

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/539 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710180326.7

[43] 公开日 2009 年 4 月 15 日

[11] 公开号 CN 101408543A

[22] 申请日 2007.10.13

[21] 申请号 200710180326.7

[71] 申请人 陈纯美

地址 350025 福建省福州市西洪路 312 号

[72] 发明人 陈纯美

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称

差异反应免疫检测法

[57] 摘要

一种微粒免疫检测法，其特征是将标本稀释成不同浓度(可用本法在反应孔中稀释)，分别加入反应孔，使各浓度反应结果叠加；反应后将上清液或稀释上清液吸入另一孔对照反应显示，或在同一孔中分步反应显示，再算出沉集物的显示值，查出待测物浓度。可减少 hook 效应，省去洗涤。

1 一种微粒免疫检测法,其特征是将同一待测标本稀释成不同浓度,分别加入反应孔;反应后将上清液(或稀释上清液)吸入另一孔对照反应显示,或将上清液(或稀释上清液)和沉集物在同一孔中分步反应显示,再算出沉集物的显示值,查出待测物浓度。

2 根据权利要求1所述检测法,用磁性分离时在反应孔底侧部或侧面、上侧部放置磁体,使沉集物沉积于孔底或孔壁的一侧。

3 根据权利要求1所述检测法,微量稀释法是用一尖头物蘸取微量标本,置入反应孔的液体中,使尖头上标本微量进入液中。

4 根据权利要求1所述检测法,预先封闭反应孔蛋白结合位点后,可先加试剂后加标本。

差异反应免疫检测法

技术领域 本发明涉及一种医用免疫检测法，特别是一种用一份标本不同浓度反应和对照显示反应产物的微粒免疫检测法。

背景技术 现有的微粒固相检测法的原理是以微粒为载体，在液相中捕获待测物，形成微粒免疫复合物，再使微粒免疫复合物沉降，去掉上清液，洗涤后检测沉淀物的显示值，算出标本中待测物浓度。现有的磁性酶联免疫夹心法用针对待测抗原的一株单克隆抗体标记酶 AKP，另外一株单克隆抗体标记荧光素 FITC；检测时将待测抗原与 AKP 标单抗和 FITC 标单抗混匀结合形成“夹心三明治”，加入包被有羊抗 FITC 抗体的磁性微粒，反应后外加磁场沉淀，去掉上清液，洗涤沉淀物，加入底物显示结果。以上两法检测高浓度标本时都有 hook 效应（太高浓度待测物呈假阴性），而且都需反复洗涤以除去未结合的标记物。

发明内容

本发明的目的是建立一种可减少 hook 效应和可不用常规洗涤的微粒免疫检测法。

本发明的目的是这样实现的，将同一待测标本稀释成不同浓度，在操作过程中分别加入反应管或孔；反应后将部分或全部上清液（或稀释的上清液）吸入另一孔对照反应显示，或将上清液（或稀释的上清液）和沉集物在同一反应孔中分步反应显示，再算出沉集物的显示值，查出待测物浓度。

方案分述如下：

1. 用微量稀释法在反应孔或管（可预先封闭蛋白结合位点）中用稀释液或试剂稀释待测标本，加入试剂 I（比如标记的抗体），反应后将未稀释标本加入该反应孔；反应后在该孔中加入试剂 II（已包被另一株单抗或抗抗体或金葡菌 A 蛋白等的磁性微粒）；反应后在反应孔底侧部或侧面、上侧部外加磁场，使沉集物积于孔底或孔壁的一侧；取部分或全部上清液（或稀释上清液）加入另一孔（孔 2），去掉原孔（孔 1）上清液（或保留部分上清液在孔 1），分别加入显示底物，反应后加入终止液，测显示值，对照孔 1 和孔 2 及空白孔显示值算出沉集物的显示值，查出待测物浓度。也可待沉集物沉淀堆积于孔底一侧后，在磁场固定下（或离心固定），去掉部分或全部上

清液，将洗稀液和/或底物液加入该孔，反应一定时间后，测显示值；然后去掉磁场，使沉淀物重悬混匀，再反应一定时间后，再使沉集物沉淀于孔底一侧，再测上清液显示值，算出待测物浓度。

2. 微量稀释法：在反应孔（可预先封闭蛋白结合位点）中先加入稀释液或试剂；用一尖头物（比如微量加样器的吸嘴）置入待稀释的标本中，使尖头外面蘸湿（或将液体吸入再打出，使尖头里外面都蘸湿）；移出尖头，在管壁接触片刻或一纸垫上轻点一下，除去多余液体；将尖头置入反应孔的液体中，使尖头所蘸标本微量进入液体中，再移出尖头，由此达到高倍数直接稀释的目的。

以上方案中也可将标本稀释成多种浓度分多步加入；标记用的荧光素也可用其他适合标记的物质（比如地高辛、生物素等）替代；磁性微粒也可用血球、胶乳或聚乙二醇等可用于分离的试剂替代；标记用的酶也可用荧光素、发光物、同位素、稀土元素等替代。分配上清液时，可以1比1或其他比例分配。也可标记抗原，检测相应抗体。

方案特点：

1. 试剂 I、试剂 II 和标本的适当比例可使标本的各浓度得以充分反应显示，显示值可以叠加，使高浓度标本的显示值大于某一阈值，提示应作进一步稀释定量，从而减少或排除 hook 效应。取上清液另孔对照测定或原孔对照测定，可算出沉集物的显示值，故可省去常规洗涤。

2 微量稀释法可直接在反应孔中作高倍数稀释，简便节省。

3. 磁性分离时在反应孔底侧部或侧面、上侧部放置磁体，可使沉集物积于孔壁一侧，故可直接在该孔比色。

4. 预先封闭反应孔蛋白结合位点可减少塑料孔对蛋白的吸附，可先加试剂后加标本。

以上特点可分别组合使用或与别的方法组合使用。

具体实施方式

实施例（一）：差异夹心法（两孔）检测甲胎蛋白（AFP）

取 3~50 μ l 稀释液加入反应孔中，用一微量加样器取一干燥洁净吸嘴，将吸嘴置入标本中，使吸嘴尖头外面被标本蘸湿，移出吸嘴，在管壁接触片刻，再插入反应孔的稀释液中，再移出吸嘴；加入试剂 I（5~50 μ l 酶 AKP 标记单抗、5~50 μ l 荧光素

FITC 标记单抗), 混匀, 37℃反应后将未稀释标本加入该孔, 混匀, 37℃反应后加入试剂 II (已包被抗 FITC 抗体的磁性微粒) 10~100μl, 混匀, 37℃反应后在孔底侧部外加磁场, 使沉集物堆于孔底的一侧。在磁场中固定沉淀物, 去掉原孔 (孔 1) 中全部上清液, 加入洗稀液, 再将孔 1 中洗稀液移入孔 2; 去掉磁场, 在孔 1 和孔 2 中分别加入适量显示底物, 混匀反应后分别加入适量终止液, 测吸光度 A 值, 对照两孔 A 值及空白孔 A 值算出沉淀物的显示值, 从标准曲线查出 AFP 浓度。

实施例 (二): 差异夹心法 (单孔) 检测 C 肽

取试剂 I (10~50μl 酶 HRP 标记单抗、10~50μl 荧光素 FITC 标记单抗) 加入反应孔 (已预封闭); 用一微量加样器取一干燥洁净吸嘴, 将吸嘴置入标本中, 使吸嘴尖头外面被标本蘸湿, 移出吸嘴, 在管壁接触片刻, 再插入反应孔的试剂 I 中并移出吸嘴, 混匀, 37℃反应后加入试剂 II (已包被抗 FITC 抗体的磁性微粒) 20~100μl, 混匀, 37℃反应后在孔底侧部外加磁场, 使沉集物沉淀于孔底的一侧。在磁场中固定沉淀物, 去掉孔中上清液, 加入底物液, 37℃反应后, 测吸光度 A 值; 然后去掉磁场, 使沉淀物重悬混匀, 反应一定时间后, 再使之沉淀于孔底一侧, 再测上清液吸光度 A 值, 计算 A 值差并校正沉淀物对上清液 A 值的影响, 查出 C 肽浓度。

实施例 (三): 差异竞争法检测促甲状腺素 (TSH)

取 5~50μl 标本加入反应孔中, 加入试剂 I (5~50μl 抗 TSH 抗体 (兔抗人) 和 5~50μl 酶标记 TSH 抗原), 混匀, 37℃反应后加入试剂 II (已包被羊抗兔抗体的磁性微粒) 10~100μl, 混匀, 37℃反应后在孔底侧部外加磁场, 使沉集物堆于孔底的一侧。在磁场中固定沉淀物, 去掉原孔 (孔 1) 中全部上清液, 加入洗稀液, 再将孔 1 中洗稀液移入孔 2; 在孔 1 和孔 2 中分别加入适量显示底物, 混匀反应后分别加入适量终止液, 测吸光度 A 值, 对照两孔 A 值及空白孔 A 值算出沉淀物的显示值, 从标准曲线查出 TSH 浓度。

专利名称(译)	差异反应免疫检测法		
公开(公告)号	CN101408543A	公开(公告)日	2009-04-15
申请号	CN200710180326.7	申请日	2007-10-13
[标]发明人	陈纯美		
发明人	陈纯美		
IPC分类号	G01N33/539 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种微粒免疫检测法，其特征是将标本稀释成不同浓度(可用本法在反应孔中稀释)，分别加入反应孔，使各浓度反应结果叠加；反应后将上清液或稀释上清液吸入另一孔对照反应显示，或在同一孔中分步反应显示，再算出沉集物的显示值，查出待测物浓度。可减少hook效应，省去洗涤。