[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
G01N 33/543

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02823033.7

[43] 公开日 2005 年 3 月 2 日

[11] 公开号 CN 1589405A

[22] 申请日 2002.11.20 [21] 申请号 02823033.7
[30] 优先权
[32] 2001.11.20 [33] FR [31] 01/15011
[86] 国际申请 PCT/FR2002/003974 2002.11.20
[87] 国际公布 WO2003/044532 法 2003.5.30
[85] 进入国家阶段日期 2004.5.20
[71] 申请人 斯达高诊断公司
地址 法国阿涅尔
共同申请人 热罗姆·比贝特
[72] 发明人 热罗姆·比贝特 让·博德里
阿兰·鲁索
[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 于 辉
权利要求书 4 页 说明书 13 页 附图 3 页

[54] 发明名称 使用磁性胶态颗粒检测分析物的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种检测和/或定量液体介质中的至少一种分析物的方法，其特征在于使用表面经所述待检测和/或待测定的分析物的至少一种特异性配体官能化的磁性胶态颗粒，并且所述方法包括：将所述颗粒与所述待分析的介质接触；对所述介质施加一磁场，其强度足够使所述磁性颗粒组装成链状；将所述磁场保持足够时间，以使所述分析物与至少两个分别存在于链的两个相邻颗粒上的特异性配体偶联或结合；去除磁场，并检测所述分析物是否存在，并根据情况，通过是否存在所述恒定的磁性颗粒链来检测其浓度。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1、一种检测和/或定量液体介质中的至少一种分析物的方法，其特征在于使用表面经所述待检测和/或待测定的分析物的至少一种特异性配体官能化的磁性胶态颗粒，并且所述方法包括：

（1）将所述颗粒与所述待分析的介质接触，

（2）对所述介质施加一磁场，其强度足够使所述磁性颗粒组装成链状，

（3）将所述磁场保持足够时间，以使所述分析物与至少两个分别存在于链的两个相邻颗粒上的特异性配体偶联或结合，

（4）去除磁场，和

（5）检测所述分析物是否存在，并根据情况，通过是否存在恒定的磁性胶态颗粒链来检测其浓度。

2、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述颗粒是超顺磁的胶态颗粒。

3、如权利要求 2 所述的方法，其特征在于所述超顺磁胶态颗粒是用含水铁氧流体与聚合物共沉淀或者在有机相中用铁氧流体乳化而获得的。

4、如权利要求 1-3 任一项所述的方法，其特征在于所述磁性胶态颗粒大小在 5-10000 nm 之间，更优选在 100-500 nm 之间。

5、如权利要求 1-4 任一项所述的方法，其特征在于所述特异性配体通过吸附相互作用、共价相互作用和/或高亲合力相互作用固定到所述颗粒的表面上。

6、如权利要求 1-5 任一项所述的方法，其特征在于所固定的配体是高亲合力键合偶联的两个成对物之一。

7、如权利要求 6 所述的方法，其特征在于所述配体为选自如下偶联对的一个配对物：(聚)碳水化合物/electin；生物素或生物素化的化合物/抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素、蛋白受体及其特异性配体；和半抗原/抗体。

8、如权利要求 1-7 任一项所述的方法，其特征在于所固定的配体是选自如下的化合物：肽；包括糖蛋白、脂蛋白和其它类似或衍生结构的自由或络合形式的蛋白质；免疫球蛋白；核酸，如 DNA 或 RNA 及其同源物；糖类如单糖或二糖、低聚糖和多糖；脂类；激素；受体；代谢物和其它生物物质。

9、如权利要求 1-8 任一项所述的方法，其特征在于目标分析物是抗原、抗体和核酸和/或蛋白质。

10、如权利要求 1-9 任一项所述的方法，其特征在于待分析的介质预先经过预处理，以便使分析物对其特异性配体之一的至少两个分子具有反应活性。

11、如权利要求 10 所述的方法，其特征在于所述预处理包括用高亲合力偶联成对物之一官能化所述分析物。

12、如权利要求 1-11 任一项所述的方法，其中所检测和/或定量的分析物为：诸如病毒、细菌或原生动物和其它感染剂的病原体的抗

体；肿瘤抗体；针对变应原的抗体或者自身抗体。

13、如权利要求 1-11 任一项所述的方法，其中所检测和/或定量的抗原为：自由抗原，例如血蛋白和诸如凝血因子的因子、代谢物、激素或介体；或者与载体相连的抗原，例如微生物的表面抗原、膜结合的受体；血型抗原和主要组织相容性系统的抗原。

14、如权利要求 1-13 任一项所述的方法，其特征在于所述磁性胶态颗粒还带有第二标记。

15、如权利要求 14 所述的方法，其特征在于所述标记能够通过肉眼、光学、机械和/或电的方式表征。

16、如权利要求 14 或 15 所述的方法，其特征在于所述标记选自彩色颜料和荧光剂或磷光剂。

17、如权利要求 1-16 任一项所述的方法，其特征在于使用多种磁性胶态颗粒，分别用各待测定分析物的至少一种特异性配体对这些磁性胶态颗粒进行官能化。

18、如权利要求 1-17 任一项所述的方法，其特征在于所述磁场是连续的。

19、如权利要求 18 所述的方法，其特征在于所述连续磁场的磁通量密度为 5-500 mT，优选 10-100 mT。

20、如权利要求 1-19 任一项所述的方法，其特征在于所述磁场

是交变的。

21、如权利要求 1-20 任一项所述的方法，其特征在于所述链的表征通过显微镜观察直接进行，和/或根据情况通过任意的光学、机械和/或电方法间接进行。

22、如权利要求 21 所述的方法，其特征在于所述链的表征是通过光度测定法或浊度测定法进行的。

23、如权利要求 21 所述的方法，其特征在于所述链的表征是通过图像处理进行的。

24、如权利要求 23 所述的方法，其特征在于使用 CCD 照相机作为图像捕获设备。

25、如权利要求 21-24 任一项所述的方法，其特征在于使用激光作为光源。

26、一种检测液体介质中分析物的试剂盒，其特征在于它至少包括表面经所述目标分析物的至少一种特异性配体官能化的磁性胶态颗粒。

27、如权利要求 1-25 任一项所述的方法用于检测和/或定量微流体系统中的至少一种分析物的用途。

使用磁性胶态颗粒检测分析物的方法

技术领域

本发明涉及用于检测液体、生物或合成样品中至少一种分析物的方法，包括将所述物质与类似凝集剂的试剂偶联。

背景技术

迄今，已提出了许多“凝集”方法。它们主要用于检测抗原和/或抗体以进行诊断。这些方法尤其适用于生物分析鉴定(验孕、凝固试验)或者诊断传染病。然而，这些方法通常具有有限的灵敏度。事实上，这些试验的一般原理在于检测有分析物的情况下胶态颗粒凝胶的形成。在这类试验中，分析物必须能够附着两种胶态颗粒，这些颗粒的表面覆盖有识别待检测分析物（广义上说）的分子。

更具体地，本发明基于使用磁性颗粒作为胶体凝集剂。

磁性颗粒已用于生物分离技术或诊断检测技术(WO 94/09368; EP 180 384; WO 98/51435)。磁性分离速度快并且易于实施，需要的设备简单。使用覆盖有识别待捕获分析物的分子的磁性颗粒，可以在磁力作用下将分析物从复杂混合物中分离。例如，使用该方法有益于“ELISA”测定(酶联免疫测定)。所用的磁性颗粒将磁性材料（例如磁铁矿、铁氧体、氧化铬或氧化镍）加入基质（通常为有机基质）中。使用抗原、半抗原或抗体类型的反应基团对它们的表面进行官能化，以使其与待分离的反应物反应。

为了避免与剩磁有关的问题，通常超顺磁材料比传统铁磁性材料优选。铁磁流体，具有高的磁化度和饱和度(大于 100 mT)并且在没有外来磁场的情况下不显示任何剩磁，它们是用于超顺磁胶体方法的良

好候选物。

本发明旨在在磁场的作用下利用这些磁性胶体所示的能力形成特定的结构组织。

在这种情况下，磁场诱导的凝集作用（根据胶体的体积份）产生单独“链”或称作“簇”的链组。本文后面将链或簇无差别地称作链。关于这些结构及其形成的详细文献在许多出版物中都可以找到。

换句话说，在没有磁场的情况下，这些颗粒呈分散态。在有磁场的情况下，它们在水溶液中组装成颗粒链。当然，这些链是可逆的，并且当除去磁场之后，在热搅拌的作用下它们快速解开。有利地，如果这些颗粒足够小，并因此作布朗运动和可极化的话，这些链将沿施加其上的磁场的轴快速形成，并且它们对重力不敏感。这种现象图示于图 1A。图 1B 显示了这些颗粒在磁场中形成的链的显微照片。

本发明人已出人意料地证实，可以利用磁性胶态颗粒在磁场的作用下快速组装成颗粒链的能力来检测和/或定量液体介质中的特定物质，。

在这种情况下，当这些磁性胶态颗粒的表面上覆盖有特异性配体，并且它们分散于其中的连续相含有能够与至少两个特异性配体反应的物质时，所述物质将在磁场的催化作用下附着到所述磁场诱导链内的两个相邻的不同颗粒上。磁场除去之后，附着有所述物质的颗粒被牢固地组装在永久链内，并由此指示在所分析的介质中存在目标物质。

更具体地说，本发明首先涉及一种检测和/或定量液体介质中的至少一种分析物的方法，其特征在于使用磁性胶态颗粒，所述磁性胶态颗粒的表面用所述待检测和/或测定的分析物的至少一种特异性配体进行官能化，并且其特征还在于它包括：

1、将所述颗粒与所述介质接触，

2、对所述介质施加一磁场，其强度足够使所述磁性颗粒组装成

链状，

3、将所述磁场保持足够时间，以使所述分析物与至少两个分别存在于链的两个相邻颗粒上的特异性配体偶联或结合，

4、去除磁场，和

5、检测所述分析物是否存在，并根据情况，通过所述液体介质中是否存在所述恒定的磁性胶态颗粒链来检测其浓度。

应注意的是，所列的这些步骤的顺序相当于本发明的优选实施方式，但是在本发明的上下文中，也可以不同顺序实施它们，例如在加入待分析的介质之前激活磁场。

在本发明的上下文中，也可以收集由待检测、测定和替换的分析物连接的磁性胶态颗粒。

在本发明的上下文中，可以使用各种不同的磁场和磁场梯度几何形状，也可以使用各种不同几何形状的“凝集池”。根据情况，这些不同的几何形状易于使配体-受体缔合的速度以及恒定链的检测最佳化，所述恒定链可以随条件的不同在长度和粗细方面有很大的不同。具体地说，本发明包括微流体设备，它使得通道的宽度或高度小于100 μm。可以使用与通道轴垂直和平行取向的磁场。

有利地，该方法可用于诊断工具中，例如分析设备中。特别优选自动化分析设备。

至于这些恒定链的具体表征，可以有利地通过对待分析介质的简单显微测定来进行。然而，尤其是当使用自动化分析设备时，优选对这些链的存在进行光学检测。因此通过测定光散射（例如通过光度测定法和浊度测定法）可以检测链的存在。另一种方法是处理捕获的图像，例如通过 CCD 照相机。这种方法的优点在于能够对这些链的大小作细微分析。任何适宜的光源（优选激光）都可用于这些检测方法。

当然，与传统凝集物相似，链的形成首先取决于待分析的介质中

分析物的浓度，其次取决于颗粒的浓度。可以直观地认为，所述介质中存在的分析物越多，链越长，并且颗粒浓度越高，链越粗，并且与聚集物更相似。因此本发明证实可以通过对组装成恒定链状的磁性颗粒的密度的定量来确定分析物的浓度。这种密度测定可以通过常规技术进行。因此对给定的分析物可以预先建立参照校准。

所述方法在灵敏度方面特别有益。因此证实其对检测液体介质中低浓度的分析物是有益的。

正如下面实施例中所示，使用相同的配体-受体偶联对(生物素-抗生蛋白链菌素)进行，以抗原分析物为例，当分析物的浓度数量级是 10^{-9} mol/l 时，本发明链状物持久存在，而传统凝集测定的检测限则为 10^{-5} mol/l。有利地，当使用相同的抗原-抗体偶联对，并在没有磁场的情况下，这一浓度阈值低于传统凝集测定中聚集物持久存在和形成凝胶所需的浓度阈值。

因此所述方法有利地替代了传统凝集测定，并且大大增加了测定的灵敏度。

为了本发明的目的，术语“胶体”是指颗粒大小在 5-10000 nm 之间，更优选在 100-500 nm 之间。然而，特别有利地是优选使用尽可能小的颗粒，与此同时还要保证它们具有足够的磁化率，使它们能够在磁性偶极力和布朗运动的结合作用下立即凝集。通常，当磁性材料（通常是包封的氧化铁）的量最大时，粒径不大于几微米，优选约 0.1-0.5 微米就达到这种平衡。

为了上述原因，优选使用超顺磁的胶态颗粒。

有几种不同方法可以生产具有本发明所需质量的超顺磁胶态颗粒。例如用含水铁氧流体与天然或合成的聚合物共沉淀，或者在有机相中用铁氧流体乳化。

以控制方式获得这类胶体材料的优选工艺是基于乳化然后聚合并枝接的原理。这些乳液尤其可以通过将由有机铁氧流体和富含表面

活性剂的水相组成的混合物剪切制得。选择铁氧流体，以便其有机相微溶于水相中。在这种情况下，每一液滴转变成包含磁性材料（优选磁性氧化铁(磁赤铁矿)）的纳米颗粒的球状聚集体，其中在每一液滴中约有 60 体积%的氧化铁。通过加入疏水单体（例如苯乙烯）将由此获得的颗粒聚合，这样在这些液滴内发生反应。在聚合作用结束时加入水溶性功能单体使得表面官能化。通过乳化和聚合这两个操作获得富含氧化铁并且涂布有经过聚合和官能化的层的球形颗粒。就该乳液的制备而言，尤其可以参考 J. Bibette 在 J. Magn. and Magn. Mat. V. 122, p. 37 (1993) 和 T. Mason 和 J. Bibette 在 Phys. Rev. Lett. 77, 3481 (1996)以及 WO 97/38787 和 FR 2800836 中公开的方法。

有利地，加入的磁性材料选自氧化铁、氧化钴或者最终分开并稳定的金属，并且优选磁赤铁矿。以 40 体积%，并优选 60%的比例将磁性材料加入到这些颗粒内。根据本发明的一个优选方案，基本磁性材料是铁氧流体。

根据传统工业方法，由于由此获得的磁性胶态颗粒可以兼容固定在其表面的大量配体，因此它们是特别有益的。

有益地，它们可以与各种特异性配体混合以将它们转化成特别适用于本发明所述的免疫测定和凝集测定的试剂。

所述配体分子可以通过吸附相互作用、共价相互作用和/或高亲合力相互作用固定到磁性胶态颗粒的表面上。

例如，可以使用颗粒表面上存在的化学反应基团进行共价偶联。更具体地说，这些基团可以是羧基、氨基、醛和环氧基团。当将要表征的分析物是一反应活性化学物质时，这些基团本身能够起到目标分析物的特异性配体的作用。

至于通过高亲合力相互作用获得的固定，通常是借助如下高亲合力键合偶联的两个成对物：(聚)碳水化合物/electin；生物素或生物素化的化合物/抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素、蛋白受体及其特异性

配体；和半抗原/抗体等。

最后，配体与颗粒表面的附着可以直接进行，或者可以使用间隔单元来进行，也称之为使用术语“连接物”和“间隔物”。

借助这些共价或高亲合力相互作用可以固定天然或合成的配体，例如肽；包括糖蛋白、脂蛋白和其它类似或衍生结构的自由或络合形式的蛋白质；免疫球蛋白；核酸，如 DNA 或 RNA 及其同源物；糖类如单糖或二糖、低聚糖和多糖；脂类；激素；受体；代谢物和其它生物物质。

可以通过所述方法检测和/或测定的分析物优选为可以高亲合力特异性地与本发明的官能化颗粒相互作用的物质。因此它们可以是可通过免疫反应检测到的抗原和抗体，或者可以通过杂交反应检测的核酸，并且更一般地是所有类型的蛋白质。

优选，这些分析物在待分析的介质中的扩散系数至少等于所述颗粒的扩散系数。

待鉴定的分析物可以天然形式以相同方式与两个不同配体（例如抗原和抗体，它们通常具有几个缔合位点）反应。

在相反情况下，在采用所述方法之前对待分析的介质进行预处理，以便使分析物对其特异性配体之一的至少两个分子具有反应活性。这种预处理尤其可以是用上面讨论的“高亲合力”偶联成对物之一的至少一个分子官能化该分析物。这种预处理的实施在本领域技术人员的能力的范围内。

本发明的第一个实施方式涉及检测和/或定量液体样品内抗体型的分析物：诸如针对病毒、细菌或原生动物和其它感染剂的病原体的抗体；肿瘤抗体；针对变应原的抗体或者自身抗体。

本发明的第二个实施方式涉及检测和/或定量抗原，如自由抗原，例如血蛋白和诸如凝血因子的因子、代谢物、激素或介体；或者与载体相连的抗原，例如微生物的表面抗原、膜结合的受体；血型抗原和

主要组织相容性系统的抗原等。

所述方法还可用于检测和/或定量非生物分子，例如任意天然或人造药物，应理解为所讨论的药物对一配体可以直接具有双重亲合力。如果不是这种情况，必须通过缔合预处理使这类分析物相对设计的配体为二价。本发明在分析和微量分析化学中尤其有用。

根据本发明的一个具体实施方式，几种不同的磁性胶态颗粒可以在同一测试中用作凝集剂。当分析物易于与两种配体发生反应时这可能是有益的。而且，本发明所用的胶态颗粒可以带有第二标记。

由于这种标记能够将第二模式的检测与显微观察检测结合起来，或者能够简单地改善显微观察检测，因此它是有益的。这种附加的标记尤其可以通过肉眼、光学、机械和/或电方法表征。根据本发明的这一实施方式，链的表征可以通过显微观察直接进行，或者根据所选标记的性质通过光学、机械和/或电方法间接进行。适用于本发明的标记，尤其可以提到的有彩色颜料、荧光剂或磷光剂。

待分析的液体介质可以是合成或天然的，例如生物流体。它们尤其可以是体液，例如血液(全血或部分血)、血清、血浆、尿或脑脊髓液，它们可以稀释或未稀释的形式使用。

至于磁场，可以通过本领域技术人员已知的各种方式产生，例如赫姆霍兹线圈、电磁铁或永久磁铁。

所施加的连续磁场通常为 1-500 mT，优选 1-100 mT。

施加基本上均匀的磁场通常是有益的。产生这种磁场的简单方法是在“凝集”区的任一侧分别放置永久磁铁或电磁铁的两极（北极和南极）。另一种方式是用电流发生器磁化的赫姆霍兹线圈构建一具有基本上为环状和同心轴通道。

根据本发明的一个优选实施方式，施加振荡(交变)磁场。

振荡磁场能够增加待检测的分析物处于分别存在于两个颗粒的两个特异性配体附近的可能性。在每一磁场循环中，颗粒可以彼此缔

合以便形成或延伸链，并且不会影响已经形成的链。因此这意味着能够实现官能化磁性胶态颗粒的配体与待检测分析物之间的反应。

因此可以检测低浓度的分析物，由此获得具有较好灵敏度的测定。

然而，应注意的是，本发明的一些用途可能需要非均匀的磁场。具体地说，可以使用能够对颗粒进行凝集的磁场和能够在精确位置将链浓缩的磁场梯度。该磁场及其梯度都可以同时或单独操作。因此，可以首先浓缩分析物，然后通过形成足够大小的聚集体来观察它们。在为本发明内容的一部分的其它应用中，优选在微流体通道内进行凝集。例如(E. M. Lawrence 等人，Int. J. of Modern Phys. B，8, 2765-2777，1994)已知富含磁性颗粒的柱或链的直径和间隔取决于磁场和池的厚度。因此可以选择最适合所需应用的凝集条件。

加入待分析介质的手段包括：

- 采用一个或多个沉积样品的凹口或“孔”，如凝胶电泳中的，“Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications, A. T. Andrews, Oxford University Press, NY 1986”，

- 或者采用过压或减压系统，如毛细管电泳中的，例如参见“Capillary Electrophoresis”, P. D. Grossman, J. C.Colburn published by Academic Press, San Diego, CA, USA, 1992)，

- 或者采用一通道，经过它滴流样品连续溢出，如液体静脉中的电泳，

- 或者采用一种用于色谱分析的进样方法(“Chromatographie en phase liquide et supercritique”[液相色谱和超临界色谱法], R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, 巴黎，Masson 出版，1991；“Practical High Performance Liquid Chromatography”, V. R. Meyer, John Wiley 出版, Chichester, NY, USA；“Chromatography of polymers”, T. Prodver, 由华盛顿特区的 ACS 出版公司出版，1993)，

- 或者使用样品池或其它容器，例如自动化分析设备中常用的。

在其最简单的实施中，按照以下方案进行试验，并在此基础上，容易想到许多其它方案。

将具有上述性能的胶态颗粒上枝接待测抗原的特异性抗体。为了清楚起见，在本说明书中考虑抗生蛋白链菌素-生物素配体-受体的偶联。由于抗生蛋白链菌素被枝接在这些颗粒上，因此待检测的抗原例如是其两端枝接有生物素分子的小聚乙二醇聚合物。如果足量的该抗原以 1%或更大的体积份与所述颗粒混合，那么正如传统凝集测定所预期的，可以在几秒钟，或者甚至几分钟内便可看到凝胶形式的凝集。C*是传统检测方法的抗原浓度检测限，低于该值时，在传统方法中检测不到凝集。

在本发明的试验中，将 0.1 体积%的颗粒与浓度 C（计作 C*/x）远低于 C*的抗原混合，将该混合物吸入矩形横截面(厚度为 20-50 μm)的毛细管内并与毛细管轴平行地施加一磁场。可以通过放置在毛细管两侧的两个磁铁施加该磁场。该磁场保持 2 分钟，强度例如为至少 500 高斯。然后用显微镜观察该毛细管，以便检测链或聚集体的存在。

因此通过生物素-抗生蛋白链菌素的实例可以发现，在低达 C*/1000 的抗原浓度下也可以通过磁场凝集检测聚集体。

所述方法对检测特别有益，并且在适当情况下，可以定量微流体中的至少一种分析物。在该具体实施方式中，可以在微流体系统的一个进行磁性凝集，并在另一区域进行检测。这种实施方式尤其有益地适用于将颗粒的恒定链与没有经过凝集的颗粒分离。

本发明方法的特别有益的应用包括多标准分析，用于在同一测量中同时检测几种分析物。

根据该实施方式，同时使用多种官能化磁性胶态颗粒。每一种颗粒用至少一种待测定分析物的特异性配体官能化。

然后施加振荡磁场，使得逐渐形成由每一分析物的同种特异性颗粒构成的链。

为了能够区分它们，并因此使测定结果能够读出，各种磁性胶态颗粒带有针对每一待测定的分析物的特异性第二标记。

本发明还涉及一种检测液体介质（优选生物流体）中至少一种分析物的试剂盒，其特征在于它包含至少一种表面用所述至少一种分析物的至少一种特异性配体官能化的磁性胶态颗粒。

下面通过实施例并参照附图更清楚地描述本发明，这些附图显示了：

图 1：在磁场下形成磁性胶态颗粒链的原理示意图和显微照片。

图 2：除去磁场之后含有枝接磁性胶态颗粒和生物素化 BSA 的溶液的显微照片。

图 3：显示了在磁场下以及除去磁场之后磁性胶态颗粒链的平均长度作为溶液内生物素化 BSA 的浓度的函数的图。

图 4A 显示了 0%稀释(对照)的实施例 2 的溶液的显微照片；

图 4B 显示了 0.1%稀释的实施例 2 的溶液的显微照片；

图 4C 显示了 1 %稀释的实施例 2 的溶液的显微照片；

图 4D 显示了 100%稀释的实施例 2 的溶液的显微照片；

实施例 1

使用磁性胶态颗粒检测分析物

本实施例描述了得自生物素/抗生蛋白链菌素高亲合力偶联的模型分析物的检测并且旨在表征本发明方法对给定分析物的灵敏度域值。分析物为生物素，并将抗生蛋白链菌素枝接在胶态颗粒上。

更具体地说，生物素化分析物是由分子量为 5000 的聚乙二醇聚合物构成，在其两端枝接有生物素分子。这些产品可商购获得(Shearwater USA)。

预先获得枝接抗生蛋白链菌素的超顺磁胶态颗粒。这些胶态颗粒是按照 J. Bibette 的 J. Magn. and Magn. Mat. V. 122，p. 37 (1993)和 F. Leal Calderon、T. Stora、O. Mondain-Monval、P. Poulin 和 J. Bibette、Phys. Rev. Lett., 72, 2959 (1994)公开的步骤或者按照 T. Mason 和 J Bibette 的 Phys. Rev. Lett. 77, 3481 (1996)以及 WO 97/38787 中公开的步骤获得。这些颗粒的聚合是按照申请 FR 2800836 中所述的方法获得的。抗生蛋白链菌素在羧基位置的枝接对本领域技术人员来说为公知。可以参考：Molday RS、Dreyer WJ、Rembaum A、Yen SP、J Cell Biol 1975 年 1 月；64(1)：75-88 和 Staros JV、Wright RW、Swingle DM、Anal Biochem. 1986 年 7 月；156 (1)：220-2。

在磁场下的凝集试验包括将枝接有抗生蛋白链菌素的磁性胶态颗粒与“PEG-生物素”分析物混合。选择的检测方法是在显微镜下直接观察。

对 10^{-4}-10^{-2} 的给定颗粒浓度(以体积ϕ计)，改变分析物的浓度 C 以检测该测量的灵敏度极限。

对每一测量而言，将所述混合物吸入厚度为 50 微米的扁平毛细管，将其放置在两个平面磁铁之间，这样产生的磁场大于约 50 mT 并且与毛细管的轴平行。该磁场由市售平面磁铁产生。将磁场施加 2 分钟并在没有磁场的情况下在显微镜下观察毛细管。当在显微镜下可以看到有链和聚集体(参见图 2)时，该检测为阳性，当在热搅拌作用下颗粒立即再次分散时，该检测为阴性。

根据该实施方式的发现，分析物浓度降低至 10^{-9} mol/1 时，本发明方法检测结果仍然为阳性。而作为对照，当分析物浓度低于 10^{-5} mol/1，传统凝集检测是不可能进行的。

在一补充研究中，测得链的平均长度为待测定的分析物(生物素化的 BSA，8-12 生物素/BSA)的浓度的函数。图 3 显示了在 10 mT 的磁场中 30 分钟之后链的平均长度(实线)以及在没有磁场下 24 小时之

后链的平均长度(虚线)，横坐标为生物素化的 BSA 的浓度。

注意到，使用磁场可以快速检测浓度低至 10^{-9} mol/l 甚至更低的分析物，这说明灵敏度比目前销售的测量方法的高。

此外，注意到形成的链的平均长度随分析物浓度的增加而增加。因此，本发明的方法也能够通过测定链的平均长度来定量测定待测定的分析物。

实施例 2

枝接有抗-vWF 免疫球蛋白 G (IgG)的磁性胶态颗粒的制备和 von Willebrand 因子的检测

制备 200 μl 在磷酸盐缓冲液中的胶态颗粒溶液(20 mM, pH 7.2)，它含有 1 体积%的磁性胶态颗粒(直径为 206 nm，可从法国 Ademtech 获得)。

为了激活这些颗粒，向该溶液中加入 200 μl 的 0.01 g/l 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDAC)水溶液，并在 44℃下将混合物持续搅拌 20 分钟。然后用 0.001 %的吐温 20 水溶液洗涤除去过量的 EDAC。

接下来，通过将 400 μl 激活的胶态颗粒溶液加入到 400 μl 的 IgG 溶液(1.7 μl IgG 以 20 mg/ml 于 398 μl 水中)中将 IgG 枝接到胶态颗粒上。在 44℃下将该溶液持续搅拌 20 分钟，然后在室温下保持 10 分钟。

然后用饱和缓冲液冲洗将过量的 IgG 溶液除去 (含有 0.001 %吐温 20 的甘氨酸-BSA 缓冲液)。通过 1.2 μm 过滤器过滤分离由此获得的枝接颗粒。

由此制得的枝接颗粒具有控制密度和取向的枝接抗体。此外，枝接稳定，即使在溶液中有表面活性剂和其它蛋白的情况下。就 von

Willebrand 因子的测定而言，使用含有 200% (2 国际单位) von Willebrand 因子的 Liatest®vVF 校准血浆(STA®vWF Calibrator，可从 Diagnostica Stago 获得)，并且基本上按照本测试说明书中所述的步骤，只是使用枝接磁性颗粒的胶体溶液。

用 Owren-Koller 缓冲液制备含 100%、1%、0.1% von Willebrand 因子的血浆稀释液。使用该 Owren-Koller 缓冲液作为对照(0%)。

接下来，向 1 体积的各稀释液中加入 2 体积的甘氨酸缓冲液和 3 体积的枝接磁性颗粒的胶体溶液。

然后将所得溶液放置在横截面为 50 μm 的正方形毛细管中。将该装配放置在强度为 70 mT 的磁场中持续 5 分钟。除去磁场之后，将该样品放置在光学显微镜的平台上。图 4A、B、C 和 D 显示了所研究的不同稀释样品在显微镜下的外观。尤其注意到，所述方法还可以可见地分辨出相对于对照物(0%)为 0.1%的样品。这一结果比 Liatest® 的 2%的检测域值要好。

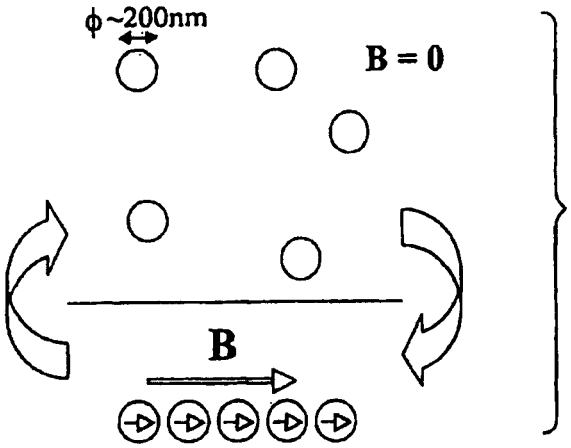


图1A

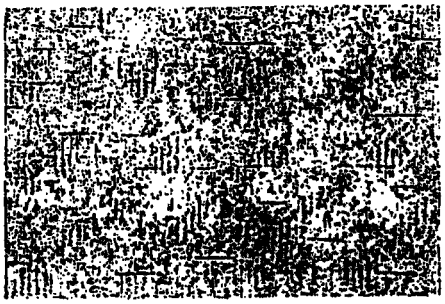


图1B

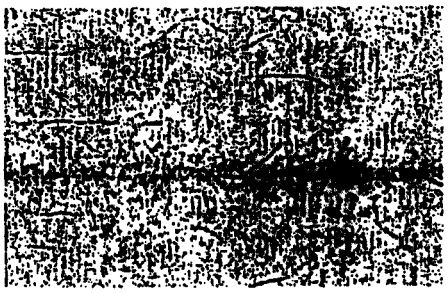


图2

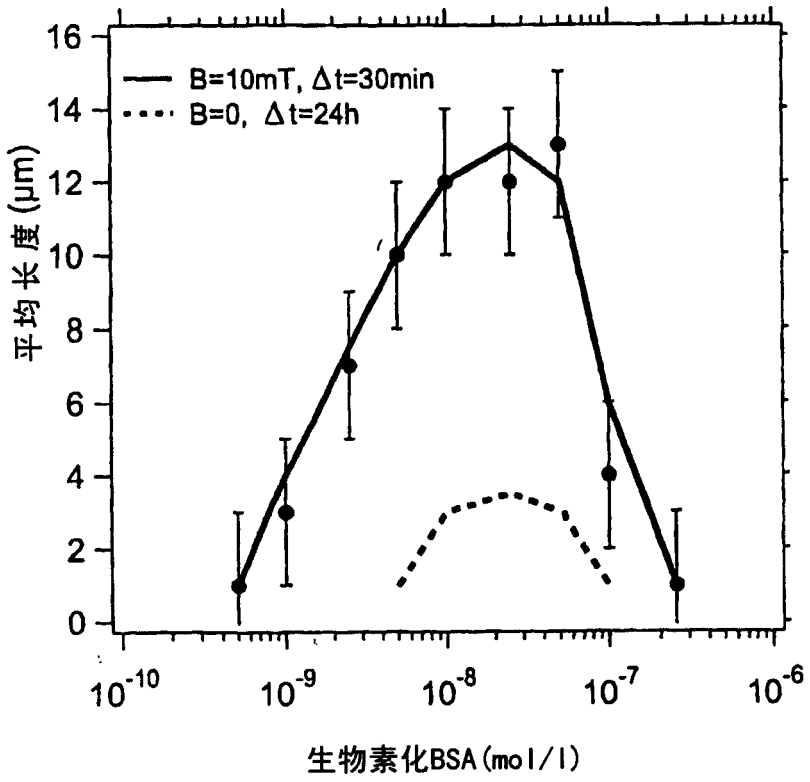

B=10mT, Δt=30min
B=0, Δt=24h
平均长度(μm)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
生物素化BSA(mol/l)

图3

图4A

图4B

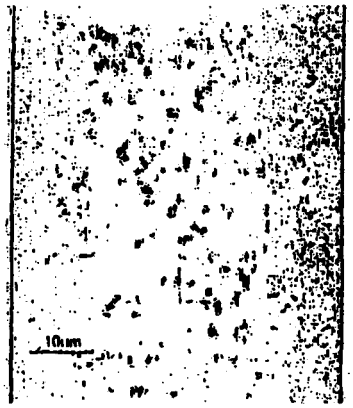


图4C

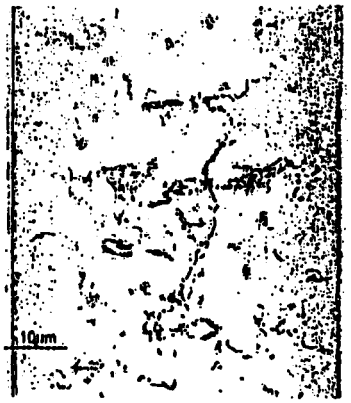
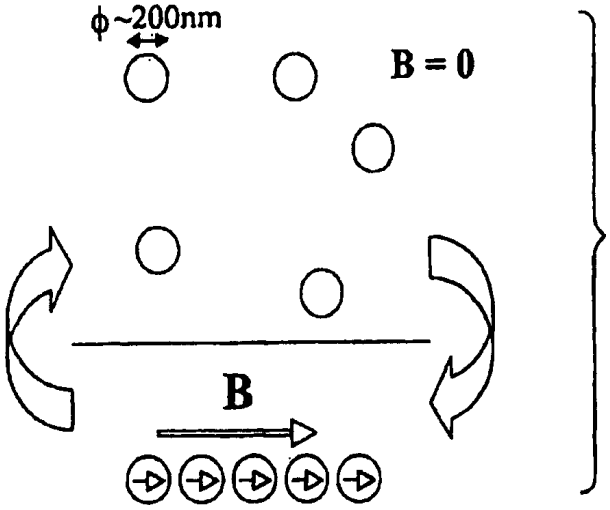


图4D

专利名称(译)	使用磁性胶态颗粒检测分析物的方法		
公开(公告)号	CN1589405A	公开(公告)日	2005-03-02
申请号	CN02823033.7	申请日	2002-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	斯达高诊断公司 热罗姆·比贝特		
申请(专利权)人(译)	斯达高诊断公司 热罗姆·比贝特		
当前申请(专利权)人(译)	斯达高诊断公司 热罗姆·比贝特		
[标]发明人	热罗姆比贝特 让博德里 阿兰鲁索		
发明人	热罗姆·比贝特 让·博德里 阿兰·鲁索		
IPC分类号	G01N33/553 C12N15/09 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/5434		
代理人(译)	于辉		
优先权	2001015011 2001-11-20 FR		
其他公开文献	CN100501403C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测和/或定量液体介质中的至少一种分析物的方法，其特征在于使用表面经所述待检测和/或待测定的分析物的至少一种特异性配体官能化的磁性胶态颗粒，并且所述方法包括：将所述颗粒与所述待分析的介质接触；对所述介质施加一磁场，其强度足够使所述磁性颗粒组装成链状；将所述磁场保持足够时间，以使所述分析物与至少两个分别存在于链的两个相邻颗粒上的特异性配体偶联或结合；去除磁场，并检测所述分析物是否存在，并根据情况，通过是否存在所述恒定的磁性颗粒链来检测其浓度。