



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110869514 A

(43)申请公布日 2020.03.06

(21)申请号 201880030887.5

(22)申请日 2018.03.29

(30)优先权数据

62/479,278 2017.03.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/025299 2018.03.29

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/183779 EN 2018.10.04

(71)申请人 小利兰·斯坦福大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 C·贝尔托齐 S·J·加利

K·穆凯 P·罗宾逊 蔡政廷

M·蔡

(74)专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理有限公司 11329

代理人 孙涛 肖鹏

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6851(2018.01)

C12Q 1/6804(2018.01)

C12Q 1/6806(2018.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/52(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书11页 说明书62页

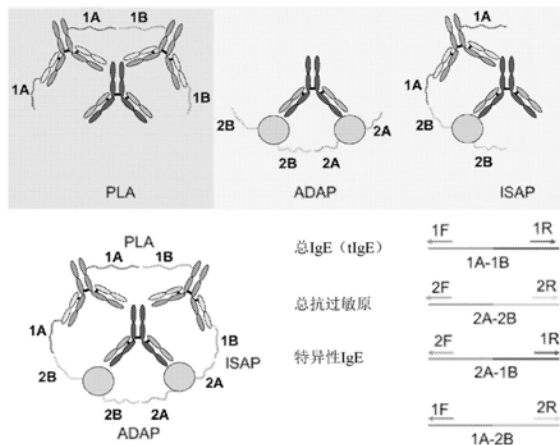
序列表7页 附图15页

(54)发明名称

多重同型特异性抗体检测

(57)摘要

公开了用于多重检测抗体的方法和试剂。具体地说,本发明涉及抗体的多重检测,其利用携带DNA条形码的抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物鉴别和定量疾病相关抗体同型,例如涉及过敏反应、自体免疫疾病、感染和发炎的那些抗体同型。



1. 一种检测样品中的目标抗体同型的方法,所述方法包含:
  - a) 使所述样品与以下接触:i) 抗体结合剂与包含条形码的第一部分的第一DNA分子的结合物,和ii) 抗原与包含条形码的第二部分的第二DNA分子的结合物,其中如果所述样品中存在所述目标抗体同型,则所述抗原结合到所述目标抗体同型,并且所述抗体结合剂特异性结合到所述目标抗体同型,从而形成复合物;
  - b) 使所述复合物中的所述第一DNA分子与所述第二DNA分子连接,其中所述条形码的所述第一部分和所述条形码的所述第二部分连接而形成完整条形码;以及
  - c) 检测所述完整条形码,其指示所述样品中的所述目标抗体同型的存在。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述连接包含:
  - a) 使所述复合物与桥接寡核苷酸接触,其中所述桥接寡核苷酸包含与所述第一DNA分子充分互补且能够杂交的第一部分,以及与所述第二DNA分子充分互补且能够杂交的第二部分,其中所述第一DNA分子和所述第二DNA分子在所述复合物中彼此充分邻近,以同时与所述桥接寡核苷酸杂交;以及
  - b) 使所述复合物中的所述第一DNA分子与所述第二DNA分子连接,以产生包含所述完整条形码的连接产物。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述连接包含使所述第一DNA分子中的核苷酸序列与所述第二DNA分子中的互补核苷酸序列杂交。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述第一和第二DNA分子的互补核苷酸序列具有至少6个核苷酸的长度。
5. 根据权利要求3所述的方法,其进一步包含使用聚合酶延伸所杂交的所述第一和第二DNA分子以产生包含所述完整条形码的核酸。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述聚合酶在等温条件下使用。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述目标抗体同型选自由以下组成的组:免疫球蛋白E (IgE)、免疫球蛋白M (IgM)、免疫球蛋白G (IgG)、免疫球蛋白A (IgA) 和免疫球蛋白D (IgD)。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述IgG选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体结合剂包含特异性结合到所述目标抗体同型的抗体、抗体模拟物或适体。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中特异性结合到所述目标抗体同型的所述抗体选自由以下组成的组:单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、纳米抗体、抗体的重组片段、Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、F<sub>v</sub>片段和scF<sub>v</sub>片段。
11. 根据权利要求9所述的方法,其中特异性结合到所述目标抗体同型的所述抗体选自由以下组成的组:抗IgE抗体、抗IgM抗体、抗IgG抗体、抗IgA抗体和抗IgD抗体。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述检测是使用聚合酶链反应 (PCR)、等温扩增或微阵列分析进行。
13. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包含定量所述目标抗体同型的量。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述定量包含进行定量PCR (qPCR)。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品获自患有免疫病症的受试者。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述免疫病症选自由过敏症、感染、自身免疫病

症、炎性病症组成的组。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述感染是人类免疫缺陷病毒(HIV)。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述抗原选自由以下组成的组:HIV-1抗原、HIV-2抗原、HIV-1/2抗原、p16、p14、p24、p55、gp120、gp160、gp41和gp36。

19. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品是血液、血浆或血清。

20. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法能够检测到浓度大于或等于0.01ng/mL的IgE。

21. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包含将多种抗体结合剂-DNA结合物添加至所述样品中,其中每种抗体结合剂与包含不同条形码序列的DNA分子结合,并且每种抗体结合剂能够结合到不同的目标抗体同型,以允许对所述样品中的多种目标抗体同型进行多重检测。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述抗体结合剂-DNA结合物选自由以下组成的组:用于检测IgE的抗IgE二次抗体-DNA结合物、用于检测IgM的抗IgM二次抗体-DNA结合物、用于检测IgG的抗IgG二次抗体-DNA结合物、用于检测IgA的抗IgA二次抗体-DNA结合物,和用于检测IgD的抗IgD二次抗体-DNA结合物。

23. 根据权利要求1所述的方法,其中所述桥接寡核苷酸包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的所述序列具有至少95%一致性的核苷酸序列,其中所述桥接寡核苷酸能够与所述二次抗体-DNA结合物中的DNA和所述抗原-DNA结合物中的DNA杂交。

24. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法用至少一组选自由以下组成的组的试剂进行:

a) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;

b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;

c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;

d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;

e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;

f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;

g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列

的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物；

h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物；

i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物；以及

j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

25. 根据权利要求1所述的方法，其中所述抗原选自以下组成的组：过敏原、自体免疫疾病抗原、癌症抗原和病原体抗原。

26. 根据权利要求1所述的方法，其进一步包含进行邻近连接分析 (PLA) 或凝集-聚合酶链反应 (ADAP)。

27. 一种用于进行同型特异性凝集-聚合酶链反应 (ISAP) 的试剂盒，所述试剂盒包含至少一种抗原-DNA结合物、至少一种抗体结合剂-DNA结合物、至少一种桥接寡核苷酸，和至少一对PCR引物用于检测抗体同型。

28. 一种抗原-DNA结合物，其包含选自由SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列，或与选自由SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列具有至少95%一致性的DNA序列。

29. 一种抗体结合剂-DNA结合物，其包含选自由SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列，或与选自由SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列具有至少95%一致性的DNA序列。

30. 一种用于检测生物样品中的抗体的组合物，所述组合物包含至少一组选自由以下组成的组的试剂：

a) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物；

b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物；

c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物；

d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物；

e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗

体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;

f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;

g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;

h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;

i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及

j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

31. 一种试剂盒,其包含根据权利要求30所述的组合物和用于检测抗体的说明书。

32. 根据权利要求31所述的试剂盒,其进一步包含连接酶。

33. 根据权利要求31所述的试剂盒,其进一步包含用于进行PCR的试剂。

34. 一种用于检测样品中的过敏原抗体的方法,所述方法包含使用至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合来进行同型特异性凝集-聚合酶链反应(ISAP),以检测所述样品中的过敏原特异性IgE含量。

35. 根据权利要求34所述的方法,其进一步包含使用至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗免疫球蛋白G4 (IgG4) 抗体-DNA结合物的组合来进行ISAP,以检测过敏原特异性IgG4含量。

36. 根据权利要求34所述的方法,其进一步包含使用至少一对抗IgE抗体-DNA结合物进行邻近连接分析(PLA),以检测所述样品中的总免疫球蛋白E (IgE) 含量。

37. 根据权利要求34所述的方法,其进一步包含使用至少一对过敏原-DNA结合物来进行凝集-聚合酶链反应(ADAP),以检测所述样品中的总抗过敏原抗体含量。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中使用ADAP检测IgG、IgM、IgE、IgA和IgD的总抗过敏原抗体含量。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述IgG选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组。

40. 根据权利要求37所述的方法,其进一步包含使用至少一对抗IgE抗体-DNA结合物进行邻近连接分析(PLA),以检测所述样品中的总免疫球蛋白E (IgE) 含量。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述进行所述PLA包含:

a) 将所述至少一对抗IgE抗体-DNA结合物添加到所述样品中,其中所述至少一对抗IgE抗体-DNA结合物包含在第一位点结合到所述样品中的IgE的第一抗IgE抗体-DNA结合物和

在第二位点结合到所述同一IgE的第二抗IgE抗体-DNA结合物；

b) 使所述样品与PLA桥接寡核苷酸接触,其中所述PLA桥接寡核苷酸包含:(i)与所述第一抗IgE抗体-DNA结合物中的所述DNA充分互补并且能够杂交的第一部分,和(ii)与所述第二抗IgE抗体-DNA结合物中的所述DNA充分互补且能够杂交的第二部分,其中所述第一抗IgE抗体-DNA结合物中的所述DNA与所述第二抗IgE抗体-DNA结合物中的所述DNA彼此充分邻近,以同时与所述PLA桥接寡核苷酸杂交;

c) 使所述第一抗IgE抗体-DNA结合物与所述第二抗IgE抗体-DNA结合物连接,以产生PLA连接产物;以及

d) 检测所述PLA连接产物,其指示所述样品中的所述IgE的存在。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述进行所述ADAP包含:

a) 将所述至少一对过敏原-DNA结合物添加至所述样品中,其中所述至少一对过敏原-DNA结合物包含在第一位点结合到所述样品中的抗过敏原抗体的第一过敏原-DNA结合物和 在第二位点结合到所述同一抗过敏原抗体的第二过敏原-DNA结合物;

b) 使所述样品与ADAP桥接寡核苷酸接触,其中所述ADAP桥接寡核苷酸包含:(i)与所述第一过敏原-DNA结合物中的所述DNA充分互补且能够杂交的第一部分,和(ii)与所述第二过敏原-DNA结合物中的所述DNA充分互补且能够杂交的第二部分,其中所述第一过敏原-DNA结合物中的所述DNA和所述第二过敏原-DNA结合物中的所述DNA彼此充分邻近,以同时与所述ADAP桥接寡核苷酸杂交;

c) 使所述第一过敏原-DNA结合物与所述第二过敏原-DNA结合物连接,以产生ADAP连接产物;以及

d) 检测所述ADAP连接产物,其指示所述样品中的所述抗过敏原抗体的存在。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述进行所述ISAP包含:

a) 将所述至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合添加到所述样品中,其中所述过敏原-DNA结合物结合到所述样品中的所述过敏原特异性IgE,并且所述抗IgE抗体-DNA结合物结合到所述同一过敏原特异性IgE,从而形成第一复合物;

b) 使所述第一复合物与ISAP桥接寡核苷酸接触,其中所述ISAP桥接寡核苷酸包含:(i)与所述抗IgE抗体-DNA结合物中的所述DNA充分互补且能够杂交的第一部分,和(ii)与所述过敏原-DNA结合物中的所述DNA充分互补且能够杂交的第二部分,其中所述抗IgE抗体-DNA结合物中的所述DNA和所述过敏原-DNA结合物中的所述DNA在所述第一复合物中彼此充分邻近,以同时与所述ISAP桥接寡核苷酸杂交;

c) 使所述第一复合物中的所述抗IgE抗体-DNA与所述过敏原-DNA连接,以产生第一ISAP连接产物;

d) 检测所述第一ISAP连接产物,其指示所述样品中的所述过敏原特异性IgE的存在;

e) 将所述至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合添加到所述样品中,其中所述过敏原-DNA结合物结合到所述样品中的所述过敏原特异性IgG4,并且所述抗IgG4抗体-DNA结合物结合到所述同一过敏原特异性IgG4,从而形成第二复合物;

f) 使所述第二复合物与ISAP桥接寡核苷酸接触,其中所述ISAP桥接寡核苷酸包含:(i)与所述抗IgG4抗体-DNA结合物中的所述DNA充分互补且能够杂交的第一部分,和(ii)与所

述过敏原-DNA结合物中的所述DNA充分互补且能够杂交的第二部分,其中所述抗IgG4抗体-DNA结合物中的所述DNA和所述过敏原-DNA结合物中的所述DNA在所述第一复合物中彼此充分邻近,以同时与所述ISAP桥接寡核苷酸杂交;

g) 使所述第二复合物中的所述抗IgG4抗体-DNA与所述过敏原-DNA连接,以产生第二ISAP连接产物;以及

h) 检测所述第二ISAP连接产物,其指示所述样品中的所述过敏原特异性IgG4的存在。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述检测所述PLA连接产物、所述ADAP连接产物、所述第一ISAP连接产物和所述第二ISAP连接产物是利用多重聚合酶链反应(PCR)、等温扩增或微阵列分析来进行。

45. 根据权利要求44所述的方法,其进一步包含对所述PLA连接产物、所述ADAP连接产物、所述第一ISAP连接产物和所述第二ISAP连接产物的量进行定量。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述定量包含进行定量PCR(qPCR)。

47. 根据权利要求40所述的方法,其中所述PLA用至少一组选自以下组成的组的试剂进行:

a) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;

b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;

c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;

d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;

e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;

f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;

g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;

h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;

i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的

DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物；以及

j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

48. 根据权利要求37所述的方法,其中所述ADAP用至少一组选自以下组成的组的试剂进行:

a) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;

b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;

c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;

d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;

e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;

f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;

g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;

h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;

i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及

j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

49. 根据权利要求34所述的方法,其中所述ISAP用至少一组选自以下组成的组的试剂进行:

a) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物；

b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物；

c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物；

d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物；

e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物；

f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物；

g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物；

h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物；

i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物；以及

j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

50. 根据权利要求49所述的方法,其进一步包含用至少一组选自以下组成的组的试剂进行ISAP:

a) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物；

b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物；

c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的

抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物；

d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物；

e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物；

f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物；

g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物；

h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物；

i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物；以及

j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

51. 一种根据权利要求40所述的方法检测样品中的花生过敏原抗体的方法，其中所述进行ADAP包含使用一对Ara h1-DNA结合物检测所述样品中的总抗Ara h1抗体含量、使用一对Ara h2-DNA结合物检测所述样品中的总抗Ara h2抗体含量，以及使用一对Ara h3-DNA结合物检测所述样品中的总抗Ara h3抗体含量。

52. 根据权利要求51所述的方法，其中所述进行ISAP包含使用Ara h1-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合来检测所述样品中的Ara h1特异性IgE含量、使用Ara h2-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合来检测所述样品中的Ara h2特异性IgE含量，以及使用Ara h3-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合来检测所述样品中的Ara h3特异性IgE含量。

53. 根据权利要求52所述的方法，其中所述进行ISAP进一步包含使用Ara h1-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合来检测所述样品中的Ara h1特异性IgG4含量、使用Ara h2-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合来检测所述样品中的Ara h2特异性IgG4含量，以及使用Ara h3-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合来检测所述样品中的Ara h3特异性IgG4含量。

54. 根据权利要求53所述的方法，其中：

a) 所述PLA使用以下进行：包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、

包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物,以检测所述样品中的总IgE含量;

b) 所述ADAP使用以下进行:i) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第一Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第二Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测所述样品中的总抗Ara h1抗体含量,ii) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第一Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第二Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测所述样品中的总抗Ara h2抗体含量,和iii) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第一Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第二Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测所述样品中的总抗Ara h3抗体含量;并且

c) 所述ISAP使用以下进行:i) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测所述样品中的Ara h1特异性IgE含量;ii) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测所述样品中的Ara h2特异性IgE含量;iii) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测所述样品中的Ara h3特异性IgE含量;iv) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测所述样品中的Ara h1特异性IgG4含量;v) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测所述样品中的Ara h2特异性IgG4含量;以及vi) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测所述样品中的Ara h3特异性IgG4含量。

55. 一种组合物,其包含:

a) 用于进行PLA的试剂,其包含:包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物,以便检测总IgE含量;

b) 用于进行ADAP的试剂,其包含:i) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第一Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第二Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测总抗Ara h1抗体含量;ii) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第一Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第二Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测总抗Ara h2抗体含量,和iii) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第一Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第二Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测总抗Ara h3抗体含量;以及

c) 用于进行ISAP的试剂,其包含:i) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测Ara h1特异性IgE含量;ii) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测Ara h2特异性IgE含量;iii) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测Ara h3特异性IgE含量;iv) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测Ara h1特异性IgG4含量;v) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测所述样品中的Ara h2特异性IgG4含量;以及vi) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测Ara h3特异性IgG4含量。

56. 一种试剂盒,其包含根据权利要求55所述的组合物和用于检测过敏原抗体的说明书。

57. 根据权利要求56所述的试剂盒,其进一步包含连接酶。

58. 根据权利要求56所述的试剂盒,其进一步包含用于进行PCR的试剂。

## 多重同型特异性抗体检测

[0001] 关于联邦政府资助的研究或研发的声明

[0002] 本发明是在政府支持下根据国立卫生研究院授予的合同DK108781和AR067145完成的。政府拥有本发明的某些权利。

### 技术领域

[0003] 本发明大体涉及免疫学领域和检测特定抗体同型的方法。具体地说,本发明涉及抗体的多重检测,其利用携带DNA条形码的抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物鉴别和定量疾病相关抗体同型,例如涉及过敏反应、自体免疫疾病、感染和发炎的那些抗体同型。

### 背景技术

[0004] 过敏症是一种普遍的免疫超敏疾病,其影响超过20%的美国人口(Gupta等人(2011)《儿科学(Pediatrics)》128:e9-e17;Akinbami等人(2012)《NCHS数据简介(NCHS Data Brief)》94:1-8)。暴露于过敏原能够引起危及生命的病症,例如过敏性反应(Chinthrajah等人(2016)《过敏症与临床免疫学杂志(J.Allergy Clin.Immunol.))》137:984-997)和过敏性哮喘(Milgrom等人(1999)《新英格兰医学杂志(N.Engl.J.Med.))》341:1966-1973)。新颖的抗过敏症疗法直接调节过敏反应内的免疫因子(Milgrom等人,同上)。举例来说,最新的口服免疫疗法试验已展示诱导针对花生过敏原的耐受性的前景(Syed等人(2014)《过敏症与临床免疫学杂志》133:500-510;Vickery等人(2016)《过敏症与临床免疫学杂志》S0091-6749:30531-0),花生过敏原是折磨全世界数百万患者的最常见过敏之一(Gupta等人,同上)。这些激动人心的新疗法都需要有成本效益、灵敏且可靠的诊断方法来鉴别出合格的患者进行治疗并且跟踪他们对治疗的反应。尽管目前已为此目的部署了几种技术,但它们消耗大量样品并且缺乏满足过敏症专科医生和其患者临床需求的成本效益。

[0005] 最常见的过敏症测试之一是皮肤点刺测试(SPT,Bernstein等人(2008)《过敏性哮喘与免疫学年鉴(Ann Allergy Asthma Immunol.))》100:S1-148)。这种测试是通过皮下注射过敏原提取物并观察所形成的过敏病灶来测量过敏反应。尽管SPT测试价格便宜且能够快速进行,但其侵入性和潜在的系统并发症限制了其广泛接受性,尤其是在儿科人群中(Liccardi等人(2006)《过敏学与临床免疫学研究杂志(J.Investig.Allergol.Clin.Immunol.))》16:75-78)。此外,由于医师依赖标准化程度不高的参数进行量化,因此SPT的结果波动很大(Fatteh等人(2014)《过敏性哮喘与临床免疫学(Allergy Asthma Clin.Immunol.))》10(1):44)。

[0006] 分子工具已经展示出有望作为具有更强大和更可靠的定量能力的补充诊断工具(Ferreira等人(2014)《延世医学杂志(Yonsei Med.J.))》55:839-852)。通过简单的血液测试,对总IgE(tIgE)和过敏原特异性IgE(sIgE)的测量可靠地鉴别患者对给定过敏原展现过敏反应所必需的抗体类型(即sIgE)的存在(Ferreira等人,同上)。但是,若干技术挑战限制了当前一代IgE分子测试的能力。相较于其它高度丰裕且潜在干扰性的蛋白质,例如IgG(40-50mg/mL),血清中的IgE浓度极低(100-500ng/mL)(Amarasekera等人(2011)《亚太过敏

症(Asia Pac Allergy)》。5-6个数量级的浓度差异阻碍了在无关血清蛋白海洋中检测出微量IgE的分析法的发展。

[0007] 进一步加剧该问题的是,过敏原特异性分析中通常会掺入来自全过敏原提取物的蛋白质杂质(Ferreira等人,同上)。这些杂质与非过敏性抗体发生交叉反应,从而降低这些测试的特异性(Ferreira等人,同上)。最近的工作已经鉴别出了与潜在过敏症密切相关的确切过敏原蛋白。利用精确的过敏原蛋白(与全提取物相反)进行的分析构成了“组分解析的过敏症诊断学”的基础(Ferreira等人,同上)。这些测试显示出基于IgE的过敏反应测试的准确性显著提高(Ferreira等人,同上)。

[0008] ImmunoCAP平台(Phadia,Thermo Fischer)主导了组分解析的过敏症IgE测试的诊断领域(Chapman等人(2015)《最新过敏症与哮喘报告(Curr.Allergy Asthma Rep.)》15:36。ImmunoCAP的关键组件是经过过敏原浸渍的致密的聚合物(Chapman等人,同上)。负载在聚合物上的高过敏原有效地捕获了样品中的大部分过敏原结合抗体(Chapman等人,同上)。这种方法使ImmunoCAP的灵敏度比不使用基于聚合物的捕获方法的传统ELISA分析形式大得多。但是,过敏原消耗量的增加会增加ImmunoCAP测试成本(每个样品50美元)。5组件ImmunoCAP测试花生过敏症的成本可高达250美元,并且需要200 $\mu$ L血浆。尽管高性能的组分解析过敏症测试具有增强的灵敏度和特异性,但其相对较高的成本和样品消耗量为品质改进的新型诊断技术提供了机遇。

[0009] 因此,仍然需要对敏感、具特异性和成本效益的抗体进行诊断测试的更好方法。

## 发明内容

[0010] 本发明是基于开发灵敏、可靠的诊断分析用于检测特定同型的抗体。带有DNA条形码的抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物可用于检测特定抗体的存在。DNA条形码的使用允许通过基于核酸的检测方法来鉴别抗体,例如聚合酶链反应(PCR)、等温扩增或微阵列分析。具体地说,本发明的方法将允许监测与免疫病症相关的疾病相关抗体,所述免疫病症例如是过敏症、自身免疫疾病、感染或炎症,从而能够更好地进行疾病管理。

[0011] 在一个方面中,本发明包括一种检测样品中的目标抗体同型的方法,所述方法包含:a)使样品与以下接触:i)抗体结合剂与包含条形码第一部分的第二DNA分子的结合物,以及ii)抗原与包含条形码第二部分的第二DNA分子的结合物,其中样品中如果存在目标抗体同型,则抗原结合到样品中的目标抗体同型,并且抗体结合剂特异性结合到目标抗体同型,从而形成复合物;b)使复合物中的第一DNA分子与第二DNA分子连接,其中条形码的第一部分与条形码的第二部分连接形成完整条形码;以及c)检测完整条形码,其指示样品中的目标抗体同型的存在。

[0012] 第一DNA分子与第二DNA分子的连接能够以各种方式完成。在一个实施例中,所述方法包含:a)使复合物与桥接寡核苷酸接触,其中桥接寡核苷酸包含与第一DNA分子充分互补并能够杂交的第一部分,和与第二DNA分子充分互补并能够杂交的第二部分,其中第一DNA分子和第二DNA分子在复合物中彼此足够接近以同时与桥接寡核苷酸杂交;以及b)将复合物中的第一DNA分子与第二DNA分子连接,以产生包含完整条形码的连接产物。在另一个实施例中,所述方法包含使第一DNA分子中的核苷酸序列与第二DNA分子中的互补核苷酸序列杂交,以及使用聚合酶延伸杂交的第一和第二DNA分子以产生包含完整条形码的核酸。聚

合酶反应能够在例如等温条件下进行。

[0013] 在某些实施例中,使用PCR、等温扩增或微阵列分析检测完整条形码。在另一个实施例中,所述方法进一步包含例如使用定量PCR (qPCR) 定量目标抗体同型的量。

[0014] 在某些实施例中,样品获自患有免疫病症(例如过敏症、感染、自身免疫病症、炎性病症)的受试者。样品通常是血液、血浆或血清,但是可以是任何包含抗体的样品。

[0015] 在某些实施例中,本发明的方法用于检测抗人免疫缺陷病毒(HIV)抗体以诊断HIV感染。为了检测抗HIV抗体,与第二DNA分子结合的抗原是HIV抗原。示例性的HIV抗原包括HIV-1抗原、HIV-2抗原、HIV-1/2抗原、p16、p14、p24、p55、gp120、gp160、gp41和gp36。

[0016] 在某些实施例中,目标抗体分析物选自由以下组成的组:免疫球蛋白E(IgE)、免疫球蛋白M(IgM)、免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白A(IgA)和免疫球蛋白D(IgD)。在某些实施例中,抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型的IgG。

[0017] 抗体结合剂可以是特异性结合到目标抗体同型的任何药剂。抗体结合剂的实例包括但不限于抗体、抗体片段、抗体模拟物和适体。

[0018] 在某些实施例中,抗体结合剂包含特异性结合到目标抗体同型的抗体。所述抗体可以是例如单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、纳米抗体、抗体的重组片段、Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、F<sub>v</sub>片段或scF<sub>v</sub>片段。在某些实施例中,特异性结合到目标抗体同型的抗体选自由以下组成的组:抗IgE抗体、抗IgM抗体、抗IgG抗体、抗IgA抗体和抗IgD抗体。

[0019] 在其它实施例中,抗体结合剂包含特异性结合到目标抗体同型的适体。例如,可以使用特异性结合到目标抗体同型的DNA、RNA、异种核酸(XNA)或肽适体。

[0020] 在其它实施例中,抗体结合剂包括特异性结合到目标抗体同型的抗体模拟物。示例性的抗体模拟物包括亲和抗体分子、人泛素、亲和体、亲和素、 $\alpha$ 抗体、抗运载蛋白、高亲合性多聚体、锚蛋白重复蛋白、非诺莫(fynomers)和单功能抗体。

[0021] 在另一个实施例中,所述方法进一步包含向样品中添加多种抗体结合剂-DNA结合物,其中每种抗体结合剂与包含不同条形码序列的DNA分子结合并且每种抗体结合剂能够结合到不同的目标抗体同型以允许对样品中的多种目标抗体同型进行多重检测。在某些实施例中,抗体结合剂-DNA结合物选自由以下组成的组:用于检测IgE的抗IgE二次抗体-DNA结合物、用于检测IgM的抗IgM二次抗体-DNA结合物、用于检测IgG的抗IgG二次抗体-DNA结合物、用于检测IgA的抗IgA二次抗体-DNA结合物,和用于检测IgD的抗IgD二次抗体DNA结合物。

[0022] 在某些实施例中,所述方法用于检测过敏原特异性抗体,其中所述方法能够检测到浓度大于或等于0.01ng/mL的IgE。

[0023] 在某些实施例中,抗原-DNA结合物包含选自由以下组成的组的抗原:过敏原、自身免疫疾病抗原、癌症抗原和病原体抗原。

[0024] 在另一个实施例中,本发明包括一种检测样品中的目标抗体同型的方法,所述方法包含:a)将抗体结合剂与第一DNA分子的结合物和抗原与第二DNA分子的结合物添加到样品中,其中如果样品中存在目标抗体同型,则抗原结合到样品中的目标抗体同型,且抗体结合剂特异性结合到目标抗体同型,从而形成复合物;b)使复合物与桥接寡核苷酸接触,其中桥接寡核苷酸包含与第一DNA分子充分互补且能够杂交的第一部分,和与第二DNA分子充分互补且能够杂交的第二部分,其中第一DNA分子与第二DNA分子在复合物中彼此充分接近,

以同时与桥接寡核苷酸杂交;c)使复合物中的第一DNA分子与第二DNA分子连接;以及d)检测连接产物,其指示样品中的目标抗体同型的存在。

[0025] 在另一个实施例中,本发明包括一种检测样品中的目标抗体同型的方法,所述方法包含:a)将抗体结合剂与第一DNA分子的结合物和抗原与第二DNA分子的结合物添加至样品中,其中如果样品中存在目标抗体同型,则抗原结合到样品中的目标抗体同型,并且抗体结合剂特异性结合到目标抗体同型,从而形成复合物,且其中第一DNA分子的一部分与第二DNA分子的一部分充分互补以与其杂交;b)使用DNA聚合酶延长所杂交的第一与第二DNA分子,以产生延长的DNA产物;以及d)检测延长的DNA产物,其指示样品中的目标抗体同型的存在。

[0026] 抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物的示例性DNA序列、桥接寡核苷酸和用于检测DNA连接产物的PCR引物展示于实例1和序列表的SEQ ID NO:1-21中。

[0027] 在某些实施例中,抗原-DNA结合物包含选自SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列,或与选自SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列具有至少95%一致性的DNA序列。

[0028] 在某些实施例中,抗体结合剂-DNA结合物包含选自SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列,或与选自SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列具有至少95%一致性的DNA序列。

[0029] 在某些实施例中,桥接寡核苷酸包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的序列具有至少95%一致性的核苷酸序列,其中桥接寡核苷酸能够与第二抗体结合剂-DNA结合物的DNA和抗原-DNA结合物的DNA杂交。

[0030] 在另一个实施例中,所述方法用至少一组试剂进行,所述试剂选自以下组成的组:a)包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;c)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;d)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;e)包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;f)包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;g)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含

SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

[0031] 在另一个实施例中,本发明包括一种用于检测生物样品中的抗体的组合物,其包含至少一组选自由以下组成的组的试剂:a) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

[0032] 在另一个实施例中,本发明包括一种用于进行同型特异性凝集-聚合酶链反应(ISAP)的试剂盒,其包含至少一种抗原-DNA结合物、至少一种抗体结合剂-DNA结合物(例如特异性针对抗体同型的二次抗体或适体)、至少一种桥接寡核苷酸,和至少一对用于检测抗体的PCR引子。试剂盒可进一步包含用于进行ISAP以检测抗体的说明书。试剂盒可进一步包含连接酶,聚合酶和/或用于进行PCR的试剂。

[0033] ISAP能够与其它抗体检测方法组合,尤其是利用DNA条形码以便通过多重PCR检测多种抗体同型的其它方法。在一种多重分析形式中,将ISAP与邻近连接分析(PLA)及/或凝集-聚合酶链反应(ADAP)组合。

[0034] 在某些实施例中,本发明包括一种用于检测样品中的过敏原抗体的方法,所述方法包含将至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物组合使用来执行同型特异性凝集-聚合酶链反应(ISAP),以检测样品中的过敏原特异性IgE含量。

[0035] 在另一个实施例中,本发明进一步包含将至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗免疫球蛋白G4(IgG4)抗体-DNA结合物组合来执行ISAP,以检测过敏原特异性IgG4含量。

[0036] 在另一个实施例中,本发明进一步包含使用至少一对抗IgE抗体-DNA结合物执行邻近连接分析(PLA),以检测样品中的总免疫球蛋白E(IgE)含量。

[0037] 在另一个实施例中,本发明进一步包含使用至少一对过敏原-DNA结合物来执行凝集-聚合酶链反应(ADAP),以检测样品中的总抗过敏原抗体含量。

[0038] 在另一个实施例中,本发明包括一种用于检测样品中的过敏原抗体的方法,所述方法包含:a)使用至少一对抗IgE抗体-DNA结合物执行邻近连接分析(PLA),以检测样品中的总免疫球蛋白E(IgE)含量;b)使用至少一对过敏原-DNA结合物执行凝集-聚合酶链反应(ADAP),以检测样品中的总抗过敏原抗体含量;以及c)将至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物组合使用来执行同型特异性凝集-聚合酶链反应(ISAP),以检测样品中的过敏原特异性IgE含量。所述方法可以进一步包括用至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗免疫球蛋白G4(IgG4)抗体-DNA结合物组合进行ISAP以检测过敏原特异性IgG4含量。

[0039] 在某些实施例中,ADAP用于检测IgG、IgM、IgE、IgA和IgD的总抗过敏原抗体含量。

[0040] 在某些实施例中,检测亚型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型或其组合的IgG的总抗过敏原含量。

[0041] 在另一个实施例中,执行PLA包含:a)向样品中添加所述至少一对抗IgE抗体-DNA结合物,其中所述至少一对抗IgE抗体-DNA结合物包含在第一位点结合到样品中的IgE的第一抗IgE抗体-DNA结合物和和第二位点结合到同一IgE的第二抗IgE抗体-DNA结合物;b)使样品与PLA桥接寡核苷酸接触,其中PLA桥接寡核苷酸包含:(i)与第一抗IgE抗体-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第一部分,和(ii)与第二抗IgE抗体-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第二部分,其中第一抗IgE抗体-DNA结合物中的DNA和第二抗IgE抗体-DNA结合物中的DNA彼此充分邻近以同时与PLA桥接寡核苷酸杂交;c)使第一抗IgE抗体-DNA结合物与第二抗IgE抗体-DNA结合物连接以产生PLA连接产物;以及d)检测PLA连接产物,其指示样品中的IgE的存在。

[0042] 在另一个实施例中,执行ADAP包含:a)向样品中添加所述至少一对过敏原-DNA结合物,其中所述至少一对过敏原-DNA结合物包含在第一位点结合到样品中的抗过敏原抗体

的第一过敏原-DNA结合物和在第二位点结合到同一抗过敏原抗体的第二过敏原-DNA结合物;b)使样品与ADAP桥接寡核苷酸接触,其中ADAP桥接寡核苷酸包含:(i)与第一过敏原-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第一部分,和(ii)与第二过敏原-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第二部分,其中第一过敏原-DNA结合物中的DNA和第二过敏原-DNA结合物中的DNA彼此充分邻近以同时与ADAP桥接寡核苷酸杂交;c)使第一过敏原-DNA结合物与第二过敏原-DNA结合物连接以产生ADAP连接产物;以及d)检测ADAP连接产物,其指示样品中的抗过敏原抗体的存在。

[0043] 在另一个实施例中,执行ISAP包含:a)向样品中添加至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合,其中过敏原-DNA结合物结合到样品中的过敏原特异性IgE,且抗IgE抗体-DNA结合物结合到同一过敏原特异性IgE,从而形成第一复合物;b)使第一复合物与ISAP桥接寡核苷酸接触,其中ISAP桥接寡核苷酸包含:(i)与抗IgE抗体-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第一部分,和(ii)与过敏原-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第二部分,其中抗IgE抗体-DNA结合物中的DNA与过敏原-DNA结合物中的DNA在第一复合物中彼此充分邻近以同时与ISAP桥接寡核苷酸杂交;c)使第一复合物中的抗IgE抗体-DNA与过敏原-DNA连接,以产生第一ISAP连接产物;d)检测第一ISAP连接产物,其指示样品中的过敏原特异性IgE的存在;e)向样品中添加至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合,其中过敏原-DNA结合物结合到样品中的过敏原特异性IgG4,并且抗IgG4抗体-DNA结合物结合到同一过敏原特异性IgG4,从而形成第二复合物;f)使第二复合物与ISAP桥接寡核苷酸接触,其中ISAP桥接寡核苷酸包含:(i)与抗IgG4抗体-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第一部分,和(ii)与过敏原-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第二部分,其中抗IgG4抗体-DNA结合物中的DNA与过敏原-DNA结合物中的DNA在复合物中彼此充分邻近以同时与ISAP桥接寡核苷酸杂交;g)使第二复合物中的抗IgG4抗体-DNA和过敏原-DNA连接以产生第二ISAP连接产物;以及h)检测第二ISAP连接产物,其指示样品中的过敏原特异性IgG4的存在。

[0044] 在某些实施例中,利用多重聚合酶链反应(PCR)、等温扩增或微阵列分析来检测PLA连接产物、ADAP连接产物、第一ISAP连接产物和第二ISAP连接产物。所述方法可以进一步包含对PLA连接产物、ADAP连接产物、第一ISAP连接产物和第二ISAP连接产物的量进行定量,例如通过执行qPCR来定量。

[0045] 在另一个实施例中,使用至少一组选自以下组成的组的试剂进行PLA:a)包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;c)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;d)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID

NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

[0046] 在另一个实施例中,ADAP用至少一组选自以下组成的组的试剂执行:a) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8

的序列的正向引物;h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物; i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

[0047] 在另一个实施例中,用至少一组选自由以下组成的组的试剂执行ISAP:a) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

[0048] 在另一个实施例中,用至少一组选自由以下组成的组的试剂执行ISAP:包含SEQ ID NO:1的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结

合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

[0049] 在另一个实施例中,本发明包括一种用于检测样品中的花生过敏原抗体的方法,其中a) 利用一对抗IgE抗体-DNA结合物执行PLA以检测样品中的总IgE含量;b) 利用以下执行ADAP:检测样品中的总抗Ara h1抗体含量的一对Ara h1-DNA结合物、检测样品中的总抗Ara h2抗体含量的一对Ara h2-DNA结合物,和检测样品中的总抗Ara h3抗体含量的一对Ara h3-DNA结合物;以及c) 利用以下来执行ISAP:Ara h1-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合以检测样品中的Ara h1特异性IgE含量、Ara h2-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合以检测样品中的h2特异性IgE含量,和Ara h3-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合以检测样品中的Ara h3特异性IgE含量。在另一个实施例中,执行ISAP进一步包含使用Ara h1-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合来检测样品中的Ara h1特异性IgG4含量、使用Ara h2-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合来检测样品中的Ara h2特异性IgG4含量,以及使用Ara h3-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合来检测样品中的Ara h3特异性IgG4含量。

[0050] 在另一个实施例中,所述方法包含:a)用以下执行PLA以检测样品中的总IgE含量:包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b)用以下执行ADAP:i)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第一Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第二Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测样品中的总抗Ara h1抗体含量;ii)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第一Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第二Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测样品中的总抗Ara h2抗体含量,和iii)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第一Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第二Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测样品中的总抗Ara抗体含量;以及c)用以下执行ISAP:i)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h1特异性IgE含量;ii)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h2特异性IgE含量;iii)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h3特异性IgE含量;iv)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h1特异性IgG4含量;v)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h2特异性IgG4含量;和vi)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h3特异性IgG4含量。

[0051] 在另一个实施例中,本发明包括一种组合物,其包含:a)用于执行PLA的试剂,所述试剂包含:包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物,以便检测总IgE含量;b)用于执行ADAP的试剂,所述试剂包含:i)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的

第一Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第二Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以便检测总抗Ara h1抗体含量;ii) 包含SEQ ID NO:9DNA序列的第一Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第二Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以便检测总抗Ara h2抗体含量;和iii) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第一Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第二Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以便检测总抗Ara h3抗体含量;以及c) 用于执行ISAP的试剂,所述试剂包含:i) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以便检测Ara h1特异性IgE含量;ii) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以便检测Ara h2特异性IgE含量;iii) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的Ara-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以便检测Ara h3特异性IgE含量;iv) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以便检测Ara h1特异性IgG4含量;v) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以便检测样品中的Ara h2特异性IgG4含量,和vi) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以便检测Ara h3特异性IgG4含量。

[0052] 在另一个实施例中,本发明包括一种试剂盒,其包含本文所述的组合物和检测过敏原抗体的说明书。试剂盒可进一步包含连接酶和用于进行PCR的试剂。

[0053] 所属领域的技术人员鉴于本文的公开内容将容易想到本发明的这些和其它实施例。

## 附图说明

[0054] 图1显示了凝集PCR同型特异性抗体检测(ISAP)的示意图。

[0055] 图2显示了ISAP方法原则上可用于检测任何同型的抗体,包括IgE、IgM、IgG、IgA和IgD,并且还可以用于在单一分析中通过添加相应的二次抗体-DNA结合物来检测两种或更多种不同的同型。表格(右表)列出了能够在单一分析中检测IgG4和IgE抗花生抗原抗体的

组合物。

[0056] 图3A-3C显示了ISAP方法能用于检测针对花生抗原Ara h1 (图3A)、Ara h2 (图3B)和Ara h3 (图3C)的IgE抗体。结果与临床上目前使用的黄金标准 (ImmunoCAP) 密切相关。

[0057] 图4显示了过敏原-DNA和抗体-DNA结合物的代表性银染色。与DNA结合的过敏原或抗体比其未结合的对对应物具有更高的质量。

[0058] 图5显示了基于PCR的过敏分析的概述,包括邻近连接分析 (PLA),它是基于PCR的蛋白质检测方法;凝集PCR抗体检测 (ADAP),其检测所有亚型 (IgG、IgM、IgA、IgE、IgD)的抗原特异性免疫球蛋白,和同型特异性凝集PCR (ISAP),其检测特定同型的抗原特异性免疫球蛋白。图5 (底部) 显示了将PLA、ADAP和ISAP整合到单一分析中。使用所示引物对进行PCR能够对过敏症标记多重检测。引物1F/1R检测总IgE,2F/2R检测总抗过敏原抗体,并且2F/1R或1F/2R检测过敏原特异性IgE。

[0059] 图6A和6B显示,ISAP在缓冲液中检测到纯化的抗体,胜过ELISA。图6A显示了对纯化抗OVA IgE (黑色方形)、抗OVA IgG (深灰色方形) 和非特异性IgE (浅灰色菱形)的稀释系列进行的ISAP分析。图6B显示了对纯化抗OVA IgE的稀释系列进行的ISAP (黑色圆圈) 和ELISA (灰色方形) 分析。两个图中的x轴是抗体的摩尔量。y轴表示与空白值相比的 $\Delta Ct$ 值。

[0060] 图7A-7C显示经整合的基于PCR的分析以最小的串扰检测过敏症标记。在这种分析中,我们以多重方式检测了总IgE (tIgE)、总抗过敏原和特异性IgE (sIgE)。分别通过 (图7A) 抗OVA IgG、(图7B) 非特异性IgE和 (图7C) 抗OVA IgE的稀释系列来评估所整合的分析的特异性。

[0061] 图8A-8E显示了对来自卵白蛋白 (OVA) 致敏小鼠的血清进行的基于PCR的整合分析。在第0、7、14和21天从OVA致敏小鼠和对照小鼠收集血清。每只小鼠的PCR信号相对于第0天归一化。图8A-8C显示出了基于PCR的分析检测到IgE从第7天 (图8A) 开始,sIgE在第14天 (图8B) 和总抗OVA在第7天的产生增强。图8D显示了对同一组血清样品上的sIgE进行的ELISA分析。第14天观察到产生增强。图8E示出了使用血清和全血样品对总IgE进行的基于PCR的分析之间的相关性。血清和全血样品显示0.86的相关系数 (R)。

[0062] (\*表示P值小于0.05)

[0063] 图9A和9B显示了对来自花生致敏小鼠的血清进行的基于PCR的分析。

[0064] 图9A显示了用花生油通过表皮致敏的BALB、Rag敲除和Jh敲除小鼠的结果。将测得的PCR信号相对于第0天归一化。致敏后,观察到BALB小鼠的总IgE、抗Ara h1 IgE和总抗Ara h3产生增加。图9B显示了通过ELISA对同一组BALB小鼠血清进行的花生特异性IgE检测。没有观察到花生特异性IgE的诱导。

[0065] 图10A-10E显示了对来自花生过敏性人类患者的血浆进行的基于PCR的分析。血浆是来自POISED免疫疗法试验 (ClinicalTrials.gov标识符:NCT02103270) 的基线样品。基于PCR的整合分析在单一分析中从1 $\mu$ L血浆中同时检测到10种过敏特点:tIgE、sIgE-Ara-h1、sIgG4-Ara-h1、总抗Ara-h1、sIgE-Ara-h2、sIgG4-Ara-h2、总抗Ara-h2、sIgE-Ara-h3、sIgG4-Ara-h3、总抗Ara-h3。图10A-10C显示了基于PCR的分析与ImmunoCAP之间的相关性。观察到我们的基于PCR的分析与ImmunoCAP分析之间存在高度相关性 (图10A (sIgE Ara-h1的R=0.64),图10B (sIgE-Ara-h2为0.92);图10C (sIgE Ara-h3为0.88))。图10D显示了基于PCR的分析与全花生提取物ImmunoCAP之间的相关性。我们将通过基于PCR的Ara-h1、Ara-h2

和Ara-h3分析法测得的sIgE信号加总,这代表了向全花生提取物的反应性。ISAP总信号与全花生提取物ImmunoCAP的相关性很高( $R=0.82$ )。图10E显示了我们的基于PCR的分析与ImmunoCAP之间的比较。(样品量和成本是基于我们的基于PCR的分析所提供的全部10种过敏特点)。

### 具体实施方式

[0066] 除非另外指示,否则本发明的实施将采用所属领域的技能范围内的免疫学、化学、生物化学、分子生物学和重组DNA技术的常规方法。这类技术充分解释于文献中。参见例如哮喘和过敏性疾病的IgE和抗IgE疗法(IgE and Anti-IgE Therapy in Asthma and Allergic Disease)(《健康和疾病中的肺生物学(Lung Biology in Health and Disease)》,R.B.Fick和P.M.Jardieu编,CRC出版社,2002);《米德尔顿过敏症:原理和实践(Middleton's Allergy:Principles and Practice)》(N.F.Adkinson,B.S.Bochner,A.W.Burks,W.W.Busse,S.T.Holgate,R.F.Lemanske和R.E.O'Hehir编,Saunders,第8版,2013);《PCR技术:当前创新(PCR Technology:Current Innovations)》(T.Nolan和S.A.Bustin编,CRC出版社,第3版,2013);《抗体:实验室手册(Antibodies A Laboratory Manual)》(E.A.Greenfield编,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),第2次实验室版本,2013);《实验免疫学手册(Handbook of Experimental Immunology)》第I-IV卷(D.M.Weir和C.C.Blackwell编,布莱克威尔科学出版社(Blackwell Scientific Publications));T.E.Creighton,《蛋白质:结构和分子特性(Proteins:Structures and Molecular Properties)》(W.H.Freeman and Company,1993);A.L.Lehninger,《生物化学(Biochemistry)》(沃斯出版社有限公司(Worth Publishers, Inc.),最新版);M.R.Green和J.Sambrook,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(冷泉港实验室出版社,第4版,2012);酶学方法(S.Colowick和N.Kaplan编,学术出版社有限公司(Academic Press,Inc.))。

[0067] 本文中(不论上文或下文)所列举的所有出版物、专利和专利申请都以其全文引用的方式并入本文。

[0068] 1. 定义

[0069] 在描述本发明时,将采用以下术语并且希望如下文所指示定义。

[0070] 还应了解,除非上下文另外明确规定,否则如本说明书和所附权利要求书中所用,单数形式“一(a/an)”和“所述(the)”包括复数个指示物。因此,举例来说,提及“抗体”包括两种或更多种抗体的混合物以及其类似物。

[0071] 术语“约”,特别是关于给定数量,意欲涵盖加上或减去5%的偏差。

[0072] 本文中所用的术语“聚核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”包括任何长度的核苷酸的聚合物形式:核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。这个术语仅指分子的一级结构。因此,所述术语包括三链、双链和单链DNA以及三链、双链和单链RNA。它还包括修饰,例如甲基化和/或加帽,和多核苷酸的未修饰形式。更具体地说,术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”包括多脱氧核糖核苷酸(含有2-脱氧-D-核糖)、多核糖核苷酸(含有D-核糖)、任何其它类型的多核苷酸,其是嘌呤或嘧啶碱的N-糖苷或C-糖苷,以及含有非核苷酸主链的其它聚合物,例如聚酰胺(例如肽核酸(PNA))和聚吗啉基(可购自抗病毒有限公司

(Anti-Virals, Inc.), Corvallis, Oregon, 作为Neugene) 聚合物, 以及其它合成序列特异性核酸聚合物, 其条件是聚合物所含核碱基的构形允许发生碱基配对和碱基叠加, 例如DNA和RNA中所发现的那样。术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”之间在长度上无预定的区别, 且此等术语可互换地使用。因此, 此等术语包括例如3'-脱氧-2', 5'-DNA、寡脱氧核糖核苷酸N3'P5'氨基磷酸酯、2'-O-烷基取代的RNA、双链和单链DNA, 以及双链和单链RNA、DNA:RNA杂合体, 以及PNA与DNA或RNA之间的杂合体, 且还包括已知的修饰类型, 例如所属领域中已知的标记、甲基化、“帽”、一个或多个天然存在的核苷酸被类似物取代、核苷酸间修饰, 例如不带电荷的键联(例如磷酸甲酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)、带负电荷的键联(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等), 以及带正电荷的键联(例如氨基烷基氨基磷酸酯、氨基烷基磷酸三酯); 含有侧接部分的那些修饰, 例如蛋白质(包括核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等); 具有嵌入剂的那些修饰(例如吡啶、补骨脂素等)、含有螯合剂的那些修饰(例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)、含有烷基化剂的那些修饰、具有经修饰的键联的那些修饰(例如 $\alpha$ 变旋异构核酸等), 以及多核苷酸寡核苷酸寡核苷酸的未修饰形式。

[0073] 如本文用于描述核酸分子的“重组体”是指基因组、cDNA、病毒、半合成或合成来源的多核苷酸, 其凭借其来源或操控而与自然界中和其相关的多核苷酸的全部或部分不相关。如关于蛋白质或多肽所使用的术语“重组”是指通过重组多核苷酸的表达而产生的多肽。一般来说, 将所关注的基因克隆且然后在转化的生物体中表达, 如下文进一步描述。宿主生物体表达外源基因以在表达条件下产生蛋白质。

[0074] 如本文所用, “固体载体”是指固体表面, 例如磁珠、乳胶珠、微量滴定板孔、玻璃板、尼龙、琼脂糖、丙烯酰胺等。

[0075] “基本上纯化的”通常是指物质(化合物、多核苷酸、蛋白质、多肽、肽组合物)的分离, 使得所述物质占其所驻留的样品的大部分。通常, 在样品中, 基本上纯化的组分占样品的50%, 优选80%-85%, 更优选90-95%。所关注的多核苷酸和多肽的提纯技术是本领域众所周知的, 包括例如离子交换色谱、亲和色谱和根据密度的沉降。

[0076] 当提及多肽时, 术语“分离”意指所指定的分子与自然界中发现存在所述分子的整个生物体是分开的且离散的, 或在同类型的其它生物学大分子基本缺乏的情况下存在。关于核酸的术语“分离的”是在自然界中完全或部分缺乏通常与之相关的序列的核酸分子; 或当其在自然界中存在时但具有与之相关的异源序列的序列; 或从染色体解离的分子。

[0077] 如本文所用, 术语“目标核酸区域”或“目标核酸”表示具有待扩增的“目标序列”的核酸分子。目标核酸可以是单链或双链核酸并且除目标序列外, 还可以包括可能未扩增的其它序列。术语“目标序列”是指待扩增的目标核酸的特定核苷酸序列。目标序列可包括目标分子内所含的探针杂交区, 探针将在所需条件下与之形成稳定的杂交体。“目标序列”还可以包括利用目标序列作为模板、与寡核苷酸引物复合且延长的复合序列。在目标核酸最初是单链的情况下, 术语“目标序列”也指与目标核酸中存在的“目标序列”互补的序列。如果“目标核酸”最初是双链的, 则术语“目标序列”是指正链(+)和负链(-)(或有义和反义链)。

[0078] 如本文所用, 术语“引物”或“寡核苷酸引物”是指一种寡核苷酸, 其与核酸的模板链杂交且当放在诱导引物延伸产物合成的条件(即, 在核苷酸和聚合诱导剂(例如DNA或RNA

聚合酶)存在下且在适合的温度、pH、金属浓度和盐浓度)下时引发与模板链互补的核酸链的合成。为了使扩增效率最大化,引物优选单链的,但可以替代地是双链的。如果是双链,则在用于制备延伸产物之前,可以首先处理引物以分离其链。这个变性步骤通常通过加热来进行,但是可以替代地使用碱进行,随后中和。因此,“引物”与模板互补,并且通过氢键结合或与模板杂交而复合,得到引物/模板复合物用于通过聚合酶引发合成,所述复合物通过在DNA或RNA合成过程中添加在其3'末端连接的与模板互补的共价键结的碱基而延伸。通常,使用至少一组寡核苷酸引物扩增核酸,所述寡核苷酸引物包含至少一个正向引物和至少一个反向引物,所述引物能够与待扩增的核酸部分侧翼的核酸区域杂交。

[0079] 术语“扩增子”是指PCR反应或其它核酸扩增方法(例如等温扩增、滚环扩增、连接酶链反应(LCR))的扩增核酸产物。

[0080] 如本文所用,术语“探针”或“寡核苷酸探针”是指如上文所定义的多核苷酸,其含有与目标核酸分析物中存在的核酸序列互补的核酸序列。探针的多核苷酸区域可以由DNA和/或RNA和/或合成核苷酸类似物组成。可以标记探针以检测目标序列。这样的标签可以存在于5'末端、3'末端、5'和3'末端两者和/或内部。“寡核苷酸探针”可以含有至少一种荧光剂和至少一种淬灭剂。荧光团荧光的淬灭可以通过核酸外切酶使荧光团从寡核苷酸分裂(例如TaqMan分析)或通过寡核苷酸探针与核酸目标序列(例如分子信标)杂交来消除。另外,当用于核酸扩增分析中时,寡核苷酸探针通常将衍生自位于有义和反义引物之间的序列。

[0081] 术语“杂交(hybridize)”和“杂交(hybridization)”是指核苷酸序列之间形成复合物,所述核苷酸序列充分互补以经由沃森-克里克碱基配对(Watson-Crick base pairing)来形成复合物。在引物与目标(模板)“杂交”的情况下,此类复合物(或杂合体)的稳定性足以发挥预致敏功能,例如DNA聚合酶引发DNA合成所必需的预致敏功能。

[0082] 应了解,杂交序列无需为了提供稳定杂合体而具有完美的互补性。在许多情况下,会形成稳定的杂交体,其中少于约10%的碱基是错配的,而忽略了四个或更多核苷酸的环。相应地,如本文所使用,术语“互补”是指寡核苷酸在分析条件下与其“组分”形成稳定双螺旋体,一般而言,其中存在约90%或更大的同源性。

[0083] 术语“选择性地检测(selectively detects)”或“选择性地检测(selectively detecting)”是指利用寡核苷酸(例如能够检测到特定DNA条形码的引物和/或探针)检测抗体同型,例如扩增和/或结合到特定抗原-DNA或抗体结合剂-DNA结合物(例如二次抗体-DNA、抗体模拟物-DNA,或适体-DNA结合物)的DNA条形码,或其连接产物或延伸产物,但在适当杂交条件下不扩增和/或结合到其它DNA序列。

[0084] 术语“抗体”涵盖多克隆和单克隆抗体制剂,以及包括以下的制剂:杂合体抗体、改变的抗体、嵌合抗体和人源化抗体,以及:杂合体(嵌合)抗体分子(参见例如Winter等人(1991)《自然(Nature)》349:293-299;和美国专利第4,816,567号);F(ab')<sub>2</sub>和F(ab)片段;F<sub>v</sub>分子(非共价杂二聚体,参见例如Inbar等人(1972)《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》69:2659-2662;和Ehrlich等人(1980)《生物化学(Biochem)》19:4091-4096);单链F<sub>v</sub>分子(sF<sub>v</sub>) (参见例如Huston等人(1988)《美国国家科学院院刊》85:5879-5883);纳米抗体或单域抗体(sdAb) (参见例如Wang等人(2016)《国际纳米医学杂志(Int J Nanomedicine)》11:3287-3303;Vincke等人(2012)《分子生物学方法(Methods Mol Biol)》

911:15-26;二聚合和三聚合抗体片段构筑体;微型抗体(参见例如Pack等人(1992)《生物化学》31:1579-1584;Cumber等人(1992)《免疫学杂志(J Immunology)》149B:120-126);人源化抗体分子(参见例如Riechmann等人(1988)《自然》332:323-327;Verhoeyan等人(1988)《科学(Science)》239:1534-1536;以及1994年9月21日公开的英国专利公开第GB2,276,169号);以及获自此类分子的任何功能片段,其中此类片段保持亲本抗体分子的特异性结合特性。

[0085] 如本文所用的术语“抗原”是指任何天然存在的或合成的免疫原性物质。免疫原性物质包括外来物质和天然存在于生物体体内的物质。这样,外源免疫原性物质的引入可以诱导生物体对外来免疫原性物质产生一般或特异性免疫反应。在其它情况下,在生物体体内产生免疫原性物质可以诱导所述生物体对天然免疫原性物质产生特异性或一般的自身免疫反应。如本文所用,抗原涵盖但不限于化学物质、小分子、生物分子(例如核酸)、大分子、肽、多肽、细胞片段、细胞、单细胞生物体、多细胞生物体、其片段和其组合。在一些情况下,抗原可以是结合抗原的药剂已知的抗原,例如结合多肽的抗体已知的多肽。在某些情况下,抗原可以是结合抗原的药剂未知的抗原,例如结合多肽的抗体未知的多肽。举例来说,天然存在的与合成的多肽和肽用作可以产生抗体的抗原的用途已经描述于例如《分子生物学方法:免疫化学方案(Methods in Molecular Biology:Immunochemical Protocols)》Burns,R.编,胡马纳出版社(Humana Press),2005,其公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0086] 当提及抗原或过敏原时,短语“特异性地(或选择性地)结合”到抗体或与抗体“特异性地(或选择性地)发生免疫反应”是指结合反应,其确定蛋白质和其它生物制剂的异质群中的抗原或过敏原的存在。因此,在指定的免疫分析条件下,指定的抗体与特定抗原的结合至少是本底的两倍,并且基本上不与样品中存在的其它抗原大量结合。在此类条件下特异性结合到抗体可能需要根据其针对特定抗原的特异性来选择抗体。例如,可以选择针对特定物种(例如大鼠、小鼠或人类)的抗原产生的多克隆抗体,以仅获得与所述抗原具有特异性免疫反应而不与其它蛋白质发生特异性免疫反应的那些多克隆抗体,但多态性变体和等位基因除外。所述选择可以通过减去与其它物种的分子发生交叉反应的抗体来实现。可以使用多种免疫分析形式来选择与特定抗原发生特异性免疫反应的抗体。例如,常规地使用固相ELISA免疫分析来选择与蛋白质发生特异性免疫反应的抗体(参见例如Harlow& Lane.《抗体:实验室手册(Antibodies,A Laboratory Manual)》(1988),其描述了能用于确定特异性免疫反应性的免疫分析形式和条件。通常,特异性或选择性反应将是本底信号或噪声的至少两倍,更通常是本底的10到100倍。

[0087] 如本文所用,“生物样品”是指从受试者中分离的细胞、组织或体液的样品,包括(但不限于)例如血液、血浆、血清、粪便物、尿液、骨髓、胆汁、脊髓液、淋巴液、皮肤样品、皮肤的外分泌物、呼吸道、肠道和泌尿生殖道、泪液、唾液、乳汁、细胞(例如上皮和内皮细胞、纤维母细胞和巨噬细胞)、肌肉、关节、器官(例如肝脏、肺、脾脏、胸腺、肾脏、脑或淋巴结)、体液的异常收集物(例如炎性渗出液或流出物)、脓、囊肿内容物或组织坏死区域、天然或经诱导的痰液、通过为了诊断或治疗目的而执行的灌洗所获得的体液(例如鼻、咽或支气管肺泡灌洗液),或活体组织切片,以及试管内细胞培养成分的样品,包括(但不限于)由细胞和组织(例如重组细胞和细胞组分)在培养基中生长而产生的条件培养基。

[0088] 如本文所用,术语“标记”和“可检测标记”是指能够检测的分子,包括(但不限于)放射性同位素、荧光剂、化学发光剂、发色团、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂、半导体纳米粒子、染料、金属离子、金属溶胶、配体(例如生物素、链霉亲和素或半抗原)等等。术语“荧光”是指能够在可检测范围内展现荧光的物质或其一部分。可以用于实施本发明的标记的特定实例包括(但不限于)SYBR绿、SYBR金、CAL Fluor染料(例如CAL Fluor金540、CAL Fluor橙560、CAL Fluor红590、CAL Fluor红610和CAL Fluor红635)、Quasar染料(例如Quasar 570、Quasar 670和Quasar 705)、Alexa Fluor(例如Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647和Alexa Fluor 784)、花青染料(例如Cy 3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5和Cy7)、荧光素、2',4',5',7'-四氯-4-7-二氯荧光素(TET)、羧基荧光素(FAM)、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(JOE)、六氯荧光素(HEX)、若丹明(rhodamine)、羧基-X-若丹明(ROX)、四甲基若丹明(TAMRA)、FITC、丹酰、伞酮、二甲基吡啶酯(DMAE)、德克萨斯红(Texas red)、鲁米诺(luminol)、NADPH、辣根过氧化酶(HRP),和 $\alpha$ - $\beta$ -半乳糖苷酶。

[0089] “受试者”是指脊索动物亚门的任何成员,包括(但不限于)人类和其它灵长类动物,包括非人类灵长类动物,例如黑猩猩和其它猿和猴物种;耕畜,例如牛、绵羊、猪、山羊和马;家养哺乳动物,例如狗和猫;鸟类;以及实验室动物,包括啮齿动物,例如小鼠、大鼠和豚鼠等。所述术语不表示特定年龄。因此,希望涵盖成人和新生儿。

[0090] 2. 实施本发明的方式

[0091] 在详细描述本发明之前,应理解,本发明不限于特定配制品或程序参数,因为这些当然可变化。还应理解,本文所用的术语仅出于描述本发明的具体实施例的目的,并且不希望具有限制性。

[0092] 尽管在本发明的实施中可使用与本文所述的方法和材料类似或等效的许多方法和材料,但是本文描述了优选的材料和方法。

[0093] 本发明是基于发现用于检测特定同型的抗体的试剂和方法。具体地说,携带DNA条形码的抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物用于检测特定抗体的存在。DNA条形码的使用允许通过基于核酸的检测方法(例如PCR、等温扩增或微阵列分析)来鉴别抗体。本发明的方法可以用于在单一分析中检测和/或定量多种抗体。另外,本文描述的分析能够容易地与检测抗体的任何其它分析组合。多重分析能够用于例如检测疾病相关抗体的总含量以及多种疾病相关抗体同型的个体含量。本发明的方法将允许监测与免疫病症相关的疾病相关抗体,所述免疫病症例如过敏症、自身免疫疾病、感染或炎症以及更好的疾病管理。

[0094] 为了进一步理解本发明,下面提供了关于检测抗体的分析方法及其在诊断和监测疾病相关抗体方面的用途的更详细的讨论。

[0095] A. 检测抗体的多重分析

[0096] 所述方法使用抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物以及寡核苷酸试剂(例如寡核苷酸引物和/或探针)或能够在单一分析中检测一种或多种抗体同型的试剂的组合。本文所述的分析方法可以用于检测对任何类型的抗原具有特异性的抗体同型,所述抗原包括(但不限于)过敏原、自身免疫疾病抗原、癌症抗原或病原体抗原。有许多分析设计能够用于检测抗体同型,其能够单独使用或彼此组合使用。

[0097] 在一个实施例中,本发明包括一种检测样品中的目标抗体同型的方法,所述方法

包含:a)使样品与以下接触:抗体结合剂与包含条形码第一部分的第二DNA分子的结合物,以及抗原与包含条形码第二部分的第二DNA分子的结合物,其中样品中的目标抗体同型如果存在,则抗原结合到样品中的目标抗体同型,并且抗体结合剂特异性结合到目标抗体同型,从而形成复合物;b)使复合物中的第一DNA分子与第二DNA分子连接,其中条形码的第一部分与条形码的第二部分连接形成完整条形码;以及c)检测完整条形码,其指示样品中的目标抗体同型的存在。

[0098] 第一DNA分子与第二DNA分子的连接可以多种方式完成。在一个实施例中,使用连接酶将第一DNA分子和第二DNA分子连接在一起以产生包含完整条形码的连接产物。桥接寡核苷酸可用于促进连接,其中桥接寡核苷酸包含与第一DNA分子充分互补并且能够杂交的第一部分,以及与第二DNA分子充分互补并能够杂交的第二部分。在包含抗体结合剂与第一DNA分子的结合物和抗原与第二DNA分子的结合物的复合物(其中两种结合物均与目标抗体同型结合)中,第一DNA分子和第二DNA分子彼此充分邻近以同时与桥接寡核苷酸杂交并且经历连接。连接产物能够加以检测和/或定量,例如利用聚合酶链反应(PCR)、等温扩增或微阵列分析加以检测和/或定量。

[0099] 在另一个实施例中,第一DNA分子和第二DNA分子包含互补的核苷酸序列,其中第一DNA分子中的核苷酸序列与第二DNA分子中的互补核苷酸序列杂交允许聚合酶延长所杂交的第一与第二DNA分子,以产生包含完整条形码的核酸。聚合酶反应能够例如在等温条件下进行。

[0100] “抗体结合剂”可以是特异性结合到目标抗体同型的任何药剂。在一些实施例中,抗体结合剂以高亲和力结合到目标抗体同型。抗体结合剂的实例包括(但不限于)抗体、抗体片段、抗体模拟物和适体。

[0101] 在某些实施例中,抗体结合剂包含特异性结合到目标抗体同型的抗体。可以使用任何类型的抗体,包括多克隆和单株抗体、杂合抗体、改变的抗体、嵌合抗体和人源化抗体,以及:杂合(嵌合)抗体分子(参见例如Winter等人(1991)《自然(Nature)》349:293-299;和美国专利第4,816,567号);F(ab')<sub>2</sub>和F(ab)片段;F<sub>v</sub>分子(非共价杂二聚体,参见例如Inbar等人(1972)《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》69:2659-2662;和Ehrlich等人(1980)《生物化学(Biochem)》19:4091-4096);单链F<sub>v</sub>分子(sFv)(参见例如Huston等人(1988)《美国国家科学院院刊》85:5879-5883);纳米抗体或单域抗体(sdAb)(参见例如Wang等人(2016)《国际纳米医学杂志(Int J Nanomedicine)》11:3287-3303;Vincke等人(2012)《分子生物学方法(Methods Mol Biol)》911:15-26;二聚合和三聚合抗体片段构筑体;微型抗体(参见例如Pack等人(1992)《生物化学》31:1579-1584;Cumber等人(1992)《免疫学杂志(J Immunology)》149B:120-126);人源化抗体分子(参见例如Riechmann等人(1988)《自然》332:323-327;Verhoeyan等人(1988)《科学(Science)》239:1534-1536;以及1994年9月21日公开的英国专利公开第GB 2,276,169号);以及获自此类分子的任何功能片段,其中此类片段保持亲本抗体分子的特异性结合特性(即,特异性结合到目标抗体同型)。

[0102] 在其它实施例中,抗体结合剂包含特异性结合到目标抗体同型的适体。可以使用任何类型的适体,包括特异性结合到目标抗体同型的DNA、RNA、异种核酸(XNA)或肽适体。此类适体能够例如通过筛选组合文库来鉴定。选择性结合到目标抗体同型的核酸适体(例如DNA或RNA适体)能够通过重复进行多轮试管内选择或通过指数富集(SELEX)的配体系统进

化来产生。可以从组合文库中分离出结合到目标抗体同型的肽适体,并通过定向突变或重复的多轮诱变和选择来改进。关于适体产生方法的描述,参见例如《适体:纳米疗法和分子成像的工具(Aptamers:Tools for Nanotherapy and Molecular Imaging)》(R.N.Veedu编,Pan Stanford,2016)、《核酸和肽适体:方法和方案(Nucleic Acid and Peptide Aptamers:Methods and Protocols)》(《分子生物学方法(Methods in Molecular Biology)》,G.Mayer编,胡马纳出版社,2009)、《核酸适体:选择、表征和应用(Nucleic Acid Aptamers:Selection,Characterization,and Application)》(《分子生物学方法》,G.Mayer编,胡马纳出版社,2016)、《通过细胞-SELEX选择的适体用于治疗诊断学(Aptamers Selected by Cell-SELEX for Theranostics)》(W.Tan,X.Fang编,施普林格(Springer),2015),Cox等人(2001)《生物有机化学与医药化学(Bioorg.Med.Chem.)》9(10):2525-2531;Cox等人(2002)《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》30(20):e108;Kenan等人(1999)《分子生物学方法(Methods Mol Biol.)》118:217-231;Platella等人(2016)《生物化学与生物物理学报(Biochim.Biophys.Acta)》Nov 16pii:S0304-4165(16)30447-0,和Lyu等人(2016)Theranostics 6(9):1440-1452,所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0103] 在另一个实施例中,抗体结合剂包含抗体模拟物。可以使用任何类型的抗体模拟物,包括(但不限于)亲和抗体分子(Nygren(2008)《欧洲生物化学协会联合会杂志(FEBS J.)》275(11):2668-2676)、人泛素(Ebersbach等人(2007)《分子生物学杂志》372(1):172-185)、亲和体(Johnson等人(2012)《分析化学(Anal.Chem.)》84(15):6553-6560)、亲和素(Krehenbrink等人(2008)《分子生物学杂志》383(5):1058-1068)、 $\alpha$ 抗体(Desmet等人(2014)《自然通讯(Nature Communications)》5:5237)、抗运载蛋白(Skerra(2008)《欧洲生物化学协会联合会杂志》275(11):2677-2683)、高亲合性多聚体(Silverman等人(2005)《自然·生物技术(Nat.Biotechnol)》23(12):1556-1561)、锚蛋白重复蛋白(Stumpp等人(2008)《当今药物开发(Drug Discov.Today)》13(15-16):695-701)、非诺莫(Grabulovski等人(2007)《生物化学杂志》282(5):3196-3204),和单功能抗体(Koide等人(2007)《分子生物学方法》352:95-109)。

[0104] 本发明方法的抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物分别包括连接到抗原或抗体结合剂的至少一种DNA分子,其中DNA分子包含独特的条形码序列以鉴别目标抗原特异性抗体同型(即,通过使抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物中的DNA序列连接而产生的完整条形码)。连接到抗原或抗体结合剂的DNA分子可以部分地根据所用检测方法、连接方法、待检测的特异性抗体等来改变。一般来说,所连接的DNA分子的长度将为至少15个核苷酸,但范围可以为15个核苷酸至200个核苷酸或更多,包括(但不限于)例如20个或更多个核苷酸、25个或更多个核苷酸、30个或更多个核苷酸、35个或更多个核苷酸、40个或更多个核苷酸、45个或更多个核苷酸、50个或更多个核苷酸、55个或更多个核苷酸、60个或更多个核苷酸、65个或更多个核苷酸、70个或更多个核苷酸、75个或更多个核苷酸、80个或更多个核苷酸、90个或更多个核苷酸、95个或更多个核苷酸、100个或更多个核苷酸、15至200个核苷酸、20至200个核苷酸、25至200个核苷酸、30至200个核苷酸、35至200个核苷酸、40个至200个核苷酸、45至200个核苷酸、50至200个核苷酸、15至100个核苷酸、20至100个核苷酸、25至100个核苷酸、30至100个核苷酸、35至100个核苷酸、40至100个核苷酸、45至100个核苷酸、50至100个核苷酸等。

[0105] 可以通过任何方便的方法将DNA连接至抗原或抗体结合剂,如下文更详细地描述。所述DNA可以在沿着DNA长度的任何方便的点处,包括在3'或5'末端,连接到抗原或抗体结合剂。在一些情况下,DNA在其3'端或5'端连接到抗原或抗体。在某些情况下,抗原和抗体结合剂都在其3'端连接有DNA分子。在某些情况下,抗原和抗体结合剂都在其5'端连接有DNA分子。

[0106] 如本文所用,术语“桥连寡核苷酸”或“桥接寡核苷酸”是指通过同时与每个DNA分子上的互补区或DNA末端的互补区杂交而将两个或更多个单独DNA分子或单个DNA分子的两个末端接合的任何寡核苷酸。在某些情况下,桥接寡核苷酸通过同时与抗原-DNA结合物的DNA中的第一互补区和抗体结合剂-DNA结合物的DNA中的第二互补区杂交而使抗原-DNA结合物与抗体结合剂-DNA结合物接合。桥接寡核苷酸可以是部分或完全单链的,包括部分单链和部分双链。本公开内容的桥接寡核苷酸的长度将变化并且可以是10个或更多个核苷酸,并且在10至100个或更多个核苷酸的范围内,包括例如10至100个核苷酸、12至100个核苷酸、14至100个核苷酸、16至100个核苷酸、18至100个核苷酸、20至100个核苷酸、22至100个核苷酸、24至100个核苷酸、26至100个核苷酸、28至100个核苷酸、30至100个核苷酸、10至50个核苷酸、12至50个核苷酸、14至50个核苷酸、16至50个核苷酸、18至50个核苷酸、20至50个核苷酸、22至50个核苷酸、24至50个核苷酸、26至50个核苷酸、28至50个核苷酸、30至50个核苷酸、10至40个核苷酸、12至40个核苷酸、14至40个核苷酸、16至40个核苷酸、18至40个核苷酸、20至40个核苷酸、22至40个核苷酸、24至40个核苷酸、26至40个核苷酸、28至40个核苷酸、30至40个核苷酸、10至30个核苷酸、12至30个核苷酸、14至30个核苷酸、16至30个核苷酸、18至30个核苷酸、20至30个核苷酸、12个或更多个核苷酸、13个或更多个核苷酸、14个或更多个核苷酸、15个或更多个核苷酸、16个或更多个核苷酸、17个或更多个核苷酸、18个或更多个核苷酸、19个或更多个核苷酸、20个或更多个核苷酸、12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸、30个核苷酸等。

[0107] 桥接寡核苷酸可以“桥接”两个或更多个DNA分子以形成复合物。在一些情况下,桥接多核苷酸可以与两个DNA末端杂交,包括相同或不同核酸的末端,使得末端在复合物中相邻,例如,允许相邻末端的连接。在一些情况下,桥接多核苷酸可以与两个DNA末端杂交,包括相同或不同核酸的末端,使得末端在所得的多核苷酸复合物中不相邻,例如,不相邻以使得它们不能直接连接在一起。。在一些情况下,例如在复合物中的两个DNA末端不相邻的情况下,夹板多核苷酸可以在两个末端之间的空间中杂交,使得夹板多核苷酸的末端邻近于一个或多个末端定位。如本文所用,术语“夹板多核苷酸”是指多核苷酸,其通常可以是单链或部分单链和部分双链的,可以用于填充复合物中的两个DNA末端之间的一个或多个间隙,例如通过使用桥接多核苷酸形成的那些复合物。在一些情况下,夹板多核苷酸可与桥接寡核苷酸的一个或多个部分具有互补性。在一些情况下,可以将与夹板多核苷酸相邻的DNA末端连接至夹板多核苷酸。

[0108] 在一些情况下,本公开的桥接寡核苷酸可包括一种或多种核苷类似物。例如,在某些情况下,本公开的桥接寡核苷酸可以包括一个或多个脱氧核糖尿嘧啶(即,脱氧核糖尿嘧啶、脱氧尿苷等)核苷/核苷酸。在某些情况下,桥接多核苷酸可包括2个或更多个核苷类似

物,包括(但不限于)例如3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个等。在一些情况下,核苷类似物数目占桥接多核苷酸的总碱基数的百分比为1%或更高,包括(但不限于)例如2%或更高、3%或更高、4%或更高、5%或更高、6%或更高、7%或更高、8%或更高、9%或更高、10%或更高、11%或更高、12%或更高、13%或更高、14%或更高、15%或更高、16%或更高、17%或更高、18%或更高、19%或更高、20%或更高、21%或更高、22%或更高、23%或更高、24%或更高、25%或更高、26%或更高、27%或更高、28%或更高、29%或更高、30%或更高等等。

[0109] 来自抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物的DNA分子的接合产生了鉴别目标抗体同型的完整条形码序列,可以将其扩增以产生能检测的扩增产物(即扩增子)。如下面更详细描述,可以使用任何方便的扩增方法来产生扩增产物,并且可以取决于所形成的特定复合物和/或整个检测分析的特定要求。由于扩增子的形成取决于样品中的结合到抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物的目标抗体,因此扩增产物的存在表明样品中存在对抗原具有特异性并且也被抗体结合剂识别的目标抗体(例如,对特定目标抗体同型具有特异性的二次抗体、抗体模拟物或适体)。

[0110] 在一些情况下,可以通过聚合酶链反应(PCR)进行扩增。在代表性的PCR扩增反应中,反应混合物通常包括模板核酸,其与一种或多种在引物延伸反应中使用的引物组合,例如PCR引物(例如以几何(或指数)扩增方式使用的正向和反向引物或以线性扩增方式使用的单个引物)。因此,在某些情况下,上述核酸复合物的杂交部分可以用作扩增反应的“引物”。例如,在采用线性扩增的情况下,上述核酸复合物的杂交核酸的单个游离3'末端可以用作扩增的引物。在某些情况下,可以添加一种或多种其它核酸以在所形成的核酸复合物中用作引物。例如,在某些情况下,两个抗原结合的多核苷酸可以通过连接反应连接,并且可以添加两个附加的引物以促进新连接的核酸片段或模板扩增。在一些情况下,上述核酸复合物的杂交核酸的单个游离3'末端可以用作第一引物,并且可以添加第二引物以促进扩增。

[0111] 与模板核酸(为方便起见,在下文中称为模板DNA)接触的任何寡核苷酸引物的长度将足以提供在粘接条件下与互补模板DNA的杂交。引物通常具有至少6bp的长度,包括(但不限于)例如至少10bp的长度、至少15bp的长度、至少16bp的长度、至少17bp的长度、至少18bp的长度、至少19bp的长度、至少20bp的长度、至少21bp的长度、至少22bp的长度、至少23bp的长度、至少24bp的长度、至少25bp的长度、至少26bp的长度、至少27bp的长度、至少28bp的长度、至少29bp的长度、至少30bp的长度,并且可以具有长达60bp或更长的长度,其中引物的长度通常在18至50bp的长度范围内,包括(但不限于)例如约20至35bp的长度。在一些情况下,根据是否需要模板DNA的引物延伸、线性或指数扩增,可以使模板DNA与单个引物或一组两个引物(正向和反向引物)接触。本发明方法中可以使用的PCR方法包括(但不限于)美国专利第4,683,202号、第4,683,195号、第4,800,159号、第4,965,188号和第5,512,462号,其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0112] 除上述组分外,在本发明方法中产生的PCR反应混合物可包括聚合酶和脱氧核糖核苷三磷酸酯(dNTP)。所需的聚合酶活性可以由一种或多种不同的聚合酶提供。在多个实施例中,反应混合物至少包括家族A聚合酶,其中所关注的代表性家族A聚合酶包括(但不限于):水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)聚合酶,包括天然存在的聚合酶(Taq)以及其衍生物

和同源物,例如Klentaq(如《美国国家科学院院刊》(1994) 91:2216-2220中所述,其公开内容以全文引用的方式并入本文中);极端嗜热菌(*Thermus thermophilus*)聚合酶,包括天然存在的聚合酶(Tth)及其衍生物和同源物等等。在其中所进行的扩增反应是高保真度反应的某些实施例中,反应混合物可以进一步包括具有3'-5'核酸外切酶活性(例如可以由家族B聚合酶提供)的聚合酶,其中所关注的家族B聚合酶包括(但不限于):海滨嗜热球菌(*Thermococcus litoralis*)DNA聚合酶(Vent)(例如如Perler等人,《美国国家科学院院刊》(1992) 89:5577中所述,其公开内容以全文引用的方式并入本文中);火球菌种(*Pyrococcus* species)GB-D(Deep Vent);激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)DNA聚合酶(Pfu)(例如如Lundberg等人,《基因》(1991) 108:1-6中所述,其公开内容以全文引用的方式并入本文中)、沃氏火球菌(*Pyrococcus woesei*)等等。通常,反应混合物将包括对应于四种天然存在的碱基的四种不同类型的dNTP,即dATP、dTTP、dCTP和dGTP,并且在某些情况下,可包括一种或多种经修饰的核苷酸dNTP。

[0113] PCR反应通常通过使反应混合物在适用于粘接、延长/延伸和变性的温度之间循环特定次数来进行。这样的温度和时间将变化并且将取决于反应的特定组分,包括例如聚合酶和引物以及所得PCR产物的预期长度。在某些情况下,例如在采用巢式或两步PCR的情况下,循环反应可以分阶段进行,例如,根据具有特定循环程序或使用特定温度的第一阶段进行循环并且随后根据具有特定循环程序或使用特定温度的第二阶段进行循环。

[0114] 多步PCR方法可以包括或不包括在扩增开始后添加一种或多种试剂。举例来说,在一些情况下,扩增可以始于使用聚合酶进行的延长且在反应的初始阶段之后,可以向反应物中添加额外的试剂(例如一种或多种额外的引物、额外的酶等)以促进反应的第二阶段。在一些情况下,扩增可以使用第一引物或第一组引物起始且在反应的初始阶段之后,可以向反应物中添加额外的试剂(例如一种或多种额外的引物、额外的酶等)以促进反应的第二阶段。在某些实施例中,扩增的初始阶段可以称为“预扩增”。

[0115] 在某些情况下,扩增可以在等温条件下进行,例如通过等温扩增。等温扩增方法通常利用分离DNA链的酶促方法以促进在恒定温度下的扩增,例如置换链的聚合酶或解旋酶,因此不需要热循环来使DNA变性。本发明方法可采用任何方便且适当的等温扩增方法,包括(但不限于):回路介导的等温扩增(LAMP)、链置换扩增(SDA)、解旋酶依赖性扩增(HDA)、切口酶扩增反应(NEAR)等。LAMP通常利用多个引物,例如4-6个引物,其可以识别目标DNA的多个不同区域,例如6-8个不同区域。合成通常通过置换链的DNA聚合酶起始,其中两个引物形成环结构以促进随后多轮扩增。LAMP快速而灵敏。另外,在某些情况下,无需使用专用设备,例如通过肉眼就可以观察到在LAMP扩增反应过程中产生的焦磷酸镁。SDA通常包括使用置换链的DNA聚合酶(例如Bst DNA聚合酶、大(克列诺(Klenow))片段聚合酶、克列诺片段(3'-5'外-)等等)在引物中所含的位点引发通过限于链的限制性核酸内切酶或切口酶所产生的切口。在SDA中,切口位点一般通过每个聚合酶置换步骤再生,从而引起指数扩增。HDA一般采用:使双链DNA解旋、从而解开各链的解螺旋酶;可以与解旋的DNA粘接的引物,例如两个引物;和置换链的DNA聚合酶用于延伸。NEAR一般包括置换链的DNA聚合酶在切口(例如通过切口酶产生的切口)处引发延长。NEAR快速而灵敏,可从目标序列快速产生许多短核酸。

[0116] 在一些情况下,可以组合整个扩增方法,或者可以将各种扩增方法的方面重新组合以产生杂交扩增方法。例如,在一些情况下,PCR的方面可以用于例如产生初始模板或扩

增子或第一轮或多轮扩增,并且随后可以使用等温扩增方法进行进一步扩增。在一些情况下,可以采用等温扩增方法或等温扩增方法的方面,随后进行PCR以进一步扩增等温扩增反应的产物。在一些情况下,可以使用第一扩增方法对样品进行预扩增,并且可以使用第二扩增方法进行进一步处理,包括例如进一步扩增或分析。作为非限制性实例,样品可以通过PCR进行预扩增,并通过qPCR进行进一步分析。

[0117] 在一些情况下,可以在使用或不使用预扩增步骤的情况下将下文所述的扩增步骤和检测步骤组合。在一些情况下,所采用的特定扩增方法允许定性检测扩增产物,例如在检测试剂存在或不存在的条件下目视检查扩增反应。在一个实施例中,连接产物通过等温扩增法(例如LAMP)扩增,并且扩增使扩增反应产生可见的变化,其表示有效的扩增且因此样品中存在抗体同型。在一些情况下,将扩增和检测步骤组合,在扩增期间监测扩增反应,例如在例如实时PCR(在本文中亦称为定量PCR(qPCR))中所执行。

[0118] 在一些情况下,本文所述的方法可以利用邻近连接分析(PLA)和邻近延长分析(PEA)中所采用的那些方法,例如扩增方法和其组分,包括(但不限于)例如滚环扩增(RCA)、结合诱导DNA组装(BINDA)、切口酶辅助荧光信号扩增(NEFSA),以及Janssen等人(2013)《传感器(Sensors)》13,1353-1384中所述的那些方法,其公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0119] 本发明的方法可以适于多路复用。举例来说,可以将多种抗体结合剂-DNA结合物添加至样品中,其中每种抗体结合剂与包含不同条形码序列的DNA分子结合并且每种抗体结合剂能够结合到不同的目标抗体同型以允许对样品中的多种目标抗体同型进行多重检测。在某些实施例中,抗体结合剂-DNA结合物选自由以下组成的组:用于检测IgE的抗IgE二次抗体-DNA结合物、用于检测IgM的抗IgM二次抗体-DNA结合物、用于检测IgG的抗IgG二次抗体-DNA结合物、用于检测IgA的抗IgA二次抗体-DNA结合物,和用于检测IgD的抗IgD二次抗体-DNA结合物,其中结合物中的DNA分子包含同型特异性DNA条形码,所述同型特异性DNA条形码能够在多重型分析形式中通过使用引物和/或探针的适合组合来同时扩增和检测。

[0120] 抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物的示例性DNA序列、桥接寡核苷酸和用于检测DNA连接产物的PCR引物展示于实例1和序列表的SEQ ID NO:1-21中。在某些实施例中,抗原-DNA结合物包含选自由SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列,或与选自由SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列具有至少95%一致性的DNA序列。在其它实施例中,二次抗体结合剂-DNA结合物包含选自由SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列,或与选自由SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17和18组成的组的DNA序列具有至少95%一致性的DNA序列。在某些实施例中,桥接寡核苷酸包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列或与SEQ ID NO:21的序列具有至少95%一致性的核苷酸序列,其中所述桥接寡核苷酸能够与DNA杂交。

[0121] 在另一个实施例中,使用选自由以下组成的组的至少一组试剂执行所述方法:a)包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:

21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;c)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;d)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;e)包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;f)包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;g)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;h)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;i)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及j)包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗体结合剂-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

[0122] ISAP能够与其它抗体检测方法组合,尤其是利用DNA条形码以便通过多重PCR检测多种抗体同型的其它方法。在一种多重分析形式中,将ISAP与邻近连接分析(PLA)及/或凝集-聚合酶链反应(ADAP)组合。参见例如Gullberg等人(2005)《美国国家科学院院刊》101(22):8420-9424;Gustafsdottir等人(2005)《分析生物化学(A analytical Biochemistry)》345(1):2-9(关于PLA的描述)和Tsai等人(2016)《ACS中心科学(ACS Central科学)》2(3):139-147,国际专利申请公开号W02016168711A1(关于ADAP的描述),所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0123] 举例来说,ISAP能够与PLA和/或ADAP组合以便检测样品中的过敏原抗体。在一个实施例中,所述方法包含:a)利用至少一对抗IgE抗体-DNA结合物执行PLA以检测样品中的总IgE含量;b)利用至少一对过敏原-DNA结合物执行ADAP以检测样品中的总抗过敏原抗体含量;和c)利用至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合来执行ISAP以检测样品中的过敏原特异性IgE含量。所述方法可以进一步包含用至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗免疫球蛋白G4(IgG4)抗体-DNA结合物的组合进行ISAP以检测过敏原特异性IgG4含量。在某些实施例中,ADAP用于检测IgG、IgM和IgE的总抗过敏原抗体含量。

[0124] 执行PLA时,所述方法包含:a)向样品中添加至少一对抗IgE抗体-DNA结合物,其中

至少一对抗IgE抗体-DNA结合物包含在第一位点结合到样品中的IgE的第一抗IgE抗体-DNA结合物和在第二位点结合到同一IgE的第二抗IgE抗体-DNA结合物；b)使样品与PLA桥接寡核苷酸接触，其中PLA桥接寡核苷酸包含：(i)与第一抗IgE抗体-DNA结合物的DNA充分互补且能够杂交的第一部分，和(ii)与第二抗IgE抗体-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第二部分，其中第一抗IgE抗体-DNA结合物中的DNA与第二抗IgE抗体-DNA结合物中的DNA彼此充分邻近以同时与PLA桥接寡核苷酸杂交；c)使PLA桥接寡核苷酸与第一抗IgE抗体-DNA结合物和第二抗IgE抗体-DNA结合物连接以产生PLA连接产物；以及d)检测PLA连接产物，以指示样品中的IgE的存在。

[0125] 执行ADAP时，所述方法包含：a)向样品中添加所述至少一对过敏原-DNA结合物，其中至少一对过敏原-DNA结合物包含在第一位点结合到样品中的抗过敏原抗体的第一过敏原-DNA结合物和和(ii)与第二过敏原-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第二部分，其中第一过敏原-DNA结合物中的DNA和第二过敏原-DNA结合物中的DNA彼此充分邻近以同时与ADAP桥接寡核苷酸杂交；c)使ADAP桥接寡核苷酸与第一过敏原-DNA结合物和第二过敏原-DNA结合物连接以产生ADAP连接产物；以及d)检测ADAP连接产物，其指示样品中的抗过敏原抗体的存在。

[0126] 执行ISAP时，所述方法包含：a)向样品中添加至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合，其中过敏原-DNA结合物结合到样品中的过敏原特异性IgE，且抗IgE抗体-DNA结合物结合到同一过敏原特异性IgE，从而形成第一复合物；b)使第一复合物与ISAP桥接寡核苷酸接触，其中ISAP桥接寡核苷酸包含：(i)与抗IgE抗体-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第一部分，和(ii)与过敏原-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第二部分，其中抗IgE抗体-DNA结合物中的DNA与过敏原-DNA结合物中的DNA在第一复合物中彼此充分邻近以同时与ISAP桥接寡核苷酸杂交；c)使ISAP桥接寡核苷酸与第一复合物中的抗IgE抗体-DNA和过敏原-DNA连接，以产生第一ISAP连接产物；d)检测第一ISAP连接产物，其指示样品中的过敏原特异性IgE的存在；e)向样品中添加至少一种过敏原-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合，其中过敏原-DNA结合物结合到样品中的过敏原特异性IgG4，并且抗IgG4抗体-DNA结合物结合到同一过敏原特异性IgG4，从而形成第二复合物；f)使第二复合物与ISAP桥接寡核苷酸接触，其中ISAP桥接寡核苷酸包含：(i)与抗IgG4抗体-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第一部分，和(ii)与过敏原-DNA结合物中的DNA充分互补且能够杂交的第二部分，其中抗IgG4抗体-DNA结合物中的DNA与过敏原-DNA结合物中的DNA在复合物中彼此充分邻近以同时与ISAP桥接寡核苷酸杂交；g)使ISAP桥接寡核苷酸与第二复合物中的抗IgG4抗体-DNA和过敏原-DNA连接以产生第二ISAP连接产物；以及h)检测第二ISAP连接产物，其指示样品中的过敏原特异性IgG4的存在。

[0127] 在某些实施例中，检测PLA连接产物、ADAP连接产物、第一ISAP连接产物和第二ISAP连接产物包含利用多重聚合酶链反应(PCR)、等温扩增或微阵列分析。所述方法可以进一步包含对PLA连接产物、ADAP连接产物、第一ISAP连接产物和第二ISAP连接产物的量进行定量，例如通过执行qPCR来定量。

[0128] 在另一个实施例中,使用选自由以下组成的组的至少一组试剂执行PLA:a)包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;c)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;d)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;e)包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;f)包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;g)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;h)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;i)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及j)包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

[0129] 在另一个实施例中,使用选自由以下组成的组的至少一组试剂执行ADAP:包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;c)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序

列的正向引物;d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的第二过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的第一过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

[0130] 在另一个实施例中,用选自由以下组成的组的至少一组试剂执行ISAP:a) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID

NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

[0131] 在另一个实施例中,用选自由以下组成的组的至少一组试剂执行ISAP:a) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;c) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;d) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;e) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物;f) 包含SEQ ID NO:1的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;g) 包含SEQ ID NO:5的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物;h) 包含SEQ ID NO:9的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物;i) 包含SEQ ID NO:13的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物;以及j) 包含SEQ ID NO:17的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的过敏原-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:20的序列的正向引物。

[0132] 在另一个实施例中,本发明包括一种用于检测样品中的花生过敏原抗体的方法,

其中a)利用一对抗IgE抗体-DNA结合物执行PLA以检测样品中的总IgE含量;b)利用以下执行ADAP:检测样品中的总抗Ara h1抗体含量的一对Ara h1-DNA结合物、检测样品中的总抗Ara h2抗体含量的一对Ara h2-DNA结合物,和检测样品中的总抗Ara h3抗体含量的一对Ara h3-DNA结合物;以及c)利用以下来执行ISAP:Ara h1-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合以检测样品中的Ara h1特异性IgE含量、Ara h2-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合以检测样品中的h2特异性IgE含量,和Ara h3-DNA结合物与至少一种抗IgE抗体-DNA结合物的组合以检测样品中的Ara h3特异性IgE含量。在另一个实施例中,执行ISAP进一步包含使用Ara h1-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合来检测样品中的Ara h1特异性IgG4含量、使用Ara h2-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合来检测样品中的Ara h2特异性IgG4含量,以及使用Ara h3-DNA结合物与至少一种抗IgG4抗体-DNA结合物的组合来检测样品中的Ara h3特异性IgG4含量。

[0133] 在另一个实施例中,所述方法包含:a)使用以下执行PLA以检测样品中的总IgE含量:包含SEQ ID NO:1的DNA序列的第一抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的第二抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:4的序列的正向引物;b)使用以下执行ADAP:i)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的第一Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:6的DNA序列的第二Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测样品中的总抗Ara h1抗体含量;ii)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的第一Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:10的DNA序列的第二Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列的反向引物和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测样品中的总抗Ara h2抗体含量;和iii)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的第一Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:14的DNA序列的第二Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测样品中的总抗Ara抗体含量;以及c)使用以下执行ISAP:i)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h1特异性IgE含量;ii)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h2特异性IgE含量;iii)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:2的DNA序列的抗IgE抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h3特异性IgE含量;iv)包含SEQ ID NO:5的DNA序列的Ara h1-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:8的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h1特异性IgG4含量;v)包含SEQ ID NO:9的DNA序列的Ara h2-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID

NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:12的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h2特异性IgG4含量;和vi)包含SEQ ID NO:13的DNA序列的Ara h3-DNA结合物、包含SEQ ID NO:18的DNA序列的抗IgG4抗体-DNA结合物、包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的桥接寡核苷酸、包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列的反向引物,和包含SEQ ID NO:16的序列的正向引物,以检测样品中的Ara h3特异性IgG4含量。

#### [0134] B. 检测

[0135] 扩增产物的存在可以通过任何方便的方法来确定,包括定性确定或定量确定。在一些情况下,可以定性确定扩增产物的存在,例如,通过指示连接产物有效扩增的扩增反应的物理变化。

[0136] 在一些情况下,根据非特异性检测经扩增的核酸的检测方案或特异性检测经扩增的核酸的方案来检测扩增产物且/或测量扩增产物的量。

[0137] 所关注的代表性非特异性检测方案包括利用信号产生系统选择性地检测双链核酸产物的方案,例如通过隔行扫描。在此类实施例中发现有用的代表性可检测分子包括荧光核酸染色剂,例如菲啶鎓染料,包括其单体或同二聚体或异二聚体,其当与核酸复合时提供增强的荧光。菲啶鎓染料的实例包括乙锭同二聚体、溴化乙锭、碘化丙啶和其它经烷基取代的菲啶鎓染料。在另一个实施例中,核酸染色剂包括吡啶染料或其同二聚体或异二聚体,例如吡啶橙、吡啶同二聚体、乙锭-吡啶异二聚体,或9-氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶。在另一个实施例中,核酸染色剂是吡啶或咪唑染料,例如Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hoechst34580、DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吡啶)或DIPI (4',6-(二咪唑啉-2-基)-2-苯基吡啶)。其它允许的核酸染色剂包括(但不限于)7-氨基放线菌素D、羟基芪脒、LDS 751、选定的补骨脂素(呋喃香豆素)、苯乙烯基染料、金属络合物(如钌络合物)和过渡金属络合物(例如并入Tb<sup>3+</sup>和Eu<sup>3+</sup>)。在某些实施例中,核酸染色剂是花青染料或花青染料的同二聚体或异二聚体,当与核酸结合时,其提供增强的荧光。在一些情况下,可以使用美国专利第4,883,867号、美国专利第5,582,977号、美国专利第5,321,130号和美国专利第5,410,030号中所述的染料,包括以商标TOTO、BOBO、POPO、YOYO、TO-PRO、BO-PRO、PO-PRO和YO-PRO市售的核酸染色剂(生命技术有限公司(Life Technologies, Inc.), 纽约州格兰德岛(Grand Island)), 所述文献以全文引用的方式并入本文。在一些情况下,可以使用美国专利第5,436,134号、美国专利第5,658,751号和美国专利第5,863,753号中所述的染料,包括以商标SYBR、SYTO、SYTOX、PICOGREEN、OLIGREEN和RIBOGREEN(生命技术有限公司, 纽约州格兰德岛), 所述文献以全文引用的方式并入本文中。在又其他实施例中,核酸染色剂是单体、同二聚体或异二聚体花青染料,其并入氮杂或聚氮杂苯并恶唑鎓杂环,例如氮杂苯并恶唑、氮杂苯并咪唑或氮杂苯并噻唑,其当与核酸(包括以商标SYTO、SYTOX、JOJO、JO-PRO、LOLO、LO-PRO市售的核酸染色剂(生命技术有限公司, 纽约州格兰德岛))结合时得到增强的荧光。

[0138] 在其它实施例中,通常与双链分子相反,可以使用对扩增产物具有特异性的信号产生系统检测扩增。在这些实施例中,信号产生系统可以包括特异性结合到扩增产物中发现的序列的探针核酸,其中探针核酸可以用直接或间接可检测的标记加以标记。可直接检测的标记是无需使用其它试剂即可直接检测的标记,而可间接检测的标记能通过使用一种或多种其它试剂检测的标记,例如,其中标记是由两种或更多种组分组成的信号产生系统

的成员。在一些实施例中,标记是直接可检测的标记,其中所关注的直接可检测标记包括(但不限于):荧光标记、放射性同位素标记、化学发光标记等。在一些实施例中,标记是荧光标记,其中此类实施例中使用的标记试剂是荧光标记的核苷酸,例如荧光标记的CTP(例如Cy3-CTP、Cy5-CTP)等。可用于标记核苷酸以产生经标记的探针核酸的荧光部分包括(但不限于):荧光素、花青染料,例如Cy3、Cy5、Alexa555、Bodipy 630/650等。也可以采用其它标签,例如上述标签。

[0139] 在信号产生系统是荧光信号产生系统的那些实施例中,信号检测通常包括检测来自反应混合物的荧光信号的变化以获得分析结果。换句话说,评估由反应混合物产生的荧光信号的任何调节。所述变化可以是荧光的增加或减少,这取决于所用标记的性质,并且在某些实施例中是荧光的增加。可以使用任何方便的手段,例如合适的荧光计,例如热稳定的比色杯或读板器荧光计,根据荧光的增加筛选样品。使用已知的荧光计适当地监测荧光。来自这些设备的信号(例如光电倍增管电压的形式)被发送到数据处理器板,并转换为与每个采样管相关的频谱。可以同时评估多个反应容器,例如多个管、多孔板等。

[0140] 在某些情况下,特定DNA序列的延长和/或扩增(例如,来自抗原-DNA结合物、抗体-DNA结合物和桥接寡核苷酸)引起一个或多个特定核酸序列的重复,从而产生含有一个或多个特定核酸序列重复的一条或多条链。这样的重复序列可以检测,例如通过对重复的特定序列具有特异性的探针核酸的杂交来检测。在某些情况下,可以利用对重复的特定序列具有特异性的经标记的探针核酸(例如荧光标记的探针核酸、酶标记的探针核酸、放射性标记的探针核酸等)检测含有重复的特定序列的经延长的多核苷酸或扩增产物。在一些情况下,由于大量经标记的探针核酸与延长的多核苷酸或扩增产物杂交,因此经标记的探针核酸与延长的多核苷酸或扩增产物的重复序列的杂交允许检测延长的多核苷酸或扩增产物,从而引起可检测标签的高局部浓度。

[0141] 例如,在某些情况下,来自抗原-DNA结合物或抗体结合剂-DNA结合物的一个或多个DNA序列的重复包含于根据本文所述方法产生的扩增产物或延伸产物中,并且通过使用对重复序列单元具有特异性的经标记的探针核酸检测重复。在一些情况下,桥接多核苷酸的一个或多个序列的重复包含于根据本文所述的方法产生的扩增产物或延伸产物中,并且通过使用对重复序列单元具有特异性的经标记的探针核酸检测重复。在一些情况下,环化寡核苷酸的一个或多个序列的重复包含于根据本文所述方法产生的扩增产物或延伸产物中,并且通过使用对重复序列单元具有特异性的经标记的探针核酸检测重复。

[0142] 在某些实施例中,可以通过本文所述的一种或多种延伸和/或扩增方法(例如PCR扩增、等温扩增(例如RCA)等)来产生重复核酸序列,并且可以通过一种或多种荧光标记的探针核酸与延伸和/或扩增产物的杂交而使得延伸和/或扩增产物可检测。可以通过用于检测荧光的任何方便的手段来鉴别这种可检测的延伸和/或扩增产物,包括(但不限于)例如荧光显微镜、流式细胞术、成像流式细胞术等。在某些情况下,鉴别可检测的延伸和/或扩增产物可允许检测或鉴别与衍生出延伸和/或扩增产物的复合物中的抗体相关的分子、颗粒、细胞、组织、生物体等。例如,在某些情况下,荧光探针结合的延伸和/或扩增产物可以保持与产生抗体的细胞结合,从而允许鉴别细胞,例如通过荧光显微术,和/或分离细胞,例如通过荧光活化细胞分选(FACS)。

[0143] 如上所述,在某些情况下,可以实时监测扩增以提供检测和/或定量。在检测方案

是实时方案的情况下,例如qPCR反应方案中采用的方案,可以在整个反应过程中以频繁的间隔收集数据,例如每10ms一次,或者频率大于或小于每10ms一次。通过在每个循环期间监测来自样品的反应性分子的荧光,可以各种方式监测扩增反应的进程。例如,可以分析熔融峰所提供的数据,例如通过计算熔融峰下的面积并且将这些数据相对于循环数作图。

[0144] 以这种方式产生的光谱可以解析,例如使用预选的荧光部分(例如染料)的“拟合”来解析,以形成代表每个信号传导部分(即,荧光团)的峰。可以测定峰下面积,所述面积代表每个信号的强度值,并且如果需要,则可以彼此的商表示。信号强度和/或比率的差异将允许记录经标记的探针在整个反应中或在不同反应条件(例如温度)下的变化。所述变化与寡核苷酸探针和目标序列之间的结合现象或与目标序列结合的寡核苷酸探针的降解有关。微分峰下面积的积分将允许计算标记效应的强度值。

[0145] 根据荧光变化筛选混合物得到一个或多个分析结果,这取决于在扩增反应结束时是否筛选样品一次,还是在反应过程中筛选多次,例如在每个循环后(例如,如实时PCR监测时那样)。

[0146] 根据本文所述的方法,可以检测抗体同型的存在,例如,高于或低于特定的检测阈值,或者可以进行测量,例如,当高于特定检测阈值存在时可以测量样品中的抗体同型的实际量或浓度。用于受试者抗体同型检测反应的实际检测阈值将变化并且将取决于例如待检测的抗体同型、所采用的特定扩增方法、所采用的检测方法等。在一些情况下,受试者检测方法的检测阈值可以在15ng/ml至1pg/ml的范围内,并且可以包括小于15ng/ml、小于14ng/ml、小于13ng/ml、小于12ng/ml、小于11ng/ml、小于10ng/ml、小于9ng/ml、小于8ng/ml、小于7ng/ml、小于6ng/ml、小于5ng/ml、小于4ng/ml、小于3ng/ml、小于2ng/ml、小于1ng/ml、小于500pg/ml、小于400pg/ml、小于300pg/ml、小于200pg/ml、小于100pg/ml、小于90pg/ml、小于80pg/ml、小于70pg/ml、小于60pg/ml、小于50pg/ml、小于40pg/ml、小于35pg/ml、小于30pg/ml、小于25pg/ml、小于20pg/ml、小于19pg/ml、小于18pg/ml、小于17pg/ml、小于16pg/ml、小于15pg/ml、小于14pg/ml、小于13pg/ml、小于12pg/ml、小于10pg/ml等。在某些情况下,本文所述的特定检测方法的检测阈值可以样品中可以检测到的抗体同型的最小摩尔数表达,并且这种检测阈值可以在200个埃摩尔(attomole)到100仄摩尔(zeptomole)的范围内,包括(但不限于)例如200埃摩尔、190埃摩尔、180埃摩尔、170埃摩尔、160埃摩尔、150埃摩尔、140埃摩尔、130埃摩尔、120埃摩尔、110埃摩尔、100埃摩尔、90埃摩尔、80埃摩尔、70埃摩尔、60埃摩尔、50埃摩尔、40埃摩尔、30埃摩尔、20埃摩尔、10埃摩尔、1埃摩尔、900仄摩尔、800仄摩尔、700仄摩尔、600仄摩尔、500仄摩尔、400仄摩尔、350仄摩尔、300仄摩尔、250仄摩尔、200仄摩尔、190仄摩尔、180仄摩尔、170仄摩尔、160仄摩尔、150仄摩尔、140仄摩尔、130仄摩尔、120仄摩尔、110仄摩尔、100仄摩尔等。

[0147] 在检测之后(可以或可以不包括定性或定量测量扩增产物),可以评估检测结果以确定样品中存在抗体同型的可能性。在进行此类评估时,在某些情况下,可以将受试者反应与一个或多个对照反应或参考值进行比较。本发明方法的对照反应包括阳性对照,例如,已知含有所关注抗体和/或已知包含已知量的所关注抗原的反应。对照反应还可以包括阴性对照,例如,已知不含关键试剂的反应,例如抗原、聚合酶、关键多核苷酸等。可以与检测反应结果比较的参考值包括(但不限于)从预先执行的任何对照反应中获得的参考测量值、从对照反应中收集的标准曲线、从阳性或阴性对照中获得的一组实测荧光值、用户定义的参

考值、制造商提供的参考值等。在一些情况下,受试者反应的评估可以包括与量表进行比较,例如参考值的量表,其能用于估计样品中存在的抗体的量。

#### [0148] C. 多重操作

[0149] 根据本文所述的方法,根据目标抗体同型的存在容易筛选样品。所述方法适用于检测单个目标抗体同型以及多重分析(其中分析样品中的两种或更多种不同的目标抗体同型)。在后面的这些多重情形中,可以使用的不同组的抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物的数目通常在约2至约20或更高的范围内,例如高达100或更高、1000或更高等,包括(但不限于)例如2至50、2至100、10至100、50至100、50至200、50至300、50至400、50至500等。在一个实施例中,多重分析可以利用与独特标记的DNA分子结合的各种不同抗原,因此特别经独特标记的DNA分子的扩增表示对特定抗原具有特异性的抗体存在。在另一个实施例中,多重分析可利用对不同目标抗体同型与独特标记的DNA分子的结合物具有特异性的各种不同抗体结合剂,因此特别经独特标记的DNA分子的扩增表示抗体同型的存在。相应地,本发明的分析可以利用核酸标记和/或“条形码”策略以允许检测和/或定量对样品中的特定抗原具有特异性的多种抗体同型。如本文所述的多重分析中可以包括的经核酸条形码独特标记的不同抗原和抗体结合剂的数目可以改变并且可能仅限于例如抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物中的可供条形码利用的DNA长度和样品中可能存在的抗原或抗体浓度的物理限制。

[0150] 这样,在一些情况下,可以在单个反应中筛选一组抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物,并且可以评估所述组中的每种目标抗体同型的存在或数量。上述检测方法可以并行地用于在双重分析中检测和测量扩增产物。在某些情况下,在多重和非多重分析中,均可以利用核酸测序方法检测和/或测量扩增产物。举例来说,在一些情况下,定量测序可以用于例如已经产生多种扩增产物的多重分析中,以测定每种扩增产物的相对量或存在,从而允许对单个样品中的多种不同抗体同型进行高灵敏度和高多重性评估。

[0151] 在某些实施例中,可以通过合并的反应进行本公开的多重分析以形成多个扩增子,并且随后可以对所形成的扩增子进行定量以提供多重分析的个别抗体同型的量。例如,在一个实施例中,可以将多种不同的抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物添加到含有或怀疑含有一种或多种目标抗体同型的样品中。因此,在抗原-DNA和/或抗体结合剂-DNA结合物中的DNA分子形成复合物且接合后(任选地,虽然在桥接寡核苷酸存在下使用连接,或聚合酶催化互补区延长),形成扩增子,所述扩增子包含与样品中存在的目标抗体同型对应的完整条形码。因此,所形成的每种扩增子的相对量将对应于样品中的每种目标抗体同型的相对量。因此,可以通过对所形成的扩增子进行定量来定量每种抗体同型。

[0152] 所形成的扩增子的定量可以通过任何方便的方法进行,其中所使用的特定方法可以部分地取决于待检测的不同抗体同型的数量、所需的检测灵敏度、所需的定量灵敏度、所需的动态定量范围等。可以在合并的反应中进行定量,或者可以将形成扩增子的反应等分以进行定量。例如,在一些情况下,可以形成扩增子,并且可以对合并的样品进行定量,例如通过扩增子的定量测序。在其它情况下,可以形成扩增子,并且可以通过等分样品并且个别地定量每种扩增子来进行定量,例如通过使用与扩增子杂交的引物通过qPCR来进行。

[0153] 在多重分析的一个实施例中,使每种抗原和/或抗体结合剂与DNA分子结合,所述DNA分子含有所结合的抗原和/或抗体结合剂独特的序列以及用于桥接多核苷酸的通用序列。所述独特序列可以是或可以包括引物结合位点。通用序列可以与桥接多核苷酸的一部

分(包括例如一半)互补,使得抗体结合剂-DNA结合物和抗原-DNA结合物之间形成复合物后,使所连接的DNA分子接近,以使得桥接寡核苷酸可以同时结合抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物中的DNA分子的通用序列,从而允许两个所结合的DNA分子连接。然后可以将包含通过连接反应形成的多个扩增子的样品等分到个别反应中,各方应包含对特定抗原或抗体的引物结合位点具有特异性的引物组,并允许针对与特定的抗体同型对应的特定扩增子进行qPCR。因此,通过扩增池中的每个特定扩增子,可以确定样品中最初存在的每种抗体同型的量。

[0154] 可以使用抗原-DNA和/或抗体结合剂-DNA结合物的文库进行本公开的多重分析。此类文库将根据待筛选的抗原和/或抗体的数量和/或类型而变化。相应地,在一些情况下,本公开的文库可以根据文库中所含的抗原的类型来分类,包括例如含有多种过敏原抗原的过敏原文库,用于检测通过针对过敏原的宿主过敏反应所产生的抗体或以其它方式充当过敏症类型的生物标记物;含有多种病原体抗原的病原体文库,用于检测通过针对病原体感染的宿主反应所产生的抗体或以其它方式充当感染的生物标记物;含有多种自抗原或自体抗原的自体免疫文库,用于检测受试者产生的作为自体免疫疾病一部分的抗体或以其它方式充当自体免疫疾病的生物标记物;含有多种抗原的癌症文库,用于检测受试者回应于癌症或肿瘤的存在而产生的抗体或以其它方式充当癌症的生物标记物;含有多种细胞因子抗原的细胞因子文库,用于检测受试者因衰老或其它神经病症而产生的抗体等等。文库中不同抗原-DNA结合物的数目将变化并且可以在10或更少至1000或更多的范围内,包括(但不限于)例如10至1000、20至1000、30至1000、40至1000、50至1000、60至1000、70至1000、80至1000、90至1000、100至1000、100至900、100至800、100至700、100至600、100至500、100至400、100至300、100至200、10至900、10至800、10至700、10至600、10至500、10至400、10至300、10至200、10至100、20至100、30至100、40至100、50至100、60至100、70至100、80至100、90至100、12、24、36、48、96、384等。文库中不同的多核苷酸抗原可以物理方式分离,例如在单独的容器或多孔板的单独孔中分离,或者可以不用物理方式分离,即可以合并于单一溶液中、单个容器中等等。

[0155] 另外,文库可以包括能够结合到各种同型抗体的一种或多种抗体结合剂-DNA结合物(例如二次抗体、抗体模拟物或适体DNA结合物)。例如,这样的文库可以包含用于检测IgE的抗IgE二次抗体-DNA结合物、用于检测IgM的抗IgM二次抗体-DNA结合物、用于检测IgG的抗IgG二次抗体-DNA结合物、用于检测IgA的抗IgA二次抗体-DNA结合物,以及用于检测IgD的抗IgD二次抗体-DNA结合物。

[0156] 在一些情况下,抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物的文库可包括引物的相应文库,例如用于定量抗原特异性抗体同型的引物对。在一个实施例中,抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物的合并文库将具有引物对的相应文库,用于专门扩增和定量由完整条形码序列扩增而衍生的独特扩增子,所述完整条形码序列是通过将来自抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物的DNA分子接合而产生(即,通过将抗原-DNA结合物与特异性针对抗原的目标抗体复合而产生条形码,所述条形码又被抗体结合剂-DNA结合物接合,其中复合物的抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物中的DNA分子充分邻近,以允许通过形成连接产物而接合或杂交和聚合酶催化的延长,其中条形码对应于抗原特异性抗体同型)。在一些情况下,此类引物文库可以在多孔板的个别孔中各自含有引物对,使得每个孔被配置成在将连接反

应物的等分试样添加至每个孔后,扩增和定量对特定抗原特异性抗体同型具有特异性的特定扩增子。文库中的每种扩增子/抗原特异性抗体同型的定量从而允许测定初始样品中存在的为了检测而配置的文库中的每种抗原特异性抗体同型的量。举例来说,在一些情况下,具有12对不同的抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物的文库具有相应的12孔引物文库,其中每个孔含有引物对,所述引物对经配置以扩增对12对抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物之一具有特异性的扩增子,用于检测抗原特异性抗体同型。在其它情况下,具有24对不同的抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物的文库具有相应的24孔引物文库,其中每个孔含有引物对,所述引物对经配置以扩增对24对抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物之一具有特异性的扩增子,用于检测抗原特异性抗体同型。在又其它情况下,具有48对不同的抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物的文库具有相应的48孔引物文库,其中每个孔含有引物对,所述引物对经配置以扩增对48对抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物之一具有特异性的扩增子,用于检测抗原特异性抗体同型。在又其它情况下,具有96对不同的抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物的文库具有相应的96孔引物文库,其中每个孔含有引物对,所述引物对经配置以扩增对96对抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物之一具有特异性的扩增子,用于检测抗原特异性抗体同型。在其它情况下,具有384对不同的抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物的文库具有相应的384孔引物文库,其中每个孔含有引物对,所述引物对经配置以扩增对384对抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物之一具有特异性的扩增子,用于检测抗原特异性抗体同型。在一些情况下,文库中的抗原-DNA结合物和/或抗体结合剂-DNA结合物比多孔引物对培养板上所提供的相应引物对更多,包括例如其中引物文库包括多个引物对培养板以便允许文库中的所有扩增子扩增。

[0157] 本公开的文库还可以包括用于执行如本文所述的方法的全部或一部分的一种或多种额外试剂,包括用于连接、扩增、检测等的额外试剂。在一些情况下,额外的试剂可以包括于合并的文库中。例如,在一些情况下,用于连接的试剂,例如连接酶,可以包括于抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物的合并文库中。在某些情况下,额外的试剂可以包括于多孔板的个别孔中。例如,在某些情况下,用于扩增的药剂,例如聚合酶、dNTP等,可以包括于多孔板引物文库的孔内。所描述的文库中可以或可以不包括适当的缓冲液、盐等。在一些情况下,可以冻干形式提供文库和/或其组分,例如引物文库,并且可以在使用时复水。

#### [0158] D. 应用

[0159] 本文所述的方法和组合物特别适用于检测和/或定量存在于样品中的抗体同型。这种检测可以在多种技术领域中找到各种应用,包括(但不限于)例如基础科学研究(例如生物医学研究、生物化学研究、免疫学研究、分子生物学研究、微生物学研究、细胞生物学研究、遗传学等)、医学和/或药物研究(例如药物发现研究、药物设计研究、药物开发研究、药理学、毒理学、药物化学、临床前研究、临床研究、个性化或“精密”医学等)、医学、流行病学、公共卫生、生物技术、兽医学、兽医药学、农业、材料科学、分子检测、分子诊断等。

[0160] 在某些情况下,本文描述的方法可用于检测受试者的生物样品中的抗体。如本文所用,术语“受试者”是指动物,包括人、牲畜、宠物、实验动物、生物生产动物(例如用于产生生物产物(例如抗体)的动物)等。在一些情况下,样品来自哺乳动物受试者,包括例如哺乳动物组织、哺乳动物细胞、哺乳动物体液、哺乳动物分泌的体液、哺乳动物半固体分泌物等。

[0161] 可以衍生此类样品的所关注哺乳动物包括(但不限于)例如人类、有蹄类动物(例

如猪科动物(猪)、牛科动物(牛)、绵羊科动物(绵羊)和山羊科动物(山羊)、马科动物(马)、骆驼科动物(骆驼)或通常有蹄类的家畜或农耕动物等的任何物种或亚种)、啮齿动物(例如小鼠、大鼠、沙鼠、仓鼠、豚鼠等)、兔、猫、狗、灵长类动物等等。

[0162] 在某些情况下,样品可以衍生自非人类动物,包括但不限于非人类哺乳动物。可以衍生样品的非人类哺乳动物包括(但不限于)上面列出的那些。可以衍生样品的非人类动物包括(但不限于)上面列出的那些,以及另外,例如禽类(即鸟类,例如鸡、鸭等)、两栖动物(例如青蛙)、鱼等

[0163] 在一些情况下,本文所述的方法用于检测源自人类的样品中抗体同型的存在和/或测量其同型的量,以便评估受试者是否患有特定病状。在这种情况下,源自受试者的抗体同型通常是单特异性抗体同型,例如单特异性抗体,包括例如单特异性多克隆抗体。在人类或非人类受试者中测量的单特异性抗体可以是对疾病抗原具有单特异性的抗体,其中疾病抗原可以是宿主内源性的(即,宿主衍生的抗原或自身抗原),或者可以是宿主外源性的(即,非宿主衍生的抗原或感染病原体衍生的抗原)。

[0164] 在一些实施例中,本文所述的方法用于提供评估,例如受试者病状的存在或判断或鉴定形式和在一些情况下受试者病状的诊断形式;确定患有病状的受试者的疗法;监测患有病状的受试者等。在一些情况下,利用如本文所述的方法评估受试者的病状包括产生书面报告,包括技术人员对受试者的当前健康状态的评估,即,受试者预后的“诊断评估”,即,可能治疗方案的“预后评估”,即,“治疗评估”和/或对治疗的反应,即,“预后评估”。因此,本发明方法可以进一步包括产生或输出报告的步骤,所述报告提供诊断评估、预后评估、治疗评估或监测评估和其组合的结果,所述报告能够以电子媒体(例如计算器监测仪上的电子显示器)的形式提供,或以有形媒体(例如纸上印刷的报告或其它有形媒体)的形式提供。

[0165] 在一些情况下,如本文所述的评估作为治疗方案的一部分进行,例如评估治疗的有效性或确定最佳治疗时机或确定是否需要调节治疗。例如,在一些情况下,可以根据本文所述的方法收集和评估预处理样品,并且根据评估来选择治疗方案。在其它情况下,根据本文所述的评估来收集治疗后样品并将其与治疗前样品进行比较,以便评估治疗效果。在其它情况下,进行一次或多次治疗后评估以最好地确定进一步治疗的时机。

[0166] 本文所述的检测方法所针对的病状(包括人类和非人类动物疾病)包括(但不限于)涉及受试者的免疫系统和/或免疫反应的那些病状。在一些情况下,受试者的病状可以来源于病原体(例如感染),并且在其它情况下,受试者的病状可以来源于受试者(例如自身免疫疾病或过敏症),并且在某些情况下,病状的来源可能是未知的。

[0167] 在一些情况下,本发明的方法可通过检测源自受试者的样品中的一种或多种针对过敏原的抗体的存在而用于检测受试者的过敏原特异性抗体。过敏原包括在患有过敏症的受试者中产生异常强的免疫反应(即过敏反应)的任何类型的抗原,其中抗原在没有患过敏症的受试者中通常不产生强免疫反应(即与抗原诱导的临床体征和症状相关)。过敏原可以触发超敏反应,所述超敏反应部分地通过IgE反应来介导。在一些受试者中,超敏反应将通过伴随的sIgG4反应而减轻。具有过敏反应的受试者的免疫反应也可能涉及各种免疫球蛋白同型(IgG、IgM、IgA、IgD等)的其它抗过敏原抗体。任何摄入或吸入的过敏原都可能引起过敏反应或过敏原诱发的炎症,这些过敏原能够诱导或“触发”有害的IgE介导的免疫反应。

过敏源材料可以包括花粉、动物皮屑、真菌孢子、屋尘螨粪便颗粒、节肢动物或爬行动物毒液、食品、乳胶和治疗剂,例如药物、麻醉剂和治疗性抗体或其它蛋白质。具体地说,食物诱发的过敏反应通常由花生、坚果、鸡蛋、牛奶、贝类、鱼、小麦、大豆、芝麻、芥末和芹菜触发。

[0168] 过敏原可能与触发和/或加剧IgE介导的病症或过敏性疾病、过敏原诱导的炎症和哮喘相关,包括(但不限于)例如以下病状:过敏性和特应性哮喘、特应性皮炎和湿疹、过敏性鼻炎、过敏性结膜炎和鼻结膜炎、过敏性脑脊髓炎、过敏性血管炎、过敏性休克、过敏症、过敏原(例如但不限于动物过敏症(例如猫)、蟑螂过敏症、壁虱过敏症、尘螨过敏症、昆虫刺激性过敏症(例如(蜜蜂、黄蜂和其它)、食物过敏症(例如草莓和其它水果和蔬菜、花生、大豆和其它豆类、核桃和其它坚果、贝类和其它海鲜、牛奶和其它乳制品、小麦和其它谷物和鸡蛋)、乳胶过敏症、药物过敏症(例如青霉素、卡铂)、霉菌和真菌过敏症(例如交链链格孢(*Alternaria alternata*)、链霉菌(*Aspergillus*)和其它)、花粉过敏症(例如豚草(*ragweed*)、百慕大草(*Bermuda grass*)、俄罗斯蓟(*Russian thistle*)、橡木、黑麦和其它)和金属过敏症。

[0169] 如本文所用,感染病状可以变化并且包括宿主生物体中存在外来抗原的任何病状,包括(但不限于)常见感染性疾病、新发感染性疾病、有症状的感染、无症状的感染等。感染病状的非限制性实例包括(但不限于)在此列出的那些病状,其与引起示例性病状的病原体一起提供,例如不动杆菌感染(鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*))、放线菌病(衣氏放线菌(*Actinomyces israelii*)、戈氏放线菌(*Actinomyces gerencseriae*)和丙酸丙酸杆菌(*Propionibacterium propionicum*))、非洲睡眠病(非洲锥虫病(*African trypanosomiasis*)) (布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*))、获得性免疫缺陷综合症(*Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS*) (人类免疫缺陷病毒(*Human immunodeficiency virus, HIV*))、阿米巴病(溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*))、边虫病(边虫属)、炭疽病(炭疽杆菌)、溶血隐秘杆菌(*Arcanobacterium haemolyticum*)感染(溶血隐秘杆菌)、阿根廷出血热(鸠宁病毒(*Junin virus*))、蛔虫病(似蚓蛔线虫(*Ascaris lumbricoides*))、曲霉病(曲霉属)、星状病毒感染(星状病毒科)、焦虫病(巴倍虫属)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)感染(蜡样芽孢杆菌)、细菌性肺炎(多种细菌)、细菌性阴道病(BV)(多种细菌)、拟杆菌感染(拟杆菌属)、小袋虫病(结肠小袋虫)、贝蛔虫感染(贝蛔属)、BK病毒感染(BK病毒)、黑发结节病(*Black piedra*) (何德毛结节菌(*Piedraia hortae*))、人芽囊原虫(*Blastocystis hominis*)感染(人芽囊原虫)、芽生菌病(皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*))、玻利维亚出血热(马丘波病毒(*Machupo virus*))、疏螺旋体感染(疏螺旋体属)、肉毒中毒(和婴儿肉毒中毒)(肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*))、巴西出血热(清风藤属(*Sabia*))、布氏杆菌病(布氏杆菌属)、腺鼠疫(*Bubonic plague*) (细菌性肠杆菌科)、伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia*)感染(通常为伯克霍尔德氏菌和其它伯克霍尔德氏菌种)、布鲁氏溃疡(*Buruli ulcer*) (溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*))、杯状病毒感染(*Calicivirus*)感染(诺如病毒(*Norovirus*)和札幌病毒(*Sapovirus*)) (杯状病毒科(*Caliciviridae*))、弯曲杆菌症(弯曲杆菌属(*Campylobacter* genus))、念珠菌病(念珠菌病(*Moniliasis*);鹅口疮)(通常是白色念珠菌(*Candida albicans*)和其它念珠菌种)、猫抓病(亨氏巴尔通体(*Bartonella henselae*))、蜂窝组织炎(通常是A组链球菌属和葡萄球菌属)、恰加斯氏病(*Chagas Disease*) (美洲锥虫病)(克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*))、软下

瘁(杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*))、水痘(水痘带状疱疹病毒(VZV))、屈公热(Chikungunya)(甲病毒(Alphavirus))、衣原体属(沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*))、肺炎嗜衣体感染(台湾急性呼吸道媒介物或TWAR)(肺炎嗜衣体)、霍乱(霍乱弧菌)、着色芽生菌病(通常为裴氏着色霉(*Fonsecaea pedrosoi*))、支睾吸虫病(华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*))、艰难梭菌感染(艰难梭菌(*Clostridium difficile*))、球霉菌病(粗球霉菌(*Coccidioides immitis*)和波萨达斯球霉菌(*Coccidioides posadasii*))、科罗拉多壁虱热(Colorado tick fever)(CTF)(科罗拉多壁虱热病毒(CTFV))、普通感冒(急性病毒性鼻咽炎;急性鼻炎)(通常为鼻病毒和冠状病毒)、克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease,CJD)(PRNP)、克里米亚-刚果出血热(Crimean-Congo hemorrhagic fever,CCHF)(克里米亚-刚果出血热病毒)、隐球菌病(新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*))、隐孢子虫病(隐孢子虫属(*Cryptosporidium* genus))、皮肤幼虫移行症(CLM)(通常为巴西钩虫(*Ancylostoma braziliense*);多种其它寄生虫)、环孢子虫病(圆孢子球虫(*Cyclospora cayentanensis*))、囊虫病(猪肉绦虫(*Taenia solium*))、巨细胞病毒感染(巨细胞病毒)、登革热( ) (登革病毒(DEN-1、DEN-2、DEN-3和DEN-4)-黄病毒)、栅藻(*Desmodesmus*)感染(绿藻链带藻(*Desmodesmus armatus*))、双核阿米巴症(脆双核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*))、白喉(白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*))、裂头绦虫病(裂头绦虫(*Diphyllobothrium*))、龙线虫病(麦地那龙线虫(*Dracunculus medinensis*))、埃博拉出血热(埃博拉病毒(*Ebolavirus*,EBOV))、棘球蚴病(棘球绦虫属(*Echinococcus* genus))、埃立克体病(埃立克体属(*Ehrlichia* genus))、蛲虫病(蛲虫感染)(蛲虫(*Enterobius vermicularis*))、肠球菌属感染(肠球菌属)、肠病毒感染(肠病毒属)、流行性斑疹伤寒(普氏立克次氏体(*Rickettsia prowazekii*))、传染性红斑(*Erythema infectiosum*)(第五病)(细小病毒B19)、幼儿急疹(*Exanthem subitum*)(第六疾病)(人类疱疹病毒6(HHV-6)和人类疱疹病毒7(HHV-7))、姜片吸虫病(*Fasciolopsiasis*)(布氏姜片吸虫(*Fasciolopsis buski*))、片虫病(*Fasciolosis*)(肝片吸虫(*Fasciola hepatica*)和大片吸虫(*Fasciola gigantica*))、致死性家族性失眠症(FFI)(PRNP)、丝虫病(丝虫总科(*Filarioidea*))、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)引起的食物中毒、独立生存的阿米巴感染(多种病原体)、梭杆菌感染(梭杆菌属(*Fusobacterium* genus))、气性坏疽(肌坏死梭菌(*Clostridial myonecrosis*))(通常是产气荚膜梭菌;其它梭菌种)、地丝菌病(*Geotrichosis*)(白地霉(*Geotrichum candidum*))、格-施-沙综合症(*Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome*,GSS)(PRNP)、梨形鞭毛虫病(肠道梨形鞭毛虫(*Giardia intestinalis*))、鼻疽病(鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia mallei*))、颚口线虫病(*Gnathostomiasis*)(棘颚口线虫(*Gnathostoma spinigerum*)和刚刺颚口线虫(*Gnathostoma hispidum*))、淋病(淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*))、腹股沟肉芽肿(杜诺凡病(*Donovanosis*))(肉芽肿克雷白氏杆菌(*Klebsiella granulomatis*))、A组链球菌感染(化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*))、B组链球菌感染(无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*))、流感嗜血杆菌感染(流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*))、手足口病(*Hand,foot and mouth disease*;HFMD)(肠道病毒,主要是柯萨基A病毒(*Coxsackie A virus*)和肠病毒71(EV71))、汉坦病毒(*Hantavirus*)肺综合症(HPS)(辛诺柏病毒(*Sin Nombre virus*))、华伦病毒(*Heartland virus*)病(华伦病毒)、幽门螺旋

杆菌感染(幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*))、溶血性尿毒综合症(HUS)(大肠杆菌0157:H7、0111和0104:H4)、出血热伴肾综合症(HFRS)(布尼亚病毒科(Bunyaviridae family))、A型肝炎(A型肝炎病毒)、B型肝炎(B型肝炎病毒)、C型肝炎(C型肝炎病毒)、D型肝炎(D型肝炎病毒)、E型肝炎(E型肝炎病毒)、单纯疱疹(单纯疱疹病毒1和2(HSV-1和HSV-2))、组织胞浆菌病(荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*))、钩虫感染(十二指肠钩虫(*Ancylostoma duodenale*)和美洲钩虫(*Necator americanus*))、人类博卡病毒感染(人类博卡病毒(HBoV))、人类伊氏埃立克体病(伊氏埃立克体(*Ehrlichia ewingii*))、人类粒细胞边虫病(HGA)(嗜吞噬细胞边虫(*Anaplasma phagocytophilum*))、人类偏肺病毒感染(人类偏肺病毒(hMPV))、人类单核细胞埃立克体病(查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*))、人类乳头瘤病毒(HPV)感染(人类乳头瘤病毒(HPV))、人类副流感病毒感染(人类副流感病毒(HPIV))、膜壳绦虫病(微小膜壳绦虫(*Hymenolepis nana*)和缩小膜壳绦虫(*Hymenolepis diminuta*))、埃-巴二氏病毒感染性单核细胞增多症(Mono)(埃-巴二氏病毒(EBV))、流行性感冒(流感)(正黏病毒科(Orthomyxoviridae))、等孢子虫病(贝氏等孢球虫(*Isospora belli*))、川崎病(Kawasaki disease)(未知病原体)、角膜炎(多种病原体)、金格杆菌(*Kingella kingae*)感染(金格杆菌)、库鲁病(Kuru)(PRNP)、拉沙热(Lassa fever)(拉沙病毒)、退伍军人病(Legionellosis)(退伍军人病)(嗜肺军团菌)、军团菌病(庞蒂亚克热(Pontiac fever)(嗜肺军团菌)、利什曼病(Leishmaniasis)(利什曼虫属)、麻风病(麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)和弥漫型麻风分枝杆菌(*Mycobacterium lepromatosis*))、钩端螺旋体病(钩端螺旋体属(*Leptospira* genus))、李氏菌病(单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*))、莱姆病(Lyme disease)(莱姆包柔螺旋体(Lyme borreliosis))(通常是伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)和其它疏螺旋体种)、淋巴丝虫病(象皮病(Elephantiasis))(班氏吴策线虫(*Wuchereria bancrofti*)和马来布鲁线虫(*Brugia malayi*))、淋巴细胞性脉络膜脑膜炎(Lymphocytic choriomeningitis)(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV))、疟疾(疟原虫属(*Plasmodium* genus))、马尔堡出血热(Marburg hemorrhagic fever;MHF)(马尔堡病毒)、麻疹(麻疹病毒)、中东呼吸综合症(MERS)(中东呼吸综合症冠状病毒)、类鼻疽病(韦特摩病(Whitmore's disease))(类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*))、脑膜炎(多种病原体)、脑膜炎球菌病(脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*))、后殖吸虫病(Metagonimiasis)(通常为横川后殖吸虫(*Metagonimus yokagawai*))、微孢子(微担孢子门)、传染性软疣(Molluscum contagiosum;MC)(传染性软疣病毒(MCV))、猴痘(猴痘病毒)、腮腺炎病毒(腮腺炎病毒)、鼠斑疹伤寒(地方性斑疹伤寒)(斑疹伤寒立克次体(*Rickettsia typhi*))、支原体肺炎(肺炎支原体)、足菌病(细菌(足菌肿(*Actinomycetoma*)) and 真菌(真菌瘤(*Eumycetoma*))的许多菌种)、蝇蛆病(寄生双翅目蝇蛆)、新生儿结膜炎(新生儿眼炎)(最常见的是沙眼衣原体和淋病奈瑟菌)、诺卡氏菌病(Nocardiosis)(通常是星形诺卡菌(*Nocardia asteroides*)和其它诺卡氏菌种)、盘尾丝虫病(Onchocerciasis)(河盲症)(圆盘曲霉(*Onchocerca volvulus*))、副球孢子菌病(南美芽生菌病)(巴西副球菌(*Paracoccidioides brasiliensis*))、并殖吸虫病(通常为卫氏并殖吸虫(*Paragonimus westermani*)和其它并殖吸虫种)、巴氏杆菌属病(巴氏杆菌属(*Pasteurella* genus))、病原性肠溶性疾病(包括例如肠道细菌的病原性菌株引起的那些疾病(例如病原性艰难梭菌、病

原性肠道沙门氏菌、病原性蜡样芽孢杆菌、病原性幽门螺旋杆菌、病原性弯曲杆菌属等)、头虱病(Pediculosis capitis)(头虱)(人头虱(Pediculus humanus capitis))、体虱病(Pediculosis corporis)(体虱)(人体虱(Pediculus humanus corporis))、阴虱病(Pediculosis pubis)(阴虱、会有阴虱)(阴虱(Phthirus pubis))、盆腔炎症性疾病(Pelvic inflammatory disease;PID)(多种病原体)、百日咳(Pertussis)(百日咳(Whooping cough))(百日咳博德特氏菌(Bordetella pertussis))、鼠疫(鼠疫耶尔森氏菌(Yersinia pestis))、肺炎球菌感染(肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae))、肺囊虫肺炎(PCP)(杰氏肺囊虫(Pneumocystis jirovecii))、肺炎(多种病原体)、脊髓灰质炎(脊髓灰质炎病毒)、普雷沃氏菌(Prevotella)感染(普雷沃氏菌属)、原发性阿米巴脑膜脑炎(Primary amoebic meningoencephalitis;PAM)(通常是福氏奈格勒菌(Naegleria fowleri))、渐进性多病灶脑白质病(JC病毒)、鹦鹉热(鹦鹉热嗜衣体(Chlamydophila psittaci))、寇热(Q fever)(伯氏立克次氏体(Coxiella burnetii))、狂犬病(狂犬病病毒)、鼠咬热(念珠状链杆菌(Streptobacillus moniliformis)或小螺旋菌(Spirillum minus))、呼吸道合胞病毒感染(呼吸道合胞病毒(RSV))、鼻孢子菌病(Rhinosporidiosis)(西伯氏鼻孢子虫(Rhino sporidium seeberi))、鼻病毒感染(鼻病毒)、立克次体感染(立克次体属)、立克次体痘(Rickettsialpox)(小蛛立克次体(Rickettsia akari))、裂谷热(Rift Valley fever;RVF)(裂谷热病毒)、落基山斑疹热(Rocky Mountain spotted fever;RMSF)(立氏立克次体(Rickettsia rickettsii))、轮状病毒感染(轮状病毒)、风疹(风疹病毒)、沙门氏菌病(沙门氏菌属(Salmonella genus))、SARS(严重急性呼吸性综合症)(SARS冠状病毒)、疥疮(疥螨(Sarcoptes scabiei))、血吸虫病(血吸虫属(Schistosoma genus))、败血症(多种病原体,包括例如碳酸噬胞菌属(Capnocytophaga))、志贺菌病(Shigellosis)(细菌性痢疾(Bacillary dysentery))(志贺氏菌属(Shigella genus))、带状疱疹(Shingles)(带状疱疹(Herpes zoster))(水痘带状疱疹病毒(Varicella zoster virus;VZV))、痘疮(Smallpox)(天花(Variola))(大天花或小天花)、孢子丝菌病(申克氏孢子丝菌(Sporothrix schenckii))、葡萄球菌食物中毒(葡萄球菌属(Staphylococcus genus))、葡萄球菌感染(葡萄球菌属)、圆线虫病(粪类圆线虫(Strongyloides stercoralis))、亚急性硬化性全脑炎(麻疹病毒)、梅毒(梅毒螺旋体(Treponema pallidum))、绦虫病(绦虫属)、破伤风(破伤风杆菌(Clostridium tetani))、须癣(须疮)(通常是发癣菌属(Trichophyton genus))、头癣(Tinea capitis)(头皮上的癣)(通常是断发癣菌(Trichophyton tonsurans))、体癣(Tinea corporis)(身体上的癣)(通常是发癣菌属(Trichophyton genus))、股癣(Tinea cruris)(股圆癣(Jock itch))(通常是絮状表皮癣菌(Epidermophyton floccosum)、红色发癣菌(Trichophyton rubrum)和发疮小芽胞癣菌(Trichophyton mentagrophytes))、手癣(Tinea manum)(手部的癣)(红色发癣菌(Trichophyton rubrum))、黑癣(Tinea nigra)(通常是威尼克何德霉(Hortaea werneckii))、足癣(Tinea pedis)(运动员足)(通常是发癣菌属)、灰指甲(Tinea unguium)(甲癣)(通常是发癣菌属)、花斑癣(Tinea versicolor)(花斑糠疹(Pityriasis versicolor))(马拉色氏霉菌属(Malassezia genus))、弓蛔虫病(眼幼虫移行症(Ocular Larva Migrans;OLM))(犬弓蛔虫(Toxocara canis)或猫弓蛔虫(Toxocara cati))、沙眼(沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis))、弓形虫病(刚地弓形虫(Toxoplasma gondii))、

旋毛虫病(旋毛虫(*Trichinella spiralis*))、滴虫病(阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*))、鞭虫病(鞭虫感染)(毛首鞭虫(*Trichuris trichiura*))、肺结核(通常是结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*))、兔热病(*Tularemia*) (土拉弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*))、伤寒热(肠道沙门氏菌亚种,肠道血清型(*Salmonella enterica* subsp.*enterica*, serovar *typhi*))、豚原体属解脲感染(解脲豚原体)、裂谷热(犬球霉菌或波萨达斯球孢子菌(*Coccidioides posadasii*))、委内瑞拉马脑炎(委内瑞拉马脑炎病毒)、委内瑞拉出血热(瓜纳里病毒(*Guanarito virus*))、病毒性肺炎(多种病毒)、西尼罗河热(西尼罗河病毒(*West Nile virus*))、白毛症(白秃疮(*Tinea blanca*)) (白色毛孢子菌(*Trichosporon beigeli*))、假结核耶尔森氏菌感染(假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*))、耶尔森氏菌病(小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*))、黄热病(黄热病病毒)、寨卡病毒(*Zika virus*)病(寨卡病毒)、接合菌病(*Zygomycosis*) (毛霉目(*Mucorales* order)) (毛霉病(*Mucormycosis*)和虫霉目(虫霉病(*Entomophthoromycosis*)))等。通常在本文中,根据所述方法检测感染病状包括通过检测来源于宿主的样品中所存在的一种或多种针对病原体源抗原的抗原特异性抗体同型(例如宿主源抗体)来检测针对感染的宿主免疫反应。

[0170] 相应地,在一些情况下,本发明方法可以用于检测受试者来源的样品或其它类型的样品中的病原体的存在,这是通过检测所述样品中的针对病原体或其组分的一种或多种抗体的存在来进行。可以根据本发明方法检测的病原体包括(但不限于)例如病毒病原体、细菌病原体、真菌病原体、原生动物病原体等。如将容易理解的,根据本公开的一个或多个实施例,可以通过从病原体中分离出抗原组分以用作与多核苷酸结合的抗原来分析新发现的病原体在样品内的存在。

[0171] 在一些情况下,本文描述的方法将检测和/或测量针对HIV抗原的抗体的存在,包括(但不限于)例如HIV-1抗原、HIV-2抗原、HIV-1/2抗原、p16、p14、p24、p55、gp120、gp160、gp41、gp36等。

[0172] 如本文所用,自身免疫病状可以变化并且包括受试者自身的免疫细胞攻击健康组织和/或受试者对受试者来源的抗原产生免疫反应的任何病状,包括(但不限于)有症状的自身免疫疾病、无症状的自身免疫疾病、急性自身免疫疾病、慢性自身免疫疾病、移植诱发的自身免疫疾病等。不受理论的束缚,在某些情况下,自身免疫疾病可能由外来物的存在触发,但是活化的免疫反应可能不特异性针对外来物。通常受自身免疫病状影响的区域包括(但不限于)例如血管、结缔组织、内分泌组织(例如甲状腺组织、胰腺组织等)、关节组织、肌肉组织、造血组织(例如包括红细胞等)、上皮组织(例如包括皮肤和肠)。自体免疫病状和自体免疫相关病状的非限制性实例包括(但不限于)例如急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、急性坏死性出血性白质脑炎、阿狄森病(Addison's disease)、肾上腺炎、无 $\gamma$ 球蛋白血症、斑秃、淀粉样变性、强直性脊柱炎、抗GBM/抗TBM肾炎、抗磷脂综合症(Antiphospholipid syndrome; APS)、自身免疫血管性水肿、自身免疫再生障碍性贫血、自身免疫自主神经失调、自身免疫肝炎、自身免疫高脂血症、自身免疫免疫缺陷、自身免疫内耳疾病(Autoimmune inner ear disease; AIED)、自身免疫心肌炎、自身免疫卵巢炎、自身免疫胰腺炎、自身免疫视网膜病变、自身免疫血小板减少性紫癜(Autoimmune thrombocytopenic purpura; ATP)、自身免疫甲状腺疾病、自身免疫荨麻疹、轴突和神经元神经病变、巴罗病(Balo disease)、

白塞氏病 (Behcet's disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、卡斯尔曼病 (Castleman disease)、乳糜泻、查格司病 (Chagas disease)、慢性疲劳综合症、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病 (Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy; CIDP)、慢性复发性多病灶骨髓炎 (Chronic recurrent multifocal osteomyelitis; CRM0)、丘-施二氏综合症 (Churg-Strauss syndrome)、瘢痕性类天疱疮/良性粘膜类天疱疮、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、库庚综合症 (Cogans syndrome)、冷凝集素病、先天性心脏传导阻滞、柯萨奇心肌炎 (Coxsackie myocarditis)、CREST病、原发性混合型冷球蛋白血症、脱髓鞘神经病变、疱疹样皮炎、皮炎、迪维克氏病 (Devic's disease) (视神经脊髓炎)、盘状狼疮、德莱西综合症 (Dressier's syndrome)、子宫内膜异位、嗜酸性食管炎、嗜酸性筋膜炎、结节性红斑、实验性过敏脑脊髓炎、伊文氏综合症 (Evans syndrome)、肌肉纤维疼痛、纤维性肺泡炎、巨细胞性动脉炎 (颞动脉炎)、巨细胞心肌炎、肾小球肾炎、古德帕斯丘综合症 (Goodpasture's syndrome)、肉芽肿病伴多血管炎 (GPA) (以前称为“韦格纳氏 (Wegener's) 肉芽肿病)、格雷夫斯氏病 (Graves' disease)、吉兰-巴雷综合症 (Guillain-Barre syndrome)、桥本氏脑炎 (Hashimoto's encephalitis)、桥本氏甲状腺炎、溶血性贫血、过敏性紫癜、妊娠疱疹、低 $\gamma$ 球蛋白血症、特发性血小板减少性紫癜 (Idiopathic thrombocytopenic purpura; ITP)、IgA肾病变、IgG4相关硬化性疾病、免疫调节脂蛋白、包涵体肌炎、间质性膀胱炎、幼年型关节炎、幼年型糖尿病 (1型糖尿病)、幼年型肌炎、川崎综合症 (Kawasaki syndrome)、兰伯特-伊顿综合症 (Lambert-Eaton syndrome)、白细胞破碎性血管炎、扁平苔藓、苔藓性硬化 (Lichen sclerosus)、木样结膜炎、线性IgA病 (LAD)、狼疮 (SLE)、莱姆病 (Lyme disease)、慢性梅尼尔氏病 (chronic, Meniere's disease)、显微镜下多血管炎、混合型结缔组织病 (MCTD)、穆恩溃疡 (Mooren's ulcer)、穆查-哈伯曼病 (Mucha-Habermann disease)、多发性硬化症、重症肌无力、肌炎、发作性睡病、视神经脊髓炎 (戴维克氏 (Devic's))、嗜中性白细胞减少症、眼瘢痕性类天疱疮、视神经炎、复发性风湿病、PANDAS (与链球菌属相关的儿科自身免疫神经精神病)、副肿瘤小脑变性、阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH)、帕瑞隆伯格综合症 (Parry Romberg syndrome)、帕森纳-特纳综合症 (Parsonnage-Turner syndrome)、睫状体平坦部炎 (Pars planitis) (周边葡萄膜炎)、天疱疮、周边神经病变、静脉周围脑脊髓炎、恶性贫血、POEMS综合症、结节性多发性动脉炎、I型、II型和III型自身免疫多内分泌腺综合症、风湿性多肌痛、多发性肌炎、心肌梗塞后综合症、心包切开后综合症、孕酮皮炎、原发性胆汁性硬化症、原发性硬化性胆管炎、牛皮癣、牛皮癣关节炎、特发性肺纤维化、特发性肺纤维化、坏疽性脓皮病、纯红细胞发育不良、雷诺现象 (Raynauds phenomenon)、反应性关节炎、反射性交感神经营养不良、莱特氏综合症 (Reiter's syndrome)、复发性多软骨炎、腿躁动综合症、腹膜后纤维化、风湿热、类风湿关节炎、类肉瘤病、施密特综合症 (Schmidt syndrome)、巩膜炎、硬皮病、休格连氏综合症 (Sjogren's syndrome)、精子和睾丸自身免疫性疾病、僵人综合症、亚急性细菌性心内膜炎 (Subacute bacterial endocarditis; SBE)、苏萨科综合症 (Susac's syndrome)、交感神经性眼炎、高安氏动脉炎 (Takayasu's arteritis)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、血小板减少性紫癜 (Thrombocytopenic purpura; TTP)、托洛萨-亨特综合症 (Tolosa-Hunt syndrome)、横贯性脊髓炎、1型糖尿病、溃疡性结肠炎、未分化的结缔组织病 (UCTD)、葡萄膜炎、血管炎、水疱性皮肤病、白癜风、韦格纳氏肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis) (现称为肉芽肿病伴多血管炎 (Granulomatosis with

Polyangiitis;GPA)等。通常,在本文中,根据所述方法检测自体免疫病状包括通过检测来源于受试者的样品中所存在的一种或多种抗原特异性抗体同型(例如针对受试者源抗原的受试者源自身免疫抗体)来检测受试者的自身免疫反应。在某些情况下,特定的自身免疫疾病的特征可能在于存在多种同型的多种不同自身抗体,因此,如本文所述的多重检测方法可用于检测或测量一组自身免疫相关自身抗体。

[0173] 本公开的方法可用于检测一种或多种临床相关的自身抗体,包括(但不限于)例如受试者响应于肿瘤而产生的一种或多种自身抗体,包括(但不限于)例如其中赘瘤是前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌、肝癌和甲状腺癌中的一种或多种。在某些情况下,可以在疾病症状出现之前进行检测。在其它情况下,可以在疾病症状出现之后进行检测,包括例如在一种或多种疾病症状出现之后,但是在治疗之前、治疗期间、治疗之后,或其组合。

[0174] 有用的自身抗体可以包括癌症自身抗体(即,指示癌症存在的抗体)。可以鉴别或预测癌症存在的癌症自身抗体可以包括(但不限于)例如前列腺癌自身抗体(包括(但不限于)例如特异性结合 $\alpha$ -甲基乙酰基辅酶A消旋酶(AMACR)、含有溴结构域的蛋白质2(BRD2)、钙调蛋白结合蛋白1(CALD1)、真核转译起始因子4 $\gamma$ ,1(EIF4G1)、激肽释放素-3(KLK3)、纽约食道鳞状细胞癌1(NY-ESO-1)、帕金森蛋白质7(PARK7)、PC4和SFRS 1相互作用性蛋白质1(PSIP1)、核糖体蛋白质L13a(RPL13A)、核糖体蛋白质L22(RPL22)、滑膜肉瘤、X断裂点2(SSX2)、(TAR DNA结合蛋白(TARDBP)、转铁蛋白受体(TFRC)、踝蛋白1(TLN1)、X抗原家族成员IB(XAGE1B)等的基因产物的那些生物标记物自身抗体)、乳癌自身抗体(包括(但不限于)例如特异性结合 $\alpha$ 2-HS糖蛋白(AHSG)、含有ASB9锚蛋白重复和SOCS盒的蛋白质9(ASB9)、早发型乳癌1(BRCA1)、早发型早发乳癌2(BRCA2)、

[0175] 癌胚抗原相关细胞粘附分子(CEACAM)基因、真核延伸因子-2激酶(EEF2K)、erb-b2受体酪氨酸激酶2(ERBB2)、热休克蛋白质60(HSP60)、粘蛋白1(MUC1)、Myc、NY-ESO-1、周期素依赖性激酶抑制剂2A(p16)、PARK7、RELT肿瘤坏死因子受体、含有丝氨酸活性位点的蛋白质1(SERAC1)、肿瘤蛋白质p53(TP53)等的基因产物的那些生物标记物自身抗体)、肺癌自身抗体(包括(但不限于)特异性结合磷脂结合蛋白A1(ANXA1)、癌症抗原1(CAGE1)、CEACAM基因、烯醇酶1(ENO1)、ERBB2、GBU4-5、胃泌素释放肽(GRP)、MUC1、Myc、NY-ESO-1、磷酸乙醇酸磷酸酶(PGP)、核糖体蛋白质SA(RPSA)、超氧化歧化酶2(SOD2)、TP53、丙糖磷酸异构酶(TPI)、酪氨酸3-单加氧酶/色氨酸5-单加氧酶活化蛋白质 $\theta$ (YWHAQ)等的基因产物的那些生物标记物自身抗体)、结肠癌自身抗体(包括(但不限于)例如特异性结合周期素B 1(CCNB1)、周期素D1(CCND1)、CEACAM基因、GRP、HSP60、IMP(肌苷5'-单磷酸酯)脱氢酶1(IMPDH1)、胰岛素样生长因子2mRNA结合蛋白3(KOC)、黏蛋白5AC

[0176] (MUC5AC)、Myc、核结合蛋白1(NUCB 1)、核孔蛋白62kDa(NUP62)、p16、Fas(TNF受体超家族元件6)(TNFRSF6)、TP53等的基因产物的那些生物标记物)、胃癌自身抗体(包括(但不限于)例如特异性结合CEACAM基因、GRP、MUC1、TP53等的基因产物的那些生物标记物自身抗体)、肝癌自身抗体(包括(但不限于)例如特异性结合 $\alpha$ 胎蛋白(AFP)、细胞凋亡诱导因子(AIF)、血管紧张素I转化酶(DCP)、DEAD盒解螺旋酶3、X连锁(DDX3X)、EEF2K、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、甲状腺癌、赫托细胞(Hurthle cell)(HCC)、异质核核糖核蛋白A2(HNRNPA2)、HSP70、NUP62、多囊素1、相互作用的瞬变受体潜在通道(PBP)、过氧化物还原酶(PRDH)、SOD2、TP53、TPI等的基因产物的那些生物标记物自身抗体等等。

[0177] 因此,在某些情况下,本公开的受试者可以包括患有癌症的受试者,怀疑患有癌症的受试者和/或已经或正在接受癌症治疗的受试者,包括(但不限于)例如前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌、肝癌等。

[0178] 在一些情况下,本公开的受试者可能患有或怀疑患有一种或多种副肿瘤综合症,即,由于体内癌症而并非由于癌细胞的局部存在而引起的综合症。副肿瘤症候群包括(但不限于)例如内分泌副肿瘤症候群(包括例如库欣综合症(Cushing syndrome)、抗利尿激素(ADH)分泌不当综合症(SIADH)、高钙血症、低血糖症、类癌综合症、红细胞增多症(polycythemia)、醛固酮增多症等)、神经系统副肿瘤综合症(包括例如兰伯特-伊顿肌无力综合症(Lambert-Eaton myasthenic syndrome;LEMS)、副肿瘤性小脑变性、脑脊髓炎、边缘叶脑炎、脑干脑炎、视性眼阵挛肌阵挛共济失调综合症、抗NMDA受体脑炎、多发性肌炎等)、粘膜皮肤副肿瘤综合症(包括例如黑棘皮病、皮炎、莱瑟-曲莱病征(Leser-Trelat sign)、坏死性迁徙性红斑、斯韦特氏综合症(Sweet's syndrome)、菜花状皮肤乳头瘤病、坏疽性脓皮病、后天性全身性毛发过多等)、血液副肿瘤综合症(包括粒细胞增多症、红细胞增多症、陶瑟征(Trousseau sign)、非细菌性血栓性心内膜炎、贫血等)、膜性肾小球肾炎、肿瘤诱发骨软化症、斯托弗综合症(Stauffer syndrome)、肿瘤性发热等。相应地,本发明的方法可以鉴别或预测受试者的一种或多种副肿瘤综合症或与副肿瘤综合症相关的赘瘤的存在,例如通过检测受试者中的自身抗体。

[0179] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴定或预测与皮炎相关的自身抗体的存在,包括(但不限于)例如针对MORC家族CW型锌指3(NXP2)、含有三联基序的蛋白质33(TIF1y)、小泛素样修饰物活化酶(SAE)等的一种或多种基因产物的自身抗体。

[0180] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴定或预测与全身性硬化相关的自身抗体的存在,包括(但不限于)例如针对RNA聚合酶III的自身抗体。

[0181] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴定或预测与兰伯特-伊顿肌无力综合症相关的自身抗体的存在,包括(但不限于)针对电压门控钙通道基因的一种或多种基因产物的自身抗体。

[0182] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴定或预测与重症肌无力有关的自身抗体的存在,包括(但不限于)针对肌连蛋白(Titin)、兰尼碱(ryanodine)受体等的一种或多种基因产物的自身抗体。

[0183] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴别或预测与副肿瘤天疱疮相关的自身抗体的存在,包括(但不限于)针对桥粒斑蛋白I、桥粒斑蛋白II、包斑蛋白、网蛋白、周斑蛋白等等的一种或多种基因产物的自身抗体。

[0184] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴别或预测与副肿瘤神经疾病相关的自身抗体的存在,包括(但不限于)针对Hu(抗神经元自身抗体1(ANNA1)、Yo(普尔基涅细胞(Purkinje cell)的细胞质抗体1型(PCA-1))、Ri(抗神经元自身抗体2(ANNA2)、Ma1/2(副肿瘤抗原Ma1/2PNMA1 PNMA1/2)、CV2(CV2/CRMP5-Ab)、两性蛋白、SRY(性别决定区Y)-盒1(SOX1)、Zic家族成员4(Zic4)、Tr( $\Delta$ /凹口样表皮生长因子相关受体(DNER))、蛋白激酶C $\gamma$ (PKC $\gamma$ )、CARPVII、Ca/ARHGAP26等等的一种或多种基因产物/抗原的自身抗体。

[0185] 在一些情况下,本公开的受试者可以包括患有或怀疑患有或正在治疗神经疾病的受试者,所述神经疾病包括例如具有自身免疫组分的神经疾病(例如神经炎性疾病、炎性神

经肌肉疾病等),包括(但不限于)例如重症肌无力、多发性硬化等。因此,在一些情况下,本公开的方法可以包括鉴别或预测与神经病症相关的自身抗体的存在,包括(但不限于)例如结合电压门控钾通道复合物(例如VGKC、LG11、CASPR2等)的组分的自身抗体、结合NMDA受体(例如NR2)的自身抗体、结合AMPA受体的自身抗体、结合GABAA/B受体的自身抗体、结合二肽基-肽酶样蛋白质-6(DPPX)的自身抗体、结合到IgLON5的抗体、结合到重症肌无力的病原性组分的自身抗体或通常与重症肌无力相关的自身抗体(包括(但不限于)例如抗乙酰胆碱受体(AChR)抗体、抗肌肉特异性激酶(MuSK)抗体、抗脂蛋白相关蛋白质(LRP)4、针对集聚蛋白的抗体、针对皮层肌动蛋白的抗体等等)、结合到多发性硬化症的病原性组分组分的自身抗体或通常与多发性硬化症相关的自身抗体(包括例如抗水通道蛋白4抗体、抗髓鞘抗体(抗MOG、抗MBP等)、抗KIR4.1抗体、抗SPAG16抗体等)

[0186] 在一些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有或已经治疗胆汁性肝硬化的受试者。这样,在某些情况下,本公开的方法可以包括通过检测或测量一种或多种胆汁性肝硬化相关抗体(包括但不限于例如抗M2线粒体抗体)来鉴定或预测胆汁性肝硬化的存在。

[0187] 在一些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有自身免疫风湿性疾病或正在接受自身免疫风湿性疾病治疗的受试者。因而,在一些情况下,本公开的方法可以包括通过检测或测量一种或多种自身免疫风湿病相关抗体来鉴定或预测自身免疫风湿病的存在,所述自身免疫风湿病相关抗体包括(但不限于)例如抗核抗体、抗SSA自身抗体(抗体格连氏综合症相关抗原A)、抗体格连氏综合症B型(SSB)抗体、抗史密斯抗体、抗U1RNP抗体、抗双链DNA抗体、抗磷脂抗体、抗瓜氨酸化蛋白抗体等。

[0188] 在一些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有特发性炎性肌病(IIM)或正接受所述肌病治疗的受试者,特发性炎性肌病(IIM)也分别称为多肌炎(PM)和皮肌炎(DM)。因而,在一些情况下,本公开的方法可以包括通过检测或测量一种或多种IIM相关抗体来鉴定或预测IIM的存在,所述相关抗体包括(但不限于)例如抗Jo-1抗体、氨基酰基-tRNA合成酶自身抗体(例如Jo-1(组氨酰基)抗体、PL-7(苏氨酰基)抗体、PL-12(丙氨酰基)抗体、OJ(异亮氨酰基)抗体、EJ(甘氨酰基)抗体、KS(天冬酰胺酰基)抗体、Zo(苯丙氨酰基)抗体和Ha(酪氨酰基)抗体等)、抗Mi-2抗体、抗MDA5抗体、抗NXP2抗体、抗SAE抗体,和抗TIF1y(p 155/140)抗体等等。

[0189] 在一些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有非炎性肌肉坏死或正接受非炎性肌肉坏死治疗的受试者。因此,在一些情况下,本公开的方法可以包括通过检测或测量一种或多种非炎性肌肉坏死相关抗体来鉴别或预测非炎性肌肉坏死的存在,包括(但不限于)例如抗3-羟基-3-甲基戊二酰基-辅酶A还原酶(HMGCR)抗体。

[0190] 在某些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有全身性硬化症和混合型结缔组织病或正在接受所述疾病治疗的受试者。因此,在一些情况下,本公开的方法可以包括通过检测或测量一种或多种全身性硬化症或混合型结缔组织疾病相关抗体来鉴别或预测全身性硬化症和/或混合型结缔组织疾病的存在,所述抗体包括(但不限于)例如抗PM-Scl1抗体、抗Ku抗体和抗U1RNP抗体等等。

[0191] 在一些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有代谢疾病(例如糖尿病,包括例如1型糖尿病)或正在接受代谢疾病治疗的受试者。因而,在一些情况下,本公开的方法可以包括通过检测或测量一种或多种代谢疾病相关抗体来鉴别或预测代谢疾病的存在,所

述抗体包括(但不限于)抗谷氨酸脱羧酶(GAD)抗体、抗酪氨酸磷酸酶样分子抗体、抗IA-2抗体和抗胰岛素抗体,例如如在检测和/或监测1型糖尿病时所用。

[0192] 在一些情况下,本公开的病症和可以利用如本文所述的用于鉴别病状或作为受试者病状的预后的一部分使用的方法检测的自身抗体包括(但不限于)例如以下文献中所述的那些:Zaenker和Ziman,《癌症流行病学、生物标记物和预防(Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.)》(2013) 22(12):2161-81;Leslie等人《临床研究杂志(J Clin Invest)》(2001) 108(10):1417-22;Damoiseaux等人《自身免疫评论(Autoimmunity Reviews)》(2015) 14:555-563,所述文献的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0193] 在一些情况下,本文所述的方法可用于治疗后的患者监测,例如手术(包括组织移植)后、癌症治疗后、感染病状治疗后、自身免疫病状治疗后等。在一些情况下,本文所述的方法可用于监测癌症手术治疗后的受试者,例如,监测与手术切除癌症后癌症存在或不存在相关的自身抗体水平。例如,在一个实施例中,本文所述的方法可用于监测甲状腺切除术的一种或多种甲状腺球蛋白自身抗体。在某些情况下,本公开的方法可用于检测一种或多种抗甲状腺球蛋白抗体、一种或多种抗C1q抗体、一种或多种抗MPO抗体、一种或多种抗转谷氨酰胺酶抗体、一种或多种抗Sm/RNP抗体、一种或多种抗GAD65抗体、一种或多种抗Ro/SSA抗体、一种或多种抗JO-1抗体、一种或多种抗IA-2抗体、一种或多种抗La/SSB抗体、一种或多种抗PR3抗体、一种或多种抗Sm B/B'抗体、一种或多种抗CENP-A抗体、一种或多种抗U1-snRNP-C抗体、一种或多种抗麦醇溶蛋白抗体、一种或多种抗组蛋白H3抗体、一种或多种抗H2B抗体、一种或多种抗SmD抗体、一种或多种抗组蛋白H4抗体或一种或多种抗胰岛素H抗体。因此,在某些情况下,本发明方法的抗原可以是一种或多种甲状腺球蛋白抗原、一种或多种C1q抗原、一种或多种MPO抗原、一种或多种转谷氨酰胺酶抗原、一种或多种Sm/RNP抗原、一种或多种GAD65抗原、一种或多种Ro/SSA抗原、一种或多种JO-1抗原、一种或多种IA-2抗原、一种或多种La/SSB抗原、一种或多种PR3抗原、一种或多种Sm B/B'抗原、一种或多种CENP-A抗原、一种或多种U1-snRNP-C抗原、一种或多种麦醇溶蛋白抗原、一种或多种抗组蛋白H3抗原、一种或多种H2B抗原、一种或多种SmD抗原、一种或多种组蛋白H4抗原或一种或多种胰岛素H抗原。在某些多重分析中,特定分析可以包括个别地与如本文所述的多核苷酸结合的多种抗原的组合,其中所述抗原可以是以下中的每一种或选自甲状腺球蛋白抗原、C1q抗原、MPO抗原、转谷氨酰胺酶抗原、Sm/RNP抗原、GAD65抗原、Ro/SSA抗原、JO-1抗原、IA-2抗原、La/SSB抗原、PR3抗原、Sm B/B'抗原、CENP-A抗原、U1-snRNP-C抗原、麦醇溶蛋白抗原、组蛋白H3抗原、H2B抗原、SmD抗原、组蛋白H4抗原和/或胰岛素H抗原。

[0194] 在一些情况下,本发明方法可用于将样品中存在的一种或多种抗体同型的测量值归一化。例如,在某些情况下,可以根据样品中存在的第二抗体的含量来归一化特定抗体同型的含量。在一些情况下,可以根据样品中存在的一种或多种免疫球蛋白的含量来归一化抗体的含量。在一些情况下,样品中的免疫球蛋白含量可以指示免疫球蛋白缺乏。

[0195] 任何方便的样品都可以用于执行本文所述的方法。在一些情况下,从受试者获得的样品,例如患者样品,可以包括(但不限于)例如组织样品(例如活检样品)。如本文所用,组织样品通常是指含有细胞和其它组分并且可以变化的样品,但是通常包括皮肤组织样品、肌肉组织样品、肿瘤组织样品、血液样品、骨样品、骨髓样品、脑组织样品、结缔组织组织样品等。在一些情况下,例如在组织样品为固体或半固体的情况下,在用于本文所述的方法

之前,可将组织样品液化或将细胞样品解离和/或均质化。在一些情况下,例如当组织是液体组织样品(例如血液)时,这种预处理是不必要的。在一些情况下,本文所述的方法可以在没有预处理的情况下针对固体或半固体组织样品进行,例如针对组织切片或从固体或半固体组织获得的细胞的细胞学样品进行,例如,如利用组织学或细胞学方法所执行。因此,在一些情况下,本发明的方法可用于染色,例如用于鉴定抗体、组织学或细胞学样品。

[0196] 在某些实施例中,本公开方法的抗体检测方法的专用性不依赖于样品中的抗多核苷酸抗体的存在。因而,无论样品中存在或不存在抗多核苷酸抗体,都可以进行所述分析。在一些情况下,本公开的样品可以是已知含有抗多核苷酸抗体的样品。在一些情况下,本公开的样品可以是怀疑含有抗多核苷酸抗体的样品。如本文所用的术语“抗多核苷酸抗体”包括由受试者的免疫系统产生的特异性结合一种或多种多核苷酸的那些抗体,包括(但不限于)例如抗DNA自身抗体、抗双链DNA(dsDNA)抗体、抗单链DNA(ssDNA)抗体等。

[0197] 抗DNA抗体在一般人群中普遍存在,某些受试者,包括易患自身免疫性疾病的受试者,在其血液中展示抗DNA抗体的可能性增加。另外,某些病状与抗DNA抗体的存在和/或含量增加相关或可能相关。此类病状包括(但不限于)例如红斑狼疮(SLE)、

[0198] 风湿病(例如抗磷脂抗体综合症、类风湿性关节炎、CREST(钙化病、雷诺病、食道蠕动障碍、指端硬化和毛细血管扩张症)、硬皮病、血管炎、幼年型风湿性关节炎、混合型结缔组织病等)、恶性疾病(例如淋巴瘤和其它癌症)、感染疾病(例如结核病和其它感染)、内分泌失调、肝炎(例如自身免疫肝炎、B型肝炎等)、结节病、家族性地中海热、特发性血小板减少性紫癜、风湿性心脏病、肌无力格雷夫斯氏病、晚期肾病、溃疡性结肠炎、癫痫、纤维肌痛、骨软骨炎、骨关节炎、伊万斯综合症(Evans syndrome)、皮肤牛皮癣、皮疹、多发性硬化等。与抗DNA抗体的存在或含量升高有关的受试者和病状包括(但不限于)例如以下文献中所述的那些: Isenberg等人,《风湿病学(Rheumatology)》(牛津). (2007) 46(7):1052-6; Attar等人,《沙特医学杂志(Saudi Med J.)》(2010) 31(7):781-7和Williamson等人,《美国国家科学院院刊》(2001) 98(4):1793-8; 所述文献以全文引用的方式并入本文。

[0199] 在一些情况下,患者样品(例如血液、血清等)可能含有或更可能含有或怀疑含有抗多核苷酸抗体,包括例如上文所述和通常人类患者群体的那些抗DNA抗体相关病状。本公开的发明人已经发现,在某些情况下,抗多核苷酸抗体能够干扰凝集分析,不受理论的束缚,其通过目标抗体干扰所需抗原的凝集和/或产生多核苷酸结合的抗原与抗多核苷酸抗体的假阳性凝集。在一些情况下,可以通过向凝集反应中添加未结合的(即,游离的)多核苷酸来减轻抗多核苷酸抗体对如本文所述的凝集分析的有害影响。

[0200] 在某些情况下,本公开的方法包括向凝集反应中添加游离DNA,例如游离ssDNA,包括其中将这种游离DNA添加至已知或预期含有抗DNA抗体的样品中的情况以及其中将游离DNA预防性地添加至样品中的情况,其中抗DNA抗体的存在是未知的或未预期的。凝集反应中的游离DNA的有用量将变化,并且有用的浓度可以在0.1 $\mu$ M或更小至1mM或更高的范围内,包括(但不限于)例如0.1 $\mu$ M至1mM、1 $\mu$ M至1mM、2 $\mu$ M至1mM、3 $\mu$ M至1mM、4 $\mu$ M至1mM、5 $\mu$ M至1mM、6 $\mu$ M至1mM、7 $\mu$ M至1mM、8 $\mu$ M至1mM、9 $\mu$ M至1mM、10 $\mu$ M至1mM、0.1 $\mu$ M至100 $\mu$ M、1 $\mu$ M至100 $\mu$ M、2 $\mu$ M至100 $\mu$ M、3 $\mu$ M至100 $\mu$ M、4 $\mu$ M至100 $\mu$ M、5 $\mu$ M至100 $\mu$ M、6 $\mu$ M至100 $\mu$ M、7 $\mu$ M至100 $\mu$ M、8 $\mu$ M至100 $\mu$ M、9 $\mu$ M至100 $\mu$ M、10 $\mu$ M至100 $\mu$ M等。凝集反应中有用的游离DNA(即竞争性DNA或阻断性DNA)通常不会与抗原结合的多核苷酸或其它多核苷酸具有显著同源性

(例如,桥多核苷酸,夹板多核苷酸等),其中“显著的同源性被认为是足以在正常反应条件下杂交的同源性。因此,这种游离DNA的结构(例如长度、核苷酸含量、序列等)将广泛变化。在一些情况下,游离DNA的范围可以是50个或更少的核苷酸至100或更多,包括(但不限于)例如50至100个核苷酸、50至95个核苷酸、50至90个核苷酸、50至85个核苷酸、50至80个核苷酸、55至100个核苷酸、60至100个核苷酸、60至90个核苷酸、60至80个核苷酸、60个核苷酸、65个核苷酸、70个核苷酸、75个核苷酸、80个核苷酸、85个核苷酸等。在一些情况下,游离DNA的G/C含量百分比将为50%或更少,包括(但不限于)例如30%至50%、35%至50%、40%至50%、45%至50%等。

[0201] 在一些情况下,样品是血液样品。血液样品可以作为全血样品进行分析,或可以部分或全部地分级分离。在一些情况下,分级分离的血液样品可产生可对其执行本文所述的检测方法的血清样品或可对其进行本文所述的检测方法的血浆样品。

[0202] 在一些情况下,样品可以是分泌的体液或半固体,使得获得样品以无创方式进行和/或在受试者没有任何伤害的情况下进行。

[0203] 所关注的分泌体液和/或半固体包括(但不限于)例如尿液、唾液、眼泪、汗水、脓液和粪便。在某些情况下,本发明方法的高灵敏度允许检测传统凝集方法和/或ELISA所不能检测到的分泌体液或半固体中的抗体同型。

[0204] 在一些情况下,例如在生物技术和/或医药应用中,可以对样品中的特定抗体同型的存在进行分析且/或对特定抗体同型的量进行测量(例如滴定),作为产生特定抗体同型和/或筛选靶向特定抗体同型的药剂活性的方法中的步骤。在一些情况下,本文描述的方法可用于其中的样品是实验室产生的细胞样品。这样的实验室细胞样品可以是试管内或体内产生的。在一些情况下,细胞样品是试管内产生的杂交瘤,并且本抗体是由杂交瘤产生的抗体。在一些情况下,细胞样品是体内产生的杂交瘤,并且本发明抗体是由杂交瘤产生的抗体。因而,在一些情况下,本文所述的本发明方法和本文所述的多重方法可用于筛选杂交瘤。可以进行杂交瘤筛选以检测期望的天然或合成产生的抗体,包括(但不限于)例如单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)等。

[0205] 所述方法所适用的杂交瘤产生和分析方法对于本领域普通技术人员而言是显而易见的,并且包括例如以下文献中所述的那些:《分子生物学方法:免疫化学方案(Methods in Molecular Biology:Immunochemical Protocols)》Burns,R.编,胡马纳出版社(Humana Press),2005,其公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0206] 在一些情况下,通过检测根据本文所述的方法所产生的相关的延长多核苷酸或扩增产物,可以鉴定表达抗体的细胞(例如B细胞、T细胞、杂交瘤细胞等)表达抗体,例如B细胞受体、T细胞受体、抗体等。在一些情况下,使用可检测的探针核酸,例如荧光标记的探针核酸,可以检测到基于多核苷酸所结合的抗原和抗体的聚集而产生的延伸和/或扩增产物,从而鉴定与延伸和扩增产物相关的细胞。例如,在某些情况下,使用可检测的探针核酸,例如荧光标记的探针核酸,可以检测到基于多核苷酸所结合的抗原和抗体的聚集而产生的延伸和/或扩增产物,从而鉴定产生抗体的细胞。在一些情况下,这种鉴定允许定量所鉴定细胞的抗体对抗原的相对结合(例如,允许鉴定产生具有抗原-抗体结合或具有优异的抗原-抗体结合的抗体的细胞)。在一些情况下,这样的鉴定允许基于细胞的抗体产生和/或基于它们的相对优异的抗体产生来对细胞进行分选(例如,通过FACS),例如其中以并行或多重方

式分析多种不同细胞。

[0207] 在某些情况下,本文描述的方法可用于筛选已被免疫而产生抗体的宿主动物。任何便利的宿主动物抗体产生系统都可以与本文所述方法组合使用,并且可以包括(但不限于)例如上述那些受试动物。

[0208] 由于生物技术和/或药学应用包括单特异性和多特异性(例如双特异性)抗原结合成员的使用和/或产生,因此如本文所述的本发明方法通常可以被配置用于检测单特异性或多特异性抗体,例如单特异性或多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

[0209] 上述用途决不认为是限制性的,因为本文所述的方法和组合物可具有本文未描述的附加用途。

[0210] E. 组合物和试剂盒

[0211] 本公开包括可用于实施本文描述的方法的组合物,例如试剂、试剂盒和装置。本文描述的任何试剂可以个别地在用于检测抗体的方法或试剂盒中使用。例如,本公开提供了可用于所述分析中的抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物。

[0212] 如上所述,抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物可以通过任何方便的方法产生。在一些情况下,多核苷酸和抗原或抗体结合剂可以直接连接,例如通过单键直接连接,或间接连接,例如通过使用合适的连接子,例如聚合物连接子、化学连接子或一个或多个连接分子或部分。在一些情况下,多核苷酸与抗原或抗体结合剂的连接可以通过一种或多种共价相互作用的方式进行。在一些情况下,抗原可以官能化,例如为了结合到多核苷酸,添加或产生反应性官能基。在一些情况下,多核苷酸可以官能化,例如为了结合到抗原,添加或产生反应性官能基。可以修饰官能化抗原、抗体结合剂和/或多核苷酸以包含便于结合的任何反应性官能团。在一些情况下,将多核苷酸官能化以包含一个或多个官能团,所述官能团包括胺官能团,例如末端胺官能团、羧基官能团(例如末端羧基官能团或巯基)、硫醇官能团,例如在硫醇化或硫醇修饰的寡核苷酸等中。

[0213] 在多核苷酸经官能化而具有胺官能团和/或羧基官能团和/或巯基和多肽抗原或抗体的情况下,官能化的多核苷酸与多肽抗原或抗体可以通过任何方便的蛋白质结合方法结合,包括(但不限于)蛋白质交联,包括(但不限于)例如戊二醛交联、碳二亚胺交联、丁二酰亚胺酯交联、亚氨基酯交联、马来酰亚胺交联、碘乙酰胺交联、联苯胺交联、高碘酸酯交联、异硫氰酸酯交联等。这样的结合方法可以任选地使用多肽抗原的氨基酸残基的反应性侧链基团(例如,蛋白质的Lys、Cys、Ser、Thr、Tyr、His或Arg氨基酸残基的反应性侧链基团,即,多肽连接基团可以具有氨基反应性、硫醇反应性、羟基反应性、咪唑基反应性或胍基反应性。在一些情况下,可以利用与多核苷酸上的相容性官能团结合的化学选择性反应性官能团。用于纳入本发明多肽抗原中的化学选择性反应性官能团包括(但不限于):叠氮基、炔基、膦基、半胱氨酸残基、C末端硫酯、芳基叠氮化物、马来酰亚胺、碳二亚胺、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)-酯、酰肼、PFP酯、羟甲基膦、补骨脂素、酰亚胺酯、吡啶基二硫化物、异氰酸酯、氨基、醛、酮、氯乙酰基、溴乙酰基和乙烯基砜。另外的示例性官能团和交联方法以及使用这种官能团的结合方法描述于例如Hermanson,《生物结合技术(Bioconjugate Techniques)》第二版,学术出版社(Academic Press),2008中,其公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0214] 视抗原或抗体结合剂和待结合的多核苷酸上存在的特定官能团(无论是天然存在的还是合成的)而定,在一些情况下,有用的结合试剂可以包括(但不限于)例如同双官能结

合试剂(例如(双(2-[丁二酰亚胺基氧基羰基氧基]乙基)砜、1,4-二-(3'-[2'吡啶基二硫代]-丙酰胺基)丁烷、辛二酸二丁二酰亚胺酯、酒石酸二丁二酰亚胺酯、酒石酸磺基二丁二酰亚胺酯、二硫代双(丙酸丁二酰亚胺酯)、3,3'-二硫代双(丙酸磺基丁二酰亚胺酯)、乙二醇双(丁二酸丁二酰亚胺酯)等)、杂双官能结合试剂(例如间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基丁二酰亚胺酯、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基丁二酰亚胺酯、N-γ-马来酰亚胺基丁酰氧基丁二酰亚胺酯、N-γ-马来酰亚胺基丁酰氧基磺基丁二酰亚胺酯、N-(8-马来酰亚胺基己酸)酰肼、N-(ε-马来酰亚胺基己酰氧基)丁二酰亚胺酯、N-(8-马来酰亚胺基己酰氧基)磺基丁二酰亚胺酯、N-(对马来酰亚胺基苯基)异氰酸酯、N-丁二酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸丁二酰亚胺酯、4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸丁二酰亚胺酯、(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸N-磺基丁二酰亚胺酯、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸磺基丁二酰亚胺酯、4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸磺基丁二酰亚胺酯、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐、马来酰亚胺PEG N-羟基丁二酰亚胺酯等等)、光反应性结合试剂(例如对叠氮基苯甲酰基酰肼、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲氧基丁二酰胺、对叠氮基苯基乙二醛单水合物、N-(4-[p-叠氮基水杨基酰胺基]丁基)-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺、双(对-[4-叠氮基水杨基酰胺基]-乙基)二硫化物、N-羟基丁二酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸、N-羟基磺基丁二酰亚胺基-4-叠氮基本甲酸酯、磺基丁二酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3-二硫代丙酸酯、磺基丁二酰亚胺基2-(间叠氮基-邻硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-丙酸酯、磺基丁二酰亚胺基6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯、磺基丁二酰亚胺基(4-叠氮苯基二硫代)丙酸酯、磺基丁二酰亚胺基-2-(对叠氮基水杨基酰胺基)乙基-1,3-二硫代丙酸酯等等)。

[0215] 在多核苷酸经官能化而具有硫醇官能团的情况下(例如硫醇化的寡核苷酸),可以通过使用4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸磺基-磺基丁二酰亚胺酯(磺基-SMCC)结合实现与所关注抗原或抗体结合剂的结合,如本文所述。

[0216] 在多核苷酸与小分子结合的情况下,任何方便的结合方法可用于将多核苷酸共价连接到小分子,这取决于多种因素,包括例如小分子上的可用反应基团以及多核苷酸上的特定修饰的存在或缺乏。在一些情况下,胺官能化的多核苷酸可以通过胺反应性交联剂与所需的小分子结合,所述交联剂包括(但不限于)例如NHS酯,包括例如本文所述。

[0217] 在一些情况下,多核苷酸与抗原或抗体结合剂的连接是利用了已经存在于多核苷酸上的现有官能性部分。在一些情况下,向多核苷酸中添加用于将多核苷酸与抗原或抗体结合的官能性部分以产生官能化的多核苷酸。可以通过修饰多核苷酸的一个或多个核苷酸或通过向多核苷酸添加修饰的核苷酸来产生官能化的多核苷酸。在一些情况下,这样的经修饰的核苷酸可以被称为官能化的核苷酸。

[0218] 可以通过任何方便的方法将修饰的核苷酸引入多核苷酸,所述方法包括(但不限于)例如合成/化学合成(例如固相寡核苷酸合成、磷酸胺合成等)、重组合成、酶并入等。经修饰的核苷酸和适用于与所关注的抗原形成连接的核苷酸修饰包括(但不限于)例如适用于点选化学官能化的那些(例如叠氮基官能化、炔基官能化、二苯并环辛炔(DBCO)官能化等)、适用于核酸标记的那些、适用于光交联的那些、适用于丙烯酸类氨基磷酸酯连接的那些、适用于焦磷酸酯连接/接合的那些,等等,例如,3'-叠氮基-2',3'-双脱氧腺苷酸-5'-三

磷酸酯、5-(3-叠氨基丙基)-尿苷-5'-三磷酸酯、5-乙炔基-2'-尿苷5'-三磷酸酯、8-叠氨基-腺苷-5'-三磷酸酯、N<sup>6</sup>-(6-叠氨基)己基-3'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯、胞苷-5'-磷酸酯-3'-(15-叠氨基-4,7,10,13-四氧杂-十五烷酰基-6-氨基己基)磷酸酯、 $\gamma$ -(2-叠氨基乙基)-腺苷-5'-三磷酸酯、 $\gamma$ -(6-叠氨基己基)-腺苷-5'-三磷酸酯、 $\gamma$ -[(6-叠氨基己基)-酰亚胺基]-腺苷-5'-三磷酸酯、N<sup>6</sup>-(6-叠氨基)己基-腺苷-5'-三磷酸酯、N<sup>6</sup>-(6-叠氨基)己基-2'-脱氧-腺苷-5'-三磷酸酯、N<sup>6</sup>-(6-叠氨基)己基-3'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯、3'-叠氨基-2',3'-双脱氧胸苷-5'-三磷酸酯、5-(15-叠氨基-4,7,10,13-四氧杂-十五烷酰基-氨基烯丙基)-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯、N<sup>6</sup>-炔丙基-腺苷-5'-三磷酸酯、腺苷-5'-[ $\gamma$ -(炔丙基)]三磷酸酯、腺苷-5'-[ $\gamma$ -(炔丙基)-酰亚胺基]三磷酸酯、2-乙炔基-腺苷-5'-三磷酸酯、5-(辛-1,7-二炔基)-2'-脱氧胞苷5'-三磷酸酯、5-(辛-1,7-二炔基)-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸酯、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸酯、5-二苯甲基环辛炔-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸酯、2-氨基嘌呤-2'-脱氧核苷-三磷酸酯、5-氨基烯丙基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯、5-氨基烯丙基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯、5-炔丙基氨基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯、5-炔丙基氨基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯、5-碘尿苷-5'-三磷酸酯、4-硫尿核苷-5'-三磷酸酯、5-溴尿苷-5'-三磷酸酯、5'-丙烯酰化修饰、5'-腺苷酰化修饰等等。

[0219] 在一些情况下,多核苷酸与所关注抗原或抗体结合剂的连接是通过一个或多个官能性连接子介导。如本文所用,官能性连接子是指具有用于将一个分子连接至另一分子的一个或多个官能团的任何合适连接子。例如,在一些情况下,本公开的多核苷酸的核苷酸可以连接至包含官能团(例如氨基官能团、硫醇官能团、羟基官能团、咪唑基官能团、胍基官能团、炔炔官能团、叠氮官能团、应变炔炔官能团等)。作为非限制性实例,本公开的多核苷酸的核苷酸可以使用包含官能团的功能性生物素发生生物素化。

[0220] 在一些情况下,可用于将多核苷酸连接至所需抗原或抗体结合剂的那些经修饰的核苷酸可包括可从商业供应商获得的那些,包括(但不限于)例如集成DNA技术有限公司(Integrated DNA Technologies, Inc.) (Coralville, IA); TriLink 生物技术有限公司(TriLink BioTechnologies, Inc.) (San Diego, CA); Jena 生物科学有限公司(Jena Bioscience GmbH) (Jena, 德国); 生命技术有限公司(Life Technologies, Inc.) (Grand Island, NY); 新英格兰生物实验室有限公司(New England Biolabs, Inc.) (Ipswich, MA); Zymo 研究公司(Zymo Research Corporation) (Irvine, CA); Enzo 生命科学有限公司(Enzo Life Sciences, Inc.) (Farmingdale, NY) 等等。

[0221] 本公开的抗原-DNA结合物和抗体结合剂-DNA结合物的产生可以考虑结合反应的效率,其影响结合后的抗原与多核苷酸的摩尔比,例如抗原:DNA或抗体结合剂:多核苷酸,例如抗体、抗体模拟物或适体:DNA摩尔比。本公开的发明人已经发现,抗原与多核苷酸的摩尔比在所述分析中影响凝集。不受理论的束缚,低抗原或抗体与高多核苷酸的比率在一些情况下似乎抑制凝集(例如,通过抑制抗原和抗体的结合表面的进入)。在许多情况下,结合后的抗原与多核苷酸或抗体与多核苷酸的摩尔比将大于1:5,包括(但不限于)例如大于1:4,大于1:3,大于1:2等。在某些情况下,结合后的抗原与多核苷酸的摩尔比为1:1至1:5,包括(但不限于)例如1:1至1:4、1:1至1:1至1:3、1:1至1:2等。在其它情况下,结合之后,如所述在分析中使用的抗原与多核苷酸或抗体与多核苷酸摩尔比基本上是1:1,基本上是1:2,基本上是1:3等等。

[0222] 本公开还提供了与本发明分析和所述抗体检测有关的装置。这样的装置可以包括(但不限于)“现场使用”装置,例如浸染棒分析装置、侧向流分析装置、基于载玻片的装置等,其可以允许以最少的或不使用实验室便利设施(例如电、化学试剂、温度控制、制冷等)进行本文所述的凝集分析。还包括用于实验室环境的装置,例如对所产生的扩增产物利用精确定量的那些装置,包括例如PCR装置、qPCR装置、荧光计、闪烁计数器、显微镜、读板器、核酸测序装置等。在一些情况下,可以改进等温扩增装置,例如Cheng等人(2012)《传感器(Sensors)》12,8319-8337中所述的那些装置,以使用作实施如本文所述方法的装置,所述文献的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0223] 在另一方面,本公开提供了用于实施本发明方法(例如如上文所述)的试剂盒。本发明试剂盒可包括可用于实施上述方法的本文所述试剂、装置或组合物的任何组合,包括(但不限于)例如所述抗原-DNA结合物、抗体结合剂-DNA结合物、桥接多核苷酸、夹板多核苷酸、酶试剂(例如连接酶),引物等中的一种或多种。本发明试剂盒可进一步包括一种或多种试剂制备试剂,包括(但不限于)例如用于使抗原或抗体结合剂官能化的试剂(包括例如容易使多核苷酸与所关注抗原或抗体结合剂结合的官能化多核苷酸)、用于使多核苷酸官能化的试剂(例如官能化的核苷酸(即包括一个或多个反应基团的核苷酸)、用于多核苷酸和/或抗原和/或抗体结合剂(包括例如一种或更种如本文所述的结合和/或交联试剂或连接子)结合的试剂。

[0224] 另外,本发明试剂盒可以进一步包括分析试剂或适用于对样品(例如患者样品)执行分析的试剂,以便评估例如来自受试者的样品中是否存在一种或多种抗体同型。此类分析试剂可包括(但不限于)例如检测试剂、样品制备试剂、扩增试剂(例如PCR试剂和/或等温扩增试剂和/或qPCR试剂等)和凝集试剂(例如抗原-DNA结合物、抗体结合剂-DNA结合物等)、缓冲液、稀释剂等。此类分析试剂盒可进一步包括样品收集组件,例如样品收集容器和/或样品收集装置等。上述组件可以存在于分开的容器中,或者可以将一种或多种组件组合成单个容器,例如玻璃或塑料瓶或试管。

[0225] 试剂盒可进一步包括对照试剂和样品,包括(但不限于)例如对照样品(例如阳性对照样品、阴性对照样品等)、校准试剂(例如荧光校准试剂等)。

[0226] 除上述组件外,本发明试剂盒可进一步包括用于实施本发明方法的说明书。这些说明书可以多种形式存在于本发明试剂盒中,其中一种或多种可以存在于试剂盒中。这些说明书可以存在的一种形式是合适介质或基材(例如其上打印有信息的一张或多张纸、试剂盒的包装、药品说明书等)上的打印信息。另一种方法是其上已经记录了信息的计算机可读介质,例如磁盘、CD、DVD、蓝光、可移动的驱动器(例如闪存装置)等。可以存在的另一手段可以是网站地址,其可以通过因特网使用以访问远程站点的信息。试剂盒中可以存在任何方便的手段。

[0227] 3. 实验

[0228] 以下为实施本发明的特定实施例的实例。实例仅为了说明性目的而提供,并且不打算以任何方式限制本发明的范围。

[0229] 已经努力确保关于所用数字(例如数量、温度等)的准确度,但当然应允许一些实验误差和偏差。

[0230] 实例1

[0231] 凝集PCR同型特异性抗体检测 (ISAP)

[0232] ISAP方法概述

[0233] 图1说明了用于检测目标抗体的ISAP方法。将抗体结合剂-DNA结合物和抗原-DNA结合物与包含目标抗体分析物的样品一起培育。二次抗体-DNA结合物结合到目标抗体,目标抗体又结合到抗原-DNA结合物而形成复合物,其中二次抗体-DNA和抗原-DNA彼此靠近。二次抗体-DNA和抗原-DNA由于它们的接近而可以在桥接寡核苷酸的存在下连接。可以通过qPCR或任何其它DNA检测方法(例如DNA微阵列)来检测和定量连接产物。

[0234] ISAP方法原则上能够用于检测任何同型的抗体,包括IgE、IgM、IgG、IgA和IgD。此外,ISAP方法通过向系统中添加相应的二次抗体-DNA结合物而能够用于在单次分析中检测两种或更多种不同同型。例如,可以使用以下二次抗体-DNA结合物中的一种或多种:用于检测IgE的抗IgE二次抗体-DNA结合物、用于检测IgM的抗IgM二次抗体-DNA结合物、用于检测IgG的抗IgG二次抗体-DNA结合物、用于检测IgA的抗IgA二次抗体-DNA结合物和用于检测IgD的抗IgD二次抗体-DNA结合物。

[0235] 方法

[0236] 血浆样品分析

[0237] 从花生过敏症患者获取血浆样品,作为他们纳入一项经过机构审查委员会批准的花生过敏症儿童和成人口服免疫疗法(OIT)临床试验的一部分(POISED; ClinicalTrials.gov标识符:NCT02103270)。花生过敏症被定义为对花生的双盲、安慰剂对照食物激发有反应( $\leq 500\text{mg}$ 花生蛋白引起反应),并且对花生的皮肤点刺测试反应呈阳性( $\geq 5\text{mm}$ )。

[0238] OVA致敏

[0239] 小鼠的致敏是通过给予卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝(alum),随后用OVA鼻内激发来实现。所述方案如文献所述执行(Bernstein等人(2008)《过敏、哮喘和免疫学年鉴(Ann Allergy Asthma Immunol.)》100:S1-148,所述文献以引用的方式并入本文中),其中有少量的修改。简单地说,第0天和第14天,小鼠( $n=5/\text{组}$ )以腹膜内方式用 $20\mu\text{g}$  OVA(V级;密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich, St Louis, Mo))免疫,所述OVA在 $2.25\text{mg alum}$  (AlumImuject; Pierce, 伊利诺伊州罗克福德(Rockford, Ill))中乳化,总体积为 $100\mu\text{L}$ 。对照小鼠( $n=5$ )以类似方式接种,但是没有OVA。然后在第21天用含 $200\mu\text{g}$  OVA于PBS中的 $20\mu\text{L}$ 溶液或单独的PBS通过鼻内激发小鼠。激发后2小时连续测量体温变化。成功的致敏定义为OVA激发后,检测到体温显著下降( $>3^\circ\text{C}$ )。第0、7和14天,通过眼眶后放血收集血清样品。在第21天,通过吸入 $\text{CO}_2$ 处死小鼠,并从心脏收集血清样品。所有血清样品均在 $-80^\circ\text{C}$ 下储存直至使用。全血样品与血清样品一起收集。全血样品在采集后立即在 $10\text{mM EDTA}$ 和 $1\text{X PBS}$ 中以1:1稀释,以防止凝血。全血样品在 $-80^\circ\text{C}$ 下储存直至使用。

[0240] 用花生油致敏

[0241] BALB/c野生型小鼠( $n=10$ )、C57BL/6野生型小鼠( $n=10$ )、BALB/c-Jh基因敲除小鼠( $n=5$ )和BALB/c-RAG基因敲除小鼠( $n=5$ )以表皮方式用花生油( $200\mu\text{L}$ , Golden Peanut Company, 佐治亚州道森(Dawson, Georgia))致敏6周。BALB/c和C57BL/6小鼠然后以腹膜内方式用 $5\text{mg}$ 花生蛋白(如前所述从脱脂花生粉中提取(Byrd Mill, 弗吉尼亚州阿什兰(Ashland, Virginia)))激发。如上所述测量体温以确认致敏。第0天,通过眼眶后放血来收

集血清样品,且第45天,在通过吸入CO<sub>2</sub>杀死小鼠之后,通过心脏放血来收集血清样品。血清样品在-80℃储存直至使用。

[0242] ELISA分析

[0243] 如所述 (Bernstein等人,同上) 进行特异性IgE (sIgE) ELISA。简单地说,将OVA沉积在ELISA板上以捕获和检测来自纯化的IgE样品和来自OVA致敏小鼠的血清样品中的抗OVA IgE。通过在二次抗小鼠IgE和SA-HRP处理后检测吸光度来定量表面结合的IgE的量。为了检测花生特异性IgE,将花生提取物涂布在ELISA板上,并如上所述检测抗花生IgE。

[0244] ImmunoCAP分析

[0245] ImmunoCAP分析由Thermo Fischer的Phadia进行。

[0246] DNA序列设计

[0247] DNA序列和引物由Enable Biosciences提供。优化序列以最小化二级结构和引物二聚体的形成,同时最大化扩增效率。

[0248] ISAP中使用的序列(包括抗体-DNA或抗原-DNA结合物中的DNA分子、桥接寡核苷酸和PCR引物)如下所示:

[0249] 1A:5'-CAGGTAGTAGTACGTCTGTTTCACGATGAGACTGGATGAA-3'

[0250] (SEQ ID NO:1)

[0251] 1B:5'-TCACGGTAGCATAAGGTGCAAGATAATACTCTCGCAGCAC-3'

[0252] (SEQ ID NO:2)

[0253] 反向引物1:GTGCTGCGAGAGTATTATCT (SEQ ID NO:3)

[0254] 正向引物1:CAGGTAGTAGTACGTCTGTT (SEQ ID NO:4)

[0255] 2A:5'-GGCCTCCTCCAATTAAGAATCACGATGAGACTGGATGAA-3'

[0256] (SEQ ID NO:5)

[0257] 2B:5'-TCACGGTAGCATAAGGTGCAGTACCCAAATAACGGTTCAC-3'

[0258] (SEQ ID NO:6)

[0259] 反向引物2:GTGAACCGTTATTTGGGTAC (SEQ ID NO:7)

[0260] 正向引物2:GGCCTCCTCCAATTAAGAA (SEQ ID NO:8)

[0261] 3A:GGATCACTCCAAGTAGACTATCACGATGAGACTGGATGAA

[0262] (SEQ ID NO:9)

[0263] 3B:TCACGGTAGCATAAGGTGCAGTTATATCTGCCACTGTCAC

[0264] (SEQ ID NO:10)

[0265] 反向引物3:GTGACAGTGGCAGATATAAC (SEQ ID NO:11)

[0266] 正向引物3:GGATCACTCCAAGTAGACTA (SEQ ID NO:12)

[0267] 4A:AGAGTCCACTTCCCATAATGTCACGATGAGACTGGATGAA

[0268] (SEQ ID NO:13)

[0269] 4B:TCACGGTAGCATAAGGTGCACGGTACTGTCAGCATAGTTC

[0270] (SEQ ID NO:14)

[0271] 反向引物4:GAACTATGCTGACAGTACCG (SEQ ID NO:15)

[0272] 正向引物4:AGAGTCCACTTCCCATAATG (SEQ ID NO:16)

[0273] 5A:CTACGACTAGGAGATAGATGTCACGATGAGACTGGATGAA

[0274] (SEQ ID NO:17)

[0275] 5B:TCACGGTAGCATAAGGTGCAGTTATGTATAGTACGCTCGC

[0276] (SEQ ID NO:18)

[0277] 反向引物5:GCGAGCGTACTATACATAAC (SEQ ID NO:19)

[0278] 正向引物5:CTACGACTAGGAGATAGATG (SEQ ID NO:20)

[0279] 桥接寡核苷酸:CTACCGTGATTCATCCAG (SEQ ID NO:21)

[0280] 图2说明在利用ISAP的单一分析中如何使用这些序列检测针对Ara-h1、Ara-h2和Ara-h3抗原的IgG4和IgE抗花生抗体。

[0281] 过敏原-DNA和抗体-DNA结合物的合成

[0282] OVA获自生命技术公司 (Life Technologies) (#77120)。Ara-h1 (#LTN-AH1-1)、Ara-h2 (#RP-AH2-1) 和Ara-h3 (#NA-AH3-1) 购自Indoor Technologies。过敏原 (OVA、Ara-h1、Ara-h2和Ara-h3) -DNA结合物是通过再悬浮重组蛋白反应缓冲液 (1mg/mL蛋白质于55mM磷酸钠、150mM氯化钠、20mM EDTA中, pH 7.2) 来合成。将SMCC (丁二酰亚胺基4- (N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-甲酸酯, 皮尔斯生物技术 (Pierce Biotechnologies)) 溶解于无水DMSO中, 并且向50 $\mu$ L蛋白质溶液中添加5 $\mu$ L的4mM溶液并且在室温下培育2小时。将硫酸化DNA (IDT) 再悬浮于反应缓冲液中至100 $\mu$ M, 并向50 $\mu$ L反应缓冲液中添加3 $\mu$ L。向这个溶液中添加4 $\mu$ L 100mM DTT溶液 (生命技术公司) 以还原氧化的硫酸-DNA。然后将溶液在37 $^{\circ}$ C下培育1小时。使7k MWC0 (分子量截止值) 凝胶微离心柱 (生命技术公司) 相对于反应缓冲液平衡。还原的寡核苷酸通过平衡的微离心柱脱盐两次。通过在反应缓冲液中稀释至500 $\mu$ L体积, 从过敏原蛋白溶液中除去未反应的SMCC。然后将硫酸-DNA和过敏原-SMCC溶液混合, 并在4 $^{\circ}$ C下反应过夜, 然后通过30k MWC0过滤柱 (Millipore) 纯化。通过BCA分析 (生命技术公司) 测定结合物的浓度。如前所述通过SDS-PAGE和银染来测定结合效率。提供了代表性的银染色剂 (图4)。根据UV-VIS吸收来估计结合物中的DNA与过敏原比率。过敏原-DNA结合物在4 $^{\circ}$ C下储存供短期使用, 或等分试样在-80 $^{\circ}$ C下储存供长期使用。

[0283] 抗体-DNA结合物是按照类似方案合成, 但有少量修改。简单地说, 抗IgE和抗IgG4多克隆抗体购自西格玛 (Sigma) 和赛默飞世尔 (Thermo Fischer)。代替30K MWC0过滤器, 使用100K MWC0过滤柱从未反应的DNA中纯化结合物。

[0284] 同型特异性凝集PCR (ISAP)

[0285] 为了检测过敏原特异性IgE, 将1fmol过敏原-DNA结合物和抗IgE结合物再悬浮于2 $\mu$ L培育缓冲液C (含有2%BSA、0.2%Triton X-100、8mM EDTA的PBS) 中。向这个溶液中添加1 $\mu$ L分析物, 然后在37 $^{\circ}$ C下培育30分钟。培育后, 添加117 $\mu$ L连接混合物 (20mM Tris、50mM KCl、20mM MgCl<sub>2</sub>、20mM DTT、25 $\mu$ M NAD、0.025U/ $\mu$ L连接酶、100nM桥接寡核苷酸、0.001%BSA, pH=7.5), 且然后在30 $^{\circ}$ C下培育15分钟。在此培育步骤之后, 将25 $\mu$ L溶液添加到具有10nM引物的25 $\mu$ L 2x PCR预混液 (Qiagen) 中, 然后通过PCR (95 $^{\circ}$ C维持10分钟, 60 $^{\circ}$ C维持30秒, 95 $^{\circ}$ C维持15秒, 共13个循环) 进行扩增。然后将PCR反应液在ddH<sub>2</sub>O中按1:20稀释, 并将8.5 $\mu$ L稀释的PCR样品添加到含1.5 $\mu$ L引物 (最终浓度690nM) 的10 $\mu$ L 2x qPCR预混液 (生命技术公司) 中。在Bio-Rad CFX96实时PCR检测系统上通过qPCR进行分析。

[0286] 检测过敏原特异性IgG4的程序相似, 例外之处在于使用抗IgG4-DNA结合物代替抗IgE-DNA结合物。

### [0287] 数据分析

[0288] 所有PCR分析同时用单独缓冲液C空白(含有2%BSA、0.2%Triton X-100、8mM EDTA的PBS)进行,以校正试验间的偏差。每个样品的Ct值由Bio-Rad软件自动选择的单阈值荧光值测定。对于每个样品,荧光值与阈值对应的PCR循环数定义为循环阈值(Ct)。 $\Delta Ct$ 定义为空白的Ct值减去样品的Ct值。 $\Delta Ct$ 值与PCR板孔中的初始扩增子浓度成比例。这种扩增子浓度也与目标抗体的量成比例。

[0289] 为了确定检出限,使用定制软件确定抗体稀释系列的非线性四参数逻辑拟合。基于PCR的分析的检出限定义为单独缓冲液C的空白的平均 $\Delta Ct$ 值加上空白的3个标准差。相对于空白计算检出限的值。对通过ELISA测量的抗体稀释系列进行类似的方法,以获得相应的检出限。

[0290] 为了测试来自经历OVA或花生致敏的小鼠的试样,我们将基于PCR的信号相对于第0天观察到的信号归一化。我们凭经验观察到这种归一化有助于校正小鼠之间的异质性。

[0291] 为了进行统计分析,进行了曼-惠特尼U检验(Mann-Whitney U tests)。我们认为小于0.05的P值具有统计学意义。

### [0292] 实例2

#### [0293] 通过PCR对过敏反应进行超灵敏多重检测

[0294] 在此,我们展现了利用整合的基于PCR的方案进行高灵敏度和多重组分解析过敏症诊断。首先,我们报告同型特异性凝集PCR(ISAP)的发展,这是一种新的基于PCR的检测过敏原特异性IgE的方法。然后我们将ISAP与凝集PCR抗体检测(ADAP)(Tsai等人(2016)《ACS中心科学(ACS Cent Sci)》2:139-147)和邻近连接分析(PLA)(Fredriksson等人(2007)《自然方法(Nat Methods)》4:327-329)组合在单一平台中。这种多重分析同时检测四个免疫学特征:总IgE、特异性IgE、特异性IgG4和总抗过敏原免疫球蛋白(IgG、IgM、IgE等),这是通过将其蛋白质水平编码成独特的DNA序列,然后使用qPCR检测这些DNA序列来进行的。

[0295] 在花生过敏症小鼠模型中,我们证明了我们基于PCR的方法比ELISA明显更灵敏,并以ELISA无法检测到的水平检测与疾病相关的过敏症标记。我们还证明了我们基于PCR的方法具有成本效益(每个样品每个特征0.5美元),仅消耗1 $\mu$ L血浆,同时与ImmunoCAP在分析花生过敏患者组时具有很好的相关性。

#### [0296] 结果

[0297] 使用基于PCR的分析来检测过敏性免疫球蛋白反应。

[0298] 我们整合了三种抗体检测方法以产生全面的过敏症分析。

[0299] 首先,我们创建了邻近连接分析(PLA),以检测总IgE含量(Fredriksson等人,同上)。PLA采用一对抗体-DNA结合物检测目标抗原。在这种情况下,我们使用了一对多克隆抗IgE抗体-DNA结合物来检测IgE。抗体-DNA结合物结合到同一IgE分子上的多个位点,使单链DNA(ssDNA)在结合物上的定位极为接近。添加短的桥接寡核苷酸和DNA连接酶将两条附近的链连接成全长扩增子。qPCR分析确定了重组扩增子的数量,这反映了样品中IgE分子的丰度。

[0300] 其次,我们使用先前开发的分析(凝集PCR抗体检测;ADAP)来检测总抗过敏原抗体的含量。13种过敏原结合抗体将合成的过敏原-DNA结合物凝聚成大型免疫复合物,使所连接的DNA链紧密相邻定位,从而能够通过qPCR进行连接和定量。

[0301] 抗过敏原抗体的检测有助于建立过敏反应的完整视图,而其它单独测试可能会提供误导性或不完整的图象。例如,一些患者的sIgE和sIgG4可能呈阴性,但由于存在其它抗体同型,因此总抗过敏抗体含量仍然很高。这些子组可能显示出与所有同型均呈阴性的临床行为不同的临床行为。因此,包含全部抗过敏原抗体有助于对过敏反应进行分类,特别是对于正在经历免疫治疗的患者。

[0302] 第三,我们报告了一种新的基于PCR的检测方法的开发,所述方法称为同型特异性凝集PCR (ISAP),用于检测过敏原特异性IgE和IgG4。ISAP使用抗体结合剂-DNA结合物和过敏原-DNA结合物来检测针对特定过敏原的抗体同型。如果抗过敏原抗体不是IgE同型,则抗IgE-DNA结合物不存在于免疫复合物中,从而排除了连接和信号产生的可能性。同样,如果抗体是IgE,但不与过敏原结合,则过敏原-DNA结合物将从免疫复合物中排除,并且不产生信号。只有当抗体是IgE并且结合到目标过敏原时,这两种DNA结合物才会同一分子上结合在一起,以有效地连接成全长扩增子。我们还将这项技术扩展为通过使用抗IgG4-DNA和过敏原-DNA结合物来检测sIgG4。

[0303] 然后能够在整合的基于PCR的分析中使用适当的引物来询问每个过敏特征。例如,1F1R报告总IgE,2F2R显示总抗过敏原抗体水平,而2F1R则定量sIgE水平。这种条形码方法不仅可以深入研究针对一种过敏原的免疫球蛋白反应,而且容许同时监测多种过敏原组分。

[0304] 过敏原-DNA和抗体-DNA结合物的合成。

[0305] 我们的基于PCR的分析中的核心试剂是高品质的过敏原-DNA和抗体-DNA结合物(Tsai等人,同上)。

[0306] 对于过敏原-DNA结合物,我们使用重组表达或纯化的过敏原分子。过敏原与ssDNA利用称为磺基-SMCC的小分子交联剂交联,所述交联剂将硫醇官能化的ssDNA连接到过敏原表面上的赖氨酸残基。这些结合物通常每个过敏原分子带有2.5个ssDNA链,如凝胶分析和UV-VIS光谱法测定。这种ssDNA负载量足以产生强的分析信号,同时不阻断过敏原上的抗原表位(Tsai等人,同上)。

[0307] 使用相同策略合成抗体-DNA。具体而言,在这项研究中,我们使用纯化的多克隆抗IgE和抗IgG4抗体。还通过凝胶和UV-VIS分析验证了所得的结合物。

[0308] 基于PCR的过敏反应检测流程。

[0309] 使用我们基于PCR的整合方法检测过敏症相关抗体是由三个步骤组成。(1) 首先,将1 $\mu$ L样品与2 $\mu$ L DNA结合物探针混合,并且在37 $^{\circ}$ C下培育30分钟。在此培育步骤期间,探针结合到样品中的分析物,使探针上的ssDNA紧密接近。(2) 接着添加含有DNA连接酶和短桥接DNA的连接预混液。如果探针被目标分析物适当地聚簇,则桥接DNA与附近的两个ssDNA杂交,并通过DNA连接酶触发连接。值得注意的是,由于探针上的每个ssDNA仅具有一个引物结合位点,因此探针本身无法通过PCR进行扩增。因此,仅连接的DNA将具有两个能够进行PCR扩增的引物位点。(3) 连接的DNA通过PCR进行预扩增,然后通过实时qPCR进行分析。已经显示,预扩增步骤通过在qPCR步骤之前增加DNA的拷贝数来增强分析可重复性(Tsai等人,同上)。

[0310] 此外,仅阴性缓冲液对照始终与之并行试验。 $\Delta$ Ct值表示含分析物的样品和单独缓冲液样品的Ct值之间的差值。因此,单独缓冲液样品作为参考点用于校正分析之间的差

异 (Tsai等人,同上)。 $\Delta Ct$ 值与样品中的目标分析物的量成比例。

[0311] 总而言之,我们的分析流程仅需要连续添加关键试剂。使用容易获得的实时qPCR热循环仪进行分析。我们预计这些简单的要求将有助于促进所述技术在研究和临床实验室中的采用。

[0312] 通过ISAP验证过敏原特异性IgE检测

[0313] 为了验证同型特异性凝集PCR (ISAP) 是否真实地检测特定同型抗体,我们获得了针对卵清蛋白 (OVA) 蛋白质的高度纯化IgE和IgG抗体。我们在缓冲液中制备了两种抗体的系列稀释液,并使用抗IgE-1B和OVA-2A作为探针对其进行了ISAP分析。

[0314] 如预期的那样,我们观察到了连续稀释的IgE抗OVA的浓度依赖性信号,而IgG抗OVA却无信号。IgE抗OVA的检出限是12埃摩尔。因此,ISAP实际上以同型特异性方式灵敏且特异性地检测抗体-抗原结合。

[0315] 为了进一步挑战ISAP的特异性,我们制备了一系列对OVA缺乏亲和力的非特异性IgE稀释液。如预期的那样,从ISAP分析中未观察到信号。这表明,ISAP实际上仅对针对特定过敏原的IgE抗体有反应,而对随机和非特异性IgE分子无反应。

[0316] 重要的是,我们通过测试相同的IgE抗OVA抗体稀释系列,比较了ISAP对ELISA的分析灵敏性。改进的灵敏度可以减少样品消耗,并增加观察到甚至较低水平的疾病相关IgE抗体的可能性。研究人员特别关注使用小鼠模型研究过敏反应的这些关节特征,因为尾巴/眼部放血产生的血清/血浆的量非常少。ISAP分析通过每次测试仅消耗1 $\mu$ L样品而允许进行更频繁的样品收集或进行更多类型的分析。

[0317] 通过整合的PCR分析对过敏反应进行多重检测

[0318] PLA、ADAP和ISAP的整合将允许在单一分析中同时监测总IgE、总抗过敏原抗体、过敏原特异性IgE和IgG4。作为概念验证实验,我们再次制备了IgE抗OVA、IgG抗OVA和非特异性IgE抗体的稀释系列。

[0319] 与单一分析相反,多重探针组包括抗IgE-1A、抗IgE-1B、OVA-2A和OVA-2B。任何IgE分子的存在都会触发1A-1B DNA的产生,任何抗OVA抗体都会产生2A-2B DNA,只有IgE抗OVA会形成1A-2B或2A-1B DNA。因此,通过适当选择引物对,我们可以在单个测定中同时量化所有三个。

[0320] 如预期的那样,当分析IgE抗OVA或非特异性IgE时,1A-1B仅显示浓度依赖性信号。2A-2B仅在分析IgE抗OVA或IgG抗OVA时显示浓度依赖性信号。2A-1B仅在测试IgE抗OVA时显示信号。

[0321] 尽管可能有人曾预期2A-1B和1A-2B都对IgE抗OVA具有特异性,但我们观察到1A-2B的特异性不如2A-1B。换句话说,当分析高浓度的IgG抗OVA时,1A-2B显示出串扰。因此,优选使用2A-1B来分析过敏原特异性IgE抗体。这些实验证明,通过适当选择引物对可以实现多种过敏信息的多重检测。

[0322] 通过基于PCR的分析、使用1 $\mu$ L样品检测卵白蛋白致敏小鼠的过敏反应

[0323] 我们接下来试图使用OVA致敏的小鼠过敏症模型对基于PCR的分析性能进行基准测试 (Nakae等人 (2007)《过敏症临床免疫学杂志 (J. Allergy Clin. Immunol.)》119:680-686)。OVA致敏的小鼠组在第0天和第14天用两次OVA剂量致敏。每7天通过尾巴放血收集样品。给对照组小鼠注射PBS媒剂,并且如前收集样品。重要的是,为了进一步研究样品类型与

基于PCR的方法的兼容性,我们收集所有时间点得自每只小鼠的全血和血清样品。

[0324] 为了进行基于多重PCR的分析,我们使用抗IgE-1A、抗IgE-1B、OVA-2A、OVA-2B作为探针。此组让我们检测到针对OVA的tIgE、sIgE和针对OVA的总免疫球蛋白。简而言之,我们将1 $\mu$ L样品与探针一起培育,添加连接混合物,通过PCR进行预扩增,然后通过qPCR进行分析。

[0325] 对于血清样品,我们观察到总IgE信号从第7天开始明显升高。我们还在第14天观察到抗OVA sIgE。在第7天观察到针对OVA的总免疫球蛋白。为了进一步验证通过基于PCR的方法观察到的过敏反应,我们使用ELISA分析了同组样品中针对OVA的sIgE。如预期的那样,在第14天通过ELISA观察到sIgE,这与基于PCR的方法一致。重要的是,基于ELISA的分析消耗了20 $\mu$ L血清,而基于PCR的方法每次仅使用了1 $\mu$ L血清。

[0326] 我们还研究了基于PCR的方法与全血样品的兼容性。与血清相比,全血可能是有利的,因为它不需要费力且费时的分离过程 (Ramakrishnan等人 (2008)《糖尿病科学技术杂志 (J.Diabetes Sci.Technol.)》2:242-243)。此外,全血样品可以在室温下作为干血斑在实验室之间转移,这大大降低了运输成本 (Ramakrishnan等人,同上)。

[0327] 对于全血样品,观察到与血清样品相似的过敏状况。总IgE在第7天显示升高,针对OVA的特异性IgE在第14天显示升高,并且在第7天观察到针对OVA的总免疫球蛋白。重要的是,使用血清和全血样品测得的信号显示出高度的相关性 ( $R=0.9$ )。

[0328] 这些实验证明基于PCR的分析与血清和全血样品均兼容。基于PCR的方法可以真是地揭示过敏信息,同时消耗的样品量比ELISA小得多。

[0329] 在小鼠模型中基于PCR检测多种花生组分IgE的灵敏性大于ELISA

[0330] 接下来,我们试图证明我们基于PCR的方法能够在单一分析中揭示多种花生组分 (Ara h1、h2和h3)的过敏信息。B6和BALB小鼠均在表皮上用花生油致敏连续六周。第0天和第45天收集血清样品。静脉内大剂量给予花生提取物之后发生的过敏反应证实了花生过敏症的成功诱导。

[0331] 在基于PCR的这个高多重性分析中,我们使用了抗IgE-1A、抗IgE-1B、Ara-h1-2A、Ara-h1-2B、Ara-h2-3A、Ara-h2-3B、Ara-h3-4A和Ara-h3-4B作为探针。我们分析了1 $\mu$ L小鼠血清样品,并观察到致敏后针对Ara-h1的总IgE和sIgE的信号明显升高。观察到Ara-h2的信号升高,但未达到统计学意义。这个结果概括了先前的结果,即整个花生皮肤致敏导致小鼠模型中强烈产生Ara-h1特异性IgE (Smit等人 (2015)《临床和转化性过敏症 (Clin.Transl.Allergy)》5:13)。重要的是,当通过ELISA分析同组小鼠血清中的花生特异性IgE时,致敏后未观察到反应。这个结果突出了我们基于PCR的分析在检测极低水平的IgE分析物方面强于标准ELISA的能力。

[0332] 有趣的是,当对BALB和B6小鼠都进行皮肤致敏时,与B6小鼠相比,在BALB小鼠中观察到了在性质上更强的反应。这个结果也与当前的理解一致,即BALB小鼠产生更强的Th2应答,因此对IgE诱导更敏感 (Sahu等人 (2010)《公共科学图书馆·综合 (PLoS One)》(5:e11348)。

[0333] 为了进一步验证基于PCR的分析所观察到的结果归因于花生致敏诱导特异性IgE,我们采用相同的方案对Jh和Rag基因敲除小鼠进行了表皮致敏。这两种小鼠品系不能产生免疫球蛋白,因此不应产生针对花生组分的sIgE (Lansford等人 (1998)《国际免疫学

(Int. Immunol.)》10:325-332;Chen等人(1993)《国际免疫学》5:647-656)。如所预期的那样,当我们分析Jh和RAG小鼠的血清样品时,致敏后未观察到统计学上的显著差异。

[0334] 在这里,我们证明了我们基于PCR的方法能够在单一分析中分析多种花生组分的过敏信息。基于PCR的方法提高了灵敏度,观察到传统ELISA无法检测到的相关信号。另外,观察到的信号实际上具有特异性,因为在免疫受损的小鼠品系中未观察到信号。

[0335] 利用1 $\mu$ L患者血浆对花生过敏反应的多重分析和其与ImmunoCAP的相关性。

[0336] 最后,我们试图证明基于PCR的分析能够使用临床患者样品真实地捕获针对花生过敏症的免疫反应,并将结果与ImmunoCAP相关。

[0337] 我们从POISED临床试验中获得了20个基线患者样品(Mukai等人(2016)《过敏症与临床免疫学杂志(J. Allergy Clin. Immunol.)》S0091-6749:30613-3),其是为了研究花生口服免疫疗法减轻过敏反应的功效而设计。在这里,我们使用了一组前述多重抗IgE-DNA、Ara h1-DNA、Ara-h2-DNA和Ara-h3-DNA探针对。此外,我们包括抗IgG4-DNA结合物以检测针对花生组分的sIgG4。

[0338] 令人满意的是,我们基于PCR的方法仅从1 $\mu$ L患者血浆中成功跟踪了10种过敏症参数。重要的是,Ara h1、h2和h3的特定IgE信号与ImmunoCAP的相关性非常好(Ara h1的R=0.82,Ara h2的R=0.92且Ara h3的R=0.84)。

[0339] 这些结果表明,基于PCR的方法至少与黄金标准ImmunoCAP平台一样有效,但具有关键优势,包括成本效益和减少的样品消耗。例如,使用ImmunoCAP收集的相同信息将需要400 $\mu$ L患者血浆。我们基于PCR的整合方法仅需1 $\mu$ L并且在单一分析中检测所有这些参数。此外,每个ImmunoCAP分析所需的大量抗原将这种形式的成本提高到约500美元,而我们基于PCR的方法的材料成本约为5美元。正在进行进一步的研究,以检查基于PCR的方法对其它过敏原和患者样品的精确临床灵敏性和特异性。

[0340] 讨论

[0341] 我们报告了ISAP,这是一种新开发的基于PCR的方法,可以检测特定同型的抗原结合抗体。我们进一步将ISAP与其它基于PCR的方法耦合成单一分析。这种基于PCR的整合方法是在一项多重分析中检测总IgE、特异性IgE、特异性IgG4和总抗过敏原抗体。

[0342] 我们基于PCR的过敏症检测方法具有若干个优点。首先,它利用了组分解析式过敏症诊断学的高特异性,这是通过使用个别的过敏原蛋白-DNA结合物作为探针。其次,通过DNA条形码能够实现高多重分析,从而允许同时检测针对多种过敏原组分的反应。第三,由于PCR的指数级扩增,因此其展现大大改进的分析灵敏性。第四,我们基于PCR的方法仅消耗微量样品(1 $\mu$ L),这有助于测试儿科患者。第五,与黄金标准过敏原分析相比,基于PCR的分析的材料成本非常低(0.5美元/每个样品/每个特征)。最后,基于PCR的方法的操作流程操作简单并且不需要专门的设备。

[0343] ImmunoCAP分析被认为是测量sIgE的黄金标准。在这里,我们证明了我们基于PCR的抗体测试与ImmunoCAP在分析临床患者样品方面具有很好的相关性。重要的是,我们基于PCR的方法每次测试的成本不到5美元。类似的ImmunoCAP分析成本超过500美元。此外,基于PCR的方法仅使用1 $\mu$ L血浆,相比之下,ImmunoCAP却需要400 $\mu$ L。成本的显著降低可以促进组分解析式过敏症诊断学的广泛使用。

[0344] ISAC技术是ImmunoCAP平台的姊妹技术(Chapman等人(2015)《当前过敏症与哮喘

报告 (Curr. Allergy Asthma Rep.) 》15:36)。与传统ImmunoCAP分析中使用的基于聚合物的分析相反,ISAC使用过敏原打印的阵列来捕获和检测大量过敏原组分的sIgE。但是,由于用于捕获IgE的抗原较少,因此ISAC的灵敏性低于ImmunoCAP。此外,ISAC固定为一次检测所有112种过敏原。据报道,这种固定的多重格式能产生令人困惑/误导的信息 (Incorvaia等人 (2015)《过敏症与临床免疫学杂志-实务 (J. Allergy Clin. Immunol. Pract.) 》3:879-882)。由于DNA-条形码的性质,我们基于PCR的整合方法具有灵活的多重力量,理想情况下能够根据需要检测1-96种过敏原组分。

[0345] 但是,基于PCR的方法并非没有局限性。血清样品能含有大量的抗过敏原 (sIgG) IgG抗体,并与sIgE竞争结合探针。我们通过实验验证了我们基于PCR的方法能容纳高达1000-10000倍过量的sIgG。这种对sIgG干扰的适应力与临床使用的ISAC格式相比具有优势 (Lupinek等人 (2014)《方法 (Methods) 》66:106-119)。

[0346] 此外,从花生过敏症患者中分析的许多样品中都含有可检测水平的sIgG4。幸运的是,我们基于PCR的方法仍准确检测出这些样品中针对花生组分的sIgE。sIgE水平也与ImmunoCAP非常相关。这些数据表明,即使在sIgG存在下,我们基于PCR的方法也真实地检测sIgE。

[0347] 在最坏的情况下,我们基于PCR的方法内在地检测总抗过敏原抗体,其中如果总抗过敏原或IgG4显示出很强的信号,则能够鉴定出IgE测试呈假阴性。

[0348] 总之,基于PCR的过敏症分析具有增强的灵敏度、特异性、低样品消耗和分析成本以及对标准qPCR仪器的依赖。由于将这些患者与临床试验和其它新兴疗法联系起来以改善疾病管理所需的样品量减少,因此我们的分析对儿科患者将特别有益。因此,我们设想ISAP和其联合的基于PCR的方法将为实验室和诊所中进行更好的过敏症测试奠定基础。

[0349] 尽管已经详细描述了本发明的优选实施例,但是应当理解,在不脱离本文所定义的本发明的精神和范围的情况下,能够进行明显的变更。

## 序列表

- <110> 小利兰·斯坦福大学托管委员会  
<120> 多重同型特异性抗体检测  
<130> S16-414  
<150> 62/479,278  
<151> 2017-03-30  
<160> 21  
<170> PatentIn 3.5版  
<210> 1  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> DNA 1A  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (40)  
<223> 序列是合成的  
<400> 1  
caggtagtag tacgtctggt tcacgatgag actggatgaa 40  
<210> 2  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> DNA 1B  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (40)  
<223> 序列是合成的  
<400> 2  
tcacggtagc ataaggtgca agataataact ctgcagcac 40  
<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 反向引物1

<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (20)  
<223> 序列是合成的  
<400> 3  
gtgctgcgag agtattatct 20  
<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 正向引物1  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (20)  
<223> 序列是合成的  
<400> 4  
caggtagtag tacgtctggt 20  
<210> 5  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> DNA 2A  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (40)  
<223> 序列是合成的  
<400> 5  
ggcctcctcc aattaaagaa tcacgatgag actggatgaa 40  
<210> 6  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> DNA 2B  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (40)

<223> 序列是合成的

<400> 6

tcacggtagc ataaggtgca gtaccctaat aacggttcac 40

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物2

<220>

<221> 来源

<222> (1) .. (20)

<223> 序列是合成的

<400> 7

gtgaaccgtt atttgggtac 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物2

<220>

<221> 来源

<222> (1) .. (20)

<223> 序列是合成的

<400> 8

ggcctcctcc aattaaagaa 20

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DNA 3A

<220>

<221> 来源

<222> (1) .. (40)

<223> 序列是合成的

<400> 9

ggatcactcc aactagacta tcacgatgag actggatgaa 40

<210> 10  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> DNA 3B  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (40)  
<223> 序列是合成的  
<400> 10  
tcacggtagc ataaggtgca gttatatctg ccaactgtcac 40  
<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 反向引物3  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (20)  
<223> 序列是合成的  
<400> 11  
gtgacagtgg cagatataac 20  
<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 正向引物3  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (20)  
<223> 序列是合成的  
<400> 12  
ggatcactcc aactagacta 20  
<210> 13  
<211> 40  
<212> DNA

<213> 人工序列  
<220>  
<223> DNA 4A  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (40)  
<223> 序列是合成的  
<400> 13  
agagtccact tcccataatg tcacgatgag actggatgaa 40  
<210> 14  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> DNA 4B  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (40)  
<223> 序列是合成的  
<400> 14  
tcacggtagc ataaggtgca cggtagctgc agcatagttc 40  
<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 反向引物4  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (20)  
<223> 序列是合成的  
<400> 15  
gaactatgct gacagtaccg 20  
<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 正向引物4

<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (20)  
<223> 序列是合成的  
<400> 16  
agagtccact tcccataatg 20  
<210> 17  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> DNA 5A  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (40)  
<223> 序列是合成的  
<400> 17  
ctacgactag gagatagatg tcacgatgag actggatgaa 40  
<210> 18  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> DNA 5B  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (40)  
<223> 序列是合成的  
<400> 18  
tcacggtagc ataaggtgca gttatgtata gtacgctcgc 40  
<210> 19  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 反向引物5  
<220>  
<221> 来源  
<222> (1) .. (20)

<223> 序列是合成的

<400> 19

gcgagcgtac tatacataac 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物5

<220>

<221> 来源

<222> (1) .. (20)

<223> 序列是合成的

<400> 20

ctacgactag gagatagatg 20

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 桥接寡核苷酸

<220>

<221> 来源

<222> (1) .. (18)

<223> 序列是合成的

<400> 21

ctaccgtgat tcatccag 18

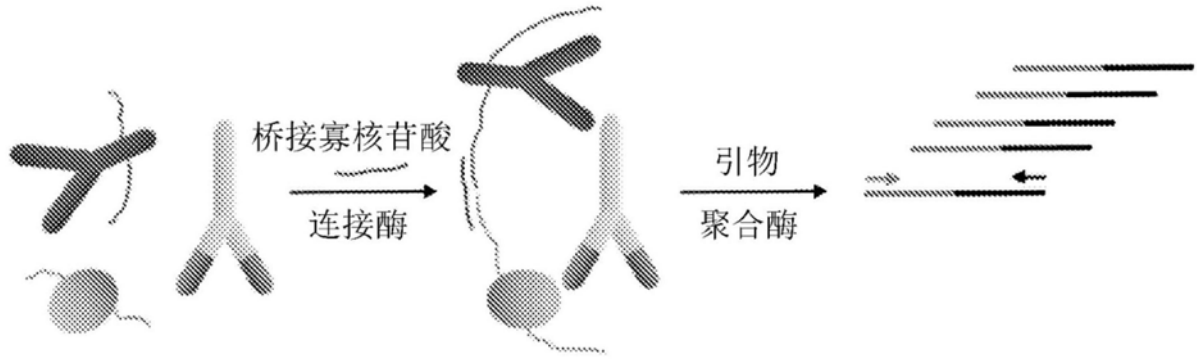


图1

序列	含义
1A1B	总IgE
2A1B	特异性IgE-h1
3A1B	特异性IgE-h2
4A1B	特异性IgE-h3
2A5B	特异性IgG4-h1
3A5B	特异性IgG4-h2
4A5B	特异性IgG4-h3
2A2B	总抗h1
3A3B	总抗h2
4A4B	总抗h3

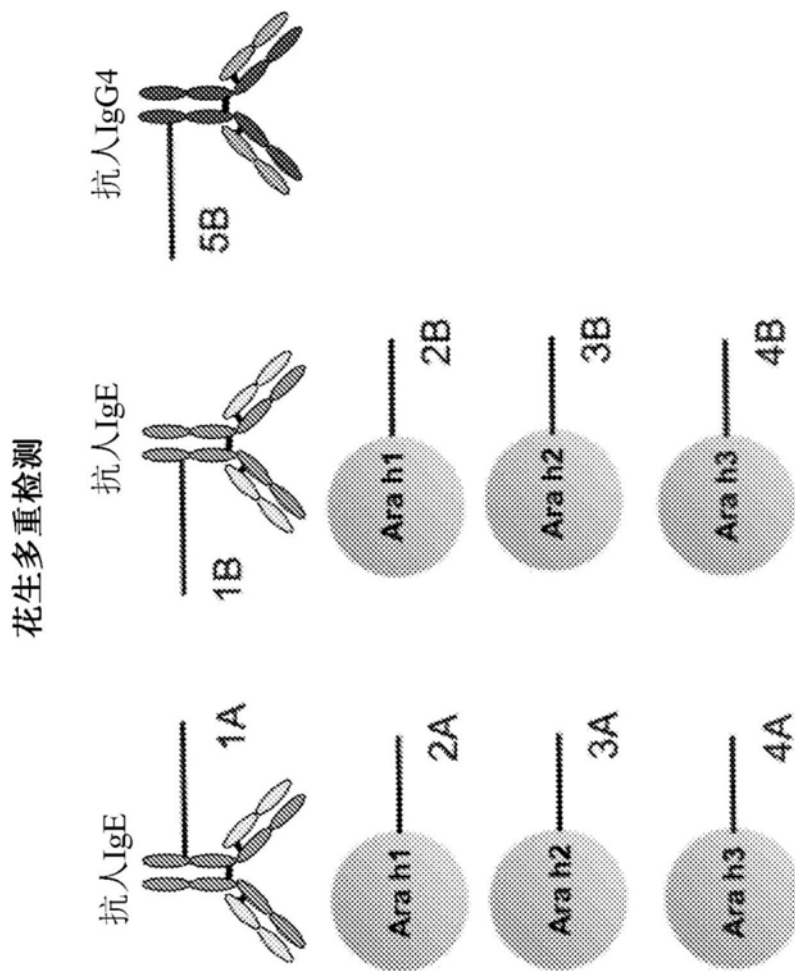


图2

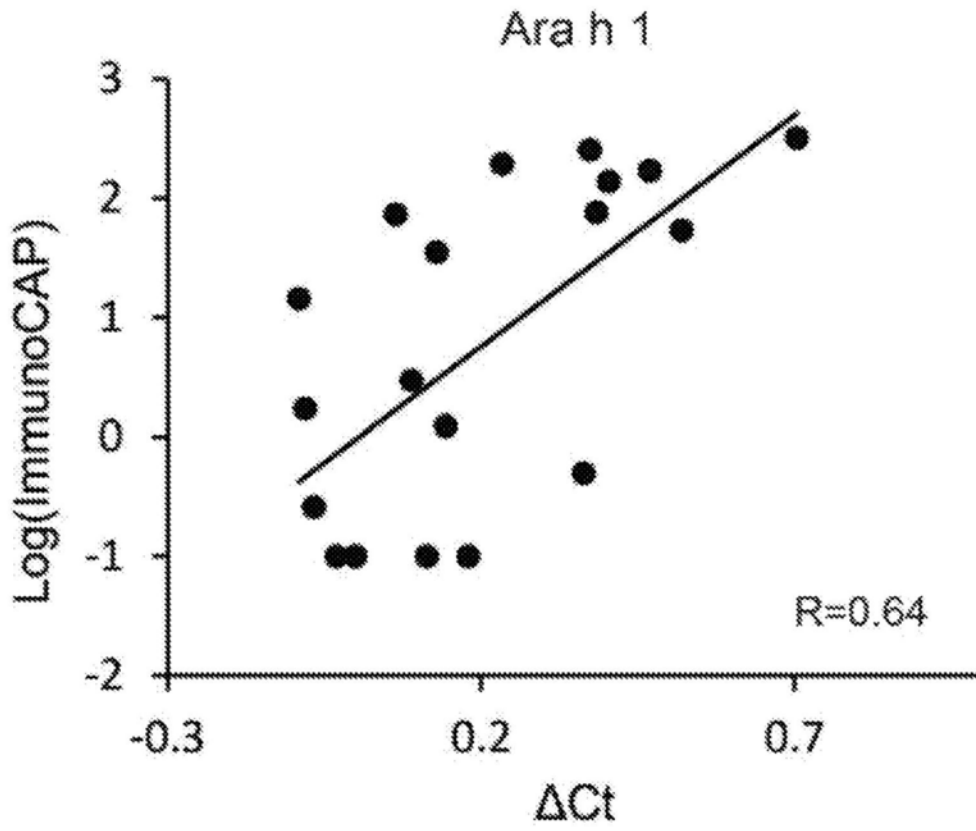


图3A

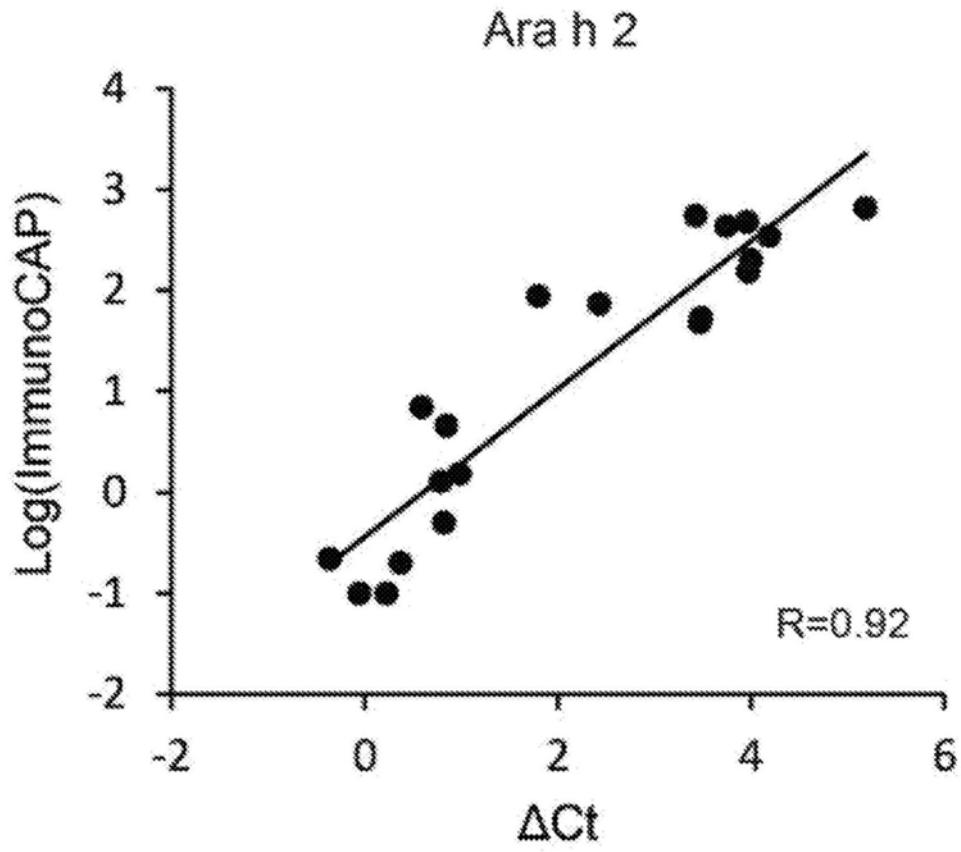


图3B

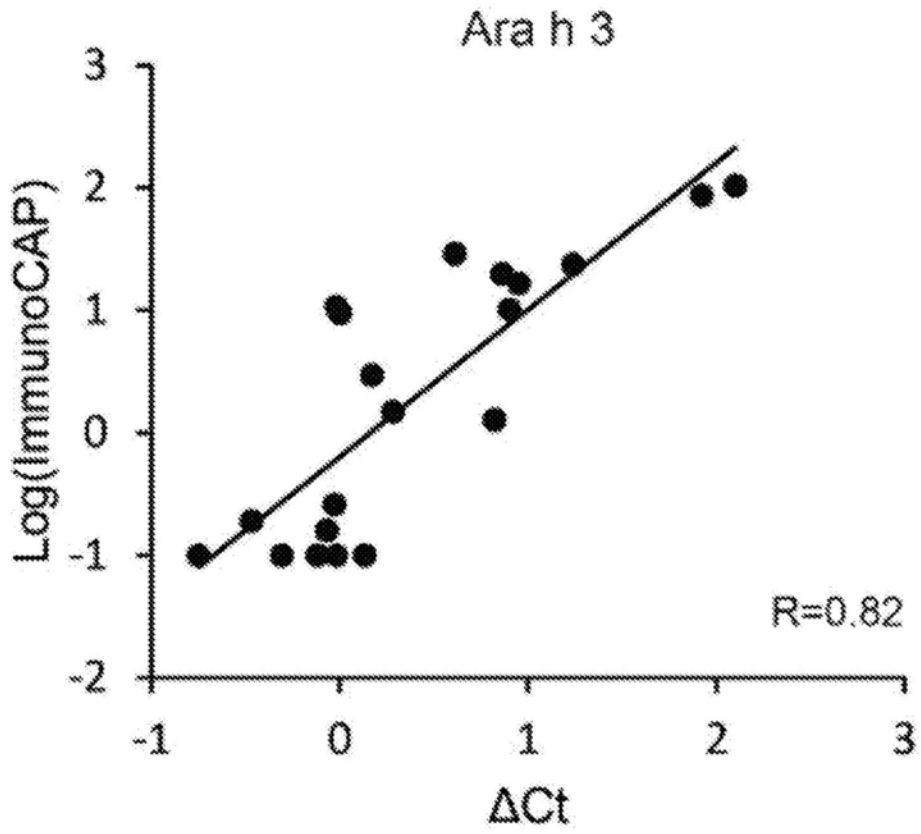


图3C

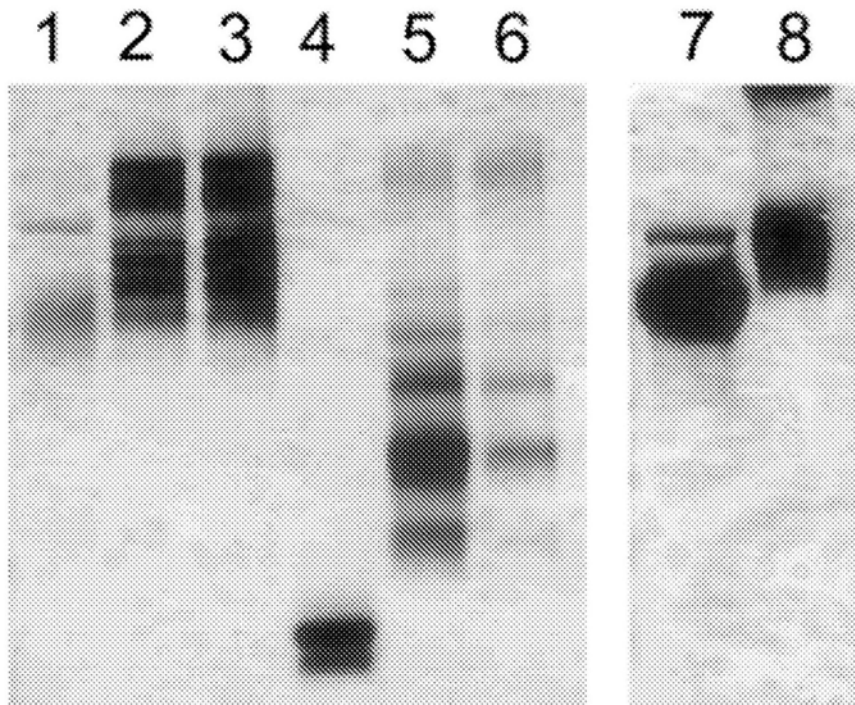


图4

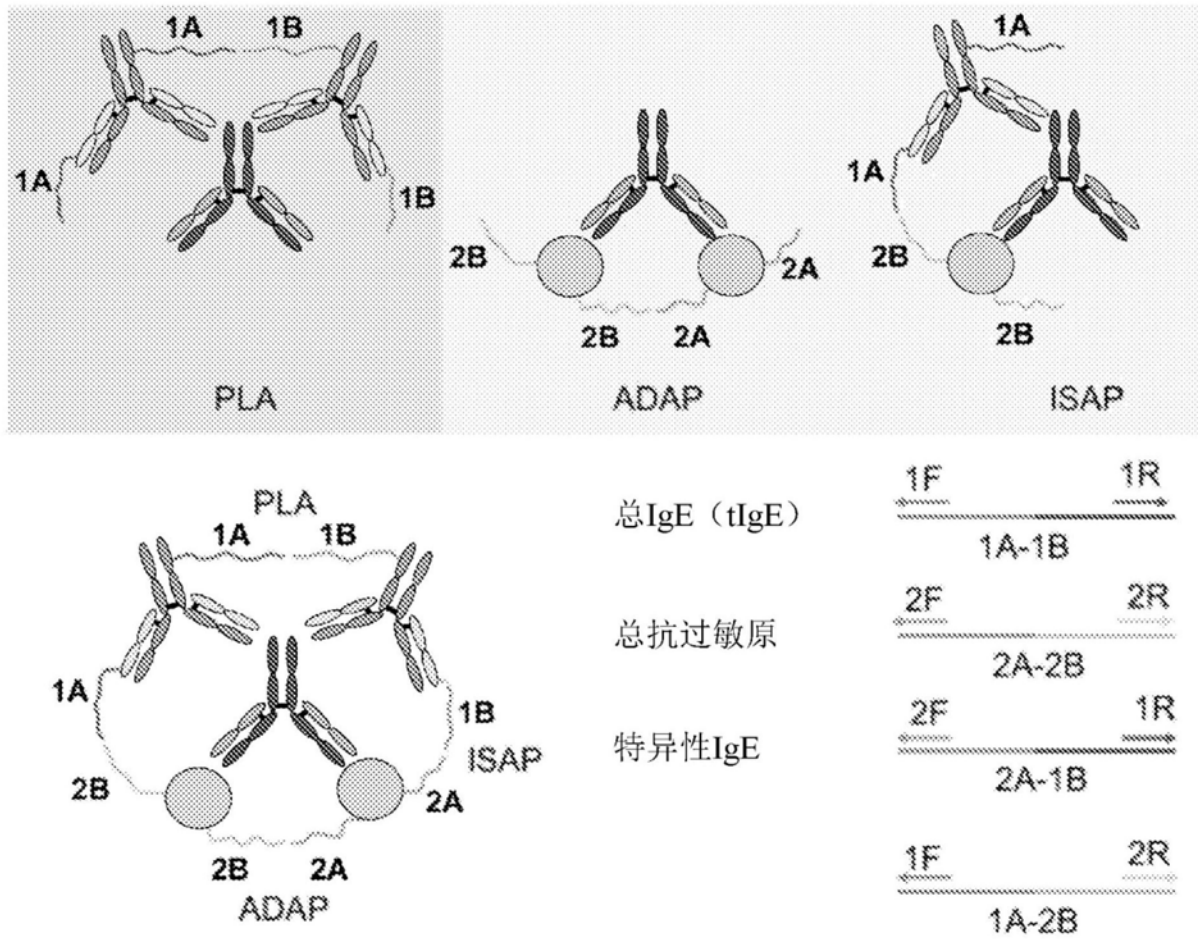


图5

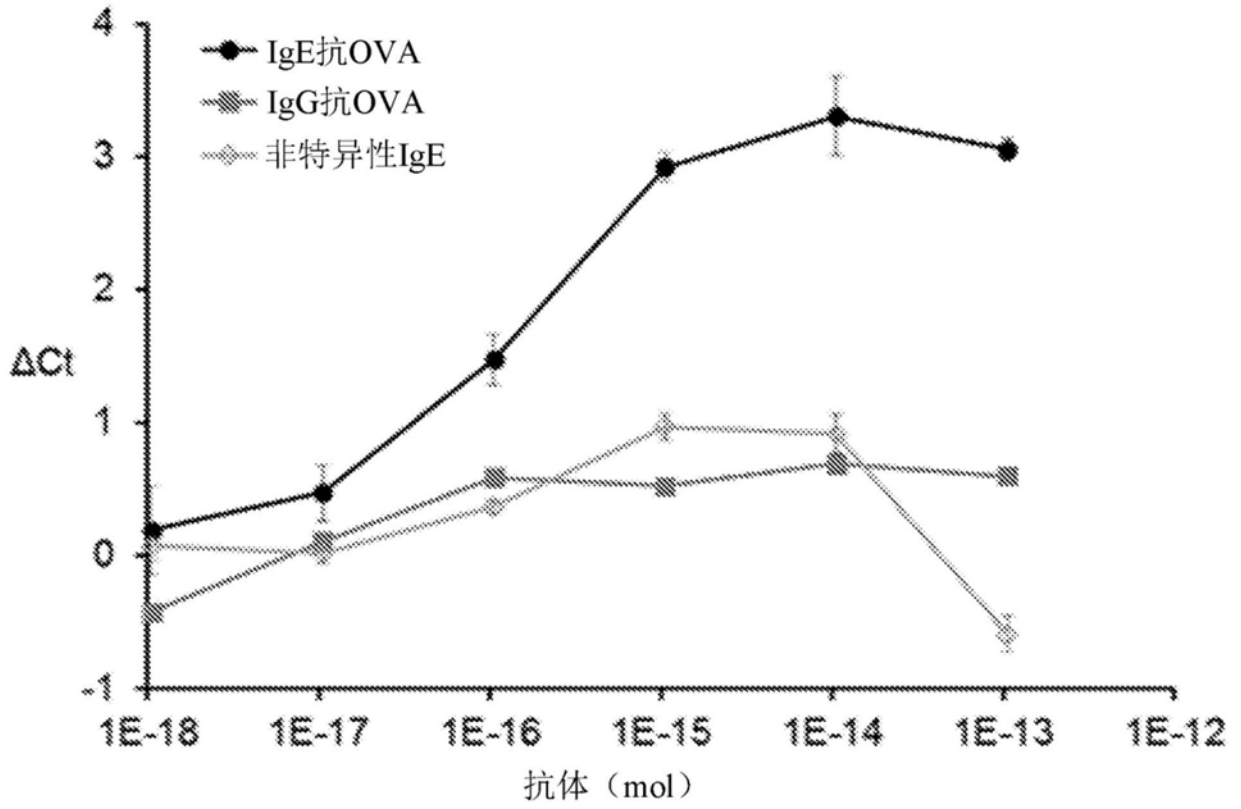


图6A

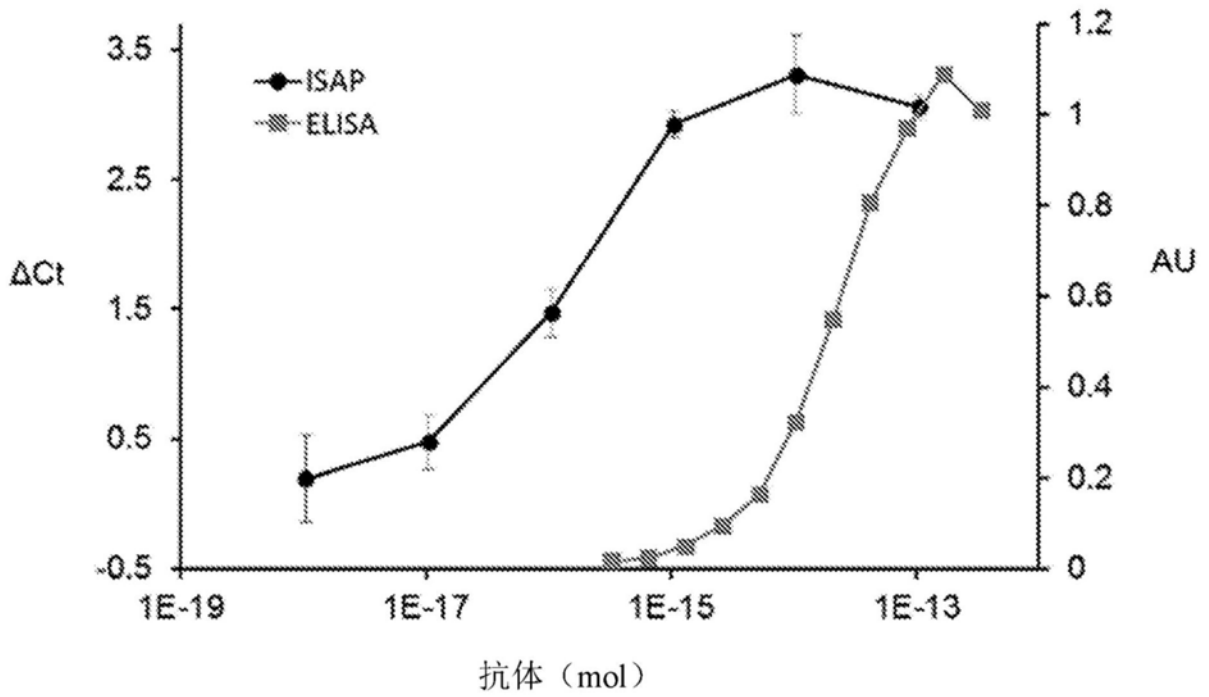


图6B

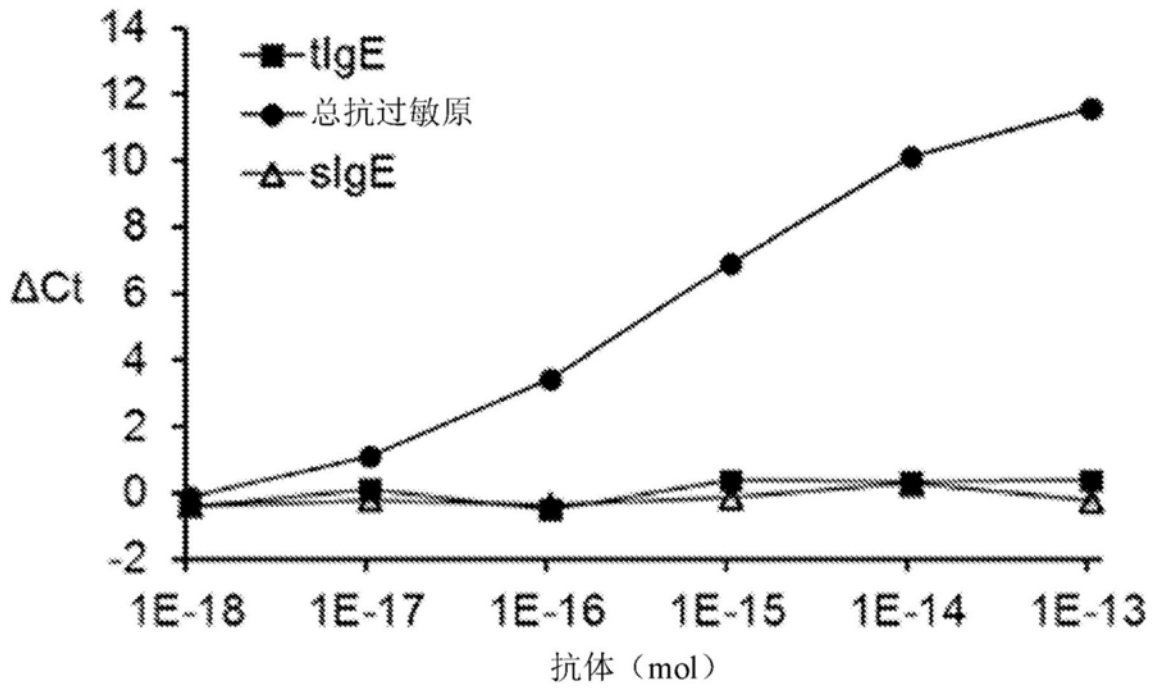


图7A

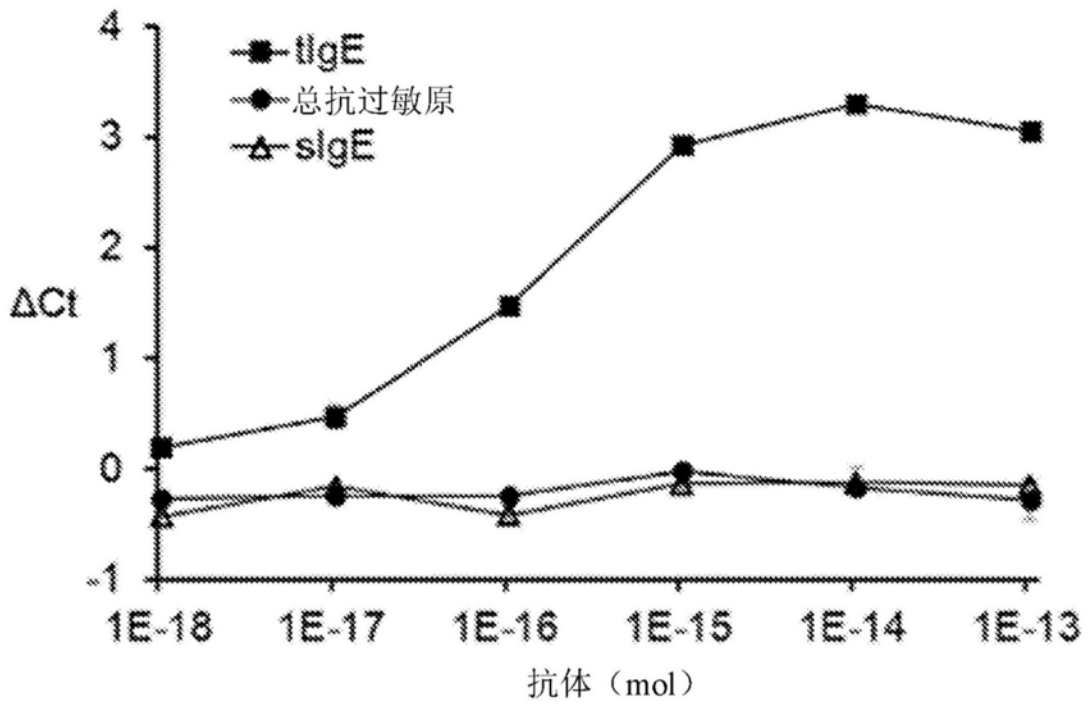


图7B

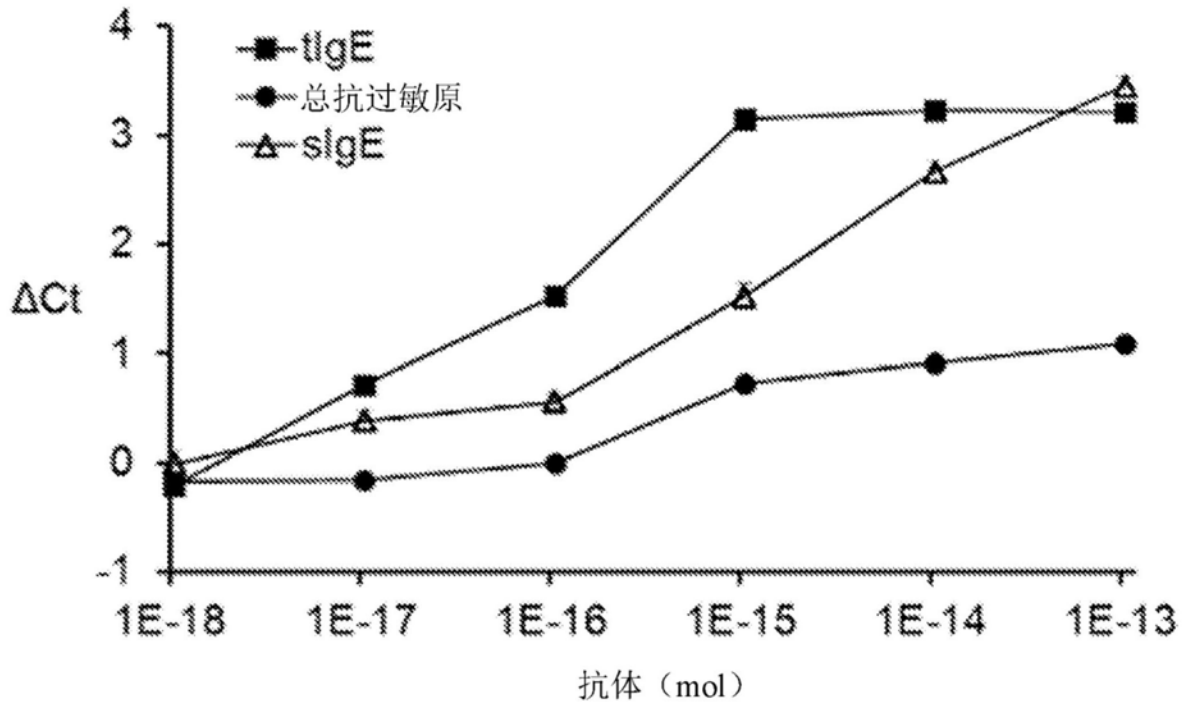


图7C

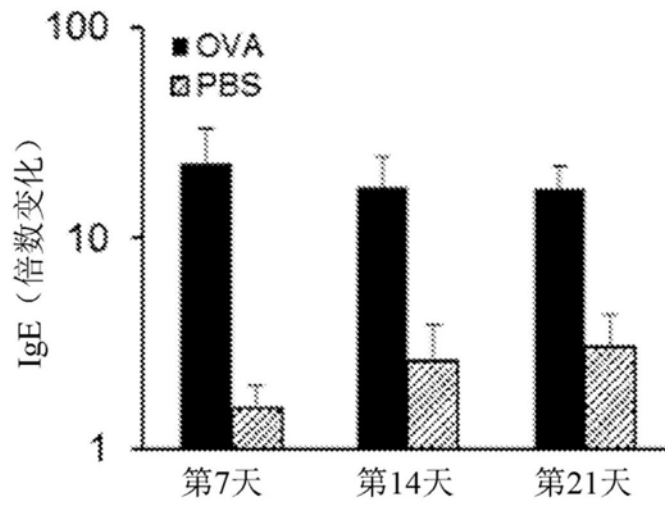


图8A

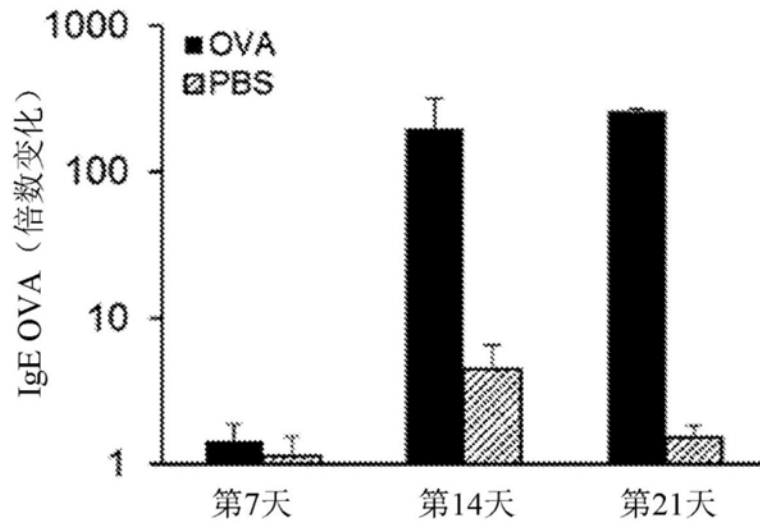


图8B

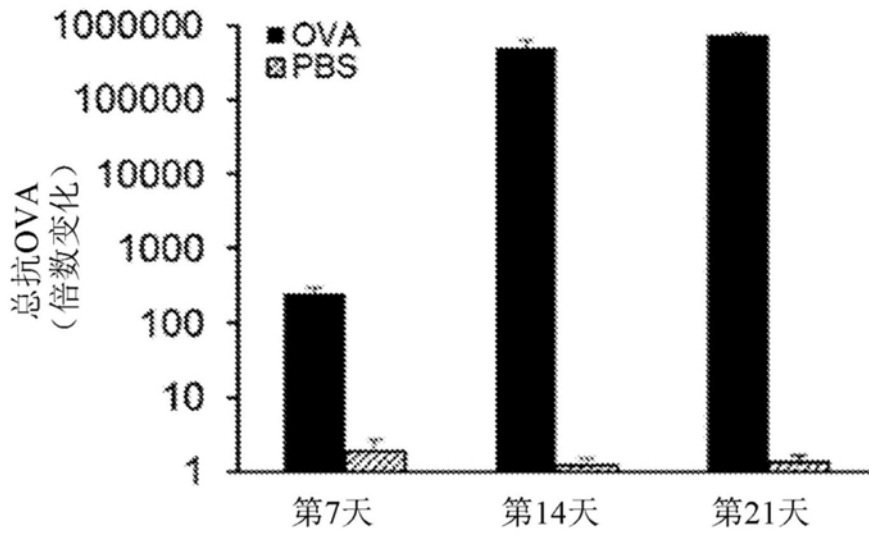


图8C

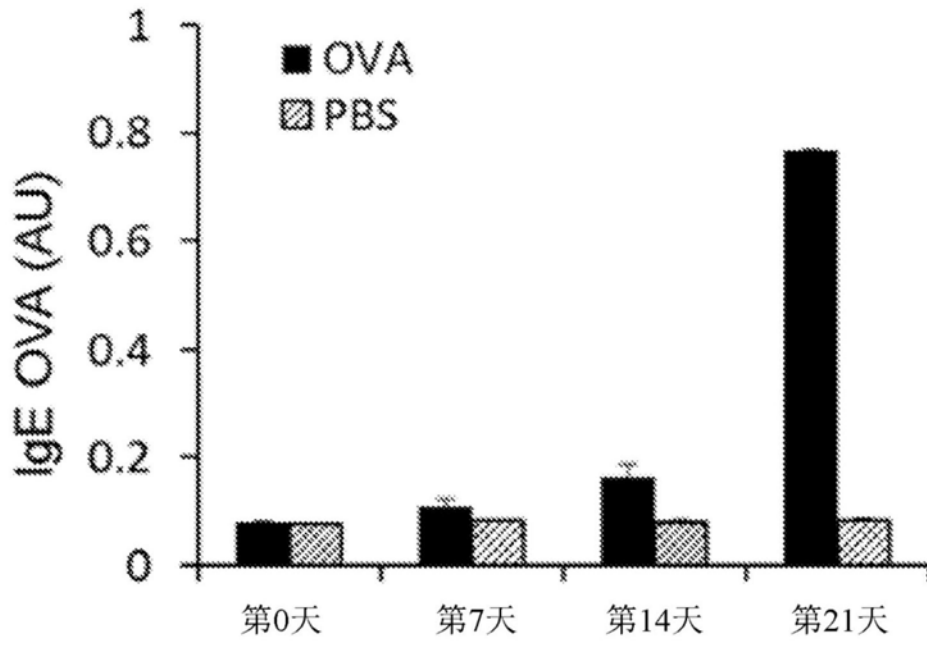


图8D

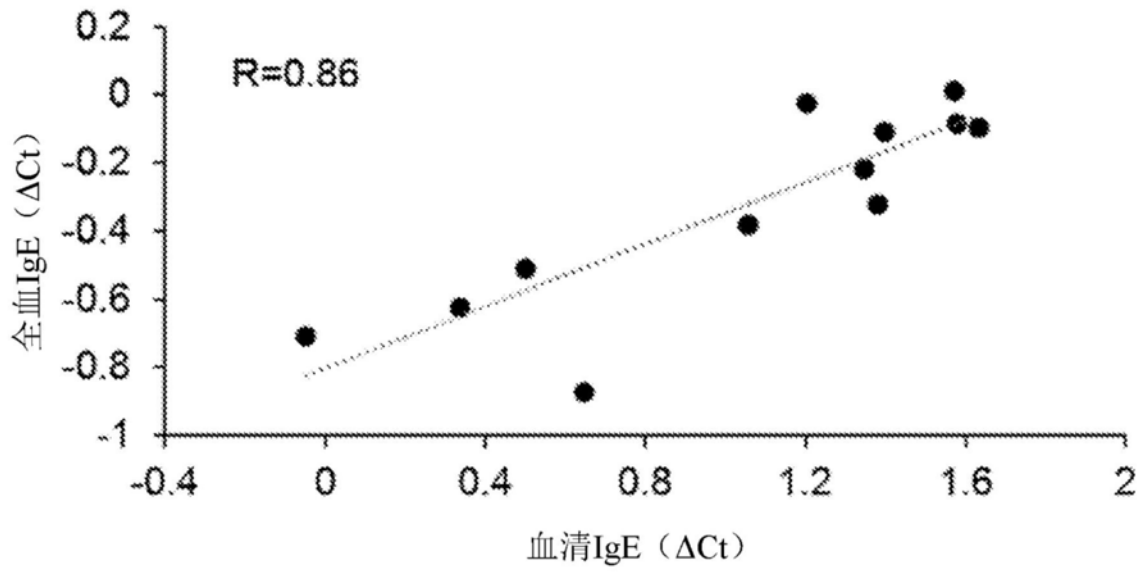


图8E

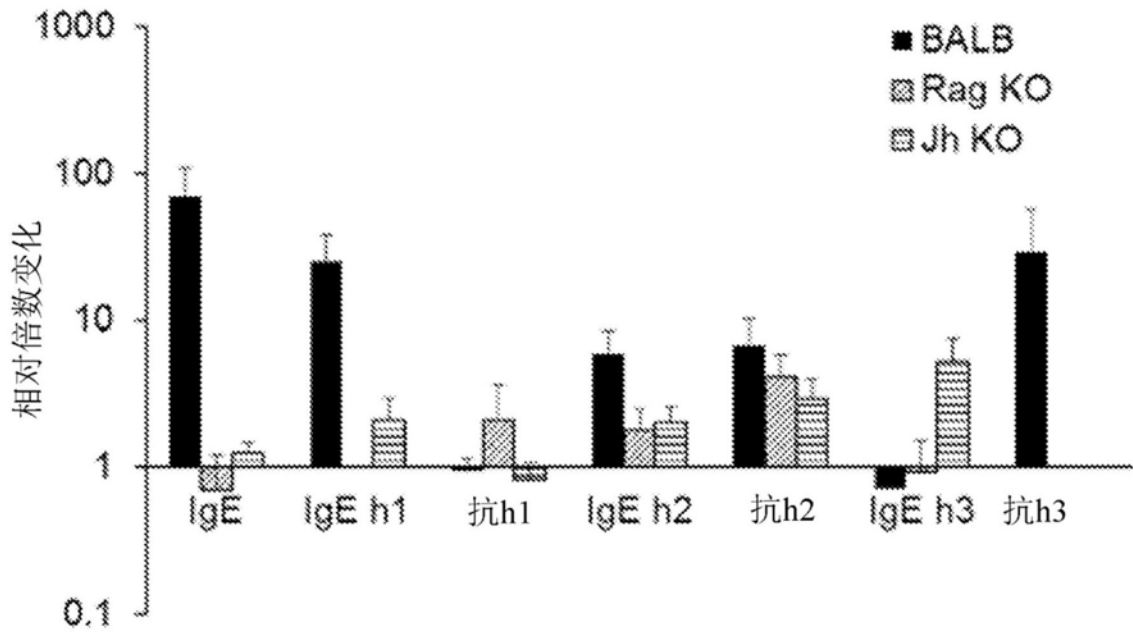


图9A

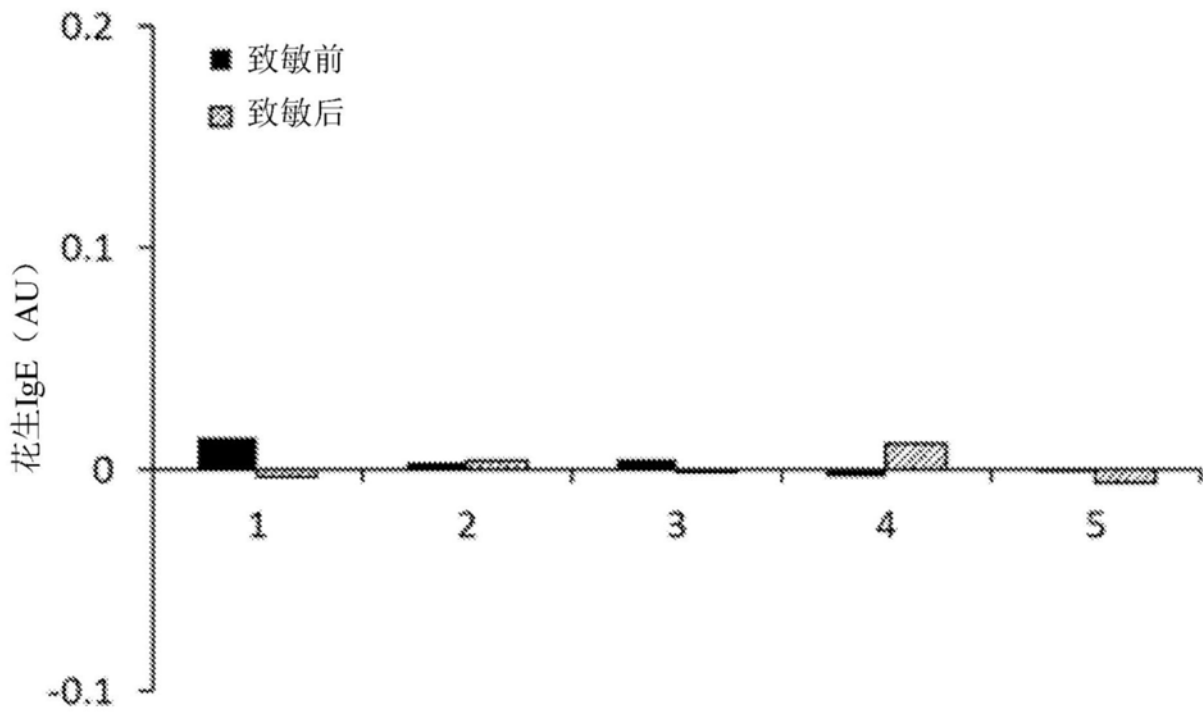


图9B

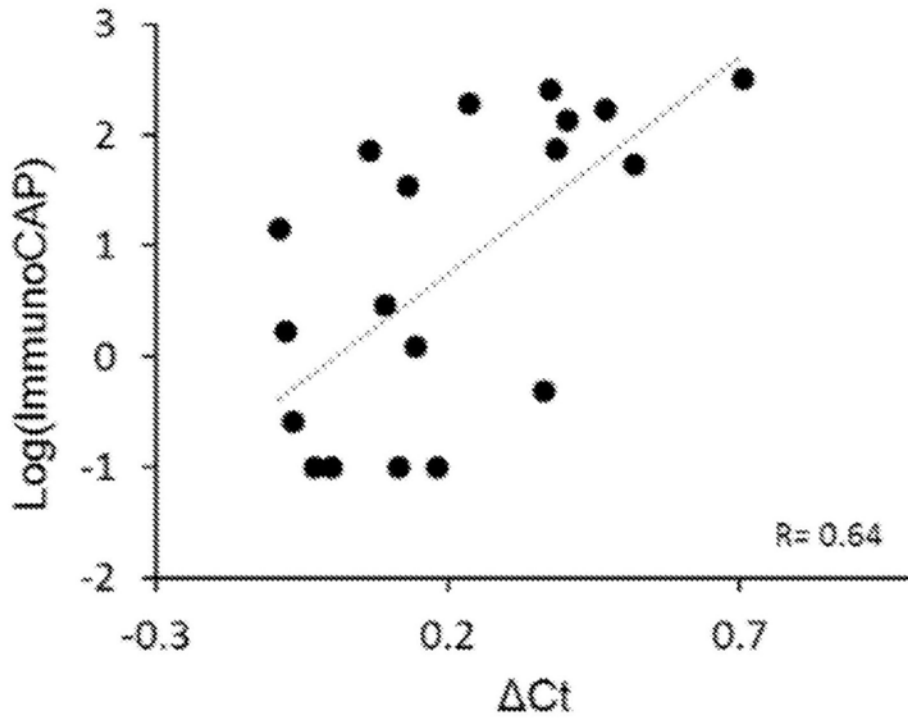


图10A

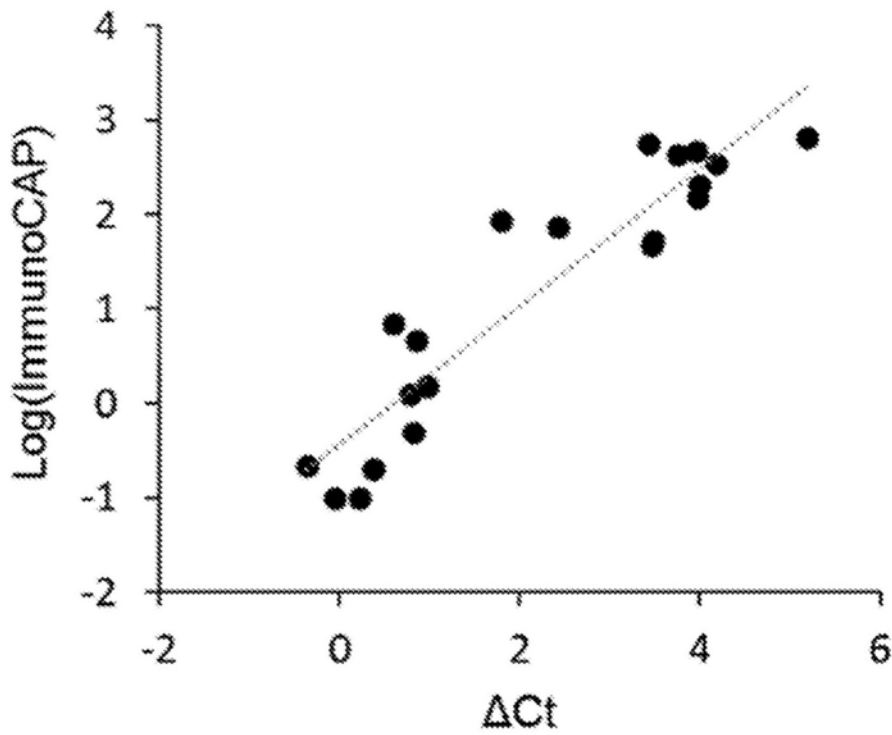


图10B

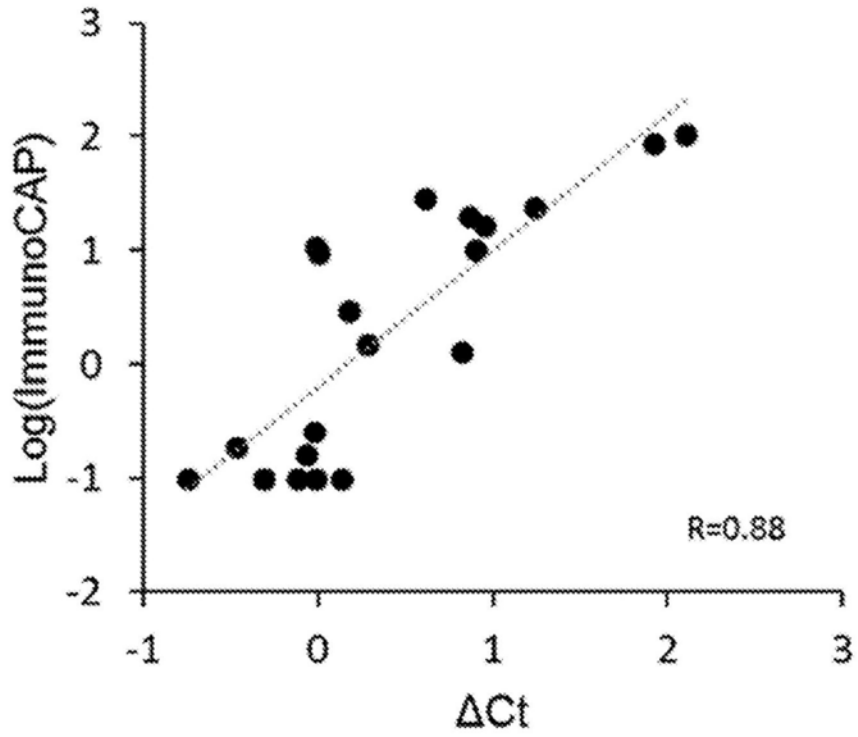


图10C

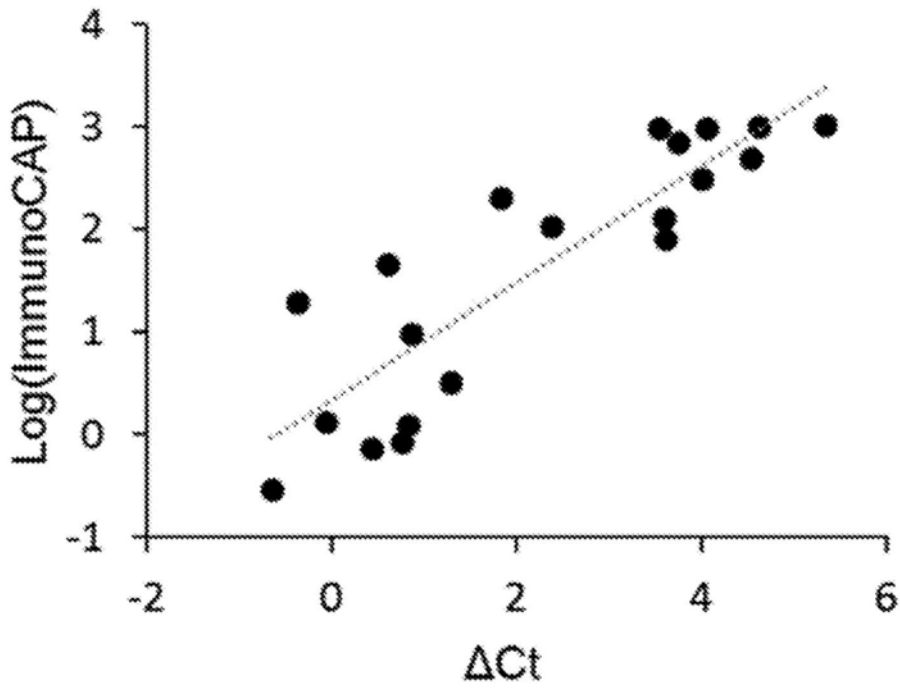


图10D

	基于PCR的分析	ImmunoCAP
样品体积	1 $\mu$ l	200 $\mu$ l
成本	\$5	\$500
周转时间	< 4 h	< 6 h
仪器	qPCR机器	免疫分析的分析仪

图10E

专利名称(译)	多重同型特异性抗体检测		
公开(公告)号	<a href="#">CN110869514A</a>	公开(公告)日	2020-03-06
申请号	CN201880030887.5	申请日	2018-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	斯坦福大学		
申请(专利权)人(译)	小利兰·斯坦福大学托管委员会		
当前申请(专利权)人(译)	小利兰·斯坦福大学托管委员会		
[标]发明人	C贝尔托齐 P罗宾逊 蔡政廷 M蔡		
发明人	C·贝尔托齐 S·J·加利 K·穆凯 P·罗宾逊 蔡政廷 M·蔡		
IPC分类号	C12Q1/6851 C12Q1/6804 C12Q1/6806 G01N33/68 G01N33/48 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	C12Q1/6804 G01N33/686 G01N2458/10 C12Q2521/101 C12Q2521/501 C12Q2525/205 C12Q2537/143 C12Q2563/179		
代理人(译)	孙涛		
优先权	62/479278 2017-03-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

公开了用于多重检测抗体的方法和试剂。具体地说，本发明涉及抗体的多重检测，其利用携带DNA条形码的抗原-DNA和抗体结合剂-DNA结合物鉴别和定量疾病相关抗体同型，例如涉及过敏反应、自体免疫疾病、感染和发炎的那些抗体同型。

