



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1888904 B

(45) 授权公告日 2010.09.29

(21) 申请号 200510027165.9

(22) 申请日 2005.06.27

(73) 专利权人 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 31100

代理人 徐迅

(51) Int. Cl.

G01N 33/538(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

(56) 对比文件

JP 57181695 A, 1982.11.09, 全文.

审查员 王丽华

权利要求书 3 页 说明书 24 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和试剂盒

(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,

$\text{anti}_1\text{X-bead}$  (I)

式中,“X”表示目标抗原,“ $\text{anti}_1\text{X}$ ”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,

$\text{Z-bead}''$  (III)

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即正常值比较,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,

$\text{X-bead}'$  (II)

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,  
 $\text{anti}_1\text{X-bead}$  (I)

式中,“X”表示目标抗原,“ $\text{anti}_1\text{X}$ ”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,

$Z\text{-bead''}$  (III)

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,

X-bead' (II)

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和试剂盒

### 技术领域

[0001] 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

[0002] 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。

[0003] 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. 1995Feb ;16(2) :66-75.)。

[0004] 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。

[0005] 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。

[0006] 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.)

[0007] 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)。

[0008] 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。

[0009] 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

[0010] 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。

[0011] 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。

[0012] 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：

[0013] (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，

[0014] 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，

[0015] anti<sub>1</sub>X-bead (I)

[0016] 式中，“X”表示目标抗原，“anti<sub>1</sub>X”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，

[0017] 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，

[0018] 从而形成“第二抗体 - 抗原 - 第一抗体 - 微球”四元复合物；

[0019] 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，

[0020] Z-bead" (III)

[0021] 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，

[0022] 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；

[0023] (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；

[0024] 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。

[0025] 在另一优选例中，在步骤 (a) 和 (b) 之间，还包括步骤：

[0026] (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，

[0027] X-bead' (II)

[0028] 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,

[0029] 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

[0030] (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。

[0031] 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。

[0032] 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:

[0033] (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;

[0034] (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;

[0035] (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。

[0036] 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:

[0037] (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;

[0038] (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;

[0039] (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。

[0040] 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。

[0041] 在另一优选例中,所述的抗原是蛋白质。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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:

[0045] (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,

[0046] anti<sub>1</sub>X-bead (I)

[0047] 式中,“X”表示目标抗原,“anti<sub>1</sub>X”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,

[0048] (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,

[0049] (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,

[0050] Z-bead'' (III)

[0051] 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。

[0052] 在另一优选例中,所述的试剂盒还包括:

[0053] (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,

[0054] X-bead' (II)

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 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

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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( $\beta$ -HCG)。

[0064] 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。

[0065] 基本原理

[0066] (a) 双抗夹心法的原理

[0067] 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。

[0068] (b) Luminex xMAP 法的原理

[0069] 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。

[0070] 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:

[0071] 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,

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] (c) 指示异嗜性干扰的原理

[0076] 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:

[0077] ① 1 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,

[0078] ② 二抗与血清或标准质控品液中相应的抗原结合,

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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:

[0082] ① 2 号 Beads 上的一抗与血清样本中的 HAMA 抗体结合;

[0083] ② 鼠源的任意二抗与血清样本中的 HAMA 抗体结合,

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 第一抗体 - 微球的二元复合物 (检测微球)

[0092] 在本发明中, 第一抗体 - 微球的二元复合物具有式 (I) 结构:

[0093]  $\text{anti}_1\text{X-bead}$  (I)

[0094] 式中, X 表示肿瘤标志物,  $\text{anti}_1\text{X}$  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;

[0095] 一抗与微球的交联

[0096] 针对不同肿瘤标志物抗原的一抗 ( $\text{anti}_1\text{X}$ , 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](http://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  $\text{anti}_1\text{X-Beads}$ 。

[0097] 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)。

[0098] 鼠源抗体 - 微球的二元复合物 (HAMA 指示微球)

[0099] 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。

[0100] 二抗的标记

[0101] 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。

[0102] 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 ( $\text{anti}_2\text{X}$ , X 代表肿瘤标志物抗原) 透析纯化后加入生物素二甲基亚砜 (DMSO) 溶液, 避光反应, 透析去除未反应的生物素, 保存备用。

[0103] 分别取针对不同肿瘤标志物抗原的生物素标记的  $\text{anti}_2\text{X}$ , 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  $\text{PE-anti}_2\text{X}$ , 其中 PE 表示藻红蛋白), 得到第二抗体溶液 (简称为 C 液)。

[0104] 质控或标准

[0105] 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。

[0106] 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。

[0107] 例如, 抗原标准 ( $\text{STD}_n$ ,  $n = 0 \sim 5$ ) 和质控品 (质控 1、质控 2) 溶液的配制可按下表配制

[0108] 表 1: 混合抗原标准质控品溶液配制表

[0109]

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	$C_{6-1}$	$C_{6-2}$	$C_{6-3}$	$C_{6-4}$	$C_{6-5}$	$C_{6-6}$	$C_{6-7}$

[0110]

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

[0111] 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)。

[0112] 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)。

[0113] 2.5HAMA 血清样本的判断及正常血清样本中某种抗原的定量检测

[0114] 将 A、B 和 C 液混匀, $37^\circ\text{C}$  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;

[0115] 将 A、人血清样本和 C 液混匀, $37^\circ\text{C}$  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。

[0116] (d) 指示 HD-HOOK 方法的原理

[0117] 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。

[0118] 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。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 抗原-微球的二元复合物(HD-HOOK 指示微球)

[0124] 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)。

[0125] 样品的检测

[0126] 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。

[0127] (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)

[0128] 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;

[0129] 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。

[0130] B. 指示 HD-HOOK 效应

[0131] (b1) 测定无 HD-HOOK 效应时 2 号微球的荧光信号值

[0132] 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);

[0133] (b2)HD-HOOK 效应的指示和样本中抗原的定量检测

[0134] 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。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 本发明的主要优点在于:

[0138] (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。

[0139] (b) 操作简单。

[0140] (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。

[0141] 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适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。

[0142] 实施例

[0143] 材料:

[0144] 抗原和抗体来源:

[0145]

原料	批号 / 货号	厂商
CA125- 抗体	M86306M(groupA)	Biodesign
CA125- 抗体	M86294M(groupB)	Biodesign

原料	批号 / 货号	厂商
CA125Ag	30AC20	Fitzgerald
CA153- 抗体	M37901M(clone695)	Biodesign
CA153- 抗体	M37552M(clone552)	Biodesign
原料	批号 / 货号	厂商
CA153Ag	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
CA19-9Ag	30AC14	Fitzgerald
NSE- 抗体	9601	Medix
NSE- 抗体	9602	Medix
NSE Ag	30-AN10	Fitzgerald
$\beta$ -HCG- 抗体	5012	Medix
$\beta$ -HCG- 抗体	5006	Medix
$\beta$ -HCG Ag	A81455M	Biodesign
CA242- 抗体	101-01	Canag

原料	批号 / 货号	厂商
CA242Ag		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		Biodes ign
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

[0146] 微球 (Beads) 购自美国 Luminex 公司, 规格为  $5.0 \mu\text{m}$ , 微球表面为  $-\text{COOH}$  修饰, 其他常规试剂为市售品。

[0147] 实施例 1:

[0148] 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)

[0149] 1. 准备

[0150] 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。

[0151] 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)。

[0152] 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)。

[0153] 2. 微球 (Beads) 活化

[0154] 2.1 微球原液旋涡混旋仪混悬 20 秒, 移取  $200 \mu\text{L}$  微球 (相当于  $2.5 \times 10^6$  微球) 于 1.5ml 聚丙烯离心管中。

[0155] 2.2 15000rpm 离心 2 分钟 (设置 3 分钟), 移去上清液。

[0156] 2.3 加入  $100 \mu\text{L}$  蒸馏水, 旋涡混旋仪混悬 20 秒, 15000rpm 离心 2 分钟, 移去上清液。

[0157] 2.4 重复 2.3。

[0158] 2.5 加入  $80 \mu\text{L}$  0.1mol/L 磷酸缓冲液 (PBS), pH 6.2, 旋涡混旋仪混悬 20 秒。

[0159] 2.6 用蒸馏水将 (NHSS) 稀释至 50mg/ml。 (现配现用)

[0160] 2.7 取  $10 \mu\text{L}$  50mg/ml (NHSS) 加到 Beads 溶液中, 旋涡混旋仪混悬 20 秒。

[0161] 2.8 用蒸馏水将 EDC 稀释至 50mg/ml。 (现配现用)

[0162] 2.9 取  $10 \mu\text{L}$  50mg/ml EDC 加到 Beads 溶液中, 旋涡混旋仪混悬 20 秒。

[0163] 2.10 避光、 $37^\circ\text{C}$  孵育 20 分钟。

[0164] 2.11 15000rpm 离心 2 分钟, 移去上清液。

- [0165] 2. 12 加入 250  $\mu$  L 50mmol/L 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES) (MES) pH5. 0。
- [0166] 2. 13 15000rpm 离心 2 分钟, 移去上清液。
- [0167] 2. 14 重复 2. 12, 2. 13, 马上进行下步实验。
- [0168] 3. 交联、封闭和储存
- [0169] 3. 1 加 20  $\mu$  g 已处理的一抗到已活化的 Beads 中, 旋涡混旋仪混悬 20 秒。
- [0170] 3. 2 避光、37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时, 每十五分钟混匀一次。
- [0171] 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)。
- [0172] 3. 4 加入 500  $\mu$  L PBS-TBN, 旋涡混旋仪混悬 20 秒, 15000rpm 离心 2 分钟。移去上清液。
- [0173] 3. 5 加入 500  $\mu$  L PBS-TBN, 旋涡混旋仪混悬 20 秒。
- [0174] 3. 6 2-8 $^{\circ}$ C 避光保存。
- [0175] 4. 二抗 (anti<sub>2</sub>X) 的生物素标记
- [0176] 4. 1 二抗预处理
- [0177]

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 $\times$ 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 OD <sub>280</sub> (10D <sub>280</sub> 相当于 0. 7mg/ml 单克隆抗体)。最终用 1 $\times$ PBS, pH7. 4 将浓度定于 2mg/ml (浓缩使用 Pall 公司脱盐离心柱)。

- [0178] 4. 2 生物素标记反应
- [0179] 取上述预处理的二抗 25  $\mu$  L, 加入 25  $\mu$  L 的 1mg/ml NHSS-biotin DMSO 溶液, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光反应 2 小时。
- [0180] 5. 混合抗原标准、质控品 (B 液) 的配制
- [0181]

TM	STD0	STD1	STD2	STD 3	STD 4	质控 1	质控 2
$\beta$ -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

TM	STD0	STD1	STD2	STD 3	STD 4	质控 1	质控 2
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

[0182] 用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液按上表配制 B 液。

[0183] 6. A 液的配制

[0184] 取 10 种不同 Beads 的下列 anti<sub>1</sub>β-HCG-Beads, anti<sub>1</sub>PEree-PSA-Beads, anti<sub>1</sub>total-PSA-Beads, anti<sub>1</sub>NSE-Beads, anti<sub>1</sub>CA15-3-Beads, anti<sub>1</sub>CA19-9-Beads, anti<sub>1</sub>CA125-Beads, anti<sub>1</sub>CA242-Beads, anti<sub>1</sub>APEP-Beads, anti<sub>1</sub>CEA-Beads 溶液,按  $4 \times 10^5$  个 / 种混合,加在 pH7.4PBS 中,体积为 5ml,4℃ 避光保存备用。

[0185] 7. 混合二抗 -PE 混合物 (C 液) 配制

[0186] 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 pH7.4PBS 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。

[0187] 8. 病人血清消化道肿瘤标志物含量检测

[0188] 8.1 收集病人血样 10 份 2ml / 份,5000rpmX5min,取上清,备用。

[0189] 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。

[0190] 8.3 孵育完成后于旋涡混旋仪上充分混匀在 Luminex100 上读数。

[0191] 8.4 检测结果见下表:

[0192]

位置	样品	$\beta$ -HCG	CA199	f-PSA	t-PSA	NSE	CA125	CA153	CA242	AFP	CEA	总事件
1	20 $\mu$ l-0	51	68	85.5	77	64	64	79	69	33.5	47	1286
2	20 $\mu$ l-1	130	231	88	112	124	48	343	103	75	107	1243
3	20 $\mu$ l-2	300.5	435	338	1006	639.5	329.5	442	160	418.5	244.5	1282
4	20 $\mu$ l-3	2256	678.5	2812	7041.5	1313	751	336	469.5	2417	540	1268
5	20 $\mu$ 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

[0193] 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。

[0194] 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。

[0195] 实施例 2

[0196] 人血清样本 HAMA 反应的指示和对血清中甲胎蛋白 (AFP) 的检测

[0197] 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。

[0198] 1. 准备

[0199] 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。

[0200] 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）。

[0201] 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）。

[0202] 2. 微球 (beads) 活化

[0203] 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  $\mu$ l beads (相当于  $2.5 \times 10^6$  beads) 于两个 1.5ml 聚丙烯离心管中。

[0204] 2.2 15000rpm 离心 2 分钟（设置 3 分钟），移去上清液。

- [0205] 2.3 加入 100  $\mu$  L 蒸馏水,旋涡混旋仪混悬 20 秒,15000rpm 离心 2 分钟,移去上清液。
- [0206] 2.4 重复 2.3。
- [0207] 2.5 在两管中分别加入 80  $\mu$  L 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (PBS),pH 6.2,旋涡混旋仪混悬 20 秒。
- [0208] 2.6 用蒸馏水将 (NHSS) 稀释至 50mg/ml。(现配现用)
- [0209] 2.7 分别取 10  $\mu$  L 50mg/ml (NHSS) 加到两种 beads 溶液中,旋涡混旋仪混悬 20 秒。
- [0210] 2.8 用蒸馏水将 EDC 稀释至 50mg/ml。(现配现用)
- [0211] 2.9 分别取 10  $\mu$  L 50mg/ml EDC 加到两种 beads 溶液中,旋涡混旋仪混悬 20 秒。
- [0212] 2.10 避光、37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。
- [0213] 2.11 15000rpm 离心 2 分钟,移去上清液。
- [0214] 2.12 分别加入 250  $\mu$  L 50mmol/L 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES)pH5.0。
- [0215] 2.13 15000rpm 离心 2 分钟,移去上清液。
- [0216] 2.14 重复 2.12,2.13,马上进行下步实验。
- [0217] 3. 交联、封闭和储存
- [0218] 3.1 取 20  $\mu$  g 已处理好的小鼠 IgG 加入到已活化的 46 号 beads 中;取 20  $\mu$  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。
- [0219] 3.2 避光、37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时,每十五分钟混匀一次。
- [0220] 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)。
- [0221] 3.4 分别加入 500  $\mu$  L PBS-TBN,旋涡混旋仪混悬 20 秒,15000rpm 离心 2 分钟。移去上清液。
- [0222] 3.5 分别加入 500  $\mu$  L PBS-TBN,旋涡混旋仪混悬 20 秒。
- [0223] 3.6 用显微镜计数两种 beads 的浓度分别是:
- [0224] 33 号:1X10<sup>6</sup> 个/ml,46 号:1X10<sup>6</sup> 个/ml。
- [0225] 3.72-8 $^{\circ}$ C 避光保存。
- [0226] 4. 二抗的生物素 (Biotin) 标记
- [0227] 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。
[0228] 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)。

## [0229] 4.2 生物素标记反应

[0230] 取上述预处理的 AFP 二抗 10  $\mu$  L, 加入 25  $\mu$  L 的 1mg/ml NHSS-Biotin DMSO 溶液, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光反应 2 小时。透析过夜备用。

## [0231] 5. 抗原标准品 (B 液) 的配制

[0232] 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。

## [0233] 6. A 液的配制

[0234] 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。

## [0235] 7. 二抗 -PE (C 液) 的配制

[0236] 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  $\mu$  g/ml, 同时加入链亲和素标记的 PE 总浓度为 60  $\mu$  g/ml, 二抗 -PE 总体积为 5ml, 4 $^{\circ}$ C 避光保存备用。

## [0237] 8. HAMA 反应的指示和人血清中 AFP 的检测

[0238] 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。

[0239] 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  $\mu$  L, 每孔再分别加入 25  $\mu$  L A 液及 25  $\mu$  L C 液, 混匀; 另选 10 孔分别加入 10 种上述人血清样本 5  $\mu$  L/孔和 25  $\mu$  L/孔 A 液及 25  $\mu$  L/孔 C 液, 混匀; 于 37 $^{\circ}$ C 避光孵箱反应 40 分钟。

[0240] 8.3 孵育完成后于旋涡混旋仪上充分混匀, 在 Luminex 100 上读数。

[0241] 8.4 检测结果如下:

[0242] 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
[0243] 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

[0244] 8.5 实验结果判断

[0245] 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  $1.5 \times 113$ , 则判断样品 6 到 10 为 HAMA 阴性。

[0246] 实施例 3

[0247] 5 种肿瘤标志物并行检测 (带 HAMA 指示)

[0248] 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、 $\beta$ -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。

[0249] 另外, 混合抗原标准 (B 液) 的配制浓度如下:

[0250]

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

TM	STD1	STD2	STD3	STD4	STD 5	STD 6
CEA	0ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	200ng/ml	1200ng/ml	2400ng/ml
$\beta$ -HCG	0ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	200ng/ml	1000ng/ml	2000ng/ml

[0251] 用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液按上表配制 B 液。

[0252] 另外, A 液、C 液和 H 液的配制同实施例 1 和 2。

[0253] 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:

[0254]

	SCCA	CA125	CA15-3	CEA	$\beta$ -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

[0255] 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。

[0256] 实施例 4

- [0257] 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
- [0258] 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。
- [0259] 1. 准备
- [0260] 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。
- [0261] 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)。
- [0262] 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)。
- [0263] 2. 微球活化
- [0264] 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  $\mu$  L 微球 (相当于  $2.5 \times 10^6$  微球) 于两个 1.5ml 聚丙烯离心管中。
- [0265] 2.2 15000rpm 离心 2 分钟 (设置 3 分钟), 移去上清液。
- [0266] 2.3 加入 100  $\mu$  L 蒸馏水, 旋涡混旋仪混悬 20 秒, 15000rpm 离心 2 分钟, 移去上清液。
- [0267] 2.4 重复 2.3。
- [0268] 2.5 在两管中分别加入 80  $\mu$  L 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (PBS), pH 6.2, 旋涡混旋仪混悬 20 秒。
- [0269] 2.6 用蒸馏水将 (NHSS) 稀释至 50mg/ml。 (现配现用)
- [0270] 2.7 分别取 10  $\mu$  L 50mg/ml (NHSS) 加到两种微球溶液中, 旋涡混旋仪混悬 20 秒。
- [0271] 2.8 用蒸馏水将 EDC 稀释至 50mg/ml。 (现配现用)
- [0272] 2.9 分别取 10  $\mu$  L 50mg/ml EDC 加到两种微球溶液中, 旋涡混旋仪混悬 20 秒。
- [0273] 2.10 避光、37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。
- [0274] 2.11 15000rpm 离心 2 分钟, 移去上清液。
- [0275] 2.12 分别加入 250  $\mu$  L 50mmol/L 2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid (MES) pH5.0。
- [0276] 2.13 15000rpm 离心 2 分钟, 移去上清液。
- [0277] 2.14 重复 2.12, 2.13, 马上进行下步实验。
- [0278] 3. 交联、封闭和储存
- [0279] 3.1 取 20  $\mu$  g 已处理好的 AFP 一抗加入到已活化的 33 号微球中; 取 20  $\mu$  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。
- [0280] 3.2 避光、37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时, 每十五分钟混匀一次。
- [0281] 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)。
- [0282] 3.4 分别加入 500  $\mu$  L PBS-TBN, 旋涡混旋仪混悬 20 秒, 15000rpm 离心 2 分钟。移去上清液。
- [0283] 3.5 分别加入 500  $\mu$  L PBS-TBN, 旋涡混旋仪混悬 20 秒。

[0284] 3.6 用显微镜计数两种微球的浓度分别是：

[0285] 33 号： $1 \times 10^6$  个/ml, 51 号： $1 \times 10^6$  个/ml。

[0286] 3.72-8℃避光保存。

[0287] 4. 二抗的生物素标记

[0288] 4.1 二抗预处理

[0289]

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Pa11公司脱盐离心柱)。

[0290] 4.2 生物素标记反应

[0291] 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。

[0292] 5. 抗原标准品 (B 液) 的配制

[0293] 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。

[0294] 6. A 液的配制

[0295] 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, 使溶液中含 10000 个微球。

[0296] 7. 二抗 -PE (C 液) 的配制

[0297] 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。

[0298] 8. H 液的配制

[0299] 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 溶液中含 10000 个微球。

[0300] 9. HD-HOOK 效应的指示和人血清中 AFP 的检测

[0301] 9.1 收集 AFP 检测高值 > 20000ng/ml 的人血清样本 5 份和 AFP 检测高值 < 1000ng/ml 的人血清样本 5 份, 2ml/份, 5000rpm×5min, 取上清, 备用。

[0302] 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 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 30mins, 然后加入 5 μL/孔的 H 液, 混匀; 于 37℃避光孵箱反应 10mins。

[0303] 9.3 孵育完成后于旋涡混旋仪上充分混匀,在 Luminex100 上读数。

[0304] 9.4 检测结果如下:

[0305]

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

[0306] 9.5 实验结果判断

[0307] 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 有轻微的 HOOK 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)。

[0308] 实施例 5

[0309] 5 种肿瘤标志物并行检测 (带 HD-HOOK 指示)

[0310] 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、 $\beta$ -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。

[0311] 另外, 混合抗原标准 (B 液) 的配制浓度如下:

[0312]

TM	STD0	STD1	STD2	STD3	STD 4	STD5
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
$\beta$ -HCG	0ng/ml	2ng/ml	20ng/ml	200ng/ml	1000ng/ml	2000ng/ml

[0313] 用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液按上表配制 B 液。

[0314] 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。

[0315] 检测结果见下表:

[0316]

样品	$\beta$ -HCG	$\beta$ -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
STD0	51	11110	79	12457	64	5421	31.5	7543	47	9534
STD1	130	11045	343	11789	128	4978	145	7478	107	9745
STD2	300.5	9876	442	13121	329.5	5246	410.5	7369	244.5	9324
STD3	2256	11132	2145	12346	751	5347	2400	7274	2147	9218
STD4	5087.5	11095	6257	11975	1112.5	5124	3535	7345	5495	9635
STD5	9546.5	11115	12375	12678	5325	5074	7365	7510	9372.5	9415
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	7216
样品7	124	13452	98	13487	4712	3621	5741	5487	421	9350
样品8	5321	5483	7962	6425	458	1425	75	7456	58	9415
样品9	75	14782	59	13756	982	1578	645	1459	6579	5215
样品10	8035	7425	245	1457	3545	5374	3785	2478	1463	987

[0317] 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。

[0318] 实施例 6

[0319] 5 种肿瘤标志物并行检测(带 HD-HOOK 指示和 HAMA 指示)

[0320] 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。

[0321] 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。

[0322] 实施例 7

[0323] 检测试剂盒

[0324] 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。

[0325] 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。

[0326] 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和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1888904B</a>	公开(公告)日	2010-09-29
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)	上海透景生命科技股份有限公司		
[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		
审查员(译)	王丽华		
其他公开文献	CN1888904A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

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。

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 <sub>1-1</sub>	C <sub>1-2</sub>	C <sub>1-3</sub>	C <sub>1-4</sub>	C <sub>1-5</sub>	C <sub>1-6</sub>	C <sub>1-7</sub>
2	0	C <sub>2-1</sub>	C <sub>2-2</sub>	C <sub>2-3</sub>	C <sub>2-4</sub>	C <sub>2-5</sub>	C <sub>2-6</sub>	C <sub>2-7</sub>
3	0	C <sub>3-1</sub>	C <sub>3-2</sub>	C <sub>3-3</sub>	C <sub>3-4</sub>	C <sub>3-5</sub>	C <sub>3-6</sub>	C <sub>3-7</sub>
4	0	C <sub>4-1</sub>	C <sub>4-2</sub>	C <sub>4-3</sub>	C <sub>4-4</sub>	C <sub>4-5</sub>	C <sub>4-6</sub>	C <sub>4-7</sub>
5	0	C <sub>5-1</sub>	C <sub>5-2</sub>	C <sub>5-3</sub>	C <sub>5-4</sub>	C <sub>5-5</sub>	C <sub>5-6</sub>	C <sub>5-7</sub>
6	0	C <sub>6-1</sub>	C <sub>6-2</sub>	C <sub>6-3</sub>	C <sub>6-4</sub>	C <sub>6-5</sub>	C <sub>6-6</sub>	C <sub>6-7</sub>