

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/68

G01N 33/577 G01N 33/58



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96192014.9

[43] 授权公告日 2003 年 4 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1105306C

[22] 申请日 1996.1.19 [21] 申请号 96192014.9

[30] 优先权

[32] 1995. 1. 19 [33] FR [31] 95/00597

[86] 国际申请 PCT/FR96/00095 1996.1.19

[87] 国际公布 WO96/22535 法 1996.7.25

[85] 进入国家阶段日期 1997.8.19

[71] 专利权人 比奥拉德 巴斯德公司

地址 法国马恩科奎特

[72] 发明人 C·卡佐拉里 O·弗莱切克斯

B·保

[56] 参考文献

US4598044A 1986.07.01 G01N33/53, G01N33/564,
C12Q1/66

CLIN. CHEM 39/6 1993 - 01 - 01 catherine larue,
charles calzolari, jean - pierre bertinchant, florence leclercq,
robert grolleau, bernard p

审查员 飞竹玲

[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 杜京英

权利要求书 2 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 检测心肌肌钙蛋白 I 的超敏感方法

[57] 摘要

本发明涉及一种利用化学发光检测心肌肌钙蛋白 I 的超敏感方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 样品中心肌肌钙蛋白 I 的夹心型免疫酶检测方法, 其包括以下步骤:
 - a- 使样品与联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体和另一种抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体相接触, 这些抗体天然地或通过协同作用而与心肌肌钙蛋白 I 的解离平衡常数等于或低于 10^{-8} M,
 - b- 通过加入由二酰基肼或 1,2-二氧杂丁环衍生来的化学发光底物进行酶促显色,
 - c- 通过直接读取所获得的光信号对心肌肌钙蛋白 I 进行定量。
2. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述抗体与心肌肌钙蛋白 I 的解离平衡常数等于或低于 10^{-9} M。
3. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其包括下述步骤:
 - a- 使待测样品或标准品与一联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体和任选地结合于固相载体的另一抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体同时接触,
 - b- 将反应混合物进行孵育,
 - c- 然后洗涤,
 - d- 通过加入由二酰基肼或由 1,2-二氧杂丁环衍生来的化学发光底物进行酶促显色,
 - e- 通过直接读取所获得的光信号评价待测样品中或标准品中存在的心肌肌钙蛋白 I 的量。
4. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其包括以下步骤:
 - a- 使待测样品或标准品
 - …或者首先与联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体接触, 经孵育后, 再与另一任选地结合于一固相载体的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体接触, 然后再次孵育,
 - …或首先与任选地结合于一固相载体的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体接触, 经孵育和任选地洗涤后, 再与联有酶标记物的第二种抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体相接触, 再次孵育,
 - b- 然后任选地洗涤反应混合物,

c-通过加入由二酰基肼或由1,2-二氧杂丁环衍生来的化学发光底物进行酶促显色,

d-通过直接读取所获得的光信号评价待测样品中或标准品中存在的心肌肌钙蛋白 I 的量。

5. 根据权利要求1或2的方法,其中的化学发光底物是鲁米诺。

6. 根据权利要求1或2的方法,其中的化学发光底物是鲁米根(lumigen)PPD。

7. 根据权利要求1或2的方法,其中所用的抗肌钙蛋白 I 单克隆抗体是具有小鼠单克隆抗体 11E12 和 8E1 特点的单克隆抗体。

8. 根据权利要求1或2的方法,其中与抗肌钙蛋白 I 单克隆抗体相联的酶标记物是碱性磷酸酶或过氧化物酶。

9. 根据权利要求1或2的方法,其中联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体是一抗心肌肌钙蛋白单克隆抗体-过氧化物酶的结合体,所说的抗体具有小鼠单克隆抗体 11E12 的特点,化学发光底物是二酰基肼的衍生物。

10. 根据权利要求1或2的方法,其中联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体是抗心肌肌钙蛋白单克隆抗体-碱性磷酸酶的结合体,所说的抗体具有小鼠单克隆抗体 8E1 的特点,化学发光底物是1,2-二氧杂丁环的衍生物。

11. 根据权利要求1或2的方法,其中的化学发光底物是鲁米诺和4-碘苯酚的混合物。

12. 根据权利要求1或2的方法,其中待测样品或标准品在PH为5到6之间的微酸性条件下与联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体相接触,并任选地与另一抗心肌肌钙蛋白 I 的抗体接触。

13. 根据权利要求12的方法,其中所述微酸性 pH 为 pH 5.4-pH 5.7。

14. 根据权利要求1或2的方法,其在显色之前所使用的洗涤液 PH 值等于 6.8 到 8, 温度在 2℃ 到 37℃ 之间。

15. 根据权利要求14的方法,其中所述温度在 2℃ 到 10℃ 之间。

检测心肌肌钙蛋白 I 的超敏感方法

本发明涉及一种利用化学发光检测心肌肌钙蛋白 I 的超敏感方法。

心肌梗死 (MIF) 依然是一种医学急症, 而且仍是全球范围内死亡和心血管病发病的主要原因。

在所有的病例中, 所采用的疗法都是为保护心肌组织免于发生不可逆性坏死而设计的。目前, 新的治疗措施, 如溶栓或一线血管成形术, 使得快速恢复冠脉循环以限制坏死区域的大小, 降低死亡率和发病率成为可能。

这些治疗工具都是在临床征象出现后应用的越早就越有效。面对这种病状的临床医生应该能有日益有效的诊断工具。

血清蛋白特别是酶的检测已经成为诊断心肌梗死和评价再灌注成功或失败的一个决定性组成部分。

已知肌钙蛋白是一种肌原纤维蛋白复合体, 由肌钙蛋白 C, I 和 T 三种蛋白组成。

心肌肌钙蛋白是一种只存在于心肌中的可收缩蛋白 [Wilkinson J.M. 等, 《自然》(Nature) (1978), 271, 31 - 35 页; Wade R. 等, Genomics (1990), 7, 346-357 页]。

它的生理学作用是在缺少钙离子的条件下抑制肌动蛋白 - 肌球蛋白复合体的 ATP 酶活性, 从而抑制肌肉收缩 [Perry S.V., Biochem. Soc. Trans (1979), 7, 593-617 页]。

在由于为心脏供血的动脉 (冠状动脉) 中的一支堵塞而引起的梗死过程中, 局部缺血出现后, 接着便出现心肌的坏死, 这就导致心肌细胞的破坏和心肌肌钙蛋白 I 被释放入血。因此, 肌钙蛋白 I 是心肌梗死的特异性标志。

于是, 近来肌钙蛋白 I 的检测已被推荐用于心肌梗死的早期诊断 [《美国心脏学杂志》(Am. Heart J.) (1981), 110, 1334-1344 页; 《分子免疫》(Molecular Immunology) (1992), 29 (2), 271 - 278 页]。

此外, 目前认为患有代表着心肌缺血关键阶段的环稳定型心绞痛患者可能有较高的风险发生心肌梗死和猝死。对这类患者的尸检研究表明, 在这些并发症出现之前往往有心肌的微梗死发生 [Davies M. J. 等, 《循环》(Circulation) (1985), 71, 699-708 页]。

因而, 心肌肌钙蛋白的检测对于在不稳定型心绞痛患者中发现危险对象, 特别是用于微梗死的诊断都显得非常有利。

不仅如此, 设想在对溶栓疗法和心脏外科手术(冠状动脉搭桥术、血管成形术和类似的手术)的术后监测过程中, 检测心肌肌钙蛋白 I 可用来确定再灌注的成功或失败。肌钙蛋白 I 的检测也可用于心脏移植排斥反应的诊断和对如使用蒽环类抗生素的具有心脏毒性的治疗的监测。

目前已经知道免疫酶方法可以用来检测肌钙蛋白 I。Larue C. 等[《分子免疫》(1992), 29(2), 271-278 页; 《临床化学》(1993) 39/6, 972-979 页]。描述了一种利用产色底物四甲基联苯胺(TMB)-过氧化氢进行酶促显色的夹心型免疫酶检测法。显色后, 于 450nm 波长处读取光吸收值, 根据作者的报告, 其检出限为 0.2 μ g/l。

由 Bodor 等描述的另一种肌钙蛋白 I 的检测方法使得检出 1.5 到 3.1 μ g/l 浓度水平的肌钙蛋白 I 成为可能 [Bodor 等, 《临床化学》(Clin. Chem.) (1992), 38/11, 2203-2214 页; Adams J. 等, 《循环》(1993), 88(1), 101-106 页]。此方法用一种碱性磷酸酶的显色底物对硝基苯基磷酸进行酶促显色, 并在 405nm 波长处进行检测。

利用这些方法已经能够证明在心肌梗死临床征象出现 4 小时后患者血浆中有肌钙蛋白 I 存在 [Adams J. 等, 《循环》(1993), 88(1), 101-106 页]。

然而, 这些免疫酶检测法与那些如以放射性检测为基础的复杂且难以应用的检测方法比起来, 其灵敏度要低得多 [《美国心脏学杂志》(1987 年 6 月) 113(6), 1333-1334 页]。

目前已知胍的环状衍生物, 特别是二酰基胍可被用作化学发光剂 [Roswell 等, 《酶学方法》(Methods Enzymol.) (1978), 57, 409-423 页]。这些试剂已经被设想或已被用于某些免疫酶检测之中 [Thrope G. H. G. 等《临床化学》(1985), 31, 1335-1341 页; Thrope G. H. G. 等《酶学方法》

(1988), 133, 331 - 353 页] (申请 WO 88/00695)。另外, 利用 1, 2-二氧杂丁环衍生物的酶促分解而进行的化学发光检测方法也已被了解。

然而, 众所周知, 因为本领域的专业人员面临许多限制灵敏检测方法发展的因素 (不同的分析成分尤其是抗原/抗体系统的亲和力、酶标记物、底物、检测的原理和类似的因素), 所以对这些试剂的使用需要进行深入细致的研究。事实上, 合适地选择不同的试剂和检测条件是必须的。显然当测量的本底 (本底噪声或空白本底) 较高或其信/噪比太低时不可能想象一个即灵敏又特异的检测。准确地说, 测量的本底取决于试剂和检测条件的选择。

现已发现, 利用某种类型的抗心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体和进行酶促显色适宜的底物以非常高的灵敏度对肌钙蛋白 I 进行化学发光检测是可行的。实际上, 利用本发明的方法达到 2 到 5ng/l 水平的灵敏度是完全可能的, 这意味着其灵敏度比迄今所知的检测肌钙蛋白 I 的最灵敏的免疫酶检测法的灵敏度要高出约 40 到 1500 倍。

本发明涉及一种允许定量检测心肌肌钙蛋白 I 的夹心型免疫酶检测法, 其中用于酶促显色的底物选自大量化学发光底物, 特别是二酰基胍或 1, 2-二氧杂丁环的衍生物。

本发明的目的更确切地是一种心肌肌钙蛋白 I 的夹心型免疫酶检测方法:

... 它利用两个抗心肌肌钙蛋白的单克隆抗体, 其中之一联有酶标记物, 这两种单克隆抗体天然地或通过协同作用而与心肌肌钙蛋白 I 具有较高的亲和力, 其解离平衡常数等于或低于 $10^{-8}M$, 优选等于或低于 $10^{-9}M$, 及
... 它用二酰基胍的衍生物或 1, 2-二氧杂丁环的衍生物作为酶促显色的化学发光底物。

实际上, 本发明涉及一种心肌肌钙蛋白 I 的夹心型免疫酶定量检测法, 其中使待测样品或标准品同时与一联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体和另一抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体接触, 这两种单克隆抗体天然地或通过协同作用与心肌肌钙蛋白 I 的解离平衡常数等于或低于 $10^{-8}M$, 优选等于或低于 $10^{-9}M$, 然后, 通过在其中加入选择的化学发光底物进行酶促显色, 继而直接读取所获得的光信号。

本发明的方法可以利用手工系统（诊断检测试剂盒）或自动化系统来完成。根据不同的实施方案，一步检测法或两步检测法都是可行的。

对于一步检测法，使待测样品或标准品与一联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体和选择性地固定于一固相载体的另一抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体同时接触。经孵育和洗涤后，进行酶促显色。根据发明，这一步是通过加入衍生自二酰基肼或 1,2-二氧杂丁环的化学发光底物来实现。通过直接读取所得的光信号来评价待测样品或标准品中含有的心肌肌钙蛋白 I 的量。

对于两步检测法，待测样品或标准品

…或者首先与联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体相接触，经过孵育后再与选择性地固定于一固相载体的另一抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体相接触，然后再次进行孵育。

…或者首先与选择性地固定于一固相载体的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体相接触，经过孵育和非必须的洗涤后，再与另一联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体相接触，然后再次进行孵育。

在这两种情况下，经过非必须的洗涤后，根据本发明都通过加入衍生自二酰基肼或 1,2-二氧杂丁环的化学发光底物来进行酶促显色。通过直接读取所得的光信号来评价待测样品或标准品中含有的心肌肌钙蛋白 I 的量。

对于两步检测法，优选首先使待测样品和标准品与联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体接触，经孵育后再使之与固定于一固相载体的另一抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体接触，然后再次进行孵育。

作为抗心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体，任何与心肌肌钙蛋白 I 具有高亲和力且解离平衡常数等于或低于 10^{-8} M，优选等于或低于 10^{-9} M 的单克隆抗体都可以使用。也可以利用任何对于结合心肌肌钙蛋白 I 具有协同作用的成对单克隆抗体，在心肌肌钙蛋白 I 被结合于第二个抗体时，结果这种协同作用增加了第一个单克隆抗体对心肌肌钙蛋白 I 的亲和力（解离平衡常数 $\leq 10^{-8}$ M）。

作为抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体，优选在《临床化学》(1993), 39, p. 972-979 上介绍的小鼠 11E12 和 8E1 单克隆抗体。事实上，令人惊奇的是观察到 11E12 单克隆抗体阻止结合于 8E1 抗体的心肌肌钙蛋白 I

的释放。这个现象已通过利用 PHARMACIA 生产的 BIACORE™ 系统测定在 11E12 抗体存在和不存在的条件下心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 对 8E1 单克隆抗体的结合和解离动力常数而得到证实。

表 I 给出了不同的结果。

表 I

	AcM 8E1: cTnI 克隆	AcM 8E1: cTnI+HE12
解离动力常数 koff (S^{-1})	3.2×10^{-3}	2.8×10^{-4}
结合动力常数 kon ($M^{-1} \times s^{-1}$)	5.8×10^5	4.5×10^5
解离平衡常数 koff/kon (M)	5.7×10^{-9}	0.6×10^{-9}

表 I 的结果证明, 对于 8E1 抗体如果在 11E12 单克隆抗体存在的条件下, 其对心肌肌钙蛋白 I 的亲合力则达 10 倍之高。更确切地说, 解离平衡常数降低至 1/10 (结合动力常数没有变)。因此, 在两个抗心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体与心肌肌钙蛋白的结合过程中存在着协同作用。凭借这种阻止复合物解离的效应, 便可以利用这两种单克隆抗体进行免疫酶检测, 这就是本发明的目的。

关于抗心肌肌钙蛋白单克隆抗体-酶标记物结合体的形成, 碱性磷酸酶或过氧化物酶被用作酶标记物。

当化学发光底物是 1, 2-二氧杂丁环的衍生物时, 使用碱性磷酸酶; 而当化学发光底物是二酰基肼的衍生物时, 使用过氧化物酶。

可以利用单克隆抗体 8E1 或 11E12 来制备与酶标记物相联的结合体。优选制备 11E12 单克隆抗体与过氧化物酶的结合体和 8E1 单克隆抗体与碱性磷酸酶的结合体。

根据不同的实施方案, 把表面结合有抗心肌肌钙蛋白 I 抗体的聚苯乙烯管 (在诊断试剂盒的情况下) 或表面结合有抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的磁性 (特别是铁的) 或其它种类微粒 (自动检测条件下) 作为固相载体

都是可行的。

抗肌钙蛋白 I 单克隆抗体-酶标记物的结合体是按照已知的方法制备的[组织化学细胞化学杂志(J. Histochem. Cytochem.) (1974), 22, 1084-1091 页]。

例如, 被以共价键结合于固相的抗肌钙蛋白 I 单克隆抗体也是按照文献中描述的方法制备的[免疫方法杂志(J. Immunological Methods, (1979), 31, 231-236 页]。

在使待测样品或标准品与抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体和/或联有酶标记物的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体接触的过程中, 反应介质 pH 优选略微偏酸。pH 具体应该在 5 到 6 之间, 更精确地应该在 5.4 到 5.7 之间。可以使用各种适宜的缓冲液或弱有机酸溶液, 如 pH 为 5.2 到 5.4 的琥珀酸溶液或缓冲液, 来调节 pH 值。

血浆或血清与抗肌钙蛋白 I 抗体或标准品之间的孵育在 20℃ 到 37℃ 之间进行, 孵育的时间可在 5 分钟到 20 分钟之间变化。

孵育后, 在 2℃ 到 37℃ 之间, 优选低于 10℃ 进行一次或数次洗涤。关于洗涤, 优选使用 pH6.8 的磷酸盐缓冲液或 pH8 的 Tris 缓冲液。

正如上面指出的, 由二酰基肼的衍生物特别是鲁米诺[5-氨基-2, 3-二氢-1, 4-苯二甲酰肼]或 1,2-二氧杂丁环的衍生物特别是鲁米根(Lumigen) PPD[4-甲氧基-4-(3-磷酸苯基)螺(1, 2-二氧杂丁环-3-金刚烷-2') 钠盐]作为发光底物。含有鲁米诺的发光底物在市场上可以购到, 如由 Amersham 出售的鲁米诺 ECL-免疫检测信号试剂 RPN190 或由 Boehringer Mannheim 出售的鲁米诺 BM 化学发光 ELISA 试剂 1582950。含有鲁米诺和 4-碘苯酚混合物的底物更佳。含有鲁米根 PPD 的发光底物市场上也有出售, 如由 Analytical Luminescence Laboratory 出售的 Lumi-Phos 530。这种试剂含有鲁米根 PPD 和一种化学发光助催化剂-源于荧光素的一种表面活性剂。

酶促显色也是在 20℃ 到 37℃ 之间进行。优选在显色约 2 到 10 分钟后对化学发光进行读数。

利用纯化的人心肌肌钙蛋白 I 标准溶液(标准品)来制备定量检测所用的校准系列[Larue C. 等, 临床化学, (1993), 39, 972-979 页]。

本发明还涉及鲁米诺和鲁米根 PPD 作为化学发光底物,通过夹心型免疫酶方法检测心肌肌钙蛋白 I 的用途,该检测方法利用两种与心肌肌钙蛋白 I 的解离平衡常数等于或低于 10^{-8}M (天然地或通过协同作用) 的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体,两种单克隆抗体中的一种联有酶标记物,具体地,如果底物是鲁米诺则为过氧化物酶,如果底物是鲁米根 PPD 则为碱性磷酸酶。

本发明还涉及一种检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒,它包括两种抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体,其中之一联有酶标记物,且这两种抗体对心肌肌钙蛋白 I 的解离平衡常数天然地或通过协同作用而等于或低于 10^{-9}M ; 它还包括由二酰基胍衍生来的化学发光底物,优选鲁米诺,或由 1,2-二氧杂丁环衍生来的化学发光底物,优选鲁米根 PDD。

下面举出的无任何限定意义的实施例说明本发明。

实施例 1

利用自动化系统检测心肌肌钙蛋白 I

用于免疫酶检测的自动化系统是由 Sanofi Diagnostics Pasteur 出售的 Access® 免疫检测系统。

检测按照以下方式进行: 在每个加样孔内加入待测样品 $50\mu\text{l}$, 4mg/ml 的小鼠免疫球蛋白溶液 $25\mu\text{l}$, 0.1M 的琥珀酸溶液 $10\mu\text{l}$, 小鼠抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 8E1-碱性磷酸酶结合体 ($C = 5\mu\text{g/ml}$) $50\mu\text{l}$ 。

37°C 孵育 5 分钟后,加入表面与小鼠抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 11E12 以共价键结合的铁乳珠 (Rhone Poulenc ref. MI-070/60) $50\mu\text{l}$ 。

将混合物置 37°C 孵育 36 秒,然后在一磁场的帮助下分离铁乳珠。用 pH 为 8 的 Tris 缓冲液冲洗后,加入 $200\mu\text{l}$ Lumi-Phos™ 530 底物。

于 37°C 进行显色,并用发光计测量反应所产生的发光。

总的分析时间是 15 分钟。

使用经纯化的人心肌肌钙蛋白 I 溶液作为校准系列。

优选制备对应 0 到 $50\mu\text{g/l}$ 之间浓度的校准系列。

通过校正曲线评价本方法的灵敏度为 3.5ng/l 。

实施例 II

利用免疫酶试剂盒检测心肌肌钙蛋白 I

在由小鼠抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 8E1 包被的聚苯乙烯管中, 加入含 20 % 到 0.2 % Tween、非特异性小鼠免疫球蛋白和 0.1% Kathon 的琥珀酸盐缓冲液 150 μ l, 小鼠抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 11E12 - 过氧化物酶结合体 50 μ l, 和待测样品及作为校准系列的标准溶液 200 μ l。

以含有 0 到 2 μ g/l 纯化的人心肌肌钙蛋白 I 的血清作为校准系列。

在室温下水平摇动孵育 15 分钟, 然后以下述方式冲洗试管:

- ... 将试管的内容物倒入一容器, 并将试管在吸水纸上擦干,
- ... 加入 1ml 含有 0.1 % Tween 20 和 0.3 % Kathon 的 pH 为 6.8 的 0.1M 磷酸盐缓冲液进行冲洗, 温度最高保持在 8 $^{\circ}$ C。重复这一步 3 次。

冲洗后, 彻底移走冲洗所用的溶液, 用 300 μ l 由 100 份鲁米诺 (BM 化学发光 ELISA 试剂, Boehringer Mannheim) 和 1 份过氧化氢组成的混合物进行酶促显色。

反应介质于室温放置 3 分钟后, 用发光计测定发光。每管精确地读数 30 秒和 10 秒。

这种检测法的灵敏度是 3ng/l。

按照上述的和由 Larue C. 等[分子免疫, (1992), 29 (2), p. 271 - 278; 临床化学, (1993), 39/6, p. 972 - 979]描述的方法, 测量的纯信/噪比 (S - N) / N 在下面表 II 中给出。

表 II

心肌肌钙蛋白 I 的浓度	实施例的方法	Larue 等描述的方法
100ng/l	$\frac{S-B}{B} = \frac{1200-95}{95} = 11.6$	$\frac{S-B}{B} = \frac{150-50}{50} = 2.0$
10ng/l	$\frac{S-B}{B} = \frac{250-95}{95} = 1.6$	$\frac{S-B}{B} = 0 \quad (S=B)$

应用本发明的方法所获得的测量的信/噪比的值证明了其高度的敏感性

和特异性。