



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101069098 B

(45) 授权公告日 2013.03.27

(21) 申请号 200580041554.5

(22) 申请日 2005.11.23

(30) 优先权数据

0426592.2 2004.12.03 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.06.04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2005/012523 2005.11.23

(87) PCT申请的公布数据

W02006/058645 EN 2006.06.08

(73) 专利权人 欧雷恩诊断公司

地址 芬兰埃斯波

(72) 发明人 胡阿尼·卢奥托拉 汉努·尼库拉

米拉·穆尔托弗瑞

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 韩克飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(56) 对比文件

US 5236836 A, 1993.08.17, 全文.

US 6096563 A, 2000.08.01,

US 6632603 B1, 2003.10.14, 全文.

审查员 张丽颖

权利要求书 3 页 说明书 14 页 附图 4 页

(54) 发明名称

基于颗粒的结合测定

(57) 摘要

本发明提供检测样品中分析物的存在或含量的方法,所述方法包括:向多孔表面上加入连接有结合物的颗粒、分析物和被结合物包被的标记颗粒。如果在样品中存在所述分析物,那么在液相中发生免疫反应或化学反应。通过使用所述表面实现从未结合物中分离结合复合体,其中主要在所述多孔表面(例如格栅)的表面上发生二维分离。有趣的是,所公开的表面能够进行分离,其中所述复合体在所述多孔表面(例如格栅)上是二维分布的,而未结合物是三维分布的。因此,所述表面既能进行二维分离又能进行三维分离。

1. 非诊断目的的检测样品中分析物的存在或含量的方法,所述方法包括:

(a) 向多孔表面施加第一结合成分,所述第一结合成分包含连接有结合物的俘获颗粒,所述结合物与所述分析物特异结合;

(b) 向所述多孔表面施加所述样品;

(c) 向所述多孔表面施加第二结合成分,所述第二结合成分包含可检测的被标记颗粒;以及

(d) 检测由所述多孔表面上的所述可检测的被标记颗粒产生的信号,所述信号指示所述分析物在所述样品中的存在和/或含量;

其中所述多孔表面是格栅或栅格;

其中所述多孔表面允许所述第二结合成分通过所述表面,而不允许所述第一结合成分通过所述表面;

其中所述第一结合成分和所述分析物相互结合以形成第一结合复合体;

其中所述可检测的被标记颗粒与结合物结合,所述结合物与所述分析物或所述第一结合复合体特异结合,以便所述第二结合成分与所述第一结合复合体相互结合以形成第二结合复合体;并且

其中所述第一结合复合体和/或第二结合复合体保留在所述多孔表面上。

2. 非诊断目的的检测样品中分析物的存在或含量的方法,所述方法包括:

(a) 将所述样品和第一结合成分相互接触,所述第一结合成分包含连接有结合物的俘获颗粒,所述结合物与所述分析物特异结合;

(b) 向多孔表面施加所述样品和所述第一结合成分;

(c) 向所述多孔表面施加第二结合成分,所述第二结合成分包含可检测的被标记颗粒;以及

(d) 检测由所述多孔表面上的所述可检测的被标记颗粒产生的信号,所述信号指示所述分析物在所述样品中的存在和/或含量;

其中所述多孔表面是格栅或栅格;

其中所述多孔表面允许所述第二结合成分通过所述表面,而不允许所述第一结合成分通过所述表面;

其中所述第一结合成分和所述分析物相互结合以形成第一结合复合体;

其中所述可检测的被标记颗粒与结合物结合,所述结合物与所述分析物或所述第一结合复合体特异结合,以便所述第二结合成分与所述第一结合复合体相互结合以形成第二结合复合体;并且

其中所述第一结合复合体和/或第二结合复合体保留在所述多孔表面上。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中在步骤(b)之前进行步骤(a)。

4. 非诊断目的的检测样品中分析物的存在或含量的方法,所述方法包括:

(a) 将所述样品与第一结合成分和第二结合成分相互接触,所述第一结合成分包含连接有结合物的俘获颗粒,所述结合物与所述分析物特异结合,所述第二结合成分包含可检测的被标记颗粒;

(b) 向多孔表面施加所述样品、所述第一结合成分和所述第二结合成分;以及

(c) 检测由所述多孔表面上的所述可检测的被标记颗粒产生的信号,所述信号指示所

述分析物在所述样品中的存在和 / 或含量 ;

其中所述多孔表面是格栅或栅格 ;

其中所述多孔表面允许所述第二结合成分通过所述表面,而不允许所述第一结合成分通过所述表面 ;

其中所述第一结合成分和所述分析物相互结合以形成第一结合复合体 ;

其中所述可检测的被标记颗粒与结合物结合,所述结合物与所述分析物或所述第一结合复合体特异结合,以便所述第二结合成分与所述第一结合复合体相互结合以形成第二结合复合体 ;并且

其中所述第一结合复合体和 / 或第二结合复合体保留在所述多孔表面上。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其还包括在步骤 (b) 与 (c) 之间和 / 或步骤 (c) 与 (d) 之间,向所述表面施加能够通过所述多孔表面的洗液。

6. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中所述第二结合成分包含连接有结合物的可检测的被标记颗粒,所述结合物与所述分析物特异结合。

7. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中所述多孔表面包括 :

(a) 金属、塑料、陶瓷、玻璃或硅材料 ;和 / 或

(b) 分离装置。

8. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中所述多孔表面既包含二维分离又包含三维分离。

9. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中所述第一结合成分或所述第二结合成分的颗粒 :

(a) 包括塑料、玻璃、金属或纤维素材料 ;或者

(b) 是脂质体、细胞或微生物。

10. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中所述第一结合成分或所述第二结合成分的颗粒包括合成聚合物。

11. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中所述第一结合成分的颗粒的平均直径大于所述第二结合成分的颗粒的平均直径。

12. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中

(a) 所述第一结合成分的颗粒的平均直径为  $0.1 \mu\text{m}$  至  $200 \mu\text{m}$  ;和 / 或

(b) 所述第二结合成分的颗粒的平均直径为  $1\text{nm}$  至  $1000\text{nm}$ 。

13. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中所述多孔表面包含具有两个平行边的孔 / 开口并且所述平行边之间的距离小于第一结合成分的颗粒的平均直径。

14. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中所述结合物以足以基本包被所述颗粒的量吸附地或共价地与所述俘获或被标记颗粒结合。

15. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中所述结合物包括单克隆抗体、多克隆抗体或其  $F(ab')$  或  $F(ab')_2$  片段。

16. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中使用发光的、放射性标记的、发色的或磁性的物质可检测地标记所述被标记颗粒。

17. 根据权利要求 1,2 或 4 中任一项所述的方法,其中所述分析物是抗原。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述抗原是 C 反应性蛋白 (CRP) 或性激素结合

球蛋白 (SHBG)。

19. 检测样品中分析物的存在和 / 或含量的试剂盒,其包含:

(a) 多孔表面;

(b) 第一结合成分,其包含连接有结合物的俘获颗粒,所述结合物与所述分析物特异结合以形成第一结合复合体;以及

(c) 第二结合成分,其包含可检测的被标记颗粒,所述可检测的被标记颗粒连接有结合物,所述结合物与所述分析物或所述第一结合复合体特异结合,以便所述第二结合成分与所述第一结合复合体相互结合以形成第二结合复合体;

其中所述多孔表面是格栅或栅格;

其中所述第一结合复合体和 / 或第二结合复合体能够被保留在所述多孔表面上。

## 基于颗粒的结合测定

### 发明领域

[0001] 本发明涉及从多孔表面（例如格栅）上的未结合物中分离形成的免疫复合体或任何生物分子复合体，所述多孔表面包含与所用颗粒兼容的孔或开口。本发明公开了用于样品中分析物的检测和定量的异相免疫测定，该测定以二颗粒测定形式进行，其中利用了所述颗粒的尺寸及其不同的性质。在该方法中，使用大颗粒从样品中捕捉分析物，从体液中分离并辨别所述分析物，而小颗粒被用作标记工具。

### [0002] 发明背景

[0003] 若干方法使用免疫测定技术来检测和定量标本中的抗原。当前使用两种类型的免疫测定系统。在均相系统中，所述测定在单一相中进行。在异相系统中，所述免疫测定分两步进行。需要额外的步骤从未结合物中分离结合物。通常，固体支持物表面被用作结合相，抗体或抗原通过吸附或化学结合与所述结合相连接。已经开发出了多种固体支持物表面以改善免疫反应的性能和分离步骤的效能。

[0004] 颗粒已经被用作凝集测定中的流动固相以便改善抗体和抗原间免疫反应的效能。在该系统中，可溶性抗原 / 抗体将与结合在所述颗粒上的特异性抗体 / 抗原结合，从而在所述颗粒的表面形成不溶性的抗原 - 抗体免疫复合体沉淀物。在固相免疫测定中，可以通过洗涤固相结合免疫复合体来提高该测定的灵敏度，这使得未结合物的分离更加完全并因此提高信噪比。此外，也已经在提高固体载体表面积的努力中使用了具有多种成分的微粒。

[0005] 本领域技术人员公知基于颗粒的凝集测定。最初的凝集测定利用单一尺寸的颗粒作为聚苯乙烯颗粒，即乳胶颗粒。美国专利第 4, 279, 617 号公开了克服凝集测定灵敏度低的方法，尤其是测定少量分析物时，其中使用了两种不同的包被微粒反应物。所述颗粒可以是不同尺寸的。所述方法并不涉及使用过滤处理从凝集物中分离未结合物。

[0006] 现有技术的文献承认存在大量的公开了测定技术的出版物，这些技术依赖多孔部件的使用，例如膜、滤膜或其它基质。美国专利第 4, 632, 901 号、EP-B-180638 和美国专利第 4, 727, 019 号公开了与靶分析物的受体结合的部件以及吸取向第一部件中加入的液体的第二部件。当加入液体样品时，液体流过，部件中的受体与样品中存在的分析物结合。加入样品后，加入分析物的另一标记受体以进行检测。合适的标记是酶、放射性核素或荧光标记。当使用酶标记时，缺点是必须向膜添加显色底物。

[0007] EP-B-253579 公开了上述基于膜的技术的另一实施方案。该实施方案利用被俘获在多孔膜小间隙中的微球以实现将受体或配体固定到多孔膜上的方法。

[0008] 美国专利第 4, 916, 056 号、EP-B-389003、美国专利第 5, 008, 080 号和美国专利第 5, 149, 622 号公开了基于膜的流过测定，其利用上面固定有抗体或抗原的颗粒。颗粒的大小并不重要，虽然优选颗粒大小低于纤维基质的平均孔径。

[0009] 三维膜通常用于从未结合物中分离免疫复合体。美国专利第 5, 501, 949 号公开了使用磨碎的颗粒作为固相用于第一结合成分（物质）的免疫测定。使用信号生成物质标记可溶的第二结合成分。与使用标记有颗粒结合标记的结合成分相比，该方法中使用的可溶的非颗粒结合的标记结合成分具有更低的特异活性。这导致测定灵敏度降低。该方法使用

三维膜来过滤免疫复合体并分离未结合物。

[0010] 美国专利第 4, 853, 335 号公开了免疫测定, 其中向多孔膜上加入生物样品、胶体金标记的配体或抗配体 (anti-ligand)、以及使用配体或抗配体包被的固相俘获颗粒。根据颜色目测检查膜上俘获的颗粒。

[0011] 英国专利申请第 2123146 号描述了在双通道光电细胞计数器中或荧光显微镜中完成的测定方法。该公开涉及具有不同的可检测性质的第一和第二微粒, 所述不同的可检测性质通过所述测定方法表现出来。所述申请并没有公开使用过滤法从凝集物中分离未结合物。生物液体与颗粒混合, 随后测量其不同的性质。

[0012] 美国专利第 5, 565, 366 号包括一种方法, 其中通过使样品与有色颗粒接触形成测试混合物, 所述有色颗粒的表面带有对配体特异的受体。当所述测试混合物通过具有孔径大于颗粒但小于集合物的滤膜时, 集合物从滤液中被除去, 并分析滤膜 / 滤液的颜色。该文献公开了对于集合物的形成, 与现有技术中使用的较大颗粒相比, 使用小的颗粒大小更加有利。然而, 使用小颗粒是不利的, 因为较小颗粒消耗更多的配体或抗配体。

[0013] 美国专利第 6, 268, 222 号公开了一种不同的方法, 其中微粒与使用荧光染料标记的纳米颗粒结合。所述颗粒通过其表面官能团相互结合。该发明包括核或在其表面具有多个小聚合颗粒的载体颗粒。当使用不同的荧光染料时, 通过光源激发可以得到多个荧光发射。通过改变不同纳米球群体的量和比例, 可以建立并区分大量的具有独特发射光谱的载体颗粒的分离群体。该方法可以用于样品中多种分析物的多元分析。

[0014] 如上述现有技术的综述所公开, 已经单独使用颗粒或与不同应用的三维膜共用使用颗粒以便从样品中分离期望的分析物。然而, 由于膜的多孔性, 经常存在标记结合物的非特异性结合。因此, 当使用三维膜时, 由于高背景信号, 所以信噪比低。故而, 三维膜需要进行大量的洗涤以降低非特异性结合。

[0015] 除了上述公开的方法以外, 本领域技术人员还公知诸如利用磁珠的测定方法。

[0016] 上述现有技术文献中公开的方法主要依赖于分析物的目测检测, 并且因此对于测量低浓度的分析物来说, 并不足够灵敏。此外, 标记产生的信号水平并非在各种环境下都足够强。

[0017] 本领域中更加尖端的方法使用电流的变化来指示样品中分析物的存在。例如在美国专利第 4, 238, 757 号中, 在栅极区域中使用抗体层包被的场效应晶体管以便通过跃迁的电荷浓度的变化来检测抗原 - 抗体反应。

[0018] 在美国专利第 4, 219, 335 号中, 加入了标记的反应物, 其与分析物 - 反应物复合体反应或与反应物反应以改变表面的电抗。

[0019] 美国专利第 4, 233, 144 号公开了也可以通过电量计免疫测定来测量免疫反应, 其中使用电活性物质标记一个免疫反应物。

[0020] 美国专利第 4, 054, 646 号公开了一种方法, 其中抗原 - 抗体层被夹在两层传导层之间, 并且测量所得层压材料的电容。

[0021] 美国专利第 4, 072, 576 号公开了另一类型的测量电容的技术, 其利用一对被底物包被并浸在介质中的电极, 所述介质含有与底物特异性结合的物质。

[0022] 如美国专利第 4, 287, 300 号所述, 还可以将检测效应信号的变化与酶免疫测定技术相结合。

[0023] 然而,上述电方法并没有满足对免疫诊断测定所需的简单、迅速、灵敏、廉价并易于使用的方法的需求。

[0024] 美国专利第 5, 284, 748 号公开了旨在解决上述缺点的方法,其中在新的免疫诊断方法中使用抗原或抗体标记的胶体金颗粒,任选地使用银进行增强。如此形成的复合体造成基本开放电路的完全或部分完成(闭合)。另一实施方案包括一对空间分离的电导体,尤其是布置在基本上不导电的基质上的导电层。在电导体间存在的空间被定义为路径或通道。形成电路的装置与每一电导体接触,使得通道在回路中形成断开。所述成对物质之间的结合反应完全或部分地桥接所述回路中的断开。一种这样的装置涉及在导电颗粒的表面附着该对物质之一。

[0025] 发明概述

[0026] 本发明涉及检测样品中分析物的存在或含量的方法。本发明使用被第一结合物(即第一结合成分)包被的流动俘获颗粒和被第二结合物(即第二结合成分)包被的可检测的被标记颗粒。两种结合物均是当样品中存在分析物(配体或抗配体)分子时,与该分析物(配体或抗配体)分子结合的特异性配体或抗配体。

[0027] 本发明利用所述颗粒并且依赖于多孔表面的使用,所述多孔表面即分离装置。与现有技术不同,本发明利用俘获颗粒的使用,所述俘获颗粒上结合了对样品中分析物特异的结合物。随后加入时,所产生的复合体将保留在多孔表面上。因此,由第一结合成分-分析物-第二结合成分或第一结合成分-分析物组成的复合体在所述分离装置的表面上从未结合物中分离。所以该操作还可以被用于所述分析物的分离与富集。所述富集的分析物然后可以被用于其它操作和研究。

[0028] 所述多孔表面可以形成装置的基本部分,所述装置还可以包括框架、支架或其它支撑物,形成例如测定箱(筒)。

[0029] 为了产生增强的液体流用于除去未结合物,可以使用毛细膜(wicking membrane)和/或负压或正压或外力(例如超声)。

[0030] 本发明利用二维和三维分离装置在免疫反应或化学反应后,从未结合物中分离形成的免疫/生物分子复合体。在这样的分离装置中,所述免疫/生物分子复合体的分离发生在所述分离装置的表面。有趣的是,所公开的多孔表面使得能够在所述表面上二维分离所述复合体,而小标记颗粒和其它未结合物通过穿透所述表面而三维分布。因此,通过使用所述多孔表面可以进行二维和三维分离。故而如果需要,可以从所述表面释放产生的免疫/生物分子复合体并根据额外的需要将其转移。分析物本身或某些其它细胞成分可以被进一步表征,例如通过 PCR 或任何本领域技术人员公知的其它生物化学或分子生物学的方法。

[0031] 本发明通过利用不同大小的未标记和标记颗粒以及多孔表面克服了现有方法的灵敏度缺陷。现有方法中使用的标记的普遍问题是不合适的信号强度和信噪比。在本发明中,最优化了俘获颗粒与标记颗粒相比的大小,以消耗当与小颗粒相比时,更少量但仍然是最佳量的配体或抗配体。根据本发明,可以通过使用多孔表面降低由于高非特异性标记结合造成的高背景标记计数,所述多孔表面具有低非特异性标记结合,用于从未结合物中分离免疫复合体。此外,通过使用与标记颗粒连接的结合物可以提高测定的灵敏度,因此提高标记结合物的特异活性和测定的灵敏度。

[0032] 特别地,本发明提供检测样品中分析物的存在或含量的方法,所述方法包括:(a)

向多孔表面施加第一结合成分,所述第一结合成分包含连接有结合物的颗粒,所述结合物特异结合所述分析物;(b)向所述多孔表面施加所述样品;(c)向所述多孔表面施加第二结合成分,所述第二结合成分包含可检测的被标记颗粒;以及(d)检测由所述多孔表面上的所述可检测的被标记颗粒产生的信号,所述信号指示所述分析物在所述样品中的存在和/或含量;其中所述多孔表面允许所述第二结合成分通过所述表面,而不允许所述第一结合成分通过所述表面;其中所述第一结合成分和所述分析物相互结合以形成第一结合复合体;其中所述可检测的被标记颗粒上连接有特异结合所述第一结合复合体的结合物,使得所述第二结合成分与所述第一结合复合体相互结合以形成第二结合复合体;并且其中所述第一结合复合体和/或第二结合复合体保留在所述多孔表面上。在一实施方案中,在将其向所述表面施加之前,使所述样品和第一结合成分相互接触。在另一实施方案中,在步骤(b)之前进行步骤(a)。在另一实施方案中,在将其向所述表面施加之前,使所述样品、第一结合成分和第二结合成分相互接触。在另一额外实施方案中,在步骤(a)之前进行步骤(b)。

[0033] 本发明还提供检测样品中分析物的存在和/或含量的试剂盒,其包含:

[0034] (a) 多孔表面;

[0035] (b) 第一结合成分,其包含连接有结合物的颗粒,所述结合物与所述分析物特异结合以形成第一结合复合体;以及

[0036] (c) 第二结合成分,其包含可检测的被标记颗粒,所述被标记颗粒上连接有特异结合所述第一结合复合体的结合物,使得所述第二结合成分与所述第一结合复合体相互结合以形成第二结合复合体;

[0037] 其中所述第一结合复合体和/或第二结合复合体能够被保留在所述多孔表面上。

[0038] 附图的简要说明

[0039] 图1公开了用于免疫复合体形成的测定原理。

[0040] 图2公开了在格栅上所述复合体的二维分离。

[0041] 图3公开了将所述物质通过格栅过滤对未结合的非特异性物质进行三维分离。

[0042] 图4描述了显示样品中hCRP浓度的曲线图。

[0043] 图5描述了显示样品中hSHBG浓度的曲线图。

[0044] 图6显示了使用栅格结构(A)从与第一结合成分(C)结合的第二结合成分(B)中分离未结合的第二结合成分(B)。

[0045] 附图的详细说明

[0046] 图1公开了用于免疫复合体形成的示例性方法。该图描述了第一结合成分和第二结合成分是如何形成所述免疫复合体的。首先,结合物(2)包被的俘获颗粒(1)形成第一结合成分,所述结合物(2)通常是配体或抗配体。示踪颗粒(3)和结合物(2)形成第二结合成分,所述结合物(2)通常是配体或抗配体。其次,当与样品中存在的分析物(4)接触时,这些结合成分将凝集,从而形成所述免疫复合体(5),所述分析物(4)通常是配体或抗配体。

[0047] 图2显示了在向格栅(6)施加免疫复合体(5)之后如何发生二维过滤的正视图。四方孔眼结构(7)形成了所述格栅的基本结构。

[0048] 图3显示了保留在格栅(6)上的免疫复合体(5)、滤过的示踪颗粒(3)以及不想要的非特异性物质(8)的三维过滤方向的侧视图。

[0049] 图 4 公开了显示测定结果的曲线图,该测定使用 hCRP 作为分析物并使用被多克隆抗体的 F(ab')<sub>2</sub> 片段包被的俘获和标记颗粒,从而形成免疫复合体并在格栅上分离所述复合体。hCRP 的测定范围是 0.08-10mg/l。

[0050] 图 5 公开了显示测定结果的曲线图,该测试使用 hSHBG 作为分析物并使用被两种不同单克隆抗体包被的俘获和标记颗粒,从而形成免疫复合体并在格栅上分离所述复合体。hSHBG 的测定范围是 6-200nmol/l。

[0051] 图 6 显示了使用栅格结构从与第一结合成分结合的第二结合成分中分离未结合的第二结合成分。含有第二和第一结合成分的复合体 (C) 不能通过栅格 (A)。未结合的第二结合成分 (B) 能够通过栅格。在理想的情况下,栅格和第一结合成分的俘获颗粒 (D) 的切点趋近 0。

[0052] 使用的定义

[0053] 本发明中使用的及其描述的概念具有下列被赋予的含义:

[0054] - 结合物 - 能够识别特定分子的独特位置(例如表位或抗原决定基)并与之相结合的任何分子、配体或抗配体、化合物或它们的组合;

[0055] - 配体或抗配体 - 在免疫测定中与诸如抗原或抗体等另一分子形成复合体的分子;

[0056] - 第一结合物 - 被包被在或将要被包被在俘获颗粒上的结合物;

[0057] - 第二结合物 - 被包被在或将要被包被在标记颗粒上的结合物;

[0058] - 俘获颗粒 - 由任意类型的聚合物、塑料、玻璃、金属、纤维素等等组成的固体颗粒,其被用作结合物的固相或载体,因此使得所述结合物不溶;或者,不同的非固体(弹性)物质可以起到俘获颗粒的功能,例如脂质体、细胞、包括病毒在内的微生物;

[0059] - 标记 - 产生或能被用于产生信号的物质,所述信号可以通过目测或仪器方法检测或测量;

[0060] - 标记颗粒 - 由任意类型的聚合物、塑料、玻璃、金属、纤维素等等组成的固体颗粒,其被可检测地标记;或者,不同的非固体(弹性)物质可以起到标记颗粒的功能,例如脂质体、细胞、包括病毒在内的微生物;

[0061] - 第一结合成分 - 包含被第一结合物包被的俘获颗粒的成分;

[0062] - 第二结合成分 - 包含被第二结合物包被的标记颗粒的成分;

[0063] - 结合成分 - 指第一结合成分和/或第二结合成分;

[0064] - 第一结合复合体 - 指第一结合成分和分析物之间形成的复合体;

[0065] - 第二结合复合体 - 指第一结合复合体(第一结合成分和分析物)和第二结合成分之间形成的复合体;

[0066] - 第三结合成分 - 指第二结合成分和分析物之间形成的复合体;

[0067] - 免疫复合体或其它生物分子复合体 - 第一、第二或第三结合复合体;

[0068] - 分析物 - 其在样品溶液中的存在需要被定性或定量评价的化合物或物质,其包含至少一种能够被结合物识别或结合的独特空间或极性排列;该分析物在溶液中可以是游离的(分离的)或是例如与细胞膜结合的;

[0069] - 分离装置 - 在其中安装有多孔表面的装置;

[0070] - 多孔表面 - 用于从未结合物中分离免疫复合体或其它生物分子复合体的表面,

其允许第二结合成分和其它未结合物通过,但不允许第一结合成分通过;所述多孔表面既不允许第一结合复合体通过也不允许第二结合复合体通过;所述多孔表面包含孔或开口;

[0071] - 孔或开口 - 本文中这些术语可以互换使用;孔/开口是第二结合成分和其它未结合物通过所述多孔表面的装置;

[0072] - 孔/开口的大小 - 指限制颗粒或物质通过能力的孔/开口的尺寸;所述大小例如可以指孔/开口的平均直径或孔/开口的两个平行侧面之间的距离;

[0073] - 颗粒大小 - 指限制其通过孔/开口的能力的颗粒尺寸;所述大小例如可以指球形颗粒的平均直径;

[0074] - 分离装置或装备 - 使用时与多孔表面的意思相同;

[0075] - 格栅、栅格 - 多孔表面的具体实例,其具有相对于颗粒大小的尺寸的孔或开口;

[0076] - 二维形式 - 物质在多孔表面横向运动,因为其不能通过所述表面;大于多孔表面中孔/开口的大小的颗粒将被二维分离;第一结合成分、第一结合复合体和第二结合复合体经历二维分离;

[0077] - 三维分离 - 物质在多孔表面横向运动且纵向通过多孔表面,因为其能够通过所述表面;小于多孔表面中孔/开口的大小的颗粒将被三维分离;第二结合成分经历三维分离。

[0078] 发明的详细说明

[0079] 本发明使用多孔表面作为在形成免疫复合体或其它生物分子复合体后从未结合物中分离所述复合体的装置。所述复合体的分离严格在所述多孔表面(分离装置)的表面进行。

[0080] 俘获颗粒的使用使得能够使用具有孔/开口的多孔表面,所述孔/开口的大小可以在所述多孔表面上保留第一结合成分、第一结合复合体和第二结合复合体,而允许第二结合成分和其它不想要的物质通过所述表面。第三结合复合体将被保留在所述多孔表面上或通过所述多孔表面。这些选择中的哪些适用取决于孔/开口的形状和大小。

[0081] 俘获颗粒的使用使得能够在多孔表面上从未结合物中分离所述复合体,所述俘获颗粒使得能够使用比仅仅使用第二结合成分(被结合物包被的标记颗粒)时具有更大孔的多孔表面。多孔表面的孔/开口的大小和形状是关键。以下将对其详细讨论。本领域技术人员承认,颗粒具有造成假阳性结果的自体凝集倾向。因此,孔的大小应该足够大以便自体凝集的第二结合成分通过多孔表面,使得只有来自第二结合复合体的特异性信号指示待研究的样品中存在分析物。因此,孔的大小应该使得自体凝集的颗粒不阻塞孔。此外,孔的形状应该使得所使用的俘获颗粒不塞住孔。

[0082] 多孔表面,尤其是其孔/开口应该与俘获颗粒的大小和形式协调。孔和俘获颗粒形成功能性整体,其应该被最优化以便在多孔表面上保留包被有结合物的俘获颗粒(第一结合成分)而不堵塞孔。在所有情况下,多孔表面的孔都应该保持其允许未结合的第二结合成分和其它不想要的物质通过所述表面的能力。这通过设计有功能的孔-俘获颗粒对实现,其中俘获颗粒与孔边缘之间的切向接触点在数值上以及在接触面积的大小上都尽可能小。

[0083] 本发明尤其适合确定样品中的低浓度分析物。当少量分析物与暴露于具有低浓度所述分析物的样品的结合物结合时,不可能使用常规方法来确定该少量凝集。根据本发明,

通过利用标记颗粒的高强度信号可以确定所述分析物。正如所提及的那样,少量的凝集不足以得到准确和可靠的结果,然而,通过使用本发明的方法可以测量所述凝集。本发明并不依靠所形成的凝集本身,而是依靠标记信号,其强度与产生的凝集的量成比例增加。当常规免疫比浊测定与本发明相比时,这将变得明显。

[0084] 通常的凝集测试利用 0.1-1.0  $\mu\text{m}$  大小的颗粒以及使用非常准确量的结合物包被所述颗粒。被结合物包被的颗粒的最佳浓度使其发生目测的凝集。本发明公开了方法,其中可以大量降低用于包被俘获颗粒或标记颗粒的结合物的浓度。可能进行这种降低的原因是基于使用产生强信号的标记,所述标记被并入标记颗粒。作为强信号产生的结果,甚至当只有少量分析物被俘获颗粒表面上的降低数量的结合物所俘获时,还能实现信号。因此,由于所述强信号产生能力,少量结合物包被的标记颗粒也足以实现可靠的测量。

[0085] 本发明利用高浓度的信号产生标记(由于信号溢出,在常规低阈响应装置中不能测量)和高阈响应装置。由于使用的标记分子的量如此之高,使得在常规装置中发生信号溢出,所以结果无法预期,而当根据本发明进行测定时,所述量是在可测极限之内的。

[0086] 通常,少量的标记分子能够与抗体或抗原结合。本发明公开了方法,其中所述标记颗粒作为大量标记分子的载体,这产生高强度的信号和更高的灵敏度。当使用例如适于即时检验的装置时,结果是灵敏度增加。与昂贵的实验室级别的仪器相比,在本申请中公开的荧光测定可以通过适度灵敏的低廉装置进行,所述实验室级别的仪器通常在进行不含任何颗粒增强的此类测定时使用。此外,该测定形式允许将大量电光设计并入低成本装置中,尤其是用于即时检验类型的测定。

[0087] 根据本发明,提供了检测样品中分析物的存在或含量的方法,所述方法包括:(a) 向多孔表面施加第一结合成分,所述第一结合成分包含连接有结合物的颗粒,所述结合物特异结合所述分析物;(b) 向所述多孔表面施加所述样品;(c) 向所述多孔表面施加第二结合成分,所述第二结合成分包含可检测的被标记颗粒;以及(d) 检测由所述多孔表面上的所述可检测的被标记颗粒产生的信号,所述信号指示所述分析物在所述样品中的存在和/或含量;其中所述多孔表面允许所述第二结合成分通过所述表面,但不允许所述第一结合成分通过所述表面;其中所述第一结合成分和所述分析物相互结合以形成第一结合复合体;其中所述可检测的被标记颗粒上连接有结合物,所述结合物特异结合所述第一结合复合体,以便所述第二结合成分与所述第一结合复合体相互结合以形成第二结合复合体;并且其中所述第一结合复合体和/或第二结合复合体保留在所述多孔表面上。

[0088] 可以在试管或小杯中通过加入全部反应成分完成反应后,一起加入到多孔表面上进行所述测定方法。或者,可以通过首先向所述表面施加第一结合复合体,然后施加第二结合成分进行所述测定方法。优选一起加入全部反应成分。

[0089] 还可以通过首先向所述表面施加样品或第一结合成分,然后施加第二结合成分来进行所述测定方法。该顺序对多孔表面的疏水性和孔径有特殊要求。在这样的应用中,当样品中存在分析物时,样品和第二结合成分在完成反应前应该不能通过孔。其后,未结合物应该自由通过由任何方法产生的表面。当向所述表面施加足够小以致于可以通过多孔表面的孔/开口的样品或任何其它成分时,对测定性能有更多要求。可以通过机械或物理化学阻断来暂时阻止样品和其它小成分通过孔/开口的逃逸。

[0090] 全部反应物混合在一起的测定是更加复杂的,因为分析物和第二结合成分之间的

反应可以导致第三结合复合体。在这样的测定中,分析物和第二结合成分之间的反应与分析物和第一结合成分之间的反应同时发生。然而,第三结合复合体保持其通过分析物与第一结合成分结合的能力。

[0091] 在本发明方法的固相免疫测定中将颗粒用作俘获表面以便增加用于结合的表面积。通过使用悬浮于反应溶液中的小的可检测的被标记颗粒,能够通过增强的布朗运动来实现有利的反应动力学。因此,与具有较小的可供结合的表面积的系统相比,可以更加迅速地建立平衡。

[0092] 当通过固相过程进行免疫测定时,将物质从液相中除去。当在固相中随后进行洗涤时,获得更完全的分选并且所述测定的整体灵敏度提高。

[0093] 本发明利用其上连接有结合物的微米颗粒或纳米颗粒。在异相免疫测定方法中颗粒一方面起到流动固相的作用,而另一方面起到标记的作用。尤其是当使用多孔表面时颗粒辅助分选所得到的复合体。

[0094] 第一结合物成分的俘获颗粒优选是大的(通常为微米大小)。第二结合成分的可检测的被标记颗粒优选是小的(通常为纳米大小)。然而,假设俘获颗粒和标记颗粒间的大小比例维持不变,颗粒和孔/开口的尺寸可以减小。第一结合成分的颗粒的平均直径优选大于第二结合成分的颗粒。使用多孔表面从未结合物中分选所得的复合体,所述复合体是在所述结合成分和样品中分析物之间形成的。分选后,大部分颗粒表面在分选装置的表面上。

[0095] 俘获颗粒可以由可以使用结合物包被的任意固体(例如塑料、玻璃、金属)或非固体(即弹性物,例如脂质体、细胞、包括病毒在内的微生物)制成。标记颗粒还可以由可以将标记或产生标记的物质并入或连接于其中/其上的任意固体或非固体制成,并且所述标记颗粒可以使用标记或未标记的结合物包被。分选物及其性质的要求限制了俘获颗粒的大小。被结合物包被的俘获颗粒应该足够大,以便在第一结合复合体和/或第二结合复合体形成之前和之后均被保留在所述多孔表面上,所述第一结合复合体和/或第二结合复合体是在多孔表面上进行免疫反应或化学反应中得到的。另一方面,俘获颗粒和标记颗粒的大小均应该足够小,以便悬浮在溶液中并增加结合表面。

[0096] 如上所述,俘获颗粒大小的限制因素是多孔表面的开口或孔的大小。所述俘获颗粒必须足够大,使其不能通过所述孔/开口,而标记颗粒必须足够小,以便其通过所述孔/开口。合适的颗粒大小范围是平均直径为  $0.1\ \mu\text{m}$  至  $200\ \mu\text{m}$ 。最优选的俘获颗粒的大小是平均直径为  $1\text{--}10\ \mu\text{m}$ 。标记颗粒的大小明显小于俘获颗粒的大小并且当未与俘获颗粒-分析物(第一结合)复合体结合时,这些标记颗粒通过多孔表面(例如格栅)。标记颗粒的大小可以在平均直径  $1\text{--}1000\text{nm}$  间变化,最优选的平均直径为  $50\text{--}150\text{nm}$ 。俘获颗粒的优选平均直径为微米大小,而纳米大小最适于标记颗粒的平均直径。

[0097] 例如,当本发明使用平均直径为  $10\ \mu\text{m}$  的俘获微粒时,这些颗粒的优选量为每次测试  $4\times 10^3\text{--}3\times 10^6$ ,最优选量为  $2\times 10^4\text{--}2\times 10^5$ 。当在所述的数量范围内使用俘获颗粒时,平均直径为  $100\text{nm}$  的标记颗粒的优选量为每次测试  $1\times 10^8\text{--}2\times 10^9$ 。

[0098] 包含信号或产生信号的物质以及第二结合物的标记颗粒被用于提高标记物的特异活性。因此,使用这些标记颗粒提高了测定的灵敏度。发光的、放射性标记的、磁性的或发色的物质可以被并入颗粒中或与颗粒连接,并被用作标记或产生信号的物质。如美国专

利第 4, 283, 382、4, 259, 313 和 4, 735, 907 号所述, 含有稳定荧光标记的颗粒已经被用于标记免疫试剂, 所述荧光标记含有稀土螯合物。这些标记具有改善的荧光效能并且尤其适于免疫测定。这些标记还具有在荧光光谱中使用时的高灵敏度。除了诸如钬、铽、钆、镱等镧系元素以外, 诸如荧光的 (例如荧光素和若丹明)、磷光的 (例如卟啉)、化学发光的 (例如吖啶酯、鲁米诺)、电化学发光的、生物发光的等其它发光标记和放射性标记、诸如水不溶性或水溶性染料等色原以及磁性标记 (铁氧体、磁铁矿) 也可以用于本发明特异性标记物的产生, 但并不限于上述这些物质。

[0099] 此外, 可以将本发明扩展以涵盖多参数测定形式, 其利用包被到相同或不同俘获颗粒上的具有不同特异性的结合物以及具有不同特性的标记。

[0100] 来自第二结合复合体中标记颗粒的信号的存在与样品中分析物的存在相关。所得信号的强度与产生的免疫 / 生物分子 (第二结合) 复合体的量相关联, 因此与样品中存在的分析物的量相关。本发明还保留使用标记的分子形式或任何固体形式。通过诸如荧光计、发光测量计、放射性计数器、磁强计和分光光度计等合适的仪器可以测量所述信号的水平。

[0101] 可检测的被标记颗粒连接有特异结合第一结合复合体的结合物。当结合物以较其它复合体或物质优先的亲合性与第一结合复合体结合时, 所述结合物与第一结合复合体“特异结合”。结合物可以与第一结合复合体的任意部分特异结合。结合物可以与分析物、第一结合成分或其二者特异结合。结合物优选与分析物特异结合。

[0102] 在本发明所述的颗粒辅助的免疫反应中, 第一结合物结合在俘获颗粒的表面并且第二结合物与颗粒结合, 信号或产生信号的物质被并入所述颗粒或连接到所述颗粒。俘获颗粒和标记颗粒均使得结合物变得不溶。通常, 结合物是抗体或其诸如  $F(ab')$  和  $F(ab')_2$  的片段或衍生物, 其识别并与样品中的分析物结合。在本发明中, 多克隆抗体和单克隆抗体均可以用作结合物。当确定 CRP 为分析物时, 所用的第一结合物和第二结合物是多克隆抗体的  $F(ab')_2$  片段。当确定 SHBG 为分析物时, 两种具有不同特异性的单克隆抗体被分别用作第一结合物和第二结合物。来源于不同克隆的全 IgG 分子代表 SHBG 抗体。作为在俘获颗粒和标记颗粒表面结合于颗粒的结合物, 单克隆抗体给予与该抗体相关的高度特异性和灵敏度。通过吸附或通过使用本领域技术人员公知的偶联法进行共价化学结合, 可以将结合物连接到俘获颗粒和标记颗粒的表面上。

[0103] 优选地, 结合物以足以基本包被颗粒的量与颗粒结合。“基本包被”指颗粒的某些但并非全部表面积被包被。这维持结合物的空间运动。颗粒被包被表面积的最小百分比部分取决于所用标记的类型和强度。标记强度越大, 俘获颗粒上所需的结合物就越少。使用低阈响应装置进行本申请的涉及由不同量结合物所包被的颗粒的测定。

[0104] 通过使用用于时间分辨荧光测量的高阈响应装置进行本申请的分离测定。当使用灵敏度较低简单装置时, 不得不在比使用更尖端低阈响应装置时的颗粒量高 100 倍的浓度下使用标记颗粒。当反应中标记颗粒的量增加例如 100 倍时, 被包被颗粒 (涉及俘获颗粒和标记颗粒) 的行为没有 (根本) 不同。

[0105] 如上所述, 本发明涉及使用多孔表面作为分离装置用于在免疫反应或化学反应发生后从未结合物中分离免疫复合体 / 生物分子复合体。所述免疫复合体 / 生物分子复合体的分离严格地发生在多孔表面 (分离装置) 的表面。

[0106] 本发明所公开的测定的原理依赖于多孔表面上俘获颗粒和标记颗粒的分离。该分

离通常取决于所述颗粒和所述多孔表面中孔 / 开口的形状和大小。

[0107] 所述孔 / 开口可以是任意形状,例如是正方形、矩形、圆形、三角形、六角形或八角形。所述孔 / 开口优选具有两个平行边。可以通过两个末端来连接两个平行边从而形成孔 / 开口,每一末端由一条任意长度的直边形成。这些末端可以与平行边成直角,例如所述孔 / 开口是正方形或矩形,或者所述末端可以成其它角度,例如所述孔 / 开口是平行四边形或菱形。或者,可以通过两个末端来连接两个平行边从而形成孔 / 开口,每一末端包含多于一个的任意长度的直边。这些末端的直边可以包含两个直边(例如所述孔 / 开口是六边形)、三个直边(例如所述孔 / 开口是八边形)、四个直边(例如所述孔 / 开口是十边形)或更多直边。

[0108] 形成这些末端的多个直边可以具有相同或不同的长度。因此,孔 / 开口可以是规则或不规则的形状。这些末端可以与平行边成直角,例如所述孔 / 开口是正方形或矩形,或者这些末端可以与平行边成其它角度,例如所述孔 / 开口是平行四边形或菱形。可以通过两个或多个任意长度的边将两个平行边相连。或者,通过两个末端连接两平行边从而可以形成孔 / 开口,每一末端包含形成圆形的一部分的边,例如半圆形。或者,通过两个末端连接两平行边从而可以形成孔 / 开口,每一末端包含任意形状的不规则边。

[0109] 在一实施方案中,具有平行边的孔 / 开口扩展到几乎横跨整个多孔表面,例如所述多孔表面是栅格。在另一实施方案中,所述孔 / 开口覆盖几乎全部表面,例如所述多孔表面是格栅。这样的实施方案对于未结合物通过所述表面是最有效的,因为存在更多的物质可以通过的通道。

[0110] 俘获颗粒的大小通常大于多孔表面的开口 / 孔的大小。此外,所述表面的孔 / 开口的大小通常大于测定中以任何形式使用的标记颗粒的大小。在一实施方案中,多孔表面包含具有两个平行边的开口 / 孔,并且这些边之间的距离小于第一结合成分的俘获颗粒的大小,但是大于第二结合成分的标记颗粒的大小。

[0111] 当孔 / 开口的形状具有如上讨论的两个平行边时,与孔的形状兼容的俘获颗粒的优选形状是球形。球形俘获颗粒的平均直径优选大于两个平行边之间的距离。类似地,当孔 / 开口的形状具有如上讨论的两个平行边时,与孔的形状兼容的标记颗粒的优选形状是球形。标记颗粒的平均直径优选小于两个平行边之间的距离。

[0112] 如果使用棒状俘获颗粒,那么所述颗粒的宽度应该总是大于孔 / 开口的大小(例如平均直径或两个平行边之间的距离)。如果使用棒状的标记颗粒,那么所述颗粒的宽度应该总是小于孔 / 开口的大小(例如平均直径或两个平行边之间的距离)。

[0113] 表面开口或孔 / 开口的优选大小是标记颗粒大小的至少两倍。重要的是,表面孔 / 开口的大小与俘获颗粒的大小有关,以防止俘获颗粒通过多孔表面(例如格栅)。孔 / 开口的典型平均大小(例如平均直径或两个平行边之间的距离)为 0.05-100  $\mu\text{m}$ ,更优选 1-20  $\mu\text{m}$ 。孔 / 开口的大小(例如平均直径或两个平行边之间的距离)应为俘获颗粒直径的 10-90%,优选为 50-70%。标记颗粒的大小应为孔的大小(例如平均直径或两个平行边之间的距离)的至多 50%,优选 0.1-10%。例如,当最大俘获颗粒的大小为 200  $\mu\text{m}$  时,孔 / 开口的大小最大为 180  $\mu\text{m}$ 。

[0114] 大部分第一结合成分突出在多孔表面上,只有少部分相切地排列在多孔表面的孔中。从而第二结合成分能够被动地或主动地自由通过表面。

[0115] 在此测定中仅测量与第二结合复合体中的俘获颗粒结合的标记。辅助标记颗粒与结合颗粒结合的免疫反应或化学反应可以在试管、小杯等等中进行或在多孔表面上进行。

[0116] 所述表面的结构和所使用的物质使得不能够在表面内部发生结合。全部第一结合成分和与其结合的第二结合成分被留在表面上，而全部未结合标记物流过表面。可以将全部的分离物质留在表面上或从表面上释放用于标记的定量分析。通常在收集复合体，如免疫复合体或化学复合体时，表面具有被动的性质。然而，在信号产生和 / 或信号传导以及除去未结合标记中，多孔表面（例如格栅）还能够具有主动的性质。用于信号产生的合适方法例如是发光、电磁辐射和磁力测定。然而，可以允许多孔表面物质通过电、电磁或磁方法反射或传导来自与第一结合成分结合的第二结合成分的信号。所选多孔表面物质的性质应该具有低背景和高信噪比。满足上述要求的优选物质包括但不限于金属、硅化合物和低背景的聚合物。术语“低背景的聚合物”指与（特异性）标记产生的信号相比，具有非常低（非特异性）信号比的任何聚合物材料。低背景的聚合物是不干扰标记（信号）测量的聚合物。另一方面，具有低背景但通过参与特异性信号引发而主动参与测量的物质也是可以使用的。这样的物质包括但不限于优选在荧光计膜底微量滴定板中使用的物质，例如 Acrowell GHP (Pall-Gelman Laboratory) 或 Multiscreen-FL、聚碳酸酯 (Millipore)。

[0117] 本领域技术人员公知合适的多孔物质。例如优选在光激发和发射应用中作为光导向的多孔表面。此外，在电信号产生和收集中优选电导率和半导体性质，而磁力性质适于磁力测定。

[0118] 多孔表面优选是格栅。合适的格栅例如是在电子显微镜中用作样品支撑物（支架）的格栅。所述电子显微镜格栅例如可以使用金属制备，所述金属例如是铜、镍、铝、钼、钛、银和 / 或金。除了这些金属以外，还可以使用陶瓷、玻璃或更加柔软的物质制备所述电子显微镜格栅，所述柔软的物质例如是不同种类的塑料和 / 或硅。

[0119] 格栅的结构可以被表达成简单的平坦平面、试管壁或封闭空间的壁的形式，所述封闭空间的壁例如是门。因此，可以设计并制造具有不同格栅结构的多种构造。现代微加工技术，例如显微注射成型、用热模压印浮雕图案或硅微加工能够实现非常复杂的格栅。通过那些现代方法制造并完成的格栅可以用于本发明公开的现代分析诊断装置中的格栅装置。

[0120] 在分离免疫复合体之前，可以在分析物和第一结合成分之间的第一免疫反应后进行洗涤步骤。可以在向表面加入复合体之前在例如试管中进行所述洗涤步骤。所述洗涤步骤可以包括加入缓冲液。离心分离并再悬浮沉淀颗粒以除去未结合的样品物质以及游离的未结合分析物，尤其是当测试高分析物浓度时。在第一结合成分 - 分析物复合体和第二结合成分之间的第二免疫反应后，可以将反应成分转移至多孔表面（例如格栅）上。或者，根据分离装置的结构，两个免疫反应均可以直接在多孔表面（例如格栅）上进行。还可以通过将缓冲液直接加到多孔表面（例如格栅）上来完成洗涤。洗液（或缓冲液）优选能够通过所述多孔表面。缓冲液冲洗复合体、多孔表面（例如格栅）及其孔，并除去未结合的标记颗粒，因而降低背景信号。因为测定技术的效能部分取决于结合物和未结合物之间的分离的完全情况，所以当更多的洗液与结合成分接触时，所述洗涤步骤更加有效。完全的洗涤降低存在的背景信号，其中未结合的信号产生物质仍然留在测量区域中。使用金属格栅作为多孔表面的优点是该物质本身具有非常低的背景荧光和标记颗粒的非特异性结合，并且格栅上的样品成分很少。

[0121] 本发明包含实现独特分离方法的一般方法。所述分离方法由二维分离和三维分离的实践组成。由于其较大尺寸而不能通过多孔表面（例如格栅）开口（孔）的物质在平坦平面上运动，例如进行二维分离，所述物质例如是第一结合成分和第一和第二结合复合体。可以引起非特异性结合并且其大小足以通过开口的其它物质利用三维路径，所述其它物质例如过量的第二结合成分、不想要的物质。这使得在多孔表面建立了纯免疫复合体 / 生物分子（第一和第二结合）复合体。

[0122] 因此，通过使用所述表面实现从未结合物中分离结合的免疫复合体 / 生物分子复合体，其中主要发生在所述表面上的二维分离。有趣的是，所公开的表面能够进行所述复合体在所述表面上二维分布，而未结合物是三维分布的分离。因此，所述方法既能够进行二维分离也能够进行三维分离。该特征非常清晰地区分了本发明和现有技术。当需要时，所述特征使得能够从多孔表面（例如格栅）的表面释放并转移复合体。本分离方法的另一重要优点在于分离不需要额外的装置，例如当使用磁珠时使用的磁体。根据本发明，分离发生在表面，即测试或测定装置上，其已经被认为是进行测定的基本设备。使用所述表面进行免疫复合体 / 生物分子复合体分离的优点在于低的非特异性标记结合，因此具有高信噪比。其它优点包括选择不与标记或标记颗粒进行非特异性结合的表面物质。

[0123] 此外，通过在毛细部件（wicking member）、基质或任何其它类型的膜或过滤器的表面上应用多孔表面可以使得使用多孔表面的三维分离更加迅速并更加有效。目的是使含有未结合物的流体通过多孔表面（例如格栅）。还可以使用包含位于多孔表面下用于收集未结合物的凝胶层的物质来改善多孔表面的特征。

[0124] 利用经典三维膜的测定依赖从未结合物中分离结合物，其中某些结合物结合在膜的内部并且某些在膜的表面。本发明依赖于结合物和未结合物的分离，其中所述结合物结合在多孔表面上。事实上，这意味着大部分第一结合成分突出多孔表面并且如果存在的话，只有少部分在多孔表面的开口或孔中。所述分布高度依赖于孔的直径和颗粒的大小。在本发明方法中可以单层、双层或多层地向多孔表面（例如格栅）施加所述颗粒。

[0125] 通常，所用的测定方法是非竞争性测定。所用的测定方法还可以用在竞争性测定过程中。在非竞争性测定中测量信号的强度，而在竞争性测定中测量信号强度的降低。

[0126] 根据本发明的方法，可以依次或同时在试管或小杯或直接在格栅表面上进行全部的免疫反应。通常，当同时进行全部免疫反应时，总孵育（测定）时间是 1 至 5 分钟，而当依次进行全部免疫反应时，总孵育（测定）时间是 3 至 15 分钟。然而，所述分析方法所用的时间可能会少于或多于上述时间。该方法尤其适用于具有多于一个特异性结合位点的分析物。

[0127] 通常对感染性疾病、临床化学和卫生监测领域中的样品，尤其是生物样品应用本发明的方法。通常，所述样品是已知或可疑来自个体的机体样品，所述个体例如是人。优选地，所述样品包含体液，例如血液、血清、血浆、脑脊液、尿、唾液、创伤愈合液、腹水、胸水、滑液、皮肤的吸出水泡液或羊水。此外，所述方法还适于测试水溶性固体或半固体或糊状样品，例如粪便、痰、咽、脓等等。此外，可以在食品和其它工业的卫生监测，以及医院、实验室等等中使用所述方法。

[0128] 所述方法可以用于免疫复合体的分离，因此可以用于微生物及其抗原、以及真核细胞及其抗原的检测，所述微生物例如细菌、病毒、真菌和寄生虫（原虫）。此外，可以确定

下列类型的分析物：激素、药物、毒素、维生素、环境化学剂、酶、肽、蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、脂质、半抗原、变态反应原和核酸。所述方法还可以用于其它类型的生物分子复合体的分离和分析，所述生物分子复合体例如核酸间的复合体（DNA-DNA 和 DNA-RNA）以及核酸和蛋白质间的复合体（例如调控基因表达的调节复合体）。所述生物分子复合体还包括其它类型的不同蛋白质（包括糖蛋白和脂蛋白）之间的复合体，例如配体和受体间的复合体（与完整的细胞膜或分离的细胞膜结合的受体），多酶复合体（包括不同的酶亚基）以及蛋白质和其它类型的生物分子之间的复合体，例如酶及其底物间的复合体。所述分析物可以是无细胞抗原的（例如核酸或细胞质蛋白）或与原核或真核细胞膜结合的细胞抗原（例如受体）。

[0129] 本发明还提供检测样品中分析物的存在和 / 或含量的试剂盒。除了多孔表面和第一和第二结合成分以外，本发明的试剂盒可以包含合适的缓冲液、合适的校准试剂、毛细膜、取样装置、使用说明书和其它常见组分。

#### [0130] 实施例

[0131] 下列实施例说明本发明。除非另有说明，所用方法是标准的生物化学和分子生物学技术。所示实施例仅是举例而非旨在限制本发明的范围。

[0132] 本发明中用于免疫复合体分离和测定装置的金属格栅的材料是铜。所用格栅的厚度约为  $10\ \mu\text{m}$ ，棒厚度为  $5\ \mu\text{m}$ ，孔大小为  $7.5\ \mu\text{m}$ （2000 目）。本发明中使用的格栅与电子显微镜中用作样品支撑物（支架）的格栅类似。

#### [0133] 实施例 1

[0134] 使用与颗粒结合的第一和第二结合物的 hCRP 依次测定的过程，其中采用多克隆  $\text{F}(\text{ab}')_2$  片段并测量在用于分离复合体的格栅上所形成的免疫复合体（图 4）。

[0135] 人 C 反应性蛋白（hCRP）测定被用作炎症指示剂。在本实施例中，在校准样品中确定 hCRP。首先，将含有浓度为  $0-10\text{mg}/\text{l}$  的 hCRP 的样品和  $0.1\text{ml}$  缓冲液（基于 Tris 的）加入到小离心管中。然后，加入  $10\ \mu\text{l}$   $10.25\%$  的由抗 CRP  $\text{F}(\text{ab}')_2$  片段包被的乳胶颗粒（直径  $10\ \mu\text{m}$ ），将试管孵育 5 分钟同时混合。孵育后，将试管离心  $0.5-3$  分钟（约  $16000\text{xg}$ ）并丢弃上清液。然后洗涤结合有 CRP 的乳胶颗粒，通过离心和抽吸的方法除去未结合的 CRP。将颗粒再次悬浮于  $0.1\text{ml}$  的缓冲液中并加入  $10\ \mu\text{l}$  的标记，所述标记含有被结合物包被的乳胶颗粒（ $0.125\%$  的混悬液；乳胶颗粒的直径为  $0.1\ \mu\text{m}$ ）。孵育 5 分钟后，通过将反应成分转移至  $7.5\ \mu\text{m}$ （孔直径）的格栅上并通过所述格栅（直径为  $3\text{mm}$ ）过滤，分离形成的免疫复合体：带有第一结合物的俘获乳胶-CRP- 带有第二集合物的标记乳胶。图 2 和图 3 描述了过滤过程。洗涤后，测量格栅结合免疫复合体的荧光信号。该信号与格栅上免疫复合体的量相关，因此与所述复合体中的 CRP 的量相关，因而与样品中的分析物的量相关。

#### [0136] 实施例 2

[0137] 使用与颗粒结合的第一和第二结合物的 hSHBG 依次测定的过程，其中采用单克隆抗体并测量在用于分离复合体的格栅上所形成的免疫复合体（图 5）。

[0138] 人性激素结合球蛋白（hSHBG）测定被用作激素状况的一个指标。在本实施例中，在细胞培养基样品中确定重组 hSHBG。首先，将含有浓度为  $0-200\text{nmol}/\text{l}$  的 hSHBG 的样品和  $0.1\text{ml}$  缓冲液加入到小离心管中。然后，加入  $10\ \mu\text{l}$   $10.25\%$  的由单克隆抗 SHBG 抗体包被的乳胶颗粒（直径  $10\ \mu\text{m}$ ），将试管孵育 5 分钟并混合。孵育后，将试管离心  $0.5-3$  分钟（约  $16000\text{xg}$ ）并丢弃上清液。然后洗涤结合有 SHBG 的乳胶颗粒，通过离心和抽吸的方法除去未

结合的 SHBG。将颗粒再次悬浮于 0.1ml 的缓冲液中并加入  $10 \mu\text{l}$  的标记,所述标记含有被结合物包被的乳胶颗粒 (0.125% 的混悬液;乳胶颗粒的直径为  $0.1 \mu\text{m}$ )。所述结合物是对 SHBG 具有与所述第一结合物不同特异性的单克隆抗体。孵育 5 分钟后,通过将反应成分转移至  $7.5 \mu\text{m}$  (孔直径) 的格栅上并使用所述格栅 (直径为 3mm) 过滤,分离形成的免疫复合体:带有第一结合物的俘获乳胶-SHBG-带有第二集合物的标记乳胶。图 2 和图 3 描述了过滤过程。洗涤后,测量格栅结合免疫复合体的荧光信号。该信号与格栅上免疫复合体的量相关,因此与所述复合体中 SHBG 的含量相关,因而与样品中的分析物的含量相关。

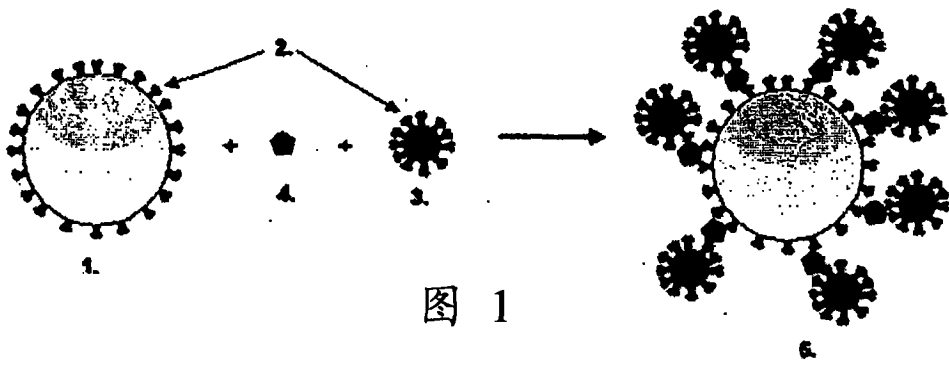


图 1

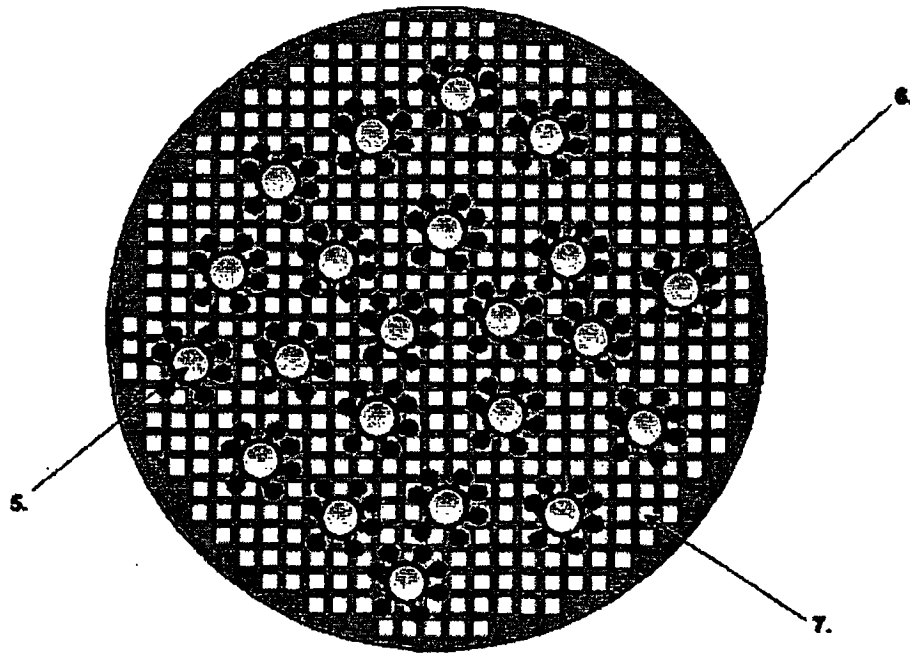


图 2

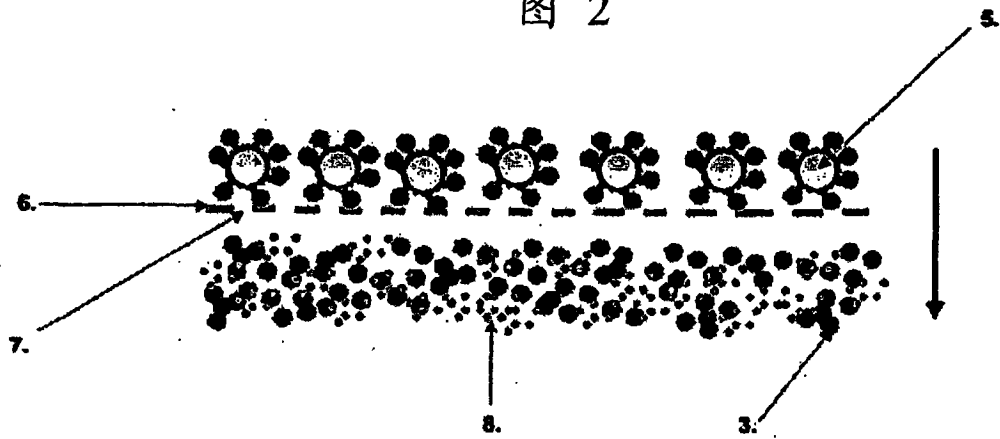


图 3

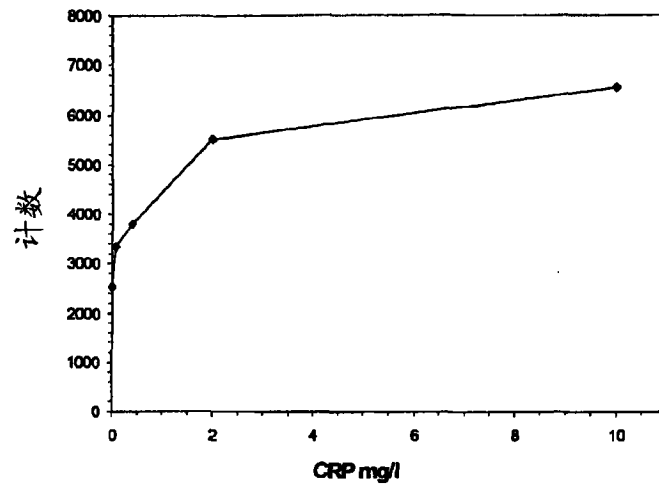


图 4

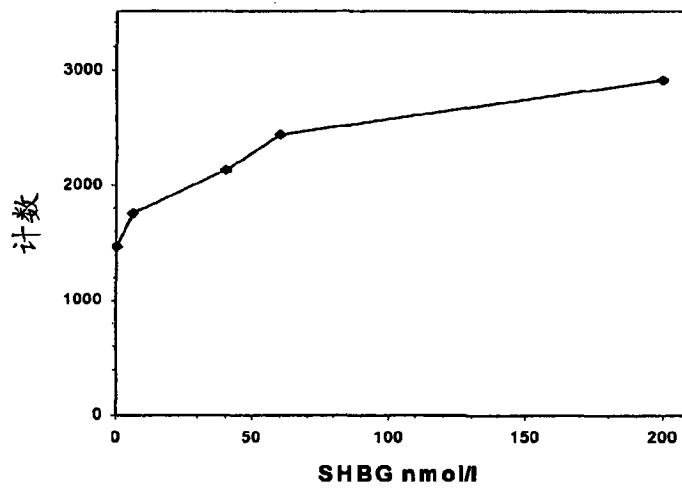


图 5

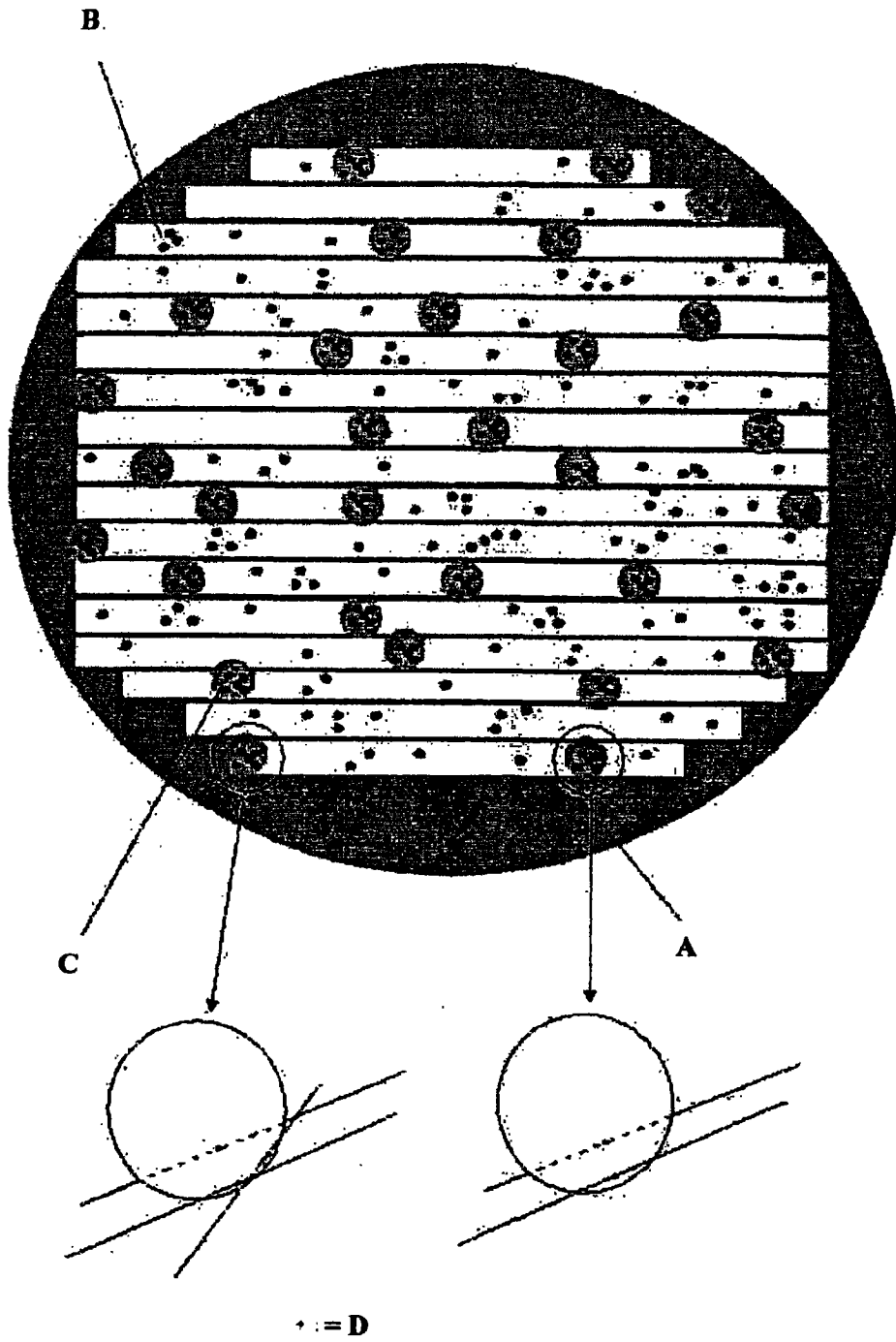


图 6

专利名称(译)	基于颗粒的结合测定		
公开(公告)号	<a href="#">CN101069098B</a>	公开(公告)日	2013-03-27
申请号	CN200580041554.5	申请日	2005-11-23
[标]发明人	胡阿尼卢奥托拉 汉努尼库拉 米拉穆尔托弗瑞		
发明人	胡阿尼·卢奥托拉 汉努·尼库拉 米拉·穆尔托弗瑞		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/58 G01N33/543 G01N33/538		
CPC分类号	Y10S435/975 G01N33/538 Y10S435/971 Y10S436/824		
代理人(译)	韩克飞		
审查员(译)	张丽颖		
优先权	2004026592 2004-12-03 GB		
其他公开文献	CN101069098A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供检测样品中分析物的存在或含量的方法，所述方法包括：向多孔表面上加入连接结合物的颗粒、分析物和被结合物包被的标记颗粒。如果在样品中存在所述分析物，那么在液相中发生免疫反应或化学反应。通过使用所述表面实现从未结合物中分离结合复合体，其中主要在所述多孔表面(例如格栅)的表面上发生二维分离。有趣的是，所公开的表面能够进行分离，其中所述复合体在所述多孔表面(例如格栅)上是二维分布的，而未结合物是三维分布的。因此，所述表面既能进行二维分离又能进行三维分离。

