



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107709992 A

(43)申请公布日 2018.02.16

(21)申请号 201680038562.2

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

(22)申请日 2016.05.03

代理人 康艳青 姚开丽

(30)优先权数据

10201503435Q 2015.04.30 SG

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2016/050204 2016.05.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/175708 EN 2016.11.03

(71)申请人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡市

(72)发明人 V·摩尼 A·辛格哈尔

G·德利贝罗

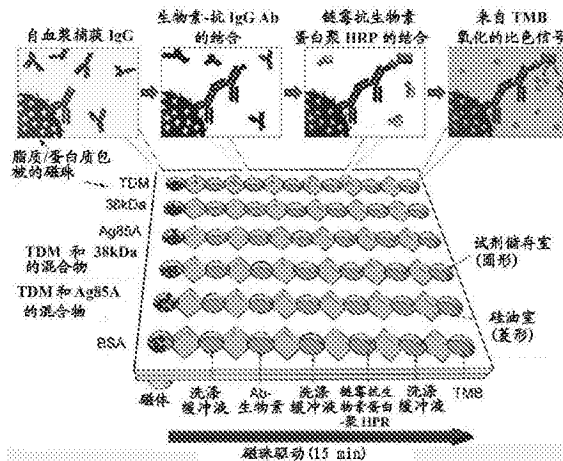
权利要求书2页 说明书24页 附图19页

(54)发明名称

酶联免疫吸附测定板和系统的新设计及其使用方法

(57)摘要

本公开涉及包含至少一行反应室的酶联免疫吸附测定(ELISA)板,其中同一行中的反应室彼此流体连通。还附上用于检测一种或更多种靶分析物的系统,其包括如本文所述的ELISA板、多个磁珠和被配置为与磁珠配合的磁体。还包括进行ELISA测定的方法,其包括将磁珠移动通过随后的反应室,其中所述反应室交替填充有非水性液体例如硅油以及水性ELISA试剂。



1. 一种包括至少一行反应室的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 板, 其中同一行中的反应室彼此流体连通。

2. 根据权利要求1所述的ELISA板, 其中所述反应室的几何形状选自由长方体、立方体、圆柱形、圆形、球形、矩形、正方形、三角形、多边形、菱形、六角柱、椭圆形、椭球体或梯形组成的组。

3. 根据权利要求2所述的ELISA板, 其中所述同一行中的反应室包括第一几何形状和与所述第一几何形状不同的第二几何形状。

4. 根据权利要求3所述的ELISA板, 其中所述第一几何形状是圆形的, 并且所述第二几何形状选自由菱形、正方形、圆形和椭球体组成的组。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的ELISA板, 其包括底板和顶板, 其中所述底板包括实心板, 并且其中所述顶板包括构成所述反应室的穿孔。

6. 根据权利要求5所述的ELISA板, 还包括设置在所述底板和所述顶板之间的疏水层。

7. 一种用于检测靶分析物的系统, 其包括根据权利要求1-6中任一项所述的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 板、多个磁珠和被配置为与所述磁珠配合的磁体。

8. 根据权利要求7所述的系统, 其中所述磁体被配置为控制所述磁珠在所述同一行中的反应室之间移动。

9. 根据权利要求7-8所述的系统, 其还包括用于检测从所述反应室产生的信号的检测器。

10. 一种试剂盒, 其包含根据权利要求1-6中任一项所述的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 板、多个磁珠和磁体。

11. 一种使用根据权利要求7-9所述的系统进行酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的方法, 其中所述ELISA板的反应室是液体填充的, 所述方法包括:

(a) 将包含一种或更多种靶分析物的样品与多个能够捕获所述一种或更多种靶分析物的磁珠在根据前述权利要求中任一项所述的ELISA板的每行的第一室中孵育;

(b) 用交替的液体装载所述ELISA板的列的随后的反应室, 其中所述液体是水性和非水性的;

(c) 通过使用所述磁体将所述多个磁珠从每行的第一反应室移动到同一行的随后的反应室;

(d) 在所述随后的反应室中孵育所述多个磁珠;

(e) 重复步骤 (c) 至 (d), 直到达到该行中的最终室; 和

(f) 检测在最终反应室中产生的信号。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中在所述每行的第一反应室和最终反应室之间进行一个或多个中间测量。

13. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述反应室用交替的液体填充。

14. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述交替的液体是非水性和水性的。

15. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述非水性液体是非极性液体。

16. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述非极性液体选自由矿物油、硅油、亚麻籽油、向日葵油、菜籽油和石蜡组成的组。

17. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述水性液体选自由洗涤缓冲液、第一抗体溶

液、第二抗体溶液、酶溶液和比色检测溶液组成的组。

18. 一种使用根据权利要求7-9所述的系统或根据权利要求10所述的试剂盒检测受试者中的结核病的方法。

19. 一种使用根据权利要求7-9所述的系统或根据权利要求10所述的试剂盒检测样品中的至少一种细胞因子的方法。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述至少一种细胞因子选自由趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子组成的组。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述干扰素是IFN- γ 。

22. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述肿瘤坏死因子是TNF- α 。

23. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述白介素为IL-2。

24. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述样品是从受试者或从细胞培养获得的样品。

25. 一种使用根据权利要求7-9所述的系统或根据权利要求10所述的试剂盒在相同受试者中检测至少一种细胞因子和针对至少一种脂质和/或蛋白质的IgG应答的方法。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述脂质包含海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)。

27. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述蛋白质包含抗原85A或38KDa。

酶联免疫吸附测定板和系统的新设计及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年4月30日提交的新加坡临时申请号10201503435Q的优先权,其内容在此通过引用整体并入用于所有目的。

发明领域

[0003] 本发明一般涉及分子生物学领域。具体地,本发明涉及特殊设计的板在检测分析物中的用途。

[0004] 发明背景

[0005] 许多疾病(如结核病, TB)的管理和控制仍然是对公共卫生的重大威胁,部分原因是缺乏有成本效益的灵敏且快速的诊断测试。例如,对于结核病,目前痰涂片显微术是疾病流行(endemic)国家中用于诊断的最常用的护理点(POC)方法,尽管其灵敏度差(30-60%)。尽管“黄金标准”细菌培养确实提供了所需的灵敏度(>90%),但测试需要数周时间,且需要设备齐全的实验室和经培训的员工。这么长的周转时间通常导致诊断延迟,持续传播以及发展耐药性的风险。

[0006] 以横向流动装置或标准ELISA形式的基于检测针对如结核病等疾病的分枝杆菌蛋白质抗原的抗体的血清学测试已被广泛用于诊断目的。然而,与许多ELISA测试一样,与标准培养方法相比,这些测试显示差的灵敏度(1-60%)和特异性(53-99%),表现并不比痰涂片显微术好,并且未能改善患者的结果。因此,世界卫生组织(WHO)已建议不要使用血清学检测。WHO对基于核酸扩增的结核病诊断测试例如本领域已知的和市售的那些的认可,已经有助于弥补这一空白。然而,它们在资源有限的环境中的实施受到高维护成本和对精密仪器、经训练的人员以及不间断供电的需求的严重限制。因此,需要一种简单、灵敏和便携的测定法用于护理点(POC)早期检测结核病。

发明内容

[0007] 在一方面,本发明涉及酶联免疫吸附测定(ELISA)板,其包含至少一行反应室,其中同一行中的反应室彼此流体连通。

[0008] 在另一方面,本发明涉及用于检测靶分析物的系统,其包含本文公开的酶联免疫吸附测定(ELISA)板、多个磁珠和经配置为与磁珠配合的磁体。

[0009] 在又另一方面,本发明涉及包含本文公开的酶联免疫吸附测定(ELISA)板、多个磁珠和磁体的试剂盒。

[0010] 在另一方面,本发明涉及使用本文公开的系统进行酶联免疫吸附测定(ELISA)的方法,其中所述ELISA板的反应室是液体填充的,所述方法包括(a)将包含一种或更多种靶分析物的样品与多个能够捕获所述一种或更多种靶分析物的磁珠在根据前述权利要求中任一项所述的ELISA板的每行的第一室中孵育;(b)用交替的液体装载ELISA板的列的随后的反应室,其中所述液体是水性或非水性的;(c)通过使用磁体将所述多个磁珠从每行的第一反应室移动到同一行的随后的反应室;(d)在随后的反应室中孵育所述多个磁珠;(e)重

复步骤(c)至(d),直到达到该行中的最终室;和(f)检测在最终反应室中产生的信号。

[0011] 在另一方面,本发明涉及使用本文公开的系统或本文公开的试剂盒来检测受试者中的结核病的方法。

[0012] 在又另一方面,本发明涉及使用本文公开的系统或本文公开的试剂盒检测样品中的至少一种细胞因子的方法。

附图说明

[0013] 结合非限制性实施例和附图考虑时,参考详述将更好地理解本发明,其中:

[0014] 图1显示了用于产生如本文所述的ELISA板的模板。图1A显示了用于微芯片装置的顶部的微芯片制作的AutoCAD设计模板,该顶部是在3mm厚的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)上被激光切割。设计图中的数字是指以毫米计的对象尺寸。图1B显示了用于微芯片装置的底部的微芯片制作的AutoCAD设计模板,其为在1.5mm厚的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)上被激光切割。设计图中的数字是指以毫米计的对象尺寸。图1C显示了例如疏水膜结合的微芯片装置的组件,其中微芯片装置的底部(底层)结合到疏水层(例如石蜡膜;中间层)和微芯片装置的顶部(顶层)。

[0015] 图2显示了本说明书中公开的ELISA板的一般示意图(在使用中和不在使用中时两者)。该示意图显示了不在使用中时的ELISA板,并指示了磁珠的可能移动方向。

[0016] 图3显示了使用磁体驱动的磁珠ELISA的微芯片的示意图,该微芯片用于同时检测活动性结核病(ATB)、潜伏性TB感染(LTBI)和健康对照(HC)个体血浆中的糖脂、蛋白质以及糖脂和蛋白质特异性IgG抗体的混合物。微芯片由特征在于用于水性试剂储存(圆形)和非水性硅油(菱形)的连通的室的通道组成。微芯片有六个通道,每个通道的特征在于独立的脂质或蛋白质包被的MB以及脂质和蛋白质MB的混合物。例如,通道1含有海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)包被的磁珠,通道2含有38KDa包被的磁珠,通道3含有抗原85A包被的磁珠,通道4含有海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)磁珠和38KDa磁珠,通道5含有海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)磁珠和抗原85A磁珠,且通道6含有BSA包被的磁珠(作为阴性对照)。使用位于芯片下方的六个磁体同时驱动每个室中的磁珠,从一个试剂室通过硅油相到另一个试剂室。免疫测定的总时间从加入血浆样品到检测人抗体约15分钟。

[0017] 图4显示了添加血浆样品之前(左)和15分钟之后(右)的磁体驱动的磁珠ELISA的照片。A行显示用于检测海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)的磁珠,B行显示用于检测38kDa的磁珠,C行显示用于检测Ag85A的磁珠,D行显示用于检测海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)和38kDa的磁珠,E行显示用于检测海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)和Ag85A的磁珠,F行为BSA(阴性对照)。奇数列是圆形的试剂储存室,偶数列是菱形的硅油室。第1列含有血浆样品和各自包被的磁珠,第5列含有生物素缀合的抗IgG抗体,第9列含有链霉抗生物素蛋白聚辣根过氧化物酶(HRP)抗体,第13列含有用于比色检测的3',3',5',5'-四甲基联苯胺(Tetramethylbenzidine,TMB)底物。第3、7和11列含有洗涤缓冲液。第2、4、6、8和10列含有硅油。

[0018] 图5显示了在例如磷酸盐缓冲盐水和吐温(PBS-T)中检测IFN- γ 和TNF- α 的疏水膜结合的微芯片ELISA的代表性示意图。MP代表磁性颗粒(正如MB代表磁珠;MB);TMB代表3',3',5',5'-四甲基联苯胺,一种用于比色检测的底物。

[0019] 图6显示了涉及使用在常规96孔ELISA板中的TDM包被的磁珠进行的ELISA(此后称为“MB ELISA”)和常规的96孔板ELISA进行的ELISA(此后称为“常规平板ELISA”)比较的数据。在所有基于ELISA的实验中,TDM珠粒在其表面上具有约 $0.41\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的TDM浓度(亦请参见下面的图12)。图6A显示了散点图,其示出了使用MB ELISA确定的活动性TB(ATB)和健康对照(HC)个体的血浆中的抗海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(抗TDM) IgG应答的分布比较,其中血浆在5%BSA缓冲液中稀释125倍。 $N=40, \text{ATB}=19, \text{HC}=21$ (***, $P=0.0003$)。图6B显示了散点图,其示出了使用常规平板ELISA确定的活动性结核病(ATB)和健康对照(HC)个体的血浆中的抗海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(抗TDM) IgG应答分布的比较,其中血浆在5%BSA中稀释2500倍。 $N=40, \text{ATB}=19, \text{HC}=21$ (***, $P=0.0007$,对于平板ELISA)。图6C显示了阐明磁珠ELISA(MB ELISA)和常规平板ELISA之间的线性回归的线图,从而显示了使用两种不同ELISA测定法的抗TDM血浆IgG应答的相关性。

[0020] 图7显示了使用石蜡膜包被的 $4.5\mu\text{m}$ 珠微芯片ELISA测定法测量的在RPMI培养基+10%FCS中剧增的IFN- γ 、TNF- α 和IL-2的标准曲线的线图,测试浓度范围为 $10\text{pg}/\text{mI}$ 至 $2500\text{pg}/\text{mI}$ 。DL表示检测限,其基于测试信号 $>$ 平均空白($0\text{pg}/\text{mI}$)+ 3stdev 计算。使用Graphpad Prism利用非线性回归-二阶多项式(二次方程式)拟合曲线。 $n=3$ 。IFN- γ 的检测限为 $20\text{pg}/\text{mI}$ (图7A)。TNF- α 的检测限为 $40\text{pg}/\text{mI}$ (图7B)。IL-2的检测限为 $40\text{pg}/\text{mI}$ (图7C)。

[0021] 图8显示从比较活动性结核病(ATB)、潜伏性结核病感染(潜伏性TB或LTB)和健康个体(H或HC)的基于磁珠的微芯片ELISA的结果分析得到的数据。图8A显示了散点图,其示出了通过微芯片免疫测定法测定的ATB、LTB和H个体的血浆中抗结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)的抗体应答分布。散点图表示不同组之间的结核分枝杆菌抗原特异性抗体分布的比较,即ATB对比LTB(左),ATB对比H(中心)和LTB对比H(右)。散点图中的点表示来自单个个体的血浆。水平线是在75%的固定特异性测量灵敏度而确定的截止值。每个散点图由基于不同组的比较的灵敏度和特异性的值组成。血浆样品的总数= $146, \text{ATB}=65, \text{LTB}=40, \text{H}=41$ 。图8B显示了散点图,其示出了通过微芯片免疫测定法测定的ATB、LTB和H个体血浆中抗38kDa的抗体应答分布。散点图表示不同组之间的结核分枝杆菌抗原特异性抗体分布的比较,即ATB对比LTB(左),ATB对比H(中心)和LTB对比H(右)。散点图中的点表示来自单个个体的血浆。水平线是在75%的固定特异性测量灵敏度而确定的截止值。每个散点图由基于不同组的比较的灵敏度和特异性的值组成。血浆样品的总数= $146, \text{ATB}=65, \text{LTB}=40, \text{H}=41$ 。图8C显示了散点图,其示出了通过微芯片免疫测定法测定的ATB、LTB和H个体血浆中抗抗原85A的抗体应答分布。散点图表示不同组之间的结核分枝杆菌抗原特异性抗体分布的比较,即ATB对比LTB(左),ATB对比H(中心)和LTB对比H(右)。散点图中的点表示来自单个个体的血浆。水平线是在75%的固定特异性测量灵敏度而确定的截止值。每个散点图由基于不同组的比较的灵敏度和特异性的值组成。血浆样品的总数= $146, \text{ATB}=65, \text{LTB}=40, \text{H}=41$ 。图8D显示了散点图,其示出了通过微芯片免疫测定法测定的ATB、LTB和H个体血浆中抗38kDa与海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)的混合物的抗体应答分布。散点图表示不同组之间的结核分枝杆菌抗原特异性抗体分布的比较,即ATB对比LTB(左),ATB对比H(中心)和LTB对比H(右)。散点图中的点表示来自单个个体的血浆。水平线是在75%的固定特异性测量灵敏度而确定的截止值。每个散点图由基于不同组的比较的灵敏度和特异性的值组成。血浆样品的总数= $146, \text{ATB}=65, \text{LTB}=40, \text{H}=41$ 。

图8E显示了散布图,其示出了通过微芯片免疫测定法测定的在ATB、LTB和H个体的血浆中抗原85A与海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)的混合物的抗体应答的分布。散点图表示不同组之间的结核分枝杆菌抗原特异性抗体分布的比较,即ATB对比LTB(左),ATB对比H(中心)和LTB对比H(右)。散点图中的点表示来自单个个体的血浆。水平线是在75%的固定特异性测量灵敏度而确定的截止值。每个散点图由基于不同组的比较的灵敏度和特异性的值组成。血浆样品的总数=146,ATB=65,LTB=40,H=41。

[0022] 图9显示了描绘使用微芯片免疫测定法针对下列情形测定的个体抗原或组合的血浆IgG测定的接收器工作特征(ROC)曲线的图:活动性结核病对比潜伏性结核病,活动性结核病对比健康个体和潜伏性结核病感染对比健康个体。图9A显示线图,其显示用于区分活动性(ATB)个体与潜伏性(LTBI)个体的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)、38kDa、抗原85A、海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)与38kDa和海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)与抗原85A的血浆IgG测定的ROC曲线。曲线下面积(AUC)用Graph Pad prism 5软件计算。图9B显示了线图,其显示用于区分活动性(ATB)个体与健康(HC)个体的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)、38kDa、抗原85A、海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)与38kDa和海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)与抗原85A的血浆IgG测定的ROC曲线。使用Graph Pad prism 5软件计算AUC。图9C显示线图,其显示用于区分潜伏性(LTBI)个体与健康(HC)个体的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)、38kDa、抗原85A、海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)与38kDa和海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)与抗原85A的血浆IgG测定的ROC曲线。使用Graph Pad prism 5软件计算AUC。

[0023] 图10显示了描绘如通过微芯片ELISA评估的血浆对单个抗原以及它们的组合的反应性的热图。每列表示在一个血浆样品中观察到的反应,每行描绘对不同抗原或其组合的反应。将归一化光密度(OD)值可视化为如行z分数所示的色谱。使用R统计计算软件,利用 z 分数= $(x-\mu)/\sigma$ 生成热图,其中 x 是个体的OD响应, μ 是针对每种抗原的所有个体($N=146$)的OD响应的平均值,以及 σ 是标准偏差。 $N=146$;ATB=65;LTBI=40;HC=41。

[0024] 图11显示了表示来自从痰涂片和细胞培养获得的结果比较的数据的散点图,其是用于鉴定和表征结核病感染所进行的护理测试的当前标准。图11A显示了散点图,其示出了在经分类的活动性结核病(ATB)样品中抗海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(抗TDM) IgG应答的分布。根据AFB(耐酸杆菌)痰涂片等级分类样品。应注意的是,AFB痰涂片等级在临床上应用于估计患者痰液中的杆菌载荷。杆菌载荷越高,等级阳性越高(more positive)。然而,所得到的治疗不依赖于通过该分析获得的等级。 $N=62$; -ve=28; 1+=11; 2+=11; 3+=8和4+=4 (**, $P=0.002^*$, $P=0.013$)。图11B显示了散点图,其示出了在经分类的活动性结核病样品中抗海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(抗TDM) IgG应答的分布。根据分枝杆菌培养试验(被认为是目前结核病诊断的黄金标准)对样品进行分类。培养阳性, $N=47$; 培养阴性, $N=13$ (* $P=0.0312$)。

[0025] 图12显示了柱图,其描绘具有变化的标称TDM表面浓度的TDM包被的MB制备物的动态光散射(DLS)。A) $0\mu\text{g}/\text{cm}^2$, B) $0.16\mu\text{g}/\text{cm}^2$, C) $0.41\mu\text{g}/\text{cm}^2$, D) $0.65\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。使用Brookhaven粒度分析仪软件估算每个珠粒制备物的平均直径。

[0026] 图13显示了光学显微镜的图像,其描绘了均匀的单分散的包被的磁珠。A) BSA包被的MB和B) TDM包被的MB ($0.41\mu\text{g}/\text{cm}^2$),以 $400\times$ 放大。

[0027] 图14显示了从磁珠提取的TDM的薄层色谱分析(TLC)的结果。将TDM标准品和来自小批量(0.2mI)的不同磁珠制备物(即,具有变化的标称TDM表面浓度, $0-0.65\mu\text{g}/\text{cm}^2$)的提

取TDM点样,并且使用 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:24:4) 作为流动相和基于地衣酚的碳水化合物染色进行TLC。使用TDM标准品的线性校准曲线来量化各珠粒制备物上存在的TDM。下表表示装载至 4×10^7 个珠粒(总表面积:25.6 cm^2)上的不同TDM、回收的结合TDM和各珠粒制备物上结合的TDM的收率百分比(%)。

[0028] 图15显示了描绘使用以变化的标称表面TDM浓度(0-0.65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 包被的磁珠对汇集的活动性结核病(ATB) 血浆(N=5) 中的抗TDM IgG应答的基于流式细胞术的检测的图。曲线表示在自汇集的ATB血浆中捕获抗TDM抗体时TDM-包被的MB制备物(0-0.65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 的MFI峰,所述血浆然后用Alexa-647缀合的第二抗体染色。使用流式细胞仪(MACS定量分析仪)获取样品。

[0029] 图16显示了线图,其描绘了来自在10个月的时间于室温(22-25 $^{\circ}\text{C}$) 对TDM包被的MB(0.41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 的稳定性分析的数据。使用如本文所描述的微芯片免疫测定法在不同天数测量活动性结核病(ATB) 患者血浆中的抗IgG应答,并且由第0天珠粒的初始活性获得在时间(t,天)的%相对活性。N=3。

[0030] 图17显示了描绘来自使用游离海藻糖的TDM平板ELISA竞争的数据的线图。使用常规TDM平板ELISA估计抗TDM IgG水平,其中将血浆与/不与游离海藻糖(10%) 预孵育1小时,然后加入到TDM包被的平板上。N=22(*,P=0.037)。

[0031] 图18显示了描绘ATB患者中抗38kDa和Ag85A的抗IgG应答的统计学分布的散点图。A和B) AFB涂片分级痰样品。N=62;-ve=28;1+=11;2+=11;3+=8and 4+=4), (38kDa;*,P=0.032)。C和D) 基于培养试验分层的样品。N=60;培养阳性样品N=47;培养阴性样品,N=13。NS,不显著。

[0032] 定义

[0033] 如本文所用的,术语“ELISA”是指酶联免疫吸附测定,一种用于测量溶液中一种或更多种靶分析物(通常是抗体、蛋白质或抗原等)的浓度的常规实验室技术。基本的ELISA或酶免疫测定法(EIA) 将其自身区别于其它基于抗体的测定法,这是由于通过连续结合到固体表面(通常是聚苯乙烯多孔板(例如96孔板)) 而发生的特异性和非特异性相互作用的分离所致,ELISA可获得定量的结果。ELISA的各个步骤导致着色的终产物或发射的信号,其可以使用合适的检测器进行定量,由此发射的信号或着色的终产物的量与原始样品中存在的分析物的量相关。

[0034] 如本文所用的,术语“几何形状”是指给定物品的表面形状,例如反应室的形状。如本文所用的,该术语可以指二维(2D) 或三维(3D) 形状。因此,关于反应室的几何形状,使用术语正方形是指反应室的二维形状。因此根据这一思路,术语圆柱形的使用会是指反应室的三维形状。

[0035] 如本文所用的,术语“反应室”是指如本文所述的微芯片ELISA板的顶板内的穿孔,其与实心底板一起形成反应液体可以沉积于其中并且其中发生ELISA的反应的孔。

[0036] 如本文所用的,术语“疏水的”或“疏水性”是指似乎排斥大量水的分子(然后称为疏水物)的物理性质。严格来说,疏水性不涉及排斥力,而是没有吸引力。如本领域已知的,疏水性分子倾向于是非极性的(即它们在分子内不具有总偶极子或分子偶极矩),因此优选其它中性分子和非极性溶剂。水中的疏水分子通常聚集在一起,形成胶束或类似的结构。疏水表面上的水会呈现高接触角。疏水性分子的实例通常包括但不限于烷烃、油、脂肪和多脂

的(greasy)物质。术语“疏水性”可以与术语“亲脂性的”(即“脂肪爱好的”)互换使用。但是,应该注意的是,这两个术语不是同义词。虽然本领域中已知疏水性物质是亲脂性的,但是存在不是亲脂性的疏水性物质的例外,例如硅氧烷和碳氟化合物。

[0037] 如本文所用的,术语“水性的”是指水性溶液,为其中溶剂是水的溶液。该术语通常在化学方程中通过附加(aq)至相关的化学式来显示。例如,食盐或氯化钠(NaCl)在水中的溶液会表示为NaCl(aq)。用语水性的意指涉及于、相关于、类似于或溶解于水。由于水是优异的溶剂,亦是天然丰富的,因此在化学中是普遍存在的溶剂。本领域中已知称为“疏水性的”(即“恐水的”)的物质通常不能很好地溶解在水中,而被称为“亲水性的”(即“爱水的”)的物质则能。亲水性物质的实例是氯化钠,因为氯化钠易溶于水。用于描述相反效果的术语,即其中溶剂不是水的溶液,称为“非水性的”。

[0038] 如本文所用的,化学极性的概念描述了导致分子或其化学基团具有电偶极或多极矩的电荷分离。极性分子通过偶极-偶极分子间力和氢键相互作用。分子极性取决于化合物中原子之间的电负性差异和化合物结构的不对称性。极性是许多物理性质的起因,所述物理性质包括表面张力、溶解度、熔点和沸点。如本文所用的,术语“非极性”是指平等共享双原子分子的两个原子之间的电子的分子或具有对称的极性键排列的分子,如在更复杂的分子中的情况。例如,三氟化硼(BF₃)以120°具有三个极性键的三角平面排列。这导致分子中没有整体偶极。极性分子的实例是氟化氢(HF),其是由于氟原子的高电负性所致而具有偶极矩的线性分子,所述高电负性导致结合电子以及氢原子的结合电子被“拉向”氟原子,导致氟离子周围产生部分带负电荷区域。

[0039] 如本文所用的,混溶性的概念是指以所有比例混合形成均一溶液的性质。该术语最常用于液体,但也适用于固体和气体。例如,水和乙醇是可混溶的,因为它们以所有比例混合。相比之下,术语“不混溶的”用于描述其中显著比例不形成均一溶液的物质。例如,丁酮被认为是显著溶于水,但这两种溶剂不被认为是可混溶的(即它们是不混溶的),因为它们不以所有比例可溶。

[0040] 如本文所用的,术语“IgG”是指一类免疫球蛋白,其包括在血液中循环的最常见的抗体,其促进对身体外来的微生物的吞噬性破坏。这些免疫球蛋白结合微生物或其部分,由此激活补体免疫系统。天然存在的抗体(例如IgG)包括四条多肽链,通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链。然而,已经表明抗体的抗原结合功能可以由天然存在的抗体的片段进行。因此,这些抗原结合片段也意在用术语“抗体”表示。术语抗体中包含的结合片段的实例包括(i)由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab片段;(ii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iii)由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(iv)由VH结构域组成的dAb片段;和(v)F(ab')₂片段,包含通过在铰链区的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段。此外,虽然Fv片段的两个结构域由不同的基因编码,但是可以通过重组方法制备合成接头,所述接头使其能够被制成单个蛋白质链(称为单链Fv(scFv))。还包括这类单链抗体以及dsFv(二硫化物稳定的Fv)和二聚Fv(双抗体),其通过配对不同多肽链产生。

[0041] 如本文所使用的,术语“护理点(POC)”也称为“床边测试”,是指在护理点处或附近(即在患者护理的时间和地点)的医疗诊断测试。这与历史程序(historical procedure)形成对照,历史程序中测试完全或主要限于医学实验室。这需要将标本送离护理点,然后等待数小时或数天才能获知结果,在此期间,护理必须在不存在所需信息的情况下继续。

[0042] 如本文所用的,术语“TDM”是指海藻糖6,6'-二霉菌酸酯,已知在结核病感染中起重要作用的索状因子。

[0043] 如本文所用的,术语“38kDa”是指38-kDa脂蛋白,其在本领域已知在结核病感染期间诱导巨噬细胞胱天蛋白酶依赖性细胞凋亡。

[0044] 如本文所用的,术语“抗原85A (Ag85A)”是指在结核病培养液中最丰富存在的分泌蛋白。

[0045] 如本文所用的,术语“血清学诊断”是指基于从受试者获得的血清或任何其它浆液中的研究而对受试者中的疾病或病况的诊断。这还可以包括但不限于血浆、血清、全血、淋巴液、尿液、胸腔积液和浆液。

[0046] 如本文所用的,术语“行”和“列”分别指例如ELISA板上水平和垂直取向的一排反应室。在该实例中,该行是指沿着ELISA板的长度的一段反应室,并且该列是指沿着ELISA板的宽度的一段反应室,其中术语宽度和长度如本文所定义,即宽度是沿着物体边缘的测量,其比同一物体的长度短。

[0047] 发明详述

[0048] 本公开内容提供了用于进行酶联免疫吸附测定的新型平板设计,其可以以小型化形式用于简单的超快速检测例如针对多种抗原的IgG应答或检测在上清液中的细胞因子例如IFN- γ 。然后将这种检测受试者体液中免疫分子的存在概念用于诊断和鉴定特定疾病例如结核病。

[0049] 在一个实例中,尽管在超过一个世纪前将结核分枝杆菌鉴定为结核病的原因,但在资源有限的环境中诊断结核病仍然是一个重大挑战。实际上,例如对于由类似的细菌或导致具有不明确症状的疾病或病况的其它致病原(infectious agent)引起的细菌感染也可以这样说。例如对于疾病流行国家的绝大多数患者,例如结核病诊断主要取决于痰显微术和培养,其在灵敏度、特异性和周转时间上具有许多限制。接入护理点(POC)、快速、便宜、灵敏和无仪器的结核病(TB)诊断测试仍然是一个重大挑战。开发的测试必须符合世界卫生组织(WHO)概述的最低规范,如测定速度(少于3小时)、最小样品制备、免维护仪器、低成本(每次测试少于\$10)以及环境上可接受的废物可处置性。

[0050] 微米级和纳米级技术的进步为小型化护理点装置的开发提供了可行的方法。微米级技术允许多步测定例如酶联免疫吸附测定(ELISA)的集成和自动化,从而使样品处理、靶捕获和检测能够在单个集成装置中进行,否则必须由训练有素的操作者在实验室环境中进行。具体地,磁珠(MB)由于其均匀的尺寸、高的表面积体积比、快速的反应动力学和易操作性,已经广泛地用于微流体ELISA中,与常规的平坦表面相比,以更快的速度提供更好的灵敏度。此外,通过使用外部磁体,可以通过一系列固定试剂驱动/操作磁珠,用于自动测定中的生物检测。这提供了一个简单的基于“进样和出答案(sample-in and answer-out)”的系统,其对护理点诊断而言是非常合乎期望的。

[0051] 本文提供了微芯片酶联免疫吸附测定,其能够在快速和小型化检测系统中检测针对来自患者的活动性感染例如活动性结核病(ATB)的血浆样品的一种或多种抗原或任何其它靶分析物(一种或更多种)的IgG应答。各微芯片酶联免疫吸附测定或酶联免疫吸附测定(ELISA)板可包含5-10之间的、8-15之间的、18-32之间的行、约1、约2、约3、约4、约5或约6个单独的行。酶联免疫吸附测定板的显著技术特征是反应室彼此流体连通这一事实。在常规

的酶联免疫吸附测定中,使用本领域已知的方法将样品分析物结合到反应室的表面。进行酶联免疫吸附测定所需的流体的洗涤和更换通常通过将ELISA板翻转并拍出任何进入反应流体来进行。已知这种样品的“人工处理”导致由于不充足的缓冲液去除而导致的测量中的差异,不充足的缓冲液去除可导致所得信号的稀释。此外,通过将所述流体移液入反应室而应用新的缓冲液和反应流体涉及由于不充分或强力的移液技术而在检测之前洗出样品分析物的风险,从而引入实验者特异性信号变异性。因此,在一个实例中,反应室彼此流体连通。该流体连通使得能够在各孔之间移动具有靶分析物的磁性样品载体(即磁珠),而不需要板的任何移位或洗出靶分析物,从而降低样品稀释和信号差异的风险。因此,在一个实例中,公开了包含至少一行反应室的酶联免疫吸附测定(ELISA)板,其中同一行中的反应室彼此流体连通。所描述的流体连通能够通过相邻反应室的一个壁或两个壁二者中的开口实现,从而使得能够在反应室之间移动例如磁珠。该开口也可以被称为相邻反应室之间的“连接”。需要相邻反应室之间的开口足够大以使得能够在反应室之间移动例如磁珠,但也足够小,使得各反应室中的流体停留在其反应室内,也就是说以防止例如非水性液体流入沉积在相邻反应室中的水性液体。换句话说,例如,如果开口太大,则该大开口会有助于其中使用的水性液体的扩散和混合。如果开口太小,则会使得难以将磁珠移动(或驱动)到相邻的室和从相邻的室移动出(或驱动出)。因此,当使用要求保护的微芯片ELISA时,开口的大小对于有效的测定操作是至关重要的。如之前所述的,例如,对于含有水性液体的反应室,圆形室会是技术上有利的选择,因为圆形形状提供了在形状和混合上的均匀性,沿着边缘具有相等的表面张力。此外,例如在圆形反应室中的开口为磁珠转移至相邻的例如菱形反应室提供了更容易的进入。表面张力以及反应室的形式或几何形状在不同液体的分离中起重要作用。

[0052] 本文公开的微芯片中的反应室通过反应室侧面中的一个或更多个开口连接(即彼此流体连通)。如上文所提供的,反应室的侧面/壁中的这些开口的大小在本发明的功能中起重要作用。按绝对值计,所描述的反应室壁中的所述开口可以宽度在0.5至2mm之间、宽度在1至1.8mm之间、约1.1mm、约1.2mm、约1.3mm、约1.4mm、约1.5mm、约1.6mm、约1.7mm、约1.8mm、约1.9mm或约2.0mm宽。在一个实例中,反应室壁中的开口为1.7mm。按相对值计,反应室壁中的开口可在例如反应室一侧的圆形室的周长的4%至10%之间、或5%至9%之间或约6%、约7%、约8%、约9%。在反应室的相对侧的反应室壁中的开口会需要具有相同的大小以便执行相同的功能。因此,反应室壁的相对侧上的开口也会在例如反应室一侧的圆形室的周长的4%至10%之间、5%至9%之间、或约6%、约7%、约8%、约9%。在一个实例中,反应室壁的相对侧上的开口为5%至9%之间。

[0053] 在本文公开的本发明的处理方面或关于如本文所公开的反应室的装载方面,应理解的是,标准实验室设备例如20 μ l、100 μ l或200 μ l移液器用于液体处理。本领域技术人员能够决定哪个实验室设备将适合于所需的实验。例如,可使用100 μ l移液器将水性试剂添加到圆形室中,而可使用200 μ l移液器填充油室。在一个工作实例中,在第一步中,除非另外提及,否则首先将水性液体加入到微芯片上的圆形反应室中,然后将其它反应室,即具有例如菱形几何形状的反应室,填充非水液体例如油。这是因为下列事实:如果首先添加非水性液体,则在旨在容纳水性液体的邻近(圆形)室内会形成薄油层,从而导致由于下面的油相所致而难以在水性室中将珠粒混合。

[0054] 适用于细胞培养的任何材料,即生物相容性并且不与靶分析物或标准酶联免疫吸附测定方案中使用的任何液体交叉反应的任何材料,均可用于产生本发明。制造ELISA板的材料包括但不限于聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯、聚碳酸酯、玻璃及其组合。在一个实例中,ELISA板由聚甲基丙烯酸甲酯制成。

[0055] 如之前所述的,本文公开的ELISA板包含多个反应室。这些反应室位于其中发生化学或生化反应例如酶联免疫吸附测定的化学或生化反应的板上。因此,反应室的大小由进行ELISA测定所需的体积决定。典型的ELISA测定可具有50 μ I至150 μ I之间、175 μ I至200 μ L之间或180 μ I至200 μ I之间的样品体积。在一个实例中,如本文所公开的,反应室的体积选自约50 μ I、约60 μ I、约70 μ I、约80 μ I或约90 μ I。在另一个实例中,反应室的体积为70 μ I至80 μ I。

[0056] 如本文所述的反应室可以呈任何合适形状的形式。反应室的几何形状仅由用于在反应室之间驱动样品的形式的实用性决定。因此,在一个实例中,所述多个反应室可以包括单一几何形状或多种几何形状。在另一个实例中,反应室包括两种几何形状。在另一个实例中,反应室包括三种或更多种几何形状。不同几何形状的可能用途是例如不同反应室及其各种内容物之间的光学差异。例如,有可能使容纳非水性溶液的所有反应室具有一种几何形状,并且在板上的剩余反应室具有不同的几何形状。代替使用不同的几何形状来指示反应室中的不同内容物的是,不同反应室的这种光学差异也可以使用ELISA板的顶部或侧面上的标记(着色或不着色)或者使板的侧面着色而实现。话虽如此,在一个实例中,圆形室用于水性液体,因为它提供反应室形状上的均匀性和可在这样的反应室中进行的混合上的均匀性,沿着边缘具有相等的表面张力。此外,如本公开内容的另一部分所讨论的,例如圆形反应室中的开口为珠粒转移至例如相邻的菱形室提供了容易的进入。另一方面,在一个实例中,非水性反应室的形状可以是但不限于正方形、矩形、圆形或椭球体形。

[0057] 在一个实例中,反应室的几何形状包括但不限于长方体、立方体、圆柱形、圆形、圆的、球形、矩形、正方形、三角形、多边形、菱形、六角柱、椭圆形、椭球体或梯形。

[0058] ELISA板上或甚至相同行中的反应室的几何形状可以以重复图案或交替几何形状的形式存在于ELISA板上。反应室几何形状的重复或图案的选择取决于实验要求,例如在不同流体的单个室(例如,容纳非水性分离液的室)旁边的一个类型的多个室(例如容纳水性洗涤溶液的室)。在一个实例中,如本文所述的ELISA板包括同一行中的反应室,其包括第一几何形状和与第一几何形状不同的第二几何形状。这种系统排列会导致例如具有后接正方形反应室的彼此相邻的两个圆形反应室的板。或者,酶联免疫吸附测定板可以包括严格交替的几何形状,例如交替的圆形和正方形反应室。因此,在一个实例中,ELISA板如本文所述,其中第一几何形状为圆柱形,第二几何形状为菱形。在另一个实例中,反应室都是圆柱形的。在又一个实例中,反应室都是菱形的。

[0059] 取决于实验者的要求和制造能力,如本文所述的酶联免疫吸附测定板可以以条带(即成排)或列生产。然而,无论板如何划分,各单独的酶联免疫吸附测定板包括底板和顶板。在一个实例中,底板是实心板。在另一实例中,顶板包括构成反应室的穿孔。在另一个实例中,底板包括实心板,并且其中顶板包括构成反应室的穿孔。还设想的是,将反应室蚀刻成实心板,从而消除了需要组装的酶联免疫吸附测定板的要求。在一个实例中,板也可以倒入合适的模具中,从而仅制备顶板或整个板本身。

[0060] 确保酶联免疫吸附测定(ELISA)的充分性能的一个要求是防止靶分析物粘附到除

了能够检测靶分析物的表面以外的表面,因为靶分析物与不能检测的表面的任何结合导致信号检测的丢失,从而影响所进行的测定的总体效力和/或灵敏度。防止靶分析物意外粘附到非预期表面的一种方法是涂覆材料的使用,涂覆材料然后用于涂覆例如反应室的内表面。这些涂层可呈喷雾、箔、薄膜、溶液、乳液、聚合物涂层、干涂层、金属涂层及其组合的形式,但不限于此。因此,在一个实例中,涂层是薄膜。这些涂层可以是疏水的或亲水的,这取决于靶分析物。如果靶分析物是生物分子,例如疏水性蛋白质,则防止所述疏水性蛋白质粘附到反应室表面的涂层会是亲水涂层。因此,在一个实例中,本文公开的酶联免疫吸附测定板包含疏水层。用于防止意外粘附的涂层的位置可存在于在反应室的所有表面上。可选地,涂层可仅存在于反应室的壁上。涂层也可只存在于反应室的基底。在一个实例中,将涂层设置在底板和顶板之间。

[0061] 使靶分析物与反应室的表面结合的可替换的选择为,或者例如在样品中的靶分析物的浓度有限并且可能需要靶分析物的预浓缩的情况下,载体,其包括但不限于磁珠、磁性颗粒、超顺磁性珠粒或颗粒、聚合物包被的磁芯珠粒或颗粒等,珠粒和颗粒之间的差异通常是颗粒具有不规则表面,而珠粒主要具有圆形表面。这些载体可以由能够根据各种物理或化学原理捕获靶分析物的物质制成。例如,当载体由琼脂糖制成时,有可能在载体的表面包含孔,从而仅浓缩特定分子大小的分析物。在另一个实例中,载体用例如分析物捕获抗体(anaLyte-capturing antibody)包被,从而特异性地浓缩和结合仅所述抗体的抗原(即靶分析物)。在一个实例中,使用磁珠。在又一个实例中,磁珠用靶分析物特异性抗体包被。例如,如果靶分析物是38kDa结核病蛋白质,那么所使用的抗体是抗38kDa。由于已知抗体对其相应的抗原是非常特异性的,所以也有可能用多于一种抗体包被载体。在另一个实例中,载体被抗原包被。当靶分析物是抗体时,例如当检测对感染性颗粒的免疫反应的强度或用于检测潜伏性疾病或感染时,使用该方法。因此,例如,载体被抗原包被,并且在已经进行相应的ELISA之后产生的所得信号会告知本领域技术人员感染或疾病是否存在。所进行的ELISA的结果还向本领域技术人员表明感染或疾病是否是活动性的(即例如致病原是活跃地复制的)、潜伏的(即致病原以被认为低于活动性感染的定义阈值的水平复制;这种潜伏性感染可以以无症状的方式存在)、休眠的(即已经确定存在致病原,但致病原不是复制性的)和不存在(即,受试者中不存在致病原)。

[0062] 在本发明中使用的载体在性质上是磁性的情况下,需要存在另外的磁体以便将载体从一个反应室移动到下一个反应室。因此,在一个实例中,存在能够驱动(即移动)磁珠的另外的磁体。所述另外的磁体的极性必须使得其能够通过反应室的壁磁性地吸引反应室内的磁珠,使得在样品处理和移动期间磁珠不与另外的磁体接触。本发明中使用的ELISA板的大小决定了样品处理所需的另外的磁体的大小。因此,磁体的大小包括但不限于在10mm至150mm之间、在100mm至200mm之间、约25mm、约35mm、约50mm、约55mm、约60mm、约85mm、约90mm、约105mm、约150mm或约180mm。因此,如果例如ELISA板的宽度(即沿着反应室的列的长度)为50mm,则另外的磁体的长度为至少5mm。也可能同时使用一个或更多个磁体移动所述磁珠。也可能首先使用一个磁体移动一部分磁珠,并使用相同的磁体返回并移动其它反应室中的磁珠。如本文所使用的,术语“宽度”被定义为沿着板的一个外部边缘的度量,其中宽度度量比长度度量短。在一个实例中,磁体的长度为70mm。

[0063] 反应室的大小进一步决定了如本文所述的ELISA板的总体大小。可选择地,可以

说,ELISA板的大小决定了反应室的体积。ELISA板的大小是可扩展的,并且包括但不限于例如微米级或纳米级。按绝对值计,ELISA板的大小包括但不限于25mm至100mm之间、30mm至150mm之间、80mm至200mm之间的长度、约60mm、约80mm、约90mm、约120mm、约130mm或约150mm的长度,藉此将ELISA板的长度定义为板的最长边缘,即长度度量根据定义比宽度度量长。在一个实例中,ELISA板的长度为95mm。因此,当需要时随着板长度的调整而调整宽度。

[0064] 反应室的大小也受所用ELISA板的高度的影响。具有低高度的ELISA板将不能产生足够的用于进行所需ELISA的反应室,因为所得到的反应室可能太宽而不能全部装配在板的表面上。因此,ELISA板的高度包括但不限于在1mm至10mm之间、在5mm至25mm之间、在15mm至20mm之间、约14mm、约15mm、约17mm、约19mm或约20mm的总高度。因此,在一个实例中,ELISA板的总高度为5mm。这又意味着例如如果ELISA板由多于一个构件例如底板和顶板构建,则两个板的组合高度也为5mm。我们的另一个考虑是,如果在实验完成之后,ELISA板应在标准光谱仪或标准读板仪中读取,这些仪器具有需要遵守的标准,否则测量会失真或得不到充分补偿。

[0065] 另一个考虑是,反应室顶部的开口不大于技术上必需的,因为较大的反应室开口将导致包含在这些室内的流体以比反应室具有小开口时更快的速率蒸发。话虽如此,如果例如正确尺寸的移液器或针不可用的话,小的开口可导致样品未正确地装载入反应室。所有这些元素通过影响ELISA的结果而影响进行的ELISA的灵敏度和准确性。还考虑使用ELISA板顶部的盖子,从而防止反应流体或样品经由蒸发的任何过量损失。

[0066] 如本文所述的,ELISA板的各个部分也可以被描述为用于检测靶分析物的系统,其包括本文公开的酶联免疫吸附测定(ELISA)板、多个磁珠和经配置为与磁珠配合的磁体。在一个实例中,该系统的磁体被配置为控制磁珠在同一行中的反应室之间移动。该系统还可以包括但不限于用于在ELISA反应结束时检测从反应室产生的信号的检测器。

[0067] 本文还公开了包含如本文所述的酶联免疫吸附测定(ELISA)板、多个磁珠和磁体的试剂盒。在一个实例中,板是微孔板。

[0068] 使用所要求保护的发明的一个实例是使用如本文所述的系统进行酶联免疫吸附测定(ELISA)。如本文所述的,用于进行ELISA的液体基于本领域已知的ELISA的原理和要求来选择。例如,根据本领域已知的确立原理进行捕获、第一抗体和第二抗体的配对和组合。对在ELISA结束时的信号产生而言必需的检测底物和检测溶液根据用于测量所述信号的要求和可用手段来选择。检测方法的类型包括但不限于比色、发冷光、生物发光、荧光、光度和放射照相。在一个实例中,ELISA板的反应室是液体填充的。在另一个实例中,ELISA板的列的反应室或单元格用交替的液体填充。在又一个实例中,液体是水性或非水性的。

[0069] 在又一个实例中,将包含靶分析物的样品与能够在根据前述权利要求中任一项所述的ELISA板的第一室中捕获所述靶分析物的多个磁珠一起孵育。在另一个实例中,将包含一种或多种靶分析物的样品与能够在根据前述权利要求中任一项所述的ELISA板的第一室中捕获所述一种或多种靶分析物的多个磁珠一起孵育。在又一个实例中,使用磁体将所述多个磁珠从第一反应室移动到随后的反应室。在另一个实例中,将所述多个磁珠在随后的反应室中孵育。在一个实例中,多次重复孵育和移动所述多个磁珠的先前步骤。在另一个实例中,重复所述步骤,直到达到该行中的最终室。在又一个实例中,使用适当的手段检测在最终反应室中产生的信号。在另一个实例中,在第一反应室和最终反应室之间进行

一个或多个中间测量。应注意,根据实验者的要求,可以重复且以彼此的任何组合执行任何一个或更多个先前概述的步骤。在另一个实例中,使用如本文所述的系统进行酶联免疫吸附测定(ELISA),其中ELISA板的反应室是液体填充的,该方法包括(a)用交替的液体装载ELISA板的列的单元格,其中所述液体是水性或非水性的;(b)将包含一种或更多种靶分析物的样品与能够在根据前述权利要求中任一项所述的ELISA板的第一室中捕获所述一种或更多种靶分析物的多个磁珠一起孵育;(c)通过使用磁体将所述多个磁珠从第一反应室移动到随后的反应室;(d)在随后的反应室中孵育所述多个磁珠;(e)重复步骤(c)至(d),直到达到该行中的最终室;和(f)检测在最终反应室中产生的信号。

[0070] 本文还描述了使用如本文所述的系统进行酶联免疫吸附测定(ELISA)的方法。在一个实例中,该方法包括将包含一种或更多种靶分析物的样品与能够在如本文所述的ELISA板的每行的第一个室中捕获所述一种或更多种靶分析物的多个磁珠一起孵育;用交替的液体装载ELISA板的列的随后的反应室,其中液体是水性或非水性的;通过使用磁体将所述多个磁珠从每行的第一反应室移动到同一行的随后的反应室;在随后的反应室中孵育所述多个磁珠;重复前面的步骤,直到达到该行中的最终室;和检测在最终反应室中产生的信号。该方法可以包括例如在每行的第一反应室和最终反应室之间进行一个或更多个中间测量。该方法还可以包括用交替的液体填充反应室。

[0071] 本发明中使用的液体可以是但不限于非水性和水性液体。在一个实例中,非水性液体是非极性液体。非水性溶液的功能是充当在含有水性溶液的反应室之间的屏障,从而防止各种水性溶液的混合或稀释。而且,非水性溶液充当流体不渗透的屏障,其尽管是流体不渗透的,但是使磁珠能够移入和移出连接的反应室,而不会携带水性溶液。因此,非水性溶液必须足够粘稠以能够停留在其分配的反应室中,从而防止相邻室中的水性溶液流入,但也必须是足够流动的以允许磁珠通过在室之间的非水性液体。因此,在另一个实例中,非极性液体包括但不限于矿物油、硅油、亚麻籽油、向日葵油、菜籽油和石蜡。

[0072] 用于本发明的水性溶液是本领域已知并用于进行酶联免疫吸附测定(ELISA)的标准溶液。例如,洗涤缓冲液的功能是在各反应步骤之后从磁珠洗去残留的分子,从而防止本身可导致假阳性结果的携带物。第一抗体的功能是正面地鉴定磁珠上预期的靶分析物的存在,而缀合的第二抗体用于例如放大靶分析物的信号并将所述第二抗体的结合转换成用于下游检测(例如使用检测溶液)的可读信号的双重目的。因此,在一个实例中,水性液体选自自由洗涤缓冲液、第一抗体溶液、第二抗体溶液、酶溶液和检测溶液组成的组。在另一个实例中,检测溶液包括但不限于比色、发冷光、生物发光、荧光和放射照相溶液。

[0073] 基于由如本文所述的酶联免疫吸附测定(ELISA)反应产生的信号的强度确定受试者中的一种或更多种靶分析物的浓度的比较或一种或更多种靶分析物(例如一种或更多种蛋白质、寡聚体或寡核苷酸)的存在或不存在的确定。一般来说,比较是基于在受试者中确定的在一种或更多种靶分析物的水平与在对照组或对照个体中确定的相同的一种或更多种靶分析物的水平的比较。在本公开内容中,对照受试者或个体是无病的个体。也就是说,对照个体是没有要进行测试的疾病的个体。通常,术语无疾病意味着受试者健康。

[0074] 在一个实例中,正在进行测试的疾病是结核病。然而,可以使用本文提供的本发明来确定任何其它疾病的存在,只要已经鉴定出具有足够的灵敏度和准确度的适当的分析物。在一个实例中,本文公开的微芯片酶联免疫吸附测定利用一种或更多种特异于鉴定例

如结核病感染的靶分析物。靶分析物可以是但不限于抗原、抗体、蛋白质、寡核苷酸、核酸序列、多肽及其组合。需要根据靶分析物依照本领域已知的原理和概念调整ELISA所需的捕获和检测抗体。在一个实例中,靶分析物包括但不限于结核分枝杆菌(Mtb)表面糖脂,即海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)、38kDa糖脂蛋白和抗原85A(Ag85A)。较后的38kDa糖脂蛋白和抗原85A(Ag85A)是两种纯化的培养滤液蛋白,基于其已知的免疫原性及其在结核病血清学诊断中的应用,其被认为是抗原。ELISA依赖于通过序贯组织的试剂对抗原包被的磁珠的驱动,用于从血浆中捕获结核分枝杆菌抗原特异性IgG,随后进行标记和比色检测。特征在于检测抗海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(抗TDM) IgG应答的ELISA例如特别用于检测结核病的ELISA,对于区分ATB患者与健康对照(HC)个体而言,显示与痰涂片显微术(56%)相比显著更高的灵敏度(72%)和与标准培养测试(78%)相当的灵敏度。

[0075] 如本领域已知的,取决于抗体的特异性和所使用的检测底物的质量,标准的酶联免疫吸附测定(ELISA)可需要在3小时至6小时至过夜的任何时间。通常,单个分析物ELISA从开始到完成需要大约3小时,如果需要样品与ELISA板的在先孵育,即来自样品的靶分析物与反应室表面经由例如疏水相互作用的结合,则需要更长的时间。如本文所述,本发明导致与本领域已知的ELISA相比显著地节省时间,因为使用本发明的情况下,从样品添加到检测可以在15分钟内完成ELISA。这15分钟标记也是世界卫生组织(WHO)定义的护理点结核病测试所需的最低规范。

[0076] 如本文所用的,术语“样品”包括但不限于任何数量的来自活物(Living thing)或曾经的活物的物质。这样的活物包括但不限于人、小鼠、猴、大鼠、兔、狗、猪和其他动物。这些物质包括但不限于血清、血液、全血、血浆、血清、痰、汗、粪便、尿液、精子、细胞、器官、组织、骨、骨髓、淋巴、淋巴结、滑液组织、内皮细胞和皮肤。其中还包括实验室样品,例如但不限于活检样品、传代细胞、细胞培养样品、细胞培养上清液和裂解的细胞。

[0077] 本文所述的ELISA将简单的样品添加(进样)提供至基于比色检测(出答案)的系统,以区分例如活动性结核病与健康对照/潜伏性结核病感染,结果可在不到15分钟内得到。例如基于海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)的ELISA相比于痰显微术的更高灵敏度(72%对比56%)可用于具有临床活动性疾病的个体的快速筛选和诊断。这种超快速测试是简单和便宜的,非常适合于进行潜在患者的初始筛选,该潜在患者可以稍后使用例如基于PCR的测定法或本领域已知的其它方法进行验证。例如基于海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)的ELISA的灵敏度(72%)与经典海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)酶联免疫吸附测定(69%,95%置信区间(CI)28-94%)密切一致。类似地,涂片阳性样品中例如基于38kDa的ELISA的灵敏度(46%)与使用平板结合ELISA的研究中观察到的灵敏度(47%,95%置信区间(CI),39-55%)密切一致。ELISA测试例如对结核病进行的ELISA测试,与使用例如38kDa和TDM作为抗原的其它商业测试相比性能良好,该其他商业测试例如分别为Pathozyme Myco-G(Omega diagnostics,UK)(10-85%灵敏度)和结核病糖脂测定(Kyowa Medex,Japan)(59-90%灵敏度)。然而,本文公开的ELISA板和ELISA方法提供了更快、更简单和更便宜的优点。

[0078] 如本文所公开的ELISA平台与常规的酶联免疫吸附测定相比具有三个重要的技术实现。首先,ELISA的工作原理,即磁珠驱动通过预先填充有固定试剂的室,避免了对额外的设备的需要,所述额外的设备例如昂贵的泵、阀和样品计量,其通常需要例如挑战性的微米级制造技术。ELISA板需要简单的非平版印刷制造方法,并且不需要复杂的工具来执行测

试。因此,测试成本(包括试剂和装置制造)仍然非常低(每次测试不到10美元)。第二,与传统的酶联免疫吸附测定(ELISA)相反,如本文所述的ELISA板和方法使用聚合的辣根过氧化物酶(HRP)标记,而不是单个HRP标记的第二抗体。在标记步骤中辣根过氧化物酶与聚合物的较高比例(400个辣根过氧化物酶/聚合物)扩增了比色信号,并能够检测例如低IgG滴度样品。第三,在微芯片中使用的基于珠粒的酶联免疫吸附测定相对于传统的平坦表面具有特定的优点。与平板表面相比,结合在珠粒表面上的抗原的高局部浓度促进了有效的抗原-抗体结合,平板表面中的结合通过缓慢扩散促进,并且需要数小时才能达到饱和。这转化为如本文所公开的ELISA中各步骤的更快的反应时间,使用血浆样品基质显著地将测定的总体时间降低至约15分钟,但仍然如标准经典酶联免疫吸附测定那样有效地进行。此外,与痰样品(强烈咳嗽,需要数次尝试)相比,由于其简单的样品采集(全血,静脉/手指刺),本文提供的基于血浆的测试容易进行。这对于例如来自儿童的样品采集特别有意义,对于儿童而言痰液收集是具有挑战性和侵入性的。

[0079] 此外,如本文所公开的,本ELISA板和测定与商业免疫色谱(IC)测试相比具有许多优点,IC测试广泛用于例如低收入、高负担国家的结核病诊断。虽然免疫色谱测试是用户友好的、快速的和可负担得起的,但它们缺乏经典的酶联免疫吸附测定的灵敏度(53%,95%置信区间(CI)42-64%),并且结果是定性的,依赖于聚集的金纳米颗粒带的强度的主观解释。此外,免疫色谱测试仅能够为单个抗原提供二进制报告(是/否),而分析针对多个抗原的反应是复杂的。相比之下,本文公开的ELISA装置代表简单而稳健的平台,灵敏度与台式酶联免疫吸附测定相当,并且提供了针对多种生物标志物的反应的准确的数值解释。

[0080] 本文公开的ELISA平台是可以适应于诊断其它疾病的灵活技术。同时使用多行甚至可以用于同时检测数种疾病的多种生物标志物。检测模式不限于比色读出,并且可以转化为更灵敏的电化学、电-化学发光、化学发光、荧光和等离子体读出,但不限于此。本发明具有被集成到全自动化装置中用于在资源有限的环境中进行操作的适用性。设想的是磁体驱动的自动化和便携式比色传感器向本文提供的单个装置中的整合将提供用于疾病鉴定和检测(在一个实例中用于结核病检测)的单步小型化测定。这种装置在例如结核病的护理点诊断中用于筛选患者和结核病接触是真正有用的,其中即刻治疗的决定具有高的临床意义。

[0081] 如本文所公开的本ELISA板相对于当前可用的测试具有几个显著的优点,即该装置是用简单的非光刻方法制造的,是小型化的,并且不需要复杂的工具来进行测定。测定平台价格合理,每次测试费用低于10美元。该测定是超快的并且可以在15分钟内完成,并且使用本文公开的平板的ELISA测定的性能等同于黄金标准测试。此外,使用本文公开的平板的ELISA测定容易地与痰显微术结合实施,以加速在分诊和社区环境中的结核病诊断。

[0082] 因此,本文公开了一种简单且低成本的血清学诊断测试,例如用于检测结核病,其基于微芯片酶联免疫吸附测定平台用于在经报的少于15分钟内检测血浆样品中的例如抗分枝杆菌IgG。本文所公开的ELISA板采用较少流动的、磁体驱动的基于珠粒的酶联免疫吸附测定,用于同时检测针对多种分枝杆菌抗原的一种或更多种IgG应答。抗海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM) IgG应答是区分活动性结核病(ATB)与健康对照(HC)和潜伏性结核病感染(LTBI)的最强的预测因子。基于海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM)的ELISA测定显示与痰显微术相比的优越灵敏度(72%对比56%),在涂片阳性和涂片阴性确认的活动性结核病感染

(ATB) 样品中分别具有80%和63%的阳性率。接收器工作特性分析显示了将ATB与HC区分的良好准确度(AUC=0.77)。因此,基于TDM的ELISA测定可用作筛选装置,用于在护理点进行快速诊断。

[0083] 如本文所公开的,在一个实例中,本发明包括用于结核分枝杆菌感染的快速血清学诊断的微芯片ELISA。护理点测试(POCT)检测针对结核分枝杆菌特异性抗原的人免疫球蛋白(hIgG)的存在。微芯片酶联免疫吸附测定平台是可区分具有活动性结核病(ATB)的个体、具有潜伏性结核病(LTB)的个体和健康个体的快速检测,结果在十五分钟内可获得。

[0084] 在另一个实例中,本文描述了用于同时检测针对多种结核分枝杆菌脂质(海藻糖6,6'-二霉菌酸酯;TDM)和结核病蛋白质抗原(例如38kDa和抗原85A)的人IgG抗体应答的基于微芯片的免疫测定。

[0085] 微芯片装置由用于试剂储存例如洗涤缓冲液、磁珠(MB)的分散体、生物素标记的抗体、链霉抗生物素蛋白聚合酶标记和比色底物的多个序贯组织的水性(圆形)室组成(图2B)。通过不混溶的硅油相(菱形室)分离水性室以防止试剂混合。微芯片免疫测定采用磁体协助抗原包被的磁珠移动通过空间排列的水性试剂相和油相,用于血浆孵育、洗涤、标记和检测步骤。该装置的特征在于六个通道,各通道含有结核分枝杆菌脂质和蛋白质抗原包被的磁珠的个体或混合物。例如,通道1包含TDM包被的磁珠,而通道4包含TDM包被的磁珠和抗原85A包被的磁珠的混合物。然后使用位于微芯片下方的六个磁体,将磁珠从水相同时驱动到油并驱动回到水相中。

[0086] 本文还公开了检测样品中一种或更多种靶分析物的方法。这些一种或更多种靶分析物包括但不限于哺乳动物免疫系统的组分,例如抗体和细胞因子。在一个实例中,靶分析物是细胞因子。细胞因子的实例包括但不限于趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。趋化因子的实例包括但不限于C趋化因子、CC趋化因子、CX3C趋化因子和CXC趋化因子。CC趋化因子的实例包括但不限于CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27和CCL28。C趋化因子的实例包括但不限于XCL1和XCL2。CX3C趋化因子的实例包括但不限于CX3CL1。CXC趋化因子的实例包括但不限于CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16和CXCL17。干扰素的实例包括但不限于干扰素 α 、干扰素 α 1、干扰素 α 2、干扰素 α 4、干扰素 α 5、干扰素 α 6、干扰素 α 7、干扰素 α 8、干扰素 α 10、干扰素 α 13、干扰素 α 14、干扰素 α 16、干扰素 α 17、干扰素 α 21、干扰素 β 1、干扰素 ω 、干扰素 ϵ 1和干扰素 κ 。肿瘤坏死因子的实例包括但不限于肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 恶病质素)、肿瘤坏死因子 β (TNF- β)、肿瘤坏死因子配体超家族成员4(TNFSF4)、肿瘤坏死因子配体超家族成员8(TNFSF8)、肿瘤坏死因子配体超家族成员9(TNFSF9)、肿瘤坏死因子配体超家族成员11(TNFSF11, RANKL)、肿瘤坏死因子配体超家族成员12(TNFSF12; TWEAK)、肿瘤坏死因子配体超家族成员13(TNFSF13)、肿瘤坏死因子配体超家族成员13(TNFSF13b)、肿瘤坏死因子配体超家族成员14(TNFSF14)、肿瘤坏死因子配体超家族成员15(TNFSF15)、肿瘤坏死因子配体超家族成员18(TNFSF18)、淋巴毒素- α (LT- α)、LTA、LTB、T细胞抗原gp93(CD40L)、CD27L、CD30L、CD70、EDA、FASL、FASLG、4-1BBL、OX40L、增殖诱导配体(APRIL)和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL, TNFSF10)。白介素的实例包括但不限于白介素1(IL-1)、白介素1(IL-1)、白介素2

(IL-2)、白介素3(IL-3)、白介素4(IL-4)、白介素5(IL-5)、白介素6(IL-6)、白介素7(IL-7)、白介素8(IL-8)、白介素1(IL-8;也称为CXCL8)、白介素9(IL-9)、白介素10(IL-10)、白介素11(IL-11)、白介素12(IL-12)、白介素13(IL-13)、白介素14(IL-14)、白介素15(IL-15)、白介素16(IL-16)、白介素17(IL-17)、白介素18(IL-18)、白介素19(IL-19)、白介素20(IL-20)、白介素21(IL-21)、白介素22(IL-22)、白介素23(IL-23)、白介素24(IL-24)、白介素25(IL-25)、白介素26(IL-26)、白介素27(IL-27)、白介素28(IL-28)、白介素29(IL-29)、白介素30(IL-30)、白介素31(IL-31)、白介素32(IL-32)、白介素33(IL-33)、白介素35(IL-35)和白介素36(IL-36)。在另一个实例中,靶分析物是抗体。

[0087] 本文说明性地描述的本发明可以适当地在没有本文并未具体公开的任一种或多种要素、限制的情况下实施。因此,例如,术语“包括”、“含有”,“包含”等应被广泛而且不受限制地理解。此外,本文使用的术语和表述已经被用作描述而不是限制的术语,并且无意使用这些术语和表述来排除所示出和描述的特征或其部分的任何等同物,但是认可的是,在所要求保护的发明的范围内各种修改是可能的。因此,应当理解,尽管通过优选实施方案和任选特征具体公开了本发明,但是本领域技术人员仍可诉诸于本文所公开的其中体现的本发明的修改和变化,并且这些修改和变化被视为在本发明的范围内。

[0088] 本发明已经在本文中得到了广泛和一般地描述。落入一般公开内容的各较窄的种类和亚属分组也构成了本发明的一部分。这包括具有从该属去除任何主题名称的附带条件或负面限制的本发明的一般描述,而不管本文中是否明确记载了所去除的材料。

[0089] 其它实施方案在所附权利要求书和非限制性实施例之内。此外,在本发明的特征或方面以马库什组的措辞进行描述的情况下,本领域技术人员将认识到,本发明也藉由由马库什组的任何个体成员或成员亚组来描述。

[0090] 实验部分

[0091] 化学品与材料:超顺磁性微珠例如甲苯磺酰基激活的超顺磁性微珠(MBs, Dynabeads, 目录号14013, 直径4.5 μ m或1.0 μ m, 4×10^8 个珠粒/mL, 30mg/mL)来自Invitrogen。来自牛分枝杆菌(Mycobacterium bovis)的海藻糖6,6'-二霉菌酸酯(TDM, 目录号T3034),不含脂肪酸的牛血清白蛋白(BSA, 目录号A7030)来自Sigma。用生物素标记的山羊F(ab')₂抗人IgG(H+L)来自Southern Biotech。Nunc PolySorp 96孔板、1步超TMB ELISA和Pierce链霉抗生物素蛋白聚-HRP得自Thermo Scientific。分枝杆菌重组38kDa和Ag85A蛋白得自Mybiosource(CA, USA)。磁体例如钕盘磁体(直径5mm, 厚度2mm)来自Alibaba Global Retail。除非另有规定,所有实验均使用不含Ca⁺²和Mg⁺²离子的PBS缓冲液进行。

[0092] 装置制造:使用如现有技术中报道的非平版印刷技术制造本文所公开的微芯片或ELISA板。该装置由组装和粘合的两片透明的聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)激光切割片(也称为例如“微芯片”)或在组装和粘合的片之间具有石蜡膜层的两片PMMA激光切割片(称为“石蜡膜粘合的微芯片”)组成。模板使用AutoCAD软件设计。然后将设计提供给供应商(Ying KwangAcrylic Trading, 新加坡)进行激光切割服务。顶模板(图1A)在3mm厚的PMMA上被激光切割,而底模板(图1B)在1.5mm厚的PMMA上切割。两个模板或两个模板和石蜡膜层(图1C)使用喷雾粘合剂(3M, Super 75)粘合。允许粘合剂粘合并干燥20分钟,然后微芯片即可使用。六通道微芯片装置的大致尺寸为95mm \times 70mm \times 5mm(长 \times 宽 \times 高)。

[0093] 人类受试者和样品采集:在新加坡Tan Tock Seng医院(TTSH)的结核病控制组采集了活动性结核病(ATB)、健康对照(HC)和潜伏性结核病感染(LTBI)个体的血液样品。在BSL3设备中分离血浆,并立即储存在 -80°C 。在收集的样品中,根据临床数据如干扰素- γ 释放测定、痰涂片显微术和细菌培养试验随机选择和分层来自65名ATB、41名HC和40名LTBI个体的血浆。该研究获得机构IRB(NHG DSRB号2010/00566)的批准。基于根据美国胸科学会(ATS)进行的AFB(耐酸杆菌)涂片等级对痰样品进行分层,阴性(-ve)代表0个AFB/100个视场;1+代表1-9个AFB/100个视场;2+代表1-9个AFB/10个视场;3+代表1-10个AFB/视场,4+表示 >10 个AFB/视场。

[0094] 血浆中针对IFN- γ 应答的样品采集:在IGRA管中获得4名LTBI和5名HC个体的血液样品,IGRA管是Quantiferon TB黄金测定的一部分。一个是阳性对照管,一个是阴性对照管,一个是测试管(具有Mtb特异性抗原)。简而言之,血液被收集在这些管中。过夜孵育后,使用标准96孔ELISA,从所有三个管中的血浆中估计IFN γ 。在本情形中,将血液一式二份地抽取在三个管[丝裂原(阳性对照管)、抗原(测试管)和无(阴性对照管)]中。然后将这些管在 37°C 孵育过夜。第二天,将第一组的三个管送到TTSH医院检测干扰素 γ (IFN- γ)。在医院,这使用标准IFN- γ ELISA(Quantiferon测定的一部分)对分离的血浆进行。将血浆从第二组的三个管中分离,并用于使用微芯片ELISA法检测IFN- γ 。

[0095] 制备脂质和蛋白质包被的MB:对于TDM包被,将 0.8mI MB储液(4×10^8 个珠粒/ mI)装入具有螺帽的玻璃管中,并依次用70%和100%乙醇磁性洗涤。然后将MB风干,并将含 $84\mu\text{g}$ TDM的 2.4mI 溶剂(9:1己烷:乙醇)加入到干燥的MB中。然后将MB分散体在水浴中超声处理约1小时,直到溶剂蒸发至干。对照珠粒(无TDM的珠粒)类似地用无TDM溶剂进行超声处理,直至溶剂蒸发。该步骤之后是化学和物理阻断,其中用 1.6mI 0.1%BSA/PBS缓冲液将干燥的TDM包被的MB超声处理2min,随后在加入 6.4mI 0.2M Tris缓冲液pH 8.0之后再超声处理2min。然后将珠粒分散体在缓倾斜转子中于室温混合24h,并用 10mI 0.1%BSA洗涤四次,然后在 1.6mI 0.1%BSA/PBS缓冲液中复溶,并于 4°C 储存直至进一步使用。

[0096] 对于蛋白质或抗体包被,38kDa糖脂蛋白(38kDa)、抗原85A(Ag85A)蛋白或小鼠抗人干扰素 γ 抗体(抗人IFN- γ Ab, BD#551221)或小鼠抗人IL-2抗体(抗人IL2Ab, BD#555051)或小鼠抗人肿瘤坏死因子 α 抗体(抗TNF- α Ab, BD#551220)根据制造商的方案(Invitrogen)与磁珠共价连接。简言之,用 1mI 0.1M硼酸盐缓冲液(pH9.5)洗涤 0.2mI MB储液。然后,每mg MB加入 $40\mu\text{g}$ 蛋白质,并将其在缓倾斜转子中混合30min。在下一步中,加入BSA至0.1%的终浓度,再混合24h。将MB用含0.1%BSA的PBS洗涤两次,用0.2M Tris和0.1%BSA缓冲液化学和物理封闭过夜。将MB用0.1%BSA/PBS洗涤两次,在 0.4mI 0.1%BSA中复溶,并于 4°C 储存直至进一步使用。

[0097] TDM包被的磁珠的表征:TDM在疏水(磁性)珠粒上的均匀包被取决于标称的TDM表面浓度,其相当于添加的TDM的量/包被过程中使用的珠粒的总表面积。由于高脂质浓度导致形成大珠粒聚集体,首先评估不同的TDM表面浓度($0.16\mu\text{g}/\text{cm}^2$, $0.41\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 $0.65\mu\text{g}/\text{cm}^2$),以最佳包被TDM到珠粒上。然后测试所得的TDM包被的磁珠的尺寸分布、结合的TDM的量以及使用ATB个体的汇集的血浆样品检测抗TDM IgG的能力。动态光散射(DLS)显示磁珠的均匀尺寸分布,无论TDM表面浓度如何(图12)。对于所有MB制备物,获得 <0.21 的多分散性指数(PI),表明存在单分散磁珠(基于标准,单分散珠粒的PI <0.3)。通过动态光散射获得的

TDM包被的磁珠的平均直径范围为4.2-4.6 μm ,完全在未包被的新生磁珠(直径4.4 μm)的范围内。此外,通过光学显微术观察不到大的多珠粒聚集体,表明TDM包被的磁珠的单分散性质(图13)。

[0098] 为了评估吸附到磁珠表面上的TDM的量,提取了与各磁珠制备物(见上文)结合的TDM用于薄层色谱(TLC)分析。薄层色谱分析表明,使用0.41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和0.16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的表面TDM浓度制备的磁珠的结合TDM的回收率(%)相似,但是使用0.65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的浓度的磁珠的回收率较低(图14)。因为在小批量制备物(0.2mI)中由于对反应小瓶的非特异性吸附引起的更高的脂质损失是显著的,使用以大批量(1.6mI)制备的磁珠重复TDM回收过程。在大批量制备中,表面TDM浓度为0.41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的磁珠显示出结合的TDM的回收率为54%。在该浓度并基于TDM的分子量($\sim 2636\text{g}/\text{mol}$)和制备中使用的珠粒的总数,每珠粒的TDM分子数估计为 $\sim 3.2 \times 10^7$ 。这与基于珠粒的表面积($6.4 \times 10^{-11}\text{m}^2$,直径 $\sim 4.5\mu\text{m}$)和TDM分子排阻(molecular exclusion)面积($\sim 180^\circ\text{A}^2/\text{分子}$)的 3.4×10^7 个TDM分子/珠粒的理论估计值是一致的,表明珠粒表面上均匀的TDM单层。接下来,使用基于流式细胞术的MB免疫测定测试TDM包被的磁珠在ATB个体的汇集血浆中检测抗TDM IgG应答的能力。与使用0.16和0.65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的TDM制备的磁珠相比,表面TDM浓度为0.41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的珠粒制备物显示出最高水平的抗TDM IgG抗体(图15)。因为温度变化和试剂储存可影响酶联免疫吸附测定的性能,所以随后测试了TDM包被的磁珠(0.41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)的稳定性。磁珠在室温下保存5个月后保持95%的活性,10个月后保持74%的活性,具有65-125%的相对变化(图16)。基于上述分析,选择表面TDM浓度为0.41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的磁珠制备物进一步用于磁珠ELISA和基于TDM的微芯片ELISA。

[0099] 微芯片ELISA设计:然后将磁珠ELISA测定转化到微芯片装置上,用于快速检测血浆样品中的IgG。各微芯片具有六个通道,其中可以进行六个不同的反应/测定。各通道由连接的室组成,所述室填充有由不混溶的油分离的空间排列的静止的水性试剂。微芯片ELISA通过使用下面的磁体驱动这些室中的每一个中的抗原包被的磁珠来进行。各室执行不同的功能:第一个用于IgG捕获,第二个用于结合生物素标记的第二抗IgG抗体,第三个用于结合链霉抗生物素蛋白聚合酶,备选室用于洗涤(图2)。最后,MB结合的聚合酶在后一个室中诱导TMB氧化,产生蓝色底物(图4)。停止反应,并在450nm测量光密度(OD)。在微芯片ELISA的前三个通道中,分别检测针对TDM、38kDa和Ag85A的IgG。第四和第五通道用于测量针对与每种蛋白质抗原组合的TDM的总IgG应答。第六通道用作阴性对照,没有加入抗原。整个微芯片ELISA过程从血浆样品添加到比色检测需要15min。

[0100] 微芯片ELISA原理:微芯片装置由六个通道组成,各通道特征在于与六个菱形室交替连接的七个圆形室。圆形室含有70 μI 的水性试剂,例如脂质/蛋白质/抗体包被的磁珠(MB)、洗涤缓冲液、检测示踪剂抗体、聚合物酶标记和比色底物,而菱形室含有70 μI 不混溶的硅油。油在水性试剂之间提供了屏障,并且允许在试剂之间珠粒的手动辅助的磁珠驱动。将血浆和试剂在含5%无脂肪酸BSA的PBS缓冲液中稀释。

[0101] 为了同时检测针对多种结核分枝杆菌抗原的IgG应答用于结核病诊断,在微芯片装置的通道1、2和3中,使用TDM-、38kDa-或Ag85A-包被的珠粒(5 μI , 10^6 个珠粒)与BSA包被的珠粒(5 μI , 10^6 个珠粒)的均等混合物,而通道4和5含有TDM包被的MB(5 μI)与38kDa-或Ag85A-包被的MB(5 μI)的相等混合物;通道6含有BSA包被的MB(10 μI , 2×10^6 个珠粒)作为对照。然后将血浆样品(60 μI , 1:200)加至珠粒并反应3min。

[0102] 为了开发细胞因子标准曲线,使用5个独立的石蜡膜粘合的微芯片装置。实验在不同天进行,并制备不同批次的抗体包被的MB (10 μ I, 2 \times 10⁶个珠粒)。通过在10%胎牛血清中掺入IFN γ 制备IFN γ 标准品(浓度范围为4IU/mI至0.25IU/mI)。将标准品(50 μ I, 1:2)加至珠粒并在37 $^{\circ}$ C反应10分钟。

[0103] 为了确定LTBI和HC个体的血浆中的IFN- γ ,在石蜡膜粘合的微芯片的全部6个通道中都使用了抗体(抗IFN- γ)包被的MB (10 μ I, 2 \times 10⁶个珠粒)。为来自抗原、丝裂原和无(niI)的管的各血浆样品分配两个孔。将血浆样品(50 μ I, 稀释度1:2)加至珠粒并在37 $^{\circ}$ C反应10分钟。

[0104] 为了标准化微芯片ELISA以检测细胞因子,在石蜡膜粘合的微芯片的全部6个通道中使用抗体包被的MB (10 μ I, 2 \times 10⁶个珠粒)。将细胞因子标准品(IFN- γ 、TNF- α 或IL-2, 浓度范围为10-2500pg/mI)掺入PBS-Tween、含10%胎牛血清(FCS)的RPMI、全血浆和全血作为培养基。从健康的无病个体获得为汇集的血浆的样品。将掺标的样品(60 μ I)加至珠粒并在37 $^{\circ}$ C分别反应5分钟、10分钟、10分钟和18小时。

[0105] 在捕获特异性IgG或细胞因子后,将珠粒磁力驱动至洗涤室(30秒)以去除非特异性血浆蛋白。然后将珠粒驱动至生物素抗人IgG(500ng/mI)室,用于生物素-抗体标记2或3分钟。在短暂洗涤(30秒)后,将珠粒驱动至链霉抗生物素蛋白聚-HRP(500ng/mI)室用于额外2或3min的酶标记。再次洗涤(30秒)后,将珠粒驱动至一步超TMB底物溶液(one-step ultra TMB substrate solution)并孵育5分钟。使用等体积的2M H₂SO₄或3M H₂SO₄停止比色反应,并将所得溶液立即转移到96孔板中以使用微孔板读数器(PerkinElmer Envision 2104多标记读数器)在450nm处进行吸光度测量。从BSA珠粒(通道6)中减去测试抗原珠粒(通道1-5)的吸光度值,该差值与血浆中存在的脂质/蛋白质特异性抗体的量相关。微芯片ELISA测定的总时间在约15至25分钟之间。

[0106] 数据分析:通过从测试抗原包被的MB中减去对照BSA包被的MB的值,在450nm处测量微芯片和常规平板或MB结合的测定的吸光度值。通过保持75%的恒定特异性来确定测定的截止点(图上的水平线,如例如图8所示)和灵敏度。选择这个界限来在恒定特异性比较对多种抗原的灵敏度。通过绘制真阳性率和假阳性率曲线,在GraphPad Prism 5软件中生成ROC曲线。从真阳性样品的比例和真假阳性样品的总和获得阳性预测值,而从真阴性样品的比例和真假阴性样品的总和获得阴性预测值。使用Mann-Whitney非配对t检验(GraphPad Prism 5)确定不同群体之间IgG应答的显著差异。

[0107] 针对抗TDM反应检测比较MB ELISA与常规平板ELISA形式。使用TDM包被的MB(0.41 μ g/cm²)进行MB ELISA以检测血浆中的抗TDM IgG,并将所得IgG水平与常规平板ELISA形式(其中TDM被包被在平板表面上)进行比较。两种形式都示出,与HC个体相比,ATB患者血浆中抗TDM IgG水平显著升高(图6A、B)。使用竞争性平板测定法测试抗TDM IgG抗体的特异性,其中使用10%游离海藻糖来阻断抗原-抗体反应。在22个ATB血浆样品中,12个显示出使用游离海藻糖对IgG与TDM结合的50%或更多的抑制,这表明血浆抗TDM抗体对TDM的海藻糖部分的亲和力(图17)。在剩余的10个ATB样品中,没有观察到游离海藻糖的抑制作用,表明抗TDM抗体与海藻糖和分枝菌酸之间的糖苷键附近的表位结合,所述糖苷键由与酰基链结合时二糖所获得的独特构象构成。为了使用常规平板ELISA对MB ELISA进行基准测试,评估了使用两种方法的相同个体血浆中的抗TDM IgG。两种方法都显示灵敏度>68%(表5)和良好

的相关性 ($R^2=0.96$, 图6C)。磁珠ELISA的总体测定时间为约50分钟,大幅度地快于常规平板ELISA(5小时)。

[0108] 基于微芯片的免疫测定

[0109] 基于微芯片的免疫测定特征在于以下顺序步骤:

[0110] -使血浆样品与水性室中的脂质/蛋白质抗原包被的MB反应(约3分钟);

[0111] -在洗涤室中从珠粒上洗去未结合的非特异性血浆蛋白(约30秒);

[0112] -使生物素缀合的抗人IgG与吸附在MB上的hIgG结合(约2分钟);

[0113] -将过量的、未结合的生物素缀合的抗人IgG从珠粒上洗去(约30秒);

[0114] -将链霉抗生物素蛋白聚辣根过氧化物酶(聚-HRP)与珠粒上的生物素缀合的抗人IgG结合(约2分钟);

[0115] -免疫反应后,在洗涤室中从珠粒上洗去未结合的聚合酶,然后将MB转移到具有TMB底物的室中;在此聚合酶诱导的TMB氧化导致形成蓝色产品(约5分钟);

[0116] -显色后,将MB驱动回到前室;

[0117] -随后,将终止溶液(75 μ I)加入到TMB室中,并在450nm处测量吸光度,以确定针对所选Mtb抗原的IgG抗体的水平。

[0118] 基于微芯片的免疫测定的总时间从样品加入到针对结核分枝杆菌的抗体的比色检测为大约15分钟。

[0119] 针对结核分枝杆菌抗原的抗体应答

[0120] 使用基于微芯片的免疫测定法测量具有活动性结核病(ATB)、潜伏感染(LTB)和健康对照(H)的个体的血浆样品中针对结核分枝杆菌抗原的IgG应答(图8)。在微芯片上测试了总共146个血浆样品:65个ATB、40个LTB和41个H。针对作为生物标志物的TDM的IgG应答对区分活动性结核病样品与潜伏感染和健康对照的样品显示最高的灵敏度(图8A)。针对TDM和抗原85A蛋白质的混合物的IgG应答对区分潜伏个体与健康对照显示出最高的灵敏度(图8E)。

[0121] 抗体检测测定的ROC曲线

[0122] 产生接收器工作特征(ROC)曲线以阐明三种所选择的抗原区分活动性TB、潜伏感染和健康对照组的表现。TDM脂质抗原在区分活动性结核病与潜伏感染(AUC 0.75;图9A)和健康对照(AUC 0.77;图9B)中显示最大曲线下面积(AUC)。具有TDM作为单一抗原的人IgG应答与通过两种抗原的组合获得的那些相比为更好或相似的(图9A和9B)。抗原85A单独或与TDM脂质组合显示0.69的最高AUC,以区分潜伏感染与健康对照(图9C)。因此,抗原85A是区分潜伏个体与健康个体的最强的预测因子。

[0123] 比较血浆反应性来选择结核分枝杆菌(Mtb)抗原

[0124] 为了了解针对被测抗原的应答库,将吸光度值归一化并在ATB、LTB和H个体之间进行比较。图10显示了归一化值的热图,其表明在活动性结核病(ATB)、潜伏性结核病(LTB)和健康(HC)个体中对单个抗原和抗原混合物的血浆反应性。针对TDM脂质抗原的IgG应答可以区分活动性结核病(ATB)病例与LTB和H个体的病例。

[0125] 所选择的抗原在微芯片免疫测定法中的血清学诊断潜力

[0126] 为了解析在潜在的基于微芯片测定的护理点(POC)测试中被测抗原及其各自组合的血清学诊断潜力,计算了灵敏度、特异性、阳性预测值和阴性预测值。表1表明使用TDM抗

原区分活动性个体与潜伏个体的灵敏度和特异性分别为71%和75%。类似地,单独的TDM抗原在区分活动性TB与健康个体中表现最好,灵敏度和特异性分别为72%和76%(表2)。TDM脂质和抗原85A蛋白质的混合物可以区分潜伏性结核病感染与健康个体,灵敏度为57%,特异性为76%(表3)。

[0127]

活动性结核病对比潜伏感染					
抗原	灵敏度 (%)	特异性 (%)	阳性预测值(PPV) %	阴性预测值 (PPV) %	ROC, AUC
TDM	71	75	82	61	0.75
38kDa	46	75	75	46	0.62
抗原 85A	32	75	68	40	0.57
TDM + 38kDa	63	75	81	57	0.7
TDM+抗原 85A	51	75	77	48	0.65
TDM+38kDa+抗原 85A 的 GLM	65	75			0.77

[0128] 表1.使用微芯片ELISA评估单独的TDM脂质、38kDa和抗原85A蛋白质以及TDM+38kDa和TDM+抗原85A的混合物在区分ATB和LTB个体的血清学诊断潜力。广义线性模型(GLM)被应用于外推三种抗原的组合的血清学诊断潜力。

[0129]

活动性结核病对比潜伏感染					
抗原	灵敏度 (%)	特异性 (%)	阳性预测值(PPV) %	阴性预测值 (PPV) %	ROC, AUC
TDM	71	75	82	61	0.75
38kDa	46	75	75	46	0.62
抗原 85A	32	75	68	40	0.57
TDM + 38kDa	63	75	81	57	0.7
TDM+抗原 85A	51	75	77	48	0.65
TDM+38kDa+抗原 85A 的 GLM	65	75			0.77

[0130] 表2.使用微芯片ELISA评估TDM、38kDa、抗原85A、TDM+38kDa、TDM+抗原85A以及三

种抗原的组合(外推自GLM)用于区分ATB和H个体的血清学诊断潜力。

[0131]

潜伏感染对比健康对照					
抗原	灵敏度 (%)	特异性 (%)	阳性预测值(PPV) %	阴性预测值 (PPV) %	ROC, AUC
TDM	35	76	58	54	0.56
38kDa	35	76	58	54	0.56
抗原 85A	42	76	63	57	0.69
TDM + 38kDa	42	75	63	57	0.62
TDM+抗原 85A	57	76	70	65	0.69
TDM+38kDa+抗原 85A 的 GLM	56	76			0.70

[0132] 表3. 使用微芯片ELISA评估TDM、38kDa、抗原85A、TDM+38kDa、TDM+抗原85A以及三种抗原的组合用于区分LTB和H个体的血清学诊断潜力。

[0133] 由于痰阴性活动性结核病患者难以使用POC测定进行诊断,因此应用我们的基于微芯片的免疫测定来检测活动性结核病患者这一亚组。基于抗TDM IgG应答分别检测了80%的痰阳性和63%的痰阴性活动性结核病患者(表4)。

[0134]

抗原	涂片阳性培养确认病例(%)	涂片阴性培养确认病例(%)
TDM	80	63
38kDa	48	52
抗原 85A	49	59
TDM + 38kDa	66	77
TDM+抗原 85A	77	67
TDM+38kDa+ 抗原 85A 的 GLM	77	74

[0135] 表4. 涂片阳性和涂片阴性样品中抗原阳性的百分比。

[0136] 用于诊断结核病的POC的最小规范

[0137] 接下来,测试了具有世界卫生组织(WHO)针对护理点测试规定的最小规范(minimum specifications)的基于TDM抗原的微芯片ELISA的血清学诊断潜力。比较表明,开发的基于TDM的微芯片免疫测定符合WHO的规范。鉴于成年人中的特异性较低,与用于作

出治疗决定的测试相比,开发的POCT旨在进行分诊和转诊。此外,我们的队列中免疫测定的灵敏度优于痰显微术测定(灵敏度~56%)。

[0138] 使用微芯片ELISA同时检测针对多种Mtb抗原的IgG抗体。微芯片ELISA显示在146个血浆样品(65个ATB、40个LTBI和41个HC)中针对三种抗原(TDM、38kDa和Ag85A)及其组合的IgG抗体的检测。如果值高于从HC和LTBI样品获得的截止值,则ATB样品被认为是阳性的。在75%的特异性设定各抗原的截止值,以便于固定特异性比较它们的相对灵敏度。使用上述标准,88%(57/65)的ATB血浆样品对于所测试的三种抗原中的至少一种为IgG阳性。仅40%(26/65)的ATB血浆样品对于任何两种被单独测试的抗原均为IgG阳性,仅28%(18/65)的ATB血浆样品对全部三种抗原均为IgG阳性。这些发现表明针对三种抗原的异质IgG应答。与HC血浆样品相比,活动性结核病(ATB)样品对全部三种抗原具有显著更高的IgG水平(图8A-C),最高灵敏度为针对TDM的72%,表明在区分活动性结核病(ATB)与健康对照(HC)中,与抗蛋白应答相比,抗糖脂体液应答的可靠性更高。另外,接收器工作特征(ROC)曲线分析表明,与38kDa和Ag85A相比,就曲线下面积(AUC,0.77对比分别的0.69和0.74)而言,基于TDM的微芯片ELISA在区分活动性结核病(ATB)与健康对照(HC)个体中具有更好的表现(图9B)。这些结果表明,针对TDM的IgG体液免疫应答是ATB检测的大有希望的免疫学标志物。

[0139] 基于TDM的磁珠ELISA(MB ELISA)与常规平板ELISA测定的比较显示良好的相关性($R^2=0.96$;图6C;表5),表明TDM微芯片ELISA与台式ELISA一样有效,具有在15分钟内进行而不需要精密仪器的重要优点。

[0140]

TDM 包被表面 (测定时间)	灵敏度(%)	特异性(%)
MB ELISA (~ 50min)	68	75
常规平板 ELISA (~5 小时)	74	75

[0141] 表5.常规平板ELISA和MB TDM ELISA之间的灵敏度和特异性比较。

[0142] 针对区分ATB与LTBI个体,观察到类似趋势。当与针对38kDa和Ag85A蛋白质抗原的应答相比时,抗TDM IgG水平提供了最高的区分灵敏度(71%) (图8A,左图和表6)。接收器工作曲线(ROC)进一步证实了,与基于蛋白质抗原的测定相比,基于TDM的微芯片ELISA(AUC,0.75)在区分活动性结核病(ATB)与潜伏性结核病个体(LTBI;表6)中优异的准确性。实际上,根据广义线性模型(使用逻辑回归分析),针对TDM的IgG应答在区分活动性结核病与健康对照(HC)和潜伏结核病个体(LTBI)中是最强预测因子。

[0143]

ATB 对比 LTBI

抗原	灵敏度(%)	特异性(%)	阳性预测值 (PPV) %	阴性预测值 (NPV) %	ROC, AUC
TDM	71	75	82	61	0.75
38kDa	46	75	75	46	0.62
Ag85A	32	75	68	40	0.57
TDM + 38kDa	63	75	81	57	0.7
TDM + Ag85A	51	75	77	48	0.65

[0144] 表6. 使用微芯片ELISA评估单独的抗原及其组合用于区分ATB和LTBI个体的血清学诊断潜力。

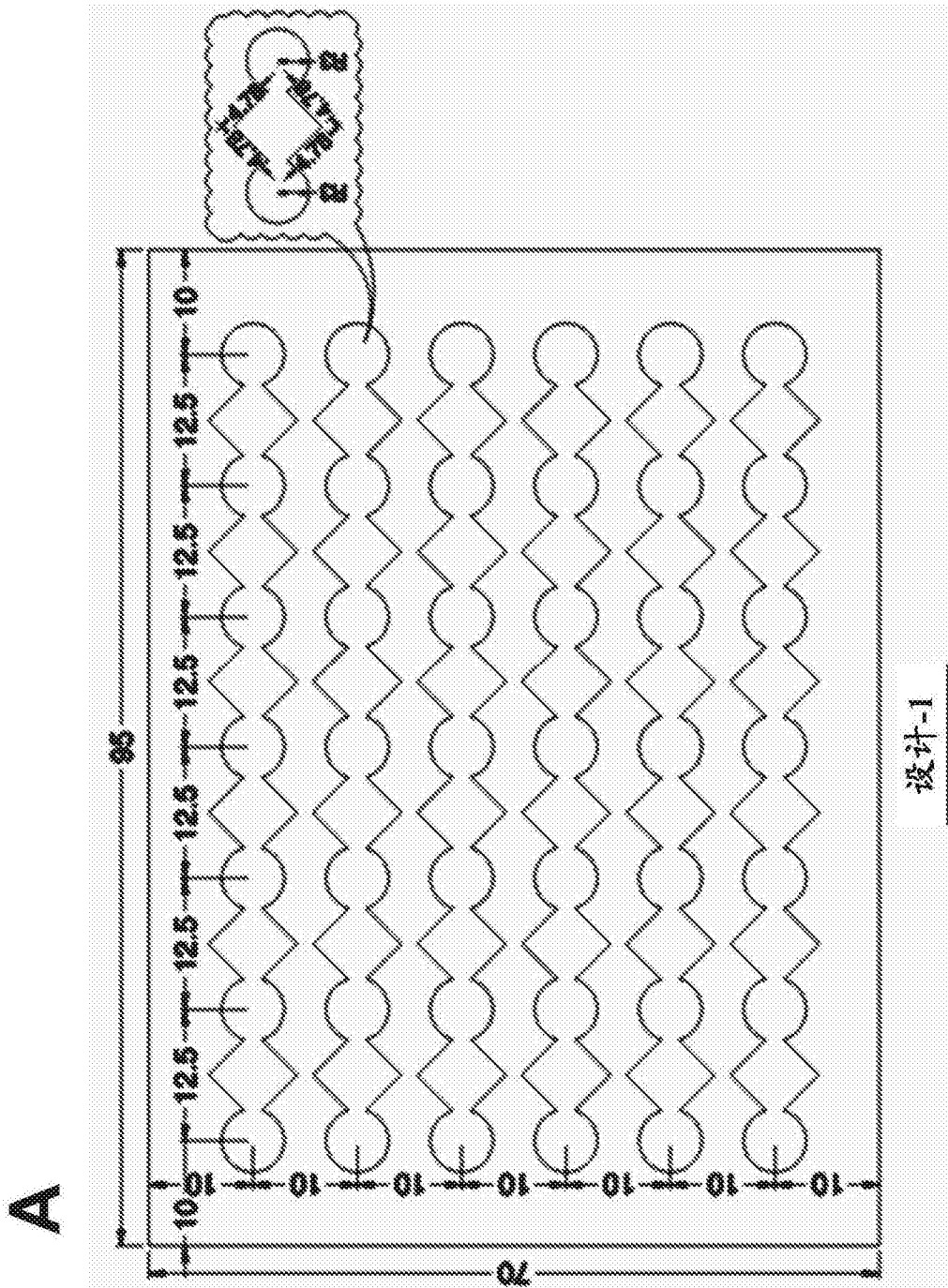


图1

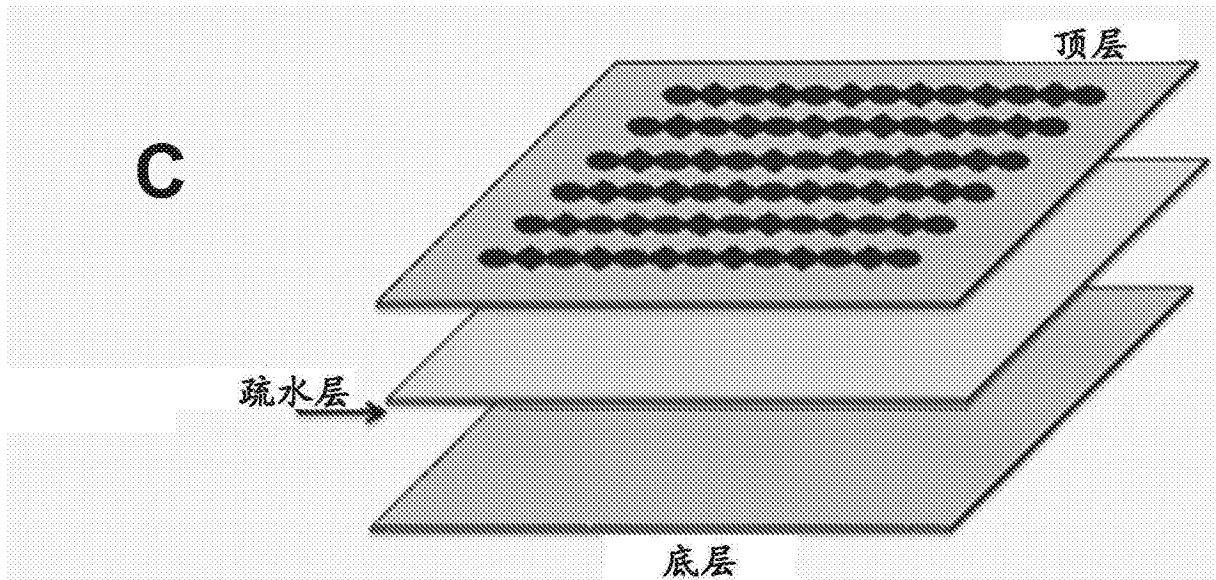
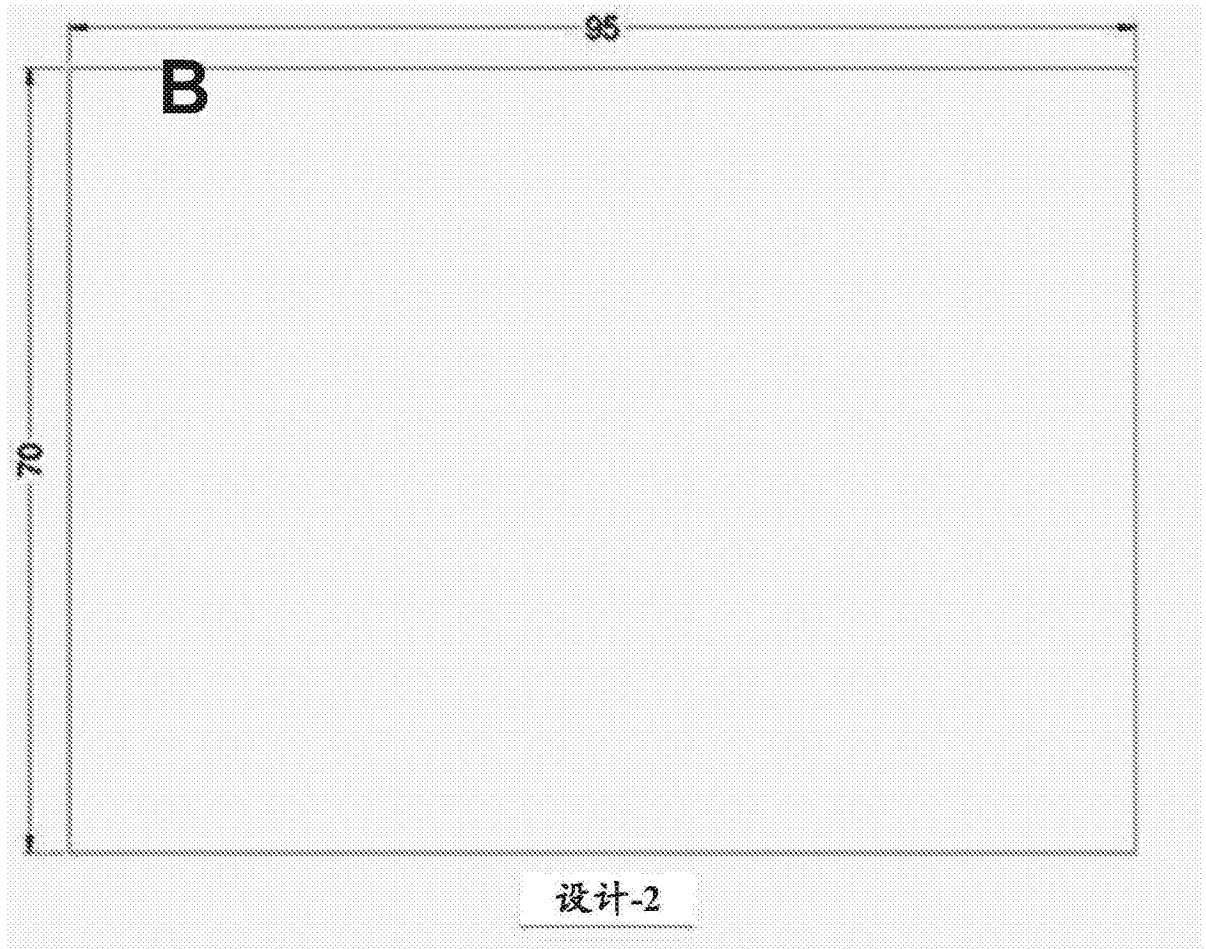


图1 (续)

A

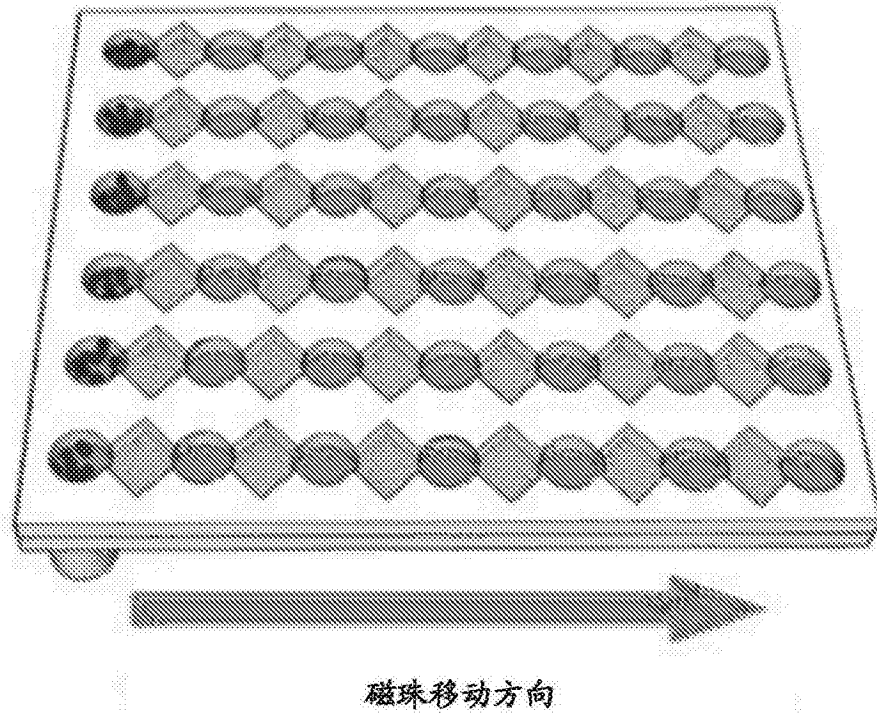


图2

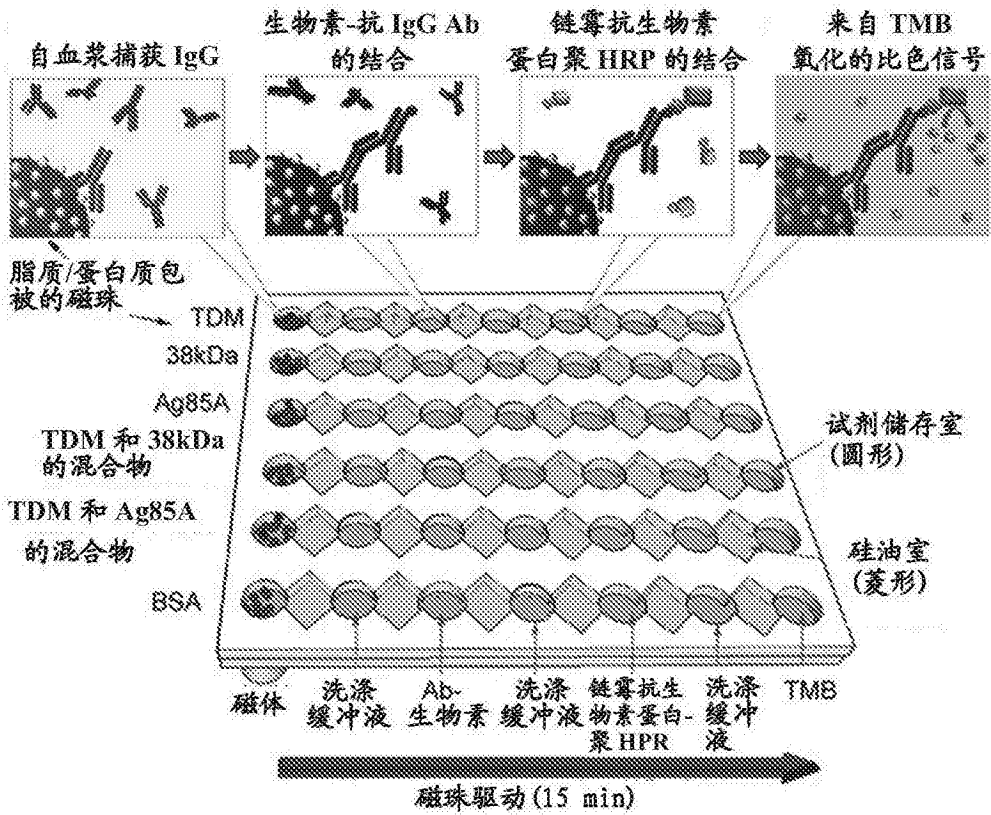


图3

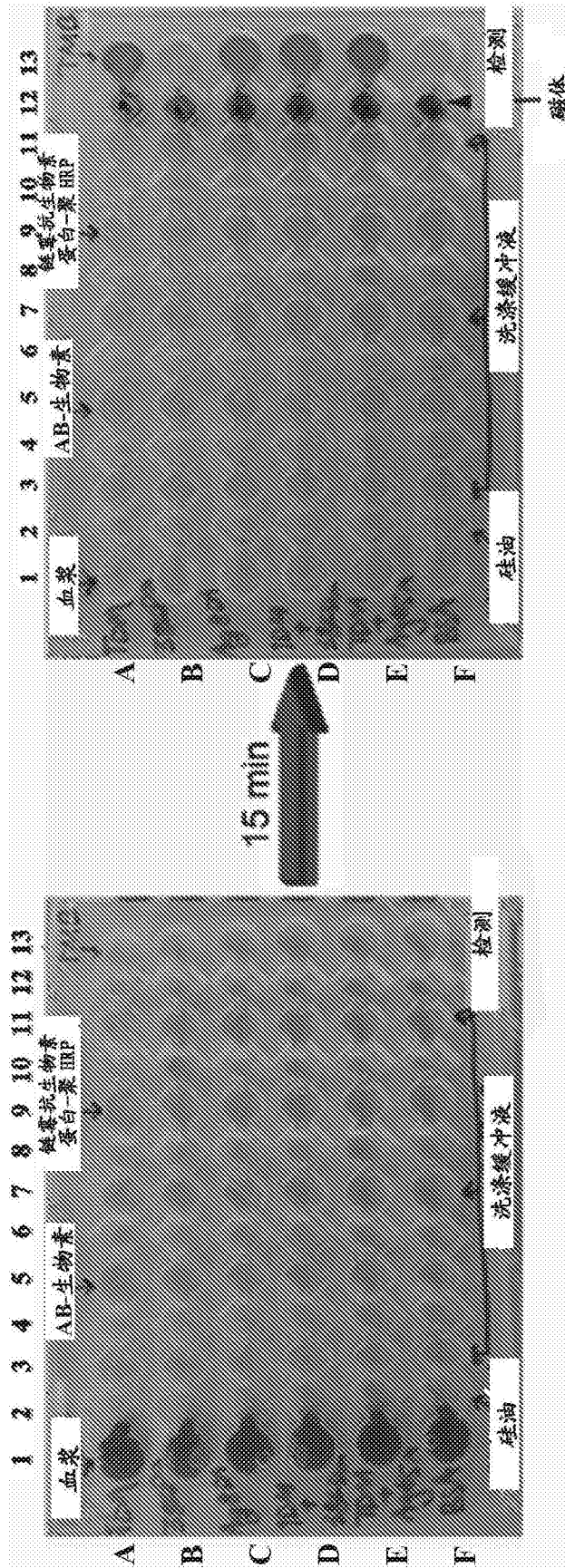


图4

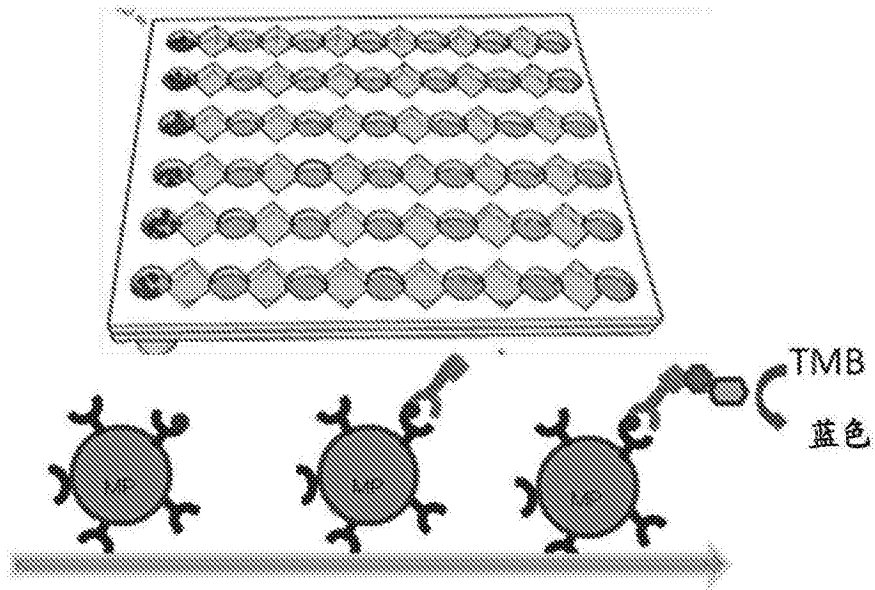


图5

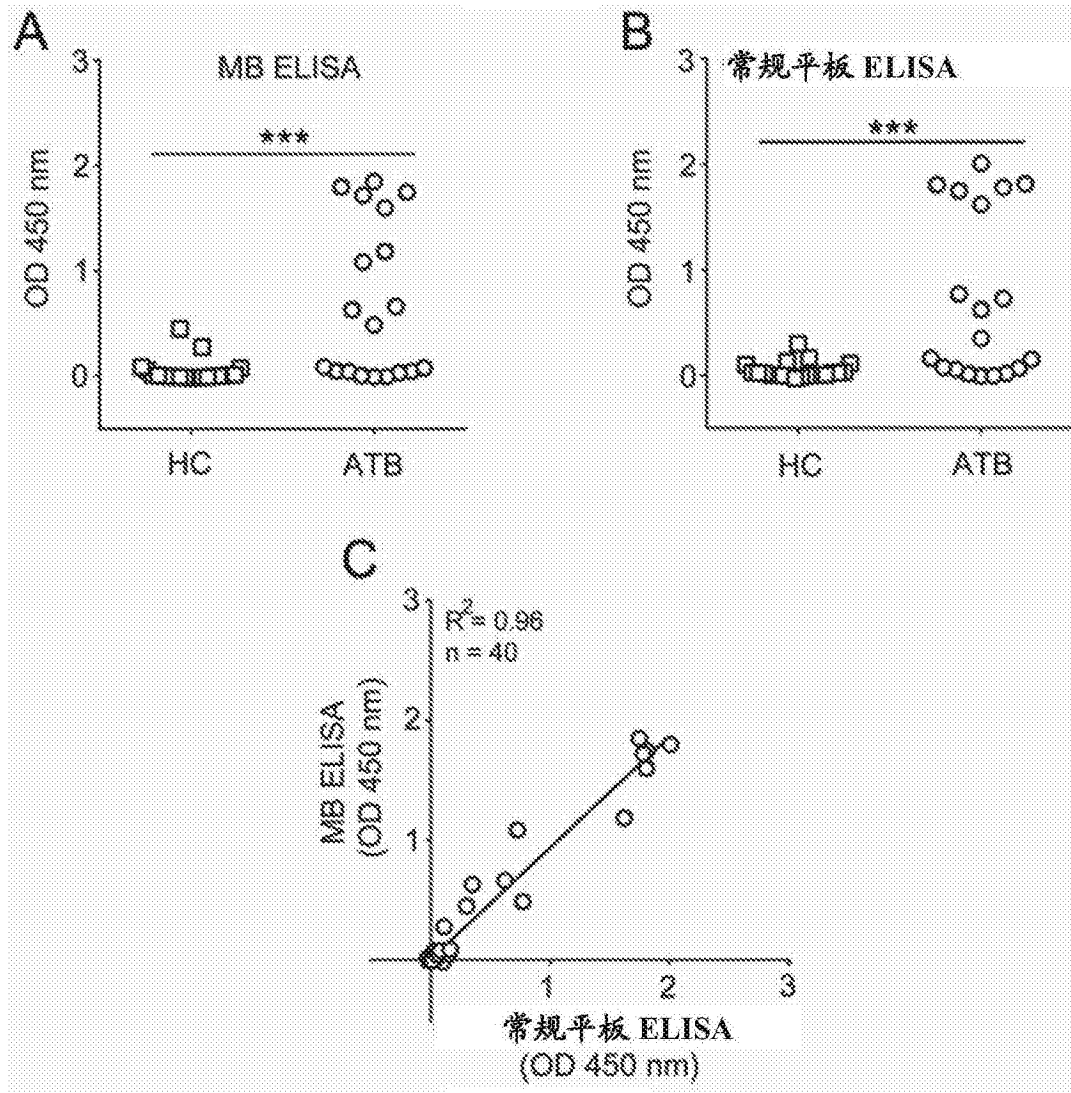


图6

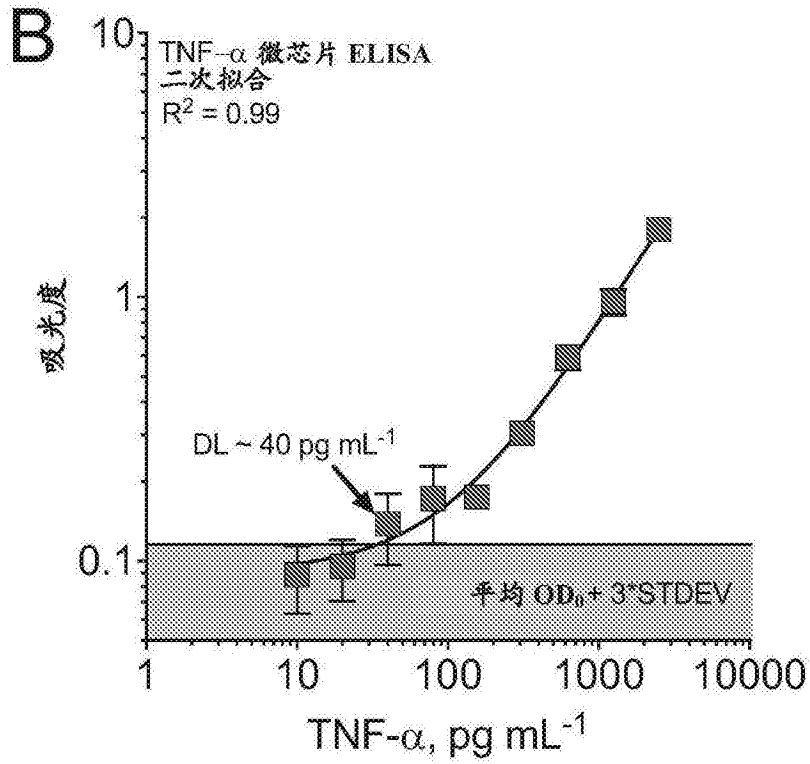
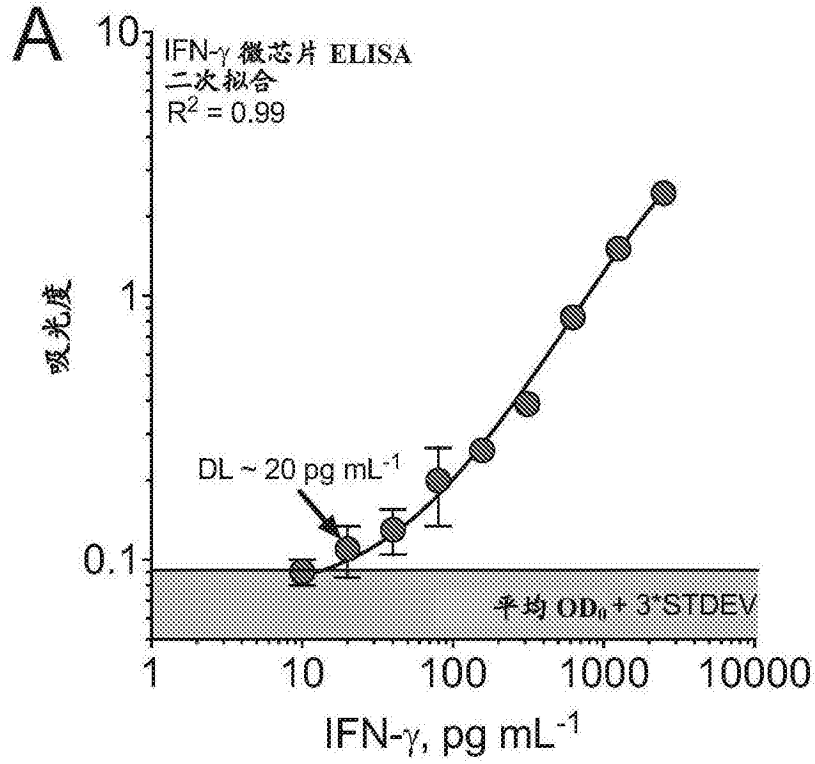


图7

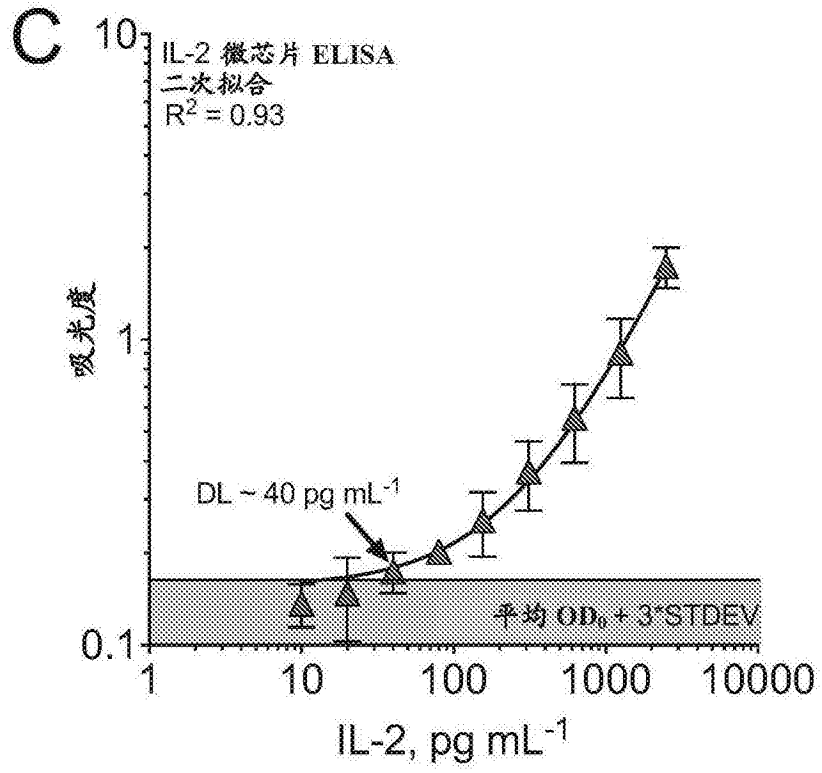


图7(续)

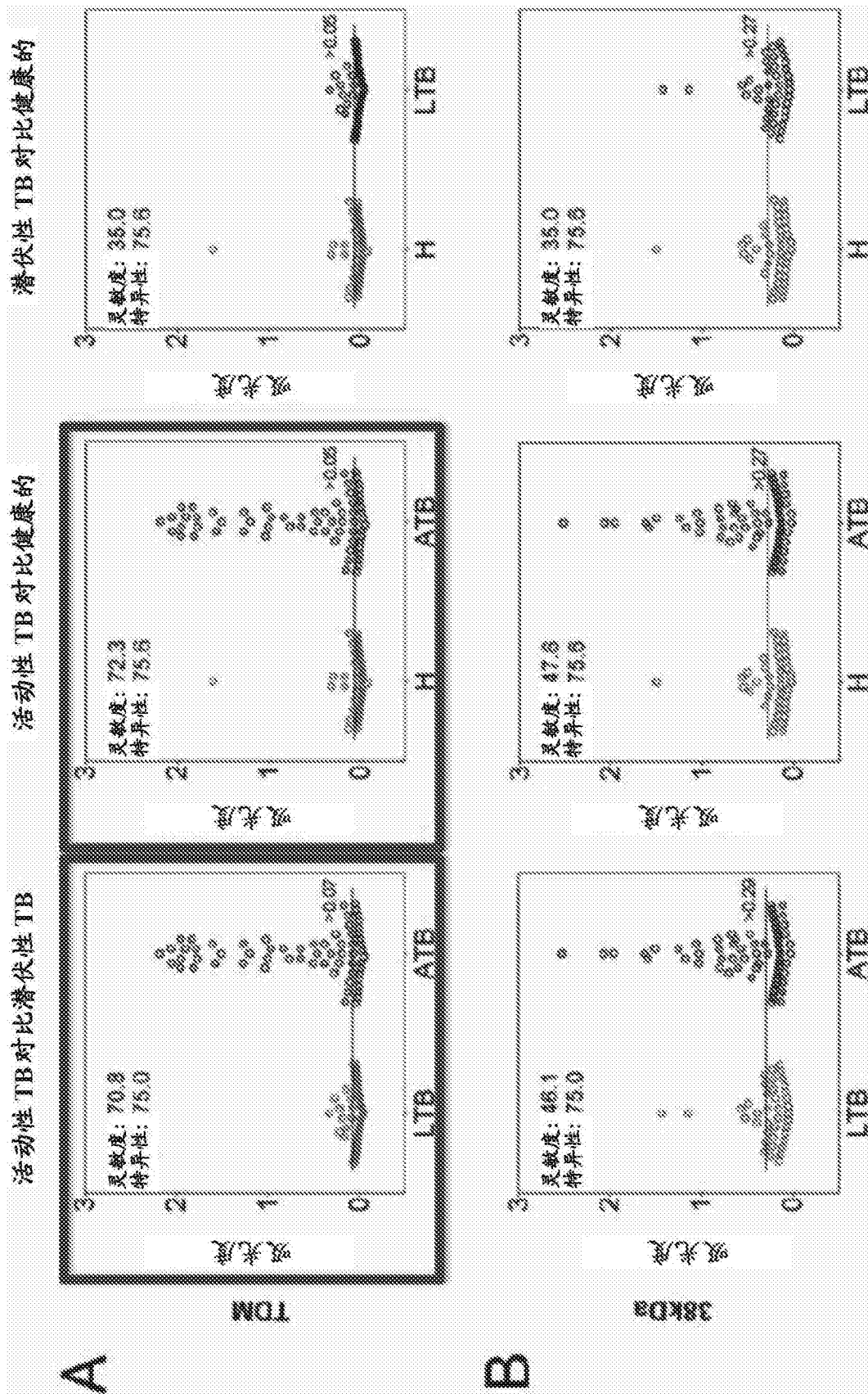


图8

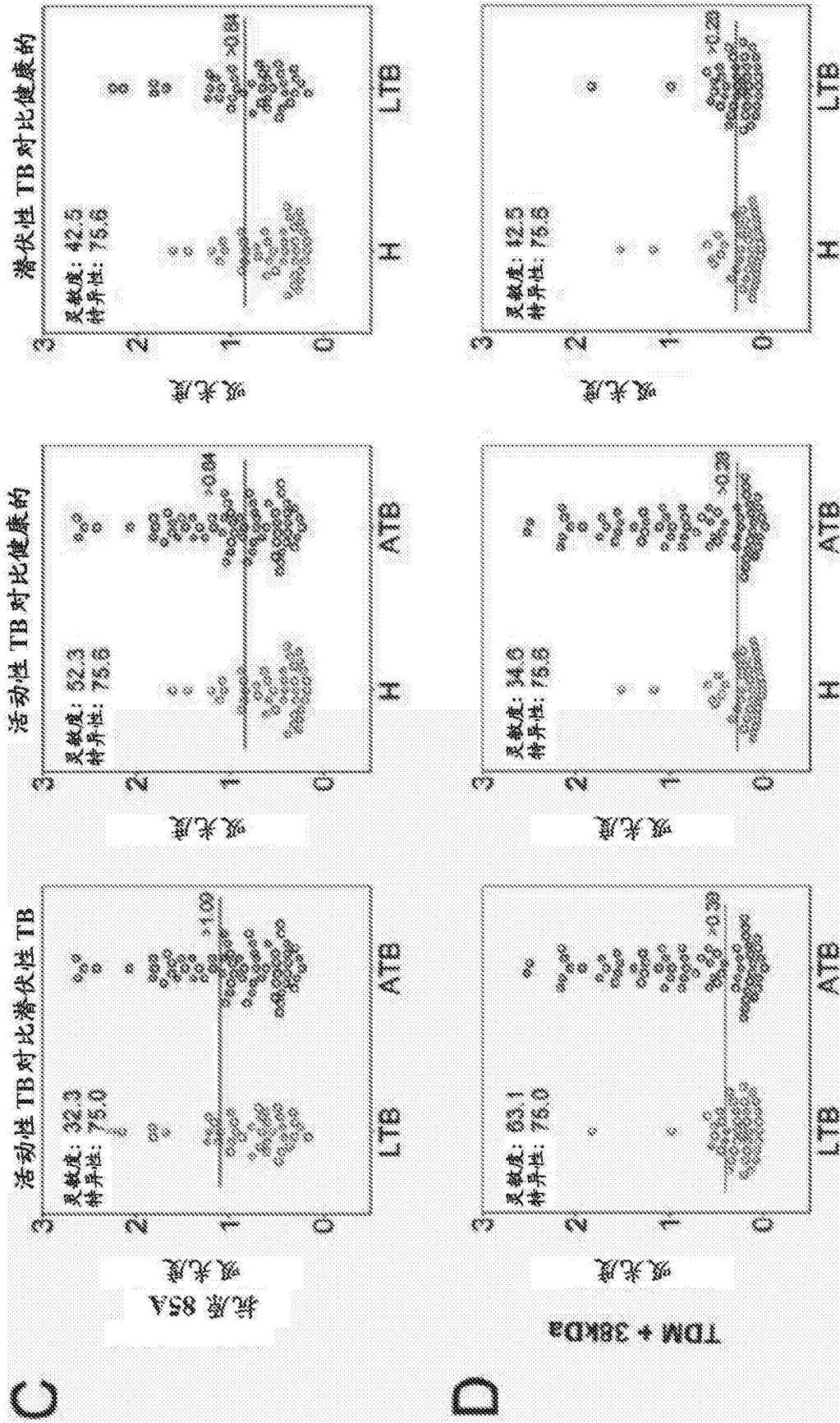


图8(续)

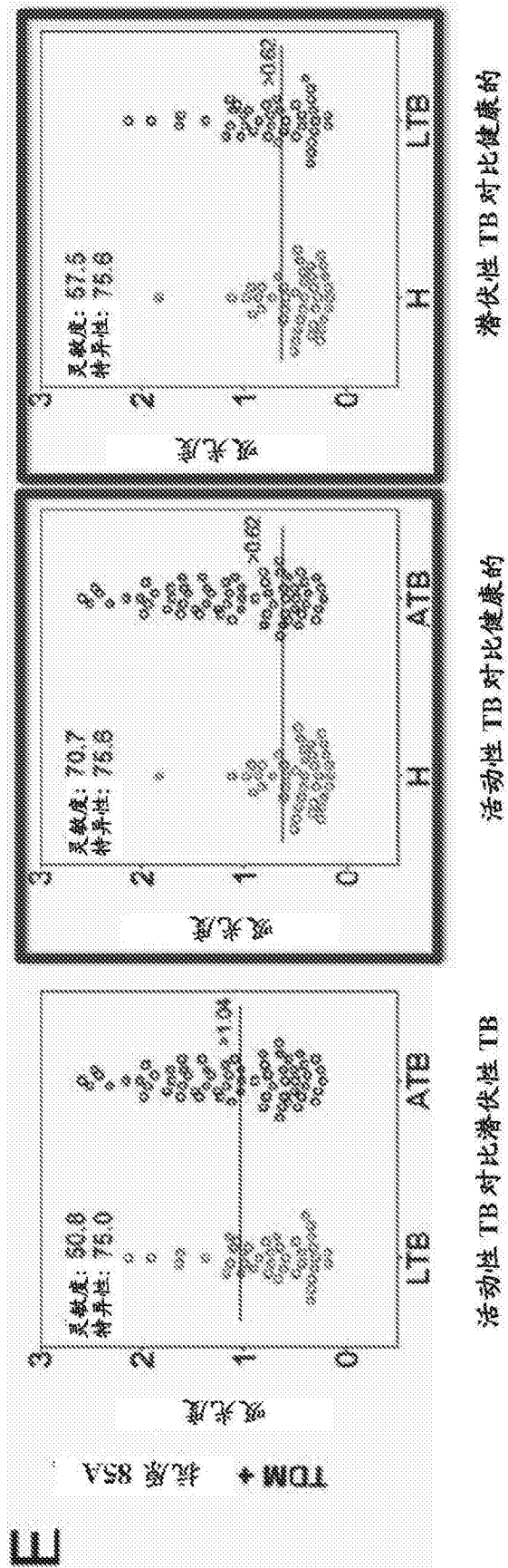


图8(续)

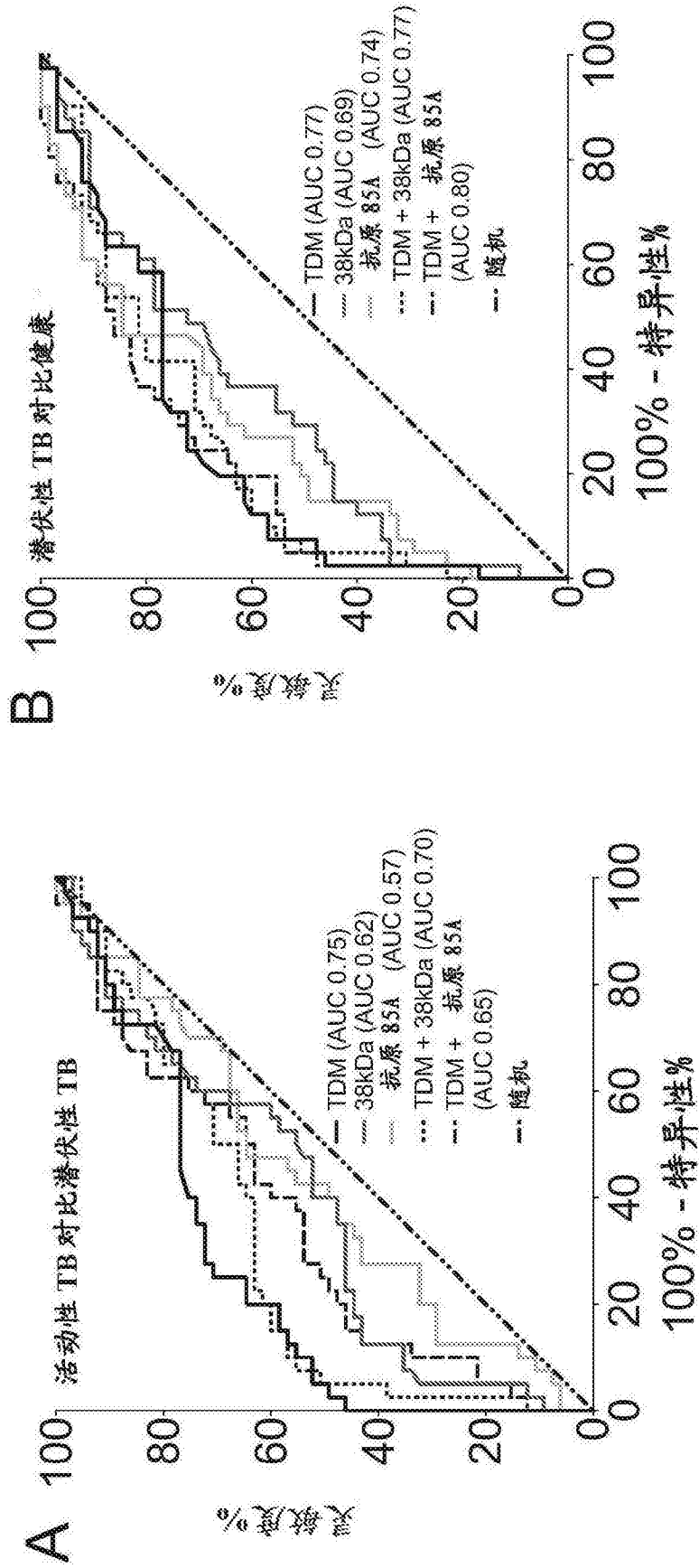


图9

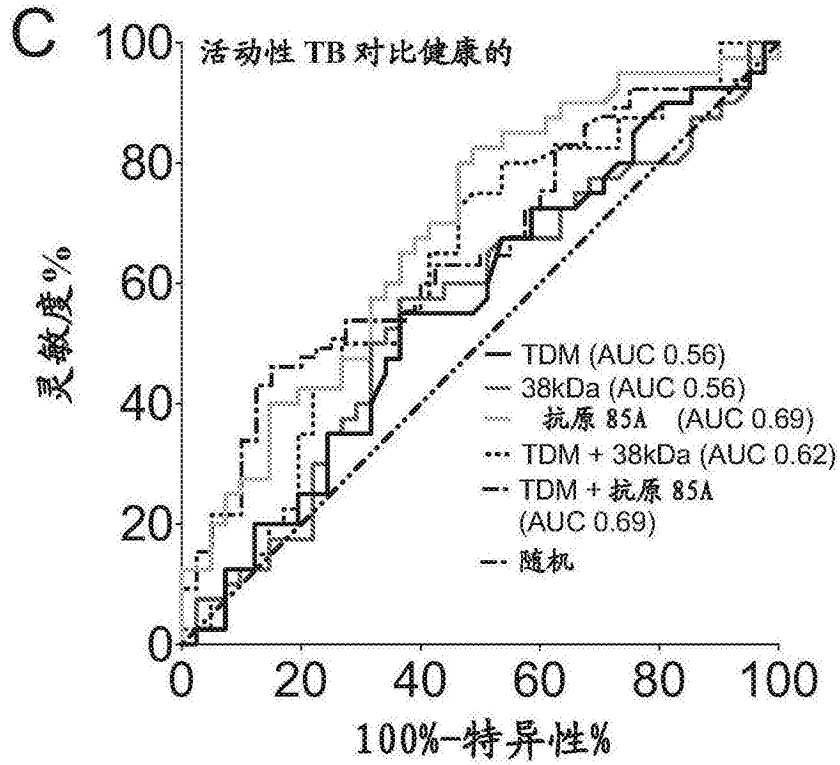


图9(续)

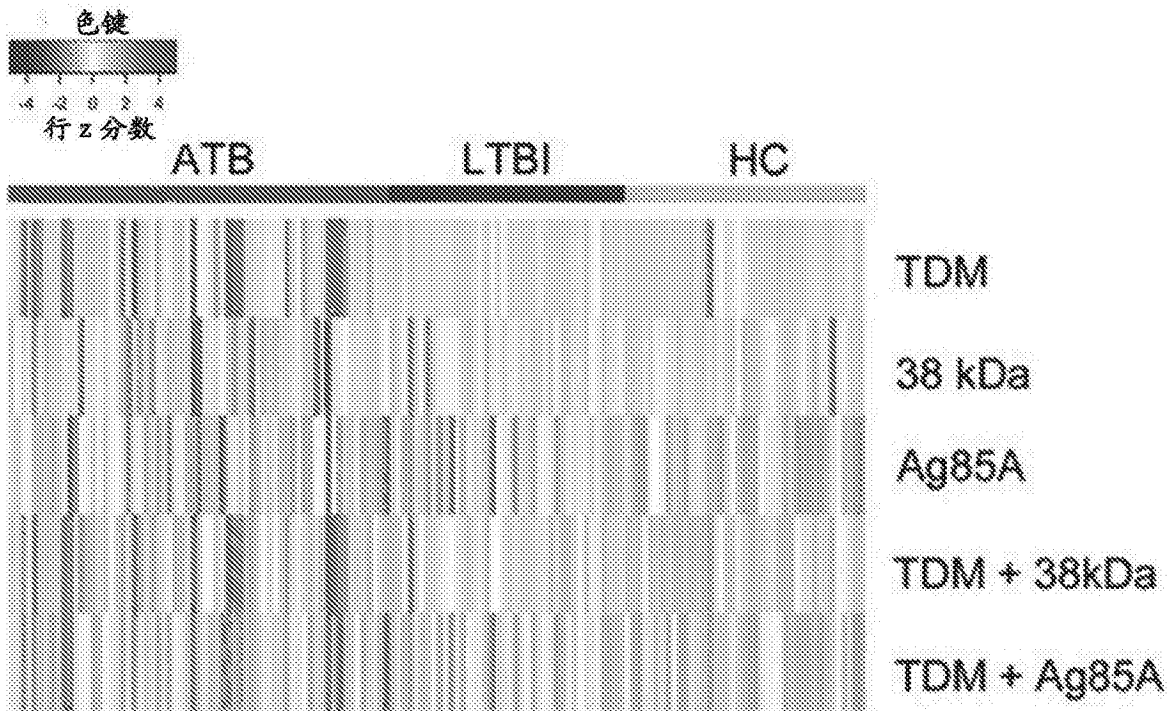


图10

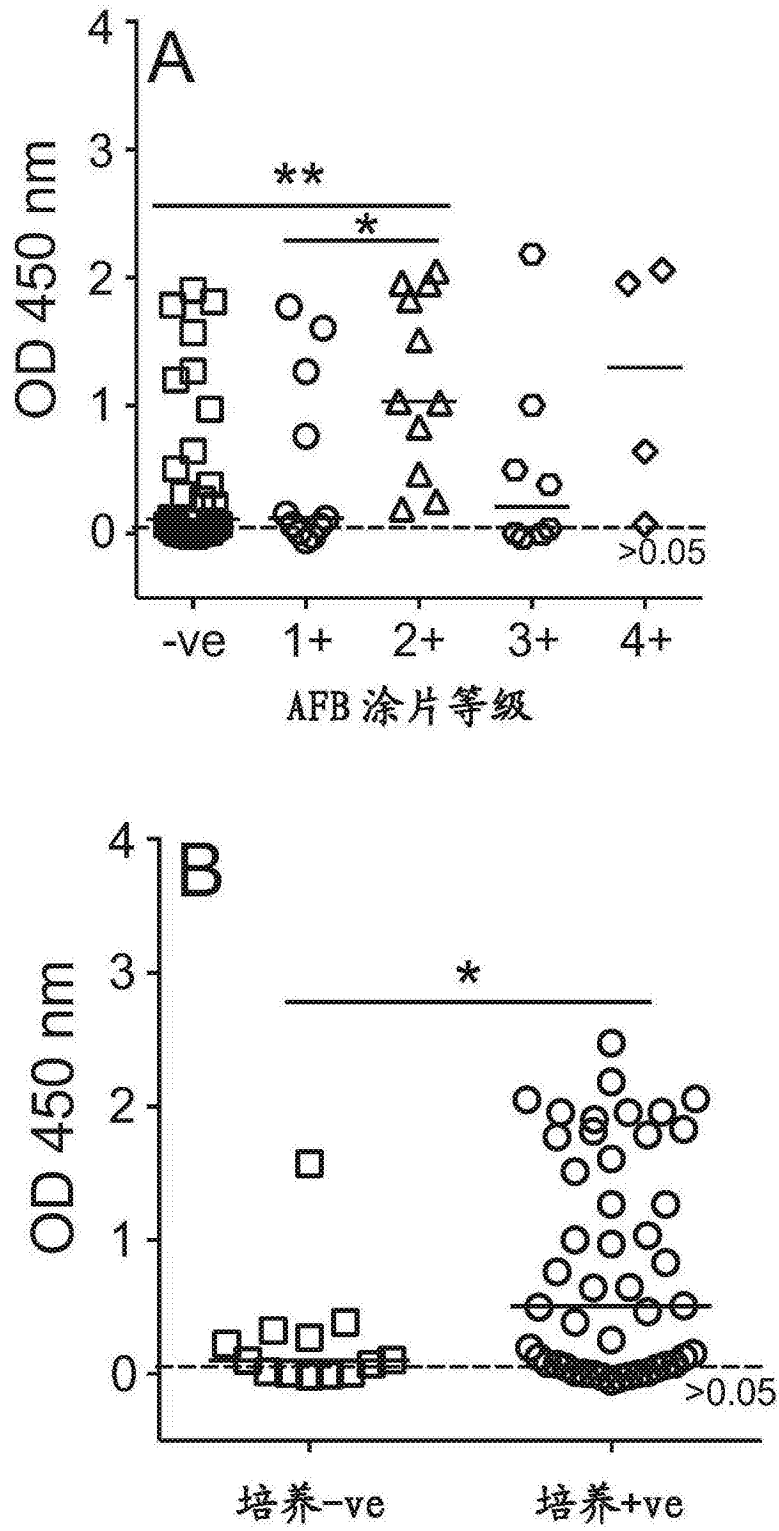


图11

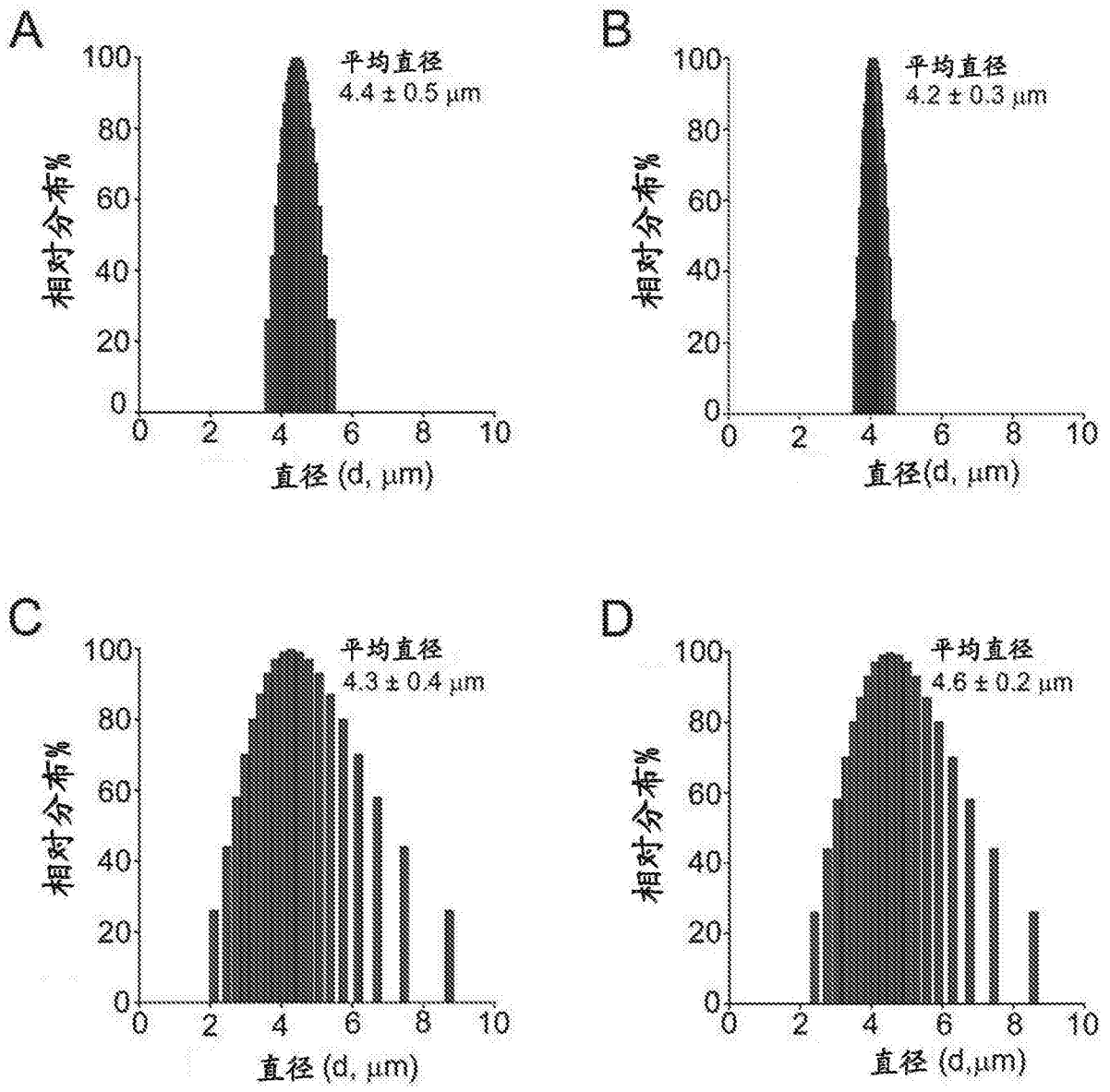


图12

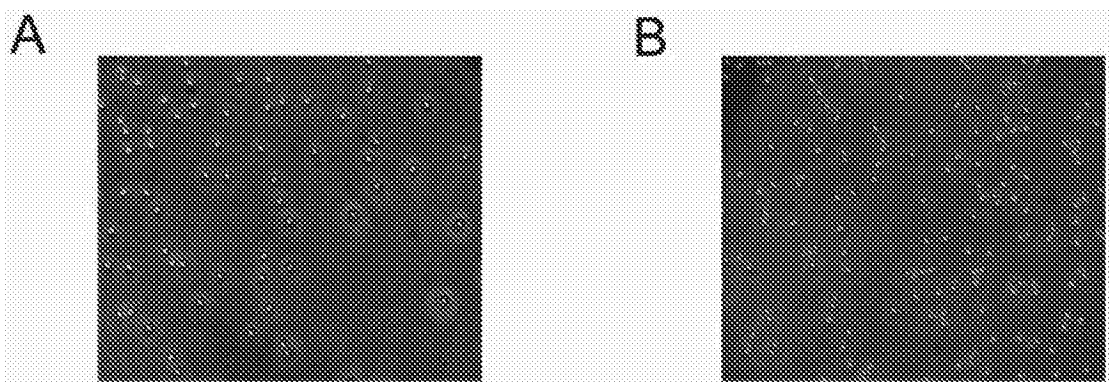


图13

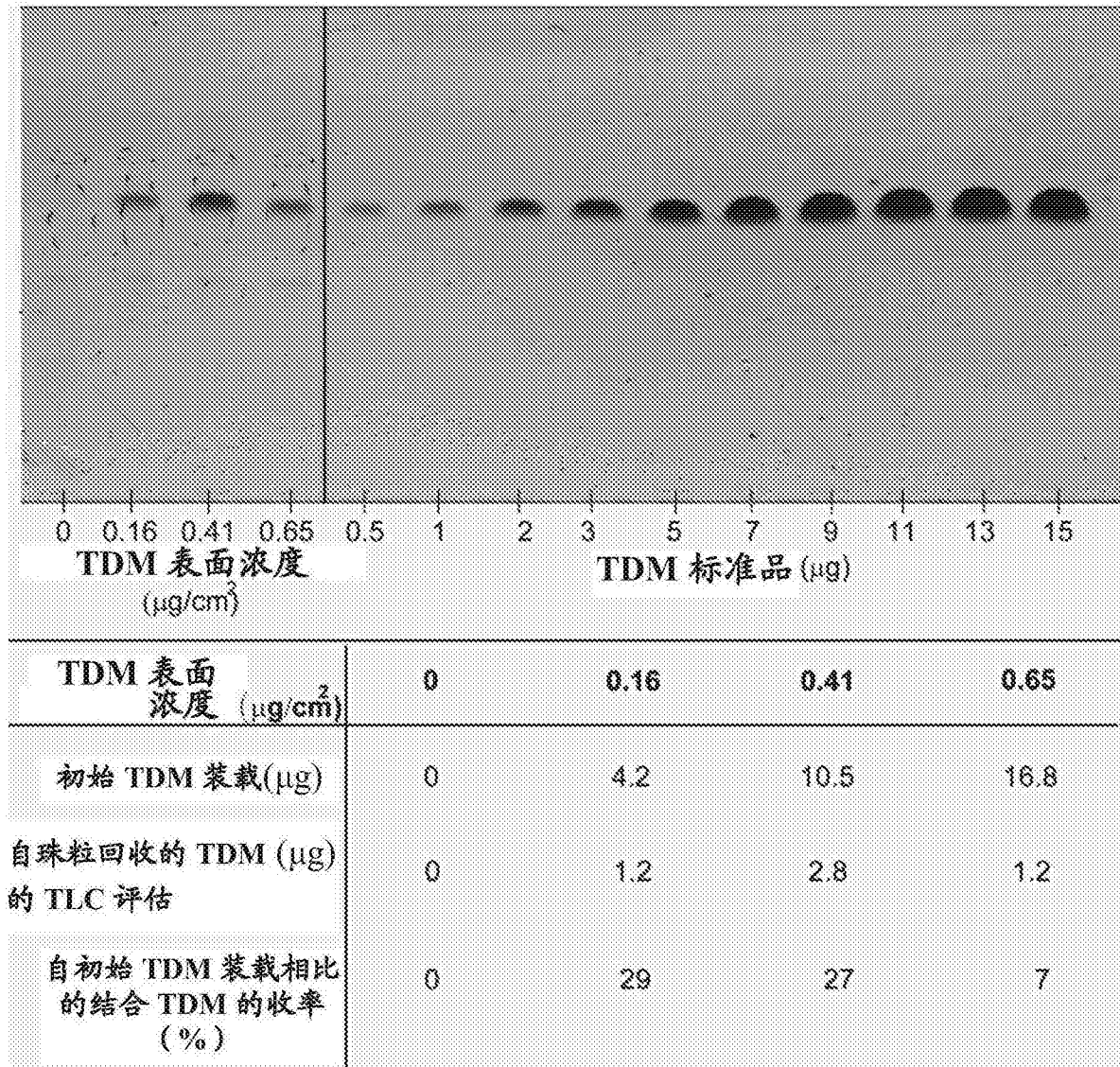


图14

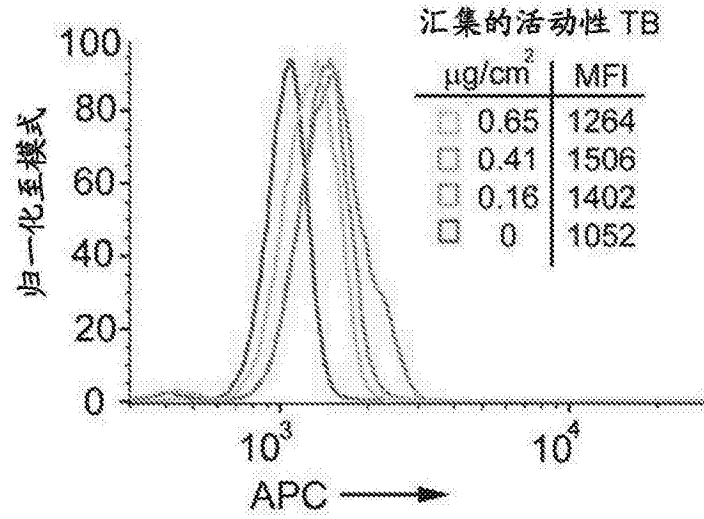


图15

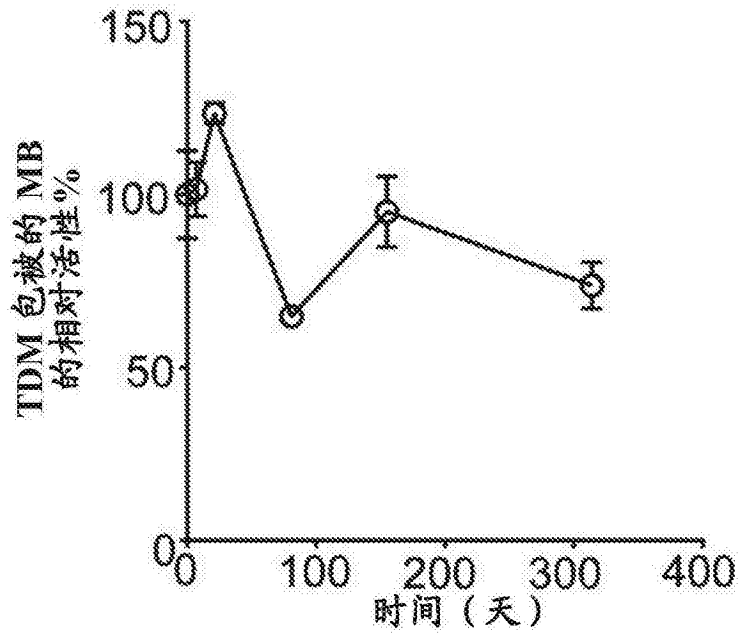


图16

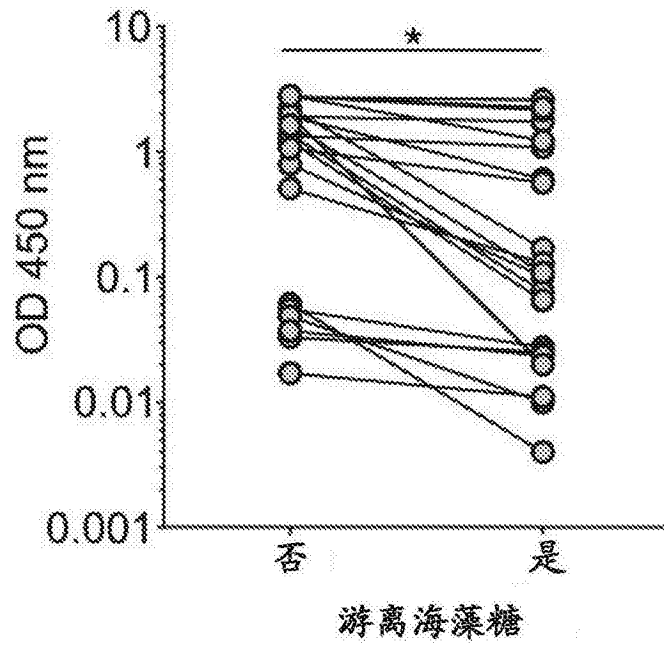


图17

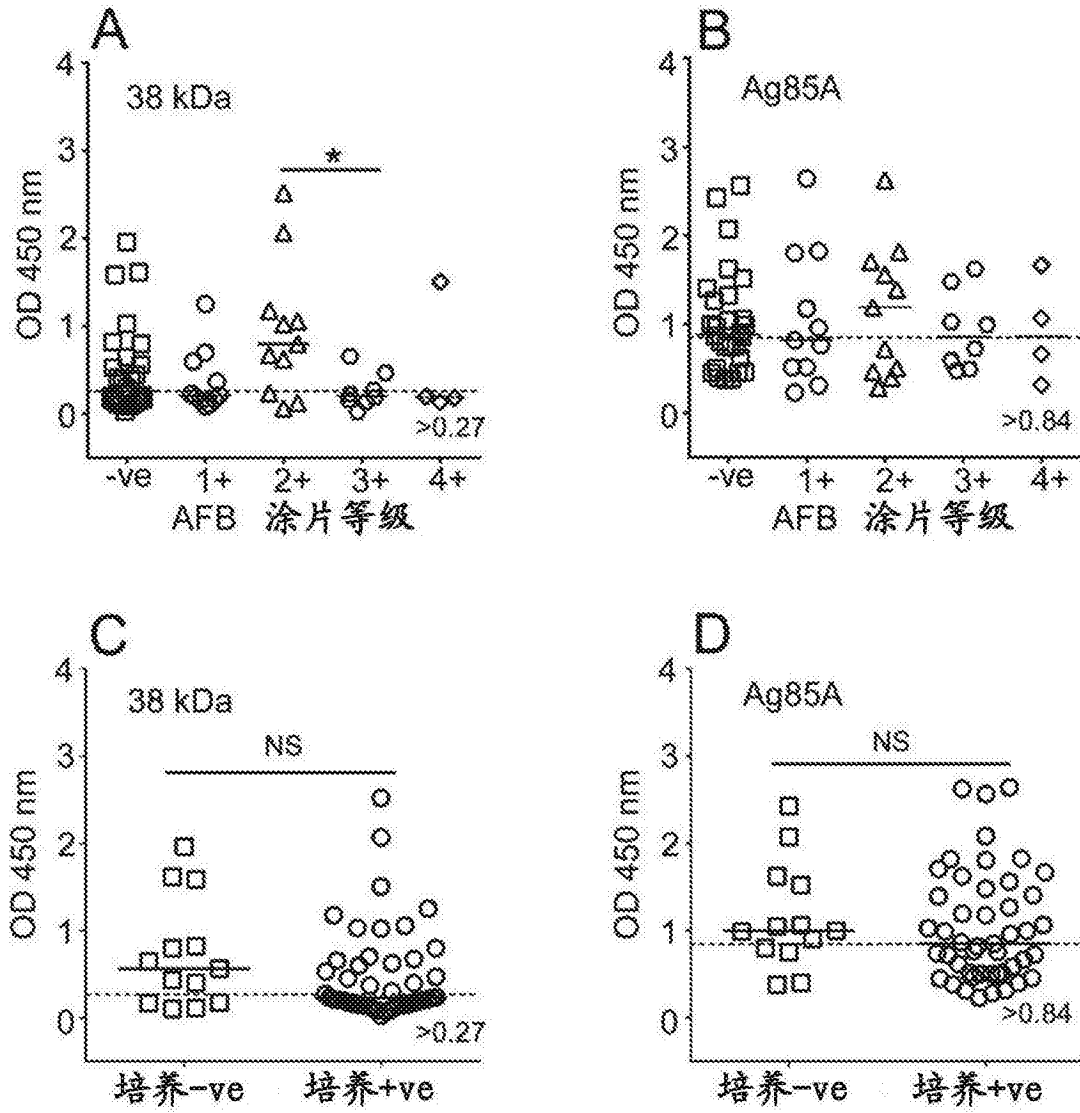


图18

专利名称(译)	酶联免疫吸附测定板和系统的新设计及其使用方法		
公开(公告)号	CN107709992A	公开(公告)日	2018-02-16
申请号	CN201680038562.2	申请日	2016-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
当前申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
[标]发明人	V 摩尼 A 辛格哈尔 G德利贝罗		
发明人	V·摩尼 A·辛格哈尔 G·德利贝罗		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	B01L3/5025 B01L2200/0668 B01L2300/0829 B01L2300/0858 B01L2300/087 B01L2300/161 B01L2400/043 G01N33/5304 G01N33/6854 B01L3/5023 B01L2300/08 B01L2300/0877 G01N33/54386 G01N33/5695 G01N33/6863 G01N33/6866 G01N33/6869 G01N2333/35 G01N2333/525 G01N2333/55 G01N2333/57 G01N2800/60		
优先权	10201503435Q 2015-04-30 SG		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本公开涉及包含至少一行反应室的酶联免疫吸附测定(ELISA)板，其中同一行中的反应室彼此流体连通。还附上用于检测一种或更多种靶分析物的系统，其包括如本文所述的ELISA板、多个磁珠和被配置为与磁珠配合的磁体。还包括进行ELISA测定的方法，其包括将磁珠移动通过随后的反应室，其中所述反应室交替填充有非水性液体例如硅油以及水性ELISA试剂。

