



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107533052 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680027104.9

(22)申请日 2016.05.10

(30)优先权数据

62/159,919 2015.05.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/031661 2016.05.10

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2016/183092 EN 2016.11.17

(71)申请人 万迈医疗仪器有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 罗伯特·F·祖克 夏青

(74)专利代理机构 北京商专永信知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

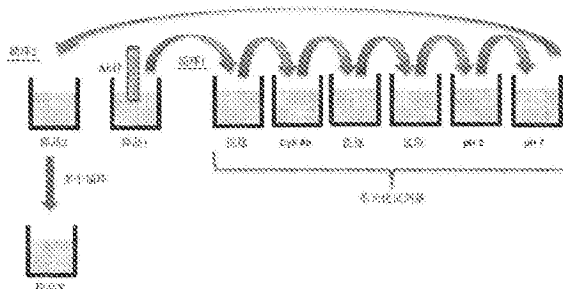
权利要求书2页 说明书12页 附图11页

(54)发明名称

在免疫测定中重复使用测试探针和试剂的方法

(57)摘要

本发明涉及一种免疫测定方法,所述方法重复使用抗体固定化测试探针和试剂,以用于定量不同样品中的分析物,使用次数约3至20次,同时保持可接受的临床测定性能。所述方法在每个反应循环完成后重新生成测试探针。本发明还涉及一种用于免疫测定试验的单元化盒(条)。每个单元化盒含有所有必需的试剂,可用于3至20个循环,以测量3至20个不同的样品。



1. 一种检测多个液体样品中的分析物的方法,包含以下步骤:

(a) 获得探针,其具有固定在所述探针尖端上的第一抗体,其中所述尖端表面的直径 $\leq 5\text{mm}$ ;

(b) 将所述探针浸入包含pH为6.0至8.5的水溶液的预读容器中,以预读所述探针尖端的荧光信号;

(c) 将所述探针尖端浸入含有具有分析物的液体样品的样品容器中;

(d) 将所述探针尖端浸入含有试剂溶液的试剂容器中,所述试剂溶液包含与一或多个荧光标记结合的第二抗体,以在所述探针尖端上的所述分析物、所述第一抗体和所述第二抗体之间形成免疫复合物,其中所述第一抗体和所述第二抗体是针对所述分析物的抗体;

(e) 将所述探针尖端浸入含有洗涤溶液的洗涤容器中;

(f) 通过测量所述探针尖端的所述免疫复合物的荧光信号,减去(b)的所述预读荧光信号,并根据校准曲线定量来测定所述第一样品中的分析物浓度;

(g) 将所述探针尖端浸入pH为约1.0至4.0的酸性溶液中,以从所述探针尖端洗脱所述免疫复合物;以及

(h) 在第二循环中采用第二样品容器中的第二液体样品重复步骤(b)至步骤(g),由此检测多个液体样品中的所述分析物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,步骤(f)中的所述校准曲线对于所有的定量循环是相同的。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,步骤(f)中的所述校准曲线是循环特异性校准曲线。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中,步骤(g)中的所述酸性溶液的pH为1.5至2.5。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中,在步骤(g)中,将所述探针尖端暴露于所述酸性溶液一次,持续10秒至2分钟。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,在步骤(g)中,将所述探针尖端暴露于2至5个循环的所述酸性溶液处理的脉冲处理,然后在读取容器中中和10至20秒。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一抗体用生物素标记,并且间接地固定在涂有抗生蛋白链菌素的感测表面上。

8. 一种检测多个液体样品中具有宽浓度范围的分析物的方法,包含以下步骤:

(i) 获得探针,其具有固定在所述探针尖端上的第一抗体,其中所述尖端表面的直径 $\leq 5\text{mm}$ ;

(ii) 将所述探针浸入包含水溶液的预读容器中,以预读所述探针尖端的荧光信号,

(iii) 将所述探针尖端浸入到含有具有分析物的第一样品溶液的第一样品容器中,以将分析物结合到所述探针尖端上的所述第一抗体;

(iv) 将所述探针尖端浸入到含有包含与荧光标记结合的第二抗体的试剂溶液的试剂容器中,以形成所述分析物、所述第一抗体和所述第二抗体的免疫复合物,其中所述第一抗体和所述第二抗体为针对所述分析物的抗体;

(v) 将所述探针尖端浸入到含有洗涤溶液的洗涤容器中,以洗涤所述探针尖端;

(vi) 测量在所述探针尖端上形成的所述第一免疫复合物的第一荧光信号;

(vii) 将所述探针尖端浸入到所述同一样品容器中,持续时间比步骤(iii)中的时间

段更长,并使所述第一样品容器中的所述样品溶液流动,以将第一样品中额外的分析物结合到所述探针尖端上的所述第一抗体;

(viii) 以较长的孵育时间重复步骤(iv),并且重复步骤(v);

(ix) 测量在所述探针尖端上形成的第二免疫复合物的第二荧光信号;

(x) 通过首先从所述第一和所述第二荧光信号中减去(b)中的预读荧光信号,然后根据高端校准曲线或低端校准曲线对所述分析物浓度进行定量,来确定所述第一样品中的所述分析物浓度;

(xi) 将所述探针尖端浸入pH约1.0至4.0的酸性溶液中,以从所述探针尖端洗脱所述免疫复合物,以及

(xii) 在第二循环中采用第二样品容器中的第二液体样品重复步骤(ii)至步骤(xi),由此检测出多个液体样品中的所述分析物。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中,步骤(x)中的所述高端和所述低端校准曲线对于所有定量循环都是相同的。

10. 根据权利要求8所述的方法,其中,步骤(x)中的所述高端和所述低端校准曲线是循环特异性校准曲线。

11. 根据权利要求8所述的方法,其中,步骤(xi)中的所述酸性溶液的pH为1.5至2.5。

12. 根据权利要求8所述的方法,其中,在步骤(xi)中,将所述探针尖端暴露于所述酸性溶液一次,持续10秒至2分钟。

13. 根据权利要求8所述的方法,其中,在步骤(xi)中,将所述探针尖端暴露于2至5个循环的酸性溶液处理的脉冲处理,然后在所述读取容器中中和10至20秒。

14. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述第一抗体用生物素标记,并且间接地固定在涂有抗生蛋白链菌素的感测表面上。

15. 一种用于免疫测定的盒,包含(a)探针槽,其包含探针和帽,所述帽处于闭合位置以将所述探针封闭在所述探针槽中,其中所述探针具有涂有第一抗体的底部尖端;(b)样品槽,用于接收样品;(c)含有试剂的试剂槽;(d)一或多个各自含有洗涤溶液的洗涤槽;(e)包含酸性试剂的低pH槽,以提供1至4的pH,(f)含有pH 6.0至8.5的缓冲试剂的中和槽;和(g)具有透光底部的测量槽,所述测量槽含有水溶液;其中所述样品槽、试剂槽、测量槽和洗涤槽的开口被密封。

16. 一种用于免疫测定的盒,包含(a)探针槽,其包括探针和帽,所述帽处于闭合位置以将所述探针封闭在所述探针槽中,其中所述探针具有涂有第一抗体的底部尖端;(b)样品槽,用于接收样品;(c)含有试剂的试剂槽;(d)一或多个各自含有洗涤溶液的洗涤槽;(e)含有酸性pH试剂的低pH槽,以提供1至4的pH,以及(f)具有透光底部且含有pH 6.0至8.5的水性缓冲液的中和和测量槽;其中所述样品槽、试剂槽、测量槽和洗涤槽的开口被密封。

## 在免疫测定中重复使用测试探针和试剂的方法

### 背景技术

[0001] 成本控制是全球保健服务提供者的主要目标。体外诊断 (IVD) 也不例外,其中生物标记物在诊断和预后中的临床效应已成为患者管理的标准。免疫测定技术在IVD行业中占大部分,并且以在美国约为3%/年、在发展中国家为15-20%/年的速度稳步增长。在某些情况下,例如在诊断心肌梗死时对心脏标记物的系列测量,成本可能限制适当的测试量。

[0002] 降低免疫测定成本的典型方法需要使包含材料、劳动力和设施日常管理费的制造费用最小化。

[0003] 需要降低免疫测定的成本,同时保持其临床性能。

### 附图说明

[0004] 图1示出了荧光检测系统的实施例。

[0005] 图2示出了测定形式的一个实施例,其中C型反应蛋白 (CRP) 是待测量的分析物的一个实例。固相(探针尖端)用抗生蛋白链菌素:生物素抗CRP抗体固定。

[0006] 图3示出了转移探针的测定方案。

[0007] 图4示出了在宽范围方案中的两个事件序列中转移探针的测定方案。

[0008] 图5示出了通过重复使用相同的试管,以C30抗体作为捕获抗体及以C5抗体作为信号抗体测定的20个循环测量(序列1) 30、100和300mg/L的CRP样品的荧光信号。

[0009] 图6示出了通过重复使用相同的试管,以C30抗体作为捕获抗体及以C5抗体作为信号抗体测定的9个循环测量(序列1) 10、30、100和300mg/L的CRP样品的荧光信号。

[0010] 图7示出了通过重复使用相同的试管,以C30抗体作为捕获抗体及以C5抗体作为信号抗体的9个循环测量(序列2) 在0、3和10mg/L下CRP样品的荧光信号。

[0011] 图8示出了以C30抗体作为捕获抗体及以C5抗体作为信号抗体,以3和300mg/L的、CRP高至低的样品的荧光信号的重现性。

[0012] 图9表明了通过本方案和已建立的临床仪器(西门子BN II) 测量的100个临床样本的CRP结果的相关性。

[0013] 图10示出了使用C2抗体作为捕获抗体及C5抗体作为信号抗体的9个循环测量中0、3、10和30mg/L的CRP样品的荧光信号。

[0014] 图11示出了使用多克隆抗体作为捕获抗体及C16B5单克隆抗体作为信号抗体,在5个循环测量中0、1、2、5和10ng/mL的PCT样品的荧光信号。

### 具体实施方式

[0015] 定义

[0016] 除了如下所述的定义,本权利要求书和说明书中使用的术语应根据本领域技术人员所理解的常规含义进行解释。

[0017] 本文使用的“关于”是指所述值的 $\pm 15\%$ 或 $\pm 10\%$ 以内。

[0018] 如本文所使用的“分析物结合”分子是指能够参与与分析物分子特异性结合反应

的任何分子。实例包括但不限于：(i) 抗原分子，用于检测对所述抗原特异性的抗体的存在；(ii) 抗体分子，用于检测抗原的存在；(iii) 蛋白质分子，用于检测用于所述蛋白质的结合配偶体的存在；(iv) 配体，用于检测结合配偶体的存在；或(v) 单链核酸分子，用于检测核酸结合分子的存在。

[0019] 形状的“纵横比”是指其较长尺寸与其较短尺寸的比值。

[0020] “结合分子”是指能够与另一种感兴趣分子结合的分子。

[0021] 如本文所使用的“结合对”是指彼此吸引并且彼此特异性结合的两个分子。结合对的实例包括但不限于，抗原和针对所述抗原的抗体，配体及其受体，核酸的互补链，生物素和抗生物素蛋白，生物素和抗生物素蛋白，凝集素和碳水化合物。优选的结合对为生物素和抗生物素蛋白，生物素和抗生物素蛋白，荧光素和抗荧光素，洋地黄素/抗洋地黄素(digoxigenin/anti-digoxigenin)。生物素和抗生物素蛋白，其包括生物素衍生物和抗生物素蛋白衍生物，例如抗生物素蛋白，可以作为使用复合结合序列的测定方案中的中间结合物。例如，抗体可以用生物素标记(“生物素化”)，并用于结合预先固定在固相表面上的靶物质。然后可以使用根据本发明使用抗生物素蛋白或抗生物素蛋白的荧光组合物来引入荧光标记。

[0022] 如本文所使用的“固定化”是指被固定在固体表面上的试剂。当试剂被固定在固体表面上时，它被非共价结合或共价结合到所述表面。

[0023] 如本文所使用的“整体式基板”是指单片固体材料，例如具有一种折射率的玻璃、石英或塑料。

[0024] 如本文所使用的“探针”是指在感测面涂覆有分析物结合分子薄膜层的底物。探针具有远端和近端。近端(也指在本申请中的探针尖端)具有涂覆分析物结合分子薄膜层的感测表面。

[0025] 如本文所使用的“宽范围浓度”是指至少50倍、100倍或500倍的浓度范围。

[0026] 本发明公开了在保持可接受的临床测定性能的同时，重复使用约3至20次的免疫测定测试探针和试剂的方法。免疫测定测试探针和试剂可以包含在一种测试条或盒中。本发明重复使用测试探针和试剂，并且在每个测试基础上节省成本。

[0027] 实施本发明有几个关键要素。第一，本发明通过使用变性试剂来再生测试探针，其中所述变性试剂使结合到固定在固相上的抗体的免疫复合物解离，但使结合到固相上的抗体变性或解离的程度不影响测定性能。变性步骤是固相抗体用于与其它包含样品的抗原的后续结合步骤的条件。第二，探针尖端尺寸很小(直径 $<5\mu\text{m}$ )，使得试剂的消耗可忽略不计，并且在测定循环期间不需要补充试剂。第三，所述测定使用进行完整测定所需的、相同的测试探针和相同的试剂，这有助于多个测定循环而无需额外的试剂。

[0028] 荧光检测系统

[0029] 本发明使用美国专利号8,492,139中所记载的荧光检测系统(所述专利通过引用并入本文)，用于测量探针尖端上的荧光信号。所述系统包括：(a) 探针，其长宽纵横比为至少5:1，探针具有第一端和第二端，第二端具有与荧光标记结合的感测表面；(b) 光源，用于将激发光直接发射到探针感测表面；(c) 指向感测表面的聚光透镜；和(d) 用于检测发射荧光的光学检测器；其中聚光透镜收集发射荧光并将发射荧光导向光学检测器。

[0030] 探针可以是整体式基板或光纤。探针可以是任何形状，例如杆、圆柱形、圆形、正方

形、三角形等,其长宽纵横比为至少5:1,优选为10:1。因为在免疫测定期间探针将被浸入样品溶液和一或多种测定溶液中,所以希望具有纵横比至少为5:1的长探针,以使探针尖端能够浸入溶液中。可以在将长探针转移到不同反应室的情况下进行非均质测定。避免在测定过程中分配和抽吸试剂和样品。探针的感测表面涂覆有分析物结合分子,并且与荧光标记结合。

[0031] 对于荧光标记,可以发射合适的激发光的任何光源都适用于本发明。优选的光源是可以发射波长适合荧光标记的光的激光器。例如,对于Cy5荧光染料,激光中心波长优选为649nm。用于检测发射光的、合适的光学检测器是光电倍增管(PMT)、电荷耦合器件(CCD)或光电二极管。

[0032] 包括聚光透镜的光源和光学检测器安装在探针尖端表面(感测表面)的同一侧。如果感测表面朝下,则它们都安装在探针尖端表面下方。如果感测表面朝上,它们都安装在探针尖端上方。它们比探针的另一端更靠近感测表面。感测表面总是在聚光透镜的数字槽内。探头可以是,但不是必须,与所述聚光透镜集中对齐。

[0033] 图1示出了荧光检测系统的一个实施例。

[0034] 通过再循环方案检测分析物

[0035] 本发明涉及通过荧光免疫测定法对于不同的样品使用相同的测试探针和测试试剂来检测多种液体样品中分析物的方法。所述方法包括以下步骤:(a)获得探针,其具有固定在所述探针尖端上的第一抗体,其中所述尖端表面的直径 $\leq 5\text{mm}$ ;(b)将所述探针浸入包含pH值为6.0至8.5的水溶液的预读容器中,以预读所述探针尖端的荧光信号;(c)将所述探针尖端浸入包含具有分析物的液体样品的样品容器中;(d)将所述探针尖端浸入含有试剂溶液的试剂容器中,所述试剂溶液包含与一或多个荧光标记结合的第二抗体,以在所述探针尖端上的分析物、所述第一抗体和所述第二抗体之间形成免疫复合物,其中所述第一抗体和所述第二抗体是针对所述分析物的抗体;(e)将所述探针尖端浸入含有洗涤溶液的洗涤容器中;(f)通过测量所述探针尖端的所述免疫复合物的荧光信号,减去(b)的预读荧光信号,并根据校准曲线定量来测定所述第一样品中的分析物浓度;(g)将所述探针尖端浸入pH为约1.0至4.0的酸性溶液中,以从所述探针尖端洗脱所述免疫复合物,以及(h)采用第二样品容器中的第二液体样品,重复步骤(b)-(f) 1-20次,优选1-10次,由此检测多个液体样品中的所述分析物。所述方法在所有的反应循环中使用相同的探针、相同的试剂溶液和相同的洗涤溶液。

[0036] 在本方法的步骤(a)中,获得具有用于结合分析物的小尖端的探针。所述尖端具有直径 $\leq 5\text{mm}$ 的较小表面积,优选 $\leq 2\text{mm}$ 或 $\leq 1\text{mm}$ 。探针尖端的小表面赋予它几个优点。在固相免疫测定中,具有小的表面积是有利的,因为它具有较少的非特异性结合,因此产生较低的背景信号。此外,由于尖端的表面积小,在探针尖端上携带的试剂或样品非常少。所述特征使得探针尖端易于洗涤,并且由于洗涤溶液具有较大的体积,因此在洗涤溶液中引起的污染可忽略不计。探针尖端的小表面积的另一方面在于其结合能力很小。因此,当探针尖端浸入试剂溶液时,所述试剂的结合不会消耗大量的试剂。试剂浓度有效地保持不变。可忽略的洗涤溶液污染和少量的试剂消耗使得试剂和洗涤溶液能够重复使用多次,例如3-20次。

[0037] 将第一抗体固定到固相(探针尖端的感测表面)的方法在免疫化学中是常见的,并且涉及在固相和抗体之间形成共价键、疏水键或静电键。所述第一抗体,由于其捕获分析物

的能力也被称为捕获抗体,可直接固定在感测表面上。例如,可以通过吸附到固体表面或通过共价结合涂覆在固体表面上的氨基丙基硅烷来首先固定第一抗体。或者,第一抗体可以通过结合对间接固定在感测表面上。例如,可以通过已知技术用生物素标记第一抗体(参见 WiTchek和Bayer,《分析生物化学1988((1988) Anal. Biochem.)》171:1-32),然后间接固定在涂覆有抗生蛋白链菌素的感测表面上。生物素和抗生蛋白链菌素是优选的结合对,因为它们具有很强的结合亲和力,其在本方法的低pH(pH1至4)再生步骤期间不解离。当探针感测表面被再生以除去免疫反应后结合到感测表面的免疫复合物时,固定在感测表面上的捕获抗体必须能够经受得住所述变性条件。固定在感测表面上的捕获抗体不得失去显著量的活性或与固相显著解离从而降低免疫测定性能。

[0038] 在步骤(b)中,探针尖端的荧光信号由读取容器(或读取室,或读取槽)中的荧光检测系统预读取。所述读取容器含有水溶液,例如水或pH在6.0至8.5之间的缓冲液。优选地,所述水溶液含有1-10mM或1-100mM磷酸盐缓冲液、tris缓冲液、柠檬酸盐缓冲液或适于pH为6.0至8.5之间的其它缓冲液,以在低pH再生后中和探针。在第一次样品结合之前预读是必要的,从而建立第一次循环反应的任何潜在背景荧光的基线。在探针尖端的再生之后和下一个样品结合之前,还需要预读取,从而建立后续循环的基线。在每个循环之后,由于变性条件引起被固定的捕获抗体的结合特性的变化,预读信号可以与前一个循环的预读信号相同、或更高或更低。发明人已经发现,对于某些捕获抗体,在减去预读信号之后,每个循环反应完成时的荧光信号在使用相同探针和相同试剂的20个反应循环中保持恒定。发明人还发现,对于其他捕获抗体,即使在减去预读信号之后,荧光信号在每个反应循环后连续轻微地上升或下降。酸处理可以改变探针表面的蛋白质,使得捕获抗体结合能力改变或荧光信号被改变。已知荧光对环境影响非常敏感。尽管在每个循环的荧光增加或减少,在这种情况下通过循环特异性校准获得一致的定量;即,在减去预读信号之后,根据系统中包括的循环特异性校准曲线对每个循环反应完成时的荧光信号进行定量。

[0039] 在所述方法的步骤(c)中,将探针尖端浸入样品容器(或样品室,或样品槽)中,并且孵育5秒至5分钟、10秒至2分钟或30秒至1分钟,以将分析物结合到探针尖端上的第一抗体上。

[0040] 在步骤(c)之后,任选地将探针在含有洗涤溶液的洗涤容器(或洗涤室,或洗涤槽)中洗涤1-5次,优选1-3次。由于较小的结合表面积,所负载溶液的量最小,所以这种额外的洗涤步骤可以不是必需的。所述洗涤溶液通常包含缓冲液和表面活性剂,例如吐温20。

[0041] 在所述方法的步骤(d)中,将探针尖端浸入试剂容器(或试剂室,或试剂槽)中5秒钟至5分钟、10秒至2分钟或30秒至1分钟,从而将试剂结合到探针尖端上的分析物。所述试剂溶液包含荧光标记的第二抗体(信号抗体)。在这种方法中可以使用任何合适的荧光标记。荧光标记的一个实例是芳基磺酸盐花青荧光染料,如Mujumdar等《生物共轭化学1993(((1993) Bioconjugate Chemistry)》,4:105-111);Southwick等《细胞计量术(1990)((1990) Cytometry)》,11:418-430)和美国专利第5,268,486号所述。Cy5是优选的芳基磺酸盐花青荧光染料,因为它具有高消光系数和良好的量子产率;它还在大多数生物材料和塑料的自荧光波长之外的范围(500nm至750nm)内具有荧光发射光谱。此外,Cy5在水中具有良好的溶解性,具有低的非特异性结合特性。

[0042] 使用如科学和专利文献中所述的常规共轭化学,荧光标记可通过多种部分共价结

合至第二抗体,其中这些部分包括二硫化物、羟基苯基、氨基、羧基、吡啶或其它官能团。用于将芳基磺酸盐花青荧光染料标记物结合到抗体和其它蛋白质的示例性技术记载于美国专利第5,268,486号、第5,650,334号;所述专利内容通过引用并入本文。用于将优选的Cy5荧光标记与抗体连接的技术记载于生物检测系统有限公司Pittsburgh,Pa (Biological Detection Systems, Inc., Pittsburgh, Pa)出版的、序列号为A25000的技术公告。

[0043] 在步骤(e)中,将探针在含有洗涤溶液的洗涤容器中洗涤1-5次,优选1-3次。所述洗涤溶液通常含有缓冲液和表面活性剂,例如吐温20。

[0044] 在步骤(f)中,将探针保留在洗涤容器中或移到测量容器中,并且使用如上所述的荧光检测系统测定结合的免疫复合物的荧光信号,其中光源和检测器安装在探头感测表面的相同侧(近侧)。测量容器可以是单独的槽,也可以是相同的预读容器。

[0045] 可选择地,本发明的方法可以通过其它合适的荧光检测系统来检测。

[0046] 通过测量探针尖端的免疫复合物的荧光信号,减去(b)中预读的荧光信号,然后根据校准曲线(标准曲线)进行定量,来测定样品中的分析物浓度。

[0047] 根据本领域技术人员已知的方法,在测定样品之前,通常预先建立校准曲线。在一个实施例中,相同样品的荧光信号(在减去预读信号之后)在每个周期保持恒定,并且校准曲线对于每个周期是相同的。在另一个实施例中,相同样品的荧光信号(在减去预读信号之后)在每个周期增加或减少,并且需要为每个周期建立循环特异性校准曲线。在荧光信号变化的这些情况下,根据循环特异性校准曲线对样品进行定量,而且尽管在不同周期荧光信号增加或减少,但是定量结果显示为一致的。

[0048] 在步骤(g)中,通过使用解离在固相上与捕获抗体结合的免疫复合物的变性条件来再生探针,但是在某种程度上不会使捕获抗体变性或从固相上解离进而的程度不影响测定性能。通常,pH约1至约4的酸或的酸性缓冲液对于再生本发明的抗体探针是有效的。例如,可以使用盐酸、硫酸、硝酸、乙酸来再生探针。首先用酸性条件处理探针,然后使用中性水溶液如pH在6.0至8.5之间的缓冲液中和。在一个实施例中,在预读之前,在步骤(b)的读取容器中方便中和和低pH处理的探针。或者,可以在pH为6.0至8.5的缓冲液的独立容器中中和和低pH处理的探针。再生过程可以是一次酸处理,随后中和。例如,pH1至3或pH1.5至2.5(例如pH2)单次暴露10秒至2分钟是有效的。再生过程也可以是“脉冲”再生步骤,其中探针暴露于短pH处理(例如10至20秒)的2至5个循环(例如3个循环),随后在pH6.5至8.0下中和(例如10至20秒)。

[0049] 在探针再生后,在随后的循环中使用相同的探针和相同的试剂以及不同的样品重复步骤(b)至步骤(g)1至10、1至20、1至25、3至20、5至20、5至25或5至30次。

[0050] 在一个实施例中,通过搅拌或混合容器中的溶液来加速反应。例如,可以在一或多个反应容器(包括样品容器、试剂容器、洗涤容器和再生容器)中产生穿过探针尖端的溶液流,比如横向流或轨道流,从而加速结合反应、解离。例如,反应容器可以安装在定轨振荡器上,并且所述轨道振荡器以至少50rpm的速度旋转,优选至少200rpm或至少500rpm,比如50至200或500至1,500rpm。此外,可以0.01至10mm/秒的速度将探针尖端上下移动并垂直于轨道流的平面,以引起溶液在探针尖端上方和下方额外混合。

[0051] 在再生方案中检测具有宽浓度范围的分析物

[0052] 在一个实施例中,修改如上所述的本发明的再循环方法以添加第二结合事件序

列,用于对在单次测定中具有宽范围浓度的分析物进行定量,而不必稀释样品并重复测定。在所述实施例中,免疫测定的每个循环具有两个事件序列,每个序列包括将样品结合到探针、结合反应和检测。通常,针对在相关临床范围的高浓度端的样品,优化第一序列的测定条件,并且针对相关临床范围的低浓度端优化第二序列的测定条件。在第一序列的结合和检测之后,将探针重新浸入到同一样品容器中,以在比第一循环中的结合条件更有利的结合条件下(例如更长的反应时间和/或搅拌)将样品容器中额外的分析物结合到探针(参见图4)。在两个循环中均检测分析物浓度,并且组合结果提供了在单次测定中对具有宽范围浓度的分析物进行定量的能力,而不必稀释样品并重新进行测定。

[0053] 再循环和宽范围联合方案包含以下步骤:(i)获得探针,其具有固定在探针尖端上的第一抗体,其中所述尖端表面的直径 $\leq 5\text{mm}$ ;(ii)将探针浸入包含水溶液的预读容器中,以预读探针尖端的荧光信号,(iii)将探针尖端浸入到含有具有分析物的第一样品溶液的第一样品容器中(例如持续10秒至2分钟,并使样品容器中的样品溶液以0至500rpm流动),以将分析物结合到探针尖端上的第一抗体;(iv)将探针尖端浸入到含有试剂溶液(其包含与荧光标记结合的第二抗体)的试剂容器中,以形成分析物、第一抗体和第二抗体的免疫复合物,其中第一抗体和第二抗体为针对分析物的抗体;(v)将探针尖端浸入到含有洗涤溶液的洗涤容器中,以洗涤探针尖端;(vi)测量在探针尖端上形成的第一免疫复合物的第一荧光信号;(vii)将探针尖端浸入到同一样品容器中,持续时间比步骤(iii)中的时间段更长(例如1至30分钟),并使第一样品容器中的样品溶液流动(以0至1200rpm的速度,优选200至1200rpm或200至1000rpm),以将第一样品中额外的分析物结合到探针尖端上的第一抗体;(viii)以较长的孵育时间重复步骤(iv),并且重复步骤(v);(ix)测量在探针尖端上形成的第二免疫复合物的第二荧光信号;以及(x)通过首先从第一和第二荧光信号中减去(b)中的预读荧光信号,然后根据高端校准曲线或低端校准曲线对分析物浓度进行定量,来确定第一样品中的分析物浓度;(xi)将探针尖端浸入pH约1.0至4.0的酸性溶液中,以从探针尖端洗脱免疫复合物,以及(xii)使用第二样品容器中的第二液体样品重复步骤(ii)至步骤(xi),从而检测多个液体样品中的分析物。所述方法在所有反应循环中采用相同的探针、相同的试剂溶液和相同的洗涤液。

[0054] 在上述方法中,步骤(iii)至步骤(vi)是用于结合具有高浓度的分析物的结合事件的第一序列。步骤(vii)和(viii)是用于结合具有高浓度的分析物的结合事件的第二序列。在两个事件序列和测量之后,再通过步骤(xi)和(ii)再生所述探针尖端,然后在下一个循环中重复步骤(iii)至步骤(x)以对下一个样品进行定量。除非另有说明,否则,试剂和洗涤溶液以及程序都与上述再循环/再生方案中所述的试剂和洗涤溶液以及程序相同或相似。

[0055] 单元化免疫测定条

[0056] 本发明还涉及一种用于免疫测定试验的盒(条)。所述单元化的盒可用于2至20或3至20个循环,以测量2至20或3至20个不同的样品。所述盒包括(a)探针槽,其包括探针和帽,所述帽处于闭合位置,以将所述探针装入所述探针槽中,其中所述探针具有涂覆有第一抗体的底部尖端;(b)样品槽,用于接收样品;(c)试剂槽;(d)一或多个各自含有洗涤溶液的洗涤槽;(e)低pH槽,以提供1至4的pH,(f)中和槽,以提供pH为6.0至8.5的缓冲液,以及(g)具有透光底部的测量槽(读取槽),所述测量槽含有水溶液;其中所述样品槽、试剂槽、测量槽

和洗涤槽的开口被密封。在一个实施例中,所述中和槽和测量槽(读取槽)是同一槽。在另一个实施例中,所述中和槽和测量槽是两个独立的槽。

[0057] 所述盒与第8,753,574号美国专利中所记载的盒相似,其通过整体引用并入本文;不同之处在于本发明的盒含有额外的低pH槽和中和槽。

[0058] 样品槽是接收含有分析物的样品的槽。样品槽可以是空白槽,或者它可以含有用于免疫测定的、干式或湿的(液体)形式的洗涤剂、阻断剂和各种添加剂。

[0059] 试剂槽含有试剂,比如荧光标记的抗体,其与分析物反应以形成免疫复合物并产生检测信号。试剂可以是湿式或干式形式。所述湿式形式在测定缓冲液中含有试剂。湿式形式通常液体体积小(<10 $\mu$ L,例如5 $\mu$ L)。测定缓冲液通常包括缓冲液(例如磷酸盐、Tris)、载体蛋白(例如牛血清白蛋白、猪血清白蛋白和人血清白蛋白,0.1-50mg/mL)、盐(例如盐水)和洗涤剂(例如吐温、Triton)。测定缓冲液的一个实例是磷酸盐缓冲盐水,pH7.4,5mg/mL牛血清白蛋白,0.05%吐温20。所述测定缓冲液任选地含有1-500 $\mu$ g/mL的阻断剂。最终配方将根据每种分析物测定的要求而变化。干式形式是测定缓冲液中试剂的干形式。所述干式形式包括冻干饼、粉末、片剂或诊断试剂盒中典型的其他形式。通过重构缓冲液或洗涤缓冲液将干式形式重新构成湿式形式。

[0060] 所述盒包括一或多个各自含有水溶液的洗涤槽。所述洗涤槽含有洗涤缓冲液,以在样品槽和试剂槽的结合步骤之后洗涤探针。1至4个洗涤槽(例如1、2、3或4个槽)专用于每个结合步骤之后的洗涤。洗涤缓冲液含有洗涤剂。通常在免疫测定中使用的任何洗涤剂(例如吐温、Triton)均可用于本发明。

[0061] 所述盒包括具有光学透明底部的测量槽,其能够检测结合到探针的底部尖端的被标记的免疫复合物。通过槽的底部测量。

[0062] 在一个实施例中,所述盒还包括一或多个重构槽,其包含待分配到样品槽和试剂槽中的重构缓冲液,以便很好地在样品槽和试剂槽中的重构所述干燥形式。所述重构缓冲液可以简单地是如磷酸盐缓冲盐水的缓冲液。重构缓冲液可以额外地包含测定缓冲液中所含的其它添加剂(载体蛋白、阻断剂、洗涤剂等)。

[0063] 试剂槽和洗涤槽的开口用箔或薄膜密封。密封是可穿透的。所述槽可以通过手动或自动装置刺穿密封来打开。在一个实施例中,当探针的帽处于关闭位置时,所述帽被折叠在探针上,以将探针封闭在探针槽中,但所述帽不覆盖样品槽、洗涤槽或测量槽。

[0064] 包含固定化抗体的探针

[0065] 本发明提供了一种探针,其包含固定在探针尖端上的抗体,其中抗体用生物素标记,并通过涂覆在探针尖端上的抗生物素蛋白间接固定在探针末端上;其中所述尖端表面的直径 $\leq$ 5mm,并且所述抗体在酸处理之后基本上不会变性或从所述探针上解离;即酸处理循环1-20次后,不超过15%,优选不超过10%或5%的抗体变性或从探针上解离。所述酸处理通常通过将探针浸入到低pH缓冲液中(pH1至4、或1至3、或1.5至2.5)10秒至2分钟来进行。

[0066] 包含如上所述的捕获抗体的探针对于免疫测定是有用的,因为探针经受得住酸再生,并且对于至少20个再生循环产生一致的剂量反应曲线。所述探针在所有20个循环中仅仅需要单一的校准曲线。相反,包含在酸再生后其结合活性变化的捕获抗体的探针对于每个循环将需要循环特异性校准曲线,这增加了测定的成本和时间,并且为了保持这些循环

的一致性需要更多的工作。

[0067] 发明人已经发现来自HyTest (芬兰图尔库) 的小鼠单克隆抗人类C型反应蛋白C30抗体 (IgG1同种型), 当用生物素标记并通过涂覆在探针尖端上的抗生蛋白链菌素固定在探针尖端上时, 在用于本发明所述方法的过程中, 对于使用相同探针和相同试剂的20个反应循环, 在每个反应循环完成时的荧光信号在减去预读信号后保持恒定。

[0068] 通过以下实例进一步说明本发明, 这些实施例不应被解释为将本发明的范围限制在其中描述的具体步骤中。

[0069] 实例

[0070] 实例1. 准备抗体包被的探针

[0071] 采用化学气相沉积工艺 (产率工程系统Yield Engineering Systems, 1224P), 遵循制造商的操作流程, 用氨基丙基硅烷涂覆直径为1mm、长度为2cm的石英探针。然后将探针尖端浸入抗生蛋白链菌素 (Sigma-Aldrich) 的溶液中, 在磷酸盐缓冲盐水pH7.4 (PBS) 中为10 $\mu$ g/ml。在将蛋白质吸附到探针上5分钟后, 在PBS中洗涤探针尖端。然后将探针尖端浸入到含有生物素标记抗体的溶液中, 在PBS中为10 $\mu$ g/ml。10分钟后, 在PBS中洗涤探针尖端。抗体通过标准方法被生物素化。将经生物素化的抗体命名为“捕获抗体”。

[0072] 实例2. 制备Cy5标记的抗体

[0073] 将在1ml 0.1M pH9.5碳酸钠中为3.2mg/ml的抗体与10mM/ml DMF的10.6 $\mu$ l Cy5-NHS (GE Healthcare) 混合, 并在30 $^{\circ}$ C下反应1/2小时。然后将混合物在PD10柱 (GE Healthcare) 上纯化。将Cy5标记的抗体命名为“信号抗体”。

[0074] 实例3. C型反应蛋白免疫测定方案

[0075] 图2显示了由结合到固定在探针尖端上的抗生蛋白链菌素的、生物素化的抗C型反应蛋白 (CRP) 抗体组成的基本测定形式。在这种情况下, 抗生蛋白链菌素用作阻止抗体与探针表面直接相互作用的间隔物, 潜在地干扰其结合活性。

[0076] 图3是测定方案的示意图。在样品中孵育后, 将抗体 (Ab) 包被的探针转移到洗涤槽中, 随后与Cy5标记的第二抗体一起孵育。在与第二Ab一起孵育后, 进行洗涤循环, 然后在探针尖端测量荧光以完成测定。将探针浸于pH2的低pH缓冲液中, 解离CRP免疫复合物, 浸入pH7的缓冲液是将探针用于随后的样品分析的条件。在低pH暴露期间, 抗生蛋白链菌素-Ab复合物在探针尖端保持完整。通常, 将生物素与抗生蛋白链菌素解离需要非常苛刻的变性条件, 例如8M尿素或6M胍。

[0077] 在随后的样品分析中, 重新使用探针和用于进行测定的所有试剂。

[0078] 实例4. C型反应蛋白免疫测定 (宽浓度范围)

[0079] 图4示出了在“宽浓度范围”方案中的探针转移序列, 其可以在单次测定中定量宽范围的分析物浓度 (例如30-300mg/L CRP)。序列1对具有高浓度 (30-300mg/L) 的分析物进行定量, 并且序列2对低浓度 (0-30mg/L) 的样品进行定量。所述组合定量提供了100倍以上浓度宽范围的定量。

[0080] 通过以下方案针对荧光信号测量三组样品。第1组有20个不同的样品, 每个样品在测定缓冲液 (0.5mg/ml牛血清白蛋白 (BSA)、磷酸盐缓冲液、0.05%吐温20, pH7.4) 中的CRP浓度为30mg/L。第2组有20个不同的样品, 每个样品在测定缓冲液中的CRP浓度为100mg/L。第3组有20个不同的样品, 每个样品在测定缓冲液中的CRP浓度为300mg/L。将相同的试剂用

于每组20个不同样品的20个循环测量。

- [0081] 序列1 (高浓度检测)
- [0082] 1. 预读
- [0083] 2. 第一样品 (CRP) 孵育:7秒钟0RPM
- [0084] 3. 洗涤三次:7秒钟1200RPM
- [0085] 4. Cy5\_C5孵育:7秒钟1200RPM
- [0086] 5. 洗涤三次:7秒钟1200RPM
- [0087] 6. 第一次读取
- [0088] 序列2 (低浓度检测)
- [0089] 7. 相同的第一样品 (CRP) 孵育:15秒钟1200RPM
- [0090] 8. 洗涤三次:7秒钟1200RPM
- [0091] 9. Cy5\_C5孵育:15秒钟1200RPM
- [0092] 10. 洗涤三次:15秒钟1200RPM
- [0093] 11. 第二次读取
- [0094] 脉冲再生
- [0095] 12. 再生缓冲液 (pH2.0) :10秒钟500RPM
- [0096] 13. PBS (pH7.4) :10秒钟500RPM
- [0097] 14. 重复12
- [0098] 15. 重复13
- [0099] 16. 重复12
- [0100] 17. 重复13
- [0101] 18. 返回到1,用于不同样本的后续循环

[0102] 将Hytest小鼠抗人类CRP单克隆抗体C30用作捕获抗体,并将Hytest小鼠抗人类CRP单克隆抗体C5用做信号抗体。图5示出了对三组样品 (序列1,每组中,n=20) 的CRP测定结果;所述结果表明,荧光信号与低变异系数(CV)一致,荧光信号总结于表1中。

[0103] 表1

[0104]

CRP (mg/L)	信号平均值	信号标准差	CV (%)
30	155	16	10
100	424	22	5
300	937	54	6

[0105] 实例5.C型反应蛋白免疫测定 (宽浓度范围方案)

[0106] 通过实例4中相同的方案针对荧光信号测量6组样品。每组具有CRP浓度为0、3、10、30、100或300mg/L的PBS样品。每个样品在9个循环中测量9次。每组样品的9个循环的测量使用相同的试剂。

[0107] 这个方案的第一步是“预读”,以测量与探针相关的背景荧光。表2显示了“预读”:每个循环前从CRP样品采集的信号。预读数据表明,在每个循环后和下一个循环前,酸洗脱不包括探针上的残留荧光。结果表明,“预读”的荧光信号随着每个循环而增加,但是,如图5和6所示,“预读”的减法在每个循环产生一致的结果。

[0108] 表2.(预读信号)

[0109]

CRP (mg/L)	循环									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	97	121	156	175	195	212	229	244	259	282
1	153	196	237	265	288	310	333	351	369	388
3	95	115	150	173	195	215	234	246	259	277
10	95	122	160	190	217	240	261	281	300	321
30	91	138	195	238	238	277	310	339	366	417
100	84	147	210	257	306	351	393	430	470	508
300	93	147	209	262	308	352	393	434	474	513

[0110] 图6和表3示出了高端曲线(序列1,n=9)的荧光信号。

[0111] 表3

[0112]

CRP (mg/L)	信号平均值	信号标准差	CV (%)
10	80	4	5
30	168	15	9
100	453	25	5
300	954	55	6

[0113] 图7和表4示出了低端曲线(序列2,n=20)的荧光信号。

[0114] 表4.

[0115]

CRP (mg/L)	信号平均值	信号标准差	CV (%)
0	30	5	
3	231	14	6
10	617	8	1

[0116] 图6示出了从10至300mg/L的高CRP样品的测定信号,图7显示了从0至10mg/L的低CRP样品的测定信号的第二次测量。对于测得的所有CRP水平,9个循环的测定信号是一致的。

[0117] 实例6.测量高浓度至低浓度样品中的CRP

[0118] 在临床实践中,以随机序列测定CRP样品。为了评估非常高的样品的测定是否会偏离随后的低样品结果,我们测定了10个循环的300mg/L样品,随后测定3mg/L样品。所述300mg/L处于代表与极端炎症相关的CRP水平的量化范围的顶部,而3mg/L在正常范围内。图8显示两组样品的CRP测定结果;结果表明对于300mg/L和3mg/L两者,荧光信号(减去预读信号后)是一致的,高低样品之间交替的偏差可忽略不计。荧光信号总结在表5中。

[0119] 表5.

[0120]

CRP (mg/L)	平均值 (n=5)	标准差 (SD)	CV (%)
3	202	8	4
300	1051	69	7

[0121] 实例7.对比研究

[0122] 这个试验比较了通过如实例4所示的本方案和通过已设置的临床仪器(西门子BN II)测定100个临床样品的CRP结果。

[0123] 使用10个测试条通过本方法对100个样品进行定量。每个测试条在重复使用同一测试探针的10个循环中测定了10个随机选取的样品。西门子的结果是按照制造商的标准方案获得的。本方法与西门子方法的对比结果如图9所示,这表明本方法产生的结果与西门子方法产生的结果高度相关, $R^2$ 为0.9596 ( $R$ =相关系数)。

[0124] 实例8.用不同的捕获抗体测定CRP

[0125] 以与实例4中所述的相同方案评估第二捕获抗体(Hytest小鼠单克隆抗人类CRP C2),图10展示了意想不到的结果——即使在减去预读值之后,CRP信号随每个循环都增强。酸处理可以改变探针表面的蛋白质,使得抗体结合能力增加或荧光信号被改变。已知荧光对环境影响非常敏感。

[0126] 为了处理每个循环中荧光信号的增强,在每个循环中建立标准曲线,并且根据循环特异性标准曲线计算每个循环中分析物的定量。在9个循环中测试测定缓冲液中6.0mg/mL的CRP样品,并根据循环特异性标准曲线定量从而确定再现性。结果表明平均值为6.1mg/mL,标准差为0.5mg/mL,并且CV为9%。

[0127] 尽管每个循环的荧光信号增强,通过运行针对每个循环的校准曲线来实现一致的定量。

[0128] 实例9.降钙素原测定

[0129] 以下方案列出了降钙素原(PCT)测定的步骤。

[0130] 序列1(高浓度检测)

[0131] 1.预读

[0132] 2.第一样品(PCT)孵育:15秒钟0RPM

[0133] 3.洗涤三次:7秒钟1200RPM

[0134] 4.Cy5\_16B5孵育:15秒钟1200RPM

[0135] 5.洗涤三次:7秒钟1200RPM

[0136] 6.第一次读取

[0137] 序列2(低浓度检测)

[0138] 7.第一样品(CRP)孵育:360秒钟1200RPM

[0139] 8.洗涤三次:7秒钟1200RPM

[0140] 9.Cy5\_16B5孵育:60秒钟1200RPM

[0141] 10.洗涤三次:15秒钟1200RPM

[0142] 11.第二次读取

[0143] 再生

[0144] 12.再生缓冲液(pH2.0):10秒钟500RPM

[0145] 13.PBS(pH7.4):10秒钟500RPM

[0146] 14.返回到1,用于不同样品的后续循环

[0147] PCT方案与CRP方案类似(参见实例4),不同之处在于,步骤2和7具有较长的孵育时间以对PCT低得多的浓度负责。此外,所述PCT方案仅使用单次10秒、pH2.0的再生。捕获抗体是山羊多克隆抗PCT(Hytest,PPC3),信号抗体是单克隆抗PCT(Hytest,16B5)。

[0148] 5个循环的荧光信号总结在图11中,此图表明,与所述两个CRP捕获抗体相比较,荧光信号对于再循环方案具有不同的效果。经过5个循环,荧光信号显示轻微降低。

[0149] 为了处理每个循环荧光信号的降低,为每个循环建立标准曲线,并根据循环特异性标准曲线计算每个循环中分析物的定量。在5个循环中测试测定缓冲液中5.0ng/mL的PCT样品,并根据循环特异性标准曲线定量,从而确定再现性。所述结果表明平均值为4.8ng/mL,标准差为0.4mg/mL, CV为9%。

[0150] 尽管在每个循环荧光信号降低,通过运行针对每个循环的校准曲线来实现一致的定量。

[0151] 现在以如此全面、清晰、简明和准确的术语对于本发明、和制作及使用本发明的方式和过程进行说明,以使本发明所属领域的任何技术人员能够制造和使用它。应当理解,前述内容描述了本发明的优选实施方式,并且,如权利要求书所列出的在不超出本发明范围的情况下可以对其进行修改。特别指出并明确声明所述主题应看作本发明,以下权利要求书是本说明书的结论。

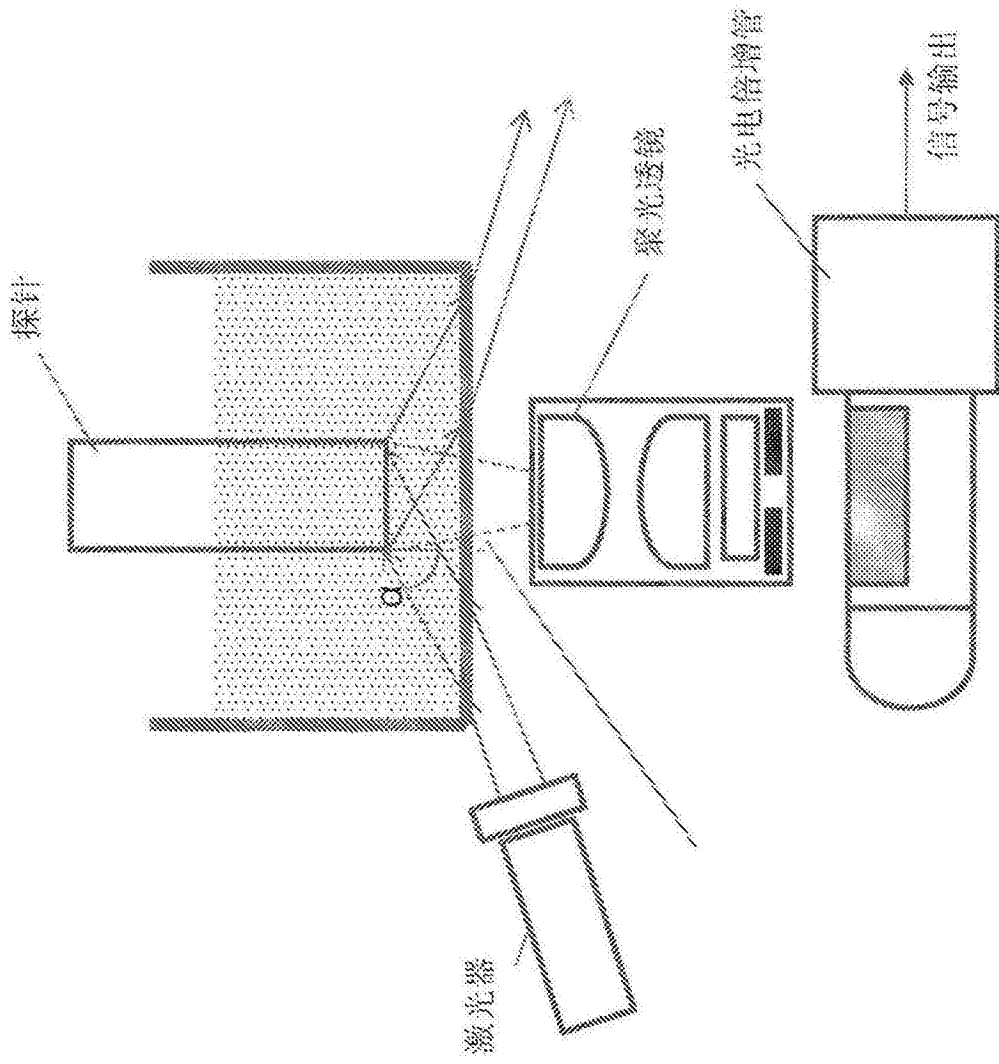


图1

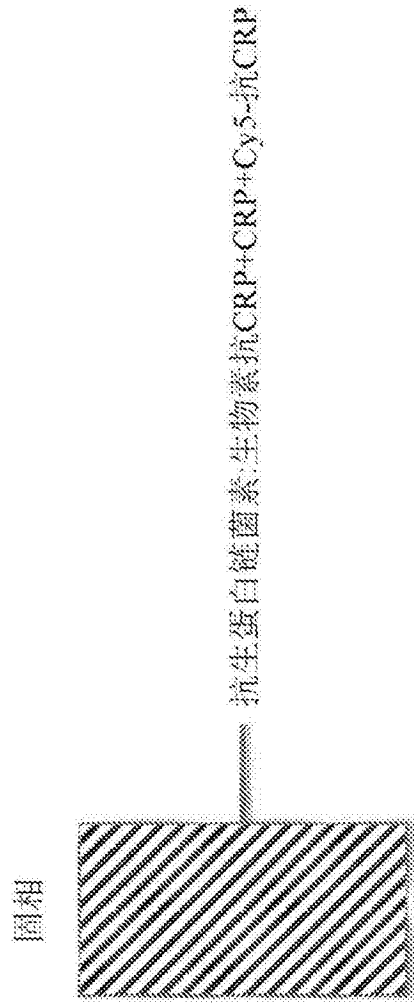


图2

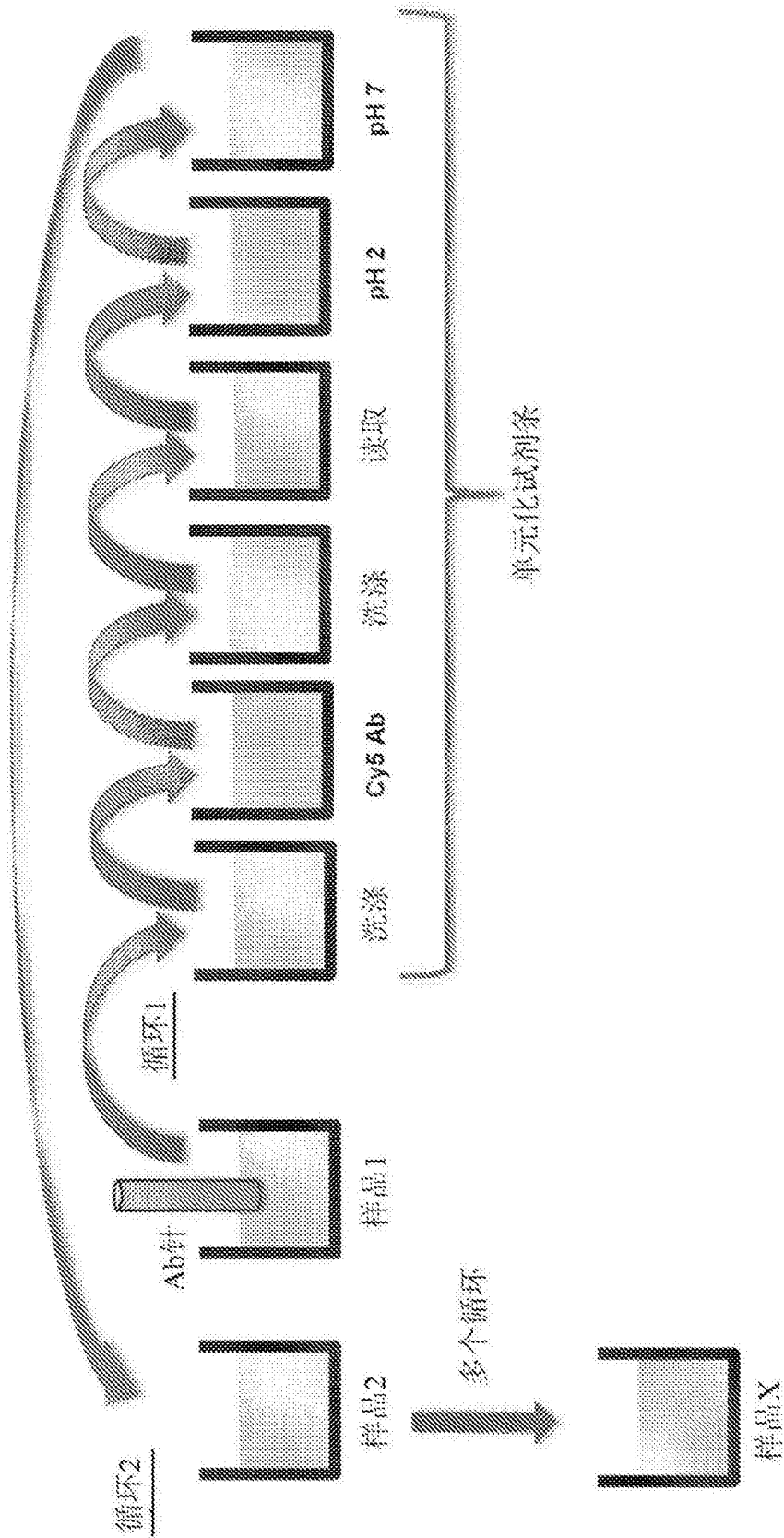


图3

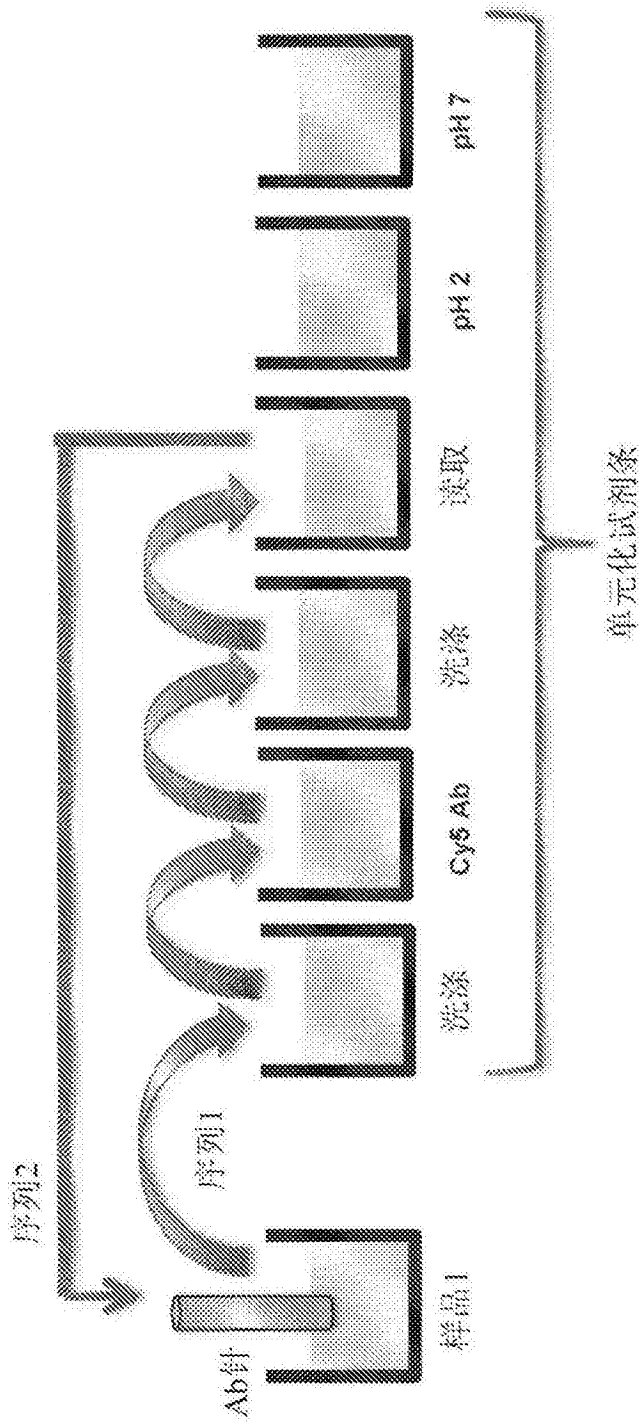


图4

序列1

- 样品孵育：7秒钟，0 rpm
- CRP定量范围：30-300 mg/L

序列2

- 样品孵育：15秒钟，1200rpm
- CRP定量范围：0-30 mg/L

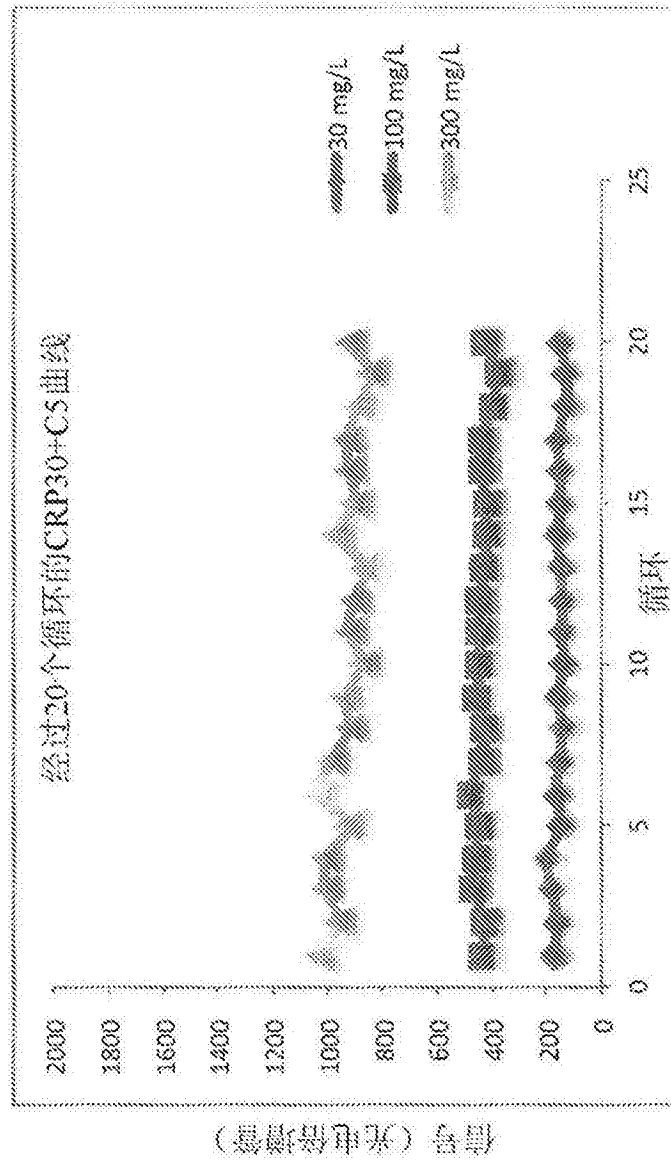


图5

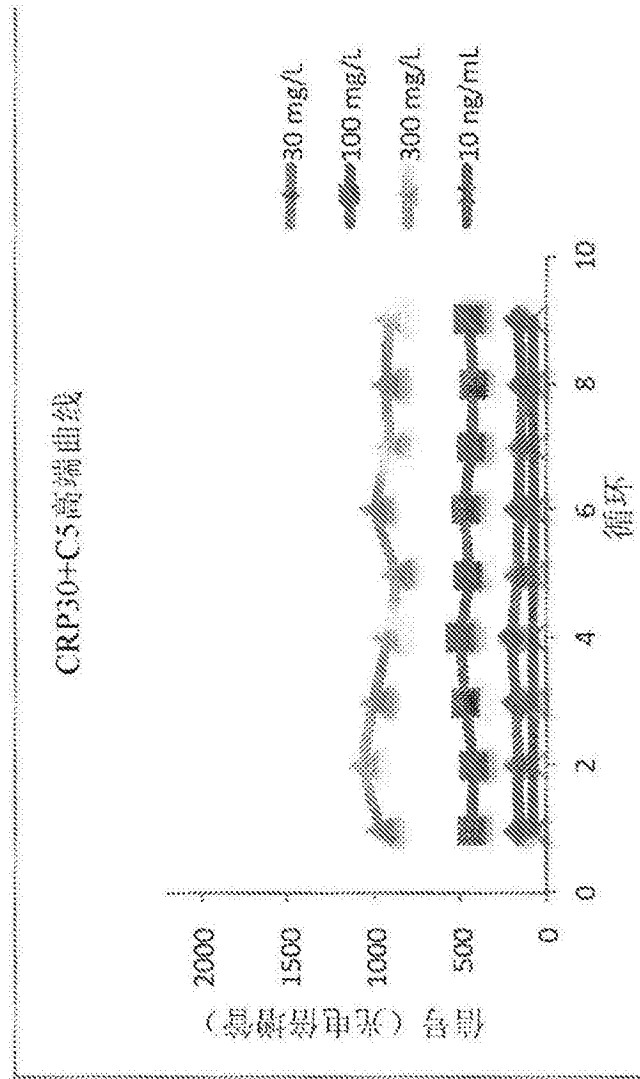


图6

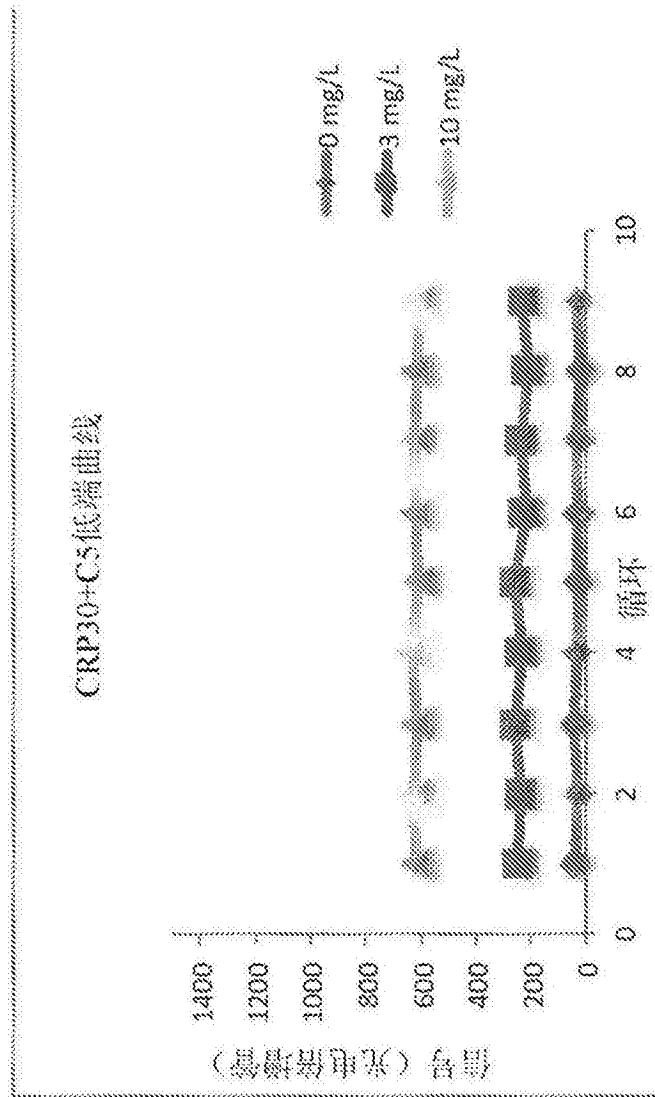


图7

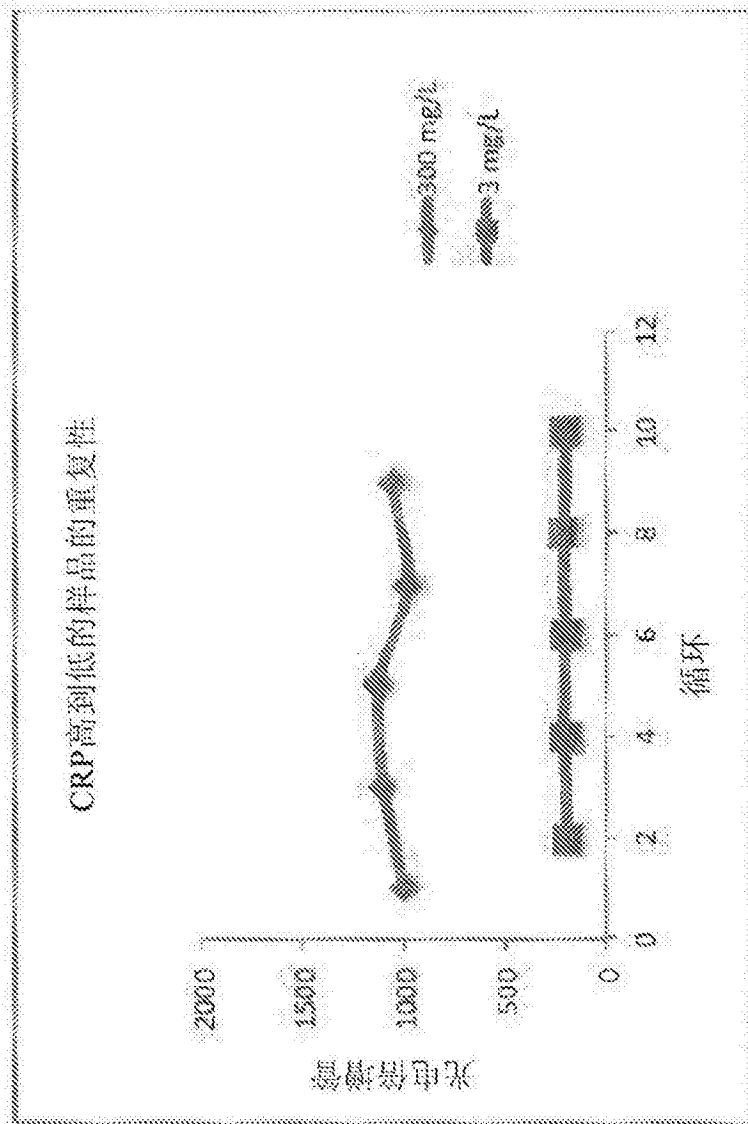


图8

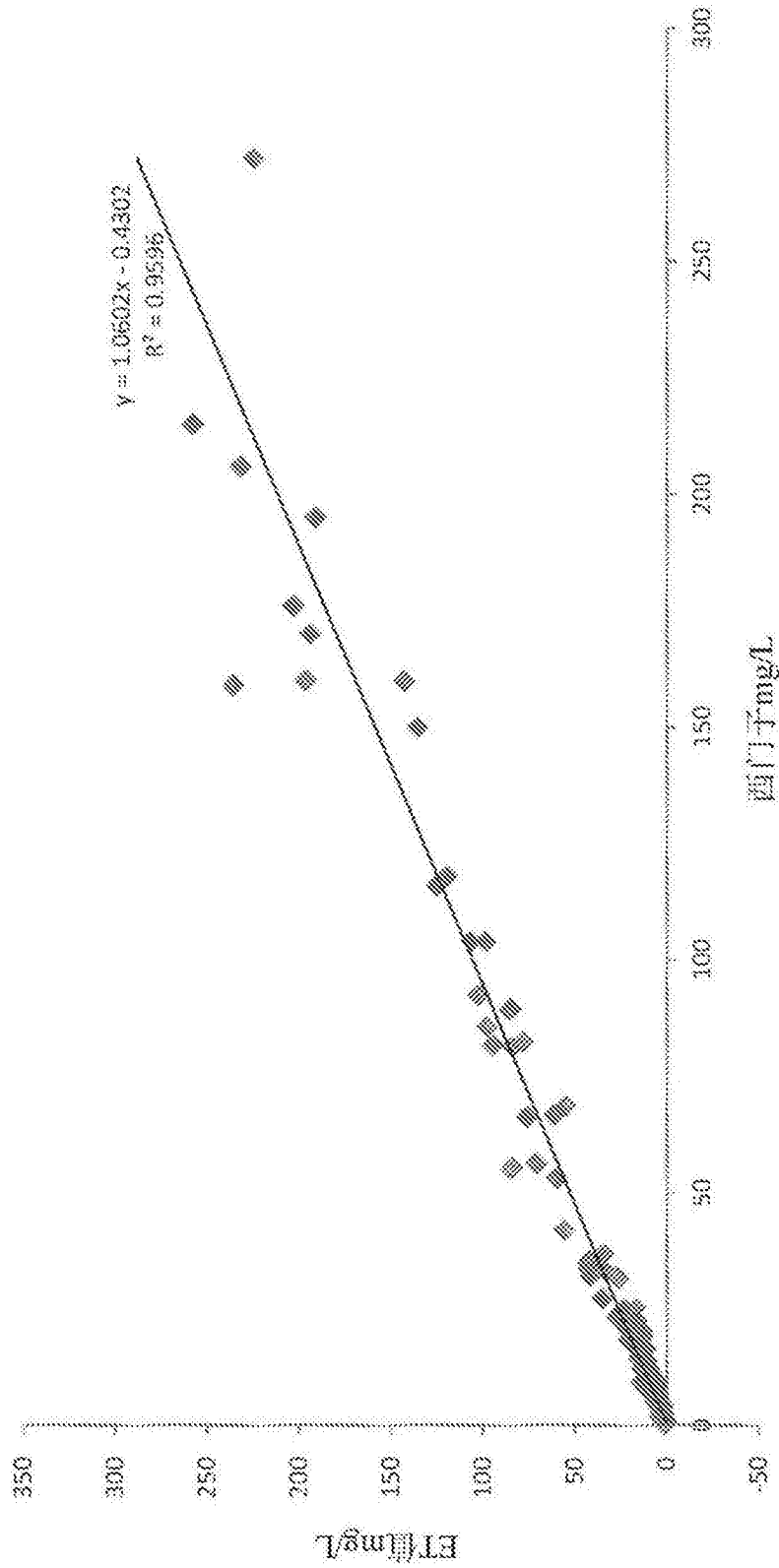


图9

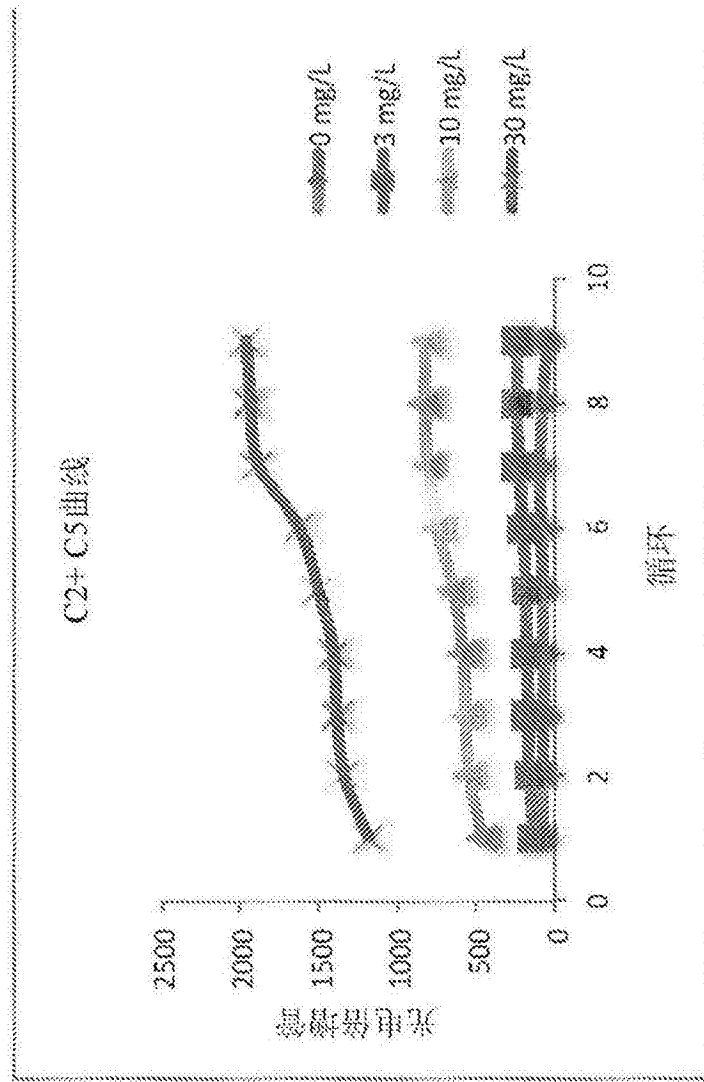


图10

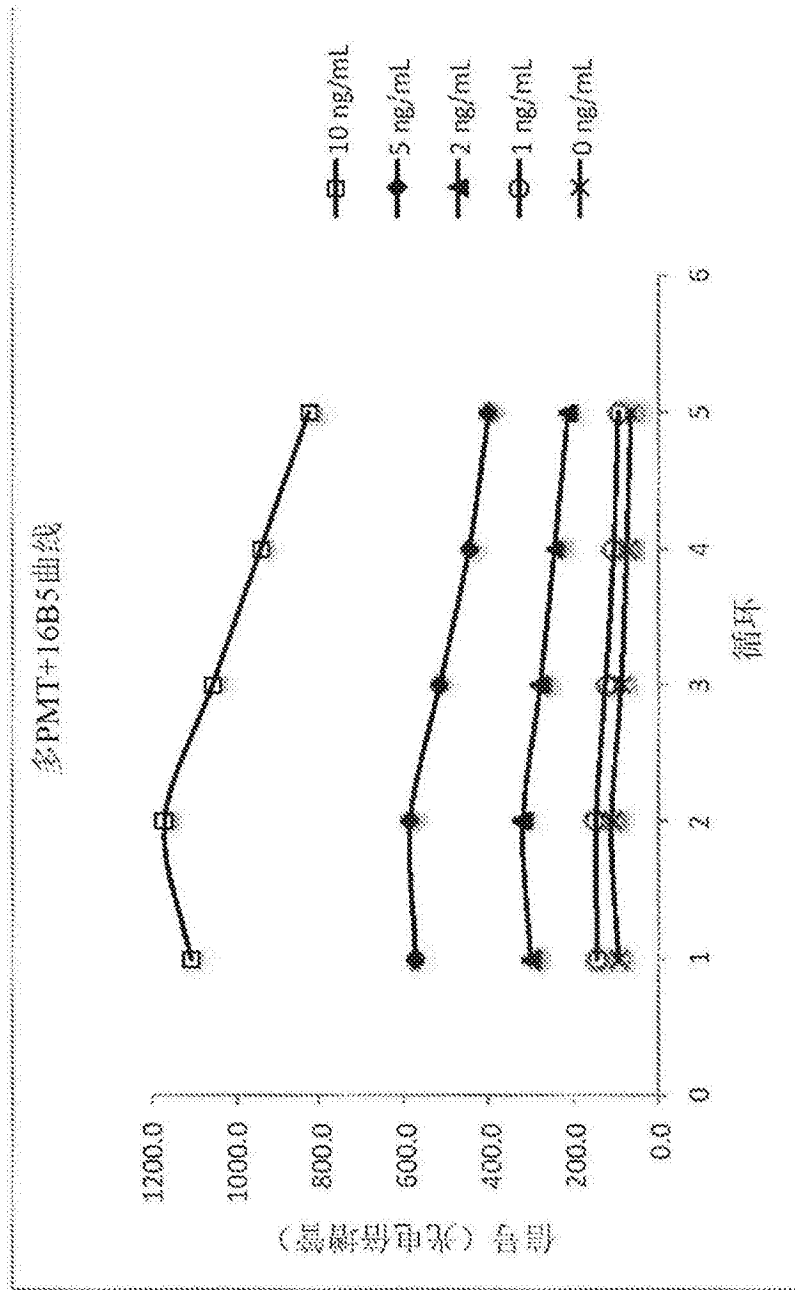


图11

专利名称(译)	在免疫测定中重复使用测试探针和试剂的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107533052A</a>	公开(公告)日	2018-01-02
申请号	CN201680027104.9	申请日	2016-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	万迈医疗仪器有限公司		
申请(专利权)人(译)	万迈医疗仪器有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	万迈医疗仪器有限公司		
[标]发明人	罗伯特F祖克 夏青		
发明人	罗伯特·F·祖克 夏青		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/536 G01N33/54386 G01N33/54393 G01N2333/4737		
代理人(译)	葛强		
优先权	62/159919 2015-05-11 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫测定方法，所述方法重复使用抗体固定化测试探针和试剂，以用于定量不同样品中的分析物，使用次数约3至20次，同时保持可接受的临床测定性能。所述方法在每个反应循环完成后重新生成测试探针。本发明还涉及一种用于免疫测定试验的单元化盒(条)。每个单元化盒含有所有必需的试剂，可用于3至20个循环，以测量3至20个不同的样品。

