

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/536 G01N 33/544

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00109912.4

[43] 公开日 2001 年 2 月 14 日

[11] 公开号 CN 1283794A

[22] 申请日 2000.7.12 [21] 申请号 00109912.4

[71] 申请人 华西医科大学

地址 610041 四川省成都市人民南路三段十七号

[72] 发明人 李毓琦 李明远 何俊 龚其美

[74] 专利代理机构 华西医科大学专利事务所

代理人 马碧娜

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 同步快速测定多项免疫指标技术

[57] 摘要

本发明提供一种同步快速测定多项免疫指标技术,它应用酶联免疫分析原理,经抗体或扩原膜的制备及组装;免疫复合物膜及夹心膜的形成;显色及结果测定等步骤,完成多项免疫指标测定。本发明特点是应用蚕丝绸膜作为生物活性物质载体膜;采用微波辐射加速免疫与显色反应;采用反射式光纤免疫测量仪测定结果。应用该技术制成适于同步快速免疫分析体系的试剂盒,适用于医药、卫生、食品、环境等单位分析检测,亦适用于家庭及患者个人自测。

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

权 利 要 求 书

1. 一种同步快速测定多项免疫指标技术，其特征是应用蚕丝膜作为生物活性物质载体膜；采用微波辐射及反射式光纤传导技术，能同步快速完成多项免疫指标检测，本发明测定免疫指标的步骤如下：

(1) 抗体或抗原膜的制备及组装：应用蚕丝膜作为生物活性物质载体膜，利用溴化氰活化修饰抗体或抗原于该膜上，将不同的抗体或抗原膜组装于测试片上；

(2) 免疫复合物膜的形成：采用微波辐射加速免疫反应；

(3) 免疫夹心膜的形成：采用微波辐射加速免疫反应；

(4) 显色：采用微波辐射加速酶促显色反应；

(5) 结果测定：采用反射式光纤免疫测量仪测定或目测。

2. 据权利要求 1 所述的同步快速测定多项免疫指标技术，其特征是在检测中采用微波辐射的时间为 3~5 分钟。

3. 据权利要求 1.2 所述的同步快速测定多项免疫指标技术，其特征是利用该技术可制成适于同步免疫分析体系的试剂盒应用。

同步快速测定多项免疫指标技术

本发明系免疫分析技术的一种,它应用酶联免疫分析的原理,采用新的材料和方法,能同步快速地测定多项目的免疫指标,利用该项技术制成的不同试剂盒适用于各种免疫分析领域。

免疫分析技术,目前应用最为广泛的是放射免疫法(RIA, 1956, yalow)和酶联免疫吸附法(ELISA, 1971, Engvall),后者无放射性污染且成本较低,目前应用最为广泛。过去 ELISA 法采用“二步测定法”,方法灵敏,结果准确可靠,但检测时间较长及步骤较繁,往往患者当日不能得到检验结果。近年来,改用“一步测定法”以简化操作步骤和缩短检验时间,虽已取得一定成效,但据权威人士评价,此法对浓度过高或过低的被测物质不易检出,同时易造成假阴性(中华医学检验杂志, 1993,16:351; 标记免疫分析与临床杂志, 1994,1:117)。加之 ELISA 法所用的抗体或抗原的包被板(常称酶标板)系惰性高分子材料,抗体或抗原包被时仅靠物理吸附,其结合牢固程度差,放置时间超过6个月或受外界条件影响,抗体(或抗原)即自动解吸,该板在启封后1个月内必须使用完毕,否则失效。此外,ELISA 法的包被板为分散型,即单项目多人份测定,最后综合报告患者的各项检验结果,无法多指标同步测定,按人自动处理结果,也无法让患者进行自查。

本发明旨在应用酶联免疫分析原理,使用蚕丝绸作为生物活性物质的载体材料,应用微波辐射(MW)加速免疫反应与显色反应,利用反射式光纤传导技术,使原来数十分钟单项完成的免疫检测,能在数分钟之内多项指标同步完成。

本发明的技术方案如下:

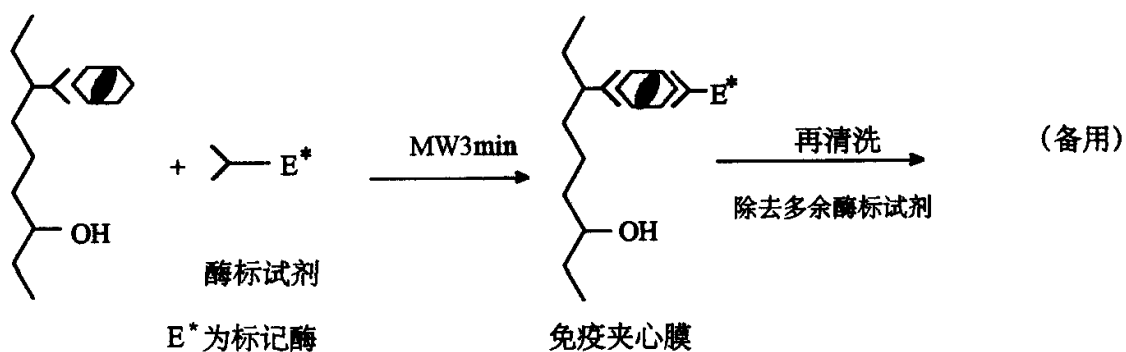
1. 抗体或抗原膜的制备及组装(可批量生产)

采用具有化学活性基团(-OH, -NH₂)的蚕丝绸膜,以溴化氰活化,然后再与具有-NH₂基的抗体、抗原、受体、及其它蛋白等偶联,形成抗体或抗原膜,将不同的抗体或抗原膜组装在同一测试片上(参见实施例示意图),存放于试剂盒内以进行检测(见技术方案2、3、4、5)。

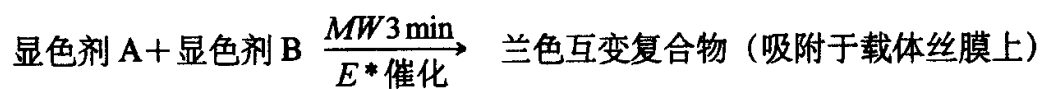
原理如下：



原理如下：



4. 显色 夹心膜上的标记酶 E^* 将催化下列反应:



5. 结果测定：①仪器测定：用反射式光纤免疫测量仪

②目测：与标准色列比较

本发明与常规的酶联免疫吸附法（ELISA）比较其优点如下：

（1）反应时间短：反应时间仅为市售 ELISA 一步法试剂盒反应时间的 1/8，因本法应用微波辐射代替 ELISA 法恒温孵育。

（2）能批量处理样本，可单项目多人份测定，亦可 1 人份多项目同步测定，这样不仅避免了不同患者血清的相互干扰，且可用仪器自动按人检测、记录、打印结果，以缩短检测周期，避免人为抄录报告的差错。

（3）抗体（或抗原）膜用化学修饰方法制备（以溴化氰活化法修饰抗体或抗原于丝膜上），它与 ELISA 采用的物理吸附法（包被）比较，其抗体（或抗原）结合率高 2~3 倍，且稳定性好，活性保存期长达数年。

（4）抗体（或抗原）膜可工业化批量生产，成本低廉。

（5）固态膜上显色结果可直接用反射式光纤免疫测量仪同步测定，由于光纤传导抗干扰力强，故该仪器较 ELISA 检测所用的酶标光度仪灵敏度高。

（6）固态膜上显示的测定结果，可直接作为实物资料长期保存。

（7）制成试剂盒附带的试剂品种比 ELISA 法现行试剂盒大大减少。

（8）本法可直接测定全血样本，对于普查更为方便。

本发明的技术特点是：

①首次使用蚕丝膜作为生物活性物质载体膜（ELISA 法使用的是聚苯乙烯板）；

②检测中首次应用微波幅射加速免疫反应及酶促显色反应（ELISA 法用恒温孵育）；

③首次应用自行设计与研制的反射式光纤免疫测量仪测定结果（ELISA 法用酶标光度仪）；

④利用上述三项技术能快速、同步测定多项免疫指标。

本发明的技术特点目前尚未见国内外文献报道

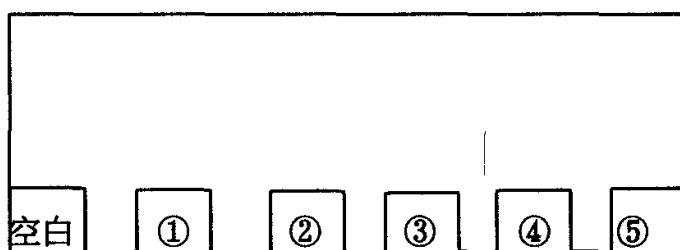
本发明同步快速测定多项免疫指标技术及其利用该技术制成的试剂盒能同步测定多项免疫指标，并缩短检测时间；同时避免假阴性结果出现；使用方便，并能应用微机全自动处理检测结果。它不仅适用于医药、卫生、食品、环保等单位分析检测使用，同时亦适于患者个人及家庭自查使用。

实施例：

应用于乙型肝炎病毒五项（HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc）免疫指标的同步测定。

1、用化学修饰法制备抗体（或抗原）膜，将不同的抗体或抗原膜组装在同一测试片上（见示意图），存放于试剂盒中。2、将被检血清滴加于已用化学修饰法制备备用的抗体（或抗原）膜上，微波辐射 3min，形成 Ag-Ab 复合膜，然后纯水冲洗 1 次，吸干备用。3、将预先制备的酶标抗体（或抗原）膜复盖于上述复合膜上，再次微波辐射 3min，使形成抗体-抗原夹心膜（或双抗结合膜），经纯水 3 次洗涤，吸干备用。4、将显色剂滴加于夹心膜上，再度微波辐射 3min，最后经纯水冲洗 1 次以终止反应。5、应用反射式光纤免疫测量仪测定，结果仍以 $S/N > 2.1$ （样品/空白的比值）表示阳性结果，亦可用肉眼观察并与标准色板比较判定结果。

乙肝病毒五项免疫指标同步测试片示意图：



- | | |
|------------|-----------------|
| ①修饰抗-HBs | 检测 HBsAg |
| ②修饰抗-HBsAg | 检测抗-HBs |
| ③修饰抗-HBe | 检测 HBeAg |
| ④修饰抗-HBe | 检测抗-HBe（配以中和试剂） |
| ⑤修饰抗-HBcAg | 检测抗-HBc |

以上操作时间仅为三个 3 分钟，故简称“三三”法。

专利名称(译)	同步快速测定多项免疫指标技术		
公开(公告)号	CN1283794A	公开(公告)日	2001-02-14
申请号	CN00109912.4	申请日	2000-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	华西医科大学		
申请(专利权)人(译)	华西医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	华西医科大学		
[标]发明人	李毓琦 李明远 何俊 龚其美		
发明人	李毓琦 李明远 何俊 龚其美		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 G01N33/544		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种同步快速测定多项免疫指标技术,它应用酶联免疫分析原理,经抗体或扩原膜的制备及组装;免疫复合物膜及夹心膜的形成;显色及结果测定等步骤,完成多项免疫指标测定。本发明特点是应用蚕丝绸膜作为生物活性物质载体膜;采用微波辐射加速免疫与显色反应;采用反射式光纤免疫测量仪测定结果。应用该技术制成适于同步快速免疫分析体系的试剂盒,适用于医药、卫生、食品、环境等单位分析检测,亦适用于家庭及患者个人自测。