

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/576 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810109254.1

[43] 公开日 2008年10月15日

[11] 公开号 CN 101285835A

[22] 申请日 2008.1.10

[21] 申请号 200810109254.1

[30] 优先权

[32] 2007.1.10 [33] US [31] 11/621797

[71] 申请人 奥索临床诊断有限公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 M·N·雅各布斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘健 黄可峻

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

### [54] 发明名称

单一元件上的多重免疫化学分析

### [57] 摘要

一种对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，所述方法包括：提供一个元件，所述元件具有基层层；含有链霉抗生物素蛋白的层；扩展层，其中扩展层可以含有或不含有链霉抗生物素蛋白；提供免疫组分以及标记的免疫反应物，所述免疫组分以及标记的免疫反应物可以在扩展层中，或可以与样本组合；在扩展层的三个或更多个区域上施加样本，和任选免疫组分和标记的免疫反应物，其中三个或更多个区域各自的中心与这三个或更多个区域形成的中心基本上等距，并且每个区域都与一个相邻区域接触，使得洗涤液向任何一个方向流动都能接触到样本；通过让洗涤液在这三个或更多个区域形成的中心流出来洗涤样本和标记物，洗涤液均匀的流过三个或者更多个区域中的每一个；测量三个或者更多个区域中的每一个，确定一种或

者多种分析物的存在或者浓度。在一个优选的实施方式中，该元件是在诊断分析仪上使用的干载玻片。

1、 一种对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，所述方法包括：

提供一个元件；所述元件具有基质层、含有链霉抗生物素蛋白的层以及扩展层；其中，扩展层可以含有或不含有链霉抗生物素蛋白；

提供免疫组分以及标记的免疫反应物，所述免疫组分以及标记的免疫反应物可以在扩展层中，或可以与样本组合；

在扩展层的三个或更多个区域上施加样本，和任选免疫组分和标记的免疫反应物，其中三个或更多个区域各自的中心与这三个或更多个区域形成的中心基本上等距，并且每个区域都与一个相邻区域接触，使得洗涤液向任何一个方向流动都能接触到样本；

通过让洗涤液在三个或更多个区域形成的中心流出来洗涤样本和标记物，洗涤液均匀的流过三个或者更多个区域中的每一个；以及

测量三个或者更多个区域中的每一个，确定一种或者多种分析物的存在或者浓度。

2、 如权利要求1所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述免疫组分包含捕获性或连接性抗体或抗原。

3、 如权利要求1所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述元件包含在诊断分析仪上使用的干载玻片。

4、 如权利要求1所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述三个或更多个区域是包含甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎以及人类免疫缺陷病毒分析物当中一种的四个区域。

5、 如权利要求1所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述三个或更多个区域包括心脏病检测组，该组包括肌钙蛋白、CKMB、肌红蛋白以及 proBNP。

6、 如权利要求1所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述三个或更多个区域包括生育力检测组，该组包括 HCG、FSH 和 LH。

7、 如权利要求1所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，

其特征在于，所述三个或更多个区域是四个区域，并且进一步包括在洗涤步骤前有一个培养期。

8、如权利要求1所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，针对各种不同的分析物的免疫组分和标记的免疫反应物在添加样本前位于扩展层内。

9、如权利要求8所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述免疫组分包含捕获性或连接性抗体/抗原。

10、如权利要求1所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述针对各个不同分析物的免疫组分在不同的层内。

11、如权利要求10所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述免疫组分包含捕获性或连接性抗体或抗原。

12、如权利要求1所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述针对各个不同分析的免疫组分与样本混合，然后样本被分成三个或者更多个等分试样，并且进一步其中针对每个待测分析物的标记的免疫反应物被加入到其中一个等分试样中。

13、如权利要求12所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述免疫组分包含捕获性或连接性抗体/抗原。

14、如权利要求1所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述样本被分成不同的等分试样，并且针对各个不同分析的免疫组分和标记的免疫反应物与不同等分试样中的样本混合。

15、如权利要求14所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述免疫组分包含捕获性或连接性抗体/抗原。

16、如权利要求1所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述针对各个不同分析物的免疫组分在添加样本和标记的免疫反应物前位于扩展层中。

17、如权利要求16所述对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，其特征在于，所述免疫组分包含捕获性或连接性抗体/抗原。

## 单一元件上的多重免疫化学分析

### 发明背景

本发明涉及一种单一元件上的多重免疫化学分析。具体的，本发明涉及一种诊断分析仪中使用的干载玻片上的多重免疫分析。

已知的诊断分析仪包括临床化学分析仪，如 Ortho-Clinical Diagnostics, Inc 出售的 Vitros® 5,1 FS。所有这些分析仪统称为诊断分析仪。这些诊断分析仪使用干载玻片进行分析，如 4,258,001、4,670,381 以及 4,997,772 所描述的那样，均在此完整引入作为参考。

载玻片带有与目标分析物反应的抗原或抗体。锚定在免疫复合物中的抗原或抗体的各种结构描述于 Gosling, *Immunoassays*, Oxford University Press, 2000, 7-15 页，在此引入作为参考。样本患者样本（如血清或者尿液）沉积在带有标记物的载玻片上。经过短暂的培养，使得待测分析物被捕获，洗涤元件的沉积样本的部分，以除去未复合的标记免疫反应物，并加入活化剂，如过氧化物。进一步培养。此后，在培养过程中，以检测设备如光密度计或反射计等测量元件的洗涤过的部分，测量数次，确定颜色变化的速率，将该速率与预示分析物（例如，DGXN, PHYT 或者 CRP）浓度的标准结果进行比较。

如上所述，已知在使用干检测元件的免疫检测领域，在检测前，需要从结合或复合的标记免疫反应物中分离并除去那些未复合的标记免疫反应物（例如，抗原或者抗体）。这可以通过在加样以及复合反应发生后洗涤检测元件来实现，使得游离的标记免疫反应物与结合的免疫反应物分离。这种分离，理论上，在检测元件中留下一定体积，其中结合的标记免疫反应物的检测不受已经洗去的未复合的免疫反应物的干扰。这种方法已经在美国专利 5,620,860 以及 5,641,860 中举例说明，均在此完整引入作为参考。

这种免疫分析的检测元件通常被构建只用于检测单个分析物。因为各种所需的检测需要不同的检测元件，这种构建自然降低了分析物的通量。

基于上述原因，因此，需要一种能够支持一个以上分析的免疫化学分析元件。

## 发明简述

本发明目的是满足支持一个以上分析的免疫分析检测元件的需要，尤其是干载玻片。

本发明的一个方面涉及一种分析样本中一种或多种目标分析物的方法。该方法包括：提供一个元件；所述元件具有基质层；含有链霉抗生物素蛋白的层；扩展层；其中，扩展层可以含有或不含有链霉抗生物素蛋白；提供免疫组分以及标记的免疫反应物，所述免疫组分以及标记的免疫反应物可以在扩展层中，或可以与样本组合；在扩展层的三个或更多个区域上施加样本，和任选免疫组分和标记的免疫反应物，其中三个或更多个区域各自的中心与这三个或更多个区域形成的中心基本上等距，并且每个区域都与一个相邻区域接触，使得洗涤液向任何一个方向流动都能接触到样本；通过让洗涤液在三个或更多个区域形成的中心流出来洗涤样本和标记物，洗涤液均匀的流过三个或者更多个区域中的每一个；以及测量三个或者更多个区域中的每一个，确定一种或者多种分析物的存在或者浓度。在一个优选的实施方式中，该元件是一个在诊断分析仪中使用的干载玻片。

根据下面优选实施方式的详细考虑，本发明的其他目的、特点以及优点对于本领域技术人员来说是显而易见的。

### 附图说明

图1是一个具有四个分析区域的载玻片的示意图，所述四个分析区域围绕着洗涤液指向的中心排列。

图2是一个具有四个分析区域的载玻片以及施加样本和任选样本标记免疫反应物和其它的免疫组分的顺序的示意图。

### 优选实施方式的详述

本发明涉及一种可以在单个元件上进行多重分析的免疫分析元件。这种形式的优点之一就是允许在同一元件上检测一系列不同的分析物。例如，供血者筛查中使用的感染筛查菜单通常需要检测人类免疫缺陷病毒(HIV)、甲型肝炎、乙型肝炎以及丙型肝炎。在本发明之前，供血者筛查需要大的微量滴定板(例如96孔微量滴定板)，在所有的孔内对同一分析物进行测试。因此，针对上述四种疾病的简单筛查将需要四块微量滴定板。如果不是所有的孔都用于检测，将造成可观的浪费和开销。利用本发明，一个供血者就能在单个元件上而不是

大量的微量滴定板上检测。

本发明的另一个优点就是在同一元件上具有校正（例如：参照）的能力。例如，在本发明的一个实施方式中，单个元件上可以有多个数目的相同分析。该元件上分析位置中的一个可以包括校正物或者参照。这提高了该元件的稳定性，因为校正物使用与元件上实际分析相同的储存和使用条件。

本发明提供了同一元件上的一组分析，例如，载玻片结构。这提高了系统通量，而不需要实质的新的硬件投入。这也降低了每次检测的费用，因为只使用一个检测元件就能得到多个结果。

在此使用的“标记的免疫反应物”指的是任何用于检测目标分析物如抗原或抗体的标记的抗体或抗原，不管这种检测是经由竞争性检测，其中目标抗原，比如与该抗原的标记形式竞争，或者是经由夹心检测法，其中目标抗原，比如在捕获性抗体与标记抗体（标记的免疫反应物）之间形成夹心复合物。标记物从而可以是任何可直接检测或间接检测的指示剂，例如荧光团（fluorophor）或者酶例如 HRP。在此使用的“免疫组分”是指使用的所有其它的反应成分，例如捕获或连接抗体或抗原，生物素等等，标记的免疫反应物除外。

下面是一个制备多重检测元件的实例：

- (1) 提供一个由透明材料例如聚酯或者聚酯薄膜（Mylar）组成的基质层。
- (2) 然后在基质层上提供缓冲层。
- (3) 提供一个由具有无色染料的明胶或聚合物组成的支持和吸收层。将抗氧化剂与染料混合用以降低染料与老化相关的自发的由白色向有色的转变。
- (4) 制备扩展层，包含利用水溶性乳胶粘合剂粘合在一起的聚苯乙烯珠子。
- (5) 包被链霉抗生物素蛋白的珠子被包含在扩展层中或在扩展层下作为单独的一层。

这些层优选的应用于整个元件。然而，这些层也可以仅应用于元件的将要包含分析的区域。按照下面所述各种实施方式制备各个不同的分析物。

完成检测元件以及在该检测元件上检测分析物的过程如下所述。根据待进行的检测，将标记的免疫反应物和免疫组分（用于 N 种不同分析的组分）可用于下面描述的几种不同的实施方式。（元件上点出至少 N 个不同的位置。如果同一分析需要进行多重点样，则将点出超过 N 个不同的区域，这样以验证校正物或者对照）：

1、所有的针对 N 种分析的免疫组分和标记的免疫反应物都在装配过程中均匀的包被在扩展层中。然后将样本点在元件上（比如干载玻片的扩展层）。

2、对于各个 N 种分析，上述的 N 种免疫组分以及标记的免疫反应物分别包被在 N 个不同的层中，使得 X/Y 一致但 Z 不一致。然后将 N 种样本点在元件上（比如干载玻片的扩展层）。

3、所有组分分别包被形成 N 种不同的分析用组分。N 种不同的分析用组分随后在装配过程中被连接到检测元件上。连接过程可以通过将各种单个的组分接合在一起来进行。然后将 N 种样本点在元件上（比如干载玻片的扩展层）。

4、将用于 N 种分析的所有免疫组分与样本混合，把样本分为 N 个等分试样。针对每个分析物的标记免疫反应物，例如 HRP 标记，被添加到各个 N 个等分试样中。然后样本和标记的免疫反应物的这些混合物的每一个点在载玻片的 N 个位置上。

5、将样本等分入 N 个容器中，然后各自与用于 N 种分析的每一种的免疫组分以及标记的免疫反应物例如 HRP 混合。将混合物点在元件（比如干载玻片的扩展层）的 N 个不同的位置上。这是最优选的实施方式。

6、实施方式 1 和 5 的组合。针对 N 种不同分析的所有 N 种免疫组分被均匀的包被在扩展层内。样本等分入 N 个容器内，然后与用于 N 种分析的每一种的标记免疫反应物混合，然后点在元件的至少 N 个单独的位置上。这种实施方式的缺陷就是可能失去分析的特异性，因为夹心复合物的两端无法与我们需要检测的分析物的部分连接。

例如，与整个元件或者每个检测区域的包被链霉抗生物素蛋白的珠子共价连接的是固定的抗-抗原抗体，例如抗-苯巴比妥抗体或者是抗-TSH 抗体，或者固定的抗原。优选地，它们与如前述实施方式 5 中描述的样本一起加入。标记的免疫反应物，如抗原过氧化物酶缀合物与样本中的目标分析物竞争固定的抗原或抗体上的结合位点。这种标记的免疫反应物理想的情况下应该作为已知的量与样本一起加入，并且与样本同时加载到元件上。图 1 中，载玻片上的第一个分析被标注为 A。

另一种类型的固定的抗-抗原抗体或者抗原，沉积在与第一个分析相邻的区域并固定在链霉抗生物素蛋白上。之后的第三和第四种分析类似，每种都各自带有不同的固定的抗-抗原抗体或抗原。这些在图 1 中分别被标注为 B、C 和 D。

这些可以是一个分析组，比如甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎以及 HIV，或者是心脏病的测试组，如肌钙蛋白、CKMB、肌红蛋白和 proBNP，或者是一个生育力组 HCG、LH、FSH。每个元件包含的分析的数目没有限制。唯一的限制因素是，每个分析点的中心必须与下面所要详述的洗涤中心等距，并且样本点必须互相接触使得样本之间没有干的扩展层，从而洗涤液能很好的流动。这种样本间的接触在图 1 以及图 2 中用字母 F、G、H、I 标注显示。因此，一个元件可以有 3 个或 4 个或 5 个或 6 个等等的分析区域排列在图 1 所示的中心洗涤点 E 的周围。因此，在单个元件上，可以进行对一种样本的多重不同的测试，或者是对多个样本进行不同的测试。虽然上面所描述的是针对每一分析是不同的，但各个检测点针对相同分析物也是完全可能的。即，每个固定的抗-抗原抗体或固定的抗原都是相同的。这样就可以检测多个样本中的同一分析物。然而，单个样本在所有四个位点进行相同的检测也可以使系统对结果进行平均，提供了一种更可信的估计或者校正，或者是同时点上对照液和病人样本，以校正每个结果。同样，上述的方法也适于仅仅只有两个分析时的情况，只是两个分析在载玻片上都将一式两份运行，并且在相同的检测循环中从相同的枪头（tip）沉积。这种在单个元件上包括的多重检测，允许一个或多个额外点以包含对照或者校正液。

实践中，一滴病人样本在元件的每一个分析区域上检测，并且通过扩展层均匀扩散。样本中的分析物，在第一次培养捕获（用于竞争性分析）或者对于夹心检测 SAC 结合与抗-抗原和标记结合(经由抗-抗原)之间的连接期间，对于有限数量的结合位点，与标记的免疫反应物竞争。

然后是短时间的培养，这使得待检测的分析物被捕获，然后，沉积了样本的元件部分将通过洗涤去除未复合的免疫反应物。再次洗涤，洗涤液中加入活化剂例如过氧化物，然后继续培养。

然后，洗涤部分中的一些在培养过程中用检测设备读取数次，比如光密度计或者是反射计以确定颜色变化速率，这种速率与校正结果进行比较，所述校正结果是分析物（比如 CKMB 或肌红蛋白）的浓度的预测指标。

标记的免疫反应物能结合到竞争性检测的目标分析物上，或者结合到用于夹心检测的抗体上，这两个方法均在本发明中使用。

本发明提供了一种在单个元件上进行多重检测的方法，其中样本以及标记

物被放置在元件的三个或更多个区域上，例如四个或者更多。一个重要的特点是，这三个或者更多个区域的中心与组合的三个或者更多个区域形成的中心基本上等距，并且样本点之间的扩展层上没有任何干的裂缝或者缺口。

在一个优选的实例中，其中存在四个位置或者区域，有四次测量，将样本置于四个位置中的每一个，并有一个“双重”洗涤。“双重”的意思是，第一次洗涤是不含有活化剂如过氧化物酶的洗脱未结合物的过程，因此不存在活化步骤，但在第二次洗涤液中还存在活化化学物质。在本发明之前，还没有哪种设计方案能解决所有与分析仪上的装配、整合有关的问题，同时保持对同一载玻片上的多重检测或多种样本的有效洗涤。

本发明的一个重要特征是构建元件上的检测方法，使得四个样本以及标记点中的每一个可以在同一个检测循环或随后的检测循环中，都能沉积在载玻片上。这得以实现是由于这种方法对在载玻片上的培养的时间不敏感，而这种不敏感是由于与链霉抗生物素蛋白包被（SAC）类系统发生的非常迅速的结合。

洗涤是本发明的一个重要部分，因为元件上的每个分析物必须接受等量的洗涤液以确保完全和相等的将未结合的标记免疫反应物从结合的标记免疫反应物分离。如美国专利号 5,620,860 描述的倾斜（ramped）洗涤方法，在此完整引入作为参考，使得能够在图 2 所示的分析组的中心点 E 上进行洗涤。在分析组中心的该洗涤提供元件上所有分析区域内都保持洗涤液（即使仅仅需要一个结果），使得元件上的多个分析点都能被洗涤。如果分析组的中心点没有被所有方向的分析区域包围，结果就是洗涤过程的短回路（short circuiting），洗涤液将优先流入没有存在分析的干的扩展层。如图 1 以及图 2 清楚展示的那样，当洗涤液从中心向元件的外周流动时，沉积在分析中心的洗涤液必须与分析物相遇。这需要洗涤液与元件上的每一分析区域同等地接触和相互作用，因此确保了对所有分析区域的一致的洗涤。

图 2 描述了一种可使用的优选的测量顺序。如图 2 所示，对角线的检测方法减少了检测过程中液体间的相互作用，使得样本（和任选免疫组分和标记的免疫反应物）液能在样本（和任选免疫组分和标记的免疫反应物）被加入到相邻分析区域前就能被吸收。如同上面所解释的，在检测后进行第一次培养以便例如抗原以及标记的免疫反应物竞争性结合锚定的抗体。该元件用另外一种洗涤液测定并再次培养，使得无色染料开始转色。颜色变化过程可以监测速率或

者是在终点进行检测。这些技术都是本领域公知的。元件如载玻片可以用图象采集设备如采用 CCD 作为反射计的采集元件,以消除读取与检测过程之间的位置敏感性。

在单个载玻片上进行多重分析的优点包括以下几点:

- 改进的通量;
- 降低了单个检测的费用;
- 使得难以处理的分析能通过使用内参照物减少涉及稳定性的问题,这将允许通过较便宜的分析仪以及较低质量的装配过程而获得可以接受的结果。

基本的检测结构可以在现有的诊断平台上实施,至多需要对其作一些小的改动。

检测元件可以是任何合适的结构,包括多种不同的固体支持物,包括试管壁、塑料杯、珠子、塑料球和圆筒以及纸和塑料球。在一个特别优选的实施方式中,检测元件是载玻片,如 Vitros®带分析仪上使用的那种。这类载玻片描述于美国专利 4,258,001,在此完整引入作为参考。

本发明也可以用做供血者筛选分析,因为这种分析的批量处理的性质,即,采用的是微量滴定板而不是载玻片。这种多重检测,还能同时在每块载玻片上进行参照或对照,可以满足血库通常对通量、可靠性和费用的要求。当前的血库检测使用的是微量滴定板,在同一板上还具有校正物或对照。本发明的多重分析元件(比如 3 个分析和三个对照)具有在每块载玻片上分析血库检测所需的分析组的一半的能力,并且在同一个载玻片上具有每个分析的参照值,用来确保检测是正确的或者提供这类检测环境必须的更高的保证。希望能获得一个特定病人或一个病例的所有结果,血液的所有测试结果同时得出,但这对于现有的微量滴定板设计来说是不可能的。并且,如果一个人仅仅需要在一块板上做 10 个检测,那么微量滴定板的其余部分将被浪费。因为板上的每个孔大概值三美元,因此,这是一笔实实在在的浪费。

多重检测元件中内参照物的引入,使得这种方法具有了减少校正或“工业(factory)”校正的可能。工业校正开启了兽医以及及时现场护理(POC)领域的应用,因为相对于仅操作分析仪,校正需要更高的技术水平。这是因为校正需要液体以正确的顺序加入,有时候需要改变,并且有些步骤需要操作者来完成。然后,校正需要检查/确认。在兽医以及 POC 领域,通常没有校正所需的时间或

者训练，因此，一个自动化的或工业校正使得检测可以在这些市场进行，否则必须搬到中心实验室进行。

这种洗涤多重检测载玻片元件的方法可以通过计算机程序完成，获得计算机可读程序代码、分析仪的计算机控制界面是本领域公知的。

对于本领域技术人员来说，很明显地，可以对本发明的组分、组合物以及方法做一些改进或者改变。因此，本发明包括这样的改进和改变，如果它们在附加权利要求及其等同物的范围内。

上述所有引用的出版物在此完整引入作为参考，就像它们分别单独引入作为参考一样。

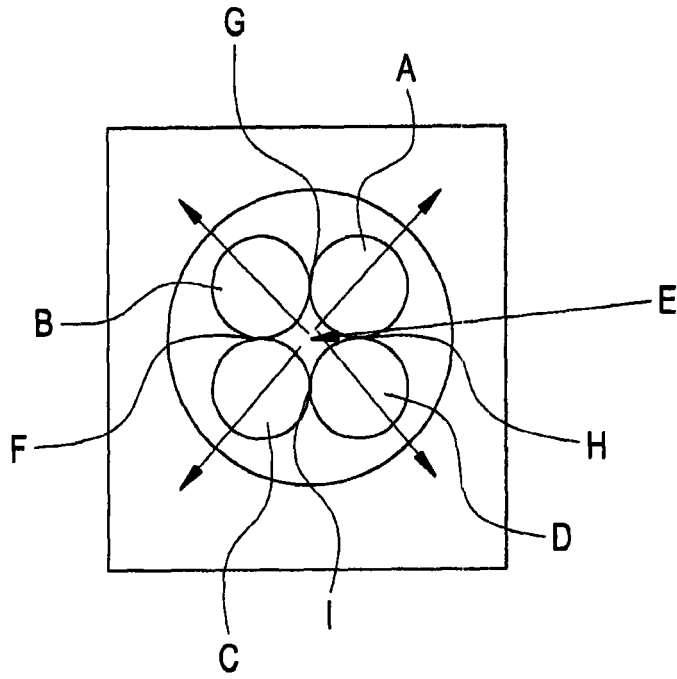


图 1

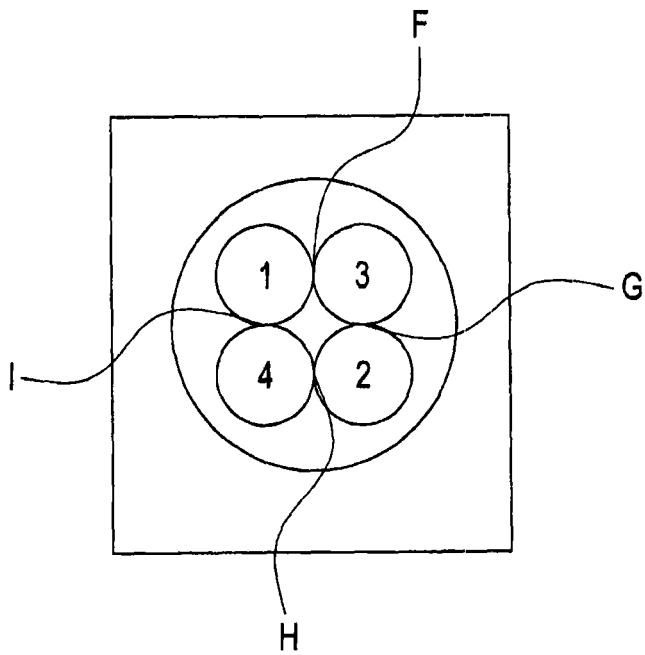


图 2

专利名称(译)	单一元件上的多重免疫化学分析		
公开(公告)号	<a href="#">CN101285835A</a>	公开(公告)日	2008-10-15
申请号	CN200810109254.1	申请日	2008-01-10
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
[标]发明人	MN雅各布斯		
发明人	M· N· 雅各布斯		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/576		
CPC分类号	Y10S435/96 Y10S435/973 G01N33/54386 Y10S435/971 Y10S435/969		
代理人(译)	刘健		
优先权	11/621797 2007-01-10 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种对样本中一种或多种目标分析物进行分析的方法，所述方法包括：提供一个元件，所述元件具有基层层；含有链霉抗生物素蛋白的层；扩展层，其中扩展层可以含有或不含有链霉抗生物素蛋白；提供免疫组分以及标记的免疫反应物，所述免疫组分以及标记的免疫反应物可以在扩展层中，或可以与样本组合；在扩展层的三个或更多个区域上施加样本，和任选免疫组分和标记的免疫反应物，其中三个或更多个区域各自的中心与这三个或更多个区域形成的中心基本上等距，并且每个区域都与一个相邻区域接触，使得洗涤液向任何一个方向流动都能接触到样本；通过让洗涤液在这三个或更多个区域形成的中心流出来洗涤样本和标记物，洗涤液均匀的流过三个或者更多个区域中的每一个；测量三个或者更多个区域中的每一个，确定一种或者多种分析物的存在或者浓度。在一个优选的实施方式中，该元件是在诊断分析仪上使用的干载玻片。

