



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104395728 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 04

(21) 申请号 201380033734. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 04. 25

G01N 21/17(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 21/53(2006. 01)

12002952. 5 2012. 04. 26 EP

G01N 21/25(2006. 01)

12196036. 3 2012. 12. 07 EP

G01N 33/53(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/058675 2013. 04. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/160425 EN 2013. 10. 31

(71) 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 T. 布吕克纳 E. 洛佩斯-卡勒

N. 奥兰特 J. 勒德尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 李慧惠 梁谋

权利要求书3页 说明书42页 附图9页

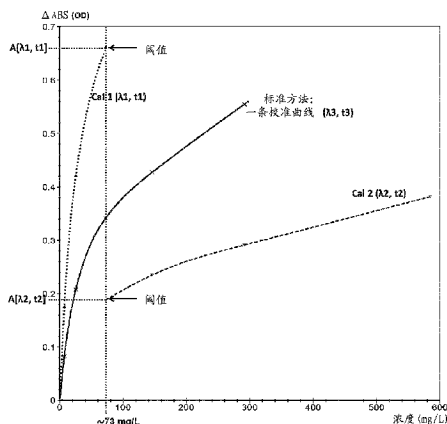
按照条约第19条修改的权利要求书3页

(54) 发明名称

通过生成多个校准曲线改进光度测定法的灵敏度和动态范围

(57) 摘要

本发明涉及用于通过光度测定法测定特定分析物的量的方法,其中样品中所述特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应。生成至少两条校准曲线,针对特定分析物的低浓度优化在第一波长记录的第一校准曲线,从而尽可能提高检测下限,且针对特定分析物的高浓度优化在第二波长记录的第二校准曲线,从而尽可能提高检测上限。优化的检测下限和优化的检测上限导致扩大的动态范围。



1. 用于通过光度测定法测定特定分析物的量的方法,其中样品中所述特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应,所述方法包括以下步骤:

a) 生成至少两条校准曲线,其中

- 将在第一波长记录的第一校准曲线针对特定分析物的低浓度进行优化,从而尽可能提高检测下限,和

- 将在第二波长记录的第二校准曲线针对特定分析物的高浓度进行优化,从而尽可能提高检测上限,

b) 至少在所述第一和第二波长同时测量反应混合物中待测定的样品的特定分析物的光信号,

c) 通过以下标准选择第一或第二校准曲线用于特定分析物的定量:

对于渐增校准曲线:

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定;

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定,

对于渐降校准曲线:

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定;

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定,

d) 通过与选择的校准曲线比较定量特定分析物的量。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中在浊度和比浊免疫测定法中,所述特定分析物从基于所述特定分析物和分析物特异性结合伴侣的凝集的反应混合物的浊度的变化来定量。

3. 根据权利要求 1 的方法,其中在比色测定法中,所述特定分析物在显色剂的帮助下定量。

4. 根据前述权利要求之一的方法,其中所述第一校准曲线在第一波长和在第一反应时间进行记录。

5. 根据前述权利要求之一的方法,其中所述第二校准曲线在第二波长和第二反应时间进行记录。

6. 根据前述权利要求之一的方法,其中在完整反应时间至少在所述第一和第二波长进行反应混合物中待测定的样品的特定分析物的光信号的同时测量。

7. 根据前述权利要求之一的方法,其中将测量结果存储在仪器平台的数据管理系统中。

8. 根据前述权利要求之一的方法,其中任选测定进一步的波长作为用于校正干扰和补偿光度噪声的空白值。

9. 根据前述权利要求之一的方法,其中生成在相同波长和在不同反应时间记录的至少两条校准曲线。

10. 根据前述权利要求之一的方法,其中所述分析物特异性反应伴侣包含在分析物存在的情况下导致颜色变化或浊度变化的结合蛋白、抗原、抗原片段、抗体、抗体片段、核酸、

受体和颗粒增强结合伴侣、酶、底物或特定化学试剂。

11. 用于增加光度测定法的灵敏度和 / 或动态范围的方法, 其中样品中特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应, 所述方法包括以下步骤:

a) 生成至少两条校准曲线, 其中

- 将在第一波长记录的第一校准曲线针对特定分析物的低浓度进行优化, 从而尽可能提高检测下限, 和

- 将在第二波长记录的第二校准曲线针对特定分析物的高浓度进行优化, 从而尽可能提高检测上限,

b) 至少在所述第一和第二波长同时测量反应混合物中待测定的样品的特定分析物的光信号,

c) 通过以下标准选择第一或第二校准曲线用于特定分析物的定量:

对于渐增校准曲线:

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号低于对应的预定阈值, 则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定;

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号超过对应的预定阈值, 则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定,

对于渐降校准曲线:

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号低于对应的预定阈值, 则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定;

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号超过对应的预定阈值, 则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定,

d) 通过与选择的校准曲线比较定量特定分析物的量。

12. 对于特定分析物预先确定的至少两个波长和至少两个反应时间用于生成至少两条校准曲线用于定量光度测定法的特定分析物的量的用途, 其中

- 将在第一波长记录的第一校准曲线针对特定分析物的低浓度进行优化, 从而尽可能提高检测下限, 和

- 将在第二波长记录的第二校准曲线针对特定分析物的高浓度进行优化, 从而尽可能提高检测上限。

13. 根据前述权利要求之一确定最佳波长、反应时间和阈值的计算机执行的方法, 所述方法包括以下步骤:

a) 接受代表在分析仪上同时可得的在完整反应时间在多个波长记录的样品的吸光度值的数据集, 其中所述数据集包括以下的多个数据点:

- 用于校准的标准品,

- 用于测定 LDL 的空白样品,

- 用于测定精确度的至少 2 种样品,

- 稀释系列

b) 通过对于较低浓度使用第一校准曲线用于分析物定量, 且通过对于较高浓度使用第二校准曲线用于分析物定量, 将阈值设定在其中校准曲线从第一校准曲线变化至第二校准曲线的浓度,

c) 测定第一和第二波长以及第一和第二反应时间;分析动力学曲线并选择对于第一校准曲线和第二校准曲线的最佳设置。

14. 计算机可读介质,其包括控制处理器以根据前述权利要求之一确定最佳波长、反应时间和阈值的代码,所述代码包括指令以:

a) 接受代表在分析仪上同时可得的在完整反应时间在多个波长记录的样品的吸光度值的数据集,其中所述数据集包括以下的多个数据点:

- 用于校准的标准品,
- 用于测定 LDL 的空白样品,
- 用于测定精确度的至少 2 种样品,
- 稀释系列

b) 通过对于较低浓度使用第一校准曲线用于分析物定量,且通过对于较高浓度使用第二校准曲线用于分析物定量,将阈值设定在其中校准曲线从第一校准曲线变化至第二校准曲线的浓度,

c) 测定第一和第二波长以及第一和第二反应时间;分析动力学曲线并选择对于第一校准曲线和第二校准曲线的最佳设置。

15. 系统分析仪,所述系统分析仪包含:

- a) 样品容器和测定试剂容器,
- b) 用于接受和混合样品和测定试剂的反应容器,
- c) 用于测量步骤 b 的反应混合物的光度计,

用于输出根据权利要求 1 测定的特定分析物的量的分析结果的装置。

## 通过生成多个校准曲线改进光度测定法的灵敏度和动态范围

### 发明领域

[0001] 本发明涉及用于通过光度测定法测定特定分析物的量的方法,其中样品中所述特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应。生成至少两条校准曲线,针对特定分析物的低浓度优化在第一波长记录的第一校准曲线,从而尽可能提高检测下限,且针对特定分析物的高浓度优化在第二波长记录的第二校准曲线,从而尽可能提高检测上限。

[0002] 在渐增校准曲线的情况下:至少在所述第一和第二波长同时测量反应混合物中待测定的样品的特定分析物的光信号,由此选择第一或第二校准曲线用于特定分析物的定量。如果所述第一和/或第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定。如果所述第一和/或第二波长的光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定。

[0003] 在渐降校准曲线的情况下:如果所述第一和/或第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定。如果所述第一和/或第二波长的光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定。最终,特定分析物的量通过与选择的校准曲线比较来定量。

[0004] 该方法特别涉及用于通过生成至少两条校准曲线通过使用用于测定特定分析物的量的不同的主要波长增加光度测定法的灵敏度和/或动态范围。由此,第一校准曲线记录特定分析物的灵敏检测,而第二校准曲线记录特定分析物上部测量范围。

### [0005] 相关技术

凝集主要是其中大分子之间的表面相互作用导致交联且形成大复合物,导致光散射增加的化学现象。这种大大分子复合物的形成可以使用浊度(turbidimetric)、比浊(nephelometric)或比色(colorimetric)检测来观察。

[0006] 浊度、比浊和比色测定法具有作为不需要任何分离或洗涤步骤的均相测定法的益处。由于其容易的一步程序和其短周转时间,均相免疫测定法(HIA)是用于在自动分析仪中应用的理想候选。均相免疫测定法常规用于在临床化学分析仪上定量血清蛋白、治疗性药物和滥用药物的临床诊断中。到目前为止,标准方法是使用生成一个校准曲线的一个主要波长,其用于在浊度、比浊和比色测定法中测定分析物。

[0007] 尽管可以在临床化学分析仪上用HIA实现优异的检测性能,但仍存在浓度在测量范围之外的患者样品。作为结果,在其中样品浓度超过检测上限的情况下稀释或者对于浓度低于检测限值的样品使用较高样品体积之后,样品必须重新测量。重新测量引起额外费用和时间的损失,这两个因素对于进行那些测定的实验室都是关键的。因此,动态范围的增加将降低重新运行的次数。存在用于解决来自现有技术方法的问题的几种方法。

[0008] EP 1845373 提供了用高浓度的分析物简化样品检查的方法。根据样品是否含有高浓度分析物(前区阳性的(prozone-positive)),不同的校准曲线或单一校准曲线的不同

部分被用于计算分析物的浓度。将样本与抗体混合,并且样品的浊度测量在 340 nm 的主要波长进行。800 nm 的次要波长用于校正干扰。

[0009] US 6,284,472 描述了以下校准方法,所述校准方法由生成两种反应速率测量曲线、使用较高体积的样品生成的第一曲线和使用较小体积的相同样品生成的第二曲线组成。浊度在 340 nm 监测,并通过 700 nm 设置空白。对于高于测定范围的抗原浓度,利用两种速率的高抗原信号避免了报道错误结果。

[0010] JP 06109740 涉及通过在多种具有不同浓度的标准样品上实施光学测量的免疫比浊分析方法。校准曲线响应于在反应的初始阶段和进展后两次测量的光学值和从回归方程计算的虚拟值之间的差异程度来选择。

[0011] JP 06094717 描述了用于判断样品是否在正确的抗原-抗体条件或抗原抗体反应中的前区条件中进行测量的方法。两种波长用抗原-抗体反应溶液照射,以获得吸光度的比率。当被判断为前区条件时,计算偏移因子,并且根据偏移在分析条件下进行重新测试。

[0012] JP 08075740 涉及通过获得多个波长的校准曲线通过比浊分析方法定量抗原-抗体反应的方法。预先确定吸光度的上限,其满足对于每个波长作为定量测定限值的线性度。由此,主题分析组分的浓度通过等于或低于定量测定的最短波长的校准曲线获得。

[0013] 然而,上述提到的工具是远非最佳的,因为所述方法没有解决如何用测量范围以外的患者样品进行(尤其对于自动化系统)的问题。作为结果,在其中样品浓度超过检测上限的情况下稀释或者对于浓度低于检测限值的样品使用较高样品体积之后,样品仍必须重新测量。重新测量,所谓的重新运行,引起额外费用和时间的损失,这两个因素对于进行那些测定的实验室都是关键的。

[0014] 此外,对于几种分析物,两种测试系统可用于测量高分析物浓度,且高灵敏测试系统可用于测定低分析物浓度。例如,对于分析物 CRP(C 反应蛋白),对于低分析物浓度的测定,存在用于心血管风险评价的额外高灵敏度 C 反应(hs-CRP)免疫测定法(Tina-quant Cardiac C-反应蛋白(Latex)高灵敏)。

[0015] 作为结果,存在对于增加光度测定法的灵敏度且扩大光度测定法的动态范围的高需求。新方法应当提供最简化的实施和优异精确度的保留,而没有任何改变试剂及其制剂。

[0016] 待解决的问题

因此,本发明解决的问题是提供改进的浊度、比浊和比色测定法,其提供增加的动态范围和灵敏度。现在已经令人惊讶地发现,生成至少两条校准曲线,在针对特定分析物的低浓度优化(从而尽可能提高检测下限)的第一波长记录的第一校准曲线和在针对特定分析物的高浓度优化(从而尽可能提高检测上限)的第二波长记录的第二校准曲线,导致光度测定法的动态范围和灵敏度的改进。预期本发明克服(至少部分地克服)样品重新测量的问题。

[0017] 发明概述

这些目标中的至少一个通过提供权利要求和下文中定义的主题来实现。在第一个方面,本发明涉及用于通过光度测定法确定特定分析物的量的方法,其中样品中所述特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应。

[0018] 生成至少两条校准曲线,针对特定分析物的低浓度优化在第一波长记录的第一校准曲线,从而尽可能提高检测下限,且针对特定分析物的高浓度优化在第二波长记录的第

二校准曲线,从而尽可能提高检测上限。

[0019] 至少在所述第一和第二波长在反应混合物中同时测量待测定的样品的特定分析物的光信号。通过以下标准选择第一或第二校准曲线用于特定分析物的定量:

对于渐增校准曲线:

- 如果所述第一和 / 或第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定;

- 如果所述第一和 / 或第二波长的光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定。

[0020] 对于渐降校准曲线:

- 如果所述第一和 / 或第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定;

- 如果所述第一和 / 或第二波长的光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定。特定分析物的量通过与选择的校准曲线比较来定量。

[0021] 在浊度和比浊免疫测定法中,样品中的特定分析物从基于所述特定分析物和分析物特异性结合伴侣的聚集的反应混合物的浊度的变化来定量,其中在比色免疫测定法中,样品中的特定分析物在显色剂的帮助下来定量。

[0022] 在第二个方面,本发明涉及用于增加光度测定法的灵敏度和 / 或动态范围的方法,其中针对特定分析物的低浓度优化在第一波长记录的第一校准曲线,从而尽可能提高检测下限,且针对特定分析物的高浓度优化在第二波长记录的第二校准曲线,从而尽可能提高检测上限。

[0023] 在第三个方面,本发明涉及至少两条校准曲线用于定量光度测定法的特定分析物的量的用途,其中针对特定分析物的低浓度优化在第一波长记录的第一校准曲线,从而尽可能提高检测下限,且针对特定分析物的高浓度优化在第二波长记录的第二校准曲线,从而尽可能提高检测上限。

[0024] 发明详述

在第一个方面,本发明涉及用于通过光度测定法确定特定分析物的量的方法,其中样品中所述特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应。

[0025] 生成至少两条校准曲线,针对特定分析物的低浓度优化在第一波长记录的第一校准曲线,从而尽可能提高检测下限,且针对特定分析物的高浓度优化在第二波长记录的第二校准曲线,从而尽可能提高检测上限。

[0026] 至少在所述第一和第二波长在反应混合物中同时测量待测定的样品的特定分析物的光信号。通过以下标准选择第一或第二校准曲线用于特定分析物的定量:对于渐增校准曲线:

对于渐增校准曲线:

- 如果所述第一和 / 或第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定;

- 如果所述第一和 / 或第二波长的至少一种光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定。

[0027] 对于渐降校准曲线：

- 如果所述第一和 / 或第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定；

- 如果所述第一和 / 或第二波长的光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定。特定分析物的量通过与选择的校准曲线比较来定量。

[0028] 本发明的发明人令人惊讶地发现,在两种不同波长和不同反应时间同时测量特定分析物(从一次运行(一次测量)生成至少两条校准曲线)增加了光度测定法的动态范围。

[0029] 光度测定法涵盖浊度和比浊免疫测定法以及比色测定法。在浊度和比浊免疫测定法中,特定分析物从基于所述特定分析物和分析物特异性结合伴侣的凝集的反应混合物的浊度的变化来定量,而在比色测定法中,特定分析物在显色剂的帮助下来定量。

[0030] 在第一(在大多数情况下)短波长在第一反应时间的测量允许关于灵敏度的最佳检测,并且在第二(在大多数情况下)较大波长在第二反应时间的平行测量确保高检测上限,两者都导致相比于仅在一个波长在一个反应时间的测量的扩大的动态范围。作为结果,动态范围的扩大得到实现,而不需要修饰测定试剂和它们的制剂,从而确保了快速且高性价比的实现。随后,根据对于样品获得的信号值,使用合适的校准曲线用于特定分析物的定量。现在可能与标准技术相比增加测定的动态范围。

[0031] 本发明的一个进一步实施方案在于,存在以下情况:在第一反应时间的大波长允许关于灵敏度的最佳检测,并且在第二较小波长在第二反应时间的平行测量确保高检测上限,两者都导致相比于仅在一个波长在一个反应时间的测量的扩大的动态范围。

[0032] 当以竞争性抑制形式进行凝集测定法时,在第一(在大多数情况下)较大波长在第一反应时间的测量允许关于灵敏度的最佳检测,并且在第二(在大多数情况下)较短波长在第二反应时间的平行测量确保高检测上限,两者都导致相比于仅在一个波长在一个反应时间的测量的扩大的动态范围。

[0033] 本发明的一个进一步实施方案在于,存在以下情况:在第一反应时间的小波长允许关于灵敏度的最佳检测,并且在第二较大波长在第二反应时间的平行测量确保高检测上限,两者都导致相比于仅在一个波长在一个反应时间的测量的扩大的动态范围。

[0034] 定义：

如本文中所使用,术语“测定”意指评估、诊断、决定、鉴定、评价或分类样品中的特定分析物是否通过浊度和比浊免疫测定法从基于所述特定分析物和分析物特异性结合伴侣的凝集的反应混合物的浊度的变化来定量,或者特定分析物是否在比色测定法中在显色剂的帮助下来定量。

[0035] 如本文中所使用,术语“量”涵盖分析物的绝对量或所述分析物的相对量和 / 或浓度和 / 或可以与之关联和 / 或可以因此推导的任何值和 / 或参数。

[0036] 如本文中所使用,术语“样品”是指选自血液的体液的样品,即全血,血浆或血清,或尿液,CSF,痰,或是指分离的细胞的样品,或是指来自分别个体的组织或器官的样品。体液样品可以通过众所周知的技术来分离。组织或器官样品可以从任何组织或器官通过,例如,组织活检来分离。分离的细胞可以从体液或组织或器官通过分离技术诸如离心或细胞分选来分离。优选地,来自细胞、组织或器官样品的裂解物从表达或产生本文所述的肽的细

胞、组织或器官中分离。

[0037] 如本文中所未使用,术语“凝集”主要是其中大分子之间的表面相互作用导致交联且形成大复合物的化学现象。这种大复合物的形成导致光散射特性的增加,取决于复合物的尺寸,这可以用肉眼观察或使用浊度和比浊检测光度监测(参见 Christopher P. Price, Encyclopedia of Life Sciences 2001, p. 1-7)。

[0038] 本发明的测定方法可以是任何类型的光散射测定法,特别是浊度、比浊和比色测定法。该测定法可用于测定适于通过浊度、比浊和比色测定法测定的任何特定分析物的量,即对其存在易于被结合的特异性识别分析物的反应伴侣的任何分析物的量。

[0039] 术语“浊度法(turbidimetry)和比浊法(nephelometry)”是本领域已知用于基于测量浊度对光的透射和散射的效果测定溶液中混浊的量或该浊度的方法。液体中的浊度是由细分的悬浮颗粒的存在引起的。如果使光束通过混浊样品,则其强度由散射而降低,并且散射光的量取决于颗粒的浓度和尺寸分布。分光光度计测量增加的浊度(即,强度透射光中光的减少),这是由于由免疫凝集反应导致的渐增的粒径引起的。这种增加的浊度是由分析物引起的免疫凝集的直接量度,或由分析物引起的免疫凝集抑制的间接量度。在比浊法中,测量散射光的强度,而在浊度法中,测量透射通过样品的光的强度。

[0040] 浊度测定法涉及测量当入射光束通过样品时入射光束的强度。光束可以通过悬浮液或被颗粒吸收、反射或散射。作为结果,当光透射通过悬浮液时,光的强度降低。对于非吸收性颗粒,由于散射引起的光强度的降低表示为浊度。

[0041] 比浊测定法是指当入射光束通过样品时,测量从入射光束以定义角度  $\theta$  散射的光。在比浊法中,测量一段时间后的散射光的强度的变化,因为散射物质迅速增加尺寸。当在固定的抗体-胶乳复合物存在的情况下测量时,散射光与初始抗原浓度成比例。进一步的解释描述于 J. A. Molina-Bolivar 等人, Journal of Macromolecular Science, Part C-Polymer Review, 45:59-98, 2005。

[0042] 本发明的免疫测定方法在有和没有微粒增强的情况下用所有已知凝集试验都起作用。

[0043] 本发明中优选使用“微粒增强光散射凝集试验”,这也被称为“颗粒增强浊度免疫测定法”(PETIA)。颗粒增强免疫测定法常规用于在临床化学分析仪上定量血清蛋白、治疗性药物和滥用药物的临床诊断中,因为它们具有作为不需要任何分离或洗涤步骤的准均相测定的益处。为了增强反应混合物中特定分析物和分析物特异性结合伴侣之间的光检测,将分析物或分析物特异性结合伴侣连接至合适的颗粒。由此,分析物与分析物特异性结合伴侣包被的颗粒反应并凝集。随着分析物量逐渐增加,复合物的凝集和尺寸逐渐增加,进一步导致光散射的变化。凝集的颗粒通过浊度和比浊测量法来测定。

[0044] 微粒的材料可以是适合用于微粒增强光散射测定法的任何无机、有机或聚合物材料。微粒的材料可以是适合用于微粒增强光散射测定法的任何无机、有机或聚合物材料。此类材料包括例如硒、碳、金;碳、硅或锗的氮化物,例如  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ;铁、钛或硅的氧化物,例如  $\text{TiO}_2$  或  $\text{SiO}_2$ ;和聚合物材料,诸如例如聚苯乙烯、聚(氯乙烯)、环氧树脂、聚(偏二氯乙烯)、聚(甲基丙烯酸  $\alpha$  萘酯)、聚(乙烯基萘)或其共聚物,特别是苯乙烯和可共聚的烯键式不饱和化合物的共聚物,例如,苯乙烯-(甲基)丙烯酸酯共聚物。如,例如美国专利号 4, 210, 723 中所述的由聚合材料制成的微粒,以及由从苯乙烯聚合的内核和从苯乙烯与

可共聚的烯键式不饱和化合物的共聚形成的外壳组成的核-壳颗粒是特别合适的。大部分基于颗粒的测定法采用胶乳颗粒,其中主要类型是聚苯乙烯。胶乳凝集试验的综述描述于(J. L. Ortega-Vinuesa, J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 12, No. 4 pp. 379-408 (2001))。

[0045] 存在颗粒增强浊度免疫测定法(PETIA)的不同的测试形式,竞争性形式和直接形式。

[0046] 直接形式优选适用于具有大尺寸的分析物。这些分析物都是具有多个表位的多价抗原,例如,蛋白和微生物。对于直接形式,颗粒用与分析物凝集的抗体包被。

[0047] 浊度和比浊测定法也可以以竞争性抑制形式进行。这种形式最常用于测量小分子,诸如半抗原,并且通常适用于诊断滥用药物测试和治疗药物监测。在这种形式中,测定试剂不仅含有分析物特异性结合伴侣,而且含有通过将其连接至微球表面或另一载体分子诸如蛋白(例如牛血清白蛋白)或水溶性聚合物或寡聚物而获得的化学修饰的分析物。与未修饰的分析物相比,该试剂能够在分析物特异性结合伴侣存在的情况下由于分子中存在的多个拷贝的分析物而凝集。样品中的分析物从基于在修饰分析物存在的情况下特定分析物和分析物特异性结合伴侣的聚集的反应混合物的浊度的变化来定量。

[0048] 将抗原连接至交联剂例如聚半抗原,其与样品的抗原竞争如 EP 545350 中显示的抗体的结合位点。在这里,可溶性聚合物、蛋白或微粒充当多个拷贝抗原的载体分子。测试样品中未标记抗原的量是通过其与免疫测定中标记的抗原竞争的能力来测量。未标记抗原阻断标记的抗原结合的能力,因为抗体上的结合位点已经被占用。因此,在竞争性免疫测定中,测定法中测量的较少标记意指存在更多未标记的(测试样品)抗原。

[0049] 优选使用用于测定分析物的量的微粒增强光散射凝集法,其包括使用携带对分析物具有高反应性的至少一种结合伴侣的强光散射特性的颗粒和携带对分析物具有低反应性的至少一种结合伴侣的弱光散射特性的颗粒的混合物,如 EP 0898169 中所述。强光散射特性的颗粒具有比弱光散射特性的颗粒较大的尺寸和/或较高的折射率。用于测定分析物的量的微粒增强光散射免疫测定法的微粒试剂,其包括直径为 30 至 600 nm 的微粒的混合物,包括携带对分析物具有高反应性伴侣的至少一种结合伴侣的强光散射特性的颗粒和携带对分析物具有低反应性的至少一种结合伴侣的弱光散射特性的颗粒。微粒通常是近似球形,具有窄尺寸分布,它们的尺寸的良好表示是它们的平均直径。根据光散射定律(D:J. Newman 等人, 1992, Ann. Clin. Biochem. 29, 22-42),强光散射特性由大颗粒尺寸和/或颗粒的折射率与介质的折射率的高比率导致,而弱光散射由小颗粒尺寸和/或颗粒的折射率与介质的折射率的低比率导致。

[0050] 术语“分光光度测定法”,也称为“光度测定法”,是本领域众所周知的。光度测定法涵盖浊度和比浊免疫测定法以及比色测定法。在浊度和比浊免疫测定法中,特定分析物从基于所述特定分析物和分析物特异性结合伴侣的凝集的反应混合物的浊度的变化来定量,而在比色测定法中,特定分析物在显色剂的帮助下来定量。在分光测定法中,反应过程随后测量测定溶液吸收多少光的变化。如果该光是在可见区域中,则可以实际上看到测定的颜色变化,这些被称为比色测定法。MTT 测定法,使用四氮唑染料作为底物的氧化还原测定法,是比色测定法的一个实例。经常使用 UV 光,因为共同辅酶 NADH 和 NADPH 以其还原形式,但不以其氧化形式,吸收 UV 光。因此,使用 NADH 作为底物的氧化还原酶可以通过遵循当其消

耗辅酶时 340 nm 波长的 UV 吸光度的降低来测定。

[0051] 甚至当酶反应不导致光的吸光度的变化时,其仍可以可能通过使用偶联测定法使用酶的分光光度测定法。在这里,使用一种反应的产物作为另一种可易于检测的反应的底物。用于偶联测定的一个实例是酶己糖激酶,其可以通过使用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶将其葡萄糖-6-磷酸的产生偶联至 NADPH 产生来测定。

[0052] 根据本发明的术语“比色测定法”通常用于在高度自动化的临床化学分析仪上的临床诊断。由于其容易的一步程序和其短周转时间,均相比色测定法是用在自动分析仪中应用的理想候选。实际上提供用于临床化学分析仪的广泛测试菜单,例如 Roche Diagnostics cobas® c。比色测定法的特征在于在待定量的分析物存在的情况下颜色的形成或改变或耗尽。在实验室分析仪上运行的典型比色试验是临床化学试验和酶免疫试验 (CEDIA, EMIT)。此类测定在光度计中通过分光光度法检测。在 cobas® c 仪器上检测这些测定基于具有钨卤灯作为照射源和光电二极管阵列 (产生 340 和 800 nm 之间的 12 种波长的 12 个二极管) 作为检测器的光度计。O. D. 与有色化合物的浓度成正比。如果颜色的发展与溶液中物质的浓度关联,则该浓度可以通过测定适当波长的光吸收程度来测量。本发明的一个实施方案是本发明的方法,其中在比色免疫测定法中,特定分析物在显色剂的帮助下来定量。

[0053] 术语“显色剂”涵盖导致测定的颜色变化、颜色形成或颜色耗尽的任何测定试剂或测定试剂的混合物,所述颜色变化、颜色形成或颜色耗尽可以在光度计上用范围为 340 至 800nm 的典型波长来测量。许多比色测定法涉及在一个或多个步骤反应中导致有色产物的酶和对应底物;颜色变化可以通过对应的酶辅因子如 NAD/ NADH、而不是底物本身来诱导。还存在基于在一个或多个步骤反应中导致产生有色产物的分析物与化学试剂的特异性反应的比色测定法。在比色免疫测定法如 EMIT 或 CEDIA 中,颜色通常由导致产生具有特征性和可检测的吸收特性的产物的报道酶如  $\beta$ -半乳糖苷酶或脱氢酶与其对应底物的反应形成。报道酶与底物的反应通常在分析物和抗体的免疫反应 (其然后触发或抑制酶反应) 之后发生。在其它比色测试中,如用于实验室分析仪的典型临床化学测试中,颜色由分析物与酶或任何其它特定化学试剂或其组合的反应形成、改变或耗尽。在一些情况下,分析物本身充当酶。甚至当酶反应不导致光的吸光度的变化时,其仍可以可能通过使用偶联测定法使用酶的分光光度测定法。在这里,使用一种反应的产物作为另一种可易于检测的反应的底物。用于偶联测定的一个实例是酶己糖激酶,其可以通过使用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶将葡萄糖-6-磷酸的产生偶联至 NADPH 产生来测定。

[0054] 术语“瑞利散射 (Rayleigh scattering)”是比光的波长小得多的颗粒对光或其它电磁辐射的弹性散射。该颗粒可以是个别原子或分子。当光经过透明固体和液体时,其可以发生,但在气体中最显著地看到。瑞利散射是颗粒的电极化性的函数。与光的波长类似或比其更大的颗粒的散射通常由 Mie 理论、离散偶极近似法和其它计算技术来处理。瑞利散射适用于相对于光的波长小的颗粒,并且其在光学上是“软的 (soft)” (即,折射率接近 1)。对于光束发生的瑞利散射的量取决于颗粒的尺寸与光的波长。

[0055] 根据本发明的术语“分析物”涵盖任何“体外诊断化合物”,诸如例如血清蛋白、治疗性药物和滥用药物。代表分析物包括但不限于抗原、半抗原、抗体、蛋白、肽、氨基酸、激素、类固醇、癌细胞标记、组织细胞、病毒、维生素、核酸、和杀虫剂。如本文中所使用,“分析

物”或“特定分析物”是指样品中其存在和 / 或浓度待测定的物质。术语“分析物”包括针对其存在特异性反应伴侣（例如，特异性结合分析物的结合分子或物质）或可以针对其制备特异性结合伴侣的任何物质。

[0056] 可以通过本发明的测定法测定的分析物包括抗原性分析物，结合伴侣，然后合适地是免疫结合伴侣。抗原性分析物可以是单体或聚合的，有或没有重复表位。

[0057] 合适的抗原性分析物包括：

a) 特定蛋白，诸如例如  $\alpha$ -1- 酸性糖蛋白 (AAGP)、 $\alpha$ -1- 抗胰蛋白酶 (AAT)、血清中的白蛋白 (ALBS)、微量白蛋白 (ALBU)、载脂蛋白 A-1 (APOA)、载脂蛋白 B (APOB)、抗链球菌溶血素 O (ASO)、抗凝血酶 III (AT III)、补体 C3c (C3C)、补体 C4 (C4)、C 反应蛋白 (CRP)、纤维蛋白原 (FIBG)、纤连蛋白 (FIBR)、结合球蛋白 (HAPT)、免疫球蛋白 A、G、M (IGA、IgG、IgM)、脂蛋白 a (LPA)、类风湿因子 (RF)、转铁蛋白 (TRSF)、血清淀粉样蛋白 A (SAA)；

b) 肿瘤标记，诸如例如  $\alpha$ - 甲胎蛋白 (AFP)、人绒毛膜促性腺激素  $\beta$ - 亚单位 (b-HCG)、 $\beta$ -2- 微球蛋白、碳水化合物抗原诸如 CA 125、CA 15-3、CA 19-9、CA 72-4、癌胚抗原 (CEA)、铁蛋白、粘蛋白样癌相关抗原 (MCA)、神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、前列腺特异性抗原 (PSA)；

c) 心血管或纤溶标记诸如例如脂肪酸结合蛋白 (FABP)、纤维蛋白和纤维蛋白原降解产物 (FDP)、FDP D- 二聚体、肌钙蛋白、肌红蛋白、糖化血红蛋白 A1c (HbA1c)；

d) 病毒标记诸如例如流感病毒、单纯疱疹病毒 (HSV)；

e) 免疫球蛋白 E (IgE)、胰岛素、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C

f) 免疫抑制剂诸如例如环孢霉素、依维莫司、MPA (霉酚酸)、西罗莫司、他克莫司

g) 治疗性药物诸如例如对乙酰氨基酚、氨基甙类、苯丙胺、阿米卡星、巴比妥酸盐、苯二氮草、丁丙诺啡、卡马西平、可卡因、地高辛、洋地黄毒苷、迷魂药、庆大霉素、HIV 蛋白酶抑制剂、利多卡因、LSD、MDEA、美沙酮、甲基苯丙胺、甲喹酮、6- 单乙酰基 - 吗啡、扑热息痛 (Napa)、普鲁卡因酰胺、苯妥英、苯环己哌啶、苯巴比妥、丙氧芬、奎尼丁、水杨酸盐 / 酯、茶碱、THC、三环抗抑郁药、妥布霉素、万古霉素、VPA

可以通过本发明的测定法测定的分析物进一步包括核酸，结合伴侣，然后合适地是寡核苷酸捕获探针，其显示足够的序列互补性以使得杂交进行。合适的核酸分析物包括 DNA、RNA 及其衍生物，其量的测定是诊断和药物领域中感兴趣的。此类可以使用本发明的测定法定量测定的核酸的实例为 HIV1-RNA、HIV2-RNA、HCV-RNA、肠道病毒 RNA、HTLV-DNA、CMV-DNA 和结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) DNA。

[0058] 作为实例，根据本发明的方法测定样品中的分析物 CRP (C 反应蛋白)、铁蛋白、肌红蛋白、D- 二聚体、RF II (风湿病因子 II)、DIG (地高辛) 和苯巴比妥。

[0059] 如本文中所使用，术语“分析物特异性反应伴侣”能够与特定分析物反应，从而形成反应复合物，如抗原 - 抗体免疫复合物，或形成新的产物，如由酶 - 底物反应导致产生的产物。典型的分析物特异性反应伴侣包括，但不限于，在分析物存在的情况下导致颜色变化的结合蛋白、抗原、抗原片段、抗体、抗体片段、核酸、受体和颗粒增强结合伴侣、酶、底物（在分析物是酶的情况下）、特定化学试剂。对于给定分析物特异性的此类反应伴侣可以从商业来源获得，或者可以根据本领域技术人员已知的标准程序制备。分析物特异性反应伴侣对的实例包括，但不限于，半抗原 : 抗体，生物素 : 抗生物素蛋白，激素 : 受体，多肽 : 抗体，

和寡核苷酸；互补 DNA 或 RNA，酶 - 底物。对于导致形成与分析物的结合复合物的分析物特异性反应伴侣，因为这是抗体的情况，所以术语“分析物特异性结合伴侣”可以同样用来代替“分析物特异性反应伴侣”。

[0060] 如本文中所使用，术语“抗体”是指响应于外来物质的检测产生的免疫球蛋白，并且包括完整分子以及其功能片段，诸如 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、和 Fv。可以用作本发明的测定法中的免疫结合伴侣的抗体包括任何物种的多克隆抗体，任何物种的单克隆抗体（包括嵌合抗体和 / 或重组抗体）。因为它们被无限量相同产生的能力，单克隆抗体或其片段通常是优选的。

[0061] 如本文中所使用，术语“抗原”特征在于其在抗体的抗原结合位点处被结合的能力。被抗体识别且抗体结合的抗原的区域被称为“表位”。抗原是当引入动物或人体时能够诱导免疫应答，即抗体产生，的物质。半抗原是只有当连接至大载体诸如蛋白质时才可以引发免疫应答的小分子。载体可以是自身也不会引发免疫应答的载体。一旦机体已经生成针对半抗原 - 载体加成物的抗体，小分子半抗原也可以能够结合抗体。

[0062] 通常的做法是通过使用“校准曲线”（通常也称为标准曲线或工作曲线）来确定分析物的浓度，所述校准曲线已经通过绘制标准样品中分析物的已知浓度和标准样品的分析测量值诸如光密度之间的相互关系来预先绘制。当校准曲线在定量分析区域中的较宽范围内具有足够线性度时，校准曲线可以用相对较小数量的标准样品来制备，所述标准样品靠近定量分析的测定范围中的上限、下限和中间点。

[0063] 然而，在实践中，存在许多通常不是线性的校准曲线。从特定波长的吸光度制备的浊度、比浊或比色测定法的校准曲线通常是非线性的 S 形校准曲线，其中灵敏度在接近零的浓度处变差，并且在较高浓度侧是饱和的。S 形校准的确定需要多点校准，其中必须使用多个浓度的标准样品。

[0064] 此外，该 S 形校准曲线在非常低的浓度和非常高的浓度缺乏可报道的测量范围。尽管存在几种方法，但仍存在浓度在测量范围之外的患者样品。作为结果，在其中样品浓度超过检测上限的情况下，样品必须进行稀释，或者对于浓度低于检测限值的样品，必须使用较高体积的样品。这些重新测量，所谓的重新运行，引起额外费用和时间的损失，这两个因素对于进行那些测定的实验室都是关键的。为了避免这些缺点，本文中提供了用于增强浊度、比浊或比色测定法的灵敏度且扩大浊度、比浊或比色测定法的动态范围的新方法。

[0065] 当生成用于基于反应混合物的浊度测量的凝集测定法的校准曲线时，波长的选择，除了反应时间之外，对于曲线的斜率（分析灵敏度）和可实现的上部测量范围发挥至关重要的作用。对于直接测定形式，小波长可以导致产生具有高斜率和高信号的校准曲线，而对于高浓度区域，曲线可以变得初期平坦，导致对于高浓度的相当的信号值，且结果也导致低检测上限。另一方面，较大波长可以导致具有小斜率的曲线，但对于在高浓度区域导致可区分的信号值。因此，选择一个波长和对应的反应时间用于目标在于生成校准曲线的信号计算可以是分析灵敏度和上部测量范围之间的折衷。在比色测定法中遇到类似情况。选择形成的有色产物的吸收最大值附近的波长确保了高信号和高灵敏度，另一方面，对于高分析物浓度的信号可以在检测器的指定光范围之外。

[0066] 在本发明中，对于两个不同波长和反应时间同时生成两条校准曲线，其令人惊讶地允许在动态范围增加的情况下定量样品中的特定分析物。出于该目的，还使用至少在这

两个不同波长和反应时间测量样品。样品的至少一个光学信号或其计算的至少一个信号值决定哪个校准曲线用于其定量。

[0067] 如本文中所以使用,术语“第一校准曲线”从在第一波长和第一反应时间(两者都优化用于实现低检测限值)的反应混合物的光信号生成。将在第一波长和第一反应时间记录的第一校准曲线针对特定分析物的低浓度进行优化,从而尽可能提高检测下限。

[0068] 如本文中所以使用,术语“第二校准曲线”从在第二波长和第二反应时间(两者都优化用于实现高检测上限)的反应混合物的光信号生成。将在第二波长和第二反应时间记录的第二校准曲线针对特定分析物的高浓度进行优化,从而尽可能提高检测上限。如本发明中进行的用两种、而不是一个校准曲线工作还可以显示进一步的益处,诸如减轻与所需校准物的数量和浓度相关的问题以及用于校准曲线的曲线拟合程序。通过使用标准样品对于特定分析物预先确定本发明的校准曲线。

[0069] 通过将样品与分析物特异性反应伴侣和分析物(可以将其化学修饰)混合制备测量样品之后,允许样品混合物反应给定的完整反应时间。在完整反应时间至少在所述第一和第二波长同时测量反应混合物中待测定的样品的特定分析物的光信号。

[0070] 选择分别在第一波长和第一反应时间记录或在第二波长和第二反应时间记录的第一或第二校准曲线用于定量特定分析物,其中基于样品光信号中至少一个或基于其计算的至少一个信号值,通过以下标准选择第一或第二校准曲线用于计算分析物浓度:

对于渐增校准曲线:

如果所述第一和/或第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在第一波长和第一反应时间记录的第一校准曲线来测定;

如果所述第一和/或第二波长的至少一种光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在第二波长和第二反应时间记录的第二校准曲线来测定。

[0071] 对于渐降校准曲线:

如果所述第一和/或第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在第二波长和第二反应时间记录的第二校准曲线来测定;

如果所述第一和/或第二波长的光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在第一波长和第一反应时间记录的第一校准曲线来测定。特定分析物的量通过与选择的校准曲线比较来定量。

[0072] 本发明提供了用于通过光度测定法确定特定分析物的量的方法,其中样品中所述特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应。根据分光光度计和可用波长,生成在第一和第二反应时间的对于第一和第二波长的至少两条校准曲线,其对于特定分析物预先确定。由此,在所述第一和第二波长在反应混合物中同时测量待测定的样品的特定分析物的光信号。

[0073] 如本文中所以使用,术语“第一波长”和第一反应时间针对特定分析物的低浓度进行优化,从而尽可能提高检测下限。这意指第一波长组合第一反应时间生成,例如,在直接测定形式的情况下的高信号,导致具有高分析灵敏度的校准曲线。灵敏度、分析灵敏度、检测下限 (LDL)、空白限值 (LOB)、检测限值 (LOD) 和定量限值 (LOQ) 是用来描述可以通过分析方法可靠测量的量度的最小浓度的术语。所有这些术语都相关,但具有不同的定义 (siehe Lit. clin biochem rev 2008, 29, 49)。例如,术语“分析灵敏度”被定义为校准曲线的

斜率。

[0074] 如本文中所使用,术语“检测下限”(LDL)也被称为较低测量范围。估计 LDL 的一种典型方法由测量零校准物或空白样品的重复(诸如  $n=21$ ),确定平均值  $x$  和标准偏差 (SD) 组成。LDL 计算为  $x+2SD$  或  $x+3SD$ 。这种用于 LDL 测定的方法根据 Kaiser (H. Kaiser, Fresenius Zeitschrift für analytische Chemie, 1965, 209, Nr.1, 第 1-18 页) 描述的方法。如果(在完整反应时间至少在第一和第二波长同时测量的样品的光信号中)样品的至少一种光信号或其计算的至少一个信号值低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过与对于具有渐增校准曲线的测定的第一波长和第一反应时间的校准曲线的比较来确定。在竞争性凝集测定的情况下或在具有渐降校准曲线的比色测定法的情况下,如果(在完整反应时间至少在第一和第二波长同时测量的样品的光信号中)样品的至少一种光信号或其计算的至少一个信号值低于对应的预定阈值,将使用第二波长和第二反应时间的校准曲线。

[0075] 如本文中所使用,术语“第二波长”和第二反应时间针对特定分析物的高浓度进行优化,从而尽可能提高检测上限。这意指第二波长和第二反应时间生成,例如,在直接测定形式的情况下上部测量范围中不同分析物浓度的可区分信号,导致具有高上部测量范围的校准曲线。

[0076] 第一和第二波长是不同的,理想地相差至少 5nm,尽管第一和第二反应时间可以是不同或相同的。

[0077] 如本文中所使用,术语“检测上限”(UDL)也被称为上部测量范围。UDL 是可以可靠地测定的样品中分析物的最高量。在本发明中,UDL 通过评价该方法的线性度、然后选择线性范围内的最高浓度值作为 UDL 来测定。当从一系列样品溶液的分析物回收率(测量值)与样品溶液中分析物的实际浓度(真实值)成比例时,该方法被称为是线性的 (Arch Pathol Lab Med 2004, 128, 第 44-48 页)。校准曲线的形式(其可以是抛物线或 S 形的)不应当与描述测量值和真实值之间关系的方法的线性度混淆。校准曲线描述信号和浓度之间的关系。

[0078] 在本发明上下文中的术语“动态范围”描述测定法的测量范围的量级,且在此被定义为检测上限 (UDL) 与检测下限 (LDL) 的比率。如果没有另外说明,我们使用术语测量范围作为在 LDL 开始且在 UDL 结束的浓度值。主要地,除了 LDL 以外,可以使用其它灵敏度术语,如 LOD 或 LOQ,并且除了 UDL 以外,描述上部测量范围的还有其它术语也可以用于计算动态范围。

[0079] 根据用于测量分析物的现有技术,两种波长(第一和第二波长)是所谓的“主要波长”。

[0080] 如本文中所使用,术语“光信号”描述通过进行反应混合物的吸光度测定而获得的信号。光信号可以是在浊度和比色测定法的情况下的吸光度值,或比浊测定法的散射光信号。

[0081] 在本发明的上下文中,术语“其计算的信号值”意指反应混合物的光信号的变化,并且可以是两个吸光度测量值(初始和最终测量值)之间的差异,或者可以是表达每单位时间的吸光度变化的动力学参数。通常,初始测量可以在将最终试剂添加至反应混合物之前或之后不久进行。

[0082] 如本文中所使用,术语“反应时间”是用于计算其信号值的光信号的第一(或初始)和第二(或最终)测量之间的时间段。第一(或初始)测量在将最终试剂添加至反应混合物之前或之后不久进行。在动力学测量的情况下,反应时间可以是用于计算表示每单位时间的吸光度变化的值的时间段。“反应时间”可以与“完整反应时间”相同或比其更短。

[0083] 在本发明的上下文中,术语“特定分析物”意指对于待测量的样品中的每种分析物,可以测定特定校准曲线和特定波长和反应时间,将其针对每种特定分析物优化以定量浓度,且其可以从分析物至分析物有差异。常见光度计是分光光度计或用于浊度免疫测定的浊度计和用于比浊免疫测定的比浊计。本领域中已知的多波长分光光度计用于测量根据本发明的反应混合物中待测定样品的特定分析物的光信号。优选用于比色测定法和浊度和比浊免疫测定法的是分光光度计。

[0084] 根据选择的分光光度计的结构和可用波长(其从设备至设备可不同),从多个波长选择第一和第二波长。如本文中所使用的光度计是具有同时测量 300 nm 至 800 ± 2 nm 之间的 12 个波长的能力的 Roche 的分析仪 cobas c® 311。优选使用的是波长 340、376、415、450、480、505、546、570、600、660、700、800 ± 2 nm。如果用于具有同时测量多个波长的能力的自动分析仪,诸如 cobas c 311,则本发明的方法是特别有利的。该测量优选在定义温度(优选 20 和 40 摄氏度之间的温度)进行。

[0085] 作为实例,在标准条件下在 Roche 的分析仪 cobas c® 311 上,根据本发明确定用于目的在于定量几种特定分析物的生成第一和第二校准曲线的第一和第二波长和第一和第二反应时间。该仪器自动移取样品和检测试剂至反应室(= 小杯)。该仪器在 12 个不同波长(340、376、415、450、480、505、546、570、600、660、700、800 ± 2 nm)同时测量吸光度。对于每个反应室(reaction cell),测量水空白,然后在 10 分钟内 57 次采集吸光度读数,因此对于每个波长的吸光度得到总共 57 个测量点。浓度可以通过使用这些测量点中的至少一个来计算。测量在 37 摄氏度进行。

[0086] 对于分析物 CRP(直接测定形式),第一波长确定为 505 nm 且第二波长确定为 600 nm,而标准波长为 570 nm。第一反应时间确定为 2.0min 且第二反应时间确定为 1.2min,而标准反应时间为 2.0 min。对于第一和第二校准曲线以及对于标准校准曲线,记录 800nm 且 800nm 通过设置空白用于校正目的。

[0087] 对于分析物铁蛋白(直接测定形式),第一波长确定为 505 nm 且第二波长确定为 570 nm,而标准波长为 570 nm。第一反应时间确定为 4.9min 且第二反应时间确定为 5.1min,而标准反应时间为 5.1 min。对于第一和第二校准曲线以及对于标准校准曲线,记录 800nm 且 800nm 通过设置空白用于校正目的。

[0088] 对于分析物肌红蛋白(直接测定形式),第一波长确定为 505 nm 且第二波长确定为 660 nm,而标准波长为 570 nm。第一反应时间确定为 6.7min 且第二反应时间确定为 2.6min,而标准反应时间为 4.7 min。对于第一和第二校准曲线以及对于标准校准曲线,记录 800nm 且 800nm 通过设置空白用于校正目的。

[0089] 对于分析物 D-二聚体(直接测定形式),第一波长确定为 800 nm 且第二波长确定为 700 nm,而标准波长为 800 nm。第一反应时间确定为 4.3min 且第二反应时间确定为 1.4min,而标准反应时间为 4.3 min。

[0090] 对于分析物风湿病-因子 II(直接测定形式),第一波长确定为 546 nm 且第二波

长确定为 660 nm,而标准波长为 570 nm。第一反应时间确定为 8.5min 且第二反应时间确定为 1.4min,而标准反应时间为 2.2 min。对于第一和第二校准曲线以及对于标准校准曲线,记录 800nm 且 800nm 通过设置空白用于校正目的。

[0091] 对于分析物 DIG(地高辛)(竞争性测定形式),第一波长确定为 660 nm 且第二波长确定为 505 nm,而标准波长为 660 nm。第一反应时间确定为 4.7min 且第二反应时间确定为 4.7min,而标准反应时间为 4.7 min。对于第二校准曲线,记录 800nm 且 800nm 通过设置空白用于校正目的。

[0092] 对于分析物苯巴比妥(竞争性测定形式),第一波长确定为 600 nm 且第二波长确定为 505 nm,而标准波长为 600 nm。第一反应时间确定为 6.5min 且第二反应时间确定为 7.9min,而标准反应时间为 6.5 min。对于第一和第二校准曲线以及对于标准校准曲线,记录 800nm 且 800nm 通过设置空白用于校正目的。

[0093] 在大多数情况下,动态范围通过使用本发明的方法,通过改进测定的 LDL 和 / 或 UDL,进行改进。仅在地高辛和 D-二聚体的情况下,改进是适中的。

[0094] 从上面描绘的这些测定实例,可以推导出一些趋势用于直接测定形式。用于第一校准曲线和用于分析物的灵敏检测的第一波长通常比用于第二校准曲线和检测高分析物浓度的第二波长更小。对于 D-二聚体测定显示例外。此外,第一反应时间大于或等于大多数情况下的第二反应时间。对于铁蛋白测定鉴定到例外,显示比第二反应时间更短的第一反应时间。对于具有竞争性测定形式的测定法观察到类似的趋势,这似乎对于具有直接形式的测定的表现反之亦然。

[0095] 本发明的一个实施方案是,任选地,进一步波长被测定为用于校正干扰和补偿光度噪声的空白值,也称为双色测量(clin. Chem. 1979, 25, 1482 - 1484)。对于两个主要波长中每一个,如果记录进一步的波长用于通过从主要波长的信号减去校正波长的信号的校正目的,这是任选的。优选地,对于分析物 CRP,在 800 nm 记录这种进一步的波长用于校正。

[0096] 对于“第一波长”和第一反应时间和对于“第二波长”和第二反应时间,用同时测量的特定分析物的标准样品构建校准曲线。根据本发明,针对灵敏度或检测下限(LDL)优化在第一波长( $\lambda_1$ )和第一反应时间( $t_1$ )记录的第一校准曲线。针对高检测上限(UDL)优化在第二波长( $\lambda_2$ )和第二反应时间( $t_2$ )记录的第二校准曲线。作为实例,对于 CRP-测定,在 cobas c 311 上在 10 min(=完整反应时间)的时间段在可用的所有 12 个波长(包括  $\lambda_1$ (=505 nm)和  $\lambda_2$ (=600nm)以及校正波长(800nm))同时测量标准样品。通过减去在 800nm 的对应吸光度值校正正在全部反应时间(约 10 分钟)过程中测量的在 505nm 的所有吸光度值,随后通过计算在将最终试剂添加至反应混合物后不久的时间的吸光度值和将最终试剂添加至反应混合物后 2.0min 记录的吸光度值之间的差异而计算对于其第一反应时间( $t_1$ )的信号值,获得校准曲线 1; 并且同时通过减去在 800nm 的对应吸光度值校正正在全部反应时间(约 10 分钟)过程中测量的在 600nm 的所有吸光度值,随后通过计算在将最终试剂添加至反应混合物后不久的时间的吸光度值和将最终试剂添加至反应混合物后 1.2min 记录的吸光度值之间的差异而计算对于其第二反应时间( $t_2$ )的信号值,获得校准曲线 2。

[0097] 进一步的实施方案是根据本发明的方法,其中生成在相同波长和在不同反应时间记录的两条校准曲线。

[0098] 对于特定分析物构建校准曲线 1 和 2 之后,可以测定样品的浓度。因此,将含有待测定的特定分析物的样品添加至测试试剂中,再添加至小杯中。将该混合物孵育特定反应时间,在这里,完整反应时间,例如 10 min。

[0099] 如本文中所使用,对于该分析物的术语“光信号”,也被称为吸光度,在完整反应时间内在一次运行中,至少在两个预定波长(第一和第二波长)在反应混合物中同时测量。任选地,同样可以记录在校正波长的光信号。

[0100] 如本文中所使用,术语“阈值”,也被称为“截止值”,用于本方法的分析物的定义的吸光度值或定义量;优选使用吸光度值。理想地,阈值取自本方法的两条校准曲线从第一校准曲线改变至第二校准曲线的点。只有一个吸光度值可以被定义为阈值,即对于第一波长和第一反应时间的值 ( $A[\lambda 1, t1]$ ),或对于第二波长和第二反应时间的值 ( $A[\lambda 2, t2]$ ),或者可以平行考虑两个吸光值 ( $A[\lambda 1, t1]$  和  $A[\lambda 2, t2]$ )。作为实例,对于 CRP 测定,  $A[\lambda 1, t1]$  和 / 或  $A[\lambda 2, t2]$  可以被定义为对应于 73 mg/l 的 CRP 的浓度的阈值。在具有渐增校准曲线的测定的情况下,由于它是用 CRP 的情况,所以值  $A[\lambda 1, t1]$  是校准曲线 1 的最高信号值,且  $A[\lambda 2, t2]$  是校准曲线 2 的最低信号值。此外,对应于吸光度值  $A[\lambda 1, t1]$  和 / 或  $A[\lambda 2, t2]$  的原始吸光度信号可以被定义为阈值。如果样品的至少一种光信号或其计算的至少一个信号值超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过与第二波长和第二反应时间的第二校准曲线比较来测定。在与临床决定值不一致的浓度选择阈值对于 IVD 测定是重要的。

[0101] 对于选择其中本方法的两条校准曲线从第一校准曲线改变至第二校准曲线的点,通常存在广泛的灵活性。重要的是,在选择点,两条曲线都满足与该方法的线性度和与精确度以及与灵敏度相关的要求。例如,校准曲线 2 理想地应当具有至少覆盖在选择点的浓度的 LDL;且校准曲线 1 理想地应当显示至少直至所述选择点的该方法的线性度。

[0102] 对于第一校准曲线的最佳第一波长和第一反应时间的选择,其特征在于得到最佳 LDL,以及对于第二校准曲线的最佳第二波长和第二反应时间的选择,其特征在于得到最佳 UDL,通过试错程序 (trial-and-error procedure) 进行。尽管对于选择最佳波长和反应时间存在一些趋势,但也存在所述趋势的例外,并且作为结果,必须检查波长和反应时间的所有组合产生最佳 LDL 或 UDL 的能力。然而,当手动进行这些计算(即没有自动计算工具或者算法的帮助下)时,以合理的努力和合理的时间段不可能进行波长和反应时间的所有组合的 LDL 和 UDL 计算。出于该原因,在本发明中使用以下步骤用于开发用于特定测定的方法,换言之,用于选择最佳第一波长和反应时间,以及第二波长和反应时间,以及阈值:

1) 在例如 cobas c 311 分析仪上在完整反应时间在 12 个可用波长同时测量以下样品的吸光度值:

- 用于校准的一式两份的至少 6 种标准品,
- 用于测定 LDL 的 21 份重复的空白样品,
- 用于测定精确度(变异系数)的 21 份重复的至少 2 种样品,
- 用于测定该方法的 UDL 和线性度的覆盖例如比已知 UDL 高 2-4 倍的浓度的稀释系列。

[0103] 2) 用于第一校准曲线的第一反应时间  $t1$  和第一波长  $\lambda 1$  的选择通过分析在完整反应时间在 12 个不同的主要波长记录的空白样品(21 份重复)和低浓度样品的 12 种动力

学曲线来进行。任选地,可以额外考虑校正波长,因此增加待分析的动力学曲线的数量,用于选择最佳波长和反应时间。低浓度样品 (low concentrated sample) 具有已知 LOQ 值的 1-5 倍范围内的浓度,并且可以是标准样品之一或在点 1) 下测量的精确样品之一。动力学曲线描述 y 轴的吸光度值和 x 轴的时间 (在 cobas c 311 的情况下,时间被描述为测量点)。仅考虑检测器的指定光学范围内的吸光度值 (0.0000-3.0000 吸光度)。在第一步中,通过选择添加最终试剂之前或之后不久的初始时间点 (或测量点) 和通过选择最终时间点 (或测量点),对于对应的动力学曲线的每个波长测定一些最佳反应时间,满足以下准则:

在初始时间点,空白样品 (21 份重复) 的信号变化是最小的且空白样品的信号低。

[0104] 低浓度样品的吸光度读数在初始时间点低且在最终时间点高,即初始吸光度读数和最终吸光度读数之间的差异最大。

[0105] 如本文中所使用,术语“反应时间”是从初始时间点至最终时间点的差异。已经对于每个波长选择一些最佳反应时间之后,计算这些反应时间的所有 12 个波长的 LDL。选择得到最佳 LDL 的波长和反应时间作为用于生成第一校准曲线的第一波长和第一反应时间。

[0106] 3) 用于第二校准曲线的第二反应时间  $t_2$  和第二波长  $\lambda_2$  的选择通过分析在完整反应时间在 12 个不同的主要波长记录的覆盖例如比已知 UDL 高 2-4 倍的浓度的稀释系列的 12 种动力学曲线来进行。任选地,可以额外考虑校正波长,因此增加待分析的动力学曲线的数量,用于选择最佳波长和反应时间。仅考虑检测器的指定光学范围内的吸光度值 (0.0000-3.0000)。在第一步中,通过选择添加最终试剂之前或之后不久的初始时间点 (或测量点) 和通过选择最终时间点 (或测量点),对于对应的动力学曲线的每个波长测定一些最佳反应时间,满足以下标准:

- 在添加最终试剂之前或之后不久的点选择初始时间点

- 以一定方式选择最终时间点,所述方式使得稀释系列的最高浓度样品在浓度渐增的情况下显示可区分和渐增的信号,即,对于一定浓度样品的初始吸光度读数和最终吸光度读数之间的差异的绝对值高于下一个较低浓度样品的差异值的对应绝对值。

[0107] 已经对于每个波长选择一些最佳反应时间 (初始时间点至最终时间点的差异) 之后,计算这些反应时间的所有 12 个波长的 UDL。选择得到最佳 UDL 的波长和反应时间作为用于生成第二校准曲线的第二波长和第二反应时间。

[0108] 4) 阈值设置:阈值被设定在其中校准曲线从第一校准曲线变化至第二校准曲线的浓度,即对于较低浓度,第一校准曲线用于分析物定量,且对于较高浓度,第二校准曲线用于分析物定量。对于其中校准曲线变化的点或浓度的选择,通常存在广泛的灵活性。

[0109] 在该点,符合以下标准是重要的:

- 两条校准曲线都显示该方法的线性度,第一校准曲线在 LDL 至阈值浓度的范围内,且第二校准曲线在阈值浓度至 UDL 的范围内,

- 第二校准曲线显示至少覆盖阈值浓度的 LDL,

- 阈值浓度与 IVD 测试的临床决定值不相同。

[0110] 因此,一个实施方案是根据本发明确定最佳波长、反应时间和阈值的计算机执行的方法,包括以下步骤:

- a) 接受代表在分析仪上同时可得的样品的吸光度值的数据集,其中所述数据集包括多个数据点:

- 用于校准的一式两份的标准品,
- 用于测定 LDL 的空白样品,
- 用于测定精确度的一式两份的至少 2 种样品,

b) 稀释系列覆盖测定第一校准曲线的第一反应时间和第一波长的浓度,其通过分析在完整反应时间在不同的主要波长记录的空白样品和低浓度样品的动力学曲线来进行。

[0111] c) 通过分析在完整反应时间在不同的主要波长记录的动力学曲线测定第二校准曲线的第二反应时间和第二波长。

[0112] d) 通过对于较低浓度使用第一校准曲线用于分析物定量,且通过对于较高浓度使用第二校准曲线用于分析物定量,将阈值设定在其中校准曲线从第一校准曲线变化至第二校准曲线的浓度。

[0113] 一个进一步实施方案是包括控制处理器以根据本发明确定最佳波长、反应时间和阈值的代码的计算机可读介质,所述代码包括指令以:

a) 接受代表在分析仪上同时可得的样品的吸光度值的数据集,其中所述数据集包括多个数据点:

- 用于校准的一式两份的标准品,
- 用于测定 LDL 的空白样品,
- 用于测定精确度的重复的至少 2 种样品,

b) 稀释系列覆盖测定第一校准曲线的第一反应时间和第一波长的浓度,其通过分析在完整反应时间在不同的主要波长记录的空白样品和低浓度样品的动力学曲线来进行。

[0114] c) 通过分析在完整反应时间在不同的主要波长记录的动力学曲线测定第二校准曲线的第二反应时间和第二波长。

[0115] d) 通过对于较低浓度使用第一校准曲线用于分析物定量,且通过对于较高浓度使用第二校准曲线用于分析物定量,将阈值设定在其中校准曲线从第一校准曲线变化至第二校准曲线的浓度。

[0116] 在本发明的一个示例性实施方案中,所述方法可以通过使用传统个人计算机系统来实施,所述传统个人计算机系统包括,但不限于,输入数据集的输入装置,诸如键盘、鼠标等;代表曲线区域中感兴趣的特定点的显示装置,诸如监视器;实施该方法中的每个步骤必要的处理装置,诸如 CPU;网络接口,诸如调制解调器,存储数据集的数据存储装置,在处理器上运行的计算机代码等。此外,该方法也可以在分析仪,例如 cobas c 311 分析仪上实施。

[0117] 在对于任何浓度的阈值不满足这些标准的情况下,用于第一校准曲线的条件(第一波长和第一反应时间)和/或用于第二校准曲线的条件(第二波长和第二反应时间)必须改变,从而使得所述标准得到满足。此类改变可折衷实现的动态范围的改进倍数。在上述用于选择校准曲线 1 和 2 的最佳波长和反应时间的程序中,只有两点终点法用于计算信号。两点终点法是执行样品空白的终点测定法。在这里考虑在两个不同测量点的两个吸光度读数:通常在添加最后试剂之前或之后不久采集第一读数;在添加最后试剂之后任何时间点采集第二读数。主要地,对于最佳第一波长和第一反应时间以及第二波长和第二反应时间的选择,动力学信号计算方法可以额外考虑,且对于某些测定法这可得到与两点终点法相比更好的结果。

[0118] 通过选择用于定量特定分析物的第一或第二校准曲线（这取决于待测定样品的光信号），扩大的动态范围或测量范围得到实现。

[0119] 如本文中所使用，术语“扩大的动态范围”意指，可以测定具有非常低浓度的特定分析物的样品和 / 或具有非常高浓度的特定分析物的样品，这不是只用一个主要波长和一个校准曲线的标准方法的情况。根据本发明，检测下限和 / 或检测上限的改进导致改进的动态范围。

[0120] 根据本发明，如本文中所使用，“高浓度的特定分析物”不引起高剂量的“钩效应 (Hook-effect)”。钩效应是临床实验室的每日工作中的常见现象。首先，钩效应取决于分析物浓度，它是远超出 (overwhelm) 捕获抗体的结合能力的过量的分析物。这导致不适当地低信号，对于具有过高分析物浓度的样品引起错误的低或正常结果（“钩”结果）。这意指存在饱和抗体上的所有结合位点的巨大过量分析物。如果在稀释样品中测量出比未稀释样品中更高的值，则钩效应是存在的。一些自动化分析仪具有用于识别过量分析物、同时样品被同时稀释的系统。根据本发明，引起高剂量“钩效应 (Hook-effect) 的过量特定分析物无法通过与第二校准曲线的比较来防止。

[0121] 本发明的一个实施方案是提供用于校正校准曲线的情况。分析物 CRP 在 505nm (用于灵敏检测的第一波长) 和 600 nm (用于检测上限的第二波长) 测量。第三波长在 800 nm 记录，用于在第一和第二校准曲线中校正干扰和补偿大多数光度噪声。

[0122] 如本文中所使用，术语“完整反应时间”是在多个波长测量特定分析物的时间段。为了选择最佳的两个波长（目的在于生成两条校准曲线），在 cobas c® 仪器上可用的 12 个不同波长同时测量标准品。仅考虑处于检测器的光学范围内的吸光度值 (0.0000 - 3.0000 吸光度)。

[0123] 本免疫测定时间的典型完整反应时间在 1 到 20 分钟之间变化。优选地，多波长分光光度计光度计的完整反应时间优选为 10 分钟左右。本发明的一个实施方案是在完整反应时间过程中测量特定分析物的光信号。最优选地，至少在第一和第二主要波长同时测量特定分析物的光信号。如本文中所使用，术语“时间延迟”是用于检测特定分析物的第一和第二主要波长之间的时间段。

[0124] 如本发明中所使用，术语“同时”可意指小于 60x 秒的时间延迟，例如小于 10x 秒、优选小于 1x 秒、最优选小于 1 ms 或者甚至小于 0.1x ms 的时间延迟。最优选地，术语“同时”意指没有时间延迟。

[0125] 本发明的一个进一步方面是用于增强光度测定法的灵敏度和 / 或动态范围的方法，其中样品中的特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应，包括以下步骤：生成至少两条校准曲线，其中针对特定分析物的低浓度优化在第一波长记录的第一校准曲线，从而尽可能提高检测下限，且针对特定分析物的高浓度优化在第二波长记录的第二校准曲线，从而尽可能提高检测上限，至少在第一和第二波长对于反应混合物中待测定的样品的特定分析物同时测量光信号。通过以下标准选择第一或第二校准曲线用于特定分析物的定量：

对于渐增校准曲线：

如果所述第一和 / 或第二波长的光信号低于对应的预定阈值，则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定。如果所述第一和 / 或第二波长的光信号超

过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线且最终定量特定分析物的量来测定。

[0126] 对于渐降校准曲线:

如果所述第一和 / 或第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定。如果所述第一和 / 或第二波长的光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线且最终定量特定分析物的量来测定。优选地,生成对于第一和第二波长和反应时间的两条校准曲线,其对于特定分析物预先确定。根据本发明,检测下限和检测上限两者都导致灵敏度和 / 或动态范围的增加。益处是导致更高通量样品的减少的再次运行数和减少的周转时间。此外,降低了测试成本并改进了可靠性。

[0127] 本发明导致对于检测下限 (LDL) 和 / 或检测上限 (UDL) 所示的改进。优选地,对于检测下限 (LDL) 和 / 或检测上限 (UDL) 显示 1 至 2 倍改进。更优选地,对于检测下限 (LDL) 和 / 或检测上限 (UDL) 显示 3 至 4 倍改进。最优选地,本发明导致对于检测下限 (LDL) 和 / 或检测上限 (UDL) 所示的 5 倍改进。优选地,如对于 RF II 直接测定法所示,改进倍数高于 1 倍,更优选地,该系数高于 3 倍,最优选地,该系数高于 5 倍。

[0128] 本发明的一个进一步方面是用于通过浊度和比浊免疫测定法测定 CRP 的量的方法,其中样品中的 CRP 从基于 CRP 和 CRP 结合伴侣的聚集的反应混合物的浊度的变化来定量。生成对于第一和第二波长和对应的第一和第二反应时间的两条校准曲线,其对于 CRP 预先确定。在完整反应时间过程中至少在第一和第二波长同时测量反应混合物中待测定的样品的 CRP 的光信号。针对 CRP 的低浓度优化第一波长,从而尽可能提高检测下限,使用第二校准曲线,将其针对 CRP 的高浓度优化,从而尽可能提高检测上限。选择第一或第二波长和第一或第二反应时间用于 CRP 的定量。如果在完整反应时间过程中测量的样品的至少一种光信号或其计算的至少一个信号值低于对应的预定阈值,则 CRP 的浓度通过与第一波长和第一反应时间的校准曲线比较来测定。另一方面,如果样品的至少一种光信号或其计算的至少一个信号值超过对应的预定阈值,则 CRP 的浓度通过与第二波长和第二反应时间的校准曲线比较来测定。

[0129] 在 CRP 测试的情况下,在 505 nm(反应时间为 2.0min) 记录且在 800nm 校正的校准曲线得到最佳 LDL (0.036 mg/L)。标准表现和本发明的方法的比较导致灵敏度 (LDL) 增加 1.8 倍,且动态范围扩大接近 3.1 倍。在 600 nm(反应时间为 1.2min) 记录且在 800nm 校正的校准曲线 2 导致最佳 LDL (660 mg/L)。UDL 显示与标准条件相比增加 1.8 倍。

[0130] 此外,对于颗粒增强比浊测定法,使用 CRP L3 测定法作为先导参数评估具有调整的颗粒尺寸和抗体装载度的本发明的方法的组合。CRP L3 测定法包括如 EP 0898169 中所述的两种不同类型的颗粒,用高亲和力抗体包被的大胶乳颗粒 (MP2) 和用较弱亲和力抗体 (克隆 21F12 ;用于胶乳包被的浓度 :45mg/g 胶乳) 包被的小胶乳颗粒 (MP1)。

[0131] CRP- 测定灵敏度的额外改进通过使用 230- 400 nm、更优选 250-350 nm、最优选 280-320 nm 直径之间的大颗粒用于增加的光散射效率和使用抗体对颗粒的高装载度来得到,通过使用 55-70 mg IgG/ 克颗粒、优选 60-70 mg IgG/ 克颗粒之间的抗体浓度用于它们缀合至颗粒来获得。

[0132] 本发明的方法与用于缀合反应的 230- 330 nm 之间的大颗粒尺寸和 55-70 mg

IgG/克颗粒之间的抗体浓度的组合导致与标准测定法(大颗粒尺寸:220nm,50 mg IgG/克颗粒的抗体浓度用于缀合大颗粒;小颗粒尺寸:110-140nm)相比灵敏度(LDL)进一步增加接近八倍且,因此,动态范围扩大接近八倍。

[0133] 因此,本发明的另一个实施方案是根据本发明的方法,其中对于特定分析物 CRP,使用 230- 400 nm 之间的大颗粒的颗粒尺寸和约 110-140 nm 之间的小颗粒的颗粒尺寸,以及 55-70 mg IgG/克颗粒的抗体浓度用于缀合大颗粒的缀合反应。

[0134] 第一校准曲线在 505nm 的第一波长与作为校正波长的 800nm 和 2.8min 的第一反应时间记录;第二校准曲线在作为主要波长的 570nm 与作为校正波长的 800nm 和 2.0min 的反应时间测量。标准方法仅具有一个校准曲线,所述校准曲线作为主要波长的 570nm 与作为校正波长的 800nm 和 2.0min 的反应时间测量。

[0135] 本发明的一个进一步方面是使用对于特定分析物预先测定的至少两个波长和至少两个反应时间用于生成至少两条校准曲线用于定量光度测定法中的特定分析物的量,其中针对特定分析物的低浓度优化在第一波长记录的第一校准曲线,从而尽可能提高检测下限,且针对特定分析物的高浓度优化在第二波长记录的第二校准曲线,从而尽可能提高检测上限,且在完整反应时间过程中同时测量在第一和第二波长的特定分析物的光信号。

[0136] 本发明的另一个方面是系统分析仪,所述系统分析仪包含样品容器和测定试剂容器,用于接受和混合样品和测定试剂的反应容器,用于测量步骤 b 的反应混合物的光度计和用于输出用于测定根据本发明的特定分析物的量的分析结果的装置。

[0137] 附图简述

图1显示 CRP-测定在不同波长的校准曲线。在 cobas c® 仪器上可用的 12 个不同的波长同时测量六种标准品。仅考虑处于检测器的光学范围内的吸光度值(0.0000 - 3.0000 吸光度)。在这里,显示五条校准曲线作为实例,其在 12 个可能波长中的 5 个不同的主要波长(对于主要波长 480-、505nm、546nm、570-nm 和 600- nm)进行记录。所有曲线在波长 800nm 校正,并在 2.0 分钟反应时间获取。

[0138] 图2显示通过应用本发明的方法组合颗粒的不同粒径和不同抗体装载用 CRP 测定获得的改进。

[0139] 在第一个实例中,将新方法与目的在于增加灵敏度(LDL)的颗粒调整组合。新方法较大粒径(290nm,而不是 220nm 直径的 MP2 颗粒)的组合,其用于增加的光散射效率和更高抗体装载度(60 mg IgG/g 颗粒的抗体浓度用于大颗粒的缀合反应),用于增加的免疫反应性,导致灵敏度(LDL)增加约八倍且动态范围扩大八倍。

[0140] 在第二个实例中,改变两种颗粒(大颗粒 MP2 以及小颗粒 MP1)的尺寸和抗体装载:

- 较大 MP2 颗粒(290nm,而不是 220nm),其与 70 mg IgG/g 颗粒的抗体浓度缀合,和
- 较小 MP1 颗粒(90nm,而不是 110-140nm),其与 50 mg IgG/g 颗粒的抗体浓度缀合。

[0141] 这些新颗粒得到与标准测定(MP1:110-140nm,具有 45mg IgG/g,和 MP2:220nm,具有 50mgIgG/g)相比改进 3 倍的 LDL 和改进约 2 倍的 UDL。

[0142] 图3示意性地显示可以如何放置阈值用于选择本发明的两条校准曲线之一。

[0143] 图4显示 CRP-测定的校准曲线。标准校准曲线通过在 570- 800 nm 测量而获得。在 505-800 nm 记录的校准曲线 1(Cal 1) 和 2.0min 的反应时间得到最佳 LDL(0,036 mg/

L)。在 600–800 nm 记录的校准曲线 2(Cal 2) 和 1.2min 反应时间导致最佳 UDL (660 mg/L)。CRP 的阈值可以被定义为在 73 mg/L 两个吸光度值中的至少一个。

[0144] 图 5 显示通过使用来自 Roche 的产品组合的高售测试的新方法的益处。测定的分析物是铁蛋白、肌球蛋白、D-二聚体、风湿因子 II (RF II)、CRP、地高辛 (DIG)、苯巴比妥 (PHENO)。在第二列中显示用于标准校正曲线的条件。第三和第四列显示用于校准曲线 1 和 2 的新条件。对于每种特定分析物,测定 LDL 和 UDL 的最佳波长和 LDL、UDL 的改进倍数。在大多数情况下,新方法改进了动态范围,而对试剂或制剂没有任何改变。

[0145] 图 6 显示铁蛋白测定的示例性动力学曲线,其显示在 2 个不同的主要波长 (505nm (图 6 a) 和 570nm (图 6 b)) 的低浓度样品 (10 $\mu$ g/ml 铁蛋白;21 个重复) 和空白样品 (0 $\mu$ g/ml 铁蛋白;21 个重复) 的信号幅度 (吸光度)。动力学曲线描述 y 轴的吸光度值和 x 轴的时间 (在 cobas c 311 的情况下,时间被描述为测量点)。用于第一校准曲线的最佳反应时间通过选择添加最终试剂之前或之后不久的初始时间点 (或测量点) 和通过选择最终时间点 (或测量点) 来测定,满足以下准则:

- 在初始时间点,空白样品 (21 份重复) 的信号变化是最小的且空白样品的信号低。
- 低浓度样品的吸光度读数在初始时间点低且在最终时间点高,即初始吸光度读数和最终吸光度读数之间的差异最大。

[0146] 反应时间是从初始时间点至最终时间点的差异。在大多数情况下,如果空白样品的标准偏差是相当的,则低浓度样品的信号幅度越高,获得的 LDL 值越好。

[0147] 图 7 显示铁蛋白测定的示例性动力学曲线,其显示在主要波长 570nm 记录,通过波长 800nm 的吸光度校正的不同的高浓度样品 (981–4950  $\mu$ g/L 铁蛋白) 的信号幅度 (吸光度)。动力学曲线描述 y 轴的吸光度值和 x 轴的时间 (在 cobas c 311 的情况下,时间被描述为测量点)。用于第二校准曲线的最佳反应时间通过选择添加最终试剂之前或之后不久的初始时间点 (或测量点) 和通过选择最终时间点 (或测量点) 来测定,满足以下标准:

- 在添加最终试剂之前或之后不久的点选择初始时间点
- 以一定方式选择最终时间点,所述方式使得稀释系列的最高浓度样品在浓度渐增的情况下显示可区分和渐增的信号,即,对于一定浓度样品的初始吸光度读数和最终吸光度之间的差异高于下一个较低浓度样品的对应差异值。

[0148] 反应时间是从初始时间点至最终时间点的差异。通常,当高浓度样品的信号可区分且当信号随着样品浓度增加时,获得良好 UDL 值。

[0149] 图 8:如表 4 和实施例 6、7、8、9 中显示,本发明的应用导致市售测定法的测量范围的扩大。

[0150] 该测量范围扩大的一个益处是,对于在自动化实验室分析仪上的测定,可以降低由分析物浓度超过测量范围的样品引起的重新运行率。为了进行可实现的重新运行率降低的规模的粗略估计,用标准方法和本发明的方法分析在 cobas c501 分析仪上对于每个测定至少 1000 个临床样品获得的结果。分析物浓度落在测量范围以外的样品引起分析仪上的自动重新运行。用标准方法可实现的测量范围描绘于商业测试的包装插页文件中。

[0151] ALTL 实例:通过使用本发明的方法,所述测定法的测量范围与标准方法相比扩大 12.1 倍。该动态范围改进导致与标准方法相比重新运行的减少:分析物浓度低于标准测量范围的样品引起的所有重新运行中的 87% 可以通过应用本发明的方法避免;并且可以避免

超过标准测量范围的样品引起的所有重新运行中的 99%。用于本研究的样品是来自健康概况与标准中心实验室中存在的患者的健康概况相当的供体。

## 实施例

### [0152] 实施例 1:CRP L3 测试的动态范围的测定

#### 1.1 仪器：

具有多波长分光光度计作为检测单元的 Roche's (Roche Diagnostics GmbH) cobas c311 分析仪用于本实验。该仪器自动移取样品和检测试剂至反应室 (reaction cells)。可以将多达 3 种不同试剂 R1、R2 和 R3 添加至样品。该仪器使用卤钨灯作为照射源 (12 V / 50 W), 并用由 12 个光电二极管组成的光电二极管阵列在 12 种不同波长 (在 340、376、415、450、480、505、546、570、600、660、700 和  $800 \pm 2$  nm) 同时测量吸光度。光路长度为 5.6 mm, 且检测器的光范围为 0.0000 - 3.0000 吸光度。对于每个反应室 (reaction cell), 测量水空白, 然后在 10 分钟 (在这里也称为完整反应时间) 内 57 次采集吸光度读数, 因此对于每个波长的吸光度得到总共 57 个测量点, 也称为光度点或测定点。浓度可以通过使用这些测量点中的至少一个来计算。在该仪器上存在两种基本类型的光度测定法: 端点测定法和速率测定法。测量在 37 摄氏度进行。

#### [0153] 1.2 用于使用标准方法的 CRP- 测定法的程序：

选择 Roche's CRP L3 测试 (CRPL3, 目录号 04956842), 颗粒增强免疫浊度测定法, 用于该研究。具有用单克隆抗 CRP 抗体包被的胶乳颗粒的人 CRP 聚集物; 浊度测定该聚集物。cobas c 包装中提供用于所有 Roche 测试的试剂。这些盒 (cassettes) 包含一至三个特别设计的试剂瓶, 且具有详细的相关试剂和测试的条形码标记。对于 CRP L3 测试, 盒中使用两种试剂: R1 (具有牛血清白蛋白和防腐剂的 TRIS 缓冲液) 和 R2 (用甘氨酸缓冲液中的抗 CRP (小鼠)、免疫球蛋白 (小鼠) 和防腐剂包被的胶乳颗粒)。来自 CRP L3 测试的包装插页中描述的程序用作标准方法。

#### [0154] 1.3 移取方案：

随后将 2  $\mu$ L 样品和 150  $\mu$ L 测定缓冲液 (R1) 添加至反应室, 随后添加胶乳试剂 (R2), 用 24  $\mu$ L 稀释液 (水) 稀释, 并混合反应混合物。

#### [0155] 1.4 用于生成校准曲线的条件：

对于测量, 使用 570nm 作为主要波长, 且使用 800nm 作为校正波长。测定类型是两点终点测定法。两点终点测定法是执行样品空白的终点测定法。在这里考虑在两个不同测量点的两个吸光度读数: 通常在添加最后试剂之前或之后不久采集第一读数; 在添加最后试剂之后任何时间点采集第二读数。用于校准曲线和因此用于浓度计算的吸光度值通过从第二读数减去第一读数而获得。对于 CRP L3, 第一读数是在测量点 8, 且意指添加最终试剂之后不久, 第二读数在测量点 18, 其对应于 2.0 分钟的反应时间。为了生成校准曲线, 一式两份测量来自 Roche (目录 11355279) 的 6 份标准品, 使用样条 (spline) 作为校准类型, 其拟合通过三阶多项式近似的测量校准物的数据点之间的范围, 从而使得获得平滑校准曲线。

#### [0156] 1.5 用于根据本发明的 CRP- 测定法的程序：

用于这些实验的试剂与用于标准方法的试剂相同: 参见实施例 1.2。使用来自 CRP L3 测试的包装插页中描述的程序, 除了波长和反应时间。

[0157] 1.6 移取方案:与移取方案 1.3 相同

1.7 用于生成校准曲线的条件:

如前所述测定对于两条校准曲线的最佳条件,并获得以下结果:使用 505nm 作为第一波长,使用 800nm 作为校正波长,且使用 2.0 分钟作为第一反应时间;使用 600nm 作为第二波长,使用 800nm 作为校正波长,且使用 1.2 分钟作为第二反应时间。测定类型为如实施例 1.4 下所述的两点终点测定法。

[0158] 对于第一校准曲线,第一读数是在测量点 8,且意指添加最终试剂之后不久,且第二读数在测量点 18,其对应于 2.0 分钟的反应时间;对于第二校准曲线,第一读数是在测量点 8,且意指添加最终试剂之后不久,且第二读数在测量点 14,其对应于 1.2 分钟的反应时间。为了生成两条校准曲线,一式两份测量覆盖对应浓度范围的每 6 份标准品,使用样条(spline)作为校准类型,其拟合通过三阶多项式近似的测量校准物的数据点之间的范围,从而使得获得平滑校准曲线。当对于两条校准曲线使用来自标准方法的 6 种标准品(目录号 11355279)时,获得类似结果。

[0159] 使用第一校准曲线,将其针对特定分析物的低浓度优化,从而尽可能提高检测下限,使用第二校准曲线,将其针对特定分析物的高浓度优化,从而尽可能提高检测上限。根据待定量样品的分析物含量或对应吸光度,选择第一校准曲线或第二校准曲线用于定量 CRP。对于该目的,将样品的信号与预定阈值进行比较。CRP 的阈值可以被定义为 CRP 的校准曲线中两个吸光度值之一或两个吸光度值,其对应于 73 mg/L 的浓度(参见图 3 或新图),换言之,对于 2.0 分钟的反应时间,505nm-800nm 的吸光度 ( $A[\lambda 1, t1] = A[505nm-800nm, 2.0 \text{ 分钟}]$ ) 和 / 或对于 1.2 分钟的反应时间,600nm-800nm 的吸光度 ( $A[\lambda 2, t2] = A[600nm-800nm, 1.2 \text{ 分钟}]$ )。

[0160] 如果对于 505nm-800nm 和 2.0 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[505nm-800nm, 2.0 \text{ 分钟}]$  和 / 或如果对于 600nm-800nm 和 1.2 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[600nm-800nm, 1.2 \text{ 分钟}]$ ,则使用第一校准曲线用于其定量。

[0161] 如果对于 505nm-800nm 和 2.0 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[505nm-800nm, 2.0 \text{ 分钟}]$  和 / 或如果对于 600nm-800nm 和 1.2 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[600nm-800nm, 1.2 \text{ 分钟}]$ ,则使用第二校准曲线用于其定量。作为结果,获得两条校准曲线用于覆盖用于 CRP 测定的测量范围,第一校准曲线覆盖 0 至 73mg/L 的分析物浓度,并且第二校准曲线覆盖 73 mg/L 至 UDL 的范围。

[0162] 使用标准方法和根据本发明的方法的 CRP- 测定法的结果:

1.8 LDL 的测定:

生成空白样品的 21 份重复,且通过减去 800nm 的吸光度校正在 570nm 的主要波长记录的吸光度值、随后从在测量点 18 采集的值减去在测量点 8 采集的值而计算对应的信号值  $x_1, x_2, \dots, x_{21}$ 。最后,计算 21 个信号值  $x_1, x_2, \dots, x_{21}$  的平均值  $\bar{x}$  和对应的标准偏差。LDL 被确定为对应于信号值 ( $\bar{x} + 3 \text{ SD}$ ) 的浓度。对于新方法,仅使用在第一波长和第一反应时间下生成的数据以及对应的第一校准曲线。

[0163] 1.9 UDL 的测定:

测量覆盖比由 Roche 测定法已知的 UDL 高约 2 到 4 倍的浓度的样品稀释系列,随后通过形成测量值与理论值的比率计算分析物回收率。对于 90% 和 110% 之间的值,考虑该方

法是线性的。选择 UDL 作为线性范围内的最高浓度值。对于新方法,仅使用在第二波长和第二反应时间下生成的数据以及对应的第二校准曲线。

**[0164] 1.10 变异系数 (CV) 的测定:**

测量特定浓度的血清样品的 21 份重复,并通过标准偏差与平均值的比率计算发现的浓度值的 CV。对于新方法,根据待评估的分析物浓度,使用

- 在第一波长和第一反应时间下生成的数据以及对应的第一校准曲线,或
- 在第二波长和第二反应时间下生成的数据以及对应的第二校准曲线。评估两种低浓度样品 (1 和 5 mg/L CRP) 用于测定。

**[0165] 1.11 结果概述和结论:**

结果概述描述于表 1 中。CRP 测试的新方法的应用显示灵敏度 (LDL, 检测下限) 增加 1.8 倍,且检测上限 UDL 扩大 1.8 倍。对应的动态范围改进 3.1 倍。用新方法获得的精确度 (CV) 与标准方法相当。新方法提供最小的实施;该方法的应用不需要试剂和它们的制剂的任何改变。可以仅仅调整用于校准的标准品的数量和浓度。

**[0166] 表 1:对于 CRP L3 的结果概述**

	标准方法 (570 nm 波长, 800nm 校正波长, 2.0 min 反应 时间)	新方法 (校准曲线 1: 505 nm 波长, 800nm 校正波长, 2.0 min 反应 时间; 校准曲线 2: 600nm 波 长, 800nm 校正波长, 1.2 min 反应时间)
<b>LDL (mg/L)</b>	<b>0,063</b>	<b>0,036</b>
<b>UDL (mg/L)</b>	<b>370</b>	<b>660</b>
<b>动态范围</b>	<b>5870</b>	<b>18330</b>
<b>测量范围(mg/L)</b>	<b>0,063 - 370</b>	<b>0,036 - 660</b>
<b>在 1 mg/L 的 CV (%)</b>	<b>5,3</b>	<b>5,0</b>
<b>在 5 mg/L 的 CV (%)</b>	<b>1,8</b>	<b>1,7</b>

**[0167] 实施例 2:进一步测定的动态范围的测定**

2.1 仪器:参见实施例 1。

**[0168] 2.2 用于使用标准方法的铁蛋白测定法的程序:**

选择 Roche's 铁蛋白测试 (FERR4, 目录号 04885317), 颗粒增强免疫浊度测定法,用于该研究。具有用抗铁蛋白抗体包被的胶乳颗粒的人铁蛋白聚集物;浊度测定该聚集物。cobas c 包装中提供用于所有 Roche 测试的试剂。这些盒 (cassettes) 包含一至三个特别设计的试剂瓶,且具有详细的相关试剂和测试的条形码标记。对于铁蛋白测试,盒中使用两种试剂:R1 (具有免疫球蛋白 (兔) 和防腐剂的 TRIS 缓冲液 pH7.5) 和 R3 (用抗人铁蛋白抗体 (兔)、防腐剂包被的胶乳颗粒)。来自铁蛋白测试的包装插页中描述的程序用作标准方法。

**[0169] 2.3 移取方案:**

随后将 10 $\mu$ L 样品和 80 $\mu$ L 测定缓冲液 (R1) 添加至反应室, 随后添加胶乳试剂 (R3), 并混合反应混合物。

[0170] 2.4 用于生成校准曲线的条件:

对于测量, 使用 570nm 作为主要波长, 且使用 800nm 作为校正波长。测定类型为如实施例 1.4 下所述的两点终点测定法。对于铁蛋白, 第一读数是在测量点 24, 且意指添加最终试剂之后不久, 且第二读数在测量点 57, 其对应于 5.1 分钟的反应时间。为了生成校准曲线, 一式两份测量来自 Roche (目录号 11355279) 的 6 份标准品, 使用样条 (spline) 作为校准类型, 其拟合通过三阶多项式近似的测量校准物的数据点之间的范围, 从而使得获得平滑校准曲线。

[0171] 2.5 用于根据本发明的铁蛋白测定法的程序:

用于这些实验的试剂与如实施例 2.2 中所述用于标准方法的试剂相同。使用来自铁蛋白测试的包装插页中描述的程序, 除了波长和反应时间。

[0172] 2.6 移取方案: 与如 2.3 中所述的移取方案相同。

[0173] 2.7 用于生成校准曲线的条件:

如前所述测定对于两条校准曲线的最佳条件, 并获得以下结果: 使用 505nm 作为第一波长, 使用 800nm 作为校正波长, 且使用 4.9 分钟作为第一反应时间; 使用 570nm 作为第二波长, 使用 800nm 作为校正波长, 且使用 5.1 分钟作为第二反应时间。测定类型为如实施例 1.4 下所述的两点终点测定法。对于第一校准曲线, 第一读数是在测量点 25, 且意指添加最终试剂之后不久, 且第二读数在测量点 57, 其对应于 4.9 分钟的反应时间; 对于第二校准曲线, 第一读数是在测量点 24, 且意指添加最终试剂之后不久, 且第二读数在测量点 57, 其对应于 5.1 分钟的反应时间。为了生成两条校准曲线, 一式两份测量覆盖对应浓度范围的每 6 份标准品, 使用样条 (spline) 作为校准类型, 其拟合通过三阶多项式近似的测量校准物的数据点之间的范围, 从而使得获得平滑校准曲线。当对于两条校准曲线使用来自标准方法的 6 种标准品 (目录号 11355279) 时, 获得类似结果。阈值可以被定义为校准曲线中对于 100  $\mu$ g/L 浓度的铁蛋白的两个吸光度值之一或两个吸光度值。

[0174] 使用标准方法和根据本发明的方法的铁蛋白测定法的结果:

2.8 LDL / UDL / CV 的测定: 参见实施例 1。

[0175] 2.9 结果概述和结论:

结果概述描述于表 2 中。Roche 的铁蛋白测试的新方法的应用显示灵敏度 (LDL, 检测下限) 增加 1.7 倍, 且保留的检测上限 UDL。对应的动态范围改进 1.7 倍。用新方法获得的精确度 (CV) 与标准方法相当。新方法提供最小的实施; 该方法的应用不需要试剂和它们的制剂的任何改变。可以仅仅调整用于校准的标准品的数量和浓度。

[0176] 表 2: 对于 FERR4 的结果概述

	标准方法 (570 nm 波长, 800nm 校正波长, 5.1 min 反应时间)	新方法 (校准曲线 1: 505 nm 波长, 800nm 校正波长, 4.9 min 反应时间; 校准 曲线 2: 570nm 波长, 800nm 校正 波长, 5.1 min 反应时间)
LDL (µg/L)	2.0	1.2
UDL (µg/L)	1940	1940
动态范围	970	1617
测量范围(µg/L)	2 - 1940	1.2 - 1940
在 10 µg/L 的 CV (%)	8.9	6.7
在 30 µg/L 的 CV (%)	2.9	1.7
在 145 µg/L 的 CV	0.7	0.7

[0177] 实施例 3:来自 Roche 的进一步测试的动态范围扩大潜能的评估

3.1 仪器:参见实施例 1。

[0178] 3.2 用于使用标准方法的测定法的程序:

评估以下来自 Roche 的颗粒增强免疫浊度测定法:具有直接测试形式的三种测定法,肌红蛋白 (MY02, 目录号 04580010)、D 二聚体 (D-DI2, 号 04912551) 和类风湿因子 (RF-II, 目录号 20764574), 以及具有竞争性测试形式的两种测定法 (KIMS:溶液中微粒的动态相互作用), 地高辛 (DIG, 目录号 20737836) 和苯巴比妥 (PHN02, 目录号 04490924)。在 DIG 测定法中, 将颗粒用地高辛包被, 并根据样品的地高辛浓度在抗体溶液存在的情况下迅速聚集。在 PHN02 测定法中, 将苯巴比妥抗体共价偶联至微粒, 并将苯巴比妥衍生物连接至大分子; 苯巴比妥衍生物与微粒上抗体的结合受样品中苯巴比妥的存在的抑制。来自上述测试的对应包装插页中描述的程序用作标准方法。

[0179] 3.3 关于试剂、移取和校准程序的概述:

程序如来自测试的包装插页文件中所述, 并且总结于下表 (表 3)。

	试剂	移取方案	波长, 反应时间 **	校准
肌红蛋白	<b>R1:</b> 甘氨酸缓冲液, 防腐剂。 <b>R2:</b> 用抗肌红蛋白抗体包被的胶乳颗粒, 具有防腐剂的缓冲液。	3 $\mu$ L 样品, 90 $\mu$ L R1, 30 $\mu$ L R2	570nm – 800nm, 4.7 min (7-29)	标准品: 6点校准, 目录号 04580044。 校准类型: RCM*。 测定类型: 两点终点。
D二聚体	<b>R1:</b> Tris 缓冲液, 防腐剂。 <b>R3:</b> 用抗 D 二聚体抗体包被的胶乳颗粒, 具有防腐剂的缓冲液。	5 $\mu$ L 样品, 90 $\mu$ L R1, 90 $\mu$ L R3	800nm, 4.3 min (27-57)	标准品: 6点校准, 目录号 05050901。 校准类型: 样条。 测定类型: 两点终点。
RF II	<b>R1:</b> 甘氨酸缓冲液, 防腐剂。 <b>R2:</b> 用人 IgG 包被的胶乳颗粒, 具有防腐剂的缓冲液。	3 $\mu$ L 样品, 90 $\mu$ L R1, 30 $\mu$ L R2	570nm – 800nm, 2.2 min (7-18)	标准品: 6点校准, 目录号 12172828。 校准类型: RCM*。 测定类型: 两点终点。
DIG	<b>R1:</b> 具有防腐剂的缓冲液中的抗地高辛抗体。 <b>R2:</b> 缀合的地高辛衍生物微粒, 具有防腐剂的缓冲液。	5.5 $\mu$ L 样品, 84 $\mu$ L R1, 22 $\mu$ L R2 (用 20 $\mu$ l 水稀释)	660nm, 4.7 min (9-31)	标准品: 6点校准, 目录号 03375790。 校准类型: RCM*。 测定类型: 两点终点。
PHENO	<b>R1:</b> 具有防腐剂的缓冲液中的苯巴比妥缀合物。 <b>R2:</b> 用抗苯巴比妥抗体包被的胶乳颗粒, 具有防腐剂的缓冲液。	2 $\mu$ L 样品, 93 $\mu$ L R1, 93 $\mu$ L R2	600nm – 800nm, 6.5 min (10-49)	标准品: 6点校准, 目录号 03375790。 校准类型: RCM*。 测定类型: 两点终点。

表 3:测试概述。

\* RCM: Rodbard 拟合 ;\*\* 主要波长 - 校正波长;反应时间(分钟);括号中为对于第

一和第二读数的测量点。

[0180] 3.4 用于根据本发明的测定法的程序：

用于这些实验的试剂与如实施例 3.2 中所述用于标准方法的试剂相同。使用来自铁蛋白测试的包装插页中描述的程序，除了波长和反应时间。

[0181] 3.5 关于试剂、移取和校准程序的概述：

如果没有另外提到，则程序如来自测试的包装插页文件中所述，并且总结于表 3。

[0182] 使用标准方法和本发明的新方法的测定法肌红蛋白、D 二聚体、RF II、DIG 和 PHENO 的结果：

3.6 LDL / UDL / CV 的测定：参见实施例 1。

[0183] 3.7 结果概述和结论：

结果概述描述于表 4 中。如较早所述测定对于所述第一和第二校准曲线的最佳波长和反应时间。将新方法应用于市售 Roche 的测试在大多数情况下导致灵敏度 (LDL, 检测下限) 的改进和 / 或上部测量范围的改进。动态范围改进 1.5 至 5.8 倍。在两种情况 (D 二聚体和 Dig) 下, 改进是适中的。在改进适中的情况下, 将改进倍数设置在括号中。用新方法获得的精确度 (CV) 与标准方法相当。新方法提供最小的实施; 该方法的应用不需要试剂和它们的制剂的任何改变。可以仅仅调整用于校准的标准品的数量和浓度。

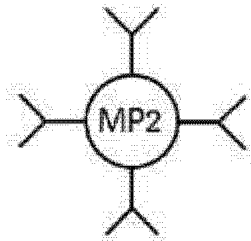
[0184] 表 4: 结果概述

Roche 测试	标准条件 <sup>d</sup>	新条件 <sup>d</sup>		改进倍数 <sup>e</sup>		
		Cal 1	Cal 2	LDL	UDL	动态范围
肌红蛋白 Gen. 2	570 nm – 800 nm 4.7min (7 – 29)	505 nm – 800 nm 6.7min (9 – 50)	660 nm – 800 nm 2.6min (7 – 20)	2 <sup>a</sup>	2	4
D-二聚体 Gen. 2	800 nm 4.3min (27 – 57)	800 nm 4.3min (27 – 57)	700 nm 1.4min (26 – 33)	-	(1.14)	(1.14)
RF II	570 nm – 800 nm 2.2min (7 – 18)	546 nm – 800 nm 8.5min (7 – 57)	660 nm – 800 nm 1.4min (7 – 14)	5 <sup>b</sup>	(1.15)	5.8
DIG	660 nm 4.7min (9 – 31)	660 nm 4.7min (9 – 31)	505 nm – 800 nm 4.7min (9 – 31)	-	(1.15)	(1.15)
PHENO	600 nm – 800 nm 6.5min (10 – 49)	600 nm – 800 nm 6.5min (10 – 49)	505 nm – 800 nm 7.9min (10 – 57)	-	1.5	1.5

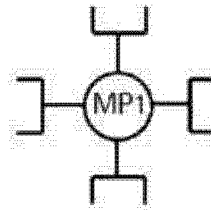
<sup>a</sup> 无仪器因素, <sup>b</sup> 与样条 (spline) 的变化校准, <sup>e</sup> 在新条件下保留来自标准条件的良好精确度, <sup>d</sup> 第一行: 主要波长 – 校正波长; 第二行: 反应时间 (分钟), 括号内: 测量点。

[0185] 实施例 4 :用修饰的颗粒 MP2 额外改进本发明的组合测定的动态范围

4.1 此外,使用 CRP L3 测定法作为先导参数评估具有调整的颗粒尺寸和抗体装载度的本发明的测定的组合。CRP L3 测定包括如 EP 0898169 中所述的两种不同类型的颗粒,用高亲和力抗体(克隆 36F12 ;用于胶乳包被的浓度 :50mg/g 胶乳)包被的大胶乳颗粒 (MP2,约 220nm 直径)和用较弱亲和力抗体(克隆 21F12 ;用于胶乳包被的浓度 :45mg/g 胶乳)包被的小胶乳颗粒 (MP1,约 110-140 nm 直径)。在这里,MP2 颗粒通过使用较大尺寸和抗体装载度以增强测定法中测定的分析灵敏度和最后可实现的 LDL 和动态范围来修饰,如下所述。



- ~ 220 nm  $\varnothing$  胶乳
- 抗-CRP 36F12 (高亲和力)
- 50 mg 36F12/g 胶乳



- 110-140 nm  $\varnothing$  胶乳
- 抗-CRP 21F12 (低亲和力)
- 45 mg 21F12/g 胶乳

[0186] 4.2 修饰 MP2 颗粒的合成 :

向胶乳颗粒(羧酸酯修饰的微粒,290nm 尺寸)中以 750 $\mu$ l MES 缓冲液(20mM, pH 6.1)中 2%固体的浓度依次添加 30 $\mu$ l 磺基-NHS(磺基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺, MES 缓冲液中 100mM)溶液和 30 $\mu$ l EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺, MES 缓冲液中 100mM)溶液。将反应混合物短暂超声处理并使其在混合轮上在室温反应 1 小时。然后,将含有 37 $\mu$ l Synperonic P85 溶液(MES 中 1%)的 750 $\mu$ l MES 缓冲液(20mM, pH 6.1)中 60mg 抗体 36F12/克胶乳与磺基-NHS/EDC 活化的胶乳颗粒混合。将反应混合物短暂超声处理并使其在混合轮上在室温反应 2 小时。向反应混合物中添加 45 $\mu$ l 甘氨酸溶液(2M, pH 11),超声处理,并在混合轮上混合 15 分钟。最后,将颗粒通过离心并再悬浮于含有 0.03% Synperonic P85 的甘氨酸(50mM, pH 8)中而洗涤 2 次。在最后离心和再悬浮步骤之后,将胶乳颗粒(1%固体)储存在含有 0.03% Synperonic P85、0.1% BSA 和 0.05% 叠氮化钠的甘氨酸(50mM, pH 8)中。

[0187] 4.3 标准 MP1 颗粒的合成 :

向具有 750 $\mu$ l MES 缓冲液(20mM, pH 6.1)中 2%固体的浓度的胶乳颗粒(羧酸酯修饰的微粒,尺寸 110-140nm)中依次添加 30 $\mu$ l 磺基-NHS(磺基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺, MES 缓冲液中 100mM)溶液和 30 $\mu$ l EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺, MES 缓冲液中 100mM)溶液。将反应混合物短暂超声处理并使其在混合轮上在室温反应 1 小时。然后,将 750 $\mu$ l MES 缓冲液(20mM, pH 6.1)中 45mg 抗体 21F12/克胶乳与磺基-NHS/EDC 活化的胶乳颗粒混合。20 分钟后,将 37 $\mu$ l Synperonic P85 溶液(MES 中 1%)添加至混合物中。将反应混合物短暂超声处理并使其在混合轮上在室温反应 100 分钟。向反应混合物中添加 45 $\mu$ l 甘氨酸溶液(2M, pH 11),超声处理,并在混合轮上混合 15 分钟。最后,将颗粒通过离心并再悬浮于含有 0.03% Synperonic P85 的甘氨酸(50mM, pH 8)中而洗涤 2 次。在

最后离心和再悬浮步骤之后,将胶乳颗粒(1%固体)储存在含有0.03% Synperonic P85、0.1% BSA 和 0.05% 叠氮化钠的甘氨酸(50mM, pH 8)中。

[0188] 4.4 用于分析仪测定的试剂 R1 和 R2 的制备:

试剂 R1 和 R2 如来自测试的包装插页文件中所述。R2 试剂通过混合步骤 a) 和 b) 中合成的 MP1 和 MP2 颗粒来制备。将该试剂填充在 cobas c 包装中。

[0189] 4.5 仪器:参见实施例 1。

[0190] 4.6 用于使用标准方法的 CRP- 测定法的程序与实施例 1.2 的程序相同。

[0191] 4.7 移取方案:与实施例 1.3 的移取方案相同

4.8 用于生成校准曲线的条件与实施例 1.4 相同。

[0192] 4.9 用于使用本发明的新方法的 CRP- 测定法的程序:

用于这些实验的试剂如上面实施例 1.2 中所述制备。使用来自 CRP L3 测试的包装插页中描述的程序,除了波长和反应时间。

[0193] 4.10 移取方案:与实施例 1.3 的移取方案相同。

[0194] 4.11 用于生成校准曲线的条件:

如前所述测定对于两条校准曲线的最佳条件,并获得以下结果:使用 505nm 作为第一波长,使用 800nm 作为校正波长,且使用 2.8 分钟作为第一反应时间;使用 570nm 作为第二波长,使用 800nm 作为校正波长,且使用 2.0 分钟作为第二反应时间。测定类型为如实施例 1.4 下所述的两点终点测定法。对于第一校准曲线,第一读数是在测量点 8,且意指添加最终试剂之后不久,且第二读数在测量点 22,其对应于 2.8 分钟的反应时间;对于第二校准曲线,第一读数是在测量点 8,且意指添加最终试剂之后不久,且第二读数在测量点 18,其对应于 2.0 分钟的反应时间。为了生成两条校准曲线,一式两份测量覆盖对应浓度范围的每 6 份标准品,使用样条(spline)作为校准类型,其拟合通过三阶多项式近似的测量校准物的数据点之间的范围,从而使得获得平滑校准曲线。当对于两条校准曲线使用来自标准方法的 6 种标准品(目录号 11355279)时,获得类似结果。使用第一校准曲线,将其针对特定分析物的低浓度优化,从而尽可能提高检测下限,使用第二校准曲线,将其针对特定分析物的高浓度优化,从而尽可能提高检测上限。根据待定量样品的分析物含量或对应吸光度,选择第一校准曲线或第二校准曲线用于定量 CRP。对于该目的,将样品的信号与预定阈值进行比较。CRP 的阈值可以被定义为 CRP 的校准曲线中两个吸光度值之一或两个吸光度值,其对应于 10 mg/L 的浓度,换言之,对于 2.8 分钟的反应时间,505nm-800nm 的吸光度 ( $A[\lambda 1, t1] = A[505nm-800nm, 2.8 \text{ 分钟}]$ ) 和 / 或对于 2.0 分钟的反应时间,570nm-800nm 的吸光度 ( $A[\lambda 2, t2] = A[570nm-800nm, 2.0 \text{ 分钟}]$ )。

[0195] 如果对于 505nm-800nm 和 2.8 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[505nm-800nm, 2.8 \text{ 分钟}]$  和 / 或如果对于 570nm-800nm 和 2.0 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[570nm-800nm, 2.0 \text{ 分钟}]$ ,则使用第一校准曲线用于其定量。

[0196] 如果对于 505nm-800nm 和 2.8 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[505nm-800nm, 2.8 \text{ 分钟}]$  和 / 或如果对于 570nm-800nm 和 2.0 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[570nm-800nm, 2.0 \text{ 分钟}]$ ,则使用第二校准曲线用于其定量。作为结果,获得两条校准曲线用于覆盖用于 CRP 测定的测量范围,第一校准曲线覆盖 0 至 10mg/L 的分析物浓度,并且第二校准曲线覆盖 10 mg/L 至 UDL 的范围。

[0197] 使用标准方法和根据本发明的方法的 CRP- 测定法的结果：

4. 12 LDL、UDL 和 CV 的测定：参见实施例 1。

[0198] 4.13 结果概述和结论：

如图 2 和表 5 中所述，使用具有较高抗体装载度 (60mg 36F12/g 胶乳，而不是 50 mg/g) 的较大 MP2 颗粒 (290nm，而不是 220nm) 组合多应用方法导致与使用标准条件 (具有未修饰的 MP1 和 MP2 颗粒的胶乳试剂；在 570nm 的一个主要波长测量，通过 800nm 校正，2.0 min 反应时间) 的商业标准 CRP L3 测定相比 LDL 和动态范围改进 8 倍。用新方法获得的精确度 (CV) 与标准方法相当。新方法的条件为在 505nm 记录的具有 800nm 作为校正波长和 2.8min 反应时间的第一校准曲线，和在 570nm 记录的具有 800nm 作为校正波长和 2.0 min 反应时间的第二校准曲线。

[0199] 表 5：对于具有调整的颗粒 MP2 的 CRP 的结果概述

	标准试剂 (MP1: 110-140nm, 45mg 21F12/g 胶乳; MP2: 220nm, 50mg 36F12/g 胶乳), 标准方法 (570 nm - 800nm, 2.0 min)	调整试剂 (MP1: 110-140nm, 45mg 21F12/g 胶乳; MP2: 290nm, 60mg 36F12/g 胶乳), 新方法 (校准 1: 505 nm - 800nm, 2.8 min; 校准 2: 570nm - 800nm, 2.0 min)
LDL (mg/L)	0.091	0.011
UDL (mg/L)	350	350
动态范围	3846	31818
测量范围(mg/L)	0.091- 350	0.011- 350
在 1 mg/L 的 CV (%)	4.6	3.4
在 5 mg/L 的 CV (%)	1.5	0.9

[0200] 实施例 5：用修饰的颗粒 MP1 和 MP2 额外改进多应用方法的组合的动态范围

5.1 此外，使用 CRP L3 测定法作为先导参数评估具有调整的颗粒尺寸和抗体装载度的多应用方法的组合。CRP L3 测定包括如 EP 0898169 中所述的两种不同类型的颗粒，用高亲和力抗体 (克隆 36F12；用于胶乳包被的浓度：50mg/g 胶乳) 包被的大胶乳颗粒 (MP2，约 220nm 直径) 和用较弱亲和力抗体 (克隆 21F12；用于胶乳包被的浓度：45mg/g 胶乳) 包被的小胶乳颗粒 (MP1，约 110-140 nm 直径)。在这里，MP2 颗粒通过使用较大尺寸和抗体装载度来修饰，且小 MP1 颗粒通过使用较小颗粒来修饰，且最后使用测定中测定的可实现的 LDL、UDL 和动态范围，如下所述。

[0201] 5.2 修饰 MP2 颗粒的合成：

向具有 750 $\mu$ l MES 缓冲液 (20mM, pH 6.1) 中 2% 固体的浓度的胶乳颗粒 (羧酸酯修饰的微粒，290nm 尺寸) 中依次添加 30 $\mu$ l 磺基-NHS (磺基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺，MES 缓冲液中 100mM) 溶液和 30 $\mu$ l EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺，MES 缓冲液中 100mM) 溶液。将反应混合物短暂超声处理并使其在混合轮上在室温反应 1 小时。然后，将含有 37 $\mu$ l Synperonic P85 溶液 (MES 中 1%) 的 750 $\mu$ l MES 缓冲液 (20mM, pH 6.1) 中 70mg 抗体 36F12/克胶乳与磺基-NHS/EDC 活化的胶乳颗粒混合。将反应混合物短暂超声

处理并使其在混合轮上在室温反应 2 小时。向反应混合物中添加 45 $\mu$ l 甘氨酸溶液 (2M, pH 11), 超声处理, 并在混合轮上混合 15 分钟。最后, 将颗粒通过离心并再悬浮于含有 0.03% Synperonic P85 的甘氨酸 (50mM, pH 8) 中而洗涤 2 次。在最后离心和再悬浮步骤之后, 将胶乳颗粒 (1% 固体) 储存在含有 0.03% Synperonic P85、0.1% BSA 和 0.05% 叠氮化钠的甘氨酸 (50mM, pH 8) 中。

[0202] 5.3 修饰的 MP1 颗粒的合成:

向具有 750 $\mu$ l MES 缓冲液 (20mM, pH 6.1) 中 2% 固体的浓度的胶乳颗粒 (羧酸酯修饰的微粒, 尺寸 90nm) 中依次添加 30 $\mu$ l 磺基-NHS (磺基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺, MES 缓冲液中 100mM) 溶液和 30 $\mu$ l EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺, MES 缓冲液中 100mM) 溶液。将反应混合物短暂超声处理并使其在混合轮上在室温反应 1 小时。然后, 将 750 $\mu$ l MES 缓冲液 (20mM, pH 6.1) 中 50mg 抗体 21F12/克胶乳与磺基-NHS/EDC 活化的胶乳颗粒混合。20 分钟后, 将 37 $\mu$ l Synperonic P85 溶液 (MES 中 1%) 添加至混合物中。将反应混合物短暂超声处理并使其在混合轮上在室温反应 100 分钟。向反应混合物中添加 45 $\mu$ l 甘氨酸溶液 (2M, pH 11), 超声处理, 并在混合轮上混合 15 分钟。最后, 将颗粒通过离心并再悬浮于含有 0.03% Synperonic P85 的甘氨酸 (50mM, pH 8) 中而洗涤 2 次。在最后离心和再悬浮步骤之后, 将胶乳颗粒 (1% 固体) 储存在含有 0.03% Synperonic P85、0.1% BSA 和 0.05% 叠氮化钠的甘氨酸 (50mM, pH 8) 中。

[0203] 5.4 用于分析仪测定的试剂 R1 和 R2 的制备:

试剂 R1 和 R2 如来自测试的包装插页文件中所述。R2 试剂通过混合步骤 a) 和 b) 中合成的 MP1 和 MP2 颗粒来制备。将该试剂填充在 cobas c 包装中。

[0204] 5.5 仪器: 参见实施例 1。

[0205] 5.6 用于使用标准方法的 CRP-测定法的程序与实施例 1.2 的程序是相同的。

[0206] 5.7 移取方案: 与实施例 1.3 的移取方案相同。

[0207] 5.8 用于生成校准曲线的条件: 与实施例 1.4 相同。

[0208] 5.9 用于使用本发明的新方法的 CRP-测定法的程序:

用于这些实验的试剂如上面所述制备, 且此后填充在 cobas c 包装中。R1 (TRIS 缓冲液) 和 R2 (甘氨酸缓冲液中的用抗 CRP (小鼠) 包被的胶乳颗粒)。使用来自 CRP L3 测试的包装插页中描述的程序, 除了波长和反应时间。

[0209] 5.10 移取方案: 与实施例 1.3 的移取方案相同。

[0210] 5.11 用于生成校准曲线的条件:

如前所述测定对于两条校准曲线的最佳条件, 并获得以下结果: 使用 546nm 作为第一波长, 使用 800nm 作为校正波长, 且使用 7.1 分钟作为第一反应时间; 使用 660nm 作为第二波长, 使用 800nm 作为校正波长, 且使用 0.8 分钟作为第二反应时间。测定类型为如实施例 1.4 下所述的两点终点测定法。对于第一校准曲线, 第一读数是在测量点 7, 且意指添加最终试剂之后不久, 且第二读数在测量点 50, 其对应于 7.1 分钟的反应时间; 对于第二校准曲线, 第一读数是在测量点 7, 且意指添加最终试剂之后不久, 且第二读数在测量点 11, 其对应于 0.8 分钟的反应时间。为了生成两条校准曲线, 一式两份测量覆盖对应浓度范围的每 6 份标准品, 使用样条 (spline) 作为校准类型, 其拟合通过三阶多项式近似的测量校准物的数据点之间的范围, 从而使得获得平滑校准曲线。当对于两条校准曲线使用来自标准方法

的 6 种标准品（目录号 11355279）时，获得类似结果。

[0211] 使用第一校准曲线，将其针对特定分析物的低浓度优化，从而尽可能提高检测下限，使用第二校准曲线，将其针对特定分析物的高浓度优化，从而尽可能提高检测上限。根据待定量样品的分析物含量或对应吸光度，选择第一校准曲线或第二校准曲线用于定量 CRP。对于该目的，将样品的信号与预定阈值进行比较。CRP 的阈值可以被定义为 CRP 的校准曲线中两个吸光度值之一或两个吸光度值，其对应于 50 mg/L 的浓度，换言之，对于 7.1 分钟的反应时间，546nm-800nm 的吸光度 ( $A[\lambda 1, t1] = A[546\text{nm}-800\text{nm}, 7.1 \text{ 分钟}]$ ) 和 / 或对于 0.8 分钟的反应时间，660nm-800nm 的吸光度 ( $A[\lambda 2, t2] = A[660\text{nm}-800\text{nm}, 0.8 \text{ 分钟}]$ )。

[0212] 如果对于 546nm-800nm 和 7.1 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[546\text{nm}-800\text{nm}, 7.1 \text{ 分钟}]$  和 / 或如果对于 660nm-800nm 和 0.8 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[660\text{nm}-800\text{nm}, 0.8 \text{ 分钟}]$ ，则使用第一校准曲线用于其定量。

[0213] 如果对于 546nm-800nm 和 7.1 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[546\text{nm}-800\text{nm}, 7.1 \text{ 分钟}]$  和 / 或如果对于 660nm-800nm 和 0.8 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[660\text{nm}-800\text{nm}, 0.8 \text{ 分钟}]$ ，则使用第二校准曲线用于其定量。作为结果，获得两条校准曲线用于覆盖用于 CRP 测定的测量范围，第一校准曲线覆盖 0 至 50mg/L 的分析物浓度，并且第二校准曲线覆盖 50 mg/L 至 UDL 的范围。

[0214] 对于使用标准方法和本发明的新方法的 CRP- 测定法的结果：

5.12LDL / UDL / CV 的测定：参见实施例 1。

[0215] 5.13 结果概述和结论：

如图 2 和表 6 中所述，使用具有较高抗体装载度 (70mg 36F12/g 胶乳，而不是 50 mg/g) 的较大 MP2 颗粒 (290nm，而不是 220nm) 和较小 MP1 颗粒 (90nm，而不是 110-140nm；对于胶乳缀合反应，50mg 21F12/g 胶乳) 组合多应用方法导致与使用标准条件（具有未修饰的 MP1 和 MP2 颗粒的胶乳试剂；在 570nm 的一个主要波长测量，通过 800nm 校正，2.0 min 反应时间）的商业标准 CRP L3 测定相比 LDL、UDL 和动态范围分别改进 3.0、2.3 和 6.9 倍。用新方法获得的精确度 (CV) 与标准方法相当。新方法的条件为在 546nm 记录的具有 800nm 作为校正波长和 7.1 min 反应时间的第一校准曲线，和在 660nm 记录的具有 800nm 作为校正波长和 0.8 min 反应时间的第二校准曲线。

[0216] 表 6：对于具有调整的颗粒 MP1 和 MP2 的 CRP 的结果概述

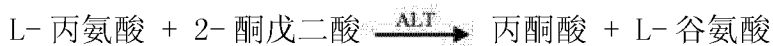
	标准试剂 (MP1: 110-140nm, 45mg 21F12/g 胶乳; MP2: 220nm, 50mg 36F12/g 胶乳), 标准方法 (570 nm - 800nm, 2.0 min)	调整试剂 (MP1: 90nm, 50mg 21F12/g 胶乳; MP2: 290nm, 70mg 36F12/g 胶乳), 新方法 (Cal 1: 546 nm - 800nm, 7.1 min; Cal 2: 660nm - 800nm, 0.8 min)
LDL (mg/L)	0,060	0,020
UDL (mg/L)	367	844
动态范围	6117	42200
测量范围(mg/L)	0,060 - 367	0,020 - 844
在 1 mg/L 的 CV (%)	8,3	2,7
在 5 mg/L 的 CV (%)	1,9	0,9
在 10 mg/L 的 CV (%)	1,3	1,3
在 100 mg/L 的 CV (%)	1,3	1,3

[0217] 实施例 6 : 比色测定法的动态范围的测定 : 丙氨酸转氨酶 (ALTL)

6.1 仪器 : 参见实施例 1。

[0218] 6.2 用于使用标准方法的 ALTL (丙氨酸转氨酶) 测定法的程序 :

选择 Roche 的丙氨酸转氨酶测试 (ALTL, 目录号 20764957), 比色测定法, 用于该研究。酶丙氨酸转氨酶 (ALT) 催化 L- 丙氨酸和 2- 酮戊二酸之间的反应。形成的丙酮酸被 NADH 在由乳酸脱氢酶 (LDH) 催化的反应中还原, 以形成 L- 乳酸和 NAD<sup>+</sup>。NADH 氧化的速率与光度测量的催化 ALT 活性成正比。其通过测量吸光度的降低来测定。



[0219] cobas c 包装中提供用于所有 Roche 测试的试剂。这些盒包含一至三个特别设计的试剂瓶, 且具有含有详细的试剂和测试相关的信息的条形码标记。对于 ALTL 测试, 盒由两种试剂构成 : R1 (TRIS 缓冲液, pH7.3, L- 丙氨酸, 白蛋白 (牛), LDH (微生物), 稳定剂和防腐剂) 和 R2 (2- 酮戊二酸, NADH, 添加剂和防腐剂)。ALTL 测试的包装插页中描述的程序用作标准方法。

[0220] 6.3 移取方案 :

随后将用 32μL 稀释液 (水) 稀释的 9μL 样品和 59μL 测定试剂 R1 添加至反应室, 随后添加用 20μL 稀释液 (水) 稀释的 17μL 2- 酮戊二酸和 NADH 试剂 (R2)。其后, 混合所有反应组分。

[0221] 6.4 用于生成校准曲线的条件 :

在作为主要波长的 340nm 和作为校正波长的 700nm 实施吸光度读数。测定类型为动力学 A 测定法, 也称为速率 A 测定法。

[0222] 对于速率测定, 通过测量作为时间的函数的吸光度追踪反应的时程。即, 当反应进

行时进行测量。速率测定使用这些测量,因为它们浓度计算基于吸光度的变化速率的测定。对于多个测量点编程速率 A 测定。这意指,存在测量窗口,且对于速率计算考虑该窗口内的每个光度测量 - 以在第一编程测量点的读数开始到第二编程测量点的读数。通过最小二乘分析将吸光度值转化为吸光度的变化速率。对于 ALTL,第一编程测量点(初始测量点)为测量点 12,这意指将样品和最终试剂移取到反应室后不久(添加最终试剂后 66 秒)。在测量点 31 取第二编程测量点(最后测量点),其对应于 4.1 分钟的反应时间。从最初和最终测量点之间的每个读数计算信号。这两个测量点之间的吸光度的变化速率(斜率)速度通过最小二乘法来计算。为了生成校准曲线,用线性校准类型一式两份测量来自 Roche 的两份标准品(标准品 1:用于空白测定的水;标准品 2,目录号 10759350),其通过线性模式拟合测量校准物的数据点,从而使得获得线性校准曲线。

[0223] 6.5 用于根据本发明的 ALTL 测定法的程序:

用于这些实验的试剂与如实施例 6.2 中所述用于标准方法的试剂相同。使用来自 ALTL 测试的包装插页中描述的程序,除了波长和反应时间。

[0224] 6.6 移取方案:与移取方案 6.3 相同

6.7 用于生成校准曲线的条件:

为了生成两条校准曲线,用线性作为校准类型一式两份测量 2 份标准品,其通过线性模式拟合测量校准物的数据点,从而使得获得线性校准曲线(标准品 1:用于空白测定的水;标准品 2:来自 Roche 目录号 10759350)。如前所述测定对于两条校准曲线的最佳条件,并获得以下结果:使用 340nm 作为第一波长,使用 800nm 作为校正波长,且使用 8.5 分钟作为第一反应时间;使用 376nm 作为第二波长,使用 700nm 作为校正波长,且使用 1.4 分钟作为第二反应时间。测定类型为如实施例 1.4 下所述的用于第一和第二校准曲线两者的两点终点测定法。对于第一校准曲线,第一读数是在测量点 7,且意指添加最终试剂之后不久,且第二读数在测量点 57,其对应于 8.5 分钟的反应时间;对于第二校准曲线,第一读数是在测量点 7,且意指添加最终试剂之后不久,且第二读数在测量点 14,其对应于 1.4 分钟的反应时间。当使用其它测定类型(诸如动力学 A)用于计算第一和/或第二校准曲线时,获得类似的结果。此外,当使用与此处使用的那些不同的其它标准品浓度(来自 Roche,目录号 10759350 的市售校准物)时,以及当使用多于 2 种标准品,例如多达六种标准品用于生成各校准曲线和对于两条校准曲线中每种的不同校准类型(例如,样条(spline))时,获得了类似结果。

[0225] 使用第一校准曲线,将其针对特定分析物的低浓度优化,从而尽可能提高检测下限,使用第二校准曲线,将其针对特定分析物的高浓度优化,从而尽可能提高检测上限。根据待定量样品的分析物含量或对应吸光度,选择第一校准曲线或第二校准曲线用于定量 ALTL。对于该目的,将样品的信号与预定阈值进行比较。ALTL 的阈值可以被定义为 ALTL 的校准曲线中两个吸光度值之一或两个吸光度值,其对应于 200 U/L 的浓度,换言之,对于 8.5 分钟的反应时间,340nm-800nm 的吸光度 ( $A[\lambda 1, t1] = A[340\text{nm}-800\text{nm}, 8.5 \text{ 分钟}]$ ) 和/或对于 1.4 分钟的反应时间,376nm-700nm 的吸光度 ( $A[\lambda 2, t2] = A[376\text{nm}-700\text{nm}, 1.4 \text{ 分钟}]$ )。

[0226] 如果对于 340nm-800nm 和 8.5 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[340\text{nm}-800\text{nm}, 8.5 \text{ 分钟}]$  和/或如果对于 376nm-700nm 和 1.4 分钟反应时间计算的样品

的光信号低于预定阈值 A [376nm-700nm, 1.4 分钟], 则使用第二校准曲线用于其定量。

[0227] 如果对于 340nm-800nm 和 8.5 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值 A [340nm-800nm, 8.5 分钟] 和 / 或如果对于 376nm-700nm 和 1.4 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值 A [376nm-700nm, 1.4 分钟], 则使用第一校准曲线用于其定量。作为结果, 获得两条校准曲线用于覆盖用于 ALTL 测定的测量范围, 第一校准曲线覆盖 0 至 200 U/L 的分析物浓度, 并且第二校准曲线覆盖 200 U/L 至 UDL 的范围。

[0228] 使用标准方法和根据本发明的方法的 ALTL 测定法的结果:

6. LDL / UDL / CV 的测定: 参见实施例 1。

[0229] 6.9 结果概述和结论:

结果概述描述于表 7 中。Roche 的 ALTL 测试的新方法的应用显示灵敏度 (LDL, 检测下限) 增加 2.9 倍, 且检测上限 UDL 扩大 4.2 倍。最后, 动态范围扩大 12.2 倍。用新方法获得的精确度 (CV) 与标准方法相当。新方法提供最小的实施; 该方法的应用不需要试剂和它们的制剂的任何改变。如果需要, 可以仅仅调整用于校准的标准品的数量和 / 或浓度。

[0230] 表 7: 对于 ALTL 的结果概述

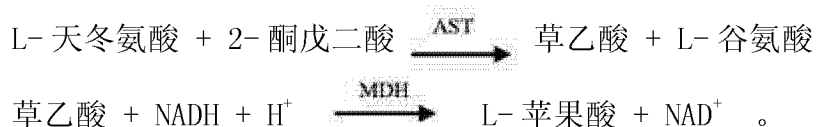
	标准方法 (340 nm 波长, 700nm 校正波长, 4.1 min 反 应时间)	新方法 (校准曲线 1: 340 nm 波长, 800nm 校 正波长, 8.5 min 反应时间; 校准曲线 2: 376nm 波长, 700nm 校正波长, 1.4 min 反应时间)
<b>LDL (U/L)</b>	<b>1.6</b>	<b>0.55</b>
<b>UDL (U/L)</b>	<b>811</b>	<b>3383</b>
<b>动态范围</b>	<b>507</b>	<b>6151</b>
<b>测量范围(U/L)</b>	<b>1.6 - 811</b>	<b>0.55 - 3383</b>
<b>在 10 U/L 的 CV (%)</b>	<b>8.37</b>	<b>5.00</b>
<b>在 150 U/L 的 CV (%)</b>	<b>0.53</b>	<b>0.30</b>
<b>在 2000 U/L 的 CV (%)</b>	<b>0.47</b>	<b>0.44</b>

[0231] 实施例 7: 比色测定法的动态范围的测定: 天冬氨酸转氨酶 (ASTL)

7.1 仪器: 参见实施例 1。

[0232] 7.2 用于使用标准方法的 ASTL (天冬氨酸转氨酶) 测定法的程序:

选择 Roche 的天冬氨酸转氨酶测试 (ASTL, 目录号 20764949), 比色测定法, 用于该研究。酶天冬氨酸转氨酶 (AST) 催化 L- 天冬氨酸和 2- 酮戊二酸之间的反应。形成的草乙酸被 NADH 在由苹果酸脱氢酶 (MDH) 催化的反应中还原, 以形成 L- 苹果酸和 NAD<sup>+</sup>。NADH 氧化的速率与光度测量的催化 AST 活性成正比。其通过测量吸光度的降低来测定。



[0233] cobas c 包装中提供用于所有 Roche 测试的试剂。这些盒包含一至三个特别设计

的试剂瓶,且具有含有详细的试剂和测试相关的信息的条形码标记。对于 ASTL 测试,盒由两种试剂构成:R1( TRIS 缓冲液, pH7.8, L- 天冬氨酸, 白蛋白(牛), MDH(微生物), LDH(微生物), 稳定剂和防腐剂)和 R2(2- 酮戊二酸, NADH 和防腐剂)。ASTL 测试的包装插页中描述的程序用作标准方法。

[0234] 7.3 移取方案:

随后将用 51 $\mu$ L 稀释液(水)稀释的 9 $\mu$ L 样品和 40 $\mu$ L 测定试剂 R1 添加至反应室,随后添加用 20 $\mu$ L 稀释液(水)稀释的 17 $\mu$ L 试剂 R2。其后混合反应混合物。

[0235] 7.4 用于生成校准曲线的条件:

在作为主要波长的 340nm 和作为校正波长的 700nm 实施吸光度读数。测定类型为动力学 A 测定法,也称为速率 A 测定法。

[0236] 对于速率测定,通过测量作为时间的函数的吸光度追踪反应的时程。即,当反应进行时进行测量。速率测定使用这些测量,因为它们的浓度计算基于吸光度的变化速率的测定。对于多个测量点编程速率 A 测定。这意指,存在测量窗口,且对于速率计算考虑该窗口内的每个光度测量 - 以在第一编程测量点的读数开始到第二编程测量点的读数。通过最小二乘分析将吸光度值转化为吸光度的变化速率。对于 ALTL,第一编程测量点(初始测量点)为测量点 12,这意指将样品和最终试剂移取到反应室后不久(添加最终试剂后 66 秒)。在测量点 31 取第二编程测量点(最后测量点),其对应于 4.1 分钟的反应时间。从最初和最终测量点之间的每个读数计算信号。这两个测量点之间的吸光度的变化速率(斜率)速度通过最小二乘法来计算。为了生成校准曲线,用线性校准类型一式两份测量来自 Roche 的两份标准品(标准品 1:用于空白测定的水;标准品 2,目录号 10759350),其通过线性模式拟合测量校准物的数据点,从而使得获得线性校准曲线。

[0237] 7.5 用于根据本发明的 ASTL 测定法的程序:

用于这些实验的试剂与如实施例 7.2 中所述用于标准方法的试剂相同。使用来自 ASTL 测试的包装插页中描述的程序,除了波长和反应时间。

[0238] 7.6 移取方案:与移取方案 7.3 相同

7.7 用于生成校准曲线的条件:

为了生成两条校准曲线,用线性作为校准类型一式两份测量 2 份标准品,其通过线性模式拟合测量校准物的数据点,从而使得获得线性校准曲线(标准品 1:用于空白测定的水;标准品 2:来自 Roche 目录号 10759350)。如前所述测定对于两条校准曲线的最佳条件,并获得以下结果:使用 340nm 作为第一波长,使用 700nm 作为校正波长,且使用 8.3 分钟作为第一反应时间;使用 376nm 作为第二波长,使用 800nm 作为校正波长,且使用 1.2 分钟作为第二反应时间。测定类型为如实施例 1.4 下所述的用于第一和第二校准曲线两者的两点终点测定法。对于第一校准曲线,第一读数是在测量点 8,且意指添加最终试剂之后不久,且第二读数在测量点 57,其对应于 8.3 分钟的反应时间;对于第二校准曲线,第一读数是在测量点 8,且意指添加最终试剂之后不久,且第二读数在测量点 14,其对应于 1.2 分钟的反应时间。当使用其它测定类型(诸如动力学 A)用于计算第一和/或第二校准曲线时,获得类似的结果。此外,当使用与此处使用的那些不同的其它标准品浓度(来自 Roche,目录号 10759350 的市售校准物)时,以及当使用多于 2 种标准品,例如多达六种标准品用于生成各校准曲线和对于两条校准曲线中每种的不同校准类型(例如,样条(spline))时,获得了类

似结果。

[0239] 使用第一校准曲线,将其针对特定分析物的低浓度优化,从而尽可能提高检测下限,使用第二校准曲线,将其针对特定分析物的高浓度优化,从而尽可能提高检测上限。根据待定量样品的分析物含量或对应吸光度,选择第一校准曲线或第二校准曲线用于定量 ASTL。对于该目的,将样品的信号与预定阈值进行比较。ASTL 的阈值可以被定义为 ASTL 的校准曲线中两个吸光度值之一或两个吸光度值,其对应于 200 U/L 的浓度,换言之,对于 8.3 分钟的反应时间,340nm-700nm 的吸光度 ( $A[\lambda 1, t1] = A[340\text{nm}-700\text{nm}, 8.3 \text{ 分钟}]$ ) 和 / 或对于 1.2 分钟的反应时间,376nm-800nm 的吸光度 ( $A[\lambda 2, t2] = A[376\text{nm}-800\text{nm}, 1.2 \text{ 分钟}]$ )。

[0240] 如果对于 340nm-700nm 和 8.3 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[340\text{nm}-800\text{nm}, 8.5 \text{ 分钟}]$  和 / 或如果对于 376nm-800nm 和 1.2 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[376\text{nm}-800\text{nm}, 1.2 \text{ 分钟}]$ , 则使用第二校准曲线用于其定量。

[0241] 如果对于 340nm-700nm 和 8.3 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[340\text{nm}-700\text{nm}, 8.3 \text{ 分钟}]$  和 / 或如果对于 376nm-800nm 和 1.2 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[376\text{nm}-800\text{nm}, 1.2 \text{ 分钟}]$ , 则使用第一校准曲线用于其定量。作为结果,获得两条校准曲线用于覆盖用于 ASTL 测定的测量范围,第一校准曲线覆盖 0 至 200 U/L 的分析物浓度,并且第二校准曲线覆盖 200 U/L 至 UDL 的范围。

[0242] 使用标准方法和根据本发明的方法的 ASTL 测定法的结果:

7.8 LDL / UDL / CV 的测定:参见实施例 1。

[0243] 7.9 结果概述和结论:

结果概述描述于表 8 中。Roche 的 ASTL 测试的新方法的应用显示灵敏度 (LDL, 检测下限) 增加 2.2 倍,且检测上限 UDL 扩大 3.4 倍。最后,动态范围扩大 7.5 倍。用新方法获得的精确度 (CV) 与标准方法相当。新方法提供最小的实施;该方法的应用不需要试剂和它们的制剂的任何改变。如果需要,可以仅仅调整用于校准的标准品的数量和 / 或浓度。

[0244] 表 8:对于 ASTL 的结果概述

	标准方法 (340 nm 波长, 700nm 校正波长, 4.1 min 反应时间)	新方法 (校准曲线 1: 340 nm 波长, 700nm 校正波长, 8.3 min 反应时间; 校准 曲线 2: 376nm 波长, 800nm 校正 波长, 1.2 min 反应时间)
<b>LDL (U/L)</b>	<b>1.71</b>	<b>0.78</b>
<b>UDL (U/L)</b>	<b>854</b>	<b>2868</b>
<b>动态范围</b>	<b>502</b>	<b>3677</b>
<b>测量范围(U/L)</b>	<b>1.71-854</b>	<b>0.78-2868</b>
<b>在 20 U/L 的 CV (%)</b>	<b>4.46</b>	<b>1.67</b>
<b>在 150 U/L 的 CV (%)</b>	<b>0.58</b>	<b>0.27</b>
<b>在 2000 U/L 的 CV (%)</b>	<b>1.12</b>	<b>0.31</b>

**[0245] 实施例 8 : 比色测定法的动态范围的测定 : 血尿素氮 (U-BUN)**

8.1 仪器 : 参见实施例 1。

**[0246] 8.2 用于使用标准方法的 U-BUN (血尿素氮) 测定法的程序 :**

选择 Roche 的血尿素氮测试 (UREAL, 目录号 04460715), 比色测定法, 用于该研究。酶尿素酶在尿素酶存在的情况下水解尿素以形成铵和碳酸盐。在以下反应中, 谷氨酸脱氢酶 (GLDH) 催化 2- 酮戊二酸、铵和 NADH 之间的反应, 导致 L- 谷氨酸和 NAD<sup>+</sup> 形成。NADH 浓度降低的速率与样本中的尿素浓度成正比, 且进行光度测量。其通过测量吸光度的降低来测定。



[0247] cobas c 包装中提供用于所有 Roche 测试的试剂。这些盒包含一至三个特别设计的试剂瓶, 且具有含有详细的试剂和测试相关的信息的条形码标记。对于 U-BUN 测试, 盒由两种试剂构成 : R1 (NaCl 9%) 和 R2 (TRIS 缓冲液, pH8.6, 2- 酮戊二酸, NADH, ADP, 尿素酶 (刀豆), GLDH (牛肝), 非反应的稳定剂和防腐剂)。U-BUN (UREAL) 测试的包装插页中描述的程序用作标准方法。

**[0248] 8.3 移取方案 :**

随后将用 90 $\mu$ L 稀释液 (水) 稀释的 2 $\mu$ L 样品和 10 $\mu$ L 测定试剂 R1 添加至反应室, 随后添加用 110 $\mu$ L 稀释液 (水) 稀释的 38 $\mu$ L 试剂 R2。其后, 混合反应组分。

**[0249] 8.4 用于生成校准曲线的条件 :**

在作为主要波长的 340nm 和作为校正波长的 700nm 实施吸光度读数。测定类型为动力学 A 测定法, 也称为速率 A 测定法。

[0250] 对于速率测定, 通过测量作为时间的函数的吸光度追踪反应的时程。即, 当反应进行时进行测量。速率测定使用这些测量, 因为它们浓度计算基于吸光度的变化速率的测定。对于多个测量点编程速率 A 测定。这意指, 存在测量窗口, 且对于速率计算考虑该窗口内的每个光度测量 - 以在第一编程测量点的读数开始到第二编程测量点的读数。通过最小二乘分析将吸光度值转化为吸光度的变化速率。对于 U-BUN, 第一编程测量点 (初始测量点) 为测量点 10, 这意指将样品和最终试剂移取到反应室后不久 (添加最终试剂后 42 秒)。在测量点 19 取第二编程测量点 (最后测量点), 其对应于 1.8 分钟的反应时间。从最初和最终测量点之间的每个读数计算信号。这两个测量点之间的吸光度的变化速率 (斜率) 速度通过最小二乘法来计算。为了生成校准曲线, 用线性校准类型一式两份测量来自 Roche 的两份标准品 (标准品 1 : 用于空白测定的水 ; 标准品 2, 目录号 10759350), 其通过线性模式拟合测量校准物的数据点, 从而使得获得线性校准曲线。

**[0251] 8.5 用于根据本发明的 U-BUN 测定法的程序 :**

用于这些实验的试剂与如实施例 8.2 中所述用于标准方法的试剂相同。使用 U-BUN (UREAL) 测试的包装插页中描述的程序, 除了波长和反应时间。

**[0252] 8.6 移取方案 : 与移取方案 8.3 相同****8.7 用于生成校准曲线的条件 :**

为了生成两条校准曲线, 用线性作为校准类型一式两份测量 2 份标准品, 其通过线性

模式拟合测量校准物的数据点,从而使得获得线性校准曲线(标准品 1:用于空白测定的水;标准品 2:来自 Roche 目录号 10759350)。如前所述测定对于两条校准曲线的最佳条件,并获得以下结果:对于第一校准曲线,使用 340nm 作为第一波长,使用 800nm 作为校正波长,且使用 8.3 分钟作为第一反应时间;对于第二校准曲线,使用 376nm 作为第二波长,使用 700nm 作为校正波长,且使用 1.4 分钟作为第二反应时间。测定类型为如实施例 1.4 下所述的用于第一和第二校准曲线两者的两点终点测定法。对于第一校准曲线,第一读数是在测量点 8,且意指添加最终试剂之后不久,且第二读数在测量点 57,其对应于 8.3 分钟的反应时间;对于第二校准曲线,第一读数是在测量点 8,且意指添加最终试剂之后不久,且第二读数在测量点 15,其对应于 1.4 分钟的反应时间。当使用其它测定类型(诸如动力学 A)用于计算第一和/或第二校准曲线时,获得类似的结果。此外,当使用与此处使用的那些不同的其它标准品浓度(来自 Roche,目录号 10759350 的市售校准物)时,以及当使用多于 2 种标准品,例如多达六种标准品用于生成各校准曲线和对于两条校准曲线中每种的不同校准类型(例如,样条(spline))时,获得了类似结果。

[0253] 使用第一校准曲线,将其针对特定分析物的低浓度优化,从而尽可能提高检测下限,使用第二校准曲线,将其针对特定分析物的高浓度优化,从而尽可能提高检测上限。根据待定量样品的分析物含量或对应吸光度,选择第一校准曲线或第二校准曲线用于定量 U-BUN。对于该目的,将样品的信号与预定阈值进行比较。U-BUN 的阈值可以被定义为 U-BUN 的校准曲线中两个吸光度值之一或两个吸光度值,其对应于 10 mmol/L 的浓度,换言之,对于 8.3 分钟的反应时间,340nm-800nm 的吸光度 ( $A[\lambda 1, t1] = A[340\text{nm}-800\text{nm}, 8.3 \text{ 分钟}]$ ) 和/或对于 1.4 分钟的反应时间,376nm-700nm 的吸光度 ( $A[\lambda 2, t2] = A[376\text{nm}-700\text{nm}, 1.4 \text{ 分钟}]$ )。

[0254] 如果对于 340nm-800nm 和 8.3 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[340\text{nm}-800\text{nm}, 8.3 \text{ 分钟}]$  和/或如果对于 376nm-700nm 和 1.4 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[376\text{nm}-700\text{nm}, 1.4 \text{ 分钟}]$ ,则使用第二校准曲线用于其定量。

[0255] 如果对于 340nm-800nm 和 8.3 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[340\text{nm}-800\text{nm}, 8.3 \text{ 分钟}]$  和/或如果对于 376nm-700nm 和 1.4 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[376\text{nm}-700\text{nm}, 1.4 \text{ 分钟}]$ ,则使用第一校准曲线用于其定量。作为结果,获得两条校准曲线用于覆盖用于 U-BUN 测定的测量范围,第一校准曲线覆盖 0 至 10 mmol/L 的分析物浓度,并且第二校准曲线覆盖 10 mmol/L 至 UDL 的范围。

[0256] 使用标准方法和根据本发明的方法的 U-BUN (UREAL) 测定法的结果:

8.8 LDL / UDL / CV 的测定:参见实施例 1。

[0257] 8.9 结果概述和结论:

结果概述描述于表 9 中。Roche 的 U-BUN 测试的新方法的应用显示灵敏度 (LDL, 检测下限) 增加 2.2 倍,且检测上限 UDL 扩大 1.4 倍。最后,动态范围扩大 3 倍。用新方法获得的精确度 (CV) 与标准方法相当。新方法提供最小的实施;该方法的应用不需要试剂和它们的制剂的任何改变。如果需要,可以仅仅调整用于校准的标准品的数量和/或浓度。

[0258] 表 9:对于 U-BUN 的结果概述

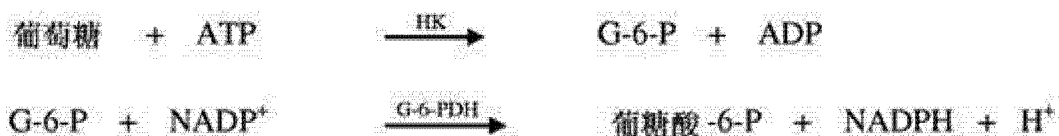
	标准方法 (340 nm 波长, 700nm 校正波长, 1.8 min 反应时间)	新方法 (校准曲线 1: 340 nm 波长, 800nm 校正波长, 8.3 min 反应时间; 校准 曲线 2: 376nm 波长, 700nm 校正波 长, 1.4 min 反应时间)
LDL (mmol/L)	0.071	0.032
UDL (mmol/L)	57	78
动态范围	803	2438
测量范围(mmol/L)	0.071-57	0.032-78
在 2 mmol/L 的 CV (%)	1.74	1.35
在 10 mmol/L 的 CV (%)	0.99	0.91
在 60 mmol/L 的 CV (%)	0.72	0.92

[0259] 实施例 9 : 比色测定法的动态范围的测定 : 葡萄糖 (Gluc3)

9.1 仪器 : 参见实施例 1。

[0260] 9.2 用于使用标准方法的葡萄糖 (Gluc3) 测定法的程序 :

选择 Roche 的葡萄糖测试 (Gluc3, 目录号 04404483), 比色测定法, 用于该研究。酶己糖激酶通过 ATP 催化葡萄糖磷酸化为葡萄糖 -6- 磷酸 (G-6-P)。在以下反应中, 葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 (G-6-PDH) 在  $\text{NADP}^+$  存在的情况下氧化葡萄糖 -6- 磷酸, 导致葡萄糖酸 -6- 磷酸和 NADPH 形成。NADPH 形成的速率与样本中的葡萄糖浓度成正比, 且进行光度测量。其通过测量吸光度的增加来测定。



[0261] cobas c 包装中提供用于所有 Roche 测试的试剂。这些盒包含一至三个特别设计的试剂瓶, 且具有含有详细的试剂和测试相关的信息的条形码标记。对于 Gluc3 测试, 盒由两种试剂构成 : R1 (MES 缓冲液, pH6.0,  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP, NADP 和防腐剂) 和 R2 (HEPES 缓冲液, pH8.0,  $\text{Mg}^{2+}$ , 己糖激酶 (酵母), 葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 (大肠杆菌) 和防腐剂)。Gluc3 测试的包装插页中描述的程序用作标准方法。

[0262] 9.3 移取方案 :

随后将用 141 $\mu\text{L}$  稀释液 (水) 稀释的 2 $\mu\text{L}$  样品和 28 $\mu\text{L}$  测定试剂 R1 添加至反应室, 随后添加用 20 $\mu\text{L}$  稀释液 (水) 稀释的 10 $\mu\text{L}$  试剂 R2。其后, 混合反应组分。

[0263] 9.4 用于生成校准曲线的条件 :

在作为主要波长的 340nm 和作为校正波长的 700nm 实施吸光度读数。在两个不同测量点进行吸光度读数。测定类型是两点终点测定法。两点终点测定法是执行样品空白的终点测定法。在这里考虑在两个不同测量点的两个吸光度读数 : 通常在添加最后试剂之前或之后不久采集第一读数 ; 在添加最后试剂之后任何时间点采集第二读数。用于校准曲线和因

此用于浓度计算的吸光度值通过从第二读数减去第一读数而获得。

[0264] 对于 Gluc3, 第一读数是在测量点 6, 且意指添加最终试剂之前不久, 且第二读数在测量点 32, 其对应于 5.5 分钟的反应时间。为了生成校准曲线, 用线性作为校准类型一式两份测量两份标准品, 其通过线性模式拟合测量校准物的数据点, 从而使得获得线性校准曲线 (标准品 1: 用于空白测定的水; 标准品 2: 来自 Roche 目录号 10759350)。

[0265] 9.5 用于根据本发明的 Gluc3 测定法的程序:

用于这些实验的试剂与如实施例 9.2 中所述用于标准方法的试剂相同。使用 Gluc3 测试的包装插页中描述的程序, 除了波长和反应时间。

[0266] 9.6 移取方案: 与移取方案 9.3 相同

#### 9.7 用于生成校准曲线的条件:

为了生成两条校准曲线, 用线性作为校准类型一式两份测量两份标准品, 其通过线性模式拟合测量校准物的数据点, 从而使得获得线性校准曲线 (标准品 1: 用于空白测定的水; 标准品 2: 来自 Roche 目录号 10759350)。如前所述测定对于两条校准曲线的最佳条件, 并获得以下结果: 对于第一校准曲线, 使用 340nm 作为第一波长, 使用 700nm 作为校正波长, 且使用 8.7 分钟作为第一反应时间; 对于第二校准曲线, 使用 376nm 作为第二波长, 使用 700nm 作为校正波长, 且使用 5.5 分钟作为第二反应时间。测定类型为两点终点测定法, 其已经在用于 Gluc3 测试的标准方法中描述。对于第一校准曲线, 第一读数是在测量点 6 (添加最终试剂之前 6 秒) 进行, 且第二读数在测量点 57 (其对应于 8.7 分钟的反应时间) 进行; 对于第二校准曲线, 第一读数也是在测量点 6, 且第二读数在测量点 32, 其对应于 5.5 分钟的反应时间。当使用其它测定类型 (诸如动力学 A) 用于计算第一和 / 或第二校准曲线时, 获得类似的结果。此外, 当使用与此处使用的那些不同的其它标准品浓度 (来自 Roche, 目录号 10759350 的市售校准物) 时, 以及当使用多于 2 种标准品, 例如多达六种标准品用于生成各校准曲线和对于两条校准曲线中每种的不同校准类型 (例如, 样条 (spline)) 时, 获得了类似结果。

[0267] 使用第一校准曲线, 将其针对特定分析物的低浓度优化, 从而尽可能提高检测下限, 使用第二校准曲线, 将其针对特定分析物的高浓度优化, 从而尽可能提高检测上限。根据待定量样品的分析物含量或对应吸光度, 选择第一校准曲线或第二校准曲线用于定量 Gluc3。对于该目的, 将样品的信号与预定阈值进行比较。Gluc3 的阈值可以被定义为 Gluc3 的校准曲线中两个吸光度值之一或两个吸光度值, 其对应于 10 mmol/L 的浓度, 换言之, 对于 8.7 分钟的反应时间, 340nm-700nm 的吸光度 ( $A[\lambda 1, t1] = A[340nm-700nm, 8.7 \text{ 分钟}]$ ) 和 / 或对于 5.5 分钟的反应时间, 376nm-700nm 的吸光度 ( $A[\lambda 2, t2] = A[376nm-700nm, 5.5 \text{ 分钟}]$ )。

[0268] 如果对于 340nm-700nm 和 8.7 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[340nm-700nm, 8.7 \text{ 分钟}]$  和 / 或如果对于 376nm-700nm 和 5.5 分钟反应时间计算的样品的光信号低于预定阈值  $A[376nm-700nm, 5.5 \text{ 分钟}]$ , 则使用第一校准曲线用于其定量。

[0269] 如果对于 340nm-700nm 和 8.7 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[340nm-700nm, 8.7 \text{ 分钟}]$  和 / 或如果对于 376nm-700nm 和 5.5 分钟反应时间计算的样品的光信号超过预定阈值  $A[376nm-700nm, 5.5 \text{ 分钟}]$ , 则使用第二校准曲线用于其定量。作为结果, 获得两条校准曲线用于覆盖用于 Gluc3 测定的测量范围, 第一校准曲线覆盖 0 至 10

mmol/L 的分析物浓度, 并且第二校准曲线覆盖 10 mmol/L 至 UDL 的范围。

[0270] 使用标准方法和根据本发明的方法的 Gluc3 测定法的结果:

9. LDL / UDL / CV 的测定: 参见实施例 1。

[0271] 9.9 结果概述和结论:

结果概述描述于表 10 中。Roche 的 Gluc3 测试的新方法的应用显示灵敏度 (LDL, 检测下限) 增加 1.5 倍, 且检测上限 UDL 扩大 1.6 倍。最后, 动态范围扩大 2.4 倍。用新方法获得的精确度 (CV) 与标准方法相当。新方法提供最小的实施; 该方法的应用不需要试剂和它们的制剂的任何改变。如果需要, 可以仅仅调整用于校准的标准品的数量和 / 或浓度。

[0272] 表 10: 对于 Gluc3 的结果概述。

	标准方法 (340 nm 波长, 700nm 校正波长, 5.5 min 反应时间)	新方法 (校准曲线 1: 340 nm 波长, 700nm 校正 波长, 8.7 min 反应时间; 校准曲线 2: 376nm 波长, 700nm 校正波长, 5.5 min 反应时间)
LDL (mmol/L)	0.017	0.011
UDL (mmol/L)	46	73
动态范围	2706	6636
测量范围(mmol/L)	0.017-46	0.011-73
在 0.3 mmol/L 的 CV (%)	6.51	5.94
在 10 mmol/L 的 CV (%)	0.75	0.71
在 100 mmol/L 的 CV (%)	0.55	0.83

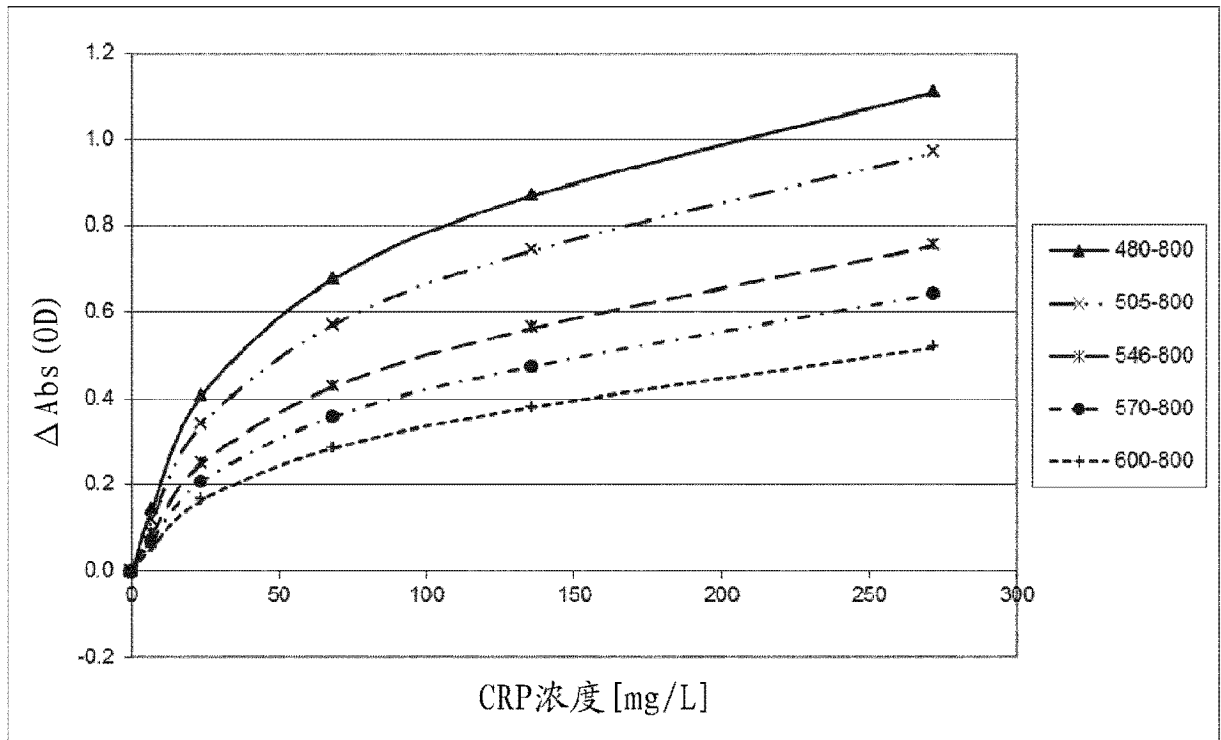


图 1

测试	标准条件 <sup>a,c</sup>	新条件 <sup>a,c</sup>		改进倍数:		
		Cal 1	Cal 2	LDL	LDL	动态范围
CRP: 具有选择的 MP2的直接 测定形式	570 - 800 nm / 2.0 min MP1: 110-140 nm, 45mg IgG/g MP2: 220 nm, 50mg IgG/g	505 - 800 / 2.8 min MP1: 110-140 nm, 45mg IgG/g MP2: 290 nm, 60mg IgG/g	570 - 800 nm / 2.0 min MP1: 110-140 nm, 45mg IgG/g MP2: 290 nm, 60mg IgG/g	8	-	8
CRP: 具有选择的 MP1和MP2的 直接测定 形式	570 - 800 nm / 2.0 min MP1: 110-140 nm, 45mg IgG/g MP2: 220 nm, 50mg IgG/g	545 - 800 / 7.1 min MP1: 90 nm, 50mg IgG/g MP2: 290 nm, 70mg IgG/g	660 - 800 nm / 0.8 min MP1: 90 nm, 50mg IgG/g MP2: 290 nm, 70mg IgG/g	3.0	2.3	6.9

<sup>a</sup> 来自Roche的CRP L3测定法包括两种不同类型的颗粒，具有高亲和力抗CRP抗体的大颗粒MP2 (约220nm) 和具有较低亲和力抗CRP抗体的小颗粒MP1 (约110-140nm)

<sup>b</sup> 在新条件下保留来自标准条件的良好精确度

<sup>c</sup> 主要波长 - 校正波长 / 反应时间 (分钟)

图 2

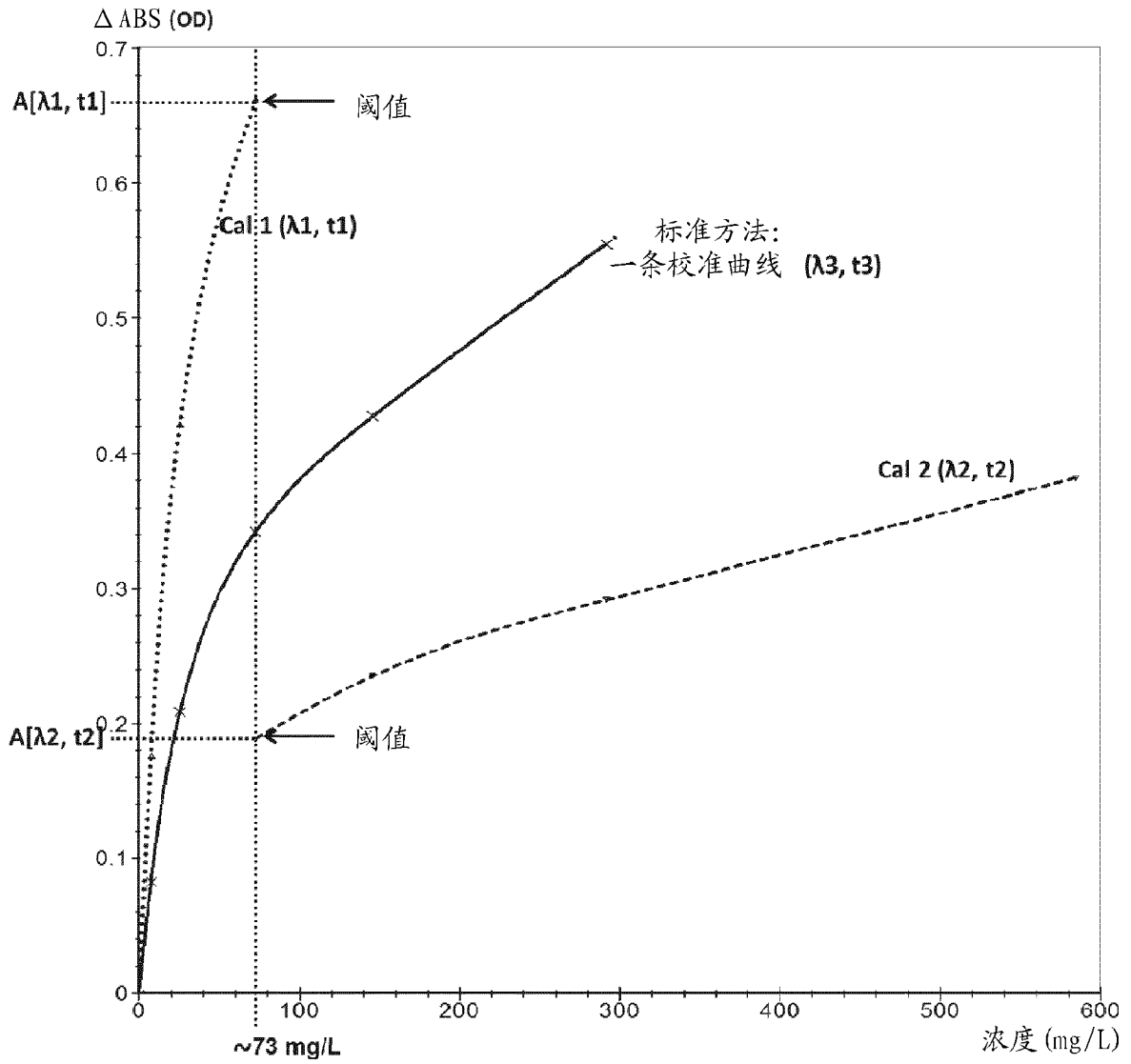


图 3

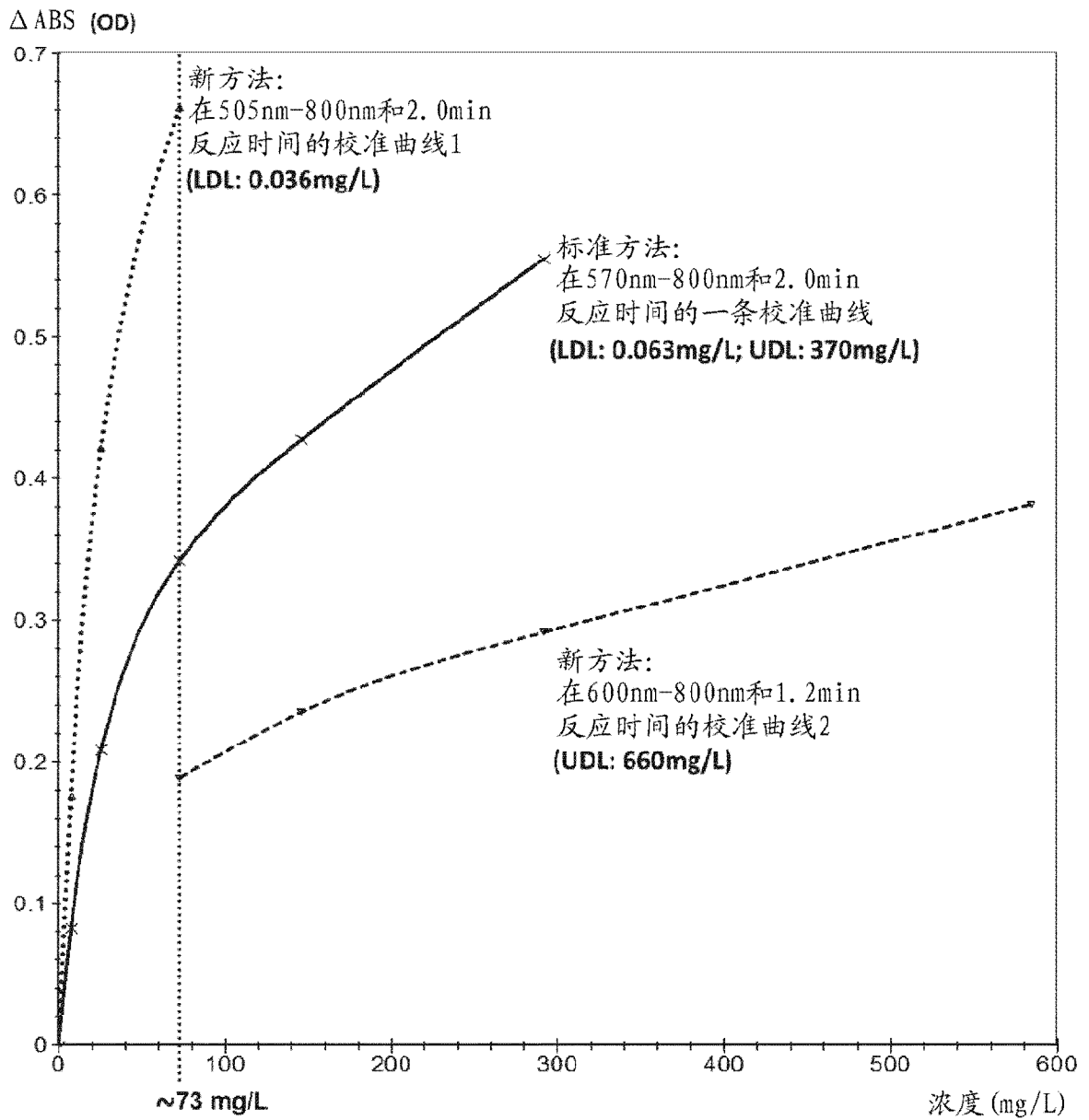


图 4

结果概述-在大多数情况下，新方法改进/扩大动态范围  
w/o试剂改变

Roche测试	标准条件 <sup>d</sup>	新条件 <sup>d</sup>		改进倍数 <sup>c</sup>		
		Cal 1	Cal 2	LDL	UDL 动态范围	
铁蛋白Gen. 4 直接测定	570 nm – 800 nm / 5.1min	505 nm – 800 nm / 4.9min	570 – 800 nm / 5.1min	1.7	-	1.7
肌红蛋白Gen. 2 直接测定	570 nm – 800 nm / 4.7min	505 nm – 800 nm / 6.7min	660 – 800 nm / 2.6min	2 <sup>a</sup>	2	4
D-二聚体Gen. 2 直接测定	800 nm / 4.3min	800 nm / 4.3min	700 nm / 1.4min	-	(1.14)	(1.14)
RF II 直接测定	570 nm – 800 nm / 2.2min	546 nm – 800 nm / 8.5min	660 – 800 nm / 1.4min	5 <sup>b</sup>	(1.15)	5.8
CRP L3 (Gen. 3) 直接测定	570 nm – 800 nm / 2.0min	505 nm – 800 nm / 2.0min	600 – 800 nm / 1.2min	1.8	1.8	3.1
DIG 竞争测定	660 nm / 4.7min	660 nm / 4.7min	505 – 800 nm / 4.7min	-	(1.15)	(1.15)
PHENO 竞争测定	600 nm – 800 nm / 6.5min	600 nm – 800 nm / 6.5min	505 – 800 nm / 7.9min	-	1.5	1.5

<sup>a</sup> 无仪器因素, <sup>b</sup> 对样条 (spLine) 的变化校准, <sup>c</sup> 在新条件下保留来自标准条件的良好精确度, <sup>d</sup> 主要波长 - 校正波长/反应时间 (分钟)

铁蛋白, 0和 10 $\mu$ /L (N= 21) bei

A) 505nm 和

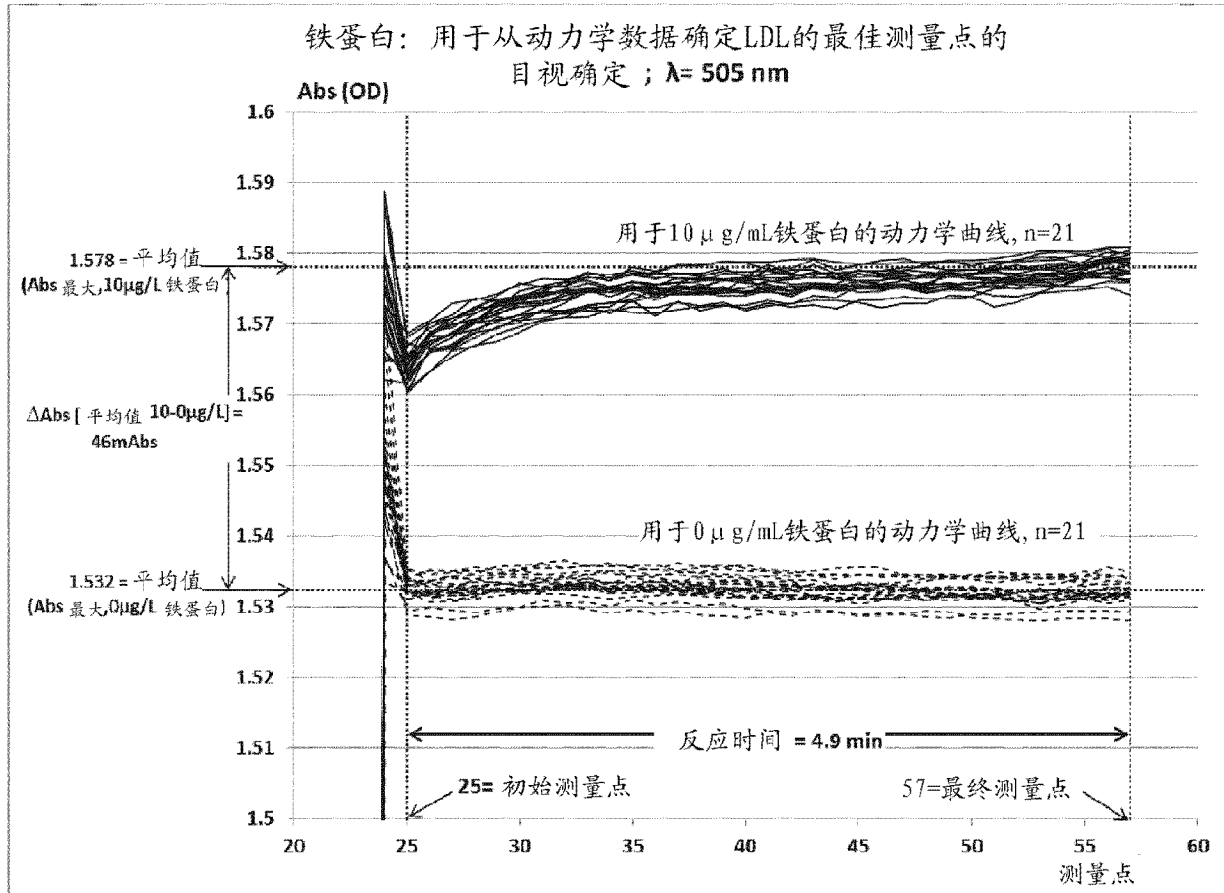


图 6a

铁蛋白, 0和 10 $\mu$ /L (N= 21) bei

B) 570nm

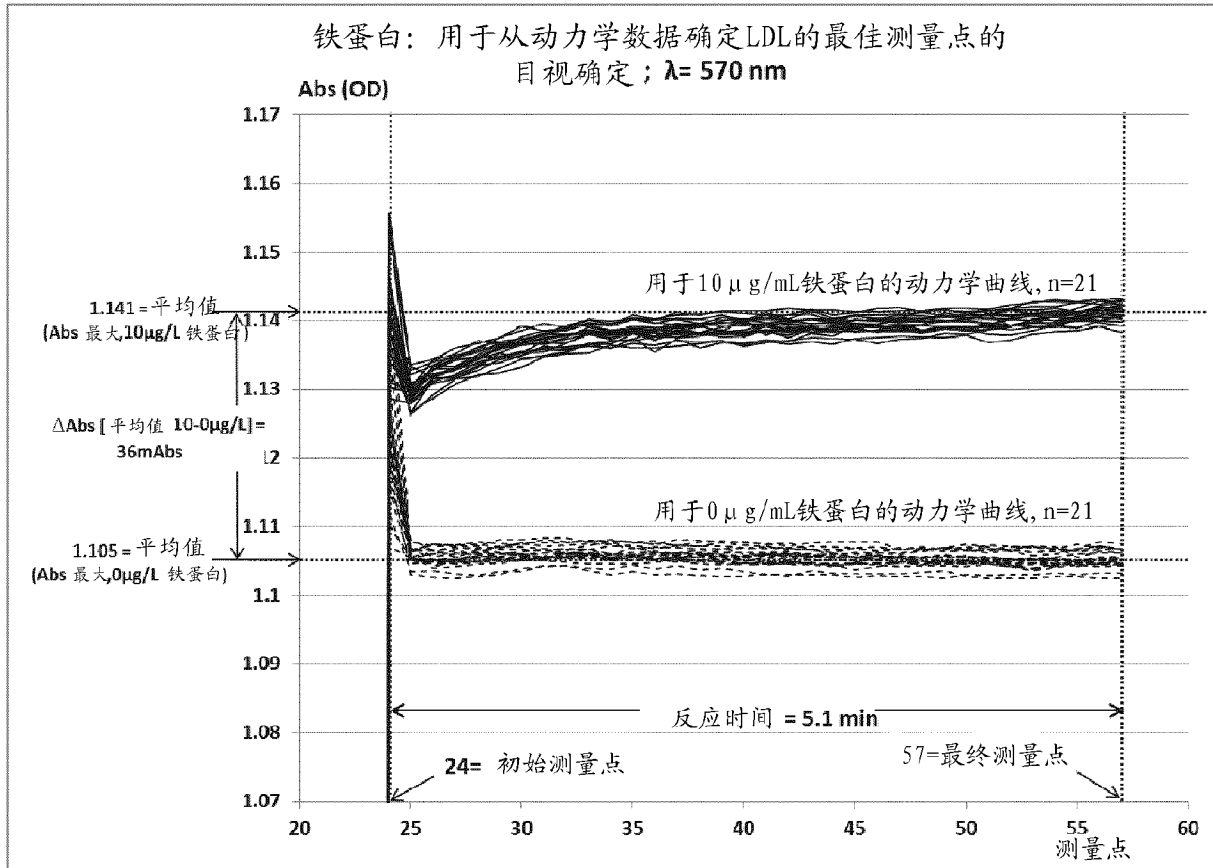


图 6b

铁蛋白, 981-4950 $\mu\text{g/L}$  (N=1) bei 570-800nm

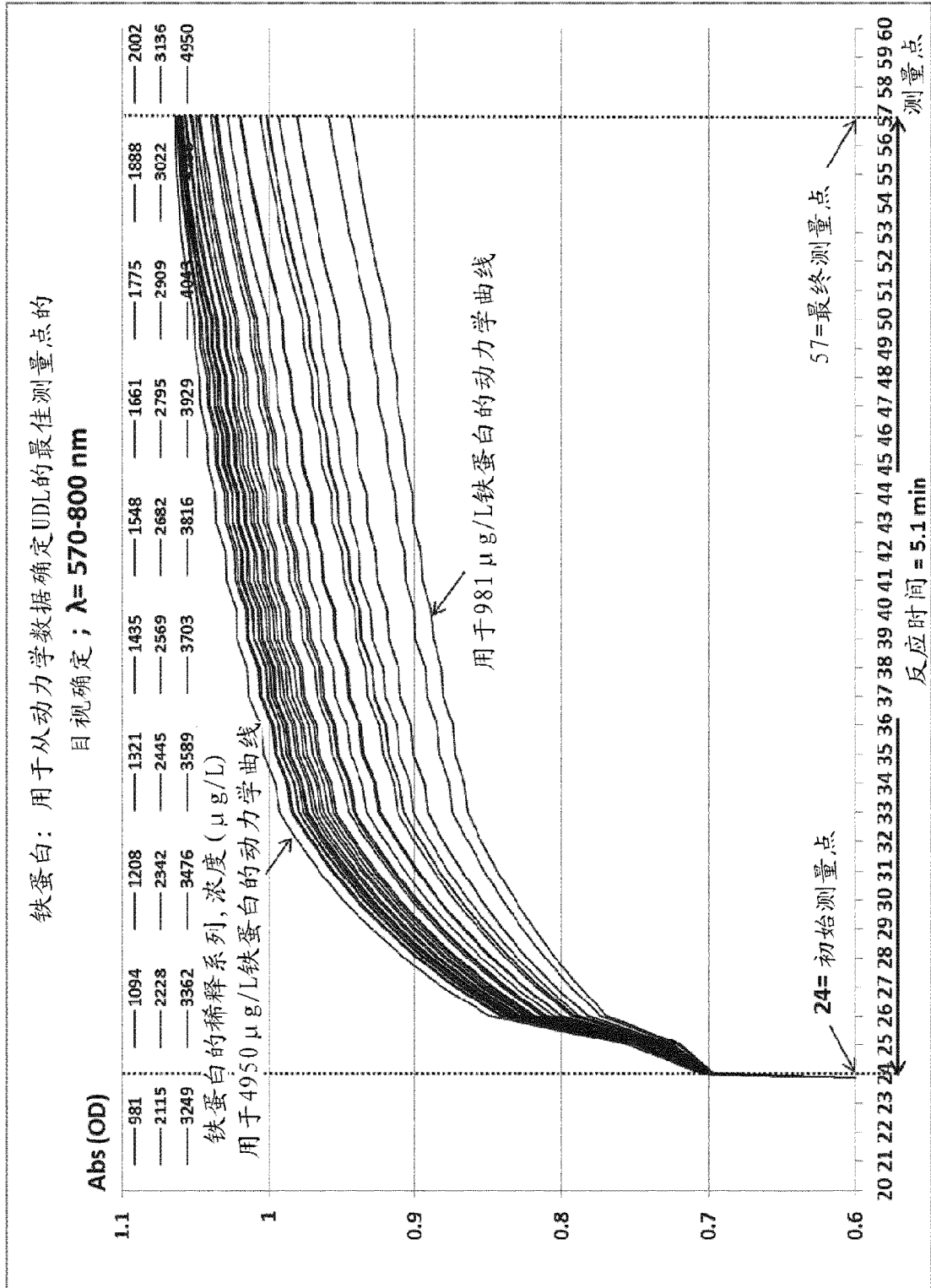


图 7

测定	基于本发明的 动态范围的 改进倍数	本发明使自动重新运行的降低	
		低于标准测量范围的 样品引起的重新运行	高于标准测量范围的 样品引起的重新运行
ALTL	12.2	87 %	99 %
ASTL	7.5	87 %	99 %
CRPL3	3.1	57 %	99 %
D-二聚体 Gen.2	1.14	未计算 *	0 %
DIG	1.15	0 %	27 %
铁蛋白 Gen.4	1.7	71 %	0 %
GLUC3	2.4	81 %	96 %
MYO2	4	未计算 *	51 %
PHENO	1.5	3 %	77 %
RF II	5.8	97 %	9 %
U-BUN	3	未计算 *	87 %

\* 没有获得足够数据用于计算

图 8

1. 用于通过光度测定法测定特定分析物的量的方法,其中样品中所述特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应,所述方法包括以下步骤:

a) 生成至少两条校准曲线,其中

- 将在第一波长记录的第一校准曲线针对特定分析物的低浓度进行优化,从而尽可能提高检测下限,和

- 将在第二波长记录的第二校准曲线针对特定分析物的高浓度进行优化,从而尽可能提高检测上限,

b) 至少在所述第一和第二波长同时测量反应混合物中待测定的样品的特定分析物的光信号,

c) 通过以下标准选择第一或第二校准曲线用于特定分析物的定量:

对于渐增校准曲线:

- 如果所述第一和/或所述第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定;

- 如果所述第一和/或所述第二波长的光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定,

对于渐降校准曲线:

- 如果所述第一和/或所述第二波长的光信号低于对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定;

- 如果所述第一和/或所述第二波长的光信号超过对应的预定阈值,则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定,

d) 通过与选择的校准曲线比较定量特定分析物的量。

2. 根据权利要求1的方法,其中在浊度和比浊免疫测定法中,所述特定分析物从基于所述特定分析物和分析物特异性结合伴侣的凝集的反应混合物的浊度的变化来定量。

3. 根据权利要求1的方法,其中在比色测定法中,所述特定分析物在显色剂的帮助下定量。

4. 根据前述权利要求之一的方法,其中所述第一校准曲线在第一波长和第一反应时间进行记录。

5. 根据前述权利要求之一的方法,其中所述第二校准曲线在第二波长和第二反应时间进行记录。

6. 根据前述权利要求之一的方法,其中在完整反应时间至少在所述第一和第二波长进行反应混合物中待测定的样品的特定分析物的光信号的同时测量。

7. 根据前述权利要求之一的方法,其中将测量结果存储在仪器平台的数据管理系统中。

8. 根据前述权利要求之一的方法,其中任选测定进一步的波长作为用于校正干扰和补偿光度噪声的空白值。

9. 根据前述权利要求之一的方法,其中生成在相同波长和在不同反应时间记录的至少两条校准曲线。

10. 根据前述权利要求之一的方法,其中所述分析物特异性反应伴侣包含在分析物存在的情况下导致颜色变化或浊度变化的结合蛋白、抗原、抗原片段、抗体、抗体片段、核酸、

受体和颗粒增强结合伴侣、酶、底物或特定化学试剂。

11. 用于增加光度测定法的灵敏度和 / 或动态范围的方法, 其中样品中所述特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应, 所述方法包括以下步骤:

a) 生成至少两条校准曲线, 其中

- 将在第一波长记录的第一校准曲线针对特定分析物的低浓度进行优化, 从而尽可能提高检测下限, 和

- 将在第二波长记录的第二校准曲线针对特定分析物的高浓度进行优化, 从而尽可能提高检测上限,

b) 至少在所述第一和第二波长同时测量反应混合物中待测定的样品的特定分析物的光信号,

c) 通过以下标准选择第一或第二校准曲线用于特定分析物的定量:

对于渐增校准曲线:

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号低于对应的预定阈值, 则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定;

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号超过对应的预定阈值, 则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定,

对于渐降校准曲线:

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号低于对应的预定阈值, 则分析物的浓度通过使用在所述第二波长记录的第二校准曲线来测定;

- 如果所述第一和 / 或所述第二波长的光信号超过对应的预定阈值, 则分析物的浓度通过使用在所述第一波长记录的第一校准曲线来测定,

d) 通过与选择的校准曲线比较定量特定分析物的量。

12. 对于特定分析物预先确定的至少两个波长和至少两个反应时间用于生成至少两条校准曲线用于定量光度测定法的特定分析物的量的用途, 其中样品中所述特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应, 其中

- 将在第一波长和第一反应时间记录的第一校准曲线针对特定分析物的低浓度进行优化, 从而尽可能提高检测下限, 和

- 将在第二波长和第二反应时间记录的第二校准曲线针对特定分析物的高浓度进行优化, 从而尽可能提高检测上限。

13. 根据前述权利要求之一确定最佳波长、反应时间和阈值的计算机执行的方法, 所述方法包括以下步骤:

a) 接受代表在分析仪上同时可得的在完整反应时间在多个波长记录的样品的吸光度值的数据集, 其中所述数据集包括以下的多个数据点:

- 用于校准的标准品,

- 用于测定 LDL 的空白样品,

- 用于测定精确度的至少 2 种样品,

- 稀释系列

b) 通过对于较低浓度使用第一校准曲线用于分析物定量, 且通过对于较高浓度使用第二校准曲线用于分析物定量, 将阈值设定在其中校准曲线从第一校准曲线变化至第二校

准曲线的浓度，

c) 测定第一和第二波长以及第一和第二反应时间；分析动力学曲线并选择对于根据权利要求 1-10 的第一校准曲线和第二校准曲线的最佳设置。

14. 计算机可读介质，其包括控制处理器以根据前述权利要求之一确定最佳波长、反应时间和阈值的代码，所述代码包括指令以：

a) 接受代表在分析仪上同时可得的在完整反应时间在多个波长记录的样品的吸光度值的数据集，其中所述数据集包括以下的多个数据点：

- 用于校准的标准品，
- 用于测定 LDL 的空白样品，
- 用于测定精确度的至少 2 种样品，
- 稀释系列

b) 通过对于较低浓度使用第一校准曲线用于分析物定量，且通过对于较高浓度使用第二校准曲线用于分析物定量，将阈值设定在其中校准曲线从第一校准曲线变化至第二校准曲线的浓度，

c) 测定第一和第二波长以及第一和第二反应时间；分析动力学曲线并选择对于根据权利要求 1-10 的第一校准曲线和第二校准曲线的最佳设置。

15. 系统分析仪，所述系统分析仪包含：

- a) 样品容器和测定试剂容器，
- b) 用于接受和混合样品和测定试剂的反应容器，
- c) 用于测量步骤 b 的反应混合物的光度计，

用于输出根据权利要求 1 测定的特定分析物的量的分析结果的装置。

专利名称(译)	通过生成多个校准曲线改进光度测定法的灵敏度和动态范围		
公开(公告)号	<a href="#">CN104395728A</a>	公开(公告)日	2015-03-04
申请号	CN201380033734.3	申请日	2013-04-25
申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	T 布吕克纳 E 洛佩斯 卡勒 N 奥兰特 J 勒德尔		
发明人	T.布吕克纳 E.洛佩斯-卡勒 N.奥兰特 J.勒德尔		
IPC分类号	G01N21/17 G01N21/53 G01N21/25 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/274 G01N33/52 G06F19/3431 G01D18/00 G01N21/63 G06F19/18 G01N33/54393 G01N21/78 G01N33/54346 G01N2021/825 G01N33/573 G01N33/92 G01N33/6827 G01N21/82 G01N33/54313		
代理人(译)	李慧惠 梁谋		
优先权	2012002952 2012-04-26 EP 2012196036 2012-12-07 EP		
其他公开文献	CN104395728B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于通过光度测定法测定特定分析物的量的方法，其中样品中所述特定分析物与反应混合物中的分析物特异性反应伴侣反应。生成至少两条校准曲线，针对特定分析物的低浓度优化在第一波长记录的第一校准曲线，从而尽可能提高检测下限，且针对特定分析物的高浓度优化在第二波长记录的第二校准曲线，从而尽可能提高检测上限。优化的检测下限和优化的检测上限导致扩大的动态范围。

