



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101762688 A

(43) 申请公布日 2010.06.30

(21) 申请号 200910062674.3

*G01N 33/533* (2006.01)

(22) 申请日 2009.06.12

(71) 申请人 华中科技大学同济医学院附属同济  
医院

地址 430030 湖北省武汉市汉口解放大道  
1095 号

(72) 发明人 李方和 张春燕 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

(51) Int. Cl.

*G01N 33/53* (2006.01)

*G01N 33/543* (2006.01)

*G01N 33/569* (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法

### (57) 摘要

抗原特异性相关多类抗体相对绝对含量同步检测实验方法,该方法利用不同类型抗体在同一系统中与对应抗原发生竞争性反应,其结合数量与标本中各自含量相对应的检测方法,在同一次实验对同一个标本中至少两类具有相同抗原特异性的抗体的绝对含量进行定量检测,并据此计算出它们之间的相对含量,所述绝对含量是指上述被测定的各类抗体在受检者血清中的含量水平,相对含量指上述被测定的各类抗体在实验标本中含量的相对百分率比较。该方法适用于各类抗体的分类定性、定量检测,以及它们之间相对含量的测定,同时也适用于其它具有共同抗原决定簇的相关物质,如某些具有同工异构及其序贯降解特征的物质及其物质系列等进行检测。

1. 抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法,该方法利用不同类型抗体在同一系统中与对应抗原发生竞争性反应,其结合数量与标本中各自含量相对应的检测方法,在同一次实验对同一个标本中至少两类具有相同抗原特异性的抗体的绝对含量进行定量检测,并据此计算出它们之间的相对含量,所述绝对含量是指上述被测定的各类抗体在受检者血清中的含量水平,相对含量指上述被测定的各类抗体在实验标本中含量的相对百分率比较。

2. 根据权利要求1所述的抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法,其特征是所述的具有相同抗原特异性的抗体为存在于人或动物感染者个体血清或体液中,具有同一抗原结合特性的 IgM、IgG、IgA、IgD 或 IgE 型抗体及其它们的亚类等。

3. 根据权利要求1所述的抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法,其特征是所述检测方法为:将被靶抗原包被的固相载体与待检标本混合,待同一标本中不同类型抗体竞争性结合到同一固相载体上的固相化抗原上后,再与采用几种不同物质标记的示踪抗体反应,在相应的检测仪器上进行检测,并与阴性对照标本、阳性对照标本和空白对照标本进行对比,计算出绝对含量和相对含量。

4. 根据权利要求3所述的抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法,其特征是所述检测仪器为流式细胞仪。

5. 根据权利要求3所述的抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法,其特征是所述固相载体是一种大小与质地均一规则,对高分子多肽具有特殊吸附能力,直径在 0.1-50 微米之间的微球,其应用特征与流式免疫微球相同。

6. 根据权利要求3所述的抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法,其特征是所述固相载体上的固相化抗原为经纯化处理的以全基因重组真核细胞或原核细胞表达的靶抗原产物,或其免疫原性相似或相同的自然表达、非全基因表达及化学合成的蛋白或多肽。

7. 根据权利要求3所述的抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法,其特征是所述示踪抗体为抗人 IgG-FICT 和抗人 IgM-PE,或为抗人 IgG-PE 和抗人 IgM-FICT;示踪抗体上荧光标记分子采用 FICT、PE 或 PE-CY 15。

8. 根据权利要求1至7中任一权利要求所述的抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法,其特征是所述检测实验方法的具体实验步骤为:将被靶抗原包被的固相载体分配到各试验管中;在不同实验管中分别加入待检标本,阴性对照标本,阳性对照标本和空白对照标本,育温反应并洗涤;向每个实验管中分别加入示踪抗体,育温反应;将各实验管在流式细胞仪上检测,根据检测结果绘制各类 Ig 的标准曲线,并根据标准曲线求得各试验管中各类抗体的相对与绝对含量。

## 抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及血清免疫学检测领域,尤其涉及一种抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法。该方法在适用于各类抗体的分类定性定量检测与相对含量检测的同时,也适用于其它具有共同抗原决定簇的相关物质(如某些具有同工异构及其序贯降解特征的物质系列)的测定。

### 技术背景

[0002] 总体技术背景:

[0003] 抗体又称为免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)是一组在抗原物质的刺激下,由生物体内产生,能与对应抗原发生结合反应的免疫分子。人类抗体包括 IgG、A、M、D 与 E 等类五类(及其亚类),不同类抗体结构、功能、含量、产生部位及其产生时机均存在区别。这类物质在体内能清除抗原或病原性物质,防止致病性抗原对机体的再感染,在体外能与特定的抗原发生可见或可以检测的免疫反应现象,从而作为机体病原体(或某些抗原)既往与现症感染的特异性诊断指标,在临床诊断、流行病学与预防医学研究中发挥重要的作用。在某些特殊情况下此类抗体还能引发一些特殊的病理过程。

[0004] 抗体的临床检测分为非特异性与特异性抗体检测两大类,前者(包括血清丙种球蛋白检测,以及不同种类 Ig 的检测等)用于机体免疫状态的一般评价。特异性抗体检测对疾病诊断意义的研究开始于 18 世纪的中后期,早期检测的目的旨在确证受检者是否存在对应病原物的感染。检测方法包括环状沉淀,多种琼脂扩散实验、电泳实验、凝集实验、补体结合实验,以及粘附与粘附抑制实验等多种。这些方法受其敏感性、特异性及稳定性等多种限制,仅能进行初步的定性或半定量检测。而只有在标记免疫学等现代检测技术发展渐趋成熟,抗体的定量检测与分类检测才获得临床应用的技术基础,并受到临床与流行病学研究学者的关注。在最近的三十余年中,随着检验技术水平逐步提高与国民经济实力的日渐增强,血清特异性抗体检测的范围与内涵不断得以开发与拓展。迄今为止,针对同一抗原的特异性抗体的分类检测已见诸报道项目包括 IgM、IgG 及 IgG<sub>1</sub>、IgA、IgA<sub>1</sub> 与 IgA<sub>2</sub>、以及 IgE 等各种不同类型与亚类,其检测结果在诊断患者致病原因,评价疾病进程与分型、致病物质入侵途径与侵犯部位,以及对应抗原存在状况等方面的作用均不尽相同。

[0005] 上述指标中,由于特异性 IgM 抗体在接受抗原刺激后出现时间最早,IgG 型抗体在体内的含量最高且持续存在时间最长,因而它们在实施疾病病原学诊断,阐述疾病分型与进程、流行病学状态及其在预防医学研究中所起的作用是其它任何指标均无法取代的。为降低早期检测的技术难度并提高方法的敏感性,血清总抗体活性检测(即不分类别,多种类型抗体活性同时检测)指标应运而生,并在临床检测中得到广泛应用。为深入发掘抗体检测在流行病与预防医学研究中的价值,多种特异性 IgM 与 IgG 分类检测的方法得以先后建立,两者在外周血液与体液中含量的动态变化得到系统的研究,两者同一时间断面比率(即相对含量)改变在流行病学与预防医学中的意义亦受到一定程度的关注与评价。但受实验方法限制,对此两者相对含量的检测一直未能得以开展。

[0006] 标记免疫学包括放射免疫、酶免疫及其荧光免疫三类,各类实验同时包含多种不同的反应方式,他们在特异性、敏感性、稳定性、操作的便捷性,以及对环境影响的抗性等多种技术特征上各不相同。就其宏观发展进程而言(近四十年来)标记免疫学技术发展还可分为定性检测,定量检测及其多指标集约化检测等几个主要阶段,不同阶段技术在临床应用上相互交叉渗透但并不完全互相取代。其中以 ELISA 与荧光(或化学发光)检测技术等两类方法在抗体检测中的应用最多。流式免疫微球分析、蛋白芯片技术、及其光激化学发光技术等则是现代技术进步的典型代表。就其反应模式而言各层面技术均有其各自经典的反应程序,独到的优势与缺点,并因而为各自的发展留下了独立或相互交叉的空间,并为新的实验方法的建立提供了广阔而多样化的技术舞台。

[0007] 单一检测技术背景举例:

[0008] 现就血清抗 HBc 标志检测技术背景叙述如下

[0009] 1. 乙肝病毒感染状况

[0010] 乙肝是世界上流传最广,感染人数最多(4.5 亿以上)的感染性疾病。对该病的传播,治疗与预防已经构成目前世界上最大的公共卫生问题。

[0011] 中国是世界上乙肝病毒感染流行最广的国家之一,其感染人数最多(现症感染超过三亿),预防任务最重,对我国国民经济的影响最大,已经成为国家及其卫生部门最为关注的首要公共卫生问题。

[0012] 2. 血清乙肝病毒标志检测状况

[0013] 第一线检测标志 HBsAg 抗 HBs HBeAg 抗 HBe 抗 HBc

[0014] 总抗体

[0015] 第二线检测标志 抗 HBc-IgM, pre S1 ;HBV DNA

[0016] 第三线检测标志 其它抗原标志:(DNAPase ;HBcAg ;HBxAg ;)

[0017] 其它抗体标志:

[0018] 分子生物学标志:DNA 测序 ;亚型检测 ;变异类型检测

[0019] 3. 抗 HBc 检测的实验指标与方法

[0020] 抗 HBc 总抗体:临床一线标志

[0021] 抗 HBc-IgM:临床二线标志

[0022] 抗 HBc-IgG、G1、A、A1、A2、E:科研及特殊临床现象解释

[0023] 抗 HBc-IgG/M 比值的检测:早期在对抗体产生规律的阐述中曾有所涉及。未见专门检测方法(在各单一抗体检测的基础上脱机推演是其主要的评价方式)。未进入临床应用,亦未作为正式的科研指标。

## 发明内容

[0024] 本发明的目的是针对上述背景技术中存在的不足,在血清特异性抗体检测领域提出一种抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法,并以此大力提升血清特异性抗体检测在临床、流行病学、及其预防医学研究领域中的价值。

[0025] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法,该方法利用不同类型抗体在同一系统中与对应抗原发生竞争性反应,其结合数量与标本中各自含量相对应的检测方法,在同一次实验对同一个标本中至少

两类具有相同抗原特异性的抗体的绝对含量进行定量检测,并据此计算出它们之间的相对含量,所述绝对含量是指上述被测定的各类抗体在受检者血清中的含量水平,相对含量指上述被测定的各类抗体在实验标本中含量的相对百分率比较。

[0026] 在上述方案中,所述的具有相同抗原特异性的抗体为存在于人或动物感染者个体血清或体液中,具有同一抗原结合特性的 IgM、IgG、IgA、IgD 或 IgE 型抗体及其它们的亚类等。具体检测组合往往局限在其含量相对接近,并具有特殊临床与科学价值的某些(两到三种)抗体种类或亚类。

[0027] 所述检测方法为:

[0028] 抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测,原则上可采用所有标记免疫学技术,流式荧光免疫微球实验作为阐述该发明的技术基础。其检测过程包括将被靶抗原包被的固相载体与待检标本混合,待同一标本中不同类型抗体竞争性结合到同一固相载体上的固相化抗原上后,再与采用几种不同物质标记的示踪抗体反应,在相应的检测仪器上进行检测,并与阴性对照标本、阳性对照标本和空白对照标本进行对比,计算出绝对含量和相对含量。

[0029] 检测仪器、试剂与器材根据试验方法的选择定,以流式荧光免疫微球技术为例,所述检测仪器可以为流式细胞仪。

[0030] 所述固相载体可以是一种大小与质地均一规则,对高分子多肽具有特殊吸附能力,直径在 0.1-50 微米之间的微球,其应用特征与流式免疫微球相同。

[0031] 所述固相载体上的固相化抗原可以为经纯化处理的以全基因重组真核细胞或原核细胞表达的靶抗原产物,或其免疫原性相似或相同的自然表达、非全基因表达及化学合成的蛋白或多肽。

[0032] 所述示踪抗体可以为抗人 IgG-FICT 和抗人 IgM-PE,或为抗人 IgG-PE 和抗人 IgM-FICT;其示踪抗体上标记的荧光分子为 PE、FICT、PE-cy15,或其它多种类似的荧光分子。

[0033] 所叙述用于各类特异性靶抗体检测的阴性对照、阳性对照、空白对照以及定量检测阳性标准血清等与常规标记免疫检测试验(如 ELISA 与化学发光等)大致相同,其制剂质量与靶物质含量的标定严格参照 WHO 及中国药品与生物制品鉴定所颁发的标准。

[0034] 在上述方案中,所述检测方法的具体实验步骤为:将固相载体分配到各试验管中;在不同实验管中分别加入待检标本,阴性对照标本,阳性对照标本、空白对照标本、以及不同浓度的定量测定标准品系列,育温反应;向每个实验管中分别加入荧光标记的混合示踪抗体,育温反应,洗涤并将其悬浮在测定液中;采用流式细胞仪对各实验管进行检测,根据定量标准管检测结果绘出各类 Ig 的标准曲线;根据待检标本检测信号在各自的标准曲线上分别查出不同类 Ig 的绝对含量;根据绝对含量计算出待检标本中不同 Ig 的含量的比值(相对含量),并报告实验结果。

[0035] 本发明采用单一抗原包被的微球,能在同一个标本和同一次实验中同时检测出至少两类具有相同抗原特异性的抗体的绝对含量,同时得出它们之间绝对含量的比值(相对含量);在同一体系中加入两套(或以上)大小不同,包被抗原不同的免疫微球,即能在同一实验标本中,经同一次实验完成针对两种(或多种)抗原物质的对应抗体的多种类型抗体相对与绝对含量的分析,其检测内涵可根据需要成倍增长。

[0036] 本发明所使用的实验设备（如流式细胞仪）应具有强大的记忆、分析与多渠道输出功能，能同时显示几种抗体的绝对含量，并在机（亦可脱机）计算出两者的相对含量（%）。

[0037] 本发明所述绝对含量是指上述受检抗体在受检者血清中的含量水平，通常用抗体活性单位（国际单位或毫国际单位。血清抗 HBc 检测目前采用 NCU/ml）表示，也可采用它们在检测中所表现的信号强度，或以其为依据计算出的其它计量方法（如质量单位或微克当量单位）表示之；相对含量指上述被测定的各类抗体在实验标本中含量的相对百分率比较，或单一被检测抗体占其被检测抗体总活性（或含量）的比率。

[0038] 本发明的效果及优点：

[0039] 1、本发明能很好地解决两种或多种类型抗体同步定量检测问题，其检测效果等于或优于（借助在机校正作用）其它单一抗体检测技术；

[0040] 2、本发明的实施能以几类特异性抗体绝对含量检测为依托，在机或脱机计算它们之间的相对含量，与既往分别检测脱机计算的方法相比，在方法上大为简化，在结果的可比性上大幅度提高，其临床的实用性因而得到显著增强。

[0041] 3、本发明各类抗体比率的确定以它们在反应体系中对固相抗原竞争性结合的能力为依据，其比率与反应体系中抗体数量的多少无关，即便缺少准确的定量标准，在相对控制实验条件的前提下，仅凭相互间检测信号的强度即可客观地评价它们之间的相对含量。通过引入相对含量检测标准体系（其开发与本专利相关），亦可直观地判读检测结果的相对含量。

[0042] 4、采用传统捕获法进行血清抗体的分类检测，其敏感性欠佳，并易受血清中类风湿因子的干扰；本发明方法的敏感性较捕获法显著提高，并能有效地避开类风湿因子的干扰。

[0043] 5、以流式荧光免疫微球实验技术及其流式细胞仪为依托，可使实验方法同时获得以下优点。

[0044] 1) 敏感性高：可与其它现行试剂（包括化学发光试剂等）相媲美，（用于血清抗 HBc 检测，敏感性超出 5.0NCU/ml）；

[0045] 2) 绝对值定量范围拓宽且具适当的可调节性（利用该仪器信号强度调节功能）；

[0046] 3) 检测信息容量大。利用流式细胞仪的强大信息采集与分析功能，不仅可对单一抗原特异性的多类抗体进行检测，引入不同抗原包被且大小不同的微球进行实验，还可在同一血清中同时检测几种不同抗原特异性的多类特异性抗体；

[0047] 6、以间接抗体反应技术（如间接 ELISA）做分类抗体检测，所描述的绝对含量系几类抗体相互竞争反应后的结果，其测值偏离真值，且其偏离程度各异。本发明在对几类抗体作绝对含量同步检测的同时，由于能同步检测它们之间的相对含量，为其绝对含量的校正提供了依据。因此，相对传统技术而言，本法检测结果可根据需要进行校正，校正后的测值较现行检测结果更为接近真值。

[0048] 7、本发明所提出的检测理念在实验材料、实验技术、检测对象、及其应用范围等方面均具有广阔的拓展空间。

[0049] 本发明的应用范围：

[0050] 检测范围包括 各类抗体的分类定性定量检测与相对含量检测；

- [0051] 具有共同抗原决定簇的相关物质的绝对与相对含量检测。
- [0052] 研究领域 临床诊断 :疾病的分期与分型 ;
- [0053] 流行病学调查 ;隐性感染、现症感染、既往感染的评价 ;
- [0054] 预防医学研究 :既往防护能力与现行预防效果的评价 ;
- [0055] 动物学与兽医学研究 :其应用领域与上述三者同。
- [0056] 专利技术依托 :以流式荧光免疫微球技术为先导,其应用可拓展到现
- [0057] 行全部标记免疫学技术。
- [0058] 应用价值评价 绝对含量检测的应用 :与常规定量检测方法同 ;
- [0059] 相对含量检测的应用 :以乙肝病毒感染为例,不同感染个体对病毒抗原的免疫反应强度可有很大区别,但对其相应抗体(如 G、A、M 等各类抗 HBc 等)产生的顺序与体内消涨方式的既有规律目前尚无作者提出歧见。也就是说,无论体内是否存在对应抗原物质,受检者体内不同类型抗体相对含量(%)的高低对于解释感染者临床、流行病以及预防医学中某些状况的价值显著大于对此类抗体绝对含量(如血清抗 HBc-IgM 含量检测,已被视为 HBV 现症感染的重要临床标志之一)的分别测定。因此,尽管迄今尚无不同类型抗体相对含量检测的报道,这一类指标的建立与应用,对乙肝等相关疾病临床诊断,流行病学以及预防医学研究的发展将会起到十分有力的推动作用。

#### 附图说明

- [0060] 图 1 是系列质控血清检测结果的重叠分析图。
- [0061] 图 2 是系列质控血清靶物质含量与检测信号量效关系的分析图。

#### 具体实施方式

[0062] 为更简洁明确地阐述本发明,在下述实施例的阐述中以“间接流式荧光免疫微球术”为技术载体,以具有相同抗原特异性的 IgG 与 IgM 两类免疫球蛋白的相对与绝对含量的检测为实验目标。通过对血清抗 HBc IgM/IgG 相、绝对含量同步流式免疫微球检测技术的阐述达到诠释本发明内容的目的。

[0063] 实施例 1 的具体内容包括 :①相关抗原与抗体的制备与与纯化 ;②实验试剂的制备(微球制备 ;荧光标记示踪抗体制备 ;多种实验标准与对照品的制备) ;③间接流式免疫微球分析技术建立与优化(反应体系的配制与优化 ;反应程序的设定与优化 ;试剂与设备的应用、调整与发展) ;④临床验证 ;在上述基础上检测部分临床标本,借助现有硬件与软件系统实时显示并报告检测结果。

[0064] 在上述前提下所设定的间接荧光免疫微球法,其具体实验步骤为,将微球溶溶处理(或不处理),然后分配到各试验管中 ;在不同实验管中分别加入待检标本,阴性对照标本,阳性对照标本、空白对照标本、以及不同浓度的定量测定标准品系列,育温反应并洗涤 ;向每个实验管中分别加入不同标记示踪抗体的混合物,同上反应及洗涤 ;将各实验管在流式细胞仪上检测,据此绘出各标准曲线 ;以此为依据计算出待检标本两类具有相同抗原特异性抗体的绝对含量,以及两者含量的比值(相对含量)。

[0065] 在同上反应体系中引入不同荧光素标记的抗人 IgG、IgM 与 IgA 抗体,并适当修改流式荧光免疫微球检测的分析程序,即可进行三类不同抗 HBc 抗体的绝对与相对含量的检

测。该法的简介见实施例 2。

[0066] 实施例 1 :血清抗 HBc-IgM 与抗 HBc-IgG 抗体相、绝对含量同步检测

[0067] 实验方法

[0068] 检测目标 :

[0069] 血清抗 HBc 特异性 IgM 与 IgG 含量,及两者含量比值(即相对含量)。

[0070] 试剂、仪器与实验材料 :

[0071] 1、微球(或称固相载体):特殊制备,粒度均一,大小约 0.5-50  $\mu\text{m}$ ,其功能与流式荧光免疫微球的固相吸附材料类似。微球制备方法不在本专利范围。主要用途如下:

[0072] 1) 空白校正微球(本底校正,兼作微球体积校正)包被无干蛋白,同步参与实验反应。

[0073] 2) 实验检测微球:HBcAg 抗原包被,用于不同类型抗体的竞争性结合与示踪;(上述微球分别制备,按比例混合,以 5~10%比例混悬在保存液中,0-4 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存。临用前摇匀后取样、稀释成 0.05-2.00%浓度,用于实验检测。)

[0074] 3) 固相抗原:全基因重组 HBcAg 真核细胞表达产物纯品;

[0075] 2、标准品 根据需要制备标准品。制备方法与本专利相关联。

[0076] 主要种类如下。

[0077] 1) 阴性对照血清:自社会人群随机采集,其特征与常规抗 HBc 检测同;

[0078] 2) 抗 HBc IgG 阳性对照血清;自乙肝感染相关人群采集,主要特征与常规抗 HBc 检测质控物同。其制剂分高浓度(定量或不定量),或既定浓度即用型两种,抗 HBc IgG、IgM 及其两者的相对含量被控制在既定范围。

[0079] 3) 抗 HBc IgM 阳性对照血清;自乙肝感染相关人群采集,主要特征与常规抗 HBc 检测质控物相同,其制剂分高浓度(定量或不定量),或既定浓度即用型两种,抗 HBc IgG、IgM 及其两者的相对含量被控制在既定范围。

[0080] 3、荧光标记(示踪)抗体:

[0081] 混合示踪抗体,内含抗人 IgG-FICT 与抗人 IgM-PE,分别标定两者效价,适当比例混合,低温保存,临用时稀释,(或稀释成即用状态,低温保存在效期内使用)。

[0082] 4、实验缓冲体系:

[0083] 标本稀释液

[0084] 试剂稀释液

[0085] 实验洗涤液

[0086] 5、实验仪器与器材:

[0087] 1) 流式细胞仪(或待研发之专项检测设备)

[0088] 2) 相关实验器材(与流式细胞术所用实验器材同)

[0089] 3) 专有实验分析软件体系(待研发)

[0090] 实验方法:

[0091] 1、血清抗 HBc IgM/IgG 相对与绝对含量的同步检测

[0092] 1) 实验试剂准备

[0093] 微球准备:取混合免疫微球适量,加至实验分析体系中,溶胀 15min,采用相同体系配成 0.1%浓度,(质控参照微球做同样处理),分配至各试验管中,每管 50-100  $\mu\text{l}$ ;在

12 小时内使用；

[0094] 溶液状态下保存的微球,在使用前先混匀,定量吸取,离心洗涤一次,采用相同体系配成 0.1%浓度,分配至各试验管中,每管 50-100  $\mu$  l,在 12 小时内使用备用；

[0095] 质控物准备:自冰箱中取出所需要的标准品,质控物或对照血清,置室温平衡 15-30min 后备用。

[0096] 标本准备:新鲜血清,4 度保存血清,或低温冻存血清。后两者需置室温,待温度平衡后使用。

[0097] 2) 实验操作

[0098] (1) 编号含各类微球的实验管；

[0099] (2) 在不同实验管中分别加入待测血清,不同标准品,或质控与对照(阳性与阴性对照)血清各 10  $\mu$  l,混匀;室温震荡放置(或静置每隔 3-5 分钟摇匀一次)30min；

[0100] (3) 加入洗涤液 0.5-2.0ml,混匀,500g $\times$ 5min 离心洗涤 3 次,恢复至原体积(50-200  $\mu$  l)；

[0101] (4) 加入示踪抗体(酶标记抗人 IgG/IgM 混合物)10  $\mu$  l/管,同上摇匀、反应及洗涤(3 次)；

[0102] (5) 加稀释液至 0.2-1.0ml,摇匀,即可进行上机检测；

[0103] (6) 上机检测与结果分析：

[0104] 阴性对照标本:校正设备基线 在机记忆工作数据；

[0105] 阳性对照标本:根据包被与非包被颗粒校正设备放大系数,

[0106] 并与储存线性数据相关联。在机记忆工作数据；

[0107] 标准曲线制定:启动标准曲线制定程序,依次对各实验标本

[0108] 反应管进行测定,测定结束后在机即刻显示

[0109] 曲线,分析曲线统计数据特征,并相机进行

[0110] 曲线统计修订(此为避免重大显性误差)。经

[0111] 确认后在机记忆曲线数据。供本次检测标本

[0112] 的结果分析,并保留做下次实验参考(模拟

[0113] 曲线见图 1)。

[0114] 临床标本的检测:输入检测标本的编号与临床资料;实施标本

[0115] 检测(限时限量检测,确保检测分析的可重

[0116] 复性);在机记忆、分析并实时显示检测数据;

[0117] 信号重新分析功能:资料的重新分析(资料的锁定,解锁定,

[0118] 及其再度重新分析方式略);

[0119] 实验目标结果:该实验项目举例的检测靶指标包括血清抗

[0120] HBc-IgG 含量;HBc-IgM 含量;血清抗 HBc

[0121] IgM/IgG 比值等三个。

[0122] 绝对含量检测敏感性不低于 5.0NCU/ml;相

[0123] 对含量检测范围 0.1%~99.9%;

[0124] 结果报告方式:以化验单的方式直接打印输出上述实验结果。

- [0126] 联机输出与电子版文件输出方式
- [0127] 屏幕显示方式提示结果分析资料。
- [0128] 实验结果及评价
- [0129] 1、抗 HBc 绝对含量的检测水平,及其临床与流行病学的意义与既往有关检测报道类似;
- [0130] 2、抗 HBc 检测相对含量的检测水平,通常不受其绝对含量检测结果的限制。其抗 HBc IgM/IgG 检测的理论数值通常在 0-99%之间;
- [0131] 3、抗 HBc IgM/IgG 相对含量检测的实际检测结果迄今未见诸文献报道,初步试验显示可出现如下三类典型状况。其在临床与流行病学中的价值有待进一步的研究证实。
- [0132] 1) 抗 HBc IgM/IgG 相对含量大于 50% :急性感染,现症感染窗口期;
- [0133] 2) 抗 HBc IgM/IgG 相对含量 10-30% :现症感染,既往感染早期;
- [0134] 3) 抗 HBc IgM/IgG 相对含量小于 5.0% :既往感染。
- [0135] 4) 实验结果的评价方法图示
- [0136] (1) 信号采集系列质控血清检测信号的检测与重叠显示(见图 1)。
- [0137] (2) 信号分析 系列质控血清检测信号量效关系分析(见图 2)。
- [0138] 实施例 2 :血清抗 HBc-IgG、抗 HBc-IgM 与抗 HBc-IgA 抗体三者相、绝对含量同步检测实验方法
- [0139] 检测目标 :血清抗 HBc 特异性 IgG、A 与 M 三者的含量,以及三者间
- [0140] 含量比值(即相对含量)的检测。
- [0141] 血清抗 HBc 检测技术背景 :同上实施例 1。
- [0142] 试剂、仪器与实验材料 :主要内容同上。不同之处为 :
- [0143] 荧光标记(示踪)抗体 :混合示踪抗体,内含抗人 IgG-FICT、抗人 IgM-PE、抗人 IgA-PE-CY15 三种荧光标记抗体。三者分别标定效价,适当比例混合,低温保存,临用时稀释(或稀释成即用状态,低温保存在有效期内使用)。
- [0144] 标准品区别 :制备方法同上,但在标准品体系中增加抗 HBcIgA 的绝对与相对含量检测参比指标。
- [0145] 专有分析软件 :与实施例 1 存在一定差别,具体待开发。
- [0146] 实验方法 :同上,经检测及分析后得出三类不同抗 HBc 的绝对与相对含量。
- [0147] 本发明所述阴性对照标本为 :自社会人群筛选的靶抗体阴性者的血清或其制备产物,不含具有与靶物质特异性结合能力的 IgG、IgM 与 IgA 等;
- [0148] 所述阳性参比标本为 :自社会人群筛选的靶抗体为阳性者的血清或其制备产物,含有与靶物质特异性结合能力的 IgG、IgM 与 IgA 等;
- [0149] 抗 HBc IgG 定量参比质控血清为 :上述阳性参比标本,其 IgG 抗体与靶物质特异性结合的含量(或能力)被准确标定,以及以该血清制备的含已知抗 HBc IgG 浓度的标准品系统;
- [0150] 抗 HBc IgM 定量参比质控血清为 :上述阳性参比标本,其 IgM 抗体与靶物质特异性结合的含量(或能力)被准确标定,以及以该血清制备的含已知抗 HBc IgM 浓度的标准品系统;
- [0151] 抗 HBc IgA 定量参比质控血清为 :上述阳性参比标本,其 IgA 抗体与靶物质特异性

结合的含量（或能力）被准确标定，以及以该血清制备的含已知抗 HBc IgA 浓度的标准品系统；

[0152] 抗 HBc IgM/IgG 定量参比质控血清为：上述阳性参比标本，其 IgM 与 IgG 抗体与靶物质特异性结合的含量（或能力）被准确标定，并在此基础上制备的，其两类抗体呈不同活性比率的标准品系统；

[0153] 上述 IgG 与 IgM 型靶抗体含量的标定严格参照 WHO 及中国药品与生物制品鉴定所颁发的标准；

[0154] 所述空白对照标本为：不含靶物质抗体的稀释缓冲实验体系或与 HBV 寄主无关的动物血清。

[0155] 用于上述对照及标准血清制备的原料血清，在采集前供血者除部分 HBV 感染相关血清标志物阳性外，HCV 抗体、HIV-1/HIV-2 抗体、梅毒螺旋体等项检测均阴性，血清 ALT 测值大致正常。但因部分 HBV 感染标志阳性，在使用时必须注意个人防护。

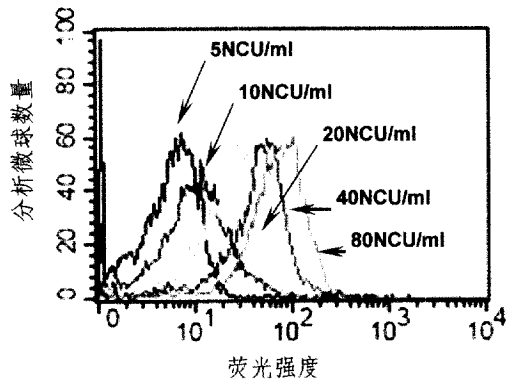


图 1

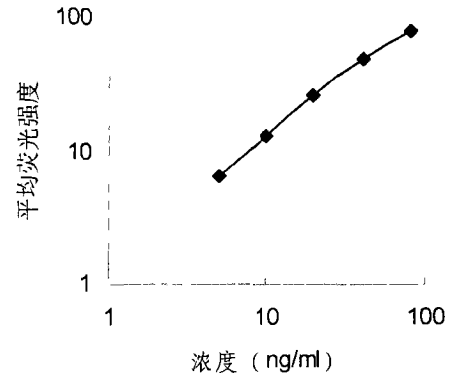


图 2

专利名称(译)	抗原特异性相关类抗体相对绝对含量同步检测实验方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101762688A</a>	公开(公告)日	2010-06-30
申请号	CN200910062674.3	申请日	2009-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	华中科技大学同济医学院附属同济医院		
申请(专利权)人(译)	华中科技大学同济医学院附属同济医院		
当前申请(专利权)人(译)	华中科技大学同济医学院附属同济医院		
[标]发明人	李方和 张春燕 李时君		
发明人	李方和 张春燕 李时君		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

抗原特异性相关多类抗体相对绝对含量同步检测实验方法，该方法利用不同类型抗体在同一系统中与对应抗原发生竞争性反应，其结合数量与标本中各自含量相对应的检测方法，在同一次实验对同一个标本中至少两类具有相同抗原特异性的抗体的绝对含量进行定量检测，并据此计算出它们之间的相对含量，所述绝对含量是指上述被测定的各类抗体在受检者血清中的含量水平，相对含量指上述被测定的各类抗体在实验标本中含量的相对百分率比较。该方法适用于各类抗体的分类定性、定量检测，以及它们之间相对含量的测定，同时也适用于其它具有共同抗原决定簇的相关物质，如某些具有同工异构及其序贯降解特征的物质及其物质系列等进行检测。

