



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108132344 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201611034237.7

(22)申请日 2016.11.22

(71)申请人 博阳生物科技(上海)有限公司

地址 201210 上海市浦东新区自由贸易试
验区蔡伦路88号五楼东面

(72)发明人 杨阳 赵卫国 张向辉

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 孟凡宏 谢燕军

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/63(2006.01)

权利要求书3页 说明书14页 附图4页

(54)发明名称

免疫测定方法、用于鉴定免疫测定的系统和
试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种免疫测定方法,其特征在
于,所述方法包括如下步骤:(1)对含待测目标抗
原(或抗体)的待测样本进行化学发光免疫反应,
激发和记录化学发光的第一次和第二次读数,并
将第二次和第一次读数之间的差值增幅记为A,
(2)根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系
列标准物质的第一次读数和两次读数的增幅A分
别做标准曲线;(3)将含待测目标抗原(或抗体)
的待测样本的第一次读数和两次读数的增幅A与
标准曲线进行比较,来确定样本的浓度。本发明
还涉及一种用于鉴定免疫测定的系统和一种试
剂盒。

1. 一种免疫测定方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:(1)对含待测目标抗原(或抗体)的待测样本进行化学发光免疫反应,激发和记录化学发光的第一次和第二次读数,并将第二次和第一次读数之间的差值增幅记为A,(2)根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的第一次读数和两次读数的增幅A分别做标准曲线;(3)将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本的第一次读数和两次读数的增幅A与标准曲线进行比较,来确定样本的浓度。

2. 根据权利要求1所述的免疫测定方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1)将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本与第一抗体(或抗原)包被的发光微粒、标记物标记的第二抗体(或抗原)混合,温育得混合液;

(2)第一次读数:在步骤(1)的混合液中再加入标记物特异结合物标记的感光微粒,温育后进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU1;

(3)第二次读数:将步骤(2)中进行第一次读数后的反应溶液进一步温育后,再进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU2;

(4)计算样本第二次读数所得信号值相对于第一次读数所得信号值的增幅A, $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$;

(5)根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的两次读数的增幅A做标准曲线;

(6)通过A值确定待测物质浓度是在标准曲线的上升区间或者是在下降区间,再将待测样本的RLU1代入其对应的标准曲线计算浓度。

3. 根据权利要求2所述的免疫测定方法,其特征在于,发光微粒是指填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒;所述感光微粒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。

4. 根据权利要求2所述的免疫测定方法,其特征在于,步骤(2)和(3)中,以600~700nm的红色激发光照射,检测反应溶液的发射光量;发射光的检测波长为520~620nm。

5. 根据权利要求2所述的免疫测定方法,其特征在于,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;所述第一抗体和第二抗体指可特异性结合于所述目标抗原的抗体;所述第一抗原和第二抗原指可特异性结合于所述目标抗体的抗原。

6. 一种用于鉴定免疫测定的系统,所述系统包括:

免疫反应装置,其用于实施化学发光免疫反应,

化学发光免疫反应激发和计数装置,其用于激发和记录化学发光的第一次和第二次读数,并将第二次和第一次读数之间的差值增幅记为A,

处理器,其用于根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的第一次读数和两次读数的增幅A分别做标准曲线,将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本的第一次读数和两次读数的增幅A与标准曲线进行比较,来确定样本的浓度。

7. 根据权利要求6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)将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本与第一抗体(或抗原)包被的发光微粒、标记物标记的第二抗体(或抗原)混合,温育得混合液;

(2)第一次读数:在步骤(1)的混合液中再加入标记物特异结合物标记的感光微粒,温

育后进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU1;

(3) 第二次读数:将步骤(2)中进行第一次读数后的反应溶液进一步温育后,再进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU2;

(4) 计算样本第二次读数所得信号值相对于第一次读数所得信号值的增幅A, $A = (RLU2/RLU1-1) \times 100\%$;

(5) 根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的两次读数的增幅A做标准曲线;

(6) 通过A值确定待测物质浓度是在标准曲线的上升区间或者是在下降区间,再将待测样本的RLU1代入其对应的标准曲线计算浓度。

8. 根据权利要求7所述的系统,其特征在于,发光微粒是指填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒;所述感光微粒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。

9. 根据权利要求7所述的系统,其特征在于,步骤(2)和(3)中,以600~700nm的红色激光照射,检测反应溶液的发射光量;发射光的检测波长为520~620nm。

10. 根据权利要求7所述的系统,其特征在于,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;所述第一抗体和第二抗体指可特异性结合于所述目标抗原的抗体;所述第一抗原和第二抗原指可特异性结合于所述目标抗体的抗原。

11. 一种试剂盒,包括第一抗体(或抗原)包被的发光微粒、标记物标记的第二抗体(或抗原)、标记物特异结合物标记的感光微粒,其特征在于,所述试剂盒的使用方法包括如下步骤:(1)对含待测目标抗原(或抗体)的待测样本进行化学发光免疫反应,激发和记录化学发光的第一次和第二次读数,并将第二次和第一次读数之间的差值增幅记为A,(2)根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的第一次读数和两次读数的增幅A分别做标准曲线;(3)将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本的第一次读数和两次读数的增幅A与标准曲线进行比较,来确定样本的浓度。

12. 根据权利要求11所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的使用方法包括如下步骤:

(1) 将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本与第一抗体(或抗原)包被的发光微粒、标记物标记的第二抗体(或抗原)混合,温育得混合液;

(2) 第一次读数:在步骤(1)的混合液中再加入标记物特异结合物标记的感光微粒,温育后进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU1;

(3) 第二次读数:将步骤(2)中进行第一次读数后的反应溶液进一步温育后,再进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU2;

(4) 计算样本第二次读数所得信号值相对于第一次读数所得信号值的增幅A, $A = (RLU2/RLU1-1) \times 100\%$;

(5) 根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的两次读数的增幅A做标准曲线;

(6) 通过A值确定待测物质浓度是在标准曲线的上升区间或者是在下降区间,再将待测样本的RLU1代入其对应的标准曲线计算浓度。

13. 根据权利要求12所述的试剂盒,其特征在于,发光微粒是指填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒;所述感光微粒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。

14. 根据权利要求12所述的试剂盒,其特征在于,步骤(2)和(3)中,以600~700nm的红色激发光照射,检测反应溶液的发射光量;发射光的检测波长为520~620nm。

15. 根据权利要求12所述的试剂盒,其特征在于,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;所述第一抗体和第二抗体指可特异性结合于所述目标抗原的抗体;所述第一抗原和第二抗原指可特异性结合于所述目标抗体的抗原。

免疫测定方法、用于鉴定免疫测定的系统和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及光激化学发光技术领域,具体涉及一种免疫测定方法、一种用于鉴定免疫测定的系统和一种试剂盒。

背景技术

[0002] 免疫学检测是基于抗原抗体特异性反应的原理进行的,由于其可以利用同位素、酶、化学发光物质等对被测物进行显示或信号的放大,因此常被用于检测蛋白质、激素等微量生物活性物质。

[0003] 化学发光免疫分析则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。

[0004] 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。它通过感光微粒和发光微粒在一定范围内结合,产生离子氧能量的传递,发出光信号,从而对待测样本进行检测。其中,感光微粒内部填充有感光化合物,而发光微粒内部填充有发光化合物和镧系元素。在红色激光(600~700nm)的激发下,感光微粒释放出高能态的单线态氧离子($4\mu\text{S}$),其传播距离约为200nm。当感光微粒和发光微粒的距离足够接近时,感光微粒释放的单线态氧离子能到达发光微粒,并通过一系列的化学反应,发射出520~620nm高能级的光,而被仪器检测到。在本反应体系中,微粒的浓度很低,碰撞几率较小,本底信号微弱。只有在感光微粒和发光微粒通过免疫反应结合以后,才会发射出明显的光,因此系统的灵敏度很高。在疾病诊断中,常用的检测模式包含三到四个组分:包被抗原或抗体的发光微粒、生物素或地高辛标记的抗原或抗体、亲和素或抗地高辛包被的感光微粒,中和抗原或抗体等。以上各组份通过两步以上温育反应与待测抗原或抗体结合,并通过化学发光量的强弱对待测样本进行定性或定量检测。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。

[0005] 对于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。

[0006] 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。

[0007] 具体来说,一方面,在检测高浓度的样本时,高剂量-钩状效应可能导致检测信号偏低,样本也因此被判读为偏低浓度。既往的解决办法是增加试剂的组分,对待测样本进行稀释或进行两步法检测等。

[0008] 另一方面,因为高剂量-钩状效应,当样本浓度的升高到一定值时,信号并不能持续升高,限制了检测范围。既往主要通过优化抗体或提高抗体浓度等方法来拓宽检测范围。

[0009] 常规检测流程有以下5个步骤:反应孔中加入待测物及试剂、第一步温育、添加LiCA通用液、第二步温育和读数。

[0010] 本发明的检测方法是基于常规检测流程,在不中断反应的前提下,在反应过程多次读取信号值,通过观察信号的变化来判断样本的真实浓度。

发明内容

[0011] 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免疫测定方法,本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围,并简便快速地计算出待测物浓度。

[0012] 为了实现上述目的及其他相关目的,本发明采用如下技术方案:

[0013] 本发明的第一方面提供了一种免疫测定方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:(1)对含待测目标抗原(或抗体)的待测样本进行化学发光免疫反应,激发和记录化学发光的第一次和第二次读数,并将第二次和第一次读数之间的差值增幅记为A,(2)根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的第一次读数和两次读数的增幅A分别做标准曲线;(3)将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本的第一次读数和两次读数的增幅A与标准曲线进行比较,来确定样本的浓度。根据一个优选的实施方式,所述的免疫测定方法包括如下步骤:

[0014] (1)将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本与第一抗体(或抗原)包被的发光微粒、标记物标记的第二抗体(或抗原)混合,温育得混合液;

[0015] (2)第一次读数:在步骤(1)的混合液中再加入标记物特异结合物标记的感光微粒,温育后进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU1;

[0016] (3)第二次读数:将步骤(2)中进行第一次读数后的反应溶液进一步温育后,再进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU2;

[0017] (4)计算样本第二次读数所得信号值相对于第一次读数所得信号值的增幅A, $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$;

[0018] (5)根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的两次读数的增幅A做标准曲线;

[0019] (6)通过A值确定待测物质浓度是在标准曲线的上升区间或者是在下降区间,再将待测样本的RLU1代入其对应的标准曲线计算浓度。

[0020] 根据一个优选的实施方式,所述发光微粒是指填充有发光化合物和镧系元素化合物的高分子微粒;所述感光微粒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。

[0021] 根据一个优选的实施方式,所述步骤(2)和(3)中,以600~700nm的红色激发光照射,检测反应溶液的发射光量;发射光的检测波长为520~620nm。

[0022] 根据一个优选的实施方式,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;所述第一抗体和第二抗体指可特异性结合于所述目标抗原的抗体;所述第一抗原和第二抗原指可特异性结合于所述目标抗体的抗原。

[0023] 本发明的第二方面提供一种用于鉴定免疫测定的系统,所述系统包括:

[0024] 免疫反应装置,其用于实施化学发光免疫反应,

[0025] 化学发光免疫反应激发和计数装置,其用于激发和记录化学发光的第一次和第二次读数,并将第二次和第一次读数之间的差值增幅记为A,

[0026] 处理器,其用于根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的第一次读数和两次读数的增幅A分别做标准曲线,将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本的第一次读数和两次读数的增幅A与标准曲线进行比较,来确定样本的浓度。

[0027] 在一个具体的实施方式中,本发明用于鉴定免疫测定的系统包括免疫反应装置,例如盛放溶液的容器;化学发光免疫反应激发和计数装置,例如光子计数模块和发光二极管;以及处理器,例如电脑,对所述读数进行处理和作图等。这种用于鉴定免疫测定的系统可以例如参考本申请人的实用新型专利CN201532646U,其以引用方式引入本申请。

[0028] 根据一个优选的实施方式,所述系统的使用方法包括如下步骤:

[0029] (1) 将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本与第一抗体(或抗原)包被的发光微粒、标记物标记的第二抗体(或抗原)混合,温育得混合液;

[0030] (2) 第一次读数:在步骤(1)的混合液中再加入标记物特异结合物标记的感光微粒,温育后进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU1;

[0031] (3) 第二次读数:将步骤(2)中进行第一次读数后的反应溶液进一步温育后,再进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU2;

[0032] (4) 计算样本第二次读数所得信号值相对于第一次读数所得信号值的增幅A, $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$;

[0033] (5) 根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的两次读数的增幅A做标准曲线;

[0034] (6) 通过A值确定待测物质浓度是在标准曲线的上升区间或者是在下降区间,再将待测样本的RLU1代入其对应的标准曲线计算浓度。

[0035] 本发明的第三方面提供一种试剂盒,包括第一抗体(或抗原)包被的发光微粒、标记物标记的第二抗体(或抗原)、标记物特异结合物标记的感光微粒,其特征在于,所述试剂盒的使用方法包括如下步骤:(1)对含待测目标抗原(或抗体)的待测样本进行化学发光免疫反应,激发和记录化学发光的第一次和第二次读数,并将第二次和第一次读数之间的差值增幅记为A,(2)根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的第一次读数和两次读数的增幅A分别做标准曲线;(3)将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本的第一次读数和两次读数的增幅A与标准曲线进行比较,来确定样本的浓度。

[0036] 根据一个优选的实施方式,所述试剂盒的使用方法包括如下步骤:

[0037] (1) 将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本与第一抗体(或抗原)包被的发光微粒、标记物标记的第二抗体(或抗原)混合,温育得混合液;

[0038] (2) 第一次读数:在步骤(1)的混合液中再加入标记物特异结合物标记的感光微粒,温育后进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU1;

[0039] (3) 第二次读数:将步骤(2)中进行第一次读数后的反应溶液进一步温育后,再进行激发光照射并检测发射光量,光子计数器读数,计为RLU2;

[0040] (4) 计算样本第二次读数所得信号值相对于第一次读数所得信号值的增幅A, $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$;

[0041] (5) 根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的两次读数的增幅A做标准曲线;

[0042] (6) 通过A值确定待测物质浓度是在标准曲线的上升区间或者是在下降区间,再将待测样本的RLU1代入其对应的标准曲线计算浓度。

[0043] 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,通过两次读数来拓宽检测范围,以在检测过程中,简便快速地计算出其浓度。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 本发明实施例中,所述抗原或抗体选自胰岛素(INS)、乙型肝炎病毒表面抗体(HBsAb)、甲胎蛋白(AFP)和促甲状腺素(TSH)。

[0047] 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。

[0048] 优选的,所述第一抗体和第二抗体指可特异性结合于所述抗原的抗体。

[0049] 对于同一抗原而言,相应的第一抗体和第二抗体可以是相同的也可以是不同的,并且可同时结合于所述的抗原。

[0050] 所述第一抗原和第二抗原指可特异性结合于所述目标抗体的抗原。

[0051] 对于同一抗体而言,相应的第一抗原和第二抗原可以是相同的也可以是不同的,并且可同时结合于所述的抗体。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 优选的,所述发光微粒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等,该微粒可由市场上购得。发光微粒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。

[0055] 优选的,所述感光微粒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。当其与发光微粒距离足够近的情况下,单线氧离子传递到发光微粒,与发光微粒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。

[0056] 优选的,步骤(2)和(3)中,以600~700nm的红色激发光照射,检测反应溶液的发射光量。发射光的检测波长为520~620nm。

[0057] 进一步的,红色激光(600~700nm)照射感光微粒,感光微粒释放的单线态氧离子,一部分单线态氧离子被发光微粒接收,从而发射出520~620nm高能级的光。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 本发明的方法,通过两次读数,比较两次读数所得信号值增幅之间的关系,从而可以起到拓宽检测范围的作用。两次读数的差异由以下三个方面决定:

[0061] 第一方面,第一次读数时,感光微粒受红色激光(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发光微粒后,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。

[0062] 第二方面,对于低浓度样本而言,感光微粒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。

[0063] 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。

[0064] 综上所述,本发明在反应未达到平衡时进行第一次读数,感光微粒受激发光照射释放单线态氧,一部分传递到发光微粒,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,另一方面感光微粒在激发过一次后,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感光微粒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,随着待测目标抗原(或抗体)浓度的升高,第二次光激发光的信号值与第一次信号值的增高幅度也增高。信号的增幅与样本浓度正相关,比较两次信号的增幅可以来拓宽检测范围,以在检测过程中,简便快速地计算出其浓度。

[0065] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0066] (1) 本发明基于光激化学发光平台(发光氧通道)的免洗和反应的均一性,能实现对一个反应进行多次信号测量而不中断免疫反应的进行,检测出在不同反应时间的光信号,两次信号的大小比较能区分出HD-HOOK效应样本,所述方法不受检测范围限制,有效地拓宽检测范围100倍以上。

[0067] (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。

[0068] (3) 本发明的方法操作简单,通过两次读数来拓宽检测范围,并在检测过程中,简便快速地计算出待测物浓度。

附图说明

[0069] 图1:INS采用常规检测方法所得信号值与样本浓度的关系曲线图。

[0070] 图2:INS采用本发明方法所得第一次读数信号和增幅A与样本浓度关系曲线图。

[0071] 图3:HBsAb采用常规检测方法所得信号值与样本浓度的关系曲线图。

- [0072] 图4:HBsAb采用本发明方法所得第一次读数信号和增幅A与样本浓度关系曲线图。
- [0073] 图5:AFP采用常规检测方法所得信号值与样本浓度的关系曲线图。
- [0074] 图6:AFP采用本发明方法所得第一次读数信号和增幅A与样本浓度关系曲线图。
- [0075] 图7:TSH采用常规检测方法所得信号值与样本浓度的关系曲线图。
- [0076] 图8:TSH采用本发明方法所得第一次读数信号和增幅A与样本浓度关系曲线图。

具体实施方式

[0077] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围。

[0078] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0079] 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。

[0080] 本发明的发明人经过广泛而深入的研究发现,通过设立两次读数,并研究两次读数的增幅与样本浓度之间的关系,通过两次读数来拓宽检测范围,以在检测过程中,简便快速地计算出其浓度。

[0081] 如本发明所述,术语“第一抗体”和“第二抗体”指可特异性结合于某一抗原(如肿瘤标志物)的抗体。对于同一抗原(如肿瘤标志物)而言,相应的第一抗体和第二抗体可以是不同的也可以是相同的,并且可同时结合于所述的抗原。术语“第一抗原”和“第二抗原”指可特异性结合于某一抗体(如乙肝表面抗体)的抗原。对于同一抗体(如乙肝表面抗体)而言,相应的第一抗原和第二抗原可以是不同的也可以是相同的,并且可同时结合于所述的抗体。

[0082] 如本发明所述,术语“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。

[0083] 如本发明所述,术语“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。

[0084] 双抗夹心法的基本原理:

[0085] 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(或抗原)固定于固相载体,然后将第一抗体(或抗原)与抗原(或抗体)反应,再与标记的第二抗体(或抗原)反应,最后进行化学发光或酶联显色反应检测信号。

[0086] 光激化学发光法的基本原理:

[0087] 光激化学发光法的基本原理是本领域技术人员所熟知的。常规的做法是通过感光微粒和发光微粒在一定范围内结合,产生离子氧能量的传递,发出光信号,从而对待测样本进行检测。其中,感光微粒内部填充有感光化合物,而发光微粒内部填充有发光化合物和镧系元素。在红色激光(600~700nm)的激发下,感光微粒释放出高能态的单线态氧离子($4\mu\text{S}$),其传播距离约为200nm。当感光微粒和发光微粒的距离足够接近时,感光微粒释放的单线态氧离子能到达发光微粒,并通过一系列的化学反应,发射出520~620nm高能级的光,而被仪器检测到。

[0088] 在本发明的一个优选实施例中,充分利用了第一抗体固定在发光微粒上的特点,同时采用生物素标记第二抗体,链霉亲和素包被感光微粒,将血清样本或抗原标准质控品液与第一抗体包被的发光微粒、生物素标记第二抗体依次或同时加入反应容器中,再加入链霉亲和素标记的感光微粒,从而发生以下反应:

[0089] (1) 发光微粒上的第一抗体与血清样本或抗原标准质控品液中相应的抗原结合,形成“抗原-第一抗体-发光微粒”三元复合物;

[0090] (2) 第二抗体与血清样本或抗原标准质控品液中相应的抗原结合,最终形成“第二抗体-抗原-第一抗体-发光微粒”双抗夹心复合物;

[0091] 生物素和链霉亲和素特异性结合,使得双抗夹心复合物与感光微粒结合到一起。

[0092] 此时,感光微粒和发光微粒之间的距离小于200nm,红色激光(600~700nm)照射感光微粒后,释放的单线态氧能够被发光微粒接收。通过一系列化学反应,发射出520~620nm高能级的光,并通过化学发光量的强弱对待测样本进行定性或定量检测。

[0093] 在本发明的另一个优选实施例中,充分利用了第一抗原固定在发光微粒上的特点,同时采用生物素标记第二抗原,链霉亲和素包被感光微粒,将血清样本或抗原标准质控品液与第一抗原包被的发光微粒、生物素标记第二抗原依次或同时加入反应容器中,再加入链霉亲和素标记的感光微粒,从而发生以下反应:

[0094] (1) 发光微粒上的第一抗原与血清样本或抗原标准质控品液中相应的抗体积结合,形成“抗体-第一抗原-发光微粒”三元复合物;

[0095] (2) 第二抗原与血清样本或抗原标准质控品液中相应的抗体结合,最终形成“第二抗原-抗体-第一抗原-发光微粒”双抗夹心复合物;

[0096] 生物素和链霉亲和素特异性结合,使得双抗夹心复合物与感光微粒结合到一起。

[0097] 此时,感光微粒和发光微粒之间的距离小于200nm,红色激光(600~700nm)照射感光微粒后,释放的单线态氧能够被发光微粒接收。通过一系列化学反应,发射出520~620nm高能级的光,并通过化学发光量的强弱对待测样本进行定性或定量检测。

[0098] 以下,进一步说明本发明的相关操作细节。

[0099] (1) 第一抗体(或抗原)包被的发光微粒,记为试剂1,可购买于博阳生物科技有限公司。

[0100] (2) 第二抗体(或抗原)可用各种本领域已知的标记物及其特异结合物系统进行标记。优选地是通过生物素-亲和素系统标记第二抗体(或抗原)。生物素标记的第二抗体(或抗原),记为试剂2,可购买于博阳生物科技有限公司。

[0101] (3) 链霉亲和素包被的感光微粒,记为LiCA通用液,可购买于博阳生物科技有限公司。

[0102] (4) 标准品:

[0103] 用待测抗原(或抗体)配置浓度范围很宽(跨越HD-HOOK效应浓度)的一系列标准品溶液。将标准品、试剂1、试剂2混匀,温育反应后加入LiCA通用液,继续温育反应一段时间后第一次读数(RLU1),再温育一段时间后进行第二次读数(RLU2),计算 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$,根据标准品的RLU1和两次读数的增幅A分别与标准品浓度做标准曲线;标准品的RLU1与浓度的标准曲线表现为在非HD-HOOK效应阶段,RLU1随浓度的升高而升高,记为RLU1的上升区间,浓度升高到HD-HOOK效应阶段后,RLU1随浓度的升高而降低,记为RLU1的下降区间,标准品的A与浓度的标准曲线表现为A随浓度的升高而升高,不受HD-HOOK效应影响。

[0104] (5) 样品的检测:

[0105] 可用本发明方法检测的样品没有特别限制,可以是任何含有抗原(或抗体)的样品,代表性的例子可包括血清样本、尿液样本、唾液样本等。优选的样品是血清样品。

[0106] (6) 样品浓度计算:

[0107] 先将待测样本两次读数增幅A值代入标准品A与标准品浓度的标准曲线中,判断出待测样本浓度是处于RLU1的上升区间还是下降区间,再将待测样本的RLU1代入所在区间的标准品RLU1与标准品浓度的标准曲线中计算待测样本浓度。

[0108] 实施例1:常规方法和本发明方法分别检测胰岛素(INS)样本

[0109] 采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的胰岛素(INS)检测试剂盒(化学发光法)来检测样本中胰岛素(购自Fitzgerald,Catalog No:30R-2704)的含量。

[0110] 将高浓度的胰岛素抗原进行梯度稀释,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胰岛素的样本的信号值。

[0111] 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1所示。

[0112] 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 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$,检测结果如下:

[0113] 表1:

[0114]

浓度 ($\mu\text{IU/ml}$)	常规检测结果	本发明检测结果		
	RLU	RLU1	RLU2	增幅 A
3	3031	3132	2058	-34%
10	11328	9809	6631	-32%
33	33433	30397	21212	-30%
100	152385	117194	86069	-27%
335	732465	503568	449149	-11%
1,000	1797417	1342726	1446642	8%
3,350	2441794	1857062	2100576	13%
10,000	2470762	1880534	2247857	20%
33,500	2033507	1482999	1958095	32%
100,000	1209233	786883	1228586	56%
335,000	464717	273591	483967	77%
1,000,000	100765	58998	115157	95%

[0115] 由表1和图1可知,浓度从 $3\mu\text{IU/ml}$ 到 $10000\mu\text{IU/ml}$ 信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随胰岛素浓度升高而降低,即浓度大于 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 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 $10,000\mu\text{IU/ml}$)。

[0116] 本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围。每个待测样本先后检测到信号值结果RLU1、RLU2,将第二次读数的增幅 $A = (\text{RLU2}/\text{RLU1} - 1) \times 100\%$ 作为判断样本浓度区间的指标之一。由表1和图2可知,信号值随浓度续升高到 $10,000\mu\text{IU/ml}$,之后信号值开始随浓度升高而下降,但是增幅A却是随浓度持续上升的。

[0117] 当胰岛素校准品浓度覆盖到从 $3\mu\text{IU/ml}$ 到 $1,000,000\mu\text{IU/ml}$ 范围,用本发明方法作出RLU1和A标准曲线(如图2),随浓度升高,A持续上升,RLU1分为 $3\mu\text{IU/ml}$ 到 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 的上升区间和 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 到 $1,000,000\mu\text{IU/ml}$ 的下降区间。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1、RLU2和A。先通过A值确定待测物质浓度是在 $3\mu\text{IU/ml}$ 到 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 的上升区间或者是 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 到 $1,000,000\mu\text{IU/ml}$ 的下降区间,再将待测物质的RLU1代入其对应的标准曲线计算确切浓度。

[0118] 由表1可知,胰岛素浓度为 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 时,有信号峰值,其对应A为20%。若待测物 $A < 20\%$,则待测样本不是HD-HOOK样本,将其RLU1代入浓度小于 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 的标准曲线计算浓度;若 $A \geq 20\%$,则待测样本是HD-HOOK样本,将其RLU1代入浓度大于 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 的标准曲线计算浓度,从而将检测上限从 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 拓宽到了 $1,000,000\mu\text{IU/ml}$ 。

[0119] 实施例2:常规方法和本发明方法分别检测乙型肝炎病毒表面抗体(HBsAb)样本

[0120] 采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的乙型肝炎病毒表面抗体检测试剂盒(光

激化学发光法)来检测样本中乙型肝炎病毒表面抗体(购自北京中科京达生物技术有限公司,Clone No:M2201)的浓度。

[0121] 将高浓度的HBsAb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HBsAb的样本的信号值。

[0122] 常规检测方法:梯度稀释的HBsAb样本,试剂1(HBsAg包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记的HBsAg)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,光子计数器读取RLU。

[0123] 采用两次读数法:梯度稀释的HBsAb样本,试剂1(HBsAg包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记的HBsAg)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 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$,检测结果如下:

[0124] 表2:

浓度 (mIU/ml)	常规检测结果	本发明检测结果		
	RLU	RLU1	RLU2	增幅 A
1	703	652	737	13.0%
3	1257	1182	1424	20.5%
10	3443	2876	3592	24.9%
33	9387	7743	10124	30.8%
100	31033	25555	33721	32.0%
335	101781	79257	106917	34.9%
1,000	341483	259926	352344	35.6%
3,350	757906	570542	781231	36.9%
10,000	1050237	775542	1066620	37.5%
33,500	985422	753452	1039798	38.0%
100,000	576535	415949	577782	38.9%
335,000	258461	184878	259170	40.2%
1,000,000	107739	75811	109111	43.9%
3,350,000	44514	33501	48374	44.4%

[0125]

[0126] 由表2和图3可知,浓度从1mIU/ml到10000mIU/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随HBsAb浓度升高而降低,即浓度大于10,000mIU/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10,000mIU/ml)。

[0127] 本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围。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4可知,信号值随浓度续升高到10,000mIU/ml,之后信号值开始随浓度升高而下降,但是增幅A却是随浓度持续上升的。

[0128] 当HBsAb校准品浓度覆盖到从1mIU/ml到3,350,000mIU/ml范围,用本发明方法作出RLU1和A标准曲线(如图4),随浓度升高,A持续上升,RLU1分为1mIU/ml到10,000mIU/ml的上升区间和10,000mIU/ml到3,350,000mIU/ml的下降区间。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1、RLU2和A。先通过A值确定待测物质浓度是在1mIU/ml到10,000mIU/ml的上升区间或者是10,000mIU/ml到3,350,000mIU/ml的下降区间,再将待测物质的RLU1代入其对应的标准曲线计算确切浓度。

[0129] 由表2可知,HBsAb浓度为10,000mIU/ml时,有信号峰值,其对应A为37.5%。若待测物A<37.5%,则待测样本不是HD-HOOK样本,将其RLU1代入浓度小于10,000mIU/ml的标准曲线计算浓度;若A≥37.5%,则待测样本是HD-HOOK样本,将其RLU1代入浓度大于10,000mIU/ml的标准曲线计算浓度,从而将检测上限从10,000mIU/ml拓宽到了3,350,000mIU/ml。

[0130] 实施例3:常规方法和本发明方法分别检测胎儿甲种球蛋白(AFP)样本

[0131] 采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的胎儿甲种球蛋白检测试剂盒(光激化学发光法)来检测样本中AFP(购自Fitzgerald,Catalog No:30-1370)的含量。

[0132] 将高浓度的AFP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AFP的样本的信号值。所述常规检测方法和本发明方法参照实施例1。检测结果如下:

[0133] 表3:

[0134]

浓度	常规检测结果		本发明检测结果		
(ng/ml)	RLU	RLU1	RLU2	增幅	
5	6236	5240	3196	-39%	
20	28026	21592	13538	-37%	
100	192398	134766	103650	-23%	
500	1075656	814013	829990	2%	
1,000	1729407	1342554	1508052	12%	
10,000	2817087	2132217	2513551	18%	
35,000	1874558	1443089	1761348	22%	
70,000	1280414	988315	1235805	25%	
100,000	1019883	766931	976572	27%	
350,000	327178	236131	306697	30%	
700,000	139241	97740	129928	33%	
1,000,000	58911	40668	54969	35%	

[0135]

[0136] 由表3和图5可知,浓度从5ng/ml到10000ng/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随AFP浓度升高而降低,即浓度大于10,000ng/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10,000ng/ml)。

[0137] 本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围。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6可知,信号值随浓度续升高到10,000ng/ml,之后信号值开始随浓度升高而下降,但是增幅A却是随浓度持续上升的。

[0138] 当AFP校准品浓度覆盖到从5ng/ml到1,000,000ng/ml范围,用本发明方法作出RLU1和A标准曲线(如图6),随浓度升高,A持续上升,RLU1分为5ng/ml到10,000ng/ml的上升区间和10,000ng/ml到1,000,000ng/ml的下降区间。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1、RLU2和A。先通过A值确定待测物质浓度是在5ng/ml到10,000ng/ml的上升区间或者是10,000ng/ml到1,000,000ng/ml的下降区间,再将待测物质的RLU1代入其对应的标准曲线计算确切浓度。

[0139] 由表3可知,AFP浓度为10,000ng/ml时,有信号峰值,其对应A为18%。若待测物 $A < 18\%$,则待测样本不是HD-HOOK样本,将其RLU1代入浓度小于10,000ng/ml的标准曲线计算浓度;若 $A \geq 18\%$,则待测样本是HD-HOOK样本,将其RLU1代入浓度大于10,000ng/ml的标准曲线计算浓度,从而将检测上限从10,000ng/ml拓宽到了1,000,000ng/ml。

[0140] 实施例4:常规方法和本发明方法分别检测促甲状腺素(TSH)样本

[0141] 采用博阳生物科技(上海)有限公司生产的促甲状腺素检测试剂盒(光激化学发光法)来检测样本中促甲状腺素(购自Fitzgerald,Catalog No:30R-AT009)的含量。

[0142] 将高浓度的TSH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TSH的样本的信号值。所述常规检测方法和本发明方法参照实施例1。检测结果如下:

[0143] 表4:

浓度 ($\mu\text{IU/ml}$)	常规检测结果	本发明检测结果		
	RLU	RLU1	RLU2	增幅 A
1	1103	945	907	-4.0%
3	2575	2164	2094	-3.2%
10	7819	6599	6531	-1.0%
33	21753	18402	18769	2.0%
100	72245	56936	58935	3.5%
335	211059	165014	179901	9.0%
1,000	544987	431178	483676	12.2%
3,350	927996	766522	887819	15.8%
10,000	1105743	935888	1095402	17.0%
33,500	1076776	908019	1069339	17.8%
100,000	947465	759085	899887	18.5%
335,000	584210	471532	563676	19.5%
1,000,000	303719	249043	301106	20.9%

[0144]

[0145] 由表4和图7可知,浓度从 $1\mu\text{IU/ml}$ 到 $10000\mu\text{IU/ml}$ 信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随TSH浓度升高而降低,即浓度大于 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 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 $10,000\mu\text{IU/ml}$)。

[0146] 本发明方法通过两次读数来拓宽检测范围。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8可知,信号值随浓度续升高到 $10,000\mu\text{IU/ml}$,之后信号值开始随浓度升高而下降,但是增幅A却是随浓度持续上升的。

[0147] 当TSH校准品浓度覆盖到从 $1\mu\text{IU/ml}$ 到 $1,000,000\mu\text{IU/ml}$ 范围,用本发明方法作出RLU1和A标准曲线(如图8),随浓度升高,A持续上升,RLU1分为 $1\mu\text{IU/ml}$ 到 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 的上升区间和 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 到 $1,000,000\mu\text{IU/ml}$ 的下降区间。用本发明方法检测得到待测样本的RLU1、RLU2和A。先通过A值确定待测物质浓度是在 $3\mu\text{IU/ml}$ 到 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 的上升区间或者是 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 到 $1,000,000\mu\text{IU/ml}$ 的下降区间,再将待测物质的RLU1代入其对应的标准曲线计算确切浓度。

[0148] 由表4可知,TSH浓度为 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 时,有信号峰值,其对应A为17.0%。若待测物 $A < 17.0\%$,则待测样本不是HD-HOOK样本,将其RLU1代入浓度小于 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 的标准曲线计算浓度;若 $A \geq 17.0\%$,则待测样本是HD-HOOK样本,将其RLU1代入浓度大于 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 的标准曲线计算浓度,从而将检测上限从 $10,000\mu\text{IU/ml}$ 拓宽到了 $1,000,000\mu\text{IU/ml}$ 。

[0149] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因

此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

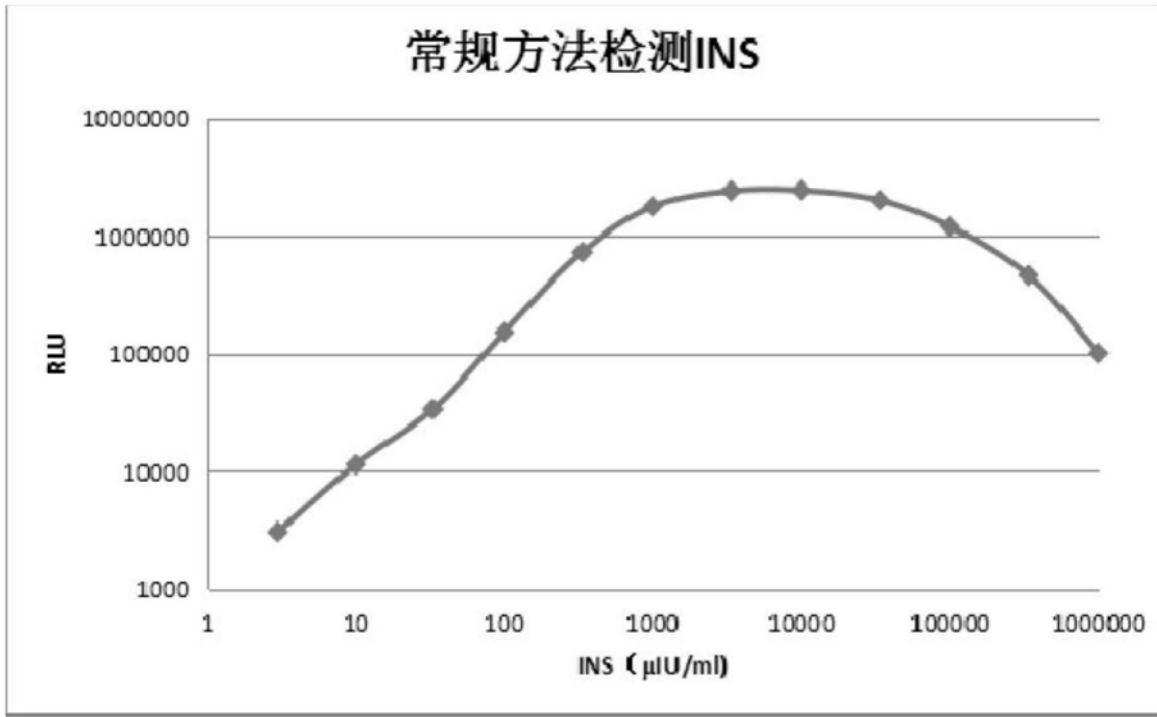


图1

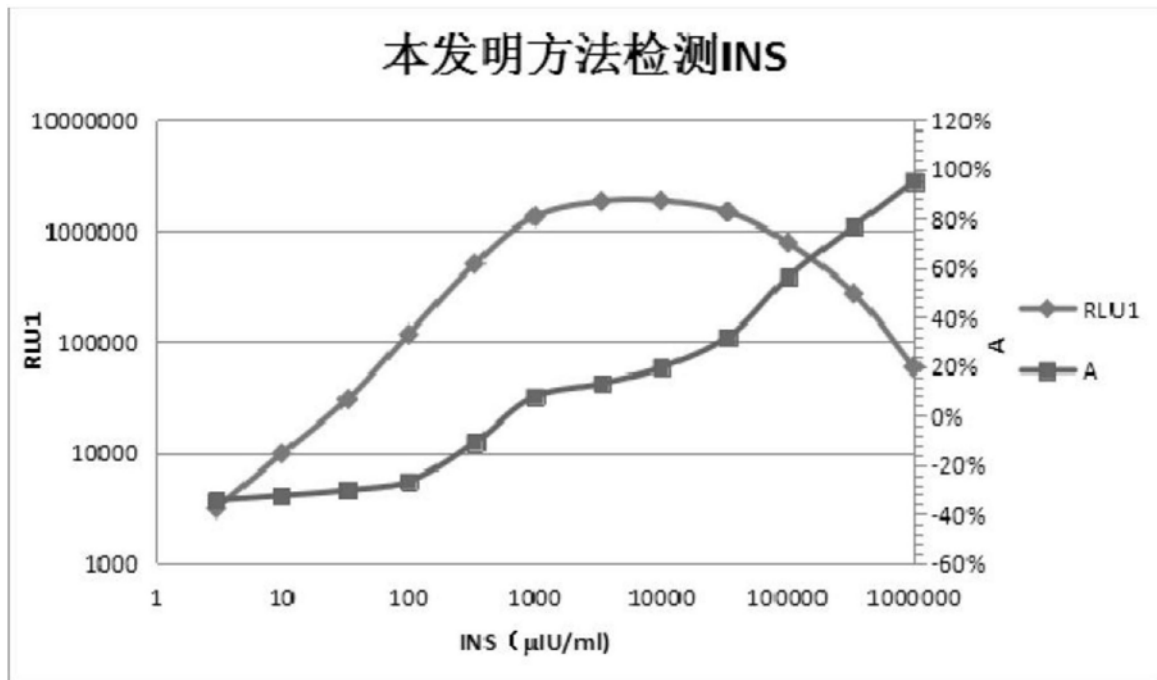


图2

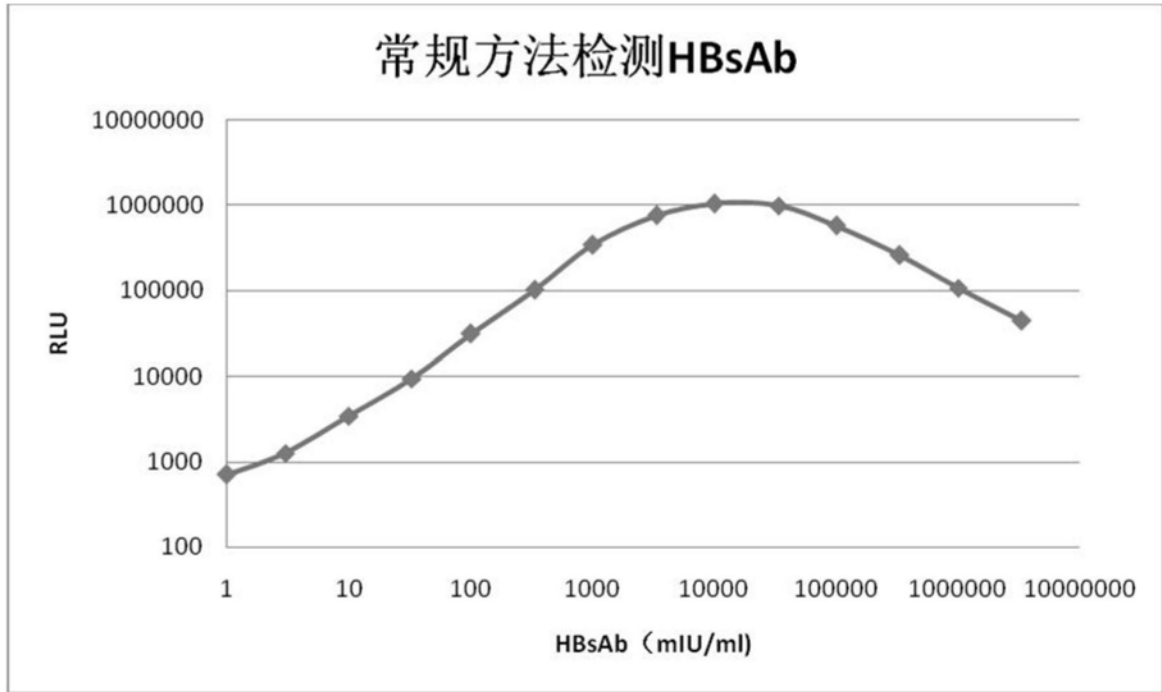


图3

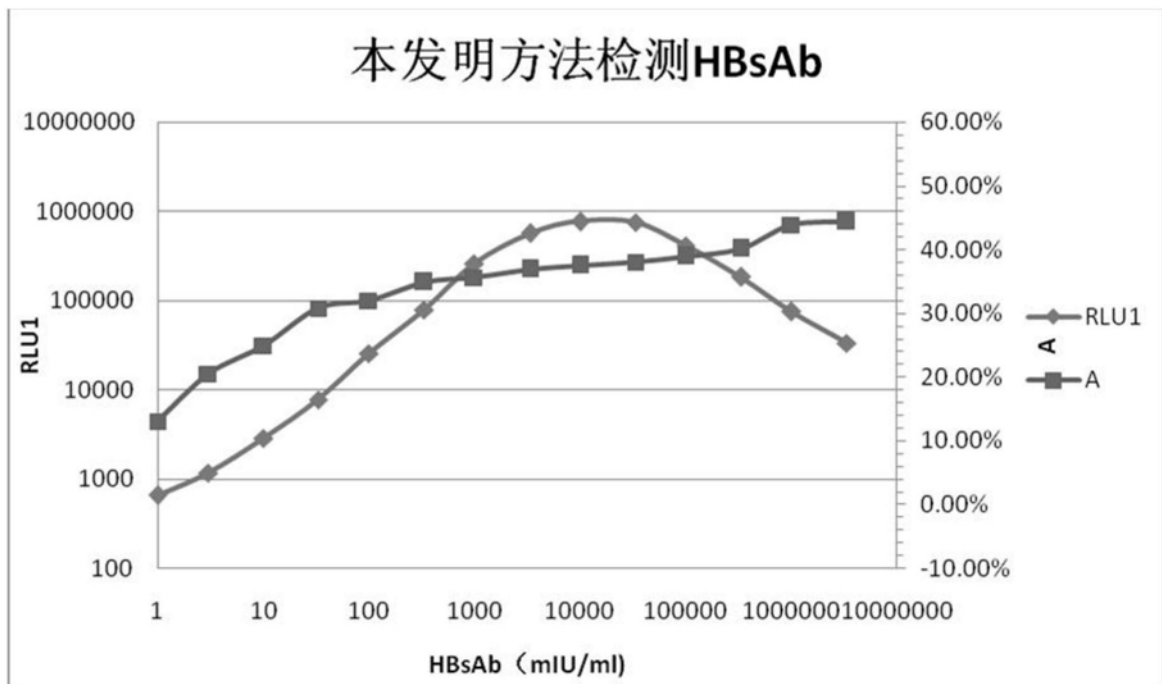


图4

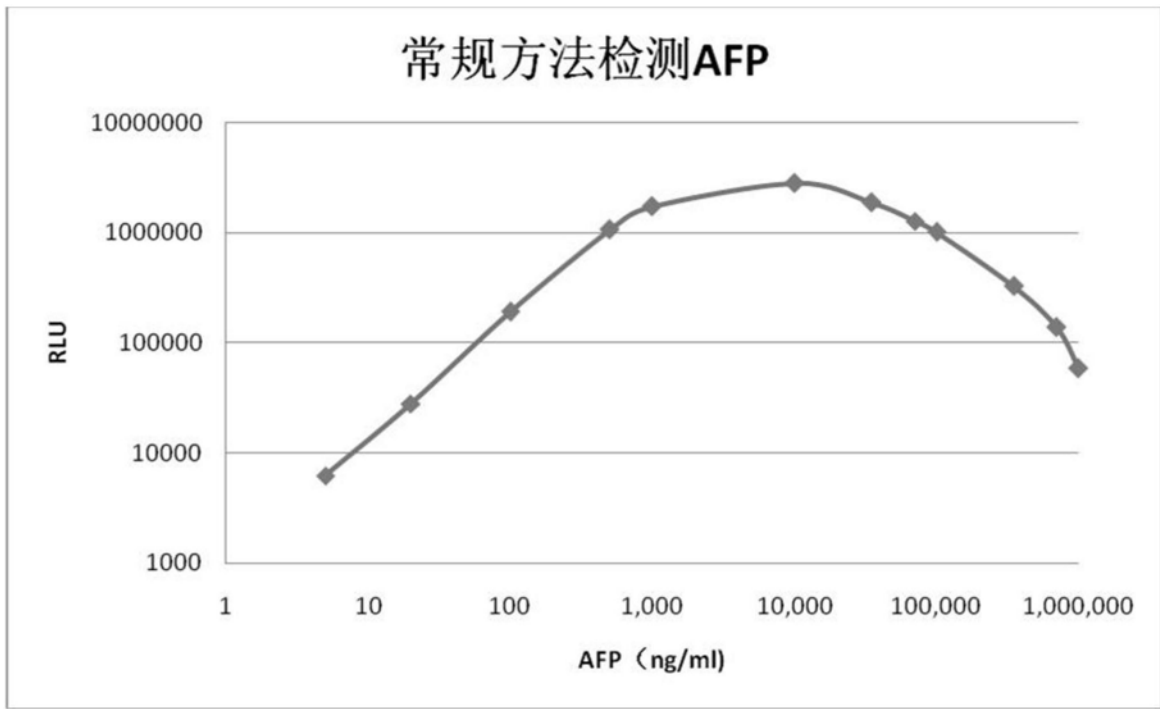


图5

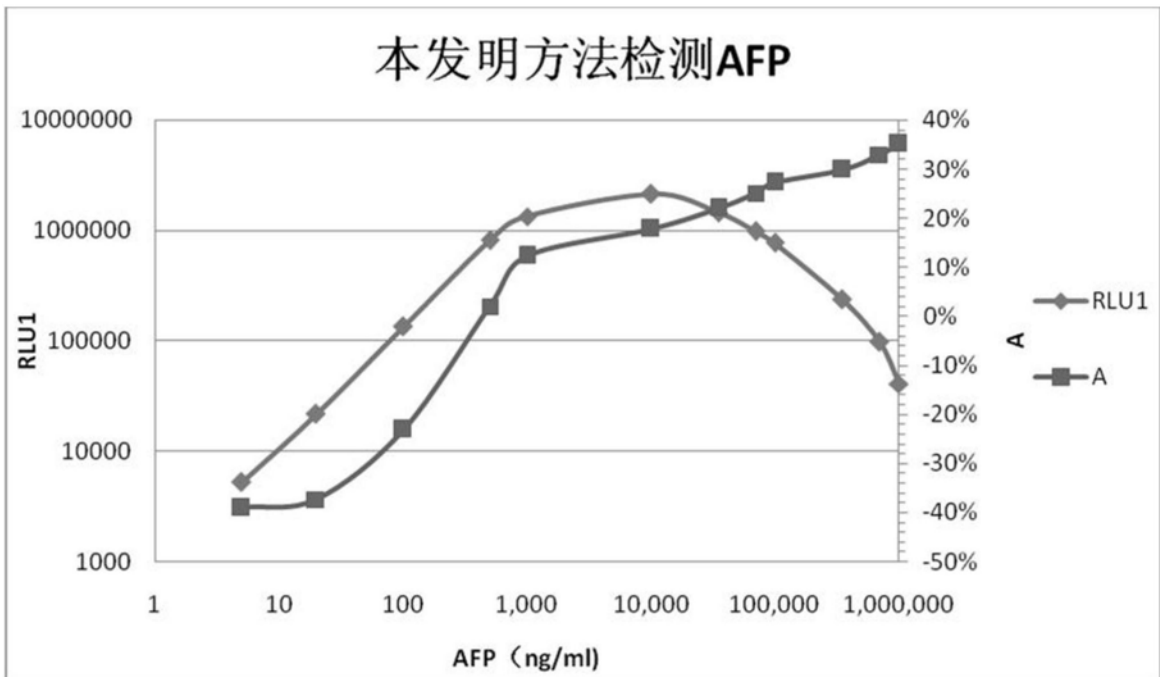


图6

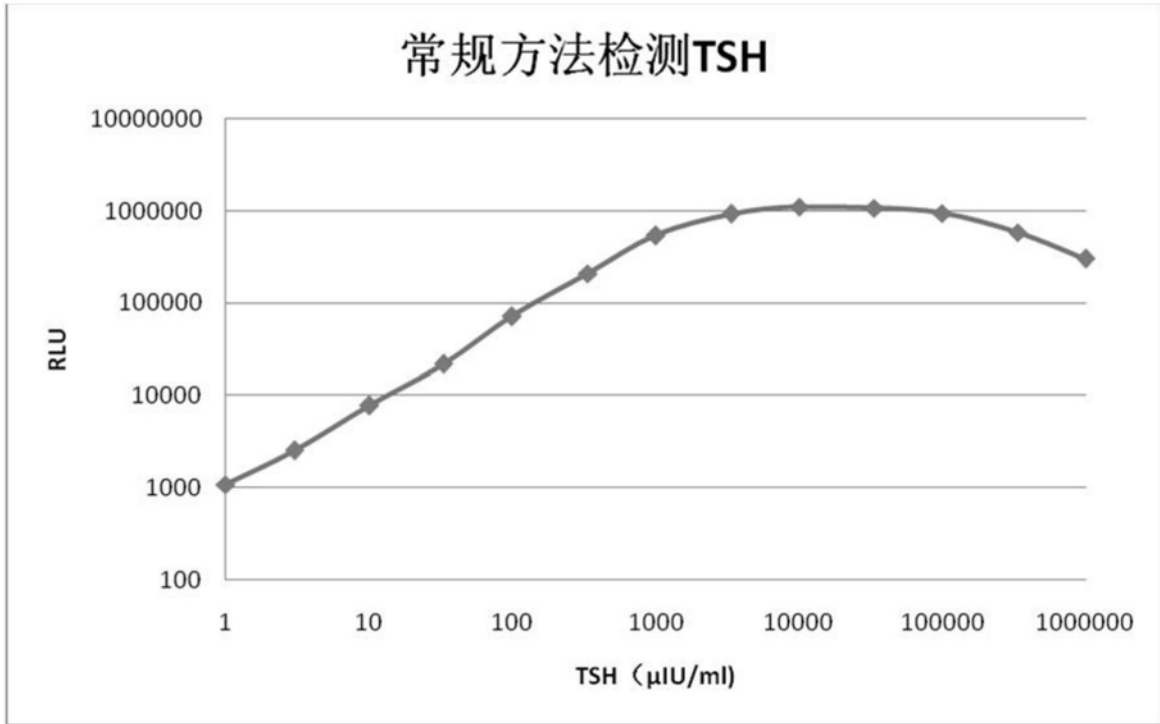


图7

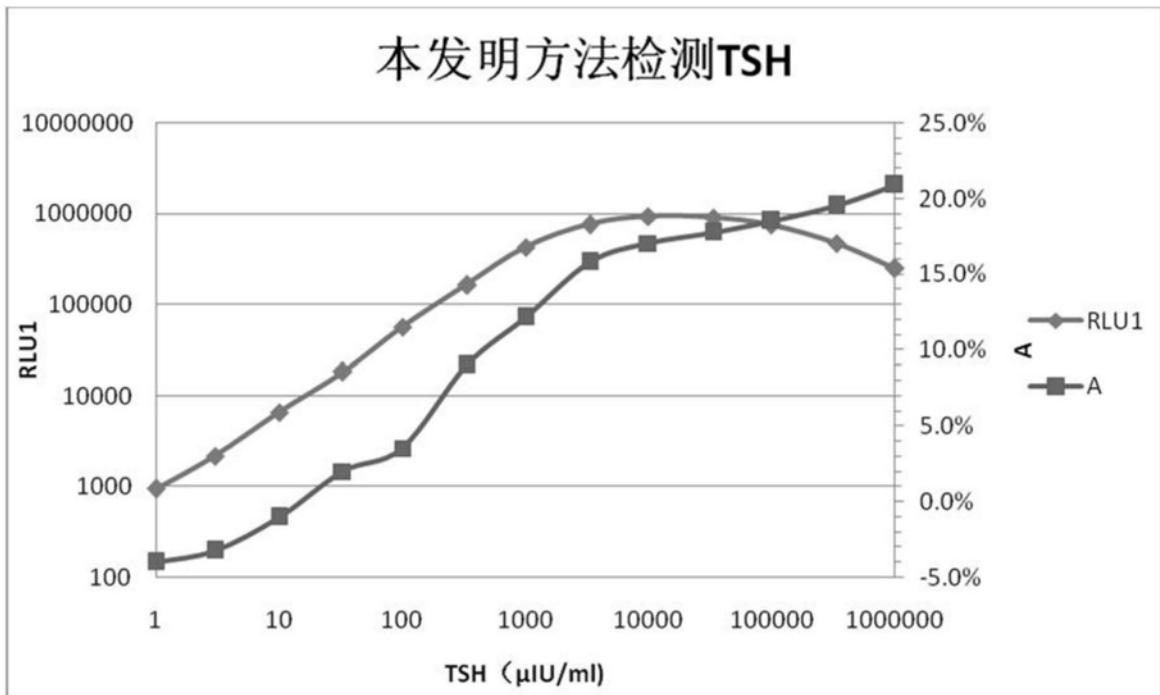


图8

专利名称(译)	免疫测定方法、用于鉴定免疫测定的系统和试剂盒		
公开(公告)号	CN108132344A	公开(公告)日	2018-06-08
申请号	CN201611034237.7	申请日	2016-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)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		
[标]发明人	杨阳 赵卫国 张向辉		
发明人	杨阳 赵卫国 张向辉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N21/63		
代理人(译)	谢燕军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种免疫测定方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：
 (1)对含待测目标抗原(或抗体)的待测样本进行化学发光免疫反应，激发和记录化学发光的第一次和第二次读数，并将第二次和第一次读数之间的差值增幅记为A，(2)根据含待测目标抗原(或抗体)的已知的一系列标准物质的第一次读数和两次读数的增幅A分别做标准曲线；(3)将含待测目标抗原(或抗体)的待测样本的第一次读数和两次读数的增幅A与标准曲线进行比较，来确定样本的浓度。本发明还涉及一种用于鉴定免疫测定的系统和一种试剂盒。

浓度 ($\mu\text{IU/ml}$)	常规检测结果	本发明检测结果		
	RLU	RLU1	RLU2	增幅 A
3	3031	3132	2058	-34%
10	11328	9809	6631	-32%
33	33433	30397	21212	-30%
100	152385	117194	86069	-27%
335	732465	503568	449149	-11%
1,000	1797417	1342726	1446642	8%
3,350	2441794	1857062	2100576	13%
10,000	2470762	1880534	2247857	20%
33,500	2033507	1482999	1958095	32%
100,000	1209233	786883	1228586	56%
335,000	464717	273591	483967	77%
1,000,000	100765	58998	115157	95%