



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102944672 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201210461525. 6

CN 101620229 A, 2010. 01. 06, 权利要求 1-3, 6-8.

(22) 申请日 2012. 11. 16

CN 102914643 A, 2013. 02. 06, 全文.

(73) 专利权人 李方和

JP H0635976 B2, 1994. 05. 11, 全文.

地址 430030 湖北省武汉市硚口区解放大道 1095 号

WO 2007058129 A1, 2007. 05. 24, 全文.

审查员 杨冀川

(72) 发明人 李方和 李时君

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 黄行军 徐绍新

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1484032 A, 2004. 03. 24, 权利要求 1-3, 说明书第 6 页, 第 14 页.

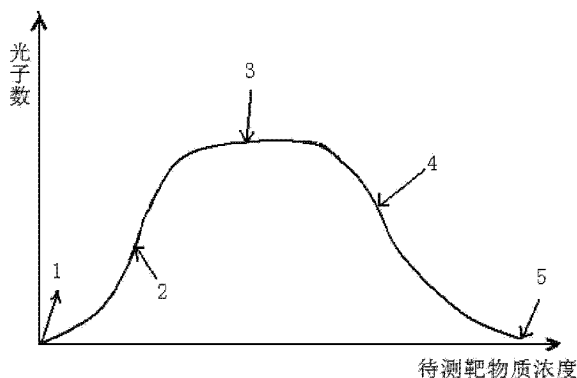
权利要求书1页 说明书18页 附图4页

(54) 发明名称

采用光激发化学发光免疫分析对血清中的待测靶物质进行定性与定量检测的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种采用光激发化学发光免疫分析对血清中的靶物质进行定性与定量检测的方法,包括向待测标本中加入包被靶物质抗体的发光微球、生物素包被靶物质抗体、链亲和素(SA)包被的感光微球进行第一次免疫反应和检测的步骤,还包括向反应体系中加入抗 He 试剂发生靶物质免疫叠加反应,并进行第二次光激发化学发光免疫检测的步骤。本发明通过对两次 LiCA 检测结果的综合分析达到全方位纠正 Hooks 效应的目标,分析过程包括根据其在一次 LiCA 与二次 LiCA 检测的信号特征将被检标本区分为阴、低阳、中阳,高阳与超高阳等五个浓度区间;根据第一次 LiCA 对低阳与超高阳浓度区段的标本进行定量分析。本发明具有结果准确,操作简便,适用范围广等特点。



1. 一种采用光激发化学发光免疫分析对血清中的待测靶物质进行定性或定量检测的方法,包括如下步骤:向血清中依次加入包被靶物质抗体的发光微球、生物素标记的靶物质抗体、链亲和素包被的感光微球,混匀后温育以发生免疫反应;然后用激发光激发上述免疫反应后的反应体系,并第一次检测反应体系所发出的发射光的光子信号强度,检测出的光子信号强度依据靶物质浓度与发光信号强度的标准曲线关系,第一次确定靶物质含量;其特征在于:在第一次检测反应体系所发出的发射光的光子信号强度后,向免疫反应后的反应体系中加入抗 He 试剂,混匀后温育发生免疫叠加反应;然后用激发光激发上述免疫叠加反应后的反应体系,并第二次检测反应体系所发出的发射光的光子信号强度;

根据第一次和第二次的信号强度推导新的靶物质含量与信号强度的关系,并据此计算待测标本中的靶物质浓度:

所述的反应体系与抗 He 试剂的体积比为 5-50:1;

所述待测靶物质为抗原时,所述的抗 He 试剂中靶物质的浓度为 10-200000ng/ml;

所述待测靶物质为抗体时,所述的抗 He 试剂中靶物质的浓度为 1-20000IU/ml。

2. 如权利要求 1 所述的采用光激发化学发光免疫分析对血清中的待测靶物质进行定性与定量检测的方法,其特征在于:所述待测靶物质为抗原,所述的抗 He 试剂中靶物质的浓度为 2000ng/ml。

3. 如权利要求 1 所述的采用光激发化学发光免疫分析对血清中的待测靶物质进行定性与定量检测的方法,其特征在于:所述待测靶物质为抗体,所述的抗 He 试剂中靶物质的浓度为 1000IU/ml。

4. 如权利要求 1 所述的采用光激发化学发光免疫分析对血清中的待测靶物质进行定性与定量检测的方法,其特征在于:所述的反应体系与抗 He 试剂的体积比为 10:1。

5. 如权利要求 1 所述的采用光激发化学发光免疫分析对血清中的待测靶物质进行定性与定量检测的方法,其特征在于:所述激发光波长为 680nm,发射光波长为 610-615nm。

6. 如权利要求 1 所述的采用光激发化学发光免疫分析对血清中的待测靶物质进行定性与定量检测的方法,其特征在于:所述包被靶物质抗体的发光微球的浓度为 10-100 $\mu$ g/ml,所述生物素标记的靶物质抗体浓度为 1.0-10 $\mu$ g/ml,所述链亲和素包被的感光微球浓度为 10-100 $\mu$ g/ml,所述血清与包被靶物质抗体的发光微球、生物素标记的靶物质抗体、链亲和素包被的感光微球的体积比依次为 1:1:1:7。

7. 如权利要求 1 所述的采用光激发化学发光免疫分析对血清中的待测靶物质进行定性与定量检测的方法,其特征在于:所述温育的时间为 5 ~ 60 分钟。

8. 权利要求 1 所述的方法在血清 HBsAg 定性和定量检测中的应用。

9. 权利要求 1 所述的方法在血清抗 HBc 定性和定量检测中的应用。

10. 权利要求 1 所述的方法在血清 AFP 定性和定量检测中的应用。

## 采用光激发化学发光免疫分析对血清中的待测靶物质进行 定性与定量检测的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物学领域中的标记免疫分析方法,具体涉及一种采用光激发化学发光(Light initiated Chemiluminescence Assay, LiCA)免疫分析对血清中的靶物质进行定性与定量检测的方法。

### 背景技术

[0002] 均相免疫指全部的反应与结果的观察均在均一的液相界面进行的免疫学检测方法,操作简洁是均相免疫的主要特征。光激发化学发光(LiCA)免疫分析是这类方法的主要代表,亦是目前已经商品化的主要均相免疫技术之一,与酶联免疫分析(ELISA)、电化学发光免疫分析等固相免疫分析相比, LiCA 免疫分析涉及时间分辨荧光,纳米微球研究,受体(生物素与亲和素)固定,特殊的能量转递方式及均相免疫反应等多种前沿科学成果,其技术含量最高,实验操作最简洁,但因 Hooks 效应的影响妨碍了其市场推广。

[0003] Hooks 效应即钩状效应,其表现为当反应体系中待测物质(包括抗原或抗体)的浓度升高到一定程度后,检测信号反而下降或显著下降,甚至出现假阴性结果,由此造成的后果首先是个别靶物质含量极高的强阳性标本表现出假阴性,其次为阳性标本中大约 10 ~ 30% 左右强阳性标本,被误判为弱阳或低浓度阳性。

[0004] 这种存在于多种血清学检测中的量(待测物浓度)效(检测信号)分离现象的产生虽可能与待测免疫分子的结构相关,但反应体系中靶物质与对应免疫物质比例的高度失调是其最主要的原因。这一效应如果发生于某些特殊临床检测如血清 HBsAg 的筛选,则可造成大量临床标本的定量检测结果偏离真值,部分强阳性标本测值降低或显著降低,甚至导致个别具有高度传染性的强阳性标本出现假阴性结果。如果这种漏检发生在献血员筛选,则势必导致受血者发生输血相关性肝炎的严重临床事件。鉴于血清 HBsAg 检测的范围及其社会影响面极大,我国已明令禁止“一步法”检测在献血员 HBV 感染者筛选中的应用。

[0005] 通过近十余年的努力,对 Hooks 效应干扰的认识已有很大提高,针对固相免疫实验中的 Hooks 效应纠正方法不断出现。但由于反应方式的大相径庭,这些方法都不能用于均相免疫实验,而有效拮抗均相免疫中 Hooks 效应影响的方法迄今尚未见报道与公布。

[0006] 均相与固相免疫的主要差别,还在于全部的固相免疫试验在操作上均存在一次甚至多次已反应物与未反应物质的分离,而均相免疫在整个的实验过程中,尤其是实验信号的采集完成后,试剂体系中的未反应物单独或与反应后物质一道存在于同一反应孔(管)中,并很好地保留着与随后加入靶物质结合的能力,这一差别,为“靶物质叠加反应”在均相免疫实验中的实施提供了契机。

[0007] 此外,免疫学检测方法的定量检测范围通常均较为局限,敏感性越高的试验方法其定量范围通常越窄,发光分析虽然在一定程度上能纠正这一现象,然而在兼顾方法敏感性,特异性,稳定性及试剂成本的前提下,其定量检测范围亦仅在 1000ng/ml 左右。如何采用单一检测对多数靶物质实施全程或亚全程定量分析已经成为制约免疫学技术发展的重

要技术瓶颈。

[0008] 血清学免疫检测技术至少包括固相与均相免疫两类,能接受本专利措施的血清免疫学检测实验方法须具备以下前提。①不发生试剂系统对靶物质的结合能力的自消耗;②不发生已反应物与未反应物间的相互分离与清除;③“未参与反应的试剂”能在系统中较长时期保留与靶物质反应并生成检测信号的能力。符合上述条件的实验方法多集中在均相免疫实验,光激发化学发光免疫分析(LiCA)是其中的重要代表。

[0009] 现有血清免疫学试验尽管存在上述缺点,但在技术发展上均达到或基本达到在当前物质与技术条件下该技术可具备的最佳的状态。包括合理的实验步骤与反应条件,完善的试验操作与检测系统(仪器),稳定的试剂质量,以及良好地检测品质(高度的特异性敏感性与稳定性)等。部分还预留进一步完善与发展的技术方向。本专利发明以上述各实验方法的最新技术成果为基础,全盘接受上述试验技术发展所取得的优良技术特征,不排斥正在或将要进行的适合本专利技术实施的任何技术革新与改造,为适应本专利实施所进行的相关改造(包括试剂改造与实验仪器改造)亦以不妨碍原有试验的操作以及技术特征的充分发挥为前提。

## 发明内容

[0010] 本发明的目的是对现有的光激发化学发光免疫分析方法进行改进,提供一种能纠正 Hooks 效应并扩大定量检测范围的光激发化学发光免疫分析方法。

[0011] 上述目的是通过以下技术方案实现的:

[0012] 一种采用光激发化学发光免疫分析对血清中的待测靶物质进行定性或定量检测的方法,包括如下步骤:向血清中依次加入包被靶物质抗体的发光微球、生物素标记的靶物质抗体、链亲和素包被的感光微球,混匀后温育以发生免疫反应;然后用激发光激发上述免疫反应后的反应体系,并第一次检测反应体系所发出的发射光的光子信号强度,检测出的光子信号强度依据靶物质浓度与发光信号强度的标准曲线关系,第一次确定靶物质含量;在第一次检测反应体系所发出的发射光的光子信号强度后,向免疫反应后的反应体系中加入抗 He 试剂,混匀后温育发生免疫叠加反应;然后用激发光激发上述免疫叠加反应后的反应体系,并第二次检测反应体系所发出的发射光的光子信号强度;

[0013] 根据第一次和第二次的信号强度推导新的靶物质含量与信号强度的关系,并据此计算待测标本中的靶物质浓度;

[0014] 所述的反应体系与抗 He 试剂的体积比为 5-50:1,

[0015] 当所述待测靶物质为抗原时,所述的抗 He 试剂中靶物质的浓度为 10-200000ng/ml;

[0016] 当所述待测靶物质为抗体时,所述的抗 He 试剂中靶物质的浓度为 1.0-20000IU/ml。

[0017] 当所述待测靶物质为抗原(如血清 HBsAg)时,优选的抗 He 试剂中靶物质的浓度为 2000ng/ml。

[0018] 当所述待测靶物质为抗体(如血清抗 HBc)时,优选的抗 He 试剂中靶物质的浓度为 1000IU/ml。

[0019] 优选的,所述的反应体系与抗 He 试剂的体积比为 10:1。

[0020] 优选的,所述激发光波长为 680nm,发射光波长为 610-615nm。

[0021] 所述包被靶物质抗体的发光微球的浓度为 10-100  $\mu\text{g/ml}$ ,所述生物素标记的靶物质抗体浓度为 1.0-10  $\mu\text{g/ml}$ ,所述链亲和素包被的感光微球浓度为 10-100  $\mu\text{g/ml}$ ,所述血清与包被靶物质抗体的发光微球、生物素标记的靶物质抗体、链亲和素包被的感光微球的体积比依次为 1:1:1:7。

[0022] 所述室温下温育的时间为 5-60 分钟。

[0023] 所述上述各项试验条件,以能产生足以可供分析的试验信号,并以不发生对试验效果的干扰为前提,由于本专利主要发明点为抗 He 介入及其靶物质叠加免疫反应,现阶段 LiCA 检测部分的主要实验条件(即优选实验条件)的选择依据市售试剂的规定,并接受可能出现的适宜本专利实施的改进;

[0024] 所述的方法在血清 HBsAg、抗 HBc、AFP 定性和定量检测中的应用。

[0025] 在 LiCA 检测中,当第一次 LiCA 反应及其检测完毕后,包括标本在内的全部的反应体系仍旧存在于反应孔中。阴性,及其低浓度阳性孔中的抗体或包被了抗体与亲和素的发光微球未经或仅部分与靶物质(如抗原)发生反应,全部或多数抗体或包被了抗体的发光微球得以保留并具备与后续加入的靶物质发生反应的能力,其反应强度足以使第二次 LiCA 检测所获得的信号(单独或与一次 LiCA 反应信号叠加)达到饱和或过饱和状态。在“靶物质叠加反应”过程中能与随后加入的靶物质(其浓度以能产生可供识别与分析的试验信号为度,通常以产生饱和 LiCA 信号的靶物质的 2 倍为佳)发生反应并产生新的实验信号,这一信号与第一次 LiCA 检测的信号有机叠合,可使第二次 LiCA 所检测出的信号强于或显著强于该类标本所产生的第一次 LiCA 检测信号。通过对其信号增强幅度的分析,可提示被检测标本中的靶物质为阴性,或低浓度阳性状态。

[0026] 而靶物质强阳性与超强阳性(即假阴性)孔中的抗体或包被了抗体的发光微球体系已经与靶物质充分反应并为其饱和与过饱和,在一次 LiCA 检测中已表现出试验信号强度与靶物质浓度的负相关关系(不同程度 Hooks 效应所致)。不仅不具备与后续加入的靶物质继续反应的能力,其信号强度并可能存在受再次加入抗原的负面影响而出现降低的趋势。在“靶物质叠加反应”后的 LiCA 反应中,所检测到的信号(第二次 LiCA 信号)基本由第一次 LiCA 反应产生,其强度与一次 LiCA 相当,略低或略强于(因测试原因)一次 LiCA 检测的信号。

[0027] 如图 1 所示,受 Hooks 效应影响,高与超高浓度靶物质区段标本一次 LiCA 检测信号的强度与靶物质的浓度呈负相关,这种因浓度升高而造成的检测信号渐进性降低,其原理与竞争抑制法(如竞争抑制性 ELISA)类似,其表现呈检测信号的渐进性降低,两者的改变亦具有良好地剂量相关性。

[0028] 综合上述靶物质叠加 LiCA 所体现的种种实验信号内涵,可将被测标本划分为如下 5 类即:①阴性;② LiCA 常规定量范围内的低阳性;③饱和信号的阳性;④信号因 Hooks 效应降低的高阳性;⑤信号接近或低于阈值的超高阳性(即假阴性)。表 1 为对上述 5 类标本实施靶物质叠加反应前后两次 LiCA 检测试验信号特征的分析。

[0029] 表 1 靶物质叠加免疫反应 LiCA 检测实验标本浓度区间评估方法

[0030]

浓度区间	第一次 LiCA 分析	第二次 LiCA 分析	两者信号比较	结果认定方式
阴性	域值以下	接近或达饱和信号	十分显著升高	根据第一次 LiCA 确认阴性
低浓度阳性	随浓度上升渐进升高	接近或达饱和信号	不同程度升高	根据第一次 LiCA 定量分析
中浓度阳性	信号饱和状态	接近或达饱和信号	基本无改变	仅能提示浓度区间，暂时无法定量分析
高浓度阳性	随浓度上升渐进降低	随浓度渐进降低	基本无改变	根据第一次 LiCA 定量分析

[0031]

超高浓度阳性	域值附近或以下，假阴性	域值附近或以下	基本无改变	能提示浓度区间
--------	-------------	---------	-------	---------

[0032] 从表 1 可以看出，通过靶物质免疫叠加反应及对第一次 LiCA 检测信号和第二次 LiCA 检测信号进行对比分析，便可消除 Hooks 效应所致的假阴性，并大幅提升定量分析能力。从而实现对靶物质在更高层面上的定性和定量分析。

[0033] 所述的方法同时可用于血清 HBsAg、抗 HBc、AFP 等以外的其它抗原与抗体的定性和定量检测。

[0034] 当然，本发明的原理也可用于其它均相免疫分析，如酶联均相免疫分析与免疫凝集试验分析等，能接受此改进措施的方法如前所述。这类方法通过引入“靶物质叠加反应”，亦可达到消除 Hooks 效应影响并提升定量检测范围的目的。

## 附图说明

[0035] 图 1 是受 Hooks 效应影响的 LiCA 检测分段曲线图。

[0036] 图 2 是低浓度组标本 HBsAg 浓度与 LiCA 信号之间的线性关系曲线图。

[0037] 图 3 是高浓度标本 HBsAg 浓度与第一次 LiCA 检测信号之间的线性关系曲线图。

[0038] 图 4 是高浓度标本 HBsAg 浓度与第二次 LiCA 检测信号之间的线性关系曲线图。

[0039] 图 5 是高浓度标本 HBsAg 浓度与第二次 LiCA 检测信号饱和度之间的线性关系曲线图。

[0040] 图 6 是低浓度组标本抗 HBc 浓度与 LiCA 信号之间的线性关系曲线图。

[0041] 图 7 是高浓度标本抗 HBc 浓度与第一次 LiCA 检测信号之间的线性关系曲线图。

[0042] 图 8 是高浓度标本抗 HBc 浓度与第二次 LiCA 检测信号之间的线性关系曲线图。

[0043] 图 9 是高浓度标本抗 HBc 浓度与第二次 LiCA 检测信号饱和度之间的线性关系曲线图。

[0044] 图 5、图 9 中，横坐标为待测靶物质浓度，纵坐标为第一 / 第二次 LiCA 检测光子数比率(%)。其余各图中，横坐标为待测靶物质浓度，纵坐标为检测到的光子数。

## 具体实施方式

[0045] 实施例 1 检测 HBsAg 的方法

[0046] 一、检测方法：

[0047] 方法名称：HBsAg 检测靶抗原叠加 LiCA；

[0048] 原有方法名称：HBsAg 检测 LiCA；

[0049] 敏感性：0.05-1.0ng/ml；

[0050] 定量范围：0.1-500 至 1000ng/ml 内；

[0051] Hooks 效应起点(即反应信号呈浓度依赖性降低起点)：约 50 000ng/ml 左右；

[0052] 假阴性出现浓度(反应信号接近 cut off 值)：大于 1 000  $\mu$ g/ml；

[0053] 二、材料：

[0054] 1、仪器与耗材

[0055] 检测仪器：LiCA HT 光激化学发光检测仪；由中国博阳生物(上海)科技有限公司制造；

[0056] 2、试剂

[0057] (1)血清 HBsAg 检测光激化学发光试剂盒：由博阳生物(上海)科技有限公司制造，市售获得。包括下述试剂：

[0058] 试剂 1：Anti-HBs 包被发光微球，浓度为 40  $\mu$ g/ml；

[0059] 试剂 2：生物素化 Anti-HBs，浓度为 4.0  $\mu$ g/ml；

[0060] 试剂 3：链亲和素(SA)包被感光微球(通用微球)，浓度为 50  $\mu$ g/ml。

[0061] (2)抗 He 试剂(全称：抗 Hooks 效应试剂, Anti Hooks Effect Agent, 抗 He)：主要成分为 HBsAg，浓度范围 10-200 000ng/ml；本实施例选用三种不同 HBsAg 浓度的抗 He，分别为：2000ng/ml、10.0ng/ml、200 000ng/ml。

[0062] (3)标准血清，含已知浓度 HBsAg 的血清，或纯化 HBsAg 溶液。

[0063] 窄幅标准血清：自制，或由上述 LiCA 试剂盒配备；用于低靶物质浓度标本的计量分析(通常 6 个，浓度范围在 1000ng/ml 以内)；

[0064] 宽幅标准血清：自制，浓度经卫生部生物制品检定所标定。用于高及超高靶物质浓度组的计量分析(通常 6 个，浓度范围在 2000  $\mu$ g/ml 以内)；

[0065] 本次使用的自制参比血清系纯化自然表达 HBsAg，紫外光谱吸收检测其浓度；免疫活性未与市售标准品作严格比对。

[0066] (4)阴性对照与阳性对照血清：自制或市售试剂配备；用于域值确认，反应性评价，以及饱和信号强度的确认(现阶段主要用自制阳性对照血清)；

[0067] (5)待检标本：血清，血浆或其它体液；其它标本(如基因重组表达产物)。

[0068] 三、操作步骤

[0069] 1. 试验准备：

[0070] 取出所有试剂与标本，并恢复至室温。

[0071] 2. 实验操作

[0072] (1)取待测标本，阴、阳性对照，及其 HBsAg 定量标准血清系列各 25  $\mu$ l，分别加至 LiCA 板各反应孔中，每份标本加一孔(或根据需要的任意孔)；

- [0073] (2) 旋即加入试剂 1, 每一反应孔加入各 25  $\mu$  l。
- [0074] (3) 旋即加入试剂 2, 每一反应孔加入各 25  $\mu$  l, 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟,
- [0075] (4) 加入试剂 3, 每一反应孔加入各 175  $\mu$  l, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟;
- [0076] (5) 置 LiCA 发光检测仪上, 采用 680nm 波长激发, 610nm 波长检测各孔信号, 初步评价检测标本的信号强度, 并绘制标准曲线;
- [0077] (6) 每一反应孔加入抗 He 试剂各 25  $\mu$  l, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟;
- [0078] (7) 再次置 LiCA 发光检测仪上, 采用 680nm 波长激发, 610nm 波长检测各孔信号, 并初步评价各反应孔信号强度;
- [0079] 根据第一, 第二次 LiCA 检测结果, 将待测标本分别归类为 5 个靶物质浓度区间, 归类方式见表 1。

#### [0080] 四、结果分析

- [0081] 根据阴性对照结果按常规确定检测域值;
- [0082] 根据阳性对照孔(既定浓度靶物质)均值确定饱和信号强度;
- [0083] 根据饱和信号强度计算各实验孔二次 LiCA 信号饱和度;
- [0084] 根据一, 二次 LiCA 测值计算各实验孔(两者)信号比值;
- [0085] 根据第一及第二次检测结果及其上述分析指标对被检测标本进行靶物质浓度分类, 分类方式见下表。

[0086] 表 2 受检标本中靶物质表达浓度状态分类表

[0087]

类别与表达状态	一次实验信号	二次实验信号	二次信号饱和度和	一/二次信号比	大致浓度范围估计
1 阴性	域值或以下	贴近饱和信号	接近 100%	<5%	无
2 低阳	低于饱和信号 95%	贴近饱和信号	接近 100%	$\leq$ 100%	<1000ng/ml
3 中阳	贴近饱和信号	贴近饱和信号	接近 100%	接近 100%	1000-40000ng/ml
4 高阳	低于饱和信号 95%	低于饱和信号 95%	<95%	$\geq$ 100%	40-1000 $\mu$ g/ml
5 超高阳	域值或以下	域值或以下	<5%	接近 100%	>1000 $\mu$ g/ml

- [0088] (1) 根据各标本的检测数据以及前述分析, 自上表中确定各自的靶物质浓度状态, 并对阴性, 中等程度阳性, 及其假阴性(即第 1、3、5 类标本)作出定性报告;
- [0089] (2) 采用前述制备的低及高浓度标准品系列孔检测数据绘制的标准曲线, 分别对归类于低阳与高阳组(即第 2、4 类标本)的标本以回归法判读定量检测数据。

#### [0090] 五、检测效果

[0091] (一) 采用抗 He (2000ng/ml) 检测

[0092] 1、域值与饱和信号值

[0093] 域值 :697.5 (阴性对照均值) × 2.1 = 1464.8

[0094] 饱和信号值 :862478 (两孔阳性对照均值)。

[0095] 2、低浓度靶物质的检测效果

[0096] 对一组系列稀释的低浓度靶物质(参比法标定)进行检测,结果见表 3。

[0097] 表 3 低浓度组 HBsAg 含量与 LiCA 信号之间的剂量相关性

[0098]

实验管序	HBsAg 设定值 (ng/mL)	一次 LiCA 检测光子数	二次 LiCA 检 测光子数	两者比率 (一次/二次)	二次 LiCA 信号饱和度#
1	0	787.2	875882	0.091%	101.51%
2	2	5714.6	849932	0.672%	98.55%
3	4	10463	837791	1.25%	97.38%
4	8	21434	860135	2.49%	99.73%
5	16	39950	853249	4.68%	98.93%
6	32	83779	837931	9.98%	97.13%
7	64	181502	849935	21.35%	98.55%
8	128	348526	837791	41.60%	97.38%
9	256	676695	851425	79.48%	98.72%
10	512	785516	868839	90.41%	100.74%
11*	1024	865312	856297	101.05%	99.28%
12*	2048	859643	862937	99.62%	100.05%

[0099] \* :阳性对照替代品 ;两者均值为饱和信号强度值 862478。

[0100] # :二次 LiCA 信号饱和度的计算方法为 :二次 LiCA 信号值 / 饱和信号强度值。

[0101] 低浓度组标本 HBsAg 浓度与 LiCA 信号之间的关系见图 2,图中 X 轴 :HBsAg 浓度 ( $2^n$ ), Y 轴 :光子数。

[0102] 结果表明 :本发明 LiCA 检测的信号强度与血清 HBsAg 浓度之间有很好的量效关系。

[0103] 3、高浓度靶物质的检测效果

[0104] 对一组系列稀释的高浓度靶物质(浓度经参比法标定)进行检测,结果见表 4。

[0105] 表 4 高浓度组 HBsAg 含量与 LiCA 信号之间的剂量相关性

[0106]

实验管序	HBsAg 设定值 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	一次 LiCA 检测光子数	二次 LiCA 检测光子数	两者比率 (一次/二次)	二次 LiCA 信号饱和度#
1	32	860592	854352	100.73%	99.06%
2	64	673917	664195	101.46%	77.01%
3	128	198354	214627	92.42%	24.89%
4	256	61473	63472	96.43%	7.36%
5	512	21794	19746	110.37%	2.29%
6	1024	7239	6593	109.80%	0.76%
7	2048	2162	1735	124.61%	0.20%

[0107] 高浓度标本血清 HBsAg 含量与第一次 LiCA 检测信号之间的剂量相关性见图 3, 与第二次 LiCA 检测信号之间的剂量相关性见图 4, 图中 X 轴: HBsAg 浓度 ( $2^n$ ), Y 轴: 光子数。经过比较, 第一次与第二次检测信号强度大致相当, 两者之间差值在  $\pm 10\%$  范围内。

[0108] 图 5 是高浓度标本 HBsAg 浓度与第二次 LiCA 检测信号饱和度 (%) 之间的线性关系曲线图。

[0109] 结果表明: 该组标本靶物质浓度与检测信号之间呈较好地剂量相关关系 (负相关关系)。

[0110] 采用靶物质叠加 -LiCA 对部分特殊选定标本进行检测, 检测及分析结果如表 5。

[0111] 表 5 靶物质叠加免疫实验受检标本中靶物质表达浓度状态分类表

[0112]

标本号	一次实验信号	二次实验信号	二次信号饱和度	一/二次信号比	定性结果报告	定量结果单位/ml
1	1329	857326	100.1	0.0016	阴性	定性
2	927	813452	102.2	0.0011	阴性	定性
3	28634	853249	99.7	3.36	低阳	11.5 ng
4	348526	846391	98.9	41.8	低阳	125.7 ng
5	785516	868839	101.3	90.41	低阳	1021.4 ng
6	865312	856297	100.03	101.1	中阳	定性

[0113]

7	856943	862937	100.6	99.6	中阳	定性
8	846752	856125	99.9	98.9	中阳	定性
9	673917	664195	77.01	101.5	高与超高阳	67.2 $\mu$ g
10	61473	63472	7.4	96.4	高与超高阳	503.6 $\mu$ g
11	296341	279536	32.61	106.1	高与超高阳	117.4 $\mu$ g
12#	1286	1329	0.16	97.5	极高浓度阳性	4200 $\mu$ g

[0114] \* :阳性对照替代品 ;两者均值为饱和信号强度值 862478。# :假阴性,设定浓度为 4200  $\mu$ g/ml。

[0115] (二) 采用抗 He (10.0ng/ml) 检测

[0116] 1、检测目标 :因抗 He 试剂选择的不同,由全面纠正 Hooks 效应改为避免因 Hooks 效应所致的假阴性结果,检测结果的分析方式亦发生相应的改变。

[0117] 2、检测方法

[0118] 1) 与抗 He (2000ng/ml) 时的检测方法相同,其试验操作,标准曲线的制备,检测结果的分析严格遵照试剂盒拟定的方法。根据检测结果对各被检标本中靶物质 (HBsAg) 阳性者出具检测报告。

[0119] 2) 第一次 LiCA 检测及报告完成后,在呈阴性反应的各反应孔中加入抗 He (10.0ng/ml),混合,同前作第二次 LiCA 检测,并对检测结果进行分析。表 6 结果显示,在一次 LiCA 呈阴性(包括信号 P/N 值小于 5 的检测灰区标本)的检测标本中,二次 LiCA 检测 P/N 呈显著升高 ( $P/N < 10$ ) 者为 HBsAg 阴性,基本不升高,或升高幅度小于  $P/N5.0$  者为超高浓度阳性。在试剂与检测方法无误的前提下,两者的区别十分鲜明。

[0120] 3) 根据表 6 分析再次报告经核定的阴性结果。如分析结果证实有假阴性存在,则应报告为超高浓度阳性。HBsAg 浓度通常超过 1.0mg/ml。

[0121] 4) 检测结果显示 :HBsAg 浓度在 10.0ng/ml 以下的阳性标本在二次 LiCA 检测测值可升高或略升高,这一改变无助于对此浓度受试标本检测结果的定性与定量评价,但有助于对个别特别高浓度标本的识别(原理前已述及)。

[0122] 表 6 采用抗 He (10ng/ml) 检测阴性与假阴性标本信号表达特征与鉴别

[0123]

标本号	一次 LiCA 信号 值 (光子数)	一次 LiCA 信 号值 (P/N)	二次 LiCA 信号 值 (光子数)	二次 LiCA 信号 值 (P/N)	结果报告 (定性)
1	629	0.90	25832	37.01	阴性
2	927	1.32	24769	35.49	阴性
3	863	1.23	27653	39.62	阴性
4	852	1.22	26412	37.84	阴性
5	568	0.81	23689	33.94	阴性
6	612	0.88	25426	36.43	阴性
7	543	0.78	25762	36.91	阴性
8	675	0.97	27741	39.74	阴性
9	917	1.31	1145	1.64	假阴性
10	1473	2.11	1256	1.80	假阴性
11	963	1.38	1337	1.92	假阴性
12	1286	1.84	1143	1.64	假阴性
13*	25693	36.81	未做	无	抗 He 对照
14*	26187	37.52	未做	无	抗 He 对照
15*	26529	38.01	未做	无	抗 He 对照

[0124] 抗 He 试剂对照 \* :抗 He (低浓度, HBsAg10.0ng/ml)

[0125] (三) 采用抗 He (200 000ng/ml) 检测

[0126] 1、检测目标 :因抗 He 试剂选择的不同而异,由全面纠正 Hooks 效应改为避免产生由 Hooks 效应所致的假阴性,检测结果的分析亦发生相应的改变。

[0127] 2、检测方法

[0128] 1)与抗 He(2000ng/ml)时的检测方法相同,其试验操作,标准曲线的制备,检测结果的分析严格遵照 LiCA 试剂盒规定,根据一次 LiCA 检测结果对被检标本中靶物质(HBsAg)阳性者作出定性与定量报告。

[0129] 2)第一次 LiCA 检测呈阴性反应的各反应孔中加入抗 He (200 000ng/ml),混合,同前作第二次 LiCA 检测。并对检测结果进行分析,结果见表 7。

[0130] 表 7 采用抗 He (200 000ng/ml) 检测阴性与假阴性标本信号表达特征与鉴别

[0131]

标本号	一次 LiCA 信号 值 (光子数)	一次 LiCA 信 号值 (P/N)	二次 LiCA 信号 值 (光子数)	二次 LiCA 信号 值 (P/N)	结果报告 (定性)
1	629	0.90	102583	147.2	阴性
2	927	1.32	114697	164.6	阴性
3	863	1.23	99753	143.1	阴性
4	852	1.22	96412	138.3	阴性
5	568	0.81	89236	128.0	阴性
6	612	0.88	95426	136.9	阴性
7	543	0.78	105723	151.7	阴性
8	675	0.97	87741	125.9	阴性
9	917	1.31	1015	1.46	假阴性
10	1473	2.11	1347	1.93	假阴性
11	963	1.38	734	1.05	假阴性
12	1286	1.84	1743	2.50	假阴性
13*	120693	173.1	未做	无	抗 He 对照
14*	99267	142.4	未做	无	抗 He 对照
15*	108529	155.7	未做	无	抗 He 对照

[0132] 抗 He 对照 \* :抗 He (高浓度, HBsAg 200 000ng/ml)。

[0133] 3)表 7 结果显示,在一次 LiCA 呈阴性的检测标本中,二次 LiCA 检测 P/N 呈显著升高(P/N 值差大于 10)者为 HBsAg 阴性,基本不升高,或升高幅度小于 5.0 者为假阴性或称超高浓度 HBsAg 阳性。在试剂与检测方法无误的前提下,两者差别十分鲜明。根据表 7 结果可作出核定为阴性的检测报告。如分析结果发现有假阴性存在,则此类标本 HBsAg 浓度通常超过 1000  $\mu$ g/ml。

[0134] 4)一次 LiCA 检测 HBsAg 阳性标本,在采用此抗 He 做二次 LiCA 检测的实验数据亦表现出如某种特征性的改变,这些改变为:①一次 LiCA 中测值大于单纯抗 He 检测孔测值:二次 LiCA 检测信号降低或稍降低,提示检测标本中 HBsAg 处于中高浓度状态。其浓度范围约在一次 LiCA 低浓度曲线测值的中上段至接近抗 He 中的 HBsAg 浓度值;②一次 LiCA 测值小于单纯抗 He 孔检测值:二次 LiCA 信号降低或稍降低提示受检标本 HBsAg 浓度高于抗 He 试剂;③二次 LiCA 信号升高提示受检标本中 HBsAg 浓度为处于域值以上的低表达状态。由于采用此浓度抗 He 的目标旨在避免 Hooks 效应所致的假阴性结果,上述改变特征仅供试验分析参考。

[0135] 六. 评价:

[0136] 采用本方法进行血清 HBsAg 检测,圆满达成全方位纠正 Hooks 效应干扰的实验目

标,主要技术特征如下。

[0137] 1、靶物质免疫叠加反应是指在第一次 LiCA 检测结束后,加入含既定浓度靶物质试剂再次进行 LiCA 检测。前后两步 LiCA 检测都在同一个反应孔进行,共用第一次加入的反应体系,通过对两次 LiCA 检测结果的综合分析达到全方位纠正 Hooks 效应的目标。由于操作简便 LiCA 的主要特点,因此即便增加一道反应步骤,本方法亦显著较现有多种固相免疫检测技术明显简捷。

[0138] 2、本方法不仅能避免因浓度过高而出现的假阴性,而且能根据靶物质浓度将标本区分为阴、低阳、中阳,高阳与超高阳五个浓度区间,并对低阳与高阳浓度区段的标本进行定量分析,将定量检测的能力提升到一个新的阶段。

[0139] 3、LiCA 免疫分析检测方法为当前用于血清 HBsAg 检测最先进的方法之一,具有很好的特异性,敏感性与稳定性,操作简便是其最重要的技术特征,因而本发明在对低浓度阳性样本检测时获得与 LiCA 完全一致的敏感性,特异性与稳定性,低浓度区间的定量检测范围亦与 LiCA 相同。

[0140] 4、现有的 LiCA 检测方法由于受 Hooks 效应的影响,不能区分“阴性”与“超高阳性”两种靶物质浓度状态,采用本发明的 LiCA 检测能将上述两种状态加以区别。

[0141] 5、现有的 LiCA 检测方法只能将检测到饱和信号的标本笼统认定为高浓度或高信号靶物质表达,而本发明不仅将其浓度定量到中等浓度表达区间,并能给出明确的浓度区段。

[0142] 6、现有的 LiCA 检测方法将高浓度标本因 Hooks 效应影响而表现出的试验信号降低混同于低浓度靶物质的低强度信号表达,并给出错误的定量检测结果。而本发明不仅能纠正这一缺点,并能利用在此状态下靶物质浓度与信号强度的负相关对其作出定量评价。

[0143] 7、本法中用到的抗 He 试剂制备简单,来源广泛,成本低廉,不同浓度的抗 He 对 Hooks 效应的纠正效果虽有参差,但它们均能完全避免因 Hooks 效应产生的假阴性。与几种当今针对固相免疫的 Hooks 效应拮抗措施(如二步法,一道洗涤法,排溢法等)相比,其效果显著优越。

[0144] 实施例 2 检测血清抗 HBc 的方法

[0145] 一、检测方法:

[0146] 方法名称:抗 HBc 检测靶抗原叠加 LiCA;

[0147] 原有方法名称:抗 HBc 检测 LiCA;

[0148] 敏感性:0.10IU/ml;

[0149] 定量范围:250IU/ml 内;

[0150] Hooks 效应起点(即反应信号呈浓度依赖性降低起点):2 500IU/ml 左右;

[0151] 假阴性出现浓度(反应信号接近 cut off 值):大于 200 000IU/ml;

[0152] 二、仪器与材料:

[0153] 1、仪器与耗材

[0154] 同实施例 1。

[0155] 2 试剂

[0156] (1) 血清抗 HBc 检测光激发化学发光试剂盒:由博阳生物(上海)科技有限公司制造,市售获得,包括下述试剂:

- [0157] 试剂 1 :HBcAg 包被发光微球,浓度为 10  $\mu$ g/ml ;
- [0158] 试剂 2 :生物素标记 HBcAg,浓度为 1.0  $\mu$ g/ml ;
- [0159] 试剂 3 :链亲和素(SA)包被感光微球(通用微球),浓度为 10  $\mu$ g/ml。
- [0160] (2)抗 Hooks 效应试剂(Anti Hooks effect Agent,抗 He):主要成份为抗 HBc。本实施例采用三个不同浓度分别为:抗 HBc 1000IU/ml,抗 HBc 1.0IU/ml,抗 HBc 20 000IU/ml 三种。其中前一种抗 He 为优先实施浓度 ;
- [0161] (3)标准品与对照血清
- [0162] 窄幅标准血清:采用 LiCA 试剂盒随带标准品,用于低抗 HBc 浓度标本的计量分析 ;
- [0163] 宽幅标准血清:自制,用于高及超高抗 HBc 浓度标本的计量分析。
- [0164] 此两类标准品及其抗 He 中的靶物质浓度均经相关单位核对与标定 ;
- [0165] 参比血清:自制,由相关单位标定抗 HBc 活性,未与市售标准品作严格比对。
- [0166] 阳性与阴性对照血清:自制、试剂盒配备。用于阈值及饱和信号值的设定。
- [0167] (4)待检标本:血清(血浆或其它液体标本)。
- [0168] 三、检测步骤
- [0169] 1. 取出所有试剂与标本,并恢复至室温。
- [0170] 2. 操作步骤
- [0171] (1)取待测标本,阴、阳性对照,及抗 HBc 定量标准血清系列各 25  $\mu$ l,分别加至 LiCA 板各反应孔中,每份标本加一孔(或根据需要的任意孔) ;
- [0172] (2)旋即加入试剂 1,每一实验孔加入 25  $\mu$ l ;
- [0173] (2)旋即加入试剂 2,每一实验孔加入 25  $\mu$ l,混匀,温育 15 分钟以完成免疫反应 ;
- [0174] (3)加入试剂 3,每一实验孔加入 175  $\mu$ l,混匀,温育 60min 以完成配受体结合反应 ;
- [0175] (4)置 LiCA 发光检测仪上,680nm 波长激发,610nm 波长检测各孔实验信号,绘制标准曲线,并初步评价检测标本的信号强度 ;
- [0176] (5)每一反应孔加入抗 He 试剂各 25  $\mu$ l。混匀,37 $^{\circ}$ C 同上温育以使抗 HBc 与实验体系中的相关物质发生反应并生成可被检测的 LiCA 信号 ;
- [0177] (6)再次置 LiCA 发光检测仪上,610nm 波长下检测各孔实验信号,并初步评价各反应孔信号强度 ;
- [0178] 四. 检测结果
- [0179] 1、采用抗 He 1000IU/ml 试验结果
- [0180] 1)低浓度靶物质的检测效果
- [0181] 对一组系列稀释的低浓度靶物质(参比法标定)进行检测,实验结果见表 8 及图 6。
- [0182] 表 8 低浓度组抗 HBc 含量与 LiCA 信号之间的剂量相关性

[0183]

实验管序	抗 HBc 设定值 ( IU/mL)	一次 LiCA 检测光子数	二次 LiCA 检测光子数	两者比率 (一次/二次)	二次 LiCA 信号饱和度#
1	0	922*	758824	0.12	95.06%
2	0.2	5106	749932	0.68	93.95%
3	0.4	8671	837791	1.03	104.95%
4	0.8	17651	780135	2.26	97.73%
5	1.6	32926	732840	4.92	91.81%
6	3.2	68994	793182	8.70	99.44%
7	6.4	149443	749935	19.93	93.95%
8	12.8	287076	837791	34.27	104.95%
9	25.6	557206	781425	71.42	97.89%
10	51.2	721673	808839	89.22	101.33%
11	1024	813660#	798562	101.89	100.03%
12	204.8	798250#	802693	99.46	100.56%

[0184] 表注 : \* :指定域值 ( $922 \times 2.1 = 1936.2$ ) ; # :指定饱和信号值 ; 805955.0

[0185] 低浓度组标本抗 HBc 浓度与 LiCA 信号之间的关系见图 6, 图中 X 轴 : 抗 HBc 浓度 ( $0.2 \text{ IU/ml} \times 2^n$ ), Y 轴 : 光子数。

[0186] 结果表明 : 本发明 LiCA 检测的信号强度与血清抗 HBc 浓度之间有很好的量效关系。

[0187] 2) 高浓度靶物质的检测效果

[0188] 采用本发明对一组系列稀释的高浓度抗 HBc (浓度经参比法标定) 血清进行检测, 实验结果见表 9。

[0189] 表 9 高浓度组抗 HBc 含量与 LiCA 信号之间的剂量相关性

实验管序	抗 HBc 设定 (IU/mL)*	一次 LiCA 检测光子数	二次 LiCA 检测光子数	两者比率* (一次/二次)	二次 LiCA 信号饱和度
1	3.2	798671#	801435	99.65	100.3
2	6.4	596347	621659	95.93	77.8
[0190] 3	12.8	243653	255647	95.31	32.0
4	25.6	102748	98572	104.23	12.3
5	51.2	30976	32346	95.76	4.05
6	102.4	9861	8721	113.07	0.87
7	204.8	1753	1235	141.83	0.15

[0191] \* :抗 HBc 设定浓度 :IU 值  $\times 10^3$

[0192] 高浓度标本血清抗 HBc 含量与第一次 LiCA 检测信号之间的剂量相关性见图 7, 图 8 是与第二次 LiCA 检测信号之间的剂量相关性, 图中 X 轴 :抗 HBc 浓度 ( $10^3 \text{IU} \times 2^n$ ), Y 轴 :光子数。

[0193] 图 9 是高浓度标本抗 HBc 浓度与第二次 LiCA 检测信号饱和度(%) 之间的线性关系曲线图。

[0194] 该组标本靶物质浓度与检测信号之间呈较好地剂量相关关系(负相关关系)。

[0195] 2、采用抗 HBc 1.0IU/ml 及抗 HBc 20000IU/ml 浓度抗 He

[0196] 采用含低及高浓度抗 HBc 的抗 He 进行检测, 二次 LiCA 检测结果只能有规律地提升低浓度阳性标本的试验信号, 因而主要用于鉴别并避免产生超高浓度标本在一次 LiCA 试验中所产生的假阴性结果。采用此两类抗 He 检测其实验试剂及实验方法等与采用抗 He1000IU/ml 相同, 实验结果的分析参照实施例 1 的有关章节。主要实验结果见表 10 和 11。

[0197] 表 10 抗 HBc 检测(抗 He 1.0IU/ml) 阴性与假阴性信号表达特征与鉴别

[0198]

标本号	一次 LiCA 信号 值 (光子数)	一次 LiCA 信 号值 (P/N)	二次 LiCA 信号 值 (光子数)	二次 LiCA 信号 值 (P/N)	结果报告 (定性)
1	1649	1.79	213459	231.52	阴性
2	927	1.01	214697	232.86	阴性
3	852	0.92	209753	227.50	阴性
4	1473	1.60	196412	213.03	阴性
5	2963	3.21	2637	2.86	假阴性
6	1286	1.39	1429	1.55	假阴性
7	212069	230.00	未作	无	抗 He 对照
8	209267	226.97	未作	无	抗 He 对照

[0199] 表 11 抗 HBe 检测 (抗 He 20 000IU/ml) 阴性与假阴性信号表达特征与鉴别  
[0200]

标本号	一次 LiCA 信号 值 (光子数)	一次 LiCA 信 号值 (P/N)	二次 LiCA 信号 值 (光子数)	二次 LiCA 信号 值 (P/N)	结果报告 (定性)
1	1962	2.13	159213	172.68	阴性
2	1027	1.11	169721	184.08	阴性
3	961	1.04	175367	190.20	阴性
4	1473	1.60	164123	178.01	阴性
5	1736	1.88	1592	1.73	假阴性
6	2184	2.37	2548	2.76	假阴性
7	163258	177.07	未作	无	抗 He 对照
8	167923	182.13	未作	无	抗 He 对照

[0201] 实施例 3 检测血清 AFP 的方法

[0202] 一. 检测方法:

[0203] 专利方法名称:血清 AFP 检测靶抗原叠加 LiCA;

[0204] 原有方法名称:血清 AFP 检测 LiCA;

[0205] 敏感性:1.0ng/ml;

[0206] 定量范围:1000ng/ml 内;

[0207] Hooks 效应起点(即反应信号呈浓度依赖性降低起点):50 000ng/ml 左右;

[0208] 假阴性出现浓度(反应信号接近 cut off 值):大于 1 000 000ng/ml;

[0209] 仪器与材料:

[0210] 1、试剂

[0211] (1)血清 AFP 检测光激发化学发光试剂盒:由博阳生物(上海)科技有限公司制造,市售获得。包括下述试剂:

[0212] 试剂 1:抗 AFP 包被发光微球,浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$ ;

[0213] 试剂 2:生物素标记抗 AFP,浓度为 10.  $\mu\text{g/ml}$ ;

[0214] 试剂 3:链亲和素(SA)包被感光微球,浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$ ;

[0215] (2)抗 Hooks 效应试剂(Anti Hooks effect Agent,抗 He 试剂):主要成份为含既定浓度的 AFP;

[0216] (3)标准品与对照血清

[0217] 窄幅标准血清:自制,用于低浓度 AFP 标本的计量分析;

[0218] 宽幅标准血清:自制,用于高及超高浓度 AFP 标本的计量分析;

[0219] 参比血清:自制,系纯化自然表达之 AFP,紫外光谱吸收检测其浓度;免疫活性未与市售标准品作严格比对。

[0220] 阳性与阴性对照血清:自制、试剂盒配备。用于域值确定,以及饱和信号值的设定。

[0221] (4)待检标本:血清(血浆或其它体液标本)。

[0222] 二、检测方法

[0223] 1. 试验准备

[0224] (1)取出所有试剂与标本,并恢复至室温。

[0225] (2)取等体积的试剂 2 及试剂 3,混匀,室温下放置 20 分钟,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置当天使用。

[0226] 2. 操作步骤

[0227] (1)取待测标本,阴、阳性对照,及 AFP 定量标准血清系列各 50  $\mu\text{l}$ ,分别加至 LiCA 板各反应孔中,每份标本加一孔(或根据需要的任意孔),

[0228] (2)加入试剂 1,每一反应孔加入 50  $\mu\text{l}$ ;

[0229] (3)旋即加入试剂 2、3 混合液,每一反应孔加 100  $\mu\text{l}$ ,混匀,温育 5min 以完成免疫反应;

[0230] (4)置 LiCA 发光检测仪上,680nm 波长激发,610nm 波长检测各孔检测信号,绘制标准曲线,并初步评价各标本的检测状况;

[0231] (5)每一反应孔加入抗 He 试剂各 50  $\mu\text{l}$ ,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15min 以使被加入的 AFP 与反应体系中的相关物质发生反应并生成可被检测的 LiCA 信号;

[0232] (6)再次置 LiCA 发光检测仪上,680nm 激发,610nm 波长下检测各孔检测信号,并初步评价各反应孔信号强度;

[0233] 三、检测结果

[0234] 1、域值及饱和信号值

[0235] 域值:阴性均值  $\times 2.1 = 1132.7 \times 2.1 = 2378.7$

[0236] 阳性信号饱和值:阳性对照孔(3 孔)均值 = 976249.2

[0237] 2、低浓度靶物质的检测效果

[0238] 对一组系列稀释的低浓度靶物质(参比法标定)进行检测,结果见表 12。

[0239] 表 12 低浓度组 LiCA 信号的表达特征及其与 AFP 浓度之间的剂量相关性

[0240]

实验管序	AFP 设定值 (ng/mL)	一次 LiCA 检测光子数	二次 LiCA 检 测光子数	两者比率 (一次/二次)	二次 LiCA 信号饱和度#
1	0	1273.6	975824	0.13	99.25%
2	2	6571.8	1004932	0.65	102.94%
3	4	12032.5	983791	1.22	100.77%
4	8	24649.1	978135	2.52	100.19%
5	16	48250.3	963240	5.01	98.67%
6	32	98137.6	973182	10.08	99.69%
7	64	201436.7	964935	21.81	98.84%
8	128	416904.9	983743	42.38	100.77%
9	256	773024.3	978425	79.01	100.22%
10	512	913348.4	980839	93.46	100.47%
11	1024	988589.5	975264	101.37	99.90%
12	2048	995108.7	984693	101.06	100.66%

[0241] 3、高浓度靶物质的检测效果

[0242] 对一组系列稀释的高浓度 AFP 进行检测,结果见表 13。

[0243] 表 13 高浓度组与 LiCA 信号的表达特征及其与 AFP 含量之间的剂量相关性

[0244]

实验管序	AFP 设定值 ( $\mu\text{g/mL}$ )*	一次 LiCA 检测光子数	二次 LiCA 检 测光子数	两者比率* (一次/二次)	二次 LiCA 信号饱和度
1	32	918471.7	921650.3	99.65	94.41
2	64	683499.1	714907.9	95.93	73.23
3	128	286195.0	293994.5	97.53	30.11
4	256	118160.1	113357.8	104.23	11.61
5	512	35622.4	37197.9	95.76	3.81
6	1024	10342.2	9157.2	112.93	0.94
7	2048	1420.2	1296.035	109.58	0.13

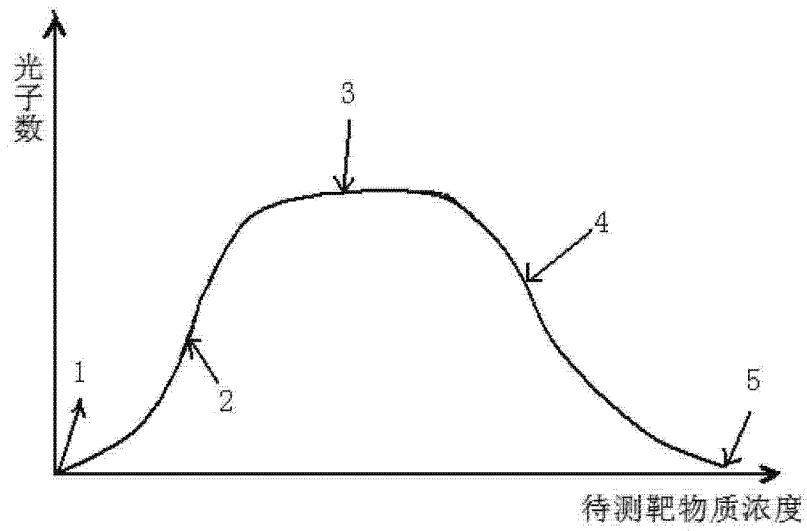


图 1

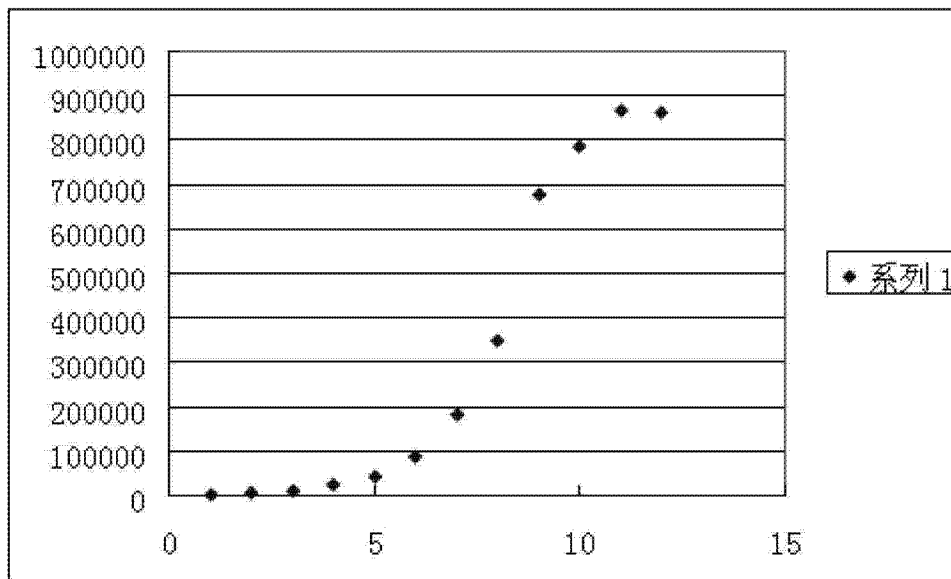


图 2

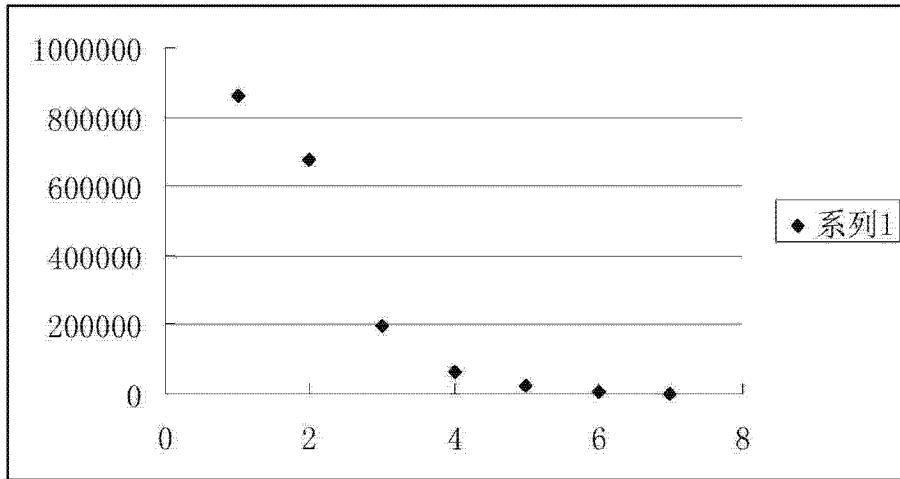


图 3

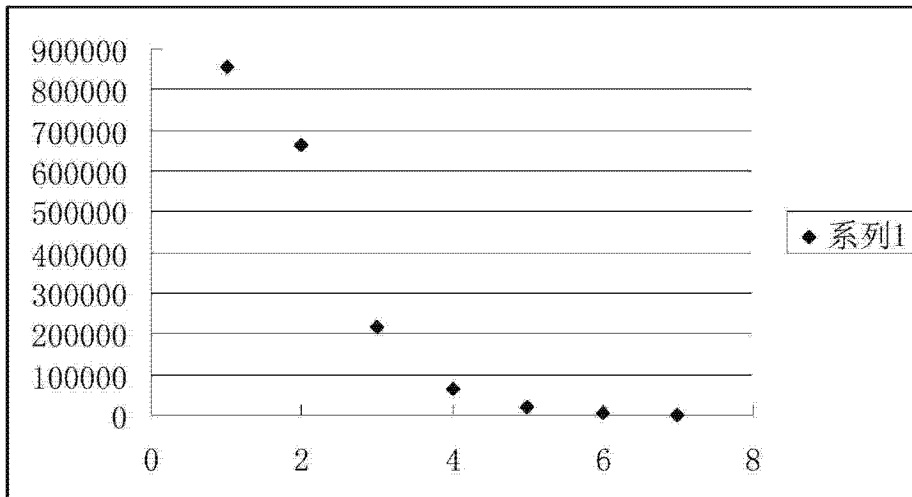


图 4

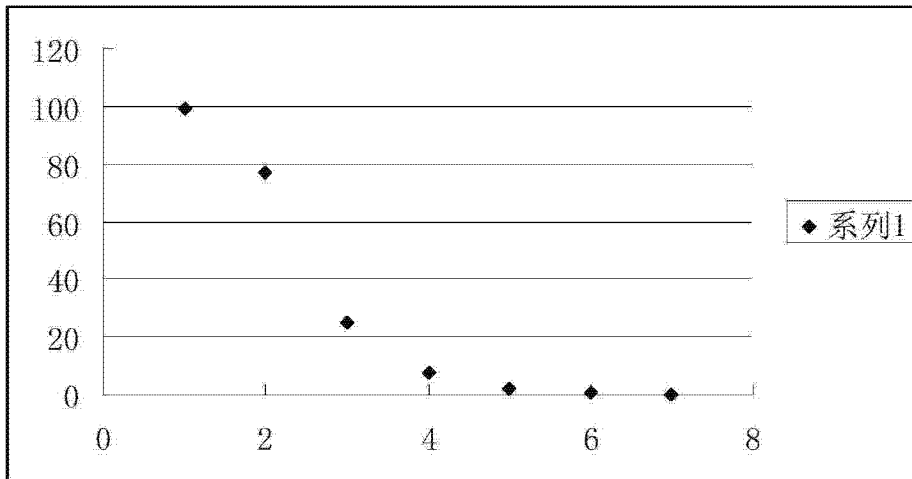


图 5

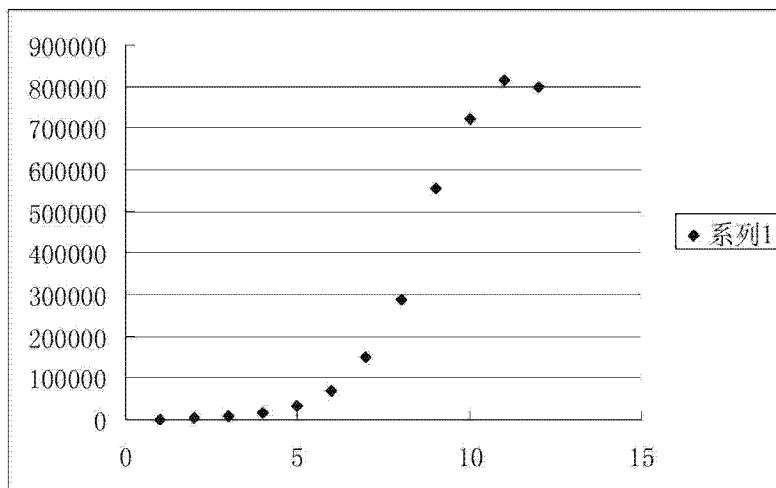


图 6

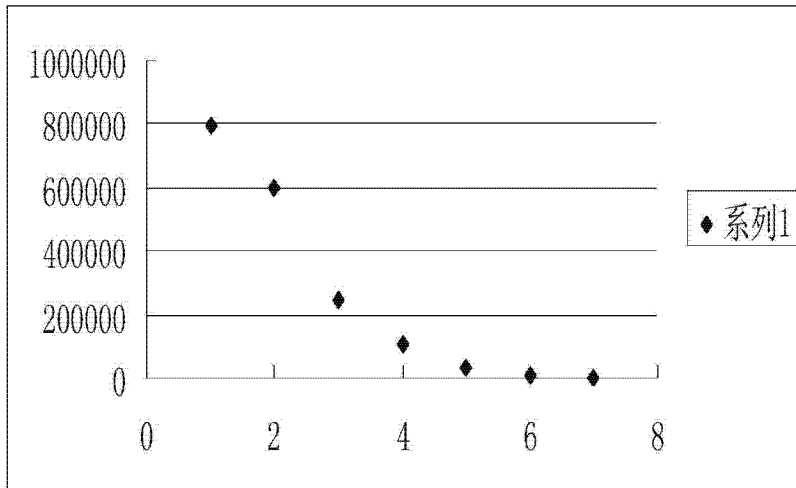


图 7

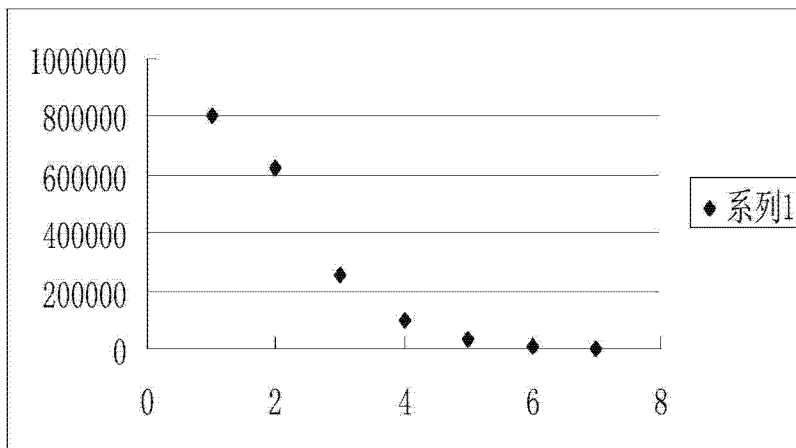


图 8

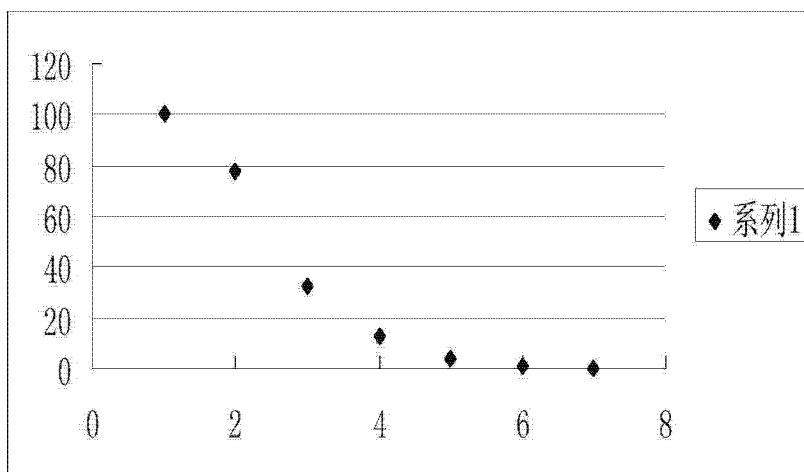


图 9

专利名称(译)	采用光激发化学发光免疫分析对血清中的待测靶物质进行定性与定量检测的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102944672B</a>	公开(公告)日	2015-05-20
申请号	CN201210461525.6	申请日	2012-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	李方和		
申请(专利权)人(译)	李方和		
当前申请(专利权)人(译)	李方和		
[标]发明人	李方和 李时君		
发明人	李方和 李时君		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76		
代理人(译)	徐绍新		
其他公开文献	CN102944672A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种采用光激发化学发光免疫分析对血清中的靶物质进行定性与定量检测的方法，包括向待测标本中加入包被靶物质抗体的发光微球、生物素包被靶物质抗体、链亲和素(SA)包被的感光微球进行第一次免疫反应和检测的步骤，还包括向反应体系中加入抗He试剂发生靶物质免疫叠加反应，并进行第二次光激发化学发光免疫检测的步骤。本发明通过对两次LiCA检测结果的综合分析达到全方位纠正Hooks效应的目标，分析过程包括根据其在一次LiCA与二次LiCA检测的信号特征将被检标本区分为阴、低阳、中阳，高阳与超高阳等五个浓度区间；根据第一次LiCA对低阳与超高阳浓度区段的标本进行定量分析。本发明具有结果准确，操作简便，适用范围广等特点。

