



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110462383 A

(43)申请公布日 2019.11.15

(21)申请号 201880014031.9

(22)申请日 2018.01.26

(30)优先权数据

62/450,623 2017.01.26 US

62/544,393 2017.08.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.08.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/015440 2018.01.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/140719 EN 2018.08.02

(71)申请人 生命生物科学股份有限公司

地址 加拿大安大略省

(72)发明人 A·沃德 A·R·钱德拉塞克兰

D·陈 C·布兰卡德 P·加登

B·德马科 J·福曼 M·A·库萨

L·考德威尔

(74)专利代理机构 北京嘉和天工知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11269

代理人 缪策 甘玲

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

权利要求书4页 说明书47页 附图35页

(54)发明名称

基于磁性颗粒的免疫测定及其使用方法

(57)摘要

本发明部分地描述了用于使用磁性颗粒来检测生物样品中的分析物的改进方法、测定和试剂盒。所述方法包括以下步骤:使样品与包含磁性颗粒和捕获部分的磁性缀合物接触,所述捕获部分被配置为结合所述样品中的所述感兴趣分析物;使所述样品与包含报告物和报告结合部分的报告缀合物接触,所述报告结合部分被配置为结合所述样品中的所述感兴趣分析物;使所述感兴趣分析物与所述捕获部分和所述报告结合部分结合;通过向分析腔室施加磁场将所述感兴趣分析物从所述样品中分离;以及通过检测所述报告物来检测所述感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)



1. 一种用于检测样品中感兴趣分析物的存在、不存在或水平的方法,所述方法包括以下步骤:

使样品与包含磁性颗粒和捕获部分的磁性缀合物接触,所述捕获部分被配置为结合所述样品中的所述感兴趣分析物;

使所述样品与包含报告物和报告结合部分的报告缀合物接触,所述报告结合部分被配置为结合所述样品中的所述感兴趣分析物;

使所述感兴趣分析物与所述捕获部分和所述报告结合部分结合;

通过向分析腔室施加磁场将所述感兴趣分析物从所述样品中分离;以及

通过检测所述报告物来检测所述感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述报告物包含金属芯和二氧化硅壳。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述二氧化硅壳浸渍有多个量子点。

4. 如权利要求2或3所述的方法,其中所述金属芯包含金。

5. 如权利要求1所述的方法,其中所述报告物包含多个量子点。

6. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述报告物是荧光报告物、磷光报告物或比色报告物。

7. 如前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法还包括以下步骤:在使所述样品与所述磁性缀合物接触之后,通过向所述分析腔室施加磁场来浓缩所述样品中的所述感兴趣分析物;然后减少所述分析腔室中所述样品的体积。

8. 如权利要求7所述的方法,所述方法还包括在使所述样品与所述报告缀合物接触之前使所述磁场解除激活的步骤。

9. 如前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法还包括以下步骤:在使所述样品与所述磁性缀合物接触之后,通过向所述分析腔室施加磁场来浓缩所述样品中的所述感兴趣分析物;从所述分析腔室中除去一定体积的所述样品;以及将一定体积的缓冲液和另外体积的所述样品中的一者或两者添加到所述分析腔室中。

10. 如权利要求9所述的方法,所述方法还包括在使所述样品与所述报告缀合物接触之前使所述磁场解除激活的步骤。

11. 如权利要求1所述的方法,其中所述报告缀合物用生物素标记,并且所述报告物用链霉抗生物素蛋白功能化。

12. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述感兴趣分析物选自以下组成的组:人绒毛膜促性腺激素(hCG)、促黄体激素(LH)/黄体生成素、前列腺特异性抗原(PSA)、单纯疱疹病毒(HSV)抗体、雌酮-3-葡萄糖苷酸(E3G)、细菌、血红蛋白A1C、C反应蛋白、炎症生物标记物、肌钙蛋白、莱姆病抗原、莱姆病抗体、LDL生物标记物、HDL生物标记物、总胆固醇生物标记物、促甲状腺激素、丙型肝炎病毒生物标记物、鼻病毒生物标记物、流感病毒生物标记物、肝功能生物标记物、雌激素、孕酮、乳酸以及它们的组合。

13. 一种用于检测样品中感兴趣分析物的存在、不存在或水平的方法,所述方法包括以下步骤:

使样品与包含磁性颗粒和捕获部分的磁性缀合物接触,所述捕获部分被配置为结合所述样品中的所述感兴趣分析物;

使所述感兴趣分析物与所述捕获部分结合;

通过向分析腔室施加磁场以将所述磁性缀合物和与所述磁性缀合物缔合的感兴趣分析物向下牵引,从而将所述感兴趣分析物从所述样品中分离;

使所述样品与包含报告物和报告结合部分的报告缀合物接触,所述报告结合部分被配置为结合所述样品中的所述感兴趣分析物;

使所述感兴趣分析物与所述报告结合部分结合;

通过向所述分析腔室施加磁场将所述感兴趣分析物和与所述感兴趣分析物结合的所述报告结合部分从所述样品中分离;以及

通过用光源和光电检测器检测所述报告物来检测所述感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述报告物包括荧光报告物、磷光报告物或比色报告物。

15. 如权利要求13所述的方法,其中所述报告缀合物包含多个量子点。

16. 如权利要求13至15中任一项所述的方法,其中所述感兴趣分析物选自由以下组成的组:人绒毛膜促性腺激素(hCG)、促黄体激素(LH)/黄体生成素、前列腺特异性抗原(PSA)、单纯疱疹病毒(HSV)抗体、雌酮-3-葡糖苷酸(E3G)、细菌、血红蛋白A1C、C反应蛋白、炎症生物标记物、肌钙蛋白、莱姆病抗原、莱姆病抗体、LDL生物标记物、HDL生物标记物、总胆固醇生物标记物、促甲状腺激素、丙型肝炎病毒生物标记物、鼻病毒生物标记物、流感病毒生物标记物、肝功能生物标记物、雌激素、孕酮、乳酸以及它们的组合。

17. 一种用于检测样品中感兴趣分析物的存在、不存在或水平的方法,所述方法包括以下步骤:

使样品与包含磁性颗粒和捕获部分的磁性缀合物接触,所述捕获部分被配置为结合所述样品中的所述感兴趣分析物;

使所述感兴趣分析物与所述捕获部分结合;

使所述样品与报告物标记的分析物接触,所述报告物标记的分析物被配置为在所述样品中不存在所述感兴趣分析物的情况下结合所述磁性缀合物;

通过向所述样品施加磁场将所述感兴趣分析物从所述样品中分离;以及

通过检测所述报告物来检测所述感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述报告物包括荧光报告物、磷光报告物或比色报告物。

19. 如权利要求17或18所述的方法,其中报告物标记的分析物包含多个量子点。

20. 如权利要求17至19中任一项所述的方法,其中所述感兴趣分析物选自由以下组成的组:人绒毛膜促性腺激素(hCG)、促黄体激素(LH)/黄体生成素、前列腺特异性抗原(PSA)、单纯疱疹病毒(HSV)抗体、雌酮-3-葡糖苷酸(E3G)、细菌、血红蛋白A1C、C反应蛋白、炎症生物标记物、肌钙蛋白、莱姆病抗原、莱姆病抗体、LDL生物标记物、HDL生物标记物、总胆固醇生物标记物、促甲状腺激素、丙型肝炎病毒生物标记物、鼻病毒生物标记物、流感病毒生物标记物、肝功能生物标记物、雌激素、孕酮、乳酸以及它们的组合。

21. 一种用于检测样品中感兴趣分析物的存在、不存在或水平的方法,所述方法包括以下步骤:

使样品与包含报告物和报告结合部分的报告缀合物接触,所述报告结合部分被配置为

结合所述样品中的所述感兴趣分析物；

使所述感兴趣分析物与所述报告结合部分结合；

使所述样品与磁性颗粒标记的分析物接触，所述磁性颗粒标记的分析物被配置为在所述样品中不存在所述感兴趣分析物的情况下结合所述报告缀合物；

通过向所述样品施加磁场将所述磁性颗粒标记的分析物从所述样品中分离；以及  
通过检测所述报告物来检测所述感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

22. 如权利要求21所述的方法，其中所述报告物包括荧光报告物、磷光报告物或比色报告物。

23. 如权利要求21或22所述的方法，其中所述报告缀合物包含多个量子点。

24. 如权利要求21至23中任一项所述的方法，其中所述感兴趣分析物选自以下组成的组：人绒毛膜促性腺激素 (hCG)、促黄体激素 (LH) / 黄体生成素、前列腺特异性抗原 (PSA)、单纯疱疹病毒 (HSV) 抗体、雌酮-3-葡糖苷酸 (E3G)、细菌、血红蛋白A1C、C反应蛋白、炎症生物标记物、肌钙蛋白、莱姆病抗原、莱姆病抗体、LDL生物标记物、HDL生物标记物、总胆固醇生物标记物、促甲状腺激素、丙型肝炎病毒生物标记物、鼻病毒生物标记物、流感病毒生物标记物、肝功能生物标记物、雌激素、孕酮、乳酸以及它们的组合。

25. 一种用于检测样品中感兴趣分析物的存在、不存在或水平的方法，所述方法包括以下步骤：

使样品与包含磁性颗粒和捕获部分的磁性缀合物接触，所述捕获部分被配置为结合所述样品中的所述感兴趣分析物；

使所述感兴趣分析物与所述捕获部分结合；

使所述样品与包含生物素标记的报告结合部分接触，所述报告结合部分被配置为结合所述样品中的所述感兴趣分析物；

使所述样品与包含链霉抗生物素蛋白标记的报告物接触，所述链霉抗生物素蛋白标记被配置为结合所述生物素标记；

通过向所述样品施加磁场将所述感兴趣分析物从所述样品中分离；以及

通过检测所述报告物来检测所述感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

26. 如权利要求25所述的方法，其中所述报告物包括荧光报告物、磷光报告物或比色报告物。

27. 如权利要求25或26所述的方法，其中所述报告物包含多个量子点。

28. 如权利要求25至27中任一项所述的方法，其中所述感兴趣分析物选自以下组成的组：人绒毛膜促性腺激素 (hCG)、促黄体激素 (LH) / 黄体生成素、前列腺特异性抗原 (PSA)、单纯疱疹病毒 (HSV) 抗体、雌酮-3-葡糖苷酸 (E3G)、细菌、血红蛋白A1C、C反应蛋白、炎症生物标记物、肌钙蛋白、莱姆病抗原、莱姆病抗体、LDL生物标记物、HDL生物标记物、总胆固醇生物标记物、促甲状腺激素、丙型肝炎病毒生物标记物、鼻病毒生物标记物、流感病毒生物标记物、肝功能生物标记物、雌激素、孕酮、乳酸以及它们的组合。

29. 如权利要求1至28中任一项所述的方法，所述方法包括将所述样品添加到分析腔室中的步骤。

30. 如权利要求29所述的方法，其中使所述样品与所述磁性缀合物接触的所述步骤包括使所述样品与所述分析腔室中的所述磁性缀合物接触。

31. 如权利要求29或30所述的方法,其中将所述样品添加到所述分析腔室中的所述步骤包括将所述样品添加到与所述分析腔室流体连通的样品收集器中。

32. 如权利要求31所述的方法,其中使所述样品与所述磁性缀合物接触的所述步骤包括使所述样品与所述样品收集器中的所述磁性缀合物接触。

33. 一种试剂盒,所述试剂盒用于提供如权利要求1至32中任一项所述的方法。

34. 一种用于评估生物事件的方法,所述方法包括使用如权利要求1至32中任一项所述的方法测量生物标记物。

## 基于磁性颗粒的免疫测定及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 该国际申请要求2017年1月26日提交的美国临时申请No. 62/450,623和2017年8月11日提交的美国临时申请No. 62/544,393的权益,所述临时申请的全部内容以引用方式并入本文。

### 发明领域

[0003] 本文所述的发明总体上涉及用于检测生物样品中的分析物的改进方法、测定和试剂盒。

[0004] 发明背景

[0005] 分析物检测在医学和生物学研究以及环境科学等各个行业中具有各种临床和非临床应用。用于分析物检测的传统方法包括诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、质谱和高压液相色谱(HPLC)的测定。HPLC和质谱可用于基于电荷和/或尺寸来检测分析物,而ELISA可用于基于分析物上可被捕获剂和检测剂(例如,抗体、适体等等)识别的抗原来检测分析物。特别地,ELISA检测已成为生命科学中比较常用的检测方法。然而,传统的ELISA可能是耗时的,因为它涉及各种孵育和洗涤步骤,并且可能无法为各种应用提供足够的灵敏度。此外,用于进行ELISA测定的参数是高度可变的,如此使得该测定难以发展成为通用平台,尤其是难以发展成为个人使用者的家庭诊断法。

[0006] 事实上,如果能在家中轻松且频繁地监测生物标记物,健康护理将受益匪浅。举例来说,与医疗专业人员相比,个人更适合监测自己的健康状态并指导护理,因为医疗专业人员在治疗患者方面时间和资源有限。此外,获得了健康信息,个人能够更准确地规划生活,包括例如规划生殖时间。

[0007] 因此,仍然需要用于检测样品中的分析物的改进方法,这些改进方法与常规方法相比执行所需的时间和输入减少,同时维持或提高了检测的灵敏度。

### 发明内容

[0008] 本文描述了免疫测定;包括所述测定的试剂盒;以及使用所述测定检测样品中感兴趣分析物的存在、不存在或水平的方法。

[0009] 在一些方面,本发明涉及用于检测分析物(例如来自生物样品的抗原)的系统和方法,所述系统和方法利用磁介导的分离,比现有方法具有更高的灵敏度,例如依赖于对感兴趣抗原(例如可用于与个体的健康状态相关联的抗原)的基于抗体的检测。相比本领域的免疫测定,本文所述的免疫测定、试剂盒和方法提供了相当大的优势。实际上,在一些实施方案中,本文所述的发明包括省去样品制备,这在已知免疫测定中是从未有过的。本领域的现有方法需要大量的样品制备。这里,在一些实施方案中,可以将样品与必需试剂(包括磁性缀合物和报告物或报告缀合物)在分析腔室中混合,并且施加磁场作为“向下牵引(pull down)”步骤,然后对报告物进行可视化和/或量化。

[0010] 在一个实施方案中,本发明包括一种用于检测样品中感兴趣分析物的存在、不存

在或水平的方法。在一些实施方案中,样品可以是如本文所定义的体液。

[0011] 在一个实施方案中,本发明的方法可包括将样品添加到分析腔室中的步骤。在一些实施方案中,将样品添加到分析腔室中可包括将样品递送至与分析腔室流体连通的样品收集器(例如,吸收剂或芯吸材料)。在一些实施方案中,样品收集器然后可以将样品进给到分析腔室中。在一些实施方案中,本发明的方法可包括使样品与包含磁性颗粒和捕获部分的磁性缀合物接触,所述捕获部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;在一些实施方案中,可以将磁性缀合物置于样品收集器处,并且使样品与磁性缀合物接触的步骤可以在样品收集器处发生。在一些实施方案中,在将样品添加到样品收集器中之前,可以将磁性缀合物嵌入样品收集器的一部分中。在一些实施方案中,本发明的方法可包括使分析腔室中的样品与磁性缀合物接触。在一些实施方案中,捕获部分是抗体、抗原结合片段、抗原、受体、配体、适体、适体受体、核酸或小分子。在一些实施方案中,捕获部分是捕获抗体。在一些实施方案中,磁性缀合物包含磁性颗粒和捕获抗体。

[0012] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:使样品与报告物或包含报告物和报告结合部分的报告缀合物接触,所述报告结合部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物。在一些实施方案中,可以将报告物或报告缀合物置于样品收集器处,并且使样品与报告物或报告缀合物接触的步骤可以在样品收集器处发生。在一些实施方案中,在将样品添加到样品收集器中之前,可以将报告物或报告缀合物嵌入样品收集器的一部分中。在一些实施方案中,本文所述的方法可包括使分析腔室中的样品与报告物或报告缀合物接触的步骤。在一些实施方案中,报告结合部分是抗体、抗原结合片段、抗原、受体、配体、适体、适体受体、核酸或小分子。在一些实施方案中,报告结合部分是报告抗体。在一些实施方案中,报告缀合物包含报告物和报告抗体。在一些实施方案中,本文所述的方法可包括使感兴趣分析物与捕获抗体和报告抗体结合的步骤。在一些实施方案中,本文所述的方法可包括通过向分析腔室施加磁场将感兴趣分析物从样品中分离的步骤。在一些实施方案中,本文所述的方法可包括通过检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平的步骤。

[0013] 在一些实施方案中,报告物可包括金属芯(例如,金属微粒或金属纳米颗粒)并且可包括二氧化硅壳。在一些实施方案中,报告物包括金属芯并具有二氧化硅壳。在一些实施方案中,报告物包括多个量子点。在一些实施方案中,报告物包括具有二氧化硅壳的金属芯,并且二氧化硅壳浸渍有多个量子点。在一些实施方案中,报告物包括金属芯,并且金属芯可包含或如本文所述的另一种金属。

[0014] 在一些实施方案中,本文所述的报告物可以是荧光报告物、磷光报告物或比色报告物(诸如有色颗粒),所述报告物可被配置为测量光的吸收或散射(或者,例如通过比色分析测量某种颜色的存在/不存在)。

[0015] 在一些实施方案中,本文所述的方法还可包括以下步骤:在使样品与磁性缀合物接触之后,通过向分析腔室施加磁场来浓缩样品中的感兴趣分析物;然后减少分析腔室中样品的体积。在一些实施方案中,本文所述的方法还可包括在使样品与报告缀合物接触之前使磁场解除激活的步骤。

[0016] 在一些实施方案中,本文所述的方法还可包括以下步骤:在使样品与磁性缀合物接触之后,通过向分析腔室施加磁场来浓缩样品中的感兴趣分析物;从分析腔室中除去一定体积的样品;以及将一定体积的缓冲液和/或另外体积的样品添加到分析腔室中。在一些

实施方案中,本文所述的方法还包括在使样品与报告缀合物接触之前使磁场解除激活的步骤。

[0017] 在一些实施方案中,本文所述的报告抗体用生物素标记。在一些实施方案中,本文所述的报告物用链霉抗生物素蛋白功能化。在一些实施方案中,本文所述的报告抗体用链霉抗生物素蛋白标记。在一些实施方案中,本文所述的报告物用生物素功能化。

[0018] 在一些实施方案中,本文所述的感兴趣分析物可以是本文所述的任何分析物和/或生物标记物。在一些实施方案中,感兴趣分析物可以选自人绒毛膜促性腺激素(hCG)、促黄体激素(LH)/黄体生成素(Lutropin)、前列腺特异性抗原(PSA)、单纯疱疹病毒(HSV)抗体、雌酮-3-葡糖苷酸(E3G)、细菌、血红蛋白A1C、C反应蛋白、炎症生物标记物、肌钙蛋白、莱姆病抗原、莱姆病抗体、LDL生物标记物、HDL生物标记物、总胆固醇生物标记物、促甲状腺激素、丙型肝炎病毒生物标记物、鼻病毒生物标记物、流感病毒生物标记物、肝功能生物标记物、雌激素、孕酮、乳酸以及它们的组合。在一些实施方案中,细菌可以是A组链球菌(*Streptococcus-A*)、衣原体和/或淋病球菌(*Gonorrhea*)。在一些实施方案中,炎症生物标记物可以是CRP、SAA和/或MP8。在一些实施方案中,肝功能生物标记物可以是ALT和/或AST。在一些实施方案中,感兴趣分析物可以选自由以下组成的组:排卵生物标记物、妊娠生物标记物、链球菌性喉炎生物标记物、前列腺癌生物标记物、疱疹生物标记物、糖尿病生物标记物、炎症生物标记物、心脏病发作生物标记物、衣原体生物标记物、细菌生物标记物、莱姆病生物标记物、胆固醇生物标记物、甲状腺机能减退生物标记物、丙型肝炎生物标记物、鼻病毒生物标记物、流感生物标记物、肝功能生物标记物、生育生物标记物、肌肉疲劳生物标记物以及它们的组合。

[0019] 在一些实施方案中,排卵生物标记物可以源自基于尿液、血液或血清的样品。在一些实施方案中,妊娠生物标记物可以源自基于尿液或血液的样品。在一些实施方案中,链球菌性喉炎生物标记物可以源自基于唾液的样品。在一些实施方案中,基于唾液的样品可以是唾液、面颊拭子或咽喉拭子的等分试样。在一些实施方案中,前列腺癌生物标记物可以源自基于血液、血清或尿液的样品。在一些实施方案中,疱疹生物标记物可以源自源于血液或唾液的样品。

[0020] 在一个实施方案中,本文所述的方法可以检测样品中感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0021] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:使样品与包含磁性颗粒和捕获部分的磁性缀合物接触,所述捕获部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使样品与包含报告物和报告结合部分的报告缀合物接触,所述报告结合部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与捕获部分和报告结合部分结合;通过向分析腔室施加磁场将感兴趣分析物从样品中分离;以及/或者通过检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0022] 在一些实施方案中,本文的方法可包括以下步骤:使样品与包含报告物和报告结合部分的报告缀合物接触,所述报告结合部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使样品与包含磁性颗粒和捕获抗体的磁性缀合物接触,所述捕获部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与捕获部分和报告结合部分结合;通过向分析腔室施加磁场将感兴趣分析物从样品中分离;以及/或者通过检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不

存在或水平。

[0023] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:使样品与包含磁性颗粒和捕获部分的磁性缀合物接触,所述捕获部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与捕获部分结合;通过向分析腔室施加磁场以将磁性缀合物和与所述磁性缀合物缔合的感兴趣分析物向下牵引,从而将感兴趣分析物从样品中分离;使样品与包含报告物和报告结合部分的报告缀合物接触,所述报告结合部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与报告结合部分结合;通过向分析腔室施加磁场将感兴趣分析物和与所述感兴趣分析物结合的报告结合部分从样品中分离;以及/或者通过用光源和光电检测器检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0024] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:使样品与包含报告物和报告结合部分的报告缀合物接触,所述报告结合部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与报告结合部分结合;使样品与磁性颗粒标记的分析物接触,所述磁性颗粒标记的分析物被配置为在样品中不存在感兴趣分析物的情况下结合报告缀合物;通过向样品施加磁场将磁性颗粒标记的分析物从样品中分离;以及/或者通过检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0025] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:使样品与包含磁性颗粒和捕获部分的磁性缀合物接触,所述捕获部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与捕获部分结合;使样品与包含生物素标记的报告结合部分接触,所述报告结合部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使样品与包含链霉抗生物素蛋白标记的报告物接触,所述链霉抗生物素蛋白标记被配置为结合生物素标记;通过向样品施加磁场将感兴趣分析物从样品中分离;以及/或者通过检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0026] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:使样品与包含磁性颗粒和捕获部分的磁性缀合物接触,所述捕获部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与捕获部分结合;使样品与包含链霉抗生物素蛋白标记的报告结合部分接触,所述报告结合部分被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使样品与包含生物素标记的报告物接触,所述生物素标记被配置为结合链霉抗生物素蛋白标记;通过向样品施加磁场将感兴趣分析物从样品中分离;以及/或者通过检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0027] 在一个实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:将样品添加到分析腔室中;使样品与包含磁性颗粒和捕获抗体的磁性缀合物接触,所述捕获抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与捕获抗体结合;通过向分析腔室施加磁场以将磁性缀合物和与所述磁性缀合物缔合的感兴趣分析物向下牵引,从而将感兴趣分析物从样品中分离;使样品与包含报告物和报告抗体的报告缀合物接触,所述报告抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与报告抗体结合;以及通过用光源和光电检测器检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0028] 在一些实施方案中,本文所述的方法可以对阴性样品(即,不包含感兴趣分析物的样品)执行,从而确定样品中不存在感兴趣分析物。

[0029] 在一个实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:将样品添加到分析腔室中;

使样品与包含磁性颗粒和捕获抗体的磁性缀合物接触,所述捕获抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与捕获抗体结合;使样品与报告物标记的分析物接触,所述报告物标记的分析物被配置为在样品中不存在感兴趣分析物的情况下结合磁性缀合物;通过向分析腔室施加磁场将感兴趣分析物从样品中分离;以及通过检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0030] 在一个实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:将样品添加到分析腔室中;使样品与包含报告物和报告抗体的报告缀合物接触,所述报告抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与报告抗体结合;使样品与磁性颗粒标记的分析物接触,所述磁性颗粒标记的分析物被配置为在样品中不存在感兴趣分析物的情况下结合报告缀合物;通过向样品施加磁场将磁性颗粒标记的分析物从样品中分离;以及通过检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0031] 在一个实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:将样品添加到分析腔室中;使样品与包含磁性颗粒和捕获抗体的磁性缀合物接触,所述捕获抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使感兴趣分析物与捕获抗体结合;使样品与包含生物素标记的报告抗体接触,所述报告抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;使样品与包含链霉抗生物素蛋白标记的报告物接触,所述链霉抗生物素蛋白标记被配置为结合生物素标记;通过向样品施加磁场将感兴趣分析物从样品中分离;以及通过检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0032] 在一些实施方案中,在本文所述的方法包括接触步骤(例如,使样品与磁性缀合物、报告抗体、报告物标记的缀合物和/或报告缀合物接触)的情况下,这种接触步骤可包括将样品(其可能含有分析物)与相应的磁性缀合物、报告抗体、报告物标记的缀合物和/或报告缀合物在选定的时间段内和选定的温度下孵育。

## 附图说明

[0033] 当结合附图一起阅读时,将更好地理解前述发明内容以及以下具体实施方式。

[0034] 图1A至图1D示出了存在或不存在抗原时,本文所述的免疫测定的夹心模式的示例性特征。图1A示出了夹心模式的示例性参数:(a)感兴趣分析物(例如hCG);(b)对感兴趣分析物特异的抗体#1(例如MoLogic抗hCG 4F9);(c)对感兴趣分析物特异的抗体#2(例如Medix抗hCG 5011);(d)如此处所示,抗体1和2能够同时与分析物结合;(e)荧光报告物;以及(f)磁性颗粒。在存在分析物的情况下,将形成复合物,其既被标记又可被吸引至磁体。图1B示出了磁性缀合物和报告缀合物的添加。图1C示出了磁向下牵引。图1D示出了分析物的检测。

[0035] 图2A至图2F示出了存在或不存在抗原时,本文所述的免疫测定的单独添加模式的示例性特征。图2A示出了单独添加模式的示例性参数:(a)感兴趣分析物(hCG);(b)对感兴趣分析物特异的抗体#1(例如MoLogic抗hCG 4F9);(c)对感兴趣分析物特异的抗体#2(例如Medix抗hCG 5011);(d)如此处所示,抗体1和2能够同时与分析物结合;(e)荧光报告物;以及(f)磁性颗粒。图2B示出了磁性缀合物的添加。图2C示出了磁向下牵引。图2D示出了报告缀合物的添加。图2E示出了第二次磁向下牵引。图2F示出了分析物的检测。

[0036] 图3A至图3E示出了存在或不存在抗原时,本文所述的免疫测定的竞争性模式的示

例性特征。图3A示出了竞争性模式的示例性参数：(a) 感兴趣分析物；(b) 对感兴趣分析物特异的抗体；(c) 荧光报告物；以及(d) 磁性颗粒。在不存在分析物的情况下，抗体上的结合位点仍然可用，因此使得能在磁性颗粒与报告物之间制成复合物。在存在分析物的情况下，游离抗原可封闭抗体上的结合位点，由此阻止与磁体颗粒和报告物形成复合物。图3B示出了磁性缀合物的添加。图3C示出了报告物标记的分析物的添加。图3D示出了磁向下牵引。图3E示出了分析物的检测。

[0037] 图4A至图4G示出了存在或不存抗原时，本文所述的免疫测定的三级模式的示例性特征。图4A示出了三级模式的示例性参数：(a) 感兴趣分析物；(b) 对感兴趣分析物特异且用生物素标记的抗体#1；(c) 对感兴趣分析物特异的抗体#2；(d) 如此处所示，抗体1和2能够同时与分析物结合；(e) 用链霉抗生物素蛋白功能化的荧光报告物；以及(f) 磁性颗粒。在存在分析物的情况下，将与磁性颗粒标记的生物素形成复合物。当将链霉抗生物素蛋白标记的报告物添加到该复合物中时，报告物将与该复合物结合并将产生荧光复合物，该荧光复合物将被吸引至磁体。图4B示出了磁性缀合物的添加。图4C示出了磁向下牵引。图4D示出了生物素标记的抗体的添加。图4E示出了链霉抗生物素蛋白标记的报告物的添加。图4F示出了第二次磁向下牵引。图4G示出了分析物的检测。

[0038] 图5示出了本发明的用于检测人绒毛膜促性腺激素(hCG)的测定的灵敏度。\*Elecsys电化学发光免疫测定HCG STAT(cobas e 601模块,cobas e 602模块)。1fM=10<sup>-15</sup>摩尔/升。

[0039] 图6示出了本发明的用于检测促黄体激素(LH)的测定的灵敏度。\*Elecsys电化学发光免疫测定LH(cobas)。1fM=10<sup>-15</sup>摩尔/升。

[0040] 图7示出了本发明的用于检测前列腺特异性抗原(PSA)的测定的灵敏度。\*Elecsys电化学发光免疫测定游离PSA(cobas)。1fM=10<sup>-15</sup>摩尔/升。

[0041] 图8A至图8D示出了存在或不存细菌时，本文所述的免疫测定的细菌检测模式的示例性特征。图8A示出了细菌检测模式的示例性参数：(a) 感兴趣的细菌；(b) 对细菌表面上的分析物特异的抗体#1；(c) 对细菌表面上的分析物特异的抗体#2(可能与抗体#1相同)；(d) 荧光报告物；以及(e) 磁性颗粒。许多标记的抗体可以立即与单个细菌结合，产生可被吸引至磁体且被荧光标记的细菌。图8B示出了磁性缀合物和报告缀合物的添加。图8C示出了磁向下牵引。图8D示出了分析物的检测。

[0042] 图9示出了本发明的用于检测A组链球菌的测定的灵敏度。

[0043] 图10示出了在本发明的示例性竞争性模式免疫测定中检测E3G。

[0044] 图11示出了本文所述的免疫测定的PSA测量值与在临床实验室中实现的PSA测量值之间的相关性。

[0045] 图12示出了如通过本文所述的免疫测定测量的对尿液样品中hCG的典型试验。

[0046] 图13示出了量化来自图12的结果的曲线图。

[0047] 图14示出了阶梯曲线，该曲线显示了作为排卵后天数的函数的阳性分数。如本文所述的免疫测定(即Confer Magneto)以紫色显示。First Response以粉红色显示。以黑色和白色作为参考，在第10天，Confer Magneto是顶部曲线，而First Response是底部曲线。

[0048] 图15示出了妊娠数据的总结，示出了在First Response之前给定天数读数为阳性的样品的百分比。

[0049] 图16示出了使用具有405nm激光激发源的二向色镜布置的顺光激发方法。二向色镜:Thor Labs,DMLP490R,25mm x 36mm长通二向色镜,490nm截止波长。滤波器:Thor Labs FGL610滤波器。

[0050] 图17A和图17B示出了用于分析血清样品以检测C反应蛋白的方案的结果。图17A示出了缓冲液中的CRP浓度系列,而图17B示出了加标血清中的CRP浓度系列。

### 具体实施方式

[0051] 本发明部分地基于以下发现:例如,对于健康相关的应用,可以使用磁分离以灵敏且有效的方式检测感兴趣分析物。

[0052] 在一些方面,本发明提供了一种用于检测溶液中分析物的存在、不存在或水平的方法,所述方法包括将标记的结合剂置于允许结合剂与分析物结合的条件下;将包含结合剂的颗粒置于允许结合剂与分析物结合的条件下;施加具有足够强度的磁场以将包含分析物和标记的所得复合物从所述溶液中分离;以及检测复合物中的标记。

[0053] 在各种实施方案中,在存在或不存在磁场的情况下比较检测到的标记的量。例如,在一些实施方案中,检测到标记(例如,使用本文所述的任何技术)指示分析物的存在。此外,在一些实施方案中,检测到的标记的量(例如,使用本文所述的任何技术)指示分析物的量。在各种实施方案中,检测到的标记的量与分析物的量成比例。在一些实施方案中,未检测到(或检测到极少的)标记(例如,使用本文所述的任何技术)指示分析物不存在(或基本不存在)。

[0054] 在各种实施方案中,关于样品中感兴趣分析物的存在、不存在或水平的信息指导健康护理或与健康相关的生活方式决定。

#### [0055] 免疫测定

[0056] 本文所述的发明部分地涉及用于检测样品中分析物用于检测感兴趣分析物的改进的免疫测定,所述样品可包括体液样品。

[0057] 在一个实施方案中,本发明包括可用于检测样品中感兴趣分析物的存在、不存在或水平的免疫测定。

[0058] 在一些实施方案中,本文所述的免疫测定可包括分析腔室,所述分析腔室可包含样品、磁性缀合物、报告物或报告缀合物、磁体、光源和/或光电检测器。

[0059] 在一些实施方案中,本文所述的免疫测定可包括与分析腔室相联或以其他方式与分析腔室流体连通的样品收集器。在一些实施方案中,样品收集器可包括可吸收样品的吸收和/或芯吸材料,然后样品收集器将样品进给到分析腔室中。在一些实施方案中,可以将磁性缀合物、报告物和报告缀合物中的一者或多者置于样品收集器中,使得当将样品添加到样品收集器中时,样品可以接触磁性缀合物、报告物、报告缀合物或它们的组合。在一些实施方案中,可以将磁性缀合物、报告物和报告缀合物中的一者或多者嵌入样品收集器的一部分中。

[0060] 在一些实施方案中,样品收集器包括海绵、泡沫或膜(诸如聚氨酯海绵或泡沫),或另一种吸附剂和/或吸收材料。在一些实施方案中,样品收集器可包括纤维素、硝基纤维素和/或聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、海绵或泡沫。在一些实施方案中,样品收集器可以是Porex吸附剂,其可以是基于PE/PET的。在一些实施方案中,Porex吸附剂可包括Porex缀合物剥离

层,其可以是基于PE的烧结物。

[0061] 在一些实施方案中,磁体可以是永磁体,其可以与分析腔室分开,以便向分析腔室施加磁场。在一些实施方案中,磁体可以是电磁体,其可以被激活或解除激活,以便向分析腔室施加磁场。

[0062] 在一些实施方案中,光源连接至分析腔室并且可被配置为使光透射通过分析腔室的一部分。

[0063] 在一些实施方案中,分析腔室可以是一个腔室、或两个腔室、或三个腔室、或四个腔室。在一些实施方案中,分析腔室可以是一个或多个腔室、或两个或更多个腔室、或三个或更多个腔室、或四个或更多个腔室。在一些实施方案中,分析腔室可包括多个腔室。在一些实施方案中,多个腔室可以流体连通。在一些实施方案中,可以将样品、报告物或报告缀合物以及磁性缀合物在第一腔室中混合。在某些实施方案中,可以在第二腔室中施加磁场,并且连接至分析腔室的光源可被配置为使光透射通过第二腔室。在一些实施方案中,本文所述的方法步骤可各自在分析腔室的单独腔室中执行。在一些实施方案中,分析腔室可以是一个腔室,并且所有方法步骤可以在同一腔室中执行。

[0064] 在一些实施方案中,光电检测器可以连接至分析腔室(例如,面向光源、与光源对齐或与光源相对),并且可被配置为检测由光源透射通过分析腔室的光,从而测量光的透射和/或吸收。在一些实施方案中,光电检测器可以连接至分析腔室(与光源正交(正交照明)),并且可被配置为检测分析腔室的一部分中的报告物或报告缀合物的荧光和/或磷光。在一些实施方案中,光电检测器可以连接至分析腔室(与光源相对(透射照明)),并且可被配置为检测分析腔室的一部分中的报告物或报告缀合物的荧光和/或磷光。在一些实施方案中,光电检测器可以连接至分析腔室(与光源对齐,例如通过如图16所示的二向色镜(顺光照明)),并且可被配置为检测分析腔室的一部分中的报告物或报告缀合物的荧光和/或磷光。在一些实施方案中,光电检测器可包括一个或多个光电倍增管检测器和光电二极管检测器。如本文所用,术语“光电倍增器”或“光电倍增管”是指通过光电效应和二次电子发射将入射光子转换成电子的光学检测部件。术语光电倍增管旨在包括含有用于电流倍增的单独倍增电极的器件以及含有一个或多个通道电子倍增器的那些器件。如本文所用,术语“光学检测器”或“光电检测器”是指当用光能照射时产生输出信号的器件。因此,术语光学检测器系统在其最广泛的意义上被认为是指出于物理量测量或信息传递目的将能量从一种形式转换为另一种形式的装置。光学检测器包括但不限于光电倍增管和光电二极管。如本文所用,术语“光电二极管”是指固态光检测器类型,包括但不限于PN、PIN、APD、CMOS和CCD。在一些实施方案中,光电检测器可包括基于PN的检测器、基于PIN的检测器、基于APD的检测器、基于CMOS的检测器和基于CCD的检测器中的一者或多者。在一些实施方案中,分析腔室包括如本文所述的光电检测器。在一些实施方案中,分析腔室包括包括基于PN的检测器、基于PIN的检测器、基于APD的检测器、基于CMOS的检测器和基于CCD的检测器中的一者或多者。

[0065] 在一些实施方案中,本文所述的磁性缀合物可包括磁性颗粒和与所述磁性颗粒缔合的捕获抗体。在一些实施方案中,磁性颗粒可以与捕获抗体结合。

[0066] 在一些实施方案中,本文所述的报告缀合物可包括报告物和报告抗体。在一些实施方案中,报告物可以与报告抗体结合。

[0067] 结合配偶体和抗体

[0068] 在一些实施方案中,捕获部分和报告结合部分可以相同或不同。在一些实施方案中,捕获部分和/或报告结合部分可以是抗体、抗原结合片段、抗原、受体、配体、适体、适体受体、核酸或小分子。在一些实施方案中,捕获部分可以是捕获抗体。在一些实施方案中,报告结合部分可以是报告抗体。

[0069] 在一些实施方案中,捕获抗体和/或报告抗体可以选自由用于本文所述的感兴趣分析物的抗体组成的组。在一些实施方案中,捕获抗体和/或报告抗体可以选自由以下组成的组:抗hCG抗体、抗LH抗体、抗PSA抗体、抗HSV抗体、抗E3G抗体、抗细菌细胞表面蛋白抗体、抗血红蛋白A1C抗体、抗C反应蛋白抗体、抗炎症生物标记物抗体、抗肌钙蛋白抗体、抗莱姆病抗体、抗LDL生物标记物抗体、抗HDL生物标记物抗体、抗总胆固醇生物标记物抗体、抗雌激素抗体、抗孕酮抗体、抗促甲状腺激素抗体、抗丙型肝炎病毒生物标记物抗体、抗鼻病毒生物标记物抗体、抗流感生物标记物抗体、抗肝功能生物标记物抗体、抗生育生物标记物抗体、抗肌肉疲劳生物标记物抗体以及它们的组合。

[0070] 在一些实施方案中,捕获抗体和/或报告抗体可以是可结合选自由以下组成的组的感兴趣分析物的抗体:人绒毛膜促性腺激素(hCG)、促黄体激素(LH)/黄体生成素、前列腺特异性抗原(PSA)、单纯疱疹病毒(HSV)抗体、雌酮-3-葡糖苷酸(E3G)、细菌、血红蛋白A1C、C反应蛋白、炎症生物标记物、肌钙蛋白、莱姆病抗原、莱姆病抗体、LDL生物标记物、HDL生物标记物、总胆固醇生物标记物、促甲状腺激素、丙型肝炎病毒生物标记物、鼻病毒生物标记物、流感病毒生物标记物、肝功能生物标记物、雌激素、孕酮、乳酸以及它们的组合。在一些实施方案中,细菌可以是A组链球菌、衣原体和/或淋病球菌。在一些实施方案中,炎症生物标记物可以是CRP、SAA和/或MP8。在一些实施方案中,肝功能生物标记物可以是ALT和/或AST。在一些实施方案中,感兴趣分析物可以选自由以下组成的组:排卵生物标记物、妊娠生物标记物、链球菌性喉炎生物标记物、前列腺癌生物标记物、疱疹生物标记物、糖尿病生物标记物、炎症生物标记物、心脏病发作生物标记物、衣原体生物标记物、细菌生物标记物、莱姆病生物标记物、胆固醇生物标记物、甲状腺机能减退生物标记物、丙型肝炎生物标记物、鼻病毒生物标记物、流感生物标记物、肝功能生物标记物、生育生物标记物、肌肉疲劳生物标记物以及它们的组合。

[0071] 在各种实施方案中,本文所述的结合配偶体可包括但不限于抗体,包括但不限于单链抗体、抗原结合抗体片段、抗原(例如用于结合其抗体)、受体、配体、适体、适体受体、核酸、小分子等。

[0072] 在一些实施方案中,捕获抗体和/或报告抗体可以选自由以下组成的组:INN-hCG-2、INN-hCG-2、5008-SP5、5008-SP5和5011SPRN-1,或其功能变体。在一些实施方案中,捕获抗体和/或报告抗体可以是表1中描述的一种或多种抗体。

[0073] 表1中列出的是可用于检测hCG的示例性抗体对(例如,选择以下各物中的一者或两者来产生对):

[0074] 表1

[0075]

<b>ISOBMii 抗体代码</b>	<b>所有者</b>	<b>所有者代码</b>
382	Stenman	F16-6G5
383	Medix	5501 SP-1
384	Stenman	F52-3F8
385	Medix	5503 SPI
386	Stenman	F94-8F8
387	Medix	5009 SP-5
388	Medix	5006 SP-5
389	Stenman	F140-11C5
390	Medix	5008 SP-5
391	Medix	6601 SPR-5
392	Stenman	F20-6E11
393	Stenman	F52-3C11
394	Medix	5014 SPTN-5

[0076]

ISOBMii 抗体代码	所有者	所有者代码
395	Abbott	71752
396	Stenman	F132-3C10
397	Stenman	F142-7F3
398	Stenman	F26-2G11
399	Stenman	F95-5C4
400	Abbott	95658
401	Stenman	F95-1E8
402	Medix	5004 SP-1
403	Roche	M-INN2
404	Stenman	F26-7E10
405	Stenman	F95-1B2
406	Medix	5011 SPRN-1
407	Stenman	F19-9C11
408	Medix	5016 SPRN-5
409	Medix	5012 SPRN-1
410	Roche	M-BCG005
411	Roche	M-1F7.9
412	Siemens	34/25.2.2
413	Mologic	D101
414	Paus	E26
415	Siemens	3A11
416	Paus	E30
417	Roche	M-INN22
418	Siemens	2F11
419	Paus	E27
420	Roche	M-94.139
421	Siemens	41I/100.1.1.200.4.2
422	Paus	E28
423	Mologic	D102
424	Siemens	1G4
425	Siemens	500000
426	Siemens	16 E 2
427	Siemens	34A8.1.1
432	Medix	41-3-9
433	Medix	45A10
428 sheep	Mologic	8F11 sheep
429 sheep	Mologic	9F10 sheep
430 sheep	Mologic	8G5 sheep
431 sheep	Mologic	618 sheep poly
434a	INN	hCG111

ISOBMii 抗体代码	所有者	所有者代码
435a	INN	hCG2
436a	INN	hCG40
437a	INN	hCG64
438a	INN	hCG53
439a	INN	hCG68
440a	INN	hCG26
441a	INN	bLH1
[0077] 442a	INN	hCG58
443a	INN	hCG112
444a	INN	hCG106
445a	INN	hCG24
446a	INN	hCG45
447a	INN	hCG10
448a	INN	hCG103
449a	INN	hCG22
450a	Stahli	h54

[0078] 已经确定了选择可成功用于尿液的抗体对的若干重要因素。例如，同时结合的能力是先决条件。在一些实施方案中，抗体必须能够结合完整无缺的hCG以及β亚基。具有高亲和力但低结合率的抗体是有效的但需要长时间孵育。以下抗体已成功用于检测人尿液中的内源性hCG：INN-hCG-2、INN-hCG-22、5008-SP5、5014-SPTN5和5011SPRN-1。因此，本发明的实施方案涉及使用或INN-hCG-2、INN-hCG-22、5008-SP5、5014-SPTN5和5011 SPRN-1或其功能片段中的一者或两者。

[0079] 在一些实施方案中，捕获抗体和/或报告抗体可以是Fitzgerald 10-L15A和10-L15B或其功能变体。

[0080] 在一些实施方案中，捕获抗体和/或报告抗体可以是抗PSA 5001 (Medix)、抗PsA 5012 (Medix) 或其功能变体。

[0081] 在一些实施方案中，捕获抗体和/或报告抗体可以由Biospecific制造的靶向A组链球菌抗原的多克隆抗体或单克隆A组链球菌2601 SPTN-5或2603 SPTN-5抗体或其功能变体。

[0082] 在各种实施方案中，待检测的分析物实际上可以是任何分析物，条件是可获得对该分析物特异的结合配偶体。在各种实施方案中，分析物可以同时被至少两个结合配偶体结合。在各种实施方案中，分析物在相同表位或不同表位被结合配偶体结合。在各种实施方案中，分析物可以是或可包含核酸、肽或蛋白质、碳水化合物、脂质或它们的任何组合。

[0083] 在各种实施方案中，本文所述的发明涵盖例如检测人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 作为妊娠试验的一部分。完整无缺的hCG包括在两个hCG亚基即α-hCG和β-hCG之间形成的二聚体。在一些实施方案中，使用抗体，例如识别α-hCG和β-hCG上的一个或多个表位的一对抗体检测hCG。在一个实施方案中，使用识别β-hCG的抗体检测hCG。在各种实施方案中，在本文所述的发明中可利用任何已知针对α-hCG或β-hCG的抗体。在一些实施方案中，抗体包括INN-hCG-2、INN-hCG-2、5008-SP5、5008-SP5和5011 SPRN-1或其功能变体。在一些实施方案中，

相比市场上的常规妊娠试验,诸如由First Response开发的那些妊娠试验(如本文所用,“First Response”是指用于定性检测人绒毛膜促性腺激素(hCG)的非处方色谱免疫测定),本文所述的方法可以更早且更准确地检测hCG。

[0084] 在各种实施方案中,本文所述的发明涵盖例如检测促黄体激素(LH)/黄体生成素作为用于鉴定排卵的试验的一部分。可用于本文所述方法的识别LH的示例性抗体包括但不限于Fitzgerald 10-L15A和10-L15B或其功能变体。

[0085] 在一些实施方案中,本文所述的发明还涵盖检测雌酮-3-葡糖苷酸(E3G)作为另一种用于鉴定排卵的生物标记物。在一些实施方案中,相比市场上的常规排卵试验诸如由ClearBlue开发的如ClearBlue数字排卵试验(ClearBlue Digital Ovulation Test)(非处方LH试验)或其他排卵试验,本文所述的方法可以更早且更准确地检测LH或E3G。在一些实施方案中,本文所述的方法特别适于预测患有卵巢多囊综合征(PCOS)、因高LH基线而不能使用当前市场上的排卵试验的女性的排卵。

[0086] 在各种实施方案中,本发明涵盖检测前列腺特异性抗原(PSA)。可用于本文所述方法的识别PSA的示例性抗体包括但不限于抗PSA5001(Medix)、抗PSA 5012(Medix)或其功能变体。

[0087] 在各种实施方案中,本发明涵盖检测单纯疱疹病毒(HSV)或血液或血清中存在的针对HSV的抗体。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及检测HSV-1(口腔疱疹)或血液或血清中存在的针对HSV-1的抗体。在其他实施方案中,本文所述的方法涉及检测HSV-2(生殖器疱疹)或针对HSV-2的抗体。例如,HSV-1或HSV-2抗原可用作结合配偶体以检测血液或血清中针对HSV-1或HSV-2的抗体的存在。

[0088] 在各种实施方案中,本发明涵盖检测A组链球菌(*Streptococcus-A/Strep-A*)。可用于检测A组链球菌的示例性抗体包括但不限于由Biospecific制造的靶向A组链球菌抗原的多克隆抗体或单克隆A组链球菌2601SPTN-5或2603SPTN-5抗体或其功能变体。在一些实施方案中,相比常规试验诸如QuickVue Dipstick Strep A试验(用于检测来自有症状患者的咽喉拭子的A组链球菌抗原的免疫荧光试验),本文所述的方法可以更早且更准确地检测A组链球菌抗原。

[0089] 在一个实施方案中,相比当前市场上的其他快速试验例如QuickVue Dipstick Strep A试验的灵敏度,本文所述的方法的灵敏度为至少约10倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍或至少约100倍。在各种实施方案中,与其他链球菌细菌诸如B组链球菌、C组链球菌或G组链球菌相比,本文所述的方法对A组链球菌具有增强的特异性。

[0090] 在各种实施方案中,本发明涵盖检测各种感染,包括淋病和衣原体感染。可以使用本文所述方法中的抗体检测的示例性抗原包括但不限于衣原体LPS KDO-三糖、衣原体主要外膜蛋白、淋病奈瑟氏菌的所有抗原(包括任何主要外膜蛋白)。

[0091] 在各种实施方案中,本发明涵盖检测各种疾病或病症,包括糖尿病和炎症。可以使用本文所述方法中的抗体检测的示例性抗原包括但不限于血红蛋白A1C和C反应蛋白。可以通过本文所述的方法检测的其他抗原包括可以通过当前市场上的ELISA或夹心ELISA免疫测定检测的任何已知抗原。

[0092] 在某些实施方案中,本文所述的方法可涵盖使用一种抗体(例如,捕获抗体或报告

抗体)。在各种实施方案中,本文所述的发明涵盖使用多种抗体,诸如例如一种或多种捕获抗体和一种或多种报告抗体。在一些实施方案中,本文所述的发明可利用至少约2种、约3种、约4种、约5种、约6种、约7种、约8种、约9种、约10种、约11种、约12种、约13种、约14种、约15种、约16种、约17种、约18种、约19种、约20种、约21种、约22种、约23种、约24种、约25种、约26种、约27种、约28种、约29种、约30种、约31种、约32种、约33种、约34种、约35种、约36种、约37种、约38种、约39种、约40种、约45种、约50种、约55种、约60种、约65种、约70种、约75种、约80种、约85种、约90种、约95种、约100种、约110种、约120种、约130种、约140种、约150种、约160种、约170种、约180种、约190种、约200种、约250种、约300种、约350种、约400种、约450种、或约500种、约750种、约1000种、约1250种、约1500种、约1750种、约2000种、约3000种、约4000种、约5000种、约6000种、约7000种、约8000种、约9000种、约10000种抗体。在一些实施方案中,本文所述的发明可利用至少约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约7个、约8个、约9个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约16个、约17个、约18个、约19个、约20个、约25个、约30个、约40个、约45个、约50个、约55个、约60个、约65个、约70个、约75个、约80个、约85个、约90个、约95个、约100个、约110个、约120个、约130个、约140个、约150个、约160个、约170个、约180个、约190个、约200个、或约250个、或约500个、或约750个、或约1000个、或约1250个、或约1500个、或约1750个、或约2000个、或约3000个、或约4000个、或约5000个、或约6000个、或约7000个、或约8000个、或约9000个、或约10000个抗体对。

[0093] 在一些实施方案中,本文所述的发明可利用多价抗体。例如,本发明可涉及二价或三价单链可变片段抗体(例如,它们各自可分别含有约4或约6个分析物或更多个结合位点)的偶联。在其他实施方案中,本文所述的方法可涉及以化学方法形成多种抗体的聚集体。这可以使用多种多官能接头执行。

[0094] 预期使用多种结合配偶体可以改善分析物检测的速度和灵敏度。

[0095] 在各种实施方案中,本文所述的方法最小化假阳性信号。在一些实施方案中,本发明方法通过控制溶液pH来减少信号。在一些实施方案中,通过使用适当的缓冲液来控制溶液pH,所述缓冲液可以对所用的抗体具有特异性。在一些实施方案中,使用Tris/硼酸/EDTA缓冲液和/或含EDTA的缓冲液。在本发明中可以使用各种缓冲液。可用于在本发明中运行凝胶的示例性缓冲液包括但不限于单缓冲体系,诸如硼酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、硼酸锂、Tris/乙酸/EDTA、Tris/乙酸、Tris-乙酸、Tris乙酸EDTA、Tris/TAPS/EDTA缓冲液、Bis-Tris/HCl缓冲液、Tris-乙酸SDS、MOPS、MOPS/Tris/SDS/EDTA、MOPS/Tris/EDTA、MOPS/Tris/SDS、MOPS/Tris、MES、MES/Tris/SDS/EDTA、MES/Tris/EDTA、MES/Tris/SDS、MES/Tris、Tris-甘氨酸;或双缓冲系统,诸如凝胶一侧为Tris EDTA,另一侧为硼酸。可用于稳定pH的另外的示例性缓冲液包括但不限于硼酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、硼酸锂、Tris-HCl、TAPS、Tris/乙酸/EDTA、Tris-乙酸、Tris乙酸EDTA、Tris/TAPS/EDTA缓冲液、碳酸氢铵、碳酸氢钠、磷酸盐缓冲液、盐酸胍、硫氰酸胍、Bis-Tris/HCl缓冲液、Tris-乙酸SDS、MOPS、MOPS/Tris/EDTA、MOPS/Tris/SDS、MOPS/Tris、MES、MES/Tris/SDS/EDTA、MES/Tris/SDS、MES/Tris和Tris-甘氨酸。

[0096] 在一些实施方案中,使用钝化剂诸如Tween、BSA、聚乙二醇或酪蛋白。可用于本发明的另外的示例性钝化剂包括但不限于甘油、蔗糖、葡萄糖、TritonX、SDS、LDS、Sigmacoat、DNA寡核苷酸、鱼明胶、全血清、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、鲑鱼精子DNA、硅烷和二氧化硅。

[0097] 使用免疫测定的方法

[0098] 本文所述的方法包括用于检测样品中感兴趣分析物的存在、不存在或水平的方法。

[0099] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:

[0100] a. 使样品与包含磁性颗粒和捕获抗体的磁性缀合物接触,所述捕获抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;

[0101] b. 使样品与包含报告物和报告抗体的报告缀合物接触,所述报告抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;

[0102] c. 使感兴趣分析物与捕获抗体和报告抗体结合;

[0103] d. 通过向分析腔室施加磁场以将磁性缀合物和与所述磁性缀合物缔合的感兴趣分析物向下牵引,从而将感兴趣分析物从样品中分离;以及

[0104] e. 通过用光源和光电检测器检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0105] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:

[0106] a. 使样品与包含报告物和报告抗体的报告缀合物接触,所述报告抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;

[0107] b. 使样品与包含磁性颗粒和捕获抗体的磁性缀合物接触,所述捕获抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;

[0108] c. 使感兴趣分析物与捕获抗体和报告抗体结合;

[0109] d. 通过向分析腔室施加磁场以将磁性缀合物和与所述磁性缀合物缔合的感兴趣分析物向下牵引,从而将感兴趣分析物从样品中分离;以及

[0110] e. 通过用光源和光电检测器检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0111] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:

[0112] a. 使样品与包含磁性颗粒和捕获抗体的磁性缀合物接触,所述捕获抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;

[0113] b. 使感兴趣分析物与捕获抗体结合;

[0114] c. 通过向分析腔室施加磁场以将磁性缀合物和与所述磁性缀合物缔合的感兴趣分析物向下牵引,从而将感兴趣分析物从样品中分离;

[0115] d. 使样品与包含报告物和报告抗体的报告缀合物接触,所述报告抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;

[0116] e. 使感兴趣分析物与报告抗体结合;

[0117] f. 通过向分析腔室施加磁场以将磁性缀合物和与所述磁性缀合物缔合的感兴趣分析物和报告缀合物向下牵引,从而将感兴趣分析物从样品中分离;以及

[0118] g. 通过用光源和光电检测器检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

[0119] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:

[0120] a. 使样品与包含磁性颗粒和捕获抗体的磁性缀合物接触,所述捕获抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;

- [0121] b.使感兴趣分析物与捕获抗体结合；
- [0122] c.使样品与报告物标记的分析物接触,所述报告物标记的分析物被配置为在样品中不存在感兴趣分析物的情况下结合磁性缀合物；
- [0123] d.通过向分析腔室施加磁场以将磁性缀合物和与所述磁性缀合物缔合的感兴趣分析物向下牵引,从而将感兴趣分析物从样品中分离;以及
- [0124] e.通过用光源和光电检测器检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。
- [0125] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:
- [0126] a.使样品与包含报告物和报告抗体的报告缀合物接触,所述报告抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;
- [0127] b.使感兴趣分析物与报告抗体结合;
- [0128] c.使样品与磁性颗粒标记的分析物接触,所述磁性颗粒标记的分析物被配置为在样品中不存在感兴趣分析物的情况下结合报告缀合物;
- [0129] d.通过向样品施加磁场将磁性颗粒标记的分析物从样品中分离;以及
- [0130] e.通过用光源和光电检测器检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。
- [0131] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:
- [0132] a.使样品与包含磁性颗粒和捕获抗体的磁性缀合物接触,所述捕获抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;
- [0133] b.使感兴趣分析物与捕获抗体结合;
- [0134] c.使样品与包含生物素标记的报告抗体接触,所述报告抗体被配置为结合样品中的感兴趣分析物;
- [0135] d.使样品与包含链霉抗生物素蛋白标记的报告物接触,所述链霉抗生物素蛋白标记被配置为结合生物素标记;
- [0136] e.通过向样品施加磁场将感兴趣分析物从样品中分离;以及
- [0137] f.通过检测报告物来检测感兴趣分析物的存在、不存在或水平。
- [0138] 在本文所述方法的一些实施方案中,磁性缀合物(包括捕获抗体)可以与报告物或报告缀合物同时添加。
- [0139] 在本文所述方法的一些实施方案中,磁性缀合物(包括捕获抗体)和报告物或报告缀合物可以分开添加。
- [0140] 在各种实施方案中,本发明的方法可包括将样品添加到分析腔室中的步骤。在一些实施方案中,将样品添加到分析腔室中可包括将样品递送至与分析腔室流体连通的样品收集器(例如,吸收剂和/或芯吸材料)。在一些实施方案中,样品收集器然后将样品进给到分析腔室中。
- [0141] 在一些实施方案中,可以将磁性缀合物、报告物和报告缀合物中的一者或多者置于样品收集器处,并且使样品与磁性缀合物、报告物或报告缀合物接触的步骤可以在样品收集器处发生。在一些实施方案中,在将样品添加到样品收集器中之前,可以将磁性缀合物、报告物和报告缀合物中的一者或多者嵌入样品收集器的一部分中。在一些实施方案中,本文所述的方法可包括使分析腔室中的样品与磁性缀合物、报告物和/或报告缀合物接触。

[0142] 在本文所述方法的一些实施方案中,报告物可以是荧光报告物、磷光报告物或比色报告物(诸如有色颗粒),所述报告物可被配置为测量光的吸收或散射(或者,例如通过比色分析测量某种颜色的存在/不存在)。

[0143] 在一些实施方案中,本文所述的方法还可包括以下步骤:在使样品与磁性缀合物接触之后,通过向分析腔室施加磁场来浓缩样品中的感兴趣分析物;然后减少分析腔室中样品的体积。在一些实施方案中,本文所述的方法还可包括在使样品与报告缀合物接触之前使磁场解除激活的步骤。

[0144] 在一些实施方案中,减少分析腔室中样品的体积可以通过例如对一部分体积进行虹吸或通过除去全部样品并以新的较小体积重悬来进行。

[0145] 在一些实施方案中,本文所述的方法还可包括以下步骤:在使样品与磁性缀合物接触之后,通过向分析腔室施加磁场来浓缩样品中的感兴趣分析物;从分析腔室中除去一定体积的样品;以及将一定体积的缓冲液和/或另外体积的样品添加到分析腔室中。在一些实施方案中,本文所述的方法可包括在使样品与报告缀合物接触之前使磁场解除激活的步骤。

[0146] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括将一定体积的缓冲液和/或另外体积的样品添加到分析腔室中的步骤。

[0147] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括以下步骤:在将磁性缀合物向下牵引(即施加磁场)之后以及在使样品与报告物或报告缀合物接触之前或之后,从分析腔室中除去一定体积的样品。

[0148] 在本文所述方法的一些实施方案中,报告抗体用生物素标记,并且报告物用链霉抗生物素蛋白功能化。在本文所述方法的一些实施方案中,报告抗体用链霉抗生物素蛋白功能化,并且报告物用生物素标记。

[0149] 在一些实施方案中,在本文所述的方法包括接触步骤(例如,使样品与磁性缀合物、报告抗体、报告物标记的缀合物和/或报告缀合物接触)的情况下,这种接触步骤可包括将样品(其可能含有分析物)与相应的磁性缀合物、报告抗体、报告物标记的缀合物和/或报告缀合物在选定的时间段内和选定的温度下孵育。

[0150] 在本文所述方法的一些实施方案中,感兴趣分析物可以是本文所述的任何感兴趣分析物。在一些实施方案中,感兴趣分析物可以选自由以下组成的组:人绒毛膜促性腺激素(hCG)、促黄体激素(LH)/黄体生成素、前列腺特异性抗原(PSA)、单纯疱疹病毒(HSV)抗体、雌酮-3-葡糖苷酸(E3G)、细菌、血红蛋白A1C、C反应蛋白、炎症生物标记物、肌钙蛋白、莱姆病抗原、莱姆病抗体、LDL生物标记物、HDL生物标记物、总胆固醇生物标记物、促甲状腺激素、丙型肝炎病毒生物标记物、鼻病毒生物标记物、流感病毒生物标记物、肝功能生物标记物、雌激素、孕酮、乳酸以及它们的组合。在一些实施方案中,细菌可以是A组链球菌、衣原体和/或淋病球菌。在一些实施方案中,炎症生物标记物可以是CRP、SAA和/或MP8。在一些实施方案中,肝功能生物标记物可以是ALT和/或AST。在一些实施方案中,感兴趣分析物可以选自由以下组成的组:排卵生物标记物、妊娠生物标记物、链球菌性喉炎生物标记物、前列腺癌生物标记物、疱疹生物标记物、糖尿病生物标记物、炎症生物标记物、心脏病发作生物标记物、衣原体生物标记物、细菌生物标记物、莱姆病生物标记物、胆固醇生物标记物、甲状腺机能减退生物标记物、丙型肝炎生物标记物、鼻病毒生物标记物、流感生物标记物、肝功能

生物标记物、生育生物标记物、肌肉疲劳生物标记物以及它们的组合。

[0151] 在一些实施方案中,排卵生物标记物可以源自基于尿液、血液或血清的样品。在一些实施方案中,妊娠生物标记物可以源自基于尿液或血液的样品。在一些实施方案中,链球菌性喉炎生物标记物可以源自基于唾液的样品。在一些实施方案中,前列腺癌生物标记物可以源自基于血液、血清或尿液的样品。在一些实施方案中,疱疹生物标记物可以源自源于血液或唾液的样品。

[0152] 在某些实施方案中,感兴趣分析物可以选自由以下组成的组:hCG、C反应蛋白、LH、PSA、HSV、E3G、细菌(例如A组链球菌)以及它们的组合。

[0153] 在本文所述方法的一些实施方案中,样品可以是如本文所述的体液。在一些实施方案中,本文所述的方法可包括从患者获得体液样品。

[0154] 在某些实施方案中,本文所述的方法涵盖夹心方法、单独添加方法、竞争方法和三级方法。

[0155] 例如,本文所述的夹心方法会非常适于以免疫测定形式处理小流体样品体积。本文所述的单独添加方法可使得能够以更高的灵敏度处理更大的流体体积。竞争性测定方法可用于以下情况的测定:使用者不能发现可同时结合分析物的捕获抗体和报告抗体,例如当分析物是小分子时。三级测定方法可以提供三个结合事件以增强系统的动力学。可以通过夹心方法、单独添加方法或竞争测定方法形式应用三级结合基序。

[0156] 在各种实施方案中,本文所述的免疫测定、方法和试剂盒允许对感兴趣分析物进行个人基线定线(base lining)。在此类实施方案中,本文所述的免疫测定、方法和试剂盒允许确定每个个体使用者的正常分析物范围。在一些实施方案中,如果存在与个体的个人正常分析物范围的任何偏差,则警告使用者。

[0157] 在各种实施方案中,可以检测的分析物(例如抗原)是生物事件的任何生物标记物。在一些实施方案中,生物事件可包括疾病事件(即疾病生物标记物)、炎症事件(即炎症生物标记物)、生殖事件(即生殖生物标记物)和/或老化事件(即老化生物标记物)。

[0158] 在各种实施方案中,本发明涉及使用本文所述的系统和方法检测生物事件的生物标记物。在各种实施方案中,提供了使用本文所述的系统和方法进行妊娠检测的方法。在各种实施方案中,提供了使用本文所述的系统和方法进行排卵检测的方法。在各种实施方案中,提供了使用本文所述的系统和方法进行前列腺健康检测的方法(例如,检测癌症的存在或发展癌症的可能性)。在各种实施方案中,提供了使用本文所述的系统和方法进行疱疹检测的方法。在各种实施方案中,提供了使用本文所述的系统和方法进行链球菌感染检测的方法。

[0159] 在各种实施方案中,本文所述的方法包括例如针对报告信号的各种检测技术。此类检测技术可涉及显微镜、分光光度计、荧光计、管发光计或板发光计、x射线胶片、磁场、闪烁体、荧光激活细胞分选(FACS)装置、微流体装置、基于珠粒的装置等。

[0160] 在一些实施方案中,磁性颗粒是顺磁性颗粒。在一些实施方案中,顺磁性颗粒是纳米颗粒或微粒。在一些实施方案中,顺磁性颗粒是珠粒,诸如纳米珠粒或微珠。在各种实施方案中,顺磁性颗粒是磁性纳米珠粒或微珠,其允许颗粒被磁体固持和/或操纵。在一些实施方案中,顺磁性颗粒是涂覆有薄(约2nm)石墨烯类碳层的金属纳米颗粒。在一些实施方案中,顺磁性颗粒是被涂覆的,例如涂覆有链霉抗生物素蛋白或PEG。可以使用的示例性磁性

颗粒是DYNABEAD (THERMOFISHER)、MACS珠粒 (MILTENYI BIOTEC)、TURBOBEADS (TURBOBEADS)、ABSOLUTE MAG STREPTAVIDIN MAGNETIC PARTICLES (CREATIVE DIAGNOSTICS) 和GOLD NANOPARTICLES (SIGMAALDRICH)。

[0161] 在一些实施方案中,本文所述的磁性颗粒可包括生物相容性涂层,所述生物相容性涂层可用胺基或羧基激活以促进酰胺偶联。在一些实施方案中,本文所述的磁性颗粒可以用胺基或羧基激活以促进酰胺偶联。

[0162] 在一些实施方案中,本文所述的报告颗粒可包括生物相容性涂层,所述生物相容性涂层可用胺基或羧基激活以促进酰胺偶联。在一些实施方案中,本文所述的报告颗粒可以用胺基或羧基激活以促进酰胺偶联。

[0163] 在一些实施方案中,本文所述的颗粒可以是微粒(例如微珠),其直径为约0.5微米至约500微米(例如约0.5微米、或约1微米、或约10微米、或约50微米、或约100微米或约250微米或约500微米)。

[0164] 在一些实施方案中,本文所述的颗粒可以是纳米颗粒(例如纳米珠粒),其直径小于1微米(例如约5至约500纳米,例如约5纳米、或约10纳米、或约50纳米、或约100纳米、或约250纳米、或约500纳米)。在一些实施方案中,纳米颗粒(例如纳米珠粒)的平均粒径为25-500nm+/-5nm、25-500nm+/-10nm、25-500nm+/-15nm、25-500nm+/-20nm、25-500nm+/-25nm、25-500nm+/-30nm、25-500nm+/-35nm、25-500nm+/-40nm、25-500nm+/-45nm或25-500nm+/-50nm。在一些实施方案中,纳米颗粒(例如纳米珠粒)的平均粒径为约20至约200nm。

[0165] 在一些实施方案中,微粒(例如微珠)的直径为约0.5微米至约500微米(例如约0.5微米、或约1微米、或约10微米、或约50微米、或约100微米或约250微米或约500微米)。

[0166] 在一些实施方案中,纳米颗粒(例如纳米珠粒)的直径小于1微米(例如约5至约500纳米,例如约5纳米、或约10纳米、或约50纳米、或约100纳米、或约250纳米、或约500纳米)。在一些实施方案中,纳米颗粒(例如纳米珠粒)的平均粒径为25-500nm+/-5nm、25-500nm+/-10nm、25-500nm+/-15nm、25-500nm+/-20nm、25-500nm+/-25nm、25-500nm+/-30nm、25-500nm+/-35nm、25-500nm+/-40nm、25-500nm+/-45nm或25-500nm+/-50nm。在一些实施方案中,纳米颗粒(例如纳米珠粒)的平均粒径为约20至约200nm。

[0167] 在一些实施方案中,磁性颗粒可以是磁性纳米颗粒(例如纳米珠粒),其由氧化物(诸如铁氧体、磁赤铁矿、磁铁矿或氧化铁)组成,任选地由表面活性剂、二氧化硅、硅氧烷或磷酸衍生物改性。在一些实施方案中,纳米颗粒(例如纳米珠粒)由具有壳(例如二氧化硅壳,任选地被改性)的铁氧体组成。在一些实施方案中,磁性纳米颗粒(例如纳米珠粒)是金属的(例如铁、钴等)。在一些实施方案中,磁性纳米颗粒(例如纳米珠粒)是具有壳(例如温和氧化、表面活性剂、聚合物和贵金属(例如金、石墨烯等))的金属。

[0168] 在一些实施方案中,本文所述的颗粒可以是包含一个或多个量子点的纳米颗粒(例如纳米珠粒)。在一些实施方案中,纳米颗粒包含金属芯和一个或多个量子点。在一些实施方案中,纳米颗粒包含可以镶嵌有一个或多个量子点的金属芯。在一些实施方案中,纳米颗粒包含可以镶嵌有多个量子点的金属芯。量子点是离散的纳米颗粒,它们的性质与体半导体类似,使得当暴露于电磁能时它们继而发出能量。通过改变尺寸和组成,量子点可被设计为对红外区域、可见光谱甚至紫外线范围内的能量敏感。此外,它们可被设计为光致发光的或光伏的,分别产生光或能量。



远离磁场进行,例如在与执行磁向下牵引步骤的腔室分开的腔室中进行。

[0175] 可根据本发明方法使用的免疫测定试剂盒

[0176] 在一些实施方案中,本发明包括试剂盒,所述试剂盒包括如本文所述的用于实践本文所述的一种或多种方法的免疫测定。

[0177] 在一些实施方案中,本发明提供了妊娠检测试剂盒,所述妊娠检测试剂盒包括本文所述的免疫测定,并涉及hCG(例如 $\beta$ -hCG)的检测。

[0178] 在一些实施方案中,本发明提供了排卵检测试剂盒,所述排卵检测试剂盒包括本文所述的免疫测定,并涉及LH的检测。

[0179] 在一些实施方案中,本发明提供了妊娠检测试剂盒,所述妊娠检测试剂盒包括本文所述的免疫测定,并涉及E3G的检测。

[0180] 在一些实施方案中,本发明提供了用于检测PSA的试剂盒,所述试剂盒包括本文所述的免疫测定。

[0181] 在一些实施方案中,本发明提供了用于检测针对HSV(例如HSV-1和/或HSV-2)的抗体的试剂盒,所述试剂盒包括本文所述的免疫测定。在一个实施方案中,相比HSV-1抗体,本文所述的试剂盒对HSV-2抗体具有特异性。

[0182] 在一些实施方案中,本发明提供了用于检测A组链球菌的试剂盒,所述试剂盒包括本文所述的免疫测定。

[0183] 在其他实施方案中,本发明提供了用于检测感染(例如淋病和衣原体感染)的试剂盒,所述试剂盒包括本文所述的免疫测定。

[0184] 在其他实施方案中,本发明提供了用于检测疾病或疾患(诸如但不限于炎症和糖尿病)的试剂盒,所述试剂盒包括本文所述的免疫测定。

[0185] 除非另外定义,否则在本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。本文提及的所有专利和出版物均以引用方式整体并入。

[0186] 定义

[0187] 如本文所用,“一个/种”或“该/所述”意指一个/种或多于一个/种。

[0188] 此外,当与引用数字指示结合使用时,术语“约”意指引用数字指示加上或减去该引用数字指示的最多10%。例如,语言“约50%”涵盖45%至55%的范围。

[0189] 如本文所用,在存在剂或刺激物的情况下,相对于不存在这种调节的情况如果活性和/或效果的读数减少了显著量,诸如减少了至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%或更多(最多至且包括至少约100%),则某物“降低”。如本领域普通技术人员将理解的,在一些实施方案中,活性降低并且一些下游读数将降低但是其他读数可以增加。

[0190] 相反地,在存在剂或刺激物的情况下,相对于不存在这种剂或刺激物的情况如果活性和/或效果的读数增加了显著量,例如增加了至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%或更多(最多至且包括至少约100%)、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约50倍、

至少约100倍,则活性“增加”。

[0191] 如本文所提及,除非另外指明,否则所有组成百分比均按组合物总体的重量计。如本文所用,词语“包括”及其变体旨在是非限制性的,使得对列表中的项目的叙述不排除可能也可用于此技术的组合物和方法中的其他类似项目。类似地,术语“可”和“可以”及其变体旨在是非限制性的,使得实施方案可或可以包括某些元素或特征的叙述不排除不包含那些元素或特征的本技术的其他实施方案。

[0192] 如本文所用,术语“样品”可以指可包含或不包含感兴趣分析物的溶液、悬浮液、混合物或未稀释量的体液。如本文所用,样品可包括水和/或缓冲液。在一些实施方案中,可添加本文所述的缓冲液以减少或消除钩状效应(hook effect),钩状效应在本领域的大多数免疫测定平台中存在。在一些实施方案中,“大体积”的样品可以是20 $\mu$ L或更大体积的样品或20 $\mu$ L至500 $\mu$ L的样品。在一些实施方案中,“小体积”的样品可以是小于20 $\mu$ L的样品或1 $\mu$ L至15 $\mu$ L的样品。

[0193] 如本文所用,术语“体液”可以指可从个体体内分离的任何流体,且包括但不限于全血、血浆、血清、胆汁、唾液、尿液、泪液、汗液、脑脊液(CSF)、精液、拭子样品(如面颊拭子、咽喉拭子等)、粘液、痰、经血、月经液、阴道粘液、羊水、滑液、母乳、耳垢、预射精液、恶露、发炎性分泌物(Rheum)、淋巴、脓等。在一些实施方案中,体液可以更具体地指全血、血清、尿液、唾液、拭子样品、粘液或精液。在某些实施方案中,体液可以更具体地指全血、血清、尿液或唾液。在一些实施方案中,体液可包括感兴趣分析物(例如生物标记物)。

[0194] 如本文所用,术语“感兴趣分析物”或“靶分析物”或“分析物”可以互换使用,并且指生物事件的抗原和/或生物标记物,包括本文所述的任何生物标记物。在一些实施方案中,生物事件可包括疾病事件(例如疾病生物标记物)、炎症事件(例如炎症生物标记物)、生殖事件(例如生殖生物标记物)和/或老化事件(例如老化生物标记物)。疾病生物标记物可包括与患者中疾病发作、疾病消退和/或疾病状态的存在相关或相关联的一种或多种疾病生物标记物。疾病生物标记物可包括病毒生物标记物、细菌生物标记物、癌症生物标记物或症状生物标记物中的一者或多者。病毒生物标记物可包括但不限于普通感冒(例如鼻病毒)、流感、疱疹、寨卡病毒(Zika)和/或HIV的生物标记物。在一些实施方案中,病毒生物标记物可包括单纯疱疹病毒(HSV)、一种或多种鼻病毒蛋白、一种或多种甲/乙/丙型流感蛋白、一种或多种HSF-1/2蛋白和/或一种或多种HIV病毒蛋白。细菌生物标记物可包括但不限于链球菌性喉炎的生物标记物(即A组链球菌(*Streptococcus-A*/Strep-A))、衣原体的生物标记物和/或淋病的生物标记物。在一些实施方案中,细菌生物标记物可包括但不限于一种或多种链球菌蛋白、一种或多种沙眼衣原体蛋白和/或一种或多种淋病奈瑟氏菌蛋白。症状生物标记物可包括但不限于咳嗽、喘息、流鼻涕、恶心、痉挛、胸闷、头晕、喉咙痛和/或胸痛。疾病生物标记物还可以包括但不限于心脏病和/或糖尿病的生物标记物。在一些实施方案中,疾病生物标记物可包括肌钙蛋白、CRP和/或ha1c。癌症生物标记物可包括前列腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、胃癌、GIST、白血病/淋巴瘤、肺癌、黑素瘤和/或胰腺癌的生物标记物。在一些实施方案中,前列腺癌生物标记物可包括PSA。在一些实施方案中,乳腺癌生物标记物可包括ER/PR和HER-2/neu中的一者或多者。在一些实施方案中,结肠直肠癌生物标记物可包括EGFR、KRAS和UGT1A1中的一者或多者。在一些实施方案中,胃癌生物标记物可包括HER-2/neu。在一些实施方案中,GIST生物标记物可包括c-KIT。在一些实施方案中,

白血病/淋巴瘤生物标记物可包括CD20抗原、CD30、FIP1L1-PDGRF $\alpha$ 、PDGFR、PML/RAR $\alpha$ 、TPMT和UGT1A1中的一者或多者。在一些实施方案中,肺癌生物标记物可包括ALK、EGFR和KRAS中的一者或多者。在一些实施方案中,黑素瘤生物标记物可包括BRAF。可包括抗炎生物标记物的炎性生物标记物可以包括美国专利申请公开No.2010/0275282中描述的一种或多种炎性生物标记物,所述专利申请的全部内容以引用方式并入本文。生殖生物标记物可包括排卵、受精、植入和/或胚胎发育的生物标记物。在一些实施方案中,生殖生物标记物可包括 $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -hCG或hCG)、高糖基化hCG、促黄体激素(LH)、雌酮-3-葡糖苷酸(E3G)、早孕因子(EPF)和/或预植入因子。老化生物标记物或年龄相关的生物标记物包括美国专利申请公开No.2008/0124752中描述的一种或多种生物标记物,所述专利申请的全部内容以引用方式并入本文。另外的感兴趣抗原/生物标记物包括但不限于与以下相关的任何已知抗原/生物标记物:SARS、手足口病、心脏病生物标记物、甲状腺激素、肥胖症生物标记物、与出血病症相关的生物标记物诸如(vWF、因子8、因子10)、第五病(fifths disease)、感冒、流感、埃博拉病毒、大肠杆菌、李斯特菌和沙门氏菌。

[0195] 如本文所用,术语“磁性颗粒”是指具有至少一些磁性特征(例如铁磁性、顺磁性和超顺磁性)的任何颗粒。术语“珠粒”和“颗粒”可互换使用。在一些实施方案中,磁性颗粒可包括磁性材料诸如铁、镍和钴,以及金属氧化物诸如Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、BaFe<sub>12</sub>O<sub>19</sub>、Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、CoO、NiO和CoMnP。在一些实施方案中,磁性颗粒包含聚合物磁性材料或完全由聚合物磁性材料组成。聚合物磁性材料包括例如其中磁性材料与聚合物材料混合的材料以及涂覆有聚合物材料的磁性材料。优选地,磁性材料仅是微粒的一种组分,微粒的其余部分由聚合物材料组成,磁性响应材料固定在所述聚合物材料上(参见下面的编码颗粒)。用于制备或组成磁性颗粒的示例性方法描述于例如美国专利No.6,773,812和6,280,618中,所述专利的全部内容以引用方式并入本文。在一些实施方案中,磁性颗粒可以是如本文所述的磁性纳米颗粒或磁性微粒。

[0196] 如本文所用,术语“捕获部分”可以指与或者可以与选择用于结合靶分析物的磁性颗粒缀合或结合的抗体、单链抗体、抗原结合抗体片段、抗原、受体、配体、适体、适体受体、核酸或小分子。在某些实施方案中,捕获部分是捕获抗体。

[0197] 如本文所用,术语“捕获抗体”可以指与或者可以与选择用于结合靶分析物的磁性颗粒缀合或结合的抗体。

[0198] 如本文所用,术语“报告结合部分”可以指与或者可以与选择用于结合靶分析物的报告物缀合或结合的抗体、单链抗体、抗原结合抗体片段、抗原、受体、配体、适体、适体受体、核酸或小分子。在某些实施方案中,报告结合部分是报告抗体。

[0199] 如本文所用,术语“报告抗体”可以指与或者可以与选择用于结合靶分析物的报告物缀合或结合的抗体。在一些实施方案中,“捕获抗体”和“报告抗体”可以结合靶分析物的不同部分。

[0200] 如本文所用,术语“报告物”和“标记”可互换使用,并且通常可以指信号产生化合物和/或可检测标记或芯(例如金属芯),其中一种或多种信号产生化合物和/或可检测标记连接至所述芯。在一些实施方案中,报告物可以是荧光报告物、磷光报告物或比色报告物(诸如有色颗粒),所述报告物用于测量光的吸收和/或散射(或者,例如通过比色分析测量某种颜色的存在/不存在)。在一些实施方案中,可以使用本领域已知的任何合适的可检测

标记。例如,可检测标记可以是放射性标记(诸如 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 和 $^{33}\text{P}$ )、酶标记(诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶等)、化学发光标记(诸如吖啶酯、硫酯或磺胺;鲁米诺、异鲁米诺、菲啶鎓酯等)、荧光标记(诸如荧光素(例如5-荧光素、6-羧基荧光素、3'-羧基荧光素、5(6)-羧基荧光素、6-六氯荧光素、6-四氯荧光素、异硫氰酸荧光素等))、罗丹明、藻胆蛋白、R-藻红蛋白、含量子或金属的(Mc)点(例如硫化锌加帽的硒化镉)、测温标记或免疫聚合酶链反应标记。在各种实施方案中,标记包括但不限于荧光团、发色团、放射性同位素、磁性颗粒、金颗粒、酶底物等。在一些实施方案中,标记是化学发光或荧光蛋白,诸如例如绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、海肾(Renilla Reniformis)绿色荧光蛋白、GFPmut2、GFPuv4、黄色荧光蛋白(YFP)、增强型黄色荧光蛋白(EYFP)、青色荧光蛋白(CFP)、增强型青色荧光蛋白(ECFP)、增强型蓝色荧光蛋白(EBFP)、来自香菇珊瑚(discosoma)的柠檬色和红色荧光蛋白(dsRED)、荧光素酶、伞形酮、罗丹明、荧光素、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯、藻红蛋白等。在一些实施方案中,标记是以下任何家族的非蛋白质有机荧光团:咕吨衍生物,诸如荧光素、罗丹明、俄勒冈绿(Oregon green)、伊红和德克萨斯红(Texas red);花菁衍生物,诸如花菁、吖啶菁、氧碳菁(oxacarboxyanine)、硫碳菁(thiacarboxyanine)和部花菁;方酸衍生物和环取代的方酸,包括Seta、SeTau和Square染料;蔡衍生物(丹磺酰和氟硅酸钠(prodan)衍生物);香豆素衍生物;噁二唑衍生物,诸如吡啶基噁唑、硝基苯并噁二唑和苯并噁二唑;葱衍生物,诸如葱醌,包括DRAQ5、DRAQ7和CyTRAK橙;茈衍生物,诸如级联蓝(cascade blue)等;噁嗪衍生物,诸如尼罗红(Nile red)、尼罗蓝(Nile blue)、甲酚紫、噁嗪170等;吖啶衍生物,诸如原黄素、吖啶橙、吖啶黄等;芳基次甲基衍生物,诸如金胺、结晶紫、孔雀石绿;以及四吡咯衍生物,诸如卟吩、酞菁、胆红素。在各种实施方案中,标记包括但不限于酶标记,例如诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶等的酶。在一些实施方案中,报告物可以是如本文所述的量子点。在一些实施方案中,报告物可包含如本文所述的量子点。在一些实施方案中,报告物可包括具有二氧化硅壳的金属芯(即金芯),其中二氧化硅壳浸渍有多个(例如100-600个)量子点。

[0201] 尽管作为诸如包括、含有或具有等术语的同义词的开放式术语“包含”在本文中用于描述并要求保护本发明,但是本发明或其实施方案可替代地使用替代性术语诸如“由...组成”或“大体上由...组成”来描述。

[0202] 如本文所用,词语“优选的”和“优选地”是指在某些情况下提供某些益处的技术的实施方案。然而,在相同或其他情况下,其他实施方案也可以是优选的。此外,对一个或多个优选实施方案的叙述并不意味着其他实施方案是无用的,并且不旨在将其他实施方案排除在该技术的范围之外。

[0203] 为避免疑义,本文预期的是结合本发明的特定方面、实施方案或实施例描述的特定特征(例如整数、特性、值、用途、疾病、配方、化合物或组)应理解为适用于本文所述的任何其他方面、实施方案或实施例,除非不相容。因此,这些特征可以在适当时结合本文定义的任何定义、权利要求或实施方案使用。本说明书中公开的所有特征(包括任何所附权利要求、摘要和附图)和/或所公开的任何方法或过程的所有步骤可以以任何组合进行组合,其中至少一些特征和/或步骤互相排斥的组合除外。本发明不限于任何公开的实施方案的任何细节。本发明扩展至本说明书(包括任何所附权利要求、摘要和附图)中公开的特征的任

何新颖特征或新颖组合,或扩展至所公开的任何方法或过程的步骤的任何新颖步骤或任何新颖组合。

[0204] 虽然本文示出并描述了本发明的优选实施方案,但是这些实施方案仅以举例的方式提供,并不旨在以其他方式限制本发明的范围。在实践本发明时可以采用本发明所述实施方案的各种替代方案。

[0205] 实施例

[0206] 现在参考以下实施例描述本文涵盖的实施方案。提供这些实施例仅为了说明的目的,并且决不应将本文涵盖的公开内容理解为限于这些实施例,相反,应理解为涵盖由于本文提供的教导而变得显而易见的任何及所有变型。

[0207] 报告物/抗体偶联程序

[0208] 开发了共价偶联程序以将抗体偶联至荧光标记的报告颗粒。除非另外指明,否则所述报告颗粒是金属芯量子点镶嵌颗粒(Nanocompsix),其具有羧基表面涂层。

[0209] 实验程序

[0210] 通过将小瓶在超声波仪中静置对含有储备报告颗粒的玻璃小瓶进行超声处理,持续10秒。使用设定为600的P1000混合报告颗粒,直至没有明显的沉淀物或沉降物。

[0211] 使用设定为600的P1000,将600 $\mu$ L储备报告物转移至1.5mL VWR离心管中。

[0212] 使用设定为10的P10,向3个1mg的1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)管中各添加10 $\mu$ L。将EDC管放入Ezee迷你离心机(Ezee Mini-Centrifuge)中。旋转5秒。从两个管中取出10 $\mu$ L并添加到第三个管中。用移液管充分混合。

[0213] 使用设定为28.8的P100,将28.8 $\mu$ L EDC溶液添加到600 $\mu$ L报告颗粒中。

[0214] 使用设定为20的P20,向3个2mg的N-羟基磺基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)管中各添加20 $\mu$ L。用移液管充分混合,直至看不到固体。从两个管中取出20 $\mu$ L并添加到第三个管中。用移液管充分混合。

[0215] 使用设定为57.6的P100,向600 $\mu$ L报告物中添加57.6 $\mu$ L EDC溶液。

[0216] 使用设定为200 $\mu$ L的P200移液管,混合报告颗粒-EDC-NHS混合物。

[0217] 将报告颗粒-EDC-NHS混合物放入浴超声波仪中并开启1分钟。

[0218] 将报告颗粒-EDC-NHS放在设定为40%速度的Rugged旋转器(Rugged Rotator)上并上下颠倒旋转15分钟。

[0219] 在1.5mL Eppendorf低蛋白吸附管(Eppendorf Protein Lo-bind tube)中,添加360 $\mu$ L 1mg/mL抗体。如果抗体高于1mg/mL,则使用磁珠偶联缓冲液(MB Coupling Buffer)(即PBS,0.01%Tween-20,pH 7.4)稀释至1mg/mL。

[0220] 将报告颗粒-EDC-NHS溶液在离心机中以3600rcf旋转5分钟。

[0221] 使用P200,小心地从管中除去上清液。确保不要干扰管底部的报告颗粒沉淀物。

[0222] 使用P1000,向报告颗粒沉淀物中添加600 $\mu$ L MD反应缓冲液。

[0223] 将报告颗粒管放入超声波仪中持续10秒。

[0224] 使用设定为600 $\mu$ L的P1000,充分混合并将600 $\mu$ L报告颗粒转移至含有抗体的管中。

[0225] 将报告颗粒-抗体溶液放在设定为40%速度的Rugged旋转器上并旋转1小时。

[0226] 通过使用设定为7至63 $\mu$ L无核酸酶水(如通过P100测量的)的P10添加7 $\mu$ L的储备羟胺溶液,制备1:10稀释羟胺溶液。

- [0227] 使用P100,向报告颗粒-抗体溶液中添加60 $\mu$ L 1:10稀释羟胺溶液。
- [0228] 将报告颗粒-抗体溶液放在设定为40%速度的Rugged旋转器上并旋转10分钟。
- [0229] 将报告颗粒-抗体溶液在离心机中以3600rcf旋转5分钟。
- [0230] 使用P200,小心地从管中除去上清液。确保不要干扰管底部的报告颗粒沉淀物。
- [0231] 使用P1000,向报告颗粒沉淀物中添加600 $\mu$ L磁珠储存缓冲液(MB Storage Buffer)。充分混合并超声处理10秒。
- [0232] 将报告颗粒-抗体溶液在离心机中以3600rcf旋转5分钟。
- [0233] 使用P200,小心地从管中除去上清液。确保不要干扰管底部的报告颗粒沉淀物。
- [0234] 使用P1000,向报告颗粒沉淀物中添加600 $\mu$ L磁珠储存缓冲液。充分混合并超声处理10秒。将报告颗粒-抗体溶液在离心机中以3600rcf旋转5分钟。
- [0235] 使用P200,小心地从管中除去上清液。确保不要干扰管底部的报告颗粒沉淀物。
- [0236] 使用P1000,向报告颗粒沉淀物中添加300 $\mu$ L磁珠储存缓冲液。充分混合并超声处理10秒。
- [0237] 通过适当设定尺寸的移液管向偶联的报告颗粒中添加一定体积的磁珠储存缓冲液(即PBS,0.01%Tween-20,0.05%叠氮化钠,pH 7.4),并确保偶联的报告颗粒为2.2摩尔颗粒/L。
- [0238] 将抗体偶联的报告颗粒在4 $^{\circ}$ C下储存长达一个月。
- [0239] 磁珠/抗体偶联程序
- [0240] 该程序描述了用于将抗体与磁性捕获颗粒(即磁珠)共价偶联的示例性方案。
- [0241] 该方案中使用的磁珠是具有超顺磁性Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>芯和生物相容性外部涂层的纳米颗粒。表面用羧基激活。
- [0242] 实验程序
- [0243] 蛋白质制备
- [0244] 使用7K Zeba脱盐柱,将感兴趣抗体的缓冲液更换为磁珠偶联缓冲液(即PBS,0.01%Tween-20,pH 7.4);如果抗体浓度大于1mg/mL,则在使用Zeba柱之前使用磁珠偶联缓冲液将抗体溶液稀释至1mg/mL。测量IgG浓度。
- [0245] 磁珠(Magbead)清洁和重悬
- [0246] 使用设定为175的P200,向0.5mL Eppendorf低蛋白吸附管中添加175 $\mu$ L Ocean Nanotech超羧基磁珠(Ocean Nanotech Super Carboxyl Magbead),添加两次,得到350 $\mu$ L。
- [0247] 将管放在Promega磁力架(Promega Magstand)上持续1分钟。
- [0248] 通过使用设定为200的P200两次,除去上清液(上清液可以是棕色的)。
- [0249] 使用设定为100的P200,添加100 $\mu$ L磁珠激活缓冲液(Magbead Activation Buffer),并通过轻轻移液来完全重悬(应看不到黑暗区域)。
- [0250] 将管放回Promega磁力架上持续1分钟。
- [0251] 通过使用设定为200的P200两次,除去上清液(上清液可以是棕色的)。
- [0252] 使用设定为100的P200,添加100 $\mu$ L磁珠激活缓冲液(即MES,0.01%Tween-20,pH 6.0),并通过轻轻移液来完全重悬(应看不到黑暗区域)。
- [0253] 将管放在管浮子上并超声处理1分钟。
- [0254] Magbead激活

- [0255] 使用设定为100的P100,将100 $\mu$ L无核酸酶的水添加到Pierce无重量1mg EDC管中(10mg/mL)。
- [0256] 涡旋30秒,并在管旋转器上旋转30秒。
- [0257] 使用设定为25的P100,将25 $\mu$ L悬浮的EDC添加到磁珠溶液中。
- [0258] 将200 $\mu$ L无核酸酶的水添加到ThermoFisher无重量2mg Sulfo-NHS管中,并充分混合以溶解固体(10mg/mL)。
- [0259] 使用设定为25的P100,将25 $\mu$ L悬浮的Sulfo-NHS添加到磁珠溶液中。
- [0260] 将管放在旋转器上并在室温下反应15分钟。
- [0261] 抗体缀合
- [0262] 使用设定为150的P200,将150 $\mu$ L激活的Magbead转移到新的Eppendorf低吸附管中。
- [0263] 将管放在Promega磁力架上持续30秒。
- [0264] 使用设定为200的P200,除去上清液。
- [0265] 从磁力架上取接管,并使用P200添加一定量的激活缓冲液。该量基于抗体浓度而变化,以确保批次间的最终孵育抗体浓度相同。
- [0266] 将管中途浸没在超声波仪中持续10秒以重悬。
- [0267] 使用P100,添加一定量的缓冲液更换的链球菌抗体,并使用设定为200的P200将管充分混合。该量基于抗体浓度而变化,以确保批次间的最终孵育抗体浓度相同。
- [0268] 在室温下在旋转器上反应2.5小时。在1:15时间点用P200移液管混合。
- [0269] 使用设定为50的P100,添加50 $\mu$ L磁珠猝灭缓冲液(Magbead Quenching Buffer)。
- [0270] 在室温下在旋转器上反应30分钟。
- [0271] 将管放在Promega磁力架上持续1分钟。
- [0272] 使用设定为200的P200,除去上清液。
- [0273] 从磁力架上取接管,并使用设定为200的P200添加200 $\mu$ L磁珠储存缓冲液(Magbead Storage Buffer)并轻轻移液以重悬。
- [0274] 将管放在Promega磁力架上持续1分钟。
- [0275] 使用设定为200的P200,除去上清液。
- [0276] 从磁力架上取接管,并使用设定为200的P200添加200 $\mu$ L磁珠储存缓冲液并轻轻移液以重悬。
- [0277] 将管放在Promega磁力架上持续1分钟。
- [0278] 使用设定为200的P200,除去上清液。
- [0279] 从磁力架上取接管,并使用设定为150的P200,通过移液两次添加300 $\mu$ L磁珠储存缓冲液,轻轻移液以重悬。
- [0280] 将管中途浸没在超声波仪中持续10秒以完全重悬。
- [0281] 将偶联的磁珠在4 $^{\circ}$ C下储存长达一个月。
- [0282] 磁珠/生物标记物偶联程序(雌酮-3-葡萄糖苷酸-磁珠)
- [0283] 该程序描述了用于将生物标记物(即雌酮-3-葡萄糖苷酸(E3G)与磁性捕获颗粒(即磁珠)共价偶联的示例性方案。
- [0284] 使用的磁珠是具有超顺磁性Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>芯和生物相容性外部涂层的纳米颗粒。表面用胺

基激活。

[0285] 磁珠清洁和重悬

[0286] 使用设定为300 $\mu$ L的P1000,将Ocean Nanotech超胺磁珠 (Ocean Nanotech Super Amine Magnetic Bead) 移液至0.5mL Eppendorf低蛋白吸附管中。

[0287] 将管放在Promega磁力架 (Promega Magstand) 上持续1分钟。

[0288] 通过使用设定为200的P200两次,除去上清液(上清液可以是棕色的)。

[0289] 使用设定为90的P100,添加90 $\mu$ L磁珠激活缓冲液(即MES,0.01% Tween-20, pH 6.0),并通过轻轻移液来完全重悬(应看不到黑暗区域)。

[0290] 将管放回Promega磁力架上持续1分钟。

[0291] 通过使用设定为100的P100一次,除去上清液(上清液可以是棕色的)。

[0292] 使用设定为90的P100,添加90 $\mu$ L磁珠激活缓冲液,并通过轻轻移液来完全重悬(应看不到黑暗区域)。

[0293] 将管放在管浮子上并超声处理1分钟。

[0294] 试剂混合

[0295] 使用设定为100的P100,将100 $\mu$ L无核酸酶的水添加到Pierce无重量1mg EDC管中。(10mg/mL)

[0296] 涡旋30秒,并在管旋转器上旋转30秒。

[0297] 使用设定为30的P100,将30 $\mu$ L悬浮的EDC添加到磁珠溶液中。

[0298] 将200 $\mu$ L无核酸酶的水添加到ThermoFisher无重量2mg Sulfo-NHS管中,并充分混合以溶解固体(10mg/mL)。

[0299] 使用设定为30的P100,将30 $\mu$ L悬浮的Sulfo-NHS添加到磁珠溶液中。

[0300] 使用设定为30的P100,添加30 $\mu$ L的1mg/mL E3G的无核酸酶水溶液。

[0301] 激活孵育

[0302] 将管放在旋转器上并在室温下反应15小时。

[0303] 磁珠清洁和最终悬浮

[0304] 将管放在Promega磁力架上持续1分钟。

[0305] 使用设定为200的P200两次,除去上清液。

[0306] 从磁力架上取尿管,并使用设定为200的P200添加200 $\mu$ L磁珠储存缓冲液(即PBS, 0.01% Tween-20, 0.05% 叠氮化钠, pH 7.4) 并轻轻移液以重悬。

[0307] 将管放在Promega磁力架上持续1分钟。

[0308] 使用设定为200的P200,除去上清液。

[0309] 从磁力架上取尿管,并使用设定为200的P200添加200 $\mu$ L磁珠储存缓冲液并轻轻移液以重悬。

[0310] 将管放在Promega磁力架上持续1分钟。

[0311] 使用设定为200的P200,除去上清液。

[0312] 从磁力架上取尿管,并使用设定为300的P1000添加300 $\mu$ L磁珠储存缓冲液,轻轻移液以重悬。

[0313] 将管中途浸没在超声波仪中持续10秒以完全重悬。

[0314] 在4 $^{\circ}$ C下储存长达一个月。

[0315] 实施例1-免疫测定夹心模式操作

[0316] 准备如本文所述的免疫测定用于夹心模式,这是用于处理小流体体积的理想设置。

[0317] 如图1A至图1D中所示,可以使用本文所述的免疫测定的夹心模式。如图中所示,可以使用包含报告物(具有浸渍有100-600个量子点的二氧化硅壳的金芯颗粒(nanoComposix))和抗体#1的报告缀合物以及包含抗体#2和磁性颗粒的磁性缀合物来检测分析腔室中的感兴趣hCG分析物(图1A)。

[0318] 在第一步中,可以将磁性缀合物和报告缀合物添加到测定腔室中并将它们与含有感兴趣分析物(hCG)的样品混合(图1B)。可以通过磁体施加磁场(“向下牵引”)以将感兴趣分析物从样品中分离(图1C)。然后,可使光透射通过分析腔室的一部分,以使报告物发荧光(图1D)。可以通过检测器检测这种荧光。

[0319] 在不存在分析物的情况下,报告物不会与分析物一起被向下牵引,因此将不会出现荧光。

[0320] 实施例2-免疫测定单独添加操作

[0321] 准备如本文所述的免疫测定用于单独添加模式,这是用于处理大体积样品并允许浓缩分析物的优选设置。这使得灵敏度大大提高。

[0322] 如图2A至图2F中所示,可以使用本文所述的免疫测定的单独添加模式。如图中所示,可以使用包含报告物(具有浸渍有100-600个量子点的二氧化硅壳的金芯颗粒(nanoComposix))和抗体#1的报告缀合物以及包含抗体#2和磁性颗粒的磁性缀合物来检测分析腔室中的感兴趣hCG分析物(图2A)。

[0323] 在第一步中,可以将磁性缀合物添加到测定腔室中并将其与含有感兴趣分析物(hCG)的样品混合(图2B)。可以执行向下牵引,并且任选地可以除去一定体积的样品,然后可以添加另外体积的样品(图2C)。在添加另外的样品之后,可以使磁场解除激活并且可以再次将磁性缀合物与样品混合。可以重复该过程以浓缩感兴趣分析物。在浓缩感兴趣分析物之后,可以添加报告缀合物并将其与样品混合以结合感兴趣分析物(图2D)。可以执行另外的向下牵引以将感兴趣分析物从样品中分离(图2E)。然后,可使光透射通过分析腔室的一部分,以使报告物发荧光(图2F)。可以通过检测器检测这种荧光。

[0324] 在不存在分析物的情况下,报告物不会与分析物一起被向下牵引,因此将不会出现荧光。

[0325] 实施例3-竞争性免疫测定操作-第一方法

[0326] 准备如本文所述的免疫测定用于竞争性模式,这是当感兴趣分析物太小而不能被两种抗体结合时优选的设置。当仅存在一种抗体来结合感兴趣分析物时,这也是优选的。

[0327] 如图3A至图3E中所示,可以使用本文所述的免疫测定的竞争性模式。如图中所示,可以使用报告物标记的分析物和包含抗体和磁性颗粒的磁性缀合物检测分析腔室中的感兴趣分析物(图3A)。

[0328] 在第一步中,可以将磁性缀合物添加到测定腔室中并将其与含有感兴趣分析物的样品混合(图3B)。然后可以添加报告物标记的分析物并将其与样品混合(图3C)。当存在感兴趣分析物时,报告物标记的分析物不与磁性缀合物结合。实际上,磁性缀合物抗体上的结合位点被来自样品的感兴趣分析物占据。然而,如果样品中不存在感兴趣分析物,则磁性缀

合物将与报告物标记的分析物结合(图3C)。执行向下牵引以将感兴趣分析物从样品中分离(图3D)。然后,可使光透射通过分析腔室的一部分,以使报告物发荧光(图3E)。可以通过检测器检测这种荧光。

[0329] 在不存在分析物的情况下,报告物标记的分析物将与磁性缀合物一起被向下牵引并将检测到荧光。

[0330] 实施例4-竞争性免疫测定操作-第二方法

[0331] 准备如本文所述的免疫测定用于替代性竞争性模式

[0332] 磁性颗粒可以和与其结合的感兴趣分析物一起使用。在这方面,在测定开始时磁性颗粒带有感兴趣分析物,而非如实施例3中那样报告物带有感兴趣分析物。报告缀合物包含抗体和报告物,所述报告物可用于在分析腔室中检测样品中的感兴趣分析物。

[0333] 在第一步中,将报告缀合物添加到分析腔室中并将其与含有感兴趣分析物的样品混合。将磁性颗粒和与所述磁性颗粒结合的分析物添加到分析腔室中并与样品混合。然后执行向下牵引以将磁性颗粒和与所述磁性颗粒结合的分析物从样品中分离。然后取出样品。然后可使光透射通过样品,以使报告物发荧光。可以通过检测器检测这种荧光。

[0334] 在不存在分析物的情况下,报告缀合物将被向下牵引并且不会在样品中存在,导致没有荧光。

[0335] 实施例5-三级免疫测定操作

[0336] 准备如本文所述的免疫测定用于三级模式,利用三个结合事件来增强系统的动力学。可以将三级结合基序应用于夹心模式(实施例1)、单独添加模式(实施例2)和竞争性测定模式(实施例3和4)。

[0337] 如图4A至图4G中所示,可以使用本文所述的免疫测定的三级模式。如图中所示,可以使用包含报告物(用链霉抗生物素蛋白功能化的荧光量子点)和抗体#1(用生物素标记)的报告缀合物以及包含抗体#2和磁性颗粒的磁性缀合物来检测分析腔室中的感兴趣hCG分析物(图4A)。

[0338] 在第一步中,可以将磁性缀合物添加到测定腔室中并将其与含有感兴趣分析物的样品混合(图4B)。可以通过磁体施加磁场(“向下牵引”)以将感兴趣分析物从样品中分离(图4C)。可以除去一定体积的样品并且可以如实施例2中所述执行分析物浓缩步骤。可以使磁场解除激活,并且可以将抗体#1添加到分析腔室中,所述抗体#1然后可以与感兴趣分析物结合,所述感兴趣分析物还与磁性缀合物结合(图4D)。然后可以将报告物添加到分析腔室中,所述报告物然后通过链霉抗生物素蛋白-生物素结合相互作用与抗体#1结合(图4E)。然后可以执行向下牵引以再次将分析物从样品中分离(图4F)。

[0339] 然后,可使光透射通过分析腔室的一部分,以使报告物发荧光(图4G)。可以通过检测器检测这种荧光。

[0340] 在不存在分析物的情况下,报告物不会与分析物一起被向下牵引,因此将不会出现荧光。

[0341] 实施例6-用于检测人绒毛膜促性腺激素的测定的示范

[0342] 提供了免疫测定以用于使用实施例15的方案检测尿液样品中的人绒毛膜促性腺激素(hCG)。如图5中所示,该测定表现出飞摩尔级灵敏度。

[0343] 实施例7-用于检测促黄体激素的测定的示范

[0344] 提供了免疫测定以检测尿液样品中的促黄体激素 (LH)。如图6中所示,该测定表现出飞摩尔级灵敏度。

[0345] 用于检测尿液中的LH的方案如下。

[0346] 该测定中的磁珠是涂覆有结合LH的抗体 (Medix 5304) 的磁性纳米颗粒。

[0347] 该测定中的报告物是荧光标记的纳米颗粒,所述纳米颗粒已经涂覆有结合LH的抗体 (Medix 5304)。

[0348] 所用设备

[0349] 使用以下设备。

	设备
	CPX2800 超声波数字台式清洁器 (CPX2800 Ultrasonic Digital Bench Top Cleaner)
	Rugged 旋转器: # 099A-RD4612
	SpectraMax i3x
[0350]	Pipetman P200 移液管
	Pipetman P100 移液管
	Pipetman P20 移液管
	Pipetman P10 移液管
	Promega 磁力分离架 (Promega Magnetic Separation stand) (0.5mL)
	Promega 磁力分离架(0.5mL)
	计时器

[0351] 实验程序

[0352] 在收集日之前(例如,在收集日之前约下午5点),根据以下公式在Chon Block中稀释磁珠和报告物,记录使用的确切体积:

[0353] • 报告物体积 (uL) =

$$Ceiling \left( \left( \frac{(\text{受试者数目}) \times (3\text{次重复}) \times (3\text{uL}/\text{重复样品}) + (36\text{uL}\text{校正})}{(51 \times \text{稀释系数})} \right) \times \right.$$

[0354]

$$\left. (1.2 \times \text{安全系数}) \right)$$

[0355] • ChonBlock体积 (uL) = (磁珠体积) × (51X稀释系数) - (磁珠体积)

[0356] • 磁珠体积 (uL) =

$$Ceiling \left( \left( \frac{(\text{受试者数目}) \times (3\text{次重复}) \times (3\text{uL}/\text{重复样品}) + (36\text{uL}\text{校正})}{(6 \times \text{稀释系数})} \right) \times \right.$$

[0357]

$$\left. (1.2 \times \text{安全系数}) \right)$$

[0358] • ChonBlock体积 (uL) = (磁珠体积) × (6X稀释系数) - (磁珠体积)

- [0359] 通过将管在超声波仪中保持10秒来对报告物进行超声处理。使用设定为100的P100,混合报告物。
- [0360] 使用适当设定尺寸的移液管将计算体积的Chon Block添加到0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中。
- [0361] 将计算体积的报告物添加到Chon Block中。上下移液以确保移液管中已清除报告物。
- [0362] 用适当设定尺寸的移液管将现在稀释的报告物混合。
- [0363] 通过将管在超声波仪中保持10秒来对磁珠进行超声处理。使用设定为100的P100,混合磁珠。
- [0364] 使用适当设定尺寸的移液管将计算体积的Chon Block添加到0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中。
- [0365] 将计算体积的磁珠添加到ChonBlock中。上下移液以确保移液管中已清除磁珠。
- [0366] 用适当设定尺寸的移液管将现在稀释的磁珠混合。
- [0367] 将稀释的试剂均在4℃下储存在金属支架中。试剂可以保存20小时。
- [0368] 在收集尿液样品的同时,使用设定为3μL的P10移液管将3μL磁珠分配到三个0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中,这些管预先标记有受试者数目、周期日期和重复数目(1、2、3)。
- [0369] 当样品到达时,将3μL尿液添加到第一重复管中。
- [0370] 紧接着,启动计时器,计几分钟。
- [0371] 30秒后,使用P10移液管将3μL报告物添加到第一重复管中。使用设定为3μL的P10混合。
- [0372] 当计时器达到1分钟时,使用P10移液管将3μL尿液添加到第二重复管中。使用设定为3μL的P10混合。
- [0373] 当计时器经过1:30秒时,使用P10移液管将3μL报告物添加到第二重复管中。使用设定为3μL的P10混合。
- [0374] 当计时器达到2分钟时,使用P10移液管将3μL尿液添加到第三重复管中。使用设定为3μL的P10混合。
- [0375] 当计时器经过2:30秒时,使用P10移液管将3μL报告物添加到第三重复管中。使用设定为3μL的P10混合。
- [0376] 在计时器上经过5分钟后,将第一重复管放在Promega磁力架上,并检查计时器,计1分钟。
- [0377] 在6分钟的时间点,将第二重复管放在第二Promega磁力架上。
- [0378] 在6:05,使用设定为20μL的P20移液管,从第一重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。
- [0379] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将100μL TBS添加到第一重复管中,然后通过过量移液除去100μL TBS。
- [0380] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100μL TBS添加到第一重复管中,然后通过过量移液除去100μL TBS。
- [0381] 从磁力架上取下Eppendorf管。
- [0382] 使用P20移液管添加20μL TBS,并通过上下移液充分混合。

- [0383] 在7分钟的时间点,将第三重复管放在第一Promega磁力架上。
- [0384] 在7:05,使用设定为20 $\mu$ L的P20移液管,从第二重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。
- [0385] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0386] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0387] 从磁力架上取下Eppendorf管。
- [0388] 使用P20移液管添加20 $\mu$ L TBS,并通过上下移液充分混合。
- [0389] 在8:05,使用设定为20 $\mu$ L的P20移液管,从第二重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。
- [0390] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0391] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0392] 从磁力架上取下Eppendorf管。
- [0393] 使用P20移液管添加20 $\mu$ L TBS,并通过上下移液充分混合。
- [0394] 将测定管储存在冷却器的金属支架中,以备后续分析。
- [0395] Spectra Max分析
- [0396] 使用P20移液管,将复制样品各20 $\mu$ L上样到384孔板上。
- [0397] 使用P10移液管,将20 $\mu$ L TBS上样到同一384孔板上的2个孔中。
- [0398] 将384孔板上样到SpectraMax中。
- [0399] 实施例8-用于检测前列腺特异性抗原的测定的示范
- [0400] 提供了免疫测定以检测血清/全血样品中的前列腺特异性抗原(PSA)。如图7中所示,该测定表现出飞摩尔级灵敏度。
- [0401] 用于检测全血和血清中的PSA的示例性方案如下。
- [0402] 该测定中的磁珠是涂覆有结合PSA的抗体(Medix Anti-h PSA 8311)的磁性纳米颗粒。制备磁珠溶液,将磁珠混合并超声处理10秒。200pM磁珠溶液包含2.5 $\mu$ L磁珠和22.5 $\mu$ L Chon Block。
- [0403] 该测定中的报告物是荧光标记的纳米颗粒,所述纳米颗粒已经涂覆有结合PSA的抗体(Medix Anti-h PSA 8301)
- [0404] PSA剥离抗体溶液
- [0405] PSA 8301抗体:储备5.3mg/mL (35.35 $\mu$ M)。对于6.66 $\mu$ M,混合5.65 $\mu$ L的储备8301抗体和24.35 $\mu$ L的Chon Block。对于660nM,添加10 $\mu$ L的6.66 $\mu$ M溶液和90 $\mu$ L的Chon Block。
- [0406] 对于血清剥离溶液,添加2 $\mu$ L的660nM溶液和98 $\mu$ L的Chon Block。
- [0407] 对于全血剥离溶液,添加10 $\mu$ L的660nM溶液和90 $\mu$ L的Chon Block。
- [0408] 血清制备
- [0409] 标准血清制备包括向80 $\mu$ L Chon Block中添加20 $\mu$ L血清。
- [0410] 通过将20 $\mu$ L血清添加到80 $\mu$ L血清剥离溶液中来制备PSA剥离的血清。

[0411] 全血准备

[0412] 标准全血制备包括混合76 $\mu$ L全血、19 $\mu$ L Chon Block和4.75 $\mu$ L10%Triton X-100。

[0413] 通过混合76 $\mu$ L全血、19 $\mu$ L全血剥离溶液和4.75 $\mu$ L 10%Triton X-100来制备PSA剥离的全血。

[0414] 孵育

[0415] 通过首先向100 $\mu$ L制备的血清中添加25 $\mu$ L磁珠和9 $\mu$ L报告物,然后将样品孵育30分钟来进行孵育。

[0416] 同样通过首先向100 $\mu$ L全血中添加25 $\mu$ L磁珠和9 $\mu$ L报告物,然后将样品孵育30分钟来进行孵育。

[0417] 孵育后向下牵引

[0418] 通过将孵育的溶液暴露于磁体5分钟来执行向下牵引。

[0419] 将向下牵引的结果用100 $\mu$ L PBS冲洗两次,同时仍然保持在磁体上并用27 $\mu$ L PBS重悬。

[0420] 然后通过荧光光谱法分析重悬的磁珠/报告物以检测全血和血清中的PSA。标准血清(或全血)与剥离的血清(或全血)之间的信号差异将给出PSA水平的量度,该量度消除个体血清的基质效应。

[0421] 实施例9-细菌免疫测定操作

[0422] 准备如本文所述的免疫测定用于检测样品中的细菌。

[0423] 如图8A至图8C中所示,可以使用本文所述的免疫测定的夹心模式检测样品中的细菌(例如A组链球菌)。如图中所示,可以使用包含报告物(具有浸渍有100-600个量子点的二氧化硅壳的金芯颗粒(nanoComposix))和抗体#1的报告缀合物以及包含抗体#2和磁性颗粒的磁性缀合物来检测分析腔室中的感兴趣细菌分析物(图8A)。

[0424] 在第一步中,可以将磁性缀合物和报告缀合物添加到测定腔室中并将它们与含有感兴趣分析物(细菌)的样品混合(图8B)。可以通过磁体施加磁场(“向下牵引”)以将感兴趣分析物从样品中分离(图8C)。然后,可使光透射通过分析腔室的一部分,以使报告物发荧光(图8D)。可以通过检测器检测这种荧光。

[0425] 在不存在分析物的情况下,报告物不会与分析物一起被向下牵引,因此将不会出现荧光。

[0426] 实施例10-检测A组链球菌细菌的细菌免疫测定的示范

[0427] 如实施例9提供细菌免疫测定,该细菌免疫测定用于检测样品中A组链球菌的存在,所述样品包括来自26名患有链球菌性喉炎的受试者以及15名怀疑未被A组链球菌感染的受试者的咽喉、面颊和唾液样品。如图9中所示,该测定表现出200生物体级灵敏度。

[0428] 此外,关于灵敏度,与Quidel临床等级试验92%的灵敏度和98%的特异性相比,本测定显示出93%ND的灵敏度和100%的特异性。

[0429] 用于检测链球菌的测定如下。

[0430] 该测定中的磁珠是涂覆有结合A组链球菌的抗体(Biospecific G47091041)的磁性纳米颗粒。通过向烧瓶中添加4 $\mu$ L磁珠(2.89nM)来制备300pM磁珠溶液,用磁体将其向下牵引,然后重悬于38.5 $\mu$ L Chon Block中

[0431] 在该测定中使用的报告物是荧光标记的纳米颗粒,所述纳米颗粒已经涂覆有结合

A组链球菌的抗体(Biospecific G47091041)。通过混合4.5 $\mu$ L报告物(2.2nM)和35.5 $\mu$ L Chon Block来制备250pM报告物溶液。

[0432] 储备封闭混合物制备

[0433] 将Biospecific G47091041 (1m/mL) 制备为6.67 $\mu$ M的储备溶液,并且在PBS中制备1 $\mu$ M、500nM和100nM的溶液。

[0434] 拭子处理

[0435] 在第一步中,擦拭受试者的扁桃体。然后将150 $\mu$ L PBS添加到可挤压管中。然后将拭子浸没在PBS溶液中。1分钟后,将拭子从管中间拉出并用手指夹住以从拭子中提取液体。

[0436] 通过混合16 $\mu$ L拭子处理的混合物和2 $\mu$ L Chon Block来制备链霉菌溶液。

[0437] 通过混合16 $\mu$ L拭子处理的混合物和2 $\mu$ L的500nM链球菌封闭混合物来制备封闭的链霉菌溶液。

[0438] 样品孵育

[0439] 链球菌孵育:将16 $\mu$ L链球菌溶液与3 $\mu$ L磁珠和3 $\mu$ L报告物混合。孵育进行10分钟。

[0440] 封闭孵育:将16 $\mu$ L封闭的链球菌溶液与3 $\mu$ L磁珠和3 $\mu$ L报告物混合。孵育进行10分钟。

[0441] 孵育后向下牵引

[0442] 然后在磁体上对孵育的溶液执行向下牵引,持续5分钟。将所得向下牵引物用100 $\mu$ L PBS冲洗两次,同时仍然保持在磁体上,然后用27 $\mu$ L PBS悬浮。

[0443] 然后通过荧光光谱法分析重悬的磁珠/报告物以检测样品中的A组链球菌。链球菌孵育管的信号与封闭的孵育管之间的信号差异将给出A组链球菌的量度,该量度消除不同个体拭子中的基质效应。

[0444] 实施例11-竞争性E3G检测测定的方法

[0445] 可以在通过本文所述的竞争性免疫测定进行分析的样品中检测E3G。

[0446] 可以使用E3G偶联磁珠和抗E3G偶联量子点(具有浸渍有100-600个量子点的二氧化硅壳的金芯颗粒(nanoComposix))。可以在分析腔室中使用缓冲液,所述缓冲液可包括chonblock和PBS。量子点工作溶液可包含1 $\mu$ L储备抗E3G量子点和6 $\mu$ L Chonblock。

[0447] 该方案可如下所示:

[0448] a. 将6.25 $\mu$ L尿液与1.25 $\mu$ L量子点工作溶液混合;

[0449] b. 孵育5分钟;

[0450] c. 添加5 $\mu$ L E3G偶联磁珠;

[0451] d. 孵育30分钟;

[0452] e. 放在磁力架上1分钟;

[0453] f. 除去上清液;

[0454] g. 用50 $\mu$ L PBS冲洗两次;

[0455] h. 重悬于27 $\mu$ L PBS中;并且

[0456] i. 移取20 $\mu$ L到孔板中。

[0457] 然后可以对移取的材料进行成像,如图10中所示,与空白相比,在两个样品中检测到44 $\mu$ M和200nM E3G。

[0458] 实施例12-测量所述免疫测定的测量值与在临床实验室中实现的测量值之间的相

### 关性的临床研究

[0459] 进行临床研究,测量实施例8中描述的本PSA检测免疫测定平台上的测量值与在临床实验室中实现的测量值之间的相关性,如图11中所示显示出非常高的相关性。

#### [0460] 实施例13-利用免疫测定技术进行的 $\beta$ -hCG检测的临床验证

[0461] 在该实施例中,描述了在 $\beta$ -hCG检测平台的临床验证中使用的方法和标准操作程序。

[0462] IRB批准启动了一项临床研究,该临床研究接受了近500次调查,共有76名受试者入组,其中15人妊娠。15名妊娠受试者中的13名使用以下冷冻样品方案收集尿液,而15名受试者中的2名使用新鲜方案收集样品。

[0463] 冷冻样品方案。向收集冷冻样品的受试者提供尿杯、标签、Ziploc袋和样品记录,以便他们可以收集每日样品。受试者每天早晨将尿液收集在尿杯中,记录排尿时间,给杯子贴上标签,装袋,然后立即放入冷冻机。受试者周期完成后(通过使用所提供的试验之一获得了阳性妊娠试验结果,或者获知了他们的周期),研究人员将从受试者家中收取样品,他们将检索样品并将样品运送到实验室中装满冰袋的冷却器中。立即将样品存放在实验室冷冻机中(详见材料和方法)。

[0464] 新鲜样品方案。向收集新鲜样品的受试者提供单个尿杯和小型保温瓶。受试者每天早晨收集尿液并将尿杯放入保温瓶中。然后,他们会向临床研究协调员发送短信,临床研究协调员会在尿液收集后2小时内将样品带回进行分析。

[0465] 样品试验范例。对样品进行试验以确定First Response产生阳性结果的第一天(即First Response在该日前一天尿液读数为阴性,但在该日当天尿液读数为阳性)。这一天被称为First Response日。然后在First Response日和至少三天前对免疫测定平台进行试验。另外,试验了两个基线日(参与者排卵之前的日子,确保她不能妊娠)。

[0466] 典型的试验看上去如图12中所示,其中第一行和第二行是重复样品。较暗的圆圈表示样品中的hCG浓度较高。正如预期的那样,基线日显示出非常低的信号,而First Response确定日之前的日子的强度增加。图12的图像在图13中进行量化和绘制,其中误差条代表1个标准偏差。

[0467] 性能比较。图14示出了阶梯曲线,该曲线显示了作为排卵(LH峰值日)后天数的函数的阳性分数,其中Confer Magneto是本文所述的免疫测定。

[0468] 基线比较。将分析的每日与排卵前收集尿液的日子(也称为基线日)的信号进行比较。这是因为每个人都有特征性的基线hCG量。通过计算获得的信号大于已经针对该受试者测量的最大基线信号的概率,对是/否妊娠做出确定。

[0469] 假设每日的信号由高斯概率描述,其中平均值等于每个相应日的测量信号和标准偏差估计值,以此来计算概率。基线日信号的概率 $P_{BL}(S)$ ,通过下式给出:

$$[0470] \quad P_{BL}(S) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{BL}} e^{-\frac{(S-\mu_{BL})^2}{2\sigma_{BL}^2}}$$

[0471] 所用数据为信号(S)、平均值( $\mu_{BL}$ )和标准偏差( $\sigma_{BL}$ )。所分析的当日信号的概率 $P_{CD}(S)$ 是:

$$[0472] \quad P_{CD}(S) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_{CD}}} e^{-\frac{(S-\mu_{CD})^2}{2\sigma_{CD}^2}}$$

[0473] 所用数据为信号(S)、平均值( $\mu_{CD}$ )和标准偏差( $\sigma_{CD}$ )。

[0474] 当日信号大于BL信号的概率是1减去当日信号小于或等于基线日信号的概率 $P_{CD \leq BL}$ ,其由下式给出:

$$[0475] \quad P_{CD \leq BL} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^S P_{BL}(S) P_{CD}(S') dS dS'$$

[0476] 这些积分是用数值估计的。如果任何两天之间的差异大于 $4(\sigma_{BL} + \sigma_{CD})$ ,则我们设 $P_{CD \leq BL} = 0$ 。

[0477]  $P_{CD \geq BL} = 1 - P_{CD \leq BL}$ ,因此如果任何两天之间的差异大于 $4(\sigma_{BL} + \sigma_{CD})$ ,则我们设 $P_{CD \leq BL} = 1$ (或100%)。为方便起见,这些数值用于确定此处重现的数字中的%确定性。

[0478] 图15中示出了妊娠数据的总结,示出了在First Response之前给定天数读数为阳性的样品的百分比。

[0479] 材料和方法。如实施例2中所述提供(图2A至图2F)。

[0480] hCG:2阶段结合方案-7分钟方案。

[0481] 缓冲液:

[0482] a. CD=缀合物稀释剂(0.1x PBS,0.5%BSA,0.05%叠氮化钠)

[0483] b. Chon Block是可商购获得的封闭溶液

[0484] 将抗体与量子点缀合:

[0485] 反应缓冲液:5mM磷酸钾,pH 7.4,0.5%20K MW PEG。

[0486] 程序:

[0487] a. 制备100mg/mL EDC和Sulfo-NHS溶液

[0488] i. 2mg sulfo-NHS+20uL H<sub>2</sub>O。

[0489] ii. 4.8mg EDC+48uL H<sub>2</sub>O。

[0490] b. 将0.8uL EDC和1.6uL sulfo-NHS添加至16.7uL量子点(具有浸渍有100-600个量子点的二氧化硅壳的金芯颗粒(nanoComposix))。

[0491] c. 旋转30分钟。

[0492] d. 以3600RCF离心5分钟。

[0493] e. 除去上清液并用16.7uL反应缓冲液重悬。

[0494] f. 超声处理10秒并涡旋至完全重悬。

[0495] g. 重悬于17uL的1.7mg/mL 4F9抗体中。

[0496] h. 孵育1小时。

[0497] i. 添加3.75uL羟胺,旋转10分钟。

[0498] j. 以3600RCF离心5分钟,除去上清液并用100uL反应缓冲液重悬。

[0499] k. 以3600RCF离心5分钟,除去上清液并用适当体积的缀合物稀释剂重悬。

[0500] 制备工作溶液:

[0501] 将以下物质在0.5mL Eppendorf低蛋白吸附管中混合(可通过在4°C下储存来保存溶液以备将来使用):

- [0502] a. 1.1 $\mu$ M 5011\_生物素抗体 (溶于缀合物稀释剂中)
- [0503] i. 10 $\mu$ l的缀合物稀释剂
- [0504] ii. 2 $\mu$ l的储备 (6.6 $\mu$ M) 5011\_生物素抗体
- [0505] b. 2.5x稀释的4F9\_量子点
- [0506] i. 3.75 $\mu$ L的Chon Block
- [0507] ii. 2.5 $\mu$ L的储备4F9\_量子点
- [0508] 磁珠制备:
- [0509] a. 将以下物质在0.5mL Eppendorf低蛋白吸附管中混合:
- [0510] i. 4.4 $\mu$ L 100nm储备链霉抗生物素蛋白磁珠。
- [0511] ii. 2.2 $\mu$ L的1.1 $\mu$ M 5011\_生物素抗体 (溶于缀合物稀释剂中)。
- [0512] b. 在室温下在旋转器上孵育5分钟。
- [0513] c. 添加4.14 $\mu$ L饱和生物素溶液。
- [0514] d. 用移液管充分混合。
- [0515] e. 再孵育1分钟。
- [0516] f. 将管放在磁力架上使其静置1分钟 (注意: 如果要为大量样品制备磁珠, 当总体积超过100 $\mu$ L时, 可以放大此做法, 需要增加在磁力架上的时间, 例如300 $\mu$ L体积将需要在磁力架上保持4分钟以完全恢复磁珠)。
- [0517] g. 使用P20移液管 (或在放大时将能除去体积的适当移液管) 除去上清液。
- [0518] h. 向沉淀物中添加20 $\mu$ L Chon Block并用移液管混合以重悬
- [0519] i. 将管放在磁力架上使其静置1分钟 (请参阅上面关于>100 $\mu$ l的体积的时间的说明)。
- [0520] j. 使用P20移液管 (或在放大时将能除去体积的适当移液管) 除去上清液。
- [0521] k. 向沉淀物中添加4.4 $\mu$ L Chon Block并用移液管混合以重悬。
- [0522] 该方法提供了4.4 $\mu$ L预制磁珠。
- [0523] 阶段1结合: 磁珠分析物结合
- [0524] a. 将以下物质在0.5mL Eppendorf低蛋白吸附管中混合:
- [0525] i. 4 $\mu$ L预制磁珠
- [0526] ii. 25 $\mu$ L尿液
- [0527] b. 在室温下在工作台上孵育1分钟。
- [0528] c. 将管放在磁力架上使其静置45秒。
- [0529] d. 使用P200移液管 (或在放大时将能除去体积的适当移液管) 除去上清液。
- [0530] e. 向沉淀物中添加4 $\mu$ L Chon Block并用移液管混合以重悬。
- [0531] 该方法提供了4 $\mu$ L阶段1结合混合物。
- [0532] 阶段2结合: 量子点结合
- [0533] a. 将以下物质在0.5mL Eppendorf低蛋白吸附管中混合:
- [0534] i. 4 $\mu$ L阶段1结合混合物
- [0535] ii. 1 $\mu$ L的2.5x稀释的4F9\_量子点
- [0536] b. 在室温下孵育5分钟。
- [0537] 该方法提供了5 $\mu$ L阶段2结合混合物。

- [0538] 向下牵引和冲洗
- [0539] a. 将含有5 $\mu$ L阶段2结合混合物的管放在磁力架上使其静置20秒
- [0540] b. 在其余5个步骤中将管保持在磁力架上
- [0541] i. 使用P20移液管 (或在放大时将能除去体积的适当移液管) 除去上清液。
- [0542] ii. 用P200移液管添加100 $\mu$ L的1xTBS缓冲液。
- [0543] iii. 用P200移液管除去100 $\mu$ L的TBS缓冲液。
- [0544] iv. 用P200移液管添加100 $\mu$ L的TBS缓冲液。
- [0545] v. 用P200移液管除去100 $\mu$ L的TBS缓冲液。
- [0546] c. 从磁力架上取下管。
- [0547] d. 向沉淀物中添加10 $\mu$ L缀合物稀释剂并用P20移液管混合以重悬。
- [0548] 该方法提供了10 $\mu$ L与磁性颗粒和荧光量子点两者结合的分析物, 准备成像。
- [0549] 实施例14-用于分析尿液样品以检测雌酮-3-葡糖苷酸的方案
- [0550] 以下呈现根据本文所述方法分析尿液样品以检测雌酮-3-葡糖苷酸 (E3G) 的示例性方案。
- [0551] 根据前述方案, 该测定中的磁珠是涂覆有E3G的磁性纳米颗粒。
- [0552] 该测定中的报告物是荧光标记的纳米颗粒, 所述纳米颗粒已经涂覆有结合E3G的抗体 (Absolute Antibody 4115)。
- [0553] 所用设备
- [0554] 使用以下设备。
- [0555]

CPX2800超声波数字台式清洁器
Rugged旋转器:#099A-RD4612
SpectraMax i3x
Pipetman P200移液管
Pipetman P100移液管
Pipetman P20移液管
Pipetman P10移液管
Promega磁力分离架 (0.5mL)
Promega磁力分离架 (0.5mL)
计时器

- [0556] 实验程序
- [0557] 在收集日之前 (例如, 在收集日之前约下午5点), 根据以下公式在Chon Block中稀释磁珠和报告物:

$$\begin{aligned}
 & \text{报告物体积}(\mu\text{L}) \\
 [0558] \quad & = \text{Ceiling} \left( \left( \frac{(\text{受试者数目}) \times (3\text{次重复}) \times (3\mu\text{L}/\text{重复样品}) + (54\mu\text{L}\text{校正})}{(50\text{X}\text{稀释系数})} \right) \right) \\
 & \quad \times (1.2\text{X}\text{安全系数})
 \end{aligned}$$

- [0559] ChonBlock体积 ( $\mu$ L) = (磁珠体积)  $\times$  (50X稀释系数) - (磁珠体积)

$$\begin{aligned}
 & \text{磁珠体积 (uL)} \\
 [0560] \quad & = \text{Ceiling} \left( \left( \frac{(\text{受试者数目}) \times (3 \text{次重复}) \times (3 \mu\text{L} / \text{重复样品}) + (54 \mu\text{L} \text{校正})}{(21.74 \times \text{稀释系数})} \right) \right) \\
 & \quad \times (1.2 \times \text{安全系数})
 \end{aligned}$$

[0561] ChonBlock体积 (uL) = (磁珠体积) × (21.74X稀释系数) - (磁珠体积)。

[0562] a. 通过将管在超声波仪中保持10秒来对报告物进行超声处理。使用设定为100的P100,混合报告物。

[0563] b. 使用适当设定尺寸的移液管,将一定体积的Chon Block添加到0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中。

[0564] c. 使用P10,向Chon Block中添加一定体积的E3G偶联磁珠。上下移液以确保移液管中已清除储备磁珠。

[0565] d. 用适当设定尺寸的移液管将现在稀释的E3G磁珠混合。

[0566] e. 通过将管在超声波仪中保持10秒来对E3G偶联磁珠进行超声处理。使用设定为100的P100,混合磁珠。

[0567] f. 使用适当设定尺寸的移液管,将一定体积的Chon Block添加到0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中。

[0568] g. 使用适当设定尺寸的移液管,向Chon Block中添加一定体积的E3G偶联磁珠。上下移液以确保移液管中已清除磁珠。

[0569] h. 用适当设定尺寸的移液管将现在稀释的E3G磁珠混合。

[0570] i. 将稀释的试剂均在4°C下储存在金属支架中。试剂将在20小时内使用。

[0571] 在收集尿液样品的同时,使用设定为3μL的P10移液管将3μL磁珠分配到三个0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中,这些管预先标记有受试者数目、周期日期和重复数目(1、2、3)。

[0572] 当样品到达时,将3μL尿液添加到第一重复管中。

[0573] 紧接着,启动计时器,计几分钟。

[0574] 30秒后,使用P10移液管将3μL报告物添加到第一重复管中。使用设定为3μL的P10混合。

[0575] 当计时器达到1分钟时,使用P10移液管将3μL尿液添加到第二重复管中。使用设定为3μL的P10混合。

[0576] 在计时器上经过1:30秒后,用P10移液管将3μL报告物添加到第二重复管中。使用设定为3μL的P10混合。

[0577] 当计时器达到2分钟时,使用P10移液管将3μL尿液添加到第三重复管中。使用设定为3μL的P10混合。

[0578] 在计时器上经过2:30秒后,用P10移液管将3μL报告物添加到第三重复管中。使用设定为3μL的P10混合。

[0579] 在计时器上经过5分钟后,将第一重复管放在Promega磁力架上,并检查计时器,计1分钟。

[0580] 在6分钟的时间点,将第二重复管放在第二Promega磁力架上。

[0581] 在6:10,使用设定为20μL的P20移液管,从第一重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。

- [0582] 在将管保持在磁力架上的同时,用P200移液管将100 $\mu$ L的Tris缓冲盐水(TBS)添加到第一重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L的TBS。
- [0583] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100 $\mu$ L TBS添加到第一重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0584] 从磁力架上取下Eppendorf管。
- [0585] 使用P20移液管添加20 $\mu$ L TBS,并通过上下移液充分混合。
- [0586] 在7分钟的时间点,将第三重复管放在第一Promega磁力架上。
- [0587] 在7:10,使用设定为20 $\mu$ L的P20移液管,从第二重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。
- [0588] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0589] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0590] 从磁力架上取下Eppendorf管。
- [0591] 使用P20移液管添加20 $\mu$ L TBS,并通过上下移液充分混合。
- [0592] 在8:10,使用设定为20 $\mu$ L的P20移液管,从第二重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。
- [0593] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0594] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0595] 从磁力架上取下Eppendorf管。
- [0596] 使用P20移液管添加20 $\mu$ L TBS,并通过上下移液充分混合。
- [0597] 储存测定管以备后续分析。
- [0598] Spectra Max分析
- [0599] 使用P20移液管,将样品各20 $\mu$ L上样到384孔板上。
- [0600] 使用P10移液管,将20 $\mu$ L TBS上样到同一384孔板上的2个孔中。
- [0601] 将384孔板上样到SpectraMax中并进行分析。
- [0602] 实施例15-用于分析尿液样品以检测人绒毛膜促性腺激素的方案以下呈现根据本文所述方法分析尿液样品以检测人绒毛膜促性腺激素(HCG)的示例性方案。
- [0603] 该测定中的磁珠是涂覆有结合HCG的抗体(Scripps GC099)的磁性纳米颗粒。
- [0604] 该测定中的报告物是荧光标记的纳米颗粒,所述纳米颗粒已经涂覆有结合HCG的抗体(Scripps GC099)。
- [0605] 所用设备
- [0606] 使用以下设备。

[0607]	超声波仪 EQP-00089	CPX2800 超声波数字台式清洁器
	旋转器 EQP-00099	Rugged 旋转器: # 099A-RD4612
	SpectraMax i3x EQP-00001	SpectraMax i3x
	P200 移液管	Pipetman 200uL FA10005M
	P100 移液管	Pipetman 100uL FA10004M
	P20 移液管	Pipetman 20uL FA10003M
	P10 移液管	Pipetman 10uL FA10002M
	Promega 磁力分离架(0.5mL)	Z5331
[0608]	Promega 磁力分离架(0.5mL)	
	计时器	
	计时器	
	Corning 384 孔黑色透明底聚 苯乙烯(Corning 384 well Black Clear bottom Polystyrene)	

[0609] 实验程序

[0610] 在测定之前,根据以下做法在Chon Block中稀释磁珠和报告物:

[0611] a. 通过将管在超声波仪中保持10秒来对报告物进行超声处理。使用设定为100的P100,混合报告物。

[0612] b. 使用设定为50 $\mu$ L的P200,将50 $\mu$ L Chon Block添加到0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中。

[0613] c. 将5 $\mu$ L磁珠添加到50 $\mu$ L Chon Block中。上下移液以确保移液管中已清除磁珠。

[0614] d. 用设定为150的P200将现在稀释的磁珠混合。

[0615] e. 通过将管在超声波仪中保持10秒来对磁珠进行超声处理。使用设定为100的P100,混合磁珠。

[0616] f. 使用P200,将59.4 $\mu$ L Chon Block添加到0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中。

[0617] g. 将6 $\mu$ L磁珠添加到59.4 $\mu$ L Chon Block中。上下移液以确保移液管中已清除磁珠。

[0618] h. 用设定为125的P200将现在稀释的磁珠混合。

[0619] i. 将稀释的试剂均在4 $^{\circ}$ C下储存在金属支架中。

[0620] 使用设定为16 $\mu$ L的P20移液管将16 $\mu$ L尿液添加到三个0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中,这些管预先标记有受试者数目、周期日期和重复数目(1、2、3)。

[0621] 当样品到达时,将2 $\mu$ L报告物添加到第一重复管中。

[0622] 紧接着,启动计时器,计几分钟。

[0623] 30秒后,使用P10移液管将2 $\mu$ L磁珠添加到第一重复管中。使用设定为16 $\mu$ L的P20混

合。

[0624] 当计时器达到1分钟时,使用P10移液管将2 $\mu$ L报告物添加到第二重复管中。使用设定为2 $\mu$ L的P10混合。

[0625] 当计时器经过1:30秒时,使用P10移液管将2 $\mu$ L磁珠添加到第二重复管中。使用设定为2 $\mu$ L的P10混合。

[0626] 当计时器达到2分钟时,使用P10移液管将2 $\mu$ L报告物添加到第三重复管中。使用设定为2 $\mu$ L的P10混合。

[0627] 当计时器经过2:30秒时,使用P10移液管将2 $\mu$ L磁珠添加到第三重复管中。使用设定为2 $\mu$ L的P10混合。

[0628] 在计时器上经过20分钟后,将第一重复管放在Promega磁力架上,并检查计时器,计1分钟。

[0629] 在21分钟的时间点,将第二重复管放在第二Promega磁力架上。

[0630] 在21:10,使用设定为20 $\mu$ L的P20移液管,从第一重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。

[0631] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将100 $\mu$ L TBS添加到第一重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。

[0632] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100 $\mu$ L TBS添加到第一重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。

[0633] 从磁力架上取下Eppendorf管。

[0634] 使用P20移液管添加20 $\mu$ L TBS,并通过上下移液充分混合。

[0635] 在22分钟的时间点,将第三重复管放在第一Promega磁力架上。

[0636] 在22:10,使用设定为20 $\mu$ L的P20移液管,从第二重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。

[0637] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。

[0638] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。

[0639] 从磁力架上取下Eppendorf管。

[0640] 使用P20移液管添加20 $\mu$ L TBS,并通过上下移液充分混合。

[0641] 在23:10,使用设定为20 $\mu$ L的P20移液管,从第二重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。

[0642] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。

[0643] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。

[0644] 从磁力架上取下Eppendorf管。

[0645] 使用P20移液管添加20 $\mu$ L TBS,并通过上下移液充分混合。

[0646] 储存测定管以备后续分析。

[0647] Spectramax分析

- [0648] 使用P20移液管,将样品各20 $\mu$ L上样到384孔板上。
- [0649] 使用P10移液管,将20 $\mu$ L TBS上样到同一384孔板上的2个孔中。
- [0650] 将384孔板上样到SpectraMax中并进行分析。
- [0651] 实施例16-用于分析尿液样品以检测促黄体激素的方案
- [0652] 以下呈现根据本文所述方法分析尿液样品以检测促黄体激素(LH)的示例性方案。
- [0653] 该测定中的磁珠是涂覆有结合LH的抗体(Medix 5304)的磁性纳米颗粒。
- [0654] 该测定中的报告物是荧光标记的纳米颗粒,所述纳米颗粒已经涂覆有结合LH的抗体(Medix 5304)。
- [0655] 所用设备
- [0656] 使用以下设备。

[0657]	超声波仪 EQP-00089	CPX2800 超声波数字台式清洁器
	旋转器 EQP-00099	Rugged 旋转器: #099A-RD4612
	SpectraMax i3x EQP-00001	SpectraMax i3x
	P200 移液管	Pipetman 200 $\mu$ L FA10005M
	P100 移液管	Pipetman 100 $\mu$ L FA10004M
	P20 移液管	Pipetman 20 $\mu$ L FA10003M
	P10 移液管	Pipetman 10 $\mu$ L FA10002M
	Promega 磁力分离架(0.5mL)	Z5331
	Promega 磁力分离架(0.5mL)	
	计时器	
[0658]	计时器	
	Corning 384 孔黑色透明底聚苯乙烯	

- [0659] 实验程序
- [0660] 在收集之前(例如,在收集前一天的约下午5点),根据以下做法在Chon Block中稀释磁珠和报告物:
- [0661] a. 通过将管在超声波仪中保持10秒来对报告物进行超声处理。使用设定为100的P100,混合报告物。
- [0662] b. 使用设定为150的P200,将150 $\mu$ L ChonBlock添加到0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中。
- [0663] c. 将3 $\mu$ L磁珠添加到150 $\mu$ L Chon Block中。上下移液以确保移液管中已清除报告物。
- [0664] d. 用设定为150的P200将现在稀释的磁珠混合。
- [0665] e. 通过将管在超声波仪中保持10秒来对磁珠进行超声处理。使用设定为100的P100,混合磁珠。

- [0666] f. 使用设定为125的P200,将125 $\mu$ L Chon Block添加到0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中。
- [0667] g. 将25 $\mu$ L磁珠添加到125 $\mu$ L Chon Block中。上下移液以确保移液管中已清除储备磁珠。
- [0668] h. 用设定为125的P200将现在稀释的磁珠混合。
- [0669] i. 将稀释的试剂均在4 $^{\circ}$ C下储存在金属支架中。
- [0670] 在收集尿液样品的同时,使用设定为3 $\mu$ L的P10移液管将3 $\mu$ L磁珠分配到三个0.5mL Eppendorf蛋白低吸附管中,这些管预先标记有受试者数目、周期日期和重复数目(1、2、3)。
- [0671] 当样品到达时,将3 $\mu$ L尿液添加到第一重复管中。
- [0672] 紧接着,启动计时器,计几分钟。
- [0673] 30秒后,使用P10移液管将3 $\mu$ L报告物添加到第一重复管中。使用设定为3 $\mu$ L的P10混合。
- [0674] 当计时器达到1分钟时,使用P10移液管将3 $\mu$ L尿液添加到第二重复管中。使用设定为3 $\mu$ L的P10混合。
- [0675] 在计时器上经过1:30秒后,用P10移液管将3 $\mu$ L报告物添加到第二重复管中。使用设定为3 $\mu$ L的P10混合。
- [0676] 当计时器达到2分钟时,使用P10移液管将3 $\mu$ L尿液添加到第三重复管中。使用设定为3 $\mu$ L的P10混合。
- [0677] 在计时器上经过2:30秒后,用P10移液管将3 $\mu$ L报告物添加到第三重复管中。使用设定为3 $\mu$ L的P10混合。
- [0678] 在计时器上经过5分钟后,将第一重复管放在Promega磁力架上,并检查计时器,计1分钟。
- [0679] 在6分钟的时间点,将第二重复管放在第二Promega磁力架上。
- [0680] 在6:10,使用设定为20 $\mu$ L的P20移液管,从第一重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。
- [0681] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将100 $\mu$ L TBS添加到第一重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0682] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100 $\mu$ L TBS添加到第一重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0683] 从磁力架上取下Eppendorf管。
- [0684] 使用P20移液管添加20 $\mu$ L TBS,并通过上下移液充分混合。
- [0685] 在7分钟的时间点,将第三重复管放在第一Promega磁力架上。
- [0686] 在7:10,使用设定为20 $\mu$ L的P20移液管,从第二重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。
- [0687] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0688] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0689] 从磁力架上取下Eppendorf管。

- [0690] 使用P20移液管添加20 $\mu$ L TBS,并通过上下移液充分混合。
- [0691] 在8:10,使用设定为20 $\mu$ L的P20移液管,从第二重复管中除去上清液,同时将管保持在磁力架上。
- [0692] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0693] 在将管保持在磁力架上的同时,使用P200移液管将另外100 $\mu$ L TBS添加到第二重复管中,然后通过过量移液除去100 $\mu$ L TBS。
- [0694] 从磁力架上取下Eppendorf管。
- [0695] 使用P20移液管添加20 $\mu$ L TBS,并通过上下移液充分混合。
- [0696] 储存测定管以备后续分析。
- [0697] Spectra Max分析
- [0698] 使用P20移液管,将样品各20 $\mu$ L上样到384孔板上。
- [0699] 使用P10移液管,将20 $\mu$ L TBS上样到同一384孔板上的2个孔中。
- [0700] 将384孔板上样到SpectraMax中并进行分析。
- [0701] 实施例17-用于分析血清样品以检测C反应蛋白的方案
- [0702] 以下呈现根据本文所述方法分析血清样品以检测C反应蛋白(CRP)的示例性方案。
- [0703] 该测定中的磁珠是涂覆有结合CRP的抗体(抗CRP-C2)的磁性纳米颗粒。
- [0704] 该测定中的报告物是荧光标记的纳米颗粒,所述纳米颗粒已经涂覆有抗体(抗CRP-C6)。
- [0705] 实验程序
- [0706] 链霉抗生物素蛋白磁珠与生物素化的抗CRP-C2抗体的预孵育:
- [0707] a.如上所述在旋转器上将磁珠与在缀合物稀释剂中稀释至1 $\mu$ M的抗体混合5分钟。
- [0708] b.添加饱和生物素溶液并将该组合孵育1分钟。
- [0709] c.放在磁体上并向下牵引,然后用Chon Block洗涤。
- [0710] d.再次向下牵引,然后将磁珠重悬于Chon Block中。
- [0711] 报告物制备
- [0712] 用于该测定的报告物溶液的浓度为440pM,该溶液是从2.2nM的储备溶液用Chon Block稀释而来。
- [0713] 血清制备
- [0714] 通过以下方式制备血清:向下牵引20 $\mu$ L上述磁珠,然后重悬于10 $\mu$ L血清中,接着孵育10分钟。
- [0715] 进行另一次向下牵引30秒,然后将上清液转移至新管中。
- [0716] CRP稀释液
- [0717] 从21.28mg/mL的CRP储备溶液制备浓度为2.5mg/L、1.25mg/L和0.5mg/mL的CRP在Chon Block中的稀释液。
- [0718] 加标血清样品的制备
- [0719] 根据以下加入标准血清样品以制备加标样品:
- [0720] a.10mg/L:8 $\mu$ L 2.5mg/L CRP稀释液+2 $\mu$ L标准血清(最终2mg/L);
- [0721] b.5mg/L:8 $\mu$ L 1.25mg/L CRP稀释液+2 $\mu$ L标准血清(最终1mg/L);

[0722] c. 2mg/L:8 $\mu$ L 0.5mg/L CRP稀释液+2 $\mu$ L标准血清(最终0.4mg/L);以及

[0723] d. 0mg/L:8 $\mu$ L Chon Block+2 $\mu$ L标准血清(最终0mg/L)。

[0724] 分析方案

[0725] 在一组四个管中,添加上述加标标准血清样品。然后,将3 $\mu$ L磁珠预先分配到每个管中。在磁珠之后,将3 $\mu$ L待分析样品添加到每个管中。约30秒后,添加3 $\mu$ L报告物,然后孵育约30分钟。

[0726] 孵育一段时间后,在磁力架上对样品管执行向下牵引,用100 $\mu$ L冲洗两次,然后重悬于最终体积为20 $\mu$ L的TBS中。

[0727] 该测定的结果显示在图17A和图17B中,这些图示出了缓冲溶液中的CRP浓度系列(图17A)和加标血清中的CRP浓度(图17B)。

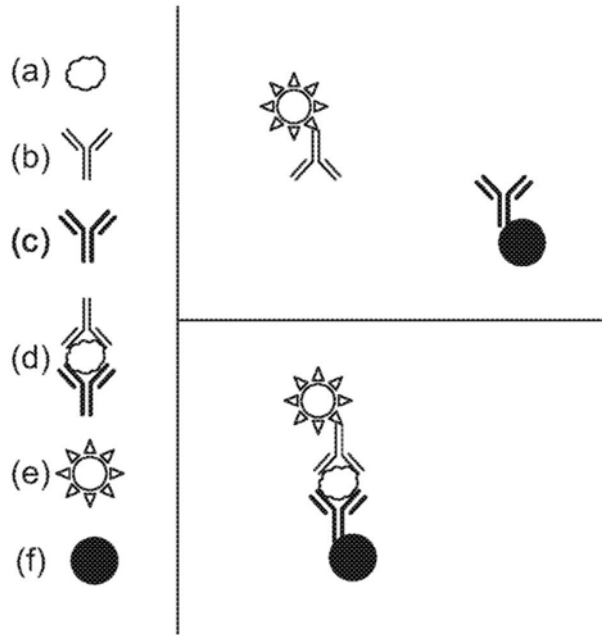


图1A

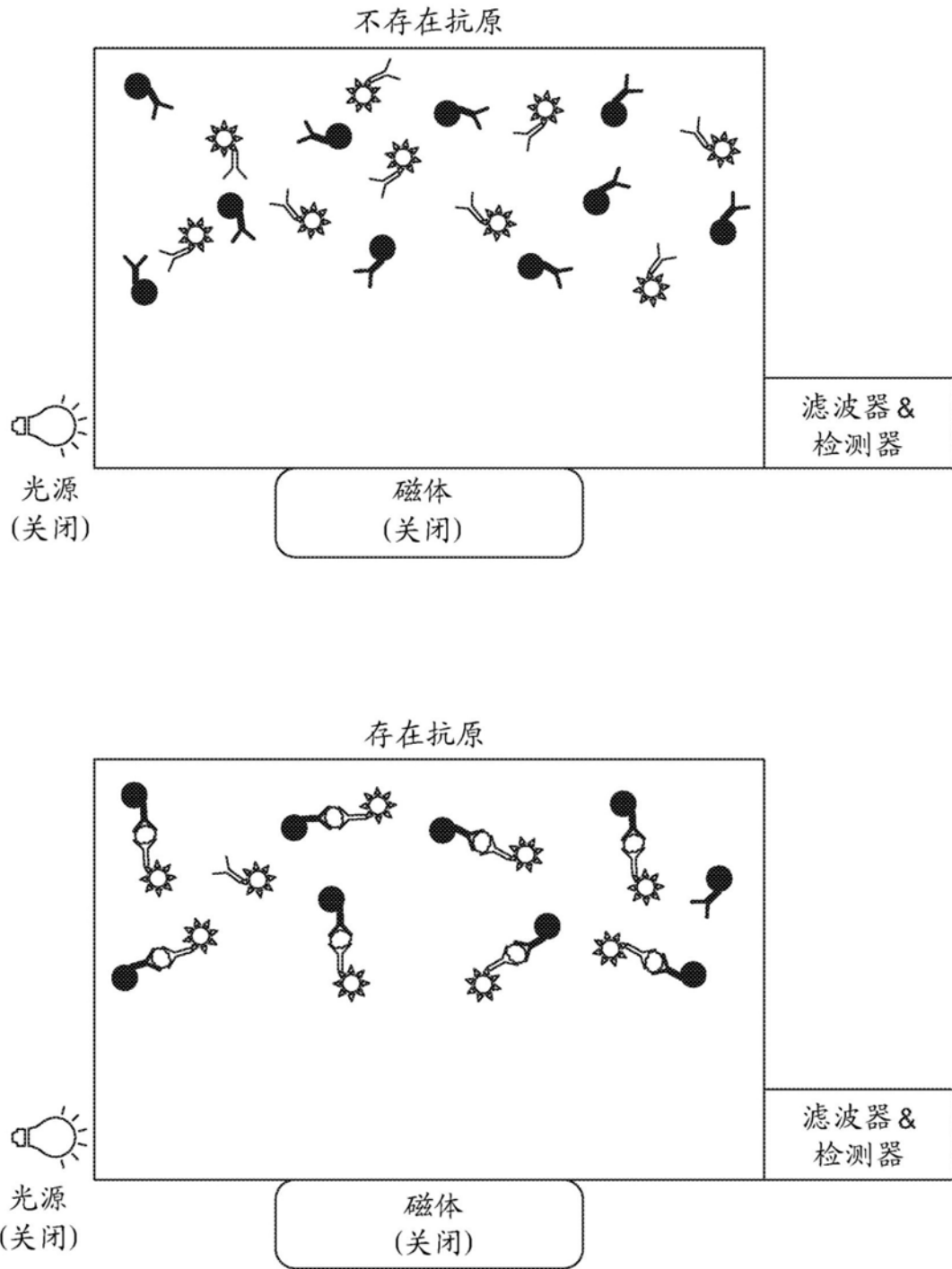


图1B

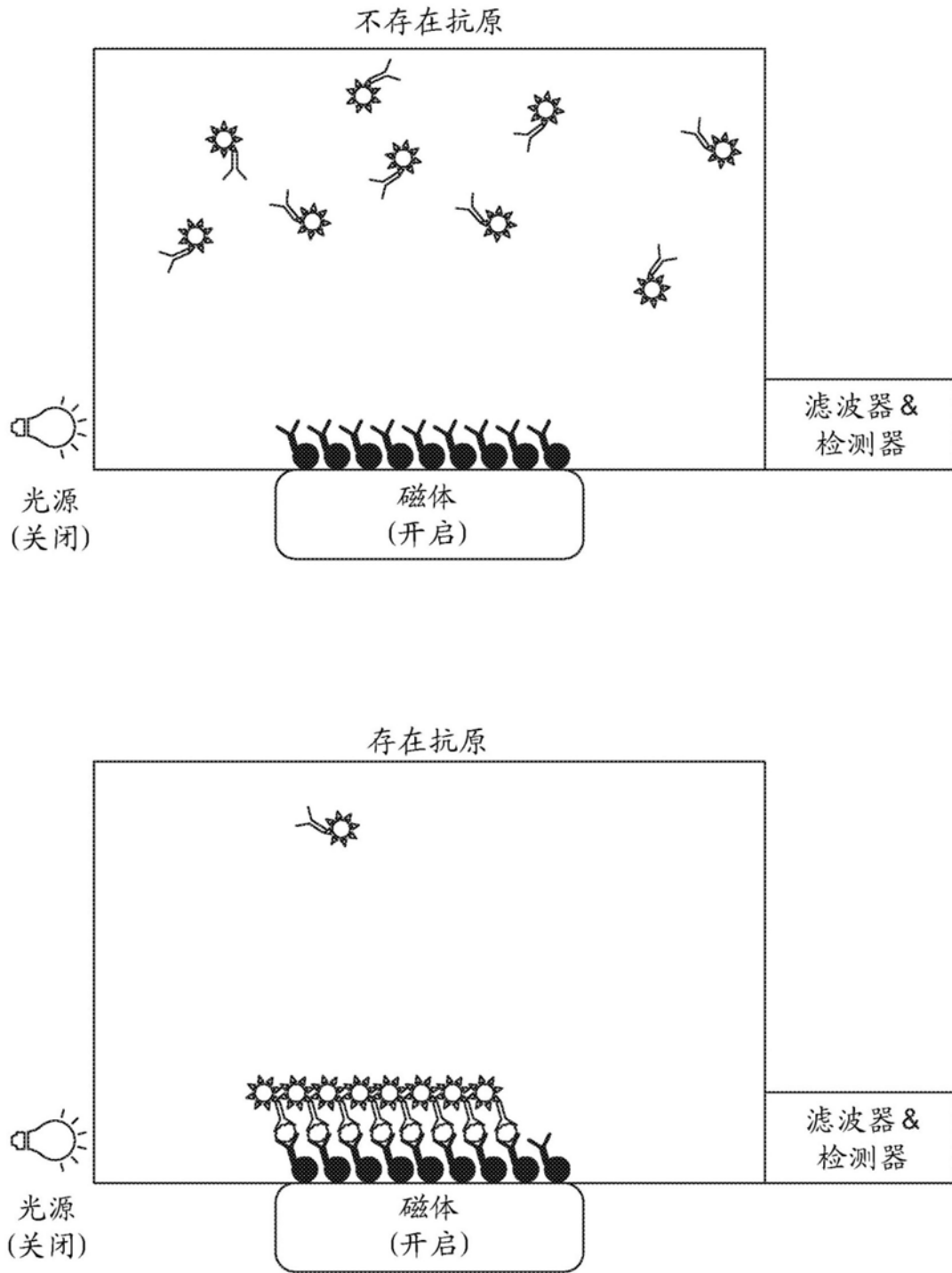


图1C

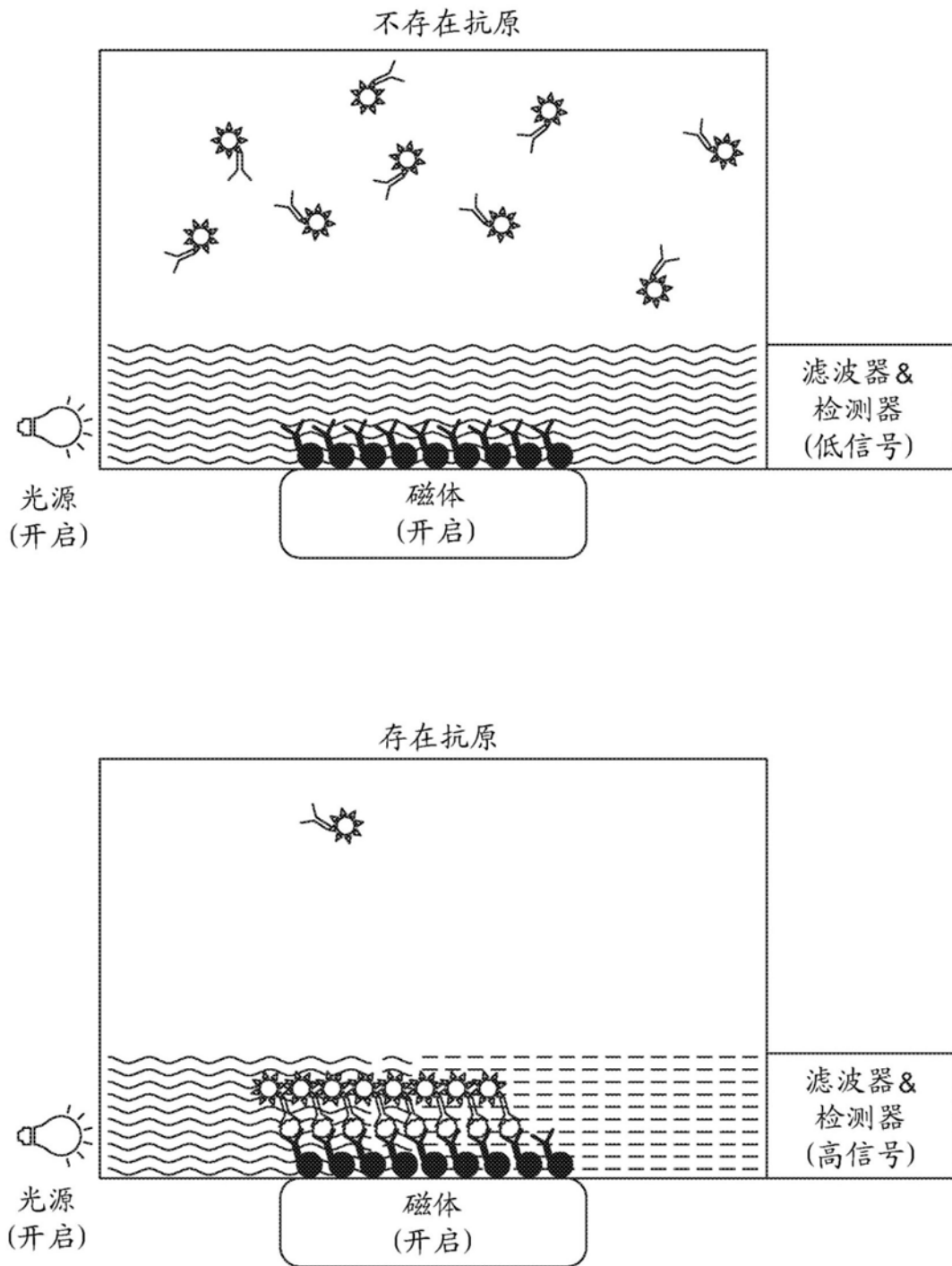


图1D

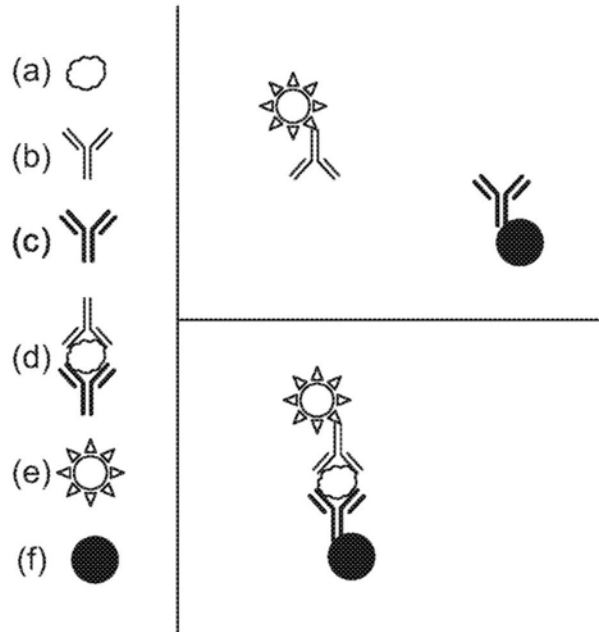


图2A

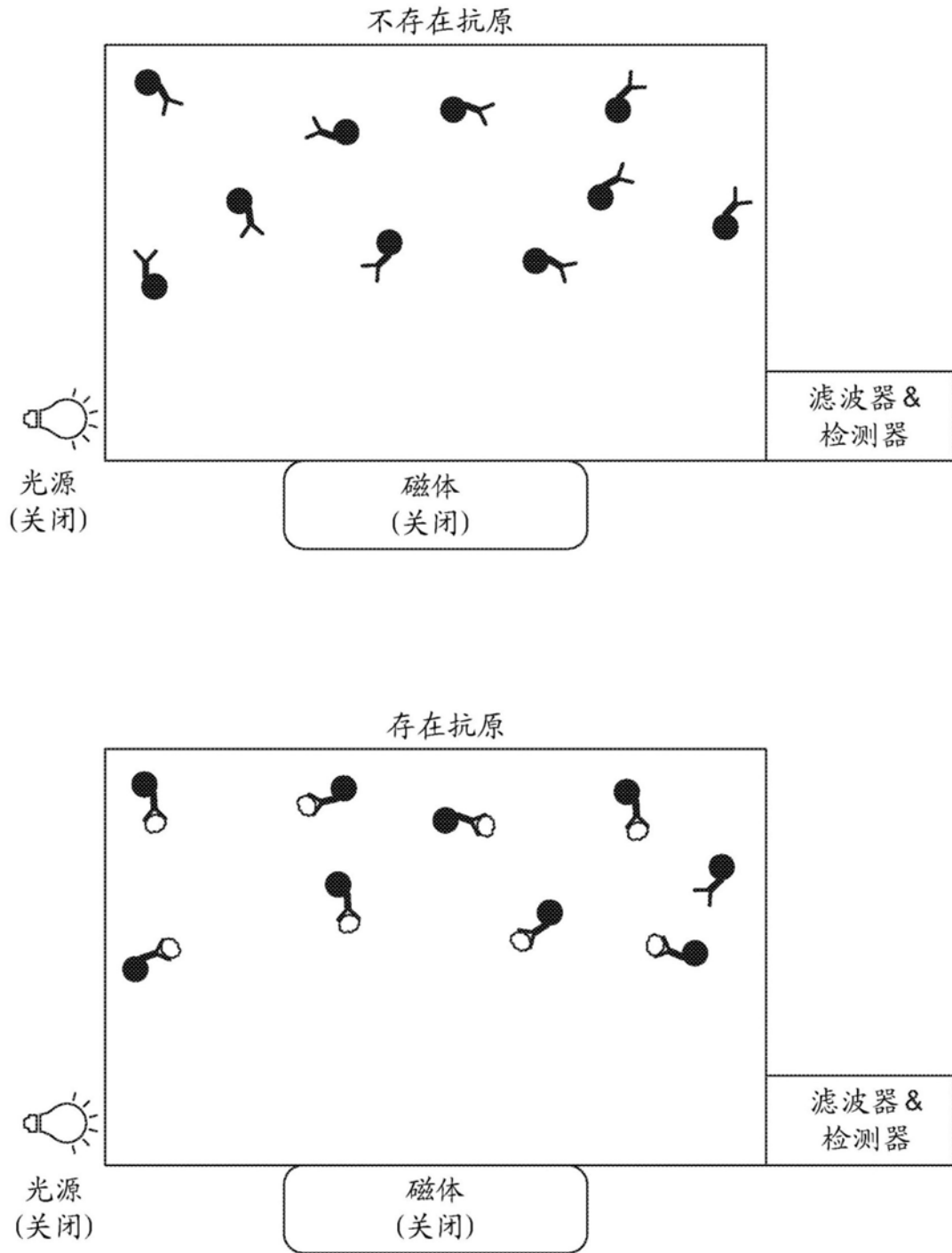


图2B

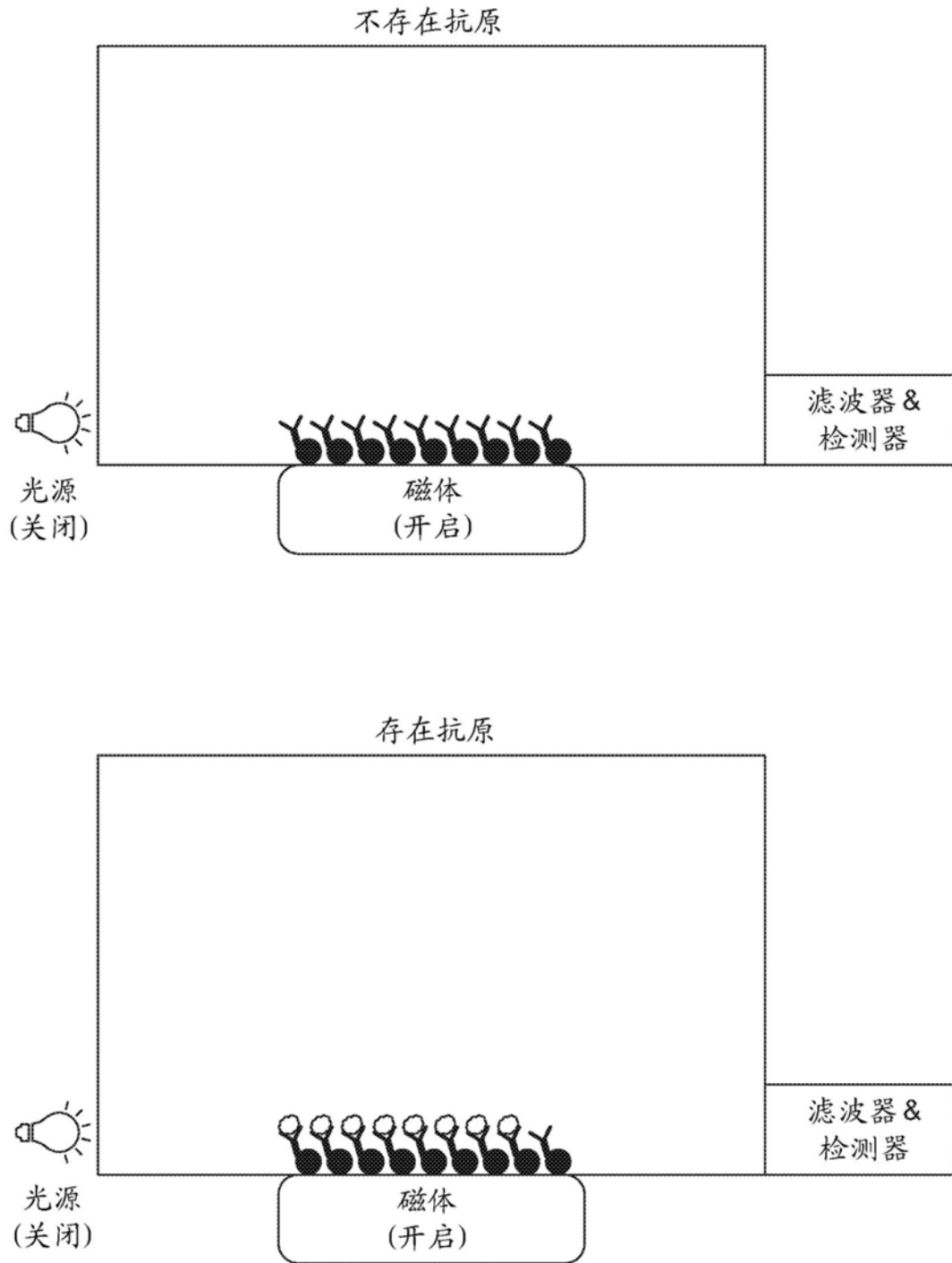


图2C

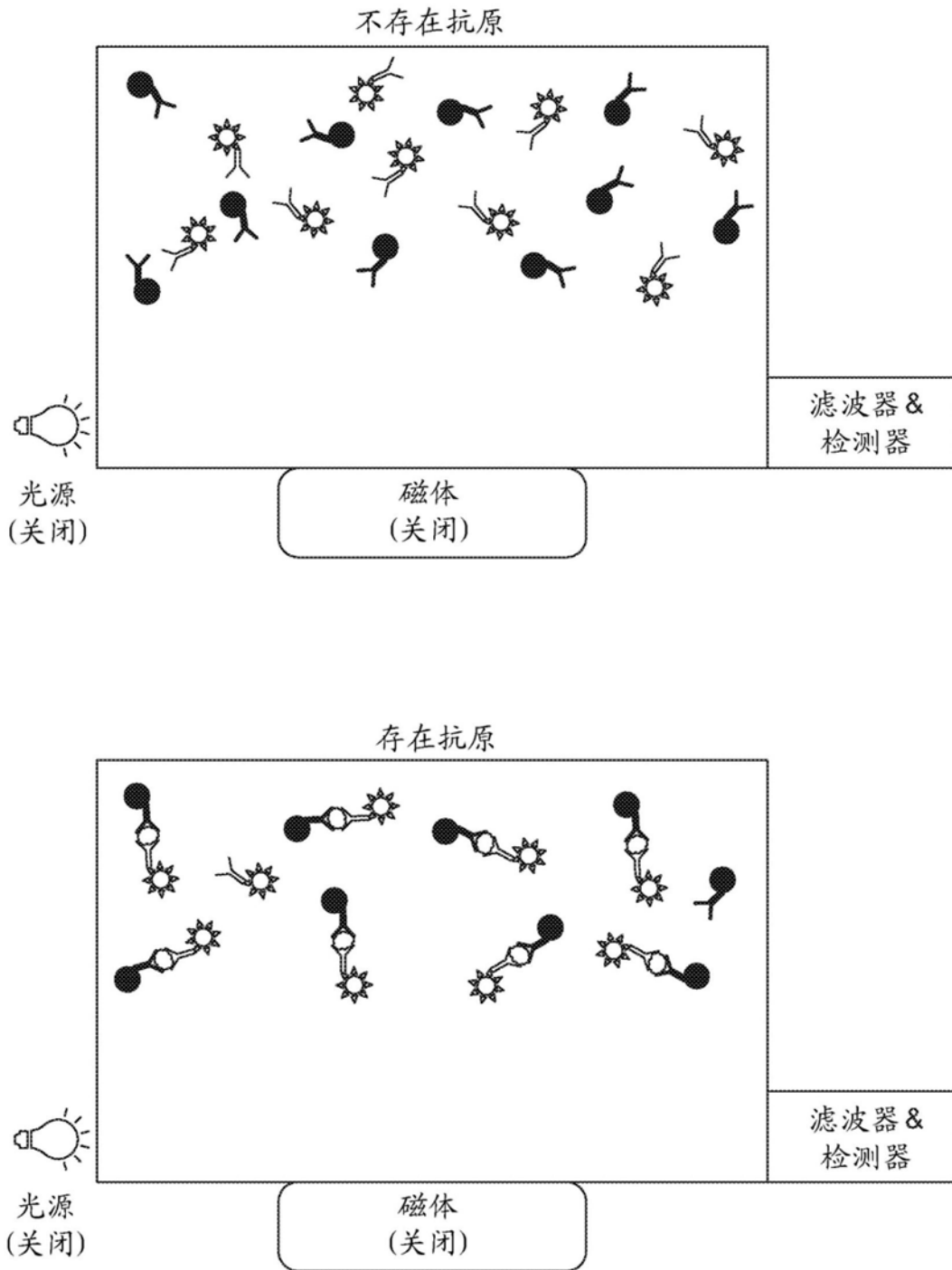


图2D

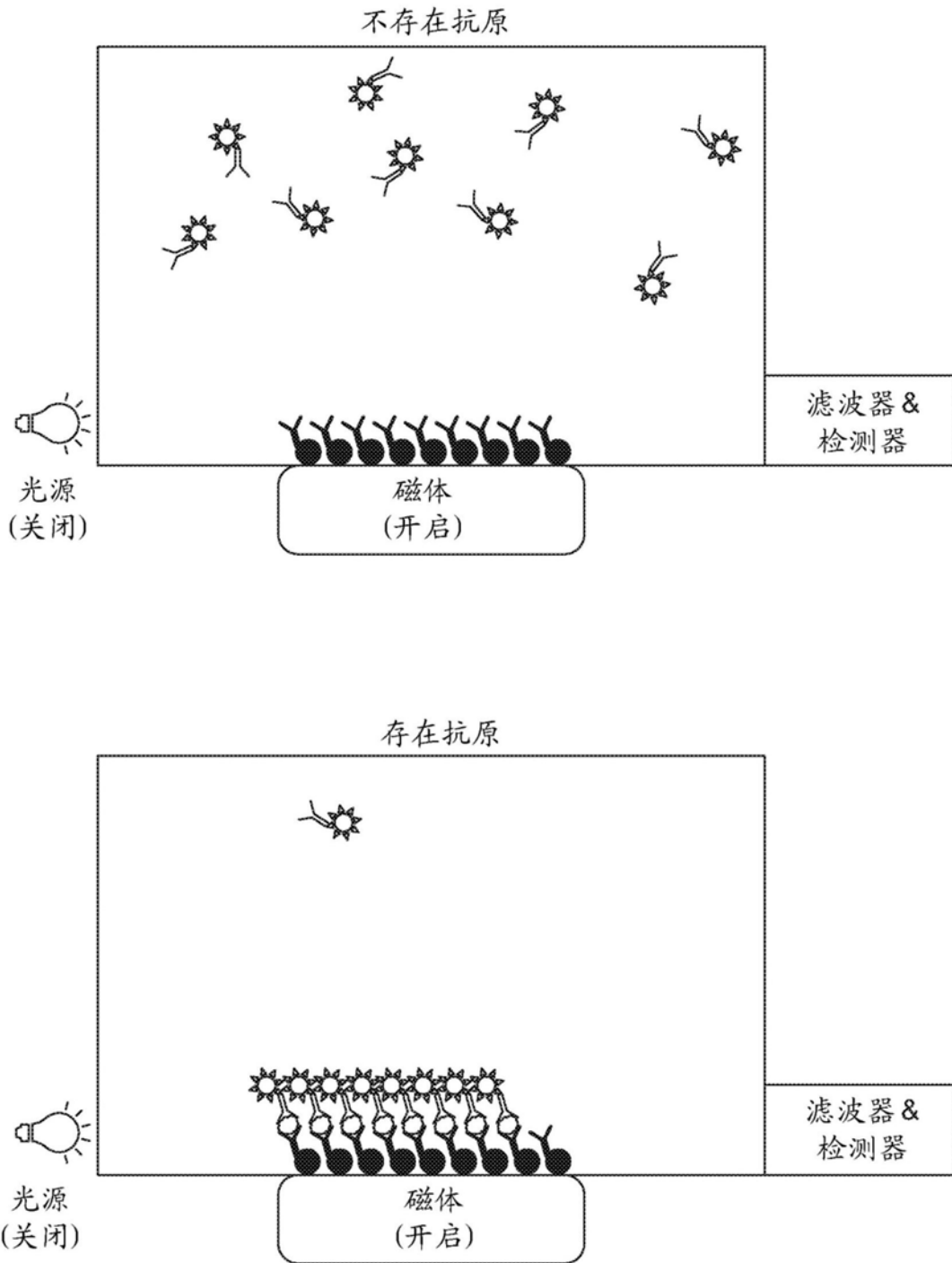


图2E

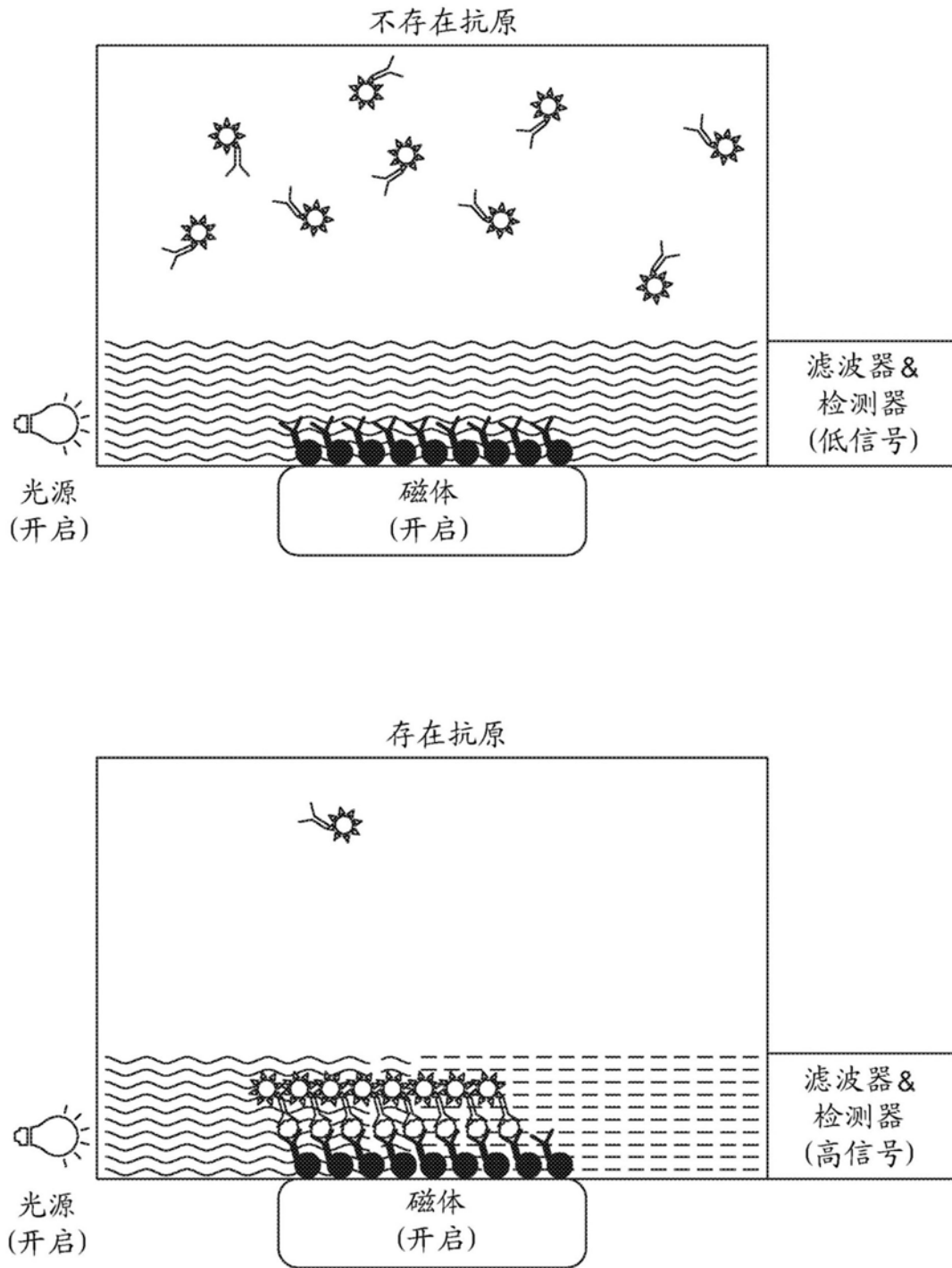


图2F

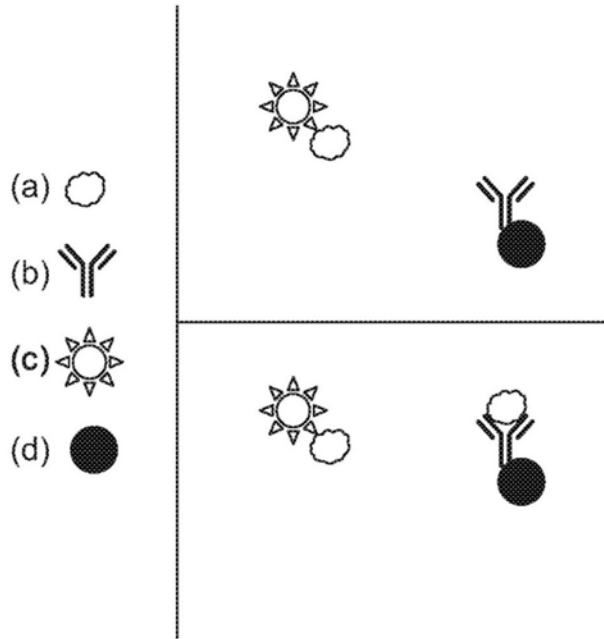


图3A

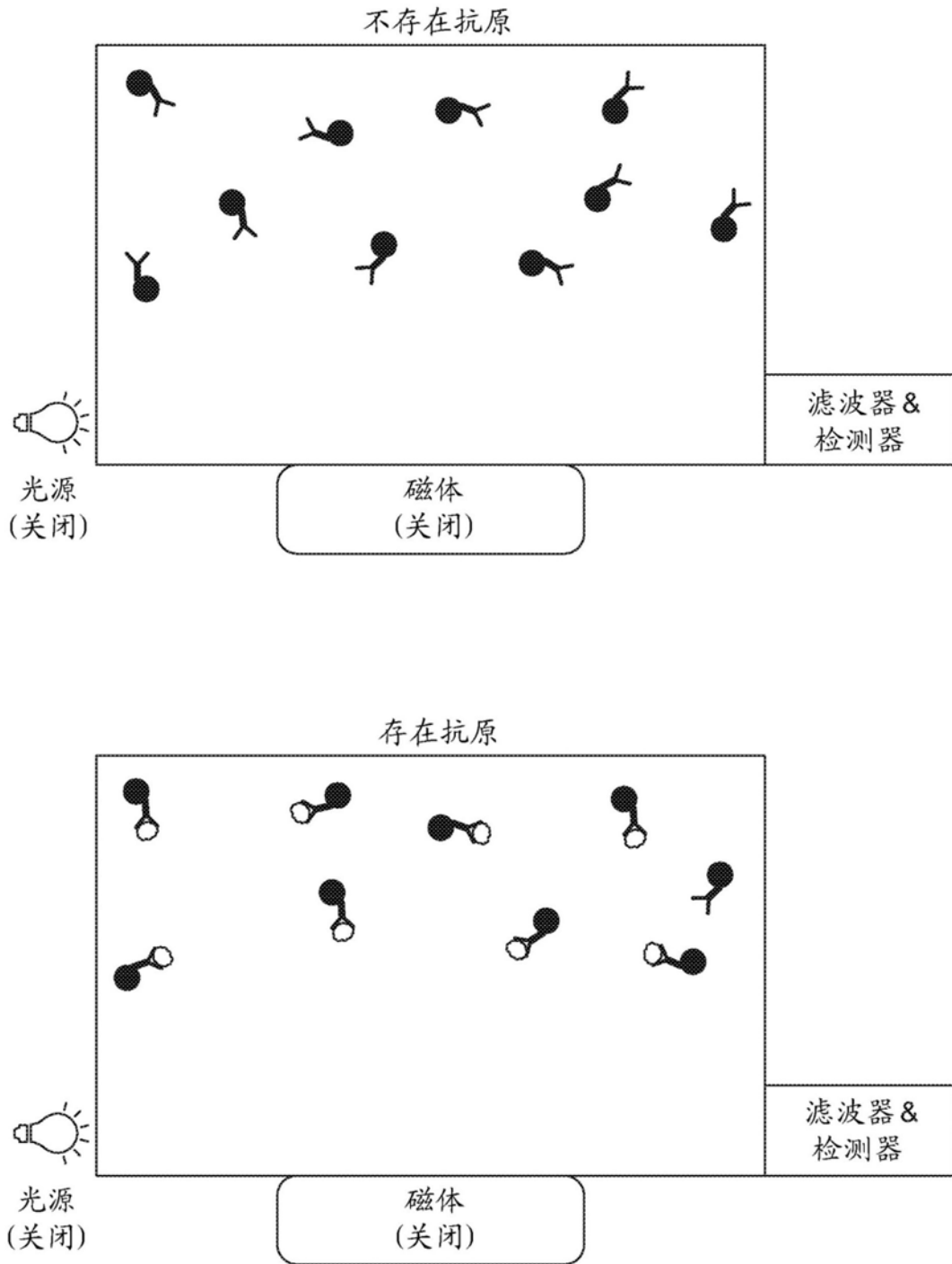


图3B

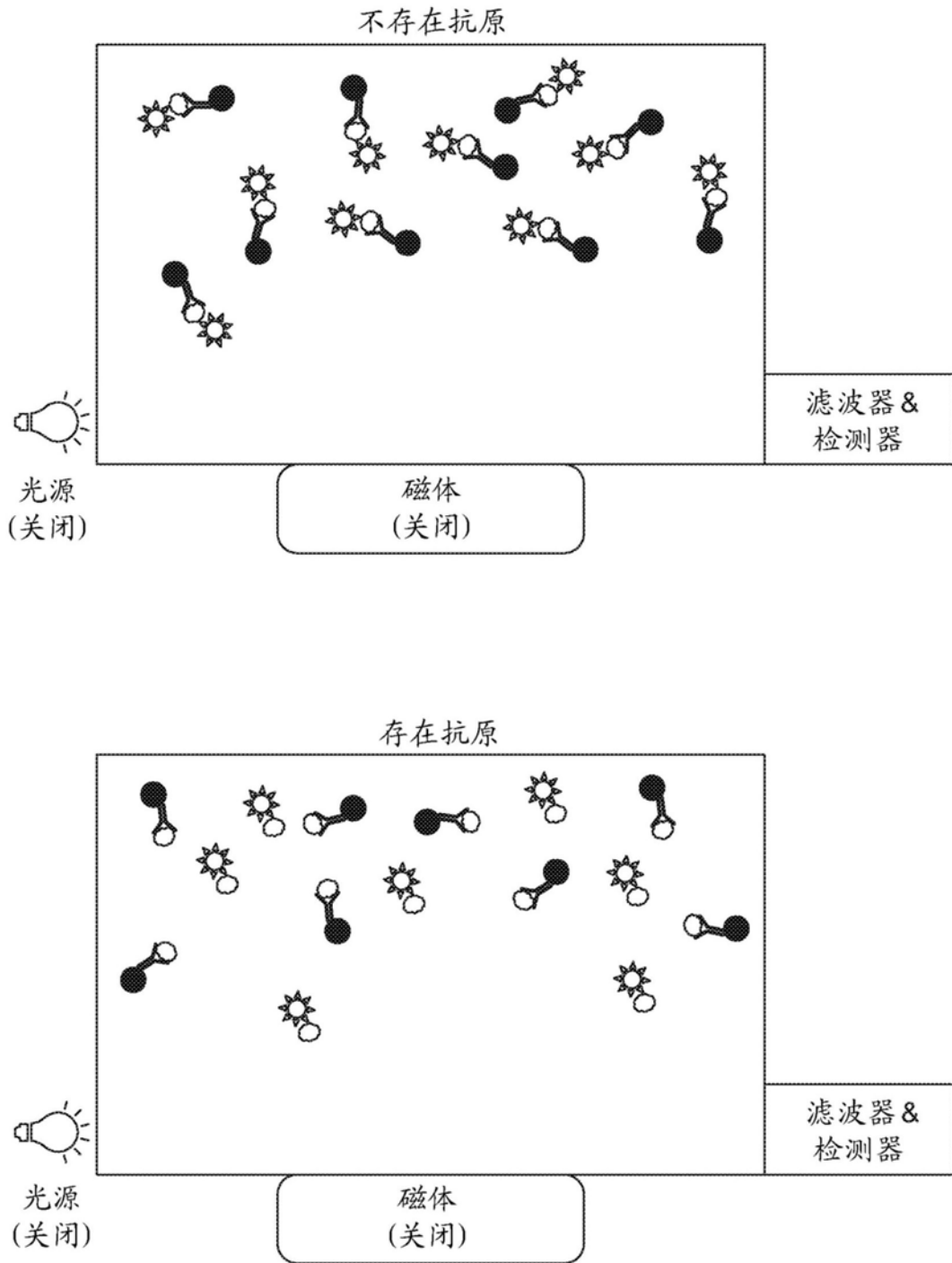


图3C

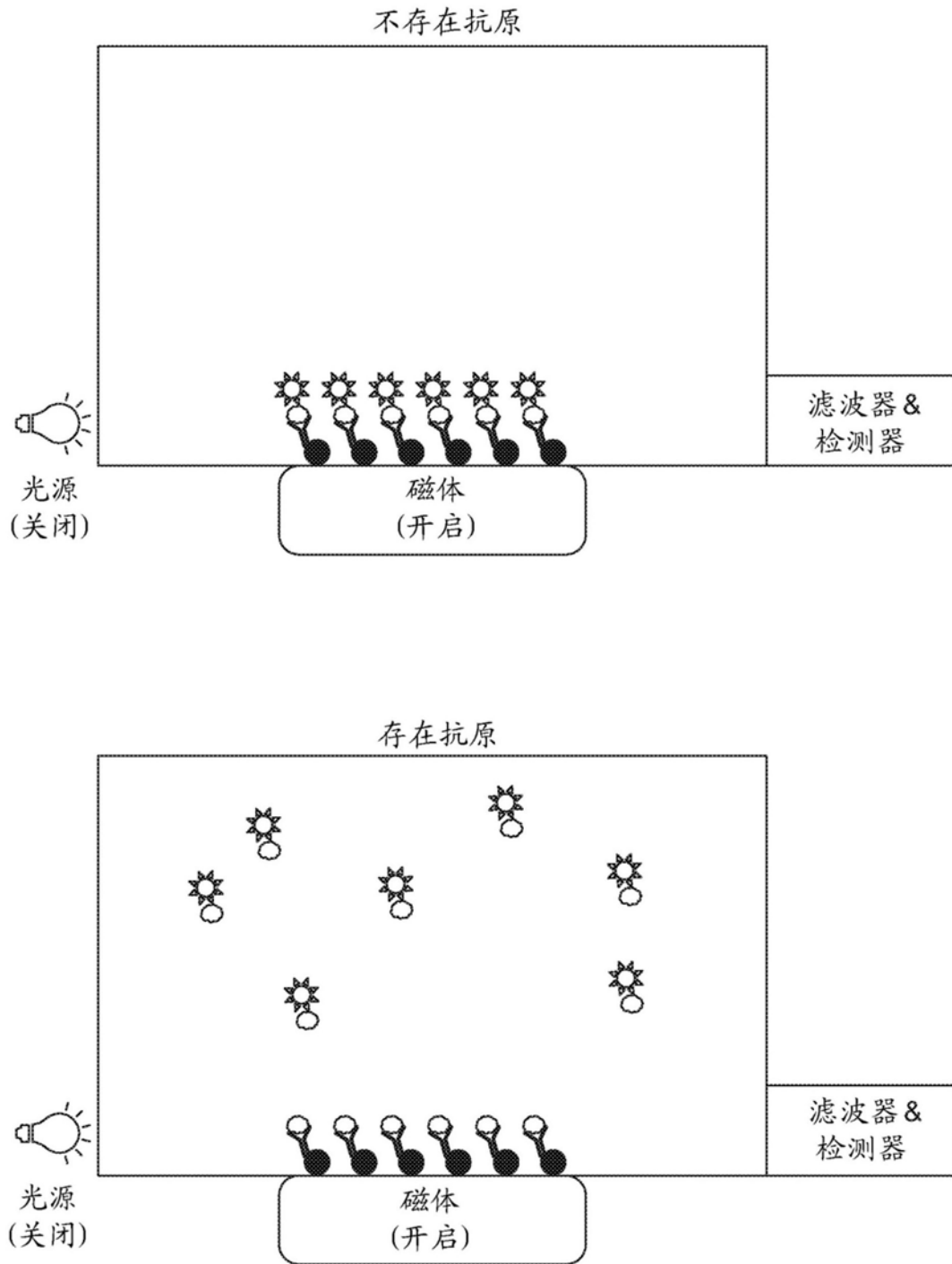


图3D

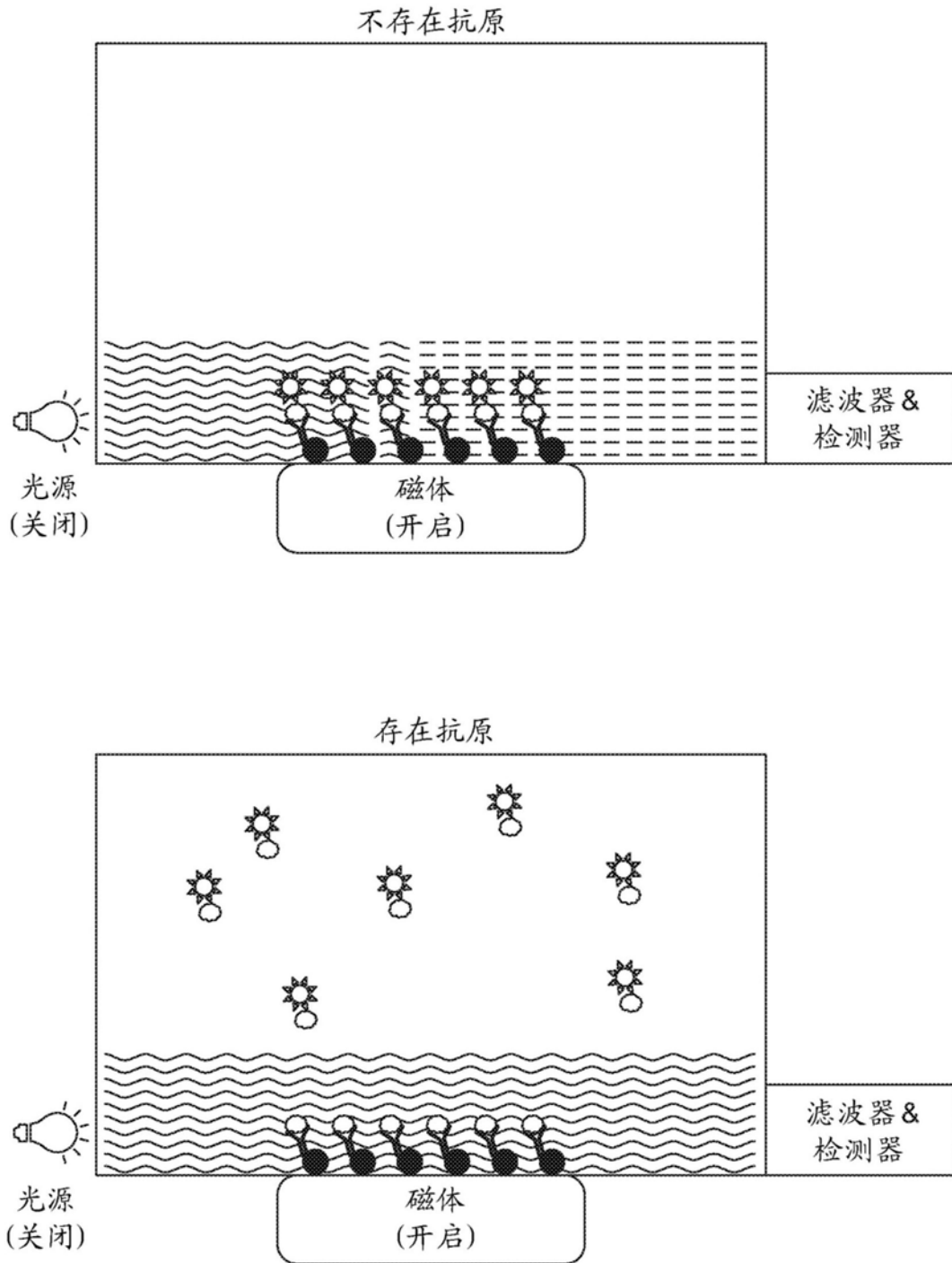


图3E

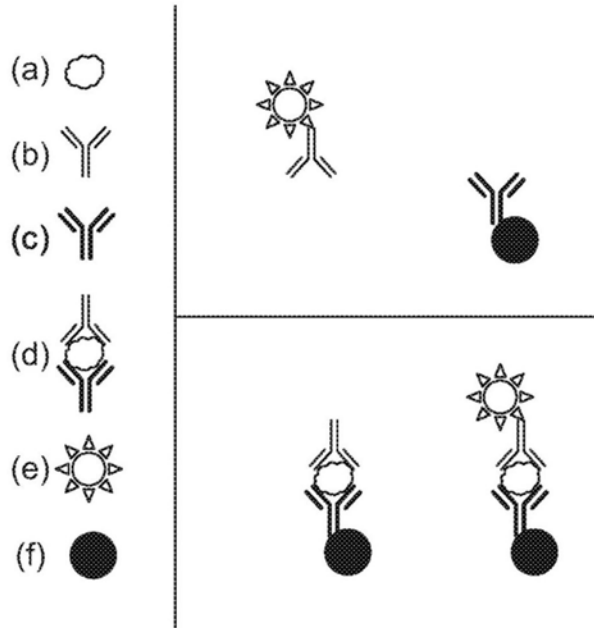


图4A

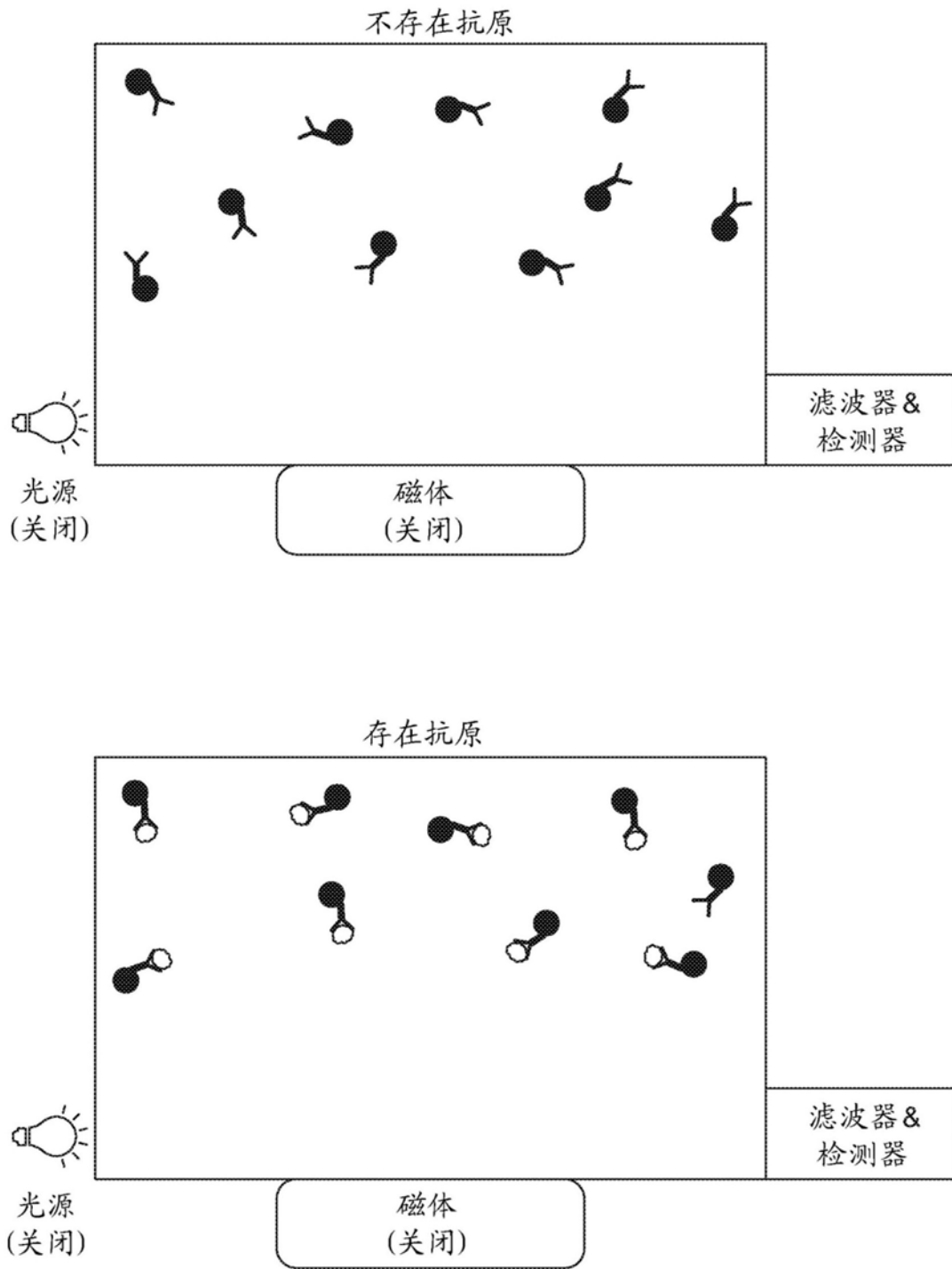


图4B

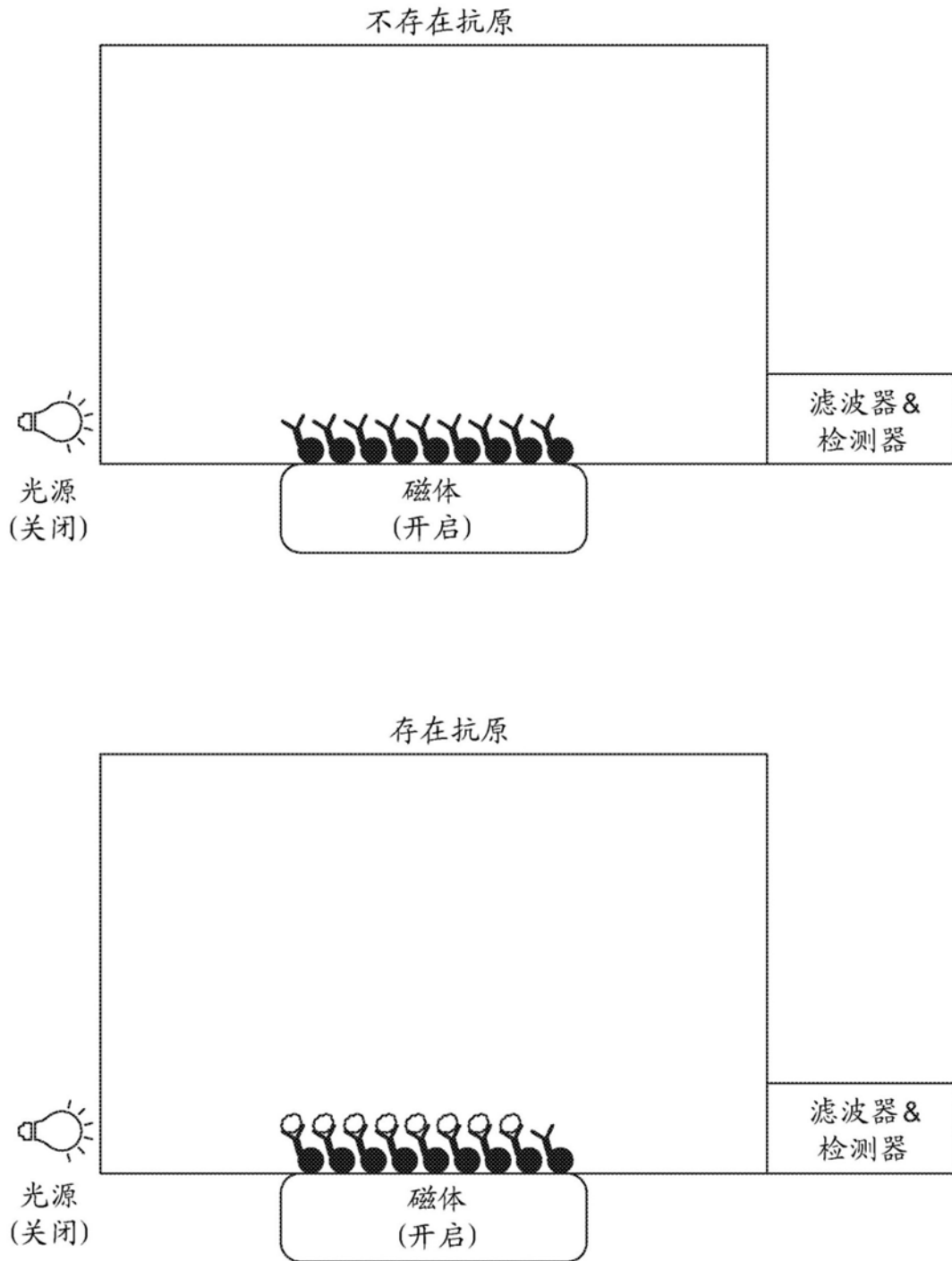


图4C

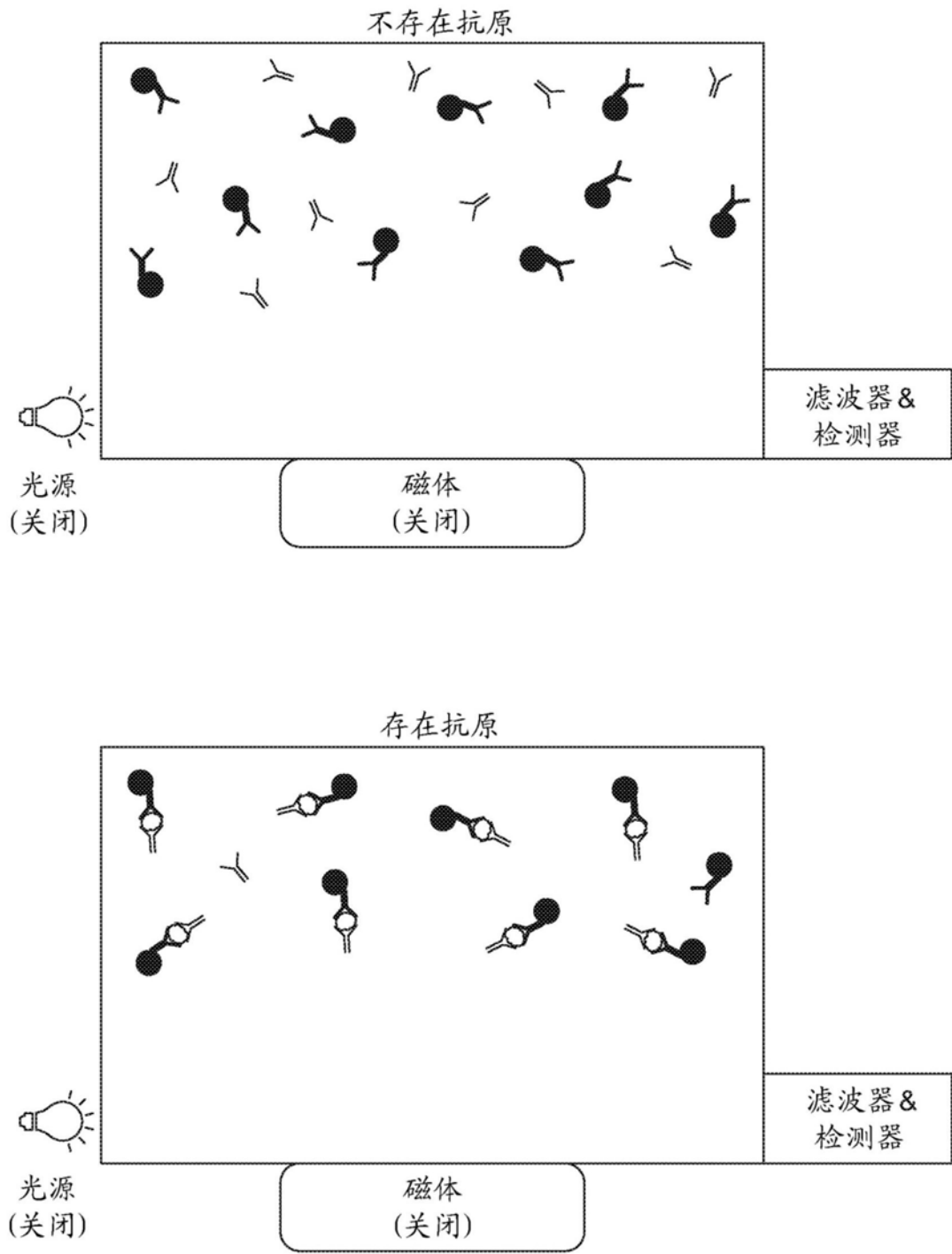


图4D

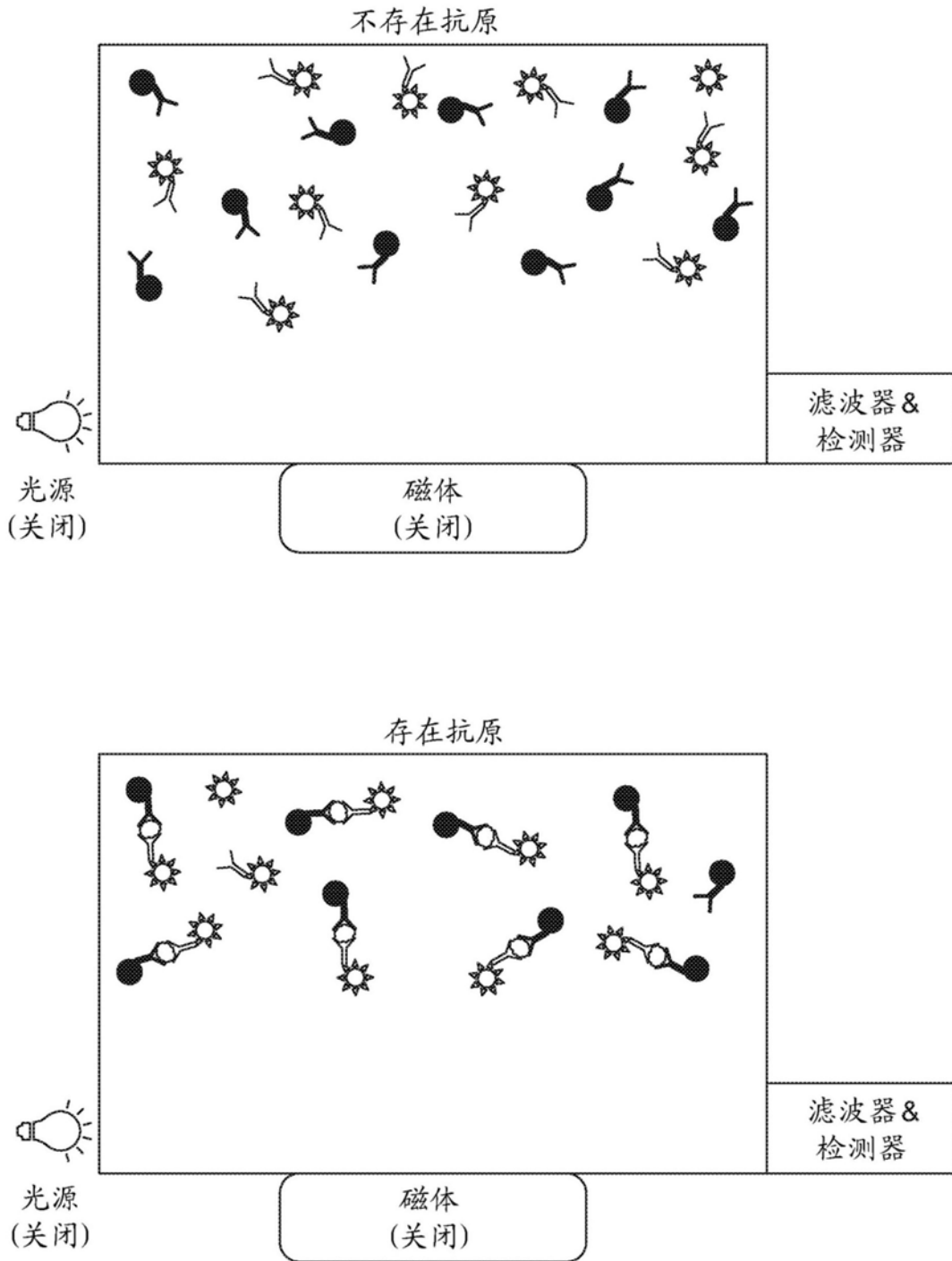


图4E

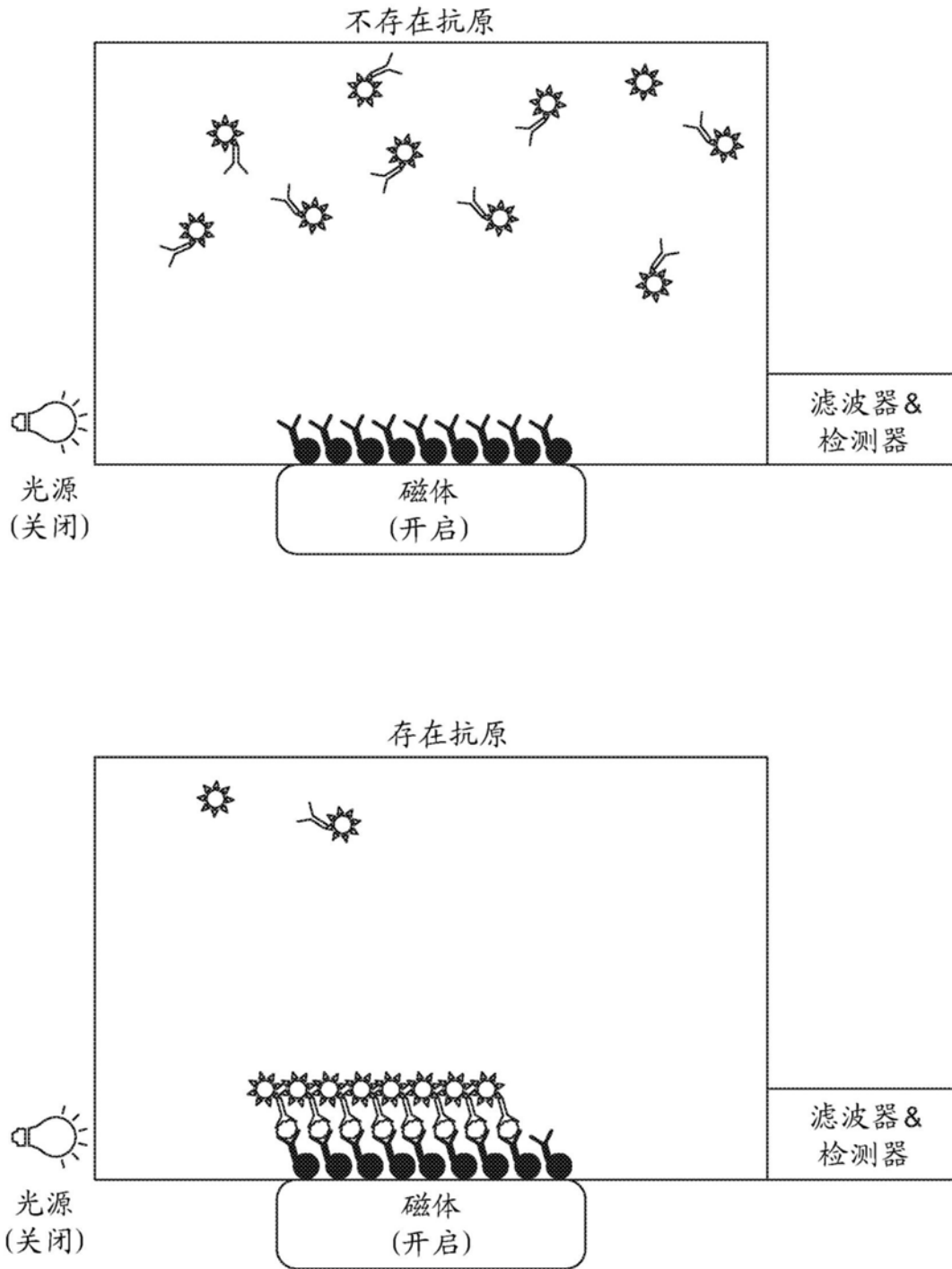


图4F

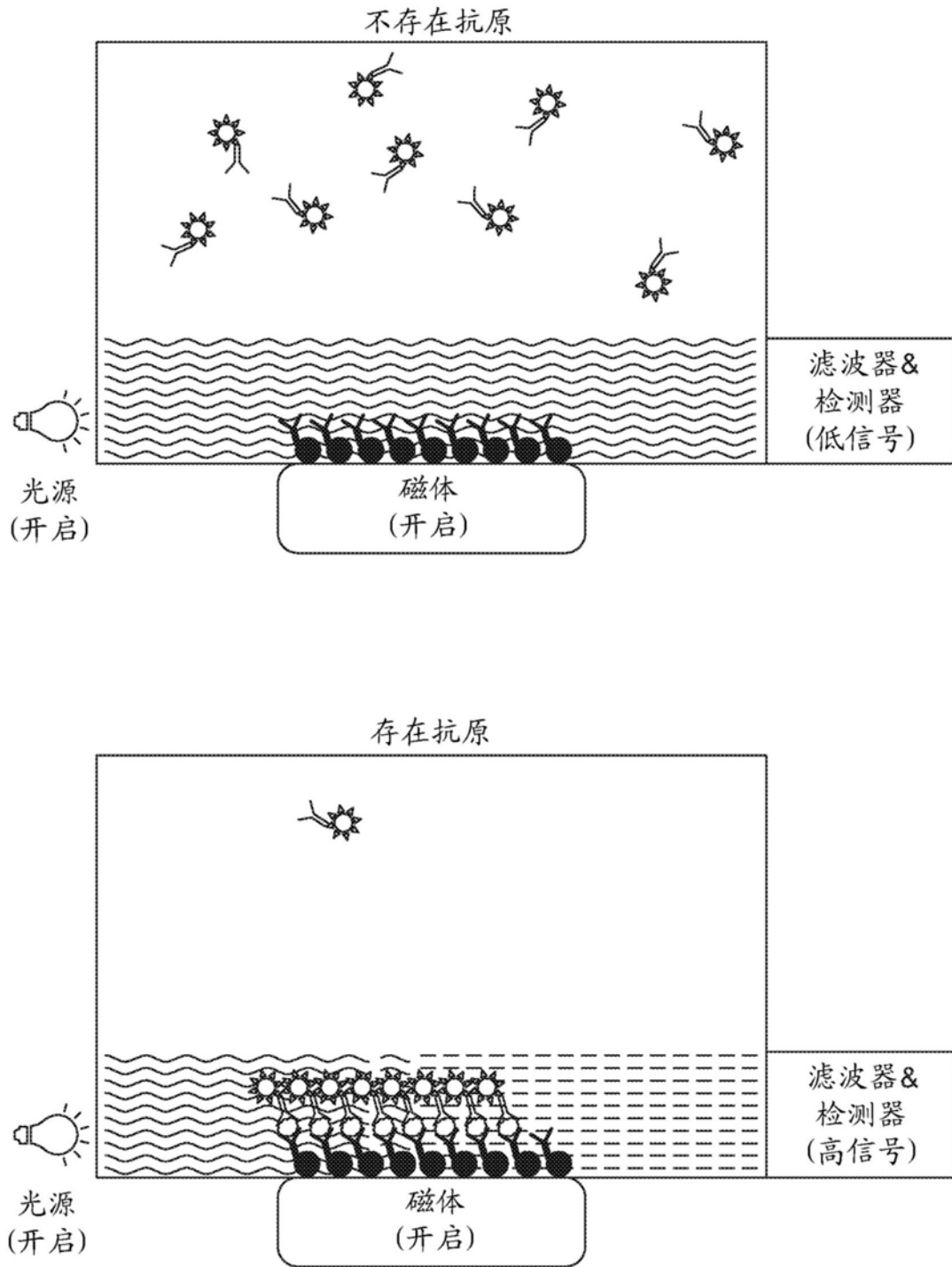


图4G

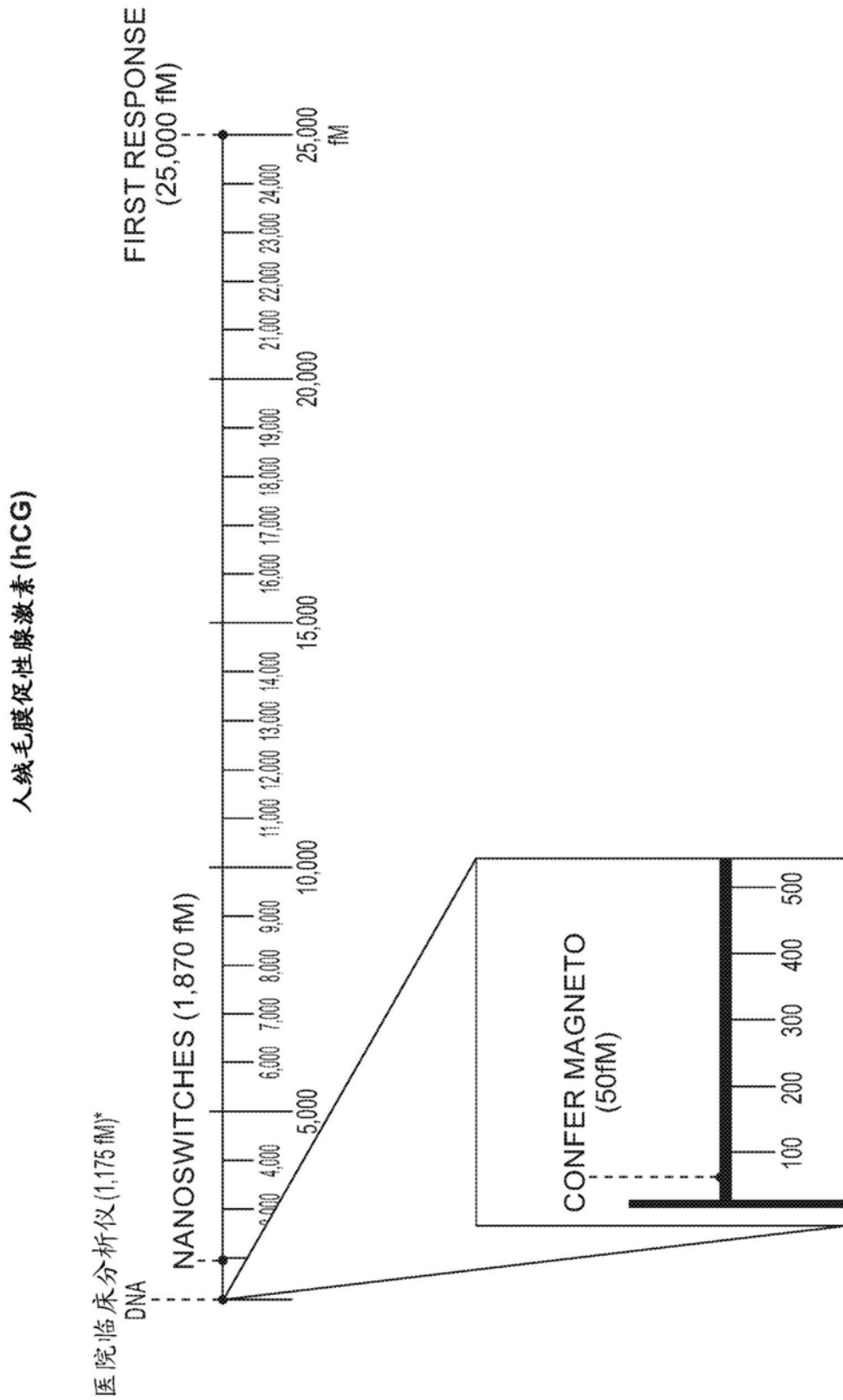


图5

促黄体激素 (LH)

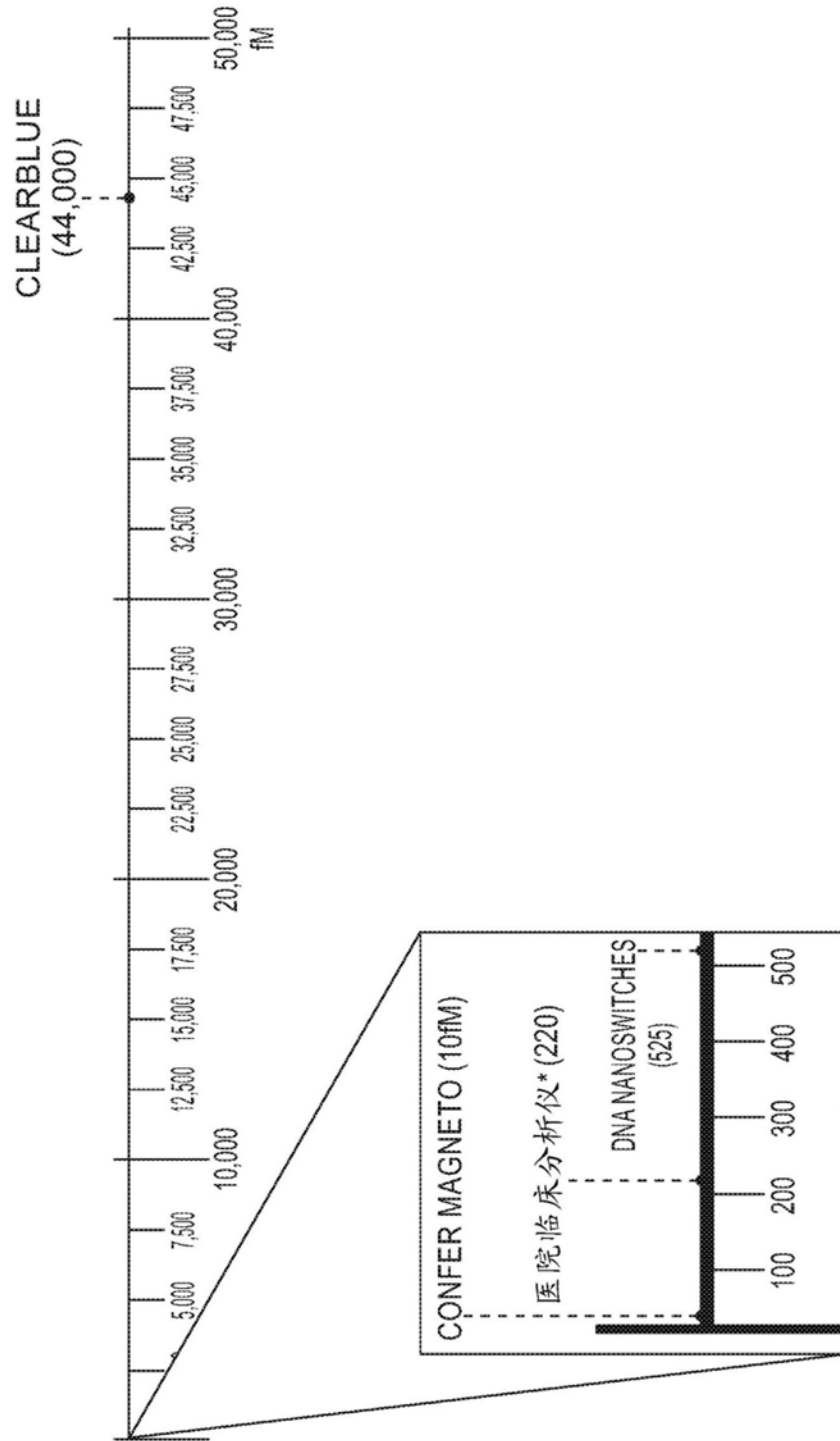


图6

前列腺特异性抗原 (PSA)

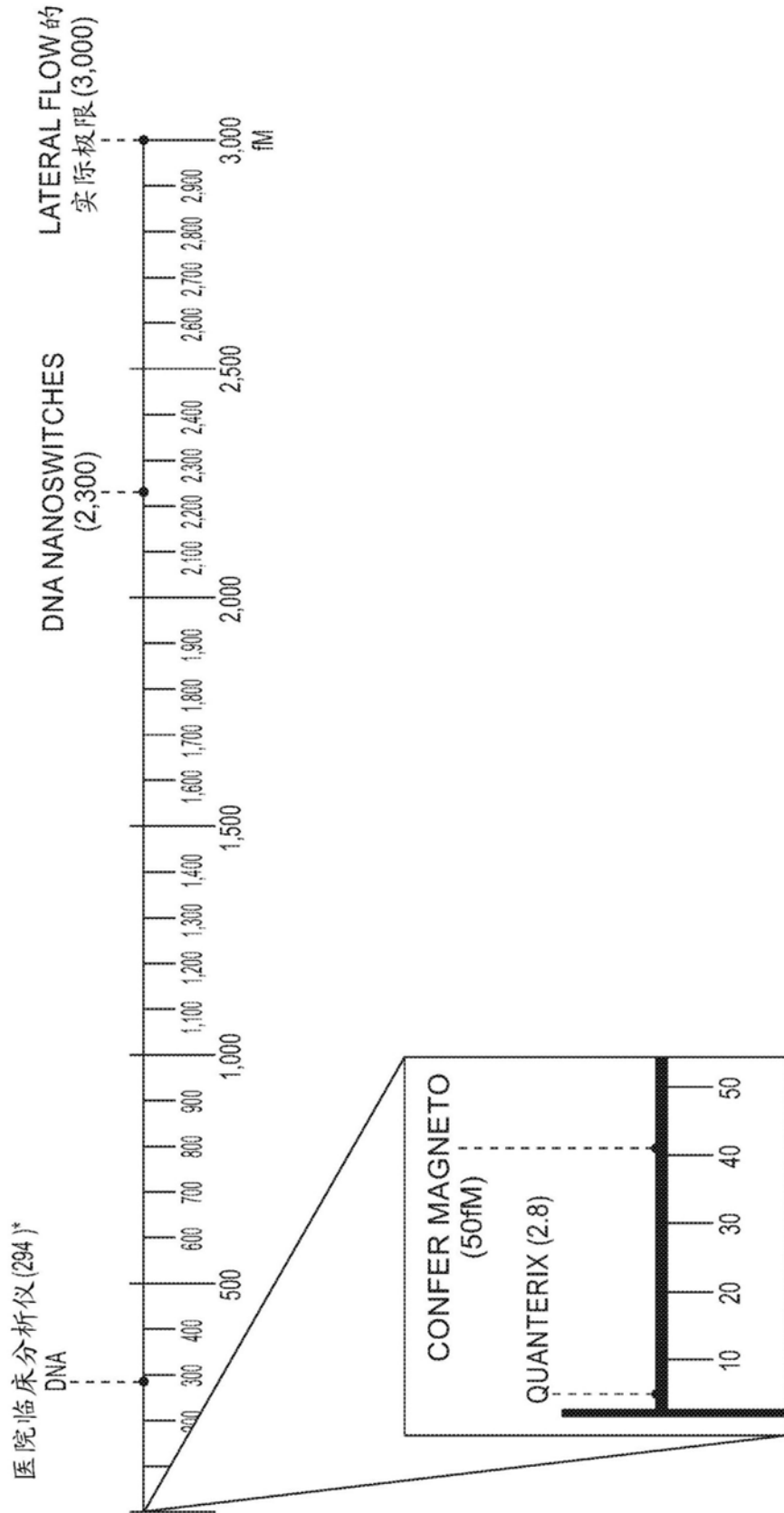


图7

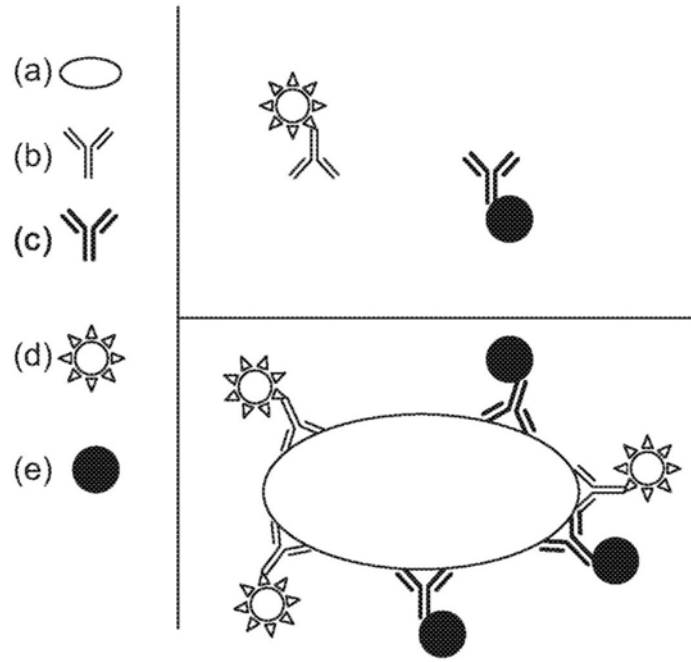


图8A

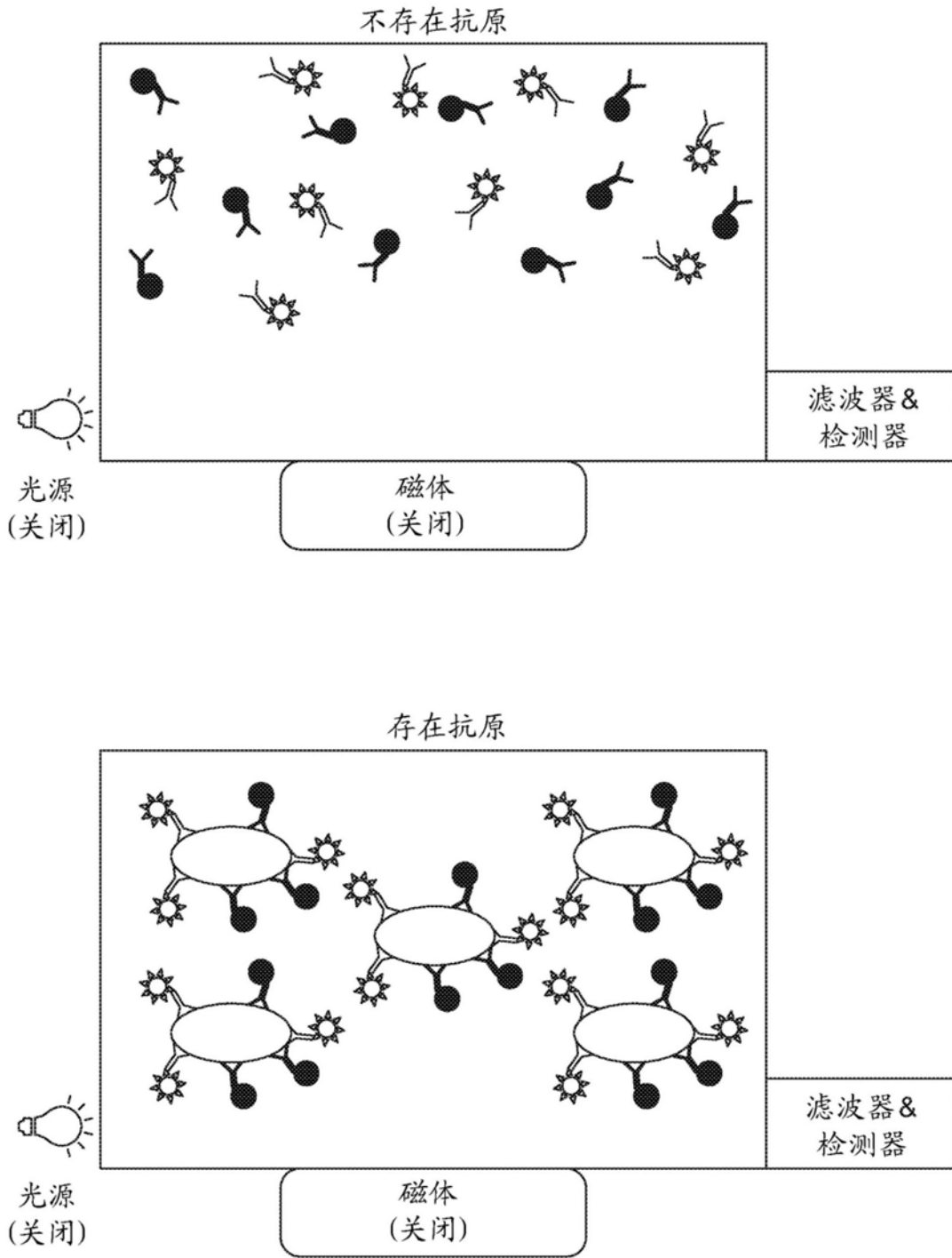


图8B

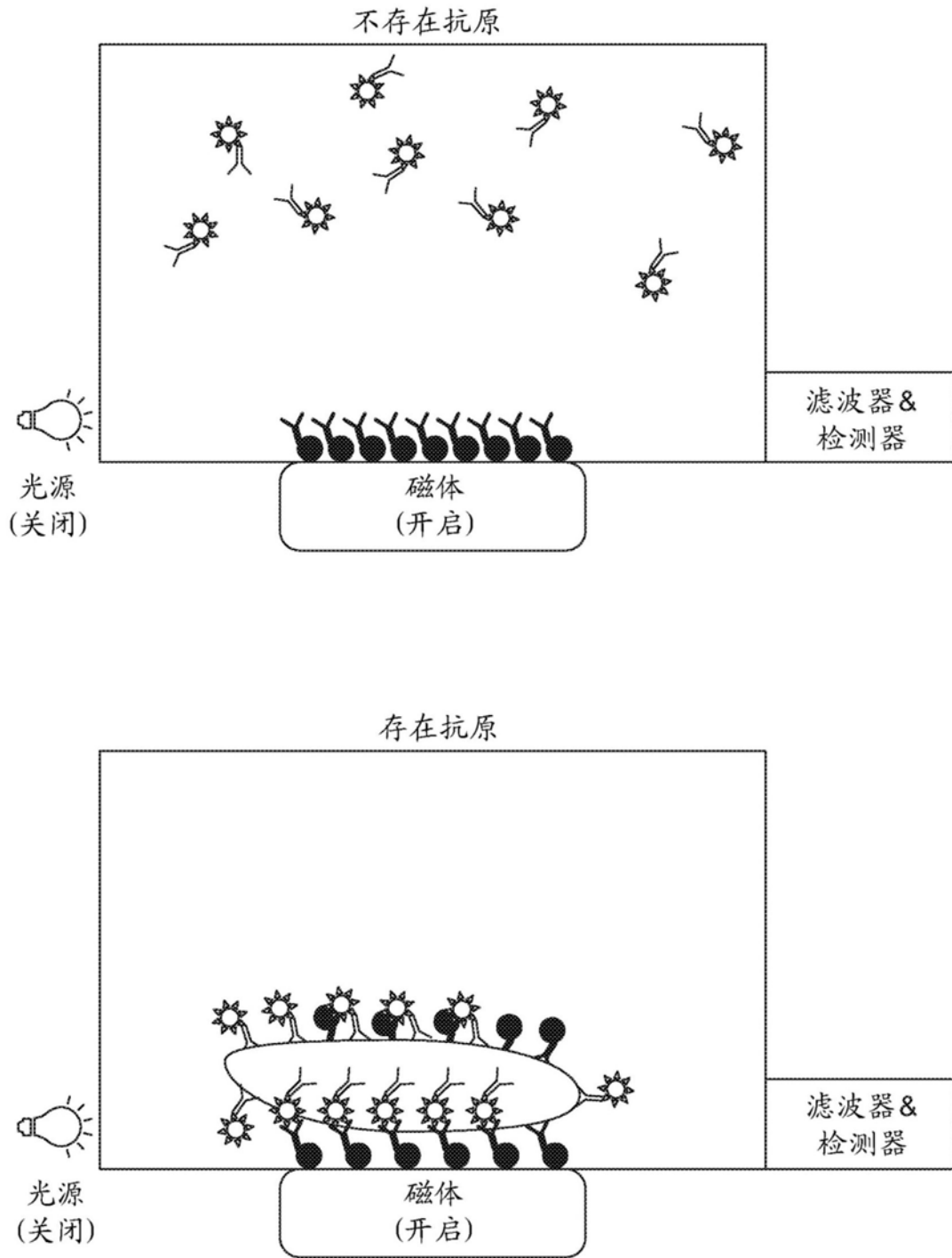


图8C

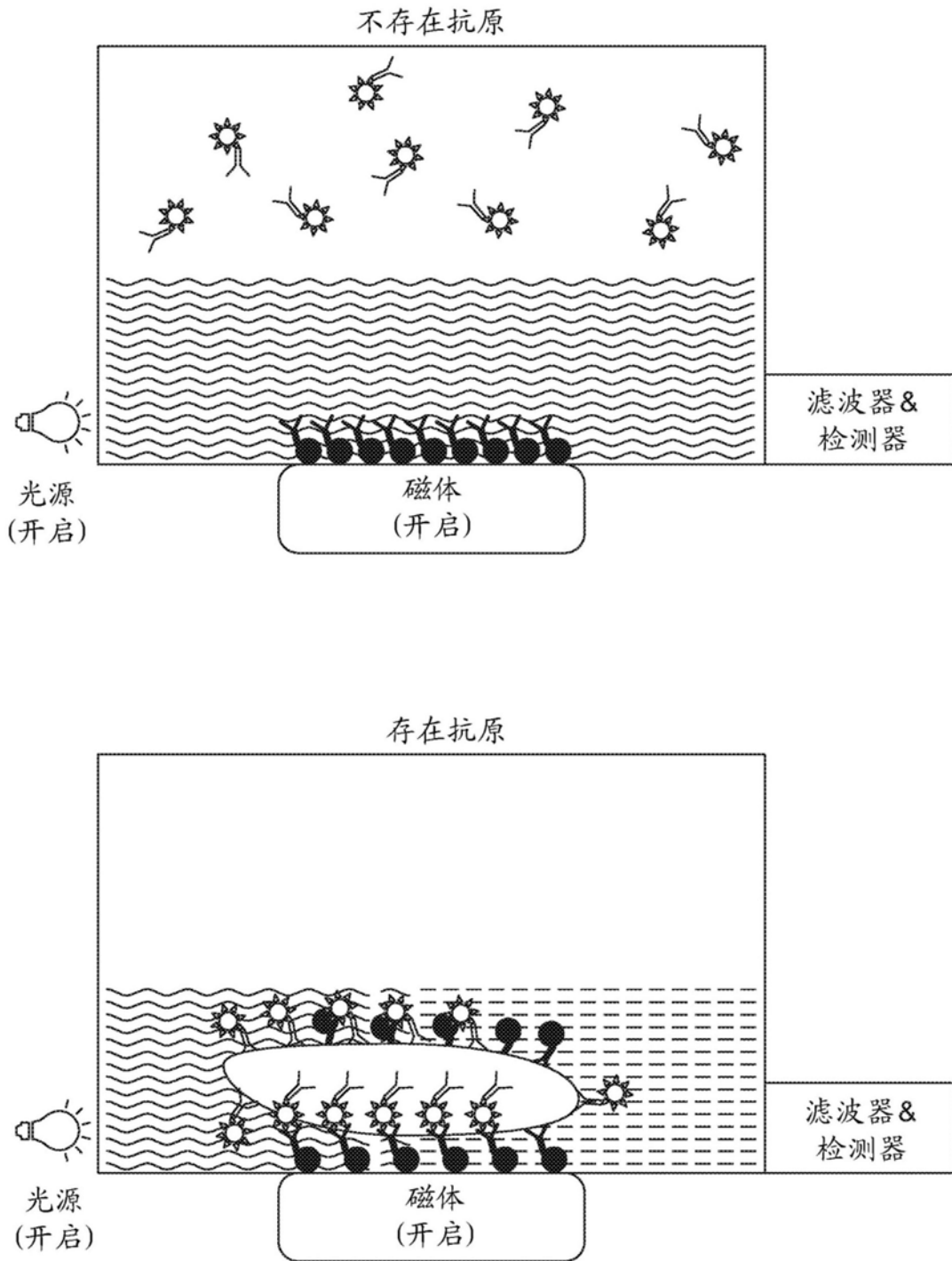


图8D

A 组链球菌

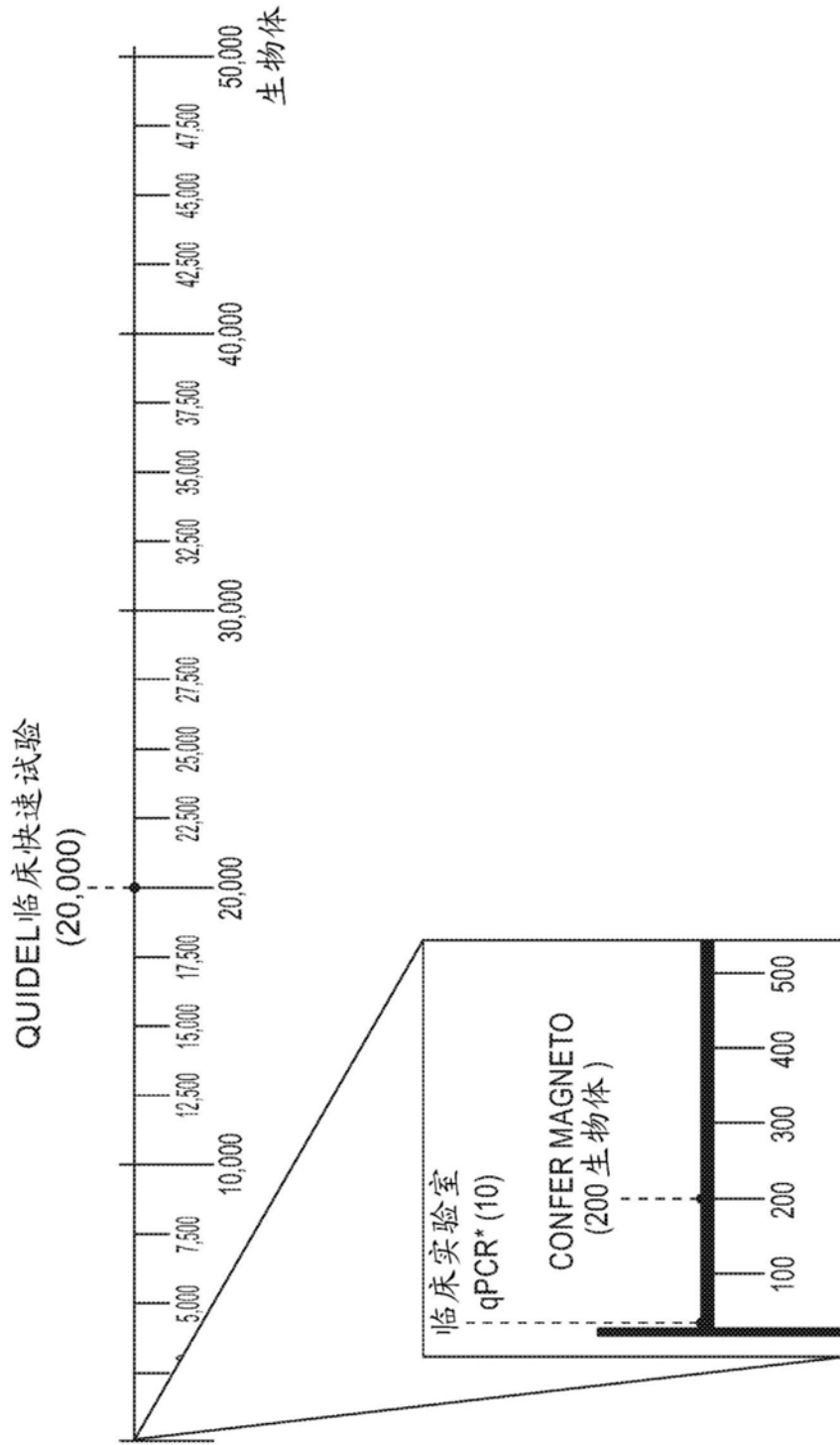


图9

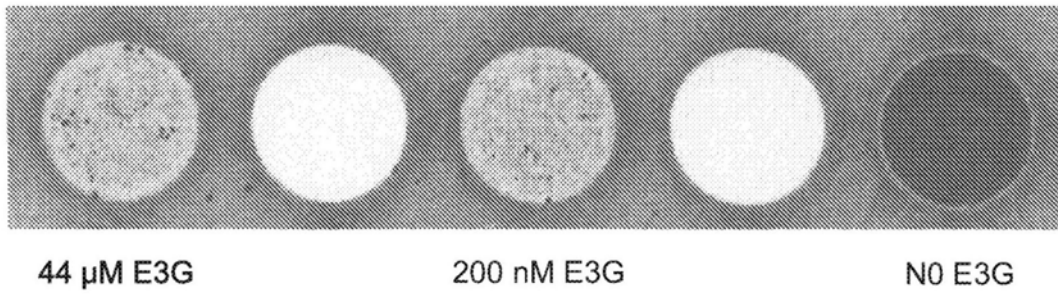


图10

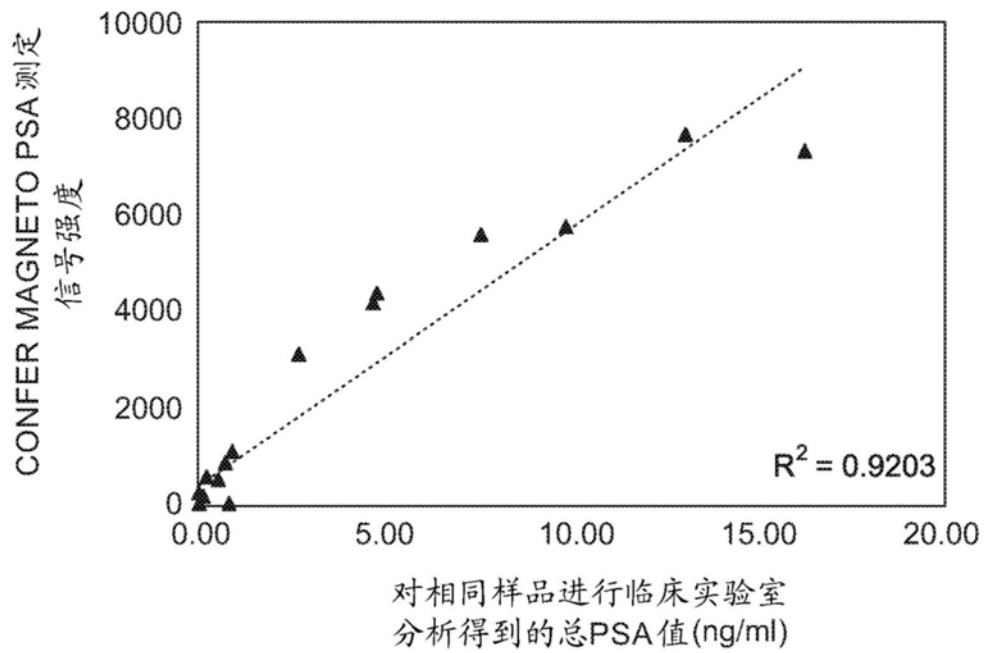


图11

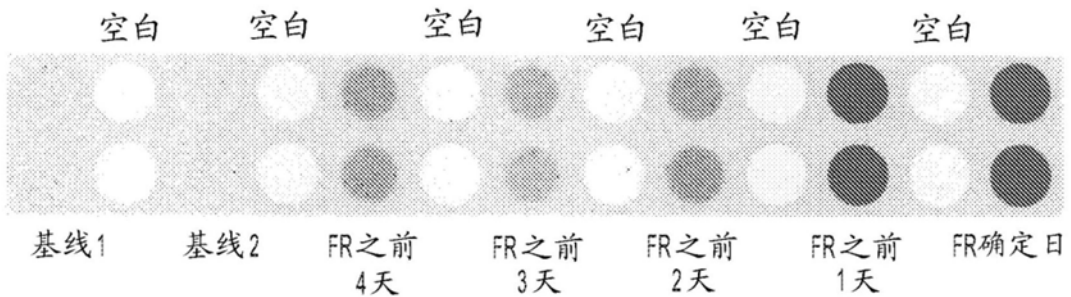


图12

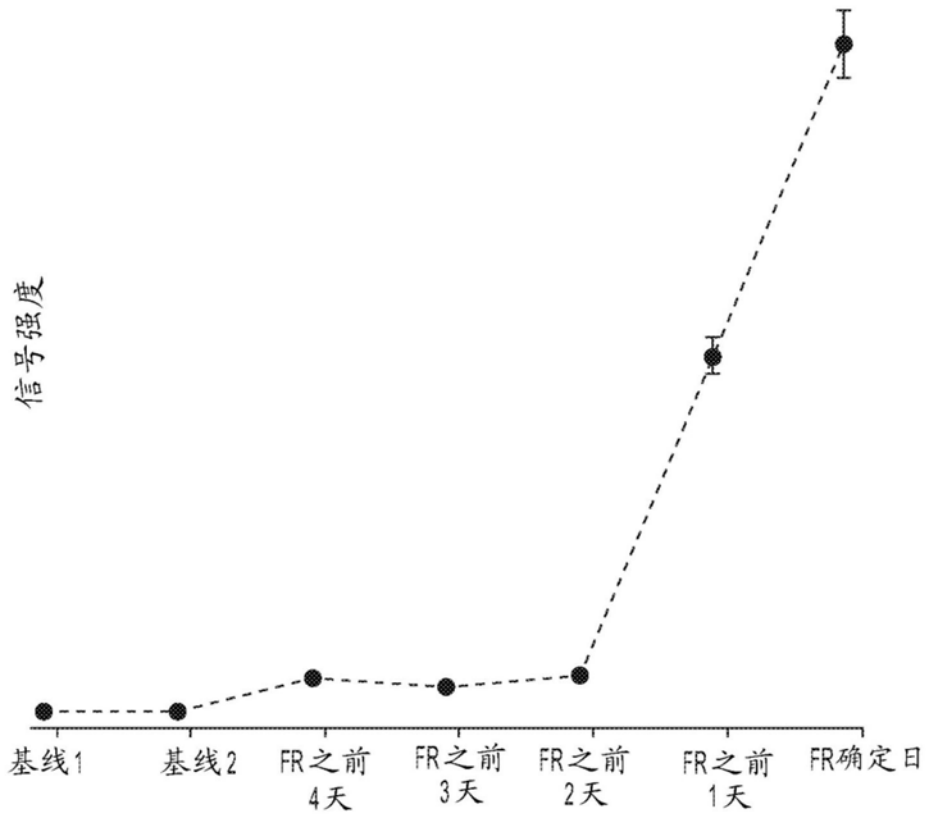


图13

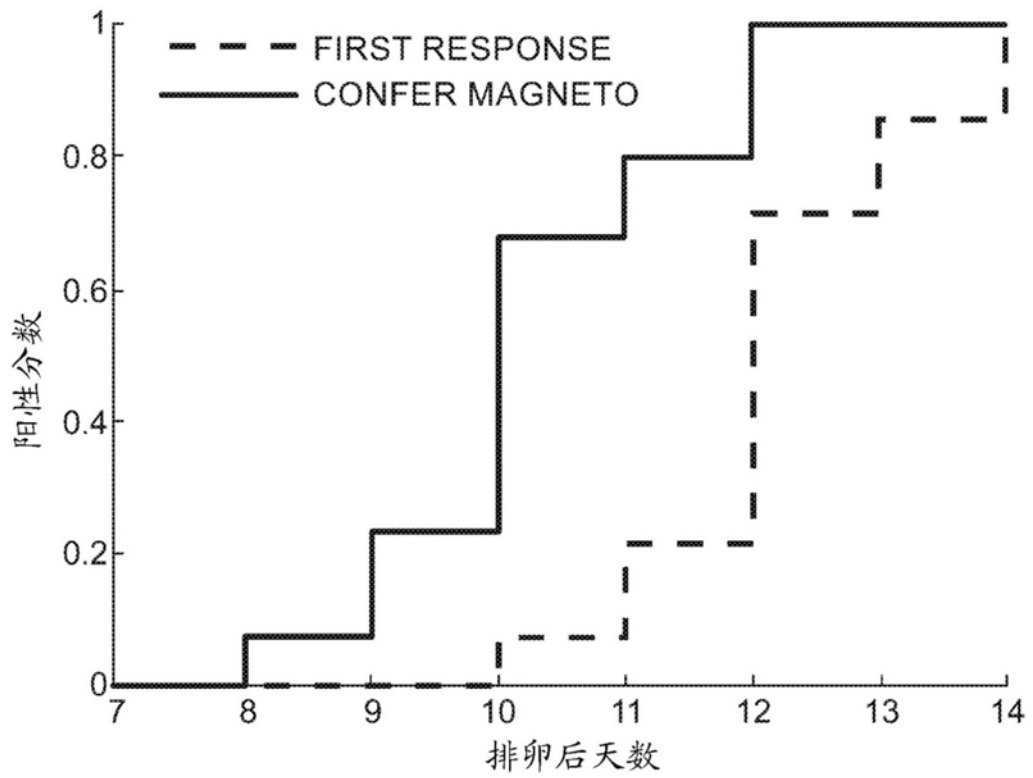


图14

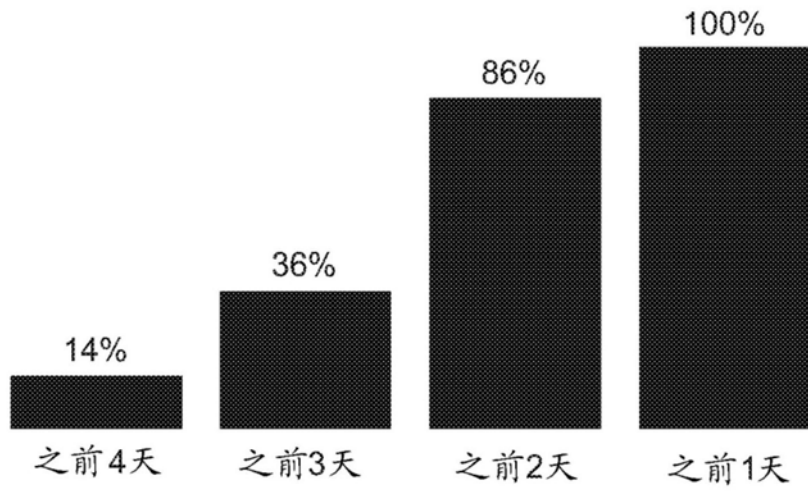


图15

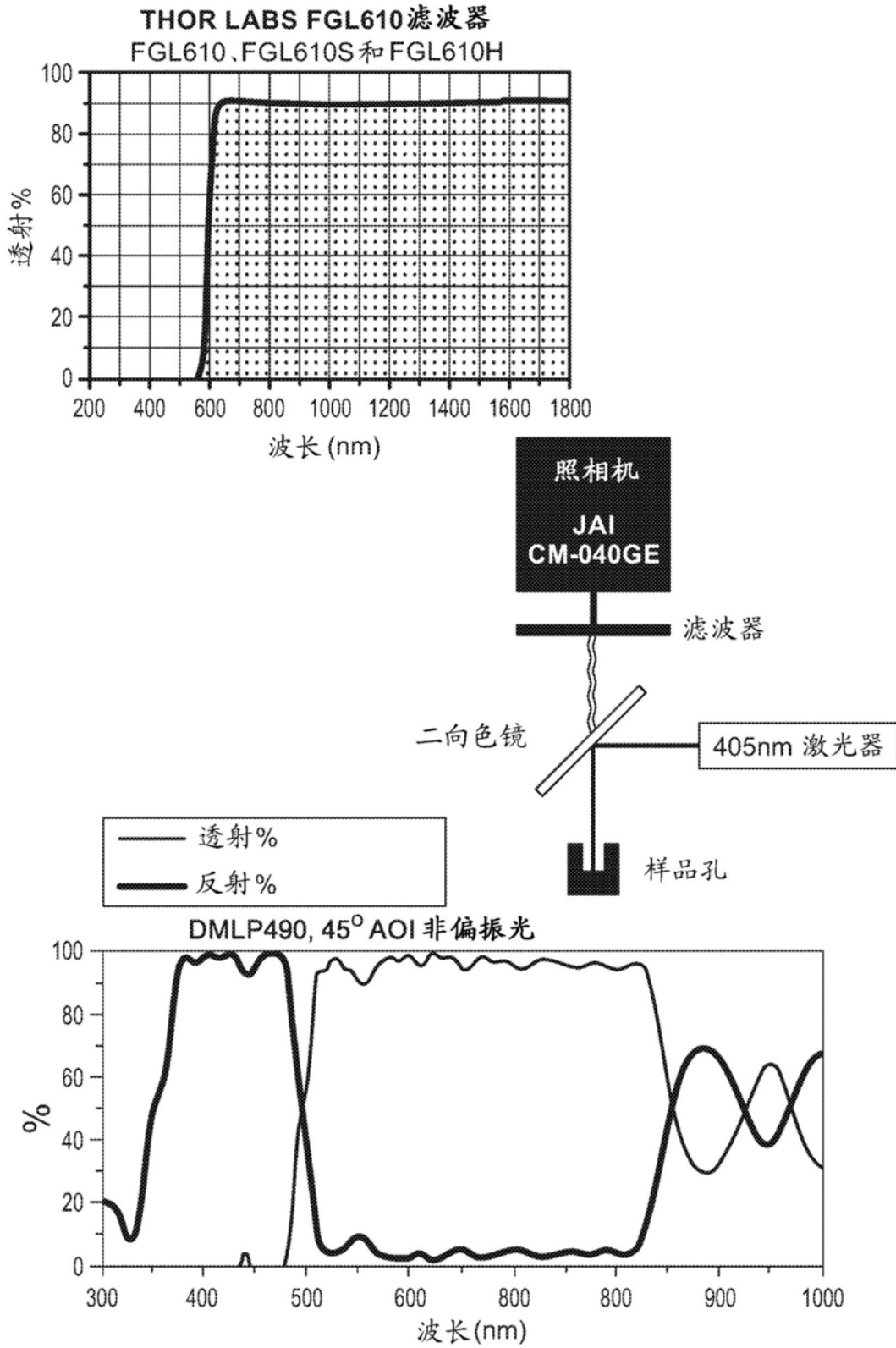


图16

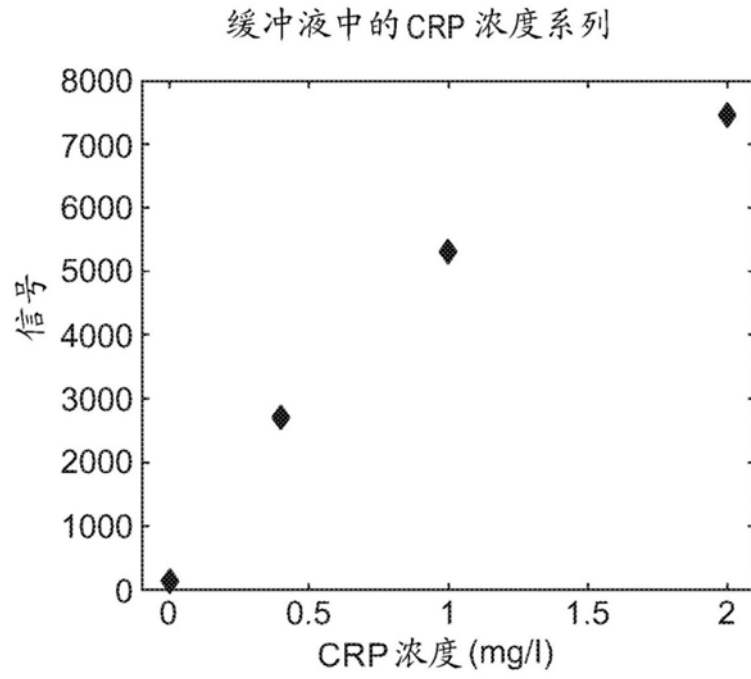


图17A

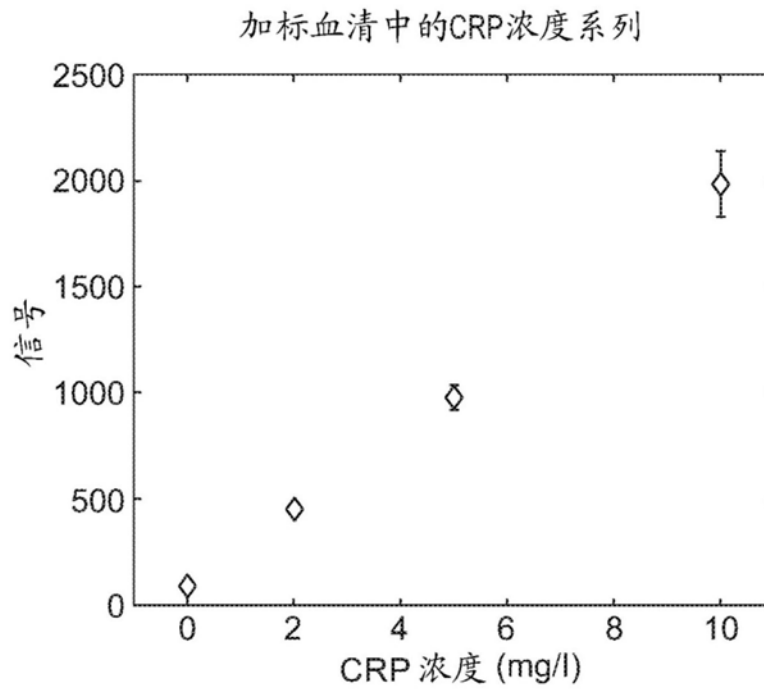




图17B

专利名称(译)	基于磁性颗粒的免疫测定及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110462383A</a>	公开(公告)日	2019-11-15
申请号	CN201880014031.9	申请日	2018-01-26
[标]发明人	A沃德 D陈 MA库萨		
发明人	A·沃德 A·R·钱德拉塞克兰 D·陈 C·布兰卡德 P·加登 B·德马科 J·福曼 M·A·库萨 L·考德威尔		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/531 G01N33/553		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N21/645 G01N33/531 G01N33/553 Y02A50/57		
代理人(译)	缪策 甘玲		
优先权	62/450623 2017-01-26 US 62/544393 2017-08-11 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)


本发明部分地描述了用于使用磁性颗粒来检测生物样品中的分析物的改进方法、测定和试剂盒。所述方法包括以下步骤：使样品与包含磁性颗粒和捕获部分的磁性缀合物接触，所述捕获部分被配置为结合所述样品中的所述感兴趣分析物；使所述样品与包含报告物和报告结合部分的报告缀合物接触，所述报告结合部分被配置为结合所述样品中的所述感兴趣分析物；使所述感兴趣分析物与所述捕获部分和所述报告结合部分结合；通过分析腔室施加磁场将所述感兴趣分析物从所述样品中分离；以及通过检测所述报告物来检测所述感兴趣分析物的存在、不存在或水平。

(a) 

(b) 

(c) 

(d) 

(e) 

(f) 

