



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102914643 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201210461942. 0

(22) 申请日 2012. 11. 16

(73) 专利权人 武汉林勉生物技术有限公司

地址 430014 湖北省武汉市硚口区解放大道  
586 号 27 栋 3 单元 4 层 2 号

(72) 发明人 李方和 李时君

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 黄行军

(51) Int. Cl.

G01N 33/538(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

审查员 肖吉

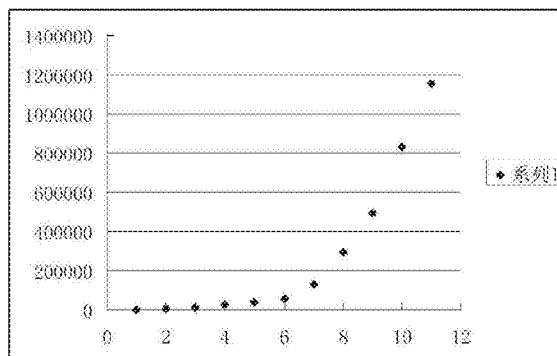
权利要求书2页 说明书25页 附图7页

### (54) 发明名称

利用免疫层叠法进行可溶性靶物质的检测方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种利用免疫层叠法进行可溶性靶物质的检测方法，它以现代免疫血清学试验为基础，通过引入传统均相或类均相免疫实验，建立血清抗原或抗体检测免疫层叠实验方法，包括以下步骤：(1) 试剂与标准血清的准备；(2) 进行基础免疫实验：即现代高敏感性免疫血清学试验（如 LiCA 实验等）；(3) 进行叠加免疫实验：即相对低敏感性免疫实验（如絮状免疫凝集实验等）；(4) 综合得出实验结果。该方法将两种具有较大反差的免疫实验有机结合，既保留了 LiCA 所具有的敏感、特异及其稳定等优点，操作简捷，又能克服 Hooks 效应干扰及其定量检测范围狭窄的技术问题，能满足精度要求高，浓度变异范围大的实验要求，能进行全程定量检测，具有高度的实用性。



1. 一种利用免疫层叠法进行可溶性靶物质的检测方法,其特征在于:它包括如下步骤:

(1) 向血清中加入实验试剂进行基础免疫实验,所述基础免疫实验为免疫层叠实验的第一次免疫反应,所述实验试剂为基础免疫实验的实验试剂,所述基础免疫实验为光激发化学发光类免疫实验;

(2) 对步骤 1 试验过程中所产生的实验信号进行检测,检测出的实验信号依据靶物质浓度与实验信号的函数关系,确定低浓度段靶物质含量,所述低浓度段为基础免疫实验检测所取得的定量范围;

(3) 在步骤 (1) 结束后,通过向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂,进行至少一次的叠加免疫实验;抗 He 试剂为溶解于水中的能与靶物质特异性结合的抗体或抗原,所述抗体或抗原游离于水中或吸附在悬浮于水中的固相载体上,抗 He 试剂中抗体浓度为  $0.05 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ ,或抗原浓度为  $0.01 \sim 500 \mu\text{g/ml}$ ,加入抗 He 试剂体积与基础免疫实验结束时实验体系的体积比例为  $1:1 \sim 20$ ;

(4) 对步骤 3 实验过程中所产生的实验信号进行检测,检测出的实验信号依据靶物质浓度与实验信号的函数关系,确定高浓度段靶物质含量;所述高浓度段为叠加免疫实验检测所取得的能够定量的检测范围;

(5) 取基础免疫实验能精确反应靶物质浓度的上限值为叠加免疫实验结果靶物质浓度取值的下限值,将叠加免疫实验的下限值以上部分的实验结果与基础免疫实验上限值以下部分的实验结果进行交汇叠加;形成新的靶物质含量与实验信号强度的关系,并据此计算待测标本中的靶物质浓度;

所述步骤 (1) 中的实验试剂为包被有 anti-HBs 的发光微球、生物素化的 anti-HBs 和包被链亲和素的感光微球;所述步骤 (3) 中抗 He 试剂的抗体为抗 HBs;所述步骤 (3) 中向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在  $37^{\circ}\text{C}$  下温育  $5 \sim 60\text{min}$ ,所述的抗 He 试剂中抗 HBs 浓度为  $100 \sim 750 \mu\text{g/ml}$ ,其加入体积为  $5 \sim 50 \mu\text{L/孔}$ ;加入体积与一次免疫反应终末体系的比例为  $1:5 \sim 20$ 。

2. 一种利用免疫层叠法进行可溶性靶物质检测的方法,其特征在于:它包括如下步骤:

(1) 向血清中加入实验试剂进行基础免疫实验,所述基础免疫实验为免疫层叠实验的第一次免疫反应,所述实验试剂为基础免疫实验的实验试剂,所述基础免疫实验为光激发化学发光类免疫实验;

(2) 对步骤 1 试验过程中所产生的实验信号进行检测,检测出的实验信号依据靶物质浓度与实验信号的函数关系,确定低浓度段靶物质含量,所述低浓度段为基础免疫实验检测所取得的定量范围;

(3) 在步骤 (1) 结束后,通过向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂,进行至少一次的叠加免疫实验;抗 He 试剂为溶解于水中的能与靶物质特异性结合的抗体或抗原,所述抗体或抗原游离于水中或吸附在悬浮于水中的固相载体上,抗 He 试剂中抗体浓度为  $0.05 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ ,或抗原浓度为  $0.01 \sim 500 \mu\text{g/ml}$ ,加入抗 He 试剂体积与基础免疫实验结束时实验体系的体积比例为  $1:1 \sim 20$ ;

(4) 对步骤 3 实验过程中所产生的实验信号进行检测,检测出的实验信号依据靶物质

浓度与实验信号的函数关系,确定高浓度段靶物质含量;所述高浓度段为叠加免疫实验检测所取得的能够定量的检测范围;

(5) 取基础免疫实验能精确反应靶物质浓度的上限值为叠加免疫实验结果靶物质浓度取值的下限值,将叠加免疫实验的下限值以上部分的实验结果与基础免疫实验上限值以下部分的实验结果进行交汇叠加;形成新的靶物质含量与实验信号强度的关系,并据此计算待测标本中的靶物质浓度;

所述步骤(1)中的实验试剂为包被有 anti-HBe 的发光微球、生物素化的 anti-HBe 和包被链亲和素的感光微球;所述步骤(3)中抗 He 试剂的主要免疫反应物质为抗 HBe 致敏的乳胶溶液;所述步骤(3)中向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在 37℃ 下温育 5~60min,所述的抗 He 试剂中抗 HBe 标记乳胶的质量浓度为 0.5~2.0%,其加入体积为 5~50  $\mu$ L/孔;加入体积与基础免疫反应终末体系的比例为 1:5~20。

3. 一种利用免疫层叠法进行可溶性靶物质检测的方法,其特征在于:它包括如下步骤:

(1) 向血清中加入实验试剂进行基础免疫实验,所述基础免疫实验为免疫层叠实验的第一次免疫反应,所述实验试剂为基础免疫实验的实验试剂,所述基础免疫实验为固相酶联免疫实验;

(2) 对步骤 1 试验过程中所产生的实验信号进行检测,检测出的实验信号依据靶物质浓度与实验信号的函数关系,确定低浓度段靶物质含量,所述低浓度段为基础免疫实验检测所取得的定量范围;

(3) 在步骤(1)结束后,通过向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂,进行至少一次的叠加免疫实验;抗 He 试剂为溶解于水中的能与靶物质特异性结合的抗体或抗原,所述抗体或抗原游离于水中或吸附在悬浮于水中的固相载体上,抗 He 试剂中抗体浓度为 0.05~1000  $\mu$ g/ml,或抗原浓度为 0.01~500  $\mu$ g/ml,加入抗 He 试剂体积与基础免疫实验结束时实验体系的体积比例为 1:1~20;

(4) 对步骤 3 实验过程中所产生的实验信号进行检测,检测出的实验信号依据靶物质浓度与实验信号的函数关系,确定高浓度段靶物质含量;所述高浓度段为叠加免疫实验检测所取得的能够定量的检测范围;

(5) 取基础免疫实验能精确反应靶物质浓度的上限值为叠加免疫实验结果靶物质浓度取值的下限值,将叠加免疫实验的下限值以上部分的实验结果与基础免疫实验上限值以下部分的实验结果进行交汇叠加;形成新的靶物质含量与实验信号强度的关系,并据此计算待测标本中的靶物质浓度;

所述步骤(1)中的实验试剂为 HBsAg 包被酶标反应板、HRP 酶标记 HBsAg、洗涤液和含发光促进剂的发光底物;所述步骤(3)中抗 He 试剂的主要免疫反应物质为 HBsAg 致敏乳胶;所述步骤(3)中向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在 37℃ 下温育 5~60min,所述的抗 He 试剂中 HBsAg 标记乳胶的质量浓度为 0.1~1.0%,其加入体积为 5~50  $\mu$ L/孔;加入体积与基础免疫反应终末体系的比例为 1:1~10。

## 利用免疫层叠法进行可溶性靶物质的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物学实验技术领域,具体是指一种利用免疫层叠法进行可溶性靶物质检测的方法。

### 背景技术

[0002] 免疫学技术是一类用于生物学及医学领域实验研究,临床诊断,及其相关生物制品生产监测的实验方法。该类方法大致分为均相与固相免疫技术两类。其发展顺序可界定为传统均相与类均相免疫,固相免疫,及其现代均相与类均相免疫等三个主要阶段。各阶段发展过程相互交错,相互推进,相互补充,从而构成一套完整地免疫血清学实验技术体系。新近,传统均相免疫实验因其敏感性及其操作上的诸多原因已较少在临床(及田间)使用;现代均相免疫实验因其技术含量过高,以及自身技术缺陷等原因尚未得以普及;而固相免疫实验则成为迄今应用最广泛的实验技术。

[0003] 标记免疫学技术创建于上世纪六十年代中后期,它同时用于固相及均相免疫技术中,是免疫(血清)学实验的一个重大技术进步。既往标记固相免疫实验就其反应方式而言包括直接法、间接法、补体法、双抗体(或双抗原)夹心法、几种不同方式的竞争与竞争抑制法,液相 PAP 技术,以及多种蛋白芯片技术等试验形式,具有高度的特异性、敏感性与稳定性。操作步骤繁琐及其定量检测范围狭窄是该类方法的主要缺点。自动化仪器的发展及其推广应用使操作繁琐的缺点从表观上得以纠正或部分纠正,但其对实验结果稳定性的影响并未因此而根除。现代均相(及类均相)免疫技术的研发能有效地克服固相免疫检测操作繁琐的弊端,并能保持与之相同或更高的特异性,稳定性与敏感性,如能克服定量范围狭窄及其 Hooks 效应干扰等技术瓶颈,将具有极其广阔地应用前景。

[0004] 现代均相免疫实验(包括 LiCA 等类均相免疫试验)是一类为简化固相免疫实验操作步骤而发展起来的新的试验方法。具备与固相免疫实验相当或更高的 敏感性,特异性与稳定性。实验步骤较固相免疫实验显著简单。其定量检测范围与部分发光免疫检测技术相当(如电化学发光),但仍远不足以对多数免疫物质作全定量检测。Hooks 效应对其试验结果的影响较固相法相当或略重,且几种在固相免疫检测方法中纠正 Hooks 效应的反应模式,如二步法,一道洗涤法,及其排溢法等均无法用于均相免疫技术。这类技术缺陷严重妨碍了均相免疫技术的推广应用。如能克服这类弊端,其使用价值可望显著大于现行固相免疫检测。

[0005] 传统均相与类均相免疫检测技术操作相对简便,可同时进行初步的定性与定量(或半定量)检测。该类方法敏感性偏低,定量范围偏向靶物质含量的高浓度端,受 Hooks 效应影响程度相对较小等特征既是该类方法的技术缺陷,亦是它们区别于前两类方法的重要特征。近十余年来,由于在材料与方法学上的进步,上述缺陷已部分纠正。

[0006] “Hooks 效应”或称“钩状现象”是一种存在于多种血清学检测中的量(靶物质浓度)效(检测信号)分离现象,其发生虽可能与靶物质免疫分子的结构相关,但反应体系中靶抗原与对应抗体比例的高度失调是其最主要的原因。其表现为当反应体系中靶物质,包括

抗原或抗体的浓度升高到一定程度后,检测信号反而下降或显著下降,甚至出现假阴性结果。随着标记免疫学技术在敏感性上的大幅提升,尤其是当部分固相免疫实验主要反应方式由传统的二步法转变为一歩法(如一步法 ELISA),并在我国临床检验中大量普及应用后,由 Hooks 效应引起的检验结果失真便成为一个较为常见的临床现象。这一效应直接造成检测结果的失真,显著妨碍科研数据的准确性,并对临床诊断、治疗及其预后的判断造成负面影响。如果发生于某些特殊临床检测如采用一步法 ELISA 或化学发光技术进行血清 HBsAg 筛选,则可造成大量临床标本的定量结果偏离真值,部分强阳性标本测值降低或显著降低,甚至导致个别具有高度传染性的强阳性标本出现假阴性结果。如果这种漏检发生在献血员筛选,则势必导致输血相关性肝炎的严重临床事件。在我国,血清 HBsAg 检测的类均相免疫检测实验如光激发化学发光实验(Light Initiated chemiluminescence assay, LiCA)方法及其试剂已获准进入临床应用,其实验结果受 Hooks 效应的影响与一步法 ELISA 等方法相当或更甚,若将其误用于 HBsAg 的献血员筛选,亦有可能产生与其它一步法固相免疫检测相似的负面效果。鉴于血清 HBsAg 检测的规模及其社会影响面极大,一些存在 Hooks 效应干扰的检测方法(如“一步法”ELISA 与“一步法”化学发光等)已在我国献血员 HBV 感染筛选中被禁止使用。LiCA 也在禁用之列。

[0007] 与定性检测相比,定量检测是免疫血清学检测发展的高级阶段。为追求这一目标,相关学者进行了长期艰苦努力并取得较好成果。值得注意的是部分优化措施在提高方法敏感性的同时,使这些实验方法的定量范围显著狭窄并被局限在靶物质的低浓度端,显然不能满足对多数指标的定量分析,尤其是采用高值试剂进行的细胞因子及其时相蛋白类物质的定量研究(通常为科学研究),以及一些直接用于治疗效果评价的特殊免疫标志物(如血清 HBsAg 等)的全程定量检测。这一现象已引起相关学者的高度关注,其纠正方法包括对原有技术如 ELISA 等的优化,能一定程度提升检测范围但偶可伤及方法的敏感性;通过示踪及其信号检测方式的改进发展新的试验方法,如通过建立各类免疫发光技术,将消光法检测改为发光检测以显著拓宽定量范围等,但其拓展范围仍旧有限;实验标本的稀释或系列稀释,能定量检测任意浓度的试验标本,但操作过程繁琐,且需成倍甚至数倍增加实验时间,试剂与器材的消耗。也就是说,为使实验结果更为全面客观,研究者不得不付出成倍甚至数倍的金钱与劳动。新近,罗氏公司推出以电化学发光为依托的血清 HBsAg 全程定量检测试剂,其方法改进同时涵盖以上提及的三个技术层面,能基本满足血清 HBsAg 的全程定量需要,颇受临床检验学者的欢迎。但由于其定量范围拓展的基点主要立足于标本稀释及重复检测,试剂耗费成倍增加,实验操作繁琐,在技术上并无特别的进步。

[0008] 现代免疫检测方法多种技术特征的达成有赖于既往研究者对试验条件的长期优化,这些优化措施在赋予方法高度特异性,敏感性与稳定性的同时,使定量范围更趋狭窄,且 Hooks 效应干扰亦更为显著。为纠正这些缺陷所采取的措施又使实验方法操作相对繁琐,结果稳定性降低,反应时间延长,及其试剂消耗显著增加,不宜用作对高浓度与超高浓度标本的检测与定量检测。因而,在保留现行技术优势的同时提升其对高浓度靶物质的定量检测能力便成为当今免疫血清学检验所面对的重要技术难题。鉴于近十余年来传统均相免疫检测方法的技术特质已有显著提升,以及他们既往在高浓度样本检测中所具有的特殊优势,如能将现代高敏感性检测技术(包括经改进的传统均相免疫实验)与传统低敏感性免疫学技术同时加以改造,并使两者在定量检测范围上完美对接,从而建立一个既能保持

现代免疫技术的特异性,敏感性,稳定性与实验操作的简洁,又能突破 Hooks 效应干扰与定量范围狭窄技术瓶颈的新型实验方法,即免疫层叠实验,将其用于对多种免疫物质的检测,有可能将现行免疫血清学检测水平提升到一个前所未有的新高度。

[0009] 由于在纠正 Hooks 效应同时能拓展定量检测范围,这一改进措施(即免疫层叠实验)较几种旨在单纯避免 Hooks 效应干扰的免疫反应方法,包括二步法,一道洗涤法,以及排溢法等显然具有更大的竞争潜力。鉴于定量范围狭窄的问题困扰着几乎所有的免疫学检测指标,即便不存在 Hooks 效应干扰的检测标志亦需要应用免疫层叠实验以提升其检测品质。

[0010] 相对检测试剂而言,受检标本实际上是一个更为复杂得多的生物学体系。检测试剂在正常状态下有足够能力在体系中识别出未发生免疫反应的对应靶物质。同理,某一检测试剂与受检标本混合并实施检测或免疫反应后,作为生物体系的实验标本尽管在成分上有所增加(增加了试剂体系中的各个组分),或在浓度上有所降低(稀释),但其生物学的本质并无改变,如未参与干扰实验的有害物质或因素,该体系中未参与免疫反应的靶物质仍可与随后加入的对应试剂进行免疫反应(后续免疫反应),包括实施与前期相同或不同的检测反应,从而形成,或再次形成可供观察的实验信号。这一特征是实施免疫层叠实验的物质条件。根据这一理念,在两类试剂互不干扰的前提下,当某一实验(基础实验)完成后,可通过新试剂的加入立即在原位(或易位)进行另一轮新的免疫实验(叠加实验)反应。由于取消样本准备与加样等繁琐的实验操作,新的实验方法能在保留基础实验与叠加实验两者多种高技术特征的同时,仍旧保持实验操作的简洁与相对简洁。从而极大提升这一新实验体系的应用前景。

[0011] 同上理由推导,在免疫反应中,部分参与免疫反应但其结合位点并未为对应免疫物质所饱和的靶物质仍旧可以参与随后的抗原抗体反应,这类反应亦有助于二次反应中实验信号的形成,而为抗原附着的固相物质(如纳米微球及某些标记物等)的被动参与则有助于对反应信号的强化或提升。

[0012] 免疫层叠实验由基础实验与叠加实验所组成,实验方法的选择是建立该方法的首要步骤。基础实验的选择主要考虑实验方法的反应方式,技术先进性,以及特异性、敏感性与稳定性等技术特征;叠加实验的选择在考虑方法特异性与稳定性的同时,主要考虑方法的简便性,以及在敏感性与检测范围上与基础方法的衔接。鉴于当前用于免疫血清学检测的实验方法在自然状态下能达成完美对接者不多,因而在多数情况下需要对现有实验方法在敏感性与定量范围上做出精细的调整。这种调整对基础免疫实验而言需要在保证足够敏感性的前提下尽量拓展定量检测范围,而对叠加实验而言则需要调整(包括提升与钝化)自身的敏感性,以确保其定量范围与基础免疫实验能有效地衔接。

[0013] 鉴于当前供选择的实验方法较多,多数实验在敏感性的提升研究上均经过艰苦努力并取得经验,因而当选定适宜的基础实验方法后,在一定程度上调节叠加实验的敏感性不应该存在过大的技术困难。

[0014] 免疫层叠实验的建立尚应考虑以下因素。即依托与叠加反应应尽可能在同一空间(或试验位点如反应孔)进行,即在原位与换位反应中优先选择前者;同理,在信号检测上也应该优先考虑实验反应与信号检测在同一实验点进行而摒弃需要将样品迁移的换位测定;此外,尽管从理论上讲免疫层叠实验能够实施多层叠加,但此举仅是在特殊场合下应对某

些因基础免疫实验定量检测范围过窄及靶物质表达范围过宽,一步叠加实验不能实施全定量检测的特殊试验场合。即便是在这种情况下,我们仍旧宁愿选择对试验方法与试剂(尤其是抗 He 试剂)的改进,甚至是试验标本稀释等措施。

## 发明内容

[0015] 本发明的目的是提供一种具有原组合方法的多种技术特征,能同时用于抗原及抗体等免疫物质的检测,能拮抗 Hooks 效应干扰,并能极大拓宽靶物质定量检测范围的利用免疫层叠法进行可溶性靶物质检测的方法。

[0016] 为实现上述目的,本发明提供的利用免疫层叠法进行可溶性靶物质的检测方法,其特征在于:它包括如下步骤:

[0017] (1) 向血清中加入实验试剂进行基础免疫实验,所述基础免疫实验为免疫层叠实验的第一次免疫反应,所述实验试剂为基础免疫实验的实验试剂,所述基础免疫实验为放射免疫实验、高敏感性乳胶凝集试验、固相酶联免疫实验、化学发光免疫实验、电化学发光免疫实验、时间分辨免疫荧光实验或光激发化学发光类免疫实验之中任一种实验;

[0018] (2) 对步骤 1 试验过程中所产生的实验信号进行检测,检测出的实验信号依据靶物质浓度与实验信号的函数关系,确定低浓度段靶物质含量,所述低浓度段为基础免疫实验检测所取得的定量范围;

[0019] (3) 在步骤 (1) 结束后,通过向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂,进行至少一次的叠加免疫实验;抗 He 试剂为溶解于水中的能与靶物质特异性结合的抗体或抗原,所述抗体或抗原游离于水中或吸附在悬浮于水中的固相载体上,抗 He 试剂中抗体浓度为  $0.05 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ ,或抗原浓度为  $0.01 \sim 500 \mu\text{g/ml}$ ,加入抗 He 试剂体积与基础免疫实验结束时实验体系的体积比例为  $1:1 \sim 20$ ;

[0020] (4) 对步骤 3 实验过程中所产生的实验信号进行检测,检测出的实验信号依据靶物质浓度与实验信号的函数关系,确定高浓度段靶物质含量;所述高浓度段为叠加免疫实验检测所取得的能够定量的检测范围;

[0021] (5) 取基础免疫实验能精确反应靶物质浓度的上限值为叠加免疫实验结果靶物质浓度取值的下限值,将叠加免疫实验的下限值以上部分的实验结果与基础免疫实验上限值以下部分的实验结果进行交汇叠加;形成新的靶物质含量与实验信号强度的关系,并据此计算待测标本中的靶物质浓度。

[0022] 作为优选方案,所述步骤 (1) 中的实验试剂为包被有 anti-HBs 的发光微球、生物素化的 anti-HBs 和包被链亲和素的感光微球;所述步骤 (3) 中抗 He 试剂的抗体为抗 HBs;所述步骤 (3) 中向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在  $37^{\circ}\text{C}$  下温育  $5 \sim 60\text{min}$ ,所述的抗 He 试剂中抗 HBs 浓度为  $100 \sim 750 \mu\text{g/ml}$ ,其加入体积为  $5 \sim 50\mu\text{L/孔}$ ;加入体积与一次免疫反应终末体系的比例为  $1:5 \sim 20$ 。

[0023] 作为优选方案,所述步骤 (1) 中的实验试剂为包被有 anti-HBe 的发光微球、生物素化的 anti-HBe 和包被链亲和素的感光微球;所述步骤 (3) 中抗 He 试剂的主要免疫反应物质为抗 HBe 致敏的乳胶溶液;所述步骤 (3) 中向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在  $37^{\circ}\text{C}$  下温育  $5 \sim 60\text{min}$ ,所述的抗 He 试剂中抗 HBe 标记乳胶的质量浓度为  $0.5 \sim 2.0\%$ ,其加入体积为  $5 \sim 50\mu\text{L/孔}$ ;加入体积与基础免疫反应

终末体系的比例为 1 : 5 ~ 20。

[0024] 作为优选方案,所述步骤(1)中的实验试剂为抗人 IgE 抗体包被微孔板条、鎗标记抗 -hIgE、洗涤液和发光促进剂 ;所述步骤(3)中抗 He 试剂的主要免疫反应物质为抗人 IgE 致敏乳胶 ;所述步骤(3)中向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在 37℃ 下温育 5 ~ 60min,所述的抗 He 试剂中抗人 IgE 标记乳胶的质量浓度为 0.1 ~ 1.0%,其加入体积为 5 ~ 50μL/ 孔 ;加入体积与基础免疫反应终末体系的比例为 1 : 1 ~ 10。

[0025] 作为优选方案,所述步骤(1)中的实验试剂为包被有 anti-IL-6 的酶标反应板、酶标记 anti-IL6、洗涤液、底物 A 及 B,分别含 TMB 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和固定剂 ;所述步骤(3) 中抗 He 试剂的主要免疫反应物质为抗人 IL-6 致敏乳胶 ;所述步骤(3)中向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在 37℃ 下温育 5 ~ 60min,所述的抗 He 试剂中抗 IL-6 标记乳胶的质量浓度为 0.1 ~ 1.0%,其加入体积为 5 ~ 50μL/ 孔 ;加入体积与基础免疫反应终末体系的比例为 1 : 1 ~ 10。

[0026] 作为优选方案,述步骤(1) 中的实验试剂为 HBsAg 包被酶标反应板、HRP 酶标记 HBsAg、洗涤液和含发光促进剂的发光底物 ;所述步骤(3)中抗 He 试剂的主要免疫反应物质为 HBsAg 致敏乳胶 ;所述步骤(3)中向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在 37℃ 下温育 5 ~ 60min,所述的抗 He 试剂中 HBsAg 标记乳胶的质量浓度为 0.1 ~ 1.0%,其加入体积为 5 ~ 50μL/ 孔 ;加入体积与基础免疫反应终末体系的比例为 1 : 1 ~ 10。

[0027] 作为优选方案,所述步骤(1) 中的实验试剂为生物素化的 anti-AFP、三联吡啶钡标记 anti-AFP、含发光促进剂的链亲和素标记磁性微球、洗涤液和发光促进剂 ;所述步骤(3) 中抗 He 试剂的主要免疫反应物质为抗人 AFP 抗体 ;所述步骤(3) 中向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在 37℃ 下温育 5 ~ 60min,所述的抗 He 试剂中抗人 AFP 的浓度为 50 ~ 250μg/ml,其加入体积为 5 ~ 50μL/ 孔 ;加入体积与基础免疫反应终末体系的比例为 1 : 1 ~ 10。

[0028] 上述的方法在血清 HBsAg、血清总 IgE、血清人白细胞介素 -6、血清抗 HBs 或血清 AFP 定性和定量检测中的应用。

[0029] 本发明中 :

[0030] (1)基础试验是免疫层叠实验的主要技术依托,又称依托免疫实验。通过此实验过程决定方法的特异性与敏感性。

[0031] (2) 叠加实验是免疫层叠实验的重要组成部分,反应体系内物质包括基础实验反应后孔(管)内全部物质,以及随后加入的抗 e 试剂 ;反应过程为两者混合及其随后的短时免疫反应。此实验过程的介入可提高整体实验方法(专利方法)对 Hooks 效应的拮抗能力,并显著拓展定量检测范围。

[0032] 叠加实验包括多种不同的实验方法,其技术特征亦随叠加实验的不同而异。

[0033] (3) 抗 e 试剂的主要成分为能与靶物质发生特异性结合,并能间接或直接产生可检测信号的实验材料。它是实施免疫叠加反应的物质基础。

[0034] (4) 标准品的主要成分为能与靶物质特异性结合,并能间接或直接产生可检测信号的实验材料。该标准品溶解于与实验标本类似的反应体系中,由高低两个系列组成,分

别用于基础与叠加实验,是实施免疫层叠反应的物质基础。此两系列中标准品样本设定的数量及其浓度须满足基础与叠加实验对靶物质定量的客观要求。

[0035] 为增加实验试剂的利用效率,用于对叠加实验结果作定量分析的高浓度标准血清系列在基础免疫实验阶段不必加到反应板中。在基础免疫实验结束后再根据浓度的不同依序加至对应标准孔中作叠加实验。由此造成的误差可以忽略或通过计算进行校正。

[0036] (5)定量方式与结果计算:实验结果的计算采用函数法,由于全程(亚全程)定量涉及被检测物质的浓度变化范围过宽,因而其标准品以两个或两个以上系列方式提供,结果的计算亦分两个或以上阶段,如基础实验阶段,叠加实验阶段等。实验结果的最后形成需结合不同阶段数据得出。

[0037] 用于免疫层叠技术中的实验过程及控制,实验试剂、耗材,实验仪器,以及实验结果处理(计算)的软硬件设施等均存在极大的研发空间,这些研发的完成应包含在本发明保护的范围内。

[0038] 下列几项为免疫层叠实验技术的基本概念:

[0039] ①免疫层叠技术:本发明中所指的“免疫层叠技术”是指将一种以上免疫方法有机结合在一起,用于对某一靶物质进行检测,所形成的新的实验方法能保留原始方法的主要优点,并能获得一些原始方法所不具备的新特征。在本发明的描述中,“絮状免疫凝集-LiCA”实验是免疫层叠技术的重要分支;血清 HBsAg 检测全定量“絮状免疫凝集-LiCA”实验是“絮状免疫凝集-LiCA”方法系统中具有代表性的实验方法,同时是为阐述本发明所采用的“优选方案”。

[0040] ②基础实验:本发明中所指的基础实验,是指建立“免疫层叠技术”所依托主要实验方法。该方法通常指现行流通的具有高度敏感性,特异性与稳定性,且其操作相对简便的免疫血清学检测方法,能为免疫层叠实验提供最基本的技术保障。

[0041] ③叠加实验:本发明中所指的叠加实验,是指建立“免疫层叠技术”所依托的主要实验方法之一,可为一重或数重迭加。该方法具有特异,稳定,及其操作简便等特点,但其敏感性较现行多数免疫血清学检测方法为低,且具有较高的可调节性。用于构建免疫层叠实验,能为纠正 Hooks 效应影响,并拓宽定量检测范围提供技术方向;

[0042] ④优选方案:本发明内容中所指优选方案系指为更清楚地阐述本发明的核心观点而采用的一种应用方法举例。具体是指血清 HBsAg 检测絮状免疫凝集-LiCA。应用该优选方案作为方法举例能更为清楚地阐述“免疫层叠技术”的发明点,基本原理、实验操作及其具体应用,以及专利方法所具有的先进性、实用性、代表性及其易转化性等诸多特点。

[0043] ⑤显性实验操作:本发明中所描述的显性实验操作,系指不能为实验仪器所完全取代,或虽可为实验仪器取代但对实验结果的影响无法消除的实验操作。

[0044] ⑥假阴性:本发明中所描述的假阴性,专指因待测靶物质浓度过高,在反应体系中形成对对应检测系统的饱和结合并阻止可检测信号的产生而导致的一种假阴性检测结果;

[0045] ⑦全程定量检测:本发明中所描述的全程定量,系指通过单一实验对标本中自然表达的任意浓度靶物质含量进行定量检测。这是一个相对的技术概念。在现有技术条件下,尚无一个免疫血清学方法能做到全程定量检测。新近,罗氏公司推出血清 HBsAg 电化学发光全程定量检测,其最高检测浓度可达 500 000ng/ml 或以上,应该认为达到全程或亚全程

定量。然该法以标本的稀释或系列稀释及其重复实验为基础,在技术上不具备实质性的创新。

[0046] 本发明的优点在于:本发明提供了一种“免疫层叠法”免疫血清学实验方法体系及其在可溶性抗原(或抗体)检测中的应用,并通过“优选方案”的介绍对其进行细致说明。其特殊之处在于:

[0047] 1. 创新性强:

[0048] 在确保现有基础免疫实验方法多种优良技术特征的前提下,能克服现有免疫血清学技术受 Hooks 效应干扰及其定量检测范围狭窄等两项长期阻碍发展的技术瓶颈,使那些浓度变异范围大或超大,检测精度要求高,不同浓度表达分别具有不同生物学意义的靶物质的全程定量检测得以实施,具有高度的原始创新性与广泛地实用性。

[0049] 2. 实验技术先进:

[0050] 该实验体系能把握当代实验技术的发展,有选择性地选用当前最先进的实验技术为依托,并能保留它们在敏感性,特异性,稳定性,及其操作简捷性等方面的诸多技术特征,不排斥这些技术可能出现的新改进与新发展,并能接受不断出现的新的实验技术与方法。其先进程度始终与当代实验技术的发展并驾齐驱;

[0051] 3. 涉及面广:

[0052] 就实验技术而言,它在理论上能涉及当代可用于可溶性抗原抗体检测的一切新旧技术。重点包括几种现代最优秀的免疫血清学试验(基础免疫实验),以及几种检测敏感性偏低但具备高度可塑性的实验方法或方法系统。

[0053] 就检测对象而言,涵盖所有的抗原,半抗原与相应的抗体,及其以抗原抗体反应(包括配受体反应)为手段进行检测的其它物质;

[0054] 就应用领域而言:以生物医学领域为基点,向外发散至全部的基础与实验生物学整体,以及需要涉及抗原抗体反应或者与之类似反应的研究与应用领域。

[0055] 4. 技术发展空间广阔:

[0056] 该项专利在实验方法上的成功证明了其所推行技术在理论上的正确性,其进一步的推广应用将涉及多种实验方法在仪器,试剂及其实验材料上的多方面改进,并引发上述领域中一系列发现,发明及其创新,这种全面而系统的创新机遇将为我国相关学科跨越式发展提供良好的契机。而以本发明技术为导向开展系统扎实的技术研究,可望将国内外免疫血清学诊断实验技术水平推向一个新的高度。

[0057] 絮状免疫沉淀-LiCA (优选方法)是在 LiCA (一种现代类均相免疫实验)的基础上引入絮状免疫凝集试验(传统均相免疫检测实验),所建立的“免疫层叠实验”能同时用于多种血清抗原或抗体检测。血清 HBsAg 全程定量检测絮状免疫凝集-LiCA 是这一技术系列的代表方法之一。这一方法既具有 LiCA 的高度敏感性、特异性与稳定性,又能保留其操作简捷等优点,并能克服 LiCA 的 Hooks 效应干扰及其定量检测范围狭窄的技术瓶颈。这一反应方式不仅用于普通免疫物质的定性与定量分析,尤其适宜对精度要求高,浓度变异范围大或超大的靶物质进行全程定量检测。该方法承载了“免疫层叠技术”的主要优点,具有高度的实用性。

附图说明

[0058] 图 1 是本发明基础免疫实验 (LiCA) 检测血清 HBsAg 与光子数量之间的量效关系。

[0059] 其中 :X 轴 :HBsAg 浓度 ( $2^n$  ng/ml);Y 轴 :光子数。

[0060] 图 2 是本发明叠加实验 (絮状免疫凝集) 检测血清 HBsAg 含量与检测信号之间的剂量相关性。

[0061] 其中 :X 轴 :HBsAg 浓度 ( $2^n$   $\mu$ g/ml);Y 轴 :消光度 ( $A_{450}$ )。

[0062] 图 3 是本发明血清 HBsAg 絮状免疫凝集 -LiCA 检测及其与罗氏电化学发光 (稀释法) 全定量检测试验的比较。

[0063] 其中 :X 轴 :罗氏公司检测浓度, Y 轴本发明方法检测浓度。浓度均为 ng/ml。

[0064] 图 4 是本发明血清 HBeAg 基础免疫实验 (LiCA) 检测信号强度与靶抗原浓度之间的量效关系。

[0065] 其中 :X 轴 :HBeAg 浓度 ( $2^n$  ng/ml);Y 轴 :光子数。

[0066] 图 5 是本发明叠加实验 (乳胶免疫凝集) 检测血清 HBeAg 含量与检测信号之间的剂量相关性。

[0067] 其中 :X 轴 :HBeAg 浓度 ( $2^n$   $\mu$ g/ml);Y 轴 :消光度 ( $A_{450}$ );

[0068] 图 6 是本发明基础免疫实验 (时间分辨免疫实验) 检测人血清总 IgE 含量与检测信号之间的剂量相关性。

[0069] 其中 :X 轴 :hIgE 浓度 ( $2^n$  ng/ml);Y 轴 :发光系数值;

[0070] 图 7 是本发明叠加免疫实验 (絮状免疫凝集) 检测人血清总 IgE 含量与检测信号之间的剂量相关性。

[0071] 其中 :X 轴 :hIgE 浓度 ( $2^n$   $\mu$ g/ml);Y 轴 :消光度 ( $A_{450}$ )。

[0072] 图 8 是本发明血清 IL-6 检测基础免疫实验 (ELISA) 信号与靶物质浓度之间的剂量关系。

[0073] 其中 :X 轴 :人 IL-6 浓度 ( $2^n$  fg /ml);Y 轴 :消光度 ( $A_{450}$ )。

[0074] 图 9 是本发明血清 IL-6 检测叠加实验 (乳胶凝集试验) 信号与靶物质浓度间的剂量关系。

[0075] 其中 :X 轴 :人 IL-6 浓度 ( $2^n$  ng/ml);Y 轴 :消光度 ( $A_{450}$ )。

[0076] 图 10 是本发明血清抗 HBs 检测基础免疫实验 (ELISA) 信号与靶物质浓度之间的剂量关系。

[0077] 其中 :X 轴 :抗 HBs 浓度 ( $2^n$  mIU/ml);Y 轴 :消光度 ( $A_{450}$ )。其中 :X 轴 :50.0 IU/ml  $\times 2e1-2e12$ ;Y 轴 :A450

[0078] 图 11 是本发明血清抗 HBs 检测叠加实验 (乳胶凝集试验) 信号与靶物质浓度之间的剂量关系。

[0079] 其中 :X 轴 :抗 HBs 浓度 ( $2^n$  IU/ml);Y 轴 :消光度 ( $A_{450}$ )。

[0080] 图 12 是本发明基础免疫实验 (电化学发光) 检测血清 AFP 浓度与检测信号之间的量效关系。

[0081] 其中 :X 轴 :AFP 浓度 ( $2^n$  ng/ml);Y 轴 :发光系数值;

[0082] 图 13 是本发明叠加实验 (絮状免疫凝集) 检测血清 AFP 含量与检测信号之间的剂量相关性。

[0083] 其中 :X 轴 :AFP 浓度 ( $2^n \mu\text{g/ml}$ ) ;Y 轴 :消光度 ( $A_{450}$ )。

## 具体实施方式

[0084] 以下结合附图和具体实施例对本发明作进一步的详细描述。

[0085] 实施例 1 血清 HBsAg 检测絮状免疫凝集 -LiCA

[0086] 一. 方法构建 :

[0087] 基础方法 :光激发化学发光实验 (Light initiated chemilluminescence assay, LiCA) ;

[0088] 层叠方法 :絮状免疫凝集试 (Flocculent immune agglutination test, FIAT)

[0089] 定量范围 :1.0-1 000 000 ng/ml。

[0090] Hooks 效应拮抗 :完全拮抗。

[0091] 二. 实验材料 :

[0092] 1、仪器与耗材

[0093] LiCA 发光检测系统 :LiCA TH 高通量均相发光免疫分析仪

[0094] 酶标比色仪 :Thermo Labsystems Multiskan MK32 酶标仪 ;LiCA 反应板 96 孔

[0095] 2 试剂

[0096] LiCA HBsAg 检测试剂由中国上海博阳生物技术公司生产,市售获得。包括 :

[0097] 试剂 1 :包被有 anti-HBs 的发光微球,

[0098] 试剂 2 :生物素化的 anti-HBs。

[0099] 试剂 3 :包被链亲和素 (SA) 的感光微球。

[0100] 抗 He (抗 Hooks 效应试剂),自制,专利试剂,主要成分为抗 HBs ;

[0101] 标准品 :窄幅标准血清 :LiCA 试剂盒随带

[0102] 宽幅标准血清 :自制 (暂),专利制品 ;

[0103] 阴性对照与阳性对照血清 :自制或市售试剂配备 ;用于域值确认,以及试剂的反应性评价 ;

[0104] 待检标本 血清 (血浆或其它体液)。

[0105] 其它 (略)

[0106] 三. 实验方法

[0107] 以下各步骤中反应条件为 :第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在  $37^{\circ}\text{C}$  下温育  $5 \sim 60\text{min}$ ,所述的抗 He 试剂中抗 HBs 浓度为  $100 \sim 750 \mu\text{g/ml}$ ,其加入体积为  $5 \sim 50 \mu\text{L/孔}$  ;加入体积与一次免疫反应终末体系的比例为  $1 : 5 \sim 20$ ,以下为优选的条件 :

[0108] 1. 实验准备 :

[0109] 取出所有试剂与标本,按需调整至工作 (或准工作) 浓度 ;并复温至室温。

[0110] 2. 实验操作

[0111] 1) 取待测标本,阴、阳性对照,及其 HBsAg 定量标准血清系列各  $25 \mu\text{l}$ ,分别加至 LiCA 板各反应孔中,每份标本加一孔 (或根据需要的任意孔) ;

[0112] 2) 加入试剂 1,每一实验孔加入各  $25 \mu\text{l}$ 。

[0113] 3) 旋即加入试剂 2,每一实验孔加入各  $25 \mu\text{l}$ 。混匀,  $37^{\circ}\text{C}$  温育  $15 \text{ min}$  ;

[0114] 4) 加入试剂 3, 每一实验孔各加入 175  $\mu$ l。混匀, 37℃温育 15 min;

[0115] 5) 置 LiCA 发光检测仪上, 680 nm 激发, 610nm 波长检测各孔实验信号并计算各孔靶物质的浓度。

[0116] 6) 置酶标比色仪上, 450 nm 透射法比浊测定并记录各孔本底吸收;

[0117] 7) 每一实验孔加入抗 He 溶液各 25  $\mu$ l。混匀, 37℃温育 15min;

[0118] 8) 置酶标比色仪上, 透射法比浊, 检测各孔实验信号 (OD), 经空白校正后根据标准品各孔(管) 信号计算各孔靶物质的浓度;

[0119] 9) 综合上述两步检测的实验结果综合报道待测标本的靶物质浓度。

[0120] 四. 应用效果

[0121] 采用本发明方法之实施例 1 对一组低浓度实验标本(系列稀释的参比血清)进行检测, 实验结果见表 1 及图 1。基础免疫实验(LiCA) 的信号强度与血清 HBsAg 浓度之间均有很好的剂量相关关系。

[0122] 表 1 血清 HBsAg 絮状免疫凝集 -LiCA 实验基础免疫实验(LiCA) 检测结果。

[0123]

| 实验管管序          | 0    | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11      |
|----------------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| HBsAg (ng/mL)* | 0.0  | 2    | 4     | 8     | 16    | 32    | 64     | 128    | 256    | 512    | 1024   | 1024    |
| 信号(光子数)        | 1032 | 7053 | 11247 | 22153 | 37412 | 58251 | 130279 | 291043 | 496310 | 833157 | 962041 | 1156234 |

[0124] \*: 靶抗原浓度设定值。

[0125] 采用本发明方法之实施例 1 对中高浓度试验标本(系列稀释的参比血清) 进行检测, 实验结果见表 2 及图 2。叠加实验(乳胶凝集试验) 的信号强度与血清 HBsAg 浓度之间有很好的剂量相关关系。

[0126] 表 2 血清 HBsAg 絮状免疫凝集 -LiCA 叠加实验(絮状免疫凝集) 检测结果。

[0127]

| 试验管管序                   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12     |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| HBsAg (ng/mL)**         | 1     | 2     | 4     | 8     | 16    | 32    | 64    | 128   | 256   | 512   | 1024  | 2048   |
| 消光度值(A <sub>450</sub> ) | 0.020 | 0.024 | 0.026 | 0.030 | 0.033 | 0.032 | 0.144 | 0.138 | 0.244 | 0.360 | 0.408 | 0.337* |

[0128] \*: 最高浓度孔出现显然的比色误差; \*\*: 靶抗原浓度设定值

[0129] 采用本发明方法(絮状免疫凝集 -LiCA) 对一组血清 HBsAg 阳性标本进行检测, 并与美国罗氏电化学发光稀释法全程定量检测试剂进行比较, 两者比较结果见图 3。X 轴: 为罗氏公司检测浓度, Y 轴为本发明方法检测浓度。

[0130] 五. 实施效果评价(说明):

[0131] 采用本发明方法进行血清 HBsAg 检测, 圆满达成预定的实验目标。主要技术特征如下。

[0132] 1. 依托方法与叠加方法两者其信号形成的强度与 HBsAg 浓度之间具有很好的剂量相关性。

[0133] 2. LiCA 为当前用于血清 HBsAg 检测最先进的实验方法之一。具有很好的特异性, 敏感性与稳定性, 操作简便是其最重要的技术特征。将其用于本发明方法(免疫叠层实验),

由于全盘保留 LiCA 的实验试剂与操作,能使上述主要技术特征得以完整保留,因而使本发明技术在对低浓度实验样本的检测时获得与 LiCA 完全一致的敏感性,特异性与稳定性。

[0134] 3. 絮状免疫凝集试验操作简单,特异性高,其实验过程,信号采集方式,以及多项实验条件的设定均具有较大的可塑性。有目的地对这些条件进行优化,能在保障操作简单,结果稳定等技术特征的前提下,使实验方法的敏感性及其定量检测范围在一定范围内得到调节。专项检测仪器的开发与应用将显著提升叠加实验的信号采集效果。具有很大的发展空间。

[0135] 4. 采用基础方法(LiCA)进行血清 HBsAg 检测,其靶物质最高可定量浓度可达到甚至超过 1000 ng/ml;而叠加方法(絮状免疫沉淀试验)的定量检测下限值,即便采用透射终点法,亦可达到 2000ng/ml 以下。即使不作任何调整,两者计量区间在自然状态下即可达成对接(见图 1 及 2)。调整试剂制备并采用专门研发检测仪器能显著提升信号采集,尤其是叠加实验信号采集的效果,将进一步提升两者定量区间的对接质量。这一特征为本试验的成立奠定基础。

[0136] 5. 图 2 结果显示,采用透射终点法检测,当靶物质浓度上升至  $2.048 \times 10^6$  ng/ml (即 2.048 mg/ml)时,其检测信号与靶物质浓度之间仍旧保有较好的剂量相关性。提示,采用此法检测,其定量范围可延生至  $2.048 \times 10^6$  ng/ml 或以上,不仅能完全消除 LiCA 试验因 Hooks 效应所致的假阴性,同时大大拓展了 LiCA 的定量检测范围。

[0137] 6. 方法的“有机叠加”是指通过将基础方法与叠加方法限制在同一实验容器中进行,并共用同一次加入的实验标本,这一设定可使实验操作简化,仅增加一步显性操作便能达成本发明所设定的全部实验目标。鉴于操作简便为 LiCA 的主要特点,即便增加抗 He 加入步骤,所形成的专利方法亦较现有多种固相免疫检测技术简捷。然而,为实现这种完全的“有机叠加”需要保证并提升所依托方法的试剂品质,并可能对现行试剂,仪器甚至实验耗材进行较大幅度的改造。在达成上述改进之前,试验结果的分析与报告(制作)不得不采用手工操作。

[0138] 7. 综上所述,本发明方法举例的特点为,其一,能获得与现行检测方法相似或更加优良的技术特征,包括与 LiCA 同等的特异性敏感性与稳定性,以及虽较 LiCA 法略增加但仍较现行固相免疫检测实验显著简洁的实验操作;其二,能突破现有实验方法在技术发展上的瓶颈。包括完全纠正 LiCA 在检测中 Hooks 效应的干扰,以及显著拓展其靶物质定量检测的范围等。具有很强的原始创新性与实用性。

[0139] 实施例 2 血清 HBeAg 检测乳胶免疫凝集-LiCA

[0140] 一. 方法构建:

[0141] 基础方法:光激发化学发光实验(Light initiated chemilluminescence assay, LiCA);

[0142] 层叠方法:乳胶免疫凝集试验(Latex Immune agglutination test, LIAT);

[0143] 定量范围:1.0-100 000ng/ml。

[0144] Hooks 效应拮抗:完全拮抗

[0145] 二. 实验材料:

[0146] 1、仪器与耗材

[0147] LiCA 发光检测系统:LiCA TH 高通量均相发光免疫分析仪;

[0148] 酶标比色仪：Thermo Labsystems Multiskan MK32 酶标仪；酶标反应板：96 孔；

[0149] 2. 试剂

[0150] LiCA HBeAg 检测试剂由中国上海博阳生物技术公司生产，市售获得。包括：

[0151] 试剂 1：包被有 anti-HBe 的发光微球；

[0152] 试剂 2：生物素化的 anti-HBe；

[0153] 试剂 3：包被链亲和素(SA)的感光微球；

[0154] 抗 He (抗 Hooks 效应试剂)，自制，专利试剂，主要成分为抗 HBe 致敏的乳胶溶液；

[0155] 标准品 窄幅标准血清 LiCA 试剂盒随带；

[0156] 宽幅标准血清 自制，专利制品；

[0157] 阴性对照与阳性对照血清：自制或市售试剂配备；用于域值确认，以及试剂的反应性评价；

[0158] 待检标本 血清(血浆或其它体液)。

[0159] 其它 (略)

[0160] 三. 试验操作

[0161] 1. 实验准备

[0162] (1)取出所有试剂与标本，按需调整至工作(或准工作)浓度；并复温至接近室温水平。

[0163] (2)按需取试剂 2 及试剂 3 各等体积，混匀，室温放置 20 分钟；

[0164] 2. 实验操作

[0165] 以下各步骤中的反应条件为：中向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在 37℃ 下温育 5～60min，所述的抗 He 试剂中抗 HBe 标记乳胶的质量浓度为 0.5～2.0%，其加入体积为 5～50μL/孔；加入体积与基础免疫反应终末体系的比例为 1:5～20，以下为优选的条件：

[0166] 1)取待测标本，阴、阳性对照，及 HBeAg 定量标准血清系列各 50 μl，分别加至 LiCA 板各反应孔中，每份标本加一孔(或根据需要的任意孔)，

[0167] 2)加入试剂 1，每一反应孔加入各 50 μl；

[0168] 3)旋即加入试剂 2,3 混合液，每一反应孔加入各 150 μl，混匀，温育 15 分钟以完成免疫反应；

[0169] 4)置 LiCA 发光检测仪上，680 nm 波长激发，610nm 波长检测各孔测试信号，绘制标准曲线，并初步评价检测标本的信号强度；

[0170] 5)置酶标比色仪上，450 nm 透射法比浊记录各孔本底吸收；

[0171] 6)每一实验孔加入抗 He 溶液各 25μl。混匀，37℃温育 15min；

[0172] 7)置酶标比色仪上，透射法比浊，检测各孔实验信号 ( $A_{450}$ )，校正并计算各孔靶物质的浓度；

[0173] 8)综合上述两步检测的实验结果综合报道待测标本的靶物质浓度。

[0174] 四. 应用效果

[0175] 采用本发明方法之实施例 2 对低浓度标准血清(系列稀释的标准血清)进行检测，实验结果见表 3 及图 4。基础免疫实验(LiCA)的信号强度与血清 HBeAg 浓度之间有很好的

剂量相关关系。

[0176] 表 3 血清 HBeAg 絮状免疫凝集 -LiCA 基础免疫实验(LiCA) 检测结果。

[0177]

| 实验管序号                      | 0   | 1    | 2    | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8      | 9      | 10     |
|----------------------------|-----|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| HBeAg( $\mu\text{g/ml}$ )* | 0.0 | 2    | 4    | 8     | 16    | 32    | 64    | 128   | 256    | 512    | 1024   |
| 信号(光子数)                    | 953 | 5612 | 6538 | 16276 | 25143 | 34257 | 49630 | 87219 | 143292 | 271833 | 563981 |

[0178] \*:靶抗原浓度设定值。

[0179] 采用本发明方法之实施例 2 对中高浓度标准血清(系列稀释的参比血清) 进行检测,实验结果见表 4 及图 5。叠加实验(乳胶免疫凝集试验) 信号强度与血清 HBeAg 浓度之间有很好的剂量相关关系。

[0180] 表 4 叠加实验(乳胶免疫凝集试验) 血清 HBeAg 检测结果

[0181]

| 样本编号                       | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11     |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| HBeAg( $\mu\text{g/ml}$ )* | 0.1   | 0.2   | 0.4   | 0.8   | 1.6   | 3.2   | 6.4   | 12.8  | 25.6  | 51.2  | 102.4* |
| 检测信号(A <sub>490</sub> )    | 0.028 | 0.055 | 0.051 | 0.072 | 0.103 | 0.172 | 0.265 | 0.379 | 0.495 | 0.613 | 0.721  |

\*:靶抗原浓度设定值。。

[0182] 五. 实施效果评价(说明):

[0183] 采用本发明方法进行血清 HBeAg 检测,圆满达成预定的实验目标。主要技术特征如下。

[0184] 1. 依托方法与叠加方法两者其信号形成的强度与 HBeAg 浓度之间具有很好的剂量相关性。

[0185] 2. LiCA 为当前用于血清 HBeAg 检测最先进的实验方法之一。具有很好的特异性,敏感性与稳定性,操作简便是其最重要的技术特征。将其用于本发明方法(免疫叠层实验),由于全盘保留 LiCA 的实验试剂与操作,能使上述主要技术特征得以完整保留,因而本发明技术在对低浓度实验样本的检测时能获得与 LiCA 完全一致的敏感性,特异性与稳定性。

[0186] 3. 乳胶免疫凝集试验操作简单,特异性高,其实验过程,信号采集方式,以及多项实验条件的设定均具有较大的可塑性,并在近十余年的研究中取得较大发展。有目的地对这些条件进行优化,能在保障操作简单,结果稳定等技术特征的前提下,使方法的敏感性及其定量检测范围在一定范围内得到调节以达成与基础方法的理想对接。具有很大拓展空间。

[0187] 4. 采用依托方法(LiCA)进行血清 HBeAg 检测,其靶物质最高可定量浓度超过 1000 ng/ml;而叠加方法(乳胶免疫凝集试验)的定量检测下限值(或检测的敏感性值)最低约在 1-10 ng/ml 之间,经调变亦可达到 50-500 ng/ml 水平。采用透射终点法,可达到 200 ng/ml 左右。在此条件下,两法的计量区间不仅能达成完美对接(见图 4 及 5),而且为定量范围拓展留下足够的空间。

[0188] 5. 图 5 结果显示,采用透射终点法检测,当靶物质浓度上升至(即 102.4  $\mu\text{g/ml}$  时,其检测信号与靶物质浓度之间仍旧保有良好地剂量相关性。提示,采用此法检测,其定量范

围可延生至  $2.0 \times 10^5$  ng/ml 或以上。而如此高浓度的 HBeAg 表达在临床标本中十分罕见。上述结果表明,本方法可完全消除浓度依赖性 Hooks 效应所致的假阴性,但受预试验条件的限制,现阶段仅能基本满足血清 HBeAg 全程定量检测的需求。

[0189] 6. 方法的“有机叠加”是指通过将依托方法与叠加方法限制在同一实验容器中进行,并共用同一次加入的实验标本,可使实验操作高度简化,仅增加一步显性操作便能达成本发明所设定的全部实验目标。由操作简便为 LiCA 的主要特点,即便增加抗 He 加入步骤,所形成的专利方法亦较现有多种固相免疫检测技术简捷。然而,尽管将本发明方法用于 HBeAg 检测在试剂上存在种种便利,但仍存在不少缺点,尤其是叠加实验检测信号的采集质量的提升需要借助专门的实验仪器。因而实现这种完全的“有机叠加”仍旧需要在仪器甚至实验耗材上进行较大幅度的改造。在达成上述改进之前,对试验结果的分析及其报告仍旧将以手工操作进行。

[0190] 7. 综上所述,本发明方法举例的特点为,其一,能获得与现行检测方法相似或更加优良的技术特征,包括与 LiCA 同等的特异性敏感性与稳定性,以及虽较 LiCA 法略增加但仍较现行多种试验方法显著简洁的实验操作;其二,能突破现有实验方法在技术发展上的瓶颈。包括完全纠正 LiCA 在检测中 Hooks 效应的干扰,以及显著拓展其靶物质定量检测的范围等。具有很强的原始创新性与实用性。

[0191] 实施例 3 血清总 IgE 检测乳胶免疫凝集-时间分辨免荧光法检测

[0192] 一. 方法构建:

[0193] 基础方法:时间分辨免疫荧光试验(Time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)

[0194] 层叠方法:乳胶免疫凝集试验(Latex Immune agglutination test, LIAT);

[0195] 定量范围:0.10-100 000 ng/ml。

[0196] Hooks 效应拮抗:全拮抗。

[0197] 二. 实验材料:

[0198] 1、仪器与耗材

[0199] 时间分辨荧光分析仪:ANYTEST 时间分辨荧光分析仪;

[0200] 酶标比色仪:Thermo Labsystems Multiskan MK32 酶标仪;酶标反应板:96 孔;

[0201] 2) 试剂

[0202] TRFIA hIgE 总抗体检测试剂由中国上海新波生物技术有限公司生产,市售获得。包括:

[0203] 试剂 1:抗人 IgE 抗体(抗-hIgE)包被微孔板条;

[0204] 试剂 2:酶标记抗-hIgE;

[0205] 试剂 3:洗涤液;

[0206] 试剂 4:发光促进剂;

[0207] 抗 He(抗 Hooks 效应试剂),自制,专利试剂,主要成分为抗人 IgE 致敏乳胶;

[0208] 标准品 窄幅标准血清:自制或时间分辨荧光检测试剂盒随带;

[0209] 宽幅标准血清:自制(暂),专利制品;

[0210] 阴性对照与阳性对照血清:自制或市售试剂配备;用于域值确认,以及试剂的反

应性评价；

[0211] 待检标本 血清(血浆或其它体液)。

[0212] 其它 (略)

[0213] 三. 实验操作

[0214] 1. 试验准备：

[0215] 取出试剂与标本，按需调整至工作(或准工作)浓度，复温至 20-25℃。

[0216] 2. 操作步骤

[0217] 以下各步骤中的反应条件为：向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在 37℃ 下温育 5 ~ 60min，所述的抗 He 试剂中抗人 IgE 标记乳胶的质量浓度为 0.1 ~ 1.0%，其加入体积为 5 ~ 50μL/孔；加入体积与基础免疫反应终末体系的比例为 1:1 ~ 10，以下为优选的条件：

[0218] 依托试验按试剂说明采用两步法免疫反应(一步法反应更适宜本发明方法)。

[0219] 1) 取待测标本，阴、阳性对照，及其 hIgE 定量标准血清系列各 100ul，分别加至抗人 IgE 包被的微孔板各反应孔中，每份标本加一孔(或根据需要的任意孔)；

[0220] 2) 置水平振荡器上，25℃ 缓慢震荡孵育 40min；

[0221] 3) 小心移出全部反应孔中标本，分别移至一块未做抗 -hIgE 包被的新酶标反应板的相应试验孔中。注意移液体积须精确，并避免相互间靶物质的污染；

[0222] 4) 洗涤经免疫反应后的抗 hIgE 包被板，1min×4 次；

[0223] 5) 加入酶标记工作液，100 微升/孔。置水平振荡器上，25℃ 缓慢震荡孵育 40min；

[0224] 6) 同上洗涤经再次免疫反应后的抗 hIgE 包被板，1min×6 次；

[0225] 7) 加入发光促进剂，每孔 100 微升，置 25℃ 缓慢震荡孵育 5min；

[0226] 8) 置时间分辨发光检测仪上，使用抗人 hIgE IFMA 测定程序，即刻判读试验结果。

[0227] 9) 方法的有效性鉴定。有效的试验检测结果须满足如下三个要求。①典型的剂量反应曲线；②反应曲线 r 大于 0.9800；③阴性参比孔发光值小于 5000，最高靶物质参比孔检测发光值大于 1000000；未达此三条标准者需重新实验。

[0228] 10) 将前述盛有一次免疫反应后试验标本的酶标反应板置酶标比色仪上，450 nm 透射法比浊记录各孔本底吸收；

[0229] 11) 加入抗 He，每孔 50 ul，混匀，静置 30min，混匀并比色，校正信号值并根据标准孔检测信号计算各孔靶物质的含量；

[0230] 12) 综合上述两步检测的实验结果综合报道待测标本的靶物质浓度。

[0231] 四. 应用效果

[0232] 采用本发明方法实施例 3 对一组系列稀释的标准血清进行血清总 hIgE 检测，基础免疫实验(时间分辨荧光试验)检测结果见表 5，检测信号与靶物质含量之间的剂量相关关系见图 6。

[0233] 表 5 血清总 hIgE 检测乳胶免疫凝集-时间分辨荧光试验基础免疫实验(TRFIA)检测结果。

[0234]

| 实验管序号         | 1    | 2    | 3     | 4     | 5     | 6      | 7      | 8      | 9      | 10      | 11      |
|---------------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| hIgE (ng/mL)* | 0    | 0.5  | 1.0   | 2.0   | 4.0   | 8.0    | 16     | 32     | 64     | 128     | 256     |
| 信号 (发光值)      | 2371 | 7643 | 14685 | 32741 | 61583 | 113426 | 238304 | 394258 | 763241 | 1143517 | 1296437 |

[0235] \*:靶抗原浓度设定值。。

[0236] 采用本利专实施方法举例 3 对一组系列稀释的高浓度参比血清进行检测,叠加实验(絮状免疫凝集试验)结果见表 6,叠加实验信号强度与人血清总 IgE (hIgE) 浓度之间的剂量相关关系见图 7。

[0237] 表 6 叠加实验(絮状免疫凝集)血清 hIgE 检测结果

[0238]

| 实验管序                    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7*    | 8*    | 9*    | 10*   | 11*   | 12    |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 含量(μg/mL)**             | 0.1   | 0.2   | 0.4   | 0.8   | 1.6   | 3.2   | 6.4   | 12.8  | 25.6  | 51.2  | 102.4 | 204.8 |
| 检测信号(A <sub>490</sub> ) | 0.029 | 0.047 | 0.083 | 0.147 | 0.221 | 0.345 | 0.473 | 0.652 | 0.823 | 1.129 | 1.431 | 1.527 |

[0239] \*:模拟数据(因实验阶段缺少高浓度参比物)。 \*\*:靶抗原浓度设定值。

[0240] 五. 实施效果评价(说明):

[0241] 采用本发明方法进行血清总 hIgE 检测,圆满达成预定的实验目标。主要技术特征如下。

[0242] 1、依托方法与叠加方法两者其信号形成的强度与 hIgE 浓度之间具有很好的剂量相关性。

[0243] 2、时间分辨荧光检测试验为当前最先进的实验方法之一,具有很好的特异性,敏感性与稳定性。将本发明方法(免疫叠层实验)用于该项检测技术,由于全盘保留该方法的实验试剂与操作,能使上述主要技术特征得以完整保留,因而使本发明技术在对低浓度实验样本的检测时获得与所依托技术完全一致的敏感性,特异性与稳定性。

[0244] 3、乳胶免疫凝集试验操作简单,特异性高,其实验过程,信号采集方式,以及多项实验条件的设定均具有较大的可塑性。有目的地对这些条件进行优化,能在保障操作简单,结果稳定等技术特征的前提下,使方法的敏感性及其定量检测范围在一定程度上得到调节。现代免疫试验仪器的使用(或整合使用,目前尚未应用)能显著提升该方法的检测效果,尤其是叠加实验的信号采集效果,从而使本发明方法具有更大的发展空间。

[0245] 4、采用基础方法(时间分辨荧光)进行血清 hIgE 检测,其靶物质最高可定量浓度超过 150 ng/ml;叠加方法(乳胶免疫凝集试验)的定量检测下限值最高可达 fg/ml 水平,即便采用透射终点法,亦可达到 100ng/ml 左右,经过适当的调整,两法在计量区间的对接可以更加完美。

[0246] 5、图 7 结果显示,采用透射终点法检测,当靶物质浓度上升至  $1.024 \times 10^5$  ng/ml (即 102.4 μg/ml) 时,其检测信号与靶物质浓度之间仍旧保有良好地剂量相关性。而迄今文献报道之血清 hIgE 最高含量绝少高于 20.0 μg/ml (罕见的 IgE 型骨髓瘤资料未收集),鉴于此法检测定量范围上限可达 102.4 μg/ml 或以上。尽管该指标检测无需考虑因 Hooks 效应干扰所致的假阴性,但对血清 hIgE 实施全定量检测。

[0247] 6、方法的有机叠加是指依托方法与叠加方法依次序贯进行,并共用同一次加入的

实验标本,此举可使专利方法在不明显增加实验操作的前提下显著提升检测品质。为保全试验方法的完整性,本实施例保留了基础试验的二步法免疫反应;叠加实验改为以手工方式在异孔进行,此两者的结合显然使操作变得相对繁琐。若将二步免疫反应改为一步法,以及通过对现行试剂,仪器甚至现行实验耗材作适宜本发明需求的改进而达成试验操作的自动化,可望使试验操作得以十分显著地简化。

[0248] 7、综上所述,本发明方法举例具有以下两个特点,其一能获得部分与依托方法相似或更加优良的技术特征,包括方法的特异性敏感性与稳定性等;其二,能突破现有实验方法在发展上的技术瓶颈,如完全纠正 Hooks 效应干扰,显著拓展现有方法靶物质的定量检测范围,并基本达成在单一试验中对血清 hIgE 的全程定量检测。具有很强的原始创新性与实用性。受试剂,器材及其实验仪器等多方面的限制本发明方法在现阶段未达成两个免疫反应阶段的有机叠加,使操作显得较为繁琐;抗 He 制备成本偏高亦可能影响该技术近期的推广应用。这些缺陷将在专利的进一步实施中得到解决。

[0249] 实施例 4 人白细胞介素 -6 (IL-6 等) 检测乳胶凝集 -ELISA

[0250] 一. 方法构建:

[0251] 基础方法:固相酶联免疫试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA);

[0252] 层叠方法:乳胶免疫凝集试验(Latex Immune agglutination test, LIAT);

[0253] 定量范围:10.0- 100 000 ng/L。

[0254] Hooks 效应拮抗:全拮抗。

[0255] 二. 实验材料:

[0256] 1. 仪器与耗材

[0257] 酶标比色仪:: Thermo Labsystems Multiskan MK32 酶标仪:酶标反应板: 96 孔;

[0258] 2. 试剂

[0259] ELISA 检测人 IL-6 检测试剂, Sigma 公司制造市售获得。包括:

[0260] 试剂 1: 包被有 anti-IL-6 酶标反应板;

[0261] 试剂 2: 酶标记 anti-IL6;

[0262] 试剂 3: 洗涤液;

[0263] 试剂 4: 显色剂 A 及 B (分别含 TMB 及  $H_2O_2$ );

[0264] 试剂 5: 固定剂。

[0265] 抗 He (抗 Hooks 效应试剂), 自制, 专利试剂, 主要成分为抗人 IL-6 致敏乳胶。

[0266] 标准品 窄幅标准血清 ELISA 试剂盒随带;

[0267] 宽幅标准血清 自制, 专利制品;

[0268] 阴性对照与阳性对照血清: 自制或市售试剂配备; 用于域值确认, 以及试剂的反应性评价。

[0269] 其它 (略)

[0270] 三. 实验操作

[0271] 1. 试验准备:

[0272] 取出所有试剂与标本, 按需调整至工作(或准工作)浓度; 并复温至接近室温水平。

[0273] 2. 实验操作

[0274] 以下各步骤中的反应条件为：向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在 37℃ 下温育 5 ~ 60min, 所述的抗 He 试剂中抗 IL-6 标记乳胶的质量浓度为 0.1 ~ 1.0%, 其加入体积为 5 ~ 50μL/孔; 加入体积与基础免疫反应终末体系的比例为 1:1 ~ 10, 以下为优选条件:

[0275] 采用一步法 ELISA, 市售试剂, 试验程序较试剂盒说明有所改变。

[0276] 1) 取待测标本, 阴、阳性对照, 及其人 IL-6 定量标准血清系列各 50 μl, 分别加至抗 IL-6 包被的酶标反应板各孔中, 每份标本加一孔(或根据需要的任意孔);

[0277] 2) 旋即加入酶标抗体 50 μl, 混匀, 37℃ 反应 30min, A<sub>450</sub> 扫描并记录 A450 值;

[0278] 3) 每孔旋即加入抗 He 溶液 50 μl, 混匀, 37℃ 反应 15 min, 置酶标比色计上, A<sub>450</sub> 扫描并记录 OD;

[0279] 4) 在机或脱机做本底校正, 制备标准曲线, 并根据曲线计算各实验孔靶物质含量;(中高浓度部分。此步操作在时间上不宜影响下步试验的进行);

[0280] 5) 采用洗涤液洗涤反应板 3min × 5 次; 每孔加入显色剂 A 及 B 各 50 μl, 室温显色 15 min;

[0281] 6) 每孔加终止剂各 50 μl, 混匀, 终止酶促反应;

[0282] 7) 置酶标比色计, 450 nm 比色并记录 A450, 绘制标准曲线并计算各孔靶物质含量(低浓度靶物质测值);

[0283] 8) 综合上述两步检测的实验结果综合报告待测标本的靶物质浓度。

#### [0284] 四. 应用效果

[0285] 采用本发明实施例 4 方法进行血清 IL-6 检测。表 7 显示基础免疫实验(ELISA)对低浓度标准血清检测的实验结果。图 8 显示检测信号强度与血清靶物质浓度之间的剂量相关关系。

[0286] 表 7 血清 IL-6 乳胶免疫凝集-ELISA 实验基础免疫实验(ELISA)检测结果。

[0287]

| 实验管序         | 0     | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    |
|--------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| IL-6(pg/mL)* | 0.0   | 10   | 20   | 40   | 80   | 160  | 320  | 640  | 1280 | 2560 |
| 信号(A450)     | 0.032 | 0.14 | 0.27 | 0.53 | 0.92 | 1.73 | 2.38 | 3.13 | 3.29 | 3.31 |

[0288] \*: 靶抗原浓度设定值。

[0289] 采用本发明实施例 4 方法进行血清 IL-6 检测。表 8 显示叠加实验(乳胶凝集试验)对中高浓度标准血清检测的实验结果。图 9 显示检测信号强度与血清靶物质浓度之间的剂量相关关系。

[0290] 表 8 血清乳胶免疫凝集-ELISA 实验叠加实验(乳胶免疫凝集)检测结果

[0291]

| 试验管序                    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11     | 12     |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| IL-6(pg/mL)*            | 1.0   | 2.0   | 4.0   | 8.0   | 16.0  | 32.0  | 64.0  | 128.0 | 256.0 | 512.0 | 1024.0 | 2048.0 |
| 检测信号(A <sub>450</sub> ) | 0.032 | 0.045 | 0.073 | 0.137 | 0.213 | 0.325 | 0.457 | 0.639 | 0.793 | 1.032 | 1.341  | 1.527  |

[0292] \* :靶抗原浓度设定值。

[0293] 五. 实施效果评价(说明):

[0294] 采用本发明方法进行血清 IL-6 检测, 主要技术特征如下。

[0295] 1、外周血 IL-6 的存在方式有多种, 其中高分子(实际上是分子复合体)与低分子 IL-6 之间在免疫反应性上的差别既往曾对该物质的检测产生较大干扰。以至采用不同试剂检测其结果可出现十分巨大的差别。对这一现象的探索引发 IL-6 检测在实验试剂上的革命, 而试剂品质进步所取得的成果又因检测方法定量范围的过于狭窄而被抵消。大幅提升检测方法的定量范围成为目前改善 IL-6 及其类似细胞因子检测品质的最主要途径。而本发明技术的革新 方向即为纠正一步法 ELISA Hooks 效应影响并拓展现有方法定量检测的范围;

[0296] 2、将本发明用于人血清 IL-6 检测, 依托方法与叠加方法两者其信号形成的强度与靶抗原浓度之间均具有很好的剂量相关性。

[0297] 3、ELISA 为当前血清 IL-6 检测最成熟, 综合性能最佳的实验方法之一。具有很好的特异性, 敏感性与稳定性, 改进后的一步法 ELISA 较之传统二步法 ELISA 显著简便。将其用于本发明方法(作为基础方法), 能使本发明技术获得与一步法 ELISA 一致的敏感性, 特异性与稳定性, 并为其定量范围拓展及其 Hooks 效应的矫正提供了契机;

[0298] 4、乳胶免疫凝集试验操作简单, 特异性高, 其实验过程, 信号采集方式, 以及实验条件的设定等多个环节均具有较大的可塑性。有目的地对这些环节进行优化, 能在获得操作简单, 结果稳定等技术特征的前提下, 使方法的敏感性及其定量检测范围得以较大幅度地调节。近十余年来免疫凝集与沉淀方法在技术上的成熟为上述改进提供了强大地技术保障。由于方法简便, 及其在敏感性与定量范围上的高度可塑性, 该法尤其适宜作为叠加方法用于本发明技术。

[0299] 5、采用基础方法(ELISA)进行血清 IL-6 检测, 靶物质检测的敏感性可达 10 pg/ml 或更低, 但最高可定量浓度仅达 2000-5000 pg/ml 单一实验检测显然不能满足对全部 IL-6 进行定量检测的需求; 而叠加方法(乳胶免疫凝集试验)的定量检测下限值, 在采用专门检测技术与仪器的前提下, 其敏感性可达 pg 水平, 即便采用透射终点法, 对这类分子量相对较小的靶物质而言, 其定量检测下限亦很容易保持在 2-5.00 ng/ml 水平之间(本实施例约为 1-2 ng/ml)。根据所显示的情况不作或稍加调节, 依托法与叠加法两者的计量区间即可达成较完美地对接(见图 8 及 9)。

[0300] 6、图 9 结果显示, 采用透射终点法检测, 当靶物质浓度上升至  $1 \times 10 \text{ ng/ml}$  (即 1024 ng/ml) 时, 其检测信号与靶物质浓度之间仍旧保有较好地剂量相关性。提示, 采用此法检测, 其定量范围可望延伸至  $1 \times 10^3 \text{ ng/ml}$  (目前已知最高表达量为 10  $\mu\text{g/ml}$ ), 较原 ELISA 约提升 1000 倍以上, 其定量范围远大于现行一切市售 IL-6 检测试剂。能具有如此宽幅度的定量检测范围, 本发明方法显然摆脱(或基本摆脱)了 Hooks 效应对实验结果的干扰。

[0301] 7、方法的有机叠加是指依托方法与叠加方法两者共用同一次加入的实验标本, 以期达到专利方法最终的实验操作较依托方法仅多一个抗 He 加入步骤(忽略信号判读与计算过程), 便获得定量范围拓展与纠正 Hooks 效应影响等两大创新性效果。此举相对一步法 ELISA 而言操作增加不多, 就二步法 ELISA 而言操作有一定程度简化, 具有较强的现实可行性。

[0302] 8、部分研究者提出,在本实验状态下“原位叠加免疫反应”的实施或可减弱依托试验(ELISA)的敏感性。但这一负面影响效果有限,不会对临床检测造成实质性的负面影响,且可通过易位乳胶凝集试验(即将免疫反应后的标本移至另一空白的反应孔,然后加入抗 He 进行乳胶凝集试验,此内容不在此讨论)加以纠正。

[0303] 9、综上所述,本项专利方法举例优点如下。能获得与依托方发相似的特异性敏感性与稳定性;实验操作相对简洁;能突破一步法 ELISA 应用中 Hooks 效应的干扰,能显著拓展定量检测的浓度范围,具有较强的原始创新性,并具有广泛的应用前景。

[0304] 实施例 5 抗 HBs 检测乳胶免疫凝集-CLIA

[0305] 一. 方法构建:

[0306] 基础方法:化学发光免疫分析法(或称化学发光酶免疫分析法, Chemiluminescence immunoassay CLIA)

[0307] 层叠方法:乳胶免疫凝集试验(Latex Immune agglutination test, LIAT);

[0308] 定量范围:0.01- 100 000 IU/ml。

[0309] Hooks 效应拮抗:全拮抗。

[0310] 二. 实验材料:

[0311] 1. 仪器与耗材

[0312] 化学发光分析仪

[0313] 酶标比色仪

[0314] 酶法发光检测微孔板 96 孔

[0315] 酶标反应板

[0316] 2. 试剂

[0317] 人抗 HBs ELISA 酶化学发光试剂盒由中国郑州安图生物技术公司制备,市售获得。包括:

[0318] 试剂 1:HBsAg 包被酶标反应板;

[0319] 试剂 2:酶(HRP)标记 HBsAg;

[0320] 试剂 3:洗涤液;

[0321] 试剂 4:发光底物(底物 A 及 B)

[0322] 抗 He (抗 Hooks 效应试剂):自制,专利试剂,主要成分为 HBsAg 致敏乳胶;

[0323] 标准品 窄幅标准血清 ELISA 试剂盒随带

[0324] 宽幅标准血清 自制,专利制品;

[0325] 阴性对照与阳性对照血清:自制或市售试剂配备;用于域值确认,以及试剂的反应性评价;

[0326] 其它 (略)

[0327] 三. 实验操作

[0328] 1. 试验准备:

[0329] 取出所有试剂与标本,按需调整至工作(或准工作)浓度;并复温至接近室温水平。

[0330] 以下各步骤中的反应条件为:向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在 37℃ 下温育 5 ~ 60min,所述的抗 He 试剂中 HBsAg 标记乳胶的质量浓度为 0.1 ~ 1.0%,其加入体积为 5 ~ 50μL/孔;加入体积与基础免疫反应终末体系

的比例为 1:1 ~ 10, 以下为优选条件:

[0331] 1) 取待测标本, 阴、阳性对照, 及其抗 HBs 定量标准血清系列各 50  $\mu$ l, 分别加至已包被 HBsAg 的微孔反应板各反应孔中, 每份标本加一孔(或根据需要的任意孔);

[0332] 2) 旋即加入酶标 HBsAg 50  $\mu$ l, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min;

[0333] 3) 置酶标比色仪上, A450 测定记录 OD;

[0334] 4) 每孔旋即加入抗 He 溶液 50  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min;

[0335] 5) 置酶标比色仪上, A<sub>450</sub> 测定记录 OD, 根据标准曲线各孔激算高浓度靶物质各标本的抗 HBs 浓度;

[0336] 6) 采用洗涤液洗涤酶标反应板, 3min $\times$ 5 次;

[0337] 7) 加发光底物 A 及 B 各 50 $\mu$ l, 混匀, 室温放置平衡 5 分钟;

[0338] 8) 置多功能酶标比色仪上, 采集试验信号并根据标准曲线判读低浓度阳性标本靶物质检测的结果;

[0339] 9) 综合上述两步检测的实验结果报告待测标本的靶物质浓度。

[0340] 四. 应用效果

[0341] 采用实施例 5 对一组系列稀释的标准血清进行抗 HBs 检测。表 9 显示采用基础免疫实验(ELISA)对低浓度抗 HBs 标准血清检测的实验结果。图 10 为检测信号强度与血清抗 HBs 浓度之间的剂量相关关系。

[0342] 表 9 血清抗 HBs 絮状免疫凝集-CLIA 实验基础免疫实验(CLIA)检测结果。

[0343]

| 实验管序          | 0   | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11     | 12     |
|---------------|-----|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| 抗 HBs(IU/ml)* | 0.0 | 0.01 | 0.02 | 0.04 | 0.08 | 0.16 | 0.32  | 0.64  | 1.280 | 2.56  | 5.120 | 10.24  | 20.48  |
| 信号(发光值)       | 80  | 380  | 730  | 1280 | 2340 | 5410 | 10780 | 17310 | 31920 | 56780 | 87330 | 145200 | 184300 |

[0344] \*: 靶抗原浓度设定值。

[0345] 表 10 为采用叠加实验(乳胶免疫凝集试验)对高浓度抗 HBs 标准血清检测的实验结果, 图 11 显示其信号强度与血清抗 HBs 浓度之间的剂量相关关系。

[0346] 表 10 血清抗 HBs 检测絮状免疫凝集-ELISA 实验叠加实验(乳胶免疫凝集)检测结果

[0347]

| 实验管序                    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 抗 HBs (IU) *            | 20    | 40    | 80    | 160   | 320   | 640   | 1280  | 2560  | 5120  | 1024  | 2048  | 40960 |
| 检测信号(A <sub>450</sub> ) | 0.032 | 0.045 | 0.073 | 0.137 | 0.213 | 0.325 | 0.437 | 0.639 | 0.793 | 1.032 | 1.341 | 1.527 |

[0348] \*: 靶抗原浓度设定值。

[0349] 五. 实施效果评价(说明):

[0350] 采用本发明方法对血清抗 HBs 进行检测, 主要技术特征如下。

[0351] 1. 抗 HBs 是人体 HBV 感染最重要的预防因子, 血清中抗 HBs 的存在与否直接提示人体对 HBV 感染的免疫状态, 具有重要的临床与流行病学价值。与抗 HBc 相比, 血清中抗 HBs 的表达浓度通常较低, 但中, 低表达及其动态改变三者对 HBV 感染的临床预防及其流行病学研究均具有同等的重要价值。这一特点提示未来的检测方法必须同时满足对抗 HBs 在

低,中与高浓度三个区间的精确定量。然而采用现行方法对不加稀释的标本进行单一检测仅能满足对低浓度抗体的定量分析,这一特征使该项指标在前述领域中的价值大受影响。因而尽管 Hooks 效应并不对抗 HBs 的检测质量产生特别影响,但如何突破单一检测定量范围狭窄的限制,则成为提升该指标检测品质的重要方向。

[0352] 2. 基础方法与叠加方法两者检测信号的强度与抗 HBs 的含量之间具有很好的剂量相关性。

[0353] 3. 化学发光免疫分析方法为当前血清抗 HBs 检测最成熟,综合性能最佳的实验方法之一。具有很好的特异性,敏感性与稳定性,改进后的双抗原夹心一步法 CLIA 较之传统二步法更为简便。将其用于本发明方法(作为基础方法),能使本发明技术获得与二步法 ELISA 一致的敏感性,特异性与稳定性,并为本发明功能的发挥留下空间。

[0354] 4. 乳胶免疫凝集试验操作简单,特异性高,其实验过程,信号采集方式,以及多项实验条件的设定等多个环节均具有较大的可塑性。有目的地对这些环节进行优化,能在获得操作简单,结果稳定等技术特征的前提下,使方法的敏感性及其定量检测范围得以较大幅度地调节。近十余年来免疫凝集与沉淀方法在技术上的成熟为上述改进提供了强大地技术保障。

[0355] 5. 采用基础方法(酶法化学发光)进行血清抗 HBs 检测,靶抗体最高可定量浓度可达到甚至超过 25 IU/ml(市场流通试剂);而叠加方法(凝胶免疫凝集试验)的定量检测下限值,即便采用投射终点法,亦可达到 20-100 IU/ml 以下(本实施例低于 20 IU/ml)。根据所显示的情况不作或稍加调节,两法计量区间即可达成完美地对接(见图 10 及 11)。

[0356] 6. 图 11 结果显示,采用透射终点法检测,当靶抗体浓度上升至  $4.00 \times 10^5$  IU/ml 时,其检测信号与靶物质浓度之间仍旧保有较好地剂量相关性。提示,采用此法检测,其定量范围可延伸至  $1 \times 10^5$  IU/ml 或以上,其定量幅度约高出原化学发光法约 1000 倍,并远高于所有现行市售试剂的定量检测范围。具有如此宽幅度的定量检测范围,本发明方法显然能摆脱 Hooks 效应对实验结果的干扰。

[0357] 7. 方法的有机叠加是指依托方法与叠加方法两者共用同一次加入的实验标本,全部实验过程(包括免疫反应与检测)在同一实验体系中序贯进行。此举可使专利方法的操作得以显著简化,仅增加一步抗 He 加入与反应步骤,便获得定量范围拓展与纠正 Hooks 效应影响等两大创新性效果。由于酶促反应与乳胶凝集两者均可在同一反应孔中原位进行,本发明方法在实施例 5 上有机叠加的达成似乎较其它实施例(如絮状免疫沉淀-时间分辨免疫检测技术等)更为容易。而对叠加免疫反应对基础免疫的可能产生干扰的担心可望通过易位乳胶凝集试验(即将免疫反应后的标本移至另一空白的反应孔,然后加入抗 He 进行乳胶凝集试验)加以消除。

[0358] 8. 综上所述,本发明方法举例具有以下几个特点,其一能获得与现行检测方法相似的特异性敏感性与稳定性;能突破现有实验方法在技术发展上的瓶颈。如能完全纠正在均相检测中 Hooks 效应的干扰,能显著拓展现有方法靶物质的定量检测范围,即基本达成在单一试验中对血清抗 HBs 的全程定量检测;但靶物质叠加的介入需导致现行依托方法试验程序的改变,并对现行试验仪器的工作带来一定影响。这一特征在一定程度上影响此实施例试验方法的推广。

[0359] 实施例 6 血清 AFP 检测絮状免疫凝集-电化学发光检测免疫叠层实验

[0360] 一. 方法构建:

[0361] 依托方法:电化学发光免疫分析法(Electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA);

[0362] 层叠方法:絮状免疫凝集试(Flocculent immune agglutination test, FIAT)

[0363] 定量范围:1.0-1000 000 ng/ml。

[0364] Hooks 效应拮抗:全拮抗。

[0365] 二. 实验材料:

[0366] 1、仪器与耗材

[0367] 电化学发光检测检测系统

[0368] 酶标比色仪

[0369] 强磁性微球分离器

[0370] 化学发光微孔反应板

[0371] 酶标反应板

[0372] 2、试剂

[0373] 试剂1:生物素化的 anti-AFP;

[0374] 试剂2:三联吡啶钌  $\{Ru[(bpy)_3]^{2+}\}$  标记 anti-AFP;

[0375] 试剂3:链亲和素(SA)标记磁性微球(含发光促进剂);

[0376] 试剂4:洗涤液

[0377] 试剂5:发光底物(含促进剂)。

[0378] 抗 He (抗 Hooks 效应试剂), 自制, 专利试剂。主要成分为抗人 AFP 抗体;

[0379] 标准品 窄幅标准血清: ECLIA 试剂盒内随带

[0380] 宽幅标准血清: 自制(暂), 专利制品;

[0381] 阴性对照与阳性对照血清:自制或市售试剂配备;用于域值确认,以及试剂的反应性评价;

[0382] 待检标本 血清(血浆或其它体液)。

[0383] 其它 (略)

[0384] 三. 实验操作

[0385] 1. 试验准备:

[0386] 取出所有试剂与标本,按需调整至工作(或准工作)浓度;并复温至接近室温水平。

[0387] 2. 操作步骤

[0388] 依托试验采用市售试剂,但将试验模式改为一步法双抗体夹心。这一改进可以节省一道洗涤步骤,并使依托与叠加免疫实验两者有可能在同一试验孔中进行(本试验仍旧为异孔免疫叠加试验)。由一步法所产生的 Hooks 效应将以本发明方法纠正。

[0389] 以下各步骤中的反应条件为:中向第一次免疫反应后的反应体系中定量加入加入抗 He 试剂进行叠加免疫实验是在 37℃ 下温育 5 ~ 60min,所述的抗 He 试剂中抗人 AFP 的浓度为 50 ~ 250μg/ml,其加入体积为 5 ~ 50μL/孔;加入体积与基础免疫反应终末体系的比例为 1:1 ~ 10,以下为优选条件:

[0390] 1) 取待测标本,阴、阳性对照,及其 AFP 定量标准血清系列各 50u1,分别加至电化学发光微孔板各反应孔中,每份标本加一孔(或根据需要的任意孔);

[0391] 2) 加入试剂 1 及试剂 2, 每一实验孔各加入 25ul, 混匀, 室温反应 15 min;

[0392] 3) 加入试剂 3。每一实验孔加 50 ul。混匀, 37℃温育 15 min;

[0393] 4) 将反应板置强磁微球分离器上, 待磁性微球吸附在孔底后, 每孔吸出反应液 100 ul, 转移至酶标反应板各相应的试验孔中;

[0394] 5) 采用洗涤液洗涤移出反应液的各试验孔, 加入发光促进剂, 每孔各 100ul, 混匀, 置电化学发光分析仪上序贯检测各孔反应结果, 根据各孔检测信号分别计算靶物质浓度;

[0395] 6) 将酶标反应板置酶标比色仪上,  $A_{450}$  比色记录各孔本底值;

[0396] 7) 在酶标反应板各孔加入抗 He, 每孔 50 ul, 混匀, 静置 30min, 450 nm 比色并根据标准孔检测信号计算各孔靶抗体的含量;

[0397] 8) 根据上述两步检测的实验结果综合报道待测标本的靶物质浓度。

#### [0398] 四. 应用效果

[0399] 采用本专实验利方法举例 6 对一组系列稀释的标准血清进行血清 AFP 检测, 基础免疫实验(ECLIA) 检测结果见表 11, 检测信号与靶物质含量之间的剂量相关关系见图 12。

[0400] 表 11 血清 AFP 絮状免疫凝集 - ECLIA 检测基础免疫实验(ECLIA) 结果。

[0401]

| 实验管管序                         | 0    | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11      |
|-------------------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| AFP( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )* | 0.8  | 2    | 4     | 8     | 16    | 32    | 64     | 128    | 256    | 512    | 623    | 1024    |
| 信号(光子数)                       | 1832 | 7920 | 11080 | 22000 | 37006 | 58000 | 130000 | 200000 | 456000 | 830000 | 962048 | 1156239 |

[0402] \*: 靶抗原浓度设定值。

[0403] 采用本发明方法举例 6 对一组系列稀释参比血清进行检测, 叠加实验(絮状免疫凝集试验) 结果见表 12, 叠加实验信号强度与血清 AFP 浓度之间的剂量相关关系见图 13。

[0404] 表 12 叠加实验(絮状免疫凝集) 血清 AFP 检测结果

[0405]

| 实验管序                             | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| AFP 含量( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )* | 1     | 2     | 4     | 8     | 16    | 32    | 64    | 128   | 256   | 512   | 1024  | 2048  |
| 检测信号( $A_{450}$ )                | 0.024 | 0.027 | 0.030 | 0.033 | 0.034 | 0.146 | 0.161 | 0.265 | 0.334 | 0.438 | 0.615 | 0.692 |

[0406] \*: 靶抗原浓度设定值。。

#### [0407] 五. 实施效果评价(说明):

[0408] 采用本发明方法进行血清 AFP 检测, 圆满达成预定的实验目标。主要技术特征如下。

[0409] 1、依托方法与叠加方法两者其信号形成的强度与 AFP 浓度之间具有很好的剂量相关性。

[0410] 2、ECLIA 为当前用于血清 AFP 检测最先进的实验方法之一。具有很好的特异性, 敏感性与稳定性, 操作的高度系统化是其最重要的技术特征。将其用于本发明方法(免疫叠层实验), 由于全盘保留 ECLIA 的实验试剂与操作, 能使上述主要技术特征得以完整保留, 从而使本发明技术在对低浓度实验样本的检测时获得与 ECLIA 完全一致的敏感性, 特异性与稳定性。

[0411] 3、絮状免疫凝集试验操作简单, 特异性高, 其实验过程, 信号采集方式, 以及多项

实验条件的设定均具有较大的可塑性。有目的地对这些条件进行优化,能在保障操作简单,结果稳定等技术特征的前提下,使方法的敏感性及其定量检测范围在一定范围内得到调节。具有很大的发展空间。

[0412] 4、采用基础方法 (ECLIA) 进行血清 AFP 检测,其靶物质最高可定量浓度超过 1000 ng/ml ;而叠加方法(絮状免疫沉淀试验)的定量检测下限值,即便采用透射终点法,亦可达到 2000ng/ml 以下(或为 1000ng/ml)。无须人为调整,两者计量区间在自然状态下即可达成较好地对接(见图 12 及 13),适当采用调变措施,并采用专门的比浊仪器,将会使两者计量范围的对接更完美。

[0413] 5、图 13 结果显示,采用透射终点法检测,当靶物质 (AFP) 浓度上升至  $2.048 \times 10^6$  ng/ml (即 2.048 mg/ml) 时,其检测信号与靶物质浓度之间仍旧保有较好地剂量相关性。提示,采用此法检测,其定量范围至少达 1000 000ng/ml,不仅远远超出现行检测方法的定量范围,并显然能消除 Hooks 效应对试验结果的干扰。

[0414] 6、方法的有机叠加是指依托方法与叠加方法序贯进行,并共用同一次加入的实验标本,此举用于均相免疫实验可使试验操作大为简化。然而 ECLIA 是固相免疫技术的一种,以此为依托施行免疫叠加检测,虽然能够达成预期的试验目标,但会导致现行基础方法试验程序的改变。在尚不具备相应试验软硬件设施的情况下,将会增加试验操作,从而降低此实施例试验方法的实用性。

[0415] 7、综上所述,本发明方法举例具有以下几个特点,其一能获得与现行检测方法相似或更加优良的技术特征,包括与 ECLIA 同等的特异性敏感性与稳定性 ;其二,能突破现有实验方法在技术发展上的瓶颈。如能完全纠正在均相检测中 Hooks 效应的干扰,能显著拓展现有方法靶物质的定量检测范围,即达成在单一试验中对血清 HBsAg 的全程定量检测。其三,靶物质叠加措施的介入需导致现行依托方法试验程序的改变,一定程度上增加试验操作,从而降低此实施例试验方法的实用性。这一不足在今后的实施过程中将会得到纠正。

[0416] 在本发明的 6 个实施案例中,第 2、3、4、5 案例的叠加实验在敏感性上均进行了调整。调整方法为在含标记乳胶溶液的抗 He 试剂中掺入一定浓度的与标记物相同的免疫物质。其掺入数量取决于非标记免疫物质的纯度,活性,及其所研制试剂对方法敏感性与定量范围调节的幅度。具体数据必须根据试剂制备时实验材料状况与对实验的具体要求,经过精细地实验研究取得。

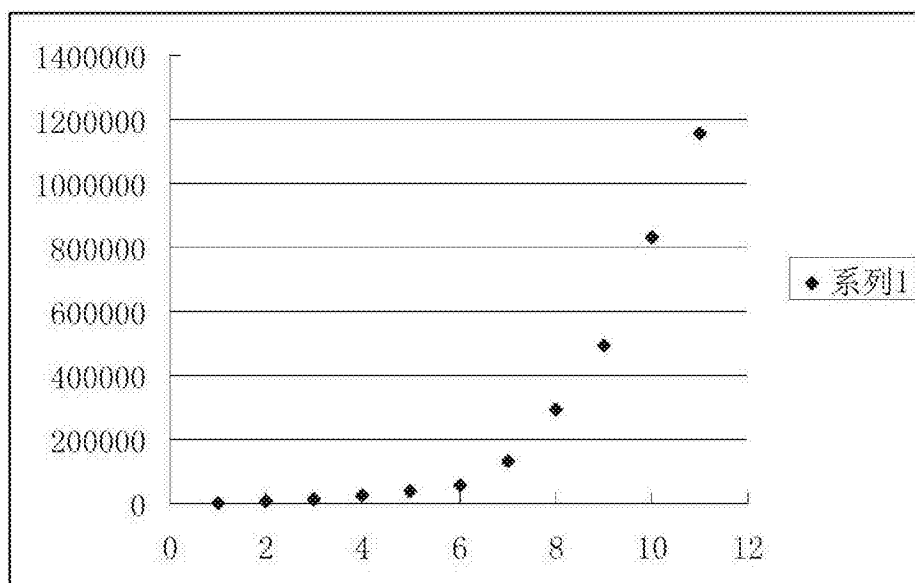


图 1

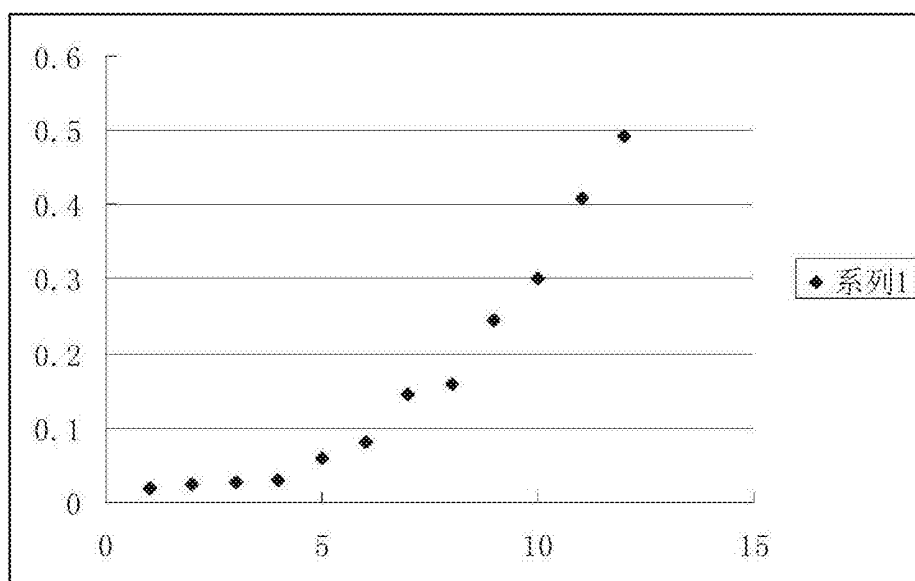


图 2

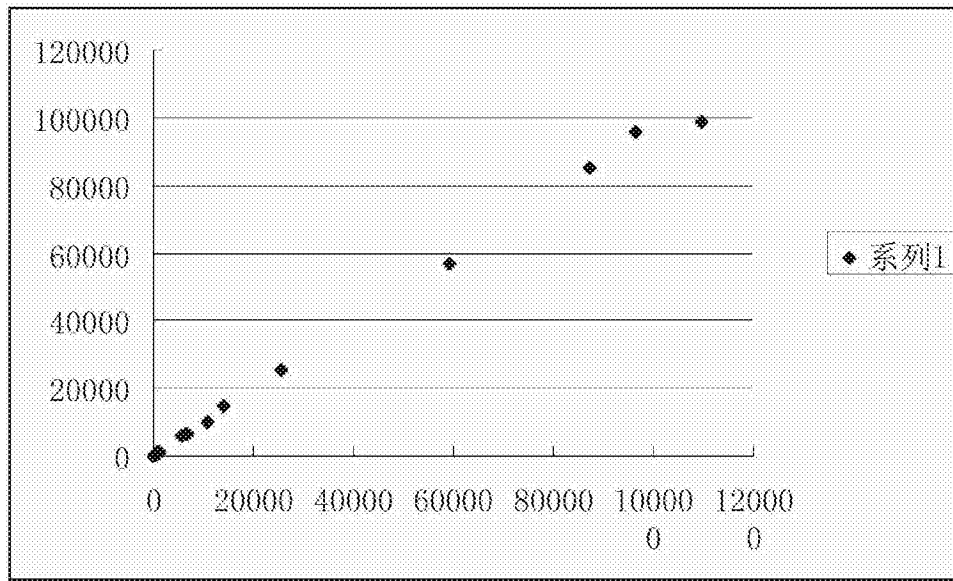


图 3

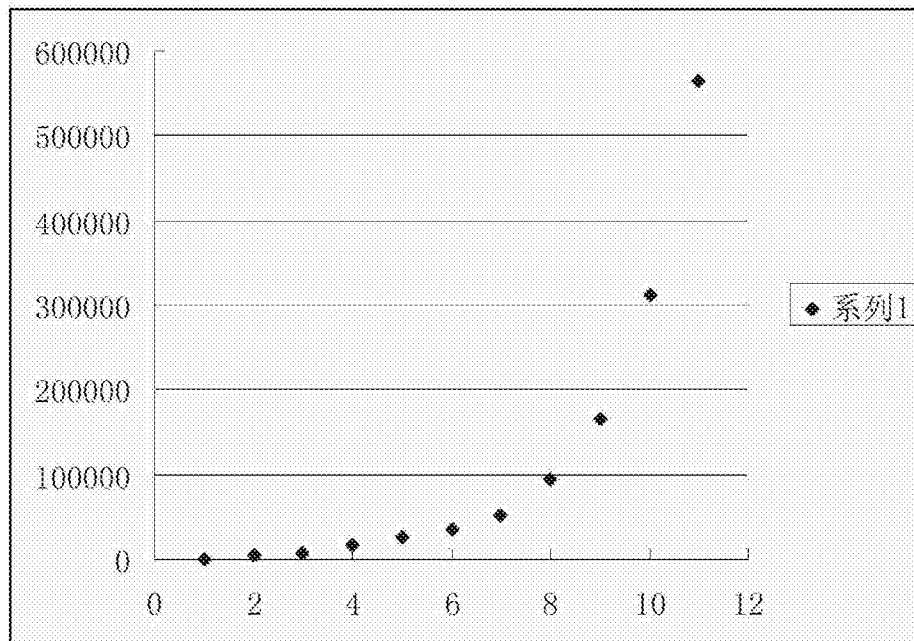


图 4

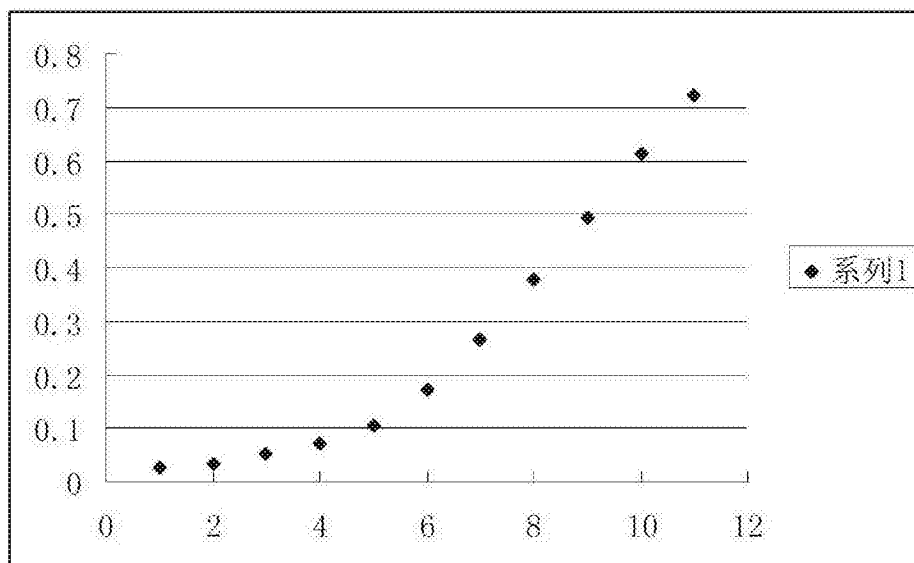


图 5

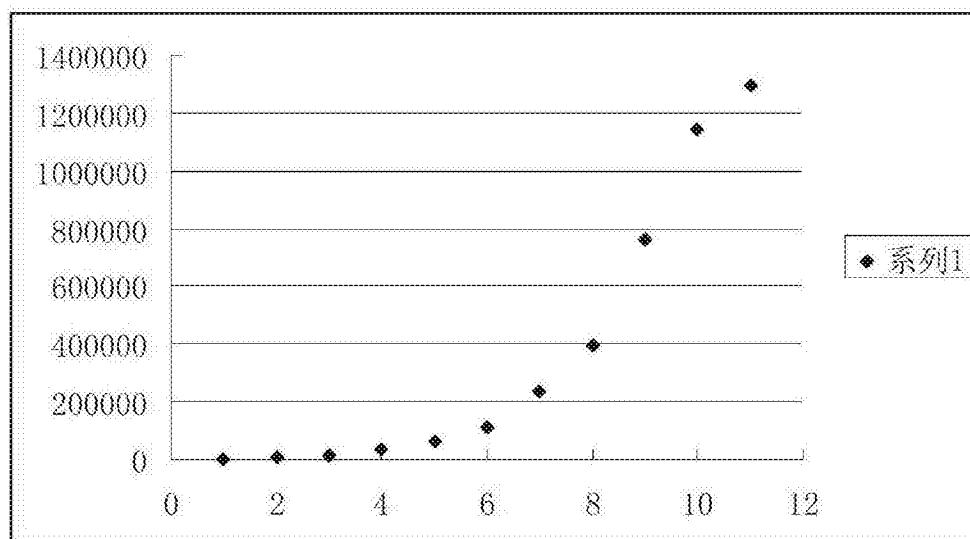


图 6

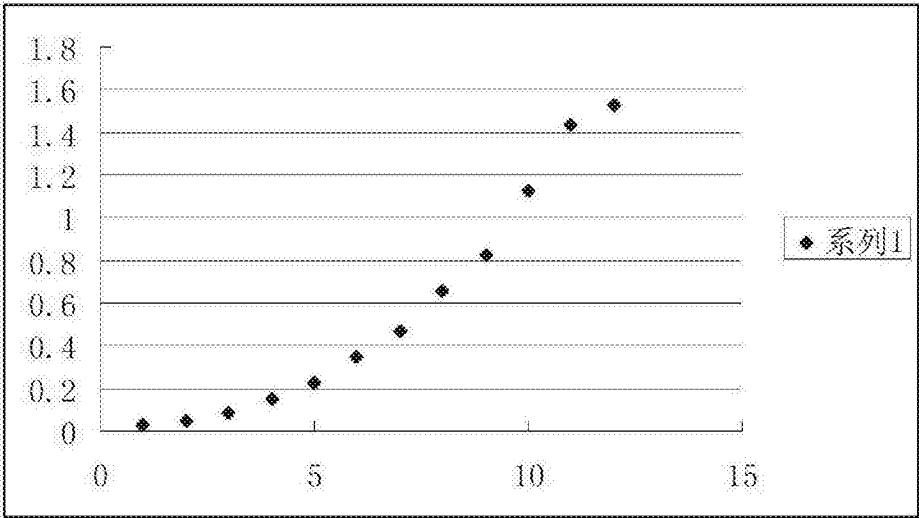


图 7

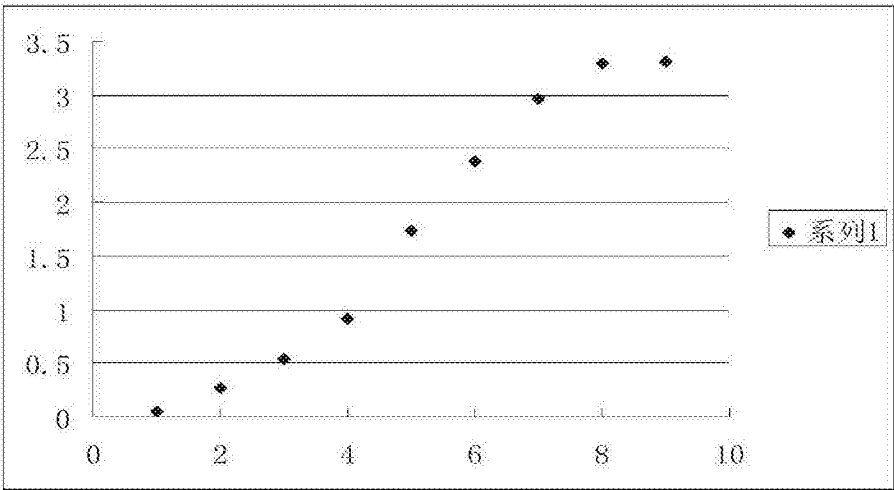


图 8

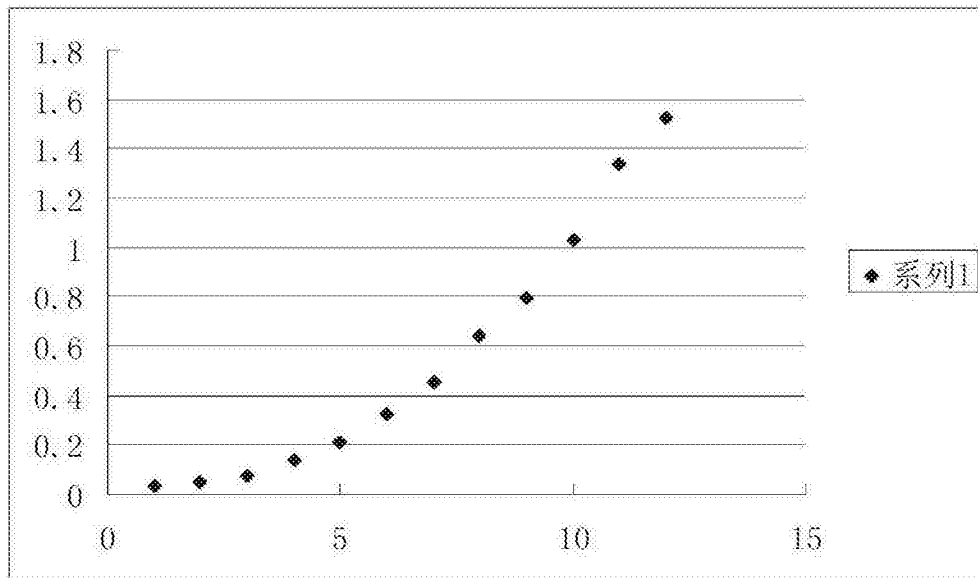


图 9

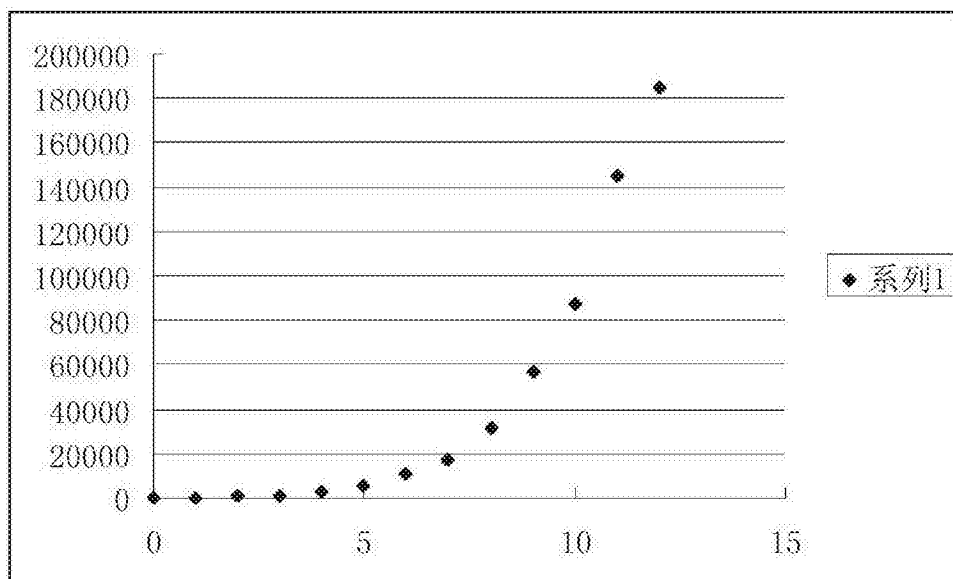


图 10

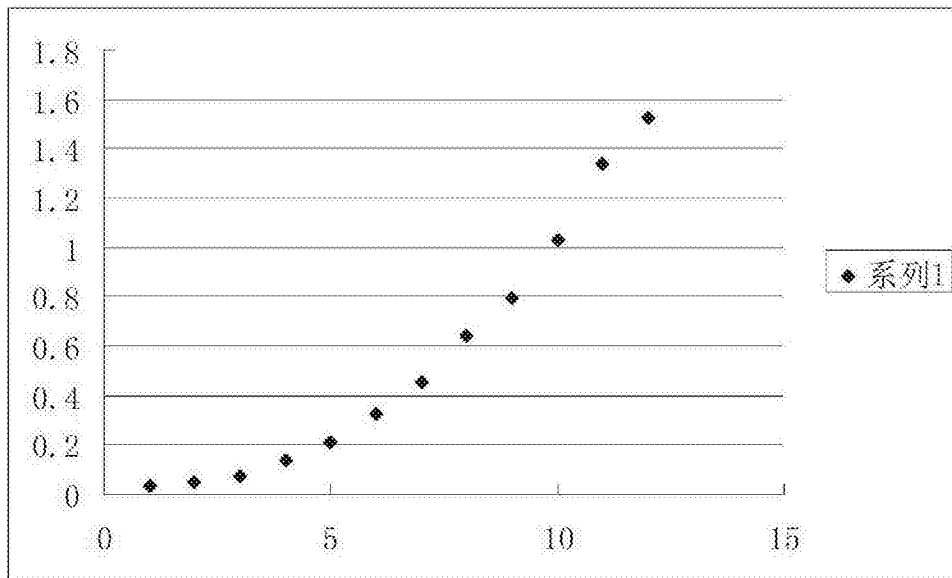


图 11

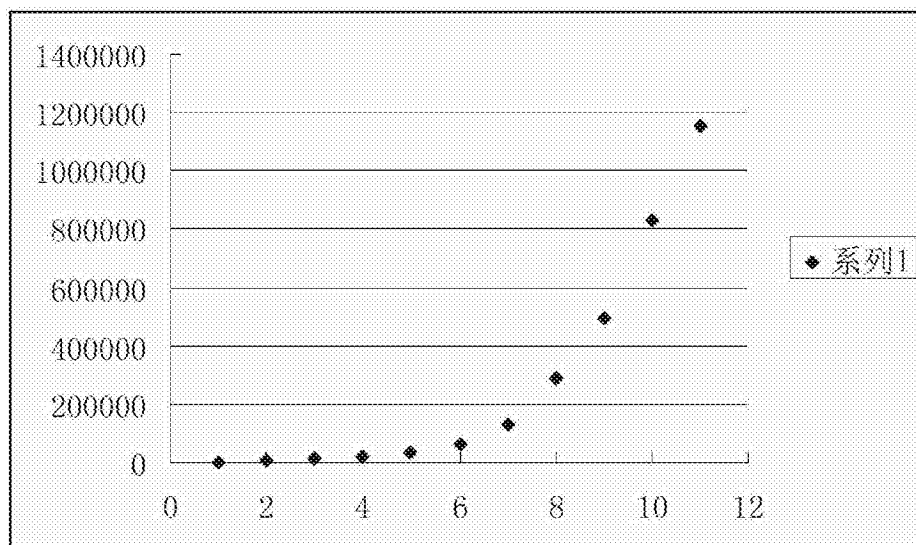


图 12

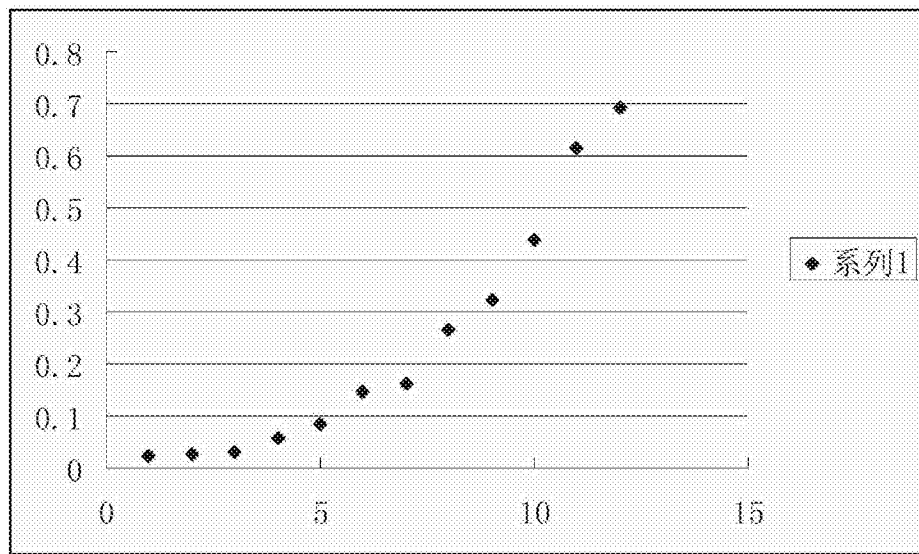


图 13

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 利用免疫层叠法进行可溶性靶物质的检测方法                           |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN102914643B</a>                   | 公开(公告)日 | 2015-10-28 |
| 申请号            | CN201210461942.0                               | 申请日     | 2012-11-16 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 李方和                                            |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 李方和                                            |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 武汉林勉生物技术有限公司                                   |         |            |
| [标]发明人         | 李方和<br>李时君                                     |         |            |
| 发明人            | 李方和<br>李时君                                     |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/538 G01N33/543                          |         |            |
| 审查员(译)         | 肖吉                                             |         |            |
| 其他公开文献         | CN102914643A                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种利用免疫层叠法进行可溶性靶物质的检测方法,它以现代免疫血清学试验为基础,通过引入传统均相或类均相免疫实验,建立血清抗原或抗体检测免疫层叠实验方法,包括以下步骤:(1)试剂与标准血清的准备;(2)进行基础免疫实验:即现代高敏感性免疫血清学试验(如LiCA实验等);(3)进行叠加免疫实验:即相对低敏感性免疫实验(如絮状免疫凝集实验等);(4)综合得出实验结果。该方法将两种具有较大反差的免疫实验有机结合,既保留了LiCA所具有的敏感,特异及其稳定等优点,操作简捷,又能克服Hooks效应干扰及其定量检测范围狭窄的技术问题,能满足精度要求高,浓度变异范围大的实验要求,能进行全程定量检测,具有高度的实用性。

