



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110023756 A

(43)申请公布日 2019.07.16

(21)申请号 201780064574.7

(22)申请日 2017.10.27

(30)优先权数据

62/415,247 2016.10.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/058878 2017.10.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/081646 EN 2018.05.03

(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 方挺

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

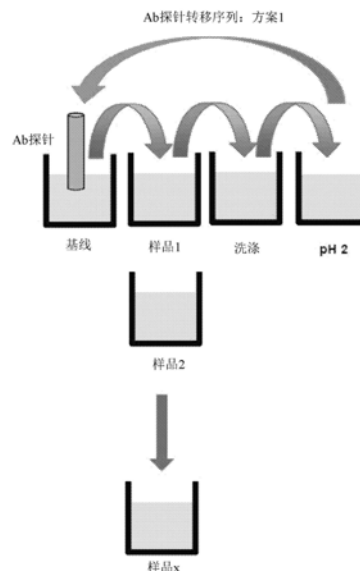
权利要求书2页 说明书9页 附图7页

## (54)发明名称

基于干涉测量在免疫测定中重复使用测试探针和试剂的方法

## (57)摘要

本发明涉及一种使用干涉检测系统的免疫测定方法。所述测定重复使用抗体固定的测试探针和试剂对不同样品中的分析物进行定量,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用酸性溶液再生所述测试探针。本发明还涉及用于免疫测定测试的组合筒(条带)。每个组合筒含有所有必需的试剂,并且可用于3-20个循环来测量3-20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,其包含以下步骤:

(a) 获得探针,其具有针对固定在所述探针尖端上的所述分析物的抗体,其中尖端表面的直径 $\leq 5\text{mm}$ ;

(b) 将所述探针浸入包含pH为6.0-8.5的水溶液的基线容器中持续第一段时间,以确定所述探针尖端的基线干涉测量图案;

(c) 将所述探针尖端浸入含有具有所述分析物的液体样品的样品容器中持续第二段时间,以确定在所述探针尖端处形成的免疫复合物的第二干涉测量图案;

(d) 通过测量所述第二干涉测量图案和所述基线干涉测量图案之间的所述干涉测量相移,并针对校准曲线定量所述相移来确定所述样品中的所述分析物浓度;

(e) 将所述探针尖端浸入pH约1.0-4.0的酸性溶液中以从所述探针尖端洗脱所述免疫复合物;和

(f) 在第二循环中在第二样品容器中用第二液体样品重复步骤(b)-(e),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(d)中的所述校准曲线对于所有量化循环都是相同的。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述分析物为C-反应蛋白(CRP),并且所述抗体为小鼠抗人CRP单株抗体CRP30。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(e)中的所述酸性溶液具有1.5-2.5的pH。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中在步骤(e)中,将所述探头尖端暴露在所述酸性溶液一次,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(e)中,将所述探头尖端暴露在2-5个循环的所述酸性溶液处理的脉冲处理中,然后在读取容器中中和10-20秒。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(b)-(e)重复3-20次。

8. 一种检测多个液体样品中的分析物的方法,其包含以下步骤:

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

(b) 将所述探针尖端浸入含有具有所述分析物的液体样品的样品容器中;

(c) 将所述探针尖端浸入含有缓冲液的洗涤容器中以洗涤所述探针;

(d) 将所述探针浸入包含pH为6.0-8.5的水溶液的基线容器中持续第一段时间,以确定所述探针尖端的基线干涉测量图案;

(e) 将所述探针浸入包含pH为6.0-8.5的第二抗体的试剂容器中持续第二段时间,以确定在所述探针尖端处形成的免疫复合物的第二干涉测量图案;

(f) 通过测量所述第二干涉测量图案和所述基线干涉测量图案之间的所述干涉测量相移,并针对校准曲线定量所述相移来确定所述样品中的所述分析物浓度;

(g) 将所述探针尖端浸入pH约1.0-4.0的酸性溶液中以从所述探针尖端洗脱免疫复合物;和

(h) 在第二循环中在第二样品容器中用第二液体样品重复步骤(b)-(g),由此检测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(f)中的所述校准曲线对于所有量化循环都是相同的。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述分析物为CRP,并且所述第一抗体为小鼠抗人CRP单株抗体CRP30。

11. 根据权利要求8所述的方法,其中步骤(g)中的所述酸性溶液具有1.5-2.5的pH。

12. 根据权利要求8所述的方法,其中在步骤(g)中,将所述探头尖端暴露在所述酸性溶液一次,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(g)中,将所述探头尖端暴露在2-5个循环的所述酸性溶液处理的脉冲处理中,然后在读取容器中中和10-20秒。

14. 根据权利要求8所述的方法,其中步骤(b)-(g)重复3-20次。

## 基于干涉测量在免疫测定中重复使用测试探针和试剂的方法

### 发明领域

[0001] 本发明涉及一种在薄膜干涉测量检测系统中重复使用免疫测定测试探针约3至20次的方法。

### 背景技术

[0002] 成本控制为全球医疗保健提供商的主要目标。体外诊断 (IVD) 也不例外,其中生物标志物在诊断和预后中的临床效用已成为患者管理的标准。免疫测定技术在IVD行业中占很大比例并且正在稳步增长,在美国约为3%/年,且在发展中国家为15-20%/年。在某些情况下,例如在诊断心肌梗塞时心脏标志物的连续测量,成本可能限制适当的测试量。

### 附图说明

[0003] 图1显示包括透镜的生物传感器干涉仪。

[0004] 图2示出了由薄膜干涉仪检测的结合测定的典型干涉图案。

[0005] 图3A示出了包括耦合毂的生物传感器干涉仪。图3B显示插入耦合毂的探针。

[0006] 图4示出了第一测定方案。Ab=抗体。样品含有抗原分析物。

[0007] 图5示出了第二测定(夹心形式)方案,其中C-反应蛋白(CRP)为分析物。探针用第一抗CRP抗体固定,并且试剂容器含有第二抗CRP抗体。

[0008] 图6A显示当抗CRP抗体CRP 30用作捕获抗体时,循环1至循环10的波长相移(nm)。结果显示循环1至循环10的波长相移一致。图6B显示当抗CRP抗体C7用作捕获抗体时,循环1至循环9的波长相移(nm)。结果显示,波长相移从循环1显著下降到循环9。

[0009] 图7显示当抗CRP抗体CRP 30用作捕获抗体,并且抗CRP抗体C5用作信号抗体时,循环1至循环10的波长相移(nm)的结果。结果显示循环1至循环10的波长相移一致。

### 具体实施方式

[0010] 定义

[0011] 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理解的通常含义来解释,除了并且如下文所阐述的定义。

[0012] 如本文所用,“约”是指在所述值的 $\pm 10\%$ 内。

[0013] 如本文所用,“分析物结合”分子是指能够参与与分析物分子的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,以用于检测特异性针对其抗原的抗体的存在;(ii) 抗体分子,以用于检测抗原的存在;(iii) 蛋白质分子,以用于检测其蛋白质的结合伴侣的存在;(iv) 配体,以用于检测结合伴侣的存在;或(v) 单链核酸分子,以检测核酸结合分子的存在。

[0014] 形状的“纵横比”是指其较长尺寸与较短尺寸的比率。

[0015] “结合分子”是指能够结合所关注的另一种分子的分子。

[0016] 如本文所,“套圈”是指将波导限制或保持为连接器组件的一部分的刚性管。

[0017] 如本文所用,“固定”是指被固定到固体表面上的试剂。当试剂固定在固体表面上时,其被非共价结合或共价结合到表面上。

[0018] 如本文所用,“单块衬底”是指单一块固体材料,如具有一个折射率的玻璃、石英或塑料。

[0019] 如本文所用,“探针”是指在传感面涂有分析物结合分子的薄膜层的衬底。探针具有远端和近端。近端(也指本申请案中的探针尖端)具有涂有分析物结合分子的薄层的传感表面。

[0020] 如本文所用,“波导”是指设计成限制和引导电磁波传播(作为光)的装置(作为管道、同轴电缆或光纤);例如,波导管为用于引导超高频波的金属管。

[0021] 如本文所用,“波导连接器”是指用于光学连接波导系统的可分离配合部分的机械装置。其也被称为波导耦合器。

[0022] 本发明公开了一种方法,其基于干涉测量在免疫测定中重复使用免疫测定测试探针和试剂约3至20次,同时保持可接受的临床测定性能。免疫测定测试探针和试剂可以包含在一个测试条带或一个滤筒中。本发明重复使用测试探针和试剂,并且在每个测试的基础上节省了成本。

[0023] 实施本发明有几个关键要素。第一,本发明通过使用低pH变性试剂再生测试探针,所述低pH变性试剂解离与固定在固相上的抗体结合的免疫复合物,但不使与固相结合抗体变性或解离至影响测定性能的程度。变性步骤调节固相抗体用于随后与其它含抗原样品的结合步骤。第二,探针尖端具有小尺寸(直径 $\leq 5\text{mm}$ ),因此试剂消耗可忽略不计,并且在测定循环期间不需要补充试剂。第三,测定使用相同的测试探针和进行完整测定所需的相同试剂,这有利于多个测定循环而无需另外的试剂。

[0024] 干涉检测系统

[0025] 在一个实施例中,本发明使用如图1所示的干涉检测系统。图1示出了包括透镜16的生物传感器干涉仪10的实例。生物传感器干涉仪10包含光源11、检测器12、波导耦合器19、波导13和光学组件14。光学组件14包含波导的尖端(也称为波导尖端)15、透镜16、单块衬底17、薄膜层(干涉层)22和生物分子层21。薄膜层22可包括透明材料。薄膜层22具有传感表面24和反射表面23。生物分子层21在表面24处附接到薄膜层22。反射表面23在薄膜层22和单块衬底17之间。薄膜层22和生物分子层21之间的表面24也称为“传感表面”。

[0026] 从第一和第二反射表面23、28之间的边界反射的两个光信号26、27产生光谱干涉图案,如图2所示。当生物分子与薄膜层22的外周表面上的分析物分子结合以形成干涉层时,第二反射信号27的等效光路延伸。结果,光谱干涉图案从T0移位到T1,如图2所示。通过实时连续测量图案的相移,可以测量动态结合曲线作为移位量与时间的关系。分析物与固定在表面上的捕获分子的结合速率可用于计算分析物的浓度。因此,此相移的测量为薄膜干涉仪的检测原理。

[0027] 在一个实施例中,本发明使用如美国专利第8,597,578号中所述的干涉检测系统,其以全文引用的方式并入本文中,用于测量探针尖端的干涉图案。

[0028] 在一个实施例中,干涉检测系统包含如图3A所示的耦合毂。图3A显示基于薄膜干涉仪的生物传感器的简化图示。生物传感器包含光源11、光谱仪12、波导13、套圈41、耦合毂31、探针42和传感表面24。将探针的尖端和传感表面24浸入含有分析物结合分子的涂层溶

液中。图3B显示探针32插入模塑塑料31的中心孔中并产生结构33。

[0029] 在其它实施例中,在下面的美国专利第5,804,453号、第7,394,547号和第7,319,525号中所述的干涉检测系统可在本方法中使用。

[0030] 美国专利第5,804,453号公开了一种使用具有直接涂覆在与其结合的物质远端的试剂(捕获分子)的光纤来确定样品溶液中物质的浓度的方法。然后将远端浸入含有分析物的样品中。分析物与试剂层的结合产生干涉图案并由光谱仪检测。此专利中描述的干涉检测系统以引入的方式并入本文中。

[0031] 美国专利第7,394,547号公开了一种生物传感器,其中第一光学透明元件机械附接到光纤尖端,在其之间具有气隙,且然后将厚度大于50nm的第二光学元件作为干涉层附接到第一个元件的远端。生物层形成在第二光学元件的外周表面上。在干涉层和第一元件之间涂覆厚度在5-50nm之间并且折射率大于1.8的另加反射表面层。此专利中描述的干涉检测系统以引入的方式并入本文中。

[0032] 美国专利第7,319,525号公开了一种不同的配置,即光纤的一部分机械地附接到由一个或多个光纤组成的尖端连接器,其中一个或多个光纤具有在光纤部分的近端与尖端连接器之间的气隙。干涉层且然后生物层构建在光纤部分的远端表面上。此专利中描述的干涉检测系统以引入的方式并入本文中。

[0033] 干涉层(薄膜层)为涂覆在单块衬底的传感面上的透明材料。薄膜为薄的材料层,其厚度为几分之纳米(单层)至几微米。本发明的薄膜层通常具有至少50nm,且优选至少100nm的厚度。示例性厚度在约100-5,000nm之间,优选在400-1,000nm之间。薄膜层材料的折射率优选类似于第一反射表面的折射率,使得来自光学组件的下远端的反射主要产生自由分析物结合分子形成的层,而不是光学元件和分析物结合分子之间的界面。类似地,当分析物分子结合到光学组件的下层时,组件下端的光反射主要产生自由分析物结合分子和结合分析物形成的层,而不是界面区域。形成薄膜层的一种示例性材料为SiO<sub>2</sub>。薄膜层也可以由透明聚合物作为单块衬底(例如聚苯乙烯或聚乙烯)形成。

[0034] 生物分子(分析物结合分子)层的厚度设计成基于特异性硬件和光学组件来优化整体灵敏度。常规的固定化学物质以化学方式,例如共价使用,将一层分析物结合分子附接到光学元件的下表面。举例来说,各种双功能试剂,其含有用于化学附接到SiO<sub>2</sub>的硅氧烷基团,以及用于附接生物分子(例如蛋白质(例如抗原、抗体)或核酸)的羟基、胺、羧基或其它反应基团。众所周知,蚀刻或以其它方式处理玻璃表面以增加可以结合分析物结合分子的羟基密度。当薄膜层由聚合物如聚苯乙烯形成时,有多种方法可用于暴露可用的化学活性表面基团,例如胺、羟基和羧基。

[0035] 分析物结合层优选在光学元件的远端表面被密集涂覆的条件下形成,使得分析物分子与层的结合迫使层的厚度变化,而不是填充层。分析物结合层可以为单层或多层基质。

[0036] 分析物对光学组件的存在、浓度和/或结合速率的测量是通过来自光学组件中的两个反射表面的反射光束的干涉来进行的。具体地,当分析物分子附接到表面或从表面脱离时,第一反射层的平均厚度相应地改变。因为所有其它层的厚度保持相同,所以由两个表面反射的光波形成的干涉波根据分析物结合引起的厚度变化而相移。

[0037] 探针

[0038] 探针可为单块衬底或光纤。探针可为任何形状,如条形、圆柱形、圆形、正方形、三

角形等,其中长度与宽度的纵横比为至少5比1,优选10比1。因为在免疫测定期间将探针浸入样品溶液和一种或多种试剂溶液中,所以需要具有纵横比为至少5比1的长探针以使探针尖端浸入溶液中。可以在将长探针转移至不同反应室的情况下进行异质测定。避免了在测定期间分配和抽吸试剂和样品。在一个优选实施例中,探针尖端表面的直径 $\leq 5\text{mm}$ ,或 $\leq 2\text{mm}$ 。探针尖端的传感表面涂有分析物结合分子。

[0039] 将第一抗体固定到固相(探针尖端的传感表面)的方法在免疫化学中是常见的,并且涉及固相和抗体之间的共价、疏水或静电键的形成。第一抗体,也称为捕获抗体,因为其能够捕获分析物,可以直接固定在传感表面上。举例来说,通过吸附到固体表面上或通过与固体表面上涂覆的氨基硅烷共价结合可首先固定第一抗体。替代地,第一抗体可通过结合对间接固定在传感表面上。举例来说,第一抗体可通过已知技术(参见Wilchek和Bayer,(1988) Anal. Biochem. 171:1-32)标记有生物素,并且随后间接固定在涂有抗生蛋白链菌素的传感表面上。生物素和抗生蛋白链菌素为优选的结合对,因为其具有强结合亲和力,其在本方法的低pH(pH 1-4)再生步骤期间不会解离。当在免疫反应之后使探针传感表面再生以去除结合到传感表面上的免疫复合物时,固定在传感表面上的捕获抗体必须能够经受住变性条件。固定在传感表面上的捕获抗体不得失去大量活性或从固相中显著解离,因此免疫测定性能受到影响。

[0040] 通过再循环方案-第一实施例检测分析物

[0041] 本发明涉及一种在干涉测量检测系统中使用相同的测试探针和相同的测试试剂对不同样品通过免疫测定检测多个液体样品中的分析物的方法。

[0042] 在第一实施例中,捕获抗体固定在探针上,并且样品含有抗原分析物。

[0043] 第一方法包含以下步骤:(a)获得探针,其具有针对固定在探针尖端上的分析物的抗体,其中尖端表面的直径 $\leq 5\text{mm}$ ;(b)将探针浸入包含pH为6.0-8.5的水溶液的基线容器中第一段时间,以确定探针尖端的基线干涉测量图案;(c)将探针尖端浸入含有具有所述分析物的液体样品的样品容器中第二段时间,以确定在探针尖端处形成的免疫复合物的第二干涉测量图案;(d)通过测量第二干涉测量图案和基线干涉测量图案之间的干涉测量相移,并针对校准曲线定量相移来确定样品中的分析物浓度;(e)将探针尖端浸入pH约1.0-4.0的酸性溶液中以从探针尖端洗脱免疫复合物;和(f)在第二循环中在第二样品容器中用第二液体样品重复步骤(b)-(e),由此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使用相同的探针、相同的试剂溶液和相同的洗涤溶液。此第一实施例的测定方案如图4所示。

[0044] 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。尖端具有较小的表面积,其直径 $\leq 5\text{mm}$ ,优选 $\leq 2\text{mm}$ 或 $\leq 1\text{mm}$ 。探头尖端的小表面赋予其几个优点。在固相免疫测定中,具有小表面积是有利的,因为其具有较少的非特异性结合并因此产生较低的背景信号。此外,由于尖端的小表面积,在探针尖端上携带的试剂或样品非常小。此特征使得探针尖易于洗涤,并且由于洗涤溶液具有更大的体积而导致洗涤溶液中的污染可忽略不计。探针尖端的小表面积的另一方面为其具有小的结合能力。因此,当探针尖端浸入试剂溶液中时,试剂的结合不会消耗大量的试剂。试剂浓度实际上没有变化。洗涤溶液的可忽略的污染和试剂的少量消耗使得试剂和洗涤溶液可重复使用多次,例如3-20次。

[0045] 在步骤(b)中,将探针浸入包含pH为6.0-8.5的水溶液的基线容器(预读容器)中第

一段时间(例如,5秒至5分钟、10秒至2分钟,或30秒至1分钟),以确定探针尖端的基线干涉测量图案。基线容器(或预读容器)含有水溶液,例如水或pH为6.0-8.5的缓冲液。优选地,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在6.0-8.5之间的其它缓冲液,以在低pH再生后中和探针。在第一样品结合之前必须进行预读以建立用于第一循环反应的基线。在探针尖端再生之后和下一样品结合之前,还需要预读取以建立用于后续循环的基线。在通过低pH再生探针后的每个循环后,由于固定捕获由变性条件引起的抗体的结合特性的变化,预读基线干涉图案可以与前一循环的预读基线干涉图案相同或不同。

[0046] 在方法的步骤(c)中,将探针尖端浸入含有具有分析物的液体样品的样品容器(或样品室或样品孔)中第二段时间(例如,5秒至5分钟、10秒至2分钟,或30秒至1分钟),以确定在探针尖端处形成的免疫复合物的第二干涉测量图案。

[0047] 在步骤(d)中,通过确定第二干涉测量图案和基线干涉测量图案之间的干涉测量相移,并针对校准曲线定量波长相移以确定分析物浓度来定量样品中的分析物浓度。可以动态地监视相移,或者通过起始时间点(T0)和结束时间点(T1)之间的差来确定相移。

[0048] 校准曲线通常是根据的本领域技术人员众所周知的方法测定样品之前预先建立。在一个实施例中,相同样品的干涉图案在每个循环保持恒定,并且校准曲线对于每个循环是相同的。在另一个实施例中,相同样品的干涉图案在每个循环处改变,并且需要为每个循环建立循环特异性校准曲线。在干涉图案发生变化的这些情况下,样品针对循环特异性校准曲线进行定量,并且尽管不同循环的干涉图案发生变化,但定量结果仍显示一致。

[0049] 在步骤(d)之后,任选地在含有洗涤溶液的洗涤容器中洗涤探针1-5次,优选1-3次。洗涤溶液通常含有缓冲剂和任选的表面活性剂,例如吐温(Tween) 20。可能不需要此洗涤步骤,因为由于小的结合表面积,所以所携带的溶液的量最小。

[0050] 在步骤(e)中,将探针浸入含有低pH缓冲液的容器中以再生探针。通过使用变性条件使探针再生,所述变性条件在固相上解离与捕获抗体结合的免疫复合物,但不使捕获抗体从固相变性或解离至影响测定性能的程度。通常,pH约1至约4的酸或酸性缓冲液有效再生本发明的抗体探针。举例来说,可以使用盐酸、硫酸、硝酸、乙酸来再生探针。再生过程可以为单一酸性处理,然后中和。举例来说,单一pH 1-3,或pH 1.5-2.5(例如,pH 2)暴露范围为10秒至2分钟是有效的。再生过程也可以为“脉冲”再生步骤,其中探针暴露于短pH处理的2-5个循环(例如3个循环)(例如,10-20秒),然后在pH 6.5-8.0下中和(例如10-20秒)。

[0051] 探针再生后,在相同的探针和相同的试剂的情况下,在后续循环中用不同的样品重复步骤(b)-(e),进行1-10、1-20、1-25、3-20、5-20、5-25,或5-30次。

[0052] 当重复步骤(b)时,低pH处理探针在步骤(b)的预读基线容器中方便地中和。

[0053] 捕获抗体

[0054] 发明人已经发现,对于某些抗体,例如来自Hyttest(芬兰图尔库(Turku,Finland))的小鼠抗人CRP单株抗体CRP 30(IgG1同种型),当在本方法中用作捕获抗体时,使用相同探针和相同试剂,每次反应和再生循环后的干涉图案保持至少10个循环不变。因为捕获抗体抗CRP抗体CRP 30通过多个再生循环提供一致的干涉图案,所以这种效果使得能够使用单个校准曲线进行样品定量,从而提供方便性和高精度。

[0055] 发明人已经发现,对于一些抗体,例如来自HyTest的抗人CRP单株抗体C7,当在本

方法中用作捕获抗体时,每次反应和再生循环后的干涉图案发生改变。

[0056] 酸处理可改变探针的表面的蛋白质,以引起捕获抗体结合能力的改变。尽管在每个循环中基线干涉图案发生变化,但在这种情况下可以通过循环特异性校准获得分析物浓度的一致量化;即,在反应的每个循环完成时的干涉图案,由基线干涉图案进行调整之后,针对包括在系统中的循环特异性校正曲线进行定量。

[0057] 虽然循环特异性校准曲线可以解决某些捕获抗体在低pH条件下再生探针后干涉图案的变化,但在低pH条件下再生探针后,使用一种不改变干涉图案的捕获抗体是有利的。与临床实验室中使用的大多数定量免疫测定一样,CRP具有一组确定的性能参数,必须满足这些参数才能具有临床效用。最小检测限、分析范围和精确度为此类性能参数的实例。使用CRP 30抗体,可以建立测定条件,并且在使用单个校准的多次再循环期间保持不变,同时保持其测定性能参数。通过低pH再生后捕获产生可变信号的抗体需要循环特异性校准;此外,测定参数难以维持。由于循环特异性校准引入了另外变量,因此循环之间的不精确性更大。这是一个缺点,因为临床测定需要高精度,其变异系数(CV) < 10%。在低pH处理后失去活性并产生递减波长相移的抗体通常难以保持精确度、最小检测限和由于信号减少引起的分析范围。

[0058] 通过再循环方案-夹心形式检测分析物

[0059] 在第二实施例(夹心形式)中,捕获抗体被固定在探针上,样品含有的抗原分析物,并且干涉图案移位由第二抗体的结合之后确定。图5中示出了本发明第二实施例的测定方案。

[0060] 夹心方法包含以下步骤:(a)获得探针,其具有固定在探针尖端上的第一抗体,其中尖端表面的直径 $\leq 5\text{mm}$ ;(b)将探针尖端浸入含有具有分析物的液体样品的样品容器中;(c)将探针尖端浸入含有缓冲液的洗涤容器中以洗涤所述探针;(d)将探针浸入包含pH为6.0-8.5的水溶液的基线容器中第一段时间,以确定探针尖端的基线干涉测量图案;(e)将探针浸入包含pH为6.0-8.5的第二抗体的试剂容器中第二段时间,以确定在探针尖端处形成的免疫复合物的第二干涉测量图案;(f)通过测量第二干涉测量图案和基线干涉测量图案之间的干涉测量相移,并针对校准曲线定量相移来确定样品中的分析物浓度;(g)将探针尖端浸入pH约1.0-4.0的酸性溶液中以从探针尖端洗脱免疫复合物;和(h)在第二循环中在第二样品容器用第二液体样品重复步骤(b)-(g),由此检测多个液体样品中的分析物。本发明第二实施例的参数与本发明第一实施例相似或相同。

[0061] 夹心形式测定方案具有相较于第一实施例的通过第二抗体的另外结合步骤。然而,其具有解决样品中由非分析物材料引起的非特异性结合的优点。

[0062] 在干涉测量测定中,任何与传感表面结合并改变生物分子层厚度的材料都会产生干涉测量信号的变化。血液样品通常含有如白蛋白、类风湿因子、嗜异性抗体和脂质组分,其为已知的结合非特异性抗体涂覆的固相。在干涉测量测定中,这将产生干涉免疫测定的非特异性信号。这一问题因血液样品的不同而进一步手袋挑战,导致非特异性效应的变化。

[0063] 本发明的夹心形式方案可以最小化由血液组分引起的非特异性结合效应。在此形式中,将抗体涂覆的探针浸入含分析物的血液样品中,然后依次洗涤以去除血液,并且然后浸入第二抗体试剂中。洗涤去除非特异性结合的材料。洗涤后读取基线,并且然后通过干涉图案检测第二抗体与探针上的免疫复合物的结合。

[0064] 组合免疫测定条带

[0065] 本发明还涉及一种用于免疫测定测试的滤筒(条带)。此组合筒可用于2-20或3-20个循环以测量2-20或3-20个不同的样品。所述滤筒包含:(a)包含探针的探针孔,其中探针具有涂有第一抗体的底部尖端,(b)基线孔(或预读孔),以建立基线干涉图案,(c)样品孔,以接收样品,(d)低pH孔,以提供1-4的pH,(e)任选的试剂孔;和(f)一个或多个洗涤孔,每个洗涤孔含有洗涤溶液。

[0066] 样品孔为接收含有分析物的样品的孔。样品孔可以为空白孔,或其可以含有洗涤剂、封闭剂和用于免疫测定的各种添加剂,其可以为干燥形式或湿(液体)形式。

[0067] 试剂孔含有试剂,如抗体,其可与分析物反应形成免疫复合物。试剂可以为湿形式或干燥形式。湿形式含有在测定缓冲液中的试剂。湿形式通常为小液体体积(<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、曲拉通(Triton))。测定缓冲液的实例为磷酸盐缓冲盐水, pH 7.4, 5mg/ml牛血清白蛋白, 0.05%吐温20。测定缓冲液任选地含有1-500 $\mu$ g/mL的封闭剂。最终调配物将根据每种分析物测定的要求而变化。干燥形式为测定缓冲液中试剂的干燥形式。干燥形式包括冻干饼、粉末、片剂或诊断试剂盒中典型的其它形式。干燥形式通过重构缓冲液或洗涤缓冲液重构成湿形式。

[0068] 滤筒任选地包含一个或多个洗涤孔,每个洗涤孔都含有水溶液。洗涤孔含有洗涤缓冲液,以在样品孔和试剂孔中结合步骤后洗涤探针。在每个结合步骤后,一至四个洗涤孔(例如,1、2、3或4个孔)专用于洗涤。洗涤缓冲液含有洗涤剂。通常用于免疫测定的任何洗涤剂(例如,吐温、曲拉通均可用于本发明)。

[0069] 试剂孔和洗涤孔的开口用箔或膜密封。密封件为可穿透的。可以通过手动或自动装置刺穿密封来打开孔。

[0070] 通过以下实例进一步说明本发明,所述实例并不视为将本发明的范围限制于其中所述的特定过程。

[0071] 实例

[0072] 实例1. 制备抗生蛋白链菌素涂覆的探针

[0073] 制备氨基丙基丙硅烷涂覆的探针

[0074] 玻璃棒(单块衬底)直径为1mm,并且长度为2cm,耦合端和传感端都经过抛光。传感端为首先使用物理气相沉积技术涂有厚度为650nm的SiO<sub>2</sub>涂层(薄膜层),并且然后使用化学气相沉积法(Yield Engineering Systems, 1224P)沉积氨基丙基硅烷(APS),其遵循制造商的方案。沉积APS以使蛋白质固定。APS通过疏水和离子相互作用的组合将蛋白质吸附到探针表面。APS仅为单层,厚度约7nm。

[0075] 制备交联抗生蛋白链菌素

[0076] 以下列方式制备交联抗生蛋白链菌素(SA)。将10mg抗生蛋白链菌素单体(斯克利普斯实验室(Scripps Labs))以10mg/ml溶解在含有150mM NaCl, pH 7.2(PBS)的100mM磷酸钠缓冲剂中,其用10M过量的双功能试剂N-琥珀酰亚胺基-A-乙酰硫代乙酸酯(SATA)衍生,在二甲基甲酰胺(DMF)中以40mg/ml溶解2小时。同时,将10mg抗生蛋白链菌素以10mg/ml溶解在PBS中,其用10M过量的双功能试剂磺基丁二酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸盐(磺酸基-SMCC)衍生,在水中以40mg/ml溶解1小时。使用10mL交联的葡聚糖脱

盐柱纯化样品以去除过量的双功能试剂。将纯化的样品以相等摩尔比组合并在真空下脱气。确定组合的体积,并且然后添加预先在真空下脱气的1M量的盐酸羟胺,使得样品中盐酸羟胺的最终浓度为50mM。盐酸羟胺的添加使SATA改性蛋白上的乙酰化硫氢基解封,产生游离的硫氢基以与磺酸基-SMCC改性蛋白上的马来酰亚胺基团反应。反应在室温下进行1小时30分钟。将过量的马来酰亚胺基团用 $\beta$ -巯基乙醇封端15分钟。将过量的巯基用N-乙基马来酰亚胺封端15分钟。然后将样品针对5L PBS透析。然后将交联的SA在S-300柱中纯化。

[0077] 制备抗生蛋白链菌素涂覆的探针

[0078] 在回旋振荡(1000rpm)下将APS探针浸入交联的SA(100 $\mu$ g/mL PBS)10分钟;然后将探针在PBS中洗涤15秒三次。然后将探针浸入15%蔗糖溶液中,然后在常规烘箱中在37 $^{\circ}$ C下干燥30分钟。

[0079] 实例2.制备抗CRP抗体涂覆的探针

[0080] 通过标准方法将抗CRP抗体生物素化。

[0081] 将实例1的抗生蛋白链菌素涂覆的探针浸入生物素化抗CRP(Hytest CRP30)或生物素化抗CRP(Hytest C7)的10 $\mu$ g/ml溶液中10分钟,然后浸入10%蔗糖中30秒随后在30 $^{\circ}$ C下干燥1小时且然后在干燥条件下储存。

[0082] 实例3.CRP测定,方案1(图4)

[0083] 1.)将抗CRP涂覆的探针浸入缓冲液中30秒以建立基线干涉测量相移信号。

[0084] 2.)将探针浸入CRP样品中,并在60秒处对来自T0的干涉测量相移信号的干涉测量进行测量。

[0085] 3.)在缓冲液中洗涤探针10秒(任选)

[0086] 4.)将探针浸入pH 2缓冲液中15秒

[0087] 5.)用探针重复步骤1-4,在步骤2中使用新的CRP样品,对步骤1、3&4使用相同的试剂。再循环探针和试剂可进行20次。

[0088] 实例4.CRP测定,方案1,将CRP 30和C7作为捕获抗CRP抗体进行比较

[0089] 含有10mg/L CRP的缓冲液(PBS)使用两种不同的抗CRP涂覆的探针(CRP30或C7),按照实例3的过程对波长相移10个循环进行测试。

[0090] 图6A显示当抗CRP抗体CRP 30用作捕获抗体时,从循环1至循环10的波长相移(nm)。结果显示循环1至循环10的波长相移一致。

[0091] 图6B显示当抗CRP抗体C7用作捕获抗体时,从循环1至循环9的波长相移(nm)。结果显示波长相移从循环1显著下降到循环9。

[0092] 实例5:CRP测定,夹心形式,使用抗CRP CRP 30作为捕获抗体且抗CRP C5作为信号抗体

[0093] 1.)在PBS,pH 7.4中预洗涤抗CRP涂覆的探针10秒

[0094] 2.)将抗CRP涂覆的探针浸入含有20mg/L CRP的样品中,并以500rpm孵育3分钟

[0095] 3.)在PBS中洗涤探针,3次,10秒,500rpm

[0096] 4.)将探针浸入缓冲液中30秒以读取基线相移干涉信号

[0097] 5.)将探针转移至抗CRP C5抗体(20mg/L),500rpm,并监测相移干涉信号3分钟,并从T0读取3分钟处的波长相移(nm)。

[0098] 6.)在PBS中洗涤三次,10秒,500rpm

[0099] 7.) 将探针浸入再生缓冲液 (10mM甘氨酸, pH 2) 中, 10秒, 500rpm

[0100] 8.) 在PBS中洗涤探针, 10秒, 500rpm

[0101] 9.) 重复6和7两次

[0102] 10.) 返回2, 进行后续的CRP循环

[0103] 整个过程在室温下进行。

[0104] 图7显示当抗CRP抗体CRP 30用作捕获抗体和抗CRP抗体C5用作信号抗体时, 从循环1至循环10的波长相移 (nm) 的结果。结果显示循环1至循环10的波长相移一致。

[0105] 本发明和制造和使用其的方式和方法现描述于这些完全、清楚、简洁和精确术语中, 以便使其涉及的本领域的技术人员制造并且使用其。应该理解, 前文描述了本发明的优选实施例, 并且可以在不脱离权利要求所述的本发明的范围的情况下进行修改。为特别指出并且清楚地要求视为本发明的主题, 以下权利要求书总结本说明书。

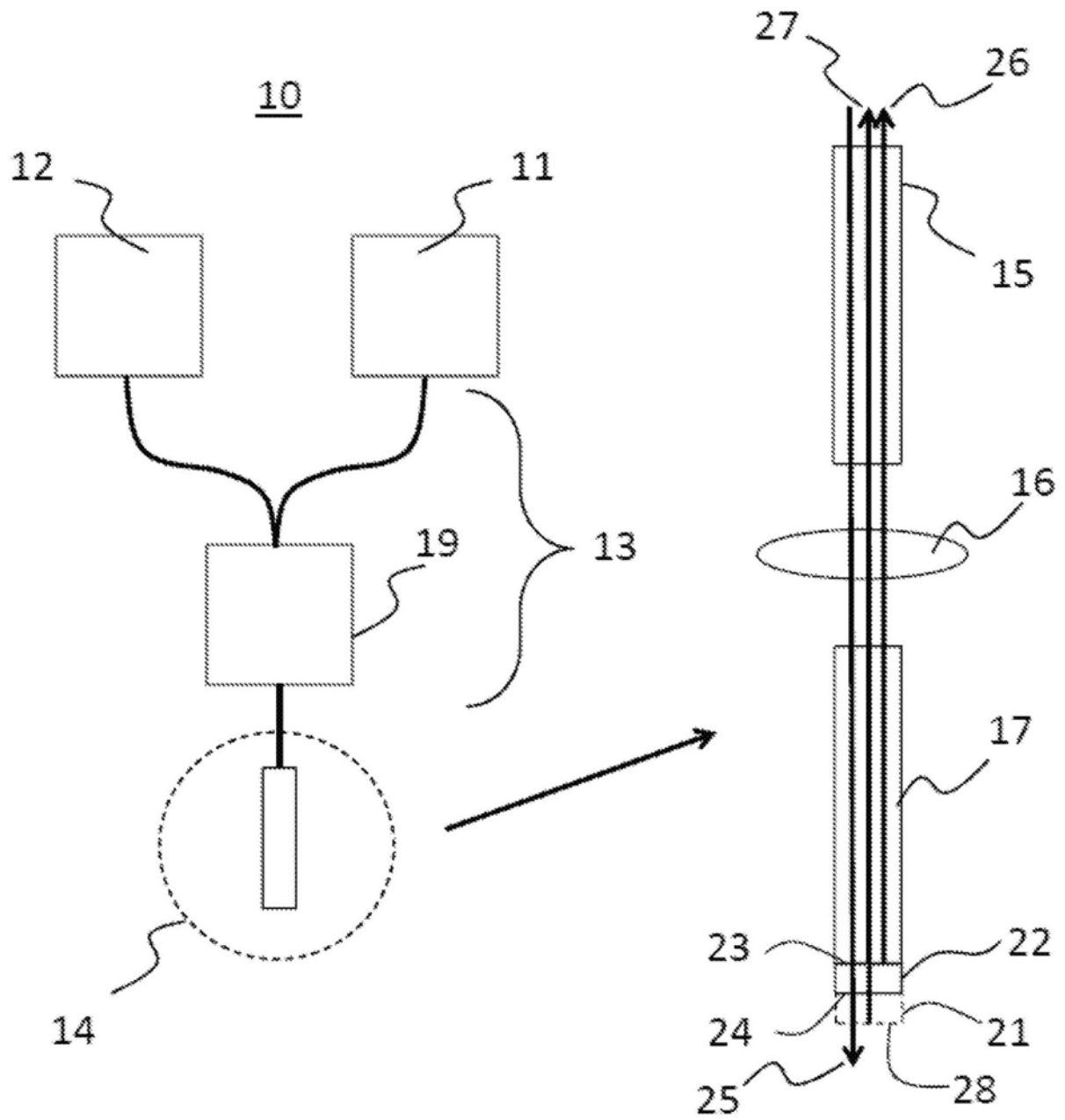


图1

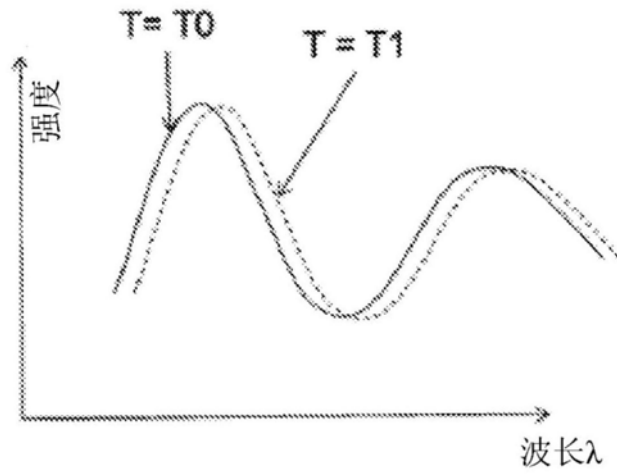


图2

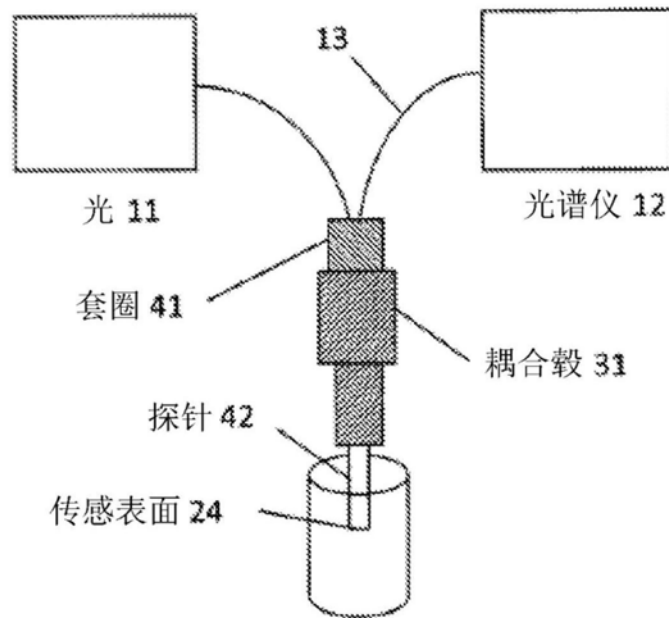


图3A



图3B

Ab探针转移序列：方案1

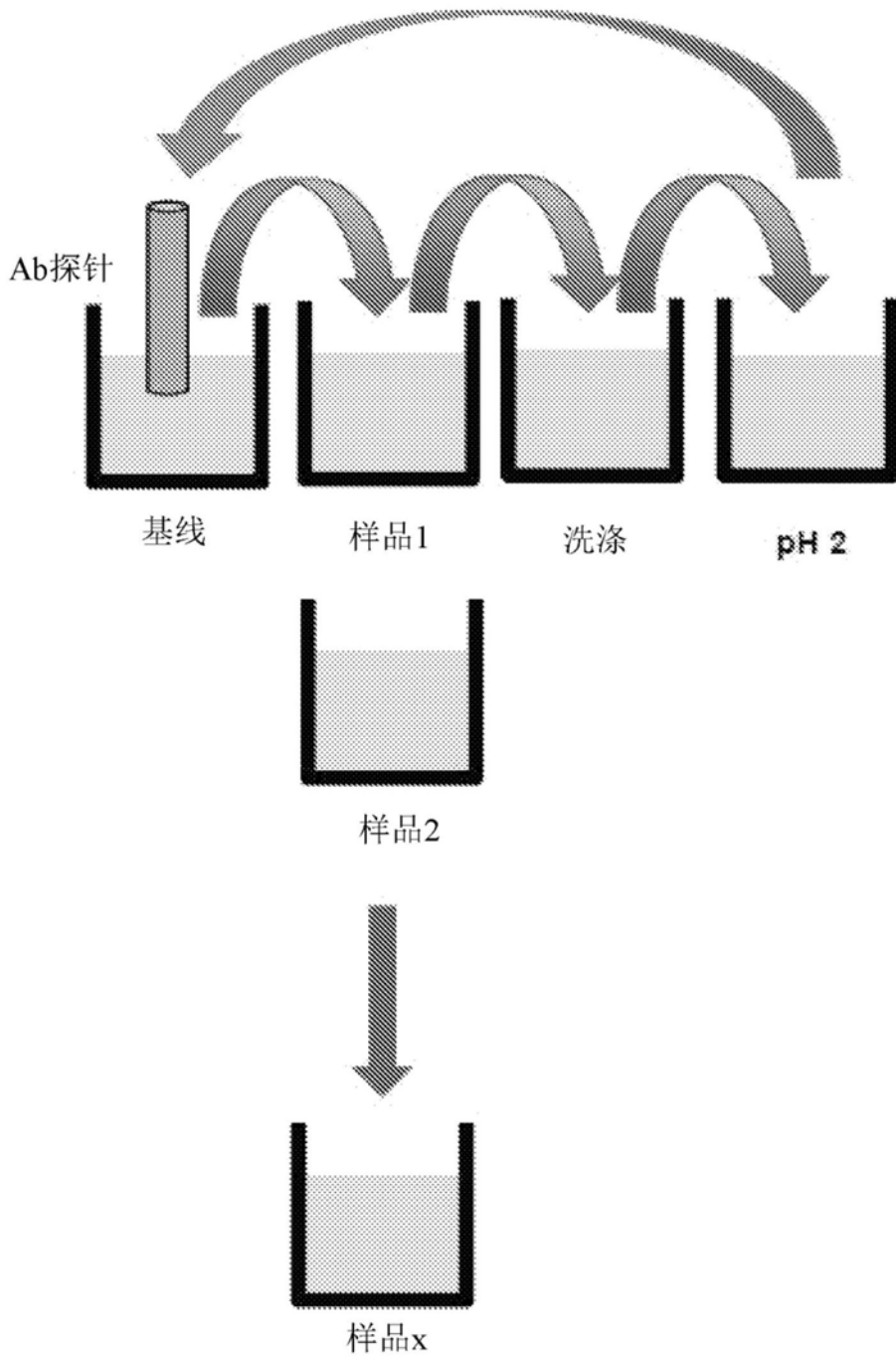


图4

Ab探针转移序列：方案2

夹心形式

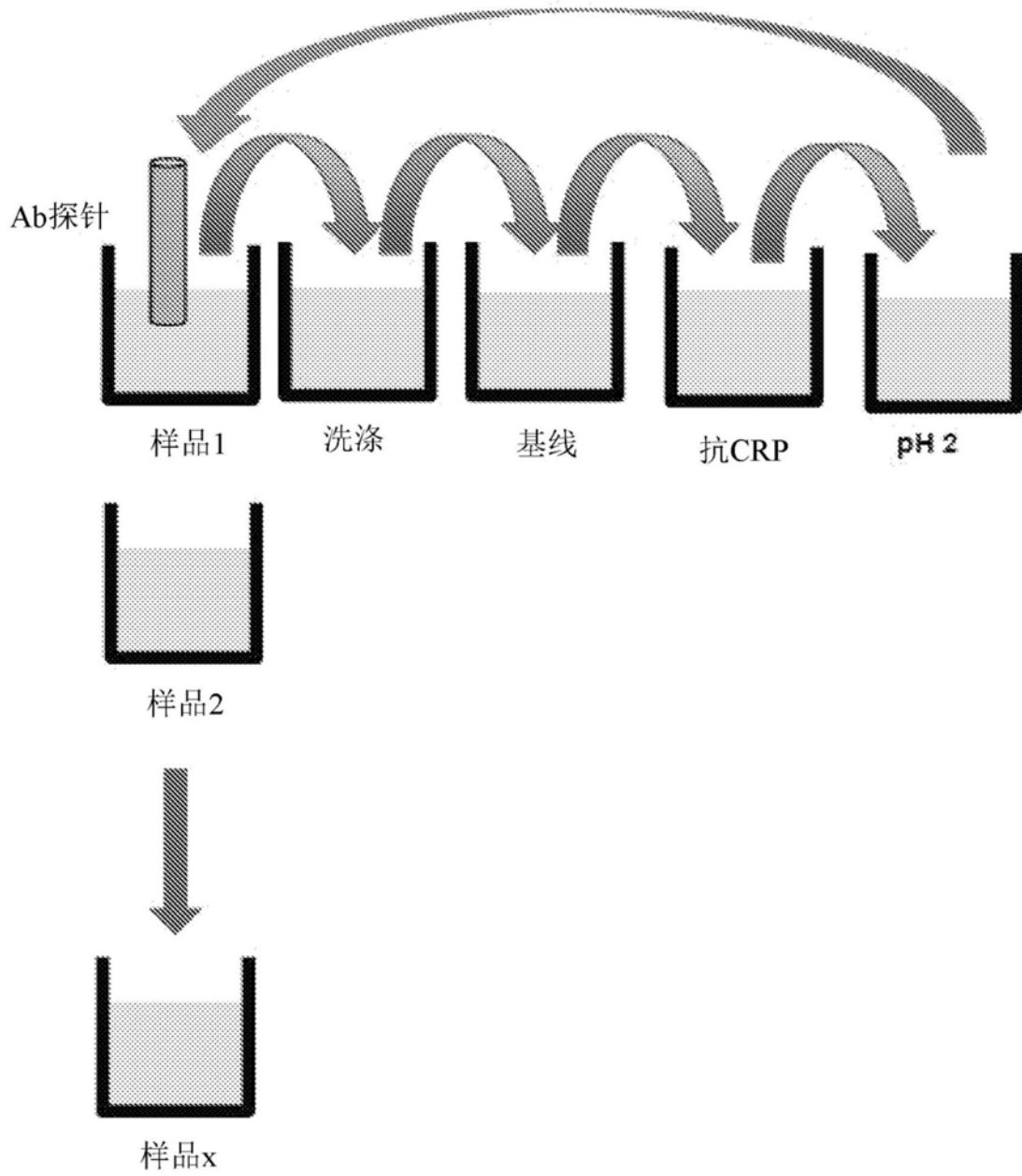


图5

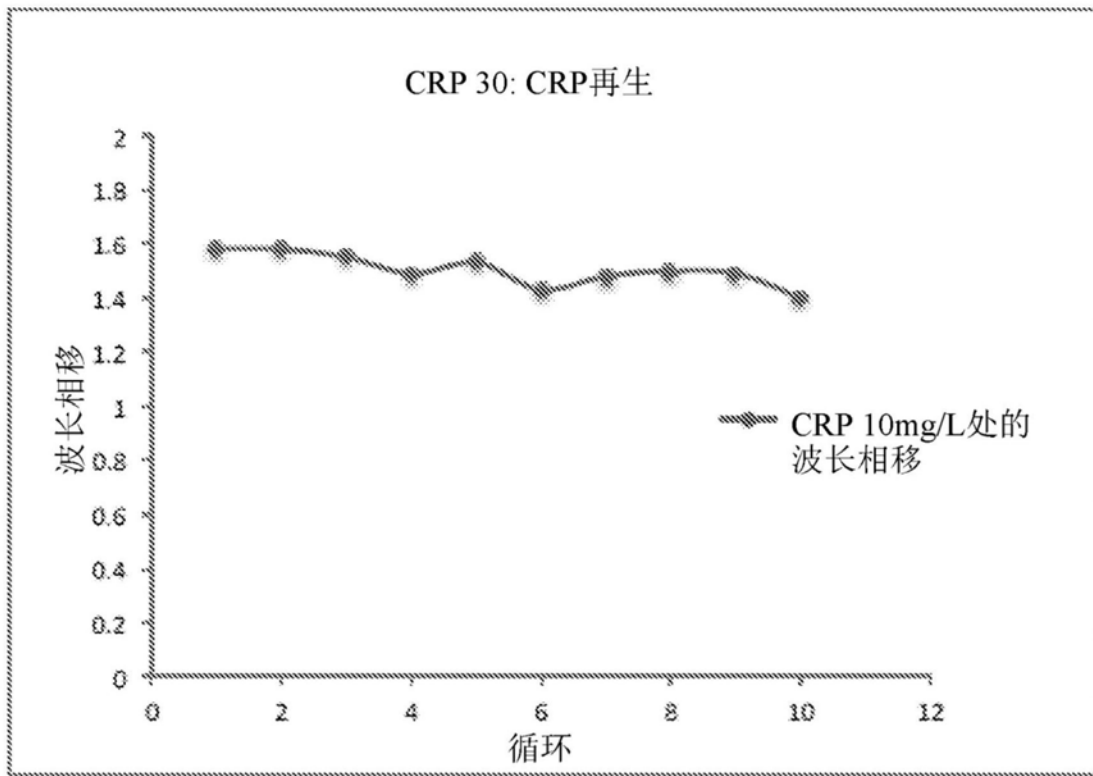


图6A

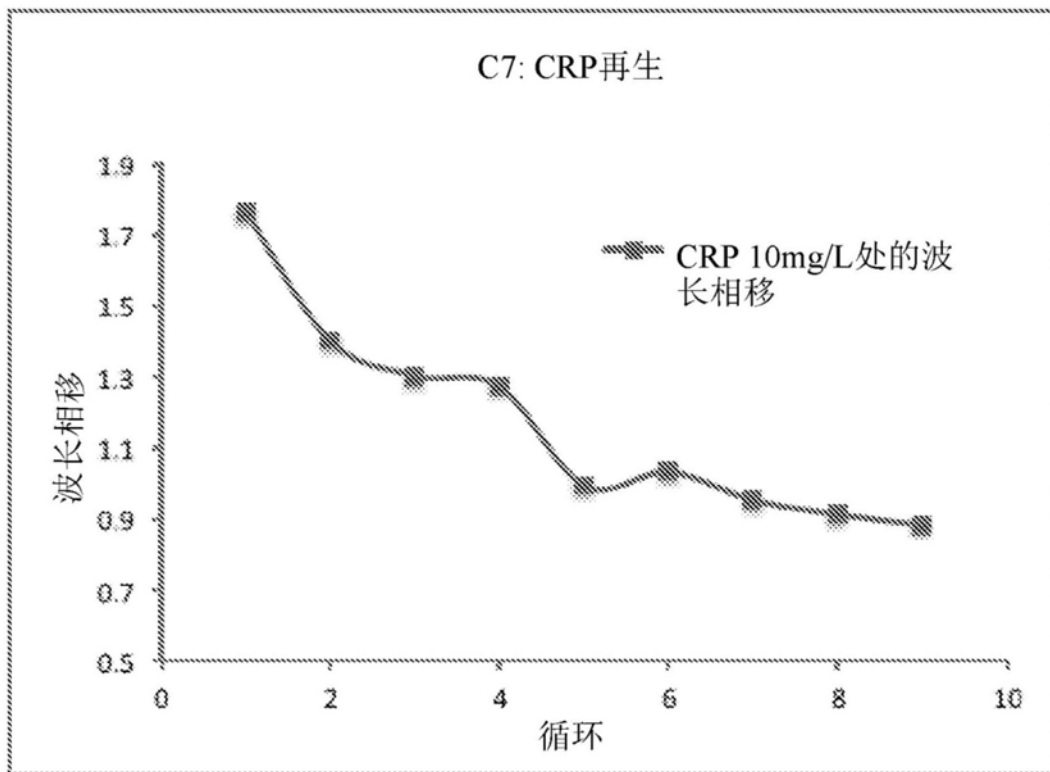


图6B

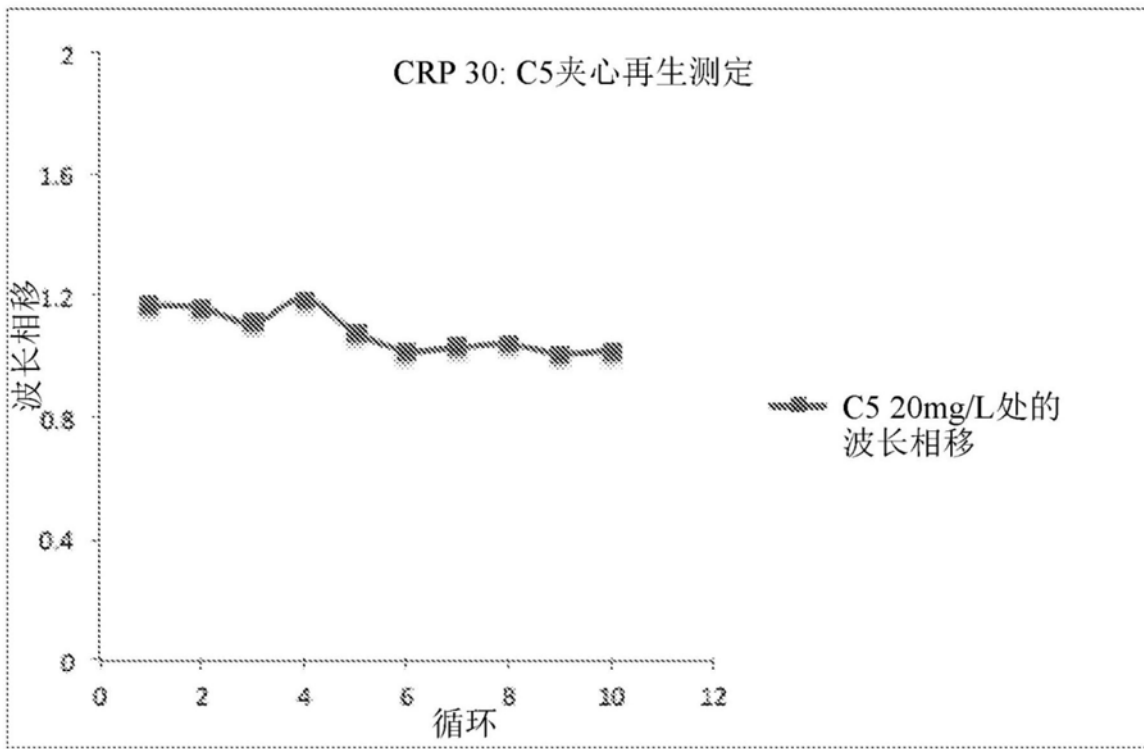


图7

专利名称(译)	基于干涉测量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="#">CN110023756A</a>	公开(公告)日	2019-07-16
申请号	CN201780064574.7	申请日	2017-10-27
[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	G01N33/543		
代理人(译)	方挺		
优先权	62/415247 2016-10-31 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种使用干涉检测系统的免疫测定方法。所述测定重复使用抗体固定的测试探针和试剂对不同样品中的分析物进行定量，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用酸性溶液再生所述测试探针。本发明还涉及用于免疫测定测试的组合筒(条带)。每个组合筒含有所有必需的试剂，并且可用于3-20个循环来测量3-20个不同的样品。

