



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104246500 B

(45) 授权公告日 2016.02.17

(21) 申请号 201380019495.6

G01N 33/532(2006.01)

(22) 申请日 2013.04.12

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/624,924 2012.04.16 US

13/794,080 2013.03.11 US

CN 102341696 A, 2012.02.01,

US 2008182235 A1, 2008.07.31,

WO 2011109379 A1, 2011.09.09,

CN 1784603 A, 2006.06.07,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014.10.11

审查员 周洋

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/036389 2013.04.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/158494 EN 2013.10.24

(73) 专利权人 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

(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)

权利要求书2页 说明书11页 附图5页

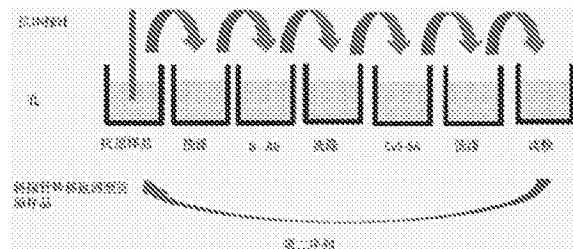
(54) 发明名称

宽范围发光免疫分析

(57) 摘要

本发明涉及一种方法,该方法用于在无需稀释样品和重复分析的情况下在单次分析中量化具有宽浓度范围的分析物。本发明的关键特征是具有事件的两个循环,包括样品结合至探针、结合反应,以及检测。在结合与检测的第一循环之后,将该探针再浸入相同的样品容器中以使该样品容器中额外的分析物在比第一循环的结合条件更有利的结合条件下结合。

宽范围操作规程: 两组探针转移序列



1. 一种检测液体样品中的处于宽浓度范围中的分析物的方法,包括顺序如下的步骤:
 - (a) 获得具有固定于探针梢端上的第一抗体的探针,其中该梢端表面的直径是 $\leq 5\text{mm}$;
 - (b) 将所述探针梢端浸入容纳含有分析物的样品溶液的样品容器中 10 秒至 2 分钟,并使所述样品溶液在所述样品容器中以 0-500rpm 侧向流动,从而使所述分析物与在所述探针梢端上的第一抗体结合;
 - (c) 将所述探针梢端浸入容纳试剂溶液的试剂容器中,所述试剂溶液包含与结合配对的第一成员缀合的第二抗体的试剂,从而使所述试剂与所述分析物结合;
 - (d) 将所述探针梢端浸入容纳第一洗液的第一洗涤容器中以洗涤所述探针梢端;
 - (e) 将所述探针梢端浸入容纳扩增溶液的扩增容器中,所述扩增溶液包含与一个或多个发光标记缀合的结合配对的第二成员,从而在所述探针梢端上形成所述分析物、所述第一抗体、所述第二抗体以及所述结合配对的第一和第二成员的免疫复合物;
 - (f) 将所述探针梢端浸入容纳第二洗液的第二洗涤容器中以洗涤所述探针梢端;
 - (g) 通过测量在所述探针梢端上形成的免疫复合物的发光信号获得第一结果;
 - (h) 将所述探针梢端浸入相同的样品容器中 1-30 分钟,并使所述样品溶液在所述样品容器中以 0-1200rpm 侧向流动,从而使所述样品中额外的分析物与所述探针梢端上的第一抗体结合;
 - (i) 重复步骤 (c) 至 (f) 1-10 次;和
 - (j) 通过测量在所述探针梢端上形成的最终免疫复合物的发光信号获得第二结果;和
 - (k) 合并所述第一结果和第二结果,并在宽范围中分析所述分析物的浓度;其中所述第一抗体和所述第二抗体是对抗所述分析物的抗体。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述扩增溶液包含聚合物,所述聚合物与所述结合配对的第二成员的至少 5 个分子以及至少 25 个所述发光标记缀合,其中所述聚合物具有至少 1 百万道尔顿的分子量,并且所述发光标记具有小于 2,000 道尔顿的分子量。
3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述梢端表面的直径是 $\leq 2\text{mm}$ 。
4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述结合配对是半抗原及它的抗体、配体及它的受体、核酸的互补链,或者凝集素及碳水化合物。
5. 权利要求 4 所述的方法,其中所述结合配对是生物素和链霉亲和素、生物素和抗生物素蛋白、生物素和 NeutrAvidin、荧光素和抗荧光素、洋地黄毒苷 / 抗洋地黄毒苷,或者 DNP 和抗 -DNP。
6. 权利要求 5 所述的方法,其中所述结合配对的第一成员是生物素,并且所述结合配对的第二成员是链霉亲和素。
7. 权利要求 1 所述的方法,其中所述扩增溶液包含聚合物,所述聚合物与所述结合配对的第二成员的至少 5 个分子以及至少 25 个所述发光标记缀合,其中所述聚合物具有至少 500,000 道尔顿的分子量。
8. 权利要求 7 所述的方法,其中所述聚合物是多糖、多核苷酸、树状聚合物、多元醇或者聚乙二醇。
9. 权利要求 7 所述的方法,其中所述聚合物是支化的多糖。
10. 权利要求 1 所述的方法,其中所述步骤 (i) 将步骤 (c) 至 (f) 重复 1-3 次。
11. 权利要求 1 所述的方法,其中所述发光标记是选自由花青、香豆素、咕吨及其衍生

物组成的组的荧光染料。

12. 权利要求 1 所述的方法,其中所述发光标记是钿(II)三-联吡啶或鲁米诺的化学发光标记。

13. 一种检测液体样品中的处于宽浓度范围中的分析物的方法,包括顺序如下的步骤:

(i) 获得具有固定于探针梢端上的第一抗体的探针,其中所述梢端表面的直径是 $\leq 5\mu\text{m}$;

(ii) 将所述探针梢端浸入容纳含有分析物的样品溶液的样品容器中 10 秒至 2 分钟,并使所述样品溶液在所述样品容器中以 0-500rpm 侧向流动,从而使所述分析物与在所述探针梢端上的第一抗体结合;

(iii) 将所述探针梢端浸入容纳试剂溶液的试剂容器中,所述试剂溶液包含与发光标记缀合的第二抗体,从而形成所述分析物、所述第一抗体和所述第二抗体的免疫复合物;

(iv) 将所述探针梢端浸入容纳洗液的洗涤容器中以洗涤所述探针梢端;

(v) 通过测量在所述探针梢端上形成的第一免疫复合物的发光信号获得第一结果;

(vi) 将所述探针梢端浸入相同的样品容器中 1-30 分钟,并使所述样品溶液在所述样品容器中以 0-1200rpm 侧向流动,从而使所述样品中额外的分析物与在所述探针梢端上的第一抗体结合;

(vii) 重复步骤 (iii) 和 (iv);

(viii) 通过测量在所述探针梢端上形成的最终免疫复合物的发光信号获得第二结果;
和

(ix) 合并所述第一结果和第二结果,并分析处于宽范围中的所述分析物浓度;其中所述第一抗体和所述第二抗体是对抗所述分析物的抗体。

14. 权利要求 13 所述的方法,其中所述试剂溶液包含聚合物,所述聚合物与所述第二抗体的至少 5 个分子以及至少 25 个所述发光标记缀合,其中所述聚合物具有至少 1 百万道尔顿的分子量,并且所述发光标记具有小于 2,000 道尔顿的分子量。

15. 权利要求 13 所述的方法,其中所述梢端表面的直径是 $\leq 2\mu\text{m}$ 。

16. 权利要求 14 所述的方法,其中所述聚合物是多糖、多核苷酸、树状聚合物、多元醇或者聚乙二醇。

17. 权利要求 16 所述的方法,其中所述聚合物是支化的多糖。

18. 权利要求 13 所述的方法,其中所述发光标记是选自由花青、香豆素、咕吨及其衍生物组成的组的荧光染料。

19. 权利要求 13 所述的方法,其中所述发光标记是钿(II)三-联吡啶或鲁米诺的化学发光标记。

宽范围发光免疫分析

背景技术

[0001] 在临床诊断中的许多情形中,通过免疫分析量化的某些样品可以产生出高范围值,即,分析物浓度高于该分析可产生准确且可再现结果的水平。因为产生这样出自高范围分析物样品的患者通常具有需求医疗照顾的发病和死亡的高发生率,所以需要量化这些样品。免疫分析在这些临床情形中也是有用的工具,不仅用于诊断,而且用于监测治疗。

[0002] 对于出自高范围的样品,标准实验室规程是实验室人员进一步稀释该样品,从而该分析物浓度落在量化范围内,而后重复第二分析。此规程的问题在于再分析(re-assay)要求更多时间得出结果,在急症护理或急诊室中是不利的,而且还使实验室承受额外的试剂成本。一些普通的侧向流动免疫分析装置不具备稀释样品的工具,迫使用户在容许样品稀释操作的另一个仪器上进行后续的分析。

[0003] 因为分析物浓度可超出被固定的抗体的结合能力,固相免疫分析对于高范围样品具有局限性。一些临床分析还要求低分析物水平的超灵敏检测和大量分析物的量化的组合,因此,宽量化范围是可取的。B-型钠尿肽(naturetic peptide)、NTproBNP和降钙素原(procalcitonin)是这样的实例。

[0004] 开发具有低和高水平检测宽量化范围的固相免疫分析是相对的技术目标。例如,为了不超出具有高分析物水平的被固定抗体的结合能力,使样品高度稀释(1/10-1/100),或者具有与固相一起的短温育时间。灵敏的分析通常需要最低的样品稀释(未经稀释,1/2-1/3)并且与固相一起相对长的温育时间以实现痕量分析物的可检测量的结合。净结果通常是低于足够的量化范围与具有未达最佳临床性能的分析物范围的下限或上限的折中。

[0005] 芳基磺酸盐(Arylsulfonate)花青荧光染料在Mujumdar等人,(1993)Bioconjugate Chemistry,4:105-111;Southwick等人,(1990)Cytometry,11:418-430;以及美国专利号5,268,486中有述。Cy5在每一篇参考文献中有述,并且可从宾夕法尼亚州匹兹堡市的生物学检测系统公司(Biological Detection Systems, Inc.)以商标名Fluorolink™ Cy5™商购获得。芳基磺酸盐花青荧光染料具有高消光系数(通常为130,000L/摩尔至250,000L/摩尔),良好的量子产率,在大多数生物材料和塑料的自体荧光波长之外的范围(500纳米至750纳米)中的荧光发射光谱,优良的溶解性,以及低非特异性结合特征。

[0006] 尽管有这些优异性能,芳基磺酸盐花青荧光染料也遭受某些限制。具体而言,这些染料具有相对窄的斯托克斯位移(Stokes shift),其导致该染料的激发和发射光谱之间的显著重叠。当染料分子在受激发时彼此位置接近时,该激发和发射光谱的重叠继而可以引起荧光的自淬灭。这种自淬灭限制了可与用于免疫分析中的单个抗体分子缀合的芳基磺酸盐染料分子的数目。在示例性的芳基磺酸盐花青荧光染料Cy5的情况下,斯托克斯位移是17纳米(其为650纳米的激发波长和667纳米的发射波长之差)。当两至四个Cy5分子与单个抗体分子缀合时,获得最佳的荧光产率。当超过四个染料分子与单个抗体分子缀合时,该荧光信号输出迅速下降。这种不能使超过四个染料分子与单个抗体分子缀合的特性显著

地限制了利用 Cy5- 标记的抗体及其它结合物质的免疫分析的灵敏度。

[0007] 美国公开 2011/0312105 公开了一种检测系统和荧光免疫分析;该公开通过援引以它的全文并入本文中。

[0008] 需要一种方法,该方法在无需稀释样品并用新鲜试剂重复分析的情况下在单次分析中用于量化具有宽浓度范围的分析物。

附图说明

[0009] 图 1 显示用于检测来自探针的感光表面的荧光信号的光学检测系统。

[0010] 图 2 显示用于检测在探针尖端上的化学发光信号的电化学发光检测系统。

[0011] 图 3 显示用于检测抗原分析物的本发明第一实施方案的免疫分析方式。Ab :抗体, Ag :抗原, Sa :链霉亲和素, B :生物素, F :荧光标记。

[0012] 图 4 显示本发明的第一实施方案的宽范围规程。

[0013] 图 5 显示用于检测抗原分析物的本发明第二实施方案的免疫分析方式。Ab :抗体, Ag :抗原, F :荧光标记。

[0014] 图 6 显示本发明的第二实施方案的宽范围规程。

[0015] 图 7 显示制备交联 FICOLL[®] 400-SPDP 的流程图。

具体实施方式

[0016] 定义

[0017] 除非在下文定义,权利要求书和说明书中所用的术语将根据本领域技术人员理解的它们的通常含义进行解释。

[0018] 在本文中使用时,“约”指在所列举值的 $\pm 10\%$ 内。

[0019] 在本文中使用时,“结合分析物的分子”指能够参与在与分析物分子的特异性结合反应中的任何分子。

[0020] 一种形状的“纵横比”指它的较长尺寸比它的较短尺寸之比。

[0021] “结合分子”指一种能够结合另一种感兴趣的分子的分子。

[0022] 在本文中使用时,“结合配对”指彼此吸引并特异性地彼此结合的两个分子。结合配对的例子包括,但不限于,抗原以及对抗该抗原的抗体,配体及其受体,核酸的互补链,生物素和抗生物素蛋白 (avidin),生物素和链霉亲和素,生物素和 NeutrAvidin (抗生物素蛋白的去糖基化的形式),凝集素和糖类。优选的结合配对是生物素和链霉亲和素,生物素和抗生物素蛋白,生物素和 NeutrAvidin,荧光素和抗荧光素,洋地黄毒苷 / 抗洋地黄毒苷 (digoxigenin/anti-digoxigenin), DNP (二硝基苯酚) 和抗 -DNP。

[0023] 在本文中使用时,“支化的聚合物”指具有二维或三维结构的非线形聚合物,可以是天然存在的支化的聚合物,或是经合成交联的聚合物。

[0024] 在本文中使用时,“化学发光”指,作为化学反应的结果,能量的释放伴随有限的发光的释放。例如,当鲁米诺在合适的催化剂存在下与过氧化氢反应,它产生处于激发态的 3-氨基邻苯二甲酸盐,当它衰减到较低的能量级时发光。

[0025] 在本文中使用时,“树状聚合物”指重复的有机的支化分子。树状聚合物环绕着核心典型地是对称的,且通常采取球状三维形态。

[0026] 在本文中使用时，“电化学发光”（ECL）指在溶液中在电化学反应过程中产生的发光。在 ECL 中，电化学法产生的中间体经过高放能的反应而产生电子激发态，然后发光。ECL 激发是由电产生的（electrogenerated）物质的高能电子转移反应（氧化还原反应）引起的。在向含有发光物质溶液的电化学电池的电极施加电势（若干伏特）过程中，通常观察到 ECL。

[0027] 本文中使用时，“被固定”指试剂被固定至固体表面。当试剂被固定至固体表面时，其被非共价或共价地结合至该表面。

[0028] 在本文中使用时，“整体式衬底”是指单块的固体材料。

[0029] 在本文中使用时，“探针”是指在传感侧包覆有结合分析物的分子的薄膜层的衬底。探针具有远端和近端。该近端（在此申请中也称为探针梢端）具有用分析物结合分子的薄层包覆的传感表面。

[0030] 在本文中使用时，“宽范围浓度”是指超过至少 500 倍、1000 倍、2000 倍或 5000 倍的浓度范围。

[0031] 本发明涉及一种方法，该方法用于在无需稀释样品和重复分析的情况下在单次分析中量化具有宽浓度范围的分析物。本发明的特征具有事件的两个循环，每个循环包括样品结合至探针、结合反应，以及检测。一般而言，针对处于相关临床范围的高浓度端的样品，优化第一循环的分析条件，并针对相关临床范围的低浓度端，优化第二循环的分析条件。在结合与检测的第一循环之后，将该探针再浸入相同的样品容器中以使该样品容器中额外的分析物在比第一循环的结合条件更有利的结合条件（例如，较长的反应时间和 / 或搅拌）下结合至该探针。在两个循环中，检测分析物浓度，并且合并的结果提供在单次分析中量化具有宽浓度范围的分析物的能力，而不必稀释样品并重新分析。本发明的另一优势在于，宽范围操作规程在两个循环中使用相同的样品和试剂，并且不要求额外的样品或试剂用于第二个循环。

[0032] 第一实施方案

[0033] 在第一实施方案中，该方法包括以下顺序的步骤：(a) 获得具有固定于探针梢端上的第一抗体的探针，其中梢端表面的直径是 $\leq 5\text{mm}$ ；(b) 将该探针梢端浸入容纳含有分析物的样品溶液的样品容器中 10 秒至 2 分钟，并使该样品溶液在样品容器中以 0-500rpm，优选 0-200rpm 侧向流动，从而使分析物与在该探针梢端上的第一抗体结合；(c) 将该探针梢端浸入容纳试剂溶液的试剂容器中，该试剂溶液包含与结合配对的第一成员缀合的第二抗体的试剂，从而使该试剂与分析物结合；(d) 将该探针梢端浸入容纳洗液的第一洗涤容器中以洗涤该探针梢端；(e) 将该探针梢端浸入容纳扩增溶液的扩增容器中，该扩增溶液包含与一个或多个发光标记缀合的结合配对的第二成员，从而在该探针梢端形成分析物、第一抗体、第二抗体以及结合配对的第一和第二成员的免疫复合物；(f) 将该探针梢端浸入容纳洗液的第二洗涤容器中以洗涤该探针梢端；(g) 通过测量在该探针梢端上形成的免疫复合物的发光信号获得第一结果；(h) 将该探针梢端浸入相同的样品容器中 1-30 分钟并使该样品溶液在该样品容器中以 0-1200rpm，优选 200-1200rpm 或者 200-1000rpm 侧向流动，从而使该样品中额外的分析物与该探针梢端上的第一抗体结合；(i) 重复步骤 (c) 至 (f) 1-10 次；(j) 通过测量在该探针梢端上形成的最终免疫复合物的发光信号获得第二结果；和 (k) 合并此二结果并在宽范围中分析该分析物的浓度；其中该第一抗体和该第二抗

体是对抗所述分析物的抗体。

[0034] 在步骤 (a) 中, 该探针可以是任何形状, 例如, 杆形, 圆柱形, 圆形, 正方形, 三角形等, 其长度比宽度的纵横比至少为 5 比 1, 优选为 10 比 1。优选杆形。因为在免疫分析期间该探针被浸在样品溶液和一种或多种分析溶液中, 可取的是, 具有纵横比至少为 5 比 1 的长探针, 使得该探针的梢端能够浸入该溶液中。对于荧光分析, 该探针可以为整体式衬底。

[0035] 该探针具有用于结合分析物的小梢端。该梢端具有较小的表面积, 直径 $\leq 5\text{mm}$, 优选 $\leq 2\text{mm}$, 或者 $\leq 1\text{mm}$, 例如, 0.5–2mm。该探针梢端的小表面提供若干优点。首先, 小表面具有较少的非特异性结合, 因此产生较低的背景信号。其次, 由于该梢端的小表面积, 在该探针梢端上携带的试剂或样品极其少。此特征使该探针梢端易于清洗, 并且由于洗液具有较大体积, 故而在该洗液中产生可忽略的污染。再者, 该探针梢端的小表面积具有小的结合能力。因此, 当该探针梢端被浸入试剂溶液中时, 与该试剂的结合不消耗显著量的试剂。该试剂浓度实际上未改变。对洗液可忽略的污染以及对试剂的低消耗容许试剂溶液、扩增溶液和洗液被重复使用多次, 例如, 1–10 次或者 3–5 次。

[0036] 探针的传感表面包覆有与样品中的分析物结合的第一抗体。将试剂固定至固相 (该探针梢端的传感表面) 的方法在免疫化学中是普通的, 并且包括固相与试剂之间共价键、疏水键或静电键的形成。该第一抗体可以直接被固定在传感表面上。可供选择地, 该第一抗体可以通过结合配对间接地被固定在传感表面上。例如, 抗-荧光素可以首先通过吸附至固体表面, 或者通过与涂布于固体表面上的氨丙基硅烷共价结合进行固定。然后, 以荧光素标记的第一抗体可以通过荧光素与抗荧光素 (结合配对) 的结合而被结合至固体表面。

[0037] 在步骤 (b) 中, 该探针梢端被浸入样品容器中 10 秒至 2 分钟, 优选 30 秒至 1 分钟, 从而使分析物与在该探针梢端上的第一抗体结合。

[0038] 在步骤 (b) 后, 将该探针任选地在容纳有洗液的洗涤容器中洗涤 1–5 次, 优选 1–3 次。由于结合表面积小, 所携带的溶液量最小, 所以此附加的洗涤步骤可以是非必需的。该洗液通常包含缓冲剂和表面活性剂例如 Tween20。

[0039] 在步骤 (c) 中, 将该探针梢端浸入试剂容器中 20 秒至 10 分钟, 优选 20 秒至 2 分钟以使试剂与该探针梢端上的分析物结合。试剂溶液包含与结合配对的第一成员缀合的第二抗体的试剂。

[0040] 该结合配对典型地是半抗原及它的抗体、配体及它的受体、核酸的互补链, 或者凝集素及碳水化合物。例如, 该结合配对是生物素和链霉亲和素、生物素和抗生物素蛋白、生物素和 NeutrAvidin、荧光素和抗荧光素、洋地黄毒苷 / 抗洋地黄毒苷, 以及 DNP (二硝基苯酚) 和抗-DNP。优选, 该结合配对的第一成员是生物素, 该结合配对的第二成员是链霉亲和素。

[0041] 在步骤 (d) 中, 将该探针在包含洗液的第一洗涤容器中洗涤 1–5 次, 优选 1–3 次。该洗液通常包含缓冲剂和表面活性剂例如 Tween20。

[0042] 在步骤 (e) 中, 将该探针浸入包含扩增溶液的扩增容器中 20 秒至 5 分钟, 优选 20 秒至 2 分钟, 从而在该探针梢端上形成分析物、第一抗体、第二抗体以及结合配对的第一成员和第二成员的免疫复合物。该扩增溶液包含与一个或多个发光标记缀合的结合配对的第二成员。

[0043] 为了改进该分析的灵敏度,扩增溶液可以包含聚合物,该聚合物与该结合配对的第二成员的至少 5 个分子以及至少 25 个发光标记缀合。该聚合物优选为支化的和 / 或交联的。该聚合物具有至少 500,000, 优选 1 百万道尔顿的分子量。该聚合物可以是多糖 (例如, FICOLL[®] (蔗糖和环氧氯丙烷的共聚物) 或葡聚糖)、多核苷酸、树状聚合物、多元醇或者聚乙二醇。该聚合物优选是支化的或者交联的以具有二维或三维结构。该聚合物优选包含 5-50 个或者 5-100 个结合分子以及 25-100 个或 25-500 个发光分子。

[0044] 用于本发明的发光标记具有 < 5,000, 优选 < 2,000, 例如 500-2000 或者 100-2000 道尔顿的分子量。在一种实施方案中,该发光标记是选自由以下组成的组的荧光染料:花青、香豆素、咕吨及其衍生物。例如,荧光染料是 Cy5 (分子量 MW792)、Alexa Fluor647、DyLight350 (MW874)、DyLight405 (MW793)、DyLight488 (MW71011)、DyLight550 (MW982)、DyLight594 (MW1078)、DyLight633 (MW1066)、DyLight650 (MW1008)、DyLight680 (MW950)、DyLight755 (MW1092)、DyLight800 (MW1050)、Oyster 荧光染料、IRDye, 或者包含与稀土金属如镧系元素 (Eu、Th、Sm 或 Dy) 整合的多个环的有机化合物。

[0045] 在另一个实施方案中,发光标记是选自由钆 (II) 三-联吡啶 (MW1057)、鲁米诺 (MW177)、吖啶鎓 (acridinium) 酯 (9[[4-[3-[(2,5-二氧代-1-吡咯烷基)氧基]-3-氧代丙基]苯氧基]羰基]-10-甲基-吖啶鎓三氟甲磺酸盐, MW632)、氯高铁血红素 (MW652) 组成的组的化学发光标记。

[0046] 当结合分子是多肽或蛋白质时,利用科学和专利文献中所述的常规缀合化学,该发光标记可以通过各种部分,包括二硫化物、羟基苯基、氨基、羧基、吡啶或其它官能团,与它共价结合。

[0047] 可以利用常规的缀合化学同时许多文献中教导的以生物素衍生化,通过各种部分,包括醛、酮、异硫氰酸酯、亚胺酯、肌苷、酰基和烷基,实现结合分子与多核苷酸的共价结合。(Leary 等人, (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA80 :4045-4049 ;W086/02929 ;EP063879 ; Langer 等人, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA78 :6633-6637 ;和 EP2009 996)。

[0048] 在每一步骤 (b)、(c) 和 (e) 中,可以通过搅拌或混合容器中的溶液使反应加速。例如,可以致使该溶液以 1-500rpm, 优选 1-200rpm 侧向流动 (轨道流动 orbital flow) 经过探针尖端,由此使通过它的被固定至固相的结合配偶体对目标分子的捕获加快。例如,可以将反应容器安置在轨道式摇床上,并使该轨道式摇床以至少 50rpm, 优选至少 200rpm 的速度旋转。任选地,可以使该探针尖端以 0.01 至 10mm/秒的速度垂直于轨道流动的平面上下移动,以在该探针尖端以上和以下引起溶液的额外混合。

[0049] 在步骤 (f) 中,将该探针在包含第二洗液的第二洗涤容器中洗涤 1-5 次, 优选 1-3 次。该洗液通常包含缓冲剂和表面活性剂例如 Tween20。该第一洗涤容器和第二洗涤容器可以是相同的容器,或者不同的容器。该第一洗液和第二洗液可以是相同的或不同的溶液。

[0050] 在步骤 (g) 中,免疫复合物是通过读取探针上的发光信号进行检测。对于荧光标记,将该探针置于有透明底的孔中,并通过检测器例如 US2011/0312105 中所述的那些 (图 1) 进行读数,通过援引加入本文中。

[0051] 对于化学发光标记,将该探针置于包含具有共反应物的测量溶液的有透明底的孔中。例如,若该化学发光标记是钆 (II) 三联吡啶,该共反应物是三丙胺。若该化学发光标记是鲁米诺,该共反应物是过氧化氢和水中的氢氧化钠盐。发出的光通过光电倍增管 (PMT)

进行测量。

[0052] 对于电化学发光 (ECL), ECL 分析仪的原理和主要部件在 Blackburn 等 (Clin. Chern. 37 :1534-1539 (1991)) 中有述,通过援引加入本文中。在将探针置于含有共反应物的测量溶液的有透明底的孔中后,向工作电极和反电极施加电压,发出的光通过 PMT 进行测量。

[0053] 在一个优选的实施方案中,涂布有抗体的探针充当 ECL 分析仪的工作电极 (图 2)。由于钌 (II) / 三丙胺氧化还原反应需要在电极表面或非常接近的邻近处发生,这提供了有效发光的优点。

[0054] 步骤 (h) 开始事件的第二循环。步骤 (h) 将该探针梢端返回浸入相同的样品容器中 1-30 分钟,优选 2-30 分钟,或者 3-30 分钟的较长时间,并任选地搅拌所述溶液,从而使额外的分析物与该探针梢端上的第一抗体的结合增大。

[0055] 步骤 (i) 是通过重复步骤 (c)-(f) 1-10 次,优选 1-5 次,1-3 次,或 2-3 次的循环扩增。当扩增溶液包含聚合物,该聚合物与该结合配对的第二成员的至少 5 个分子以及至少 25 个发光标记缀合,可以将步骤 (c)-(f) 重复 2-10 次以增大分析信号和灵敏度。每个循环由以下组成:将该探针返回置于相同相同的试剂容器、相同的第一洗涤容器、相同的扩增容器,以及相同的第二洗涤容器中。当该扩增溶液不包含高分子量的聚合物时,通过将步骤 (c)-(f) 重复仅一次。

[0056] 步骤 (j) 通过测量该探针梢端上的发光信号检测形成的最终免疫复合物,并合并此二检测结果以分析处于宽范围中的分析物浓度,然后合并此二检测结果以分析处于宽范围中的分析物浓度。

[0057] 图 3 显示用于检测抗原分析物的本发明的第一实施方案的免疫分析方式。

[0058] 图 4 显示在本发明的第一实施方案的宽范围操作规程中的探针转移。在图 4 中,该宽范围操作规程由用相同的样品和试剂的两组分析序列组成。第一序列包括:将涂布抗体 (Ab) 的探针浸入抗原 (Ag) 样品容器中,接着浸入生物素化 - 抗体 (B-AB) 试剂容器中,然后浸入含有与荧光标记 (CyS-SA) 缀合的链霉亲和素的容器中。在经标记的链霉亲和素结合之后,在该探针的远侧梢端上读取信号。对于第二序列,然后将该探针转移返回至相同的样品容器,在其中使结合条件改变以实现更大的结合和更高的灵敏度。通常,增大温育时间和 / 或增大该探针的轨道流量改进样品结合的灵敏度。然后将该探针转移至相同的生物素化 - 抗体试剂容器,接着转移至经标记的链霉亲和素试剂容器,而后进行第二测量。

[0059] 第二实施方案

[0060] 在第二实施方案中,本发明的方法包括以下顺序的步骤:

[0061] (i) 获得具有固定于探针梢端上的第一抗体的探针,其中该梢端表面的直径是 $\leq 5\text{mm}$; (ii) 将该探针梢端浸入容纳含有分析物的样品溶液的样品容器中 10 秒至 2 分钟,并使该样品溶液在该样品容器中以 0-500rpm 侧向流动,从而使该分析物与在该探针梢端上的第一抗体结合; (iii) 将该探针梢端浸入容纳试剂溶液的试剂容器中,该试剂溶液包含与荧光标记缀合的第二抗体,从而形成该分析物、该第一抗体和该第二抗体的免疫复合物; (iv) 将该探针梢端浸入容纳洗液的洗涤容器中以洗涤该探针梢端; (v) 通过测量在该探针梢端上形成的第一免疫复合物的发光信号获得第一结果; (vi) 将该探针梢端浸入相同的样品容器中 1-30 分钟,并使该样品溶液在该样品容器中以 0-1200rpm, 优选

200-1200rpm 或 200-1000rpm 侧向流动,从而使该样品中额外的分析物与在该探针梢端上的第一抗体结合;(vii) 重复步骤 (iii) 和 (iv);(viii) 通过测量在该探针梢端上形成的最终免疫复合物的发光信号获得第二结果;和 (ix) 合并此二结果并分析处于宽范围中的分析物浓度;其中该第一抗体和该第二抗体是对抗该分析物的抗体。

[0062] 第二实施方案的步骤 (i) 和 (ii) 与第一实施方案的步骤 (a) 和 (b) 相似。

[0063] 在步骤 (iii) 中,将探针梢端浸入试剂容器中 20 秒至 10 分钟,优选 20 秒至 2 分钟以使该试剂结合至探针梢端上的分析物。该试剂溶液包含与荧光标记结合的第二抗体的试剂。

[0064] 在一种实施方案中,该试剂溶液包含聚合物,该聚合物与至少 5 分子的该第二抗体和至少 25 个发光标记缀合,其中该聚合物的分子量为至少 1 百万道尔顿,并且该发光标记的分子量低于 2,000 道尔顿。适合的聚合物与在第一实施方案中所述的那些相似。

[0065] 步骤 (iv)、(v)、(vi)、(viii) 和 (ix) 分别与第一实施方案的步骤 (d)、(g)、(h)、(j) 和 (k) 相似。

[0066] 图 5 显示用于检测抗原分析物的本发明的第二实施方案的免疫分析方式。

[0067] 图 6 显示本发明的第二实施方案的宽范围操作规程中的探针转移。在图 6 中,该宽范围操作规程由用相同的样品和试剂的两组分析序列组成。第一序列包括;将涂布抗体 (Ab) 的探针浸入抗原 (Ag) 样品容器中,然后浸入含有与荧光标记 (Ab-Cy5) 缀合的抗体的试剂容器中。在经标记的抗体结合之后,在该探针的远侧梢端上读取信号。对于第二序列,然后将该探针转移返回至相同的样品容器,在其中使结合条件改变以实现更大的结合和更高的灵敏度。通常,增大温育时间和/或增大该探针的轨道流量改进样品结合的灵敏度。然后将该探针转移至相同的试剂容器,而后进行第二测量。

[0068] 一般而言,针对处于相关临床范围的高浓度端的样品,优化第一序列的分析条件,第浓度样品是不可检测到的。针对低浓度临床样品,优化第二序列的分析条件,高浓度样品使该探针的结合能力达到饱和。循环扩增可以在任一序列中采用,但是在第一序列中很少采用,因为在该步骤中不要求高灵敏度。

[0069] 使用小表面积探针的宽范围操作规程以使用相同的样品和试剂的两组分析序列为特征,从而扩展免疫分析的分析范围。相对于因具有实现快速捕获抗原的相对高表面积而常用作固相的其它异源免疫分析方式例如微孔、磁性克隆或珠,本发明具有出人意料的优点。它们的操作规程包括添加,以及在温育期后从固相取回样品和试剂。在每次向固相添加试剂之间,执行洗涤序列。该洗涤序列还由添加而后从该固相取回洗涤剂组成。它增加执行该分析的复杂性,配备额外的移液系统以容许样品和试剂的重复使用。其次,在其它操作规程中固相的高表面积可消耗试剂,或者在洗涤循环中造成携带,可降低分析性能。

[0070] 通过以下实施例进一步说明本发明,所述实施例不应被解释为将本发明的范围限定于其中描述的具体步骤。

[0071] 实施例

[0072] 实施例 1:制备带有被固定的第一抗体的探针

[0073] B型钠尿肽 (Basic natriuretic peptide) (BNP) 是由心室响应于心肌细胞的过度拉伸而分泌的有 32 个氨基酸的多肽。脑钠尿肽的 N 端激素原 (NT-proBNP) 是有 76 个氨基酸的 N 端片段。血液中的 BNP 和 NT-proBNP 水平被用于急性充血性心力衰竭的筛查、诊断,

并且可用于建立心力衰竭的预后。

[0074] 降钙素原 (PCT) 是激素降钙素的多肽前体,后者与钙自稳态 (homeostasis) 相关。它由 116 个氨基酸构成,并由甲状腺的滤泡旁细胞以及肺和肠的神经内分泌细胞产生。

[0075] 利用化学气相沉积法 (Yield Engineering Systems, 1224P), 按照生产商的说明, 用氨丙基硅烷涂布直径 1 毫米长 2 厘米的石英探针。然后将该探针稍端浸入在以 10 微克 / 毫升的鼠单克隆抗荧光素 (BiosPacific Inc.) 溶于磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 值 7.4) 的溶液中。在使抗体得以吸附至探针 20 分钟后, 将该探针稍端在 PBS 中洗涤。

[0076] 通过标准方法, 用荧光素对用于 BNP、NT-proBNP 和 PCT (HyTest, 芬兰) 的捕获抗体进行标记。通常, 每个抗体有约 4 个荧光素取代。将经抗荧光素涂布的探针浸入已被荧光素标记的捕获抗体溶液 (5 微克 / 毫升) 中 5 分钟, 随后在 PBS 中洗涤。

[0077] 实施例 2: 制备生物素化的抗体

[0078] 通过标准方法, 用生物素标记抗 -BNP、抗 -NT-proBNP 和抗 -PCT 抗体。例如, 使生物素化的 -NHS 与所述抗体以约 15 比 1 的摩尔比在室温下在 PBS (pH7) 中反应 1 小时。该生物素化的抗体通过 Sephadex G-25 柱进行纯化。通常, 每个抗体有约 3-6 个生物素。

[0079] 实施例 3. 制备交联的 **FICOLL**[®] 400-SPDP

[0080] 交联的 **FICOLL**[®] 400-SPDP (琥珀酰亚胺基 6-[3-[2-吡啶二硫基]-丙酰胺基]己酸酯, Invitrogen) 是按照 US2011/0312105 的实施例 1 进行制备, 通过援引加入本文中。图 7 显示它的制备流程图。

[0081] 实施例 4. 制备 Cy5- 链霉亲和素

[0082] 使 32 μ L 的 5mg/ml 的 Cy5-NHS (GE Healthcare) / DMF 与 1ml 的 2.4mg/ml 的链霉亲和素 (Scripps Labs) 在 0.1M 碳酸钠缓冲液 pH9.5 中在 30 $^{\circ}$ C 下反应 40 分钟。将该混合物施加至 PD10 柱 (Pharmacia), 除去未被缀合的 Cy5。光谱分析表明每个链霉亲和素分子连接着 2.8 个 Cy5。

[0083] 实施例 4a 制备 Cy5- 抗体

[0084] Cy5- 抗体是根据实施例 4 通过用抗体替换链霉亲和素进行制备。

[0085] 实施例 5 制备 Cy5- 链霉亲和素交联的 **FICOLL**[®]

[0086] 使 5.8 μ L 的 10mg/ml 的 SMCC (琥珀酰亚胺基 4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯, Pierce Chemical) / DMF 与 1ml PBS pH7.4 中的 2mg Cy5- 链霉亲和素 (实施例 4) 在室温下反应 1 小时。将该混合物施加至 PD10 柱, 除去未被结合的 SMCC。

[0087] 交联的 **FICOLL**[®] 400-SPDP 上的硫醇通过将 30 μ L DTT 以 38mg/ml 添加到 1ml PBS 中的 1mg 交联的 **FICOLL**[®] 400-SPDP 并在室温下反应 1 小时进行脱保护, 而后通过 PD10 柱以纯化交联的 **FICOLL**[®]。

[0088] 使 Cy5- 链霉亲和素 -SMCC 与交联的 **FICOLL**[®] 400-SH 混合并在室温下过夜反应。然后将 10 μ L NEM (Aldrich) 以 12.5mg/ml 加入, 并在室温下反应 1/2 小时。然后在 Sepharose 4B CL 柱上纯化该缀合物。该缀合物估计带有约 20 至 30 个链霉亲和素 / **FICOLL**[®] (2 百万道尔顿), 以及 2-3 个 Cy5 / 链霉亲和素。

[0089] 实施例 5a 制备 Cy5- 链霉亲和素 - 交联的 **FICOLL**[®]

[0090] Cy5-抗体-交联的FICOLL[®]是按照实施例5,通过用抗体替代链霉亲和素进行制备。

[0091] 实施例6:用于BNP的宽范围操作规程

[0092] 对于宽范围分析的第一序列,将BNP校准物(Hytest)掺加入正常的混合人血浆中,然后在含有5mg/ml BSA和0.05% Tween20的PBS(分析缓冲液)中稀释1比3(1to3)。将该探针尖端浸入BNP样品孔中,并在室温下温育1分钟,伴随着该样品孔以50rpm轨道运动(1mm直径行程)。使该探针保持静止。将该探针在PBS,0.05% Tween20中洗涤3次,10秒。在该洗涤序列之后,将该探针浸入在试剂溶液中,该试剂溶液包含以10 μ g/ml生物素化的抗-BNP/分析缓冲液,然后在500rpm下温育0.5min,然后3x洗涤序列。然后将探针转移至扩增溶液Cy5-链霉亲和素-Cx FICOLL[®]。在500rpm下温育0.5分钟之后,对该探针进行洗涤序列。然后测量在该探针的远侧尖端处的荧光,并将结果示于表1中第一读数下。

[0093] 第二序列由以下组成:将该探针转移返回至相同的样品孔,以及以循环扩增步骤实施该分析。使该探针在该样品孔中在750rpm下温育5min,而后进行洗涤序列。然后进行三个循环,其中对于每个循环,将该探针浸入相同的生物素化的抗-BNP溶液中在500rpm下持续2min,接着进行洗涤序列,浸入相同的Cy5-链霉亲和素-Cx FICOLL[®]溶液中在500rpm下持续1分钟,而后进行洗涤序列。在第一循环(Amp1)和第三循环(Amp3)之后,测量在该探针尖端上的荧光。数据示于表1中。每个数据点是重复测量的平均值。"Sat"指饱和的信号。

[0094] 表1.

[0095]

[BNP] (ng/ml)	第一读数	第二读数	
		Amp 1	Amp 3
50	5.2	12.6	Sat
25	3.5	10.2	Sat
12	2.1	7.3	Sat
6	1.4	6.6	Sat
3	0.7	3.7	14.3
1	0.27	1.85	8.43
0.3	0.1	0.83	3.93
0.1	0.004	0.3	1.13
0.05	0.01		0.43
0.012	0.01		0.28
0	0.01	0	0.09

[0096] 表 1 的结果显示,对于第一序列(第一读数),量化范围是约 1-50ng/ml,对于用一个扩增循环(Amp1)的第二序列,量化范围是 0.3-25ng/ml,对于用三个扩增循环(Amp3)的第二序列,量化范围是 0.012-3ng/ml。与依赖于单组序列相比,第一序列和第二序列的结果的合并得出远远更大的总范围(0.01-50ng/mL,5000 倍)。

[0097] 实施例 7 :用于 NT-proBNP 的宽范围操作规程

[0098] 从芬兰 Hytest 获得 NT-proBNP 校准物。除了在第二序列中实施两个扩增循环(Amp2)之外,与实施例 5 相似地进行分析。

[0099] 数据示于表 2 中。

[0100] 表 2.

[0101]

NTProBNP	第一读数	第二读数
ng/ml		Amp2

[0102]

135	7.25	20
45.3	4.66	20
15.1	2.01	20
5.04	0.81	16.4
1.67	0.23	9.29
0.56	0.12	5.25
0.18	0.07	2.25
0.06	0.05	0.94
0	0.06	0.13

[0103] 表 2 的结果显示,对于第一序列(第一读数),量化范围是约 0.56-135ng/ml,对于用两个扩增循环(Amp2)的第二序列,量化范围是 0.06-5.04ng/ml。与依赖于单组序列相比,第一序列和第二序列的结果的合并得出远远更大的总范围(0.06-135ng/mL,2250 倍)。

[0104] 作为与工业标准的比较,罗氏 Cobas NTproBNP 分析范围是 0.06-35ng/mL(583 倍)。罗氏的量化范围低于本发明约 4 倍。

[0105] 实施例 8 :用于 PCT 的宽范围操作规程

[0106] PCT 校准物是从芬兰 Hytest 获得。除了在第二序列中实施两个扩增循环(Amp 2)之外,与实施例 5 相似地进行分析。

[0107] 数据示于表 3 中。

[0108] 表 3.

[0109]

[PCT], ng/ml	第一读数	第二读数
ng/ml		Amp2
400	5.84	20
133	2.11	20
44	0.81	20
14.8	0.28	20
4.9	0.11	11.82
1.64	0.07	4.54

[0110]

0.54	0.04	1.68
0.18	0.04	0.83
0.06	0.04	0.54
0	0.04	0.38

[0111] 表 3 的结果显示,对于第一序列(第一读数),量化范围是约 4.9-400ng/ml,对于用两个扩增循环(Amp2)的第二序列,量化范围是 0.06-14.8ng/ml。与依赖于单组序列相比,第一序列和第二序列的结果的合并得出远远更大的总范围(0.06-400ng/mL,6667 倍)。

[0112] 与工业标准比较,罗氏 Cobas PCT 分析范围是 0.06-100ng/mL(1667 倍)。罗氏的量化范围低于本发明约 4 倍。

[0113] 本发明及其制备和使用的方式和方法,现已用完全、清楚、简要和准确的术语进行了叙述,足以使其所属领域的任何技术人员能够制造和使用所述发明。应当理解,前文描述了本发明的优选实施方案,并且在不脱离权利要求书所述的本发明范围的情况下,可以进行修改。

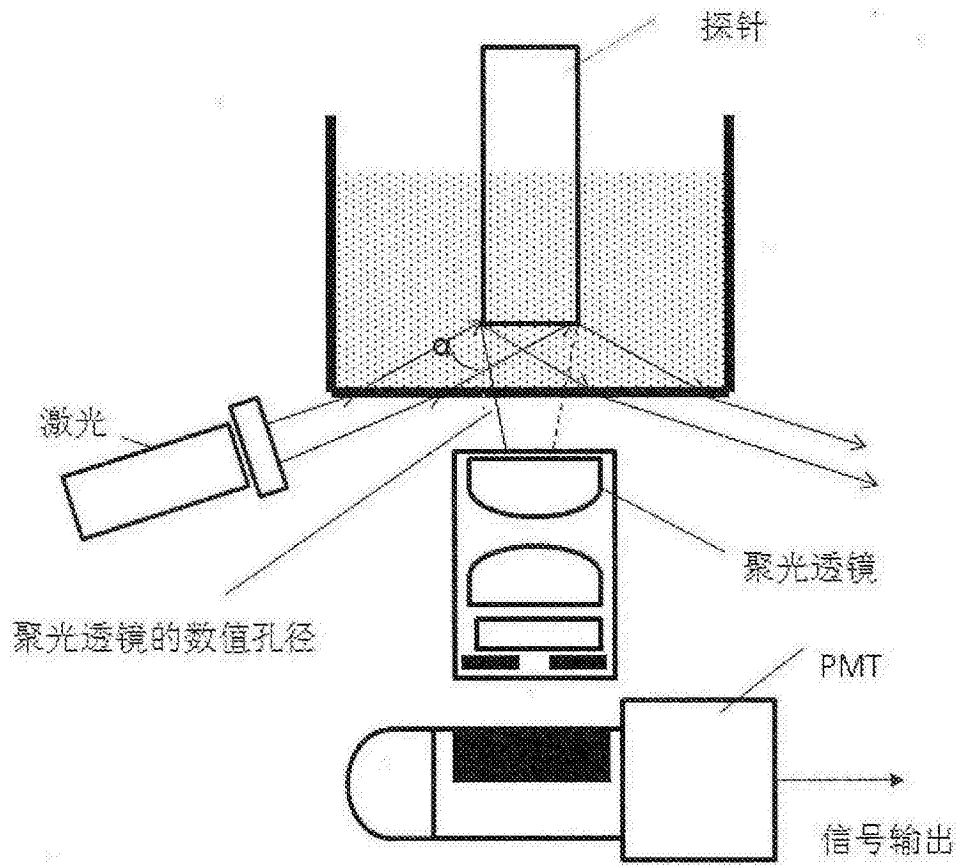


图 1

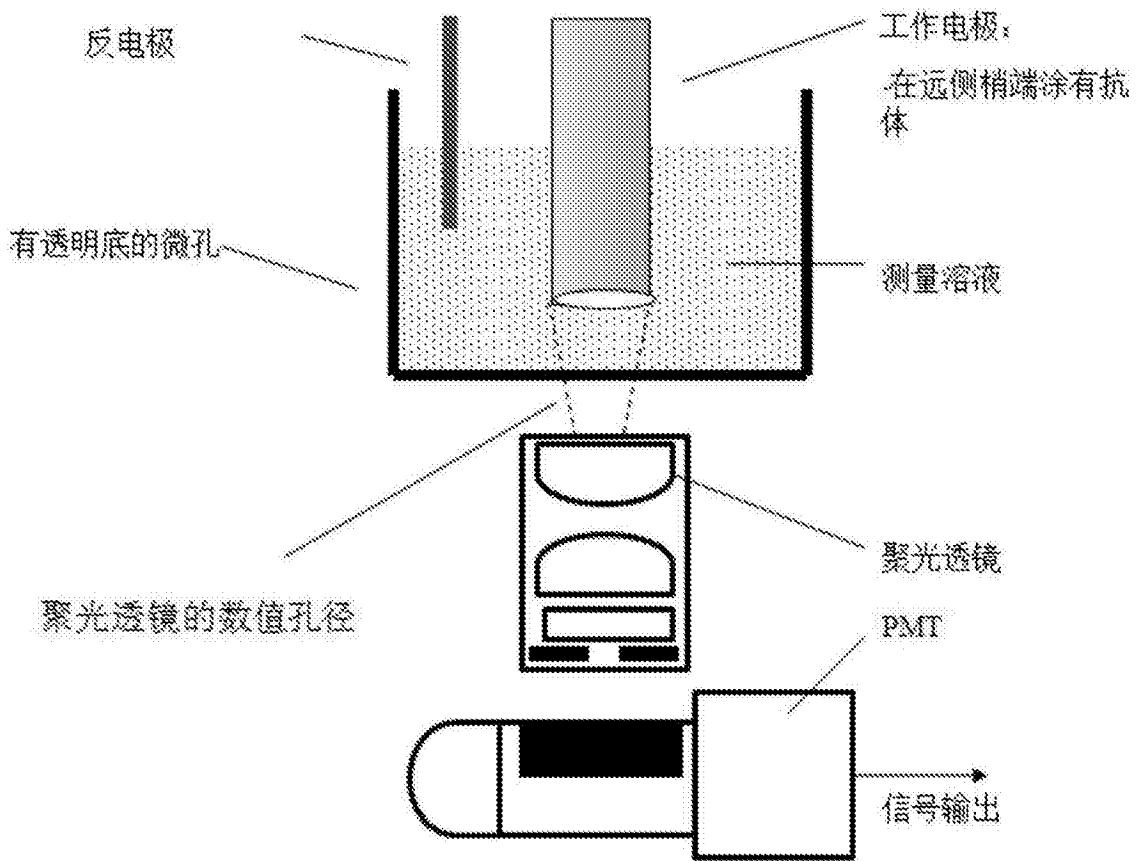


图 2

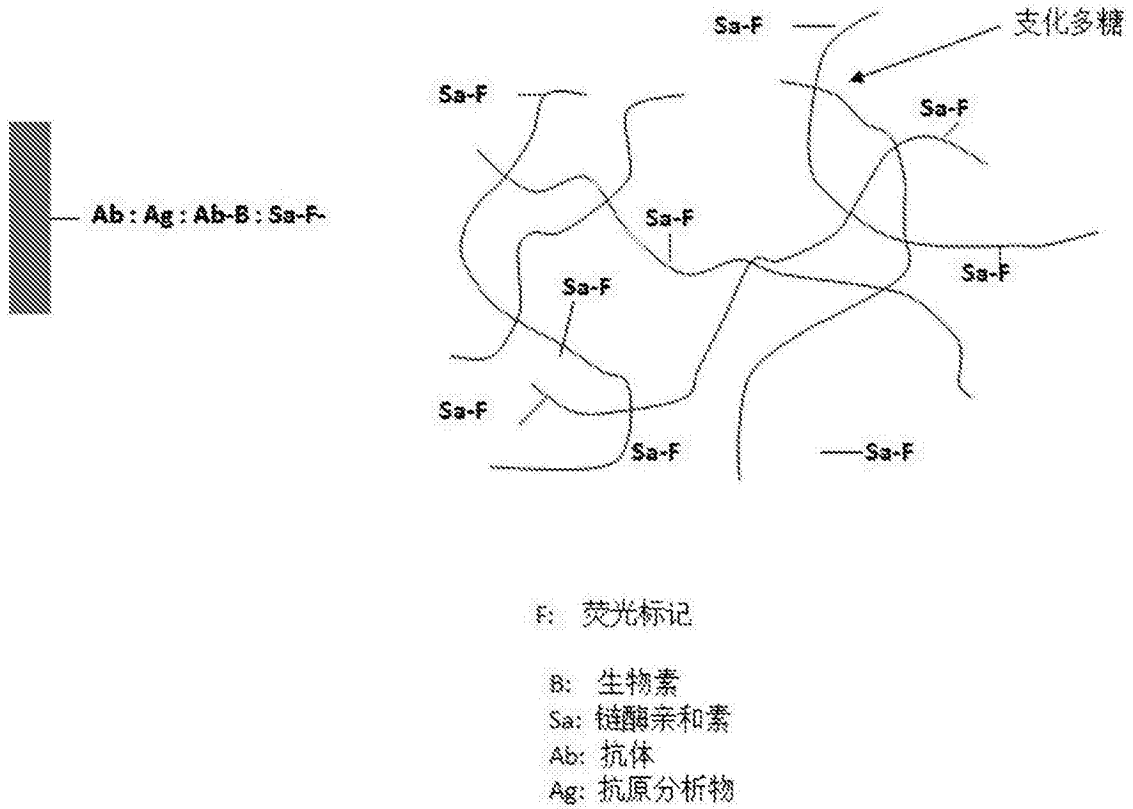


图 3

宽范围操作规程：两组探针转移序列

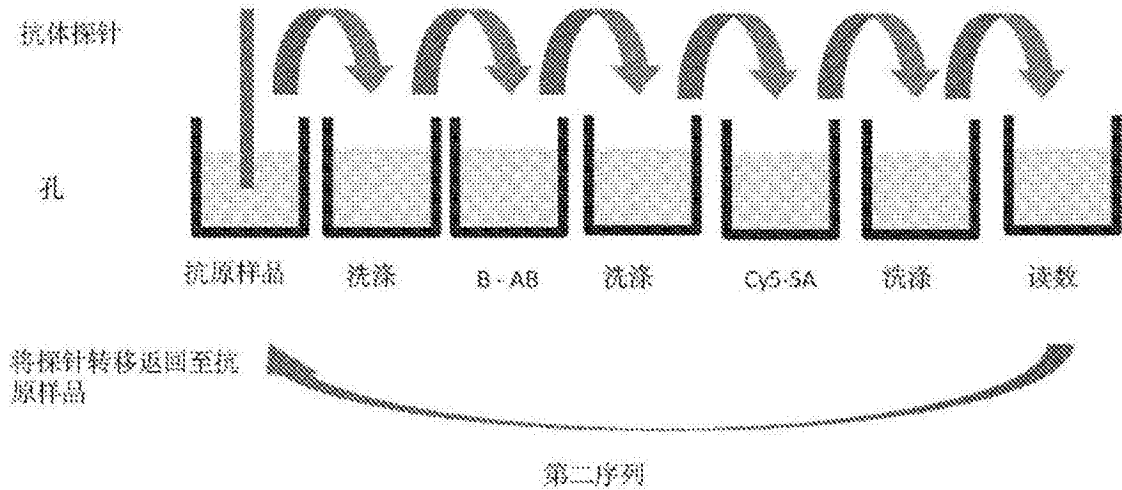


图 4

交联的 Ficoll-SPDP 制备



图 7

专利名称(译)	宽范围发光免疫分析		
公开(公告)号	CN104246500B	公开(公告)日	2016-02-17
申请号	CN201380019495.6	申请日	2013-04-12
[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		
发明人	罗伯特·F·祖克		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532		
代理人(译)	葛强		
审查员(译)	周洋		
优先权	61/624924 2012-04-16 US 13/794080 2013-03-11 US		
其他公开文献	CN104246500A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种方法，该方法用于在无需稀释样品和重复分析的情况下在单次分析中量化具有宽浓度范围的分析物。本发明的关键特征是具有事件的两个循环，包括样品结合至探针、结合反应，以及检测。在结合与检测的第一循环之后，将该探针再浸入相同的样品容器中以使该样品容器中额外的分析物在比第一循环的结合条件更有利的结合条件下结合。

宽范围操作规程：两组探针转移序列

