



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109781972 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201910042577.1

(22)申请日 2019.01.16

(71)申请人 深圳大学

地址 518000 广东省深圳市南山区科技园  
南区W2-A2

(72)发明人 买制刚

(74)专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理  
有限公司 44217

代理人 郭伟刚

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

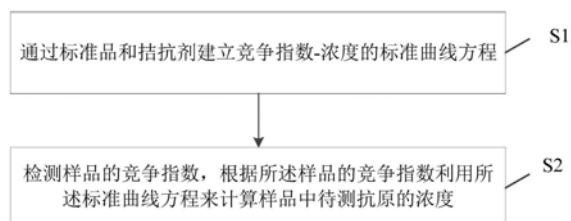
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

### (54)发明名称

一种免疫定量检测方法和应用

### (57)摘要

本发明公开了一种免疫定量检测方法,包括以下步骤:步骤S1、通过标准品和拮抗剂建立竞争指数-浓度的标准曲线方程;步骤S2、检测样品的竞争指数,根据样品的竞争指数利用标准曲线方程来计算样品中待测抗原的浓度。本发明的免疫定量检测方法通过引入特殊设计抗原(拮抗剂)把样本和标准品的免疫反应建立关联,再通过双色荧光反应把荧光强度数据处理成为竞争指数,建立剂量-竞争指数的标准曲线来定量;采用竞争指数作为定量的反应关系,不仅解决了免疫反应条件差异的影响,又能使用存储的标准曲线进行定量,不用每次随样本做标准曲线,完美解决了免疫分析(包括免疫层析)准确定量与简单方便之间的矛盾。



1. 一种免疫定量检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤S1、通过标准品和拮抗剂建立竞争指数-浓度的标准曲线方程;

步骤S2、检测样品的竞争指数,根据所述样品的竞争指数利用所述标准曲线方程来计算样品中待测抗原的浓度。

2. 根据权利要求1所述的免疫定量检测方法,其特征在于,所述标准品中的抗原和所述样品中的待测抗原包含第一抗体识别位点和第二抗体识别位点,不含第三抗体识别位点;所述拮抗剂中的抗原包含第一抗体识别位点和第三抗体识别位点,不含第二抗体识别位点;使用第一荧光物质标记所述第二抗体,使用第二荧光物质标记所述第三抗体。

3. 根据权利要求2所述的免疫定量检测方法,其特征在于,所述第三抗体可识别基因工程抗原标签蛋白,不能识别所述标准品中的抗原和所述样品中的待测抗原上的位点。

4. 根据权利要求2所述的免疫定量检测方法,其特征在于,使用特异反应的结合物和配体来代替所述第三抗体及其抗原位点。

5. 根据权利要求2所述的免疫定量检测方法,其特征在于,所述步骤S1包括:

步骤S11、将所述标准品与所述拮抗剂的混合物与标记物液体反应,去除未反应的液体;

步骤S12、检测所述第一荧光物质和所述第二荧光物质的荧光强度,计算竞争指数,所述竞争指数=所述第一荧光物质的荧光强度/所述第二荧光物质的荧光强度;

步骤S13、改变所述标准品的浓度,重复步骤S11和步骤S12,得到对应的竞争指数;

步骤S14、利用标准品的浓度和对应的竞争指数绘制所述标准曲线方程。

6. 根据权利要求5所述的免疫定量检测方法,其特征在于,所述步骤S2包括:

步骤S21、将所述样品与所述拮抗剂的混合物与标记物液体反应,去除未反应的液体;

步骤S22、检测所述第一荧光物质和所述第二荧光物质的荧光强度,计算竞争指数;

步骤S23、根据所述样品的竞争指数和所述标准曲线方程来计算样品中待测抗原的浓度。

7. 一种通过权利要求1-6所述的免疫定量检测方法在使用微孔板反应法定量检测血清中降钙素原中的应用。

8. 一种通过权利要求1-6所述的免疫定量检测方法在使用免疫层析法定量检测血清中降钙素原中的应用。

## 一种免疫定量检测方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,尤其涉及一种免疫定量检测方法和应用。

### 背景技术

[0002] 免疫检测的定量方案有两种:制作标准曲线定量和相对比较的半定量。标准曲线一般是在其检测的线性范围内,由多个(五个或更多)已知浓度的标准品同步与样本反应,根据其剂量-反应关系确定,连接这些点并拟合生成标准曲线,再根据样本的反应值来计算其浓度,这种方法具有定量准确的优点,但需要同时检测多个浓度的标准品来制作标准曲线,一般用在ELISA、化学发光免疫检测等同时能进行多样本检测的技术中。半定量免疫检测是通过比较样本反应的程度与标准浓度(一般只有一个)的反应程度来大致确定样本浓度,常用于单个测试中,具有简单方便的优点,但定量误差大、准确度低。

[0003] 但是,无论是标准曲线法还是半定量法,标准品与样本之间都是各自反应,两者反应的关联度不强,无论哪一方发生问题都会影响最终定量结果的准确性。

### 发明内容

[0004] 本发明提供一种免疫定量检测方法和应用以实现快速准确的免疫定量检测。

[0005] 一方面,本发明提供一种免疫定量检测方法,包括以下步骤:

[0006] 步骤S1、通过标准品和拮抗剂建立竞争指数-浓度的标准曲线方程;

[0007] 步骤S2、检测样品的竞争指数,根据所述样品的竞争指数利用所述标准曲线方程来计算样品中待测抗原的浓度。

[0008] 在本发明提供的免疫定量检测方法中,所述标准品中的抗原和所述样品中的待测抗原包含第一抗体识别位点和第二抗体识别位点,不含第三抗体识别位点;所述拮抗剂为包含第一抗体识别位点和第三抗体识别位点、不含第二抗体识别位点的抗原;使用第一荧光物质标记所述第二抗体,使用第二荧光物质标记所述第三抗体。

[0009] 在本发明提供的免疫定量检测方法中,所述第三抗体可识别基因工程抗原标签蛋白(包含且不限于MyC、His、GST、HA、GFP、CFP、YFP、荧光素酶等)或其他位点,不能识别所述标准品中的抗原和所述样品中的待测抗原上的位点。

[0010] 在本发明提供的免疫定量检测方法中,可以使用特异反应的结合物和配体(包含且不限于亲和素与生物素、酶与底物、受体与配体、蛋白质与适配体等)来代替所述第三抗体及其抗原位点。

[0011] 在本发明提供的免疫定量检测方法中,所述步骤S1包括:

[0012] 步骤S11、将所述标准品与所述拮抗剂的混合物与标记物液体反应,去除未反应的液体;

[0013] 步骤S12、检测所述第一荧光物质和所述第二荧光物质的荧光强度,计算竞争指数,所述竞争指数=所述第一荧光物质的荧光强度/所述第二荧光物质的荧光强度;

[0014] 步骤S13、改变所述标准品的浓度,重复步骤S11和步骤S12,得到对应的竞争指数;

- [0015] 步骤S14、利用标准品的浓度和对应的竞争指数绘制所述标准曲线方程。
- [0016] 在本发明提供的免疫定量检测方法中,所述步骤S2包括:
- [0017] 步骤S21、将所述样品与所述拮抗剂的混合物与标记物液体反应,去除未反应的液体;
- [0018] 步骤S22、检测所述第一荧光物质和所述第二荧光物质的荧光强度,计算竞争指数;
- [0019] 步骤S23、根据所述样品的竞争指数和所述标准曲线方程来计算样品中待测抗原的浓度。
- [0020] 相应地,本发明还提供一种通过如上所述的免疫定量检测方法在使用微孔板反应法定量检测血清中降钙素原中的应用。
- [0021] 相应地,本发明还提供一种通过如上所述的免疫定量检测方法使用免疫层析法定量检测血清中降钙素原中的应用。
- [0022] 与现有技术相比,本发明的免疫定量检测方法有以下优点:本发明的免疫定量检测方法通引入特殊设计抗原(拮抗剂)把样本和标准品的免疫反应建立关联,再通过双色荧光反应把荧光强度数据处理成为竞争指数,建立剂量-竞争指数的标准曲线来定量;采用竞争指数作为定量的反应关系,不仅解决了免疫反应条件差异的影响,又能使用存储的标准曲线进行定量,不用每次随样本做标准曲线,完美解决了免疫分析(包括免疫层析)准确定量与简单方便之间的矛盾。

## 附图说明

- [0023] 图1所示为本发明一实施例提供的免疫定量检测方法的流程图;
- [0024] 图2所示为以荧光强度为纵坐标的标准曲线;
- [0025] 图3所示为以竞争指数为纵坐标的标准曲线。

## 具体实施方式

- [0026] 下面的实施是对本发明的进一步说明,而非限定本发明的范围。
- [0027] 本发明引入特殊设计抗原(拮抗剂)把样本和标准品的免疫反应建立关联,再通过双色荧光反应把荧光强度数据处理成为竞争指数,建立剂量-竞争指数的标准曲线来定量。研究表明,在一定范围内,对于同一标本多次检测结果无论差别又多大,其竞争指数差别很小,因此,使用竞争指数完全能体现免疫定量的准确性。
- [0028] 参照图1,本发明提供的免疫定量检测方法包括以下步骤:
- [0029] 步骤S1、通过标准品和拮抗剂建立竞争指数-浓度的标准曲线方程;
- [0030] 步骤S2、检测样品的竞争指数,根据所述样品的竞争指数利用所述标准曲线方程来计算样品中待测抗原的浓度。
- [0031] 具体地,在本发明中,采用一种双色免疫荧光竞争反应的模式,通过拮抗剂把标准品与样品的反应发生关联。具体设计如下:样本(标准品)检测采用相同的荧光标记,拮抗剂采用另外一种荧光标记,可以用于标记的荧光有FITC、PE、RB200、TRITC、CY3、CY5、镧系:Eu、Tb等。两种荧光的搭配注意有发射光谱交叉的荧光避免同时使用,例如FITC和PE,尽量使用荧光强度接近的两种荧光物质搭配。

[0032] 进一步地,在本发明中,待测抗原(即标准品和样品中的抗原)上包含第一抗体识别位点和第二抗体识别位点,没有第三抗体识别位点;特殊设计的抗原(即拮抗剂中的抗原)包含第一抗体识别位点和第三抗体识别位点,缺失第二抗体识别位点。所述第三抗体可识别基因工程抗原标签蛋白(如MyC、His、GST、HA、GFP、CFP、YFP、荧光素酶等)或其他的位点,不能识别所述标准品中的抗原和所述样品中的待测抗原上的位点。第三抗体及其抗原位点也可以使用其他的能特异反应的结合物和配体(如亲和素与生物素、酶与底物、受体与配体、蛋白质与适配体等)来替代。

[0033] 本发明主要用于采用双抗体夹心法来检测抗原的免疫定量检测中。对于双抗体夹心法检测:第一抗体、第二抗体均为针对某抗原上不同位点的抗体。第一抗体作为固相(包被)抗体,第二抗体作为标记抗体。第三抗体可以是通用标签抗体,也用于标记。第一抗体和标记了第一荧光物质的第二抗体与待测抗原(即标准品和样品中的抗原)间能形成双抗体夹心结构。第一抗体和标记了第二荧光物质的第三抗体能与特殊设计的抗原(即拮抗剂中的抗原)间形成双抗体夹心结构。

[0034] 具体地,在反应体系中,同时加入待测抗原和一定浓度的拮抗剂(特殊设计抗原),待测抗原与拮抗剂同时与固相第一抗体竞争反应,若样本中没有待测抗原,第一抗体位点尽数被拮抗剂占据,随着待测抗原浓度的增加,第一抗体位点逐渐被待测抗原占据,拮抗剂占据的位点数量减少,去除未反应的两种抗原,再同时与不同标记的第二抗体和第三抗体反应,洗去未反应的标记抗体,分别读取两种荧光,两种荧光强度能反映待测抗原和拮抗剂的相对浓度,计算其竞争指数。在一定范围内,待测抗原的浓度与一定浓度的特殊抗原反应的竞争指数呈正相关,可以据此建立剂量-竞争指数关系进行定量。

[0035] 进一步地,步骤S1包括:

[0036] 步骤S11、将所述标准品与所述拮抗剂的混合物与标记物液体反应,去除未反应的液体;

[0037] 步骤S12、检测所述第一荧光物质和所述第二荧光物质的荧光强度,计算竞争指数,所述竞争指数=所述第一荧光物质的荧光强度/所述第二荧光物质的荧光强度;

[0038] 步骤S13、改变所述标准品的浓度,重复步骤S11和步骤S12,得到对应的竞争指数;

[0039] 步骤S14、利用标准品的浓度和对应的竞争指数绘制所述标准曲线方程。

[0040] 进一步地,步骤S2包括:

[0041] 步骤S21、将所述样品与所述拮抗剂的混合物与标记物液体反应,去除未反应的液体;

[0042] 步骤S22、检测所述第一荧光物质和所述第二荧光物质的荧光强度,计算竞争指数;

[0043] 步骤S23、根据所述样品的竞争指数和所述标准曲线方程来计算样品中待测抗原的浓度。

[0044] 在本发明中,使用六个(或多个)已知浓度的待测抗原(标准品)按照上述反应原理建立竞争指数-浓度的标准曲线,拟合标准曲线方程,记录此方程。检测样品时,只需要检测样品的竞争指数,并根据竞争指数利用拟合方程来计算样品中待测抗原的浓度。

[0045] 本发明提供的免疫定量检测方法具有以下优点:

[0046] 1、只需要建立一次标准曲线,通过使用竞争指数这种稳定的参数,引入特殊抗原

(拮抗剂)这种内参,充分体现免疫反应的效率,避免免疫反应每次实验的误差。

[0047] 2、竞争指数考虑到了抗原抗体的反应性,与直接使用荧光强度相比,每次检测稳定性更高,无需每次建立标准曲线。

[0048] 3、调整拮抗剂的浓度可以改变标准曲线的线性范围,适应性更为宽泛。

[0049] 4、可以把标准曲线内置于检测仪器内,对于单个测试(如试纸条等POCT技术)来讲更具优势。

[0050] 以下以两个例子详细说明本发明提供的免疫定量检测方法的应用。

[0051] 实施例一

[0052] 微孔板免疫法定量检测血清中降钙素原(PCT)

[0053] 1.1两种抗原设计:两种抗原都采用基因工程的方法来制备。一种是抗原I,包含抗体1和抗体2识别位点的抗原,不能包含抗体3识别位点;另一种是抗原II(特殊设计抗原),包含抗体1和抗体3识别位点,不能包含抗体2识别位点。抗原I准确定量后用以配制标准品;抗原II经准确定量后用以制备拮抗剂。

[0054] 对于PCT抗原I采用完全抗原设计,首先查找PCT的基因序列(mRNA),替换其中的稀有密码子后,设计引物:

[0055] PCT P5' ctcgaggcaccattcaggtctgcc

[0056] PCT P3' gaattcgttggcattctggggcatg

[0057] PCR扩增全基因,导入到pTrxA表达载体内,制备成pTrxA-PCT质粒,转化到BL21大肠杆菌中,以异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达全长的PCT融合蛋白(融合TrxA蛋白),通过HIS柱纯化,标定蛋白浓度作为标准品备用。

[0058] PCT抗原II只包含前50个氨基酸的设计,其中抗体1的结合位点就包含其中,这样的50个氨基酸的抗原加上与GST融合的抗原构成了PCT抗原II的设计。设计引物:

[0059] NPCT P5' ctcgaggcaccattcaggtctgcc

[0060] NPCT P3' gaattc ggagccctctctctctttgct

[0061] 用此引物PCR扩增PCT基因,通过PCR产物两端的酶切位点把包含PCT前150bp的核苷酸序列插入到pGEX-4T-1表达载体内,转化到BL21大肠杆菌中,表达出带有GST标签的PCT抗原片段,这种融合的抗原通过GST柱纯化,标定浓度12.3mg/ml;用含有30%胎牛血清的PBS稀释到1.0ng/ml的浓度即为拮抗剂,4℃存放备用。

[0062] 1.2三种抗体设计:三种抗体均为单克隆抗体。选择完整待测抗原上的2个抗原位点,制备相应的抗体1和抗体2,抗体3不可以是识别待测抗原位点的抗体,只可以是识别基因工程抗原标签蛋白(如MyC、His、GST、HA、GFP、CFP、YFP、荧光素酶等)或其他位点的抗体。对于PCT抗原来讲,抗体1识别位点位于前50个氨基酸内;抗体2识别位点位于后面50个氨基酸内。抗体3识别位点是GST蛋白的位点。抗体1作为包被抗体。抗体2标记荧光物质CY3,抗体3标记荧光物质CY5,并按比例混合两者用含有保护性蛋白BSA的PBS稀释成标记物工作液。

[0063] 1.3微孔板定量方法,反应步骤分为一步法和两步法

[0064] 1.3.1一步法步骤:

[0065] 1.3.1.1微孔板包被:抗体1用缓冲液稀释到工作浓度,再通过物理吸附或化学交联法把抗体1包被到微孔板上。

[0066] 1.3.1.2把标准品或待测样本50u1加入到微孔板中,再加入50u1稀释好的拮抗剂

和50ul标记物工作液,37℃反应60min,甩去未反应液体,用清洗液洗板5次。

[0067] 1.3.1.3PCT标准品浓度设置:0.0ng/ml;0.1ng/ml;0.2ng/ml;0.5ng/ml;1.0ng/ml;2.0ng/ml。

[0068] 1.3.1.4检测两种荧光的强度,计算竞争指数,利用标准品的浓度和竞争指数绘制标准曲线。并根据标准曲线以及样本的竞争指数来定量计算样本的浓度。

[0069] 1.3.2两步法步骤

[0070] 1.3.2.1微孔板包被:抗体1用缓冲液稀释到工作浓度,再通过物理吸附或化学交联法把抗体1包被到微孔板上。

[0071] 1.3.2.2把标准品或待测样本加入到微孔板中,再加入稀释好的拮抗剂,37℃反应60min,甩去未反应液体,用清洗液洗板5次。

[0072] 1.3.2.3再加入标记物工作液100ul,37℃反应60min。甩去未反应液体,用清洗液洗板5次。

[0073] 1.3.2.4检测两种荧光的强度,计算竞争指数,利用标准品的浓度和竞争指数绘制标准曲线。并根据标准曲线以及样本的竞争指数来定量计算样本的浓度。

[0074] 1.3.2.5PCT标准品浓度设置:0.0ng/ml;0.1ng/ml;0.2ng/ml;0.5ng/ml;1.0ng/ml;2.0ng/ml。

[0075] 1.3.2.6PCT正常参考值:<0.1ng/ml(无感染);0.1ng/ml $\leq$ PCT $\leq$ 0.5ng/ml提示轻度局部细菌感染;PCT $\geq$ 0.5ng/ml提示中度以上的感染发生。

[0076] 1.4检测结果:作为方法学的研究分别作灵敏度测试、精密度测试、特异性、重复性、准确度测试以及标准曲线;改变拮抗剂的浓度对于检测结果的影响。

[0077] 1.4.1灵敏度:检测试剂盒的最低检测限和线性范围,以0ng/ml竞争指数的平均值+10倍SD作为阳性判定标准,最低检测限达到0.05ng/ml。

[0078] 1.4.2精密性:检测同一个标本多批次,计算原始竞争指数值和浓度值的平均值、标准偏差和变异系数 $\leq 10\%$ 。

[0079] 1.4.3特异性:检测其他类高浓度的抗原对试剂检测的影响,与牛血清白蛋白(BSA)、C反应蛋白(CRP)、血清淀粉样蛋白A(SAA)、人血清白蛋白等蛋白无交叉反应。

[0080] 1.4.4重复性:使用3批次试剂,检测相同的标本结果的一致性,检测结果S误差在平均值的 $\pm 5.0\%$ 内。

[0081] 1.4.5准确度:已知含量的标本检测浓度与靶值之间的差距在靶值 $\pm 5.0\%$ 内。

[0082] 1.4.6标准曲线:分别用3批试剂盒测定的6个标准曲线的数据进行分析,分析数据的稳定性以及误差。通过检测6批次的标准品,并绘制标准曲线。发现检测的荧光值差别较大,但不同批次的每个标本的竞争指数差异很小。

[0083] 图2和图3为分别使用荧光强度和竞争指数作为纵坐标制作六组数据的标准曲线,荧光强度不同组别差异较大而竞争指数不同组别的差异小,通过误差棒可以看出。说明竞争指数在不同的免疫反应中,相对稳定。但由于拮抗剂的存在会影响方法的最低检测限和检测范围。

[0084] 实施例二

[0085] 免疫层析法定量检测血清中的PCT

[0086] 2.1层析膜包被:抗体包被层析膜采用物理吸附法,在碳酸盐缓冲液(pH8.5)或磷

酸盐缓冲液 (pH8.5) 中配制浓度约5ug/ml的抗体1,利用点膜划线仪在检测带处划线,对照带处包被上过量的蛋白A (G) 或是抗小鼠抗体 (二抗)。4℃过夜晾干,再以封闭液 (磷酸盐缓冲液包含2%牛血清白蛋白) 封闭层析膜4℃过夜,甩干封闭液,37℃晾干即完成包被层析膜的制备。

[0087] 2.2层析装置类似于胶体金装置,由样本垫、标记物垫、层析膜和吸水材料顺序组合而成。样本垫上预先带上一定量的拮抗剂。两种荧光偶联抗体 (CY3-抗体1和CY5-抗体2) 按照一定的比例同时放置于标记物垫上。

[0088] 2.3层析反应

[0089] 2.3.1把50ul样本 (标准品) 液加到样本垫处,层析反应开始。

[0090] 2.3.2样本液携带样本垫中的拮抗剂一起通过标记物垫,样本中的抗原与标记物垫的抗体2-CY3反应,拮抗剂则与抗体3-CY5反应形成复合物。

[0091] 2.3.3液流继续沿层析膜层析到反应区,抗体1分别与抗原-抗体2-CY3复合物和拮抗剂-抗体3-CY5复合物竞争结合,未反应的抗体2-CY3和抗体3-CY5继续层析到质控带与蛋白A (G) 或是二抗结合。剩余液流继续层析到上层吸水材料中。

[0092] 2.3.4结果分析:读取检测带的CY3和CY5荧光强度,计算竞争指数。利用标准品及其竞争指数制作标准曲线,并存储于检测仪器或电子计算机中。然后,根据样本的竞争指数通过标准曲线内部拟合的方程来计算相应的浓度。质控带的两种荧光强度分别指示两种荧光抗体的质量,正常情况下,应该有较强的荧光强度,两者的比值相对固定。如果质控带异常提示荧光标记物问题。

[0093] 2.4检测结果

[0094] 2.4.1灵敏度:检测试剂盒的最低检测限和线性范围,以0ng/ml竞争指数的平均值+10倍SD作为阳性判定标准,最低检测限达到0.05ng/ml。

[0095] 2.4.2精密性:检测同一个标本多批次,计算原始竞争指数值和浓度值的平均值、标准偏差和变异系数 $\leq 10\%$ 。

[0096] 2.4.3特异性:检测其他类高浓度的抗原对试剂盒检测的影响,与BSA、CRP、SAA、人血清白蛋白等蛋白无交叉反应。

[0097] 2.4.4重复性:使用3批次试剂,检测相同的标本结果的一致性,检测结果S误差在平均值的 $\pm 5.0\%$ 的范围内。

[0098] 2.4.5准确度:已知含量的标本检测浓度与靶值之间的差距在靶值 $\pm 5.0\%$ 内。

[0099] 2.4.6标准曲线:分别用3批试剂盒测定的6个标准曲线的数据进行分析,分析数据的稳定性以及误差。通过检测6批次的标准品,并绘制标准曲线。发现检测的荧光值差别较大,但不同批次的每个标本的竞争指数差异很小。



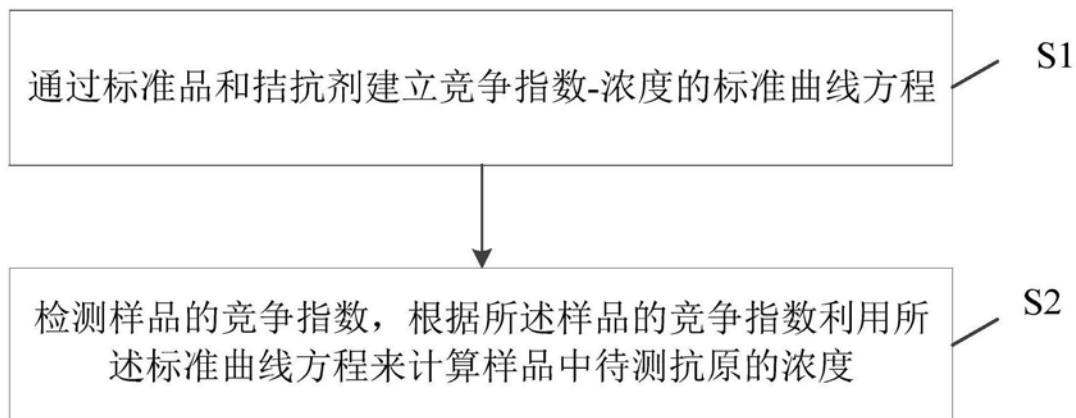


图1

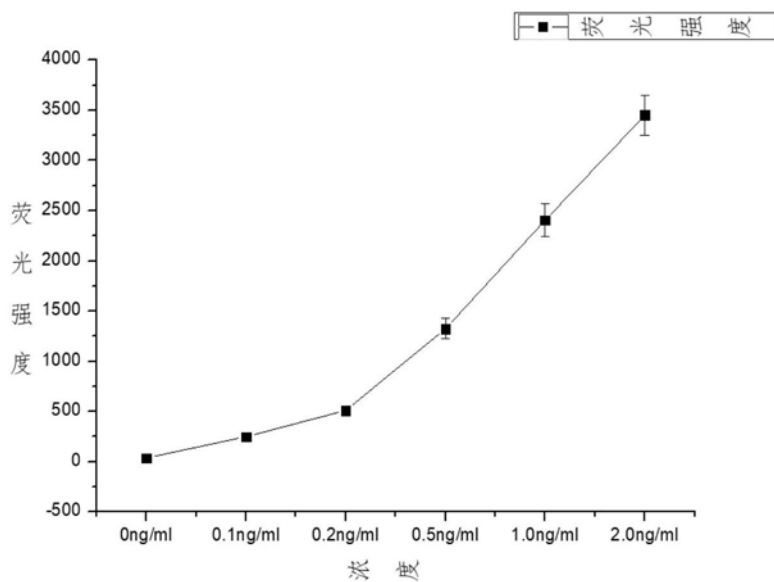


图2

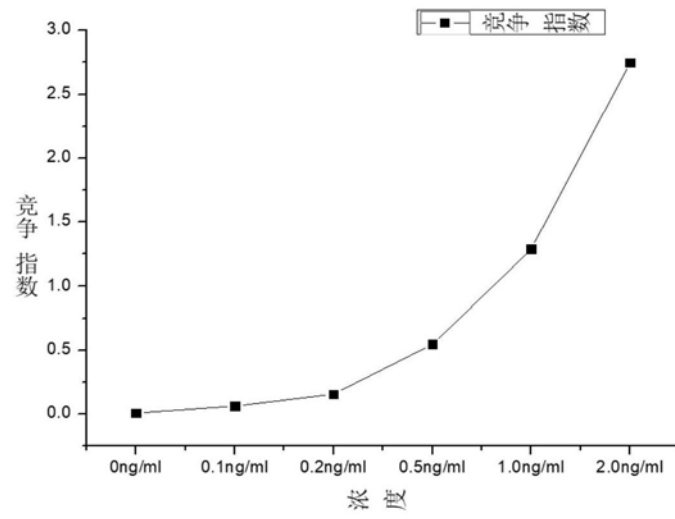


图3

专利名称(译)	一种免疫定量检测方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109781972A</a>	公开(公告)日	2019-05-21
申请号	CN201910042577.1	申请日	2019-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	深圳大学		
申请(专利权)人(译)	深圳大学		
当前申请(专利权)人(译)	深圳大学		
[标]发明人	买制刚		
发明人	买制刚		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/58		
代理人(译)	郭伟刚		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种免疫定量检测方法，包括以下步骤：步骤S1、通过标准品和拮抗剂建立竞争指数-浓度的标准曲线方程；步骤S2、检测样品的竞争指数，根据样品的竞争指数利用标准曲线方程来计算样品中待测抗原的浓度。本发明的免疫定量检测方法通引入特殊设计抗原(拮抗剂)把样本和标准品的免疫反应建立关联，再通过双色荧光反应把荧光强度数据处理成为竞争指数，建立剂量-竞争指数的标准曲线来定量；采用竞争指数作为定量的反应关系，不仅解决了免疫反应条件差异的影响，又能使用存储的标准曲线进行定量，不用每次随样本做标准曲线，完美解决了免疫分析(包括免疫层析)准确定量与简单方便之间的矛盾。

