

[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 200880009863.8

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
C12P 19/30 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月24日

[11] 公开号 CN 101657723A

[22] 申请日 2008.2.14

[21] 申请号 200880009863.8

[30] 优先权

[32] 2007.3.26 [33] US [31] 11/691,096

[86] 国际申请 PCT/US2008/054011 2008.2.14

[87] 国际公布 WO2008/118558 英 2008.10.2

[85] 进入国家阶段日期 2009.9.25

[71] 申请人 巴特勒能源同盟有限公司

地址 美国爱达荷州

[72] 发明人 W·A·阿佩尔 V·S·汤普森

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 余颖

权利要求书5页 说明书26页 附图9页

[54] 发明名称

通过增加报道抗体层积改进抗体谱灵敏度

[57] 摘要

公开了一种用于鉴定法医样品或检测一种分析物存在的通过抗体谱分析生物样品的方法。在本发明的一种实施方式中，所述分析物是一种药物，如大麻、可卡因、甲基苯丙胺、甲基睾丸素或甲氢睾酮。所述方法包括以预先选定的图案将抗原与一种固体支持物的表面连接以形成阵列，其中所述抗原的位置是已知的；所述阵列与所述生物样品接触使得样品中的一部分抗体与阵列中的抗原反应并结合以形成免疫复合物；洗去不形成免疫复合物的抗体；以及检测所述免疫复合物以形成抗体谱。通过比较来自未知来源的样品与来自已知来源的样品鉴定法医样品。此外，诸如测试违禁药物使用的检测可以与身份测试相关联，从而使得所述检测结果与受试者的身份正相关。

1. 一种用于分析含有个体特异性抗体的生物材料的方法，所述方法包括：
形成一种包含以预先选定的位点模式与固体支持物表面相连的多种抗原的阵列；
获得具有个体特异性抗体的生物材料样品并将所述阵列与所述样品接触使得至少一部分所述个体特异性抗体与所述阵列的所述多种抗原结合，以形成免疫复合物；
洗涤含有所述免疫复合物的所述阵列；
通过对所述阵列使用至少三种不同抗体检测所述免疫复合物；以及
鉴定所述阵列上的所述免疫复合物，以获得抗体谱。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，形成一种阵列包括通过共价键将多种抗原与所述固体支持物相连。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述方法包括获得选自下组的生物材料的样品：组织、血液、唾液、尿液、汗液、泪液、精液、血清、血浆、羊水、胸膜液、脑脊髓液及其组合。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，形成所述阵列包括多种抗原与包括玻璃或硅石在内的固体支持物相连。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，检测所述免疫复合物包括处理所述阵列使得一个位点上免疫复合物的存在情况通过该位点上的颜色变化加以表征。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，检测所述免疫复合物包括使用电荷耦合装置获得输出值，其中所述颜色变化包括荧光或冷光发射。
7. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，检测所述免疫复合物进一步包括用固态颜色检测电路监测所述阵列并比较检测所述免疫复合物前后的颜色模式。
8. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，检测所述免疫复合物进一步包括获得所述阵列与所述样品接触前和检测所述免疫复合物后的颜色照片图像，以及对由颜色照片图像所获得的像素信息进行分析。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，检测所述免疫复合物进一步包括在所述阵列与所述样品接触前后扫描所述阵列，其中所述固体支持物是表面等离子共振芯片。

10. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，形成所述阵列包括连接为获得抗体谱而设置的第一抗原亚组和为检测所述样品中所选的分析物而设置的至少一种抗原的第二亚组。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，连接所述至少一种抗原的第二亚组包括连接至少一种药物。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，连接至少一种药物包括连接选自下组的一种药物：大麻、可卡因、甲基苯丙胺、安非他明、海洛因、甲基睾丸素、甲氢睾酮及其组合。

13. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，获得一种生物材料的样品包括获得来自法医样品的所述生物材料。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述方法进一步包括将由来自法医样品的所述生物材料所获得的抗体谱与由来自犯罪嫌疑人的生物样品所制备的抗体谱进行比较。

15. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，通过对所述阵列使用至少三种不同抗体检测所述免疫复合物包括：

使所述免疫复合物与能够结合所述免疫复合物的第一抗体接触，其中所述第一抗体来自于不同于所述个体特异性抗体的物种；

除去没有与所述免疫复合物结合的第一抗体；

使与所述免疫复合物结合的所述第一抗体与能够结合所述第一抗体的第二抗体接触，其中所述第二抗体来自于不同于所述个体特异性抗体和所述第一抗体的物种；

除去未结合的第二抗体；

使与所述第一抗体结合的所述第二抗体与能够结合所述第二抗体的酶偶联第三抗体接触，其中所述酶偶联第三抗体来自于不同于所述个体特异性抗体、所述第一抗体和所述第二抗体的物种；

除去未结合的酶偶联第三抗体；以及

检测结合的酶偶联第三抗体，以检测所述阵列上的所述免疫复合物。

16. 一种用于检测包含个体特异性抗体的生物样品中的一种所选药物并鉴定所述生物样品来源的方法，所述方法包括：

将多种抗原以预先选定的图案固定在一种固体支持物上；

将可检测量的一种所选药物固定在所述固体支持物上，以形成一个阵列；

提供一种包含一种设置为与所述所选药物结合的抗体的抗体-酶偶联物和一种能够将显色性底物转化为有色产物的酶；

所述阵列与一种生物样品接触，以使所述多种抗原中的至少一些与所述生物样品中的个体特异性抗体结合，以形成免疫复合物；

所述阵列与所述抗体-酶偶联物接触，其中所述抗体-酶偶联物竞争性结合(i)固定在所述阵列上的所述所选药物，以形成固定化的抗体-酶偶联物，和(ii)所述生物样品中可能存在的任何所选药物，以形成可溶的药物-抗体-酶偶联物；

洗涤所述固体支持物，以除去至少所述可溶的药物-抗体-酶复合物；

使所述固体支持物与一种显色性底物接触以通过所述固定化的抗体-酶偶联物将所述显色性底物转化为有色产物；

测定所存在的所述有色产物的量，其中所述有色产物的所述量与所述生物样品中的所述所选药物的量相关；以及

通过对所述固体支持物使用至少三种不同抗体以形成表征所述生物样品来源的抗体谱检测固定在所述固体支持物上的所述免疫复合物。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述方法进一步包括将所述抗体谱与来自候选来源的一个或多个候选抗体谱进行比较，其中所述抗体谱与所述一种或多种候选抗体谱的匹配确定所述生物样品的来源。

18. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，将可检测量的一种所选药物固定在所述固体支持物上包括从下组中选择所选药物：大麻、可卡因、甲基苯丙胺、安非他明、海洛因、甲基睾丸素、甲氢睾酮及其组合。

19. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述阵列与一种生物样品接触包括从选自下组的来源获得一种生物样品：组织、血液、唾液、尿液、汗液、泪液、精液、血清、血浆、羊水、胸膜液、脑脊髓液及其组合。

20. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述方法包括从唾液获得所

述生物样品。

21. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述方法包括固定化来自 HeLa 细胞的多种抗原。

22. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述方法包括固定化来自随机肽文库的多种抗原。

23. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述方法包括固定化来自表位文库的多种抗原。

24. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述方法包括固定化来自随机 cDNA 表达文库的多种抗原。

25. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述方法包括在所述固体支持物上固定化多种抗原，其中所述固体支持物包含至少一种选自下组的物质：玻璃、硅、硅石、聚合材料、聚四氟乙烯、聚偏二氟乙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸酯、陶瓷材料以及亲水无机材料。

26. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述方法包括在所述固体支持物上固定化多种抗原，其中所述固体支持物包含选自下组的亲水无机材料：氧化铝、氧化锆、氧化钛和氧化镍中的至少一种。

27. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，提供所述抗体-酶偶联物包括与碱性磷酸酶偶联的所述抗体。

28. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，提供所述抗体-酶偶联物包括与辣根过氧化物酶偶联的所述抗体。

29. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，通过对所述固体支持物使用至少三种不同抗体检测固定在所述固体支持物上的所述免疫复合物包括：

使所述免疫复合物与能够结合所述免疫复合物的第一抗体接触，其中所述第一抗体来自于不同于所述个体特异性抗体的物种；

除去没有与所述免疫复合物结合的第一抗体；

使与所述免疫复合物结合的所述第一抗体与能够结合所述第一抗体的第二抗体接触，其中所述第二抗体来自于不同于所述个体特异性抗体和所述第一抗体的物种；

除去未结合的第二抗体；

使与所述第一抗体结合的所述第二抗体与能够结合所述第二抗体的酶偶联第三抗体接触，其中所述酶偶联第三抗体来自于不同于所述个体特异性抗体、所述第一抗体和所述第二抗体的物种；

除去未结合的酶偶联第三抗体；以及

检测结合的酶偶联第三抗体，以检测所述阵列上的所述免疫复合物。

通过增加报道抗体层积改进抗体谱灵敏度

相关申请

本申请要求 2007 年 3 月 26 日提交的名为 IMPROVED ANTIBODY PROFILING SENSITIVITY THROUGH INCREASED REPORTER ANTIBODY LAYERING(通过增加报道抗体层积改进的抗体谱灵敏度)的美国非临时申请 11/691,096 的权利, 该申请的完整内容通过引用纳入本文。

本发明的合同约定

根据美国能源部和巴特尔能源联合会(Battelle Energy Alliance, LLC)之间的合同 DE-AC07-94ID13223、DE-AC07-99ID13727 和 DE-AC07-05ID14517, 美国政府拥有以下发明的权利。

发明领域

本发明涉及检验生物样品。本发明尤其涉及生物样品的分析方法, 包括抗体谱型分析(antibody profiling)。在本发明的一种实施方式中, 对生物样品的分析包括用于表征所述生物样品中个体特异性抗体的抗体谱型分析并同时检验所述生物样品中一种分析物的组合。

发明背景

已知许多方法用于个体鉴别或从这样的个体所获得的生物样品的鉴别。例如, 血液分型是建立在存在于红细胞表面的抗原的基础上的。ABO 系统涉及与两种抗原(A 和 B)相关的 4 种情况。A 型个体展示 A 抗原; B 型个体展示 B 抗原; AB 型个体展示 A 和 B 抗原; O 型个体既不展示 A 抗原, 也不展示 B 抗原。通过分析一个人的血液样品, 可以将该血液归入这些血型组之一。虽然这一方法可以用于从一小组个体中鉴别出一个个体, 当个体组成的组较大时, 所述方法受到限制, 因为具有相同血型的个体之间无法区分。例如, 美国 ABO

血型的分布大致为 45% O、42% A、10% B 和 3% AB。基于其它血液组抗原或体液中同工酶的测试具有与 ABO 血型测试相同的缺点。这些方法可以排除某些个体，但不能区分相同血型组的成员。

在亲子鉴定以及在涉及移植或输液手术的供体和受体相容性的确定中，常规使用基于遗传学的各种免疫学和生物化学测试，这些测试有时也用于帮助人和动物的鉴定。例如，人白细胞抗原(HLA)基因座位编码的蛋白质的血清学测试是熟知的。虽然关于 HLA 座位的遗传结构的许多信息是已知的，将 HLA 血清学分型用于大组中的个体鉴定存在许多缺点。每一个 HLA 抗原必须在单独的检测中测试，并且必须对许多这样的抗原进行检验以鉴定一个个体，在一个大组中鉴别一个个体是一项艰巨的工作。

在过去的十年间，诸如限制性片段长度多态性(RFLP)和聚合酶链式反应(PCR)的基于 DNA 的分析技术在用于将生物样品与个体匹配的司法和亲子鉴定中迅速获得了承认。然而，由于需要相对大的样品量、专门的设备、高度熟练的技术人员以及长的分析时间，RFLP 技术存在问题。对于司法应用，通常没有适用于此类检测的足够样品，并且在偏远地区经常没有所需的设备。此外，这一技术可能花费 2 到 6 周才能完成，并可能导致犯罪调查中宝贵时间的延误。而且，如果需要筛查许多样品，RFLP 分析的成本可能限制其使用。相对于 RFLP 分析，PCR 技术具有要求少得多的样品量并允许更快速分析的优势，但仍需要专门的设备和熟练的技术人员，而且也是昂贵的。

美国专利 4,880,750 和美国专利 5,270,167 公开了一种据称克服了与 DNA 分析相关的许多缺点的“抗体谱”或“AbP”方法。抗体谱是建立在每一个体在其体液中存在一套独特的抗体这一发现的基础上的(R.M. Bernstein 等, Cellular Protein and RNA Antigens in Autoimmune Disease(自身免疫性疾病中的细胞蛋白质和 RNA 抗原), 2 Mol. Biol. Med. 105-120 (1984))。在血液、血清、唾液、尿液、精液、汗液、泪液和身体组织中发现了这些被称为“个体特异性抗体”或“ISA”的抗体(A.M. Francoeur, Antibody Fingerprinting: A Novel Method for Identifying Individual People and Animals(抗体指纹识别: 鉴定个体人类和动物的新方法), 6 Bio/technology 821-825 (1988))。ISAs 与疾病无关并被认为是针对身体的细胞成分的。每个人出生时具有与母亲抗体谱相匹配的抗体谱(T.F.

Unger & A. Strauss, Individual-specific Antibody Profiles as a Means of Newborn Infant Identification(利用个体特异性抗体谱鉴定新生儿), 15 J. Perinatology 152-155 (1995)). 然而, 小孩的抗体谱逐渐改变, 直至约 2 岁前获得稳定的独特的抗体谱。已经显示, 即便是遗传学上相同的个体也具有不同的抗体谱。个体的抗体谱在其一生中基本稳定, 并且不受短期疾病的影响(A.M. Francoeur, 如上)。对具有长期疾病的个体进行的研究还很少。然而, 初步结果指出, 虽然可能出现一些额外的条带, 整个图谱保持完整。这一技术已经在医学领域用于跟踪患者样品并避免样品混乱。此外, 在医院中换错婴儿或声称诱拐的情况中已经使用了该技术。相较于 DNA 技术, 所述方法具有许多优点, 这包括低成本、快速分析(获得样品起 2 小时)、及其简易性(不需要专门设备或培训)。此外, 这一方法将可能用于不含 DNA 的样品。

通过将诊断测试结果与生物样品的抗体谱相联系, WO 97/29206 公开了一种用于诊断测试的鉴定生物样品来源的方法。通过产生每种生物样品的抗体谱, 鉴别所述生物样品的来源。

现在有很多将特异性核酸探针或其他生物分子附着在诸如玻璃、硅、聚甲基丙烯酸酯、聚合滤器、微球、树脂等等表面的检测方法。在所述表面为平面的一种构造中, 这些检测方法有时被称为“生物芯片”。起初, 生物芯片含有以微阵列形式附着在玻璃或硅基质上核酸探针。这些 DNA 芯片通过最初针对计算机芯片生产所开发的微细加工技术进行制造。领先的 DNA 芯片技术包括原位光化学合成方法(P.S. Fodor, 277 Science 393-395 (1997); 美国专利 5,445,934); 电化学定位方法(美国专利 5,605,662); 类似于喷墨打印机的使用喷雾器将基因探针堆积在芯片上; 以及在溶解为基础的过程中使用凝胶。已经在生物芯片上制作了诸如肽的其他类型分子的阵列(例如, 美国专利 5,445,934)。

虽然使用抗体谱的已知方法通常适合于其有限的目的, 它们带有某些固有的缺陷, 妨碍其在生物样品的分析、表征和鉴别中的全面应用。例如, 已知方法依赖于通过电泳分离抗原并随后将分离的抗原转移至膜上。由于分离过程之间条件上的差异, 在膜上的抗原位置上存在批次间差异, 这导致使用一个批次的膜所获得的结果无法与使用另一个批次的膜所获得结果进行比较。此外, 在使用比色方法检测膜上的免疫复合物时, 颜色的判断可能是主观的, 从而不同

的观察者可能对结果有不同的解读。

根据以上所述，提供一种其中试剂的批次间差异和主观性不影响对结果的解读的用于分析生物样品的方法会是本领域中的显著进步。更具体地说，提供一种通过生物芯片形式的抗体谱分析生物样品、从而使得分析适于自动化操作的方法是有益的。

发明概述

本发明的一种实施方式包含一种用于分析含有个体特异性抗体的生物材料的方法，该方法包括：通过将多种抗原以预先选定的图案附着在固体支持物的表面形成多种抗原的阵列，从而使得所述多种抗原的相应位置是已知的；获得所述生物材料的样品并将所述阵列与所述样品接触，从而使得样品中所包含的一部分个体特异性抗体与所述阵列中的抗原反应并结合以形成免疫复合物；洗涤含有免疫复合物的固体支持物，从而除去样品中未与阵列中的抗原反应并结合的抗体；以及检测所述免疫复合物并确定其位置，从而获得抗体谱。在一种实施方式中，可以通过使免疫复合物与识别并结合个体特异性抗体的第一种额外抗体接触进行免疫复合物的检测。在另一种实施方式中，可以使用识别第一种额外抗体或相互识别的一种或更多种额外抗体。

根据本发明的实施方式，免疫复合物的检测包括处理携带附着于其上的免疫复合物的固体支持物，从而通过与不存在免疫复合物的位点相比较的颜色变化来表征一个位点上免疫复合物的存在。在一种实施方式中，免疫复合物的检测过程进一步包括用于对与所述样品接触前后的色彩图谱加以比较的固态色彩探测电路监测所述固体支持物。在另一实施方式中，检测所述免疫复合物的过程进一步包括获得所述阵列与所述样品接触前后的色彩照片图像并分析由此获得的像素信息。在本发明的另一实施方式中，所述固体支持物是一种表面等离子体共振芯片并且所述免疫复合物的检测进一步包括在所述阵列与所述样品接触前后扫描所述表面等离子体共振芯片并比较由此所获得的数据。在本发明的另一实施方式中，免疫复合物的检测包括使用电荷耦合装置获得图像以探测含有荧光发射的色彩变化。

在本发明的另一实施方式中，所述方法用作使用药物的测试。本发明的另

一种实施方式包括分析得自法医样品的抗体谱的分析以及与来自疑犯或受害者的样品的抗体谱的比较。

附图说明

图 1 显示了如实施例 1 的方法所述的从唾液样品所获得的示例性的抗体谱。

图 2 显示了如实施例 1 的方法所述的来自 6 个个体的成对的唾液和血液抗体谱的比较。

图 3 显示了如实施例 1 的方法所述的从来自单一个体的唾液样品用各种掺杂物污染后所获得的抗体谱。

图 4 显示了如实施例 1 的方法所述的从唾液样品中可卡因的免疫检测中所获得的示例性结果。

图 5 显示了如实施例 1 的方法所述的从唾液样品中甲基苯丙胺的免疫检测中所获得的示例性结果。

图 6 显示了在 PVDF 膜上可卡因免疫检测的示例性结果：条带 5, 0 $\mu\text{g/ml}$ 可卡因；条带 6, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 可卡因；条带 7, 10 $\mu\text{g/ml}$ 可卡因；条带 8, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 可卡因。

图 7 显示了在 PVDF 膜上甲基苯丙胺免疫检测的示例性结果：条带 1, 0 $\mu\text{g/ml}$ 甲基苯丙胺；条带 2, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 甲基苯丙胺；条带 3, 10 $\mu\text{g/ml}$ 甲基苯丙胺；；条带 4, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 甲基苯丙胺。

图 8 显示了 3 名不同个体的抗体谱；每对中的一个条带不含药物，每对中的另一个条带含 1000 $\mu\text{g/ml}$ 的可卡因和甲基苯丙胺。

图 9 显示了使用双抗体层积方法的不同血清量的抗体谱。条带 A 与 50 微升血清接触；条带 B 与 10 微升血清接触；条带 C 与 5 微升血清接触；条带 D 与 3 微升血清接触；条带 E 与 1 微升血清接触；条带 F 与 0.5 微升血清接触；条带 G 与 0.1 微升血清接触；以及条带 H 与 0 微升血清接触。

图 10 显示了使用三抗体层积方法的不同血清量的抗体谱。条带 A 与 50 微升血清接触；条带 B 与 25 微升血清接触；条带 C 与 15 微升血清接触；条带 D 与 7.5 微升血清接触；条带 E 与 10 微升血清接触；条带 F 与 2.5 微升血清接触；条带 G 与 1 微升血清接触；条带 H 与 0.5 微升血清接触；条带 I 与 0.1 微升血

清接触；条带 J 与 0 微升血清接触。

图 11 并排显示了 3 微升血清的抗体谱，其中条带 A 是用三抗体方法显色的，条带 B 是用双抗体方法显色的。

图 12 显示了来自图 11 条带 A 和 B 的光密度数据。顶端的线是条带 A，较低的线是条带 B。

发明详述

在对用于分析生物样品的本方法进行详细描述之前，应当理解，本发明并不限于这里所公开的具体构造、处理过程和材料，因为这样的构造、处理过程和材料可以有些改变。也应当理解，这里所采用的术语仅仅针对描述具体实施方式的目的而使用并且不具有限制性，因为本发明的范围仅由附属的权利要求书及其等价物限定。

这里所提及的用以描述本发明的背景并提供其实践的额外细节的出版物和其他参考资料由此通过参考整合在本申请中。完全提供了其公开在本申请提交日期之前的这里所述的参考文献。本申请中没有内容可被解释为对由于在先发明而不认可本发明人在这样的公开之前的承认。

必须注意到，如本说明书和附属的权利要求书中所使用的，单数形式的“一种”、“一个”和“”包括复数指代物，除非上下文中另有明确规定。因此，例如，提及用于分析来自“一只动物”的生物样品的方法包括对两只或更多这样的动物的指代，对“一个固体支持物”的指代包括对一个或多个这样的固体支持物的指代，并且对于“一个阵列”的指代包括对两个或更多这样的阵列的指代。

在本发明的描述和权利要求中，以下术语将按照以下定义加以使用。

如这里所使用的，“包含”、“包括”、“含有”、“其特征为”、及其语法上的等价物是包容性的或无限制的术语，不排除额外的、未历数的元件或方法步骤。“包含”被解读为包含更高限制性的术语“由...构成”和“主要由...构成”。

如这里所使用的，“由...构成”及其语法上的等价物将要求中未指明的任何元件、步骤或成分排除在外。

如这里所使用的，“主要由...构成”及其语法上的等价物将要求的范围限定为指定的材料或步骤以及那些对所要求的发明的基本的和新的特征不产生实

质影响的材料或步骤。

如这里所使用的，“固体支持物”是指在其上安置抗原阵列的通常或基本平坦的基质。固体支持物可以包含适于携带阵列的任何材料或材料组合。用于构建这些固体支持物的材料需要满足一些要求，如(1)存在可以方便地衍生化的表面基团，(2)对检测中所使用的试剂的惰性，(3)长期稳定，(4)以及与生物样品的相容性。例如，适当的材料包括玻璃、硅、二氧化硅(即硅石)、塑料、聚合物、亲水性无机支持物以及陶瓷材料。示例性的塑料和聚合物包括聚四氟乙烯、聚偏二氟乙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸酯、以及它们的组合。示例性的亲水性无机支持物包括氧化铝、氧化锆、氧化钛和氧化镍。玻璃基质的一个例子可以是显微镜载片。用于制造计算机芯片的硅片也被用于制造生物芯片。参见例如美国专利 5,605,662。

如这里所使用的，“阵列”是指固体支持物上位点的排列。所述位点通常会排列在二维阵列中，但可能具有其他形式。位点的数量可以处于几个到至少几十万个的区间内。阵列图谱和点密度可以改变。例如，使用遗传微系统公司(Genetic Microsystems, Woburn, Massachusetts)的市售 GMS 417 点样仪，用户可以选择点的大小和密度。在直径 150 μm 的点和 300 μm 的中心间距的条件下，1 平方厘米内可以放置 1000 多个点，并且在常规显微镜载片上可以放置 10,000 个以上的点。在 200 μm 中心间距的条件下，这些数量提高到每平方厘米 2500 点和每张载片 25,000 以上个点。

如这里所使用的，“显色性”是指一种用适当的酶消化时产生有色产物的底物。这样的有色产物包括荧光和冷光产物。

本发明中的第一个过程是通过将抗原以预先选定的图案附着在固体支持物表面上制备抗原阵列，从而使得阵列中抗原的位置是已知的。如这里所使用的，抗原是被抗体结合的物质。抗原可以包括蛋白质、碳水化合物、核酸、荷尔蒙、药物、受体、肿瘤标记物等等以及它们的混合物。抗原也可以是抗原的组，如从排阻色谱柱流出的特定蛋白质组份。此外，也可以将表达文库或随机表位文库的一个特定克隆作为抗原。

在本发明的一种实施方式中，如 A.-M. Francoeur 等，136 J. Immunol. 1648 (1986)中所述从 HeLa 细胞中分离抗原。简言之，HeLa 细胞在常规培养基中在

常规组织培养条件下生长。随后优选地用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤融合的 HeLa 细胞培养物、用洗涤剂溶解细胞、并离心除去不溶的细胞碎片。上清液含有约 10,000 种适于产生阵列的免疫学上不同的抗原。

用于产生阵列的抗原并不要求是已知的。全部的要求是抗原的来源是一致的，从而能够产生可重复的阵列。例如，如本领域内所熟知的，含有抗原的 HeLa 细胞上清液可以用排阻层析柱、电泳凝胶、密度梯度等等进行分离。收集组份，所收集的每个组份可能代表可用于产生阵列的一套独特的抗原。因此，即便所述抗原是未知的，如果使用相同的方法和条件对 HeLa 细胞抗原进行分离和分级，可以产生可重复的阵列。

诸如制备随机肽文库或表位文库的其他方法是本领域内熟知的并可用于可重复地生产抗原(E.g., J.K. Scott & G.P. Smith, Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library(用表位文库搜寻肽配体), 249 Science 386 (1990); J.J. Devlin 等, Random Peptide Libraries: A Source of Specific Protein Binding Molecules(随机肽文库：特异性蛋白质结合分子的来源), 249 Science 404-406 (1990); S.E. Cwirla 等, Peptides on Phage: A Vast Library of Peptides for Identifying Ligands(噬菌体肽：鉴定配体的巨大肽文库), 87 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 6378-6382 (1990); K.S. Lam 等, A New Type of Synthetic Peptide Library for Identifying Ligand-binding Activity(鉴定肽结合活性的新型合成肽文库), 354 Nature 82-84 (1991); S. Cabilly, Combinatorial Peptide Library Protocols(组合肽文库策略) (休马那出版社(Humana Press), 304 页, 1997); 美国专利 5,885,780)。这样的文库可以通过将合成的寡核苷酸与适当的融合噬菌体相连进行构建。融合噬菌体是丝状噬菌体载体，其中外源序列克隆在噬菌体基因 III 中并作为基因 III 蛋白质(pIII)的部分展示在病毒粒的一端。每个噬菌体编码单一的随机序列并将其作为与 pIII 融合的复合物表达，其中 pIII 是以每个噬菌体约 5 个分子的量存在的小的壳蛋白。例如，在 J.K. Scott & G.P. Smith(如上)的融合噬菌体技术中，构建了含有 6 个氨基酸残基的可变盒的文库。与噬菌体蛋白质融合的所述 6 肽模块提供了能够用于一次检测 $>10^{12}$ 个噬菌体(或约 10^8 - 10^{10} 个不同克隆)的筛选方法的文库，其中每个在病毒粒表面具有一个待测序列。所获得的文库用于筛选对特定 6 肽序列特异的单克隆抗体。其他研究小组也使用了所述融合噬菌体系统，

并且构建了含有更长肽插入的文库。按照本方法所制备的融合噬菌体可以对阵列中所包含的抗原进行随机或非随机的挑选。所挑选的包含所述阵列的融合噬菌体可以用常规方法加以繁殖以形成所选择抗原事实上的不断供应。

产生抗原的其他方法也是本领域内已知的。例如，通过在表达载体中随机克隆 DNA 片段或 cDNA 可以制备表达文库(E.g., R.A. Young & R.W. Davis, *Yeast RNA Polymerase II Genes: Isolation with Antibody Probes*(酵母 RNA 聚合物 II 基因：用抗体探针分离), 222 *Science* 778-782 (1983); G.M. Santangelo 等, *Cloning of Open Reading Frames and Promoters from the Saccharomyces cerevisiae Genome: Construction of Genomic Libraries of Random Small Fragments*(从酿酒酵母基因组克隆开放读框和启动子：构建随机小片段的基因组文库), 46 *Gene* 181-186 (1986))。有各种来源的商品化的可用于生产这样的文库的表达载体。例如，可以将 HeLa 细胞 DNA 的随机片段或 cDNA 克隆入表达载体，并随后可以挑选表达 HeLa 细胞蛋白质的克隆。这些克隆随后可以用本领域内熟知的方法进行繁殖。随后分离或纯化所表达的蛋白质并可以在阵列生产中使用。

另外，可以使用本领域内熟知的重组 DNA 技术合成抗原。已经克隆了编码许多病毒、细菌和哺乳动物蛋白质的基因，因此可以快速、便宜地合成大量高纯度的蛋白质。例如，已经克隆了编码许多真核和哺乳动物膜结合受体、生长因子、细胞黏附分子和调控蛋白质的基因，并可用作抗原。通过这样的重组技术生产的许多蛋白质(如转化生长因子、酸性和碱性成纤维细胞生长因子、干扰素、胰岛素样生长因子和来自不同物种的各种白介素)是商品化的。

在大多数情况下，不需要将完整的多肽用作抗原。例如，含有至少一个表位(即抗原决定簇或与一种抗体特异性相互作用的抗原的部分)的任何大小多肽或多肽的一部分足以在阵列中使用。

将无论随机或非随机选择的抗原安置在固体支持物上以形成阵列。所述抗原在所述固体支持物上的图案应当是可重复的。即，固体支持物上每个抗原的位置和身份应是已知的。例如，在 10 x 10 的阵列中，精通本领域的人员可以将 1-100 的抗原分别放置在阵列 1-100 的位置上。

可以使用移液装置或机器或为了将液体样品置于固体支持物上所构建的装

置将蛋白质置于固体支持物表面上的阵列中，例如使用商品化的微点样仪，如笛卡尔科技公司(Cartesian Technologies, Inc., Irvine, California)、基因机械公司(Gene Machines, San Carlos, California)、遗传微系统公司(Genetic MicroSystems, Woburn, Massachusetts)、基因派克 DNA 公司(GenePack DNA, Cambridge, UK)、吉提有限公司(Genetix Ltd., Christchurch, Dorset, UK)、以及派科德仪器公司(Packard Instrument Company, Meriden, Connecticut)的产品。

将一系列蛋白质抗原排列在表面上的相关方法包括非接触按需液滴分配和喷墨技术。两种方法都有商品化的设备。笛卡尔科技公司提供了几种纳升级的分配设备，能从 96、384、1536、3456、和 9600 孔微平板中分配体积为 20 nL 至 250 μL 的液体并将其以 400 点/ cm^2 以下的密度精确放置在表面上。所述设备能以各种图案在表面上点样。如其名称所表示的，喷墨技术采用与其在喷墨打印机中相同的原理。MT 公司(Microfab Technologies)提供一种能以各种图案将皮升级的液体分配在表面上的 10 流体头。本发明的一种示例性图案可以是 10 x 10 至 100 x 100 的简单阵列。

许多方法可以用于将蛋白质或其他抗原附着在固体支持物的表面上。其中最简单的事是通过疏水、离子、和范德华力的简单吸附。然而，由于蛋白质具有随时间从所述表面脱离的倾向，这一方法并不是优选的。一种适用的吸附化学方法涉及使用双功能有机硅烷。例如，Thompson 和 Maragos, 44 J. Agric. Food Chem. 1041-1046 (1996)。有机硅烷的一端与芯片表面上暴露的-OH 基团反应形成硅烷醇键。有机硅烷的另一端含有能与蛋白质表面诸如-NH₂ 和-SH 基团的各种基团反应的基团。这一将蛋白质附着与芯片的方法导致在蛋白质和芯片之间形成共价连接。已经用于将蛋白质附着与表面的其他合适的方法包括芳香叠氮基、硝基苄基、和双吡丙啶光化学方法。以上化学品与紫外线接触导致形成能与蛋白质反应形成共价键的反应性基团。芳香叠氮基化学反应形成能够插入 C-H 键的反应性氮烯基团，而双吡丙啶化学反应形成反应性碳烯基团。硝基苄基化学反应被称为锁定化学，其中锁定基团灭活反应性分子。与紫外线接触释放所述分子并使其能够反应。用于将蛋白质附着在固体支持物上的其他方法是本领域内熟知的，例如参见 S.S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking(蛋白质偶联和交联中的化学) (CRC 出版社(CRC Press), 340 页,

1991)。

将抗原以所选阵列附着在固体支持物上之后，应当通过用适当的液体冲洗对固体支持物进行洗涤以除去未结合的抗原。用于洗涤的适当的液体包括磷酸缓冲盐溶液(PBS)及类似溶液，即缓冲在中性或中性附近的相对低离子强度、生物相容性的盐溶液。许多这样的合适的洗涤液是本领域内已知的或可由精通本领域的人员无需过分实验加以设计。例如参见 N.E. Good & S. Izawa, Hydrogen Ion Buffers(氢离子缓冲剂), 24 Methods Enzymology (酶学方法) 53-68 (1972)。

随后对固体支持物进行处理以封闭蛋白质和其他分子与所述固体支持物的非特异性结合。这一封闭步骤阻止抗原、抗体及其他物质与所述固体支持物的结合，其中这样的抗原、抗体或其他分子是不希望结合的。封闭降低了可能遮盖信号的本底，从而增强了信噪比。通过将所述固体支持物在含有与可能以其它方式发生非特异性结合的位点结合的惰性分子的培养基中孵育，封闭所述固体支持物。适用的封闭剂的例子包括牛血清白蛋白、人白蛋白、明胶、脱脂奶粉、聚乙烯醇、Tween 20 和各种商品化封闭剂，如 SEA BLOCK® (ECB 公司(East Coast Biologics, Inc., Berwick, Maine)的商标) 和 SuperBlock™ (皮尔斯化学品公司(Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois)的商标)封闭缓冲液。

在洗涤以从所述阵列除去未结合的抗原并封闭后，所述固体支持物与待测的液体样品接触。所述样品可以来自任何产生个体特异性抗体的动物。例如，人、狗、猫、小鼠、马、牛、和兔都显示具有 ISA。所述样品可以来自各种体液和身体组织，这包括血液、唾液、精液、血清、血浆、尿液、羊水、胸膜液、脑脊髓液、以及它们的混合物。这些样品按照本领域内所熟知的方法获得。根据所使用的检测方法，可能需要处理所述生物样品以实现最佳反应条件。例如，可以调节离子强度或氢离子浓度或所述生物样品的浓度以实现最佳的免疫复合物形成、酶催化等等。

如授权给 Francoeur 的美国专利 5,270,167 中详细描述，当 ISA 与一组随机抗原反应时，形成一定数量的免疫复合物。例如，使用一板约 1000 种独特型抗原，在已经稀释 20 倍的生物样品中可以检测到 ISA 之间的约 30 种免疫复合物。如果所述生物样品是未稀释的，能形成的可检测的免疫复合物的总数可

以大于 10^{23} 。通过选择“较大的”抗原(即具有多个表位的蛋白质而不是肽),也可以增加可能的免疫复合物的总数。因此,应当意识到,根据抗原及其所使用的数量、生物样品的稀释度、以及检测方法,精通本领域的人员可以控制能形成并被检测的免疫复合物的数量。生物样品中 ISA 和阵列中抗原之间形成和不能形成的独特的免疫复合物的组构成了抗体谱。

检测抗体/抗原或免疫复合物的方法是本领域内所熟知的。精通本领域的人员可以对本发明进行改进以适应本领域内已知的各种检测方法。精通本领域的人员所选择的具体检测方法取决于几个因素,这包括可用的生物样品量、生物样品类型、生物样品的稳定性、抗原的稳定性、以及抗原和抗体之间的亲和力。此外,如上所述,根据所选用的检测方法,可能需要对生物样品加以修饰。

虽然这些技术是本领域内所熟知的,以下简要描述了可以用于实践本发明的一些检测方法的例子。

本领域内已知多种免疫检测法。最常见的免疫检测法是竞争性和非竞争性异质检测法,如酶联免疫吸附试验(ELISA)。在非竞争性 ELISA 中,未标记的抗原与诸如生物芯片表面的固体支持物结合。生物样品与结合在反应池中的抗原结合,并且生物样品中的抗体(第一抗体)与所述抗原结合,形成免疫复合物。免疫复合物形成后,除去过量的生物样品并洗涤生物芯片以除去非特异性结合的抗体。所述免疫复合物随后可以与适当的酶标记的抗免疫球蛋白(第二抗体)反应。第二抗体与免疫复合物中的抗体而不是与结合在生物芯片上的其他抗原反应。与包括人在内的不同物种的抗体特异性结合的第二抗体是本领域内所熟知的并且是商品化的,如西格玛化学品公司(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)和 SCB 公司(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California)的产品。进一步洗涤后,加入酶底物。与第二抗体相连的酶催化反应,将底物转化成产物。当存在过量抗原时,产物的量与存在于生物样品中的第一抗体的量直接成正比。产物可以是发荧光或发冷光的,可以使用本领域内熟知的技术和装置加以测量。也可以使用形成有色产物的反应路线,该产物可用分光光度法进行测量。

在本发明的其他实施方式中,第二抗体可以不加利于检测的标记。可以层积额外的抗体(如第三、第四等等),使得每种额外的抗体特异性地识别先前向

免疫复合物所添加的抗体。任何一种这样的额外抗体(例如第三、第四等等)可以加以标记,从而可以如这里所述的对免疫复合物进行检测。

夹心或捕获检测法也可以用于免疫复合物的鉴别和定量。夹心检测法是非竞争性 ELISA 的镜像,其中抗体与固相结合并检测生物样品中的抗原。这些检测法尤其可用于对以低浓度存在的具有多个表位的抗原的检测。这一技术要求固相上(如生物芯片)附着过量抗体。结合的抗体随后与生物样品孵育,并且使得样品中的抗原与结合的抗体的形成免疫复合物。所述免疫复合物与酶联第二抗体孵育,该抗体识别如同第一抗体的抗原上的相同或不同表位。因此,酶活性与生物样品中的抗原数量成正比。D.M. Kemeny & S.J. Challacombe, *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays*(ELISA 和其他固相免疫测定法) (1988)。

可以与第二抗体相连的常见的酶包括辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、6 磷酸葡萄糖脱氢酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶和脲酶。与各种酶相连的二级抗原特异性抗体可从例如西格玛化学品公司(Sigma Chemical Co.)和 ALS 公司(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, Illinois)公司购得。

除了酶联抗体与生物样品中的未标记抗体竞争有限的抗原结合位点以外,竞争性 ELISA 与非竞争性 ELISA 类似。简言之,有限数量的抗原结合在固体支持物上。向所述固体支持物添加生物样品和酶联抗体。生物样品中的抗原特异性抗体与酶联抗体竞争与固体支持物结合的有限数量抗原。形成免疫复合物后,通过洗涤除去非特异结合的抗体,加入酶底物,并测量酶活力。不需要第二抗体。由于所述检测法是竞争性的,酶活力与生物样品中的抗体量成反比。

本发明范围内也可以使用另一种竞争性 ELISA。在这一实施方式中,来自生物样品的有限量的抗体如这里所述与固体支持物的表面结合。随后使标记的和未标记的抗原与固体支持物接触,从而使得标记的和未标记的抗原互相竞争结合固体支持物表面上的抗体。形成免疫复合物后,通过洗涤除去非特异结合的抗原。通过与酶联第二抗体孵育检测免疫复合物,所述第二抗体将抗原上相同或不同的表位作为第一抗体加以识别。随后测试酶活力,获得与所存在的抗原量成反比的信号。

实践本发明的方法时也可以使用匀质免疫检测法。匀质免疫检测可以优选用于检测如荷尔蒙、治疗性药物和非法药物等不能用其他方法分析的低分子量

化合物或高浓度化合物。由于不需要分离步骤，匀质检测尤其有用。R.C. Boguslaski 等, *Clinical Immunochemistry: Principles of Methods and Applications* (临床免疫化学方法和应用原则) (1984)。

在匀质技术中，对结合的或未结合的抗原进行酶联。当生物样品中的抗体与酶联抗原结合时，空间位阻使酶失活。这导致可测量的酶活的丧失。自由抗原(即没有酶联的)与酶联抗原竞争有限的抗体结合位点。因此，酶活与生物样品中的抗原浓度成正比。

可以在匀质免疫检测中使用的酶包括溶菌酶、神经氨酸苷酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、6 磷酸葡萄糖脱氢酶以及 β -半乳糖苷酶。T. Persoon, *Immunochemical Assays in the Clinical Laboratory*(临床实验室中的免疫化学试验), *5 Clinical Laboratory Science* 31 (1992)。酶联抗原可以购得或可以使用本领域内所熟知的各种化学品进行连接，所述化学品包括戊二醛和马来酰亚胺衍生物。

在先的抗体谱技术包括碱性磷酸酶标记的第二抗体和 5-溴-4-氯-3'-吲哚基磷酸对甲苯胺盐(BCIP)及氯化硝基四氮唑蓝(NBT)，以上两种化合物可从诸如皮尔斯化学品公司(Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois)的各种来源购得。酶反应形成堆积在膜表面上的不溶的有色产物，在产生抗原-抗体复合物的地方形成条带。在生物芯片中这一方法不是最理想的，因为它难以定量，并且比色法通常比基于荧光和冷光的检测法的灵敏度要低。

实践本发明时也可以使用荧光免疫检测。除了将酶换成称为荧光团或荧光染料的荧光化合物外，荧光免疫检测类似于 ELISA。这些化合物能够从入射光中吸收能量并以更长波长和更低能量的光线形式放射能量。通常能方便地与抗原和抗体偶联的异硫氰酸盐形式的荧光素和罗丹明是本领域内最常用的。D.P. Stites 等, *Basic and Clinical Immunology*(基础和临床免疫学) (1994)。荧光素吸收波长为 490 至 495 nm 的光线并发射 520 nm 波长的光线。四甲基罗丹明吸收 550nm 波长的光线并发射 580nm 波长的光线。示例性的基于荧光的检测方法包括 ELF-97 碱性磷酸酶底物(分子探针公司(Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon))、PBXL-1 和 PBXL-3 (与链亲和素偶联的藻胆体) (MB 公司(Martek Biosciences Corp., Columbia, Maryland))、FITC 和得克萨斯红(Texas Red)标记的

羊抗人 IgG(杰克逊免疫研究实验室(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania))、以及与链亲和素偶联的 B-藻红蛋白和 R-藻红蛋白(分子探针公司(Molecular Probes Inc.))。ELF-97 是一种无荧光化学品, 它被碱性磷酸酶消化形成荧光分子。由于碱性磷酸酶的周转, 使用 ELF-97 底物导致信号放大。与第二抗体相连的荧光分子不表现出这一放大效果。

本领域中也使用约 600nm 处产生荧光的从藻类分离的藻胆蛋白、卟啉和叶绿素。I. Hemmila, Fluoroimmunoassays and Immunofluorometric Assays(荧光免疫测定和免疫荧光计测定), 31 Clin. Chem. 359 (1985); 美国专利 4,542,104。藻胆蛋白及其衍生物可以商品名 R-藻红蛋白(PE)和 Quantum Red™购得, 例如购自西格玛化学品公司(Sigma Chemical Co.)。

此外, 在免疫检测中可以使用 Cy-偶联的第二抗体, 并且它们是商品化的。例如, Cy-3 在 554 nm 处最大激发并发射 568 至 574 nm 之间的光。Cy-3 比其他荧光团更加亲水, 并因此具有更低的非特异结合或聚合的倾向。Cy-偶联的化合物可以从 ALS 公司(Amersham Life Sciences)购买。

示例性的基于冷光的检测方法包括 CSPD 和 CDP-Star 碱性磷酸酶底物(罗氏分子生化公司(Roche Molecular Biochemicals))和 SuperSignal®辣根过氧化物酶底物(皮尔斯化学品公司(Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois))。

化学发光、电发光和电化学发光(ECL)检测方法也是对生物样品中抗原和抗体进行定量的有吸引力的方法。发光化合物具有吸收能量的能力, 该能量在激发时以可见光的形式释放出来。在化学反光中, 激发源是一种化学反应; 在电发光中激发源是电场; 在 ECL 中电场引起发光的化学反应。

用于 ECL 检测方法的分子通常含有一种有机配体和一种过渡金属。有机配体与一个或多个过渡金属原子螯合形成一种有机金属复合物。各种有机金属和过渡金属-有机配体复合物已被用作 ECL 标记物用于生物样品中分析物的检测和定量。由于其热、化学和光化学稳定性、其强烈的光发射和长的光发射时间, 本领域内常用钪、钇、镧、铈和铈过渡金属。有机配体的种类很多并包括葱和多吡啶分子以及杂环有机化合物。例如, 联吡啶、二吡啶、三吡啶、菲罗琳以及它们的衍生物是本领域内常用的有机配体。本领域内常见的有机金属复合物包括三-联吡啶钪(II), 由 IGEN 公司(IGEN, Inc., Rockville, Maryland)和西格玛

化学品公司(Sigma Chemical Co)提供商品化产品。

有利的是, ECL 可以在水性条件和生理 pH 值下进行, 从而对生物样品的处理最少。J.K. Leland 等, *Electrogenerated Chemiluminescence: An Oxidative-Reduction Type ECL Reactions Sequence Using Tripropyl Amine*(电致化学发光: 采用三丙胺的氧化还原型 ECL 反应序列), 137 *J. Electrochemical Soc.* 3127-3131 (1990); WO 90/05296; 美国专利 5,541,113。而且, 通过添加诸如胺的各种辅助因子可以增强这些化合物的发光。

在实践中, 三-联吡啶钌(II)复合物可以例如使用本领域内熟知的方法(包括与赖氨酸氨基基团、半胱氨酸巯基基团和组氨酸咪唑基团相连)与第二抗体相连。在一典型的 ELISA 免疫检测中, 第二抗体能够识别与抗原相结合的 ISA, 但不识别未结合的抗原。洗去非特异性结合的复合物后, 三-联吡啶钌(II)复合物可以通过化学的、光化学的、以及电化学的激发方法加以激发, 例如通过对生物芯片通电。例如 WO 86/02734。激发会导致三-联吡啶钌(II)复合物的双氧化反应, 这形成可以被例如光电倍增管探测到的冷光。用于检测冷光的设备是本领域内熟知的并可以从例如 IGEN 公司(IGEN, Inc.)处购得。

固态颜色检测电路也可以用于监测生物芯片上的颜色反应, 并且在需要时比较使用样品前后的颜色图谱。也可以是使用颜色照片影像并分析像素信息以获得相同的信息。

另一种检测方法是使用表面等离子共振(SPR)芯片。在使用样品前后扫描所述芯片的表面并进行比较。SPR 芯片依赖于感兴趣的分子暴露于光源时的光折射。每种分子具有其自身的折射率, 可由此对其加以鉴定。这一方法要求准确的定位和控制电路以精确扫描芯片。

另一种方法涉及用荧光试剂流动洗涤生物芯片。与生物样品结合的微观位点会发荧光并用电荷耦合器件(CCD)阵列进行检测。分析这样的 CCD 阵列的输出以确定与每个样品相关的独特图谱。这一方法避免了与扫描技术相关的问题。对于任何一种方法而言, 速度不是问题, 因为在几分钟内发生样品与参照物的化合。

此外, 阵列扫描仪是商品化的, 例如可从遗传微系统公司(Genetic Microsystems)购得。GMS 418 阵列扫描仪使用激光镜片将聚焦的光束在生物芯

片上快速移动。这一系统使用双波长系统，含有产生高激发能量以缩短激发时间的高功率固态激光。在 30 Hz 的扫描速度下，GMS 418 可以在约 4 分钟内以 10 μm 的分辨率扫描一片 22x75 mm 的载片。

对使用阵列扫描仪所获得的图像进行分析的软件是易于获得的。可用的软件包包括 ImaGene (BD 公司(BioDiscovery, Los Angeles, California)); ScanAlyze (可免费使用; 由 Mike Eisen 开发, 斯坦福大学); De-Array (由国家健康研究所的 Yidong Chen 和 Jeff Trent 开发; 与扫描分析公司(Scanalytics, Fairfax, Virginia) 的 IP Lab 共同使用); Pathways (RG 公司(Research Genetics, Huntsville, Alabama)); GEM tools (IP 公司 (Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, California)); 以及 Imaging Research (ALS 公司(Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, New Jersey))。

一旦抗原和 ISA 之间的相互作用得以鉴定和定量，信号可以数字化。数字化的抗体谱作为鉴定生物样品来源的识别标志。根据所使用的生物芯片，数字化的数据可以采用多种形式。例如，生物芯片可以包含具有 10 列和 10 行组成总数为 100 个微位点的阵列。每个微位点含有至少一种抗原。向每个微位点添加含有 ISA 的生物样品并进行孵育后，对抗原和生物样品中 ISA 的相互作用进行鉴定和定量。在每个微位点中，该位点上的抗原和生物样品中的 ISA 的相互作用会形成或不会形成可定量的信号。在一种实施方式中，通过将数值“0”(如果没有获得可定量的信号)或“1”(如果获得了可定量的信号)赋予 100 个微位点中的每一个位点，将抗体谱的结果数字化。使用这一方法，数字化的抗体谱含有一组独特的 0 和 1 的组合。

当然可以将数值“0”或“1”根据内参微位点中所获得的信号进行标准化，从而可以对较晚获得的数字化抗体谱进行正确地比较。例如，一个或几个微位点可以含有一种已知的抗原，它会随时间保持恒定。因此，如果后来的生物样品是比先前的生物样品更大或更少稀释的，使用来自已知抗原的信号可以对信号进行标准化。

精通本领域的人员应当认识到，存在并可以使用其他数字化抗体谱的方法。例如，所使用的数值可以是渐增的并与信号强度成正比，而不是将数值“0”或“1”赋予每个微位点。

通过数字化抗体谱信号，可以将生化结果输入计算机并快速访问和参考。抗体谱数字化几秒钟内，计算机可以与先前数字化的抗体谱进行比较以确定是否存在匹配。如果数据库中存在相匹配的抗体谱，可以对生物样品的来源作出阳性鉴定。因此，本发明的方法可以对生物样品的来源进行区分和作出阳性鉴定。

在本发明的一种实施方式中，本发明的方法可以用于对一种生物样品与犯罪嫌疑人进行匹配进行司法分析。从犯罪现场所获得的法医样品经常遭遇样品受到干燥、小的样品量、与一个以上个体的样品混合、掺杂有化学品等等的情况。本发明提供了快速分析、简单、低成本以及法医样品与嫌疑人匹配的精确性的优点。例如，根据本领域内熟知的方法获得法医样品和来自一个或多个嫌疑人的样品。如这里所述的制备每个样品的抗体谱。随后对抗体谱进行比较。抗体谱的匹配说明所述法医样品是来自所匹配的嫌疑人。如果没有获得抗体谱的匹配，则所有嫌疑人都不是所述法医样品的来源。

在本发明的另一实施方式中，本发明所述的方法用于对个体的药物测试。例如，在许多工作场所中，不使用违禁药物是获得或保持工作的一个条件。使用本发明的方法通过抗体捕获或类似方法，可以检测人的血流中违禁药物的存在。而且，如 WO 97/29206 中所述的，在单次测试中可以将药物测试与样品的鉴定相关联。在某些动物中(如参加竞赛的马和狗)，药物测试也是重要的。

在以下实施例中对本发明进行进一步的描述，这些实施例是出于举例说明的目的而提供的，并且不以任何方式限制本发明。

实施例 1

执法机构已经表现出对与嫌疑人的药物检测相关的几种需求，这包括处理与样品收集相关的隐私问题、样品保管链的维护、防止嫌疑人对样品的掺假、以及推动更快的样品分析时间周期。目前的药物检测方案采用尿液样品和偶尔采用的血液样品。侵犯隐私是采用尿液样品的一个持续性问题，因为必须观察提供样品的个体以维护保管链并排除样品调换或掺假的可能性。尿液样品也不是目前中毒水平的好的指示物，因为许多药物代谢物在最初服用所述药物后的几天或几周内持续排入尿液中。虽然血液样品没有这些问题，收集血液是一种

入侵性过程，要求特别的工具和受过训练的人员，这在有需求时可能不是总能得到的。执法人员必须对所有收集的样品保持严格的保管链，以确保不会发生违规的运作或故意的篡改。保管链中的违规或甚至是感觉上的违规可能导致证据完全被驳回或几乎不产生效力。

本发明的实施方式以几种方式解决这些问题。首先，将抗体谱鉴定与药物测试相结合使得样品提供者的鉴定与测试形成整体并避免了对复杂的保管过程链的需求。第二，因为唾液中的药物水平能够容易地与血液中的药物水平相关联(W. Schramm 等, *Drugs of Abuse in Saliva: A Review*(唾液中的滥用药物回顾), 16 *J. Anal. Toxicology* 1-9 (1992); E.J. Cone, *Saliva Testing for Drugs of Abuse*(药物滥用的唾液检测), 694 *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 91-127 (1995)), 这提供了目前药物使用的较好的指示物(D.A. Kidwell 等, *Testing for drugs of abuse in saliva and sweat*(检测唾液和汗液中的滥用药物), 713 *J. Chrom. B* 111-135 (1998)), 基于唾液的药物测试优于尿液测试。嫌疑人的唾液样品也可以在执法人员的视线内方便地收集而不会侵犯隐私或使用入侵性方法。最后，所述测试易于使用并可以由执法人员在所在地快速进行，而不要求在遥远的中心实验室需要几天至几周的时间。V.S. Thompson 等, *Antibody profiling as an identification tool for forensic samples*(法医样品鉴定工具：抗体谱型分析), 3576 *Investigation and Forensic Science Technologies* 52-59 (1999)。

在这一实施例中，提供了针对两种常见违禁药物(可卡因和甲基苯丙胺)的基于抗体的测试。这些是最常见的滥用药物，并且其使用呈上升趋势。S.B. Karch, *Drug Abuse Handbook*(药物滥用手册) (CRC 出版社(CRC Press), 1998); L.D. Bowers, *Athletic Drug Testing*(运动药物检测), 17 *Sports Pharmacology* 299-318 (1998)。

材料和方法。与碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体购自杰克逊免疫研究实验室(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)。兔抗人 IgA 抗体购自美国生物公司(U.S. Biological, Swampscott, MA)。SeablockTM、氯化硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3'-吲哚基磷酸对甲苯胺盐(NBT/BCIP)、对硝基苯磷酸二钠盐(PNPP)、EZ-LinkTM 马来酰亚胺活化的碱性磷酸酶试剂盒、以及 FreeZyme®偶联物纯化试剂盒来自皮尔斯化学品公司(Pierce Chemical, Rockford, Illinois)。针对苯甲

酰爱康宁和甲基苯丙胺的单克隆抗体、以及甲基苯丙胺和苯甲酰爱康宁的牛血清白蛋白(BSA)偶联物购自 OEM 概念公司(O.E.M Concepts, Toms River, New Jersey)。可卡因和甲基苯丙胺盐酸盐购自西格玛公司(Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri)。抗体谱试条购自麦氏公司(Miragen, Inc., Irvine, California)。用于组合的药物-抗体谱测试的试条按照 A.M. Francoeur, Antibody fingerprinting: a novel method for identifying individual people and animals(抗体指纹识别: 鉴定个体人类和动物的新方法), 6 Bio/Technology 822-825 (1988)的实验方案生产。使用 SDS 公司(Saliva Diagnostic Systems, Vancouver, Washington)、OST 公司(Ora Sure Technologies, Inc., Bethlehem, Pennsylvania)、以及萨氏公司(Sarstedt, Inc., Newton, North Carolina)的唾液取样器从志愿者处收集唾液样品。

通过对先前用于处理血液样品的方案进行改进开发了基于唾液的抗体谱检测方法。T.F. Unger & A. Strauss, Individual-specific antibody profiles as a mean of newborn infant identification(利用个体特异性抗体谱鉴定新生儿), 15 J. Perinatology 152-155 (1995)。简言之, 将用 1.0 ml PBST(50 mM 磷酸缓冲盐溶液, 0.2% Tween 20)稀释的 500 μ l 唾液样品与抗体谱试条孵育至少 16 小时过夜, 并用 PBST 洗去过量的样品。随后, 所述试条接连用 100 ng/ml 兔抗人 IgA 孵育 1 小时并用 100 ng/ml 羊抗兔 IgG-碱性磷酸酶偶联物孵育 30 分钟, 两次孵育之间进行洗涤。所述试条再次用 PBST 洗涤, 并添加碱性磷酸酶的沉淀底物 NBT/BCIP 以在试条上显示条带。

检测了 Saliva SamplerTM (SDS 公司(Saliva Diagnostic Systems))和 SalivetteTM (萨氏公司(Sarstedt, Inc.))的唾液收集系统与抗体谱检测法的相容性。Saliva SamplerTM 系统包括一个与塑料手柄相连的棉垫。当已经收集了足够的样品时, 手柄中的窗口变蓝。收集后将所述的垫放置在保存缓冲液中。SalivetteTM 是一个在口腔内放置约 10 分钟并随后在塑料管中离心以收集样品的棉花卷。两种取样器都放置在口腔的牙龈沟中进行样品收集。作为温度为-20°C、4°C、和 25°C 时保存时间的函数的样品质量通过对这两种取样器收集的样品进行抗体谱实验加以评估。

五名志愿者参加了研究, 以比较血液 AbP 图谱和从其唾液样品所获得的 AbP 图谱。使用人作为对象的研究方案按照爱达荷州国家工程与环境实验室制

度审查委员会的指导。血液样品收集在含有抗凝剂 EDTA 的试管中并立即使用。使用 Saliva Sampler™ 唾液收集系统收集唾液。使用 Unger & Strauss 的血液实验方案(如上)和如上所述的唾液抗体谱检测方法对成对的血液和唾液样品进行分析。

四名另外的志愿者参加了唾液掺杂研究以评估各种食物和饮料对抗体谱检测的影响。向所述志愿者提供了奶油硬糖和柠檬硬糖、含糖和无糖口香糖、含糖和无糖可乐、以及牛奶巧克力。吃了以上物品后,要求志愿者使用所提供的唾液取样器收集唾液样品。也要求志愿者饮酒、喝咖啡、吃他们所选择的食物、并在提供样品前刷牙。一名吸烟的志愿者在吸了一支烟后提供了样品。也从这些志愿者处收集了基准样品。

按照生产商的实验方案,使用 Pierce EZ-Link™ 马来酰亚胺活化的碱性磷酸酶试剂盒将针对甲基苯丙胺和苯甲酰爱康宁的单克隆抗体与碱性磷酸酶偶联。按照生产商的实验方案,使用 FreeZyme® 偶联物纯化试剂盒将未偶联的抗体与抗体-酶偶联物分离。

针对可卡因和甲基苯丙胺开发了竞争性酶联免疫吸附试验(ELISA)。将甲基苯丙胺或苯甲酰爱康宁的 BSA 偶联物在 pH 9.6 的 50 mM 碳酸盐缓冲液中稀释,并在 96 孔微滴定平板的每个孔中加入 50 μ l。4°C 孵育平板过夜以使得偶联物与孔表面结合。随后用 PBST 洗涤平板以除去过量的 BSA 偶联物。然后,在平板上添加 50 μ l 浓度介于 0 到 1000 μ g/ml 的可卡因或甲基苯丙胺溶液并添加 50 μ l 与碱性磷酸酶偶联的单克隆抗苯甲酰爱康宁或抗甲基苯丙胺。在这一步骤中,固定化的 BSA 药物偶联物与溶液中的游离药物竞争抗体上的结合位点。竞争反应完成后,洗去未结合的抗体和游离的药物。最后,在孔内添加 100 μ l 溶解的碱性磷酸酶底物(PNPP)溶液以与通过抗药物抗体与孔表面结合的碱性磷酸酶反应。反应 20-30 分钟后通过添加 25 μ l 3M 的 NaOH 终止反应,并使用 Tecan Spectra 平板阅读器读取 405 nm 处每个孔的吸光度。

在 Miragen AbP 条带的生产中使用了聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,并将其用于评估可卡因-和甲基苯丙胺-BSA 偶联物与其表面结合的可行性。将 PVDF 膜切成与其在抗体谱检测中所使用的大小相同的试条。对每种药物准备了 4 个试条,在每个试条的 3 个位点上点上 10 μ l 的一种药物-BSA 偶联物以进行一式三份的

分析。使用前将试条 35°C 干燥 1 小时。试条上的非特异性结合位点用含有 1 mg/ml BSA 的 PBST 封闭 1 小时并随后用 PBST 洗涤。在 PBST 中制备浓度为 0、0.1、10 和 1000 $\mu\text{g/ml}$ 的可卡因和甲基苯丙胺溶液。然后，向试条添加 750 μl 可卡因或甲基苯丙胺溶液，并加入另外 750 μl 与碱性磷酸酶偶联的抗苯甲酰爱康宁或抗甲基苯丙胺抗体并孵育 1 小时。在此期间发生游离的和固定化的药物之间针对抗体结合位点的竞争反应，洗涤试条以除去未结合的抗体和药物并加入 NBT/BCIP 底物。试条显色 15 分钟。

通过将 10 μl 含甲基苯丙胺和苯甲酰爱康宁-BSA 偶联物的液滴点在抗体谱试条的空白的底部并使其 35°C 干燥 1 小时准备组合的抗体谱-药物检测。使用 Ora Sure 取样器收集来自 3 名个体的唾液样品。一半唾液样品加入 1000 $\mu\text{g/ml}$ 的可卡因或甲基苯丙胺。用含 1.0 mg/ml BSA 的 PBST 封闭试条 1 小时并用 PBST 洗涤。然后，向试条添加 500 μl 加料或未加料的唾液与碱性磷酸酶偶联的抗苯甲酰爱康宁和抗甲基苯丙胺抗体并室温孵育过夜。用 PBST 洗涤试条并如上所述进行抗体谱检测。

结果与讨论。通过改变试剂浓度、样品体积以及孵育时间优化了基于唾液的抗体谱检测。图 1 中显示了由唾液样品所获得的抗体谱的示例性结果。与基于血液的抗体谱检测相比，唾液检测耗费多得多的时间(18 小时相对 2 小时)并要求多 10 倍的样品量。这是由于与血液相比，唾液中存在的总抗体水平低 100 倍。Parry, Tests for HIV and hepatitis viruses(HIV 和肝炎病毒的检测), 694 Annals N.Y. Acad. Sci. 221 (1993)。

使用 Saliva SamplerTM 或 SalivetteTM 系统收集的唾液样品中存在的抗体的稳定性通过在 -20°C、4°C、和 25°C 保存并在一周内每天进行样品的抗体谱检测以观察所看到的图谱是否有任何改变加以确定。使用任何一种取样器的新鲜的唾液样品产生最好的结果。在所有温度下，用 Saliva SamplerTM 系统收集的样品随时间的稳定性优于用 SalivetteTM 系统收集的样品。随 Saliva SamplerTM 系统所提供的防腐保存缓冲液看来阻止了由于细菌污染引起的抗体降解，而 SalivetteTM 取样器不包含防腐剂。

在 5 天内，用 Saliva SamplerTM 系统收集并保持在室温下的样品没有表现出图谱的改变。这一结果与用保存在冰箱中的样品所得到的相反，后者即便在保

存几小时后就表现出明显的退化。不清楚为何会发生。由于冷冻-解冻循环引起的损害，冷冻的样品也表现出一些退化，但在冷冻温度下长期保存没有导致进一步的降解。由于 Saliva Sampler™ 唾液收集系统具有较好的保存特性并更易于使用，将其用于掺杂研究。

将血液 AbP 图谱与唾液 AbP 图谱进行比较以确定存在于这些样品中的 ISA 是否相同。结果显示，从这两种不同样品所得到的图谱差异明显(图 2)。这一结果有些令人惊讶，因为唾液是血液的滤出液，并且预期存在于唾液中的 ISA 应与存在于血液中的相同。不同的图谱可能源自每一例中所检查的抗体的同种型。在血液分析了 IgG 抗体，因为它们是最普遍的。在唾液中 IgA 抗体更为普遍并进行了分析。获得上述结果后，对唾液样品也进行了 IgG 抗体分析以确定是否其图谱与血液图谱相同。然而，由于唾液中所存在的 IgG 抗体水平极低，没有取得成功。

唾液掺杂研究显示，当任何一种掺杂物存在时，实际上抗体谱中没有发生改变(图 3)。在一些情况下，一个条带可能更暗或更亮，但看来没有缺失或额外的条带。由于这是初步研究，所检验的掺杂物是日常生活中可能使用的易于获得的物品。然而，正如互联网快速搜索显示的，存在许多战胜基于尿液的药物检测的建议方法，包括用由这些网站出售的各种物质对样品进行吸收和掺杂。这里所显示掺杂结果是有前景的，因为看来抗体谱检测不受通常可以在进行唾液检测前消费的食物影响。

使用直接竞争检测法开发了对可卡因和甲基苯丙胺的免疫检测测试。抗苯甲酰爱康宁抗体用于可卡因检测；然而，这一抗体对可卡因和苯甲酰爱康宁(可卡因的主要代谢物)产生相同的反应，因此对检测结果不产生影响。在这一检测中，存在于样品中的药物与固定在微滴定板的孔表面的 BSA 偶联的药物竞争酶标抗体上的结合位点。在高药物浓度的样品中，大部分抗体-酶偶联物会与溶液中的药物结合并会在最后步骤中被洗去。因此，微滴定平板中会存在极少的酶并且显色的量会很低。相反地，如果样品中没有药物，抗体会与固定的药物结合并在洗涤步骤后留在孔内，导致强烈的显色。这导致与药物浓度成反比的信号(图 4 和 5)。可卡因检测的线性区间为 0.1 到 5 μ g/ml，甲基苯丙胺检测的线性区间为 0.1 到 10 μ g/ml。这一区间涵盖了目前由药物滥用和心理健康

服务署(Substance Abuse and Mental Health Services Administration)所设定的这些药物的临界值(分别为 0.3 和 1.0 $\mu\text{g/ml}$)。M. Peat & A.E. Davis, Drug Abuse Handbook(药物滥用手册) (CRC 出版社(CRC Press, Boca Raton, Fla.), 1998)。

通过使用 ELISA 研究过程中所确定的最优浓度 BSA-药物偶联物,在 PVDF 膜上进行了药物检测。因为免疫检测与药物浓度的相反关系,当药物浓度低时观察到深色的点,随着药物浓度的增加,点逐渐消失(图 6 和 7)。

由于 PVDF 膜上的药物测试是有前景的,评价了将两种药物测试与抗体谱检测合并的可能性。无论是否存在所述药物,3 名个体的 AbP 图谱没有改变(图 8)。这一结果显示,所述药物的存在不干扰用于进行抗体谱检测的试剂。

实施例 2

在这一实施例中,遵照实施例 1 的过程,除了将分组的 HeLa 细胞抗原以预先确定的图案以二维阵列固定在 PVDF 膜上。此外,可卡因和甲基苯丙胺作为所述阵列上额外的点固定在所述膜上。如所述的显色后,结果基本与实施例 1 中的类似。

实施例 3

在这一实施例中,遵照实施例 2 的过程,除了将所述阵列固定在玻璃载片上。

实施例 4

如实施例 1 中制备检测试条并在 PBS 中预先封闭。试条随后与介于 50 μl 至 0.1 μl 的各种量的血清接触 20 分钟。随后将试条放入漂白溶液(0.5%体积比的次氯酸钠)并用 PBS 洗涤 4 次。

在试条经受两步层积操作的情况下,所述试条与兔抗人 IgG 接触 12 分钟后用 PBS 洗涤 4 次。这些试条随后与偶联有碱性磷酸酶的羊抗兔 IgG 接触 12 分钟。随后洗涤所述试条并如实施例 1 中所述的进行显色。两个抗体层的结果可参见图 9,其中在低至 1 微升血清时可以看到具有一些条带缺失的可读图谱,并在 3 微升血清时可以看到完整图谱。

在所述试条经受3步层积处理的情况下,所述试条与兔抗人IgG接触12分钟后用PBS洗涤4次。这些试条随后与羊抗兔IgG接触12分钟。所述试条随后与偶联有碱性磷酸酶的驴抗羊IgG接触12分钟。随后洗涤所述试条并如实施例1中所述的进行显色。三个抗体层的结果可参见图10,其中在低至0.5微升血清时可以看到具有一些条带缺失的可读的图谱,在1微升血清时可以看到完整图谱。

图9和10的比较显示,在提供个体特异性抗体的可读图谱方面,三抗体层积处理比两层处理提高了灵敏度。

实施例5

如实施例1中制备检测试条并在PBS中预先封闭。所述试条与3微升血清接触20分钟。随后将试条放入漂白溶液(0.5%体积比次氯酸钠),之后用PBS洗涤4次。

在所述试条经受两步沉积处理的情况下,所述试条与兔抗人IgG接触12分钟后用PBS洗涤4次。这些试条随后与偶联有碱性磷酸酶的羊抗兔IgG接触12分钟。随后如实施例1中所述洗涤所述试条并显色。

在所述试条经受三步沉积处理的情况下,所述试条与羊抗人IgG接触12分钟后用PBS洗涤4次。这些试条随后与兔抗羊IgG接触12分钟。所述试条随后与偶联有碱性磷酸酶的驴抗兔IgG接触12分钟。随后如实施例1中所述洗涤所述试条并显色。

图11中并排展示了两步和三步沉积处理的结果。试条A是三层试条,试条B是两层试条。如图所示,用三层方法获得了强得多的信号和灵敏度。

对所述两种试条进行了光密度分析研究,结果显示在图12中,其中三层试条是上面的线,两层试条是下面的线。线的高度表示条带的强度。如图12所示,三层方法对于特定条带具有增强的读出值,但在背景噪音中没有成比例的增强。因此,三层方法比两层方法具有提高的灵敏度。

虽然在某些实施方式中已经对本发明进行了描述,本发明可以在本公开的精神和范围内作其他的改进。因此,本申请书意味着涵盖使用其普通原理的本发明的任何变化、应用或改装。此外,本申请书意味着涵盖那些随着本发明所

属领域内的已知或常规实践所产生的并在附属的权利要求书的限定之内的对本公开的偏离。

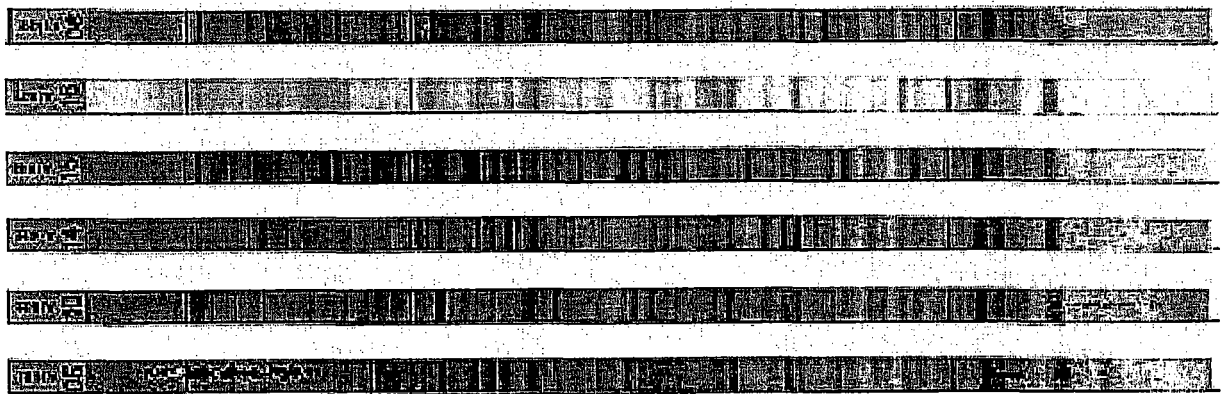


图 1

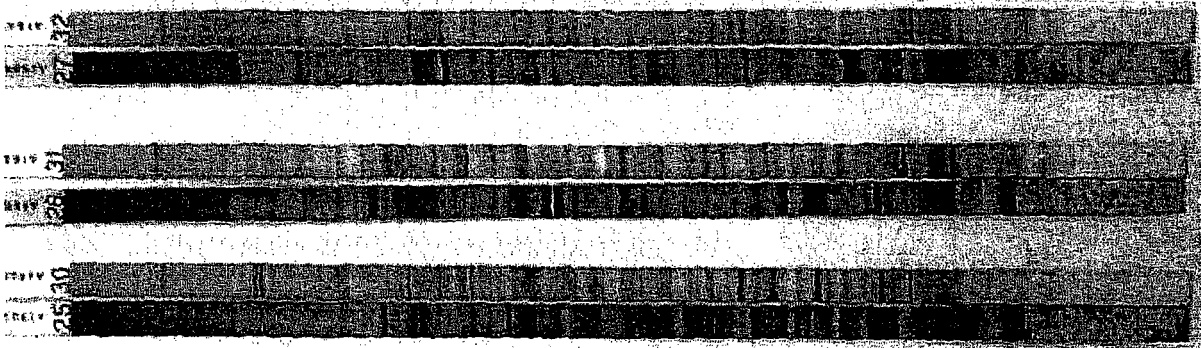


图 2

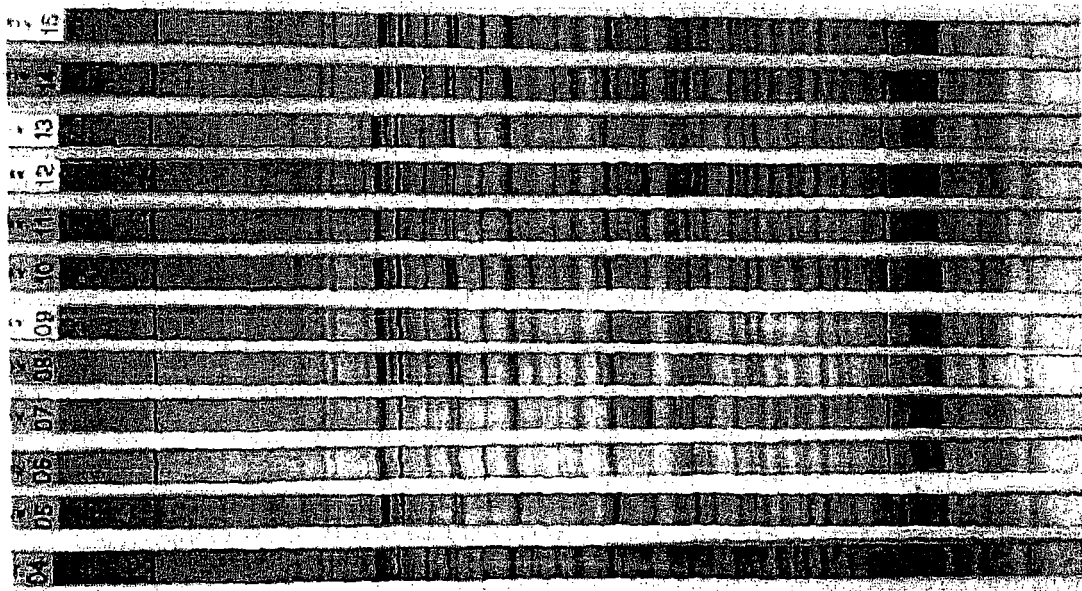


图 3

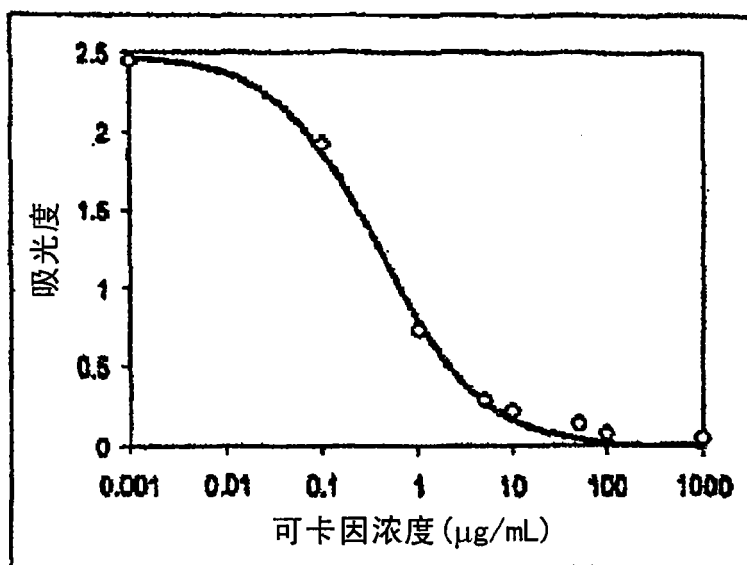


图 4

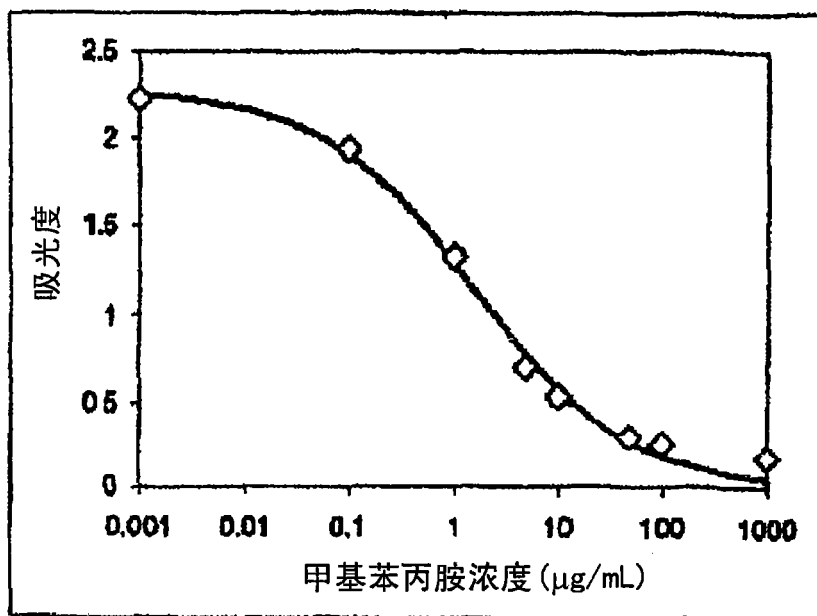


图 5

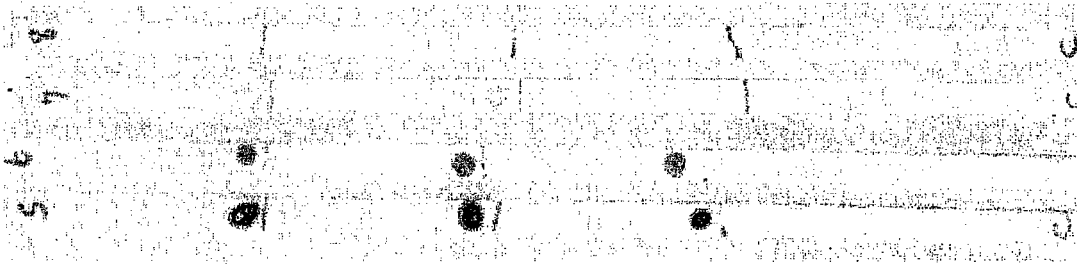


图 6

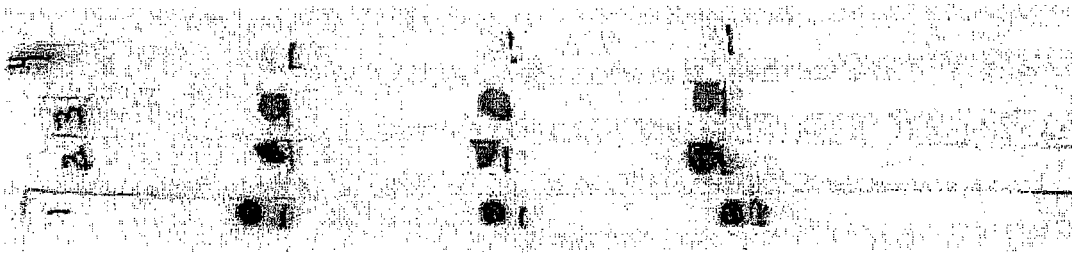


图 7

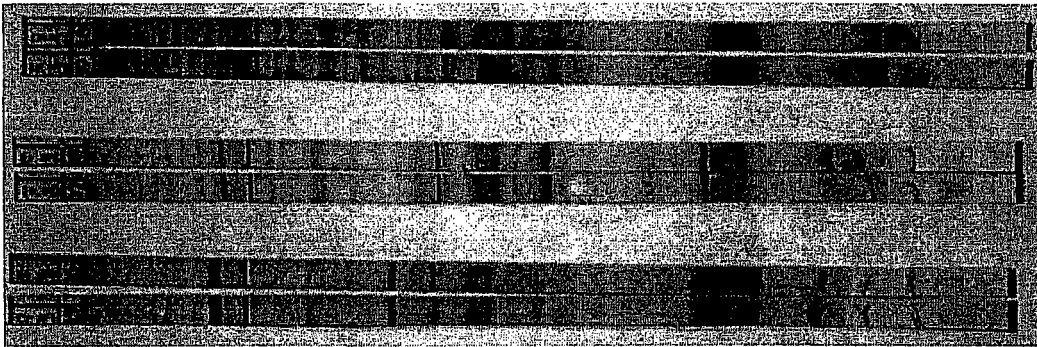


图 8

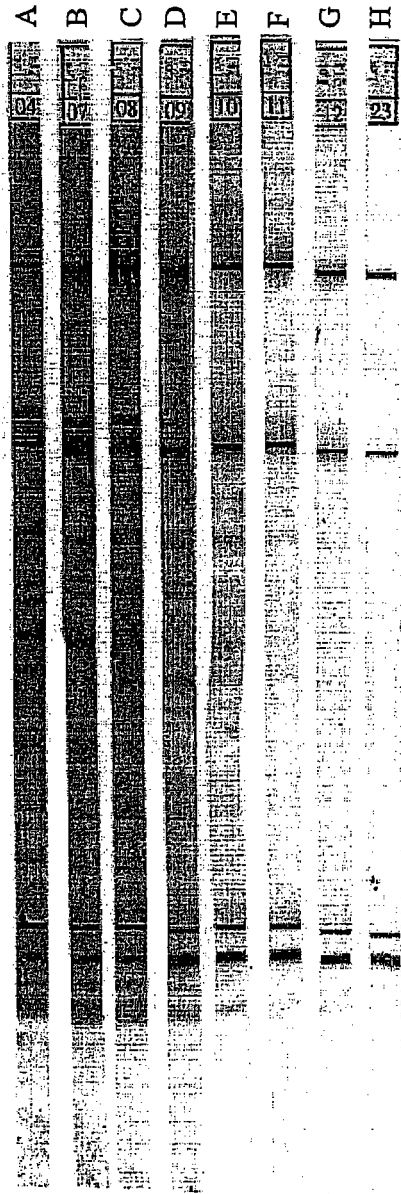


图 9

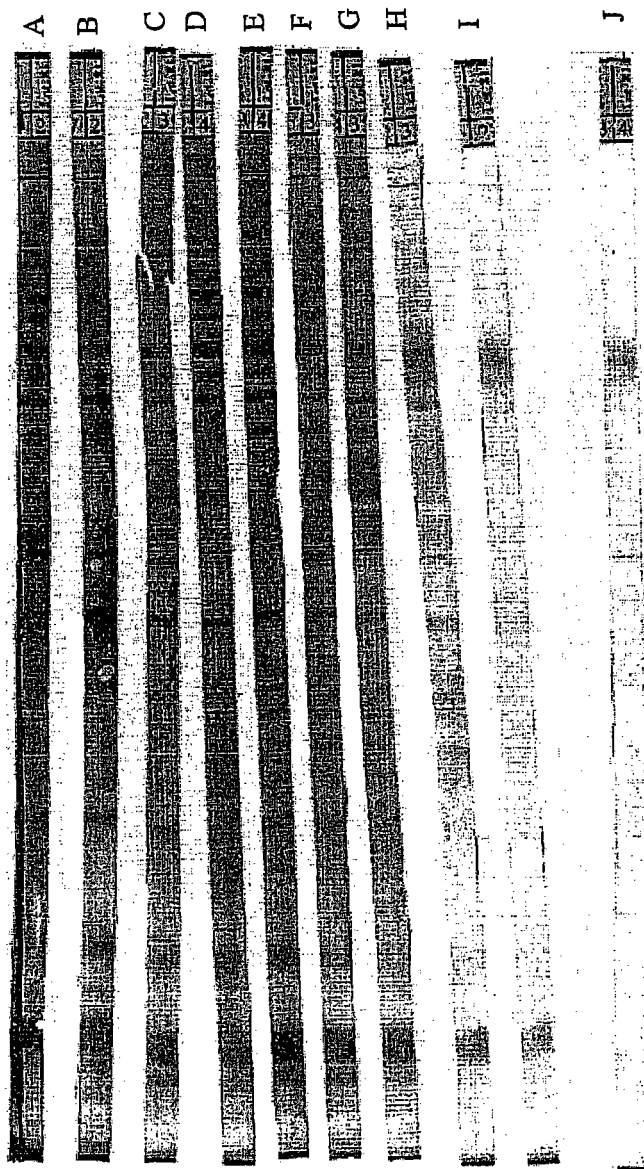


图 10



图 11

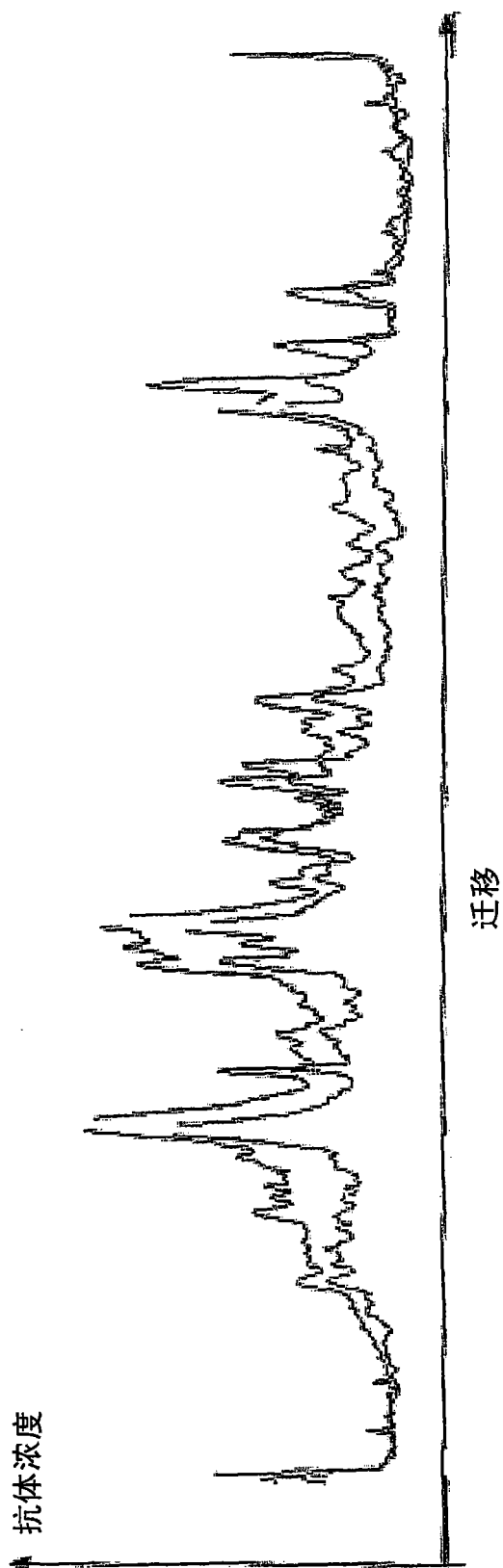


图 12

专利名称(译)	通过增加报道抗体层积改进抗体谱灵敏度		
公开(公告)号	CN101657723A	公开(公告)日	2010-02-24
申请号	CN200880009863.8	申请日	2008-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	巴特勒能源同盟有限公司		
申请(专利权)人(译)	巴特勒能源同盟有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	巴特勒能源同盟有限公司		
[标]发明人	WA阿佩尔 VS汤普森		
发明人	W·A·阿佩尔 V·S·汤普森		
IPC分类号	G01N33/53 C12P19/30		
CPC分类号	G01N33/946 Y10S435/975 Y10S435/973 Y10S435/971		
代理人(译)	余颖		
优先权	11/691096 2007-03-26 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了一种用于鉴定法医样品或检测一种分析物存在的通过抗体谱分析生物样品的方法。在本发明的一种实施方式中，所述分析物是一种药物，如大麻、可卡因、甲基苯丙胺、甲基羟酮或甲氢羟酮。所述方法包括以预先选定的图案将抗原与一种固体支持物的表面连接以形成阵列，其中所述抗原的位置是已知的；所述阵列与所述生物样品接触使得样品中的一部分抗体与阵列中的抗原反应并结合以形成免疫复合物；洗去不形成免疫复合物的抗体；以及检测所述免疫复合物以形成抗体谱。通过比较来自未知来源的样品与来自已知来源的样品鉴定法医样品。此外，诸如测试违禁药物使用的检测可以与身份测试相关联，从而使得所述检测结果与受试者的身份正相关。

