



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03812955.8

[43] 公开日 2005 年 8 月 24 日

[11] 公开号 CN 1659286A

[22] 申请日 2003.6.3 [21] 申请号 03812955.8

[30] 优先权

[32] 2002.6.5 [33] FR [31] 02/06883

[86] 国际申请 PCT/FR2003/001659 2003.6.3

[87] 国际公布 WO2003/104490 法 2003.12.18

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.3

[71] 申请人 拜奥默里克斯公司

地址 法国玛西 - 勒托勒

[72] 发明人 B·曼德兰德 A·佩林

A·瑟尔茨

[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

代理人 程 泳

权利要求书 3 页 说明书 17 页 序列表 4 页
附图 2 页

[54] 发明名称 同时检测杂交和免疫反应的方法以及其在诊断方面的应用

[57] 摘要

本发明涉及一种在样品中同步检测杂交反应和免疫反应的方法，所述样品可能包含由至少一种核酸和至少一种不同性质的其它配体组成的目标分析物。本发明方法包含以下步骤：(i) 将一定量已知体积的稀释于反应缓冲液中的样品加在反应液中预先包被用于俘获目标分析物的配偶体的俘获表面，该俘获配偶体由至少一种核酸探针和至少一种抗配体组成；(ii) 在 15℃ 至 60℃ 之间的温度反应；(iii) 使这样获得的杂交反应和免疫反应可视化。本发明还涉及该方法的应用：可用于检测传染、代谢、病毒引起的疾病；细菌存在与否的工业诊断；检测和/或定量测定生物分子等。本发明进一步涉及该方法在诊断中的应用，以及用于执行本发明方法的生物学或诊断测试试剂盒。

1、在可能含有目标分析物的样品中同时检测杂交反应和免疫反应的方法，所述目标分析物由至少一种核酸和至少一种不同性质的其它配体组成，并且所述方法包括以下步骤：

(i)将已知体积量的稀释于反应缓冲液中的样品沉积于预先包被有用于俘获所述目标分析物的配偶体的俘获表面上，其中所述俘获配偶体由至少一种核酸探针和至少一种抗配体组成，

(ii)在 15°C 至 60°C 的温度反应，和

(iii)使如此获得的杂交反应和免疫反应可视化。

2、权利要求 1 的方法，其特征在于它在步骤 (i) 和步骤 (ii) 之间包含下列附加步骤 (i')：

(i')加入特异于所述目标分析物的结合配偶体，所述配偶体已经预先与标记物缀合。

3、权利要求 1 的方法，其特征在于它在步骤 (ii) 和步骤 (iii) 之间含有下列两个附加步骤 (ii') 和 (ii'')：

(ii')加入特异于所述目标分析物的结合配偶体，所述配偶体已经预先与标记物缀合，和

(ii'') 在 15°C 至 60°C 的温度反应。

4、权利要求 2 或 3 的方法，其特征在于所述生物样品中所含的目标核酸已被预先标记，从而只有在步骤 (i') 或 (ii') 中加入的结合配偶体是特异于所述配体的配偶体，其中所述配偶体已被预先标记。

5、权利要求 2-4 中任一项的方法，其特征在于在步骤 (i') 或 (ii') 中，加入预先被标记并可能含于生物样品中的配体以取代所述配体-特异性结合配偶体。

6、权利要求 2-5 中任一项的方法，其特征在于在步骤 (iii) 之前加入特异于所述标记物的底物以使杂交反应和免疫反应可视化。

7、权利要求 1-6 中任一项的方法，其特征在于步骤在 (ii) 和/或 (ii'') 后清洗所述俘获表面。

- 8、权利要求 1-7 中任一项的方法，其特征在于反应温度在 35-45℃ 之间。
- 9、权利要求 8 的方法，其特征在于反应温度在 37-41℃ 之间。
- 10、权利要求 9 的方法，其特征在于反应温度是 37℃ 或 41℃。
- 11、权利要求 1-10 中任一项的方法，其特征在于反应缓冲液的离子强度在 0.4-1M，pH 为 7-8，并含有表面活性剂。
- 12、权利要求 2-11 中任一项的方法，其特征在于核酸特异性结合配偶体和配体特异性结合配偶体，权利要求 4 中的目标核酸和权利要求 5 中的配体使用同样的标记物标记。
- 13、权利要求 1-12 中任一项的方法，其特征在于所述俘获配偶体是同种疾病的标志物。
- 14、权利要求 1-12 中任一项的方法，其特征在于所述俘获配偶体是不同疾病的标志物。
- 15、权利要求 1-14 中任一项的方法在检测起因于感染或代谢的疾病中的用途。
- 16、权利要求 15 中的方法的用途，用于检测起因于病毒的疾病。
- 17、权利要求 1-14 中任一项的方法在工业诊断细菌是否存在中的用途。
- 18、权利要求 1-14 中任一项的方法在鉴定和/或定量生物分子中的用途。
- 19、权利要求 1-14 中任一项的方法在同时检测细胞或生物体的转录组和蛋白质组中的用途。
- 20、诊断试剂盒，含有俘获表面、由至少一种核酸探针和至少一种不同性质的其他配体组成的并用于俘获目标分析物的配偶体、和反应缓冲液。
- 21、权利要求 20 的诊断试剂盒，其特征在于它还含有预先标记的特异于所述目标配体的结合配偶体。
- 22、权利要求 20 的诊断试剂盒，其特征在于它还含有预先标记的并可能存在于待测样品中的配体，和反应缓冲液。

23、权利要求 21 或 22 的诊断试剂盒，其特征在于它还含有特异于所述目标核酸的结合配偶体。

同时检测杂交和免疫反应的方法以及 其在诊断方面的应用

本发明涉及一种全新的同时检测杂交和免疫反应的方法，以及它在治疗，工业诊断和定性和/或定量测定生物分子方面的应用。

病理学的诊断或监控往往需要通过杂交或免疫鉴定。例如在 AIDS 的诊断中，蛋白质 p24、抗病毒包膜蛋白抗体和病毒 RNA、或抗-p24 蛋白抗体和病毒 RNA 均需被检测。

在同样操作条件和反应介质下对杂交和免疫反应进行同步检测可以简化需要此类双重检测的病理学诊断。

现有技术已研究了如何用共同参数检测免疫和杂交反应。

因此，专利申请 WO 01/86296 描述了使用一套特异于每个分析物的标记来同时检测大量分析物的方法。但是该方法没有描述同时检测杂交反应和免疫反应，并且对特异于每一分析物的每一标记使用不同的操作条件以进行可视化。

专利申请 WO01/61040 也介绍了一种同步检测分析物的方法，它使用了半导体纳米晶体作为检测标记。通过测量进行读数的波长的变化来检测杂交或免疫反应。然而，该方法的不足之处在于必须将待分析样品分为几份，以便在不同操作条件下研究每一分析物。

现有技术的缺陷在于不能在同样操作条件和反应介质下同步检测杂交和免疫反应，因此同步检测既复杂又价格昂贵。

本发明作者研究出了一种同步检测杂交和免疫反应的新方法，避免了以上缺陷。

本发明的一个目的涉及一种同步检测样品中杂交反应和免疫反应的方法，其中所述样品可能含有由至少一种核酸和至少一种其它不同特性的配体组成的目标分析物。本发明方法特点在于它包含以下步骤：

(i) 将一定量已知体积的稀释于反应缓冲液中的样品加在预先包被

用于俘获所述目标分析物的配偶体的俘获表面，该俘获配偶体由至少一种核酸探针和至少一种抗配体（antiligand）组成；

(ii)在 15°C 至 60°C 之间的温度反应；

(iii)使这样获得的杂交反应和免疫反应可视化。

本发明也涉及用该方法检测感染性疾病，例如源于病毒或代谢；工业诊断细菌的存在；鉴定和/或定量测定生物分子。

本发明的另一个目标是可用于执行所述方法的生物学和诊断测试试剂盒。

本发明方法简单易行，并出人意料的使用在同样操作条件（即反应介质和温度）下检测样品中由至少一种核酸和至少一种不同性质的其它配体组成的目标分析物成为可能。目标分析物的存在通过杂交反应和免疫反应的可视化而得到证实。

术语“杂交反应”是指任何在目标核酸和俘获核酸之间的反应，术语“免疫反应”是指任何在与核酸性质不同的俘获抗配体和目标配体之间的反应。

术语“核酸”是指寡核苷酸，脱氧核糖核酸，核糖核酸和它们的衍生物。

术语“寡核苷酸”是指最少含有两个天然的或被修饰的核苷酸（脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或两者）的链，在适当的杂交条件下可以与至少部分互补的寡核苷酸进行杂交反应。“修饰的核苷酸”是指含有被修饰的碱基和/或在核苷酸之间的键和/或骨架方面具有修饰的核苷酸。举例来说，被修饰的碱基有次黄苷、甲基-5-脱氧胞嘧啶、二甲氨基-5-脱氧尿嘧啶、二氨基-2,6-嘌呤和溴-5-脱氧尿嘧啶；修饰的核苷酸之间的键包括硫代磷酸酯键、N-烷基磷酰胺键、烷基磷酸酯键、烷基磷酸二酯键等。在 FR-A-2 607 507 中介绍的那些 α -寡核苷酸，在 *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 8, Issue 16, August 18, 1998, 2219-2222 页中介绍的 LNA 例如硫代磷酸-LNA 和 2'-硫代 LNA 以及 M. Egholm 等, *J. Am. Chem. Soc.* (1992), 114, 1895-1897 页中的 PNA 是由骨架被修饰的核苷酸组成的寡核苷酸的例子。

“性质不同于核酸的配体”是指任何一种与核酸不同的分子，并可以和特定的结合配偶体结合的分子。该结合配偶体当构成俘获配偶体时称为抗配体。为方便起见，此后的“配体”和“抗配体”将指任何一个能够进行免疫反应但不能进行杂交反应的化合物。

可作为配体的有抗原、抗体、多肽、蛋白质、半抗原、糖、酶以及它们的底物。

可作为抗配体的包括那些可作为配体的物质、以及凝集素、细胞受体和阿普塔默。

术语“抗原”是指可以被抗体识别的化合物，所述抗体由其通过免疫反应而诱导合成。

“抗体”包括单克隆抗体、多克隆抗体、通过基因重组获得的抗体和抗体片段。

多克隆抗体可如下获得：用感兴趣的目标抗原对动物免疫，取动物血清，将抗体与血清其他组分分开，特别是通过在其上附着有被该抗体特异识别的抗原（特别是感兴趣的目标抗原）的柱上进行亲和层析，来回收所需抗体。

单克隆抗体可通过杂交瘤技术得到。一般原理如下：

首先，选取动物，多为老鼠（或在体外免疫的情况下为培养细胞），用感兴趣的目标抗原对其进行免疫，使 B 淋巴细胞产生针对该抗原的抗体。将这些产生抗体的淋巴细胞与“无限繁殖”骨髓瘤细胞（在实施例 1 中为鼠细胞）融合得到杂交瘤。然后从获得的不同细胞混合物中选出可以产生特定抗体并无限增殖的细胞。每个杂交瘤都通过克隆的方式增殖，每个克隆生产单克隆抗体，可以检测该单克隆抗体针对感兴趣的肿瘤抗原的识别特性，检测方式有例如 ELISA、一维或二维免疫阻断、免疫荧光或使用生物传感器。最后将所选单克隆抗体纯化，特别是按照上述的亲和层析法。

抗体片段是指保留与其结合或俘获配偶体结合的功能的片段。

“多肽”是指含有至少两个氨基酸的链。“氨基酸”指编码蛋白质的主要氨基酸、酶反应产生的生氨基酸如反式-4-羟脯氨酸以及天然的但不存

在于蛋白质中的氨基酸，如正缬氨酸、N-甲基-L-亮氨酸、staline (Hunt S. *Chemistry and Biochemistry of the amino acids*, Barette G.C.ed., Chapman and Hall, London, 1985)、化学官能团保护的可用于液相或固相合成的氨基酸或非天然的氨基酸。

术语“蛋白质”包括全蛋白质和杂蛋白质(heteroprotein)，例如核蛋白、脂蛋白、磷酸化蛋白质、金属蛋白质和糖蛋白，可以是纤维状和球状的。

术语“半抗原”指非免疫原性化合物，即该化合物自身并不能通过抗体生产来促进免疫反应，但在一定条件下可以被由动物免疫获得的抗体识别，特别是用半抗原-蛋白质化合物免疫获得的。这些化合物分子量通常小于 3000Da，最通常小于 2000Da，并且可能是糖基化肽、代谢产物、维生素、激素、前列腺素、毒素或各种药物产物、核苷酸和核苷。

在本领域酶与其底物已被深入了解。在样品测试中可以将酶作为抗配体以寻找该酶底物的类似物。

已知凝集素可以通过本领域已知的机制识别糖，如 *Biochemistry*, 4th Edition, G.L.Zubay, 1998, The McGraw-Hill Companies, USA, Boston 中所述。

作为抗配体的受体是指可与包膜蛋白靶配体结合的表面蛋白。此类受体的例子包括 HIV gp120 包膜蛋白的趋化因子受体 CXCR4 (Corananti, M.T., 2001, *Neuroscience Letters*, 312 (2), 67-70)。

阿普塔默是指为天然蛋白质或核酸的俘获配偶体，他们的功能是作为抗体与蛋白质配体结合 (Toulmé, J.J.和 Giege, R., 1998, *Medicine Science*, 14 (2), 155-166)。

本发明中的待测样品可以是生物或工业样品。

生物样品可以是指能够含有目标分析物的任何生物流体，如血液、淋巴液、脑脊液、痰、阴道取样物和尿液。

工业样品可以是源自工业的对其进行生物分析是必要的任何样品。来自食品工业的样品(简易制备的粮食粉末、经处理的水)就是工业样品的例子。

稀释样品的反应缓冲液是介于杂交缓冲液和免疫反应所用缓冲液的中间反应缓冲液。它可由本领域技术人员很容易地确定。

根据一个具体实施方案，反应缓冲液离子强度在 0.4-1M，pH 值在 7-8，并含有表面活性剂。

反应缓冲液的例子有基于磷酸盐、钠盐、锂盐或 HEPES 的缓冲液。表面活性剂的例子有 Tween20、Tween80 和 Triton。

本发明的创新点在于它可以在上述反应缓冲液中同时检测到杂交反应和免疫反应。

本发明中反应温度为 15-60°C。15°C 以下，杂交反应将有可能变为非特异性，尤其是当多核苷酸的长度超过 8bp 时；温度在 60°C 以上时，在配体和抗配体之间可能出现问题。在此温度下，某些蛋白质会发生变性，且只有长度大于 30bp 的多核苷酸才可能发生杂交反应。

根据一个实施方案，反应温度应在 35-45°C，优选在 37-41°C，37°C 和 41°C 的温度是更加优选的。

待测样品沉积在其上的俘获表面可以是任何一种可吸附核酸探针和抗配体的表面。俘获表面的例子有微孔、微板、聚合物表面、膜、显微镜载玻片、官能化或未官能化的无机支持体如硅石、玻璃、云母或石英、金属表面如金和银、和颗粒和微粒，特别是磁颗粒和微粒。

在本发明方法中，俘获表面需用可俘获目标分析物的俘获配偶体预先包被，即核酸探针和抗配体。

俘获配偶体沉积按在申请人的专利申请 FR00/14691 (FR2 816 711) 描述的方法进行，该方法是不通过接触的沉积方法，特别适合 96 孔微板。该方法使用喷射器在机械冲击力的作用下喷射校准的纳米液滴 (nanodroplet) 微板的孔底部。通过每次冲击，获得了液滴，其直径取决于喷嘴的直径而变化，为大约 50 μ m 至 500 μ m。

俘获配偶体也可通过使用内径约 100 μ m 的玻璃毛细管手工沉积。在这种情况下，毛细管需要和沉积表面相接触以产生沉积作用，因此会给沉积表面产生轻微的冲击力。

杂交反应和免疫反应的可视化可通过任何检测手段而实现，例如直

接或间接的手段。

在直接检测的情况下，即不进行标记，杂交反应和免疫反应例如是通过等离子共振或通过带有导电聚合物的电极上的循环伏安法进行观察的。

在间接检测的情况下，即通过标记，所述标记在目标分析物上间接进行，或特异于所述目标分析物并进行预标记的结合配偶体来进行。

“特异于目标分析物的结合配偶体”是指任何可以与目标分析物结合的配偶体，例如核酸、抗原、抗体、抗体片断、蛋白质、半抗原、聚核苷酸或或核苷酸和酶底物。

在本发明的一个实施方案中，杂交反应和免疫反应的可视化通过使用特异于所述目标分析物并进行预标记的结合配偶体来进行，所述方法在步骤 (i) 和 (ii) 之间包含一个附加步骤 (i')：

(i') 加入特异于所述目标分析物的结合配偶体，所述配偶体已经事先与配偶体缀合。

在另一个实施方案中，杂交反应和免疫反应的可视化也通过使用特异于所述目标分析物并进行预标记的结合配偶体来进行，该方法在步骤 (ii) 和 (iii) 之间包括以下两个附加步骤 (ii') 和 (ii'')：

(ii') 加入特异于所述目标分析物的结合配偶体，所述结合配偶体已经事先与标记缀合，和

(ii'') 在 15-60°C 的温度反应。

因此，在这种情况下，本发明所述方法包括两步反应。一步是在目标分析物与用于俘获目标分析物的结合配偶体之间进行结合（步骤 (ii)），另一步是在俘获配偶体/目标分析物缀合物和特异于目标分析物的结合配偶体之间结合（步骤 (ii'')）。

根据另一个实施方案，杂交反应的可视化通过对核酸类型的目标分析物进行预标记来实现，免疫反应的可视化通过对特异于配体类型的所述目标分析物的结合配偶体进行标记来实现。因此，在该实施方案中，由于目标核酸已被预标记，因此在步骤 (i') 或 (ii') 处要加入的结合配偶体仅是特异于所述配体的预先标记的结合配偶体。

免疫反应也可通过“竞争”方法检测。将可能包含于生物样品中的预先标记的配体加入反应介质中（步骤（i'）和（ii'）），以取代配体特异性配偶体，这构成了本发明的另一个实施方案。在这种情况下，当所要寻找的配体不存在时，检测信号最大，随着所要寻找的配体浓度增加而逐渐降低，所述配体是未标记的，其浓度通过竞争反应而增加。

本发明中，任一种实施方案的反应步骤（步骤（ii）和/或（ii''））都可以清洗俘获表面，以从俘获表面去除那些未参加反应或非特异性结合而较弱吸附的分子。因此改善了杂交反应和免疫反应的可视化。这构成了本发明的另一个实施方案。

清洗介质的例子有 PBS-tween，描述于 A.Perrin 等，*J.Immunological Methods*, 1999, 224, 77-87）。

术语“标记”是指将可以直接或间接产生可检测信号的标记物相连。这些标记物的非限制性例子包括：

- 产生可检测信号的酶，这些信号可由如比色法，荧光或发光检测，这些酶例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 α -半乳糖苷酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，

- 生色团，例如发光或染料化合物，
- 放射性分子如 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I ，
- 荧光分子，如荧光素、罗丹明、alexa 或藻蓝蛋白，
- 颗粒，例如金颗粒、磁胶体颗粒，或脂质体。

也可以使用间接系统，例如通过另一种配体/抗配体对。所述配体/抗配体对是本领域技术人员熟知的，作为例子有：生物素/链霉亲和素、半抗原/抗体、抗原/抗体、肽/抗体、糖/凝集素以及多核苷酸/该多核苷酸的互补序列。在这种情况下，带有结合试剂的是配体。抗配体可以通过上述标记物得到直接检测，或通过配体/抗配体是自身可检测的。

这些间接检测系统可以在一定条件下将信号放大。这种信号放大技术是本领域技术人员熟知的，可以参考申请人的优先专利申请 FR98/10084 或 WO-A-95/08000，或参考文章 *J.Histochem. Cytochem.*45:481-491, 1997。

核酸类型的目标分析物的预标记可通过用聚合酶直接或间接整合标记而进行。

特异于目标分析物的结合配偶体的标记是本领域技术人员熟知的，并描述于例如：**Greg T.Hermanson, Bioconjugate Techniques, 1996, Academic Press Inc, 525B Street, San Diego, CA 92101 USA.**

根据所使用的缀合物的标记类型，例如使用酶，本领域技术人员加入用于使标记可视化的试剂。

因此，根据本发明方法的一个实施方案，在步骤 (iii) 之前加入特异于所述配体的底物以使杂交反应和免疫反应可视化。

此类试剂是本领域技术人员熟知的，具体描述于 **Principle and Practice of Immunoessay, 2nd Edition, C.Price 编辑, D.J.Newman Stockton Press, 1997, 345 Park Avenue South, New York.**

为本发明方法的目的标记的元素，例如核酸特异性结合配偶体、配体特异性结合配偶体、包含于生物样品中的目标核酸和可能包含于生物样品中的配体，可以用不同的或相同的标记物标记，第二种溶液是优选的。

由本发明方法检测的杂交反应和免疫反应可能代表存在某一种疾病。在这种情况下，应用于俘获表面的俘获配偶体是同一种疾病的标记，这构成了本发明的一个实施方案。

例如，在 AIDS 的早期诊断中，可以检测抗 P24 蛋白抗体和病毒 RNA 两者的存在。俘获表面上的俘获配偶体可以是 P24 蛋白，和能与病毒 RNA 进行杂交反应的核酸探针。

由本发明方法检测的杂交反应和免疫反应也可以代表多种疾病。在这种情况下，俘获配偶体是不同疾病的标记物，这构成了本发明的另一个实施方案。因此在同一操作条件下和相同时间下，本发明方法可以使用一种生物样品筛选几种不同疾病，其中通过检测核酸或检测其它性质的配体来证明这些疾病。该方法例如可在输血前对捐献的血液样品进行分析，以确保无病原体存在。

可通过本发明方法检测的疾病是其中至少一个能相互作用的目标

分析物和俘获配偶体对是已知的所有疾病。

这些疾病可以是传染性疾病，即细菌或病毒引起的，如 AIDS 或各种类型的肝炎，或者是代谢性疾病，例如甲状腺功能亢进或糖尿病。

因此，本发明的另一主题就是使用该方法检测源于感染或代谢的疾病。

本发明的另一个目的是将该方法用于细菌的工业诊断。事实上，细菌（尤其是食品工业中的利斯特氏菌或沙门氏菌）在工业中存在的证明，可以通过检测杂交反应（检测细菌 DNA 或 RNA）和免疫反应（检测细菌蛋白质）来进行。

本发明的另一个目的是使用此方法鉴定和/或定量测定生物分子。事实上，当使用可检测多种不同生物分子的很多不同的俘获配偶体时，本发明方法可以判断样品中含有何种分子。同样的，若使用大量性质稍有不同的俘获配偶体时，该方法就可定量测定样品中的生物分子，从而为病理学或为所限定的环境状态产生标准曲线。

本发明的另一个目的是用本方法同时检测细胞或器官的转录组（transcriptome）和蛋白质组。同时检测器官或细胞所有的 RNA（转录组）和所有的蛋白质（蛋白质组），使得研究蛋白质相对于所存在 RNA 的过量表达造成的潜在机能障碍成为可能。

为了实行本发明方法，可以获得由下列至少一种成分组成的试剂盒：

- 俘获表面，
- 用于俘获目标分析物的配偶体，其由至少有一种核酸探针和性质上不同的至少一种其它抗配体组成，
- 反应缓冲液，
- 可选择的，特异于预标记的目标配体或可能包含于待测样品中的预标记配体的配偶体，
- 可选择的，特异于目标核酸的配偶体。

这些试剂盒（当待测样品是工业中的时，该试剂盒可以称为生物测试试剂盒；当待测样品是生物样品时，该试剂盒可称为诊断测试试剂盒）

构成了本发明的另一个实施方案。

本发明将通过下面的非限制性实施例和附图 1 和 2 得到更充分地理解。

图 1 显示的两张图表首先表明了 p24 蛋白质/VEMA 聚合物俘获配偶体和人血清抗 p24 蛋白质抗体之间的免疫反应的荧光变化是血清稀释倍数的函数 (图 1A)，其次表明了代表杂交反应有无的荧光变化是 PCR 产物稀释倍数的函数，其中如果合适，所述杂交反应是核酸探针俘获配偶体 C+ (可以与 HIV 病毒 DNA 目标物反应) 和 C- (不能与 HIV 病毒 DNA 目标物反应) 与 HIV 病毒 DNA 目标物之间的杂交反应 (图 1B)；

图 2 是具有 17 孔的多剂量检测芯片的沉积方案，每孔含有双份的俘获配偶体和如下物质：

- 在 1、9 和 17 号孔中：HIV 病毒的核酸俘获配偶体 (C_{HIV})
- 在 3 和 11 号孔中：乙肝 HBV 的核酸俘获配偶体 (C_{HBV})
- 在 7 和 15 号孔中：丙肝 HCV 病毒的核酸俘获配偶体 (C_{HCV})
- 在 5 和 13 号孔中：HIV 病毒的蛋白俘获配偶体 (gp160 包膜蛋白)
- 在 4 和 12 号孔中：HCV 病毒的蛋白俘获配偶体 (核心蛋白)
- 在 8 和 16 号孔中：HBV 病毒的核酸俘获配偶体 (每孔中两个不同的 HBAg 表面抗原) 以及
- 在 2、6、10 和 14 号孔中：非特异于该研究的蛋白俘获配偶体，即抗-TSH 抗体 (NSP1, 2 和 10 号孔) 和抗 HCG 抗体 (NSP2, 6 和 14 号孔)。

实施例 1: 制备用于证明患者中存在 HIV 病毒的杂交反应和免疫反应的俘获表面

1.1 制备可识别抗 p24 蛋白抗体的俘获配偶体

在长颈瓶中将马来酸酐乙烯基醚聚合物 MAVE-67(67000g/mol) 以浓度 1g/L 溶于 90/10 (V/V) 的 DMSO (二甲亚砜) /水混合物中，制备溶液。将该混合物于 37°C 孵育 48h。接着将 100 μ L 聚合物溶液与 36 μ g 的重组 p24 蛋白 (pmR K24H, biomérieux, Marcy l'Etoile. France)

混合。该混合物在 37°C 反应 3h。

1.2 制备可识别由 HIV 病毒 RNA 扩增得到的 DNA 目标物的俘获配偶体

将以下两种多核苷酸中的每种在 3×PBS 缓冲液 (0.45M NaCl, 0.15M 磷酸钠, pH6.8) - EDTA 10mM 中稀释至 10μM 的浓度, 其中 C+可以与 DNA 目标物发生杂交反应; C-无法发生这种杂交反应。

C+: NH₂-CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG

C-: NH₂-TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC

1.3 俘获表面的制备

按照前面提到的专利申请 FR00/14691 所述方法不经过接触即在微板 (Nunc Maxisorb) 每孔中沉积 4 个点。其中两个点使用了 p24 蛋白 - MAVE 聚合物缀合体, 一个点使用了 C+探针, 另一个点使用了 C-探针。

在沉积完这些点后, 将平板放入 4°C 温箱 2h, 接着在 60°C 孵育 30min。

实施例 2: 目标分析物的制备和特异俘获

2.1 目标分析物的制备

从细胞培养物中提取的病毒基因的一部分通过 RT-PCR 得到 DNA 目标分析物 (200bp)。它们用在 5'位置带有生物素的下列引物 A 和 B 进行标记:

引物 A: CAT gTg CTA CTT CAC CAA Cgg

引物 B: CTg gTA gTT gTg TCT gCA CAA

在引入它们之前, 这些目标物先通过与同体积的 0.2N 的氢氧化钠室温孵育 5 分钟而变性。

将已用传统方法事先检测过抗 p24 蛋白抗体存在与否的各种人血清以 1/500 稀释于反应缓冲液 A 中, 该反应缓冲液 A pH 为 7, 由 0.1M 磷酸钠、0.5M 氯化钠、0.65% tween20、0.014% 鲑鱼 DNA 和 2% PEG 4000 组成。

2.2 目标分析物的特异俘获

将 30 μ L 稀释的患者血清、30 μ L 反应缓冲液 A 和 3 μ L 变性的 DNA 目标物混合，将该混合物加入每孔中。37 $^{\circ}$ C 反应 1h。之后用含有 0.15M 氯化钠和 0.05% tween20 的 50mM 磷酸钠缓冲液 (PBS-Tween) 清洗孔。

实施例 3: 杂交反应和免疫反应的检测

每孔中加入下面混合物：30 μ L 反应缓冲液 A、10ng 过氧化物酶缀合的山羊抗人抗体 (Jackson ImmunoResearch)、0.07pmol 与 DNA 目标物互补的寡聚核酸，从而可以将目标物夹于固定于孔底部的俘获探针和检测探针之间。该寡核苷酸在 5' 位置用过氧化物酶预先标记。37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。接着用 PBS-Tween 清洗孔。

每孔加入 30 μ L 过氧化物酶的比色沉淀底物 (TMB, bioFX)。20 分钟可以实现可视化。用移液管吸出底物，每个点的光密度使用与 CCD 相机 (Spot) 相连并配有图象处理软件 (Image Pro+, Soft Imaging) 的显微镜 (Zeiss Axioplan2) 检测。该软件可以将每个点的信号强度转换成 0 (黑, 无信号) 至 255 (白, 饱和信号) 的数值形式。

重复以上程序以进行比较，但不使用 DNA 目标物以测试杂交反应的特异性，或使用无病毒血清 (HIV-)。

获得结果如表 1 所示：

表 1

血清	DNA 目标物的存在	C+点的强度	C-点的强度	P24-MAVE 点的强度
HIV+	是	103	48	115
HIV-	是	108	45	45
HIV+	否	47	45	109
HIV-	否	46	51	48

以上结果显示了令人十分满意的反应特异性。DNA 目标物的存在不影响 P24 抗原和抗 P24 抗体的免疫反应识别。相反，DNA 目标物在核酸探针点上的杂交在介质中存在抗体的情况下也是可能的。这种或另一种分析物的存在不会产生不需要的背景噪音。无论怎样，C-点都不

会被检出，对于 HIV-血清也一样。

实施例 4: 根据本发明方法对检测进行定性和定量测定

重复实施例 1 和 2 中的程序，所不同的是 DNA 目标物的浓度和 HIV+血清的稀释度改变了。

杂交反应和免疫反应的检测如下进行：

每孔加入如下混合液：30 μ L 反应缓冲液 A、10ng 碱性磷酸酶缀合的山羊抗人抗体（Jackson ImmunoResearch）和 25ng 碱性磷酸酶标记的链霉亲和素（Sigma）。该混合物放于 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。用 PBS-tween 冲洗每孔。

每孔加入 30 μ L 碱性磷酸酶的荧光底物（ECF, Amercham, 即用型）。5 分钟即可实现可视化，接着吸去底物，按实施例 3 中所述方法测量每个点的荧光强度。

图 1A 和图 1B 给了荧光强度与 PCR 产物或血清稀释度的关系图。为清楚起见，图 1A 给出的是在 p24 蛋白-MAVE 聚合物缀合物点上测得的信号。图 1B 给出的是同样孔中 C+点（菱形）和 C-点（正方形）上测得的信号。

在图 1A 中，可以观察到作为孔中血清浓度的函数的荧光信号线性增加，在小于 1/1000 的稀释度时达到平稳。因此可以通过本发明来进行定量检测。根据统计方法，估计检测极限为 0.00001，这相应于 1/100000 的血清稀释度。这么高的灵敏度使它可以检测 HIV 感染后的血清变化。

在图 1B 中，获得了与用系列稀释的血清所观察到的相似的图表。在特异性点 C+（菱形）上，荧光信号作为 DNA 目标物浓度的函数而增加。另一方面，该信号保持稳定，与它在 C-点上缺乏目标物时所得的水平相似，其中 C-点不能与目标物发生杂交反应（正方形）。估计检测极限为 0.00007，也就是将 PCR 产物稀释 1/14000。

实施例 5: 改变反应温度和缓冲液的影响

重复实施例 4 的程序，所不同的是也使用了 pH7.5 的反应缓冲液 B

(由 160mM HEPES、0.5M 氯化锂和 0.05% tween20 组成)，并且反应温度改为 41℃。

在本实验中，未使用含有病毒的血清 (HIV+) 和不识别病毒 DNA 的目标物 (C-)。

具体结果如下表 2。

表 2

温度	反应缓冲液	C+点的信号	P24-MAVE 点的信号
37℃	A	2.1	3.8
37℃	B	1.8	2.7
41℃	A	1.6	3.6
41℃	B	1.3	1.8

实施例 6: 在检测芯片上同时检测 HIV、HBV 和 HCV 病毒引起的病毒感染

6.1 用于检测组合的核酸和蛋白质参数的生物学工具

6.1.1 杂交反应

使用了由 Ambion (Austin, Texas, USA) 获得的 HIV RNA 目标物。由 Eurogentec (Seraing Belgium) 合成了生物素化的引物 (SK431, TGC TAT GTC AGT TCC CCT TGG TTC TCT 和 SK462 AGT TGG AGG ACA TCA AGC AGCCAT GCA AAT) 和用于俘获 PCR 产物的氨基化的俘获探针 (C_{HIV}: GAG ACC ATC AAT GAG GAA GCT GCA GAA TGG GAT)。

HCV 病毒的 RNA 是使用 Nucleospin RNA Virus 试剂盒 (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) 由慢性病患者血清中提取出，并通过 RT-PCR 用生物素化的引物扩增 (RC21: CTC CCG GGG CAC TCG CAA GC 和 RC1: GTG TAG CCA TGG CGT TAG TA) (Reque Afonso A.M., 2000, Journal of Virological Methods, 86, 55-60)。氨基化的 HCV 俘获探针序列为 C_{HCV} (CAT AGT GGT CTG CGG AAC CGG

TGA GT)。HIV 和 HCV 的 RNA 都使用 Promega 的 Access 试剂盒 (Madison, WI, USA) 通过 RT-PCR 扩增, 反应条件如下: 1X AMV/Tf1 反应缓冲液、1.8mM 硫酸镁、0.2mM dNTP、1 μ M 引物、1USI 的 AMV 反转录酶和 5USI 的 Tf1 DNA 聚合酶; 循环温度 48 $^{\circ}$ C, 45 分钟; 35 个 PCR 循环(94 $^{\circ}$ C, 30 秒; 60 $^{\circ}$ C, 1 分钟; 68 $^{\circ}$ C, 2 分钟); 68 $^{\circ}$ C 最终延伸 7 分钟。

扩增子用琼脂糖加溴乙锭胶电泳, 扩增产物浓度使用质量梯度 (Eurogentec) 估测 (HIV 扩增子为 46nM, HCV 扩增子为 23nM)。

在 Eurogentec 合成衍生自 HBV 基因的单链合成目标物 (74bp) (CCC AGT AAA GTT CCC CAC CTT ATG AGT CCA AGG AAT TAC TAA CAT TGA GAT TCC CGA GAT TGA GAT CTT CTG CGA), 以及都与 HBV 目标物互补的氨基化俘获探针 (C_{HBV} : ATC TCG GGA ATC TCA ATG TTA G) 和生物素标记的检测探针 (D_{HBV} : TAT TCC GAC TCA TAA GGT G)。

6.1.2 免疫反应

申请人已生产了 HCV 核心蛋白 (HCV 核心) 和 HIV 包膜蛋白 (gp160)。使用了两种不同的 HBV 表面抗原 (HBsAg), 即亚型 Ay 抗原 (Hytest, Turku, Finland) 和 Cliniaq 血浆亚型 Ad 抗原 (Fallbrook, CA, USA)。

为了保证检测的特异性, 使用了两种非特异于本实验的小鼠抗体, 分别为抗-TSH 抗体 (NSP_1) 和抗-HCG 抗体 (NSP_2)。

Lyon 医院提供了 HIV、HBV 和 HCV 人血清。

Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA) 提供了碱性磷酸酶标记的山羊抗人 IgG 缀合物; 碱性磷酸酶标记的链霉亲和素来自 Sigma (St Quentin, France)。

6.2 检测芯片的制备和生物检测流程

6.2.1 俘获配偶体的沉积

将多核苷酸在用于吸附该多核苷酸的反应缓冲液 (50mM 磷酸, 450mM 氯化钠, 1mM EDTA; pH7.4) 中稀释为 10 μ M。

非特异性 IgG 用 50mM 碳酸盐溶液 (pH9.3) 稀释成 50 μ g/mL。
gp160、HBAg 和 HCW 核心蛋白在 PBS 溶液中稀释至 10 μ g/mL。

沉积使用 Biochip Arrayer 装置 (Perkin Elmer, Boston, USA) 进行。在白色微量滴定板 (Greiner, Longwood, USA) 中以环状形式沉积 16 + 1 个点 (两份) (图 2)。

沉积并在受控温度条件 (10 $^{\circ}$ C) 和湿度条件 (50%) 下孵育后, 用 PBS-Tween (0.05%) 清洗平板, 晾干, 存放于 4 $^{\circ}$ C。

6.2.2 核酸目标物和抗体的俘获

使用了下列各种分析物组合:

I: HBV 目标物

II: HIV 目标物

III: HBV 血清

IV: HIV 血清

V: HBV + HIV 目标物

VI: HBV + HIV + HCV 目标物

VII: HBV + HIV + HCV 目标物 + HBV 血清

VIII: HBV + HIV + HCV 目标物 + HBV 血清 + HIV 血清

为此, 每孔加入: 1.5 μ L 由 1.5 μ L 0.2N 氢氧化钠事先变性的 HIV 或 HCV 扩增产物; 3 μ L 10nM 的合成 HBV DNA; 1 μ L 稀释至 1/10 的人血清。用反应缓冲液 (0.1M 磷酸二氢钠/磷酸氢二钠; 0.5M 氯化钠; 0.65% tween20; 2% PEG 4000; pH7) 补至总体积 30 μ L, 将溶液在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1h, 接着用 PBS - tween 0.05% 混合物洗涤。

6.2.3 检测

用 0.2 μ M D_{HBV} 溶液 (HBV 检测) 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育平板 30min, 接着清洗。而后在 0.5 μ g/mL 的链霉亲和素-碱性磷酸酶和碱性磷酸酶标记的山羊抗人抗体 (μ g/mL) 溶液存在下对平板进行孵育。接着用 PBS-Tween 0.05% 清洗平板, 向每个孔中加入碱性磷酸酶的沉淀底物

(BM purple, Roche, Basel, Switzerland)。使用与图象分析软件相连的 CCD 相机对平板照相，从而有可能来确定每点的平均灰度水平。

所得结果如下表 3

分析物组合	点的预期位置	点的实测位置	与每个分析物相关的灰度水平 (a.u.)
I	3, 11	3, 11	34 935
II	1, 9, 17	1, 9, 17	38 144
III	8, 16	8, 16	33 664
IV	5, 13	5, 13	12 480
V	3, 11	3, 11	43 605
	1, 9, 17	1, 9, 17	49 470
VI	3, 11	3, 11	43 350
	1, 9, 17	1, 9, 17	48 832
	7, 15	7, 15	14 917
VII	3, 11	3, 11	36 465
	1, 9, 17	1, 9, 17	42 712
	7, 15	7, 15	11 857
	8, 16	8, 16	45 772
VIII	3, 11	3, 11	34 807
	1, 9, 17	1, 9, 17	40 290
	7, 15	7, 15	11 730
	8, 16	8, 16	42 840
	5, 13	5, 13	12 240

相关孔显示是被孵育的分析物性质的函数，这表明杂交反应和免疫反应在同样的操作条件下进行，特别是在同样的缓冲液中和同样的温度下进行，甚至当俘获配偶体为不同疾病的标记时也是如此。

<110> bioMérieux

<120> 同时检测杂交反应和免疫反应的方法

<130> Multidetecion

<150> FR 02/06883

<151> 2002-06-05

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 俘获寡核苷酸 C+

<400> 1

cgcttcgaca gcgacgtggg g

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 俘获寡核苷酸 C-

<400> 2

tatgaaactt atggggatac

20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 A	
<400> 3	
catgtgctac ttcaccaacg g	21
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 B	
<400> 4	
ctggtagttg tgtctgcaca a	21
<210> 5	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 SK431	
<400> 5	
tgctatgtca gttccccttg gttctet	27
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 SK462	
<400> 6	
agttggagga catcaagcag ccatgcaaat	30

-
- <210> 7
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 俘获探针 C HIV
- <400> 7
 gagaccatca atgaggaagc tgcagaatgg gat 33
- <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 引物 RC21
- <400> 8
 ctccccggggc actcgcaagc 20
- <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 引物 RC1
- <400> 9
 gtgtagccat ggcgtagta 20
- <210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 俘获探针 C HCV

<400> 10	
catagtggtc tgcggaaccg gtgagt	26
<210> 11	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HBV target	
<400> 11	
cccagtaaag ttccccacct tatgagtcca aggaattact aacattgaga ttcccgagat	60
tgagatcttc tgcga	75
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 俘获探针 HBV	
<400> 12	
atctcgggaa tctcaatggt ag	22
<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> D HBV	
<400> 13	
tattccgact cataaggtg	19

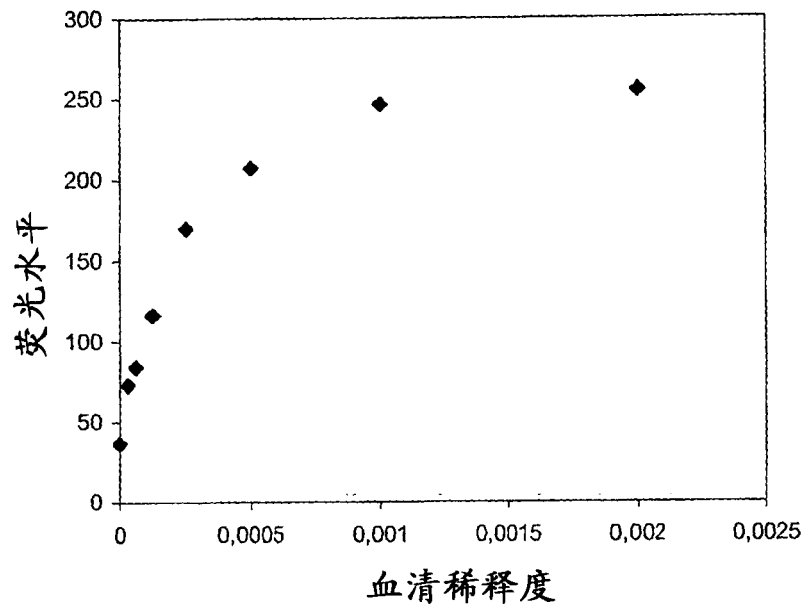


图 1A

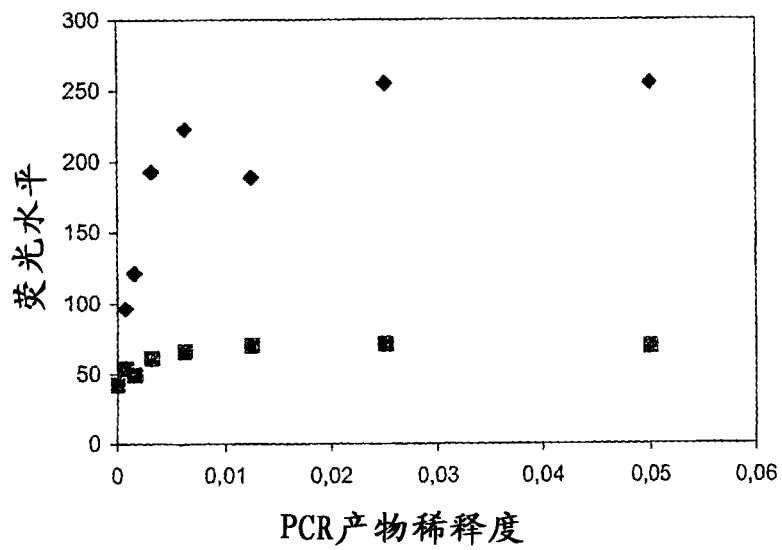


图 1B

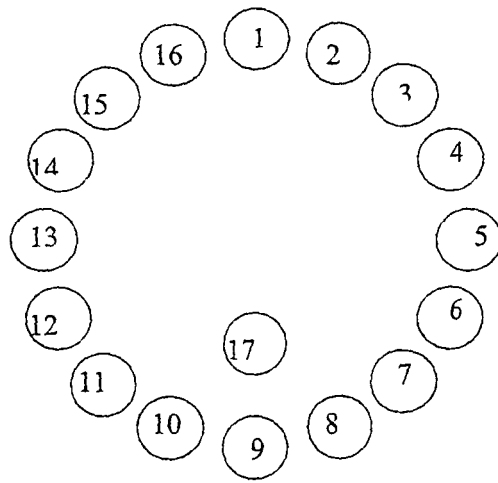


图 2

专利名称(译)	同时检测杂交和免疫反应的方法以及其在诊断方面的应用		
公开(公告)号	CN1659286A	公开(公告)日	2005-08-24
申请号	CN03812955.8	申请日	2003-06-03
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	拜奥默里克斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜奥默里克斯公司		
[标]发明人	B曼德兰德 A佩林 A瑟尔茨		
发明人	B·曼德兰德 A·佩林 A·瑟尔茨		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/543 C12Q1/6883		
代理人(译)	程泳		
优先权	2002006883 2002-06-05 FR		
其他公开文献	CN100467612C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种在样品中同步检测杂交反应和免疫反应的方法，所述样品可能包含由至少一种核酸和至少一种不同性质的其它配体组成的目标分析物。本发明方法包含以下步骤：(i)将一定量已知体积的稀释于反应缓冲液中的样品加在反应液中预先包被用于俘获目标分析物的配偶体的俘获表面，该俘获配偶体由至少一种核酸探针和至少一种抗配体组成；(ii)在15°C至60°C之间的温度反应；(iii)使这样获得的杂交反应和免疫反应可视化。本发明还涉及该方法的应用：可用于检测传染、代谢、病毒引起的疾病；细菌存在与否的工业诊断；检测和/或定量测定生物分子等。本发明进一步涉及该方法在诊断中的应用，以及用于执行本发明方法的生物学或诊断测试试剂盒。

