



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101395473 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 19

(21) 申请号 200680053685. X	<i>C12Q 1/42</i> (2006. 01)
(22) 申请日 2006. 03. 20	<i>C12Q 1/28</i> (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日 2008. 09. 03	<i>C07K 1/10</i> (2006. 01)
(86) PCT申请的申请数据 PCT/US2006/010406 2006. 03. 20	<i>C07K 1/04</i> (2006. 01)
(87) PCT申请的公布数据 W02007/123507 EN 2007. 11. 01	<i>C07K 16/00</i> (2006. 01)
(73) 专利权人 阿莱瑞士股份有限公司 地址 瑞士楚格	(56) 对比文件 CN 1311856 A, 2001. 09. 05, 权利要求 1-25, 说明书第 3、4 页, 第 8 页到第 10 页, 第 22 页, 附图 4. US 5543332 A, 1996. 08. 06, 全文. CN 1134154 A, 1996. 10. 23, 全文.
(72) 发明人 M·W·牛顿 A·C·威杰冉阿迪翰	审查员 杨冀川
(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有 限公司 33100 代理人 徐关寿	
(51) Int. Cl. <i>G01N 33/53</i> (2006. 01) <i>G01N 33/535</i> (2006. 01) <i>G01N 33/532</i> (2006. 01) <i>G01N 33/533</i> (2006. 01) <i>G01N 33/543</i> (2006. 01) <i>G01N 33/548</i> (2006. 01)	

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 4 页

(54) 发明名称

利用水溶性轭合物的电化学检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种水溶性轭合物以及使用他们进行检测, 诊断的方法。一个检测和定量检测的装置也在本发明能中被揭示。在很多实施方式中, 这种水溶性轭合物被用在免疫和横向流动检测中。本发明还提供一种制备水溶性轭合物的方法, 通过该方法可以让检测的灵敏度提高。另外, 本发明还提供一种用于电化学检测的水溶性轭合物, 使用这种检测可以提高检测的灵敏度。

1. 一种检测样品中被分析物存在与否或含量的方法,包括:
 - 使包覆有与待检被分析物配合的特异性结合分子的电极表面与样品接触;
 - 使包覆有与待检被分析物配合的特异性结合分子的电极表面与水溶性辄合物接触,辄合物含有:
 - 至少一种载体组分,
 - 至今一种连接组分,至少一种共价结合到载体组分上的电化信号酶,至少一种与待检被分析物配合的靶向组分;以及
 - 形成包覆在电极表面上的特异性结合分子、被分析物和水溶性辄合物的复合结合物;
 - 使复合结合物与适于电化信号酶的底物接触形成产物溶液;
 - 确定样品中被分析物的存在与否或含量。
2. 根据权利要求1的方法,其中:特异性结合分子为抗体或抗体片断;电化信号酶选自下组物质:碱性磷酸酶和辣根过氧化酶;以及,底物选自下组物质:1-萘基磷酸盐和对苯二酚。

利用水溶性轭合物的电化学检测方法

[0001] 本申请是于 2004 年 8 月 23 日申请的序列号为 10/924,738 美国专利的部分继续申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于检测测定的水溶性轭合物组分,制备和使用轭合物的方法,免疫测定,侧向横流检测,及检测装置。

[0003] 发明背景

[0004] 人们一直需要一种制备轭合物的优越方法,使得轭合物能够在用于免疫化学测定比如家用妊娠和生育化验中具有高灵敏度和特异性。

[0005] 用以提高免疫测定的灵敏度和可靠性的多种策略由 L J Kricka 在临床化学 1994 年 40 期 347-357 页进行了综述。

[0006] 欧洲专利 EP0594772B1 涉及一种水溶性、含有二乙烯基砷衍生部分的以聚合物为基基的轭合物。欧洲专利 EP0594772B1 论述了利用所谓的盐析效应来增强分子种类比如抗体和抗原与水溶性载体分子结合能力的可行性。但是,结果显示当盐浓度增加到 1M 时,产生了不可逆的沉淀物。

[0007] 美国专利 US6,627,460Lihme 等人提供了水溶性交联轭合物及其使用方法。该专利提供了进一步在反应混合物中提高盐浓度的方法,从而形成了含有一种水溶性轭合物的可逆(即可重溶)沉淀物,该沉淀物可应用在各种免疫化学测定中比如侧向横流装置中。

发明内容

[0008] 本发明提供了一种应用于诊断和检测化验中的水溶性轭合物组分,它们的制备和使用方法。作为多种实施方案,轭合物在免疫测定和侧向横流检测中有效。本发明提供了制备轭合物的方法,制备过程中收率更高,检测灵敏度更高。本发明还提供一种制备时更加经济的水溶性轭合物。本发明还提供了就许多有用的配体进行检测和定量检测而应用的装置。本发明还提供了利用电化检测方法并具有非常高灵敏度的水溶性轭合物。

[0009] 制备水溶性轭合物的方法在美国专利 US6,627,460 中已有论述,其全部内容包括所有表格、图片和权利要求通过引用方式并入本文中。这些制备方法涉及的水溶性轭合物通常含有一种载体组分,一种连接组分,一种间隔剂组分,一种信号组分和一种待检配体靶向组分或者待检配体(主要靶向组分)。信号组分共价结合到间隔剂组分上,间隔剂组分经连接组分共价结合到载体组分上。这些方法包括 a) :将水溶性中间体轭合物与至少一个主要靶向组分(待检配体靶向组分或者配体)反应,该中间体轭合物含有一种载体组分,一种连接组分,一种间隔剂组分,一种信号组分(信号组分共价结合到间隔剂组分上,间隔剂组分经连接组分共价结合到载体组分上)。该反应在水溶液中进行,反应中具有连接组分衍生的未反应活性基团。上述反应条件使得形成了可逆沉淀物。含有水溶性轭合物的可逆沉淀物在水介质中重新溶解,以及 c) 该水溶性交联轭合物进行一个提纯步骤。关于本发明的详细细节在美国专利 US6,627,460 中提供,其全部内容包括所有表格、图片和权利要求通过

引用方式并入本文中。作为多种实施方案，轭合物可互相交联形成更大的共轭分子。[0009] 虽然本文提供了水溶性轭合物的排列示例，其它排列方式同样是可行的。例如，靶向组分可经连接组分结合到载体组分上，或者与间隔剂组分结合，或者与一种非特异性蛋白质结合，可参见如下描述。同样，信号信号可与载体组分，或者与间隔剂组分，或者甚至与靶向组分结合。各组分的精确排列可按任意方式变化而产生一种可作为试剂的水溶性轭合物，轭合物进行化验后能得到一个有用的结果。

[0010] 在第一方面，本发明提供了一种制备水溶性轭合物的方法，包括 a) 制备一种作为悬浮液中的可逆沉淀物的水溶性轭合物，该轭合物包括至少一种载体组分，至少一种连接组分，至少一种信号组分和至少一种待检配体靶向组分或者一种待检配体。该悬浮液经超声波处理形成超声处理液，含有水溶性轭合物的上层清液从处理液中分离出来。可选择的，该水溶性轭合物可从该上清液中提纯。作为一种实施方案，该水溶性轭合物经凝胶过滤色谱（或层析）提纯。作为一种实施方案，凝胶过滤色谱采用一种平均尺寸排阻 300kD 的介质进行。

[0011] 在本文描述的本发明多种实施方案中，水溶性轭合物也可含有一种间隔剂组分。作为一种实施方案，载体组分与连接组分共价结合，信号组分共价结合到间隔剂组分上。水溶性轭合物可通过使水溶性中间体轭合物与待检配体或者配体靶向组分在至少浓度为 1.25M 的易溶盐溶液中接触而制备。作为另一种实施方案，易溶盐的浓度可以是至少大约 1.5M，或者至少大约 1.75M，或者至少大约 2.0M，或者至少大约 2.5M。水溶性轭合物含有一种载体组分、一种连接组分，一种待检配体靶向组分或者一种待检配体，一种信号组分，可选择的含有一种间隔剂组分。“水溶性中间体轭合物”是指含有一种载体组分、一种连接组分和一种信号组分的分子。水溶性中间体轭合物也可含有一种间隔剂组分。“水溶性中间体前体”是指含有水溶性共轭分子中任意两个或更多组分的分子，它不是水溶性轭合物或者中间体轭合物。作为一种实施方案，水溶性中间体前体含有一种载体组分和一种连接组分。作为另一种实施方案，前体含有载体组分、连接组分和间隔剂组分。作为一种实施方案，水溶性中间体轭合物含有载体组分、连接组分、信号组分和间隔剂组分。“超声处理”是指应用于化学和生物中暴露在高频声波下的公知技术。其有时也被称为“超声破碎”。超声处理可在任意合适的功率下进行，比如至少大约 300 瓦，或者至少大约 500 瓦，或者至少大约 700 瓦，或者至少大约 900 瓦，或者至少大约 1000 瓦，或者大于 1000 瓦。任意合适的频率皆可使用，比如从 20 到 24KHz。本文的“大约”是指上下增减 10%。术语“可逆沉淀物”是指形成的沉淀物经 25°C 的水溶液稀释后可以重新溶解。

[0012] 易溶盐可包括组分如锂、钠、钾、钙、和铵的硫酸盐，磷酸盐，柠檬酸盐，酒石酸盐，可在浓度大约 2.5M 下存在。作为一种实施方案，该盐为磷酸钾或者磷酸钠。

[0013] 在上下文中与轭合物连用的术语“水溶性”是指得到的轭合物应该在水介质中可溶，比如室温下的水中，也即通过本发明披露的方法得到的交联轭合物应该得到经肉眼观察透明、均质的溶液。

[0014] 作为多种实施方案，得到的轭合物应该在 25°C 每 ml 水中具有至少 0.1，或者至少 0.2，或者至少 0.5，或者至少 1，或者至少 3，或者至少 5，或者至少 7，或者从 5 到 10，或者从 4 到 11，或者至少 10，或者至少 20，或者至少 30，或者至少 40，或者至少 50，或者至少 100，或者在特殊情况下至少 200mg 的溶解度。本发明同时也提供了按照本发明的任一方法制备

的水溶性轭合物。

[0015] 在另一方面,本发明提供了制备水溶性轭合物的方法,包括制备本文描述的作为悬浮液中沉淀物的水溶性轭合物。含有水溶性轭合物的颗粒从悬浮液中分离,颗粒用水溶液洗涤形成二次悬浮液。含有水溶性轭合物的颗粒从二次悬浮液中分离。按照这些方法制备的水溶性轭合物与本文描述的轭合物结构相同。比如,轭合物可进一步含有一间隔剂组分,载体组分与连接组分共价结合,信号组分共价结合到间隔剂组分上。

[0016] 作为一种实施方案,水溶性轭合物通过下述工艺进行提纯:将沉淀物与上清液分离,形成沉淀物在水中的悬浮液,再将沉淀物与上清液分离。轭合物可含有一个经连接组分(比如,牛血清白蛋白,免疫球蛋白)结合到载体组分上的非特异性蛋白质。作为一种实施方案,靶向组分为经还原剂处理过的抗体。“还原剂”是指通过提供一个电子或多个电子而化学还原其它物质的物质。还原剂的示例包括 beta- 巯基乙醇,二硫苏糖醇,2-亚氨基硫杂戊烷。“洗涤颗粒”是指将颗粒与水溶液接触并搅拌。搅拌可以是通过任一方式,比如涡流,或者搅动或者晃动容器。搅拌过程中部分颗粒可能会从初始颗粒上脱落,可经离心作用或者其它方法重新结成颗粒。作为另一种实施方案,采用水溶液洗涤水溶性轭合物后,不再对轭合物进行进一步的提纯。

[0017] 作为一种实施方案,水溶性轭合物经离心法与上清液分离,虽然实施本方法并不必然使用离心法。轭合物也可采用任意合适的技术比如通过凝胶过滤从上清液中精制。“上清液”是指样品中的液体部分。

[0018] 在另一方面,本发明提供了含有一种载体组分、一种共价结合到载体组分上的连接组分,一种信号组分,一种待检配体靶向组分或者一种待检配体,以及一种非特异性蛋白质。作为一种实施方案,非特异性蛋白质经连接组分共价结合到载体组分上。作为另一种实施方案,非特异性蛋白质经连接组分结合到载体组分上,与轭合物的其它组分(除了连接组分)不结合。作为其它实施方案,至少 2% 或者至少 3% 或者至少 5% 或者至少 10% 或者至少 15% 或者至少 20% 的非特异性蛋白质经连接组分结合到载体组分上,与轭合物的其它组分(除了连接组分)不结合。作为其它实施方案,至少 50% 或者至少 60% 或者至少 70% 或者至少 80% 或者至少 85% 或者至少 90% 或者至少 95% 的非特异性蛋白质经连接组分结合到载体组分上,与轭合物的其它部分(除了连接组分)不结合。作为相关的实施方案,所有以上引述的相同百分比例的连接组分结合到非特异性蛋白质上,非特异性蛋白质与连接组分结合,与轭合物的其它组分不结合。任一水溶性轭合物也可含有一间隔剂组分。

[0019] “非特异性蛋白质”是指在其应用环境中不具有结合特异性或者靶的的蛋白质。非特异性蛋白质通常通过化学键与水溶性轭合物连接。牛血清白蛋白,免疫球蛋白,钥孔血蓝素,以及其它蛋白质为非特异性蛋白质的典型示例。作为一种实施方案,非特异性蛋白质是与间隔剂组分(当间隔剂组分存在时)不同的蛋白质,但间隔剂组分和非特异性蛋白质也可是用于实现不同功能的相同蛋白质。非特异性蛋白质可含有氨基以使非特异性蛋白质与轭合物共价结合,当然也可使用其它合适的化学连接键。作为另一种实施方案,间隔剂组分与非特异性蛋白质相互独立,并经过连接组分共价结合到载体组分上;信号组分共价结合到间隔剂组分上;待检配体或者待检配体靶向组分共价结合到载体组分上。

[0020] 作为其它实施方案,信号组分与间隔剂组分、非特异性蛋白质的任一或者两者同时结合。也可以将非特异性蛋白质性和间隔剂组分经过连接组分结合到载体组分上,将靶

向 组分或者配体,以及信号组分与非特异性蛋白质和间隔剂组分的任一或者两者同时结合。

[0021] 在另一方面,本发明提供了制备水溶性轭合物的方法,包括 a) 使水溶性中间体轭合物与 i) 待检配体靶向组分或者 ii) 待检配体接触,形成含有包括水溶性轭合物沉淀物的悬浮液,该中间体轭合物含有一种载体组分、一种连接组分,一间隔剂组分和一种信号组分。该方法还包括将水溶性轭合物从悬浮液中提取出来。待检靶向组分或者待检配体在与水溶性中间体轭合物接触之前,经还原剂进行前处理。提取可以采用任意合适的方法。作为一种实施方案,水溶性轭合物经离心法分离。“前处理”是指组分与还原剂接触或者经还原剂培育。作为一种实施方案,还原剂是二硫苏糖醇,其可在任一合适的浓度下使用。例如,前处理可采用至少大约 15mg/100ul 二硫苏糖醇,或者至少大约 10mg/100ul,或者至少大约 5mg/100ul,或者至少大约 20mg/100ul。也可使用相同用量的其它还原剂。前处理可以进行任一段合适的时间,比如 5 分钟,或者 10 分钟,或者 15 分钟,或者 20 分钟,或者长于 20 分钟。

[0022] 在另一方面,本发明提供了一种制备水溶性轭合物的方法,包括将水溶性中间体前体与至少一种待检配体靶向组分或者待检配体、一种非特异性蛋白质接触以形成水溶性中间体轭合物,该前体包括至少一种载体组分和至少一种连接组分。信号组分与水溶性中间体轭合物结合形成水溶性轭合物。形成含有水溶性轭合物沉淀物的悬浮液,然后水溶性轭合物由悬浮液中分离。作为多种实施方案,非特异性蛋白质可以是牛血清白蛋白,免疫球蛋白或者钥孔血蓝素。载体组分和连接组分在加成靶向组分或者配体、以及非特异性蛋白质之前,也可以含有信号组分;或者在结合靶向组分或者配体、以及非特异性蛋白质之后加成。作为一种实施方案,靶向组分或者配体、以及非特异性蛋白质与水溶性中间体前体同时接触、加成、结合或者培育。作为一种实施方案,水溶性中间体前体在加成靶向组分或者配体前含有载体组分和连接组分。靶向组分或者配体、以及非特异蛋白质可在最低 1.6M,或者最低 1.7M,或者最低 1.8M,或者最低 1.9M,或者最低 2.0M,或者最低 2.2M,或者最低 2.5M 的盐浓度下结合到中间体前体上。非特异性蛋白质与前体可在下述比例下反应:1:1 或者更大(前体比非特异性蛋白质)或者 1:5 或者更大,或者 1:7 或者更大,或者 1:10 或者更大,或者 1:12 或者更大,或者 1:15 或更大,或者 1:20 或者更大。本方法制备出如本文描述的水溶性轭合物。

[0023] 作为另一种实施方案,轭合物可由非特异蛋白质经连接组分结合到载体组分上而形成,这样所有的连接组分被封闭。从而,靶向组分或者配体就可经非特异性蛋白质与前体结合。信号组分或者经靶向组分或配体结合,或者经非特异性蛋白质结合,或者在后一步骤中结合而形成最终轭合物。

[0024] 在另一方面,本发明提供了制备水溶性轭合物的方法。本方法涉及将水溶性轭合物前体采用一种待检配体或者一种待检配体靶向组分,和一种非特异性蛋白质培育,该前体含有一种载体组分、一种共价结合到载体组分上的连接组分,一种信号组分。从而制备了一种具有经连接组分共价结合到载体组分上的非特异性蛋白质的水溶性轭合物。作为一种实施方案,非特异性蛋白质经连接组分结合到载体组分上,与水溶性轭合物的其它部分不结合。待检配体靶向组分(或者待检配体)和非特性蛋白质同时与前体进行培育。

[0025] 在另一方面,本发明提供了一种含有水溶性轭合物的装置。轭合物处于检测条上,

检测条是一个包括采样区和检测区的多孔载体材料。施加在采样区的液体样品流向检测区。检测条的检测区中还含有第二靶向组分,用于选择液体样品中可能存在的配体靶向组分或者配体。“多孔载体”是指液体经毛细管力可以通过的吸水材料。该材料的示例为硝化纤维,当然本领域的普通技术人员会鉴别同样适用在本发明中的其它吸水材料,比如聚酰胺和粗加工纸。“采样区”是检测条中滴加待测样品的区域。“试剂区”是检测条中含有试剂的区域。试剂在检测条上以固体形式,或者以可移动的形式存在。“检测区”是检测条中用于检测样品中可能存在的配体是否存在及其含量的区域。该装置还可含有一个“标记区”,用于将标记剂可移动地施加在检测条上。“毛细管力”是指作用于毛细管中或者多孔介质中液体的表面张力,该力能使得液体通过毛细管或者多孔介质。“可移动”是指随着液体在检测条上的流动,试剂或其它成分可沿着本装置从一区流向另一区。

[0026] 可以提供本装置的多种实施方案。作为一种实施方案,水溶性轭合物在检测条上以固体形式存在,处于检测区的上游,采样区的下游。本检测条也可含有一控制区,处于检测区的下游。“控制区”含有一靶向组分,在控制区结合显示出检测如计划进行。作为另一种实施方案,本装置含有一外壳,用于包装检测条和定义采样区。多孔载体背面可采用不透气的材料,与外壳的内壁接触。作为一种实施方案,本装置还具有一个盖子,其选择地安装在外壳的一端并盖住装置的采样区。外壳可由塑料或其它合适的材料制造。作为一种实施方案,检测条还在检测区上游设有过滤器,其可为多孔载体材料的一部分。过滤器用于移除待测样品中可能存在的污染物。检测条还可以制备成在内部具有结合部位的形式,该结合部分为阻断蛋白质或聚乙烯醇所封闭。例如,阻断蛋白质可为牛血清白蛋白,牛乳蛋白质,或者在检测中具有同等效力的其它材料。样品可为待测的尿,血清,血浆,血液,精液,唾液,或其它人体液或其它生物体液。作为另一种实施方案,本装置含有检测条、一外壳,检测条的部分由外壳中伸出。例如,检测条的 1cm 或者更少部分由外壳中伸出用于接受样品。

[0027] 在另一方面,本发明提供了制备水溶性轭合物的方法,包括 a) 使一水溶性中间体前体与一种信号组分接触,形成含有包括水溶性轭合物沉淀物的悬浮液,该前体含有一种载体组分、一种连接组分,一间隔剂组分,一种待检配体靶向组分或者一种待检配体。水溶性轭合物再从悬浮液中分离。

[0028] 在另一方面,本发明提供了一种水溶性轭合物,包括至少一种载体组分、至少一种连接组分、至少一种经连接组分共价结合到载体组分上的电化信号组分,以及至少一种待检配体靶向组分或者一种待检配体。轭合物还可具有一间隔剂组分,其经连接组分结合到载体组分上。“电化信号组分经连接组分结合到”是指信号组分直接与连接组分结合而没有中间分子,或者信号组分结合到一种自身与连接组分结合的基团上。举例说,信号组分结合到间隔剂组分上,间隔剂组分与连接组分结合。

[0029] 作为一种实施方案,电化信号组分是一种将底物或者反应介质转化成电化可检物质的酶。例如,电化信号组分可以是碱性磷酸酶,辣根过氧化酶,或者其它酶,底物可以是适于该酶的任意一种,比如 1- 萘基磷酸盐,或者对苯二酚,或者适于该酶的其他底物。从而,电化可检物质可为 1- 萘酚,或苯醌,或酶作用于采用的底物而得到的其它物质。

[0030] 作为一种实施方案,电化信号组分共价结合到间隔剂组分上,待检配体或者待检配体靶向组分经连接组分共价结合到载体组分上。

[0031] 在另一方面,本发明提供了制备一种水溶性轭合物的方法。本方法包括将具有至

少一种连接组分的载体组分与至少一电化信号组分结合形成中间体轭合物,然后再将中间体轭合物与待检配体或者待检配体靶向组分接触形成水溶性轭合物。

[0032] 作为多种实施方案,载体组分与电化信号组分的摩尔比为 1:10 或者更大,或者 1:15 或者更大,或者大约 1:20,或者 1:20 或者更大。作为另一种实施方案,使水溶性前体与靶向组分接触形成水溶性轭合物的步骤会导致水溶性轭合物作为沉淀形成,该方法还包括在形成水溶性轭合物后对该沉淀进行超声波处理。

[0033] 另一方面,本发明提供了检测样品中被分析物的存在与否及其含量的方法。本方法包括:使包覆有待测被分析物的特异性结合分子的表面与样品接触;使包覆待测被分析物的特异性结合分子的表面与本发明描述的水溶性轭合物接触,形成包覆在表面上的特异性结合分子、被分析物,水溶性轭合物形成的复合结合物;将该复合结合物与适用于电化信号酶的底物作用形成产物溶液;然后确定样品中被分析物的存在与否。

[0034] 作为一种实施方案,该种特异性结合分子为抗体或者其片断。复合结合物为一种结合在表面的抗体、被分析物与轭合物上的复合物。作为多种实施方案,表面可为一电极,一磁珠、或者其它表面。当该表面为磁珠时,本方法还包括使产物溶液与电极接触以确定样品中被分析物的存在与否或含量。

[0035] 上述的发明摘要并不能涵盖全部内容,本发明的其它特点和优点可从下面的详细说明以及权利要求中显而易见地得到。

[0036] 图片简要说明

[0037] 图 1 演示了水溶性轭合物及其制备的一般技术,以便于读者形象地理解说明书中描述的轭合物和后续制备工艺。

[0038] 图 2 提供了将传统的辣根过氧化物酶-葡聚糖共轭检测方法与本发明方法的对比。

[0039] 详细说明

[0040] 本发明中的方法通过在交联后对轭合物进行适当的超声波处理后得到了较之以前方法更高的收率。超声波处理工艺得到了透明溶液,这意味着其不含有肉眼可见的非液物质,或者说得到了最少的非液物质。通常地,在本工艺之后,并不必要经过离心步骤。

[0041] 本发明的一方面涉及洗涤经对形成的轭合物进行离心得到的颗粒,该颗粒作为反应产物中的沉淀存在。上层清液与颗粒分离,颗粒用水溶液或者缓冲液洗涤以形成二次悬浮液。二次颗粒经过分离,如必要的话,洗涤步骤可以再重复 1—2 次。不受限于任何特定的理论,人们相信洗涤颗粒的步骤使靶向组分溶解在溶液中,也即靶向组分处于上层清液中。从而,未反应的靶向组分可以容易地排除。并且还发现,洗涤步骤还免除了进一步提纯产品的必要。因此,用于提纯产品的多余步骤比如凝胶过滤(S-300)柱就被取消了。

[0042] 在另一方面,本方法提供了一种轭合物(及其制备方法),轭合物含有一种载体组分、一种连接组分,一种可选择的间隔剂组分,一种信号组分,一种待检配体靶向组分或者一种待检配体,以及一种经连接组分共价结合到载体组分上的非特异性蛋白质。以前,制备水溶性轭合物需要利用大量的靶向组分分子以确保充分耦合和交联。而本发明中,只需更少的靶向组分或者配体即可确保与载体组分上所有可用的位置进行交联。通过在反应混合物中含有非特异性蛋白质,载体组分上的许多位置(可经过连接组分结合)会为非特异性蛋白质占据。从而,靶向组分或者配体的充分结合会制备出有用的产品。从而,通过采用本

发明教导的方法,使用者可以减少制备工艺中的靶向组分(配体)用量,从而大幅度降低制备该产品的成本。

[0043] 在另一方面,本发明提供了制备水溶性轭合物的方法,包括使水溶性中间体前体与靶向组分或者配体接触形成含有包括水溶性轭合物沉淀物的悬浮液,然后将该轭合物从悬浮液中分离;其中,待检靶向组分或者配体在与水溶性中间体轭合物接触之前,经还原剂进行前处理。靶向组分采用还原剂进行前处理使得其结合到与载体组分上的速率加快,从而检测时灵敏度提高。实施例5提供了本发明这一方面的实际应用。可以使用任一还原剂,比如二硫苏糖醇, beta- 巯基乙醇,特劳特试剂(2-亚氨基硫醇),或者其它还原剂。

[0044] 另一方面,本发明提供了确认样品中被分析物存在与否的方法。本方法包括使液体样品与本发明装置中的某部分接触,该部分位于检测区的上游;使该液体样品流向检测区;通过观察检测区确认液体样品中被分析物的存在与否以及含量。检测步骤中可通过肉眼观察检测区的信号。

[0045] 载体

[0046] 本发明上下文中的术语“载体组分”是用于表示轭合物的骨架,也即载体组分作为一种多种基团可以结合在上面的骨架。作为本方法制备轭合物方法中载体组分的水溶性聚合物可从宽范围类型的聚合物中选择,包括:天然和合成的多聚糖及其衍生物,比如葡聚糖和葡聚糖衍生物,淀粉与淀粉衍生物,纤维素衍生物,直链淀粉与果胶,以及某些天然胶及其衍生物,比如阿拉伯胶,藻酸盐;具有适宜的反应官能团的均聚氨基酸比如聚赖氨酸,聚组氨酸,或聚鸟氨酸;天然或合成的多肽和蛋白质比如牛血清白蛋白(BSA)和其它哺乳动物白蛋白;以及具有亲核官能团的合成聚合物,比如聚乙烯醇、聚丙烯醇、聚乙二醇和取代聚丙烯酸酯。

[0047] 用于本发明目的特别适合的聚合物为多聚糖及其衍生物,比如:葡聚糖,羧甲基葡聚糖,羟乙基和羟基淀粉,糖原,琼胶糖衍生物,以及羟乙基和羟基纤维素。从本文实施例中可以明显地看出,特别地,葡聚糖被证明是与本发明相关的非常合适的聚合物。

[0048] 轭合物,尤其对于许多轭合物的免疫化学应用来说,没有或者基本没有净电荷较为理想,因为此种情况下存在净正电荷或负电荷可能尤其导致轭合物与不需要的底物和/或其它物质发生不期望的非特异性结合。许多情况下,除非引入带电物质,这种条件通常仅需确保聚合体的载体组分本身不带净电荷即可实现。因此,用于本发明方法的合适聚合体载体组分是:处于单体状态,基本线型和 pH 在 4~10 之间基本不带电,后者的 pH 间隔为与大多数免疫化学过程、杂化过程及轭合物的其它应用实际相关的区间。符合此标准的多种聚合物中,比如有众多的多聚糖和多糖衍生物,例如葡聚糖、羟乙基和羟丙基纤维素。

[0049] 根据轭合物的应用场合,本轭合物可能基于一分子量范围的聚合物载体。作为本发明一种实施方案,聚合物载体的峰值分子量可处于 40000~40000000 之间(水溶性聚合物载体与连接剂如 DVS(二乙烯基砜)或 EPCH(表氯醇)反应之前,或使得到的水溶性中间体前体与间隔剂组分或信号组分反应最终形成交联轭合物或交联共轭复合物之前)。非常理想的峰值分子量是处于 100,000~10,000,000 之间,比如 500,000~8,000,000,或者 500,000~4,000,000。比如,在 500,000~2,000,000 之间。尤其对于葡聚糖作为聚合物载体来说,特别理想的峰值分子量是大约 500,000,大约 1,000,000,大约 1,500,000,大约 2,000,000,2,500,000,大约 3,000,000,大约 3,500,000 以及大约 4,000,000。

[0050] 优选地,分子量范围在 20,000 ~ 2,000,000 的葡聚糖适合作为起始载体组分。最优选地,优选而不仅限于 20,000Da 的葡聚糖适合于采用抗生蛋白链菌素作为基本或次要目标的轭合物和 / 或复合物。进一步,优选而不局限于 500,000Da 的葡聚糖适合于采用某些染料,酶和某些特异性结合分子作为基本或次要目标的轭合物和 / 或复合物。更进一步,优选而不局限于 2,000,000Da 的葡聚糖适合于采用某些其它染料。作为多种实施方案,载体可以为任一合适的载体分子,比如葡聚糖,淀粉,糖原,琼胶糖,细胞膜质,天然胶或者它们的混合物。

[0051] 在本说明书和权利要求书中使用的与载体组分相关的术语“峰值分子量”指最大数量分子的分子量,即在分子量分布中,在所给的聚合物样品或批次中最多数分子所具有的分子量。由于获得或制备非常窄分子量分布的聚合物片断是非常困难的,因而通常用这种方式表征众多类型的聚合物。鉴于有众多的商业可获取的载体可以用于本发明上下文中,比如葡聚糖,其生产者或销售者会提供可靠的峰值分子量数据(比如由凝胶—渗透色谱法确定),这会为选择合适的聚合物载体组分提供依据。应该在此提醒,本说明书和权利要求中引述的峰值分子量是指述及的聚合物单体峰值分子量,并不考虑可能形成的交联聚合物单元,如在制备轭合物的方法中两个或者多个聚合物分子经与连接组分比如 DVS 或者 EPCH 反应而交联得到的产物;平均起来,该交联单元会具有比形成它们的聚合物单体更高的分子量。

[0052] 连接组分

[0053] 在上下文中,术语“连接剂”或者“连接组分”包括可在其它特别是较大分子间建立共价键结合的双官能团分子。适用于本发明方法中的连接组分举例如具有双官能团反应活性的分子,比如戊二醛,二酰亚胺, N, N' - 间苯撑双马来酰亚胺, N- 琥珀酰亚胺 3—(2—吡啶) 丙酸酯,对苯醌,双环氧乙烷,二乙烯基砜 (DVS) 和环氧衍生物,比如通式 I 的环氧化物:

[0054] 其中 R_1 为氢或 C_{1-4} 的烷基, n 为范围 1—4 的整数,也即 1, 2, 3 或者 4, 以及字母 X 是离去基团比如甲苯磺酰基, 甲磺酰基, 或者卤素比如氟, 氯, 溴, 或者碘。上下文中的术语“ C_{1-4} 的烷基”表示具有 1—4 个碳原子的直链或支链饱和烃基, 比如甲基, 乙基, 正丁基, 异丙基, 异丁基等等。从本文提供的实施例可以看出, 非常具有应用前景的环氧衍生的连接组分为表氯醇 (EPCH), 即在具有通式 I 的化合物中, R_1 为氢, n 为 1, 离去基团 X 为氯。

[0055] 连接组分应该稳定存在于水相环境中。相应地, 连接组分 EPCH 与连接组分 DVS 共同组成一种本发明方法中非常有用的连接组分。

[0056] 间隔剂

[0057] 间隔剂组分经与连接组分反应, 共价结合到水溶性中间体前体上, 从而形成第二水溶性中间体前体。正如上面指明的, “间隔剂组分”经连接组分共价结合到载体组分上。从而, 当用于本发明的上下文时, 术语“间隔剂组分”是指蛋白质或者多肽, 其具有许多用于与信号组分共价结合的可用位置, 比如染料 (见下页)。间隔剂组分在本文中的水溶性轭合物和任一制备轭合物的方法中均有效, 虽然轭合物无需间隔剂组分也照样可行。

[0058] 引入间隔剂组分的目的, 特别是对于具有许多用于与信号组分共价结合位置的间隔剂组分来说, 是由于本方法提供了一种在轭合物上结合更多数量信号组分的方式 (即水溶性中间性轭合物上信号组分的加载量, 见前), 从而提高了检测时轭合物的灵敏度, 如本

文描述的免疫化学测定和侧向横流装置（见下页）。应该可以理解，作为一种实施方案，信号组分（比如某染料）与连接组分直接结合（不经过间隔剂组分）意味着（至少原则上来说）只有一个指示分子结合到每个轭合物上的连接组分分子上。

[0059] 作为制备第二水溶性前体的几个实施方案，每摩尔起始葡聚糖的间隔剂组分摩尔用量（间隔剂组分的加载量）范围为 1 到 500，优选地 2 到 100，最优选地 5 到 75。同样，第二水溶性中间体也可采用加载在每摩尔载体上的间隔剂组分数量（摩尔数）来表征。

[0060] 如前所述，水溶性中间体中连接组分的活性基团中只有一小部分与间隔剂组分反应。取决于间隔剂组分和连接组分，在间隔剂组分反应后，连接组分约 1—99% 的未反应活性基团，或者 20—99%，特别地 30—99% 比如 40—99%，以及更特别地 50—99% 仍然没有参与反应。这就是说，作为一种实施方案，在某种情况下，1—49% 的未反应连接部分与间隔剂组分反应。

[0061] 间隔剂组分可以为蛋白质，比如牛血清白蛋白（BSA），蛋清蛋白，球蛋白等等，或多肽如同聚多肽，例如聚赖氨酸，聚组氨酸，或聚鸟氨酸等。但是，间隔剂组分的选择要取决于使用的信号组分（如实际应用特定轭合物中的染料）和连接组分。

[0062] 间隔剂组分的分子量，如蛋白质，可为至少 2,500，或至少 5,000，或至少 10,000，或处于 10,000—2,000,000 之间，比如处于 20,000—500,000 之间。引入间隔剂组分的一个主要作用在于增加用于引入信号组分数量的可用位置，与信号组分结合的可用官能团数量优选地为每摩尔间隔剂组分至少为 5，比如 10—1,000，特别优选地为 10—500。

[0063] 可选择地，间隔剂组分也可多聚糖或多核苷酸。在制备水溶性中间体轭合物前，通常需要对这些聚合物进行化学修饰。

[0064] 鉴于间隔剂组分的耦合特性，（与连接组分结合形成第二水溶性中间体前体，或者后来与信号组分结合形成水溶性中间体轭合物，见下页），间隔剂组分上具有一活性基团如亲核基团。合适的间隔剂组分将会是那些具有亲核官能团的化合物，比如 $-O^-$ （如脱质子酚羟基，比如多肽或蛋白质的酪氨酸残基中的脱质子芳香族羟基基团）， $-S^-$ （如芳环或脂肪族的脱质子巯基，比如多肽或者蛋白质的半胱氨酸残基中的脱质子巯基）， $-OH$ （如多肽或者蛋白质的某些氨基酸残基中的脂肪族羟基，比如丝氨酸或者苏氨酸残基）， $-SH$ （如多肽或者蛋白质的半胱氨酸残基中的巯基），伯胺基（如多肽或者蛋白质的赖氨酸或者鸟氨酸残基中的）或仲胺基（如多肽或者蛋白质的组氨酸残基中的）。本领域技术人员会明白，上述的官能团是否处于质子化状态或脱质子化状态，将取决于选定的反应条件，比如反应混合物的 pH。

[0065] 作为一种实施方案，水溶性轭合物的连接组分只有一小部分未反应活性基团与间隔剂组分反应。也就是说，第二水溶性中间体仍然具有相当数量的未反应活性基团。

[0066] 得到的第二水溶性中间体前体可采用本方法中已论述的相关提纯步骤进行提纯，即与水溶性中间体前体相关的提纯步骤。从本文提供的实施例可以看出，一种用于提纯得到的第二水溶性中间体前体的合适方法为凝胶—过滤法。

[0067] 信号组分

[0068] 作为一些实施方案，信号组分经与间隔剂组分反应，共价结合到第二水溶性中间体前体上，从而形成了一种水溶性中间体轭合物。

[0069] 本文应用的术语“信号组分”是指直接可以物理可检的组分或者作为这些物理可

检组分的前体,或者产生这些物理可检组分的组分。作为一种实施方案,信号组分作为标签或标记起作用,其可以随时通过现有技术中的物理方法来检测,比如通过光学方法,如分光光度测定法,荧光法,发光法,磷光法或其它如同在“论述过的方法。信号组分也可通过肉眼观察发现。可选择地,如上所述,信号组分可为物理可检组分的前体。该类前体的典型示例为酶,当其作用于合适的底物时,可以产生有色物质,这样就可以通过上面提到的一种或多种方法检测到。

[0070] 信号组分可从下述物质中选择,比如染料;荧光性、冷光的,磷光的及其它发光物质;金属螯合物,包括亚氨基二乙酸,乙二胺四乙酸(EDTA),二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)及去铁胺B;用放射同位素标记的物质;用重原子标记的物质;及它们的混合物。

[0071] 为给出更进一步的示例,荧光物质可从如荧光素(也称为荧光素异硫氰酸酯, FITC),氨基荧光素,1-萘酚,2-萘酚,四溴荧光素,四碘荧光素,桑色素, o-苯二胺,若丹明和8-苯胺-1-萘磺酸中选择。相关的放射性同位素可从如氢的同位素(即氘,³H),碳(如¹⁴C),磷(如³²P),硫(如³⁵S),碘(如¹³¹I),铋(如²¹²Bi),钇(如⁹⁰Y),锝(如^{99m}Tc),钯(如¹⁰⁹Pd)和钐(如¹⁵³Sm)。相关的重原子可从如锰、铁、钴、镍、铜、锌、镓、铟、银、金、汞、碘、铋、钷、镧,铈,铀和钷中选择。金(Au)是在多种情况下特别有效的重原子。[0065]作为一种实施方案,信号组分可为非粒子标记剂,如非粒子染料。在本发明上下文中术语“染料”是指可采用分光光度分析检测的染料分子或其衍生物。按照本发明,用于与本方法制备的轭合物结合的染料包括那些可视染料,磷光染料,荧光染料,激光染料,红外线染料和镧系元素螯合物的衍生物。特别适用的染料为可视染料,包括可溶性可视染料,如颜料,还原染料,硫化染料,媒染料,无色瓮染料以及如荧光素,若丹明及其衍生物(如硫代若丹明,若丹明氢化物和若丹明酰肼),还有恶嗪染料,花青染料和偶氮染料。合适染料的具体示例如德克萨斯红,刚果红,胎盘蓝,丽丝胺蓝,雷马素黑,雷马素亮红,若丹明B异硫氰酸酯, Cy5-0su单官能团活性染料,活性橙16, Uniblue A等。非粒子染料同样在本发明中有效。“非粒子”标记剂是标记剂检测不同于固体检测的基本原理所在,无论该固体为信号组分(如乳液或其它粒子)或无论产生了固定沉淀物,那就是检测的基本原理。

[0072] 上述的用于本发明中作为信号组分的染料为现有技术所公知,并且本领域技术人员会为了实现本发明目的而知道使用其它染料作为信号组分。其它可作为信号组分使用的染料如在““纺织品纤维染色和化学工艺学”,特罗特曼,第34版, C.Griffin公司,伦敦”和“合成染料化学”, Vankataramon (Ed), 学术出版社,纽约,1979”中提及的染料,上述文献的披露内容通过引用的方式并入本文中。

[0073] 信号组分可与蛋白质如BSA反应,以及可按下文描述的可选择实施方案,和/或能与连接组分未反应的活性基团反应。进一步,信号组分在与间隔剂组分反应或结合后,不应该对水溶性中间体轭合物带来不需要的属性,即信号组分不应该促进任何不可控制的非特异性结合,也不应该抑制靶向组分(如抗体)与轭合物结合的活性。进一步,信号组分不应该明显降低轭合物的水溶解度。

[0074] 作为一种实施方案,在形成水溶性中间体轭合物的过程中,第二水溶性中间体的连接组分只有一小部分活性基团与信号组分反应。根据该信号组分,间隔剂组分和连接组分,在与该信号组分反应后,相对于第二水溶性中间体前体中存在的未反应的活性连接组分的数量,该连接组分的未反应活性基团大约有50—100%,比如60—100%,特别是70—

100%如范围为 80—100%，尤其是 90—100% 仍然未反应（注：与第二水溶性中间体前体相比）。

[0075] 取决于决定的染料，由本发明方法制得的轭合物在可见区域、UV 区和近红外区域反射，散射或者放射出光子。采用可视染料如若丹明将使本发明轭合物在可见光区域（如蓝色）内反射或散射光子，从而将补充波长的颜色（如红色）传递给观测者。可选择地，使用荧光染料可导致（被辐射时）本发明轭合物由于电子返回基态而发射出某一特定波长的光子。“可视染料”是指在可见光区域内可反射或散射光线的染料。

[0076] 作为一种实施方案，信号组分为一染料供体 / 受体对。染料供体 / 受体对为化学领域所熟知。在能量共振转移中，供体分子吸收光子并开始将能量转移给受体。受体吸收传递的能量并发射出光子。供体染料和受体染料激活后会进行荧光共振能量转移。一些合适的供体 / 受体对为 6- 羧基荧光素 /6- 羧基-X- 若丹明 (FAM—ROX)，3-(epsilon- 羧基戊基-3"- 乙基-5,5'- 二甲基氧杂羰花青 /6- 羧基-X- 若丹明 (CYA—ROX)，以及 4,4- 二氟-4-bora-3alpha,4alpha-diaza-S-indacene-3- 丙酸 (BODIPY) 衍生物，5,7- 二甲基-BODIPY/5-(4- 苯基-1,3- 丁二烯基)BODIPY (BODIPY503/512-BODIPY581/591)。这些供体 / 受体对通过实施例予以提供，本领域普通技术人员能够识别更多的能实现荧光共振能量转移的供体 / 受体染料对，并能适于在本发明中使用。FRET 为荧光共振能量转移，是指将受激态能量由供体转移给受体。

[0077] 作为一种实施方案，间隔剂经连接组分与载体共价结合，信号组分是共价结合到间隔剂组分上的染料（如一对供体 / 受体），配体或者配体靶向组分共价结合到载体组分上。载体为葡聚糖，连接组分为二乙烯基砒，间隔剂为牛血清白蛋白。

[0078] 本方法同样适于制备水溶性轭合物，轭合物中信号组分与连接组分共价结合，随后结合到载体组分上，即在轭合物中没有结合蛋白质或多肽（见下页）。更详细的细节可参见美国专利 US6,627,460，特别在 12 栏。

[0079] 作为另一种实施方案，信号组分为电化信号组分，其可通过连接组分共价结合到载体组分上。作为一种实施方案，轭合物中不含有间隔剂组分，但轭合物含有载体分子，连接组分，以及与连接组分结合的电化信号组分。电化信号组分可为与底物反应产生电化可检物质的酶。电化可检物质可由底物转换而来，或者反应的副产品，如反应介质。可用于本发明中的酶实例包括碱性磷酸酶，辣根过氧化酶，葡萄糖 6- 磷酸脱氢酶，乙酰胆碱酯酶，半乳糖苷酶，葡萄糖氧化酶，过氧化氢酶，和胆碱氧化酶。也可以使用多种酶的组合物，其中各组分酶独立工作，或者双酶或多酶体系。双酶体系的一种实例为 NADH 氧化酶和乙醇脱氢酶。另一种可在本发明中工作的双酶体系为酪氨酸酶和葡糖脱氢酶。双酶体系可采用氧传感器用于检测。当电化信号组分为酶（或多种酶的组合）时，它被称为电化信号酶。

[0080] 可用来产生电化信号的底物或反应介质包括任意用于选定酶、并且产生电化可检产物或物质的底物或反应介质。底物的实例包括 4- 氨基苯基磷酸盐，1- 萘基磷酸盐，葡萄糖-6- 磷酸盐，4- 羟萘基-左型磷酸盐，3- 吡啶磷酸盐，磷酸苯酯，5- 溴基-4- 氯代-3- 氮茛苈基磷酸酯，6-(N- 二茂铁甲酰氨基)-2,4- 二甲苯基磷酸盐，4- 乙酰氨基酚磷酸盐，3,3',5,5'- 四甲基联苯胺 (TMB)，对苯二酚，氧化还原 Os^{+2} - 基聚合物，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和葡萄糖-6- 磷酸盐，乙酰基硫代碘化胆碱，4- 氨基苯基-beta-D- 半乳糖苷 (PAPG)，葡萄糖和介质，以及胆碱。反应介质的实例包括铁氰化物，二聚环戊二烯铁，和二聚环戊二烯铁衍

生物。这些列出的项目仅提供作示例,因为许多其它底物和反应介质也同样可以使用。“反应介质”是不同于底物并应用在酶促反应中的物质。反应介质在酶促反应中可被转化为电化可检物质。

[0081] “电化可检物质”是一种可通过伏安法,电位测定法,或电导分析法的至少一种电分析技术检测出的物质。电化可检物质的实例包括 4-氨基苯酚,1-萘酚,葡萄糖,二羟萘,靛蓝,石炭酸,双氧水,6-(N-二茂铁胺)-2,4-二甲苯酚,4-乙酰氨基酚(TMB ox),苯醌,铁氰化物,氧化二聚环戊二烯铁和二聚环戊二烯铁衍生物, Os^{+3} , NADH, 硫代胆碱,4-氨基苯酚(PAP),葡萄糖酸内酯和还原介质,及甜菜碱。根据本发明的公开内容,本领域技术人员会明白许多其它酶,底物,和电化可检物质也可用于本发明中。

[0082] 伏安法是用于电化学分析或确定电极反应的动力学和原理的电化测试技术。在伏安法中,控制工作电极的电位(通常通过稳压器),测量流经电极的电流。电位测定法,属于电分析化学领域,电位在没有电流的情况下测量。测量的电位可能会用于确定所关心的分析定量,通常是被分析物溶液某些组分的浓度。电化学电池中的电位是自由能变化的结果,自由能变化这一化学现象会一直继续到平衡条件满足为止。电导分析法是溶液电导率的科学测量方法。

[0083] 待检配体或配体靶向组分

[0084] 术语“靶向组分”是指能与生物源物质的互补分子或互补结构部分进行结合或反应的分子,尤其是生物源分子。当靶向组分为待检配体靶向组分时,靶向组分与待检配体结合或反应。

[0085] 相关的待检配体靶向组分的实例为:单克隆和多克隆抗体,基因探针,天然和合成的低聚物多核苷酸,天然和合成的单、低聚和多糖,植物凝血素,抗生物素蛋白,抗生蛋白链菌素,生物素,生长因子,激素,受体分子,蛋白 A 和蛋白 G;以及它们的混合物。优选的实例包括抗人体绒毛膜促性腺素(anti hCG),促黄体生成素(LH),兔抗人 CRP,抗生蛋白链菌素,抗生物素蛋白,抗 HIV,抗丙肝病毒,抗衣原体,抗疱疹,抗促甲状腺激素,(anti TSH),抗利斯塔氏菌,抗沙门氏菌,抗-单核细胞增多症,抗-HBeAb,抗-HBsAb,和抗-H. pylori。

[0086] 待检配体

[0087] “配体”是指与与配体靶向组分结合的分子。用于本发明中的配体实例为抗原和半抗原,但可包括任一检测中所关心的配体。激素作为配体的示例为:激素(如雌激素,雌二醇,孕酮,人体绒毛膜促性腺素(hCG),黄体生成素,卵泡刺激素,皮质醇,T3,T4),氨基酸激素(如甲状腺素),缩氨酸和蛋白激素(如抗利尿激素,蛙皮素,胃泌激素,胰岛素)和滥用药物。其它配体包括心脏标志物如肌钙蛋白 I,肌钙蛋白 T,高灵敏度 C-反应蛋白(hsCRP),肌酸激酶同工酶,肌红蛋白,N 末端脑钠素原,B 型钠尿肽(BNP),心钠素(ANP),和髓过氧化物酶;肿瘤标志物如前列腺特异性抗原(PSA),癌胚抗原(CEA),和 alpha-血清甲种胎儿蛋白(AFP)。其它配体包括心脏标志物如肌钙蛋白 I,肌钙蛋白 T,高灵敏度 C-反应蛋白(hsCRP),肌酸激酶同工酶,肌红蛋白,N 末端脑钠素原,B 型钠尿肽(BNP),心钠素(ANP),和髓过氧化物酶;肿瘤标志物如前列腺特异性抗原(PSA),癌胚抗原(CEA),和 alpha-血清甲种胎儿蛋白(AFP)。滥用药物是指因非治疗原因而应用的药物(通常为达到瞬间改变的效果)。这些药物的滥用会导致生理和心理的损伤,会产生依赖和上瘾(随同一些物质)。滥用药物的实例包括可卡因,安非他明(如 black beauties,white bennies,(dexies,beans),

脱氧麻黄碱 (crank, meth, crystal, speed)), 巴比妥酸盐, 麦角酰二乙胺 (LSD), 抑制剂, 镇静剂 (如选择性血清素再摄取抑制剂), 苯环利定 (PCP), 四氢大麻酚 (THC), 和鸦片剂 (如咖啡, 鸦片, 可待因, 和吗啡)。

[0088] 本发明的方法和组分在许多种检测形式中有效。例如, 一些形式会采用与样品中可能存在的配体相适应的抗体。在这些形式中, 试剂可移动式地位于测试条上, 样品施加在采样区。然后, 样品经过试剂区, 在其中试剂与样品中可能存在的配体结合, 然后到达检测区, 检测区中施加有靶向组分, 与可能存在的配体、或者结合到配体上的靶向组分、或者甚至与轭合物的其它组分结合。“选择性结合”是指靶向组分可以将所关心的配体与样品中可能存在的其它配体区分, 从而检测可以如所预期地进行。选择性结合的靶向组分仍可与一个以上的配体结合。“特异性结合”是指靶向组分与其目标配体结合, 而不与样品中可能存在的其它配体结合。

[0089] 在另一种检测形式中, 可以使用具有对所关心配体较低选择性的两种抗体, 从而不但可以与所关心的配体结合, 还与样品中存在的第二分子结合。在这种形式中, 应用一种结合到第二分子的结合位置上的清除剂抗体, 从而将这些结合部位阻聚, 使得两个抗体仅与所关心的配体结合。在其它形式中, 可以应用一种以上的清除剂抗体和二种以上的抗体。关于本发明的披露内容, 本领域普通技术人员会设计出其它的检测形式, 这同样符合本发明的预期。本文列出的特定形式作为实施例提供。

[0090] 本发明还可以直接的三明治检测形式进行。在这种形式下, 样品被施加在采样区, 再流经含有标记剂 (如葡聚糖-牛血清白蛋白-抗-人绒毛膜促性腺激素, 抗体-若丹明) 的标记区。如果待检配体存在, 标记剂与配体结合。然后样品继续流向检测区 (含有附加在检测条上的抗体, 如抗人绒毛膜促性腺激素)。在检测区, 标记后的配体结合到检测区上, 通过观察检测区即会得到检测结果。

[0091] 在另一个检测形式 (有时称为“间接”形式) 中, 样品施加于采样区, 并流经试剂区, 试剂区含有与待检配体相适应的靶向组分, 靶向组分可移动地存在于试剂区 (如生物素-人绒毛膜促性腺激素抗体) 内。然后样品继续流经标记区, 标记区含有本发明的轭合物, 轭合物与配体 (如 beta-人绒毛膜促性腺激素) 或结合到配体上的靶向组分特异性地结合。从而, 信号组分结合到待检配体上。然后样品继续流向检测区, 检测区具有与样品结合的靶向组分 (如抗生蛋白链菌素-免疫球蛋白 G 或者抗生蛋白链菌素-牛血清白蛋白)。通过肉眼观察检测区显示出配体的存在与否, 或存在的含量。

[0092] 根据本发明的披露内容, 本领域技术人员会实现其它形式来应用本发明, 这些也符合本发明的预期。例如, 本发明可以按下述参考物的形式进行应用: 。以下实施例用于进一步地说明本发明。

[0093] 酶电化免疫测定

[0094] 在酶电化免疫测定中 (ECI), 被分析法或第二抗体经酶标记, 酶用来催化产生电化可检产物, 产物形成的速率用来测定被分析物的含量。从而, 通过化学放大, 酶 ECI 利用抗体实现特异性, 利用酶标记实现灵敏度。

[0095] 大多数免疫测定的电化检测技术是基于电分析的分支—伏安法, 该方法包括将一电位施加到一电化学电池, 然后测量由于电极氧化或还原而导致的电流大小。在多种伏安法技术中, 电流分析法一直最适合于电化免疫测定。在电流分析法中, 电极被控制在一固定

电位,测量在电极表面由于氧化还原作用而产生的电流。电流分析法当应用在液力电化检测器时会在纳摩尔水平产生检测局限。因为检测可在非常小的样品体积(小于 $10\ \mu\text{L}$)内进行,样品中的氧化还原活性物质的绝对量可能低到 10^{-14} 或更少。

[0096] 在电流分析法中,用于检测的最佳电极电位通过获得电流响应来选择,电流响应由被分析物因外加电位的作用而产生。溶液中的电活化粒种的电流响应通常有三种不同的行为区间。一,电位区间,其中混合物是非电活性的,电流很微小。二,上升的电流响应区,由能斯特方程确定。三,有限的电流稳定水平,其独立于电位。用于检测的最佳电位是沿着极限电流稳定水平,此时被分析物在向电极质量传递的极限程度下被电解,外加电位的稍许变化不会对电流测量产生太大影响。在极限稳定水平的电流响应直接与被分析物浓度成正比,通过公式得出 $I = nFADC^0/d$,其中 I 为电流, n 为氧化还原反应中参与的电子数, F 为法拉第常数, A 为电极表面积, D 为扩散系数, C^0 为被分析物主体浓度,和 d 为扩散层的厚度。

[0097] 酶-底物-产物 (E-S-P) 体系

[0098] 在酶电化免疫测定中 E-S-P 体系的选择是非常重要的因素。重要的是酶促反应应该迅速,以及酶底物 S 在某些电位范围内呈反应惰性,而产物 P 呈反应活性。优选地,产物 P 在低电位下呈电活性,从而随上升的电位而增加的背景噪音仍然处于低水平。通常使用的酶标记为碱性磷酸酶 (ALP), 4-氨基苯基磷酸盐 (PAPP) 作为底物。其酶化反应产品 4-氨基苯酚 (PAP) 具有低氧化电位(如 0.18Vvs Ag/AgCl , 玻碳电极, pH7 缓冲液),从而不会引起电极中毒。更为低廉和稳定的碱性磷酸酶底物 1-萘基磷酸盐同样也被使用过。E-S 对被证明特别适用于基于丝网印刷电极的免疫传感器。应用于 ECI 的其它酶也在本文中作了描述。

[0099] 虽然在酶免疫测定中最为常用单一的 E-S 对,但也可使用双酶或多酶体系。一种检测方案是采用酪氨酸酶氧化苯酚先成儿茶酚,再到 O-苯醌。O-苯醌变成葡萄糖酶脱氢反应的介质,再次转化为儿茶酚。碱性磷酸酶 (ALP) 的定量计算采用测量苯酚氧化过程中 O_2 的损失间接得到。

[0100] 丝网印刷电极 (SPEs),采用薄膜技术制造,制造时采用基于石墨粉的墨水将电极印刷在聚苯乙烯表面上,主要通过电极表面对抗体的被动吸附使电极适合于免疫传感器。基于丝网印刷电极的免疫传感器可被用于多种本文描述的检测应用中。

[0101] 本发明中的组分及方法可被用于任何恰当的检测方式。然而,二种形式最适用于电化检测试剂。一种形式中,磁珠采用一种待检被分析物的特异性结合分子(如抗体)处理,然后置于容器中。待分析的样品与磁珠接触。如果样品中被分析物存在,它将会被磁珠上的特异性结合分子结合上。加入本发明中具有电化信号组分的组分,该混合物反应。经适当冲洗,与电化信号组分配对的底物与磁珠接触。混合物可在极小体积的毛细管中进行反应。极小体积会减少酶产物的稀释,因为电化信号与浓度线性成正比,从而提供了一个增强电化信号。绿过适当的搅拌和冲洗,产物溶液被置于电极上,样品中被分析物的存在与否及含量就被确定出来。

[0102] 作为另一种实施方案,与被分析物对应的特异性结合分子被吸附到电极上。在该类型检测中,样品溶液与电极接触。如果样品中存在被分析物,它将会被特异性结合分子结合上。使本发明的组分与电极接触,形成一种被分析物抗体、被分析物、以及本发明轭合物的复合物。经适当冲洗,与电化信号组分配对的底物与电极接触。反应后,采用如伏安法,

电位测定法,或者电导分析法等方法判断并确定样品中被分析物的存在与否及含量。

[0103] “特异性结合分子”是指可经化学或物理途径与样品中存在的可检物质进行选择性的分子。“选择性结合”是指分子与期望的目标位置优先结合,或者与目标位置间较其它分子有较大的亲和力。作为一种实施方案,特异性结合分子为抗体或抗体片断。“抗体”指免疫球蛋白,无论是天然或者部分或者全部合成的。该术语同样包括保持特异性结合性能的它们的衍生物。该术语同样涵盖了任意含有结合功能区的蛋白质,该结合功能区与免疫球蛋白的结合功能区相同或者大体上相同。这些蛋白质可能来源于天然原料,或者部分,或者全部合成制备。抗体可为单克隆的或多克隆,或者为免疫球蛋白类(或类的组合)的成员,包括人类的任一种:免疫球蛋白G,免疫球蛋白M,免疫球蛋白A,免疫球蛋白D,免疫球蛋白G,和免疫球蛋白E。“抗体片断”是指少于全长的抗体衍生物。抗体片断至少可以维持全长抗体的特异性结合性能的一个重要部分。抗体片断的实例包括而不局限于: Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv 双链抗体,和 Fd 片断。“衍生物”是指与母体化合物具有同样基础结构的任意分子。

[0104] 抗体片断可采用任一方法制备。例如,抗体片断可由完整抗体经酶促或化学方法产生,或者其通过对部分抗体序列进行基因编码后重组得到。可选择地,抗体片断可全部或部分合成得到。抗体片断可以选择地为单链抗体片断。可选择地,片断可以包括连接在一起的多链,比如经二硫键连接。片断也可选择的为一多分子复合物。功能抗体片断一般含有至少 50 个氨基酸,优选地含有至少 200 个氨基酸。

[0105] 单链 Fvs(scFvs) 为重组体抗体片断,只含有通过多肽连接剂而相互共价连接的可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)。V_L或V_H中的任一可为NH₂封端的结构域。多肽连接剂可为可变的长度和组分,只要使二个可变结构域连接时没有严重的位阻影响即可。通常地,连接剂主要由甘氨酸和丝氨酸残基伸展开来,上面分布有一些谷氨酸或赖氨酸残基用于增加溶解度。“双链抗体”是二聚 scFvs。二聚体通常比大多数 scFvs 具有更短的缩氨酸连接组分,它们更易于以二聚物缔合。

[0106] “Fv”片断包括由非共价键作用而结合在一起的V_H和V_L结构域。术语“dsFv”在本文中用来指代采用工程化分子间二硫键用于稳定V_H-V_L对的Fv。F(ab')₂片断是基本等价于那些通过胃蛋白酶在pH4.0-4.5下浸提得到的免疫球蛋白(通常为免疫球蛋白G)的抗体片断。该片断可通过重组制备。Fab'片断是一种基本上等价于通过对二硫桥或多桥进行还原得到的抗体,这些二硫桥或多桥将位于F(ab')₂片断的两个重链碎片连接在一起。Fab'片断可经过重组制备。Fab片断是一种基本上等价于通过木瓜蛋白酶浸提免疫球蛋白(典型地如免疫球蛋白G)而获得的抗体片断。Fab片断可经过重组制备。Fab片断的重链部分为Fd碎片。

[0107] 活性抗体片断优选含有抗体的Fv结构域。活性抗体片断可由现有技术中的方法制备,如对含有抗体的样品进行蛋白水解浸提。除非另有说明,抗体可为多克隆,或单克隆。抗体的制备可以是粗制的,如全血,血清或者血浆,或者部分提纯,比如由分子量提纯或硫酸铵沉淀法进行粗分离,或者充分提纯,比如对一类抗体,子类抗体进行亲和色谱法,或者与特定抗原或抗原决定基结合。用于上述提纯的方法为现有技术所公知,比如“Harlow and Lane,抗体,实验室手册,Cold Spring Harbor Press(1988)”公开的技术。

[0108] 实施例 1——水溶性轭合物的制备

[0109] 本实施例的制备工艺包括四个步骤：采用二乙烯基砒活化葡聚糖，将牛血清白蛋白结合到活化的葡聚糖上，将葡聚糖-牛血清白蛋白的牛血清白蛋白部分附上若丹明染料；将抗体与葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明骨架交联。

[0110] 活化葡聚糖：

[0111] 制备下述溶液进行活化：25mg/ml 葡聚糖 (500,000MW) 的蒸馏水溶液，0.5M 磷酸钾 pH11.4，以及 25mg/ml 硼氢化钠的蒸馏水溶液（使用前制备）

[0112] 活化条件为：10mg/ml 最终葡聚糖浓度，0.25M 磷酸钾缓冲液，0.25mg/ml 最终硼氢化钠，以及 5% 二乙烯基砒。整个操作在通风橱中进行。葡聚糖，蒸馏水和磷酸钾开始混合，搅拌 10-15 分钟。加入硼氢化钠，随即再加入二乙烯基砒。从加入第一滴二乙烯基砒开始计时，二乙烯基砒在 2 分钟内滴加完毕。从加入第一滴二乙烯基砒开始计时，全部二乙烯基砒二乙烯基砒二乙烯基砒滴加完后，溶液进行搅拌 30-35 分钟。经过 30-35 分钟培育后，用 25% HCl 调整 pH 到 7，活化停止。活化后的葡聚糖采用蒸馏水渗析，四天内每天换二次水。收集渗析液，加入氯丁醇至最终浓度为 0.01%。

[0113] 将牛血清白蛋白结合到活化葡聚糖上：

[0114] 制备用于共轭作用的溶液为：50mg/ml 牛血清白蛋白（牛血清白蛋白）0.1M 氯化钠溶液，0.4M 磷酸钾 pH10.4，以及 0.1M 氯化钠。

[0115] 那共轭作用的条件为：活化葡聚糖与牛血清白蛋白 1:25 的摩尔比，0.010M K_2HPO_4 ，pH10.4，30°C，以及 22 小时。活化葡聚糖，牛血清白蛋白溶液和磷酸钾缓冲液共同混合在一起。采用 1M HCl 将混合物 pH 调整至 10.4。混合物置于 30°C 恒温箱内 22 小时。经过 22 小时培育后，混合物经 1MHCl 将 pH 调低至 6.5。然后，混合物采用 S300 尺寸排阻柱进行提纯，使用 0.1M 氯化钠作为运行缓冲液。收集第一个峰用于下一步骤。将葡聚糖-牛血清白蛋白的牛血清白蛋白部分附上若丹明染料：

[0116] 制备下述溶液：1M 碳酸氢钠 pH8.6，10mg/ml 异硫氰酸若丹明的二甲基亚砒溶液，0.05M K_2HPO_4 pH7.2。

[0117] 共轭结合的条件为：100-200ug 染料/mg 牛血清白蛋白，0.1M 碳酸氢钠，pH8.0，30°C，1 小时。葡聚糖-牛血清白蛋白，若丹明溶液，和碳酸氢钠缓冲液混合在一起。用 1M HCl 调整 pH 至 8.0。混合物置于 30°C 恒温箱内培育 1 小时。培育后，混合物采用 10

[0118] niM K_2HPO_4 pH7.2 广泛渗析（4 天内每天换 2 次）。收集渗析液，然后加入 Bronidox（5-溴-5-硝基-1,3-二恶烷-）到最终浓度 0.05%。

[0119] 抗体与葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明的交联

[0120] 交联需要的组分为：抗体溶液，3.5M K_2HPO_4 pH9-10，葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明，0.1M 半胱氨酸的蒸馏水溶液（仅在使用前制备），蒸馏水和 50mM Tris pH7.2/0.1M NaCl/0.02% 叠氮化钠。[00105] 交联条件为：葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明与抗体的摩尔比为 1:25-1:5，30°C，18-22 小时，以及 2.5M K_2HPO_4 摩尔浓度盐溶液。

[0121] 实施例 2-- 抗体与葡聚糖牛血清白蛋白-若丹明交联后进行超声波处理

[0122] 本实施例阐述了本方法中进行超声波处理的应用。交联条件为：葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明与抗体以 1:25 摩尔比，30°C，18-22 小时，2.5M K_2HPO_4 盐摩尔浓度。葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明采用 4000g 离心分离以去除所有粒子。抗体溶液、葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明和 K_2HPO_4 混合在一起。培育后，加入 1/10 总体积的半胱氨酸。加入蒸

馏水将盐浓度从 2.5M 调节至 1.75M。然后,混合物采用 9,333g 离心分离将水溶性轭合物形成颗粒。颗粒在蒸馏水中再次悬浮,蒸馏水体积为用于交联的葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明的原始体积的一半。再次悬浮的颗粒进行超声波处理(功率设为 700 瓦,每周期 5 秒,10 个周期,每周期之间暂停 10 秒),然后采用 327g 离心分离 5 分钟。上层清液在 S300 凝胶过滤柱进行提纯,采用 50mM Tris/0.1M 氯化钠/0.02% 叠氮化钠作为运行缓冲液。收集第一峰,并用作标记轭合物。

[0123] 为制备标记板,每次检测使用 0D1.527u1。结果显示,当没有配体存在时呈阴性结果,当存在 25mIU/ml 和 50mIU/ml 配体时呈阳性结果。

[0124] 实施例 3-- 使用洗涤程序而免去凝胶过滤柱

[0125] 以下过程说明,通过洗涤沉淀后的颗粒不再需要由凝胶过滤或其它步骤对水溶性轭合物进行提纯。

[0126] 制备下述包括抗体和“葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明”的溶液:0.00258umole 抗体和 0.00535umole 葡聚糖(如同“葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明”一样)与 3.5M pH11.5 的磷酸钾缓冲液混合,形成最终浓度:2.5M 磷酸钾缓冲液,pH11.0,溶液中“葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明”与抗体的摩尔比为 1/2.5。[00110] 混合后,观察到溶液中出现了沉淀。在 30°C 下持续耦合 3 小时。耦合后,加入半胱氨酸直至最终浓度为 0.01M。溶液中的磷酸盐缓冲液浓度通过在溶液中加入去离子水调整至 1.75M。在 10,000rpm 下溶液旋转 5 分钟,用移液管小心吸出透明和几乎无色的上层清液。

[0127] 含有自由抗体和耦合抗体的沉淀物(颗粒)溶解在 3ml 去离子水中。重溶沉淀物在 12000rpm 下旋转 10 分钟;去除含有自由抗体的上层清液。重复上述步骤。然后,沉淀物(颗粒)溶解在 1ml 去离子水中。检测“葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明-抗体”轭合物的 OD₅₅₈,其大于 20。结果总结如下:

[0128] 结果:OD_{558/280} = 41/39,使用 OD = 20 制作标记板,体积 = 120u1

[0129]

	1IUhCG/ml	50mIUhCG/ml	25mIUhCG/ml	尿)(-)	去离子水
样品 -1	+++	++	+	-	-
样品 -2	+++	++	+	-	-

[0130] 实施例 4-- 采用非特异性蛋白质制备水溶性轭合物

[0131] 本实施例阐述了用非特异性蛋白质来制备水溶性轭合物,此处采用牛血清白蛋白和免疫球蛋白。方法:

[0132] (一) 依次加入下述物质:

[0133] Medix 生产的单克隆抗 beta 人绒毛膜促性腺激素, clone500810mg 葡聚糖-牛血清白蛋白-染料 6ml (Dextran conc,00043um/ml), (葡聚糖:抗体 = 1:25) 35M K₂HPO₄pH9.5, 20.2ml (最终 2.5M)

[0134] 30C, 0/N

[0135] 01M 半胱氨酸, 2ml

[0136] 去离子水 6.67ml

[0137] 8000rpm, 10 分钟

[0138] S-300 提纯

[0139] 将提纯的抗体轭合物施加在标记板上, OD558 = 0.686, 每次检测用 59u1 检测结

果：

[0140] 采用老鼠免疫球蛋白 G 不采用老鼠免疫球蛋白 G

[0141] 阴性尿 - -

[0142] hCG25mIU/ml + +

[0143] hCG25mIU/ml + +

[0144] 2) 在第二实验中,依次加入下述物质：

[0145]

	1	2	3	4	5	6	7	8
抗体 (Ab)	5mg	5mg	2mg	1mg				
BSA (牛血清白蛋白)	0	4.224 mg	6.8 mg	7.66 mg				
葡聚糖-牛血清白蛋白-染料	0.0128 um	0.0128 um	0.0128 um	0.0128 um				
葡聚糖: 抗体	1: 2.5	1: 2.5	1: 1	1: 0.5				
葡聚糖: BSA	1: 0	1: 5	1: 8	1: 9				
K ₂ HPO ₄	2.5M, PH=10							
温度	30°C							
时间	16 小时							
1000rpm, 10 分钟	部分溶解	溶解	溶解	溶解				
纯化	S-300							
	未完成	完成	完成	完成				

[0146] 将提纯的抗体复合物施加在标记板上, OD558 = 0686, 每次检测用 59u1, 检测结果如下：

[0147] 采用牛血清白蛋白 (1:5) 采用牛血清白蛋白 (1:8)

[0148] 阴性尿 - -

[0149] hCG25mIU/ml + +

[0150] hCG50mIU/ml + +

[0151] 实施例 5--- 采用二硫苏糖醇进行前处理制备水溶性复合物

[0152] 本实施例阐述了采用二硫苏糖醇对抗体 (靶向组分) 进行前处理以制备水溶性复合物。

[0153] 葡聚糖-牛血清白蛋白-若丹明, 葡聚糖浓度 0.00464uM/ml³, Ab: 单克隆抗-beta 人绒毛膜促性腺激素, clone5008, 4.8mg/ml。

[0154] 2. 方法

[0155]

	1	2	3a	3b	4
抗体 (Ab)	4mg	4mg	4mg	4mg	2mg
DTT1.5mg/100u1	17u1	34u1	80u1	80u1	0
RT	30'	1h15'	1h30'	1h30'	no

[0156] [0157]

PD10 纯化	用	用	用	用	用
葡萄糖 - 牛血清白蛋白 - 染料	1. 1123mL	1. 1123mL	1. 1123mL	1. 1123mL	1. 1123mL
葡萄糖 : 抗体	1 : 5	1 : 5	1 : 5	1 : 5	1 : 2.5
3. 5M K ₂ HPO ₄	7. 03mL (2. 5M)	6. 53Ml (约等于 2. 5M)	6. 52Ml 约等于 2. 3M)	5. 52Ml (2. 5M)	3. 8225Ml (2. 5M)
缓冲 PH	9	9	9	8. 5	9
30°C, 11. 5 小时	是的	是的	是的	是的	是的
1/10 总体积的半胱氨酸	是的	是的	是的	是的	是的
DI 水配置的盐离子浓度	1. 75M	1. 75M	1. 75M	1. 75M	1. 75M
10000rpm, 10 分钟	沉淀	沉淀	沉淀	沉淀	沉淀
DI 水	0. 6ml	0. 6ml	0. 6ml	0. 6ml	0. 6ml
3000rpm, 5 分钟	大部分沉淀	溶解	溶解	溶解	溶解
S-300 纯化	是的	是的	是的	是的	是的
标记板 ODI. 5/27ul/ 检测					

[0157] 3. 结果

[0158] NC:FHC102 上处理单克隆抗 α 1 人绒毛膜促性腺激素, Aeon Bio

[0159]

样本	LP2	LP3a	LP3b	LP4
DI 水	-	-	-	-
阴性尿液	-	-	-	-
25mIU/ml (HCG)	+(L3)	+(L3)	+(L4)	+(L5)
50mIU/ml (HCG)	+(L4)	+(L3)	+(L4)	+(L5)
100mIU/ml (HCG)	+	+	+	+
1mIU/ml (HCG)	+	+	+	+

[0160] 实施例 6-- 交替逐步共轭

[0161] 本实施例阐述了制备水溶性轭合物的替代方法。本方法中, 信号组分在与水溶性中间体轭合物结合形成水溶性轭合物之前, 与靶向组分连接。

[0162] 牛血清白蛋白与活化葡聚糖共轭结合。该组分经提纯后分离牛血清白蛋白单体。然后, 若丹明染料与葡聚糖-牛血清白蛋白以摩尔比 5:1 共轭结合, 反应在 0.1M 磷酸钾中进行, 在 30°C 保持 pH9.618 小时。该通分再经提纯后分离出抗体单体。若丹明染料与葡聚糖-牛血清白蛋白-抗体以 150ug 染料/mg 蛋白的比例共轭结合, 反应在 0.1M 碳酸氢钠中进行, pH8.0, 30°C, 反应时间 3 小时。采用半胱氨酸终止反应, 再一次用 10mMK₂HPO₄ pH7.2 广泛渗析。最后, 抗体与葡聚糖-牛血清白蛋白-抗体-染料以摩尔比 2.5:1 交联, 反应在 2.5MK₂HPO₄, 在 30°C 保持 pH10.618 小时。然后, 轭合物经提纯后分离出抗体单体。

[0163] 制作标记板时, OD 为 0.8, 每次测试用 27u1。结果显示, 当没有配体存在时呈阴性结果, 当存在 100mIU/ml 配体时呈阳性结果。

[0164] 实施例 7-- 间接检测形式

[0165] 本实施例阐述了采用间接检测的方式应用本发明。水溶性轭合物按照上面描述的步骤进行, 除了第一次离心后, 颗粒在蒸馏水中洗涤三次。然后, 最终的颗粒再次在蒸馏水中形成悬浮液。溶液进行超声波处理 10 周期, 每 5 秒一周期, 每周期间隔 10 秒。标记板的 OD550 为 45。

[0166] 标记板按照下述结构进行评价: 一检测条, 含有一采样区, 位于试剂区的生物素化 α 1-人绒毛膜促性腺激素抗体, 一标记板, 脱除在硝化纤维上的抗生蛋白链菌素-免疫球蛋白 G, 以及位于检测区的吸收剂。检测条置于塑料外壳内。本检测装置可采用不同级别的人绒毛膜促性腺激素浓度、阴性尿和蒸馏水检测。

[0167] 在采用蒸馏水和尿而不存在人绒毛膜促性腺激素时, 三分钟获得的结果为阴性。含有 1IU/ml, 500mIU/ml, 100mIU/ml, 和 50mIU/ml 的样品得到了阳性结果。

[0168] 实施例 8-- HRP 与活化葡聚糖的共轭结合

[0169] 本实施例阐述了 HRP 与分子量 500,000 的 DVS-活化葡聚糖的结合。分子量 500,000, 活化度 26% 的活化葡聚糖被加入到 HRP 溶液中, 摩尔比为 1:20 (葡聚糖:HRP)。耦合缓冲液为 10mM 磷酸盐, pH10.4, 耦合在 30°C、40mg/ml HRP 中持续 22 小时。将容器从 30°C 恒温箱中取出, pH 用 1M HCl 滴定至 6.5。溶液采用 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱分离。过滤柱采用 0.1M NaCl 平衡, 使用前除气。采用 0.1M NaCl 作为洗脱液进行无梯度洗脱提纯。在 403nm 下检测 HRP 洗脱。

[0170] 实施例 9-- 制备用于电化免疫测定的抗人绒毛膜促性腺激素轭合物

[0171] 本实施例阐述了通过抗-人绒毛膜促性腺激素抗体与二乙烯基砷活化的葡聚

糖-HRP 结合合成抗-人绒毛膜促性腺激素轭合物,合成中利用了高盐分缓冲液中的沉淀。抗-beta-人绒毛膜促性腺激素(R006003,6.5mg/ml 磷酸盐缓冲盐水)经葡聚糖上的二乙烯基砜自由基与活化-HRP-轭合物结合。结合和沉淀后,通过加入半胱氨酸来封闭所有未反应的 VS(乙烯基砜)自由基。沉淀物经离心形成颗粒,在去离子水中采用超声波处理重新形成悬浮液。葡聚糖-HRP/抗人绒毛膜促性腺激素轭合物经凝胶过滤 Sephacryl S-300 与未结合的抗体分离。提纯过的轭合物在 280nm 下检测。

[0172] 使用的摩尔比为 2 摩尔抗体比 1 摩尔葡聚糖-HRP。在磷酸盐缓冲盐水(PBS)含有 0.46ml 葡聚糖-HRP 及 0.95ml 抗-beta-人绒毛膜促性腺激素(6.5mg/ml)。逐滴加入 1.9ml K_2HPO_4 (3M, pH9.0) 使磷酸盐浓度达到 2. M,保持混合液在 15ml 锥形管中形成涡流。总体积为 3.31ml。锥形管伴随 125rpm 轻微晃动在 30℃ 培育 18 小时。18 小时后,沉淀物在溶液表面附近积聚。加入 0.46ml 去离子水,搅拌溶液调整磷酸盐浓度至 1.75M。加入 0.377ml 0.1M 半胱氨酸封端所有剩余的乙烯基。溶液轻微搅拌,在室温下保持 15 分钟。混合物转移至 2ml microfuge 离心管中,在 10000rpm 下旋转 15 分钟。移除透明的上层清液,使颗粒再悬浮,并合并到大约体积 15ml 的去离子水中。

[0173] 该管置于 cuphorn 超声破碎器中进行超声波处理,cuphorn 浴池保持有冰块。超声破碎器控制设为 5 秒脉冲,90% 最大输出。超声波处理过程中将聚丙烯塑料管与超声探头相互挤压,以在 4℃ 下完成最大能量转移。超声波处理过程中以三秒为间隔。三秒间隔内,该管保持在冰水中,并与超声探头挤压四次。据发现,本过程阻止了样品的微加热,能使样品的重溶最佳化。

[0174] 颗粒再次旋转减慢,保留上层清液。颗粒在 0.35ml 去离子水中再悬浮,重复进行超声波处理。不断循环重复超声波处理和旋转,直至最少 90% 的颗粒溶解。将上述溶液合并。

[0175] 溶解的轭合物采用具有 30000 分子量筛截的自旋浓缩器浓缩至大约 1ml 体积。轭合物然后进入 S-300 柱(至少 31ml 柱床体积),该柱采用 50mM Tris,0.1M NaCl,pH7.2 进行预平衡。洗脱采用三羟甲基氨基甲烷缓冲液,速率为 1ml/min,第一个峰收集成一到二份。轭合物在第一个峰脱出,该峰的份数合并在一起。

[0176] 实施例 10-- 在电极上包覆抗体以用于电化检测

[0177] 本实施例阐述了制备包覆抗体的电极用作电化检测人绒毛膜促性腺激素的亲性和性传感器。

[0178] 使用一具有 Melinex ST328 聚酯薄膜底物的丝网印刷碳电极。电极采用石墨油墨和氯化银油墨印刷。丝网印刷机为 SMT Optiprint,型号 1616,PD-F。

[0179] 电极浸在 100 μ g/ml 抗- α 人绒毛膜促性腺激素抗体的包覆缓冲液中室温下 2 小时,然后浸在封闭液中室温下 1 小时。洗涤,干燥后,电极干燥保存。

[0180] 包覆后的电极在含有公知浓度人绒毛膜促性腺激素的样品基质或磷酸盐缓冲盐水室温下培育 30 分钟,人绒毛膜促性腺激素的浓度如 0,2,5,或者 50mIU/ml hCG。洗涤后,电极浸在 anti- β 人绒毛膜促性腺激素标记轭合物缓冲液(3 μ g/ml)中室温下 30 分钟。洗涤后,在电极上施加上 20 μ l 底物(20mM 萘酚磷酸盐,0.1M NaCl,0.1M 乙二醇胺 pH9.6,用于碱性磷酸酶轭合物)室温下培育 10 分钟。然后采用微分脉冲伏安法记录信号。

[0181] 实施例 11-- 传统的 HRP- 抗体检测与 HRP- 葡聚糖- 抗体的比较

[0182] 捕获界面通过以下步骤制备：将 50ul Dynabeads® M-280 抗生蛋白链菌素和 133ul 100ug/ml 生物素化 6002 人绒毛膜促性腺激素捕获抗体在容器中混合，搅拌 50 分钟。磁珠用冲洗缓冲液（80ul 磷酸盐缓冲液（pH7.2），含有 0.5% BSA 和 0.5% 吐温）洗涤。加入 80ul 1% 的酪蛋白，混合物培育 2 小时。然后，混合物经 1% 酪蛋白洗涤，在 166ul 1% 酪蛋白中再悬浮，然后置于 4℃ 的冷藏室中。

[0183] 两只管分别标记为 A 和 B。管 A 加入 10ul 磁珠。经适当冲洗后，加入本文制备的 5ul HRP-6003 轭合物，混合物置于振荡器上。混合过程中加入 50ul 标准人绒毛膜促性腺激素。混合物培育 7.5 分钟，用冲洗缓冲液洗两次（同上），然后在 50ul 冲洗缓冲液中再悬浮。

[0184] 管 A 中的磁珠转移于管 B，用磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤。然后磁珠用磁铁分离，移去上层清液。采用 15ul 酶底物混合物（10mM 对苯二酚及新鲜混合的 H₂O₂）洗涤，然后混合 20 分钟。分离磁珠，将 5ul 磁珠经移液管移至电极上进行微分脉冲伏安法检测。作为对比，在另一单独实验中，捕获界面通过将 30ul Dynabeads® M-280 抗生蛋白链菌素与 80ul 100ug/ml biot-6002 抗体混合制备。混合物搅拌 45 分钟，采用含有 0.5% 牛血清白蛋白和 0.5% 吐温的 80ul 磷酸盐缓冲液（pH7.2）洗涤一次。加入 80ul 1% 的酪蛋白，培育 2 小时。混合物用 80ul 酪蛋白洗涤，然后在 100ul 1% 酪蛋白中再悬浮。标记后的抗体为按本文所述制备的碱性磷酸酶-6003 轭合物抗体。标准人绒毛膜促性腺激素按下述方法制备：

[0185] 井 400- 加入 120ul 1% 酪蛋白和 80ul 人绒毛膜促性腺激素

[0186] 井 200- 加入 100ul 1% 酪蛋白 + 100ul 上管溶液

[0187] 井 100- 加入 100ul 1% 酪蛋白 + 100ul 上管溶液

[0188] 井 50- 加入 100ul 1% 酪蛋白 + 100ul 上管溶液

[0189] 井 25- 加入 100ul 1% 酪蛋白 + 100ul 上管溶液

[0190] 井 125- 加入 100ul 1% 酪蛋白 + 100ul 上管溶液

[0191] 井 0- 加入 100ul 1% 酪蛋白

[0192] 标准人绒毛膜促性腺激素沿微量滴定板的一个柱进行制备，每个井加入 5ul 标记后的抗体。50ul 标准人绒毛膜促性腺激素在 2 分钟内迅速地从柱 12 移至柱 1，搅拌、预培育 2 分钟。每个井加入 10ul 磁珠，同时在板振荡器上混合，培育 8 分钟。磁珠用磁铁分离，上层清液从每个井中取出。磁珠用含有 0.5% 牛血清白蛋白和 0.5% 吐温的 70ul 磷酸盐缓冲液（pH7.2）冲洗二次。然后，每个井内加入 70ul 磷酸盐缓冲液，磁珠转移到邻近的柱 2 井中。磁珠再次用 70ul 磷酸盐缓冲液冲洗。加入 15ul 底物（在 100mM 二乙醇胺中的 20mM 1- 萘基磷酸盐，pH9.6），混合物培育 25 分钟。保留磁珠，将 8ul 底物直接转移到丝网印刷电极上进行微分脉冲伏安法检测。

[0193] 图 2 显示出，采用本发明的电化检测方法得到了相比传统电化方法几倍的高灵敏度。差别更为显著的是，传统方法较 11 分钟的本发明方法大约需要几乎二倍的培育时间（20 分钟）。

[0194] 本文描述的本发明可在缺少本文没有具体披露的任一组分或多种组分，或者某种限制或者多种限制下实施。使用的术语和措辞用作说明，不做任何限制。使用上述术语和措辞并无意排除其中显示或描述的同等特征或部分，但是应该认识到各种各样的改进仍然可能处于本发明权利要求的保护范围。从而，应该明白虽然本发明通过多种实施方案和可

选特征进行了具体披露,本领域技术人员可采用本文披露的构思进行改进或变化,这些改进和变化被认为处于通过附加的权利要求所定义的本发明保护范围内。

图 1A

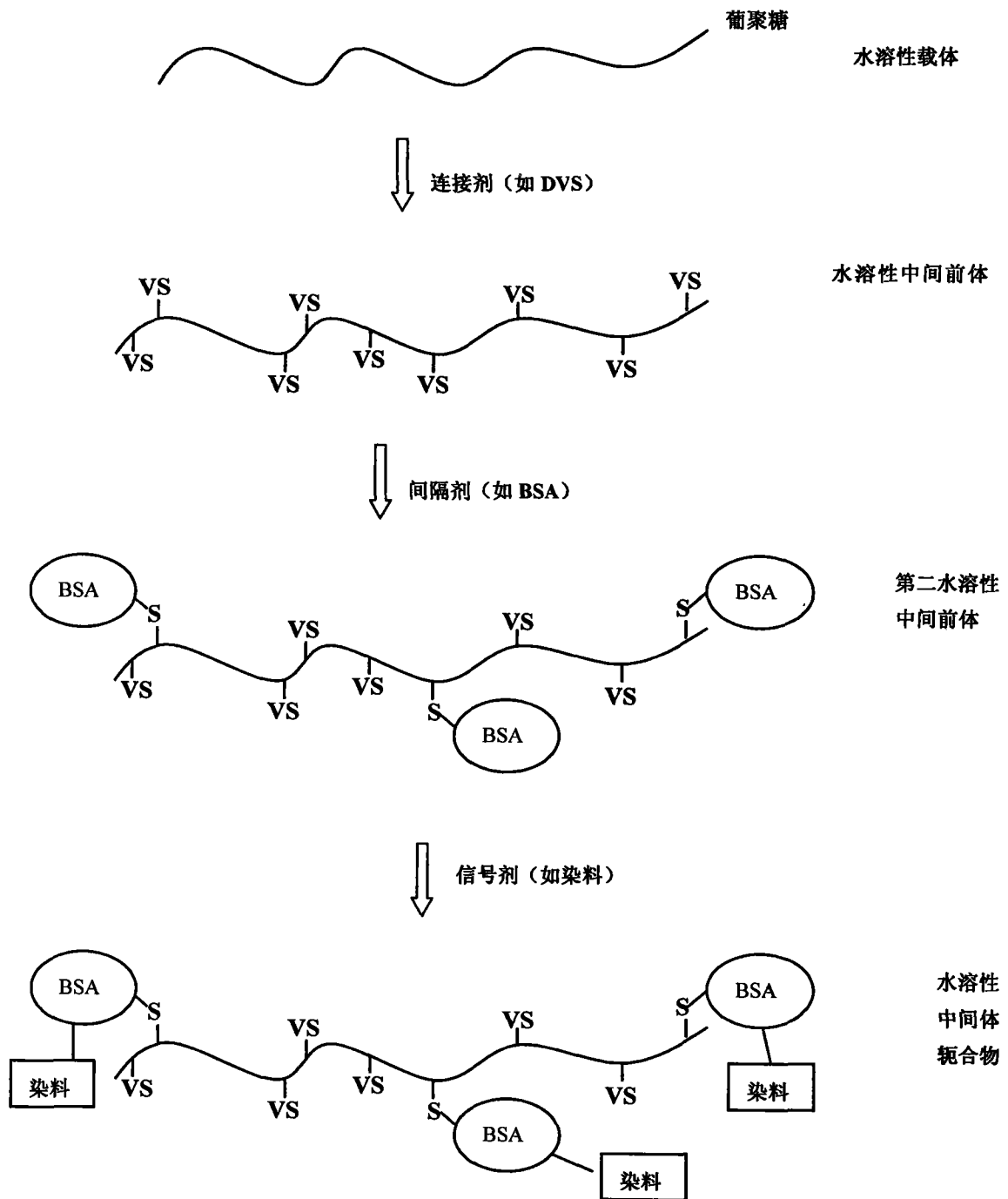
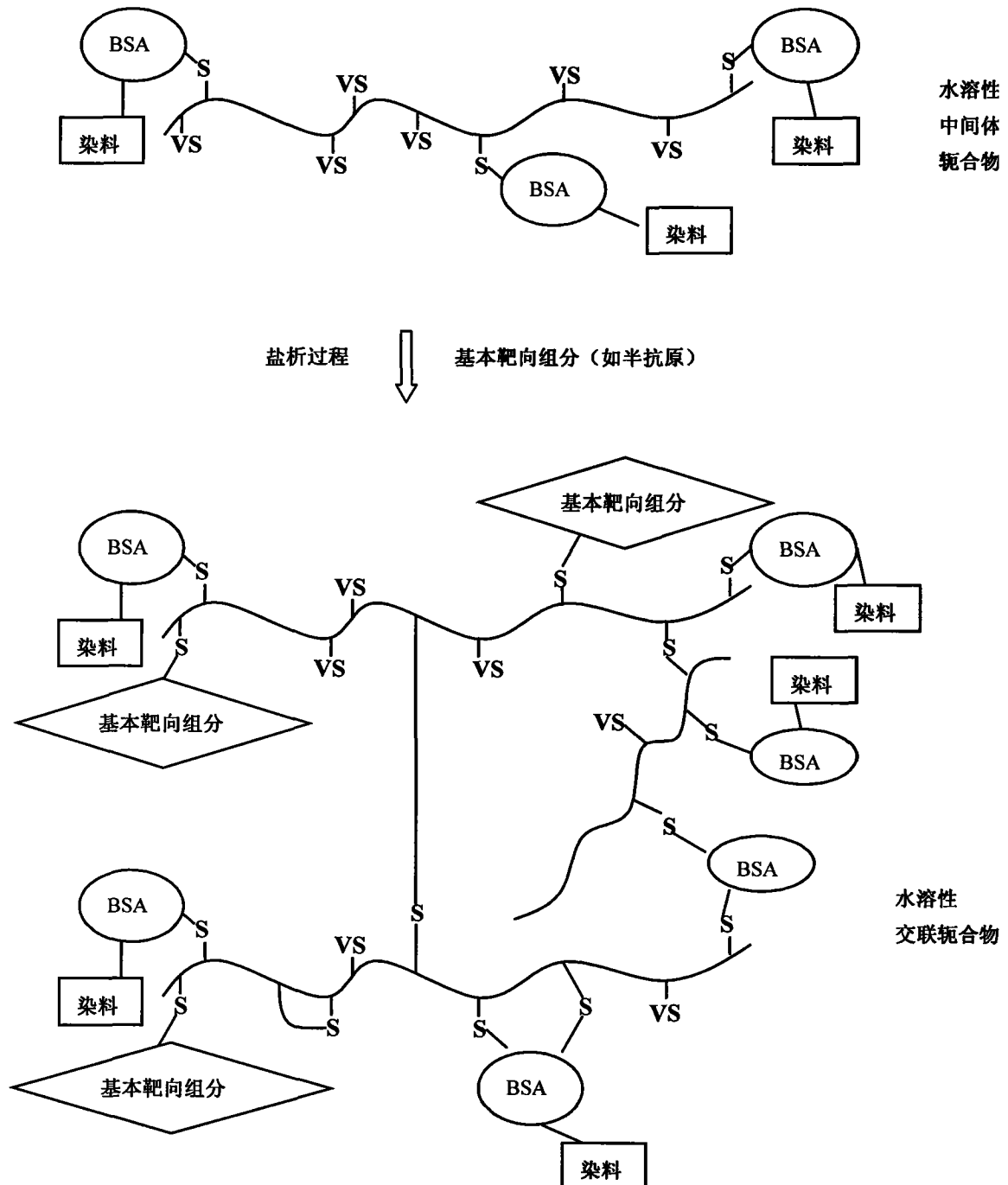
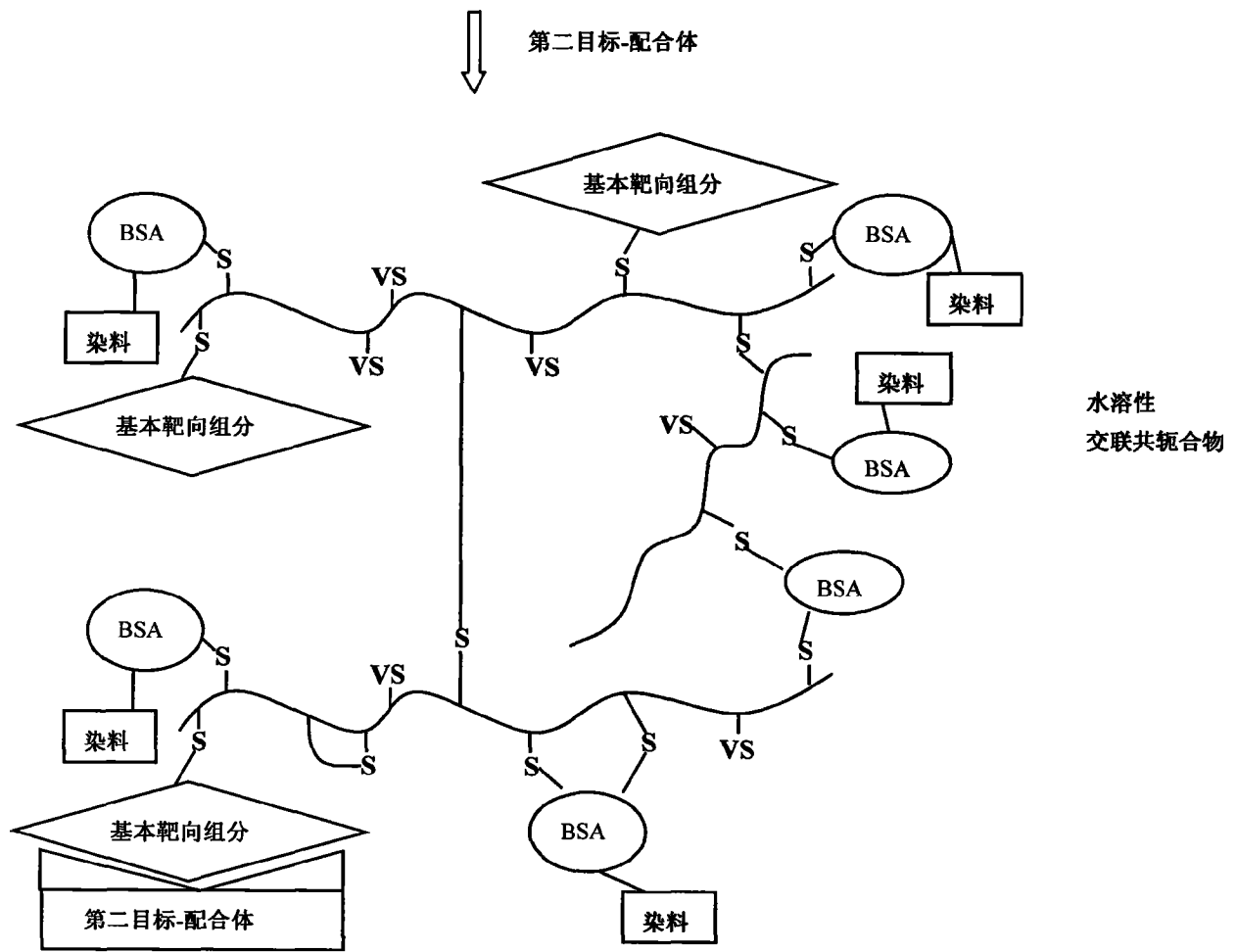


图 1B





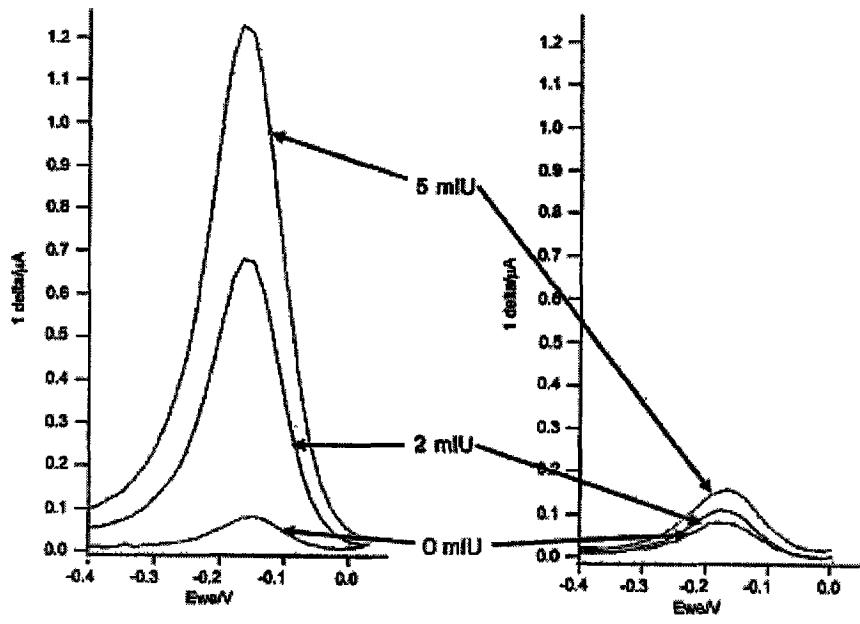


图 2A

图 2B

专利名称(译)	利用水溶性轭合物的电化学检测方法		
公开(公告)号	CN101395473B	公开(公告)日	2012-09-19
申请号	CN200680053685.X	申请日	2006-03-20
申请(专利权)人(译)	因韦尔尼斯医药瑞士股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿莱瑞士股份有限公司		
[标]发明人	MW牛顿 AC威杰冉阿迪翰		
发明人	M· W· 牛顿 A· C· 威杰冉阿迪翰		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/548 C12Q1/42 C12Q1/28 C07K1/10 C07K1/04 C07K16/00		
CPC分类号	A61K49/0041 A61K49/0056 A61K49/0058 A61K47/48692 G01N33/581 G01N33/5438 A61K47/6883		
其他公开文献	CN101395473A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种水溶性轭合物以及使用他们进行检测，诊断的方法。一个检测和定量检测的装置也在本发明中被揭示。在很多实施方式中，这种水溶性轭合物被用在免疫和横向流动检测中。本发明还提供一种制备水溶性轭合物的方法，通过该方法可以让检测的灵敏度提高。另外，本发明还提供一种用于电化学检测的水溶性轭合物，使用这种检测可以提高检测的灵敏度。

	1	2	3	4	5	6	7	8
抗体 (Ab)	5mg	5mg	2mg	1mg				
BSA (牛血清白蛋白)	0	4.224 mg	6.8 mg	7.66 mg				