



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103547921 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201280019279. 7

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司 72003

(22) 申请日 2012. 04. 17

代理人 王芝艳 吴小瑛

(30) 优先权数据

1106478. 9 2011. 04. 18 GB

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/68(2006. 01)

2013. 10. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2012/050846 2012. 04. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/143709 EN 2012. 10. 26

(71) 申请人 微测试矩阵有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 安德烈亚·克里桑蒂 毛罗·马卡里

弗兰切斯卡·巴尔德拉琦尼

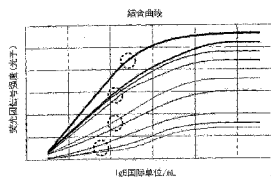
权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

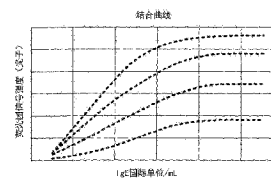
免疫测定

(57) 摘要

本发明提供了一种对测试样品中的多重抗原特异性免疫球蛋白进行定量的方法,该方法包括利用固定于固体支持物上的抗免疫球蛋白抗体、其片段或衍生物的系列稀释液以及免疫球蛋白参比样品的系列稀释液,产生多个结合力曲线。使所述结合力曲线与利用对这些抗原的反应性已知的血清样品针对待测试的每个特定抗原产生的特定剂量反应曲线相匹配,以提供一种校准系统,该系统能够更加精确的分析样品中的抗原特异性免疫球蛋白。本发明还提供了校正设备的方法,所述设备适于检测多重抗原特异性免疫球蛋白与固定在固体支持物上的多重抗原或其片段的结合。本发明还提供了用于上述方法的多重变应原测试系统和试剂盒。



2a



2b

1. 一种对测试样品中的多重抗原特异性免疫球蛋白进行定量的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 分析系列样品与固定于第一固体支持物上的多重重组或纯化抗原成分或其片段的结合,所述样品含有具有已知抗原反应性的免疫球蛋白,

(ii) 将步骤 (i) 中的结合水平与已知反应性进行比较,从而产生针对每种抗原成分或其片段的剂量响应曲线,

(iii) 分析参比免疫球蛋白样品的系列稀释液与固定于第一或第二固体支持物上的抗免疫球蛋白抗体、其片段或衍生物的系列稀释液的结合,其中所述参比免疫球蛋白样品与步骤 (i) 使用的属于相同的免疫球蛋白亚型,具有已知免疫球蛋白总量,

(iv) 将步骤 (iii) 中的结合水平与参比免疫球蛋白的已知总量进行比较,以针对每种抗免疫球蛋白抗体、其片段或衍生物稀释液产生结合力曲线,

(v) 将步骤 (ii) 中产生的剂量响应曲线与步骤 (iv) 中产生的结合力曲线进行比较,针对每种抗原或其片段鉴定出与剂量响应曲线最密切匹配的结合力曲线,并在此基础上,为每种抗原或其片段分配结合力曲线,

(vi) 分析测试样品中的抗原特异性免疫球蛋白与固定于第一、第二或第三固体支持物上的重组或纯化抗原成分或其片段的结合,和

(vii) 将步骤 (vi) 关于每种单独抗原或其片段的结合水平与步骤 (v) 中分配给该抗原或其片段的结合力曲线进行比较,并对测试样品中存在的抗原特异性免疫球蛋白的水平进行定量。

2. 权利要求 1 的方法,其中将步骤 (iv) 生成的结合力曲线群集成代表性的结合力曲线以代表不同的结合力水平,例如,极高度结合、高度结合、中等结合和低结合,其中将步骤 (ii) 中产生的剂量响应曲线与代表性结合力曲线,而不是步骤 (iv) 中产生的结合力曲线进行步骤 (v) 中的比较。

3. 一种校准设备的方法,所述设备适于测定多重抗原特异性免疫球蛋白与固定于固体支持物上的多重抗原或其片段的结合,所述方法包括以下步骤:

(i) 分析系列样品与固定于第一固体支持物上的多重重组或纯化抗原成分或其片段的结合,所述样品包含具有已知抗原反应性的免疫球蛋白,

(ii) 将步骤 (i) 中的结合水平与已知反应性进行比较,以针对每种抗原成分或其片段产生剂量响应曲线,

(iii) 分析参比免疫球蛋白样品的系列稀释液与固定于第一或第二固体支持物上的抗免疫球蛋白抗体、其片段或衍生物的系列稀释液的结合,其中所述参比免疫球蛋白样品与步骤 (i) 使用的属于相同的免疫球蛋白亚型,具有已知免疫球蛋白总量,

(iv) 将步骤 (iii) 中的结合水平与参比免疫球蛋白的已知总量进行比较,以针对每种抗免疫球蛋白抗体、其片段或衍生物稀释液产生结合力曲线,

(v) 将步骤 (ii) 中产生的剂量响应曲线与步骤 (iv) 中产生的结合力曲线进行比较,针对每种抗原或其片段鉴定出与剂量响应曲线最密切匹配的结合力曲线,并在此基础上,为每种抗原或其片段分配结合力曲线,和

(vi) 将步骤 (v) 产生的结合力曲线输入设备,以使每种抗原的结合力曲线能插入由含有未知量的特异性结合所述抗原的免疫球蛋白的样品产生的信号。

4. 权利要求 3 的方法, 其中将步骤 (iv) 生成的结合力曲线群集成代表性的结合力曲线以代表不同的结合力水平, 例如, 极高度结合、高度结合、中等结合和低结合, 其中将步骤 (ii) 中产生的剂量响应曲线与代表性结合力曲线, 而不是步骤 (iv) 中产生的结合力曲线进行步骤 (v) 中的比较。

5. 权利要求 1 到 4 任一项的方法, 其中抗原是变应原, 免疫球蛋白是 IgE, 抗免疫球蛋白抗体是抗 IgE 抗体。

6. 一种多重变应原测试系统, 其含有固定于固体支持物上的抗 IgE 抗体、其片段或衍生物的系列稀释液。

7. 权利要求 6 的系统, 进一步包含固定于第二固体支持物上的重组或纯化的变应原成分、或其片段。

8. 一种试剂盒, 其包含权利要求 6 或 7 的多重变应原测试系统和以下一种或多种:

i) 参比 IgE 样品;

ii) 第一抗体制备物, 含有结合 IgE 的第一抗体

iii) 第二抗体制备物, 含有特异性结合第一抗体的第二抗体;

iv) 第三抗体制备物, 含有特异性结合第二抗体的第三抗体; 并且

其中第二抗体或第三抗体与可检测标记相连接。

9. 权利要求 8 的试剂盒, 其中可检测标记是酶, 例如辣根过氧化物酶 (HRP)。

10. 权利要求 8 的试剂盒, 其中可检测标记是化学发光部分、放射性部分或荧光部分。

11. 权利要求 1 到 10 任一项的方法、系统或试剂盒, 其中固体支持物是微阵列芯片。

## 免疫测定

[0001] 本发明涉及一种对样品中 IgE 水平进行定量的免疫测定方法,校正适于实施所述定量的设备的方法和一种实现所述定量的系统。

[0002] 免疫测定是利用抗体结合性能的方法。通常,免疫测定用于分析样品中特定抗原特异性抗体的存在。这种测定是通过在固定于固体支持物上的抗原上洗涤样品,随后使用不同的技术使任何结合的抗体可视化。

[0003] 通常,免疫测定需要使用校准物来给未知的样品分配数值或浓度。在经典的免疫测定中,使用一组校准物绘出信号对浓度的校准曲线,并通过插入法(interpolation)确定未知样品的浓度。

[0004] 过敏状况通过对无害环境抗原的不当和放大的免疫反应来表征。这些抗原统称为变应原(过敏原)。对变应原的免疫反应包括第一阶段致敏,该阶段包括(i)抗原呈递细胞(APC)处理变应原,(ii)用APC将处理的变应原呈递至T辅助0(Th0)静止细胞,(iii)Th0静止细胞分化成Th2细胞,和(iv)Th2细胞刺激B细胞,导致B细胞产生和分泌变应原特异性IgE。

[0005] 每种特异性变应原都将刺激产生对该变应原具有特异性的IgE。IgE抗体可与两种不同的细胞类型相互作用:肥大细胞和嗜碱性粒细胞,其含有含组胺的颗粒。

[0006] 当引发致敏阶段的相同变应原第二次进入体内,并被适当的肥大细胞和嗜碱性粒细胞识别时,激发变态反应机制的第二个阶段,称为“激发阶段”。变应原与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面呈递的其特异性IgE结合,触发了最终导致肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱粒并分泌组胺的机制,而组胺是变态反应中典型的炎性反应原因。随后发生的变态反应的激烈程度取决于该个体中变应原特异性IgE的水平。因此,检测并量化个体中针对特定变应原产生的IgE浓度,以便能够鉴定变应性(或特应性)个体并表征其变态反应,这很重要。

[0007] 诊断变应原的定量免疫测定通常使用或参考世界卫生组织(WHO)国际参比制品(International Reference Preparation)75/502来构建校准系统。这是一种具有确定的IgE反应性的冻干的人血清样品(Kontis K,等(2006),Correlation of the Turbo-MP RIA with ImmunoCAP FEIA for Determination of Food Allergen-Specific Immunoglobulin-E. Ann Clin Lab Sci. 36(1):79-87;Bousquet J等(1990)Comparison between RAST and Pharmacia CAP system:A new automated specific IgE assay. J Allergy Clin Immunol. 85(6):1039-43;产品参考:<http://www.nibsc.ac.uk/documents/ifu/75-502.pdf>)。

[0008] 典型的,测量的变应原特异性IgE抗体的反应值通过针对总IgE校准曲线(WHO国际参比制品)进行评价,并以变应原特异单元/升(kUA/l)的浓度表示。使用IgE参比曲线来描述测试的所有变应原的剂量响应曲线。这需要对固定在固体支持物上的免疫测定用变应原性成分进行浓度优化,以使IgE和变应原的剂量响应曲线显示出相同的趋势。为优化剂量响应曲线中变应原性浓缩物的浓度,针对反应性已知的样品组测定变应原的不同浓度,以鉴定出产生与WHO国际参比总IgE曲线的形状和倾斜度均类似的剂量响应曲线的浓度。

[0009] 目前用于变应性疾病的免疫测定包括：放射性过敏原吸附试验 (RAST)，酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和 ImmunoCAP。

[0010] RAST 涉及将变应原（或其他抗原）与纸盘固相共价偶联。随后将纸盘与来自要检测变态反应状况的病人的血清共同孵育。如果血清中存在针对该变应原的抗体，则抗体与所结合的变应原发生反应，并通过放射性标记抗 IgE 抗体来显示这种结合。在其最初的形式中，测试结果通过从异源 IgE 抗白桦花粉参比曲线的内插以等级或任意单位的形式报告。偶联于纸盘上的白桦变应原与具有已知反应性的血清样品共同孵育，通过针对已知 IgE 浓度对获得的信号绘制曲线产生参比曲线。如上所述，WHO/NIBSC 国际参比 IgE 制品通常被用于校准白桦参比系统。

[0011] 类似的，ELISA 涉及将吸附到固相（典型的为塑料多孔板）的变应原（或其他抗原）与待测病人的血清一起孵育。通过将吸附在固相上的变应原结合的 IgE 与酶联抗 IgE 抗体共孵育，并随后加入酶的适当底物，来揭示样品中 IgE 与吸附变应原的结合。底物催化导致平板上的颜色变化。通过将颜色信号插入参比曲线来测量色彩的强度，从而能够量化血清 IgE。通过用捕获抗人 IgE 抗体包被 ELISA 孔，并将其先与 WHO/NIBSC 国际参比 IgE 制备标准品共孵育，随后与具有适当底物的酶联抗 IgE 抗体共孵育，从而产生参比曲线。所述捕获抗 IgE 的浓度在参比孔中保持恒定，对参比 IgE 制品进行滴定以获得参比曲线。

[0012] 例如，由 ALLERGOPHARMA 生产的 ELISA RV-5 试剂盒由一种吸附于置于平底 96 孔板底部的纸盘的单浓度变应原以及包被有单浓度的捕获抗人 IgE 的盘组成。当将变应原包被的盘与人血清共孵育时，包被有捕获抗 IgE 的盘与来源于 WHO/NIBSC 国际参比的人 IgE 制品杂交。随后通过针对来自包被有捕获抗 IgE 孔板的信号强度和已知的 WHO/NIBSC IgE 浓度绘制参比曲线。HYCOR 用于变应性测试的全自动酶免疫测定 (EIA) 就是基于同样的原理。

[0013] CAP 系统 -PHADIA (对照法) 在固相 -ImmunoCAP 的本质与上述方法实质上不同。ImmunoCAP 的固相是一种 CNBr- 激活的纤维素衍生物，其与其他底物相比具有更高的结合能力 (David W. (2006), The immunoassay handbook, Elsevier Ltd 出版)。期望的变应原共价偶联于包装于胶囊中的亲水载体多聚体上。所述载体由具有高蛋白结合特性的纤维素衍生物组成。ImmunoCAP 可与病人血清中的特异性 IgE 反应，在将未结合的 IgE 洗去后，加入酶 - 标记的抗 IgE 抗体以形成复合物，随后将其与荧光底物共孵育。与使用 ELISA 方法相同，通过向用于校准的异源总血清 -IgE 剂量响应曲线中插入，颜色强度提供了血清中变应原特异性 IgE 水平的指示。该测试通过 WHO 的 IgE 标准品进行校准，包括两组校准物：0.35-100kUA/l (用于特异性 IgE Ab 和窄量程总 IgE) 和 2-2000kUA/l (用于宽量程总 IgE)。抗 -IgE 经设计允许剂量响应曲线具有相同初始斜率的更宽量程。随后分别对所有固相变应原的最大容量、响应和相对于量程的低背景噪声进行个体优化。

[0014] PHADIA 生产的 ImmunoCAP ISAC 试剂盒是一种基于微阵列的变态反应诊断测试。它基于现代生物芯片技术。ImmunoCAP ISAC 是一种小型化免疫测定平台，可以允许针对许多变应原成分的特定 IgE 抗体的多重测量。将纯化的天然或重组变应原 (40 种常见的变应原来源) 成分固定在固体支持物 (生物芯片) 上。这是一种两步化测定。第一步，使来自病人血清的 IgE 抗体与所固定的变应原成分结合。第二步，在短暂的洗涤步骤之后，用荧光标记的抗 -IgE 抗体检测结合有变应原的 IgE 抗体。ImmunoCAP ISAC 是一种半定量测试，其

结果以 ISAC 标准化单位 (ISU) 报告。

[0015] Deinhofer 等 (2004) Methods:32:249-254 描述了将微阵列技术用于多重-变应原测试系统。

[0016] EP1322960B1 描述了一种基于微阵列的变应原测试系统。

[0017] 在本发明的说明书中对明显的在先出版文件的罗列或讨论不应必然的视为承认该文件是现有技术状况的一部分或是常规的一般性知识。

[0018] 本发明寻求解决上述免疫测定的问题。本发明提供一种对测试样品的 IgE 水平进行更精确的定量的免疫测定方法。

[0019] 第一方面,本发明提供一种对测试样品中的多重抗原特异性免疫球蛋白进行定量的方法,该方法包含以下步骤:

[0020] (i) 分析系列样品与固定于第一固体支持物上的多重重组或纯化抗原成分或其片段的结合,所述样品为例如血清样品,其含有已知抗原反应性的免疫球蛋白,该免疫球蛋白与测试样品中的免疫球蛋白具有相同亚型,

[0021] (ii) 将步骤 (i) 中的结合水平与已知反应性进行比较,从而产生针对每种抗原成分或其片段的剂量响应曲线,

[0022] (iii) 分析参比免疫球蛋白样品的系列稀释液与固定于第一或第二固体支持物上的抗免疫球蛋白抗体、其片段或衍生物的系列稀释液的结合,其中所述参比免疫球蛋白样品与步骤 (i) 使用的属于相同的免疫球蛋白亚型,具有已知免疫球蛋白总量,

[0023] (iv) 将步骤 (iii) 中的结合水平与参比免疫球蛋白的已知总量进行比较,以针对每种抗免疫球蛋白抗体、其片段或衍生物稀释液产生结合力曲线,

[0024] (v) 将步骤 (ii) 中产生的剂量响应曲线与步骤 (iv) 中产生的结合力曲线进行比较,针对每种抗原或其片段鉴定出与剂量响应曲线最密切匹配的结合力曲线,在此基础上,为每种抗原或其片段分配 (assign) 结合力曲线,

[0025] (vi) 分析测试样品中的抗原特异性免疫球蛋白与固定于第一、第二或第三固体支持物上的重组或纯化抗原成分或其片段的结合,和

[0026] (vii) 将步骤 (vi) 关于每种单独抗原或其片段的结合水平与步骤 (v) 中分配给该抗原或其片段的结合力曲线进行比较,对测试样品中存在的抗原特异性免疫球蛋白的水平进行定量。

[0027] 含有已知免疫球蛋白反应性的样品可以是含有已知的对特定抗原的免疫球蛋白反应性的任何样品。优选的,该样品含有已知的 IgE 反应性。本领域技术人员理解,样品的反应性应在其应用于本发明的方法之前已通过适当的免疫测定方法测定。上文提供了适当的免疫测定方法的例子,例如 ELISA。优选的,样品是血清样品,例如人血清样品。反应性表示为国际单位 / 毫升 (IU/ml)。例如通过针对 IgE 反应性 (表示为国际单位 /ml) 对免疫测定中获得的荧光基团信号强度作图,产生剂量响应曲线。

[0028] 目的是,步骤 (i) 使用的系列样品包含一组样品;每个样品都可以与一种或多种固定化的或其他抗原反应。该步骤利用了不同样品的不同特性,每种样品可对同样的抗原具有不同的反应性水平,以对每种抗原提供宽范围的不同结合水平。例如,样品 1 可对抗原 A 具有反应性 x,样品 2 可对抗原 A 具有反应性 y,样品 3 可对抗原 A 具有反应性 z。当将样品 1 到 3 对抗原 A 的反应性绘制到曲线上时,即产生了剂量响应曲线。因此,这些对相同抗

原和对不同抗原具有不同反应性的样品被用于构建针对在本发明方法随后的步骤中使用的每种固定化抗原的剂量反应曲线。

[0029] 可以预期的是,已知反应性的样品和 / 或测试样品是从患者,例如人类获得的样品。样品可以是血清样品,全血样品,血浆样品,淋巴样品,脑脊液样品,骨髓样品,肺抽吸样品,尿样品,粪样品,唾液样品,痰样品,组织样品或其他任何含有免疫球蛋白的样品。优选的,样品是含有已知 IgE 反应性的血清样品。

[0030] 参比免疫球蛋白样品根据测试样品中期望待测的免疫球蛋白的类别而含有适当类别的免疫球蛋白。例如,如果免疫测定是针对测试样品中的 IgE 的测定,参比免疫球蛋白样品将含有已知的总 IgE。参比免疫球蛋白样品可以是任何具有已知总免疫球蛋白浓度的免疫球蛋白样品。例如,当免疫球蛋白是 IgE 时,参比 IgE 样品可以是 WHO/NIBSC 国际参比。总 IgE 可以表示为国际单位 /ml。

[0031] 当免疫球蛋白是 IgG、IgA 和 / 或 IgM,或任何其他可用于本发明方法的免疫球蛋白亚类时,替换方案是可预期的。提供合适的抗免疫球蛋白抗体可用来产生结合力曲线,以表示特定抗原与这些不同类别免疫球蛋白各个之间的结合能力。也就是说,当待测的免疫球蛋白亚类是 IgA 时,参比免疫球蛋白和已知反应性的免疫球蛋白样品将含有合适的 IgA,并且抗免疫球蛋白抗体将是抗 IgA。

[0032] 固定于第一或进一步的固体支持物上的第一方面步骤 (iii) 提供的抗免疫球蛋白抗体涉及测试样品中期望待测的抗体类别。例如,如果期望检测测试样品中的变应原特异性 IgE 抗体,则血清样品和参比样品将含有分别含有已知反应性和已知总 IgE 的 IgE。因此,抗免疫球蛋白抗体将是抗 IgE 抗体。抗免疫球蛋白抗体的抗体亚类通常是 IgG。因此,可以预期,抗免疫球蛋白抗体可以是抗 IgE、IgG 抗体。

[0033] “抗原”的含义包括含有被免疫球蛋白特异性识别的表位的任何化合物。因此,抗原可来自天然提取物,可以是重组蛋白,或其他蛋白,或其他纯化自天然提取物的分子(例如多糖),或任何其他来源。抗原优选是变应原,即被认为有能力在与个体接触时在该个体中引起变态反应的变应原。抗原可以是已表征的变应原,或尚待表征的变应原。可以预期,抗原可以是任何被 IgG 分子特异性识别的化合物。

[0034] 可包含在固体支持物上的变应原成分的例子包括:Der p1 和 Der p2 - 尘螨、屋尘螨 (*Dermatophagoides pteronyssinus*) 中主要的变应原分子;Bet v1 和 Bet v2 - 白桦花粉中主要的变应原分子;Phl p1, Phl p5, Phl p2 和 Phl p6 - 梯牧草花粉中主要的变应原分子。

[0035] 上述第一方面的步骤 (ii) 提供固体支持物上含有的每种抗原的剂量响应曲线。固体支持物上的抗原浓度可以进行优化,以便获得合适的响应。可以从蛋白浓度方面,并通过使用最合适的缓冲液,对抗原(例如变应原)进行优化。抗原浓度和缓冲液的优化在本发明的方法实施前进行。优化通过针对每种抗原鉴定出最合适的蛋白浓度和最合适的缓冲液而进行,所述缓冲液用于稀释蛋白质,从而在与针对该给定抗原具有已知反应性的样品相比时在反应性方面具有最高的一致性。用于溶解待固定于固体支持物的抗原和优化抗原浓度的适当缓冲液的例子包括:pH7.4 的磷酸盐缓冲液,pH7.4 的磷酸盐缓冲液并加入 0.1g/l 吐温 20,和 / 或 pH7.4 的磷酸盐缓冲液并加入 10% 甘油。

[0036] 完成第一方面的步骤 (i) 到 (iv) 后,本领域技术人员将得到每种固定化抗原的剂

量响应曲线和存在于第一或进一步的固体支持物上的每个浓度的抗免疫球蛋白抗体的结合力曲线。因此,将产生两个图表:第一个比较了每种抗原的结合强度与已知样品中存在的抗原特异性免疫球蛋白的反应性(参见图 1,含有 IgE 样品的曲线的实例);第二个比较了抗免疫球蛋白抗体每种稀释液的结合强度与参比样品中存在的总免疫球蛋白的浓度(参见图 2A,含有 IgE 样品的曲线的实例)。

[0037] 第一方面的步骤(v)提供了上述两个图表的比较,以使每种抗原产生的曲线与每种抗免疫球蛋白抗体浓度产生的曲线相匹配。这种比较可以以可视方式或其他方式进行,例如使用计算机软件。

[0038] 一旦将每种抗原样品与特定抗免疫球蛋白浓度相匹配,则将该免疫球蛋白浓度分配给该抗原,并随后用作更加精确的参比或校准,更精确的描述了该特定抗原的结合力的该抗原的曲线。因此,特异于测试样品中的该抗原的抗体浓度可以通过使用该抗原的新分配的结合力校准曲线而得到更精确的描述。

[0039] 发明人已经发现,作为本领域中的标准操作而使用单个参比曲线来校准多重抗原尤其是多重变应原的免疫测定,不足以描述不同变应原所表现出来的不同结合力。发明人发现,当免疫测定在与不同变应原提取物共孵育的具有已知 IgE 反应性的血清样品上进行时,利用针对每种变应原产生的数据获得了不同的剂量响应曲线。这在图 1 中有举例说明。因此,在变应原测定的实例中,当在多重分析中测试多重变应原时,以往变应原免疫测定中使用的校准系统不足以提供关于血清样品 IgE 反应性的精确定量信息。

[0040] 发明人寻求提供一种校准系统,其可以克服已有免疫测定的不足并提供更加精确的定量免疫测定。本发明中,基于抗原结合力,将不同的参比曲线分配给每种抗原的步骤,使得能够对测试样品中特定免疫球蛋白进行更加精确的定量。在变应原测试的实例中,本发明以比以往测试更精确的方式描述了变应原剂量响应行为。

[0041] 结合力曲线可以读入控制免疫分析设备的软件中,作为将来测定的标准。可将每个测试的内部对照用于弥补每个测试中的微小环境变化。然而,可以预期,为保证测定的准确性,如本发明所教导,当新批次的变应原制备好并将荷载到固体支持物上时,可以适当调整结合力曲线或产生新的结合力曲线。此种质量控制活动是本领域技术人员容易理解的。

[0042] 第一方面的步骤(vi)和(vii)利用之前步骤产生的结合力曲线来对测试样品中的抗原特异性免疫球蛋白水平进行定量。可以预期,根据用于实现该方法的测定设备要求,在第一方面中描述的所有固定化成分均可被固定化于相同或不同的固体支持物上。因此,所有合适的固定化成分均可以被固定于相同的固体支持物上,例如芯片,包括抗原、捕获免疫球蛋白和阴性、阳性对照。然而,可以预期,可以将每种样品与不同的固体支持物,如芯片一起孵育,以防止交叉污染。因此,在每个测定中可使用数个固体支持物,例如芯片。例如,如果要在固体支持物上孵育 50 个血清样品,可以使用固定有适当的抗原/免疫球蛋白/对照的 50 个独立的固体支持物。同样,每个参比样品也可以孵育于不同的固体支持物上,以防止交叉污染。本领域技术人员理解,使用的测定设备将影响样品孵育的精确细节。

[0043] 在一个优选的实施方式中,参比免疫球蛋白样品(例如 WHO 国际标准 IgE)使用最终免疫球蛋白浓度,范围为 0.1 到 100IU/ml。优选的,待固定在固体支持物上的抗免疫球蛋白抗体(例如抗 IgE 抗体)的使用浓度范围为 30 到 0.1  $\mu$ g/ml。

[0044] 术语“免疫球蛋白”在本发明中可与术语“抗体”互换使用。

[0045] 第一方面可进一步包括如下步骤,将步骤 (iv) 生成的结合力曲线群集成代表性的结合力曲线以代表不同的结合力水平,例如,极高度结合、高度结合、中等结合和低结合,其中将步骤 (ii) 中产生的剂量响应曲线与代表性结合力曲线,而不是步骤 (iv) 中产生的结合力曲线进行步骤 (v) 中的比较。

[0046] 可以预期,将该进一步的提供更少的经巩固结合力曲线的步骤纳入将简化数据管理,从而简化校准过程。这些结合力曲线,如图 2B 所例举,将被储存于免疫测定分析仪设备的软件中用于将来的样品分析。

[0047] “抗免疫球蛋白抗体、其片段或衍生物”包括以下含义:抗体包含抗体或其抗原结合片段,例如类 Fab 分子;Fv 分子;单链 Fv (ScFv) 分子,其  $V_H$  和  $V_L$  配对结构域通过弹性寡肽连接;和含有分离的 V 结构域的单链抗体 (dAbs),其也可以是任何其他表现出上面提到的优选结合特性的配基。

[0048] 在第二方面,本发明提供了一种校准设备的方法,所述设备适于测定多重抗原特异性免疫球蛋白与固定于固体支持物中的多重抗原或其片段的结合,该方法包含如下步骤:

[0049] (i) 分析系列样品与固定于第一固体支持物上的多重重组或纯化抗原成分或其片段的结合,所述样品为例如具有已知抗原反应性的免疫球蛋白的血清样品,

[0050] (ii) 将步骤 (i) 中的结合水平与已知反应性进行比较,以针对每种抗原成分或其片段产生剂量响应曲线,

[0051] (iii) 分析参比免疫球蛋白样品的系列稀释液与固定于第一或第二固体支持物上的抗免疫球蛋白抗体、其片段或衍生物的系列稀释液的结合,其中所述参比免疫球蛋白样品与步骤 (i) 使用的属于相同的免疫球蛋白亚型,具有已知免疫球蛋白总量,

[0052] (iv) 将步骤 (iii) 中的结合水平与参比免疫球蛋白的已知总量进行比较,以针对每种抗免疫球蛋白抗体、其片段或衍生物稀释液产生结合力曲线,

[0053] (v) 将步骤 (ii) 中产生的剂量响应曲线与步骤 (iv) 中产生的结合力曲线进行比较,针对每种抗原或其片段鉴定出与剂量响应曲线最密切匹配的结合力曲线,在此基础上,为每种抗原或其片段分配结合力曲线,和

[0054] (vi) 将步骤 (v) 产生的结合力曲线输入设备,以使每种抗原的结合力曲线能插入由含有未知量的特异性结合该抗原的免疫球蛋白的样品产生的信号。

[0055] 第二方面可进一步包括如下步骤,将步骤 (iv) 生成的结合力曲线群集成代表性的结合力曲线以代表不同的结合力水平,例如,极高度结合、高度结合、中等结合和低结合,其中将步骤 (ii) 中产生的剂量响应曲线与代表性结合力曲线,而不是步骤 (iv) 中产生的结合力曲线进行步骤 (v) 中的比较。

[0056] 一旦使用第二方面的方法校准了所述设备,其就可以用于分析和量化测试样品中的抗原特异性免疫球蛋白。

[0057] 例如,可以在进行适当处理使结合抗体的抗原可视化后,使用 ADAM 设备 (Microtest Matrices Ltd) 读出微阵列玻片 (固体支持物)。收集原始数据并用于计算剂量响应曲线。设备的输出形式是文本文件,其中列举了微阵列的所有点;他们通过坐标以及数值来描述,其中数值是微阵列上每个点释放的光子。使用类似 Matlab 的数字计算环境,对所有来自阅读器的数据进行计算,并产生一组描述剂量响应曲线的因子。ADAM 设备运用

这些因子构建插入配置文件中的内部控制校准曲线。

[0058] 在第一和第二方面的优选的实施方式中,抗原是变应原,免疫球蛋白是 IgE,抗免疫球蛋白抗体是抗 IgE 抗体。因此,在该实施方式中,通过分析来自病人的样品对固定于固体支持物上的变应原成分或其片段的 IgE 反应性,该方法可被用于检测病人对特定变应原的变态反应。这些信息有助于针对特定变应原的变态反应诊断。

[0059] 可以固定在固体支持物上的变应原的例子列举于表 1 中。

[0060] 表 1 :变应原列表

[0061]

## 变应原列表

药物	F44 (草莓)	M2 枝孢菌 ( <i>Cladorporium erbarum</i> )
C1 (青霉素 G)	F45 (烘焙酵母)	M3 烟曲霉 ( <i>Aspergillus fumigatus</i> )
C2 (青霉素 V)	F46 (辣椒)	M4 葡萄状毛霉菌 ( <i>Mucor racemosus</i> )
C214 (阿莫西林)	F49 (苹果)	M5 白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> )
螨		M6 细链格孢( <i>Alternaria tenuis</i> )
D1 屋尘螨 ( <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> )	F74 (鸡蛋)	M7 灰葡萄孢菌 ( <i>Botrytis cinerea</i> )
D2 粉尘螨( <i>Dermatophagoides farinae</i> )	F76 ( $\alpha$ 乳清蛋白)	M9 串珠镰刀菌 ( <i>Fusarium moniliforme</i> )
D3 表皮螨 ( <i>Dermatophagoides microceras</i> )	F77 ( $\beta$ 乳清蛋白)	M13 茎点霉蚜( <i>Phoma betae</i> )
D70 粗脚粉螨( <i>Acarus siro</i> )		M20 蜂毛霉菌( <i>Mucor mucedo</i> )
D71 ( <i>Lepidoglyfus destructor</i> )	F83 (鸡肉)	树的花粉
D72 腐食酸螨 ( <i>Tyrophagus putrescentiae</i> )	F84 (猕猴桃)	T2 (桉木)
D73 家甜食螨 ( <i>Glyciphagus domesticus</i> )	F85 (芹菜)	T3 (白桦花粉)
动物上皮	F92 (香蕉)	T4 (榛子)
E1 (猫毛)	F95 (桃)	T5 (欧洲山毛榉)
E2 (狗毛)	草的花粉	T6 (高山雪松)
E3 (马毛)	G1 (甜黄花茅)	T7 (橡树)
	G2 (狗牙根草/匍匐冰草)	T9 (橄榄树)
E78 澳洲长尾小鸚鵡羽毛( <i>Budgerigar feathers</i> )	G3 (野茅)	T11 (悬铃木)
E81 (绵羊上皮)	G4 (牛尾草)	T14 (白杨)
E82 (兔上皮)	G5 (多年生黑麦草)	T901 (白蜡树)
食物变应原	G6 (梯牧草)	T904 (黄华柳)
F1 (蛋白)	G8 (莓系属牧草, 六月-肯塔基)	杂草花粉
F2 (牛奶)	G12 (栽培黑麦)	W1 (常见豚草)
F3 (鳕鱼)	G14 (栽培燕麦)	W6 (艾蒿)

[0062]

F4 (面粉)	G15 (小麦)	W8 (蒲公英)
F7 (燕麦粉)	G18 (大麦)	W9 (英国车前草)
F8 (玉米粉)	昆虫	W20 (大荨麻)
F13 (花生)	I1 (蜜蜂毒液)	W21 (墙草)
F14 (大豆)	I3 (黄蜂毒液)	W32 (油菜)
F16 (胡桃)		纯化的蛋白
F17 (榛子)	I71 (Midge/Mosquito/Gnat)	蚊 Bet v 1
F23 (河虾)	职业变应原	Phl p 5 (G6-V)
	K81 垂叶榕 ( <i>Ficus benjamina</i> )	Phl p 1
F26 (猪肉)	K82 (乳胶)	Der p 1 (D1-I)
F27 (牛肉)	K87 ( $\alpha$ 淀粉酶)	Der p 2 (D1-II)
F31 (胡萝卜)	K905 (HSA)	Bet v 2
F33 (橙)	霉菌	Phl p 2
F35 (土豆)	M1 点青霉 ( <i>Penicillium notatum</i> )	Phl p 6

[0063] 在本发明的第三方面,提供一种多重变应原测试系统,包括固定化于固体支持物上的抗 IgE 抗体、其片段或衍生物的系列稀释液。该多重变应原测试系统可用于本发明前述方面的方法中。

[0064] 在第三方面的一个实施方式中,该系统进一步包括重组或纯化的变应原成分或其片段,固定于第二固体支持物上。

[0065] 在第四方面,本发明提供一种试剂盒,包含第三方面的多重变应原测试系统,以及以下一种或多种:

[0066] i) 参比 IgE 样品;

[0067] ii) 第一抗体制备物,含有结合 IgE 的第一抗体

[0068] iii) 第二抗体制备物,含有特异性结合第一抗体的第二抗体;

[0069] iv) 第三抗体制备物,含有特异性结合第二抗体的第三抗体;并且

[0070] 其中第二抗体或第三抗体与可检测标记相连接。

[0071] 在本发明第四方面的实施方式中,本领域技术人员将理解,可检测标记可以是酶,例如辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶。HRP 的适当底物包括生色底物 (如 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB), 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 和 2, 2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) (ABTS) 和化学发光底物 (如 SuperSignal 和 ECL)。尤其优选的一种底物是 Alexa555 荧光基团标记的酪胺。

[0072] 在第四方面的一个替换实施方式中,可检测标记可以是化学发光部分 (如吖啶酯化合物),放射性部分 (如  $^{32}\text{P}$ ),或荧光部分 (如荧光素 (FITC))。根据其检测以及与抗体的连接情况,其他合适的可检测标记和方法为本领域技术人员所熟知。

[0073] 在本发明任何方面的实施方式中,固体支持物可以是微阵列芯片。合适的微阵列芯片可以按照下列方法构建:通过用最适缓冲液 (事先确定,如前所述) 将蛋白质母液稀释

到最适的终浓度,从而制备最初的蛋白质溶液(即变应原)。本领域技术人员理解,对于每种单独抗原,终浓度可以不同。随后将蛋白质溶液上载到 384 孔平板。随后将平板和固体支持物放进打印机,例如无触点压电式打印机。打印机拥有数个喷嘴,自孔中吸取溶液并将其逐滴散布到固体基板(微阵列)上。将每种溶液散布后,洗涤喷嘴并为随后的溶液最好准备。打印机具有相机,称为频闪仪,可通过对被散布的液滴进行拍照监控溶液是否完全散布。如果溶液没有完全散布,该频闪仪进行报告。可以使用任何合适的光学支持物制备微阵列。通常,任何玻璃支持物,或类似物都合适。本领域技术人员熟知各种此类支持物。

[0074] 下面将描述本发明的具体实施方式,仅仅是与附图相关内容的例举,其中:

[0075] 图 1 是多重变应原剂量响应曲线的图示;

[0076] 图 2A 是多重结合力曲线的图示;和

[0077] 图 2B 是根据本发明巩固的结合力曲线的图示。

[0078] 实施例 1:带有结合力校准系统的免疫测定

[0079] 下面描述一种使用基于微阵列的免疫测定作为平台,适于精确定量血清变应原特异性 IgE 的校准系统。该描述的免疫测定含有大约 100 个不同的变应原提取物,覆盖大约 100 个不同的变应原。

[0080] 该描述的校准系统可以可靠的描述所有 100 个变应原提取物的剂量响应行为。每种变应原提取物是具有不同 IgE 结合能力(即不同的剂量响应斜度)的独特化合物。本发明的校准系统考虑了这些不同的结合活性,提供一种测量样品中变应原特异性 IgE 水平的精确系统。

[0081] 微阵列芯片实例

[0082] 此处描述的系统是一种基于微阵列的测试,使用针对多达约 103 个变应原的测定而设计的小型免疫测定。变应原提取物固定于化学活化的载玻片上以产生阵列。将每种天然变应原提取物以其最适蛋白浓度和缓冲液(预先选择)点到微阵列上。此外,微阵列含有阳性对照(如山羊抗小鼠 IgG)和阴性对照(如非特异性蛋白,例如牛血清白蛋白),捕获抗人 IgE(多克隆山羊抗人 IgE),均以系列稀释液形式点样。

[0083] 抗体可视化方法实例

[0084] 下述是一个方法实例,所述方法可用于使血清样品或参比样品(测试同时进行,适当时使用相同的反应剂,以便控制可能的环境变化)中的 IgE 与本文描述的微阵列的结合可视化。

[0085] 单独的阵列首先与 IgE 样品(血清或参比)孵育,随后与单克隆抗人(或其他合适抗体,取决于分析样品)IgE 抗体(例如抗人 IgE 小鼠 IgG)孵育,如果存在 IgE 并与所点样的变应原结合,则所述抗体将与来自血清或参比样品的人 IgE 结合。随后向微阵列加入连接有辣根过氧化物酶(HRP)的山羊多克隆抗小鼠 IgG 抗体,而后加入 Alexa555 荧光基团标记的酪胺。在每个抗体孵育步骤之间进行适当的洗涤。

[0086] 过氧化氢( $H_2O_2$ )存在下,HRP 酶将酪胺-Alexa555 转化为高度反应性、短效的酪胺-Alexa555 基团,后者与 HRP 靶标相互作用位点附近的亲核残基发生反应。这产生具有特定波长(555nm)的荧光释放,其强度与结合 HRP 酶的量成正比。

[0087] 使用多克隆抗体和 HRP-酪胺系统(非线性信号放大系统)大大提高了微阵列免疫测定的灵敏度。

[0088] 上述方法为每种变应原斑点提供了荧光强度,该荧光强度与血清样品浓度作曲线,产生一条用参比曲线插入的曲线,以量化 IgE 水平。

[0089] 本发明的校准方法

[0090] 本发明描述的校准方法通过使用本发明的微阵列芯片以下列步骤进行示例性说明:

[0091] 1. 鉴定每种变应原的剂量响应曲线。在微阵列芯片上测定数个具有已知 IgE 反应性的血清样品。收集来自变应原的信号强度并用于产生变应原剂量响应曲线。

[0092] 2. 产生结合力曲线组。在芯片上孵育 WHO/NIBSC 国际参比 IgE 制品(从 0.1 到 100 国际单位/ml)的系列稀释液。IgE 与斑点化的捕获抗人 IgE 相结合,测量产生的信号强度并用于构建结合力曲线组。每条曲线对应一个不同的捕获抗人 IgE 浓度,并通过对于孵育芯片的 WHO/NIBSC IgE 浓度和获得的相应信号强度作曲线而获得。根据芯片上出现的不同捕获抗人 IgE 的斑点数量产生多个结合曲线(参见图 2A,其中每条曲线对应一种在阵列上点样的捕获抗人 IgE 斑点的不同浓度,并通过对于 WHO/NIBSC IgE 浓度和相应获得的信号强度作图而获得)。

[0093] 3. 群集结合力曲线。随后将结合力曲线群集成组以代表不同的结合力(例如,极高、高、中度和低结合力)。对每组产生回归曲线,并储存于分析设备的软件中(参见图 2B,其中显示了群集成组的结合力曲线)。

[0094] 4. 分配了变应原的结合力曲线。根据如第 1 点中描述的方法获得的变应原剂量响应曲线的斜度和形状,将向每种抗原分配一条结合力曲线(主曲线)。

[0095] 5. 变应原特异性 IgE 的定量。使用这种校准系统,通过向明确分配的结合力曲线中插入来自点样于微阵列芯片上的特定变应原的信号强度,来测量未知病人血清的变应原特异性 IgE。变应原反应性以国际单位/ml 和或分类得分的形式表示。

[0096] 6. 通过在每个芯片中使用内对照(调节物),该系统可以构建剂量响应内部曲线,其考虑了载玻片的存储和环境条件,相应的对第 4 点得到的主曲线进行调整。该内部校准由运行一种算法以根据调节物的信号移动主校准曲线组成。例如,如果调节物的信号显示为 950(期望值是 1000),该算法可导致主校准曲线移动 5%。

[0097] 经典的变应原免疫测定使用单个校准曲线,不同与此,本发明的免疫测定系统考虑了每种变应原的结合力的差异。这提供了一种更加精确的测试对样品中的变应原特异性 IgE 进行定量。

变应原剂量响应曲线

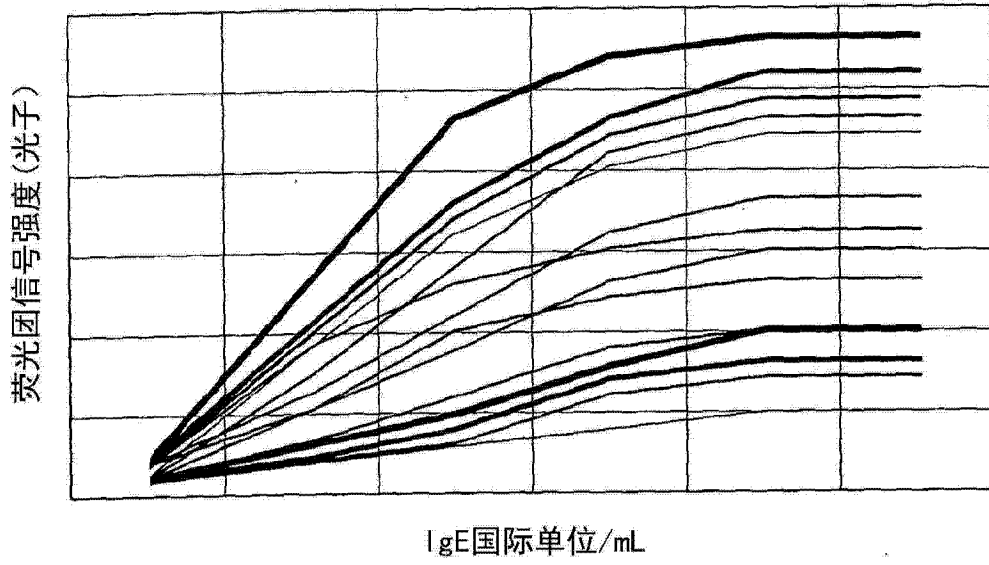


图 1

结合曲线

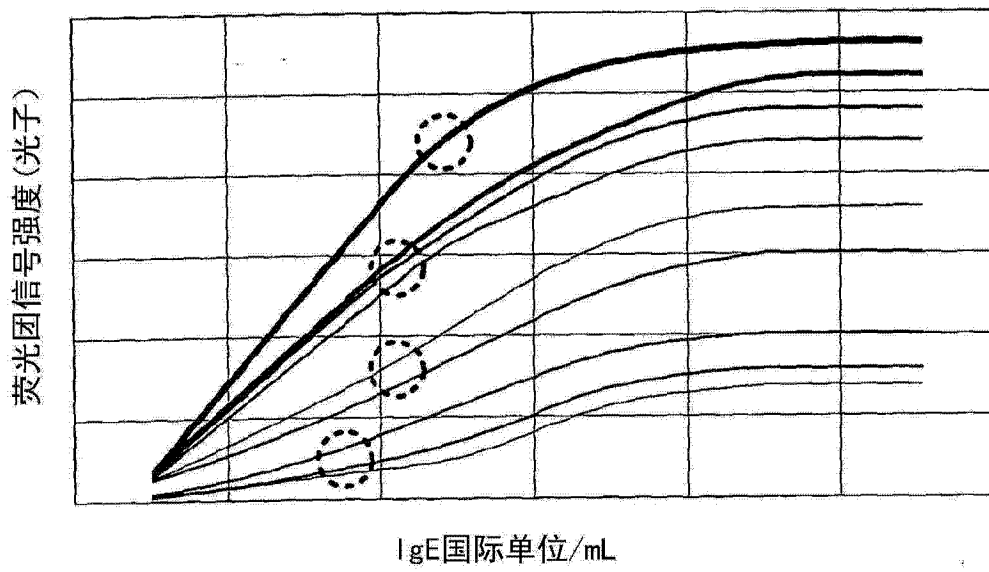


图 2a

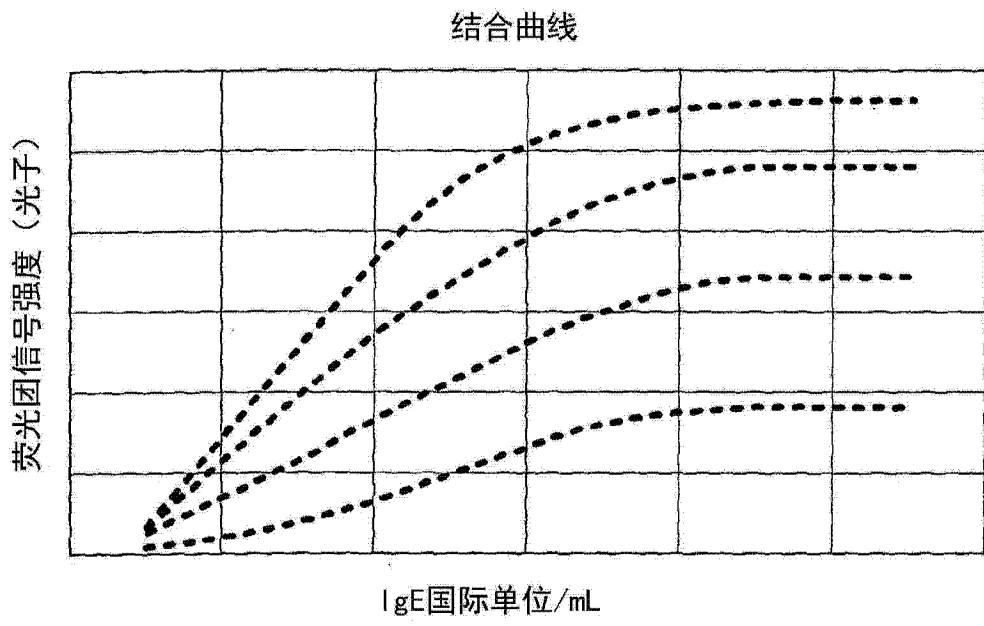


图 2b

专利名称(译)	免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">CN103547921A</a>	公开(公告)日	2014-01-29
申请号	CN201280019279.7	申请日	2012-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	微测试矩阵有限公司		
申请(专利权)人(译)	微测试矩阵有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	微测试矩阵有限公司		
[标]发明人	安德烈亚克里桑蒂 毛罗马卡里 弗兰切斯卡巴尔德拉琦尼		
发明人	安德烈亚·克里桑蒂 毛罗·马卡里 弗兰切斯卡·巴尔德拉琦尼		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/53 G01N2800/24 G01N33/6854 G01N33/54306		
优先权	2011006478 2011-04-18 GB		
其他公开文献	CN103547921B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种对测试样品中的多重抗原特异性免疫球蛋白进行定量化的方法，该方法包括利用固定于固体支持物上的抗免疫球蛋白抗体、其片段或衍生物的系列稀释液以及免疫球蛋白参比样品的系列稀释液，产生多个结合力曲线。使所述结合力曲线与利用对这些抗原的反应性已知的血清样品针对待测试的每个特定抗原产生的特定剂量反应曲线相匹配，以提供一种校准系统，该系统能够更加精确的分析样品中的抗原特异性免疫球蛋白。本发明还提供了校正设备的方法，所述设备适于检测多重抗原特异性免疫球蛋白与固定在固体支持物上的多重抗原或其片段的结合。本发明还提供了用于上述方法的多重变应原测试系统和试剂盒。

