



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104126121 B

(45)授权公告日 2017.02.22

(21)申请号 201380010090.6
 (22)申请日 2013.02.20
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 104126121 A
 (43)申请公布日 2014.10.29
 (30)优先权数据
 10-2012-0017039 2012.02.20 KR
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2014.08.20
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2013/001340 2013.02.20
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02013/125855 KO 2013.08.29
 (73)专利权人 纳诺恩科技有限公司
 地址 韩国首尔
 (72)发明人 郑灿一 李昌燮 黄正九 丁钟植
 (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 罗菊华

(51)Int.Cl.
 G01N 33/53(2006.01)
 G01N 33/532(2006.01)
 G01N 33/543(2006.01)
 G01N 33/574(2006.01)
 (56)对比文件
 CN 101326440 A,2008.12.17,
 CN 1892223 A,2007.01.10,
 CN 101254482 A,2008.09.03,
 EP 1879028 A1,2008.01.16,
 WO 01/13116 A1,2001.02.22,
 CN 1608207 A,2005.04.20,
 刘蕾 等.基于一维CCD的免疫层析试纸条检
 测系统.《仪器仪表学报》.2007,第28卷(第2期),
 审查员 赵晓明

权利要求书2页 说明书19页 附图10页

(54)发明名称

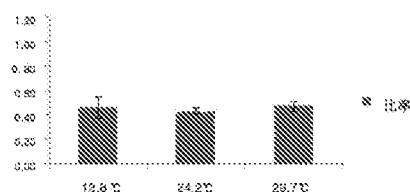
新颖的抗原的检测方法及利用该检测方法的装置

(57)摘要

本发明涉及分析试样的内部抗原的检测方法,包括:步骤(a),使结合有产生能够检测的信号标记且与上述抗原特异性地结合的检测抗体和分析试样相接触,来形成结果物;步骤(b),使与要检测的抗原特异性地结合的捕获抗体和上述步骤(a)的结果物相接触,来形成结果物;步骤(c),使标准物质(reference substance)和检测抗体相接触,来形成结果物,上述标准物质包含特异性地结合有上述检测抗体的表位,并与固相底物的表面相结合,上述检测抗体结合有产生上述能够检测的信号标记;步骤(d),测定从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记

所产生的信号;以及步骤(e),分析所测定的上述信号,来决定上述分析试样的内部抗原的存在与否或量。与现有的抗原检测方法相比,在本发明的抗原检测方法中,能够调节分析试样的流动(flow)及反应时间,以提高反应灵敏度,将分析试样的浓度或检测反应温度的影响最小化,使得数据的安全性、可靠性及再现性优秀。并且,即使没有专业技术,也能够容易操作本发明的抗原检测方法及检测装置,从而能够通过现场诊断迅速掌握分析试样的内部检测抗原的存在与否及量。

比率



1. 一种分析试样的内部抗原的检测方法,其中所述方法包括:

步骤(a),使结合有产生能够检测的信号标记且与上述抗原特异性地结合的检测抗体和分析试样相接触,来形成结果物,

步骤(b),使与要检测的抗原特异性地结合的捕获抗体和上述步骤(a)的结果物相接触,来形成结果物,

步骤(c),使标准物质和检测抗体相接触,来形成结果物,上述标准物质包含上述检测抗体会特异性地结合的表位,并与固相底物的表面相结合,上述检测抗体结合有产生上述能够检测的信号标记,

步骤(d),测定从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记所产生的信号,以及步骤(e),分析所测定的上述信号,来决定上述分析试样的内部抗原的存在与否和量;

其中上述步骤(a)~步骤(d)在设有微通道的微芯片上实施,上述信号分析是测定由上述微通道依次提供的反应开始区域、试验区域、标准区域及反应结束区域中的信号而实施的;

其中

所述试验区域的表面结合有上述捕获抗体,

所述标准区域结合有上述标准物质,且

所述反应开始区域及反应结束区域是以规定间隔划分微通道内的信号测定区域的区域中的一部分;

其中所测定的上述信号的分析用来计算从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记所产生的信号的强度的比率值;且

其中从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记所产生的信号的强度的比率值不受实施上述分析试样的内部抗原的检测方法的温度变化的影响。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述捕获抗体与固相底物的表面相结合。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中

所述反应开始区域和所述反应结束区域是区域“0~900”中的一部分,

所述反应开始区域对应于整个区域“0~900”中的区域180~370,及

所述反应结束区域对应于整个区域“0~900”中的区域700~880。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述分析试样适用于上述微芯片,所适用的上述分析试样通过形成于上述微通道的流动与上述试验区域及标准区域相接触。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述分析试样依次与上述试验区域及标准区域相接触,或者依次与上述标准区域及试验区域相接触。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述标准物质为与上述抗原相同的物质或者包含上述表位的上述抗原的片段。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中,

所测定的上述信号的分析还包括计算在上述试验区域及标准区域所测定的信号的出错率的分析步骤;

上述出错率是测定从上述试验区域及标准区域位于规定距离的反应开始区域及反应结束区域的信号而计算的;且其中

从上述反应开始区域及反应结束区域计算出的出错率为20%以上的情况下,重新实施

上述信号分析;

上述出错率由 $[\frac{|(\text{反应开始区域的信号}-\text{反应结束区域的信号})|}{\text{反应开始区域的信号}}] \times 100$ 来计算。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述分析试样为全血、血浆、血清或细胞培养上清液。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述分析试样为体液。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗原为药物、毒素、蛋白质、碳水化合物或核酸。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中,从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记所产生的信号的强度的比率值相对于上述步骤(a)的分析试样的浓度成线性比例。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中,从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记所产生的信号的强度的比率值在实施上述方法的10~30℃温度范围下表示相同的值。

新颖的抗原的检测方法及利用该检测方法的装置

【技术领域】

[0001] 本发明涉及新颖的抗原的检测方法及利用该检测方法的装置。

【背景技术】

[0002] 开发不仅能够迅速简单测定复杂的试样中的分析对象(例如,抗原),且测定值的可靠性高的抗原检测方法的重要性越来越大。例如,在医院的紧急情况下,临床诊断的要点为不熟练的技师实施复杂的化学或免疫化学分析方法,来迅速准确地测定患者的状态。这种化验通常由作为临床化学家未受过训练的医院的工作人员或护士实施。就向医院的化验室移送血液试样并实施分析的当前的临床诊断系统而言,在需要迅速的化验结果的情况下,不妥当。因此,需要能够在短时间内获得分析结果,且利用医院的诊断系统来实施化验的职员及装置符合上述要求的测定方法。

[0003] 作为现有的抗原的测定方法,主要利用免疫检测(immunoassay)。尤其,当检查肿瘤标记物的项目时,大部分利用免疫检测(immunoassay)。免疫检测作为利用抗原抗体反应的检测,能够利用选择性地与要测定的物质相结合的抗体来测定所需的物质。代表性的免疫检测的种类和原理如下。虽然按不同器官使用的方法和具体的反应条件有所差异,但基本原理几乎相同。

[0004] 凝集法(颗粒免疫检测,particle immunoassay)利用因抗原和抗体的结合而发生凝集反应(agglutination)的情况。大致测定如下情况,即,在红细胞或乳胶(latex)、明胶(gelatin)等附着抗原或抗体,当该粒子反应时,表示凝集。在凝集测定中,能够利用浊度测定法(turidimetry)来测定光的吸收程度,或者利用比浊法(nephelometry)来测定光的散射程度。

[0005] 酶免疫测定法(EIA,enzyme immunoassay)利用酶反应(enzyme reaction)来测定抗原和抗体的结合。大部分预先在与要测定的物质相结合的抗体附着酶,并发生抗原抗体反应。之后,若放入与结合的酶反应的底物,则发生酶反应。通常利用的酶有碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)、 β 半乳糖苷酶(β -galactosidase)等。酶反应的产物大部分为带色物质,利用分光光度计(spectrophotometer)来测定这些带色物质。

[0006] 在放射免疫测定法中,利用放射性同位素(radioisotope)来测定抗原和抗体的结合。放射性同位素指在物理方面不稳定,且自然发生衰变(放射性衰变,radioactive decay)而转换为稳定的物质,在此过程中,放出放射线的物质。在要测定的物质之类的物质附着放射性同位素,或者在与要测定的物质反应的抗体附着放射性同位素,从而发生抗原抗体反应。在反应结束后,能够测定从反应物放出的放射线的量,并计算出所需的物质浓度。多利用的放射性同位素有 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 等。过去多利用放射免疫测定法,但这有需要使用放射性物质的危险,且随着开发化学发光免疫测定法等方法,使用上述放射免疫测定法的情况越来越少。

[0007] 在荧光免疫测定法中,利用荧光反应(fluorescence)来测定抗原和抗体的结合。

荧光反应是指,荧光物质吸收特定波长的光,使得荧光物质的分子激励(excitation),重新回到原来的状态,并放出与吸收的光不同的波长的光的反应。当利用于免疫测定时,在要测定的物质之类的物质附着荧光物质,或者在与要测定的物质反应的抗体附着荧光物质,从而发生抗原抗体反应。在反应结束后,若透射可进行荧光反应的波长的光,则与荧光物质的量成正比地呈现荧光,并根据上述荧光的量来计算测定物质的浓度。

[0008] 在化学发光免疫测定法中,利用化学发光反应(chemiluminescence)来测定抗原和抗体的结合。化学发光反应是指,使化学发光物质激励(excitation),并回到基态(ground state)而发光的现象,这在使分子激励的能量不是光而是化学反应的方面,与荧光不同。当利用于免疫测定时,与其他方法相同,在要测定的物质之类的物质附着化学发光物质,或者在与要测定的物质反应的抗体附着化学发光物质,从而发生抗原抗体反应。在反应结束后,并在进行所需的化学反应之后,测定所散发的发光程度,由此计算测定物质的浓度。代表性的发光物质有鲁米诺(luminol)、异鲁米诺(isoluminol)、吖啶酯(acridinium ester)等。

[0009] 在本发明中将要利用的抗原检测方法是基于荧光免疫测定法的,就现有的荧光免疫测定法而言,由于因试样的浓度及反应温度而使抗原的测定数值发生变化,因而存在数据的再现性及可靠性下降的问题,而作为改善这种问题的方法,开发了上述抗原检测方法。因此,本发明人基于利用抗原-抗体反应的荧光免疫测定法,确立能够实现现场诊断,并不受分析试样的浓度及反应温度的限制的抗原检测系统。

[0010] 在本说明书全文中,参照了多篇论文及专利文献,并表示了其引用。所引用的论文及专利文献的公开内容全部引入本说明书作为参照,从而更加明确说明本发明所属的技术领域的水平及本发明的内容。

【发明内容】

[0011] 【发明要解决的技术课题】

[0012] 本发明人为了开发新颖的抗原的检测方法而锐意研究努力。其结果,在现有的试验区域(test zone)和标准区域(reference zone)结合了互不相同的检测抗体,来检测仅与试验区域特异性地结合的抗原的方法,本发明人与此不同地开发了如下方法:使标准区域和包含与要检测的抗原相同的表位的标准物质(reference substance)相结合,来在试验区域(test zone)和标准区域(reference zone)结合了相同的检测抗体,由此能够更加准确地检测抗原的存在及量。与现有的抗原检测方法相比,利用本发明的检测方法来调节分析试样的流动(flow)及反应时间,提高反应灵敏度,并将分析试样的浓度或检测反应温度的影响最小化,来确认提高数据的安全性、可靠性及再现性的情况,从而完成本发明。

[0013] 因此,本发明的目的在于,提供新颖的抗原的检测方法。

[0014] 本发明的另一目的在于,提供新颖的抗原的检测装置。

[0015] 本发明的其他目的及优点能够通过以下的发明内容、发明要求保护范围及附图来更加明确。

[0016] 【解决课题的技术方案】

[0017] 根据本发明的一实施方式,本发明提供分析试样的内部抗原的检测方法,上述分析试样的内部抗原的检测方法包括:

[0018] 步骤(a),使结合有产生能够检测的信号标记且与上述抗原特异性地结合的检测抗体和分析试样相接触,来形成结果物;

[0019] 步骤(b),使与要检测的抗原特异性地结合的捕获抗体和上述步骤(a)的结果物相接触,来形成结果物;

[0020] 步骤(c),使标准物质(reference substance)和检测抗体相接触,来形成结果物,上述标准物质包含特异性地结合有上述检测抗体的表位,并与固相底物的表面相结合,上述检测抗体结合有产生上述能够检测的信号标记;

[0021] 步骤(d),测定从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记所产生的信号;以及

[0022] 步骤(e),分析所测定的上述信号,来决定上述分析试样的内部抗原的存在与否或量。

[0023] 本发明人为了开发新颖的抗原的检测方法而锐意研究努力。其结果,在将现有的试验区域(test zone)和标准区域(reference zone)结合了互不相同的检测抗体,来检测仪与试验区域特异性地结合的抗原,本发明人与此不同地开发了如下方法:使标准区域和包含与要检测的抗原相同的表位的标准物质(reference substance)相结合,来在试验区域(test zone)和标准区域(reference zone)结合了相同的检测抗体,由此能够更加准确地检测抗原的存在及量。与现有的抗原检测方法相比,利用本发明的检测方法来调节分析试样的流动(flow)及反应时间,提高反应灵敏度,并将分析试样的浓度或检测反应温度的影响最小化,来确认提高数据的安全性、可靠性及再现性的情况。

[0024] 上述抗原的检测方法为测定存在于分析试样内的抗原的存在及量的方法,本发明人在考虑到如下问题之后,为了开发用于改善这些问题的抗原的检测方法而努力,其结果,设计出了本发明的方法,具体问题如下:在现有的抗原检测方法中,在分析试样为人类的血浆的情况下,i)与标准区域相结合的标准物质不能成为来源于人类的肽或可与该肽相结合的物质,因而在选定标准物质上受限,并且,ii)在试验区域(test zone)和标准区域(reference zone)结合了互不相同的检测抗体,由此检测结果有可能根据抗体对抗原的亲密度(affinity)而不同,iii)在分析试样为高浓度的情况下,与结合于试验区域的检测抗体的饱和度无关地,标准区域的检测抗体继续以规定水平与标准区域相结合,因而试验区域的测定信号/标准区域的信号强度的比率值不规定,iv)无法排除基本上随着利用抗原-抗体反应而伴随的温度的影响。

[0025] 以下,对本发明的方法的分析试样的内部抗原的测定方法进行详细说明。

[0026] 【步骤(a):检测抗体和分析试样的接触】

[0027] 首先,使结合有产生可检测的信号标记且与上述抗原特异性地结合的检测抗体和分析试样相接触。

[0028] 可利用本发明的方法的分析试样包含来源于所有哺乳动物的有机物质(organic materials)及人为地合成的有机分子(organic molecules),但并不局限于此。上述分析试样优选为全血、血浆、血清、体液或细胞培养上清液。

[0029] 上述有机分子(organic molecules)意味着在碳、氮、氧和/或硫原子之间具有共价键的分子。有机分子可选自一氧化碳等小尺寸的分子到聚合物(polymer)等复杂的大尺寸的分子,或者上述有机分子可以为糖苷分子。

[0030] 在本说明书中,术语“抗原”包含可利用本发明的方法来检测的所有分子。例如,上述抗原为存在于体内的小分子即药物、毒素、自身抗体(autoantibody)、自身抗原(autoantigen)、蛋白质、碳水化合物、核酸及其他分子。可存在于对象(subject)的血清内的抗原并不仅限于药物,例如包含巴比妥盐(barbiturate)、三环类抗抑郁药(TCA, tricyclic antidepressants)、毛地黄(Digitalis)、癌相关抗原(例如,与乳房、精巢、脑、肝、大肠、胰脏、胃或肺癌相关的抗原)、病毒抗原(例如,与人类免疫缺陷病毒(HIV)、流感或其他病毒相关的抗原)、细菌抗原(例如,全身性细菌感染)、激素(例如,促甲状腺激素(TSH)、人生长激素、黄体酮、睾丸素、绒毛膜促性腺激素(hCG))、血浆蛋白质(例如,纤维蛋白降解产物(FDP)、C-反应蛋白(CRP)、癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚蛋白)、原生动物抗原(protozoal antigens)、血小板抗原(plaque antigens)、半抗原(例如,血管紧张素1、血管升压素、生长抑素、心房利钠激素(atrial natriuretic hormone)、内皮素(endoserine)、黄体生成素释放激素(LHRH)、肛褶蛙肽(kassinin)或其他肽)、类固醇(例如,皮质醇)及细胞因子(例如,白细胞介素-1、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、白细胞介素-2、白细胞介素-4、白细胞介素-6、白细胞介素-7、白细胞介素-12、白细胞介素-15、B7、CD28或其他免疫球蛋白超家族(IgSF)成员)。

[0031] 上述病毒抗原包含公知的各种病毒抗原,例如,包含与A型肝炎病毒、B型肝炎病毒、C型肝炎病毒、流感、水痘(varicella)、腺病毒、单纯疱疹病毒1型、单纯疱疹病毒11型、牛瘟(rinderpest)、鼻病毒、埃可病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、乳头瘤病毒、乳多空病毒、巨细胞病毒、棘状病毒(echino virus)、虫媒病毒、汉坦病毒、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、人类免疫缺陷病毒1型、人类免疫缺陷病毒11型、微小核糖核酸病毒科、肠病毒、披膜病毒(例如,甲病毒属、黄病毒属、冠状病毒属、狂犬病病毒、埃博拉病毒、人类T细胞白血病毒1型、人类T细胞白血病毒11型、慢病毒多瘤病毒、细小病毒属、EB(epstein-barr)病毒、人类疱疹病毒-6、疱疹病毒1或水痘病毒)相关的抗原或者从上述病毒所生产的抗原,但并不局限于此。

[0032] 上述细菌抗原包含公知的各种细菌抗原,例如,包含与分枝杆菌立克次氏体(Mycobacteria rickettsia)、支原体(Mycoplasma)、奈瑟菌属(Neisseria spp.)、军团菌(Legionella)、霍乱弧菌(Vibrio cholerae)、链球菌(Streptococci)、白喉棒状杆菌(Corynebacteria diphtheriae)、破伤风梭菌(Clostridium tetani)、百日咳杆菌(Bordetella pertussis)、嗜血杆菌属(Haemophilus spp.)、衣原体属(Chlamydia spp.)或产肠毒素性大肠杆菌(enterotoxigenic Escherichia coli)相关的抗原或者从上述细菌所生产的抗原,但并不局限于此。

[0033] 上述原生动物抗原包含公知的各种原生动物抗原,例如包含与疟原虫属(Plasmodia)、艾美球虫属(Eimeria)、利什曼虫属(Leishmania)或锥体虫属(Trypanosoma)相关的抗原或者从上述原生动物所生产的抗原,但并不局限于此。

[0034] 上述癌相关抗原(cancer-related antigen)包含公知的各种癌相关抗原,例如,包含存活素(survivin)、细胞周期蛋白D1、人类表皮生长因子受体2(Her2/neu)、K-ras、胰凝乳蛋白酶原、X-染色体连锁凋亡抑制蛋白(XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF, Epidermal Growth Factor)受体、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)、甲胎蛋白、 β 2微球蛋白、膀胱癌抗

原(BTA)、嗜铬粒蛋白A、神经元特异性烯醇化酶、S-100蛋白质、TA-90蛋白质、组织胺抗原(TPA)及人绒毛膜促性腺激素(hCG),但并不局限于此。优选地,上述癌相关抗原为前列腺特异性抗原。

[0035] 除了上述抗原之外,本发明的抗原包含污染物质、毒素、有毒化学物质、法医学物质或与其类似的物质。

[0036] 根据本发明的优选实例,上述抗原为药物、毒素、自身抗体(autoantibody)、自身抗原(autoantigen)、蛋白质、碳水化合物、核酸或癌相关抗原,更优选为癌相关抗原。

[0037] 本发明的方法利用两种形态的抗体,即检测抗体及捕获抗体。术语“检测抗体”意味着可与由上述捕获抗体捕获的上述抗原或标准物质相结合的抗体。在本说明书中,术语“捕获抗体”意味着可与要从分析试样检测的上述抗原相结合的抗体。可利用于本发明的方法的抗体用于检测分析试样内的抗原,并包含与分析试样内的抗原特异性地结合的核苷酸序列的表位。利用于本说明书的抗体不仅包含可与要检测的表位、抗原或抗原片段相结合的整个抗体,还包含抗体片段(例如,F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv)。利用于本发明的抗体为多克隆抗体或单克隆抗体,优选为单克隆抗体。

[0038] 对于上述抗原的抗体可利用在该领域中通常所实施的方法,例如融合方法(Kohler and Milstein,European Journal of Immunology,6:511-519(1976))、重组DNA方法(美国专利第481656号)或噬菌体抗体库方法(Clackson et al,Nature,352:624-628(1991)及Marks et al,J.Mol.Biol.,222:58,1-597(1991))来制成。在Harlow,E.and Lane,D.,Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,New York,1999;Zola,H.,Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques,CRC Press, Inc.,Boca Raton,Florida,1984;及Coligan,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY,Wiley/Greene,NY,1991中详细记载了制造抗体的一般过程,上述文献插入于本说明书作为参照。

[0039] 上述检测抗体结合有产生可检测的信号标记。术语“信号”意味着可检测的参数(parameter),包含光学参数、电性参数或磁性参数的流动、荧光放射、红外线放射、紫外线放射、化学发光、光反射或上述信号的吸收程度。产生可检测的信号标记包含化学物质(例如,生物素)、酶(碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶及细胞色素P450)、放射性物质(例如,¹⁴C、¹²⁵I、³H、³²P及³⁵S)、荧光物质(例如,荧光素)、发光物质、化学发光物质(chemiluminescent)及荧光共振能量转移(FRET,fluorescence resonance energy transfer),但并不局限于此。在Ed Harlow and David Lane,Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999中记载了各种标记(label)及标记方法。优选地,作为产生可检测的信号标记,利用荧光物质。

[0040] 上述标记可根据发散的波长而观察出分别不同的荧光信号,优选地,上述标记以与检测抗体相结合的形态与捕获抗体或标准物质相结合。上述标记可包含公知的各种荧光物质,例如,荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、藻红蛋白、荧光黄、B-藻红蛋白、9-吖啶异硫氰酸酯(9-acridine isothiocyanate)、荧光黄VS、4-乙酰氨基-4'-异硫代氰酸根合芪-2,2'-二磺酸(4-acetamido-4'-iso-thio-cyanato stilbene-2,2'-disulfonic acid)、7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酸苯基)-4-甲基香豆素(7-diethylamino-3-(4'-isothiocyanate phenyl)-4-methyl coumarin)、琥珀酰亚胺-芪丁酸(succinimidyl-pyrene butyrate)、4-乙酰氨基-4'-异硫代氰酸根合芪-2,2'-二磺酸衍生物、LCTM-Red

640、LCTM-Red 705、PC5、Cy5、Cy5.5、丽丝胺、异硫氰酸酯(isothiocyanate)、赤藓红异硫氰酸酯(erythrosine isothiocyanate)、二乙烯三胺五乙酸酯(diethylene triamine pentaacetate)、1-二甲氨基萘-5-磺酸盐(1-dimethylamino naphthyl-5-sulfonate)、1-苯胺基-8-萘磺酸(1-anilino-8-naphthalene sulfonate)、2-对甲苯氨基-6-萘磺酸盐(2-p-toluidinyl-6-naphthalene sulfonate)、3-苯基-7-异氰酸基香豆素(3-phenyl-7-isocyanato coumarin)、9-异硫氰酸吡啶、吡啶橙、N-(对-(2-苯并恶唑基)苯基)马来酰亚胺(N-(p-(2-benzoxazolyl)phenyl)maleimide)、苯并恶二唑(benzoxadiazole)、芪(stilbene)及芘(pyrene),但并不局限于此。

[0041] 根据本发明的方法,与抗原-特异性检测抗体相结合的标记放出的信号测定为荧光信号,可分别测定试验区域及标准区域的两信号,来确认要检测的抗原的存在与否及量。上述检测抗体及捕获抗体具有与上述抗原特异性地结合的亲和性(affinity),并不与利用于本发明的方法的其他任何试剂反应。

[0042] 【步骤(b):捕获抗体及上述步骤(a)的结果物的接触】

[0043] 接着,使上述步骤(a)的结果物与与要检测的抗原特异性地结合的捕获抗体相接触。即,使步骤(a)的结果物与试验区域(test zone)或标准区域(reference zone)的抗原-特异性捕获抗体或标准物质相结合。

[0044] 在本说明书中,术语“捕获抗体”如步骤(a)所述。

[0045] 根据本发明的优选实例,上述捕获抗体与固相底物的表面相结合,上述捕获抗体存在于实现反应物的连续流动的一个反应容器的底物表面上,上述反应容器为设有微通道的微芯片。

[0046] 在本说明书中,术语“固相底物(solid substrate)”能够以固相载体(solid support)或与固相(solid phase)相同的含义使用,并意味着非液相物质。优选地,上述固相底物可形成于上述微通道内,例如,能够以在膜(membrane)、毛细管的一部分或微通道内流动/粘附的小直径珠子(small diameter beads)存在。这种形态的公知的物质包含聚苯乙烯(polystyrene)、聚丙烯(polypropylene)、玻璃、金属及凝胶等碳氢化合物聚合物。上述固相底物能够以试纸条、微量滴定板、粒子(例如,珠子)、亲和柱及免疫印迹膜(例如,聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride)膜)的形态存在(参照美国专利第5143825号、美国专利第5374530号、美国专利第4908305号及美国专利第5498551号)。

[0047] 根据本发明的其他优选实例,上述微芯片的微通道包括试验区域(test zone)及标准区域(reference zone),上述试验区域的表面结合有上述捕获抗体,上述标准区域结合有上述标准物质。

[0048] 在本说明书中,术语“试验区域(test zone)”为包括在上述微芯片的微通道内的区域,试验区域的表面结合有上述捕获抗体,在捕获抗体结合有要检测的上述抗原及与上述抗原特异性地结合的检测抗体。

[0049] 在本说明书中,术语“标准区域(reference zone)”为包括在上述微芯片的微通道内的区域,标准区域的表面结合有标准物质(reference substance),在标准物质结合有与要检测的上述抗原特异性地结合的检测抗体。

[0050] 在本说明书中,术语“标准物质”意味着可使上述检测抗体结合的物质,根据本发明的优选实例,上述标准物质为与上述抗原相同的物质或者包含上述表位的上述抗原的片

段。

[0051] 上述抗体、抗原或标准物质可通过物理吸附或化学粘附来附着于固相底物。在适当的缓冲液中的抗体或抗原和固相材料之间通过反应来执行物理吸附。缓冲液有磷酸盐缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、碳酸盐缓冲液等。在4~37℃温度下,尤其在室温条件下,混合上述缓冲液并维持特定时间而执行反应。可通过使用肽附着方法中的碳化二亚胺法来执行化学附着。其他化学法为由戊二醛(glutaraldehyde)或三聚氯氰(cyanuric chloride)(“肽合成法”、丸善(Maruzen)、1975或“酶免疫测定法”、交流书版、“蛋白质核酸酶”、特别号31, 1987)等二价横向连接的试剂执行的方法。

[0052] 根据本发明的优选实例,上述分析试样适用于上述微芯片,适用的上述分析试样通过形成于上述微通道的流动与上述试验区域及标准区域相接触。并且,上述分析试样可依次与上述试验区域及标准区域相接触,或者依次与上述标准区域及试验区域相接触。

[0053] 如上所述,本发明的检测方法表现为在使检测抗体与分析试样相接触之后,与捕获抗体相接触,但这只便于记载,并不排除如下情况:在本发明的检测方法中,i)在以相反方式进行上述过程的情况下,即,首先执行使分析试样与上述捕获抗体相接触的步骤,接着使分析试样和捕获抗体的反应结果物与检测抗体相接触,以及ii)使分析试样同时与检测抗体及捕获抗体相接触。

[0054] 在上述过程中,首先执行使分析试样与上述检测抗体相接触的步骤,接着使分析试样和检测抗体的反应结果物与捕获抗体相接触,这种情况下,可在微芯片内或微芯片外进行上述分析试样和检测抗体的反应。根据本发明的具体的一实施例,在微芯片外进行上述反应。

[0055] **【步骤(c):标准物质(reference substance)及结合有产生可检测的信号的标记的检测抗体的接触】**

[0056] 在使检测抗体及上述步骤(a)的结果物相接触之后,使标准物质(reference substance)与检测抗体相接触,上述标准物质包含特异性地结合有上述检测抗体的表位,并与固相底物的表面相结合,上述检测抗体结合有产生上述可检测的信号的标记,

[0057] 在本说明书中,就术语“表位”而言,抗体结合的抗原的部位意味着抗原决定簇(antigenic determinant),上述标准物质可包含一种以上的表位,或者包含一种以上的相同的表位,但优选地,上述检测抗体结合的表位选择在标准物质上可仅发现一次的序列。

[0058] **【步骤(d):信号的测定】**

[0059] 接着,使用信号测定装置来测定从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记所产生的信号。上述信号测定装置的详细说明见以下内容。

[0060] **【步骤(e):信号的分析】**

[0061] 分析在上述步骤(d)中所测定的信号,来决定上述分析试样内的抗原的存在与否或量。

[0062] 根据上述信号的量(amount)来决定抗原的存在及量,术语“量(amount)”以包括在可测定上述信号的灵敏度(sensitivity)的特定电平(level)内为前提,意味着作为物理参数的上述信号的强度(intensity)增加、减少或维持的程度。例如,若信号以10单位增加,且信号的测定灵敏度在1单位的范围内,则可测定信号量。上述信号的量能够以任意单位表示。

[0063] 可在设有微通道(microchannel)的微芯片中实施上述步骤(a)~步骤(d)或上述步骤(b)~步骤(d),上述信号分析是测定由上述微通道提供的反应开始区域、试验区域、标准区域及反应结束区域中的信号而实施的。

[0064] 可从上述反应开始区域及反应结束区域的信号计算出出错率(%),在出错率为20%以上的情况下,重新实施分析,以提高试验区域及标准区域信号的可靠性。术语“出错率(error rate)”是因分析试样的粘性或流动性(flow)不规定而导致信号的分析结果不同,且由于实施分析的实验人员操作不熟练而导致信号的分析结果不同,因而将由此产生的误差最小化,并为了获得数据的可靠性而测定的值。

[0065] 术语“反应开始区域”及“反应结束区域”为包括在上述微芯片的微通道内的区域,是以规定间隔划分微通道内的信号测定区域的区域(0~900)中的一部分。

[0066] 上述反应开始区域及反应结束区域可根据抗原的种类来改变区域。根据一例,在利用本发明的方法来检测PSA抗原的实验中,反应开始区域为整个“0~900”范围中的180~370的区域,反应结束区域相当于700~880的区域(参照图1)。

[0067] 微通道内的信号测定区域由反应开始区域、试验区域、标准区域及反应结束区域构成,当以曲线图表示各区域中的信号时,以如下方式计算信号量。在曲线图中,横轴可由以规定间隔划分微通道内的信号测定区域的区域(0~900)表示,纵轴可由荧光信号的量(强度)表示。

[0068] 【数学式1】

[0069] **试验区域荧光信号** =
$$\int_{X_{tc}-30}^{X_{tc}+30} (X_n - X_b)$$

[0070] 【数学式2】

[0071] **标准区域荧光信号** =
$$\int_{X_{rc}-30}^{X_{rc}+30} (X_n - X_b)$$

[0072] ($X_n = n$ 位置上的荧光信号,

[0073] X_{tc} = 试验区域中央地点的荧光信号,

[0074] X_{rc} = 标准区域中央地点的荧光信号,

[0075] X_b = 微通道0~900的位置中的最少50地点的荧光信号平均值)

[0076] 【数学式3】

[0077] **反应开始区域的荧光信号** =
$$\left(\sum_{X_{tc}-(X_{rc}-X_{tc})-30}^{X_{tc}-(X_{rc}-X_{tc})+30} X_n \right) / 60$$

[0078] 【数学式4】

[0079] **反应结束区域的荧光信号** =
$$\left(\sum_{X_{rc}+(X_{rc}-X_{tc})-30}^{X_{rc}+(X_{rc}-X_{tc})+30} X_n \right) / 60$$

[0080] ($X_n = n$ 位置上的荧光信号

[0081] X_{tc} = 试验区域中央地点的荧光信号

[0082] X_{rc} = 标准区域中央地点的荧光信号)

[0083] 即,反应开始区域的荧光信号为从 $X_{tc}-(X_{rc}-X_{tc})-30$ 地点到 $X_{tc}-(X_{rc}-X_{tc})+30$ 地点为止的各地点的信号平均值,反应结束区域的荧光信号为从 $X_{rc}+(X_{rc}-X_{tc})-30$ 地点到

Xrc+(Xrc-Xtc)+30地点为止的各地点的信号平均值。

[0084] 能够以如下方式计算出上述出错率(error rate)。

[0085] 【数学式5】

[0086] 出错率(%)=[|(反应开始区域的信号-反应结束区域的信号)|/反应开始区域的信号]×100

[0087] 根据本发明的优选实例,所测定的上述信号的分析是计算从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记所产生的信号的强度的比率而实施的。

[0088] 根据现有的抗原检测方法,将试验区域(test zone)和与要检测的抗原特异性地结合的物质(本发明中的捕获抗体)相结合,并将标准区域(reference zone)与来源于人类的抗原无法结合的外来的物质相结合,由此测定各区域中产生的信号,标准区域中的信号作为用于校正试验区域的信号的数值而使用。即使是相同浓度的试样,流入于微通道内的试样的速度(反应速度)也因试样粘性的差异而不同,使得试验区域的信号不同。作为校正上述信号的方法,当相同浓度时,若低粘性的试样迅速经过微通道内,则与试验区域的信号的减少量相对应地,标准区域的信号一起减少,若相同浓度的高粘性的试样慢慢经过微通道内,则与试验区域的信号的增加量相对应地,标准区域的信号一起增加,其结果,以没有试样的粘性差异的方式表现相同的比率值,从而信号值虽然不同,但比率值却实质上相同。术语“实质上(substantially)”为包括完全不受试样的粘性差异的影响的情况以及虽然受试样的粘性的影响,但因程度轻微而可视为不受试样的粘性差异的影响的情况的含义。例如,试验区域及标准区域的信号强度的比率值虽然受试样的粘性差异影响,但其偏差几乎规定地维持在±2.0,这意味着上述信号强度的比率值实质上不受试样的粘性差异的影响。

[0089] 但是,根据上述方法,存在如下问题:例如,在分析试样为人类的血清的情况下,i)与标准区域相结合的标准物质不可能为来源于人类的肽或可与该肽相结合的物质,因而在选定标准物质上受限,ii)将试验区域(test zone)和标准区域(reference zone)与互不相同的检测抗体相结合,由此检测结果有可能根据抗体的对于抗原的亲密度(affinity)而不同,iii)在分析试样为高浓度的情况下,与结合于试验区域的检测抗体的饱和度无关地,标准区域的检测抗体继续以规定水平与标准区域相结合,因而试验区域的测定信号/标准区域的信号强度的比率值不规定,iv)无法排出基本上随着利用抗原-抗体反应而伴有的问题的温度的影响。因此,本发明人开发了将选定标准物质时的限制、分析试样的浓度及温度的影响最小化,来提高数据的安全性、可靠性及再现性的本发明的方法,其中,本发明的最大特征在于,在检测分析试样的内部抗原时,将分析试样的浓度及温度的影响最小化。

[0090] 根据本发明的其他优选实例,从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记所产生的信号的强度的比率值相对于上述步骤(a)的分析试样的浓度成线性比例。

[0091] 根据本发明的其他优选实例,从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记所产生的信号的强度的比率值实质上不受实施上述方法的温度变化的影响。术语“实质上(substantially)”为包括完全不受温度变化的影响的情况以及虽然受温度的影响,但因程度轻微而可视为不受温度变化的影响的情况的含义。例如,试验区域及标准区域的信号强度的比率值虽然受温度变化的影响,但其偏差几乎规定地维持在±0.17,这意味着上述信号强度的比率值实质上不受温度变化的影响。

[0092] 根据本发明的其他优选实例,从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记

所产生的信号的强度的比率值在实施上述方法的温度范围10~30℃内表示相同的值。

[0093] 在利用本发明的方法的情况下,即使在包含高浓度的抗原的试样中,也可以进行抗原的定量检测,例如,可进行1800ng/ml以上浓度的抗原的检测。根据一例,在利用本发明的方法来检测PSA抗原的情况下,在PSA浓度在0.0001~1500ng/ml范围内的试样中,根据实验性地测定的T/R比率曲线图,可知PSA抗原的浓度,当PSA浓度为1500~1800ng/ml及1800ng/ml以上时,可在实验性地获得的上述曲线图的延长线上了解抗原的浓度。根据其他一例,可利用本发明的方法来测定并检测PSA浓度为4000ng/mL以上的高浓度试料。即,在PSA浓度在0.0001~4500ng/mL范围内的试样中,根据实验性地测定的T/R比率曲线图,可知PSA抗原的浓度,当PSA浓度为4500ng/ml以上时,可在实验性地获得的上述曲线图的延长线上了解抗原的浓度。

[0094] 根据本发明的其他实施方式,本发明提供分析试样的内部抗原的检测装置,上述分析试样的内部抗原的检测装置包括:

[0095] (a)微芯片,设有微通道(microchannel),上述微通道用于收容分析试样,并实现反应;

[0096] (b)试验区域(test zone),形成于上述微通道的一个部位,上述试验区域的表面结合有与要检测的抗原特异性地结合的捕获抗体;以及

[0097] (c)标准区域(reference zone),形成于上述微通道的一个部位,上述标准区域的表面结合有标准物质(reference substance),上述标准物质包含特异性地结合有检测抗体的表位。

[0098] 利用本发明的方法的检测装置不受抗体的亲和度、分析试样的浓度及检测温度的影响,因而能够准确测定要检测的抗原的量,即使没有专业技术,也能够容易进行操作,从而能够进行靶抗原检测的现场诊断。本发明的抗原检测装置利用了如上所述的本发明的抗原检测方法,为了避免本说明书过于复杂,省略了两者之间的共同内容。

[0099] 按照各自的结构对本发明的装置进行的详细说明如下。

[0100] 【结构(a):设有微通道(microchannel)的微芯片】

[0101] 上述抗原检测装置包括用于收容分析试样且实现反应的微芯片。在上述微芯片内设有用于收容分析试样的微通道,上述微通道可具有各种深度(depth)。

[0102] 可收容分析试样的上述微芯片可包括一个以上的微通道,上述微通道可与分别检测不同抗原的捕获抗体及标准物质相结合。上述微通道包括反应开始区域、试验区域、标准区域及反应结束区域,优选地,上述各区域以反应开始区域、试验区域、标准区域及反应结束区域的顺序进行设置。

[0103] 利用如上所述的本发明的方法的上述检测装置以用各自的步骤实施分析试样和捕获抗体及检测抗体的反应、标准物质和检测抗体的反应等的方式表现,但这只是为了便于记载,本发明的抗原检测装置可仅通过将分析试样分注于微芯片来测定抗原的存在与否及量。因此,优选地,上述微芯片包括上述抗原检测方法中所使用的i)试剂、标准物质及捕获抗体或者ii)试剂、标准物质、结合有信号发散标记的检测抗体及捕获抗体,若向微通道内滴入分析试样之后,将上述微芯片安装于本发明的装置,则自动测定检测抗原的存在与否及量。因此,便于使用,且适合于现场诊断,因而不仅是专业人员,普通人也可以容易使用。

[0104] 上述微通道可包括可注入分析试样的投入口,若分析试样通过上述投入口流入于微通道的内部,则可一边经过微通道,一边检测(detection)抗原,或者与反应试剂等反应,以测定抗原的量。

[0105] 根据本发明的具体的一实施例,为了检测抗原,可在微通道内进行利用荧光物质等的分析试样的标记(labelling)反应或者利用抗原-抗体反应等的分析试样的特异反应(specific reaction)等。即,可利用蛋白质的抗原-抗体特异反应(specification)等,并以后通过传感器等各种检测单元选择性地仅确认所需的抗原。标记的分析试样通过微通道的内部,而此时微通道的一截面向光学传感器露出,也可以利用上述光学传感器来检测荧光信号。

[0106] **【结构(b):试验区域(test zone)】**

[0107] 在本发明的抗原检测装置中,上述试验区域形成于上述微通道的一个部位,且表面结合有与要检测的抗原特异性地结合的捕获抗体。

[0108] **【结构(c):标准区域(reference zone)】**

[0109] 本发明的抗原检测装置设计为,将上述标准区域形成于上述微通道的一个部位,且表面结合有包含特异性地结合有检测抗体的表位的标准物质(reference substance)。

[0110] 根据本发明的优选实例,上述装置还可以包括检测抗体,上述检测抗体结合有产生可检测的信号标记,并与上述抗原特异性地相结合。

[0111] 根据本发明的其他优选实例,上述装置还可以包括用于测定从上述标记所产生的信号的测定单元,或者上述装置还可以包括用于计算在上述试验区域及标准区域所测定的信号的强度的比率的分析单元。

[0112] 上述测定单元意味着使从与上述检测抗体相结合的标记所产生的信号通过的装置的结构要素,例如包括光学要素(optical component)。上述测定单元可使荧光信号通过,并传输至信号分析单元,且部分地将荧光信号转换为电信号。上述测定单元能够以与本发明的装置形成一体化的方式存在,或者以独立装置的方式存在。

[0113] 上述分析单元能够以与信号处理器(signal processor)相同的含义使用,意味着使在上述试验区域及标准区域中所测定的信号的一部分变形,或者可校正信号的测定值的装置的结构要素。上述分析单元可与上述光学要素同时起作用,并将荧光信号转换为电信号。

[0114] 能够以各种方式使用本发明的方法及装置,例如,在检测前列腺癌相关抗原的情况下,可将前列腺特异性抗原(PSA,prostate specific antigen)作为肿瘤标记物,来进行有无良性及恶性的前列腺癌细胞、前列腺癌是否复发、危险度、是否转移等临床判断,并迅速报告病情进展等。并且,当评价用于治疗前列腺癌的药物功效时,也可以利用本发明的方法。

[0115] **【发明效果】**

[0116] 归纳本发明的特征及优点如下。

[0117] (a)本发明涉及新颖的抗原检测方法以及利用该新颖的抗原检测方法的抗原检测装置。

[0118] (b)在现有的试验区域(test zone)和标准区域(reference zone)结合了具有互不相同的表位的物质,来检测特异性地与该物质结合的抗原的方法,本发明的抗原检测方

法与此不同地在标准区域结合了包含与要检测的抗原相同的表位的标准物质(reference substance),由此能够更加准确地检测抗原的存在及量。

[0119] (c)在使用现有的抗原检测方法的情况下,存在抗原浓度越高,反应性就越减小,且当反应饱和时,在规定水平上,信号值不再增加的缺点,但在使用本发明的抗原检测方法的情况下,以T/R比率值测定试验(test)值,因而不发生这种钩状效应(hook effect),其结果,具有检测范围(detection range)变大的特征。

[0120] (d)并且,与现有的抗原检测方法相比,在本发明的检测方法中,能够调节分析试样的流动(flow)及反应时间,以提高反应灵敏度,且将分析试样的浓度或检测反应温度的影响最小化,使得数据的安全性、可靠性及再现性优秀。

[0121] (e)因此,就本发明的抗原检测方法及检测装置而言,即使没有专业技术,也能够容易操作,从而能够迅速以现场诊断掌握分析试样内检测抗原的存在与否及量。

【附图说明】

[0122] 图1是为了验证通过本发明的抗原检测方法所测定的信号测定值是否有效而在五个柱体测定信号的结果。横轴意味着以规定间隔划分微通道内的信号测定区域的区域,纵轴意味着荧光信号强度的数值。

[0123] 图2a使用作为现有的抗原检测方法的兔IgG标准系统来分别以曲线图表示(i)基于分析试样的浓度的试验区域及标准区域信号强度以及(ii)基于分析试样的浓度的试验区域/标准区域信号强度的比率值。

[0124] 图2b使用基于本发明的方法的前列腺特异性抗原(PSA)标准系统来分别以曲线图表示(i)基于分析试样的浓度的试验区域及标准区域信号强度以及(ii)基于分析试样的浓度的试验区域/标准区域信号强度的比率值。

[0125] 图3a使用兔IgG标准系统来分别以曲线图表示(i)基于测定温度的试验区域及标准区域信号强度以及(ii)基于测定温度的试验区域/标准区域信号强度的比率值。

[0126] 图3b使用前列腺特异性抗原(PSA)标准系统来分别以曲线图表示(i)基于测定温度的试验区域及标准区域信号强度以及(ii)基于测定温度的试验区域/标准区域信号强度的比率值。

[0127] 图4a、图4b利用现有的抗原检测方法(兔羊抗兔系统,Rabbit-Goat anti-Rabbit system)来分别以曲线图表示(i)基于测定温度的试验区域及标准区域信号强度(图4a)以及(ii)基于测定温度的试验区域/标准区域信号强度的比率值(图4b)。

[0128] 图5a、图5b利用现有的抗原检测方法(Taq小鼠抗Taq系统,Taq-Mouse anti-Taq system)来分别以曲线图表示(i)基于测定温度的试验区域及标准区域信号强度(图5a)以及(ii)基于测定温度的试验区域/标准区域信号强度的比率值(图5b)。

[0129] 图6a、图6b利用基于本发明的方法的抗原检测方法(PSA小鼠抗PSA系统,PSA-Mouse anti-PSA system)来分别以曲线图表示(i)基于测定温度的试验区域及标准区域信号强度(图6a)以及(ii)基于测定温度的试验区域/标准区域信号强度的比率值(图6b)。

[0130] 图7利用美国博适(Biosite)公司的抗原检测方法来以曲线图表示基于测定温度的试验区域/标准区域信号强度的比率值。

[0131] 图8使用基于本发明的方法的前列腺特异性抗原(PSA)标准系统来分别以曲线图

表示基于分析试样的浓度的试验区域/标准区域信号强度的比率值。

[0132] 图9a、图9b使用基于本发明的方法的前列腺特异性抗原(PSA)标准系统及现有的抗原检测方法(兔羊抗兔系统,Rabbit-Goat anti-Rabbit system)来分别以曲线图表示高浓度分析试样的试验区域/标准区域信号强度的比率值。

【具体实施方式】

[0133] 以下,通过实施例对本发明进行更为详细的说明。这些实施例仅用于更加具体地说明本发明,根据本发明的要旨,本发明的范围不受这些实施例的限制,这对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说是显而易见的。

[0134] 【实施例】

[0135] 【实施例1:基于流速(flow rate)校正的检测数据测定】

[0136] 【1-1.利用本发明的抗原检测方法的PSA检测】

[0137] 作为在本发明中利用的血液试样,利用了委托韩国高丽大学安山医院诊断检查医学系门诊化验室的患者的血液试样,并随机选定了患者组。

[0138] 利用基于本发明的方法的检测装置来测定了患者试样内抗原的量。上述患者组为前列腺癌患者,将前列腺特异性抗原(PSA,prostate specific antigen)作为肿瘤标记物,来测定了存在于患者的血清(serum)内的PSA的量。

[0139] 前列腺特异性抗原(PSA)大部分主要为由人类的前列腺上皮生产的单链33kDa糖蛋白,在人类的精液中以0.5至2.0mg/ml的浓度存在。前列腺特异性抗原作为在前列腺的上皮细胞中合成的蛋白分解酶,在除了前列腺之外的组织中,几乎未被表达,因而在利用于前列腺癌的筛选方面有用的肿瘤标记物。前列腺特异性抗原虽然针对前列腺组织具有特异性,但不对肿瘤具有特异性,因而也会在前列腺肥大症、前列腺炎、前列腺梗死等中增加,除了前列腺癌的筛选检查之外,还可以有用地利用于手术后的复发判定。

[0140] 在从上述患者组中获得的血清试样中,从相同浓度的试样中筛选粘性分别不同的试样,来实施了利用本发明的检查装置的抗原测定。向芯片(或柱体)的样品注入(inlet)部位滴入了30 μ l的样品(脂蛋白脂肪酶存在或不存在的患者血清或血浆)。在滴入样品5分钟后,将芯片插入于本发明的抗原检测装置。经过约40秒钟后,在检测装置的显示器画面以定量显示样品内的前列腺特异性抗原的存在程度,并且,显示了试验区域及标准区域的信号强度值。

[0141] 分别测定了患者A和患者B中的信号测定值,并利用上述信号测定值来计算出了试验区域(T)/标准区域(R)的信号强度的比率值(表1)。各区域的信号计算方法表示在数学式1及数学式2。

[0142] 【数学式1】

$$[0143] \quad \text{试验区域荧光信号} = \int_{X_{tc}-30}^{X_{tc}+30} (X_n - X_b)$$

[0144] 【数学式2】

$$[0145] \quad \text{标准区域荧光信号} = \int_{X_{rc}-30}^{X_{rc}+30} (X_n - X_b)$$

[0146] $X_n = n$ 位置上的荧光信号

[0147] X_{tc} = 试验区域中央地点的荧光信号

[0148] X_{rc} = 标准区域中央地点的荧光信号

[0149] X_b = 微通道0-900的位置中的最少50地点的荧光信号平均值,0-900意味着以规定间隔划分微通道内的信号测定区域的区域。

[0150] 【表1】

[0151] 各区域的信号及比率

[0152]

患者组	试验区域信号强度(T)	标准区域信号强度(R)	比率(T/R)
患者A	500	500	1.0
患者B	1000	1000	1.0

[0153] 其结果,若仅比较信号的强度,则患者B的信号高,而根据分别计算出的试验区域和标准区域的信号强度的比率值的结果,分析出两个患者的试样内前列腺特异性抗原量相同。

[0154] 与上述表1的结果一起,计算出了有可能产生在各试验区域和标准区域的信号强度的比率值的标准偏差(CV,%)值(表2)。选择分析试样中的一个,并分别向五个柱体分注相同的分析试样之后,实施了分析。

[0155] 【表2】

[0156]

-	试验区域(T)	标准区域(R)	比率(T/R)
柱体1	21302	74288	3.487
柱体2	24603	84160	3.421
柱体3	26133	93322	3.571
柱体4	30427	104619	3.438
柱体5	32557	112542	3.457
标准偏差	16.72	16.36	1.70

[0157] 其结果,各分析柱体的试验区域和标准区域的信号有所差异,但试验区域信号/标准区域信号的比率值(T/R)呈现为几乎规定。

[0158] 【1-2.本发明的抗原检测方法的条件确立】

[0159] 本发明的抗原检测方法的目的在于,调节分析试样的流动,并调节反应时间,来去除在流动反应中会出现的缺点,以最大限度地提高反应灵敏度,因而实施了是否达成这种目的相关的实验。即,为了验证通过本发明的抗原检测方法所测定的信号测定值是否有效,实施了出错率(error rate)分析,出错率的计算方法如数学式3至数学式5所示。反应开始区域的荧光信号为从 $X_{tc} - (X_{rc} - X_{tc}) - 30$ 地点到 $X_{tc} - (X_{rc} - X_{tc}) + 30$ 地点为止的各地点的信号平均值,反应结束区域的荧光信号为从 $X_{rc} + (X_{rc} - X_{tc}) - 30$ 地点到 $X_{rc} + (X_{rc} - X_{tc}) + 30$ 地点为止的各地点的信号平均值。

[0160] 【数学式3】

[0161] 反应开始区域的荧光信号 = $\frac{\sum_{X_{tc} - (X_{rc} - X_{tc}) - 30}^{X_{tc} - (X_{rc} - X_{tc}) + 30} X_n}{60}$

[0162] 【数学式4】

[0163] **反应结束区域的荧光信号** = $(\sum_{Xrc+(Xrc-Xtc)+30}^{Xrc+(Xrc-Xtc)-30} Xn) / 60$

[0164] Xn = n 位置上的荧光信号

[0165] Xtc = 试验区域中央地点的荧光信号

[0166] Xrc = 标准区域中央地点的荧光信号

[0167] **【数学式5】**

[0168] 出错率(%) = $[|(反应开始区域的信号 - 反应结束区域的信号)| / 反应开始区域的信号] \times 100$

[0169] 在注入各个试样的微芯片,即柱体(1至5)中测定了反应开始区域及反应结束区域中的信号,并从上述反应开始区域及反应结束区域计算出了出错率(参照表3及图1)。

[0170] **【表3】**

[0171] 出错率测定

[0172]

-	反应开始区域信号	反应结束区域信号	出错率(%)	测定装置显示部
柱体1	252	263	4.34	正常(normal)
柱体2	309	308	0.46	正常(normal)
柱体3	530	960	81.23	不适当(inadequacies)
柱体4	282	329	16.68	正常(normal)
柱体5	250	288	15.47	正常(normal)

[0173] 其结果,测定出柱体3的分析试样中的出错率最高,在出错率为20%以上的情况下,在调整分析试样的浓度之后,重新实施了分析。

[0174] **【实施例2:基于分析试样的浓度的检测数据的比较】**

[0175] 利用本发明的检测方法及现有的抗原检测方法(兔免疫球蛋白G(兔IgG)标准系统),来针对分析试样为高浓度的情况的测定结果值的解析度实施了比较试验。

[0176] **【2-1.利用现有的抗原检测方法的PSA检测】**

[0177] 作为基于本发明的方法的前列腺特异性抗原检测结果的参照值,实施了如下的前列腺特异性抗原检测实验。

[0178] 在利用于本发明的试样中,筛选非线性区间的高浓度患者试样,并利用基于本发明的检测装置来实施了测定。向芯片的样品注入(inlet)部位滴入了30 μ l的样品(脂蛋白脂肪酶存在或不存在的患者血清或血浆)。在滴入样品5分钟后,将芯片插入于本发明的抗原检测装置。经过约40秒钟后,在检测装置的显示器画面以定量显示样品内的前列腺特异性抗原的存在程度,并且,显示了试验区域及标准区域的信号强度值。

[0179] 其结果,可以确认分析试样的浓度越高,试验区域/标准区域信号强度的比率增加的宽度就越变小(图2a)。

[0180] **【2-2.利用本发明的方法的PSA检测】**

[0181] 利用本发明的检测方法来实施的PSA的检测实验如下。

[0182] 实施了与上述实施例2-1相同的实验方法,并使用了相同的试样。

[0183] 其结果,可以确认分析试样的浓度越高,试验区域/标准区域信号强度的比率也规定增加,从而呈现线性比例的曲线图(图2b)。

[0184] **【实施例3:基于测定温度的检测数据的比较】**

[0185] 利用本发明的检测方法及现有的抗原检测方法(兔IgG标准系统)来实施了比较试验。

[0186] **【3-1.利用现有的抗原检测方法的PSA检测】**

[0187] 作为基于本发明的方法的PSA检测结果的参照值,实施了如下的PSA检测实验。

[0188] 在利用于本发明的试样中,使用线性区间的一个浓度的患者试样,并分别在13.8℃、24.2℃及29.7℃温度的环境下,实施了试验。在按照各自的温度预先设置芯片之后,向芯片的样品注入(inlet)部位滴入了30μl的样品(脂蛋白脂肪酶存在或不存在的患者血清或血浆)。在滴入样品5分钟后,将芯片插入于本发明的抗原检测装置。经过约40秒钟后,在检测装置的显示器画面以定量显示样品内的前列腺特异性抗原的存在程度,并且,显示了试验区域及标准区域的信号强度值。

[0189] 其结果,可以确认测定温度越高,试验区域/标准区域信号强度的比率也一起增加(图3a)。由此,确认了抗原-抗体反应根据温度而增加。

[0190] **【3-2.利用本发明的方法的PSA检测】**

[0191] 利用本发明的检测方法来实施的PSA的检测实验如下。

[0192] 使用了与上述实施例3-1相同的实验方法,并使用相同的试样来实施。

[0193] 其结果,可以确认即使测定温度发生变化,也几乎维持规定的试验区域/标准区域信号强度的比率(图3b)。

[0194] **【实施例4:基于相同试料的温度的温度变异系数的测定】**

[0195] 为了了解本发明的检测方法是否受温度的影响,如下所述,实施了基于温度的变异系数测定实验。利用上述兔IgG标准系统、Taq IgG标准系统、本发明的检测方法(PSA标准系统)及美国博适(Biosite)公司(美国授权专利第6194222号)的抗原检测方法来实施了比较试验。

[0196] 使用了与上述实施例3-1相同的实验方法,并使用相同的试样来实施。

[0197] 分别在三种温度条件下,测定了试验区域及标准区域的信号,并为了将上述信号表现在曲线图上,计算出表现值。表现值以如下方式计算。使用仅在试验区域发生特异性反应的各个不同浓度的标准物质(reference substance),来绘制了标准浓度曲线图。向利用于本发明的检测装置的编码芯片输入与上述曲线图相应的函数。其结果,在试验区域显示的信号计算出与其相应的浓度的表现值(表4及表5)。其结果,当利用兔IgG标准系统(图4a及图4b,基于温度的变异系数33%)、Taq IgG标准系统(图5a及图5b,基于温度的变异系数36.9%)及美国博适公司的检测方法(图7,基于温度的变异系数31.0%)时,可以确认随着测定温度增加,试验区域/标准区域信号强度的比率值增加,使得PSA的检测量根据温度变化而不同。相反,当利用本发明的方法时,PSA的表现值在13.8℃、24.2℃及29.7℃温度下分别测定为4.35、4.01及4.45,因此呈现为几乎不受温度变化的影响(图6a及图6b,基于温度的变异系数5.5%)。

[0198] **【数学式6】**

[0199] 变异系数=标准偏差/平均值×100

[0200] **【表4】**

[0201] 根据本发明的检测方法的基于温度变异系数的确认

[0202]

1.兔-山羊抗兔 (Rabbit-Goat anti Rabbit)			
温度	13.8℃	24.2℃	29.7℃
试验区域 (T)	17508	46064.8	54976.6
标准区域 (R)	47493.8	60212.6	57960.8
比率 (T/R)	0.36	0.78	0.96
比率的表现值	3.25	7.94	10.32
基于温度的变异系数	33%		
2.Taq 小鼠抗 Taq (Taq-Mouse anti Taq)			
温度	13.8℃	24.2℃	29.7℃
试验区域 (T)	23712.8	42231.4	50583
标准区域 (R)	43406.2	54236.2	49724.5
比率 (T/R)	0.55	0.78	1.03
比率的表现值	5.27	7.94	11.28
温度的变异系数	36.9%		
3.兔-山羊抗兔 (Rabbit-Goat anti Rabbit)			
温度	13.8℃	24.2℃	29.7℃
试验区域 (T)	25488.4	34305.2	47303.0
标准区域 (R)	54916.4	79658.4	100845.4
比率 (T/R)	0.46	0.43	0.47
比率的表现值	4.35	4.01	4.45
温度的变异系数	5.5%		

[0203] 【表5】

[0204] 根据美国博适公司(Biosite)分析法的基于温度变异系数的确认

[0205]

比率(T/R)的表现值测定次数	14℃	24.8℃	29.6℃
1	10.1	15.1	19.8
2	9.87	15.3	17.5
3	8.69	14.6	-
4	9.32	13.5	19.9
5	10.7	13.8	17.1
平均	9.736	14.46	18.575
标准偏差	0.765983	0.789303	1.481834
变异系数(CV%)	7.867533	5.45853	7.977574

[0206] 【实施例5:高浓度分析试样的检测数据的比较1】

[0207] 利用本发明的检测方法及现有的抗原检测方法(兔IgG标准系统),针对分析试样为高浓度的情况的测定结果值的解析度实施了比较试验。作为PSA抗原,利用了人类精液(BiosPacific,J63000),实验方法如上述实施例2所述。

[0208] 表6表示了使用基于本发明的方法的前列腺特异性抗原(PSA)标准系统,来测定基于分析试样的浓度的试验区域/标准区域信号强度的比率值的结果。

[0209] 【表6】

[0210] 基于PSA浓度的信号强度的确认

[0211]

PSA浓度(ng/ml)	试验区域(Tz)	标准区域(Rz)	T/R比率
0.45	1385	63039	0.02
5.9	22764	73660	0.31
11.7	26354	48260	0.55
23.4	61881	57307	1.08
46.9	80387	64155	1.25
93.8	85358	47459	1.80
188	127889	51162	2.50
375	156706	42899	3.65
750	168668	29439	5.73
1500	140212	16517	8.49

[0212] 如图8所示,可见在利用现有的山羊抗R 1gG-R 1gG系统的情况下,分析试样的浓度越高,试验区域/标准区域信号强度的比率增加的幅度就越减小,当PSA浓度为100ng/ml以上时,曲线图的斜率剧减,100ng/ml以上的抗原不能进行定量分析(图8)。

[0213] 但是,在利用本发明的方法的情况下,可知,即使在1500ng/ml的浓度下,也可以进行试样的定量检测,在利用图8的曲线图的情况下,即使在1500ng/ml以上的浓度下,也可以进行抗原的检测。

[0214] 【实施例6:高浓度分析试样的检测数据的比较2】

[0215] 利用本发明的检测方法及现有的抗原检测方法(兔1gG标准系统),针对分析试样为高浓度的情况的测定结果值的解析度进行了比较试验。作为PSA高浓度试料,使用了由贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter)UNICELL DX1 800、Access Hybritech(海不瑞特克公司)PSA测定并确认为8720ng/mL的试料,实验方法如上述实施例2所述。

[0216] 图9a及图9b表示了利用基于本发明的方法的前列腺特异性抗原(PSA)标准系统及现有的抗原检测方法(兔1gG标准系统),来测定基于PSA的浓度的试验区域/标准区域信号强度的比率值的结果。表7为将从各试样测定两次信号的值进行平均并表示的。

[0217] 如图9及表7所示,在利用本发明的方法的情况下,可检测/测定4360ng/mL的PSA抗原(图9a),但在利用现有的山羊抗R 1gG-R 1gG系统的情况下,当抗原的浓度为272.5ng/mL以上时,出现钩状效应(hook effect),从而无法进行抗原的定量分析(图9b)。

[0218] 【表7】

[0219] 基于PSA浓度的信号强度的确认

[0220]

PSA 浓度 (ng/ml)	本发明的方法	兔 IgG 标准系统
	T/R 比率	T/R 比率
0.07	0.00	0.008
0.13	0.01	0.015
0.27	0.01	0.032
0.53	0.02	0.046
1.06	0.04	0.108
2.13	0.08	0.253
4.26	0.14	0.425
8.52	0.25	0.620
17.03	0.41	1.007
34.06	0.73	1.427
68.13	1.05	2.364
136.25	1.32	2.694
272.50	1.69	2.934
545.00	2.09	3.023
1090.00	2.80	2.849
2180.00	3.58	2.434
4360.00	4.09	1.927

[0221] 以上,详细记述了本发明的特定部分,本发明所属技术领域的普通技术人员能够明确的是,这些具体记述内容仅属于优选实例,本发明的范围并不局限于此。因此,本发明的实质性的范围根据所附的发明要求保护范围和与其等同的技术方案而定义。

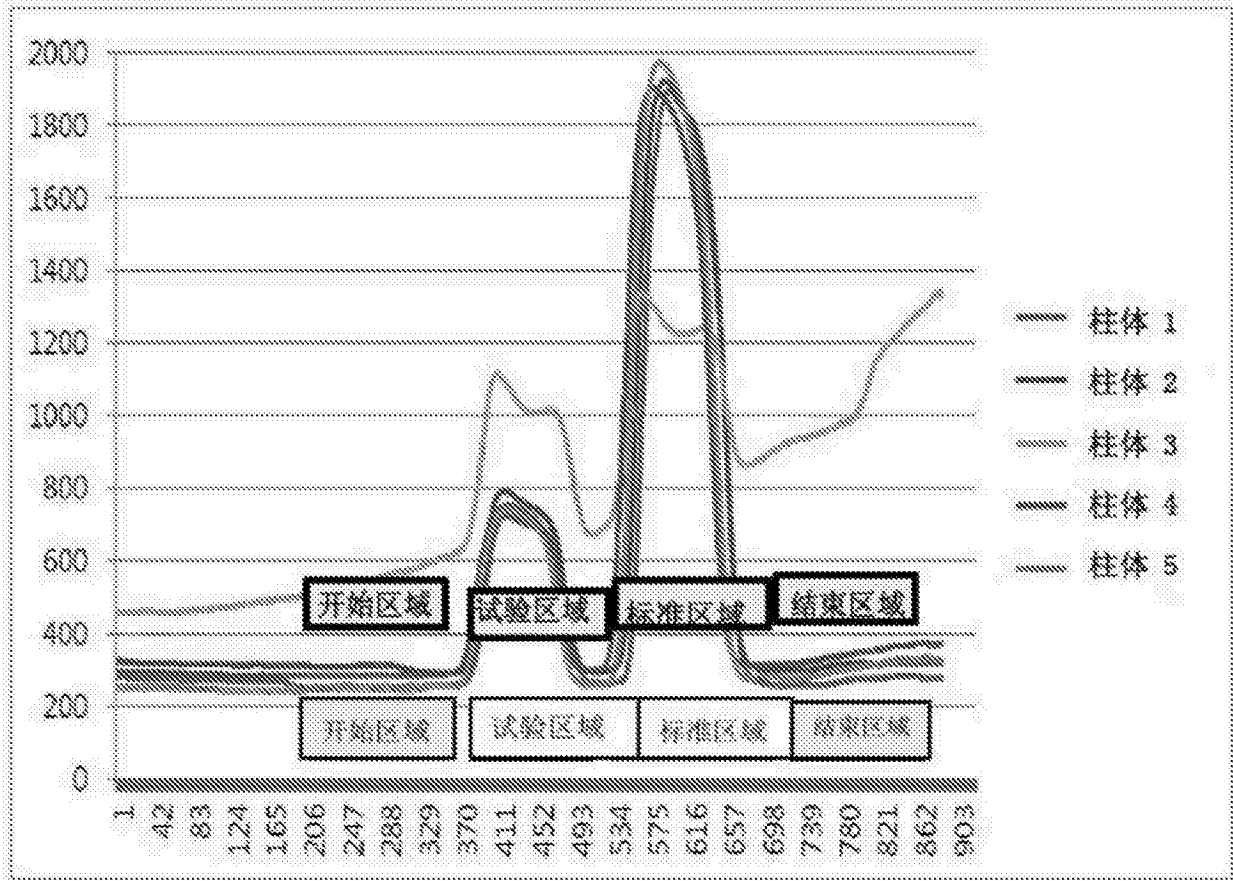


图1

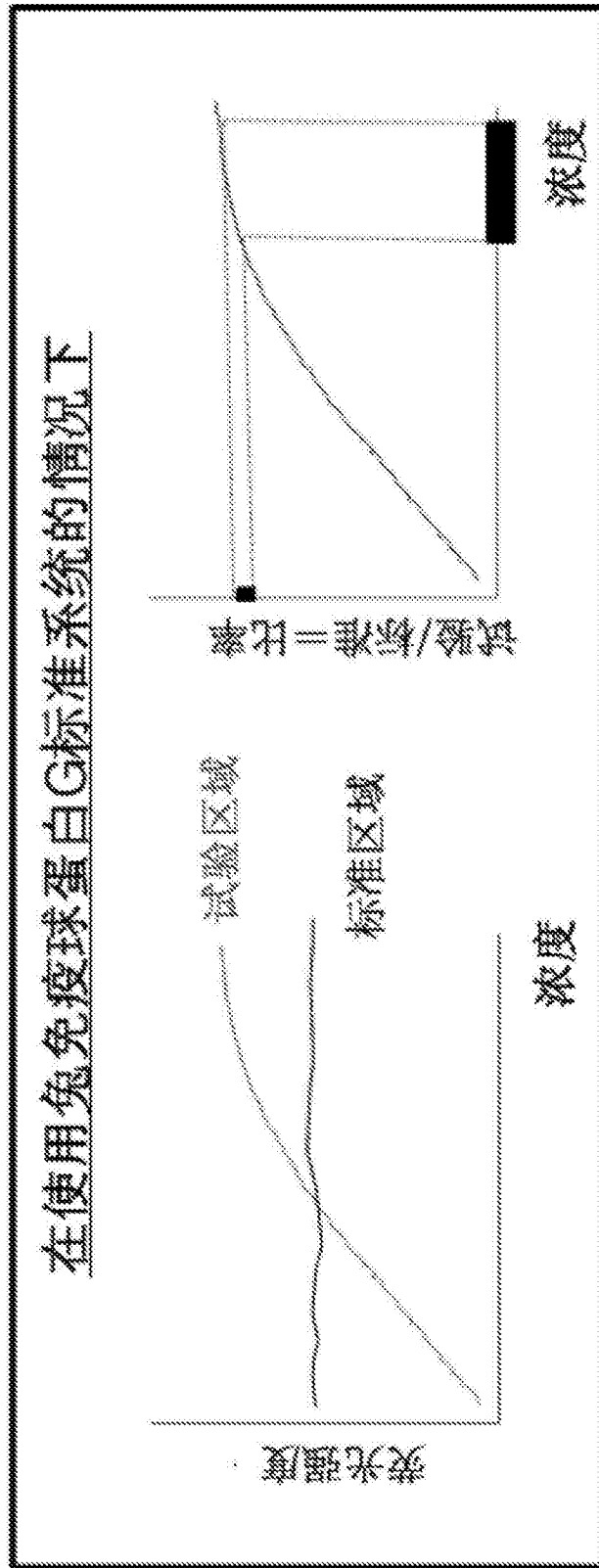


图2a

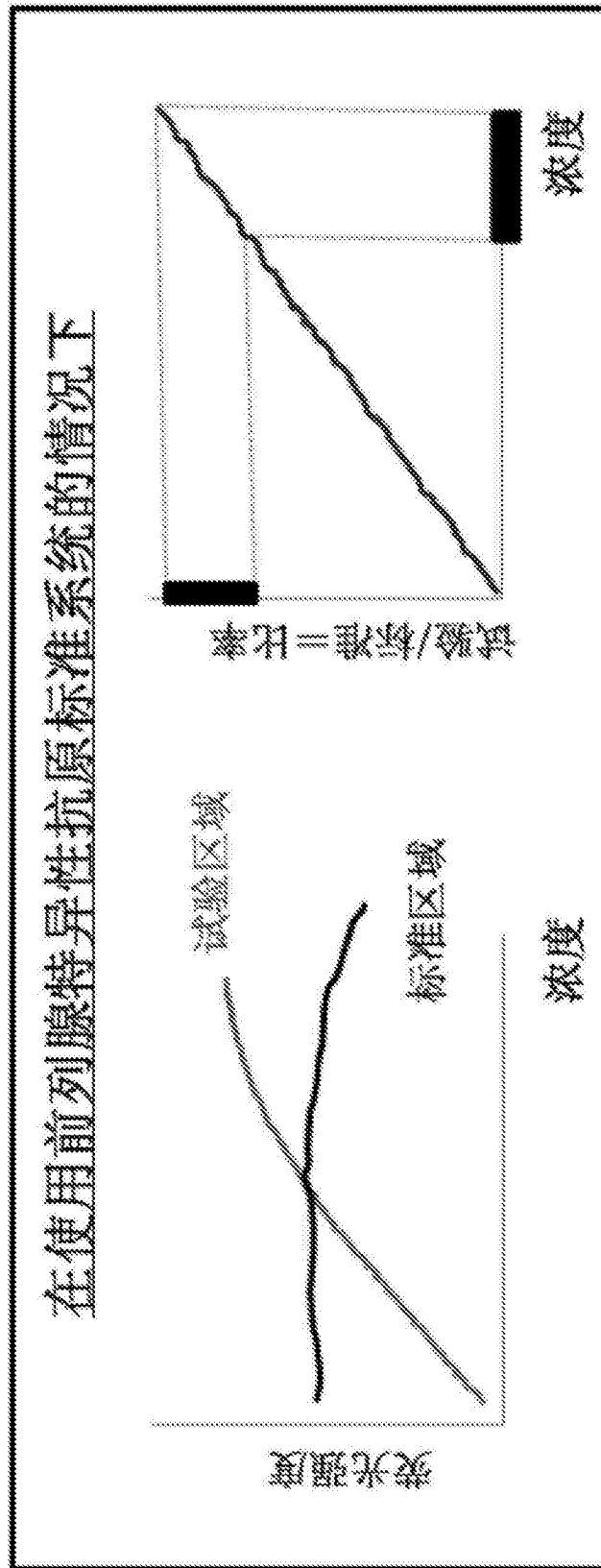


图2b

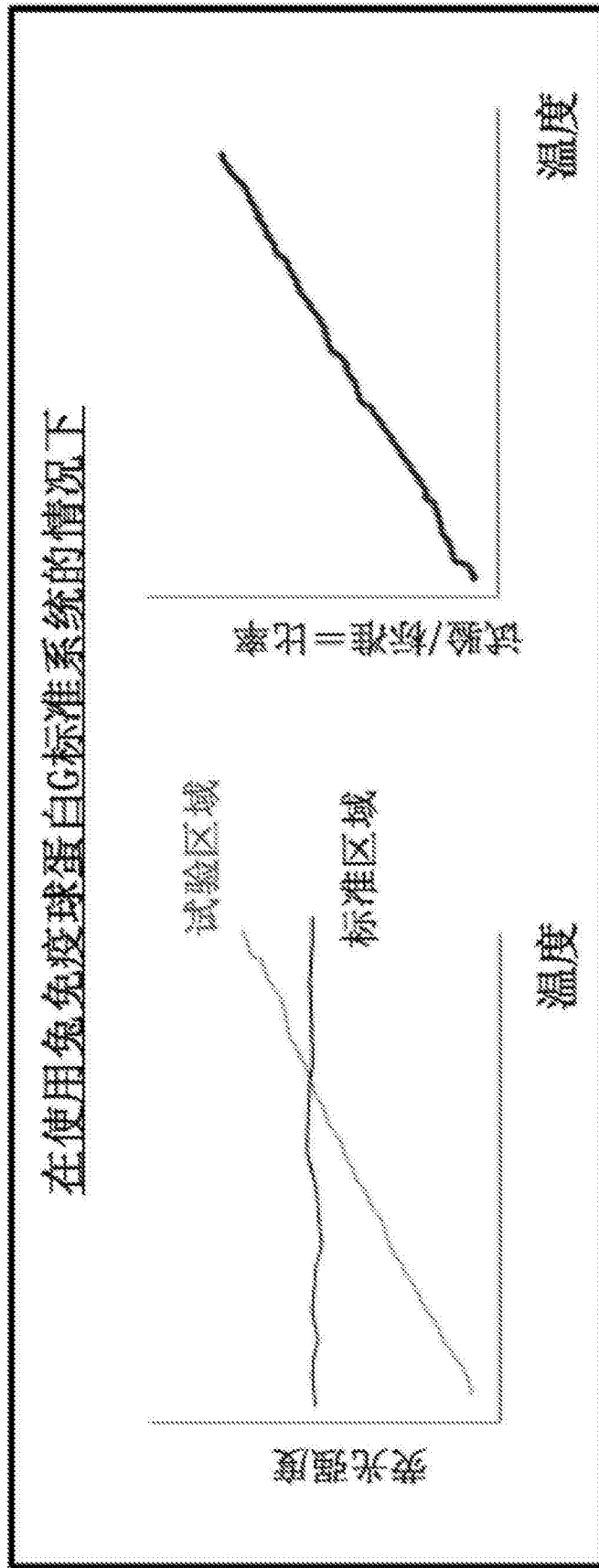


图3a

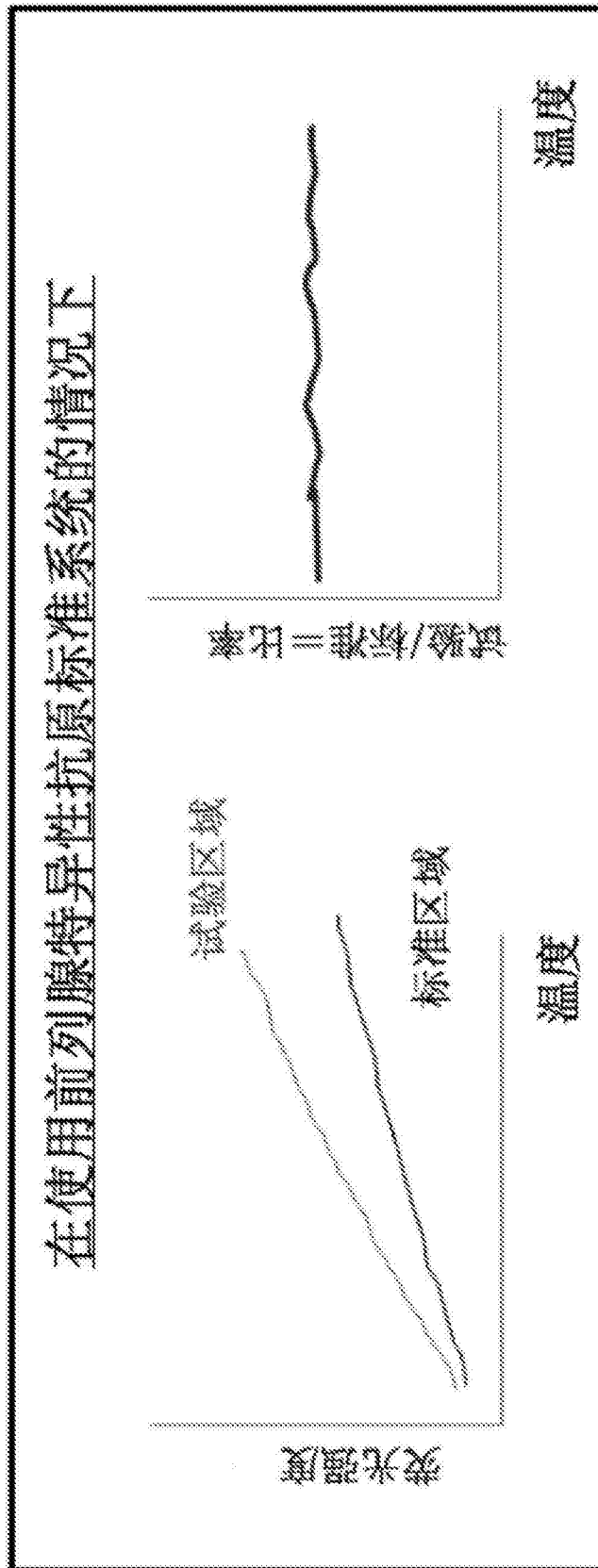


图3b

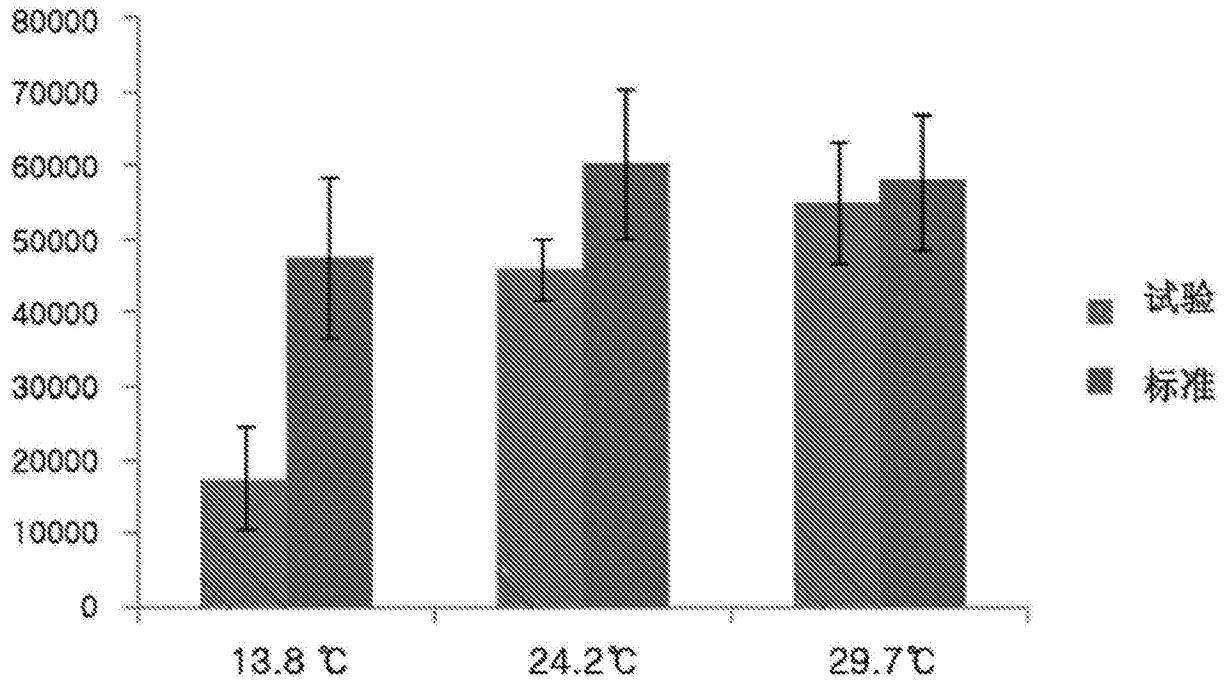


图4a

比率

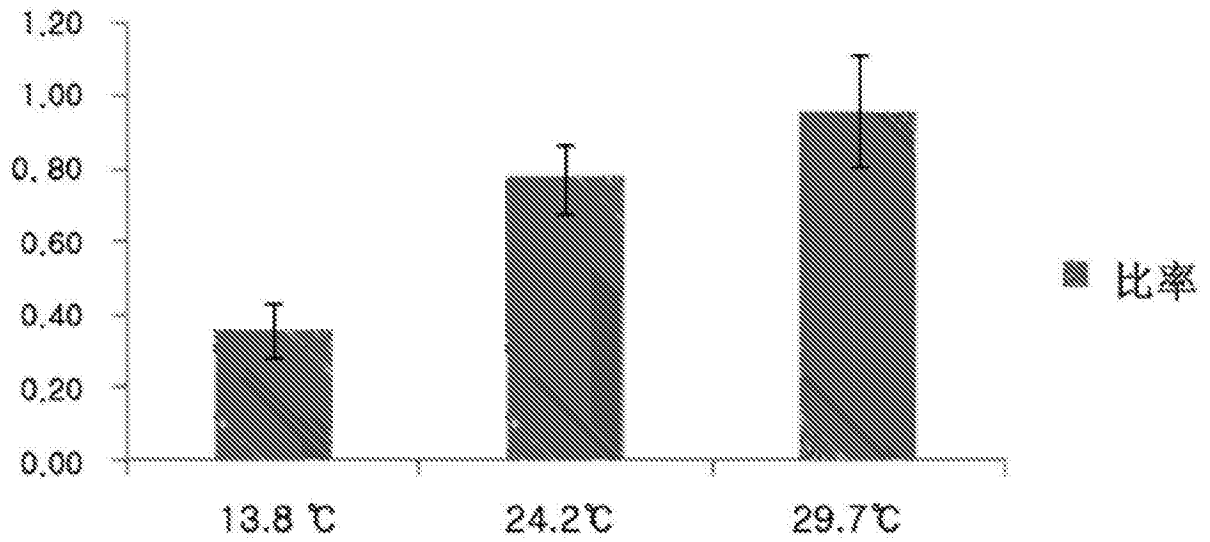


图4b

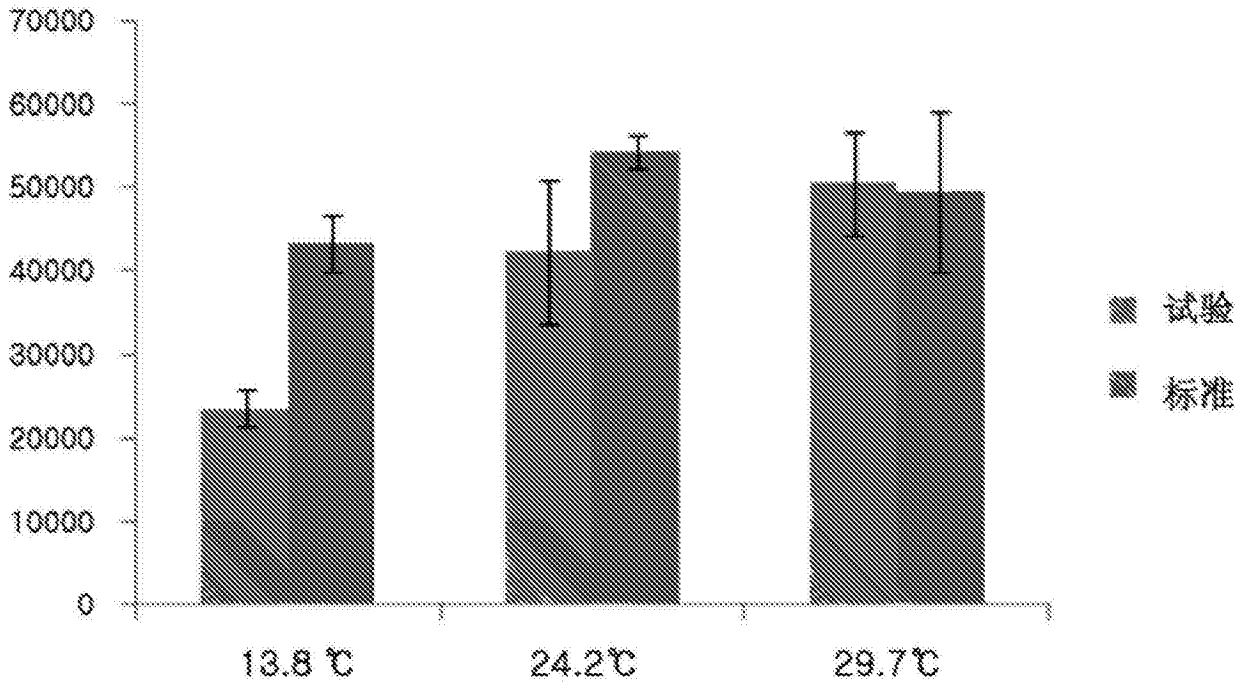


图5a

比率

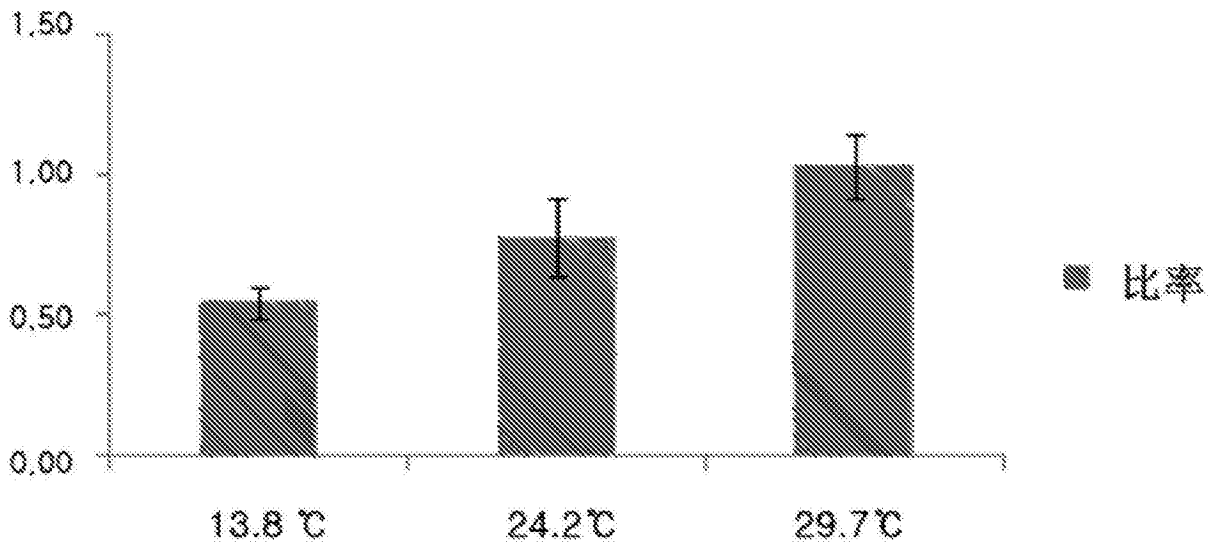


图5b

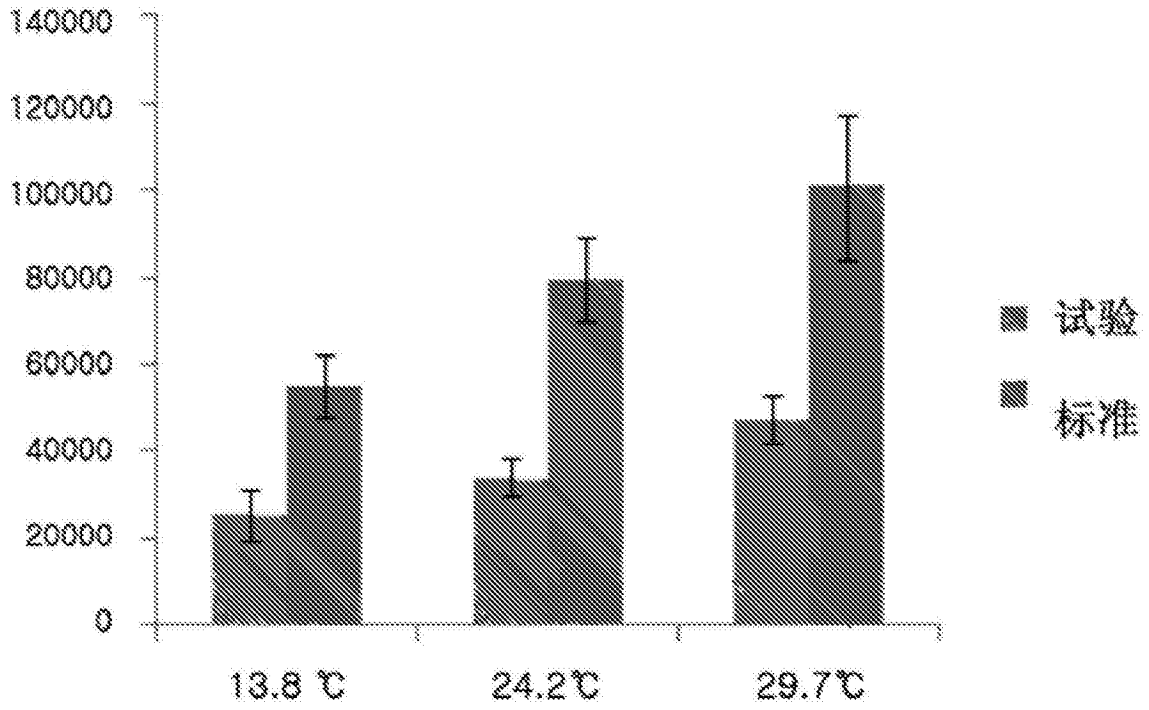


图6a

比率

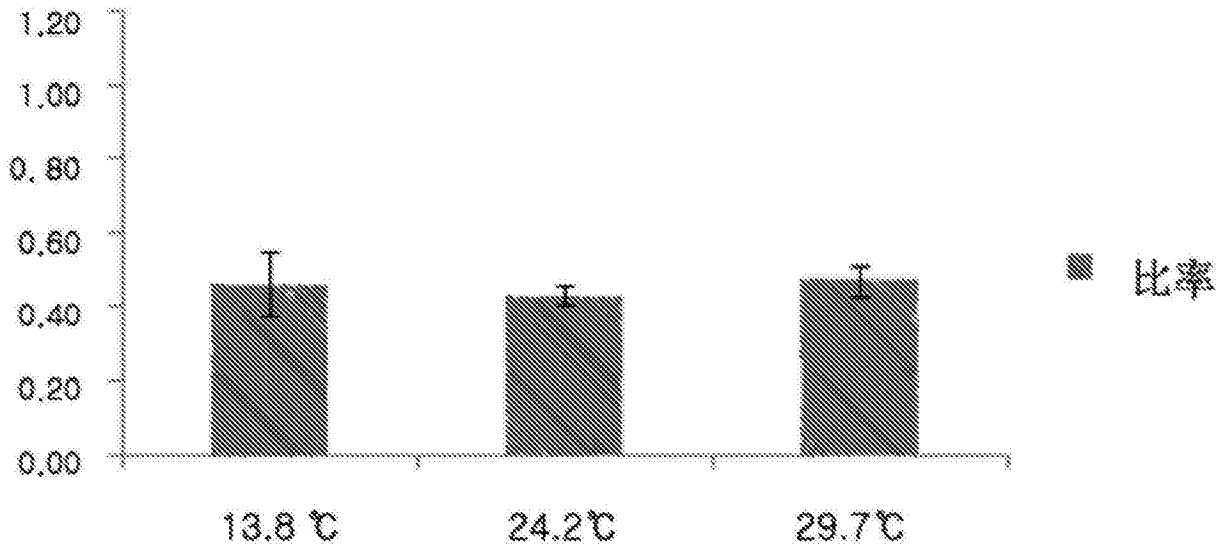


图6b

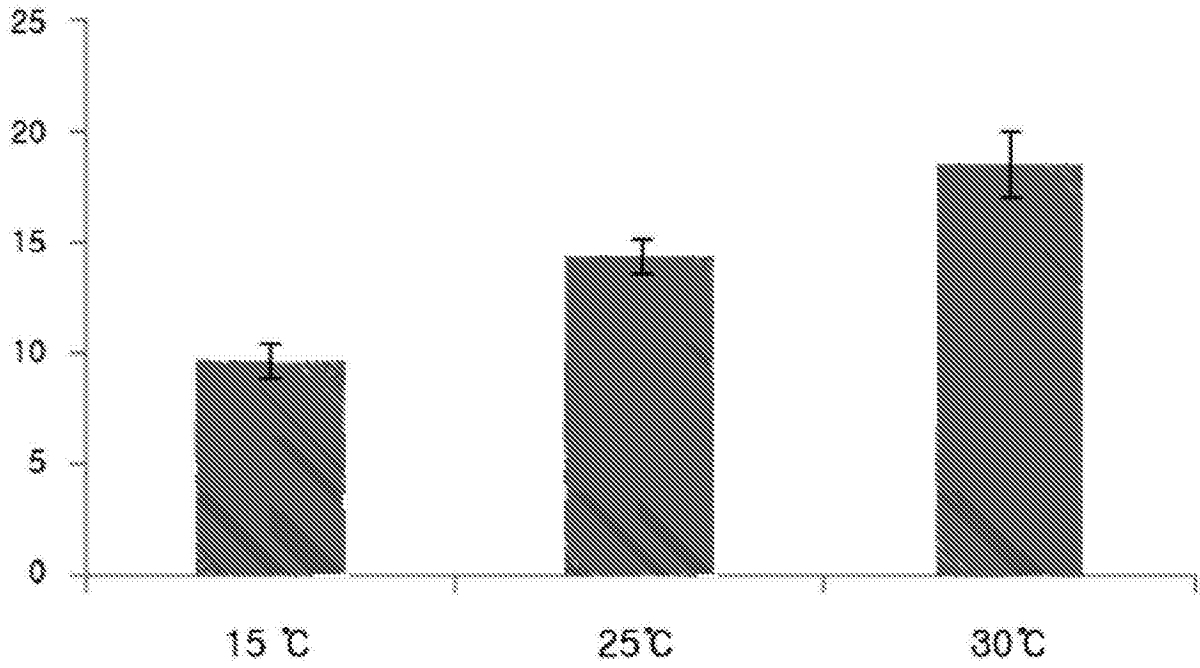


图7

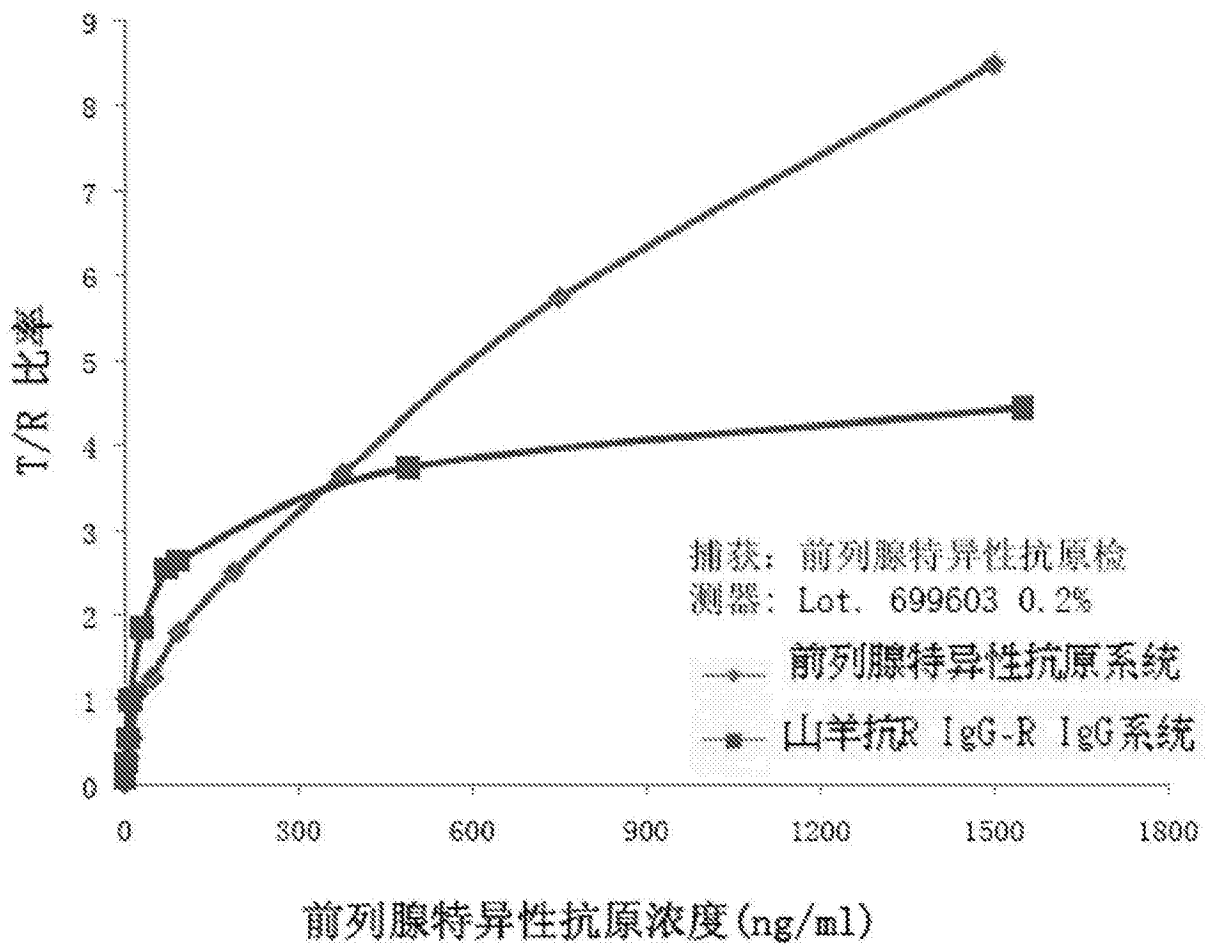


图8

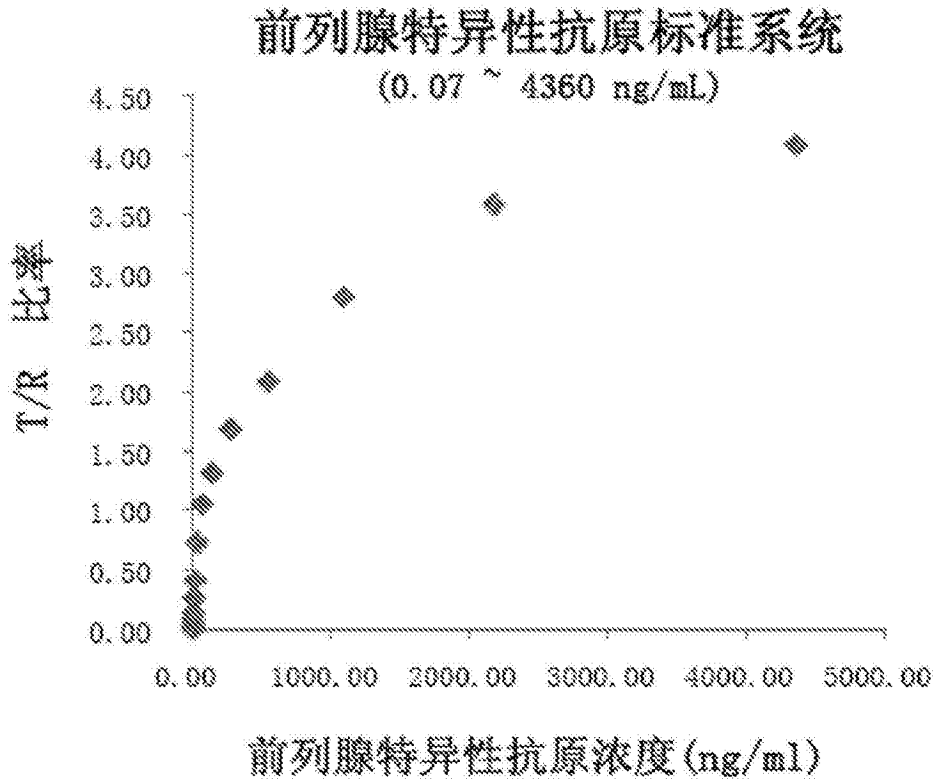


图9a

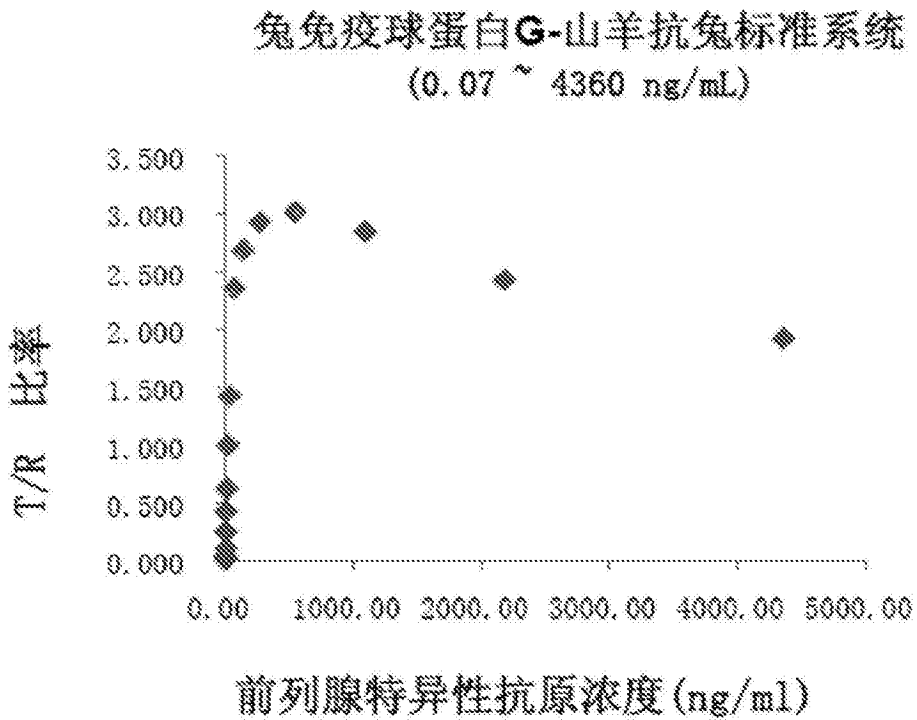


图9b

专利名称(译)	新颖的抗原的检测方法及利用该检测方法的装置		
公开(公告)号	CN104126121B	公开(公告)日	2017-02-22
申请号	CN201380010090.6	申请日	2013-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	纳诺恩科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	纳诺恩科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	纳诺恩科技有限公司		
[标]发明人	郑灿一 李昌燮 黄正九 丁钟植		
发明人	郑灿一 李昌燮 黄正九 丁钟植		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/53 G01N33/543		
审查员(译)	赵晓明		
优先权	1020120017039 2012-02-20 KR		
其他公开文献	CN104126121A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及分析试样的内部抗原的检测方法，包括：步骤(a)，使结合有产生能够检测的信号标记且与上述抗原特异性地结合的检测抗体和分析试样相接触，来形成结果物；步骤(b)，使与要检测的抗原特异性地结合的捕获抗体和上述步骤(a)的结果物相接触，来形成结果物；步骤(c)，使标准物质(reference substance)和检测抗体相接触，来形成结果物，上述标准物质包含特异性地结合有上述检测抗体的表位，并与固相底物的表面相结合，上述检测抗体结合有产生上述能够检测的信号标记；步骤(d)，测定从上述步骤(b)的结果物及步骤(c)的结果物的标记所产生的信号；以及步骤(e)，分析所测定的上述信号，来决定上述分析试样的内部抗原的存在与否或量。与现有的抗原检测方法相比，在本发明的抗原检测方法中，能够调节分析试样的流动(flow)及反应时间，以提高反应灵敏度，将分析试样的浓度或检测反应温度的影响最小化，使得数据的安全性、可靠性及再现性优秀。并且，即使没有专业技术，也能够容易操作本发明的抗原检测方法及检测装置，从而能够通过现场诊断迅速掌握分析试样的内部检测抗原的存在与否及量。

