

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880011244.2

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

B01D 57/02 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101680865A

[22] 申请日 2008.1.31

[21] 申请号 200880011244.2

[30] 优先权

[32] 2007. 2. 7 [33] US [31] 60/899,831

[86] 国际申请 PCT/US2008/052610 2008. 1. 31

[87] 国际公布 WO2008/097803 英 2008. 8. 14

[85] 进入国家阶段日期 2009. 10. 9

[71] 申请人 里泽尔诊断公司

地址 美国科罗拉多州

[72] 发明人 S·P·蒂雷尔 B·范特-赫尔

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 赵蓉民

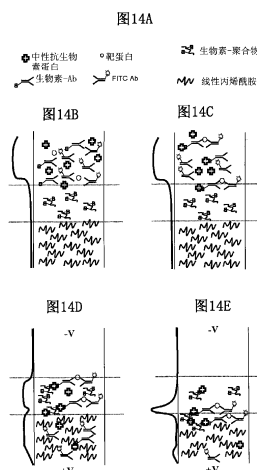
权利要求书 3 页 说明书 17 页 附图 12 页

[54] 发明名称

使用电泳的快速均相免疫测定

[57] 摘要

本发明涉及检测和/或测定靶分子浓度的方法、组合物和装置。在优选的实施方式中，所述方法包括：允许靶分子形成具有结合到检测分子的第一结合剂和结合到捕获分子的第二结合剂的复合物，允许所述复合物进一步与能够结合到所述捕获剂、基本上不带有电荷的聚合物结合，和进行垂直梯度电泳以与未结合靶、第一和第二结合剂以及聚合物分离所述复合物。完整的复合物通过电泳聚集在堆积层并且所述检测分子被检测和/或定量。因为复合物含有高质荷比，所以它在堆积层变为基本不动，而未结合成分迁移穿过堆积层并与复合物分离。这提供了非常快速和灵敏的测定，所述测定可以在短时间内检测非常低浓度的靶分子。



1. 一种检测靶分子的方法，包括：
 - a) 获得可能含有所述靶分子的样品；
 - b) 在结合检测分子的第一结合剂和结合捕获分子的第二结合剂存在的情况下，对所述样品进行垂直堆积电泳，其中所述靶分子结合所述第一和第二结合剂而形成复合物；和
 - c) 检测由所述靶分子和第一及第二结合剂形成的所述复合物的存在。
2. 根据权利要求1所述的方法，还包括：
 - i) 在基本上不带电荷的聚合物存在下进行所述电泳，所述不带电荷的聚合物能够结合所述捕获分子而成为所述复合物的部分。
3. 根据权利要求1所述的方法，其中所述结合剂是抗体或者其抗原结合片段。
4. 根据权利要求1所述的方法，其中所述结合剂的一种或者两种是生物受体或其片段。
5. 根据权利要求3所述的方法，其中所述抗体是单克隆抗体。
6. 根据权利要求1所述的方法，其中所述靶分子是蛋白质或者多肽。
7. 根据权利要求1所述的方法，其中所述电泳是在最小流体动力学半径——等于两倍横切面面积除以周长——为0.5mm的管、槽或容器中进行。
8. 根据权利要求7所述的方法，其中样品被装载在所述管、槽或者容器的顶部，并且所述电泳在密度和/或粘度从所述管、槽或容器的顶到底部逐渐增加的梯度中进行，所述梯度包括不同密度或粘度的至少两个相。

9. 根据权利要求7所述的方法，其中所述样品被装载在所述管、槽或者容器的底部或底部附近，并且所述电泳在密度和/或粘度从所述管、槽或容器的顶到底部逐渐增加的梯度中进行，所述梯度包括不同密度或粘度的至少两个相。
10. 根据权利要求8或9所述的方法，其中所述梯度包括样品层、捕获层和堆积层。
11. 根据权利要求10所述的方法，其中所述梯度包括与所述捕获层混合的样品层和堆积层。
12. 根据权利要求10所述的方法，其中所述捕获分子是生物素，并且所述电泳在生物素结合蛋白存在的情况下进行。
13. 根据权利要求12所述的方法，其中所述生物素结合蛋白选自抗生物素蛋白、链酶抗生物素蛋白和中性抗生物素蛋白。
14. 根据权利要求12或13所述的方法，其中所述电泳在结合生物素的中性聚合物存在下进行。
15. 根据权利要求14所述的方法，其中所述复合物包括靶分子，第一结合剂，第二结合剂，选自抗生物素蛋白、链酶抗生物素蛋白或中性抗生物素蛋白的多价生物素结合剂以及一种或者多种结合生物素的聚合物。
16. 根据权利要求15所述的方法，其中所述复合物的形成导致了质荷比增加和所述靶分子与复合物的电泳迁移率的降低。
17. 根据权利要求15所述的方法，其中所述复合物形成包括靶分子、第一结合剂、第二结合剂、多价生物素结合剂和一种或多种结合

生物素的聚合物在溶液中自组装而形成可检测的低迁移率复合物。

18. 根据权利要求15所述的方法，其中所述复合物在所述堆积层聚集以增进检测。
19. 根据权利要求18所述的方法，其中所述复合物在所述堆积层变得基本不动。
20. 根据权利要求18所述的方法，其中不是复合物部分的第一结合剂迁移穿过所述堆积层并且与所述复合物分离。
21. 根据权利要求1所述的方法，还包括：
 - ii) 测量所述复合物中所述检测分子的量以确定所述样品中所述靶分子的浓度。
22. 根据权利要求1所述的方法，其中所述检测分子是荧光、发光、化学发光、放射性核或产生荧光、发光、化学发光或者颜色产物的酶。
23. 检测靶分子的装置，包括：
 - a) 垂直布置的管、槽或容器，其具有至少 0.5 mm 的流体动力学半径；
 - b) 在所述试管、槽或容器内密度逐渐增加的梯度，所述梯度包括样品层、捕获层和堆积层。
24. 根据权利要求23所述的装置，还包括：
 - i) 靶分子、结合检测分子的第一结合剂和结合捕获分子的第二结合分子，其中所述靶分子、第一和第二结合分子能够在所述样品层中形成复合物；
 - ii) 所述捕获层中的基本不带电荷的聚合物，其能够结合所述捕获分子而成为所述复合物的部分。

使用电泳的快速均相免疫测定

相关申请

[001] 本申请依照美国35 U.S.C. §119(e)要求2007年2月7日递交的美国临时专利申请系列号60/899,831的权益，其全文通过引用并入本文。

发明领域

[002] 本发明涉及检测样品中蛋白质或者靶分子的存在和/或测定样品中蛋白质或者靶分子的浓度的方法、组合物和/或装置。该方法、组合物或装置对于在宽范围的靶分子（一种或多种）浓度的检测和/或浓度测量是有效的。更具体地，与用目前可选的方法可能的时间和灵敏度相比，该方法可以在更短时间（几分钟）和以更高的灵敏度进行。

发明背景

[003] 在医学、食品检验、生物学研究和生物战剂检测领域，低浓度蛋白质的检测极为重要。到目前为止，最常见的测量蛋白质的工具是抗体，抗体是由高等动物免疫系统产生的蛋白质。使用抗体（或者类似的结合剂）的检验一般称为“免疫测定”(Gosling, 1990)。

[004] 使用完整抗体分子的一般的可替代方式是只使用抗体结合区。已经知道多种抗原结合的抗体片段，如Fab片段(Gosling, 1990)、Fab'片段、F(ab)₂片段、F(ab')₂片段、scFv片段等。Fab片段可以通过生化裂解完整的抗体分子或者通过使用基因工程技术在细胞培养物中合成它们来获得。

[005] 最近开发的另外的抗体可替代物是适体(Gold 等, 1995; Drolet 等, 1996)。适体是被设计为共有多个抗体结合特性的核酸(RNA或DNA或它们的衍生物)。适体提供了这样的优势，其在比较短时间内在体外产生、有长的货架寿命、容易进行化学修饰以及潜在地显示比

抗体更好的结合特性。缺点包括高成本和在一些生物流体中具有低稳定性。

[006] 免疫测定通常被表征为“多相的 (heterogeneous)”或“均相的 (homogeneous)”。在该领域中关于这些术语所表示的意思存在一些混乱。在一些情况下, 采用术语“多相的”意味着在检测之前结合复合物从未结合的分子中分离 (通过任何方法), 而术语“均相的”意味着没有分离发生。术语“多相的” (在本公开中所使用的) 的另一通常意思是意味着测定使用固相和溶液相两种, 其中复合物结合到固相使未结合分子在检测之前被洗掉 (或者反之亦然), 而术语“均相的”意味着结合、分离 (如果有的话) 和检测步骤均在溶液相中发生。在大多数情况下, 不同的定义在如何分类测定中差别不大, 因为大多数分离或清洗步骤涉及与固体支持物结合, 因此包括分离或者清洗的测定将通过任一定义被分类为多相的。主要的例外是通过电泳进行的分离, 这使测定——依照第一组定义, 被分类为多相的, 而依照第二组定义, 被分类为均相的。本公开使用了第二组定义。

[007] 因此, 在本公开中, 多相测定包括在检验过程期间将抗体-靶蛋白复合物结合到表面, 并随后在测量样品中蛋白质的量之前清洗掉任何残余的未结合样品和抗体。在另一方面, 均相测定允许样品和抗体混合在一起并允许结果在没有任何结合到表面或者清洗情况下被测定。每种方法既有明确的益处, 也有明确的局限(Ronkainen-Matsuno, 等 2002)。

[008] 多相测定可以有极好的灵敏性和特异性并且可以提供极高通量检验系统的方式 (format) 进行。这些方式也可以适合于检验实质上的任何抗原。局限包括大量进行相对复杂的仪器操作需要漫长的检验时间以及与表面结合和清洗步骤相关的增加的成本。

[009] 均相测定可以是非常快的、容易适应于新的蛋白质和平台, 并且可以很有成本效益。局限包括潜在的较低特异性和灵敏性。另外, 这些方式一般局限于小的靶抗原。

[0010] 电泳是这样的技术, 其在某些情况下可用于代替清洗结合到固体支持物上的复合物, 由此将通常是多相的蛋白质测定转变为均相测定。电泳通常被用于根据分子的大小和电荷来分离它们(通常较大的

分子如蛋白质或者核酸)(Oda和Landers, 1997)。阳极和阴极放置在含有待分离分子的溶液中，并在电极之间施加电压降。一般而言，带有正电荷的分子将向带有负电荷的电极迁移，而带有负电荷的分子会向带有正电荷电极迁移。分子迁移的速度与它们的电荷成正比，而与它们的大小成反比。小的、高电荷分子比大的、较低电荷分子移动快。然而，致密压紧的分子比松散构象的分子移动快，这使得相同质量和电荷的两种分子可以以不同速率移动。较高的电压降使得迁移较快，而在溶液中较高浓度的其它带电分子使得迁移较慢。

[0011] 有多种不同的电泳。分子移动通过的溶液可以是任意的，通常在毛细管中，或者它包埋在基质中。一般的基质包括聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶和滤纸。基质用来根据大小筛分分子，导致更好的分离。溶液的pH(酸度)影响分子的电荷，并且可以被改变（甚至从基质的一端到另一端）以影响分子的迁移速率。溶液可以包括变性剂如尿素——其使得蛋白质和核酸分子打开——以便相同质量和电荷分子的迁移速率相同。待电泳的样品可以用去污剂如SDS——其覆盖在全部蛋白质上以抵消电荷差异——来制备，使得迁移速率取决于质量，而不取决于电荷。然而，对于大多数需要结合剂如抗体或者适体的测定，蛋白质和结合剂都需要保持在接近于它们的自然状态，这使得改变pH或使蛋白变性的过程不是切实可行的选择。

[0012] 目前检测和/或测定溶液中分子浓度的方法没有将短的测定时间、高的灵敏性和测定较大样品体积的能力进行结合，所述测定较大样品体积的能力是检测和/或定量以非常低的浓度存在的靶分子所需要的。在本领域存在提高分子检测和/或分子浓度测定的分析技术的需要。

发明概述

[0013] 在各种实施方式中，本发明一般涉及使用特定的结合试剂如抗体、适体或设计的小分子黏合剂来检测和/或测定蛋白质或者其它靶分子的浓度。优选的实施方式涉及通过以下检测靶分子：(1)将靶分子结合到两种结合剂，一种结合剂与检测分子结合，而另一种结合剂与捕获分子（例如，生物素）结合，从而形成靶复合物；(2)利用电泳使

复合的和未复合的分子移动通过含有与捕获分子的关联物（如链霉抗生物素蛋白）结合的聚合物的区域，通过其靶复合物的迁移率显著降低；(3)继续电泳，使得未复合分子与结合到聚合物上的复合分子分离；和(4)通过定量检测分子测定靶复合物浓度。

[0014] 在某些实施方式中，公开的方法将夹心免疫测定从多相测定转变为均相测定，由此消除了通常与多相测定如夹心ELISA测定相关的多个劳动密集并且昂贵的步骤。在另外的实施方式中，公开的方法获得了与完全在溶液相中进行测定相关的动力学优势。本发明将允许夹心免疫测定在数分钟内而不是在数小时内和以降低的成本进行。

附图简述

[0015] 图1-在等式中使用的符号列表。在大多数情况下，数量以用厘米·克·秒为单位(c·g·s单位)。

[0016] 图2-等式1将颗粒移动通过流体经受的摩擦力与颗粒速度、半径和流体的粘度相关联。

[0017] 图3A-等式2a将迁移率定义为颗粒的速度除以它经受的摩擦力，并由此将迁移率以它的半径及其移动经过的流体粘度限定。

[0018] 图3B-等式2b将球半径与体积相关联，并由此将半径与其密度和质量相关联。

[0019] 图3C-等式2c随后将迁移率与颗粒的质量、密度和颗粒移动经过的流体粘度相关联。

[0020] 图4-等式3将颗粒速度与它的迁移率和施加的力相关联。

[0021] 图5-等式4将颗粒的速度与其迁移率、电荷和施加的电压相关联。

[0022] 图6-等式5从颗粒的迁移率和电荷限定颗粒的电泳迁移率。

[0023] 图7A-等式6a将颗粒的斯维德贝格系数（Svedberg Coefficient）定义为它的沉降速度除以离心加速度。

[0024] 图7B-等式6b依照斯维德贝格系数和离心加速度定义迁移率。

[0025] 图8A-等式7a从等式2c计算IgG抗体的迁移率。

[0026] 图8B-等式7b从等式6b计算IgG抗体的迁移率。

[0027] 图9-荧光素(a)与第一抗体(b)结合而形成信号产生抗体(Signal Generating Antibody)(c)。图不是按比例画的,并且单个图表示反应中特定成分的存在,不表示每种成分的化学计量的量。

[0028] 图10-生物素衍生物(d)与第二抗体(e)结合而形成捕获抗体(f)。图不是按比例画的,单个图表示在反应中特定成分的存在,不表示每种成分的化学计量的量。

[0029] 图11-信号产生抗体(c),捕获抗体(f)和靶(g)结合形成三重复合物(h)和过量抗体(c)和(f)。图不是按比例画的,单个图表示在反应中特定成分的存在,不表示每种成分的化学计量的量。

[0030] 图12-由图11生成的混合物与中性抗生物素蛋白(neutravidin)(i)混合,所述中性抗生物素蛋白与含有生物素的成分结合形成中性抗生物素蛋白-三重复合物(j),中性抗生物素蛋白-捕获的抗体复合物(k),以及过量的信号产生抗体(c)和过量的中性抗生物素蛋白(i)。图不是按比例画的,单个图表示在反应中特定成分的存在,不表示每种成分的化学计量的量。

[0031] 图13-施加到反应室的电压使得由图12生成的混合物通过电泳移动进入含有与生物素结合的不带有电荷聚合物的区域。由图12生成、含有中性抗生物素蛋白的混合物的成分与连接到生物素的聚合物结合。这些所述的聚合物具有这样的大小(数十到数百万道尔顿)——得到的复合物与在由图12生成的混合物中的任何成分相比具有显著减小的电泳迁移率。图不是按比例画的,单个图表示在反应中特定成分的存在,不表示每种成分的化学计量的量。

[0032] 图14A-用于表现本图中不同成分的单个图的说明,所述不同成分包括中性抗生物素蛋白、靶蛋白和生物素结合的聚合物、捕获抗体、信号产生抗体和在堆积层中的聚合物。图不是按比例画的,并且单个图表示在反应中特定成分的存在,不表示每种成分的化学计量的量。

[0033] 图14B-反应室的起始状态,其从上到下分成三层:分别是样品层、捕获层和堆积层。样品层由图11中反应等式的左侧成分加上在反应缓冲液中的中性抗生物素蛋白组成。捕获层含有反应缓冲液中的不带电荷、生物素结合的聚合物。堆积层含有不带电荷聚合物如线性

聚丙烯酰胺。在每个图中室左边示出的灰度痕迹 (gray trace) 代表信号产生抗体在每个点的可检测的量。

[0034] 图14C-复合物在样品层中自组装, 由图11和图12中的反应等式表示。

[0035] 图14D-在垂直方向上施加的电压, 其导致所有成分电泳进入捕获层, 导致复合物的形成, 由图13中的反应等式表示。

[0036] 图14E-进一步施加电压, 导致没有结合到生物素结合聚合物的所有复合物移动进入并且穿过堆积层以及结合复合物在捕获层和堆积层之间的界面处的集中。

[0037] 图15-在每个图中的深色痕迹代表在捕获层中生物素化的葡聚糖存在下的FITC标记的中性抗生物素蛋白浓度, 而淡色痕迹代表在捕获层中没有生物素化的葡聚糖存在下的FITC标记的中性抗生物素蛋白浓度。

[0038] 图16-来自人IL-6完整夹心测定的剂量反应数据。

[0039] 图17-EVEIA夹心测定方法总结。

发明内容

分子运动的理论处理

[0040] 运动通过流体的颗粒(其可以是分子)经受的摩擦力与其速度、其大小(如由它的流体动力学半径所描述的)和流体的粘度成比例。如在等式1(图2)中显示的这个形式表达式被称为斯托克斯方程(Stokes equation)。

[0041] 称为迁移率的数量是由等式1定义, 使得颗粒速度除以迁移率得出摩擦力。以这种方式定义它的原因将很快变得清楚。对于球形分子, 流体动力学半径等于半径。对于非球形分子, 其被定义为在蠕动流 (creeping flow) 条件下表现相同的球形分子半径(如果分子的形状是已知的, 其可以理论上得到)。从等式1得到的迁移率用等式2a(图3A)来表示。如果球形形状被假定为已知分子量的分子, 那么如等式2b(图3B)中所示计算半径。将等式2b代入等式2a产生依照分子密度、分子量和流体粘度的迁移率表达式, 如在等式2c(图3C)中显示的。

[0042] 当摩擦力由于这种移动而等于施加力(例如重力、电压梯度)时, 颗粒以恒定的速度移动。使摩擦力等于施加力并得出速度表明颗粒的速度仅是施加力乘以迁移率, 如在等式3(图4)中显示。由此迁移率提供了计算颗粒速度的方便方式。分子在电场中所经受的力与分子上的电荷和电场强度成比例。分子的速度因而用等式4(图5)给出, 其中由“ u ”指明的量称为电泳迁移率(单位为厘米²/伏特秒), 由等式5(图6)所定义。在等式5中的因子 10^7 将电荷 e 转变成厘米·克·秒单位(其是米·千克·秒单位)和伏特。

[0043] 注意等式4意味着带有负电荷的分子(阴离子)以与阳离子相反的方向移动。在等式4更普遍的形式中, 颗粒的速度和电场(其是电压梯度的)是矢量, 因此具有与它们相关的方向。

[0044] 迁移率也与斯维德贝格系数密切相关, 斯维德贝格系数被定义为水中的颗粒沉淀物在20°C、离心机中的速度除以离心加速度。斯维德贝格系数用 10^{-13} 秒的单位表示。使用等式3中的浮力得到速度, 作为迁移率函数的斯维德贝格系数由等式6a(图7A)给出。因此迁移率可以源自于斯维德贝格系数, 如在等式6b(图7B)中显示的。

[0045] 免疫球蛋白G(IgG或 γ 球蛋白)是在血清中发现的最常见类型的抗体。它有大约150kDa的分子量(1320个氨基酸残基)。不同IgG分子的等电点范围是6到7.5, 意味着在中性pH为中等负电荷到轻微正电荷。IgG的斯维德贝格系数是大约7。如果密度为大约 1.2 g/cm^3 , 则从等式2b计算出的迁移率是 $2.1 \times 10^7 \text{ s/g}$, 而从等式6b计算出的迁移率是 $1.7 \times 10^7 \text{ s/g}$ 。

[0046] 这两种计算之间接近的一致性令人满意, 因为第一种计算是纯理论的, 而第二种计算有一些实验根据。两种之间的差异来自于以下至少三种来源: (1)IgG不是完全的球形分子, 因此通过沉降测定的迁移率应该是较低的; (2)IgG的密度没有被精确了解, 并且这种不确定性在第二种计算中被夸大而在第一种计算中被最小化; 和(3)在第二种计算使用的斯维德贝格系数仅仅是大约知道的。我们将采用的IgG迁移率是 $2 \times 10^7 \text{ s/g}$ 。

免疫测定

[0047] 以可靠方式测量蛋白质浓度的重要性已经导致了大量的涉及抗体或抗体样分子测定年的发展。目前广泛使用的各种免疫测定已经由Gosling (1990)进行了深入地描述,在此引入作为参考。以下描述使用抗体作为结合剂,但是在多种情况下,Fab片段或适体可以代替使用。然而,本文描述的方法和组合物不是如此有限的,并且在其它可选的实施方式中,结合剂可以是,例如生物受体。多种这样的受体(例如,胰岛素受体、胰岛素样生长因子1受体、乙酰胆碱受体、GABA受体、血管紧张素(antiotension)受体、胰高血糖素受体、趋化因子受体、细胞因子受体等)在本领域中是众所周知的,并且任何的这种已知受体或它们的配体结合片段都可以用于所要求的方法的实践中。

[0048] 浓度检测和/或测定一般这样进行:通过用信号部分如荧光、化学发光、放射性或本领域中已知的其它标签标记抗体或其它结合分子,允许结合分子结合到靶,并检测和测量与结合抗体有关的光发射、放射性的量等。在大多数情况下,信号系统的选择不是方法的中心。如果需要比色测定,结合到抗体上的荧光信号分子如FITC或罗丹明通常可以用酶如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶替换,或者用电导率测定用的酶如碳酸酐酶或脲酶替换。尽管如此,酶测定要求加入合适的底物。

[0049] 将信号分子直接连接到结合靶蛋白的抗体(初级抗体)的常用替代方式是应用与信号分子结合的二级抗体。二级抗体是被开发为结合来自某些种类(并且因此必须来自不同的种类)的所有抗体的抗体。例如,抗体可以从注射了兔抗体的山羊中收获。如果这些二级抗体与信号分子结合,那么二级抗体与初级抗体的结合提供了信号分子与初级抗体的没有化学结合的连接。这种二级抗体可以用于将信号分子连接到源自相同种类的任何初级抗体,因此增加了测定的模式化程度。

[0050] 经常描述多相免疫测定而无需具体说明结合发生的固体支持物的类型。尽管如此,使用的载体类型代表了在任何免疫测定方法中影响不同步骤中所需要的过程和时间的的重要变化,并且有时代表将会使用的检测类型。例如,在最一般的形式中,夹心ELISA包括结合复

合物到在微量滴定板中孔的底面，这使得容易手工引入清洗试剂和容易读取荧光或比色信号。然而，由于大量转移（mass-transfer）的限制，测定可能花费数小时。蛋白质在本体溶液和在表面的不流动层之间平衡以及多次清洗通常需要花费时间。这些问题通过使用微珠作为结合表面可以减轻到一定程度，其使表面与本体溶液更密切接触以及显著地增加每单位体积溶液的可用于结合的表面积。在通过过滤或者离心的清洗期间，固相（在微球上）随后与溶液相分离。此过程可通过使用顺磁性小珠更易于自动化，顺磁性微珠可很容易从溶液中磁性分离。几乎所有的多相免疫测定可以改进，以使用这些不同的表面。

[0051] 有两种常见类型的免疫测定正在使用中，用于检测和/或测定在样品中的分子浓度，该两种免疫测定有点类似于本文描述的方法。第一种是夹心ELISA，其在特异性方面被认为是免疫测定的金标准。这种高度特异性通过要求两种单独的抗体同时结合到感兴趣的靶而获得，其是以下描述的方法中也会使用的技术。第二种是亲合探针毛细管电泳测定(APCE)。这种测定由下列组成：结合感兴趣的靶标到单一初级抗体、然后运行混合物穿过毛细管电泳设备以将结合的抗体与未结合的抗体分离。该电泳分离允许整个测定在溶液中进行，其是以下描述的方法中也会使用的技术。

夹心 ELISA

[0052] 夹心酶连免疫吸附测定(ELISA)首先由Rosalyn Yalow和Solomon Berson在20世纪50年代开发为放射性免疫测定，并被认为是蛋白检测的金标准，其显示了作为它主要优点的非常高的特异性和准确性(Gosling, 1990)。它主要的缺点是费时和要求大量的步骤。取决于洗涤的严谨性和温育步骤的时间长短，该方法通常进行二个到六个小时。

[0053] 第一个步骤是结合初级抗体到靶标蛋白到孔的底面，该表面已经被制备为促进蛋白质结合。表面随后用封阻剂如牛血清白蛋白(BSA)封闭任何残余的活性位点，因此阻止了其它蛋白结合并影响检验的特异性。将孔洗涤多次以去除游离的抗体和封阻剂。

[0054] 假定含有靶蛋白的样品随后被加入到孔中并且和温育特定的时间。理想得是，仅有次靶蛋白会结合到表面抗体，并且其它蛋白不会结合到封闭的表面或者结合到表面抗体。进行多次洗涤以除去任

何非特异结合的蛋白。如果发生了任何非特异蛋白的结合，接下来的步骤是将它们影响最小化。

[0055] 靶蛋白的二级抗体——其与检测剂分子连接——被加入到孔中并使其结合。因为该抗体的特异性，极少的抗体会结合到与表面或者初级抗体非特异结合的任何蛋白。理想地是，这种抗体仅结合与初级抗体结合的靶蛋白。进行多次洗涤以去除任何未结合的二级抗体。因为这种二级抗体与检测分子连接，该二级抗体的浓度可以被测定并与在原始样品中的靶蛋白的浓度相联系。

亲和探针毛细管电泳(APCE)

[0056] 毛细管电泳包括利用带有正电荷和负电荷的电极，施加电压，穿过充满离子缓冲液的长毛细管，因而使得带有电荷的分子向一个电极或者另一个电极迁移 (Oda和Landers, 1997)。一种常见的复杂因素被称为“电渗流动”。玻璃毛细管倾向于具有带负电荷的表面，其与接近表面的溶液中带正电荷的离子相关。这些带正电荷的离子向负电极（阴极）迁移，使本体溶液与它们一起缓慢移动。这种电渗流动使得所有离子向阴极迁移(虽然以不同速率) 并常常被很好的利用，因为当离子流过时，单个检测器可以分析所有离子种类而不管其电荷如何。电渗流动可以通过改变毛细管壁的电特征而消除或者甚至反转。

[0057] 对于APCE，靶分子与已经结合到检测分子——常常是荧光探针——的关联抗体一起温育(Schultz 等, 1997)。混合物随后被注入毛细管，施加电压，建立电渗流动。游离靶、游离抗体和靶/抗体复合物会以不同速度(通过电渗流动增加)迁移，并且因此可以由荧光检测器检测为分开的峰（游离的靶不应该产生信号）。虽然毛细管电泳比ELISA测定更快，但是可以分析的样品的体积小（由于毛细管的尺寸小）限制了这种方法检测在样品中以非常低浓度存在的蛋白质或者其它靶分子的灵敏性。

用于靶分子检测和定量的增速型电泳免疫测定 (enhanced velocity Electro Immunoassay) (EVEIA)

[0058] 本申请提供了检测和测定样品中靶分子浓度的快速、高灵敏度的方法，所述方法包括垂直堆积电泳。由于EVEIA技术的电泳部分在体积和横切面面积比微毛细管大得多的容器中发生，所以要求保护

的方法允许检测在样品中以低浓度存在的靶分子。在某些优选的实施方式中，电泳可以发生在最小流体动力学半径(两倍横切面面积除以周长)为0.5mm或更高的管、槽或其它容器中。

[0059] 在优选的实施方式中，权利要求的方法由以下步骤组成：

1. 获得到感兴趣的靶的第一结合剂，并以不妨碍与感兴趣的靶的特异结合的方式将信号剂连接到第一结合剂。这种所述第一结合剂可以是单克隆抗体、抗体片段(如Fab)、适体或显示与感兴趣靶特异结合的任何其它分子或者分子复合物。感兴趣靶可以是蛋白质、蛋白质复合物或者在水溶液中可溶的任何分子。信号剂可能是荧光分子、放射性标记、产生比色产物的酶、产生电可检测的产物的酶或者可以容易地直接或者间接检测和定量的任何分子或分子复合物。在如图9中示出的一种优选实施方式中，第一结合剂是单克隆抗体，而信号剂是荧光素。

2. 获得到感兴趣靶的第二结合剂，并且以不妨碍与感兴趣靶特异结合的方式将捕获剂连接到第二结合剂。该第二结合剂可以是单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(如Fab)、适体或显示与感兴趣靶特异结合的任何其它分子或者分子复合物。捕获剂可以是生物素、链霉抗生物素蛋白、单链核酸或者能够以高特异性和亲和力结合的任何其它分子或者分子复合物。在一种优选的实施方式中，所述第二结合剂是多克隆抗体，而捕获剂是与中性抗生物素蛋白复合(如在图12中显示)的生物素(如在图10中显示)。

3. 获得假定含有一些数量的所述感兴趣靶的样品，其中所述感兴趣靶的量是期望测定的。

4. 制备由导电水溶液的堆积层组成的垂直电泳室，其中一些含有不带电荷的聚合物，这些层将被安排成从顶部到底部逐渐增加密度以阻止混合。最顶层将由待测量的样品组成("样品层")。在样品层下面的至少一层将含有连接到捕获剂的关联结合剂的聚合物("捕获层")。任选地，在捕获层下面的至少一层将含有相对高浓度的不带电荷的聚合物，其将用于阻止结合到聚合物的复合物的迁移率("堆积层")。

5. 混合并将所述第一结合剂、所述第二结合剂和所述感兴趣靶一起温育以允许形成三重复合物，其由连接到信号剂上的第一结合剂组

成，所述信号剂结合到感兴趣靶上，所述感兴趣靶结合到与捕获剂连接的第二结合剂。此步骤示于图11、图12和图14B及14C，作为本发明的一个优选实施方式，其中所述捕获剂是与中性抗生物素蛋白结合的生物素。

6. 施加电势穿过含有混合物的电泳室的垂直尺寸，从而使得所有所述分子迁移进入捕获层，其中可预期和期望的是，三重复合物将会结合与捕获剂的关联物连接的聚合物，因此显著地减少了这些所述三重复合物的迁移率。该步骤被示于图13和图14中，作为本发明的一种优选的实施方式。

7. 继续施加电势，由此实现与聚合物结合的低-迁移率三重复合物和所有其它分子之间的分离，因而在时间和空间上将感兴趣靶相关的信号剂在其它所有信号剂中定位。此步骤作为本发明的一种优选实施方式在图14D中示出。

8. 任选地，继续施加电势，由此使得所有所述分子迁移进入堆积层，其中三重复合物的迁移率进一步减小，导致含有这些三重复合物的带压缩，而实现与聚合物结合的低迁移率三重复合物和所有其它分子的进一步分离。此步骤作为本发明的一种优选实施方式在图14E中示出。

9. 测量在一种或者多种这些所述组的化合物中的信号剂，因此测定在所述样品中所述感兴趣靶的量。

实施例

[0060] 以下实施例意味着说明本发明的优选实施方式，并不是对所要求保护的题目的范围进行限制。技术人员会意识到可以利用本领域中已知的其它组合物、装置或步骤或所述步骤顺序的变化。

实施例 1. 运铁蛋白的检测

1. 将与人运铁蛋白特异结合的兔源单克隆抗体连接到荧光素，并且纯化连接的抗体。

2. 与人运铁蛋白特异结合的二级兔源单克隆抗体——其不与结合运铁蛋白的所述第一抗体进行竞争——被连接到生物素，并且纯化连接的第二抗体。

3. 制备垂直电泳室，其由含有基本上不带电荷的聚合物的导电水溶液的两个堆积层组成。这些层被排列为从顶部到底部逐渐增加密度以阻止混合。顶层由在反应缓冲液中结合生物素的葡聚糖组成（“捕获层”）。底层由在反应缓冲液中的线性聚丙烯酰胺组成（“堆积层”）。

4. 这两种连接的抗体和中性抗生物素蛋白与样品混合，混合浓度为1 nM的与荧光素连接的抗体、10 nM的与生物素连接的抗体和10 nM的中性抗生物素蛋白。将该混合物在37°C温育5分钟。

5. 样品/抗体混合物在步骤3中描述的电泳室捕获层的顶部上分层，并且施加100 V/cm的电势5分钟。这种设备的一种优选实施方式在图14中显示。

6. 反应室在步骤5期间用475 nm的光照亮，捕获层和堆积层界面附近的荧光信号用荧光检测器如具有500 nm高通滤光器的CCD照相机测量。发现等于信号剂的整个荧光信号的1%的信号。

7. 计算(1%×1 nM)显示运铁蛋白在样品混合物中以至少10 pM的浓度存在。

[0061] 另外，在上述方案和在上图绘制相对荧光信号和浓度的图以产生标准曲线之后，可以对含有已知量的运铁蛋白的样品进行分析。随后可以分析由含有未知量运铁蛋白的样品产生的荧光信号，并且将这种荧光信号与标准曲线进行比较。样品中运铁蛋白的量随后可以从标准曲线中推断出来。

[0062] 为了计算电泳迁移率，我们必须知道在IgG上的电荷。然而，由于分子的可变区，电荷范围可以是负到略微正。我们采用的电荷是-10。因此，根据等式5，电泳的迁移率是：

$$u = (1.6^{-19})(-10)(2 \times 10^7)(1 \times 10^7) = -3.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s V}$$

[0063] 在毛细管电泳中施加的电压可以高达500 V/cm。局限通常是热产生，其与施加的电压平方成比例。在这种情况下，通过施加100 V/cm，IgG分子以大约2 cm/min在负方向上移动(朝向正电极)。

实施例 2. 概念验证

[0064] 图15示出了来自概念-验证实验的数据。中性抗生物素蛋白的捕获说明了三层设计如何起作用来捕获期望的靶和将这些靶集中到

检测带中。制备这种测定用的标准电泳单元，其由三层组成：在底("堆积")层是在三醋酸缓冲液中的线性聚丙烯酰胺和7.5%的甘油；在中间("捕获")层是在三醋酸缓冲液中的生物素化葡聚糖和4%甘油；而在顶("样品")层是在三醋酸缓冲液中的FITC-标记的中性抗生物素蛋白。在对照运行中，捕获层没有生物素化的葡聚糖。

[0065] 样品层位于检测窗口的外边，在这些图中的右边。当电压施加到所述单元时，中性抗生物素蛋白迁移(到左边)进入捕获层，其中所述中性抗生物素蛋白结合生物素化聚合物，明显地降低其迁移率。当中性抗生物素-聚合物复合物到达堆积层时，线性聚丙烯酰胺的存在使复合的中性抗生物素蛋白的行进减缓到几乎停止，从而使带集中。对照运行中的游离中性抗生物素蛋白自由行进通过捕获层和堆积层。

实施例 3.IL-6 测定

[0066] IL-6被用作所述测量生物分子浓度的方法、装置和组合物应用的例子。如所说明的，EVEIA方法能够产生几乎以线性方式增加的信号，IL-6浓度的信号范围为几乎跨越2.5浓度对数，其代表了大约3pM到1000 pM的浓度。

[0067] 图16示出来自人的IL-6的全夹心测定的剂量反应数据。依照以下给出的方案产生图16中所示的数据。

装配装置和缓冲液系统

[0068] 通过垫片将3 mm内径× 60 mm石英管(电泳槽)装配在阴极(顶部)缓冲液储液槽和阳极(底部)缓冲液储液槽之间，所述垫片在缓冲液储液槽和石英管的顶部及底部之间提供开孔。在储液槽和石英管开孔之间的总体流体流动通过用垫片醋酸纤维素分子量截留膜将储液槽和管末端隔开阻止。每个储液槽装满了7.5 ml、pH 8.3的50 mM硼酸钠。在电泳槽里面的流体被设置为缓冲的蔗糖梯度：槽的下半部(阳极端)装满了另外含有7.5 % w/v 蔗糖的运行缓冲液并被称为堆积层；体积为30 μ l的另外含有5.0 % w/v蔗糖和500 nM结合线性聚丙烯酰胺的生物素(高分子量LPA-B)的运行缓冲液在堆积层上分层并被称为捕获层。另外含有2.0%蔗糖的运行缓冲液在捕获层上分层，其充满电

泳槽上半部(阴极端)。运行缓冲液由150 mM甜菜碱、0.02 % NP-40、0.01%叠氮钠和 24 mM硼酸钠组成, pH为7.8。

测定样品

[0069] IL-6剂量反应测定测量的信号是在50 μ l测定样品体积中用浓度范围为1 pM和1 nM之间(从1 nM IL-6储备液半对数稀释)的IL-6获得, 其包括“没有IL-6”对照。每个IL-6剂量结合测定样品被装配在Eppendorf®管中。将5 μ l的10 nM荧光素-标记的抗-IL-6单克隆抗体MAB206 (R&D Systems, Minneapolis, MN)加入到5 μ l适当的IL-6稀释中。在室温温育10分钟后, 加入5 μ l的10 nM生物素化的抗-IL-6多克隆抗体BAF206 (R&D Systems)。在室温温育另外的10分钟后, 将7.5 μ l的500 nM中性抗生物素蛋白(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)和另外含有4.0% w/v蔗糖的27.5 μ l运行缓冲液加入, 以产生50 μ l的最终测定样品体积。在每一50 μ l测定样品体积中, 每种抗体和中性抗生物素蛋白的浓度分别是1 nM和75 nM。在图17中用图显示了样品装配和EVEIA方法。

示例性方法

[0070] 通过将抗原和生物素化捕获抗体、荧光标记的检测抗体和中性抗生物素蛋白结合来制备测定样品。该样品被慢慢地注入到垂直电泳槽中(例如, 在顶部阴极和底部阳极缓冲液储液槽之间装配的3 mm内径 \times 60 mm石英管), 所述垂直电泳槽充满了由以下三个密度层组成的缓冲蔗糖浓度梯度: 由具有2%蔗糖的运行缓冲液组成的顶层, 由具有5%蔗糖和生物素化线性聚丙烯酰胺捕获聚合物(LPA-B)的运行缓冲液组成的小的中间层(30 μ l)以及由具有7.5%蔗糖的运行缓冲液组成的底层。当施加电压(300-900 V)穿过槽时, 阴离子测定样品成分向管底部迁移。当夹心复合物到达中间层时, 由于中性抗生物素蛋白与捕获抗体结合, 其与高分子量LPA-B结合, 并由于复合物的极低迁移率和蔗糖梯度基本固定在该中间层。包括未结合检测抗体的未结合测定样品成分电泳迁移到电泳槽底部。实时记录荧光强度数据并在整个运行时间期间进行保存。对于这个实施例, 激发光源是478 nm激光, 并用滤光的(用于荧光素发射光的适当带通滤波器 (bandpass filter)) CCD照相机检测。

EVEIA分隔和检测

[0071] 40 μ l 体积的50 μ l 测定样品用汉密尔顿氏注射器 (Hamilton syringe) 缓慢注射入电泳槽的顶部 (阴极端)。用设定为2 mA和650 V 的限定值来开始电泳。在整个运行期间用478 nm的激光照射所述槽。在12分钟期间以30秒的间隔记录7秒曝光(CCD照相机) (总共24个曝光产生了24 个"荧光强度对槽位置" 图)。每个测定样品的荧光强度数据点被认为是捕获的夹心复合物峰面积(即, 在捕获层内的信号峰面积)。从峰面积值中减去得自“无IL-6”对照的背景值。此数据的对数-对数图在图16中显示。剂量反应在至少2.5对数期间几乎是线性的。

[0072] 虽然以上的实例描述了IL-6的EVEIA技术的应用, 但是技术人员将会意识到所描述的方法、组合物和装置可以容易地应用于检测和/或测定任何选择的分子的浓度, 所述选择的分子的抗体是商业可得的或者容易制备的。在要求保护的方法的实践中应用的、针对各种靶分子的抗体生成杂交瘤的商业来源, 在本领域内是熟知的(例如 American Type Culture Collection, Manassas, VA)。针对实际上任何感兴趣靶的单克隆或者多克隆抗体或者其片段的制备技术也是本领域众所周知的, 并且可以容易被技术人员使用, 而不需要过多的实验(参见, 例如, Harlow和Lane, 1988, 在此通过引用并入其全部)。

引用的参考文献

[0073] Drolet DW, Moon-McDermott L, and Romig TS. An Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay. *Nature Biotechnology*, Vol. 14, No. 8, 1996 (pp. 1021-1025).

[0074] Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, and Yarus M. Diversity of Oligonucleotide Functions. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 64, 1995 (pp 763-797).

[0075] Gosling JP. A Decade of Development in Immunoassay Methodology. *Clinical Chemistry*, Vol. 36, No. 8, 1990 (pp 1408-1427).

[0076] Harlow, E. and Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

[0077] Oda RP and Landers JP. Introduction to Capillary Electrophoresis, in Handbook of Capillary Electrophoresis. Landers JP, editor. CRC Press, 1997 (pp. 1-48).

[0078] Ronkainen-Matsuno NJ, Thomas JH, Halsall B, Heineman WR. Electrochemical ImmunoAssay Moving into the Fast Lane. Trends in Analytical Chemistry. Vol 21, No. 4, 2002 (pp. 213-225).

[0079] Schultz NM, Tao L, Rose DJ, and Kennedy RT. Immunoassays and Enzyme Assays Using Capillary Electrophoresis, in Handbook of Capillary Electrophoresis. Landers JP, editor. CRC Press, 1997 (pp. 611-638).

[0080] Shahdeo K and Karnes HT. Combining Immunoassays with Chromatographic and Electrophoretic Separation Techniques – a Review. Mikrochimica Acta ,Vol. 129, 1998 (pp. 19-27).

图1

a = 离心加速度[cm/s²]

e = 电子或者质子电荷单元 1.6×10^{-19} C (库伦)

f = 施加的力[g cm/s²]

f_f = 摩擦力 [g cm/s²]

r = 分子流体动力学半径[cm]

m = 迁移率[s/g]

M = 分子量 [g/mole]

N = 阿伏加德罗数 6.023×10^{23} 摩尔

s = 斯维德贝格系数[10^{-13} s]

u = 电泳迁移率 [cm²/s-V]

v = 颗粒穿过流体的速度[cm/s]

z = 分子上净电荷

η = 流体粘度 [g/cm-s]

ρ = 分子密度 [g/cm³]

ρ_f = 流体密度 [g/cm³]

ψ = 电场 [volt/cm]

图2

$$f_f = 6\pi r \eta v \quad (\text{等式1})$$

图3A

$$m = v/f_f = 1/(6\pi r \eta) \quad (\text{等式2a})$$

图3B

$$r = \sqrt[3]{\frac{3V}{4\pi}} = \sqrt[3]{\frac{3M}{4\pi N\rho}} \quad (\text{等式2b})$$

图3C

$$m = \sqrt[3]{\frac{N\rho}{162\pi^2\eta^3M}} \quad (\text{等式2c})$$

图4

$$v = fm \quad (\text{等式3})$$

图5

$$v = zem\psi \quad . = u\psi \quad (\text{等式4})$$

图6

$$u = ezm \times 10^7 \quad (\text{等式5})$$

图7A

$$s = v/a \cdot 10^{13} = \frac{(\rho - \rho_f) M}{\rho_f N} a m l a \cdot 10^{13} \quad (\text{等式6a})$$

图7B

$$m = \frac{\rho N s}{(\rho - \rho_f) M} \times 10^{-13} \quad (\text{等式6b})$$

图8A

$$m = \sqrt[3]{\frac{(6 \times 10^{23})(1.2)}{162\pi^2(0.01)^3(1.5 \times 10^5)}} = 2.1 \times 10^7 \text{ s/g} \quad (\text{等式7a})$$

图8B

$$m = \frac{(1.2)(6 \times 10^{23})(7 \times 10^{-13})}{(1.2 - 1.0)(1.5 \times 10^5)} = 1.7 \times 10^7 \text{ s/g} \quad (\text{等式7b})$$

图9

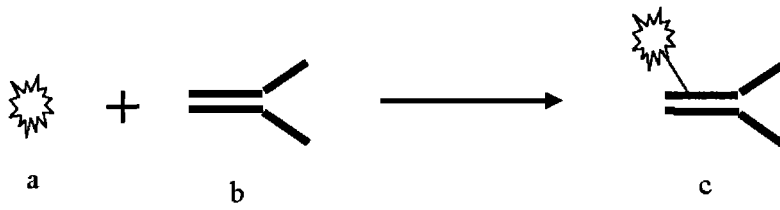


图10

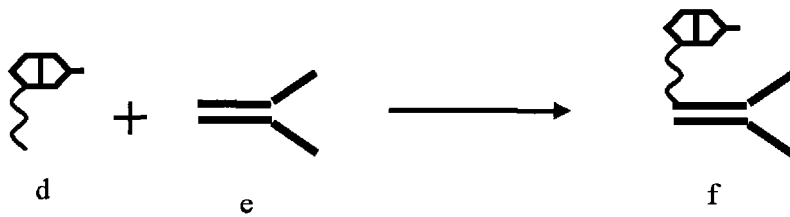


图11

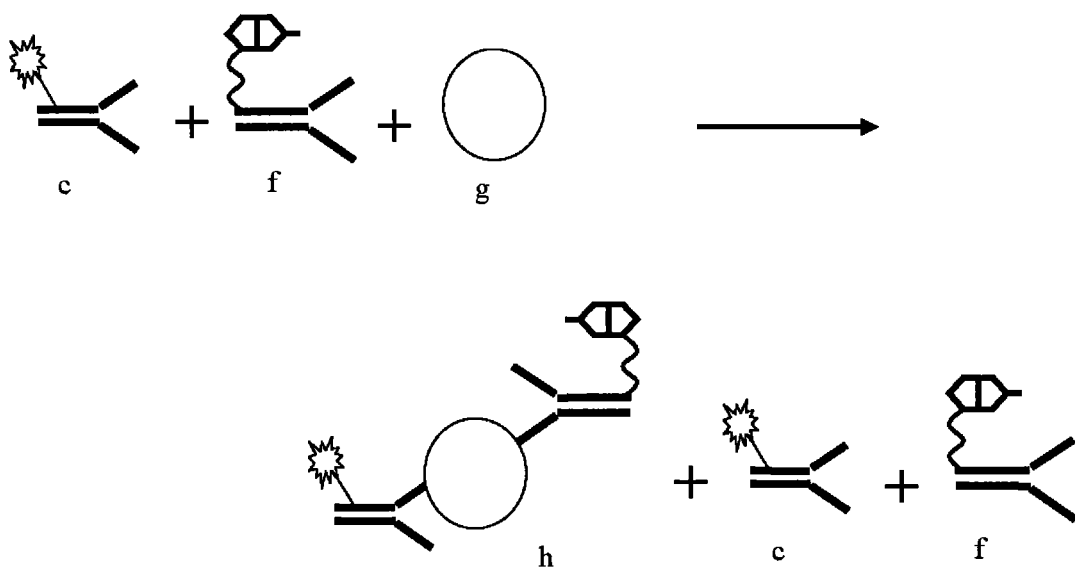


图12

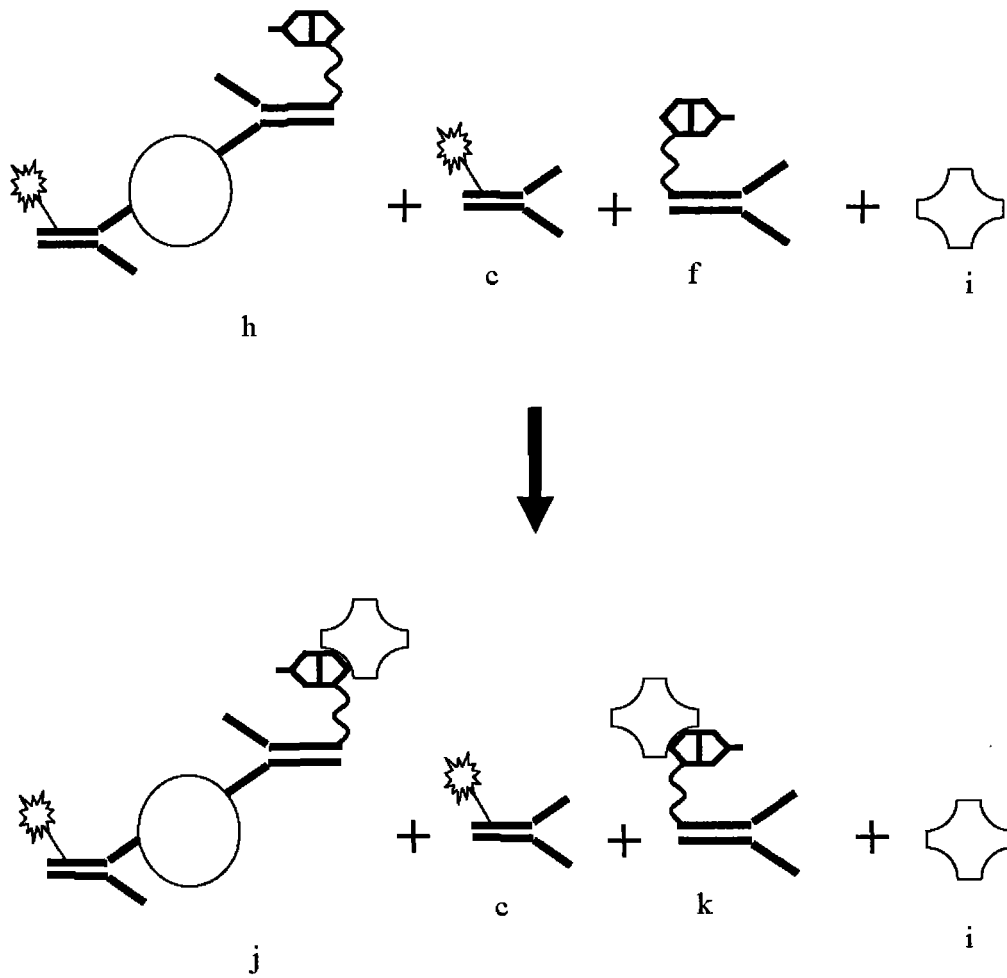


图13

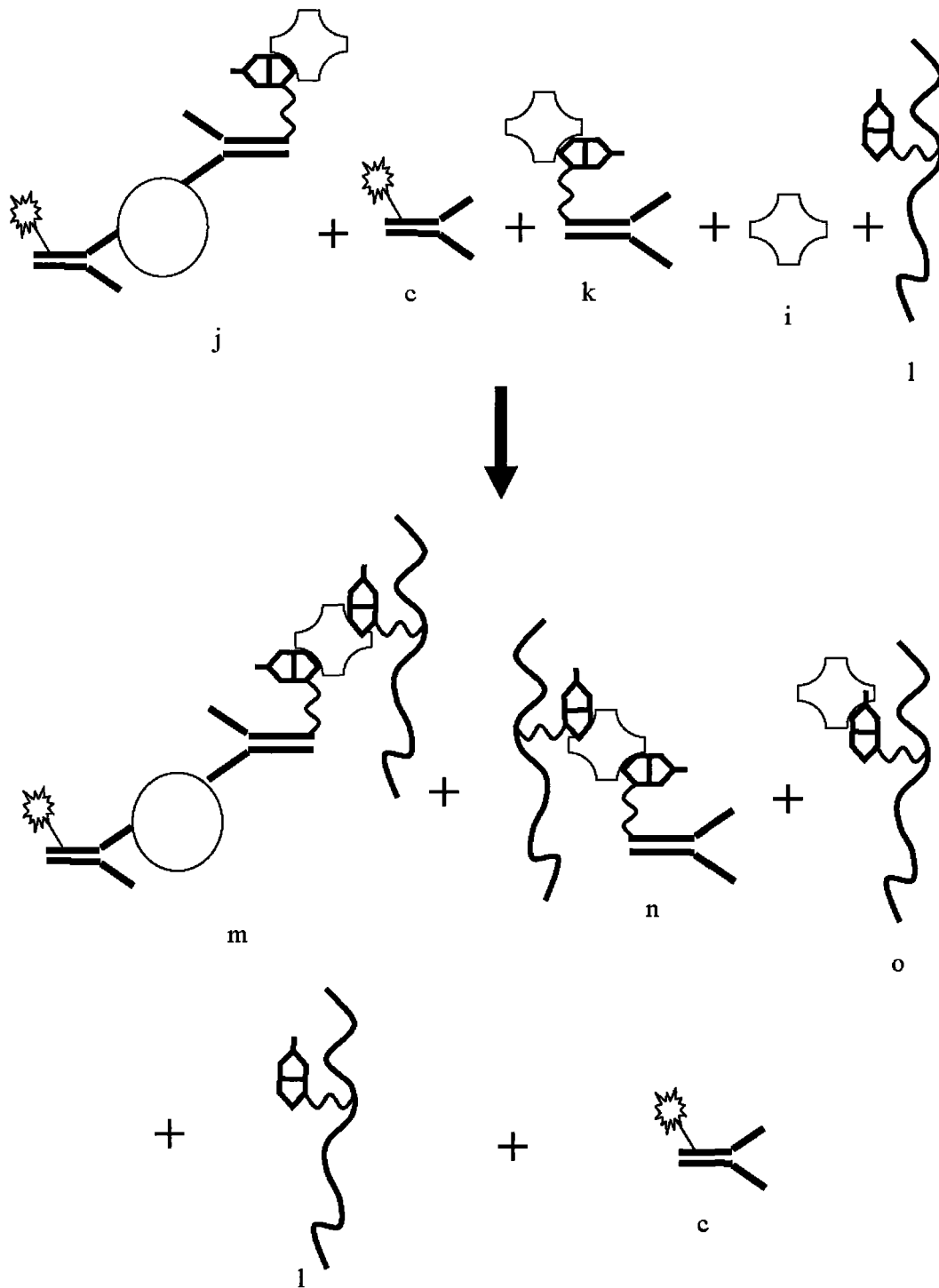


图14A

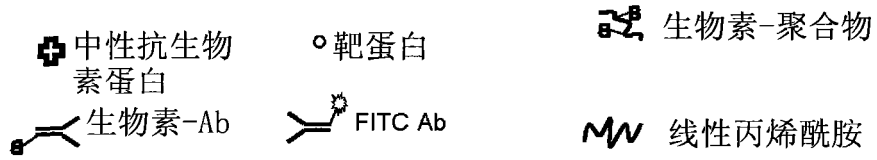


图14B

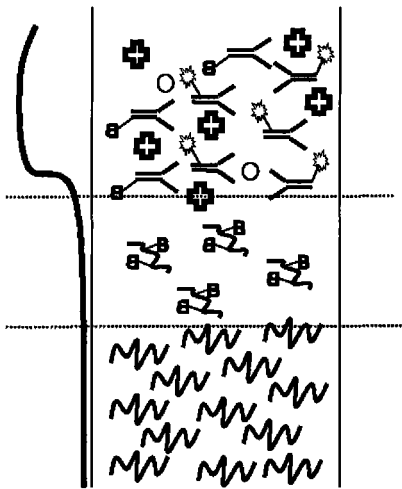


图14C

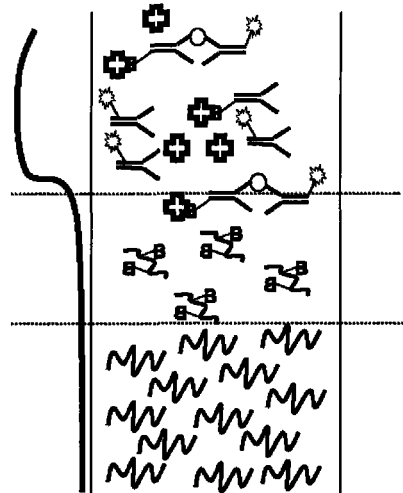


图14D

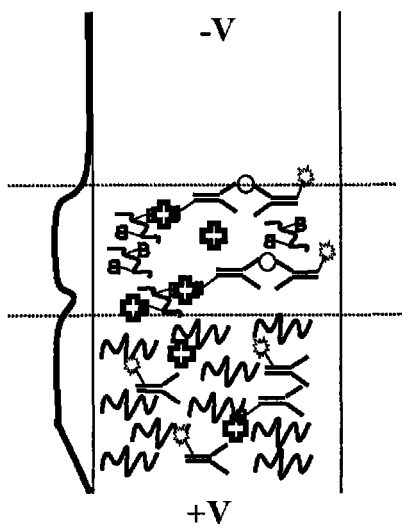


图14E

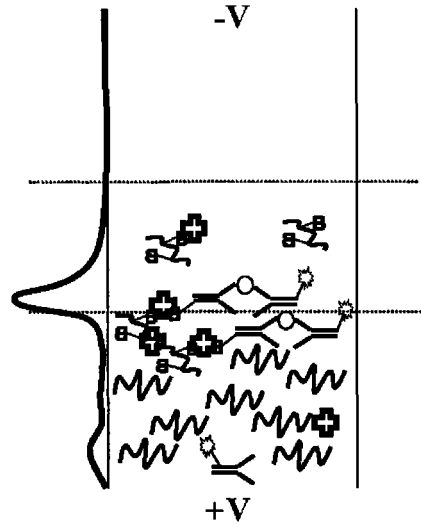


图15

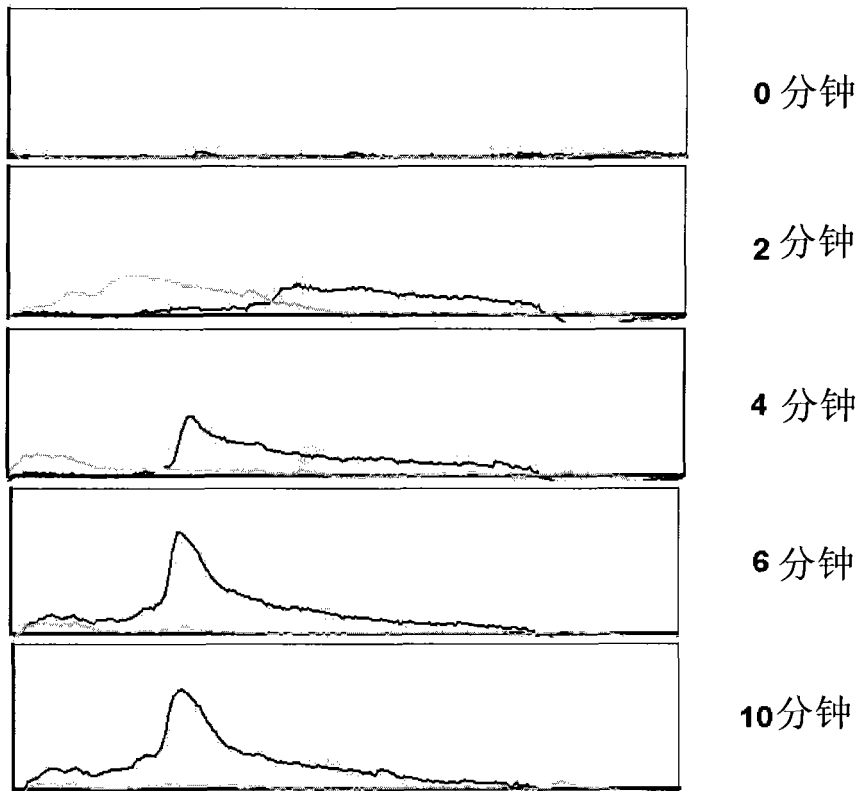
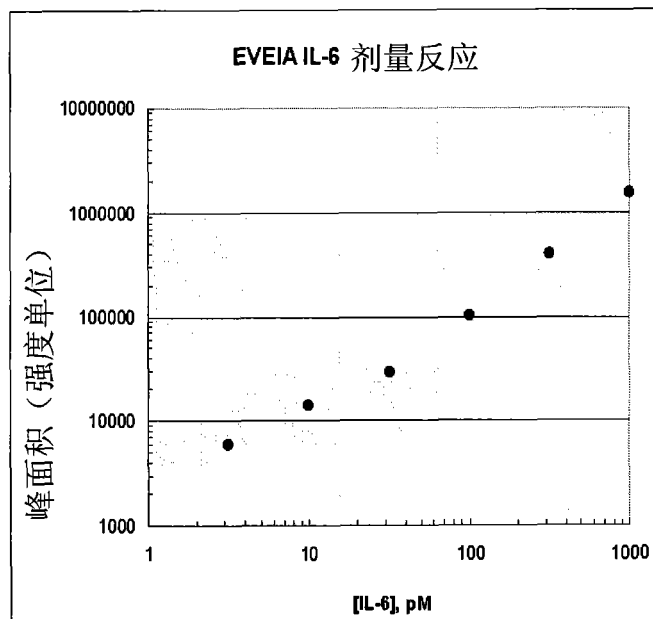


图16



[IL-6], pM	峰面积	峰面积 (减去背景)	曝光时间 , 毫秒
0	24068	0	7000
1	21785	-2283	7000
3.17	29971	5903	7000
10	37966	13898	7000
31.7	53356	29288	7000
100.1	126509	102441	7000
316.5	419017	394949	7000
1000	1543735	1519667	7000

1 nM 抗 -IL6 生物素 pAb
1 nM 抗 -IL6 荧光素 -mAb

专利名称(译)	使用电泳的快速均相免疫测定		
公开(公告)号	CN101680865A	公开(公告)日	2010-03-24
申请号	CN200880011244.2	申请日	2008-01-31
[标]发明人	SP蒂雷尔 B范特 赫尔		
发明人	S·P·蒂雷尔 B·范特-赫尔 B·范特 - 赫尔		
IPC分类号	G01N33/00 G01N33/53 B01D57/02 G01N33/566		
CPC分类号	G01N27/447 G01N33/561 B01D57/02		
优先权	60/899831 2007-02-07 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测和/或测定靶分子浓度的方法、组合物和装置。在优选的实施方式中，所述方法包括：允许靶分子形成具有结合到检测分子的第一结合剂和结合到捕获分子的第二结合剂的复合物，允许所述复合物进一步与能够结合到所述捕获剂、基本上不带有电荷的聚合物结合，并进行垂直梯度电泳以与未结合靶、第一和第二结合剂以及聚合物分离所述复合物。完整的复合物通过电泳聚集在堆积层并且所述检测分子被检测和/或定量。因为复合物含有高质荷比，所以它在堆积层变为基本不动，而未结合成分迁移穿过堆积层并与复合物分离。这提供了非常快速和灵敏的测定，所述测定可以在短时间内检测非常低浓度的靶分子。

- a = 离心加速度[cm/s²]
- e = 电子或者质子电荷单元[1.6×10^{-19} C (库伦)]
- f = 施加的力[g cm/s²]
- f_f = 摩擦力 [g cm/s²]
- r = 分子流体动力学半径[cm]
- m = 迁移率[s/g]
- M = 分子量 [g/mole]
- N = 阿伏加德罗数 6.023×10^{23} /摩尔
- s = 斯维德贝格系数[10^{-13} s]
- u = 电泳迁移率 [cm²/s-V]
- v = 颗粒穿过流体的速度[cm/s]
- z = 分子上净电荷
- η = 流体粘度 [g/cm-s]
- ρ = 分子密度 [g/cm³]
- ρ_f = 流体密度 [g/cm³]
- ψ = 电场 [volt/cm]