



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103675259 B

(45)授权公告日 2017.07.04

(21)申请号 201310475731.7

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22)申请日 2006.02.23

代理人 张平元

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103675259 A

(51)Int.Cl.

(43)申请公布日 2014.03.26

G01N 33/532(2006.01)

(30)优先权数据

G01N 33/68(2006.01)

0503836.9 2005.02.24 GB

B01L 3/00(2006.01)

审查员 黄晓丽

(62)分案原申请数据

200680006015.2 2006.02.23

(73)专利权人 阿克西斯-希尔德公司

地址 挪威奥斯陆

(72)发明人 弗兰克·弗朗策恩 阿恩·L.法伦

阿恩·K.诺德海

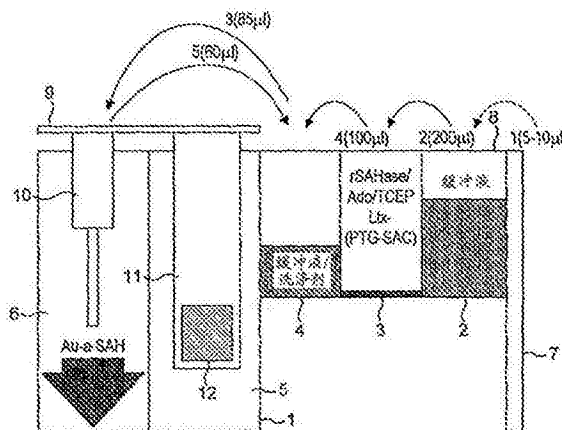
权利要求书1页 说明书15页 附图22页

(54)发明名称

分析方法

(57)摘要

本发明提供了用于高半胱氨酸的基于盒的自动化分析。本发明涉及分析血液中高半胱氨酸的方法和用于这种方法的分析试剂盒。



1. 一种分析在血浆中和在血细胞中存在的被分析物的方法,所述方法包括(a)测定所述被分析物在全血样品的血浆中的含量,其中不从所述全血样品分离源自该全血样品的细胞,(b)分光光度测定所述样品的血细胞比容或血红蛋白含量,以及(c)由此测定所述被分析物的血浆浓度。

2. 如权利要求1所要求的方法,其中测定所述被分析物的含量包括使全血样品的血浆中的被分析物反应来产生可检测的物质,而所述样品中的细胞是完整的,在细胞内被分析物不会反应来形成所述可检测的物质的条件下裂解所述细胞并检测所述可检测的物质。

分析方法

[0001] 本申请是申请日为2006年2月23日、申请号为200680006015.2、发明名称为“分析方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明涉及分析血液中高半胱氨酸的方法和用于这种方法的分析试剂盒。

[0003] 高半胱氨酸(HCy)是小的含硫 α 氨基酸,不用于蛋白质合成,但以低浓度存在于细胞和细胞外液中,例如在成年人血浆中一般约 $10\mu\text{M}$ 。提高的血浆HCy水平与叶酸或维生素B缺乏以及与心血管疾病相关。因而在分析血浆中的HCy中存在着重要临床意义。

[0004] 由Axis-Shield ASA开发了一种这样的分析系统,可以从Abbott Laboratories商业地获得。在销售的前六年中,已经使用这个系统进行了超过2600万这种HCy分析。Axis-Shield/Abbott HCy分析包括将血浆中的HCy酶转化成S-腺苷基-高半胱氨酸(SAH)和对SAH的免疫分析检测。然而Axis-Shield/Abbott HCy分析被设计在临床实验室中进行,仍然需要一种HCy分析,其是即时(point-of-care)可进行的形式,例如,在医师的办公室中进行,使得患者不必重新访问来获知分析的结果。

[0005] 能够在即时使用的分析执行设备近来已经由Axis-Shield ASA开发。这是可以商业上获得的(商标Afinion),并在例如W002/090995中进行了描述,在此引用其内容作为参考。在Afinion系统中,样品(例如,血液、血浆、尿,等等)被置于分析盒中,其含有预先加载了进行分析所需的试剂的几个孔,并带有计算机可读的信息,足以允许设备来确定对于特定的样品类型和目标被分析物如何进行分析。

[0006] 我们现在已经开发了即时能够进行的血浆HCy分析,例如,使用Afinion设备,使用全血,即,不需要从血液样品分离细胞。

[0007] 使用全血而不是血浆的能力大大地简化了医师所需的样品操作。

[0008] 然而使用全血产生了关于血浆HCy分析性能的严重难题,因为样品中的细胞内HCy可能潜在地漏入血浆中。实际上,对于血浆HCy的当前的临床实验室分析,医师被指示从全血中分离血浆,并在30分钟内冷冻保存血浆样品,以避免被细胞内HCy污染。细胞内HCy造成的污染必需避免,因为正常/异常血液HCy的当前标准是对于血浆HCy的,还不知道患者之间在细胞内HCy中存在多少差异,以及根据患者的健康状况这种差异有多少。

[0009] 然而,我们现在发现,通过延迟细胞裂解直到发生结合,并通过校正血细胞比容,有可能在血浆HCy的酶免疫分析中使用未分离的全血样品。

[0010] 因而,从本发明的一个方面考虑,提供了分析采自人类或形成血管的非人动物受试者的血液样品中血浆高半胱氨酸的方法,所述方法包括:用以下试剂接触来自所述受试者的全血样品——液体稀释剂、还原剂、高半胱氨酸-转化酶、任选的所述酶的高半胱氨酸转化反应的抑制剂、细胞裂解剂、能够与所述高半胱氨酸转化酶的转化产物结合的颜色标记的结合剂,和能够与所述转化产物竞争与所述结合剂的结合的颗粒;在用所述试剂接触后,抽吸所述样品通过具有孔隙的膜,所述孔隙足以使所述结合剂在其未结合状态时和当与所述转化产物结合时通过,但不足以容许与所述颗粒结合时的所述结合剂通过;检测保持在所述膜上的所述结合剂的颜色标记;通过应用取决于所述全血样品中红细胞浓度的校正因子,由此确定血浆高半胱氨酸浓度的指标;以及任选的但是优选的,将所述血浆高半胱

氨酸浓度表示为可视的或电子的信号;其中与所述试剂接触在如下情况下是相继的或同时的:

[0011] i) 在与所述稀释剂、酶和还原剂接触后发生与所述裂解剂的接触;

[0012] ii) 当抑制剂存在时,与抑制剂的接触发生在与所述稀释剂、酶和还原剂接触之后,但不晚于与所述裂解剂的接触;以及

[0013] iii) 与所述结合剂和所述颗粒的接触不包括与含有所述结合剂和所述颗粒两者的液体接触。

[0014] 在本发明的方法中,优选的是在细胞裂解开始前(或同时)采取步骤来终止或至少减慢高半胱氨酸转化酶的HCy转化。这可以通过改变样品温度,例如,来减慢酶反应或使酶变性,或通过稀释,或通过改变pH值,或通过添加用来抑制反应或使酶变性的试剂(例如,使用洗涤剂如SDS、离液盐例如NaSCN,或其他已知的变性剂,例如尿素或氯化胍(guanidinium chloride),或金属或辅助因子(co-factor)结合剂(其中所述酶反应需要金属或辅助因子))来实现。当使用变性洗涤剂时,这也可以起到裂解剂的作用。为了方便起见,干扰酶的HCy转化反应的这种试剂在此是指抑制剂,在本发明方法的优选的实施方式中,抑制剂被包含在一系列使用的试剂中。

[0015] 在本发明的方法中,与试剂接触优选包括孵育预定时间,和优选的在预定的温度以两个阶段进行,首先进行与稀释剂、还原剂和酶的接触,其次和随后,进行与颗粒和结合剂接触。

[0016] 在第一优选的实施方式中,接触顺序如下:

[0017] i) 与稀释剂接触,

[0018] ii) 与酶和还原剂接触,

[0019] iii) 孵育,

[0020] iv) 与颗粒、抑制剂和裂解剂接触,

[0021] v) 与结合剂接触,

[0022] vi) 孵育,以及

[0023] vii) 抽滤(draw)过膜。

[0024] 在第二的、更优选的实施方式中,接触顺序如下:

[0025] i) 与稀释剂接触,

[0026] ii) 与还原剂、酶和颗粒接触,

[0027] iii) 孵育,

[0028] iv) 与裂解剂、抑制剂和结合剂接触,

[0029] v) 孵育,以及

[0030] vi) 抽滤过膜。

[0031] 在第三优选的实施方式中,接触顺序如下:

[0032] i) 与稀释剂接触,

[0033] ii) 与还原剂、酶和颗粒接触,

[0034] iii) 孵育,

[0035] iv) 与裂解剂和抑制剂接触,

[0036] v) 与结合剂接触,

[0037] vi) 孵育, 以及

[0038] vii) 抽过膜。

[0039] 一般地, 优选的是, 试剂存在于单次使用 (single-use) 的、多孔的 (multi-walled) 分析盒中。特别优选的, 这种盒应含有试剂、顶端具有膜的移液管、和可移动的顶端为毛细管的移液管。在这种盒中, 特别优选的是至少结合剂和酶, 优选的颗粒还以干燥形式存在, 结合剂和颗粒存在于独立的孔中。

[0040] 因而, 从本发明的进一步的方面考虑, 提供了单次使用的盒, 用于使用全血进行血浆高半胱氨酸分析, 所述盒具有多孔的底座、可移动的顶端为毛细管的移液管和盖子, 所述盖子带有顶端有膜的移液管, 以及所述底座的孔含有以下的分析试剂: 液体稀释剂; 还原剂; 高半胱氨酸转化酶; 任选的, 所述酶的高半胱氨酸转化反应的抑制剂; 细胞裂解剂; 能与所述酶的转化产物结合的、颜色标记的结合剂; 以及能与所述转化产物竞争与所述结合剂结合的颗粒; 所述结合剂和所述颗粒处在不同的所述孔中; 当抑制剂存在时, 所述抑制剂和所述酶存在于不同的所述孔中, 所述裂解剂存在于不同于含有所述酶和至少部分的所述还原剂和所述稀释剂的一个或多个孔的孔中。

[0041] 在第一优选的实施方式中, 所述盒包括至少四个孔, 第一个含有稀释剂, 第二个含有酶和还原剂, 第三个含有颗粒、裂解剂和抑制剂, 第四个含有结合剂。在第二优选的实施方式中, 所述盒包括至少四个孔, 第一个含有稀释剂, 第二个含有稀释剂、抑制剂和裂解剂, 第三个含有酶、还原剂和颗粒, 第四个含有结合剂。在第三优选的实施方式中, 所述盒包括至少四个孔, 第一个含有稀释剂, 第二个含有酶、还原剂和颗粒, 第三个含有稀释剂、抑制剂和裂解剂, 第四个含有结合剂。这三种盒形式特别适合于进行以上列出的优选的接触顺序。

[0042] 本发明的盒的孔, 当它们含有液体时, 优选的具有可移动的或可打孔的封闭物 (closure), 例如, 箔封盖。盖子优选的包括钻孔器 (piercer) 用于刺穿这种封盖, 优选的形成可容纳可移动的移液管的形状, 移液管本身可用于采集全血样品用于导入盒中。

[0043] 在使用前, 所述盒优选的装在密封容器中, 例如箔包装, 其优选的还含有干燥剂, 例如硅胶或分子筛。

[0044] 因而, 使用第一优选的盒的实施方式的分析操作适当地包括以下步骤:

[0045] 1) 将毛细管浸入血中, 并将顶端为毛细管的移液管置于盒中;

[0046] 2) 将所述盒置于分析设备中, 并启动自动化分析操作 (即, 以下列出的步骤自动地进行);

[0047] 3) 从底座除下盖子并开启任何密封的孔;

[0048] 4) 将稀释剂从第一孔中引入顶端为毛细管的移液管;

[0049] 5) 将血液和稀释剂从顶端为毛细管的移液管中引入第二孔中;

[0050] 6) 使第二孔的内容物孵育预设的时间;

[0051] 7) 在孵育期间, 使用顶端为毛细管的移液管将稀释剂从第一孔引入第三孔;

[0052] 8) 使用顶端为毛细管的移液管将孵育的液体从第二孔引入第三孔;

[0053] 9) 使用顶端为毛细管的移液管将结合剂和稀释剂从第四孔引入第三孔;

[0054] 10) 使第三孔的内容物孵育预设的时间;

[0055] 11) 将孵育的液体从第三孔通过穿过所述膜引入顶端有膜的移液管;

[0056] 12) 检测保持在膜的外表面上的结合剂; 以及

- [0057] 13) 确定血浆HCy含量并显示和/或输出结果。
- [0058] 第二优选的盒的实施方案的分析操作顺序如下：
- [0059] 1) 将毛细管浸入血中,并将顶端为毛细管的移液管置于盒中；
- [0060] 2) 将所述盒置于分析设备中,并启动自动化分析操作(即,以下列出的步骤自动地进行)；
- [0061] 3) 从底座除下盖子并开启任何密封的孔；
- [0062] 4) 将稀释剂从第一孔中引入顶端为毛细管的移液管；
- [0063] 5) 将血液和稀释剂从顶端为毛细管的移液管中引入第三孔中；
- [0064] 6) 使第三孔的内容物孵育预设的时间；
- [0065] 7) 在孵育期间,使用顶端为毛细管的移液管将稀释剂从第一孔和/或第二孔引入第四孔；
- [0066] 8) 使用顶端为毛细管的移液管将稀释剂、裂解剂和抑制剂从第二孔引入第三孔；
- [0067] 9) 使用顶端为毛细管的移液管将结合剂和稀释剂从第四孔引入第三孔；
- [0068] 10) 使第三孔的内容物孵育预设的时间；
- [0069] 11) 将孵育的液体从第三孔穿过所述膜引入顶端有膜的移液管；
- [0070] 12) 检测保持在膜的外表面上的结合剂；以及
- [0071] 13) 确定血浆HCy含量并显示和/或输出结果。
- [0072] 第三个优选的盒的实施方案的分析操作顺序如下：
- [0073] 1) 将毛细管浸入血中,并将顶端为毛细管的移液管置于盒中；
- [0074] 2) 将所述盒置于分析设备中,并启动自动化分析操作(即,以下列出的步骤自动地进行)；
- [0075] 3) 从底座除下盖子并开启任何密封的孔；
- [0076] 4) 将稀释剂从第一孔中引入顶端为毛细管的移液管；
- [0077] 5) 将血液和稀释剂从顶端为毛细管的移液管中引入第二孔中；
- [0078] 6) 使第二孔的内容物孵育预设的时间；
- [0079] 7) 在孵育期间,使用顶端为毛细管的移液管将稀释剂从第三孔引入第四个孔；
- [0080] 8) 使用顶端为毛细管的移液管将孵育的液体从第二孔引入第三孔；
- [0081] 9) 使用顶端为毛细管的移液管将结合剂和稀释剂从第四孔引入第三孔；
- [0082] 10) 使第三孔的内容物孵育预设的时间；
- [0083] 11) 将孵育的液体从第三孔穿过所述膜引入顶端有膜的移液管；
- [0084] 12) 检测保持在膜的外表面上的结合剂；以及
- [0085] 13) 确定血浆HCy含量并显示和/或输出结果。
- [0086] 用于本发明的分析方法的一种或多种试剂可以以固体或半固体形式存在,例如,作为薄膜、粉末或珠子。当使用在此描述的加载了试剂的盒进行分析时,使用珠子形式的试剂是特别有益的,因为它提高了盒加载和分析操作设计的灵活性,重要是因为在盒储存期间可能相互作用的试剂可以在相同的盒的孔中以珠子形式存在而在储存期间不发生相互作用的问题。此外,单独的试剂的储存稳定性在呈珠子形式时大于溶液形式。
- [0087] 结果,在本发明的三个进一步优选的实施方式中,分析盒含有珠子形式的选定试剂。因而,在第四优选的实施方式中,所述盒包含至少五个孔:第一个含有稀释剂和细胞裂

解剂;第二个含有稀释剂;第三个含有含结合剂的第一珠子和含颗粒的第二珠子;第四个含有含抑制剂的第三珠子;第五个含有含酶和还原剂的第四珠子,任选的但是优选的,第五珠子含有核酸酶。在第五优选的实施方式中,所述盒包含至少五个孔:第一个含有稀释剂和细胞裂解剂;第二个含有稀释剂和任选的但优选的核酸酶;第三个含有含结合剂的第一珠子和含颗粒的第二珠子;第四个含有含抑制剂的第三珠子;第五个含有含酶和还原剂的第四珠子。在第六优选的实施方式中,所述盒包含至少五个孔:第一个含有稀释剂和细胞裂解剂;第二个含有稀释剂和任选的但优选的核酸酶;第三个含有含结合剂的第一珠子和含颗粒的第二珠子;第四个不含试剂;第五个含有抑制剂,和单独地,含酶和还原剂的第三珠子。

[0088] 在这些实施方式中,在第五和第四孔中的任何珠子理想地分别处于顶端为毛细管的移液管或顶端有膜的移液管内部。当第五孔含有珠子时,它优选的位于顶端为毛细管的移液管的储存器(reservoir)中。在刚刚描述的实施方式中,这些珠子含有酶和还原剂。在第六实施方式中,第五孔还含有抑制剂,例如,以干燥的形式,在孔底部的倒转的圆锥形塑料杯中,即,与所述珠子分隔开。

[0089] 因而,使用第四和第五优选的盒实施方式的分析操作适当地包括以下步骤:

[0090] 1) 将毛细管浸入血中,并将顶端为毛细管的移液管置于盒中;

[0091] 2) 将所述盒置于分析设备中,并启动自动化分析操作(即,以下列出的步骤自动地进行);

[0092] 3) 从底座除下盖子并开启任何密封的孔;

[0093] 4) 将稀释剂从第二孔中引入顶端为毛细管的移液管;

[0094] 5) 将血液、稀释剂和酶从顶端为毛细管的移液管冲洗到第二孔中;

[0095] 6) 使第二孔的内容物孵育;

[0096] 7) 将稀释剂和细胞裂解剂从第一孔引入顶端有膜的移液管中,并冲洗回第一孔;

[0097] 8) 使用顶端为毛细管的移液管,将稀释剂、细胞裂解剂和抑制剂从第一孔引入第二孔中;

[0098] 9) 使用顶端为毛细管的移液管,将裂解的样品从第二孔引入第三孔中;

[0099] 10) 使第三个孔的内容物孵育;

[0100] 11) 将孵育的液体从第三孔穿过所述膜引入顶端有膜的移液管;

[0101] 12) 检测保持在膜的外表面上的结合剂;以及

[0102] 13) 确定血浆HCy含量并显示和/或输出结果。

[0103] 使用第六优选的盒的实施方式的分析操作适当地包括以下步骤:

[0104] 1) 将毛细管浸入血中,并将顶端为毛细管的移液管置于盒中;

[0105] 2) 将所述盒置于分析设备中,并启动自动化分析操作(即,以下列出的步骤自动地进行);

[0106] 3) 从底座除下盖子并开启任何密封的孔;

[0107] 4) 将稀释剂从第二孔中引入顶端为毛细管的移液管;

[0108] 5) 将血液、稀释剂和酶从顶端为毛细管的移液管冲洗到第二孔中;

[0109] 6) 使第二孔的内容物孵育;

[0110] 7) 使用顶端为毛细管的移液管,将稀释剂、细胞裂解剂从第一孔引入第五孔来溶

解抑制剂；

[0111] 8) 使用顶端为毛细管的移液管,将稀释剂、细胞裂解剂和抑制剂从第五孔转移到第一孔中；

[0112] 9) 使用顶端为毛细管的移液管,将稀释剂、细胞裂解剂和抑制剂从第一孔转移到第二孔中；

[0113] 10) 使用顶端为毛细管的移液管,将裂解的样品从第二孔引入第三孔中；

[0114] 11) 使第三孔的内容物孵育；

[0115] 12) 将孵育的液体从第三孔穿过所述膜引入顶端有膜的的移液管；

[0116] 13) 检测保持在膜的外表面上的结合剂；以及

[0117] 14) 确定血浆HCy含量并显示和/或输出结果。

[0118] 在每种情况下,样品的血红蛋白含量优选的在摄取样品穿过膜之前以分光光度测定。理想地,在样品已经与细胞裂解剂接触后进行该测定。

[0119] 当液体从一个孔转移到另一个时,这一般地不是供体孔的全部液体内容物,而是预定的体积。

[0120] 本发明的方法中使用的高半胱氨酸转化酶可以是产生能够直接地、间接地与结合剂结合的高半胱氨酸转化产物的任何一种。就此来说间接结合是指初始的酶转化产物可以用作进一步反应中的反应物,所述进一步反应的产物可以与结合剂结合。几种高半胱氨酸转化酶是已知的并且可以使用,例如,胱硫醚 β 合成酶、高半胱氨酸酶、高半胱氨酸脱硫酶、甲硫氨酸合成酶、二甲基噻亭高半胱氨酸甲基转移酶、甜菜碱-高半胱氨酸甲基转移酶、5-甲基四氢叶酸-高半胱氨酸-S-甲基转移酶、5-甲基四氢蝶酰基三谷氨酸-高半胱氨酸S-甲基转移酶、O-琥珀酰基高丝氨酸- β -裂解酶和S-腺苷高半胱氨酸水解酶(SAH-水解酶)。使用SAH-水解酶,特别是重组的SAH-水解酶是优选的。使用这些酶的高半胱氨酸的酶转化可能需要进一步的反应物,“共同-底物(co-substrate)”,例如对于SAH-水解酶来说为腺苷或腺苷类似物,或对于高半胱氨酸酶来说为水。当需要共同底物时,这一般需要在本发明的分析方法和盒中以试剂提供它们。这种共同底物应当在第一次孵育时与血液样品接触,一般可以存在于稀释剂中或与酶一同存在。

[0121] 当酶是SAH-水解酶时,被分析物一般是腺苷或SAH,或其中之一酶转化产物。然而SAH是优选的被分析物。当酶是高半胱氨酸脱硫酶时,被分析物一般是 α -酮丁酸酯(alpha-keto butyrate)的酶转化产物。

[0122] 根据本发明使用的稀释剂优选的是含水的,例如,水或含水缓冲液,例如磷酸盐、碳酸盐、硼酸盐、MOBS、HEPES、Tris或双甘氨酸缓冲液,一般具有6到10、更优选的7到9、特别是7.2到8.5的pH值。当然可以使用具有这种pH值的其他缓冲液。

[0123] 根据本发明使用的还原剂用来将HCy可能在血浆中出现的各种形式转化成游离高半胱氨酸。还原剂的使用是血浆HCy分析中常规的。可以使用的适合的还原剂的实例包括二巯基化物(特别是二巯苏糖醇(DTT)、二巯赤藓糖醇(DTE)和双-(2-巯基乙基)砷)、磷(例如三(2-羧乙基)磷(TCEP)、三苯基磷和三-正丁基-磷)、硼烷(例如,硼烷-四氢咪喃复合物、二甲硫-甲硼烷(dimethylsulphide-borane)和癸硼烷)硼氢化物(例如,NaCNBH₃、NaBH₄和三乙酰氧基硼氢化物)、氢化物(例如,LiAlH₄)和硅烷(例如烷基硅烷如Et₃SiH、苯基硅烷和三(三甲基甲硅烷基)硅烷)。使用三(2-羧乙基)磷:HCl(TCEP)是特别优选的。

[0124] 根据本发明使用的抑制剂用来在样品中的细胞被裂解之前终止高半胱氨酸转化以防止分析所测定的血浆HCy值被来自细胞内HCy的任何显著贡献而污染。酶抑制剂是公知的。这些抑制剂一般直接与酶组合来抑制它的性能,例如,通过模拟天然底物的性质,从而例如引起酶的阻断或另一种产物的产生。然而,其他的可以作用于底物或辅助因子或作用于酶加工期间形成的分子或中间物(从而阻止正常终产物的形成)。例如对于SAH-水解酶来说,与硫醇基团反应或干扰硫醇基团的试剂将作为抑制剂起作用,因为游离硫醇基团是这种酶的生物作用所需的。实例包括硫柳汞和马来酰亚胺(maleimido)化合物(例如,N-乙基-马来酰亚胺(N-ethylmaleimide))。其他抑制剂的实例包括腺嘌呤类似物和腺苷。进一步的抑制剂包括:D-香菇嘌呤(eritadenine)、9-β-D-xylofuranosyladenine、腺嘌呤9-β-D-阿拉伯呋喃糖苷(arabino furanoside)、赤藓-9-(2-羟基-3-壬基)-腺嘌呤、全碘(periodo)-氧化的腺苷、2'-脱氧腺苷、3'-脱氧腺苷、2',3'-双脱氧腺苷、碳环的腺苷、2-氯-腺苷、2-氯脱氧腺苷、腺苷二醛、N6-甲基腺苷、助间型霉素(coformycin)、2'-脱氧柯福霉素、间型霉素(formycin)、2-氨基-6-氯-嘌呤核苷、水粉蕈素(nebularin)、吡唑霉素、3-脱氮(deaza)(+/-)-隐陡头霉素、隐陡头霉素(aristeromycin)(和它的卤乙烯基(halovinyl)衍生物)、tuberacin和阿糖腺苷(ara-A)和其衍生物(例如,2-氯-阿糖腺苷)。使用硫柳汞是优选的,然而,使用N-乙基马来酰亚胺是特别优选的,例如,在300μg/mL的使用浓度。涉及重组SAH-水解酶以及抑制它的功能的各种材料的公开物的链接可以在<http://www.pdg.cnb.uam.es/UniPub/iHOP/gs/95822.html>中找到。

[0125] 根据本发明使用的细胞裂解剂用来破坏血细胞使得它们不在膜的外表面上维持。细胞裂解剂是公知的,根据本发明使用的适合的细胞裂解剂包括洗涤剂,例如,尿素、脱氧胆酸盐、empigen、ammonyx、SDS、thesit(例如Lubrol PX和C12E9)和Triton X100(例如Nonidet P40)。优选使用0.4%wt.的工作浓度的SDS。

[0126] 在例如本发明的分析方法中,其中样品中的细胞在样品抽吸通过多孔膜之前被裂解,检测由膜保留的物质,细胞裂解释放的DNA可以至少部分地阻塞所述膜的孔洞。特别的情况是当样品含有高浓度的白细胞时。因而膜孔洞阻塞可以通过使用DNase,即,核酸酶来消化细胞裂解释放的DNA来降低。核酸酶可以在样品被抽吸通过所述膜之前的任何时间与样品接触。

[0127] 核酸酶可能需要活化剂,例如2族金属离子,例如Mg²⁺,在这种情况下与活化剂的接触可以在与核酸酶接触之前、期间或之后发生,只要它在样品被抽吸通过膜之前发生。然而优选与活化剂的接触在与核酸酶接触的同时发生。核酸酶和它们需要的活化剂是公知的和商业上可获得的,例如,来自Merck的Benzonase。

[0128] 根据本发明使用的结合剂可以是任何物质(material),其相对于样品中存在的其他物质优先地结合酶转化产物和它的竞争剂(所述颗粒)。它由共价地或其它结合或保持在一起的两个功能部分组成,即,颜色标记和结合部分。颜色标记理想地是在可见范围内吸收、发射、散射或产生光的物质,例如发色团或荧光基团。然而,可以使用在红外或UV范围内吸收、发射、散射或产生光的颜色标记。因而,颜色标记可以是任何可以分光光度检测的部分,实例例如发色团或荧光基团,或酶标记(例如,碱性磷酸酶、辣根过氧化酶或萤火虫荧光素酶),其可以产生可被分光光度地读取的颜色、荧光、光发射或散射信号。特别优选的,使用聚簇的胶态金或其他金属,例如,具有约100到200nm的聚簇(cluster)的模式颗粒大小。

结合部分可以是抗体或其片段或构建物,或小的有机分子,等等。使用抗体和抗体片段或构建物是优选的。当使用的酶是SAH-水解酶时,优选的是使用抗-SAH抗体,特别是重组的这种抗体。这种类型的抗体例如在Axis-Shield ASA的专利公开中,如W000/40973中描述了,其公开内容在此引用作为参考。更特别地,单克隆抗-SAH抗体可以如W000/40973的实施例1中描述的来产生。将胶体金偶联到这种抗体可以如US-A-5691207和US-A-5650333中描述的进行。

[0129] 根据本发明使用的颗粒可以是任何物质,其可以悬浮在稀释剂中并被所述膜保留。它也具有两个功能组分,引起膜保留的大体积实体(bulky entity)和与结合剂结合的竞争剂,这两者通过共价键或其他相互作用偶联。大体积试剂优选的是白色或无色的,例如,聚合物颗粒,例如胶乳颗粒。竞争剂部分一般是酶转化产物或其类似物或片段。当酶是SAH-水解酶时,竞争剂优选的是S-腺苷基-半胱氨酸。用于将竞争剂偶联到大体积部分的化学技术明显取决于后者上可用于反应的功能基团的性质。如果大体积部分带有反应性或预活化(preactivated)基团例如氯甲基或醛,一般地连接试剂例如水溶性的碳二亚胺,例如1-乙基-3-(二甲基氨丙基)-碳二亚胺、EDC/EDAC、同双功能的(homobifunctional)连接试剂例如双(磺基-琥珀酰亚胺基)辛二酸盐(suberate)、BS3,可以被使用或可以进行偶联。优选的,竞争剂首先与蛋白质(例如,白蛋白或更优选的甲状腺球蛋白)偶联,之后蛋白质-竞争剂缀合物与大体积部分偶联。本领域很好地建立了这种偶联化学作用。

[0130] 根据本发明使用的膜可以是具有孔洞的任何材料,使得保留颗粒但使结合剂和它与转化产物的缀合物通过。在选择膜材料时应当考虑的因素包括孔径尺寸、强度和可连接性。孔径尺寸应当足够小以阻止期望的缀合物,而又足够大以使非缀合的物质和非希望的缀合物通过。使用小的颗粒(例如,0.1到1.0 μm)比用大的颗粒(例如,1到10 μm)得到更好的信号,但也引起更高的膜阻塞。因而,优选的颗粒大小是1到2 μm ,因而优选地选择膜孔径大小。使用亲水性的聚醚砜(polyethersulphone)和丙烯酸共聚物(acrylcopolymer)膜,例如具有高于0.8 μm 孔径大小,是优选的。这种膜可以作为Supor和Versapor从Pall获得。膜可以粘附或熔接到它的移液管上;优选的它是平面的,倾斜于移液管的轴放置(即,在垂直和平行之间)。这种方案在W002/090995中描述了,在Axis-Shield ASA销售的Afinion盒中出现了。

[0131] 理想的,至少根据本发明使用的盒中无移液管的孔在横截面上是矩形的,平面的透明底座与垂直于孔轴的平面成一定角度倾斜。

[0132] 为了充分完全地发生酶反应来产生足够的被分析物,如上所述,期望的是孵育样品。同样地,为了发生足够的结合剂缀合(conjugation)以产生足够的信号,期望的是进行样品的第二次孵育。换句话说,两种反应都不需要进行到平衡,孵育时间应当理想地保持短到与期望的分析精确性相兼容,以便优化对于用户的分析可接受性。一般地,这种孵育将在20到45 $^{\circ}\text{C}$ 、优选的30到45 $^{\circ}\text{C}$ 以及最优选的36到42 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。适合的孵育时间一般在0.5到10分钟、0.75到5分钟、更优选的1到3分钟的范围内。对于酶孵育,最优选的范围是1到2分钟。

[0133] 为了血浆HCy的测定值可以用血液样品的相对血浆含量(plasma content)来修正(因为患者和患者的血细胞比容可能不相同),医师必需输入血细胞比容的值(或指标),或者,更优选的,血细胞比容的值(或指标)必需在分析过程中被测定。为此,可以在细胞裂解之前,更优选的在细胞裂解之后,分光光度法测量样品的血红蛋白含量。当测量在细胞裂解

之前进行时,优选的进行背景修正,例如,使用红外线范围中进行的分光光度法测量。当测定的血细胞比容值异常的低时,例如,低于0.3,更特别地低于0.25,本发明的方法优选的还(可视地或电子地)呈现血细胞比容值或者警告该值是低的。如果需要,可以在任何情况下呈现血细胞比容值。

[0134] 血红蛋白含量的测定可以通过光散射、透射或反射。优选的,它是吸收的,例如使用绿色或蓝色二极管作为光源。保留在膜上的结合剂浓度的测定一般通过反射光,例如,使用绿色或蓝色二极管作为光源。

[0135] 与大多数分析一样,优选的是校准分析,例如使用具有已知HCy含量的标准物。使用的试剂的校准数据优选的将与盒一起提供,例如,在标签(bar)中编码,或在盒或它的包装上标注其它机器可读的代码。

[0136] 本发明的方法在定量高达 $30\mu\text{M}$ 的血浆HCy水平中特别有效。当血浆HCy高于 $30\mu\text{M}$ 时,分析输出可以仅仅表明血浆HCy含量异常地高。正常水平一般是 $10\text{--}15\mu\text{M}$ 或更低,医师介入是更高水平所需的,例如维生素B或叶酸补充或者心血管问题的研究,等等。低于正常血浆HCy值一般不看作是有问题,在婴儿和采取了多种维生素补充的患者中,数值可以低至约 $5\mu\text{M}$ 。

[0137] 对全血进行诊断分析来确定细胞外被分析物的血浆含量(plasma content)的操作是新颖的,所述的细胞外被分析物还存在于血细胞中,并形成了本发明的进一步的方面。从本发明的这个方面考虑,提供了分析在血浆中和在血细胞中存在的被分析物的方法,所述方法包括(a)测定所述被分析物在全血样品的血浆中的含量,(b)测定(优选的分光光度法)所述样品的血细胞比容或血红蛋白含量,以及(c)由此测定所述被分析物的血浆浓度。

[0138] 因而,步骤(a)可以包括使全血样品的血浆中的被分析物反应来产生可检测的物质,而所述样品中的细胞是完整的,在细胞内被分析物不会反应来形成所述产物的条件下裂解所述细胞并检测所述产物。

[0139] 当试剂以珠子形式存在时,这些可以是包被或灌注了干燥的试剂和任选的惰性的和优选的不吸湿的粘合剂(例如,糖类例如海藻糖,或PEG)的水不溶性的珠子;然而,优选包含试剂和惰性粘合剂水溶性的珠子,。例如,通过冷冻 5 到 $100\mu\text{L}$ (优选的 $10\text{--}50\mu\text{L}$)的缓冲的试剂溶液的液滴,然后冷冻干燥所述冷冻的液滴,可以制备这种珠子。

[0140] 在诊断分析中,特别是基于盒的分析中使用这种试剂珠子是新颖的,并形成本发明的进一步的方面。因而,考虑本发明的进一步的方面,提供了单次使用的盒用于诊断分析,例如体液、胞块(mass)或组织样品中的被分析物的分析的,所述盒包括具有多个孔的箱体,孔的至少一个、优选的至少2个含有用于进行所述分析的试剂,特征在于至少一个孔含有珠子,所述珠子在溶剂(例如水)中释放至少一种所述试剂。以珠子形式呈现的试剂包括例如被分析物结合剂、竞争性结合颗粒、酶(例如,核酸酶、被分析物(例如,高半胱氨酸)转化酶,等等)等等。虽然使用这种盒分析的被分析物优选的是高半胱氨酸,它可以是任何其他适合的被分析物,例如,C-反应蛋白、凝结因子、转铁蛋白、铁蛋白等等。

[0141] 现在参考以下非限制性实施例和附图将进一步描述本发明的方法和盒,在附图中:

[0142] 图1到7是根据本发明的盒的示意图,显示了在根据本发明的分析方法的操作中的物质转移平台;和

[0143] 图8包括示意图,显示了在附图1所示的平台中盒组件的相对位置。

[0144] 参考附图1,显示了五孔分析盒,包括透明塑料底座1,其中具有五个孔2、3、4、5、6(在实施例中分别称为E、D、C、B和A孔)和支柱7。孔2、3和4用箔8密封。盒盖9(仅部分地显示)包含可移动的顶端为毛细管的移液管10和顶端有膜12的固定的移液管11。孔2到4的内容物在实施例1中描述。

[0145] 箭头显示表示了实施例2中阐述的连续物质转移。

[0146] 图2类似于附图1,只是孔2到4的内容物在实施例3中描述,箭头表示实施例4中阐述的连续物质转移。

[0147] 图3类似于附图1,只是孔2到4的内容物在实施例5中描述,箭头表示实施例6中阐述的连续物质转移。

[0148] 图4类似于附图1,只是孔2到4的内容物在实施例7中描述,箭头表示实施例8中阐述的连续物质转移。

[0149] 图5类似于附图1,只是孔1到5的内容物在实施例9中描述,箭头表示实施例10中阐述的连续物质转移。

[0150] 图6类似于附图1,只是孔1到5的内容物在实施例11中描述,箭头表示实施例12中阐述的连续物质转移。

[0151] 图7类似于附图1,只是孔1到5的内容物在实施例13中描述,箭头表示实施例14中阐述的连续物质转移。

[0152] 参考图8,实施例2中阐述的物质转移的顺序在附图8A到8X中显示。

[0153] 在实施例中,除非另有说明,百分比是重量百分比。

[0154] 实施例1

[0155] 附图1的分析盒

[0156] A孔

[0157] 这个孔含有大约22 μ g的胶体金(约100nm颗粒大小)和抗-SAH抗体的缀合物,所述抗体如W000/40973的实施例1中描述制备,并如US-A-5691207和US-A-5650333中的描述进行缀合,置于倒圆锥的塑料杯上真空干燥。

[0158] B孔

[0159] 这个孔含有顶端具有大约4mm x 8mm的Supor800膜(Pall-孔径大小0.8 μ m)的移液管。

[0160] C孔

[0161] 这个孔含有185 μ L的缓冲液(10mM磷酸盐、150mM NaCl、pH7.4或25mM tris,150mM NaCl,pH8.1),含有酶抑制剂(0.2%硫柳汞)和裂解剂(1%Triton X-100)。

[0162] D孔

[0163] 这个孔含有0.27 μ g腺苷、50 μ g颗粒(与S-腺苷基-半胱氨酸缀合的1 μ m胶乳颗粒)或300 μ g颗粒(与S-腺苷基-半胱氨酸缀合的2 μ m胶乳颗粒),约5单位重组SAH-水解酶,和还原剂(23 μ g TCEP(三(2-羧乙基)膦:HCl))。将这些内容物的浓缩水溶液填充到孔中,然后真空干燥。

[0164] E孔

[0165] 这个孔含有300到350 μ L的缓冲液(10mM磷酸盐、150mM NaCl、pH7.4或25mM tris、

150mM NaCl、pH8.1)。

[0166] 实施例2

[0167] 附图1/实施例1的分析操作

[0168] A孔中所示的毛细管中的血液样品(5到10 μ L)通过从E孔吸取200 μ L缓冲液来稀释,然后注入到D孔中。使用毛细移液管来将C孔的内容物的85 μ L转移到A孔中来溶解金缀合物。然后将盒在37 $^{\circ}$ C孵育3分钟,之后使用毛细移液管来将D孔的100 μ L内容物转移到C孔中。然后通过检测C孔的内容物对来自绿色或蓝色二极管的光线的吸收,来测量血细胞比容水平。然后使用毛细移液管将A孔的60 μ L内容物转移到C孔。然后将盒在37 $^{\circ}$ C孵育1分钟。然后将C孔的总内容物吸入到顶端有膜(membrane-tipped)的移液管中(任选的继之以E孔中的剩余缓冲液)来降低背景。然后使用绿色或蓝色二极管照明以反射方式检测保留在膜外侧的金胶体(相应于在第二次孵育形成的金/胶乳缀合物)。

[0169] 使用已知的HCy含量的标准物校准该分析,同样地相对标准物例如,离心的、对一系列血液样品的血细胞比容测定来校准血细胞比容测定。

[0170] 实施例3

[0171] 附图2的分析盒

[0172] A孔

[0173] 与实施例1中一样,但是为大约22 μ g缀合物。

[0174] B孔

[0175] 与实施例1一样。

[0176] C孔

[0177] 这个孔含有0.27g腺苷、20 μ g颗粒(与S-腺苷基-半胱氨酸缀合的1 μ m胶乳颗粒)或160 μ g颗粒(与S-腺苷基-半胱氨酸缀合的2 μ m胶乳颗粒),约5单位重组SAH-水解酶,和还原剂(23 μ g三(2-羧乙基)膦:HCl)。将这些内容物的浓缩水溶液充填到该孔中,然后真空干燥。

[0178] D孔

[0179] 这个孔含有225 μ L的缓冲液(10mM磷酸盐、150mM NaCl、pH7.4或25mM tris,150mM NaCl,pH8.1),含有酶抑制剂(0.4%硫柳汞)和裂解剂(2%Triton X-100)。

[0180] E孔

[0181] 这个孔含有350 μ L的缓冲液(10mM磷酸盐、150mM NaCl、pH7.4或25mM tris,150mM NaCl,pH8.1)。

[0182] 实施例4

[0183] 附图2/实施例3的分析操作

[0184] 将吸入到毛细移液管的血液样品(5-10 μ L)通过从E孔吸取160 μ L缓冲液到毛细移液管中来稀释。然后将毛细移液管内容物排出到C孔中。将E孔(或作为选择,D孔)的85 μ L缓冲液使用毛细移液管转移到A孔中。然后将盒在37 $^{\circ}$ C孵育3分钟。然后使用毛细移液管将D孔的40 μ L内容物转移到C孔中。然后如实施例2中使用C孔的内容物测定血细胞比容值。A孔的60 μ L内容物使用毛细移液管转移到C孔中,并将盒在37 $^{\circ}$ C孵育1分钟。将C孔的内容物(任选的继之以D和/或E孔的剩余内容物)吸取到顶端有膜的移液管中,如实施例2测量保留在膜外侧的金胶体。如实施例2中的进行校准。

[0185] 实施例5

[0186] 附图3的分析盒

[0187] A孔

[0188] 如实施例1。

[0189] B孔

[0190] 如实施例1。

[0191] C孔

[0192] 这个孔含有20 μ g颗粒(与S-腺苷基-半胱氨酸缀合的1 μ m胶乳颗粒)或160 μ g颗粒(与S-腺苷基-半胱氨酸缀合的2 μ m胶乳颗粒),75 μ g硫柳汞,和750 μ g的Triton X-100。将这些组分的浓缩水溶液充填到该孔中,然后真空干燥。

[0193] D孔

[0194] 这个孔含有0.27 μ g腺苷、5单位重组SAH-水解酶和23 μ gTCEP:HCl。将这些组分的浓缩水溶液充填到该孔中,然后真空干燥。

[0195] E孔

[0196] 这个孔含有350 μ L缓冲液(10mM磷酸盐、150mM NaCl、pH7.4或25mM tris、150mM NaCl、pH8.1)。

[0197] 实施例6

[0198] 附图3/实施例5的分析操作

[0199] 将毛细移液管中的血液样品(5到10 μ L)通过从E孔吸取175 μ L的缓冲液来稀释,并排出到D孔中。然后使用毛细移液管将E孔的80 μ L缓冲液转移到A孔中。然后将盒在37 $^{\circ}$ C孵育3分钟。然后使用毛细移液管将D孔的75 μ L内容物转移到C孔中。然后如实施例2使用C孔的内容物测定血细胞比容值。然后用毛细移液管将A孔的50 μ L内容物转移到C孔中。然后将盒在37 $^{\circ}$ C孵育1分钟。然后将C孔的内容物(任选的继之以E孔的内容物)吸取到顶端有膜的移液管中,然后如实施例2测量保留在膜外侧的金胶体。如实施例2进行校准。

[0200] 实施例7

[0201] 附图4的分析盒

[0202] A孔

[0203] 如实施例3。

[0204] B孔

[0205] 如实施例1。

[0206] C孔

[0207] 这个孔的内容物是60 μ L的水性组合物,含有4.5 μ g/ml腺苷、330 μ g/mL颗粒(与S-腺苷基-半胱氨酸缀合的1 μ m胶乳颗粒)或2.7mg/mL(与S-腺苷基-半胱氨酸缀合的2 μ m胶乳颗粒)、80U/mL重组SAH-水解酶和380 μ g/mL TCEP:HCl。

[0208] D孔

[0209] 这个孔含有225 μ L缓冲液(10mM磷酸盐、150mM NaCl、pH7.4或25mM tris、150mM NaCl、pH8.1),含有0.4%硫柳汞和2%Triton X-100。

[0210] E孔

[0211] 这个孔含有285 μ L缓冲液(10mM磷酸盐、150mM NaCl、pH7.4或者25mM tris、150mM NaCl、pH8.1)。

[0212] 实施例8

[0213] 附图4/实施例7的分析操作

[0214] 将毛细移液管中的血液样品(5到10 μ L)通过从E孔吸取100 μ L缓冲液来稀释,并排出到C孔中。然后使用毛细移液管将E孔(或D孔)的85 μ L缓冲液转移到A孔中。然后将盒在37 $^{\circ}$ C孵育3分钟。然后将D孔的40 μ L内容物转移到C孔中,随后如实施例2测量血细胞比容。然后使用毛细移液管将A孔的60 μ L内容物转移到C孔中,并将盒在37 $^{\circ}$ C孵育1分钟。将C孔的内容物(任选的继之以D和/或E孔的内容物)吸取到顶端有膜的移液管中,然后如实施例2测量保留在膜外侧的金胶体。如实施例2进行校准。

[0215] 实施例9

[0216] 附图5的分析盒

[0217] A孔

[0218] 这个孔含有吸收性擦拭器(absorbent wiper)15,当它置于盒1中时用来从顶端为毛细管的移液管10的顶端除去任何过量的样品。在移液管10的体内装有含珠子16和17的试剂。珠子16含有约5单位的rSAHase和65 μ gTCEP。珠子17含有约0.1单位的核酸酶(例如,来自Merck的Benzonase)和40 μ g MgCl₂。两种珠子还含有海藻糖作为粘合剂。

[0219] B孔

[0220] 这个孔如实施例1中描述的,但在移液管的体内含有含珠子18的试剂,所述珠子18含有120 μ g N-乙基-马来酰亚胺。

[0221] C孔

[0222] 这个孔含有两种含试剂的珠子,19和20。珠子19含有大约100 μ g如实施例1中对A孔描述的金缀合物。珠子20含有0.12 μ g颗粒(如实施例1中对D孔描述的1-2 μ m的,优选1.6 μ m的,与S-腺苷基-半胱氨酸缀合的胶乳颗粒)。

[0223] D孔

[0224] 这个孔含有含0.27 μ g腺苷的200 μ L缓冲液(10mM磷酸盐、150mMNaCl、pH7.4或者25mM tris、150mM NaCl、pH8.1)。

[0225] E孔

[0226] 这个孔含有300 μ L的含0.4%wt.的SDS的D孔的缓冲液。

[0227] 实施例10

[0228] 附图5/实施例9的分析操作

[0229] 将A孔中所示毛细管中的4.5 μ L血液样品(3到10 μ L)与D孔中的200 μ L缓冲液(125-300 μ L)吸入到顶端为毛细管的移液管中来溶解珠子16和17。内容物冲洗回D孔中,在37 $^{\circ}$ C孵育1分钟(多至3分钟)。

[0230] 在孵育期间,E孔的200 μ L洗涤剂溶液(125-300 μ L)吸入到顶端有膜的移液管中来溶解珠子18。然后将内容物冲洗回E孔。

[0231] 然后使用顶端为毛细管的移液管将100 μ L的洗涤剂和抑制剂溶液(25-200 μ L)从E孔转移到D孔中。在红细胞裂解之后,如实施例2测定D孔中的血细胞比容。

[0232] 然后使用顶端为毛细管的移液管将D孔中的200 μ L混合物(150-275 μ L)从D孔转移到C孔中,使珠子19和20溶解,并将混合物孵育1分钟(多至3分钟)。

[0233] 然后将C孔的总内容物吸到顶端有膜的移液管中,任选的继之以E孔中的剩余缓

冲液。然后使用绿色或蓝色二极管光照以反射方式检测保留在膜外侧的金胶体(相应于在第二次孵育形成的金/胶乳缀合物)。

[0234] 使用已知的HCy含量的标准物校准分析,同样地相对标准物例如,离心的、对一系列血液样品测定的血细胞比容来校准血细胞比容测定。

[0235] 括号中的体积或数量范围是转移的数量的任意的限制。然而对于精确的分析操作和校准,应使用这些范围内的预定的值。

[0236] 实施例11

[0237] 附图6的分析盒

[0238] A孔

[0239] 这与实施例9中描述的一样但省略了珠子17。

[0240] B孔

[0241] 这与实施例9中描述的一样。

[0242] C孔

[0243] 这与实施例9中描述的一样。

[0244] D孔

[0245] 这与实施例9中描述的一样,但含有0.1单位的核酸酶(如实施例9中对A孔描述的)和40 μ g MgCl₂。

[0246] E孔

[0247] 这与实施例9中描述的一样。

[0248] 实施例12

[0249] 附图6/实施例11的分析操作

[0250] 该分析的步骤如实施例10中描述进行。

[0251] 实施例13

[0252] 附图7的分析盒

[0253] A孔

[0254] 其中的顶端为毛细管的移液管和珠子(16)与实施例11中描述的一样。这个孔的底部含有插入物(如实施例1中描述的),所述插入物含有干燥的抑制剂组合物,所述组合物含80-200 μ g,例如120 μ g的N-乙基-马来酰亚胺。

[0255] B孔

[0256] 这与实施例1中描述的一样。

[0257] C孔

[0258] 这与实施例9中描述的一样。

[0259] D孔

[0260] 这与实施例11中描述的一样。

[0261] E孔

[0262] 这与实施例9中描述的一样。

[0263] 实施例14

[0264] 附图7/实施例13的分析操作

[0265] 将样品和酶和还原剂转移到D孔,并如实施例10在其中孵育。

[0266] 在该孵育期间,使用顶端为毛细管的移液管将50 μ L洗涤剂溶液(40-100 μ L)从E孔转移到A孔中。然后将该混合物转移回E孔。

[0267] 然后如实施例10中将洗涤剂和抑制剂转移到D孔中,如实施例10继续进行分析。

[0268] 实施例15

[0269] 试剂珠子

[0270] 实施例9到14中使用的珠子如下制备:

[0271] 将25mM Tris缓冲液和150mM NaCl (pH7.5) 中的试剂、海藻糖、聚乙二醇(PEG)、牛血清白蛋白(BSA)的水溶液使用移液管滴加到冷的($<-50^{\circ}\text{C}$)金属板上。冷冻的液滴被冷冻干燥来产生含有15%wt.海藻糖、0.5%wt.PEG和0.1%wt.BSA的珠子。液滴大小方便地是5到100 μ L,优选10-50 μ L。做为选择,溶液可以滴加到液氮中,此后收集冷冻的液滴并冻干。

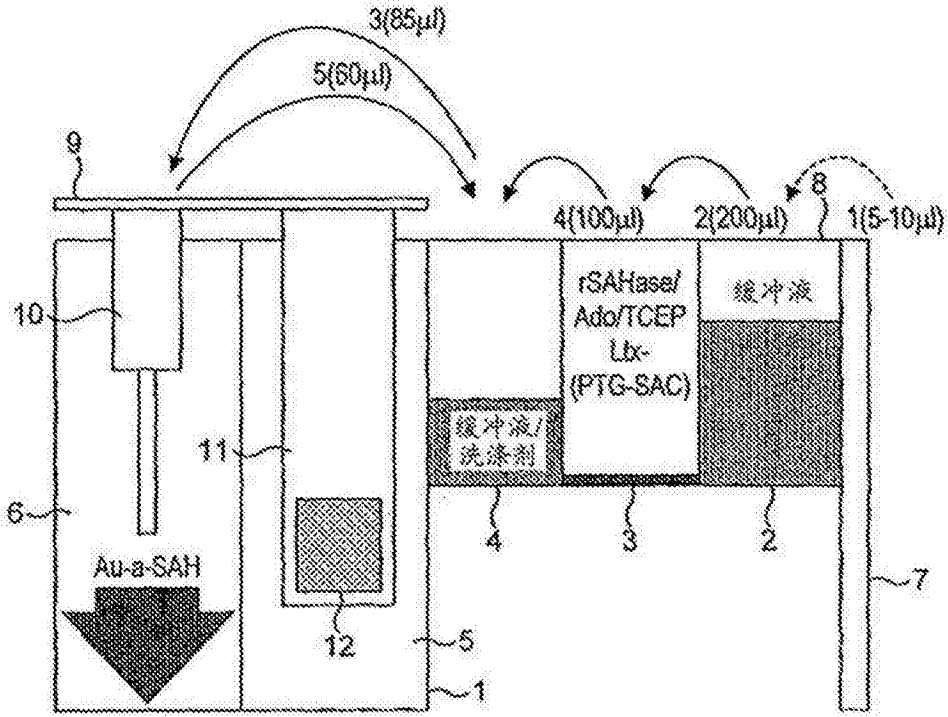


图1

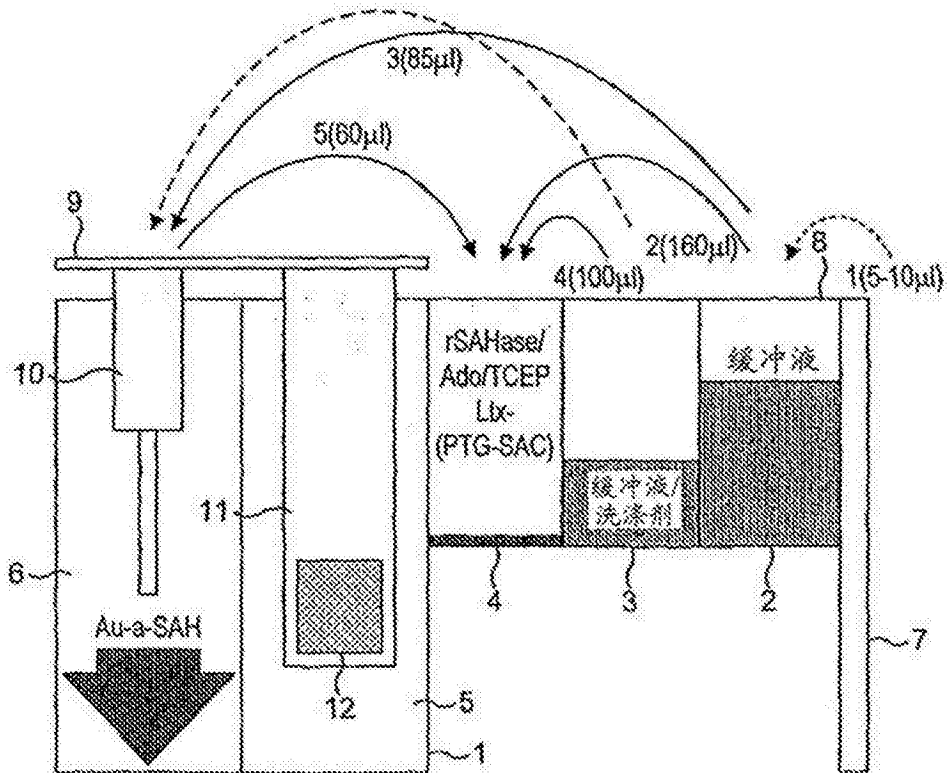


图2

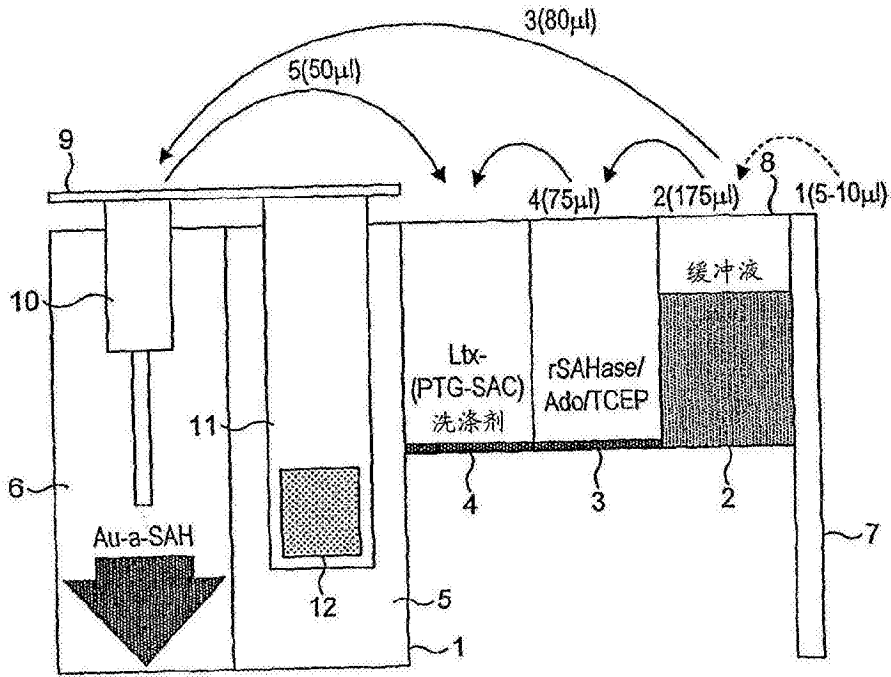


图3

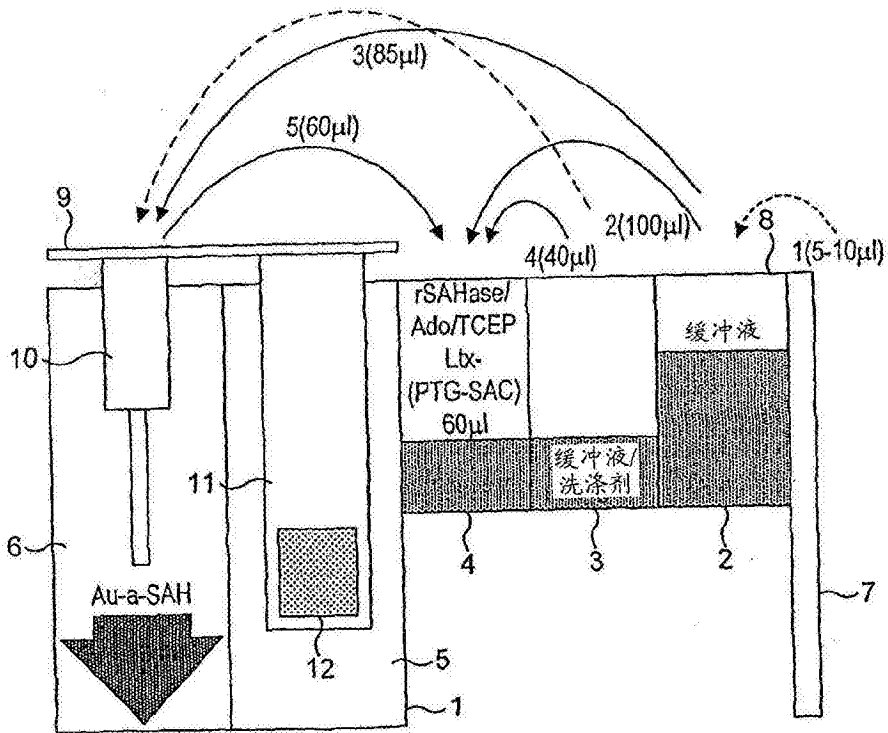


图4

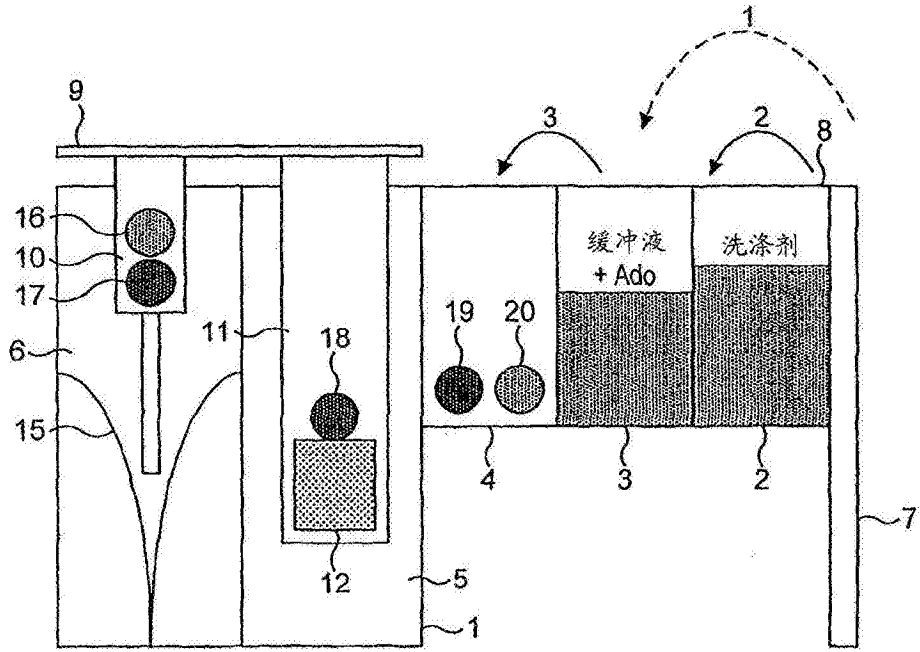


图5

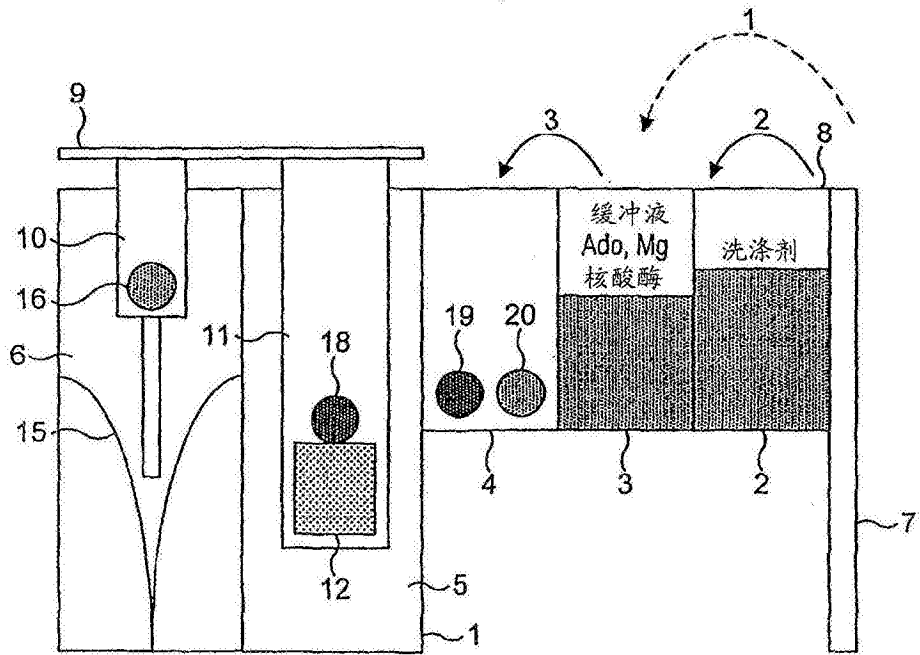


图6

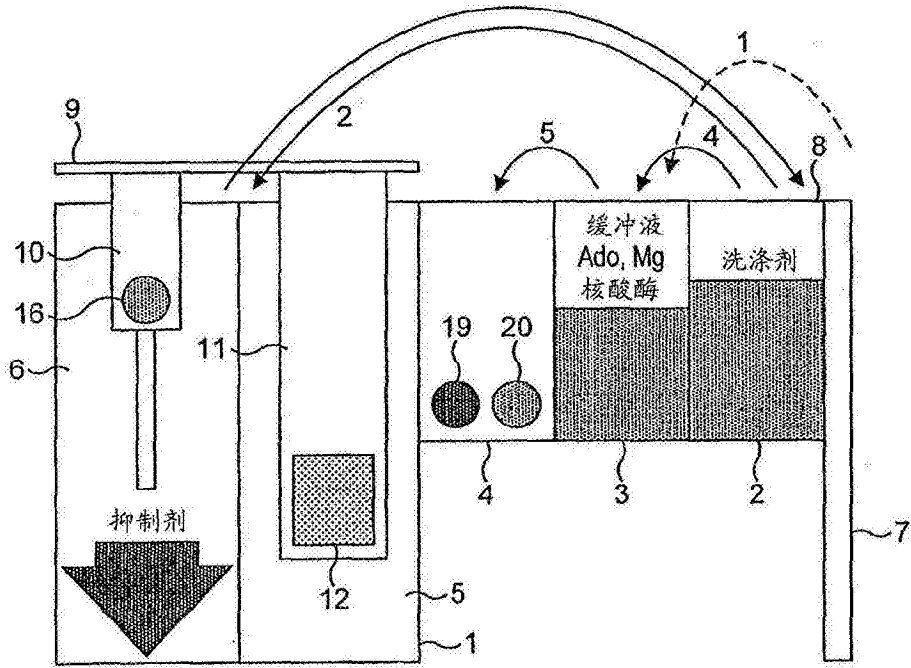


图7

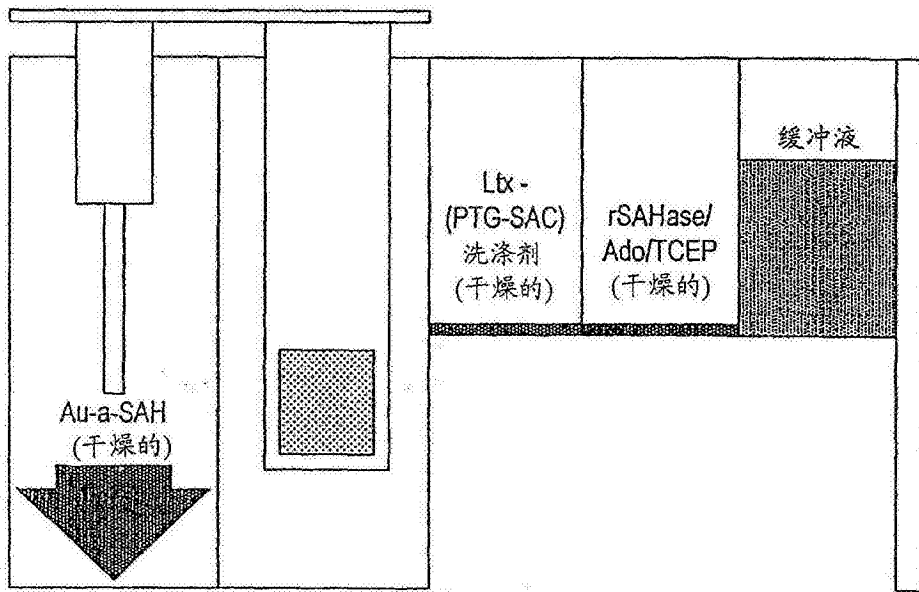


图8A

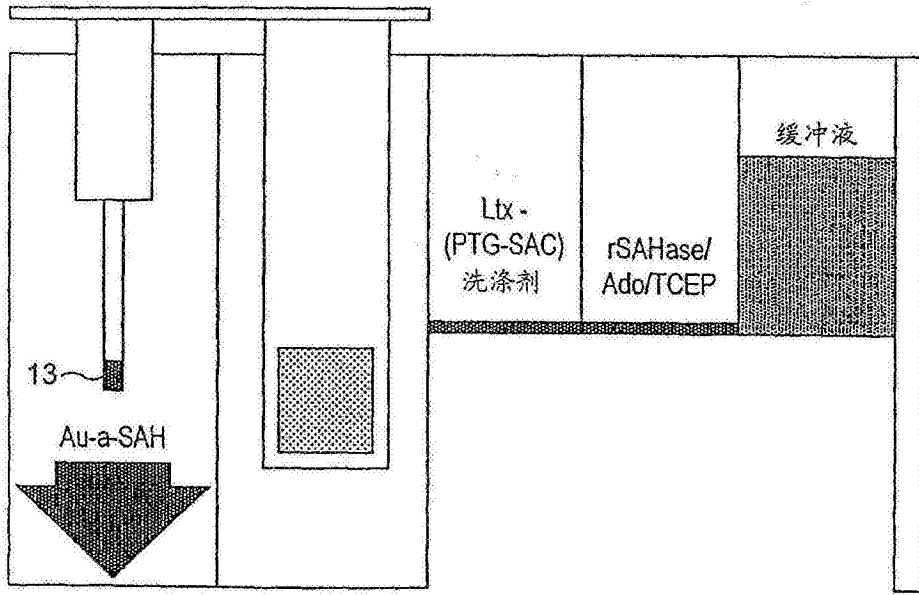


图8B

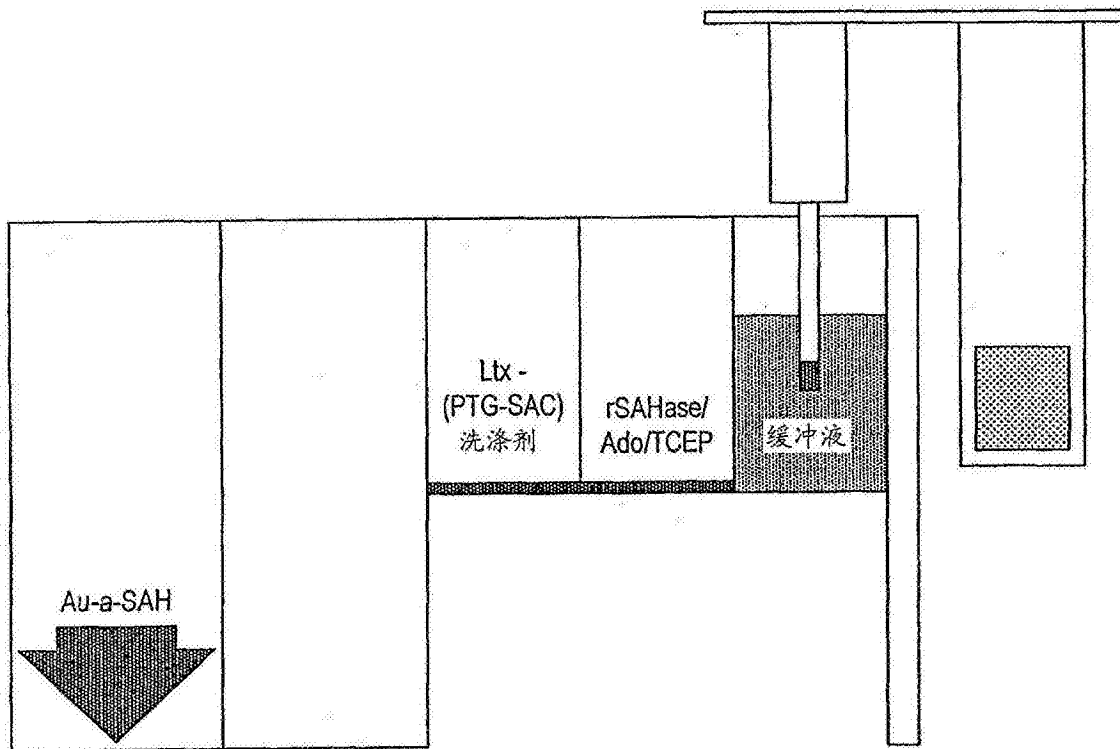


图8C

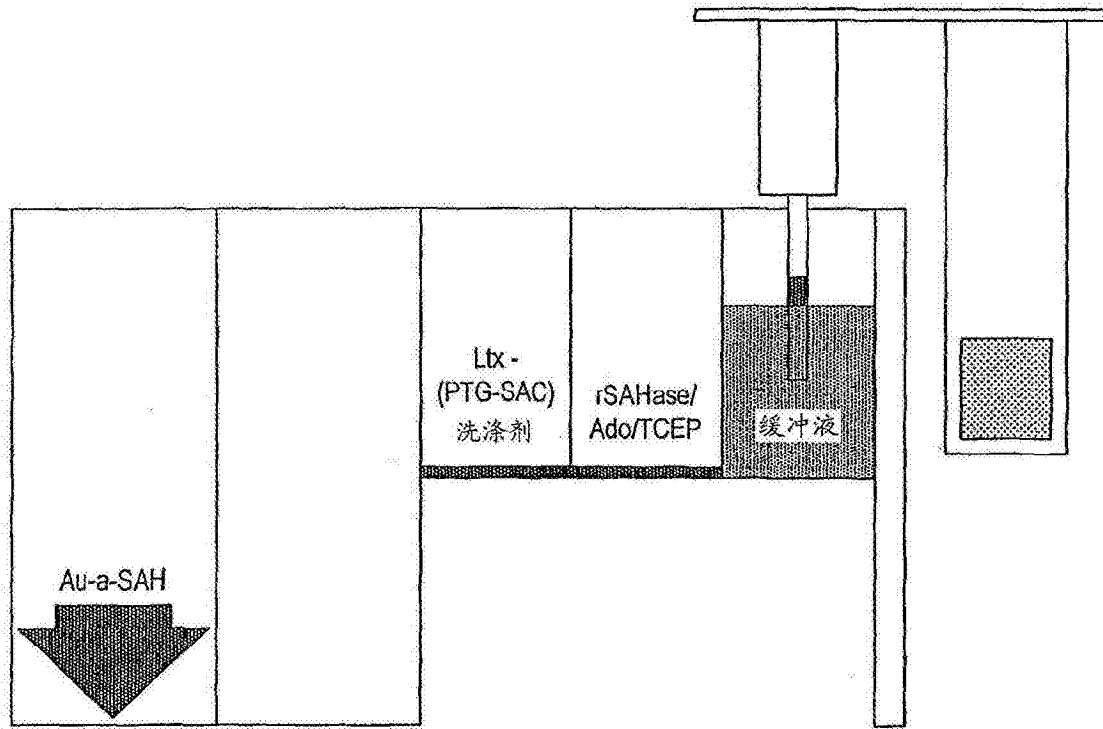


图8D

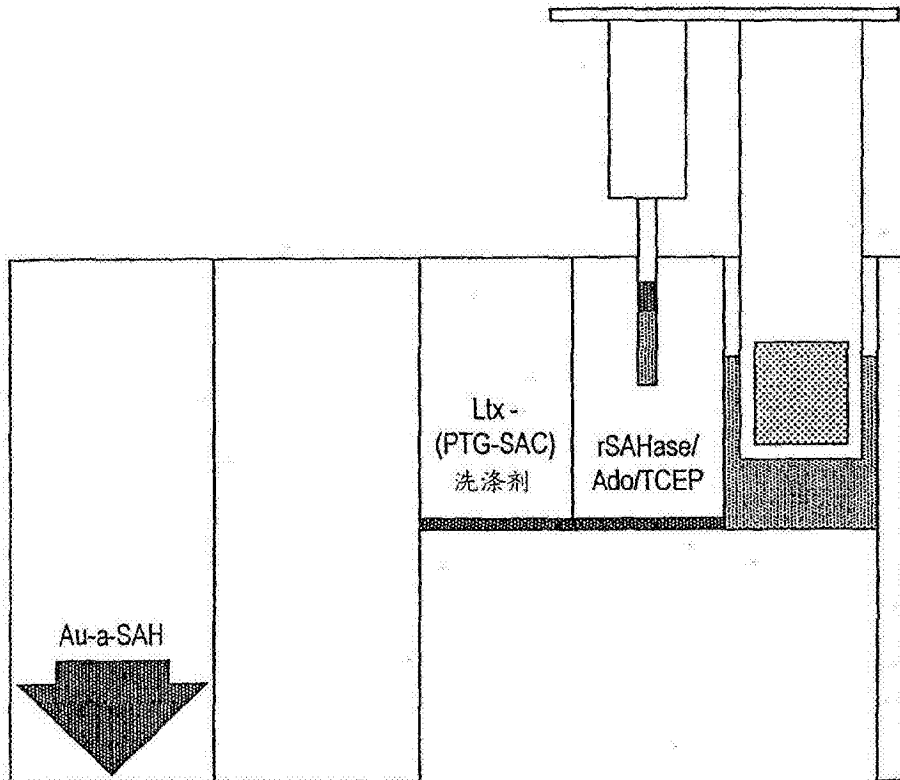


图8E

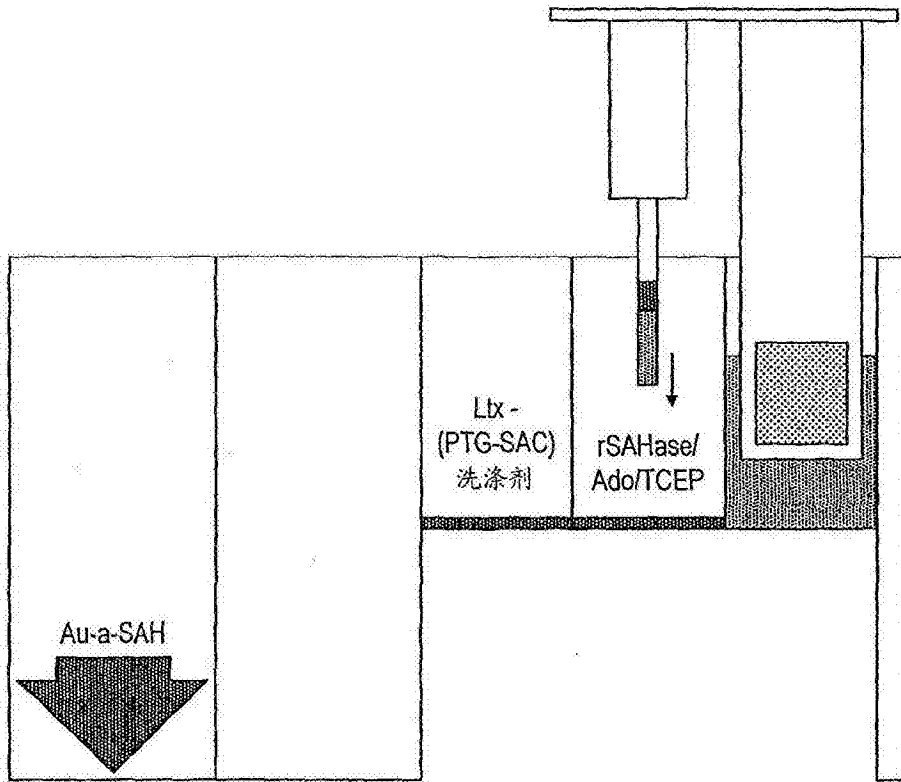


图8F

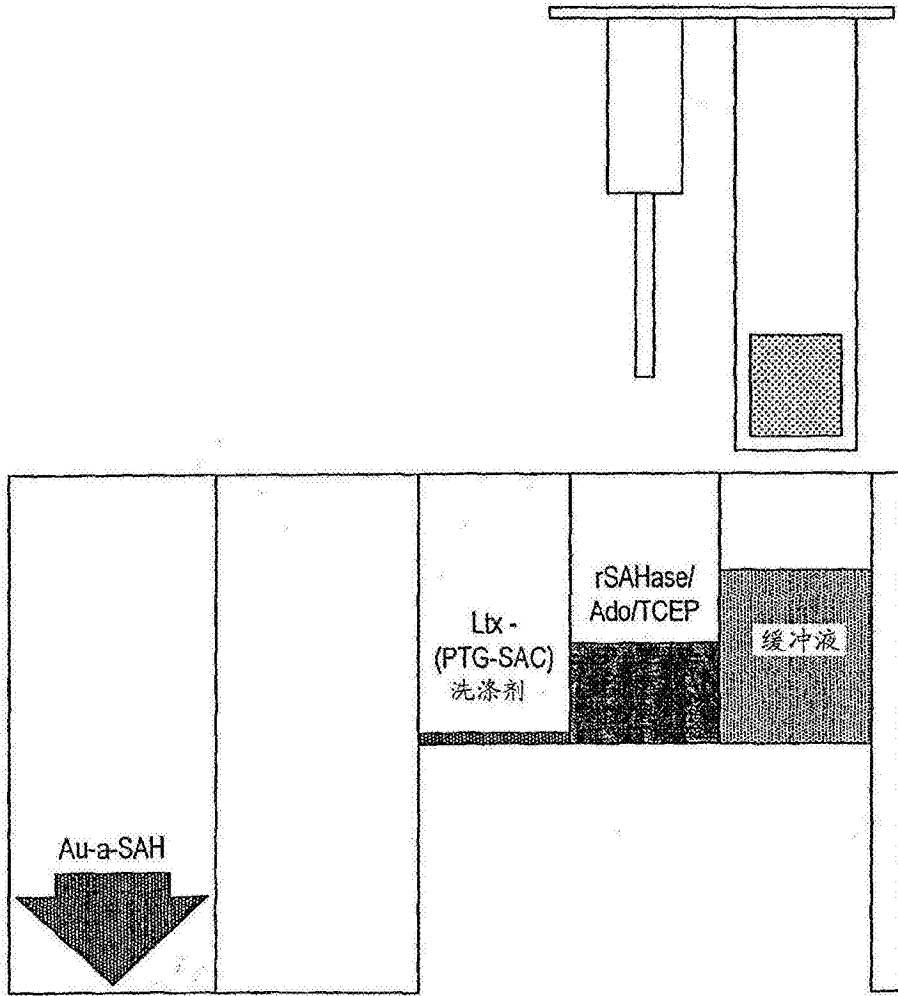


图8G

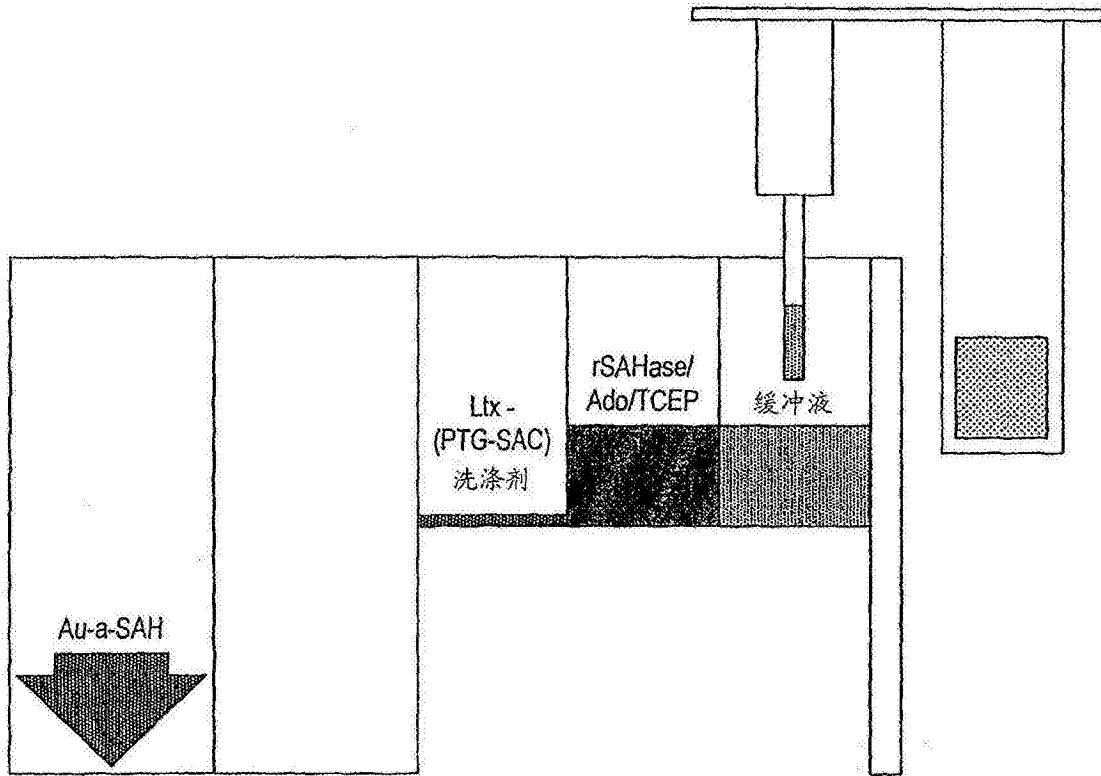


图8H

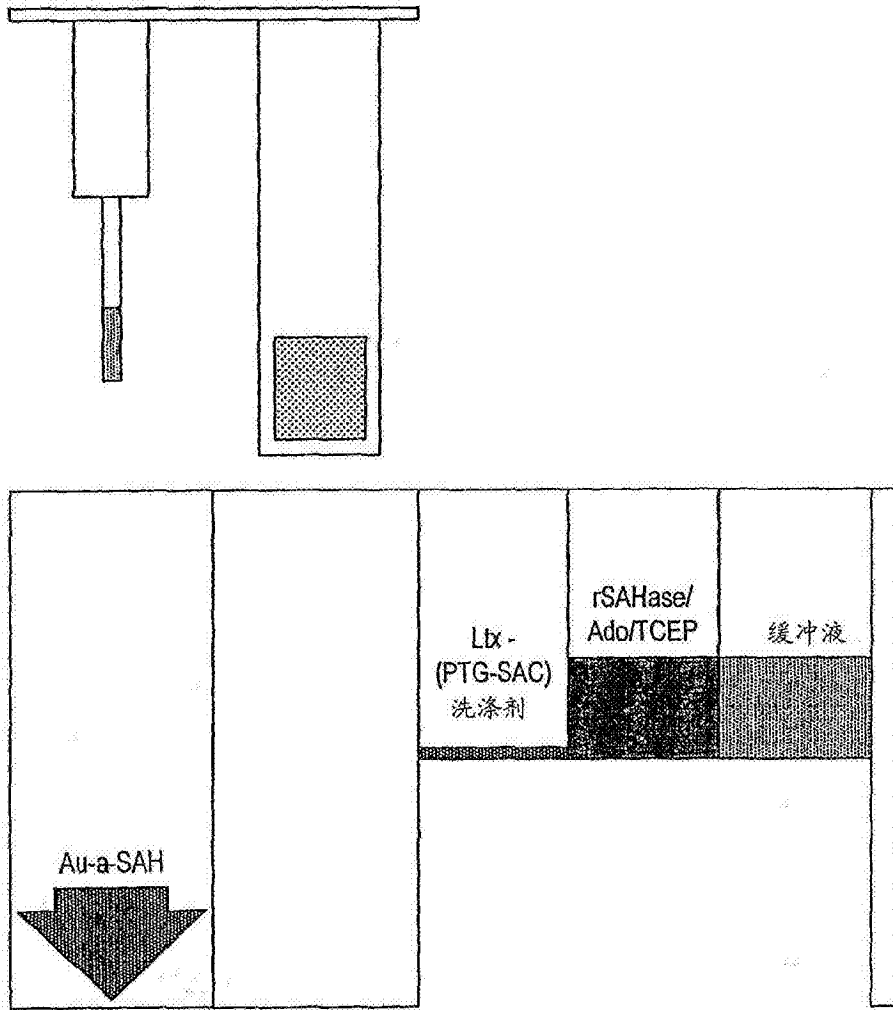


图8I

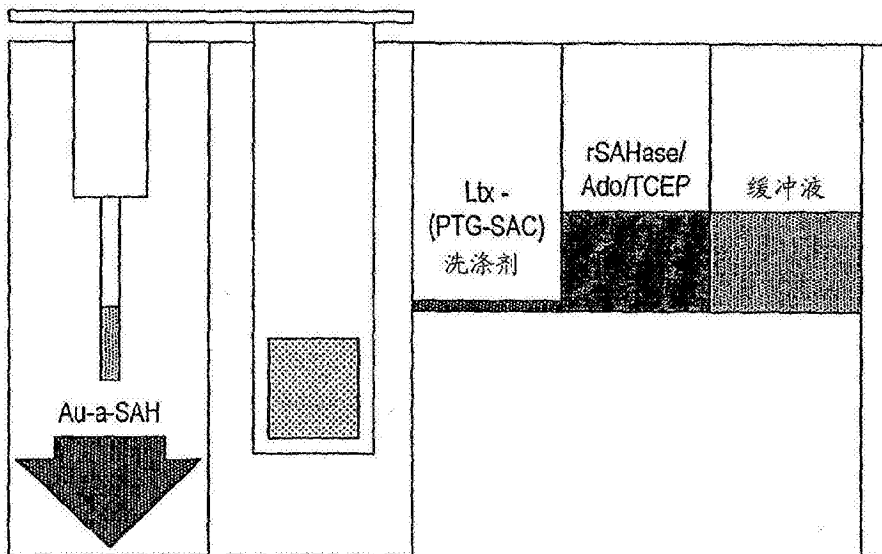


图8J

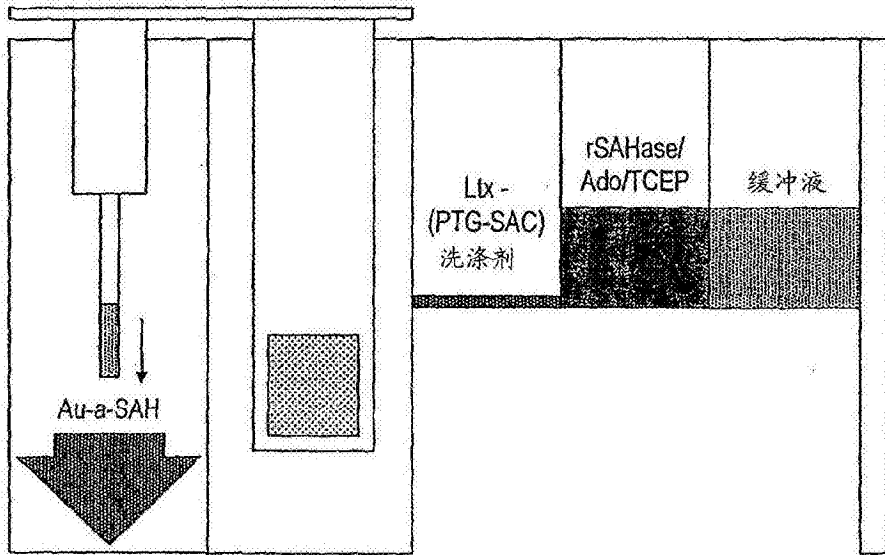


图8K

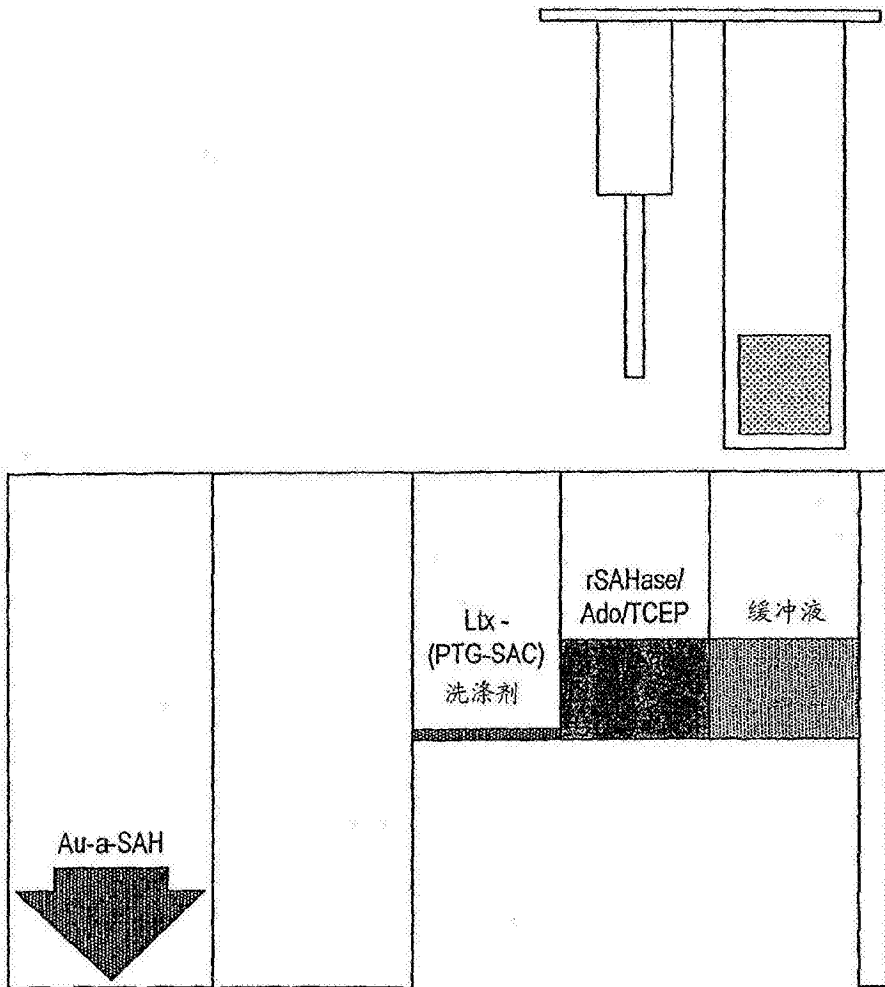


图8L

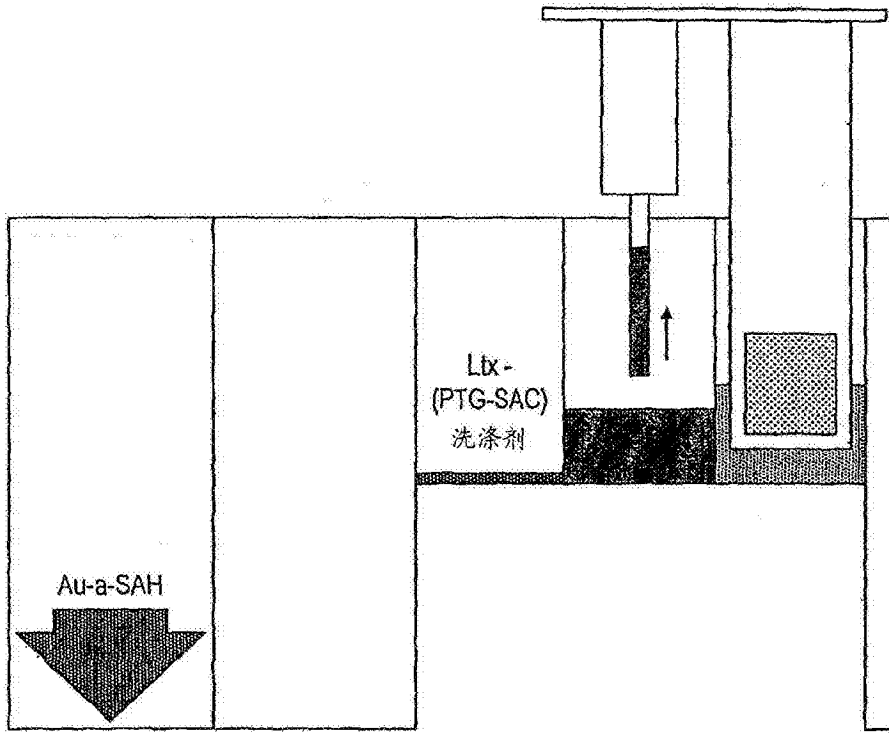


图8M

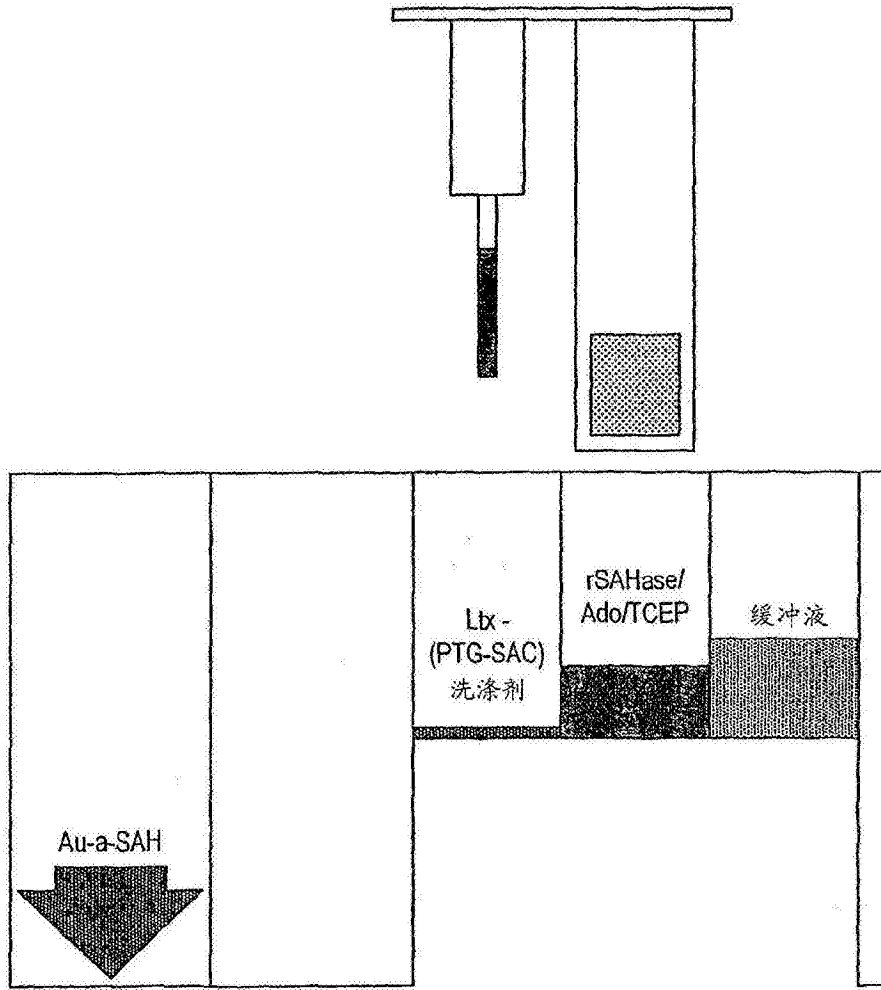


图8N

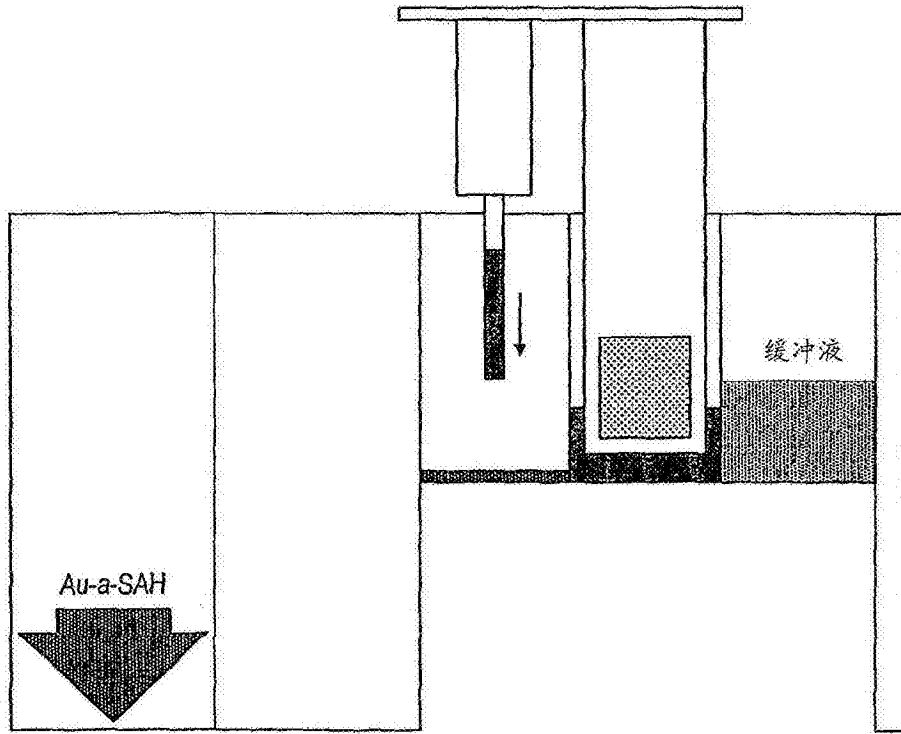


图80

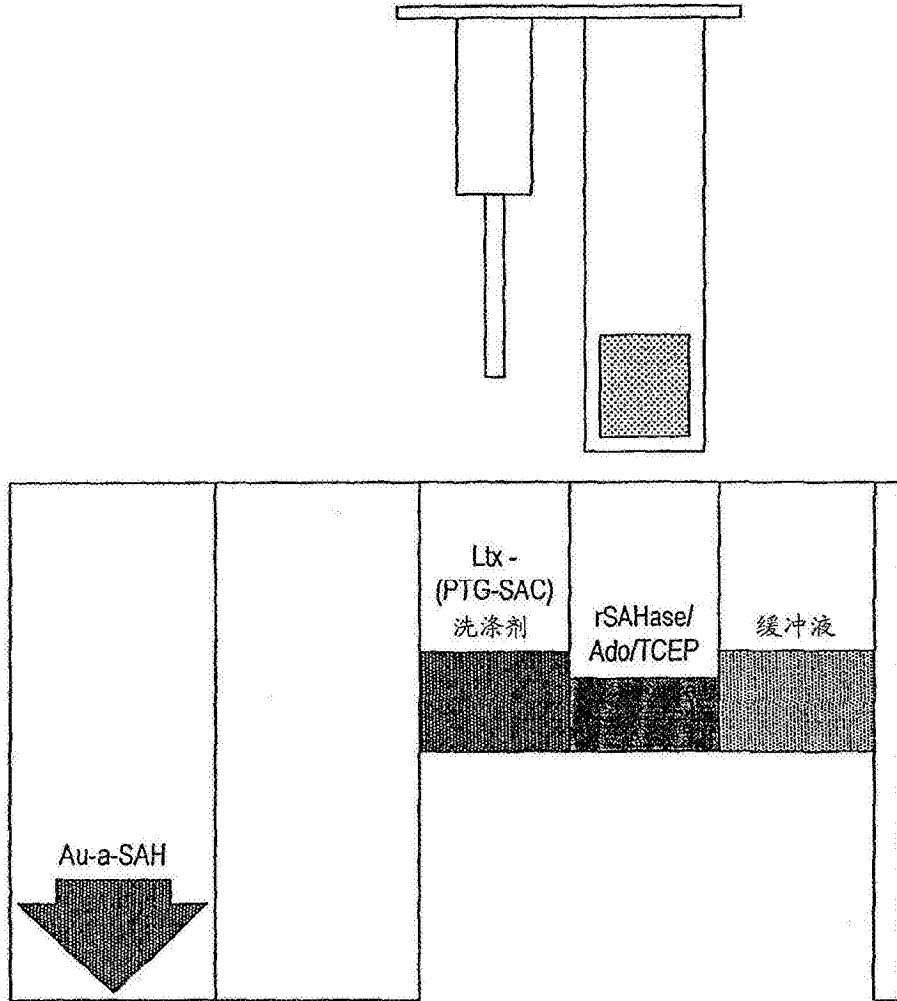


图8P

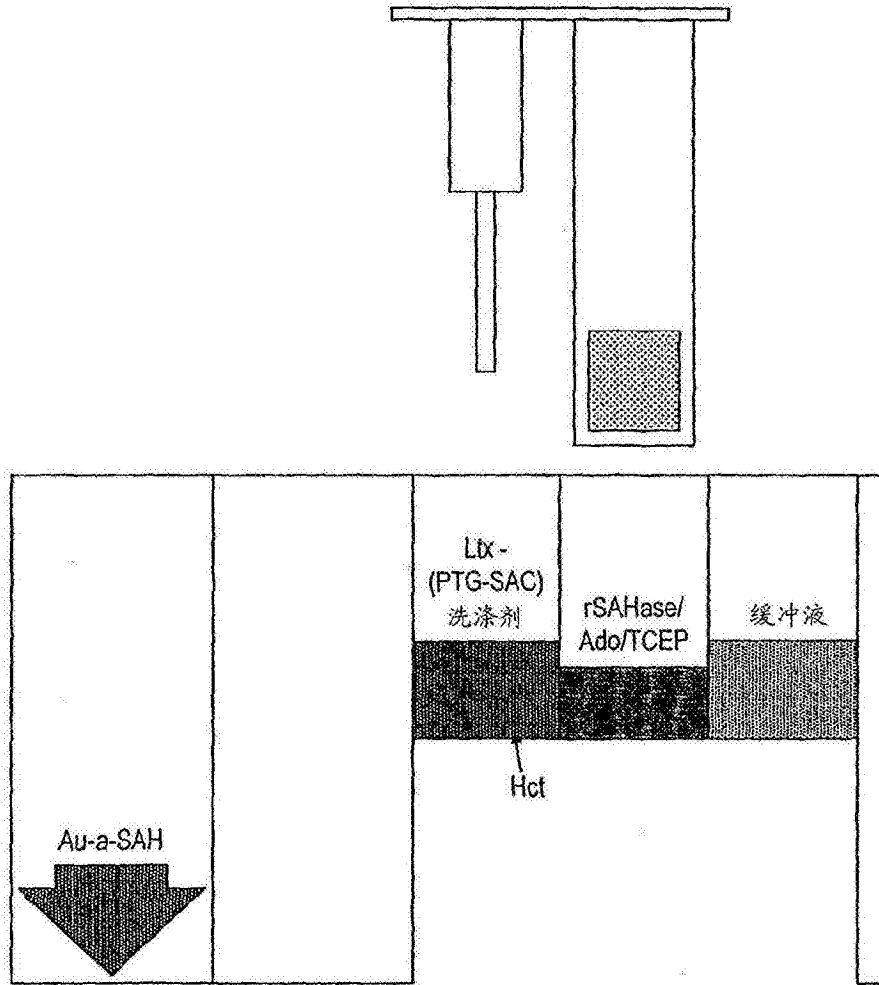


图8Q

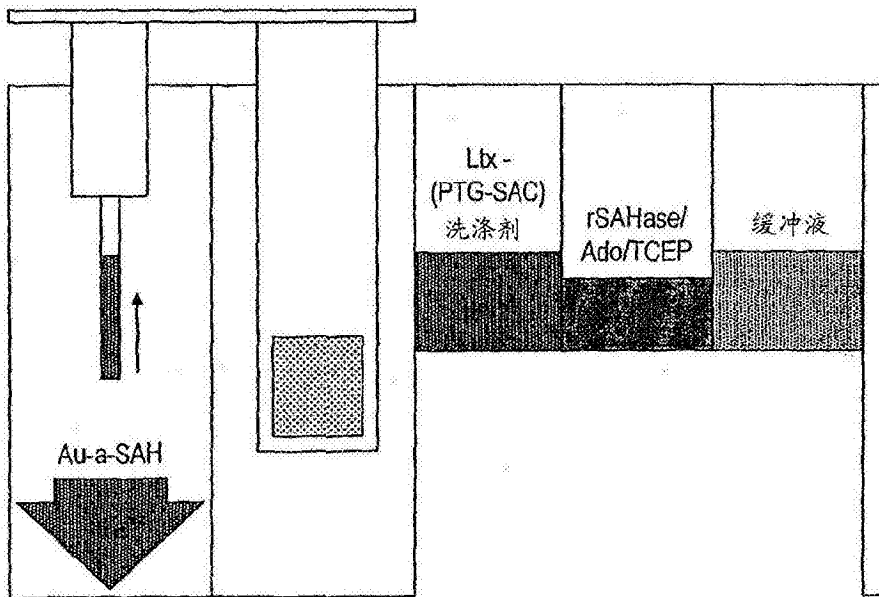


图8R

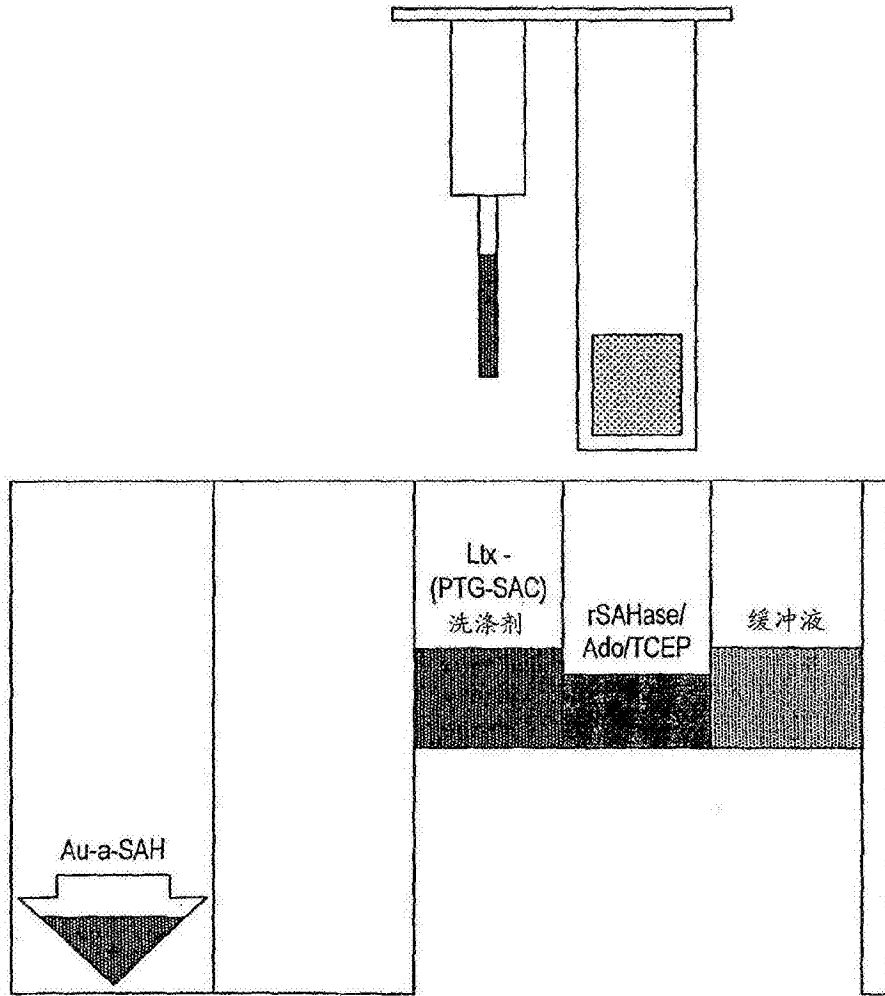


图8S

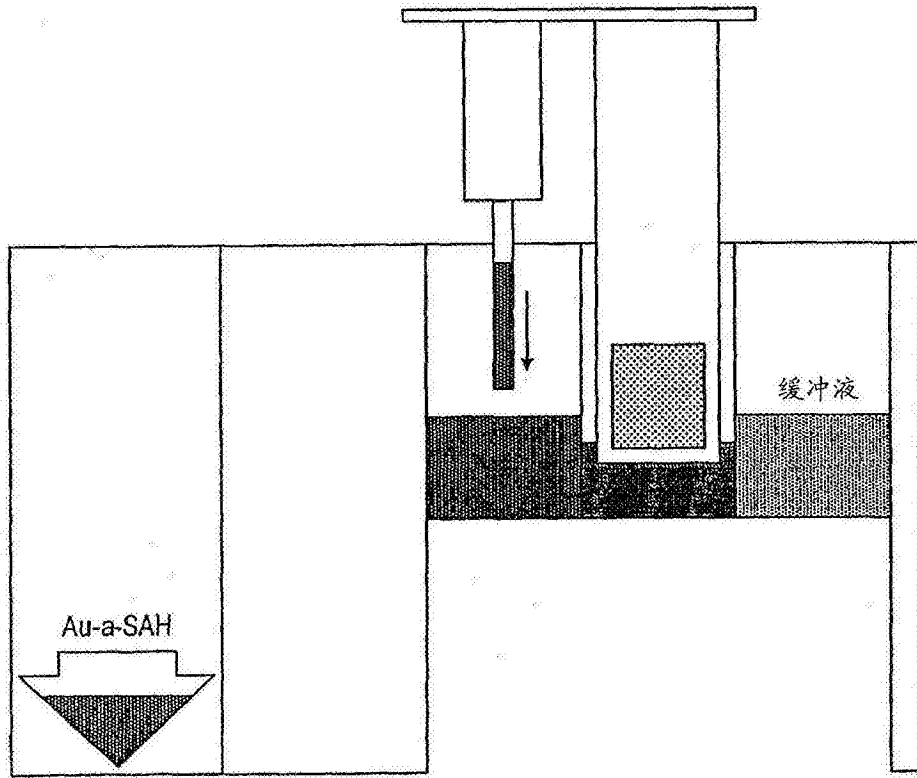


图8T

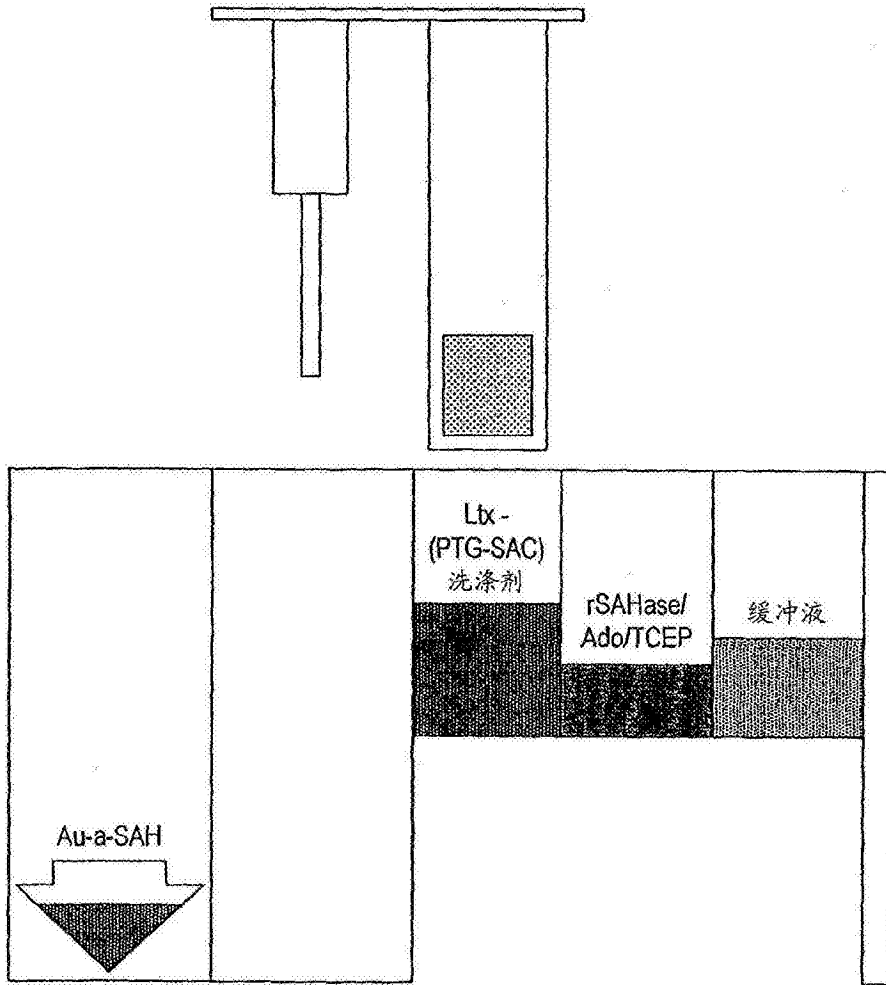


图8U

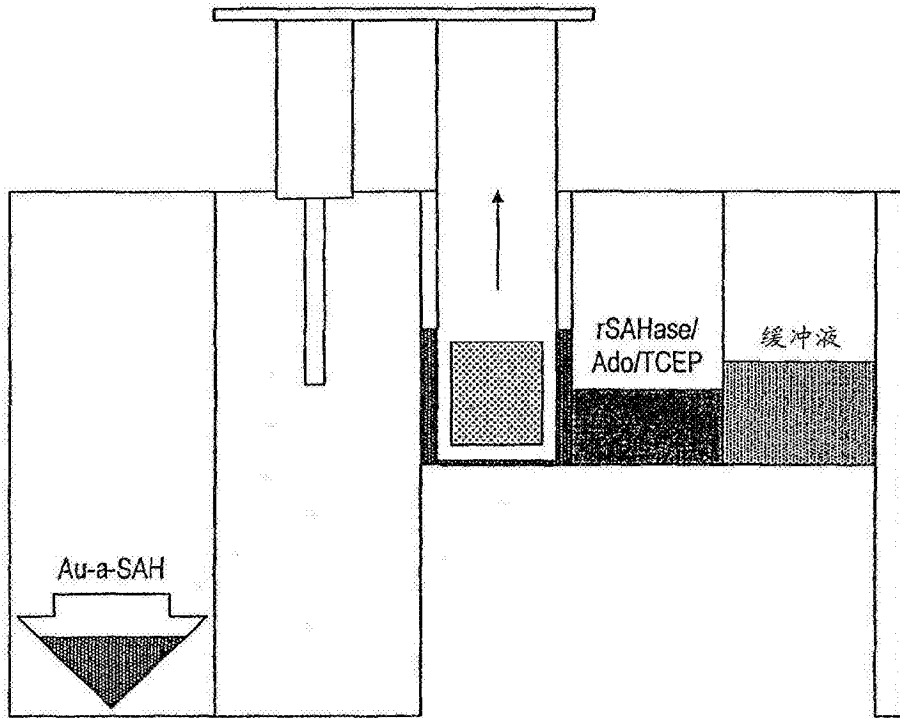


图8V

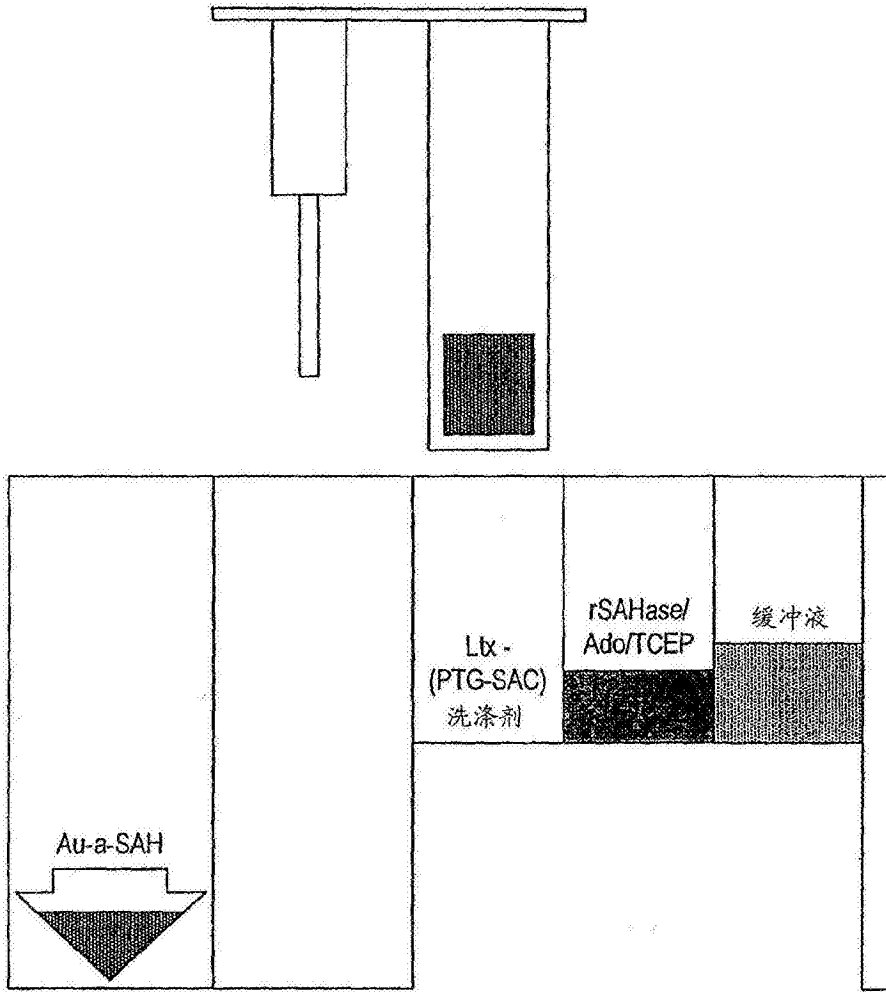


图8W

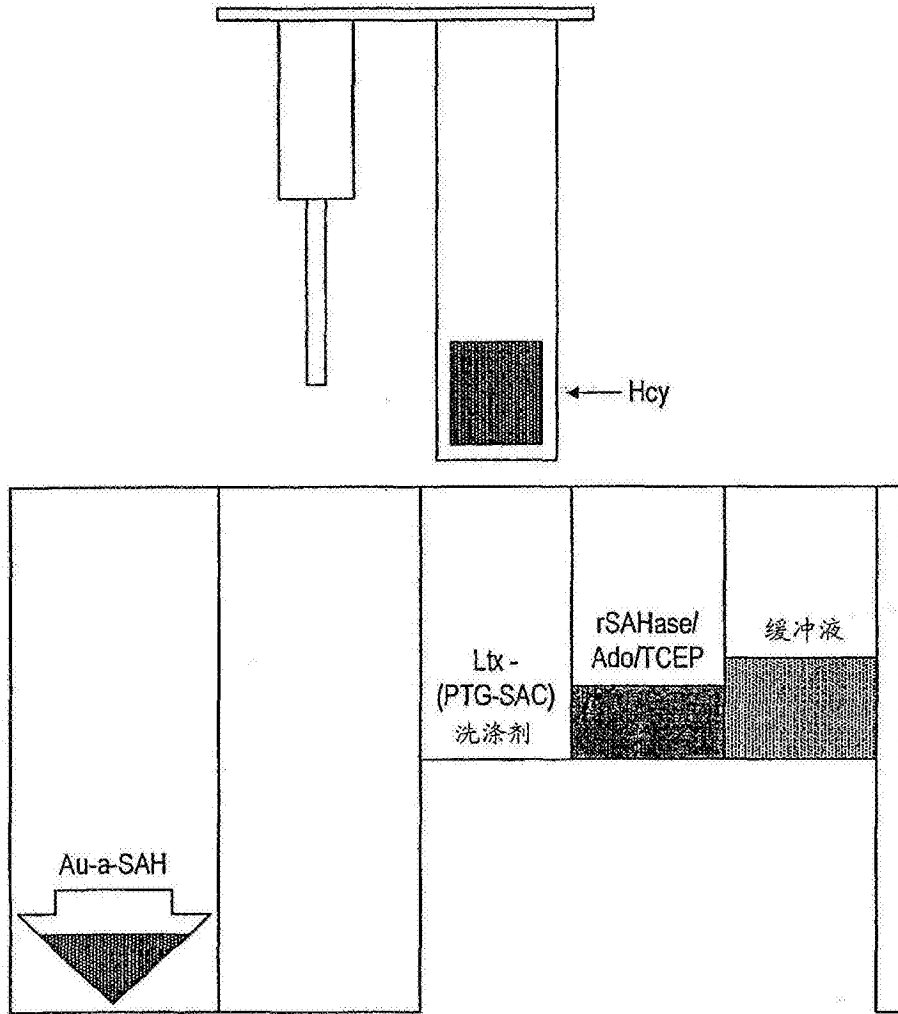


图8X

专利名称(译)	分析方法		
公开(公告)号	CN103675259B	公开(公告)日	2017-07-04
申请号	CN201310475731.7	申请日	2006-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	阿克西斯 - 希尔德公司		
申请(专利权)人(译)	阿克西斯-希尔德公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿克西斯-希尔德公司		
[标]发明人	弗兰克·弗朗策恩 阿恩·L·法伦 阿恩·K·诺德海		
发明人	弗兰克·弗朗策恩 阿恩·L·法伦 阿恩·K·诺德海		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/68 B01L3/00 B01L3/02 G01N35/02 G01N35/10		
CPC分类号	G01N33/6815 B01L3/021 B01L3/502 B01L2200/10 B01L2300/0681 G01N35/026 G01N35/1016 G01N35/1079 G01N2035/1032 G01N2035/1039		
审查员(译)	黄晓丽		
优先权	2005003836 2005-02-24 GB		
其他公开文献	CN103675259A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于高半胱氨酸的基于盒的自动化分析。本发明涉及分析血液中高半胱氨酸的方法和用于这种方法的分析试剂盒。

