

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/557 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680015934.6

[43] 公开日 2008年4月30日

[11] 公开号 CN 101171515A

[22] 申请日 2006.5.5

[21] 申请号 200680015934.6

[30] 优先权

[32] 2005.5.9 [33] GB [31] 0509419.8

[86] 国际申请 PCT/EP2006/004244 2006.5.5

[87] 国际公布 WO2006/119933 英 2006.11.16

[85] 进入国家阶段日期 2007.11.9

[71] 申请人 欧雷恩诊断公司

地址 芬兰埃斯波

[72] 发明人 考科·卡赫马

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

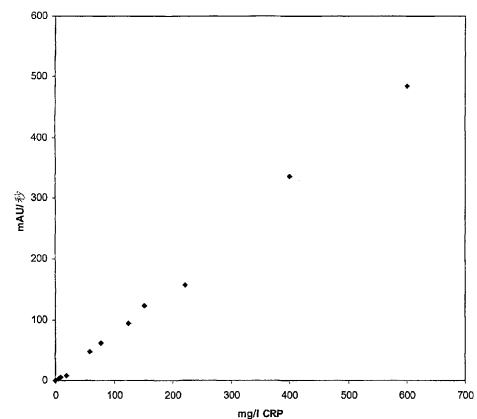
权利要求书4页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

结合物与被分析物的结合速率的测量

[57] 摘要

测量结合物与被分析物的结合速率的方法，例如在诸如免疫测定等测定中进行测量，该方法采用实施足以破坏该结合物与该被分析物之间结合的超声处理的初步步骤。在该超声处理停止后，进行测量以确定在所述超声处理停止时的结合速率或其后一段预定时间时的结合速率。该超声处理使得知道结合反应开始的准确时间，这提供了更好的速率测量。



1. 测量结合物与被分析物的结合速率的方法，所述方法包括：
将所述结合物和所述被分析物置于培养基中；
对所述培养基实施足以破坏所述结合物与所述被分析物之间结合的声处理；以及
停止对所述培养基的所述声处理，并在所述声处理停止时或所述声处理停止后在预定时间时测定所述结合速率。

2. 根据权利要求1所述的方法，其中测定所述结合速率的所述步骤包括：
在所述声处理停止后，在多个时间进行测量；以及
通过从所述测量值进行外推，推导出在所述预定时间的所述结合速率。

3. 根据权利要求2所述的方法，其中通过外推法推导出在所述预定时间的所述结合速率的所述步骤包括：
将曲线与所述测量值进行拟合；以及
从所述拟合曲线中计算在所述预定时间的所述结合速率。

4. 根据权利要求2所述的方法，其中通过外推法推导出在所述预定时间时的所述结合速率的所述步骤包括：
将第一曲线与所述测量值进行拟合；
由所述第一拟合曲线计算在所述预定时间的所述结合速率的初步估计值；
由在所述预定时间的所述结合速率的所述初步估计值确定曲线拟合算法；
应用所述确定的曲线拟合算法，将第二曲线与所述测量值进行拟合；以及
由所述拟合的第二曲线计算在所述预定时间的所述结合速率。

5. 根据权利要求 2-4 中任一权利要求所述的方法，其中所述多个时间是在从所述声处理停止后的 30 秒内。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中确定所述结合速率的所述步骤包括：

在所述声处理停止时或所述声处理停止后进行第一测量，并在所述第一测量后在预定时间间隔进行第二测量；以及

将所述第一测量值与所述第二测量值之间的差值视为所述测定的结合速率。

7. 根据权利要求 2-6 中任一权利要求所述的方法，其中所述测量值是数量的测量值，其代表所述结合物、所述被分析物或所述结合物与所述被分析物的结合复合物中至少之一的量。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述测量是通过光学进行的。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述测量值是由所述培养基吸收光的测量值、由所述培养基散射的光的测量值或来自所述培养基的荧光的测量值。

10. 根据权利要求 7 至 9 中任一权利要求所述的方法，其还包括通过从所述测量值进行外推，确定在所述声处理停止时所述数量的值。

11. 根据权利要求 7 至 9 中任一权利要求所述的方法，其中：

所述将所述结合物与所述被分析物置于培养基的步骤包括将含有所述被分析物的样品加入到含有所述结合物的培养基中；

所述方法还包括，在将含有所述被分析物的所述样品加入到所述结合物之前，实施所述声处理并进行初步所述测量。

12. 根据权利要求 1 至 6 中任一权利要求所述的方法，其中测定所述结合速率的所述步骤是通过测量光度进行。

13. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的方法，其中所述结合是免疫结合。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述结合物是抗体、抗原或半抗原。

15. 根据权利要求 1-12 中任一权利要求所述的方法，其中所述结合物和所述被分析物之一是受体，且所述结合物和所述被分析物的另一是配体。

16. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的方法，其中所述结合是非共价的。

17. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的方法，其中所述结合物被包被在不溶性载体颗粒上。

18. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的方法，其中以至少 1kHz 的频率实施所述声处理。

19. 根据权利要求 1-17 中任一权利要求所述的方法，其中以至少 20kHz 的频率实施所述声处理。

20. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的方法，其中以至少 1000kHz 的频率实施所述声处理。

21. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的方法，其还包括，在对所述培养基进行的足以破坏所述结合物与所述被分析物之间结合

的所述声处理停止后，实施能够增强所述结合物与所述被分析物之间结合的声处理。

22. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的方法，其中所述预定时间是所述声处理停止时。

23. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的方法，其还包括从所述确定的结合速率中确定所述被分析物的量、浓度或存在。

24. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的方法，其还包括重复进行对所述培养基实施声处理的所述步骤，并确定在预定时间的所述结合速率；以及
对所述重复测定的结合速率取平均值。

结合物与被分析物的结合速率的测量

本发明涉及例如在诸如免疫测定等测定中，测量结合物与被分析物的结合速率的方法。测量的结合速率可用于例如推导出该被分析物的浓度、数量或存在。

现有的涉及测量结合速率的免疫测定方法均有不能知道反应实际开始时的准确时间的问题，这是因为在混合中存在实际困难。这限制了起始结合速率的准确测定。因此通常需要反应的恒定起始速率。例如，在第 4,205,954、5,371,021 和 5,583,055 号美国专利中已描述了利用恒定起始速率的方法。在另一类型的方法中，测量峰结合速率，例如在第 4,157,871、4,204,837、4,268,171、4,766,083 和 4,835,110 号美国专利中所述。

这些方法的缺点在于需要相对长的时间来从反应中搜集足够的信息以便能够确定样品的浓度。另一缺点在于需要在加入样品后即刻开始实际测量。

根据本发明，提供了一种方法，其包括通过在培养基中对结合物和被分析物实施声处理以便破坏该结合物与该被分析物之间的结合，停止该声处理并测量停止所述声处理时或其后的一段预定时间时的结合速率，来测量该结合物与该被分析物的结合速率。

所述方法可用于例如在测定或免疫测定中从确定的结合速率推导出所述被分析物的浓度、数量或存在。所述声处理，通常为短脉冲形式的超声处理，破坏结合并有效地将结合反应重新设定在公知的初始条件下。例如，在结合复合物凝集的情况下，该凝集可明显减少或消失。结合反应在声处理停止时开始。此发生的时间点是精确已知的，并且这使得可以以精确方式确定结合的起始速率。通常该确定的结合速率是声处理实际停止时的速率，但是在某些情况下其可能是其后的一段预定时间时的速率。

因此，该方法比常规方法更快捷且更可靠和更灵敏。其可以只使

用一种试剂。其还可以采用均相免疫测定原理，而无需分离结合的和未结合的配体。可将所述被分析物，例如血液样品或标准样品，在实施所述方法之前加入到培养基中，这是因为所述声处理将破坏实际测量前发生的结合或凝集。本发明的另一优点在于贮存期间所述试剂的可能的非特异性聚集可以通过在所述测定中使用的相同的声处理步骤被有效地破坏。

根据本发明，无需反应速率是线性的，因为准确知道反应起始时间，因此无需使用现有技术中所述的更烦冗的方法。

有利地，可通过在所述声处理停止后在多个时间点进行测量并通过外推法从该测量值中推导出在所述预定时间时的结合速率来确定结合速率。

可例如通过将曲线与所述测量值进行拟合并从该拟合的曲线计算在所述预定时间时的结合速率来实施外推法。或者，可以实施更复杂形式的外推法。在一实例中，从所述数据的第一拟合曲线计算在所述预定时间时的结合速率的初步估计值并用于确定曲线拟合算法。然后，采用该确定的曲线拟合算法将第二曲线与该测量值进行拟合，并从该拟合曲线中确定在所述预定时间时的结合速率。

但是可以其它方式计算所述结合速率。例如，其它的方法是应用如下技术：测量在两个时间点时的特性并将差值视为代表结合速率。在该情况下，虽然该差值不是以正确的单位表示，但是其代表速率，这是因为所述测量值之间的时间间隔是固定的。例如，如果所述测量值代表所述结合物、被分析物或该结合物的结合复合物中至少之一的量，则该差值与所述速率成比例，实际速率等于该差值除以该测量值之间的时间间隔。本申请中使用术语“结合的速率”和“结合速率”以涵盖这种技术，其中计算代表速率的值，即使其不以正确单位表示。但是这种可供选择技术不是优选的，因为其得到的是代表在时间间隔之间的平均速率值，而不是代表在声处理实际停止时的速率值。

例如采用但不限于只采用比浊法、浊度法或荧光测定法，所述测量值是代表所述结合物、被分析物或所述结合物与被分析物的结合复合物中至少之一的量的测量值，通常是光学测量值。通常，可以通过

测量光度测定结合的速率，例如在公知的结合速率光度免疫测定方法中测定，或以任何其它方式测定。

一种任选的技术是在向含有所述结合物的培养基中加入含有所述被分析物的样品之前，实施与随后进行的破坏所述结合的声处理相同性质并获取初步测量值的声处理。然后，从所述声处理停止后得到的每一测量值中扣除该初步测量值，或可以从预定时间时的测量值的外推值中推断出该初步测量值。因此得到被测量性质的净值。这开启了在样品不存在时通过扣除从结合物中获得的初步测量值，来测量该样品的恒定性质的可能性。这允许测量例如所述样品的吸光度或另一光学特性，而不干扰正在进行的影响所述性质的反应。关于所述性质的值的信息可例如用于测量血液样品的血红蛋白含量和血细胞比容。

另一可选择的方法是将所述测量值外推回至所述声处理停止的时间。在许多实际情况下，该可选择的技术是测量所述性质而不干扰正在进行的反应的唯一有效方法。在那些情况下，这仅通过首先测量缓冲液中所述样品的性质，然后加入另一引发反应的试剂就能够实现。避免了复杂的操作程序是本发明中声处理的另一优点。

所述方法尤其可适用于能够被声处理破坏的任何类型的结合。颗粒间的特异性和可能的非特异性结合可以被破坏。通常，所述结合是可逆的、非共价结合的。通常，所述结合物和所述被分析物之一或两者均是蛋白。所述方法能够适用于两个或多个实体间的结合。

所述方法对免疫结合具有特别的应用。在该情况下，所述结合物可以是抗体、抗原(蛋白或非蛋白)或半抗原。本文所述的术语“抗体”包括与被分析物结合的片段。这样的片段包括 Fv、F(ab')和 F(ab')₂ 片段。此外，所述抗体或片段可以是嵌合抗体、CDR 抗体或人源化抗体。

另一可选择的是对受体和配体之间的结合应用本方法。

可将所述结合物和所述被分析物以任何合适的形式置于培养基中。一种可能是将结合物和被分析物均简单地悬浮在培养基中，例如，将该结合物包被在不溶的载体颗粒上。但是可同样应用其它更复杂的技术。可应用本方法分析来自各种各样的样品的被分析物，该样品包括临床的和非临床的样品，例如卫生保健样品。能够使用来自不同体

液的样品, 该体液例如全血、血清、血浆、脊髓液、腹水液体、尿、唾液、精液, 和用于卫生监控的样品, 如食品、乳、来自表面的无菌控制 swipes 或水。

通常, 所述被分析物由所述样品决定, 而不进行任何另外的处理, 但是, 如果需要, 可将该样品在实施所述测定前进行预处理, 例如, 离心、溶血或富集。

声处理是将声波(可听音或超声)应用于所述培养基。用于实施声处理的多种类型的仪器是公知的, 并且可使用任何类型的声处理仪器, 因为所述方法不依赖于仪器自身的性质。一非限制性的实例是应用同时提交的名称为“培养基的声处理”国际专利申请(要求第 0509418.0 号英国专利申请的优先权)中描述的声处理仪器, 通过参考的方式将其引入本文中。

可从广泛的频率中选择所述声处理的频率。离解能随着频率增加而增加, 以便能够广泛地选择用于任何实际应用的破坏力。对于任何特定的结合, 可如下进行频率和功率的选择: 通过简单试验不同频率和功率以选择可提供所述结合的必要破坏频率和功率。所述频率通常为至少 1kHz, 但更通常地, 所述频率是至少 20kHz, 在此情况下, 声处理可称为超声处理。通常所述频率最多为 1000kHz。可应用所述声处理一段足够长的时间以破坏所述结合, 这通常为秒级。

在免疫测定中存在一些应用超声的公知技术, 但不同于本发明。超声的一些公知应用如下所述。

已知通过采用超声驻波场, 可将超声用于增强包被的颗粒凝集免疫测定。从 20 世纪 80 年代中期至 20 世纪 90 年代末期发表了大量的报道, 其中超声用于增强凝集测定的速率和灵敏度。这样的文献仅公开了超声增强的凝集, 而在这组文献中没有出版物报道使用超声破坏特异性配体抗配体(anti-ligand)键。公开这类凝集的超声增强作用的文献实例是 GB-A-2,233,089、美国专利第 4,575,485、5,227,312、5,665,605、5,853,994、5,912,182 号和 Ellis et al. “Diagnostic particle agglutination using ultrasound: a new technology to rejuvenate old microbiological methods(应用超声的诊断颗粒凝集: 使陈旧的微生物学

方法更新的新技术)” J. Med. Microbiol. 49 853 (2000)。在本发明中，所述声处理破坏所述结合，这是与增强或推动所述结合反应相反的作用。但是，如果需要这种增强时，则超声的这种增强所述反应的应用可通过在破坏所述结合的声处理停止后实施增强超声处理(通常为合适频率的足够低能量的超声)应用于本方法中。

如下出版物描述了应用超声以破坏配体抗配体键。在美国专利第 4,615,984 号和 Haga 等人“Effect of Ultrasonic Irradiation on the Dissociation of Antigen-Antibody Complexes. Application to Homogenous Enzyme Immunoassay(超声辐射对抗原-抗体复合物的解离的作用。在均相酶免疫测定中的应用)” Chem. Pharm. Bull. 35 3822 (1987)中，超声用于解离配体-结合物(binder)复合物，允许再度使用该结合物。在分离测定中再度使用该结合物。在第 6,086,821 号美国专利中，超声力用于解离抗体-抗体复合物以便测量抗原和抗体之间的结合亲和力，但是该发明未描述或要求保护反应速率的测量，且也未用于被分析物的浓度测量。在美国专利第 6,368,553 号中，描述了测定装置，该测定装置使用超声力解离抗原-抗体复合物以便在标记试剂存在下检测被分析物，但是未描述或要求保护反应速率的测量。

所述方法可以非常快速地定量测量，因为能够在测量速率曲线的仅仅数秒(通常 0.5-30 秒)后计算初始反应速率。该测量优选取 1-15 秒，或更优选 1-10 秒。当然，原则上所述反应可进行很长时间，该时间是为了得到所需精确度而获取足够数据所需要的时间，所述时间甚至是数十分钟。

此外，所述测量可重复进行，如果需要，通过重复进行所述声处理并再测量起始速率来改进精确度。

参考附图，描述了本方法的非限制性实例，在附图中：

图 1 为实施例的校准曲线图。

以 CPR 抗体作为所述结合物，且以 CPR 作为所述被分析物，实施所述方法。

用 CPR 抗体包被的乳胶颗粒得自 Orion Diagnostica Oy, Finland 制造的 QuikRead CRP 试剂盒(目录编号 67961)。以 EP-A-0,946,871 中所

述的方式进行乳胶颗粒的包被。用 0.15 mol/l 的 pH 8.4 的三(羟甲基)氨基甲烷-HCl 缓冲液将乳胶颗粒的浓度调至 2 g/l, 该缓冲液含有 0.171 mol/l NaCl 和 0.1 %牛血清白蛋白。

制备一系列的 CPR 标准溶液, 其浓度为 0、5、9、19、59、78、125、151、221、400 和 600 mg/l。对于每一标准溶液, 实施下列操作步骤。

将 1ml 乳胶悬浮液的缓冲液移液至比色杯中, 并加入 12 μ l 标准液。

用同时提交的名称为“培养基的声处理”的国际专利申请(要求英国专利申请第 0509418.0 号的优先权)中描述的方法和仪器实施超声处理, 通过参考方式将其引入本文中。这提供了简单构建和快速操作。此外, 在超声处理过程中, 可将该比色杯完全关闭, 以避免在超声处理过程中来自该比色杯的可能的传染性物质或其它方面有害的物质的散布。

然后, 将所述比色杯放置在放在光度计内的叉状超声处理头之间。该超声处理头从两个侧面直接接触该比色杯, 但是不阻断该光度计的光路。将该光度计设定在 653nm 下每秒三次记录吸光度并开始测量。

然后, 用 37kHz 的声处理频率将该比色杯超声处理 6 秒, 并在超声处理后使凝集反应进行 1 分钟。当超声处理停止时, 立即开始该凝集反应。将超声处理结束时的瞬间限定为零时。

其次, 以吸光度为 y 轴并以时间为 x 轴, 将每一实验的吸光度读数进行绘图。通过从所述声处理结束后 2/3 秒开始并在该声处理结束后 3 秒钟时结束的实验点, 将二次多项式形式的 $y = ax^2 + bx + c$ 进行拟合。将在零时计算的该二次多项式的一阶导数($y = 2ax + b$)的值为所述凝集反应的起始反应速率。将所得到的以每秒吸光度单位形式表达的每一标准液的起始反应速率绘制为图 1 中所示的校准曲线。该校准曲线从 5 mg/l 开始一直到 600 mg/l 均是线性的。

通常, 任何数学函数均可能被拟合成功率曲线。可通过计算数学函数在合适时间时的一阶导数值来计算当所述超声处理停止时或其后一段预定时间时的起始反应速率。

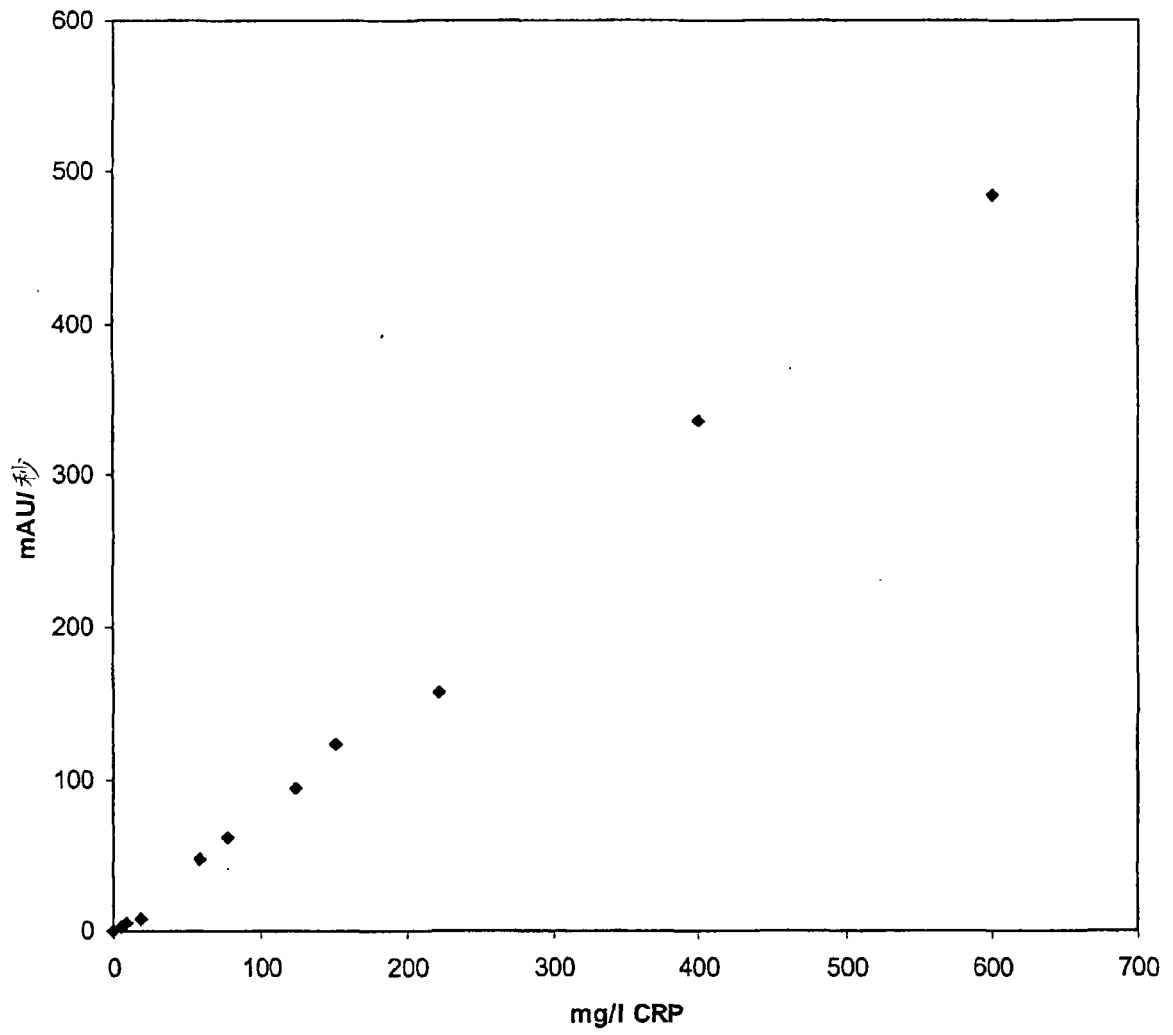


图 1

专利名称(译)	结合物与被分析物的结合速率的测量		
公开(公告)号	CN101171515A	公开(公告)日	2008-04-30
申请号	CN200680015934.6	申请日	2006-05-05
[标]发明人	考科卡赫马		
发明人	考科·卡赫马		
IPC分类号	G01N33/557 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/557 Y10S435/961		
代理人(译)	韩克飞		
优先权	2005009419 2005-05-09 GB		
其他公开文献	CN101171515B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

测量结合物与被分析物的结合速率的方法，例如在诸如免疫测定等测定中进行测量，该方法采用实施足以破坏该结合物与该被分析物之间结合的超声处理的初步步骤。在该超声处理停止后，进行测量以确定在所述超声处理停止时的结合速率或其后一段预定时间时的结合速率。该超声处理使得知道结合反应开始的准确时间，这提供了更好的速率测量。

