



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105723220 A

(43)申请公布日 2016.06.29

(21)申请号 201480061733.4

(22)申请日 2014.11.11

(30)优先权数据

10-2013-0136906 2013.11.12 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2014/010810 2014.11.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/072724 K0 2015.05.21

(71)申请人 光州科学技术院

地址 韩国光州

申请人 株式会社认知生物

(72)发明人 金珉坤 郑晓庵 吴迎庆

(74)专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283

代理人 金旭鹏 肖冰滨

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/563(2006.01)

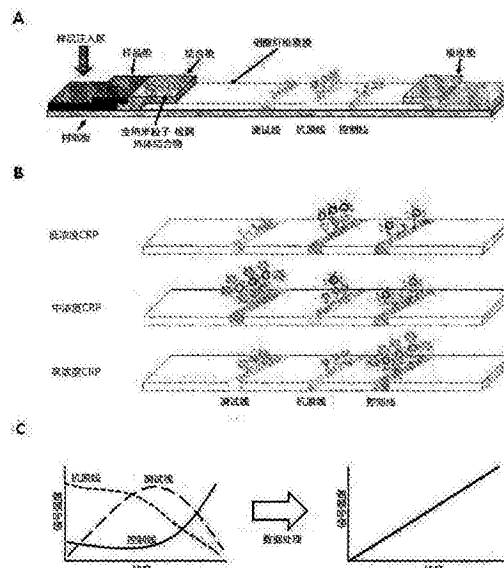
权利要求书2页 说明书11页 附图7页

(54)发明名称

能够测定广泛浓度范围的生物物质浓度的免疫层析条状传感器

(57)摘要

本发明涉及能够测定广泛浓度范围的生物物质浓度的免疫层析条状传感器及使用该免疫层析条状传感器测定广泛浓度范围的生物物质的浓度的方法。本发明的利用免疫层析条状传感器的检测方法在广泛浓度范围下可准确地测定抗原的浓度,且可实现低费用、迅速性及简便性,因而适合需要迅速性及高灵敏度的即时检验(point of care test,POCT)。



1. 一种侧方流动分析条状传感器,用于在广泛浓度范围下测定抗原的浓度,其特征在于,

上述侧方流动分析条状传感器包括依次连接有样品垫、结合垫、膜及吸收垫的结构,

上述结合垫包含纳米粒子-检测抗体结合物,上述纳米粒子-检测抗体结合物连接有纳米粒子和与上述抗原相结合的检测抗体,

在上述膜上,从上述结合垫向上述吸收垫的方向依次形成有测试线、抗原线及控制线,

在上述测试线固定有与上述抗原相结合的捕获抗体,

在上述抗原线固定有上述抗原,

在上述控制线固定有与上述检测抗体相结合的第二抗体。

2. 根据权利要求1所述的侧方流动分析条状传感器,其特征在于,固定于上述抗原线的抗原是由固定于膜上的捕获抗体介导而固定的。

3. 根据权利要求1所述的侧方流动分析条状传感器,其特征在于,上述纳米粒子-检测抗体结合物中的检测抗体为单克隆抗体。

4. 根据权利要求1所述的侧方流动分析条状传感器,其特征在于,上述纳米粒子为金纳米粒子。

5. 根据权利要求1所述的侧方流动分析条状传感器,其特征在于,上述膜为由硝酸纤维素、聚醚砜、聚乙烯、尼龙、聚偏氟乙烯、聚酯或聚丙烯制备而成的膜。

6. 根据权利要求1所述的侧方流动分析条状传感器,其特征在于,在支撑体上依次连接有上述样品垫、结合垫、膜及吸收垫。

7. 根据权利要求1所述的侧方流动分析条状传感器,其特征在于,上述抗原为C反应蛋白或肌红蛋白。

8. 一种使用侧方流动分析条状传感器来在广泛浓度范围下测定抗原的浓度的方法,其特征在于,

上述侧方流动分析条状传感器包括依次连接有样品垫、结合垫、膜及吸收垫的结构,

上述结合垫包含纳米粒子-检测抗体结合物,上述纳米粒子-检测抗体结合物连接有纳米粒子和与上述抗原相结合的检测抗体,

在上述膜上,从上述结合垫向上述吸收垫的方向依次形成有测试线、抗原线及控制线,

在上述测试线固定有与上述抗原相结合的捕获抗体,

在上述抗原线固定有上述抗原,

在上述控制线固定有与上述检测抗体相结合的第二抗体,

上述使用侧方流动分析条状传感器来在广泛浓度范围下测定抗原的浓度的方法包括:

步骤(a),使以已知的浓度包含所要分析的抗原的样品与上述样品垫相接触;

步骤(b),对在上述测试线、抗原线及控制线中生成的信号进行测定;

步骤(c),针对以与上述步骤(a)不同的已知的浓度包含所要分析的抗原的多种样品进行上述步骤(a)及步骤(b);

步骤(d),对通过上述步骤(a)至步骤(c)测定的多种信号值进行处理,来计算校正曲线;

步骤(e),使以未知的浓度包含所要分析的抗原的样品与上述样品垫相接触;

步骤(f),对在上述测试线、抗原线及控制线中生成的信号进行测定;以及

步骤(g),利用测定的信号值和上述步骤(d)的校正曲线来计算未知浓度的抗原的浓度。

9.根据权利要求8所述的使用侧方流动分析条状传感器来在广泛浓度范围下测定抗原的浓度的方法,其特征在于,在上述步骤(g)中,包括如下步骤:比较在上述抗原线中测定的信号值和在上述控制线中测定的信号值,来在抗原线的信号值大于控制线的信号值的情况下在所计算的抗原的浓度值中选择更低的值,并在抗原线的信号值小于控制线的信号值的情况下在所计算的抗原的浓度值中选择更大的值。

10.根据权利要求8所述的使用侧方流动分析条状传感器来在广泛浓度范围下测定抗原的浓度的方法,其特征在于,能够进行分析的上述抗原的浓度范围为1ng/mL~500μg/mL。

11.根据权利要求8所述的使用侧方流动分析条状传感器来在广泛浓度范围下测定抗原的浓度的方法,其特征在于,固定于上述侧方流动分析条状传感器的抗原线的抗原是由固定于膜上的捕获抗体介导而固定的。

12.根据权利要求8所述的使用侧方流动分析条状传感器来在广泛浓度范围下测定抗原的浓度的方法,其特征在于,上述侧方流动分析条状传感器的纳米粒子-检测抗体结合物中的检测抗体为单克隆抗体。

能够测定广泛浓度范围的生物物质浓度的免疫层析条状传感器

技术领域

[0001] 本专利申请针对2013年11月12日向韩国专利厅提出的韩国特许申请第KR10-2013-0136906号主张优先权,上述专利申请的公开事项插入于本说明书中作为参考。

[0002] 本发明涉及能够测定广泛浓度范围的生物物质浓度的免疫层析条状传感器(Lateral Flow Assay Strip Sensor)及使用该免疫层析条状传感器测定广泛浓度范围的生物物质的浓度的方法。

背景技术

[0003] C反应蛋白(C-reactive protein,CRP)作为众所周知的急性炎症的生物标记,以正五聚蛋白(pentraxin)的形态由5个反复结构形成,若受到白细胞介素-1及白细胞介素-6的刺激,则在肝脏中进行合成。过去数十年间,进行了如下研究(1~9):通过测定在血浆中的C反应蛋白的水平,来将其利用于预测心肌梗塞、癌症、心血管疾病、糖尿病的危险程度,或用于抗生素治疗指南。在健康的正常成人中,C反应蛋白的数值为平均 $0.8\mu\text{g/mL}$,但若发生炎症反应,则其数值增加到 100mg/L 以上。通常,在轻度炎症或病毒感染的情况下,C反应蛋白的数值为 $10\sim 50\mu\text{g/mL}$,在活动性炎症或细菌感染的情况下,C反应蛋白的数值为 $50\sim 200\mu\text{g/mL}$,在重度炎症或损伤的情况下,C反应蛋白的浓度大于 $200\mu\text{g/mL}$ 。食品药品监督管理局(FDA)劝告如下:在 $20\sim 500\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围的情况下,对炎症中的C反应蛋白进行测定,并且,对作为心血管疾病的具有可靠性的生物标记且潜在性危险预测子的高灵敏度C反应蛋白(high sensitivity CRP,hs-CRP)进行测定。在这种测定中所需的浓度范围为 $1\sim 10\mu\text{g/mL}$ 。

[0004] 在急性炎症或第一次诊疗的情况下,为了迅速的诊断或人体体液内C反应蛋白水平的连续的监控,需要测定范围的充足性、迅速性、准确性、简便性及低费用定量测定等(10~11)。通常,作为迅速的定量性C反应蛋白分析,普遍利用具有聚苯乙烯珠的免疫比浊(Immunoturbidimetric)法或免疫散射比浊(Immunonephelometry)法、金纳米粒子凝聚(agglomeration)分析法等。并且,最近,导入广泛浓度范围的C反应蛋白测试,从而扩张到能够测定广泛的浓度。例如,DIAgam XS Cardio NanoGold C反应蛋白法的情况下,使用由DIAgam laboratory(法国里尔(Lille,France))提供的试剂来实现 $0.42\sim 265\mu\text{g/mL}$ 的范围为止的测定。就DIAgam试剂而言,经过稀释试样的步骤,并使用奥林巴斯(Olympus)AU640生化分析仪,来测定 $0.1\sim 160\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围的全浓度范围。这些方法使用自动化的分析仪来提供准确的测定值,但为了进行分析工序,需要昂贵的设备和熟练的人力。作为用于克服这种局限点的方案,提出利用适合现场显示系统的低费用、短的分析时间及简单的操作技术检测C反应蛋白的方法。作为迅速且高灵敏度的即时检验(point of care test,POCT)技术中之一,微流控芯片(microfluidic chip)作为用于测定C反应蛋白的工具广泛地得到研究。在由格威斯(Gervais)等进行的研究中(12),微流控芯片对浓度为 10ng/mL 的C反应蛋白可检测3分钟,在14分钟内,可检测浓度为 1ng/mL 以下的C反应蛋白。在由乔斯森

(Jonsson)等进行的研究中(13),侧方流动聚合物芯片具有102的动态范围,并拥有2.6ng/mL的检测局限。并且,根据由格威斯等进行的报告(12),在0.01~1.0 μ g/mL范围下,若C反应蛋白浓度增加,则在C反应蛋白浓度中,荧光信号强度减少。如在上述研究结果中所示,微流控芯片非常迅速且在低浓度下可实现测定,但在高浓度的C反应蛋白测定、批量生产及相对费用方面具有局限性(14-15)。为了克服这种局限性,开发了用于C反应蛋白分析的垂直流动分析法(vertical flow assay,VFA)(16)。在这种研究中,在1分钟内,使用了比侧方流动分析法(lateral flow assay,LFA)条状生物传感器更宽的动态范围,但未覆盖更宽的范围的C反应蛋白。

[0005] 侧方流动分析法条状生物传感器用于迅速、低费用且一步免疫分析法中之一(17)。基于C反应蛋白测试条的几种类型的侧方流动分析仪在商业上可购买,但在夹心免疫分析法中,由于呈现基于分析物的非常高的浓度的假阴性结果的钩状效应(hook effect),存在无法在人血清内覆盖C反应蛋白浓度范围的缺点(18~19)。因这种理由,大部分的商业用侧方流动分析法条状传感器使用于高灵敏度C反应蛋白(hsCRP)或心脏C反应蛋白(cCRP)的诊断。但是,在由莱昂(Leung)等进行的研究中(20),在作为指示器使用金纳米粒子(AuNPs)的“数字式”分析法或“条码式”分析法中提供,在15分钟内,在测试中对红色线的数量进行计数,从而检测低浓度的C反应蛋白,来预测初期心血管疾病(CVD)危险度或细菌及病毒感染的半定量(semi-quantitative)侧方流动分析法。这种侧方流动分析法传感器的测定目的根据各个疾病而不同,但使用多线测定法来检测了相同的C反应蛋白。需要开发用于可覆盖广泛浓度范围0~500mg/L的C反应蛋白分析的一步免疫传感器。并且,侧方流动分析法生物传感器具有用于评价使用便利性、商业接近简易性及制造费用等迅速的诊断传感器或即时检验的质量的重要因素(21)。

[0006] 本说明书全文中,参照了多篇论文及专利文献,并表示了其引用。所引用的论文及专利文献的公开内容全部插入于本说明书作为参照,从而更加明确说明本发明所属技术领域的水平及本发明的内容。

[0007] 现有技术文献

[0008] 非专利文献

[0009] 1.Triant VA,Meigs JB,Grinspoon SK.Journal of acquired immune deficiency syndromes 2009;51:268-73.

[0010] 2.Patrick L,Uzick M.AJournal of clinical therapeutic 2001;6:248-71.

[0011] 3.Ridker PM.Circulation 2003;107:363-9.

[0012] 4.Kushner I,Broder ML,Karp D.The Journal of clinical investigation 1978;61:235-42.

[0013] 5.Ridker PM.Cardiology patient page.Circulation 2003;108:e81-5.

[0014] 6.Dufour JF.Hepatology 2013;57:2103-5.

[0015] 7.Mazhar D,Ngan S.QJM:monthly journal of the Association of Physicians 2006;99:555-9.

[0016] 8.Kasapis C,Thompson PD.Journal of the American College of Cardiology 2005;45:1563-9.

[0017] 9.Rifai N,Ridker PM.Clinical chemistry 2001;47:403-11.

- [0018] 10. Junker R, Schlebusch H, Luppä PB. Deutsches Arzteblatt international 2010;107:561-7.
- [0019] 11. Pfafflin A, Schleicher E. Analytical and bioanalytical chemistry 2009;393:1473-80.
- [0020] 12. Gervais L, Delamarche E. T. Lab on a chip 2009;9:3330-7.
- [0021] 13. Jonsson C, Aronsson M, Rundstrom G, Pettersson C, Mendel-Hartvig I, Bakker J, et al. Lab on a chip 2008;8:1191-7.
- [0022] 14. Rivet C, Lee H, Hirsch A, Hamilton S, Lu H. Chemical Engineering Science 2011;66:1490-507.
- [0023] 15. Yager P, Edwards T, Fu E, Helton K, Nelson K, Tam MR, Weigl BH. Nature 2006;442:412-8.
- [0024] 16. Oh YK, Joung HA, Kim S, Kim MG. Lab Chip 2013;13:768-72
- [0025] 17. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, Amerongen Av. Anal Bioanal Chem 2009;393:569-82
- [0026] 18. Fernando SA, Wilson GS. Journal of immunological methods 1992;151:47-66.
- [0027] 19. Rodbard D, Feldman Y, Jaffe ML, Miles LE. Immunochemistry 1978;15:77-82.
- [0028] 20. Leung W, Chan CP, Rainer TH, Ip M, Catherley GW, Renneberg R. Journal of immunological methods 2008;336:30-6.
- [0029] 21. Luong JH, Male KB, Glennon JD. Biotechnology advances 2008;26:492-500.

发明内容

[0030] 解决的技术问题

[0031] 本发明人为了开发对具有广泛浓度范围的生物物质还可实现准确的浓度的测定的生物传感器而努力研究。最终,通过实验确认如下情况来完成了本发明:在基于免疫层析法的侧方流动分析条状传感器中,在控制线(control line)与测试线(test line)之间设置抗原线(antigen line),从而可准确且迅速地测定广泛浓度范围的抗原的浓度。

[0032] 因此,本发明的目的在于,提供用于在广泛浓度范围下测定抗原的浓度的侧方流动分析条状传感器。

[0033] 本发明的另一目的在于,提供用于使用侧方流动分析条状传感器来在广泛浓度范围下测定抗原的浓度的方法。

[0034] 通过以下的发明的详细说明、权利要求书及附图,更加明确本发明的目的及优点。

[0035] 技术方案

[0036] 根据本发明的一实施方式,本发明提供侧方流动分析条状传感器,用于在广泛浓度范围下测定抗原的浓度,其特征在于,上述侧方流动分析条状传感器包括依次连接有样品垫、结合垫、膜及吸收垫的结构,上述结合垫包含纳米粒子-检测抗体结合物,上述纳米粒子-检测抗体结合物连接有纳米粒子和与上述抗原相结合的检测抗体,在上述膜上,从上述

形成,但通常,优选地,上述支撑体为液体不渗透性物质,以防止通过上述膜扩散的样品的流体通过支撑体泄漏。例如,包含玻璃;聚合物物质,例如,聚苯乙烯、聚丙烯、聚酯、聚丁二烯、聚氯乙烯、聚酰胺、聚碳酸酯、环氧化物、甲基丙烯酸酯及聚三聚氰胺等,但并不局限于此。

[0048] 在本发明的传感器中,在上述膜上,从上述结合垫向上述吸收垫的方向依次形成有测试线、抗原线及控制线。

[0049] 在本发明的传感器中,在上述“测试线”固定有与上述抗原相结合的捕获抗体。

[0050] 在本发明的传感器中,在上述“抗原线”固定有上述抗原。

[0051] 优选地,固定于上述抗原线的抗原是由固定于膜上的捕获抗体介导而固定的。在上述抗原线中,若使抗原结合在捕获抗体上而被固定,而不是直接固定于膜上,则可使抗原向适当的方向露出,使得抗原与纳米粒子-检测抗体的结合变得容易,从而最终可提高传感器的抗原检测性能。

[0052] 在本发明的传感器中,在上述“控制线”固定有与上述检测抗体相结合的第二抗体。控制线的第二抗体与纳米粒子-检测抗体或纳米粒子-检测抗体-抗原复合体相结合,从而产生对此的检测信号。

[0053] 在本说明书中,术语“抗原”是指所要分析浓度或是否存在的对象物质,例如,包含蛋白质、肽、微生物、氨基酸、核酸、激素、类固醇、维生素、药物、细菌、病毒粒子等,但并不局限于此。上述抗原最优选为C反应蛋白。

[0054] 在本说明书中,术语“样品”是指怀疑含有上述所要分析的抗原的生物学物质。例如,包含血液、间质液、唾液、目镜流体、脑脊髓液、汗液、尿液、乳汁、腹水、粘液、鼻腔流体(nasal fluid)、咯血、关节血液、腹腔液、阴道分泌物、月经分泌物、羊水及精液,还可来源于生理流体等有些生物学供给源。

[0055] 根据本发明的另一实施方式,本发明提供使用侧方流动分析条状传感器来在广泛浓度范围下测定抗原的浓度的方法,上述侧方流动分析条状传感器包括依次连接有样品垫、结合垫、膜及吸收垫的结构,上述结合垫包含纳米粒子-检测抗体结合物,上述纳米粒子-检测抗体结合物连接有纳米粒子和与上述抗原相结合的检测抗体,在上述膜上,从上述结合垫向上述吸收垫的方向依次形成有测试线、抗原线及控制线,在上述测试线固定有与上述抗原相结合的捕获抗体,在上述抗原线固定有上述抗原,在上述控制线固定有与上述检测抗体相结合的第二抗体,上述使用侧方流动分析条状传感器来在广泛浓度范围下测定抗原的浓度的方法包括:步骤(a),使以已知的浓度包含所要分析的抗原的样品与上述样品垫相接触;步骤(b),对在上述测试线、抗原线及控制线中生成的信号进行测定;步骤(c),针对与上述步骤(a)不同的已知的浓度包含所要分析的抗原的多种样品进行上述步骤(a)及步骤(b);步骤(d),对通过上述步骤(a)至步骤(c)测定的多种信号值进行处理,来计算校正曲线;步骤(e),使以未知的浓度包含所要分析的抗原的样品与上述样品垫相接触;步骤(f),对在上述测试线、抗原线及控制线中生成的信号进行测定;以及步骤(g),利用测定的信号值和上述步骤(d)的校正曲线来计算未知浓度的抗原的浓度。

[0056] 根据本发明的优选实例,本发明提供使用侧方流动分析条状传感器来在广泛浓度范围下测定抗原的浓度的方法,其特征在于,在上述步骤(g)中,包括如下步骤:比较在上述抗原线中测定的信号值和在上述控制线中测定的信号值,来在抗原线的信号值大于控制线

的信号值的情况下所计算的抗原的浓度值中选择更低的值,并在抗原线的信号值小于控制线的信号值的情况下所计算的抗原的浓度值中选择更大的值。

[0057] 在使用本发明的传感器来测定广泛浓度范围的抗原的浓度的情况下,由于钩状效应,测试线中的信号取得钟(bell)状的信号强度曲线。即,分析抗原的浓度越增加,测试线的信号强度就越增加,在大于临界点的浓度下,测试线的信号强度重新减少,从而形成钟状的曲线。因此,通过一个样品测定生成的信号强度可指示两种不同的浓度结果(参照图5的B部分)。为了确定实际浓度值,比较了控制线及抗原线的信号强度。在最佳的情况下,在抗原的浓度较低的样品的情况下,控制线的信号强度低于抗原线的信号强度,相反,在抗原的浓度高的样品中,与此相反,呈现抗原线的信号强度低于控制线的信号强度的信号强度模式。利用这种现象,在生物学样品中,可准确地测定具有广泛浓度范围的抗原的浓度。

[0058] 根据本发明的优选实例,在本发明的方法中,可分析的上述抗原的浓度范围为1ng/mL~500μg/mL。

[0059] 发明的效果

[0060] 本发明涉及能够测定广泛浓度范围的生物物质浓度的免疫层析条状传感器及使用该免疫层析条状传感器测定广泛浓度范围的生物物质的浓度的方法。本发明的利用免疫层析条状传感器的检测方法在广泛浓度范围下可准确地测定抗原的浓度,且可实现低费用、迅速性及简便性,因而适合需要迅速性及高灵敏度的即时检验(point of care test, POCT)。

附图说明

[0061] 图1的A部分、图1的B部分及图1的C部分为导入有抗原的侧方流动分析法条状传感器的示意图。图1的A部分示出结构,图1的B部分示出检测原理,图1的C部分示出数据处理过程。

[0062] 图2的A部分及图2的B部分为使C反应蛋白与抗原线上的经预处理的抗体直接相结合的情况和使聚乙二醇(PEG)-C反应蛋白与抗原线上的经预处理的抗体相结合的情况之间比较对1μg/mL的C反应蛋白进行测定的信号强度的结果。图2的A部分为图像,图2的B部分为图表。

[0063] 图3为比较基于预结合的抗体型抗原线的信号强度的结果。

[0064] 图4示出数据处理的整个过程。

[0065] 图5的A部分、图5的B部分及图5的C部分中,图5的A部分为测定多种浓度的C反应蛋白的图像。图5的B部分为以对数单位绘制测试线、抗原线及控制线这三种线的信号强度的结果。图5的C部分为处理数据后的测定结果。

[0066] 图6为对以10倍稀释的50个临床样品进行测试的结果。

[0067] 图7的A部分及图7的B部分为根据浓度的血清内肌红蛋白的测定结果。图7的A部分为图像,图7的B部分为曲线图。

[0068] 图8为数据处理结束之后,根据对数单位的肌红蛋白浓度的分析结果。

具体实施方式

[0069] 以下,通过实施例对本发明进行更加详细的说明。这些实施例仅用于更加具体地

说明本发明,根据本发明的要旨,本发明的范围并不受这些实施例的限制,这对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说是显而易见的。

[0070] 实施例

[0071] 实验材料及方法

[0072] 1. 实验材料

[0073] 从美国F11公司(Fitzerald Industries International,美国马萨诸塞州阿克顿(Acton,MA,USA))购买了未包含C反应蛋白的血清(90R-100)、表面活性剂(surfactant)10G(95R-103)及牛血清白蛋白(BSA)。从和光纯药化工(Wako Chemicals)公司(309-51191;日本大阪(Osaka,Japan))购买了C反应蛋白,并从艾碧康公司(Abcam Inc.)(美国马萨诸塞州坎布里奇(Cambridge,MA,USA))购买了抗-C反应蛋白多克隆抗体及单克隆抗体。从密理博(Millipore)公司(HFB02404;美国马萨诸塞州比勒利卡(Billerica,MA,USA))购买了硝酸纤维素膜。从颇尔公司(Pall Co.)(美国纽约州华盛顿港(Port Washington,NY,USA))购买了样品垫(P/N BSP-133-20)及吸收垫。从沃特曼(Whatman)公司(英国肯特(Kent,UK))购买了内垫(Fusion5 8151-6621)。从BB国际(International)(EM.GC10,15,20,40;英国加的夫(Cardiff,UK))公司购买了各个金胶体溶液。从西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich)公司(美国密苏里州圣路易斯(St.Louis,MO,USA))购买了聚乙烯吡咯烷酮(PVP10)、蔗糖(S7903)、叠氮化钠(S8032)及其他化合物。所有缓冲液和试剂溶液利用使用Milli-Q净水系统制成的纯化水来制备而得。从密理博公司(HF000MC100)取得了被层压的卡片。

[0074] 2. 金纳米粒子(AuNP)-抗体结合溶液的制备

[0075] 为了制备金纳米粒子结合物,在1mL的20nm的金纳米粒子胶体和硼酸盐缓冲液(0.1M,pH8.5)的混合物中添加了包含抗-C反应蛋白抗体的磷酸盐缓冲液(PBS)(1mg/mL浓度)10。在常温条件下,培养30分钟之后,在溶液中添加0.1mL的包含10mg/mL的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液,以便黏连金纳米粒子表面。在4℃温度下,培养60分钟之后,在10℃温度下,以12000rpm使用HANIL微型离心机(microcentrifuge)(micro 17TR;美国科罗拉多州科罗拉多斯普林斯Quasar仪器(Quasar Instruments,Colorado Springs,CO,USA))来将混合物离心分离15分钟。去除上清液,并在金纳米粒子结合物中添加10mM的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液(pH 7.4)来进行再悬浮。将离心分离及悬浮过程反复2次,来作为最终悬浮溶液,制备了10mM的包含0.1%的牛血清白蛋白、0.05%的NaN₃、1%的蔗糖的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液。

[0076] 3. 侧方流动分析法(侧方流动免疫层析法(Lateral Flow Immunoassay))传感器的制备-1

[0077] 侧方流动分析法传感器由4个结构要素构成,即,样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜及吸收垫。大部分的结构要素典型地固定于惰性塑料,例如,由聚酯形成的常规的衬纸板(backing card)上。使用分配器(DC1100;韩国京畿道泽塔公司(Zeta Corporation,Kyunggi-do,South Korea))向硝酸纤维素膜(0.25cm×30cm)上的分别不同的区域固定了捕获抗体及C反应蛋白或聚乙二醇-C反应蛋白或捕获抗体、控制抗体。在抗原线中,以1μL/cm的量将抗体(1mg/mL)固定于纤维素膜之后,依次将C反应蛋白(1mg/mL)抗原固定于其上。各区域之间的间隔为约3mm。装载结束的膜在温度&湿度(Temperature&humid)腔室中,以28℃温度干燥了1小时。干燥硝酸纤维素膜之后,利用切割机将膜切割成宽度为3.8mm的条。在

结合垫(0.75cm×0.38cm)上培养经浓缩的2X金纳米粒子-抗体结合物12,并使用温度&湿度腔室(韩国汉阳科技设备有限公司(Hanyang Scientific Equipment Co.,Ltd,Korea))在28℃温度且25%湿度条件下,依次进行干燥之后保存。将吸收垫(1.5cm×0.38cm)附着于条的上端部,样品垫(1.5cm×0.38cm)依次组装于具有粘结性的塑料背板上(6cm×0.38cm),上述塑料背板包含具有固定的抗体及吸收垫的硝酸纤维素膜。为了促进分析过程期间的溶液的移动,以1.5mm左右相互重叠了各片段。

[0078] 4. 侧方流动分析法(侧方流动免疫层析法)传感器的制备-2

[0079] 使用分配器(DC1100;韩国京畿道泽塔公司)向硝酸纤维素膜(0.25cm×30cm)上的分别不同的区域固定了捕获抗体、肌红蛋白(myoglobin)抗原及控制抗体。在控制线和测试线中,以1μL/cm的量将各个捕获抗体(1mg/mL)固定于纤维素膜,并将抗原线固定于两个线之间。在抗原线中,以1μL/cm的量将捕获抗体(1mg/mL)固定于纤维素膜之后,依次将肌红蛋白(0.5mg/mL)抗原固定于其上。各区域之间的间隔为约3mm。装载结束的膜在温度&湿度腔室中,以37℃温度干燥1小时。干燥硝酸纤维素膜之后,利用切割机将膜切割成宽度为3.8mm的条。在结合垫(1cm×0.38cm)上培养经浓缩的3X金纳米粒子-抗体结合物,并使用温度&湿度腔室(韩国汉阳科技设备有限公司)在37℃温度且20%湿度条件下,进行干燥之后保存。将吸收垫(1.5cm×0.38cm)附着于条的上端部,样品垫(1.5cm×0.38cm)依次组装于具有粘结性的塑料背板(6cm×0.38cm)上,上述塑料背板包含具有固定的抗体及吸收垫的硝酸纤维素膜。为了促进分析过程期间的溶液的移动,以2mm左右相互重叠了各片段。

[0080] 5. C反应蛋白的分析

[0081] 使用未包含C反应蛋白的人血清来制备了具有多种浓度的C反应蛋白溶液。在侧方流动分析法传感器上培养了制备的样品溶液。使用Chemi Doc™ XRS+成像系统(imaging system)(Bio-Rad)来取得图像,接着使用Image Lab™ 4.0软件(Bio-Rad)来测定了颜色强度。

[0082] 6. 肌红蛋白的分析

[0083] 使用未包含肌红蛋白的人血清来制备了具有多种浓度的C反应蛋白溶液。在侧方流动分析法传感器上培养了制备的样品溶液。使用Chemi Doc™ XRS+成像系统(Bio-Rad)来取得图像,接着使用Image Lab™ 4.0软件(Bio-Rad)来测定了颜色强度。

[0084] 7. 患者样品的制备

[0085] 从韩国庆北大学医院取得了50名患者的血清样品。向患者详细说明研究协议之后得到同意。使用静脉穿刺将血液样品采集于包含肝素锂抗凝剂(德国宁布雷希特S-Monovette(S-Monovette, Numbrecht, Germany))的管内。接着,以1000xg将血液样品管离心分离15分钟,来去除了血液内的细胞。有关已采集的试样,利用日立(HITACHI)7180设备测定浓度之后,在-80℃温度下保存血浆部分,直到进行追加分析为止。在测定样品之前,使用不包含C反应蛋白的血清来稀释了10倍。

[0086] 实验结果及观察

[0087] 1. 条状传感器的分析原理

[0088] 侧方流动分析法条状传感器从样品注入方向分别以测试线、抗原线及控制线的顺序构成(图1的A部分)。若在样品垫上培养血清样品,则在溶液与样品垫相接触之后,向水平方向分别湿润于样品垫、结合垫及硝酸纤维素膜。最初,在测试线中附着于测试线的抗体

中,在抗原与金纳米粒子-单克隆抗体结合物复合体之间发生夹心反应,在测试线中不发生反应的金纳米粒子-抗体结合物与在抗原线中固定于硝酸纤维素膜上的C反应蛋白抗原相结合。在分析低浓度的抗原的情况下,抗原线呈现最高的信号强度,相反,在分析高浓度的抗原的情况下,抗原线呈现非常低的信号强度或毫无信号强度。并且,控制线作为与标记有金的单克隆抗体发生反应的区域而使用。在图1的B部分中表示了整个反应。适用数据处理过程来表示了在分别不同的抗原浓度中测定的结果(图1的C部分)。注入样品之后,在作为与金纳米粒子复合体相汇的第一个位置的测试线中,若与C反应蛋白抗原相结合的金纳米粒子-抗体结合物-抗原复合体与固定于硝酸纤维素膜上的抗C反应蛋白多克隆抗体相结合,则呈现红色的信号。实验结果表明,在测试线中,信号强度在0~1 μ g/mL的抗原浓度范围下增加,但在抗原为高浓度的情况下减少(图5的A部分及图5的B部分)。推定这种现象是当分析大部分高浓度的抗原时,呈现的钩状效应。在抗原以规定的浓度以上存在的条件下,在结合垫内不与金纳米粒子相结合的抗原沿着硝酸纤维素膜快速移动,从而先与存在于测试线的捕获抗体相结合,这是因为较大的具有缓慢的移动速度的金纳米粒子抗体结合物复合体失去可与存在于测试线的捕获抗体相结合的机会。由于这种钩状效应,在测定高浓度的抗原的情况下,测试线的信号强度值针对实际所需的广泛抗原浓度范围具有局限性。因此,为了克服这种现象,导入抗原线来利用了测试线、抗原线及控制线的相关关系。注入样品之后,抗原线根据样品内的抗原的浓度制作了不同模式的信号。例如,在抗原的浓度为0的情况下,抗原线与在测试线中表示的信号正相反,呈现表示最高信号值的结果。相反,抗原线的信号强度呈现随着抗原的浓度增加逐渐减少的倾向,在测试线中,随着浓度,信号强度逐渐增加,并在1 μ g/mL以上的抗原浓度中,呈现了信号强度减少的倾向。最后,两个线在500 μ g/mL的浓度下未示出红色信号(图5的A部分)。在测试线中,金纳米粒子结合物-抗体(Ab)-抗原(Ag)复合体以夹心分析的形态与捕获抗体发生反应,相反,未发生反应的金纳米粒子结合物-抗体(Ab)沿着硝酸纤维素膜向上部方向移动,从而与抗原线的抗原相结合。若在形成金纳米粒子结合物-Ab-Ag复合体之前,过量的抗原先与测试线的捕获抗体相结合,则与固定于硝酸纤维素膜上的C反应蛋白的结合亲和力也减少。最终,在抗原以高浓度存在的分析中,免疫分析反应被抑制,因而不呈现测试线和抗原线两条线的信号强度,由于固定有抗-小鼠IgG抗体的控制线与未发生反应的金纳米粒子-结合-抗原复合体相结合,因而呈现最高的信号。

[0089] 2. 抗原线的最优化

[0090] 在制造条状传感器的过程中,最重要的因素是在抗原线中固定C反应蛋白。本发明人为了有助于C反应蛋白的方向和稳定化,在抗原线中,先固定捕获抗体,接着在其中添加了C反应蛋白。在将C反应蛋白直接固定于硝酸纤维素膜的情况下,在已固定的抗原与金纳米粒子结合物抗体之间未呈现反应。预计在干燥工序期间,C反应蛋白进行分解,从而为了避免这种缺点,使用活性酯聚乙二醇(NHS-PEG)来对C反应蛋白进行了聚乙二醇化。但是,结合有经聚乙二醇化的C反应蛋白的抗原线未呈现信号(图2的A部分及图2的B部分)。为了在抗原线中,维持C反应蛋白抗原和金纳米粒子-检测抗体结合物的结合亲和力,试图预先使捕获抗体结合之后,在其中附着抗原而使用的新的固定方法。首先,在硝酸纤维素膜的抗原线装载捕获抗体之后,在其中添加C反应蛋白,来使C反应蛋白附着于捕获抗体,从而制备了条状传感器,像这样制备的条状传感器未产生与C反应蛋白结合亲和力相关的问题。因此,

推定为根据与金纳米粒子-检测抗体结合物的物理空间和C反应蛋白的方向,亲和度减少,并判断为在干燥工序中,对蛋白质的分解未产生影响。并且,在C反应蛋白线与聚乙二醇化-C反应蛋白线之间,观察到了类似的信号强度。这种现象在作为预先结合的抗体使用除捕获抗体之外的其他抗体的情况下未呈现。本发明人使用两种不同的抗体来进行实验,具体如下:一种抗体与浓度的变化无关地呈现均匀的信号强度,另一种抗体中,信号强度减少,直到规定的浓度为止,或者,在大于规定浓度的浓度下,维持规定的信号(图3)。作为在抗原线及测试线中所使用的抗体使用了多克隆抗体,为了各线的制备的便利性且容易在抗原线固定抗原,测试线及抗原线中的多克隆抗体使用了相同公司的产品。并且,为了增加在抗原线中竞争反应的效率,金纳米粒子-检测抗体结合物中的检测抗体使用了单克隆抗体。在图3中,在检测抗体(Detection antibody)曲线图的情况下,是使用单克隆抗体作为检测抗体的情况,测试抗体1(Test antibody 1)(测试1(Test 1))及测试抗体2(Test antibody 2)(测试2(Test 2))的情况是使用多克隆抗体作为检测抗体的情况。可确认如下:在使用多克隆抗体作为检测抗体的情况下,与使用单克隆抗体的情况不同,不根据所要测定的C反应蛋白的浓度呈现信号减少,而维持规定的信号。

[0091] 3.广泛浓度范围的C反应蛋白水平的测定及数据处理

[0092] 为了测定广泛浓度范围的C反应蛋白,通过使用在测试线中在 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度以上条件下信号强度减少的钩状效应和在抗原线中随着抗原的浓度增加而减少的信号,来进行抗原浓度确定过程。理论上,在一步夹心免疫分析中,信号强度曲线的形状依赖于检测抗体及捕获抗体浓度(18)。另一方面,在本发明的系统中,对数单位的校正曲线以非常接近的方式与二次方程式相匹配。因此,以这种理由,为了以二次方程式的形态取得校正曲线,未进行了抗体浓度或抗体筛选测试的最优化过程。测定结束之后,从校正曲线使用二次方程式来可取得两个不同的浓度结果,接着比较抗原线与控制线之间的信号强度来确定了实际值。即,若抗原线信号值大于控制线的值,则选择更低的值,相反的情况下,选择了高的值。

[0093] 更详细地,说明数据处理过程如下。针对各条,利用Chemi_Doc MP设备求出各个各个线的信号强度,来将信号强度和试样的浓度分别转换为对数,从而利用Excel取得了二次方程式校正曲线。通过Excel程序取得的校正曲线以 $y=ax^2+bx+c$ 的形态表示,在测定的校正曲线中可分别取得a、b、c代码值。测定未知的试样,从而以与上述相同的方法测定对数形态的信号强度,导入于在上述中取得的校正曲线的y值中,并利用a、b、c值来可求出两个互不相同的x值。在像这样取得的两个x值中,对抗原线和控制线的相关关系进行分析来选择一种值,实际值以10的平方根的方式取得。在图4中表示了数据处理的整个过程。

[0094] 图5的C部分表示通过数据处理过程测定多种浓度的C反应蛋白的结果。上述的实验结果示出本发明的传感器还能够测定 $10^5\sim 10^6$ 之间的C反应蛋白浓度水平。并且,取得了 $0.649\text{ng}/\text{mL}$ 的检测局限(LOD,间隔信号(blank signal)+3标准偏差(standard deviations))。上述值作为最高的浓度,意味着可开发能够测定 $1.07\text{mg}/\text{mL}$ 的C反应蛋白浓度的传感器。

[0095] 4.临床样品的测定

[0096] 为了确认实际应用和商业化可能性,对50个临床样品进行了评价。有关临床样品,为了避免基质干扰,利用不包含C反应蛋白的血清稀释10倍之后,使用开发的条状传感器进行了测定。试验结果表明,取得了在 $0.4\sim 84.7\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内进行测试的样品之间的线性

相关关系(图6)。在实际样品测定中,对整个范围的C反应蛋白浓度(1ng/mL~500 μ g/mL)未进行评价,但确认了通过本发明的传感器可在人血清中在广泛浓度范围内可实现对C反应蛋白水平的定量测定,并确认了抗原线及本发明的分析方法还可适用于实际样品测定中。

[0097] 5. 肌红蛋白抗原的测定

[0098] 在本发明中主张的测定广泛浓度范围的方法中,为了证明可适用于除了测定的上述C反应蛋白之外的通用性的所有抗原,针对心肌梗塞生物标记中之一的肌红蛋白,直接导入在上述C反应蛋白中使用的测定方法来进行了分析。如图7所示,在肌红蛋白中,测定线、抗原线及控制线也呈现与在C反应蛋白中测定的结果相同的倾向性,并利用上述结果以与在C反应蛋白中进行的方法相同的方法进行分析,最终,如图8所示,在从1ng/mL至500 μ g/mL之间的浓度范围下,可导出具有完善的线性的结果。通过图7的A部分及图7的B部分及图8的肌红蛋白测定结果,确认了在本发明中主张的测定方法可适用于多种抗原。

[0099] 结论

[0100] 在本发明中,开发了能够测定广泛浓度范围的C反应蛋白的、具有由一个条构成的多种线的侧方流动免疫传感器。对来自以区别的方式进行操作三个免疫学活性线的信号进行处理并组合,从而在检测高浓度的抗原的情况下,可避免在通常的传感器中共同地被发现的钩状效应。本发明的侧方流动分析法传感器可在10分钟内结束对1ng/mL~500 μ g/mL的范围的C反应蛋白浓度的分析。可进行检测的浓度范围为0.67ng/mL~1.02mg/mL,这种范围为使用侧方流动分析法条状传感器来可进行测定的最宽的测定范围(约106倍)。在制造及工序中,传感器的结构由较便宜且轻的膜和垫构成,从而多重线侧方流动分析法系统尤其有利于作为即时检验设备的开发。并且,本发明的传感器可容易进行操作,并具有广泛的动态区域,从而不仅能够以简便且灵敏度高的方式检测C反应蛋白,而且可准确地诊断炎症的程度和患者的疾病的种类。并且,除了C反应蛋白之外,还在肌红蛋白测定中可取得与C反应蛋白几乎相同的水平的测定结果,并通过这种结果可确认如下:在本发明中可适用的抗原不局限于C反应蛋白,而是可广泛地适用于可进行夹心免疫反应且具有两种抗体对的抗原。

[0101] 以上,对本发明的特定部分进行了详细记述,对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,这种具体记述仅仅是优选的实例,本发明的范围并不限于此,这是显而易见的。因此,本发明的实质性的范围根据所附的发明要求保护范围和其等同技术方案来定义。

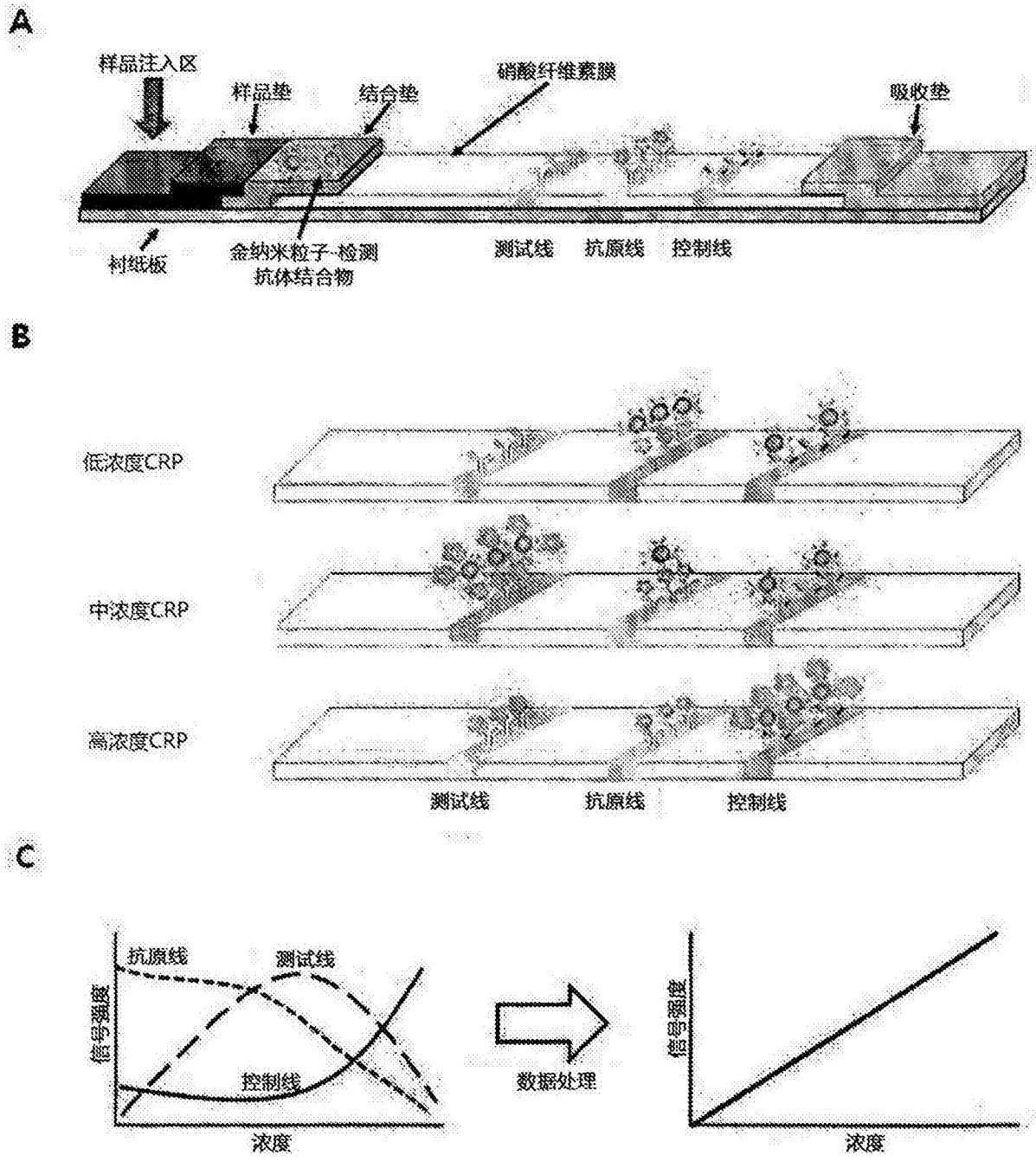


图1

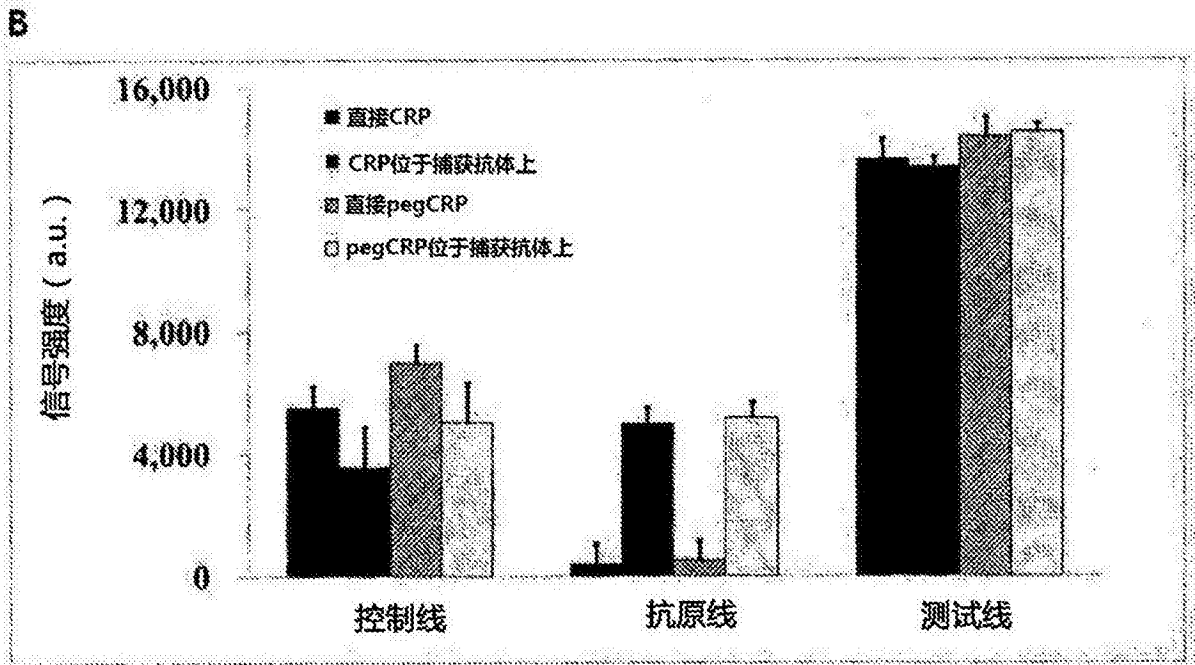
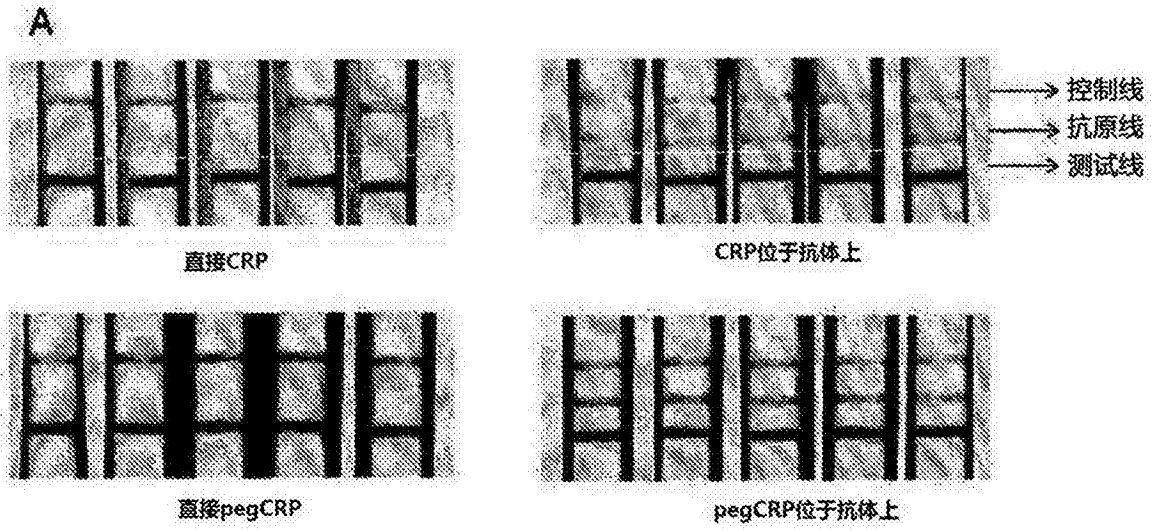


图2

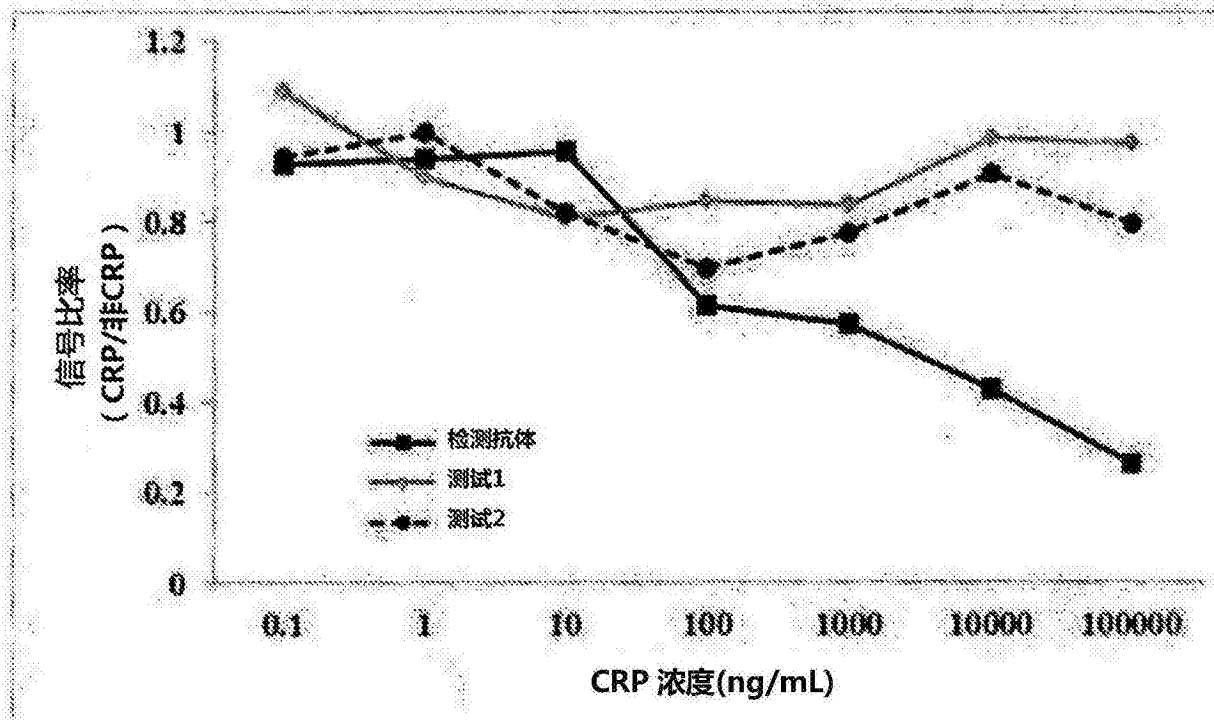
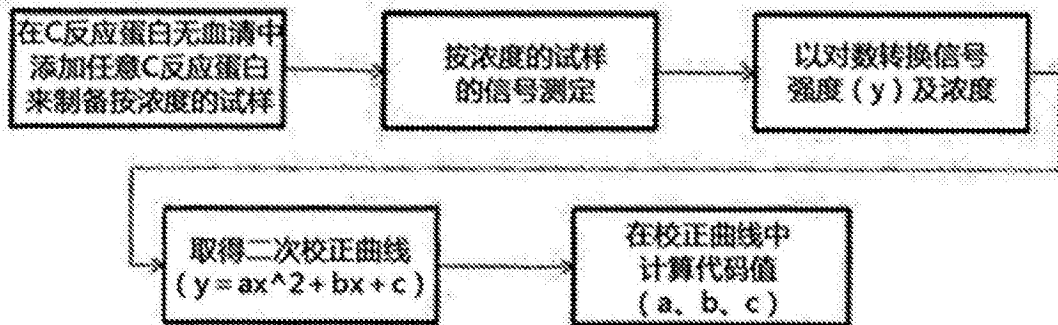


图3

◆ 校正曲线 (Calibration curve) 及代码值计算过程



◆ 临床试样的测定过程

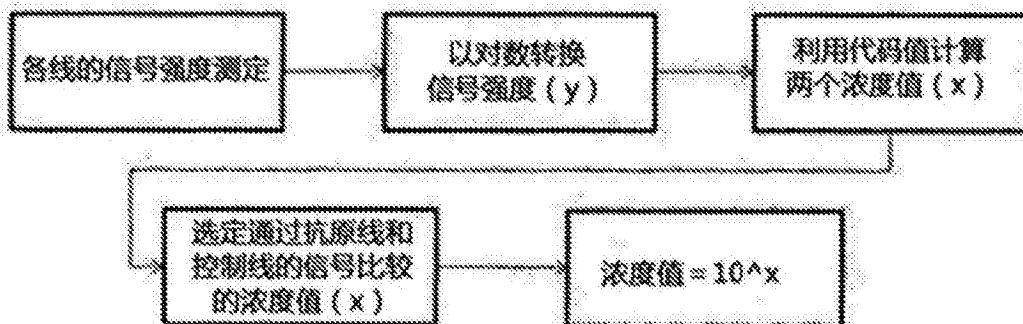


图4

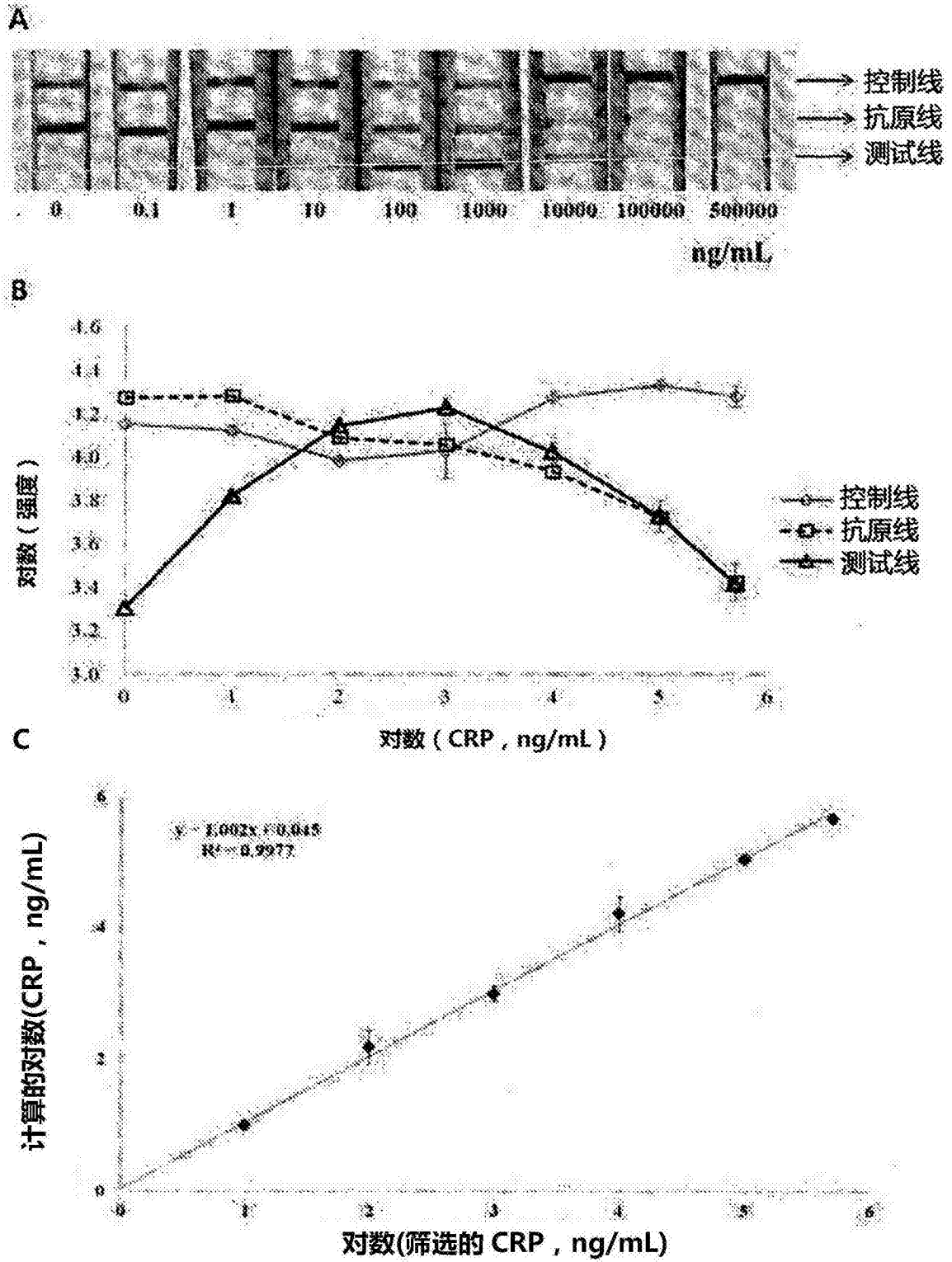


图5

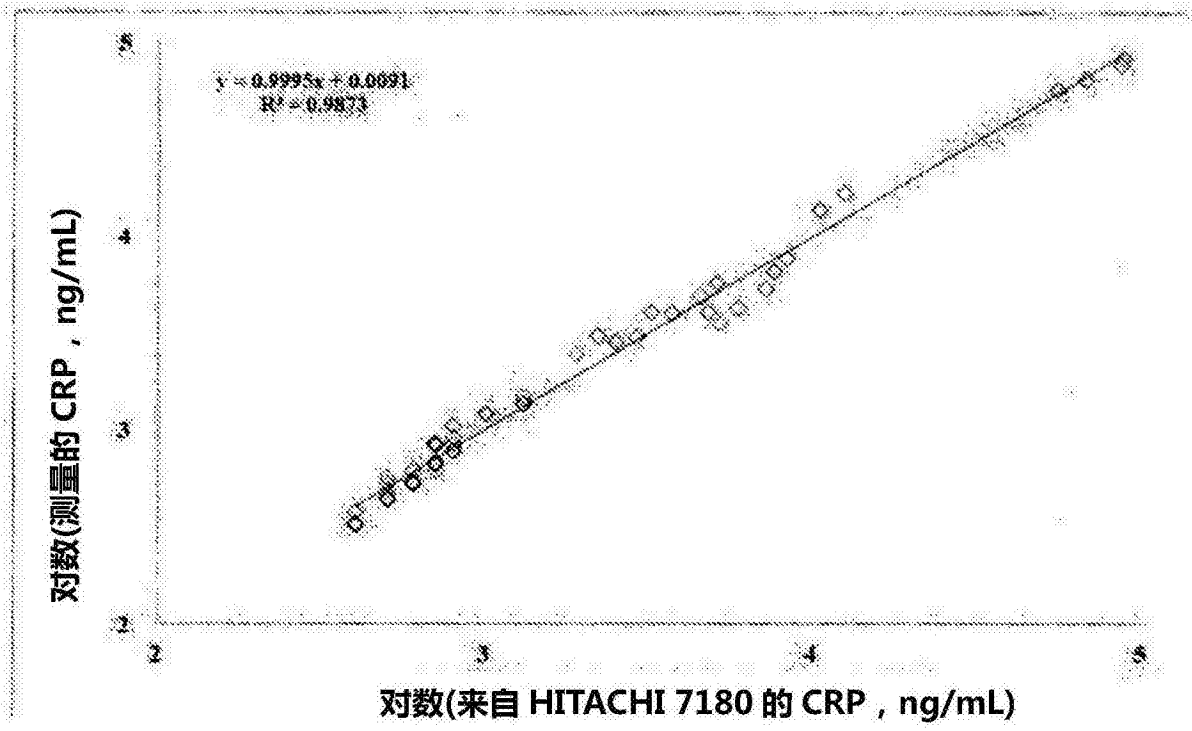


图6

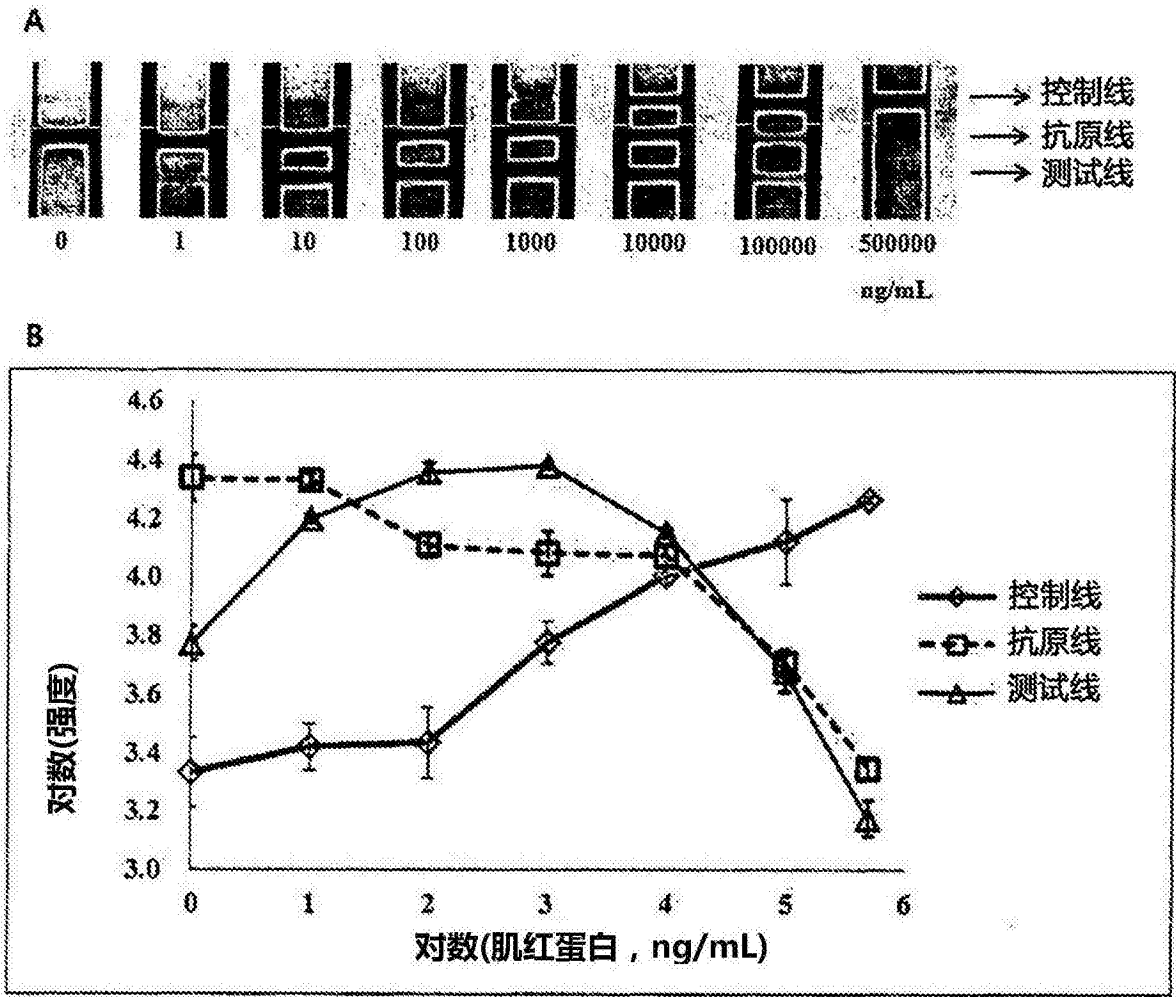


图7

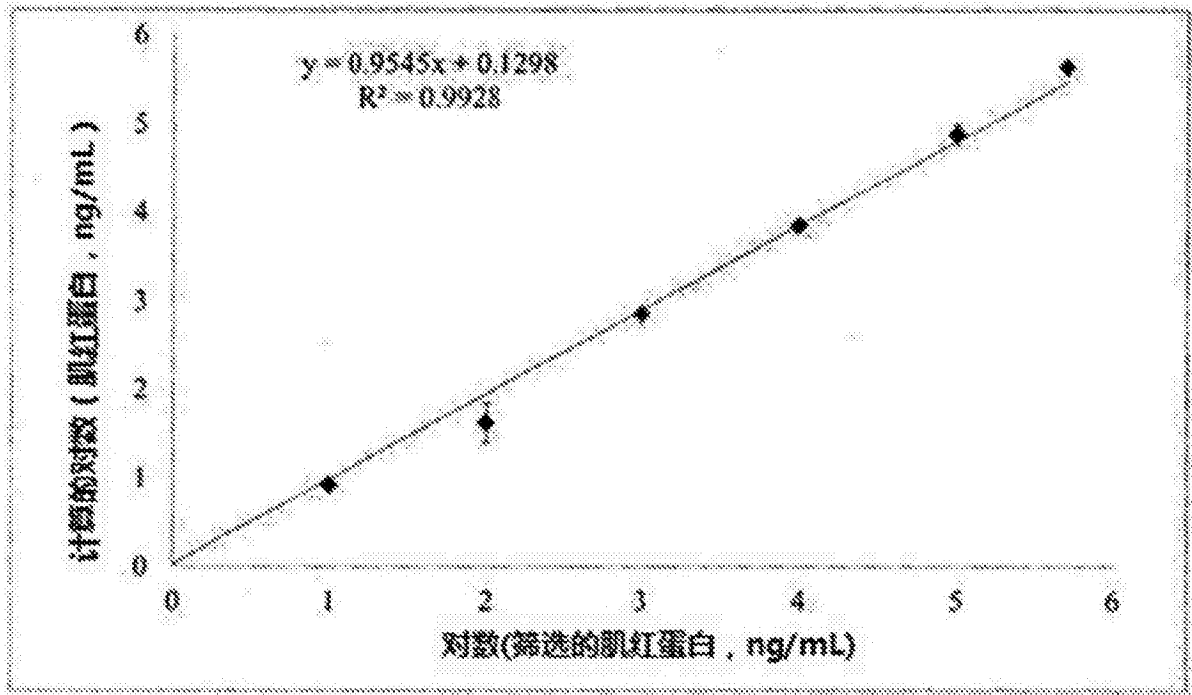


图8

专利名称(译)	能够测定广泛浓度范围的生物物质浓度的免疫层析条状传感器		
公开(公告)号	CN105723220A	公开(公告)日	2016-06-29
申请号	CN201480061733.4	申请日	2014-11-11
[标]申请(专利权)人(译)	光州科学技术院 株式会社认知生物		
申请(专利权)人(译)	光州科学技术院 株式会社认知生物		
当前申请(专利权)人(译)	光州科学技术院 株式会社认知生物		
[标]发明人	金珉坤 郑晓庵 吴迎庆		
发明人	金珉坤 郑晓庵 吴迎庆		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/563		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/54346 G01N33/553 G01N33/577 G01N2333/4737 G01N2333/805		
优先权	1020130136906 2013-11-12 KR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及能够测定广泛浓度范围的生物物质浓度的免疫层析条状传感器及使用该免疫层析条状传感器测定广泛浓度范围的生物物质的浓度的方法。本发明的利用免疫层析条状传感器的检测方法在广泛浓度范围下可准确地测定抗原的浓度，且可实现低费用、迅速性及简便性，因而适合需要迅速性及高灵敏度的即时检验(point of care test, POCT)。

