



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00812467.1

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1153970C

[22] 申请日 2000.7.28 [21] 申请号 00812467.1
 [30] 优先权
 [32] 1999. 7. 30 [33] US [31] 09/365,065
 [86] 国际申请 PCT/US2000/020769 2000. 7. 28
 [87] 国际公布 WO2001/009608 英 2001. 2. 8
 [85] 进入国家阶段日期 2002. 3. 4
 [71] 专利权人 生物功效学股份有限公司
 地址 美国明尼苏达州
 [72] 发明人 D·P·柯林斯
 审查员 边 昕

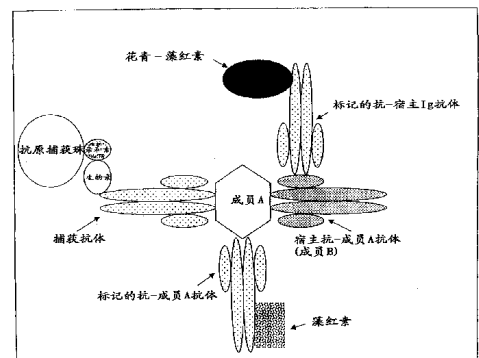
[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
 代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 2 页

[54] 发明名称 同时检测结合对的两个成员的方法

[57] 摘要

同时免疫学测定生物样品中一结合对的两个成员 A 和 B(如抗体和抗原)，通过：1) 使样品与结合于颗粒的抗 - A 抗体一起培育，产生颗粒 - 抗体 - A 复合物；2) 培育该复合物与标记的抗 - A 和抗 - B 抗体；和 3) 用流式细胞计数法检测这些标记。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1.一种同时测定生物样品中结合对复合物内两个成员 A 和 B 的方法，其特征在于，该方法包括：

5 a)提供一种固相试剂，所述固相试剂含有用对所述结合对的所述成员 A 具有特异性结合亲和力的捕获抗体包被的颗粒；

b)在所述成员 A 如存在，与所述颗粒结合的条件下，使所述生物样品与所述固相试剂接触，形成第一反应颗粒；

10 c)使所述第一反应颗粒与对所述成员 A 具有特异性结合亲和力的一抗接触，并和对所述结合对的所述成员 B 具有特异性结合亲和力的二抗接触，形成第二反应颗粒，其中所述一抗用第一标记标记，所述二抗用第二标记标记，和

d)用流式细胞计数法测定所述第二反应颗粒上的所述第一和第二标记。

2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，基本上全部所述捕获抗体排列在所述颗粒上，从而所述捕获抗体的抗原结合区域能与所述结合对的所述成员 A 结
15 合。

3.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述成员 A 是抗原，所述成员 B 是宿主抗体。

4.如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述抗原是病毒抗原。

5.如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述病毒抗原是丙肝抗原。

20 6.如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述病毒抗原是乙肝抗原。

7.如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述病毒抗原是人免疫缺陷病毒抗原。

8.如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述抗原是自身抗原。

9.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述自身抗原是谷氨酸脱羧酶。

25 10.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述成员 A 是配体，所述成员 B 是受体。

11.如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述配体是细胞因子，所述受体是细胞因子的受体。

12.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述成员 A 是酶，所述成员 B 是

是底物。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述酶是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3，所述底物是聚(ADP-核糖)聚合酶。

14. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述酶是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1，所述底物是白细胞介素原-1。

15. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述第一和第二标记是荧光团。

16. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述生物样品选自血液、血浆、血清、尿、脑脊液、痰、泪液、羊水、玻璃体液、唾液和组织培养上清液。

17. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述捕获抗体是单克隆抗体。

18. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述一抗是单克隆抗体。

19. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述二抗是单克隆抗体。

20. 一种用于同时测定生物样品中结合对的两个成员 A 和 B 的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括：

a) 一种固相试剂，所述固相试剂含有对所述结合对的所述成员 A 具有特异性结合亲和力的捕获抗体包被的颗粒，其中基本上全部所述捕获抗体排列在所述颗粒上，从而所述捕获抗体的抗原结合区域能与所述结合对的所述成员 A 结合；

b) 对所述结合对的所述成员 A 具有特异性结合亲和力的一抗，其中所述一抗用第一标记标记；和

c) 对所述结合对的所述成员 B 具有特异性结合亲和力的二抗，其中所述二抗用第二标记标记。

21. 如权利要求 20 所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还包括标签或包装插页，其中所述标签或包装插页表明所述固相试剂、所述一抗和所述二抗可用于流式细胞计数同时测定生物样品中一结合对的两个成员 A 和 B。

同时检测结合对的两个成员的方法

5 技术领域

本发明涉及同时检测生物样品中结合对的两个成员的方法。

发明背景

用于输血和输注血液成分的血制品必须常规筛检有无感染因子如人免疫缺陷病毒(HIV)、肝炎病毒、人 T-淋巴细胞嗜性病毒和巨细胞病毒的存在。通常用酶免疫试验分析(EIA)或放射免疫试验(RIA)通过鉴定病毒抗原或通过检测针对病毒的免疫应答(即宿主产生的抗病毒抗体)来检测这些因子。免疫试验技术检测感染早期的病毒污染能力有限,对于 HIV,病毒感染和免疫试验技术检测之间的窗口期大约是 2-4 周,对于丙肝病毒(HCV)达 10 周左右。逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)或支链 DNA 分析等技术能缩短感染和检测之间的时间段,但用于单个献血者其花费使人望而却步,而且不能消除窗口期。

Kortright 等于 1987 年 6 月 15 日提交的美国专利号 4,870,003 公开了一种检测 HIV 抗原和抗 HIV 抗体的系统,包括用固定化的抗 HIV 抗体捕获病毒抗原,并用生物素标记的人抗 HIV 抗体进行检测。在实验前,在病人的样品中加入已知浓度的病毒抗原。根据突出的抗原是增加还是降低光密度,间接测定 HIV 抗原/抗 HIV 抗体结合对的成员之一是否存在。Kortright 等的专利没有表明可用两种不同标记的抗体(一种对成员 A 具有特异性,另一种对于成员 B 具有特异性)同时测定结合对的两个成员。

发明简述

本发明的基础是一种同时检测生物样品中结合对的两个成员(如配体和受体或抗原和宿主抗体)的快速和灵敏的方法。例如,本发明的方法可提高检测早期感染的能力,从而及早治疗感染。

本发明的特征是一种同时检测生物样品中结合对的两个成员 A 和 B 的方法。生物样品选自血液、血浆、血清、尿、脑脊液、痰液、泪液、羊水、玻璃体液、唾液和组织培养上清液。该方法包括提供一种固相试剂,该试剂包括用捕获抗体

包被的颗粒，该捕获抗体对此结合对的成员 A 有特异性结合亲和力；在如果存在成员 A，生物样品可与颗粒结合的情况下使生物样品与该固相试剂接触，形成第一反应颗粒。捕获抗体可以是单克隆抗体。使第一反应颗粒与对成员 A 具有特异性结合亲和力的一抗接触（其中一抗用第一标记标记），并与对该结合对的成员 B 具有特异性结合亲和力的二抗（其中二抗用第二标记标记）接触，形成第二反应颗粒。一抗和二抗可以是单克隆。用流式细胞计数法测定第二反应颗粒上的第一和第二标记（如荧光团）。

在一些实施例中，基本上所有的捕获抗体都排列(orient)在颗粒上，这样捕获抗体的抗原结合区域可用于结合该结合对的成员 A。

结合对的成员 A 可以是一种抗原，而成员 B 可以是一种宿主抗体。该抗原可以是病毒抗原，如丙肝抗原、乙肝抗原或人免疫缺陷病毒抗原、或自身抗原如谷氨酸脱羧酶。结合对的成员 A 也可以是一种配体，如细胞因子，而成员 B 可以是受体，如细胞因子受体。另外，成员 A 可以是一种酶，而成员 B 可以是底物。例如酶可以是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)-3 或天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1，而底物可以分别是聚(ADP-核糖)聚合酶或白细胞介素原-1(proInterleukin-1)。

本发明的特征还包括同时检测生物样品中结合对的两个成员 A 和 B 的试剂盒。该试剂盒包括：一固相试剂，它包括用对此结合对成员 A 有特异性结合亲和力的捕获抗体包被的颗粒；和对此结合对成员 A 具有特异性结合亲和力的一抗，其中一抗用第一标记标记；和对该结合对成员 B 有特异性结合亲和力的二抗，其中二抗用第二标记标记。基本上所有的捕获抗体都排列在颗粒上，这样捕获抗体的抗原结合区域可用于结合该结合对的成员 A。该试剂盒还包括标签或包装插页，它说明固相试剂、标记的一抗和标记的二抗可用于流式细胞计数法同时测定生物样品中结合对的两个成员 A 和 B。

从下面的详述和权利要求将会明白本发明的其它特征和优点。

附图简述

图 1 是示意图，代表检测成员 A 和宿主抗成员 A 抗体(成员 B)的试验。

图 2A-2H 是分布图，表示用流式细胞计数法同时检测乙肝病毒(HBV)表面抗原、抗 HBV 宿主抗体、HCV 核心抗原和抗 HCV 宿主抗体。图 2A 是正常样品中的 HBV

抗原和抗体。图 2B 是正常样品中的 HCV 抗原和抗体。图 2C 是 HBV 阳性样品中的 HBV 抗原和抗体。图 2D 是 HBV 阳性样品中的 HCV 抗原和抗体。图 2E 是 HCV 阳性样品中的 HBV 抗原和抗体。图 2F 是 HCV 阳性样品中的 HCV 抗原和抗体。图 2G 是 HBV 阳性/HCV 阳性样品中的 HBV 抗原和抗体。图 2H 是 HBV 阳性/HCV 阳性样品中的 HCV 抗原和抗体。

发明详述

免疫试验方式

总的说，本发明使用了同时检测生物样品中结合对成员的夹心免疫试验法。结合对包括能形成复合物的分子的任何组合，包括由核酸、蛋白质或小分子和蛋白质组成的配对，核酸对可以是 DNA:RNA 对或 DNA:DNA 对。例如，单链(ss)DNA 和 mRNA 等 DNA/RNA 结合对，可以用作 PCR 产物检测系统。ssDNA 和病毒 DNA 等 DNA/DNA 对可用于竞争试验来定量测定病毒的每条扩增的 DNA。

蛋白质，或小分子和蛋白质结合对的非限制性例子包括激素、细胞因子、肽、药物、病毒蛋白质或其它抗原和同源受体或宿主抗体。病毒蛋白/受体结合对可以是例如 HIV gp120 和可溶性 CD4。药物和药物受体结合对可以是，例如可卡因和多巴胺受体。肽和肽受体结合对可以是，例如乙酰胆碱和蝇蕈碱受体或多巴胺和多巴胺受体。激素和激素受体结合对可以是，例如胰岛素和胰岛素受体。细胞因子和细胞因子结合对可以是，例如肿瘤坏死因子(TNF)和 TNF1 型或 2 型受体或白细胞介素 2(IL-2)和 IL-2 受体。抗原和抗体配对可以是，例如病毒蛋白质和宿主抗病毒蛋白质抗体或自身抗原和宿主抗自身抗原抗体。HIV p24/人抗 HIV 抗体、HIV gp120/人抗 HIVgp120 抗体、HBV 表面抗原/人抗 HBV 表面抗原抗体和 HCV 核心蛋白质/人抗-HCV 核心抗体是病毒蛋白质和宿主抗体结合对的例子。自身抗原和宿主抗自身抗原抗体结合对可以是，例如谷氨酸脱羧酶(GAD)和宿主抗-GAD 抗体。

可检测的其它蛋白质结合对是酶和酶底物结合对。例如，酶/底物配对可以是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3/聚(ADP-核糖)聚合酶或天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1/白细胞介素原-1。

成员 A 可以是结合对的任一成员，它能被对成员 A 具有特异性结合亲和力的捕获抗体包被的颗粒的固相试剂所捕获。例如，如果要同时检测的结合对是 HIV gp120/宿主抗 HIV gp120 抗体，可用对 HIV gp120 具有特异结合亲和力的抗体或

抗宿主免疫球蛋白(Ig)包被颗粒。

使生物样品与包被的捕获抗体颗粒接触，而捕获成员 A。本文所用的合适的生物样品含有细胞或细胞物质，包括例如血液、血浆、血清、尿、唾液、痰、泪液、玻璃体液和脑脊液。其它样品可包括体外组织培养液/上清液。可用非离子去污剂(如 0.5% Triton-X 100 或 Nonidet P40, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)处理生物样品，使病原体的核心抗原暴露。

可在促进成员 A(如存在)与颗粒结合的条件下使固相试剂和生物样品接触，形成第一反应颗粒。这些条件可包括：室温下，采用磷酸缓冲盐水(PBS)配的含有 1%胎牛血清(FBS)和 0.1%叠氮化钠的缓冲液，或在生理 pH 条件下使用任何生物液。然后，使第一反应颗粒与两组标记的抗体(即报道抗体)接触，形成第二反应颗粒。一抗对成员 A 具有特异性结合亲和力，用第一标记标记。一抗能与成员 A 结合，而同时成员 A 与捕获抗体结合。这样捕获抗体与一抗必须成对起作用。二抗对结合对的成员 B 具有特异性结合亲和力，用第二标记标记。在该方法中特别有用的是荧光标记的抗体。

图 1 提供了检测成员 A 和宿主抗-成员 A 抗体的试验的示意图。在该实施例中，生物素化捕获抗体对成员 A 具有特异性结合亲和力，并通过亲和素与捕获珠偶联。一抗对成员 A 具有特异性结合亲和力，用藻红素(第一标记)标记。二抗用花青-藻红素(第二标记)标记，对宿主 Ig(成员 B)具有特异性结合亲和力。第一反应颗粒包括成员 A、宿主抗成员 A 抗体、捕获抗体和固相试剂(如抗原捕获珠)，第二反应颗粒中包括第一反应颗粒和两种标记的抗体。

可用流式细胞计数法测定第二反应颗粒上的标记量。本文所用的术语“测定”指定性和定量测定。换言之，术语“测定”包括报道标记在第二反应颗粒上的存在与否，和测定存在的标记量。使用滤光片分开发射的荧光，并用光电倍增管分别放大单个发射光信号，流式细胞计数法能测定至少三种范围的分离的荧光发射波长。与颗粒有关的发射荧光强度与生物样品中存在的分析物的浓度成正比。因此，使用具有不同发射光谱的不同染料(其中各染料与不同抗体偶联)，可分析每种颗粒群中的多种分析物。流式细胞计数法还能分辨不同粒径的颗粒，如直径约 7 微米的颗粒可与直径约 10 微米的颗粒相区别。因此可用多种荧光染料的组合和 2 或 3 种不同平均粒径的颗粒群检测其它成分。

抗体生产

可用标准方法产生对成员 A 或成员 B 具有特异性结合亲和力的抗体。另外，可购得抗体，例如从 BiosPacific (Emeryville, CA)、Coulter (Hialeah, FL)、Maine Biotechnology Service (Portland, ME) 或 Biodesign International (Kennebunk, ME)。本文所用的术语“抗体”包括能与成员 A 或成员 B 的表位决定簇结合的完整分子及其片段。术语“表位”指抗原上与抗体互补位结合的抗原决定簇。表位决定簇常常由分子(如氨基酸或糖侧链)的化学活性表面基团组成，通常具有特异性三维结构和特异性带电特征。表位通常具有至少 5 个连续的氨基酸。因此术语“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体，人源化或嵌合抗体、单链 Fv 抗体片段，Fab 片段和 F(ab)₂ 片段。单克隆抗体特别有用。

一般感兴趣的蛋白质是重组，化学合成或纯化天然蛋白产生的，然后用于免疫动物。可通过注射感兴趣的蛋白质来免疫各种宿主动物(例如家兔、鸡、小鼠、豚鼠和大鼠)。可用佐剂增强依赖于宿主物种的免疫应答，佐剂包括弗氏佐剂(完全和不完全的)、矿物凝胶(如氢氧化铝)、表面活性物质(如溶血卵磷脂、复合多元醇、聚阳离子、肽、油乳剂、匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)和二硝基苯酚)。多克隆抗体是对一特定抗原具有特异性的抗体分子的异质性群体，包含在接种动物的血清中。可用标准杂交瘤技术制备单克隆抗体，它是针对抗原中所含的特定表位的抗体的均质性群体。具体说，单克隆抗体能用培养连续细胞系生产抗体分子的技术获得，如 Kohler, G. 等, Nature, 1975, 256:495 所述，人 B-细胞杂交瘤技术(Kosbor 等, Immunology Today, 1983, 4:72; Cole 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983, 80:2026)和 EBV 杂交瘤技术(Cole 等“单克隆抗体和癌症治疗” Alan R. Liss Inc. 1983, 77-96 页)所述。这些抗体可以是任何一类免疫球蛋白，包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 及其任一亚类。可在体外或体内培养杂交瘤来产生本发明的单克隆抗体。

嵌合抗体是一种分子，其中不同部分衍生自不同种动物，例如具有衍生自小鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白的稳定区的嵌合抗体。可用标准技术产生嵌合抗体。

可用已知技术产生对成员 A 或 B 具有特异性结合亲和力的抗体片段。例如这些片段包括但不限于：可通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的 F(ab')₂ 片段，通过还原 F(ab')₂ 片段的二硫键产生的 Fab 片段。另外，可构建 Fab 表达文库。见例

如, Huse 等, 1989, Science 246:1275。可通过一氨基酸桥(如 15-18 个氨基酸)连接 Fv 区的重链和轻链片段, 产生一单链多肽, 形成单链 Fv 抗体片段。可用标准技术制备单链 Fv 抗体片段。见例如美国专利号 4, 946, 778。

产生后, 用标准免疫试验法测试抗体及其片段对成员 A 或成员 B 的识别, 这些方法包括例如 ELISA 技术或 RIA。见“分子生物学中的短方案”, 11 章, Green Publishing Associates and John Wiley and Sons, Ausubel, F.M 等编, 1992。合适的抗体优选对重组和天然蛋白质具有相等的结合亲和力。

另外, 可在荧光夹心试验法中以下列方式评估抗体形成结合对的能力。可用生物素化抗体(例如抗病毒蛋白质抗体)包被珠, 然后与 2 纳克/毫升合适的蛋白质(如重组病毒蛋白)以 100 微升体积温育约 30 分钟。用 2 毫升缓冲液(含有 1% FBS 和 0.1%叠氮化钠的 PBS 溶液)洗涤珠两次后, 将珠与约 0.5 微克藻红素标记的抗体一起温育。能产生强荧光信号的抗体对适用于本发明的试验。

固相试剂

合适的颗粒(如珠)具有约 2-15 微米的平均直径, 可以是聚苯乙烯、磁铁或顺磁性颗粒。例如, 颗粒可具有约 4-11 微米的平均直径。典型的平均粒径为约 4-5 微米、7-8 微米和 10-11 微米。颗粒可购自例如 Spherotech Inc., Libertyville, IL。可用捕获抗体通过已知技术包被颗粒。例如可用生物素化捕获抗体包被亲和素或链霉亲和素包被的顺磁珠。通常将亲和素或链霉亲和素包被的珠重悬浮在盐溶液(如 PBS)中, 与生物素化抗体在饱和条件下(每 3.9×10^7 微米珠约 40 微克蛋白质)混合, 室温温育。结合完成后, 洗涤珠, 用例如含有 1% FBS 和 0.1%叠氮化钠的 PBS 缓冲液封闭。

当测定核酸结合对时, 可将亲和素或链霉亲和素包被的珠与生物素化核酸偶联。可用标准的缺口翻译反应掺入生物素-11-dUTP 用生物素标记核酸。

在具体实施例中, 基本上所有的捕获抗体都排列在颗粒上, 使得抗原结合区能用于结合成员 A, 而提高了试验的整体灵敏度。术语“基本上所有”表明至少 80%, 优选至少 90%(如 95%-99%)抗体以该形式排列。可通过测定与藻红素标记的山羊抗小鼠抗体的结合有关的荧光, 并与标准荧光颗粒比较定量估计排列百分率。当抗体主要在抗原结合区以外的氨基酸残基上生物素化时, 抗体的抗原结合区能用于结合成员 A。因此在抗体的生物素化过程中, 使用约 5:1 到 10:1 的生物素: 抗体

摩尔比和其它标准反应条件。例如，在约 8.1 的 pH 下可使用生物素 N-羟基琥珀酰亚胺酯或生物素琥珀酰亚胺酯。另外，在 pH4.5-5.0 时可使用生物素肼。

由于捕获生物样品中的成员 A 不限于常规试验的 200 微升或以下的反应体积，从而提高了试验灵敏度。易于从大体积生物样品中用磁性分离或离心收集颗粒。另外，每个颗粒含有平均约 180,000-240,000 个抗体结合位点，约 300,000-350,000 个生物素化抗原结合位点。因此，各颗粒结合能力强，对抗原浓度的分析有效范围大。

可检测标记

通过采用发射的有色光与其它荧光团发射光有反差的荧光团来标记，可清楚地观察各标记抗体。例如，可使用下列荧光团的组合：7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸 (AMCA)，TexasRed™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)，5-(和-6)-羧基-X-罗丹明、丽丝胺罗丹明 B、5-(和-6)-羧基荧光素、荧光素-5-异硫氰酸酯 (FITC)、7-二乙基氨基香豆素-3-羧酸、四甲基罗丹明-5-(和-6)-异硫氰酸酯、5-(和-6)-羧基四甲基罗丹明、7-羟基香豆素-3-羧酸、6-[荧光素 5-(和-6)-氨甲酰基]己酸、N-(4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼-3a,4a-二吡-3-茚 (indacene) 丙酸、曙红-5-异硫氰酸酯、赤藓红-5-异硫氰酸酯、藻红素 (B-、R-或花青-)、异藻青素、Oregon Green™ 和 Cascade™ 蓝乙酰叠氮 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)。

也可用半导体纳米晶体标记抗体。水溶性纳米晶体由包封在硅壳中的不同大小的镉-硒/镉-硫核心-外壳纳米晶体组成，或由溶于巯基乙酸中的镉-硒/锌-硫纳米晶体组成。这些水溶性纳米晶体具有狭窄的、可调谐的、对称的发射光谱，是光度测定稳定的。见 Bruchez, Jr. 等, Science, 1998, 281:2013-2016; 和 Chan 等, Science, 1998, 281:2016-2018。

多种抗原和宿主抗体的检测

可用标记组合，如 Oregon Green™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)、藻红素和花青-藻红素检测两种抗原和一种宿主抗体。例如，可用对 HCV 具有特异性结合亲和力的藻红素标记抗体，对 HBV 表面抗原具有特异性结合亲和力的 Oregon Green™ 标记抗体和花青-藻红素标记的抗宿主 Ig 抗体，同时检测 HCV、HBV 表面抗原、宿主抗-HCV 抗体和宿主抗-HBV 表面抗原抗体。用三种不同标记和两群具有不同粒径 (如平均直径为 7-8 微米和 10-11 微米) 的颗粒能同时检测多达 6 种不同

的待测病毒抗原和宿主抗体。用第三群平均粒径不同的颗粒能检测多达 9 种不同的待测病毒抗原和宿主抗体。

一旦病人血清阳转(即产生宿主抗体),在血浆样品中难于检测到病毒抗原,因为病毒颗粒上捕获或报道抗体的结合位点已被宿主抗体封闭。本发明克服了该困难,因为用具有不同标记的两种抗体同时检测宿主抗体和病毒抗原(或结合对复合物的两个成员)。用这种方式检测结合对复合物的两个成员提供两种信号,显示了例如病毒抗原和宿主抗体。这是一种更灵敏的实验,提供了传统免疫实验方法所不能获得的信息(例如,宿主是否已经血清转化)。因此,可用本方法在传统免疫试验法不能检测的情况下检测病毒抗原。如本文所述,可用包被了对病毒蛋白质具有特异性结合亲和力的单克隆抗体的颗粒捕获病毒抗原,用针对血清阳性个人中病毒蛋白质的报道单克隆抗体检测其存在。可同时通过标记的山羊抗人 Ig 检测针对病毒蛋白质的宿主抗体。检测到病毒蛋白质但没有检测到宿主抗体表明宿主最近被感染,未发生血清阳转,而检测到病毒蛋白质和宿主抗体表明感染和血清阳转均存在。在一些样品中,当一抗结合位点不能使用时,可检测到宿主抗体,但检测不到病毒蛋白质。虽然病毒蛋白质在这种情况下不能直接检测到,但病毒蛋白质仍然存在于样品中,因为针对病毒蛋白质的抗体包被的捕获珠捕获的是病毒抗原和宿主抗体的免疫复合物。

本发明将通过下列实施例进一步描述,这不限权利要求中所述的本发明的范围。

20 实施例

实施例 1-蛋白质的生物素化:以 5 毫克/毫升浓度偶联抗体;以 1 毫克/毫升浓度偶联病毒抗原。为了生物素标记的抗-病毒蛋白抗体和病毒抗原,用合适大小的 Centricon(Amicon)滤膜将蛋白质交换成 100mM KH_2CO_3 缓冲液(pH8.3)。

在使用之前立即制备生物素 N-羟基琥珀酰亚胺酯(Molecular Probes, Eugene, OR)的 DMSO(10 毫克/毫升, Sigma Chmical Co., St. Louis, MO, 目录号#D8779)溶液,并以 5:1 到 10:1 的摩尔比加到要生物素化的蛋白质中。轻微漩涡振荡蛋白质溶液,在蛋白质溶液中加入生物素/DMSO 并充分混合进行反应。蛋白质和生物素酯在室温下避光反应 1 小时。在 10 毫升 Sephadex-25 凝胶柱或旋转柱上用 1X PBS 洗脱,将游离生物素与偶联的蛋白质分开。收集各组分各 1 毫升,测 A_{280} 纳米吸

光值收集代表 A_{280} 第一峰的组分并合并, 丢弃剩余的组分, 包括代表第二个 A_{280} 峰的那些组分。

当使用旋转柱时, 在 4 根旋转柱之间平均分配反应混合物, 用 Serofuge 离心机高速旋转 2 分钟。收集通过柱的物质, 用 1X PBS 装满柱进行洗涤, 在 Serofuge
5 中高速旋转 2 分钟, 重复 5 次。将收集的物质重新等量分配在 4 根柱中, 然后用 Serofuge 离心机高速旋转 2 分钟。收集通过柱的物质, 合并, 重新分析 A_{280} 并测定浓度。偶联蛋白储藏在 4°C 。

实施例 2-分析物捕获珠的产生: 充分混合, 完全重悬浮亲和素包被的顺磁珠 (7 微米, Spherotech, VM-60-100) 制备分析物捕获珠。将珠 (通常 3.8×10^6 珠) 置于
10 50 毫升离心管中, 与 30 毫升 1XPBS 混合。用磁铁将珠留在试管壁上, 除去全部 PBS。用 PBS 洗涤珠两次以上。

最后一次 PBS 洗涤后, 在珠中加入所需体积的生物素化抗体 (通常 40 微克) 和 2 毫升 1X PBS。连续漩涡振荡至少 3 小时, 或漩涡振荡 1 小时, 重新悬浮珠, 然后 4°C 储藏过夜。储藏过夜的珠翌日早晨再漩涡振荡 2 小时。用约 30 毫升含有
15 1% FBS 和 0.1% NaH_3 的 PBS 缓冲液洗涤偶联珠 3 次。将珠重新悬浮在 19.25 毫升相同缓冲液中, 储藏在 4°C 直到使用。

为了用荧光素衍生物 Oregon Green™ (Molecular Probes, Eugene, OR) 标记抗体, 将抗体以 5 毫克/毫升浓度交换成 100mM KH_2CO_3 缓冲液 (pH9.0)。在抗体中以 25:1 摩尔比加入 Oregon Green™ (10 毫克/毫升的二甲亚砷溶液, DMF), 室温
20 避光温育 1 小时。在 G-25 Sephadex 柱上将抗体与游离 Oregon Green™ 分开。用 2-亚氨基硫烷 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) 以 1625:1 的摩尔比修饰荧光染料, 硫-SMCC (Pierce) 以 20:1 的摩尔比修饰抗体, 产生 R-藻红素 (PE, Intergen BioDiagnostics, Purchase, NY) 和花青-藻红素 (Cy5PE) 偶联物。将修饰的荧光染料和抗体一起在室温下避光温育 1 小时。在 Sephacryl S-300-HR 柱 (Sigma Chmical
25 Co., St. Louis, MO) 上, 将荧光染料偶联的抗体与游离荧光染料和抗体分开。亲和纯化山羊 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 抗人 Ig 抗血清 (重链和轻链特异性) 并以小鼠、马、牛、大鼠和家兔抗体吸收, 再用 PE 或 Cy5-PE 标记。可改变荧光染料和蛋白质的比例来优化对特定抗体或病毒抗原的荧光信号。

实施例 3-病毒抗原和宿主抗体的检测: 从 New York Biologicals

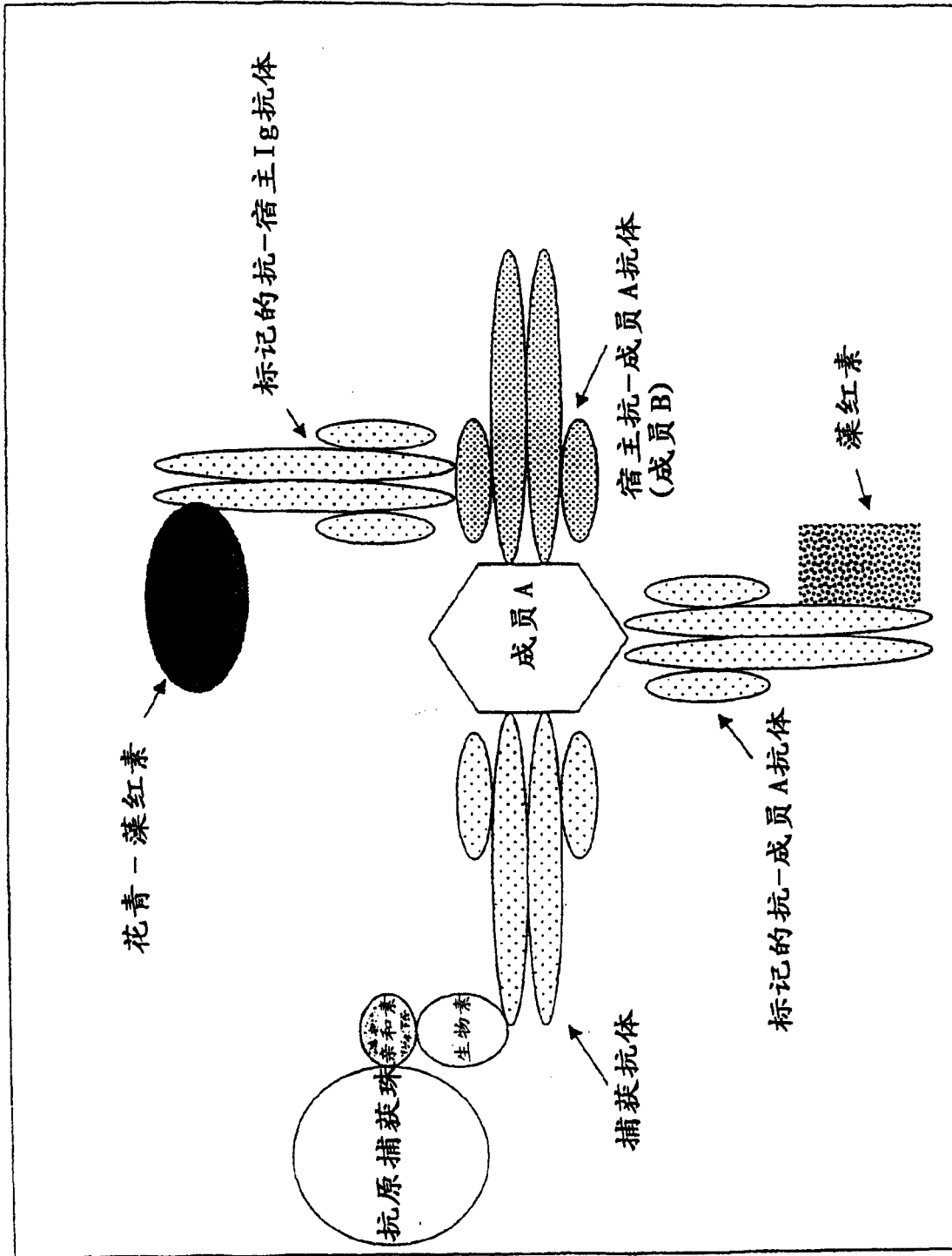
(Southampton, NY)、Scantibodies Laboratories (Santee, CA) 或 Intergen BioDiagnostics (Purchase, NY) 获得了正常个人的和 HCV、HIV 或 HBV 阳性个人的血浆样品。用 Triton-X 100 去污剂 0.5% 的最终浓度处理血浆样品，来裂解病毒膜，在测试前暴露出核心颗粒。从 BiosPacific (Emeryville, CA) 或 Intergen BioDiagnostics 获得了大肠杆菌衍生的病毒抗原。在正常非病原性血清样品中加入抗原，产生参比标准曲线，用于波尖和回收分析。

在 Coulter EPICS ProfileII、Coulter XL 或 Partec PAS 流式细胞计数仪上，用线性正向/侧向光散射门控珠群，进行流式细胞计数分析。对数放大荧光信号。用滤光片将发射荧光分成不同色光。用 525 纳米带通滤光片收集绿色荧光 (Oregon Green 和 FITC)，用 565 纳米带通滤光片收集橙色荧光 (PE)，用 630 纳米长通滤光片收集红色荧光 (Cy5PE)。

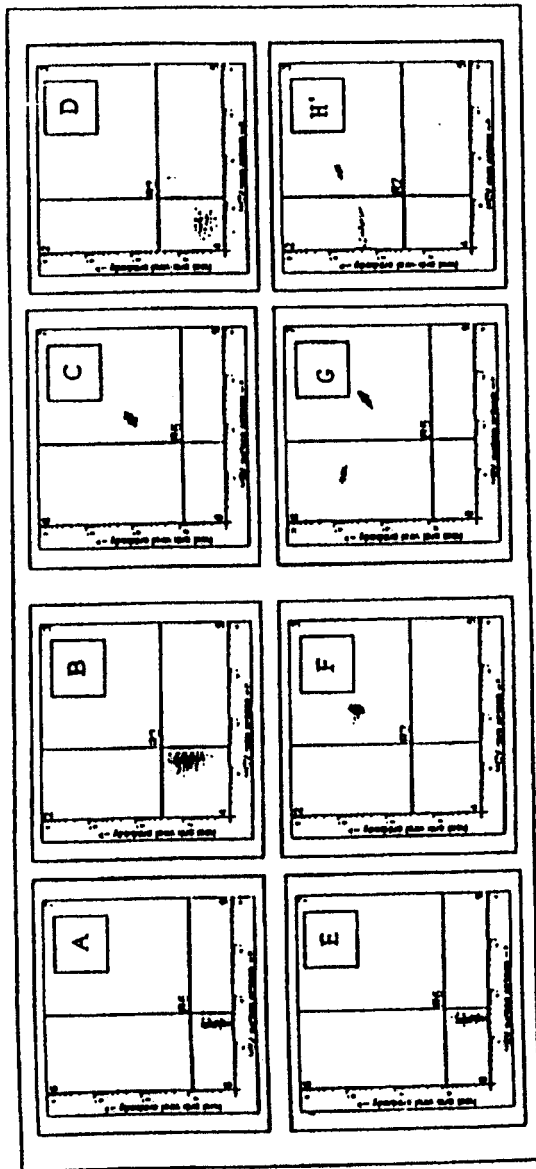
用 PE-和 Cy5PE-标记的 $F(ab')_2$ 山羊抗人 Ig (重链和轻链特异性) 抗体温育样品。在各种情况下，在具有捕获抗原的珠上检测到宿主抗病毒抗体，而在来自正常样品或不正确的病毒的珠上检测不到。用对 HCV 核心抗原具有特异性结合亲和力的 PE 标记抗体，对 HBV 表面抗原具有特异性结合亲和力的 Oregon Green 标记抗体，和 Cy5PE 标记的山羊抗人 Ig 抗体检测到 HBV 表面抗原和抗-HBV 抗体，以及 HCV 核心抗原和抗 HCV 抗体。如图 2A-2H 中所示，分别和同时检测 HCV、HBV 和宿主抗体是可能的。

其它实施例

应理解虽然已联合实施例的详细描述描述了本发明，但是上述描述仅为了说明，不是为了限制由权利要求的范围限定的本发明的范围。其它方面、优点和修改在权利要求的范围内。



1
图



2

专利名称(译)	同时检测结合对的两个成员的方法		
公开(公告)号	CN1153970C	公开(公告)日	2004-06-16
申请号	CN00812467.1	申请日	2000-07-28
[标]发明人	DP柯林斯		
发明人	D· P· 柯林斯		
IPC分类号	G01N21/78 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/573 G01N33/576 G01N33/577		
CPC分类号	Y10S435/975 Y10S435/968 Y10S435/973 Y10S435/974 Y10S435/96 G01N33/54306 Y10S435/971		
代理人(译)	徐迅		
优先权	09/365065 1999-07-30 US		
其他公开文献	CN1382258A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

同时免疫学测定生物样品中一结合对的两个成员A和B(如抗体和抗原)，通过：1)使样品与结合于颗粒的抗-A抗体一起培育，产生颗粒-抗体-A复合物；2)培育该复合物与标记的抗-A和抗-B抗体；和3)用流式细胞计数法检测这些标记。

