



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105190311 B

(45)授权公告日 2017.05.10

(21)申请号 201380075980.5

(22)申请日 2013.12.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105190311 A

(43)申请公布日 2015.12.23

(30)优先权数据
13/833,655 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.10.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/077063 2013.12.20

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/149111 EN 2014.09.25

(73)专利权人 雅培实验室
地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 B·L·杜维尔 S·给达 Q·阮
J·P·斯金纳 S·Y·特亭

(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所
11410

代理人 程芳

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

(56)对比文件
CN 101278194 A,2008.10.01,
CN 101946179 A,2011.01.12,
CN 101278194 A,2008.10.01,
孟毓等.抗TP ELISA检测的Hook效应分析.
《中国厂矿医学》.2009,(第09期),
S. Amarasiri Fernando et al.Studies
of the "Hook" effect in the one-step
sandwich immunoassay.《Journal of
Immunological Methods》.1992,第151卷(第1-2
期),

审查员 李进进

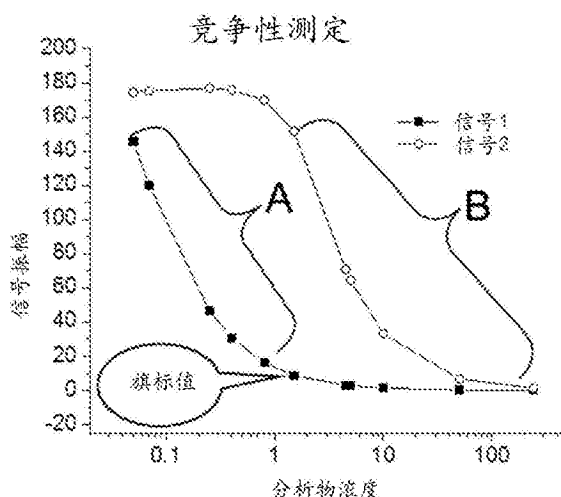
权利要求书5页 说明书11页 附图7页

(54)发明名称

具有提高的动态范围的测定

(57)摘要

本文提供了可用于避免“前带现象”或“钩效应”并且扩大可精确测量的分析物浓度范围的测定和试剂盒。



1. 一种试剂盒,其包含:
 - i) 包含第一标记物的第一分析物结合分子;
 - ii) 包含第二标记物的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,以及
 - iii) 附接至固体支持物上的第三分析物结合分子,其中第三分析物结合分子能够与第一分析物结合分子或第二分析物结合分子同时与分析物结合,其中所述固体支持物包含两个或更多个空间上分离的电极,其中所述固体支持物包含在手持式照护点装置中。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。
3. 根据权利要求1至2中任意一项所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子直接附接至标记物。
4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其中所述固体支持物选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。
5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其中所述固体支持物包含微粒。
6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。
7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中第一标记物和第二标记物是不同的。
8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约5倍至约100倍的范围内。
9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约100倍。
10. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述试剂盒能用于一步夹心测定。
11. 一种扩大测定的动态范围的方法,其包括:
 - a) 使怀疑包含分析物的测试样品与包含第一标记物的第一分析物结合分子、包含第二标记物的第二分析物结合分子和附接至固体支持物上的第三分析物结合分子在允许以下结合的条件下接触:
 - (i) 第一分析物结合分子和第三分析物结合分子,以及
 - (i) 第二分析物结合分子和第三分析物结合分子,与所述分析物的结合,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与所述分析物结合;
 - b) 测量与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物以及与分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度;以及
 - c) 通过比较第一标记物和第二标记物的信号强度确定分析物的浓度,其中测量与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度和与分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度的步骤b) 在分析物浓度的预定范围上在校准测定中完成,并且所述方法进一步包括以下步骤:
 - d) 通过在提供与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的最大信号强度的分析物浓度之处或附近,确定校准测定中与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标

记物的信号强度同与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度之比或该比值的倒数,来建立旗标值。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子直接附接至标记物。

14. 根据权利要求11所述的方法,其中所述固体支持物选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。

15. 根据权利要求11所述的方法,其中第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。

16. 根据权利要求11所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在同一反应混合物中接触。

17. 根据权利要求11所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在不同的反应混合物中接触。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中第一标记物和第二标记物是相同的。

19. 根据权利要求11所述的方法,其中第一标记物和第二标记物是不同的。

20. 根据权利要求11所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约5倍至约100倍的范围内。

21. 根据权利要求11所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约100倍。

22. 根据权利要求11所述的方法,其中所述测定的动态范围包括三个或更多个数量级。

23. 根据权利要求11所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子以相差不到约100倍的预定摩尔量存在。

24. 根据权利要求11所述的方法,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子未寡聚化或交联。

25. 根据权利要求11所述的方法,其中当与测试样品中的分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度同与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度之比:

超过或等于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

小于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

26. 根据权利要求11所述的方法,其中当与测试样品中的分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度同与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度之比:

小于或等于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物获得的信号强度的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

超过所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

27. 根据权利要求11所述的方法,其中所述方法使用自动化或半自动化系统来进行。
28. 根据权利要求11所述的方法,其中所述测定是一步测定。
29. 一种试剂盒,其包含:
- i) 衔接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子;
 - ii) 衔接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力;以及
 - iii) 包含标记物的第三分析物结合分子,其中第三分析物结合分子能与第一分析物结合分子或第二分析物结合分子同时与分析物结合。
30. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。
31. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中第三分析物结合分子直接衔接至所述标记物。
32. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中所述标记物选自酶、发色团和荧光团。
33. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中第一固体支持物和第二固体支持物独立地选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。
34. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中第一固体支持物是包含第一发色团的微粒或珠子且第二固体支持物是包含第二发色团的微粒或珠子。
35. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中第一固体支持物和第二固体支持物是形状或大小不同的微粒。
36. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中第一固体支持物是第一电极且第二固体支持物是第二电极,其中第一电极和第二电极是空间上分离的。
37. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约5倍至约100倍的范围内。
38. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约100倍。
39. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中所述试剂盒能够用于一步或两步夹心测定。
40. 一种扩大测定的动态范围的方法,其包括:
- a) 使怀疑包含分析物的测试样品与衔接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子、衔接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子和包含标记物的第三分析物结合分子在允许以下结合的条件下接触:
 - (i) 第三分析物结合分子通过与第一分析物结合分子结合的分析物与第一固体支持物的结合;以及
 - (ii) 第三分析物结合分子通过与第二分析物结合分子结合的分析物与第二固体支持物的结合;以及其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与分析物结合;
 - b) 测量来自与第一固体支持物和与第二固体支持物结合的第三分析物结合分子的标记物的信号强度;以及
 - c) 通过比较来自与第一固体支持物和与第二固体支持物结合的第三分析物结合分子的标记物的信号强度来确定分析物的浓度,其中测量与分析物和衔接至第一固体支持物上

的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度以及与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度的步骤b) 在分析物浓度的预定范围上在校准测定中完成, 并且所述方法进一步包括以下步骤:

d) 通过在提供与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的最大信号强度的分析物浓度之处或附近, 确定校准测定中与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度同与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度之比值或该比值的倒数, 来建立旗标值。

41. 根据权利要求40中所述的方法, 其中第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。

42. 根据权利要求40所述的方法, 其中第三分析物结合分子直接附接至所述标记物。

43. 根据权利要求40所述的方法, 其中第一固体支持物和第二固体支持物独立地选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。

44. 根据权利要求40所述的方法, 其中第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。

45. 根据权利要求40所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在同一反应混合物中接触。

46. 根据权利要求40所述的方法, 其中第一固体支持物是包含第一发色团的微粒或珠子且第二固体支持物是包含第二发色团的微粒或珠子。

47. 根据权利要求40所述的方法, 其中第一固体支持物和第二固体支持物是形状或大小不同的微粒。

48. 根据权利要求40所述的方法, 其中第一固体支持物是第一电极且第二固体支持物是第二电极, 其中第一电极和第二电极是空间上分离的。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中第一电极和第二电极包含在手持式照护点装置中。

50. 根据权利要求40所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在不同的反应混合物中接触。

51. 根据权利要求40所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约5倍至约100倍的范围内。

52. 根据权利要求40所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约100倍。

53. 根据权利要求40所述的方法, 其中免疫测定的动态范围包括三个或更多个数量级。

54. 根据权利要求40所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子以相差不到约100倍的预定摩尔量存在。

55. 根据权利要求40所述的方法, 其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子未寡聚化或交联。

56. 根据权利要求40所述的方法, 其中当与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度同与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度之比:

超过或等于所述旗标值时,从与该分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

小于所述旗标值时,从与该分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

57. 根据权利要求40所述的方法,其中当与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度同与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度之比:

小于或等于所述旗标值时,从与该分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

超过所述旗标值时,从与该分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

58. 根据权利要求40所述的方法,其中在使所述测试样品、所述附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子与所述包含标记物的第三分析物结合分子接触之前,通过洗涤来去除未与所述第一或所述第二固体支持物结合的分析物。

59. 根据权利要求58所述的方法,所述方法进一步包括在与分析物结合的第一分析物结合蛋白质的第一标记物的信号强度趋于平稳的值(平台值)之处或附近建立旗标值的步骤。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中当与测试样品中的分析物结合的第一分析物结合蛋白质的第一标记物的信号强度等于或高于所述旗标值时,从与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

61. 根据权利要求40所述的方法,其中该方法使用自动化或半自动化系统来进行。

具有提高的动态范围的测定

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是2013年3月15日提交的美国申请号13/833,655的继续申请,该美国申请为了所有目的通过引用而全文并入本文。

技术领域

[0003] 本文提供了用于扩大测定的动态范围的试剂盒和方法。

背景技术

[0004] 在过去几十年中,已经使用荧光、化学发光或响应于分析物产生信号的其他手段进行了测定。目前,许多测定通过测量在反应混合物的总体积中产生的光信号的强度来进行。产生的光信号可以通过光学手段来测量,其中产生的光信号由大量分子发出。在典型的实施方案中,这些测定可以如下进行:将怀疑含有抗原的样品与包含附接至固体支持物(例如,微粒)上的第一抗体的试剂组合,以形成反应混合物。该抗原如果存在于样品中,则与该第一抗体特异性结合。向反应混合物中引入包含其上附接有标记的第二抗体的偶联物,并与所述抗原特异性结合,该抗原与第一抗体特异性结合,该第一抗体如前所述附接至固体支持物上。这样的测定被称为夹心测定或免疫计量测定。这种类型的测定示意性地示于图1中。在一般通过进行洗涤步骤从反应混合物中除去未结合的偶联物之后,测量由标记物引起的信号。测量来源于反应混合物的总体积的信号,然后将其与校准曲线进行比较,以确定样品中存在的抗原的浓度。当测定包括在引入偶联物抗体之前去除未结合的样品分析物的洗涤步骤时,它通常被认为是“两步测定”。当测定将偶联物抗体和分析物一起引入抗体包被的微粒而没有中间洗涤步骤时,它被认为是“一步”测定。“钩效应”或“前带现象”是当在“一步测定”形式中存在压倒性的量的抗原时,测定得到假低值的现象。这是由测定中捕获抗体和检测抗体不足引起的。这样的钩效应限制了测定的动态范围。

[0005] 夹心测定可以检测宽范围的分析物浓度;通常,它可准确地测量2-3个数量级的分析物浓度。但是,更宽地扩大分析物检测,例如超过3个数量级,是不常见的。

发明内容

[0006] 在一个方面,本发明提供了试剂盒。在不同的实施方案中,该试剂盒包含:

[0007] i) 包含第一标记物的第一分析物结合分子;

[0008] ii) 包含第二标记物的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,以及

[0009] iii) 附接至固体支持物上的第三分析物结合分子,其中第三分析物结合分子能够与第一分析物结合分子或第二分析物结合分子同时与分析物结合。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子直接附接至标记物。在一些实施方案中,第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。在一些实施方案中,该固体支持物选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。在一些实

实施方案中,该固体支持物包含两个或更多个空间上分离的电极。在一些实施方案中,该固体支持物包含微粒。在一些实施方案中,第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。在一些实施方案中,第一标记物和第二标记物是不同的。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约5倍至约100倍,例如,约10倍至约100倍的范围内。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约100倍。在一些实施方案中,所述试剂盒可用于一步或两步夹心测定。

[0010] 在一些实施方案中,所述试剂盒包含:

[0011] i) 附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子;

[0012] ii) 附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力;以及

[0013] iii) 包含标记物的第三分析物结合分子,其中第三分析物结合分子可与第一分析物结合分子或第二分析物结合分子同时与分析物结合。在一些实施方案中,第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。在一些实施方案中,第三分析物结合分子直接附接至标记物。在一些实施方案中,该标记物选自酶、发色团和荧光团。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物独立地选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。在一些实施方案中,第一固体支持物是包含第一发色团的微粒或珠子而第二固体支持物是包含第二发色团的微粒或珠子。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物是形状或大小不同的微粒。在一些实施方案中,第一固体支持物是第一电极而第二固体支持物是第二电极,其中第一电极和第二电极在空间上是分离的。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约5倍至约100倍,例如,约10倍至约100倍的范围内。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约100倍。

[0014] 在一些实施方案中,例如,对于竞争性测定试剂盒,该试剂盒包含:

[0015] i) 附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子;

[0016] ii) 附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力;以及

[0017] iii) 包含附接至标记物的所述分析物或其片段的示踪剂,其中所述示踪剂可与所述分析物竞争结合第一分析物结合分子或第二分析物结合分子。在一些实施方案中,该试剂盒包含的第一分析物结合分子和/或第二分析物结合分子中的一个或多个为抗体或其片段。在一些实施方案中,所述标记物选自酶、发色团和荧光团。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物独立地选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。在一些实施方案中,第一固体支持物是包含第一发色团的微粒或珠子而第二固体支持物是包含第二发色团的微粒或珠子。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物是形状或大小不同的微粒。在一些实施方案中,第一固体支持物是第一电极而第二固体支持物是第二电极,其中第一电极和第二电极在空间上是分离的。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约5倍至约100倍,例如,约10倍至约100倍的范围内。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约100倍。

[0018] 在另一方面,本发明提供了扩大测定的动态范围的方法。在不同的实施方案中,该方法包括:

[0019] a) 使怀疑包含分析物的测试样品与包含第一标记物的第一分析物结合分子、包含第二标记物的第二分析物结合分子和附接至固体支持物上的第三分析物结合分子在允许以下结合的条件下接触:

[0020] (i) 第一分析物结合分子和第三分析物结合分子,以及

[0021] (ii) 第二分析物结合分子和第三分析物结合分子

[0022] 与分析物的结合,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与分析物结合;

[0023] b) 测量与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物以及与分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度;以及

[0024] c) 通过比较第一标记物和第二标记物的信号强度来确定分析物的浓度。在一些实施方案中,第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子直接附接至标记物。在一些实施方案中,该固体支持物选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。在一些实施方案中,第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在同一反应混合物中接触。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在不同的反应混合物中接触。在一些实施方案中,第一标记物和第二标记物是不同的。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约5至约100倍的范围内。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异为至少约100倍。在不同的实施方案中,所述测定的动态范围包括三个或更多个数量级,例如,四个或更多个数量级。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子以相差不到约100倍(例如,约10倍至约100倍、约10倍至约50倍、约60倍至约100倍、约25倍、约50倍、约75倍)的预定摩尔量存在。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子未寡聚化或交联。在一些实施方案中,所述方法使用自动化或半自动化系统来进行。在一些实施方案中,所述测定是一步测定。

[0025] 在一些实施方案中,测量与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度和与分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度的步骤b) 在分析物浓度的预定范围上在校准测定中完成,并且所述方法进一步包括以下步骤:

[0026] d) 通过在提供与分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的最大信号强度的分析物浓度之处或附近,确定校准测定中与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度同与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度之比值或该比值的倒数,来建立旗标值(flag value)。

[0027] 在一些实施方案中,当与测试样品中的分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度同与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度之比:

[0028] 超过或等于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记

物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

[0029] 小于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

[0030] 在一些实施方案中,当与测试样品中的分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度同与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度之比:

[0031] 小于或等于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物获得的信号强度的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

[0032] 超过所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

[0033] 在另一方面,本发明提供了扩大测定的动态范围的方法。在一些实施方案中,该方法包括:

[0034] a) 使怀疑包含分析物的测试样品与附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子、附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子和包含标记物的第三分析物结合分子在允许以下结合的条件下接触:

[0035] (i) 第三分析物结合分子通过与第一分析物结合分子结合的分析物与第一固体支持物的结合;以及

[0036] (ii) 第三分析物结合分子通过与第二分析物结合分子结合的分析物与第二固体支持物的结合;以及

[0037] 其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与分析物结合;

[0038] b) 测量来自与第一固体支持物和与第二固体支持物结合的第三分析物结合分子的标记物的信号强度;以及

[0039] c) 通过比较来自与第一固体支持物和与第二固体支持物结合的第三分析物结合分子的标记物的信号强度来确定分析物的浓度。在一些实施方案中,第一分析物结合分子、第二分析物结合分子和/或第三分析物结合分子中的一个或多个是抗体或其片段。在一些实施方案中,第三分析物结合分子直接附接至标记物。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物独立地选自颗粒、微粒、珠子、电极和多孔板。在一些实施方案中,第一标记物和第二标记物之一或两者选自酶、发色团和荧光团。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在同一反应混合物中接触。在一些实施方案中,第一固体支持物是包含第一发色团的微粒或珠子而第二固体支持物是包含第二发色团的微粒或珠子。在一些实施方案中,第一固体支持物和第二固体支持物是形状或大小不同的微粒。在一些实施方案中,第一固体支持物是第一电极而第二固体支持物是第二电极,其中第一电极和第二电极在空间上是分离的。在一些实施方案中,第一电极和第二电极包含在手持式照护点装置中。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子与测试样品在不同的反应混合物中接触。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力的差异在约5倍至约100倍,例如,约10倍至约100倍的范围内。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子对分析物的结合

亲和力的差异为至少约100倍。在一些实施方案中,免疫测定的动态范围包括三个或更多个数量级。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子以相差不到约100倍(例如,约10倍至约100倍、约10倍至约50倍、约60倍至约100倍、约25倍、约50倍、约75倍)的预定摩尔量存在。在一些实施方案中,第一分析物结合分子和第二分析物结合分子未寡聚化或交联。在一些实施方案中,所述方法使用自动化或半自动化系统来进行。

[0040] 在一些实施方案中,上述测定是一步测定(即,其中没有洗涤步骤)。在一些实施方案中,上述测定是两步测定(即,其中有洗涤步骤)。这样的两步测定可以如所描述的进行,除了任选地,在使测试样品、附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子与包含标记物的第三分析物结合分子接触之前通过洗涤来去除未与所述第一固体支持物或所述第二固体支持物结合的分析物。洗涤可以通过本领域技术人员公知的手段来完成。

[0041] 在一步测定的一些实施方案中,测量与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度以及与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度的步骤b) 在分析物浓度的预定范围上在校准测定中完成,并且所述方法进一步包括以下步骤:

[0042] d) 通过在提供与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的最大信号强度的分析物浓度之处或附近,确定校准测定中与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度同与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度之比值或该比值的倒数,来建立旗标值。

[0043] 在一步测定的一些实施方案中,当与测试样品中的分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度同与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度之比:

[0044] 超过或等于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

[0045] 小于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

[0046] 在一步测定的一些实施方案中,当与测试样品中的分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度同与该分析物结合的第二分析物结合分子的第二标记物的信号强度之比:

[0047] 小于或等于所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度;或者

[0048] 超过所述旗标值时,从与该分析物结合的第一分析物结合分子的第一标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

[0049] 在两步测定的一些实施方案中,所述方法包括另一步骤b): 测量与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度以及与分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度,其在分析物浓度的预定范围上在校准测定中完成。该方法进一步任选地包括建立标准来选择两个信号图的足够的区段以用作校准曲线的步骤。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与分析物和

附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度趋于平稳的值(平台值)之处或附近建立旗标值的步骤。在所述方法的一些实施方案中,当与分析物和附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的标记物的信号强度等于或高于旗标值时,从与该分析物和附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的标记物的信号强度获得的校准曲线的上升段用来确定分析物浓度。

[0050] 在进一步的方面,本发明提供了扩大以竞争测定形式进行的测定的动态范围的方法。在一些实施方案中,该方法任选地包括:

[0051] a) 使怀疑包含分析物的测试样品与包含附接至标记物的所述分析物或其片段的示踪剂、附接至第一固体支持物上的第一分析物结合分子、附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子相接触,其中第一分析物结合分子对分析物的结合亲和力大于第二分析物结合分子对分析物的结合亲和力,其中第一分析物结合分子和第二分析物结合分子不同时与分析物结合;

[0052] b) 测量来自与第一固体支持物上的第一分析物结合分子和第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的示踪剂的信号强度;以及

[0053] c) 在与附接至第一固体支持物上的第一分析物结合蛋白质结合的示踪剂的信号强度趋于平稳的值(平台值)之处或附近建立旗标值。在一些实施方案中,当与附接至第一固体支持物上的第一分析物结合蛋白质结合的示踪剂的信号强度等于或小于旗标值时,从与附接至第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的示踪剂的信号强度获得的校准曲线的下降段用来确定分析物浓度。

附图说明

[0054] 图1提供了夹心测定的说明性示意图。

[0055] 图2提供了竞争性测定的说明性示意图。

[0056] 图3示出了作为钩效应的结果而产生的代表性校准曲线,钩效应的缺乏用标记为“平台期(plateau)”的线示出。横坐标:分析物浓度(例如,单位如ng/mL)。纵坐标:信号振幅(例如,单位如相对光单位计数)。

[0057] 图4提供了测定的一个实施方案的说明性图解,其中第一分析物结合分子附接至第一类型的固体支持物上,第二分析物结合分子附接至第二类型的固体支持物上,并且第三分析物结合分子附接至标记物。

[0058] 图5提供了测定的一个实施方案的说明性图解,其中第一分析物结合分子附接至第一标记物,第二分析物结合分子附接至第二标记物,并且第三分析物结合分子附接至固体支持物上。ABM;分析物结合分子。

[0059] 图6A-B提供了一步夹心测定的实例。图6a示出了独立地由示例性的高亲和力和低亲和力抗体获得的说明性信号图。每张图具有校准曲线的上升段和下降段以及最大强度峰。图6b示出了来自低亲和力抗体和高亲和力抗体的信号比值图。这两张图可结合使用以确定测试样品的浓度。

[0060] 图7提供了针对前列腺特异性抗原(PSA)的模拟夹心测定的实例。图7a示出了独立地由高亲和力和低亲和力抗体获得的说明性信号图。图7b示出了来自低亲和力抗体和高亲和力抗体的信号比值图。这两张图可结合使用以确定测试样品的浓度。

[0061] 图8A-B提供了针对脑利钠肽 (BNP) 的夹心测定的实例。图8a示出了独立地由高亲和力和低亲和力抗体获得的说明性信号图。图8b示出了来自低亲和力抗体和高亲和力抗体的信号比值图。这两张图可结合使用以确定测试样品的浓度。

[0062] 图9示出了作为如本文所述进行的两步测定的结果而产生的代表性校准曲线。信号1源自与分析物结合的、被标记的分析物结合分子,该分析物还与包被在第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合。信号2源自与分析物结合的标记的分析物结合分子,该分析物还与包被在第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合。括号内的区域(左侧校准曲线的上升段“A”和右侧校准曲线的上升段“B”)可用来确定测试样品的浓度。

[0063] 图10示出了作为如本文所述进行的竞争性测定的结果而产生的代表性校准曲线。信号1源自与包被在第一固体支持物上的第一分析物结合分子结合的示踪剂。信号2源自与包被在第二固体支持物上的第二分析物结合分子结合的示踪剂。括号内的区域(左侧校准曲线的下降段“A”和右侧校准曲线的下降段“B”)可用来确定测试样品的浓度值。

具体实施方式

[0064] 本公开内容部分地基于通过消除或避免例如在包括一步和两步夹心测定在内的夹心测定中所谓的“钩效应”或“前带现象”来增加测定动态范围的测定和方法的发现和设计。

[0065] 定义

[0066] 以下术语与本公开内容有关:

[0067] 术语“钩效应”和“前带现象”可交换地是指分析物(例如,抗原)的测量水平显示出显著低于样品中存在的实际水平的吸光度。这可由许多因素引起。例如,它会在以下情况时发生:足够高的分析物浓度使测定饱和,使得捕获分析物结合分子以及检测分析物结合分子两者上的所有可用位点均过饱和,从而防止夹心结构形成。溶液中被分析物饱和的检测结合分子保持未结合并被洗掉,从而得出假低信号。当数据以信号对分析物(例如,抗原)浓度作图时,在曲线中观察到“钩”。

[0068] 例如,在典型的双抗体单步“夹心类型”免疫测定中,捕获抗体(其为通常固定到固相上的抗体)与怀疑含有感兴趣的分析物的测试样品混合。向该混合物中加入含有可检测标记物的抗体(以下称为“偶联物”)。在该测定中,捕获抗体与测试样品中的分析物结合以形成捕获抗体-分析物复合物。然后该偶联物与捕获抗体-分析物复合物结合(“夹心结构”),并且使用本领域已知的常规技术,作为感兴趣的分析物的测量值来检测该偶联物标记物。在大量过量的游离分析物的存在下,所有的偶联物直接与游离分析物结合,从而导致较少的偶联物可与捕获抗体-分析物复合物结合。因此,因为较少的游离偶联物可与捕获抗体-分析物复合物结合,与捕获抗体-分析物复合物结合的标记物的量减少,从而降低了检测到的分析物的量。图3示出了作为钩效应的结果而产生的校准曲线的实例。如图3所示,相矛盾的是,在分析物浓度的高端范围,实际分析物浓度越高,其测得的浓度显示越低。这与在没有钩效应时获得的曲线形成对比。这样的校准曲线不降低至更低的值,而是保持在平台期。

[0069] 具有钩效应的校准曲线因此将具有一个峰和两个特征段,“上升段”和“下降段”。从图3中可以看出,上升段是校准曲线逐渐升高至更高值的区段。下降段是校准曲线逐渐降

低至更低或甚至负值的区段。上升段是向上的凹形(正曲率),而下降段是向下的凹形(负曲率)。上升段和下降段由凹度从负变为正的拐点隔开。钩效应和相同类型的校准曲线可以在一步夹心测定中观察到。

[0070] “测定”是测量常常含有物质的复杂混合物的溶液中物质的存在或浓度的生化试验。在诸如血清或尿的生物液体中的分析物常常使用测定方法进行测定。此类测定是基于分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段)以高特异性与一种或非常有限的一组分子结合的独特能力。与分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段)结合的分子被称为分析物或抗原。需要分离步骤的测定,通常被称为分离测定或非均相测定,这种测定是普及的,因为它们容易设计,但它们经常需要多个步骤,包括对其上结合有标记的试剂的表面的仔细洗涤。一些测定可以在不进行分离步骤的情况下运行。此类测定常常可通过混合试剂和样品并进行物理测量来简单地进行。此类测定被称为均相测定,或者较不经常地,被称为非分离测定。

[0071] 如本文所用的,表述“夹心测定”意指采用同时(例如,在相同或单独的步骤中)与相同分析物结合两种分析物结合分子的测定。所述分析物结合分子之一直接或间接地附接至固体支持物上,从而允许分析物直接或间接地附接至该固体支持物,例如,微粒或电极。其他分析物结合分子直接或间接地附接至标记物,从而允许分析物直接或间接地附接至该标记物以提供用于检测该分析物的信号。例如,分析物结合分子之一可以是用于与样品中的分析物(例如,抗原)特异性结合的捕获分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段),由此该分析物(例如,抗原)直接或间接地附接至固体支持物,例如,电极或微粒,而其他的分析物结合分子可以是用于与样品中的分析物(例如,抗原)特异性结合的检测分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段),由此该分析物(例如,抗原)直接或间接地附接至用于检测抗原的标记物。如果样品中存在相对较高的量的分析物,则将产生较高的信号。如果样品中存在相对较低的量的分析物,则将产生较低的信号。图1是说明夹心测定的代表性实例的示意图。

[0072] 如本文所用的,表述“竞争性测定”是指其中未标记的抗原和标记的抗原竞争结合同一抗体位点的测定。或者,抗体和标记的抗体竞争结合同一抗原位点。在前者的实例中,使用标记的抗原和未标记的抗原。固体支持物用可与标记的抗原或与未标记的抗原特异性地结合的抗体包被。将固体支持物、标记的抗原和怀疑含有抗原的患者样品组合在一起。当然,患者样品中的任何抗原是未标记的。标记的抗原和未标记的抗原竞争固体支持物上的抗体位点。只有当标记的抗原附接至固体支持物上的抗体时才可能产生信号,因为只有标记的抗原能够产生信号。患者样品中的抗原的量与产生的信号的量成反比。这种类型的测定在图2中示意性地示出。

[0073] 如本文所用的,术语“复合物”意指彼此特异性结合的至少两个分子。复合物的实例包括但不限于,与分析物结合分子结合的一个分析物,与多个分析物结合分子结合的一个分析物,例如,与两个分析物结合分子结合的一个分析物,与多个分析物结合的一个分析物结合分子,例如,与两个分析物结合的一个分析物结合分子。

[0074] 如本文所用的,表述“固体支持物”意指分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段)可附接至其上,从而使得该分析物结合分子在液体介质中不能从固体支持物上脱离的任何固体表面。固体支持物可以容易地与该固体支持物接触的液体分开。在不同的实

施方案中,固体支持物可以是,例如,塑料、衍生塑料、磁性或非磁性金属、玻璃或硅。固体支持物的代表性实例包括但不限于电极、试管、珠子、微粒、纳米颗粒、微孔或多孔板的孔、凝胶、胶体、生物细胞、薄片、芯片和本领域普通技术人员所知的其他构造。分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段)可以附接至其上的物体的一个实例是微粒,例如,磁性微粒。微粒一般具有小于1000微米的平均直径。微粒可以容易地从其分散于其中的液体中分离。微粒容易地分散在水性介质中。此外,固体支持物任选地提供回收分析物结合蛋白质的手段,即,在与进行测定的条件不同的受控条件下从表面上释放或脱离分析物结合分子的手段。例如,分析物结合分子可借助于可裂解的连接体附接至固体支持物上。

[0075] 如本文所用的,表述“捕获分析物结合分子”意指这样的分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段):其将分析物,例如,抗原,结合至固体支持物上,其结果是抗体将该分析物附接至固体支持物上,由此该分析物直接地或通过居间的部分间接地附接至固体支持物上。

[0076] 如本文所用的,表述“检测分析物结合分子”意指这样的分析物结合分子(例如,抗体或其抗原反应性片段):其附接至在化学或生物反应中提供或可变成提供可检测的信号的部分。

[0077] 术语“一步”测定是指不包括从未结合的样品分析物中分离结合的样品分析物的测定。

[0078] 术语“两步”测定是指包括从未结合的样品分析物中分离结合的样品分析物的测定。

[0079] “约”是指从所述值大约 $\pm 10\%$ 的变化。应当理解,这样的变化总是包含在本文所提供的任何给定值中,无论是否具体提及。

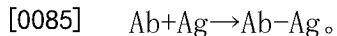
[0080] 如本文进一步描述的,“分析物”是指待测的化合物或组合物,其可以是配体,其可以是单表位的或多表位的,抗原的或半抗原的,共享至少一个共同表位位点或受体的单个或多个化合物。说明性的感兴趣的分析物通常包括但不限于,例如,蛋白质、糖蛋白、肽、多肽、寡核苷酸或多核苷酸,以及更具体地,例如,抗体、抗原、半抗原、激素、药物、酶或受体。

[0081] “抗体”和“多个抗体”是指单克隆抗体、多特异性抗体、双功能抗体、人抗体、人源化抗体(完全或部分人源化的)、动物抗体(诸如但不限于鸟(例如鸭或鹅)、鲨鱼、鲸和哺乳动物,其包括非灵长类(例如,牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠、小鼠等)或非人灵长类(例如,猴、黑猩猩等)、重组抗体、嵌合抗体、单链Fv(“scFv”)、单链抗体、单域抗体、Fab片段、F(ab')片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(“sdFv”)以及抗独特型(“anti-Id”)抗体、双域抗体、双可变域(DVD)或三可变域(TVD)抗体(双可变域免疫球蛋白及其制备方法描述于Wu, C.等人, *Nature Biotechnology*, 25(11):1290-1297(2007), 以及公开号为W0 2001/058956的国际专利申请,其中每一篇的内容均通过引用并入本文),以及上述任一种的功能活性表位结合片段。如本文所用的术语“双功能抗体”是指包含对一个抗原位点具有特异性的第一臂和对一个不同的抗原位点具有特异性的第二臂的抗体,即,双功能抗体具有双重特异性。

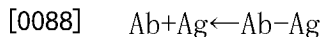
[0082] “抗体片段”和“多个抗体片段”是指包含抗原结合位点或可变区的完整抗体的一部分。该部分不包括完整抗体的Fc区的恒定重链域(即,CH₂、CH₃或CH₄,取决于抗体同种型)。抗体片段的实例包括但不限于Fab片段、Fab'片段、Fab'-SH片段、F(ab')₂片段、Fd片

段、Fv片段、双抗体、单链Fv(scFv)分子、只含有一个轻链可变域的单链多肽、含有轻链可变域的三个CDR的单链多肽、只含有一个重链可变区的重链可变区单链多肽和含有重链可变区的三个CDR的单链多肽。

[0083] “结合常数”如本文所述。在本文中可互换使用的术语“缔合速率常数”、“ k_{on} ”或“ k_a ”是指这样的值：其表示特异性结合对的第一成员(SBP1；例如，分析物结合分子，抗体(Ab)或其分析物反应性片段)和特异性结合对的第二成员(SBP2；例如，分析物(例如，抗原(Ag))的结合速率，或特异性结合对的第一成员与特异性结合对的第二成员之间的复合物形成的速率，如以下方程式所示：



[0086] 在本文中可互换使用的术语“解离速率常数”、“ k_{off} ”或“ k_d ”是指这样的值：其表示SBP1(例如，分析物结合分子，抗体或其分析物反应性片段)从SBP2(例如，抗原)上的解离速率，或SBP1-SBP2复合物(例如，抗体-抗原复合物)随时间分离成游离SBP1(例如，分析物结合分子、抗体或其分析物反应性片段)和SBP2(例如，抗原)的速率，如以下方程式所示：



[0089] 用于确定缔合和解离速率常数的方法是本领域公知的。使用基于荧光的技术提供了高灵敏度和在平衡的生理缓冲液中检测样品的能力。可以使用其他实验方法和仪器如 **BIAcore®**(生物分子相互作用分析)测定(例如，仪器可从BIAcore International AB, GE Healthcare公司,Uppsala, Sweden获得)。此外，也可以使用可从Sapidyne Instruments (Boise, Idaho)获得的 **KinExA®**(动力学排除测定)测定。

[0090] 在本文中可互换使用的术语“平衡解离常数”或“ K_D ”是指通过将解离速率(k_{off})除以缔合速率(k_{on})而得到的值。缔合速率、解离速率和平衡解离常数用来表示分析物结合分子(例如，抗体或其分析物反应性片段)对抗原的结合亲和力。这可由以下反应和方程式描述：



$$[0092] \quad K_D = \frac{[AB]}{[A][B]}。$$

[0093] 这些结合常数中的任何一个，即， k_a 、 k_d 或 K_D ，可以想象可用来评估或比较“结合亲和力”，即，结合的倾向或强度。然而，通常如本文所述，结合亲和力是指 K_D 。

[0094] “CDR”在本文中用来指分析物结合分子或抗体可变序列内的“互补性决定区”。在抗体中，在重链和轻链的每一个可变区中有三个CDR，对于每个可变区，它们被称为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。如本文所用的术语“CDR组”是指在结合抗原的单个可变区中存在的一组三个CDR。这些CDR的确切边界根据不同的体系已有不同地定义。Kabat描述的体系(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 和(1991))不仅提供了适用于抗体的任何可变区的明确的残基编号体系，而且还提供了限定三个CDR的精确的残基边界。这些CDR可被称为“Kabat CDR”。Chothia和同事(Chothia和Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)；和Chothia等人, Nature, 342:877-883 (1989))发现Kabat CDR内的某些亚部分采用几乎相同的肽骨架构象，

尽管在氨基酸序列水平上具有很大的多样性。这些亚部分被称为“L1”、“L2”和“L3”，或“H1”、“H2”和“H3”，其中“L”和“H”分别指代轻链和重链区。这些区域可以被称为“Chothia CDR”，它们具有与Kabat CDR重叠的边界。与Kabat CDR重叠的限定CDR的其他边界已由Padlan, FASEB J., 9:133-139 (1995) 和MacCallum, J. Mol. Biol., 262 (5) :732-745 (1996) 描述。另外其他的CDR界限可能不严格遵循此处的一种体系，但仍将与Kabat CDR重叠，尽管根据特定残基或成组残基乃至整个CDR不显著影响分析物（例如，抗原）结合的预测或实验发现，它们可得到缩短或加长。本文所使用的方法可以利用根据这些体系中的任意一个限定的CDR，尽管某些实施方案使用Kabat或Chothia限定的CDR。

[0095] “组分”、“多种组分”和“至少一种组分”通常是指捕获抗体、检测或偶联物抗体、校准物、对照、灵敏度组 (panel)、容器、缓冲液、稀释剂、盐、酶、酶的辅助因子、检测试剂、预处理试剂/溶液、底物（例如，作为溶液）、终止溶液等，根据本文描述的方法和本领域所知的其他方法，其可包含在用于测定诸如患者血清样品的测试样品的试剂盒中。一些组分可以在溶液中被冻干以便重建后在测定中使用。

[0096] 如本文所用的，术语“偶联物”意指包含结合对成员和标记物的实体。

[0097] “对照”是指已知不含分析物（“阴性对照”）或含有分析物（“阳性对照”）的组合物。阳性对照可以包含已知浓度的分析物。“对照”、“阳性对照”和“校准物”在本文中可互换使用，是指包含已知浓度的分析物的组合物。“阳性对照”可用来确立测定性能特性，并且是试剂（例如，分析物）完整性的有用的指示物。

[0098] “表位”、“多个表位”或“感兴趣的表位”是指被识别并且可以结合至其特异性结合配偶体（例如，分析物结合分子，例如，抗体或其片段）上的互补位点的任何分析物上的位点。分析物和抗原结合分子是特异性结合对的一部分。例如，表位可以在多肽、蛋白质、半抗原、碳水化合物抗原（例如但不限于糖脂、糖蛋白或脂多糖）或多糖上。其特异性结合配偶体可以是，但不限于，分析物结合分子（例如，抗体或其分析物反应性片段）。

[0099] “旗标值”是阈值或截止值，其决定在确定测试样品中的分析物浓度时是使用来自对分析物具有相对较高结合亲和力的分析物结合分子的信号还是使用来自对分析物具有相对较低和较高结合亲和力的分析物结合分子的信号的比值。旗标值如本文所述来确定。重要的并应当指出的是，旗标值还提供了其中以及就其本身而言重要的测定信息。例如，旗标值可以在一步测定中使用以确定测定所测得的值或结合曲线的部分是否由于钩效应而不真实地降低。

[0100] 如本文所使用的，术语“强度”意指每单位面积或体积上电、光、热或声的强度的量或程度。在不同的实施方案中，术语“强度”是指每单位时间每单位面积计数的光子的数目。例如，每单位面积1000个光子可以被记录为在单一像素中的500个计数，而每单位面积80个光子可以被记录为在单一像素中的40个计数。特定的转换取决于所使用的检测系统。强度与计数的光子数目成比例。

抗体-抗原-标记抗体夹心法

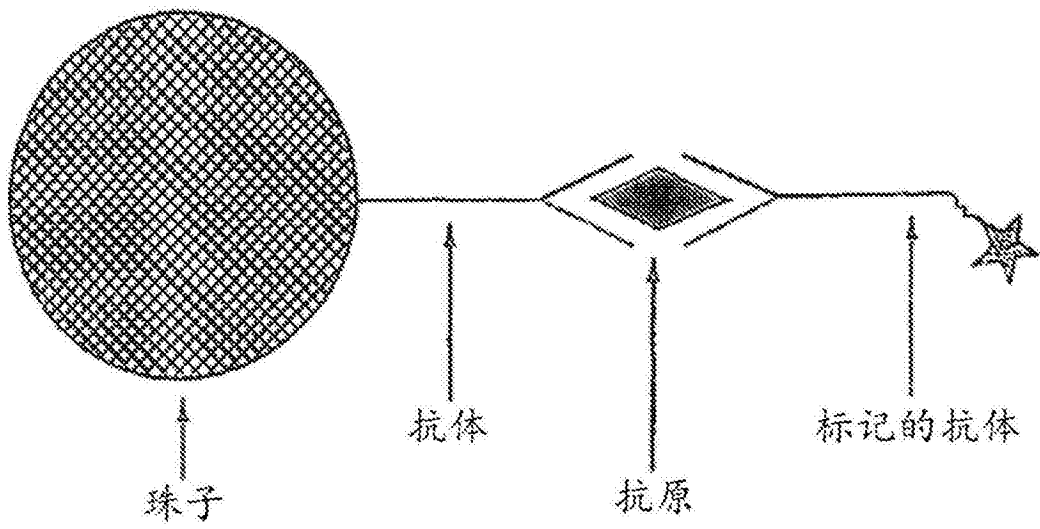


图1

竞争性测定

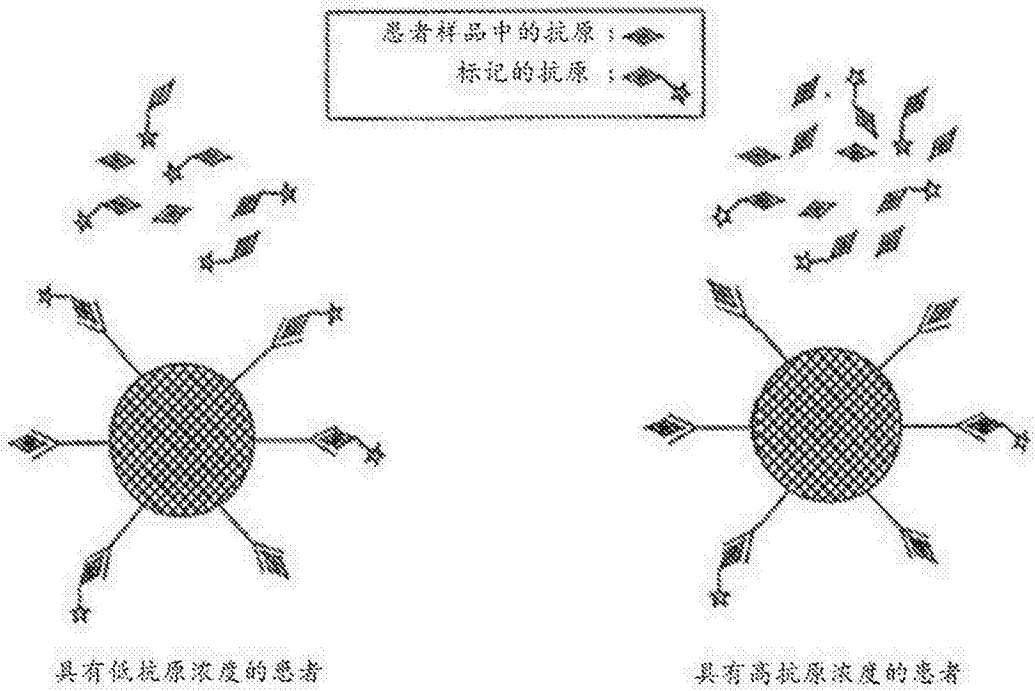


图2

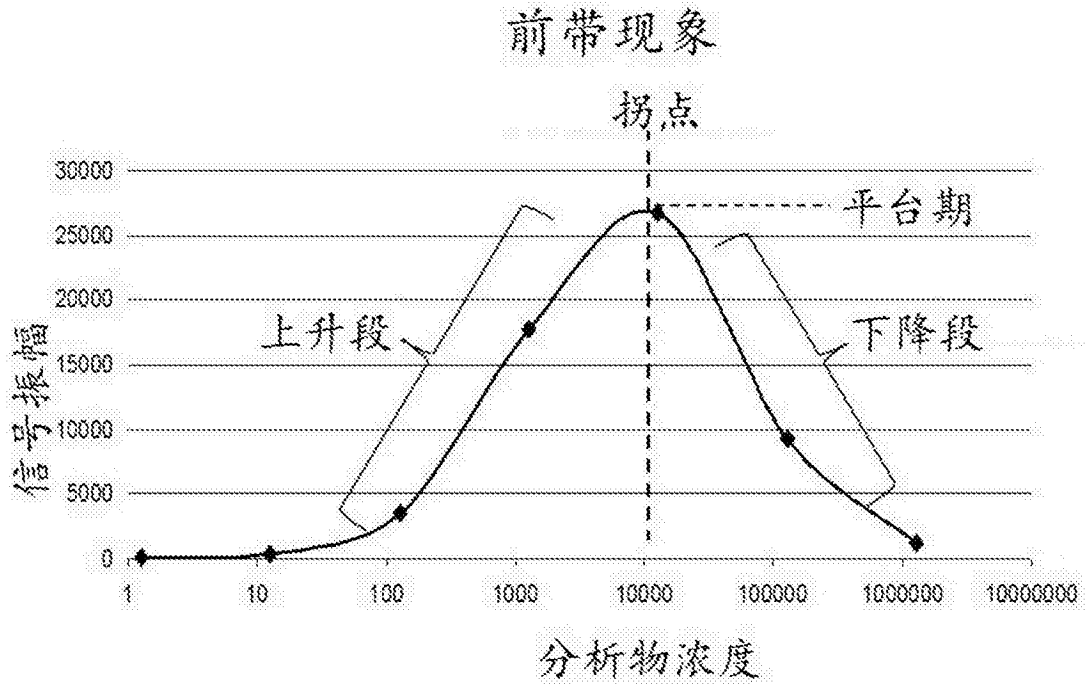


图3

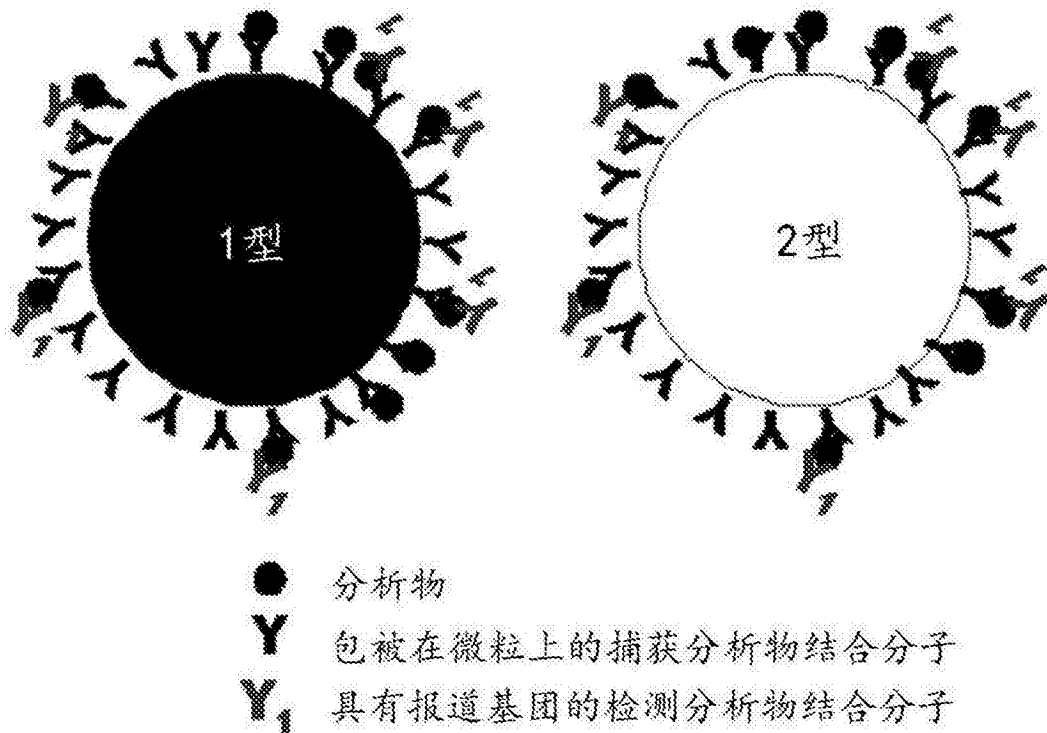
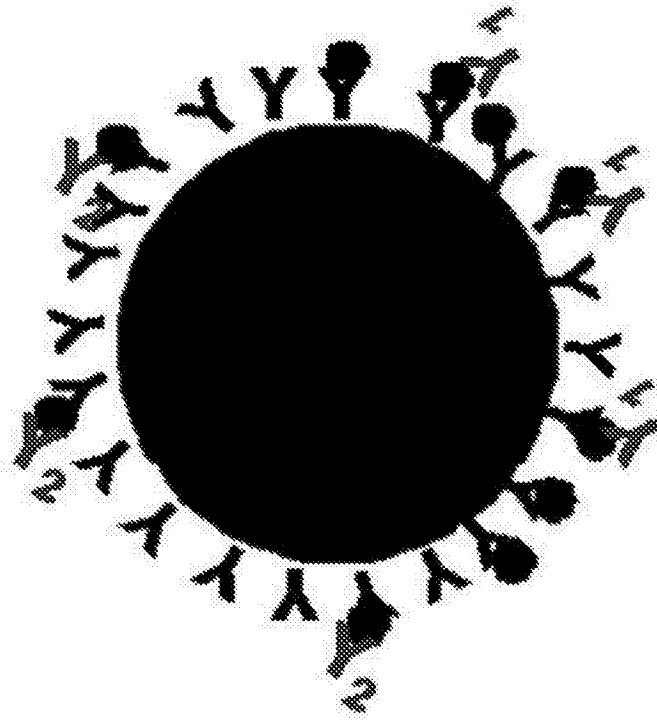


图4



- 分析物
- Y 包被在微粒上的捕获ABM
- Y₁ 具有报道基团1的检测ABM
- Y₂ 具有报道基团2的检测ABM

图5

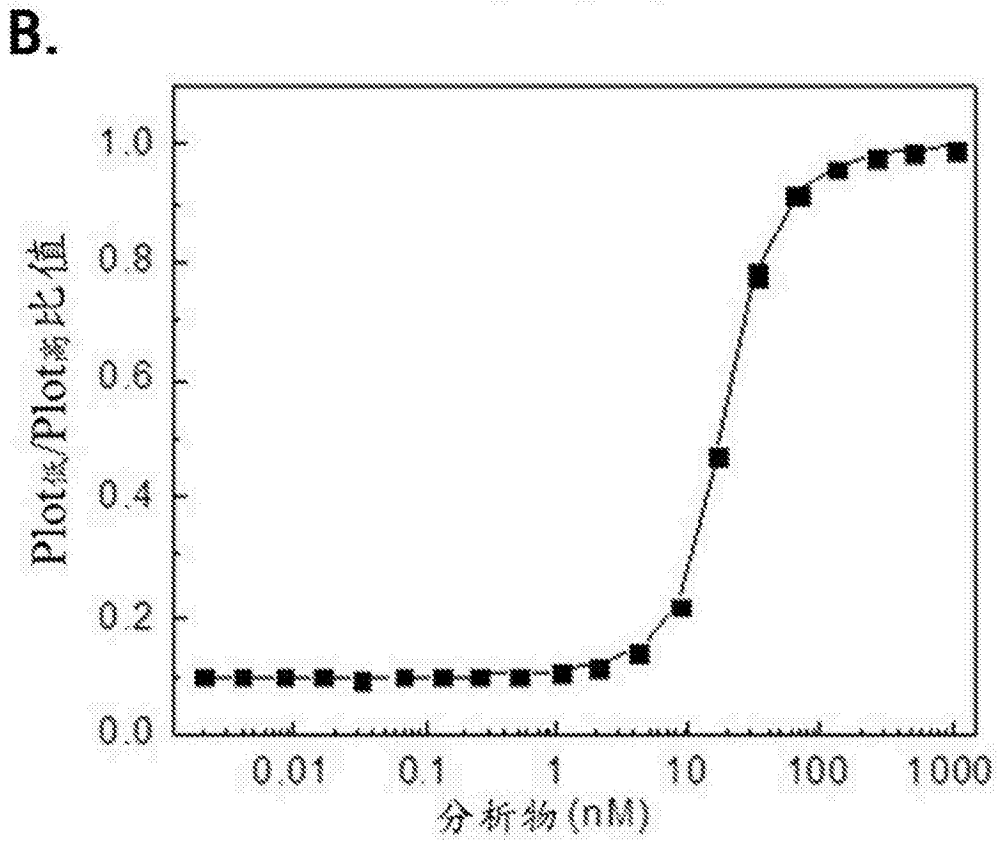
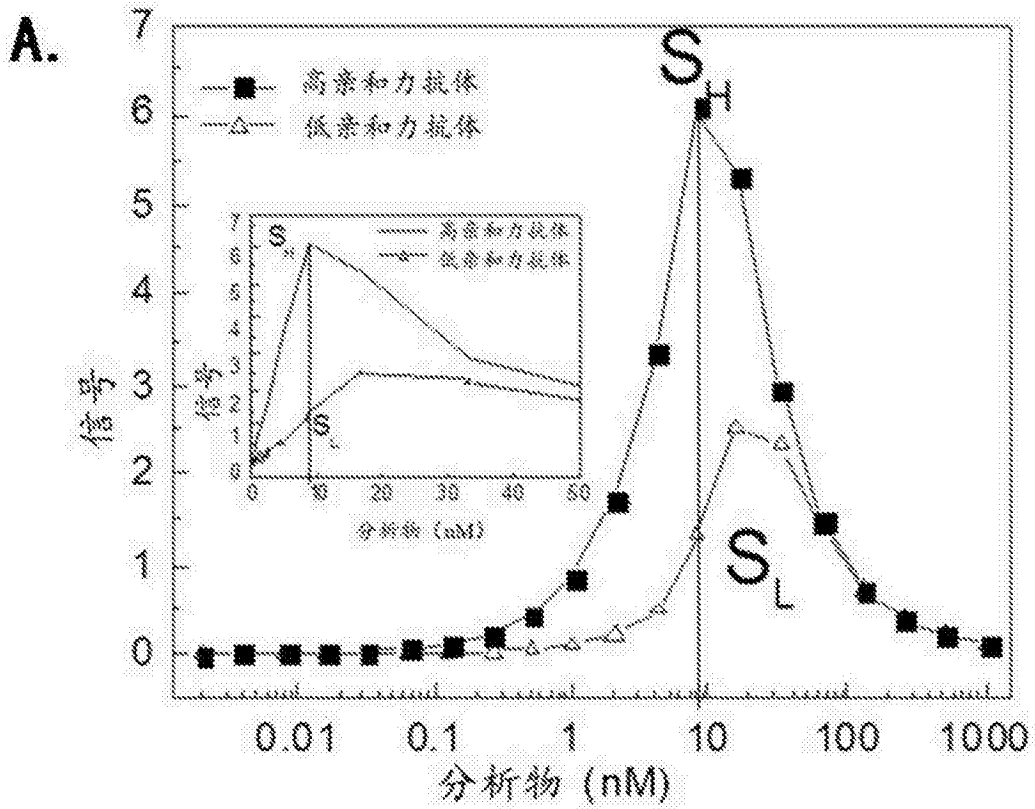


图6

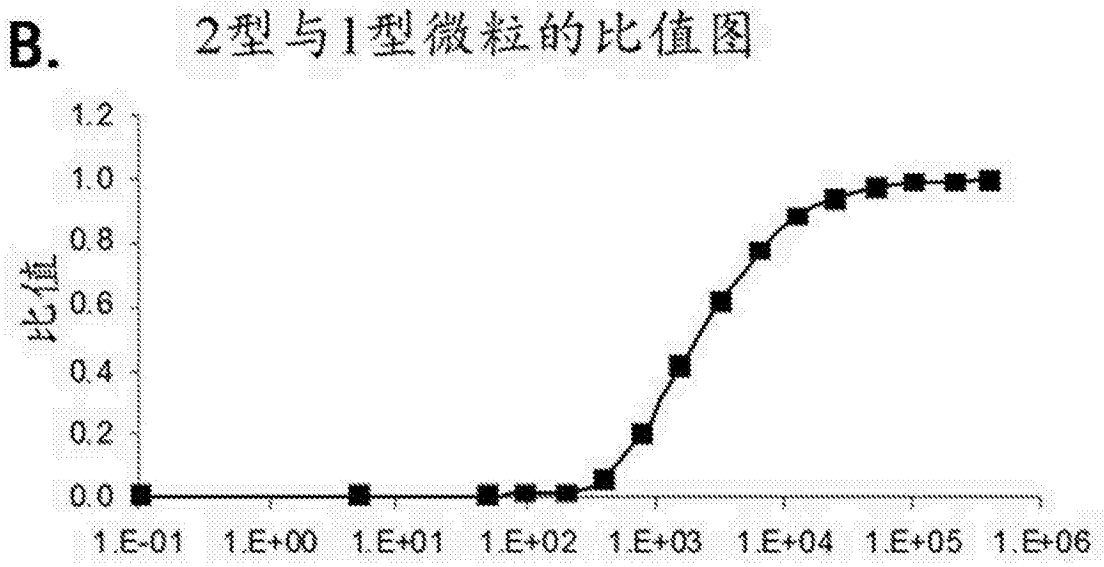
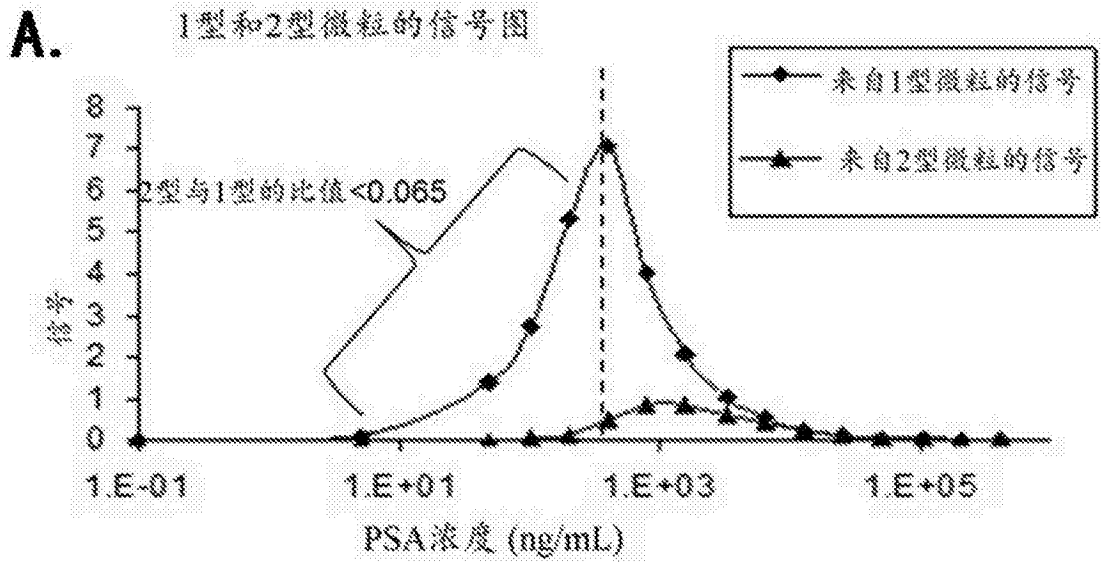


图7

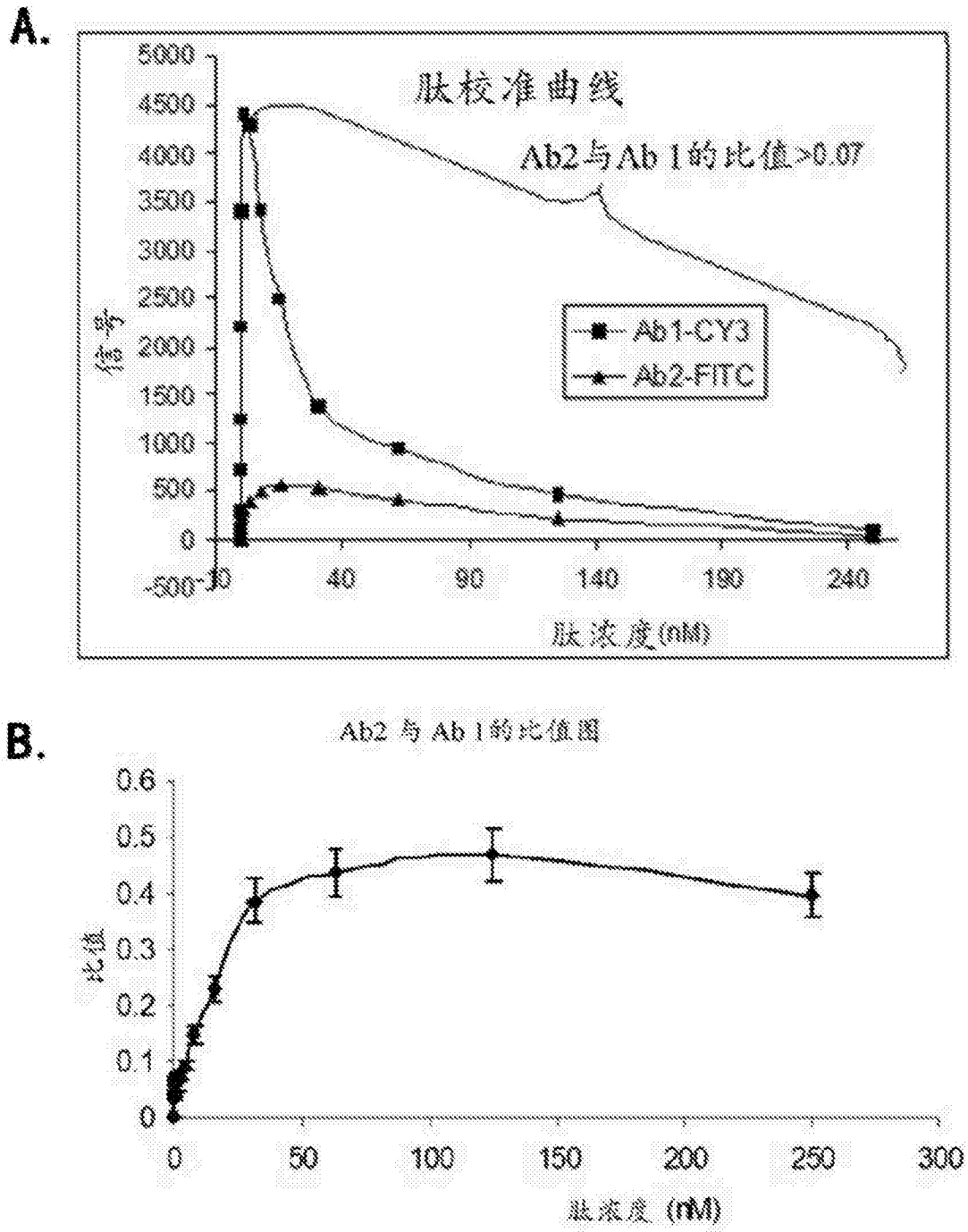


图8

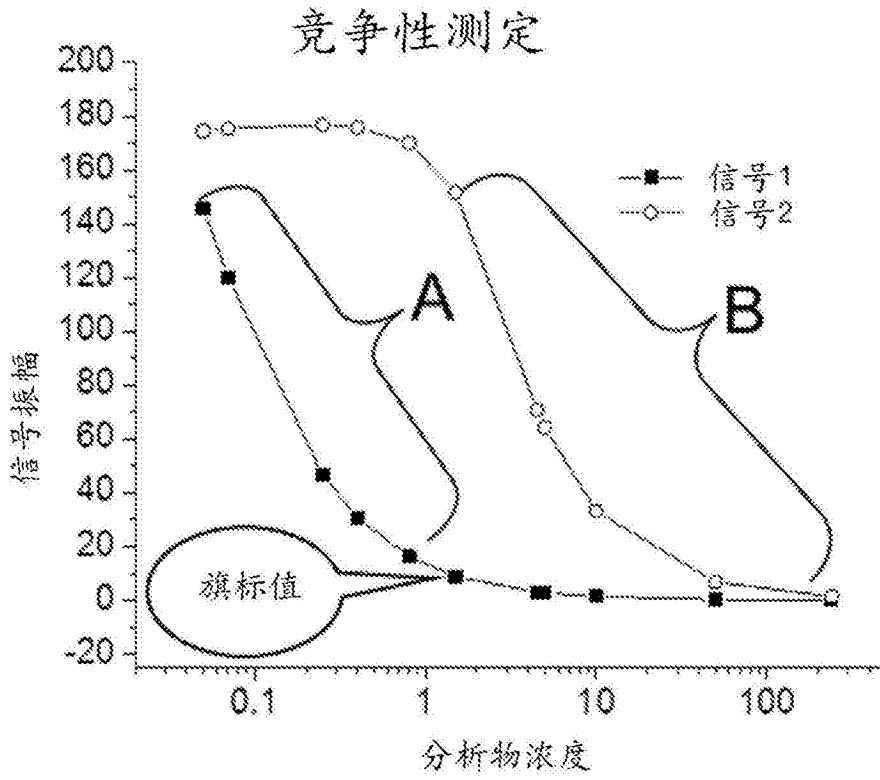


图9

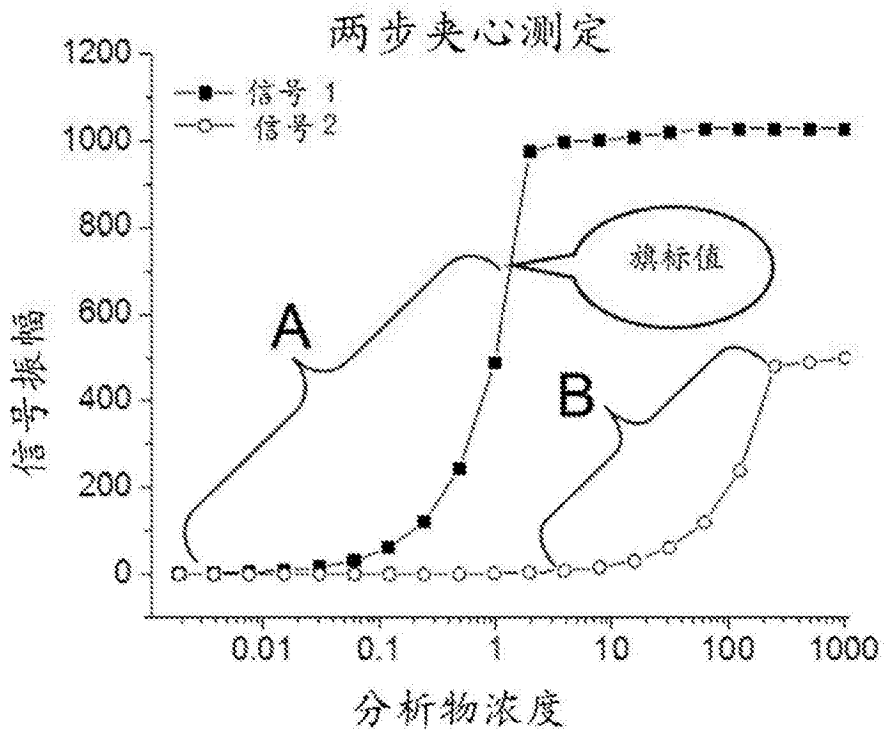


图10

专利名称(译)	具有提高的动态范围的测定		
公开(公告)号	CN105190311B	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201380075980.5	申请日	2013-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培实验室		
当前申请(专利权)人(译)	雅培实验室		
[标]发明人	BL杜维尔 S给达 Q阮 JP斯金纳 SY特亭		
发明人	B·L·杜维尔 S·给达 Q·阮 J·P·斯金纳 S·Y·特亭		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/5306 G01N33/54306		
代理人(译)	程芳		
审查员(译)	李进进		
优先权	13/833655 2013-03-15 US		
其他公开文献	CN105190311A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本文提供了可用于避免“前带现象”或“钩效应”并且扩大可精确测量的分析物浓度范围的测定和试剂盒。

