



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104838266 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201380063369. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 10. 09

G01N 33/543(2006. 01)

G01R 33/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

12188204. 7 2012. 10. 11 EP

12192353. 6 2012. 11. 13 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 06. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/071066 2013. 10. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/056987 DE 2014. 04. 17

(71) 申请人 ORGEN 技术诊断有限公司

地址 德国美因茨

(72) 发明人 V·基斯特 W·贝格 V·左斯基克

(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 11038

代理人 俞海舟

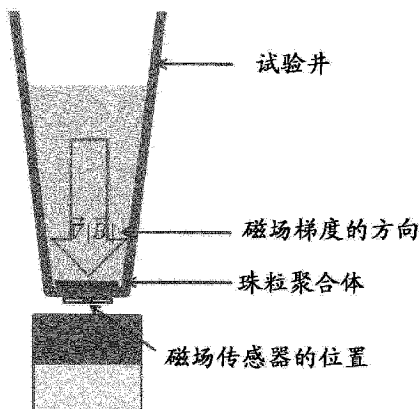
权利要求书1页 说明书9页 附图14页

(54) 发明名称

借助可磁化珠粒检测分析物并且确定分析物
浓度

(57) 摘要

本发明涉及用于检测样本中的分析物的方
法、试剂和装置。



1. 一种用于检测样本中的分析物的方法,包括下述步骤:
 - (a) 使样本与可磁化珠粒接触,所述珠粒涂有结合分子,从而根据样本中的分析物的存在和 / 或浓度实现可磁化珠粒的聚合,并且
 - (b) 通过磁性检测确定可磁化珠粒的聚合程度。
2. 根据权利要求 1 的方法,其特征在于,步骤 (a) 和 (b) 在试验井中实施。
3. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其特征在于,步骤 (b) 包括施加磁场,该磁场引起可磁化珠粒的移动。
4. 根据上述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,在步骤 (b) 中珠粒聚合程度的检测包括确定可磁化珠粒在非均匀磁场中的移动。
5. 根据上述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,步骤 (b) 包括通过施加磁场使珠粒磁化,由此珠粒产生附加磁场,测量所述附加磁场的随着时间的变化。
6. 根据上述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,使用具有过滤元件的试验井,该过滤元件对于未聚合珠粒比珠粒聚合体具有较大的渗透性。
7. 根据上述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,步骤 (b) 包括使用具有零场点的环形磁铁来施加磁场。
8. 根据上述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,步骤 (b) 包括间歇性地施加磁场。
9. 一种用于检测样本中的分析物的试剂,包括一个或多个种类的可磁化珠粒,所述珠粒涂有结合分子,从而能够根据样本中的分析物的存在和 / 或浓度实现可磁化珠粒的聚合。
10. 一种用于检测样本中的分析物的装置,包括:
 - (a) 试验井;
 - (b) 用于在试验井中产生磁场的磁铁;和
 - (c) 磁场传感器,该磁场传感器用于测量试验井中的磁场的随着时间的变化。

借助可磁化珠粒检测分析物并且确定分析物浓度

[0001] 本发明涉及用于检测样本中的分析物的方法、试剂和装置。

[0002] 有许多不同的用于检测分析物、如用于医学诊断的临床参数的方法,在其中借助适合的方法、尤其是光学和 / 或电化学的方法确定样本中的分析物的存在和 / 或浓度。

[0003] 本发明所基于的任务在于提供一种新型并且简单的用于检测分析物的方法以及适用于此的试剂和装置。

[0004] 在本发明中,借助可磁化珠粒确定待检测的分析物的存在或浓度,所述珠粒涂有结合分子,从而珠粒可根据样本中的分析物的存在和 / 或浓度发生聚合或者说交联。磁性检测所述聚合或交联的程度,由此可定性和 / 或定量地确定样本中存在的分析物。

[0005] 本发明的第一个方面涉及一种用于检测样本中的分析物的方法,包括下述步骤:

[0006] (a) 使样本与可磁化珠粒接触,所述珠粒涂有结合分子,从而可磁化珠粒根据样本中的分析物的存在和 / 或浓度实现聚合,并且

[0007] (b) 通过磁性检测确定可磁化珠粒的聚合程度。

[0008] 本发明的另一方面涉及一种用于检测样本中的分析物的试剂,该试剂包括一个或多个种类 (species) 的可磁化珠粒,所述珠粒涂有结合分子,从而可磁化珠粒能够根据样本中的分析物的存在和 / 或浓度聚合。

[0009] 所述试剂可用于磁性检测分析物的方法、尤其是如上所述的方法中。

[0010] 本发明的另一方面涉及一种用于检测样本中的分析物的装置,该装置包括:

[0011] (a) 试验井、

[0012] (b) 用于在试验井中产生磁场的磁铁和

[0013] (c) 磁场传感器,用于测量试验井中的磁场的随时间的变化。

[0014] 所述装置可用于磁性检测分析物的方法、尤其是如上所述的方法中。

[0015] 本发明涉及样本中的分析物的检测。分析物原则上可以是任一可通过结合到一种或多种特异性结合配偶体 (Bindpartner) 上来检测的物质。分析物例如是蛋白质、如抗体、受体、受体配体、酶等、核酸、如 DNA 或 RNA、激素、信号发射器、代谢物、药物、毒品或病原体、如病毒或细菌、或任何其它类型的可检测的物质。该方法优选用于检测抗体、如针对病原体的抗体、自身免疫性抗原、代谢物等。

[0016] 样本优选是生物来源、如体液样本、如血液、血清、血浆、尿液、唾液、脑脊髓液等、组织样本、细胞培养物样本、法医样本、环境样本等。

[0017] 根据本发明使用可磁化珠粒,其优选是可磁化纳米珠。珠粒优选具有 1-10000 纳米范围内的大小、特别优选为 5-1000 纳米并且最优选为 10-100 纳米。珠粒是可磁化的。优选珠粒是顺磁性珠和 / 或超顺磁性珠。它们例如可由钴制成或含有钴。其它可能的材料是铁或氧化铁 (如磁铁矿或铁合金)。在一种优选实施方式中,珠粒是由磁铁矿制成或含有磁铁矿的顺磁性和 / 或超顺磁性珠。已证明含有磁铁矿颗粒的聚合物珠粒尤为有利。有利的是,使用具有高饱和磁化强度、如 1-200emu/g、优选 2-70emu/g 或 50-200emu/g 的珠粒,以便产生尽可能强的待检测信号。

[0018] 珠粒涂有结合分子,以便与分析物的存在和 / 或浓度相关地实现珠粒的交联或者

说聚合。

[0019] 在某些实施方式中,使用这样的结合分子,其构成分析物的特异性结合配偶体、即与分析物发生特异性相互作用,如通过抗体 / 抗原结合、受体 / 配体结合或通过核酸杂交。当分析物例如是抗体时,则用于检测的珠粒可涂有由抗体识别的抗原。另一方面,当分析物是抗原时,则珠粒可涂有针对抗原的抗体或抗体片段。当分析物是核酸时,则珠粒可涂有与分析物互补的核酸(或核酸类似物)。

[0020] 在另外的实施方式中,可使用这样的结合分子,其间接地、即通过非固定化的结合配偶体与分析物特异性地结合。因此,“通用的”结合分子、如针对特定种类(如小鼠、大鼠等)的抗体的恒定域的抗体可被固定化到珠粒上。然后将该特定种类的非固定化抗体用作检测抗体,其可与分析物特异性地结合。

[0021] 在另外的实施方式中,珠粒也可涂有分析物本身或涂有分析物类似物,例如用于竞争试验。

[0022] 在本发明中可使用唯一种类的珠粒、即涂有一种结合分子的唯一种类的珠粒,或使用多种类的珠粒、即涂有不同结合分子的多个种类的珠粒。

[0023] 另外,也可在试验中加入非固定化的结合分子、如用于分析物的非固定化结合配偶体、或珠粒之间的连接分子,所述连接分子与分析物和珠粒的结合竞争。

[0024] 可通过已知方法为珠粒涂覆结合分子、如通过吸附、例如在使用化学偶联试剂的情况下的共价键、和 / 或例如通过生物素 / 链霉亲和素结合的高亲和力相互作用。

[0025] 在特定实施方式中,可优选为珠粒设置基底涂层、优选亲水性的基底涂层,以便减小基于疏水和 / 或磁相互作用的非特异性自聚合。在另外的实施方案中,也可利用非特异性聚合的效果来确定分析物的浓度。

[0026] 下面详细说明试验形式的不同实施方式。第一种实施方式涉及具有多个用于结合分子的结合位点的分析物的检测、如抗体的检测。该实施方式在图 1 中示出。当 C 型分子(分析物)具有多个用于 A 型分子(结合分子)的结合位点时,进行如下操作:为珠粒涂覆 A 型分子。优选随后制备均匀的珠粒悬浮液。然后将珠粒和含有待检测浓度 c 的分析物 C 的样本液体放入试验井中。C 型分子结合到珠粒表面上的 A 型分子上。由于分析物 C 含有多个用于 A 的结合位点,所以珠粒发生聚合。分析物 C 的浓度 c 越高,珠粒的聚合程度就越高。

[0027] 在另一种实施方式中采用这样的试验形式,其能够确定具有用于两种不同的结合分子的结合位点的分析物。该实施方式在图 2 中示出。D 型分子(分析物)具有用于 A 型结合分子的一个或多个结合位点以及用于 B 型结合分子的一个或多个结合位点,因此部分珠粒被涂上 A 型分子(=“A 型珠粒”)并且另一部分珠粒被涂上 B 型分子(=“B 型珠粒”)。优选首先制备均匀的、包括 A 型和 B 型珠粒的珠粒悬浮液。在此之前已在 A 和 D 之间以及 B 与 D 之间的结合亲和力方面优化两种珠粒类型的浓度。接着,将珠粒和包含待检测浓度 c 的分析物 D 的样本液体放入在试验井中。D 型分子结合到 A 型珠粒表面上的 A 型分子上及 B 型珠粒表面上的 B 型分子上,由此珠粒发生交联或聚合。聚合程度越高,则分析物 D 的浓度 c 就越大。

[0028] 根据本发明的另一种实施方式,当样本中存在待检测的分析物时抑制聚合体形成。该实施方式在图 3 中示出。E 型分子(分析物)具有一个或多个用于 A 型结合分子的

结合位点以及一个或多个用于 B 型结合分子的结合位点,在多于一个结合位点的情况下, E 与 A 的结合抑制 E 与 B 的结合并且 E 和 B 的结合抑制 E 与 A 的结合。在本实施例中使用的一部分珠粒涂有 A 型分子并且另一部分珠粒涂有 B 型分子。优选首先制备均匀的、包括 A 型和 B 型珠粒的珠粒悬浮液,有利的是在此之前可如上所述优化两种珠粒类型的浓度。随后,将珠粒和包含待检测浓度 c 的分析物 E 的样本液体放入在试验井中。当没有连接分子 D 时珠粒不发生交联或聚合。只有当存在 D 型连接分子时才能发生聚合。通过分析物 E 结合到固定化到珠粒上的 A 或 B 型结合分子上,抑制珠粒聚合,因为用于 D 型连接分子的自由结合位点较少。E 的浓度越高,则珠粒的聚合程度就越低。

[0029] 在另一种实施方式中,分析物或分析物类似物可固定化到珠粒本身上。该实施方式在图 4 中示出。在此情况下存在涂有结合分子 A 的珠粒和涂有分析物 C 或其类似物的珠粒。优选首先制备均匀的、包括 A 型和 C 型珠粒的珠粒悬浮液,有利的是在此之前可优化两种珠粒悬浮液的浓度。随后,优选将 C 型珠粒和包含待检测浓度 c 的分析物 C 的样本液体放入在试验井中。在加入 A 型珠粒之后可发生聚合,聚合程度随着分析物 C 浓度的增加而降低。

[0030] 在另一种实施方式中,可利用非特异性自聚合的效果来确定分析物的浓度。该实施方式在图 5 中示出。在此存在涂有 A 型结合分子的珠粒,其有自聚合趋势(左)。在具有唯一一个用于结合分子 A 的结合位点的分析物分子 C 积聚时,自聚合被抑制,因为各珠之间的距离较大。聚合程度随着分析物 C 浓度的增加而降低(右)。

[0031] 在另一种实施方式中,两种不同的珠粒类型存在于悬浮液中:一种是涂有 A 型分子的可磁化珠粒,另一种是涂有 B 型分子的不可磁化珠粒。不可磁化珠粒例如可由聚合物(如聚苯乙烯)、淀粉、硅烷等制成、优选由聚合物、尤其是由聚苯乙烯制成。

[0032] 待检测的 D 型分析物分子建立不可磁化珠粒和可磁化珠粒之间的连接。分析物 D 的浓度 c 越高,可磁化珠粒与不可磁化珠粒的结合就越多。该原理在图 13 中示出。

[0033] 在具有两种不同的、可磁化及不可磁化的珠粒类型的实施方式中,可通过珠粒层(Bead-Layer)形成速度来确定分析物浓度。当可磁化珠粒结合到不可磁化珠粒上时,它们在磁场中的移动更缓慢。

[0034] 在具有两种不同的、可磁化及不可磁化的珠粒类型的实施方式中,也可通过在某一时刻或某些时刻后测量绝对磁场强度来确定分析物浓度。由绝对磁场强度可算出有多少可磁化珠粒结合到不可磁化珠粒上。当存在许多这种结合时,则可磁化珠粒在珠粒层中的密度较低,由此磁信号较小(参见图 14)。如果没有这种结合,则可磁化珠粒在珠粒层中的密度较高,因此磁信号较强(参见图 15)。相应分等级是可能的。总之,珠粒悬浮液中存在的分析物分子越多,则层中的磁珠密度就越低并且因此磁信号越小。

[0035] 具有两种不同的、可磁化及不可磁化的珠粒类型的实施方式也适用于分离结合与未结合的珠粒。不可磁化珠粒可由低密度的、密度仅略高于水的材料(ρ :1.01-2.59g/cm³)制成。现在如使液体密度高于不可磁化珠粒的密度(例如通过加入蔗糖、聚蔗糖(如聚糖体)、甘油、不同的多元醇等),则珠粒浮起。如浮力足够大,当可磁化珠粒结合后,不可磁化珠粒随后也仍浮起。在将测量井插入磁场之前可等待直到珠粒浮起。而后珠粒处于这样高,以致磁场不能将其拉向下方,因为磁场在此太弱。即使不等待,部分珠粒也在磁场的作用范围之外。通过这种方式,可将未结合的珠粒与结合的珠粒分离。分析物浓度越大,则磁信号

越小。

[0036] 代替不可磁化珠粒,也可应用聚合物分子,所述聚合物分子可借助 B 型分子被功能化。当存在分析物分子时, B 型分子引起可磁化珠粒之间的聚合。再次借助动力学测量确定分析物浓度。

[0037] 聚合物分子例如可以是合成或天然的聚合物、如淀粉(淀粉衍生物)、葡聚糖(葡聚糖衍生物)、聚乙二醇,聚丙烯酰胺等。

[0038] 根据本发明的检测系统的不同实施方式的特征在于珠粒的聚合程度根据样本中的待检测分析物的存在和 / 或浓度发生变化。

[0039] 检测优选在试验井中进行,样本液体和可磁化珠粒(优选作为悬浮液)被放入试验井中。此外,可选地可存在缓冲液和 / 或其它试剂。试验井的体积优选为 1-1000 μ l、特别优选 50-300 μ l。根据试验形式,试验井可不同地成形,优选它们具有细长的形状,如 3mm 至 50mm 的长度,以便能够良好地分辨纳米珠和纳米珠聚合体之间的速度差异并节约液体体积。

[0040] 本发明方法的步骤 (b) 包括通过磁性检测确定可磁化珠粒的聚合程度。在此步骤 (b) 优选包括在试验井中建立磁场,该磁场引起可磁化珠粒的移动。特别优选珠粒聚合程度的检测包括确定可磁化珠粒在非均匀磁场中的移动。

[0041] 样本中分析物的检测基于,交联的珠粒聚合体在磁场中与单个珠粒以不同的速度移动。优选移动在此在磁场梯度中向磁场强度增加的方向进行。大的交联的珠粒聚合体与小的交联的珠粒聚合体也以不同的速度例如向磁场强度增加的方向移动。

[0042] 因此,珠粒或珠粒聚合体从悬浮液向测量井中所施加磁场 $\vec{B}_1(\vec{r})$ 最强的位置移动并积聚在那里,并且移动速度与珠粒间交联程度的大小相关。

[0043] 作用于珠粒的力优选产生于磁场中的场梯度。场梯度可通过非均匀磁场产生,在该磁场中珠粒向磁场强度增加的方向加速。

[0044] 由于珠粒在该外部磁场 $\vec{B}_1(\vec{r})$ 中被磁化,所以珠粒自身产生磁场,该磁场导致与时间相关的附加磁场 $\Delta\vec{B}(c,t,\vec{r})$,该附加磁场与外部磁场 $\vec{B}_1(\vec{r})$ 叠加。测量所述与时间相关的变化(“动力学测量”)。附加磁场的随着时间的演变取决于珠粒的聚合程度或者说交联程度并且因此取决于分析物浓度。

[0045] 有利的是,使用具有尽可能高的饱和磁化强度的珠粒,以便产生尽可能大的附加磁场并且因此产生强的待检测信号。

[0046] 优选基于本发明方法的分析物确定包括系统校准,在此在没有分析物或具有一种或多种已知分析物浓度的检验样本中确定珠粒的聚合程度或者说交联程度。为了校准系统,优选制出珠粒悬浮液和含有定义浓度 c_i 的分析物的样本液体的混合物。借助该混合物记录动力学曲线 $\Delta(\vec{B})(c_i,t,\vec{r}_0)$ 或 $|\Delta(\vec{B})(c_i,t,\vec{r}_0)|$, 其中 \vec{r}_0 是磁场传感器的位置。测量或通过曲线拟合确定定义动力学曲线的走向的参数。

[0047] 在许多情况下,部分动力学曲线可通过关于形状的函数

$$[0048] \quad |\vec{B}_{FH}(t)| = P + Q \cdot (1 - e^{-\frac{1}{\tau(c_i)}}) \quad (1)$$

[0049] 来描述。时间常数 $T(c)$ 取决于浓度并且曲线 $T(c)$ 是试验确定的（记录所谓的“标准曲线”）。标准曲线通过另一向离散测量值 $T_i(c)$ 的曲线拟合建立。

[0050] 另一重要的动力学遵循 Langmuir 方程

$$[0051] \quad \left| \bar{B}_{Fu}(t) \right| = P \cdot \frac{t/\tau(c)}{1+t/\tau(c)} \quad (2)$$

[0052] 也可想到其它动力学曲线,其例如可借助多项式函数拟合。

[0053] 当现在存在具有未知分析物浓度 c_x 的样本液体时,首先记录动力学曲线,其借助根据等式 (1) 或可选地等式 (2) 的曲线拟合进行拟合。借助以这种方式确定的时间常数通过赋值函数 $c \rightarrow T(c)$ 或 $T \rightarrow C(T)$ 来计算浓度 c_x 。

[0054] 在本发明的特定实施方式中,聚合程度的检测可包括使用具有过滤元件、如筛子的试验井。该过滤元件在此对于未聚合珠粒比珠粒聚合体具有较大的渗透性。过滤元件的孔直径例如可在约 100nm 至约 10nm 的范围中。

[0055] 在使用过滤元件的情况下,可额外加大单个珠粒、较小珠粒聚合体和较大珠粒聚合体的速度差异。从特定尺寸起,聚合体完全被过滤元件挡住,以致动力学饱和中的绝对磁信号 S 也减小。因此 S 也可用作分析物浓度的尺度。 S 对应于足够长的时间 t 后的 $\left| \bar{B}_{Fu} \right|$ 。与前述段落类似,可建立标准曲线 $S(c)$ 。分析物的存在和浓度的确定可如上所述进行。

[0056] 为避免过滤元件的孔不被珠粒聚合体在很大程度上堵塞,试验井可机械地或借助超声波激励被移动。

[0057] 图 6 示出安装有筛子的试验井。通过磁铁在试验井中产生磁场。在该图的左侧部分中示出通过箭头 $\vec{\nabla} \left| \bar{B} \right|$ 表示的增加的场强。珠粒如上所述向磁场强度增强的方向移动。在此单个珠粒可基本上不受阻碍地穿过筛子,而珠粒聚合体则较缓慢地穿过筛子或从某一尺寸起完全不能穿过筛子。在图 6 的右侧部分中,示例性示出珠粒的移动方向。

[0058] 为了测量磁场或磁场的变化使用磁场传感器。适合的传感器例如是霍尔传感器或磁阻传感器。

[0059] 代替磁场传感器也可使用其它传感器来检测珠粒层。可能的测量参数例如是珠粒层下方的线圈或线圈装置的阻抗和电感。

[0060] 原则上有利的是,使磁场传感器尽可能靠近珠粒聚合体并且尽可能强地磁化珠粒。

[0061] 存在可测量极小磁场的磁场传感器。在至多几毫米的距离时,珠粒聚合体对磁场的影响在纳米和微特斯拉的范围内。

[0062] 为了测量与珠粒聚合程度相关的磁场变化,可优选使用环形磁铁、尤其是具有零场点的环形磁铁。具有零场点的环形磁铁可以是永磁铁或电磁铁。

[0063] 在环形磁铁附近存在两个点,在这两个点上磁场为零(零场点)。磁场传感器优选位于上零场点的区域中。试验井可设置在该零场点上方,优选紧邻零场点上方。现在上述的珠粒聚合体聚集在井的底部,借助探针检测珠粒聚合体。该实施方式在图 7 和 8 中示出。

[0064] 图 7 示出环形磁铁附近的场分布。在大图中示出环形磁铁的横截面。灰色越深,则磁场值越高。

[0065] 图 8 示出具有环形磁铁的测量装置的结构。在此在试验井中建立磁场,磁场梯度方向通过箭头 $\vec{\nabla}|\vec{B}|$ 表示。磁场探针的作用区的位置与与上零场点一致。珠粒或珠粒聚合体在试验井中沿磁场梯度方向、即沿箭头方向移动。基于磁铁的环形形状,珠粒优选环状地积聚在试验井的底部上,其原因在于,这里磁场比中间要强。因此有利的是,可使用具有至少部分平坦的底部的试验井。只有当井与磁铁具有一定距离时,该效果才消失并且在底部上形成均匀的珠粒层(参见图 7 中的场强分布)。

[0066] 在另一种优选实施方式中,磁场可通过电磁铁产生,该电磁铁间歇性地工作。在最简单的情况下,电磁铁由一个圆柱形线圈构成,可根据所需场强在该线圈上安装金属元件,以便提高场强。

[0067] 图 9 示出构造为线圈的电磁铁附近的场分布。该线圈——可选地可连同提高场强的金属元件一起——可设置在试验井下方。

[0068] 图 10 示出这种具有电磁铁的测量装置的结构。在试验井中通过电磁铁产生磁场。磁场梯度方向通过箭头 $\vec{\nabla}|\vec{B}|$ 表示。珠粒或珠粒聚合体在试验井中沿磁场梯度方向移动并且积聚在试验井的底部上。与具有环形磁铁的方案(参见图 7)相比,在此情况下也在底部中央积聚更多珠粒。因此使用向下锥形变细的容器是有利的。

[0069] 为了能够以高灵敏度进行测量,电磁铁可在定义的时间段 δt 上在定义的时间间隔 Δt 中不工作。然后借助传感器测量珠粒聚合体的剩余磁化。与环形磁铁方案类似,以这种方式记录动力学曲线,借助该动力学曲线可推出珠粒聚合体形成的速度。

[0070] 也可想到其它具有永久磁铁或电磁铁的实施方式,所述永久磁铁或电磁铁建立其它磁场几何形状。因此在某些情况下可使用不具有零场点的永久磁铁或电磁铁并且在测量中不关断它们(参见图 11)。例如可想到使用极小的总场 $\vec{B}_1(\vec{r})$ 。

[0071] 图 16 示出一种实施方式,在其中试验井处于强稳定磁场中,该磁场主要沿水平方向延伸并且磁场强度向下增大。这种磁场可通过两个永久磁铁产生,所述永久磁场定位于试验井的两侧(图 16)。

[0072] 在该磁场几何形状中,可磁化珠粒再次向下加速,从而形成珠粒层或者说珠粒聚合体层。该珠粒沿外部磁场的磁力线方向被磁化并且因此产生附加磁场。

[0073] 磁场传感器在试验井下方定位成,使得能够测量由珠粒层产生的磁场的竖直分量。为此目的,磁场传感器并不居中地位于试验井下方、即不位于试验井中央下方,而是沿 N-S 方向偏移(参见图 17)。相反,试验井位于两个永久磁铁之间中央,以便使珠粒尽可能积聚在下方。

[0074] 珠粒聚合体的积聚和测量优选在测量井底部上进行,但也可在测量井的一侧上进行。

[0075] 可选地可借助超声波激励试验井,以便影响珠粒聚集体积聚的速度。

[0076] 在一种悬浮液中存在两种不同珠粒类型的实施方式中,即涂有 A 型分子的可磁化珠粒和涂有 B 型分子的不可磁化珠粒可用于分离与分析物结合的珠粒和未结合的珠粒。本发明因此也提供一种用于分离分析物的方法,该方法包括下述步骤:(i) 制备悬浮液,该悬浮液包括涂有第一类型结合分子的可磁化珠粒、涂有第二类型结合分子的不可磁化珠粒和

至少一种悬浮介质,其中不可磁化珠粒的密度 ρ_{nmB} 在 $1.01-2.5\text{g}/\text{cm}^3$ 、优选 $1.1-2.5\text{g}/\text{cm}^3$ 的范围中;(ii) 将分析物加入悬浮液;(iii) 将悬浮介质的密度调节为 $\rho_{\text{Medium}} > \rho_{\text{nmB}}$;(iv) 分离与分析物结合的珠粒。在一种优选实施方式中,悬浮介质是水。

[0077] 通过将悬浮介质的密度——例如通过加入蔗糖、聚蔗糖如聚糖体、甘油、多元醇等——调节为大于不可磁化珠粒的密度,珠粒浮起。如浮力足够大,当可磁化珠粒结合后,不可磁化珠粒随后也仍浮起。因此可简单地分离与分析物结合的珠粒和未结合的珠粒。该实施方式也可用于确定分析物浓度。为此将单独的样本放入磁场中的测量井中,与分析物结合的珠粒位于表面上并且不能被磁场拉向下方,因为该磁场太弱。分析物浓度越高,则磁信号越小。

[0078] 包含一个或多个种类的可磁化珠粒的试剂适合用于实施本发明方法。珠粒如上所述涂有结合分子,从而可磁化珠粒可根据样本中的分析物的存在和/或浓度发生可通过磁性检测检测的聚合。另外,该试剂还可包含其它成分、如游离形式的结合分子或交联分子、以及添加剂、如缓冲剂、抗干扰试剂等。

[0079] 该试剂还可包含如前所述的用于校准检测系统的检验样本作为其它成分。

[0080] 适合用于实施本发明方法的装置包括试验井、用于在试验井中产生磁场、尤其是非均匀磁场或磁场梯度的磁铁和适合用于测量试验井中的磁场的随时间的变化的磁场传感器。

[0081] 所述装置还可包括用于评估由传感器测得的信号的单元、如处理器、并且可选地还可包括壳体、控制台等。

[0082] 下述例子用于说明本发明。

[0083] 例 1

[0084] 使用 TurboBeads 公司 (www.turbobeads.com) 的功能化珠粒。珠粒由钴制成并且具有约 $158\text{emu}/\text{g}$ 的饱和磁化强度。直径约为 30nm 。钴珠涂有碳层。

[0085] 为该试验使用这样的珠粒,在其中碳层借助生物素分子功能化。作为试验分析物使用链霉亲和素。链霉亲和素具有四个用于生物素的结合位点。如此实现的试验系统对应所描述的第一种实施方式(参见图 1)。

[0086] 为测量磁场强度使用 MAGNET-PHYSIK 公司 (www.magnet-physik.de) 的具有霍尔探头 HS-AGE5-4805 的特斯拉计 FH54。

[0087] 作为试验结构使用图 8 的配置,但具有向下逐渐变尖的试验井。图 12 示出磁场传感器处的磁场强度的随着时间的变化。

[0088] 在测量开始时, $500\ \mu\text{l}$ 的均匀纳米珠粒悬浮液处于测量井中。纳米珠的浓度为 $2.67 \cdot 10^{11}$ 纳米珠粒 / ml、结合容量为 $0.1\text{mmol}/\text{g}$ 。

[0089] 由于永久磁铁位于试验井下方,所以珠粒在加入悬浮液后立即开始向下移动。测得的磁场强度在图 12 中以黑色实线示出。

[0090] 在另一试验中进行相同的操作,唯一的区别是,珠粒悬浮液在被加入前与链霉亲和素溶液混合。链霉亲和素与生物素结合,从而在珠粒表面上形成链霉亲和素层。由于链霉亲和素具有四个生物素结合位点,所以纳米珠聚合(参见图 1)。珠悬浮液中的链霉亲和素的浓度为 $333\text{pmol}/\text{ml}$ 。

[0091] 所记录的磁场强度在图 12 中以虚线示出。

[0092] 可以清楚地看到,纳米珠或纳米珠聚合体在具有链霉亲和素的试验中与不具有链霉亲和素的试验中相比具有减缓的动力学。

[0093] 这种效果是可再现的。

[0094] 例 2:检测具有多个用于结合分子的结合位点的分析物(参见图 1)

[0095] 使用这样的结构,在其中珠粒被拉入水平延伸的磁场中(参见图 16)。

[0096] 为了测量磁场强度使用 MAGNET-PHYSIK 公司(www.magnet-physik.de)的具有霍尔探头 HS-AGE5-4805 的特斯拉计 FH54。

[0097] 使用 Merck Millipore 公司的直径约为 170nm 的可磁化珠粒(Marke Estapor, www.estapor.com)。所述珠粒由其中嵌入磁铁矿颗粒的聚苯乙烯基质制成。珠粒的表面借助生物素功能化。

[0098] 液体的总量始终是 100 μ l。可磁化珠粒的浓度为 $1.3 \cdot 10^{12}$ 珠粒/ml。

[0099] 进行参考测量,在其中不加入链霉亲和素。接着,借助不同的链霉亲和素浓度进行测量。链霉亲和素与生物素结合。由于链霉亲和素具有四个生物素结合位点,所以珠粒聚合。

[0100] 结果在图 18 示出:

[0101] 链霉亲和素浓度在此沿箭头方向如下增加:无链霉亲和素;41.67nmol/ml;83.33nmol/ml;208.33nmol/ml;333.33nmol/ml;500nmol/ml。

[0102] 原始曲线以灰色显示。以黑色叠加的是拟合曲线。使用 Langmuir 方程:

$$[0103] \quad \left| \bar{B}_{Fu}(t) \right| = P \cdot \frac{t/\tau(c)}{1+t/\tau(c)}$$

[0104] 时间常数在此如下确定:

[0105] $T(0\text{nmol/ml}) = 78.38\text{s}$;

[0106] $T(41.67\text{nmol/ml}) = 67.25\text{s}$;

[0107] $T(83.33\text{nmol/ml}) = 60.23\text{s}$;

[0108] $T(208.33\text{nmol/ml}) = 36.49\text{s}$;

[0109] $T(333.33\text{nmol/ml}) = 26.04\text{s}$;

[0110] $T(500\text{nmol/ml}) = 8.34\text{s}$ 。

[0111] 例 3:检测具有可磁化珠粒和不可磁化珠粒的分析物

[0112] 再次使用这样的结构,在其中珠粒被拉入水平延伸的磁场中(参见图 16)。

[0113] 为了测量磁场强度使用 Micro Magnetics(www.micromagnetics.com)公司的传感器 STJ-200。

[0114] 仍使用 Merck Millipore 公司的直径约为 170nm 的可磁化珠粒。所述珠粒的表面借助髓过氧化物酶(MPO)抗原功能化。

[0115] 同样来自 Merck Millipore 的 Marke Estapor 的聚苯乙烯珠粒用作不可磁化珠粒。不可磁化珠粒的直径约为 1000nm。不可磁化珠粒借助 Anti-Human-IgG 功能化。

[0116] 液体的总量始终是 130 μ l。可磁化珠粒的浓度为 $7.77 \cdot 10^{11}$ 珠粒/ml,不可磁化珠粒的浓度为 $1.4 \cdot 10^{11}$ 珠粒/ml。

[0117] 可磁化珠粒首先与待检测的血清混合。待检测的针对 MPO 的抗体(如存在)与珠粒表面上的抗原结合。随后加入不可磁化珠粒。固定化到不可磁化珠粒上的

Anti-Human-IgG 结合到现有抗体上。较小的可磁化珠粒因此固定化到较大的不可磁化珠粒上。

[0118] 结果示于图 19 中。实线表示在不存在针对 MPO 的抗体时进行的测量（曲线 a），点划线表示在具有高阳性血清（非常多的 MPO 抗体，曲线 c）时进行的测量，虚线表示在具有相对于高阳性血清减半的 MPO 抗体浓度下进行的测量（曲线 b）。

[0119] 在该测量中使用绝对场强来确定抗体浓度。

[0120] 图 20 和 21 示出未聚合或聚合的珠粒。

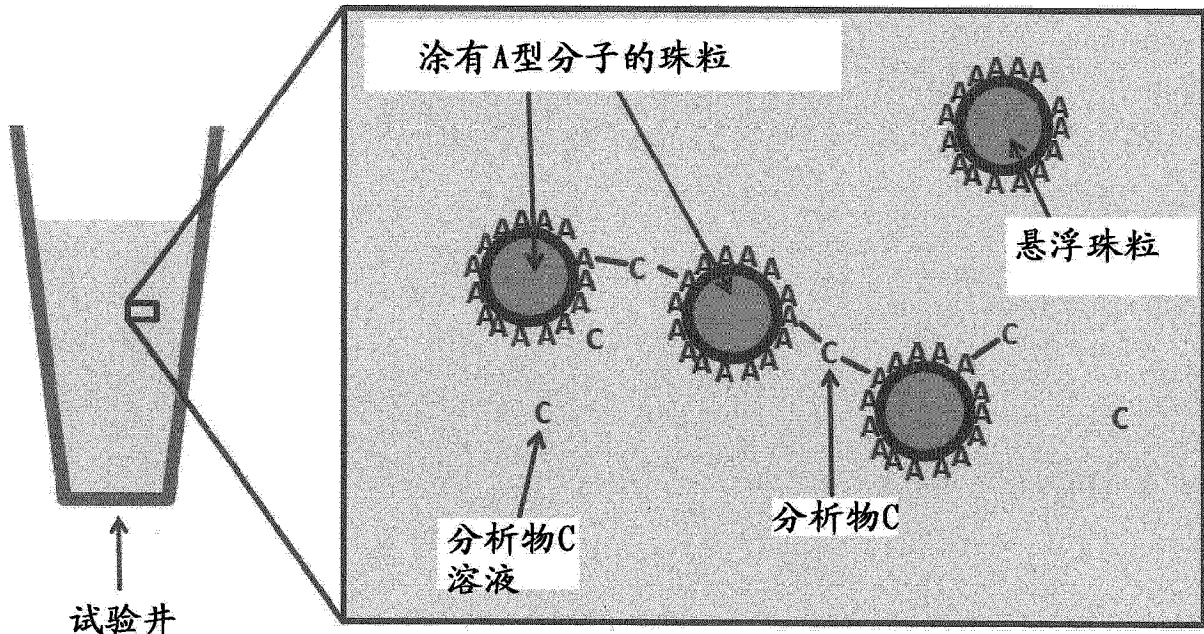


图 1

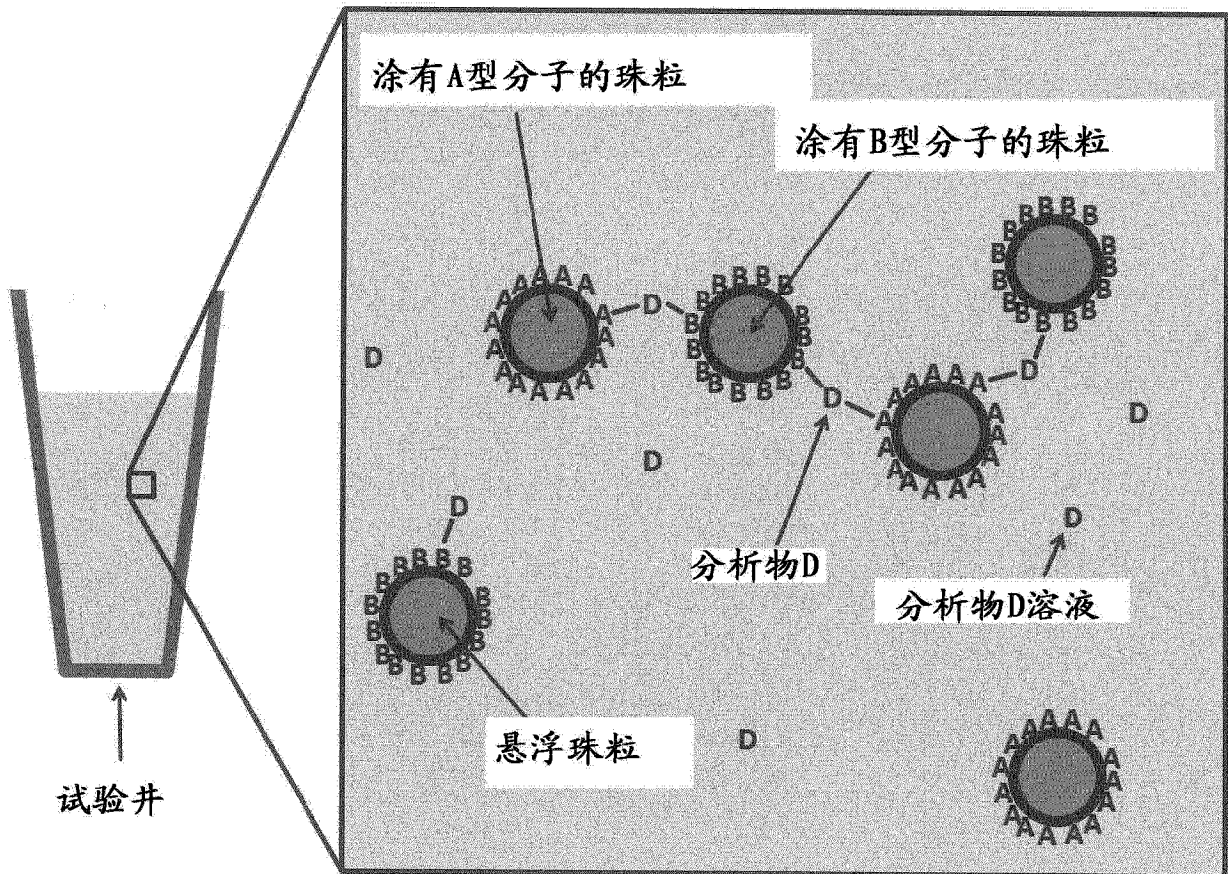


图 2

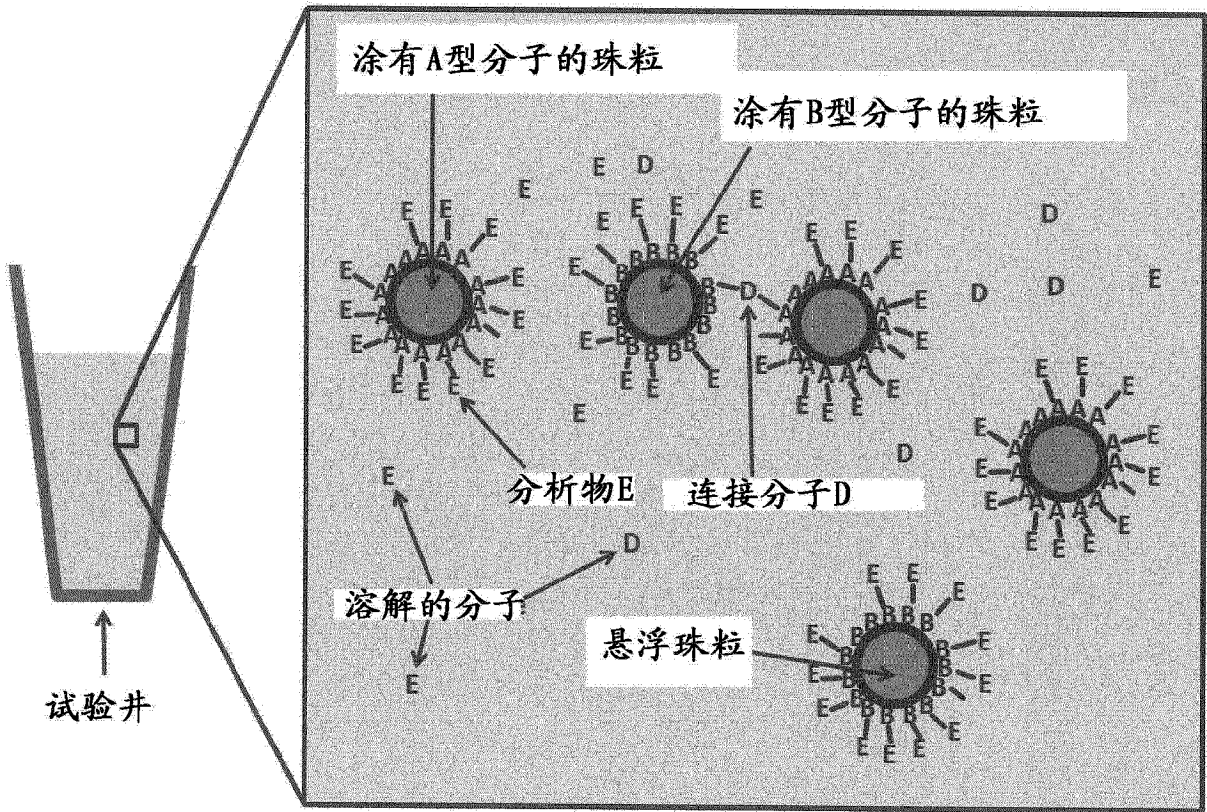


图3

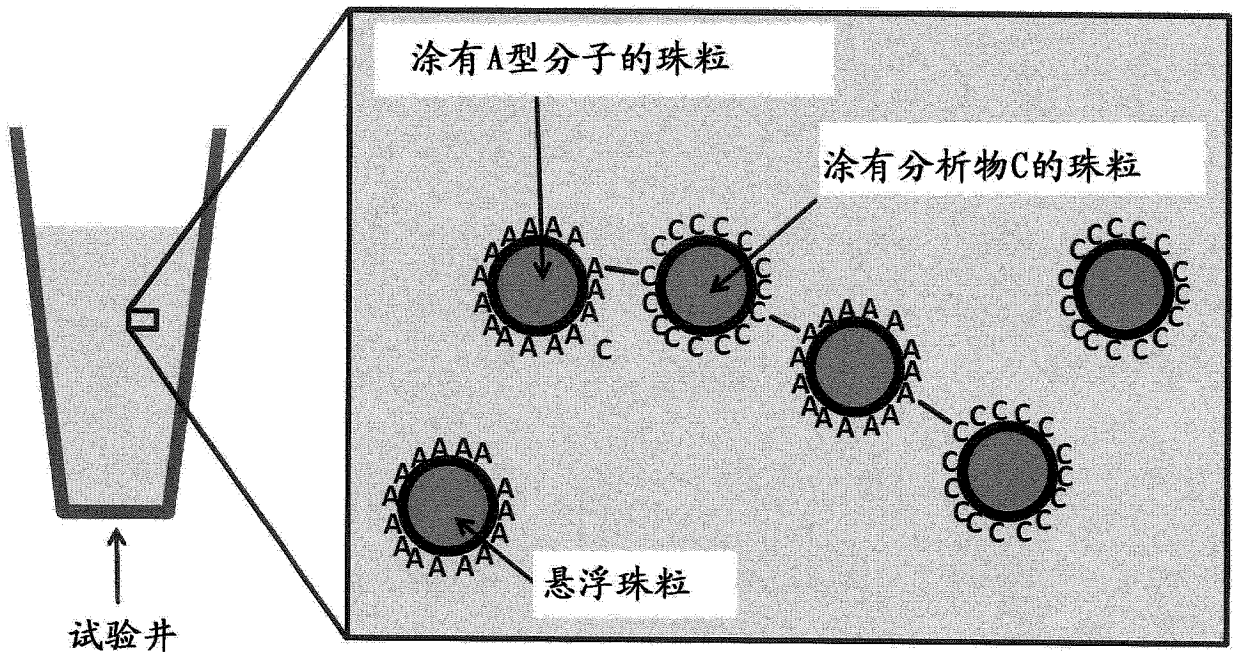


图4

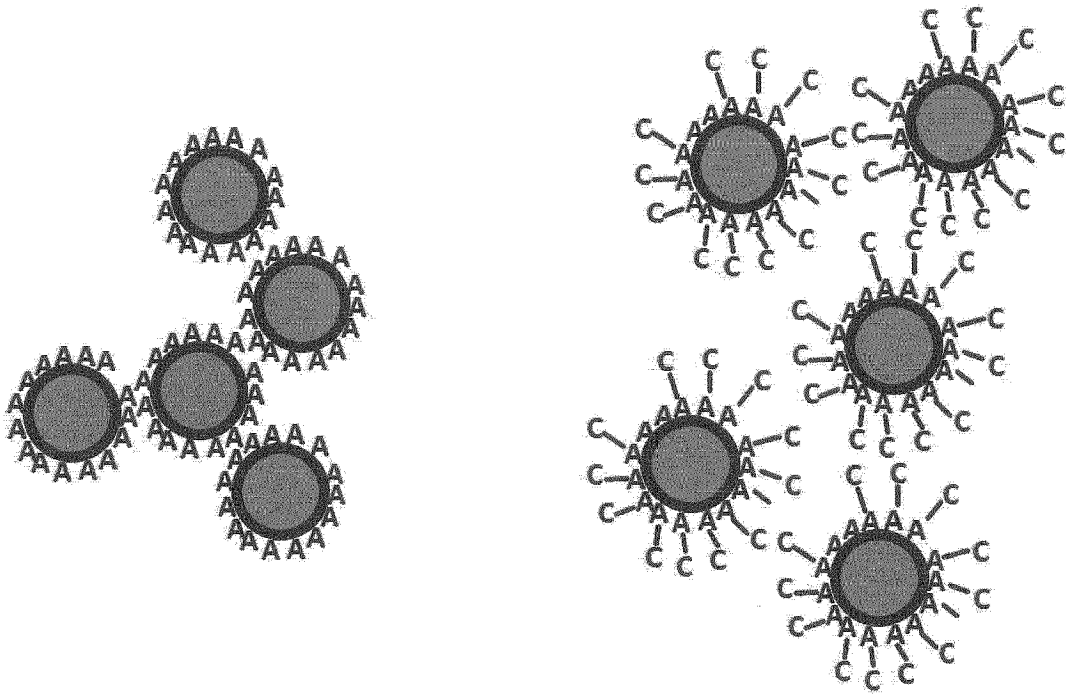


图 5

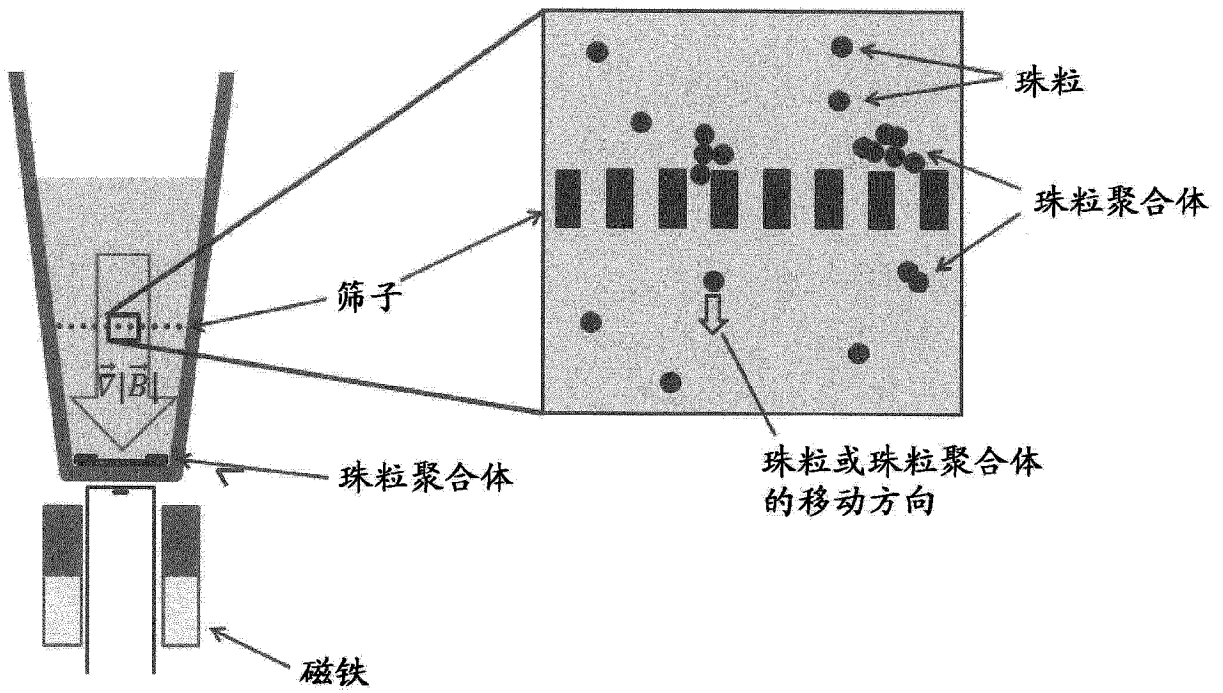


图 6

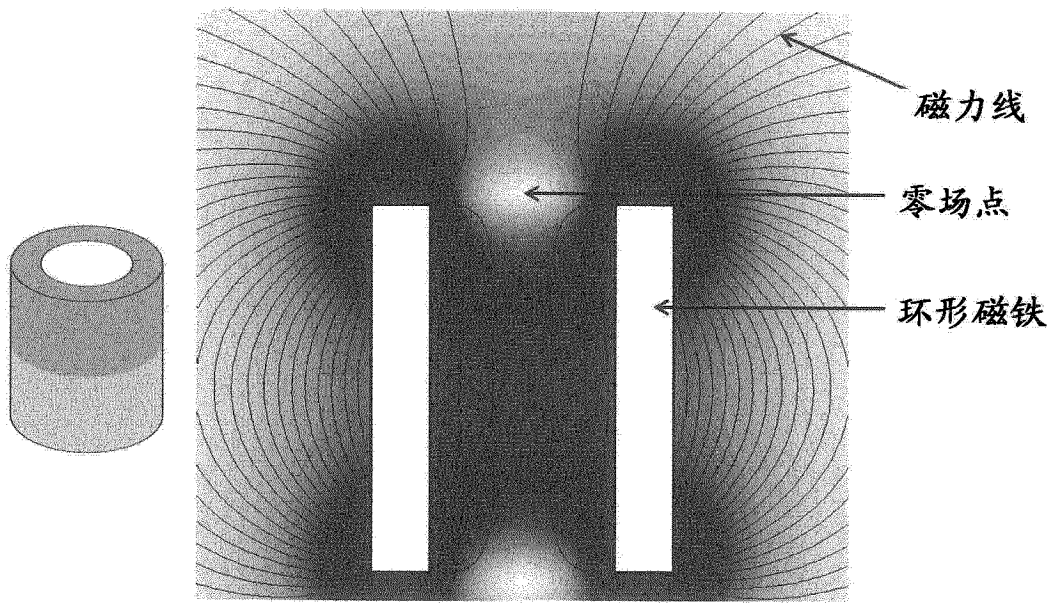


图 7

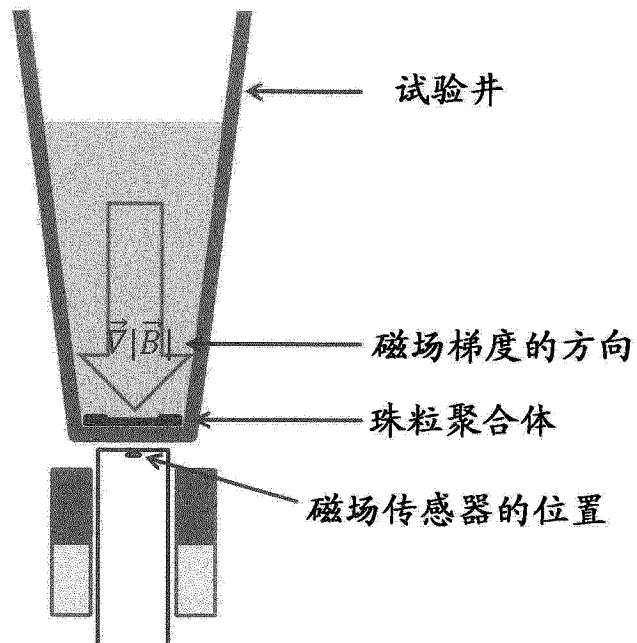


图 8

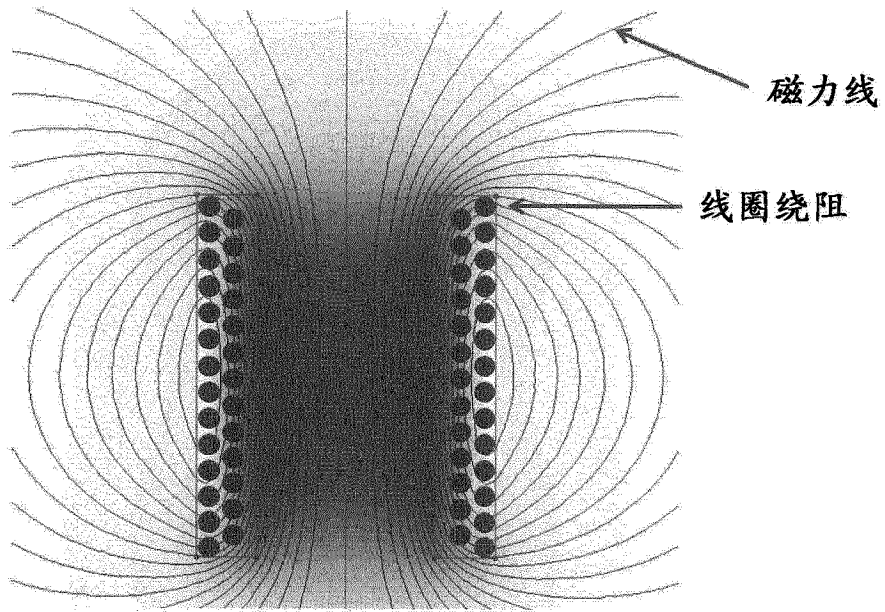


图 9

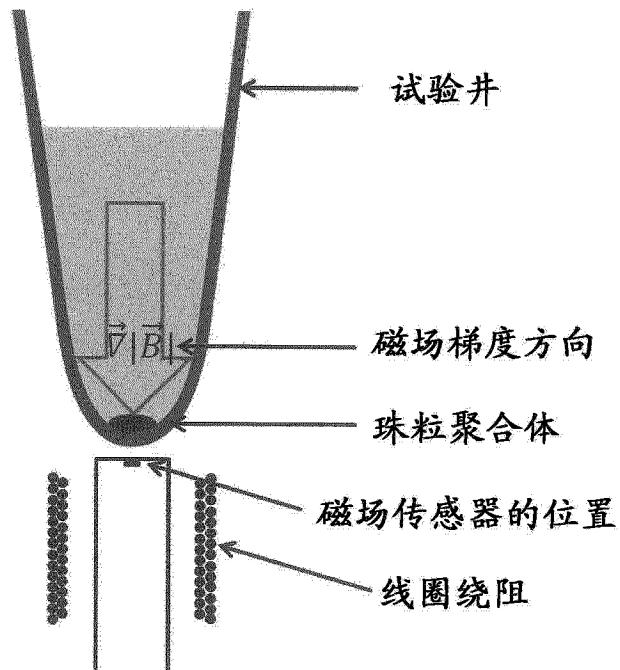


图 10

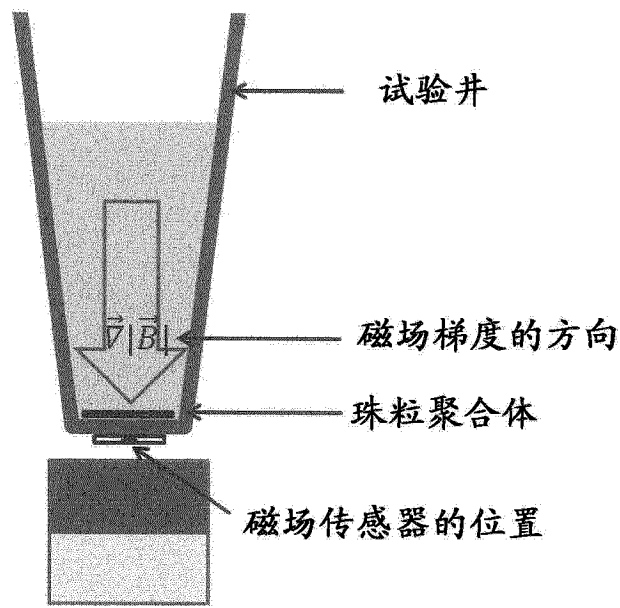


图 11

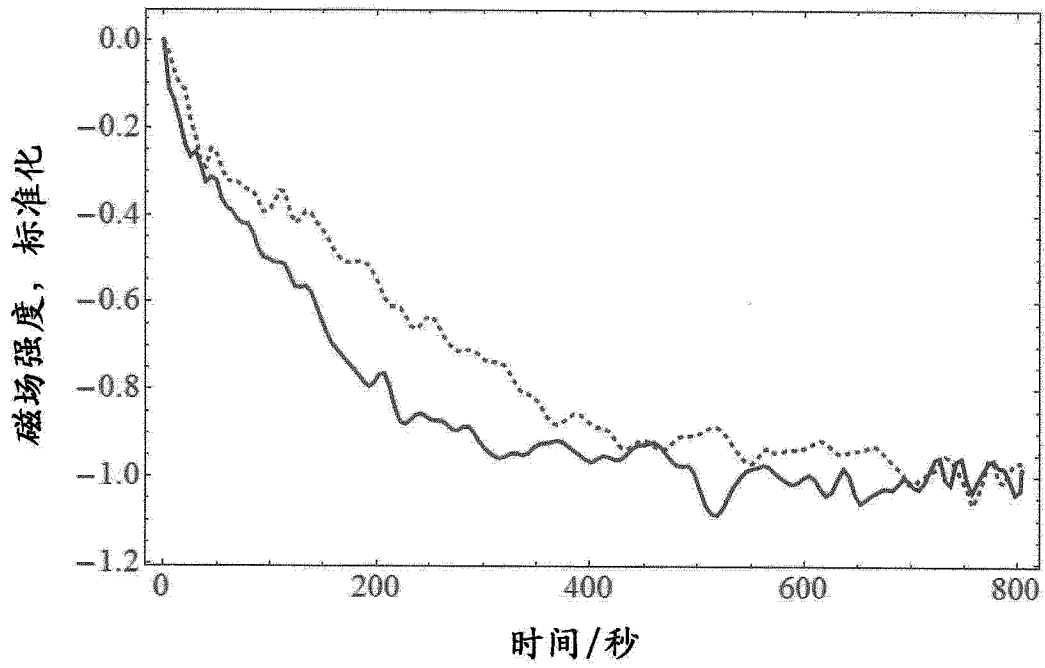


图 12

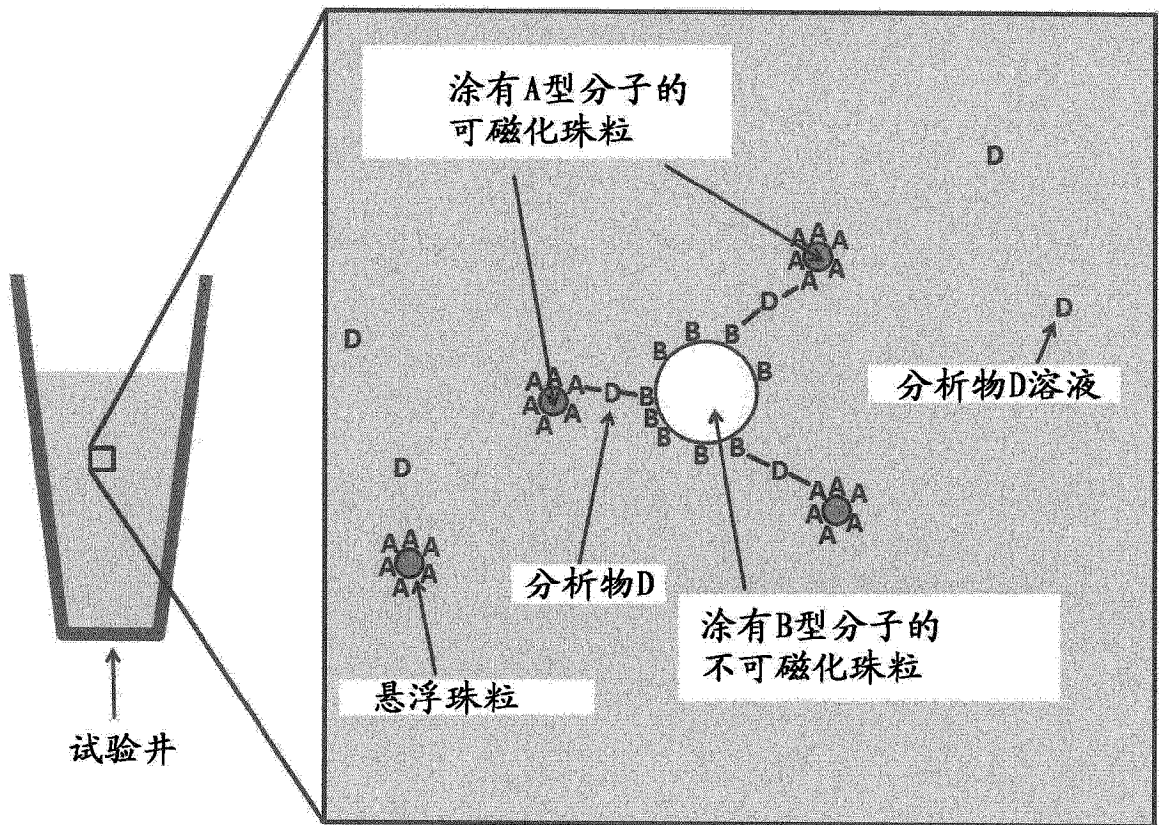


图 13

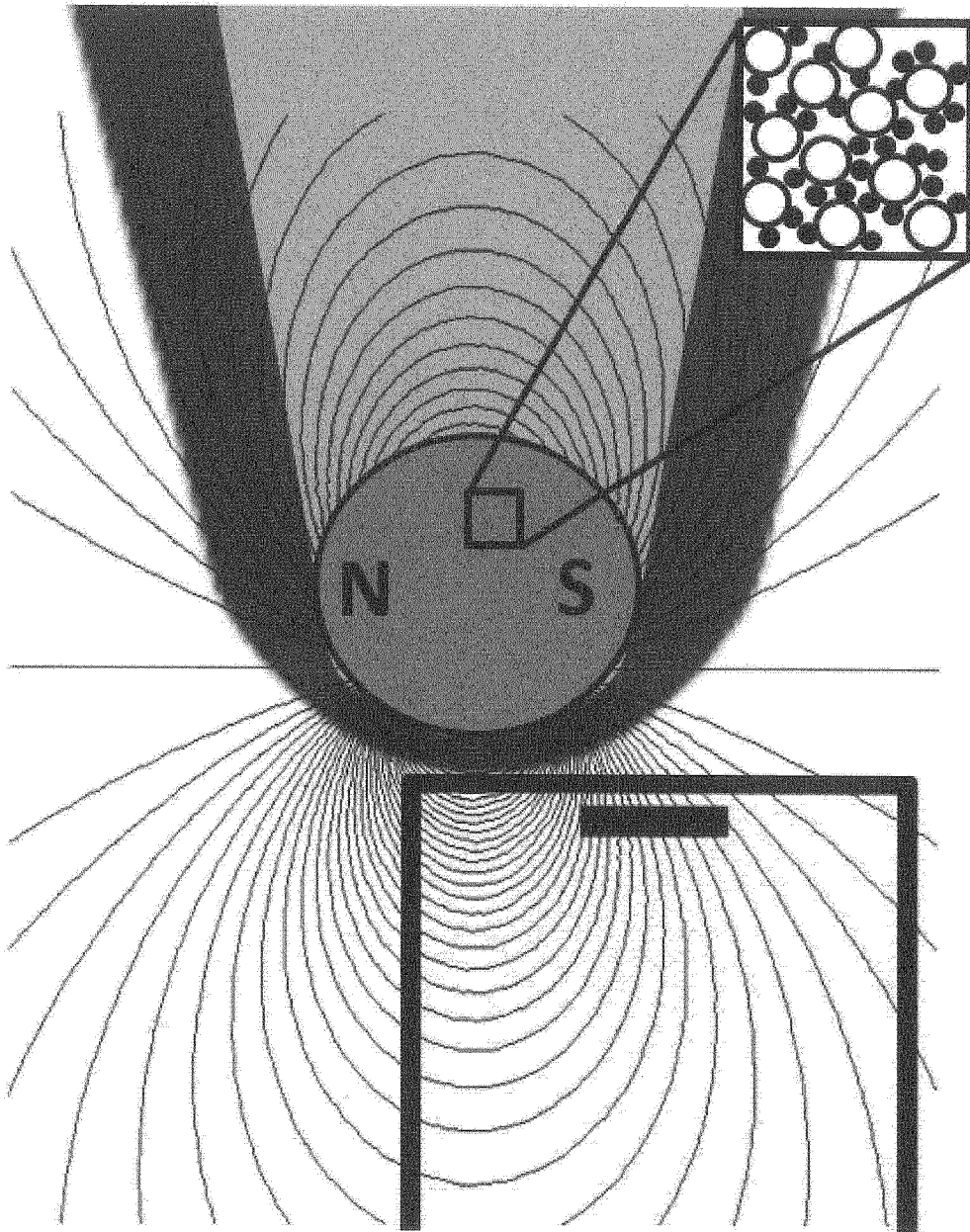


图 14

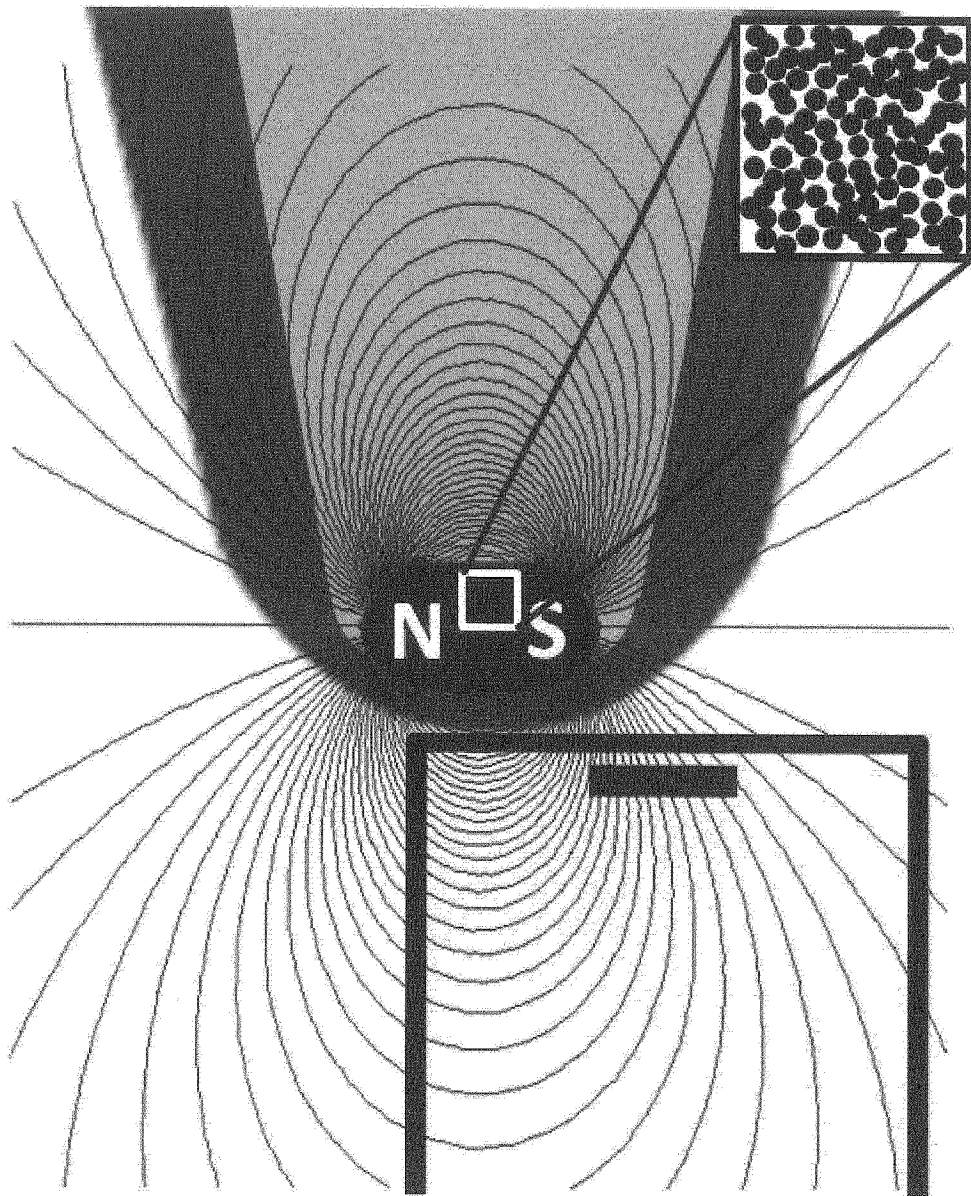


图 15

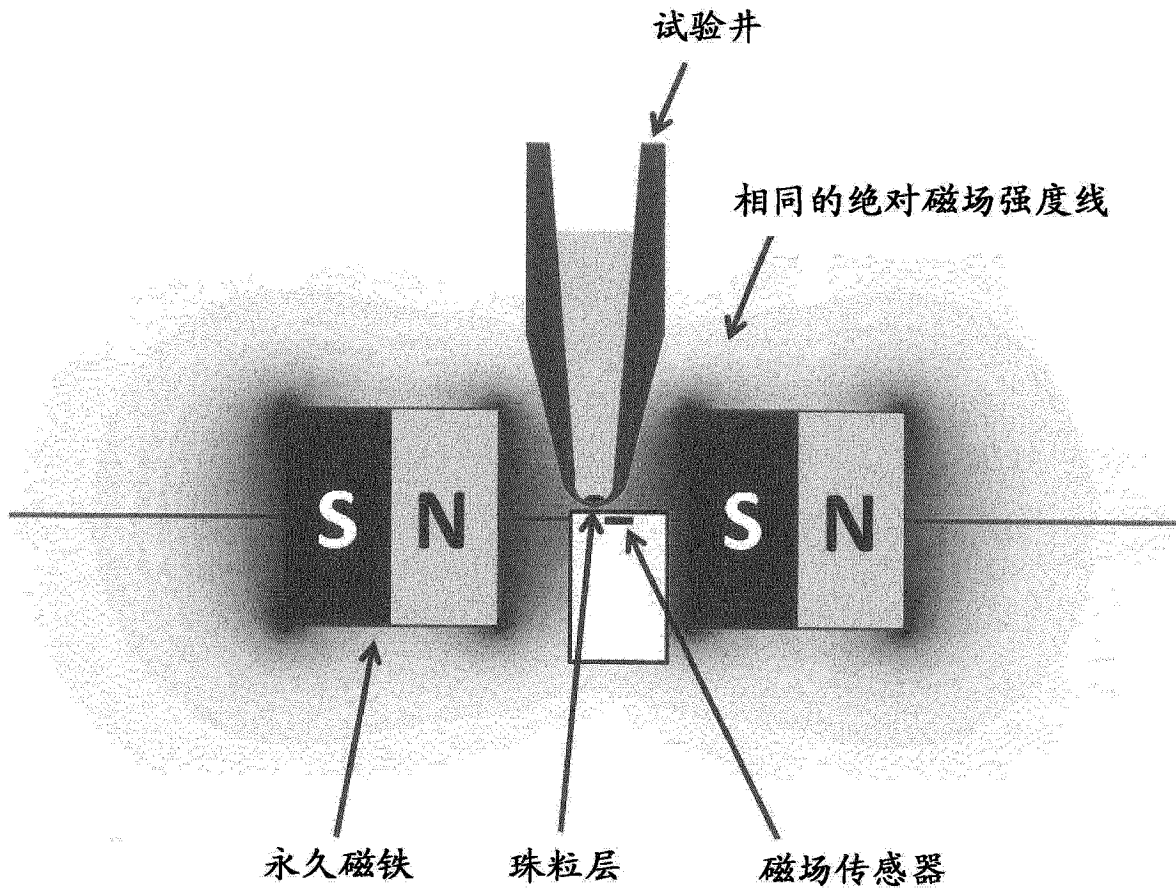


图 16

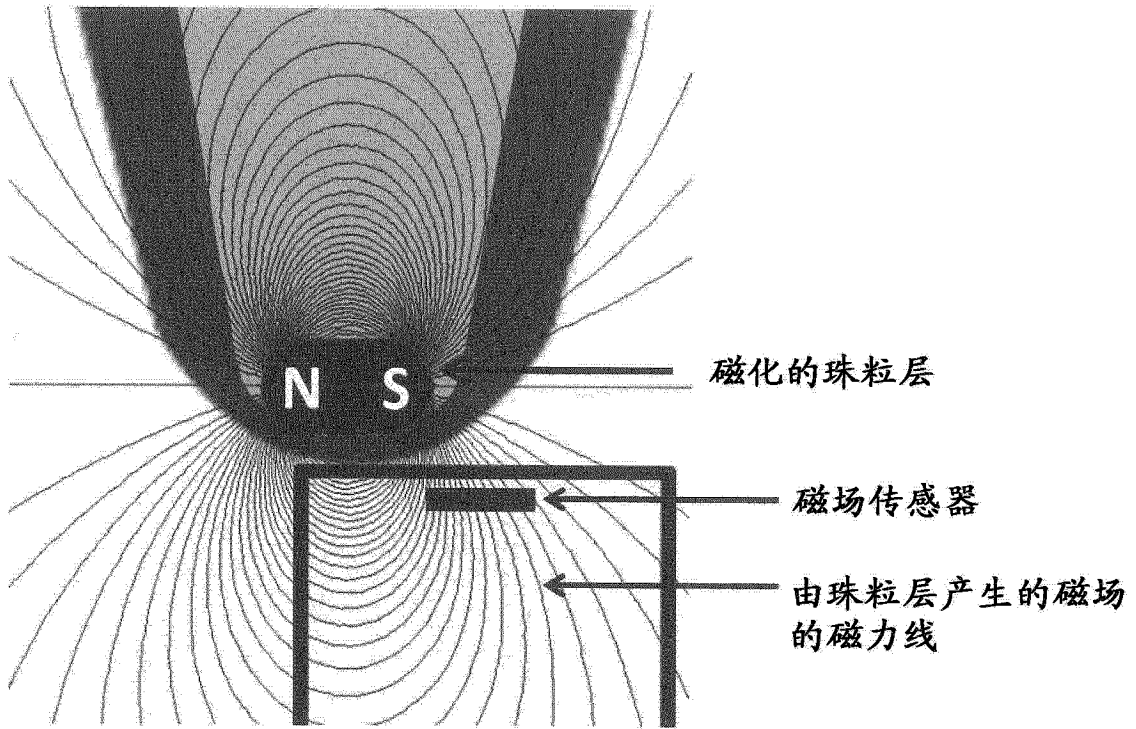


图 17

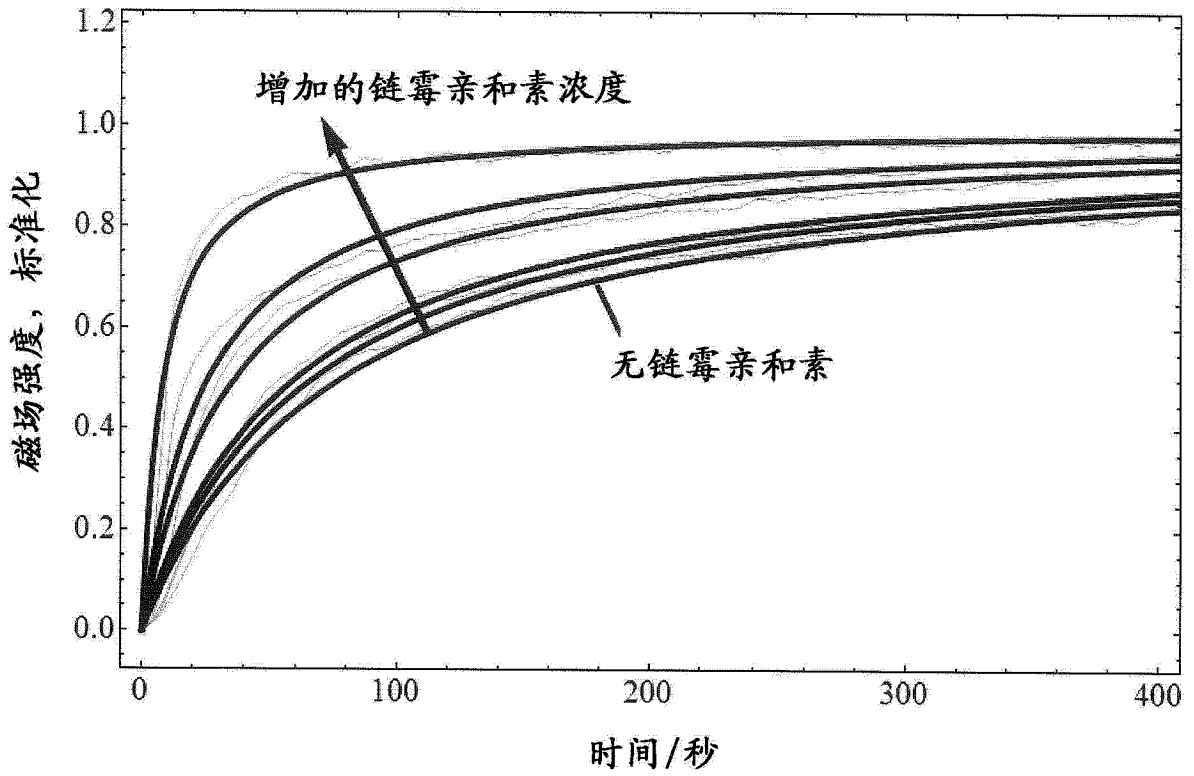


图 18

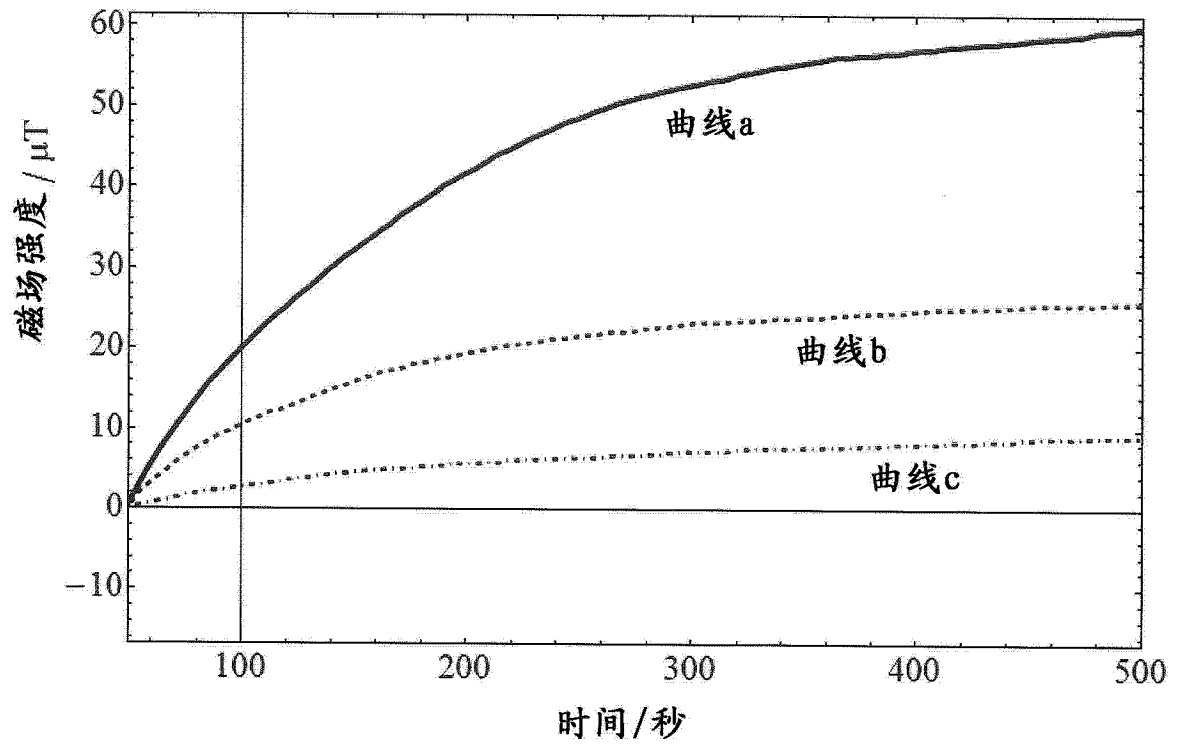


图 19

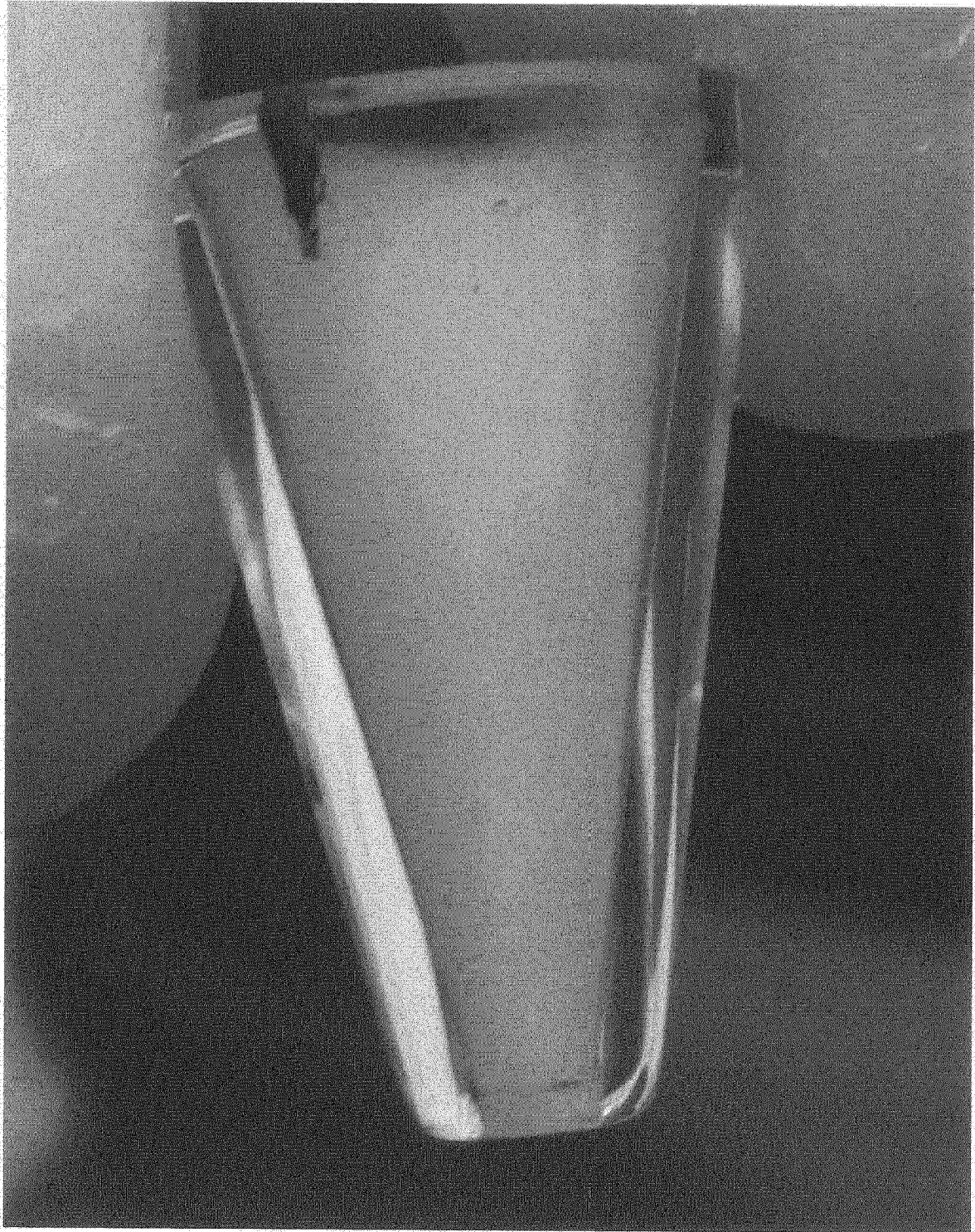


图 20

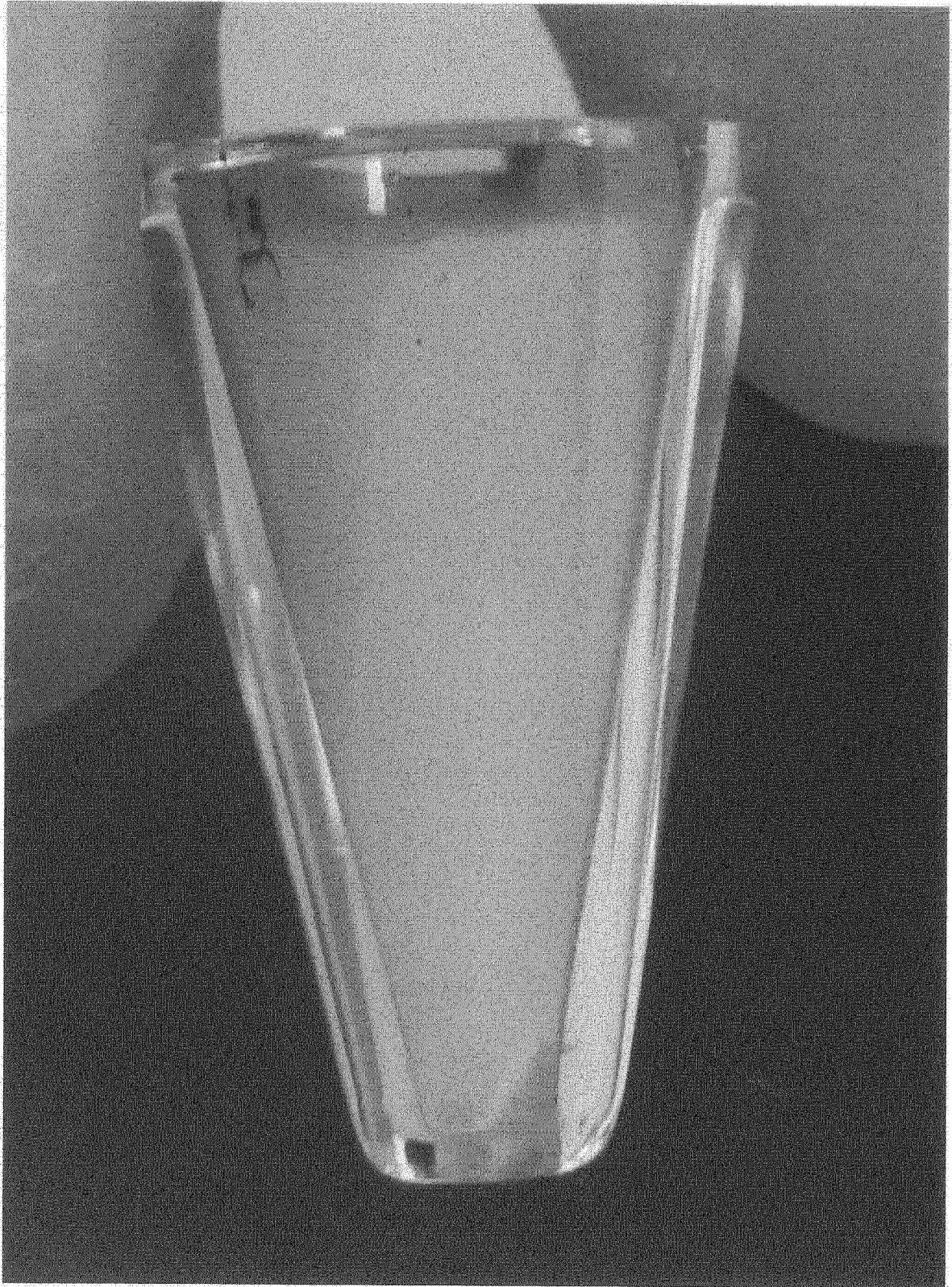


图 21