

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680025059. X

[51] Int. Cl.
G01N 33/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月9日

[11] 公开号 CN 101218506A

[22] 申请日 2006.5.10
[21] 申请号 200680025059. X
[30] 优先权
 [32] 2005. 5. 11 [33] US [31] 60/679,717
[86] 国际申请 PCT/US2006/018085 2006. 5. 10
[87] 国际公布 WO2006/124456 英 2006. 11. 23
[85] 进入国家阶段日期 2008. 1. 9
[71] 申请人 恩布里克斯公司
 地址 美国北卡罗来纳州
[72] 发明人 J·特茨科夫斯基 D·马哈托
 A·查尔克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 代理人 刘冬 梁谋

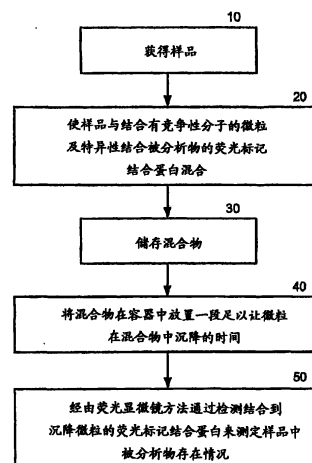
权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 5 页

[54] 发明名称

利用荧光显微镜的竞争性粒子免疫测定法

[57] 摘要

本发明提供用荧光显微镜方法通过竞争性免疫测定来测量样品中被分析物的方法。在具体实施方案中,本发明提供通过测定禽蛋胚胎液(例如尿囊液或血液)样品中雌激素类固醇化合物的存在情况来测定蛋内禽胚胎性别的方法(图1)。



1. 一种检测样品中被分析物存在情况的方法，其包括：
使样品、多种结合有竞争剂分子的微粒、和特异性结合被分析物的荧光标记的结合蛋白混合在一起；
让所述混合物在容器中放置一段足以让所述微粒沉降的时间；和
经由荧光显微镜方法，通过检测一个或多个视野中荧光标记的沉降微粒数量并将所述荧光标记的微粒数量与预定值比较，来测定所述样品中所述被分析物的存在情况，其中数量低于预定值则说明所述样品中存在高于阈值水平的所述被分析物。
2. 权利要求1的方法，其中所述容器包括显微镜玻片。
3. 权利要求1的方法，其中所述容器包括孔，其中所述孔的底部为光学透明的，其中所述微粒沉降到所述孔底。
4. 权利要求1的方法，其进一步包括在将所述混合物置于容器之前将所述混合物储存一段时间。
5. 权利要求4的方法，其中储存包括使所述混合物储存约1分钟-约45分钟(1 min. - 45 min.)。
6. 权利要求4的方法，其中储存包括使所述混合物储存超过约60分钟(60 min.)。
7. 权利要求1的方法，其中所述样品为生物样品。
8. 权利要求7的方法，其中所述生物样品来自禽蛋。
9. 权利要求7的方法，其进一步包括在所述混合步骤之前获得所述生物样品。
10. 权利要求7的方法，其中所述生物样品包括选自尿囊液、卵黄、尿、粪、血液、血浆、血清、羊水、胚下液、淋巴、脑脊髓液、乳汁、组织、组织匀浆和其组合的材料。
11. 权利要求1的方法，其中所述微粒包括直径小于约6微米(6 μ)的大体球形的珠粒。

12. 权利要求 1 的方法, 其中所述微粒包括直径为约 3-15 微米(3μ - 15μ)的的大体球形的珠粒。

13. 权利要求 1 的方法, 其中所述微粒包括选自聚苯乙烯、蜜胺、尼龙、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、二氧化硅、金和氧化铁的材料。

14. 权利要求 1 的方法, 其中所述结合蛋白为抗体。

15. 权利要求 14 的方法, 其中所述抗体为单克隆抗体。

16. 权利要求 14 的方法, 其中所述抗体为多克隆抗体。

17. 权利要求 1 的方法, 其中所述结合蛋白为受体。

18. 权利要求 1 的方法, 其中所述荧光标记的结合蛋白用选自藻胆蛋白、罗丹明染料或其衍生物、荧光素染料或其衍生物、Alexa Fluor®染料、BODIPY®染料、花青染料或其衍生物和德克萨斯红的荧光染料标记。

19. 权利要求 1 的方法, 其中所述被分析物选自蛋白质、肽、肽类生长因子、细胞因子、类固醇激素、蛋白质激素、抗体、病原体、环境污染物、爆炸物和违法物质。

20. 权利要求 1 的方法, 其中所述被分析物为选自雌二醇、雌酮、雌二醇缀合衍生物、雌酮缀合衍生物和其组合的雌激素类固醇化合物。

21. 权利要求 1 的方法, 其中所述混合步骤包括首先使所述样品和结合蛋白混合在一起, 随后将所述微粒加入到所述样品-结合蛋白混合物中。

22. 权利要求 1 的方法, 其中所述经由荧光显微镜方法测定所述样品中所述被分析物存在情况的步骤, 包括经由荧光显微镜成像而得到所述混合物的一个或多个图象。

23. 权利要求 3 的方法, 其中经由荧光显微镜方法测定所述样品中所述被分析物存在情况包括:

测定所述孔底的中值高度; 和

于高度分别高于和低于所述中值高度的焦平面获得所述孔中混合物的至少两个图像。

24. 权利要求 3 的方法，其中经由荧光显微镜方法测定所述样品中所述被分析物存在情况包括：

测定所述孔底的中值高度；

于高度分别高于和低于所述中值高度的焦平面获得所述孔中混合物的至少两个图像；和

获得所述孔中混合物的孔底焦平面图像。

25. 权利要求 3 的方法，其中经由荧光显微镜方法测定所述样品中所述被分析物存在情况包括获得所述孔中混合物的孔底焦平面图像。

26. 一种测定蛋中禽胚胎性别的方法，其包括：

使来自禽蛋的尿囊液样品与多种结合有竞争剂分子的微粒和特异性结合雌激素类固醇化合物的荧光标记结合蛋白混合在一起；

让所述混合物在容器中放置一段足以让所述微粒沉降的时间；和

经由荧光显微镜方法，通过检测荧光标记的沉降微粒，来测定样品中被分析物的存在情况，其中所述样品中存在高于阈值量的雌激素类固醇化合物说明所述禽胚胎为雌性。

27. 权利要求 26 的方法，其中测定荧光标记的沉降微粒数量并与预定值比较，其中低于预定值的数量说明在所述样品中存在高于阈值量的所述雌激素类固醇化合物。

28. 权利要求 26 的方法，其中所述结合蛋白为抗体。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述结合蛋白为雌激素类固醇化合物的受体。

利用荧光显微镜的竞争性粒子免疫测定法

相关申请资料

本申请要求于 2005 年 5 月 11 日提交的美国专利临时申请第 60/679,717 号的权益，该申请内容以其整体在此引作参考。

发明领域

本发明一般涉及测量样品中的被分析物的方法，更具体地讲，涉及用竞争性粒子免疫测定测量被分析物的方法。

发明背景

基于某些可观测的品质进行禽蛋判别，这在家禽业是众所周知和长期使用的实行方法。“照蛋”是一种这类技术的常用名词，是来源于用蜡烛光检查蛋这一习惯的术语。正如熟悉蛋的人所知，尽管蛋壳在最好的照明条件下似乎不透明，但实际上其有些半透明，当将其置于直射光前时，可看到蛋的内容物。

在孵化室管理中，可能理想的是基于诸如性别、疾病、遗传性状等等不同特性来分开禽类。举例而言，可能理想的是用特定疫苗接种雄性禽类，而用不同疫苗接种雌性禽类。在孵化时由于其它原因分开禽类性别也可能很重要。例如，因为雄性火鸡和雌性火鸡的生长率和营养需求不同，习惯上按性别来分离火鸡。在产蛋鸡或食用蛋工业，理想的是只保留雌性。在肉用仔鸡工业，理想的是基于性别将鸡分开以增进饲养效率、改进加工的一致性和降低生产成本。

不幸的是，鸟类性别鉴定的常规方法可能花费大、劳动强度大、费时长，通常需要训练有素的专门技术人员。鸟类性别鉴定的常规方法包括羽毛鉴定性别法、肛门鉴定性别法和 DNA 或血液鉴定性别法。每小时约可经羽毛鉴定三千只(3,000)鸡的性别，每只鸡花费约 0.7-2.5

美分。每小时约可经肛门鉴定一千五百只(1,500)鸡的性别，每只鸡花费约 3.6-4.8 美分。通过分析采自禽的小量血液样品，可实施 DNA 或血液鉴定性别法。

理想的是在孵化前鉴别禽类性别以及禽类的其它特性。孵化前性别鉴定可显著降低家禽业各个环节的成本。尽管常规照蛋技术能比较有效地区分活蛋和死蛋，但这些常规照蛋技术不能可靠地测定未孵化的禽类的性别和其它特性。

发明概述

本发明一方面提供检测样品中被分析物存在情况的方法，其包括：
使样品、结合有竞争剂分子的多种微粒、和特异性结合被分析物的荧光标记的结合蛋白混合在一起；

让该混合物在容器中放置一段足以让微粒沉降的时间；和

经由荧光显微镜方法，通过检测一个或多个视野中荧光标记的沉降微粒的数量并将荧光标记的微粒数量与预定值比较，来测定样品中被分析物的存在情况，其中数量低于预定值说明样品中存在高于阈值水平的被分析物。

本发明也提供测定蛋中禽胚胎性别的方法，其包括：

使来自禽蛋的尿囊液样品与结合有竞争剂分子的多种微粒和特异性结合雌激素类固醇化合物的荧光标记的结合蛋白混合在一起；

让该混合物在容器中放置一段足以让微粒沉降的时间；和

经由荧光显微镜方法，通过检测荧光标记的沉降微粒，来测定样品中雌激素类固醇化合物的存在情况，其中样品中存在高于阈值量的雌激素类固醇化合物说明禽胚胎为雌性。

本发明另一方面提供检测样品中被分析物存在情况的方法，其包括：

使液态样品、结合有竞争剂分子的多种能漂浮的微粒、和特异性结合被分析物的荧光标记的结合蛋白混合在一起；

让该液态混合物在容器中放置一段足以让能漂浮的微粒漂浮到靠近液态混合物表面的时间；和

经由荧光显微镜方法，通过检测荧光标记的微粒数量并将荧光标记的微粒数量与预定值比较，来测定样品中被分析物存在情况，其中数量低于预定值说明液态样品中存在高于阈值量的被分析物。

在以下的本发明说明中更详细阐明本发明的这些和其它方面。

附图简述

图 1 为阐明按本发明实施方案测定样品中被分析物存在情况的方法的流程图。

图 2 为可用于实施本发明实施方案的例示性样品盘的俯视图。

图 3 为阐明孔底部高度的可变性的例示性样品盘的侧视图。

图 4 为阐明按本发明实施方案测定禽蛋尿囊液样品中雌激素类固醇化合物存在情况的方法的流程图。

图 5 为阐明按本发明实施方案用能漂浮微粒测定液态样品中被分析物存在情况的方法的流程图。

发明详述

现在将在下文中参考附图更全面地阐述本发明，其中展示优选的本发明实施方案。然而，本发明可以不同形式来具体化，不应该解释为局限于本文提出的实施方案；相反，提供这些实施方案是为了向本领域技术人员完全彻底和全面地传达本发明范围。全文中相同的编号指相同的要素。在各图中，为了清楚起见可能夸大了某些线条、层次、成分、要素或特征的厚度。除非另外所指，否则虚线说明任选的特征或操作。

本文所用术语仅为了阐述具体实施方案的目的，并非意欲限制本发明。除非上下文明确指出另有所指，否则本文所用的单数形式“a”、“an”、“所述”意欲也包括复数。应该进一步理解，当术语“包含”、

“包括”等等用于本说明书中时，其指定所述特征、整数、步骤、操作、要素和/或成分存在，但并非排除一种或多种其它特征、整数、步骤、操作、要素、成分和/或其组群(group)的存在或加入。本文所用术语“和/或”包括一种或多种所列相关项目的任意组合和所有组合。本文所用措辞例如“在 X 和 Y 之间”和“在约 X 和 Y 之间”应该解释为包括 X 和 Y。本文所用措辞例如“在约 X 和 Y 之间”意即“在约 X 和约 Y 之间”。本文所用措辞例如“约 X - Y”意即“约 X - 约 Y”。

除非另外定义，否则本文所用的所有术语(包括科技术语)具有与本发明所属领域一般技术人员通常理解相同的含义。应该进一步理解，除非本文特别定义，否则术语(例如在常用字典中定义的那些术语)应解释为具有与其在说明书上下文和相关领域中一致的含义，而不应该解释为理想化的和过于正式的含义。为了简洁和/或清楚起见，可能不详细阐述众所周知的功能或构建。

应该理解，当提到一种要素位于另一种要素“上”、“附着”于另一种要素、与另一种要素“连接”、“偶联”、“接触”等等时，其可能直接位于该另一要素之上、附着于另一要素、直接与另一要素连接、偶联或接触，或也可存间插要素。与此相反，当提及一种要素例如“直接位于另一种要素之上”、“直接附着于另一种要素”、与另一种要素“直接连接”“直接偶联”或“直接接触”时，没有间插要素存在。本领域技术人员也应该了解，提及一种结构或特征被置于另一种特征“邻近”时，则可能有重叠或位于该接近特征之下的部分。

相对空间术语例如“在……之下”、“在……下面”、“低于”、“在……之上”、“上面的”等等，可用于本文灵活描述，以阐述如各图中所阐明的一种要素或特征与另外的要素或特征的相互关系。应该理解，除了各图中描述的方位外，相对空间术语意欲包括设备在使用或操作中的不同方位。例如，若将图中的设备倒置，则被阐述为在其它要素或特征“之下”或“下面”的要素，将会定位为在其它要素或特征“之上”。因此，例示性术语“在……之下”可包括“在……

之上”和“在……之下”两种情况。设备可按其它方式定位(旋转 90 度或以另外的方位),本文所用的相对空间描述语应相应解释。同样地,除非另外明确指出,否则术语“向上”、“向下”、“垂直”、“水平”等等在本文中仅用于解释。

应该理解,尽管术语“第一”、“第二”等等在本文中可用于阐述各种要素、成分、区域、层次和/或部分,但这些要素、成分、区域、层次和/或部分不应该受这些术语限制。这些术语仅仅用于将一种要素、成分、区域、层次或部分与另一种区别开。因此,以下讨论的“第一”要素、成分、区域、层次或部分也可称为“第二”要素、成分、区域、层次或部分而并不偏离本发明的教导。除非另外明确指出,否则操作(或步骤)次序不限于后附权利要求或附图中所呈现的次序。

本发明实施方案提供快速廉价的检测被分析物的方法。本发明的实施方案适合涉及最小样品处理和操作的高通量自动操作。

现参看图 1,其阐明了按本发明某些实施方案检测样品中被分析物存在情况的方法。获得样品材料(框 10),然后使其与结合有竞争剂分子的微粒和特异性结合被分析物的荧光标记的结合蛋白混合在一起(框 20)。

样品实际上可自任何来源得到,包括有机材料和无机材料,在特定实施方案中,可为生物样品(例如来自受验者或禽蛋)。例示性生物样品包括生物流体和组织,其包括但不限于尿、粪、血液、血浆、血清、淋巴、脑脊髓液、乳汁、尿囊液、卵黄、羊水、胚下液、组织、组织匀浆和它们的混合物。就禽蛋而言,例示性样品材料可得自尿囊液、血液、羊水、组织、组织匀浆等等或任一前述材料的提取物。

在其它实施方案中,样品可为土壤样品、水样、废水样品等等,或任一前述样品的提取物。

本发明的实施方案并不限于胚胎发育期间特定天数(例如第 11 天)的禽蛋。按照本发明的特定实施方案,样品来自蛋内(*in ovo*)孵化(即胚胎发育)的后半段、第四分之三段、第四分之四段的蛋。例如,对于

鸡蛋而言，孵化的后半段为孵化的约第 10 天到第 20 天，蛋内孵化的第四分之三段为孵化的约第 10 天到第 14 天，蛋内孵化的第四分之四段为孵化的约第 15 天到第 20 天。在具体实施方案中，样品来自蛋内孵化约第十八天或第十九天的鸡蛋。在其它实施方案中，样品来自孵化约第十四天到第二十七天、孵化约第十四天到第二十天、孵化约第二十一天到第二十七天、孵化约第二十五天或第二十六天的火鸡蛋。

另外，本发明实施方案的方法可用于任何种类的禽蛋，包括但不限于鸡蛋、火鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋、鹤鹑蛋、野鸡(pheasant)蛋、鹤(crane)蛋、长尾小鸚鵡(parakeet)蛋、鸚鵡蛋等等。

可以不同步骤使样品、微粒和结合蛋白混合。例如，可首先使样品和结合蛋白混合在一起，然后将微粒加入到样品-结合蛋白混合物。然而，本发明的实施方案并不限于将这些成分混合在一起的任何特定次序。

可将混合物储存一段时间(框 30)，尽管这一步并非在所有实施方案中都是必不可少。按照某些实施方案，可将混合物储存约 1 分钟 - 约 45 分钟。按照其它实施方案，可将混合物储存比 60 分钟更长的时间(例如约 2-6 小时或约 3-4 小时)。

然后将混合物在容器中放置一段足以让微粒沉降到混合物底部的时间(框 40)。本文所用术语“沉降”意即微粒基本上沉积在容器底部。微粒沉降所需时间随微粒和样品而变，这一点可为本领域技术人员所理解。举例而言，为了使微粒沉降，具有高粘度的混合物可能比具有低粘度的混合物需要更长的时间。

置于容器中的混合物的量实质上可为任意量。例示性的量可为约 1 μl 至 25、50、100 或 250 μl 。

容器实质上可为能保留混合物的任何类型的装置。例示性容器包括但不限于显微镜玻片、样品孔等等。在具体实施方案中，容器为多孔板的孔，例如 4 孔板、12 孔板、24 孔板、96 孔板、384 孔板或 1536

孔板的孔。该方法可用于一次检测一个容器中被分析物的存在情况，或作为选择，检测多个容器(例如在多孔板中)中被分析物的存在情况。

因为如下所述经由荧光显微镜方法来观察混合物，所以容器的一个或多个部分通常为光学透明的。例如，若容器为孔，则孔底部分通常为光学透明的，以便可通过孔底观察到混合物，和/或对混合物成像。在通过孔顶观察/成像情况下，孔顶应该为光学透明的。

本发明的优势之一为其可用常规荧光显微镜方法来施行，藉此避免了需要与其它技术有关的更昂贵的设备，例如共焦显微镜。因此，在具体实施方案中，本发明方法不使用共焦显微镜。

本发明方法的另一优势为除了通过如上所述使微粒沉降来达到分离之外，不需要将未结合的标记结合蛋白与微粒分离。

一旦微粒沉降，经由荧光显微镜方法，通过检测与沉降微粒结合的荧光标记的结合蛋白，可测定样品中被分析物存在情况(框 50)。

按照本发明的实施方案，被分析物的测定在本质上与其说定量，不如说是定性。例如，在具体实施方案中，定性测定样品中的雌激素类固醇化合物可用于测定禽胚胎是雄性还是雌性，而不必为了定量样品中的雌激素类固醇化合物使用昂贵的显微镜技术。

另外，按照本发明，不必定量未结合的荧光(即本底)和/或定量已结合的荧光和/或测定这两个值之间的比率或差值。因此，在具体实施方案中，本发明方法并不定量未结合的荧光(即本底)，和/或并不定量已结合的荧光，和/或不测定这两个值的比率或差值。

本文所用术语例如“定量”、“定量的”等具有本领域通常理解的含义，例如涉及测定指定物质的量(例如重量和/或浓度)。

在具体实施方案中，通过与截止值比较来测定被分析物的存在情况。荧光超过截止值则说明被分析物不存在或以低浓度存在，荧光低于截止值则说明存在高于阈值的被分析物。例如，在通过检测胚胎液(例如血液或尿囊液)中的雌激素类固醇化合物来测定蛋中禽胚胎性别的本发明方法中，高于截止值的荧光说明为雄性胚胎(即胚胎液中雌激

素类固醇化合物水平低), 低于截止值的荧光说明为雌性胚胎(即胚胎液中雌激素类固醇化合物水平相对较高)。本发明方法可用于进行其它的定性测定, 例如样品中是否存在高于阈值量的污染物、病原体或管制物质。

在其它代表性实施方案中, 本发明用于通过检测抗原(例如表面抗原)或特异性结合病原体的抗体来测定样品中病原体的存在情况。举例说明, 该方法可用于检测血液、血清或血浆或来自蛋的胚胎液(例如卵黄、血液、羊水、尿囊液)中的抗原或抗体, 以便分别测定个体受验者、母亲例如产蛋雌禽(即在母源抗体情况下)和/或禽群或动物受验者中是否存在病原体和/或先前接触病原体。

例如, 可检测禽蛋卵黄中或孵化后的禽受验者的血液、血浆或血清中禽流感抗体(即母源抗体)存在情况, 以确定受验者、产蛋雌禽(即在母源抗体情况下)和/或禽群中是否存在禽流感和/或先前接触禽流感。

作为另一实例, 可检测水样或孵化后禽或蛋内禽的血液、血浆或血清中禽流感表面抗原的存在情况, 以确定受验者、产蛋雌禽(即在母源抗体情况下)和/或禽群中是否存在禽流感和/或先前接触禽流感。

可通过本领域已知任何手段测定截止值, 其任选为预定值。在具体实施方案中, 截止值是预先确定的, 意即例如其基于先前对存在的已知量被分析物的测定和/或先前的分析而固定。或者, 术语“预定”值也可指, 即使在测定中相同被分析物的具体数值变化不定, 或甚至可在每次测定中测定, 得到截止值的方法是预先确定或固定的。例如, 可由已知阴性和/或阳性对照样品来确定截止值。

在一个具体实施方案中, 测定被分析物存在情况的方法包括通过荧光显微镜法在一个或多个显微镜视野中计数荧光标记的微粒数或对其“打分”。若荧光水平超过显微镜的检测设置, 和/或超过用于评估显微镜所捕获图像的图像处理系统设置的检测水平, 则微粒被计数或记录为荧光阳性。按照本发明这一实施方案, 不必量化结合于每种

微粒的荧光(即标记的结合蛋白)的量, 和/或不必要量化未结合的本底荧光的量。不论是结合于微粒的标记蛋白的量还是保持未结合的标记蛋白的量, 所有荧光微粒都记录为荧光阳性。荧光微粒数超过截止值说明不存在被分析物, 或以低浓度存在(即不存在超过阈值量的)。荧光微粒数低于截止值则说明样品中存在超过阈值量的被分析物。例如, 就通过测定雌激素类固醇化合物的存在情况来确定蛋内禽胚胎性别的方法而言, 若荧光微粒数超过截止值, 则说明存在低于阈值量的低水平雌激素类固醇化合物, 胚胎为雄性。若荧光微粒数低于截止值, 则说明存在超过阈值量的相对高浓度的雌激素类固醇化合物, 胚胎为雌性。因此, 本发明方法可用于无需定量已结合荧光量和/或无需定量未结合荧光量就可提供肯定/否定结果的测定(例如, 测定雄性/雌性或存在/不存在超过阈值的被分析物)中。

可实施该方法, 以使根据所期需的最终结果, 在落在截止值上或其附近的荧光微粒数可被记录为表明是否存在超过阈值量的被分析物。例如, 在区分禽蛋性别情况下, 如果将某些雌鸟误分类为雄鸟更为有利, 则将落在截止值上或与之非常靠近的值记录为雄性。

按照一种典型的测定方法, 测定多种样品的荧光记分分布, 截止值可设定在分布内的任一点, 例如通过用本领域已知统计学方法例如“聚类分析”来设定。在具体实施方案中, 截止值设定在其中大约 50% 样品低于截止值而大约 50% 样品高于截止值这样的点。该实施方案尤其适于测定其中有两相分布的被分析物。可通过本领域已知任何方法测定样品值分布, 例如, 其可基于集合多次测定的结果, 或可内部测定, 即基于一次测定。

聚类分析指多种多变量技术, 其目的在于将对象放在根据数据提示的组群中, 以便一个聚类内的对象相似, 而不同聚类内的对象不相似。尽管组群的成员可能已被指定, 或提供了组群全体成员数量实例, 但聚类分析并不设想预先已知组群的数量或全体成员。聚类分析可用于给变量(通常采用皮尔逊相关)或观测量(case) (通常采用平方欧氏距

离(距离平方之和))分组。聚类可为重叠、不相交、层次或模糊聚类。聚类分析可用于分析区间数据、计数数据或二元数据，若使用不同变量，则在分析之前可将数据标准化。常使用的聚类分析技术为(1)K-均值聚类：一种迭代法，其中每一步将观测量以最接近的中心分为聚类，重新计算聚类中心，继续进行直到中心不再发生变化，或直到达到迭代的最大次数；(2)层次聚类：一种凝聚法，其中开始时将最靠近的一对对象合并为一类，随后每一步合并对象对、聚类对或聚类中的对象，直到所有数据聚类到一起成为树状图(树)。在具体实施方案中，用 Ward 氏最小方差法(两个聚类之间的距离为点与形心偏差平方之和；目的为将类中平方和减为最小)的层次聚类来选择截止值。

可通过眼睛或作为替代用数字成像软件来为荧光微粒打分，其在本领域众所周知(例如 National Instruments Image Builder, NIH Image, Cognex VisionPro)。在具体实施方案中，用机器视觉来给荧光微粒成像。机器视觉使得可进行自动视觉检查，机器视觉系统常规包括以下组分：图像处理器(基于主机或内置式)、显示图像的视频监测器、处理和分析图像的图像软件、用户界面、照相机和照明设备。本发明领域的技术人员可很好地理解机器视觉，不必在此作进一步阐述。

举例说明，当使用 Cognex VisionPro 系统时，可使用斑点 Blob 发现算法(Blob finding algorithm)，该算法搜寻某种大小(以像素数计)的像素斑点。或者，可采用模板匹配算法。例如，可进入单珠粒模板，该算法可搜寻匹配模板的区域的图像。

可使用其它成像法，包括但不限于 Wavefront Coding 技术(CMD Optics, Inc., Boulder Colorado)。

根据本发明的某些实施方案，通过荧光显微镜方法测定样品中被分析物的存在情况，包括通过荧光显微镜成像获得混合物的一个或多个图像。含有混合物的容器部分通常为光学透明的，以使可成像。例如，若将样品置于孔中，则孔底通常为光学透明的。得到孔中混合物的孔底焦平面图像。图像中的荧光水平可用上述图像分析软件以自动

方式来测定。图像中的微粒荧光高于截止值则说明样品中被分析物的浓度低于阈值水平。相反，图像中的微粒荧光低于截止值则说明样品中被分析物的浓度超过阈值水平。

作为选择，在其它实施方案中，不用成像技术，通过荧光显微镜法测定样品中被分析物的存在情况，包括用可测定沉降微粒与显微镜物镜之间距离和/或改变距离显微镜系统焦距的距离(即自动聚焦系统)的任何技术。这样的方法包括但不限于基于激光的距离测定系统(例如来自 RAMCO Innovations USA 的位移传感器 CD4 系列)。

根据本发明的某些实施方案，微粒通常为直径约为 3 微米 - 约 15 微米(3 μ -15 μ)的球形珠。根据特定实施方案，微粒通常为直径小于约 6 微米(6 μ)的球形珠。例示性微粒材料包括但不限于聚苯乙烯、蜜胺、尼龙、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、二氧化硅、金、氧化铁和其组合。

结合蛋白可为特异性结合被分析物的任何蛋白质或肽。合适的实例包括但不限于抗体、受体、配体、底物、抗原、转运蛋白、细胞色素 P450、结合蛋白例如胰岛素样生长因子结合蛋白、和本领域所知的被分析物的任何其它特异性结合配偶体。合适结合蛋白的选择通常视感兴趣的被分析物的性质而定，其在本领域技术人员能力范围内。

根据本发明的某些实施方案，抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体，包括抗体片段。抗体或抗体片段不限于任何特定形式，可为双特异性抗体、人源化抗体、嵌合抗体或抗体片段，可进一步为 Fab 片段、单链抗体等等。

例示性受体包括蛋白质激素受体、生长因子受体、细胞因子受体、类固醇激素受体(例如雌激素类固醇化合物受体)、抗体受体等等。

特异性结合雌激素类固醇化合物的结合蛋白包括但不限于抗体、雌激素类固醇化合物的受体和芳化酶。雌激素类固醇化合物的受体包括雌激素受体(例如 ER α 和/或 ER β)。

竞争剂分子可为与被分析物竞争结合荧光标记结合蛋白的任何分子。竞争测定为本领域所熟知，通常基于样品中被分析物和已知分子

(竞争剂分子)之间竞争结合结合蛋白。竞争剂分子和被分析物无需相同(尽管在特定实施方案中为相同),只要竞争剂分子结合结合蛋白并藉此减少被分析物与结合蛋白的结合即可,反之亦然。例如,在抗体和/或受体情况下,被分析物和竞争剂分子可以不同,只要二者皆能与抗体或受体特异性结合(尽管不必有同样的亲和力或亲合力),并抑制另外一个与抗体或受体结合。使分子固定或结合到微粒的方法在本领域众所周知。

因此,根据本发明,结合到微粒的竞争剂分子和样品中的被分析物竞争结合荧光标记的结合蛋白。若不存在任何被分析物,则标记的结合蛋白将与结合于微粒的竞争剂分子结合,并将被检测为微粒相关荧光。随着样品中被分析物的浓度增加,由于其竞争结合标记的结合蛋白,荧光标记的结合蛋白与微粒的结合将会减少。因此,微粒相关荧光的量通常与样品中被分析物的量成反比。

任一合适的荧光染料皆可用于标记结合蛋白。按照本发明的实施方案,荧光染料可包括藻胆蛋白(例如 r-藻红蛋白、b-藻红蛋白、别藻蓝蛋白和/或藻胆体)、罗丹明染料或其衍生物、荧光素染料或其衍生物、Alexa Fluor®染料、BODIPY®染料、花青染料或其衍生物(例如 Cy-5、Cy-5.5 和 Cy7)、德克萨斯红和前述物质的任意组合。荧光标记蛋白质或肽的方法,例如通过使荧光染料分子结合于结合蛋白进行标记,在本领域众所周知,其易于由本领域技术人员来实施。

作为另一优势,本发明不需定量未结合的和/或已结合的荧光和/或测定已结合的相对未结合的荧光标记结合蛋白之间的差别。因此,在本发明的实施方案中,在产生荧光标记的结合蛋白期间不必分离游离的标记物,藉此避免昂贵费力的程序,使得可使用不太昂贵的试剂。

用本发明实施方案的方法可检测样品中的各种被分析物。生物样品中例示性的被分析物包括但不限于蛋白质、肽、细胞因子、肽类生长因子、类固醇激素、蛋白质激素、病原体(例如通过检测表面抗原和/或毒素)、抗体等等。

类固醇激素包括雌激素类固醇激素，其包括但不限于雌二醇、雌二醇 17 β 、雌酮、雌三醇和其缀合衍生物(conjugated derivatives)。具体的缀合衍生物包括但不限于雌二醇、雌二醇 17 β 和雌酮的葡萄糖苷酸和硫酸酯衍生物，其包括雌二醇-3-葡萄糖苷酸、雌二醇-17-葡萄糖苷酸和/或雌酮-3-葡萄糖苷酸。病原体包括细菌、原生动物、酵母、真菌和病毒病原体，包括但不限于贾第鞭毛虫属(*Giardia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、梭菌(*Clostridia*)、艾美球虫属(*Eimeria*)、大肠杆菌(*E. coli*)、新城疫病毒(Newcastle disease virus)、马立克氏病病毒(Marek's disease virus)、传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus)、流感(例如禽流感)、腔上囊炎病毒(Bursal disease virus)等等。

来自非生物来源(即不来自受验者)的例示性被分析物包括但不限于环境污染物(例如排泄物、病原体、化学制品、蛋白质激素、类固醇激素包括雌激素类固醇化合物、生长因子等等)、爆炸物(例如 TNT)和管制物质(例如麻醉品，例如鸦片剂、THC 和安非他明，或兴奋剂(performance-enhancing substances)，例如类固醇，包括雄激素和生长激素)。

请参看图 2，其阐明了含有在其中以各种阵列形成的多个样品孔 72 的例示性样品盘 70。构建各个样品孔 72 以接受上述样品混合物。可按照本发明的实施方案使用含各种样品孔构造和阵列的样品盘。可用各种材料通过各种技术形成样品盘。本发明不限于使用例示性样品盘 70。

如图 3 所示，样品盘 70 中孔 72 底部高度可变化。例示性孔 72 的底部彼此相对可有不同高度(E1、E2、E3)。为了补偿这一点，测定各孔的中值底部高度，然后于焦平面获得孔中混合物的至少两个图像，其中所述焦平面分别具有高于和低于中值高度的高度。然后如上所述分析微粒荧光的图像。本发明这方面对于其中孔底部高度可更多变的较为价廉的样品盘(例如热成型多孔板)尤其有用。

按照本发明的其它实施方案，测定各个孔底部高度中值。于高度分别高于和低于中值高度的焦平面获得孔中混合物的至少两个图像，获得孔中混合物的各孔底部焦平面的图像。然后如上所述分析微粒荧光的图像。

在代表性实施方案中，本发明可用于测量禽蛋样品的目标被分析物(例如病原体、抗体、激素、生长因子、蛋白质、肽等等)。本发明的实施方案尤其适用于测定禽蛋胚胎性别。此外，本发明的实施方案可缓解与目前性别鉴定技术有关的问题，其包括但不限于试剂费用、处理费用、设备费用、设备复杂性和测定速度。

请参看图 4，其阐明了按本发明某些实施方案测定蛋内禽胚胎性别的方法。获得尿囊液样品(框 110)，然后将其与结合有竞争剂分子(例如雌激素类固醇化合物，例如雌二醇)的微粒(例如 5 μ 的聚苯乙烯珠粒)和特异性结合雌激素类固醇化合物的荧光标记的(例如藻红蛋白标记)结合蛋白(例如单克隆抗体)混合在一起(框 120)。可如上所述让混合物储存一段时间(框 130)。然后将混合物在容器(例如上述样品盘的孔)中放置一段足以让微粒沉降到混合物底部的时间(框 140)。一旦微粒沉降了，则经由荧光显微镜方法通过检测已结合到沉降微粒的荧光标记结合蛋白来测定样品中雌激素类固醇化合物的存在情况(框 150)。若样品中存在高水平的雌激素类固醇化合物(即雌性蛋)，则荧光标记结合蛋白表现出与珠粒弱结合。若样品中存在低水平的雌激素类固醇化合物(即雄性蛋)，则荧光标记结合蛋白表现出与珠粒强结合。

在按照本发明测定蛋内禽胚胎性别的具体方法中，如上所述测定了荧光标记的沉降微粒数，也如上所述与截止值比较。荧光标记的粒子数低于截止值则说明样品中存在高于阈值量的雌激素类固醇化合物，胚胎为雌性。

在测定禽蛋中禽胚胎性别的代表性实施方案中，使来自禽蛋的尿囊液样品与结合有雌二醇的微粒(例如 5 μ 聚苯乙烯珠粒)和特异性结合

雌二醇的荧光标记单克隆抗体混合在一起。或者，该方法可使用荧光标记的雌激素受体以检测尿囊液样品中雌激素类固醇化合物的浓度。

按照具体实施方案，本发明方法相当灵敏，可检测样品中低至约 500、250、150、100、50 pg/ml 或更低的雌激素类固醇化合物。

当被分析物为雌激素类固醇化合物时，该方法可进一步包括处理样品以释放未衍生化的化合物。例如，酶处理(例如葡糖苷酸酶和/或硫酸酯酶)可用于从雌二醇和雌酮的葡糖苷酸衍生物和硫酸酯衍生物释放雌二醇和雌酮，这些衍生物通常可在例如尿囊液中发现。

请参看图 5，其阐明了按本发明某些实施方案检测样品中被分析物存在情况的方法。获得液态样品材料(框 210)，然后使其与能漂浮的结合有竞争剂分子的微粒和特异性结合被分析物的荧光标记结合蛋白混合在一起(框 220)。混合物可如上所述储存一段时间(框 230)。然后将混合物在容器(例如上述样品盘孔)中放置一段足以让能漂浮的微粒漂浮到液态混合物表面附近的时间(框 240)。一旦微粒漂浮到表面附近，则经由荧光显微镜方法通过检测结合到微粒的荧光标记结合蛋白，测定样品中被分析物的存在情况(框 250)。在这种情况下，通过容器(例如样品孔)的开口端来实施荧光显微镜方法。

在加入试剂之后，本发明实施方案不需对样品进行处理。测定结果可直接从样品容器中读取。另一优势是在具体实施方案中，仪器可为相对易于维护的设备：用卤素或 LED 照明的常规显微镜系统。

上文阐明了本发明，其不应解释为对本发明的限制。尽管业已阐述了本发明的几个例示性实施方案，但本领域技术人员将易于理解，在本质上不偏离本发明的新颖教导和优势的情况下，可以对例示性实施方案进行很多修改。因此，所有这样的修改意欲包括在权利要求所界定的本发明范围内。本发明由以下权利要求来界定，其中包括所述权利要求的等同方案。

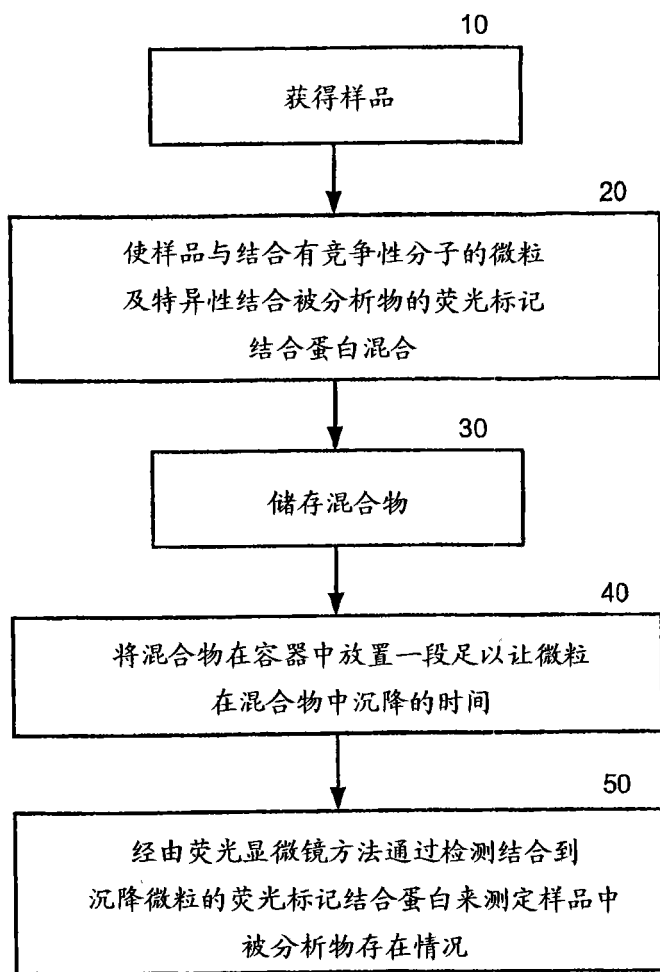


图 1

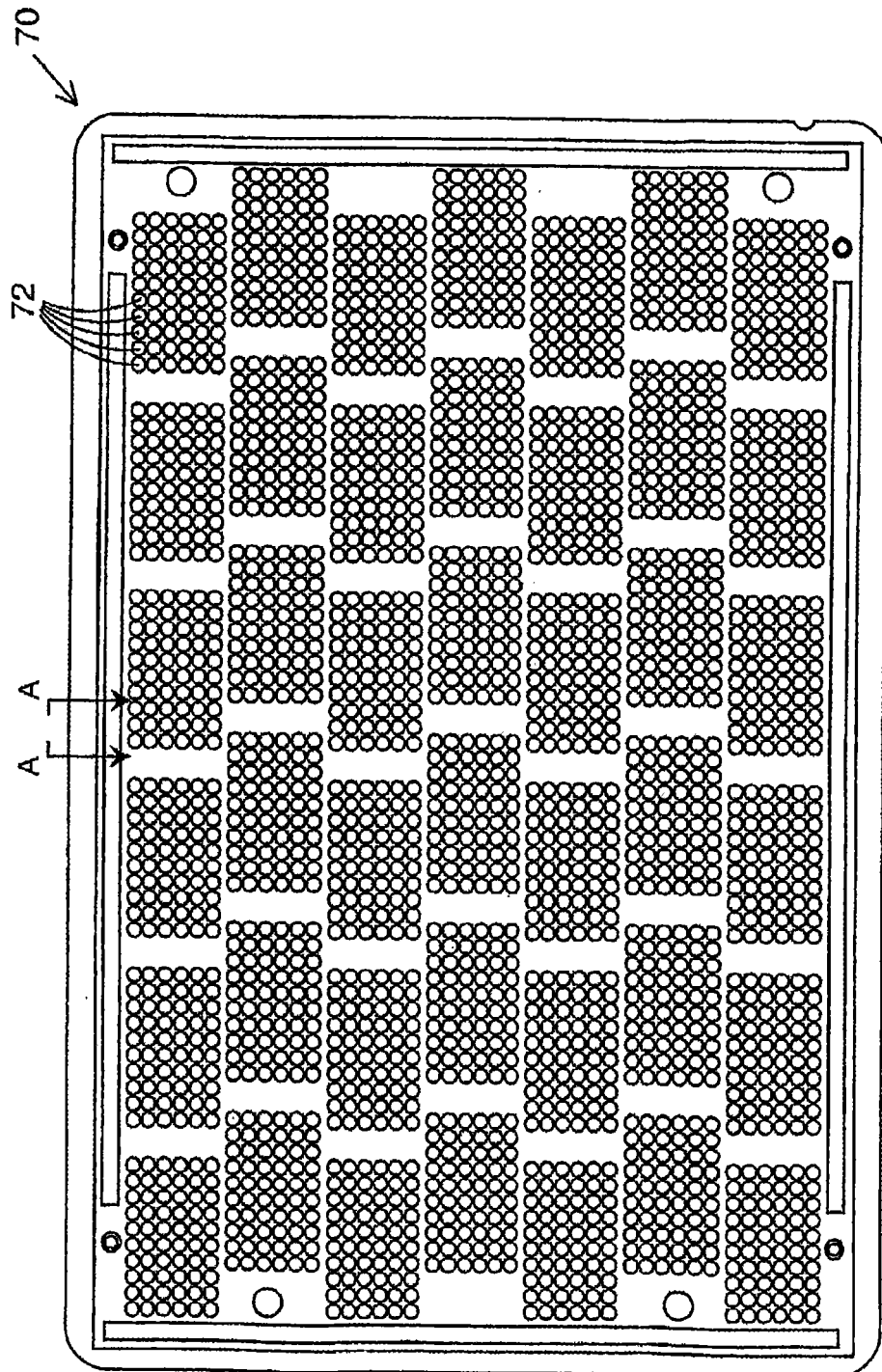


图 2

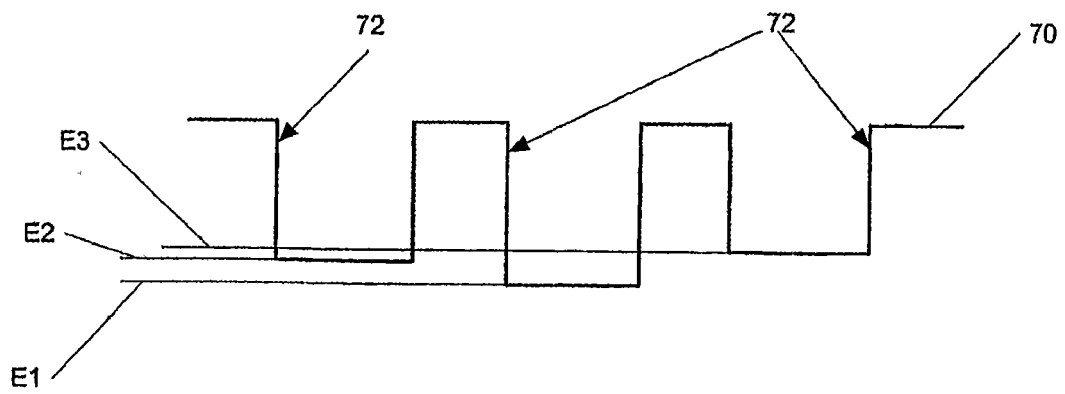


图 3

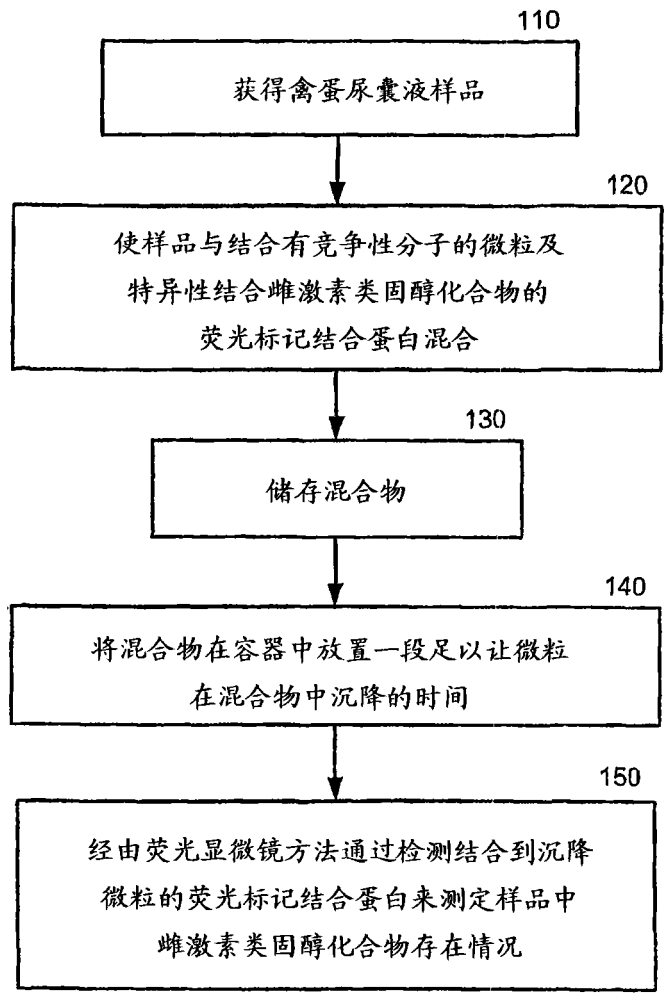


图 4

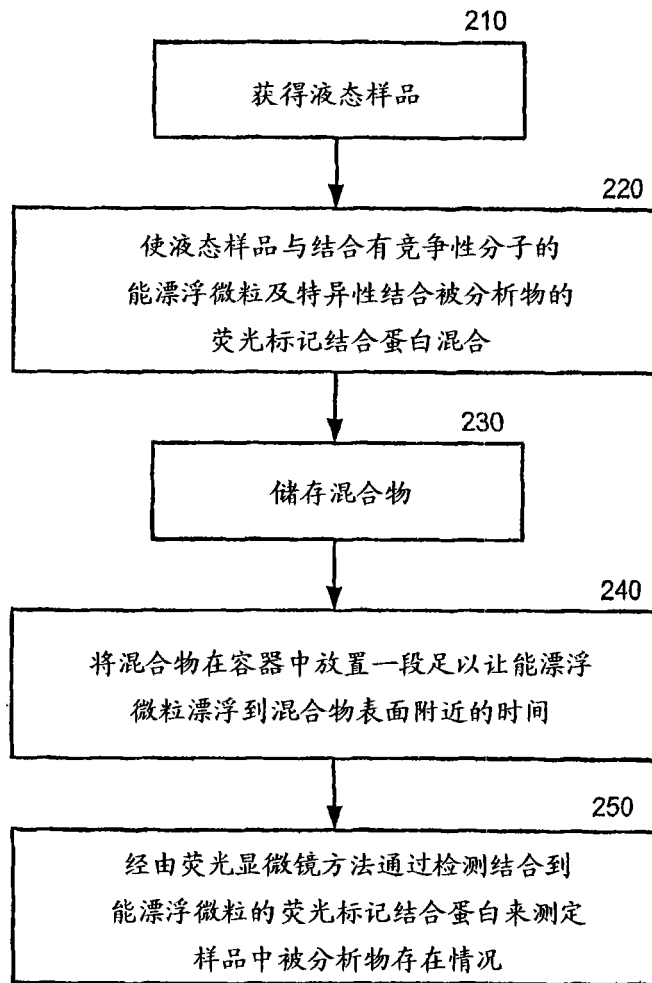


图 5

专利名称(译)	利用荧光显微镜的竞争性粒子免疫测定法		
公开(公告)号	CN101218506A	公开(公告)日	2008-07-09
申请号	CN200680025059.X	申请日	2006-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	恩布里克斯公司		
申请(专利权)人(译)	恩布里克斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	恩布里克斯公司		
[标]发明人	J特茨科夫斯基 D马哈托 A查尔克		
发明人	J·特茨科夫斯基 D·马哈托 A·查尔克		
IPC分类号	G01N33/00 G01N33/53 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G02B21/16 A01K45/00 A01K45/007 G01N21/6452 G01N33/5005 G01N33/54313 G01N33/582 G01N33/743		
代理人(译)	刘冬 梁谋		
优先权	60/679717 2005-05-11 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供用荧光显微镜方法通过竞争性免疫测定来测量样品中被分析物的方法。在具体实施方案中，本发明提供通过测定禽蛋胚胎液(例如尿囊液或血液)样品中雌激素类固醇化合物的存在情况来测定蛋内禽胚胎性别的方法(图1)。

