



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104090097 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 08

(21) 申请号 201410365848. 4

(22) 申请日 2004. 02. 26

(62) 分案原申请数据

200480042127. 4 2004. 02. 26

(71) 申请人 康多尔生物技术有限公司

地址 德国魏森斯贝格

(72) 发明人 P·劳赫 T·波利夫克 A·策尔默

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

一种用作结合对的特异性结合反应培养基的水溶液

(57) 摘要

本发明涉及一种作为用于结合对的特异性结合反应培养基使用的水溶液,其中第一结合成员识别其互补第二结合成员,该溶液含有:a)一种控制pH的缓冲液;b)选自下述基团的化合物A:-由通式 $IR^1-[[CR^2R^3]_p-O]_q-R^4$ 定义的化合物,其中 R^1 是氢或羟基,各元件的 R^2 独立地是氢或羟基, R^3 是氢、甲基、乙基, R^4 是氢或烷基,p是2到10的一个整数,q是1到100的一个整数,附带条件是该化合物至少携带两个羟基;-多元醇;-糖类;c)非离子洗涤剂。

1. 一种在结合对的特异性结合反应过程中达到降低基质效应或者降低或防止因嗜异性抗体引起的效应的体外方法,其中第一结合成员识别其互补的第二结合成员,其中所述的特异性结合反应是在血浆或血清的基质中进行的,所述方法包括使用水溶液作为所述特异性结合反应的介质,该水溶液含有

a) 控制 pH 的缓冲剂;

b) 选自下组的化合物 A:

- 由通式 I $R^1-[[CR^2R^3]_p-O]_q-R^4$ 定义的化合物,其中 R^1 是氢或羟基,各单元中 R^2 独立地是氢或羟基, R^3 是氢、甲基、乙基, R^4 是氢, p 是 2 到 10 的整数, q 是 1 到 50 的整数,附带条件是该化合物至少携带两个羟基;

- 多元醇;

- 糖类;

c) 非离子型洗涤剂,

其中所述水溶液具有 200mM-1M 的离子强度。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述的水溶液包含免疫阻断非特异性抗体结合的有效量的蛋白质。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述蛋白质选自牛血清白蛋白,卵清蛋白、酪蛋白或胎牛血清。

4. 权利要求 2 的方法,其中所述蛋白质的浓度在 0.1 到 2% (w/v) 范围之内。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述的水溶液包含选自 NaCl、KCl、 NH_4Cl 的盐。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述水溶液具有 200-800mM 的离子强度。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述水溶液具有 250-800mM 的离子强度。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述缓冲剂选自:三(羟甲基)-氨基甲烷,哌嗪-1,4-双-2-乙烷磺酸,4-吗啉代乙烷磺酸,4-(2-羟乙基)-1-哌嗪-乙烷磺酸,磷酸盐缓冲剂。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物 A 选自下组:聚亚烷基二醇,聚丙二醇,丙二醇,聚乙二醇,乙二醇,单糖,双糖,三糖,蔗糖,甘露糖,海藻糖,多元醇,甘油,和其混合物。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物 A 的浓度在 2.0 到 20% (w/v 或 v/v) 范围之内。

11. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物 A 的浓度在 2.0 到 15% (w/v 或 v/v) 范围之内。

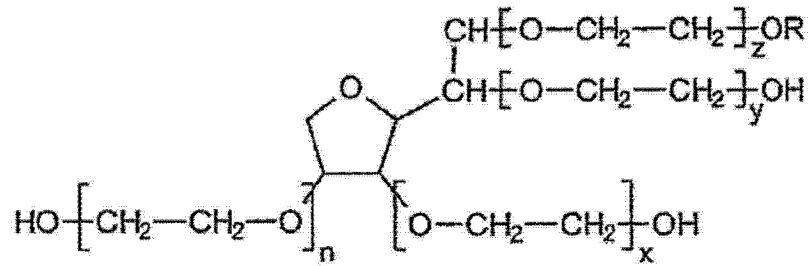
12. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物 A 的浓度在 2.0 到 10% (w/v 或 v/v) 范围之内。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物 A 的浓度在 2.0 到 7% (w/v 或 v/v) 范围之内。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述非离子型洗涤剂为通式化合物,其选自

a) 具有取代基 R^1 和 R^2 的取代的苯基 (R^1-Ph-R^2),其中 R^1 是 C_1-C_9 烷基, R^2 是 $-O-[CH_2-CH_2-O]_a-H$ 基团,其中“a”是 5 到 40 的整数,其中 R^2 相对于 R^1 在对位、间位或邻位;

b)



其中 n 、 x 、 y 及 z 都是 5 到 40 的整数， R 是脂肪酸残基。

15. 权利要求 1 的方法，其中所述非离子型洗涤剂选自：十二烷基聚（乙二醇醚） $_m$ ，其中 m 是 5 到 40 的整数；1- O -正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷（正辛葡萄糖苷）；烷基酚聚（乙二醇醚） $_m$ ，其中 m 是 5 到 40 的整数；1- O -正十二烷基- β -D-吡喃葡萄糖基（1-4） α -D-吡喃葡萄糖苷；十二烷基聚（乙二醇醚） $_m$ ，其中 m 是 5 到 40 的整数；聚（氧化乙烯）(20)-脱水山梨醇单脂肪酸酯；辛基酚聚（乙二醇醚） $_m$ ，其中 m 是 5 到 40 的整数。

16. 权利要求 1 的方法，其中所述非离子型洗涤剂的浓度在 0.1-1.0% (v/v) 范围之内。

17. 权利要求 1 的方法，其中所述非离子型洗涤剂的浓度在 0.15-1.0% (v/v) 范围之内。

18. 权利要求 1 的方法，其中所述非离子型洗涤剂的浓度在 0.2-1.0% (v/v) 范围之内。

19. 权利要求 1 的方法，其中所述非离子型洗涤剂的浓度在 0.2-0.8% (v/v) 范围之内。

20. 权利要求 1 的方法，其中所述非离子型洗涤剂与化合物 A 的比率为 1:15 到 1:25。

21. 权利要求 1 的方法，其中所述水溶液不含有二硫苏糖醇。

22. 权利要求 1 的方法，其中 pH 被调整在 5.6 到 9.6 范围内。

23. 权利要求 1 的方法，其中所述水溶液能够防止 K_D 值高至 $10^{-7}M$ 的低亲合性结合。

24. 权利要求 1 的方法，其中所述水溶液能够防止 K_D 值高至 $10^{-7}M$ 的低亲合性结合，并将 K_D 值为 $10^{-7}M$ 到 $10^{-8}M$ 范围内的中亲合性结合降低至少 90%。

25. 权利要求 1 的方法，其中所述水溶液能够防止 K_D 值为高至 $10^{-7}M$ 的低亲合性结合，并将 K_D 值为 $10^{-7}M$ 到 $10^{-9}M$ 范围内的中亲合性结合降低至少 90%。

26. 权利要求 1 的方法，其中所述水溶液能够增强抗体的结合活性。

27. 权利要求 1 到 26 的任一项的方法，其中所述结合反应是抗体抗原结合反应。

28. 权利要求 1 到 26 的任一项的方法，其中所述结合反应是受体配体结合反应。

29. 权利要求 1 到 26 的任一项的方法，其中所述水溶液用作样品及试剂的稀释缓冲液或用作洗涤缓冲液。

30. 权利要求 1 的方法，其中所述被降低或防止的因嗜异性抗体引起的效应是所述嗜异性抗体与反应中使用的抗体的结合。

31. 权利要求 1 的方法，其中所述被降低或防止的因嗜异性抗体引起的效应是所述嗜异性抗体与反应中使用的俘获抗体的结合。

32. 权利要求 1 的方法，其中所述被降低或防止的因嗜异性抗体引起的效应是所述嗜异性抗体与反应中使用的检测抗体的结合。

33. 权利要求 1 的方法,其中所述嗜异性抗体为人抗小鼠抗体。

一种用作结合对的特异性结合反应培养基的水溶液

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 2 月 26 日、申请号为 No. 200480042127. 4、发明名称为“一种用作结合对的特异性结合反应培养基的水溶液”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明涉及用作结合对的特异性结合反应培养基的水溶液。

[0003] 发明背景

[0004] 公知使用一种或多种抗体在一种试样中检测试验物质（分析物）的免疫测定技术。免疫测定技术的发展增强了该试验的敏感性。尽管在近近年来有所发展，但仍然希望消除非特异性的结合反应、交叉反应以及基质之中存在的化合物的影响。

[0005] 免疫测定法取决于结合成员对的第一结合成员（如一种抗原或配体）与结合成员对的第二结合成员（如一种抗体或受体）特异性结合的能力。为了测定这种结合的延续，用可检测部分标记含有这种结合成员的一方的共轭物。这种结合成员对可以是一种抗原和针对该抗原的抗体。

[0006] 免疫测定法可以以竞争性的免疫测定法形式或以夹心免疫测定法形式进行。在竞争性的免疫测定法形式中抗原可以被固定到固相材料上，而结合到固相材料上的可检测部分的数量能够被检出、计量并将其与试样中存在的抗体的数量相关联。固相材料的实例包括珠子、颗粒、微粒等等。在夹心免疫测定法形式中，将含有例如一种抗体的试样与一种蛋白质例如抗原相接触。所述抗原被固定在固相材料上。固相材料的实例包括珠子、颗粒、微粒等等。所述固相材料通常用一种已被可检测部分标记的第二抗原或抗体生成。然后分别在所述固相材料上第二抗原或抗体分别与相应抗体或抗原结合，在一个或多个洗涤步骤以去掉未结合的物质之后，加入一种指示剂物质例如显色物质，使其与可检测部分反应，产生可检测信号，如颜色变化。然后检出该颜色变化，计量并将其与试样之中存在的抗体数量相关联。此外应注意还需要各种稀释剂和缓冲液用于优化处理微粒、抗原、共轭物及参与化学反应的其他试验组分。

[0007] 为了在免疫测定法中获得最佳结果，用于结合伙伴之间结合反应（例如抗体和抗原反应或配体和受体生成复合物）的溶液必须提供一种培养基以优化抗体结合抗原的能力，或必须提供一种培养基以优化配体结合受体的能力，同时强有力的降低甚至防止非特异性相互作用、低亲合性结合和基质效应，以免生成错误信号。

[0008] 为了消除非特异性相互作用和交叉反应，有人在结合反应之后将洗涤剂加入洗涤步骤所用的缓冲液中以去除非特异性结合。

[0009] 对于免疫测定法，像 western 印记分析、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等，使用含有补充有牛血清白蛋白和 0.01 到 0.05 (v/v) **Tween®** 20 的磷酸盐缓冲盐水的溶液作为培养基，用于结合伙伴（例如抗体和抗原）之间的结合反应。但是常常发现用现有技术的这种缓冲液不能避免非特异性或低亲合性结合、交叉反应和基质效应。例如，当研究一种涉及多元分析物检测的 CRP 试验时，由于应用多元抗体而带来的交叉反应和基质效应看来已成为一个问题，其不能通过利用常规的免疫测定缓冲液解决。

[0010] 因此本发明的目的是提供一种溶液，作为用于结合成员对的特异性结合反应的培养基使用，其中强有力的降低或甚至防止非特异性结合、低亲合性结合、交叉反应和基质效

应。此外,本发明的目的是提供一种免疫测定方法,其中非特异性和低亲合性结合、交叉反应和基质效应被降低或防止。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的目的是通过使用一种水溶液作为用于结合成员对的特异性结合反应的培养基而实现的,其中第一结合成员识别其互补的第二结合成员,该溶液含有

[0013] a) 控制 pH 的一种缓冲液;

[0014] b) 选自下组的化合物 A:

[0015] - 由通式 I $R^1-[[CR^2R^3]_p-O]_q-R^4$ 定义的化合物,其中 R^1 是氢或羟基,各单元中 R^2 独立地是氢或羟基, R^3 是氢、甲基、乙基, R^4 是氢或烷基, p 是 2 到 10 的一个整数, q 是 1 到 100 的一个整数,附带条件是该化合物至少携带两个羟基;

[0016] - 多元醇;

[0017] - 糖类;

[0018] c) 非离子洗涤剂。

[0019] 在化合物 A 的通式 I 中,如果 R^4 是氢,相邻的残基 R^2 也是氢。如果 R^1 是羟基,相邻的残基 R^2 是氢。在一个优选具体实施方式中,化合物 A 的分子式中的 q 是从 1 到 50 的一个整数,更优选从 1 到 30。

[0020] 本发明的发明人意外地发现本发明的水溶液可以降低免疫测定中的交叉反应、基质效应、非特异性结合和低亲合性结合。此外,还发现使用本发明水溶液时可以防止嗜异性的抗体(人抗小鼠抗体)带来的影响。另外,即使在应用于血浆的情况下,用该缓冲液能够避免风湿(rheuma)因子、血红蛋白、胆红素和甘油三脂带来的负效果。

[0021] 在这里“结合成员对”包括一个“第一结合成员”和一个“第二结合成员”。两种结合成员会彼此特异性结合。结合成员对的第一结合成员可以分别是抗原或配体。第二结合成员(如分别为抗体或受体)特异性地识别并结合第一结合成员(如分别为抗原或配体)。第二结合成员是相应的结合成员,因此也称为“相应结合成员”。技术人员会理解术语“第一”结合成员和“第二”结合成员分别可以是例如抗原和相应抗体,或反之亦然。

[0022] 本发明的水溶液代表一种通用缓冲液,其在各种基质(例如血浆,血清等)中进行的免疫测定和结合反应中作为培养基。在应用多分析物的情况下,例如如果使用蛋白质芯片,需要同步孵育几个(或多个)分析物和几个抗体,经常发生非特异性结合和交叉反应。在很多情况下观察到这种不希望得到的结合反应。利用现有技术公知的标准 ELISA 缓冲液不能防止这种交叉反应影响。另外在现有技术中,与其它参照的方法相比,所采用的天然样品可导致基质效应,这会引入错误的测量值。在此术语“基质”指天然样品(例如血清)之中存在的所有化合物;术语“基质”特别是指有机的、尤其是生物化合物,例如蛋白质。

[0023] 本发明的水溶液分别可以用作结合对的结合反应的培养基,作为用于免疫测定和结合反应的样品稀释缓冲液以及抗体和抗原的稀释缓冲液。进一步可应用于多分析物免疫测定和蛋白质分析(proteomics),其中能够防止不希望得到的荧光体标记抗体的交叉反应。荧光体标记抗体往往会以非特异性方式结合其它蛋白质。使用本发明的水溶液能够避免这种影响。

[0024] 在免疫测定如 ELISA 和蛋白质芯片中,使用本发明的缓冲液可以展示出进一步的积极效果。当用本发明缓冲液孵育带有固定抗体的表面时,该固定化抗体的活性有所增强。

这使得分析物与固定化抗体的结合增强。总之,本发明缓冲液除降低非特异性信号和非特异性影响之外,还会增强分析物和抗体之间特异性结合反应阳性作用带来的特异性信号。这种固定化抗体活性的所致增强提供更高的相应试验的敏感性。

[0025] 本发明的缓冲液可以用于免疫测定 ELISA、EIA、FIA、侧向流式试验 (lateral-flow-test)、蛋白质芯片、多分析物试验、western 印记、点印记、免疫组织化学、受体配体试验和免疫 PCR。

[0026] 发明详述

[0027] 在本发明一优选具体实施方式中,该水溶液进一步包括与免疫阻断非特异抗体结合有效量的蛋白质。此蛋白质优选选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、酪蛋白、胎牛血清。进一步优选该蛋白质以 0.1 到 2% (w/v) 的浓度存在于水溶液中,更优选 0.5 到 1.5% (w/v) 范围。这些蛋白质不能被免疫测定所用的任何抗体识别。这种未被识别的蛋白质可以免疫阻断由样品之中可能存在的分子或化合物带来的非特异性抗体结合。

[0028] 在另一具体实施方式中,该水溶液含有选自下列的盐:NaCl、KCl、NH₄Cl。进一步优选该水溶液具有 100mM 到 1.5mM 的离子强度,更优选 200mM 到 1M,甚至更优选 200mM 到 800mM,特别更优选 200mM 到 600mM,最优选 250mM 到 500mM。本发明人意外地发现用作用于结合反应的培养基的该缓冲液在 200mM 到 600mM 范围内的高离子强度会进一步降低非特异性结合和交叉反应,同时没有负面影响特异性结合反应。

[0029] 在特定优选具体实施方式中,该水溶液缓冲液选自 Tris(三(羟甲基)-氨基甲烷)、Pipes(哌嗪-1,4-双-2-乙烷磺酸)、Mes(4-吗啉代乙烷磺酸)、Hepes(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪-乙烷磺酸)、磷酸盐缓冲液。

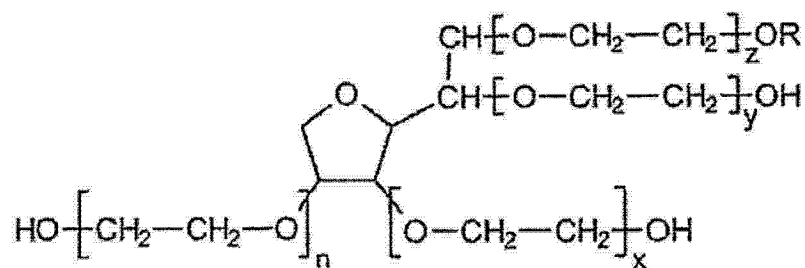
[0030] 在另一优选具体实施方式中,化合物 A 选自下组:聚亚烷基二醇,聚丙二醇,丙二醇,聚乙二醇,乙二醇,单糖,双糖,三糖,蔗糖,甘露糖,海藻糖,多元醇,甘油和其混合物。在一优选具体实施方式中化合物 A 的浓度在 0.5 到 25% (v/v) 范围之内,优选 2.0 到 20% (v/v),更优选 2.0 到 15% (v/v),进而更优选 2.0 到 10% (v/v),甚至更优选 2.0 到 7% (v/v),最优选约 5% (v/v)。如果化合物 A 是液相,该浓度则为 % (v/v)。如果该化合物 A 是固体(例如糖类),该浓度应被理解为 % (w/v)。

[0031] 在另一优选具体实施方式中,该水溶液含有选自下述的通式化合物作为非离子洗涤剂:

[0032] a) 具有取代基 R¹ 和 R²(R¹-Ph-R²) 的取代的苯基,其中 R¹ 是 C₁-C₉ 烷基,R² 是 -O-[CH₂-CH₂-O]_a-H 基团,其中“a”是 5 到 40 的一个整数,其中 R² 相对于 R¹ 在对位、间位或邻位;

[0033] b)

[0034]



[0035] 其中 n 、 x 、 y 和 z 都是 5 到 40 的一个整数, R 是脂肪酸残基。

[0036] 进一步优选该非离子型洗涤剂选自:十二烷基聚(乙二醇醚) m , 其中 m 是 5 到 40 的整数; 1- O - n -辛基- β - D -吡喃葡萄糖苷(n -辛葡萄糖苷)(n -Octylglucoside); 烷基酚聚(乙二醇-醚) m , 其中 m 是 5 到 40 的整数, 优选 $m = 11$ (**Nonidet P40**[®]); 1- O - n -十二基- β - D -吡喃葡萄糖基(1-4)- α - D -吡喃葡萄糖苷; 十二烷基聚-(乙二醇醚) m , 其中 m 是 5 到 40 的整数, 优选 $m = 23$ (**Brij35**[®]); 聚(氧乙烯)(20)-脱水山梨醇单脂肪酸酯, 优选选自聚(氧乙烯)(20)-脱水山梨醇一油酸酯 (**Tween**[®] 80), 聚(氧乙烯)(20)-脱水山梨醇单月桂酸酯 (**Tween**[®] 20), 聚(氧乙烯)(20)-脱水山梨醇单棕榈酸酯 (**Tween**[®] 40), 聚(氧乙烯)(20)-脱水山梨醇一硬脂酸酯); 辛基酚聚(乙二醇醚) m , 其中 m 是 5 到 40 的整数, 优选 $m = 10$ (**Triton**[®] X-100)。

[0037] 在优选具体实施方式中, 非离子型洗涤剂的浓度在 0.1 到 1.0% (v/v) 范围之内。优选非离子型洗涤剂的浓度在 0.15 到 1.0% (v/v), 更优选在 0.2 到 1.0% (v/v) 范围内, 进而更优选在 0.2 和 0.8% (v/v) 范围内, 甚至更优选 0.25% 到 0.6% (v/v) 范围内, 最优选约 0.25% (v/v)。

[0038] 本发明的一个重要特点是存在如权利要求 1 所述的化合物 A 和所述非离子型洗涤剂。相对于现有技术免疫测定法中孵育溶液的浓度, 所述两种组分(化合物 A 和非离子型洗涤剂)的每一种均以更高的浓度存在于本发明的水溶液中。在另一优选具体实施方式中提供了水溶液, 其中所述非离子型洗涤剂与化合物 A 的比率为 1:15 到 1:25, 优选约 1:20。

[0039] 在一个特别优选具体实施方式中, 所述水溶液含有 2 到 7% (v/v) 范围内的化合物 A 和 0.2 到 0.8% (v/v) 范围内的非离子型洗涤剂。优选该水溶液具有 200mM 到 1mM 的离子强度, 更优选 200mM 到 800mM, 尤其更优选 200mM 到 600mM, 最优选 250mM 到 500mM。优选所述水溶液含有选自下述的化合物作为化合物 A: 聚亚烷基二醇, 聚丙二醇, 丙二醇, 聚乙二醇, 乙二醇, 甘油及其混合物, 更优选选自下述的化合物: 聚丙二醇, 丙二醇, 聚乙二醇, 乙二醇, 最优选乙二醇。

[0040] 本发明的水溶液优选不含有二硫苏糖醇。还优选本发明水溶液不含有 β -巯基乙醇。

[0041] 在另一优选具体实施方式中, 水溶液的 pH 被调整在 5.6 到 9.6 范围内, 优选 6.0 到 9.0 范围内, 进一步优选 6.5 到 8.0 范围内, 最优选 6.8 到 7.4 范围内。

[0042] 所述水溶液的一个特别优选具体实施方式是具有降低非特异性结合、交叉反应及基质干扰影响的能力。与标准条件相比, 本发明的水溶液尤其能够防止 K_D 值达 10^{-7} 的低亲合性结合。进一步优选该水溶液能够防止 K_D 值为 10^{-7} M 的低亲合性结合, 并与标准条件相比, 将 K_D 值为 10^{-7} M 到 10^{-8} M 范围内的中亲合性结合降低至少 90%。更进一步优选该水溶液能够防止 K_D 值为 10^{-7} M 的低亲合性结合, 并与标准条件相比, 将 K_D 值为 10^{-7} M 到 10^{-9} M 范围内的中亲合性结合降低至少 90%。在此“标准条件”由以下条件构成的水溶液代表: 50mM PBS(磷酸盐缓冲盐水, pH 7.4), 150mM NaCl, 1% (w/v) BSA(参见表 1; 参考文献实施例)。与用另一标准溶液获得的测量值相比, 结果是相同的, 即由 50mM PBS(pH7.4), 100mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween20 组成的水溶液。

[0043] 除了降低非特异性低亲和性结合以及基质效应的影响,尤其优选该水溶液能够增强抗体的结合活性,优选固定化抗体的结合活性,以及配体和受体之间的结合活性。使用本发明溶液可以将固定化抗体的结合活性增强大约 10% 或更多。

[0044] 本发明的目的还可由之前所述本发明水溶液的浓缩物解决,优选 2 到 10 倍浓缩,更优选 3 到 5 倍浓缩。

[0045] 更进一步,本发明的目的通过利用本发明水溶液解决,将其作为结合对的结合反应的培养基,其中第一结合成员特异性识别并结合其互补的第二结合成员。优选将该水溶液作为抗体抗原结合反应的培养基,在一个替代性具体实施方式中该水溶液作为受体配体结合反应的培养基。在其它优选具体实施方式中,该水溶液作为样品、试剂、配体、受体、抗原、抗体的稀释缓冲液。该水溶液还可优选在免疫测定法中结合反应进行之后作为洗涤缓冲液。

[0046] 本发明进一步提供一种在结合对的特异性结合反应过程中降低非特异性结合和 / 或交叉反应和 / 或基质干扰影响的方法,其中第一结合成员识别其互补的第二结合成员,该方法包括利用本发明水溶液作为该特异性结合反应的培养基。

[0047] 本发明另一方面是本发明的水溶液可以作为试剂盒的一个组分。在此术语“试剂盒”是指各种试剂及相关物质,如缓冲液、包含固定化结合成员的载体以及进行试验所需要的各试剂的集合。因此,本发明提供一种通过免疫测定至少一种待测分析物的检测试剂盒,其中待测分析物是结合成员对的第一结合成员,其中该第一结合成员特异性结合其互补的结合成员,该试剂盒包含:

[0048] a) 含有本发明水溶液的容器;

[0049] b) 在其上固定有所述互补结合成员以捕获分析物的载体;以及

[0050] c) 任选地,能够免疫识别与互补结合成员结合的分析物的试剂,其中所述试剂(抗体)耦联一种检测手段;以及

[0051] d) 任选地,能与所述检测手段反应以产生可检测反应产物的试剂。

[0052] 一种典型试剂盒例如可用作 ELISA 试剂盒用于检测比如在血清中的抗体。在该情况下根据 b) 所述载体在其上含有互补结合成员,例如病毒抗原,用于捕获分析物。所述分析物是血清上抗体。根据 c), 能免疫识别所述分析物的试剂则是一种抗-抗体,其能够识别所述被捕获的抗体。

[0053] 实现发明的最佳方式

[0054] 本发明特征在于作为用于结合成员对的特异性结合反应的培养基使用的水溶液,其中第一结合成员识别其互补第二结合成员,包括:

[0055] a) 控制 pH 的缓冲液;

[0056] b) 选自下述的化合物 A: 由通式 I $R^1-[[CR^2R^3]_p-O]_q-R^4$ 定义的化合物,其中 R^1 是氢或羟基,各单元中 R^2 独立地是氢或羟基, R^3 是氢、甲基、乙基, R^4 是氢或烷基, p 是 2 到 10 的一个整数, q 是 1 到 100 的一个整数,附带条件是该化合物至少携带两个羟基;

[0057] - 多元醇;

[0058] - 糖类;

[0059] c) 非离子洗涤剂。

[0060] 在结合对的特异性结合反应过程中降低非特异性结合和 / 或交叉反应和 / 或基

质干扰影响的本发明方法,其中第一结合成员识别其互补的第二结合成员,即,用于免疫测定,该方法的特征在于包括利用上述水溶液。

[0061] 优选地,发现含有 2 到 7% (v/v) 范围内的化合物 A 和 0.2 到 0.8% (v/v) 范围内的非离子型洗涤剂的水溶液有用的。优选该水溶液具有 200mM 到 1mM 的离子强度,更优选 200mM 到 800mM,尤其更优选 200mM 到 600mM,最优选 250mM 到 500mM。优选所述水溶液含有选自下述的化合物作为化合物 A:聚亚烷基二醇,聚丙二醇,丙二醇,聚乙二醇,乙二醇,甘油及其混合物,更优选选自下述的化合物:聚丙二醇,丙二醇,聚乙二醇,乙二醇,最优选乙二醇。

[0062] 下述实施例更详细地说明本发明。但是,所述实施例仅仅用于说明,并非限制本发明的范围。

附图说明

[0063] 图 1 显示在夹心试验中与 CRP 结合的检测抗体 C6 的数量,450nm 下吸光度对 CRP 浓度 [ng/ml] 作图。所述检测抗体 C6 与蛋白质 CRP 的结合反应是在标准条件下如实施例 1 所述进行,分别使用本发明的样品缓冲液(参见表 1)。根据本发明溶液的样品缓冲液 I 到 III 很好地降低了基质效应的影响。样品缓冲液 I 显示出最佳灵敏度。参照缓冲液的低灵敏度由强烈的基质效应造成。

[0064] 图 2 显示在由多克隆的检测抗体 P2 的非特异性结合所引起的高背景信号下两种不同缓冲液的影响,所述 P2 非特异性结合捕获抗体 P3(根据实施例 2)。在该实验中无分析物存在。与参照实施例缓冲液 II 的高背景信号相比,样品缓冲液 I 显著地降低了非特异性结合。

实施例

[0065] 实施例 1:降低基质效应

[0066] 向微孔板(C8 StarWell Module, NUNC)的各孔中加入 100 μ l 稀释的捕获抗体 C2(最终浓度 1 μ g/ml 在 PBS- 缓冲液中)并用板密封垫覆盖。捕获抗体靶向 CRP(c- 反应蛋白)。然后在室温下孵育该板 5 小时。去除密封垫,以每孔 300 μ l 的洗涤缓冲液(10mM 磷酸盐,350mM NaCl,0.05% Tween,pH 7.4)洗涤该板 4 次。然后向各孔加入 200 μ l 阻断溶液(PBS- 缓冲液,pH 7.4,1% BSA)。用板密封垫覆盖后 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。在兔血清(0-5ng/ml)中稀释分析物 CRP(c 反应蛋白)并在室温下孵育 30min。在不同的样品缓冲液以及参照实施例缓冲液(参见表 1)中稀释生物素标记的检测抗体 C6(靶向 CRP)。在各制备物中的最终浓度是 4 μ g/ml。含有 CRP 的兔血清标准物被含有检测抗体的样品缓冲液以 1:2 稀释。在室温下将其孵育 30min。去除板密封垫并用 300 μ l 洗涤缓冲液洗涤该板 4 次。轻敲该板,使其干燥,彻底去除残余洗涤缓冲液。向各孔加入 100 μ l CRP 制剂。用板密封垫覆盖该板并在室温下轻微振荡孵育 4h。然后再次洗涤该板。向各孔加入 100 μ l 稀释的 NeutrAvidinTM- 辣根过氧化酶轭合物(最终浓度 0.05 μ g/ml 在 PBS 缓冲液中)。在室温下轻微振荡孵育该板 1h。然后再次洗涤该板。将等体积的 **ImmunoPure**[®] TMB Substrat 的两种溶液混合,并立即加 100 μ l 到各孔中。在室温下孵育该板直至出现期望的颜色。颜色从澄清变化为亮蓝。在最后的步骤中,向各孔加入 150 μ l 2M H₂SO₄ 停止反应,用 ELISA 板

读数器 (Molecular 设备) 在 450nm 下阅读吸光度。图 1 画出了不同缓冲液对基质效应的影响。表 1 显示该试验的结果。在表 1 中非特异性结合、低亲合性结合及基质效应的降低在“结果”一栏中用“+”表示。与参照实施例缓冲液 (“-”) 相比,“+”的数目表示非特异性结合、低亲合性结合及基质效应降低的数量。图 1 显示与 CRP 结合的检测抗体 C6 的数量,在 450nm 下吸光度对 CRP 的浓度 [ng/ml] 作图。样品缓冲液 I 显示出最佳灵敏度。参照缓冲液的低灵敏度由强烈的基质效应造成。

[0067] 实施例 2 :降低多克隆检测抗体的非特异性结合

[0068] 接下来的实验中,向微孔板 (C8 StarWell Module, NUNC) 的各孔中加入 250 μ l 稀释的捕获抗体 P3 (多克隆兔抗蛋白酶, 自有制剂, 最终浓度 1g/ml 在 PBS- 缓冲液中) 并用板密封垫覆盖。在室温下孵育该板 4 小时。去除密封垫后, 以每孔 300 μ l 的洗涤缓冲液 (10mM 磷酸盐, 350mM NaCl, 0.05% Tween, pH 7.4) 洗涤该板 4 次。然后向各孔加入 200ul 阻断溶液 (PBS- 缓冲液, pH 7.4, 1% BSA)。再次用密封垫覆盖后 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。分别在参照实施例缓冲液 II 或样品缓冲液 I (参见表 1) 中稀释生物素标记的多克隆检测抗体 P2 (多克隆兔抗蛋白酶, 自有制剂) (在各制剂中的最终浓度为 10 μ g/ml), 并加入各孔 (250 μ l 每孔; 五倍的重复实验)。在室温下孵育该板 2h。去除板密封垫并用 300 μ l 洗涤缓冲液洗涤 4 次。轻敲该板, 使其干燥, 彻底去除残余洗涤缓冲液。向各孔加入 250 μ l 稀释的 NeutrAvidinTM- 辣根过氧化物酶轭合物 (最终浓度 0.5 μ g/ml 在 PBS 缓冲液中)。在室温下轻微振荡孵育该板 1h。然后再次洗涤该板。将等体积的 Immuno **Pure**[®] TMB Substrat 的两种溶液混合, 并直接加 100 μ l 到各孔中。在室温下孵育该板直至出现期望的颜色。颜色从澄清变化为亮蓝。在最后的步骤中, 向各孔加入 150 μ l 2M H₂SO₄ 停止反应, 用 ELISA 板读数器 (Molecular 设备) 在 450nm 下阅读吸光度。图 2 显示了在由多克隆的检测抗体 P2 的非特异性结合所引起的高背景信号下两种不同缓冲液的影响, 所述 P2 非特异性结合捕获抗体 P3。图 2 表明本发明的样品缓冲液 I 能够降低背景信号。在该实验中未使用分析物。另外使用多克隆血清作为抗体。多克隆血清包含许多不同的抗体, 这些抗体均靶向靶蛋白质。许多抗体能够以低或更低的亲合性结合, 有些抗体则能以中亲合性结合, 而只有一种或少数抗体能以高亲合性结合。如图 2 所示, 通过利用本发明的缓冲液, 可以防止相应抗体的低亲合性结合, 至少降低中亲合性结合。因此, 由于本发明水溶液的特性, 一旦将一种分析物加入这样的试验中, 信噪比将会提高。

[0069] 表 1 :该表表明实施例 1 的实验结果 :结果 (=非特异性、低亲合性结合及基质效应的降低)

[0070]

溶液	缓冲液/pH	化合物A(浓度)	非离子型洗涤剂(浓度)	NaCl	BSA	结果
参考文献实施例 (现有技术)	PBS pH 7.4	-	-	150mM	1%	-
样品缓冲液 I	Tris pH 7.4	5%乙二醇	0.25 Tween®20	300mM	1%	++++
样品缓冲液 II	Tris pH 7.4	0.5%乙二醇	0.1 Tween®20	150mM	1%	+
样品缓冲液 III	PBS pH 7.4	3%甘油	0.15 Triton X100	200mM	1%	++
样品缓冲液 IV	Tris pH 7.4	5%甘油	0.25 Triton X100	300mM	1%	++++
样品缓冲液 V	PBS pH 7.4	3%甘油	0.15 Triton X100	600mM	1%	+++
参考文献实施例 II (现有技术)	PBS pH 7.4	-	0.05 Tween®20	150mM	1%	-/+
样品缓冲液 VI	Tris pH 7.4	5%乙二醇	0.25 Tween®20	-	-	+++
样品缓冲液 VII	Tris pH 7.4	5%聚乙二醇	0.25 Tween®20	-	-	+++
样品缓冲液 VIII	Tris pH 7.4	5%聚丙二醇	0.25 Tween®20	-	-	+++
样品缓冲液 IX	Tris pH 7.4	5%聚乙二醇	0.25 Tween®20	300mM	-	++++
样品缓冲液 X	Tris pH 7.4	5%聚丙二醇	0.25 Tween®20	300mM	-	++++
样品缓冲液 XI	Tris pH 7.4	5%聚乙二醇	0.25 Tween®20	300mM	1%	++++
样品缓冲液 XII	Tris pH 7.4	5%聚丙二醇	0.25 Tween®20	300mM	1%	++++
样品缓冲液 XIII	Tris pH 7.4	5%丙二醇	0.25 Tween®20	-	-	+++
样品缓冲液 XIV	Tris pH 7.4	5%丙二醇	0.25 Tween®20	300mM	-	++++
样品缓冲液 XV	Tris pH 7.4	5%丙二醇	0.25 Tween®20	300mM	1%	++++
样品缓冲液 XVI	PBS pH 7.4	5%乙二醇	0.25 Triton X100	-	-	+++
样品缓冲液 XVII	PBS pH 7.4	5%乙二醇	0.25 Triton X100	300mM	-	++++
样品缓冲液 XVIII	PBS pH 7.4	5%乙二醇	0.25 Triton X100	300mM	1%	++++
样品缓冲液 XIX	PBS pH 7.4	5%甘油	0.25 Triton X100	-	-	+
样品缓冲液 XX	PBS pH 7.4	5%甘油	0.25 Triton X100	300mM	-	+++
样品缓冲液 XXI	PBS pH 7.4	5%甘油	0.25 Triton X100	300mM	1%	+++
样品缓冲液 XXII	PBS pH 7.4	5%海藻糖	0.25 Triton X100	-	-	+
样品缓冲液 XXIII	PBS pH 7.4	5%海藻糖	0.25 Triton X100	300mM	-	++
样品缓冲液 XXIV	PBS pH 7.4	5%海藻糖	0.25 Triton X100	300mM	1%	++

[0071] 本发明涉及以下实施方式：

[0072] 实施方式 1. 一种作为用于结合对的特异性结合反应的培养基使用的水溶液，其中第一结合成员识别其互补的第二结合成员，该溶液含有

[0073] a) 控制 pH 的缓冲液；

[0074] b) 选自下组的化合物 A：

[0075] - 由通式 I $R^1-[[CR^2R^3]_p-O]_q-R^4$ 定义的化合物，其中 R^1 是氢或羟基，各单元中 R^2 独立地是氢或羟基， R^3 是氢、甲基、乙基， R^4 是氢或烷基，p 是 2 到 10 的整数，q 是 1 到 100 的整数，附带条件是该化合物至少携带两个羟基；

[0076] - 多元醇；

[0077] - 糖类；

[0078] c) 非离子洗涤剂。

[0079] 实施方式 2. 实施方式 1 的水溶液，进一步包含免疫阻断非特异性抗体结合的有效

量的蛋白质。

[0080] 实施方式 3. 实施方式 2 的水溶液, 其中所述蛋白质选自牛血清白蛋白, 卵清蛋白、酪蛋白、胎牛血清。

[0081] 实施方式 4. 实施方式 2 或 3 的水溶液, 其中所述蛋白质的浓度在 0.1 到 2% (w/v) 范围之内, 优选在 0.5 到 1.5% (w/v) 范围内。

[0082] 实施方式 5. 实施方式 1 到 4 的任一项的水溶液, 其中所述溶液包含选自 NaCl、KCl、NH₄Cl 的盐。

[0083] 实施方式 6. 实施方式 1 到 5 的任一项的水溶液, 其中所述溶液具有 100mM 到 1.5M 的离子强度, 优选 200mM 到 1M, 更优选 200mM 到 800mM, 进一步更优选 200mM 到 600mM, 最优选 250mM 到 500mM。

[0084] 实施方式 7. 实施方式 1 到 6 的任一项的水溶液, 其中所述缓冲液选自: Tris(三(羟甲基)-氨基甲烷), Pipes(哌嗪-1,4-双-2-乙烷磺酸), Mes(4-吗啉代乙烷磺酸), Hepes(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪-乙烷磺酸), 磷酸盐缓冲液。

[0085] 实施方式 8. 实施方式 1 到 7 的任一项的水溶液, 其中所述化合物 A 选自下组: 聚亚烷基二醇, 聚丙二醇, 丙二醇, 聚乙二醇, 乙二醇, 单糖, 双糖, 三糖, 蔗糖, 甘露糖, 海藻糖, 多元醇, 甘油和其混合物。

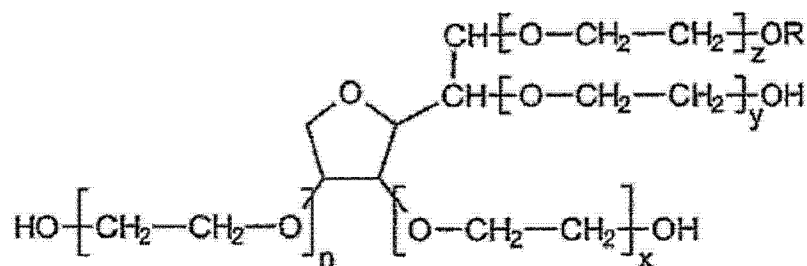
[0086] 实施方式 9. 实施方式 1 到 8 的任一项的水溶液, 其中所述化合物 A 的浓度在 0.5 到 25% (v/v) 范围之内, 优选在 2.0 到 20% (v/v) 范围内, 更优选在 2 到 15% (v/v) 范围内, 进一步更优选 2.0 到 10% (v/v) 范围内, 甚至更优选 2.0 到 7.0% (v/v) 范围内, 最优选约 5% (v/v)。

[0087] 实施方式 10. 实施方式 1 到 9 的任一项的水溶液, 其中所述非离子型洗涤剂为通式化合物, 其选自

[0088] a) 具有取代基 R¹ 和 R²(R¹-Ph-R²) 的取代的苯基, 其中 R¹ 是 C₁-C₉ 烷基, R² 是 -O-[CH₂-CH₂-O]_a-H 基团, 其中“a”是 5 到 40 的一个整数, 其中 R² 相对于 R¹ 在对位、间位或邻位;

[0089] b)

[0090]



[0091] 其中 n、x、y 及 z 都是 5 到 40 的整数, R 是脂肪酸残基。

[0092] 实施方式 11. 实施方式 1 到 9 的任一项的水溶液, 该非离子型洗涤剂选自: 十二烷基聚(乙二醇醚)_m, 其中 m 是 5 到 40 的整数; 1-O-n-辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷 (n-辛葡萄糖苷); 烷基酚聚(乙二醇-醚)_m, 其中 m 是 5 到 40 的整数, 优选 m = 11 (Nonidet **P40**[®]); 1-O-n-十二烷基-β-D-吡喃葡萄糖基 (1-4) α-D-吡喃葡萄糖苷; 十二烷基聚-(乙二醇醚)

m , 其中 m 是 5 到 40 的整数, 优选 $m = 23$ (**Brij35**[®]); 聚(氧化乙烯)(20)-脱水山梨醇单脂肪酸酯, 优选选自聚(氧化乙烯)(20)-脱水山梨醇一油酸 (**Tween**[®] 80), 聚(氧化乙烯)(20)-脱水山梨醇单月桂酸 (**Tween**[®] 20), 聚(氧化乙烯)(20)-脱水山梨醇单棕榈酸 (**Tween**[®] 40), 聚(氧化乙烯)(20)-脱水山梨醇一硬脂酸); 辛基酚聚(乙二醇醚) m , 其中 m 是 5 到 40 的整数, 优选 $m = 10$ (**Triton**[®] X-100)。

[0093] 实施方式 12. 实施方式 1 到 11 的任一项的水溶液, 其中所述非离子型洗涤剂的浓度在 0.1 到 1.0% (v/v) 范围之内, 优选在 0.15 到 1.0% (v/v) 范围内, 更优选在 0.2 到 1.0% (v/v) 范围内, 进一步更优选 0.2 到 0.8% (v/v) 范围内, 甚至更优选 0.25% 到 0.6% (v/v) 范围内, 最优选约 0.25% (v/v)。

[0094] 实施方式 13. 实施方式 1 到 12 的任一项的水溶液, 其中所述非离子型洗涤剂与化合物 A 的比率为 1:15 到 1:25, 优选约 1:20。

[0095] 实施方式 14. 实施方式 1 到 13 的任一项的水溶液, 其中所述溶液不含有二硫苏糖醇。

[0096] 实施方式 15. 实施方式 1 到 14 的任一项的水溶液, 其中 pH 被调整在 5.6 到 9.6 范围内, 优选 6.0 到 9.0 范围内, 更优选 6.5 到 8.0 范围内, 最优选 6.8 到 7.4 范围内。

[0097] 实施方式 16. 实施方式 1 到 15 的任一项的水溶液, 具有降低非特异性结合、交叉反应及基质干扰影响的能力。

[0098] 实施方式 17. 实施方式 1 到 16 的任一项的水溶液, 能够防止 K_D 值达 $10^{-7}M$ 的低亲合性结合。

[0099] 实施方式 18. 实施方式 1 到 17 的任一项的水溶液, 能够防止 K_D 值高至 $10^{-7}M$ 的低亲合性结合, 并将 K_D 值为 $10^{-7}M$ 到 $10^{-8}M$ 范围内的中亲合性结合降低至少 90%。

[0100] 实施方式 19. 实施方式 1 到 18 的任一项的水溶液, 能够防止 K_D 值为高至 $10^{-7}M$ 的低亲合性结合, 并将 K_D 值为 $10^{-7}M$ 到 $10^{-9}M$ 范围内的中亲合性结合降低至少 90%。

[0101] 实施方式 20. 实施方式 1 到 19 的任一项的水溶液, 能够增强抗体的结合活性(亲合性), 优选固定化抗体的结合活性(亲合性)。

[0102] 实施方式 21. 实施方式 1 到 20 的任一项的水溶液的浓缩物, 优选 2 到 10 倍浓缩物, 更优选 3 到 5 倍浓缩物。

[0103] 实施方式 22. 实施方式 1 到 20 的任一项的水溶液作为用于结合对的结合反应的培养基的用途, 其中第一结合成员特异性识别并结合其互补的第二结合成员。

[0104] 实施方式 23. 实施方式 1 到 20 的任一项的水溶液用作抗体抗原结合反应的培养基的用途。

[0105] 实施方式 24. 实施方式 1 到 20 的任一项的水溶液用作受体配体结合反应的培养基的用途。

[0106] 实施方式 25. 实施方式 1 到 20 的任一项的水溶液用作样品及试剂优选配体、受体、抗原、抗体的稀释缓冲液或用作洗涤缓冲液的用途。

[0107] 实施方式 26. 一种在结合对的特异性结合反应过程中降低非特异性结合和/或交叉反应和/或基质干扰影响的方法, 其中第一结合成员识别其互补的第二结合成员, 所述

方法包括利用实施方式 1 到 20 的水溶液作为该特异性结合反应的培养基。

[0108] 实施方式 27 一种通过免疫测定至少一种待测分析物的检测试剂盒,其中待测分析物是结合成员对的第一结合成员,其中该第一结合成员特异性结合其互补的结合成员,该试剂盒包含:

[0109] a) 含有实施方式 1 到 20 的任一项的缓冲液的容器;

[0110] b) 在其上固定有所述互补结合成员以捕获分析物的载体;以及

[0111] c) 任选地,能够免疫识别与互补结合成员结合的分析物的试剂,其中所述试剂结合一种检测手段;

[0112] 以及 d) 任选地,能与所述检测手段反应以产生可检测反应产物的试剂。

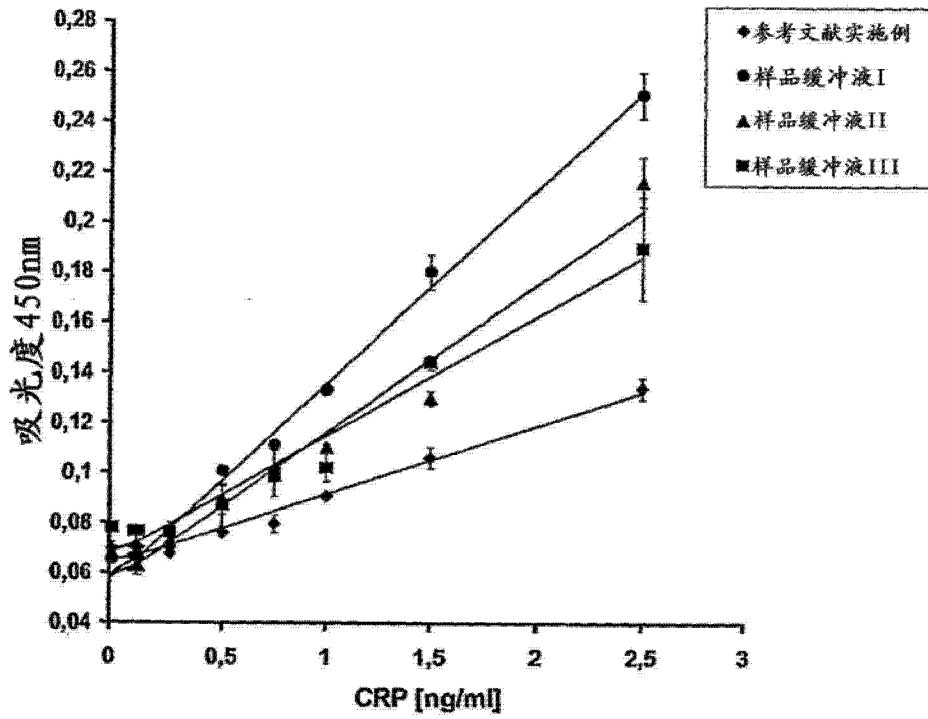


图 1

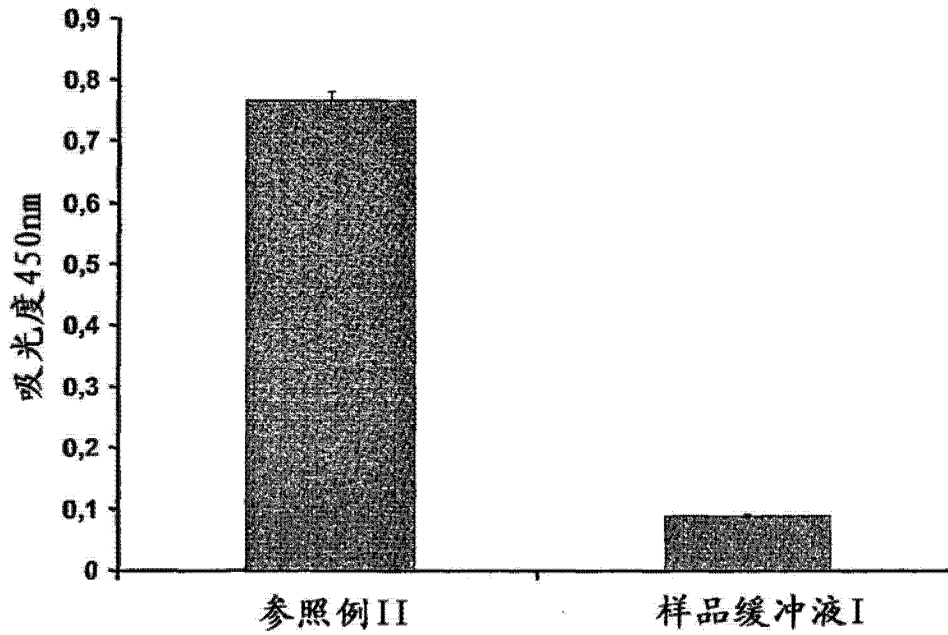


图 2

专利名称(译)	一种用作结合对的特异性结合反应培养基的水溶液		
公开(公告)号	CN104090097A	公开(公告)日	2014-10-08
申请号	CN201410365848.4	申请日	2004-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	康多尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	康多尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	康多尔生物技术有限公司		
[标]发明人	P劳赫 T波利夫克 A策尔默		
发明人	P·劳赫 T·波利夫克 A·策尔默		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306		
代理人(译)	刘晓东		
其他公开文献	CN104090097B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种作为用于结合对的特异性结合反应培养基使用的水溶液，其中第一结合成员识别其互补第二结合成员，该溶液含有：a)一种控制pH的缓冲液；b)选自下述基团的化合物A：-由通式IR₁-[[CR₂R₃]_p-O]_q-R₄定义的化合物，其中R₁是氢或羟基，各元件的R₂独立地是氢或羟基，R₃是氢、甲基、乙基，R₄是氢或烷基，p是2到10的一个整数，q是1到100的一个整数，附带条件是该化合物至少携带两个羟基；-多元醇；-糖类；c)非离子洗涤剂。

