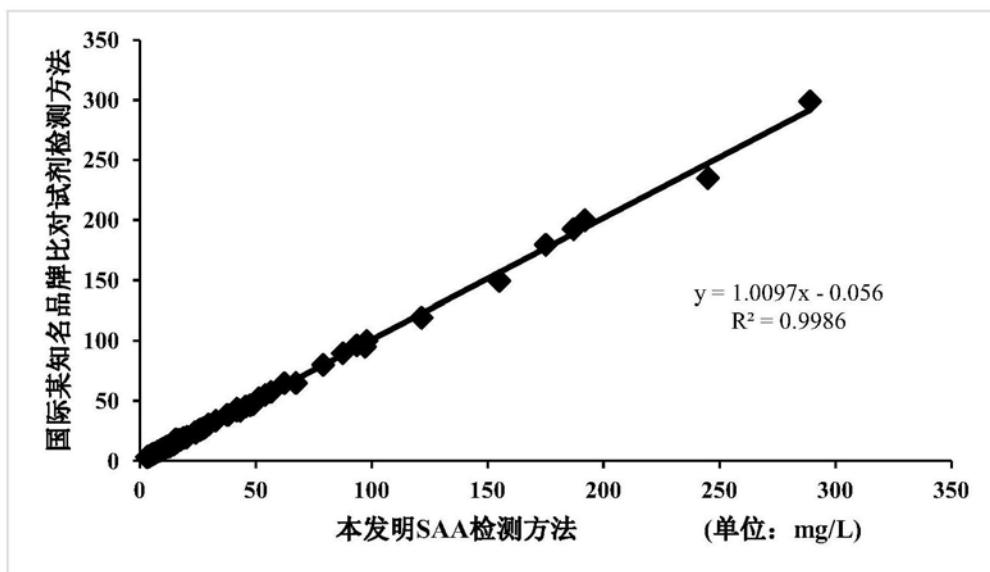


图2-2-4

专利名称(译)	一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法		
公开(公告)号	CN110296944A	公开(公告)日	2019-10-01
申请号	CN201910360498.5	申请日	2019-04-30
[标]申请(专利权)人(译)	宁波普瑞柏生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	宁波普瑞柏生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	宁波普瑞柏生物技术股份有限公司		
[标]发明人	余文娟 吴永菲 范翠翠 涂小宁 许国和		
发明人	余文娟 吴永菲 范翠翠 涂小宁 许国和		
IPC分类号	G01N21/31 G01N33/532 G01N33/536 G01N33/68		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/532 G01N33/536 G01N33/6803		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及特定蛋白检测技术领域，具体地说是一种提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法。该提高免疫比浊检测灵敏度和线性的方法是利用试剂R1、R2及校准品，基于免疫比浊原理利用透射和散射二合一仪器对同一测试同时获得透射和散射检测结果的检测方法。

样本

