



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107810414 A

(43)申请公布日 2018.03.16

(21)申请号 201680029746.2

(22)申请日 2016.05.20

(30)优先权数据

1508832.1 2015.05.22 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/061435 2016.05.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/188902 EN 2016.12.01

(71)申请人 诺华有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 史蒂文·安德鲁·罗斯

朱莉·理查兹

马克·托马斯·加顿·斯韦恩

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 胡秋玲 郑霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/542(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

用于使用电磁辐射来检测分析物的方法

(57)摘要

本发明提供了用于使用电磁辐射检测样品中的分析物的方法,包括:(i)提供标记试剂,标记试剂具有能够将分析物或分析物的类似物与标记物结合的结合部位,其中标记物能够吸收电磁辐射以通过非辐射衰变生成能量;(ii)提供装置,具有:适于生成一系列电磁辐射脉冲的辐射源;具有热电或压电元件和电极的换能器,其能够将由非辐射衰变生成的能量转换为电信号;能够检测电信号的检测器;用于控制电磁辐射源和检测器的控制器,其中装置具有第一和第二室,第一室包含靠近换能器的第一试剂,其中第一试剂能够结合到分析物,使得标记试剂经由分析物与第一试剂的结合与分析物的浓度成正比,以及第二室包含靠近换能器的第二试剂,其中第二试剂模拟分析物使得标记试剂与第二试剂的结合与分析物的浓度成反比;(iii)将样品暴露于换能器;(iv)用电磁辐射照射样品并检测电信号。

1. 一种用于使用电磁辐射来检测样品中的分析物的方法,包括:

(i) 提供标记试剂,所述标记试剂具有能够将所述分析物或所述分析物的类似物与标记物结合的结合部位,其中所述标记物能够吸收所述电磁辐射以通过非辐射衰变生成能量;

(ii) 提供装置,其具有:

辐射源,其适于生成一系列电磁辐射的脉冲,

换能器,其具有热电或压电元件和电极,所述换能器能够将由非辐射衰变生成的能量转换为电信号,

检测器,其能够检测所述电信号,

控制器,其用于控制所述电磁辐射的源和所述检测器,

其中,所述装置具有第一室和第二室,

所述第一室包含靠近所述换能器的第一试剂,其中所述第一试剂能够结合到所述分析物,使得所述标记试剂经由所述分析物与所述第一试剂的结合与所述分析物的浓度成正比,以及

所述第二室包含靠近所述换能器的第二试剂,其中所述第二试剂模拟所述分析物,使得所述标记试剂与所述第二试剂的结合与所述分析物的浓度成反比;

(iii) 将所述样品暴露于所述换能器;

(iv) 用电磁辐射照射所述样品并检测所述电信号。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述装置还包括第三室,所述第三室包括靠近所述换能器的第三试剂,所述第三试剂在所述分析的条件下对所述分析物或所述标记试剂具有比所述第一试剂对所述分析物更低的亲和性。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述第一试剂和第二试剂与所述分析物或所述标记试剂的结合取决于分析物浓度,并且所述第三试剂与所述分析物或所述标记试剂的结合独立于分析物浓度。

4. 根据任一前述权利要求所述的方法,其中,所述第三试剂在所述分析的条件下对所述分析物或所述标记试剂基本上没有亲和性。

5. 根据任一前述权利要求所述的方法,其中,所述第一试剂、第二试剂和第三试剂经由非共价结合附着到所述换能器。

6. 根据任一前述权利要求所述的方法,其中,所述第一试剂是抗体,并且所述分析物是抗原。

7. 根据任一前述权利要求所述的方法,其中,所述标记试剂是标记抗体。

8. 根据任一前述权利要求所述的方法,其中,所述标记试剂包括标记物,其中所述标记物选自染料分子、金颗粒、有色聚合物颗粒、荧光分子、酶,红细胞、血红蛋白分子、磁性颗粒和碳颗粒。

9. 根据任一前述权利要求所述的方法,其中,在将所述样品暴露于所述换能器以及照射所述样品的步骤之间不从所述换能器移除所述样品的情况下,执行所述方法。

10. 一种包括在任一前述权利要求中所述的装置和标记试剂的试剂盒。

用于使用电磁辐射来检测分析物的方法

[0001] 本发明涉及用于检测分析物的方法,且尤其涉及扩展免疫分析的动态范围和/或灵敏度。

[0002] 免疫分析常常用于测量样品中的分析物的浓度。但是,它们可在检测的下限、检测的上限和动态测量范围方面受到限制。

[0003] 在典型的夹心免疫分析中,特定于感兴趣的抗原的抗体连接到聚合物支持物,诸如聚氯乙烯或聚苯乙烯的薄片。将一滴细胞提取物或血清或尿的样品搁在薄片上,该薄片在抗体-抗原复合物的形成之后被洗涤。然后添加特定于在抗原上的不同部位的抗体,且再次洗涤薄片。这个第二抗体携带标记物,使得它可以以高灵敏度被检测到。结合到薄片的第二抗体的量与样品中的抗原的量成比例。该分析和对这类分析上的其他变化是众所周知的,参见例如“The Immunoassay Handbook, 2nd Ed.” (David Wild, Ed., Nature Publishing Group, 2001)。

[0004] 在免疫分析中的检测的上限通常受所用试剂的总量的限制。可以固定在支持物上的抗体的量受到支持物的有限表面积的限制。当样品中存在过量的分析物时,系统变得饱和,因为所有的抗体结合部位被分析物阻断(取决于所使用的抗体的亲和常数),并且未结合的分析物被洗掉。因此,系统无法区分高于饱和的分析物的浓度,通常在 $1\mu\text{M}$ 和 100mM 之间的浓度下。在实验室分析仪中,通过稀释样品并重新运行分析来解决这个问题。然而,样品稀释对于即时分析是不切实际的。

[0005] 在均相夹心分析中,第一抗体、分析物和第二抗体都同时被培养,且没有洗涤步骤。当分析物浓度增加时,检测到的信号增加,直到达到饱和为止。在高于饱和的分析物浓度下,分析物单独地结合到第一和第二抗体。因此,结合到薄片的第二抗体的量现在不再与样品中的抗原的量成比例,并且检测到的信号减少,被称为“高剂量钩”的效应。这种效应可以减小分析的动态范围。

[0006] 因此,存在对于提供对分析饱和度和/或高剂量钩的问题的解决方案的需要,以便扩展夹心分析的动态范围和/或灵敏度。

[0007] 因此,本发明提供了用于检测样品中的分析物的方法,其包括:

[0008] (i) 提供标记试剂,该标记试剂具有能够将分析物或分析物的类似物与标记物结合的结合部位,其中标记物能够吸收电磁辐射以通过非辐射衰变生成能量;

[0009] (ii) 提供装置,其具有:

[0010] 适于生成一系列电磁辐射脉冲的辐射源,

[0011] 具有热电或压电元件和电极的换能器,其能够将由非辐射衰变生成的能量转换为电信号,

[0012] 能够检测电信号的检测器,

[0013] 用于控制电磁辐射源和检测器的控制器,

[0014] 其中该装置具有第一和第二室,

[0015] 该第一室包含靠近换能器的第一试剂,其中第一试剂能够结合到分析物,使得标记试剂经由分析物与第一试剂的结合与分析物的浓度成正比,以及

[0016] 该第二室包含靠近换能器的第二试剂,其中第二试剂模拟分析物,使得标记试剂与第二试剂的结合与分析物的浓度成反比;

[0017] (iii) 将样品暴露于换能器;

[0018] (iv) 用电磁辐射照射样品并检测电信号。

[0019] 因此,本发明提供了用于执行夹心分析的方法,其中可通过同时运行竞争性分析并组合结果来扩展分析的动态范围和/或灵敏度。

[0020] 现在将参考附图描述本发明,其中:

[0021] 图1示出与本发明一起使用的W0 2004/090512的化学感测装置的示意表示;

[0022] 图2示出使用本发明的装置的夹心免疫分析;

[0023] 图3示出根据本发明的盒(cartridge);

[0024] 图4示出在不使用对照(control)的情况下的独立点2计数;

[0025] 图5示出独立点3计数;以及

[0026] 图6示出使用阳性对照和阴性对照的剂量-反应曲线。

[0027] 本发明的方法用于检测样品中的分析物。该方法提供了一种装置,该装置具有:适于生成一系列电磁辐射脉冲的辐射源;具有热电或压电元件和电极的换能器,其能够将由非辐射衰变生成的能量转换为电信号;以及能够检测由换能器生成的电信号的检测器。本发明的装置基于在W0 2004/090512中描述的装置。

[0028] 图1示出了根据本发明使用的化学感测装置1,其依赖于在用电磁辐射照射标记物2时在标记物2中的热生成。为了简单起见,在图1中仅示出标记物(本发明的装置的其余部件将在下文中被进一步详细描述)。图1示出了在存在标记物2的情况下的化学感测装置1。装置1包括具有电极涂层4、5的热电或压电换能器3。换能器3优选地是极化聚偏二氟乙烯膜。电极涂层4、5优选地是透明的,且最优选地由铟锡氧化物形成。电极优选地具有约20-30nm的厚度,尽管从1nm的下限到200nm的上限的几乎任何厚度都是可能的,在该下限之下电导率太低,而在该上限之上光透射率太低(它不应该低于80%T)。优选地,换能器是涂覆有铟锡氧化物的聚偏二氟乙烯膜。

[0029] 通过结合事件将标记物2保持为靠近换能器3。本发明的优选特征在于,标记物2在被电磁辐射(通常称为“光”)、优选地是可见光的源6照射时生成热。光源可以是例如LED。光源6用适当波长(例如互补色)的光照射标记物2。尽管不希望被理论约束,但是人们认为标记物2吸收光以生成激发态,然后该激发态经历非辐射衰变,由此生成由图1中的曲线指示的能量。这种能量主要是以热的形式(即,环境中的热运动),但是也可以生成其他形式的能量,例如冲击波。然而,能量由换能器检测并转换成电信号。本发明的装置针对被测量的特定标记物被校准,且因此不需要确定由非辐射衰变生成的能量的精确形式。除非另有说明,术语“热”在本文中用于意指由非辐射衰变生成的能量。光源6被定位成照亮标记物2。优选地,光源6位于换能器3和电极4、5的对面,并且标记物2通过换能器3和电极4、5被照亮。光源可以是换能器内的内部光源,其中光源是导波系统。波导可以是换能器本身,或者波导可以是附接到换能器的附加层。照明的波长取决于所使用的标记物;例如,对于40nm的金标记物,优选的波长是525nm,而对于碳标记物,优选的波长是690nm。

[0030] 由标记物2生成的能量由换能器3检测并转换成电信号。电信号由检测器7检测。光源6和检测器7都在控制器8的控制下。光源6生成一系列光脉冲(本文使用的术语“光”意指

任何形式的电磁辐射,除非提到特定的波长),其被称为“斩波光(chopped light)”。原则上,单个闪光(即,电磁辐射的一个脉冲)将足以从换能器3生成信号。但是,为了获得可再现的信号,使用多个闪光,其实际上需要斩波光。电磁辐射的脉冲被施加的频率可以变化。在下限处,在脉冲之间的时间延迟必须足够用于在每个脉冲和待确定的电信号的生成之间的时间延迟。在上限处,在每个脉冲之间的时间延迟必须不那么大,以致记录数据所花费的时间变得不合理地延长。优选地,脉冲的频率是从1-50Hz,更优选地1-10Hz,且最优选为2Hz。这对应于分别在20-1,000ms、100-1,000ms和500ms的脉冲之间的时间延迟。另外,所谓的“标空(mark-space)”比,即接通信号(on signal)与断开信号(off signal)的比优选地是一,但是可以使用其他比而没有有害的影响。使用具有较长的断开信号的较短接通脉冲有一些好处,以便允许系统在下一个脉冲干扰系统之前接近热平衡。在一个实施方式中,1-50ms、优选地8ms的光脉冲接着是10-500ms、优选地250ms的弛豫时间允许对直接结合到表面的颗粒的更精确测量。产生具有不同的斩波频率的或不同的标空比的斩波光的电磁辐射源是在本领域中已知的。检测器7确定在来自光源6的每个光脉冲与由检测器7检测到的来自换能器3的对应电信号之间的时间延迟。申请人已经发现,这个时间延迟是距离d的函数。信号优选地从2-7ms被测量。

[0031] 可以使用用于确定在每个光脉冲与提供可再现结果的相应电信号之间的时间延迟的任何方法。优选地,时间延迟从每个光脉冲的开始到在与来自结合标记物的热的吸收对应的电信号中的最大值被检测器7检测到的时刻被测量。

[0032] 标记物2可以与换能器表面分离并且信号仍然可以被检测到的发现是令人惊讶的,因为技术人员预期热被分散到周围介质中并且因此不能被换能器3检测到,或者至少没有有意义的信号被换能器接收到。令人惊讶地发现,不仅通过能够向换能器3传送能量的中间介质可检测信号,而且可以区分不同的距离d(这被称为“深度分布”),并且接收到的信号的强度与在离换能器3的表面的特定距离d处的标记物2的浓度成比例。此外,发现介质本身的性质在给定的时间延迟处影响信号的时间延迟和幅度。在本发明中,检测器布置成仅检测与在换能器附近发生的非辐射衰变对应的电信号。

[0033] 通过作为本发明的基础的原理的解释,图2示出使用本发明的装置的典型捕获抗体分析(尽管仅示出第一试剂)。该装置包括换能器3、用于保持容纳其中存在的分析物11的样品10的样品室9和靠近换能器表面的捕获试剂12。换能器在图中具有捕获试剂12,抗体附着到捕获试剂12。捕获试剂12的这种附着可以经由共价键或到表面上的非共价吸附,诸如通过氢键结合。附加层可以分离捕获试剂12和换能器3,诸如聚对二甲苯聚合物层,或者抗体可以附着到惰性颗粒,且然后将惰性颗粒附着到换能器3。可选地,捕获试剂12可以被俘获在涂覆到换能器3的表面上的凝胶层内。

[0034] 在使用中,样品室充满含有分析物11的液体10(或任何流体)。分析物11然后结合到第一试剂12。另外的标记试剂13存在于液体中,并且所谓的“夹心”复合物在结合的第一试剂12、分析物11和标记试剂13之间形成。过量的标记试剂13被包括,使得所有的结合的抗原11形成夹心复合物。因此,样品含有结合的标记试剂13a和在溶液中游离的未结合的标记试剂13b。

[0035] 在形成夹心复合物期间或之后,使用一系列电磁辐射的脉冲(诸如光)来照射样品。在每个脉冲与换能器3对电信号的生成之间的时间延迟由检测器检测。选择适当的时间

延迟来主要测量由结合的标记试剂13a生成的热。由于时间延迟是标记物离换能器3的距离的函数,因此结合的标记试剂13a可以与未结合的标记试剂13b区分开。这提供了优于常规夹心免疫分析法的显著优点,因为它消除了对洗涤步骤的需要。在常规夹心免疫分析中,在进行任何测量之前必须将未结合的标记试剂与结合的标记试剂分离,因为未结合的标记试剂干扰由结合的标记试剂生成的信号。然而,由于本发明提供的“深度分布”,可以区分结合和未结合的标记试剂。事实上,区分开在换能器附近的标记物(即,结合的)和在本体溶液中的标记物(即未结合的)的能力是本发明的特定优点。

[0036] 本发明的方法还包括将样品暴露于如本文所述的装置,将生成的能量转换成电信号并检测信号。优选地,在将样品暴露于换能器的步骤和将生成的能量转换成电信号的步骤之间执行该方法而不从换能器移除样品,即该方法是均相分析。

[0037] 本发明提供了补偿测量系统的部件(包括热电传感器材料、LED光源和放大器电路)中的自然变化、被测量的样品中的变化以及在测量期间环境条件的变化的对照。这可以通过将样品暴露于换能器的表面上的试剂来实现。不同的试剂通常位于换能器表面的不同区域处,这些区域被以不同的试剂涂覆。这些对照在以下的意义下被定义为“阴性”和“阳性”对照:在不存在分析物的情况下阴性对照应接近预期的信号以及当分析物使系统饱和时阳性对照应接近预期的信号。在优选实施方式中,本发明的装置基于在WO 2012/137009中描述的装置和其中描述的对照。WO 2012/137009描述了这样的对照的使用如何提高使用在WO 2004/090512中描述的装置进行的分析的准确度和精度。

[0038] 为了利用这些对照来实现检测,本发明的装置包括第一、第二和第三室,其分别包含靠近换能器的第一、第二和第三试剂。

[0039] 第一试剂具有能够与分析物结合的结合部位。然后标记试剂与分析物结合,使得标记试剂经由分析物与第一试剂的结合与分析物的浓度成正比。以这种方式,分析物具有两个不同的表位。因此,第一室包括夹心免疫分析。

[0040] 确定标记试剂与第一试剂的结合的程度提供了样品中的分析物的浓度的测量结果。

[0041] 第二试剂模拟分析物并且是分析物的类似物(它是类似物,因为它通过共价键或非共价相互作用与换能器表面结合)。标记试剂直接结合到第二试剂。第二试剂将与样品中的任何游离分析物竞争以用于标记试剂的结合,使得标记试剂与第二试剂的结合与样品中的分析物的浓度成反比。当样品中不存在分析物时,标记试剂仅与第二试剂结合,并且高信号被检测到。随着样品中存在的分析物的浓度的增加,标记试剂与第二试剂的结合成比例降低,并检测到信号中的下降。因此,第二室包括竞争性免疫分析。因此,本发明是组合分析,因为夹心和竞争性免疫分析用于检测样品中的分析物。

[0042] 作为分析物浓度的函数的竞争性分析的灵敏度取决于许多因素,包括标记试剂的群体和第二试剂的表面浓度。通过调整这些因素,可能“调节”竞争性分析的灵敏度。

[0043] 在一个实施方式中,调节竞争性分析,使得它比夹心分析对分析物浓度更不敏感。以这种方式,当样品中存在的分析物浓度增加时,来自第一样品室的信号急剧上升,而来自第二室的信号缓慢下降。通过在数学上组合这两个输出,可能保持夹心分析的检测极限,同时通过使用同时发生的较不敏感的竞争性分析来扩展分析的动态范围。

[0044] 在第二个实施方式中,夹心分析和竞争性分析具有相似的灵敏度,且因此它们在

相似的浓度下饱和。在这种情况下,分析的动态范围没有增加,但是通过组合在相反模式下起作用的两种分析来提高检测极限。

[0045] 优选地,装置还包括第三室,第三室包括靠近换能器的第三试剂,第三试剂在分析条件下对分析物或标记试剂比第一试剂对分析物具有更低的亲和性。因此,第三试剂提供阴性对照。在分析条件下考虑亲和性是重要的。原因在于第一试剂对标记试剂的亲和性由分析物的存在介导。因此,在没有分析物的情况下,第一试剂和第三试剂都不具有对标记试剂的亲和性。但是,在分析物存在的情况下,第三试剂比第一试剂具有对标记试剂的更低的亲和性。

[0046] 第三试剂是模拟其中第一和第二试剂被固定的表面的惰性表面。在一个实施方式中,第三试剂是多糖,例如葡聚糖。在可选的实施方式中,第三试剂是同型对照抗体。第三试剂通常具有与第一试剂类似的化学和物理性质,但在分析条件下提供对标记试剂的很小亲和性或不提供亲和性。在特别优选的实施方式中,在分析条件下,第三试剂对标记试剂基本上没有亲和性。优选地,第三试剂对分析物基本上不提供亲和性。也就是说,标记试剂或在可适用的场合的分析物与第三试剂的结合是非特定的。以这种方式,第三试剂可以补偿标记试剂与第一试剂的非特定结合,并且也可以例如通过在重力下沉降来补偿标记试剂相对于换能器的不希望移动,这可能干扰测量过程。

[0047] 来自样品室的电信号在数学上被操纵。电信号的数学操纵与在WO 2012/137009中描述的相同。在优选实施方式中,本发明的方法还包括从第一和第二室的电信号中减去第三室的电信号以获得基线校正的电信号,并将第一室的基线校正的电信号除以第二室的基线校正的电信号。

[0048] 在本发明中,第一和第二试剂可被认为充当对于彼此的“动态”对照,而WO 2012/137009使用“静态”阳性对照。当使用这样的静态阳性对照时,算法输出大约被限制到0.000和1.000之间。

[0049] 在本发明中,在分析物的低浓度下,获得在0.000和1.000之间的比率计信号,其通过询问检测器的输出相对于第二和第三试剂的结合(即,分别为阳性对照和阴性对照)来定义来自与第一试剂的结合的信号(即测量信号)的幅值。

[0050] 在一个实施方式中,在分析物的高浓度下,比率计信号增加到1.000以上,即来自与第一试剂的结合的信号超过来自与第二试剂的结合的信号。这种情况出现是因为来自与第二试剂的结合的信号(阳性对照)缓慢下降,而来自与第一试剂的结合的信号(测量信号)急剧增加。在该实施方式中,由于使用低灵敏度的竞争性分析,来自与第二试剂的结合的信号中的减少是稳定的。比率计信号继续增加至1.000以上,直至来自与第二试剂的结合的信号由于标记试剂与分析物的饱和而接近0.000为止。以这种方式,第一和第二试剂彼此组合地工作,以扩展在第一样品室中的夹心分析的动态范围,并延迟通常在较低分析物浓度下观察到的饱和和/或高剂量钩的开始。第一和第二试剂可以被认为充当彼此的对照。与第三试剂结合,第一和第二试剂可以增加夹心分析的动态范围,而不危害分析的灵敏度。

[0051] 在优选实施方式中,第一和第二试剂与分析物或标记试剂的结合取决于分析物浓度,且第三试剂与分析物或标记试剂的结合独立于分析物浓度。因此第二试剂(阳性对照)是可变的,而第三试剂(阴性对照)是恒定的。本发明消除了对“静态”阳性对照的要求,尽管也可以包括这样的对照而没有损害。

[0052] 第一、第二和第三试剂可以使用本领域已知的技术附着到换能器。优选地,附着是经由非共价结合,例如,原生层(诸如链霉亲和素或聚链霉亲和素)被吸附到换能器上,并且试剂通过结合事件附着到原生层。

[0053] 该分析还需要标记试剂的存在。“标记”试剂指的是附着到标记物的试剂,该标记物能够吸收由辐射源生成的电磁辐射,以通过非辐射衰变生成能量。正是这种非辐射衰变通过换能器转换成电信号。

[0054] 因此,标记物可以由能够以这种方式与电磁辐射相互作用的任何材料构成。优选地,标记物选自但不限于碳颗粒、有色聚合物颗粒(例如着色胶乳)、染料分子、酶、荧光分子、金属(例如金)颗粒、血红蛋白分子、红细胞、磁性颗粒、具有非导电芯材料和至少一个金属壳层的纳米颗粒、由聚吡咯或其衍生物组成的颗粒以及其组合。优选地,标记物是碳颗粒或金颗粒,且最优选是碳颗粒。

[0055] 在磁性颗粒的情况下,电磁辐射是射频辐射。上文提到的所有其他标记物都采用光,其可以包括IR或UV辐射。金颗粒是在市场上可买到的或者可以使用已知方法被制备(参见例如G.Frens, *Nature*, 241, 20-22 (1973))。对于纳米颗粒标记物的更详细的解释,参见US 6,344,272和WO 2007/141581。

[0056] 优选地,本发明使用具有20到1000nm、更优选为100到500nm的颗粒尺寸的颗粒。颗粒尺寸指的是颗粒在其最宽点处的直径。颗粒的密度将取决于分析的类型。在分析被扩散控制的情况下,颗粒优选地具有0.5-3.0g/mL、更优选地1.5-2.0g/mL、最优选地1.8g/mL的密度。在该分析类型中,颗粒是具有上述颗粒尺寸和密度的碳颗粒。在重力辅助的分析的情况下,颗粒优选地具有1.5-23g/mL、更优选地15-20g/mL、最优选地19g/mL的密度。在该分析类型中,颗粒是具有上述颗粒尺寸和密度的金颗粒。

[0057] 当结合事件发生时,标记物靠近传感器。也就是说,标记物足够接近换能器的表面以用于换能器能够检测在样品被照射时由标记物生成的能量。然而,在标记物与换能器的表面之间的实际距离将取决于许多变量,诸如标记物的大小和性质、抗体和分析物的大小和性质、样品介质的性质以及电磁辐射的性质和检测器的相应设置。本发明的装置可以包括适合于生成一系列电磁辐射脉冲的辐射源,并且检测器适于确定在来自辐射源的每个电磁辐射脉冲与电信号的生成之间的时间延迟,从而允许精确确定标记物相对于换能器的位置,如参考图1所讨论的。

[0058] 第一、第二和第三试剂以及标记试剂的性质将取决于分析物的性质。在特别优选的实施方式中,标记试剂包括培养为分析物或分析物的复合物或衍生物的抗体,第一试剂是培养为分析物或分析物的复合物或衍生物的抗体,第二试剂是分析物的类似物,以及第三试剂是中性表面。原则上,单个分子可用于每个试剂,但实际上,第一、第二和第三试剂以及标记试剂是分子的群体。术语“抗体”在其范围内优选地包括Fab片段、单链可变片段(scFv)和重组结合片段。

[0059] 作为抗体-抗原反应的可选方案,试剂和分析物可以是第一和第二核酸,其中第一和第二核酸是互补的,或者是含有抗生物素蛋白或其衍生物的试剂和含有生物素或其衍生物的分析物,反之亦然。试剂也可以是适体。系统也不限于生物分析,并且可以应用于例如水中的重金属的检测。系统也不需要限于液体,且可以使用任何流体系统,例如空气中的酶、细胞和病毒等的检测。

[0060] 最大可观察的信号是当监测结合到表面的标记物时可以实现的最大信号。在没有可选的质量传递现象(例如,对流、磁性运动、浮力、沉降等)的情况下,颗粒与换能器的结合被分析物和标记试剂的扩散速率控制,该标记试剂又主要由这些组分的流体动力学半径和样品的粘度/温度控制。阴性对照应该给出独立于待测量的分析物的存在或不存在的信号。

[0061] 已经发现,对于免疫(即,夹心或试剂过量)分析,性能的改善可以通过使用分析物的类似物作为阳性对照(其识别标记试剂上的抗体)和非反应性表面作为阴性对照来实现。当组合地被使用时,这些对照限定系统的测量范围的上限和下限。因此,来自系统的输出被定义为其中测量结果位于这两个界限之间的比。令人惊讶的是,这种组合可以用来组合地应对系统部件(例如,形成换能器的材料)中的变化、环境条件、样品变化和不希望的颗粒移动(例如,沉降)。已经发现由本发明提供的对照同时补偿所有这些参数。

[0062] 可以使用其他方法以通过在不同的浓度或不同的亲和性下合并不同的试剂点与不同的抗体并通过使用不同标记物的混合物来增加分析的动态范围。然而,这大大增加了系统的复杂性,并且需要另外的反应室,并且可能需要样品的分裂,以便将样品的不同部分与不同的试剂和/或标记物混合。

[0063] 怀疑含有感兴趣的分析物的样品通常是流体样品,例如液体样品,且通常是生物样品,诸如体液,例如血液、血浆、唾液、血清或尿液。样品可含有悬浮颗粒,且甚至可能是全血。本发明的方法的优点在于可以在确实含有悬浮颗粒的样品上进行分析,而不会不当地影响分析结果。样品通常将在微升的数量上(例如,1-100 μ L,优选地1-10 μ L)。为了保持流体样品,换能器优选地位于具有一个或更多个侧壁、上表面和下表面的样品室中。因此,本发明的装置优选地还包括用于保持含有分析物或分析物的复合物或衍生物的液体样品的、与换能器接触的室。在优选的实施方式中,换能器与室形成一整体,即它形成限定室的上表面或下表面或者侧壁之一。如图3所示,换能器优选地形成上表面。显然,第一、第二和第三试剂以及标记试剂将在室的内表面上以允许与样品接触。样品可以仅通过表面张力被保留在例如毛细通道内。

[0064] 该装置包含含有第一试剂的第一室、含有第二试剂的第二室和含有第三试剂的第三室。第一、第二和第三试剂靠近换能器。第一、第二和第三室优选地流体连通,允许样品和标记试剂的混合物以连续的方式填充三个室。应该注意的是,在本发明中,在三个室中的每一个中的样品和标记试剂是相同的。该装置优选地还包含毛细通道,该毛细通道具有与装置的外部接触的产品接收端和与样品室(一个或更多个)流体连通的样品输送端,如图3中的芯21所示。

[0065] 标记试剂和可选地一种或更多种另外的试剂优选地储存在合并到本发明的装置中的室中。标记试剂也可作为合并该装置和标记试剂的试剂盒的一部分被供应。因此,本发明还提供了包括如本文所述的装置和标记试剂的试剂盒。标记试剂可以沉积在换能器的表面上。

[0066] 本发明的装置不限于仅检测一种分析物,并且可以通过采用选择性地结合被检测的每种分析物或分析物的衍生物或复合物的不同的第一试剂来检测不同的分析物。可以只使用到换能器的一个电气连接通过顺序地照射换能器的不同位置并顺序地询问输出来执行多个测试。

[0067] 潜在的附加背景干扰源是悬浮颗粒到压电/热电换能器的表面上的沉淀,包括标

记试剂和样品的细胞组分。通过将换能器定位在本体溶液上方,例如在反应室的上表面上,可以减少这种干扰源。因此,如果任何沉淀出现,它将不干扰换能器。可选地,颗粒可能比介质更不密集,且因此漂浮到本体溶液的表面而不是沉淀在换能器的表面上。这个和其它修改被包括在本发明的范围内。

[0068] 在优选实施方式中,本发明的装置基本上由上述特征组成。“基本上”指的是不需要其他特征来执行分析。该装置可以采取单独的读取器和盒或集成装置的形式。在前者中,装置由读取器和盒构成,其中盒可释放地与读取器接合,并且其中读取器合并辐射源和检测器,并且盒合并换能器和第一、第二和第三试剂。读取器优选地是便携式读取器。本发明还提供了包括换能器和如本文所定义的第一、第二和第三试剂的盒。盒优选是一次性盒。

[0069] 现在将参考下面的示例来描述本发明,示例不旨在进行限制。

[0070] 示例

[0071] PVDF薄膜

[0072] 在下面的示例中,使用涂覆在铟锡氧化物中的极化的压电/热电聚偏二氟乙烯(PVDF)双压电晶片膜作为感测装置。通过气相沉积工艺用一层聚对二甲苯(具有约1微米的厚度)涂覆铟锡氧化物表面。这种方法涉及对环芳烷前体的升华和随后的热解,随后是表面上的自由基聚合。参见WO 2009/141637以获得进一步的细节。然后在2小时的过程中通过被动吸附用一层生物素化的牛血清白蛋白(10 μ g/mL,在10mM磷酸盐缓冲液中)涂覆因而产生的聚对二甲苯层。表面被洗涤,且然后在室温下通过培育在聚链霉亲和素溶液(10 μ g/mL,在含有2.7mmol/L KCl、137mmol/L NaCl和0.05%非离子活性剂(Tween)的PBS-10mmol/L磷酸盐缓冲液中)中被涂覆。如Tischer等人所述的(美国专利号5,061,640)制备聚链霉亲和素。

[0073] 材料

[0074] 单克隆抗体基本上如在J.R.Birch和E.S.Lennox的于1995年在Wiley-Blackwell上发表的“Monoclonal Antibodies: Properties, Manufacture and Applications”中所述的培养,并通过本领域中已知的方法被生物素化。碳标记的报道缀合物基本上如Van Doorn等人所述的被制备(美国专利号5,641,689)。

[0075] 盒的制备

[0076] 如上所述,PVDF热电聚合物膜的条带在三个分开的区域中用通用链霉亲和素涂层涂覆。三个区域由附着到传感器的表面上的粘合剂隔离物分开,允许试剂随后培育到每个区域上而没有表面的交叉污染。三个表面(被标记为点1、点2和点3)用三种不同的生物素化试剂涂覆、被洗涤,且然后在蔗糖稳定剂存在时干燥。

[0077] 如图3所示,制造盒14以执行分析。盒14由支撑在加强板16上的抗体涂覆的压电/热膜15制成。被冲切以形成三个样品室18的压敏粘合剂涂覆的聚酯膜17被涂敷到表面上。做好准备以允许与压电/热膜15的顶表面和底表面的电连接以便检测所生成的电荷。然后将上述部件夹在标记物20被涂敷的顶盖19和芯21、密封件22和底盖23之间而形成盒14。

[0078] 分析

[0079] 通过用穿过芯21中的毛细通道的样品装填样品室来执行分析。样品或者在将样品装入盒中之前与标记的碳颗粒预先混合,或者将碳颗粒(和任何附加试剂)在盒的通道中干燥。样品然后通过由仪器中的活塞泵穿过盒的通道被抽吸来与试剂混合。在测量室被填充

之后,它们然后用斩波LED光顺序地被照射(通过顶盖19中的孔)。对于每个LED脉冲,使用放大器和模数(ADC)转换器在压电/热膜15上测量电压。随着时间的推移计算ADC信号的变化。来自每个点的最终输出是作为时间的函数的来自ADC的信号的变化速率。

[0080] 示例1(比较的)和示例2(发明)

[0081] 执行对IgE的两种不同类型的分析。每个分析使用三个测量室,其被标记为点1(阴性对照)、点2(夹心分析)和点3(阳性对照)。在点1和点2中的涂层对于每个分析是相同的。用在1 μ g/ml的浓度下的生物素结合的70kDa氨基葡聚糖(Fleet生物工艺)涂覆点1,以及用在4 μ g/ml的浓度下的生物素化的抗IgE Hytest鼠抗体(克隆4F4)涂覆点2。点3中的涂层对每个分析都是特异的。在示例1(比较的)中,使用固定的阳性对照,用生物素化的羊抗鼠IgG涂覆点3。在示例2(发明)中,生物素化的IgE在10 μ g/ml的浓度下被涂覆到点3上。在匹配的抗IgE抗体Hytest4F4中涂覆的碳颗粒被用作系统中的标记物。为避免混淆,点2(在上面被描述为第一室)的表面相当于第一试剂,点3(在上面被描述为第二室)的表面相当于第二试剂,以及点的表面1(在上面被描述为第三室)相当于第三试剂。

[0082] 在四种不同的IgE浓度(0、156、547、1471IU/mL)下对新鲜血液样品进行重复测量(在每个浓度下六次)。对于每个盒,从点2和点3中的输出中减去来自点1的输出(即,两个测量都是基线校正的)。然后,点2中的基线校正的测量值除以点3中的基线校正的测量值。然后根据在每个浓度下运行的盒计算平均最终分析计数(和标准偏差)。

[0083] 结果在表1中被陈述。

[0084] 表1. 平均最终分析计数和对于两个IgE分析的单独点输出

[0085]

	IgE 浓度 (IU/mL)	平均最 终分析计 数	点 1 (平均)	点 2 (平均)	点 3 (平均)
示例 1 (比较的) 羊抗鼠点 3	0	0.0431	-419.3905	50.5571	10702.0851
	156	0.5224	-233.5235	5941.9443	11590.9966
	547	0.6859	-415.1160	7954.2608	11800.8352
	1471	0.5963	-280.7532	6256.8410	10686.1634
示例 2 (发明) 生物素化的 IgE 点 3	0	0.0438	-115.5008	481.3997	13517.8891
	156	0.8225	-309.9573	8071.0033	9894.9731
	547	1.6244	-283.0646	11221.4316	6799.9965
	1471	3.8582	-210.2222	9487.1137	2302.3897

[0086] 图4示出了示例1(比较的)的单独点2计数在不使用本发明的动态对照的情况下在547和1471IU/mL之间的IgE浓度下引起饱和及轻微钩住(hooking)。

[0087] 图5比较了示例1(比较的)和示例2(发明)的单独点3计数。结果显示对于示例1(比较的)的点3计数保持高,而与分析物浓度无关,以及对于示例2(发明)的点3计数随着分析物浓度的增加而降低。

[0088] 图6示出了对于使用两个对照的数据的剂量-反应曲线。示例1(比较的)示出了窄得多的动态范围(在约200IU/mL饱和),而示例2(发明)示出了宽得多的动态范围,测量高达1500IU/mL。

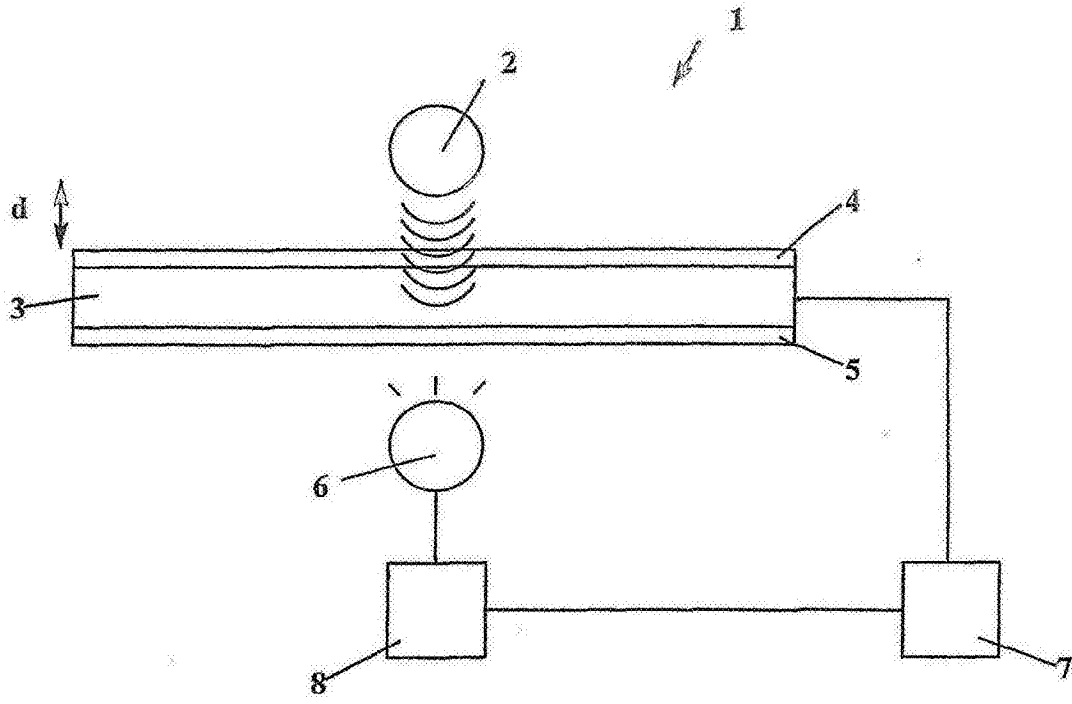


图1

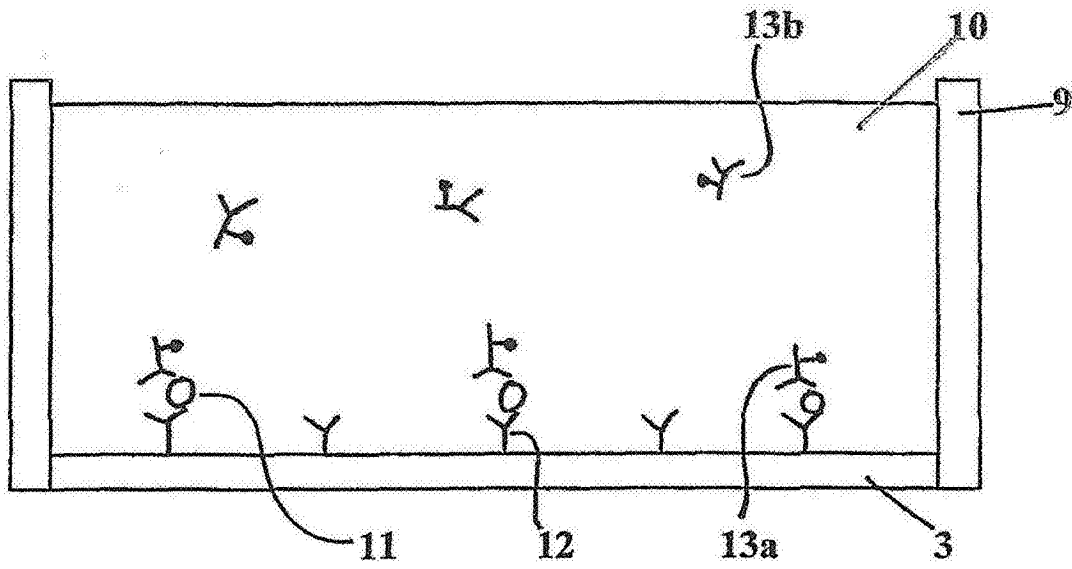


图2

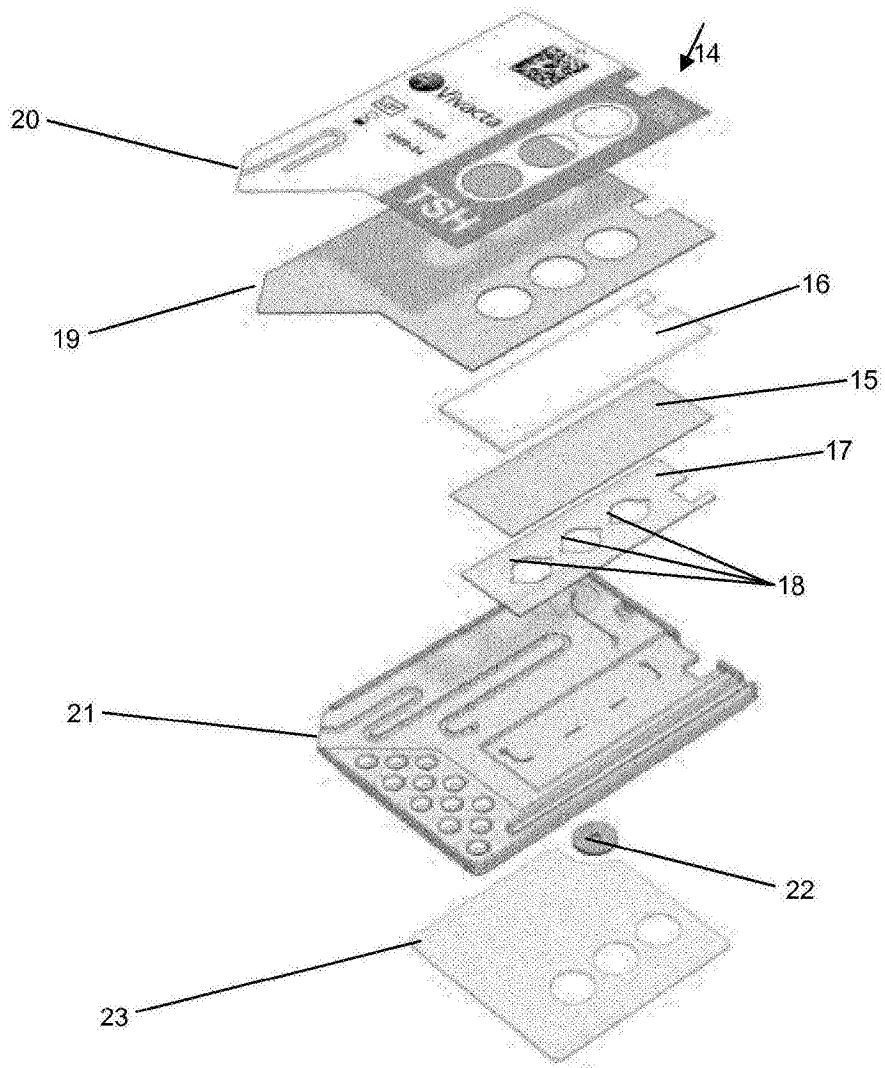


图3

Ige测定点2反应计数

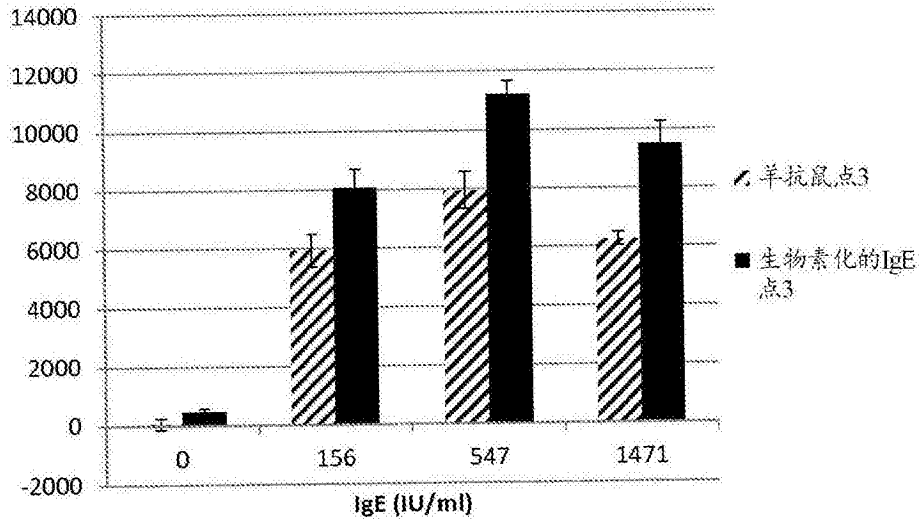


图4

Ige测定点3阳性对照计数

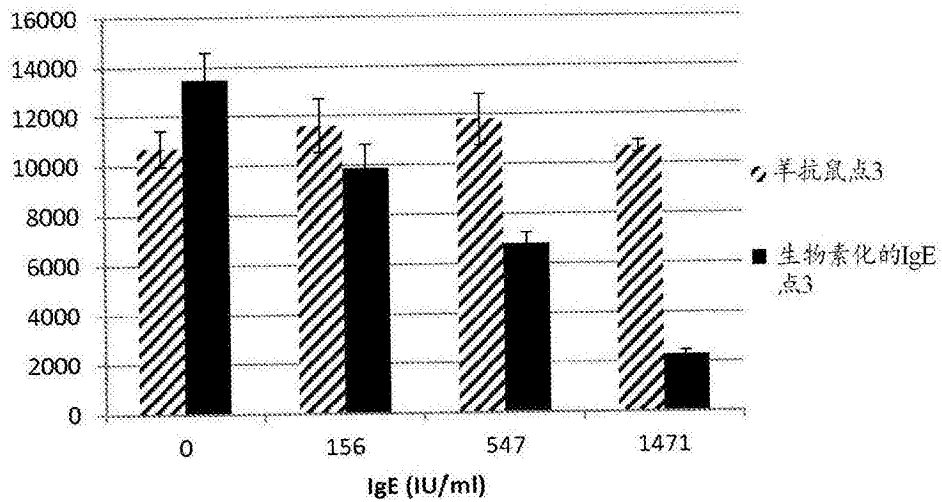


图5

最终测定计数

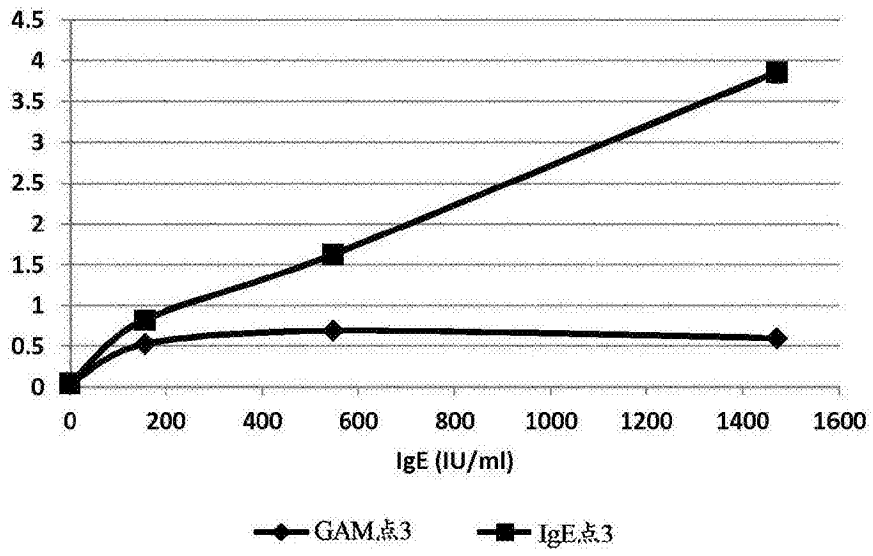


图6

专利名称(译)	用于使用电磁辐射来检测分析物的方法		
公开(公告)号	CN107810414A	公开(公告)日	2018-03-16
申请号	CN201680029746.2	申请日	2016-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺华有限公司		
[标]发明人	史蒂文安德鲁罗斯 朱莉理查兹 马克托马斯加顿斯韦恩		
发明人	史蒂文·安德鲁·罗斯 朱莉·理查兹 马克·托马斯·加顿·斯韦恩		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/542 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54373 G01N25/482 G01N25/488 G01N29/2437 G01N33/5302 G01N33/542 G01N2291/02433 G01N2291/02466 G01N2291/0255 G01N2291/0256 G01N2291/02809		
代理人(译)	郑霞		
优先权	2015008832 2015-05-22 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于使用电磁辐射检测样品中的分析物的方法，包括：(i)提供标记试剂，标记试剂具有能够将分析物或分析物的类似物与标记物结合的结合部位，其中标记物能够吸收电磁辐射以通过非辐射衰变生成能量；(ii)提供装置，具有：适于生成一系列电磁辐射脉冲的辐射源；具有热电或压电元件和电极的换能器，其能够将由非辐射衰变生成的能量转换为电信号；能够检测电信号的检测器；用于控制电磁辐射源和检测器的控制器，其中装置具有第一和第二室，第一室包含靠近换能器的第一试剂，其中第一试剂能够结合到分析物，使得标记试剂经由分析物与第一试剂的结合与分析物的浓度成正比，以及第二室包含靠近换能器的第二试剂，其中第二试剂模拟分析物使得标记试剂与第二试剂的结合与分析物的浓度成反比；(iii)将样品暴露于换能器；(iv)用电磁辐射照射样品并检测电信号。

	IgE 浓度 (IU/mL)	平均最 终分析计 数	点1 (平均)	点2 (平均)	点3 (平均)
示例1 (比较的) 羊抗鼠点3	0	0.0431	-419.3905	50.5571	10702.0851
	156	0.5224	-233.5235	5941.9443	11590.9966
	547	0.6859	-415.1160	7954.2608	11800.8352
	1471	0.5963	-280.7532	6256.8410	10686.1634
示例2 (发明) 生物素化的 IgE点3	0	0.0438	-115.5008	481.3997	13517.8891
	156	0.8225	-309.9573	8071.0033	9894.9731
	547	1.6244	-283.0646	11221.4316	6799.9965
	1471	3.8582	-210.2222	9487.1137	2302.3897