



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105181659 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201510353808. 2

(22) 申请日 2012. 04. 16

(30) 优先权数据

61/477, 171 2011. 04. 20 US

(62) 分案原申请数据

201280019552. 6 2012. 04. 16

(71) 申请人 万迈医疗仪器有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 罗伯特·F·祖克 谭洪

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理

事务所(普通合伙) 11400

代理人 邬玥 葛强

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006. 01)

G01N 33/536(2006. 01)

G01N 33/58(2006. 01)

权利要求书1页 说明书13页 附图5页

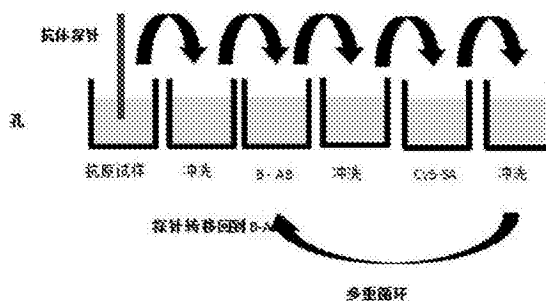
(54) 发明名称

发光聚合物循环扩增

(57) 摘要

本发明涉及一个用于探测在液体试样中具有高敏感度的被分析物的发光免疫分析方法。本发明提供了一个独特的组合 (i) 利用具有小的传感表面积用以结合被分析物分子的探针, (ii) 利用一个结合有多个结合分子和多个发光标记的高分子量的支化聚合物, 并且 (iii) 具有免疫复合物结构的探针循环地返回至试剂容器和扩增容器 1-10 次并且重复与试剂和扩增聚合物的反应, 以改善探测水平的敏感度。对每个循环, 发光信号的比噪音提高显著。

探针转移



1. 一个电化学发光系统包括 : (a) 长度比宽度的纵横比至少为 5 比 1 的探针, 该探针具有第一和第二端, 该第二端具有包覆有抗体的传感表面, 和带有化学发光标记的免疫复合物结合, 其中探针由一个传导材料制成并且充当工作电极来产生电化学反应 ; (b) 一个对应电极 ; (c) 指向该传感表面的会聚透镜 ; 和 (d) 用于检测该发射化学发光标记的光学探测器 ; 其中该会聚透镜会聚所发的光并将其引导至该光学探测器。

2. 根据权利要求 1 的一个电化学发光系统, 其中该传感表面的直径  $\leq 5\text{mm}$ 。

## 发光聚合物循环扩增

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种在液体试样中利用一个具有小表面积的探针和一个具有多个结合分子和多个荧光或化学发光法标记的支化聚合物以探测被分析物的方法。这个方法的敏感性是通过多次循环结合反应和扩增反应来提高的。

### 背景技术

[0002] 在许多免疫分析应用中需要发展高灵敏度的测定方法。发光染料,发射荧光或化学发光信号,提供了若干实用性的优点,例如:稳定性,低成本,适合于标记步骤和最小限度的受生物试样或固相底物干扰的光谱性质。与其他测定方法相比,荧光染料法有一个缺点,特别是 ELISA,其酶活力扩增了与免疫复合物结构相关的可测信号的总量。

[0003] 芳基磺酸酯花青荧光染料被描述于 Mujumdar 等 (1993) *Bioconjugate Chemistry*, 4:105-111; Southwick 等 (1990) *Cytometry*, 11:418-430; 和美国专利号 5,268,486。每一篇参考文献都描述了 Cy5, 并且其可以从宾夕法尼亚州匹兹堡的 Biological Detection Systems 公司买到,商品名为 FLUOROLINK™Cy5™。该芳基磺酸酯花青荧光染料具有高消光系数(通常为 130,000 升/摩尔至 250,000 升/摩尔),优良的量子产率,在大多数生物材料和塑料的自体荧光波长范围以外(500 纳米至 750 纳米)的荧光发射谱,优良的溶解性,以及低非特异性结合特性。

[0004] 尽管有这些优异性能,芳基磺酸酯花青荧光染料也存在某些限制。特别是,这些染料的斯托克斯频移相对较窄,其导致该染料的激发和发射谱之间的明显重叠。当这些染料分子在受激发时彼此位置接近时,该激发和发射谱的重叠可以引起荧光的自熄灭。这种自熄灭限制了可以结合至单个抗体分子用于免疫分析的芳基磺酸酯染料分子的数目。在示范性的芳基磺酸酯花青荧光染料 Cy5 的情况下,斯托克斯频移是 17 纳米(其为 650 纳米的激发波长和 667 纳米的发射波长之差)。当两至四个 Cy5 分子被结合至单个抗体分子时,获得最佳的荧光产率。当超过四个染料分子被结合至单一抗体分子时,该荧光信号输出迅速下降。这种不能结合超过四个染料分子至单一的抗体分子的特性明显限制了使用 Cy5- 标记的抗体及其它结合物质的免疫分析的灵敏度。

[0005] 美国公开 2001/0312105 公开了一个探测系统和荧光免疫分析;该公开的整体以参考方式被合并于此。该公开没有公开通过探针在试剂容器和扩增容器来回地循环得到扩增。

[0006] 需要有改善的方法,用于通过荧光或化学发光法免疫分析以高灵敏度检测被分析物。该方法应易于由用户操作,并提供高特异性的信号和最小的背景噪声。

### 发明内容

[0007] 本发明涉及用于探测在液体试样中具有高敏感性的被分析物的发光免疫分析方法。该方法包括步骤:(a) 获得一探针,其具有被固定在该探针梢端上的第一抗体;(b) 将该探针梢端浸入包含具有被分析物的样品溶液的样品容器中,将被分析物与在探针梢端的第

一抗体结合；(c) 将该探针梢端浸入包含试剂溶液的试剂容器，该试剂溶液包括和一结合配对的第一成员结合的第二抗体分子试剂以结合该试剂和被分析物；(d) 将该探针梢端浸入含洗液的洗涤容器中来洗涤探针梢端；(e) 将该探针梢端浸入含有扩增溶液的扩增容器中，该扩增溶液中含有一聚合物，该聚合物结合有至少 5 个分子的该结合配对的第二成员和至少 25 个荧光标记，以在该探针梢端上形成该被分析物，该第一抗体，该第二抗体，和该结合配对的第一和第二成员间的免疫复合物，其中该聚合物是分支的，并且其分子量至少为约一百万道尔顿，发光标记的分子质量小于 2000 道尔顿；(f) 将该探针梢端浸入含第二洗液的第二洗涤容器以洗涤探针梢端；(g) 重复步骤 (c) 至 (f) 1-10 次，以及 (g) 通过测定在探针梢端的发光信号来探测免疫复合物。

[0008] 本发明还涉及到一个组合物，包括 (a) 具有分子量至少一百万道尔顿的支化聚合物，(b) 至少 5 个结合分子，并且 (c) 至少 25 个选自三(双吡啶)合钌(II) (ruthenium(II) tris-bipyridine)，鲁米诺，吡啶酯，和氯化血红素的化学发光分子；其中结合分子和化学发光分子被结合到聚合物上。

## 附图说明

[0009] 图 1 显示了用于探测探针传感表面的荧光信号的光学探测系统。

[0010] 图 2 显示了用于探测在探针梢端的化学发光信号的电化学发光探测系统。

[0011] 图 3 显示了用于检测抗原被分析物的免疫分析形式。Ab：抗体，Ag：抗原，Sa：链霉亲和素，B：生物素，F：荧光标记。

[0012] 图 4 显示了在循环扩增中的探针转移。

[0013] 图 5 显示了制备交联 ficoll 400-SPDP 的流程图。

[0014] 详细说明

[0015] 定义

[0016] 除非在下文定义，权利要求和说明书中使用的术语将根据本领域技术人员所理解的通常含义进行解释。

[0017] 此处使用的“约”指在所列举值的  $\pm 10\%$  以内。

[0018] 此处使用的“结合被分析物的分子”指能参与和被分析物分子的特异性结合反应的任何分子。

[0019] 形状的“纵横比”指其较长尺寸与其较短尺寸的比率。

[0020] “结合分子”指能够结合另一个感兴趣的分子的分子。

[0021] 此处使用的“结合配对”指彼此吸引并特异性结合的两个分子。结合配对的例子包括，但不限于，抗原和针对该抗原的抗体，配位体及其受体，核酸的互补链，生物素和抗生物素蛋白 (avidin)，生物素和链霉亲和素，生物素和亲和素 (neutravidin) (去糖基化的版本的抗生物素蛋白 (avidin))，凝集素和糖类。优选的结合配对是生物素和链霉亲和素，生物素和抗生物素蛋白 (avidin)，生物素和亲和素 (neutravidin)，荧光素和抗荧光素，异羟甲基洋地黄毒苷 / 抗异羟甲基洋地黄毒苷 (digioxygenin/anti-digioxygenin)，DNP (二硝基苯酚) 和抗 -DNP。

[0022] 此处使用的“支化聚合物”指一个非线性聚合物，其具有二或三维结构，其可能是天然存在的支化聚合物，或一个合成交联聚合物。

[0023] 此处使用的“化学发光”指能量的释放伴随有限的冷光的释放,是一个化学反应的结果。例如,当鲁米诺在有合适催化剂时与过氧化氢反应,产生处于激活态的 3-氨基邻苯二甲酸盐,它在衰变到低能量级时发光。

[0024] 此处使用的“树状聚合物”指重复的有机的支化分子。一个树状聚合物一般对称地环绕于核心,且通常采取球状三维结构。

[0025] 此处使用的“电化学发光”(ECL)指在溶液中的电化学反应中产生的冷光。在电化学发光中,电化学产生的中间体经过一个高放能反应产生一个电子激活态,然后发光。ECL 激发是由电子产生的物质经高能电子转移反应(氧化还原反应)引起的。ECL 通常可以通过向含有发光物质溶液的电化学电池的电极施加电位(若干伏特)观察到。

[0026] 此处使用的“被固定”指试剂被固定在固体表面上。当试剂被固定至固体表面时,其可以被非共价或共价地结合至该表面。

[0027] 此处使用的“整体式衬底”指具有一个折射指数的单块固体材料。

[0028] 此处使用的“探针”指在传感侧包覆有被分析物结合分子的薄膜层的衬底。探针具有远端和近端。该近端(在此申请中也称为探针梢端)具有用被分析物结合分子的薄层包覆的传感表面。

[0029] 高敏感度发光免疫分析

[0030] 本发明涉及一个高敏感度免疫分析方法。发明人已经发现,一个独特的组合(i)利用具有晓得传感表面积用以结合被分析物分子的探针,(ii)利用一个与复合分子和复合发光标记结合的高分子量的支化聚合物,并且(iii)具有免疫复合物结构的探针循环地返回试剂容器和扩增容器 1-10 次并且与试剂和扩增聚合物重复反应,改善探测水平的敏感度。本发明涉及一个高敏感度免疫分析方法。发明人已经发现,(i)利用具有小的用以结合被分析物分子的传感表面积的探针,(ii)利用一个与多个结合分子和多个发光标记结合的高分子量的支化聚合物,以及(iii)将具有形成的免疫复合物的探针循环地返回试剂容器和扩增容器 1-10 次并且重复与试剂和扩增聚合物的反应的独特组合,改进了探测水平的敏感度。对每个循环,发光信号比噪音提高显著。

[0031] 本方法提供了高灵敏度和精密度而不增加分析试剂,消耗品和测量仪器整体的复杂度。本方法要求探针反复地在两个试剂间转移,其中一个是有多个结合分子和多个发光标记的扩增聚合物。聚合物具有分子量 $\geq 400K$ ,优选 $\geq$ 一百万道尔顿。聚合物的交联希望能控制分子大小的分布和非特异性结合。聚合物应携带最少 5 个结合分子每个聚合物,优选大于 10 个。发光标记应较小,其分子量 $< 5K$  道尔顿。发明人已经发现不用如上所述在扩增中的聚合物而简单地循环反应没有提高灵敏度。

[0032] 本方法探测在液体试样中被分析物。该方法包括步骤:(a)获得一探针,其具有被固定在该探针梢端上的第一抗体,其中该梢端表面的直径 $\leq 5$  毫米;(b)将该探针梢端浸入包含具有被分析物的样品溶液的样品容器中,将被分析物与在探针梢端的第一抗体结合;(c)将该探针梢端浸入包含试剂溶液的试剂容器,该试剂溶液包括和一结合配对的第一成员结合的第二抗体分子试剂以结合该试剂和被分析物;(d)将该探针梢端浸入含洗液的洗涤容器中来洗涤探针梢端;(e)将该探针梢端浸入含有扩增溶液的扩增容器中,该扩增溶液中含有一聚合物,该聚合物结合有至少 5 个分子的该结合配对的第二成员和至少 25 个荧光标记,以在该探针梢端上形成该被分析物,该第一抗体,该第二抗体,和该结合配对的第

一和第二成员间的免疫复合物,其中该聚合物是支化的,并且其分子量至少为约一百万道尔顿,发光标记的分子质量小于 2000 道尔顿;(f) 将该探针梢端浸入含第二洗液的第二洗涤容器以洗涤探针梢端;(g) 重复步骤 (c) 至 (f) 1-10 次,且 (h) 通过测定在探针梢端的发光信号来探测免疫复合物,其中该第一抗体和该第二抗体是针对该被分析物的抗体。

[0033] 在步骤 (a) 中,该探针可以为任何形状,如杆形,圆柱形,圆形,正方形,三角形等,其长度比宽度的纵横比至少为 5 比 1,优选为 10 比 1。优选杆型。因为在免疫分析期间该探针被浸在样品溶液和一种或多种分析溶液中,需要有纵横比至少为 5 比 1 的长探针,使该探针的梢端能够浸入该溶液。对荧光检测,探针可以为整体式衬底。

[0034] 该探针具有用于结合被分析物的小梢端。该梢端具有较小的表面面积,其直径 $\leq$ 5 毫米,优选 $\leq$ 2 毫米或 $\leq$ 1 毫米,例如,0.5-2mm。该探针梢端的小表面赋予它若干优点。首先,小表面面积具有更少的非特异性结合,并因此产生更低的背景信号。第二,由于该梢端的表面面积小,携带在该探针梢端上的试剂或样品也极小。此特征使该探针梢端便于洗涤,由于洗液具有较大的体积,其在该洗液中导致的污染可以忽略。进一步,该探针梢端的小表面面积具有结合量小。因此,当该探针梢端被浸入试剂溶液中时,该试剂的结合不会耗损大量该试剂。该试剂的浓度被有效地维持不变。对洗液污染可忽略不计以及试剂消耗少可以使该试剂溶液,该扩增溶液,以及该洗液被重复使用许多次,例如 1-10 次。

[0035] 该探针的传感表面被涂覆有可以结合试样中的被分析物的第一抗体。将试剂固定至该固相(该探针梢端的传感表面)的方法在免疫生物化学中是常见的,其涉及该固相和试剂之间共价的,疏水性的或静电键的形成。第一抗体分子可以被直接固定在该传感表面上。或者,第一抗体可以通过结合配对被间接固定在该传感表面上。例如,可以先通过对该固体表面的吸附或通过和该固体表面上涂覆的氨基丙基硅烷的共价结合固定抗荧光素,然后用荧光素标记的第一抗体可以通过荧光素和抗荧光素的结合(结合配对)结合至该固体表面。

[0036] 在步骤 (b),该探针梢端被浸入到样品容器中 20 秒到 60 分钟,优选 20 秒到 10 分钟,以结合被分析物到探针梢端的第一抗体。

[0037] 在步骤 (b) 之后,该探针可选地被冲洗 1-5 次,优选在含有洗液的洗涤容器中冲洗 1-3 次。这额外洗涤步骤可能不需要,因为由于小的结合表面面积携带的溶液是最小限度的。洗液通常含有缓冲液和表面活性剂,例如吐温 20。

[0038] 在步骤 (c),该探针梢端被浸入到样品容器中 20 秒到 10 分钟,优选 20 秒到 2 分钟,以结合试剂到探针梢端的被分析物。该试剂溶液包括一个与结合配对的第一成员结合的第二抗体的试剂。

[0039] 该结合配对通常为半抗原和其抗体,配位体及其受体,核酸的互补链,或外源凝集素和碳水化合物。例如,结合配对是,生物素和链霉亲和素,生物素和抗生物素蛋白,生物素和亲和素(neutravidin),荧光素和抗荧光素,异羟基洋地黄毒苷/抗异羟基洋地黄毒苷(digoxigenin/anti-digoxigenin),DNP(二硝基苯酚)和抗-DNP。优选,结合配对的第一成员是生物素和结合配对的第二成员是链霉亲和素。

[0040] 在步骤 (d),该探针被冲洗 1-5 次,优选在含有洗液的洗涤容器中冲洗 1-3 次。洗液通常含有缓冲液和表面活性剂,例如吐温 20。

[0041] 在步骤 (e),该探针梢端被浸入到含有扩增溶液的扩增容器中 20 秒到 5 分钟,优

选 20 秒到 2 分钟,以在该探针稍端上形成该被分析物,该第一抗体,该第二抗体,和该结合配对的第一和第二成员间的免疫复合体。该扩增溶液中含有一聚合物,该聚合物结合有至少 5 个分子的该结合配对的第二成员和至少 25 个荧光标记。该聚合物是支化的,并且其分子量至少为 500,000,优选一百万道尔顿。该聚合物可能是一个聚糖(例如,聚蔗糖或葡聚糖),一个多核苷酸,一个树状聚合物,一个多元醇,或聚乙二醇。该聚合物优选具有 2- 或 3- 维结构的支化物。该聚合物优选包括 5-50 或 5-100 个结合分子和 25-100 或 25-500 个发光分子。

[0042] 对本发明有用的发光标记具有分子量小于 5,000,优选小于 2,000,例如 500-2000 或 100-2000 道尔顿。在一实施例中,该发光标记是一个选自青色素,香豆素,夹氧杂葱和其衍生物的一个荧光染料。例如,该荧光染料是 Cy5(分子量 792),Alexa Fluor 647, DyLight 350(分子量 874), DyLight 405(分子量 793), DyLight 488(分子量 71011), DyLight 550(分子量 982), DyLight 594(分子量 1078), DyLight 633(分子量 1066), DyLight 650(分子量 1008), DyLight 680(分子量 950), DyLight 755(分子量 1092), DyLight 800(分子量 1050),Oyster 荧光染料,IR 染料,或包括多个螯合有稀土金属(例如镧系元素(铈,钕,钐,或铽))的环的有机化合物。

[0043] 在另一实施例中,该发光标记是选自三(双吡啶)合钕(II)(分子量 1057),鲁米诺(分子量 177),吡啶酯(9[[[4-3-[(2,5-二酮-1-吡咯烷基)氧]-3-酮基丙基]苯氧]羰基]-10-甲基吡啶三氟甲磺酸,分子量 632),和氯化血红素(分子量 652)的化学发光分子。

[0044] 当该结合分子是多肽或蛋白质时,该荧光标记可以采用科学和专利文献中所述的常规的结合化学作用通过多种部分与之共价结合,包括二硫化物,羟苯基,氨基,羧基,吡啶,或其它官能团。

[0045] 该结合分子与多核苷酸的共价结合可以用常规的结合化学作用通过多种部分实现,包括醛,酮,异硫氰酸酯,亚氨酸酯,肌苷,酰基和烷基,而许多参考文献也教导了用生物素的衍生。(Leary 等(1983)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 :4045-4049 ;W086/02929 ;EP 063 879 ;Langer 等(1981)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 :6633-6637 ;和 EP 2009 996)。

[0046] 在每一步(b),(c),和(e)中,反应可以通过搅拌或混合在容器中的溶液来加速。例如,可以引起该溶液横向流动(轨道流)经过该探针稍端,其加速固定化至固相的配偶体对其靶分子捕获。例如,该反应容器可以被装在轨道振荡器上,并且该轨道振荡器以至少 50rpm 的速度旋转,优选至少 200rpm,更优选至少 500rpm,如 500-1,000rpm。可选地,该探针稍端以 0.01 至 10 毫米/秒的速度垂直于该轨道流的平面上上下下移动,以在该探针稍端以上和以下引起额外的溶液混合。

[0047] 在步骤(f),该探针在含有洗液的洗涤容器中被冲洗 1-5 次,优选 1-3 次。洗液通常含有缓冲液和表面活性剂,例如吐温 20。

[0048] 步骤(g)是通过重复步骤(c)至(f)1-10,优选 1-5 次或 2-3 次的循环扩增。每个循环包括将探针放置回相同的试剂容器,相同的第一洗涤容器,相同的扩增容器,和相同的第二洗涤容器。

[0049] 在步骤(h),该免疫复合物可通过读取在探针稍端被探测的发光信号探测出。对于荧光标记,正如在美国出版物 2011/0312105(图 1)中所描述的,探针被放置在一个有透明

底的孔中并且通过检测仪读取。

[0050] 对于化学发光标记,探针被放置于一个含有共反应剂的测量溶剂的有透明底的孔。例如,如果化学发光标记是三(双吡啶)合钌(II),其共反应剂是三丙基胺。如果化学发光法标记是鲁米诺,共反应剂是过氧化氢和氢氧化钠盐的水溶液。所发的光可通过光电倍增管(PMT)测量。

[0051] 对于电化学发光(ECL),ECL分析仪的原理和主要元件在Blackburn等(Clin. Chern. 37:1534-1539(1991))中有所描述,在此作为参考并入本文。在探针被放置到含有共反应剂的测量溶剂的有透明底的孔后,施加电压到工作电极和对应电极,所发的光通过光电倍增管(PMT)测量。

[0052] 在一优选实施例中,由抗体覆盖的探针充当ECL分析仪的工作电极(图2)。由于钌(II)/三丙基胺氧化还原反应需要在电极表面或非常接近其表面时发生,这一方法提供了高效放光的优点。

[0053] 图3显示了一个用于检测抗原被分析物的免疫分析形式的实施例。图4显示了在循环扩增中的探针转移。

[0054] 在发光聚合物中有若干关键特性使其能实现循环扩增。聚合物本身应该是有低的非特异性结合,应该是大于400或500KD分子量以提供一个多个结合分子(如链酶亲和素)的高效载体。携带多个结合分子的能力对加强生物素结合能力和形成交替层是重要的,例如生物素基化的抗体和链酶亲和素聚合物。聚合物应该是支化的或交联的,并且有二或三维结构以进一步促进复合层结构的形成。标记的大小也是一个重要参数。当一个高分子量标记结合到链酶亲和素时有可能改变其生物素结合能力和在循环扩增中的复合层结构形成中产生位阻。标记应该是小的,其分子量 $\leq 5000$ 道尔顿;优选 $\leq 2000$ 道尔顿。

[0055] 当聚合物偶联结合到在免疫复合物中的第一层生物素-抗体时,它有充足残留的生物素结合力来形成另一层生物素-抗体。聚合物的大小和它的支化结构在探针尖端产生一个延展开的三维结构络合物,它减小在生物素-抗体和聚合物偶联以形成附加层时的空间位阻。聚合物的分子量大到使标记了的链酶亲和素分子分开。在荧光分析中,间隔降低了能量转移介导的荧光淬灭。在电化学分析中,由于聚合物的间隔和结构其具有相同的优点。结合到固相免疫复合物中的钌(双吡啶)标记与流动相的三丙基胺(TPA)发生反应。钌(双吡啶)/三丙基胺(TPA)衰变发射一个光子使钌(双吡啶)再生与另一个三丙基胺(TPA)分子发生反应。最后三丙基胺(TPA)用完。如果钌(双吡啶)在表面密布,三丙基胺(TPA)将在局部更快地被用完。由于在化学发光标记间的间隔,交联聚合物产生产生更高效的化学发光。

[0056] 观测到Cy5标记的单个链酶亲和素的可忽略的循环扩增。带有四个结合位点的单个链酶亲和素和标记有4-5个生物素的抗体被估计能够在探针表面形成交替层。然而,在结合配对的一个成员已经结合的探针表面可能限制其层结构的旋转程度从而在空间上阻碍了后续层的形成。Cy5-链酶亲和素阴性结果的第二个可能性是有层结构的形成但是Cy5荧光被淬灭。Cy5,与许多荧光染料一样,能有自己的荧光淬灭,通常通过一个能量转移的机理。能量转移淬灭的效率是由供体和受体染料间的距离决定的。交替层的形成能产生密集叠加的Cy5-链酶亲和素其中Cy5分子非常接近并且因此可以产生荧光淬灭。

[0057] 循环扩增的另一重要方面是探针在相同的试剂容器,洗涤容器,和扩增容器中来

回转移,而无需使用新的含有新溶液的容器。在结合步骤中探针的小的表面面积能降低试剂和扩增聚合物的消耗。这一特性大大简化了检验的试剂需求和整体消耗系统的设计。在循环扩增中的每个结合步骤只是一个 30 秒到 2 分钟的短时段,例如,1 分钟。因此,循环扩增没有引起分析时间的延长。10-15 分钟的高敏感分析是可行的。

[0058] 含多个结合分子和化学发光标记的高分子支化聚合物

[0059] 本发明还涉及组合物,其包括 (a) 分子量至少为 500,000 或一百万道尔顿的支化聚合物,(b) 至少 5 个结合分子,和 (c) 至少 25 个化学发光分子,其中这些结合分子和化学发光分子与该交联 Ficoll 相连。该组合物优选包括 5-50 或 5-100 个结合分子和 25-100 或 25-500 个化学发光分子。

[0060] 该聚合物可能是一个聚糖(例如,聚蔗糖或葡聚糖),一个多核苷酸,一个树状聚合物,一个多元醇,或是聚乙二醇。一般的聚糖对许多通常在免疫分析中应用的固相物质呈现可忽略的非特异性结合。市场上的聚蔗糖有 70K 和 400K 道尔顿的分子量。交联聚蔗糖(Ficoll)是优选聚合物。

[0061] 对本发明有用的化学发光标记具有 < 5,000 的分子量,优选 < 2,000,例如 500-2000 或 100-2000 道尔顿。优选的化学发光标记包括,但不限于,三(双吡啶)合钆(II),鲁米诺,吡啶酯,和氯化血红素。

[0062] 在一实施例中,化学发光分子被直接连接到聚合物上。在另一实施例中,化学发光分子通过结合配对被间接连接到聚合物上。

[0063] 电化学发光检测装置

[0064] 本发明针对一个用于测量在探针梢端的化学发光信号的电化学发光探测系统。

[0065] 一个电化学发光系统包括:(a) 长度比宽度的纵横比至少为 5 比 1 的探针,该探针具有第一和第二端,该第二端具有和涂覆有抗体且和带有化学发光标记的免疫复合物结合的传感表面,在此探针由一个传导材料制成并且充当工作电极来产生电化学反应;(b) 一个对应电极;(c) 指向该传感表面的会聚透镜;和 (d) 用于检测该化学发光标记所发光的光学探测器;其中该会聚透镜会聚该发射光并将其引导至该光学探测器。

[0066] 该探针可以由任何传导性物质制成,例如金属,金属氧化物和碳,例如,银,金,白金,铜,二氧化钛,石墨,和其任何组合。该探针可以为任何形状,如杆形,圆柱形,圆形,方形,三角形等,其长度比宽度的纵横比至少为 5 比 1,优选为 10 比 1。因为在免疫分析期间该探针被浸在样品溶液和一种或多种分析溶液中,需要有纵横比至少为 5 比 1 的长探针,使该探针的梢端能够浸入该溶液。该探针的传感表面被被分析物-结合分子所覆盖,例如抗体,且结合了化学发光标记。

[0067] 在一优选实施例中,该探针具有用于结合分子的小梢端。该梢端具有较小的表面积,其直径 $\leq 5$ 毫米,优选 $\leq 2$ 毫米或 $\leq 1$ 毫米,例如,0.5-2mm。该探针梢端的小表面赋予它若干优点。本发明利用一探针具有用于结合被分析物的小梢端。该梢端具有较小的表面积,其直径 $\leq 5$ 毫米,优选 $\leq 2$ 毫米或 $\leq 1$ 毫米,例如,0.5-2mm。该探针梢端的小表面赋予它若干优点,例如,较低的非特异性结合,较少携带试剂,便于洗涤,和较少消耗试剂。

[0068] 所发光的光子可通过光电倍增管(PMT),硅光电二极管,或黄金覆盖的光纤传感器探测出。

[0069] 图 2 显示了本发明的一个实施例。杆的低端被当作一个传感表面。化学发光标记

结合到传感表面。为了探测发光,探针杆的传感端浸没到带有透明底部的容器,该透明底部装有含共反应剂的测量溶液。该透明底部的材料可选自塑料,玻璃或石英。施加等变压到工作电极和对应电极上,所发光通过会聚透镜校正并且指向光电倍增管(PMT)来测量。

[0070] 本发明的一个独特方面是探针充当工作电极,因为钨(II)/三丙基胺氧化还原反应需要出现在电极表面或非常接近其表面,从而提供了高效放光的优点。该光学设备配置能够对工作表面电极施用多个电压波形,通常在大约1伏特产生发光。

[0071] 通过以下实施例进一步示例本发明,所述实施例不应被解释为将本发明的范围限定为其中描述的具体步骤。

## 具体实施方式

[0072] 实施例1:带有固定化的第一抗体的探针的制备

[0073] 石英探针,直径1mm,长度2cm,按照制造商的规程利用化学气相沉积过程(Yield Engineering Systems,1124P)涂有氨丙基甲硅烷。然后将该探针尖端浸没在含有鼠类单克隆抗荧光素(Biospecific),10 $\mu$ g/ml PH7.4的PBS(磷酸盐缓冲液)的溶液中。在抗体吸附到探针20分钟后,探针尖端在PBS中冲洗。

[0074] 从HyTest获得的,用于肌钙蛋白I(TnI)和脑钠肽(BNP)的捕捉抗体通过标准方法用荧光素进行标记。通常,每个抗体有大约4个荧光素取代基。涂有抗荧光素的探针浸没于用荧光素标记的捕捉抗体溶液(5 $\mu$ g/ml)中,5分钟后在PBS中冲洗。

[0075] 实施例2. 交联聚蔗糖(Ficoll)400-SPDP的制备

[0076] 交联聚蔗糖(Ficoll)400-SPDP(6-[3-[2-吡啶基二硫基]丙酰胺基]己酸琥珀酰亚胺酯,Invitrogen)依照美国公开2001/0312105的实施例1来制备。图5显示了该制备的流程图。

[0077] 实施例3. Cy5-链霉亲和素的制备

[0078] 将32微升Cy5-NHS(GE Healthcare)在DMF中的5毫克/毫升溶液和1毫升链霉亲和素(Scripps Labs)在0.1M, pH为9.5的碳酸钠缓冲液中的2.4毫克/毫升溶液在30 $^{\circ}$ C反应40分钟。将该混合物施加于PD 10柱(Pharmacia),去除未结合的Cy5。光谱分析显示每链霉亲和素分子连接2.8个Cy5。

[0079] 实施例4. Cy5-链霉亲和素-交联Ficoll的制备

[0080] 将5.8微升SMCC(4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯)(Pierce Chemical)在DMF中的10毫克/毫升溶液和在1毫升, pH为7.4的PBS中的2毫克Cy5-链霉亲和素在室温下反应1小时。将该混合物施加于PD 10柱,去除未结合的SMCC。

[0081] 通过将30微升38毫克/毫升的DTT加入在1毫升PBS中的1毫克交联Ficoll 400-SPDP并在室温下反应1小时,来去保护交联Ficoll 400-SPDP上的硫醇,随后用PD10柱纯化该交联Ficoll。

[0082] 将该Cy5-链霉亲和素-SMCC与交联Ficoll 400-SH混合,并在室温下反应过夜。然后加入10微升12.5毫克/毫升的NEM(Aldrich),并在室温下反应1/2小时。然后在Sepharose 4B CL柱上纯化该结合物。估计每个聚蔗糖(两百万道尔顿)结合大约20-30个链酶亲和素,并且每个链酶亲和素结合2-3个Cy5。

[0083] 实施例5:第一阅读, Cy5-链酶亲和素 vs. Cy5-链酶亲和素-交联Ficoll(非循

环)

[0084] 用一个 BNP 分析来对比 Cy5- 链酶亲和素和 Cy5- 链酶亲和素 -Cx Ficoll 的荧光信号。该分析利用 BNP 单克隆抗体的夹心对 (Hytest)。一个用荧光素标记,第二个用生物素标记。两个标记都通过每个抗体被 4-5 个半抗原取代的标准方法操作。如实施例 1 所述将荧光素 - 抗体结合到探针。在分析中,将 BNP 校准器 (Hytest) 刺入正常的混和人血浆,然后由含有 5mg/ml BSA 和 0.05%吐温 20 的 PBS(分析缓冲液)中稀释 3 倍。该探针稍端浸没于 BNP 试样中并且在转速为 750rpm 的轨道运动(1mm 直径行程)的试样孔中室温培养 5 分钟。该探针保持固定。探针在 PBS,0.05%吐温 20 冲洗 3 次,每次 10 秒。在冲洗序列后,探针浸没于在分析缓冲液中含有浓度为 10  $\mu$ g/ml 的生物素基化的抗 BNP 溶液中,随后在转速 500rpm 下培养 2 分钟,然后洗涤 3 次。然后探针被转移到含有 Cy5- 链酶亲和素(实施例 2)或 Cy5- 链酶亲和素 -Cx Ficoll(实施例 3)的溶液中。在以上两个实施例中的链酶亲和素标记有大约 2-3 个 Cy5 并且浓度为 10  $\mu$ g/ml。在转速 500rpm 培养 1 分钟后,该探针进行一个冲洗序列。然后在探针远稍端的荧光通过如图 1 所示的光学设置测量。带有 Cy5- 链酶亲和素和 Cy5- 链酶亲和素 -Cx Ficoll 的分析设置如图 4 所示。其结果在表 1 中所示。在第一次结合后的测量称为第一阅读(非循环)。

[0085] 表 1. 第一阅读 :Cy5- 链酶亲和素 vs. Cy5- 链酶亲和素 - 交联 Ficoll

[0086]

	Cy5-SA	Cy5-SA-Cx Ficoll
	伏特	伏特
BNP, ng/ml		
18	0.32	6.27
9	0.25	5.35
3	0.15	3.03
1	0.15	1.71
0.3	0.11	0.8
0.1	0.11	0.32
0	0.12	0.16

[0087] 数据是重复测定的平均值

[0088] 在表 1 中的结果显示 Cy5- 链酶亲和素只能在背景以上大约 9-18ng/ml 探测出 BNP,而聚蔗糖偶联物能容易地探测出低达 0.1ng/ml 的浓度。该结果证明高分子量聚蔗糖聚合物能提高敏感性。

[0089] 实施例 6 :循环扩增

[0090] 在第一阅读后,实施例 5 中的探针进行进一步扩增循环。一个循环包括将探针放

置回相同的生物素 - 抗体溶液 1 分钟 (转速 500rpm), 随后进行冲洗序列, 在冲洗序列后回到链酶亲和素溶液中 1 分钟 (转速 500rpm), 随后进行冲洗序列。该循环意在建立生物素 - 抗体和链酶亲和素的交替层。图 5 描述了在循环扩增过程中探针从孔到孔的转移。在每个扩增循环结束后, 测量探针梢端的荧光。

[0091] 表 2 显示了从表 1BNP 分析的一个延续, 该探针经过 2 次扩增循环, 循环 1 和循环 2。

[0092] 表 2. 循环扩增 :Cy5- 链酶亲和素 vs. Cy5- 链酶亲和素 - 交联 Ficoll

[0093]

	Cy5-SA			Cy5-SA-Cx Ficoll		
	第一阅读	循环 1	循环 2	第一阅读	循环 1	循环 2

[0094]

BNP ng/ml							
18	0.32	0.38	0.41	6.27	8.36	10.92	
9	0.25	0.27	0.28	5.35	7.78	10.49	
3	0.15	0.21	0.22	3.03	4.77	7.01	
1	0.5	0.15	0.16	1.71	2.77	4.41	
0.3	0.11	0.11	0.11	0.8	1.37	2.19	
0.1	0.11	0.11	0.12	0.32	0.53	0.82	
0	0.12	0.12	0.13	0.16	0.25	0.36	

[0095] 数据是重复测定的平均值

[0096] 表 2 的结果表明 Cy5- 链酶亲和素通过 2 轮扩增循环后没有显著增加信号。相反, Cy5- 链酶亲和素 - 交联聚蔗糖偶联物显示在原始结合 (第一阅读) 外两次循环后的荧光信号提高大约两倍。这些结果表明通过生物素 - 抗体和 Cy5- 链酶亲和素的交替层而得到的循环扩增不仅仅取决于探针在两种试剂间来回的转移。循环扩增仅能在 Cy5- 链酶亲和素 - 交联聚蔗糖偶联物中实现。

[0097] 实施例 7 :循环扩增的 BNP 分析

[0098] 表 3 包括 BNP 分析的结果, 如实施例 5 按相同的流程操作, 进行更多循环扩增步骤。

[0099] 表 3. 具有多个循环扩增步骤的 BNP 分析

[0100]

	第一阅读	循环 1	循环 2	循环 3	循环 4
BNP, pg/ml					
580	1.13	3.11	6.37	11.49	PMT sat.
58	0.18	0.42	0.82	1.51	2.57

14	0.13	0.29	0.58	1.06	1.81
0	0.15	0.23	0.42	0.75	1.27

[0101] 数据是重复测定的平均值

[0102] 表 3 的结果表明循环扩增提高在免疫分析中的敏感度。在此实施例中,14pg/ml BNP 试样的信号在第一阅读时的阴性试样相若。在第二次循环扩增后,14pg/ml 已经可以容易地判定了。该分析进行 4 次扩增循环并且荧光信号在每次循环后稳定提高。

[0103] 在另一实施例中进行了 9 次扩增循环并且荧光信号在每次循环后仍然稳定提高。

[0104] 实施例 8 :循环扩增的肌钙蛋白 I 分析

[0105] 表 4 显示利用循环扩增方法的肌钙蛋白 I 分析的数据。利用单克隆抗体 (Hytest) 的夹心对,其中一个用荧光素标记并且第二个用生物素标记。通过标准方法标记半抗原。涂布了荧光素 - 抗肌钙蛋白 I 的探针如在实施例 1 中所描述。抗肌钙蛋白 I 包覆的探针浸没于在分析缓冲液中稀释 3 倍的肌钙蛋白 I 试样中并且在转速为 750rpm 轨道流的试样孔中室温培养 20 分钟。在冲洗序列后,探针浸没于转速为 500rpm 浓度为 10  $\mu$ g/ml 的 B- 抗肌钙蛋白 I 的溶液中 2 分钟,然后培养于转速为 500rpm 的 Cy5-SA- 聚蔗糖溶液中 1 分钟。接着两次循环扩增,通过循环地将探针放置回 B- 抗肌钙蛋白 I 的溶液 (培养 1 分钟),通过冲洗序列,放置到 Cy5-SA- 聚蔗糖 (培养 1 分钟),随后进行一次冲洗序列来进行。所有步骤在流速为 500rpm 及室温下进行。在完成每次循环扩增时,测定探针梢端的荧光并且该结果在表 4 中显示。

[0106] 表 4. 循环扩增步骤的肌钙蛋白 I 分析

[0107]

	第一阅读	循环 1	循环 2
TnI, pg/ml			
1000	2.34	7.06	13.41
100	0.54	1.43	3.17
10	0.31	0.66	1.43
0	0.31	0.53	1.04

[0108] 注:数据是重复测定的平均值

[0109] 在表 4 中描述的数据显示循环扩增法提高敏感度。在第一阅读未被检测出的浓度为 10pg/ml 的肌钙蛋白 I 试样在两次扩增循环后其荧光大于阴性试样的荧光。

[0110] 实施例 9 :循环扩增的分析精密度

[0111] 由于高分子量络合物的复合层的形成,人们会推断其不精确度将随更多的扩增步骤而增加。然而,表 5 显示了循环扩增方法的另一个意料外的方面。

[0112] 精密度研究按照在实施例 5 中描述的规程利用临床相关 BNP 水平进行研究。在表 5 中显示了对 BNP 浓度单元 (pg/ml) 的 % CV (变异系数)。其结果显示循环扩增方法具有

变异系数小于 10%的高精密密度。

[0113] 表 5. BNP 分析精密密度

[0114]

BNP	100pg/ml	500pg/ml	1500pg/ml
第一阅读	17.3% CV	2.2% CV	4.4% CV

[0115]

循环 1	8.1% CV	2.5% CV	4.6% CV
循环 2	7.4% CV	2.8% CV	5.5% CV
	n = 8	n = 8	n = 8

[0116] 实施例 10. 最小检出限的减小

[0117] 表 6 显示利用在实施例 4 和 5 中所描述的规程进行三次循环扩增步骤得到的 BNP 分析结果。在表 6 中是 BNP 校正曲线和平均值,标准误差,一个阴性试样 16 次重复的两个标准误差的结果。BNP 的高点看上去在大约浓度为 3-6ng/ml 时开始饱和探针,并且该分析具有低至 pg/ml 范围的敏感度。两个标准差是一个决定一个免疫分析的最小检出限的通用方法。在表 6 中的数据显示最小检出限从第一阅读的 6.4pg/ml 逐渐降低至在 3 次循环扩增后的 1pg/ml。在第一阅读,阴性试样的标准误差是 0.0078V,此处误差的主源是在分析中应用的特定仪器。仪器误差是大约 ±0.007V。随着循环扩增,敏感度通过增加免疫特异信号而保持仪器测量噪音不变而提高。

[0118] 表 6. 随循环扩增最小检出限的提高

[0119]

	PMT 伏特							
BNP (pg/ml):	6000	3000	1000	333	111	37	12	0
第一阅读	9.48	7.87	4.3	2.32	0.83	0.29	0.07	0.04
循环 1	11.62	10.14	6.7	4.53	1.8	0.66	0.16	0.06
循环 2	饱和	12.37	8.73	6.94	3.2	1.22	0.29	0.09
循环 3	饱和	饱和	10.6	9.14	4.91	2.01	0.45	0.13

	阴性试样	标准误差* (n=16)	2x 标准误差	检出限 (pg/ml)
第一阅读	0.04	0.0079	0.016	6.4
循环 1	0.06	0.012	0.024	3.7
循环 2	0.09	0.015	0.03	2.4
循环 3	0.13	0.016	0.032	1.1

[0120] 实施例 11 :带有化学发光标记的链酶亲和素 - 交联聚蔗糖的制备

[0121] 在 35  $\mu$ l 二甲基甲酰胺中的 0.176  $\mu$ g 三(双吡啶)合钐(II)-NHS(MesoScale Discovery, R91BN-2) 与在 PH7.4 的 PBS 中 1mg 链酶亲和素混合并在室温下反应一小时。通常每个链酶亲和素分子与大约 2-4 个钐标记结合。该钐 - 链酶亲和素偶联物在 PD-10 柱 (Pharmacia) 上纯化。2.9  $\mu$ L 的 SMCC(10mg/ml, DMF) 与 1ml PH7.4 的 PBS 中的 1mg 的钐 - 链酶亲和素室温反应一小时。该混合物在 PD10 柱上柱来去除未结合的 SMCC。

[0122] 在交联聚蔗糖 400-SPDP 上的硫醇通过添加 30  $\mu$ l 浓度为 38mg/ml 的 DTT 到 1ml PBS 中的 1mg 交联聚蔗糖 400-SPDP 来脱保护并且在室温下反应 1 小时,随后通过 PD10 柱对交联聚蔗糖纯化。

[0123] 该钐 - 链酶亲和素 -SMCC 与交联聚蔗糖 400-SH 混合并且室温过夜反应。然后添加 10  $\mu$ l 浓度为 12.5mg/ml 的 NEM(Aldrich) 并且室温下反应半小时。然后将偶联物在琼脂糖 4B CL 柱上纯化。该得到的偶联物中每个交联聚蔗糖有大约 20 个链酶亲和素和每个链酶亲和素上有 2-4 个钐。

[0124] 实施例 12 :带有化学发光标记的循环扩增

[0125] 如在实施例 1 中所述制备的直径 1mm 涂布了抗 BNP 的探针,浸没于 BNP 试样中并且在受转速 750rpm 轨道运动(1mm 直径行程)的试样孔中室温培养 5 分钟。探针保持静止。探针在 PBS,0.05%吐温 20 中冲洗 3 次,每次 10 秒。在冲洗序列后,探针浸没于在含有浓度为 10  $\mu$ g/ml 生物素基化的抗 BNP 的分析缓冲液的溶液中,随后在转速为 500rpm 培养 2 分钟,然后进行 3 次冲洗序列。然后探针转移至含有浓度为 10  $\mu$ g/ml 的钐 - 链酶亲和素 -Cx Ficol1 的溶液中。在转速 500rpm 培养 1 分钟后,探针进行一次冲洗序列,然后经历 2 次扩增循环。一次扩增循环包括将探针放置回转速为 500rpm 的相同的生物素 - 抗体溶液 1 分钟,随后进行冲洗序列 1 次,然后放回在转速 500rpm 的链酶亲和素 1 分钟,随后进行冲洗序列 1 次。在完成最后一次冲洗步骤后,探针浸没于含有带共反应剂,三丙基胺(MesoScale Discovery, Read Buffer S, R92SC-3) 的测量溶液的具有透明底部的微孔中,并通过图 2 的光学设备读取。

[0126] 本发明,和其制作和使用的方式和过程已用完整,清晰,简洁,和准确的语言描述,使任何技术人员能够同样地制作和使用。应当理解的是上述本发明的优选实施例和其中做的修改都可以不脱离本发明范围(如权利要求中所列)而达成。其后的权利要求为总结本发明说明书以特别指出并明确要求的作为发明的主题。

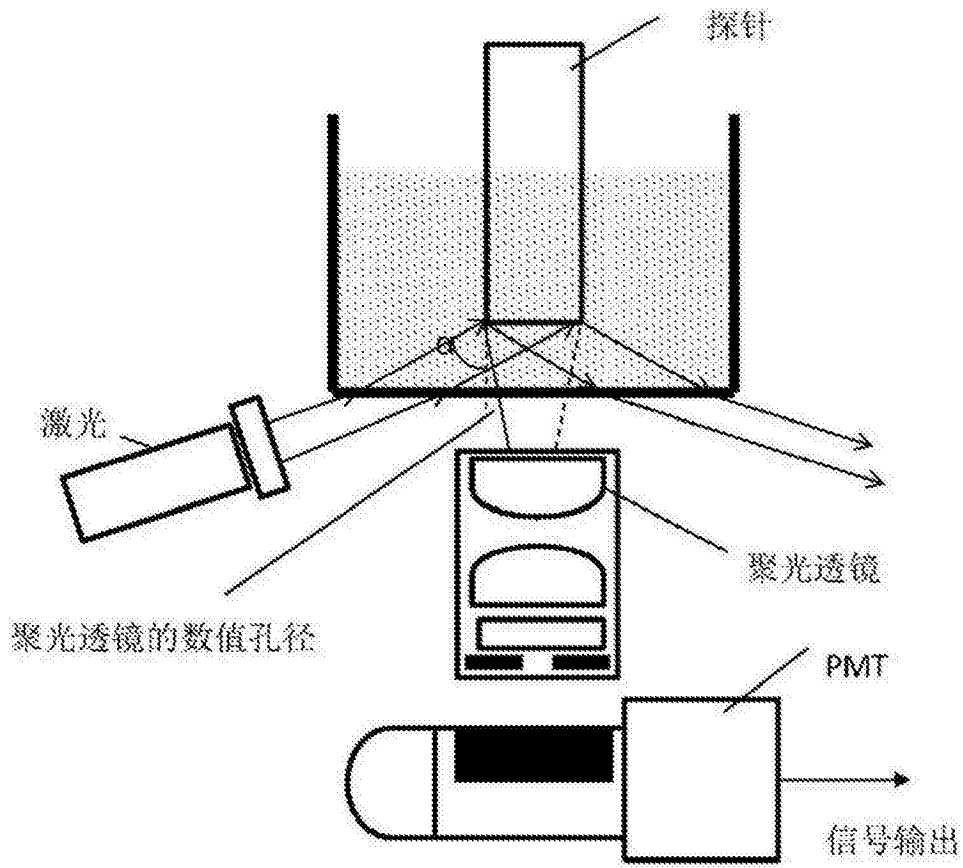


图 1

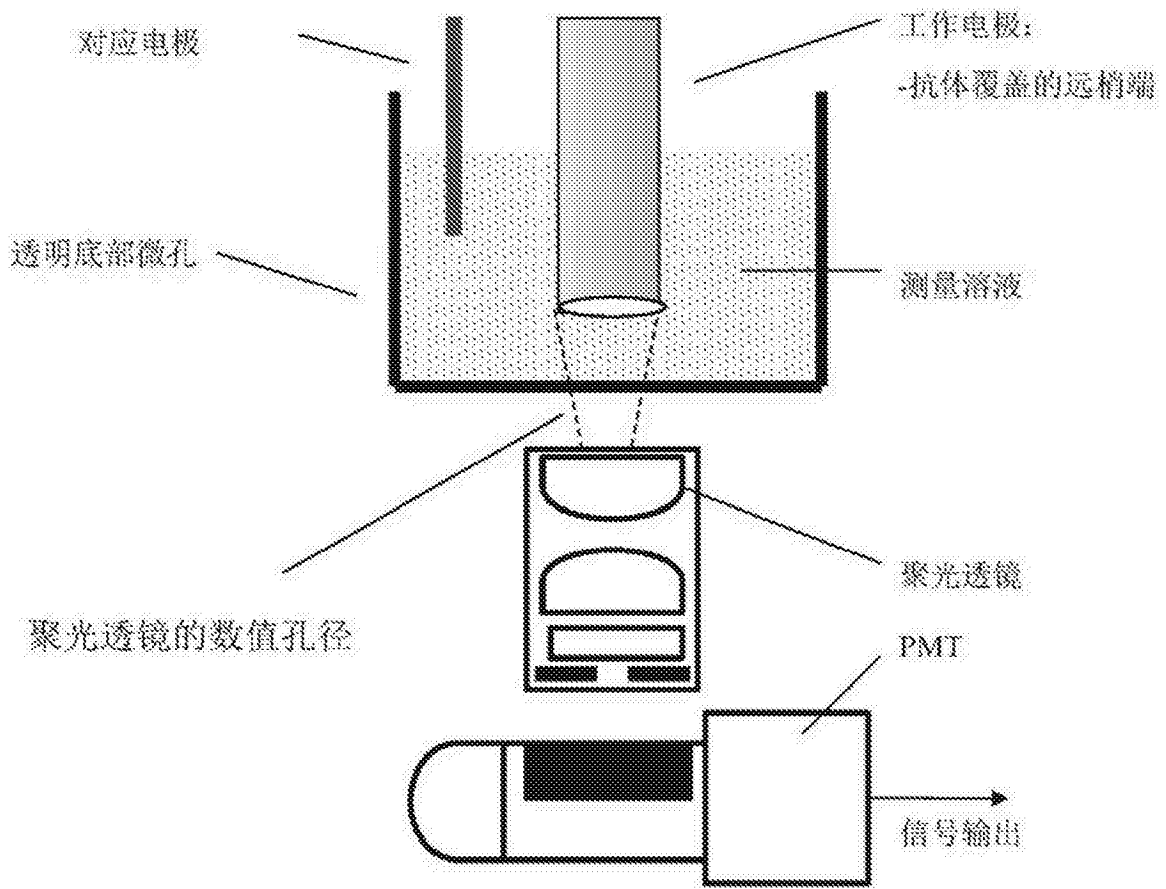


图 2



# 探针转移

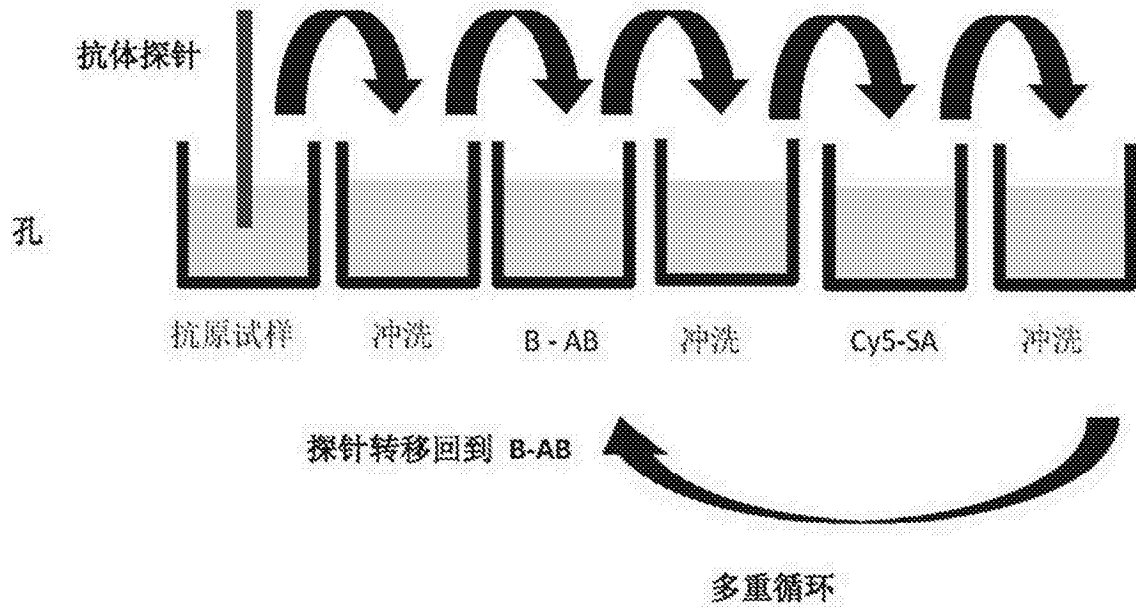


图 4

### 交联 Ficoll-SPDP 的制备

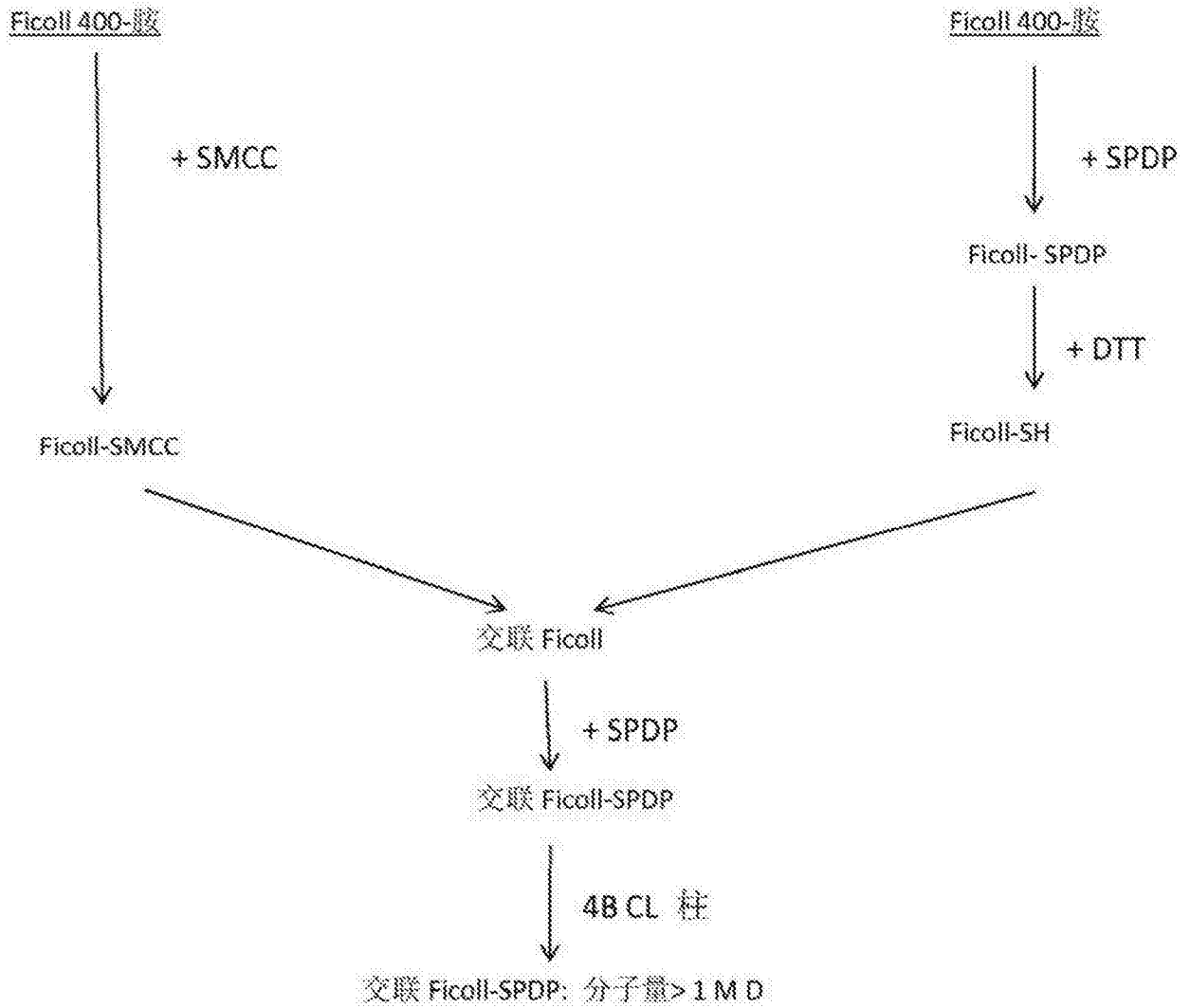


图 5

专利名称(译)	发光聚合物循环扩增		
公开(公告)号	<a href="#">CN105181659A</a>	公开(公告)日	2015-12-23
申请号	CN201510353808.2	申请日	2012-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	万迈医疗仪器有限公司		
申请(专利权)人(译)	万迈医疗仪器有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	万迈医疗仪器有限公司		
[标]发明人	罗伯特F祖克 谭洪		
发明人	罗伯特·F·祖克 谭洪		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/536 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/533 G01N21/76 G01N27/3277 G01N33/5306 G01N33/5438 G01N33/553 G01N2021/757		
代理人(译)	葛强		
优先权	61/477171 2011-04-20 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一个用于探测在液体试样中具有高敏感度的被分析物的发光免疫分析方法。本发明提供了一个独特的组合(i)利用具有小的传感表面积用以结合被分析物分子的探针，(ii)利用一个结合有多个结合分子和多个发光标记的高分子量的支化聚合物，并且(iii)具有免疫复合物结构的探针循环地返回至试剂容器和扩增容器1-10次并且重复与试剂和扩增聚合物的反应，以改善探测水平的敏感度。对每个循环，发光信号的比噪音提高显著。

探针转移

