



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02820038.1

[43] 公开日 2005 年 4 月 20 日

[11] 公开号 CN 1608205A

[22] 申请日 2002.10.10 [21] 申请号 02820038.1
 [30] 优先权
 [32] 2001.10.10 [33] GB [31] 0124341.9
 [86] 国际申请 PCT/GB2002/004594 2002.10.10
 [87] 国际公布 WO2003/031977 英 2003.4.17
 [85] 进入国家阶段日期 2004.4.9
 [71] 申请人 兰道克斯实验有限公司
 地址 英国安特里姆
 [72] 发明人 理查德·威廉姆·勒克斯顿
 比德·霍金斯

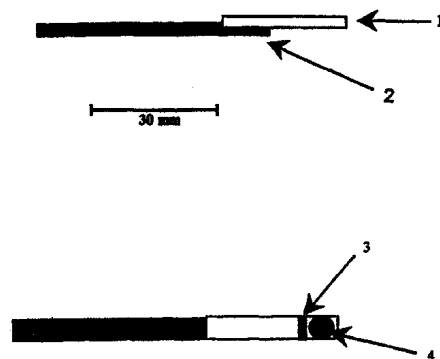
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
 标事务所
 代理人 康建忠

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 7 页

[54] 发明名称 采用磁场的结合检测

[57] 摘要

本发明描述了一种实现结合检测的方法，包括如下步骤：(i) 将目标分子与其亲和配体结合形成结合复合物，其中目标分子固定于磁性粒子上，亲和配体固定于支持物上；检测复合的磁性粒子数量，从而确定复合的目标分子的量，其特征在于，至少步骤(i)是在施加的磁场存在的条件下实施的。



1. 一种进行结合检测的方法，包括如下步骤：

(i) 将目标分子与其亲和配体结合形成结合复合物，其中目标分子固定于磁性粒子上，亲和配体固定于支持物上；以及，

(ii) 检测复合的磁性粒子数量，从而确定复合的目标分子的数量，

其特征在于，至少步骤(i)是在施加的磁场存在的情况下进行的。

2. 根据权利要求1的方法，其特征在于目标分子是一种抗体。

3. 根据权利要求1或2的方法，其特征在于亲和配体是一种抗体或抗原。

4. 根据权利要求3的方法，其特征在于亲和配体是一种抗原。

5. 根据前述任一权利要求的方法，其特征在于亲和配体通过一种媒介抗体固定于支持物上。

6. 根据权利要求1的方法，其特征在于，目标分子是一种多聚核苷酸。

7. 根据权利要求1或6的方法，其特征在于，亲和配体是一种多聚核苷酸。

8. 根据前述任一权利要求的方法，其特征在于，施加的磁场是稳定磁场。

9. 根据权利要求1-7中任一权利要求的方法，其特征在于，施加的磁场是变化的磁场。

10. 根据权利要求9的方法，其特征在于，磁场是通过作为方波、正弦波或锯齿波施加的外部信号而变化的。

11. 根据权利要求10的方法，其特征在于，磁场是通过施加方波而变化的。

12. 根据前述任一权利要求的方法，其特征在于，通过带有聚焦磁场的金属立柱的电磁铁来提供磁场。

13. 根据权利要求 1-11 中任一权利要求的方法，其特征在于，通过电磁线圈来提供磁场。

14. 根据权利要求 13 的方法，其特征在于，采用多个电磁线圈。

15. 根据前述任一权利要求的方法，其特征在于，磁性粒子通过光学显微镜进行光学测定。

16. 根据权利要求 1-14 中任一权利要求的方法，其特征在于，步骤 (ii) 是通过确定复合物暴露于由线圈和调谐电路产生的磁场时以及复合物不暴露于磁场时，调谐电路的共振频率的差来进行的。

17. 根据权利要求 16 的方法，其特征在于，步骤 (ii) 是在检测过程中以有规律的时间间隔进行的，以提供结合检测的动力学分析。

18. 根据前述任一权利要求的方法，其特征在于，通过利用安置于支持物表面上方的磁铁将任何未结合的磁性粒子从支持物表面移去。

19. 在免疫检测中采用施加的磁场，来提高分析物与其亲和配体的结合，分析物被结合于磁性粒子且亲和配体被结合于支持物上。

20. 带有聚焦产生的磁场的金属立柱的电磁铁在权利要求 1-18 中任一权利要求的方法中的应用。

采用磁场的结合检测

发明领域

本发明涉及一种实施结合检测的方法，尤其是采用磁性粒子标记的免疫检测方法。

发明背景

免疫检测是开发的一种抗体对一种分析物的专一结合位点的专一识别的配体结合检测。免疫检测通常涉及将配体（抗体，其他蛋白质，半抗原等）固定于固定相上，而后依次被待测分析物识别。采用专门的标记检测剂有利于其后的检测及液体样品中分析物的定量。样品中分析物的量是结合的标记检测剂的函数：在竞争性检测中二者成反比，而在非竞争性检测中二者成正比。

在过去的十年，免疫检测在设计和形式上都有许多变化，灵敏性也得到了提高。一些采用不同标记的革新被用于检测免疫反应。最初采用放射性同位素，但随后就被酶标记及荧光/发光标记所取代。这些变革克服了同位素标记在稳定性、标记成分的保藏及适于处理方面的许多缺点。通用的采用荧光或类似标记物的免疫检测分析系统需要昂贵的专用设备且不适于制作成手提系统。目前唯一可利用的便携系统采用的是带有颜色标记的试条技术。它们主要用于检测结果仅为或者阳性，或者阴性的怀孕检测。通常不适于某种待测物的实际浓度检测。

在 Kriz 等的两篇论文（生物传感器及生物电子学，1998；13：817-823 及分析化学，1996；68：1966-1970）中对在免疫检测中采用铁磁粒子作为标记进行了描述。然而，在这些技术中，采用一种置于允许测定样品的磁渗透性的 Maxwell 桥中的单一测定线圈来测定铁磁粒子。然后，用磁渗透性作为指标来确定物质中粒子的数量。

申请号为 EP-A-01303319.6 的欧洲专利申请是申请人的待批申请，其内容在此引用作为参考。该申请描述了一种使用磁性粒子作为

标记的免疫检测方法，粒子通过测定共振频率来测定。

发明概述

本发明是基于，当采用磁性粒子作为标记并在反应过程中采用磁场，结合检测可更为有效的实现这一令人惊讶的发现。

根据本发明的第一方面，一种实现结合检测的方法，包括如下步骤：

(i) 将目标分子与其亲和配体结合形成结合复合物，其中目标分子固定于磁性粒子上，亲和配体固定于支持物上；以及

(ii) 检测复合的磁性粒子数量，从而测定复合的目标分子的量，其特征在于，至少步骤 (i) 是在采用的磁场存在的情况下实施的。

本发明的方法可被用于提高结合检测的速度，如免疫检测。无需期望相应的理论，其检测速度的提高似乎是使各个独立的结合配体近似地非常接近，从而有利于结合反应更有效的进行。

附图描述

参照附图对本发明进行描述，其中：

图 1 图解的是测试条的侧视图 (a) 和俯视图 (b)，其中 (1) 代表聚对苯二甲酸乙二酯疏水外表面，(2) 代表塑料棒，(3) 为石蜡线，以及 (4) 为样品/生物试剂；

图 2 显示的是频率发生器，电源及电磁铁；

图 3 显示的是电磁铁，包括立柱；

图 4 图解的是增大的磁场强度对结合于支持物上的顺磁粒子数量的作用；

图 5 图解的是，显示在给定的施加电压下的电磁铁的磁场强度的校准曲线；

图 6 图解的是在检测 CK-MB 时的结合情况；

图 7 图示的是检测 CRP 的情况；

图 8 图示的是频率随时间的变化；以及

图 9 图示的是，通过计算检测过程中的频率变化建立的分析物

CKMB 的校准曲线。

发明详述

根据本发明的方法可用于任何形式的期望测定特定分析物的存在或浓度的结合反应。一种适合的结合反应是 DNA 杂交反应。在这种情况下，目标分子及其结合配体是互补的 DNA 分子。也可采用多聚核苷酸与其他因子结合。例如，多聚核苷酸可以是适配子，用于结合所谓的 DNA 结合蛋白。优选的结合反应是形成特定的抗体/抗原结合复合物的免疫检测。进行结合检测的常用方法，包括 DNA 杂交反应及免疫检测，对本领域技术人员来说是公知的。进行检测结合的合适的技术可参考 Sambrook 等著的《分子克隆实验手册》（1989），以及 Ausubel 等著、John Wiley and Sons 公司发行的《当前分子生物学方案》（1995）。

关于免疫检测，固定于磁性粒子上的分子可结合直接结合于支持物上的亲和配体。作为选择，亲和配体也可间接结合于支持物上，例如，通过对固定于支持物上的分子的单独亲和而结合。在该实施例中，亲和配体可以存在于液体样品中，与支持物及磁性粒子接触。亲和配体结合支持物上的分子及磁性粒子上的分子，从而作为支持物与粒子之间的桥梁。该实施方式在下面给出的实施例 1 中阐明。其变化对于本领域技术人员来说是显而易见的。

典型地，采用的磁性粒子为顺磁粒子，尽管也可采用铁磁粒子或者其他磁性粒子。顺磁粒子可通过商业途径得到，直径通常为 $2.8\mu\text{m}$ ，且由包被着其上可固定结合检测中使用的分子的、合适的聚合体层的顺磁材料核心组成。

通常，每个磁性粒子包括一个单一分子，从而有利于直接计算分子的浓度。将分子固定于磁性粒子上的方法对本领域技术人员来说是公知的。专门的例子在下面给出的实施例 1 中详细描述，其变换方式是显而易见的。不过，如果需要，粒子可包含多于一个分子。典型地，磁性粒子的直径约为 $0.5\mu\text{m}$ - $5\mu\text{m}$ ，优选 $1\mu\text{m}$ - $3\mu\text{m}$ 。纳米粒子，直径通常为 5nm - 300nm ，也适合于本发明的范围。

结合检测可通过固定于合适的支持物上的亲和配体来完成。基于常规的结合检测，尤其是免疫检测，合适的支持物对本领域技术人员来说是公知的。合适的支持物包括玻璃、陶瓷、塑料以及硅支持物。在一个优选的实施例中，支持物是聚酯类材料。尽管也可采用其他外形，支持物通常是平坦的、平面的、表面的，采用本领域公知的常规方法将亲和配体结合于其上。在一个优选的实施例中，支持物是微阵列的形式。在 GB-A-2324866 中描述了一个合适的微阵列，其内容在此通过参考而包含于本申请中。

结合检测在施加磁场存在下来完成。磁场可采用本领域公知的设备来施加，尤其是电磁铁或螺线管。施加的磁场可以是不变的，也可以是根据施加的外部信号例如方波、正弦波或锯齿波而变化。

一个令人惊讶的发现是，变化的施加磁场与稳定的施加磁场相比，其效果更好。尤其是，变化的磁场使反应时间极大地缩短，也增加了在反应过程中，当施加的磁场强度较小时，磁性粒子结合不紧密时更多结合的可能性，使它们可移动并向固定的目标蛋白暴露出更多结合位点。

通过常规试验，技术人员可确定合适的磁场频率。频率优选少于 1 赫兹。在一个优选的实施例中，通过一个包括聚焦磁场的金属立柱的电磁线圈来施加磁场。在图 3 中显示的是一个包括金属立柱的合适的电磁铁。支持物可置于电磁铁的立柱上来聚焦磁场。

在本发明的另一个优选实施例中，采用一个或多个扁绕线圈来施加磁场。线圈可沉积于支持物的下侧，即包括固定分子（亲和配体）的反面。线圈可用采用导电材料，如本领域技术人员所乐于采用的金属，的厚膜或薄膜技术结合到支持物上。每个线圈的共振频率可通过其直径、线圈的匝数以及制作的材料来确定。单一线圈或多线圈可制模于支持物上用于单一或多种分析物检测。生物分子（亲和配体）沉积于支持物的另一面与线圈相对应的位置。接着，一系列结合事件发生，支持物被磁性、顺磁性或超顺磁材料（微米或纳米大小的粒子）包被。

令人惊讶是，该检测可实现与阅读最终的反应终点不同的、获得动力学的测定。动力学测定可通过采用永磁体及其开关的转换来实现。

在一个实施例中，检测采用双磁铁系统来进行；一个置于支持物的下方以将磁性粒子吸引到支持物表面上，另一个置于支持物上方以吸引未结合的粒子使其脱离表面。磁铁可交替打开，以使粒子在某一时刻只朝一个方向被吸引。可采用一个检测线圈询问表面并测定其上存在的磁性粒子的数量。也可采用一种装置来控制上面和下面的磁铁，以便于它们向着或背离支持物运动。当下方的磁铁移动到接近支持物施加磁力时，上方磁铁远离支持物而不发挥作用。接着磁铁被移开以实现反定向。在这种方式下，施加于检测成分的磁场是变化的。当上方磁铁施加其最大吸引，即接近支持物时，通过测定其频率变化可进行定量测定。频率的变化采用样品的平均频率，减去空白时（无分析物）的平均频率来测定。如果该过程在有规律的时间间隔，在设定时间的过程内，如每隔两分钟来实施，就能建立每种待研究的分析物的校准曲线。

检测的最后一步是测定以复合物形式结合在故乡支持物上的磁性粒子数量。磁性粒子可通过光学方法，在光学显微镜下通过人工计算来测定。作为选择并优选的，磁性粒子可通过包含结合的磁性粒子的复合物暴露于线圈产生的磁场及不暴露于磁场，测定产生的调谐电路的共振频率的差来确定。本发明的这一方面在申请待批的专利申请 EP-A-01303319.6 中被描述。

检测可用任何合适的装置来完成。例如，支持物可以是当进行诊断检测时可置于磁场上方的测试条（诊断试条）的一部分。作为选择，支持物可以保存于适合的密封反应器中。磁性、顺磁性或超顺磁性粒子可悬浮于反应容器里适合的缓冲液中，相应的，包含待测分析物的生物检测样品可通过进口引入反应容器中。适合的反应容器对本领域技术人员来说是公知的。

下列实施例解释本发明。

实施例 1

塑料测试条的制备

支持材料采用透明的聚对苯二甲酸乙二酯 (PT), A 型激光/影印机 (Rank Xerox, UK)。如在图 1a 中显示的那样, 量出 30mm (长度) x 50mm (宽度) 的 PT 试条粘贴到塑料棒上。将 PT 试条定位于疏水外表面。为防止使用的试剂沿着 PT 测试条的长度方向扩散, 如在图 1b 中显示的那样, 用石蜡经过 PT 朝着塑料棒的方向画一条线。

磁免疫检测

pH7.2、0.15M 的磷酸缓冲盐液 (PBS), 按如下方法配制: 将 40 克氯化钠, 7.2 克磷酸氢二钠的二水化合物, 1 克氯化钾及 1 磷酸二氢钾溶解于 5L 蒸馏水中。将 pH 值调至需要的 7.2。

将兔抗人转铁蛋白 (Dako AIS, 丹麦) 按 1: 1000 的比例用磷酸缓冲盐液 (PBS) 稀释。在 PBS 中加入体积比为 1% 的戊二醛。

封闭液: w/v 为 1% 的小牛血清蛋白 (BSA) 和 w/v 为 1M 的氨基乙酸溶于 PBS 中制得。

人转铁蛋白: 全转铁蛋白的保藏溶液用 PBS 制备, 浓度为 1mg ml^{-1} 。然后将保藏溶液用 1% 的 BSA/PBS 稀释为终浓度为 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 。

羊抗人转铁蛋白: 羊抗人转铁蛋白按 1: 1000 的比例用 1% 的 BSA/PBS 稀释。

顺磁粒子 (PMP's): 链霉亲和素包被的 M-280 磁性颗粒及磁性粒子浓缩器购自挪威 Dynal 公司。

PMP's 的洗涤缓冲液: 将 0.16 克磷酸氢二钠, 0.98 克的磷酸二氢钠的二水化合物及 8.10 克氯化钠溶于 1L 的蒸馏水中。用盐酸或氢氧化钠调节 pH 至 7.4。

驴抗羊生物素标记: 用于包被顺磁粒子的驴抗羊生物素标记用 PBS 稀释。

PMP's 的最终悬浮缓冲液: PBS/1% 的小牛血清蛋白/4% 的聚乙二醇 (PBS\BSA\PEG): w/v 为 1% BSA 及 w/v 为 4% 的 PEG 溶于 PBS 中。

“PL”双输出实验室电源, 弧光 500 振荡器及 50mm 电磁铁 (12V)

均购自英国 Farnell Electronic 公司。

为帮助聚焦磁场，立柱是自己通过机械加工连接于电磁铁上的。

方法

i. 链霉亲和素 PMP's 的制备

对于每一个测试条，旋转 1 分钟，将 10 μ l 的 PMP's 再次悬浮于装有洗涤缓冲液的试管中，接着放入磁性粒子收集器 (MPC) 中两分钟。其结果是顺磁粒子被吸附并被 MPC 中的磁铁保持于试管的一侧。除去上清液。重复该步骤三次。

包被过程根据《DynaI 手册》(DynaI, 1996) 中推荐的方法进行。链霉亲和素-顺磁粒子与驴抗羊生物素标记 (1.5 μ g 蛋白/10⁷ 顺磁粒子) 混合，4 $^{\circ}$ C 下双向混合 (采用 DynaI MX2 样品混合器, DynaI, 挪威) 孵育 30 分钟。接着将包被的顺磁粒子在 1%BSA/PBS 中用 MPC 洗涤 4 次，然后将其再次悬浮于 PBS\BSA\PEG 中。

ii 磁免疫检测

固相洗涤步骤：除非说明，这里采用的词语“洗涤”描述的是用巴氏吸液管，先用 3x3ml 的蒸馏水，然后再用 1x3ml 的 PBS 清洗固相。孵育温度：除非说明，所有的孵育均在室温下进行。

25 μ l 兔抗人转铁蛋白与 10 μ l 1% 的戊二醛 (v/v) 混合并用于每一测试条。然后将测试条在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。洗涤，然后将测试条与包被液孵育 1 小时。然后洗涤并与 20 μ l 人转铁蛋白孵育 30 分钟。洗涤。在每一个测试条上加入 30 μ l 羊抗人转铁蛋白孵育 30 分钟，重复洗涤步骤。然后在每一测试条上加入 10 μ l (6.7x10⁵) 包被的顺磁粒子并按照所说的情形 (见下面) 在电磁铁上孵育。最后一步清洗包括用 4x1ml 的蒸馏水+0.02% 的 Tween20，使用巴氏吸液管来完成，以除去未结合的顺磁粒子。

采用电磁铁来提供磁场。磁场可以是永久磁场，也可以是通过施加外部信号例如方波、正弦波或锯齿波引起的变化磁场。此外，金属立柱置于电磁铁上以聚焦磁场 (图 3)。生物结合反应的提高指的是在给定时间、给定磁场条件下，有更多数量的顺磁粒子结合到固相上。

研究了下列变化。

- 永久磁场
- 方波
- 正弦波
- 锯齿波
- 场强
- 电磁铁的“立柱”条件
- 零偏移

顺磁粒子的测定及定量通过光学显微镜来进行。这也减少了由于采用磁力计而带来的其它可能变化。

结果

最初的试验说明了，顺磁粒子与用分析物（转铁蛋白）作为桥连剂包被的塑料表面在磁场中发生结合。结合到表面上的粒子数量依赖于施加的磁场强度。图 4 显示的是，结合的顺磁粒子增加的数量是施加的永久磁场的磁场强度增加的结果。

磁场强度采用 Hall 探针来测定，并得出关于施加到磁铁上的电压及测定的场强的校准曲线。这在图 5 中显示。变化的施加磁场强度的作用的进一步实验给出了不同的结果。对方波、正弦波及锯齿波三种波形进行了研究。开始，调节频率计以使波形的振幅从 0 电压到与特定的磁场相应的电压。

锯齿波形给出了随场强增加而增加的粒子数量，但总的说来这种波形给出了最低的顺磁粒子结合数量。方波显示了最大的顺磁粒子结合量，尤其是在孵育时间较长的情况下。与锯齿波相比，场强的影响看起来较小。有趣的是，在达到特定场强前，正弦波给出了增加的结合量，接着随着场强的增加结合量下降。在电磁铁上采用立柱得到了最好的结果，但也给出了较高的空白值。

施加的波形的偏移量在检测中也显示出了重要变化。当变化的场强在整个周期中保持正值时，结合的粒子数量会大量增加。

实施例 2

CK-MB 检测-采用微米尺寸的顺磁粒子

对肌酸激酶 MB 亚单位 (CK-MB) 的直接的、5 分钟检测进行了研究。捕获抗体是鼠单克隆抗体且检测抗体为羊多克隆抗体,二者均为 CK-MB 的直接抗体。在该检测中羊抗体被固定于支持物上。

对一个包被支持物的较宽的范围条件进行了尽可能的研究,并得出了固定的蛋白的最大数量。包括:

- 4°C 下孵育过夜。
- 室温下孵育 4 小时。
- 在加入蛋白前用反式照明器照射固定相 15 分钟。

上述所有过程均采用有或没有戊二醛的包被缓冲液,并采用较宽的抗体稀释范围: 1/200, 1/500 及 1/1000。

制备支持物后,检测可采用 2 步法(间接)也采用一步法(直接)进行。在间接检测中,抗原和标记抗体的添加是分开进行的。相反在直接检测中,抗原和标记抗体是同时合并孵育的。

在最初的研究中,采用一种酶标记的抗鼠-HRP 的二抗来显示检测的进行。后来被包被于顺磁粒子的鼠抗-CK-MB 抗体所取代,用在带立柱的电磁铁上孵育取代用下列两种情况来聚焦磁场:

1. 在永磁场中孵育阶段 5 分钟 (500mA/282mT)
2. 孵育阶段 5 分钟-磁铁 1 分钟开, 1 分钟关, 5 分钟 (500mA/282mT)。

结果

如在图 6 中显示的那样,下列步骤/条件的结合产生了较好的微分响应(与对照相比)。

包被 将反应表面朝向 UV 光源,在紫外灯下照射棒 15 分钟。
用 25 μ l 羊抗-CKMB 抗体 (1/1000) 及 10 μ l 1% 戊二醛在室温下孵育 4 小时。

封闭 用 50 μ l 10% BSA/1M 氨基乙酸/PBS。

PMP's 用 1% BSA/PBS/1M 氨基乙酸按 1: 1000 的比例稀释 CK-MB。

将 10 μ l 包被的 PMP's 与 10 μ lCK-MB 混合。抗体用三乙醇胺交连。

检测 在电磁铁上孵育：1 分钟开，1 分钟关，5 分钟。最大磁场（500mA/282mT）。

用 2x2ml 的 PBS，1x1ml 的 dH₂O 洗涤。允许干燥并用磁力计判读。

实施例 3

CRP 检测—采用纳米尺寸的顺磁粒子（铁磁流体）

在一个测定 C-反应蛋白（CRP）的检测系统中采用纳米尺寸的顺磁粒子。当顺磁粒子不适于采用显微方法计数时，可进行初始反应研究磁力计中磁流体的磁化系数。将其与微米尺寸的顺磁粒子的磁化率相比较。我们发现，对于给定质量的顺磁材料，磁流体在磁力计中给出了较大响应。

检测的展开

知道了磁流体可在磁力计中检测，我们对发展一个 5 分钟竞争性检测进行了研究。检测必须是竞争性的，采用标记抗原进行。在该检测中，抗 CRP 的抗体被固定于支持物上，样品抗原及标记抗原竞争固定于支持物上的有限的抗体结合位点。

当进行 CK-MB 检测时，对包被支持物的条件的较宽范围进行了可能的研究并得到了固定的蛋白的最佳值。包括：

- 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。
- 室温下孵育 4 小时。
- 在加入蛋白前用反式照明器照射固定相 15 分钟。

上述所有过程均采用有或没有戊二醛的包被缓冲液，并采用较宽的抗体稀释范围：1/200，1/500 及 1/1000，1/5000。

检测通过将检测抗原与标记抗原混合来进行（CRP 磁流体）。该检测可将血清与高浓度的 CRP 合并按 1/50 和 1/500 稀释进行。磁流体稀释为 1/3 待用。在电磁铁上孵育 5 分钟可在有聚焦磁场的立柱存在、场强为 282mT 下进行。

结果

对于研究的所有检测条件的不同组合的，下面描述的条件给出了最佳结果。这些结果显示于图 7 中。检测在不同的两天重复进行，图表显示了两天的响应 (R1 和 R2) 及平均响应。检测中采用的条件为：

包被 将反应表面朝向 UV 光源，在紫外灯下照射棒 15 分钟。

用 PBS 按 1: 500 稀释抗 CRP 抗体。

用 25 μ l 的抗 CRP 抗体及 10 μ l 的 PBS。

室温下孵育 4 小时。

封闭 用 1%BSA/PBS 室温下封闭 1 小时

磁流体 用 1%BSA/PBS 按 1: 500 稀释 CRP 标准物。

将 10 μ l 的 CRP-磁流体 (稀释 1/3) 与 10 μ l 的 CRP 混合。

在电磁铁上孵育 5 分钟，普姆场，最大场强(500mA, 282mT)。

用 3x2mlPBS 洗涤，干燥后用磁力计判读。

实施例 4

CK-MB 检测—定量测定

进行该实验来建立不同浓度的分析物的校准曲线，以获得定量结果。

采用直径为 1.5cm 的聚酯盘。用下列方式活化：

·浸入甲醇中 1 分钟并用 UV 照射 10 分钟。

·用甲醇洗涤。

·浸入聚合戊二醛中 30 分钟 (5ml5%的戊二醛，500 μ l 0.1M 的 NaOH)。

·浸入甲醇中 1 分钟。

将稀释的捕获抗体 (1/1000 到 5.56 μ g/ml) 加入到 0.1M 的 pH9.7、含有 2%甲醇和 0.5%戊二醛的重碳酸盐缓冲液中。接着将盘在室温下孵育 4 小时，用 PBS 洗涤并 1% BSA/氨基乙酸/PBS 封闭 1 小时。

顺磁粒子按如下方式制备:

- 在 0.1M pH5.8 的磷酸钠缓冲液稀释羊 CKMB (1/1000 到 5.73 μ g/ml)。
- 用上述缓冲液洗涤 PMP 280 (每种样品 10 μ l) 2—3X。
- 将 30 μ l 羊 CKMB+10 μ l PMP (每张盘) 混合, 室温条件下在一个缓慢旋转的 Dynal 样品混合器上孵育 10 分钟。
- 最后用含有等体积的 1%PBS 及 0.1%的 Tween 20 的 PBS 洗涤 3 次。

使用了下列 CKMB 溶液:

1. 1/1000 (250ng/ml)
2. 1/2000 (125ng/ml)
3. 1/4000 (62.5ng/ml)
4. 1/8000 (31.25ng/ml)
5. 1/16000 (15.6ng/ml)
6. 1/32000 (7.8ng/ml)

接着将 0.9ml 合适的稀释 CKMB 注入反应容器中, (调节容器接收 PBS/BSA) 并将 100 μ l 标记的 PMPs 加入每个反应容器中 (进行三重检测)。将溶液混合并立即确定其频率 (0 时间)。采用一个上部磁铁和一个下部磁铁施加磁场 (位于支持表面的上面或下面), 每个磁铁都交替地向着或背离支持物运动来施加磁场。每两分钟当下面的磁铁离支持物距离最大时测定一次频率。

根据下列方程来确定频率的变化:

((判读的样品平均频率) — (判读的空白平均频率)) 之差的绝对值。结果在图 8 及图 9 中显示。

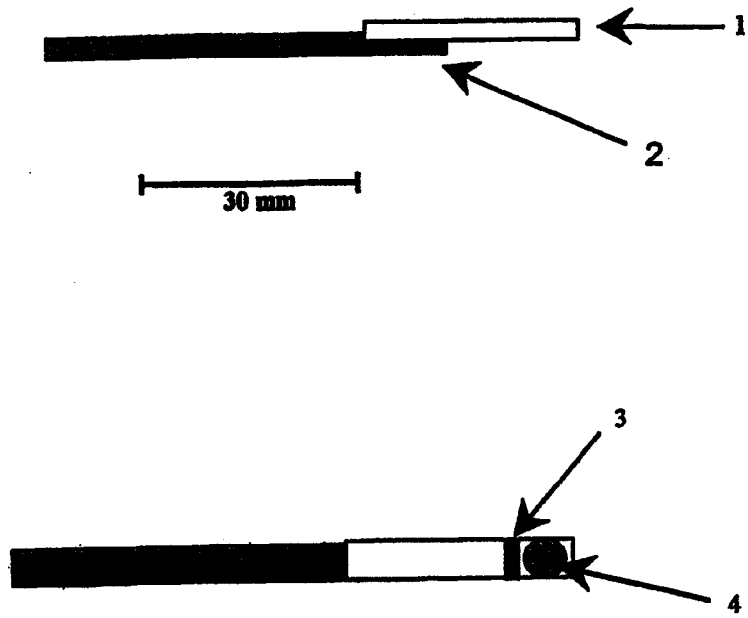


图1



图2

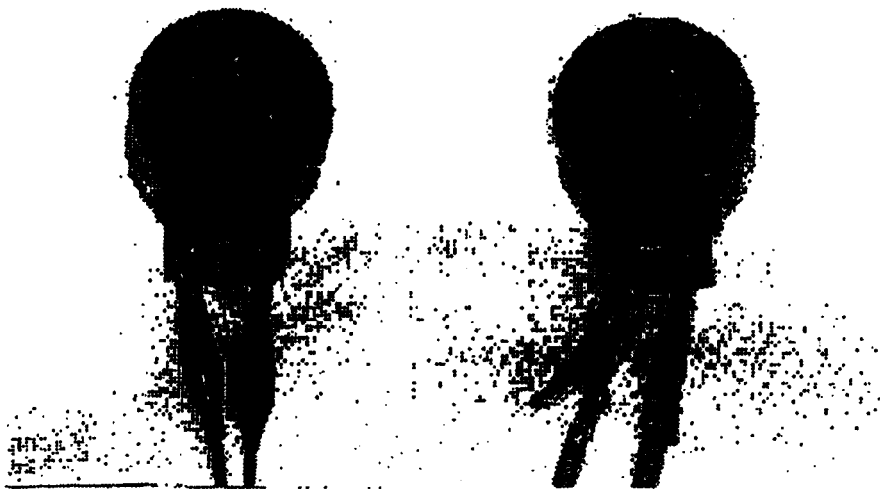


图3

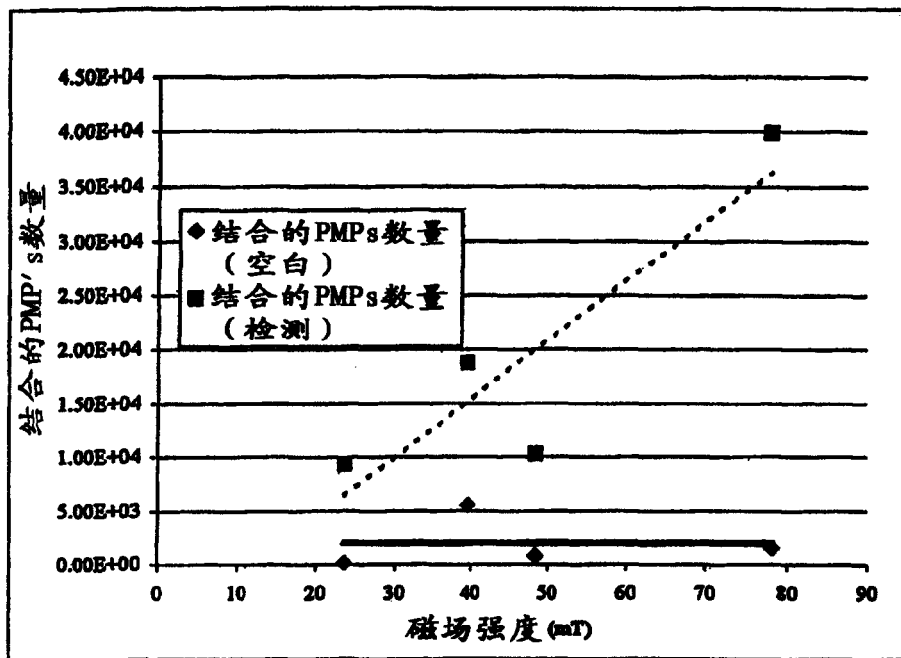


图 4

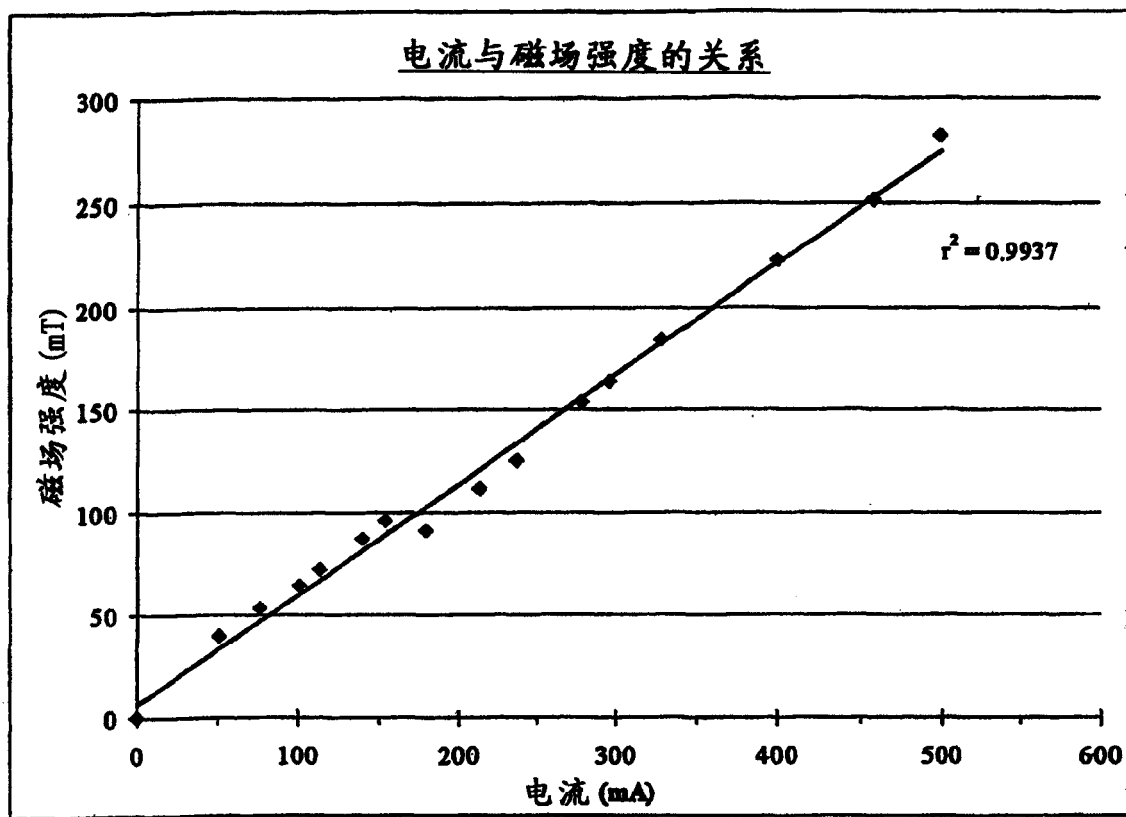


图5

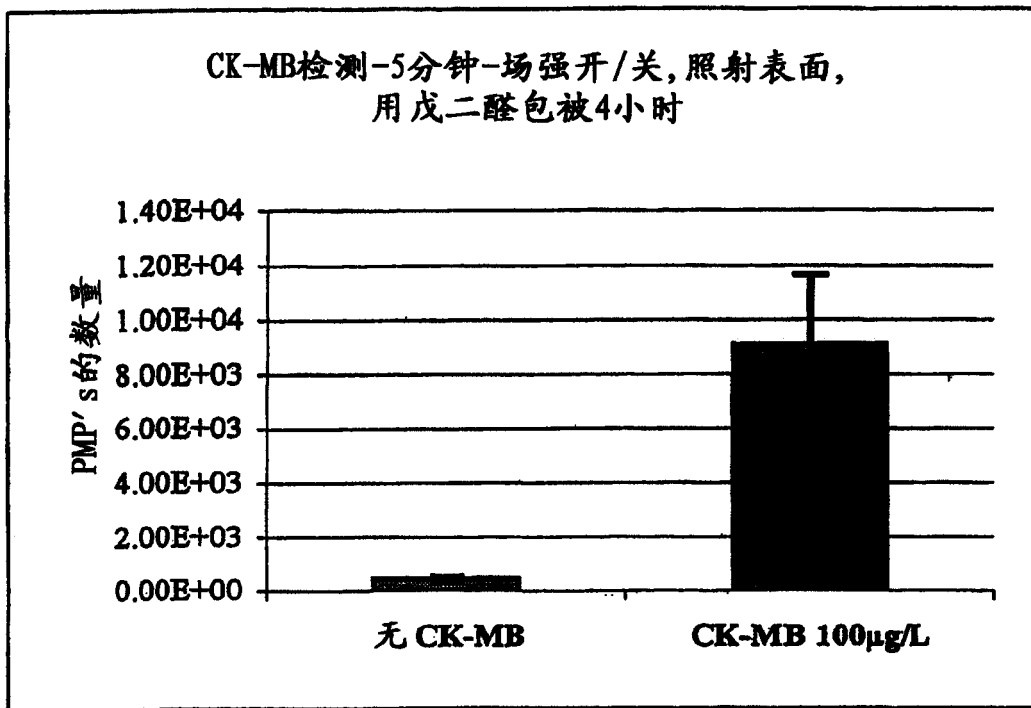


图6

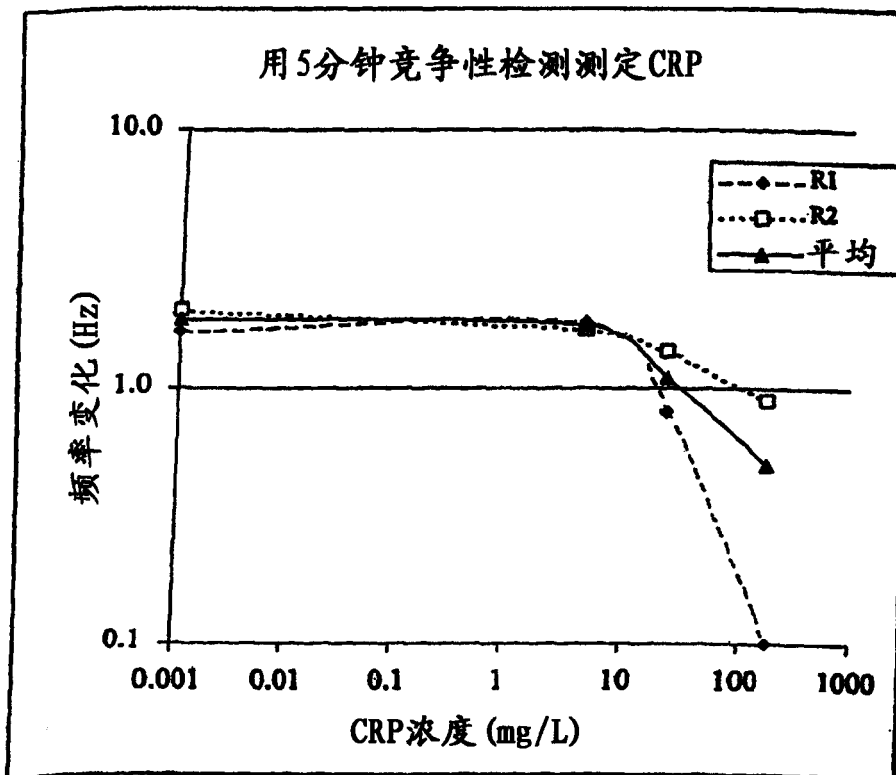


图 7

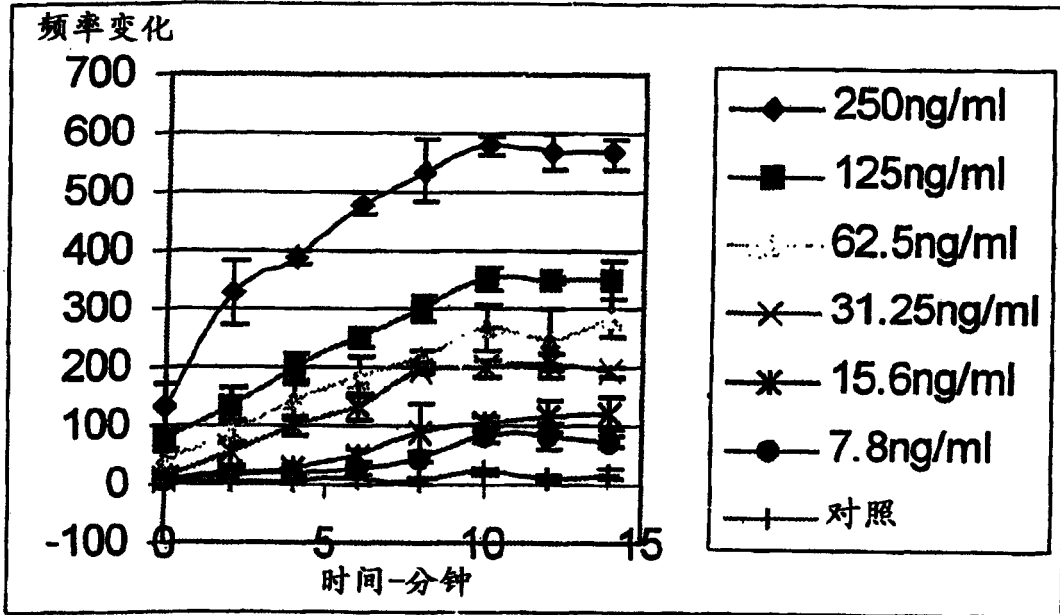


图 8

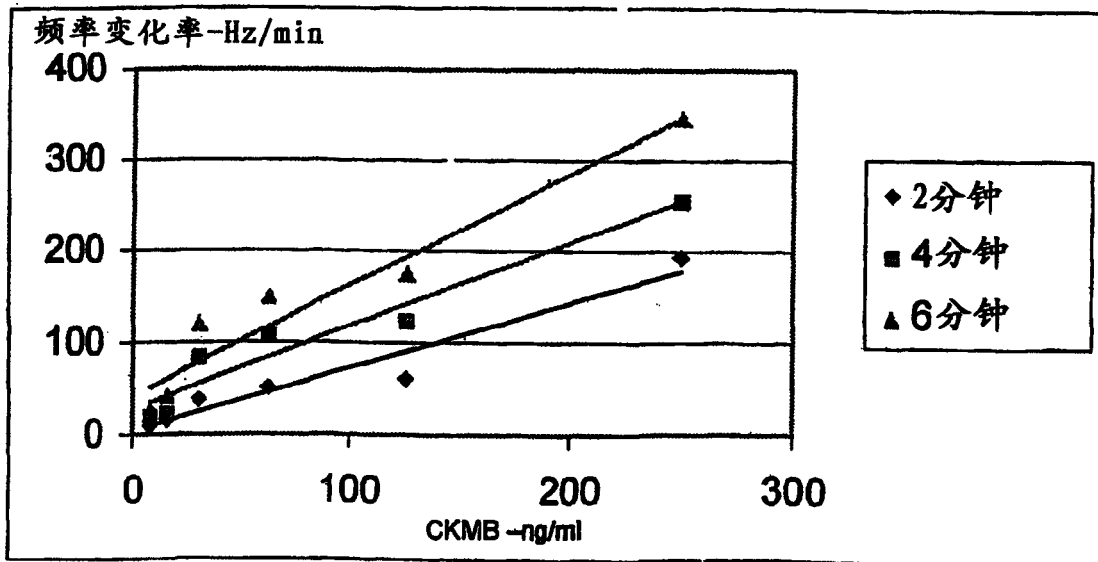


图 9

专利名称(译)	采用磁场的结合检测		
公开(公告)号	CN1608205A	公开(公告)日	2005-04-20
申请号	CN02820038.1	申请日	2002-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	兰道克斯实验有限公司		
申请(专利权)人(译)	兰道克斯实验有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	兰道克斯实验有限公司		
[标]发明人	理查德威廉姆勒克斯顿 比德霍金斯		
发明人	理查德·威廉姆·勒克斯顿 比德·霍金斯		
IPC分类号	B03C1/01 B03C1/28 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566		
CPC分类号	B03C1/01 B03C1/288 B03C2201/26 G01N33/54326		
代理人(译)	康建忠		
优先权	2001024341 2001-10-10 GB		
其他公开文献	CN100343669C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了一种实现结合检测的方法，包括如下步骤：(i)将目标分子与其亲和配体结合形成结合复合物，其中目标分子固定于磁性粒子上，亲和配体固定于支持物上；检测复合的磁性粒子数量，从而确定复合的目标分子的量，其特征在于，至少步骤(i)是在施加的磁场存在的情况下实施的。

