



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104364652 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201380030556. 9

代理人 王达佐 洪欣

(22) 申请日 2013. 04. 19

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/53 (2006. 01)

61/636, 066 2012. 04. 20 US

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/564 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2013/000388 2013. 04. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/155617 EN 2013. 10. 24

(71) 申请人 ZBX 公司

地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 史沁卫 徐静

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

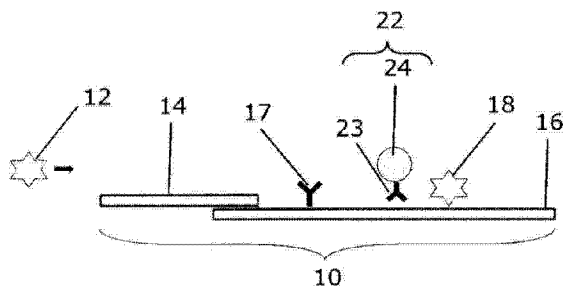
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

用于检测样品中的分析物的固相载体和方法

(57) 摘要

用于检测样品中处于预定阈值或高于预定阈值的分析物的存在的固相载体,其包含:在所述固相载体中的竞争性分析物,其中所述竞争性分析物与结合对的第一元件偶联;所述固相载体中处于所述竞争性分析物下游的经标记的缀合物,其中所述分析物同所述竞争性分析物竞争结合所述缀合物;以及固定于所述固相载体中的、处于所述缀合物下游的捕获试剂,其中所述捕获试剂包含结合对的第二元件;其中选择固相载体中结合对的第一元件和第二元件彼此间的亲和力以及缀合物与捕获试剂之间的距离和/或缀合物与竞争性分析物之间的距离,以提高固相载体对分析物的阈值。



1. 用于检测样品中处于预定阈值或高于预定阈值的分析物的存在的固相载体,所述固相载体包含:

- 所述固相载体中的竞争性分析物,其中所述竞争性分析物与结合对的第一元件偶联;

- 所述固相载体中的、处于所述竞争性分析物下游的经标记的缀合物,其中所述分析物同所述竞争性分析物竞争结合所述缀合物;以及

- 固定于所述固相载体中的、处于所述缀合物下游的捕获试剂,其中所述捕获试剂包含所述结合对的第二元件;

其中选择所述固相载体中所述结合对的所述第一元件和所述第二元件彼此间的亲和力,以及所述缀合物与所述捕获试剂之间的距离和/或所述缀合物与所述竞争性分析物之间的距离,以提高所述固相载体对所述分析物的阈值。

2. 如权利要求 1 所述的固相载体,其中所述分析物是免疫球蛋白。

3. 如权利要求 2 所述的固相载体,其中所述免疫球蛋白是 IgG。

4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的固相载体,其中所述缀合物是对所述分析物具有特异性的抗体。

5. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的固相载体,其中所述结合对的所述第一元件是生物素,并且所述结合对的所述第二元件是抗生物素蛋白链菌素或抗生物素蛋白。

6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的固相载体,其中所述样品是选自全血、血清、血浆、尿、乳和初乳的生物样品。

7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的固相载体,其中所述预定阈值为至少约 1mg/ml、3mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、40mg/ml 或 50mg/ml。

8. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的固相载体,其还包含所述竞争性分析物上游的封闭捕获试剂。

9. 用于检测样品中处于预定阈值或高于预定阈值的分析物的存在的固相载体,所述固相载体包含:

- 固定于所述固相载体中的封闭捕获试剂,其中所述封闭捕获试剂能与所述样品中的所述分析物结合,并从而降低可移动的所述分析物的浓度;

- 所述固相载体中的、处于所述封闭捕获试剂下游的经标记的缀合物;以及

- 固定于所述固相载体中的、处于所述缀合物下游的捕获试剂,其中所述捕获试剂是竞争性分析物,并且其中所述分析物与所述竞争性分析物竞争结合所述缀合物;

其中选择所述固相载体中所述缀合物与所述捕获试剂之间的距离,以提高所述固相载体对所述分析物的阈值。

10. 用于检测样品中分析物的一步式方法,所述方法包括将所述样品施加至权利要求 1 至 9 中任一项所述的固相载体,其中阳性信号表示所述分析物不存在,或者以低于所述预定阈值的量存在。

11. 用于确定新生哺乳动物是否需要免疫转移的一步式方法,所述方法包括将来自所述新生哺乳动物或其母体的生物样品施加至固相载体,所述固相载体包含:

- 与结合对的第一元件偶联的哺乳动物 IgG;

- 位于所述哺乳动物 IgG 下游的、经标记的抗哺乳动物 IgG 抗体;以及

- 位于所述抗哺乳动物 IgG 下游的、所述结合对的第二元件；

其中选择所述结合对的所述第一元件和所述第二元件彼此间的亲和力,以及所述抗哺乳动物 IgG 抗体与所述结合对的所述第二元件之间的距离和 / 或所述抗哺乳动物 IgG 与所述哺乳动物 IgG 之间的距离,以使得当所述哺乳动物具有处于或低于 mg/ml 范围内的预定阈值时产生阳性信号,指示所述哺乳动物需要免疫转移。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述结合对的所述第一元件是生物素,并且所述结合对的所述第二元件是抗生物素蛋白链菌素或抗生物素蛋白。

13. 如权利要求 11 或 12 所述的方法,其中所述样品来源于所述新生哺乳动物,并且选自全血、血清、血浆和尿。

14. 如权利要求 11 或 12 所述的方法,其中所述样品来源于所述新生哺乳动物的母体,并且选自乳和初乳。

15. 如权利要求 11 至 14 中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物是狗、猫、牛、马、无峰驼、羊驼、绵羊、猪、山羊或兔。

16. 如权利要求 11 至 15 中任一项所述的方法,其中所述预定阈值为约 10mg/ml。

用于检测样品中的分析物的固相载体和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分析物检测。更具体地,本发明涉及用于检测样品中处于预定阈值或高于预定阈值的分析物的固相载体和方法。

[0002] 发明背景

[0003] 一般而言,用于检测分析物的固相载体和方法具有提高灵敏度的目标,因为大多数分析物在样品中以非常低的水平存在,并且检测的临床相关阈值通常在 ng/ml 至低 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围。然而,某些分析物在样品中以高得多的量存在,并且临床相关阈值太高而不能使用常规方法直接检测。相反,检测这样的高浓度分析物的一般方法包括由最终使用者稀释样品。此外,许多常规方法不适于由最终使用者直接使用,并且相反样品必须被送至实验室用于测定最终结果。当分析物检测必须快速进行时,这种延迟是有问题的。

[0004] 例如,新生小牛仅可通过从初乳中摄取免疫球蛋白 (Ig) 来获得对疾病的被动免疫。该初乳 Ig 的传递仅可能在小牛生命的约第一天内发生。在产后的约 12 小时后,以逐渐升高的速率自发发生小牛肠通透性的终止。Ig 传递的量变化较大,并且已认识到,多至约 40% 的小牛未获得足够的被动免疫。在那些小牛中所得到的低 Ig 浓度与高发病率和死亡率有关。然而,无论它们是否需要免疫转移,小牛中存在的 Ig 的量都非常高,处于 mg/ml 范围,并因此超出了常规方法直接检测的范围。

[0005] 因此,需要减轻和 / 或克服现有技术的至少一种缺陷。

[0006] 发明概述

[0007] 在一些方面,本发明涉及用于检测样品中处于预定阈值或高于预定阈值的分析物的存在的固相载体和一步式方法。本文描述的固相载体和方法可用于检测阈值处于 mg/ml 范围的样品中的分析物。因此,这样的固相载体和方法可用于鉴定在出生后短时间内需要免疫系统传递的新生小牛或其他哺乳动物。

[0008] 根据一个方面,提供了用于检测样品中处于预定阈值或高于预定阈值的分析物的存在的固相载体,所述固相载体包含:

[0009] - 在所述固相载体中的竞争性分析物,其中所述竞争性分析物与结合对的第一元件偶联;

[0010] - 所述固相载体中处于所述竞争性分析物下游的经标记的缀合物,其中所述分析物同所述竞争性分析物竞争结合所述缀合物;以及

[0011] - 固定于所述固相载体中的、处于所述缀合物下游的捕获试剂,其中所述捕获试剂包含所述结合对的第二元件;

[0012] 其中选择所述固相载体中所述结合对的所述第一元件和所述第二元件彼此间的亲和力,以及所述缀合物与所述捕获试剂之间的距离,和 / 或所述缀合物与所述竞争性分析物之间的距离,以提高所述固相载体对所述分析物的阈值。

[0013] 在一个方面,如权利要求 1 所述的固相载体,其中所述分析物是免疫球蛋白,例如 IgG。

[0014] 在一个方面,所述缀合物是对所述分析物具有特异性的抗体。

[0015] 在一个方面,所述结合对的所述第一元件是生物素,并且所述结合对的所述第二元件是抗生物素蛋白链菌素或抗生物素蛋白。

[0016] 在一个方面,所述样品是选自全血、血清、血浆、尿、乳和初乳的生物样品。

[0017] 在一个方面,所述预定阈值为至少约 1mg/ml、3mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、40mg/ml 或 50mg/ml。

[0018] 在一个方面,所述固相载体还包含所述竞争性分析物上游的封闭捕获试剂。

[0019] 根据另一个方面,提供了用于检测样品中处于预定阈值或高于预定阈值的分析物的存在的固相载体,所述固相载体包含:

[0020] - 固定于所述固相载体中的封闭捕获试剂,其中所述封闭捕获试剂与所述样品中的所述分析物结合,并从而降低可移动的所述分析物的浓度;

[0021] - 所述固相载体中的、处于所述封闭捕获试剂下游的经标记的缀合物;以及

[0022] - 固定于所述固相载体中的、处于所述缀合物下游的捕获试剂,其中所述捕获试剂是竞争性分析物,并且其中所述分析物同所述竞争性分析物竞争结合所述缀合物;

[0023] 其中选择所述固相载体中所述缀合物与所述捕获试剂之间的距离,以提高所述固相载体对所述分析物的阈值。

[0024] 根据另一个方面,提供了用于检测样品中分析物的一步式方法,所述方法包括将所述样品施加至本文所述的固相载体,其中阳性信号表示所述分析物不存在,或者以低于预定阈值的量存在。

[0025] 根据另一个方面,提供了用于确定新生哺乳动物是否需要免疫转移的一步式方法,所述方法包括将来自所述新生哺乳动物或其母体的生物样品施加至固相载体,所述固相载体包含:

[0026] - 与结合对的第一元件偶联的哺乳动物 IgG;

[0027] - 所述哺乳动物 IgG 下游的经标记的抗哺乳动物 IgG 抗体;以及

[0028] - 所述抗哺乳动物 IgG 下游的所述结合对的第二元件;

[0029] 其中选择所述结合对的所述第一元件和所述第二元件彼此间的亲和力,以及所述抗哺乳动物 IgG 抗体与所述结合对的所述第二元件之间的距离,和/或所述抗哺乳动物 IgG 与所述哺乳动物 IgG 之间的距离,以使得当所述哺乳动物具有处于或低于 mg/ml 范围内的预定阈值时产生阳性信号,指示所述哺乳动物需要免疫转移。

[0030] 在一个方面,所述结合对的所述第一元件是生物素,并且所述结合对的所述第二元件是抗生物素蛋白链菌素或抗生物素蛋白。

[0031] 在一个方面,所述样品来源于所述新生哺乳动物,并且选自全血、血清、血浆和尿。

[0032] 在一个方面,所述样品来源于所述新生哺乳动物的母体,并且选自乳和初乳。

[0033] 在一个方面,所述哺乳动物是牛、马、羊驼或无峰驼。

[0034] 在一个方面,所述预定阈值为约 10mg/ml。

[0035] 本发明的其他特征和优点将从下文的详细描述中变得显而易见。但是,应理解,详述和具体实例在表示本发明实施方案的同时,仅以解释说明的方式给出,因为对本领域技术人员来说,本发明精神和范围内的多种改变和修饰都将从所述详述中变得显而易见。

附图说明

[0036] 本发明将通过下文的描述以及参考附图而得到进一步的理解,其中:

[0037] 图 1 示出了如本文描述的固相载体第一方面的示意图;并且

[0038] 图 2 示出了如本文描述的固相载体第二方面的示意图。

[0039] 发明详述

[0040] 常规的固相载体测定已被进行了优化以提高其灵敏度,从而降低样品中存在的分析物的检测阈值。这是因为大多数分析物的临床相关阈值水平十分低,例如在 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内或者更低。因此,这样的常规固相载体测定在用于鉴定样品中以较高量存在的分析物的阈值水平的一步式方法中不是直接可用的,其中这样的分析物的临床相关阈值水平要高得多,例如处于 mg/ml 的范围内。

[0041] 当使用常规固相载体测定来检测以较高量存在于样品中的分析物时,在将样品施加至固相载体之前通常需要进行样品稀释。“稀释”是指在施用于固相载体测定之前用合适的稀释剂稀释例如血液或尿样品,并且不原样使用直接来自身体的样品。因此,由于需要进行样品稀释,这样的测量不视为“一步式”测定。样品稀释可导致若干问题,至少包括由于对样品的不适当稀释而导致的样品污染和测试结果不准确。此外,样品的稀释需要最终使用者进行计算和测量,这也可导致测试结果不准确。

[0042] 特别地,常规固相载体测定的高灵敏度已经成为快速鉴定需要免疫转移的新生小牛方面的问题。这样的小牛必需尽快得到鉴定,因为免疫转移可有效进行的时间窗十分有限。此外,新生小牛的血液中一般存在 mg/ml 范围的牛 IgG,其中将小牛分成需要免疫转移的小牛(IgG 低于 10mg/ml 的小牛)和不需要免疫转移的小牛(IgG 为 10mg/ml 或更高的小牛)的阈值为约 10mg/ml IgG。过去难以找到可“在牛旁边”以一步式方式进行的而无需进行样品稀释的测试来提供快速和准确的测试结果,从而确定哪些小牛低于该测试阈值并因此需要免疫转移。

[0043] 因此,本发明涉及固相载体用于检测样品中处于预定阈值或高于预定阈值的分析物的存在的固相载体和一步式方法。一般而言,该阈值处于 mg/ml 范围内。因为本文描述的固相载体已经被修饰成通过降低固相载体对分析物的灵敏度将阈值或“截断”检测水平增加至 mg/ml 范围,通常不需要为了达到可用的结果而进行样品稀释。因此,在一个方面,本发明明确地排除了在将样品施加至本文描述的固相载体前进行样品稀释的步骤。

[0044] 所述固相载体和方法的第一方面在图 1 中示出。固相载体 10 用于检测分析物 12。在一个方面,固相载体 10 是包含分离膜 14 和分析膜 16 的膜阵列。分析膜 16 包含固定的封闭捕获试剂 17,其将结合并捕获样品中一定量的分析物 12。封闭捕获试剂 17 的下游是缀合物 22,其包含与可检测标记 24 缀合的分析物结合分子 23。缀合物 22 的下游是固定的竞争性分析物 18。竞争性分析物 18 与分析物 12 相当或足够相当,从而使得分析物 12 同竞争性分析物 18 竞争结合缀合物 22。

[0045] 在使用中,在一端将样品施加至固相载体 10。在一个方面,固相载体是包含分离膜 14 和分析膜 16 的膜阵列,并且样品被施加于分离膜 14。样品将横向地沿着固相载体 10 通过毛细管作用从分离膜 14 流至分析膜 16。样品将首先遇到封闭捕获试剂 17,其将捕获并固定样品中预定量的分析物 12,有效降低将进一步流至固相载体下游的分析物 12 的量。样品将继续沿着固相载体 10 移动,直至其遇到缀合物 22 和竞争性分析物 18。样品中的任何剩余分析物 12 都将同竞争性分析物 18 竞争结合缀合物 22,基于样品中分析物 12 的量形

成分析物 12 和缀合物 22 的复合物和 / 或竞争性分析物 18 和缀合物 22 的复合物。

[0046] 如果样品中不存在分析物 12 或以低于预定阈值的量存在分析物 12, 则分析物 12 将不会以胜过竞争性分析物 18 的足够的量存在来与缀合物 22 结合。在这种情况下, 缀合物 22 将与足够量的竞争性分析物 18 结合, 从而产生阳性信号, 指示样品中不存在分析物 12 或者样品中以低于预定阈值的量存在分析物。

[0047] 在另一方面, 如果样品中存在等于或大于预定阈值的量的分析物 12, 则分析物 12 将以胜过竞争性分析物 18 的足够的量存在来与缀合物 22 结合。在这种情况下, 缀合物 22 将不会与足够量的竞争性分析物 18 结合以产生阳性信号, 指示样品中存在等于或大于预定阈值的量的分析物 12。

[0048] 所述固相载体和方法的第二方面在图 2 中示出。固相载体 10 用于检测分析物 12。在一个方面, 固相载体 10 是包含分离膜 14 和分析膜 16 的膜阵列。分析膜 16 包含与结合对的第一元件 20 偶联的竞争性分析物 18。竞争性分析物 18 的下游是缀合物 22, 其包含与可检测标记 24 缀合的分析物结合分子 23。竞争性分析物 18 与分析物 12 相当或足够相当, 从而使得分析物 12 同竞争性分析物 18 竞争结合与缀合物 22。

[0049] 缀合物 22 下游是结合对的第二元件 26, 其也称为捕获试剂, 因为它将结合并捕获结合对的第一元件 20。应理解, 本文描述的固相载体 10 利用组合的三明治 / 竞争性测定模式, 其中分析物 12 同竞争性分析物 18 竞争结合缀合物 22。此外, 如将要描述的, 如果分析物 12 以低于预定阈值的量存在, 则结合对的第二元件 26 和缀合物 22 将与竞争性分析物 18 和结合对的第一元件 20 形成“三明治”。

[0050] 固相载体 10 被设计成具有用于检测分析物 12 的预定阈值, 即, 当分析物 12 在样品中以低于该预定阈值的水平存在时, 固相载体 10 将通过可检测标记 24 产生阳性结果。虽然调节固相载体阈值的一般方法包括改变试剂浓度、膜孔径、抗体亲和力等, 但是现在已发现还可基于至少两种额外的新因素进一步调节预定阈值。

[0051] 首先, 可基于结合对元件彼此间的亲和力来选择结合对的第一元件 20 和第二元件 26。通过选择彼此间具有高亲和力的结合对, 可提高预定阈值。例如, 生物素与抗生物素蛋白链菌素彼此间具有特别强的亲和力。因此, 使用生物素作为结合对的第一元件 20 并且使用抗生物素蛋白链菌素作为结合对的第二元件 26 将得到具有比选择具有更低亲和力的结合对时得到的阈值更高的预定阈值的固相载体 10。

[0052] 其次, 可改变竞争性分析物 18 与缀合物 22 之间的距离以及缀合物 22 与结合对的第二元件 26 之间的距离, 以调节固相载体 10 的预定阈值。当将竞争性分析物 18 与缀合物 22 布置得彼此更接近时, 竞争性分析物 18 到达缀合物 22 之前须移动的距离减小。竞争性分析物 18 在到达缀合物 22 之前须移动的距离的该减小使得竞争性分析物 18 在固相载体中的扩散度变得更小, 从而有效地将到达缀合物 22 并与之反应的竞争性分析物 18 的浓度保持在较高水平。此外, 当将缀合物 22 与结合对的第二元件 26 布置得彼此更近时, 在与缀合物 22 的反应过程中, 由于反应时间减少而使竞争性分析物 18 的扩散进一步降低。因为存在于样品中的分析物 12 的浓度一直恒定, 并且不受扩散的影响, 这些变量一起导致固相载体 10 的预定阈值的相比较的提高。

[0053] 应理解, 如图 2 所示的固相载体和方法的该第二方面还可包含竞争性分析物 18 上游的封闭捕获试剂 17。

[0054] 在使用中,在一端将样品施加至固相载体 10。在一个方面,固相载体是包含分离膜 14 和分析膜 16 的膜阵列,并且样品被施加于分离膜 14。样品将横向地沿着固相载体 10 通过毛细管作用从分离膜 14 流至分析膜 16。样品首先遇到与结合对的第一元件 20 结合的竞争性分析物 18。然后,竞争性分析物 18 将松动,并将沿着固相载体 10 与样品一起移动,直至样品遇到包含与可检测标记 24 结合的分析物结合分子 23 的缀合物 22。样品中的任何分析物 12 都将同竞争性分析物 18 竞争结合缀合物 22,基于样品中分析物 12 的量形成分析物 12 和缀合物 22 的复合物和 / 或竞争性分析物 18 和缀合物 22 的复合物。样品与复合物将继续沿着分析膜流动,直至他们遇到结合对的第二元件 26。

[0055] 如果样品中不存在分析物 12 或以低于预定阈值的量存在分析物 12,则分析物 12 将不会以胜过竞争性分析物 18 的足够的量存在来与缀合物 22 结合。由于结合对的第一元件 20 和第二元件 26 之间的亲和力,即使是少量的竞争性分析物 18 与缀合物 22 的复合物也将与结合对的第二元件 26 结合,并产生阳性信号,指示样品中不存在分析物 12,或者样品中以低于预定阈值的量存在分析物 12。

[0056] 在另一方面,如果样品中存在等于或大于预定阈值的量的分析物 12,则分析物 12 将以胜过竞争性分析物 18 的足够的量存在来与缀合物 22 结合,使得几乎没有或完全没有竞争性分析物 18 和缀合物 22 的复合物与结合对的第二元件 26 的结合。在这种情况下,由于缀合物没有以足以产生信号的量来结合结合对的第二元件 26,将不存在来自缀合物 22 中的标记 24 的信号,指示样品中存在等于或大于预定阈值的量的分析物 12。

[0057] 在固相载体 10 中使用的样品可为任何体液。在一个方面,所述样品选自全血、血清、血浆、尿、涎、汗、脊液、精液、组织溶解物、乳、初乳及以上的组合。在一个特定方面,所述样品是全血。可选地,所述样品是乳或初乳。此外,所述样品可来自任何来源,但通常来源于哺乳动物。术语“哺乳动物”是指归类为哺乳动物的任何动物,包括人、其他高等灵长类、家养动物和农场动物,以及动物园动物、运动动物或宠物,例如狗、猫、牛、马、无峰驼、羊驼、绵羊、猪、山羊、兔等。一般地,所述哺乳动物是牛、马、无峰驼或羊驼。

[0058] 例如,样品可为来源于诸如牛或马的新生农场动物的全血,以确定该动物是否需要免疫转移。可选地,所述样品可来源于新生农场动物母体的乳或初乳,以从母体是否能够为新动物提供足够的抗体方面来确定母体的乳或初乳质量。计划对新动物和母体二者都进行测试以确定动物需要免疫转移的总体可能性。

[0059] 待测的样品体积可通过改变固相载体中的尺寸、孔隙率以及其他变量而发生改变。一般而言,样品体积较小,例如约一滴血的大小,例如约 $10 \mu\text{l}$ 至约 $50 \mu\text{l}$ 。在一个特定方面,样品体积为约 $35 \mu\text{l}$ 。

[0060] 样品从固相载体上的接触点流至固相载体的末端以得到测试结果所需的时间也可通过改变固相载体中的多个变量来进行改变。通常来说,该时间小于约 30 分钟,例如小于约 25 分钟、小于约 20 分钟、小于约 15 分钟、小于约 10 分钟、小于约 5 分钟或小于约 2 分钟。

[0061] 待检测的分析物通常是以相对较高的量遍布于待测样品中的分析物。一般而言,需要回答的问题不是样品中是否存在分析物,而是分析物在样品中是以高于还是低于阈值的量存在。通常来说,阈值量较高,例如处于 mg/ml 范围,例如至少约 1mg/ml 、 3mg/ml 、 5mg/ml 、 10mg/ml 、 15mg/ml 、 20mg/ml 、 25mg/ml 、 30mg/ml 、 40mg/ml 或 50mg/ml 。可选地,可以

μM 的量来测量阈值量,且其可为至少约 $10\ \mu\text{M}$ 、 $50\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}$ 、 $150\ \mu\text{M}$ 、 $200\ \mu\text{M}$ 、 $250\ \mu\text{M}$ 或 $300\ \mu\text{M}$ 。以这么高的量存在的分析物包括免疫球蛋白,例如 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM;白蛋白;血红蛋白或 C-反应性蛋白(CRP)。在一个特定方面,所述分析物是 IgG。

[0062] 封闭捕获试剂可为能够结合目的分析物从而降低其沿着固相载体向前运动的浓度的任何试剂。封闭捕获试剂可对目的分析物是特异性的,并且可为例如抗体。可选地,其可对目的分析物是非特异性的,并且可结合样品中的若干种分子。在这种情况下,封闭捕获试剂可为例如蛋白 A 或蛋白 G。

[0063] 竞争性分析物一般与待检测的分析物相同。但是,应理解,本文涵盖了能够与待检测分析物竞争结合缀合物的任何竞争性分析物。例如,如果分析物是牛 IgG,则竞争性分析物也可为牛 IgG。可选地,其可为例如牛 IgG 的竞争结合 Fc 区特异性的缀合物的 Fc 片段。

[0064] 类似地,缀合物中的分析物结合分子可为结合分析物和竞争性分析物二者的任何分子。通常来说,分析物结合分子是抗体,例如抗 IgG 抗体。但是,缀合物还可为例如肽或小分子。此外,如果待检测分析物是抗体,则分析物集合分子可为例如天然的或重组的蛋白 A、蛋白 G、蛋白 A/G 或蛋白 L。

[0065] 如果样品中不存在分析物或样品中存在的分析物低于阈值量,则缀合物与结合对第二元件的偶联将凭借缀合物上的标记产生可见的线。通常来说,得到阳性测试结果时,缀合物上的标记是肉眼直接可见的。就此而言,所述标记可为例如金属标记、酶标记或经着色的乳胶珠。金是常用的金属标记,并且一般具有约 20nm 至 65nm 的粒径。此外,应理解,可通过使用作为可见产物沉积的可还原的银盐(例如乳酸银)组合还原剂(例如氢醌)来增强金信号以使其容易可见。金属银在每个金颗粒周围形成容易辨识的黑色沉积物。

[0066] 可选地,得到阳性测试结果时,所述标记可以不是肉眼直接可见的,例如,如果采用了荧光标记。在这种情况下,将通过使用例如读取器来确定测试结果。

[0067] 此外,如所公知的,可在固相载体上形成第二线作为指示测试完成的对照,无论结果是阳性还是阴性。此外,缀合物本身可发挥过程控制的功能。例如,如果缀合物包含经着色的标记,则在进行测试之前固相载体上将显示线。在将样品施加于固相载体后,缀合物将松动,并且第一线的强度将因此降低,指示测试正在进行。

[0068] 所述固相载体和方法可为定性的、半定量的或定量的。在定性测定中,提供“是”或“否”答案,意指分析物以预定阈值或高于预定阈值存在或不以预定阈值或高于预定阈值存在。在半定量测定中,固相载体上产生第二线,其一般处于包含捕获试剂的信号线的下游,其中第二线的强度是恒定的或与信号线的强度成反比。例如,如果缀合物包含单克隆抗体,则第二线可包含抗该单克隆抗体的抗体。任何游离的单克隆抗体都将结合于第二线,并发射信号。如果样品中不存在分析物,或样品中存在的分析物低于预定阈值,则将在结合对的第二元件所处的信号线处形成第二线,因为缀合物和竞争性分析物之间的复合物将会结合于该处。样品中分析物的水平越高,该第二线将越弱。通过比较第一线和第二线,最终使用者可估计样品中的分析物水平。在定量测定中,可通过仪器测量信号线的强度,以将该强度转换为相应的分析物浓度。

[0069] 如已经描述的,可改变竞争性分析物与缀合物之间的距离以及缀合物与结合对的第二元件之间的距离,以调节固相载体的预定阈值。应理解,这些距离将根据固相载体的尺寸和期望接收的样品的量而发生改变。在一个方面,将缀合物布置于结合对的第二元件的

紧上游,和/或将竞争性分析物布置于缀合物的紧上游。在另一个方面,在被设计成接收约 $5\mu\text{l}$ 至约 $50\mu\text{l}$ 样品的固相载体中,缀合物与结合对的第二元件之间和/或竞争性分析物与缀合物之间可相距小于约 5mm 、小于约 4mm 、小于约 3mm 、小于约 2mm 或小于约 1mm 。在一个具体实例中,在被设计成接收 $35\mu\text{l}$ 样品的固相载体中,竞争性分析物、缀合物和结合对的第二元件之间各自相距 2mm 。

[0070] 上文已经描述结合对的第一元件和第二元件为例如生物素和抗生物素蛋白链菌素。应理解,可选择其他结合对用于本发明,其中结合对元件彼此之间的亲和力在一个方面被用于设置固相载体的预定阈值。例如,可使用的结合对还包括生物素和抗生物素蛋白,或者任何已知的高亲和力抗原/抗体结合对。

[0071] 上文已经描述固相载体是包含分离膜和分析膜的膜阵列。但是,应理解,在本发明中可使用任何固相载体模式。例如,本发明不需要分离膜,并且可明确地将其排除。在一个特定的方面,本发明用于美国专利第 7,785,865、7,883,899 和 8,119,393 号以及美国专利申请公布第 2005/0244985、2010/0137145、2010/0323433、2011/0189791 和 2011/0287461 号中描述的任意一种或多种固相载体,其每个通过引用整体并入本文。使用本文描述的固相载体不需要膜。就此而言,所述固相载体可为例如由 Biosite 市售的毛细通道(参见例如美国专利第 6,669,907 号,其通过引用整体并入本文),或者其可为微流通道。

[0072] 在理解本申请的范围时,本文所用术语“包含(comprising)”及其派生词旨在作为开放式术语,其指明存在所记载的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤,但是不排除存在其他未记载的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤。前述事项也适用于具有相似含义的词语,例如术语“包括(including)”、“含有(having)”及其派生词。应理解,在用术语“包含(comprising)”或其等价词描述本发明的任何特征时,本发明还包括这样的变体,其中其“由所记载的特征组成”。最后,本文所用程度术语例如“基本”、“约”和“近似”意指不使最终结果发生显著变化的所修饰术语的合理偏差量。这些程度术语应理解为包括所修饰术语的至少 $\pm 5\%$ 的偏差,只要该偏差不否定其修饰的词的含义即可。

[0073] 上述公开内容在整体上描述了本发明。通过参考以下的具体实施例可得到更完整的理解。这些实施例仅用于举例说明的目的,并且不旨在限制本发明的范围。在情形可暗示或使得更为便利的情况下,本发明包括形式改变和等同物替换。虽然在本文中使用了具体的术语,但是这些术语旨在作为描述性的意义,而非用于限制目的。

实施例

[0074] 实施例 1- 比较实施例

[0075] 制备了用于实施分析物 C- 反应性蛋白(CRP)的检测的竞争测定的固相载体,其包含分离膜和分析膜,其中分析膜处于分离膜的下游。以缀合于抗 CRP 单克隆抗体(Hytest)的 40nm 金颗粒(British Biocell International)制备了终 OD 3 处于 540nm 的胶体金共轭溶液。用该胶体金共轭溶液包被分离膜(Whatman),然后冻干所述分离膜以除去水。由具有的 $8\mu\text{m}$ 孔径的硝化纤维(Millipore)制得分析膜。用包含 1.5mg/ml CRP 的捕获溶液浸渍分析膜,然后在 37°C 下孵育 30 分钟以使分析膜干燥。将分离膜和分析膜用透明的聚酯带(Adhesive Research)覆盖,并用聚苯乙烯背衬带(G&L Precision Die Cutting, Inc.)支承。

[0076] 为了进行测试,将 35 μ l 人血清施加至分离膜。在约 15 分钟后,完成测试。通过使用该常规设计,CRP 检测的阈值最高为约 10 μ g/ml。

[0077] 实施例 2

[0078] 制备了用于实施分析物 IgG 的检测的经修改的竞争测定的固相载体,其包含分离膜(Whatman)和由具有 5 μ m 的孔径的硝化纤维(Millipore)制得的分析膜。以缀合于山羊抗牛 IgG 多克隆抗体(BiosPacific)并且包含明胶作为封闭试剂的 60nm 金颗粒(British Biocell International)制备了终 OD16 处于 540nm 的胶体金共轭溶液。制备了封闭捕获溶液,并且其包含 2.2mg/ml 的与共轭溶液中所用的相同的山羊抗牛 IgG 多克隆抗体。最后,制备了包含 3.5mg/ml 牛 IgG 的捕获溶液。将这三种溶液浸渍于分析膜中,其中共轭溶液处于封闭捕获溶液下游,并且捕获溶液处于共轭溶液下游。特别地,捕获溶液位于共轭溶液下游小于约 2mm。随后将分析膜于 37°C 下孵育 40 分钟,以干燥试剂。将分析膜用透明的聚酯带(Adhesive Research)覆盖,并用聚苯乙烯背衬带(G&L Precision Die Cutting, Inc.)支承。

[0079] 为了进行测试,将 35 μ l 牛血清施加至分离膜。在约 15 分钟后,完成测试。通过使用该设计,IgG 检测的阈值为约 3mg/ml。

[0080] 实施例 3

[0081] 制备了用于实施分析物 IgG 的检测的组合三明治/竞争测定的固相载体,其包含分离膜(Whatman)和具有 5 μ m 的孔径的硝化纤维(Millipore)制得的分析膜。以缀合于山羊抗牛 IgG 多克隆抗体(BiosPacific)并且包含明胶作为封闭试剂的 60nm 金颗粒(British Biocell International, BBI)制备了终 OD 16 处于 540nm 的胶体金共轭溶液。以 3mg/ml 的浓度制备了与待检测的 IgG 对应的生物素化的牛 IgG。最后,制备了包含 3mg/ml 抗生物素蛋白链菌素(IPOC Inc.)的捕获溶液。将这三种溶液浸渍于分析膜中,其中共轭溶液处于生物素化的牛 IgG 下游,并且捕获溶液处于共轭溶液下游。特别地,捕获溶液位于共轭溶液下游小于约 2mm。然后将分析膜于 37°C 下孵育 40 分钟,以干燥试剂。将分析膜用透明的聚酯带(Adhesive Research)覆盖,并用聚苯乙烯背衬带(G&L Precision Die Cutting, Inc.)支承。

[0082] 为了进行测试,将 35 μ l 牛血清施加至分离膜。在约 15 分钟后,完成测试。通过使用该设计,IgG 检测的阈值为至少约 30mg/ml。

[0083] 上述公开内容从整体上描述了本发明。虽然在本文中使用了具体的术语,但是这些术语旨在作为描述性的意义,而非用于限制目的。

[0084] 所有出版物、专利和专利申请都通过引用整体并入本文,其程度跟特别并且单独地指明通过引用将每个单独的出版物、专利或专利申请整体并入本文一样。

[0085] 虽然本文已经详细描述了本发明的示例性实施方案,但是本领域技术人员将理解,可对其作出改变而不脱离本发明的精神或所附权利要求的范围。

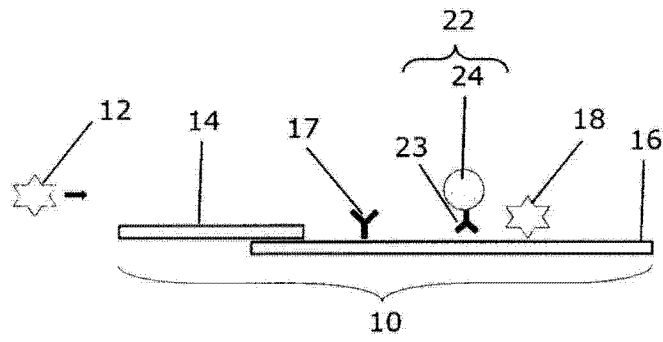


图 1

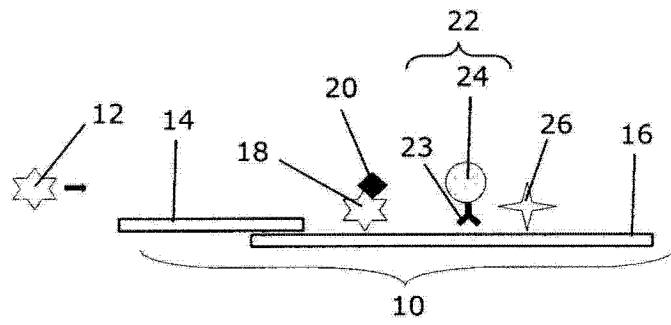


图 2

专利名称(译)	用于检测样品中的分析物的固相载体和方法		
公开(公告)号	CN104364652A	公开(公告)日	2015-02-18
申请号	CN201380030556.9	申请日	2013-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	ZBX公司		
申请(专利权)人(译)	ZBX公司		
当前申请(专利权)人(译)	ZBX公司		
[标]发明人	史沁卫 徐静		
发明人	史沁卫 徐静		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/564		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/54306 G01N33/686 G01N33/54393 G01N33/548 G01N33/558		
代理人(译)	洪欣		
优先权	61/636066 2012-04-20 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

用于检测样品中处于预定阈值或高于预定阈值的分析物的存在的固相载体，其包含：在所述固相载体中的竞争性分析物，其中所述竞争性分析物与结合对的第一元件偶联；所述固相载体中处于所述竞争性分析物下游的经标记的缀合物，其中所述分析物同所述竞争性分析物竞争结合所述缀合物；以及固定于所述固相载体中的、处于所述缀合物下游的捕获试剂，其中所述捕获试剂包含结合对的第二元件；其中选择固相载体中结合对的第一元件和第二元件彼此间的亲和力以及缀合物与捕获试剂之间的距离和/或缀合物与竞争性分析物之间的距离，以提高固相载体对分析物的阈值。

