



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110514651 A

(43)申请公布日 2019.11.29

(21)申请号 201810806514.4

(22)申请日 2018.07.20

(66)本国优先权数据

201810491322.9 2018.05.21 CN

(71)申请人 博阳生物科技(上海)有限公司

地址 201210 上海市浦东新区张江蔡伦路
88号2号楼3楼东

申请人 北京科美生物技术有限公司

(72)发明人 杨阳 赵卫国 刘宇卉 李临

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

代理人 吴大建 陈伟

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

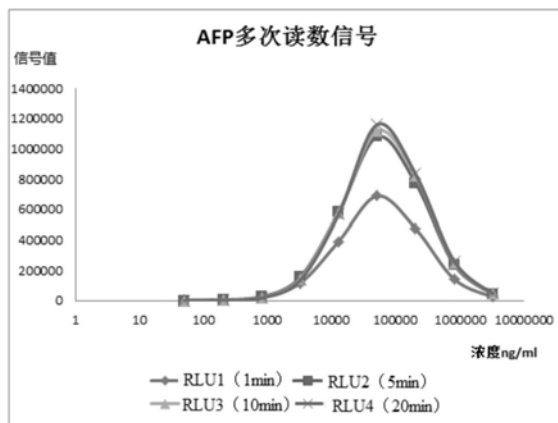
权利要求书5页 说明书24页 附图5页

(54)发明名称

一种化学发光免疫分析测定方法及使用该方法的系统、试剂盒

(57)摘要

本发明涉及化学发光技术领域的一种化学发光分析测定方法、一种使用化学发光分析测定方法的系统和一种试剂盒。本发明方法通过多次读数后,选取两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。



1. 一种化学发光免疫分析测定方法,其包括如下步骤:

(1) 将疑似含待测目标分子的待测样本与发生化学发光免疫反应所需的试剂混合后反应形成待测混合物;

(2) 先后 t 次激发所述待测混合物发生化学发光, n 次记录所述化学发光的信号值;其中,第 n 次记录的化学发光信号值记为读数 RLU_n ;

(3) 选取所述 n 次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数 RLU_m 和读数 RLU_k ,并将 RLU_m 和 RLU_k 的差值增幅记为 A ;

(4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数 RLU_m' 和 RLU_k' 的差值增幅 A' 做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

(5) 如果所述增幅 A 大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

其中, t 、 n 、 m 和 k 均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述增幅 $A = (RLU_m / RLU_k - 1) \times 100\%$ 。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述 n 大于2。

4. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述化学发光免疫反应为均相化学发光免疫反应。

5. 根据权利要求1-4中任意一项所述的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述发生化学发光免疫反应所需的试剂包括受体试剂和供体试剂;其中:

所述供体试剂中包含供体,所述供体能够在激发状态下生成单线态氧;

所述受体试剂中包含受体,所述受体能够与单线态氧反应产生可检测的化学发光信号值。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述受体是填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述发光化合物选自烯烃化合物,优选选自二甲基噻吩、双丁二酮化合物、二氧杂环己烯、烯醇醚、烯胺、9-亚烷基苍耳烷、9-亚烷基-N-9,10-二氢吡啶、芳基乙醚烯、芳基咪唑和光泽精以及它们的衍生物,更优选选自二甲基噻吩及其衍生物。

8. 根据权利要求6或7所述的方法,其特征在于,所述镧系元素化合物为镧配合物。

9. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶。

10. 根据权利要求5-9中任意一项所述的方法,其特征在于,所述受体与待测目标分子第一特异结合物直接地或间接地结合。

11. 根据权利要求5-10中任意一项所述的方法,其特征在于,所述供体是填充有感光化合物的高分子微粒,其在红色激光激发下可以产生单线态氧。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述感光化合物选自亚甲基蓝、玫瑰红、吡啶和酞菁中的一种。

13. 根据权利要求5-12中任意一项所述的方法,其特征在于,所述供体与标记物直接地或间接地结合。

14. 根据权利要求1-13中任意一项所述的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述发生化学发光免疫反应所需的试剂还包括待测目标分子第二特异结合物试剂;优选地,所述待测目标分子第二特异结合物与标记物特异结合物直接地或间接地结合。

15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于,步骤(1)中,先将含待测目标分子的待测样本与受体试剂以及待测目标分子第二特异结合物试剂混合,然后再将其与供体试剂混合。

16. 根据权利要求1-15中任意一项所述的方法,其特征在于,步骤(2)中,利用能量和/或活性化合物激发所述待测混合物发生化学发光;优选地,以600~700nm的红色激发光照射待测混合物激发其发生化学发光。

17. 根据权利要求1-16中任意一项所述的方法,其特征在于,步骤(2)中,记录所述化学发光信号值的检测波长为520~620nm。

18. 根据权利要求1-17中任意一项所述的方法,其特征在于,所述待测目标分子为抗原或抗体;其中,所述抗原是指具有免疫原性的物质,所述抗体是指机体产生的能识别特定外来物的免疫球蛋白。

19. 根据权利要求1-18中任意一项所述的方法,其特征在于,所述标准物质是阳性对照。

20. 根据权利要求16-19中任意一项所述的方法,其特征在于,所述方法具体包括如下步骤:

(a1) 将疑似含待测抗原(或抗体)的待测样本与受体试剂混合后进行第一次温育;再将第一步温育所得混合液与供体试剂混合,第二次温育后形成待测混合物;

(a2) 以600~700nm的红色激发光先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值,检测波长为520~620nm;其中,第n次记录的化学发光信号值就记为读数RLUn;

(a3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A,增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$;

(a4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的阳性对照品以及其在步骤(a2)和步骤(a3)中任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

(a5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

21. 一种使用化学发光免疫分析测定方法的系统,其包括:

反应装置,其用于实施化学发光免疫反应;

激发和读数装置,其用于先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值;其中,第n次记录的化学发光信号值记为读数RLUn;选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A;

处理器,其用于根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK

效应的浓度；如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值，则对待测样本进行稀释后再进行测定；

其中，t、n、m和k均为大于0的自然数，且 $k < m \leq n \leq t$ ， $n \geq 2$ 。

22. 根据权利要求21所述的系统，其特征在于，所述系统的使用方法包括如下步骤：

(1) 将疑似含待测目标分子的待测样本与发生化学发光免疫反应所需的试剂混合后反应形成待测混合物；

(2) 先后t次激发所述待测混合物发生化学发光，n次记录所述化学发光的信号值；其中，第n次记录的化学发光信号值就记为读数RLUn；

(3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值，分别记为读数RLUm和读数RLUk，并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A；

(4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线；其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度；

(5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值，则对待测样本进行稀释后再进行测定；

其中，t、n、m和k均为大于0的自然数，且 $k < m \leq n \leq t$ ， $n \geq 2$ 。

23. 根据权利要求21或22所述的系统，其特征在于，所述增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$ 。

24. 根据权利要求21-23中任意一项所述的系统，其特征在于，所述n大于2。

25. 根据权利要求22-24中任意一项所述的系统，其特征在于，步骤(1)中，所述化学发光免疫反应为均相化学发光免疫反应。

26. 根据权利要求22-25中任意一项所述的系统，其特征在于，步骤(1)中，所述发生化学发光免疫反应所需的试剂包括受体试剂和供体试剂；其中：

所述供体试剂中包含供体，所述供体能够在激发状态下生成单线态氧；

所述受体试剂中包含受体，所述受体能够与单线态氧反应产生可检测的化学发光信号值。

27. 根据权利要求26所述的系统，其特征在于，所述受体是填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒。

28. 根据权利要求27所述的系统，其特征在于，所述发光化合物选自烯烃化合物，优选选自二甲基噻吩、双丁二酮化合物、二氧杂环己烯、烯醇醚、烯胺、9-亚烷基苍耳烷、9-亚烷基-N-9,10二氢吡啶、芳基乙醚烯、芳基咪唑和光泽精以及它们的衍生物，更优选选自二甲基噻吩及其衍生物。

29. 根据权利要求27或28所述的系统，其特征在于，所述镧系元素化合物为镧配合物。

30. 根据权利要求26所述的系统，其特征在于，所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物，其为非粒子形式，且在含水介质中可溶。

31. 根据权利要求26-30中任意一项所述的系统，其特征在于，所述受体与待测目标分子第一特异结合物直接地或间接地结合。

32. 根据权利要求26-31中任意一项所述的系统，其特征在于，所述供体是填充有感光化合物的高分子微粒，其在红色激光激发下可以产生单线态氧。

33. 根据权利要求32所述的系统,其特征在于,所述感光化合物选自亚甲基蓝、玫瑰红、吡啶和酞菁中的一种。

34. 根据权利要求26-33中任意一项所述的系统,其特征在于,所述供体与标记物直接地或间接地结合。

35. 根据权利要求22-34中任意一项所述的系统,其特征在于,步骤(1)中,所述发生化学发光免疫反应所需的试剂还包括待测目标分子第二特异结合物试剂;优选地,所述待测目标分子第二特异结合物与标记物特异结合物直接地或间接地结合。

36. 根据权利要求35所述的系统,其特征在于,步骤(1)中,先将含待测目标分子的待测样本与受体试剂以及待测目标分子第二特异结合物试剂混合,然后再将其与供体试剂混合。

37. 根据权利要求22-36中任意一项所述的系统,其特征在于,步骤(2)中,利用能量和/或活性化合物激发所述待测混合物发生化学发光;优选地,以600~700nm的红色激发光照射待测混合物激发其发生化学发光。

38. 根据权利要求22-37中任意一项所述的系统,其特征在于,步骤(2)中,记录所述化学发光信号值的检测波长为520~620nm。

39. 根据权利要求21-38中任意一项所述的系统,其特征在于,所述待测目标分子为抗原或抗体;其中,所述抗原是指具有免疫原性的物质,所述抗体是指机体产生的能识别特定外来物的免疫球蛋白。

40. 根据权利要求21-39中任意一项所述的系统,其特征在于,所述标准物质是阳性对照。

41. 根据权利要求37-40中任意一项所述的系统,其特征在于,所述方法具体包括如下步骤:

(a1) 将疑似含待测抗原(或抗体)的待测样本与受体试剂混合后进行第一次温育;再将第一步温育所得混合液与供体试剂混合,第二次温育后形成待测混合物;

(a2) 以600~700nm的红色激发光先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值,检测波长为520~620nm;其中,第n次记录的化学发光信号值就记为读数RLUn;

(a3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A,增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$;

(a4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的阳性对照品以及其在步骤(a2)和步骤(a3)中任意两次反应的读数RLUm' 和RLUk' 的差值增幅A' 做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

(a5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

42. 一种试剂盒,其包括化学发光免疫分析测定所需的试剂,其使用方法包括如下步骤:

(1) 将疑似含待测目标分子的待测样本与发生化学发光免疫反应所需的试剂混合后反应形成待测混合物;

(2) 先后 t 次激发所述待测混合物发生化学发光, n 次记录所述化学发光的信号值;其中,第 n 次记录的化学发光信号值记为读数 RLU_n ;

(3) 选取所述 n 次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数 RLU_m 和读数 RLU_k ,并将 RLU_m 和 RLU_k 的差值增幅记为 A ;

(4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数 RLU_m' 和 RLU_k' 的差值增幅 A' 做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

(5) 如果所述增幅 A 大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

其中, t 、 n 、 m 和 k 均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

43. 根据权利要求42所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的使用方法具体包括如下步骤:

(a1) 将疑似含待测抗原(或抗体)的待测样本与受体试剂混合后进行第一次温育;再将第一步温育所得混合液与供体试剂混合,第二次温育后形成待测混合物;

(a2) 以600~700nm的红色激发光先后 t 次激发所述待测混合物发生化学发光, n 次记录所述化学发光的信号值,检测波长为520~620nm;其中,第 n 次记录的化学发光信号值就记为读数 RLU_n ;

(a3) 选取所述 n 次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数 RLU_m 和读数 RLU_k ,并将 RLU_m 和 RLU_k 的差值增幅记为 A ,增幅 $A = (RLU_m/RLU_k - 1) \times 100\%$;

(a4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数 RLU_m' 和 RLU_k' 的差值增幅 A' 做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

(a5) 如果所述增幅 A 大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

其中, t 、 n 、 m 和 k 均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

44. 根据权利要求42或43所述的试剂盒,其特征在于,所述增幅 $A = (RLU_m/RLU_k - 1) \times 100\%$ 。

45. 根据权利要求42或43所述的试剂盒,其特征在于,所述 n 大于2。

46. 一种如权利要求1-20中任意一项所述的方法、如权利要求21-41中任意一项所述的系统或如权利要求42-45中任意一项所述的试剂盒在AFP检测中的应用。

一种化学发光免疫分析测定方法及使用该方法的系统、试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光技术领域,具体涉及一种化学发光免疫分析测定方法、一种使用化学发光免疫分析测定方法的系统和一种试剂盒。

背景技术

[0002] 化学发光免疫分析是近年来发展较迅速的非放射性免疫检测技术,其原理是利用化学发光物质进行信号的放大,并借助其发光强度,对免疫结合过程进行直接测定,该法已成为免疫学检测的重要方向之一。光激化学发光是化学发光分析技术的常用方法之一,可用于研究生物分子间的相互作用,临床上主要用于疾病的检测。该技术整合了高分子微粒技术、有机合成、蛋白质化学及临床检测等相关领域的研究。与传统的酶联免疫分析方法相比,它具有均相、灵敏度高和操作简便易于自动化等特点。因此,其应用前景十分广阔。

[0003] 化学发光免疫分析测定中的双抗夹心的检测模式中,当待检测物质浓度高到一定浓度时,会因为不能形成双抗夹心复合物从而信号值偏低的现象,称为高剂量-钩状效应(HD-HOOK效应)。也就是说,高剂量-钩状效应是指在双位点夹心免疫实验中,其剂量反应曲线的高剂量区段,线性走向不是呈平台状无限后延,而是向下弯曲状,似一只钩子,导致产生假阴性的现象。HD-HOOK效应在免疫检测中经常发生,其发生率占阳性样本30%左右。由于HD-HOOK效应的存在导致被检测样本不能被正确区分为是由于其浓度超出检测试剂盒的线性范围还是本身浓度就是该值,以至于实验误诊,尤其是导致假阴性率上升。

[0004] 因此,亟需提供一种能拓宽检测范围、避免HD-HOOK效应的化学发光免疫分析测定方法。

发明内容

[0005] 针对现有技术中所存在的缺陷,本发明的目的在于提供一种化学发光免疫分析测定方法,本发明方法通过多次读数后,选取任意两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。

[0006] 为了实现上述及相关目的,本发明的第一方面提供了一种化学发光免疫分析测定方法,其包括如下步骤:

[0007] (1) 将疑似含待测目标分子的待测样本与发生化学发光免疫反应所需的试剂混合后反应形成待测混合物;

[0008] (2) 先后 t 次激发所述待测混合物发生化学发光, n 次记录所述化学发光的信号值;其中,第 n 次记录的化学发光信号值记为读数 RLU_n ;

[0009] (3) 选取所述 n 次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数 RLU_m 和读数 RLU_k ,并将 RLU_m 和 RLU_k 的差值增幅记为 A ;

[0010] (4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数 RLU_m' 和 RLU_k' 的差值增幅 A' 做标准曲线;其中所述标准物质的浓度

低于产生HOOK效应的浓度；

[0011] (5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值，则对待测样本进行稀释后再进行测定；

[0012] 其中，t、n、m和k均为大于0的自然数，且 $k < m \leq n \leq t$ ， $n \geq 2$ 。

[0013] 在本发明的一些实施方式中，所述增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$ 。

[0014] 在本发明的另一些实施方式中，所述n大于2。

[0015] 在本发明的一些实施方式中，步骤(1)中，所述化学发光免疫反应为均相化学发光免疫反应。

[0016] 在本发明的一些优选的实施方式中，步骤(1)中，所述发生化学发光免疫反应所需的试剂包括受体试剂和供体试剂；其中：

[0017] 所述供体试剂中包含供体，所述供体能够在激发状态下生成单线态氧；

[0018] 所述受体试剂中包含受体，所述受体能够与单线态氧反应产生可检测的化学发光信号值。

[0019] 在本发明的一些实施方式中，所述受体是填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒。

[0020] 在本发明的一些优选的实施方式中，所述发光化合物选自烯烃化合物，优选选自二甲基噻吩、双丁二酮化合物、二氧杂环己烯、烯醇醚、烯胺、9-亚烷基苍耳烷、9-亚烷基-N-9,10-二氢吡啶、芳基乙醚烯、芳基咪唑和光泽精以及它们的衍生物，更优选选自二甲基噻吩及其衍生物。

[0021] 在本发明的另一些优选的实施方式中，所述镧系元素化合物为铈配合物。

[0022] 在本发明的一些实施方式中，所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物，其为非粒子形式，且在含水介质中可溶。

[0023] 在本发明的一些具体的实施方式中，所述受体与待测目标分子第一特异结合物直接地或间接地结合。

[0024] 在本发明的一些实施方式中，所述供体是填充有感光化合物的高分子微粒，其在红色激光激发下可以产生单线态氧。

[0025] 在本发明的另一些实施方式中，所述感光化合物选自亚甲基蓝、玫瑰红、吡啶和酞菁中的一种。

[0026] 在本发明的一些实施方式中，所述供体与标记物直接地或间接地结合。

[0027] 在本发明的一些优选的实施方式中，步骤(1)中，所述发生化学发光免疫反应所需的试剂还包括待测目标分子第二特异结合物试剂；优选地，所述待测目标分子第二特异结合物与标记物特异结合物直接地或间接地结合。

[0028] 在本发明的一些实施方式中，步骤(1)中，先将含待测目标分子的待测样本与受体试剂以及待测目标分子第二特异结合物试剂混合，然后再将其与供体试剂混合。

[0029] 在本发明的一些具体实施方式中，步骤(2)中，利用能量和/或活性化合物激发所述待测混合物发生化学发光；优选地，以600~700nm的红色激光照射待测混合物激发其发生化学发光。

[0030] 在本发明的另一些具体实施方式中，步骤(2)中，记录所述化学发光信号值的检测波长为520~620nm。

[0031] 在本发明的一些实施方式中,所述待测目标分子为抗原或抗体;其中,所述抗原是指具有免疫原性的物质,所述抗体是指机体产生的能识别特定外来物的免疫球蛋白。

[0032] 在本发明的另一些实施方式中,所述标准物质是阳性对照。

[0033] 在本发明的一些具体的实施方式中,所述方法具体包括如下步骤:

[0034] (a1) 将疑似含待测抗原(或抗体)的待测样本与受体试剂混合后进行第一次温育;再将第一步温育所得混合液与供体试剂混合,第二次温育后形成待测混合物;

[0035] (a2) 以600~700nm的红色激发光先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值,检测波长为520~620nm;其中,第n次记录的化学发光信号值就记为读数RLUn;

[0036] (a3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A,增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$;

[0037] (a4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的阳性对照品以及其在步骤(a2)和步骤(a3)中任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

[0038] (a5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

[0039] 其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

[0040] 本发明第二方面提供了一种使用化学发光免疫分析测定方法的系统,其包括:

[0041] 反应装置,其用于实施化学发光免疫反应,

[0042] 激发和读数装置,其用于先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值;其中,第n次记录的化学发光信号值记为读数RLUn;选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A;

[0043] 处理器,其用于根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

[0044] 其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

[0045] 在本发明的一些具体实施方式中,所述系统的使用方法包括如下步骤:

[0046] (1) 将疑似含待测目标分子的待测样本与发生化学发光免疫反应所需的试剂混合后反应形成待测混合物;

[0047] (2) 先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值;其中,第n次记录的化学发光信号值就记为读数RLUn;

[0048] (3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A;

[0049] (4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

[0050] (5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行

测定；

[0051] 其中， t 、 n 、 m 和 k 均为大于0的自然数，且 $k < m \leq n \leq t$ ， $n \geq 2$ 。

[0052] 在本发明的一些实施方式中，所述增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$ 。

[0053] 在本发明的另一些实施方式中，所述 n 大于2。

[0054] 在本发明的一些实施方式中，步骤(1)中，所述化学发光免疫反应为均相化学发光免疫反应。

[0055] 在本发明的一些优选的实施方式中，步骤(1)中，所述发生化学发光免疫反应所需的试剂包括受体试剂和供体试剂；其中：

[0056] 所述供体试剂中包含供体，所述供体能够在激发状态下生成单线态氧；

[0057] 所述受体试剂中包含受体，所述受体能够与单线态氧反应产生可检测的化学发光信号值。

[0058] 在本发明的一些实施方式中，所述受体是填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒。

[0059] 在本发明的一些优选的实施方式中，所述发光化合物选自烯烃化合物，优选选自二甲基噻吩、双丁二酮化合物、二氧杂环己烯、烯醇醚、烯胺、9-亚烷基苍耳烷、9-亚烷基-N-9,10-二氢吡啶、芳基乙醚烯、芳基咪唑和光泽精以及它们的衍生物，更优选选自二甲基噻吩及其衍生物。

[0060] 在本发明的另一些优选的实施方式中，所述镧系元素化合物为铈配合物。

[0061] 在本发明的一些实施方式中，所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物，其为非粒子形式，且在含水介质中可溶；

[0062] 在本发明的一些具体的实施方式中，所述受体与待测目标分子第一特异结合物直接地或间接地结合。

[0063] 在本发明的一些实施方式中，所述供体是填充有感光化合物的高分子微粒，其在红色激光激发下可以产生单线态氧。

[0064] 在本发明的一些优选的实施方式中，所述感光化合物选自亚甲基蓝、玫瑰红、吡啶和酞菁中的一种。

[0065] 在本发明的一些实施方式中，所述供体与标记物直接地或间接地结合。

[0066] 在本发明的一些优选的实施方式中，步骤(1)中，所述发生化学发光免疫反应所需的试剂还包括待测目标分子第二特异结合物试剂；优选地，所述待测目标分子第二特异结合物与标记物特异结合物直接地或间接地结合。

[0067] 在本发明的一些实施方式中，步骤(1)中，先将含待测目标分子的待测样本与受体试剂以及待测目标分子第二特异结合物试剂混合，然后再将其与供体试剂混合。

[0068] 在本发明的一些实施方式中，步骤(2)中，利用能量和/或活性化合物激发所述待测混合物发生化学发光；优选地，以600~700nm的红色激光照射待测混合物激发其发生化学发光。

[0069] 在本发明的另一些实施方式中，步骤(2)中，记录所述化学发光信号值的检测波长为520~620nm。

[0070] 在本发明的一些实施方式中，所述待测目标分子为抗原或抗体；其中，所述抗原是指具有免疫原性的物质，所述抗体是指机体产生的能识别特定外来物的免疫球蛋白。

[0071] 在本发明的另一些实施方式中,所述标准物质是阳性对照。

[0072] 在本发明的一些优选的具体实施方式中,所述方法具体包括如下步骤:

[0073] (a1) 将疑似含待测抗原(或抗体)的待测样本与受体试剂混合后进行第一次温育;再将第一步温育所得混合液与供体试剂混合,第二次温育后形成待测混合物;

[0074] (a2) 以600~700nm的红色激发光先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值,检测波长为520~620nm;其中,第n次记录的化学发光信号值就记为读数RLUn;

[0075] (a3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A,增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$;

[0076] (a4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的阳性对照品以及其在步骤(a2)和步骤(a3)中任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

[0077] (a5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

[0078] 其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

[0079] 本发明第三方面提供了一种试剂盒,其包括化学发光免疫分析测定所需的试剂,其使用方法包括如下步骤:

[0080] (1) 将疑似含待测目标分子的待测样本与发生化学发光免疫反应所需的试剂混合后反应形成待测混合物;

[0081] (2) 先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值;其中,第n次记录的化学发光信号值记为读数RLUn;

[0082] (3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A;

[0083] (4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

[0084] (5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

[0085] 其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$;

[0086] 在本发明的一些具体实施方式中,所述试剂盒的使用方法具体包括如下步骤:

[0087] (a1) 将疑似含待测抗原(或抗体)的待测样本与受体试剂混合后进行第一次温育;再将第一步温育所得混合液与供体试剂混合,第二次温育后形成待测混合物;

[0088] (a2) 以600~700nm的红色激发光先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值,检测波长为520~620nm;其中,第n次记录的化学发光信号值就记为读数RLUn;

[0089] (a3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A,增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$;

[0090] (a4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的

浓度低于产生HOOK效应的浓度；

[0091] (a5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值，则对待测样本进行稀释后再进行测定；

[0092] 其中，t、n、m和k均为大于0的自然数，且 $k < m \leq n \leq t$ ， $n \geq 2$ 。

[0093] 在本发明的一些实施方式中，所述增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$ 。

[0094] 在本发明的另一些实施方式中，所述n大于2。

[0095] 本发明第四方面提供了一种如本发明第一方面所述的方法、如本发明第二方面所述的系统或如本发明第三方面所述的试剂盒在AFP检测中的应用。

[0096] 本发明的有益效果为：

[0097] (1) 本发明所述方法通过多次读数后，选取两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。

[0098] (2) 本发明的方法能够100%正确地鉴别双抗夹心法检测中HD-HOOK效应样本，所述方法能够显著提高双抗体夹心法免疫测定的准确性，并降低双抗体夹心法免疫测定的假阴性率。

附图说明

[0099] 下面结合附图对本发明进一步说明。

[0100] 图1为实施例中浓度及对应的信号值的标准曲线。

[0101] 图2为实施例中浓度与多次读数的信号差值增幅A的标准曲线。

[0102] 图3:HCG+ β 采用本发明方法所得信号值和A分别与样本浓度关系曲线图。

[0103] 图4:Ferr采用本发明方法所得信号值和A分别与样本浓度关系曲线图。

[0104] 图5:anti-HIV采用本发明方法所得信号值和A分别与样本浓度关系曲线图。

[0105] 图6:MYO采用本发明方法所得信号值和A分别与样本浓度关系曲线图。

[0106] 图7:NT-proBNP采用本发明方法所得信号值和A分别与样本浓度关系曲线图。

[0107] 图8:PCT采用本发明方法所得信号值和A分别与样本浓度关系曲线图。

[0108] 图9:cTnI采用本发明方法所得信号值和A分别与样本浓度关系曲线图。

具体实施方式

[0109] 为使本发明容易理解，下面将详细说明本发明。但在详细描述本发明前，应当理解本发明不限于描述的具体实施方式。还应当理解，本文中使用的术语仅为了描述具体实施方式，而并不表示限制性的。

[0110] 在提供了数值范围的情况下，应当理解所述范围的上限和下限和所述规定范围中的任何其他规定或居间数值之间的每个居间数值均涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立包括在较小的范围中，并且也涵盖在本发明内，服从规定范围中任何明确排除的限度。在规定的范围包含一个或两个限度的情况下，排除那些包括的限度之任一或两者的范围也包含在本发明中。

[0111] 除非另有定义，本文使用的所有术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料也可在本发明的实施或测试中使用，但是现在描述了优选的方法和材料。

[0112] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见Sambrook等MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Second edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989and Third edition,2001;Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley&Sons,New York,1987and periodic updates;the series METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,Third edition,Academic Press,San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,Vol.304,Chromatin(P.M.Wassarman and A.P.Wolffe,eds.),Academic Press,San Diego,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Vol.119,Chromatin Protocols(P.B.Becker,ed.)Humana Press,Totowa,1999等。

[0113] I. 术语

[0114] 本发明所述用语“化学发光免疫分析测定”是指化学免疫反应能产生某种处于电子激发态的产物,当这种产物分子发生辐射跃迁或将能量转移给其他会发光的分子使该分子再发生辐射跃迁时,便产生发光现象。这种由于吸收了化学能,使分子产生电子激发而发光的现象称为化学发光。利用化学发光进行化学免疫分析及测定待测物的方法称为化学发光免疫分析测定方法。

[0115] 不仅可以是非均相化学发光免疫分析测定方法,而且还可以是均相化学发光免疫分析测定方法,优选为非均相化学发光分析测定方法。

[0116] 本发明所述用语“待测目标分子”为免疫分子,例如抗原或抗体。本发明所述用语“待检样本”其包含待测目标分子。本发明所述用语“待测混合液”其包含待测样本。

[0117] 本发明所述用语“化学发光免疫分析测定所需的试剂”,是指一个化学免疫反应要产生化学发光现象,必须满足以下条件:第一是该反应必须提供足够的激发能,并由某一步骤单独提供,因为前一步反应释放的能量将因振动弛豫消失在溶液中而不能发光;第二是要有有利的反应过程,使化学免疫反应的能量至少能被一种物质所接受并生成激发态;第三是激发态分子必须具有一定的化学发光量子效率释放出光子,或者能够转移它的能量给另一个分子使之进入激发态并释放出光子。

[0118] 化学发光免疫分析测定所需的试剂包含但不限于以下物质:(1)化学发光免疫反应中的反应物;(2)化学发光免疫反应中的催化剂、增敏剂或抑制剂;(3)偶合反应中的反应物、催化剂、增敏剂等。

[0119] 本发明所述用语“HOOK效应”,是指在双抗夹心的检测模式中,当待检测物质浓度高到一定浓度时,会因为不能形成双抗夹心复合物从而信号值偏低的现象。也就是说,HOOK效应是指在双位点夹心免疫实验中,其剂量反应曲线的高剂量区段,线性走向不是呈平台状无限后延,而是向下弯曲状,似一只钩子,导致产生假阴性的现象,又称为钩状效应。

[0120] 本发明所述用语“先后”是一个时间特征,表示多次“激发”的次数是按照时间单位来区分的。

[0121] 本发明所述用语“抗体”以最广含义使用,包括任何同种型的抗体,保留对抗原的特异性结合的抗体片段,包括但不限于Fab、Fv、scFv、和Fd片段、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、双特异性抗体、和包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白的融合蛋白。在任何需要

的情况下,抗体可以进一步与其它部分,诸如生物素或链霉亲和素等缀合。

[0122] 本发明所述用语“抗原”是指具有免疫原性的物质,例如蛋白质、多肽。代表性的抗原包括(但不限于):细胞因子、肿瘤标志物、金属蛋白类、心血管糖尿病相关蛋白等。用语“肿瘤标志物”是指在肿瘤的发生和增殖过程中,由肿瘤细胞本身所产生的或者是由机体对肿瘤细胞反应而产生的,反应肿瘤存在和生长的一类物质。本领域代表性的肿瘤标志物包括(但不限于):甲胎蛋白(AFP)、癌抗原125(CA125)等。

[0123] 本发明所述用语“结合”指由于例如共价、静电、疏水、离子和/或氢键等相互作用,包括但不限于如盐桥和水桥等相互作用引起的两个分子间的直接联合。

[0124] 本发明所述用语“特异性结合”,是指两种物质之间的相互辨别和选择性结合反应,从立体结构角度上说就是相应的反应物之间构象的对应性。

[0125] 本发明所述用语“生物素”广泛存在于动植物组织中,其分子上有两个环状结构,分别为咪唑酮环和噻吩环,其中咪唑酮环是与链霉亲和素结合的主要部位。活化的生物素可以在蛋白质交联剂的介导下,与已知的几乎所有生物大分子偶联,包括蛋白质、核酸、多糖和脂类等;而“链霉亲和素”是由链霉菌分泌的一种蛋白质,分子量为65kD。“链霉亲和素”分子由4条相同的肽链组成,其中每条肽链都能结合一个生物素。因此每个抗原或抗体可同时偶联多个生物素分子,从而产生“触手效应”提高分析灵敏度。

[0126] 在任何需要的情况下,本发明中所用的任何试剂,包括抗原、抗体、受体或供体,可以根据实际需要缀合生物素或链霉亲和素等。

[0127] 本发明所述用语“供体”是指通过能量或者活性化合物的激活后能够产生与受体反应的诸如单线态氧的活性中间体的敏化剂。供体可以是光活化的(如染料和芳香化合物)或者化学活化的(如酶、金属盐等)。

[0128] 在本发明一些具体实施例中,所述供体是光敏剂,所述光敏剂可以是本领域已知的光敏剂,优选相对光稳定且不与单线态氧有效反应的化合物,其非限定性的例子包括例如美国专利US5709994(该专利文献在此全文引为参考)公开的亚甲基蓝、玫瑰红、卟啉、酞菁和叶绿素等化合物,以及这些化合物的具有1-50个原子取代基的衍生物,所述取代基用于使得这些化合物更具有亲脂性或更具有亲水性、和/或作为连接至特异性结合配对成员的连接基团。本领域技术人员已知的其他光敏剂的例子也可以在本发明中使用,例如美国专利US6406913中记载的内容,该专利文献并入本文以供参考。

[0129] 在本发明另一些具体实施例中,所述供体是化学活化的其他敏化剂,其非限定性的例子是某些化合物,它们催化过氧化氢转化为单线态氧和水。其他一些供体的例子包括:1,4-二羧基乙基-1,4-萘内过氧化物、9,10-二苯基蒽-9,10-内过氧化物等,加热这些化合物或者这些化合物直接吸收光会释放单线态氧。

[0130] 本发明所述用语“受体”是指能够与单线态氧反应可以产生可检测信号的化合物。供体被能量或者活性化合物诱导激活并释放高能态的单线态氧,该高能态的单线态氧被近距离的受体俘获,从而传递能量以激活所述受体。

[0131] 在本发明的一些具体实施例中,所述受体是这样的物质:其经历与单线态氧的化学反应以形成不稳定的亚稳态中间体,所述亚稳态中间体可以分解,同时或随后发光。这些物质的典型例子包括但不限于:烯醇醚、烯胺、9-烷叉黄原胶、9-烷叉-N-烷基吡啶满、芳乙炔醚、双环氧乙烯、二甲基噻吩、芳香性咪唑或光泽精。

[0132] 在本发明的另一些具体实施例中,所述受体是能够与单线态氧反应以形成可以分解成酮类或羧酸衍生物的氢过氧化物或二氧环丁烷的烯炔类;可以通过光的作用分解的稳定二氧环丁烷;可以与单线态氧反应以形成二酮类的乙炔类;可以形成偶氮化合物或偶氮羰基化合物的腈类或酰肼类,诸如鲁米诺;和可以形成内过氧化物类的芳族化合物。可以根据本公开和要求保护的发明利用的受体的具体的、非限制性实例记载于美国专利号US5340716(该专利文献在此全文引为参考)。

[0133] 在本发明另一些具体实施例中,所述“供体”和/或“受体”可以通过功能基团被包被在基体上形成“供体微球”和/或“受体微球”。本发明所述“基体”是本领域技术人员所公知的微球或微粒,其可以是任何尺寸的,其可以是有机或是无机的,其可以是可膨胀或不可膨胀的,其可以是多孔的或非多孔的,其具有任何密度,但优选具有和水接近的密度,优选能漂浮于水中,且由透明、部分透明或不透明的材料构成。所述基体可以有或没有电荷,当带有电荷时,优选是负电荷。所述基体可以是固体(如聚合物、金属、玻璃、有机和无机物诸如矿物、盐和硅藻)、小油滴(如碳氢化合物、碳氟化合物、硅质流体)、囊泡(如合成的诸如磷脂、或天然的诸如细胞、及细胞器官)。基体可以是乳胶颗粒或是含有有机或无机聚合物的其他颗粒、脂双层如脂质体、磷脂囊泡、小油滴、硅颗粒、金属溶胶、细胞和微晶染料。基体通常具有多功能性,或者能够通过特异或非特异的共价或非共价相互作用而结合到供体或受体上。有许多官能团是可用的或者将其合并进来。典型的官能团包括羧酸、乙醛、氨基、氰基、乙烯基、羟基、巯基等。适用于本发明的基体的一个非限制性的例子是羧基改性的乳胶颗粒。这种基体的详细情况可参见美国专利US5709994与US5780646(这两篇专利文献在此全文引为参考)。

[0134] II. 具体实施方案

[0135] 双抗夹心法的基本原理:

[0136] 双抗体夹心法的基本原理是本领域技术人员所熟知的。常规的做法是将第一抗体固定于固相载体,然后将第一抗体与抗原反应,再与标记的第二抗体反应,最后进行化学发光或酶联显色反应检测信号。

[0137] 下面将详细说明本发明。

[0138] 本发明的第一方面所涉及的免疫测定方法,其包括如下步骤:

[0139] (1) 将疑似含待测目标分子的待测样本与发生化学发光免疫反应所需的试剂混合后反应形成待测混合物;

[0140] (2) 先后 t 次激发所述待测混合物发生化学发光, n 次记录所述化学发光的信号值;其中,第 n 次记录的化学发光信号值记为读数 RLU_n ;

[0141] (3) 选取所述 n 次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数 RLU_m 和读数 RLU_k ,并将 RLU_m 和 RLU_k 的差值增幅记为 A ;

[0142] (4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数 RLU_m' 和 RLU_k' 的差值增幅 A' 做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

[0143] (5) 如果所述增幅 A 大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

[0144] 其中, t 、 n 、 m 和 k 均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

[0145] 在本发明的一些实施方式中,所述增幅 $A = (RLU_m/RLU_k - 1) \times 100\%$ 。

[0146] 在本发明的另一些实施方式中,所述 n 大于2。例如, n 可以为3、4或5等。本发明中,当所述 n 大于2时,所述方法检测的灵敏度更高,且抗HD-HOOK效应的能力越强。

[0147] 在本发明的一些实施方式中,步骤(1)中,所述化学发光免疫反应为均相化学发光免疫反应。

[0148] 在本发明的一些优选的实施方式中,步骤(1)中,所述发生化学发光免疫反应所需的试剂包括受体试剂和供体试剂;其中:

[0149] 所述供体试剂中包含供体,所述供体能够在激发状态下生成单线态氧;

[0150] 所述受体试剂中包含受体,所述受体能够与单线态氧反应产生可检测的化学发光信号值。

[0151] 在本发明的一些实施方式中,所述受体是填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒。

[0152] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述发光化合物选自烯烃化合物,优选选自二甲基噻吩、双丁二酮化合物、二氧杂环己烯、烯醇醚、烯胺、9-亚烷基苍耳烷、9-亚烷基-N-9,10-二氢吡啶、芳基乙醚烯、芳基咪唑和光泽精以及它们的衍生物,更优选选自二甲基噻吩及其衍生物。

[0153] 在本发明的另一些优选的实施方式中,所述镧系元素化合物为镧配合物。

[0154] 在本发明的一些实施方式中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶。

[0155] 在本发明的一些具体的实施方式中,所述受体与待测目标分子第一特异结合物直接地或间接地结合。

[0156] 在本发明的一些实施方式中,所述供体是填充有感光化合物的高分子微粒,其在红色激光激发下可以产生单线态氧。

[0157] 在本发明的另一些实施方式中,所述感光化合物选自亚甲基蓝、玫瑰红、吡啶和酞菁中的一种。

[0158] 在本发明的一些实施方式中,所述供体与标记物直接地或间接地结合。

[0159] 在本发明的一些优选的实施方式中,步骤(1)中,所述发生化学发光免疫反应所需的试剂还包括待测目标分子第二特异结合物试剂;优选地,所述待测目标分子第二特异结合物与标记物特异结合物直接地或间接地结合。

[0160] 在本发明的一些实施方式中,步骤(1)中,先将含待测目标分子的待测样本与受体试剂以及待测目标分子第二特异结合物试剂混合,然后再将其与供体试剂混合。

[0161] 在本发明的一些具体实施方式中,步骤(2)中,利用能量和/或活性化合物激发所述待测混合物发生化学发光;优选地,以600~700nm的红色激发光照射待测混合物激发其发生化学发光。

[0162] 在本发明的另一些具体实施方式中,步骤(2)中,记录所述化学发光信号值的检测波长为520~620nm。

[0163] 在本发明的一些实施方式中,所述待测目标分子为抗原或抗体;其中,所述抗原是指具有免疫原性的物质,所述抗体是指机体产生的能识别特定外来物的免疫球蛋白。

[0164] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述标准物质是阳性对照。

[0165] 在本发明的一些优选的具体实施方式中,所述方法具体包括如下步骤:

[0166] (a1) 将疑似含待测抗原(或抗体)的待测样本与受体试剂混合后进行第一次温育;再将第一步温育所得混合液与供体试剂混合,第二次温育后形成待测混合物;

[0167] (a2) 以600~700nm的红色激发光先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值,检测波长为520~620nm;其中,第n次记录的化学发光信号值就记为读数RLUn;

[0168] (a3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A,增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$;

[0169] (a4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的阳性对照品以及其在步骤(a2)和步骤(a3)中任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

[0170] (a5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

[0171] 其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

[0172] 本发明第二方面所涉及的使用化学发光免疫分析测定方法的系统,其包括:

[0173] 反应装置,其用于实施化学发光免疫反应,

[0174] 激发和读数装置,其用于先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值;其中,第n次记录的化学发光信号值记为读数RLUn;选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A;

[0175] 处理器,其用于根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

[0176] 其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

[0177] 在本发明的一些实施方式中,所述系统的使用方法包括如下步骤:

[0178] (1) 将疑似含待测目标分子的待测样本与发生化学发光免疫反应所需的试剂混合后反应形成待测混合物;

[0179] (2) 先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值;其中,第n次记录的化学发光信号值就记为读数RLUn;

[0180] (3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A;

[0181] (4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

[0182] (5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

[0183] 其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

[0184] 在本发明的一些实施方式中,所述增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$ 。

[0185] 在本发明的另一些实施方式中,所述n大于2。例如,n为3、4或5等。本发明中,当所述n大于2时,所述系统检测的灵敏度更高,且抗HD-HOOK效应的能力越强。

[0186] 在本发明的一些实施方式中,步骤(1)中,所述化学发光免疫反应为均相化学发光免疫反应。

[0187] 在本发明的一些优选的实施方式中,步骤(1)中,所述发生化学发光免疫反应所需的试剂包括受体试剂和供体试剂;其中:

[0188] 所述供体试剂中包含供体,所述供体能够在激发状态下生成单线态氧;

[0189] 所述受体试剂中包含受体,所述受体能够与单线态氧反应产生可检测的化学发光信号值。

[0190] 在本发明的一些实施方式中,所述受体是填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒。

[0191] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述发光化合物选自烯烃化合物,优选选自二甲基噻吩、双丁二酮化合物、二氧杂环己烯、烯醇醚、烯胺、9-亚烷基苍耳烷、9-亚烷基-N-9,10-二氢吡啶、芳基乙醚烯、芳基咪唑和光泽精以及它们的衍生物,更优选选自二甲基噻吩及其衍生物。

[0192] 在本发明的另一些优选的实施方式中,所述镧系元素化合物为镧配合物。

[0193] 在本发明的一些实施方式中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;

[0194] 在本发明的一些具体的实施方式中,所述受体与待测目标分子第一特异结合物直接地或间接地结合。

[0195] 在本发明的一些实施方式中,所述供体是填充有感光化合物的高分子微粒,其在红色激光激发下可以产生单线态氧。

[0196] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述感光化合物选自亚甲基蓝、玫瑰红、吡啶和酞菁中的一种。

[0197] 在本发明的一些实施方式中,所述供体与标记物直接地或间接地结合。

[0198] 在本发明的一些优选的实施方式中,步骤(1)中,所述发生化学发光免疫反应所需的试剂还包括待测目标分子第二特异结合物试剂;优选地,所述待测目标分子第二特异结合物与标记物特异结合物直接地或间接地结合。

[0199] 在本发明的一些实施方式中,步骤(1)中,先将含待测目标分子的待测样本与受体试剂以及待测目标分子第二特异结合物试剂混合,然后再将其与供体试剂混合。

[0200] 在本发明的一些实施方式中,步骤(2)中,利用能量和/或活性化合物激发所述待测混合物发生化学发光;优选地,以600~700nm的红色激发光照射待测混合物激发其发生化学发光。

[0201] 在本发明的另一些实施方式中,步骤(2)中,记录所述化学发光信号值的检测波长为520~620nm。

[0202] 在本发明的一些实施方式中,所述待测目标分子为抗原或抗体;其中,所述抗原是指具有免疫原性的物质,所述抗体是指机体产生的能识别特定外来物的免疫球蛋白。

[0203] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述标准物质是阳性对照。

[0204] 在本发明的一些优选的具体实施方式中,所述系统的使用方法具体包括如下步

骤:

[0205] (a1) 将疑似含待测抗原(或抗体)的待测样本与受体试剂混合后进行第一次温育;再将第一步温育所得混合液与供体试剂混合,第二次温育后形成待测混合物;

[0206] (a2) 以600~700nm的红色激发光先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值,检测波长为520~620nm;其中,第n次记录的化学发光信号值就记为读数RLUn;

[0207] (a3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A,增幅 $A = (RLUm/RLUk-1) \times 100\%$;

[0208] (a4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的阳性对照品以及其在步骤(a2)和步骤(a3)中任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

[0209] (a5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

[0210] 其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

[0211] 本发明的第三方面所涉及的试剂盒,其包括化学发光免疫分析测定所需的试剂,其使用方法包括如下步骤:

[0212] (1) 将疑似含待测目标分子的待测样本与发生化学发光免疫反应所需的试剂混合后反应形成待测混合物;

[0213] (2) 先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值;其中,第n次记录的化学发光信号值记为读数RLUn;

[0214] (3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A;

[0215] (4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数RLUm'和RLUk'的差值增幅A'做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

[0216] (5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

[0217] 其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

[0218] 在本发明的一些实施方式中,所述增幅 $A = (RLUm/RLUk-1) \times 100\%$ 。

[0219] 在本发明的另一些实施方式中,所述n大于2。例如,n为3、4或5等。本发明中,当所述n大于2时,所述试剂盒的检测的灵敏度更高,且抗HD-HOOK效应的能力越强。

[0220] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述标准物质是阳性对照。

[0221] 在本发明的一些实施方式中,步骤(1)中,所述化学发光免疫反应为均相化学发光免疫反应。

[0222] 在本发明的一些优选的实施方式中,步骤(1)中,所述发生化学发光免疫反应所需的试剂包括受体试剂和供体试剂;其中:

[0223] 所述供体试剂中包含供体,所述供体能够在激发状态下生成单线态氧;

[0224] 所述受体试剂中包含受体,所述受体能够与单线态氧反应产生可检测的化学发光信号值。

[0225] 在本发明的一些实施方式中,所述受体是填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒。

[0226] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述发光化合物选自烯烃化合物,优选选自二甲基噻吩、双丁二酮化合物、二氧杂环己烯、烯醇醚、烯胺、9-亚烷基苍耳烷、9-亚烷基-N-9,10-二氢吡啶、芳基乙醚烯、芳基咪唑和光泽精以及它们的衍生物,更优选选自二甲基噻吩及其衍生物。

[0227] 在本发明的另一些优选的实施方式中,所述镧系元素化合物为铈配合物。

[0228] 在本发明的一些实施方式中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶。

[0229] 在本发明的一些具体的实施方式中,所述受体与待测目标分子第一特异结合物直接地或间接地结合。

[0230] 在本发明的一些实施方式中,所述供体是填充有感光化合物的高分子微粒,其在红色激光激发下可以产生单线态氧。

[0231] 在本发明的另一些实施方式中,所述感光化合物选自亚甲基蓝、玫瑰红、吡啶和酞菁中的一种。

[0232] 在本发明的一些实施方式中,所述供体与标记物直接地或间接地结合。

[0233] 在本发明的一些优选的实施方式中,步骤(1)中,所述发生化学发光免疫反应所需的试剂还包括待测目标分子第二特异结合物试剂;优选地,所述待测目标分子第二特异结合物与标记物特异结合物直接地或间接地结合。

[0234] 在本发明的一些实施方式中,步骤(1)中,先将含待测目标分子的待测样本与受体试剂以及待测目标分子第二特异结合物试剂混合,然后再将其与供体试剂混合。

[0235] 在本发明的一些具体实施方式中,步骤(2)中,利用能量和/或活性化合物激发所述待测混合物发生化学发光;优选地,以600~700nm的红色激发光照射待测混合物激发其发生化学发光。

[0236] 在本发明的另一些具体实施方式中,步骤(2)中,记录所述化学发光信号值的检测波长为520~620nm。

[0237] 在本发明的一些实施方式中,所述待测目标分子为抗原或抗体;其中,所述抗原是指具有免疫原性的物质,所述抗体是指机体产生的能识别特定外来物的免疫球蛋白。

[0238] 在本发明的一些具体实施方式中,所述试剂盒的使用方法具体包括如下步骤:

[0239] (a1) 将疑似含待测抗原(或抗体)的待测样本与受体试剂混合后进行第一次温育;再将第一步温育所得混合液与供体试剂混合,第二次温育后形成待测混合物;

[0240] (a2) 以600~700nm的红色激发光先后t次激发所述待测混合物发生化学发光,n次记录所述化学发光的信号值,检测波长为520~620nm;其中,第n次记录的化学发光信号值就记为读数RLUn;

[0241] (a3) 选取所述n次记录的化学发光信号值中的任意两次信号值,分别记为读数RLUm和读数RLUk,并将RLUm和RLUk的差值增幅记为A,增幅 $A = (RLUm/RLUk - 1) \times 100\%$;

[0242] (a4) 根据一系列已知浓度的含待测目标分子的标准物质以及其在步骤(2)和步骤(3)中任意两次反应的读数RLUm' 和RLUk' 的差值增幅A' 做标准曲线;其中所述标准物质的浓度低于产生HOOK效应的浓度;

[0243] (a5) 如果所述增幅A大于所述标准曲线的最大值,则对待测样本进行稀释后再进行测定;

[0244] 其中,t、n、m和k均为大于0的自然数,且 $k < m \leq n \leq t, n \geq 2$ 。

[0245] 本发明第四方面涉及一种如本发明第一方面所述的方法、如本发明第二方面所述的系统或如本发明第三方面所述的试剂盒在AFP检测中的应用。

[0246] 在此,需要特别说明的是,上述方法为非疾病诊断目的的方法,所述方法用于在双抗体夹心免疫法或者双抗原夹心免疫法检测过程中,通过多次读数后,选取两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。

[0247] 优选地,所述抗原是指具有免疫原性的物质。例如蛋白质、多肽。代表性的抗原包括(但不限于):细胞因子、肿瘤标志物、金属蛋白类、心血管糖尿病相关蛋白等。

[0248] 所述抗体是指机体产生的能识别特定外来物的免疫球蛋白。

[0249] 本发明中,所述抗原或抗体可选自甲胎蛋白(AFP)、HBsAb乙型肝炎病毒表面抗体(HBsAb)、人绒毛膜促性腺激及 β 亚单位(HCG+ β)、乙肝表面抗原(HBsAg)、癌抗原125(CA125)、C肽(CP)、铁蛋白(Ferr)和Anti-HCV等。

[0250] 可用本发明方法检测的样本没有特别限制,可以是任何含有待测目标抗原(或抗体)的样本,代表性的例子可包括血清样本、尿液样本、唾液样本等。本发明优选的样本是血清样本。

[0251] 优选的,所述标记物与标记物特异结合物之间能够特异性结合。

[0252] 更优选的,所述标记物为生物素,所述标记物特异结合物为链霉亲和素。

[0253] 优选的,所述受体是指填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒。发光化合物可以是Dioxene(二氧杂环己烯)或thioxene(二甲基噻吩)的衍生物等,镧系元素化合物可以是Eu(TTA)₃/TOPO或Eu(TTA)₃/Phen,该微粒可由市场上购得。受体的表面官能团可以是任何能联接蛋白质的基团,如羧基、醛基、胺基、环氧乙基或卤代烷基等各种已知的可连接蛋白质的官能团。

[0254] 优选的,所述供体是填充有感光化合物的高分子微粒,在红色激光激发下,可以产生单线态氧离子。当其与受体距离足够近的情况下,单线氧离子传递到受体,与受体中的发光化合物反应,产生紫外光,紫外光再进一步激发镧系元素化合物,产生一定波长的光子。感光化合物可以是酞菁染料等,该微粒也可由市场上购得。

[0255] 在检测范围内,待测目标抗原的浓度表现为双抗体夹心复合物的数量,并与光子数成正比;但当待测目标抗原浓度过高时,部分待测抗原分别与单个抗体结合,导致双抗夹心复合物减少,光信号偏低,不能反映待测目标抗原的真实浓度。

[0256] 同理,在检测范围内,待测目标抗体的浓度表现为双抗原夹心复合物的数量,并与光子数成正比;但当待测目标抗体浓度过高时,部分待测抗体分别与单个抗原结合,导致双抗原夹心复合物减少,光信号偏低,不能反映待测目标抗体的真实浓度。

[0257] 本发明的方法通过多次读数后,选取两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。其中两次读数的差异由以下三个方面决定:

[0258] 第一方面,第一次读数时,供体受红色激光(600~700nm)照射后,释放出单线态氧离子。一部分单线态氧离子传递至受体后,通过一系列的化学反应,发射出520~620nm高能级的光;而一部分单线态氧离子则与未被抗体(或抗原)结合的待测目标抗原(或抗体)反

应,使得待测目标抗原(或抗体)的浓度降低。对于低浓度的样本,待测目标抗原(或抗体)浓度下降后,双抗夹心复合物减少,第二次读数信号值会降低;而对于高浓度样本,待测目标抗原(或抗体)浓度降低后,双抗夹心复合物增多,第二次读数信号值反而升高。

[0259] 第二方面,对于低浓度样本而言,供体在第一次读数过程中受红色激光(600~700nm)照射,释放单线态氧离子后,其能量有所损耗,第二次读数信号会降低。

[0260] 第三方面,对于HD-HOOK效应而言,第一次读数时,抗原抗体反应尚未达到平衡,在两次读数的间隔时间,反应仍会朝正方向进行,第二次读数信号会增高。

[0261] 综上所述,本发明在反应未达到平衡时进行第一次读数,供体受激发光照射释放单线态氧,一部分传递到受体,一部分能与未结合的待检测目标抗原或抗体反应,消耗部分待检测目标抗原或抗体,使得反应平衡逆向移动,另一方面供体在激发过一次后,有所损耗,当第二次读数时,待测目标抗原或抗体浓度低的样本的信号值会降低;而浓度高样本的双抗夹心复合物与供体的结合在第一次读数时远未到达平衡,第二次读数时反应会朝正反应方向移动,故而信号会增高。

[0262] III. 实施例

[0263] 为使本发明更加容易理解,下面将结合实施例来进一步详细说明本发明,这些实施例仅起说明性作用,并不局限于本发明的应用范围。本发明中所使用的原料或组分若无特殊说明均可以通过商业途径或常规方法制得。

[0264] 实施例1:常规方法和本发明方法分别检测甲胎蛋白(AFP)样本

[0265] 本实施例采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的甲胎蛋白(AFP)检测试剂盒(化学发光法)来检测样本中甲胎蛋白的含量。

[0266] 将高浓度的甲胎蛋白抗原进行梯度稀释,分别采用常规检测方法和本发明检测方法测定含不同浓度甲胎蛋白的样本的信号值。

[0267] 常规检测方法包括以下步骤:

[0268] 将已知浓度的待测物样本(已知的标准物质)同试剂1(与鼠单克隆抗体结合的受体溶液)和试剂2(与生物素结合的鼠单克隆抗体溶液)混合,37℃温育15min;然后加入试剂3(与链霉亲和素结合的供体溶液),37℃温育10min,得到反应溶液;对反应溶液进行激光照射,光子计数器读数,读取RLU,结果如表1所示。

[0269] 采用本发明多次读数法的步骤如下:

[0270] 将已知浓度的待测物样本(已知的标准物质)同试剂1(与鼠单克隆抗体结合的受体溶液)和试剂2(与生物素结合的鼠单克隆抗体溶液)混合,37℃温育15min;然后加入试剂3(与链霉亲和素结合的供体溶液),37℃温育1min,读数RLU1(1min),37℃继续温育,两次温育时间累加5min时再次读数,读数RLU2(5min),37℃继续温育,三次温育时间累加10min时再次读数,读数RLU3(10min),37℃继续温育,四次温育时间累加20min时再次读数,读数RLU4(20min),并选择其中两次的信号读数计算二次信号差值的增幅 $A = (RLU_m / RLU_k - 1) \times 100\%$, $k < m \leq n$ 。检测结果如表1所示:

[0271] 表1:

[0272]

AFP 浓度 ng/mL	读数时间 min				两次信号差值增幅			
	RLU1 (1min)	RLU2 (5min)	RLU3 (10min)	RLU4 (20min)	(RLU2/RLU1-1) ×100%	(RLU3/RLU1-1) ×100%	(RLU4/RLU1-1) ×100%	(RLU4/RLU2-1) ×100%
50	2219	1560	1217	1057	-29.69%	-45.17%	-52.37%	-32.25%
200	6014	4453	3420	2945	-25.95%	-43.14%	-51.03%	-33.86%
800	26273	25056	20516	17906	-4.63%	-21.91%	-31.85%	-28.53%
3200	116831	155320	144980	135291	32.94%	24.09%	15.80%	-12.90%
12800	391561	581432	579317	567994	48.49%	47.95%	45.06%	-2.31%
51200	688438	1079654	1117775	1160253	56.83%	62.36%	68.53%	7.47%
204800	474318	773523	819849	832642	63.08%	72.85%	75.55%	7.64%
819200	142500	238776	253665	260325	67.56%	78.01%	82.68%	9.02%
3276800	24940	42648	45614	46874	71.00%	82.89%	87.95%	9.91%

[0273] 由表1可知,浓度从50ng/ml到51,200ng/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随甲胎蛋白浓度升高而降低,即浓度大于51,200ng/ml则HD-HOOK,在常规检测中,抗原浓度高于此检测范围的样本报告浓度将会偏低(报告浓度均小于51,200ng/ml)。

[0274] 本发明方法通过多次读数后,选取两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。一系列已知浓度样本检测后得到信号值结果,将浓度及对应的信号值和增幅A分别做出标准曲线(分别如图1和图2所示)。选取RLU2(5min),及其中二次读数得到待测样本的RLU4(20min)和RLU1(1min),计算增幅 $A = (RLU4/RLU1-1) \times 100\%$ 作为判断样本浓度区间的指标之一。由表1和图1可知,信号值随浓度续升高到51,200ng/ml(定义为上升区间),之后信号值开始随浓度升高而下降(定义为下降区间),但是增幅A却是随浓度持续上升的(如图2)。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1(1min)、RLU2(5min)、RLU3(10min)、RLU4(20min)和A。

[0275] 作上升区间(如0-1,000ng/ml)的RLU2(5min)和A标准曲线,先通过待测样本A值与标准曲线A比较, $A < A(1000ng/ml)$ 则将待测样本的RLU2(5min)代入标准曲线计算确切浓度。 $A > A(1000ng/ml)$ 则待测样本浓度超过标准曲线的范围,需稀释检测。

[0276] 实施例2:常规方法和本发明方法分别检测人绒毛膜促性腺激素及β亚单位(HCG+β)样本

[0277] 采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的人绒毛膜促性腺激素及β亚单位(HCG+β)检测试剂盒(化学发光法)来检测样本中人绒毛膜促性腺激素及β亚单位的含量。

[0278] 将高浓度的人绒毛膜促性腺激素及β亚单位抗原进行梯度稀释,分别采用常规检测方法和本发明检测方法测定含不同浓度人绒毛膜促性腺激素及β亚单位的样本的信号值。

[0279] 常规检测方法:将已知浓度的待测物样本同试剂1(与鼠单克隆抗体结合的受体溶液)和试剂2(与生物素结合的鼠单克隆抗体溶液)混合,37℃温育15min;然后加入试剂3(与链霉亲和素结合的供体溶液),37℃温育10min,光子计数器读数,读取RLU,结果如表2所示。

[0280] 采用本发明两次读数法:将已知浓度的待测物样本,试剂1(发光抗体,亦即,鼠单

克隆抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的鼠单克隆抗体),37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育3min,读数RLU1,37℃继续温育7min,读数RLU2,并计算第二次信号值的增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$,检测结果如表2和图3所示:

[0281] 表2:

样本编号	浓度 (mIU/ml)	常规检测结果	本发明检测结果		
		RLU	RLU1	RLU2	增幅 A
1#	100	4783	6073	4217	-31%
2#	400	16153	22297	15630	-30%
3#	1,600	68730	85405	66818	-22%
[0282] 4#	6,400	282534	283179	263684	-7%
5#	25,600	844830	663207	741788	12%
6#	102,400	1162159	855280	1044928	22%
7#	409,600	395703	272396	378001	39%
8#	1,638,400	97248	56037	88323	58%
9#	6,553,600	23462	13174	21321	62%

[0283] 由表2可知,浓度从100mIU/ml到102,400mIU/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随人绒毛膜促性腺激素及β亚单位浓度升高而降低,即浓度大于102,400mIU/ml(定义此浓度为HD-HOOK拐点,定义其增幅为 A_0)则HD-HOOK,在常规检测中,抗原浓度高于此检测范围的样本报告浓度将会偏低(报告浓度均小于102,400mIU/ml)。

[0284] 本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。每个待测样本先后检测到信号值结果RLU1、RLU2,将第二次读数的RLU增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$ 作为判断样本浓度区间的指标之一。由表2和图3可知,信号值随浓度续升高到51,200mIU/ml(定义为上升区间),之后信号值开始随浓度升高而下降(定义为下降区间),但是增幅A却是随浓度持续上升的。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1、RLU2和A。

[0285] 作上升区间(如0-1,0000mIU/ml)的RLU2和A标准曲线,先通过待测样本A值与标准曲线A比较, $A < A_{(10000mIU/ml)}$ 则将待测样本的RLU2代入标准曲线计算确切浓度。 $A > A_{(10000mIU/ml)}$ 则待测样本浓度超过标准曲线的范围,需稀释检测。

[0286] 实施例3:常规方法和本发明方法分别检测铁蛋白(Ferr)样本

[0287] 采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的铁蛋白(Ferr)检测试剂盒(化学发光法)来检测样本中铁蛋白的含量。

[0288] 将高浓度的铁蛋白抗原进行梯度稀释,分别采用常规检测方法和本发明检测方法测定含不同浓度铁蛋白的样本的信号值。

[0289] 常规检测方法:将已知浓度的待测物样本,试剂1(发光抗体,亦即,鼠单克隆抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的鼠单克隆抗体)加入反应杯后,37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育10min,光子计数器读数,读取RLU,结果如表3所示。

[0290] 采用本发明两次读数法:将已知浓度的待测物样本,试剂1(发光抗体,亦即,鼠单

克隆抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的鼠单克隆抗体),37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育3min,读数RLU1,37℃继续温育7min,读数RLU2,并计算第二次信号值的增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$,检测结果如表3和图4所示:

[0291] 表3:

样本编号	浓度 (ng/ml)	常规检测结果	本发明检测结果		
		RLU	RLU1	RLU2	增幅 A
1#	50	29374	36982	29226	-21%
2#	200	130237	139538	118990	-15%
3#	800	514946	470907	467257	-1%
[0292] 4#	3200	1631905	1219373	1437994	18%
5#	12800	2994937	2280569	2821545	24%
6#	51200	3402607	2578903	3163238	23%
7#	204800	3272694	2314036	2907751	26%
8#	819200	2437951	1645331	2165755	32%
9#	3276800	1002072	633495	948425	50%

[0293] 由表3可知,浓度从50ng/ml到51,200ng/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随铁蛋白浓度升高而降低,即浓度大于51,200ng/ml(定义此浓度为HD-HOOK拐点,定义其增幅为 A_0)则HD-HOOK,在常规检测中,抗原浓度高于此检测范围的样本报告浓度将会偏低(报告浓度均小于51,200ng/ml)。

[0294] 本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。每个待测样本先后检测到信号值结果RLU1、RLU2,将第二次读数的RLU增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$ 作为判断样本浓度区间的指标之一。由表3和图4可知,信号值随浓度续升高到51,200ng/ml(定义为上升区间),之后信号值开始随浓度升高而下降(定义为下降区间),但是增幅A却是随浓度持续上升的。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1、RLU2和A。

[0295] 作上升区间(如0-1,000ng/ml)的RLU2和A标准曲线,先通过待测样本A值与标准曲线A比较, $A < A_{(1000ng/ml)}$ 则将待测样本的RLU2代入标准曲线计算确切浓度。 $A > A_{(1000ng/ml)}$ 则待测样本浓度超过标准曲线的范围,需稀释检测。

[0296] 实施例4:常规方法和本发明方法分别检测人类免疫缺陷病毒抗体(anti-HIV)样本

[0297] 采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的人类免疫缺陷病毒抗体(anti-HIV)检测试剂盒(化学发光法)来检测样本中人类免疫缺陷病毒抗体的含量。

[0298] 将高浓度的人类免疫缺陷病毒抗体进行梯度稀释,分别采用常规检测方法和本发明检测方法测定含不同浓度人类免疫缺陷病毒抗体样本的信号值。

[0299] 常规检测方法:将已知浓度的待测物样本,试剂1(发光试剂,亦即,HIV抗原包被的发光微粒)和试剂2(生物素试剂,亦即生物素标记的HIV抗原)加入反应杯后,37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育10min,光子计数器读数,读取RLU,结果如表4所示。

[0300] 采用本发明两次读数法:将已知浓度的待测物样本,试剂1(发光试剂,亦即,HIV抗原包被的发光微粒)和试剂2(生物素试剂,亦即生物素标记的HIV抗原),37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育3min,读数RLU1,37℃继续温育7min,读数RLU2,并计算第二次信号值的增幅 $A = (RLU2/RLU1-1) \times 100\%$,检测结果如表4和图5所示:

[0301] 表4:

样本编号	浓度 (ng/ml)	常规检测结果	本发明检测结果		
		RLU	RLU1	RLU2	增幅 A
[0302] 1#	25	3187	6172	3086	-50%
2#	100	13310	21969	11467	-48%
3#	400	66789	97480	61403	-37%
4#	1600	403890	426498	380495	-11%
[0303] 5#	6400	1591893	1301691	1488670	14%
6#	25600	2683158	1921236	2331572	21%
7#	102400	2497961	1829868	2258869	23%
8#	409600	1854742	1305503	1712345	31%
9#	1638400	820651	539365	778920	44%

[0304] 由表4可知,浓度从25ng/ml到25600ng/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随人类免疫缺陷病毒抗体浓度升高而降低,即浓度大于25600ng/ml(定义此浓度为HD-HOOK拐点,定义其增幅为 A_0)则HD-HOOK,在常规检测中,抗原浓度高于此检测范围的样本报告浓度将会偏低(报告浓度均小于25600ng/ml)。

[0305] 本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。每个待测样本先后检测到信号值结果RLU1、RLU2,将第二次读数的RLU增幅 $A = (RLU2/RLU1-1) \times 100\%$ 作为判断样本浓度区间的指标之一。由表4和图5可知,信号值随浓度续升高到25600ng/ml(定义为上升区间),之后信号值开始随浓度升高而下降(定义为下降区间),但是增幅A却是随浓度持续上升的。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1、RLU2和A。

[0306] 作上升区间(如0-1,000ng/ml)的RLU2和A标准曲线,先通过待测样本A值与标准曲线A比较, $A < A_{(1000ng/ml)}$ 则将待测样本的RLU2代入标准曲线计算确切浓度。 $A > A_{(1000ng/ml)}$ 则待测样本浓度超过标准曲线的范围,需稀释检测。

[0307] 实施例5:常规方法和本发明方法分别检测肌红蛋白(MYO)样本

[0308] 采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的肌红蛋白(MYO)检测试剂盒(化学发光法)来检测样本中肌红蛋白的含量。

[0309] 将高浓度的肌红蛋白抗原进行梯度稀释,分别采用常规检测方法和本发明检测方法测定含不同浓度肌红蛋白的样本的信号值。

[0310] 常规检测方法:将已知浓度的待测物样本,试剂1(发光抗体,亦即,鼠单克隆抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的鼠单克隆抗体)加入反应杯后,37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育10min,光子

计数器读数,读取RLU,结果如表5所示。

[0311] 采用本发明两次读数法:将知浓度的待测物样本,试剂1(发光抗体,亦即,鼠单克隆抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的鼠单克隆抗体),37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育3min,读数RLU1,37℃继续温育7min,读数RLU2,并计算第二次信号值的增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$,检测结果如表5和图6所示:

[0312] 表5:

样本编号	浓度 (ng/ml)	常规检测结果	本发明检测结果		
		RLU	RLU1	RLU2	增幅 A
1#	6	4087	3001	3124	4%
2#	25	5904	4450	4679	5%
3#	100	13489	10081	11069	10%
[0313] 4#	400	44629	35422	46248	31%
5#	1,600	167251	130712	261070	100%
6#	6,400	468674	374761	1025554	174%
7#	25,600	832315	677602	2060119	204%
8#	102,400	539604	417102	1574654	278%
9#	409,600	179718	134668	549601	308%

[0314] 由表5可知,浓度从6ng/ml到25600ng/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随人类免疫缺陷病毒抗体浓度升高而降低,即浓度大于25600ng/ml(定义此浓度为HD-HOOK拐点,定义其增幅为 A_0)则HD-HOOK,在常规检测中,抗原浓度高于此检测范围的样本报告浓度将会偏低(报告浓度均小于25600ng/ml)。

[0315] 本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。每个待测样本先后检测到信号值结果RLU1、RLU2,将第二次读数的RLU增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$ 作为判断样本浓度区间的指标之一。由表5和图6可知,信号值随浓度续升高到25600ng/ml(定义为上升区间),之后信号值开始随浓度升高而下降(定义为下降区间),但是增幅A却是随浓度持续上升的。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1、RLU2和A。

[0316] 作上升区间(如0-1,000ng/ml)的RLU2和A标准曲线,先通过待测样本A值与标准曲线A比较, $A < A_{(1000ng/ml)}$ 则将待测样本的RLU2代入标准曲线计算确切浓度。 $A > A_{(1000ng/ml)}$ 则待测样本浓度超过标准曲线的范围,需稀释检测。

[0317] 实施例6:常规方法和本发明方法分别检测N末端心房利钠肽(NT-proBNP)样本

[0318] 采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的N末端心房利钠肽(NT-proBNP)检测试剂盒(化学发光法)来检测样本中N末端心房利钠肽的含量。

[0319] 将高浓度的N末端心房利钠肽抗原进行梯度稀释,分别采用常规检测方法和本发明检测方法测定含不同浓度N末端心房利钠肽的样本的信号值。

[0320] 常规检测方法:将已知浓度的待测物样本,试剂1(发光抗体,亦即,鼠单克隆抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的鼠单克隆抗体)加入反应杯后,37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育10min,光子

计数器读数,读取RLU,结果如表6所示。

[0321] 采用本发明两次读数法:将已知浓度的待测物样本,试剂1(发光抗体,亦即,鼠单克隆抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的鼠单克隆抗体),37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育3min,读数RLU1,37℃继续温育7min,读数RLU2,并计算第二次信号值的增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$,检测结果如表6和图7所示:

[0322] 表6:

样本编号	浓度 (pg/ml)	常规检测结果	本发明检测结果		
		RLU	RLU1	RLU2	增幅 A
1#	62.5	6022	4751	4847	2%
2#	250	8162	6507	7053	8%
3#	1000	19752	16182	19168	18%
[0323] 4#	4000	71440	50520	71309	41%
5#	16000	211974	163755	337723	106%
6#	64000	750435	587531	1555828	165%
7#	256000	1327403	1011360	3203183	217%
8#	1024000	923568	735261	2686846	265%
9#	4096000	424535	322636	1343679	316%

[0324] 由表6可知,浓度从62.5pg/ml到256000pg/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随N末端心房利钠肽浓度升高而降低,即浓度大于256000pg/ml(定义此浓度为HD-HOOK拐点,定义其增幅为 A_0)则HD-HOOK,在常规检测中,抗原浓度高于此检测范围的样本报告浓度将会偏低(报告浓度均小于256000pg/ml)。

[0325] 本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。每个待测样本先后检测到信号值结果RLU1、RLU2,将第二次读数的RLU增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$ 作为判断样本浓度区间的指标之一。由表6和图7可知,信号值随浓度续升高到256000pg/ml(定义为上升区间),之后信号值开始随浓度升高而下降(定义为下降区间),但是增幅A却是随浓度持续上升的。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1、RLU2和A。

[0326] 作上升区间(如0-35,000pg/ml)的RLU2和A标准曲线,先通过待测样本A值与标准曲线A比较, $A < A_{(35000\text{pg/ml})}$ 则将待测样本的RLU2代入标准曲线计算确切浓度。 $A > A_{(35000\text{pg/ml})}$ 则待测样本浓度超过标准曲线的范围,需稀释检测。

[0327] 实施例7:常规方法和本发明方法分别检测降钙素原(PCT)样本

[0328] 采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的降钙素原(PCT)检测试剂盒(化学发光法)来检测样本中降钙素原的含量。

[0329] 将高浓度的降钙素原抗原进行梯度稀释,分别采用常规检测方法和本发明检测方法测定含不同浓度降钙素原的样本的信号值。

[0330] 常规检测方法:将已知浓度的待测物样本,试剂1(发光抗体,亦即,鼠单克隆抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的鼠单克隆抗体)加入反应杯后,37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育10min,光子

计数器读数,读取RLU,结果如表7所示。

[0331] 采用本发明两次读数法:将知浓度的待测物样本,试剂1(发光抗体,亦即,鼠单克隆抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的鼠单克隆抗体),37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育3min,读数RLU1,37℃继续温育7min,读数RLU2,并计算第二次信号值的增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$,检测结果如表7和图8所示:

[0332] 表7:

样本编	浓度	常规检测结果	本发明检测结果		
号	(ng/ml)	RLU	RLU1	RLU2	增幅 A
1#	1	6494	5677	6306	11%
2#	4	9300	8700	9265	6%
3#	20	23184	19058	25090	32%
4#	100	70813	65143	103267	59%
5#	500	252498	218813	537843	146%
6#	2,500	785933	716506	2206900	208%
7#	12,500	1220448	1104767	3872725	251%
8#	62,500	814576	708063	2664094	276%
9#	312,500	364549	293546	1198940	308%

[0335] 由表7可知,浓度从1ng/ml到12,500ng/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随降钙素原浓度升高而降低,即浓度大于12,500ng/ml(定义此浓度为HD-HOOK拐点,定义其增幅为 A_0)则HD-HOOK,在常规检测中,抗原浓度高于此检测范围的样本报告浓度将会偏低(报告浓度均小于12,500ng/ml)。

[0336] 本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。每个待测样本先后检测到信号值结果RLU1、RLU2,将第二次读数的RLU增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$ 作为判断样本浓度区间的指标之一。由表7和图8可知,信号值随浓度续升高到12,500ng/ml(定义为上升区间),之后信号值开始随浓度升高而下降(定义为下降区间),但是增幅A却是随浓度持续上升的。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1、RLU2和A。

[0337] 作上升区间(如0-100ng/ml)的RLU2和A标准曲线,先通过待测样本A值与标准曲线A比较, $A < A_{(100ng/ml)}$ 则将待测样本的RLU2代入标准曲线计算确切浓度。 $A > A_{(100ng/ml)}$ 则待测样本浓度超过标准曲线的范围,需稀释检测

[0338] 实施例8:常规方法和本发明方法分别检测肌钙蛋白I(cTnI)样本

[0339] 采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的肌钙蛋白I(cTnI)检测试剂盒(化学发光法)来检测样本中肌钙蛋白I的含量。

[0340] 将高浓度的肌钙蛋白I抗原进行梯度稀释,分别采用常规检测方法和本发明检测方法测定含不同浓度肌钙蛋白I的样本的信号值。

[0341] 常规检测方法:将已知浓度的待测物样本,试剂1(发光抗体,亦即,鼠单克隆抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的鼠单克隆抗体)加入反应杯

后,37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育10min,光子计数器读数,读取RLU,结果如表8所示。

[0342] 采用本发明两次读数法:将知浓度的待测物样本,试剂1(发光抗体,亦即,鼠单克隆抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的鼠单克隆抗体),37℃温育15min,加入LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),37℃温育3min,读数RLU1,37℃继续温育7min,读数RLU2,并计算第二次信号值的增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$,检测结果如表8和图9所示:

[0343] 表8:

样本编号	浓度 (ng/ml)	常规检测结果	本发明检测结果		
		RLU	RLU1	RLU2	增幅 A
1#	0.2	7474	7047	8345	18%
2#	1	17361	15219	19797	30%
3#	4	55091	52344	95548	83%
[0344] 4#	20	190395	174092	439092	152%
5#	100	635772	593405	1727512	191%
6#	500	961652	933015	3338403	258%
7#	2,500	865486	839713	3200562	281%
8#	12,500	455932	417650	1991517	377%
9#	62,500	101783	104668	549601	425%

[0345] 由表8可知,浓度从0.2ng/ml到500ng/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随肌钙蛋白I浓度升高而降低,即浓度大于500ng/ml(定义此浓度为HD-HOOK拐点,定义其增幅为 A_0)则HD-HOOK,在常规检测中,抗原浓度高于此检测范围的样本报告浓度将会偏低(报告浓度均小于500ng/ml)。

[0346] 本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。每个待测样本先后检测到信号值结果RLU1、RLU2,将第二次读数的RLU增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$ 作为判断样本浓度区间的指标之一。由表8和图9可知,信号值随浓度续升高到500ng/ml(定义为上升区间),之后信号值开始随浓度升高而下降(定义为下降区间),但是增幅A却是随浓度持续上升的。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1、RLU2和A。

[0347] 作上升区间(如0-50ng/ml)的RLU2和A标准曲线,先通过待测样本A值与标准曲线A比较, $A < A_{(50ng/ml)}$ 则将待测样本的RLU2代入标准曲线计算确切浓度。 $A > A_{(50ng/ml)}$ 则待测样本浓度超过标准曲线的范围,需稀释检测。

[0348] 应当注意的是,以上所述的实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述,但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇,而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改,以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例,但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例,相反,本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

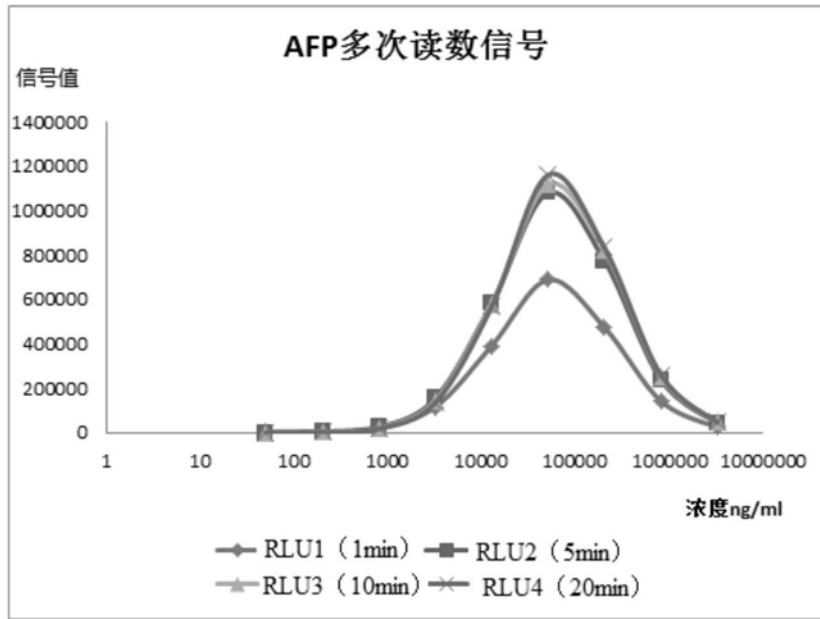


图1

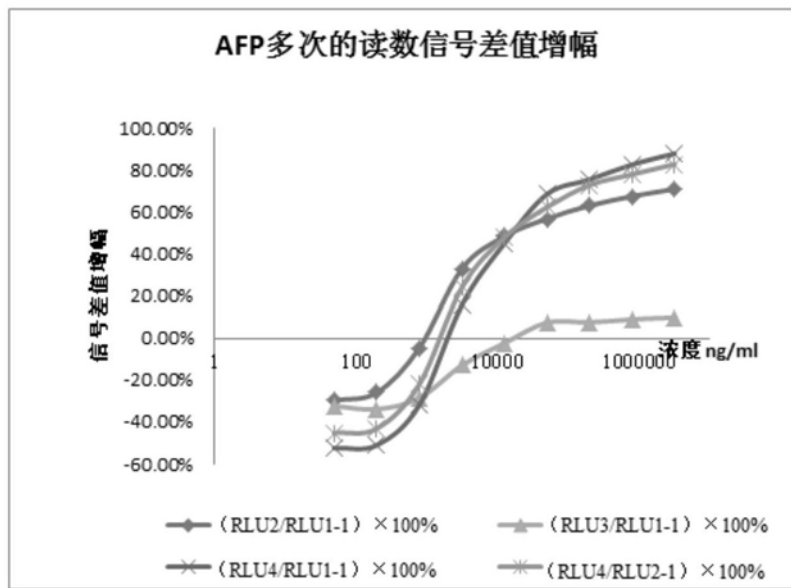


图2

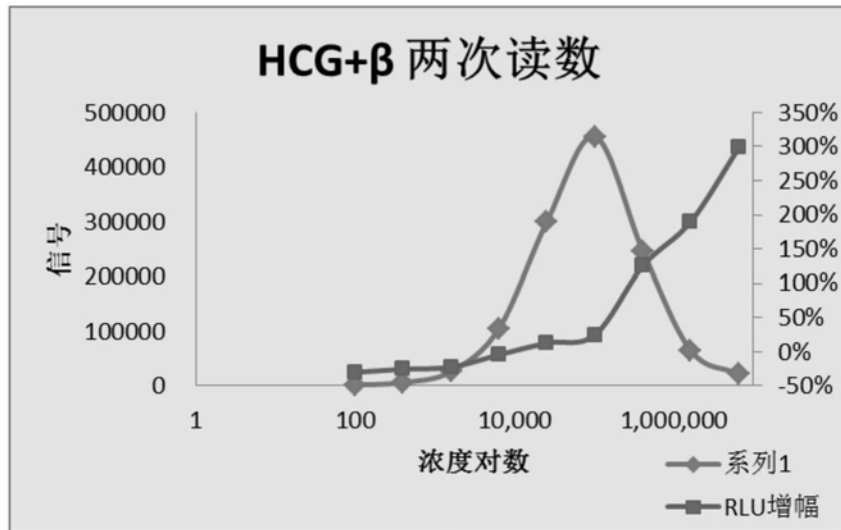


图3

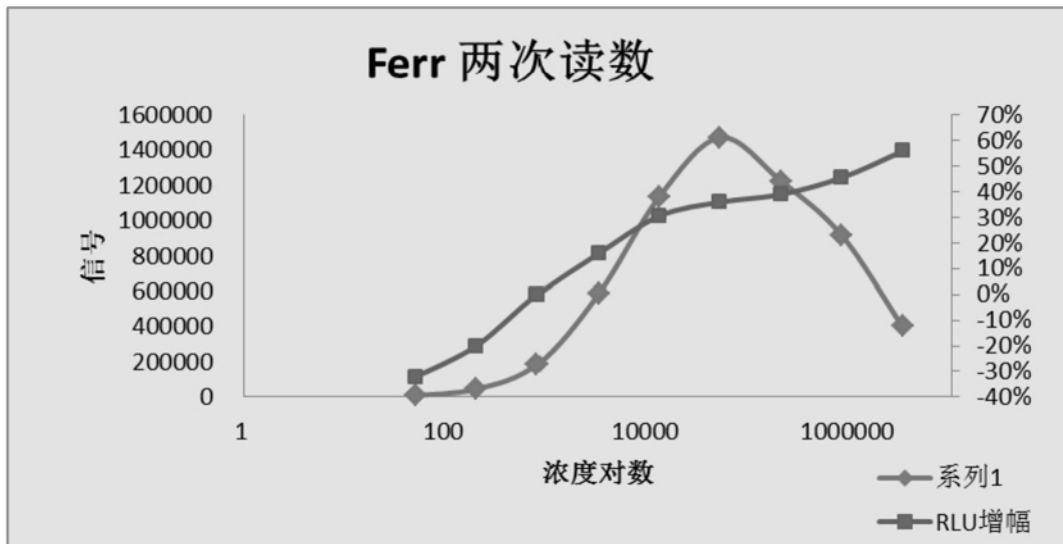


图4

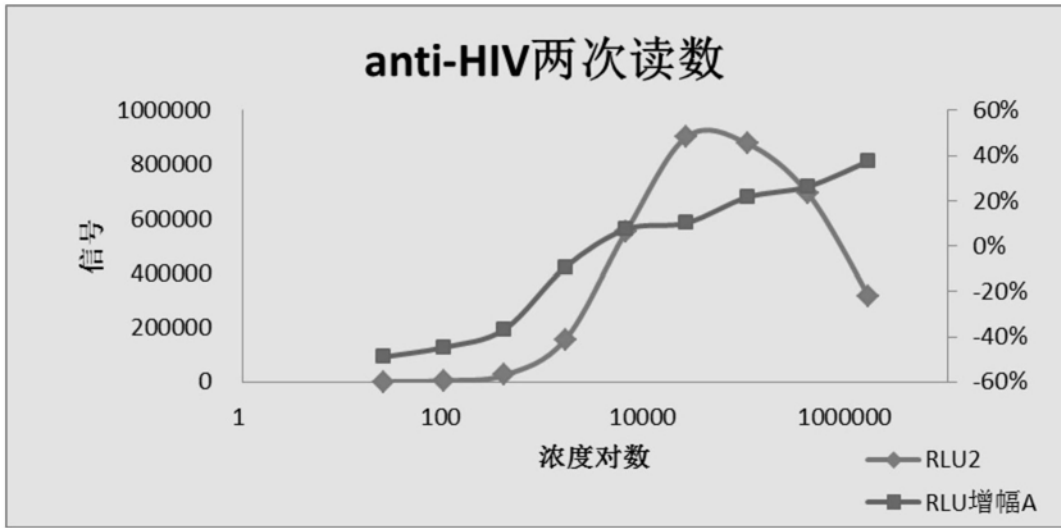


图5

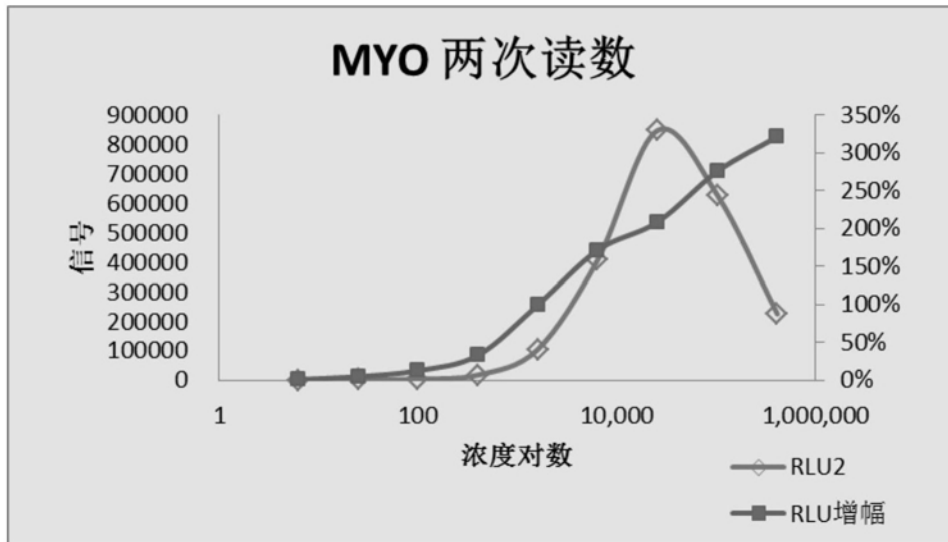


图6

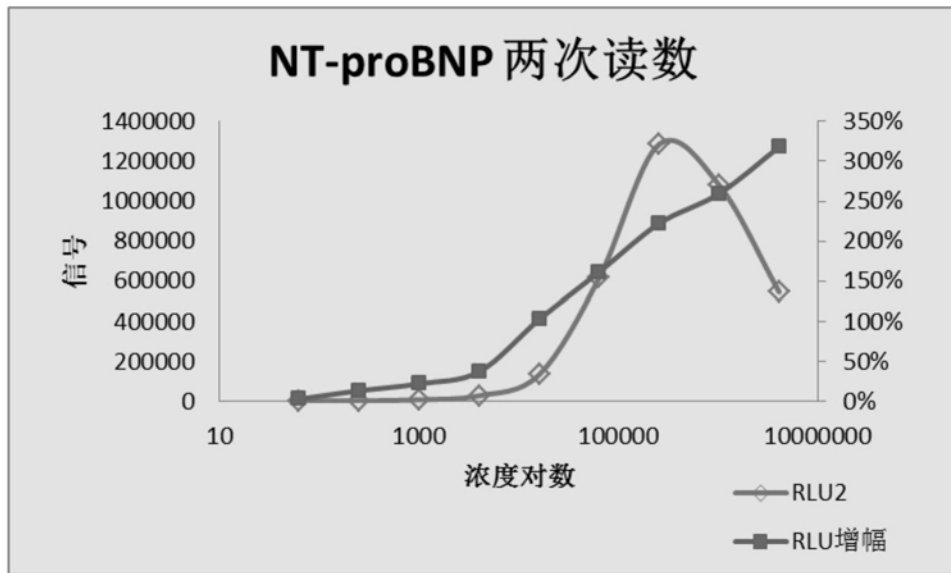


图7

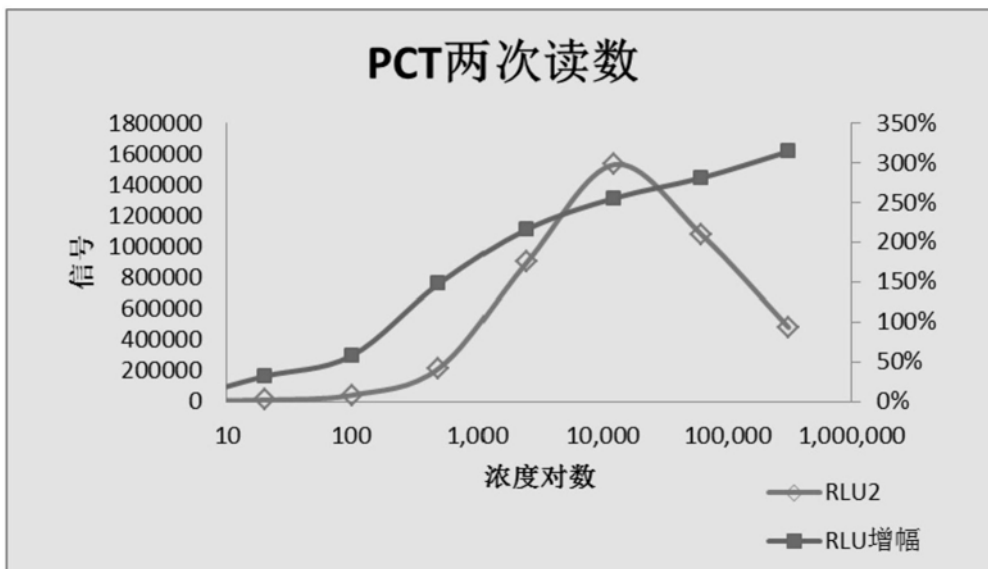


图8

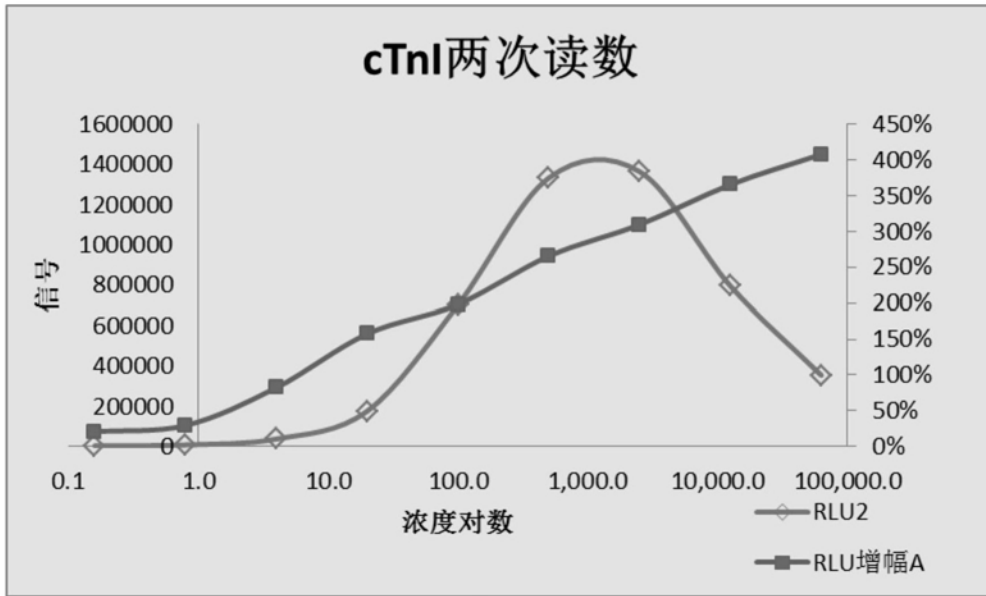


图9

专利名称(译)	一种化学发光免疫分析测定方法及使用该方法的系统、试剂盒		
公开(公告)号	CN110514651A	公开(公告)日	2019-11-29
申请号	CN201810806514.4	申请日	2018-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司 北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司 北京科美生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司 北京科美生物技术有限公司		
[标]发明人	杨阳 赵卫国 刘宇卉 李临		
发明人	杨阳 赵卫国 刘宇卉 李临		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/53		
代理人(译)	陈伟		
优先权	201810491322.9 2018-05-21 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及化学发光技术领域的一种化学发光分析测定方法、一种使用化学发光分析测定方法的系统和一种试剂盒。本发明方法通过多次读数后，选取两次读数来拓宽检测范围、指示HD-HOOK样本或超检测范围样本。

