



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105388293 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 09

(21) 申请号 201510783013. 5

(22) 申请日 2009. 12. 30

(30) 优先权数据

61/142, 048 2008. 12. 31 US

(62) 分案原申请数据

200980153231. 3 2009. 12. 30

(71) 申请人 雅培医护站股份有限公司

地址 美国新泽西

(72) 发明人 G·B·科里尔 C·J·米勒

(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 傅宇昌

(51) Int. Cl.

G01N 33/58(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书1页 说明书30页

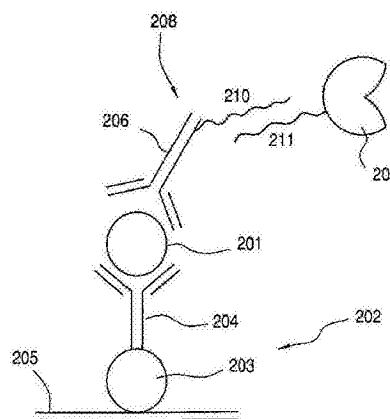
序列表2页 附图23页

(54) 发明名称

用于使用核苷酸缀合物的免疫测定的方法和设备

(57) 摘要

用于免疫测定设备和方法的物质组合物, 其包含共价地连接至第一核苷酸的信号抗体, 例如, FAB 片段; 和一个或多个信号元件, 例如信号酶 (例如 ALP) 或荧光染料, 各自共价地连接至第二核苷酸, 其中第一核苷酸具有一个或多个重复序列, 并且第二核苷酸与所述第一核苷上的一个或多个重复序列之一结合, 以及其中信号抗体与信号元件的比率受重复序列的数目控制。



1. 用于进行免疫测定的一次性盒,其包括:
用于接受怀疑含有靶分析物(201)的生物样品的样品入口(4);
包含电极(205)的管道(15);
包含具有共价连接的抗体(204)的羧基衍生的聚苯乙烯珠(203)的捕获珠(202),其中所述捕获珠(202)位于所述电极(205)的上方;
共价连接至第一单链核苷酸(210/313)的第一抗体种类(206/302);和
多个各自连接至具有所述第一单链核苷酸(210/313)的互补碱基对的第二单链核苷酸(211/314)的信号元件(207/307),
其中所述第一抗体种类(206/302)在所述样品入口(4)的下游位置处被置于处于所述管道(15)内的增溶剂中,并且
其中所述第一单链核苷酸(210/313)包含至少三个重复序列,所述至少三个重复序列被构造成结合具有至少三个所述多个信号元件(207/307)的至少三个所述第二单链核苷酸(211/314)。
2. 权利要求1的盒,其中所述多个信号元件(207/307)包括选自荧光、比色和放射性元素的非酶促检测部分。
3. 权利要求1的盒,其中所述第一抗体种类(206/302)共价连接至第三单链核苷酸(310)。
4. 权利要求3的盒,其进一步包括共价连接至第四单链核苷酸(309)的第二抗体种类(301),其中所述第三单链核苷酸(310)包含与所述第四单链核苷酸(309)的结合区域互补的结合区域。
5. 权利要求4的盒,其中所述第一抗体种类(302)和所述第二抗体种类(301)在所述样品入口(4)的下游位置处被置于处于所述管道(15)内的所述增溶剂中。
6. 权利要求4的盒,其中所述第一抗体种类(302)不同于所述第二抗体种类(301)。
7. 权利要求4的盒,其中所述第一抗体种类(302)结合所述靶分析物(201)的第一表位,并且所述第二抗体种类(301)结合所述靶分析物(201)的第二表位,其中所述第一表位不同于所述第二表位。
8. 权利要求4的盒,其中所述第一抗体种类(302)和所述第二抗体种类(301)在所述电极(205)的上游位置处被置于处于所述管道(15)内的所述增溶剂中。
9. 权利要求1的盒,其中所述多个信号元件(207/307)选自碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶、尿素酶、辣根过氧化物酶、半乳糖氧化酶和 β -半乳糖苷酶。
10. 权利要求1的盒,其中每个第二单链核苷酸(211/314)包含共价连接至所述信号元件(207/307)的间隔子序列(213/317)。

用于使用核苷酸缀合物的免疫测定的方法和设备

[0001] 本申请是申请日为2009年12月30日、申请号为200980153231.3、发明名称为“用于使用核苷酸缀合物的免疫测定的方法和设备”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 引用参考相关申请

[0003] 本申请要求2008年12月31日提交的美国临时申请号61/142,048的优先权,将其通过引用以其全部并入本文。

[0004] 发明背景

发明领域

[0005] 本发明涉及使用核苷酸缀合物进行各种用于确定分析物在样品中的存在的测定的方法和设备。

[0006] 背景信息的讨论

[0007] 一些低浓度靶分析物的检测对于一些疾病的早期诊断是重要的。例如,最近的研究暗示测量水平低于典型商业测定水平的心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 为临床医生提供了有价值的信息。注意,甚至极低水平(即低于被认为指示急性心肌梗塞的水平)的 cTnI 可预示着将来不利的心血管状态。例如, Zethelius 等人, (2006, “Troponin I as a predictor of Coronary Heart Disease and Mortality in 70-year-old men: A community-based cohort study”, *Circulation*, 第 113 卷:1071-1078) 进行了研究以调查心脏 TnI 浓度与未来冠状动脉心脏病的预测之间的关系。他们观察到在未显示心脏血管疾病的临床迹象但展现轻微升高的心脏 TnI 水平的 70 岁老年男性中,可预测即将出现的冠状动脉心脏病事件。此外, Apple 等人, (2008, “Use of the Centaur TnI-Ultra Assay for Detection of Myocardial Infarction and Adverse Events in Patients Presenting With Symptoms Suggestive of Acute Coronary Syndrome”, *Clinical Chemistry*, 第 54 卷 (4):723-728) 在灵敏肌钙蛋白测定中进行了研究以评估基于检测极限处的 cTnI 值和第 99 个百分位参考值而评估短期不利事件的风险的预后价值。他们推断“我们的数据增加了日益增加的证据:使用改进的分析上强劲的、具有低 LoD [检测的水平] 的 cTn 测定,与低于测定的 LoD 的 cTnI 浓度相比,任何可测量的 cTnI 意味着更高的风险。”

[0008] 目前的即时护理 (point-of-care) 免疫测定技术,尽管其测量各种靶分析物的存在和浓度的能力是具有高度价值的,但其在可靠地检测极低水平的靶分析物例如 cTnI 的能力上比较有限。因此,存在对可靠地检测低水平靶分析物例如 cTnI 的需要,特别是在即时护理免疫测定分析物检测设备中。

[0009] 美国专利 No. 7, 419, 821 (将其全部通过引用而并入本文) 利用了夹心测定法,其中将两种捕获抗体固定在电极上并且用信号酶(例如碱性磷酸酶 (ALP)) 标记两种信号抗体(例如 FAB (片段抗原结合) 抗体片段) 以形成信号缀合物。分析物(例如抗原(例如 cTnI)) 与捕获抗体和信号抗体结合以形成夹心测定,该测定提供了表示分析物存在的信号。常规地,通过交联技术使信号抗体与信号酶结合以形成信号缀合物。这些合成条件导致下列的宽泛范围:信号抗体与标记酶的比率,以及信号酶的数量 / 信号缀合物,和信号抗

体的数量/缀合物。例如,对于FAB抗体片段,通常存在具有从无(0)FAB/信号缀合物-估计15个FAB/信号缀合物的信号缀合物统计群体。因此,通常通过尺寸排阻层析纯化合成的信号缀合物来产生具有更窄范围的信号抗体(例如FAB分子)/信号缀合物的信号缀合物群体。然而,此类纯化技术不合期望地导致减少的可预测性以及下列的可变比率:(i)信号抗体与信号酶(例如,FAB与ALP);(ii)信号酶与信号缀合物;和(iii)信号抗体与信号缀合物。这些可变比率限制了夹心测定可靠地检测样品中极低水平的靶分析物的能力。

[0010] 用于评估样品(包括体液和环境样品)中分析物(例如抗原分子)的浓度的基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的测定通常需要将信号抗体共价地连接至信号酶以产生测定的检测组分的能力。该技术的历史和综述可见于Lequin(2005, *Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, *Clinical Chemistry*, 第51卷(12):2415-2418)中。存在对增加ELISA测定的灵敏度的需要,因为一些抗原以极低的浓度存在。

[0011] 美国专利No. 5,164,311公开了通过将巯基添加至抗体以及将马来酰亚胺基添加至酶以产生经修饰的抗体和酶,并使经修饰的抗体与酶反应以产生缀合物来产生抗体-酶缀合物。如此,‘311专利提出:“提供下列标记系统将是有益的:其中直接抗体-酶缀合物可实现高的酶与抗体的比率,并从而提供接近或等于抗生物素蛋白-生物素标记系统的更高层次的灵敏度。此种改进的直接抗体-酶缀合物将不需要如生物素-抗生物素蛋白标记系统所需要的额外的温育步骤和洗涤步骤”。‘311专利描述了对于酶-抗体缀合物使用含有具有交联巯基和马来酰亚胺基能力的交联分子的交联剂(例如SPDP),然而在其用于合成寡核苷酸方面没有记载。

[0012] 已开发了用于DNA杂交技术(如Southern杂交)的分子生物学应用的、基于酶和合成寡核苷酸的缀合物的合成(Reyes&Cockerell,1993,“Preparation of pure oligonucleotide-alkaline phosphatase conjugates”,*Nucleic Acids Research*,vol 21(23):5532-5533)。此类缀合物的所述应用没有预见其用于基于ELISA的测定。

[0013] 随着极灵敏的DNA扩增策略(例如美国专利No. 5,656,493及其它文献所涉及的聚合酶链式反应(PCR))的发展,已认识到ELISA和PCR的组合可增加检测灵敏度。例如,Sano等人,(2000,“Immuno-PCR:very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates”,*Science*,第258卷(5079):120-122)描述了该策略用于抗原检测的最早的应用之一。存在许多关于该方法的应用的参考文献,包括Kozlov等人,(2004,“Efficient strategies for the conjugation of oligonucleotides to Antibodies Enabling Highly Sensitive Protein Detection”,*Biopolymers*,第73卷:621-630),他们描述了合成寡核苷酸抗体缀合合成策略以及此类特异性缀合物用于高灵敏度检测的应用。该方法与本发明不同,因为合成寡核苷酸被用于随后的DNA扩增,而这用作灵敏的检测方法。

[0014] DNA扩增(例如PCR)的用途是有限的,因为其不允许将合成寡核苷酸-抗体缀合物用于现有的ELISA系统,并且其还需要利用要求专用设备的热循环能力。Adler在W02008/122310中描述了用于免疫测定的相关PCR法。许多相关策略已由Adler等人,(2008,“Sensitivity by combination:immuno-PCR and related technologies”,*Analyst*,第133卷:702-718);和Niemeyer等

人, (2005, “Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification”, Trends in Biotechnology, 第 23 卷 (4): 208-216) 综述。

[0015] Cantor 和 Chuck (美国专利 5, 635, 602) 描述了使用抗生物素蛋白 / 链霉抗生物素蛋白结合连接的双 - 蛋白质缀合物, 他们教导将其用于免疫测定和 PCR 测定。例如, 将第一抗体通过二硫键连接于 DNA 并且用生物素在另一端标记互补 DNA。生物素可结合还结合生物素化的辣根过氧化物酶 (HRP) 的链霉抗生物素蛋白。所述 HRP 可与底物反应以产生化学发光信号。本公开内容不同, 因为其不教导使用生物素 - 链霉抗生物素部分, 相比于多价链霉抗生物素分子, 所述生物素 - 链霉抗生物素部分不允许高度的控制。

[0016] Tennila 等人, (2008, “Peptide-oligonucleotide conjugates form stable and selective complexes with Antibody and DNA”, Bioconjugate Chemistry, 第 19 卷 (7): 1361-1367) 描述了用于抗体表位定位的、缀合至合成寡核苷酸的短寡肽。他们在 ELISA 测定方面没有记载。

[0017] Ketomaki & Lonngberg, 2006, (“A Mixed-Phase Immunoassay Based on Simultaneous Binding of Fluorescently Tagged and PNA-Conjugated peptide Epitopes on Antibodies: Quantification on PNA-Coated Microparticles”, Bioconjugate Chemistry, 第 17 卷: 1063-68.) 描述了其中有完整抗体 (具有 2 个 F(ab) 结合部分) 的系统, 在所述抗体中, 一个 F(ab) 结合部分结合具有荧光标签的肽, 而另一个 F(ab) 结合部分结合具有核酸序列的肽 (PNA)。PNA 结合微粒上的互补 PNA。这些作者未描述使用酶或抗体的共价连接, 而是描述了使用抗体与结合微粒的分子的非共价结合。另一种非共价结合方法被用于产生信号的抗体。

[0018] Wacker 等人, (2004, “Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin-biotin attachment: a comparative study”, Analytical Biochemistry, 第 330 卷: 281-287) 描述了使用共价地连接至捕获抗体的合成寡核苷酸来产生抗体阵列, 他们将其定义为 DNA 引导固定 (DNA-directed Immobilization) (DDI)。合成寡核苷酸抗体缀合物的另一个应用是将捕获抗体固定至固体载体上 (Jung 等人, 2008, “Recent Advances in immobilization methods of antibodies on solid supports”, Analyst, 第 133 卷: 697-701)。该应用与本方法的差异在于其未教导将抗体固定于固体载体。Lovrinovic 等人, (2002, “Synthesis of protein-nucleic conjugates by expressed protein ligation”, Chemical Communications, issue 7: 822-823) 公开了蛋白质 - 核酸缀合物, 其中重组蛋白质是以利用 DNA 引导固定的蛋白质内含子 (intein) 序列设计的。蛋白质内含子为约 150 个氨基酸的多肽序列, 其可“从伴有侧翼多肽 (蛋白质外显子 (extein)) 连接的初级翻译产物”中自我切除 (Cook 等人, 1995, “Photochemically Initiated protein splicing”, Angewandte Chemie International Edition in English, 第 34 卷 (15): 1629-1630)。在该论文中, Lovrinovic 使用了表达的蛋白质, 该蛋白质包含具有共价连接的蛋白质内含子序列和之后的壳多糖结合结构域的重组蛋白质。首先在壳多糖柱上利用该壳多糖结合结构域纯化该多功能蛋白质杂合体分子。在纯化后向反应中加入包含与合成寡核苷酸序列共价连接的化学合成的半胱氨酸肽的其它分子, 在通过转酯作用切除蛋白质内含子区域并接着连接化学连接的半胱氨酸 - 合成寡核苷酸杂合体后, 所述其它分子被连接至重组蛋白的羧基末端。这

现在产生了具有共价连接至半胱氨酸-合成寡核苷酸杂合体的、不含有蛋白质内含子序列的重组蛋白的分子。然后可将该新型分子用于将抗原(所述重组蛋白质)结合至与固体载体结合的互补的合成寡核苷酸,与 DDI 技术非常相似而在本申请中是用抗原或重组蛋白质分子替代了抗体。

[0019] Fan 等人,2008(“Integrated Barcode chips for rapid,multiplexed analysis of protein in microliter quantities of blood”,Nature Biotechnology,Advance Online Publication) 描述了该 DDI 技术的另一种变型。

[0020] Heyduk 等人,(2008,“Molecular Pincers:Antibody-Based Homogeneous Protein Sensors”,Analytical Chemistry,第 80 卷:5152-5159) 描述了基于荧光共振能量转移(FRET)的抗体检测技术,其中一个抗体分子具有缔合的第一合成寡核苷酸(所述寡核苷酸具有供体发色团),而第二抗体分子在抗原上的另一个位置上结合相同的抗原并且具有缔合的第二合成寡核苷酸(该寡核苷酸与第一合成寡核苷酸序列互补并具有受体发色团)。抗原上两个抗体的紧密靠近允许合成寡核苷酸序列杂交,从而使供体和受体发色团彼此紧密靠近,这减少了所产生的荧光。这是均相抗原检测法并且不采用捕获抗体。

[0021] Niemeyer 等人,(2002,“DNA-directed Assembly of Bienzymic complexes from In Vivo Biotinylated NAD(P)H:FMN Oxidoreductase and Luciferase”,(ChemBio Chem, No 02-03:242-245) 描述了使用 DNA 引导的组织的空间有序的多酶复合物(MEC),但在 ELISA 和更灵敏的免疫测定测试的发展方面没有记载。

[0022] Seeman,(1999,“DNA engineering and its application to nanotechnology”,TIBTECH,第 17 卷:437-443) 描述了 DNA 支架的应用,其中互补的合成寡核苷酸序列可被设计为用于产生独特的结构,但在 ELISA 测定方面没有记载。

[0023] Niemeyer,(2000,“Self-assembled nanostructures based on DNA:towards the development of nanobiotechnology”,Current Opinion in Chemical Biology,第 4 卷:609-618) 描述了应用 DNA 产生用于有序结构的支架骨架,但在 ELISA 和其它更灵敏的免疫测定方面没有记载。

[0024] Storhoff&Mirkin,(1999,“Programmed materials synthesis with DNA”,(Chemical Review,第 99 卷:1849-1862) 描述了使用 DNA 作为支架材料,但在其对于 ELISA 测定的用途方面没有记载。

[0025] Niemeyer 等人,(1998,“Covalent DNA-Streptavidin Conjugates as Building Blocks for novel Biometallic Nanostructures”,Angew.Chem.Int.Ed.,第 37 卷(16):2265-2268) 描述了使用 DNA 支架以产生具有多-链霉抗生物素蛋白分子聚集体的有结构的分子,其中使用连接至生物金属聚集体(biometallic aggregate)的该聚集体的生物素链霉抗生物素蛋白免疫球蛋白。

[0026] Tomkins 等人,(2001,“Preparation of Symmetrical and Unsymmetrical DNA-Protein Conjugates with DNA as a molecular Scaffold”,ChemBio Chem, Issue 5:375-378) 描述了产生链霉抗生物素-DNA 缀合物,关于链霉抗生物素蛋白-DNA 哑铃通过原子力显微镜检查使其成像。该参考文献在 ELISA 和其它灵敏的免疫测定方面没有记载。

[0027] Takeda 等人,(2008,“Covalent split protein fragment-DNA hybrids generated through N-terminus specific modification of proteins by

oligonucleotides”, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 第 6 卷 :2187-2194) 描述了使用连接至脱落蛋白的 DNA 杂合体来形成活性酶分子,但未预见 ELISA 或其它灵敏的免疫测定。

[0028] Niemeyer 等人, (1994, “Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semi-synthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates”, *Nucleic Acids Research*, 第 22 卷 (25):5530-5539) 描述了使用生物素化的抗体和生物素化的碱性磷酸酶以及与两个 DNA 序列连接的链霉抗生物素蛋白产生的抗体与 ALP 酶之间的杂合体,其中所述两个蛋白质通过生物素 - 链霉抗生物素结合而彼此结合。本发明描述了使用结合生物素化的抗体和碱性磷酸酶分子的末端链霉抗生物素蛋白分子、直接通过 DNA 杂交而构架在一起的两个分子。因为末端结合部分是链霉抗生物素蛋白,其不提供如对于共价结合的合成寡核苷酸序列将发现的受控合成的水平,因为例如,多价链霉抗生物素蛋白分子可结合被生物素化的抗体或碱性磷酸酶分子。

[0029] Duckworth 等人, (2007, “A Universal Method for the preparation of Covalent Protein-DNA Conjugates for use in Creating Protein Nanostructures”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 第 46 卷 :8819-8822) 描述了使用 DNA-蛋白质结构作为支架结构以精确地连接绿色荧光蛋白,但在 ELISA 和其它免疫测定技术方面没有记载。

[0030] Niemeyer, (2000, “Self-assembled nanostructures based on DNA: towards the development of nanobiotechnology”, *Current Opinion in Chemical Biology*, 第 4 卷 :609-618) 描述了使用共价连接的 DNA 的蛋白质装配结构的用途,但在 ELISA 和其它免疫测定技术方面没有记载。

[0031] Kawabata 等人, (2005, “Liquid-Phase Binding Assay of alpha-Fetoprotein Using DNA-Coupled Antibody and Capillary Chip Electrophoresis”, *Analytical Chemistry*, 第 77 卷 :5579-5582) 开发了基于层析的免疫测定,其中他们加入 DNA 缀合的抗体分子和抗原并且通过层析后增加的分子量确定抗原结合的存在,在该特定的测定中,他们使用了毛细管电泳。该方法既未使用捕获抗体也未使用如 ELISA 测定中所用的酶缀合物,从而与本发明不同。

[0032] Zhang & Guo, (2007, “Multiple labeling of Antibodies with Dye/DNA Conjugate for Sensitivity Improvement in Fluorescence Immunoassay”, *Bioconjugate Chemistry*, 第 18 卷 (5):1668-1672) 描述了免疫检测的方法,该方法首先需要将抗原固定至固体载体,然后加入生物素化的抗体,然后使用与荧光标记的合成寡核苷酸连接的生物素 - 链霉抗生物素 - 生物素部分。该概念与本发明不同。

[0033] Zhu 等人 (2008, “Part-per-trillion level detection of estradiol by competitive fluorescence immunoassay using DNA/dye conjugate as antibody multiple labels”, *Analytica Chimica Acta*, 第 624 卷 :141-146) 使用了加有荧光标签的 DNA 来增加信号。合成寡核苷酸包含多个荧光标签和与链霉抗生物素蛋白结合的生物素,所述寡核苷酸转而与生物素化的抗体结合。该构建的目的是增加与抗体缔合的荧光标签的数目,从而增加信号水平。这至少由于下述原因而本发明不同:合成寡核苷酸被共价连接至抗

体。

[0034] Niemeyer 等人, (2001, “Nanostructured DNA-Protein Aggregates Consisting of Covalent Oligonucleotide-Streptavidin Conjugates”, *Bioconjugate Chemistry*, 第 12 卷 (3):364-371) 生成了链霉抗生物素蛋白-生物素-DNA-生物素-链霉抗生物素蛋白-生物素-DNA-生物素-链霉抗生物素蛋白的多聚体的纳米结构, 其结合生物素化的抗体以产生用于免疫-PCR 反应的结构。这与本发明不同。

[0035] Kujipers 等人, (1993, “Specific Recognition of Antibody-Oligonucleotide Conjugates by Radiolabeled Antisense Nucleotides: A Novel Approach for Two-Step Radioimmunotherapy of Cancer”, *Bioconjugate Chemistry*, 第 4 卷:94-102) 生成了 DNA 抗体缀合物, 其用于癌症患者的“预定位 (pre-targeted)”放射免疫治疗。这允许向靶向位点加入非放射性 DNA 抗体缀合物, 然后加入放射性标记的互补 DNA, 从而允许非常特异的放射治疗。本发明不涉及放射免疫疗法。

[0036] 发明概述

[0037] 在第一个方面, 本发明针对用于进行免疫测定的一次性盒 (cartridge), 其包括用于接受怀疑含有靶分析物 (例如抗原) 的生物样品的样品入口、含有电极的管道、含有洗涤液的区域和废料室 (waste chamber)。在电极上形成夹心测定。夹心测定包括结合至靶分析物 (例如抗原) 的固定的第一抗体、针对所述靶分析物 (例如抗原) 的第二抗体, 其中所述第二抗体连接至第一单链核苷酸; 以及各自连接至具有所述第一单链核苷酸的互补碱基对的第二单链核苷酸的一个或多个信号元件 (例如, 信号酶或荧光染料)。洗涤液能够将生物样品从管道中的电极洗涤到废料室中。在其中信号元件是信号酶的实施方式中, 所述盒还包括含有酶底物的区域, 所述酶底物能够与信号酶反应以在电极处产生与生物样品中靶抗原的量成比例的信号。

[0038] 在本发明的第二个方面, 提供了用于免疫测定的物质组合物, 其包含: 共价地连接至第一核苷酸的 FAB 片段; 和各自共价地连接至第二核苷酸的一个或多个信号元件 (例如, 信号酶或荧光染料), 其中所述第一核苷酸具有一个或多个重复序列, 并且其中所述第二核苷酸结合至所述第一核苷酸上的所述一个或多个重复序列之一, 以及其中 FAB 片段与信号元件的比率受所述重复序列的数目控制。

[0039] 在本发明的第三个方面, 提供了测定生物样品中分析物的存在的方法, 其包括: 接触生物样品以使分析物结合固定的第一抗体和第二抗体以形成免疫测定, 其中所述第二抗体通过合成的核苷酸桥与至少一种信号酶结合; 从所述缀合物洗涤所述生物样品; 以及基于通过与信号酶反应而产生的信号测定分析物的存在。

[0040] 在本发明的第四个方面, 提供了确定患者是否可能患有心肌梗塞的方法, 包括: (a) 将患者的样品施用于能够结合 cTnI 上的第一表位的第一抗体所结合的表面; (b) 加入能够结合 cTnI 上的第二表位的第二抗体, 其中所述第二抗体还包含结合一个或多个第二链多核苷酸的第一链多核苷酸序列, 所述第二链多核苷酸结合信号元件 (例如, 信号酶或染料); 和 (c) 测定所述至少第二抗体的结合程度。

[0041] 附图简述

[0042] 结合本发明的非限定性优选实施方式的附图, 从下列描述, 我们的发明的上述和其它目的以及优势将得到更全面的表现, 其中在整个视图中相同的字符是指相同或相似的

部分,并且其中:

- [0043] 图 1 是用于检测目的分析物的标准夹心测定法的图示;
- [0044] 图 2 是用于检测目的分析物的标准 DNA 引导固定的图示;
- [0045] 图 3 是用于检测目的分析物的标准 DNA 引导固定的图示;
- [0046] 图 4 是具有结合至珠的核酸的标准检测测定的图示;
- [0047] 图 5 是根据本发明的实施方式使用 DNA 缀合物进行分析物的电化学检测的图示;
- [0048] 图 6 是根据本发明的实施方式使用聚合物 DNA 支架来将多个酶种类组合为缀合物进行分析物的电化学检测的图示;
- [0049] 图 7 是根据本发明的实施方式使用结合至检测抗体和信号酶的 DNA 进行分析物的电化学检测的图示;
- [0050] 图 8 是根据本发明的实施方式使用 DNA 而共价连接的抗体种类的图示;
- [0051] 图 9 是根据本发明的实施方式使用 DNA 共价连接的并且连接至酶的抗体种类的图示;
- [0052] 图 10 是根据本发明的实施方式使用 DNA 共价连接的、并且具有与每一个种类相连的 DNA 支架的抗体种类的图示;
- [0053] 图 11 是根据本发明的实施方式的酶缀合物装配的图示;
- [0054] 图 12 是根据本发明的实施方式使用聚合物 DNA 支架将不同酶种类组合为缀合物进行分析物的电化学检测的图示;
- [0055] 图 13 是根据本发明的实施方式使用聚合物 DNA 支架将不同酶种类组合为缀合物进行分析物的电化学检测的图示;
- [0056] 图 14 是根据本发明的实施方式的多抗原检测测定法的图示;
- [0057] 图 15A-15D 表示根据本发明的实施方式依赖于抗原结合的杂合种类的产生;
- [0058] 图 16A-16C 表示基于来自核酸链置换步骤的信号扩增的抗原分析检测;
- [0059] 图 17 是免疫传感器盒顶盖 (cover) 的等大俯视图;
- [0060] 图 18 是免疫传感器盒顶盖的等大仰视图;
- [0061] 图 19 是免疫传感器盒的胶带密封垫 (tape gasket) 的设计的附视图;
- [0062] 图 20 是免疫传感器盒底部的等大俯视图;
- [0063] 图 21 是免疫传感器盒的设计的示意图;
- [0064] 图 22 是免疫传感器盒内液体和气体通道的示意图,包括用于用干试剂修正液体的位点;
- [0065] 图 23: 根据本发明的实施方式来自尺寸排阻柱的发荧光级分;
- [0066] 图 24: 来自 ALP LC-SPDP 反应的 S300 柱级分;
- [0067] 图 25: 来自与经 DTT 处理的合成寡核苷酸反应的 ALP LC-SPDP 的 S300 柱级分;
- [0068] 图 26: 使用 WinISD 软件产生的在含有 'A' 的 i-STAT '免疫' 盒中测试的 ALP-A' 缀合物的 3 个稀释度 (10^1 (37.3ng), 10^2 (3.73ng)、 10^3 (0.37ng)) 的计时电流分析曲线;
- [0069] 图 27: 来自与 LC-SPDP 反应的 PEP-3F(ab')₂ 的 S300 柱级分;
- [0070] 图 28: 来自与经 DTT 处理的 A 合成寡核苷酸反应的 PEP-3F(ab')₂LC-SPDP 的 S300 柱级分;
- [0071] 图 29: 使用由向所用的样品中加入游离抗体或缀合物而进行的分析物竞争的

cTnI 盒的生产版本的计时电流分析曲线。[1] 稀释至 2.59ng/ml 的 MWC 92353 并且使用 2 μ L [5.2pg]。[2] 加入了 49.2ng PEP-3F(ab) 的分析物, [3] 加入了 61.8ng PEP-4F(ab) 的分析物, [4] 加入了 109ng E0031 缀合物的分析物;

[0072] 图 30: 来自含有 cTnI 捕获珠但无缀合物、加入了 E0030 [747ng]+E0031 [218ng] (有 [2] 分析物和无 [1]MWC 分析物) 的 i-STAT 免疫盒的计时电流分析结果; 以及

[0073] 图 31: 推定的克隆的限制性消化。

[0074] 优选实施方式详述

[0075] 在各种实施方式中, 本发明针对用于通过使用互补核苷酸序列的装饰链 (decorated strand) 制造和使用具有实质上窄的和 / 或可控制的比率或化学计量的信号缀合物的设备和方法。信号抗体优选以 DNA 的互补链与信号元件结合。如本文中所使用的, 术语“信号缀合物”是指结合至一个或多个信号元件的一个或多个信号抗体“信号元件”是指当通过信号抗体与分析物 (例如抗原) 结合时能够显示分析物的存在的元件。信号元件的实例包括例如, 信号酶 (例如碱性磷酸酶 (ALP)) 和荧光染料。在优选实施方式中, 信号缀合物包含结合至一个或多个 ALP 分子的一个或多个 (优选一对) 片段抗原结合 (FAB) 抗体片段。本标记方法导致对下列的高度控制: 信号抗体 (例如 FAB 片段) 与信号元件 (例如信号酶 (例如 ALP) 或荧光染料) 的比率、信号抗体的数目 / 信号缀合物和信号元件的数目 / 信号缀合物。

[0076] 常规夹心测定法通常形成对于 0-15 个 ALP/FAB 的可变的信号抗体与信号元件 (例如 FAB 对 ALP) 比率, 以及可变的分别地信号抗体和信号元件的数目 / 信号缀合物。由于这些可变的比率, 难以获得可对生物样品中低水平分析物更敏感的可预测信号。

[0077] 在一个实施方式中, 信号元件 (例如信号酶 (例如 ALP) 或荧光染料) 的平均数目 / 信号缀合物在约 1 至约 100, 例如 1 至约 5, 例如约 5 至约 10 或约 10 至约 100 的范围内, 同时相比于大的聚结物保持高的扩散系数。优选地, 这些范围是没有例如通过尺寸排阻层析分离信号缀合物以获得具有期望的信号元件数目 / 信号缀合物的步骤而可达到的。此外, 此类信号缀合物 (例如 FAB-ALP 缀合物) 可用于免疫测定, 其中具有可控制的 ALP 与 FAB 的比率允许操作者获得高度可预测的结果。可预测的结果可导致免疫测定的灵敏度提高, 从而导致对更低水平的靶分析物 (例如 cTnI) 的可靠检测。

[0078] 信号缀合物还优选地具有窄的信号元件与信号缀合物的比率的分布, 这为检测设备和方法提供了提高的精确度。例如, 在各种实施方式中, 至少 50wt. %, 例如至少 70wt. %, 至少 90wt. % 或至少 95wt. % 的形成的或用于检测设备或方法的信号缀合物具有 5-10 个信号元件 / 信号缀合物。在另一个实施方式中, 至少 50wt. %, 例如至少 70wt. %, 至少 90wt. % 或至少 95wt. % 的形成的或用于检测设备或方法的信号缀合物具有 1-5 个信号元件 / 信号缀合物。在另一个实施方式中, 至少 50wt. %, 例如至少 70wt. %, 至少 90wt. % 或至少 95wt. % 的形成的或用于检测设备或方法的信号缀合物具有 10 至 100 个信号元件 / 信号缀合物。

[0079] 此外, 还原的 F(ab)'₂ 信号缀合物优选地含有单个信号抗体 / 信号缀合物。然而用于形成信号缀合物的常规技术可导致具有宽的信号抗体数目 (例如, 0-4 或更多个) / 信号缀合物的分布的信号缀合物的形成。根据本发明的方法和设备的信号抗体 (例如还原的 F(ab)'₂ 片段) 的平均数目 / 信号缀合物优选地在 1-4 的范围内, 并且优选为 2, 如图 5 中

所阐明的。优选地,这些范围是没有例如通过尺寸排阻层析分离信号缀合物以达到具有期望的信号抗体数目 / 信号缀合物的信号缀合物的步骤而可达到的。

[0080] 信号缀合物还优选地具有窄的信号抗体与信号缀合物的比率的分布,这为检测设备和方法提供了提高的精确度。例如,在各种实施方式中,至少 50wt. %,例如至少 70wt. %,至少 90wt. %或至少 95wt. %的形成的或用于检测设备或方法的信号缀合物具有 1 至 4 个信号抗体 / 信号缀合物。在优选的实施方式中,至少 50wt. %,例如至少 70wt. %,至少 90wt. %或至少 95wt. %的形成的或用于检测设备或方法的信号缀合物具有 2 个信号抗体 / 信号缀合物。

[0081] 根据本发明的各种实施方式,信号缀合物还优选在信号缀合物群体中信号元件与信号抗体的总体比率上具有高度的可控制性。在一些示例性实施方式中,单独地或在信号缀合物的总群体中,信号元件(例如信号酶(例如 ALP)或荧光染料)与信号抗体(例如 FAB 片段)的平均数目比率在 0.5 至 100,例如 0.5 至 5,例如 5 至 10 或 10 至 100 的范围内。再次地,这些范围优选地是没有例如通过尺寸排阻层析分离信号缀合物以达到具有期望的信号元件与信号抗体的比率的信号缀合物的步骤而可达到的。

[0082] 信号缀合物还优选地具有窄的每信号缀合物中信号元件与信号抗体的数目比率的分布,这为检测设备和方法提供了提高的精确度。例如,在各种实施方式中,至少 50wt. %,例如至少 70wt. %,至少 90wt. %或至少 95wt. %的形成的或用于检测设备或方法的信号缀合物具有 1-5 范围内的信号元件与信号抗体的数目比率。在优选的实施方式中,至少 50wt. %,例如至少 70wt. %,至少 90wt. %或至少 95wt. %的形成的或用于检测设备或方法的信号缀合物具有 5 至 10 范围内的信号元件与信号抗体的数目比率。在另一个优选的实施方式中,至少 50wt. %,例如至少 70wt. %,至少 90wt. %或至少 95wt. %的形成的或用于检测设备或方法的信号缀合物具有 10 至 100 范围内的信号元件与信号抗体的数目比率。

[0083] 信号缀合物的扩散系数优选地足够低以在检测设备中提供信号缀合物的有效运输。更低的扩散系数减少夹心免疫测定形成所需的时间。减少形成免疫测定的时间实时提高了测试的效率,同时也增加了灵敏度。在一些示例性实施方式中,信号缀合物的扩散系数在约 1×10^{-8} 至约 $1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 的范围内 (Brune&Kim, 1993, Proceedings of the National Academy of Sciences, 第 90 卷 :3835-3839)。

[0084] 待检测的靶分析物可广泛地变化。在一些示例性实施方式中,分析物选自 TnI、TnT、TnC、CK-M、CK-B、CK-MB、肌红蛋白、TSH、FSH、CRP、BNP、pro-BNP、PSA、PCA、载脂蛋白及它们的组合。靶分析物可以是抗原。虽然本发明将根据以 cTnI 作为靶分析物来进行描述,但本发明的实施方式不限于检测 cTnI 并且,如本领域技术人员将理解的,本发明同样也可被用于检测其它分析物。本发明的实施方式通常涉及具有增加的测量生物样品(包括血液样品)中心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的灵敏度的改进的传感器设备和方法。

[0085] cTnI 现在被用作活跃的心肌梗塞 (MI) 后不久在血清中可检测的精确的心脏特异性生物学参数并且在 MI 发作后保持存在超过 2 至 3 天。肌钙蛋白作为如下三种亚基的复合物存在于心脏组织中:原肌球蛋白结合亚基、肌钙蛋白 T (“TnT”), Ca^{2+} 结合亚基、肌钙蛋白 C (“TnC”), 和抑制肌动球蛋白 Mg^{2+} ATP 酶的亚基、肌钙蛋白 I (“TnI”)。TnI 是细肌丝调节蛋白复合物,其赋予心肌和横纹肌钙敏感性。心脏 TnI 独特地位于心肌中,在心肌中其

是所存在的唯一同种型 (isoform)。心脏 TnI 在 MI 后迅速地出现在人血清中 (在约 4 至 6 小时内)。其在 18 至 24 小时后达到峰值水平并且在血流中维持升高的水平达 6 至 10 天。作为结果,从心肌释放至循环中的 cTnI 对于心肌损伤是非常特异的。在一个实施方式中,本发明的传感器和设备用于检测极低水平的 cTnI,这需要更高的灵敏度。如上所述,甚至极低水平的 cTnI (即低于被认为指示急性心肌梗塞的水平)可预示将来不利的心血管状态。在一些示范性实施方式中,本发明提供了能够检测低于 10pg/mL,例如低于 1pg/mL 或低于 0.1pg/mL 的量的 cTnI,从而提供预测心肌梗塞的能力的设备和方法。

[0086] 传统上已使用基于如图 1 中描绘的夹心测定 100 的系统和方法检测了抗原和 / 或分析物 (An) 101,正如美国公开 No. 2004/0018577 (将其全部通过引用而并入本文) 中所描述的。为了本申请的目的,抗原和 / 或分析物 101 通常是指肌钙蛋白 cTnI,但通过测定也可检测其它类型的抗原和 / 或分析物。包含具有共价连接的捕获抗体 (Ab1) 104 (抗体或其结合片段) 的羧基衍生的聚苯乙烯珠 103 的捕获珠 102 位于通常由金或铂制成的金属电极 105 上方。在分析测定中,在测试样品 (例如血液) 中发现的抗原 101 被捕获抗体 104 结合。将检测抗体 (Ab2) 106 (抗体或其结合片段) 缀合至信号产生性酶 (ENZ) 107 (例如碱性磷酸酶 (ALP))。对于常规信号元件,可将交联剂例如琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基 [6-酰胺基-己酸]、戊二醛、己二酸二酰肼、双偶氮联苯胺、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、双-马来酰亚胺己烷、4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基琥珀酰亚胺酯或 N-羟基琥珀酰亚胺 4-叠氮水杨酸用于用 ENZ 标记 Ab2。关于有关商业免疫测定产品和它们所基于的技术的更多信息,参见 Wild, (Ed), The Immunoassay Handbook, Stockton Press N. Y., 1994, 将其通过引用并入本文。将检测抗体 106 和酶 107 共价连接并形成检测抗体缀合物 108。缀合物 108 的装配使得由上面引用的美国专利 No. 7, 419, 821 中描述的酶 107 产生的生电种类 (electrogenic species) 能够十分接近金属电极 105, 从而产生待生成的电化学信号。An 通过表位 (e1 和 e2) 连接至各 Ab1 和 Ab2。

[0087] DNA 引导固定 (DDI) 是图 2 中描绘的抗原 101 的另一种常规检测系统。包含羧基衍生的聚苯乙烯珠 103 (具有共价连接的核酸 111) 的捕获珠 102' 位于通常由金或铂制成的金属电极 105 上方。将捕获抗体 104 (抗体或其结合片段) 共价连接至核酸 110。描述为 110 和 111 的核酸具有产生稳定的杂交双链 DNA 区域的互补区域。本领域技术人员将理解,蛋白质与核酸的共价连接可在 5' 或 3' 末端发生或通过一个或多个碱基的修饰发生。在使用 DDI 的分析测定中,检测与对于图 1 所描述的方法相似。检测缀合物 108 的检测抗体 106 结合抗原 101 并且酶 107 产生可被电极 105 检测的信号。

[0088] 另一个常规检测系统由图 3 中表示的 DNA 引导固定显示。包含羧基衍生聚苯乙烯珠 103 (具有共价连接的核酸 111) 的捕获珠 102' 位于通常由金或铂制成的金属电极 105 上方。核酸序列 112 具有下列特征:允许与结合至捕获珠 103 的核酸 111 杂交的区域 110'、用于与和抗体夹心结构 100 (在上文中参照图 1 描述的) 缔合的互补核酸序列 114 杂交的序列 113 和任意的间隔子序列 115。如图 3 中所显示的,可存在多个与互补核酸序列 114', 114" 杂交的序列 113', 113" 以连接多个夹心结构。另外的间隔子序列 115' 可分隔核酸 112 上的每一个序列 113。虽然图 3 中显示了 3 个夹心结构 100,但在其它 DNA 引导固定中,可存在通过核酸序列 112 结合的更多的夹心结构 100。将捕获抗体 104 共价连接至核酸序列 114。抗原 101 被捕获抗体 104 捕获且具有酶 107 的检测抗体 106 结合被捕获的抗原 101,

如上文中所描述的。

[0089] 常规检测测试的一个衍生方案显示于图 4 中。将核酸 116 共价地连接至电极 105 上方的珠 103。将捕获抗体 104 共价连接至核酸 116, 从而产生该捕获种类的额外的灵活性。抗原 101 如上所述被检测抗体 106 和酶 107 检测。

[0090] 在本发明的一个实施方式中, 提供了用于检测低浓度的免疫活性分析物 (例如 cTnI) 的分析方案。所述分析方案依赖于其中一个或多个信号抗体 (优选一对信号抗体) 通过 DNA 连接与一个或多个信号元件结合的信号缀合物的形成。信号缀合物中的信号抗体与分析物结合, 所述分析物转而与捕获抗体结合, 以形成“夹心”复合物。取决于所采用的信号元件, 可将样品中分析物的浓度转换成成比例的信号。例如, 如果信号元件包含信号酶 (例如 ALP), 那么可将样品中分析物的浓度转换成成比例的信号酶表面浓度。所述酶能够通过将底物转化成可检测的产物来放大分析物的化学信号。例如, 当 ALP 是酶时, 单个酶分子可产生约 9000 个可检测的分子 / 分钟, 从而与其中用有电活性的种类替代碱性磷酸酶而连接至抗体的方案相比, 提供了分析物的可检测性 (detectability) 上几个数量级的提高。

[0091] 为了检测低水平的靶分析物 201 (例如 cTnI), 可采用新的捕获抗体方法, 例如图 5 和 6 中显示的那些方法。如所显示的, 包含羧基衍生的聚苯乙烯珠 203 (具有共价连接的抗体 204) 的捕获珠 202 位于金属电极 205 的上方。“捕获抗体” 202 或“捕获试剂” 意指特异性结合目的分析物 201 的表位的抗体, 其中在结合目的分析物 201 (i) 之前、(ii) 之后或 (iii) 期间将捕获抗体 204 固定在珠 203 上。未被固定在珠 203 上的检测或信号抗体 206 结合目的分析物 201 的其它表位 (如果存在于生物样品中的话)。最初, 可将信号抗体 206 置于设备中管道内 (例如, 将样品引入设备的地方的下游, 但在固定的捕获抗体的上游) 的增溶剂 (例如糖基质) 中, 从而当样品接触增溶剂时, 信号抗体 206 溶于样品中。本发明使用的抗体 204、206 可包括全长抗体、单链抗体或抗体片段例如 FAB 片段。本领域技术人员将认可本文中描述的发明可通过使用能够特异性结合目的分析物 201 上的表位的任意结合成员检测目的分析物 201。结合成员包括但不限于细胞外或细胞内受体、多核苷酸、肽核酸, 及其衍生物。

[0092] 与信号抗体 206 共价连接的是第一单链核苷酸 210。将信号元件 207 (例如信号酶或荧光染料) 共价连接至第二单链核苷酸 211, 该核苷酸与第一单链核苷酸 210 互补。第一 210 和第二 211 单链核苷酸是合成的核苷酸并且可在核苷酸的 5' 末端、3' 末端或内部含有偶联部分。可从选自氨基修饰剂、巯基修饰剂和二硫酚 (dithiol) 的经修饰的亚磷酰胺产生所述偶联部分。通过掺入保护性化学基团 (例如硫代磷酸酯 (或 S-oligos)) 保护合成寡核苷酸的 3' - 末端或 5' - 末端免受样品中的内源性核酸外切酶活性的破坏。抗体 206、酶 207、第一 210 和第二 211 单链核苷酸包含检测抗体缀合物 208。

[0093] 在其中信号元件是信号酶的实施方式中, 信号酶优选选自碱性磷酸酶 (ALP)、葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶、尿素酶、辣根过氧化物酶、半乳糖氧化酶和 β -半乳糖苷酶。在优选的实施方式中, ALP 是信号酶。

[0094] 在各种备选的实施方式中, 所述一个或多个信号元件包含一个或多个非酶促检测部分。非酶促检测部分的实例包括荧光、比色和放射性元素、种类或染料, 其具体的实例包括 6-FAM (6-羧基荧光素)、放射活性或量子点。

[0095] 在一个实施方式中,第一和第二链核苷酸是具有 18 至 10,000 个碱基残基的合成寡核苷酸。在一个优选实施方式中,各序列具有间隔子 (spacer) 例如重复碱基残基,以允许信号缀合物 (例如 FAB-ALP 缀合物) 形成。第一和第二链核苷酸杂交以形成信号抗体与信号元件 (例如 ALP) 之间的桥,如图 5 中显示的。

[0096] 在一个实施方式中,一部分重复第一链核苷酸 210,210' 结合多个第二链核苷酸 211,211' 以形成如图 6 中显示的 DNA 支架或多聚体结构 212。第一链核苷酸 210,210' 的每一个部分可以是重复序列。第二链核苷酸 211,211' 结合第一链核苷酸 210,210' 的可得部分。例如,对于 FAB:ALP 缀合物,可通过具有与 5 个第二序列 211,211' (各个序列连接至 ALP 207,207') 结合的 5 个重复序列的第一链核苷酸 210,210' 而实现 1:5 (FAB:ALP) 的比率。在一个实施方式中,第一核苷酸 210 具有至少 3 个重复序列,所述至少 3 个重复序列结合具有至少 3 个所述一个或多个信号酶 207 的至少 3 个第二序列 211。在一个实施方式,第一核苷酸 210 具有至少 5 个重复序列,所述至少 5 个重复序列结合具有至少 3 个所述至少一个或多个信号酶 207 的至少 5 个第二序列 211。在一个实施方式中,第一链核苷酸 210 存在至少 2 个不同的部分用于与不同信号元件 207 (例如信号酶或荧光染料) 结合。

[0097] 任选地,一个或多个间隔子序列 (未显示) 可分隔第一链核苷酸 210,210' 和/或第二链核苷酸 211,211'。第二链核苷酸 211,211' 也可具有结合酶 207 的间隔子序列 213,213'。

[0098] 在一个实施方式中,当检测抗体 206 结合抗原 201 时,图 6 的 DNA 支架 212 可放大由酶 207,207' 产生的信号。

[0099] 图 7 表示本发明的实施方式,其中将检测抗体 206 共价结合至核酸序列 214,又将所述核酸序列 214 在其序列的另一端共价地连接至酶 207。这增加了该结构的灵活性。

[0100] 图 8 是抗体 300 的详细图示。抗体 300 可以是如贯穿本申请所描述的检测或捕获抗体。抗体 300 包括两个抗体种类 301 和 302。每一个所述两抗体种类 301,302 包含长链或片段 303,304 以及轻链 305,306。将抗体种类 301 共价连接至核酸序列 309。将抗体种类 302 共价连接至核酸序列 310。核酸序列 309 和 310 具有可杂交的结合区域。在一个实施方式中,抗体种类是不同的并且通过杂交事件连接在一起。抗体种类 301 和 302 可识别相同抗原上的相同表位、不同表位,或不同抗原。

[0101] 图 9 是包括具有酶 307 的缀合物 308 的抗体 300 的另一个详细图示。将种类 302 的长链 304 共价连接至核酸序列 313。将酶 307 共价连接至核酸序列 314。核酸序列 313 和核酸序列 314 具有可杂交的结合区域。本领域技术人员将理解,可将核酸序列共价地连接至任一种类的长链。此外,图 9 中显示的两个抗体种类均可具有不同的或相同的与其共价连接的序列。当序列不同时,可使用具有相关功能性的不同互补序列,例如不同的酶缀合物。

[0102] 在一个实施方式中,第一链核苷酸 313 的一部分结合多个第二链核苷酸 314、315、315' 以形成如图 10 中显示的 DNA 支架或多聚体结构 312。每一个抗体种类 301,302 结合至各自的 DNA 支架 312,322。DNA 支架 312 包括重复核酸 315,315', 其各具有可与核酸 316,316' 杂交的结合区域。使用间隔子序列核酸 317,317' 将 316,316' 结合至酶 307,307'。类似地, DNA 支架 322 包含重复核酸 323,323', 其各自具有可与核酸 324,324' 杂交的结合区域。使用间隔子序列 325,325' 将核酸 324,324' 结合至酶 318,318'。DNA 支架 322 还包

含核酸 320, 所述核酸 320 具有用于与共价连接至种类 301 的核酸 319 杂交的结合区域。在一些实施方式中, 在核酸与酶之间不使用间隔子。在其它实施方式中, 在每一个支架 212 和 322 上的重复核酸之间提供了额外的间隔子。

[0103] 图 11 代表根据本发明的一个实施方式的酶缀合物装配体 400。酶缀合物装配体 400 包括 4 个抗体 401、402、403 和 404 以及 2 个酶 405 和 406。酶 405 具有与其结合的核酸 407。酶 406 具有与其结合的核酸 408。对于抗体 401, 两个不同的核酸序列 410 和 411 被共价结合。抗体 402 具有 2 个共价结合的核酸序列 420 和 421。抗体种类 403 具有 2 个共价结合的核酸序列 430 和 431。抗体种类 404 具有 2 个共价结合的核酸序列 440 和 441。核酸序列如下形成结合对: 407 和 410、411 和 420、421 和 430、431 和 440 以及 441 和 408。

[0104] 返回图 6, 其中显示了一个具有多个相同类型的酶的 DNA 支架。在一个实施方式中, 所述 DNA 支架可具有如图 12 中显示的不同类型的酶。在图 12 中, 捕获珠 202 包含在电极 205 上的羧基衍生的聚苯乙烯珠 203 (该珠具有共价连接的捕获抗体 204)。在分析测定中, 测试样品 (例如血液) 中发现的抗原 201 (其中在此描绘中抗原是肌钙蛋白 cTnI) 被捕获抗体 204 结合。将检测抗体 (抗体或其结合片段) 206 缀合至作为 DNA 支架 212 的一部分的核酸序列 210, 所述 DNA 支架 212 由结合区 210, 210' 和 220, 220' 的交替重复构成。两种不同的核酸缀合物被用于该分析测定中。利用间隔子序列 213, 213' 使葡萄糖氧化酶 217, 217' 缀合至核酸序列 211, 211'。利用间隔子序列 223, 223' 使辣根过氧化物酶 218, 218' 缀合至核酸序列 221, 221'。核酸序列 211, 211' 分别结合核酸序列 210, 210'。核酸序列 221, 221' 分别结合核酸序列 220, 220'。在该分析测定中, 葡萄糖被葡萄糖氧化酶转化为过氧化氢。在底物四甲基联苯胺的存在下, 过氧化氢被转化成表示信号的蓝色化学种类。

[0105] 图 13 描绘了具有不同类型的酶的另一 DNA 支架 212。使用间隔子序列 213, 213' 使 D-乳酸脱氢酶 [EC 1.1.2.7] 227, 227' 共价地连接至核酸序列 211, 211'。使用间隔子序列 223, 223' 使丙酮酸氧化酶 [EC 1.2.3.3] 228, 228' 共价地连接至核酸序列 221, 221'。核酸序列 211, 211' 和 221, 221' 分别结合至核酸序列 210, 210' 和 220, 220'。乳酸盐被乳酸脱氢酶转化为丙酮酸盐。丙酮酸盐被丙酮酸氧化酶转化为过氧化氢。这些组分的装配使得由酶 227, 227' 和 228, 228' 产生的生电种类过氧化氢能够十分接近金属电极 205, 转而产生电化学信号。

[0106] 图 14 表示多抗原检测 (MAD) 测定。此类 MAD 测定也描述于美国公开 No. 2005/0095627 中, 将其全部内容和公开通过引用而并入本文。将抗体种类 501 共价连接至核酸 502。将抗体种类 503 共价连接至核酸 504。当抗原片段或种类 505 和 506 彼此结合时以及当抗体 501 和 503 分别结合其各自的抗原片段或种类 505 和 506 时, 核酸序列 502 和 504 在互补区中彼此结合。

[0107] 图 15A-15D 描绘了依赖于抗原 603 在抗原 603 上的两个不同位置与两个抗体 601, 602 的结合的杂交种类的产生。基于杂交区域的核酸杂交是低效率的, 需要增加的抗体相互作用热力学稳定性。抗体种类 601 和 602 在两个不同的位置处结合抗原 603。每一个抗体种类 601 和 602 包含重链 604 和轻链 605。使抗体种类 601 共价结合核酸 606。使抗体种类 602 共价结合核酸序列 607。核酸序列 606 由间隔子区域 610、结合区 611、结合区 612 和 DNA 聚合阻断核苷酸 613 (例如双脱氧或非环核苷酸碱基) 构成。核酸序列 607 由间隔子区域 615、结合区 616、结合区 617 和 DNA 聚合阻断核苷酸 618 构成。结合序列 612 和

617 彼此杂交。间隔子序列 610 和 615 不杂交。

[0108] 然后用限制性核酸内切酶处理图 15A 的该结构,从而产生图 15B 中显示的结构。使抗体种类 601 共价结合至由杂交和通过限制性核酸内切酶从原始核酸序列 606 酶促切割产生的核酸 620。使抗体种类 602 共价结合至由杂交和通过限制性核酸内切酶从原始核酸序列 607 酶促切割产生的核酸序列 621。核酸序列 620 和 621 均包含末端 3' 羟基。核酸结构 630 是从利用 Epicenter's CircLigase 环化的合成寡核苷酸或单链噬菌体或噬菌粒产生的单链环状核酸。核酸结构 630 含有下列组分:与 611 杂交的结合区域 631 以及结合区域 632、633 和 634。在具有游离 3' - 羟基的结合区域 611 处结合的单链引物序列 620 可使用环状结构 630 作为模板用于通过链置换 DNA 聚合酶和 dNTP 进行 DNA 合成。接着产生的结构描述于图 15C 中。

[0109] 图 15C 中的结构 640 由共价结合至抗体种类 602 的核酸序列 621、肌钙蛋白抗原 603、共价结合核酸序列 641 的抗体种类 601 构成。核酸序列 641 由结合序列 611、642、643 和 644 的重复单元构成。来自环状核酸种类 630 的结合区 632 在结合区处 644 杂交。

[0110] 如结构 650 中所描绘的,向反应中加入与结合序列 642 杂交的合成寡核苷酸序列 651。与结构 650 一起向反应中加入限制性核酸内切酶,产生结构 660。分子将片段化成为下述分子:其中核酸序列 621 和抗体种类 602 彼此共价结合,且肌钙蛋白抗原 603 与抗体种类 602 相结合。抗原 603 还将结合被共价地连接至核酸序列 611 的抗体种类 601。将产生另外的含有结合区 643、644 和 611 的片段 661 和 662。在分析检测步骤中,这些片段 661、662 被描述于图 15D 中。

[0111] 图 15D 描绘了检测步骤,其中片段 661 具有与核酸序列 673 杂交的亚组分 643,所述核酸序列 673 共价地连接至位于金属电极 671 上方的羧基聚苯乙烯珠 672。片段 661 还具有与共价地连接至碱性磷酸酶 675 的核酸序列 674 杂交的区域 644。这些成分的装配使得由酶 675 产生的生电种类能够十分接近金属电极 671,转而产生待生成的电化学信号。

[0112] 图 16A-16C 描绘了基于来自核酸链置换步骤的信号放大的抗原分析检测。始于图 16A,使捕获珠 703 与捕获抗体 704 共价结合。抗原 701 结合至抗体种类 704。共价结合检测抗体 706 的、由结合序列 711、712 和 713 构成的核酸序列 710 与抗原 701 结合。

[0113] 洗涤样品,然后加入与结合序列 710 互补的核酸序列 720,接着进行 DNA 聚合,产生新合成的序列,从而产生如图 16B 中显示的结构 715。核酸序列 720 含有可分别与核酸序列 710 上称为 711、712 和 713 的结合组分杂交的结合组分 721、722 和 723。

[0114] 链置换反应产生图 16C 中显示的含有结合组分 722 和 723 的核酸序列 725。核酸序列 722 结合在第二捕获位点共价地连接至起反应的羧基聚苯乙烯珠 730 的互补结合序列 708。核酸序列 709 共价地连接至核酸结合序列 723 并且核酸序列 709 连接至碱性磷酸酶 707。

[0115] 这些成分的装配使得由上述 '821 参考文献中描述的酶 707 产生的生电种类能够十分接近金属电极(未显示),转而产生待生成的电化学信号。

[0116] 应当理解,第一与第二链核苷酸的结合替代了常规用于将信号抗体连接至信号元件的交联剂。因此,本发明的优选实施方式不需要或采用交联剂并且可基本上或完全不含此类交联剂。

[0117] 虽然在上文中就与分析物的两个表位的结合对抗体进行了描述,但在一些实施方

式中,可能存在与分析物的 3 个表位结合的 3 个抗体,如美国公开 No. 2004/0018577(将其全部通过引用而并入本文)中所描述的。目的分析物及其一个或多个亚形式可通过使用抗体进行免疫测定来检测,所述抗体特异于 (i) 夹心的捕获侧上、(ii) 夹心的信号侧上、(iii) 或两者上的分析物上超过 1 个的表位。通过靶向目的分析物上的总共至少 3 个表位,本发明的多夹心测定可检测分析物及其亚形式的存在,即使某些表位不可用于亚形式上的结合,只要存在至少一个能够被捕获抗体结合的表位和至少一个可用于被信号抗体结合的表位。

[0118] 还应当指出,图 1-16C 是为了在概念上表示所述系统各部分的功能性。例如,画出了抗体分子,其中分析物与 F(ab) 分子之间的槽结合,然而在本领域已知分析物将结合至单个 F(ab) 片段的结合结构域。

[0119] 在免疫传感器实施方式中,首先使传感器与样品接触,然后在记录来自传感器的应答之前使传感器与洗涤液接触是有利的。可用洗涤液除去未与电极结合的生物样品,即,非目的样品。在特定的实施方式中,利用结合样品中目的分析物的信号缀合物(具有上述信号抗体与信号元件之间的核苷酸连接)修正样品,然后使经修正的样品与传感器接触。样品中的结合反应产生分析物/信号缀合物复合物。传感器包括靠近电极表面连接的、针对分析物的经固定的抗体。在接触传感器时,分析物/信号缀合物复合物结合电极表面附近的经固定的抗体。此处从电极附近除去尽可能多的未结合的抗体是有利的,以使来自传感器的背景信号最小化。当信号元件包含信号酶(例如 ALP) 时,信号缀合物复合物有利地能够转化液体中提供的底物以产生电化学活性种类。该活性种类靠近电极而产生并且当施加适当的电势(电流计操作)时由电极处的氧化还原反应提供电流。备选地,如果电活性种类是离子,可对其进行电势测量。在电流计测量中,电势在测量期间可以是固定的或按照预定的波形变化的。例如,可使用三角波扫过界限之间的电势,如在公知的循环伏安法技术中所使用的。备选地,数字技术(例如方波)可被用于提高与电极相邻的电活性种类的检测的灵敏度。根据电流或电压测量,计算样品中分析物的量或存在。信号与生物样品中目的分析物的量成比例。此类和其它分析电化学法在本领域内是公知的。

[0120] 在其中所述盒包括免疫传感器的实施方式中,有利地由非反应性金属(例如金、铂或铱)的基底传感器和多孔选择性渗透层(被连接至微粒(例如胶乳颗粒)的生物活性层覆盖)精密加工免疫传感器。将微粒分配到覆盖电极表面的多孔层上,形成附着的多孔生物活性层。所述生物活性层具有特异性结合目的分析物或当分析物存在时表现可检测的变化的性质,并且最优选地是经固定的抗分析物的抗体。

[0121] 本发明的设备包括盒、柱子、注射器、比色皿(cuvette)或本领域内已知的其它分析设备或系统。所述盒可以是如美国专利 Nos. 7, 419, 821 和 5, 096, 669(将其全部通过引用而并入本文)中所述的类型。其它盒构造的实例见于美国专利 Nos. 5, 416, 026、5, 593, 638、5, 447, 440、5, 628, 961、5, 514, 253、5, 609, 824、5, 605, 664、5, 614, 416、5, 789, 253、6, 030, 827 和 6, 379, 883 中,将其全部通过引用而并入本文。其它盒构造描述于 PCT/US00/31158, PCT/US01/04345, PCT/US2005/046772 和美国公开 Nos. 2007/0154922, 2005/0054078, 2004/0018577 和 2006/0160164 中,将其全部通过引用而并入本文。在优选的实施方式中,适当的盒可包括由 i-Stat 制造的 i-STAT cTnl,其可与 i-STAT 便携式临床用分析仪、i-STAT 1 分析仪和 Philips 医疗系统血液分析模块(Medical Systems Blood

Analysis Module) 一起使用。

[0122] 在本发明的示例性实施方式中,提供了内含式感应设备(sensing device)和读数器。所述内含式感应设备可以是可丢弃的或一次性的盒。读数器可以是具有输出设备(例如屏幕或打印机)的手提式读数器。操作者(例如医生、护士或技术员)将待测试的样品置于感应设备中并且将感应设备插入读数器中。在完成该过程后,操作者从读数器中移除所述设备,简单地将其丢弃。然后读数器准备好进行另一个测量,其通过插入另一个感应设备而开始。

[0123] 适当的一次性盒包括具有样品入口以接受生物样品的壳体(housing)。样品含有靶分析物,如果存在的话。样品入口与具有一个或多个电极的管道相连。电极具有附着的捕获抗体。管道优选地包括置于入口与增溶剂(例如糖基质)内的固定的捕获抗体之间的信号缀合物,如上文所描述的。壳体还包括含有洗涤液的区域,含有酶底物的区域(在其中信号元件包括信号酶的实施方式中)和废料室。将所述区域和废料室与管道相连,从而废液可通过抽运或吸取从所述区域被转移至管道以将生物样品从所述管道移入废料室中。同样地,在其中信号缀合物包括信号酶的实施方式中,将含有酶底物的区域与管道相连,从而酶底物可与在电极上产生信号的信号酶反应。除了这些特征外,所述盒可含有如下文中进一步描述的一个或多个其它特征。

[0124] 所述盒的图示显示于图 17-22 中,并且也在美国专利 No. 7, 419, 821 和美国公开 No. 2006/0160164 和 2005/0054078(将其全部通过引用而并入本文)中被进一步描述。在一个实施方式中,感应设备可包括本发明的盒。所述盒包括如图 17 和 18 中显示的顶盖、图 20 中显示的底部以及置于底部和顶盖之间的图 19 中显示的薄膜粘着密封垫。现参考图 17, 顶盖 1 由能够在灵活的铰链区(flexible hinge region)5、9、10 处反复变形而不破裂的刚性材料(优选塑料)制成。顶盖包括通过灵活的铰链区 9 连接至顶盖主体的盖子 2。在操作中,在将样品导入样品保持室(sample holding chamber)34 后,可将盖子在样品入口 4 的入口上方固定,防止样品外漏,并且通过钩子 3 使盖子的位置固定。在一个实施方式中,顶盖包括如美国公开 No. 2005/0054078(将其全部通过引用而并入本文)中描述的可滑动的闭合。顶盖还包括相对于顶盖的主体可移动并且通过灵活的铰链区 5、10 与其相连接的两个桨(paddle)6、7。

[0125] 在操作中,当通过泵装置操作时,桨 6 对由覆盖有薄膜密封垫 21 的腔 43 组成的气囊(air bladder)施力以移动盒的管道内的液体。当通过第二泵装置操作时,桨 7 对密封垫 21 施力,所述密封垫可因其中被切开的裂缝 22 而变形。盒被调整为用于插入读数装置中,从而具有用于该目的的多个机械和电联接。还应当很明显的是手工操作所述盒是可能的。因此,在将所述盒插入读数装置时,密封垫将压力传递至位于腔 42 中的充满约 130 μ L 分析/洗涤溶液("液体")的含有液体的箔包上,在钉状物 38 上使包装破裂,将液体排入管道 39 中,所述管道通过底部内短的横断管道与传感器管道连接。分析液充满分析管道的前部,首先将液体推至被用作毛细管中止(capillary stop)的胶带密封垫中的小开口上。施加于盒的分析仪机械装置的其它动作用于在分析管道内的受控位置处将一个或多个区段(segment)注射到分析液内。这些区段用于帮助以最少的液体洗涤传感器表面和周围的管道。

[0126] 顶盖还包括由柔韧的薄膜 8 覆盖的孔。在操作中,施加在膜上的压力将一个或多

个空气区段通过密封垫中的小孔 28 排入管道 20 中。

[0127] 参考图 18, 底部的下表面还包括第二管道 11 和第一管道 15。第二管道 11 包括缢缩 (constriction) 12, 其通过提供对液流的阻力控制液流。任选的包被 13, 14 提供疏水性表面, 其与密封垫孔 31, 32 一起控制管道 11, 15 之间的液流。底部内的凹陷 (recess) 17 为管道 34 中的空气提供了通过密封垫中的孔 27 通向管道 34 的途径。

[0128] 参考图 19, 薄膜密封垫 21 包括各种孔和裂缝以促进底部和顶盖内的管道之间的液体转移, 并且允许密封垫在需要时在压力下变形。因此孔 24 允许液体从管道 11 流入废料室 44; 孔 25 包括管道 34 与 11 之间的毛细管中止; 孔 26 允许空气在凹陷 18 与管道 40 之间流动; 孔 27 提供了凹陷 17 与管道 34 之间的空气流动; 以及孔 28 允许液体通过任选的可关闭的阀 41 从管道 19 流至废料室 44。孔 30 和 33 分别允许安置在切口 (cutaway) 35 和 37 内的多个电极与管道 15 内的液体接触。在特定的实施方式中, 切口 37 安置了接地电极 / 和或反向—参照电极, 且切口 35 安置了至少一个分析物传感器和任选地电导测定性传感器。图 19 中的元件 29 作为连接顶盖中的区域 (图 17) 与底部 (图 18) 的胶带中的开口。孔 92 允许液体从入口 4 流向管道 34。

[0129] 参考图 20, 管道 34 是经装配的盒中连接样品入口 4 与第一管道 11 的样品保持室。切口 35 安置了分析物传感器或分析物响应表面以及任选的电导测定性传感器。切口 37 安置了接地电极 (如果需要) 作为电化学传感器的电流回路, 并且还可安置任选的电导测定性传感器。切口 36 提供了密封垫孔 31 与 32 之间的流体通道 (fluid path), 从而液体可通过第一与第二管道之间。凹陷 42 在经装配的盒中安置有含有液体的包装 (例如可破裂的小袋), 其可因在插入读数装置时对浆 7 施加的压力而被钉状物 38 刺穿。液体从被刺穿的包装中流入 39 处的第二管道中。气囊由在上表面被密封垫 21 密封的凹陷 43 组成。气囊是抽吸装置的一个实施方式, 并且由施加于浆 6 的压力驱动, 所述浆 6 将管道 40 中的空气移置, 并从而将样品从小室 34 移置到第一管道 15 中。

[0130] 空气从气囊进入样品室 (密封垫孔 27) 的位置和毛细管中止 25 一起确定了样品室的预定容积。当压下浆 6 时, 相应于该容积的样品的量被移置到第一管道中。因此该布置是用于将未计量的样品的计量的量递送到盒的管道中的计量装置的一个可能的实施方式。

[0131] 在当前的盒中, 用于计量样品区段的装置在底部塑料部分被提供。区段大小由底部内区室的尺寸和毛细管中止的位置以及胶带密封垫中的通气管孔控制。该容积可容易地从 2 变化至 200 微升。样品尺寸的该范围的扩大在本发明的情境中是可能的。

[0132] 推动液体通过可用于在试剂 (例如颗粒或可溶性分子) 在传感器管道 19 中出现之前将所述试剂修正到样品中的分析前管道 11。备选地, 修正试剂可位于部分 15 中, 超过部分 16。推动样品通过分析前管道也用于将张力引入隔膜泵浆 7 中, 这提高了其对液体移置的驱动的反应性。

[0133] 在一些测定中, 如果需要分析物的定量, 计量是有利的。为从管道排出的样品和 / 或液体提供了废料室 44 以防止污染盒的外表面。还提供了连接废料室与外部大气的通风口 45。盒的特征是一旦加载了样品, 可完成分析并且弃去盒而操作者或其它人不接触样品。

[0134] 现参考图 21, 提供了盒和组分的特征的示意图, 其中 51-57 是可任选地用于干燥的试剂 (例如信号缀合物 (任选地在增溶剂中)) 包被以修正样品或液体的管道和样品室的部分。使样品或液体在干燥的试剂上通过至少一次以使其溶解。用于修正盒内样品或液体

的试剂包括信号缀合物或防止测定化合物间特异性或非特异性结合反应的封闭试剂。还可提供表面包被,所述包被是不溶性的但帮助阻止测定组分被非特异性吸附到盒的内表面。

[0135] 在样品或液体的区段内,可优先溶解修正物质并在区段的预定区域内使其浓缩。这是通过控制区段的位置和移动来实现的。因此,例如,如果只有一部分区段(例如前缘)在已修正的物质上方往复,那么可在接近所述前缘处获得所述物质的高的局部浓度。备选地,如果期望物质的均匀分布,例如如果需要修正物质的已知浓度用于定量分析,那么样品或液体的进一步往复将引起混合和平均分布。

[0136] 在特定的实施方式中,在第一管道和废料室之间提供了可关闭的阀。在一个实施方式中,该阀 58 由用不可渗透的物质包被的干燥的海绵材料组成。在操作中,将所述海绵材料与样品或液体接触导致海绵膨胀以充满腔 41,从而基本上阻断了液体向废料室 44 内的进一步流动。此外,浸湿的阀也阻断空气在第一管道与废料室之间流动,这允许与样品室相连的第一泵装置移置第二管道内的液体并以下列方式将液体从第二管道移置到第一管道内。在样品被暴露于传感器受控的时间后,将样品移入分析后管道 19 中,在那里可用另一种试剂对其进行修正。然后可将所述样品移回传感器并且可开始第二反应期。备选地,分析后管道可仅用于将样品区段与传感器分开。在该分析后管道内的是单个可关闭的阀,其连接传感器管道的通气口与隔膜气泵。当此阀关闭时,样品被锁在分析后管道中并且不能被移回传感器芯片。对于此阀门,本发明中包括了数个不同的设计实例。一些设计被机械地活化,而其它设计在液体接触时活化。本发明包括的其它类型的可关闭的阀包括但不限于:由可溶性胶或胶凝化聚合物(其在与液体或样品接触时溶解或膨胀从而引起垂盖(flap)关闭)保持在开放位置的灵活的垂盖;和备选地,在一个特定的实施方式中,多孔纸或类似材料的薄层被插在管道与废料室之间或管道与环境空气之间,从而当纸干燥时是空气可渗透的但当湿润时是不可渗透的。在后一种情况下,不必将可关闭的阀插在管道与废料室之间:阀在关闭前让极少的液体至无液体通过,因此当置于管道与围绕盒的环境空气之间时,所述阀是被恰当地放置的。在实际构造中,将一片滤纸置于待控制的液体通道中的胶带密封垫中的开口上。空气可容易地移动通过该介质以允许液体移动通过液体通道。当液体被推过该滤器时,过滤介质被液体充满并且通过液体通道的进一步运动终止了。一旦滤纸变湿,将需要显著的压力来移动液体通过滤器的孔。通过滤器的气流也因为将液体推出滤器所需的更高的压力而被阻止。此阀实施方式需要极少的液体以驱动阀,并且驱动快速且可靠地发生。选择材料、其尺寸、孔隙度、可湿性、溶胀特征和相关参数以在首先接触样品后提供快速关闭,在 1 秒内或更慢地(例如直至 60 秒)关闭(这取决于特定所需的关闭时间)。

[0137] 备选地,所述可关闭的阀是机械阀。在该实施方式中,将乳胶隔膜置于气囊底部、在特殊构建的槽(well)之上。所述槽含有流体性地(fluidically)连接通气口与样品管道的两个开口。当分析仪活塞推到气囊的底部时,其挤压由胶粘剂支持的所述乳胶隔膜并密封两个孔之间的连接。这封闭了样品的通气口,从而将样品锁在原位。

[0138] 现参考图 22,其阐明了免疫传感器盒的示意图,提供了 3 个泵装置 61—63。虽然已依据特定的实施方式描述了这些泵,但将容易理解的是,能够进行泵装置 61 至 63 的各功能的任意泵装置均可在本发明中使用。因此,泵装置 1,61 必须能够将样品从样品保持室移置到第一管道中;泵装置 2,62 必须能够移置第二管道内的液体;以及泵装置 3,63 必须能够将至少一个区段插入第二管道中。本申请中设想的其它类型的泵包括但不限于接触气动

装置的气囊从而将压力施加至所述气囊、灵活的隔膜、活塞和气缸 (cylinder)、电动力学泵和振动泵。关于泵装置 3, 63, 术语“泵装置”包括由其将一个或多个区段插入第二管道中的所有装置, 例如用于从气囊移置空气的气动装置、溶解时产生气体的干燥的化学品或多个可操作地连接至电流源的电解电极。在特定的实施方式中, 使用可具有超过 1 个气囊或室的机械区段生成性隔膜来产生区段。槽 8 具有连接内部隔膜泵与充满液体的管道 20 (区段将被注射到所述管道中) 的单个开口。可将隔膜分段以产生多个区段, 每个区段被注射到充满液体的管道内的特定位置中。

[0139] 在备选的实施方式中, 使用被动特征注射区段。用胶带密封垫密封盒底部中的槽。覆盖所述槽的胶带密封垫在任一端具有两个小孔。一个孔是开放的而另一个孔用与液体接触时变湿的过滤材料覆盖。用疏松的亲水材料 (例如纤维素纤维滤器、过滤纸或玻璃纤维滤器) 填充所述槽。所述亲水性材料通过毛细作用将液体吸入底部内的槽中, 移置之前在槽中的空气。空气通过胶带密封垫中的开口被排出, 产生其体积由槽的容积和疏松亲水材料的容积确定的区段。可选择用于覆盖至底部中的槽的入口之一的滤器, 用于计量液体填充所述槽的速率并从而控制区段被注射到顶盖中的管道内的速率。该被动特征允许在液体通道内的特定位置注射任何数量的受控区段并且需要最小的空间。

[0140] 本发明的实施方式还可采用用于校正信号的技术。适当的技术被描述于美国专利 No. 2006/0160164 中, 将其全部通过引用而并入本文。

[0141] 虽然使用所述实施方式在医学环境中是特别有利的并且在该情境中被描述, 但会理解可在其中期望以接近实时的速度进行液体样品的化学分析的任意情形中实施所述实施方式。例如此类具体化的方法和设备可被用于确定患者是否可能患心肌梗塞或患者是否曾患有心肌梗塞。

[0142] 通过下列非限制性实例将更好地理解本发明。

[0143] 实施例 1

[0144] 第一个实施例是基于将检测抗体与 ALP 酶桥接为分析物的缀合物的合成寡核苷酸的酶联免疫测定 (ELISA), 如图 5 中所示。

[0145] 此实施例表明了该系统的基本概念, 其中 ALP 酶分子使用 DNA 支架来结合检测 Ab 或经还原的 F(ab) 分子以用于 ELISA 测定。可从该概念系统开发更复杂的支架分子。

[0146] 合成寡核苷酸序列 A 和 A' 优选是下面显示的寡核苷酸序列。

[0147] A (DE) 5' - 氨基 C12 - (T) 20 - TGATCGCTACGGTGGTATTGT - 3' (SEQ ID NO: 1) 6-FAM, 其中 FAM 是荧光标记

[0148] A' (AP) 5' - 硫氢基修饰剂 C6 S-S - (T) 20 - ACAATACCACCGTAGCGATC * A - 3' 6FAM (SEQ ID NO: 2) 其中 FAM 是荧光标记

[0149] * 表示硫代磷酸酯连接

[0150] (T) 20 表示 20 个 'T' 残基

[0151] 为了表明完整的系统, 如下所述, 生成了单独的组分并且就它们的功能性进行了测试。

[0152] 如下进行一组实验以表明 ALP-A' DNA 蛋白质缀合物的生成。

[0153] 合成寡核苷酸珠:

[0154] 作为下述 ALP-DNA 缀合物的测试系统, 利用所连接的互补的合成寡核苷酸序列产

生珠。

[0155] 将 20 μ L 0.33 μ m 羧化物珠 (最终 2% 的固体) (Bangs Lab) 转移至硅烷化的 0.5mL 微量离心管中。将其以 12500RPM 微量离心 1 分钟, 将管旋转 180 度, 然后再微量离心另外 4 分钟。除去上清液, 加入 95 μ L 100mM MES (2-(N-吗啉代) 乙磺酸), pH 7.1。如上微量离心所述珠, 除去上清液。然后向 300 μ L MES 缓冲液, pH 7.1 中加入 7.5mg EDAC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸化物)。EDAC 是偶联氨基的羧基活化剂。该方法中的第一步是将羧基活化为 O-酰基异脲 (o-acylisourea) 基团, 其然后可与可获得的胺基反应, 将其合成到合成寡核苷酸 (A) 中, 从而形成合成寡核苷酸与羧基珠上的羧基的共价连接。将其加入至珠并且涡旋振荡 (vortex) 溶液以充分混合。然后将珠在超声处理水浴中超声处理 10 分钟。如上所述通过微量离心沉淀所述珠, 除去上清液。然后加入 288 μ L MES, pH 7.1, 并通过移液管吸打 (pipetting) 混合。向管中加入 12 μ L 100 μ M 胺修饰的寡核苷酸。涡旋振荡溶液以充分混合。然后在超声处理水浴中超声处理溶液 10 分钟。然后使管在培养箱中于室温下混合 2 小时。如上所述通过微量离心浓缩所述珠。加入 95 μ L 淬灭缓冲液 (quench buffer) (50mM MES, pH 7.1, 35mM 甘氨酸, 0.25% BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% NaN_3), 通过移液管吸打混合溶液。加入此溶液是因为甘氨酸含有将与任意未耦联的经 EDAC 活化的羧基反应的胺基, 从而封闭经 EDAC 活化的羧基, 防止反应中的进一步交差偶联。在 Clay Adams 章动器 (nutator) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 上使管混合以在室温下在多个方向上提供连续混合, 进行 30 分钟。如上所述用沉淀所述珠。加入 95 μ L 贮存缓冲液 (50mM MES, pH 7.1, 0.05% BSA, 0.05% NaN_3), 通过移液管吸打混合所述珠。用封口膜覆盖所述管以避免干燥, 然后将其于 -80°C 下贮存用于长期贮藏 (或在 4°C 下用于短期贮藏)。

[0156] 当用于微喷到生物传感器电极上而制备时, 将管解冻, 然后如上所述通过微量离心沉淀所述珠。加入 95 μ L 经高压灭菌的去离子水, 并通过移液管吸打混合所述珠。然后将这些珠微喷在生物传感器电极上, 例如图 5 中显示的 Pt 和 Au 金属电极表面。

[0157] 在美国公开 No. 2006/0160164 (将其全部内容和公开通过引用而并入本文) 中进一步描述了用作背景信号检测剂的参照珠。制备参照珠以用于微喷。

[0158] 处理合成寡核苷酸:

[0159] 为了进行蛋白质-DNA 缀合, 用硫醇 (DTT) 处理硫氢基修饰的合成寡核苷酸以产生游离硫氢基, 所述硫氢基随后可与通过其 N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯基团连接至蛋白质的胺基的 LC-SPDP (琥珀酰亚胺 6-[3'-(2-吡啶二硫) 丙酰胺] 己酸酯交联剂的 2-吡啶二硫基反应。

[0160] 应当注意, 通常在尽可能短的时间内进行该方法。由于此合成寡核苷酸包含荧光标签, 在铝箔或暗室中进行所述反应和使用所述柱。将约 50,000pmol 的 A' 合成寡核苷酸重悬于 10 μ L 1XPBSE (136mM NaCl, 2.7mM KCl, 10.1mM Na_2HPO_4 , 1.8mM KH_2PO_4 , 5mM EDTA (乙二胺四乙酸), pH 7.4), 并加入 20 μ L 高压灭菌的去离子水中的 1M DTT (二硫苏糖醇)。使反应在室温下进行 15 分钟。一旦反应完成, 加入 50 μ L 1XPBSE, 然后将整个反应加载到尺寸排阻柱上。

[0161] 由于未反应的 DTT 将干扰随后的步骤, 因此使用尺寸排阻层析将其除去。

[0162] 使用在 '0' (mL) 标志处截断的 5mL 塑料移液管制备 P-6 (Bio-Rad) 尺寸排阻柱,

将经硅化处理的玻璃棉置于所述移液管的尖端,并加入在高压灭菌的去离子水中预膨胀的 P-6 浆料直至柱子树脂填充至 '1' (mL) 标志处。用 5mL 高压灭菌的去离子水漂洗柱子。向该柱子中加载经 DTT 处理的合成寡核苷酸。使用水作为缓冲液将 14 个 200 μ L 的级分收集到分开的微量离心管中。通过特征性的黄色确定含有合成寡核苷酸的级分。此外,从每一个级分中取 1 μ L 样品,并点在置于 UV 透照仪上的保鲜膜 (saran wrap) 上。明亮地发荧光的点含有与荧光部分缔合的合成寡核苷酸,如图 23 中显示的。

[0163] 在尺寸排阻柱中,较大的分子(合成寡核苷酸)比较小的分子(DTT)更早洗脱。DTT 是未发现具有经荧光标记的合成寡核苷酸的级分中较小的分子洗脱物。黄色和发荧光的级分证实了合成寡核苷酸的存在,所述寡核苷酸含有共价连接至合成寡核苷酸的 6-FAM(6-羧基荧光素)荧光染料。

[0164] 组合含有发荧光材料的级分(图 23),并将其在黑暗中于 60 $^{\circ}$ C 下在真空离心机中干燥。

[0165] ALP 酶处理:

[0166] 当处理含巯氢基的寡核苷酸时,使 LC-SPDP 交联剂的 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯部分与存在于蛋白质分子上的胺基反应,形成交联剂与蛋白质的共价连接,留下暴露的 2-吡啶二硫基,该基团随后将被用于和与 DTT 反应的合成寡核苷酸反应。

[0167] 制备 20mM 的 N,N-二甲基甲酰胺中的 LC-SPDP(Pierce) 溶液,向 1mg 小牛小肠碱性磷酸酶[E. C. 3. 1. 3. 1](ALP) 中加入 5 μ L 该溶液,以 1XPBSE 补足 100 μ L。在振荡下使该反应在室温下进行 1 小时。将该材料加载到连接至 AKTAprime plus(Amersham Biosciences) 的 S-300 尺寸排阻柱上,使用 PrimeView 软件进行数据收集。从已反应的蛋白质样品中除去未反应的 LC-SPDP 交联剂以避免未反应的交联剂污染反应,在方法的下一步中所加入的合成寡核苷酸应当与经活化的蛋白质分子反应而不与未反应的交联剂反应。将 1/5X PBSE(27. 2mM NaCl, 0. 54mM KCl, 2mM Na₂HPO₄, 0. 4mM KH₂PO₄, 5mM EDTA, pH 7. 4) 用作缓冲液。利用 30 个 4mL 的级分以 2mL/ 分钟处理所述柱子,如图 24 中显示的。

[0168] 使用使级分号码与吸光度相结合的软件显示所产生的柱数据。

[0169] 在本实施例中,分别组合从 11 至 14 和 15 至 18 的级分。通过在 ULTRA-15 10 MWCO 渗滤柱(Amicon) 中以 4, 000 RPM 将样品离心 35 分钟而将所述级分浓缩至约 200-300 μ L。

[0170] 为了确认酶活性级分,向 1. 2M 二乙醇胺, 0. 5mM MgCl₂, 19mM 4-硝基酚磷酸盐中加入 1 μ L 的各级分。活性酶级分(级分 15 至 18) 在 5 分钟内转黄,指示 ALP 酶活性,将所述级分用于随后的处理。

[0171] 将含有活性酶活性和预计含有大量 LC-SPDP 缀合的蛋白质的浓缩的级分 15 至 18 直接加入干燥的经 DTT 处理的合成寡核苷酸中。使用干燥的合成寡核苷酸帮助了增加反应物的浓度。如上所述,共价连接的 LC-SPDP 交联剂的 2-吡啶二硫基将与经 DTT 处理的合成寡核苷酸上的巯氢基反应。轻轻地用移液管吸打溶液以确保干燥的合成寡核苷酸充分溶解。伴以振荡使其在 4 $^{\circ}$ C 下反应过夜。

[0172] 然后将与经 DTT 处理的合成寡核苷酸反应的经 LC-SPDP 活化的 ALP 加载到 S300 柱上并且如上所述进行处理,如图 25 中所显示的。

[0173] 组合来自级分 15 至 21 的主峰,如上所述通过渗滤进行浓缩。将材料在 4 $^{\circ}$ C 下于铝箔中贮藏。

[0174] 测试该材料以确认 A' 合成寡核苷酸的连接。产生了该材料的稀释液系列。向 18 μ L 1XPBSE(10-1) 中加入 2 μ L 的该材料, 向 18 μ L 1XPBSE(10-2) 中加入 2 μ L 的 10-1, 以及向 1XPBSE(10-3) 中加入 2 μ L 的 10-2。向 18 μ L 的血浆中加入 2 μ L 的这些稀释液的每一种, 并在含有具有结合的 A 合成寡核苷酸(上文所述)的珠的经修饰的 i-STAT“免疫”盒中进行测试。除了固定在电极上的珠之外, 所述盒与商业 cTnI 设备相同, 所述珠具有与珠连接的合成 DNA 寡核苷酸并且通过与 ALP 分子缀合的 DNA 提供 ALP 酶活性。带有 A' 合成寡核苷酸(与珠上的 A 序列结合)的 ALP 的存在, 在生电底物(对氨基苯酚磷酸盐)的存在下、在 ALP 切割之后产生被检测的电流计信号(参见图 26)。

[0175] 就酶活性、蛋白质浓度(使用 Bradford 法)测试该 DNA 缀合物、标记为 E0030。结果示于下表中。

[0176]

蛋白质浓度 (ug/mL)	186.7
酶特异性活性 (U/mg)	984.4

[0177] 检测抗体的处理:

[0178] 本部分描述抗体合成寡核苷酸缀合物的合成。

[0179] 合成寡核苷酸的处理:

[0180] 如上所述, 用硫醇处理合成寡核苷酸以产生游离硫氢基。

[0181] 将约 50,000pmol 的 A 合成寡核苷酸重悬于高压灭菌的去离子水中。然后加入 10 μ L 1XPBSE(136mM NaCl, 2.7mM KCl, 10.1mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, 5mM EDTA, pH 7.4) 和 20 μ L 高压灭菌的去离子水中的 1M DTT。使反应在室温下进行 15 分钟。一旦反应完成, 加入 20 μ L 1XPBSE, 将整个反应加载到尺寸排阻柱上。

[0182] 如上所述, 通过尺寸排阻层析从合成寡核苷酸中除去 DTT 以防止蛋白质分子的还原。

[0183] 使用在 '0' (mL) 标志处截断的 5mL 塑料移液管制备 P-6 (Bio-Rad) 尺寸排阻柱, 将经硅化处理的玻璃棉置于移液管的尖端, 加入在高压灭菌的去离子水中预膨胀的 P-6 浆料直至柱子树脂填充至 '1' (mL) 标志处。用 5mL 高压灭菌的去离子水漂洗柱子。向该柱子中加入经 DTT 处理的合成寡核苷酸。使用水作为缓冲液将 14 个 200 μ L 的级分收集在分开的微量离心管中。通过特征性的黄色确定含有合成寡核苷酸的级分。此外, 从每一个级分中取 1 μ L 样品, 并点在置于 UV 透照仪之上的保鲜膜上。明亮地发荧光的点含有合成寡核苷酸。

[0184] 组合含有发荧光的材料的级分, 在 60°C 下在真空离心机中使其干燥。

[0185] PEP-3F(ab')₂ 的处理:

[0186] 使用本领域内技术人员公知的标准方法, 通过胃蛋白酶切割 R&D Systems, Inc. 的山羊抗 TNI 肽 3 抗体(目录号 G-129-C)来制备 PEP-3F(ab')₂。伴随混合, 使约 200 μ L 中的 1mg 该蛋白质与 10 μ L 20mM LC-SPDP 在室温下反应 1.5 小时。然后如之前所述, 在 S-300 柱上加载并处理样品。

[0187] 如上所述组合级分 16 至 19(图 27) 并且通过渗滤将其浓缩至约 500 μ L 的终体积。将浓缩的、经 LC-SPDP 活化的 PEP-3F(ab')₂ 直接加入干燥的经硫醇处理的硫氢基 A 合成寡

核苷酸中。轻轻地用移液管吸打溶液以确保干燥的合成寡核苷酸的溶解。伴随振荡,将反应物在 4°C 下温育过夜。如之前所述,在 S-300 柱上纯化该材料(图 28)。

[0188] 通过测定 UV 荧光(通过将管置于 UV 透照仪上)检查级分。如上所述组合级分 18 至 21(图 28),通过渗滤将其浓缩。使用 Bradford 法就蛋白质浓度测试该抗体 DNA 缀合物,标记为 E0031,该缀合物经测定具有 54.5ug/mL 的蛋白质浓度。该蛋白质样品的黄色和 UV 荧光证实了合成寡核苷酸连接。

[0189] 使用基于 DNA 的缀合物检测分析物:

[0190] 通过使用标准 cTnI 盒及使用 MWC cTnI 分析物样品,有或没有缀合物样品时进行抗体竞争测定。信号的减少是分析物被 DNA 缀合物或包含 F(ab) 分子的标准缀合物的 F(ab) 分子结合的指示。上文中产生的 DNA 缀合物减少信号,并被怀疑具有如图 29 中观察到的分析物结合能力。

[0191] 测试分析物结合能力:

[0192] 使用基于 DNA 的缀合物检测分析物:

[0193] 将 4 μL PEP-3F(ab')₂-A[E0031] 加入 4 μL ALP-A'[E0030] 缀合物中,将 51.9pg cTnI MWC(制造商的工作校准品)加入 16 μL 血浆中,并在不含缀合物的‘免疫’i-STAT 盒(包含连接珠的捕获抗体、生电底物但不包含 cTnI 检测缀合物的标准 cTnI 盒,该能力由新合成的上述缀合物提供)中进行测试。还进行了无 MWC 的对照。

[0194] 图 30 暗示图 5 中描述的双重缀合物(ALP-A' + 抗体 -A) 结合捕获珠以产生小信号。对于任一样品,参照珠没产生显著的信号。

[0195] 实施例 2

[0196] 本发明的第二实施例是基于将检测抗体与 ALP 酶桥接为分析物的聚合缀合物(如图 6 中显示的)的合成寡核苷酸的酶联免疫测定(ELISA)。在本实施例中,使用连接至抗体的重复互补 DNA 序列产生信号缀合物,所述信号缀合物然后与多个 ALP-合成寡核苷酸缀合物杂交,当分析物存在时,所述 ALP-合成寡核苷酸缀合物在捕获位点增加可能的信号产生。通过产生合成 DNA 的环状片段,然后使用含 5'-硫氢基的合成寡核苷酸作为引物序列并使用用于滚环扩增的 Phi29DNA 聚合酶产生该序列的互补多聚体 DNA 来产生重复互补 DNA 序列。然后将特定的 DNA 序列缀合至抗体分子,继以与缀合有互补合成寡核苷酸的 ALP 分子的杂交。

[0197] 之前在上文中描述了光图样化金属的产生、捕获抗体与珠的缀合、盒的设计和装配以及微喷。

[0198] 合成寡核苷酸序列

[0199] A(DE)5'--硫氢基修饰剂 C6 S-S-(T)20-TGATCGCTACGGTGGTATTGT-3' (SEQ ID NO:3)

[0200] A'(AP)5'-硫氢基修饰剂 C6S-S-(T)20-ACAATACCACCGTAGCGATC*A-3' (SEQ ID NO:2)6FAM

[0201] X 5'-pACAATACCACCGTAGCGATCAAGTTATGCAACGCGGGAGTTGTGTATGAAGT-3' (SEQ ID NO:4)

[0202] * 表示硫代磷酸酯连接

[0203] (T)20 表示 20 个‘T’残基

[0204] p 表示磷酸化的 5'

[0205] ALP-A' DNA 蛋白质缀合物的产生

[0206] 如实施例 1 中描述的用于产生 ALP-A' DNA 蛋白质缀合物的相同方法用于实施例 2。该缀合物标记为 E0030。

[0207] PEP-3F(ab')₂ DNA 蛋白质缀合物的产生

[0208] 构建合成寡核苷酸环：

[0209] 用 20,000 个单位的 Circlase ssDNA 连接酶 (Epicentre) 在 0.05M MOPS(2-(N-吗啉代)丙磺酸), pH 7.5, 0.01M KCl, 5mM MgCl₂, 1.0mM DTT, 0.05mM ATP, 2.5mM MnCl₂ 中温育 100,000pmol 的合成寡核苷酸 X。使反应在 60°C 下过夜进行。将该材料的等分置于 4°C 下用于以后的凝胶分析。然后用 10,000 个单位的各核酸外切酶 I 和核酸外切酶 III 在 37°C 下处理经处理的合成寡核苷酸 45 分钟,接着通过在 90°C 加热 10 分钟进行灭活。然后如上所述,使用 P-6 树脂 (BioRad),通过尺寸排阻层析纯化经处理的寡核苷酸。然后通过 20% 丙烯酰胺 /7M 尿素变性凝胶上进行凝胶电泳来确认经处理的寡核苷酸是环状的。与未处理的合成寡核苷酸相比,电泳迁移的变化确认了环化。

[0210] 将 50,000pmol 的量的合成寡核苷酸 A 加入所制备的 1XPBSE 中的合成寡核苷酸 X 中。将混合物加热至 65°C,使其在具有 100mL 水的烧杯中在 1 小时中缓慢冷却至室温。这使含硫氢基的具有游离 3' 羟基的合成寡核苷酸与上述制备的环状 DNA 结构高效地退火。

[0211] 将经退火的反应物加入下列中:含有 40mM Tris-HCl, pH 7.5, 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 5mM(NH₄)₂SO₄, 4mM DTT 的终浓度的缓冲液和 2000 个单位的 RepliPhi Phi29 DNA 聚合酶以及各 40nmol 的 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP。这在 3' 羟基处延伸含硫氢基的合成寡核苷酸以基于环状模板产生确定的互补多聚体。此类多聚体的每一个含有 5' - 硫氢基和环状 DNA 的重复互补序列,并且被称为“有尾合成寡核苷酸 (tailed synthetic oligonucleotide)”。

[0212] 有尾合成寡核苷酸的处理：

[0213] 为了进行蛋白质-DNA 缀合,用硫醇 (DTT) 处理有尾合成寡核苷酸的经硫氢基修饰的部分以产生游离硫氢基,所述硫氢基随后可与通过其 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯基团连接至蛋白质的氨基的 LC-SPDP (琥珀酰亚胺 6-[3'-(2-吡啶二硫)丙酰胺]己酸酯交联剂的 2-吡啶二硫基反应。

[0214] 应当注意,通常在尽可能短的时间内进行该方法。将约 50,000pmol 的有尾 A' 合成寡核苷酸重悬于 10 μL 1XPBSE (136mM NaCl, 2.7mM KCl, 10.1mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, 5mM EDTA, pH 7.4) 中,并加入 20 μL 高压灭菌的去离子水中的 1M DTT (二硫苏糖醇)。使反应在室温下进行 15 分钟。一旦该反应完成,加入 50 μL 1XPBSE,然后将整个反应加载到尺寸排阻柱上。

[0215] 由于未反应的 DTT 将干扰随后的步骤,使用尺寸排阻层析将其除去。

[0216] 使用在 '0' (mL) 标志处截断的 5mL 塑料移液管制备 P-100 (Bio-Rad) 尺寸排阻柱,将经硅化处理的玻璃棉置于移液管的尖端,并加入在高压灭菌的去离子水中预膨胀的 P-100 浆料直至柱子树脂填充至 '1' (mL) 标志处。用 5mL 高压灭菌的去离子水漂洗柱子。向该柱子中加载经 DTT 处理的合成寡核苷酸。使用水作为缓冲液将 14 个 200 μL 的级分收集在分开的微量离心管中。组合在 260nm 处具有吸光度的样品,因为 DNA 在该波长处具有

吸光度。组合 DNA 吸收性级分,并在 60°C 下在真空离心机中使其干燥。

[0217] PEP-3F(ab')₂ 的处理:

[0218] 使用标准方法,通过胃蛋白酶切割 R&D Systems, Inc. 的山羊抗 TNF 肽 3 抗体 (目录号 G-129-C) 来制备 PEP-3F(ab')₂。伴随混合,使约 200 μL 中的 1mg 该蛋白质与 10 μL 20mM LC-SPDP 在室温下反应 1.5 小时。然后如之前所述,在 S-300 柱上加载并处理样品。

[0219] 如上所述,组合含有最大吸收峰的级分并且通过渗滤将其浓缩至约 500 μL 的终体积。将浓缩的经 LC-SPDP 活化的 PEP-3F(ab')₂ 直接加入到干燥的经硫醇处理的硫氢基 A 有尾合成寡核苷酸中。轻轻地用移液管吸打溶液以确保干燥的 DNA 的溶解。伴随振荡,将反应物在 4°C 下温育过夜。如之前所述,在 S-300 柱上纯化该材料。

[0220] 利用基于 DNA 的缀合物检测分析物:

[0221] 将 4 μL PEP-3F(ab')₂ 一有尾寡核苷酸加入 4 μL ALP-A' [E0030] 缀合物中,并将 51.9pg cTnI MWC (制造商的工作校准品) 加入 16 μL 血浆中,且在不含缀合物的 '免疫' i-STAT 盒 (含有连接珠的捕获抗体、生电底物但不含有 cTnI 检测缀合物的标准 cTnI 盒,该能力由新合成的上述缀合物提供) 中进行测试。也进行了无 MWC 的对照。

[0222] 实施例 3

[0223] 本发明的另一个实施例是基于将检测抗体与 ALP 酶桥接为分析物的聚合缀合物 (如图 6 中显示的) 的合成寡核苷酸的酶联免疫测定 (ELISA)。在本实施例中,利用连接至抗体的重复互补 DNA 序列产生缀合物,然后所述缀合物与多个 ALP-合成寡核苷酸缀合物杂交,当分析物存在时,所述 ALP-合成寡核苷酸缀合物在捕获位点增加可能的信号产生。通过将合成寡核苷酸克隆到噬菌粒中,利用本领域技术人员公知的技术分离单链 DNA 产生重复互补 DNA 序列,然后使用含 5' 硫氢基的合成寡核苷酸作为引物序列并使用 T4 DNA 聚合酶 (或具有链置换能力的任意其它 DNA 聚合酶) 产生该序列的互补多聚体 DNA。然后将特定的 DNA 序列缀合至抗体分子,继以与缀合有互补合成寡核苷酸的 ALP 分子的杂交。

[0224] 之前在上文中描述了光图样化金属的产生、捕获抗体至珠的缀合、盒的设计和装配以及微喷。

[0225] 合成寡核苷酸序列

[0226] A(DE)5' -- 硫氢基修饰剂 C6 S-S-(T)20-TGATCGCTACGGTGGTATTGT-3' (SEQ ID NO:3)

[0227] A' (AP)5' - 硫氢基修饰剂 C6 S-S-(T)20-ACAATACCACCGTAGCGATC*A-3' 6FAM (SEQ ID NO:2)

[0228] Y 5' -AATTACAATACCACCGTAGCGATCACTACT-3' (SEQ ID NO:5)

[0229] Y' 5' -AGCTAGTAGTGATCGCTACGGTGGTATTGT-3' (SEQ ID NO:6)

[0230] * 表示硫代磷酸酯连接

[0231] (T)20 表示 20 个 'T' 残基

[0232] p 表示磷酸化的 5'

[0233] ALP-A' DNA 蛋白质缀合物的产生

[0234] 如实施例 1 中描述的用于产生 ALP-A' DNA 蛋白质缀合物的相同方法用于实施例 3。该缀合物被标记为 E0030。

[0235] 单链环状 DNA 模板的克隆和产生

[0236] 将利用 DNA 质粒来产生可具有克隆至其中的特定 DNA 片段的环状 DNA 片段。可使用辅助噬菌体将含有 f1 复制起始点的噬菌粒质粒转变成单链 DNA。可容易地增加该单链 DNA, 将其分离和纯化。所有的方案对于本领域技术人员来说都是公知的并且基于见于 Sambrook 和 Russell (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 3 版, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 冷泉港, 纽约) 中的方案。然后可使用链置换 DNA 聚合酶 (如 Phi29 或 T4 DNA 聚合酶) 将该材料随后用于产生用于 ELISA 测定的有尾 DNA 片段。

[0237] 使用 NEBuffer 2 在 37°C 下用各 100U 的 R. EcoRI 和 R. HindIII 限制性酶 (New England Biolabs) 限制性酶切消化 10ug 质粒 pGEM 11Zf+ (Promega Corp, Genbank 序列信息: X65313) 1 小时。然后用 100U 的热敏磷酸酶 (Antarctic Phosphatase) (NEB) 在 37°C 下处理经限制性酶切的 DNA 进行 1 小时, 然后在 65°C 下加热 5 分钟进行灭活。使用低熔点琼脂糖凝胶来凝胶纯化该材料, 然后使用 β -琼脂糖酶 (New England Biolabs) 除去琼脂糖, 使用制造商的方案用于 DNA 的乙醇沉淀。将 DNA 在 60°C 下真空干燥, 然后重悬于 20uL 水中。

[0238] 将 100pmol 的合成寡核苷酸 Y 和 Y' 组合并且通过首先加热至 65°C, 并于 100mL 水中缓慢冷却至室温而使其在 TE 缓冲液 (10mM Tris, pH 7.6, 0.1mM EDTA) 中杂交约 1 小时。然后将杂交的合成寡核苷酸加入如上制备的限制酶切消化的质粒中。使用 100U T4 DNA 连接酶于 14°C 下过夜连接 DNA。并且连接含有 R • EcoRI 和 R • HindIII 各 20 个单位。为了减少未切割的材料背景, 然后按照制造商的说明书用 R. BamHI (New England Biolabs) 在 37°C 下限制性酶切消化连接的混合物 1 小时。利用苯酚 / 醚抽提反应物, 然后通过乙醇沉淀浓缩, 接着如上所述进行凝胶纯化。

[0239] 然后按照 Hanahan 等人 (1991, "Plasmid Transformation of *Escherichia coli* and other bacteria", *Methods in Enzymology*, 第 204 卷: 63-113) 的方案将纯化的 DNA 转化到感受态 Invitrogen Top10F' 感受态细菌细胞 (Invitrogen) 中。此类细胞有能力摄取 DNA。此类细胞在互补性 lacZ 基因中包含缺失, 对氨苄西林、四环素和卡那霉素敏感, 含有可利用四环素选择的并且允许利用噬菌粒产生单链 DNA 的雄性 F' 附加体 (F'-episome), 包含可用 IPTG 严格去抑制的 lacIq 抑制子和 endA1 用于减少核酸内切酶活性。将转化的材料涂板至具有 10ug/mL 氨苄西林的 2xYT 培养板上并且于 37°C 下生长过夜。选择 12 个单个的集落并且使其在 5mL 具有 100ug/mL 氨苄西林的 2xYT 培养液中于 37°C 下生长过夜。使用快速质粒制备 (Birnboim & Doly, 1979, *Nucleic Acids Research*, 第 7 卷 (6): 1513-1523) 来制备质粒 DNA。将 DNA 重悬于 20uL 水中。用 10 个单位的 R • BamHI 在 37°C 下限制性酶切消化 5uL 的各集落 DNA 制备物, 进行约 2 小时。在 0.5% 琼脂糖凝胶 (1X TBE) 上电泳经限制性酶切消化的 DNA。观察到 DNA 未被 R • BamHI 切割, 选择明显共价闭合的环状 (CCC) DNA 条带用以进行 DNA 测序 (图 31)。使用 M13 正向引物 (SEQ ID NO. 7) 对这些克隆进行测序。

[0240] 使用 Sambrook & Russell (上文) 的方案由培养在 5ml 含有 60ug/mL 氨苄西林的 2xYT 培养液中的细胞和含有 25ug/mL 卡那霉素的 M13K07 辅助噬菌体制备来自推定的克隆和未处理的噬菌粒克隆的单链 DNA。使用由末端脱氧核糖核苷转移酶标记的合成寡核苷酸 A 制成的 α -³²P 放射性标记的探针, 利用斑点印迹法筛选这些单链制备物。

[0241] 将来自斑点印迹分析的两个阳性克隆增加到 10x 500mL, 如上所述, 从这些培养液

制备单链 DNA, 产生约 1mg 的单链模板 DNA。

[0242] PEP-3F(ab')₂ DNA 蛋白质缀合物的产生

[0243] 将 5,000pmol 的量的合成寡核苷酸 A 加入所制备的 1XPBSE 中的单链 DNA 模板中。将混合物加热至 65°C, 使其在含有 100mL 水的烧杯中在 1 小时中缓慢冷却至室温。这使含硫氢基的具有游离 3' - 羟基的合成寡核苷酸与上述制备的环状 DNA 结构高效地退火。

[0244] 将退火的反应物加入下列中: 含有 40mM Tris-HCl, pH 7.5, 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 5mM(NH₄)₂SO₄, 4mM DTT 的终浓度的缓冲液和 2000 个单位的 RepliPhi Phi29 DNA 聚合酶以及各 40nmol 的 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP。这在 3' - 羟基处延伸含硫氢基的合成寡核苷酸以基于环状模板产生确定的互补多聚体。此类多聚体的每一个包含 5' - 硫氢基和环状 DNA 的重复互补序列, 并且被称为“有尾合成寡核苷酸”。

[0245] 有尾合成寡核苷酸的处理:

[0246] 为了进行蛋白质 -DNA 缀合, 用硫醇 (DTT) 处理有尾合成寡核苷酸的经硫氢基修饰的部分以产生游离硫氢基, 所述硫氢基随后可与通过其 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯基团连接至蛋白质的胺基的 LC-SPDP (琥珀酰亚胺 6-[3' -(2- 吡啶二硫) 丙酰胺] 己酸酯交联剂的 2- 吡啶二硫基反应。

[0247] 应当注意, 通常在尽可能短的时间内进行该方法。将约 5,000pmol 的有尾 A' 合成寡核苷酸重悬于 10 μL 1XPBSE (136mM NaCl, 2.7mM KCl, 10.1mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, 5mM EDTA, pH 7.4) 中, 并加入 20 μL 高压灭菌的去离子水中的 1M DTT (二硫苏糖醇)。使反应在室温下进行 15 分钟。一旦该反应完成, 加入 50 μL 1XPBSE, 然后将整个反应加载到尺寸排阻柱上。

[0248] 由于未反应的 DTT 将干扰随后的步骤, 使用尺寸排阻层析将其除去。

[0249] 使用在 '0' (mL) 标志处截断的 5mL 塑料移液管制备 P-100 (Bio-Rad) 尺寸排阻柱, 将经硅化处理的玻璃棉置于移液管的尖端, 加入在高压灭菌的去离子水中预膨胀的 P-100 浆料直至柱子树脂填充至 '1' (mL) 标志处。用 5mL 高压灭菌的去离子水漂洗柱子。向该柱子中加载经 DTT 处理的合成寡核苷酸。使用水作为缓冲液将 14 个 200 μL 的级分收集在分开的微量离心管中。组合在 260nm 处具有吸光度的样品, 因为 DNA 在该波长处具有吸光度。组合 DNA 吸收性级分, 在 60°C 下在真空离心机中使其干燥。

[0250] PEP-3F(ab')₂ 的处理:

[0251] 使用标准方法, 通过胃蛋白酶切割 R&D Systems, Inc. 的山羊抗 TNF 肽 3 抗体 (目录号 G-129-C) 来制备 PEP-3F(ab')₂。伴随混合, 使约 200 μL 中的 100ug 该蛋白质与 10 μL 20mM LC-SPDP 在室温下反应 1.5 小时。然后如之前所述, 在 S-300 柱上加载并处理样品。

[0252] 如上所述, 组合含有最大吸收峰的级分并且通过渗滤将其浓缩至约 500 μL 的终体积。将浓缩的经 LC-SPDP 活化的 PEP-3F(ab')₂ 直接加入干燥的经硫醇处理的硫氢基 A 有尾 DNA 中。轻轻地用移液管吸打溶液以确保干燥的 DNA 的溶解。伴随振荡, 将反应物在 4°C 下温育过夜。如之前所述, 在 S-300 柱上纯化该材料。

[0253] 使用基于 DNA 的缀合物检测分析物:

[0254] 将 4 μL PEP-3F(ab')₂-A 有尾 DNA 加入 4 μL ALP-A' [E0030] 缀合物中, 且将 51.9pg cTnI MWC (制造商的工作校准品) 加入 16 μL 血浆中, 在不含缀合物的 '免疫' i-STAT 盒 (包含连接珠的捕获抗体、生电底物但不包含 cTnI 检测缀合物的标准 cTnI

盒,该能力由新合成的上述缀合物提供)中进行测试。也进行了无 MWC 的对照。

[0255] 虽然已参考示例性的实施方式和实施例描述了本发明,但并非意在以限定性的意义解释这些描述。因此,在参考本说明书时,本发明的示例性实施方式以及其它实施方式的各种修饰对于本领域技术人员来说将是显而易见的。因此预期所附权利要求将涵盖任何此类变动或实施方式。本文中引用的所有出版物、专利和专利申请以其全部通过引用而并入,该引用的程度就如同各个单独的出版物、专利或专利申请被特定地及个别地显示以其全部通过引用而并入一样。

[0256] 本发明的一些实施方案如下:

[0257] 1. 用于进行免疫测定的一次性盒,其包括:

[0258] 用于接受怀疑含有靶分析物的生物样品的样品入口,

[0259] 包含电极的管道,

[0260] 包含洗涤液的区域,和

[0261] 废料室,

[0262] 其中在所述电极上形成免疫测定,所述免疫测定包括

[0263] 结合至所述靶分析物的固定的第一抗体,

[0264] 针对所述靶分析物的第二抗体,其中将所述第二抗体连接至第一单链核苷酸;以及

[0265] 一个或多个各自连接至具有所述第一单链核苷酸的互补碱基对的第二单链核苷酸的信号元件;

[0266] 其中所述洗涤液体能够将所述生物样品从所述管道中的所述电极洗入所述废料室。

[0267] 2. 实施方案 1 的盒,其中所述一个或多个信号元件包括选自荧光、比色和放射性元素的非酶促检测部分。

[0268] 3. 实施方案 1 的盒,其中所述一个或多个信号元件包括一个或多个信号酶,所述盒还包括:

[0269] 含有酶底物的区域,

[0270] 其中所述酶底物能够与所述一个或多个信号酶反应以在所述电极处产生与所述生物样品中的所述靶分析物的量成比例的信号。

[0271] 4. 实施方案 3 的盒,其中所述第一抗体结合靶分析物的第一表位。

[0272] 5. 实施方案 3 的盒,其中所述第二抗体结合靶分析物的第二表位。

[0273] 6. 实施方案 3 的盒,其中所述一个或多个信号酶选自碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶、尿素酶、辣根过氧化物酶、半乳糖氧化酶和 β -半乳糖苷酶。

[0274] 7. 用于免疫测定的物质组合物,其包含:

[0275] 共价地连接至第一核苷酸的 FAB 片段;和

[0276] 一个或多个各自共价地连接至第二核苷酸的信号元件,

[0277] 其中所述第一核苷酸具有一个或多个重复序列,并且其中所述第二核苷酸结合至所述第一核苷酸上的所述一个或多个重复序列之一,并且其中 FAB 片段与信号元件的比率受重复序列的数目控制。

[0278] 8. 实施方案 7 的物质组合物,其中所述一个或多个信号元件包含选自荧光、比色

和放射性元素的非酶促检测部分。

[0279] 9. 实施方案 7 的物质组合物,其中所述一个或多个信号元件包括一个或多个信号酶。

[0280] 10. 实施方案 9 的物质组合物,其中所述第一核苷酸和第二核苷酸在核苷酸序列的 5' 末端、3' 末端或内部包含偶联部分。

[0281] 11. 实施方案 10 的物质组合物,其中所述偶联部分由选自氨基修饰剂、巯基修饰剂和二硫酚的经修饰的亚磷酰胺产生。

[0282] 12. 实施方案 9 的物质组合物,其中通过掺入保护性化学基团保护合成寡核苷酸的 3' - 末端或 5' - 末端免受样品中的内源性核酸外切酶活性的破坏。

[0283] 13. 实施方案 12 的物质组合物,其中所述保护性化学基团是硫代磷酸酯。

[0284] 14. 实施方案 9 的物质组合物,其中所述一个或多个信号酶选自碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶、尿素酶、辣根过氧化物酶、半乳糖氧化酶和 β - 半乳糖苷酶。

[0285] 15. 实施方案 9 的物质组合物,其中所述第一核苷酸具有至少 3 个重复序列,所述至少 3 个重复序列结合具有至少 3 个所述一个或多个信号酶的至少 3 个第二序列。

[0286] 16. 实施方案 9 的物质组合物,其中所述第一核苷酸具有至少 5 个重复序列,所述至少 5 个重复序列结合具有至少 3 个所述一个或多个信号酶的至少 5 个第二序列。

[0287] 17. 测定分析物在生物样品中的存在的方法,其包括:

[0288] 接触所述生物样品从而使所述分析物结合固定的第一抗体和第二抗体以形成免疫测定,其中所述第二抗体通过合成的核苷酸桥与至少一个信号酶结合;

[0289] 从所述免疫测定洗涤所述生物样品;以及

[0290] 基于通过与信号酶反应产生的信号确定所述分析物的存在。

[0291] 18. 确定患者是否可能患心肌梗塞的方法,其包括:

[0292] (a) 将来自患者的样品施用至能够结合 cTnI 上的第一表位的第一抗体所结合的表面;

[0293] (b) 加入能够结合 cTnI 上的第二表位的第二抗体,其中所述第二抗体还包含结合一个或多个第二链多核苷酸的第一链多核苷酸序列,所述第二链多核苷酸结合信号元件;和

[0294] (c) 测定所述第二抗体的结合程度。

[0295] 19. 实施方案 18 的方法,其中所述信号元件包括信号酶。

[0296] 20. 实施方案 18 的方法,其中所述患者在步骤 (a) 之前未患有心肌梗塞。

[0297] 21. 包含信号缀合物的信号缀合物批次,其中至少 80mol% 的信号缀合物具有约 2 至约 20 个信号元件 / 信号缀合物。

[0298] 22. 实施方案 21 的信号缀合物批次,其中至少 80mol% 的信号缀合物具有约 5 至约 10 个信号元件 / 信号缀合物。

[0299] 23. 包含信号缀合物的信号缀合物批次,其中至少 80mol% 的信号缀合物具有约 1 至约 4 个信号抗体 / 信号缀合物。

[0300] 24. 实施方案 23 的信号缀合物批次,其中至少 80mol% 的信号缀合物具有约 2 个信号抗体 / 信号缀合物。

[0301] 25. 包含信号缀合物的信号缀合物批次,其中至少 80mol% 的信号缀合物具有的

信号元件与信号抗体的摩尔比在约 0.5 至约 20 的范围内。

[0302] 26. 实施方案 25 的信号缀合物批次, 其中至少 80mol% 的信号缀合物具有的信号元件与信号抗体的摩尔比在约 0.5 至约 5 的范围内。

[0001]

序列表

- <110> COLLIER, Gordon Bruce
MILLER, Cary James
- <120> 用于使用核苷酸缀合物的免疫测定的方法和设备
- <130> 215105-02601
- <150> US 61/142,048
- <151> 2008-12-31
- <160> 7
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 41
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> 氨基 C12 修饰剂在 5' 端
- <400> 1
tttttttttt tttttttttt tgaicgctac ggtggtattg t 41
- <210> 2
- <211> 41
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> 硫氢基修饰剂 C6 S-S 在 5' 端
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (40)..(41)
- <223> 硫代磷酸酯连接
- <400> 2
tttttttttt tttttttttt acaataccac cgtagegatc a 41
- <210> 3
- <211> 41
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成的寡核苷酸
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> 硫氢基修饰剂 C6 S-S 在 5' 端
- <400> 3
tttttttttt tttttttttt tgaicgctac ggtggtattg t 41
- <210> 4

[0002]

<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(1)	
<223>	磷酸化的 5' 端	
<400>	4	
	acaataccac cgtagcgatc aagttatgca acgcgggagt tgtgtatgaa gt	52
<210>	5	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	5	
	aattacaata ccaccgtagc gatcactact	30
<210>	6	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	6	
	agctagtagt gatcgctacg gtggtattgt	30
<210>	7	
<211>	225	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	7	
	tgtatacgcac tcactatagg gcgaattggc caagtcggcc gagctcgaat tacaatacca	60
	ccgtagcgat caetactagc ttgagtattc tatagtgtca cctaaatagc ttggcgtaat	120
	catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatcgct cacaattcca cacaacatac	180
	gagccggaag cataaagtgt aaagcciggg gtcctaatag agtga	225

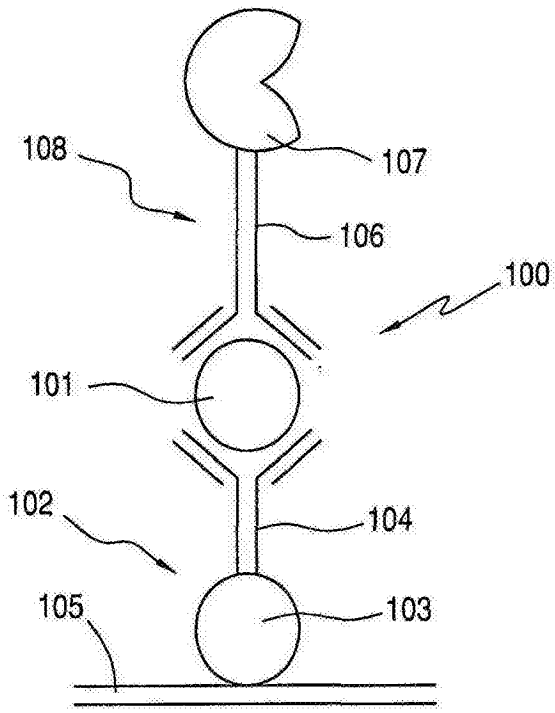


图 1 现有技术

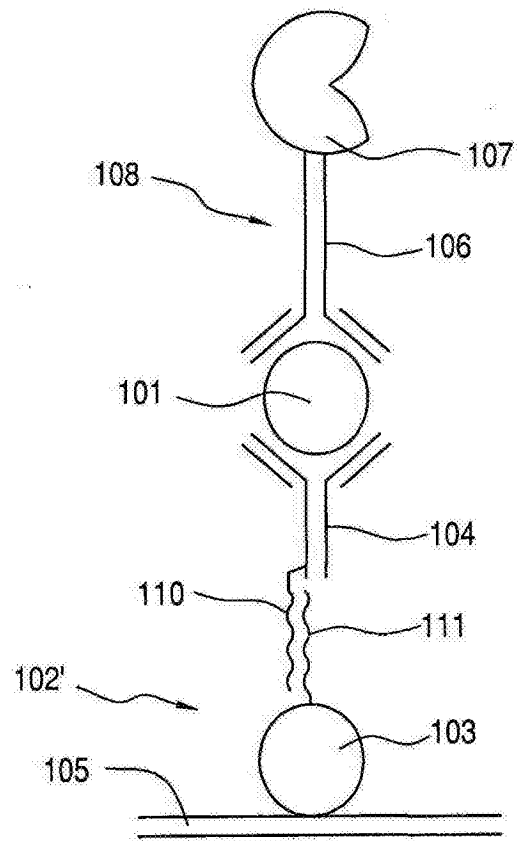


图 2 现有技术

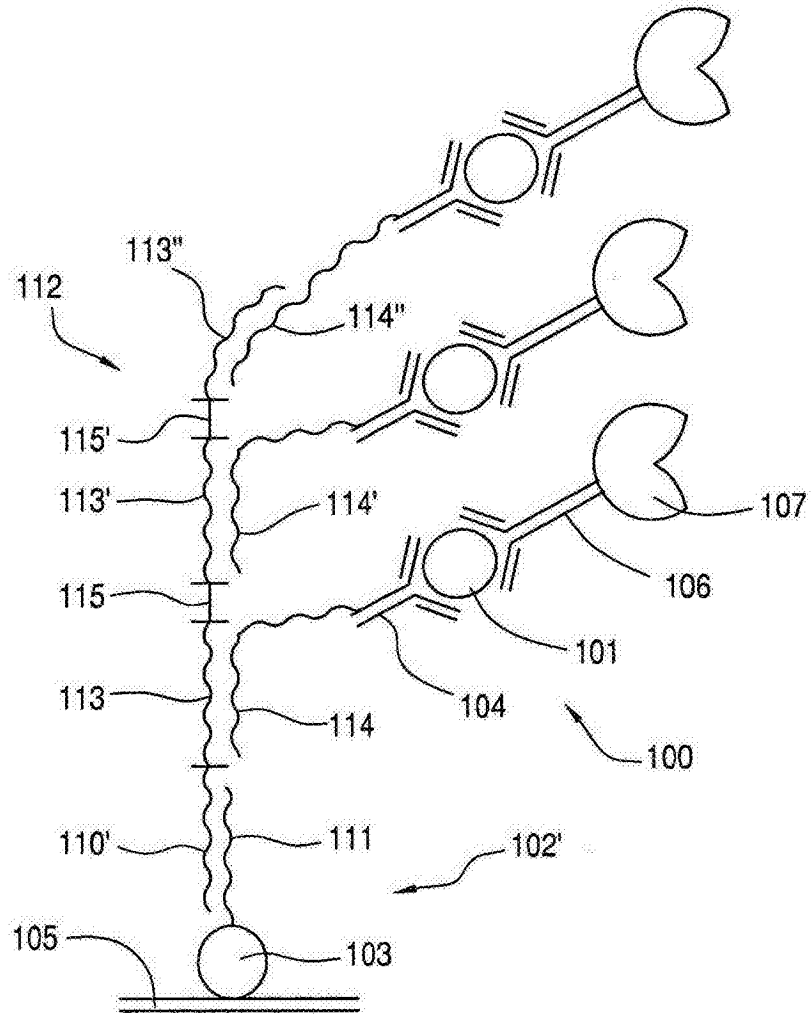


图 3 现有技术

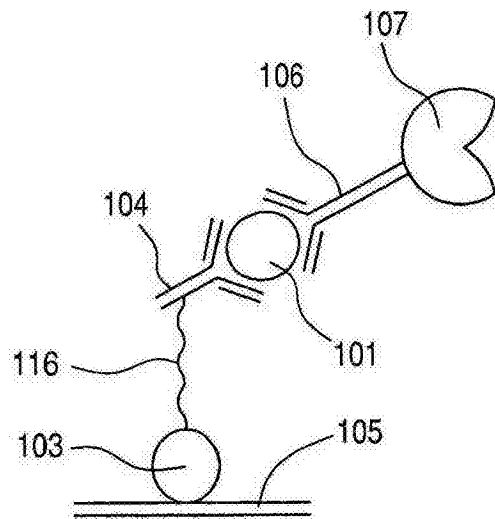


图 4 现有技术

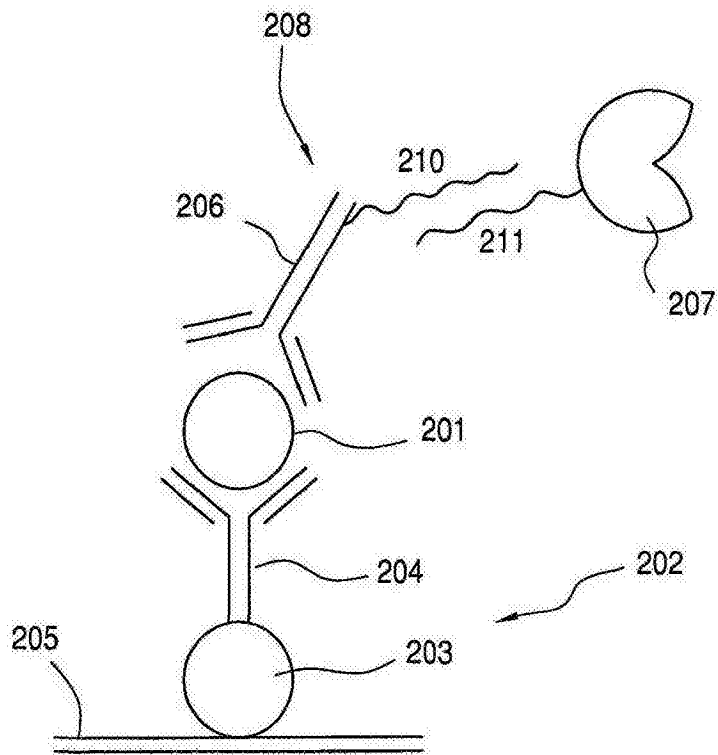


图 5

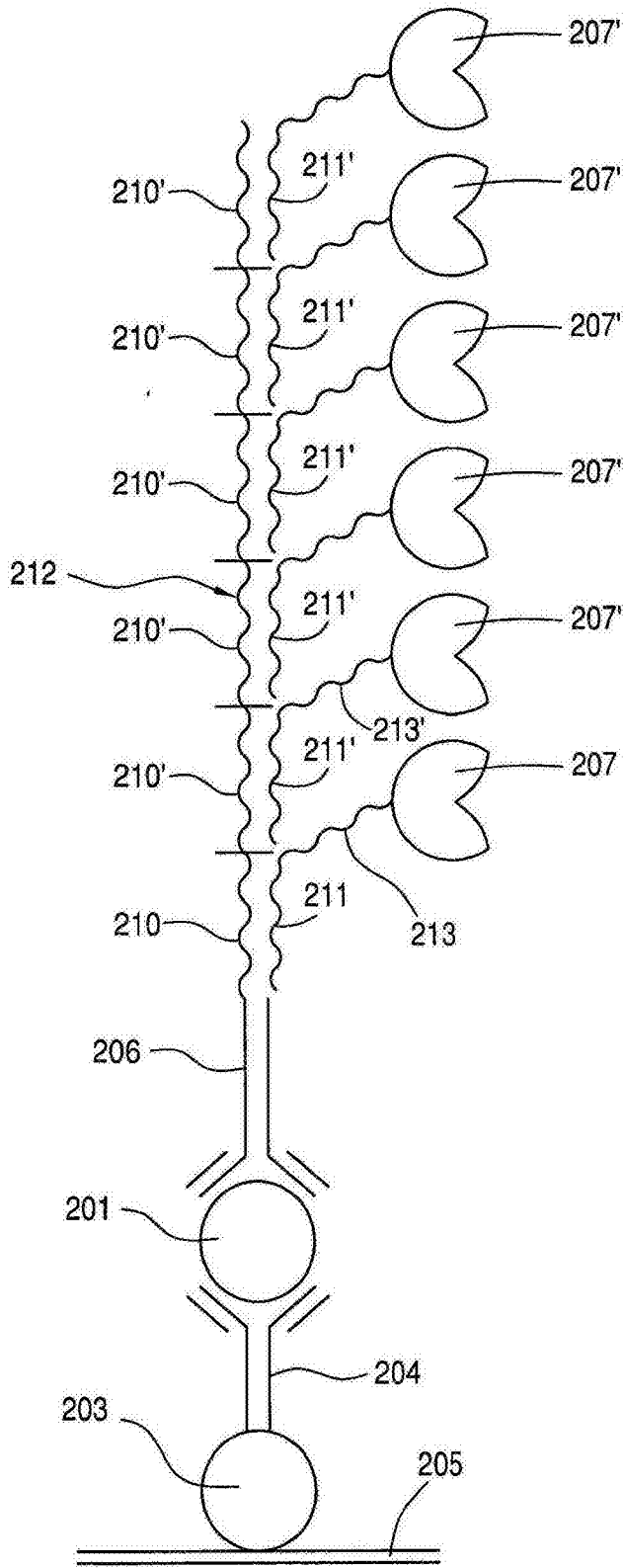


图 6

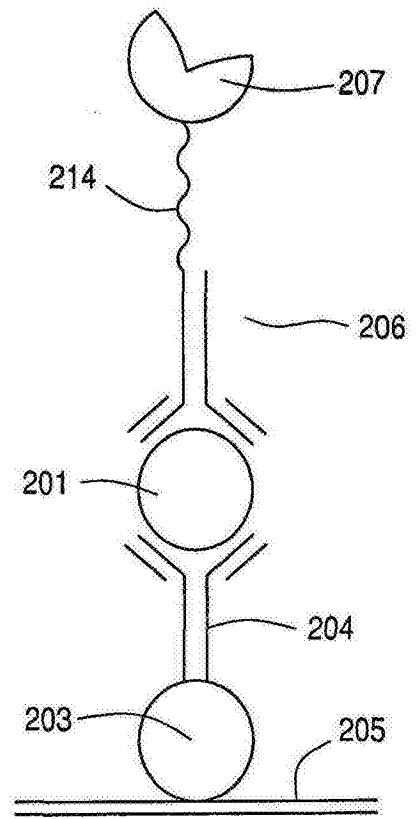


图 7

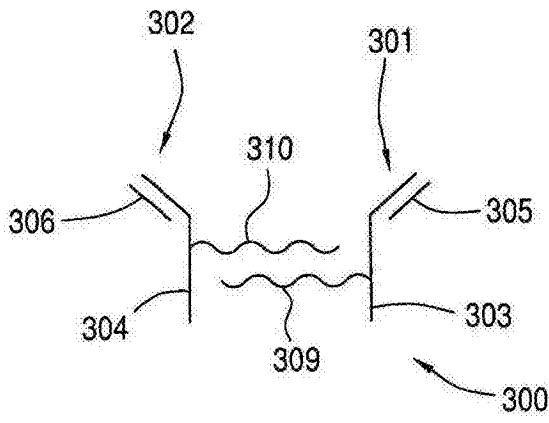


图 8

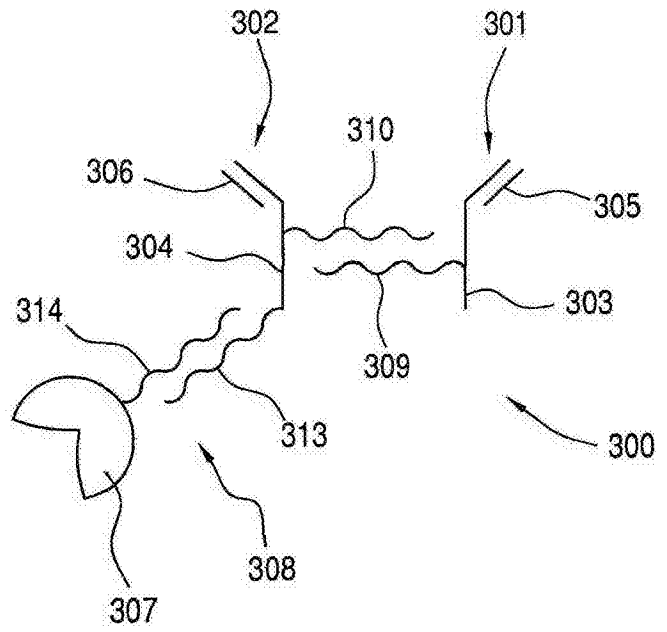


图 9

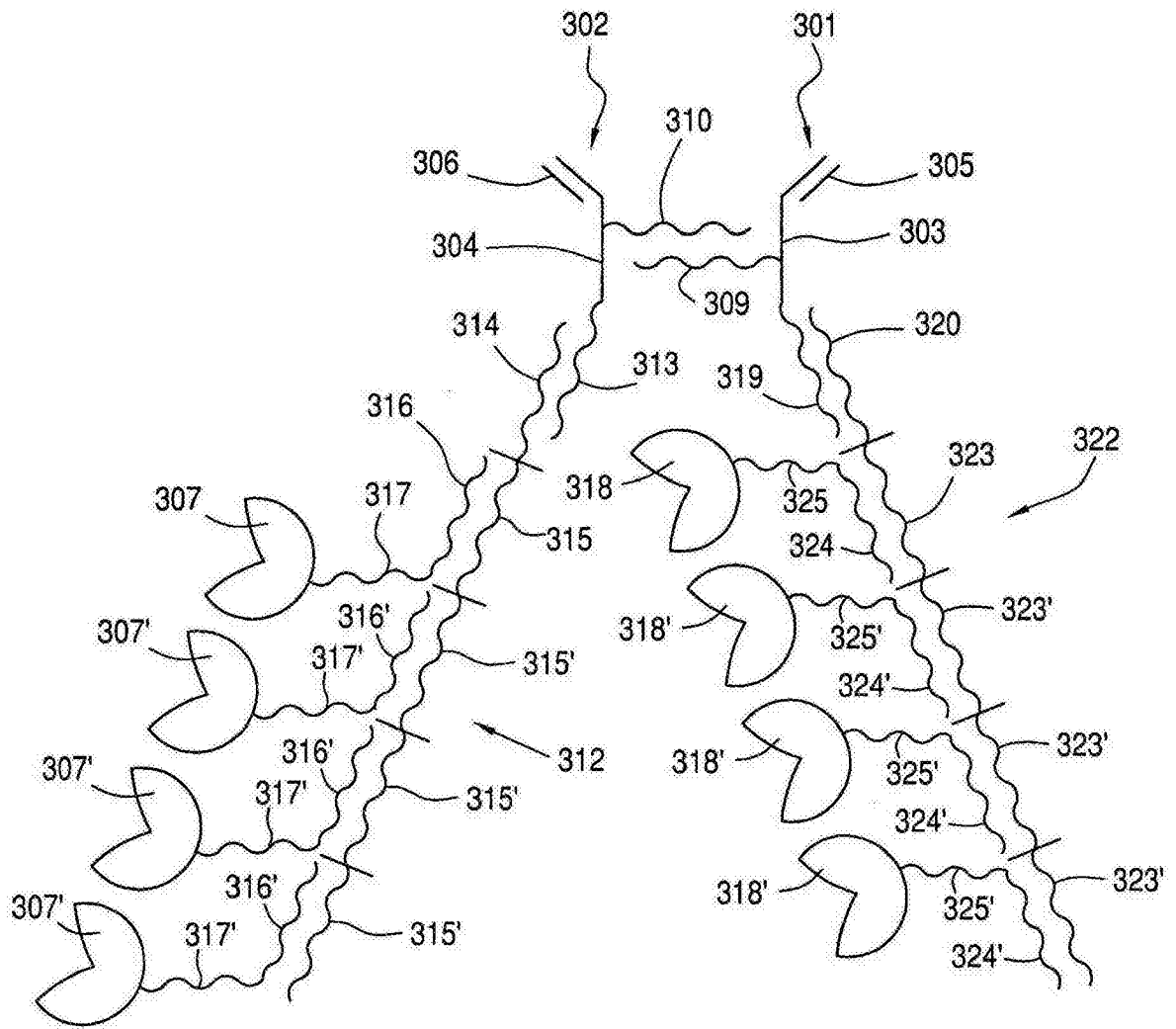


图 10

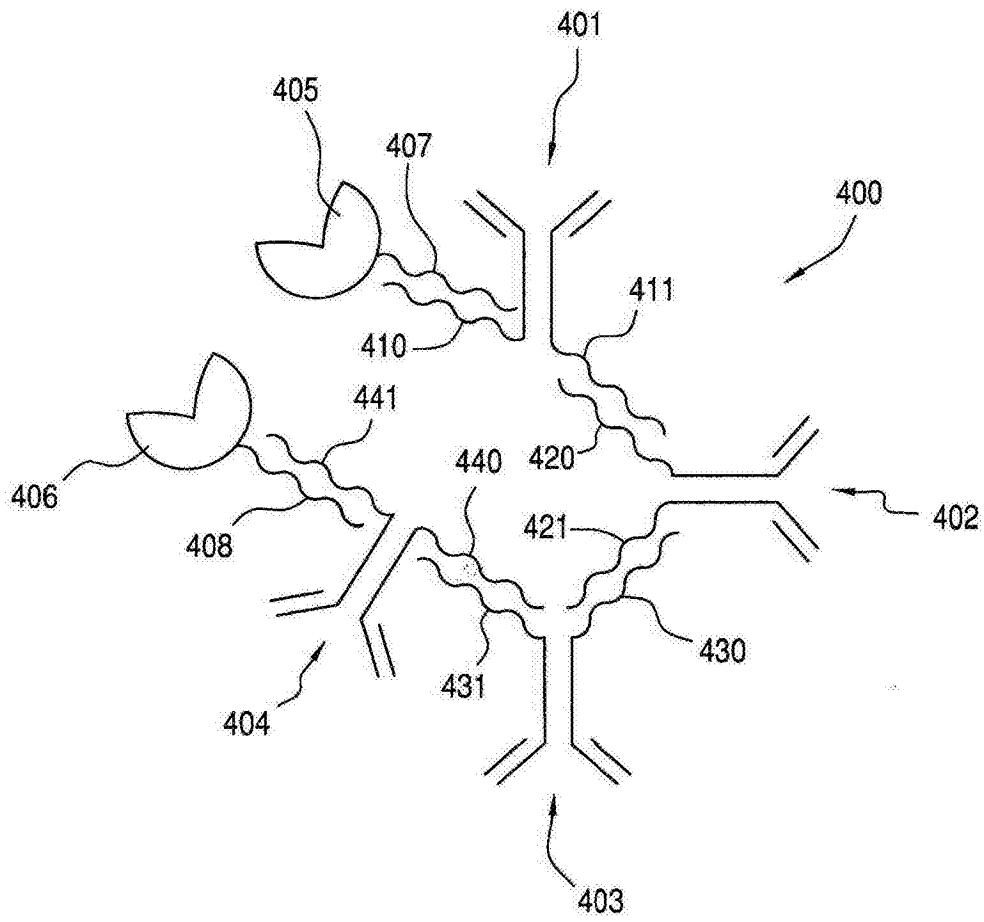


图 11

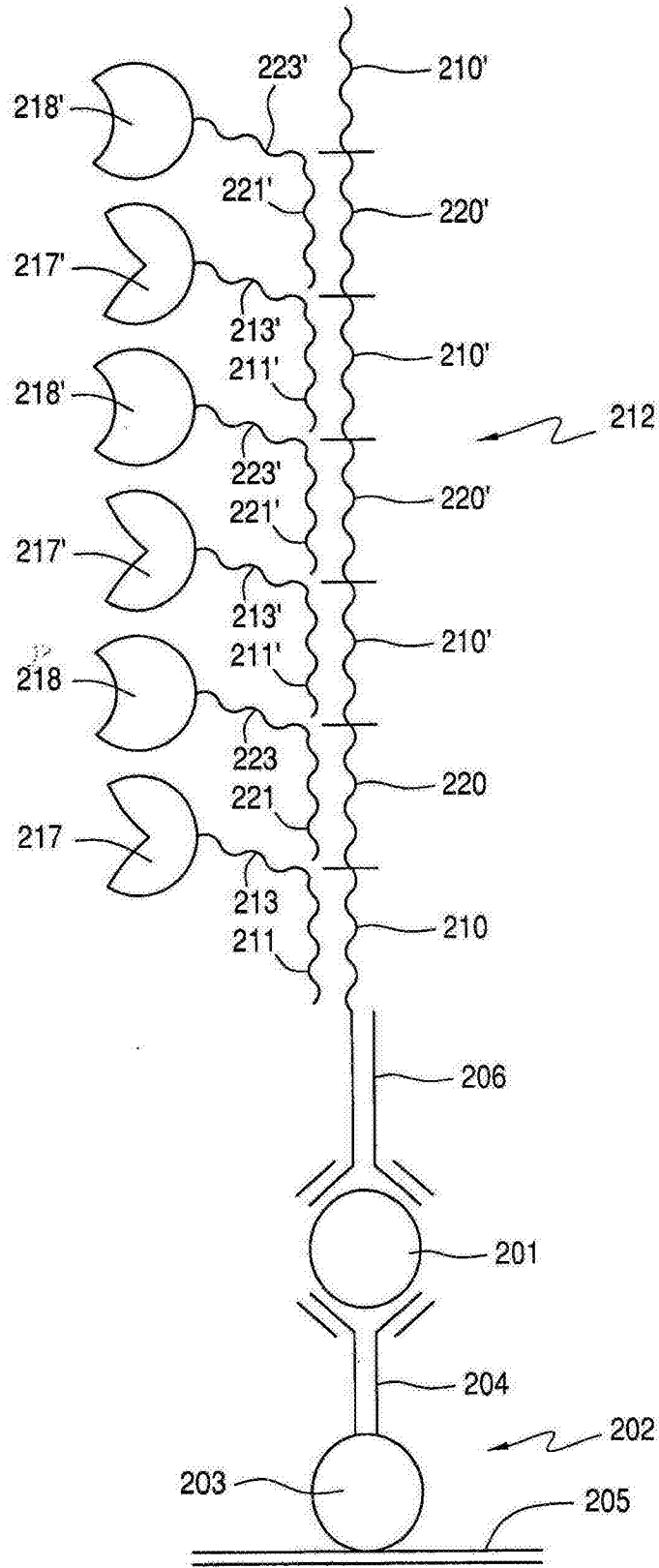


图 12

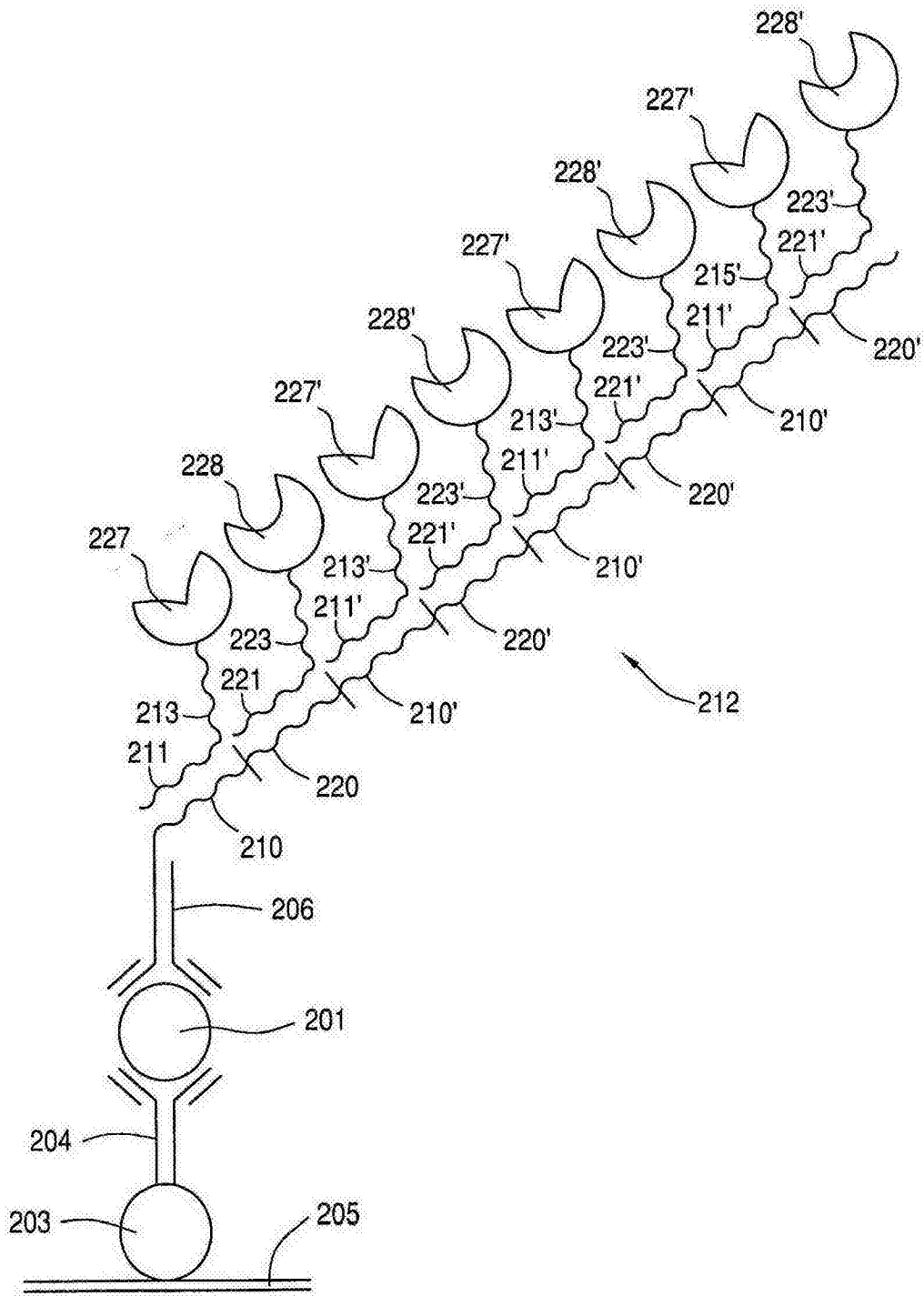


图 13

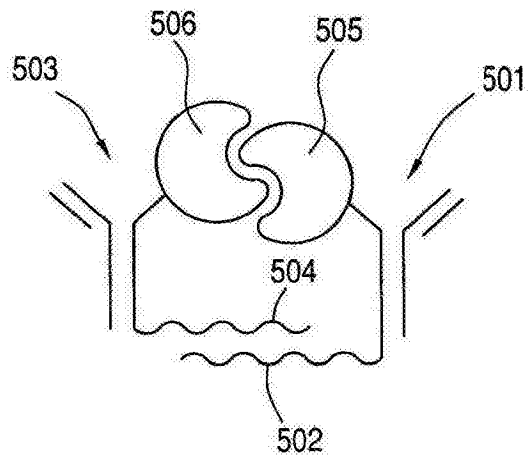


图 14

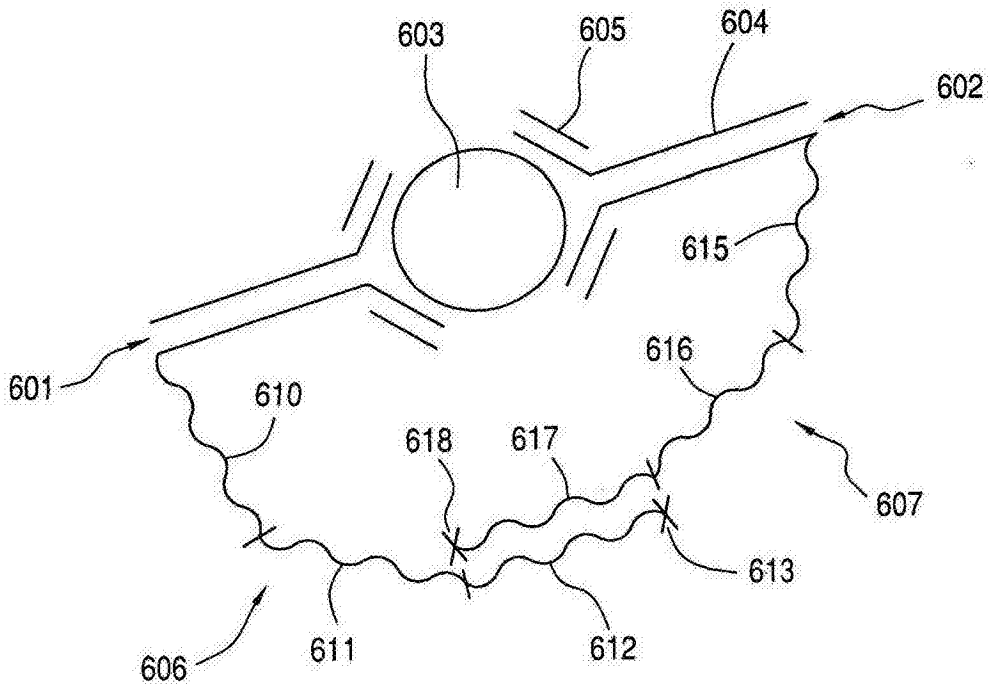


图 15A

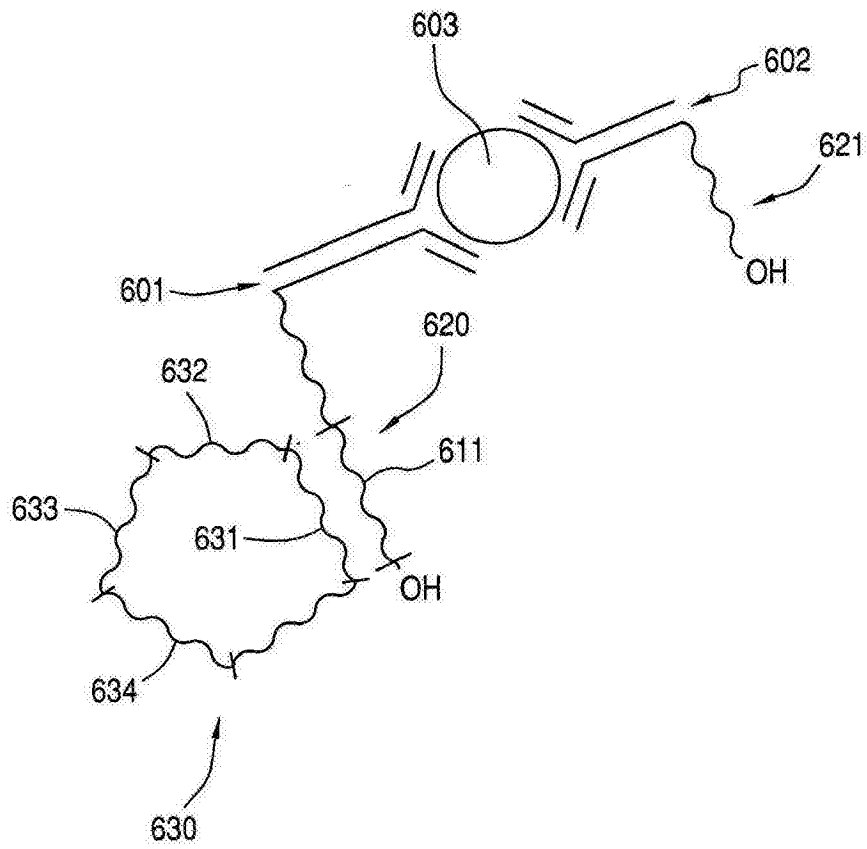


图 15B

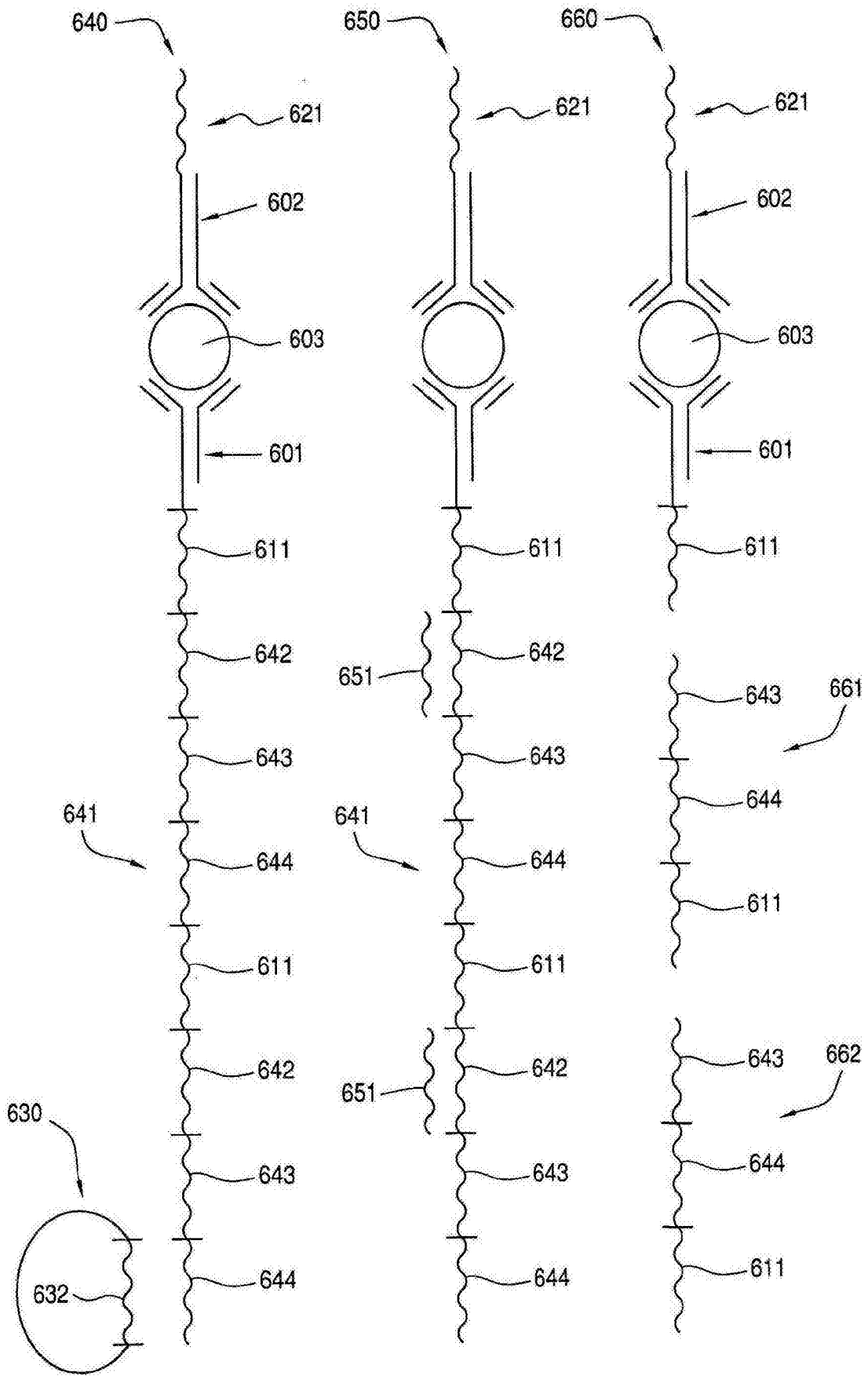


图 15C

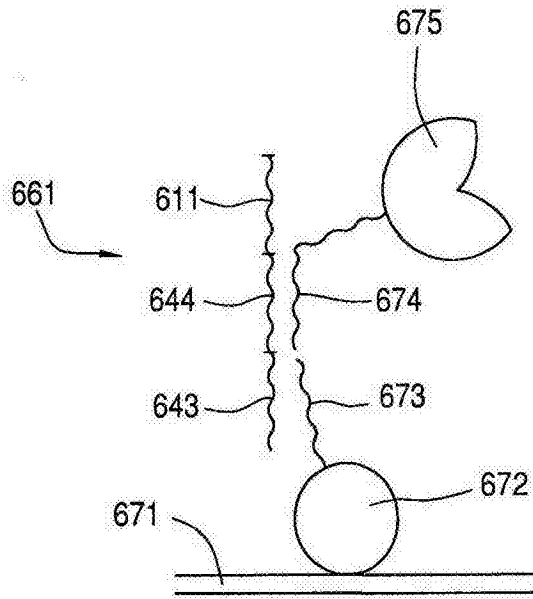


图 15D

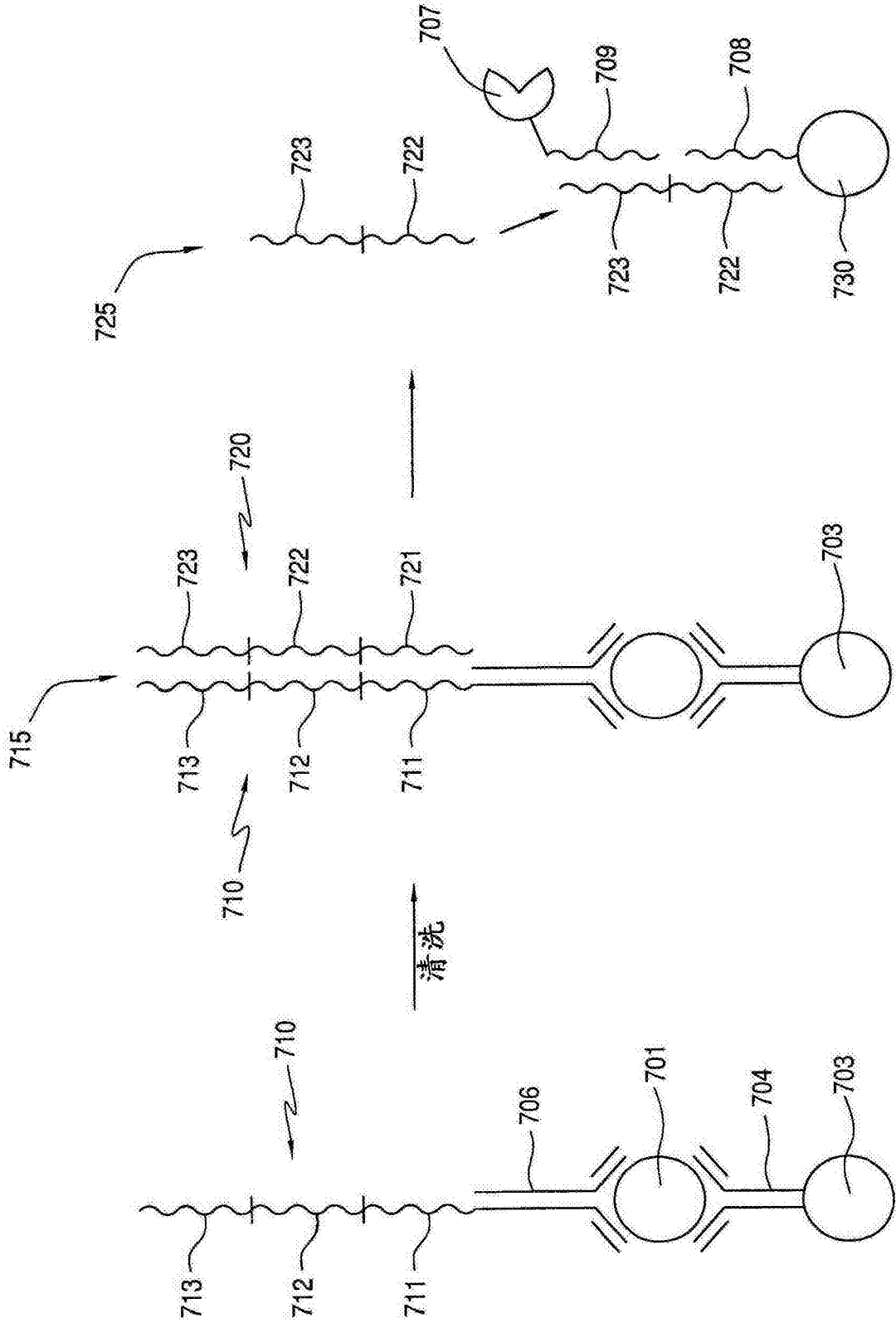


图16A

图16B

图16C

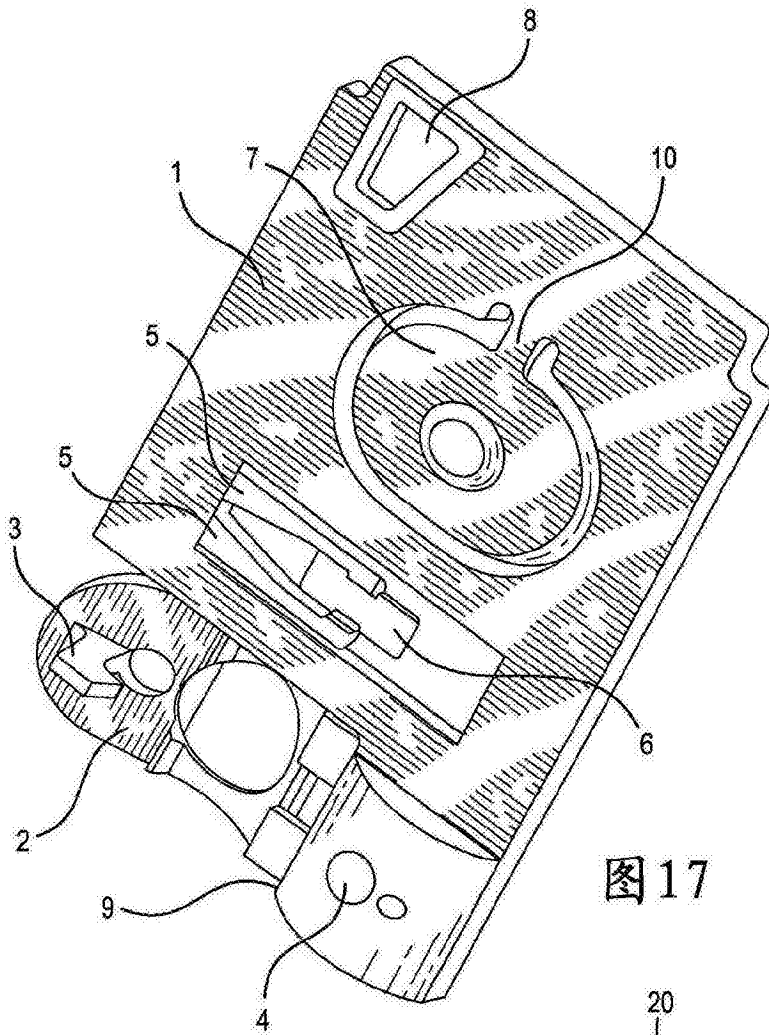


图17

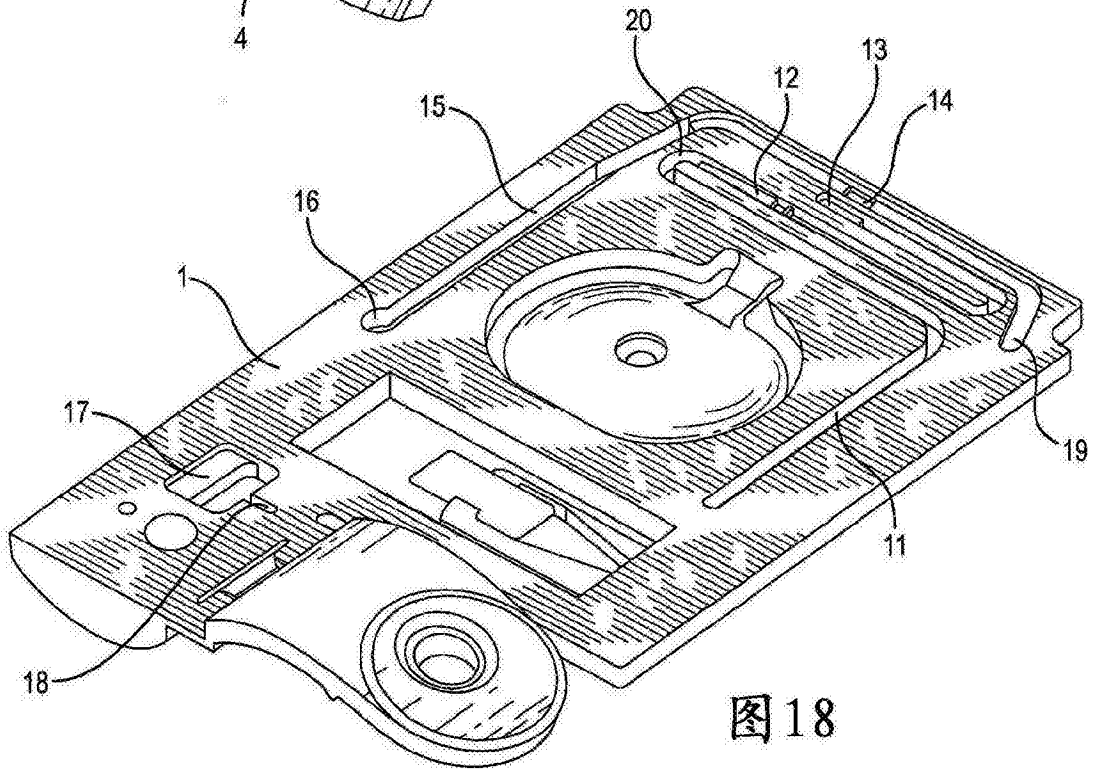


图18

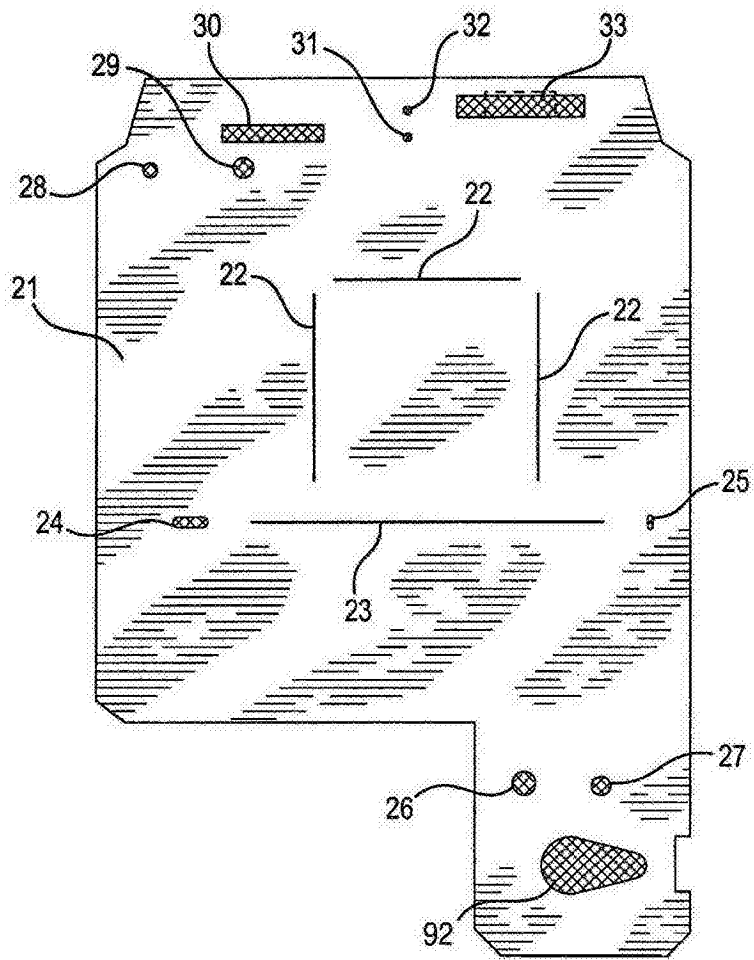


图 19

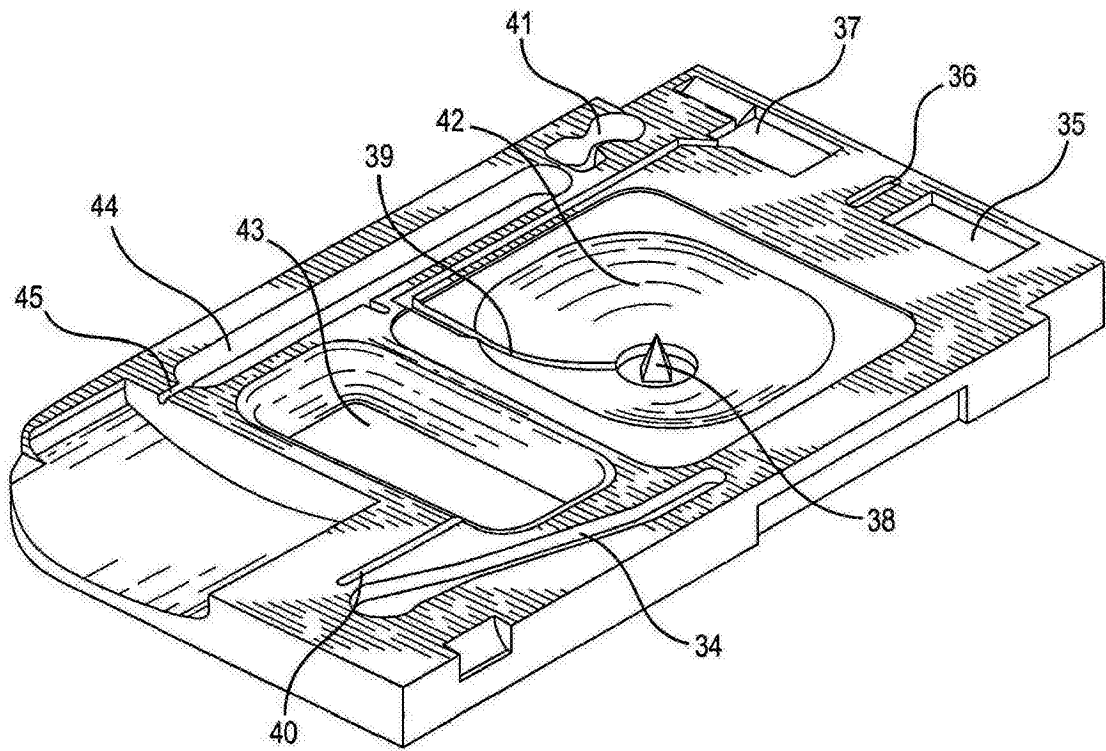


图 20

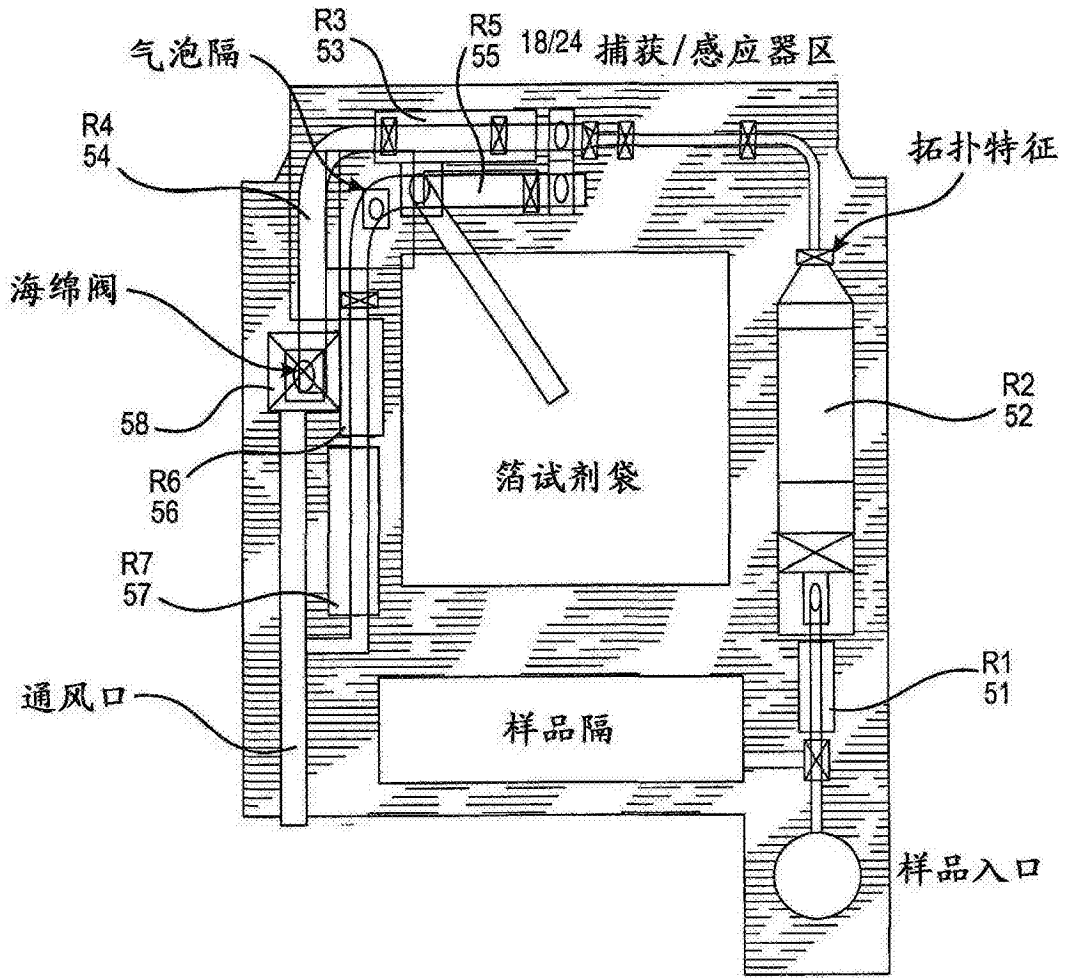


图 21

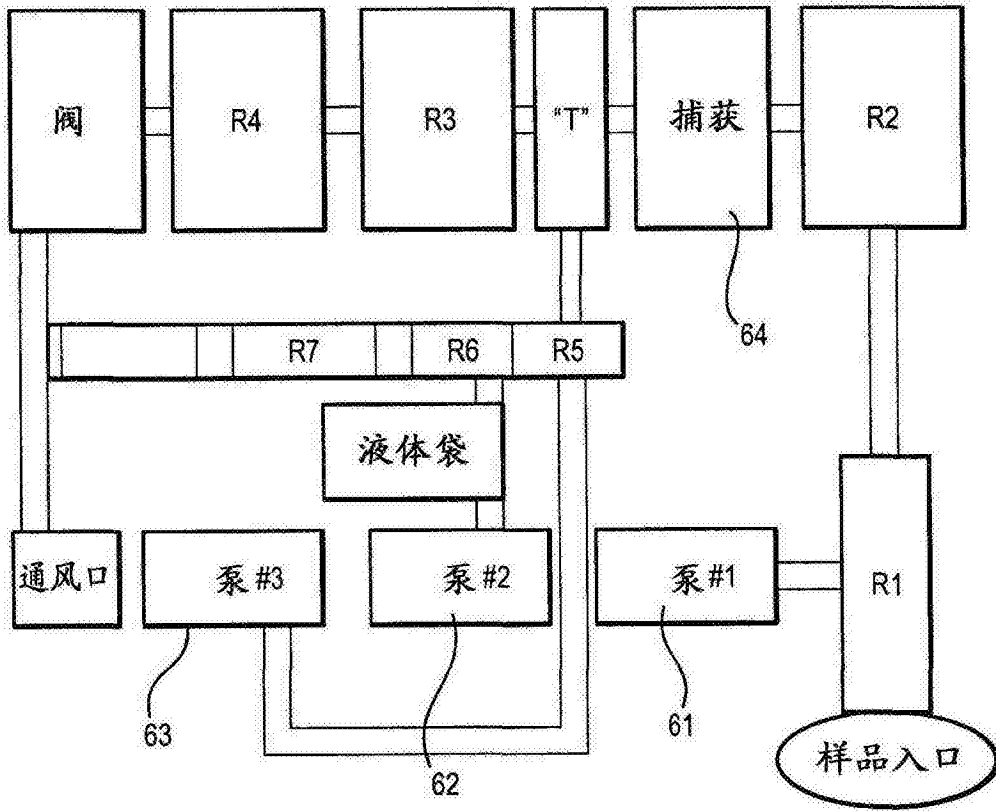
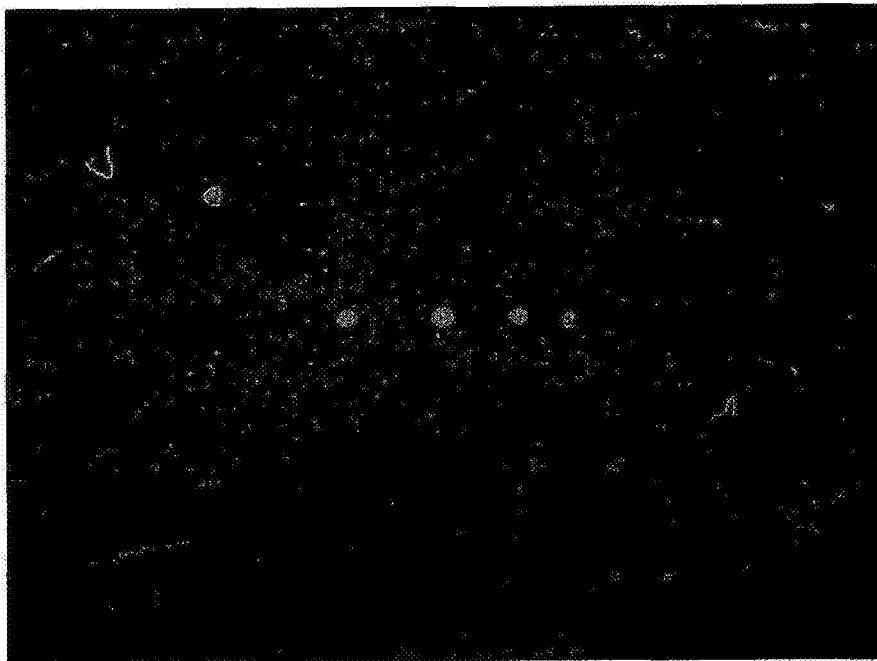
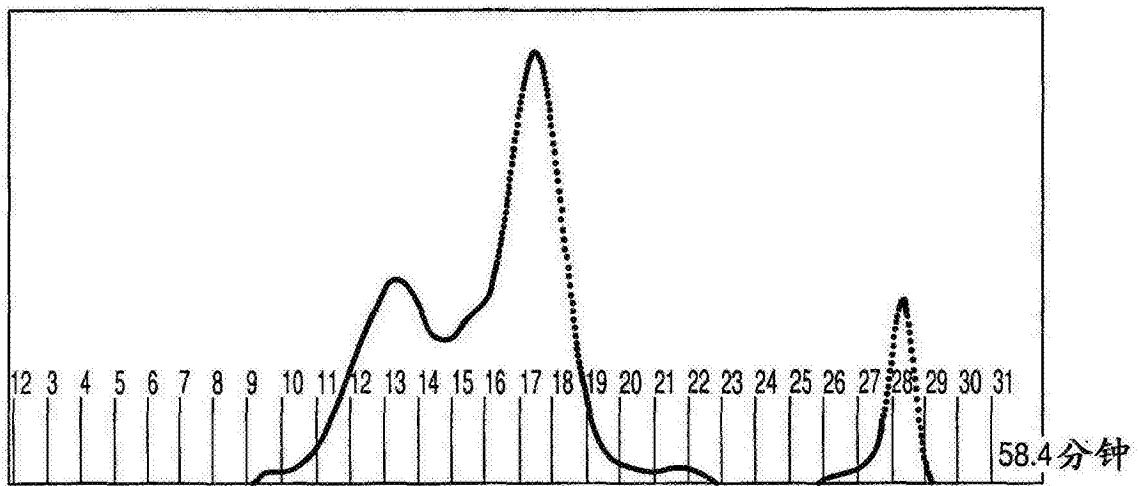


图 22



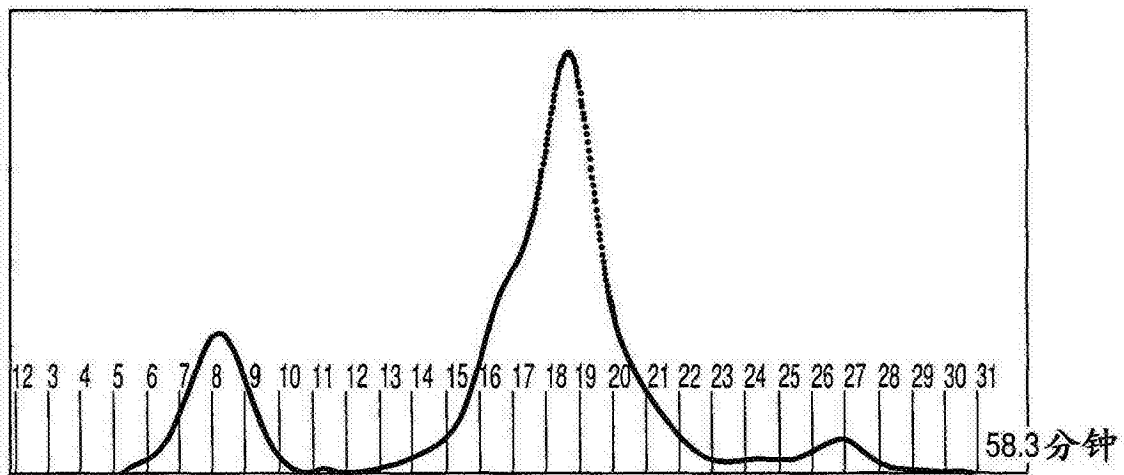
来自尺寸排阻柱的荧光级分

图 23



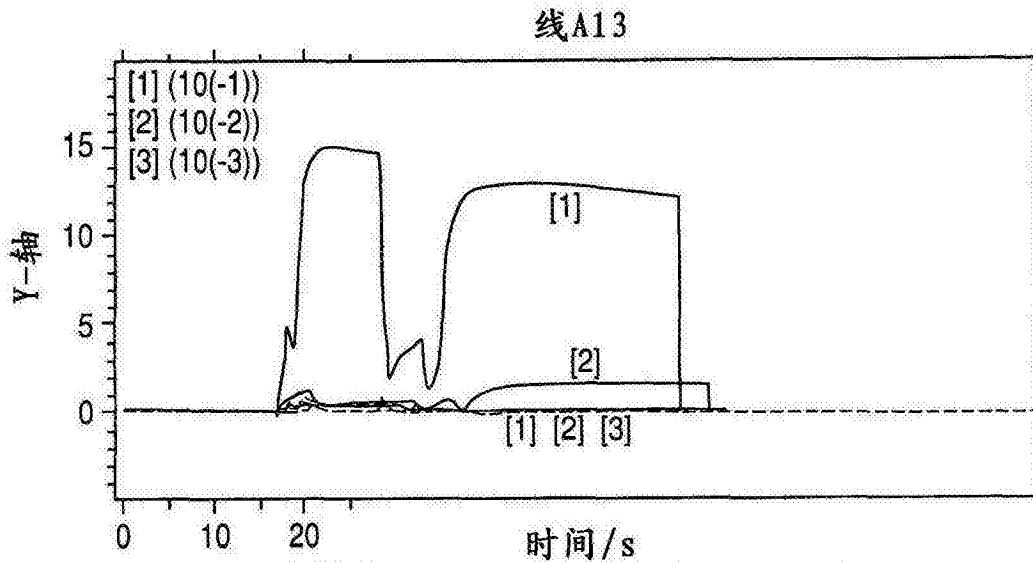
来自ALPLC-SPDP反应的S300柱级分

图 24



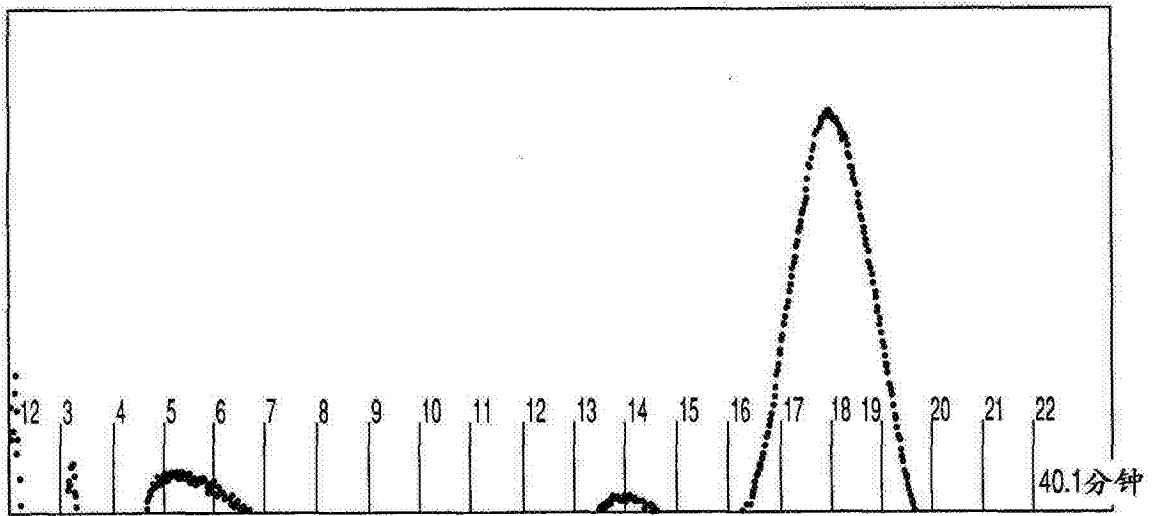
来自与经DTT处理的合成寡核苷酸
反应的ALPLC-SPDP的S300柱级分

图 25



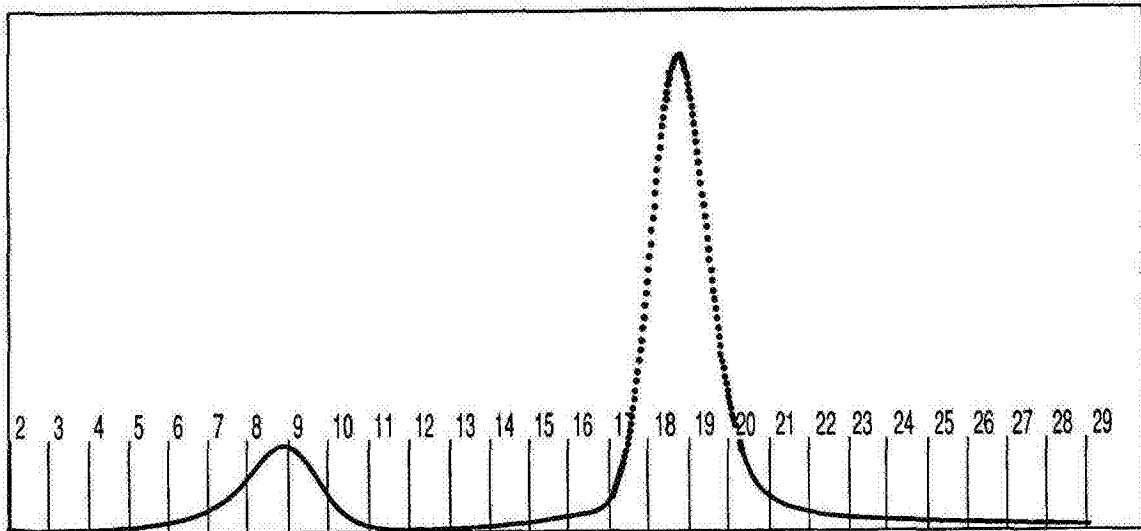
用利用 Bill Keogh 开发的 WinISD 软件在含有 i-STAT “免疫” 盒的 “A” 中测试的 ALP-A' 缀合物的三种稀释物 (10⁻¹ (37.3ng), 10⁻² (3.73 ng), 10⁻³ (0.37ng)) 的计时电流分析图

图 26



来自与 LC-SPDP 反应的 PEP-3F (ab') 2 的 S300 柱级分

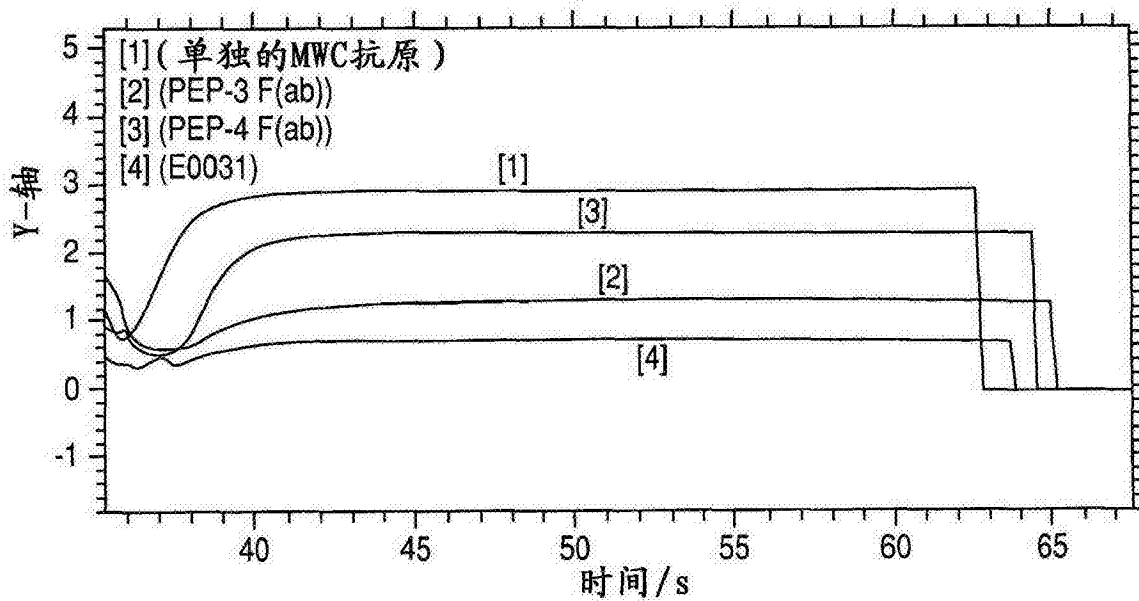
图 27



来自与经DTT处理的合成寡核苷酸反应的
PEP-3F (ab') 2LC-SPDP的S300柱级分

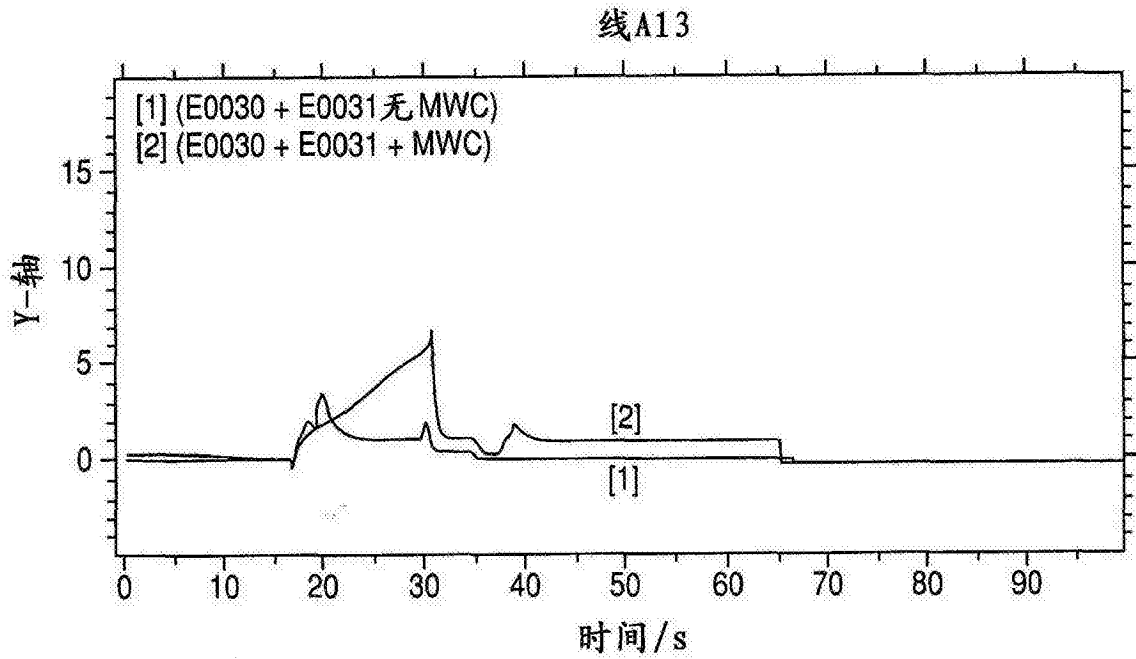
图 28

线A13



使用由向所用样品中加入游离抗体或缓合物的
抗原竞争的cTnI盒的生产版本的计时电流分析图
[1]MWC92353稀释至2.59 ng/ml并使用2 uL [5.2 pg]
[2]加入49.2 ng PEP-3F(ab)的抗原,
[3]加入61.8 ng PEP-4F(ab)的抗原,
[4]加入109 ng E0031缓合物的抗原

图 29



来自含有cTnI捕获珠而无缀合物的i-STAT免疫一盒的计时电流分析结果，加入了E0030 [747 ng]=E0031 [218 ng]有 [2] 抗原和无 [1] MWC抗原

图 30

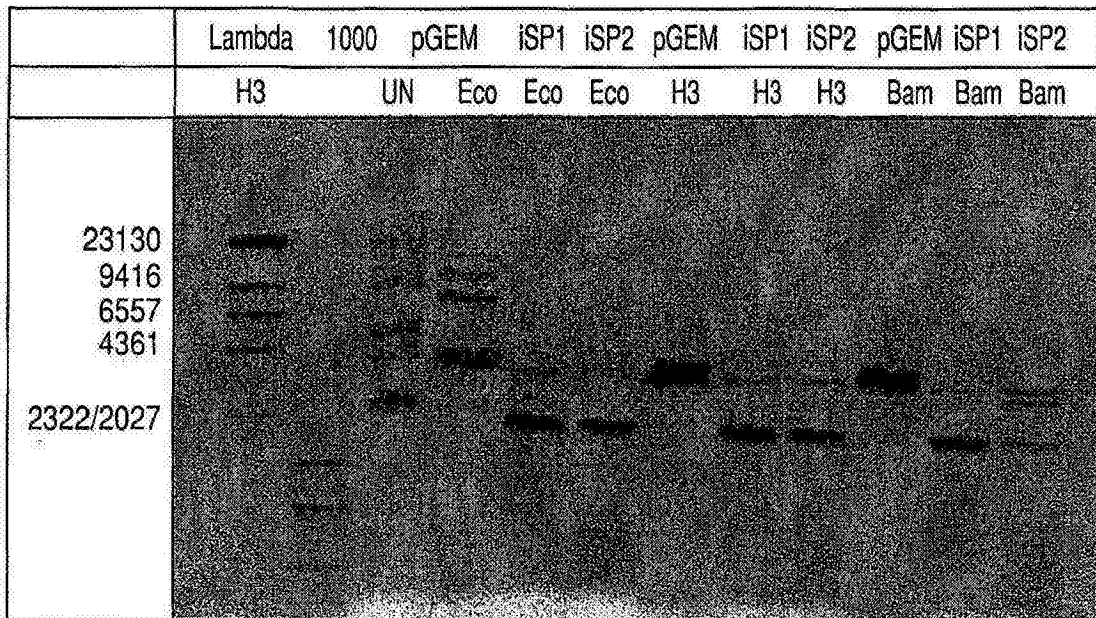


图 31

专利名称(译)	用于使用核苷酸缀合物的免疫测定的方法和设备		
公开(公告)号	CN105388293A	公开(公告)日	2016-03-09
申请号	CN201510783013.5	申请日	2009-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	雅培医护站股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	雅培医护站股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	雅培医护站股份有限公司		
[标]发明人	GB科里尔 CJ米勒		
发明人	G·B·科里尔 C·J·米勒		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/53		
优先权	61/142048 2008-12-31 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

用于免疫测定设备和方法的物质组合物，其包含共价地连接至第一核苷酸的信号抗体，例如，FAB片段；和一个或多个信号元件，例如信号酶（例如ALP）或荧光染料，各自共价地连接至第二核苷酸，其中第一核苷酸具有一个或多个重复序列，并且第二核苷酸与所述第一核苷酸上的一个或多个重复序列之一结合，以及其中信号抗体与信号元件的比率受重复序列的数目控制。

