

[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 200910163972.1

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/80 (2006.01)  
G01N 33/569 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月17日

[11] 公开号 CN 101672843A

[22] 申请日 2009.7.3

[21] 申请号 200910163972.1

[30] 优先权

[32] 2008.7.3 [33] SE [31] 0801587-7

[32] 2008.7.3 [33] US [31] 61/078295

[71] 申请人 阿米克股份公司

地址 瑞典乌普萨拉

[72] 发明人 I·门德尔-哈特维格 C·彼得森  
G·伦德斯特伦

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 权陆军 郭文洁

权利要求书1页 说明书7页

[54] 发明名称

分析循环抗体的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种分析循环抗体的方法，包括如下步骤：a) 提供包含基底的分析装置，所述基底上设有至少一个加样品区，至少一个阻留区，至少一个槽，至少一条连接加样品区、阻留区和槽的流路，其中流路是开放的并包括基本上垂直于所述基底表面并具有高度(H)、直径(D)和相互间距(t1, t2)的凸起，从而实现所述样品的横向毛细流动并且细胞可以流经凸起，其中所述阻留区包含至少一种结合细胞结构的亲和结合工具，b) 在加样品区加入至少一个样品，且c) 读出结果，其中针对细胞结构的循环抗体被测定。

1、一种分析循环抗体的方法，包括如下步骤：

a) 提供包含基底的分析装置，所述基底上设有至少一个加样品区，至少一个阻留区，至少一个槽，至少一条连接加样品区、阻留区和槽的流路，其中流路是开放的并包括基本上垂直于所述基底表面并具有高度（H）、直径（D）和相互间距（ $t_1$ ,  $t_2$ ）的凸起，从而实现所述样品的横向毛细流动并且细胞可以流经凸起，其中所述阻留区包含至少一种结合细胞结构的亲和结合工具，

b) 在加样品区加入至少一个样品，且

c) 读出结果，

其中针对细胞结构的循环抗体被测定。

2、根据权利要求1的方法，其中所述液体样品选自人或动物血液、尿液、肺液、滑液、伤口液、唾液、泪液和汗液。

3、根据权利要求1-2中任一项的方法，其中所述液体样品取自人的血液。

4、根据权利要求1-3中任一项的方法，其中所述细胞结构是部分血液抗原系统。

5、根据权利要求1-4中任一项的方法，其中所述细胞结构是部分涉及HIV感染或检测的抗原。

6、根据权利要求1-5中任一项的方法，其中所述液体样品取自人的血液并且被用于针对细菌、病毒或小粒径单或多细胞传染性介质的循环抗体的测定。

7、根据权利要求1-6中任一项的方法，其中所述液体样品取自人的骨髓。

## 分析循环抗体的方法

### 技术领域

本发明涉及一种分析循环抗体的方法。

### 背景技术

快速、可靠、花费低廉的分析和诊断方法是非常需要的。

PCT/SE03/00919 (Åmic AB) 涉及一种微流系统，它包含基底，基底上设置有至少一条流路，该流路包含复数个微型柱，它们从基底上向上伸出，微型柱之间的间距足够小从而可以引起液体样品的毛细作用，迫使上述液体移动。公开了装置可包含更密集的区域，其可以起到筛网的作用，阻止例如细胞通过。还公开了关于微结构的实施方式，其中的形状、尺寸和/或中心到中心间距形成了梯度使得细胞以及诸如此类的物质被迟滞或分离。

PCT/SE2005/000429 (Åmic AB) 公开了一种装置和方法，用来在检测液体样品中的分析物之前对所述液体样品中的成分进行分离，其中样品添加到基底上的接收区，所述基底任选地还包含反应区，分别连接接收区和反应区并在基底上形成了流路的运送或温育区，其中所述基底是无孔基底，而且至少部分所述流路由基本上垂直于所述基底表面的凸起区域组成，凸起区域具有高度、直径和相互间距，从而在所述区实现所述液体样品的横向毛细流动，并且分离部件配置成与接收样品的区域毗邻。公开了除去红细胞的实施方式。

PCT/SE2005/000787 (Åmic AB) 涉及处理液体样品的装置，包括带有至少一个用于接收样品的区的流路、和运送或温育区，所述区通过具有基本垂直于其表面的凸起的区连接或包括这样的区，所述装置提供有能接收所述液体样品的槽，所述槽包括具有基本垂直于其表面的凸起的区，并且所述槽适合于响应外部影响并调节它接收所述液体样品的能力。公开了该装置可以用于颗粒物质如细胞从大量样品中分离。描述了红细胞能被分离且没有出现显著的破裂。

PCT/US2003/030965 (The General Hospital Corporation, and GPB Scientific LLC) 公开了从样品中分离细胞的方法。还公开了具有不同性质的细胞的分离。

该装置是封闭的，具有输入和输出通道和盖子。装置包括障碍物阵列，其能够结合细胞群体。

US2007/0059718A1 公开了用于检测和浓缩具有生物危险的分析物的方法，如细菌、原生动物、病毒病原体和毒素。

目前需要建立有力和可靠的分析循环抗体的方法。

### 发明概述

本发明的一个目的是提供改进的用于分析循环抗体的方法。

本发明提供了用于分析循环抗体的方法，包括如下步骤：

a. 提供包含基底的分析装置，所述基底上设有至少一个加样品区，至少一个阻留区，至少一个槽 (sink)，至少一条连接加样品区、阻留区和槽的流路，其中流路是开放的并包括基本上垂直于所述基底表面并具有高度(H)、直径(D)和相互间距 ( $t_1$ ,  $t_2$ ) 的凸起，从而实现所述样品的横向毛细流动并且细胞可以流经凸起，其中所述阻留区包含至少一种结合细胞结构的亲和结合工具 (means)，

b. 在加样品区加入至少一个样品，且

c. 读出结果，

其中针对细胞结构的循环抗体被测定。

有关本发明的更深入的方面和实施方式在所附的权利要求中被限定，在此通过援引并入。

通过提供包含联合了阻留区的凸起的基底，在所述阻留区中颗粒和/或细胞由于吸引力会受到阻留，产生了若干优点。

这些凸起会使得基底产生很大的表面积，而且阻留区的大的表面积带来益处，这是因为细胞能更有效的结合。凸起与亲和结合的联合使分析装置的动力学得到提高。

这些与亲和结合工具联合的凸起能够使得在装置中产生适宜的样品液体流。这使得一些问题例如不希望的堵塞可以被避免。

本发明具有进一步的益处，根据本发明，在开放的系统中对结果读数更容易。而且在开放的系统中不存在滞留气体的问题。

使用基本上垂直的凸起来分析细胞带来了另一个益处，这些凸起的设计使

得细胞可以被仔细的处理。

### 定义

在描述本发明的装置和方法之前，应明白本发明不受限于本文公开的特别的构造、方法步骤和材料，因为该构造、方法步骤和材料可以有些变化。还应明白本文所用的术语仅仅是用于描述特别的实施方式，并不作为限制，因为本发明的范围只受限于所附上的权利要求以及其等同物。还必须指出，如本说明书和所附权利要求所使用的单数形式“一”和“该”包括复数指示物，上下文中明确指出的除外。因此，例如提到含“一种抗体”的反应混合物，则包括两种或更多种抗体的混合物。

术语“约”用于数值上下文中，是指本领域技术人员所熟悉和能够接受的准确度区间。所述区间是 $\pm 10\%$ 。

在描述和请求保护装置和方法时，按照此处列举的定义使用以下术语。

在权利要求书和说明书中的术语“结合细胞的亲和结合工具”表示通过在结合工具与细胞之间的吸引力与细胞结合的元件。

在权利要求书和说明书中的术语“分析”表示至少一种分析物被测定的过程。

在权利要求书和说明书中的术语“分析装置”表示借助于其才能执行分析的装置。

在权利要求书和说明书中的术语“分析物”表示在分析过程中其一种或更多种性质被测定的物质或化学或生物组分。分析物或成分本身经常不会被测量，但是分析物的可测量的性质会被测量。比如，可以测量分析物的浓度。

在权利要求书和说明书中的术语“毛细流动”表示主要由毛细力产生的流动。

在权利要求书和说明书中的术语“壳罩”表示封闭一部分或整个装置的元件。

在权利要求书和说明书中的术语“循环抗体”表示在溶液中的抗体。

在权利要求书和说明书中的术语“可检测基团”表示存在于基底上时能够被检测的任何分子或原子排列。

在权利要求书和说明书中的术语“流路”表示其中液体能够在不同区之间流动的装置上的区域。

在权利要求书和说明书中的术语“流体连接”表示流体能在其中传送的连接。

在权利要求书和说明书中的术语“盖子”表示盖住部分或整个装置的元件。

在权利要求书和说明书中使用的与毛细流动有关的术语“开放的”表示系统是开放的，也就是系统不是封闭的。有关开放系统的例子包括其中没有盖子与样品液体毛细接触的系统。在开放系统中盖子不会与样品液体毛细接触，即盖子不会参与毛细力的产生。

在权利要求书和说明书中的术语“相互间距”表示毗邻的凸起之间的间距。

在权利要求书和说明书中的术语“阻留区”表示至少部分样品在其中被阻留的区域。

在权利要求书和说明书中的术语“样品”表示被分析的混合物或溶液。

在权利要求书和说明书中的术语“加样品区”表示样品被添加的区域。

在权利要求书和说明书中的术语“槽 (sink)”表示能接收液体样品的区域。

在权利要求书和说明书中的术语“物质”表示任何纯的化学或生物实体，或包含至少一种化学或生物实体的任何混合物或溶液。

#### 详细描述

首先一方面提供了分析循环抗体的方法，包括如下步骤：

a) 提供包含基底的分析装置，所述基底上设有至少一个加样品区，至少一个阻留区，至少一个槽，至少一条连接加样品区、阻留区和槽的流路，其中流路是开放的并包括基本上垂直于所述基底表面并具有高度 (H)、直径 (D) 和相互间距 ( $t_1$ ,  $t_2$ ) 的凸起，从而实现所述样品的横向毛细流动并且细胞可以流经凸起，其中所述阻留区包含至少一种结合细胞结构的亲和结合工具，

b) 在加样品区加入至少一个样品，且

c) 读出结果，

其中针对细胞结构的循环抗体被测定。

相互间距 ( $t_1$ ,  $t_2$ ) 表示在直角坐标系统中 x 和 y 方向上的相互间距。在一个实施方式中所有的凸起在 x 方向和/或 y 方向上具有相同的间距。在可选择的实施方式中凸起在 x 方向上具有不同的间距。在一个实施方式中不同凸起在 x 方向上的间距为  $t_{11}$ 、 $t_{12}$ 、 $t_{13}$ .....在另一实施方式中凸起在 y 方向上具有不同的间距。在一个实施方式中不同凸起在 y 方向上的间距为  $t_{21}$ 、 $t_{22}$ 、 $t_{23}$ .....

装置包括基底。在一个实施方式中基底部分或全部由壳罩或盖子封闭。如果使用了壳罩或盖子，它们与基底之间的距离使得罩壳或盖子对作用在样品液

体上的毛细力没有影响。

至少有一个用于加液体样品的加样品区。流路与加样品区、阻留区和槽形成流体连接。

在一个实施方式中样品在流路内流动从加样品区经过阻留区到达槽。

在一个实施方式中阻留区被设置成穿过样品液体流经的全部路径，这样样品液体就不能避过阻留区。在一个可选择的实施方式中阻留区被设置成部分样品液体经过阻留区但是不与阻留区发生任何基本的相互作用。

在一个实施方式中 a) 加样品区、b) 阻留区和 c) 槽中的至少一个包括基本上垂直于所述基底表面并具有高度 (H)、直径 (D) 和相互间距 ( $t_1$ ,  $t_2$ ) 的凸起从而实现所述样品的横向毛细流动并且细胞可以流经凸起。

在一个实施方式中 a) 流路、b) 加样品区、c) 阻留区和 d) 槽的高度、直径和相互间距是相同的。在一个可选择的实施方式中，a) 流路、b) 加样品区、c) 阻留区和 d) 槽中的至少一个的高度、直径和相互间距是不同的。

在一个实施方式中亲和结合工具选自抗体、适配体、受体、配体、单链抗体、抗体片断和凝集素。

在一个实施方式中微型柱被排列成微型柱间距为 5-200 $\mu\text{m}$ 。在另一实施方式中微型柱间距设为 20-100 $\mu\text{m}$ 。

在一个实施方式中微型柱被排列成微型柱高度为 1-1000 $\mu\text{m}$ 。在另一实施方式中微型柱高度设为 10-100 $\mu\text{m}$ 。

在一个实施方式中液体样品选自人或动物血液、尿液、肺液、滑液、伤口液、唾液、泪液和汗液。

在一个实施方式中液体样品是取自人的血液。

在一个实施方式中细胞结构是部分血液抗原系统。

在一个实施方式中细胞结构是部分涉及 HIV 感染或检测的抗原。

在一个实施方式中液体样品是取自人的血液，并且被用于针对细菌、病毒或小粒径单或多细胞传染性介质的循环抗体的测定。

在一个实施方案中液体样品是取自人的骨髓。

对本领域技术人员来说，在阅读了说明书和实施例后，本发明的其它特点和应用以及它们连带的优点是显而易见的。

必须理解的是本发明并不限于此处公开的特定实施方式。下面的例子只是

用来提供例示的作用而不是为了限定本发明的保护范围，本发明的保护范围只受限于所附上的权利要求以及其等同物。

## 实施例

### 实施例 1

#### 细胞与根据本发明的分析装置的附着

芯片上的凸起具有不同的中心到中心间距，在流动方向上具有最大间距。凸起向着顶部逐渐缩小。凸起的高度为  $65\mu\text{m}$ 。凸起的底部的直径为  $70\mu\text{m}$ ，顶部的直径为  $50\mu\text{m}$ 。凸起间在凸起底部的间距为  $t_1=t_2=31.77\mu\text{m}$ ，在凸起顶部的间距为  $t_1=t_2=51.77\mu\text{m}$ 。

细胞附着到装置表面的原理以红细胞（RBC）的牢固结合为例说明。在自由流动到芯片的规定区域的过程中，RBCs 通过不同原理包括 RBC 凝集素、电荷和针对表面抗原的抗体被牢固的附着。

取少量 ( $0.1\mu\text{l}$ ) 的凝集素浓度为  $1\text{mg/ml}$  的  $50\text{mM}$  磷酸钠缓冲液加入芯片上单通道，pH 值为 7.5，然后  $20\mu\text{l}$   $0.8\%$ RBCs 悬浮液被加入，并让它们流经包含凝集素的检测区。结果显示 RBC 与不同凝集素（PHA-E、PHA-M、WGA、榴莲凝集素）的结合是不同的，其中最有效的是 WGA。在使用了包括如  $0.1\%$  洗涤剂吐温 20 的缓冲液  $50\mu\text{l}$  冲洗后，肉眼清晰可见的结合的 RBCs 仍为附着的。通过加入  $10\mu\text{l}$  兔抗人 RBC 联合  $10\mu\text{l}$  Cy5 山羊抗兔 IgG 即可定量测定结合的 RBCs。

通过使用针对 RBC 表面抗原例如血型糖蛋白，一种主要的人 RBC 表面蛋白，的抗体也可以使得芯片表面牢固结合 RBC。

在细胞培养中通常用来牢固结合细胞的大分子量聚赖氨酸也可以用于与 RBC 结合，在数量上可与 WGA 相比。

RBC 与 4castchip 的附着也可以通过使用生物素标记的 RBC 联合沉淀的链霉亲和素来实现。链霉亲和素 ( $0.13\mu\text{l}$  的  $2\text{mg}$  链霉亲和素/ml) 置于 pH7.5 的 PBS 中，加入芯片上的单通道中。利用磺基-NHS-生物素的生物素标记的  $20\mu\text{l}$   $1.6\%$ RBCs 流过包含链霉亲和素的检测区。结果显示 RBC 与链霉亲和素清楚可见的牢固结合，并且在使用  $80\mu\text{l}$  含例如  $0.1\%$  洗涤剂吐温 20 的缓冲液冲洗后，仍然保持附着。

## 实施例 2

针对 RBC 表面抗原的可溶性人抗体的检测（间接抗珠蛋白实验，IAT）

抗体检测的原理以在人血清中低滴定度存在的抗 D 抗体的检测为例说明。分析原理涉及通过沉积有传染性的例如针对 RBC 表面抗原抗体将存活的 RBCs 牢固附着或结合到芯片表面。这里使用了与实施例 1 相同的装置。于是，通过自由流过芯片上的微柱而转运的 RBCs 被设在检测区的芯片结合抗体俘获。少量（10 $\mu$ l）的人血清样品，其已经以 1:100 的比例在含有 0.5%明胶的 LISS 缓冲液稀释，所述样品含有不同滴度的抗 D 抗体，被用于敏化 RBCs。洗涤（30 $\mu$ l）之后 RBC 表面 IgG 的存在使用 10 $\mu$ l 缀合了 transfluosphere 的抗人珠蛋白抗体（AHG）进行检测。结果显示了相对于抗 D 抗体的滴度，AHG 缀合物与 RBCs 的剂量依赖性结合。在没有洗涤剂的存在且使用了含有 0.5%明胶的低离子强度盐（LISS）洗涤缓冲液时达到最佳敏化。

在高敏感性 IAT 分析中，利用 AHG 缀合物的检测通过具有极大斯托克斯位移（激发峰位和发射峰位之间的间距）的荧光染料组合而进行，比如在 Transfluosphere 和铕的缀合物中。

## 实施例 3

ABO 血型抗原实验

在 RBCs 上的 ABO 血型抗原被高度特异地检测。从供体血液样品中取得的 RBCs 用 LISS 缓冲液洗涤两次后重悬浮得到 0.8%的 RBC 溶液。在 LISS 缓冲液中的洗涤后的供体 RBCs（4%，20 $\mu$ l）通过沉积的抗血型糖蛋白（1mg/ml，0.13 $\mu$ l/芯片）附着到装置。先使用 10 $\mu$ l 单克隆的抗 RBC-A 和 RBC-B 抗体，接着使用 10 $\mu$ l 的 Cy5 缀合的抗小鼠 IgM 抗体，分别检测 A-和 B-抗原。最后使用 60 $\mu$ l 分析缓冲液（20mM Tris，0.135 M NaCl，10mM EDTA，0.1%吐温 20，1% BSA，pH7.4）洗涤芯片。使用了抗 RBC-A 抗体时 A 阳性 RBCs 的荧光信号在 635nm 处为明显正值，B 阳性 RBCs 的荧光信号在 635nm 处为负值（等于背景信号）。在 B 阳性 RBCs 的实验中得到了同样的高特异性。

专利名称(译)	分析循环抗体的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101672843A</a>	公开(公告)日	2010-03-17
申请号	CN200910163972.1	申请日	2009-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	阿米克股份公司		
申请(专利权)人(译)	阿米克股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿米克股份公司		
[标]发明人	I·门德尔 哈特维格 C·彼得森 G·伦德斯特伦		
发明人	I·门德尔-哈特维格 C·彼得森 G·伦德斯特伦 I·门德尔 - 哈特维格		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/80 G01N33/569		
代理人(译)	郭文洁		
优先权	0801587 2008-07-03 SE 61/078295 2008-07-03 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种分析循环抗体的方法，包括如下步骤：a)提供包含基底的分析装置，所述基底上设有至少一个加样品区，至少一个阻留区，至少一个槽，至少一条连接加样品区、阻留区和槽的流路，其中流路是开放的并包括基本上垂直于所述基底表面并具有高度(H)、直径(D)和相互间距(t1, t2)的凸起，从而实现所述样品的横向毛细流动并且细胞可以流经凸起，其中所述阻留区包含至少一种结合细胞结构的亲和结合工具，b)在加样品区加入至少一个样品，且c)读出结果，其中针对细胞结构的循环抗体被测定。