

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 21/00 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710085867.1

[43] 公开日 2007年10月17日

[11] 公开号 CN 101055272A

[22] 申请日 2007.3.8

[21] 申请号 200710085867.1

[30] 优先权

[32] 2006.4.13 [33] EP [31] 06007803.7

[71] 申请人 奥林巴斯生命及材料科学欧洲有限公司

地址 德国汉堡

[72] 发明人 G·甘泽尔 M·卡瓦勒里  
M·麦克库斯克

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所  
代理人 李 瑛

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

[54] 发明名称

免疫测定方法

[57] 摘要

免疫测定方法，包括下列步骤：通过将样本与能够特异性结合指定分析物的免疫反应性物质混合制备测定样品；使样品于指定的反应时间内反应；测定涉及免疫反应性物质与样品中的分析物在反应时间内的相互作用的信号；基于不同的时间时测定的信号检查是否在样品中已经产生前带效应并且据此标记前带阳性的样品，且根据在反应时间过程中测定的信号中的至少一种计算样品中分析物的浓度，该步骤是通过使用覆盖对前带阳性样品产生前带效应的分析物浓度的校准曲线或一部分校准曲线以及覆盖对剩余样品不产生前带效应的分析物浓度的另一种校准曲线或一部分校准曲线进行的。

1. 免疫测定方法，包括下列步骤：

(a) 制备包括不同部分的校准曲线或制备不同的校准曲线，其中一个部分或一种校准曲线分别覆盖不产生前带效应的分析物浓度，而另一个部分或校准曲线覆盖产生前带效应的分析物浓度；

(b) 通过将样本与能够特异性结合指定分析物的免疫反应性物质，尤其是抗体混合制备测定样品；

(c) 使所述样品于指定的反应时间内反应；

(d) 测定涉及免疫反应性物质与样品中的分析物在反应时间内的相互作用的信号；

(e) 基于步骤 d 中不同时间时测定的信号检查前带效应是否已在样品中产生并且据此标记前带阳性的样品；和

(f) 根据步骤 d 中测定的信号中的至少一种，优选根据在反应时间结束时取得的值，通过使用步骤 a 中生成的合适的曲线或曲线的一部分计算样品中分析物的浓度，其中一种曲线或该曲线的一部分用于前带阳性样品，而另一种曲线或该曲线的一部分用于剩余的样品。

2. 权利要求 1 的方法，其特征在于步骤 a-f 中的至少一些通过自动化分析仪进行。

3. 权利要求 1 的方法，其特征在于通过浊度测定法检测免疫反应性物质与分析物之间的相互作用。

4. 权利要求 1 的方法，其特征在于步骤 (d) 中的信号为可以通过光度法，尤其是浊度测定法测定的光信号。

5. 权利要求 1 的方法，其特征在于所用的抗体或抗原结合颗粒，尤其是聚合物珠。

6. 权利要求 4 的方法，其特征在于根据样品是否为前带阳性的，在不同条件下实施该方法。

## 免疫测定方法

本发明涉及免疫测定方法，其中将免疫反应性物质，通常为抗体加入到样本中以便检测可能包含在该样本中的指定分析物和/或对其定量。

在大部分情况中，用于免疫测定方法中的免疫反应性物质为特异性抗体。然而，如果抗体为所关注的分析物，那么也可以使用抗原。

在这两种情况中，所用的免疫反应性物质都能够通过例如形成抗体-抗原复合物而与所述的分析物发生特异性相互作用。例如，可以通过在指定时间内进行浊度测定来监测这类复合物（凝集）在样品中的形成。例如，通过浊度测定法测定的凝集程度为样品中分析物浓度的指征。

通常在分析前建立校准曲线或类似曲线并且使用在浊度测定过程中获得的值通过该曲线计算分析物的浓度。

有时在含有高浓度分析物的样品中观察到没有凝集发生或仅发生减少的凝集。如果将这类样品充分稀释，那么会发生正常的凝集。

在高分析物浓度下凝集的缺乏或减少称作前带效应或“钩形效应”并且与如下事实相关：例如在样品中过量的抗原导致形成小抗体-抗原-复合物，它们不会聚结而形成可见的凝集。一般而言，可以认为抗原的浓度与抗体的浓度相比越高，则观察到的信号越低。

当抗原的递增浓度超过了抗体群识别和结合的相对能力时，信号会衰减。这种效应是动态的并且代表了从抗原-抗体凝集物形成到非凝集化形式占优势的较高可能性之间反应平衡的改变。

已知的免疫测定法提供了鉴定产生前带效应的样品的不同手段。大部分已知的方法均使用在指定的时间内对样品进行浊度测定来建立反应动力学。例如，通过将在不同时间时从反应动力学中获得的值进行比较，能够推断样品中是否已经产生了前带效应。

用于检测前带效应的方法，例如披露在 JP 2000221195、JP 6213893 或 JP 6094717 中，仅给出几个实例。

目前，免疫测定方法的方案提供了：将其中检测到阳性前带效应的样品（前带阳性样品）稀释，并且使用稀释的样品进行新的分析。然而，当分析物的浓度未知时，通常必须进行系列稀释以便找到指定样品的正确稀释比。这类系列稀释存在缺陷，因为它们需要时间来进行测试并且分析结果，还需要分析仪器的空间和另外的试剂和样品材料。

因此，本发明的目的在于提供简化对前带阳性样品的检验的方法。该目的通过权利要求 1 的方法实现。

与已知的方法类似，本发明的方法也包括下列步骤：

- 通过将样本与能够特异性结合分析物的免疫反应性物质，尤其是抗体混合制备测定样品；
- 使样品于指定的反应时间内反应；
- 例如，通过浊度测定法测定涉及免疫反应性物质与分析物在反应时间内的相互作用的信号；和
- 基于不同的时间时测定的信号检查在样品中是否已经产生前带效应并且据此标记前带阳性的样品。

与已知的方法大不相同，本发明提供了将不同的校准曲线或单一校准曲线的不同部分用于计算分析物浓度，这取决于样品是否为前带阳性的。

与仅使用一种校准曲线的已知技术相比，本发明的方法使用了两种不同的校准曲线或系统，一种用于前带阳性样品，而另一种用于剩余的样品。

令人意外地发现，例如对含有高浓度的产生前带效应的分析物的样品进行浊度测定仍然可再现地产生在前带范围内的针对不同浓度的浓度依赖值。

因此，能够建立特定的校准曲线，它们至少能够对前带阳性样品中的分析物浓度进行近似的计算。

可以直接取用于前带阳性样品的通过本发明方法获得的浓度值或将它们用于计算正确的稀释比。

最好的是，本发明的方法避免了对前带阳性样品的再检验，例如，在其中近似的结果仍然可以满足试验的医学要求的情况下。如果认为再检验是必要的，那么对于前带阳性样品获得的浓度值是如此精确，以致于在不进行系列稀释的情况下将样品正确稀释到标准浓度范围是可能的。

本发明的方法仅需要例如选择正确的校准曲线用于计算分析物浓度。这是通过分析反应的动力学来完成的。这使得分析更为便捷。

本发明的免疫测定法适用于所有已知的使用和不使用粒子增强的凝集或血细胞凝集试验。

优选本发明的方法使用浊度测定技术来测定例如抗体与抗原之间的相互作用。然而，也可以使用能够对所述相互作用进行定量并且承担前带效应的其它技术，例如化学发光、酶免疫测定法、荧光或比浊法，仅给出一些实例。由于此原因，尽管本文主要涉及浊度测定，但是本发明不应限于应用这种技术。

可以通过本发明方法分析的典型的样本为，例如血液、血清或尿。一般而言，任何的体液或组织提取物均应符合术语可以在免疫测定法中检验的样本所涵盖。

典型的反应时间在 30 秒到 10 分钟之间改变。

可以通过使用分光光度计或比浊计进行浊度测定。所用的波长取决于该测定。一般而言，可以在 340nm - 800nm 范围内最佳地测定凝集。

在本发明中可以使用检测样品中的前带并且据此标记样品的任何已知的方法。

本发明的方法如果在能够检测样品的前带效应的自动化分析仪中使用，那么是特别有利的。可以将该分析仪的程序设定为从一种标准曲线转换到另一种校准曲线，条件是例如它可以获得样品为前带阳性的信息。

在本发明的另一个实施方案中，可以规定将免疫反应性物质固定

在微粒上，例如尤其是固定在聚合物珠，例如乳胶珠上。然而，可以分别用于普通免疫测定法或微粒增强的光散射凝集测定法的任何粒子都是适宜的。与直接凝集相比的优势在于通过使用与微粒偶联的免疫反应性物质提高测定的灵敏度。

实际上，可以利用任何与本文所述类似的软件介导的标志(flagging)过程适用于表现出“钩形效应”反应动力学的任何免疫测定检测方法。这包括绝大多数的非竞争性免疫测定法，其中的一些已经使用神经网络分类器系统(Ref Clin Chem Lab Med. 1999 Apr; 37(4): 471-6)得到检测。

另一个实施方案提供了一旦证实了样品为前带阳性的，就在不同设置下对样品进行进一步处理。

例如，可以规定在不同于用于正常样品的波长的波长下对前带阳性的样品进行浊度测定。如上所述，样品中的前带化因由于离解的凝集物占优势的可能性增加而形成的复合物的量减少所导致。可以在测定步骤期间或在随后的测定中进行波长的改变。在某些情况下，在试验中观察到的现象酷似样品的前带化，但实际上是由形成的复合物的大小增加导致的。由于这些复合物因亚适 Debye 或 Mie-样光散射效应而也许不会适当地在测定波长下干扰，所观察到的效应与如果这是由形成的复合物的大小减小导致的情况相似。因此，如果波长也增加，那么在那些条件下对信号进行更定量的测定是可能的。

除所述的波长的改变之外，对前带阳性样品使用不同的反应时间或温育温度也是可能的。

在下文中，将通过参照如下附图的实施例来解释本发明。

图 1 显示了标准校准曲线。

图 2 显示了前带校准曲线。

图 3 显示了通过标准校准曲线计算的浓度值与通过前带校准曲线重新计算的值(加框的部分)之间的比较。

## 实施例

生成两种校准曲线。使用具有覆盖线性范围的浓度的微白蛋白材料生成标准校准曲线（参见图 1）。使用在该测定的前带区中浓度下的材料生成第二种校准曲线。将这条第二种校准曲线用作“前带校准曲线”（参见图 2）。在图 1 和图 2 中，底线表示用于校准的样品的不同浓度（按 mg/l 计）。在左侧，表示了在 340nm 的波长和 800nm 的第二波长下取得的 OD（光密度）-信号。

为了证实本发明方法的可靠性，使用含有不同浓度微白蛋白（人尿白蛋白）的样本进行免疫测定。作为免疫反应性物质，使用了浓度约为 0.5mg/l 的山羊抗-人白蛋白抗体。

将样本与抗体混合并且在约 5 分钟内在 340nm 的第一波长和 800nm 的第二波长下对样品进行浊度测定。

结果如图 3 中所示。底线表示在测定的样品中微白蛋白的不同浓度（按 mg/l 计）。在左侧表示了使用标准和前带校准曲线计算的回收率。

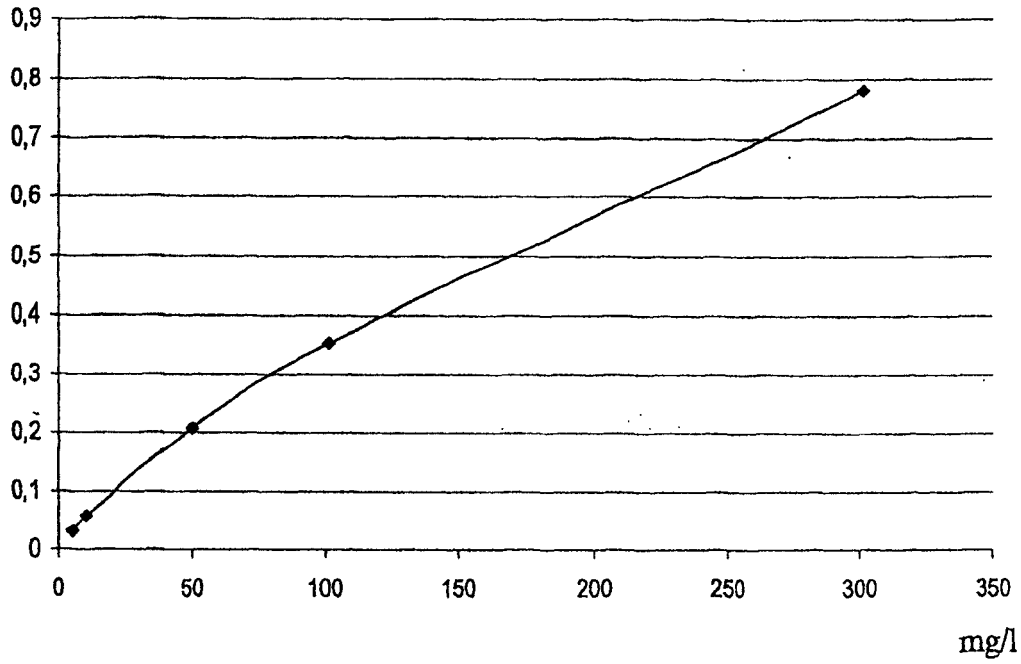
图 3 中曲线的第一部分（0-2200mg/l）代表可以通过使用图 1 的标准校准曲线计算浊度测定的 OD-值而获得的浓度值。该曲线显示了 5 - 300mg/l 的线性范围，代表了可以获得可靠结果的正常测定范围。高于 300mg/l 时值的可靠计算不再是可能的。

从大约 2200mg/l 的样品浓度开始，样品开始显示出前带效应。对这些样品而言，将图 2 中所示的前带校准曲线用于重新计算结果。重新计算的结果如图 3 中曲线的加框部分所示。可以看出使用前带校准曲线重新计算结果，获得了仍然近似地相当于样品浓度的浓度值。无论如何，重新计算的结果如此接近实际样品浓度以致于在不进行系列稀释的情况下正确稀释至 5 - 300mg/l 的浓度是可能的。

前带校准范围的作用在于实际上将这种微白蛋白测定的范围扩展至少 85 倍（300mg/l - 26000mg/l）。

OD  
340nm/800nm

图1



OD  
340nm/800nm

图2

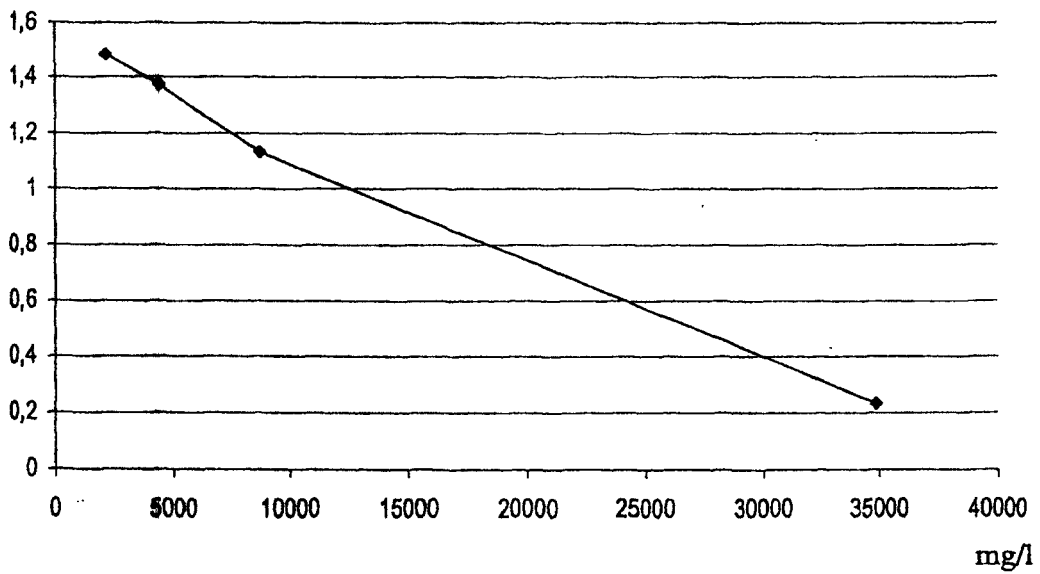
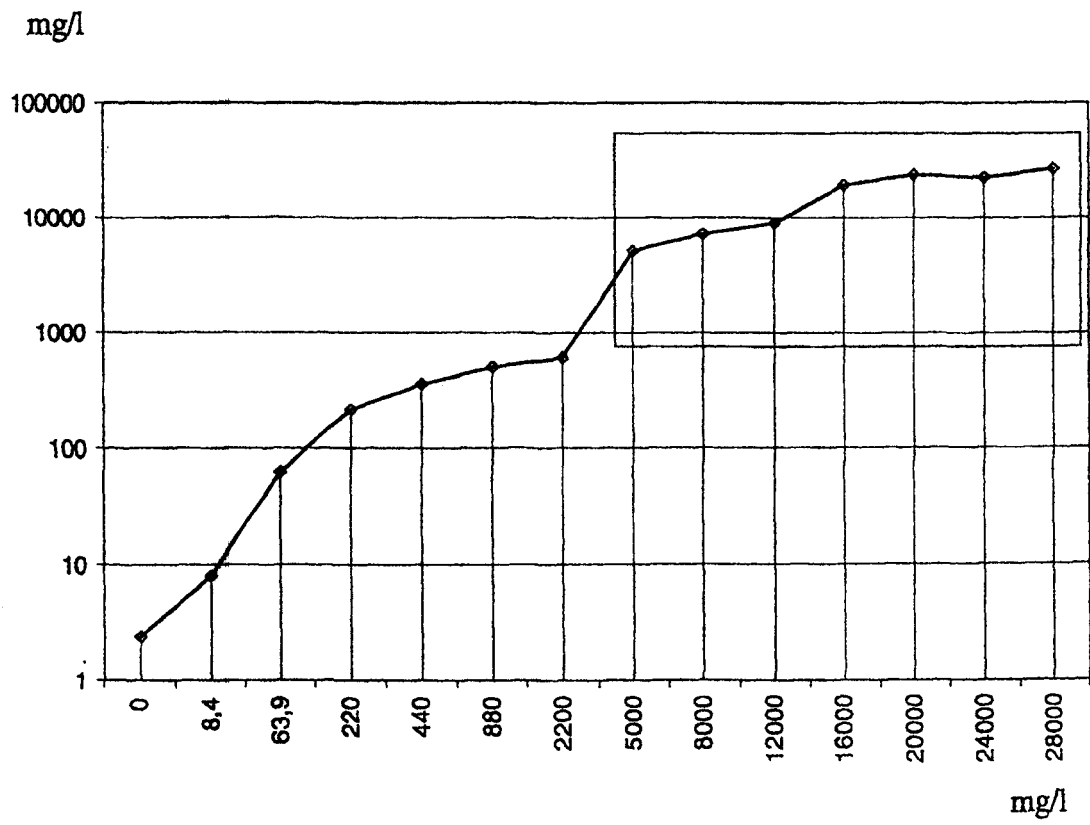


图 3



专利名称(译)	免疫测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101055272A</a>	公开(公告)日	2007-10-17
申请号	CN200710085867.1	申请日	2007-03-08
[标]发明人	G甘泽尔 M卡瓦勒里 M麦克库斯克		
发明人	G·甘泽尔 M·卡瓦勒里 M·麦克库斯克		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/00		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54393		
代理人(译)	李瑛		
优先权	2006007803 2006-04-13 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

免疫测定方法，包括下列步骤：通过将样本与能够特异性结合指定分析物的免疫反应性物质混合制备测定样品；使样品于指定的反应时间内反应；测定涉及免疫反应性物质与样品中的分析物在反应时间内的相互作用的信号；基于不同的时间时测定的信号检查是否在样品中已经产生前带效应并且据此标记前带阳性的样品，且根据在反应时间过程中测定的信号中的至少一种计算样品中分析物的浓度，该步骤是通过使用覆盖对前带阳性样品产生前带效应的分析物浓度的校准曲线或一部分校准曲线以及覆盖对剩余样品不产生前带效应的分析物浓度的另一种校准曲线或一部分校准曲线进行的。

