

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380107816.4

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

[43] 公开日 2006年12月13日

[11] 公开号 CN 1879017A

[22] 申请日 2003.12.17

[21] 申请号 200380107816.4

[30] 优先权

[32] 2002.12.26 [33] US [31] 60/436,591

[86] 国际申请 PCT/US2003/039938 2003.12.17

[87] 国际公布 WO2004/059280 英 2004.7.15

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.27

[71] 申请人 梅索斯卡莱科技公司

地址 美国马里兰

[72] 发明人 杰夫·D·德巴德 辛迪·李

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 13 页 说明书 29 页

[54] 发明名称

用于提取生物学标记物的方法、组合物和试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及用于从生物学样品中提取标记物的方法，并涉及在这些方法中所使用的系统、装置、试剂盒和试剂。本发明也涉及用于测定样品中的多种不同的生物体类型的方法、试剂盒、试剂和组合物。本发明的特殊优点之一是能从一个体积内的含有复杂生物学基质的单一样品中同时提取一种以上的微生物或病毒颗粒标记物。

1. 一种用于测定一个样品内的多种不同的生物体的方法，包括：
 - (a) 将所述样品与包含亚硝酸的提取试剂接触，由此形成一种检测组合物；以及
 - (b) 在所述检测组合物中测定所述多种生物体的标记物以测定所述多种不同的生物体。
2. 权利要求1的方法，其中所述多种生物体包括一种第一生物体，所述第一生物体为革兰氏阳性细菌，所述提取试剂从所述第一生物体中提取第一标记物且所述测定步骤包括测定所述第一标记物。
3. 权利要求2的方法，其中所述第一生物体是链球菌或肠球菌细菌且所述第一标记物是细胞壁相关抗原。
4. 权利要求3的方法，其中所述生物体是A、B、F或G组链球菌细菌且所述第一标记物是组特异性抗原。
5. 权利要求2的方法，其中所述多种不同的生物体包括选自自由真菌、病毒和革兰氏阴性细菌所组成的组的一种第二生物体。
6. 权利要求2的方法，其中所述多种不同的生物体包括一种第二生物体，所述第二生物体包括第二标记物，所述测定步骤包括测定所述第二标记物且所述第二标记物是蛋白、核酸和/或脂类标记物。
7. 权利要求1的方法，其中所述样品包括粘液。
8. 权利要求1的方法，其中所述样品是鼻或咽样品或生殖道分泌物样品。
9. 权利要求1的方法，其中所述提取试剂还包括一种表面活性物质。
10. 权利要求1的方法，其中用多路检测格式在所述检测组合物中测定所述标记物。
11. 权利要求10的方法，其中所述多路检测格式是多路免疫检测

格式。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述测定步骤包括将所述检测组合物与固定化抗体的模式化阵列接触。

13. 权利要求 1 的方法，还包括中和所述检测组合物的 pH。

14. 一种用于测定上呼吸道样品中的多种不同的生物体的方法，包括：

(a)将所述上呼吸道样品与包含亚硝酸的提取试剂接触，由此形成一种检测组合物；

(b)在适合于从链球菌细菌中提取出细胞壁相关抗原的条件下孵育所述检测组合物；

(c)在所述检测组合物中测定所述抗原以及一或多种附加标记物，所述附加标记物包括至少一种病毒的标记物。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述生物体是 A、B、F 或 G 组链球菌细菌且所述抗原是组特异性抗原。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述至少一种病毒的标记物是蛋白、核酸和/或脂类标记物。

17. 权利要求 15 的方法，其中所述病毒选自鼻病毒、副流感病毒、A、B 或 C 型流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、冠状病毒、腺病毒、柯萨奇 A 病毒、单纯疱疹病毒、肠病毒、Epstein-Barr 病毒、巨细胞病毒或乳头瘤病毒。

18. 权利要求 15 的方法，其中所述一或多种附加标记物包括 A 型流感病毒的一种标记物、B 型流感病毒的一种标记物和呼吸道合胞病毒(RSV)的一种标记物。

19. 权利要求 14 的方法，其中所述样品是鼻灌洗液或咽喉拭子。

20. 权利要求 14 的方法，其中所述提取试剂还包括一种表面活性物质。

21. 权利要求 14 的方法，其中用多路检测格式在所述检测组合物

中测定所述抗原和所述一或多种附加标记物。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述多路检测格式是多路免疫检测格式。

23. 权利要求 21 的方法，其中所述检测步骤包括将所述检测组合物与固定化抗体的模式化阵列接触。

24. 权利要求 14 的方法，还包括中和所述检测组合物的 pH。

25. 一种用于测定一种样品中的多种不同的生物体类型的试剂盒，所述试剂盒在一或多个容器中包括：(a)一种酸；(b)一种亚硝酸盐；(c)一种表面活性物质；(d)与所述多种不同生物体类型的第一生物体的第一标记物结合的第一结合试剂；和(e)与所述多种不同生物体类型的第二生物体的第二标记物结合的第二结合试剂。

26. 权利要求 25 的试剂盒，其中所述第一和第二结合试剂是抗体。

27. 权利要求 25 的试剂盒，其中所述多种不同的生物体类型的第一生物体是革兰氏阳性细菌。

28. 权利要求 27 的试剂盒，其中所述革兰氏阳性细菌是链球菌或肠球菌细菌且所述第一标记物是细胞壁相关抗原。

29. 权利要求 28 的试剂盒，其中所述革兰氏阳性细菌是 A、B、F 或 G 组链球菌且所述第一标记物是组特异性抗原。

30. 权利要求 27 的试剂盒，其中所述多种不同的生物体类型的第二生物体选自由真菌、病毒和革兰氏阴性细菌组成的组。

31. 权利要求 27 的试剂盒，其中所述第二标记物是蛋白、核酸和/或脂类标记物。

32. 权利要求 25 的试剂盒，还包括具有固定化于其上的抗体的模式化阵列的固相支持物，所述模式化阵列包括具有所述第一结合试剂的第一区以及具有所述第二结合试剂的第二区。

33. 权利要求 25 的试剂盒，还包括用于中和所述酸的碱或 pH 缓冲剂。

34. 权利要求 25 的试剂盒，其中所述亚硝酸盐和/或所述酸是干燥形式的。

35. 权利要求 25 的试剂盒，其中所述亚硝酸盐和/或所述酸是溶液形式的。

36. 权利要求 25 的试剂盒，其中所述亚硝酸盐和所述酸以作为亚硝酸的组合形式存在。

37. 一种用于测定一种样品中的多种不同的生物体类型的试剂盒，所述试剂盒在一或多个容器中包括：(a)一种酸；(b)一种亚硝酸盐；(c)一种表面活性物质；(d)与第一标记物结合的抗体，所述第一标记物是来自链球菌细菌的细胞壁相关抗原；和(e)与来自病毒的第二标记物结合的第二抗体。

38. 权利要求 37 的试剂盒，其中所述链球菌细菌是 A、B、F 或 G 组链球菌且所述第一标记物是组特异性抗原。

39. 权利要求 38 的试剂盒，其中所述第二标记物是蛋白、核酸和/或脂类标记物。

40. 权利要求 38 的方法，其中所述病毒选自由鼻病毒、副流感病毒、A 或 B 型流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、冠状病毒、腺病毒、柯萨奇 A 病毒、单纯疱疹病毒、肠病毒、Epstein-Barr 病毒、巨细胞病毒和乳头瘤病毒组成的组。

41. 权利要求 37 的试剂盒，还包括具有固定化于其上的抗体的模式化阵列的固相支持物，所述模式化阵列包括具有所述第一结合试剂的第一区以及具有所述第二结合试剂的第二区。

42. 权利要求 37 的试剂盒，还包括用于中和所述酸的碱或 pH 缓冲剂。

43. 权利要求 37 的试剂盒，其中所述亚硝酸盐和/或所述酸是干燥形式的。

44. 权利要求 37 的试剂盒，其中所述亚硝酸盐和/或所述酸是溶液

形式的。

45. 权利要求 37 的试剂盒，其中所述亚硝酸盐和所述酸以作为亚硝酸的组合形式存在。

46. 权利要求 37 的试剂盒，其中所述表面活性物质是非离子型表面活性物质。

47. 一种用于测定一种样品中的多种不同的生物体类型的试剂盒，所述试剂盒在一或多个容器中包括：(a)一种酸；(b)一种亚硝酸盐；(c)一种表面活性物质；(d)与第一标记物结合的第一抗体，所述第一标记物是来自 A、B、F 或 G 组链球菌细菌的组特异性抗原；(e)与来自 A 型流感病毒的第二标记物结合的第二抗体；(f)与来自 B 型流感病毒的第三标记物结合的第三抗体；和(g)与来自呼吸道合胞病毒(RSV)的第四标记物结合的第四抗体。

48. 权利要求 47 的试剂盒，还包括具有固定化于其上的抗体的模式化阵列的固相支持物，所述模式化阵列包括具有所述第一抗体的第一区、具有所述第二抗体的第二区、具有所述第三抗体的第三区以及具有所述第四抗体的第四区。

49. 权利要求 47 的试剂盒，还包括用于中和所述酸的碱或 pH 缓冲剂。

50. 权利要求 47 的试剂盒，其中所述亚硝酸盐和/或所述酸是干燥形式的。

51. 权利要求 47 的试剂盒，其中所述亚硝酸盐和/或所述酸是溶液形式的。

52. 权利要求 47 的试剂盒，其中所述亚硝酸盐和所述酸以作为亚硝酸的组合形式存在。

53. 权利要求 47 的试剂盒，其中所述表面活性物质是非离子型表面活性物质。

54. 一种用于从一种基质中提取两种或多种标记物的方法，包括将

含有所述基质的样品与提取试剂接触，其中所述提取试剂包含一种氧化酸。

55. 一种用于从一种基质中提取一种或多种标记物的方法，包括将含有所述基质的样品与提取试剂接触，其中所述提取试剂包含一种氧化酸且其中所述一或多种标记物包括选自由蛋白、肽、毒素、核酸、脂类及其组合组成的组的标记物。

56. 一种用于从一种基质中提取一种或多种标记物的方法，包括将含有所述基质的样品与提取试剂接触，其中所述提取试剂包括一种氧化酸且其中所述一或多种标记物包括病毒标记物、真菌标记物或其组合。

57. 一种用于测定两种或多种标记物的方法，包括

(a)将含有一或多种生物体的样品与包含一种氧化酸的提取试剂接触，由此制备一种检测组合物；和

(b)测定所述检测组合物中的所述两种或多种标记物。

58. 一种用于测定一种或多种标记物的方法，包括

(a)将含有一或多种生物体的样品与包含一种氧化酸的提取试剂接触，由此制备一种检测组合物；和

(b)测定所述检测组合物中的所述一种或多种标记物，其中所述一或多种标记物的至少一种包括一种选自由蛋白、肽、毒素、核酸和脂类组成的组的标记物。

59. 一种用于测定一种或多种标记物的方法，包括

(a)将含有一或多种生物体的样品与包括一种氧化酸的提取试剂接触，由此制备一种检测组合物；和

(b)测定所述检测组合物中的所述一种或多种标记物，其中所述一或多种标记物的至少一种是病毒标记物或真菌标记物。

60. 权利要求 54-59 中任一项的方法，其中所述提取试剂还包括一种表面活性物质。

61. 权利要求 60 的方法，其中所述表面活性物质是非离子型表面

活性物质。

62. 权利要求 54-59 中任一项的方法，还包括自所述样品分离所述一或多种标记物。

63. 权利要求 54-59 中任一项的方法，其中所述氧化酸包含亚硝酸。

64. 权利要求 63 的方法，其中通过将亚硝酸盐与酸混合而制备所述亚硝酸。

65. 权利要求 64 的方法，其中使用液体形式的所述亚硝酸盐和/或所述酸。

66. 权利要求 64 的方法，其中使用干燥形式的所述亚硝酸盐和/或所述酸。

67. 权利要求 54-59 中任一项的方法，其中所述氧化酸的 pH 值范围为 2 到 5。

68. 权利要求 54-59 中任一项的方法，其中通过混合(a)亚硝酸盐溶液、(b)酸溶液以及(c)表面活性物质溶液而制备所述提取试剂。

69. 权利要求 54-59 中任一项的方法，其中通过混合(a)包括亚硝酸盐和表面活性物质的第一溶液以及(b)包括酸和表面活性物质的第二溶液而制备所述提取试剂。

70. 权利要求 54-59 中任一项的方法，其中通过混合(a)亚硝酸盐溶液和表面活性物质的组合以及(b)干燥形式的酸而制备所述提取试剂。

71. 权利要求 54-59 中任一项的方法，其中通过混合(a)酸溶液和表面活性物质的组合以及(b)干燥形式的亚硝酸盐而制备所述提取试剂。

72. 权利要求 57-59 中任一项的方法，还包括中和所述检测组合物的 pH 值。

73. 权利要求 54-56 中任一项的方法，其中所述基质包括生物学基质。

74. 权利要求 57-59 中任一项的方法，其中所述样品包括生物学基质。

75. 权利要求 73 或 74 的方法，其中所述生物学基质是粘液分泌物(渗出物)。
76. 权利要求 54-59 中任一项的方法，其中所述样品包括生物学样品。
77. 权利要求 76 的方法，其中所述生物学样品包括临床样品。
78. 权利要求 77 的方法，其中自患者收集所述临床样品。
79. 权利要求 78 的方法，其中用拭子、吸引器或灌洗液收集所述临床样品。
80. 权利要求 77 的方法，其中所述临床样品是鼻或咽部的样品或生殖道分泌物样品。
81. 权利要求 77 的方法，还包括培养所述样品。
82. 权利要求 54-59 中任一项的方法，其中所述一或多种标记物是生物体标记物。
83. 权利要求 82 的方法，其中所述一或多种标记物包括来自不同生物体的至少两种标记物。
84. 权利要求 82 的方法，其中所述生物体是微生物。
85. 权利要求 84 的方法，其中所述微生物包括细菌、病毒或真菌。
86. 权利要求 84 的方法，其中所述微生物是选自 GABHS (A 组链球菌)、溶血隐秘杆菌(*Arcanobacterium haemolyticum*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)、杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、粘膜炎莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*) (粘膜炎布兰汉球菌(*Branhamella catarrhalis*))、副流感(*Parainfluenza*)、梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、荚膜菌属(*Calymmatobacterium*)、放线菌属(*Actinomyces*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、

梭杆菌属(*Fusobacterium*)、梭菌属(*Clostridium*)、动弯杆菌属(*Mobiluncus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、嗜肺性军团菌(*Legionella pneumophila*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)、淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、解脲尿枝原体(*Ureaplasma urealyticum*)、阴道加德纳氏菌(*Gardnerella vaginalis*)、肺炎枝原体(*Mycoplasma pneumoniae*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌(*E. coli*)和结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的菌株。

87. 权利要求 84 的方法，其中所述微生物是选自鼻病毒、副流感病毒、A 或 B 型流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、冠状病毒、腺病毒、柯萨奇 A 病毒、单纯疱疹病毒、肠病毒、Epstein-Barr 病毒、巨细胞病毒和乳头瘤病毒的病毒株。

88. 权利要求 84 的方法，其中所述微生物是选自念珠菌属(*Candida spp.*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*)、组织胞浆菌属 (*Histoplasma*)、芽生菌属(*Blastomyces*)、球孢菌属 (*Coccidioides*) 和隐球菌属 (*Cryptococcus*) 的真菌。

89. 权利要求 57 的方法，其中自单一检测体积中测定所述两种或多种标记物。

90. 权利要求 57 的方法，其中自含有部分所述样品的两个或多个体积中测定所述两种或多种标记物。

91. 权利要求 58 或 59 的方法，其中自单一检测体积中测定所述一种或多种标记物。

92. 权利要求 58 或 59 的方法，其中自含有部分所述样品的两个或多个体积中测定所述一种或多种标记物。

93. 权利要求 57-59 中任一项的方法，其中所述方法是对疑似患有感染性疾病的患者的一种诊断性测试。

94. 权利要求 93 的方法，其中所述感染性疾病是呼吸系统疾病或呼吸系统病变。

95. 权利要求 93 的方法，其中所述感染性疾病是性病。

96. 权利要求 57-59 中任一项的方法，其中所述测定包括免疫检测。

97. 权利要求 57-59 中任一项的方法，其中所述测定包括将所述检测组合物与一或多种能与所述一或多种标记物特异性结合的分子接触。

98. 权利要求 57 的方法，其中对于所述两种或多种标记物中的每一种，所述检测组合物还包括能与所述标记物特异性结合的检测分子。

99. 权利要求 58 或 59 的方法，其中对于所述两种或多种标记物中的每一种，所述检测组合物还包括能与所述标记物特异性结合的检测分子。

100. 一种组合物，其包含两种或多种标记物和一种氧化酸。

101. 一种组合物，其包含一或多种标记物和一种氧化酸，其中至少一种标记物是蛋白、肽、毒素、核酸或脂类。

102. 一种组合物，其包含一或多种标记物和一种氧化酸，其中至少一种标记物是病毒或真菌的标记物。

103. 权利要求 100-102 中任一项的组合物，还包括一种表面活性物质。

104. 权利要求 103 的组合物，其中所述表面活性物质是非离子型表面活性物质。

105. 权利要求 100-102 中任一项的组合物，还包括一种检测部分或一种捕获部分。

106. 权利要求 100-102 中任一项的组合物，还包括一种检测部分或一种捕获部分。

107. 权利要求 100-102 中任一项的组合物，还包括一种 pH 中和剂。

108. 权利要求 100-102 中任一项的组合物，其中所述标记物是生物体标记物。

109. 权利要求 100 的组合物, 其中所述两种或多种标记物是来自不同生物体的生物体标记物。

110. 权利要求 108 或 109 的组合物, 其中所述生物体是微生物。

111. 权利要求 110 的组合物, 其中所述微生物包括细菌、病毒和/或真菌。

112. 权利要求 100-102 中任一项的组合物, 其中所述标记物来源于一种微生物, 所述微生物是选自 GABHS(A 组链球菌)、溶血隐秘杆菌、脆弱拟杆菌、肠球菌属、流感嗜血杆菌、杜克雷嗜血杆菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、金黄色葡萄球菌、粘膜炎莫拉氏菌(粘膜炎布兰汉球菌)、副流感、梅毒螺旋体、百日咳杆菌、白喉杆菌、荚膜菌属、放线菌属、拟杆菌属、梭杆菌属、梭菌属、动弯杆菌属、假单胞菌属、诺卡氏菌属、嗜肺性军团菌、沙眼衣原体、肺炎衣原体、鹦鹉热衣原体、淋病奈瑟氏球菌、解脲尿支原体、阴道加德纳氏菌、肺炎支原体、肺炎克雷伯菌、大肠杆菌和结核分枝杆菌的菌株。

113. 权利要求 100-102 中任一项的组合物, 其中所述一或多种标记物来源于一种微生物, 所述微生物是选自鼻病毒、副流感病毒、A 或 B 型流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、冠状病毒、腺病毒、柯萨奇 A 病毒、单纯疱疹病毒、肠病毒、Epstein-Barr 病毒、巨细胞病毒和乳头瘤病毒的病毒株。

114. 权利要求 100-102 中任一项的组合物, 其中所述一或多种标记物来源于一种微生物, 所述微生物是选自念珠菌属、白色念珠菌、卡氏肺孢子虫、组织胞浆菌属、芽生菌属、球孢子菌和隐球菌属的真菌。

115. 权利要求 100-102 中任一项的组合物, 其中所述组合物的 pH 值范围为 2 到 5。

116. 一种应用于一或多种检测法的用于从样品中提取两种或多种标记物的试剂盒, 所述试剂盒在一或多个容器中包括: (a)一种酸; (b)一种亚硝酸盐; (c)一种表面活性物质; 和(d)至少一种提取成分, 所述提取

成分选自(i)pH 缓冲剂/pH 中和剂；(ii)样品；(iii)防腐剂；(iv)稳定剂；(v)提取容器；(vi)漂白剂；(vii)干燥剂；(viii)捕获部分；和(ix)检测部分。

117. 一种应用于一或多种检测法的用于从样品中提取一或多种标记物的试剂盒，所述试剂盒在一或多个容器中包括：(a)一种酸；(b)一种亚硝酸盐；(c)一种表面活性物质；(d)至少一种提取成分，所述提取成分选自(i)pH 缓冲剂/pH 中和剂；(ii)样品；(iii)防腐剂；(iv)稳定剂；(v)提取容器；(vi)漂白剂；(vii)干燥剂；(viii)捕获部分；和(ix)检测部分；其中所述一或多种标记物的至少一种是病毒或真菌的标记物。

118. 一种应用于一或多种检测法的用于从样品中提取一或多种标记物的试剂盒，所述试剂盒在一或多个容器中包括：(a)一种酸；(b)一种亚硝酸盐；(c)一种表面活性物质；(d)至少一种提取成分，所述提取成分选自(i)pH 缓冲剂/pH 中和剂；(ii)样品；(iii)防腐剂；(iv)稳定剂；(v)提取容器；(vi)漂白剂；(vii)干燥剂；(viii)捕获部分；和(ix)检测部分；其中所述一或多种标记物的至少一种是蛋白、核酸或脂类标记物。

119. 权利要求 116-118 中任一项的试剂盒，其中所述一或多种标记物包括来自一种生物体的至少一种生物体标记物。

120. 权利要求 119 的试剂盒，其中所述生物体是微生物。

121. 权利要求 120 的试剂盒，其中所述微生物选自细菌、病毒或真菌。

122. 权利要求 116 的试剂盒，其中所述试剂盒还包括一或多种能与所述两种或多种标记物相结合的结合试剂。

123. 权利要求 117 或 118 的试剂盒，其中所述试剂盒还包括一或多种能与所述一或多种标记物相结合的结合试剂。

124. 权利要求 116-118 中任一项的试剂盒，其中所述亚硝酸盐和/或所述酸是干燥形式的。

125. 权利要求 116-118 中任一项的试剂盒，其中所述亚硝酸盐和/或所述酸是溶液形式的。

126. 权利要求 116-118 中任一项的试剂盒，其中将所述亚硝酸盐和所述酸组合生成亚硝酸。

127. 权利要求 116-118 中任一项的试剂盒，其中所述表面活性物质是非离子型表面活性物质。

128. 权利要求 116-118 中任一项的试剂盒，其中所述 pH 缓冲剂/pH 中和剂是 Tris 碱溶液。

129. 一种用于提取造成上呼吸道疾病的致病性微生物的标记物的临床方法，包括将含有粘液的咽部和/或鼻咽部拭子或鼻灌洗液与一种包含氧化酸和去污剂的提取试剂相接触，由此从所述粘液中提取所述标记物。

130. 一种用于提取造成上呼吸道疾病的致病性微生物的标记物的临床方法，包括将含有粘液的咽部和/或鼻咽部拭子或鼻灌洗液与一种包含氧化酸和去污剂的提取试剂相接触，由此从所述粘液中提取所述标记物，且其中存在一或多种所述致病性微生物且所述致病性微生物的至少一种是病毒颗粒或真菌。

131. 一种用于提取造成上呼吸道疾病的致病性微生物的标记物的临床方法，包括将含有粘液的咽部和/或鼻咽部拭子或鼻灌洗液与一种包含氧化酸和去污剂的提取试剂相接触，由此从所述粘液中提取所述标记物，且其中存在两种或多种所述致病性微生物且所述致病性微生物的至少一种是病毒颗粒或真菌。

用于提取生物学标记物的方法、组合物和试剂盒

相关申请的交叉引用

本申请要求 2002 年 12 月 26 日提交的美国临时专利申请 No. 60/435,591 的优先权，将该申请并入本申请作为参考。

技术领域

本发明涉及从一或多种样品中提取一或多种标记物并优选地同时测定这些标记物的方法。发明也涉及在这些方法中使用的系统、装置、设备、试剂盒和试剂。

背景技术

50 年代早期到 60 年代早期的研究者就认识到临床样品中的粘液对在样品中所进行的临床测定有着不利的作用。为了将粘液粘度对临床样品的影响最小化，已经发展出用于液化粘液基质，例如痰液的特异的方法和组合物。这些提取方案包括使用 DNA 酶 (Lieberman, Amer. Rev. Resp. Disease, Vol. 97, pp. 662-672 (1968)) 或含巯基的还原剂例如 N-乙酰-L-半胱氨酸 (Webb, J. Thoracic & Cardiovascular Surg., Vol. 44, pp. 330-343 (1962)) 或二硫苏糖醇 (美国专利 No. 3,502,779 (Mar. 24, 1970))。已经单独或联合使用这些试剂 (Lightowler & Lightowler, Arch. InPharmacodyn., Vol. 189, pp. 53-58 (1971))。

有很多用于鉴定病毒颗粒的免疫测定法或凝集试验的试剂盒，最近几年已经出现在市场中 (*QuickVue* by Quidel, *RSVAbbott TestPack* by Abbott Laboratories, *FluOIA* by Biostar, Inc., 和 *Directigen Flu* 和 *Directigen RSV* by Becton Dickinson and Company)。市场中的大多数试剂盒都联合使

用去污剂和还原剂预处理临床样品以降解粘液基质并溶解抗原。在 Horaud 等的美国专利 No. 6,248,513、Crosby 等的美国专利 No. 6,207,445、Rehg 等的美国专利 No. 6,194,221、Hansen 等的美国专利 No. 5,993,826、Maul 等的美国专利 No. 5,995,377、Bogart 等的美国专利 No. 5,869,272、Imrich 等的美国专利 No. 5,415,994 和 Snyder 等的美国专利 No. 5,334,503 中描述了联合使用去污剂和还原剂提取抗原的实例，在此将各个专利一同并入作为参考。或者，尽管少见，但在本领域也使用有机溶剂提取 (Porcelli 等的美国专利 No. 6,238,676，在此一同并入作为参考)。

通过测定已知的蛋白标记物来测定一些细菌株可以采用与对病毒颗粒所采用的那些方法相似的提取方法。例如，对于用免疫化学方法测定嗜肺性军团菌 (*Legionella pneumophila*)，用含有 Triton X-100 去污剂和 EDTA 磷酸缓冲盐水的提取溶液预处理含有痰样品的拭子 (美国专利 No. 5,415,994 (May 16,1995))。

亚硝酸已经被用于从链球菌 (*Streptococci*) 和肠球菌属 (*Enterococci*) 的细胞壁中提取糖类抗原 (Petts, J. Clinical Microbiol., Vol. 33 (4), pp. 1016-18 (1995); Facldam, Infections in Medicine, Vol. 14 (11), pp. 891-898 (1997))。其他的实例包括 Bogart 等的美国专利 No. 5,494,801 和 Sand 等的美国专利 No. 5,536,646，在此将两者一同并入作为参考。亚硝酸提取只被用于从这些生物体中提取细胞壁相关的糖类标记物。从来没有预见到亚硝酸提取能用于或成功地提取其他标记物，例如蛋白标记物，或从单一样品内的多种类型的微生物中，特别是从含有复杂的生物学基质的样品例如粘液分泌物中，提取标记物。相反地，甚至认为使用亚硝酸对于蛋白标记物的测定可能是有害的。当用亚硝酸处理时，蛋白进行脱氮作用 (氨基的丢失)。预计这个分解过程将造成变性和/或沉淀。这也可以改变蛋白的抗原特性 (即抗体可能不能结合于蛋白的表面，因为当氨基被去除时，改变了与抗体结合发特性)。脱氮作用、变性和/或沉淀被认为可能减少可溶性标记物的量和可利用性，剩下的标记物的量不足以用于分

析。另外，在本领域普遍认为广泛暴露于酸性条件会对抗原的可溶性或对测定技术中所利用的抗体的反应性造成不良影响（美国专利 No. Re. 33,850）。

发明内容

发明涉及处理一或多种样品以便用于分析的新方法，以及在这些方法中所使用的试剂、组合物和试剂盒。更优选地，发明涉及用于从一或多种样品的基质中（优选地从一或多种复杂样品例如粘液中）提取出一或多种标记物的提取方法和/或使得样品更适合于分析的提取方法（例如，通过减少样品的粘度）。

令人惊异的是，本发明的优选的实施方案可以优选地用单一提取方案从相同的样品中提取并测定多种标记物，优选地是多种不同生物体的标记物。因此，不同于用不同的提取方法处理分离的样品以测定两种或多种标记物，可用单一的提取方案处理相同的样品。本发明因此能以比以往所达到的更高的速度和效率处理患者的样品。本发明也更适合用于快速现场检测装置，特别是进行多分析物测定的基于微量盒（cartridge）、微液或生物芯片的方法；使用单一的提取方法可以显著地降低用户或仪器所必须进行的样品制备的复杂性。

此外，本发明的优选的实施方案的提取方法可以有效地处理多种来自多种微生物的标记物，包括蛋白、糖类、核酸或脂类标记物。标记物可以是非糖类标记物（例如，被识别由非糖类部分所构成的抗原决定簇的抗体所结合的抗原）。

本发明的一个实施方案是一种用于测定样品中的多种不同生物体的方法。测定包括检测是否存在代表生物体的标记物、定量标记物的量、鉴定已知的标记物、确定以往未知标记物的特性等。所述生物体的至少一种优选地是革兰氏阳性细菌，更优选地是链球菌属或肠球菌属的细菌（例如，A、B、F 和 G 组链球菌）。通过从所述细菌中提取并测定一种标

记物来测定这些细菌，标记物优选地是细胞壁相关抗原，更优选地是组特异性抗原。优选地，所测定的其他的生物体的至少一种是选自由真菌和革兰氏阴性细菌所组成的组，和/或通过测定蛋白（例如，被抗体所识别的一种由氨基酸所构成的抗原决定簇）、糖类、核酸和/或脂类标记物测定其他的生物体的至少一种。所测定的病毒优选地选自由鼻病毒、副流感病毒、A、B或C型流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、冠状病毒、腺病毒、柯萨奇A病毒、单纯疱疹病毒、肠病毒、Epstein-Barr病毒、巨细胞病毒和乳头瘤病毒所组成的组。

本发明包括用于提取一或多种标记物，优选的两种或多种标记物的方法，包括用包括氧化酸（优选的亚硝酸）以及任选地去污剂的提取试剂接触样品（优选地是含粘液的样品，例如咽部和/或鼻咽部拭子或鼻拭子）。标记物优选地是来源于微生物（更优选地选自造成上呼吸道疾病或病变的致病性微生物）。提取试剂从样品中提取标记物并使得它们可用于测定（优选地通过免疫测定法、更优选地通过多种免疫测定法、甚至更优选地用直接指向标记物的固定化抗体的模式化阵列（patterned array））。

有利地，可以用本方法提取蛋白标记物和/或病毒的标记物。更有利地，本方法被用于用单一的通用提取方法从相同的样品中提取至少一种蛋白标记物（优选地来自病毒）和至少一种糖类标记物（优选地来自细菌，更优选地是革兰氏阳性细菌的细胞壁标记物）。方法也可以包括制备提取试剂的步骤，优选地通过组合一种氧化盐（最优选地是亚硝酸盐）和一种酸（优选地是盐酸、硫酸、乙酸或枸橼酸）而制备。

本发明也包括用于分析在一个样品中是否存在至少一种微生物，或更优选地分析多种相关微生物的任一种微生物的方法。这些微生物优选地选自造成上呼吸道疾病或病变的致病性微生物。方法包括用包括一种氧化酸（优选地是亚硝酸）和任选地去污剂的提取试剂接触样品（优选地是含粘液的样品例如咽部和/或鼻咽部拭子或鼻拭子）。提取试剂从样品基质和/或相关的微生物中提取标记物，使得它们可被测定（优选地通过

免疫测定法、更优选地通过多种免疫测定法、甚至更优选地用针对标记物的固定化抗体的模式化阵列)。然后分析所处理的样品以测定所提取的标记物并因此测定所对应的相关微生物。有利地,可以用本方法测定蛋白标记物例如病毒的标记物。更有利地,本方法被用于用单一的通用提取方法测定相同样品中的至少一种蛋白标记物(优选地来自病毒)以及至少一种糖类标记物(优选地来自细菌,最优选地是来自革兰氏阳性细菌的细胞壁标记物)。方法也包括制备提取试剂的步骤,优选地通过组合一种氧化盐(最优选地是亚硝酸盐)和一种酸(优选地是盐酸、硫酸、乙酸或枸橼酸)制备。

在本发明的一个具体的实施方案中,通过用电化学发光剂标记的抗体的免疫测定法可以进一步地改善测定(即,标记物是抗体所识别的抗原)。结果可被用于治疗监测和指导治疗计划。

本发明也涉及包括一种氧化酸(优选地是亚硝酸)和优选地一种表面活性物质的提取试剂。本发明还涉及一种组合物,其包括提取试剂和一或多种以下成分:(a)样品、(b)检测试剂、(c)标记的试剂,及其组合。本发明仍还涉及一种试剂盒,其在一或多种容器包括:试管或室隔、提取试剂(或其部分)以及优选地,一或多种其他的提取和/或检测成分。

在一个优选的实施方案中,试剂盒也包括具有针对感兴趣的标记物的固定化的抗体的模式化阵列的固相支持物,优选地包括含有针对第一标记物的第一结合试剂的第一区以及含有针对第二标记物的第二结合试剂的第二区。试剂盒也可包含用于中和提取试剂的碱或pH缓冲剂。

具体实施方案

提取指的是使得标记物更容易被检测的样品处理。举例来说,提取包括例如通过(i)破碎或溶解细胞膜、细胞壁、或包膜等以释放出包括或包装、附着和/或结合于细胞膜、细胞壁、包膜等的标记物;(ii)从更大的化学成分中解离出标记物;(iii)降解和/或溶解多糖层和/或(iv)降

解或溶解凝胶层，从而从细胞、微生物或细胞器中游离和/或溶解标记物。提取也包括从周围的样品基质的成分中游离出标记物、细胞、细胞器和/或微生物。基质可以包括其中存在生物体或标记物的培养基。本发明的方法特别适用于从包括粘液的样品基质中提取标记物。

本发明的提取方法可以用于用单一反应体积 (volume) 中的单一提取方案利用本发明的提取试剂从单一样品中提取一或多种不同病变或疾病的标记物，提取试剂优选地包括一种氧化酸，更优选是亚硝酸，和任选地一种表面活性物质。

适合于用本发明提取和/或测定的标记物包括为一种生物体或一组相关的生物体的特征的并能被用于测定感兴趣的生物体或生物体类型的物质 (或其片段或衍生物)。微生物在此应当理解为包括病毒、细菌、真菌和原虫。测定在此理解为包括定量和定性测定，以及包括用于各种目的所进行的测定，包括但不限于在样品中检测分析物的存在、定量分析物的量、鉴定已知的分析物、和/或确定未知分析物的特性。

在一个优选的实施方案中，本发明的有用的标记物是造成疾病或疾病病变，优选地为呼吸道感染或性病、更优选地为咽炎、鼻窦炎、肺炎、支气管炎、流感和/或感冒的致病性微生物和/或致病性微生物类型的特征。优选的标记物包括蛋白 (例如，肽、蛋白、毒素和抗生素)、糖类、核酸或脂类性质的分子或其组合 (例如糖蛋白)。最优选的本发明的标记物是蛋白、肽和多糖。多种标记物的至少一种优选地是蛋白质。

适用于用本发明提取和/或测定的标记物的具体实例是：(a) 革兰氏阳性细菌的细胞壁多糖，例如 A、B、F、G 组链球菌的组特异性抗原 (这些主要由 N-乙酰-葡萄糖胺和鼠李糖组成的链球菌抗原可被用于 A、B、F、G 组链球菌之间的鉴定和区分)；(b) 脂磷壁酸质酸 (这些细菌的糖脂抗原可被用于鉴定 D 组肠球菌)；(c) 可以鉴定流感的流感特异性蛋白例如流感核蛋白、基质蛋白、血凝素、唾液酸苷酶和/或其肽类衍生物，优选地是 A 型流感和/或 B 型流感核蛋白和/或其衍生物，以及 (d) 可以用于鉴

定呼吸道合胞病毒(RSV)的 RSV 特异性蛋白, 例如 G、F、基质、核蛋白和/或其肽类衍生物, 优选地是 G 或 F 蛋白和/或其衍生物。另一个优选的标记物组包括细菌毒素 (例如, 大环毒素)。

本发明已经被发展用于复杂的生物学基质例如含有多种类型的生物学的及小的有机分子的复杂的粘性生物学液体, 例如富含蛋白物质的粘性渗出液。令人惊异的是, 本发明的提取方法减少了与样品的基质相关的非特异性结合, 且同时通过用本发明的提取试剂溶解和/或降解样品基质的粘性或固体成分降低了基质粘度, 提取试剂优选地是一种氧化酸, 更优选地是亚硝酸, 和任选地一种表面活性物质。

本发明的优选的实施方案使用简单的一步或两步样品制备方案, 该方案从生物体中游离出标记物或降解和/或液化生物学基质。用本发明的方法可以分析的生物学基质包括环境样品 (例如, 水、食物、除去了水或空气的淤泥、环境试纸等)、血清、血浆、血液、滑膜液、脑脊液、皮脂分泌物、脓液、尿道或阴道分泌物、和这些膜表面的清洗物。最优选地, 样品是含粘液的样品, 例如鼻分泌物、痰、粘痰、咽部渗出物、尿道或阴道分泌物和这些膜表面的清洗物。在本发明的一个优选的实施方案中, 提取方案同时从相同样品的一或多种不同的生物体中同时游离两种或多种标记物, 优选地是糖类和/或蛋白质性质的标记物。有利地, 本发明的方法可以被用于同时提取不同的标记物组, 以及例如可以被用于从一种生物体中提取蛋白抗原和从不同生物体中提取糖类抗原 (优选地是革兰氏阳性细菌的糖类细胞壁抗原)。当不同生物体的组合造成了复合的病变以及患者需要药物的组合治疗时, 这个优选的实施方案是特别有利的。根据另一个优选的实施方案, 如果疾病的临床表现不能确定出诊断时, 可以进行多种分析物测定以鉴定感染的生物体。

本发明的相关的生物体选自细菌、病毒和真菌的组。造成病变及与本发明特别相关的感染性微生物包括, 但不限于:

- a) 菌株, 例如细菌株 GABHS (A 组链球菌)、溶血隐秘杆菌

(*Arcanobacterium haemolyticum*)、脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenza*)、杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、粘膜炎莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*) (粘膜炎布兰汉球菌 (*Branhamella catarrhalis*))、副流感 (*Parainfluenza*)、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*)、白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、荚膜菌属 (*Calymmatobacterium*)、放线菌属 (*Actinomyces*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、梭菌属 (*Clostridium*)、动弯杆菌属 (*Mobiluncus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、嗜肺性军团菌 (*Legionella pneumophila*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)、鹦鹉热衣原体 (*Chlamydia psittaci*)、淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、解脲尿支原体 (*Ureaplasma urealyticum*)、阴道加德纳氏菌 (*Gardnerella vaginalis*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 和结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*);

b) 病毒株, 例如鼻病毒、副流感病毒、A、B 或 C 型流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、冠状病毒、腺病毒、柯萨奇 A 病毒、单纯疱疹病毒、肠病毒、Epstein-Barr 病毒、巨细胞病毒或乳头瘤病毒的病毒株; 以及

c) 真菌, 例如念珠菌属 (*Candida spp.*), 白色念珠菌 (*Candida albicans*)、卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*)、组织胞浆菌属 (*Histoplasma*)、芽生菌属 (*Blastomyces*)、球孢菌属 (*Coccidioides*)、或隐球菌属 (*Cryptococcus*);

d) 原虫, 例如微小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*)、卡晏环孢子球虫 (*Cyclospora cayetanensis*)、溶组织内阿米巴 (*Entamoeba*

histolytica) 或兰伯贾第虫 (*Giardia lamblia*)。

令人惊异的是，可以用本发明的方法和试剂盒处理多种样品。优选地，样品为生物学样品，更优选的时含有致病性生物体的临床样品。通过擦拭或清洗粘膜或通过清除从粘膜分泌的液体可以收集样品。根据优选的实施方案，用取样器（例如，抽吸器、拭子、吸引器或刮勺），优选地用拭子（例如鼻部、鼻咽部、咽部或生殖器拭子）或灌洗液（例如鼻部或咽部灌洗液）从患者中收集样品。在另一个具体的实施方案中，浓缩或培养样品以增加细胞或病毒颗粒的数目。然后将样品用于使用提取试剂的提取方案，本发明的提取试剂优选是一种氧化酸、更优选地是亚硝酸，和任选地表面活性物质。

优选地，随后用本领域人员可得到的大量技术中的任何一种技术测定所提取的标记物，例如用免疫检测法和免疫层析检测法。本发明的一个优选的实施方案用多路检测格式 (multiplexed assay format)、优选地用多路免疫检测格式 (multiplexed immunoassay format)、最优选地用针对标记物的固定化抗体的模式化阵列测定样品中的多种感兴趣的标记物。

因此，本发明的一个宽泛的方面涉及处理一或多种可疑含有一或多种标记物的样品以制备这些用于分析的样品的方法。优选地，将样品开始与本发明的提取试剂，优选地是一种氧化酸、更优选地是亚硝酸，和任选地表面活性物质，接触一段足以提取感兴趣的标记物的时间。同时，任选地在 pH 中和和/或稀释后，标记物可以被彼此分离。联合样品的标记物的提取和分离可以多路分析分离的标记物或当分开分析时可以简化处理。优选地，本方法还包括分析所处理的样品的步骤。

根据一个优选的实施方案，样品是单一的生物学样品，更优选地是临床样品，甚至更优选地是来自单一患者的单一体积的单一样品。根据另一个优选的实施方案，本方法从一系列患者的一系列样品中提取一或多种标记物，在不同的单一体积中处理每个样品。

一个实施方案涉及一种利用本发明的提取试剂，优选地一种氧化酸，

更优选地亚硝酸，和任选地一种表面活性物质，从样品中提取一或多种标记物，优选地两种或多种标记物、更优选地三种或多种标记物、甚至更优选地五种或多种标记物以及最优选地十种或多种标记物的方法。优选地，至少一种标记物的性质是蛋白质、核酸或脂类（例如，不含有糖类成分且能被结合试剂所识别的抗原决定簇）。根据另一个实施方案，至少一种标记物是病毒或真菌标记物。

另一个实施方案包括同时从含有复杂生物学基质的单一样品中提取单一体积内的超过一种的标记物。更具体地，采用利用本发明的提取试剂的简单快速方法（提取试剂优选是一种氧化酸，更优选是亚硝酸，和任选地一种表面活性物质），单一样品可以被处理以提取并测定与多种不同的生物体所相关的标记物，优选地是一组致病性微生物，最优选地是一组与上呼吸道感染相关的致病性微生物。例如，及时地鉴定出造成疾病或病变（例如感冒、咽炎、气管支气管炎、喉炎、鼻窦炎、支气管炎、肺炎等）的致病性微生物有助于改善患者健康状况和治疗。因此，在本发明的一个实施方案中，提取方案成功地提取（以及优选地也分离）了多种标记物。优选地，这些标记物是生物体标记物，更优选地是不同生物体的标记物，以及甚至更优选地是细菌、病毒和/或真菌的标记物。

根据一个优选的实施方案，利用本发明的提取试剂的化学提取不仅提取微生物的抗原，也同时液化或减少样品或样品的基质的粘度，优选地是粘液分泌物（渗出物）的基质的粘度，提取试剂优选地是一种氧化酸、更优选地是亚硝酸，和任选地表面活性物质。

仍另一个实施方案涉及通过将含有一或多种生物体（优选的两种或多种生物体）的样品与提取试剂接触，测定两种或多种标记物的方法，优选地是生物体标记物，优选地是各种生物体标记物，更优选地是细菌、病毒和/或真菌标记物，提取试剂优选地是一种氧化酸、更优选地是亚硝酸，和任选地表面活性物质。优选地，方法包括从基质中分离两种或多种标记物，由此制备一种检测组合物，优选地还包括中和检测组合物的pH（例

如,加入碱和/或缓冲液使得 pH 在 6.0 和 8.5 之间),以及检测或测定所述检测组合物中的两种或多种标记物,优选地在单一体积内,或者,在两个或多个含有部分相同样品的检测体积内。

本发明的提取方法可以包括在将样品与提取试剂接触之前或在测定之前,优选地通过过滤或离心而预浓缩样品。也可用离心或过滤优选地在测定溶解标记物之前去除溶解后所残留的颗粒碎片。

根据本发明的一个特异的实施方案,测定方法是一种针对疑似患有感染性疾病或病变的患者的诊断性测试,优选地是一种上呼吸道的感染性疾病或病变和/或性病。

根据仍另一个优选的实施方案,本方法包括测定标记物。本发明的提取方案生成适用于通过包括本领域熟知的多种用于检测一或多种微生物标记物的检测格式的各种诊断性检测格式进行分析的检测组合物。

根据发明的另一个实施方案,本发明的方法还优选地包括测定样品中的标记物的步骤。在一个具体实施方案中,本发明提供了用于测定样品中的一或多种、优选地两种或多种标记物的方法,其中至少一种标记物是蛋白质、糖类、核酸、脂类分子或其组合。根据另一个实施方案,本发明提供了一种用于测定样品中的一或多种、优选地两种或多种标记物的方法,其中至少一种标记物是病毒、细菌或真菌标记物。优选地,通过应用多路测定法测定两种或多种标记物。

本发明的一个实施方案是一种用于测定样品的多种不同的生物体的方法。至少一种生物体优选地是革兰氏阳性细菌,更优选地是链球菌或肠球菌(例如,A、B、F和G组链球菌)。通过提取并测定所述细菌的标记物测定该细菌,标记物优选地是细胞壁相关抗原,更优选地是组特异性抗原。优选地,至少一种被测定的其他生物体选自真菌、病毒和革兰氏阴性细菌,和/或通过测定蛋白质、糖类、核酸和/或脂类标记物而测定至少一种其他生物体。所测定的病毒优选地选自鼻病毒、副流感病毒、A、B或C型流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、冠状病毒、腺病毒、柯萨奇

A 病毒、单纯疱疹病毒(HSV)、肠病毒、Epstein-Barr 病毒、巨细胞病毒和乳头瘤病毒。

在提取步骤之后可有多种用于测定微生物或与微生物相关的标记物的方法。这些技术包括但不限于，基于细胞培养的检测法、凝集试验、免疫检测法 (或其他基于使用感兴趣的分析物的特异性结合配偶体的检测格式)、免疫层析检测法、酶检测法等。一些技术可以允许肉眼观察所进行的测定，其他技术可能要求或借助于使用装置进行测定。可有大量的用于分析结合检测法的产物的测定技术。这些技术包括在表面上形成结合反应产物的固相结合检测技术以及结合产物仍保留在溶液中的均质结合检测技术。技术通过测定标记的结合试剂的参与量 (例如，通过测定具有荧光、化学发光、放射性、磁性、酶的特征的标记的这些特征的活性) 可以测定结合事件，或不需要使用标记 (例如依据测定量的变化或屈光率例如表面声波和表面等离子体共振的测定的技术)。另外，还有化学测试，其中当暴露于特定的化学物时，特定的分析物引起颜色改变。其他适合的测定方法包括应用酶的生物传感器，其中酶识别特定的分析物、催化一种分析物化学转化为一或多种反应产物，并用眼或装置测定反应产物。

可被用于测定的技术的其他实例包括质谱法、色谱法、电泳、凝集反应、western 印迹、特异结合检测法、免疫检测法、免疫荧光和免疫色谱检测法。本发明优选的方法是特异结合检测法，优选地是免疫检测法或免疫色谱检测法。

根据本发明的优选的实施方案的免疫检测法或特异结合检测法可以涉及多种本领域可获得的格式。可以用标记物标记抗体和/或特异结合配偶体，或将其固定化于表面。名词“抗体”包括完整的抗体分子 (包括抗体亚基的体外重新组合所装配成的杂交抗体)、抗体片段和包括抗体的抗原结合区的重组蛋白构建体 (如例如在 Porter, R. R. and Weir, R. C. J. *Cell Physio.*, 67 (Suppl 1): 51-64 (1966) 和 Hochman, J. Inbar, D. and Givol, D.

Biochemistry 12: 1130 (1973) 中所描述的, 在此并入作为参考)。该名词也包括已经被化学修饰的例如通过引入一种标记物所修饰的完整的抗体分子、抗体片段和抗体构建体。

优选地, 测定方法是一种结合检测法, 更优选地是一种免疫检测法, 以及通过将检测组合物与一或多种能与感兴趣的标记物特异性结合的测定分子接触进行测定。更优选地, 测定使用三明治或竞争性结合检测格式。在 Grubb 等的美国专利 No. 4,168,146 和 Tom 等的美国专利 No. 4,366,241 中描述了在测试带中进行的三明治免疫检测法的实例, 在此将这两者内容一同并入作为参考。适合用于本发明的竞争性免疫检测设备的实例包括在 Deutsh 等的美国专利 No. 4,235,601、Liotta 等的美国专利 No. 4,442,204 以及 Buechler 等的美国专利 No. 5,208,535 中所描述的设备, 在此将其完全内容一同并入作为参考。最优选地, 在这样一种检测法中所采用的至少一种结合试剂被固定化于固相支持物上。

根据本发明的优选的实施方案, 用本发明的提取方法处理样品, 随后用基于电化学发光的检测格式、最优选地是用基于电化学发光(ECL)的免疫检测法测定标记物。ECL 的高敏感性、大的动态范围以及选择性是用于医学诊断的重要因素。商业可获得的 ECL 仪器已经表现出特殊的性能。因为包括它们的接触敏感性、动态范围、精确性以及复合样品基质的可耐受性的原因, 它们已经被广泛地使用。

优选地, 在固相三明治免疫检测法中测定标记物, 最优选地, 采用 ECL 测定。在固相三明治免疫检测法中, 使用了两种针对标记物的抗体: i) 被连接于或能被连接于固相的捕获抗体 (例如, 通过形成特异的结合对, 例如生物素-链亲和素相互作用) 和 ii) 连接于或能被连接于一种标记物。优选地是 ECL 标记的检测抗体 (例如, 通过形成特异的结合对, 例如生物素-链亲和素相互作用)。将包括溶解标记物的样品与两种抗体和固相接触, 使得在存在标记物时, 两种抗体与标记物结合并在包括标记的固相上形成“三明治复合物”。测定固相上的标记以测定出样品中的标记物。

特定的商业化可获得的仪器使用利用永久的可再用流动细胞的基于流动细胞的设计。在这些类型的仪器中实施的大多数结合检测法都使用磁反应性粒子作为用于固相结合检测法的固相支持物。在磁铁的帮助下，将与粒子结合的 ECL 标记收集于流动细胞中的电极上。通过将电压应用于电极上诱导所收集的粒子上的标记发射 ECL 并测定 ECL 以测定标记的量。ECL 检测方法也可以包括在应用 ECL 诱导电压之前引入 ECL 共反应剂的步骤。

最近，已经阐述了使用固定化于电极上用于诱导 ECL 的试剂的 ECL 仪器（见，例如美国专利 No. 6,140,045、6,066,448、6,090,545、6,207,369 和已出版的 PCT 申请 No.W098/12539）。在这种情况下，电极本身是固相支持物。最近也阐述了具有整合的适用于这些 ECL 仪器的电极的多孔板（见，例如未决美国申请 No. 10/185,274 和 10/185,363，名为“用于发光测试测定的检测板、读数系统和方法”，均在 2002 年 6 月 28 日提交，在此一同并入作为参考）。这些具有整合电极的多孔板包括在孔内具有多个检测区的板，其中多个结合试剂可以被固定化。应用多孔检测板允许平行处理和分析分布于板的多个孔内的多个样品。通常在多孔检测板中储存、处理和/或分析样品和试剂（也已知为微量板和微滴定板）。

根据本发明，利用网板印刷的碳墨电极（screen-printed carbon ink electrodes）进行电化学发光测定，例如排列于特殊设计的微量盒或多孔板（例如 24、96、384 等孔板）的底部的碳墨电极。如在未决美国申请 No. 10/185,274 和 10/185,363（两者都称为“用于发光测试测定的检测板、读数系统和方法”，在 2002 年 6 月 28 日提交，在此一同并入作为参考）中所描述的那样，诱导并用显像的板读数器测定碳电极表面的 ECL 标记的电化学发光。现在可商业化获得类似的板和板读数器（Sector HTS instrument, Meso Scale Discovery）。

因此，为了进一步提高对相关生物体的测定或其他分析的敏感性和选择性，本发明优选的实施方案在免疫检测法和被标记的试剂中采用电

化学发光(ECL)标记, 优选地是被 ECL 标记所标记的抗体。同时, 有多种用于分析测定的商业化可获得的 ECL 标记。在美国专利 No. 5,093,268、5,147,806、5,324,457、5,591,581、5,597,910、5,641,623、5,643,713、5,679,519、5,705,402、5,846,485、5,866,434、5,786,141、5,731,147、6,066,448、6,136,268、5,776,672、5,308,754、5,240,863、6,207,369 和 5,589,136 以及出版的 PCT No. W099/63347、W000/03233、W099/58962、W099/32662、W099/14599、W098/12539、W097/36931、W098/57154、和 PCT/US02/19788 中描述了电化学发光标记、共反应剂以及检测或测定方法和系统的实例, 在此将所有的文献一同并入作为参考。ECL 标记的实例包括: i) 有机金属化合物, 其中金属是来自例如 VIII 组的贵金属, 包括含 Ru 和含 Os 有机金属化合物, 例如顺-二吡啶-钌 (*tris-bipyridyl-ruthenium (RuBpy)*) 部分以及 ii) 鲁米诺和相关化合物。在 ECL 过程中与 ECL 标记反应的种类在此被称为 ECL 共反应剂。常用的共反应剂包括叔胺 (例如, 见美国专利 No. 5,846,485, 在此将其并入作为参考)、草酸盐以及用于 RuBpy 的 ECL 的过硫酸盐以及用于鲁米诺的 ECL 的过氧化氢 (见, 例如美国专利 No. 5,240,863, 在此将其并入作为参考)。ECL 标记所生成的光子可以被用作为诊断方法中的报告信号 (Bard 等, 美国专利 No. 5,238,808, 在此将其并入作为参考)。例如, ECL 标记可以被共价地结合到结合试剂例如抗体上, 并且通过测定 ECL 标记所发射的 ECL 可监测结合试剂在结合相互反应中所参与的量。

本发明的一个实施方案涉及一种测定一或多种标记物 (优选地是两种或多种标记物) 的方法, 包括:

- (a) 将含有一或多种标记物的样品与本发明的提取试剂接触以形成含有一或多种所提取的标记物的组合物;
- (b) 将所述组合物与含有一或多种能与所述一或多种所提取的标记物结合的结合试剂接触, 所述结合试剂连接了 ECL 标记;
- (c) 诱导所述标记以诱导电化学发光; 以及

(d) 测定所发射的电化学发光。

本发明的一个实施方案涉及一种测定样品中的多种不同的生物体类型的方法，包括：

(a) 将所述样品与包含亚硝酸的提取试剂接触，以形成检测组合物；以及

(b) 在所述检测组合物中测定所述多种生物体种类的标记物以测定出所述多种生物体种类。

优选地，试剂进一步包括一或多种能与所述一或多种所提取的标记物结合的捕获试剂，其中捕获试剂被连接到珠上或连接到固相支持物上(例如，用于诱导电化学发光的工作电极)。

优选地，方法进一步包括在步骤 (a) 后调整或中和组合物的 pH 值。

优选地，试剂包括多种不同的能结合多种不同的标记物的结合试剂，以及任选地多种不同的捕获试剂。

本发明的另一种优选的实施方案涉及一种用于同时从一或多个患有呼吸道疾病的患者中提取各种微生物标记物，优选地是不同的和/或不一样的化学特性的标记物(例如，蛋白、糖类等)的临床方法。优选地用咽拭子或鼻拭子从患者或优选地从患上呼吸道病变的患者中取到样品。将样品与本发明的提取试剂接触，提取试剂优选地是一种氧化酸、更优选地是亚硝酸，和任选地表面活性物质，它游离出微生物标记物并有利地液化粘液渗出物以形成检测组合物。所形成的检测组合物或被直接测定感兴趣的微生物的存在或被用 pH 缓冲剂中和后再进行测定。优选地，感兴趣的微生物是 A 组链球菌、A/B 型流感病毒以及 RSV。可以在“诊所内”便利地处理并测定样品，优选地当患者在医生的诊所时。本发明的一个主要的优点是单一的提取步骤可以与对各种不同的微生物的测定结合。快速的结果可以帮助医师 (i) 提供适当的和及时的治疗计划；(ii) 正确地处方出抗病毒药物以及 (iii) 减少抗生素的不必要的使用。

本发明的另一个方面涉及用于本发明的提取试剂。一个实施方案涉

及一种包括氧化酸的提取试剂。优选地，试剂还包括一种表面活性物质。令人惊异的是，本发明的提取试剂被广泛地应用于各种微生物和基质。

另一个实施方案涉及一种基本上由一种氧化酸、优选地为一种氧化酸，和一种表面活性物质的水溶液组成的提取试剂。根据另一个实施方案，提取试剂基本上由一种氧化酸、一种表面活性物质以及一或多种选自以下一组的成分组成，所述的组由 (a) 检测标记 (例如，ECL 标记)、(b) 能与一或多种标记物结合的结合试剂、(c) ECL 共反应剂、以及 (d) 封闭试剂 (例如，BSA) 组成。可以通过加入碱和/或缓冲剂中和溶液使得 pH 值在 6.0 和 8.5 之间。

优选地，氧化酸是亚硝酸。在本领域，已知亚硝酸是适用于暴露出 A 组链球菌的 A 组抗原，但以前认为它对蛋白、核酸和脂类标记物的提取是非常有害的。优选地将亚硝酸与一种表面活性物质例如非离子型去污剂联合使用以进一步改善提取的效率。

在本发明的一个优选的实施方案中，联合亚硝酸盐和一种酸制备所用的亚硝酸。有用的亚硝酸盐包括无机盐例如亚硝酸钠、钾、锂以及有机的亚硝酸盐。优选地，亚硝酸盐是亚硝酸钠。有用的酸包括无机酸例如盐酸和硫酸以及有机酸例如乙酸和柠檬酸。优选地，酸是有机酸，更优选地是乙酸。

用于本发明提取试剂的适合的表面活性物质包括，但不限于于 Tween、TRITON、CYMAL、ZWITTERGENT、IPTG、CHAPS、CHAPSO、Anapoe、BAM、FOS-胆碱、Pluronics、四聚醇胺、Brij、Span、HEGA、C-HEGA、正-十二(十三、十四、十六、十一)烷基- β -D-麦芽糖苷 (n-Do(Tri, Tetra, Hexa, Un)decyl- β -D-maltoside) 和 L-、D-DAO 表面活性物质家族。

根据一个优选的实施方案，通过将一种亚硝酸盐例如亚硝酸钠和一种酸以及任选地一种表面活性物质混合生成提取试剂。优选地，通过混合等体积的亚硝酸钠溶液和乙酸钠，且任选地两种成分均 (或任一成分) 含有表面活性物质，优选地是 Tween-20，而生成提取试剂。更优选地，

混合从 0.5M 到 10M 亚硝酸钠溶液和匹配浓度的范围从 0.1M 到 0.5M 的酸 (优选地是乙酸), 且任选地各种溶液均含有从 0.5%到 5%表面活性物质 (优选地是 Tween-20) (或任一溶液含有该剂量的两倍), 最优选地, 混合 2M 到 7.5M 亚硝酸钠溶液与从 0.125M 到 0.188M 的酸 (优选地是乙酸), 且任选地各种溶液均含有从 1%到 3%的表面活性物质 (优选地是 Tween-20)。

根据本发明也可以使用浓缩的提取试剂。更高的试剂浓度造成更快的提取, 而更低的提取试剂浓度可以是优选的, 因为它使得中和过程更容易, 使得蛋白变性和脱氮作用更小化以及保持标记物的抗原性和试剂稳定性。在一个优选的实施方案, 例如, 将一种 2M 亚硝酸钠、1%Tween-20 的溶液与一种 0.125M 乙酸、1%Tween-20 的溶液混合。在另一个具体的实施方案中, 将一种 7.5M 亚硝酸钠、3%Tween-20 的溶液与一种 0.188M 乙酸和 3%Tween-20 的溶液混合。

在本发明的一个优选的实施方案中, 混合生成亚硝酸的两种试剂中的其中一种试剂是干燥形式的, 优选地是干燥形式的有机酸或干燥形式的任何亚硝酸盐。

本发明的另一个方面涉及用于从样品例如复杂生物学基质中提取并优选地测定标记物的改良的组合物。

一个实施方案涉及一种组合物, 该组合物包含: (a) 两种或多种标记物 (优选地是两种或多种提取的标记物), 优选地是生物体标记物, 优选地是微生物标记物, 优选地是不同生物体的标记物, 更优选地是细菌、病毒和/或真菌的标记物; 以及 (b) 一种氧化酸, 优选地是一种氧化酸以及一种表面活性物质, 优选地是非离子型表面活性物质, 组合物的 pH 值为从 2 到 5, 优选地在测定前对 pH 值进行中和。优选地, 组合物是一种检测组合物, 它们能被用于快速诊断造成疾病的多种感染性微生物。

仍是本发明的另一个实施方案涉及一种组合物, 它含有一或多种提取的标记物, 优选地是生物体标记物, 优选地是微生物标记物, 优选地

是不同生物体的标记物，更优选地是细菌、病毒和/或真菌的标记物，以及一种 pH 值范围从 2 到 5 的氧化酸，优选地是一种氧化酸和一种表面活性物质，优选地是非离子型表面活性物质，优选地在测定前对 pH 值进行中和，以及至少一种标记物是蛋白、肽、毒素、核酸或脂类，或至少一种标记物是病毒或真菌的标记物。优选地，检测组合物也可以包括一或多种检测分子或能特异地与感兴趣的标记物结合的捕获分子（即结合试剂）、检测标记、和/或共反应剂等。

在一个实施方案中，检测组合物包括一种样品和一种提取试剂，其中样品包括生物体、毒素和/或病毒颗粒以及一种本发明的提取试剂。在一个优选的实施方案中，检测组合物还可以包括 pH 缓冲剂或碱，它们能中和提取试剂。例如，在将样品与提取试剂孵育足够长的一段时间之后，将中和缓冲剂（优选地是 Tris 或 PBS，更优选地是 1M 到 2M 的 Tris）加入到生物学样品中。检测组合物的最终 pH 值优选地是中性的，优选地 pH 值为从 6.0 到 8.5。在本发明的一个特异的实施方案中，可以加入干燥形式的中和缓冲液。

本发明的另一个方面涉及用于利用本发明的提取方法从样品中提取一或多种（优选地是两种或多种）标记物以及优选地用于测定标记物的试剂盒。

本发明也涉及用于测定样品中的多种不同生物体类型的试剂盒，其在一或多个容器中包括：(a) 一种酸、(b) 一种亚硝酸盐、(c) 一种表面活性物质、(d) 一种与所述多种不同的生物体类型的第一种生物体的第一种标记物结合的第一结合试剂，以及 (e) 一种与所述多种不同的生物体类型的第二种生物体的第二种标记物结合的第二结合试剂。优选地，第一和第二结合试剂是抗体。

试剂盒将优选地在一或多种容器内包括提取试剂，优选地是亚硝酸，以及任选地一种表面活性物质。优选地，试剂盒包括一或多种检测成分。更优选地，试剂盒包括在分开的容器或隔室内的亚硝酸盐、一种酸

和一种非离子型表面活性物质，以容许快速重新组合以生成本发明的提取试剂。

本发明也涉及一种用于从样品中提取两种或多种标记物以及在一或多种检测法中所使用的试剂盒，所述标记物优选地是生物体标记物，优选地是微生物标记物，优选地是不同生物体的标记物，更优选地是细菌、病毒和/或真菌的标记物，所述试剂盒在一或多个容器、小瓶或隔室中包括：(a) 一种酸、(b) 一种亚硝酸盐、(c) 一种表面活性物质，优选地是非离子型表面活性物质以及 (d) 至少一种提取成分，所述提取成分选自由 (i) pH 缓冲剂/pH 中和剂、(ii) 取样设备 (例如，拭子、抽吸、拭子、吸引或刮勺)、(iii) 防腐剂、(iv) 稳定剂、(v) 提取容器、(vi) 漂白剂、(vii) 干燥剂、(viii) 捕获部分、和 (ix) 检测部分所组成的组。

本发明的另一个实施方案涉及一种用于从样品中提取一或多种标记物以及在一或多种检测法中所使用的试剂盒，所述标记物优选地是生物体标记物，优选地是微生物标记物，优选地是不同生物体的标记物，更优选地是细菌、病毒和/或真菌的标记物，所述试剂盒在一或多个容器、小瓶或隔室中包括：(a) 一种酸、(b) 一种亚硝酸盐、(c) 一种表面活性物质，优选地是非离子型表面活性物质以及 (d) 至少一种提取成分，所述提取成分选自由 (i) pH 缓冲剂/pH 中和剂、(ii) 取样设备 (例如，拭子、抽吸器、拭子、吸引器或刮勺)、(iii) 防腐剂、(iv) 稳定剂、(v) 提取容器、(vi) 漂白剂、(vii) 干燥剂、(viii) 捕获部分、和 (ix) 检测部分所组成的组，其中至少一种标记物是蛋白、肽、毒素、核酸或脂类，或至少一种标记物是一种病毒或真菌的标记物。本发明的试剂盒还可以包括一或多种能结合感兴趣的标记物的结合试剂。试剂盒也可以包括混合形成亚硝酸的干燥或溶液形式的亚硝酸盐以及干燥或溶液形式的酸，以及作为 pH 缓冲剂/pH 中和剂的 Tris 碱或缓冲剂或 PBS。

优选地，试剂盒还包括取样装置 (例如，抽吸器、拭子、吸引器、刮勺等)、提取容器、pH 缓冲剂、防腐剂、稳定剂、干燥剂和漂白剂。

试剂盒被优选地适合用于或兼容于各种检测方法，例如免疫检测法、免疫色谱检测法、特异性结合检测法、色谱和质谱检测法，且并不限定于一种具体的检测技术。

同样，根据一个优选的实施方案，试剂盒还包括特异性结合配偶体，优选地是标记的特异性结合配偶体，更优选地是 ECL 标记的特异性结合配偶体。本发明的试剂盒的结合配偶体可以包括各种物质，包括但不限于抗体、肽或非肽的模拟物、外源性凝集素、抗原、DNA 和/或 RNA 适体、生物素、链亲和素、抗生物素蛋白、半抗原、抗半抗原、抗生素等。

在一个优选的实施方案中，试剂盒包括两种结合配偶体，其中第一配偶体被固定化于固相支持物上，例如多孔板底部或珠，以及用标记优选地用 ECL 标记来标记第二配偶体。ECL 检测试剂盒的实例包括那些来自 IGEN 国际公司 (Gaithersburg, Maryland)、Meso Scale Diagnostics (Gaithersburg, Maryland)、以及 Roche Diagnostics 的试剂盒。这些试剂盒可以与本发明的提取试剂组合。在上述的电化学发光专利中描述了其他适合的试剂盒，在此一同并入作为参考。

在一个优选的实施方案中，固相支持物具有固定化于其上的结合试剂 (优选地是抗体) 的模式化阵列，以形成具有第一结合试剂的第一区以及具有第二结合试剂的第二区。这些结合试剂优选地是针对感兴趣的标记物，例如感兴趣的生物体的标记物。

根据本发明的优选的实施方案，试剂盒包括一种预先装配的含有优选地被储存于一或多个隔室中的包括本发明的提取试剂的一或多种必需的试剂的系统或装置，例如微量盒或多孔板。这些试剂盒将容许“在诊所内”进行快速的标记物提取并随后进行分析。

下面的实施例进一步举例说明了本发明。

实施例

以下的实施例是在本发明的范围内的一些提取物、板、试剂盒和方法的举例说明。因此，在任何情况下它们都不能被认为是对发明的限制。本领域人员不需要过多的试验就可以对本发明进行大量的变更和修饰。

材料和方法：

提取试剂：

在使用前通过混合等体积的亚硝酸钠储存溶液 (2M 亚硝酸钠, 1%Tween-20) 以及乙酸储存溶液 (0.125M 乙酸, 1%Tween-20) 新鲜制备提取溶液, 使得终浓度为 1M 亚硝酸、0.5%Tween-20、0.0625M 乙酸。

在一些实施方案中, 使用更浓缩的提取试剂。在使用前通过混合等体积的亚硝酸钠储存溶液 (7.5M 亚硝酸钠)、乙酸储存溶液 (0.188M 乙酸) 以及 3%Tween 储存溶液新鲜制备该溶液。当使用高浓度的提取试剂时, 将特别地提及。

细菌和病毒的制备：

将化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A 组链球菌, ATCC12385) 在 5%CO₂ 大气、37°C 下培养于胰酶解酪蛋白大豆肉汤培养基中直到混浊。用 PBS (100 mM 磷酸缓冲液、150 mM NaCl, pH 7.5) 按 1:10 稀释该储存液。

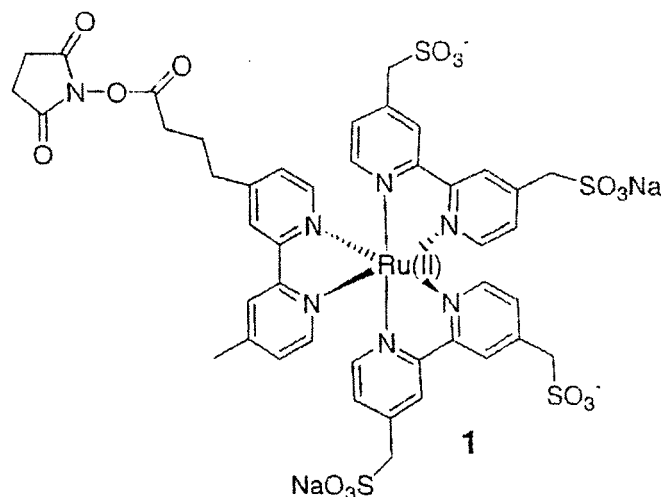
从 Advanced Biotechnologies Inc. 购得 A 型流感病毒、B 型流感病毒以及呼吸道合胞病毒的病毒样品 (2.25x10¹² 病毒颗粒/ml), 并在使用前用 PBS 将其稀释到所需的浓度。

粘液制备：

从没有上呼吸道疾病症状的个体中取得人支气管粘液样品或鼻分泌物样品。超声处理高度粘性的样品和低粘性的样品, 直到获得均质溶液。

ECL 标记:

用如下所示的标记化合物 1 (Sulfo-TAG™ NHS Ester, Meso Scale Discovery, a division of Meso Scale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) 标记用于电化学发光测定的生物分子。



通过将 sulfo-TAG NHS 酯加入到 pH 8.0 的生物分子的磷酸缓冲盐溶液中进行生物分子的标记。通常用分子排阻色谱法 (例如, 用 Superdex Peptide Gel 或 Sephadex G50, Pharmacia Biosciences) 或反相 HPLC 将标记的生物分子从未结合的标记中纯化出来。对于标记的蛋白, 从标记浓度 (从 Sulfo-TAG 标记在 455nm, $\epsilon_{455} \sim 15,400\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 的消光系数计算得到) 和蛋白浓度 (用 BCA 蛋白检测法测定得到, Pierce Chemicals) 中计算出每份蛋白的标记浓度。分别从 Virostat Inc., Fitzgerald Industries International, Research Diagnostics Inc. 和 Accurate Chemical and Scientific Corp. 购得多克隆的抗 A 组链球菌抗体和单克隆抗 A 型流感、抗 B 型流感、抗 RSV 抗体。

多孔板

用特别设计的 96 孔多孔板 (Multi-Array™ 或 Multi-Spot™ plates,

Meso Scale Discovery, a division of Meso Scale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) 进行电化学发光测试。

测试设备:

诱导电化学发光并用 Sector HTS™ 读数器或 Sector PR™ 读数器 (Meso Scale Discovery, a division of Meso Scale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) 测定。

实施例 1: 对化脓性链球菌的检测和定量

用粘液溶液 (1: 4 体积比) 稀释化脓性链球菌 (A 组链球菌)、混合并在室温下孵育 2 个小时。

将粘液中的 A 组链球菌溶液 (50 μ l) 与 450 μ l 提取试剂或两种对照溶液中的其中一种溶液 (4% Tween-20 的 PBS 溶液或无表面活性物质的 PBS 溶液) 混合。在混合并孵育 15 分钟后, 将溶液与等体积的含有 150mM 磷酸的磷酸缓冲液 (PBS) 混合并中和提取体积的酸度。将无 A 组链球菌的 PBS 用作为阴性对照以测定检测背景。

通过将 2.5 μ l 50mg/ml 抗体的 PBS 溶液直接沉积在电极表面, 用对排列在特别设计的 96 孔板 (High Bind Multi-Array plates, MSD) 底部的网板印刷的碳墨电极的被动吸附固定化多克隆抗链球菌抗体 (针对 A 组糖类)。在溶液被干燥后, 往每个孔中加入 250 μ l 5% BSA (小牛血清白蛋白, Seracare Inc), 在使用前将板在 4°C 下储存过夜。然后在使用前即刻用每孔 300 μ l PBS 冲洗板两次。用 ECL 免疫检测法测定板中的 A 组链球菌抗原。将 25 μ l 处理样品和 25 μ l 用 Sulfo-TAG (3 μ g/ml) 标记的缀合的抗 A 组链球菌抗体一起加入到板的分隔的孔中。将板孵育 1 个小时, 洗涤并添加 ECL 检测缓冲液 (125mM 三丙胺, 溶于 200M 磷酸缓冲液, pH 7.5), 用 ECL 定量 A 组链球菌抗原的量。

数据 (表 I) 说明粘液的存在完全抑制了免疫检测, 除非用亚硝酸或

表面活性物质处理样品以及先前的处理可以改进的 A 组链球菌的定量。

表 I

样品处理	A 组链球菌的稀释	低粘性粘液样品的 ECL	高粘性粘液样品的 ECL
亚硝酸/1%Tween	1: 1400	18500	11300
4% Tween	1: 1400	4440	3100
无(PBS)	1: 1400	2470	1780
无(PBS)	无链球菌	2440	1720

实施例 2：对 A 型流感病毒的检测和定量

用 PBS 1:10 稀释纯化的 A 型流感病毒 (2.25×10^{12} 病毒颗粒/ml, Advanced Biotechnologies Inc.)。然后用低粘度粘液制品稀释(1:4)该制品、混合并在室温下孵育 2 个小时。

将粘液中的流感病毒溶液(50 μ l)与 450 μ l 提取试剂或两种对照溶液中的其中一种溶液 (4% Tween-20 的 PBS 溶液或无表面活性物质的 PBS 溶液) 混合。在混合并孵育 15 分钟后, 将溶液与等体积的含有 150mM 磷酸的磷酸缓冲液(PBS)混合并中和提取试剂的酸度。将无 A 型流感病毒的 PBS 用作为阴性对照以测定检测背景。

通过沉积 2.5 μ l 50mg/ml 抗体的 PBS 溶液用对排列在特别设计的 96 孔板 (High Bind Multi-Array plates, MSD) 底部的网板印刷的碳墨电极的被动吸附固定化多克隆抗 A 组流感病毒抗体。在溶液被干燥后, 往每个孔中加入 250 μ l 5%BSA, 在使用前将板在 4 $^{\circ}$ C 下储存过夜。然后在使用前即刻用每孔 300 μ l PBS 冲洗板两次。用 ECL 免疫检测法测定板中的 A 型流感病毒抗原。将 25 μ l 提取的粘液/抗原溶液或 PBS 和 25 μ l 用 TAG (3 μ g/ml) 标记的缀合的抗 A 型流感病毒抗体一起加入到板的分隔的孔中。将板孵育 1 个小时, 洗涤并添加 ECL 检测缓冲液, 用 ECL 定量 A 型流感病毒抗原的量。

数据 (表 II) 说明粘液的存在抑制了对病毒分析物的定量, 除非用表

面活性物质处理样品。此外，令人惊异的是，亚硝酸的处理没有负面地影响检测。

表 II

样品处理	A 型流感病毒浓度(vp/ml)	粘液/A 型流感病毒样品的 ECL
亚硝酸/1% Tween	1.41×10^9	29600
4% Tween	1.41×10^9	25800
无(PBS)	1.41×10^9	288
无(PBS)	无 A 型流感病毒	312

实施例 3：对多种分析物的同步检测和定量

通过稀释纯化的储存液制备 A 型流感病毒、B 型流感病毒和呼吸道合胞病毒 (Advanced Biotechnologies, Inc.) 的 PBS 溶液。也制备混浊的化脓性链球菌培养物的 PBS 的 1:100 的稀释溶液。每个溶液 (50 μ l) 与 450 μ l 新鲜制备的提取试剂混合并孵育 5 分钟。然后用等体积的 PBS 中和溶液。

制备 4 点 96 孔多点板 (Meso Scale Discovery) 使得每个孔含有 4 个分离的点，将特异于四种分析物中的每种分析物的抗体固定化于分离的点上。通过将 250 μ l 50 μ g/ml 抗体的 PBS 溶液沉积于每个孔被动地固定化抗体。在溶液被干燥后，往每个孔中加入 250 μ l 5%BSA 并将板在 4 $^{\circ}$ C 下储存过夜。然后在使用前用每孔 300 μ l PBS 冲洗板两次。

将分析物溶液分散到各个孔中 (25 μ l/ml)，再加入含有四种 TAG 标记的缀合抗体 (每种抗体特异于一种分析物) 的混合物的溶液 (25 μ l，每种抗体的终浓度为 1.5 μ g/ml)。在混合 1 个小时后，洗涤板，加入 200 μ l ECL 检测缓冲液 (125mM 三丙胺，溶于 200M 磷酸缓冲液，pH 7.5)，用 ECL 定量每个点上所捕获的抗原的量 (表 III)。

试验证实了可使用相同的酸预处理对病毒和化脓性链球菌进行检测。

表 III

来自含有特异性抗体的表面的 ECL:

样品	A 型流感病毒	B 型流感病毒	RSV	A 组链球菌
A 型流感病毒	3382	31	35	57
B 型流感病毒	94	1462	97	108
RSV	50	42	11630	75
A 组链球菌	30	22	32	542

实施例 4: 亚硝酸和表面活性物质对粘液的作用

取得非常粘性的鼻分泌物形式的粘液样品。将样品分成两部分 (每部分 500 μ l) 并放置于干净的塑料管中。涡旋处理样品, 但是这对样品的物理性质无影响——两管都没有液体能够从管子中倒出。

将 200 μ l 提取试剂 (用 1:1 的 7.5M 亚硝酸钠和 0.188M 乙酸新鲜制备) 加入到一个样品中。将 200 μ l 20% Tween-20(w/v) 加入到另一个样品中。将两个样品都简单涡旋并在室温下孵育 2 分钟。注意到用表面活性物质处理没有改变样品的粘度。但是, 酸处理的样品具有更低的粘度, 并且可以容易地从管中倒出。在另外孵育 30 分钟后, 观察到酸处理粘液的粘性出现更大的减低。

实施例 5: 在含粘液样品中同时检测 A 组链球菌和 A 型流感病毒

通过超声处理用水稀释的粘稠的鼻分泌物制备均质的粘液溶液。通过将粘液溶液与 A 型流感病毒和 A 组链球菌的浓缩的储存液 (最终稀释 1:500) 混合制备阳性测试样品, 以模拟从患病个体中取得的鼻部样品。通过仅仅用 PBS 掺和粘液溶液制备阴性对照样品。在进行测试前, 将这些溶液冰浴放置 1.5 个小时。通过加入等体积的 0.188M 乙酸、3M 亚硝酸钠和 3% Tween-20 新鲜制备高浓度的提取试剂。通过用水替代 3% Tween-20 也可制备缺乏表面活性物质的提取试剂。

将每种阳性或阴性样品(100 μ l)与 450 μ l 提取试剂 (有或无表面活性物质) 混合。在孵育 5 分钟后, 加入 50 μ l 2M TRIS 缓冲液(pH 7.5)以中和所述溶液。将这些溶液(75 μ l)与含有抗 A 组链球菌和抗 A 型流感病毒的标记抗体 (每种 10 μ l, 25 μ g/ml) 的溶液混合, 并将 50 μ l 这些溶液加入到含有预先吸附于不同点的 A 组链球菌和 A 型流感病毒捕获抗体的 MSD 4 点多点板, 孵育 10 分钟不进行搅动。然后洗涤板, 加入检测缓冲液, 并使用 Sector HTS™设备 (Meso Scale Discovery, a division of Meso Scale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD) 进行 ECL 测定。

数据(表 IV)证实可以在用亚硝酸处理的相同的含粘液样品中同时测定 A 组链球菌和 A 型流感病毒。表面活性物质的作用使得病毒检测信号几乎被加倍, 但对 A 组链球菌的检测只有很少的影响。

表 IV

		样品处理	
		亚硝酸/Tween	亚硝酸
A 组链球菌	阳性对照	21384	16511
	阴性对照	378	305
A 型流感病毒	阳性对照	1731	863
	阴性对照	299	249

实施例 6: 用亚硝酸提取法检测临床样品中的 A 型流感病毒和 A 组链球菌抗原

从两个患 A 型流感病毒的个体以及两个患 A 组链球菌感染的个体中取得咽喉拭子。拭子被储存冷冻在-20 $^{\circ}$ C。在融化后, 将每个拭子放置在 450 μ l 新鲜制备的提取试剂中并孵育 1 分钟, 届时取出拭子并通过加入 50 μ l 2M TRIS 缓冲液(pH 7.5)中和溶液。

在每个孔内的分离的点上用特异于 A 型流感病毒和 A 组链球菌的固定化抗体制备四点多点板。用 BSA 包被每个孔中的另一个点以作为背景

测定。将所中和的拭子提取物(75 μ l)与 10 μ l TAG 标记的 A 型流感病毒和 A 组链球菌抗体 (每种标记抗体的终抗体浓度为 1 μ g/ml) 的混合物混合。将溶液(50 μ l)分散到孔内并孵育板 8 分钟, 不搅动。然后洗涤板, 加入检测缓冲液并用 ECL 定量 A 型流感病毒和 A 组链球菌的量(表 V)。令人惊异的是, 用本发明的提取试剂可以同时提取病毒颗粒和细菌的标记物。

表 V

	ECL 信号(两个复孔的平均值)	
	抗原特异性点	背景点
A 型流感病毒样品 1	5269	808
A 型流感病毒样品 2	6341	594
A 组链球菌样品 1	54628	622
A 组链球菌样品 2	27878	465

参考文献的并入

本发明不限于在此所描述的具体实施方案的范围。事实上, 除了在此所描述的内容, 显而易见的是本领域人员根据前述的描述和附图可以对本发明进行各种改变。预计这些改变也属于权利要求书的范围内。对于在此引用的各种文献, 在此将其全部内容一同并入作为参考。

专利名称(译)	用于提取生物学标记物的方法、组合物和试剂盒		
公开(公告)号	CN1879017A	公开(公告)日	2006-12-13
申请号	CN200380107816.4	申请日	2003-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	梅索磅秤技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	梅索斯卡莱科技公司		
当前申请(专利权)人(译)	梅索斯卡莱科技公司		
[标]发明人	杰夫D德巴德 辛迪李		
发明人	杰夫·D·德巴德 辛迪·李		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/554		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/5306 Y10S435/885 G01N2333/315 G01N33/56983 Y10S436/808 C12Q1/6806 C12Q1/689 G01N2333/11 C12Q2565/501		
代理人(译)	林晓红		
优先权	60/436591 2002-12-26 US		
其他公开文献	CN1879017B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于从生物学样品中提取标记物的方法，并涉及在这些方法中所使用的系统、装置、试剂盒和试剂。本发明也涉及用于测定样品中的多种不同的生物体类型的方法、试剂盒、试剂和组合物。本发明的特殊优点之一是能从一个体积内的含有复杂生物学基质的单一样品中同时提取一种以上的微生物或病毒颗粒标记物。

