



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102388306 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 21

(21) 申请号 200980153331. 6

代理人 张晶

(22) 申请日 2009. 12. 29

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/53 (2006. 01)

2, 647, 953 2008. 12. 29 CA

C40B 30/04 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

G01N 33/564 (2006. 01)

2011. 06. 29

G01N 33/58 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CA2009/001899 2009. 12. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02010/075632 EN 2010. 07. 08

(71) 申请人 SQI 诊断系统有限责任公司

地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 彼得·李

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

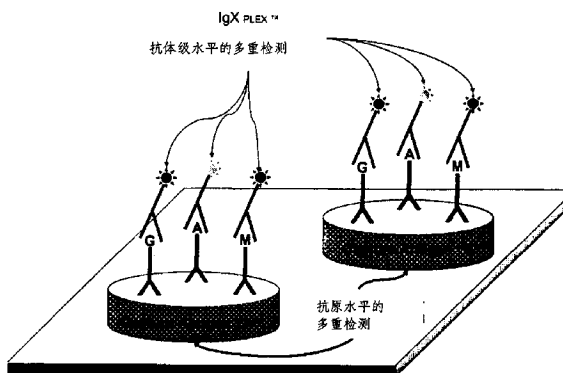
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于多重分析物检测和定量的方法

(57) 摘要

本申请涉及一种采用单一反应器,对测试样品中的多重目标分析物进行检测和定量的方法。该方法采用反应器(多孔板),其包括微阵列:(a)校准点,各点具有预定量的目标分析物;以及(b)捕捉点,各点具有有选择性结合目标分析物的试剂(抗体)。捕获的分析物和校准点用针对每个不同目标分析物的特异性荧光标记抗体检测。校准点用于生成使得能对不同目标分析物浓度进行测定的校准曲线。本申请还涉及一种对用于诊断类风湿关节炎的生物标记物进行检测和定量的方法。更具体地,本申请公开了类风湿因子(RF)和环瓜氨酸肽(CCP)作为捕捉点的应用。最后,基于上述方法,本发明提出了一种诊断或监测类风湿关节炎的方法。



1. 一种用于检测和定量测试样品中两个或更多目标分析物的方法,包括:
 - a) 提供印有微阵列的反应器,所述微阵列包括:
 - i) 包括多个第一校准点的第一校准基质,每个校准点含有预定量的第一目标分析物,
 - ii) 包括多个第二校准点的第二校准基质,每个校准点含有预定量的第二目标分析物,
 - iii) 包括多个第一捕捉点的第一捕获基质,每个捕捉点含有与第一目标分析物选择性结合的预定量试剂,及
 - iv) 包括多个第二捕捉点的第二捕获基质,每个捕捉点含有与第二目标分析物选择性结合的预定量试剂;
 - b) 将预定体积的测试样品加入到微阵列;
 - c) 将与第一目标分析物选择性结合的第一荧光标记抗体和与第二目标分析物选择性结合的第二荧光标记抗体加入到检测装置,其中所述第一和第二荧光标记抗体分别含有发射和激发光谱不互相重叠的不同荧光染料;
 - d) 测定微阵列中各点的信号强度值;
 - e) 根据每个校准点测得的信号强度值相对于第一目标分析物和第二目标分析物的已知浓度拟合曲线生成校准曲线;以及
 - f) 用生成的校准曲线确定第一目标分析物和第二目标分析物的浓度。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述目标分析物为蛋白。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述蛋白为抗体。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述反应器为多孔板的孔,其中各孔中印有微阵列。
5. 根据权利要求1-4任一项所述的方法,其中所述测试样品为生物样品。
6. 一种检测和定量用于诊断类风湿关节炎的生物标记物的方法,其包括:
 - a) 提供印有微阵列的检测装置,所述微阵列包括:
 - i) 含有多个点的校准基质,每个点含有预定量的下列物质之一:人 IgA 抗体、人 IgG 抗体和人 IgM 抗体;
 - ii) 含有多个点的第一分析物捕获基质,所述点含有预定量的类风湿因子;以及
 - iii) 含有多个点的第二分析物捕获基质,所述点含有预定量的环瓜氨酸肽;
 - b) 向检测装置中加入预定体积的血清样品;
 - c) 向该检测装置中加入与 IgA 抗体选择性结合的第一荧光标记抗体、与 IgG 抗体选择性结合的第二荧光标记抗体和与 IgM 抗体选择性结合的第三荧光标记抗体,其中所述第一、第二和第三荧光标记抗体分别含有发射和激发光谱不互相重叠的不同荧光染料;
 - d) 测定检测装置中各点的信号强度值;
 - e) 根据测得的每个校准点的信号强度值相对于人 IgA、IgG 和 IgM 抗体的已知浓度拟合曲线生成校准曲线;以及
 - f) 用该校准曲线确定每个捕获的类风湿因子-IgA、类风湿因子-IgG、类风湿因子-IgM、抗-环瓜氨酸肽 IgG、抗-环瓜氨酸肽 IgA 和 / 或抗-环瓜氨酸肽 IgM 的浓度。
7. 一种诊断患者类风湿关节炎的方法,其包括:
 - a) 采用权利要求6所述的方法,测定生物样品中类风湿因子-IgA、类风湿因子-IgG、类风湿因子-IgM 和至少一种抗-环瓜氨酸肽 IgG、抗-环瓜氨酸肽 IgA 和抗-环瓜氨酸肽

IgM 的浓度水平 ;以及

b) 将测得的类风湿因子 -IgA、类风湿因子 -IgG、类风湿因子 -IgM、抗 - 环瓜氨酸肽 IgG、抗 - 环瓜氨酸肽 IgA 和 / 或抗 - 环瓜氨酸肽 IgM 的浓度水平与类风湿因子 -IgA、类风湿因子 -IgG、类风湿因子 -IgM 以及抗 - 环瓜氨酸肽 IgG、抗 - 环瓜氨酸肽 IgA 和 / 或抗 - 环瓜氨酸肽 IgM 的指标正常水平作比较,其中,测得的浓度水平超出指标正常水平,诊断为类风湿关节炎。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中以类风湿因子 -IgM 和抗 - 环瓜氨酸肽 IgM 抗体为主的检测和定量,用来诊断类风湿关节炎的早期阶段。

9. 根据权利要求 7 所述的方法,其中类风湿因子 -IgA 和抗 - 环瓜氨酸肽 IgA 抗体的检测和定量,用来诊断类风湿关节炎的过渡阶段。

10. 根据权利要求 7 所述的方法,其中类风湿因子 -IgG 和抗 - 环瓜氨酸肽 IgG 抗体的检测和定量,用来诊断类风湿关节炎的晚期阶段。

11. 一种用于监测类风湿关节炎患者治疗的方法,包括采用权利要求 6 所述的方法,在治疗期间多次测定类风湿因子 -IgA、类风湿因子 -IgG、类风湿因子 -IgM 和至少一种抗 - 环瓜氨酸肽 IgG、抗 - 环瓜氨酸肽 IgA 和抗 - 环瓜氨酸肽 IgM 的浓度水平。

用于多重分析物检测和定量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于定量分析物的方法,特别是本发明涉及用于检测和定量单一样品中多重分析物的改进的微阵列方法。

背景技术

[0002] 目前的免疫检测方法,由于它们在单反应孔中的每次检测循环仅能检测一种目标物,因此受到局限。与任何病理或生理疾病的检测和诊断有关的几种抗原物质或生物标记物是常见的。为证实多个标记物的存在,测试样品中的每个标记物需要单独的和不同的免疫检测,以证实每个待测靶分子的存在。这种测试和样品的多种需要增加时间延迟治疗,增加了成本和分析误差的可能性。目前的现有技术,多重蛋白/抗体特别是在自身免疫疾病中表达的生物标记物的定量领域,依赖于测定多重抗原。

[0003] 酶联免疫吸附试验(ELISA)是由 Engvall 等人研发的,Immunochem.,8:871(1971),并进一步由 Ljunggren 等人,J. Immunol. Meth.,88:104(1987)和 Kemeny 等人,Immunol. Today 7:67(1986)改善。ELISA 及其应用是本领域众所周知的。

[0004] 单一 ELISA 的功能是用酶标记的抗体和显色底物检测单一分析物或抗体。为检测样品中一种以上的分析物,需要进行单独的 ELISA 以独立地检测每一种分析物。例如,为检测两种分析物,需要两个单独的 ELISA 板或两套孔,即每种分析物用一个板或一套孔。现有技术中基于 ELISA 的显色反应一次仅检测一种分析物。这在检测具有一种以上标记物的疾病或表达一种以上转基因产物的转基因有机体时是一个主要的限制。

[0005] Macri, J. N. 等人,Ann Clin Biochem 29:390-396(1992)中描述了一种间接检测,其中抗体(试剂-1)首先与分析物反应,然后第二标记抗-抗体(试剂-2)与试剂 1 的抗体反应。结果是需要两个单独的洗涤步骤,违背了直接检测的目的。

[0006] US2007141656, Mapes 等人,通过比较包被有自身抗原特异性单克隆抗体的磁珠和包被有自身抗原的磁珠,来测定自身抗原和自身抗体的比例。该方法允许至少一种分析物与相应的反应物反应,即一种分析物是自身抗原,所述反应物是自身抗原的自身抗体。

[0007] 用于检测多种分析物的另一方法公开于 US2005118574, Chandler 等人,其是利用流式细胞仪测量进行分类,实时、同步和自动检测并分析多种生物分子或 DNA 序列,同时也降低了成本。

[0008] WO 0113120, Chandler 和 Chandler 测定了单一样品中几种不同分析物的浓度。仅当使用流式细胞仪分析每个样品/分析物组合具有独特的微粒亚群时,这是必要的。这些以磁珠为基础的系统的能力仅限于同时检测到的捕获抗原之间的鉴别。

[0009] 一种以上分析物的同时检测,即同时测定蛋白的多重检测已被 Haab 等人描述,“Protein micro-arrays for highly parallel detection and quantization of specific proteins and antibodies in complex solutions,”Genome Biology 2(2):0004.1-0004.13,(2001),其以参阅的方式并入于此。制备不同的抗体和抗原混合物并用红色荧光染料标记,然后与含有相同抗体和抗原的绿色荧光参照混合物混合。观察到的红色

与绿色之间比率的差异用来反映在混合物中相应的结合部分的浓度差异。

[0010] Mezzasoma 等人 (Clinical Chemistry 48,1,121-130 (2002)) 发表了微阵列形式 (microarray format) 方法以检测在两个单独的测试中与相同捕获物结合的分析物,特别是与相同抗原反应的不同的自身抗体。该结果揭示了当捕获的分析物与一种报告分子 (例如检测免疫球蛋白 IgG) 孵育时,检测相应的分析物。在测试中,当捕获的分析物与第二报告分子使用独立的微阵列固态基板 (例如检测 IgM) 孵育时,检测第二分析物 (IgM)。

[0011] W00250537, Damaj 和 Al-assaad 公开了一种检测与以混合物形式首先包被于固体基板 (substrate) 上的必需抗体结合的多达三种固定化伴随靶抗原的方法。检测第一标记物之前,进行洗涤步骤。通过加入第一特异性底物,可检测到第一标记物的存在。读取反应孔并用光镜检测颜色变化。检测第二标记物之前,进行另一次洗涤步骤。通过向反应孔中加入对第二种酶特异的第二底物,可检测到第二标记物的存在。充分孵育后,可检测反应孔的颜色变化。同样,检测第三标记物之前,可进行洗涤步骤。

[0012] 通过向反应孔中加入对第三种酶特异的第三底物,可检测到第三标记物的存在。充分孵育后,可检测反应孔的颜色变化。虽然可在一个反应或测试孔中检测到多个分析物,但每个反应是分别进行的。

[0013] W02005017485, Geister 等人描述了在单一测试中连续测定至少两种不同抗原的方法,其通过至少两种酶标记的共轭物与两种不同的用于测定所述酶 (ELISA) 的显色底物发生两个不同的酶反应,其包括 (a) 提供固定于固体支持物上的对第一分析物特异的第一抗体和对第二分析物特异的第二抗体;(b) 使固定于固体支持物上的抗体与可能含有一种或两种抗原的液体样品接触足够的时间,以使抗体和抗原结合;(c) 从液体样品中去掉固体支持物并洗涤该固体支持物,以去除未结合的物质;(d) 使固体支持物与含有对第一抗原特异的第三抗体和对第二抗原特异的第四抗体的溶液接触足够的时间,以使第三和第四抗体与带有第一和第二抗体的分析物结合,其中,第三抗体与第一酶标物共轭结合,第四抗体与第二酶标物共轭结合;(e) 从溶液中去掉固体支持物并洗涤该固体支持物,以去除未结合的抗体;(f) 加入用于第一酶标物的第一显色底物,其中通过第一酶标物使第一显色底物转化为可检测的颜色,表示该样品中含有第一分析物;(g) 去除第一显色底物;以及 (h) 加入用于第二酶标物的第二显色底物,其中通过第二酶标物使第二显色底物转化为可检测的颜色,表示该样品中含有第二分析物。

[0014] 美国专利 7,022,479,2006, Wagner, 名称为“Sensitive, multiplexed diagnostic assays for protein analysis”公开了一种检测样品中多个不同化合物的方法,该方法包括:(a) 使样品与结合试剂的混合物接触,结合试剂为核酸蛋白融合物,各含有 (i) 蛋白部分,已知其可与一种化合物特异性结合;以及 (ii) 核酸部分,其含有独特的鉴别标签,且在一个实施方案中,其编码所述蛋白;(b) 使所述结合试剂的蛋白部分和该化合物形成复合物;(c) 捕获该结合试剂-化合物的复合物;(d) 扩增结合有试剂的所述复合物的核酸部分独特的鉴别标签;以及 (e) 检测各扩增核酸的独特的鉴别标签,从而检测样品中相应的化合物。

[0015] 尽管已知多种用于检测和定量分析物的方法,但这些方法需要针对每个目标分析物采用单独的检测步骤,这样可能会非常耗时和昂贵,特别是在临床上。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明提供了一种使用单一反应器,检测和定量测试样品中多目标分析物的快速和成本效率高的方法。本文公开的方法允许多目标分析物的同时检测,而无需进行每个目标分析物的单独检测或反应步骤。

[0018] 一方面,本发明提供用于检测和定量测试样品中两个或更多目标分析物的方法,包括:

[0019] a) 提供印有微阵列的反应器,所述微阵列包括:

[0020] i) 包括多个第一校准点的第一校准基质,每个校准点含有预定量的第一目标分析物,

[0021] ii) 包括多个第二校准点的第二校准基质,每个校准点含有预定量的第二目标分析物,

[0022] iii) 包括多个第一捕捉点的第一捕获基质,每个捕捉点含有与第一目标分析物选择性结合的预定量试剂,及

[0023] iv) 包括多个第二捕捉点的第二捕获基质,每个捕捉点含有与第二目标分析物选择性结合的预定量试剂;

[0024] b) 向微阵列中加入预定体积的测试样品;

[0025] c) 将与第一目标分析物选择性结合的第一荧光标记抗体和与第二目标分析物选择性结合的第二荧光标记抗体加入到检测装置,其中所述第一和第二荧光标记抗体分别含有发射和激发光谱不互相重叠的不同荧光染料;

[0026] d) 测定微阵列中各点的信号强度值;

[0027] e) 根据每个校准点测得的信号强度值相对于已知浓度的第一目标分析物和第二目标分析物拟合曲线生成校准曲线;以及

[0028] f) 用生成的校准曲线确定第一目标分析物和第二目标分析物的浓度。

[0029] 在本发明的一个实施方案中,所述目标分析物为蛋白。所述蛋白可以为抗体。

[0030] 在本发明另一个实施方案中,所述反应器为多孔板,其中各孔印有微阵列。

[0031] 在本发明进一步的实施方案中,所述测试样品为生物样品。

[0032] 在另一方面,本发明提供一种用于诊断类风湿关节炎的生物标记物的检测和定量方法,包括:

[0033] a) 提供印有微阵列的检测装置,所述微阵列包括:

[0034] i) 含有多个点的校准基质,每个点含有预定量的下列物质之一:人 IgA 抗体、人 IgG 抗体和人 IgM 抗体;

[0035] ii) 含有多个点的第一分析物捕获基质,所述点含有预定量的类风湿因子;以及

[0036] iii) 含有多个点的第二分析物捕获基质,所述点含有预定量的环瓜氨酸肽;

[0037] b) 向检测装置中加入预定体积的血清样品;

[0038] c) 向该检测装置中加入与 IgA 抗体选择性结合的第一荧光标记抗体、与 IgG 抗体选择性结合的第二荧光标记抗体和与 IgM 抗体选择性结合的第三荧光标记抗体,其中所述第一、第二和第三荧光标记抗体分别含有发射和激发光谱不互相重叠的不同荧光染料;

[0039] d) 测定检测装置中各点的信号强度值;

[0040] e) 根据测得的每个校准点的信号强度值相对于人 IgA、IgG 和 IgM 抗体的已知浓度拟合曲线生成校准曲线;以及

[0041] f) 用该校准曲线确定每个捕获的类风湿因子 -IgA、类风湿因子 -IgG、类风湿因子 -IgM、抗 - 环瓜氨酸肽 IgG、抗 - 环瓜氨酸肽 IgA 和 / 或抗 - 环瓜氨酸肽 IgM 的浓度。

[0042] 另一方面, 本发明提供一种诊断患者类风湿关节炎的方法, 包括:

[0043] a) 采用本文公开的方法, 测定生物样品中类风湿因子 -IgA、类风湿因子 -IgG、类风湿因子 -IgM 和至少一种抗 - 环瓜氨酸肽 IgG、抗 - 环瓜氨酸肽 IgA 和抗 - 环瓜氨酸肽 IgM 的浓度水平; 以及

[0044] b) 将测得的类风湿因子 -IgA、类风湿因子 -IgG、类风湿因子 -IgM、抗 - 环瓜氨酸肽 IgG、抗 - 环瓜氨酸肽 IgA 和 / 或抗 - 环瓜氨酸肽 IgM 的浓度水平与类风湿因子 -IgA、类风湿因子 -IgG、类风湿因子 -IgM 以及抗 - 环瓜氨酸肽 IgG、抗 - 环瓜氨酸肽 IgA 和 / 或抗 - 环瓜氨酸肽 IgM 指标正常水平作比较, 其中, 测得的浓度水平超出指标正常水平, 诊断为类风湿关节炎。

[0045] 在本发明的一个实施方案中, 以类风湿因子 -IgM 和抗 - 环瓜氨酸肽 IgM 抗体为主的检测和定量, 用来诊断类风湿关节炎的早期阶段。

[0046] 在本发明进一步的实施方案中, 类风湿因子 -IgA 和抗 - 环瓜氨酸肽 IgA 抗体的检测和定量, 用来诊断类风湿关节炎的过渡阶段。

[0047] 在本发明进一步的实施方案中, 类风湿因子 -IgG 和抗 - 环瓜氨酸肽 IgG 抗体的检测和定量, 用来诊断类风湿关节炎的晚期阶段。

[0048] 在另一方面, 本发明提供一种用于监测类风湿关节炎患者治疗的方法, 包括采用本文公开的方法, 在治疗期间多次测定类风湿因子 -IgA、类风湿因子 -IgG、类风湿因子 -IgM 和至少一种抗 - 环瓜氨酸肽 IgG、抗 - 环瓜氨酸肽 IgA 和抗 - 环瓜氨酸肽 IgM 的浓度水平。

附图说明

[0049] 本发明优选的实施方案将通过举例的方式参考附图进行描述, 其中:

[0050] 图 1 为本发明多重分析物检测的示意图;

[0051] 图 2 为两个样品, NS 和 RF#3 中捕获的 IgA 测得的荧光强度平均值相对内部校准物 IgM 的荧光强度平均值的比的柱状图;

[0052] 图 3 为两个样品, NS 和 RF#3 中捕获的 IgM 测得的荧光强度平均值相对内部校准物 IgM 的荧光强度平均值的比率的柱状图; 以及

[0053] 图 4 为采用本发明方法比较 IgA、IgG 和 IgM 的复合荧光强度的图。

具体实施方式

[0054] 本发明提供一种在单一反应孔中每个测试循环用于检测和定量测试样品中多个目标分析物的方法。本文公开的方法提供将检测装置与同一检测混合物中两个或多个荧光标记报告物 (reporter) 同时孵育, 如图 1 所示。本文公开的方法使用单一反应器可检测一个以上的分析物, 而不是用单独的反应器检测各分析物。例如, 当目标分析物为直接针对相同抗原 (即, h1gG 的 Fc 区) 的不同种类的人类抗体 (即, h1gG、h1gA 和 h1gM) 时, 使用常规方法检测和定量各目标抗体需要单独的检测。采用常规方法, 进行一个检测以检测和定量测试样品中 h1gG 的量。必须进行第二个测试以检测和定量 h1gM 的量以及进行第三个测

试以检测和定量 hlgG 的量。相比之下,本发明的方法减少了所需的多个检测步骤,因此降低了成本,节约时间。采用本发明的方法,检测样品中含有的靶 hlgG、hlgA 和 hlgM 分子可与检测装置中的一个捕捉点结合。在本发明公开的方法中,不同类型的抗体可以在单一检测中通过直接荧光标记的各 hlgG、hlgA 和 hlgM 靶分子抗体混合物 (cocktail) 检测到。由于抗体是用不同的光激发和发射荧光探针标记的,用适合的校准器 (calibrator) 可检测和定量结合于单一捕捉点的各靶分子。使用多通道检测器使单一检测中多个分析物实现基本同时检测。

[0055] 本文公开的方法中所使用的检测装置有助于进行免疫检测。该检测装置可以是 2 维或 3 维平面阵列形式的微阵列。

[0056] 在一个实施方案中,该方法可使用多孔板,其中每孔中印有微阵列。每个孔作为反应器,用于各测试样品中多种目标分析物的检测。

[0057] 所述微阵列可含有用于各目标分析物的校准基质和分析物捕获基质。

[0058] 本文使用的术语“校准基质”是指点的子阵列,其中各点含有预定量的校准标准物。本文使用的术语“预定量”是指基于已知的含有所述校准标准物的点缓冲液浓度和已知的印于反应器上的点缓冲液 (spotting buffer) 体积而计算得到的标准物的量。

[0059] 校准标准物的选择取决于目标分析物的性质。所述校准标准物可以是目标分析物本身的校准标准物。在该实施方案中,微阵列含有用于各目标分析物的单独的校准标准物。或者,微阵列可包括含有各目标分析物校准点的单一校准基质。

[0060] 在可替代的实施方案中,所述校准标准物为替代化合物。例如,如果目标分析物为一种抗体,所述替代化合物可以是另一种不同的但属于同一种类免疫球蛋白的抗体。例如,图 1 阐述了一种用于捕获六种不同抗体的检测装置,这些抗体选择性地结合两种不同的抗原。在这些实施方案中,三种不同种类的免疫球蛋白仅需要一种校准基质。

[0061] 所述校准基质可使用落入用于读取微阵列的检测系统动态范围内的预定量校准标准物,以线性、成比例稀释系列的形式印于单独的反应器基板上。

[0062] 本文使用的术语“分析物捕获基质”是指含有与所述目标分析物选择性结合的试剂的点子阵列。在实施方案中,所述目标分析物为蛋白,所述试剂可以是分析物特异性抗体或其片段。相反地,在实施方案中,其中所述目标分析物为抗体,所述试剂可以是被抗体特异性结合的抗原。例如,图 1 阐述了一种用于捕获六种不同抗体的检测装置,这些抗体选择性地结合两种不同的抗原。

[0063] 向反应装置中加入预定体积的测试样品。每个目标分析物将与它们特异的捕捉点结合。因此,在单一捕捉点中,可结合多个目标分析物。为检测各目标分析物,使用特异性地结合目标分析物的荧光标记的抗体。每种抗体与一种独特的具有特异激发和发射波长的荧光染料偶合,以获得理想的斯托克斯位移 (Stokes shift) 以及激发和发射系数。荧光染料的选择是根据各自的激发和发射光谱,这样每个标记抗体含有不同的发射和激发光谱不互相重叠的荧光染料。所述荧光标记抗体可以混合物的形式一步加入到检测装置中。

[0064] 然后测定检测装置中各点的信号强度值。可以使用扫描器元件如光源和滤光器组合读取荧光信号。一个信号检测器可以用来一次读取一个光通道,使每一个点以多个波长成像,每个波长对于目标分析物是特异的。一个光通道是一个激发源和一个激发滤光片的组合,在特定波长与激发匹配。发射滤光片和发射器只传递一个波长的特定荧光染料信号。

选择用于光通道的成套检测器,使它们不互相干扰,即通过一个通道仅激发目标染料,而不是其它任何染料。另外,多通道检测器可用于检测每个差异标记的抗体。差异荧光标记的使用允许与单一捕捉点结合的多个目标分析物实现基本上同时的检测。

[0065] 被测信号的强度直接与印有的校准点中所含物质的量以及来自测试样品中结合于印有分析物捕捉点的分析物的量成正比。对于每一个校准化合物,校准曲线的生成是根据测得的每个校准点的信号强度值相对于已知浓度的校准化合物拟合的曲线。然后使用适当的校准曲线,并通过在校准曲线上绘制测得的目标分析物信号强度来确定测试样品中多个目标分析物的浓度。

[0066] 本文中公开的方法可用于诊断或预后目的,检测和定量生物样品中多个临床相关标记物。测得的疾病相关标记物浓度可与已确定的该生物标记物的指标正常水平相比较。测得的浓度水平超出指标正常水平可诊断为该疾病。本文中公开的方法还可用于监测疾病的进展以及疾病治疗的效果。采用本发明公开的方法,在治疗期间多次定量临床相关标记物的水平。生物标记物水平的下降趋势可能与患者对治疗的积极反应有关。

[0067] 本文中公开的方法可用于诊断类风湿关节炎生物标记物的检测和定量。在一个实施方案中,该方法包括提供印有微阵列的检测装置。所述微阵列包括:i)含有多个点的校准基质,每个点含有下列之一的预定的量:人 IgA 抗体、人 IgG 抗体和人 IgM 抗体;ii)含有多个点的第一分析物捕获基质,所述点含有预定量的类风湿因子;以及 iii)含有多个点的第二分析物捕获基质,所述点含有预定量的环瓜氨酸肽。向检测装置中加入预定体积的生物样品,优选血清样品。然后向该检测装置中加入包括下列的混合物:选与 IgA 抗体择性地结合的第一荧光标记报告化合物、与 IgG 抗体择性地结合的第二荧光标记报告化合物和与 IgM 抗体择性地结合的第三荧光标记报告化合物。选择第一、第二和第三荧光标记抗体,使各抗体含有发射和激发光谱不互相重叠的不同荧光染料。然后用上述的单或多通道检测器测定检测装置中各点的信号强度值。用测得的信号强度值,然后根据测得的每个校准点的信号强度值相对于人 IgA、IgG 和 IgM 抗体的已知浓度拟合曲线生成校准曲线。用该校准曲线确定每个捕获的类风湿因子-IgA、类风湿因子-IgG、类风湿因子-IgM、抗-环瓜氨酸肽 IgG、抗-环瓜氨酸肽 IgA 和 / 或抗-环瓜氨酸肽 IgM 的浓度。

[0068] 在特定的实施方案中,本文中公开的方法可用于诊断或监测自身免疫疾病的发展。例如,就类风湿关节炎而言,以类风湿因子-IgM 和抗-环瓜氨酸肽 IgM 抗体为主的检测和定量,用于诊断类风湿关节炎的早期阶段,而类风湿因子-IgA 和抗-环瓜氨酸肽 IgA 抗体的检测和定量,用于诊断类风湿关节炎发展的过渡阶段,以及类风湿因子-IgG 和抗-环瓜氨酸肽 IgG 抗体的检测和定量,用于诊断疾病发展的晚期阶段。在其它实施方案中,本文中公开的方法可用于监测患有类风湿关节炎的患者治疗进展。例如,在治疗期间多次测定类风湿因子-IgA、类风湿因子-IgG、类风湿因子-IgM 和至少一种抗-环瓜氨酸肽 IgG、抗-环瓜氨酸肽 IgA 和抗-环瓜氨酸肽 IgM 的浓度水平。

[0069] 实施例 1- 血清样品中三种不同目标抗体的检测和定量

[0070] 人 IgM、IgG、IgA 的各四种浓度印于同一个 16-孔样品板上,预处理形成环氧硅烷底物表面。将印有蛋白的玻片和鱼明胶孵育过夜,封闭板中未反应的环氧硅烷结合位点。

[0071] 为进行检测,将血清样品在含有鱼明胶的缓冲液中稀释 1 : 9 ~ 1 : 200 倍。各样品制备四种稀释液,1 : 9、1 : 30、1 : 100、1 : 300,双份。将两份稀释样品(命名为 NS

和 RF#3, 见图 2 和 3) 孵育 45min。在 Tris 缓冲盐溶液中洗涤玻片 5 次。向玻片的所有孔中加入浓度各约为 $1 \mu\text{g/ml}$ 的结合有 FITC 的山羊抗人抗体、两种结合有 DY652 (Dyomics, 德国) 的鼠抗人 IgA 抗体以及结合有 Cy3 染料鼠抗人 IgG 抗体的混合物。

[0072] 将所述试剂孵育 45min, 接着洗涤 5 次。最后玻片旋转蒸干, 并在荧光成像扫描仪中读取三种激发和发射波长组合的荧光发射强度。分析成像结果, 推知各分析物浓度。

[0073] IgA RF 的检测如图 2 所示, 其表示用捕获的 IgA 信号的平均荧光信号除以 IgM 校准的平均校准信号, 所得比值对样品 / 稀释作图。左侧 8 个柱表示玻片左侧的 8 个孔, 右侧 8 个柱表示 16 孔玻片右侧的 8 个孔。

[0074] IgM RF 的检测如图 3 所示, 其表示用捕获的 IgM 信号的平均荧光信号除以 IgM 校准的平均校准信号, 所得比值对样品 / 稀释作图。左侧的 8 个柱表示玻片左侧的 8 个孔, 右侧的 8 个柱表示 16 孔玻片右侧的 8 个孔。

[0075] 如图 2 和 3 所示, 与校准信号相比, IgA (图 2) 和 IgM (图 3) 信号的比值随着测试样品按 $1 : 9 \sim 1 : 200$ 稀释按比例下降。这些结果证实了, 可在单一检测中, 无需多个检测步骤, 使用差异荧光标记抗体检测和定量 IgA 和 IgM。此外, 玻片上左侧和右侧柱证明了相应重复检测之间的结果一致。

[0076] 图 4 分别表示了各 IgA、IgM 和 IgG 捕捉点的组合信号强度。这些结果进一步证明了在捕获水平和检测水平上的多重检测有效。

[0077] 因此, 本发明各种实施方案通过实例的方式进行了详细描述, 对本领域技术人员而言, 很显然可进行不脱离本发明范围的各种改变和变化。本发明包括所有落入所附权利要求范围内的变化和进步。

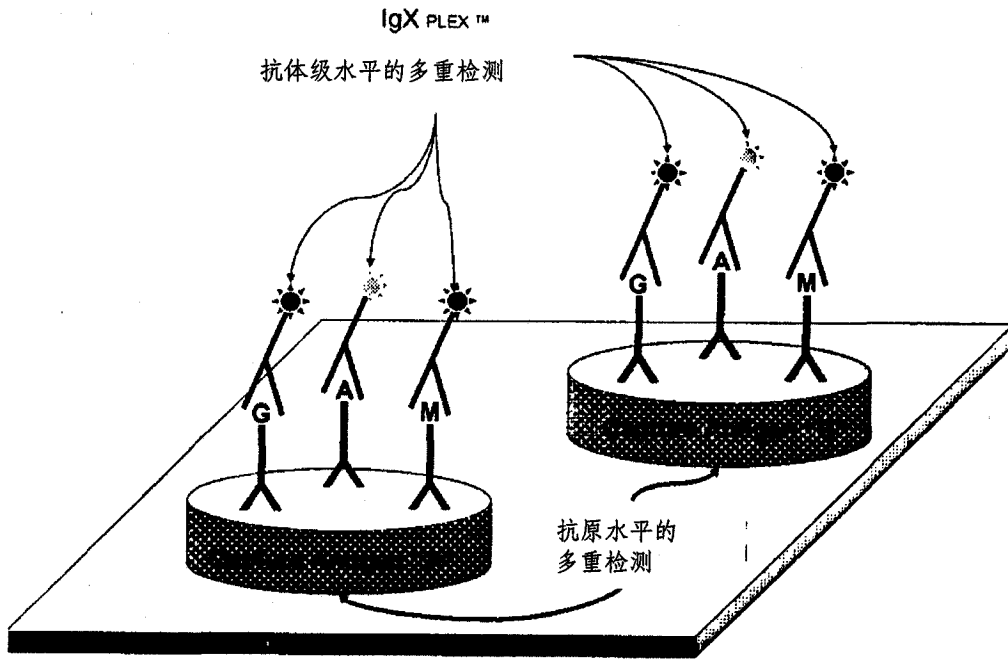


图 1

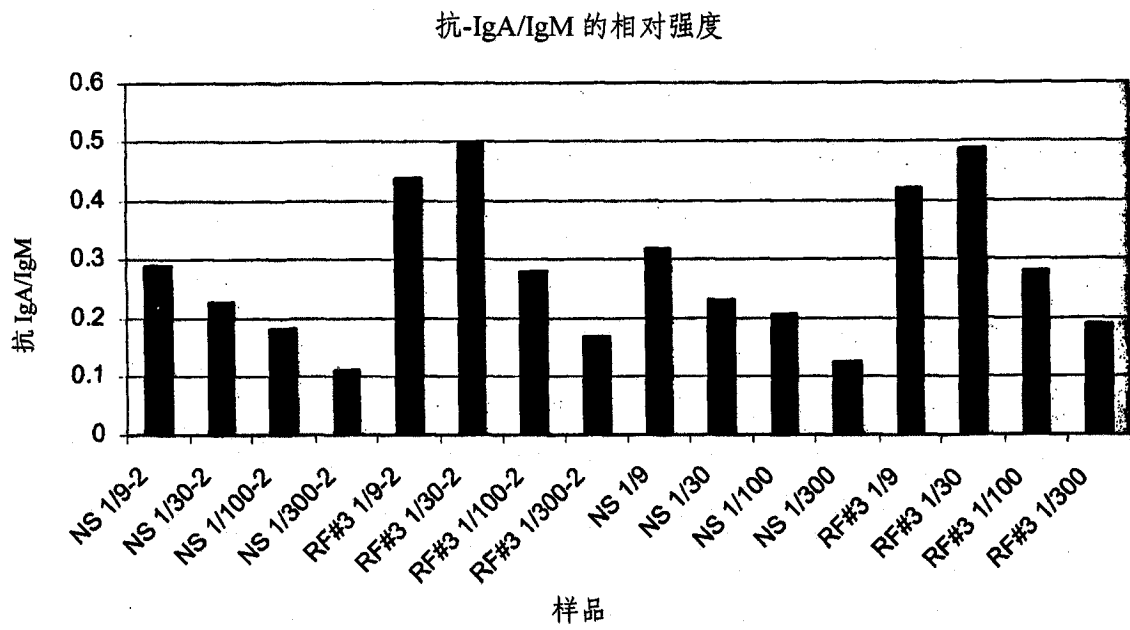


图 2

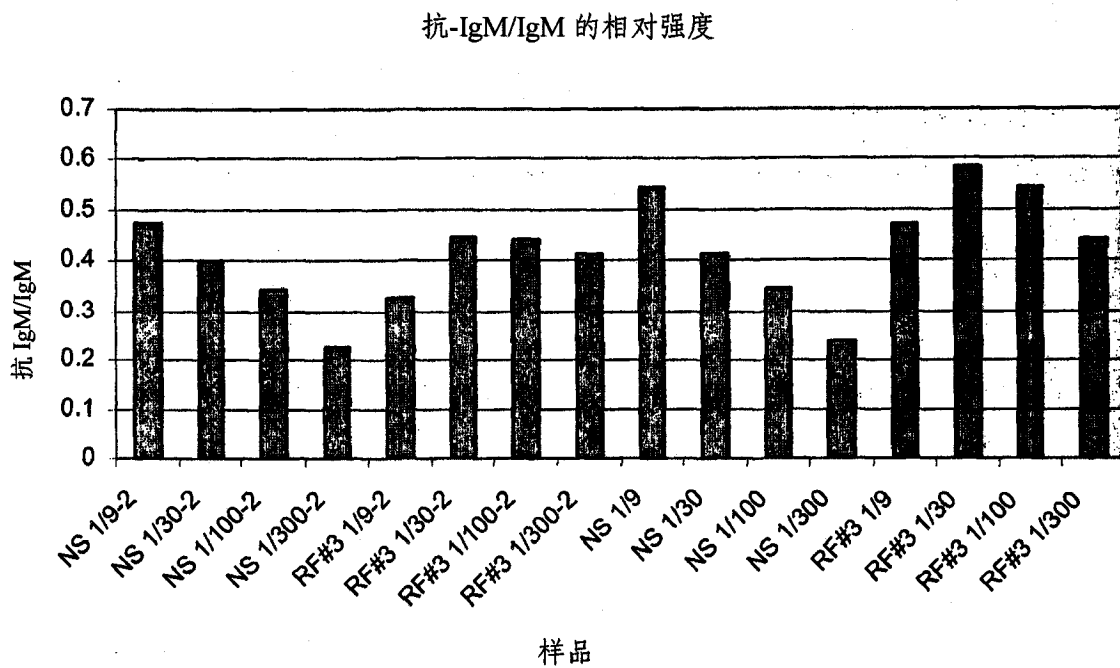


图 3

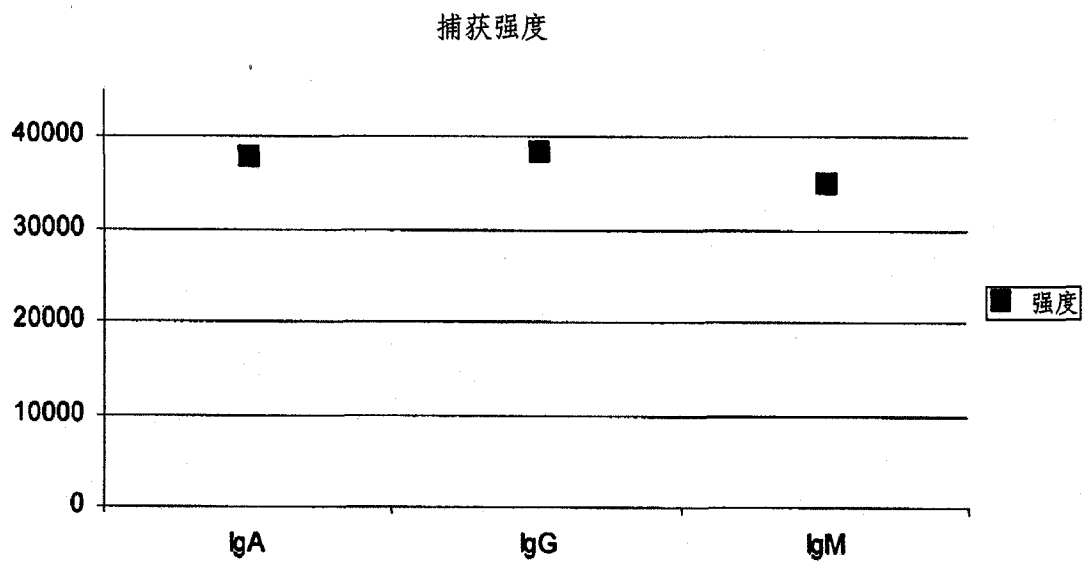


图 4

专利名称(译)	用于多重分析物检测和定量的方法		
公开(公告)号	CN102388306A	公开(公告)日	2012-03-21
申请号	CN200980153331.6	申请日	2009-12-29
[标]发明人	彼得李		
发明人	彼得·李		
IPC分类号	G01N33/53 C40B30/04 G01N33/543 G01N33/564 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/543 B01L3/5085		
代理人(译)	张晶		
优先权	2647953 2008-12-29 CA		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请涉及一种采用单一反应器，对测试样品中的多重目标分析物进行检测和定量的方法。该方法采用反应器(多孔板)，其包括微阵列：(a)校准点，各点具有预定量的目标分析物；以及(b)捕捉点，各点具有有选择性结合目标分析物的试剂(抗体)。捕获的分析物和校准点用针对每个不同目标分析物的特异性荧光标记抗体检测。校准点用于生成使得能对不同目标分析物浓度进行测定的校准曲线。本申请还涉及一种对用于诊断类风湿关节炎的生物标记物进行检测和定量的方法。更具体地，本申请公开了类风湿因子(RF)和环瓜氨酸肽(CCP)作为捕捉点的应用。最后，基于上述方法，本发明提出了一种诊断或监测类风湿关节炎的方法。

