

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/58

G01N 33/543 C12Q 1/00

C12Q 1/68 A61K 49/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96192282.6

[45] 授权公告日 2004 年 3 月 31 日

[11] 授权公告号 CN 1144048C

[22] 申请日 1996.2.29 [21] 申请号 96192282.6

[30] 优先权

[32] 1995. 3. 1 [33] DE [31] 19508772.0

[86] 国际申请 PCT/EP96/00823 1996.2.29

[87] 国际公布 WO96/27133 德 1996.9.6

[85] 进入国家阶段日期 1997.9.1

[71] 专利权人 舍林公开股份有限公司

地址 联邦德国柏林

[72] 发明人 维尔纳·魏奇斯 罗曼·考蒂茨

卢茨·特拉姆斯 托马斯·邦特

审查员 飞竹玲

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 甘 玲

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 2 页

[54] 发明名称 利用剩磁测量进行分析物检测的方法和复合物

[57] 摘要

本发明涉及借助于结合剩磁测量对液相和固相中的分析物进行定量检测的方法，适用于此目的的复合物，以及在分析化学中的应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、用于定量和/或定性地对液相或固相分析物进行检测的方法，其中，

- (i) 首先用高铁磁性或亚铁磁性材料对结构特异性物质进行标记并形成胶体颗粒，所用的高铁磁性或亚铁磁性物质的内禀 Neelian 弛豫时间要大于测量时间，然后
- (ii) 将这些胶体颗粒用于要检测的样品中，
- (iii) 从样品外部用一个合适强度的磁场对其进行磁化，
- (iv) 关闭外部磁场后，用磁场传感器测量胶体颗粒的剩余磁化强度，由于特异性结合而产生的剩磁及其大小被用于分析。

2、如权利要求1的方法，其中代替结构特异性物质，要检测的分析物也可以用高铁磁性或亚铁磁性物质进行标记，并且在要测量的样品中加入结构特异性物质。

3、如权利要求1或2的方法，其中，结构特异性物质是抗体，抗体片段，生物素或是能与生物素特异性结合的物质，能与受体特异性结合的激动剂或它们的拮抗剂，特定的肽和蛋白质，受体，酶，酶的底物，核苷酸，核糖核酸，脱氧核糖核酸，糖类，或脂蛋白。

4、如权利要求3的方法，其中，所述能与生物素特异性结合的物质是卵白素或链霉亲和素。

5、如权利要求1的方法，其中，结构特异性物质的结合常数在 $10^5 - 10^{15} (\text{mol/l})^{-1}$ 的范围内。

6、如权利要求5的方法，其中，结构特异性物质的结合常数在 $10^7 - 10^{15} (\text{mol/l})^{-1}$ 的范围内。

7、如权利要求1的方法，其中，测量时样品被移动，从而样品信号被调制。

8、如权利要求1的方法，其中，像斜度计般钩吊着的感应线圈、饱和式磁力仪、高磁阻效应传感器、或磁阻转换器被用作磁场传感器。

9、如权利要求1的方法，其中，超导量子干涉器件被用作磁场传感器。

10、如权利要求1的方法，其中，对液相或固相的几个不同分析物的同时检测是通过对待测样品逐步磁化来进行的。

11、如权利要求10的方法，其中，为对几个分析物同时进行定量检测，使用了具有矫顽场强度的不同的高铁磁性或亚铁磁性物质。

12、如权利要求1的方法，其中所用的高铁磁性或亚铁磁性物质的 Neelian 弛豫时间在 20°C 时要大于 10^{-4} 秒。

13、如权利要求12的方法，其中，所用的高铁磁性或亚铁磁性物质的 Neelian 弛豫时间在 20°C 时要大于 1 秒。

14、如权利要求1的方法，其中，高铁磁性或亚铁磁性物质的颗粒大小在 1—到 1000 纳米的范围内。

15、如权利要求14的方法，其中，高铁磁性或亚铁磁性物质的颗粒大小在 2—500 纳米的范围内。

16、如权利要求1的方法，其中，高铁磁性或亚铁磁性物质用由寡聚或多聚碳水化合物化合物，蛋白质，肽，核苷酸，表面活性剂，合成聚合物，和/或脂类构成的外壳来稳定。

17、用于如权利要求1所述的方法中的复合物，其中，它们是由稳定的或准稳定的高铁磁性或亚铁磁性物质与结构特异性物质的结合物组成的，该高铁磁性或亚铁磁性颗粒的 Neelian 弛豫时间要大于 10^{-4} 秒。

18、如权利要求 17 的复合物，其中，高铁磁性或亚铁磁性颗粒的 Neelian 弛豫时间要大于 1 秒。

19、如权利要求 17 的复合物，其中，结构特异性物质是抗体，抗体片段，能与受体特异性结合的激动剂，细胞因子、淋巴因子、内皮缩血管肽，或它们的拮抗剂，其他特异的肽和蛋白质，受体，酶，酶的底物，核苷酸，核糖核酸，脱氧核糖核酸，糖类，或脂蛋白。

20、如权利要求 17 的复合物，其中，高铁磁性或亚铁磁性物质是由铁氧化物，铁酸钡，铁酸锶，纯铁，二氧化铬，镍和钴，以及铁氧化物与锰、铜、镍或钴的加合物构成的稳定或准稳定的胶体颗粒。

21、如权利要求 17 的复合物，其中，它们包含几种具有不同矫顽场强度的高铁磁性或亚铁磁性物质。

利用剩磁测量进行分析物检测的方法和复合物

技术领域

本发明涉及一种利用剩磁测量对液相和固相中的分析物进行定量和/或定性检测的方法，以及适合于这个用途的复合物，和在分析化学中的应用。

背景技术

与其他结合分析方法（如：受体结合分析）一样，定量免疫分析使测定大量物质成为可能，这些物质也可以是在各种不同组分的样品中生物学相关的。但一般来说，用这些方法，在一次分析中，每个样品只能测定一个参数。T. Chard 对现有的各种方法作了一个概述（参见《放射免疫分析及其相关技术简介：生化及分子生物学实验技术》，第四版，Elsevier 科学出版社，阿姆斯特丹，1990）。所有结合分析的基本原理是，用同位素标记或其他方法，使化合物具有高度的探测灵敏度，并结合高特异性的配体—受体反应。

但现有的分析方法有以下缺点：

- 对同一个样品中多个分析物同时进行探测的方法，是基于让分析物结合多种放射的、荧光的或是酶标探针。而定量测定分析物的探针是否结合一般是在下一步的分离和洗涤之后进行的。因此，合适的不同的探针标记的数量是很有限的。例如，用不同的放射性同位素作探针标记时，所谓的重叠现象就会发生，从而导致各独立信号的精度锐减。用多种酶作为探针标记会引起可比性问题，这个障碍是由于必须研究反应条件，以使同时检测同一系统中的多个酶学反应成为可能。

在 JP3-220442A 公开出版物中描述的方法中，通过测量抗体中介凝集（凝集作用）的程度的抗原滴定度测定是借助于如下方法来进行的，即，在该公开物中公开的测定凝集磁性颗粒的大小。测定颗粒大小方法的要点是：连接穿过静止、沉积的试样，并测量集聚磁性颗粒的残留的磁通量密度。

从 US-4,661,408 的公开出版物已知含有由二氧化铬与抗体偶联构成的超顺磁性颗粒的铁磁流体。它要求具有极短的内禀弛豫时间的颗粒；因此，这些颗粒不能满足剩磁测量的需要。

- 这类方法的探测灵敏度受到例如基质和探针之间非特异性相互作用，或是探针的标记能力（低特异性活性）的限制。

- 这类方法的成功的实施经常需要一步一步地得到样品材料（例如，先从全血中取出血清或血浆，接着用有机溶剂提取样品，再用层析方法浓缩分析物，等等步骤）。

- 为成功地实施该方法，确保结合与未结合受体或配体分离步骤的分离和洗涤是必不可少的。

- 在进行放射免疫分析时，必须使用放射性核素，而这既昂贵又不易于操作。

- 在实践中，所使用的标记物的储存常引起问题，因为它们要么不稳定（如在放射性免疫分析时）并因此必须经常更换，要么因为其较强的反应活性而影响环境。

本发明的目的是要发现一种新的比上述的现有技术要先进的方法和物质。

发明内容

已经发现，如果将稳定或准稳定的高铁磁性(ferromagnetic)或亚铁磁性(ferrimagnetic)物质作为磁标探针用于免疫分析或是结合分析，而将样品的剩余磁化强度作为要被检定的测量参数，则在液相和/或固相对分析物进行定量的和/或定性的检测是可行的。

以下，第一次描述了克服已知方法的缺点的方法：

按照本发明的方法基于胶体状的高铁磁性或亚铁磁性物质，也即下文所说的磁标，它与要检测的物质，也即下文所说的分析物——或是结构特异性物质相结合。这种磁标与分析物或是结构特异性物质的结合物也即下文所说的磁学标识物。术语胶体状物质的使用一方面说明颗粒或物质的大小尺寸和胶体一个量级，即从1纳米到约1000纳米，另一方面说明它们是在一种合适的分散介质，大多数情况是以水性的中的分散相中使用的。当然，出于提高保质期和运输性能的目的，胶体状物质，也即下文所说的颗粒也可以干态或冷冻存在；但在实际测量时，它们一般以液相分散态存在。

本发明涉及的一个重要理论是，当外部磁场关闭后，高铁磁性或亚铁磁性的胶体物质的磁化强度与时间的关系非常敏感的依赖于材料以及所用颗粒的形状（所用颗粒材料的各向异性常数）、体积和温度。这是由于颗粒的内禀磁化矢量的旋转造成的。这即所谓的 Neelian 弛豫。如果颗粒磁化强度衰减的时间尺度小于测量的时间尺度，这种超顺磁性就认为是物质内在的。如果颗粒的 Neelian 弛豫时间比观察周期长得多，这种颗粒就被称为剩磁颗粒或是稳定颗粒。如果颗粒的 Neelian 弛豫时间与观察周期在同一数量级，就称其为准稳定颗粒。

本发明涉及的另一重要理论是，当外部磁场关闭后，自由运动的稳定和准稳定的高铁磁性或亚铁磁性胶体颗粒整体的磁化强度在测量时间尺度内的衰减归因于

另一个机制。在这种情况下，全体胶体颗粒在包围它们的液体中发生旋转，从而，时间常数与颗粒（包括其外壳）的流体力学尺寸、载流体的粘滞性以及温度有关。这些参数主要是由颗粒所处的环境决定的。这个机制被称之为 Brownian 弛豫或外禀超顺磁性(extrinsic superparamagnetism)。

根据本发明，对液相和固相的分析物的定性的和/或定量的检测方法按以下步骤实施：

- (i) 首先用高铁磁性或亚铁磁性材料对结构特异性物质进行标记并形成胶体颗粒，所用的高铁磁性或亚铁磁性物质的内禀 Neelian 弛豫时间要大于测量时间，然后
- (ii) 将这些胶体颗粒用于要检测的样品中，
- (iii) 从样品外部用一个合适强度的磁场对其进行磁化，
- (iv) 关闭外部磁场后，用磁场传感器测量胶体颗粒的剩余磁化强度，由于特异性结合而产生的剩磁及其大小被用于分析。

在结合和未结合标识物之间仅在特殊情况下才有可能的差别在按本发明的方法中使在液相中未结合的磁学标识物的衰退剩磁（外禀超顺磁性）的应用成为了可能。而所有结合了磁性的标识物显示出了可测的剩磁，其剩磁与颗粒的材料有关。这样，在对待测样品的剩磁进行测量时，只有结合了的磁学标识物的剩磁的那部分可以被测到。这一方法，即下文所说的对结合剩磁的测量或结合剩磁测量，是基于对结合了的结构特异性标识物的定量检测的。

换句话说，对分析物的检测可以不需要昂贵的分离和洗涤步骤，因为只有被分析物为获得特异性而与结构特异性物质结合的特异性结合的稳定的或准稳定的高铁磁性或亚铁磁性的物质才有剩磁，而同时在样品中存在的未结合的稳定或准稳定的高铁磁性或亚铁磁性的物质（尽管也结合着结构特异性物质）的剩磁却在开始测量前就由于外禀超顺磁性而衰减了。

在本发明的另一个实施方案中，这个方法可以作如下改变，即：让分析物本身而不是结构特异性物质与稳定或准稳定的高铁磁性或亚铁磁性的物质结合，就如同在竞争性的放射免疫分析中常采用的方法。当然，结构特异性物质还是得另外加入到样品中。

本方法亦可以用于多分析物分析，即同时直接检测液相或固相中的多个不同分析物。要达到这个目的，必须首先对各分析物用不同的高铁磁性或亚铁磁性的胶体状

物质，且这些物质必须有足够的可区分的矫顽磁场强度，进行标记。在磁学标识物的结合过程中，施加一个磁场（初始磁场）使样品中包含的所有磁学标识物都与样品的磁轴同向。

然后，测量样品剩磁。进一步的步骤是，用一个外部的反向磁场（与初始磁场反向），其强度与磁标的矫顽磁场强度相符，来逐步使样品退磁。这样，只要标记物矫顽磁场强度小于外加磁场，这些标识物总是会特异性地重新取向的。这样，在每一步退磁之间，样品的剩磁被再一次重新测定。

结合磁学标识物的不同部分就可以通过在各个单个退磁步骤中对样品剩磁的测量来量化。

这个方法使对每一样品中多个分析物的同时检测成为可能。

本发明所采用的方法以及该方法的各种变化可以用于生育力(fertility)，组织相容性，过敏学，传染病学，卫生学，遗传学，病毒学，细菌学，毒理学，病理学，环境分析及医学诊断。

结合剩磁的测量是用适合于这一目的的已有的测量仪器，如超导量子干涉器件（SQUIDs）来进行的，这样，首先用一个合适的磁场进行磁化，然后在关闭磁场后，由灵敏的磁场传感器测量磁化了的物质结构特异性物质的剩磁或是与此有关的信号。

在测量过程中，样品的移动是有助于测量的，通过振动或旋转样品来调制信号对测量尤其有利。这可以保证将直流测量信号转换到一个高频区段。

在测量中——除了上面所说的量子干涉器件（SQUIDs）外——如斜度计般钩吊着的感应线圈，饱和式磁力仪，高磁阻效应传感器，或磁阻转换器也可以使用。

在使用那些能测量直流磁场的传感器（如，SQUIDs、饱和式磁力仪，高磁阻效应传感器，或磁阻转换器）时，对样品进行磁化后就可以测量剩磁而不移动样品。

一个合理的测量方案由图1的实施例所描述。下文的实施例也采用这样的方案。

本发明的另一方面涉及对结合剩磁的测量所用的复合物。合适的复合物由胶体状的悬浮物、高铁磁性或亚铁磁性物质及结构特异性物质或分析物组成。

在本发明所涉及的范围之内，结构特异性物质是指所有与所要求研究的结构特异性结合的物质，例如，抗体，抗体片断，生物素，或是与生物素能特异性结合的物质，如卵白素或链霉亲和素，能与受体特异性结合的激动剂如细胞因子、淋巴因子、

内皮缩血管肽(endothelins)或它们的拮抗剂, 特异性肽和蛋白质, 受体, 酶, 酶的底物, 核苷酸, 核糖核酸, 脱氧核糖核酸, 碳水化合物, 脂蛋白等等。其中, 优选其中那些结合常数在 $10^5 - 10^{15}(\text{mol/l})^{-1}$ 的物质, 尤其是结合常数在 $10^7 - 10^{15}(\text{mol/l})^{-1}$ 的物质。

对于高铁磁性或亚铁磁性胶体物质, 所有内禀 Neelian 弛豫时间大于或等于测量时间, 即所谓稳定的或准稳定的高铁磁性或亚铁磁性物质都可以使用。

尤其合适的高铁磁性或亚铁磁性物质在 20°C 时其弛豫时间大于 10^{-4} 秒。尤其合适的是所有的高铁磁性或亚铁磁性物质的弛豫时间大于 1 秒。

让高铁磁性或亚铁磁性物质带一个由寡聚糖或多聚糖, 蛋白质, 肽, 核苷酸, 表面活性剂, 合成多聚物和/或脂构成的外壳将有利于其稳定。

高铁磁性或亚铁磁性颗粒的大小在 1 纳米到 1000 纳米之间是有利的。尤其优选 2 纳米到 500 纳米大小之间的颗粒。(关于颗粒大小的值与其流体力学尺寸有关。)

高铁磁性或亚铁磁性物质, 尤其是由铁氧化物 (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), 铁酸钡, 铁酸锶, 纯铁, 二氧化铬, 镍, 钴, 以及铁氧化物与锰、铜、镍或钴的加合物(如在 DE 30 27 012 和 DE 41 16 093 中描述的)组成的稳定的或准稳定的胶体颗粒是合适的。

本发明所用的、由稳定或准稳定的高铁磁性或亚铁磁性物质组成的、并能与结构特异性物质或分析物接合的复合物的制备方法是借助与免疫化学、多肽化学和蛋白质化学领域的相似的方法进行的。这样, 结构特异性物质或分析物就通过共价键与形成高铁磁性或亚铁磁性物质的起稳定作用的外壳的物质相连接。作为这些起稳定作用的外壳, 如碳水化合物, 多肽, 核苷酸, 蛋白质, 脂, 表面活性剂或是多聚物是合适的。尤其合适的键合方法有, 例如用碳化二亚胺的活化和偶联 [Jakoby and Wilchek, eds., (1974) *Methods Enzymol* 34]; 在含碳水化合物的复合物上通过高碘酸盐的作用形成希夫氏碱 [Wichek and Bayer, eds., *Methods Enzym* 184:77], 并可以为了进一步稳定而再进行还原; 用戊二醛进行偶联 [Heitzmann and Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71 (1994) 3537]; 溴乙酰化合物颗粒与巯基物质(thiolylated substances)的交联 [Angerer et al., *Cell* 9 (1976) 81], 以及还原烷化作用 [Bayer et al., *J. Histochem. Cytochem.* 24 (1976) 933]。

高铁磁性或亚铁磁性胶体颗粒也可以用结构特异性物质或分析物自身形成其稳定外壳来产生,即通过在颗粒制成后取出直接投入结构特异性物质或分析物的溶液中,同时可以选择性的加入一些辅助物,如蛋白质,碳水化合物,以及天然的、人工合成的或部分人工合成的表面活性剂,或者可以直接在有结构特异性物质或分析物存在的情况下产生颗粒。

为了进行多分析物分析,就要使用含多种不同磁学标识物的复合物的混合物,为此,不同的磁学标识物就由待测的不同的结构特异性物质或分析物与不同的高铁磁性或亚铁磁性物质的结合组成。本发明采用不同磁学标识物之结合的原理是,用具有不同矫顽磁场强度 (H_c) 的高铁磁性或亚铁磁性物质作为磁标分别标记待测的不同的结构特异性物质或分析物,为此,不同磁标的矫顽磁场强度 (H_c) 和剩余磁化强度 (M_R) 要预先用一些已知的方法分别测出来,因而是已知的。

标记了高铁磁性或亚铁磁性胶体颗粒的结构特异性物质也可以以干态存在(如:冻干),可选择与易于干燥或能提高干态产物稳定性(如:冻干物)的其他辅助物的结合。在使用前,用合适的悬浮介质可以立即将这种冻干物进行重新悬浮以备使用。

本发明的另一方面还涉及在合适的悬浮介质中用于结合剩磁测量的高铁磁性或亚铁磁性胶体颗粒。

至于悬浮介质,所有能让胶体颗粒自由运动的液体都是合适的。如果在测量的进行不需要分离和洗涤,那么,悬浮介质的粘滞性就必须和高铁磁性或亚铁磁性物质的 Neelian 弛豫时间以及测量时间相匹配,因为悬浮介质基本上决定了 Brownian 弛豫的时间常数。否则,例如,在高粘度的悬浮介质(如:80%的甘油)中使用弛豫时间短的颗粒(如,0.01秒),而测量时间又很短(如在关闭外磁场后0.0001秒就进行测量),这样的话,Brownian 弛豫(外禀超顺磁性)的衰减就会很慢,以至于不能区分结合和未结合的结构特异性标识物。通常有利的是使用粘度小于100mPas 的悬浮介质。

作为悬浮介质,水,表面活性辅助物(如表面活性剂、寡聚或多聚碳水化合物及蛋白质)的水溶液,或醇与水的混合物,如甘油和聚乙二醇的水溶液是合适的,由于水适合于注射,故是优选的。悬浮介质还可以含有能改变渗透压的辅助物,如普通的盐。另外,可含有决定 pH 的缓冲性物质,如磷酸盐。

本发明的另一目的是所说的复合物在本发明的方法中用于测量结合剩磁中的应用。

根据结合识别的物理机制，非特异性测量信号（本底现象）大部分被排除了。这样，该方法的特异性就只取决于结构特异性物质“真的”特异性（抗体的交叉反应，配体的非特异性结合）。

由于本发明所用的方法的高灵敏性，它容易保持在其他结合分析方法经常遇到的检测极限之下。

和已知的方法（JP - 235774 和 WO91/15243）相反的是，在本发明所用的方法中，磁化不是静态的，结合剩磁或信号所基于的测量不是在有外部磁场存在时测量的，而是在没有磁场的情况下测量的。只有这样，处于结合态的标识物的数据才能测得。

另外，这样可以防止测量信号受到抗磁的或是顺磁的组份或污染物的干扰，从而进一步提高测量的灵敏度。

本发明所说的结合剩磁测量方法，还可以用于检测高铁磁性或亚铁磁性物质在体内的滞留部位。由于可以用高铁磁性或亚铁磁性物质进行结合剩磁测量，这就避免了放射性同位素格外危险的应用，并且，本发明所用方法的灵敏性达到了常用的 γ 闪烁谱仪（gamma scintigraphy）及正电子发射层面 X 射线照相术等核医学方法的精度。并且，事先不需要对在血液中循环的非结合的标识物进行分离，因为与发射性诊断方法相反，这些未结合的标识物并不会产生“干涉信号”，因此不会影响对特异性结合的标识物的检测。

按照本发明，给病人施用稳定或准稳定的高铁磁性或亚铁磁性物质的悬浮液。局部给药，口服给药及各种非肠道给药的给药方式都可以。血管内的给药形式是尤其适合的。

胶体物质在有机生物体里扩散，故它在体内的分布形式将受到给药方法以及各种药动力学参数的影响。施用这些稳定或准稳定的高铁磁性或亚铁磁性物质后，在不同的时间进行结合剩磁的位置鉴别测定，检测体内的病理状态，而这些病理状态可能正是由不正常的聚集或是不能聚集的发生为特征的。

为了实现人体病理结构的可视化，采用结合了结构特异性物质的稳定或准稳定的高铁磁性或亚铁磁性物质（磁学标识物）是尤其有利的。因为，磁学标识物与病理

结构特异性结合的结果表现为一个特异性的信号,而这个信号可以按照本发明用所述用于进行结合分析的结合剩磁方法进行体内测量。

作为按照本发明的稳定或准稳定的高铁磁性或亚铁磁性物质与结合剩磁测量方法的结合应用的一个实例,可以提及使用肿瘤特异性磁学标记物检测体内的肿瘤。肿瘤特异性标识物可以是,例如,稳态或准稳态高铁磁性或亚铁磁性物质与肿瘤特异性物质,如抗体,抗体片段,肽,受体,蛋白质,核酸,寡核苷酸,以及单-、寡-或多聚碳水化合物的结合物。

在另一些可能的应用实例中,如凝块、动脉硬化斑、炎性反应、风湿或类风湿病等的可视化,用本发明的稳定的或准稳定的高铁磁性或亚铁磁性材料与对应病理结构的特异性物质磁学标识物结合物也是有利的。

按照本发明,给人施用的稳定或准稳定的磁学标识物在体内的空间分布的测量,可以按以下两种不同情况进行:

1、在身体的有利部位产生一个尽可能均匀的磁场,然后关闭磁场,用一个 SQUID - 多通道传感器,就象例如在生物磁性检测 [cf. D. Drung, IEEE Trans. Appl. Supercond., 5 (1995) 2112-2117] 时所用的,测量结合剩磁的空间分布。这个传感器应当尽可能完全地包围测量对象。为了获得充分多的测量信息,用连续光栅对测量对象进行重复测量将是有利的。

2、依次产生一个空间上受到限制的磁场,然后关闭磁场,用一个单通道传感器测量空间结合剩磁。当然也可以用多通道传感器。

用这两种方法,优选在所有三个空间方向上对检测对象进行磁化并对产生的磁场进行测量,以保证最大限度的信息采集。

对测量数据的分析,可以用适当近似的方法。如,磁偶极子,多极子,或多-偶极子的模型可用来作为离散的点。这个模型的一些特定参数,尤其是磁偶极子、磁多极子的定位,可以通过采用一些近似方法来得到,从而使测量结果与模型参数的偏差最小。磁性颗粒的空间分布可以用本领域的已知方法从这些参数得到。

类似的方法已为人所知,并已在生物电流的磁场分析研究中得到证明。

在体内测量结合剩磁时,用于体外测试的物质或由其制备的试剂基本上还是可用的。

能够被生物降解并具有相容性的磁标在体内应用是特别合适。尤其是由铁氧化物或铁氧化物与锰和钴的结合物组成的磁标更是如此。按现有的方法,如磁自旋层面X射线照相术,也就是在WO 92/12735,WO 92/22586,以及EP 0 186 616中描述的方法,也使用能够被结构特异性物质键合的磁性颗粒。本发明的另一个方面还涉及到使用磁标在体内测量结合剩磁的应用。

与结合剩磁测量在体内应用相联系的结构特异性物质尤其定义为所有能与所要鉴别的人体的结构特异性结合的物质。尤其合适的是抗体、抗体片段、能与其受体特异性结合的激动剂或它们的拮抗剂、特定的多肽和蛋白质、受体、酶、酶的底物、核苷酸、核糖核酸、脱氧核糖核酸、碳水化合物或脂蛋白。能与受体结合的激动剂中,尤其合适的是细胞因子、淋巴因子或内皮缩血管肽(endothelins)。

所有结合常数在 $10^5-10^{15} (\text{mol/l})^{-1}$ 之间的结构特异性物质都是合适的,尤其是结合常数在 $10^7-10^{15} (\text{mol/l})^{-1}$ 之间的结构特异性物质。

具体实施方式

下面的一些实施例只是对本发明的目的的更具体的解释,并不是说本发明只限于这些实施例。

实施例 1

将 100 微克的胶原 III 单克隆抗体,下文称之为抗胶原 III,溶解于 500 微升 0.1M 的碳酸氢钠溶液中。1 毫升以葡聚糖包裹的磁铁矿悬浮液(Meito Sangyo 出品),其中,铁含量为 1 摩尔/升,颗粒大小为 40 纳米左右(流体力学直径),用 0.1M 的碳酸氢钠溶液在 Sephadex 柱(Pharmacia PD 10)中进行缓冲。将 0.5 毫升含 10 毫摩尔高碘酸钠的溶液加入该悬浮液中。溶液在黑暗中放置 2 小时。然后,用 0.1 M 碳酸氢钠溶液在 PD10 中洗脱。再将抗胶原 III 溶液加入到悬浮液中。混合溶液在 4°C 黑暗中放置 3 小时。接着加入 5 毫克 NaBH_4 固体,略微旋转振荡。混合物再在 4°C 黑暗环境中放置 8 小时。然后,磁标记了的抗胶原 III(下文称为磁抗胶原 III)用磷酸缓冲的普通盐溶液(PBS, $\text{pH}=7.4$)通过 PD 10 柱进行洗脱。

将在 200 微升缓冲液(磷酸缓冲的普通盐溶液(PBS))中的 5 微克胶原 III 溶液置于聚苯乙烯样品皿中培养。(样品皿在这里作为固相,一部分胶原可以吸附在上面)。然后弃去液相。再用含 0.1% 的吐温 20(下文称为 PBST)冲洗样品皿 3 次,以洗去未附着的胶原 III。接着,用溶解在 200 微升 PBST 中的 5 微升磁抗胶原 III 加到样品皿中。在室温下保温 1 小时。然后,样品在一个磁屏蔽室里,用位于超导

量子干涉器件探测器下方 4 厘米处、强度为 2mT 的磁场进行磁化（参见图 1）。关闭磁场后对样品进行测量。为此，样品在测量期间被从磁化线圈中取出。在关闭磁场后，将样品从测量场中取出前和取出后，而剩磁则由于检测磁场强度的变化而产生。在本例情况下，剩磁被发现了。

实施例 2

将在 200 微升 pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中的 5 微克胶原 V 溶液，置于一由聚苯乙烯制成的样品皿中进行培养。然后，去除液相物质。样品皿用 pH 7.4 的 PBST 缓冲溶液冲洗 3 次。将在 200 微升 PBST 中的按实施例 1 制备的 5 微克磁抗胶原 III 加到样品中。在室温下培养 1 小时。接着在一磁屏蔽室里，用磁场强度为 2mT、位于超导量子干涉器件（SQUID）检测器下 4 厘米的磁场对样品进行磁化（参见图 1）。关闭磁场，对样品进行测量。为此，样品在测量期间被从磁化线圈中取出。在此样品中含有胶原 V，没有检测到剩磁现象。

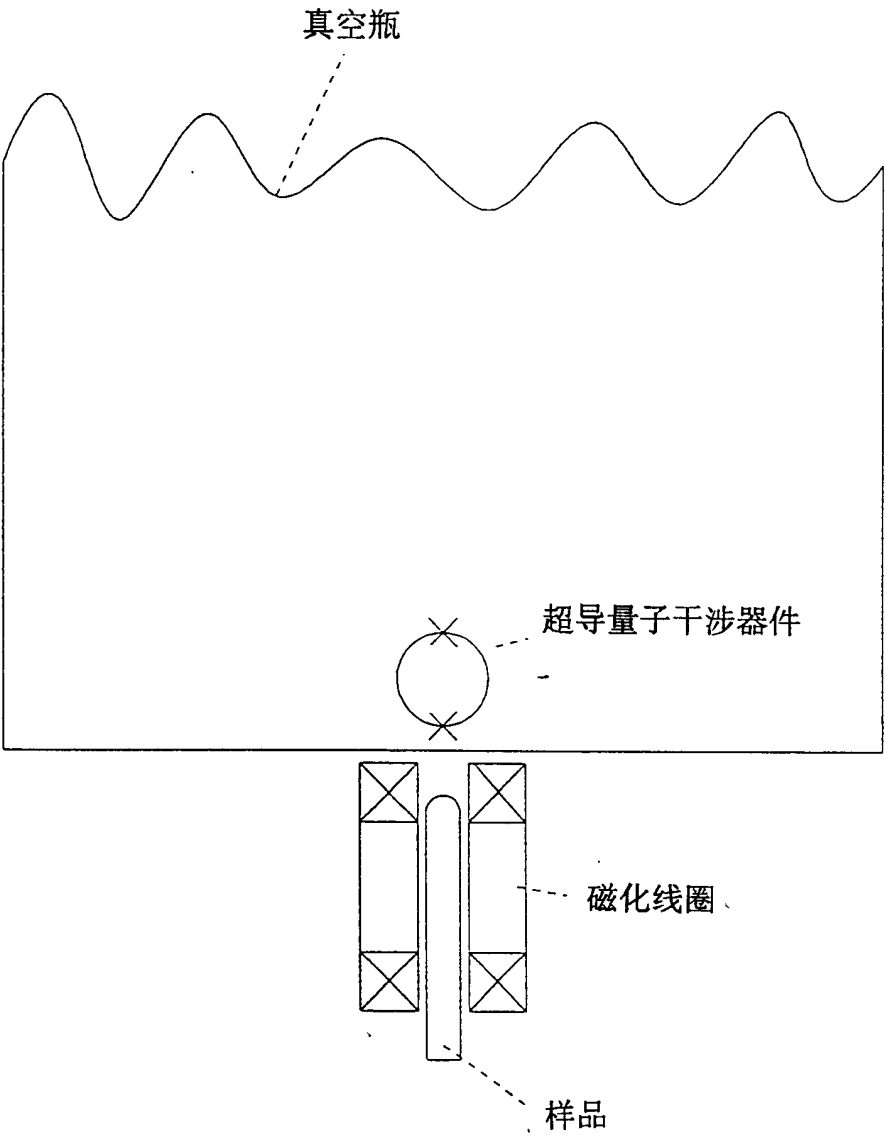
实施例 3

由 10ml 1.9 mg/ml 胶原 III 的 PBS（pH 7.4）溶液，各制备了 5ml（如下稀释液 1000ng/ml, 100ng/ml, 10ng/ml）。

从各个稀释液中各吸取 1ml 用移液管移到聚苯乙烯（试管 2.5 ml 容量）中。3 个样品试管在 37°C 下抑制 1 小时。然后去除试管中的内容物。试管分别用 1ml 的 PBST 冲洗 3 次。

分别将 1ml 的根据实施例 1 中所述方法制备的磁标抗体的 1:100 稀释液加到每个试管中。然后将试管在室温下放置 1 小时。接着，用图 1 所示的测量装置对样品进行磁化（2mT），关闭磁场后，对样品进行测量。为此，样品在测量期间被从磁化线圈中取出。被测信号的估计量即是结合剩磁的量度，并得到如图 2 如示的关系。

图1



在测量时样品被移动

图2

