

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510027165.9

[51] Int. Cl.
G01N 33/538 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月3日

[11] 公开号 CN 1888904A

[22] 申请日 2005.6.27

[21] 申请号 200510027165.9

[71] 申请人 上海透景生命科技有限公司

地址 201203 上海市浦东张江高科技园区松
涛路646号3楼

[72] 发明人 姚见儿 周雪雷 罗朝领 茅柳娟

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书3页 说明书30页

[54] 发明名称

一种指示免疫反应中异嗜性抗体干扰的方法

[57] 摘要

本发明涉及体外检测技术领域，具体地涉及一种在免疫检测样本时指示异嗜性抗体干扰的方法和相应的试剂盒。本发明可提高双位点夹心免疫测定的准确性，同时降低双位点夹心免疫测定的假阳性率。

1、一种检测样品中目标抗原的免疫夹心检测方法，其特征在于，包括以下步骤：

(a)将样品、检测微球、异嗜性抗体干扰指示微球和标记了可检测信号的第二抗体混合，形成一反应体系，

其中所述的检测微球是如I式所示的第一抗体-微球的二元复合物，



式中，“X”表示目标抗原，“anti₁X”表示针对所述目标抗原“X”的第一抗体，“bead”表示微球，“-”表示第一抗体与微球之间的结合方式，

并且所述的第二抗体与第一抗体可同时结合于目标抗原的不同表位，

从而形成“第二抗体-抗原-第一抗体-微球”四元复合物；

其中，其中所述的异嗜性抗体干扰指示微球是如III式所示的异嗜性干扰指示物-微球的二元复合物，



式中，“Z”表示异嗜性干扰指示物，“bead''”表示可与“bead”互相区别的不同微球，“-”表示异嗜性干扰指示物与微球之间的结合方式，

从而在样品中存在异嗜性抗体的情况下，形成“第二抗体-异嗜性抗体-异嗜性干扰指示物-微球”四元复合物；

(b)检测反应体系中所述“第二抗体-抗原-第一抗体-微球”四元复合物中微球上的可检测信号，并与标准值或标准曲线比较，从而确定反应体系中目标抗原的存在与否和/或数量；

并且检测反应体系中所述“第二抗体-异嗜性抗体-异嗜性干扰指示物-微球”四元复合物中微球上的可检测信号，得到异嗜性抗体干扰指示微球的信号值，并与无异嗜性抗体干扰效应时的异嗜性抗体干扰指示微球信号值(正常值)比较，当异嗜性抗体干扰指示微球测量值大于异嗜性抗体干扰指示微球正常值1.5倍时，则判定目标抗原的测定结果不可靠；如果异嗜性抗体干扰指示微球测量值小于或等于异嗜性抗体干扰指示微球正常值1.5倍时，则判定被检测样品中无异嗜性抗体干扰。

2. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，在步骤(a)和(b)之间，还包括步骤：

(b1) 将HD-HOOK指示微球加入到步骤(a)的体系中，其中HD-HOOK指示微球是式II所示的目标抗原-微球的二元复合物，



式中，“bead'”表示可与“bead”和“bead”互相区别的不同微球，“-”表示目标抗原X与微球之间的结合方式，

从而在带有可检测信号的第二抗体存在下，形成“第二抗体-抗原-微球”三元复合物；和

(b2) 检测反应体系中“第二抗体-抗原-微球”三元复合物中微球上的可检测信号，得到HD-HOOK指示微球的信号值，并与无HD-HOOK效应时的HD-HOOK指示微球信号值(正常值)比较，当HD-HOOK指示微球测量值小于HD-HOOK指示微球正常值时，则判定目标抗原的测定结果不可靠；如果HD-HOOK指示微球测量值大于或等于HD-HOOK指示微球正常值时，则判定样品中目标抗原的浓度处于可测量范围。

3. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，第一抗体、异嗜性干扰指示物、或目标抗原与微球之间的结合方式有共价键或配基反应或非特异性吸附。

4. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述异嗜性抗体干扰指示微球测量值大于异嗜性抗体干扰指示微球正常值2倍时，则判定目标抗原的测定结果不可靠，其中所述的正常值是如下确定的：

(a') 将浓度已知且处于测量范围的目标抗原标准品系列分别与所述检测微球、所述带有可检测信号的第二抗体混合，形成一反应体系，从而形成不同目标抗原标准品浓度的“第二抗体-抗原-第一抗体-微球”四元复合物；

(b') 将所述的异嗜性抗体干扰指示微球加入到步骤(a')的体系中；

(c') 检测所述异嗜性抗体干扰指示微球上的可检测信号，以 $P+2SD$ 为指示微球正常值，式中 P 表示不同目标抗原标准品浓度时，异嗜性抗体干扰指示微球信号值的平均值， $2SD$ 为2倍的标准偏差。

5. 如权利要求2所述的方法，其特征在于，在步骤(b2)中，当HD-HOOK指示微球测量值 $\leq 0.9 \times$ HD-HOOK指示微球正常值时，则判定样品存在HD-HOOK效应，并且所述HD-HOOK指示微球正常值是用以下方法确定的：

(a') 将浓度已知且处于测量范围的目标抗原标准品系列分别与所述检测微球、所述带有可检测信号的第二抗体混合，形成一反应体系，从而形成不同目标抗原标准品浓度的“第二抗体-抗原-第一抗体-微球”四元复合物；

(b')将所述的HD-HOOK指示微球加入到步骤(a')的体系中,从而在带有可检测信号的第二抗体存在下,形成不同目标抗原标准品浓度的“第二抗体-抗原-微球”三元复合物;

(c')检测所述三元复合物中微球上的可检测信号,以 $P+2SD$ 为HD-HOOK指示微球正常值,式中 P 表示不同目标抗原标准品浓度时,三元复合物中微球信号值的平均值, $2SD$ 为2倍的微球信号值的标准偏差。

6.如权利要求1所述的方法,其特征在于,目标抗原数量为1-1000种。

7.如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的抗原是蛋白质。

8.如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述的各种微球bead、bead'和bead"是带不同荧光的微球。

9.一种用于检测目标抗原的试剂盒,其特征在于,它包括:容器,以及分别装于容器中的下列物质:

(a)检测微球,其中所述的检测微球是如I式所示的第一抗体-微球的二元复合物,



式中,“X”表示目标抗原,“anti₁X”表示针对所述目标抗原“X”的第一抗体,“bead”表示微球,“-”表示第一抗体与微球之间的结合方式,

(b)带有可检测信号的第二抗体,其中,所述的第二抗体与第一抗体可同时结合于目标抗原的不同表位,

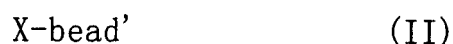
(c)异嗜性抗体干扰指示微球,其中所述的异嗜性抗体干扰指示微球是如III式所示的异嗜性干扰指示物-微球的二元复合物,



式中,“Z”表示异嗜性干扰指示物,所述的异嗜性干扰指示物选自:小鼠抗体、大鼠抗体、鸡源抗体、兔源抗体、羊源抗体、马源抗体、牛源抗体或类风湿因子,“bead''”表示可与“bead”互相区别的不同微球,“-”表示异嗜性干扰指示物与微球之间的结合方式。

10.如权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,还包括

(d)HD-HOOK指示微球,所述HD-HOOK指示微球是式II所示的目标抗原-微球的二元复合物,



式中,“bead'”表示可与“bead”、“bead''”互相区别的不同微球,“-”表示目标抗原X与微球之间的结合方式。

一种指示免疫反应中异嗜性抗体干扰的方法

技术领域

本发明涉及体外检测技术领域，具体地涉及一种在免疫检测血清样本时指示异嗜性抗体干扰的方法。

背景技术

异嗜性抗体干扰指的是指在免疫双抗夹心反应中把捕获抗体和检测抗体，不通过形成夹心，而直接连接在一起，形成假阳性结果的蛋白抗体物质。常见的异嗜性抗体有 HAMA (Human Anti-mouse Antibody) 抗体、类风湿因子等。

一种常见的异嗜性抗体干扰是由 HAMA 反应引起的。HAMA (Human Anti-mouse Antibody) 反应在免疫检测中经常发生，其发生率在 10% 左右。例如，在曾经接触过或接种过鼠抗体的个体中，其体内会存在人抗鼠的抗体。由于这些个体的血清样本含有人抗鼠的抗体，故称为 HAMA 血清样本。当免疫检测时所采用的一抗和二抗都是鼠抗体时，HAMA 血清样本中所含有的人抗鼠的抗体，可直接把一抗和二抗交联，影响血清样本的正常双抗夹心反应，造成错误显示，形成假阳性检测结果 (. Hazra DK, Britton KE, Lahiri VL, Gupta AK, Khanna P, Saran S. Nucl Med Commun. 1995 Feb;16(2):66-75.)。

目前，普通的免疫检测方法无法判断 HAMA 样本血清与正常样本血清的区别，因此无法判断检测结果为真阳性还是假阳性，最终极易导致误诊。

另一种常见的异嗜性抗体干扰是由类风湿因子引起的。类风湿因子 (RF) 是抗人 IgG 分子 FC 片段上抗原决定族的特异性抗体，为抗 IgG 的自身抗体，能与人或者动物的变性 IgG 分子结合，常常导致被检测样本的假阳性。

与之相反，在免疫反应中还存在一些易引起假阴性的现象，HD-HOOK 效应是其中之一。高剂量钩状 (HD-HOOK) 效应是指在双位点夹心免疫实验中，其剂量反应曲线的高剂量 (HIGH DOSE, HD) 区段，线性走向不是呈平台状无限后延，而是向下弯曲状，似一只钩子或一把镰刀 (HOOK)，根据此现象写实性地称之为“HD-HOOK”效应 (Miles LEM, Lipschitz DA, Bieber CP and Cook JD: Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Analyt Biochem* 61:209-224, 1974.)

产生HD-HOOK效应的分子机理有“分子变构说”和“浓度效应”等推论(《临床免疫学检验的进展》南京军区南京总医院全军医学检验中心,武建国;《ELISA的质量管理》江苏省临床检验中心,许斌;《肿瘤标志物检测的影响因素和应用原则》华中科技大学同济医学院附属协和医院,吴健民)。

HD-HOOK效应在免疫检测中经常发生,其发生率在占阳性样本30%左右。由于HD-HOOK效应的存在导致被检测样本不能被正确区分为是由于其浓度超出检测试剂盒的线性范围还是本身浓度就是该值,以至于实验误诊,尤其是导致假阴性率上升。

因此,本领域迫切需要开发新的简便的、有效指示异嗜性抗体的方法,提高双位点夹心免疫测定的准确性,同时降低双位点夹心免疫测定的假阳性率。同时,本领域还迫切需要有效指示HD-HOOK的方法,以便降低双位点夹心免疫测定的假阴性率。

发明内容

本发明的目的就是提供一种简便的、有效指示异嗜性抗体的方法,提高双位点夹心免疫测定的准确性,同时降低双位点夹心免疫测定的假阳性率。

本发明的另一目的是同时提供一种简便的、有效指示HD-HOOK效应的方法,从而降低双位点夹心免疫测定的假阴性率。

在本发明的第一方面,提供了一种检测样品中目标抗原的免疫夹心检测方法,它包括以下步骤:

(a)将样品、检测微球、异嗜性抗体干扰指示微球和标记了可检测信号的第二抗体混合,形成一反应体系,

其中所述的检测微球是如I式所示的第一抗体-微球的二元复合物,



式中,“X”表示目标抗原,“anti₁X”表示针对所述目标抗原“X”的第一抗体,“bead”表示微球,“-”表示第一抗体与微球之间的结合方式,

并且所述的第二抗体与第一抗体可同时结合于目标抗原的不同表位,

从而形成“第二抗体-抗原-第一抗体-微球”四元复合物;

其中,其中所述的异嗜性抗体干扰指示微球是如III式所示的异嗜性干扰指示物-微球的二元复合物,



式中，“Z”表示异嗜性干扰指示物(较佳地，所述的异嗜性干扰指示物选自小鼠抗体、大鼠抗体、鸡源抗体、兔源抗体、羊源抗体、马源抗体、牛源抗体、或类风湿因子)，“bead'”表示可与“bead”互相区别的不同微球，“-”表示异嗜性干扰指示物与微球之间的结合方式，

从而在样品中存在异嗜性抗体的情况下，形成“第二抗体-异嗜性抗体-异嗜性干扰指示物-微球”四元复合物；

(b)检测反应体系中所述“第二抗体-抗原-第一抗体-微球”四元复合物中微球上的可检测信号，并与标准值或标准曲线比较，从而确定反应体系中目标抗原的存在与否和/或数量；

并且检测反应体系中所述“第二抗体-异嗜性抗体-异嗜性干扰指示物-微球”四元复合物中微球上的可检测信号，得到异嗜性抗体干扰指示微球的信号值，并与无异嗜性抗体干扰效应时的异嗜性抗体干扰指示微球信号值(正常值)比较，当异嗜性抗体干扰指示微球测量值大于异嗜性抗体干扰指示微球正常值1.5倍时，则判定目标抗原的测定结果不可靠；如果异嗜性抗体干扰指示微球测量值小于或等于异嗜性抗体干扰指示微球正常值1.5倍时，则判定被检测样品中无异嗜性抗体干扰。

在另一优选例中，在步骤(a)和(b)之间，还包括步骤：

(b1)将HD-HOOK指示微球加入到步骤(a)的体系中，其中HD-HOOK指示微球是式II所示的目标抗原-微球的二元复合物，



式中，“bead'”表示可与“bead”和“bead”互相区别的不同微球，“-”表示目标抗原X与微球之间的结合方式，

从而在带有可检测信号的第二抗体存在下，形成“第二抗体-抗原-微球”三元复合物；和

(b2)检测反应体系中“第二抗体-抗原-微球”三元复合物中微球上的可检测信号，得到HD-HOOK指示微球的信号值，并与无HD-HOOK效应时的HD-HOOK指示微球信号值(正常值)比较，当HD-HOOK指示微球测量值小于HD-HOOK指示微球正常值时，则判定目标抗原的测定结果不可靠；如果HD-HOOK指示微球测量值大于或等于HD-HOOK指示微球正常值时，则判定样品中目标抗原的浓度处于可测量范围。

在另一优选例中，第一抗体、异嗜性干扰指示物、或目标抗原与微球之间

的结合方式有共价键或配基反应或非特异性吸附。

在另一优选例中，所述异嗜性抗体干扰指示微球测量值大于异嗜性抗体干扰指示微球正常值2倍时，则判定目标抗原的测定结果不可靠，其中所述的正常值是如下确定的：

(a') 将浓度已知且处于测量范围的目标抗原标准品系列分别与所述检测微球、所述带有可检测信号的第二抗体混合，形成一反应体系，从而形成不同目标抗原标准品浓度的“第二抗体-抗原-第一抗体-微球”四元复合物；

(b') 将所述的异嗜性抗体干扰指示微球加入到步骤(a')的体系中；

(c') 检测所述异嗜性抗体干扰指示微球上的可检测信号，以 $P+2SD$ 为指示微球正常值，式中 P 表示不同目标抗原标准品浓度时，异嗜性抗体干扰指示微球信号值的平均值， $2SD$ 为2倍的标准偏差。

在另一优选例中，在步骤(b2)中，当HD-HOOK指示微球测量值 $\leq 0.9 \times$ HD-HOOK指示微球正常值时，则判定样品存在HD-HOOK效应，并且所述HD-HOOK指示微球正常值是用以下方法确定的：

(a') 将浓度已知且处于测量范围的目标抗原标准品系列分别与所述检测微球、所述带有可检测信号的第二抗体混合，形成一反应体系，从而形成不同目标抗原标准品浓度的“第二抗体-抗原-第一抗体-微球”四元复合物；

(b') 将所述的HD-HOOK指示微球加入到步骤(a')的体系中，从而在带有可检测信号的第二抗体存在下，形成不同目标抗原标准品浓度的“第二抗体-抗原-微球”三元复合物；

(c') 检测所述三元复合物中微球上的可检测信号，以 $P+2SD$ 为HD-HOOK指示微球正常值，式中 P 表示不同目标抗原标准品浓度时，三元复合物中微球信号值的平均值， $2SD$ 为2倍的微球信号值的标准偏差。

在另一优选例中，目标抗原数量为1-10000种，较佳地为1-1000种，更佳地为2-1000种，最佳地为4-1000种。

在另一优选例中，所述的抗原是蛋白质。

在另一优选例中，第一抗体与相应的第二抗体的摩尔比为1:0.1-1:2。

在另一优选例中，所述的各种微球bead、bead' 和bead''是带不同荧光的微球。

在本发明的第二方面，提供了一种用于检测目标抗原的试剂盒，它包括：容器，以及分别装于容器中的下列物质：

(a)检测微球，其中所述的检测微球是如 I 式所示的第一抗体-微球的二元复合物，



式中，“X”表示目标抗原，“anti₁X”表示针对所述目标抗原“X”的第一抗体，“bead”表示微球，“-”表示第一抗体与微球之间的结合方式，

(b)带有可检测信号的第二抗体，其中，所述的第二抗体与第一抗体可同时结合于目标抗原的不同表位，

(c)异嗜性抗体干扰指示微球，其中所述的异嗜性抗体干扰指示微球是如 III式所示的异嗜性干扰指示物-微球的二元复合物，



式中，“Z”表示异嗜性干扰指示物，所述的异嗜性干扰指示物选自：小鼠抗体、大鼠抗体、鸡源抗体、兔源抗体、羊源抗体、马源抗体、牛源抗体、或类风湿因子，“bead''”表示可与“bead”互相区别的不同微球，“-”表示异嗜性干扰指示物与微球之间的结合方式。

在另一优选例中，所述的试剂盒还包括：

(d)HD-HOOK指示微球，所述HD-HOOK指示微球是式II所示的目标抗原-微球的二元复合物，



式中，“bead'”表示可与“bead”、“bead''”互相区别的不同微球，“-”表示目标抗原X与微球之间的结合方式。

在另一优选例中，所述试剂盒含有针对1-1000种(较佳地2-500种，更佳地3-100种)目标抗原的相应的检测微球、带有可检测信号的第二抗体和HD-HOOK指示微球；并且所述的各种微球bead、bead'和bead''是带不同荧光的微球。

本发明的其他方面，在阅读了本申请之后，对于本领域技术人员而言是显而易见的。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究发现，通过设立异嗜性抗体干扰指示微球，可以简便有效地排除双位点夹心免疫测定中异嗜性抗体所导致的假阳性率，从而提高双位点夹心免疫测定的准确性。

此外，进一步地通过设立HD-HOOK指示微球，可以简便有效地排除双位点夹心免疫测定中HD-HOOK效应所导致的假阴性率，从而进一步提高双位点夹心免疫测定的准确性。

如本文所用，术语“第一抗体”、“一抗”可互换使用，指可特异性结合于某一抗原(如肿瘤标志物)的一种抗体。

如本文所用，术语“第二抗体”、“二抗”可互换使用，指可特异性结合于某一抗原(如肿瘤标志物)的另一种抗体。例如，对于同一种抗原(如肿瘤标志物)而言，相应的第一抗体和第二抗体是不同的，并且可同时结合于所述的抗原的不同表位。

如本文所用，术语“抗原”指具有免疫原性的物质，例如蛋白质、多肽。代表性的抗原例子包括(但并不限于)：细胞因子、肿瘤标志物、金属蛋白类、心血管糖尿病相关蛋白等。

如本文所用，术语“肿瘤标志物”是指在肿瘤的发生和增殖过程中，由肿瘤细胞本身所产生的或者是由机体对肿瘤细胞反应而产生的，反映肿瘤存在和生长的一类物质。代表性的肿瘤标志物包括(但并不限于)：甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、癌抗原125(CA125)、糖抗原19-9(CA19-9)、总前列腺特异性抗原(PSA)、游离前列腺特异性抗原(f-PSA)、神经原特异性烯醇化酶(NSE)、糖链抗原(CA242)、癌抗原(CA15-3)、人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)。

如本文所用，术语“异嗜性干扰指示物”是指在免疫双抗夹心反应中把捕获抗体和检测抗体，不通过形成夹心，而直接连接在一起，形成假阳性结果的蛋白抗体物质。代表性的例子包括(但并不限于)：小鼠抗体、大鼠抗体、鸡源抗体、兔源抗体、羊源抗体、马源抗体、牛源抗体或类风湿因子。

基本原理

(a) 双抗夹心法的原理

双抗夹心免疫检测法的基本原理是本领域技术人员所熟知的。常规的做法是将一抗固定于固相载体，然后一抗与抗原反应，洗涤后再与标有酶的二抗反应，洗涤，最后进行化学发光或酶联显色反应检测信号。

(b) Luminex xMAP法的原理

Luminex xMAP 是一个非常灵活的多功能技术平台。其原理是把微小的乳胶颗粒(Beads, 简称为“微球”)分别染成不同的荧光色, 然后再把针对不同检测物的蛋白(如抗原抗体)以共价方式结合到特定颜色的微球上。应用时, 先把针对不同检测物的、用不同颜色编码的微球混合, 再加入被检测物(被测物可以是血清中的抗原、抗体、或酶等)。在悬液中的微球与被检测物特异性地结合, 并加上荧光标记。然后, 微球成单列通过两束激光, 一束判定微球的颜色从而决定被测物的特异性(定性); 另一束测定微球上的荧光标记强度从而决定被测物的量(定量), 所得到的数据经电脑处理后可以直接用来判断结果。

在一个优选例中, 充分利用了一抗固定在不同流动微球(Beads)的特点, 同时优化藻红蛋白(PE)标记的二抗的浓度, 将交联了一抗的微球溶液与血清样本或抗原标准质控品液、PE标记的二抗溶液依次或同时一并加入反应容器中, 从而发生以下反应:

①微球上的一抗与血清或标准质控品液中相应的抗原(即肿瘤标志物抗原)结合, 形成“肿瘤标志物-第一抗体-微球”三元复合物,

②二抗与血清或标准质控品液中相应的抗原(即肿瘤标志物抗原)结合, 最终形成“第二抗体-肿瘤标志物-第一抗体-微球”四元复合物(包括微球交联的一抗-血清相应抗原-PE标记的复合物或微球交联的一抗-标准质控品液的抗原-PE标记的复合物), 反应过程中不须离心洗涤, 在液相中即可通过Luminex xMAP检测复合物的荧光, 达到从反应到定性定量分析一步完成的效果, 即: 一步法。

在Luminex检测仪上, 这些微球被微量液体传送系统排成单列, 通过两束激光, 一束判定微球的编码从而决定被测肿瘤标志物的种类; 另一束测定微球上PE的荧光强度, 经数据处理得出被测肿瘤标志物的含量。

关于Luminex xMAP的技术平台详细资料, 请参见产品说明书或文献, (1) *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 51: 321-327, (2) *Journal of Immunological Methods*, 227: 41-52; (3) www.luminexcorp.com。

(c) 指示异嗜性干扰的原理

一方面, 在本发明方法中, 首先在1种荧光编码的微球(称为1号球)上以共价键方式交联针对某种抗原的一抗; 加入血清样本或标准质控品液、藻红蛋白

(PE)标记的对应于该种抗原的二抗溶液(正常检测这种抗原浓度,与普通的、不具有HD-HOOK效应指示功能的方法相同)。这时同时发生以下反应:

①1号微球上的一抗与血清或标准质控品液中相应的抗原结合,

②二抗与血清或标准质控品液中相应的抗原结合,

最终形成“1号荧光编码微球交联的一抗-血清相应抗原-PE标记的二抗”构成的四元复合物,或“1号荧光编码的微球交联的一抗-标准质控品液的抗原-PE标记的二抗”构成的四元复合物。

在Luminex检测仪上,荧光编码的微球被微量液体传送系统排成单列,通过两束激光,一束判定微球的编码从而决定被测抗原的种类;另一束测定微球上PE的荧光强度,经数据处理得出被测抗原的含量。

另一方面,以指示HAMA反应为例,在2号荧光编码的Beads上以共价键方式交联针对HAMA的鼠源单抗;与1号交联有抗体的beads同时加入反应系统中,同时发生以下反应:

①2号Beads上的一抗与血清样本中的HAMA抗体结合;

②鼠源的任意二抗与血清样本中的HAMA抗体结合,

最终形成2号荧光编码Beads交联的一抗-HAMA抗体-PE标记的二抗复合物。

同时在Luminex检测仪上,荧光编码的2号与1号同时进行处理,Beads被微量液体传送系统排成单列,通过两束激光,一束判定Beads的编码从而决定被测HAMA抗体;另一束测定Beads上PE的荧光强度,根据荧光信号强弱判断该血清样本是否为HAMA血清样本。

另一方面,在2号荧光编码的微球上以共价键方式交联被检测抗原纯品。在1号交联有一抗的微球和样本、二抗-PE反应结束之后,将所述交联有抗原的2号荧光编码的微球(称为“HD-HOOK指示微球”)加入反应系统中。

此时,如果样品中待检测抗原的浓度处于非HD-HOOK区(即样品中含有待检测抗原的数量并不明显大于检测体系中二抗的数量,因此有一部分或较多的二抗呈未结合状态),那么会发生以下反应:2号微球上的抗原与反应系统中剩余的游离的二抗-PE结合,最终形成“2号荧光编码微球交联的抗原-PE标记的二抗”的三元复合物。这导致后续检测中,可检测到一定数量的所述三元复合物。

与此相反,如果样品中待检测抗原的浓度超过检测的线性区域而处于HD-HOOK区(即样品中含有目标抗原的数量明显大于检测体系中二抗的数量,则几

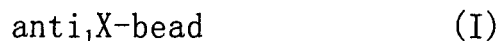
乎所有的二抗都结合于样品中的目标抗原，故体系中没有或基本上没有未结合状态的二抗)，那么2号微球上的抗原将很难遇到与反应系统中剩余的游离的二抗-PE结合，因此难以形成“2号荧光编码微球交联的抗原-PE标记的二抗”构成的三元复合物。这导致后续检测中，检测不到“2号荧光编码微球交联的抗原-PE标记的二抗”构成的三元复合物或读数很低。

在Luminex检测仪上，荧光编码的2号与1号微球同时进行处理，微球被微量液体传送系统排成单列，通过两束激光，一束判定微球的编码从而决定为HD-HOOK指示微球；另一束测定微球上PE的荧光强度，根据荧光信号强弱判断该血清样本是否为HD-HOOK血清样本。如果来自2号微球(HD-HOOK指示微球)的荧光强度较低(如低于无HD-HOOK效应时的指示微球荧光信号值(正常值)的90%，较佳地低于50%，更佳地低于30%，最佳地低于10%)，则可判定样品中待测抗原的浓度处于HD-HOOK区，即样品是HD-HOOK样品。

以下，以抗原是肿瘤标志物的情况为例，进一步说明本发明的相关操作细节。

第一抗体-微球的二元复合物(检测微球)

在本发明中，第一抗体-微球的二元复合物具有式(I)结构：



式中，X表示肿瘤标志物， anti_1X 表示抗肿瘤标志物X的第一抗体，bead表示微球，-表示第一抗体与微球之间的共价键；

一抗与微球的交联

针对不同肿瘤标志物抗原的一抗(anti_1X , X代表肿瘤标志物抗原)与微球共价交联的详细操作程序可用常规方法，例如按照Luminex公司的产品说明书或网站：www.luminexcorp.com中所述的方法进行偶连，从而得到不同微球与相应一抗形成偶连物 $\text{anti}_1\text{X-Beads}$ 。

分别取针对不同肿瘤标志物的 $\text{anti}_1\text{X-Beads}$ ，按一定比例混合就可得到第一抗体溶液(简称为A液)。

鼠源抗体-微球的二元复合物(HAMA指示微球)

按上述类似方法，将鼠源抗体与另一种号码的微球共价交联，形成鼠源抗体-微球的二元复合物(即HAMA指示微球)。将HAMA指示微球和检测微球混合，

一起为A液。

二抗的标记

虽然二抗可用各种本领域已知的可检测信号进行标记。然而，优选的是用荧光信号进行标记，尤其是通过生物素-亲和素连接方式标记PE。

在一优选例中，二抗的生物素(Biotin)标记方法如下：分别取针对不同肿瘤标志物抗原的二抗(anti_2X ，X代表肿瘤标志物抗原)透析纯化后加入生物素二甲基亚砷(DMSO)溶液，避光反应，透析去除未反应的生物素，保存备用。

分别取针对不同肿瘤标志物抗原的生物素标记的 anti_2X ，按比例混合，加入亲和素(Streptavidin)标记的PE，使生物素与Streptavidin结合，生成带荧光素标记的第二抗体(即PE- anti_2X ，其中PE表示藻红蛋白)，得到第二抗体溶液(简称为C液)。

质控或标准

为了消除假阳性和假阴性，宜在检测过程中设置质控。用某种抗原的标准品配制一定浓度范围内的标准品溶液，为B液。

此外，为了获得定量结果，可以在检测过程中设置含已知浓度的多个肿瘤标志物的标准品。

例如，抗原标准(STD_n ， $n=0\sim 5$)和质控品(质控1、质控2)溶液的配制可按下表配制

表 1:混合抗原标准质控品溶液配制表

肿瘤标志物TM	STD0	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	质控1	质控2
1	0	C_{1-1}	C_{1-2}	C_{1-3}	C_{1-4}	C_{1-5}	C_{1-6}	C_{1-7}
2	0	C_{2-1}	C_{2-2}	C_{2-3}	C_{2-4}	C_{2-5}	C_{2-6}	C_{2-7}
3	0	C_{3-1}	C_{3-2}	C_{3-3}	C_{3-4}	C_{3-5}	C_{3-6}	C_{3-7}
4	0	C_{4-1}	C_{4-2}	C_{4-3}	C_{4-4}	C_{4-5}	C_{4-6}	C_{4-7}
5	0	C_{5-1}	C_{5-2}	C_{5-3}	C_{5-4}	C_{5-5}	C_{5-6}	C_{5-7}
6	0	C_{6-1}	C_{6-2}	C_{6-3}	C_{6-4}	C_{6-5}	C_{6-6}	C_{6-7}

.	0
.	
.	
.	
.	
.	
40	0	C_{40-1}	C_{40-2}	C_{40-3}	C_{40-4}	C_{40-5}	C_{40-6}	C_{40-7}

表中第1列为不同的肿瘤标志物，STD0表示该标准溶液中的所有肿瘤标志物的浓度均为0，为标准曲线的起始点；STD 1表示该标准溶液中的不同肿瘤标志物的浓度分别为 C_{1-1} 、 C_{2-1} 、 C_{3-1} …… C_{40-1} ，为标准曲线的第2点；依此类推STD 2、STD 3、STD 4、STD 5的含义；质控1表示该标准溶液中的不同肿瘤标志物的浓度分别为 C_{1-6} 、 C_{2-6} 、 C_{3-6} …… C_{40-6} ，介于STD0和STD5之间，为内部质控点；质控2表示该标准溶液中的不同肿瘤标志物的浓度分别为 C_{1-7} 、 C_{2-7} 、 C_{3-7} …… C_{40-7} ，介于STD0和STD5之间，为另1内部质控点。STD0~STD5及质控1和质控2构成质控液（简称为B液）。

将上述的第一抗体溶液、质控液和第二抗体溶液（即A、B和C液）依次或同时混匀，然后充分反应（如在 $37 \pm 5^\circ\text{C}$ 反应10-100min），随后在luminex100上读数，即可得到多条标准曲线（具体数目由肿瘤标志物组合中不同的肿瘤标志物数目决定）。

2.5 HAMA血清样本的判断及正常血清样本中某种抗原的定量检测

将A、B和C液混匀， 37°C 反应30min，在luminex100上读数，1号微球（检测微球）上得到不同抗原浓度与对应的荧光信号作标准曲线；2号微球（HAMA指示微球）上对应的为HAMA反应阴性的荧光信号值；

将A、人血清样本和C液混匀， 37°C 反应30min，在luminex100上读数，1号微球上的荧光信号根据标准曲线换算出某种抗原的浓度。2号微球上的荧光信号与HAMA反应阴性的荧光信号值比较其大小。如果比HAMA反应阴性的荧光信号值大5倍以上则判断血清样本为阳性。

(d) 指示HD-HOOK方法的原理

在另一优选例中，一方面，在本发明方法还可同时指示HD-HOOK效应。

首先，在3号荧光编码的微球上以共价键方式交联被检测抗原纯品。在1号交联有一抗的微球和样本、二抗-PE反应结束之后，将所述交联有抗原的3号荧光编码的微球(称为“HD-HOOK指示微球”)加入反应系统中。

此时，如果样品中待检测抗原的浓度处于非HD-HOOK区(即样品中含有待检测抗原的数量并不明显大于检测体系中二抗的数量，因此有一部分或较多的二抗呈未结合状态)，那么会发生以下反应：3号微球上的抗原与反应系统中剩余的游离的二抗-PE结合，最终形成“3号荧光编码微球交联的抗原-PE标记的二抗”的三元复合物。这导致后续检测中，可检测到一定数量的所述三元复合物。

与此相反，如果样品中待检测抗原的浓度超过检测的线性区域而处于HD-HOOK区(即样品中含有目标抗原的数量明显大于检测体系中二抗的数量，则几乎所有的二抗都结合于样品中的目标抗原，故体系中没有或基本上没有未结合状态的二抗)，那么3号微球上的抗原将很难遇到与反应系统中剩余的游离的二抗-PE结合，因此难以形成“3号荧光编码微球交联的抗原-PE标记的二抗”构成的三元复合物。这导致后续检测中，检测不到“3号荧光编码微球交联的抗原-PE标记的二抗”构成的三元复合物或读数很低。

在Luminex检测仪上，荧光编码的3号与1号微球同时进行处理，微球被微量液体传送系统排成单列，通过两束激光，一束判定微球的编码从而决定为HD-HOOK指示微球；另一束测定微球上PE的荧光强度，根据荧光信号强弱判断该血清样本是否为HD-HOOK血清样本。如果来自3号微球(HD-HOOK指示微球)的荧光强度较低(如低于无HD-HOOK效应时的指示微球荧光信号值(正常值)的90%，较佳地低于50%，更佳地低于30%，最佳地低于10%)，则可判定样品中待测抗原的浓度处于HD-HOOK区，即样品是HD-HOOK样品。

以抗原是肿瘤标志物的情况为例，指示HD-HOOK效应的相关操作细节基本上同指示HAMA反应，不同点主要在于HD-HOOK指示微球的制备以及HD-HOOK指示微球是在反应结束后才加入。

抗原-微球的二元复合物(HD-HOOK指示微球)

按上述类似方法，将被检测抗原纯品与另一种号码的微球共价交联，形成

抗原-微球的二元复合物(即HD-HOOK指示微球),相应的溶液简称为H液(HD-HOOK效应指示微球悬液)。

样品的检测

可用本发明方法检测的样品没有特别限制,可以是任何含有肿瘤标志物的样品,代表性的例子包括血清样本、尿液样本、唾液样本等。优选的样品是血清样品。

(A) 指示HAMA反应干扰(即血清样本的判断及正常血清样本中某种抗原的定量检测)

将A、B和C液混匀,37°C反应30min,在luminex100上读数,1号beads上得到不同抗原浓度与对应的荧光信号作标准曲线;2号beads上对应的为HAMA反应阴性的荧光信号值;

将A、人血清样本和C液混匀,37°C反应30min,在luminex100上读数,1号beads上的荧光信号根据标准曲线换算出某种抗原的浓度。2号beads上的荧光信号与HAMA反应阴性的荧光信号值比较其大小。如果比HAMA反应阴性的荧光信号值大5倍以上则判断血清样本为阳性。

B. 指示HD-HOOK效应

(b1) 测定无HD-HOOK效应时2号微球的荧光信号值

以仅检测一种抗原为例,1号微球为交联有一抗的微球(称为检测微球);3号微球为交联有抗原的微球(HD-HOOK指示微球),其中HD-HOOK指示微球的编码荧光不同于检测微球的检测荧光。将A、B和C液混匀,37°C反应30min,然后加入H液,37°C反应10min,在luminex100上读数,1号微球上得到不同抗原浓度与对应的荧光信号作标准曲线;3号微球上对应的为无HD-HOOK效应时的指示微球信号值(正常值);

(b2) HD-HOOK效应的指示和样本中抗原的定量检测

将A、人血清样本和C液混匀,37°C反应30min,然后加入H液,37°C反应10min,在luminex100上读数,1号微球上的荧光信号根据标准曲线换算出某种抗原的浓度。3号微球上的荧光信号与上述步骤确定HD-HOOK效应阴性的荧光信号值比较其大小。

如果指示微球的荧光信号值等于或小于无HD-HOOK 效应时的指示微球信号值(正常值)的90%(较佳地等于或低于50%，更佳地等于或低于30%，最佳地等于或小于10%)，则判断该样本为HD-HOOK效应阳性。

如果同时检测样品中的多种抗原，可以相应地使用多种检测微球和HD-HOOK指示微球，即对每一种可以使用一种检测微球和HD-HOOK指示微球，并且各种检测微球和指示微球的具有不同的编码荧光，从而可以相互区分。

本发明的主要优点在于：

(a) 通过使用指示异嗜性抗体干扰的微球，可显著提高双位点夹心免疫测定的准确性，同时降低双位点夹心免疫测定的假阳性率。

(b) 操作简单。

(c) 配合使用指示HD-HOOK效应的微球，可进一步显著提高双位点夹心免疫测定的准确性，同时降低双位点夹心免疫测定的假阴性率。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人， 分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例

材料：

抗原和抗体来源：

原料	批号/货号	厂商
CA125-抗体	M86306M(groupA)	Biodesign
CA125-抗体	M86294M(groupB)	Biodesign
CA125 Ag	30AC20	Fitzgerald
CA153-抗体	M37901M(clone695)	Biodesign
CA153-抗体	M37552M(clone552)	Biodesign

原料	批号/货号	厂商
CA153 Ag	30AC16	Fitzgerald
f-PSA-抗体	M86209M(total)	Biodesign
f-PSA-抗体	M86806M(PEree)	Biodesign
PSA 抗原	A86878H Pure	Biodesign
T-PSA-抗体	M86506M(total)	Biodesign
T-PSA-抗体	M86209M(total)	Biodesign
PSA 抗原	A86878H Pure	Biodesign
CA199-抗体	M8073022	Fitzgerald
CA19-9 Ag	30AC14	Fitzgerald
NSE-抗体	9601	Medix
NSE-抗体	9602	Medix
NSE Ag	30-AN10	Fitzgerald
β -HCG-抗体	5012	Medix
β -HCG-抗体	5006	Medix
β -HCG Ag	A81455M	Biodesign
CA242-抗体	101-01	Canag
CA242 Ag		Canag
AFP-抗体	G4	上海第二军医大学
AFP-抗体	C2	上海第二军医大学
AFP Ag		Biodesign
CEA-抗体	A1	上海第二军医大学
CEA-抗体	C9	上海第二军医大学
CEA Ag	A86808H	Biodesign

微球(Beads)购自美国Luminex公司, 规格为 $5.0\mu\text{m}$, 微球表面为-COOH修饰, 其他常规试剂为市售品。

实施例1:

10种肿瘤标志物并行检测(无HD-HOOK指示, 无异嗜性抗体干扰指示)

1. 准备

1.1 一抗预先去除含氨基小分子和杂蛋白(透析或过层析柱), 测量其浓

度。

1.2 在1.5ml 聚丙烯离心管中,精确称取5mg左右N-hydroxysulfosuccinimide (NHS), 备用(防潮)。

1.3 在1.5ml 聚丙烯离心管中,精确称取5mg左右 N-ethyl-N'(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), 备用(防潮)。

2. 微球(Beads)活化

2.1 微球原液旋涡混旋仪混悬20秒,移取200 μ L 微球(相当于 2.5×10^6 微球)于1.5ml 聚丙烯离心管中。

2.2 15000rpm离心2分钟(设置3分钟),移去上清液。

2.3 加入100 μ L 蒸馏水,旋涡混旋仪混悬20秒,15000rpm离心2分钟,移去上清液。

2.4 重复2.3。

2.5 加入80 μ L 0.1 mol/L磷酸缓冲液(PBS), pH 6.2,旋涡混旋仪混悬20秒。

2.6 用蒸馏水将(NHSS)稀释至50mg/ml。(现配现用)

2.7 取10 μ L 50mg/ml (NHSS)加到Beads溶液中,旋涡混旋仪混悬20秒。

2.8 用蒸馏水将EDC稀释至50mg/ml。(现配现用)

2.9 取10 μ L 50mg/ml EDC加到Beads溶液中,旋涡混旋仪混悬20秒。

2.10 避光、37 $^{\circ}$ C孵育20分钟。

2.11 15000rpm离心2分钟,移去上清液。

2.12 加入250 μ L 50 mmol/L 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) (MES) pH5.0。

2.13 15000rpm离心2分钟,移去上清液。

2.14 重复2.12, 2.13, 马上进行下步实验。

3. 交联、封闭和储存

3.1 加20 μ g已处理的一抗到已活化的Beads中,旋涡混旋仪混悬20秒。

3.2 避光、37℃反应2小时,每十五分钟混匀一次。

3.3 加入1ml PBS-TBN,旋涡混旋仪混悬20秒,15000rpm离心2分钟。移去上清液(PBS-TBN的组成为10mmol/L pH7.4的磷酸盐缓冲液、0.02%吐温20、1mg/ml的小牛血清白蛋白和0.05%叠氮钠)。

3.4 加入500 μ L PBS-TBN,旋涡混旋仪混悬20秒,15000rpm离心2分钟。移去上清液。

3.5 加入500 μ L PBS-TBN,旋涡混旋仪混悬20秒。

3.6 2-8℃避光保存。

4. 二抗(anti₂X)的生物素标记

4.1 二抗预处理

二抗中含有叠氮钠、甘氨酸等含氨基的小分子和其它小分子	用pH7.4的1×PBS充分透析。
二抗中含有牛血清白蛋白等大分子	Protein A柱或其它柱子纯化。
二抗浓度标定	分光光度计测其OD280(10D280相当于0.7mg/ml单克隆抗体)。最终用1×PBS, pH7.4将浓度定于2mg/ml(浓缩使用Pall公司脱盐离心柱)。

4.2 生物素标记反应

取上述预处理的二抗25 μ L,加入25 μ L的1mg/ml NHSS-biotin DMSO溶液,混匀,4℃冰箱避光反应2小时。

5. 混合抗原标准、质控品(B液)的配制

TM	STD0	STD1	STD2	STD 3	STD 4	质控1	质控2
β-HCG	0mIU/ml	0.5mIU/ml	2mIU/ml	20mIU/ml	100mIU/ml	2mIU/ml	20mIU/ml
CA19-9	0U/ml	5U/ml	40U/ml	200U/ml	800U/ml	40U/ml	200U/ml
free-PSA	0ng/ml	0.5ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	100ng/ml	2ng/ml	20ng/ml
total-PSA	0ng/ml	0.5ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	100ng/ml	2ng/ml	20ng/ml
NSE	0ng/ml	5ng/ml	20ng/ml	60ng/ml	120ng/ml	20ng/ml	60ng/ml

CA125	0U/ml	40U/ml	200U/ml	400U/ml	800U/ml	200U/ml	400U/ml
CA15-3	0U/ml	1U/ml	5U/ml	30U/ml	240U/ml	5U/ml	30U/ml
CA242	0U/ml	10U/ml	50U/ml	200U/ml	400U/ml	50U/ml	200U/ml
AFP	0ng/ml	5ng/ml	20ng/ml	200ng/ml	500ng/ml	20ng/ml	200ng/ml
CEA	0ng/ml	5ng/ml	50ng/ml	200ng/ml	800ng/ml	50ng/ml	200ng/ml

用pH7.4的磷酸盐缓冲液按上表配制B液。

6. A液的配制

取10种不同Beads的下列anti₁β-HCG-Beads, anti₁PEree-PSA-Beads, anti₁total-PSA-Beads, anti₁NSE-Beads, anti₁CA15-3-Beads, anti₁CA19-9-Beads, anti₁CA125-Beads, anti₁CA242-Beads, anti₁APEP-Beads, anti₁CEA-Beads溶液, 按 4×10^5 个/种混合, 加在pH7.4 PBS中, 体积为5ml, 4℃避光保存备用。

7. 混合二抗-PE混合物(C液)配制

分别取标记好biotin的PEree-PSA, total-PSA, NSE, CA242, CA19-9, CA125, β-HCG, CA15-3, APEP, CEA二抗加入pH7.4 PBS中, 每种二抗终浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$, 同时加入PE总浓度为 $60 \mu\text{g/ml}$, 混合二抗-PE混合物总体积为5ml, 4℃避光保存备用。

8. 病人血清消化道肿瘤标志物含量检测

8.1 收集病人血样10份2ml/份, 5000rpmX5min, 取上清, 备用。

8.2 分别加入A液于96孔酶标板, $50 \mu\text{l}$ /孔; 然后加入标准品(STD0、STD1、STD2、STD3、STD4、STD5)、质控品(Contol1、Contol2)、血清样品1-9号, $5 \mu\text{l}$ /孔; 再加入C液, $50 \mu\text{l}$ /孔。在旋涡混旋仪上充分混匀, 放入37℃摇床孵育40min。

8.3 孵育完成后于旋涡混旋仪上充分混匀在Luminex100上读数。

8.4 检测结果见下表:

位置	样品	β -HCG	CA199	f-PSA	t-PSA	NSE	CA125	CA153	CA242	AFP	CEA	总事件
1	20 μ l-0	51	68	85.5	77	64	64	79	69	33.5	47	1286
2	20 μ l-1	130	231	88	112	124	48	343	103	75	107	1243
3	20 μ l-2	300.5	435	338	1006	639.5	329.5	442	160	418.5	244.5	1282
4	20 μ l-3	2256	678.5	2812	7041.5	1313	751	336	469.5	2417	540	1268
5	20 μ l-4	5087.5	822	8409	18835	2091	1112.5	281	678	3553	850	1359
6	1	78.5	196	104	81.5	560	91.5	123	75.5	115.5	102	1258
7	2	109	117	91	239.5	662	78.5	90.5	95	113	80	1177
8	3	71.5	56	105	61	182	65.5	86	68	82	97	1344
9	4	70	90	109	97	140	76	126	67	59	53	1229
10	5	91	44	120.5	401.5	67	84.5	116	49	35	60	1216
11	6	77.5	73.5	177	95	499	299	121	133	2187	99.5	1279
12	7	76.5	88	4397	10944	421.5	71	186.5	67	174	50	1355
13	8	39.5	59	90.5	56.5	456	74.5	136.5	71.5	60.5	21	1253
14	9	77	67.5	91.5	76	353	56.5	102	57	86	77	1250

注：表格中粗斜体部分为标准品检测结果，其他为样本检测结果。

结果表明，用本发明方法可同时获得多个肿瘤标志物的定量测定结果，例如第7号样品中存在大量的肿瘤标志物 t-PSA，从而可为临床诊断提供辅助性的参考指标。

实施例2

人血清样本HAMA反应的指示和对血清中甲胎蛋白(AFP)的检测

针对HAMA反应的抗体为纯化的小鼠IgG购自Biodesign公司，针对AFP的一抗和二抗购自上海第二军医大学，AFP标准品购自Biodesign公司，Beads购自Luminex公司。

1. 准备

1.1 一抗和AFP抗原预先去除含氨基小分子和杂蛋白(透析或过层析柱)，测量其浓度。

1.2 在1.5ml 聚丙烯离心管中，精确称取5mg左右N-hydroxysulfosuccinimide(NHS)，备用(防潮)。

1.3 在1.5ml 聚丙烯离心管中，精确称取5mg左右N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethyl-carbodiimide (EDC)，备用(防潮)。

2. 微球(beads)活化

2.1 分别取33号和46号 beads原液旋涡混旋仪混悬20秒，移取200 μ L beads(相当于 2.5×10^6 beads)于两个1.5ml 聚丙烯离心管中。

2.2 15000rpm离心2分钟(设置3分钟)，移去上清液。

2.3 加入100 μ L 蒸馏水，旋涡混旋仪混悬20秒，15000rpm离心2分钟，移去上清液。

2.4 重复2.3。

2.5 在两管中分别加入80 μ L 0.1 mol/L磷酸缓冲液(PBS)，pH 6.2，旋涡混旋仪混悬20秒。

2.6 用蒸馏水将(NHSS)稀释至50mg/ml。(现配现用)

2.7 分别取10 μ L 50mg/ml (NHSS)加到两种beads溶液中，旋涡混旋仪混悬20秒。

2.8 用蒸馏水将EDC稀释至50mg/ml。(现配现用)

2.9 分别取10 μ L 50mg/ml EDC加到两种beads溶液中，旋涡混旋仪混悬20秒。

2.10 避光、37 $^{\circ}$ C 孵育20分钟。

2.11 15000rpm离心2分钟，移去上清液。

2.12 分别加入250 μ L 50 mmol/L 2-(N-morpholino) ethanes μ L fonic acid (MES) pH5.0。

2.13 15000rpm离心2分钟，移去上清液。

2.14 重复2.12, 2.13, 马上进行下步实验。

3. 交联、封闭和储存

3.1 取20 μ g已处理好的小鼠IgG加入到已活化的46号beads中；取20 μ g已处理好的AFP一抗加入到已活化的33号beads中。旋涡混旋仪混悬20秒。

3.2 避光、37 $^{\circ}$ C 反应2小时，每十五分钟混匀一次。

3.3 分别加入1ml PBS-TBN，旋涡混旋仪混悬20秒，15000rpm离心2分钟。移去上清液(PBS-TBN的组成为10mmol/L pH7.4的磷酸盐缓冲液、0.02%吐温20、1mg/ml的小牛血清白蛋白和0.05%叠氮钠)。

3.4 分别加入500 μ L PBS-TBN，旋涡混旋仪混悬20秒，15000rpm离心2分钟。移去上清液。

3.5 分别加入500 μ L PBS-TBN，旋涡混旋仪混悬20秒。

3.6 用显微镜计数两种beads的浓度分别是：

33号：1X10⁶个/ml，46号：1X10⁶个/ml。

3.7 2-8℃避光保存。

4. 二抗的生物素(Biotin)标记

4.1 二抗预处理

二抗中含有叠氮钠、甘氨酸等含氨基的小分子和其它小分子	用pH7.4的1×PBS充分透析。
二抗中含有牛血清白蛋白等大分子	Protein A柱或其它柱子纯化。
二抗浓度标定	分光光度计测其OD280(10D280相当于0.7mg/ml单克隆抗体)。最终用1×PBS, pH7.4将浓度定于2mg/ml(浓缩使用Pall公司脱盐离心柱)。

4.2 生物素标记反应

取上述预处理的AFP二抗10 μ L，加入25 μ L的1mg/ml NHSS-Biotin DMSO溶液，混匀，4℃冰箱避光反应2小时。透析过夜备用。

5. 抗原标准品(B液)的配制

用pH7.4的磷酸盐缓冲液配制浓度为0ng/ml、5ng/ml、20ng/ml、200ng/ml、500ng/ml的AFP标准品液。

6. A液的配制

分别取适量标记了一抗的微球33号和46号加入到1ml pH7.4的磷酸盐缓冲

液中，使溶液中每种约含10000个微球。

7. 二抗-PE(C液)的配制

取标记好生物素化AFP二抗，加入pH7.4 磷酸盐缓冲液中，二抗终浓度为5 $\mu\text{g/ml}$ ，同时加入链亲和素标记的PE总浓度为60 $\mu\text{g/ml}$ ，二抗-PE总体积为5ml，4℃避光保存备用。

8. HAMA反应的指示和人血清中AFP的检测

8.1 收集有HAMA反应的人血清样本5份和无HAMA反应的人血清样本5份2ml/份, 5000rpmX5min, 取上清, 备用。

8.2 在96孔反应板的5个反应孔内依次加入5个不同浓度的B液各5 μL ，每孔再分别加入25 μL A液及25 μL C液，混匀；另选10孔分别加入10种上述人血清样本5 μL /孔和25 μL /孔A液及25 μL /孔C液，混匀；于37℃避光孵箱反应40分钟。

8.3 孵育完成后于旋涡混旋仪上充分混匀，在Luminex100上读数。

8.4 检测结果如下：

实验检测结果

	样本或已知浓度	检测微球(33#)	HAMA指示微球(46#)
标准品	0ng/ml	56.7	90
	5ng/ml	250.8	101
	20ng/ml	768.8	110
	200ng/ml	4829.5	96
	500ng/ml	7439.5	95
样品	样品1	2845.0	29364.5
	样品 2	2875.0	29687
	样品 3	2349.0	25476.5
	样品 4	3215.0	32452.5
	样品 5	3014.5	31484
	样品 6	115.0	145
	样品 7	3478.0	123
	样品 8	257.0	114.5
	样品 9	6473.0	134
	样品 10	578.5	94.5

8.5 实验结果判断

46#微球标准品HAMA阴性的平均MIF为113，而样品 1到5的MIF均高于HAMA阴性的10倍以上，因此指示样品 1到5的样本为HAMA血清样本。而样品 6到10的MIF小于 1.5×113 ，则判断样品 6到10为HAMA阴性。

实施例3

5种肿瘤标志物并行检测(带HAMA指示)

基本上按照实施例1和2的步骤，进行带HD-HOOK指示的5种肿瘤标志物并行检测，不同点在于选用SCCA、CA125、CA15-3、CEA、 β -HCG作为待检测的抗原。针对每一种使用一种检测微球和HAMA指示微球，并且5种检测微球和5种指示微球的具有不同的编码荧光。

另外，混合抗原标准 (B液)的配制浓度如下：

TM	STD1	STD2	STD3	STD4	STD 5	STD 6
SCCA	0ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	200ng/ml	1000ng/ml	2000ng/ml
CA125	0U/ml	40U/ml	200U/ml	600U/ml	1200U/ml	2400U/ml
CA15-3	0U/ml	1U/ml	10U/ml	100U/ml	400U/ml	800U/ml
CEA	0ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	200ng/ml	1200ng/ml	2400ng/ml
β -HCG	0ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	200ng/ml	1000ng/ml	2000ng/ml

用pH7.4的磷酸盐缓冲液按上表配制B液。

另外，A液、C液和H液的配制同实施例1和2。

用制备的微球对病人血清消化道肿瘤标志物含量进行检测，方法同实施例2。检测结果见下表：

	SCCA	CA125	CA15-3	CEA	β -HCG	Hama指示微球
Std1	85	78	95	75	76	84
Std2	198	155	354	214	225	94
Std3	534	457	945	546	635	105
Std4	1245	1145	2785	1345	2140	125
Std5	3489	2875	5345	3575	4575	114
Std6	7985	5978	9475	7540	8745	135
样品1	3245	1257	4575	2475	1350	125
样品2	104	785	157	650	900	134
样品3	752	74	978	75	1240	116
样品4	92	68	125	87	70	105
样品5	85	95	6475	3215	96	95
样品6	24573	450	27851	23565	27452	26485
样品7	30215	27955	28450	23451	29785	27850
样品8	29451	26785	26450	27459	23875	28950
样品9	16470	10054	19075	15742	18642	147820
样品10	21453	22078	25409	20985	22456	21765

实验结果判断：样品1-5为HAMA阴性样本，样品6-10为HAMA阳性样本。

实施例4

人血清样本HD-HOOK效应的指示和血清中甲胎蛋白(AFP)定量的检测

针对AFP的一抗和二抗由上海第二军医大学提供，AFP抗原纯品由Biodesign提供，微球由Luminex公司提供，常规试剂为市售品。

1. 准备

1.1 一抗和AFP抗原预先去除含氨基小分子和杂蛋白(透析或过层析柱)，测量其浓度。

1.2 在1.5ml 聚丙烯离心管中，精确称取5mg左右N-hydroxysulfosuccinimide(NHS)，备用(防潮)。

1.3 在1.5ml 聚丙烯离心管中，精确称取5mg左右N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethyl-carbodiimide (EDC)，备用(防潮)。

2. 微球活化

2.1 分别取33号和51号微球(Luminex公司)原液旋涡混旋仪混悬20秒, 移取200 μ L 微球(相当于 2.5×10^6 微球)于两个1.5ml 聚丙烯离心管中。

2.2 15000rpm离心2分钟(设置3分钟), 移去上清液。

2.3 加入100 μ L 蒸馏水, 旋涡混旋仪混悬20秒, 15000rpm离心2分钟, 移去上清液。

2.4 重复2.3。

2.5 在两管中分别加入80 μ L 0.1 mol/L磷酸缓冲液(PBS), pH 6.2, 旋涡混旋仪混悬20秒。

2.6 用蒸馏水将(NHSS)稀释至50mg/ml。(现配现用)

2.7 分别取10 μ L 50mg/ml (NHSS)加到两种微球溶液中, 旋涡混旋仪混悬20秒。

2.8 用蒸馏水将EDC稀释至50mg/ml。(现配现用)

2.9 分别取10 μ L 50mg/ml EDC加到两种微球溶液中, 旋涡混旋仪混悬20秒。

2.10 避光、37 $^{\circ}$ C 孵育20分钟。

2.11 15000rpm离心2分钟, 移去上清液。

2.12 分别加入250 μ L 50 mmol/L 2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid (MES) pH5.0。

2.13 15000rpm离心2分钟, 移去上清液。

2.14 重复2.12, 2.13, 马上进行下步实验。

3. 交联、封闭和储存

3.1 取20 μ g已处理好的AFP一抗加入到已活化的33号微球中; 取20 μ g已处理好的AFP抗原加入到已活化的51号微球中。旋涡混旋仪混悬20秒。

3.2 避光、37 $^{\circ}$ C 反应2小时, 每十五分钟混匀一次。

3.3 分别加入1ml PBS-TBN, 旋涡混旋仪混悬20秒, 15000rpm离心2分钟。移去上清液(PBS-TBN的组成为10mmol/L pH7.4的磷酸盐缓冲液、0.02%吐温20、1mg/ml的小牛血清白蛋白和0.05%叠氮钠)。

3.4 分别加入500 μ L PBS-TBN, 旋涡混旋仪混悬20秒, 15000rpm离心2分钟。移去上清液。

3.5 分别加入500 μ L PBS-TBN, 旋涡混旋仪混悬20秒。

3.6 用显微镜计数两种微球的浓度分别是：

33号： 1×10^6 个/ml, 51号： 1×10^6 个/ml 。

3.7 2-8℃避光保存。

4. 二抗的生物素标记

4.1 二抗预处理

二抗中含有叠氮钠、甘氨酸等含氨基的小分子和其它小分子	用pH7.4的1×PBS充分透析。
二抗中含有牛血清白蛋白等大分子	Protein A柱或其它柱子纯化。
二抗浓度标定	分光光度计测其OD280 (1OD280相当于0.7mg/ml单克隆抗体)。最终用1×PBS, pH7.4将浓度定于2mg/ml (浓缩使用Pall公司脱盐离心柱)。

4.2 生物素标记反应

取上述预处理的AFP二抗10 μL, 加入25 μL的1mg/ml 生物素 DMSO溶液, 混匀, 4℃冰箱避光反应2小时。透析过夜备用。

5. 抗原标准品(B液)的配制

用pH7.4的磷酸盐缓冲液配制浓度为0ng/ml、5ng/ml、20ng/ml、200ng/ml、500ng/ml的AFP标准品液。

6. A液的配制

取上述标记了一抗的33号微球加入到1ml pH7.4的磷酸盐缓冲液中, 使溶液中约含10000个微球。

7. 二抗-PE(C液)的配制

取上述标记好生物素 AFP二抗, 加入pH7.4 磷酸盐缓冲液中, 二抗终浓度为5 μg/ml, 同时加入链亲和素标记的PE总浓度为60 μg/ml, 二抗-PE总体积为5ml, 4℃避光保存备用。

8. H液的配制

取上述标记了AFP抗原的51号微球加入到1ml pH7.4的磷酸盐缓冲液中, 使

1ml溶液中约含10000个微球。

9. HD-HOOK效应的指示和人血清中AFP的检测

9.1 收集AFP检测高值 $>20000\text{ng/ml}$ 的人血清样本5份和AFP检测高值 $<1000\text{ng/ml}$ 的人血清样本5份, 2ml/份, 5000rpmX5min, 取上清, 备用。

9.2 在96孔反应板的5个反应孔内依次加入5个不同浓度的B液各 $5\mu\text{L}$, 每孔再分别加入 $25\mu\text{L}$ A液及 $25\mu\text{L}$ C液, 混匀; 另选10孔分别加入10种上述人血清样本 $5\mu\text{L}$ /孔和 $25\mu\text{L}$ /孔A液及 $25\mu\text{L}$ /孔C液, 混匀; 于 37°C 避光孵箱反应30mins, 然后加入 $5\mu\text{L}$ /孔的H液, 混匀; 于 37°C 避光孵箱反应10mins。

9.3 孵育完成后于旋涡混旋仪上充分混匀, 在Luminex100上读数。

9.4 检测结果如下:

实验检测结果			
	样本或已知浓度	检测微球(33#)	HD-HOOK指示微球(51#)
标准品	0ng/ml	56.7	11205.5
	5ng/ml	250.8	11304
	20ng/ml	768.8	11098
	200ng/ml	4829.5	11196
	500ng/ml	7439.5	11245
检测样品	样品 1	7945	10020
	样品 2	5678.5	154
	样品 3	6745.5	230
	样品 4	3725	145
	样品 5	9875	285
	样品 6	115.0	12456
	样品 7	3478.0	12378
	样品 8	257.0	13795
	样品 9	6473.0	11245
	样品 10	578.5	11659.5

9.5 实验结果判断

51#微球(HD-HOOK指示微球)在不同抗原标准品浓度时荧光信号数值的平均值为11209.7, 2SD为151.0, 故指示微球的正常值为11360.7; 样品 1到5的反应系统中指示微球荧光信号值均低于指示微球正常值的90%(10224.63), 因此指示样品1到5的血清样本有HD-HOOK效应。其中样品1有轻微H00K效应, 导致读

数偏低，而样品2-4有显著的HOOK效应(低于正常值的10%)，导致读数严重偏低，造成假阴性。而样品6到10为HD-HOOK阴性(即测定的数值是可信的，可排除HD-HOOK效应引起的假阴性)。

实施例5

5种肿瘤标志物并行检测(带HD-HOOK指示)

基本上按照实施例1和4的步骤，进行带HD-HOOK指示的5种肿瘤标志物并行检测，不同点在于选用SCCA、CA125、CA15-3、CEA、 β -HCG作为待检测的抗原。针对每一种使用一种检测微球和HD-HOOK指示微球，并且5种检测微球和5种指示微球的具有不同的编码荧光。

另外，混合抗原标准(B液)的配制浓度如下：

TM	STD0	STD1	STD2	STD3	STD 4	STD 5
SCCA	0ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	200ng/ml	1000ng/ml	2000ng/ml
CA125	0U/ml	40U/ml	200U/ml	600U/ml	1200U/ml	2400U/ml
CA15-3	0U/ml	1U/ml	10U/ml	100U/ml	400U/ml	800U/ml
CEA	0ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	200ng/ml	1200ng/ml	2400ng/ml
β -HCG	0ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	200ng/ml	1000ng/ml	2000ng/ml

用pH7.4的磷酸盐缓冲液按上表配制B液。

另外，A液、C液和H液的配制同实施例1和2。

8.3用制备的微球对病人血清消化道肿瘤标志物含量进行检测，方法同实施例2。

检测结果见下表：

样品	β -HCG	β -HCG-HOOK指示微球 荧光值	CA153	CA153-HOOK指示微球 荧光值	CA125	CA125-HOOK指示微球 荧光值	SCCA	SCCA-HOOK指示微球 荧光值	CEA	CEA-HOOK指示微球 荧光值
<i>STD0</i>	<i>51</i>	<i>11110</i>	<i>79</i>	<i>12457</i>	<i>64</i>	<i>5421</i>	<i>31.5</i>	<i>7543</i>	<i>47</i>	<i>9534</i>
<i>STD1</i>	<i>130</i>	<i>11045</i>	<i>343</i>	<i>11789</i>	<i>128</i>	<i>4978</i>	<i>145</i>	<i>7478</i>	<i>107</i>	<i>9745</i>
<i>STD2</i>	<i>300.5</i>	<i>9876</i>	<i>442</i>	<i>13121</i>	<i>329.5</i>	<i>5246</i>	<i>410.5</i>	<i>7369</i>	<i>244.5</i>	<i>9324</i>
<i>STD3</i>	<i>2256</i>	<i>11132</i>	<i>2145</i>	<i>12346</i>	<i>751</i>	<i>5347</i>	<i>2400</i>	<i>7274</i>	<i>2147</i>	<i>9218</i>
<i>STD4</i>	<i>5087.5</i>	<i>11095</i>	<i>6257</i>	<i>11975</i>	<i>1112.5</i>	<i>5124</i>	<i>3535</i>	<i>7345</i>	<i>5495</i>	<i>9635</i>
<i>STD5</i>	<i>9546.5</i>	<i>11115</i>	<i>12375</i>	<i>12678</i>	<i>5325</i>	<i>5074</i>	<i>7365</i>	<i>7510</i>	<i>9372.5</i>	<i>9415</i>
HOOK指示微球正常 荧光值	11896.0		13356.33		5537.13		7631.7		9872.82	
样品1	81	12431	598	12475	125	5142	97	7542	411	9547
样品2	5748	11456	35	13456	116.5	5147	37	7568	1419	9684
样品3	68.5	11345	1271	12695	113.5	5263	4570	7648	150	9387
样品4	66	12785	3915	15437	61	5347	64	7489	955	9574
样品5	47.5	13456	102	14289	2154	5289	59	7398	1784	9471
样品6	7421	11873	10471	15432	164.5	5478	120	7345	7459	<u>7216</u>
样品7	124	13452	98	13487	4712	<u>3621</u>	5741	<u>5487</u>	421	9350
样品8	5321	<u>5483</u>	7962	<u>6425</u>	458	<u>1425</u>	75	7456	58	9415
样品9	75	14782	59	13756	982	<u>1578</u>	645	<u>1459</u>	6579	<u>5215</u>
样品10	8035	<u>7425</u>	245	<u>1457</u>	3545	5374	3785	<u>2478</u>	1463	<u>987</u>

检测结果判断：表格中粗斜体部分为标准品检测结果，其他为样本检测结果，带下划线的数值表明样品有HOOK效应。

实施例 6

5种肿瘤标志物并行检测(带HD-HOOK指示和HAMA指示)

重复实施例3和5的过程，不同点在于同时用31号检测微球(33#)、46号HAMA指示微球、51号HD-HOOK指示微球对实施例3和5的20个样品进行并行检测。

结果表明，各微球的检测没有相互干扰，可以同时准确地检测出具有HAMA反应的样品以及具有HD-HOOK效应样品。

实施例 7

检测试剂盒

将实施例1-2中制备的33号检测微球和46号HAMA指示微球分别装于容器中，制得一可指示HAMA反应的试剂盒。

此外，还可将实施例4中制备的51号HD-HOOK指示微球装于另一容器中，以便指示HD-HOOK效应，从而制得同时指示HD-HOOK效应的检测试剂盒。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

专利名称(译)	一种指示免疫反应中异嗜性抗体干扰的方法		
公开(公告)号	CN1888904A	公开(公告)日	2007-01-03
申请号	CN200510027165.9	申请日	2005-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	上海透景生命科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海透景生命科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海透景生命科技有限公司		
[标]发明人	姚见儿 周雪雷 罗朝领 茅柳娟		
发明人	姚见儿 周雪雷 罗朝领 茅柳娟		
IPC分类号	G01N33/538 G01N33/543		
代理人(译)	徐迅		
其他公开文献	CN1888904B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及体外检测技术领域，具体地涉及一种在免疫检测样本时指示异嗜性抗体干扰的方法和相应的试剂盒。本发明可提高双位点夹心免疫测定的准确性，同时降低双位点夹心免疫测定的假阳性率。

表 1:混合抗原标准质控品溶液配制表

肿瘤标志物TM	STD0	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	质控1	质控2
1	0	C ₁₋₁	C ₁₋₂	C ₁₋₃	C ₁₋₄	C ₁₋₅	C ₁₋₆	C ₁₋₇
2	0	C ₂₋₁	C ₂₋₂	C ₂₋₃	C ₂₋₄	C ₂₋₅	C ₂₋₆	C ₂₋₇
3	0	C ₃₋₁	C ₃₋₂	C ₃₋₃	C ₃₋₄	C ₃₋₅	C ₃₋₆	C ₃₋₇
4	0	C ₄₋₁	C ₄₋₂	C ₄₋₃	C ₄₋₄	C ₄₋₅	C ₄₋₆	C ₄₋₇
5	0	C ₅₋₁	C ₅₋₂	C ₅₋₃	C ₅₋₄	C ₅₋₅	C ₅₋₆	C ₅₋₇
6	0	C ₆₋₁	C ₆₋₂	C ₆₋₃	C ₆₋₄	C ₆₋₅	C ₆₋₆	C ₆₋₇