



(21)申请号 201611034252.1

(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 21/63(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书3页 说明书20页 附图3页

(54)发明名称

鉴别HD-HOOK效应样本的方法和鉴定免疫测定中的HD-HOOK效应的系统

(57)摘要

本发明提供一种鉴别HD-HOOK效应样本的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:对校准品、峰值校准品、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,将峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅A记为R0,对比待测样本的第二次和第一次读数之间的增幅A是否大于R0,如果大于R0则样本具有HD-HOOK效应,如果小于R0则不具有HD-HOOK效应。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. 一种鉴别HD-HOOK效应样本的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:对校准品、峰值校准品、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,将峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅A记为R0,对比待测样本的第二次和第一次读数之间的增幅A是否大于R0,如果大于R0则样本具有HD-HOOK效应,如果小于R0则不具有HD-HOOK效应。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1) 将校准品、峰值校准品、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) 将峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅A记为R0;

(6) 将待测样本的两次读数增幅A值与R0比较,如果A大于等于R0,则鉴定此样本为HD-HOOK效应样本。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,将待测样本的两次读数增幅A值与R0比较,如果A大于等于R0,则待测样本为HD-HOOK效应样本,需要稀释;如果A小于R0,则直接用校准曲线计算出样本浓度。

4. 根据权利要求2所述的方法,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。

5. 根据权利要求2所述的方法,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。

6. 根据权利要求2所述的方法,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。

7. 一种用于鉴定免疫测定中的HD-HOOK效应的系统,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,

处理器,其用于根据待测样本的第二次和第一次读数之间的差值增幅A来确定HD-HOOK效应样本的存在。

8. 根据权利要求7所述的系统,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,

处理器,其用于对比待测样本的第二次和第一次读数之间的差值增幅A是否大于峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅R0,如果大于R0则样本具有HD-HOOK效应,如果小于R0则不具有HD-HOOK效应,

其中化学发光的第二次读数是针对同一免疫反应间隔一段时间后再次激发和读数得到的。

9. 根据权利要求7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) 将校准品、峰值校准品、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) 将峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅A记为R0;

(6) 将待测样本的两次读数增幅A值与R0比较,如果A大于等于R0,则鉴定此样本为HD-HOOK效应样本。

10. 根据权利要求9所述的系统,其特征在于,将待测样本的两次读数增幅A值与R0比较,如果A大于等于R0,则待测样本为HD-HOOK效应样本,需要稀释;如果A小于R0,则直接用校准曲线计算出样本浓度。

11. 根据权利要求9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。

12. 根据权利要求9所述的系统,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。

13. 根据权利要求9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。

14. 一种试剂盒,包括校准品、峰值校准品、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:对校准品、峰值校准品、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,根据待测样本的第二次和第一次读数之间的差值增幅A来确定HD-HOOK效应样本的存在。

15. 根据权利要求14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:对校准品、峰值校准品、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,对比待测样本的第二次和第一次读数之间的差值增幅A是否大于峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅R0,如果大于R0则样本具有HD-HOOK效应,如果小于R0则不具有HD-HOOK效应。

16. 根据权利要求14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) 将校准品、峰值校准品、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) 将峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅A记为R0;

(6) 将待测样本的两次读数增幅A值与R0比较,如果A大于等于R0,则鉴定此样本为HD-HOOK效应样本。

17. 根据权利要求14所述的试剂盒,其特征在于,将待测样本的两次读数增幅A值与R0比较,如果A大于等于R0,则待测样本为HD-HOOK效应样本,需要稀释;如果A小于R0,则直接用校准曲线计算出样本浓度。

18. 根据权利要求16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。

19. 根据权利要求16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。

20. 根据权利要求16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。

鉴别HD-HOOK效应样本的方法和鉴定免疫测定中的HD-HOOK效应的系统

技术领域

[0001] 本发明涉及光激化学发光技术领域,具体涉及一种鉴别HD-HOOK效应样本的方法、一种用于鉴定免疫测定中的HD-HOOK效应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] 光激化学发光法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个到四个组分: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有效鉴别HD-HOOK效应(高剂量-钩状效应)样本的方法,以在检测过程中,简便快速地识别HD-HOOK效应样本并能计算出其浓度,以防止将高浓度抗原(或抗体)样本误判为低浓度甚至假阴性样本。

[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,提供一种鉴别HD-HOOK效应样本的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:对校准品、峰值校准品、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,将峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅A记为R0,对比待测样本的第二次和第一次读数之间的增幅A是否大于R0,如果大于R0则样本具有HD-HOOK效应,如果小于R0则不具有HD-HOOK效应。

[0014] 根据本发明一个优选的实施方式,所述方法包括如下步骤:

[0015] (1) 将校准品、峰值校准品、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;

[0016] (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;

[0017] (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;

[0018] (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, $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$;

[0019] (5) 将峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅A记为R0;

[0020] (6) 将待测样本的两次读数增幅A值与R0比较,如果A大于等于R0,则鉴定此样本为HD-HOOK效应样本。

[0021] 在本发明上下文中,术语“峰值校准品”是指含特定浓度的待测物的样本,其中双抗夹心免疫实验的待测物剂量反应曲线的高剂量区段,线性走向开始向下弯曲时的浓度为峰值校准品中的待测物浓度。

[0022] 根据本发明一个优选的实施方式,将待测样本的两次读数增幅A值与R0比较,如果A大于等于R0,则待测样本为HD-HOOK效应样本,需要稀释;如果A小于R0,则直接用校准曲线计算出样本浓度。

[0023] 根据本发明一个优选的实施方式,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。

[0024] 根据本发明一个优选的实施方式,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。

[0025] 根据本发明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。

[0026] 本发明的第二方面提供一种用于鉴定免疫测定中的HD-HOOK效应的系统,所述系统包括:

[0027] 免疫反应装置,其用于实施化学发光免疫反应,

[0028] 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,

[0029] 处理器,其用于根据待测样本的第二次和第一次读数之间的差值增幅A来确定HD-HOOK效应样本的存在。

[0030] 根据本发明一个优选的实施方式,所述系统包括:

[0031] 免疫反应装置,其用于实施化学发光免疫反应,

[0032] 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,

[0033] 处理器,其用于对比待测样本的第二次和第一次读数之间的差值增幅A是否大于峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅R0,如果大于R0则样本具有HD-HOOK效应,如果小于R0则不具有HD-HOOK效应,

[0034] 其中化学发光的第二次读数是针对同一免疫反应间隔一段时间后再激发和读数得到的。

[0035] 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。

[0036] 根据本发明一个优选的实施方式,所述系统的使用方法包括如下步骤:

[0037] (1) 将校准品、峰值校准品、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) 将峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅A记为R0;

[0042] (6) 将待测样本的两次读数增幅A值与R0比较,如果A大于等于R0,则鉴定此样本为HD-HOOK效应样本。

[0043] 本发明的第三方面提供一种试剂盒,包括校准品、峰值校准品、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:对校准品、峰值校准品、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,根据待测样本的第二次和第一次读数之间的差值增幅A来确定HD-HOOK效应样本的存在。

[0044] 根据本发明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:对校准品、峰值校准品、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,对比待测样本的第二次和第一次读数之间的差值增幅A是否大于峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅R0,如果大于R0则样本具有HD-HOOK效应,如果小于R0则不具有HD-HOOK效应。

[0045] 根据本发明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:

[0046] (1) 将校准品、峰值校准品、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;

[0047] (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;

[0048] (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;

[0049] (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, $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$;

[0050] (5) 将峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅A记为R0;

[0051] (6) 将待测样本的两次读数增幅A值与R0比较,如果A大于等于R0,则鉴定此样本为HD-HOOK效应样本。

[0052] 根据本发明一个优选的实施方式,将待测样本的两次读数增幅A值与R0比较,如果A大于等于R0,则待测样本为HD-HOOK效应样本,需要稀释;如果A小于R0,则直接用校准曲线计算出样本浓度。

[0053] 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,简便快速地挑选出HD-HOOK效应样本,以防止将高浓度抗原(或抗体)样本误判为低浓度抗原(或抗体)样本。

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 本发明实施例中,所述抗原或抗体选自乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗体(HBsAb)、癌抗原125(CA125)、铁蛋白(Ferr)和C肽(CP)。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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/TPO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。

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 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。

[0070] 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和区分HD-HOOK效应样本的作用。两次读数的差异由以下三个方面决定:

[0071] 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;而对于高浓度的HD-HOOK效应样本,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。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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提示一个信号值低而增幅高的样本是HD-HOOK效应。

[0075] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0076] (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。

[0077] (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。

[0078] (3) 本发明的方法操作简单,能够简便有效地排除非疾病诊断目的双抗体夹心免疫测定中HD-HOOK效应所导致的假阴性样本。

附图说明

[0079] 图1:Ferr采用常规检测方法所得信号值与样本浓度的关系曲线图。

[0080] 图2:Ferr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。

[0081] 图3:C肽采用常规检测方法所得信号值与样本浓度的关系曲线图。

[0082] 图4:C肽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。

[0083] 图5: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。

[0084] 图6: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。

具体实施方式

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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, 1989 and Third edition, 2001; Ausubel 等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and 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。

[0088] 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是否为 HD-HOOK 效应样本的之间的关系,可以简便有效地排除双抗夹心免疫测定中 HD-HOOK 效应所导致的假阴性,及提高双抗夹心免疫测定的准确性。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 双抗夹心法的基本原理:

[0093] 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。

[0094] 光激化学发光法的基本原理:

[0095] 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 μ 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。

[0096] 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:

[0097] (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；

[0098] (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；

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 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：

[0102] (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；

[0103] (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；

[0104] 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。

[0105] 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。

[0106] 指示HD-HOOK效应样本方法的原理：

[0107] 在本发明的方法中，首先在反应孔中分别加入待测样本或标准品(包括校准品和峰值校准品)、发光微粒上包被第一抗体(或抗原)、生物素标记第二抗体(或抗原)，温育一段时间后再加入链霉亲和素包被感光微粒(正常检测这种抗原或抗体浓度，与普通的、不具有HOOK效应指示功能的方法相同)。这时同时发生以下反应：

[0108] (1) 发光微粒上的第一抗体(或抗原)与待测样本或抗原(或抗体)标准品液中相应的抗原(或抗体)结合，形成“抗原-第一抗体-发光微粒”三元复合物(或“抗体-第一抗原-发光微粒”三元复合物)；第二抗体(或抗原)与血清样本或抗原(或抗体)标准品液中相应的抗原(或抗体)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(或“第二抗原-抗体-第一抗原-发光微粒”双抗夹心复合物)；

[0109] (2) 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，

[0110] 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，得到第一次读数RLU1；

[0111] (3) 将进行第一次读数后的反应溶液进一步温育后，进行第二次读数RLU2；

[0112] (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， $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$ ；

[0113] (5) 在待测物的剂量反应曲线的高剂量区段，线性走向开始向下弯曲时的样品选

为峰值校准品,按步骤(1)~(4)检测峰值校准品,其A值作为HD-HOOK效应分界值R0;

[0114] (6) 将待测样本两次读数增幅A值与HD-HOOK效应分界值R0比较,如果A大于等于R0,则鉴定此样本为HD-HOOK效应样本。

[0115] 以下,进一步说明本发明的相关操作细节。

[0116] (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。

[0117] (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。

[0118] (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。

[0119] (4) 标准品:

[0120] 用待测抗原(或抗体)配置一定浓度范围内(校准品1-6低于HD-HOOK效应浓度,峰值校准品浓度等于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分别与标准品浓度作标准曲线;记峰值校准品的A值作为HD-HOOK效应分界值R0。

[0121] (5) 样品的检测:

[0122] 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。

[0123] (6) 样品浓度计算:

[0124] 先将待测样本两次读数增幅A值与HD-HOOK效应分界值R0比较,如果A小于R0,则此样本不是HD-HOOK效应样本,将待测样本的RLU1代入标准品RLU1与标准品浓度的标准曲线中计算待测样本浓度;如果A大于等于R0,则鉴定此样本为HD-HOOK效应样本,需要稀释检测。

[0125] 实施例1:检测人血清样本中乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)

[0126] 采用依据本发明的一种鉴别HD-HOOK样本的方法所涉及的试剂盒,检测样本中HBsAg浓度,所述试剂盒包括校准品1-校准品6、峰值校准品、试剂1(发光抗体,亦即,抗体包被的发光微粒)、试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的抗体)。

[0127] 校准品1-校准品6:常规试剂盒中的已知浓度样本,浓度远小于HOOK样本,作标准曲线计算待测物浓度。

[0128] 峰值校准品的选取:将已知的HOOK样本梯度稀释,常规检测其信号值,选取信号值最高的样本作为峰值校准品,即小于此浓度样本不会发生HOOK效应,而高于此浓度就有HOOK效应。其A值记为R0作为判断待测物是否HOOK的临界值。

[0129] 另需用到的组分:LiCA通用液(链霉亲和素标记的感光微粒),该产品为博阳生物科技公司生产光激化学发光分析系统的辅助试剂。与仪器及相应的光激化学发光法检测试剂盒配套使用,用于抗原、抗体的检测。

[0130] 先用本发明方法检测校准品1-校准品6、峰值校准品和待测的血清样本1-15:将待测物,试剂1(抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记的抗体)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:

[0131] 表1:

	样本	RLU (1)	RLU (2)	增幅 A	浓度 IU/ml
校准品	校准品 1	422	480	14%	0.00
	校准品 2	837	963	15%	0.10
	校准品 3	1810	2178	20%	0.90
	校准品 4	36396	45223	24%	27.56
	校准品 5	200089	250799	25%	156.46
	校准品 6	396371	502928	27%	336.56
	峰值校准品	1067534	1393208	31%	
待测样本	样本 1	144451	202472	40%	HOOK
	样本 2	145010	206857	43%	HOOK
	样本 3	232678	318684	37%	HOOK
	样本 4	415121	534674	29%	368.29
	样本 5	349098	468840	34%	HOOK
	样本 6	83799	123879	48%	HOOK
	样本 7	171530	211953	24%	137.07
	样本 8	199010	251351	26%	159.34
	样本 9	375057	498512	33%	HOOK
	样本 10	325790	409503	26%	250.82
	样本 11	225486	282838	25%	188.59
	样本 12	97703	141949	45%	HOOK
[0133]	样本 13	103552	150462	45%	HOOK
	样本 14	193000	263358	36%	HOOK
	样本 15	280822	370651	32%	HOOK

[0134] 本发明方法得到15个血清样本的浓度如上:表1所示,先通过与峰值校准品的增幅R0比较区分出HOOK效应的样本,即A值大于31%则判断为HOOK效应样本,推荐稀释后检测;

而A小于31%则为非HOOK效应样本,可直接用校准曲线计算出样本浓度。

[0135] 通过对样本进行梯度稀释后检测浓度变化以验证以上结论的可靠性,将样本1-样本15均进行2被稀释和4倍稀释,同时用常规检测方法检测未稀释的原倍样本、2被稀释样本和4倍稀释样本,通过观察稀释后浓度的变化判断该样本是否有HOOK效应,即若稀释后样本浓度反而升高即为HOOK效应样本。非HOOK效应样本在稀释后浓度会降低。结果如下:

[0136] 表2:

稀释 验证	检测浓度			浓度 IU/mL	
	原倍样本	2 倍稀释样本	4 倍稀释样本		
[0137]	样本 1	128.79	262.17	474.22	HOOK
	样本 2	135.81	249.87	417.08	HOOK
	样本 3	228.96	388.23	642.69	HOOK
	样本 4	369.11	222.22	124.14	369.11
	样本 5	353.47	618.94	886.34	HOOK
	样本 6	74.52	132.14	226.20	HOOK
	样本 7	134.44	60.89	31.22	134.44
	样本 8	154.76	72.45	36.50	154.76
	样本 9	331.50	546.11	881.46	HOOK
	样本 10	260.78	104.97	49.26	260.78
	样本 11	174.00	97.86	51.41	174.00
	样本 12	82.80	176.16	328.03	HOOK
	样本 13	94.92	192.47	367.37	HOOK
[0138]	样本 14	158.96	277.50	434.39	HOOK
	样本 15	269.64	480.82	814.12	HOOK

[0139] 血清样本1、2、3、5、6、9、12、13、14、15稀释后检测浓度升高,即证明为HD-HOOK效应样本,血清样本4、7、8、10、11稀释后浓度降低,证明不是HD-HOOK效应样本。与本发明方法的结果完全相同。

[0140] 实施例2:检测人血清样本中CA125验证本发明方法有效性

[0141] 采用依据本发明的一种鉴别HD-HOOK样本的方法所涉及的试剂盒,检测样本中CA125浓度,所述试剂盒包括校准品1-校准品6、峰值校准品、试剂1(发光抗体,亦即,抗体包被的发光微粒)、试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的抗体)。

[0142] 校准品1-校准品6:常规试剂盒中的已知浓度样本,浓度远小于HOOK样本,作标准曲线计算待测物浓度。

[0143] 峰值校准品的选取:将已知的HOOK样本梯度稀释,常规检测其信号值,选取信号值最高的样本作为峰值校准品,即小于此浓度样本不会发生HOOK效应,而高于此浓度就有

HOOK效应。其A值记为R0作为判断待测物是否HOOK的临界值。

[0144] 先用本发明方法检测校准品1-校准品6、峰值校准品和待测的血清样本1-18:将待测物,试剂1(抗体包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记的抗体)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:

[0145] 表3:

[0146]

	样本	RLU (1)	RLU (2)	增幅 A	浓度 U/ml
校准品	校准品 1	999	744	-25.5%	0
	校准品 2	10857	8248	-24.0%	9.17

[0147]

待测样本	校准品 3	21563	17508	-18.8%	19.11
	校准品 4	102708	88869	-13.5%	87.53
	校准品 5	271593	259355	-4.5%	251.58
	校准品 6	794718	853603	7.4%	1043.74
	峰值校准品	2537830	3012939	18.7%	
	样本 1	9665	7217	-25.3%	8.06
	样本 2	16130	12287	-23.8%	14.09
	样本 3	51059	42166	-17.4%	44.79
	样本 4	71055	59021	-16.9%	61.36
	样本 5	92952	80019	-13.9%	79.39
	样本 6	196716	178735	-9.1%	173.32
	样本 7	225436	213141	-5.5%	202.34
	样本 8	290252	281001	-3.2%	272.3
	样本 9	340529	345889	1.6%	330.44
	样本 10	465955	478028	2.6%	492.14
	样本 11	513321	530012	3.3%	560.23
	样本 12	711508	760017	6.8%	889.7
	样本 13	908842	973276	7.1%	>1000.00
	样本 14	1845773	2103378	14.0%	>1000.00
	样本 15	2390350	2772269	16.0%	>1000.00
	样本 16	688606	859340	24.8%	HOOK
	样本 17	560058	709209	26.6%	HOOK
	样本 18	453979	584179	28.7%	HOOK

[0148] 本发明方法得到18个血清样本的浓度如上：表3所示，先通过与峰值校准品的增幅R0比较区分出H00K效应的样本，即A值大于18.7%则判断为H00K效应样本，推荐稀释后检测；而A小于18.7%则为非H00K效应样本，可直接用校准曲线计算出样本浓度。

[0149] 通过对样本进行梯度稀释后检测浓度变化以验证以上结论的可靠性，将样本1-样本18均进行2被稀释和4倍稀释，同时用常规检测方法检测未稀释的原倍样本、2被稀释样本和4倍稀释样本，通过观察稀释后浓度的变化判断该样本是否有H00K效应，即若稀释后样本浓度反而升高即为H00K效应样本。非H00K效应样本在稀释后浓度会降低。结果如下：

[0150] 表4：

稀释 验证	检测浓度			浓度 U/mL
	原倍样本	2 倍稀释样本	4 倍稀释样本	
样本 1	8.02	4.36	2.26	8.02
样本 2	13.42	7.21	3.32	13.42
样本 3	47.14	25.17	11.8	47.14
样本 4	66.49	30.09	16.19	66.49
样本 5	80.84	44.42	20.86	80.84
样本 6	167.73	81.77	41.22	167.73
样本 7	192.31	101.89	49.65	192.31
样本 8	300.92	154.39	78.77	300.92
样本 9	352.65	170.05	87.05	352.65
样本 10	528.74	260.36	127.31	528.74
样本 11	612.44	299.05	141.28	612.44
样本 12	901.35	447.07	213.5	901.35
样本 13	>1000.00	559.3	258.1	>1000.00
样本 14	>1000.00	>1000.00	551.3	>1000.00
样本 15	>1000.00	>1000.00	771.9	>1000.00
样本 16	830.97	992.82	>1000.00	H00K
样本 17	734.25	934.91	>1000.00	H00K
样本 18	550.42	778.12	>1000.00	H00K

[0152] 血清样本16、17、18稀释后检测浓度升高，即证明为HD-H00K效应样本，血清样本1-样本15稀释后浓度降低，证明不是HD-H00K效应样本。与本发明方法的结果完全相同。

[0153] 实施例3：检测样本中铁蛋白 (Ferr) 验证本发明方法有效性

[0154] 采用依据本发明的一种鉴别HD-H00K样本的方法所涉及的试剂盒来检测样本中铁蛋白 (购自Fitzgerald, Catalog No:30-AF10) 的含量。所述试剂盒包括校准品1-校准品6、

峰值校准品、试剂1 (发光抗体, 亦即, 抗体包被的发光微粒)、试剂2 (生物素标记抗体, 亦即生物素标记的抗体)。

[0155] 校准品1-校准品6: 常规试剂盒中的已知浓度样本, 浓度远小于H00K样本, 作标准曲线计算待测物浓度。

[0156] 峰值校准品的选取: 将已知的H00K样本梯度稀释, 常规检测其信号值, 选取信号值最高的样本作为峰值校准品, 在本实验中即为样本9, 小于此浓度样本不会发生H00K效应, 而高于此浓度就有H00K效应。其A值记为R0作为判断待测物是否H00K的临界值。

[0157] 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浓度值。

[0158] 常规检测方法: 将校准品1-校准品6、峰值校准品和待测样本1-15, 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, 结果如下表所示。

[0159] 采用本发明两次读数法: 将校准品1-校准品6、峰值校准品和待测样本1-15, 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:

[0160] 表5:

[0161]

	样本	实际浓度	常规检测结果		本发明检测结果			
		浓度 ng/ml	RLU	浓度 ng/ml	RLU (1)	RLU (2)	增幅 A	浓度 ng/ml

[0162]

校准品	校准品 1	0	1504	0	1301	982	-24.5%	0
	校准品 2	19.91	9470	19.91	8419	5699	-32.3%	19.91
	校准品 3	101.02	46702	101.02	39701	31854	-19.8%	101.02
	校准品 4	502.74	201992	502.74	177904	152780	-14.1%	502.74
	校准品 5	994.36	382044	994.36	336189	299061	-11.0%	994.36
	校准品 6	2232.94	745316	2232.94	701657	662840	-5.5%	2232.94
	峰值校准品 (样本 9)	51000	2378260	51000	2113558	2407210	13.9%	51000
待测样本	样本 1	20	10008	21.21	9010	6256	-30.6%	21.53
	样本 2	200	83614	184.44	75542	63340	-16.2%	196.81
	样本 3	2000	688675	>2000	635950	595131	-6.4%	>2000
	样本 4	5100	1131402	>2000	1083169	1077907	-0.5%	>2000
	样本 5	10200	1684984	>2000	1448123	1526161	5.4%	>2000
	样本 6	15300	1966033	>2000	1776540	1926924	8.5%	>2000
	样本 7	20400	2132659	>2000	1907869	2132148	11.8%	>2000
	样本 8	25500	2288952	>2000	1999686	2251677	12.6%	>2000
	样本 9	51000	2378260	>2000	2113558	2407210	13.9%	>2000
	样本 10	102000	2304238	>2000	2094861	2392541	14.2%	HOOK
	样本 11	153000	2163232	>2000	1903523	2210245	16.1%	HOOK
	样本 12	204000	1958628	>2000	1740069	2031467	16.7%	HOOK
	样本 13	255000	1777808	>2000	1615030	1899252	17.6%	HOOK
	样本 14	510000	1401282	>2000	1162934	1398233	20.2%	HOOK
	样本 15	2550000	646266	1860.97	538637	668007	24.0%	HOOK

[0163] 注:铁蛋白常规检测的检测范围为0-2000ng/ml,超出检测上限样本显示浓度为>2000ng/ml。

[0164] 由表5和图1可知,常规检测高浓度抗原梯度稀释的样本,浓度上升到51000ng/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随Ferr浓度升高而降低,即浓度大于51000ng/ml则HD-HOOK,51000ng/ml的样本9即为峰值校准品,R0为13.9%。

[0165] 在常规检测中,检测范围为0-2000ng/ml,超出检测上限样本显示浓度为>2000ng/ml。当HD-HOOK效应样本浓度持续升高,信号持续下降,就会出现将超高浓度样本报告成偏低浓度情况,如样本15。故而在常规检测中就不能分辨待测样本的检测结果是真实浓度还是超高值样本受HD-HOOK效应影响而报告的偏低浓度。

[0166] 本发明方法通过两次读数来鉴别HOOK样本。每个待测样本先后检测到信号值结果RLU1、RLU2,将第二次读数的增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$ 作为判断样本浓度的指标之一。

由表5和图2可知,信号值随浓度续升高到51000ng/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。故直接比较待测样本的A值与校准品的A值,即可判断待测样本浓度与校准品浓度的大小关系。样本10~15的增幅A均大于峰值校准品的增幅R0(13.9%),表明样本10~15的Ferr浓度均大于51000ng/ml,为HD-HOOK样本。这与实际浓度相符,样本15信号值低于校准品6,常规方法检测浓度为1860.97ng/ml,通过本发明方法能鉴别其为HD-HOOK效应样本,需进行稀释检测。

[0167] 实施例4:检测样本中C肽(CP)验证本发明方法有效性

[0168] 采用依据本发明的一种鉴别HD-HOOK样本的方法所涉及的试剂盒来检测样本中C肽(购自Fitzgerald,Catalog No:30-AC96)的含量。所述试剂盒包括校准品1-校准品6、峰值校准品、试剂1(发光抗体,亦即,抗体包被的发光微粒)、试剂2(生物素标记抗体,亦即生物素标记的抗体)。

[0169] 校准品1-校准品6:常规试剂盒中的已知浓度样本,浓度远小于HOOK样本,作标准曲线计算待测物浓度。

[0170] 峰值校准品的选取:将已知的HOOK样本梯度稀释,常规检测其信号值,选取信号值最高的样本作为峰值校准品,在本实验中即为样本9,小于此浓度样本不会发生HOOK效应,而高于此浓度就有HOOK效应。其A值记为R0作为判断待测物是否HOOK的临界值。

[0171] 将高浓度的C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C肽的样本的浓度值。

[0172] 常规检测方法:将校准品1-校准品6、峰值校准品和待测样本1-15,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,结果如下表所示。

[0173] 采用本发明两次读数法:将校准品1-校准品6、峰值校准品和待测样本1-15,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:

[0174] 表6:

[0175]

	样本	实际浓度	常规检测结果		本发明检测结果			
		浓度 ng/ml	RLU	浓度 ng/ml	RLU (1)	RLU (2)	增幅 A	浓度 ng/ml
校准品	校准品 1	0	304	0	302	331	9.6%	0
	校准品 2	0.59	2035	0.59	1778	1308	-26.4%	0.59
	校准品 3	0.85	2539	0.85	2625	2016	-23.2%	0.85
	校准品 4	6.02	11619	6.02	9717	8017	-17.5%	6.02
	校准品 5	12.05	23261	12.05	21432	18465	-13.8%	12.05
	校准品 6	33.31	55424	33.31	47809	45456	-4.9%	33.31
	峰值校准品 (样本 9)	10000	3170807	>30	2669419	3292270	23.3%	>30
待测样本	样本 1	1	2912	1.06	2900	2251	-22.4%	0.93
	样本 2	3	6499	3.12	5729	4545	-20.7%	2.37
	样本 3	10	20345	10.54	16747	13986	-16.5%	10.13
	样本 4	33	56700	>30	44852	42492	-5.3%	>30
	样本 5	100	162356	>30	132253	139349	5.4%	>30

[0176]

样本 6	335	435784	>30	359060	409421	14.0%	>30
样本 7	1000	1458246	>30	1147167	1367003	19.2%	>30
样本 8	3350	2610397	>30	2305534	2785700	20.8%	>30
样本 9	10000	3170807	>30	2669419	3292270	23.3%	>30
样本 10	33500	2998354	>30	2376362	2986650	25.7%	HOOK
样本 11	100000	2165769	>30	1717649	2233121	30.0%	HOOK
样本 12	335000	946947	>30	742994	981144	32.1%	HOOK
样本 13	1000000	363059	>30	297572	398779	34.0%	HOOK
样本 14	3350000	162871	>30	135756	184090	35.6%	HOOK
样本 15	10000000	58143	>30	46580	64473	38.4%	HOOK
样本 16	33500000	15674	8.15	12274	17359	41.4%	HOOK
样本 17	100000000	2379	0.76	1902	2693	41.6%	HOOK

[0177] 注:C肽常规检测的检测范围为0-30ng/ml,超出检测上限样本显示浓度为>30ng/ml。

[0178] 由表6和图3可知,常规检测高浓度抗原梯度稀释的样本,浓度上升到10000ng/ml信号值随浓度升高而增高,浓度继续升高,信号值随C肽浓度升高而降低,即浓度大于

10000ng/ml则HD-HOOK,10000ng/ml的样本9即为峰值校准品,R0为23.3%。

[0179] 在常规检测中,检测范围为0-30ng/ml,超出检测上限样本显示浓度为>30ng/ml。当HD-HOOK效应样本浓度持续升高,信号持续下降,就会出现将超高浓度样本报告成偏低浓度情况,如样本16、17。故而在常规检测中就不能分辨待测样本的检测结果是真实浓度还是超高值样本受HD-HOOK效应影响而报告的偏低浓度。

[0180] 实施例5:检测样本中乙型肝炎病毒表面抗体(HBsAb)验证本发明方法有效性

[0181] 采用依据本发明的一种鉴别HI)-HOOK样本的方法所涉及的试剂盒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。所述试剂盒包括校准品1-校准品6、峰值校准品、试剂1(发光抗原,亦即,抗原包被的发光微粒)、试剂2(生物素标记抗原,亦即生物素标记的抗原)。

[0182] 校准品1-校准品6:常规试剂盒中的已知浓度样本,浓度远小于HOOK样本,作标准曲线计算待测物浓度。

[0183] 峰值校准品的选取:将已知的HOOK样本梯度稀释,常规检测其信号值,选取信号值最高的样本作为峰值校准品,在本实验中即为样本9,小于此浓度样本不会发生HOOK效应,而高于此浓度就有HOOK效应。其A值记为R0作为判断待测物是否HOOK的临界值。

[0184] 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的样本的浓度值。

[0185] 常规检测方法:将校准品1-校准品6、峰值校准品和待测样本1-14,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,光子计数器读数,读取RLU,结果如下表所示。

[0186] 采用本发明两次读数法:将校准品1-校准品6、峰值校准品和待测样本1-14,试剂1(HBsAg包被的发光微粒)和试剂2(生物素标记的HBsAg),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:

[0187] 表7:

[0188]

	样本	实际浓度	常规检测结果		本发明检测结果			
		浓度 mIU/ml	RLU	浓度 mIU/ml	RLU1	RLU2	增幅 A	浓度 mIU/ml
校准品	校准品 1	0	524	0	498	523	5.0%	0
	校准品 2	10.23	3548	10.23	3188	4049	27.0%	10.23
	校准品 3	71.95	21493	71.95	17403	22854	31.3%	71.95
	校准品 4	213.65	64993	213.65	50526	67526	33.6%	213.65
	校准品 5	584.26	181544	584.26	133863	180954	35.2%	584.26

[0189]

待测样本	校准品 6	1026.18	342125	1026.18	255651	347371	35.9%	1026.18
	峰值校准品 (样本 9)	10,000	1050237	>1000	775542	1066620	37.5%	>1000
	样本 1	1	703	0.6	652	737	13.0%	0.58
	样本 2	3	1257	2.48	1182	1424	20.5%	2.58
	样本 3	10	3443	9.87	2876	3592	24.9%	9.02
	样本 4	33	9387	30.24	7743	10124	30.8%	28.78
	样本 5	100	31033	103.93	25555	33721	32.0%	107.83
	样本 6	335	101781	332.87	79257	106917	34.9%	341.56
	样本 7	1,000	341483	>1000	259926	352344	35.6%	>1000
	样本 8	3,350	757906	>1000	570542	781231	36.9%	>1000
	样本 9	10,000	1050237	>1000	775542	1066620	37.5%	>1000
	样本 10	33,500	985422	>1000	753452	1039798	38.0%	HOOK
	样本 11	100,000	576535	>1000	415949	577782	38.9%	HOOK
	样本 12	335,000	258461	802.57	184878	259170	40.2%	HOOK
	样本 13	1,000,000	107739	352.22	75811	109111	43.9%	HOOK
	样本 14	3,350,000	44514	147.9	33501	48374	44.4%	HOOK

[0190] 注:HBsAb常规检测的检测范围为0-1000mIU/ml,超出检测上限样本显示浓度为>1000mIU/ml。

[0191] 由表7和图5可知,常规检测高浓度HBsAb梯度稀释的样本,浓度上升到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10000mIU/ml则HD-HOOK,10000mIU/ml的样本9即为峰值校准品,R0为37.5%。

[0192] 在常规检测中,检测范围为0-1000mIU/ml,超出检测上限样本显示浓度为>1000mIU/ml。当HD-HOOK效应样本浓度持续升高,信号持续下降,就会出现将超高浓度样本报告成偏低浓度情况,如样本12、13、14。故而在常规检测中就不能分辨待测样本的检测结果是真实浓度还是超高值样本受HD-HOOK效应影响而报告的偏低浓度。

[0193] 本发明方法通过两次读数来鉴别HOOK样本。每个待测样本先后检测到信号值结果RLU1、RLU2,将第二次读数的增幅 $A = (RLU2/RLU1 - 1) \times 100\%$ 作为判断样本浓度的指标之一。由表7和图6可知,信号值随浓度续升高到10000mIU/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。故直接比较待测样本的A值与校准品的A值,即可判断待测样本浓度与校准品浓度的大小关系。样本10~14的增幅A均大于峰值校准品的增幅R0(37.5%),表明样本10~14的HBsAb浓度均大于10000mIU/ml,为HD-HOOK样本。这与实际浓度相符,样本12、13、14信号值低于校准品6,常规方法检测浓度分别为802.57mIU/ml、352.22mIU/ml、147.9mIU/ml,通过本发明方法能鉴别其为HD-HOOK效应样本,需进行稀释检

测。

[0194] 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。

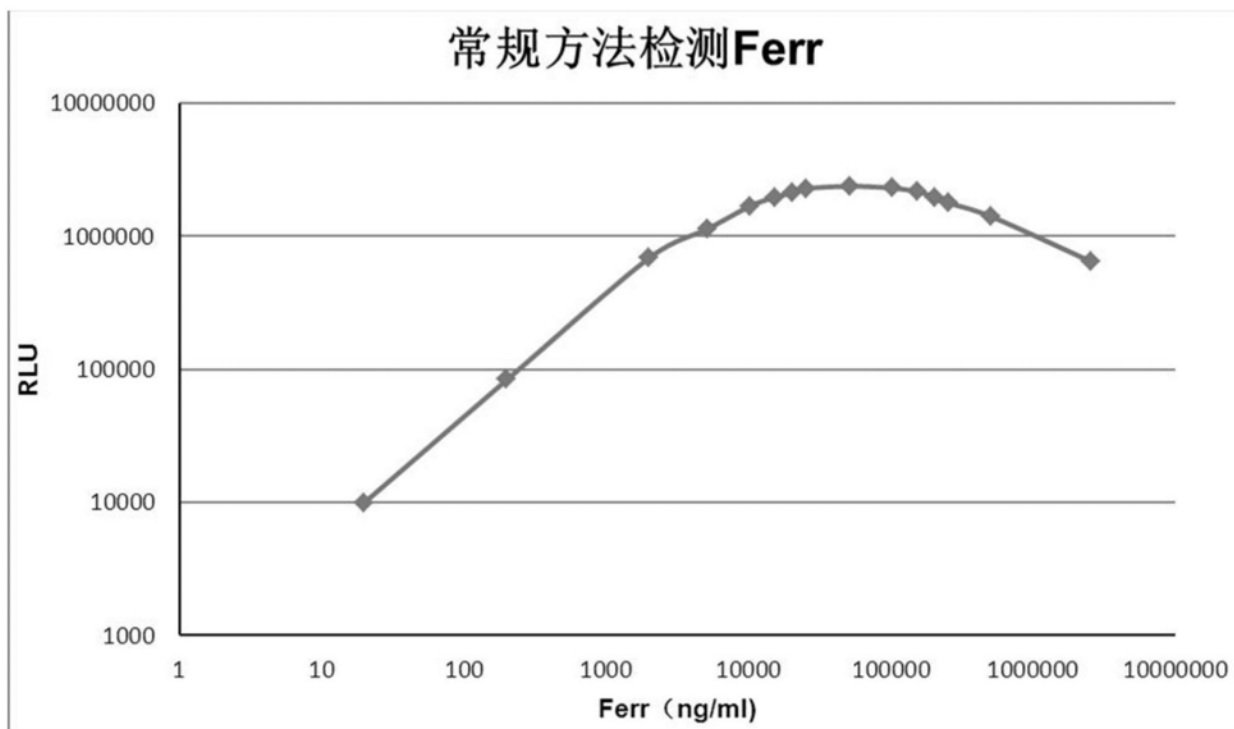


图1

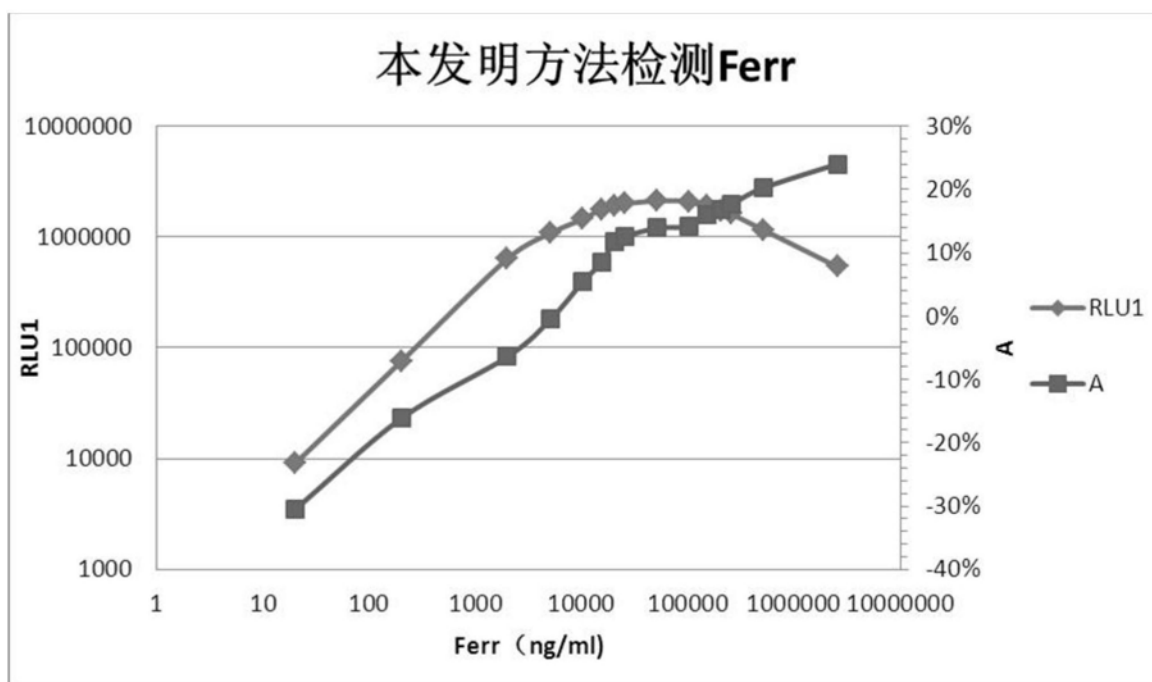


图2

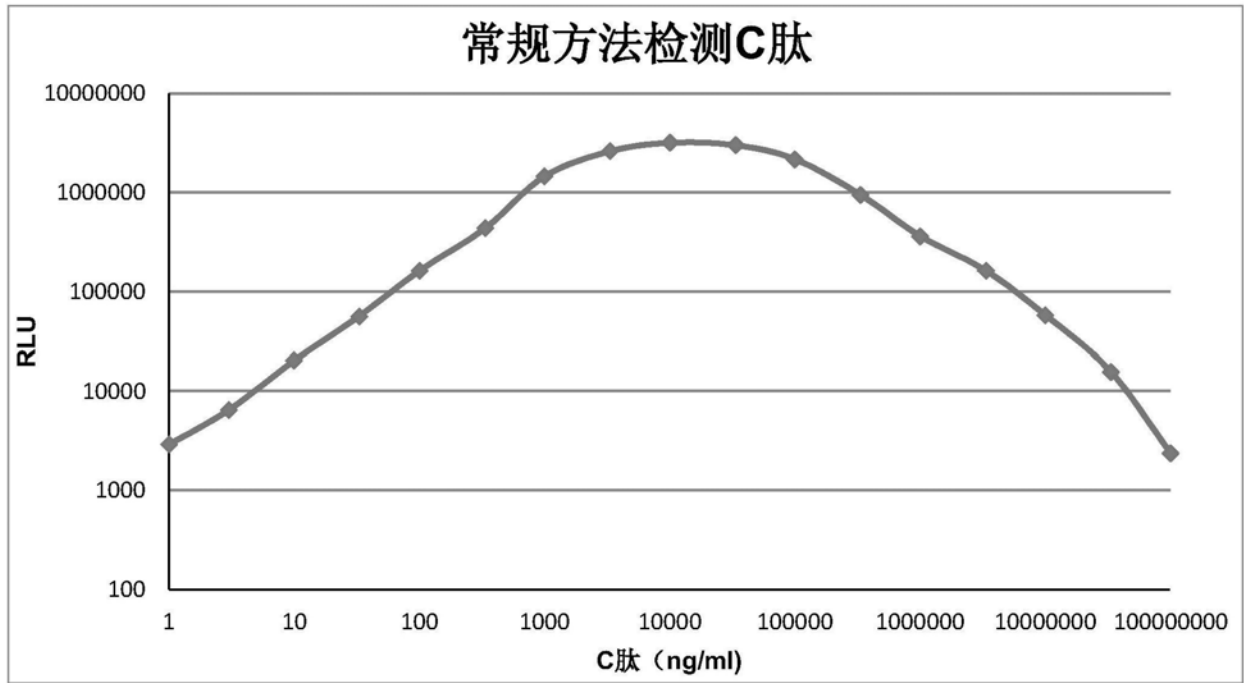


图3

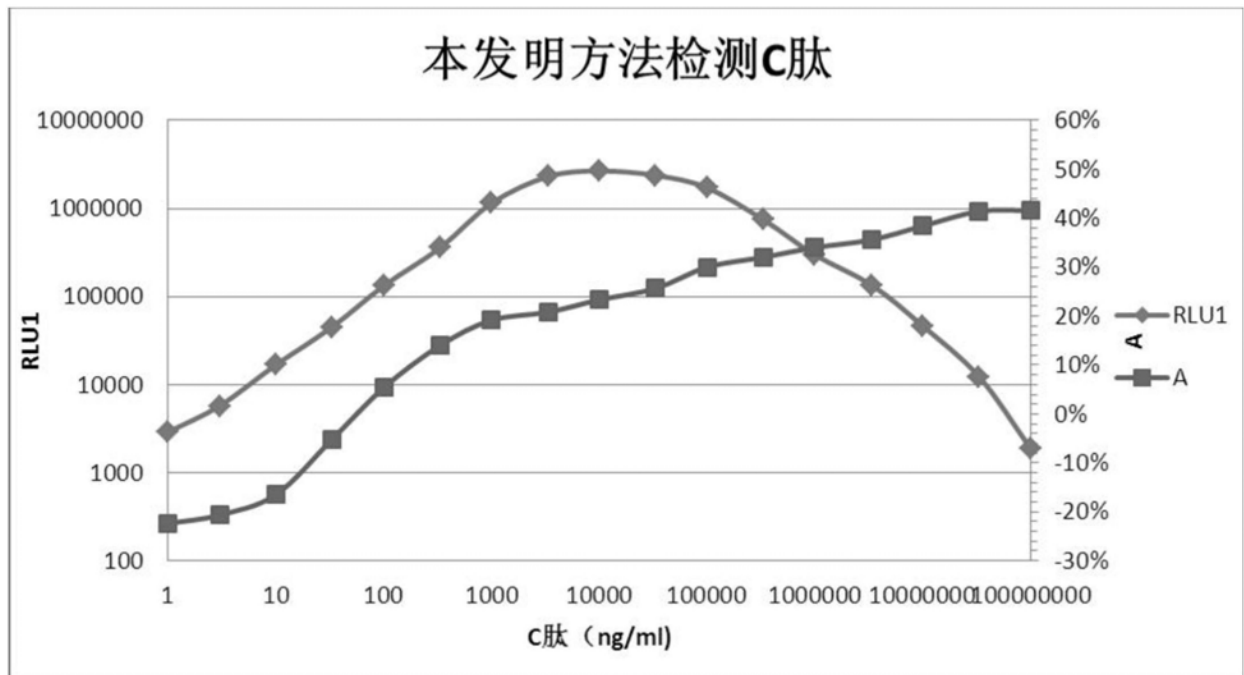


图4

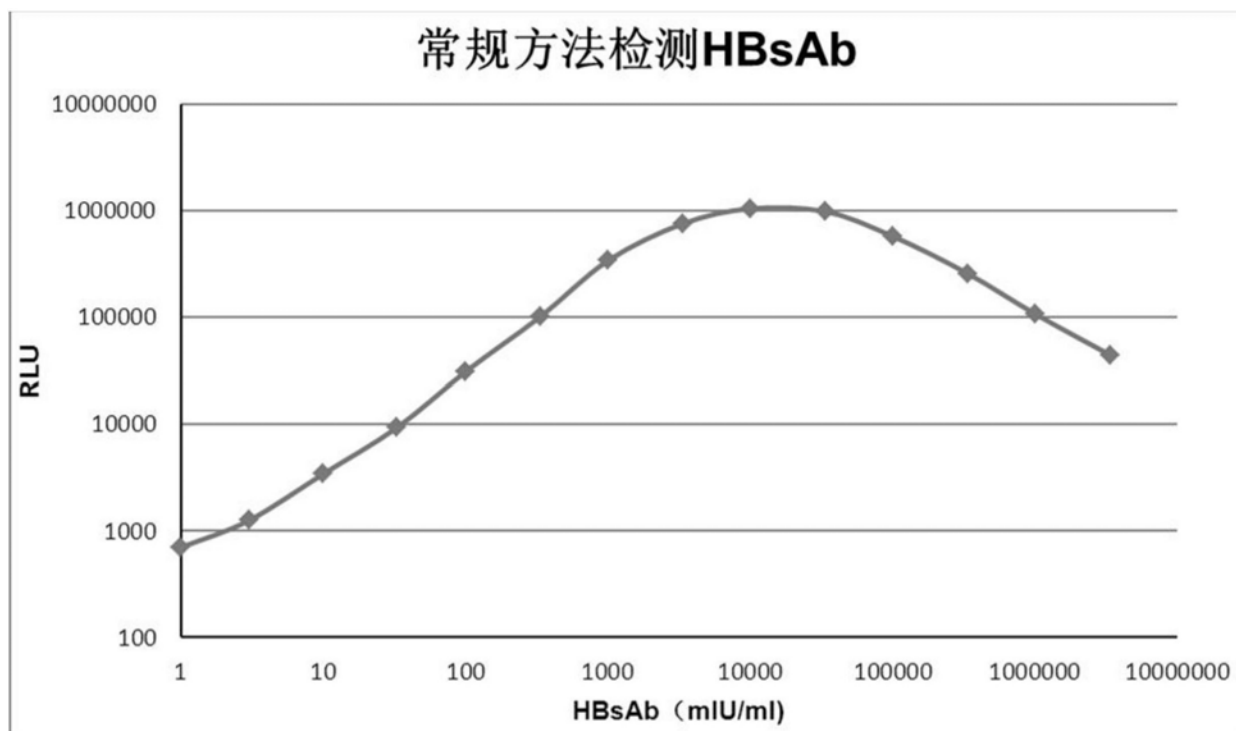


图5

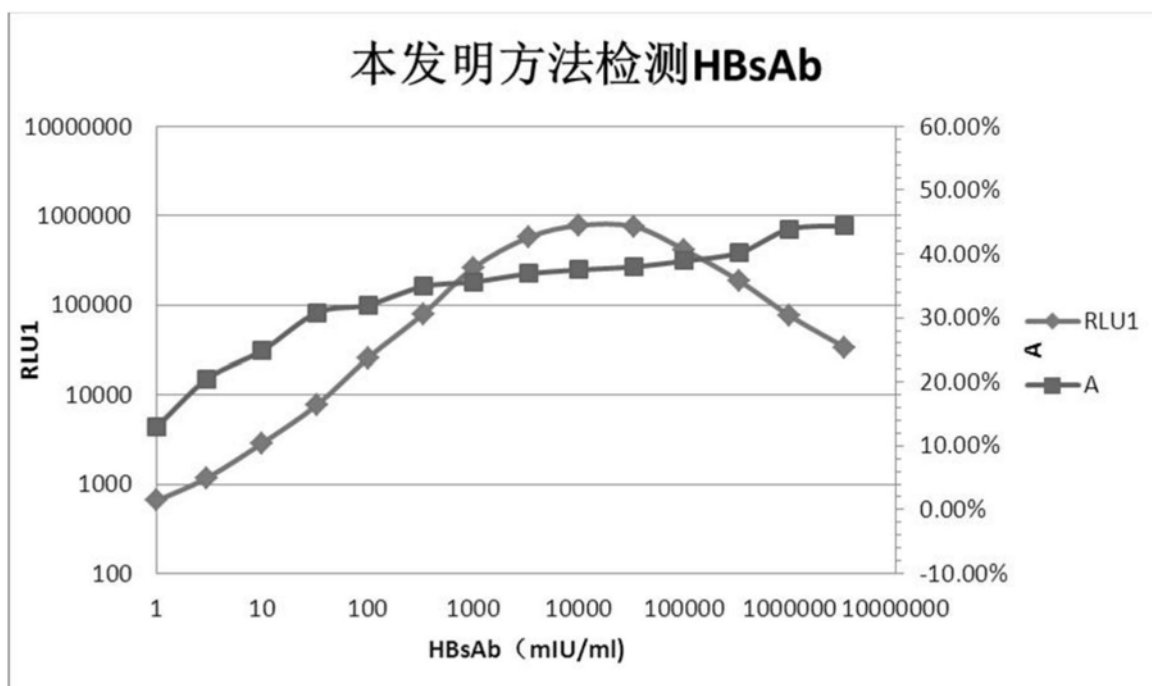


图6

专利名称(译)	鉴别HD-HOOK效应样本的方法和鉴定免疫测定中的HD-HOOK效应的系统		
公开(公告)号	CN108204959A	公开(公告)日	2018-06-26
申请号	CN201611034252.1	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	G01N21/63 G01N33/577 G01N33/576 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N21/636 G01N33/53 G01N33/54313 G01N33/576 G01N33/577 G01N2021/637		
代理人(译)	谢燕军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种鉴别HD-HOOK效应样本的方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：对校准品、峰值校准品、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，将峰值校准品的第二次和第一次读数之间差值的增幅A记为R0，对比待测样本的第二次和第一次读数之间的增幅A是否大于R0，如果大于R0则样本具有HD-HOOK效应，如果小于R0则不具有HD-HOOK效应。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。

	样本	RLU (1)	RLU (2)	增幅 A	浓度 IU/ml
校准品	校准品 1	422	480	14%	0.00
	校准品 2	837	963	15%	0.10
	校准品 3	1810	2178	20%	0.90
	校准品 4	36396	45223	24%	27.56
	校准品 5	200089	250799	25%	156.46
	校准品 6	396371	502928	27%	336.56
	峰值校准品	1067534	1393208	31%	
待测样本	样本 1	144451	202472	40%	HOOK
	样本 2	145010	206857	43%	HOOK
	样本 3	232678	318684	37%	HOOK
	样本 4	415121	534674	29%	368.29
	样本 5	349098	468840	34%	HOOK
	样本 6	83799	123879	48%	HOOK
	样本 7	171530	211953	24%	137.07
	样本 8	199010	251351	26%	159.34
	样本 9	375057	498512	33%	HOOK
	样本 10	325790	409503	26%	250.82
	样本 11	225486	282838	25%	188.59
	样本 12	97703	141949	45%	HOOK