



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102640002 A

(43) 申请公布日 2012.08.15

(21) 申请号 201080032364.8

G01N 33/538 (2006.01)

(22) 申请日 2010.05.20

(30) 优先权数据

61/180,075 2009.05.20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012.01.12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/035648 2010.05.20

(87) PCT申请的公布数据

W02010/135574 EN 2010.11.25

(71) 申请人 瑞莱诊断体系股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 W·J·若特 J·H·汉 T·科温

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

G01N 33/72 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 11 页 附图 8 页

(54) 发明名称

检测糖化血红蛋白百分比的系统和方法

(57) 摘要

本文描述的是分析样品以定量确定样品中糖化血红蛋白百分比的系统和方法。

1. 一种与 (i) 标记有第一可检测标记的识别血红蛋白的抗体和 (ii) 标记有第二可检测标记的硼酸或其衍生物偶联的糖化血红蛋白。

2. 一种测定样品中糖化血红蛋白百分比的方法,所述方法包括:

(a) 检测:

(i) 与结合所述样品中血红蛋白的第一试剂偶联的第一可检测标记;和

(ii) 与仅结合所述样品中糖化血红蛋白的第二试剂偶联的第二可检测标记;和

(b) 基于所述样品中检测的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的含量确定所述样品中的糖化血红蛋白百分比。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述第一可检测标记和所述第二可检测标记同时检测。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的方法,其特征在于,所述第一可检测标记为暴露于第一波长光时发出荧光的第一荧光团且所述第二可检测标记为暴露于第二波长光时发出荧光的第二荧光团。

5. 如权利要求 2-4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述第二试剂是硼酸或其衍生物。

6. 如权利要求 2-5 中任一项所述的方法,其特征在于,检测所述第一和第二可检测标记前,不结合血红蛋白的任何第一试剂和不结合糖化血红蛋白的任何第二试剂分别从结合血红蛋白和糖化血红蛋白的所述第一试剂和所述第二试剂中分离。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述分离可通过将所述样品置于电场中经电泳、或通过固定所述血红蛋白进行。

8. 一种检测样品中糖化血红蛋白百分比的方法,所述方法包括:

将所述样品中细胞释放的血红蛋白接触结合血红蛋白的第一试剂和仅结合糖化血红蛋白的第二试剂,其中所述第一试剂标记有第一可检测标记且所述第二试剂标记有第二可检测标记;

将所述可检测标记的血红蛋白固定在固体支持物上;

测量来自固定在所述固体支持物上的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号;和

基于所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号确定所述样品中的糖化血红蛋白百分比。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述固体支持物的一部分包含涂层,所述涂层含结合所述样品中血红蛋白的固定化捕获剂。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述捕获剂为抗体或抗体片段。

11. 如权利要求 8-10 中任一项所述的方法,其特征在于,所述固体支持物包含色谱条。

12. 如权利要求 8-11 中任一项所述的方法,其特征在于,所述血红蛋白固定于所述固体支持物前,所述血红蛋白接触标记有所述第一可检测标记的所述第一试剂和标记有所述第二可检测标记的所述第二试剂。

13. 如权利要求 8-11 中任一项所述的方法,其特征在于,所述血红蛋白加入所述固体支持物,所述固体支持物包括的区域含标记有所述第一可检测标记的所述第一试剂和标记有所述第二可检测标记的所述第二试剂,且其中所述血红蛋白在固定前接触所述固体支持

物上存在的所述第一标记的试剂和所述第二标记的试剂。

14. 如权利要求 8-13 中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一试剂为抗体或抗体片段。

15. 如权利要求 8-14 中任一项所述的方法,其特征在于,所述第二试剂是硼酸或其衍生物。

16. 如权利要求 8-15 中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一试剂和所述第二试剂从所述固体支持物的大致相同区域检测。

17. 如权利要求 8-16 中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号通过将来自所述第一光源和所述第二光源的光应用到所述固体支持物上的所述固定的血红蛋白上来检测。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其特征在于,所述第一光源或所述第二光源包括激光。

19. 如权利要求 17 所述的方法,其特征在于,所述第一光源包括第一激光且所述第二光源包括与所述第一激光不同的第二激光。

20. 如权利要求 17 所述的方法,其特征在于,所述第一可检测标记为暴露于来自所述第一光源的光时发出荧光的第一荧光团。

21. 如权利要求 17 所述的方法,其特征在于,所述第二可检测标记为暴露于来自所述第二光源的光时发出荧光的第二荧光团。

22. 如权利要求 17 所述的方法,其特征在于,所述第一可检测标记为暴露于第一波长光时发出荧光的第一荧光团且所述第二可检测标记为暴露于与所述第一波长不同的第二波长的光时发出荧光的第二荧光团。

23. 如权利要求 8-22 中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号同时检测。

24. 一种检测样品中糖化血红蛋白百分比的方法,所述方法包括:

将所述样品中细胞释放的血红蛋白接触结合血红蛋白的第一试剂和仅结合糖化血红蛋白的第二试剂,其中所述第一试剂标记有第一可检测标记且所述第二试剂标记有第二可检测标记,且其中所述第二试剂为硼酸或其衍生物;

将所述可检测标记的血红蛋白固定在固体支持物上;

测量来自固定在所述固体支持物上的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号;和

基于所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号确定所述样品中的糖化血红蛋白百分比。

25. 一种检测样品中糖化血红蛋白百分比的方法,所述方法包括:

将所述样品中细胞释放的血红蛋白接触结合血红蛋白的第一试剂和仅结合糖化血红蛋白的第二试剂,其中所述第一试剂标记有第一可检测标记且所述第二试剂标记有第二可检测标记,且其中所述第二试剂为硼酸或其衍生物;

将所述可检测标记的血红蛋白固定在固体支持物上;

同时测量来自固定在所述固体支持物上的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号;和

基于所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号确定所述样品中的糖化血红蛋白百分比。

蛋白百分比。

26. 一种检测样品中糖化血红蛋白百分比的方法,所述方法包括:

将所述样品中细胞释放的血红蛋白接触结合血红蛋白的第一试剂和仅结合糖化血红蛋白的第二试剂,其中所述第一试剂标记有第一可检测标记,所述第一可检测标记为暴露于第一波长光时发出荧光的第一荧光团,且所述第二试剂标记有第二可检测标记,所述第二可检测标记为暴露于第二波长光时发出荧光的第二荧光团;

将包括所述可检测标记的糖化血红蛋白的所述可检测标记的血红蛋白固定在固体支持物上的相同区域;

通过将含糖化血红蛋白的血红蛋白所固定的固体支持物区域暴露于所述第一和第二波长的光中来同时测量固定在所述固体支持物上的第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号;和

基于所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号确定所述样品中的糖化血红蛋白百分比。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其特征在于,所述第二试剂是硼酸或其衍生物。

28. 如权利要求 26 或 27 所述的方法,其特征在于,所述第一和第二试剂分别暴露于红光和红外光下,或分别暴露于红外光和红光下,以诱导来自所述第一和第二可检测标记的荧光。

29. 一种测试条,所述测试条包括:

色谱条;

所述色谱条一部分上的涂层,所述涂层包含结合样品中血红蛋白的捕获剂;

所述色谱条上添加样品的区域;和

所述色谱条上含结合血红蛋白的第一试剂和仅结合糖化血红蛋白的第二试剂的区域,其中所述第一试剂标记有第一可检测标记且所述第二试剂标记有第二可检测标记;

其中所述色谱条上含所述第一试剂和所述第二试剂的区域位于(i)添加所述样品的区域或(ii)添加所述样品的区域和含所述捕获剂的区域之间,从而加入所述测试条的样品在到达含所述捕获剂的区域前流过含所述第一和第二试剂的区域。

30. 如权利要求 29 所述的测试条,其特征在于,所述色谱条包括含标记有第一可检测标记的第一试剂和标记有第二可检测标记的第二试剂的偶联板,且所述偶联板位于(i)色谱条上添加所述样品的区域或(ii)添加所述样品的区域和含所述捕获剂的区域之间,从而加入所述测试条的样品在到达含所述捕获剂的区域前流过所述偶联板。

31. 如权利要求 29 或 30 所述的测试条,其特征在于,所述色谱条在所述添加样品的区域还包括样品板。

32. 如权利要求 31 所述的测试条,其特征在于,所述样品板使所述样品缓慢释放到所述偶联板上。

33. 如权利要求 29-32 中任一项所述的测试条,其特征在于,所述第一可检测标记或所述第二可检测标记为荧光团。

34. 如权利要求 29-32 中任一项所述的测试条,其特征在于,所述第一可检测标记为暴露于第一波长光时发出荧光的第一荧光团且所述第二可检测标记为暴露于与所述第一波长不同的第二波长的光时发出荧光的第二荧光团。

35. 如权利要求 29-34 中任一项所述的测试条,其特征在于,所述第二试剂是硼酸或其衍生物。

检测糖化血红蛋白百分比的系统和方法

[0001] 本申请要求 2009 年 5 月 20 日提交的题为“Test Strips and Methods for Determining the Percentage of Glycated Hemoglobin(检测糖化血红蛋白百分比的测试条和方法)”的美国临时申请系列号 61/180,075 的权益,其公开内容通过引用全文纳入本文。

[0002] 发明背景

[0003] 糖尿病是表征为胰岛素缺失,高血糖和眼、肾、外周神经、心脏及血管的并发症高风险发展的慢性病症。该疾病非常普遍,在美国有多到一千六百万人患病。而且就人的痛苦和花费来说,该疾病成本很高;估计美国用于健康护理的费用中约七分之一用于糖尿病护理,主要用于治疗慢性并发症。在美国,糖尿病是青年失明,肾衰竭和非外伤截肢的最常见原因。

[0004] 1993 年完成的糖尿病控制和并发症测试 (DCCT) 表明糖尿病慢性并发症的发生和发展与糖化血红蛋白 (GHb) 测定所测量的血糖控制程度密切相关。

[0005] DCCT 还提供了将 GHb 值和血糖均值联系起来的大量数据。因此,所述 DCCT 结果为用 GHb 作为平均血糖浓度指数来建立具体的糖尿病治疗目标创造了条件。

[0006] 理想地,血糖水平变化的早期检测能仔细监控和长期控制血糖浓度。需要快速精确的试验来检测血糖水平。许多当前血糖监控测试是根据近期食物摄入或其他生活方式习惯,其可造成糖水平短期剧烈波动。这些可能不能对血糖水平趋势进行精确描述且可掩盖升高的基线水平。如上所述,先前已确立升高的血糖引起循环红细胞内血红蛋白 (Hb) 糖化增加和糖化 Hb 水平在约 3 个月时间内与所述糖水平相关。因此,近期食物摄入对所述糖化 Hb 水平影响很小,从而提供更精确水平的血糖平均水平。

[0007] 已开发各种诊断试验和相关设备用于医疗点 (POC) 测试。鉴于 POC 诊断试验和相关设备的便利、其结果的时间性、和糖尿病的高发生率,对于发现糖尿病倾向以及监控治疗的早期诊断测试的需求突出了 POC 诊断测试的必要性。这最适于用在非医院环境下以及不需要抽血师的情况(即不需要抽血)。通常,POC 设备可为便携的或可运输的。在一些情况下,其甚至可为手持式的。

[0008] 此外,由于现有可用的测试中变化多,所以需要具有提供具有高灵敏度、精密度、精确性、测量可靠性且还适用于大群体的 POC 系统。本发明描述在试验系统中使用适合 POC 设备配置的色谱测试条,通过测量少量血液样品中糖化血红蛋白含量来检测血糖水平的方法。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明部分基于定量分析血红蛋白 (Hb)、糖化血红蛋白 (GHb) 和其他待测变体的方法的发现。因此本发明提供进行所述测试的系统 and 检测血液样品中糖化血红蛋白含量的方法。在一些实施方式中,本文所述系统和方法可用于医疗点 (POC) 测试,使用便携甚至手持式的设备,且在一些情况下可为电池操作的。在某些实施方式中,本文所述方法可为 CLIA 豁免认证(其中“CLIA”指《美国临床实验室改进修正案》)。

[0011] 本发明一个方面提供了与标记有第一可检测标记的识别血红蛋白的抗体和标记有第二可检测标记的硼酸或其衍生物偶联的糖化血红蛋白。

[0012] 本发明另一方面提供了检测样品中糖化血红蛋白百分比的方法。在一个实施方式中,所述方法包括检测与结合所述样品中血红蛋白的第一试剂偶联的第一可检测标记和与仅结合所述样品中糖化血红蛋白的第二试剂偶联的第二可检测标记,和基于所述样品中所测的第一可检测标记和第二可检测标记的含量测量样品中糖化血红蛋白百分比。来自所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号可任选地同时测量。

[0013] 在另一个实施方式中,所述方法包括检测与结合所述样品中血红蛋白的第一试剂偶联的第一可检测标记和与仅结合所述样品中糖化血红蛋白的第二试剂(硼酸或其衍生物)偶联的第二可检测标记,和基于所述样品中所测的第一可检测标记和第二可检测标记的含量测量样品中糖化血红蛋白百分比。来自所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号可任选地同时测量。

[0014] 在另一个实施方式中,所述方法包括步骤:用标记有结合血红蛋白的第一可检测标记的第一试剂和标记有仅结合糖化血红蛋白的第二可检测标记的第二试剂与释放自样品中细胞的血红蛋白接触;将所述可检测标记的血红蛋白固定在固体支持物上;测量来自固定在所述固体支持物上的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号;和基于来自所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号测量样品中糖化血红蛋白百分比。来自所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号可任选地同时测量。

[0015] 在另一个实施方式中,所述方法包括步骤:用标记有结合血红蛋白的第一可检测标记的第一试剂和标记有仅结合糖化血红蛋白的第二可检测标记的第二试剂(硼酸或其衍生物)与释放自样品中细胞的血红蛋白接触;将所述可检测标记的血红蛋白固定在固体支持物上;测量来自固定在所述固体支持物上的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号;和基于来自所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号测量样品中糖化血红蛋白百分比。在一个示例性实施方式中,同时测量来自所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号。

[0016] 在另一个实施方式中,所述方法包括步骤:用标记有结合血红蛋白的第一可检测标记的第一试剂和标记有仅结合糖化血红蛋白的第二可检测标记的第二试剂与释放自样品中细胞的血红蛋白接触;将包括所述可检测标记的糖化血红蛋白在内的所述可检测标记的血红蛋白,固定在固体支持物的相同区域上;同时测量来自固定在所述固体支持物上的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号;和基于来自所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号测量样品中糖化血红蛋白百分比。所述第一可检测标记为暴露于第一波长光时发出荧光的第一荧光团且所述第二可检测标记为暴露于第二波长光时发出荧光的第二荧光团,且检测来自固定在所述固体支持物上的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号是通过将固定包括糖化血红蛋白在内的血红蛋白的固体支持物区域暴露于所述第一和第二波长光。

[0017] 本发明另一方面提供了定量检测血液样品中糖化血红蛋白百分比的系统。在一个实施方式中,本发明提供了定量检测血液样品中糖化血红蛋白百分比的测试条。所述测试条包括色谱条;含有结合样品中血红蛋白的捕获剂的部分所述色谱条上的涂层;所述色谱条上添加样品的区域;和所述色谱条上包含标记有结合血红蛋白的第一可检测标记的第一试剂和标记有仅结合糖化血红蛋白的第二可检测标记的第二试剂的区域,其中所述包含有所述第一试剂和所述第二试剂的色谱条区域位于(i)添加所述样品的区域或(ii)添加所

述样品的区域和含所述捕获剂的区域之间,从而加入所述测试条的样品在到达含所述捕获剂的区域前流过含所述第一和第二试剂的区域。任选地,所述第一可检测标记为暴露于第一波长光时发出荧光的第一荧光团且所述第二可检测标记为暴露于第二波长光时发出荧光的第二荧光团。在一个示例性实施方式中,所述第一和第二可检测标记同时检测。

[0018] 在另一个实施方式中,所述测试条包括色谱条;含有结合样品中血红蛋白的捕获剂的部分所述色谱条上的涂层;所述色谱条上添加样品的区域;和所述色谱条上包含标记有结合血红蛋白的第一可检测标记的第一试剂和标记有仅结合糖化血红蛋白的第二可检测标记的第二试剂(包括硼酸或其衍生物)的区域,其中所述包含有所述第一试剂和所述第二试剂的色谱条区域位于(i)添加所述样品的区域或(ii)添加所述样品的区域和含所述捕获剂的区域之间,从而加入所述测试条的样品在到达含所述捕获剂的区域前流过含所述第一和第二试剂的区域。

[0019] 附图简要说明

[0020] 图1表示检测血液样品中HbA1c%的示例流程图。所述血液样品经裂解以从红细胞中释放Hb。所释放的Hb与用第一荧光团可检测标记的结合Hb(f11-Ab1)的抗体和用第二荧光团可检测标记的仅结合糖化Hb(f12-BD)的硼酸衍生物BD接触。所标记的Hb和糖化Hb暴露于分别指向所述第一和第二荧光团的预定波长的光以诱导荧光。基于来自所述第一和第二荧光团的荧光检测糖化Hb的百分比。

[0021] 图2表示依本发明一实施方式检测血液样品中糖化Hb的示意图。所述血液样品暴露于裂解液中以从所述红细胞中释放Hb。将裂解的样品加入测试条,所述测试条包含用第一荧光团可检测标记的结合Hb(f11-Ab1)的抗体和用第二荧光团可检测标记的仅结合糖化Hb(f12-BD)的硼酸衍生物3-氨基苯基硼酸(PB)。所述样品中的血红蛋白结合标记有所述第一荧光团的抗体,且所述样品中的糖化血红蛋白结合可检测标记有所述第二荧光团的硼酸衍生物。所述标记的血红蛋白沿着所述色谱条流向含结合(并因此捕获或固定化)血红蛋白的抗Hb抗体的捕获区、检测区或“测试带”。所述色谱条暴露于635nm和800nm波长的光以诱导来自所述第一或第二荧光团的荧光。基于来自所述第一和第二荧光团的荧光检测糖化Hb的百分比。

[0022] 图3表示依本发明另一实施方式检测血液样品中糖化Hb的另一示意图。所述血液样品暴露于裂解液中以从所述红细胞中释放Hb。所述裂解液包含用第一荧光团可检测标记的结合Hb(f11-Ab1)的抗体和用第二荧光团可检测标记的仅结合糖化Hb(f12-BD)的硼酸衍生物3-氨基苯基硼酸(PB)。所述样品中的血红蛋白结合标记有所述第一荧光团的抗体,且所述样品中的糖化血红蛋白结合可检测标记有所述第二荧光团的硼酸衍生物。所述标记的血红蛋白加入色谱条并沿着所述色谱条流向含结合(并因此捕获或固定化)血红蛋白的抗Hb抗体的捕获区、检测区或“测试带”。测量来自固定在所述色谱条上的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号。基于来自所述第一和第二荧光团的信号检测糖化Hb的百分比。

[0023] 图4显示能偶联可检测标记以产生结合糖化Hb的可检测标记试剂的示例性硼酸衍生物。

[0024] 图5a显示在3'位置含氨基残基的硼酸与荧光团DY-782的结合。

[0025] 图5b显示在3'位置含巯基残基的硼酸与荧光团DY-636的结合。

[0026] 图 6 显示不用氨基或巯基基团时用硼酸基团直接转换或置换荧光团的羧酸。

[0027] 图 7 显示本发明示例性测试条的示意图。所描述的测试条为双向侧流测试条,其中加在位于或接近末端 1 的口 I 上的液体流向末端 2,且加在位于或接近末端 2 的口 II 上的液体流向末端 1。在所示测试条中,样品加在口 I 上并流向含一“测试带”和两“对照带”的反应区或捕获区、或检测区。测试带含结合(并因此捕获或固定)所述样品中分析物的捕获剂,例如所述测试带可含有结合血红蛋白的抗 Hb 抗体。所述对照带“高对照”和“低对照”含结合并因此捕获样品中存在的对照的捕获剂。在另一些实施方式中,本发明的测试条可不包括或包括一个或多于两个对照带。诸如额外样品或缓冲液如洗涤缓冲液的液体可任选地加在所示口 II 上。

[0028] 发明详述

[0029] 本文描述的是分析血液样品以定量确定所述血液样品中糖化血红蛋白百分比的系统和方法。通常,本文所述方法和系统可用在医疗点(POC)设备以及其他适当的体外诊断(IVD)设备中。在一些实施方式中,所述 POC 系统设计为用于非技术人员现场测试且可为 CLIA 豁免认证的。在某些情况下,本文所述方法和系统可用在制造相对不昂贵且因此可广泛获得的设备中。此外,其可用在能在相对短时间段内(如取样后 60 分钟或更少、50 分钟或更少、40 分钟或更少、30 分钟或更少、20 分钟或更少、15 分钟或更少、10 分钟或更少、或 5 分钟或更少)提供所述血样定量分析的设备如 POC 设备中。本文所述的系统和试验方法可使用如 2010 年 4 月 14 日提交的题为“Diagnostic Devices and Related Methods(诊断设备和相关方法)”的美国专利申请系列号 12/760,518 所述的设备,所述申请通过引用全文纳入本文。

[0030] 血红蛋白为给予血液红色的载氧色素,且也是红细胞中的主要蛋白。约有 90% 的血红蛋白为血红蛋白 A(所述“A”表示成人类型)。尽管一种化学成分构成 92% 的血红蛋白 A,但约 8% 的血红蛋白 A 由化学上稍稍不同的次要组分组成。这些次要组分包括血红蛋白 A1c、A1b、A1a1、和 A1a2。血红蛋白 A1c(HbA1c)是结合葡萄糖的血红蛋白次要组分。HbA1c 还指糖基化血红蛋白、葡萄糖基化血红蛋白或糖化血红蛋白(GHb)。这些 GHb 术语在本文中可互换使用。

[0031] 本文所用的“血红蛋白”(Hb)指血红蛋白或“总”血红蛋白的所有组分,包括糖化血红蛋白。因此,结合、捕获或固定血红蛋白的试剂也结合、捕获或固定糖化血红蛋白。

[0032] 本发明一方面提供了检测样品中糖化血红蛋白百分比的方法。在一个实施方式中,所述方法包括检测与结合所述样品中血红蛋白的第一试剂偶联的第一可检测标记和检测与仅结合所述样品中糖化血红蛋白的第二试剂偶联的第二可检测标记。所述样品中的糖化血红蛋白百分比可基于该样品中检测的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的含量确定。

[0033] 所述样品可为含血红蛋白的任何液体。在一个实施方式中,所述样品是血液样品即血滴或其他需要量的血液。在另一个实施方式中,所述样品包括含分离自血液的血红蛋白的细胞如红细胞(“RBC”)。所述细胞可以但不必需裂解或制备成可渗透以释放所述血红蛋白。

[0034] 在一个实施方式中,所述样品为血液样品或含分离自血液的血红蛋白的细胞,且将所述血液或所述血细胞裂解或制备成可渗透以释放所述细胞中的血红蛋白。所述样品可

与裂解剂或使细胞可渗透的试剂接触足够的时间以释放所述血红蛋白。也可使用本领域技术人员已知的任何其他裂解方法或使之可渗透的方法。在一个实施方式中可使用裂解缓冲液。例如,所述样品可在 pH 7.5、含 1% 曲通 (Triton) X-100、150mM NaCl 的 4mM 磷酸缓冲液中裂解 1-2 分钟,或用其他本领域技术人员已知的裂解缓冲液。在另一个实施方式中,可使用机械方法如高能超滤(或“超声波降解法”)。

[0035] 然后,包含释放自所述 RBC 的血红蛋白的裂解样品可接触标记有结合血红蛋白的第一可检测标记的第一试剂和标记有仅结合血红蛋白中糖化血红蛋白 (“GHb”) 部分的第二可检测标记的第二试剂。所述第一试剂结合血红蛋白形成第一检测复合体。所述第二试剂结合 GHb。因此,例如图 2 和 3 所示,糖化血红蛋白具有两种 (2) 标记,一种来自结合血红蛋白的试剂且一种来自对糖化血红蛋白特异的试剂。能检测所述第一可检测标记和所述第二可检测标记且所述样品中的糖化血红蛋白百分比可基于该样品中检测的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的含量确定。

[0036] 在一个实施方式中,在检测所述第一和第二可检测标记前,不结合血红蛋白的任何第一试剂和不结合糖化血红蛋白的任何第二试剂分别从结合血红蛋白和糖化血红蛋白的所述第一试剂和所述第二试剂中分离。可通过已知或以后发现的任何方法,包括但不限于将所述样品置于电场中用电泳如凝胶或毛细管电泳,或通过固定所述血红蛋白进行这类分离。

[0037] 本发明的一个实施方式中,血液样品中细胞释放的血红蛋白接触标记有结合血红蛋白的第一可检测标记的第一试剂和标记有仅结合糖化血红蛋白的第二可检测标记的第二试剂(硼酸或其衍生物)。然后将包括可检测标记的糖化血红蛋白在内的所述可检测标记的血红蛋白定位在检测区中,在所述检测区中检测所述第一和第二可检测标记的信号。在一个实施方式中,包括所述糖化血红蛋白的血红蛋白定位在相同检测区中,在所述检测区中测量所述第一和第二可检测标记的信号。在另一个实施方式中,所述糖化血红蛋白位于检测区中如第一检测区,在该检测区中测量所述第一和第二可检测标记的信号,且未糖化血红蛋白位于不同的检测区域如第二检测区域,在该检测区中仅测量所述第一可检测标记的信号。

[0038] 可使用本领域技术人员已知的任何定位方法。例如,所述可检测标记的血红蛋白可固定在固体支持物上。可固定蛋白的任何固体支持物能用于固定所述可检测标记的血红蛋白。示范性固体支持物包括但不限于色谱条如侧流测试条,浸渍条,微流体设备,玻璃或塑料珠、板或柱,具有或不具有玻璃或塑料涂层的磁力珠等。本领域技术人员已知的其他固体支持物也可用于固定所述可检测标记的血红蛋白。在一个实施方式中,所述固体支持物为色谱条如侧流测试条或浸渍条。在另一实施方式中,所述固体支持物为微流体设备,在 ELISA 试验或微毛细管系统中使用的多孔塑料板。

[0039] 所述固体支持物可以但不必需包含结合并因此固定所述血红蛋白的固定化捕获剂。在一个实施方式中,在所述样品或可检测标记的血红蛋白接触所述固体支持物前,所述捕获剂固定在所述支持物上。在另一实施方式中,在所述样品加入所述固体支持物前,所述捕获剂可加入该样品(或存在于加入样品的液体如裂解缓冲液中)。所述捕获剂结合所述样品或其他加入样品的液体中的血红蛋白。当样品加入所述固体支持物如含诸如树脂珠或生物素/链霉亲和素的珠的柱子时,所述捕获剂结合所述支持物并因此固定所述结合的血

红蛋白。本文所用的术语“捕获剂”指能被固定在固体支持物上且识别并结合样品中血红蛋白的部分（或组分），从而当其结合所述血红蛋白时，该血红蛋白被“捕获”在该固体支持物上。

[0040] 来自结合血红蛋白的第一可检测标记和结合糖化血红蛋白的第二可检测标记的信号可通过本领域已知的任何方法测量。来自所述第一和第二可检测标记的信号可以但不必需同时测量。应理解当包括 GHb 在内的 Hb 被固定在固体支持物上时，仅检测来自结合或固定在所述固体支持物上的所述可检测标记试剂的信号，而不检测溶液中游离的试剂。在一些实施方式中，可能需要清洗步骤以消除任何未结合的可检测标记的试剂。在这些使用上述其他分离技术的实施方式中，确保仅检测来自结合血红蛋白和糖化血红蛋白的可检测标记试剂的信号的方法对本领域技术人员显而易见。

[0041] 所述血液样品中的糖化血红蛋白百分比可基于所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号确定。此外，可按照美国国家糖化血红蛋白标准化计划 (NGSP) 确定所述糖尿病指数。

[0042] 尽管本发明方法可用于如上所述可配制为定量确定样品中糖化血红蛋白百分比的任何系统，但本文所述方法参考示例性系统，含色谱条的测试条。

[0043] 本发明的一个实施方式中，在样品加入所述色谱条前，样品如血液样品中细胞释放的血红蛋白接触标记有结合血红蛋白的第一可检测标记的第一试剂和标记有仅结合糖化血红蛋白的第二可检测标记的第二试剂。在一个实施例中，可通过将所述样品与裂解液接触而裂解所述样品中的细胞。所述第一和第二可检测标记的试剂，可例如存在于所述裂解液中，从而所述 Hb 一旦从所述裂解的 RBC 中释放就接触所述第一和第二可检测标记的试剂。

[0044] 或者，所述样品先经过裂解且随后该裂解的样品接触所述第一和第二可检测标记的试剂。所述第一和第二可检测标记的试剂分别结合所述血红蛋白和糖化血红蛋白后，将所述样品加入所述色谱条中，其中该血红蛋白（包括该糖化血红蛋白）被所述捕获剂固定并定量检测。

[0045] 在另一个实施方式中，如图 2 所示，所述裂解的样品加入所述色谱条而不用先接触所述第一和第二可检测标记的试剂。在此实施方式中，将所述第一和第二可检测标记的试剂提供在所述色谱条上位于或接近所述裂解样品加入所述色谱条的位点，从而所述裂解样品中 Hb 和 GHb 在流过所述色谱条到达含所述捕获剂的部分前与所述第一和第二可检测标记的试剂在所述色谱条上相互作用。

[0046] 示例性捕获剂包括但不限于抗体、抗体片段、抗原、肽、半抗原、或工程改造的蛋白。在一个实施方式中，所述捕获剂是识别和结合 Hb 的抗体。所述捕获剂可为单克隆抗体或多克隆抗体如识别所有血红蛋白分子如 A、A2、F、C、D、E 和 S 中存在的常见抗原表位的多克隆抗体。或者，所述捕获剂可包括对各变体特异的抗体的混合物。捕获剂的其他例子包括抗体片段如 Fab、F(ab)2、纳米抗体、双抗体、适体、模拟抗体蛋白 (adnectin)、抗脂质运载蛋白 (anticalin) 或由各种过程产生的各种其他 Hb 特异性结合分子，包括 DARPin 和 DART。

[0047] 分别结合血红蛋白和糖化血红蛋白的第一和第二试剂可为分别结合血红蛋白和糖化血红蛋白，且能可检测标记的部分或组分。如上所述，在一个实施方式中，所述第一和

第二试剂为抗体或抗体片段。其可为单克隆抗体或多克隆抗体。应注意尽管所述捕获剂和所述第一试剂都结合 Hb,但其既不结合 Hb 上的相同抗原表位,也不彼此竞争结合 Hb。

[0048] 在一个实施方式中,结合糖化血红蛋白的第二试剂为硼酸 $[RB(OH)_2]$ 或其衍生物。可使用特异性结合 GHb 的已知或之后发现的任何硼酸衍生物。所述硼酸衍生物优选对 GHb 有高亲合力和对结合 GHb 有高结合速率(或“附加速率”)和低解离或“去除”速率。实际考虑如将所述硼酸偶联所述可检测标记的能力或便利可偏好使用具体的硼酸。这样的考虑在本领域技术范围内。所述第二试剂可为例如苯基硼酸。硼酸衍生物的例子包括但不限于 3-氨基苯基硼酸、4-氨基-3-硝基苯基硼酸、或 3-或 4-巯基(或含巯基的)苯基硼酸以及下表 1 中所列物质。可用作特异性结合 GHb 的所述第二试剂的示例性硼酸衍生物的化学结构如图 4 所示。

[0049] 表 1:示例性硼酸和其电离常数 (pK_a)

[0050]

硼酸, $RB(OH)_2$	pK_a
硼酸	9.0
甲基硼酸	10.4
苯基硼酸	8.9
3,5-二氯苯基硼酸	7.4
3,5-双(三氟甲基)苯基硼酸	7.2
3-甲氧基苯基硼酸	8.7
4-甲氧基苯基硼酸	9.3
4-羧基苯基硼酸	8.4
2-硝基苯基硼酸	9.2
4-硝基苯基硼酸	7.1
4-溴苯基硼酸	8.6
4-氟苯基硼酸	9.1
2-甲苯基硼酸	9.7
3-甲苯基硼酸	9.0
4-甲苯基硼酸	9.3

3,5-二甲苯基硼酸	9.1
3-甲氧基羰基-5-硝基苯基硼酸	6.9
3-吡啶基硼酸	4.0, 8.2
8-喹啉基硼酸	4.0, 10
2-(R ¹ R ² NCH ₂)苯基硼酸	5.2-5.8

[0051] 分别连接所述第一和第二试剂的第一和第二可检测标记可选自各种材料。在所述第一和第二可检测标记同时检测或来自如固体支持物的相同区域的实施方式中,应当理解所述第一可检测标记与所述第二可检测标记不同或至少所述标记在检测时可区分。可检测标记的示例包括但不限于颗粒、发光标记;量热标记、荧光标记;化学标记;酶;放射性标记;或射频标记;金属胶体;和化学发光标记。

[0052] 可使用基于如 Hayes 等所述 (Analytical Chem. 66 :1860-1865(1994)) 的颜色的吸收、变化(或没有变化),光学方法如测量光散射、荧光、反射率、发光(如化学发光),或电子传导或电容,放射活性(用盖革(Geiger)计数器测量),释放的电活性剂如铟、铋、镓或碲离子的电化学检测的检测方法,或基于如 Roberts 和 Durst 所述 (Analytical Chem. 67 :482-491(1995)) 的亚铁氰化物的检测方法。也可使用其他合适的方法。此外,可使用单一检测方法,或者多种(如 2、3 种)不同检测方法可一起使用。

[0053] 在一个实施方式中,通过将来自第一光源和/或第二光源的光应用到所述总血红蛋白固定的色谱条区域来测量来自所述第一可检测标记和/或所述第二可检测标记的信号。这些光源之一或二者可包含激光。应理解所述光源可具有固定或可调波长且可校准为递送所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的最优光照所需的光频率。在一个示例性实施方式中,所述第一或第二可检测标记的试剂可暴露于红光或红外光中以诱导来自所述第一和第二可检测标记的荧光。

[0054] 在一个实施方式中,所述第一或所述第二可检测标记可为荧光波长与亚铁血红素天然荧光不同的荧光团。在另一个实施方式中,所述第一或所述第二可检测标记可为荧光波长不同的荧光团,且所述波长都与亚铁血红素天然荧光不同。在另一个实施方式中,来自所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号同时测量。例如,同时检测的所述第一和所述第二可检测标记可为荧光波长不同的荧光团,且所述波长都与亚铁血红素天然荧光不同。在一个示例性实施方式中,所述第一和第二可检测标记可同时暴露于红光或红外光中以诱导来自所述第一和第二可检测标记的荧光。

[0055] 可使用的荧光团的示例包括但不限于 Dyomics、Dy-636 或 Anaspec、HiLytePlus647,二者的荧光约为 635nm,或 Dyomics、Dy-782 或 Pierce、DyLight 800,二者的荧光约为 800nm。两种(或更多)不同可检测标记如荧光团的检测方法,以及可用于所述检测的系统/设备进一步描述于 2010 年 4 月 14 日提交的题为“Diagnostic Devices and Related Methods(诊断设备和相关方法)”的美国专利申请系列号 12/760,518,所述申请通过引用已全文纳入本文。

[0056] 图 5a、5b 和 6 显示荧光团与结合 Ghb 的硼酸衍生物偶联的示例性反应。如图 5a

所示,3'位置(3-氨基苯基硼酸)或4'位置(4-氨基-3-硝基苯基硼酸)含有氨基残基的硼酸可结合荧光团(如DY-782)以形成具有酰胺键的荧光团-硼酸衍生偶联物。图5b显示在3'或4'位置含巯基残基的硼酸(如3-巯基苯基硼酸或4-巯基苯基硼酸)与荧光团(如DY-636)的结合。图6显示不用氨基或巯基基团时用硼酸基团直接转换或置换荧光团的羧酸。

[0057] 在一个示例性实施方式中,血红蛋白从样品中的细胞释放并接触标记有结合血红蛋白的第一可检测标记的第一试剂和标记有仅结合糖化血红蛋白的第二可检测标记的第二试剂。所述第一可检测标记为暴露于第一波长光时发出荧光的第一荧光团且所述第二可检测标记为暴露于第二波长光时发出荧光的第二荧光团。然后包括所述可检测标记的糖化血红蛋白在内的所述可检测标记的血红蛋白被固定于固体支持物上的相同区域。通过将含糖化血红蛋白的血红蛋白所固定的色谱条区域暴露于所述第一和第二波长的光,检测固定在所述固体支持物上的所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号。所述样品中的糖化血红蛋白百分比基于所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号确定。任选地,通过将含糖化血红蛋白的血红蛋白所固定的固体支持物区域同时暴露于所述第一和第二波长的光,检测所述第一可检测标记和所述第二可检测标记的信号。

[0058] 本发明另一个方面提供了与标记有第一可检测标记的识别血红蛋白的抗体和标记有第二可检测标记的硼酸或其衍生物偶联的糖化血红蛋白。在一个实施方式中,所述硼酸或其衍生物直接偶联所述可检测标记且可被上述任何方法检测而不使用其他试剂如对所称硼酸/硼酸衍生物或所述结合的GHb特异的抗体。所述第一和第二可检测标记可选自上述标记的任何类别和例子。相似地,所述硼酸或其衍生物可为任何合适的化合物,例如上述任何化合物。

[0059] 本发明另一方面提供了定量检测血液样品中糖化血红蛋白百分比的系统。所述系统可为能使血红蛋白和糖化血红蛋白定位从而可检测二者相对量的任何设备。在一个实施方式中,所述系统可为测试条如支持液体单向或双向流过所述测试条的侧流测试条。或者,所述系统可为浸入含释放自RBC的血红蛋白的样品中的浸渍条。在所述浸渍条的实施方式中,应理解所述裂解样品与所述第一和第二可检测标记的试剂预混合。在另一实施方式中,所述固体支持物为用于ELISA试验或微毛细管系统的多孔塑料板。

[0060] 在另一个实施方式中,所述系统可为微流体设备。例如,微流体设备可使用将结合总Hb的捕获剂固定于其内的室。微流体方法和设备如例如Martinez等“Three-Dimensional Microfluidic Devices Fabricated in Layered Paper and Tape,(在层状纸和带中制造三维微流体设备)”PNAS,第105卷第50期(2008年12月16日)19606-19611;P.K.Sorger,“Microfluidics Closes in on Point-of-Care Assays,(医疗点试验中的微流体封闭)”Nature Biotechnology,第26卷第12期(2008年12月)1345-1378;和B.Grant,“The 3 Cent Microfluidics Chip,(3美分的微流体芯片)”The Scientist(2008年12月8日)所述,其都通过引用全文纳入本文。

[0061] 在一个实施方式中,所述系统是测试条。所述测试条包括色谱条,含结合样品中血红蛋白的固定化捕获剂的部分色谱条上的涂层,所述色谱条上添加样品的区域;和所述色谱条上含标记有结合血红蛋白的第一可检测标记的第一试剂和标记有仅结合糖化血红蛋白的第二可检测标记的第二试剂的区域。所述测试条被配置为加入该测试条的样品到达含

所述捕获剂的区域前流过含所述第一和第二可检测标记的试剂的区域。例如,所述色谱条上含所述第一可检测标记的试剂和所述第二可检测的标记的试剂的区域可位于所述样品添加的区域或所述样品添加的区域和含所述捕获剂的区域之间。所述第一和第二试剂、所述捕获剂以及所述第一和第二可检测的标记可为前述任何试剂或标记。

[0062] 在一个实施方式中,所述捕获剂固定在捕获区。所述捕获区可制成任何尺寸或形状。其可为条带(如“测试带”),即在垂直于所述液体流方向上跨越所述测试条部分或全部宽度的矩形形状,或其可为近似圆形或椭圆形的“点”。所述色谱条可包括多于一个捕获血红蛋白(包括糖化血红蛋白)的捕获区,从而糖化和非糖化血红蛋白共同定位。

[0063] 在另一个实施方式中,所述色谱条含至少两个捕获区,含固定糖化血红蛋白的第一捕获剂的第一捕获区和含固定非糖化血红蛋白的第二捕获试剂的第二捕获区。在该实施方式中,来自结合血红蛋白的第一可检测标记的信号从所述第一和所述第二捕获区测量,而来自仅结合糖化血红蛋白的第二可检测标记的信号仅从所述第一捕获区测量。

[0064] 通过本文中的教授需理解,可考虑所述方法和测试条的替代实施方式。例如,释放自RBC的血红蛋白接触特异性结合血红蛋白的可检测标记的试剂(如抗体)然后固定在含两捕获区的测试条上的方法也在本发明的范围之内,所述两捕获区为含特异于糖化血红蛋白的捕获剂(如抗GHb抗体或硼酸或其衍生物)的第一捕获区,和结合Hb的第二捕获区,从而所述样品在接触所述第二捕获区前接触所述第一捕获区。在此实施方式中,所述样品中糖化血红蛋白的百分比可基于所述测试条的不同位置测量的信号确定。相似地,含两捕获区的测试条的替代实施方式也在本发明的范围之内,所述第一捕获区含结合并固定GHb的第一捕获剂,与含结合并固定Hb的第二捕获剂的第二捕获区相比,所述第一捕获区更靠近所述测试条上添加样品的区域。

[0065] 在一些实施方式中,所述测试条包括含所述第一和第二可检测标记的试剂的偶联板。或者或此外,所述测试条可含加入样品的样品板。在所述测试条包括偶联板和样品板的实施方式中,所述样品板通常可位于所述偶联板之上从而加入所述样品板的样品流向所述偶联板并从所述偶联板流到所述色谱条上。或者,所述偶联板可位于所述色谱条上,在所述样品板和含所述固定的捕获剂的区域(所述捕获区)之间。

[0066] 在一个实施方式中,所述样品板起储器的作用并使液体如所述样品或缓冲液缓慢且不断释放到所述偶联板和所述色谱条上。这不仅确保样品均匀流过所述测试条,还为样品中存在的血红蛋白和糖化血红蛋白分别结合所述偶联板中存在的所述第一和第二可检测标记的试剂提供足够的时间。应理解,所述样品板的保留时间依所述样品板的尺寸、所述测试条的尺寸和加入所述样品板的样品体积而不同。在一些实施方式中,所述样品板释放所述样品的时间可持续约60分钟、约50分钟、约40分钟、约35分钟、约30分钟、约25分钟、约20分钟、约15分钟、约10分钟、约5分钟、约3分钟、约2分钟、或约1分钟。在一个示例性的实施方式中,所述样品板可保持并释放缓冲液和样品超过20分钟。

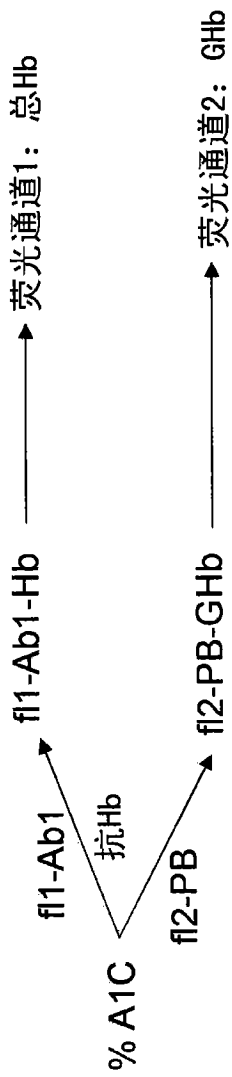
[0067] 可用于实施本发明方法/试验的测试条和系统的示例性构型进一步描述于美国专利申请系列号12/760,320、美国专利申请系列号12/760,518、美国专利号6,528,323、7,229,839和7,309,611,其都通过引用全文纳入文本。

[0068] 通过本文中的教授需理解,可考虑所述方法和测试条的替代实施方式。例如,释放自RBC的血红蛋白接触特异性结合血红蛋白的可检测标记的试剂(如抗Hb抗体)然后固

定在含两捕获区的测试条上的方法也在本发明的范围之内,所述两捕获区为含特异性于糖化血红蛋白的捕获剂(如抗 GHb 抗体或硼酸或其衍生物)的第一捕获区,和结合 Hb 的第二捕获区,从而所述样品在接触所述第二捕获区前接触所述第一捕获区。在此实施方式中,所述样品中糖化血红蛋白的百分比可基于所述测试条的不同位置测量的信号确定。相似地,含两捕获区的测试条的替代实施方式也在本发明的范围之内,所述第一捕获区含结合并固定 GHb 的第一捕获剂,与含结合并固定 Hb 的第二捕获剂的第二捕获区相比,所述第一捕获区更靠近所述测试条上添加样品的区域。

[0069] 虽然所述测试条 / 系统和方法已通过图示和实施例的方式进行了稍详细的描述,但该图示和实施例仅是为了清楚理解的目的。本领域普通技术人员通过本文的教授应容易理解,本文可进行某些改变和修改而不背离所附权利要求的精神和范围。

代理人案卷号: RLA0007-401-PC



PB=3-氨基苯硼酸

图 1

代理人案卷号: RLA0007-401-PC

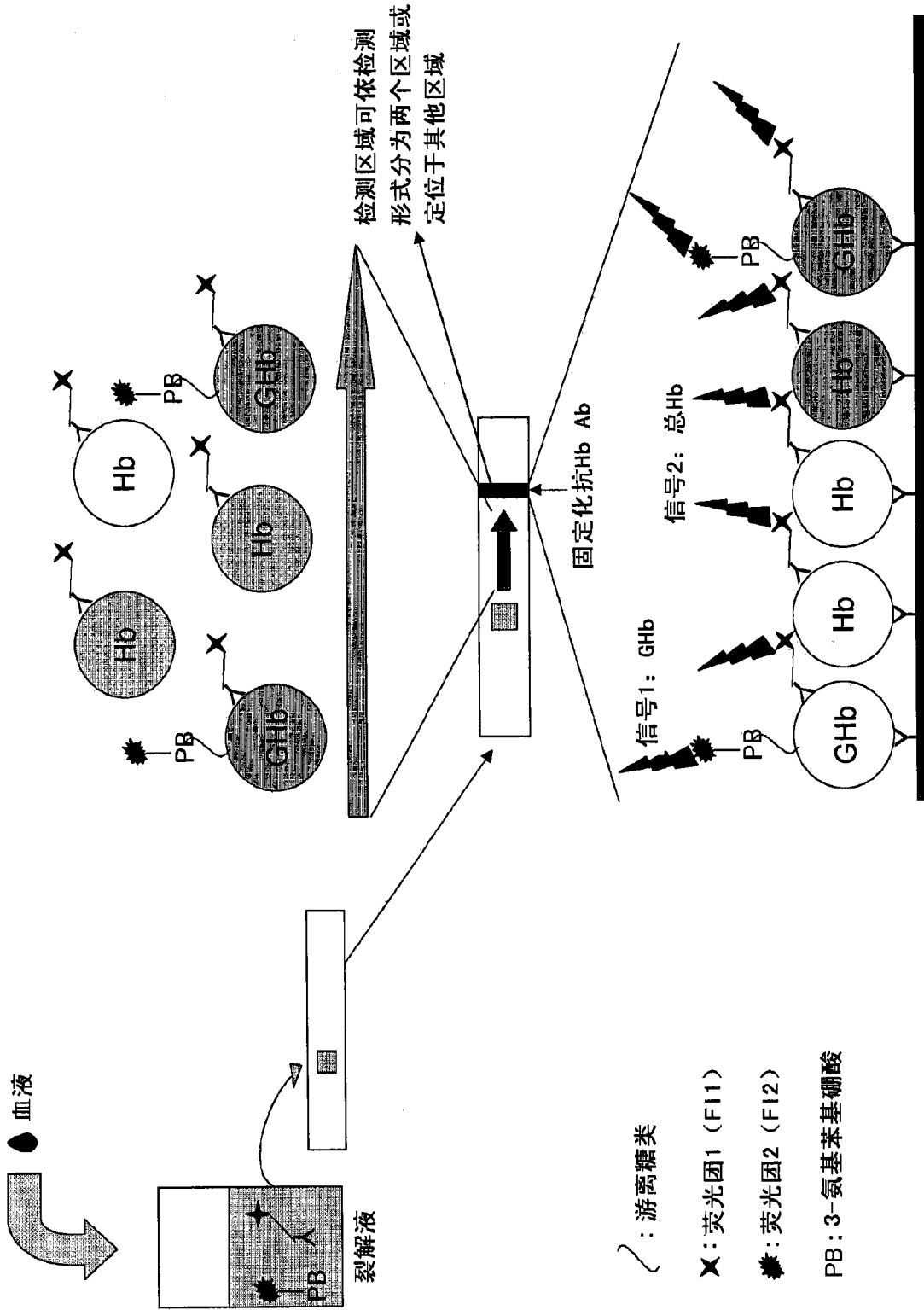
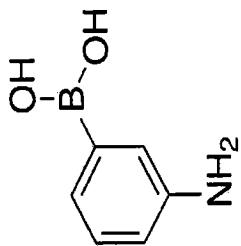


图 3

代理人案卷号: RLA0007-401-PC

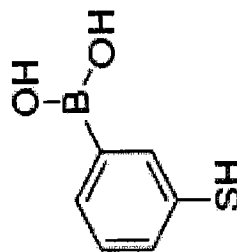
硼酸衍生物示例

含氨基基团的苯基硼酸

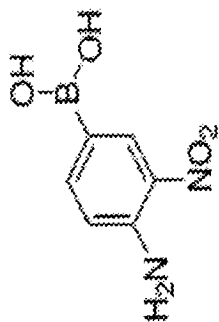


3-氨基苯基硼酸

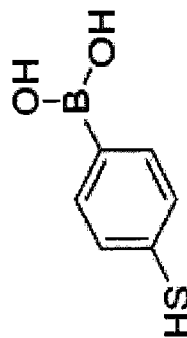
含巯基基团的苯基硼酸



3-巯基苯基硼酸



4-氨基-3-硝基苯基硼酸

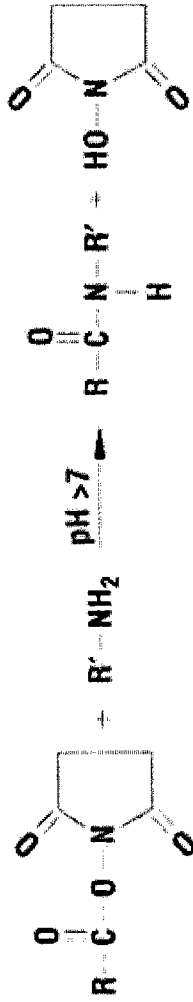


4-巯基苯基硼酸

图 4

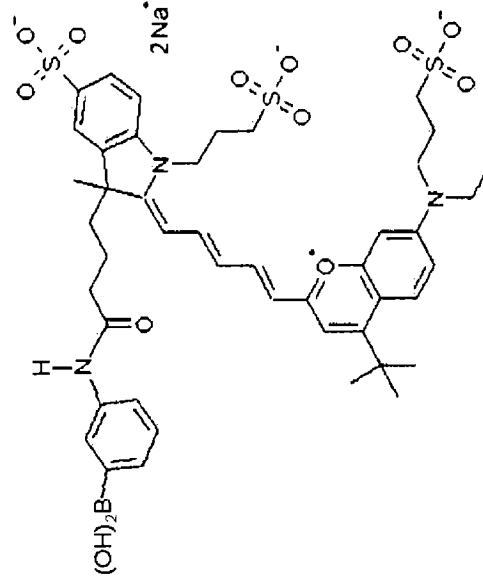
代理人案卷号: RLA0007-401-PC

硼酸衍生物偶联反应



R为荧光团, R'-NH₂ 为具有氨基基团的硼酸衍生物, 如3-氨基苯硼酸或4-氨基-3硝基苯基硼酸。

硼酸偶联物示例:

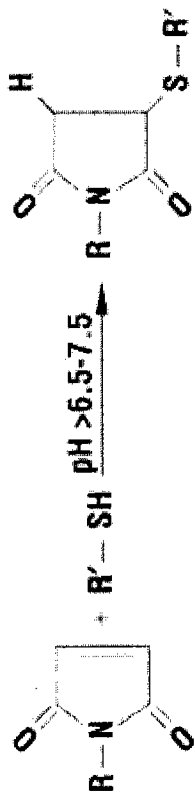


偶联反应生成的荧光团DY-782 NHS-酯 (Dyomics) 标记的3-氨基苯基硼酸

图 5A

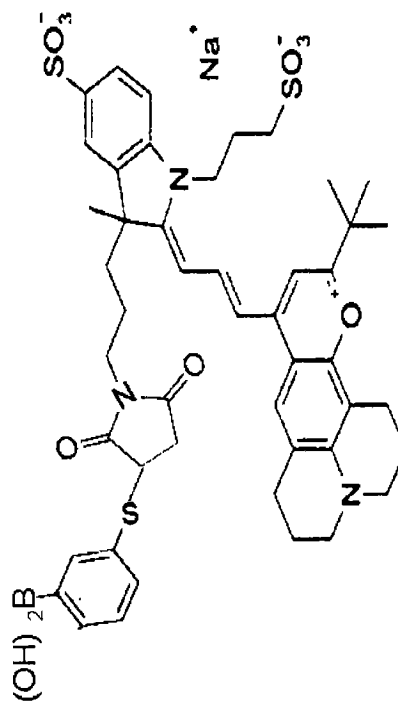
代理人案卷号: RLA0007-401-PC

硼酸衍生物的偶联反应



R为荧光团, R'-SH为具有巯基基团的硼酸衍生物, 如3-巯基苯硼酸或4-巯基苯硼酸。

硼酸偶联物示例:

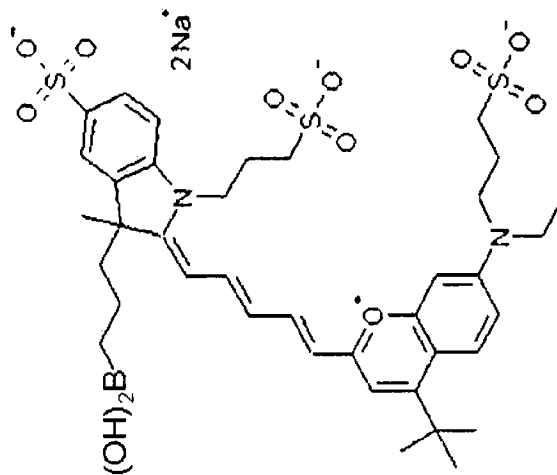


荧光团DY-636 马来酰亚胺 (Dyomics) 标记的3-氨基苯硼酸

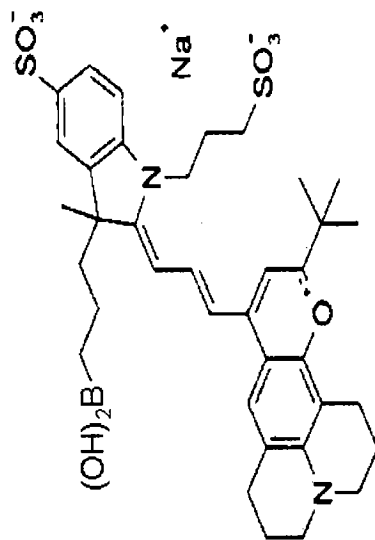
图 5B

代理人案卷号: RLA0007-401-PC

含硼酸部分的荧光团



含硼酸部分的Dy-782



含硼酸部分的Dy-636

图 6

代理人案卷号: RLA0007-401-PC

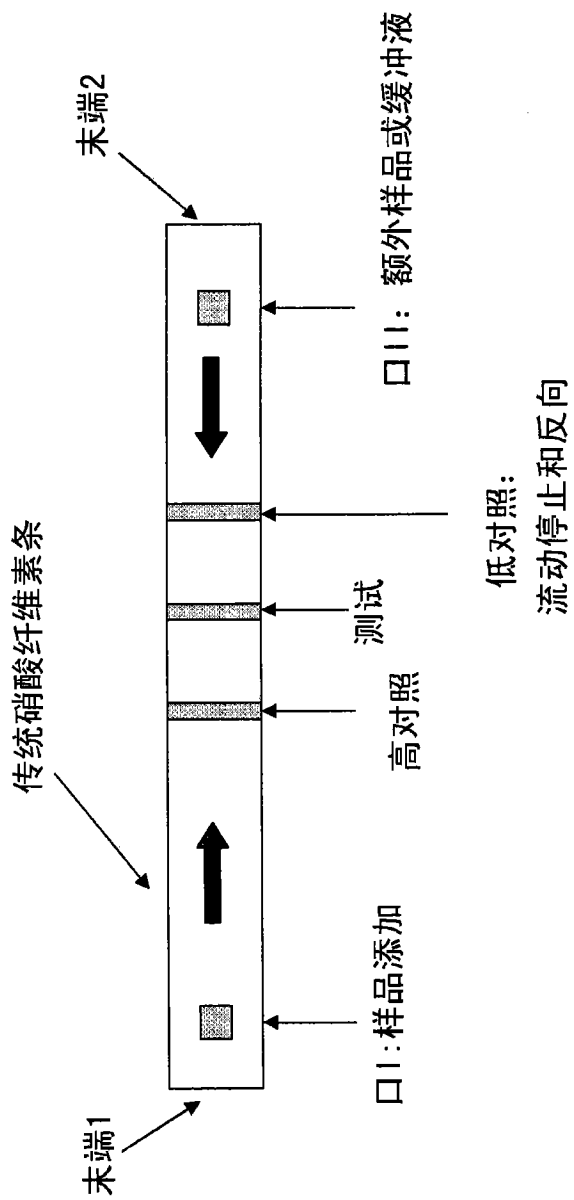


图 7

专利名称(译)	检测糖化血红蛋白百分比的系统和方法		
公开(公告)号	CN102640002A	公开(公告)日	2012-08-15
申请号	CN201080032364.8	申请日	2010-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	瑞莱诊断体系股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	瑞莱诊断体系股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	瑞莱生物工程(深圳)有限公司		
[标]发明人	WJ若特 JH汉 T科温		
发明人	W·J·若特 J·H·汉 T·科温		
IPC分类号	G01N33/72 G01N33/533 G01N33/538		
CPC分类号	G01N33/723 G01N33/526 G01N33/558 G01N33/721 Y10T436/25375		
代理人(译)	韦东		
优先权	61/180075 2009-05-20 US		
其他公开文献	CN102640002B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本文描述的是分析样品以定量确定样品中糖化血红蛋白百分比的系统和方法。

