



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107614699 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201680031621.3

(22)申请日 2016.04.15

(30)优先权数据

62/149,324 2015.04.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/027906 2016.04.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/168711 EN 2016.10.20

(71)申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 P·鲁宾逊 C-T·蔡

C·贝尔托齐

(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 韩威威

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6804(2018.01)

权利要求书4页 说明书50页

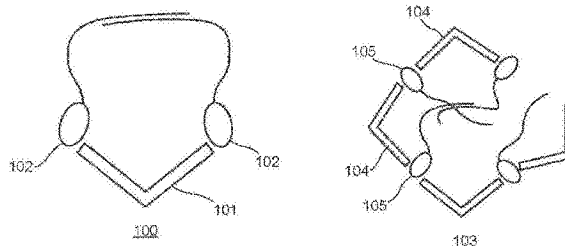
序列表4页 附图25页

(54)发明名称

用于检测凝集的方法以及用于实践该方法的组合物

(57)摘要

本发明提供用于检测样品中的抗原结合剂的方法。所述方法的方面包括通过抗原结合的多核苷酸的灵敏的基于邻近的缔合来检测抗原结合剂与多核苷酸结合的抗原的聚集。所述方法的方面还包括用于通过核酸扩增来检测此类基于邻近的缔合的方法。此外,本发明提供了用于实践所述方法的各个实施方案的组合物,如试剂、试剂盒和设备。



1. 一种检测样品中的抗原结合剂的方法,所述方法包括:
 - a) 在足以形成复合物的条件下,使所述样品与缀合至第一多核苷酸的第一分子抗原和缀合至第二多核苷酸的第二分子抗原接触,所述复合物包含结合至所述第一和第二分子的所述抗原结合剂;
 - b) 使所述复合物的第一多核苷酸与第二多核苷酸结合以形成扩增子;
 - c) 扩增所述扩增子以生成扩增产物;以及
 - d) 检测所述扩增产物,其中所述扩增产物的检测提供了所述抗原结合剂的检测。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一分子抗原和所述第二分子抗原是相同的。
3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗原结合剂是抗体。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述抗体是免疫球蛋白A (IgA)、免疫球蛋白D (IgD)、免疫球蛋白E (IgE)、免疫球蛋白G (IgG) 或免疫球蛋白M (IgM)。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗原是多肽。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合包括使桥接多核苷酸与所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸杂交。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合包括使所述第一多核苷酸的核苷酸序列与所述第二多核苷酸的互补核苷酸序列杂交。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述第一和第二多核苷酸的互补核苷酸序列的长度为至少6个核苷酸。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合包括将所述第一多核苷酸与所述第二多核苷酸连接。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法还包括使所述样品与夹板多核苷酸接触,并且所述结合包括将所述夹板多核苷酸连接至所述第一多核苷酸或所述第二多核苷酸或所述第一和第二多核苷酸二者。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一多核苷酸、第二多核苷酸和桥接多核苷酸是DNA多核苷酸,并且所述连接包括使所述样品与DNA连接酶接触。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包括使桥接多核苷酸与所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸杂交,在所述杂交之后将所述第一多核苷酸与所述第二多核苷酸连接,以及在所述连接之后特异性地降解所述桥接多核苷酸。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述桥接多核苷酸包含一种或多种核苷类似物,并且所述降解包括通过使所述样品与一种或多种碱基切除试剂接触来介导所述一种或多种核苷类似物的碱基切除。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述一种或多种碱基切除试剂包括糖基化酶、核酸内切酶或其组合。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述一种或多种核苷类似物包括脱氧核糖尿嘧啶。
16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述扩增包括聚合酶链式反应 (PCR) 扩增。
17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述扩增包括等温扩增。
18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述检测包括基于定量所述扩增产

物来测量所述样品中所述抗原结合剂的量。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述扩增包括定量PCR。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法检测所述抗原结合剂以小于15ng/mL的浓度在所述样品中的存在。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述方法检测所述抗原结合剂以小于100pg/mL的浓度在所述样品中的存在。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述样品从怀疑患有抗多核苷酸抗体的受试者获得。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述样品从怀疑患有病状的受试者获得。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述病状包括感染。

25. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述病状包括自身免疫性疾病或炎性疾病。

26. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述病状包括对赘生物的免疫应答。

27. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述病状是副肿瘤综合征。

28. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述赘生物是选自由前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌、肝癌和甲状腺癌组成的组的癌症。

29. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述病状包括代谢疾病。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述代谢疾病是糖尿病。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述样品是组织样品。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述组织样品是血液样品。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述血液样品是血清样品。

34. 根据权利要求1至30中任一项所述的方法, 其中所述样品是分泌的体液或半固体。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述分泌的体液或半固体选自由以下组成的组: 尿液、唾液、眼泪、汗液、脓液和粪便。

36. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中所述样品来源于被配置以产生所述抗原结合剂的细胞。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述细胞是杂交瘤, 并且所述抗原结合剂是由所述杂交瘤产生的抗体。

38. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中所述样品来源于被配置以产生所述抗原结合剂的实验动物。

39. 根据权利要求38所述的方法, 其中所述样品是血液样品。

40. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述血液样品是血清样品。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述样品是分泌的体液或半固体。

42. 根据权利要求41所述的方法, 其中所述分泌的体液或半固体选自由以下组成的组: 尿液、唾液、眼泪、汗液、脓液和粪便。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述接触还包括使所述样品与游离的DNA接触。

44. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述第一分子抗原和所述第一多核苷酸以及所述第二分子抗原和所述第二多核苷酸均以介于1:1和1:4之间的抗原与多核苷

酸的摩尔比缀合。

45. 一种用于检测抗原结合剂的试剂盒, 所述试剂盒包括:

a) 缀合至第一多核苷酸的第一抗原, 所述第一抗原在所述抗原结合剂的第一抗原结合位点处特异性地结合至所述抗原结合剂; 以及

b) 缀合至第二多核苷酸的第二抗原, 所述第二抗原在所述抗原结合剂的第二抗原结合位点处特异性地结合至所述抗原结合剂。

46. 根据权利要求45所述的试剂盒, 其中所述试剂盒还包括与所述第一和第二多核苷酸特异性杂交的桥接多核苷酸。

47. 根据权利要求45至46中任一项所述的试剂盒, 其中所述第一多核苷酸包含与所述第二多核苷酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

48. 根据权利要求45至47中任一项所述的试剂盒, 其还包括与所述第一多核苷酸、所述第二多核苷酸或所述桥接多核苷酸中的一种或多种特异性杂交的夹板多核苷酸。

49. 根据权利要求45至48中任一项所述的试剂盒, 其中所述第一抗原和所述第二抗原是不同的。

50. 根据权利要求45至49中任一项所述的试剂盒, 其中所述试剂盒还包括连接酶。

51. 根据权利要求45至50中任一项所述的试剂盒, 其中所述试剂盒还包括一种或多种扩增试剂。

52. 根据权利要求45至51中任一项所述的试剂盒, 其中试剂盒组分a) 和b) 存在于单个容器中。

53. 根据权利要求45至51中任一项所述的试剂盒, 其中试剂盒组分a) 和b) 存在于单独的容器中。

54. 一种用于抗原结合剂的多重检测的文库, 所述文库包括:

a) 多个抗原对, 每个抗原对包括两个相同的抗原, 每个抗原缀合至包含独特的引物结合位点的多核苷酸; 以及

b) 多个引物对, 每个引物对包含与抗原对的所述独特的引物结合位点互补的序列, 其中在所述抗原对结合至抗原结合剂时, 所述抗原对的多核苷酸形成扩增子, 所述扩增子可通过所述引物对特异性扩增, 从而允许所述抗原结合剂的多重检测。

55. 根据权利要求54所述的文库, 其中所述多个抗原对的抗原包括自身免疫性疾病抗原。

56. 根据权利要求54至55中任一项所述的文库, 其中所述多个抗原对的抗原包括癌症抗原。

57. 根据权利要求54至56中任一项所述的文库, 其中所述多个抗原对的抗原包括病原体抗原。

58. 根据权利要求54至57中任一项所述的文库, 其中每个抗原对的所述多核苷酸包含彼此互补的序列。

59. 根据权利要求54至57中任一项所述的文库, 其中每个抗原对的所述多核苷酸各自包含与桥接多核苷酸互补的序列。

60. 根据权利要求54至59中任一项所述的文库, 其中所述多个抗原对在单个容器中。

61. 根据权利要求54至59中任一项所述的文库, 其中所述多个引物对的每个引物对存

在于单独的容器中或多孔板的单独的孔中。

用于检测凝集的方法以及用于实践该方法的组合物

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2015年4月17日提交的美国临时专利申请第62/149,324号的权益,该申请全文以引用的方式并入本文。

[0003] 关于联邦政府资助研究的声明

[0004] 本发明根据美国国家卫生研究院(National Institutes of Health)颁发的授权号GM0059907-13在政府支持下进行。政府享有本发明的某些权利。

[0005] 以文本文件形式提供的序列列表以引用的方式并入

[0006] 在此以文本文件“BERK-284W0_SeqList_ST25.txt”的形式提供序列列表,该文本文件创建于2016年4月15日,大小为4KB。该文本文件的内容全文以引用的方式并入本文。

[0007] 引言

[0008] 在许多可用的生物分子检测测定法中,基于颗粒凝集,包括胶乳颗粒凝集的那些方法,持续广泛用于研究生物学以及人类和兽医学,特别是用于检测流体试验样品中的抗体。凝集测定程序具有简单、广泛适用和无害的优点。凝集测定通常也是迅速的,可在短时间内产生结果。尽管具有这些优点,但由于凝集测定的检测限差和/或需要大的样品体积,凝集测定典型地被忽略了有利于酶联免疫吸附测定(ELISA)的分析目的。

[0009] 概述

[0010] 提供用于检测样品中的抗原结合剂的方法。该方法的方面包括通过抗原结合的多核苷酸的灵敏的基于邻近的缔合来检测抗原结合剂与多核苷酸结合的抗原的聚集。该方法的方面还包括用于通过核酸扩增来检测此类基于邻近的缔合的方法。此外,提供了用于实践方法的各个实施方案的组合物,如试剂、试剂盒和设备。

[0011] 本公开的方面包括检测样品中的抗原结合剂的方法,该方法包括:a)在足以形成复合物的条件下使样品与缀合至第一多核苷酸的第一分子抗原和缀合至第二多核苷酸的第二分子抗原接触,该复合物包含结合至该第一和第二分子的抗原结合剂;b)使复合物的第一多核苷酸与第二多核苷酸结合以形成扩增子;c)扩增该扩增子以生成扩增产物;以及d)检测该扩增产物,其中该扩增产物的检测提供抗原结合剂的检测。在一些情况下,第一分子抗原和第二分子抗原是相同的。在一些情况下,抗原结合剂是抗体,如免疫球蛋白A(IgA)、免疫球蛋白D(IgD)、免疫球蛋白E(IgE)、免疫球蛋白G(IgG)或免疫球蛋白M(IgM)。在一些情况下,抗原是多肽。在一些情况下,结合包括使桥接多核苷酸(bridging polynucleotide)与第一多核苷酸和第二多核苷酸杂交。在一些情况下,结合包括使第一多核苷酸的核苷酸序列与第二多核苷酸的互补核苷酸序列杂交。在一些情况下,第一和第二多核苷酸的互补核苷酸序列的长度为至少6个核苷酸。在一些情况下,结合包括将第一多核苷酸和第二多核苷酸连接。在一些情况下,该方法还包括使样品与夹板多核苷酸(splint polynucleotide)接触,并且结合包括将夹板多核苷酸连接至第一多核苷酸或第二多核苷酸或者第一和第二多核苷酸二者。在一些情况下,第一多核苷酸、第二多核苷酸和桥接多核苷酸是DNA多核苷酸,并且连接包括使样品与DNA连接酶接触。在一些情况下,该方法包括使桥接多核苷酸与第一多核苷酸和第二多核苷酸杂交,在杂交之后连接第一多核苷酸和第二

多核苷酸,以及在连接之后特异性地降解桥接多核苷酸。在一些情况下,桥接多核苷酸包含一种或多种核苷类似物,并且降解包括通过使样品与一种或多种碱基切除试剂接触而介导的一种或多种核苷类似物的碱基切除。在一些情况下,一种或多种碱基切除试剂包括糖基化酶、核酸内切酶或其组合。在一些情况下,一种或多种核苷类似物包括脱氧核糖尿嘧啶。在一些情况下,扩增包括聚合酶链式反应(PCR)扩增。在一些情况下,扩增包括等温扩增。在一些情况下,检测包括基于定量扩增产物来测量样品中抗原结合剂的量。在一些情况下,扩增包括定量PCR。在一些情况下,该方法检测抗原结合剂以小于15ng/mL的浓度在样品中的存在。在一些情况下,该方法检测抗原结合剂以小于100pg/mL的浓度在样品中的存在。在一些情况下,样品从怀疑具有抗多核苷酸抗体的受试者获得。在一些情况下,样品从怀疑患有病状的受试者获得。在一些情况下,病状包括感染。在一些情况下,病状包括自身免疫性疾病或炎症性疾病。在一些情况下,病状包括对赘生物的免疫应答。在一些情况下,病状是副肿瘤综合征。在一些情况下,赘生物是选自由前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌、肝癌和甲状腺癌组成的组的癌症。在一些情况下,病状包括代谢疾病。在一些情况下,代谢疾病是糖尿病。在一些情况下,样品是组织样品。在一些情况下,组织样品是血液样品。在一些情况下,血液样品是血清样品。在一些情况下,样品是分泌的体液或半固体。在一些情况下,分泌的体液或半固体选自由以下组成的组:尿液、唾液、眼泪、汗液、脓液和粪便。在一些情况下,样品来源于被配置以产生抗原结合剂的细胞。在一些情况下,细胞是杂交瘤,并且抗原结合剂是由杂交瘤产生的抗体。在一些情况下,样品来源于被配置以产生抗原结合剂的实验动物。在一些情况下,样品是血液样品。在一些情况下,血液样品是血清样品。在一些情况下,样品是分泌的体液或半固体。在一些情况下,分泌的体液或半固体选自由以下组成的组:尿液、唾液、眼泪、汗液、脓液和粪便。在一些情况下,接触还包括使样品与游离的DNA接触。在一些情况下,第一分子抗原和第一多核苷酸以及第二分子抗原和第二多核苷酸均以介于1:1和1:4之间的抗原与多核苷酸的摩尔比缀合。

[0012] 本公开的方面包括用于检测抗原结合剂的试剂盒,该试剂盒包括:a)缀合至第一多核苷酸的第一抗原,所述第一抗原在抗原结合剂的第一抗原结合位点处特异性地结合至抗原结合剂;和b)缀合至第二多核苷酸的第二抗原,所述第二抗原在抗原结合剂的第二抗原结合位点处特异性地结合至抗原结合剂。在一些情况下,试剂盒还包括与第一和第二多核苷酸特异性杂交的桥接多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与第二多核苷酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在一些情况下,试剂盒还包括与第一多核苷酸、第二多核苷酸或桥接多核苷酸中的一种或多种特异性杂交的夹板多核苷酸。在一些情况下,第一抗原和第二抗原是相同的。在一些情况下,试剂盒还包括连接酶。在一些情况下,试剂盒还包括一种或多种扩增试剂。在一些情况下,试剂盒组分存在于单个容器中。在一些情况下,试剂盒组分存在于单独的容器中。

[0013] 本公开的方面包括用于抗原结合剂的多重检测的文库,该文库包括:a)多个抗原对,每个抗原对包括两个相同的抗原,每个抗原缀合至包含独特的引物结合位点的多核苷酸;和b)多个引物对,每个引物对包含与抗原对的独特的引物结合位点互补的序列,其中在抗原对与抗原结合剂结合时,抗原对的多核苷酸形成可通过引物对特异性扩增的扩增子,从而允许抗原结合剂的多重检测。在一些情况下,所述多个抗原对的抗原包括自身免疫性疾病抗原。在一些情况下,所述多个抗原对的抗原包括癌症抗原。在一些情况下,所述多个

抗原对的抗原包括病原体抗原。在一些情况下,每个抗原对的多核苷酸包含彼此互补的序列。在一些情况下,每个抗原对的多核苷酸各自包含与桥接多核苷酸互补的序列。在一些情况下,所述多个抗原对在单个容器中。在一些情况下,所述多个引物对的每个引物对存在于单独的容器或多孔板的单独的孔中。

[0014] 附图简述

[0015] 当结合附图阅读时,可从以下详述最佳地理解本发明。应该强调,根据通常实践,附图的各种特征未按比例绘制。相反,为清晰起见,各种特征的尺寸可随意放大或缩小。附图包括以下图解。

[0016] 图1描绘了凝集的抗原和抗原结合剂的实施方案。

[0017] 图2描绘了通过多核苷酸结合的抗原的邻近缔合形成的多核苷酸双链体的实施方案。

[0018] 图3描绘了通过多核苷酸结合的抗原和桥接多核苷酸的邻近缔合形成的多核苷酸复合物的实施方案。

[0019] 图4描绘了通过多核苷酸结合的抗原、桥接多核苷酸和夹板多核苷酸的邻近缔合形成的多核苷酸复合物的实施方案。

[0020] 图5描绘了通过多核苷酸结合的抗原和桥接多核苷酸的邻近缔合形成的多核苷酸复合物的实施方案。

[0021] 图6描绘了通过多核苷酸结合的抗原的邻近缔合形成的包括双链多核苷酸的多核苷酸复合物的实施方案。

[0022] 图7描绘了通过多核苷酸结合的抗原的邻近缔合形成的包括缔合成环的寡核苷酸的多核苷酸复合物的实施方案。

[0023] 图8描绘了通过凝集-连接的灵敏的免疫复合物监测平台进行的抗体检测的示意图。

[0024] 图9A-9J描绘了各种样品类型和靶标的高灵敏度,以及凝集介导的抗体的多重检测的可控制性(amenability)。

[0025] 图10提供了表1。

[0026] 图11A-11C描绘了通过抗生物素抗体凝集的生物素-DNA缀合物,以及在各种样品类型中及使用各种检测多核苷酸对其进行的定量检测。

[0027] 图12A-12C描绘了通过抗小鼠IgG抗体凝集的小鼠IgG-DNA缀合物,以及在各种样品类型中及使用各种检测多核苷酸对其进行的定量检测。

[0028] 图13描绘了通过抗GFP抗体凝集的古GFP-DNA缀合物及其基于qPCR的定量。

[0029] 图14A-14C描绘了由对应的抗体介导的小鼠IgG-DNA和生物素-DNA凝集的基于定量聚合酶链式反应(qPCR)的多重检测。

[0030] 图15提供了通过qPCR进行的各种浓度的多价多克隆抗小鼠抗体和单价抗小鼠消化的Fab片段的检测和定量比较。

[0031] 图16提供了通过qPCR进行的各种浓度的多克隆抗体和单克隆抗体的检测和定量比较。

[0032] 图17提供了使用本文所述的方法的实施方案凭经验确定的PBS或血清中各种抗体的检测限(LOD)。

[0033] 图18A-18D示出了本公开的方法可排除样品中的抗核酸抗体对目标抗体检测的干扰。

[0034] 图19描绘了无竞争DNA的抗DNA和正常血浆中的抗GFP抗体的检测。

[0035] 图20提供了多核苷酸与GFP抗原缀合和通过银染分析的此类缀合反应的效率的示意图。

[0036] 图21提供了根据本公开的一个实施方案的代表性实时qPCR测定曲线图。

[0037] 图22示出了抗原:DNA缀合比对测定表现的影响。

[0038] 图23提供了根据本公开的一个实施方案的小分子-DNA缀合物合成的反应图解示意图。

[0039] 图24A-24B示出了如本文所述的凝集检测测定中HIV抗体的单独和多重检测。

[0040] 图25示出了通过凝集测定确定的HIV阴性和阳性受试者群体的分离,该凝集测定检测人类口腔液样品中的HIV抗体。

[0041] 图26描绘了检测两种不同HIV抗体的HIV凝集测定的临床灵敏度和特异性。

[0042] 定义

[0043] 术语“凝集”和“聚集”可互换使用,如本文所用,是指将抗原和抗原结合剂连接在一起形成复合物,其中该复合物包括超过一种抗原和一种抗原结合剂。一般来讲,凝集利用多价抗原结合剂或结合超过一种抗原分子的抗原结合剂。多价抗原结合剂可促进许多抗原和抗原结合剂聚集成复合物。在凝集中,抗原可以是单价的或多价的。在某些实施方案中,凝集通过使用单价抗原和多价抗原结合剂实现。在某些实施方案中,凝集通过使用单价抗原和二价抗原结合剂实现。在某些实施方案中,凝集通过使用结合多价抗原的多价抗原结合剂实现。在某些实施方案中,凝集通过使用结合多价抗原的二价抗原结合剂实现。在某些实施方案中,凝集通过使用结合二价抗原的多价抗原结合剂实现。在某些实施方案中,凝集通过使用结合二价抗原的二价抗原结合剂实现。如本文所用,聚集的复合物的组分可保持紧密邻近,使得所述组分能够缔合和/或相互作用。在一些情况下,反应混合物的某些组分,由于其相互作用的特异性和/或其在反应混合物中的相对浓度,可以仅具有显著的相互作用可能性,例如当在聚集的复合物内保持紧密邻近时,检测凝集所需的相互作用。

[0044] 如本文所用术语“抗原”是指任何天然存在的或合成的免疫原性物质。免疫原性物质包括外源性的那些物质和天然存在于生物体内的那些物质。因此,外源免疫原性物质的引入可诱导生物体对外源免疫原性物质产生一般或特异性免疫应答。在其它情况下,在生物体内产生免疫原性物质可诱导生物体对天然免疫原性物质产生特异性或一般自身免疫应答。如本文所用,抗原涵盖但不限于化学制品、小分子、生物分子(如,核酸)、大分子、肽、多肽、细胞片段、细胞、单细胞生物体、多细胞生物体、其片段以及其组合。在一些情况下,抗原可以是其中结合该抗原的试剂是已知的抗原,如其中结合该多肽的抗体是已知的多肽。在一些情况下,抗原可以是其中结合该抗原的试剂是未知的抗原,如其中结合该多肽的抗体是未知的多肽。例如,天然存在的和合成的多肽和肽用作可产生针对其的抗体的抗原已在例如Methods in Molecular Biology:Immunochemical Protocols.Burns,R.编,Humana Press,2005中所述,该文献的公开内容全文以引用方式并入本文中。

[0045] 术语“多肽”和“蛋白质”以及“肽”可互换使用,是指氨基酸残基通过肽键连接起来的聚合物,并且出于本公开的目的,可具有至少8个氨基酸的最小长度。寡肽、寡聚物多聚物

等等通常是指较长链的氨基酸,并且还由通过肽键连接的线性排列的氨基酸组成,无论是生物产生的、重组产生的还是合成产生的,并且无论是由天然存在的还是由非天然存在的氨基酸组成,均包括在该定义内。该定义涵盖全长蛋白质及其大于8个氨基酸的片段二者。该术语还包括具有多肽的共翻译(如,信号肽裂解)和翻译后修饰,诸如例如二硫键形成、糖基化、乙酰化、磷酸化、蛋白酶裂解(如,被弗林蛋白酶或金属蛋白酶裂解)等等的多肽。另外,如本文所用,“多肽”是指包括对天然序列的修饰,诸如缺失、添加和取代(通常是性质保守的,如本领域的人员所知)的蛋白质,只要蛋白质保持所需活性即可。这些修饰可以是有意,如通过定点诱变,或可以是偶然的,诸如通过产生蛋白质的宿主的突变,或由于PCR扩增或其它重组DNA方法而产生的错误。

[0046] 如本文所用,术语“抗体”和“免疫球蛋白”可互换使用,通常可指全部或完整的分子或其片段,以及已经被修饰和/或缀合的经修饰的和/或经缀合的抗体或其片段。基于重链恒定区中氨基酸序列的差异,可将免疫球蛋白分成五种不同类别。给定类别内的所有免疫球蛋白将具有非常类似的重链恒定区。这些差异可通过序列研究或更常见地通过血清学方法(即使用涉及这些差异的抗体)检测。免疫球蛋白类别包括IgG(γ 重链)、IgM(μ 重链)、IgA(α 重链)、IgD(δ 重链)和IgE(ϵ 重链)。

[0047] 抗体或免疫球蛋白可以指一类结构上相关的糖蛋白,它由两对多肽链构成,一对低分子量轻(L)链和一对重(H)链,全部四条链通过二硫键相互连接。免疫球蛋白的结构已完全表征,参见例如Fundamental Immunology第7章(Paul,W.编,第2版Raven Press,N.Y.(1989))。简而言之,每个重链通常由重链可变区(简写为 V_H)和重链恒定区(简写为 C_H)构成。重链恒定区通常由三个结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 、和 C_{H3} 构成。每条轻链通常由轻链可变区(简写为 V_L)和轻链恒定区(本文简写为 C_L)构成。轻链恒定区通常由一个结构域 C_L 构成。 V_H 和 V_L 区还可再细分为高变区(或可为序列高度可变的和/或形成结构确定的环的高变区),也称为互补决定区(CDR),其散布于更保守的区内,即框架区(FR)。

[0048] 全部或基本上完整的抗体通常是多价的,即它们可同时结合超过一分子抗原,而抗体片段可以是单价的。作为免疫应答的一部分,由生物体产生的抗体通常是单特异性的,即它们通常结合单种抗原。多价单特异性抗体,即结合超过一分子单种抗原的抗体,可结合单个抗原表位(如,单克隆抗体)或多个不同的抗原表位(如,多克隆抗体)。

[0049] 结合多种抗原的多特异性(如,双特异性)抗体可易于由本领域的普通技术人员工程化改造,因此可涵盖在本文适当使用的术语“抗体”的用途内。另外,多价抗体片段可以例如通过连接两个单价抗体片段来工程化改造。因此,二价和/或多价抗体片段可涵盖在术语“抗体”的适当用途内,因为普通技术人员将易于理解抗体片段,如下文描述的那些抗体片段,它们可以任何简易和适当的组合连接以产生多价单特异性或多特异性(如,双特异性)抗体片段。

[0050] 抗体片段包括但不限于抗原结合片段(Fab或F(ab),包括Fab'或F(ab'))、 $(Fab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 等)、单链可变片段(scFv或Fv)、“第三代”(3G)分子等,它们能够结合表位决定簇。这些抗体片段保持了一些选择性地结合至主题抗原的能力,其实例包括但不限于:

[0051] (1) Fab,即包含抗体分子的单价抗原结合片段的片段,它可通过使用酶木瓜蛋白酶消化全抗体,得到完整的轻链和一条重链的一部分来产生;

[0052] (2) Fab',即可通过使用胃蛋白酶处理全抗体,然后还原,得到完整的轻链和重链

的一部分来获得的抗体分子片段;每个抗体分子获得两个Fab'片段;

[0053] (3) (Fab)₂,即可通过使用酶胃蛋白酶处理全抗体但不进行后续还原原来获得的抗体片段;

[0054] (4) F(ab)₂,它是两个Fab'片段通过两个二硫键保持在一起的二聚体;

[0055] (5) Fv,它被定义为以两条链表示的包含轻链可变区和重链可变区的基因工程改造的片段;

[0056] (6) 单链抗体("SCA"),它被定义为包含轻链可变区、重链可变区的基因工程改造的分子,该轻链可变区和重链可变区通过合适的多肽接头连接,作为遗传融合的单链分子;此类单链抗体可以是多聚物的形式,诸如双抗体、三抗体、四抗体等,它可以是或可以不是多特异性的(参见例如,WO 94/07921和WO 98/44001)以及

[0057] (7) "3G",其包括单个结构域(通常是缺乏轻链的可变重链结构域)和"小型化"抗体分子(通常是其中已移除了非必需结构域的完整大小的Ab或mAb)。

[0058] 本文用于描述核酸分子的术语"重组"意指基因组、cDNA、病毒、半合成和/或合成来源的多核苷酸,借助其来源或操纵,不与其天然缔合的多核苷酸序列的全部或部分缔合。关于蛋白质或多肽使用的术语重组,意指重组多核苷酸表达产生的多肽。关于宿主细胞或病毒使用的术语重组,意指已引入重组多核苷酸的宿主细胞或病毒。在本文中关于材料(如,细胞、核酸、蛋白质或载体)使用的重组还指该材料通过异源性材料(如,细胞、核酸、蛋白质或载体)的引入来修饰。

[0059] 术语"多核苷酸"、"寡核苷酸"、"核酸"和"核酸分子"在本文中可互换使用,包括核苷酸的聚合物形式,核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。该术语仅指分子的一级结构。因此,该术语包括三链、双链和单链DNA,以及三链、双链和单链RNA。该术语还包括此类具有修饰,诸如通过甲基化和/或通过加帽修饰的分子,以及未修饰形式的多核苷酸。更具体地讲,术语"多核苷酸"、"寡核苷酸"、"核酸"和"核酸分子"包括聚脱氧核糖核苷酸(包含2-脱氧-D-核糖)、聚核糖核苷酸(包含D-核糖)、任何其它类型的多核苷酸(它是嘌呤或嘧啶碱基的N-或C-糖苷)、和包含非核苷酸主链、聚合物的其它聚合物,以及其它合成的序列特异性核酸聚合物,前提条件是该聚合物包含核碱基,碱基构型允许碱基配对和碱基堆积,诸如可见于DNA和RNA中。多核苷酸还涵盖包含一种或多种"核苷类似物"或"核苷酸类似物"的那些多核苷酸,它们是如何例如RNA和DNA中的天然存在的核苷和核苷酸的核苷或核苷酸类似物。用于核苷类似物的合成或修饰的核苷类似物和试剂的非限制性实例包括但不限于例如1,3,9-三甲基黄嘌呤、1,3-二甲基尿酸、1,N6-亚乙烯基(Etheno)-2'-脱氧腺苷、1,N6-亚乙烯基腺嘌呤、1-烯丙基-3,7-二甲基-8-苯基黄嘌呤、1-烯丙基-3,7-二甲基-8-磺苯基黄嘌呤、1-环己基尿嘧啶、1-甲基胸腺嘧啶、1-甲基尿酸、2,3'-脱水胸苷、2',3',5'-三-O-乙酰基腺苷、2',3',5'-三-O-乙酰基胞苷盐酸盐、2',3',5'-三-O-乙酰基尿苷、2',3',5'-三-O-苯甲酰尿苷、2',3'-二脱氧-5-碘尿苷、2',3'-二脱氧腺苷、2',3'-二-O-苯甲酰尿苷、2',3'-O-异亚丙基-6-巯基嘌呤核糖核苷、2',3'-O-异亚丙基鸟苷、2',3'-O-异亚丙基尿苷、2'-脱氧腺苷一水合物、2'-脱氧胞苷、2'-脱氧胞苷酰(3'→5')-2'-脱氧鸟苷、2'-脱氧鸟苷一水合物、2'-脱氧肌苷、2'-脱氧尿苷、2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基胞苷、2-氨基-6-氯嘌呤核糖核苷、2-氨基-6-甲基巯基嘌呤、2-氨基嘌呤、2-氯-2'-脱氧腺苷抗白血病药、2-氯-N6-环戊基腺苷腺苷受体激动剂、2-二甲基氨基-6-羟基嘌呤、2-巯基嘌呤、2-硫尿嘧啶、3'-脱氧鸟苷、

3'-O-甲基尿苷、3-甲基腺嘌呤、3-甲基尿嘧啶、4,5,6-三氨基嘧啶硫酸盐、4-氨基-1,3-二甲基-2,6-二氧-5-亚硝基嘧啶、4-氨基-5-羧基-2-乙巯基嘧啶、4-氯尿嘧啶、4-甲基伞形酮基β-L-岩藻糖苷酶底物、4-硫代尿苷、5,6-二氢脱氧尿苷、5'-(4-氟磺酰基苯甲酰基)腺苷盐酸盐、5'-氨基-5'-脱氧胸苷、5'-脱氧-5'-(甲基硫代)腺苷、5'-脱氧腺苷甲基硫代腺苷/S-腺苷高半胱氨酸(MTA/SAH)核苷酶底物、5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧尿苷、5'-O-三苯甲基胸苷、5-尿嘧啶甲酸乙酯、5-羧基-2-硫尿嘧啶、5-氯-2'-脱氧尿苷胸苷类似物、5-乙基-2'-脱氧尿苷、5-氟-1-(四氢-2-呋喃基)尿嘧啶、5-氟尿苷、5-碘-2,4-二甲氧基-嘧啶、5-碘-2'-脱氧胞苷、5-碘胞嘧啶、5-甲氧基尿苷、5-甲基-2-硫代尿苷、5-甲基胞苷、5-甲基胞嘧啶盐酸盐、5-甲基尿苷、5-正丙基尿嘧啶、5-丙基-2-硫尿嘧啶、5-磺氨基尿嘧啶、6-(二甲基氨基)嘌呤、6-氮杂尿嘧啶、6-氮杂尿苷、6-氯嘌呤核糖核苷、6-氰基嘌呤、6-乙氧基嘌呤、6-乙巯基嘌呤、6-巯基嘌呤-2'-脱氧核糖核苷、6-甲基巯基嘌呤核糖核苷、6-甲基嘌呤、6-正丁氧基嘌呤、6-正庚基巯基嘌呤晶体、6-正丙氧基嘌呤、6-苯基-2-硫尿嘧啶、6-丙基-2-硫尿嘧啶、6-硒基嘌呤(6-Selenopurine)、7-甲基鸟苷、8-(3-羧基丙基)-1,3-二甲基黄嘌呤、8-溴-2',3',5'-三-O-乙酰基鸟苷、8-溴腺苷、9-(2',3',5'-三-O-苄基-β-D-阿拉伯呋喃糖基(arabinofuranosyl))腺嘌呤、9-乙基鸟嘌呤、9-甲基尿酸、阿德福韦酯(Adefovir dipivoxil)、别嘌呤醇核糖核苷、溴核酸、黄豆黄素、鸟苷、鸟苷酰基(2'→5')腺苷、鸟苷酰基(3'→5')胞苷、鸟苷酰基(3'→5')尿苷、次黄嘌呤、吲哚酚(Indoxyl)β-D-葡萄糖苷、异胞嘧啶、异黄蝶呤、激动素核糖核苷、N2-异丁酰基-3'-O-苯甲酰基-2'-脱氧鸟苷、N2-异丁酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧鸟苷、N2-异丁酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧鸟苷3'-O-琥珀酸、N2-甲基鸟苷、N4-乙酰基胞苷、N4-氨基胞苷、N4-茴香酰胞苷、N4-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞苷、N4-十八烷基胞嘧啶β-D-呋喃阿拉伯糖苷、N6-苯甲酰腺嘌呤、N6-甲基-2'-脱氧腺苷、N6-苯氧基乙酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺苷、乳清酸钾盐、乳清酸核苷、奥昔嘌醇(Oxypurinol)、R(-)-PD 128,908盐酸盐、S-(2-羟基-5-硝基苄基)-6-硫代鸟苷、S-(2-羟基-5-硝基苄基)-6-硫代肌苷、Se-(对硝基苄基)-6-硒基肌苷、胸苷酰基(3'→5')-2'-脱氧腺苷、胸苷酰基(3'→5')胸苷、胸腺嘧啶1-β-D-呋喃阿拉伯糖苷、三氟胸苷、尿嘧啶1-β-D-呋喃阿拉伯糖苷、玉米素核糖核苷等等。

[0060] 术语“多核苷酸结合的抗原”和“抗原结合的多核苷酸”在本文中可互换使用，通常是指如本文所述的多核苷酸，该多核苷酸如本文所述以如下这样的方式结合至抗原：多核苷酸和抗原在预期反应条件和/或多核苷酸结合的抗原可能经受的任何其它相关条件下不可能解离或已知不解离。此类多核苷酸和抗原可通过任何简易或适当的结合多核苷酸和抗原的方法结合，包括直接结合(如，共价结合)和间接结合(如，通过使用接头分子或多核苷酸-抗原结合的其它中介物)。

[0061] 如本文所用，术语“扩增子”是指在核酸扩增反应中作为扩增的核酸或初始核酸的来源的核酸复合物。“核酸复合物”是指两个或更多个连接的核酸，包括但不限于如双链体、三链体、四链体、五链体、六链体等等。核酸复合物的核酸可以是连接的，如通过氢键相互作用(包括Watson-Crick碱基配对)杂交。在一些情况下，核酸复合物的两个或更多个核酸可通过共价连接单个核酸分子的两个末端，如通过使用催化核酸的共价连接的酶或连接酶来连接在一起。在扩增反应中，另外的扩增产物可从作为初始扩增子的结果的扩增产物来扩

增,因此,术语扩增子也可指随后用于另外的扩增的扩增反应产物,然而,如本文所用,扩增子通常是指引发扩增的初始多核苷酸或多核苷酸复合物。

[0062] 本文提及的术语“连接酶”统指催化一个或多个核酸分子的两个邻近的末端的共价连接的酶。例如,核酸连接酶可催化在单链或双链核酸,包括例如单链DNA(ssDNA)、双链DNA(dsDNA)、单链RNA(ssRNA)和双链RNA(dsRNA)中并列的5'磷酸和3'羟基末端之间形成磷酸二酯键。连接酶可连接与互补核酸杂交的核酸,或可在不存在互补核酸的情况下连接。任何简易连接酶均可用于本文描述的方法,包括但不限于例如天然存在的连接酶、合成或重组连接酶、突变的连接酶、DNA连接酶、RNA连接酶、黏性末端连接酶、平滑末端连接酶、缺口修复连接酶、耐热连接酶、不耐热连接酶、T4DNA连接酶、T3DNA连接酶、T7DNA连接酶、大肠杆菌(*E.coli*)DNA连接酶、Taq DNA连接酶、热球菌(*Thermococcus*)DNA连接酶、小球藻(*Chlorella*)病毒DNA连接酶、T4RNA连接酶1、T4RNA连接酶2、嗜热自养甲烷杆菌(*Methanobacterium thermoautotrophicum*)DNA/RNA连接酶等等。

[0063] 如本文所用,术语“引物”或“寡核苷酸引物”是指当置于其中诱导引物延伸产物的合成的条件下时,如在存在核苷酸和聚合诱导剂,诸如DNA或RNA聚合酶的情况下,在合适的温度、pH、金属浓度和盐浓度下,起到引发互补核酸链的合成的作用的寡核苷酸。引物通常具有与其在引物延伸产物合成中的用途兼容的长度,并且可在8至100个核苷酸,诸如10至75个、15至60个、15至40个、18至30个、20至40个、21至50个、22至45个、25至40个核苷酸等等的长度之间的范围内,包括在18-40个、20-35个、21-30个核苷酸的长度之间的范围内,以及在所述范围之间的任何长度。在一些情况下,引物可在10-50个核苷酸,诸如15-45个、18-40个、20-30个、21-25个核苷酸等等的长度之间的范围内,以及在所述范围之间的任何长度。在一些实施方案中,引物的长度通常不超过约10、12、15、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65或70个核苷酸。

[0064] 术语“杂交(hybridize/hybridization)”是指通过Watson-Crick碱基配对在充分互补以形成复合物的核苷酸序列之间形成复合物。例如,在引物与靶标(模板)“杂交”时,此类复合物(或杂交体)足够稳定,以用于例如引发DNA合成的DNA聚合酶所需的引发功能。

[0065] 当两个核苷酸序列共有碱基对组织同源性时,那些分子是彼此“互补的”或具有“互补性”。“互补的”核苷酸序列将特异性组合,以在适当的杂交条件下形成稳定的双链体。例如,当第一序列的一部分可在反平行或反向互补意义上结合至第二序列的一部分时,两个序列是互补的,其中5'至3'方向的第一序列的互补区相对于第二序列结合至其3'至5'方向的互补序列,然后一个序列的每个A、T(U)、G和C分别与另一个序列的T(U)、A、C和G对齐。RNA序列还可包括互补的G=U或U=G碱基对。因此,两个序列不必具有完全“互补的”同源性。通常,当在确定的分子长度上,至少约85%的核苷酸共有碱基对组织时,包括但不限于在一些情况下,在确定的分子长度上,至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%和100%的碱基对组织时,两个序列是充分互补的。

[0066] 术语“严格条件”是指这样的条件:在该条件下,引物将与其互补结合配对物优先杂交或特异性地结合,并且在较小程度上或者根本不与其它序列杂交或结合。在一些情况下,在多核苷酸通过杂交彼此结合时,足以允许此类杂交的条件可包括严格条件。

[0067] 所谓“特异性地结合”或“选择性地结合”意指分子优先结合目标靶标,或与靶标结合的亲和力大于其它分子。例如,DNA分子将结合至实质上互补序列,而不结合至不相关序

列。特异性结合可指相对于溶液或反应混合物中其它分子或部分,非共价或共价优先结合至一种分子(如,相对于其它可用多肽,抗体特异性地结合至特定的多肽或表位)。在一些实施方案中,一种分子对其特异性地结合的另一种分子的亲和力以 10^{-5} M或更小(如, 10^{-6} M或更小、 10^{-7} M或更小、 10^{-8} M或更小、 10^{-9} M或更小、 10^{-10} M或更小、 10^{-11} M或更小、 10^{-12} M或更小、 10^{-13} M或更小、 10^{-14} M或更小、 10^{-15} M或更小或 10^{-16} M或更小)的 K_D (解离常数)表征。“亲和力”是指结合强度,结合亲和力增加与 K_D 减小相关。

[0068] “生物样品”涵盖从个体获得的许多样品类型,并且可用于诊断或监测测定。该定义涵盖生物来源的血液样品和其它液体样品、固体组织样品,诸如活检样本或由其来源的组织培养物或细胞及其子代。该定义还包括在获取(诸如使用试剂处理)、增溶或富集某些组分(诸如多核苷酸或多肽)之后以任何方式操纵的样品。术语“生物样品”涵盖临床样品,还包括培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物流体和组织样品。术语“生物样品”包括尿液、唾液、脑脊液、组织液、眼内液、滑液、血液级分诸如血浆和血清等等。术语“生物样品”还包括固体组织样品、组织培养物样品和细胞样品。

[0069] 术语“评估”包括任何测量形式,包括确定要素是否存在。术语“确定”、“测量”、“评价”、“评估”和“测定”可互换使用,包括定量和定性测定。评估可以是相对的或绝对的。“评估...的存在”包括确定某物存在的量和/或确定其是否存在。如本文所用,术语“确定”、“测量”和“评估”以及“测定”可互换使用,包括定量和定性测定二者。

[0070] 在进一步描述本发明之前,应当理解,本发明并不限于所描述的具体实施方案,因为这些实施方案当然是可变的。还应当理解,本文所用的术语仅出于描述具体实施方案的目的,并不旨在具有限制意义,因为本发明的范围将仅受所附权利要求的限定。

[0071] 在提供值的范围的情况下,应当理解,该范围的上限和下限之间的每个中间值(至下限单位的十分之一,除非上下文另有清楚规定)和该所述范围中的任何其它所述值和中间值也涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地被包括在较小范围中并且也被涵盖在本发明内,从属于所述范围中任何明确排除的限值。在所述范围包括限值中的一个或两个的情况下,排除那些被包括的限值中的任一个或两个的范围,也被包括在本发明中。

[0072] 除非另外定义,否则本文所用的所有科技术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的一样。虽然现在描述优选的方法和材料,但是任何与本文所述的那些方法和材料相似或等同的方法和材料也均可用于实践或测试本发明。本文所提及的全部出版物以引用的方式并入本文,以公开和描述与出版物所引用的内容相关的方法和/或材料。

[0073] 必须注意,如本文中和所附权利要求中所用,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代物,除非上下文清楚表明并非如此。因此,例如提及“一个抗原”包括多个此类抗原,提及“所述抗原”包括提及一个或多个抗原以及本领域的技术人员已知的其等同物等等。还应当指出的是,权利要求可能撰写成排除任何可选择的要素。同样,此陈述旨在作为与权利要求要素的描述联合使用此类排他性术语如“单独地”、“仅”等,或使用“否定性”限制的在先基础。

[0074] 应当认识到,为清楚起见在单独实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征也可组合提供于单个实施方案中。相反地,为简明起见在单个实施方案的上下文中描述的本发明的各种特征也可单独地或以任何合适的子组合提供。关于本发明的实施方案的所有组

合被明确地包括在本发明中并公开于本文中,就如同每个和每一个组合被个别地和明确地公开。此外,各个实施方案的所有子组合及其要素也被明确地包括在本发明中并公开于本文中,就如同每个和每一个此类子组合被个别地和明确地在本文公开。

[0075] 本文所论述的出版物仅针对它们在本申请提交日之前的公开内容而提供。本文的任何信息都不应解释为承认本发明不能因为是在先发明而先于这些出版物。此外,所提供的公开日期可能不同于实际公开日期,实际公开日期可能需要独立地进行确认。

[0076] 详述

[0077] 方法

[0078] 如上文所概述,本公开的实施方案涉及通过使抗原结合剂与多核苷酸结合的抗原聚集成复合物来检测样品中抗原结合剂的存在的方法。该方法的方面包括复合物的聚集的抗原的多核苷酸的基于邻近的缔合,以及随后检测此类缔合。

[0079] 抗原和抗原结合剂

[0080] 该方法的方面包括使用多核苷酸结合的抗原进行抗原结合剂的检测。如本文所用,所谓“抗原结合剂”意指特异性地结合至抗原的任何试剂,并且出于所述方法的目的,能够介导抗原和抗原结合剂凝集和/或聚集成复合物。在一些情况下,参见例如图1,抗原和抗原结合剂的复合物(100)可包含最少结合至两分子抗原(102)的单分子抗原结合剂(101)。因此,如本文所用,抗原结合剂可指同时结合至至少两分子单个抗原的生物分子和/或同时结合至至少两分子不同抗原的生物分子。在一些情况下,由于抗原(105)能够同时结合两分子或更多分子的抗原结合剂,因此抗原和抗原结合剂的复合物(103)可包括至少两分子抗原结合剂(104)。

[0081] 因此,主题方法的抗原结合剂可包括两个或更多个抗原结合位点。此类多个抗原结合位点可具有针对单个抗原的特异性或针对多个不同抗原的特异性。主题方法的抗原可包括两个或更多个抗原结合剂结合位点。此类多个抗原结合剂结合位点可具有针对单个抗原结合剂的特异性或针对多个不同抗原结合剂的特异性。此类结合相互作用的多样性有助于复合物形成以及抗原和抗原结合剂紧密邻近聚集。

[0082] 在一些情况下,抗原结合剂可以是结合至两分子或更多分子抗原,以介导抗原-抗体复合物的凝集和形成的抗体或多价抗体片段。在一些情况下,多价或二价抗体结合的抗原将是二价或多价抗原,以使得凝集通过每个抗体与两个或更多个抗原的结合和每个抗原与两个或更多个抗体的结合介导。因此,抗体-抗原复合物可包括结合至两分子抗原的单个抗体和/或结合至两个或更多个抗原的多个抗体(其中每个抗原结合至两个或更多个抗体)。如本文所述,抗体可以是单特异性的或多特异性的,因此,抗体-抗原复合物可包括包含单个抗原种类的那些抗体-抗原复合物以及包含两个或更多个抗原种类的那些抗体-抗原复合物。在一些情况下,抗体是双特异性的,使得每个抗体结合至两种不同抗原的不同分子,以介导凝集。因此,双特异性抗体-抗原复合物可包括结合至两分子的两个不同抗原的单个双特异性抗体和/或结合至两分子的两个不同抗原(其中每个抗原结合至两个或更多个抗体)的多个双特异性抗体。普通技术人员将易于理解本文所示的凝集复合物的上述组分的各种可能相互作用的多样性。其中凝集由样品中抗体的存在而介导的此类复合物,例如与未结合的抗原相比,使抗体结合的抗原紧密邻近定位。

[0083] 主题方法的抗原将包括连接到抗原的至少一种多核苷酸。多核苷酸可通过任何简

易方法连接到抗原,如下文更详细地描述。连接到目标抗原的多核苷酸将部分根据所用的检测方法、抗原连接到多核苷酸的方法、待检测的特定抗原结合剂等而变化。本公开的抗原结合的多核苷酸的长度将是变化的,并且为15个或更多个核苷酸,可在15个核苷酸至200个核苷酸或更多的范围内,包括但不限于例如20个或更多个核苷酸、25个或更多个核苷酸、30个或更多个核苷酸、35个或更多个核苷酸、40个或更多个核苷酸、45个或更多个核苷酸、50个或更多个核苷酸、55个或更多个核苷酸、60个或更多个核苷酸、65个或更多个核苷酸、70个或更多个核苷酸、75个或更多个核苷酸、80个或更多个核苷酸、90个或更多个核苷酸、95个或更多个核苷酸、100个或更多个核苷酸、15个至200个核苷酸、20个至200个核苷酸、25个至200个核苷酸、30个至200个核苷酸、35个至200个核苷酸、40个至200个核苷酸、45个至200个核苷酸、50个至200个核苷酸、15个至100个核苷酸、20个至100个核苷酸、25个至100个核苷酸、30个至100个核苷酸、35个至100个核苷酸、40个至100个核苷酸、45个至100个核苷酸、50个至100个核苷酸等。

[0084] 本公开的多核苷酸将包含结合至少一个其它多核苷酸并且有助于与所述其它多核苷酸形成多核苷酸复合物(如,双链体、三链体等)的至少一个互补区。根据所述方法,不受理论的束缚,通过互补氢键形成多核苷酸复合物是通过增加互补多核苷酸与多核苷酸结合的概率来促进的,所述增加概率通过增加至少两种形成复合物的多核苷酸彼此邻近的时间来进行。此类增加形成多核苷酸复合物的多核苷酸的邻近时间是通过抗原结合的多核苷酸的抗原结合剂介导的聚集来实现的。

[0085] 在一个实施方案中,结合至抗原的第一多核苷酸可包括与第二多核苷酸互补的互补区,该第二多核苷酸也结合至抗原,所述抗原包括相同的抗原或不同的抗原。在一些情况下,第一和第二多核苷酸之间的互补区足以进行两个多核苷酸的杂交。在某些情况下,第一和第二抗原结合的多核苷酸之间的杂交足够弱,以使得在不存在复合物形成的情况下杂交基本上不发生。

[0086] 在另一个实施方案中,结合至抗原的第一多核苷酸可包括与未结合至抗原的多核苷酸(包括例如本文描述的桥接多核苷酸或夹板多核苷酸)互补的互补区。在一些情况下,结合至抗原的第一多核苷酸可基本上不包括与第二抗原结合的多核苷酸显著互补的区域,使得第一多核苷酸和第二多核苷酸基本上不彼此杂交。

[0087] 虽然在很多情况下,特定多核苷酸可与仅一个其它多核苷酸,即第二抗原结合的多核苷酸或未结合至抗原的多核苷酸具有互补性,但此类多核苷酸不必受到此限制,并且在一些情况下可具有与两个或更多个不同的多核苷酸的互补性。例如,在某些实施方案中,结合至抗原的第一多核苷酸可包括多个互补区,包括例如与第二抗原结合的多核苷酸互补的第一互补区和与未结合至抗原的多核苷酸互补的第二互补区。在很多情况下,未结合至抗原的多核苷酸将具有与两种或更多种不同多核苷酸,包括例如两种或更多种抗原结合的多核苷酸、两种或更多种抗原结合的多核苷酸和未结合至抗原的第二多核苷酸等的互补性。

[0088] 本公开的两种多核苷酸之间的互补区将是变化的,并且可为6个或更多个连续碱基对,可在6个连续碱基对至50个连续碱基对或更多个的范围内,包括但不限于例如6个至50个连续碱基对、6个至45个连续碱基对、6个至40个连续碱基对、6个至35个连续碱基对、6个至30个连续碱基对、6个至25个连续碱基对、6个至20个连续碱基对、6个至15个连续碱基

对、6个至10个连续碱基对、10个至50个连续碱基对、10个至45个连续碱基对、10个至40个连续碱基对、10个至35个连续碱基对、10个至30个连续碱基对、10个至25个连续碱基对、10个至20个连续碱基对、10个至15个连续碱基对、7个或更多个连续碱基对、8个或更多个连续碱基对、9个或更多个连续碱基对、10个或更多个连续碱基对、11个或更多个连续碱基对、12个或更多个连续碱基对、13个或更多个连续碱基对、14个或更多个连续碱基对、15个或更多个连续碱基对、16个或更多个连续碱基对、17个或更多个连续碱基对、18个或更多个连续碱基对、19个或更多个连续碱基对、20个或更多个连续碱基对、6个连续碱基对、7个连续碱基对、8个连续碱基对、9个连续碱基对、10个连续碱基对、11个连续碱基对、12个连续碱基对、13个连续碱基对、14个连续碱基对、15个连续碱基对、16个连续碱基对、17个连续碱基对、18个连续碱基对、19个连续碱基对、20个连续碱基对、21个连续碱基对、22个连续碱基对、23个连续碱基对、24个连续碱基对、25个连续碱基对等。

[0089] 根据本发明方法的方面,所用的多核苷酸可以是单链或双链,包括部分或完全单链或双链,并且可以包含或不包含引物结合位点。在一些情况下,第一多核苷酸将组成一半扩增子,使得当保持足够邻近第二多核苷酸时,组成另一半扩增子,第一和第二多核苷酸共同组成完整的扩增子。在一些情况下,第一和/或第二多核苷酸可组成小于一半的一个扩增子,使得一个或多个另外的多核苷酸可为形成完整扩增子必须的,甚至当第一和第二多核苷酸充分邻近以缔合时也如此。在一些情况下,反应如化学反应或酶促反应,可用于连接根据本文所述的方法形成的复合物的两个或更多个多核苷酸,以生成组成扩增子或扩增子的一部分的单个多核苷酸。

[0090] 现在参考图2提供的非限制性实施方案。在一些情况下,当通过形成包括第一和第二抗原(200和202)和一个或多个抗原结合成员的复合物而保持相对邻近时,连接到第一抗原(200)的第一多核苷酸(201)与连接到第二抗原(202)的第二多核苷酸(203)足以形成扩增子。包含至少一些互补核酸序列的第一和第二多核苷酸(201和203),通过充分的氢键相互作用结合,以形成可用作其中一个多核苷酸延长的起始点的核酸双链体(204)。

[0091] 现在参考图3提供的非限制性实例。在一些情况下,当第一和第二多核苷酸(301和303)通过形成包括第一和第二抗原(300和302)和一个或多个抗原结合成员的复合物而保持相对邻近时,连接到第一抗原(300)的第一多核苷酸(301)与连接到第二抗原(302)的第二多核苷酸(303)和桥接多核苷酸(305)足以形成扩增子。均包含至少一些与桥接多核苷酸(305)互补的核酸序列的第一和第二多核苷酸(301和303)通过充分的氢键相互作用结合桥接多核苷酸,以形成可用作其中一个多核苷酸延长的起始点的核酸复合物(304)。任选地,例如通过加入一个或多个引物或使用桥接多核苷酸作为引物,第一和第二多核苷酸(301和303)可连接以形成可用作扩增子的连续多核苷酸。在另一个实施方案中(参见图4),第一和第二多核苷酸(401和403)连接到与桥接多核苷酸(405)具有互补性的夹板多核苷酸(406)。

[0092] 多核苷酸可在沿多核苷酸的长度的任何合适的点,包括在3'或5'末端连接到所需抗原。在一些情况下,扩增子的第一抗原结合的多核苷酸在其3'末端连接到抗原,并且扩增子的第二抗原结合的多核苷酸在其5'末端连接到抗原。在一些情况下,第一和第二抗原结合的多核苷酸二者在其3'末端连接到其各自的抗原。在一些情况下,第一和第二抗原结合的多核苷酸二者在其5'末端连接到其各自的抗原。

[0093] 在另一个实施方案中(参见图5),第一和第二抗原结合的多核苷酸(501和503)二

者均在其5'或3'末端连接到其各自的抗原(500和502),并且结合桥接多核苷酸(505),以形成核酸复合物,可由该核酸复合物引发延长。

[0094] 如本文所用,术语“桥接多核苷酸”是指通过同时与每个多核苷酸上的互补区或多核苷酸末端的互补区杂交来连接两个或更多个单独的多核苷酸或单个多核苷酸的两个末端的任何多核苷酸。在某些情况下,桥接多核苷酸通过同时与第一抗原结合的多核苷酸的第一互补区和第二抗原结合的多核苷酸的第二互补区杂交来连接两个抗原结合的多核苷酸。桥接多核苷酸可以是部分或完全单链,包括部分单链和部分双链。本公开的桥接多核苷酸的长度将是变化的,并且可为10个或更多个核苷酸,在10个至100个或更多个核苷酸的范围内,包括例如10个至100个核苷酸、12个至100个核苷酸、14个至100个核苷酸、16个至100个核苷酸、18个至100个核苷酸、20个至100个核苷酸、22个至100个核苷酸、24个至100个核苷酸、26个至100个核苷酸、28个至100个核苷酸、30个至100个核苷酸、10个至50个核苷酸、12个至50个核苷酸、14个至50个核苷酸、16个至50个核苷酸、18个至50个核苷酸、20个至50个核苷酸、22个至50个核苷酸、24个至50个核苷酸、26个至50个核苷酸、28个至50个核苷酸、30个至50个核苷酸、10个至40个核苷酸、12个至40个核苷酸、14个至40个核苷酸、16个至40个核苷酸、18个至40个核苷酸、20个至40个核苷酸、22个至40个核苷酸、24个至40个核苷酸、26个至40个核苷酸、28个至40个核苷酸、30个至40个核苷酸、10个至30个核苷酸、12个至30个核苷酸、14个至30个核苷酸、16个至30个核苷酸、18个至30个核苷酸、20个至30个核苷酸、12个或更多个核苷酸、13个或更多个核苷酸、14个或更多个核苷酸、15个或更多个核苷酸、16个或更多个核苷酸、17个或更多个核苷酸、18个或更多个核苷酸、19个或更多个核苷酸、20个或更多个核苷酸、12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸、19个核苷酸、20个核苷酸、21个核苷酸、22个核苷酸、23个核苷酸、24个核苷酸、25个核苷酸、26个核苷酸、27个核苷酸、28个核苷酸、29个核苷酸、30个核苷酸等。

[0095] 桥接多核苷酸可“桥接”两个或更多个多核苷酸,以形成多核苷酸复合物。在一些情况下,桥接多核苷酸可与两个多核苷酸末端杂交,包括相同或不同核酸的末端,使得该末端在多核苷酸复合物内邻近,如允许邻近末端的连接。在一些情况下,桥接多核苷酸可与两个多核苷酸末端杂交,包括相同或不同核酸的末端,使得该末端在所得的多核苷酸复合物中不邻近,例如不邻近以使得它们不能直接连接在一起。在一些情况下,如在多核苷酸复合物的两个末端不邻近的情况下,夹板多核苷酸可在两个末端之间的空间中杂交,使得夹板多核苷酸的末端与一个或多个末端邻近定位。如本文所用,术语“夹板多核苷酸”是指通常可为单链或部分单链和部分双链的多核苷酸,它可用于填充多核苷酸复合物的两个多核苷酸末端之间的一个或多个缺口,所述复合物如使用桥接多核苷酸形成的那些复合物。在一些情况下,夹板多核苷酸可与桥接多核苷酸的一个或多个部分具有互补性。在一些情况下,邻近夹板多核苷酸的一个或多个多核苷酸的末端可连接至夹板多核苷酸。

[0096] 在一些情况下,本公开的桥接多核苷酸可包括一个或多个核苷类似物。例如,在一些情况下,本公开的桥接多核苷酸可包括一个或多个脱氧核糖尿嘧啶(即,脱氧核糖尿嘧啶、2'-脱氧尿苷等)核苷/核苷酸。在某些情况下,桥接多核苷酸可包括2个或更多个核苷类似物,包括但不限于例如3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个等。在一些情况下,核苷类似物的数量占桥接多核苷酸的总碱基的百分比为1%或更多,包括但不限于例如2%或更多、3%或更多、4%或更多、5%或更多、6%或更多、7%或更多、8%或更多、9%

或更多、10%或更多、11%或更多、12%或更多、13%或更多、14%或更多、15%或更多、16%或更多、17%或更多、18%或更多、19%或更多、20%或更多、21%或更多、22%或更多、23%或更多、24%或更多、25%或更多、26%或更多、27%或更多、28%或更多、29%或更多、30%或更多等。

[0097] 在某些实施方案中,本公开的方法可包括桥接多核苷酸的特异性降解。例如,在一些情况下,核苷类似物在桥接多核苷酸内的存在允许桥接多核苷酸如在连接之后的靶向降解。在一些情况下,包含核苷类似物的桥接多核苷酸通过一个或多个针对核苷类似物具有特异性的碱基切除机制来介导桥接多核苷酸的特异性降解。此类方法可使用试剂进行特定核苷类似物的特异性切除,例如在方法中的特定点,如在连接步骤之后,使样品与一种或多种特异性核苷切除试剂接触。例如,包括一个或多个脱氧核糖尿嘧啶的桥接多核苷酸,与两个抗原结合的多核苷酸杂交并促进其连接,然后在连接之后,如通过使用一种或多种尿嘧啶特异性切除试剂来降解桥接多核苷酸。

[0098] 此类特异性切除试剂包括有助于特定核苷类似物的特异性切除和/或有助于一个或多个邻接特定核苷类似物的磷酸二酯键的裂解的那些试剂。因此,可用的碱基切除试剂可包括糖基化酶和/或核酸内切酶。在某些实施方案中,如在一个或多个脱氧核糖尿嘧啶并入桥接多核苷酸的情况下,可用的尿嘧啶特异性切除试剂可包括有助于尿嘧啶的特异性切除和/或有助于在尿嘧啶切除之前或之后一个或多个邻接尿嘧啶的磷酸二酯键的裂解的那些试剂。尿嘧啶特异性切除试剂的非限制性实例包括但不限于例如尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)、核酸内切酶IV、核酸内切酶VIII等等。因此,在一些情况下,特异性地降解包含核苷类似物的桥接多核苷酸可包括使样品与一种或多种碱基切除试剂接触。

[0099] 如上文所述,在一些情况下,一个或多个抗原结合的多核苷酸可以是完整或部分双链。在一个实施方案中(参见图6),第一抗原结合的多核苷酸(601)具有结合第二部分双链的抗原结合的多核苷酸(603)的足够互补性,以形成核酸复合物,当第一和第二抗原(600和602)与一分子或多分子抗原结合剂形成复合物时,可由该核酸复合物引发延长。

[0100] 在一些情况下,第一抗原结合的多核苷酸和第二抗原结合的多核苷酸之间的互补性,和/或所得的复合物的任何桥接多核苷酸和/或夹板多核苷酸在不存在凝集的情况下不足以显著形成多核苷酸复合物。例如,在一些情况下,包括特定复合物的全部互补性的大复合物的两种或更多种组分的互补性的互补性是足够低效的,使得下游程序(如连接、延长、扩增等)所需的复合物形成基本上仅在该多核苷酸结合的抗原由于结合至凝集复合物中的一种或多种抗原结合剂而紧密邻近时才出现。

[0101] 在一些情况下,如本文所述,杂交和多核苷酸复合物形成受到反应混合物的一种或多种试剂的浓度的影响。例如,在一些情况下,反应混合物的一种或多种组分的浓度足够低,以使得在不存在凝集的情况下,多核苷酸复合物的形成速率显著低于凝集复合物内多核苷酸复合物的形成速率。在一些情况下,多核苷酸结合的抗原的相对浓度足够低,以使得与游离的多核苷酸结合的抗原形成多核苷酸复合物的速率显著低于与凝集的多核苷酸结合的抗原形成多核苷酸复合物的速率。在该上下文中,所谓“显著低”意指在游离的和凝集的组分之间形成多核苷酸复合物的速率之间的差异足以使得可开发一种测定,在所述测定中例如使用本文所述的特定检测方法可区分游离和凝集状态。

[0102] 扩增

[0103] 在形成扩增子,或可由其形成扩增子的连接多核苷酸,或可由其形成扩增子的延长多核苷酸时,可使扩增子扩增以生成扩增产物。任何简易扩增方法均可用于生成扩增产物,如下文更详细地描述,并且可取决于所形成的具体多核苷酸复合物和/或总体检测测定的具体需要。由于扩增子的形成取决于多核苷酸结合的抗原的抗原结合剂介导的聚集,因此扩增产物的存在可表明样品中抗原结合剂的存在和/或抗原结合剂的量。

[0104] 在一些情况下,扩增可通过聚合酶链式反应(PCR)进行。在代表性PCR扩增反应中,反应混合物通常包括模板核酸,其与用于引物延伸反应的一种或多种引物如PCR引物(诸如用于几何(或指数)扩增的正向和反向引物或用于线性扩增的单个引物)组合。因此,在一些情况下,上述核酸复合物的杂交部分可用作扩增反应的“引物”。例如,在其中利用线性扩增的情况下,上述核酸复合物的杂交核酸的单个游离3'-末端可用作扩增的引物。在一些情况下,可加入一种或多种另外的核酸,以在所形成的核酸复合物中用作引物。例如,在一些情况下,两种抗原结合的多核苷酸可在连接反应中连接,并且可加入两种另外的引物,以便有利于新连接的核酸片段或模板的扩增。在一些情况下,上述核酸复合物的杂交核酸的单个游离的3'-末端可用作第一引物,并且可加入第二引物以便有利于扩增。

[0105] 模板核酸(为方便起见,下文称为模板DNA)所接触的任何寡核苷酸引物将具有足够的长度,以在退火条件下提供与互补模板DNA的杂交。引物通常将具有至少6bp的长度、包括但不限于例如至少10bp的长度、至少15bp的长度、至少16bp的长度、至少17bp的长度、至少18bp的长度、至少19bp的长度、至少20bp的长度、至少21bp的长度、至少22bp的长度、至少23bp的长度、至少24bp的长度、至少25bp的长度、至少26bp的长度、至少27bp的长度、至少28bp的长度、至少29bp的长度、至少30bp的长度,并且可为相等于60bp的长度或更长,其中引物的长度通常将在18至50bp的长度,包括但不限于例如约20至35bp的长度的范围内。在一些情况下,可使模板DNA与单个引物或一组两个引物(正向和反向引物)接触,这取决于是否需要引物延伸、线性扩增或指数扩增模板DNA。可用于主题方法的PCR方法包括但不限于美国专利No.4,683,202、4,683,195、4,800,159、4,965,188和5,512,462中描述的那些,每个专利的公开内容以引用的方式并入本文。

[0106] 除上述组分之外,主题方法产生的PCR反应混合物可包括聚合酶和脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)。所需的聚合酶活性可由一种或多种独特的聚合酶提供。在很多实施方案中,反应混合物包括至少家族A聚合酶,其中目标代表性家族A聚合酶包括但不限于:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)聚合酶,包括天然存在的聚合酶(Taq)及其衍生物和同源物,诸如Klentaq(如Proc.Natl.Acad.Sci USA (1994) 91:2216-2220所述,该文献的公开内容全文以引用的方式并入本文);嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)聚合酶,包括天然存在的聚合酶(Tth)及其衍生物和同源物等等。在其中所进行的扩增反应是高保真反应的某些实施方案中,反应混合物还可包括具有3'-5'核酸外切酶活性的聚合酶,例如可由家族B聚合酶提供,其中目标家族B聚合酶包括但不限于:海滨热球菌(*Thermococcus litoralis*)DNA聚合酶(Vent)(例如,如Perler等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1992) 89:5577所述,该文献的公开内容全文以引用的方式并入本文);火球菌属物种(*Pyrococcus species*)GB-D(Deep Vent);激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)DNA聚合酶(Pfu)(例如,如Lundberg等人,Gene (1991) 108:1-6所述,该文献的公开内容全文以引用的方式并入本文)、沃氏火球菌(*Pyrococcus woesei*)(Pwo)等等。一般来讲,反应混合物将包括四种不同类型的dNTP,对应

于所提供的四种天然存在的碱基,即dATP、dTTP、dCTP和dGTP,并且在一些情况下可包括一种或多种经修饰核苷酸dNTP。

[0107] PCR反应通常将通过在适当的退火、延长/延伸和变性温度之间将反应混合物循环特定的时间来进行。此类温度和时间将是变化的,并且将取决于反应的具体组分,包括例如聚合酶和引物以及预期长度的所得PCR产物。在一些情况下,例如,在利用巢式或两步PCR时,循环反应可分几个阶段进行,例如根据第一阶段的循环,所述第一阶段具有特定循环程序或使用特定温度,以及随后的根据第二阶段的循环,所述第二阶段具有特定循环程序或使用特定温度。

[0108] 多步PCR方法可以包括或不包括在扩增引发之后加入一种或多种试剂。例如,在一些情况下,扩增可通过使用聚合酶进行延长来引发,并且在初始反应期之后,可向反应加入另外的试剂(如,一种或多种另外的引物、另外的酶等)以促进第二反应期。在一些情况下,扩增可使用第一引物或第一组引物来引发,并且在初始反应期之后,可向反应加入另外的试剂(如,一种或多种另外的引物、另外的酶等)以促进第二反应期。在某些实施方案中,初始扩增期可称为“预扩增”。

[0109] 在一些情况下,扩增可在等温条件下进行,如通过等温扩增。等温扩增方法通常利用酶促分离DNA链的方法,以在恒定温度下促进扩增,诸如例如链置换聚合酶或解旋酶,从而消除了热循环以使DNA变性的需要。主题方法中可使用任何简易和适当的等温扩增方法,包括但不限于:环介导的等温扩增(LAMP)、链置换扩增(SDA)、解旋酶依赖性扩增(HDA)、缺口酶扩增反应(NEAR)等等。LAMP通常利用多个引物,如4-6个引物,它们可识别靶标DNA的多个特定区,如6-8个特定区。合成通常由具有两个形成环结构的引物的链置换DNA聚合酶引发,以促进后续轮的扩增。LAMP是迅速和灵敏的。此外,在一些情况下,LAMP扩增反应期间产生的焦磷酸镁可以不使用特殊设备观察,如通过眼睛。SDA通常涉及使用链置换DNA聚合酶(如,Bst DNA聚合酶、大(Klenow)片段聚合酶、Klenow片段(3' -5' 外切)等等)在缺口引发,该缺口通过链受限的限制性核酸内切酶或缺口酶在引物中包含的位点处形成。在SDA中,缺口位点通常通过每个聚合酶置换步骤来再生,引起指数扩增。HDA通常利用:解旋酶,它通过使双链DNA解链来分离链;引物,如可与解链DNA退火的两个引物;以及用于延伸的链置换DNA聚合酶。NEAR通常涉及在缺口(如通过缺口酶形成)处引发延长的链置换DNA聚合酶。NEAR是迅速和灵敏的,迅速从靶标序列产生很多短核酸。

[0110] 在一些情况下,可组合全部扩增方法,或可重新组合各种扩增方法的方面以产生杂交体扩增方法。例如,在一些情况下,可使用PCR的方面,例如以产生初始模板或扩增子或第一轮扩增或多轮扩增,并且等温扩增方法随后可用于另外的扩增。在一些情况下,可利用等温扩增方法或等温扩增方法的方面,然后进行PCR以进一步扩增等温扩增反应的产物。在一些情况下,样品可使用第一扩增方法预扩增并且可进一步加工,包括例如使用第二扩增方法进一步扩增或分析。作为非限制性实例,样品可通过PCR预扩增并且通过qPCR进一步分析。

[0111] 在一些情况下,可使用或不使用预扩增步骤来组合下文所述的扩增步骤和检测步骤。在一些情况下,所用的具体扩增方法允许定性检测扩增产物,如使用或不使用检测试剂目测观察扩增反应。在一个实施方案中,通过等温扩增如LAMP来扩增凝集的抗原结合的多核苷酸,并且该扩增使扩增反应产生视觉变化,表明发生了有效扩增,从而表明样品中存在

抗原结合剂。在一些情况下,通过监测扩增期间的扩增反应,可将扩增和检测步骤组合在一起,诸如在例如实时PCR中进行,在本文中也称为定量PCR(qPCR),如下文更详细地描述。

[0112] 在一些情况下,本文所述的方法可利用用于邻近连接测定(proximity ligation assay)(PLA)和邻近延长测定(PEA)的那些方法,如扩增方法及其组分,包括但不限于例如滚环扩增(RCA)、结合诱导的DNA组装(BINDA)、缺口酶辅助的荧光信号扩增(NEFSA),以及如Janssen等人(2013)Sensors,13,1353-1384中描述的那些方法,该文献的公开内容全文以引用的方式并入本文。

[0113] 作为非限制性实例,参见图7,在一些情况下,两种抗原结合的多核苷酸(701和703)通过其结合的抗原(700和702)的聚集来促进的缔合允许例如通过环化寡核苷酸(707)的连接进行环化,所述环化任选地可涉及桥接多核苷酸(705)。环化多核苷酸的环化可允许例如通过RCA延长一种抗原结合的多核苷酸。在一些情况下,通过RCA的延长和/或扩增涉及抗原结合的多核苷酸的一个或多个重复序列的产生。

[0114] 检测

[0115] 扩增产物的存在可通过任何简易方法确定,包括定性确定或定量确定。在一些情况下,扩增产物的存在可例如通过扩增反应的物理变化来定性确定,所述物理变化表明发生了靶标多核苷酸复合物的有效扩增。

[0116] 在一些情况下,检测扩增产物和/或扩增产物的量通过扩增的核酸的非特异性检测的检测方案或扩增的核酸的特异性检测的方案来测量。代表性的目标非特异性检测方案包括利用信号生成系统的方案,该信号生成系统例如通过嵌入来选择性检测双链核酸产物。可用于此类实施方案的代表性的可检测分子包括荧光核酸染色剂,诸如与核酸结合时提供增强荧光的菲啶(phenanthridinium)染料,包括单体或其同源或异源二聚体。菲啶染料的实例包括乙锭同源二聚体、溴化乙锭、碘化丙啶和其它烷基取代的菲啶染料。在另一个实施方案中,核酸染色剂包括吖啶染料或其同源或异源二聚体,诸如吖啶橙、吖啶同源二聚体、乙锭-吖啶异源二聚体或9-氨基-6-氯-2-甲氧基吖啶。在又一个实施方案中,核酸染色剂是吲哚或咪唑染料,诸如Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hoechst 34580、DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)或DIPI(4',6-(二咪唑啉-2-基)-2-苯基吲哚)。其它许可的核酸染色剂包括但不限于7-氨基放线菌素D、羟基司替巴脒、LDS 751、选择补骨脂素(呋喃香豆素)、苯乙烯基染料、金属络合物诸如钆络合物和过渡金属络合物(例如包括Tb³⁺和Eu³⁺)。在某些实施方案中,核酸染色剂是与核酸缔合时产生增强荧光的花青染料或花青染料的同源或异源二聚体。在一些情况下,可使用美国专利No.4,883,867、美国专利No.5,582,977、美国专利No.5,321,130和美国专利No.5,410,030(这些专利全文以引用的方式并入本文)描述的染料,包括以商品名TOTO、BOBO、POPO、YOYO、TO-PRO、BO-PRO、PO-PRO和YO-PRO(Life Technologies,Inc.Grand Island,NY)商购获得的核酸染色剂。在一些情况下,可使用美国专利No.5,436,134、美国专利No.5,658,751和美国专利No.5,863,753(这些专利全文以引用的方式并入本文)描述的染料,包括以商品名SYBR、SYTO、SYTOX、PICOGREEN、OLIGREEN和RIBOGREEN(Life Technologies,Inc.Grand Island,NY)商购获得的核酸染色剂。在又一个实施方案中,核酸染色剂是与核酸缔合时产生增强荧光的单体、同源二聚体或异源二聚体花青染料,包括氮杂或多氮杂吲哚鎓(polyazabenzazolum)杂环,诸如氮杂苯并噻唑、氮杂苯并咪唑或氮杂苯并噻唑,包括以商品名SYTO、SYTOX、JOJO、JO-PRO、LOLO、LO-PRO(Life

Technologies, Inc. Grand Island, NY) 商购获得的核酸染色剂。

[0117] 在又一个实施方案中, 一般来讲, 相对于双链分子, 可利用针对扩增产物具有特异性的信号产生系统来检测扩增。在这些实施方案中, 信号产生系统可包括特异性地结合至可见于扩增产物的序列的探针核酸, 其中该探针核酸可使用可直接或可间接检测的标记来标记。可直接检测的标记是不使用另外的试剂而直接检测的标记, 而可间接检测的标记是可利用一种或多种另外的试剂来检测的标记, 例如其中该标记是由两种或更多种组分构成的信号产生系统的成员。在一些实施方案中, 标记是直接检测的标记, 其中目标可直接检测的标记包括但不限于: 荧光标记、放射性同位素标记、化学发光标记等等。在一些实施方案中, 标记是荧光标记, 其中此类实施方案中使用的标记试剂是荧光标记的核苷酸, 如荧光标记的CTP (诸如Cy3-CTP、Cy5-CTP) 等。可用于标记核苷酸以制备标记的探针核酸的荧光部分包括但不限于: 荧光素、花青染料诸如Cy3、Cy5、Alexa 555、Bodipy 630/650等等。也可使用其它标记, 诸如上文描述的那些标记。

[0118] 在其中信号产生系统是荧光信号产生系统的那些实施方案中, 信号检测通常包括检测来自反应混合物的荧光信号变化, 以获得测定结果。换句话讲, 评估反应混合物产生的荧光信号的任何调整。根据所用的标记的性质, 变化可以是荧光增加或减少, 并且在某些实施方案中是荧光增加。可使用任何简易装置, 例如合适的荧光计, 诸如耐热比色杯或平板读取荧光计筛选荧光增加的样品。使用已知荧光计适当地监测荧光。将来自这些设备的信号, 例如光电倍增管电压形式的信号, 发送至数据处理器板, 并转化为与每个样品管相关的光谱。可同时评估多个反应容器, 如多个管、多孔板等。

[0119] 在一些情况下, 多核苷酸复合物的具体多核苷酸, 如抗原结合的多核苷酸、桥接多核苷酸、环化寡核苷酸等的延长和/或扩增, 使一个或多个特定核酸序列复制, 得到包含一个或多个特定核酸序列的重复序列的一条或多条链。可以例如通过对针对重复的特定序列具有特异性的探针核酸的杂交来检测此类重复序列。在某些情况下, 针对重复的特定序列具有特异性的标记的探针核酸, 如荧光标记的探针核酸、酶标记的探针核酸、放射性标记的探针核酸等, 可用于检测包含重复的特定序列的延长的多核苷酸或扩增产物。在一些情况下, 由于很多标记的探针核酸与延长的多核苷酸或扩增产物杂交, 产生高局部浓度的可检测标记, 所以标记的探针核酸与延长的多核苷酸或扩增产物的重复序列的杂交允许检测延长的多核苷酸或扩增产物。

[0120] 例如, 在一些情况下, 抗原结合的多核苷酸的一个或多个序列的重复序列包含在根据本文所述的方法产生的扩增产物或延长产物中, 并且通过使用针对重复序列单元具有特异性的标记的探针核酸检测重复序列。在一些情况下, 桥接多核苷酸的一个或多个序列的重复序列包含在根据本文所述的方法产生的扩增产物或延长产物中, 并且通过使用针对重复序列单元具有特异性的标记的探针核酸来检测重复序列。在一些情况下, 环化寡核苷酸的一个或多个序列的重复序列包含在根据本文所述的方法产生的扩增产物或延长产物中, 并且通过使用针对重复序列单元具有特异性的标记的探针核酸检测重复序列。

[0121] 在某些实施方案中, 重复核酸序列可通过本文所述的一种或多种延长和/或扩增方法, 如PCR扩增、等温扩增 (如, RCA) 等产生, 并且通过一种或多种荧光标记的探针核酸与延长和/或扩增产物的杂交可使延长和/或扩增产物变得可检测。此类可检测的延长和/或扩增产物可通过任何简易的检测荧光的方式, 包括但不限于例如荧光显微术、流式细胞术、

成像流式细胞术等来鉴定。在一些情况下,可检测的延长和/或扩增产物的鉴定可允许检测或鉴定与复合物的抗原结合剂缔合的分子、颗粒、细胞、组织、生物体等,其中延长和/或扩增产物来源于该复合物。例如,在一些情况下,荧光探针结合的延长和/或扩增产物可保持与产生抗原结合剂的细胞缔合,以允许例如通过荧光显微术来鉴定细胞,和/或例如通过荧光活化细胞分选(FACS)来分离细胞。

[0122] 如上文所述,在一些情况下,可实时监控扩增,以提供检测和/或定量。在检测方案是实时方案的情况下,例如如qPCR反应方案所用,在整个反应中可以频繁的间隔收集数据,例如每10ms一次,或频率大于或小于每10ms一次。通过在每个循环期间监测样品中反应性分子的荧光,可以各种方式监测扩增反应的过程。例如,可例如通过计算熔融峰下面积分析熔融峰提供的数据,并将这些数据对循环数作图。

[0123] 可解析以这种方式生成的光谱,例如使用预选择的荧光部分(诸如染料)的“拟合”来形成表示每个信号传递部分(即荧光团)的峰。可确定表示每个信号的强度值的峰下面积,并且如有需要,以彼此的商表示。信号强度和/或比率的微分将允许在整个反应中或在不同的反应条件诸如温度下记录标记探针的变化。该变化涉及寡核苷酸探针和靶标序列之间的结合现象或结合至靶标序列的寡核苷酸探针的降解。微分峰下面积的积分将允许计算标记效应的强度值。

[0124] 筛选荧光变化的混合物提供了一种或多种测定结果,这取决于在扩增反应结束时筛选样品一次,还是在反应期间筛选多次如在每个循环之后(如,在实时PCR监测中进行)。

[0125] 根据本文所述的方法,可检测抗原结合剂的存在,如大于或小于特定检测阈值,或可测量抗原结合剂的存在,如当以大于特定检测阈值存在时,可测量样品中抗原结合剂的实际量或浓度。主题抗原结合剂检测反应的实际检测阈值将是变化的,并且将取决于例如待检测的抗原结合剂、所用的具体扩增方法、所用的检测方法等等。在一些情况下,主题检测方法的检测阈值可在15ng/ml至1pg/ml的范围内,并且可包括小于15ng/ml、小于14ng/ml、小于13ng/ml、小于12ng/ml、小于11ng/ml、小于10ng/ml、小于9ng/ml、小于8ng/ml、小于7ng/ml、小于6ng/ml、小于5ng/ml、小于4ng/ml、小于3ng/ml、小于2ng/ml、小于1ng/ml、小于500pg/ml、小于400pg/ml、小于300pg/ml、小于200pg/ml、小于100pg/ml、小于90pg/ml、小于80pg/ml、小于70pg/ml、小于60pg/ml、小于50pg/ml、小于40pg/ml、小于35pg/ml、小于30pg/ml、小于25pg/ml、小于20pg/ml、小于19pg/ml、小于18pg/ml、小于17pg/ml、小于16pg/ml、小于15pg/ml、小于14pg/ml、小于13pg/ml、小于12pg/ml、小于10pg/ml等。在一些情况下,本文所述的具体检测方法的检测阈值可以样品中可检测的抗原结合剂的最小摩尔数表示,并且此类检测阈值可在200阿摩尔(attomole)至100仄摩尔(septomole)的范围内,包括但不限于例如200阿摩尔、190阿摩尔、180阿摩尔、170阿摩尔、160阿摩尔、150阿摩尔、140阿摩尔、130阿摩尔、120阿摩尔、110阿摩尔、100阿摩尔、90阿摩尔、80阿摩尔、70阿摩尔、60阿摩尔、50阿摩尔、40阿摩尔、30阿摩尔、20阿摩尔、10阿摩尔、1阿摩尔、900仄摩尔、800仄摩尔、700仄摩尔、600仄摩尔、500仄摩尔、400仄摩尔、350仄摩尔、300仄摩尔、250仄摩尔、200仄摩尔、190仄摩尔、180仄摩尔、170仄摩尔、160仄摩尔、150仄摩尔、140仄摩尔、130仄摩尔、120仄摩尔、110仄摩尔、100仄摩尔等。

[0126] 在可以包括或不包括扩增产物的定性或定量测量的检测后,可评估检测的结果以确定样品中存在抗原结合剂的可能性。在进行此类评估时,在一些情况下,可将主题反

应与一个或多个对照反应或参考值比较。主题方法的对照反应包括阳性对照,如已知包含目标抗原结合剂和/或已知包含已知量的目标抗原的反应。对照反应还可包括阴性对照,如已知不包含关键试剂(如抗原、聚合酶、关键多核苷酸等)的反应。检测反应的结果可与之比较的参考值包括但不限于此前进行的任何对照反应的参考测量值、从对照反应收集的标准曲线、一组从阳性或阴性对照测量的荧光值、用户定义的参考值、制造商提供的参考值等。在一些情况下,主题反应的评估可包括在一定的规模上比较,如一定规模的参考值,该参考值可用于估计样品中存在的抗原结合剂的量。

[0127] 多重测定

[0128] 根据本文所述的方法,易于筛选样品中靶标抗原结合剂的存在。该方法适用于检测单个靶标抗原结合剂以及多重分析,其中测定样品中的两种或更多种不同的靶标抗原结合剂。在这些后续多重测定情况下,不同组的可用多核苷酸结合的抗原的数量通常在约2至约20或更多的范围内,如最多100或更多、1000或更多等,包括但不限于例如2至50、2至100、10至100、50至100、50至200、50至300、50至400、50至500等。在一个实施方案中,多重测定可利用各种不同的结合至独特标记的多核苷酸的抗原,使得特别是独特标记的多核苷酸的扩增表明存在对应于扩增的标记多核苷酸的特定抗原的抗原结合剂。因此,主题测定可利用核酸标记和/或“条码标记(barcoding)”策略,以允许检测和/或定量样品中的多个抗原结合剂。如本文所述可包括在多重测定中的用核酸条码独特标记的不同抗原的数量可为变化的,并且可以仅受到以下限制,例如抗原结合的多核苷酸中可用于条码的多核苷酸的长度,可存在于反应中不对凝集测定和/或多核苷酸结合产生负面影响的抗原浓度的物理限制等等。

[0129] 因此,在一些情况下,可在单个反应中筛选一组抗原结合剂,并且可评估组中每种抗原结合剂的存在或数量。上述检测方法可在双重测定中平行用于扩增产物的检测和测量。在一些情况下,在多重和非多重测定二者中,可将核酸测序方法用于扩增产物的检测和/或测量。例如,在一些情况下,可将定量测序用于例如产生多个扩增产物的多重测定,以测定每个扩增产物的相对量或存在,从而允许高度灵敏和高度多重评估单个样品中的许多不同的抗原结合剂。

[0130] 在某些实施方案中,本公开的多重测定可在合并反应(pooled reaction)中进行以形成多个扩增子,并且随后可定量所形成的扩增子,从而提供多重测定的单个抗原结合剂的量。例如,在一个实施方案中,可将多个不同的多核苷酸结合的抗原加入包含或怀疑包含一种或多种抗原结合剂的样品。因此,在抗原凝集和多核苷酸连接(任选地,但使用桥接多核苷酸)时,形成对应于样品中存在的抗原结合剂的扩增子。因此,所形成的每个扩增子的相对量将对应于样品中每个抗原结合剂的相对量。因此,每个抗原结合剂可通过所形成的扩增子的定量来定量。

[0131] 所形成的扩增子的定量可通过任何简易方法进行,其中所用的具体方法可部分取决于待检测的不同抗原结合剂的数量、所需的检测灵敏度、所需的定量灵敏度、所需的定量动态范围等。定量可在合并反应中进行,或形成扩增子的反应是可等分的以便定量。例如,在一些情况下,可形成扩增子,并且可对合并的样品进行定量,例如通过扩增子的定量测序。在其它情况下,可形成扩增子,并且定量可通过等分样品和单独定量每个扩增子来进行,例如通过使用与扩增子杂交的引物进行qPCR。

[0132] 在多重测定的一个实施方案中,每个抗原缀合至包含结合抗原的独特序列和桥接多核苷酸的通用序列的多核苷酸。独特序列可以是或可以包括引物结合位点。通用序列可与桥接多核苷酸的一部分,包括例如桥接多核苷酸的一半互补,使得在两个抗原凝集时,连接的多核苷酸得以如此邻近,使得桥接多核苷酸可同时结合两个抗原结合的多核苷酸的通用序列,以允许连接两个抗原结合的多核苷酸。然后可将包含由连接反应形成的多个扩增子的样品等分为单个反应,每个反应包含针对特定抗原的引物结合位点具有特异性的引物组,以允许针对特定抗原对应的特定扩增子进行qPCR。因此,通过合并物的每个特定扩增子的扩增,可确定最初存在于样品中的每个抗原结合剂的量。

[0133] 本公开的多重测定可使用多核苷酸结合的抗原的文库进行。此类文库将根据待筛选的抗原的数量和/或类型而不同。因此,在一些情况下,本公开的文库可根据文库中包含的多核苷酸结合的抗原的类型分类,包括例如病原体文库(其包含用于检测抗体(该抗体由宿主响应于病原体感染而产生),或者另外用作感染的生物标志物的各种病原体抗原)、自身免疫文库(其包含用于检测抗体(作为自身免疫性疾病的一部分由受试者产生),或者另外用作自身免疫性疾病的生物标志物的各种自身或自体抗原)、癌症文库(其包含用于检测受试者响应于癌症或肿瘤的存在而产生的抗体,或者另外用作癌症的生物标志物的各种抗原)、细胞因子文库(其包含用于检测受试者产生的抗体(作为衰老或其它神经病症的结果)的各种细胞因子抗原)等等。文库中不同的多核苷酸结合的抗原的数量将是变化的,并且可在10或更小至1000或更大的范围内,包括但不限于例如10至1000、20至1000、30至1000、40至1000、50至1000、60至1000、70至1000、80至1000、90至1000、100至1000、100至900、100至800、100至700、100至600、100至500、100至400、100至300、100至200、10至900、10至800、10至700、10至600、10至500、10至400、10至300、10至200、10至100、20至100、30至100、40至100、50至100、60至100、70至100、80至100、90至100、12、24、36、48、96、384等。文库的不同多核苷酸抗原可以是物理上分离的,如在单独的容器中或在多孔板的单独的孔中,或可以不是物理上分离的,即可合并单独的溶液中、单个容器中等。

[0134] 在一些情况下,多核苷酸结合的抗原的文库可包括对应的引物文库,如引物对,以用于从每个抗原定量。在一个实施方案中,多核苷酸结合的抗原的合并文库将具有对应的引物对文库,以用于特异性扩增和定量每个抗原的独特扩增子。在一些情况下,此类引物文库可包含引物对,每个引物对处于多孔板的单独的孔中,使得在向每个孔加入连接反应等分试样时,每个孔被配置用于扩增和定量针对特定抗原具有特异性的特定扩增子。因此,文库的每个扩增子/抗原的定量允许测定该文库被配置以检测的初始样品中存在的每个抗体的量。例如,在一些情况下,具有12个不同的多核苷酸结合的抗原的文库将具有对应的12孔引物文库,其中每个孔包含被配置以扩增扩增子的引物对,该扩增子对12个抗原中的一个具有特异性。在其它情况下,具有24个不同的多核苷酸结合的抗原的文库将具有对应的24孔引物文库,其中每个孔包含被配置以扩增扩增子的引物对,该扩增子对24个抗原中的一个具有特异性。在其它情况下,具有48个不同的多核苷酸结合的抗原的文库将具有对应的48孔引物文库,其中每个孔包含被配置以扩增扩增子的引物对,该扩增子对48个抗原中的一个具有特异性。在其它情况下,具有96个不同的多核苷酸结合的抗原的文库将具有对应的96孔引物文库,其中每个孔包含被配置以扩增扩增子的引物对,该扩增子对96个抗原中的一个具有特异性。在其它情况下,具有384个不同的多核苷酸结合的抗原的文库将具有对

应的384孔引物文库,其中每个孔包含被配置以扩增扩增子的引物对,该扩增子对384个抗原中的一个具有特异性。在一些情况下,多核苷酸结合的抗原文库具有的抗原将超过多孔引物对平板上提供的对应引物对,包括例如其中引物文库包括多个引物对平板,以允许扩增抗原文库的所有扩增子。

[0135] 本公开的文库还可包括一种或多种另外的试剂,用于进行如本文所述的方法的全部或一部分,包括例如用于连接、扩增、检测等的另外的试剂。在一些情况下,另外的试剂可包括在合并文库中。例如,在一些情况下,用于连接的试剂如连接酶可包括在多核苷酸结合的抗原的合并文库内。在一些情况下,另外的试剂可包括在多孔板的单独的孔中。例如,在一些情况下,用于扩增的试剂如聚合酶、dNTP等可包括在多孔板引物文库的孔内。适当的缓冲液、盐等可以包括或不包括在所述文库中。在一些情况下,文库和/或其组分如引物文库可以冻干形式提供,并且可以在使用时再水化。

[0136] 用途

[0137] 本文所述的方法和组合物具有检测和/或定量样品中存在的抗原结合剂的特定用途。此类检测可在许多技术领域具有多种应用,包括但不限于例如基础科学研究(如,生物医学研究、生物化学研究、免疫学研究、分子生物学研究、微生物学研究、细胞生物学研究、遗传学等等)、医学和/或药学研究(如,药物发现研究、药物设计研究、药物开发研究、药理学、毒理学、药物化学、临床前研究、临床研究、个体化医学等等)、医学、流行病学、公共卫生、生物技术、兽医学、兽医医学、农业、材料科学、分子检测、分子诊断等等。

[0138] 在一些情况下,本文所述的方法可用于检测来自受试者的生物样品中的抗原结合剂。如本文所用,术语“受试者”是指动物,包括人、家畜、宠物、实验动物、生物制品动物(如,用于制备生物制品如抗体的动物)等等。在一些情况下,样品来源于哺乳动物受试者,包括例如哺乳动物组织、哺乳动物细胞、哺乳动物体液、哺乳动物分泌的体液、哺乳动物半固体分泌物等等。

[0139] 此类样品来源于的目标哺乳动物包括但不限于例如人、有蹄类(如,猪类(猪)、牛类(牛)、羊类(绵羊)和山羊类(山羊)、马类(马)、骆驼类(骆驼)的任何物种或亚种,或一般来讲有蹄宠物或家畜等)、啮齿类(如,小鼠、大鼠、沙鼠、仓鼠、豚鼠等等)、兔、猫、狗、灵长类等等。

[0140] 在一些情况下,样品可来源于非人动物,包括但不限于非人哺乳动物。样品来源于的非人哺乳动物包括但不限于上文列出的那些。样品来源于的非人动物包括但不限于上文列出的那些,以及另外例如鸟类(即,鸟,诸如例如鸡、鸭等)、两栖类(如,蛙)、鱼等。

[0141] 在一些情况下,本文所述的方法用于检测来源于人的样品中抗原结合剂的存在和/或测量该样品中抗原结合剂的量,以进行关于受试者是否患有具体病状的评估。在此类情况下,来源于受试者的抗原结合剂通常将是单特异性抗原结合剂,如单特异性抗体,包括例如单特异性多克隆抗体。在人或非人受试者中测定的单特异性抗体可以是对疾病抗原具有单特异性的抗体,其中该疾病抗原可以是宿主内源性的(即,宿主来源的抗原或自身抗原),或可以是宿主外源性的(即,非宿主来源的抗原或感染性病原体来源的抗原)。

[0142] 在一些实施方案中,本文所述的方法用于例如以受试者病状存在的判断或评价,在一些情况下受试者病状的诊断,确定患有病状的受试者的疗法,监测患有病状的受试者等形式提供评估。在一些情况下,使用本文所述的方法对受试者病状的评估包括生成包括

对受试者当前健康状态,即受试者预后的“诊断评估”,即可能治疗方案的“预后评估”,即和/或对治疗响应的“治疗评估,即“预后评估”的技术评估的书面报告。因此,主题方法还可包括生成或输出报告的步骤,以提供诊断评估、预后评估、治疗评估或监测评估结果以及其组合,该报告可以电子介质(如,电子显示于计算机监视器上)的形式,或以可触摸介质(如,打印于纸张或其它可触摸介质上的报告)的形式提供。

[0143] 在一些情况下,本文所述的评估作为治疗方案的一部分进行,例如评估治疗的有效性,或确定治疗的最佳时机,或确定治疗是否必需调整。例如,在一些情况下,可根据本文所述的方法收集和评估预处理样品,并且从该评估选择治疗方案。在其它情况下,收集后处理样品,并且根据本文所述的评估,将其与预处理样品比较,以评估治疗有效性。在其它情况下,进行一个或多个后处理评估,以最佳地确定进一步治疗的时机。

[0144] 本文所述的检测方法检测的病状(包括人和非人动物病状)包括但不限于涉及受试者的免疫系统和/或免疫应答的那些病状。在一些情况下,受试者病状可以是病原体来源的(如,感染),在其它情况下,受试者病状可以是受试者来源的(如,自身免疫性疾病),在一些情况下,病状的来源可以是未知的。

[0145] 如本文所用,感染性病状可为不同的,并且包括其中外源抗原存在于宿主生物体中的任何病状,包括但不限于常见感染性疾病、新发感染性疾病、有症状感染、无症状感染等等。感染性病状的非限制性实例包括但不限于本文列出的那些,还提供了示例性致病病原体,例如不动杆菌属(*Acinetobacter*)感染(鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*))、放射菌病(衣氏放线菌(*Actinomyces israelii*))、戈氏放线菌(*Actinomyces gerencseriae*)和丙酸杆菌属(*Propionibacterium propionicus*))、非洲昏睡病(非洲睡眠病)(布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*))、AIDS(获得性免疫缺陷综合征)(HIV(人类免疫缺陷病毒))、变形虫病(溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*))、边虫病(无形体属(*Anaplasma* genus))、炭疽(炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*))、溶血隐秘杆菌感染(溶血隐秘杆菌(*Arcanobacterium haemolyticum*))、阿根廷出血热(胡宁病毒)、蛔虫病(人蛔虫(*Ascaris lumbricoides*))、曲霉病(曲霉属(*Aspergillus* genus))、星状病毒感染(星状病毒科(*Astroviridae* family))、巴贝虫病(巴倍虫属(*Babesia* genus))、蜡样芽孢杆菌感染(蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*))、细菌性肺炎(多种细菌)、细菌性阴道炎(BV)(多种细菌)、拟杆菌属感染(拟杆菌属(*Bacteroides* genus))、小袋纤毛虫病(结肠小袋纤毛虫(*Balantidium coli*))、贝利斯蛔虫感染(贝利斯蛔虫属(*Baylisascaris* genus))、BK病毒感染(BK病毒)、黑色发结节病(何德毛结节菌(*Piedraia hortae*))、人芽囊原虫感染(人芽囊原虫(*Blastocystis hominis*))、芽生菌病(皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*))、波利维亚出血热(马秋波病毒(*Machupo virus*))、疏螺旋体属感染(疏螺旋体属(*Borrelia* genus))、肉毒杆菌中毒(和婴儿肉毒杆菌中毒)(肉毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*))、巴西出血热(萨比亚病毒(*Sabia*))、布鲁氏菌病(布鲁氏菌属(*Brucella* genus))、淋巴结鼠疫(肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)细菌)、伯克氏菌感染(通常是洋葱伯克氏菌(*Burkholderia cepacia*)和其它伯克氏菌属(*Burkholderia*)物种)、布如里氏溃疡(溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*))、杯状病毒感染(诺如病毒(*Norovirus*)和沙波病毒(*Sapovirus*)) (杯状病毒科(*Caliciviridae* family))、弯曲菌病(弯曲菌属(*Campylobacter* genus))、假丝酵母病(念珠菌病;鹅口疮)(通常是白色念珠菌(*Candida*

albicans) 和其它念珠菌属 (*Candida*) 物种)、猫抓病 (韩瑟勒巴通氏菌 (*Bartonella henselae*))、蜂窝组织炎 (通常是一型链球菌 (Group A *Streptococcus*) 和葡萄球菌 (*Staphylococcus*))、查加斯病 (美洲锥虫病) (克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*))、软性下疳 (杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*))、水痘 (水痘带状疱疹病毒 (VZV))、基孔肯雅热 (*Chikungunya*) (甲病毒)、衣原体病 (沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*))、肺炎披衣菌感染 (台湾急性呼吸因子或 TWAR) (肺炎披衣菌 (*Chlamydophila pneumoniae*))、霍乱 (霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*))、着色真菌病 (通常是佩德罗索着色芽生菌 (*Fonsecaea pedrosoi*))、华支睾吸虫病 (华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*))、艰难梭状芽孢杆菌感染 (艰难梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile*))、球孢子菌病 (粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*) 和波萨达斯球孢子菌 (*Coccidioides posadasii*))、科罗拉多蜱传热 (CTF) (科罗拉多蜱传热病毒 (CTFV))、感冒 (急性病毒鼻咽炎; 急性鼻炎) (通常是鼻病毒 (*rhinovirus*) 和冠状病毒 (*coronavirus*))、克罗伊茨菲尔德-雅各布二氏病 (Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)) (PRNP)、克里米亚-刚果出血热 (CCHF) (克里米亚-刚果出血热病毒)、隐球菌病 (新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*))、隐孢子虫病 (隐孢子属 (*Cryptosporidium* genus))、皮肤幼虫移行症 (CLM) (通常是巴西钩口线虫 (*Ancylostoma braziliense*); 多种其它寄生虫)、环孢子虫病 (环孢子虫 (*Cyclospora cayetanensis*))、囊虫病 (猪肉绦虫 (*Taenia solium*))、巨细胞病毒感染 (巨细胞病毒 (*Cytomegalovirus*))、登革热 (登革热病毒 (DEN-1、DEN-2、DEN-3 和 DEN-4) - 黄病毒)、栅藻 (*Desmodesmus*) 感染 (绿藻被甲栅藻 (*Desmodesmus armatus*))、双核阿米巴病 (脆弱双核阿米巴 (*Dientamoeba fragilis*))、白喉 (白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*))、裂头绦虫病 (裂头绦虫 (*Diphyllobothrium*))、龙线虫病 (麦地那龙线虫 (*Dracunculus medinensis*))、埃博拉出血热 (埃博拉病毒 (EBOV))、棘球蚴病 (包生绦虫属 (*Echinococcus* genus))、埃立克体病 (埃立克体属 (*Ehrlichia* genus))、蛲虫病 (蛲虫感染) (蛲虫 (*Enterobius vermicularis*))、肠球菌感染 (肠球菌属 (*Enterococcus* genus))、肠道病毒感染 (肠道病毒属 (*Enterovirus* genus))、流行性斑疹伤寒 (普氏立克次氏体 (*Rickettsia prowazekii*))、传染性红斑 (第五病) (细小病毒 B19)、幼儿急疹 (第六病) (人疱疹病毒 6 (HHV-6) 和人疱疹病毒 7 (HHV-7))、姜片虫病 (布氏姜片虫 (*Fasciolopsis buski*))、片吸虫病 (肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*) 和巨片吸虫 (*Fasciola gigantica*))、致死性家族失眠症 (FFI) (PRNP)、丝虫病 (丝虫总科 (*Filarioidea* superfamily))、产气荚膜梭状芽孢杆菌导致的食物中毒 (产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*Clostridium perfringens*))、自由生活的阿米巴感染 (多种病原体)、梭杆菌属感染 (梭杆菌属 (*Fusobacterium* genus))、气性坏疽 (梭菌性肌坏死) (通常是产气荚膜梭状芽孢杆菌、其它梭状芽孢杆菌属物种)、地霉病 (白地霉 (*Geotrichum candidum*))、杰茨曼-斯脱司勒-史茵克综合征 (GSS) (PRNP)、贾第鞭毛虫病 (肠贾第鞭毛虫 (*Giardia intestinalis*))、鼻疽病 (鼻疽伯克氏菌 (*Burkholderia mallei*))、颚口线虫病 (有棘颚口线虫 (*Gnathostoma spinigerum*) 和刚棘颚口线虫 (*Gnathostoma hispidum*))、淋病 (淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*))、性病性肉芽肿 (杜诺凡病) (肉芽肿克雷伯氏菌 (*Klebsiella granulomatis*))、一型链球菌感染 (酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*))、二型链球菌感染 (无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*))、流感嗜血杆菌感染 (流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*))、手足口病 (HFMD) (肠道病毒, 主要是柯萨

奇A病毒和肠道病毒71 (EV71))、汉坦病毒肺综合征 (HPS) (辛诺柏病毒)、哈特兰病毒病 (哈特兰病毒)、幽门螺杆菌感染 (幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*))、溶血性尿毒综合征 (HUS) (大肠杆菌0157:H7、0111和0104:H4)、肾综合征出血热 (HFRS) (本雅病毒科 (*Bunyaviridae* family))、甲型肝炎 (甲型肝炎病毒)、乙型肝炎 (乙型肝炎病毒)、丙型肝炎 (丙型肝炎病毒)、丁型肝炎 (丁型肝炎病毒)、戊型肝炎 (戊型肝炎病毒)、单纯疱疹 (单纯疱疹病毒1和2 (HSV-1和HSV-2))、组织孢浆菌病 (荚膜组织孢浆菌 (*Histoplasma capsulatum*))、钩虫感染 (十二指肠钩虫 (*Ancylostoma duodenale*) 和美洲钩虫 (*Necator americanus*))、人类博卡病毒感染 (人类博卡病毒 (HBoV))、人类尤因埃立克体病 (尤因埃立克体 (*Ehrlichia ewingii*))、人粒细胞无形体病 (HGA) (嗜吞噬细胞无形体 (*Anaplasma phagocytophilum*))、人类偏肺病毒感染 (人类偏肺病毒 (hMPV))、人单核细胞埃立克体病 (查菲埃立克体 (*Ehrlichia chaffeensis*))、人类乳头瘤病毒 (HPV) 感染 (人类乳头瘤病毒 (HPV))、人副流感病毒感染 (人副流感病毒 (HPIV))、膜壳绦虫病 (短膜壳绦虫 (*Hymenolepis nana*) 和长膜壳绦虫 (*Hymenolepis diminuta*))、爱泼斯坦-巴尔二氏病毒感染性单核白细胞增多症 (Mono) (爱泼斯坦-巴尔二氏病毒 (EBV))、流行性感 (flu) (正黏液病毒科 (*Orthomyxoviridae* family))、等孢子球虫病 (贝氏等孢子球虫 (*Isospora belli*))、川崎氏病 (未知病原体)、角膜炎 (多种病原体)、金氏金氏菌感染 (金氏金氏菌 (*Kingella kingae*))、Kuru (PRNP)、拉萨热 (拉萨病毒)、军团病 (退伍军人症) (嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*))、军团病 (庞提亚热) (嗜肺军团菌)、利什曼病 (利什曼原虫属 (*Leishmania* genus))、麻风病 (麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*) 和弥漫型麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium lepromatosis*))、钩端螺旋体病 (钩端螺旋体属 (*Leptospira* genus))、李斯特菌病 (单核球增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*))、莱姆病 (莱姆疏螺旋体病) (通常是伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 和其它疏螺旋体属 (*Borrelia*) 物种)、淋巴丝虫病 (象皮病) (班氏丝虫 (*Wuchereria bancrofti*) 和马来丝虫 (*Brugia malayi*))、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎 (淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV))、疟疾 (疟原虫属 (*Plasmodium* genus))、马尔堡出血热 (MHF) (马尔堡病毒)、麻疹 (麻疹病毒)、中东呼吸综合征 (MERS) (中东呼吸综合征冠状病毒)、类鼻疽 (惠特莫尔氏病) (类鼻疽伯克氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*))、脑膜炎 (多种病原体)、脑膜炎球菌病 (脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*))、后殖吸虫病 (通常是横川后殖吸虫 (*Metagonimus yokagawai*))、微孢子虫病 (微孢子虫门 (*Microsporidia* phylum))、接触传染性软疣 (MC) (接触传染性软疣 (*Molluscum contagiosum*) 病毒 (MCV))、猴痘 (猴痘病毒)、腮腺炎 (腮腺炎病毒)、鼠型斑疹伤寒 (地方性斑疹伤寒) (斑疹伤寒立克次氏体 (*Rickettsia typhi*))、肺炎支原体病 (肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*))、足分支菌病 (多个细菌 (放线菌性足分支菌病) 和真菌 (真菌性足分支菌病) 物种)、蝇蛆病 (寄生性双翅类蝇蛆)、新生儿结膜炎 (新生儿眼炎) (最常见的是沙眼衣原体和淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*))、诺卡氏菌病 (通常是星状诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*) 和其它诺卡氏菌属 (*Nocardia*) 物种)、盘尾丝虫病 (河盲症) (旋盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*))、副球孢子菌病 (南美芽生菌病) (巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*))、并殖吸虫病 (通常是卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*) 和其它并殖吸虫属 (*Paragonimus*) 物种)、巴斯德氏菌病 (巴斯德氏菌属 (*Pasteurella* genus))、致病性肠道疾病 (包括例如肠道细菌的致病性菌株,如致

病性艰难梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile*)、致病性肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、致病性蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、致病性幽门螺杆菌、致病性弯曲菌属 (*Campylobacter*) 等导致的那些致病性肠道疾病)、头虱病(头虱)(人头虱(*Pediculus humanus capitis*))、体虱病(体虱)(人体虱(*Pediculus humanus corporis*))、阴虱病(阴虱、蟹虱)(阴虱(*Phthirus pubis*))、盆腔炎症(PID)(多种病原体)、疫咳(百日咳)(百日咳博德特氏杆菌(*Bordetella pertussis*))、鼠疫(鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*))、肺炎球菌感染(肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*))、肺囊虫肺炎(PCP)(杰氏肺囊虫(*Pneumocystis jirovecii*))、肺炎(多种病原体)、脊髓灰质炎(脊髓灰质炎病毒)、普雷沃氏菌感染(普雷沃氏菌属(*Prevotella* genus))、原发性阿米巴脑膜脑炎(PAM)(通常是福氏耐格里变形虫(*Naegleria fowleri*))、进行性多灶性白质脑病(JC病毒)、鹦鹉热(鹦鹉热披衣菌(*Chlamydophila psittaci*))、Q热(伯氏考克斯氏体(*Coxiella burnetii*))、狂犬病(狂犬病病毒)、鼠咬热(念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*)或小螺菌(*Spirillum minus*))、呼吸道合胞病毒感染(呼吸道合胞病毒(RSV))、鼻孢子虫病(西伯氏鼻孢子虫(*Rhinosporidium seeberi*))、鼻病毒感染(鼻病毒)、立克次氏体感染(立克次氏体属(*Rickettsia* genus))、立克次氏体痘(小蛛立克次氏体(*Rickettsia akari*))、里夫特裂谷热(RVF)(里夫特裂谷热病毒)、落基山斑点热(RMSF)(立氏立克次氏体(*Rickettsia rickettsii*))、轮状病毒感染(轮状病毒)、风疹(风疹病毒)、沙门氏菌病(沙门氏菌属(*Salmonella* genus))、SARS(严重急性呼吸道综合征)(SARS冠状病毒)、疥疮(人疥螨(*Sarcoptes scabiei*))、血吸虫病(血吸虫属(*Schistosoma* genus))、败血症(多种病原体,包括例如二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*))、志贺氏菌病(杆菌痢疾)(志贺氏菌属(*Shigella* genus))、带状疱疹(蜘蛛疮)(水痘带状疱疹病毒(VZV))、天花(痘疮)(重型天花或轻型天花)、孢子丝菌病(申克氏孢子丝菌(*Sporothrix schenckii*))、葡萄球菌食物中毒(葡萄球菌属(*Staphylococcus* genus))、葡萄球菌感染(葡萄球菌属(*Staphylococcus* genus))、类圆线虫病(粪类圆线虫(*Strongyloides stercoralis*))、亚急性硬化性全脑炎(麻疹病毒)、梅毒(梅毒密螺旋体(*Treponema pallidum*))、绦虫病(带绦虫属(*Taenia* genus))、破伤风(牙关紧闭症)(破伤风梭状芽孢杆菌(*Clostridium tetani*))、触染性须疮(须癣)(通常是毛癣菌属(*Trichophyton* genus))、发癣(头皮癣)(通常是断发毛癣菌(*Trichophyton tonsurans*))、钱癣(体癣)(通常是毛癣菌属)、股癣(约克瘙痒)(通常是絮状表皮癣菌(*Epidermophyton floccosum*))、红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)和须发毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*))、鹅掌风(手癣)(红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*))、黑癣(通常是威尼克何德霉(*Hortaea wemeckii*))、足癣(香港脚)(通常是毛癣菌属)、甲霉菌病(甲癣)(通常是毛癣菌属)、花斑糠疹(花斑癣)(马拉色菌属(*Malassezia* genus))、弓蛔虫病(眼球幼虫移行症(OLM))(犬弓蛔虫(*Toxocara canis*)或猫弓蛔虫(*Toxocara cati*))、弓蛔虫病(内脏幼虫移行症(VLM))(犬弓蛔虫或猫弓蛔虫)、沙眼(沙眼衣原体)、Trinochecliasis(弓形虫(*Toxoplasma gondii*))、旋毛虫病(旋毛虫(*Trichinella spiralis*))、毛滴虫病(阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*))、鞭虫病(鞭虫感染)(毛首鞭虫(*Trichuris trichiura*))、肺结核(通常是结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*))、兔热病(土拉热弗朗西丝氏菌(*Francisella tularensis*))、伤寒(肠沙门氏菌肠亚种(*Salmonella enterica* subsp. *enterica*))、伤寒杆

菌(*Salmonella enterica* serovar typhi))、解脲支原体感染(解脲支原体(*Ureaplasma urealyticum*))、裂谷热(粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)或波萨达斯球孢子菌)、委内瑞拉马脑炎病毒(委内瑞拉马脑炎病毒)、委内瑞拉出血热(瓜纳瑞托病毒)、病毒性肺炎(多种病毒)、西尼罗河热(西尼罗河病毒)、白毛结节病(白秃疮)(白吉利丝孢酵母菌(*Trichosporon beigeli*))、假结核耶尔森氏菌感染(假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*))、耶尔森氏菌病(小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*))、黄热病(黄热病病毒)、寨卡病毒病(寨卡病毒)、接合菌病(毛霉菌目(*Mucorales* order)(毛霉菌病)和虫霉目(*Entomophthorales* order)(虫霉菌病))等等。一般来讲在本文中,根据所述方法检测感染性疾病包括通过检测宿主来源样品中存在的一种或多种抗原结合剂(如,针对病原体来源的抗原的宿主来源的抗体)来检测宿主对感染的免疫应答。

[0146] 因此,在一些情况下,本发明方法可用于通过检测样品中存在针对病原体或其组分的一种或多种抗体来检测受试者来源或其它类型样品中存在病原体。可根据本发明方法检测的病原体包括但不限于例如病毒病原体、细菌病原体、真菌病原体、原生动物病原体等等。应易于理解,根据本公开的一个或多个实施方案,通过从病原体分离抗原组分,以用作多核苷酸缀合的抗原,可测定样品内存在新发现的病原体。

[0147] 在一些情况下,本文所述的方法将检测和/或测量针对HIV抗原的抗体的存在,所述HIV抗原包括但不限于例如HIV1抗原、HIV2抗原、HIV1/2抗原、p24、gp120、gp160、gp41、gp36等等。

[0148] 如本文所用,自身免疫病状可为不同的,并且包括其中受试者自身的免疫细胞攻击健康组织和/或受试者产生对受试者来源的抗原的免疫应答的任何病状,包括但不限于有症状自身免疫性疾病、无症状自身免疫性疾病、急性自身免疫性疾病、慢性自身免疫性疾病、移植物诱导的自身免疫性疾病等等。不受理论的束缚,在一些情况下,自身免疫性疾病可通过外源性物质的存在而触发,但活化的免疫应答可不具体涉及外源性物质。身体区域通常受到自身免疫性病状的影响,包括但不限于例如血管、结缔组织、内分泌组织(如,甲状腺组织、胰腺组织等)、关节组织、肌肉组织、造血组织(如,包括红细胞等等)、上皮组织(如,包括皮肤和肠)。自身免疫性病状和自身免疫性相关病状的非限制性实例包括但不限于例如急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、急性坏死性出血性脑白质炎、阿狄森氏病、肾上腺炎、无丙种球蛋白血症、斑秃、淀粉样变性、强直性脊柱炎、抗GBM/抗TBM肾炎、抗磷脂综合征(APS)、自身免疫性血管性水肿、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性自主神经异常、自身免疫性肝炎、自身免疫性高脂质血、自身免疫性免疫缺陷、自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性卵巢炎、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性视网膜病、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、自身免疫性甲状腺病、自身免疫性荨麻疹、轴突和神经元神经病变、巴娄病(Balo disease)、贝塞特氏病(Behcet's disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、卡斯特曼病、乳糜泻(Celiac disease)、查加斯病、慢性疲劳综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、慢性复发性多灶性骨髓炎(CRMO)、查格-斯特劳斯综合征(Churg-Strauss syndrome)、瘢痕性类天疱疮/良性粘膜类天疱疮、克罗恩病(Crohn's disease)、科根综合征(Cogans syndrome)、冷凝集素病、先天性心传导阻滞、柯赛基病毒性心肌炎、CREST综合征、原发性混合型冷球蛋白血症、脱髓鞘性多发性神经病、疱疹样皮炎、皮肤炎、德维克病

(Devic's disease) (视神经脊髓炎)、盘状红斑、德雷斯勒综合征 (Dressler's syndrome)、子宫内异位症、嗜伊红性食道炎、嗜伊红性筋膜炎、结节性红斑、实验性变应性脑脊髓炎、伊文氏综合征 (Evans syndrome)、纤维性肌炎、纤维性肺泡炎、巨细胞动脉炎 (颞动脉炎)、巨细胞心肌炎、血管球性肾炎、古德帕斯特综合征 (Goodpasture's syndrome)、肉芽肿性多血管炎 (GPA) (此前称为“韦格纳 (Wegener's)”肉芽肿)、格里夫氏症 (Graves' disease)、格林-巴利综合征 (Guillain-Barre syndrome)、桥本氏脑炎 (Hashimoto's encephalitis)、桥本氏甲状腺炎、溶血性贫血、过敏性紫癜、妊娠疱疹、低丙种球蛋白血症、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA肾病、IgG4相关性硬化性疾病、免疫调节脂蛋白、包涵体肌炎、间质性膀胱炎、幼年型关节炎、幼年型糖尿病 (I型糖尿病)、幼年型肌炎、川崎氏病、蓝伯-伊顿综合征 (Lambert-Eaton syndrome)、白细胞破裂性脉管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、木质性结膜炎、线性IgA疾病 (LAD)、狼疮 (SLE)、慢性莱姆病、美尼尔氏病 (Meniere's disease)、显微镜下多血管炎、混合结缔组织病 (MCTD)、莫伦氏溃疡 (Mooren's ulcer)、穆哈-赫伯曼病 (Mucha-Habermann disease)、多发性硬化、重症肌无力、肌炎、发作性睡眠、视神经脊髓炎 (德维克病)、中性粒细胞减少症、眼部瘢痕性类天疱疮、视神经炎、复发性风湿病、PANDAS (链球菌感染相关的小儿自身免疫性神经精神障碍)、副肿瘤性小脑变性、阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH)、帕里-龙贝格综合征 (Parry Romberg syndrome)、Parsonnage-Turner综合征、睫状体平坦部炎 (周边性眼色素层炎)、天疱疮、外周神经病变、静脉周围脑脊髓炎、恶性贫血、POEMS综合征、结节性多动脉炎、I型、II型和III型多腺性自身免疫综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎、后心肌梗塞综合征、心包切开后综合征、孕酮性皮炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、特发性肺纤维化、坏疽性脓皮病、单纯性红细胞再生障碍、雷诺现象、反应性关节炎、交感神经反射障碍症、莱特氏综合征、复发性多发软骨炎、不宁腿综合征、腹膜后纤维化、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、施密特综合征 (Schmidt syndrome)、巩膜炎、硬皮病、修格连氏综合征 (Sjogren's syndrome)、精子和睾丸自身免疫、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎 (SBE)、苏萨克氏综合征 (Susac's syndrome)、交感性眼炎、大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、血小板减少性紫癜 (TTP)、托洛萨-亨特综合征 (Tolosa-Hunt syndrome)、横贯性脊髓炎、I型糖尿病、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病 (UCTD)、葡萄膜炎、脉管炎、大小疱性皮肤病、白癜风、韦格纳肉芽肿 (现在称为肉芽肿性多血管炎 (GPA)) 等等。一般来讲在本文中,根据所述方法检测自身免疫性病状包括通过检测受试者来源的样品中存在的一种或多种抗原结合剂 (如针对受试者来源的抗原的受试者来源的自身免疫抗体) 来检测受试者自身免疫应答。在一些情况下,具体自身免疫性疾病可通过多种不同的自身抗体的存在来表征,因此,如本文所述,多重检测方法可用于检测或测量一组自身免疫相关的自身抗体的水平。

[0149] 本公开的方法可用于检测一种或多种临床相关自身抗体,包括但不限于例如受试者响应于赘生物而生成的一种或多种自身抗体,包括但不限于例如其中赘生物为前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌、肝癌和甲状腺癌中的一种或多种。在某些情况下,检测可在疾病症状存在之前进行。在其它情况下,检测可在疾病症状存在之后进行,包括例如在一种或多种疾病症状出现之后,但在治疗之前、在治疗期间、在治疗之后或其组合。

[0150] 可用的自身抗体可包括癌症自身抗体 (即,表明癌症存在的抗体)。可鉴定或预测癌症的存在的癌症自身抗体可包括但不限于例如前列腺癌自身抗体 (包括但不限于例如特

异性地结合 α -甲基酰基-CoA消旋酶 (AMACR)、含溴结构域2 (BRD2)、钙调结合蛋白1 (CALD1)、真核翻译起始因子4 γ 、1 (EIF4G1)、激肽释放酶-3 (KLK3)、纽约食管鳞状细胞癌1 (NY-ESO-1)、帕金森蛋白7 (PARK7)、PC4和SFRS1相互作用蛋白1 (PSIP1)、核糖体蛋白L13a (RPL13A)、核糖体蛋白L22 (RPL22)、滑膜肉瘤、X断点2 (SSX2)、(TAR DNA结合蛋白 (TARDBP)、转铁蛋白受体 (TFRC)、踝蛋白1 (TLN1)、X抗原家族成员1B (XAGE1B) 等的基因产物的那些生物标志物自身抗体)、乳腺癌自身抗体 (包括但不限于例如特异性地结合 α 2-HS糖蛋白 (AHSG)、ASB9含锚蛋白重复序列和SOCS框9 (ASB9)、早发型乳腺癌1 (BRCA1)、早发型乳腺癌2 (BRCA2)、癌胚抗原相关细胞粘附分子 (CEACAM) 基因、真核延伸因子-2激酶 (EEF2K)、erb-b2受体酪氨酸激酶2 (ERBB2)、热休克蛋白60 (HSP60)、粘蛋白1 (MUC1)、Myc、NY-ESO-1、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2A (p16)、PARK7、RELT肿瘤坏死因子受体、含丝氨酸活化位点1 (SERAC1)、肿瘤蛋白p53 (TP53) 等的基因产物的那些生物标志物自身抗体)、肺癌自身抗体 (包括但不限于例如特异性地结合膜联蛋白A1 (ANXA1)、癌抗原1 (CAGE1)、CEACAM基因、烯醇酶1 (ENO1)、ERBB2、GBU4-5、胃泌素释放肽 (GRP)、MUC1、Myc、NY-ESO-1、磷酸乙醇酸磷酸酯酶 (PGP)、核糖体蛋白SA (RPSA)、过氧化物歧化酶2 (SOD2)、TP53、丙糖磷酸异构酶 (TPI)、酪氨酸3-单加氧酶/色氨酸5-单加氧酶活化蛋白 θ (YWHAQ) 等的基因产物的那些生物标志物自身抗体)、结肠癌自身抗体 (包括但不限于例如特异性地结合细胞周期蛋白B1 (CCNB1)、细胞周期蛋白D1 (CCND1)、CEACAM基因、GRP、HSP60、IMP (5'-单磷酸肌苷) 脱氢酶1 (IMPDH1)、胰岛素样生长因子2mRNA结合蛋白3 (KOC)、粘蛋白5AC (MUC5AC)、Myc、核结合蛋白1 (NUCB1)、核孔蛋白62kDa (NUP62)、p16、Fas (TNF受体超家族成员6) (TNFRSF6)、TP53等的基因产物的那些生物标志物自身抗体)、胃癌自身抗体 (包括但不限于例如特异性地结合CEACAM基因、GRP、MUC1、TP53等的基因产物的那些生物标志物自身抗体)、肝癌自身抗体 (包括但不限于例如特异性地结合 α 胎儿蛋白 (AFP)、凋亡诱导因子 (AIF)、血管紧张素I转化酶 (DCP)、DEAD-框解旋酶3、X-连锁 (DDX3X)、EEF2K、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、甲状腺癌、许特耳氏细胞 (Hurthle cell) (HCC)、核不均一核糖核蛋白A2 (HNRNPA2)、HSP70、NUP62、多囊肾蛋白1、瞬时受体电位通道相互作用 (PBP)、过氧化物还原酶 (PRDX)、SOD2、TP53、TPI等的基因产物的那些生物标志物自身抗体) 等等。因此, 在一些情况下, 本公开的受试者可包括患有癌症的受试者、怀疑患有癌症的受试者和/或已接受或正在接受癌症治疗的受试者, 所述癌症包括但不限于例如前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌、肝癌等等。

[0151] 在一些情况下, 本公开的受试者可患有或怀疑患有的一种或多种副肿瘤综合征, 即作为体内癌症的后果, 但不是由于局部存在癌症细胞的综合征。副肿瘤综合征包括但不限于例如内分泌副肿瘤综合征 (包括例如, 库欣氏综合征 (Cushing syndrome)、抗利尿激素 (ADH) 分泌不当综合征 (SIADH)、高钙血症、低血糖症、类癌综合征、红细胞增多症、高醛甾酮症等)、神经系统副肿瘤综合征 (包括例如, 蓝伯-伊顿肌无力综合征 (LEMS)、副肿瘤性小脑变性、脑脊髓炎、边缘叶脑炎、脑干炎、眼阵挛-肌阵挛-共济失调综合征、抗NMDA受体脑炎、多肌炎等)、粘膜皮肤副肿瘤综合征 (包括例如, 黑色棘皮症、皮炎、莱泽-特雷拉征 (Leser-Trélat sign)、坏死松解性游走红斑、斯威特氏综合征 (Sweet's syndrome)、菜花状皮肤乳头瘤病、坏疽性脓皮症、获得性全身多毛症等)、血液副肿瘤综合征 (包括例如, 粒细胞性白细胞增多、红细胞增多症、特鲁索氏征 (Trousseau sign)、非细菌性血栓性心内膜炎、贫血症等)、膜性肾小球肾炎、瘤源性软骨病、斯道弗综合征 (Stauffer syndrome) (肾源性

肝功能异常综合征)、肿瘤热等等。因此,本发明方法可以例如通过检测受试者中的自身抗体来鉴定受试者中一种或多种副肿瘤综合征或副肿瘤综合征相关的赘生物的存在或预测其存在。

[0152] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴定或预测与皮肤炎相关的自身抗体的存在,包括但不限于例如针对MORC家族CW型锌指3(NXP2)、含三重基序33(TIF1 γ)、小泛素样修饰因子活化酶(SAE)等等的一种或多种基因产物的自身抗体。

[0153] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴定或预测与全身性硬化相关的自身抗体的存在,包括但不限于例如针对RNA聚合酶III的自身抗体。

[0154] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴定或预测与蓝伯-伊顿肌无力综合征相关的自身抗体的存在,包括但不限于电压门控钙离子通道基因的一种或多种基因产物的自身抗体。

[0155] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴定或预测与重症肌无力相关的自身抗体的存在,包括但不限于针对肌联蛋白、雷诺丁受体等等的一种或多种基因产物的自身抗体。

[0156] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴定或预测与副肿瘤性天疱疮相关的自身抗体的存在,包括但不限于针对桥粒斑蛋白I、桥粒斑蛋白II、外被斑蛋白、网蛋白、周斑蛋白等等的一种或多种基因产物的自身抗体。

[0157] 在一些情况下,本公开的方法包括鉴定或预测与副肿瘤性神经疾病相关的自身抗体的存在,包括但不限于针对Hu(抗神经元自身抗体1(ANNA1))、Yo(浦肯野细胞胞质抗体1型(PCA-1))、Ri(抗神经元自身抗体2(ANNA2))、Ma1/2(副肿瘤性抗原Ma1/2(PNMA1/2))、CV2(CV2/CRMP5-Ab)、双载蛋白、SRY(性别决定区Y)框1(SOX1)、Zic家族成员4(Zic4)、Tr(δ /切口样表皮生长因子相关受体(DNER))、蛋白激酶C、 γ (PKC γ)、CARPVII、Ca/ARHGAP26等等的一种或多种基因产物/抗原的自身抗体。

[0158] 在一些情况下,本公开的受试者可包括患有或怀疑患有神经病症,或正在接受神经病症治疗的受试者,所述神经病症包括例如具有自身免疫组分的神经病症(如,神经炎性疾病、炎性神经肌肉疾病等),包括但不限于例如重症肌无力、多发性硬化等等。因此,在一些情况下,本公开的方法可包括鉴定或预测与神经疾病相关的自身抗体的存在,包括但不限于例如结合电压门控钾离子通道复合物的组分(如,VGKC、LG11、CASPR2等)的自身抗体、结合NMDA受体(如,NR2)的自身抗体、结合AMPA受体的自身抗体、结合GABAA/B受体的自身抗体、结合二肽基肽酶样蛋白6(DPPX)的自身抗体、结合IgLON5的抗体、结合重症肌无力的病原体组分的自身抗体或通常与重症肌无力相关的自身抗体(包括但不限于例如抗乙酰胆碱受体(AChR)抗体、抗肌肉特异性激酶(MuSK)抗体、抗脂蛋白质相关蛋白(LRP)4、针对聚集蛋白的抗体、针对皮层蛋白的抗体等等)、结合多发性硬化的病原体组分的自身抗体或通常与多发性硬化相关的自身抗体(包括例如抗水通道蛋白4抗体、抗髓磷脂抗体(抗MOG、抗MBP等)、抗KIR4.1抗体、抗SPAG16抗体等)。

[0159] 在一些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有胆汁性肝硬化,或正在接受胆汁性肝硬化治疗的受试者。因此,在一些情况下,本公开的方法可包括通过检测或测量一种或多种胆汁性肝硬化相关抗体,包括但不限于例如抗M2线粒体抗体来鉴定或预测胆汁性肝硬化的存在。

[0160] 在一些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有自身免疫性风湿病,或正

在接受自身免疫性风湿病治疗的受试者。因此,在一些情况下,本公开的方法可包括通过检测或测量一种或多种自身免疫性风湿病相关抗体,包括但不限于例如抗核抗体、抗SSA自身抗体(抗修格连氏综合征相关抗原A)、抗修格连氏综合征B型(SSB)抗体、抗史密斯抗体、抗U1RNP抗体、抗双链DNA抗体、抗磷脂抗体、抗瓜氨酸蛋白抗体等等来鉴定或预测自身免疫性风湿病的存在。

[0161] 在一些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有特发性炎性肌病(IIM)(也单独地称为多发性肌炎(PM)和皮肌炎(DM)),或正在接受特发性炎性肌病治疗的受试者。因此,在一些情况下,本公开的方法可包括通过检测或测量一种或多种IIM相关抗体,包括但不限于例如抗Jo-1抗体、氨酰基-tRNA合成酶自身抗体(如,Jo-1(组氨酰)抗体、PL-7(苏氨酰)抗体、PL-12(丙氨酰)抗体、OJ(异亮氨酰)抗体、EJ(甘氨酰)抗体、KS(天冬酰胺酰)抗体、Zo(苯丙氨酰)抗体和Ha(酪氨酰)抗体等)、抗Mi-2抗体、抗MDA5抗体、抗NXP2抗体、抗SAE抗体和抗TIF1 γ (p155/140)抗体等等来鉴定或预测IIM的存在。

[0162] 在一些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有非炎性肌肉坏死,或正在接受非炎性肌肉坏死治疗的受试者。因此,在一些情况下,本公开的方法可包括通过检测或测量一种或多种非炎性肌肉坏死相关抗体,包括但不限于例如抗3-羟基-3-甲基戊二酰-辅酶A还原酶(HMGCR)抗体来鉴定或预测存在非炎性肌肉坏死。

[0163] 在一些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有全身性硬化和混合结缔组织病,或正在接受全身性硬化和混合结缔组织病治疗的受试者。因此,在一些情况下,本公开的方法可包括通过检测或测量一种或多种全身性硬化或混合结缔组织病相关抗体,包括但不限于例如抗PM-Scl抗体、抗Ku抗体和抗U1RNP抗体等等来鉴定或预测全身性硬化和/或混合结缔组织病的存在。

[0164] 在一些情况下,本公开的受试者可以是患有或怀疑患有代谢疾病(如,糖尿病,包括例如1型糖尿病),或正在接受代谢疾病治疗的受试者。因此,在一些情况下,本公开的方法可包括通过检测或测量一种或多种代谢疾病相关抗体,包括但不限于例如抗谷氨酸脱羧酶(GAD)抗体、抗酪氨酸磷酸酶样分子抗体、抗IA-2抗体和抗胰岛素抗体(如用于检测和/或监测1型糖尿病)来鉴定或预测代谢疾病的存在。

[0165] 在一些情况下,本公开的病症和可使用本文所述的方法检测,以鉴定受试者的病状或作为病状预后的一部分的自身抗体,包括但不限于例如Zaenker和Ziman.Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.(2013) 22(12):2161-81;Leslie等人J Clin Invest(2001) 108(10):1417-22;Damoiseaux等人Autoimmunity Reviews(2015) 14:555—563中所述的那些,它们的公开内容全文以引用的方式并入本文。

[0166] 在一些情况下,本文所述的方法可用于监测治疗后,如手术后、癌症治疗后、感染性病状治疗后、自身免疫性病状治疗后等等的患者。在一些情况下,本文所述的方法可用于监测癌症手术治疗后的受试者,如监测手术移除癌症后存在或不存在癌症相关的自身抗体水平。例如,在一个实施方案中,本文所述的方法可用于在甲状腺切除后监测一种或多种甲状腺球蛋白自身抗体。

[0167] 在一些情况下,本公开的方法可用于检测一种或多种抗甲状腺球蛋白抗体、一种或多种抗C1q抗体、一种或多种抗MPO抗体、一种或多种抗谷氨酰胺转氨酶抗体、一种或多种抗Sm/RNP抗体、一种或多种抗GAD65抗体、一种或多种抗Ro/SSA抗体、一种或多种抗JO-1抗

体、一种或多种抗IA-2抗体、一种或多种抗La/SSB抗体、一种或多种抗PR3抗体、一种或多种抗Sm B/B' 抗体、一种或多种抗CENP-A抗体、一种或多种抗U1-snRNP-C抗体、一种或多种抗醇溶蛋白抗体、一种或多种抗组蛋白H3抗体、一种或多种抗H2B抗体、一种或多种抗SmD抗体、一种或多种抗组蛋白H4抗体或一种或多种抗胰岛素H抗体。因此,在一些情况下,本发明方法的抗原可以是一种或多种甲状腺球蛋白抗原、一种或多种C1q抗原、一种或多种MPO抗原、一种或多种谷氨酰胺转胺酶抗原、一种或多种Sm/RNP抗原、一种或多种GAD65抗原、一种或多种Ro/SSA抗原、一种或多种JO-1抗原、一种或多种IA-2抗原、一种或多种La/SSB抗原、一种或多种PR3抗原、一种或多种Sm B/B' 抗原、一种或多种CENP-A抗原、一种或多种U1-snRNP-C抗原、一种或多种醇溶蛋白抗原、一种或多种组蛋白H3抗原、一种或多种H2B抗原、一种或多种SmD抗原、一种或多种组蛋白H4抗原或一种或多种胰岛素H抗原。在某些多重测定中,具体测定可包括单独缀合至本文所述的多核苷酸的多个抗原的组合,其中所述抗原可各自为或选自甲状腺球蛋白抗原、C1q抗原、MPO抗原、谷氨酰胺转胺酶抗原、Sm/RNP抗原、GAD65抗原、Ro/SSA抗原、JO-1抗原、IA-2抗原、La/SSB抗原、PR3抗原、Sm B/B' 抗原、CENP-A抗原、U1-snRNP-C抗原、醇溶蛋白抗原、组蛋白H3抗原、H2B抗原、SmD抗原、组蛋白H4抗原和/或胰岛素H抗原。

[0168] 在一些情况下,主题方法可用于使样品中存在的一种或多种抗原结合剂的测定值归一化。例如,在一些情况下,具体抗原结合剂的水平可根据样品中存在的第二抗原结合剂的水平归一化。在一些情况下,抗原结合剂的水平可根据样品中存在的一种或多种免疫球蛋白的水平归一化。在一些情况下,样品中免疫球蛋白的水平可表明免疫球蛋白缺乏。

[0169] 任何简易样品均可用于进行本文所述的方法。在一些情况下,从受试者获得的样品(如患者样品)可包括但不限于例如组织样品(如,活检样品)。如本文所用,组织样品通常是指包含细胞和其它组分的样品,并且可为不同的,但通常包括皮肤组织样品、肌肉组织样品、肿瘤组织样品、血液样品、骨骼样品、骨髓样品、脑组织样品、结缔组织样品等等。在一些情况下,如在组织样品是固体或半固体的情况下,在本文所述的方法使用之前,可将组织样品液化,或可解离和/或匀化细胞样品。在一些情况下,此类预处理不是必要的,例如当组织是液体组织样品(如,血液)时。在一些情况下,本文所述的方法可对固体或半固体组织样品进行,而无需预处理,如对从固体或半固体组织获得的组织切片或细胞学样品进行,如在组织学或细胞学方法中进行。因此,在一些情况下,主题方法可用于染色,如用于鉴定抗原结合剂、组织学或细胞学样品。

[0170] 在某些实施方案中,本公开的抗原结合剂检测方法的特异性不取决于样品中存在抗多核苷酸抗体。因此,所述测定的进行与样品中是否存在抗多核苷酸抗体无关。在一些情况下,本公开的样品可以是已知包含抗多核苷酸抗体的样品。在一些情况下,本公开的样品可以是怀疑包含抗多核苷酸抗体的样品。如本文所用,术语“抗多核苷酸抗体”包括受试者的免疫系统产生的特异性地结合一种或多种多核苷酸的那些抗体,包括但不限于例如抗DNA自身抗体、抗双链DNA(dsDNA)抗体、抗单链DNA(ssDNA)抗体等。

[0171] 抗DNA抗体在一般群体和某些受试者中具有一些流行性,包括易患有自身免疫性疾病的那些受试者,增加了在其血液中展示抗DNA抗体的可能性。此外,某些病状为或可与抗DNA抗体的存在和/或水平增加相关。此类病状包括但不限于例如全身性红斑狼疮(SLE)、风湿性疾病(如,抗磷脂抗体综合征、类风湿性关节炎、CREST(钙质沉着、雷诺病、食道运动

功能障碍、指端硬化和毛细血管扩张)、硬皮病、血管炎、幼年型类风湿性关节炎、混合结缔组织病等)、恶性疾病(如,淋巴瘤和其它癌症)、感染性疾病(如,肺结核和其它感染)、内分泌失调、肝炎(如,自身免疫性肝炎、慢性乙型肝炎等)、结节病、家族性地中海热、特发性血小板减少性紫癜、风湿性心脏病、重症肌无力、终末期肾病、溃疡性结肠炎、癫痫、纤维肌痛、骨关节炎、骨关节炎、伊文氏综合征、皮肤牛皮癣、皮疹、多发性硬化等等。与抗DNA抗体的存在或水平增加相关的受试者和病状包括但不限于例如如Isenberg等人Rheumatology (Oxford). (2007) 46 (7):1052-6;Attar等人Saudi Med J. (2010) 31 (7):781-7和Williamson等人Proc Natl Acad Sci USA. (2001) 98 (4):1793-8中所述的那些,这些文献的公开内容全文以引用的方式并入本文。

[0172] 在一些情况下,患者样品(如,血液、血清等)可包含或可更可能包含或怀疑包含抗多核苷酸抗体,包括例如上述病状以及一般来讲人类患者群体相关的那些抗DNA抗体。本公开的发明人发现,在某些情况下,抗多核苷酸抗体可干扰凝集测定,不受理论的束缚,该干扰通过干扰靶标抗原结合剂导致的所需抗原凝集和/或使多核苷酸结合的抗原与抗多核苷酸抗体产生假阳性凝集来进行。在一些情况下,抗多核苷酸抗体对本文所述的凝集测定的不利影响可通过向凝集反应加入未结合的(即,游离的)多核苷酸来缓解。

[0173] 在某些情况下,本公开的方法包括向凝集反应加入游离的DNA(如,游离的ssDNA),包括将此类游离的DNA加入已知或预期包含抗DNA抗体的样品的情况,以及将游离的DNA预防性地加入其中抗DNA抗体的存在是未知或非预期的样品的情况。凝集反应中游离的DNA的可用量将是不同的,并且可用浓度可在0.1 μ M或更小至1mM或更大的范围内,包括但不限于例如0.1 μ M至1mM、1 μ M至1mM、2 μ M至1mM、3 μ M至1mM、4 μ M至1mM、5 μ M至1mM、6 μ M至1mM、7 μ M至1mM、8 μ M至1mM、9 μ M至1mM、10 μ M至1mM、0.1 μ M至100 μ M、1 μ M至100 μ M、2 μ M至100 μ M、3 μ M至100 μ M、4 μ M至100 μ M、5 μ M至100 μ M、6 μ M至100 μ M、7 μ M至100 μ M、8 μ M至100 μ M、9 μ M至100 μ M、10 μ M至100 μ M等。凝集反应中可用的游离的DNA(即,竞争性DNA或阻断性DNA)通常与抗原结合的多核苷酸或其它多核苷酸(如,桥接多核苷酸、夹板多核苷酸等)不具有显著的同源性,其中“显著的同源性”被视为足以在正常反应条件下杂交的同源性。因此,此类游离的DNA的结构(如,长度、核苷酸含量、序列等)将是广泛变化的。在一些情况下,游离的DNA可在50个或更少至100个或更多核苷酸的范围内,包括但不限于例如50个至100个核苷酸、50个至95个核苷酸、50个至90个核苷酸、50个至85个核苷酸、50个至80个核苷酸、55个至100个核苷酸、60个至100个核苷酸、60个至90个核苷酸、60个至80个核苷酸、60个核苷酸、65个核苷酸、70个核苷酸、75个核苷酸、80个核苷酸、85个核苷酸等。在一些情况下,游离的DNA的G/C含量将为50%或更少,包括但不限于例如30%至50%、35%至50%、40%至50%、45%至50%等。

[0174] 在一些情况下,组织样品是血液样品。血液样品可以全血液样品分析,或可以是部分或完全分级的。在一些情况下,分级血液样品在进行本文所述的检测方法时可制备血清样品,或在进行本文所述的检测方法时可制备血浆血清样品。

[0175] 在一些情况下,样品可以是分泌的体液或半固体,使得样品的获得以无创的方式进行和/或不对受试者造成任何损伤。目标分泌的体液和/或半固体包括但不限于例如尿液、唾液、眼泪、汗液、脓液和粪便。在一些情况下,主题方法的高灵敏度允许检测分泌的体液或半固体中的抗原结合剂,而传统凝集方法和/或ELISA则不能。

[0176] 在一些情况下,如在生物技术和/或制药应用中,根据制备特定抗原结合剂和/或

筛选靶向特定抗原结合剂的试剂活性的方法中的步骤,可测定样品中特定抗原结合剂的存在和/或测量(如,滴定)样品中特定抗原结合剂的量。在一些情况下,其中可使用本文所述的方法的样品是在实验室中制备的细胞样品。此类细胞实验室样品可以是体外或体内制备的。在一些情况下,细胞样品是体外来源的杂交瘤,主题抗原结合剂是杂交瘤产生的抗体。在一些情况下,细胞样品是体内来源的杂交瘤,主题抗原结合剂是杂交瘤产生的抗体。因此,在一些情况下,本文所述的主题方法和本文所述的多重方法可用于筛选杂交瘤。可进行杂交瘤筛选以检测所需的天然或合成制备的抗体,包括但不限于例如单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(如,双特异性抗体)等等。普通技术人员将易于理解其中使用所述方法的杂交瘤生产和分析方法,包括例如Methods in Molecular Biology:Immunochemical Protocols.Burns,R.编,Humana Press,2005中所述的那些方法,该文献的公开内容全文以引用的方式并入本文。

[0177] 在一些情况下,表达抗原结合剂的细胞,如B-细胞、T-细胞、杂交瘤细胞等,可通过根据本文所述的方法产生的相关延长的多核苷酸或扩增产物的检测,鉴定为表达抗原结合剂,如B-细胞受体、T-细胞受体、抗体等。在一些情况下,根据多核苷酸结合的抗原和抗原结合剂的聚集产生的延长和/或扩增产物可使用可检测探针核酸,如荧光标记的探针核酸来检测,以允许鉴定与延长和/或扩增产物相关的细胞。例如,在一些情况下,根据多核苷酸结合的抗原和抗体的聚集产生的延长和/或扩增产物可使用可检测探针核酸,如荧光标记的探针核酸来检测,以允许鉴定产生抗体的细胞。在一些情况下,此类鉴定允许定量鉴定的细胞的抗体与抗原的相对结合(如,允许使用抗原-抗体结合或使用优异抗原-抗体结合鉴定产生抗体的细胞)。在一些情况下,此类鉴定允许根据其抗体的产生和/或根据其相对优异抗体的产生分选细胞(如,通过FACS),如其中以平行或以多重方式测定多种不同的细胞。

[0178] 在一些情况下,本文所述的方法可用于筛选经免疫以生成抗体的宿主动物。任何简易宿主动物抗体产生系统可与本文所述的方法组合使用,并且可包括但不限于例如上述所述的那些受试动物。

[0179] 由于生物技术和/或制药应用涵盖单特异性和多特异性(如,双特异性)抗原结合成员的使用和/或产生,所以本文所述的主题方法通常可被配置用于检测单特异性或多特异性抗原结合剂,如单特异性或多特异性抗体(如,双特异性抗体)。

[0180] 上述用途决不视为进行限制,因为本文所述的方法和组合物可具有未在本文描述的另外用途。

[0181] 组合物和试剂盒

[0182] 本公开包括用于实践本文所述的方法的组合物,如试剂、试剂盒和设备。本文所述的任何试剂可单独用于检测抗原结合剂的方法或试剂盒。例如,本公开提供用于所述凝集测定的多核苷酸结合的抗原。

[0183] 如上文所述,多核苷酸结合的抗原可通过任何简易方法产生。在一些情况下,多核苷酸和抗原可直接连接,如通过单键,或间接连接,如通过使用合适的接头,如聚合物接头、化学接头或一种或多种连接分子或部分。在一些情况下,多核苷酸连接到抗原可通过一种或多种共价相互作用进行。在一些情况下,抗原可以是官能化的,如加入或形成反应性官能团,以用于结合多核苷酸。在一些情况下,多核苷酸可以是官能化的,如加入或形成反应性官能团,以用于结合抗原。官能化的抗原和/或多核苷酸可修饰为包含用于缀合的任何简易

反应性官能团。在一些情况下,多核苷酸被官能化为包含一个或多个官能团,包括胺官能团如末端胺官能团、羧基官能团如末端羧基官能团或巯基官能团、硫醇官能团,如硫醇化或硫醇修饰的寡核苷酸等等。

[0184] 在其中多核苷酸使用胺官能团和/或羧基官能团和/或巯基官能化,并且抗原是多肽抗原的情况下,官能化多核苷酸和多肽抗原可通过任何简易蛋白质缀合方法缀合,包括但不限于蛋白质交联,包括但不限于例如戊二醛交联、碳二亚胺交联、琥珀酰亚胺酯交联、亚氨酸酯交联、马来酰亚胺交联、碘乙酰胺交联、联苯胺交联、高碘酸盐交联、异硫氰酸盐交联等等。此类缀合方法可任选地使用多肽抗原的氨基酸残基的反应性侧链基团(如,蛋白质的氨基酸残基Lys、Cys、Ser、Thr、Tyr、His或Arg的反应性侧链基团,即多肽连接基团可以具有氨基反应性、硫醇反应性、羟基反应性、咪唑基反应性或胍基反应性)。在一些情况下,可使用缀合至多核苷酸上的兼容性官能团的化学选择反应性官能团。主题多肽抗原中包括的化学选择反应性官能团包括但不限于:叠氮基、炔基、膦基、半胱氨酸残基、C-末端硫酯、芳基叠氮化物、马来酰亚胺、碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)-酯、酰肼、PFP-酯、羟甲基膦、补骨脂素、亚氨酸酯、吡啶基二硫化物、异氰酸酯、氨基氧基、乙醛、酮、氯乙酰基、溴乙酰基和乙烯砜。另外的示例性官能团和交联方法以及使用此类官能团的缀合方法如Hermanson, "Bioconjugate Techniques" 第2版, Academic Press, 2008所述, 该文献的公开内容全文以引用的方式并入本文。

[0185] 根据待缀合的抗原和多核苷酸上存在的(无论是天然存在的还是合成的)特定官能团,在一些情况下,可用的缀合试剂可包括但不限于例如同双官能缀合试剂(如,(双(2-[琥珀酰亚胺氧羰基氧]乙基)砜、1,4-二-(3'-[2'吡啶二硫代]-丙酰胺基)丁烷、辛二酸二琥珀酰亚胺酯、酒石酸二琥珀酰亚胺酯、酒石酸磺基二琥珀酰亚胺酯、二硫代双(丙酸琥珀酰亚胺酯)、3,3'-二硫代双(丙酸磺基琥珀酰亚胺酯)、乙二醇双(琥珀酸琥珀酰亚胺酯)等等)、异双官能缀合试剂(如,间马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酸亚胺酯、间马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基硫代琥珀酰亚胺酯、N-γ-马来酰亚胺丁酰基氧琥珀酰亚胺酯、N-γ-马来酰亚胺丁酰基氧硫代琥珀酰亚胺酯、N-(ε-马来酰亚胺己酸)酰肼、N-(ε-马来酰亚胺己酰基氧)琥珀酰亚胺酯、N-(ε-马来酰亚胺己酰基氧)磺基琥珀酰亚胺酯、N-(对马来酰亚胺苯基)异氰酸酯、N-琥珀酰亚胺(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯、琥珀酰亚胺4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯、琥珀酰亚胺4-(对马来酰亚胺苯基)丁酸酯、N-磺基琥珀酰亚胺(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯、磺基琥珀酰亚胺4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯、磺基琥珀酰亚胺4-(对马来酰亚胺苯基)丁酸酯、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐、马来酰亚胺PEG-N-羟基琥珀酰亚胺酯等等)、光反应性缀合试剂(如,对叠氮基苯甲酰基酰肼、N-5-叠氮基-2-硝基苄基氧琥珀酰亚胺、对叠氮基苯基乙二醛一水合物、N-(4-[对叠氮基水杨酰胺基]丁基)-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙烯胺、双(β-[4-叠氮基水杨酰胺基]-乙基)二硫化物、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸、N-羟基磺基琥珀酰亚胺-4-叠氮基苯甲酸酯、磺基琥珀酰亚胺2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3-二硫代丙酸、磺基琥珀酰亚胺2-(间叠氮基-邻硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-丙酸、磺基琥珀酰亚胺6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯、磺基琥珀酰亚胺(4-叠氮基苯基二硫代)丙酸、磺基琥珀酰亚胺-2-(对叠氮基水杨酰胺基)乙基-1,3-二硫代丙酸等等)。

[0186] 在其中多核苷酸使用硫醇官能团(如,硫醇化寡核苷酸)官能化的情况下,缀合至目标抗原可通过使用本文所述的磺基-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸(磺基-SMCC)缀合实现。

[0187] 在其中多核苷酸缀合至小分子的情况下,根据各种因素,任何简易缀合方法均可用于将多核苷酸共价连接到小分子,所述因素包括例如小分子上的可用反应性基团以及多核苷酸上存在或不存在特定修饰。在一些情况下,胺官能化的多核苷酸可通过胺反应性交联剂缀合至所需的小分子,该胺反应性交联剂包括但不限于例如NHS酯,包括例如本文所述的那些。

[0188] 在一些情况下,多核苷酸连接到抗原利用多核苷酸上已存在的现有官能化部分。在一些情况下,将多核苷酸缀合至抗原所用的官能化部分加入多核苷酸,以生成官能化多核苷酸。官能化多核苷酸可通过修饰多核苷酸的一个或多个核苷酸或通过修饰的核苷酸加入多核苷酸来制备。在一些情况下,此类修饰核苷酸可称为官能化核苷酸。

[0189] 通过任何简易方法可将修饰的核苷酸引入多核苷酸,该方法包括但不限于例如合成/化学合成(如,固相寡核苷酸合成、亚磷酰胺合成等)、重组合成、酶促掺入等等。用于与目标抗原形成连接的修饰核苷酸和核苷酸修饰包括但不限于例如,用于点击化学官能化的那些(如,叠氮化物官能化、炔烃官能化、二苯并环辛炔(DBCO)官能化等)、用于核酸标记的那些、用于光交联的那些、用于丙烯酸亚磷酰胺键合的那些、用于焦磷酸键合/连接的那些等等,诸如例如3'-叠氮基-2',3'-二脱氧腺苷-5'-三磷酸、5-(3-叠氮基丙基)-尿苷-5'-三磷酸、5-乙炔基-2'-尿苷5'-三磷酸、8-叠氮基-腺苷-5'-三磷酸、N⁶-(6-叠氮基)己基-3'-脱氧腺苷-5'-三磷酸、胞苷-5'-磷酸-3'-(15-叠氮基-4,7,10,13-四氧杂-十五烷酰-6-氨基己基)磷酸、 γ -(2-叠氮基乙基)-腺苷-5'-三磷酸、 γ -(6-叠氮基己基)-腺苷-5'-三磷酸、 γ -[(6-叠氮基己基)-亚胺基]-腺苷-5'-三磷酸、N⁶-(6-叠氮基)己基-腺苷-5'-三磷酸、N⁶-(6-叠氮基)己基-2'脱氧-腺苷-5'-三磷酸、N⁶-(6-叠氮基)己基-3'-脱氧腺苷-5'-三磷酸、3'-叠氮基-2',3'-二脱氧胸苷-5'-三磷酸、5-(15-叠氮基-4,7,10,13-四氧杂-十五烷酰-氨基烯丙基)-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、N⁶-炔丙基-腺苷-5'-三磷酸、腺苷-5'-[γ -(炔丙基)]三磷酸、腺苷-5'-[γ -(炔丙基)-亚胺基]三磷酸、2-乙炔基-腺苷-5'-三磷酸、5-(八-1,7-二炔基)-2'-脱氧胞苷5'-三磷酸、5-八-1,7-二炔基)-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸、5-二苄基环辛炔-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸、2-氨基嘌呤-2'-脱氧核糖核苷-三磷酸、5-氨基烯丙基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、5-氨基烯丙基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、5-炔丙基氨基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、5-炔丙基氨基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、5-碘尿苷-5'-三磷酸、4-硫代尿苷-5'-三磷酸、5-溴尿苷-5'-三磷酸、5'-Acrydite修饰、5'-腺苷酰化修饰等等。

[0190] 在一些情况下,多核苷酸连接到目标抗原由一个或多个官能化接头介导。如本文所用,官能化接头是指具有一个或多个官能团的任何合适接头,该官能团用于分子的彼此连接。例如,在一些情况下,本公开的多核苷酸的核苷酸可连接到包含官能团(如,氨基官能团、硫醇官能团、羟基官能团、咪唑基官能团、胍基官能团、炔烃官能团、叠氮化物官能团、高应力炔烃官能团等)的生物分子接头。作为非限制性实例,本公开的多核苷酸的核苷酸可使用包含官能团的官能化生物素来进行生物素化。

[0191] 在一些情况下,用于将多核苷酸连接到所需抗原的那些修饰核苷酸可包括从商业

供应商获得的那些,所述商业供应商包括但不限于例如Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA)、TriLink BioTechnologies, Inc. (San Diego, CA)、Jena Bioscience GmbH (Jena, Germany)、Life Technologies, Inc. (Grand Island, NY)、New England Biolabs, Inc. (Ipswich, MA)、Zymo Research Corporation, (Irvine, CA)、Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY) 等等。

[0192] 本公开的多核苷酸缀合的抗原的产生可考虑缀合反应的效率,该效率影响了缀合后抗原与多核苷酸的摩尔比,如抗原:DNA摩尔比。本公开的发明人发现,抗原与多核苷酸的摩尔比影响了所述测定中的凝集。不受理论的束缚,在一些情况下,低抗原与高多核苷酸的比率似乎抑制凝集(如,通过抑制抗原的结合表面接近抗原结合剂)。在很多情况下,缀合后抗原与多核苷酸的摩尔比将大于1:5,包括但不限于例如大于1:4、大于1:3、大于1:2等。在某些情况下,缀合后抗原与多核苷酸的摩尔比将在1:1至1:5的范围内,包括但不限于例如1:1至1:4、1:1至1:3、1:1至1:2等。在其它情况下,如用于所述凝集测定,缀合后抗原与多核苷酸的摩尔比为基本上1:1、基本上1:2、基本上1:3等等。

[0193] 本公开还提供与主题凝集测定和所述抗原结合剂的检测相关的设备。此类设备可包括但不限于“现场使用(field-use)”设备,如试纸测定设备、侧向流动测定设备、基于载玻片的设备等等,所述设备可允许使用最少或不使用实验室设施(诸如例如电、化学试剂、温度控制、冷藏等)来进行本文所述的凝集测定。还包括用于实验室环境的设备,如利用精确定量所生成的扩增产物的那些设备,包括例如PCR设备、qPCR设备、荧光计、闪烁计数器、显微镜、读板器、核酸测序设备等。在一些情况下,可改造等温扩增设备,诸如Cheng等人(2012) *Sensors* 12, 8319–8337中所述的那些设备,该文献的公开内容全文以引用的方式并入本文,以用作实践本文所述的方法的设备。

[0194] 在又一个方面,本公开提供用于实践主题方法的试剂盒,如上文所述。主题试剂盒可包括用于实践上文所述的方法的本文所述的试剂、设备或组合物的任何组合,包括但不限于例如所述多核苷酸结合的抗原、桥接多核苷酸、夹板多核苷酸、酶学试剂(如,连接酶)等等中的一种或多种。主题试剂盒还可包括一种或多种试剂制备试剂,包括但不限于例如,用于使抗原官能化的试剂(包括例如用于将多核苷酸容易地缀合至目标抗原的官能化多核苷酸)、用于使多核苷酸官能化的试剂(如,官能化的核苷酸,即包括一个或多个反应性基团的核苷酸)、用于多核苷酸和/或抗原的缀合的试剂(包括例如本文所述的一种或多种缀合和/或交联试剂或接头)。

[0195] 此外,主题试剂盒还可包括测定试剂或用于进行样品(如,患者样品)测定的试剂,以允许评估例如一种或多种抗原结合剂是否存在于来自受试者的样品中。此类测定试剂可包括但不限于例如,检测试剂、样品制备试剂、扩增试剂(如,PCR试剂和/或等温扩增试剂和/或qPCR试剂等)和凝集试剂(如,多核苷酸结合的抗原等等)、缓冲剂、稀释剂等。此类测定试剂盒还可包括样品收集组分,如样品收集容器和/或样品收集设备等。上述组分可存在于单独的容器中,或可将一种或多种组分组合至单个容器如玻璃或塑料瓶或管。

[0196] 试剂盒还可包括对照试剂和样品,包括但不限于例如对照样品(如,阳性对照样品、阴性对照样品等)、校正试剂(如,荧光校正试剂等)。

[0197] 除上述组分之外,主题试剂盒还可包括实践主题方法的说明。这些说明可以多种形式存在于主题试剂盒中,其中一种或多种形式可存在于试剂盒中。其中这些说明的一种

存在形式是在合适的介质或基底上的印刷信息,如试剂盒包装中、说明书中一张或多张印刷信息的纸张等。又一种方式将是记录信息的计算机可读介质,如软盘、CD、可移动存储(如,闪存设备)等。又一种可存在方式是可通过互联网使用,以在远离的站点访问信息的网站地址。任何简易方式均可存在于试剂盒中。

实施例

[0198] 给出以下实施例以便为本领域的普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完整公开和描述,并且既不旨在限制发明人所认为的他们的发明的范围,也不旨在表示以下实验是所进行的全部或仅有的实验。已经作出了确保关于所用数字(例如,量、温度等)的准确性的努力,但是应考虑某些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份为重量份,分子量为重均分子量,温度为摄氏度,并且压力为大气压或接近大气压。可使用标准缩写,例如,bp,碱基对;kb,千碱基;pl,皮升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌内;i.p.,腹膜内;s.c.,皮下;等等。

[0199] 在以下实施例中,通常应用本文提供的方法和材料,除非另外指明或明显不相关:

[0200] 生物素-DNA缀合物按原样购自Integrated DNA Technologies。DNP-DNA缀合物合成通过使胺-DNA(5'或3')(Coralville,Iowa)与过量的对应的琥珀酰亚胺酯反应来实现,并通过系列乙醇沉淀纯化(参见下文)。蛋白质-DNA缀合物通过赖氨酸与硫醇(lysine-to-thiol)与磺基-SMCC(琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸)进行交联来制备。一般来讲,赖氨酸通过与SMCC一起在PBS中孵育用马来酰亚胺来活化。硫醇-DNA(5'或3')使用DTT还原,然后与马来酰亚胺官能化蛋白质在4℃下一起孵育过夜(更多详情参见下文)。小分子-DNA缀合物的表征通过高分辨率质谱实现,而蛋白质-DNA缀合物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和银染分析,以观察适当的质量位移。

[0201] 抗原-DNA缀合物的合成

[0202] 胰岛素-DNA缀合物通过重悬重组胰岛素(Sigma-Aldrich)制成在反应缓冲液(55mM磷酸钠、150mM氯化钠、20mM EDTA,pH7.2)中的1mg/mL溶液来合成。将1μL 4mM于无水DMSO中的磺基-SMCC(Pierce Biotechnologies)溶液加至10μL蛋白质溶液中,并在室温下孵育2h。将硫醇化-DNA(IDT)在反应缓冲液中重悬成100μM。然后将3微升100μM硫醇化-DNA储液加至50μL反应缓冲液中。向该溶液加入4μL 100mM DTT(Life Technologies)溶液,使氧化的硫醇化-DNA还原。然后在37℃下孵育溶液1h。使用反应缓冲液平衡7k分子量截留(MWCO)凝胶微量离心(microspin)柱(Life Technologies)。通过平衡的微量离心柱使还原的寡核苷酸脱盐两次。通过3k MWCO离心过滤柱(EMD Millipore)从胰岛素溶液移除未反应的磺基-SMCC,得到60μL的最终体积。然后混合硫醇化-DNA和胰岛素溶液,在4℃下反应过夜,然后通过10k MWCO过滤柱纯化。通过BCA测定(Life Technologies)来确定缀合物浓度。通过SDS-PAGE和银染来分析缀合效率。代表性银染如图20所示(样品通过SDS-PAGE解析,然后通过银染使总蛋白/DNA可视化。第1泳道是未修饰的GFP,第2泳道是GFP-2A缀合物,第3泳道是GFP-2B缀合物。由于向蛋白质中加入14kD寡核苷酸,所以在第2泳道和第3泳道中观察到显著质量位移。第2泳道和第3泳道的梯状条带是向单个蛋白质中加入多个寡核苷酸的结果),还示出了通过磺基-SMCC进行的GFP-DNA缀合的反应图解示意图。通过紫外可见光吸收估算缀合物的DNA与抗原比率。抗原-DNA缀合物储存在4℃下短期使用,或分成等份在-80℃

下长期储存。GFP-、小鼠-IgG-和甲状腺球蛋白-DNA缀合物类似地合成,但作出稍微修改。一般来讲,通过7kMWCO凝胶微量离心柱过滤未反应的SMCC。通过离心过滤柱(GFP,30k MWCO柱;小鼠IgG,100k MWCO柱;甲状腺球蛋白,100k MWCO柱)从未缀合的DNA纯化缀合物。

[0203] 最后,生物素-DNA缀合物购自IDT。DNP-DNA缀合物如下所述合成。将25毫克DNP-NHS酯(Life Technologies)溶解于无水DMSO中,制成50mM溶液。将5'或3'胺官能化DNA(IDT)重悬于ddH₂O中,制成1mM溶液。将40μL 1mM DNA溶液加入含50mM NaHCO₃的300μL PBS中。在室温下在恒定旋转混合下经过2天加入80μLNHS酯溶液。然后通过加入2.5倍体积的乙醇和0.1倍体积的10M乙酸铵来沉淀修饰的DNA,然后孵育4h。在4℃下通过离心15min使沉淀的DNA成团块,然后在冰冷的70%乙醇-H₂O中温和洗涤。然后将沉淀物重悬于100μL ddH₂O中,然后如前所述通过沉淀再次纯化,以确保完全移除未反应的小分子。在第二次沉淀后,将沉淀物稀释于ddH₂O中,制成100μM储液,该储液在使用前储存在-20℃下。通过高分辨率LC-MS确认合成。

[0204] 通过凝集-PCR的抗体检测(ADAP)。

[0205] 将1飞摩尔配对的抗原-DNA缀合物重悬于2μL孵育缓冲液C(2%BSA、0.2%Triton X-100、8mM EDTA于PBS中)中。将2μL分析物加至缀合物中,然后在37℃下孵育30min。加入116μL连接混合物(20mM Tris、50mM KCl、20mM MgCl₂、20mM DTT、25μMNAD、0.025U/μL连接酶、100nM桥接寡核苷酸、0.01%BSA,pH=7.5),然后在30℃下孵育15min。加入10微升尿嘧啶切除混合物(0.025U/μLEpicenter Bio)并在30℃下孵育15min。将25微升溶液加至25μL含10nM引物的2×PCR Master Mix(Qiagen)中,然后通过PCR扩增(95℃10min,95℃15s、60℃30s,12个循环)。然后将反应1:20稀释于ddH₂O中。将8.5μL稀释的PCR样品加至10μL含1.5μL引物(终浓度690nM)的2×qPCR Master Mix(Life Technologies)中。在Bio-Rad CFX96或Bio-Rad iQ5实时PCR检测系统上进行qPCR。

[0206] 如上文所述进行纯化的抗胰岛素(Abcam)、抗生物素(Abcam)、抗GFP(Vector Laboratories)和抗小鼠IgG抗体(Pierce Biotechnologies)的亲和力ADAP测定,但作出以下修改。对于在缓冲液中的稀释,将2μL抗原-DNA缀合物与2μL连续稀释的抗体(浓度范围:10²-10⁻⁴μg/mL)在缓冲液C或仅缓冲液(空白)中混合。对于在胎牛血清(Sigma-Aldrich)中的稀释,将抗体加标至胎牛血清中,获得2重量%/重量抗体溶液,然后在缓冲液C(浓度范围:10²-10⁻⁴μg/mL)中进行连续稀释,以用于ADAP测定。在相同制备条件下获得的同种型抗体(Santa Cruz Biotech)作为阴性对照并列分析。

[0207] 对来自抗血清的抗DNP抗体进行ADAP检测测定。

[0208] 如上文所述进行抗DNP抗血清(Abeam)的ADAP PCR检测测定,但作出以下修改。抗DNP抗血清从接种有DNP-缀合的载体蛋白的兔获得,无需进一步纯化。将2微升DNP-DNA缀合物与2μL连续稀释的抗DNP抗血清(浓度范围:0.4-0.0002mg/mL)在缓冲液C中混合,以用于ADAP检测。

[0209] 对抗甲状腺球蛋白患者血浆进行ADAP检测测定。

[0210] 如上文所述进行抗甲状腺球蛋白阳性患者血浆(ImmunoVision)的ADAP检测测定,但作出以下修改。将2微升甲状腺球蛋白-DNA缀合物与2μL连续稀释的患者血浆(稀释因子:10⁰-10⁶) 在缓冲液C中混合,以用于ADAP检测。

[0211] 抗生物素和抗小鼠IgG抗体的多重ADAP。

[0212] 如上文所述进行抗生物素和抗小鼠 IgG 抗体的多重 ADAP 测定,但作出以下修改。将 1 μ L 生物素-DNA 缀合物(表2中的序列1)和 1 μ L 小鼠-IgG-DNA 缀合物(表2中的序列2)与 2 μ L 连续稀释的(1)抗生物素抗体(浓度范围:10²-10⁻⁴ μ g/mL)在缓冲液C或仅缓冲液(空白)中(2)抗小鼠抗体(浓度范围:10²-10⁻⁴ μ g/mL)在缓冲液C或仅缓冲液(空白)中(3)抗生物素和抗小鼠抗体二者(浓度范围:10²-10⁻⁴ μ g/mL)在缓冲液C或仅缓冲液(空白)中混合。如上文所述处理和分析抗原和抗体混合物。

[0213] 抗生物素抗体和总 IgG 的多重 ADAP 和 PLA 检测.

[0214] ADAP 和 PLA19-22 (邻近连接测定)可结合使用,以定量给定样品中特异性抗体和总抗体的量。如上文所述进行抗生物素和总 IgG 的多重 ADAP 检测测定,但作出以下修改。将 1 μ L 生物素-DNA 缀合物(序列1)和 1 μ L 抗山羊-IgG-DNA 缀合物(序列2)与 2 μ L 连续稀释的(1)山羊抗生物素抗体(浓度范围:10²-10⁻⁴ μ g/mL)在缓冲液C或仅缓冲液(空白)中(2)山羊 IgG (浓度范围:10²-10⁻⁴ μ g/mL)在缓冲液C或仅缓冲液(空白)中(3)抗生物素和山羊 IgG 二者在缓冲液C(其中总 IgG 固定在 0.7 μ g/mL 并且抗生物素抗体级分在 100%-0% 内变化)或仅缓冲液(空白)中混合。如上文所述处理和分析抗原和抗体混合物。

[0215] 抗胰岛素抗体的直接 ELISA 检测.

[0216] 将重组人胰岛素(Sigma)在 PBS 中重悬成 1mg/mL。将 75 μ L 胰岛素溶液加入酶联免疫吸附测定(ELISA)板(Santa Cruz Biotech)的孔中。该板覆盖有塑料膜,并允许胰岛素在 4 $^{\circ}$ C 下过夜吸附到板。倾出过量上清液,使用 5% 于 PBS 中的 BSA 在 4 $^{\circ}$ C 下将孔封闭过夜。将抗胰岛素抗体稀释至 PBS 并允许在室温下结合 1h。倾出上清液并将孔使用 PBS 洗涤 4 次。二抗-HRP 探针(Santa Cruz Biotech)在 5% 于 PBS 中的 BSA 中 1:5000 稀释并加入孔中,允许在室温下孵育 1h。倾出上清液,然后在 PBS 中洗涤 4 次。加入 50 μ L TMB 底物溶液,并允许显影 15min,然后通过加入 50 μ L 2M H₂SO₄来淬灭。在读板器中读取 450nm 下的吸光度。

[0217] 排除来自抗 DNA 抗体的干扰.

[0218] 抗 DNA 抗体阳性患者血浆购自 ImmunoVision。如上文所述进行抗 DNA 血浆的 ADAP 检测,但作出稍微修改。对于抗 GFP 抗体的检测,将抗 GFP 抗体加标至抗 DNA 和正常血浆中。将 2 μ L 连续稀释的抗 GFP 溶液样品与 2 μ L 包含 GFP-DNA 缀合物同时含有或不含有 100 μ M 竞争性 DNA 的溶液一起孵育。竞争性 DNA 购自 IDT,具有以下序列:

[0219]

GGCCTCCTCCAATTAAAGAATCACGATGAGACTGGATGAATCACGGTAGCATAAGGTGCAGTACCCAAATAACGGTT CAC (SEQ ID NO:1)。

[0220] 抗甲状腺球蛋白自身抗体的放射免疫测定和电化学发光测定.

[0221] Tg-RIA (Kronus)、Beckman Access TgAb (Beckman Coulter) 和 Roche Elecsys TgAb (Roche Diagnostics) 根据制造商的说明进行。这些测定针对 WHO 参考血清 65/93 标准化。

[0222] 数据分析

[0223] 除空白之外,缓冲液C中的每个抗体样品进行三次重复 ADAP 测量。通过采用来自相同稀释系列的等分试样和相同的连接、切除和预扩增步骤制备物,但将它们置于三个不同的孔中进行 qPCR 分析来测量重复样。从连续稀释的抗生物素抗体的 ADAP 测定获得的代表性实时 qPCR 测量曲线图如图 21 所示(虚线是阈值荧光值)。由 Bio-Rad 软件自动选择单个阈值

荧光值。对于每条曲线,将荧光值对应于所选阈值的PCR循环数定义为循环阈值(Ct)。 ΔCt 定义为空白的Ct值减去样品的Ct值。 ΔCt 值与初始扩增子浓度成比例。然后该扩增子浓度还与初始稀释系列中存在的靶标抗体的量成比例。从每个连续稀释系列取2 μ L体积进行ADAP测量。因此,每次测量中抗体分子的量为 $(2 \times 10^{-6} \text{L}) \times \text{抗体浓度 (M)} \times \text{阿伏加德罗常数}$ 。使用定制软件确定抗体稀释系列的非线性四参数逻辑拟合。将ADAP测定的检测限定义为缓冲液C仅空白的平均 ΔCt 值+3倍空白标准偏差。每个检测限的值相对于对应的空白进行计算。

[0224] ADAP的测定内和测定间差异

[0225] 通过在相同平板上对抗GFP抗体进行一式三份重复ADAP测量六次来确定ADAP的测定内差异。将测定内差异定义为一式三份的标准偏差除以一式三份的平均值,并且一致地 $< 1\%$ 。通过在不同日期在五个不同平板上一式三份测量抗GFP抗体浓度来评估ADAP的测定间差异。将测定间差异定义为来自五个不同平板的浓度的标准偏差除以来自五个不同平板的浓度的平均值,并且 $< 3\%$ 。ADAP的测定内和测定间差异二者远小于所接受的生物学测定差异值,分别为10%和15%。ADAP的优异的测定内和测定间表现可能是具有较少总体处理步骤、无洗涤步骤和无离心步骤的结果。其它测定对洗涤和离心的广泛需要可能牺牲了其精确性和可重复性。

[0226] 实施例1:胰岛素、DNP、IgG和甲状腺球蛋白抗体的基于PCR的凝集-连接测定检测

[0227] 在凝集-连接测定,即所谓的“SIMPAL”(通过凝集-连接的灵敏免疫复合物监测平台),也称为“ADAP”(通过凝集-PCR的抗体检测)中,PCR扩增子分成两半,每一半都具有引物位点。每一半共价地连接到重组抗原,该重组抗原下游片段具有5'磷酸基,使其成为DNA连接酶的底物。在该测定中,1-2 μ L这些抗原-DNA缀合物与抗体一起在皮摩尔浓度下孵育,该抗体结合至抗原-DNA缀合物并使抗原-DNA缀合物聚集。聚集的缀合物保持彼此邻近,促进在使用DNA连接酶和短桥接寡核苷酸处理时两半的连接。剩余未结合的抗原-DNA缀合物浓度太稀以至于不能连接。然后复原的PCR扩增子通过基于荧光的定量PCR预扩增和定量(图8)。

[0228] 在该抗体检测实验中,1飞摩尔每种抗原-DNA缀合物在2 μ L缓冲液中稀释并加至样品中,孵育以允许结合。然后,加入包含DNA连接酶和桥接寡核苷酸的120 μ L连接混合物并在30 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育15分钟。稀释该连接混合物,在标准热循环仪中通过13轮PCR预扩增。稀释所得的PCR产物并通过qPCR分析。

[0229] 当与胰岛素-DNA缀合物一起孵育时,观察到对 α -胰岛素抗体的浓度的剂量依赖性响应超过五个数量级(例如,参见图9A)。不同的生物稀释液中获得非常类似的结果,表明测试可在复合物混合物中进行,如在PBS、牛血清和人唾液中稀释的抗体获得的结果所示。未观察到显著性差异。血清中的检测限为170皮摩尔抗体,浓度为15pg/mL。在任何情况下与对应的同种型对照一起孵育均不产生信号。测试一组蛋白质和小分子半抗原抗原-DNA缀合物诸如GFP、小鼠-IgG和生物素,得到类似的检测限(图10中提供的表1)。

[0230] 全DNP抗血清也用于使DNP-DNA缀合物凝集。使用ADAP的分析也能够检测兔血清中从仅0.74ng总抗血清蛋白质的凝集(图9J)。这些结果显示,ADAP可灵敏地检测从全血清天然产生的抗体,并且具有检测针对小分子的抗体的潜力,在常规检测测定中这具有某些难度。

[0231] 为了检查该测定对熟知标准的灵敏度,与直接ELISA进行比较,发现检测限提高865倍(图9B和表1)。通过测定包含同种型对照抗体的样品来确定ADAP的特异性,该测定不产生可检测信号(图9G)。此外,当使用不相关的抗原-DNA缀合物进行测定时,未观察到可检测信号(图9H)。

[0232] 测定还以多个构型进行。由于序列空间可用于检测核酸,所以可设计任意序列并指定为报告不同抗原的凝集。这之所以有用有几种原因。例如,很多疾病诸如1型糖尿病具有多个自身抗体生物标志物(如,胰岛素、胰岛抗原2(IA-2)、谷氨酸脱羧酶(GAD)、锌转运蛋白8(ZnT8))。可使用结合至不同抗原的特异性核酸同时和单独检测针对多个抗原的抗体,以增加诊断的可信度。该测定的多个实施方案的另外优点允许抗体测试以考虑总免疫球蛋白浓度,这通常是常规抗体测试忽视的。对于免疫球蛋白缺乏患者,忽视免疫球蛋白浓度可导致假阴性结果的常见问题(例如对于乳糜泻患者)。使用偶联测定检测除其它靶标抗体之外的免疫球蛋白水平可搜索作为异常低免疫球蛋白水平的结果的阴性结果。

[0233] 生成一组具有生物素和小鼠IgG的正交抗原-DNA缀合物。这些扩增子设计为使得第1组引物不扩增第2组扩增子,反之亦然,但共用常用桥接寡核苷酸(参见表2)。抗原-DNA缀合物如上文所述合成,使用生物素标记第1组寡核苷酸,使用小鼠IgG标记第2组寡核苷酸。合并两种抗原-DNA缀合物,然后与仅结合生物素、仅结合小鼠IgG或结合它们二者的抗体一起孵育,然后进行凝集分析。与抗生物素抗体一起孵育的样品仅在第1组引物的情况下显示信号,而与抗小鼠IgG抗体一起孵育的样品仅在第2组引物的情况下显示信号。混合的样品在两组引物的情况下均产生信号(图9D,还可参见图14A-14C)。

[0234] 为了对总IgG和抗体进行多重检测,抗IgG邻近探针从单批抗IgG多克隆抗体产生。该批次一分为二,每个库使用第2组PCR扩增子的上游或下游片段修饰。当多克隆抗体结合附近表位时,扩增子的两半紧密结合在一起,允许通过PCR进行连接和检测。山羊 α -生物素抗体稀释至山羊IgG,使得IgG的总量保持恒定,但为 α -生物素的IgG级分发生变化。使用第2组引物的qPCR分析未显示出信号变化,对应于每个样品中恒定浓度的IgG,而由第1组引物产生的信号随着 α -生物素抗体级分的增加而增加(图9I)。该数据显示,总抗体水平的检测可通过抗原特异性抗体的检测多重化。

[0235] 测试来自患者样品的诊断抗体的检测。甲状腺球蛋白自身抗体介导和诊断自身免疫性甲状腺炎。另外,在响应于癌症的治疗性甲状腺切除之后,甲状腺球蛋白滴度通常用作确保完全移除侵害性肿瘤的标志。甲状腺球蛋白自身抗体可干扰甲状腺球蛋白测定,从而表示监测恢复的重要生物标志物。目前,放射免疫测定仍然是检测甲状腺球蛋白自身抗体的黄金标准。

[0236] 使用甲状腺球蛋白-DNA缀合物对合并的健康人血浆进行SIMPAL分析,与来自测试为甲状腺球蛋白自身抗体阳性的患者的血浆进行比较。观察到来自甲状腺球蛋白阳性样品(2 μ l)的稳固信号,即使在1:100,000稀释之后,而健康样品几乎无背景(图9E)。使用三种FDA认证的临床实验室测定对相同的样品进行测定:Kronus/RSR放射免疫测定和两种电化学发光测定(Beckman Coulter和Roche)。令人印象深刻的是,ADAP检测抗甲状腺球蛋白抗体,检测限比这些标准测定低3-4个数量级(图9F)。

[0237] 总之,所开发的测定使用PCR以检测复合物混合物中存在的抗体。该测定超过或优于报告的ELISA检测限,能够检测2 μ L样品中低至仄摩尔的抗体。作为均相溶液相免疫测定,

凝集-连接测定避开了蛋白质变性和表面固定化抗原测定的表位遮蔽问题。作为非洗涤免疫测定,它消除了妨碍ELISA显影的繁琐的洗涤步骤优化。所开发的测定不需要如夹心ELISA所需的分离独特配对的抗体。值得注意的是,该测定可仅使用很多临床环境中易于获得的标准qPCR设备和试剂进行。该测定使用超低量的抗原-DNA缀合物(来自100 μ g 60kDa抗原缀合物的约1,700,000次测定)和标准连接酶。

[0238] 图8.通过SIMPAL或ADAP的抗体检测。使抗原-DNA缀合物与包含抗体的分析物一起孵育。抗体结合至缀合物并使缀合物凝集,在加入桥接寡核苷酸和DNA连接酶后将其定位于连接的有利位置。使桥接寡核苷酸水解,通过PCR预扩增新扩增子。然后通过qPCR分析该库以确定相对抗体水平。

[0239] 图9A-9J. SIMPAL或ADAP允许在复合物基质中进行抗体的高灵敏度和多重检测,将 α -胰岛素抗体稀释至PBS、胎牛血清或人唾液中,然后经受胰岛素-DNA缀合物的SIMPAL分析(图9A)。使生物素-和小鼠IgG-DNA缀合物均与 α -生物素(图9D,左)或 α -小鼠IgG抗体(图9D,中)或它们二者(图9D,右)一起孵育,然后经受SIMPAL qPCR分析。进行凝集测定和ELISA测定的头对头比较,显示出SIMPAL的优异灵敏度(图9B)。将等量的 α -胰岛素抗体稀释至PBS中,然后通过SIMPAL或直接ELISA进行分析。分析来自测试为 α -甲状腺球蛋白抗体阳性的患者的人样品并与正常人血浆和纯化的抗体进行比较(图9C)。使用对 α -生物素结合的寡核苷酸具有特异性的第1组引物和对 α -小鼠IgG具有特异性的第2组引物,在仅包含 α -生物素、仅包含 α -小鼠IgG和包含 α -生物素和 α -小鼠IgG二者的样品中进行SIMPAL(图9D)。对三个不同稀释度(1:10、1:1000、1:100,000)的合并的健康人血浆(正常)相较于来自测试为甲状腺球蛋白自身抗体阳性(α -甲状腺球蛋白阳性)的患者的血浆,使用甲状腺球蛋白-DNA缀合物进行诊断抗体 α -甲状腺球蛋白的检测(图9E)。通过ADAP、FDA认证的放射免疫测定(Kronus RIA)和两种电化学发光测定(Beckman和Roche ECL)分析相同的抗甲状腺球蛋白阳性人血浆样品(图9F)。通过分析血清中连续稀释的同种型IgG研究ADAP的特异性,但未观察到可检测信号(图9G)。误差条表示一式三份样品的标准偏差,但很多数据点由于太小而不可见。

[0240] 使抗胰岛素抗体与胰岛素-或小鼠IgG-DNA缀合物在牛血清中一起孵育,然后通过ADAP分析(图9H)。据预期,抗胰岛素抗体使胰岛素-DNA缀合物凝集并产生信号,但不使小鼠IgG-DNA缀合物凝集,因为它们对该不相关蛋白质无亲和力,因此不产生信号。该结果显示,ADAP对同源抗原-抗体对具有特异性。分别通过ADAP和邻近连接测定(PLA)进行抗抗原抗体和总抗体水平的多重检测(图9I)。使生物素-DNA缀合物和抗IgG-DNA缀合物与包含恒定的总IgG但变化的抗生物素抗体级分的样品一起孵育。通过ADAP和PLA分析这些样品。误差条表示一式三份样品的标准偏差,但很多数据点由于太小而不可见。

[0241] 通过将抗血清连续稀释至PBS中来测试来自兔抗血清的抗二硝基苯酚(DNP)的ADAP检测和分析(图9J)。稀释系列的抗原天然血清作为阴性对照进行分析。

[0242] 表2:寡核苷酸序列

名称	5'修饰	3'修饰	序列
第1组 A	硫醇	无	CAGGTAGT AGT ACGTCTGTTTCACGATGAGA CTGGATGAA (SEQ ID NO:2)
第1组 B	磷酸	硫醇	TCACGGTAGCATAAGGTGCAAGATAATACTC TCGCAGCAC (SEQ ID NO:3)
第1组桥 接*	无	无	CUACCGUGAUUCAUCCAG (SEQ ID NO:4)
第1组 F	无	无	GGCCTCCTCCAATTAAAGAA (SEQ ID NO:5)
第1组 R	无	无	GTGAACCGTTATTTGGGTAC (SEQ ID NO:6)
第2组 A	硫醇	无	GGCCTCCTCCAATTAAAGAATCACGATGAGA CTGGATGAA (SEQ ID NO:7)
第2组 B	磷酸	硫醇	TCACGGTAGCATAAGGTGCAGTACCCAAAT AACGGTTCAC (SEQ ID NO:8)
第2组桥 接*	无	无	CUACCGUGAUUCAUCCAG (SEQ ID NO:4)
第2组 F	无	无	GGCCTCCTCCAATTAAAGAA (SEQ ID NO:5)
第2组 R	无	无	GTGAACCGTTATTTGGGTAC (SEQ ID NO:6)
第4组 A	硫醇	无	TCGTGGAACCTATCTAGCGGTGTACGTGAGTG GGCATGTAGCAAGAGG (SEQ ID NO:9)
第4组 B	磷酸	硫醇	GTCATCATTCGAATCGTACTGCAATCGGGTA TTAGGCTAGTGACTACTGGTT (SEQ ID NO:10)
第4组桥 接*	无	无	GAAUGAUGACCCUCUUGCUA (SEQ ID NO:11)
第4组 F	无	无	CGTGGAACCTATCTAGCGGTGTA (SEQ ID NO:12)
第4组 R	无	无	ACCCGATTGCAGTACGATTC (SEQ ID NO:13)

*U=脱氧核糖尿嘧啶

[0245] 上文指出,ADAP与常规抗体检测方法(包括ELISA和RIA)相比具有很多优点。ADAP在溶液相中使用非常低的样品体积和超低的试剂消耗,免洗涤,无放射性反应。ADAP参数与ELISA和RIA的那些参数的比较提供于下表3中。从内部试验计算ADAP和ELISA值。从此前报告的结果确定RIA值,参见例如Falorni等人(1995) J. Immunol. Meth. 186:89-99,该文献的公开内容全文以引用的方式并入本文。

[0246] 表3:ADAP、ELISA和RIA测定参数:

[0247]

	ADAP	ELISA	RIA
检测限(阿摩尔)	4.3	3722	32
样品体积(μl)	2	100	25
每100μg抗原测定的数量	1.7×10^6	10-50	不适用
测定持续时间(小时)	<3	<4	3-24
多重测定性	约2-50	<9	无
需要固体载体	否	是	否
洗涤/离心步骤	否	是	是

需要放射性同位素	否	否	是
检测设备	热循环仪	读板器	γ 计数器

[0248] 实施例2:针对生物素、DNP、IgG和GFP抗体的基于PCR的凝集-连接测定

[0249] 使抗原-DNA缀合物以1飞摩尔每种缀合物在2 μ L缓冲液中孵育成包含DNA连接酶和桥接寡核苷酸的稀释溶液,该桥接寡核苷酸与两条链的中央20bp区杂交。然后稀释该连接混合物,并通过13轮PCR预扩增。然后使用Sybr Green检测通过qPCR分析所得的PCR产物。观察到对凝集抗体浓度的剂量依赖性响应,检测限为约37.5阿摩尔抗体(图11A-11C)。观察到针对在牛血清中稀释的抗体具有类似的检测限。在任一情况下与对应的同种型对照一起孵育均不产生信号。为建立所用序列的普遍性,合成一组正交DNA-抗原缀合物并重复实验。该序列表现稍好,检测限为3.75阿摩尔抗体。

[0250] 使用基于蛋白质的抗原来测试检测策略。使小鼠IgG-DNA缀合物与稀释系列的 α -小鼠pAb一起孵育。在连接和预扩增之后,通过qPCR分析样品。观察到响应于抗体浓度的剂量依赖性信号(图12A-12C)。相似地,抗体和抗原-DNA缀合物在血清中预孵育对检测效率无影响。同种型对照不产生高于背景的信号。使用GFP-DNA缀合物重复这些实验得到类似的结果(图13)。

[0251] 为进行多重测定,生成一组具有生物素(第1组序列)和小鼠-IgG(第2组序列)的正交抗原-DNA缀合物。这些扩增子设计为使得第1组引物不扩增第2组扩增子,反之亦然。合并两种抗原-DNA缀合物,然后与仅结合小鼠IgG(图14B)、仅结合生物素(图14A)或结合它们二者(图14C)的抗体一起孵育,然后进行凝集分析。与抗小鼠IgG抗体一起孵育的样品仅在第1组引物的情况下显示信号,而与抗GFP抗体一起孵育的样品仅在第2组引物的情况下显示信号,混合的样品在两组引物的情况下产生信号(图14A-14C)。

[0252] 图11A-11C.通过qPCR检测由 α -生物素抗体引发的生物素-DNA缀合物凝集。使生物素-DNA缀合物与在缓冲液(图11A、图11C)或血清(图11B)中稀释的各种浓度的 α -生物素或同种型对照抗体一起孵育。然后使用DNA连接酶处理样品,然后通过qPCR分析。正交DNA序列用于图11C以显示可重复性。Y-轴值显示为相对于空白的 ΔC_T 。误差条表示一式三份的标准偏差,但很多数据点由于太小而不可见。

[0253] 图12A-12C.小鼠IgG-DNA缀合物凝集通过qPCR灵敏地检测。使小鼠IgG-DNA缀合物与在缓冲液(图12A、图12C)或血清(图12B)中稀释的各种浓度的 α -小鼠IgG或同种型对照抗体一起孵育。然后使用DNA连接酶处理样品,然后通过qPCR分析。正交DNA序列用于图12C以显示可重复性。Y-轴值显示为相对于空白的 ΔC_T 。误差条表示一式三份的标准偏差,但很多数据点由于太小而不可见。

[0254] 上文实施例1和2示出了在宽泛的抗原分子量范围内的ADAP标度,同时生物素(约0.24kDa)、GFP(26kDa)和小鼠IgG(150kDa)的抗原-抗体对的测定均有所显示(图17)。对于所有三对,ADAP一致地检测低阿摩尔的抗体(参见例如,表1、图11A-11C、图12A-12C和图13)。

[0255] 图13.GFP-DNA缀合物凝集通过基于PCR的凝集-连接测定检测。使GFP-DNA缀合物与在缓冲液中稀释的各种浓度的抗GFP或同种型对照抗体一起孵育。然后使用DNA连接酶处理样品并通过qPCR分析。Y-轴值显示为相对于空白的 ΔC_T 。所有实验一式三份地进行。当在血清中稀释抗GFP或同种型对照抗体时,也获得类似的结果。误差条表示一式三份的标准偏

差,但很多数据点由于太小而不可见。

[0256] 图14A-B. 抗原凝集的多重检测。合并具有正交序列(orthogonal sequence)的小鼠IgG-DNA和生物素-DNA缀合物,并与仅结合小鼠IgG(图14B)、仅结合生物素(图14A)或结合小鼠IgG和生物素二者(图14C)的抗体一起孵育。Y-轴值显示为相对于空白的 ΔC_T 。这些结果显示使用ADAP的多重抗体检测具有正交性。

[0257] 图17. ADAP检测从摩尔至阿摩尔的结合跨越宽泛的分子量分布的抗原的抗体。抗生物素、抗胰岛素、抗GFP和抗小鼠IgG抗体(抗原分子量分别为0.24、5.8、27和150kDa)的ADAP检测限通过分析加至PBS或牛血清中的抗体确定。误差条表示一式三份样品的标准偏差。

[0258] 实施例3: 多价抗体的基于PCR的扩增/检测

[0259] 如本文所述,通过基于凝集的测定扩增和检测样品中的抗原结合剂取决于抗原结合剂的多价性。如本文所述,在基于PCR的凝集测定中使用多核苷酸结合的抗原通过qPCR以浓度依赖性方式检测和定量样品中的多价多克隆抗小鼠抗体(pAb α -小鼠)(图15)。在基于PCR的凝集测定中使用多核苷酸结合的抗原通过qPCR,多克隆抗体(pAb α -小鼠)产生稳固信号,然而,在任何测试浓度下消化的单价抗体片段(Fab α -小鼠)和阴性对照抗体片段(Fab对照)均未产生显著信号(图15)。

[0260] 在基于PCR的扩增/检测测定中,其中扩增取决于通过多核苷酸结合的抗原形成多价抗体复合物,使用类似的检测限检测单克隆抗体和多克隆抗体(图16)。在此类测定中, α -GFP单克隆抗体(mAb)和 α -GFP多克隆抗体(pAb)的动态检测范围是不相等的(对于多克隆或单克隆抗体分别为约6个或4个数量级),这显示pAb的检测和定量的动态范围大于mAb。mAb(0.1 μ g/ml)的定量曲线的拐点反映了其中所加入的mAb的浓度大约等于样品中所加入的抗原-DNA缀合物的浓度的点,不受理论的束缚,这可表明对单个mAb分子之间的抗原表位结合位点的竞争。这些发现阐明,所述测定中的机械行为或凝集,同时还显示虽然可期望不同的动态范围,但ADAP非常适于检测多克隆和单克隆抗体二者。

[0261] 图15. 使用多核苷酸结合的抗原通过qPCR扩增/检测对各种浓度的多价多克隆抗小鼠抗体(pAb α -小鼠)和单价抗小鼠消化的Fab片段(Fab α -小鼠)的检测和定量进行比较。

[0262] 图16. 使用多核苷酸结合的抗原通过qPCR扩增/检测对各种浓度的多克隆抗GFP抗体(pAb)和单克隆抗GFP抗体(mAb)的检测和定量进行比较。

[0263] 在图15和图16中,误差条表示一式三份样品的标准偏差,但很多数据点由于误差条太小而不可见。

[0264] 实施例4: 排除来自抗DNA自身抗体的干扰

[0265] 研究ADAP中来自内源性抗DNA自身抗体的干扰。此类抗体可以抗原未知(antigen-agnostic)的方式潜在地凝集抗原-DNA缀合物,并得到假阳性。患有自身免疫性疾病诸如全身性红斑狼疮(SLE)的患者通常产生高滴度的抗DNA抗体。它们通常还在约10%的健康成人中少量存在。

[0266] 获得了独立证实具有抗DNA抗体的患者血浆。还获得了正常血浆作为阴性对照,它具有更低水平的抗DNA抗体。GFP-DNA缀合物用作对照抗原,以观察来自抗DNA自身抗体的干扰程度,因为人血浆中应无天然存在的抗GFP抗体。

[0267] 据预期,观察到来自抗DNA阳性患者血浆的强信号,而正常血浆观察到弱但稳固的

信号(图18A),显示这些抗体可干扰ADAP分析。有趣的是,在加入抗GFP抗体之后,抗DNA阳性患者血浆和正常血浆二者均观察到相同的剂量响应曲线(图19)。该观察结果与无论是否存在抗DNA抗体,高亲和力抗GFP抗体主导凝集事件和ADAP信号的概念一致。

[0268] 出于高度谨慎的目的,寻找排除来自抗DNA自身抗体的潜在干扰的通用溶液。为此,游离的DNA作为竞争剂滴定,以“保护”抗原-DNA缀合物不发生伪聚集(图18B)。在100 μ M竞争剂DNA下,不再观察到来自抗DNA抗体的假信号(图18B-18C)。为验证竞争剂DNA不另外干扰ADAP表现,将抗GFP抗体和竞争剂DNA二者加入抗DNA阳性血浆和正常血浆(图18D)。这些样品的ADAP分析显示,预期剂量响应无来自抗DNA抗体的干扰。人血浆中抗GFP抗体的检测限与缓冲液中的类似(分别为48和27阿摩尔;前者表示人血浆中的检测限为 3.6 ± 0.5 ng/ml)。这些结果共同显示,竞争剂DNA的加入允许我们排除人血浆样品中的干扰。

[0269] 图18A-18D.通过与游离的DNA的竞争排除来自抗DNA自身抗体的干扰。来自抗DNA自身抗体的干扰研究。GFP-DNA缀合物用于分析抗DNA阳性患者血浆和健康正常血浆(图18A)。将患者样品分组为包含抗单链DNA抗体(ssDNA)的样品和具有抗dsDNA抗体(dsDNA)的样品。对于所有样品类型,在1和10的稀释因子下观察到干扰(图18B)。将竞争剂DNA滴定至未稀释的患者和正常血浆。竞争剂DNA的加入消除了来自干扰抗体的背景信号。重复图18A中的实验,但加入100 μ M竞争剂DNA,其消除了干扰(图18C)。将纯化的GFP抗体加入抗DNA阳性和正常血浆。GFP抗体的检测在所有样品中存在100 μ M竞争剂DNA的情况下进行,以确认其不干扰ADAP表现(图18D)。

[0270] 图19.在无竞争剂DNA的情况下抗DNA和正常血浆中的抗GFP抗体的检测。将抗GFP抗体稀释至抗DNA血浆或正常血浆,然后使用GFP-DNA缀合物作为探针通过ADAP分析。虽然如图18A所示,在1:1和1:10稀释下抗DNA和正常血浆观察到干扰,但在存在抗GFP抗体的情况下未观察到干扰。这可归因于高亲和力抗GFP抗体主导GFP-DNA缀合物的凝集,因此遮蔽了来自抗DNA抗体的干扰。

[0271] 实施例5:抗原-DNA缀合物的合成

[0272] 灵敏性ADAP测定最重要的是形成抗原-DNA缀合物。对于蛋白质抗原,使用磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸(磺基-SMCC)和硫醇化寡核苷酸通过赖氨酸与硫醇交联合成这些组分。简言之,马来酰亚胺通过在PBS中与磺基-SMCC反应装配在纯化抗原的赖氨酸上(图20)。通过二硫苏糖醇(DTT)介导的还原来活化硫醇化寡核苷酸。使抗原和寡核苷酸二者脱盐、合并并允许反应过夜。通过使用尺寸排阻离心柱进行的大规模纯化来移除未反应的试剂。通过紫外可见光谱和通过SDS-PAGE分析来确定抗原-DNA缀合比。通常,在ADAP测定中1:2的抗原与DNA缀合比产生最佳信号。据发现,更大的抗原-DNA缀合程度能够遮蔽抗体结合的表位,从而导致测定灵敏度下降(图22)。

[0273] 对于小分子抗原,在一步缀合中使N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)酯活化的衍生物与胺修饰的寡核苷酸一起孵育(图23)。所得的小分子-DNA缀合物以高分辨率质谱表征。与基于蛋白质的抗原相比,小分子由于其尺寸而包含更少的抗体表位。因此设计仍保持表位与抗体的可接近性的缀合位点是关键。对于二硝基苯酚(DNP)-DNA缀合物,相同的缀合位点用于生成所测试的抗体的免疫原(其中DNP连接至赖氨酸侧链的DNP-BSA缀合物)。

[0274] 图22.抗原:DNA缀合比对ADAP表现的影响。卵清蛋白(OVA)-抗原DNA缀合物使用低或高抗原:DNA比率(分别为1:2或1:6)合成。使卵清蛋白缀合物与稀释系列的单克隆抗OVA

抗体在缓冲液中一起孵育,并经受ADAP分析。过度缀合的卵清蛋白显示出显著降低的测定表现,而正常缀合的卵清蛋白显示出预期的浓度依赖性信号。不受理论的束缚,当抗原与寡核苷酸过度缀合时,这可以是表位遮蔽的结果。

[0275] 图23.小分子-DNA缀合物合成的反应图解。DNP-DNA缀合物通过使琥珀酰亚胺基酯活化的DNP与胺修饰的DNA的一步反应来合成。然后通过质谱表征缀合产物。

[0276] 实施例6:通过ADAP测定进行口腔样品HIV筛选

[0277] 增加针对HIV筛选的个体数量增大了公共卫生官员切断高传染性传染源的能力。虽然基于血清/血浆的HIV测试是确诊的标准,但可使用该形式收集的样品的数量由于低顺应性和安全问题而受到限制。口腔液样品可从更大的群体获得,因为收集方法是无创的且更安全。

[0278] 然而,口腔液中的抗体水平比血清或血浆中存在的低约1000倍。当患者最可能传播疾病时,当前FDA认证的口腔液测试缺乏检测在HIV感染的前2-6周内极低水平抗体的分析灵敏度。可检测非常低水平的抗体的高灵敏度口腔液测定将能够鉴定处于该关键窗口期的患者,同时提高可被筛选的患者的数量。

[0279] 为解决该问题,设计了使用对HIV具有特异性的抗原-DNA缀合探针(p24、gp120、gp160、gp41、gp36等)的HIV特异性ADAP测定。检测口腔液中HIV的抗体的测定必须考虑宿主免疫应答中的HIV是动态过程。B细胞首先释放IgM,其随后经历类型转换以产生IgG。为了在早期鉴定疾病,口腔液测定必须检测两种同种型的病毒特异性抗体。ADAP利用IgM和IgG抗体的多价和凝集力,在抗体-抗原结合时驱动形成可扩增的dsDNA,从而非常适于检测两种抗体同种型。增加该方法检测HIV的困难的是口腔样品中固有低水平的抗体和最近感染的个体的低水平的病毒特异性抗体的组合。

[0280] 在最初测试中,ADAP显示检测2 μ L样品中阿摩尔的抗p24抗体(从HIV感染的个体纯化)(图24A)。还显示两种不同相关抗体(抗gp120和抗p24)的多重检测(图24B)。

[0281] 在更大的测试中,通过ADAP测定一组44份归档的口腔液样品是否存在抗p24和抗gp120抗体(图25和图26)。此类测试发现,在HIV阳性患者群体中,抗p24和抗gp120检测的水平显著较高,说明所设计的ADAP测定可区分HIV阳性和正常口腔样品群体。同时考虑两种抗原,该测定表现出95%灵敏度和100%特异性。另外,阴性对照(GFP-DNA缀合物)未显示出HIV阳性和HIV阴性患者群体之间的显著差异。

[0282] 这些结果示出了ADAP测定对用于HIV抗体检测的真实口腔样品的功能。

[0283] 图24A-24B.通过ADAP技术进行的超灵敏抗体检测。ADAP检测抗p24抗体,在2 μ L样品中显示出阿摩尔的灵敏度(图24A)。ADAP的特异性通过测定同种型对照抗体加标的血清来确认。阴性对照实验未检测到信号。抗gp120和抗p24抗体的多重检测(图24B)。Gp120和p24抗原分别由通过引物1或引物2扩增的DNA序列编码。其同源抗体使用针对gp120的引物1(阴影条)或针对p24的引物2(实心条)通过ADAP测定来检测。大部分由技术重复测定产生的单个数据点的误差条由于太小而不可见(Δ Ct:循环阈值的变化;报告相对于对照样品的qPCR信号的标准平均值)。

[0284] 图25.人口腔液样品中基于ADAP的抗体检测。检测抗gp120(左)或p24抗体(中)的ADAP测定分为HIV阳性("p")和阴性("n")群体。检测抗GFP抗体(右)的ADAP测定显示出两个群体之间的差异很小。

[0285] 图26. 基于gp120和p24的临床灵敏度和特异性。对44份口腔液样品的初始ADAP测定使用1 μ L口腔液实现了95%灵敏度和100%特异性。包括另外的抗原(如, gp160和gp41)还将增强测定的表现。(实心圆=阳性口腔液; 空心圆=阴性口腔液)。

[0286] 实施例7: 多重抗体检测

[0287] 多重抗体发现试剂盒设计为平行检测来自单个样品的小等分试样的多个不同抗体。基于96孔检测板的初始测定使用96种抗原来设计, 包括自身免疫性疾病相关的最常见抗原, 包括如代表性实例, 甲状腺球蛋白、C1q、MPO、谷氨酰胺转氨酶、Sm/RNP、GAD65、Ro/SSA、JO-1、IA-2、La/SSB、PR3、Sm B/B'、CENP-A、U1-snRNP-C、醇溶蛋白、组蛋白H3、H2B、SmD、组蛋白H4和胰岛素H。

[0288] 对于抗原-DNA缀合, 抗原首先按分子量分为两组(“A组”=分子量大于9kDa, “B组”=分子量小于9kDa)。

[0289] 各种不同的抗原各自独立地缀合至独特的多核苷酸, 该多核苷酸包含独特的引物结合区以及与桥接寡核苷酸的一半具有同源性的末端通用区。通用序列允许在所有抗原的连接步骤中使用相同的桥接寡核苷酸。两个独特的引物位点(即, 每个位点在由桥接寡核苷酸连接的每个多核苷酸上)定义了每个抗原的同一性。虽然所述方法具有广泛的潜在多重性(multiplexability), 从而无此限制, 在本发明所述的实施方案中, 为了与常规96孔qPCR扩增和检测设备一致, 使用初始96重形式。

[0290] 来自A组的抗原-DNA缀合物通过使用过量的DNA(13kDa)驱动抗原-DNA缀合物形成来合成。过量的DNA通过20kDa MWCO过滤板与抗原-DNA缀合物(大于22kDa)分离。B组抗原-DNA缀合物通过利用过量的抗原驱动反应产物形成来合成。游离的抗原(小于9kDa)通过10kDa MWCO过滤板与抗原-DNA缀合物(至少13kDa)分离。

[0291] 分别作为A组和B组的示例性抗原, 该方法将对组蛋白H3(15kDa)和胰岛素(5.8kDa)进行描述。简言之, 对于组蛋白H3, 将5摩尔当量的磺基-SMCC与1mg组蛋白H3一起在室温下孵育2h。同时, 100 μ M硫醇化-DNA与DTT一起在37 $^{\circ}$ C下孵育1h。组蛋白和DNA二者将通过脱盐板(如, 可得自Thermo Fisher Scientific, Inc.)与未反应的小分子分离。然后使活化的组蛋白和DNA在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。接着, 将反应混合物分成等份, 置于96孔20kDa MWCO过滤板中, 并与未反应的DNA有效地分离。来自每个单独的板孔的产物纯度和收率可通过电泳和紫外可见光谱方法验证。

[0292] 胰岛素-DNA缀合物使用10kDa MWCO截留过滤板类似地制备, 主要差异在于使过量的抗原与有限的DNA一起孵育。因此, 如对于组蛋白H3所述, 10kDa MWCO过滤板还用于移除抗原而非DNA。

[0293] 可通过24孔SDS-PAGE电泳和通过银染来表征抗原-DNA缀合物的缀合效率, 后者允许使全部三种组分可视化: 抗原-DNA缀合物、未缀合的抗原、游离的DNA。抗原-DNA缀合物可通过使用SDS-PAGE比较与纯抗原的迁移率差异来确认。抗原上DNA的缀合比可通过紫外可见光谱和BCA测定来验证, 其中前者揭示了关于DNA量的信息, 后者报告了蛋白质浓度。两个测量值(使用适当标准)之间的比率表示缀合比, 在该实施方案中, 其目标是抗原与DNA比率为1:2。

[0294] 在宽泛的抗原分子量范围内进行抗原-DNA的成功缀合, 所述分子量包括例如9kDa(胰岛素)、29kDa(GFP)、65kDa(GAD65)和660kDa(甲状腺球蛋白)。此外, 还成功产生了膜蛋

白抗原的抗原-DNA缀合物,其疏水性通常增加(如, gp120)。

[0295] 使用人类患者血清样品验证所开发的多重ADAP测定,包括来自全身性红斑狼疮(SLE)和类风湿性关节炎(RA)患者的那些血清样品。测定包含结合已知在SLE(如,组蛋白H2B、Jo-1、Ro-52)和RA患者中产生的抗体的必要的自身抗原。该结果使用多重ADAP测定获得,并且灵敏度提高可使用相同的样品针对蛋白质微阵列独立地验证。

[0296] 在通用多重测定方案中,使2 μ L样品与2 μ L探针(包含合并在一起的全部96种抗原-DNA缀合物)混合15min。接着,加入116 μ L连接混合物(其包含通用桥接寡核苷酸、连接酶和缓冲液)。在30℃下进行该连接步骤15min。将所得的连接产物分成等份,置于96孔qPCR板中,其中将独特的引物对预加载至每个孔。通过将qPCR主要混合物加入20 μ L的最终体积在标准qPCR机构中进行定量。整个方法需要最少的样品消耗,并且可使用标准实验室仪器在小于2h内完成。

[0297] 虽然已经参考其具体实施方案对本发明进行了描述,但是本领域的技术人员应当理解,在不脱离本发明的真正精神和范围的情况下可作出各种改变并且可替换等效方案。此外,可以进行许多修改,以便使特定的情况、材料、物质组成、方法、一个或多个方法步骤适应本发明的目标、精神和范围。所有此类修改旨在所附权利要求书的范围之内。

序列表

<110> 加利福尼亚大学董事会

P·鲁宾逊

C-T·蔡

C·贝尔托齐

<120> 用于检测凝集的方法以及用于实践该方法的组合物

<130> BERK-284W0

<150> US 62/149,324

<151> 2015-04-17

<160> 13

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 1

ggcctcctcc aattaaagaa tcacgatgag actggatgaa tcacggtagc ataaggtgca 60
gtacccaaat aacggttcac 80

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 2

caggtagtag tacgtctgtt tcacgatgag actggatgaa 40

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 3

tcacggtagc ataaggtgca agataatact ctcgcagcac 40

<210> 4

<211> 18

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature
<222> (2) .. (2)
<223> 脱氧核糖尿嘧啶
<220>
<221> misc_feature
<222> (7) .. (7)
<223> 脱氧核糖尿嘧啶
<220>
<221> misc_feature
<222> (10) .. (11)
<223> 脱氧核糖尿嘧啶
<220>
<221> misc_feature
<222> (14) .. (14)
<223> 脱氧核糖尿嘧啶
<400> 4
cnaccgngan ncanccag 18
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 5
ggcctcctcc aattaaagaa 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 6
gtgaaccgtt atttgggtac 20
<210> 7

<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 7
ggcctcctcc aattaaagaa tcacgatgag actggatgaa 40
<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 8
tcacggtagc ataaggtgca gtacccaaat aacggttcac 40
<210> 9
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 9
tcgtggaact atctagcggg gtacgtgagt gggcatgtag caagagg 47
<210> 10
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 10
gtcatcattc gaatcgtagt gcaatcgggt attaggetag tgactactgg tt 52
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<220>
<221> misc_feature

<222> (4) .. (4)
<223> 脱氧核糖尿嘧啶
<220>
<221> misc_feature
<222> (7) .. (7)
<223> 脱氧核糖尿嘧啶
<220>
<221> misc_feature
<222> (13) .. (13)
<223> 脱氧核糖尿嘧啶
<220>
<221> misc_feature
<222> (15) .. (16)
<223> 脱氧核糖尿嘧啶
<220>
<221> misc_feature
<222> (19) .. (19)
<223> 脱氧核糖尿嘧啶
<400> 11
gaangangac ccncnngcna 20
<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 12
cgtggaacta tctagcggtg ta 22
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 13
acccgattgc agtacgattc 20

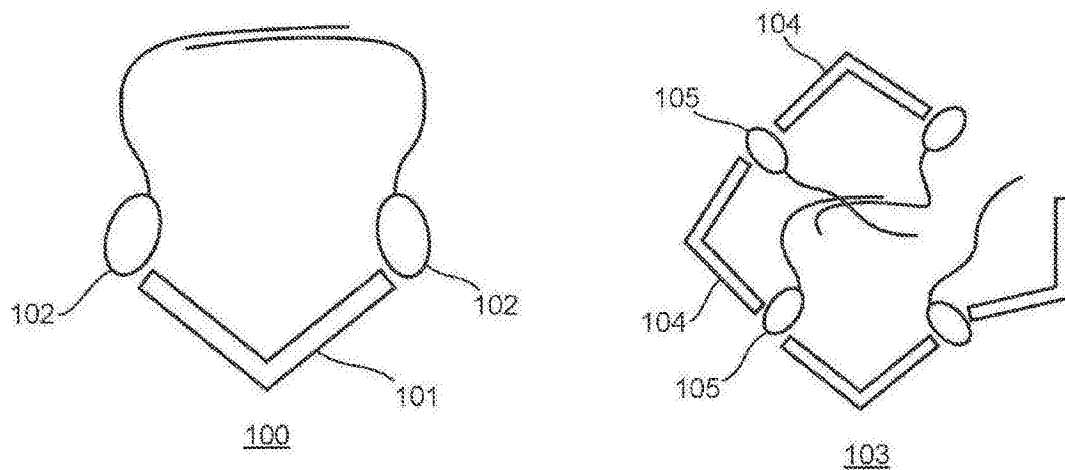


图1

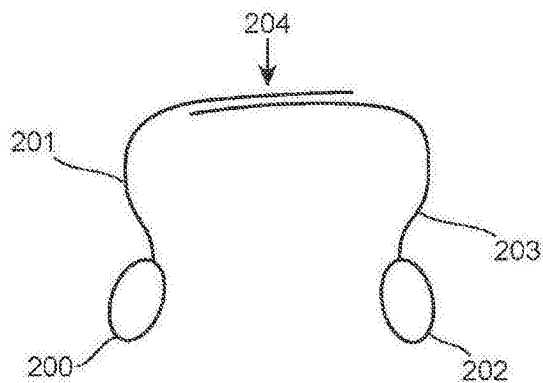


图2

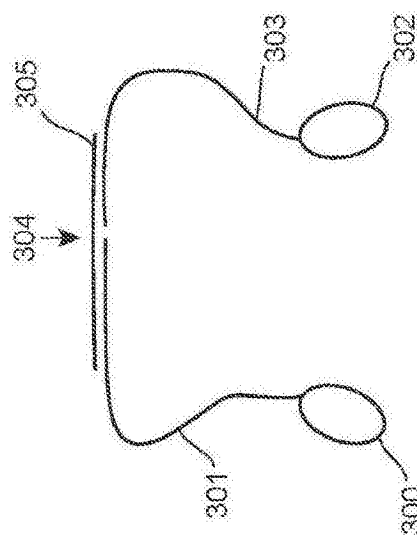


图3

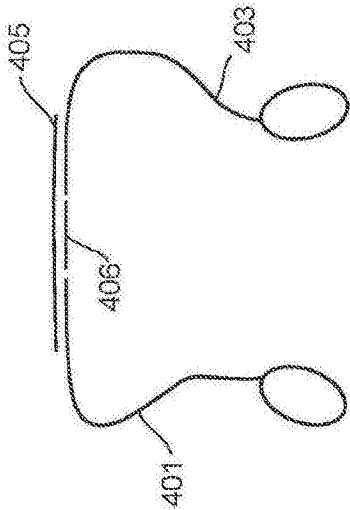


图4

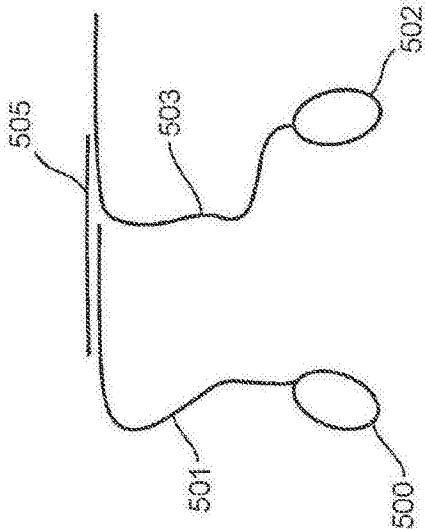


图5

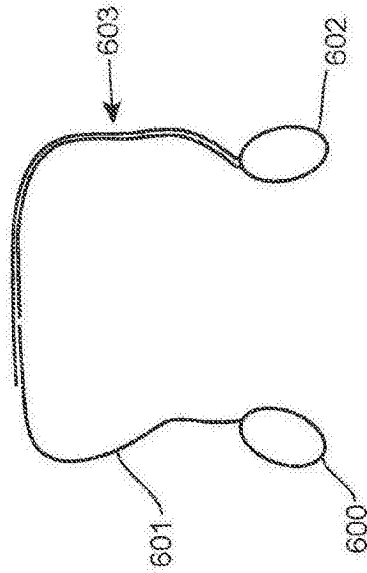


图6

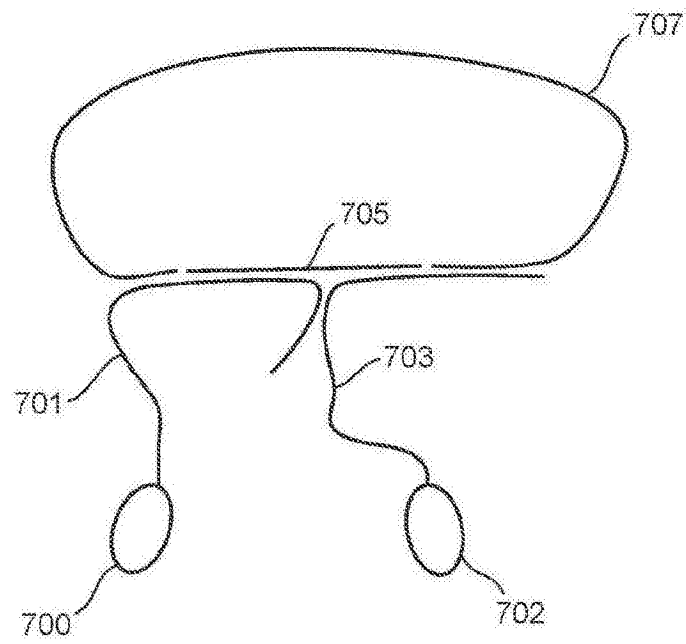


图7

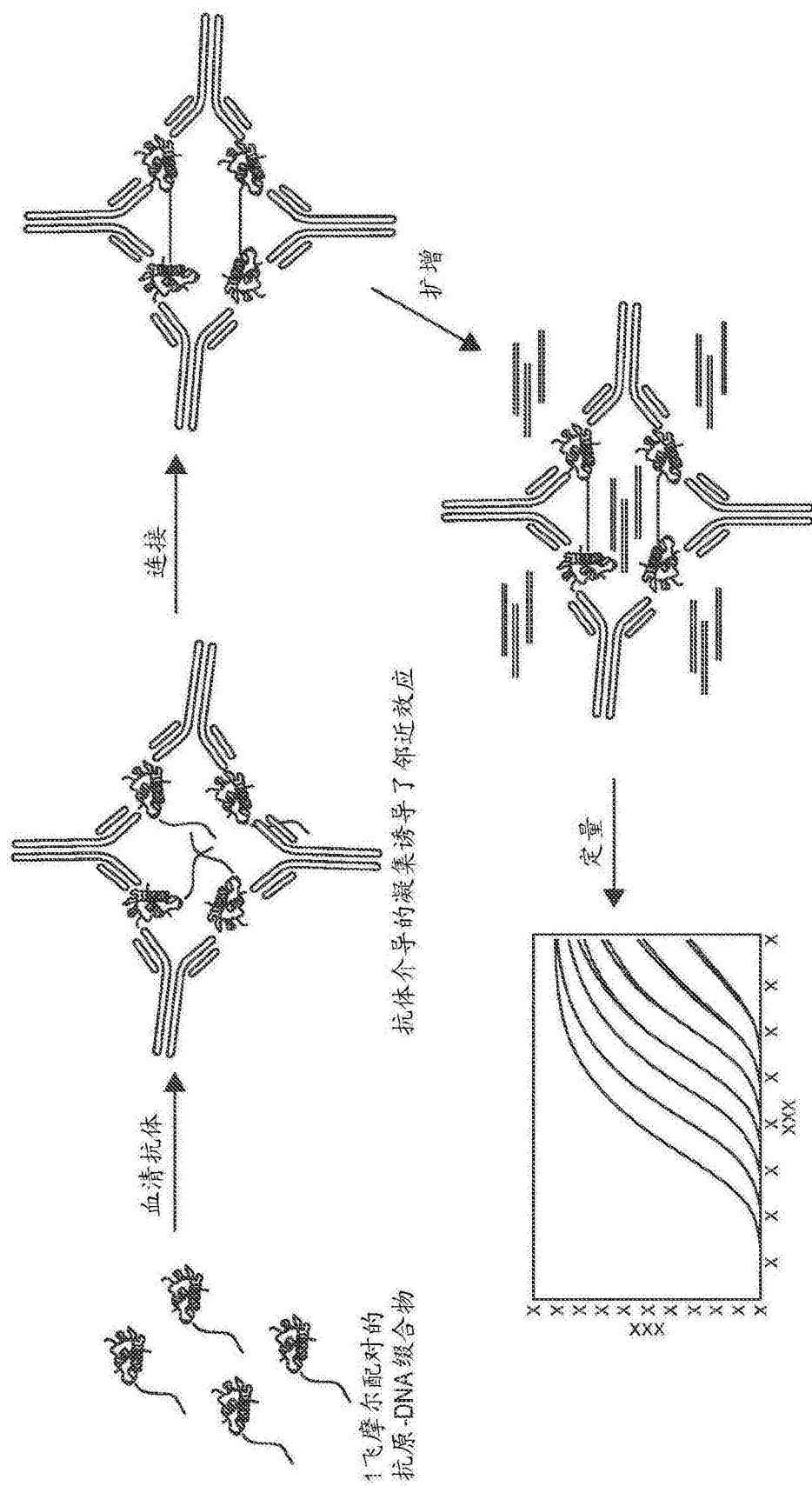


图8

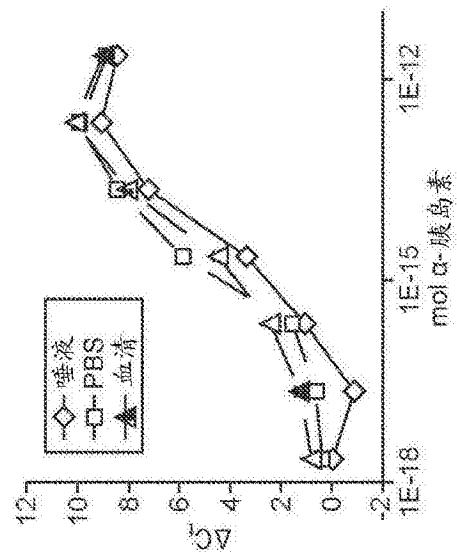


图9A

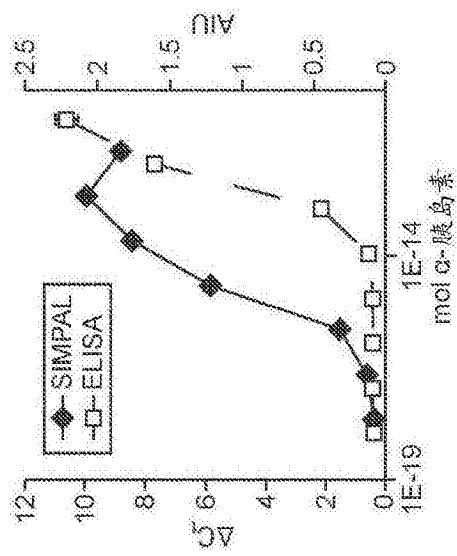


图9B

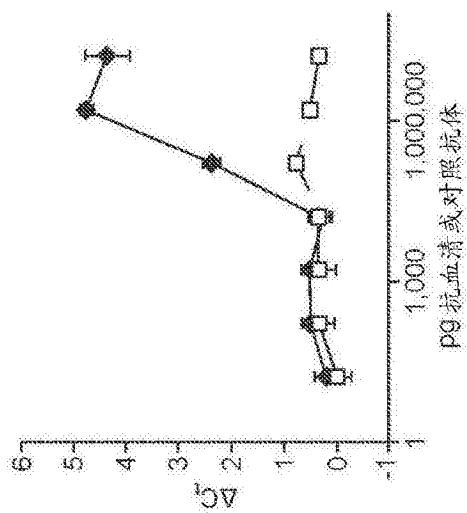


图9C

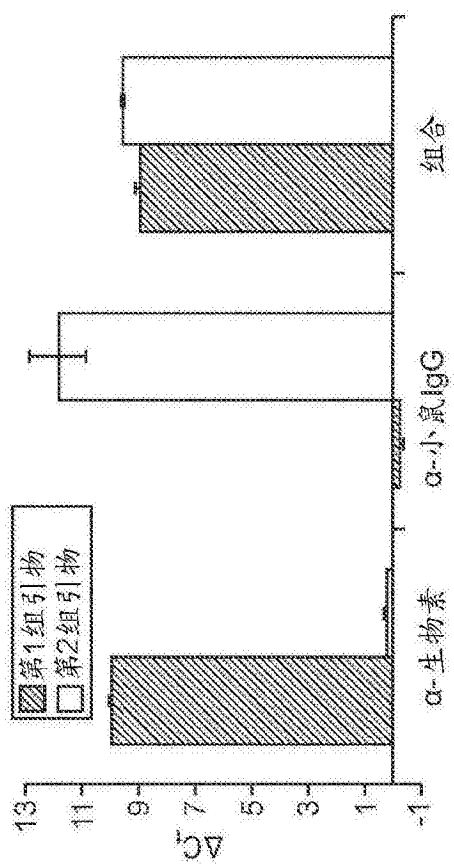


图9D

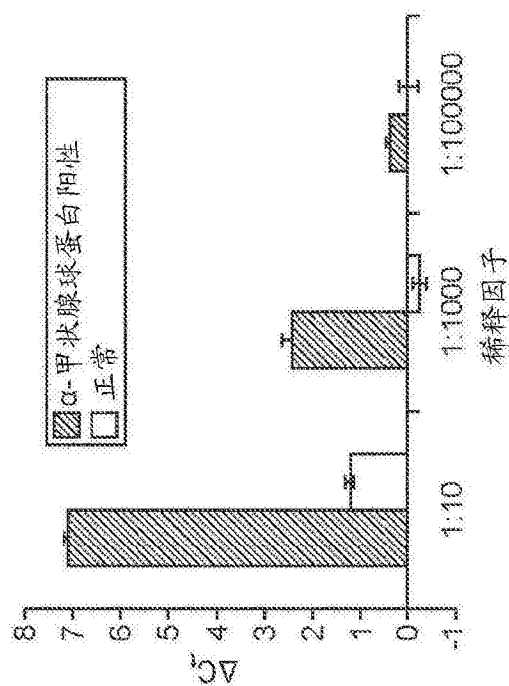


图9E

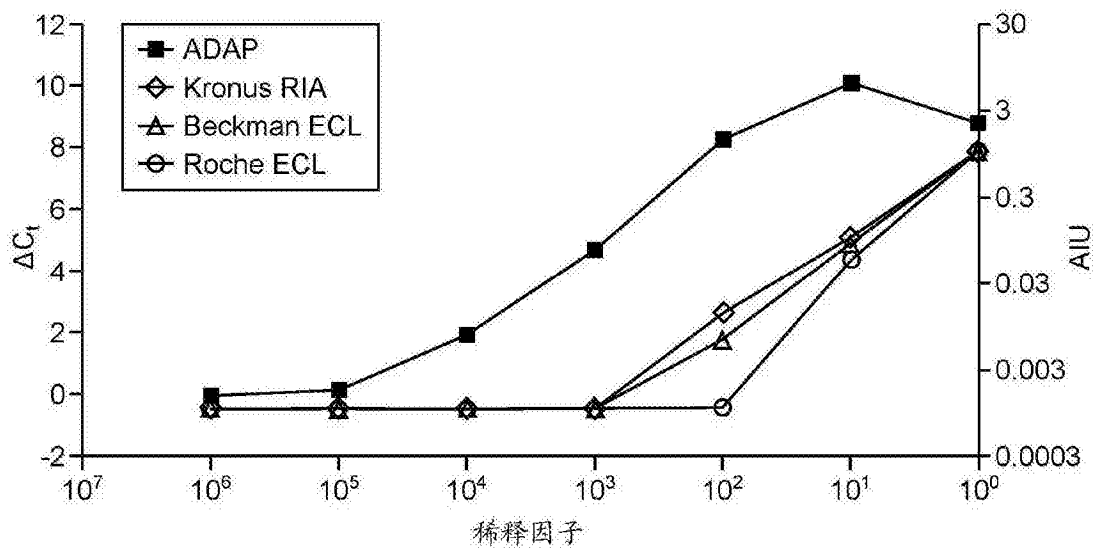


图9F

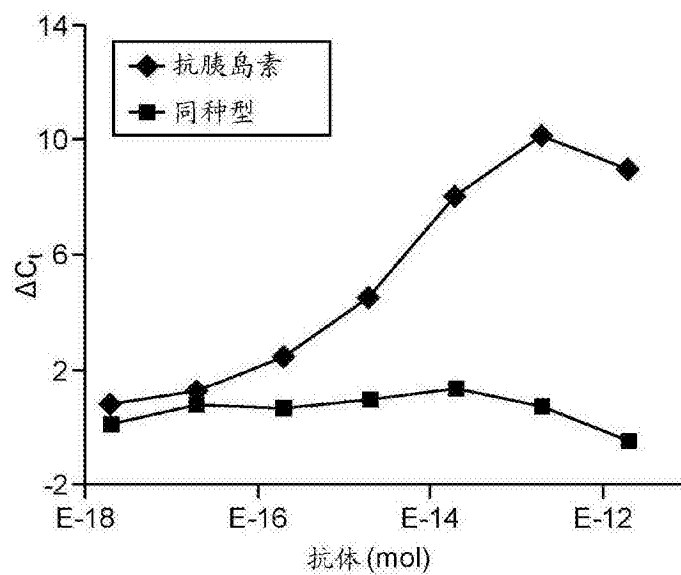


图9G

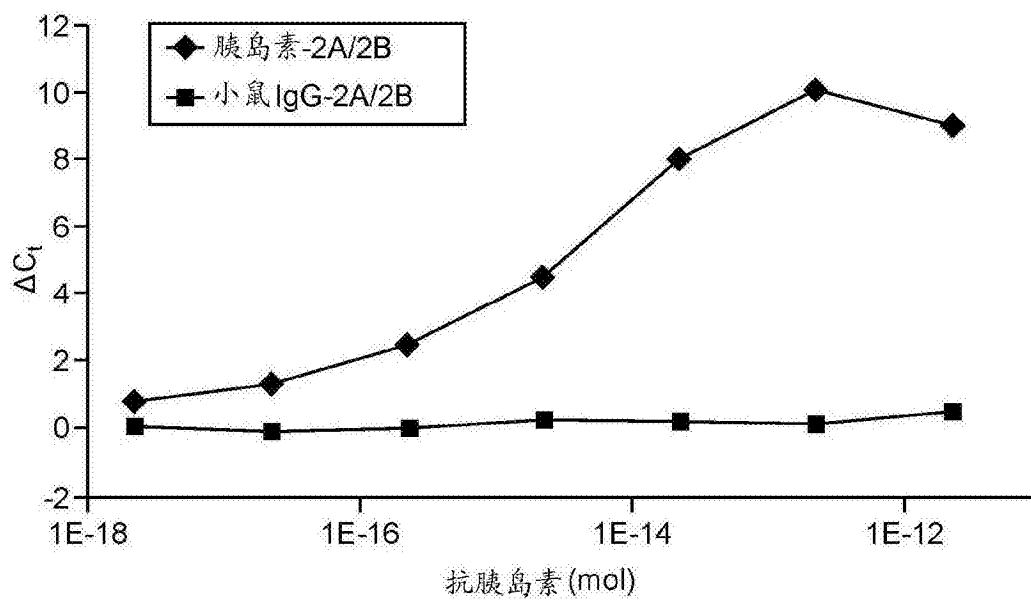


图9H

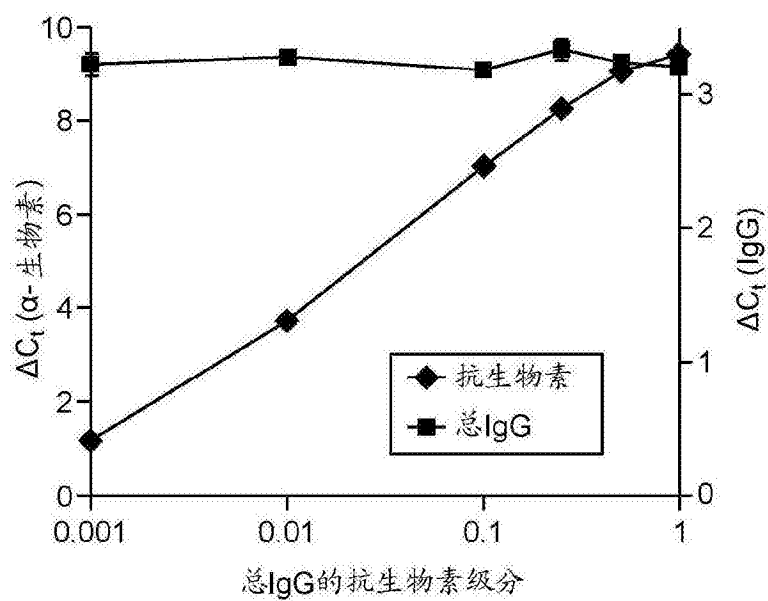


图9I

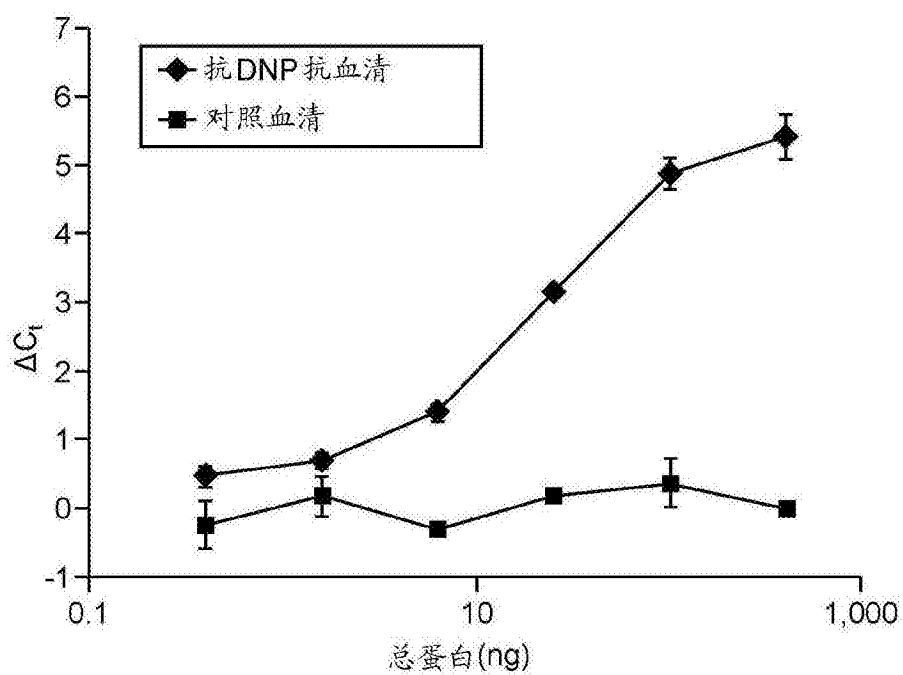


图9J

抗体	序列	稀释剂	检测限	
			ng/ml	阿摩尔
生物素	4	缓冲液	0.89 ± 0.39	12 ± 5
生物素	4	血清	3.7 ± 2	49 ± 27
生物素	1	缓冲液	0.072 ± 0.008	0.96 ± 0.11
小鼠 IgG	4	缓冲液	1.9 ± 0.6	25 ± 8
小鼠 IgG	4	血清	2.3 ± 0.3	31 ± 4
小鼠 IgG	2	缓冲液	0.096 ± 0.023	1.3 ± 0.3
小鼠 IgG	2	血清	0.060 ± 0.008	0.8 ± 0.1
GFP pAb	4	缓冲液	2.0 ± 1.1	27 ± 15
GFP pAb	4	血清	1.7 ± 0.6	23 ± 8
GFP mAb	4	Bugger	0.16 ± 0.05	2.1 ± 0.7
GFP mAb	4	细胞培养基	0.12 ± 0.05	1.6 ± 0.7
胰岛素	2	缓冲液	0.39 ± 0.48	4.3 ± 5.3
胰岛素	ELISA	缓冲液	6.7 ± 1.9	3722 ± 1056
胰岛素	2	血清	0.015 ± 0.004	0.17 ± 0.04
胰岛素	2	唾液	11 ± 3	122 ± 33
DNP	4	抗血清	9400 ± 2100	N/A

图10

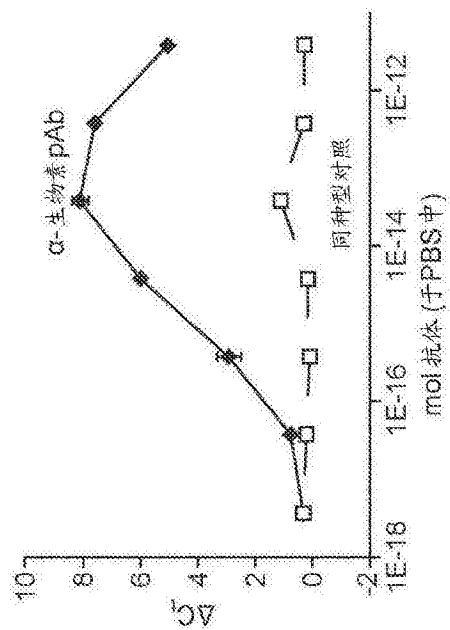


图11A

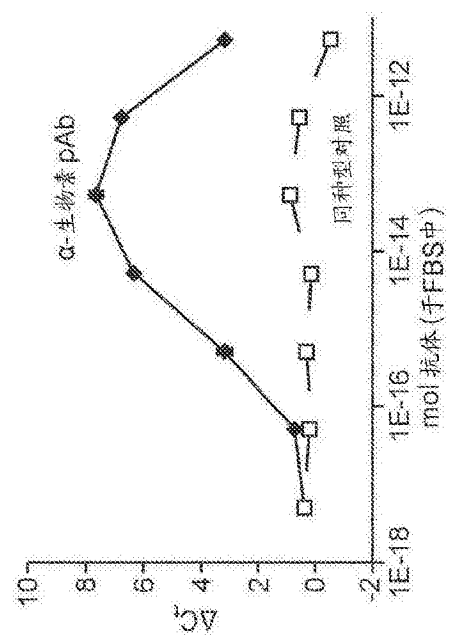


图11B

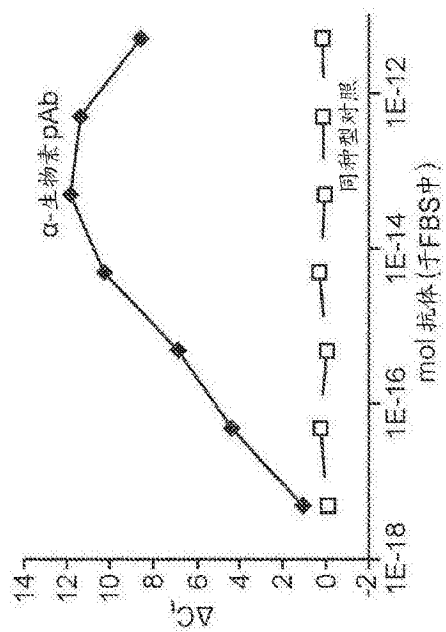


图11C

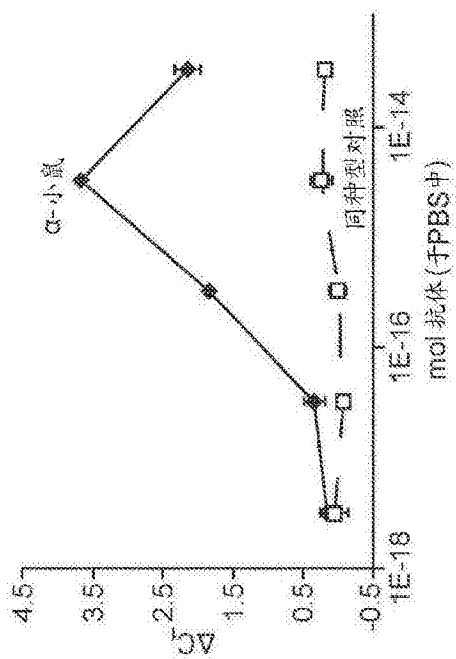


图12A

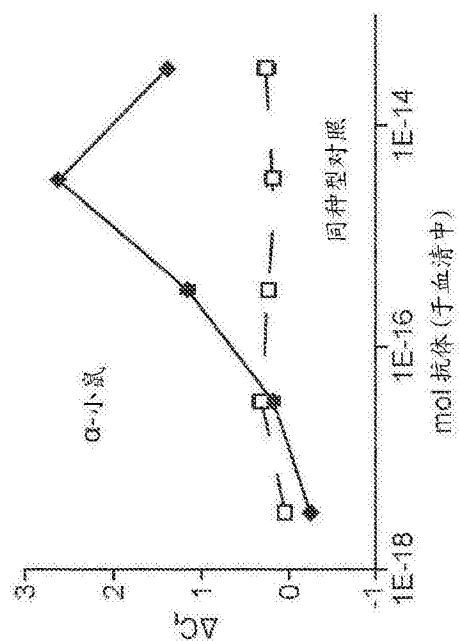


图12B

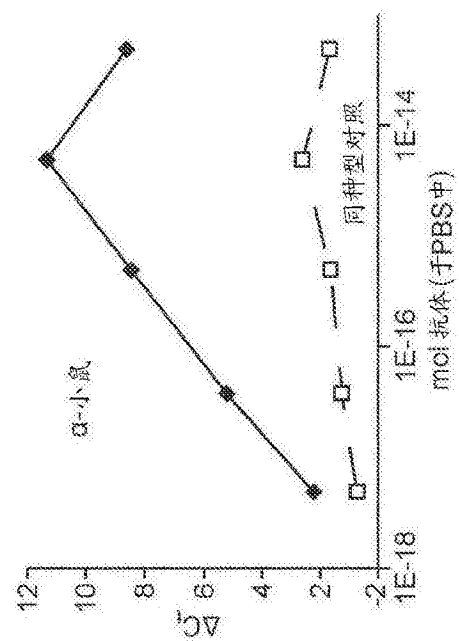


图12C

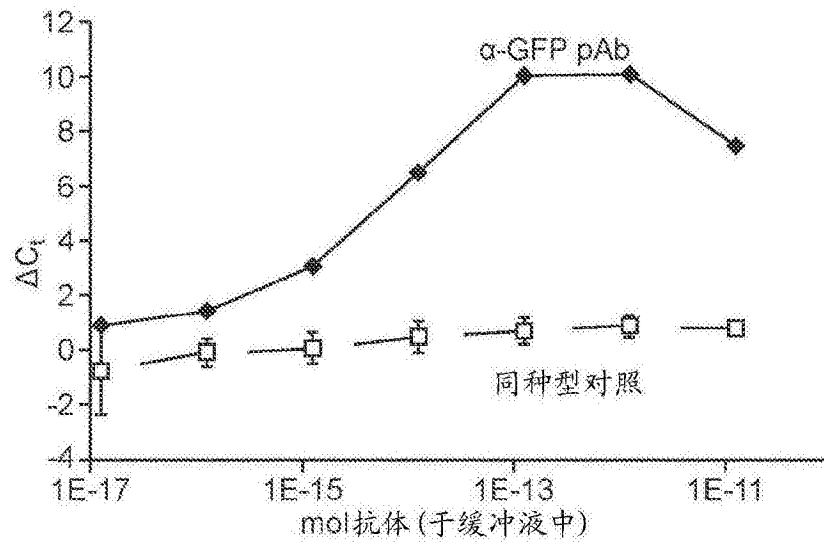


图13

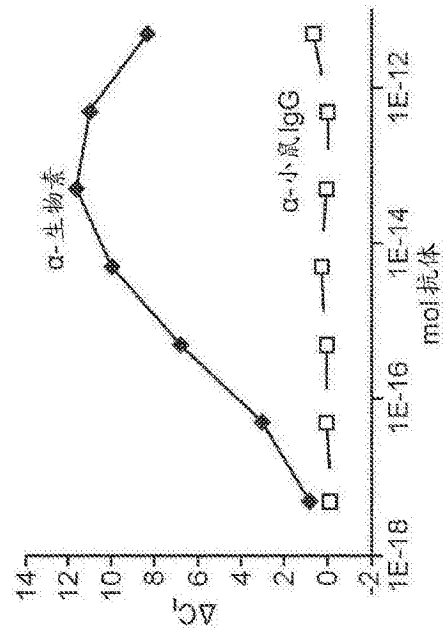


图14A

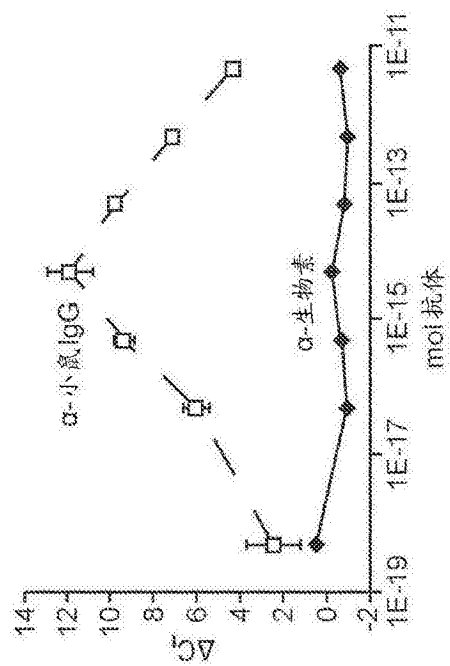


图14B

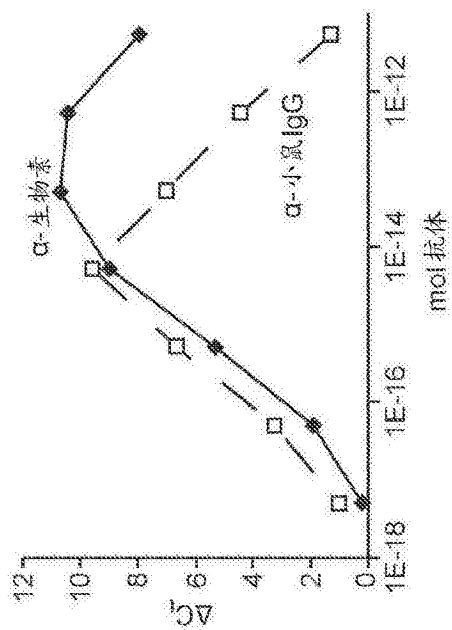


图14C

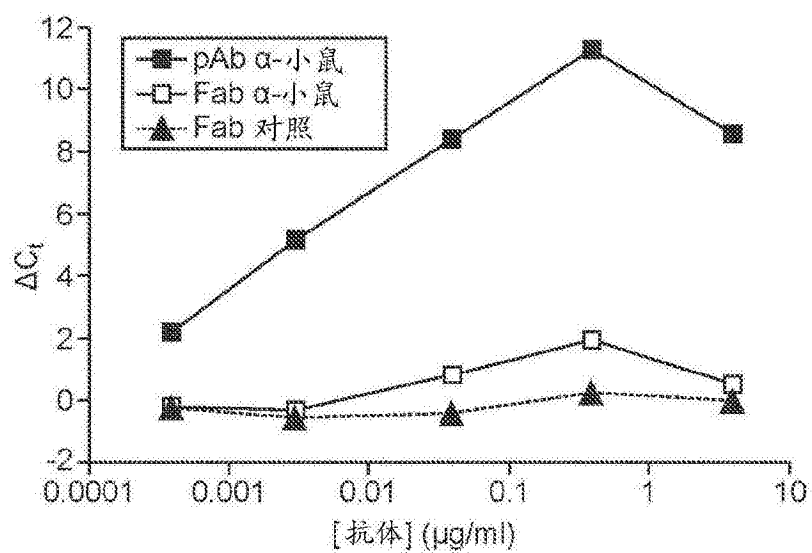


图15

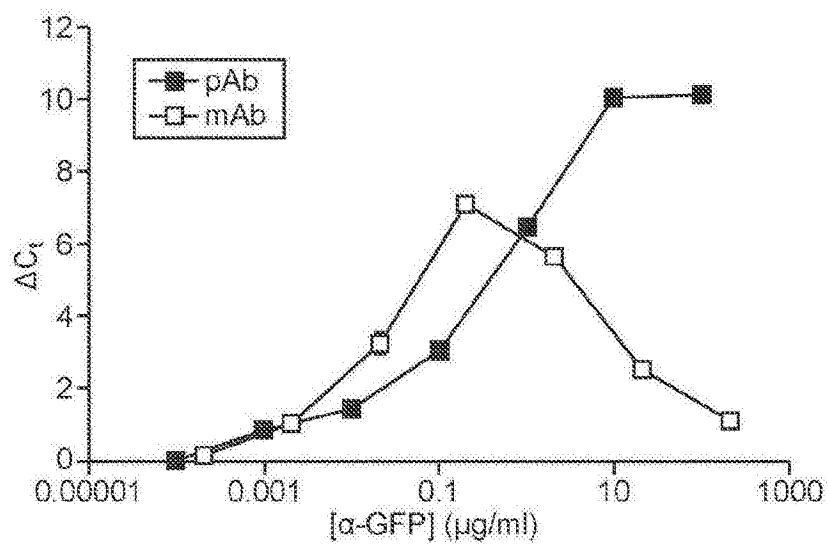


图16

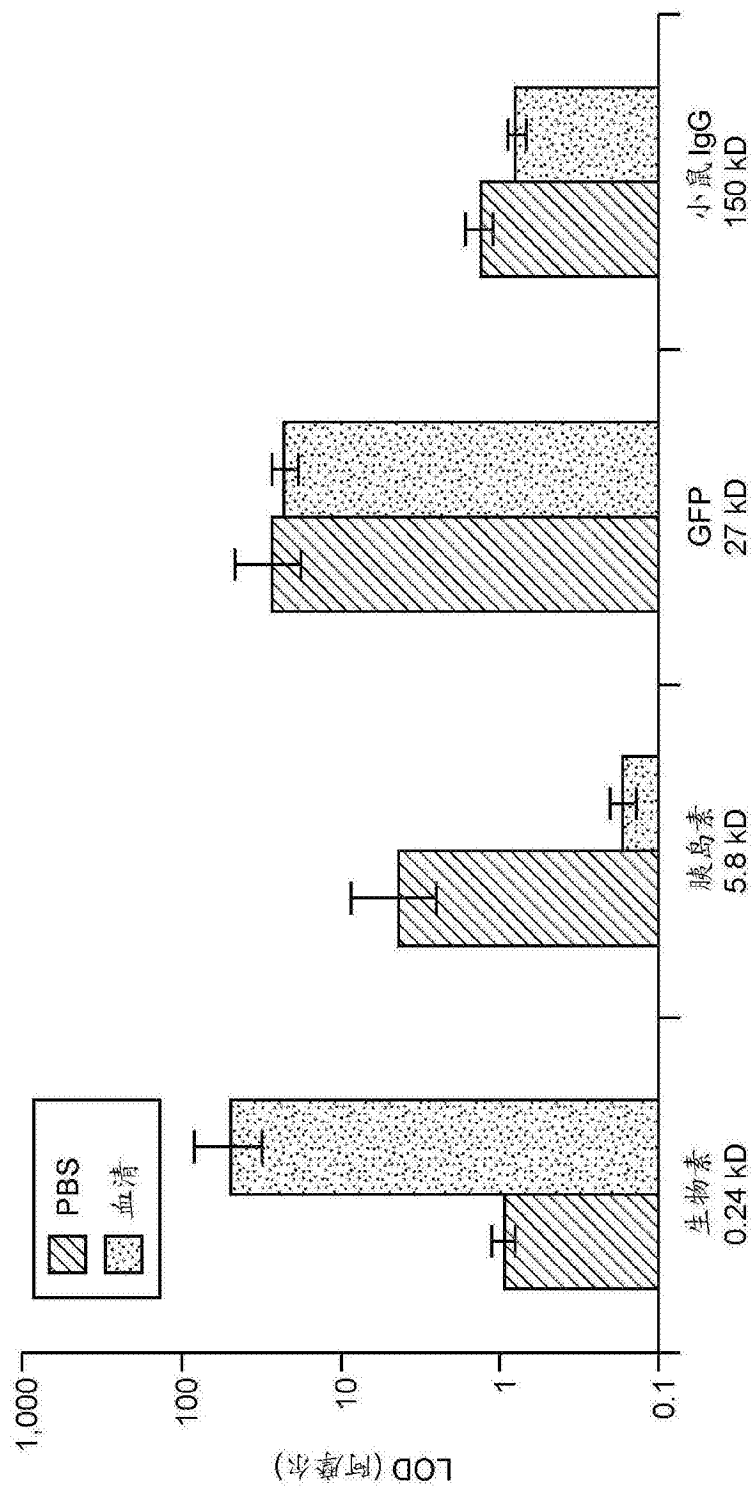


图17

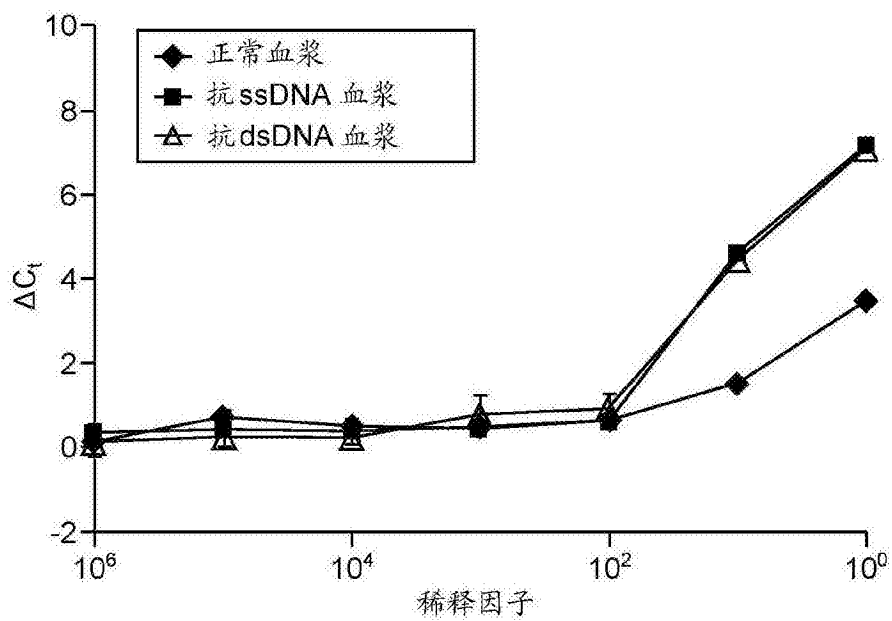


图18A

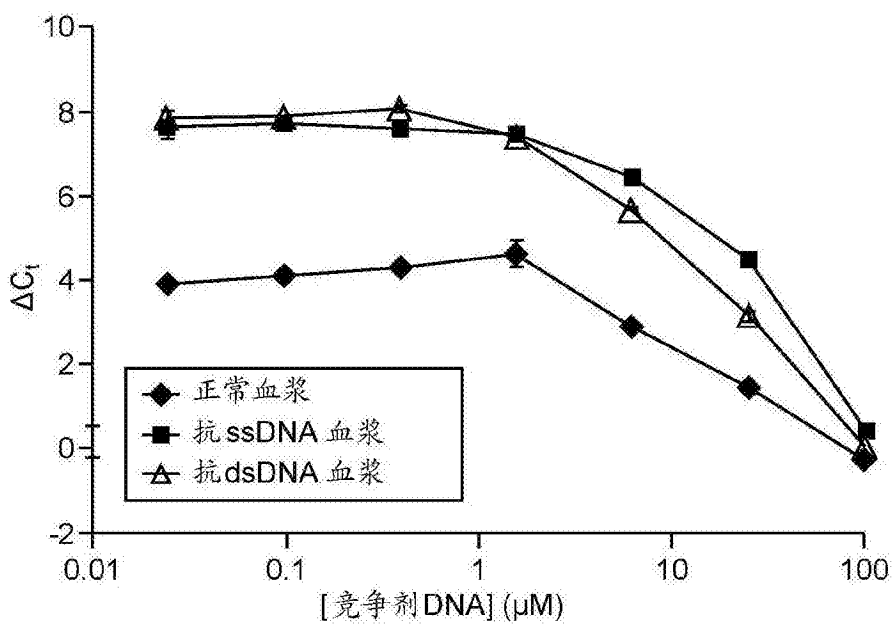


图18B

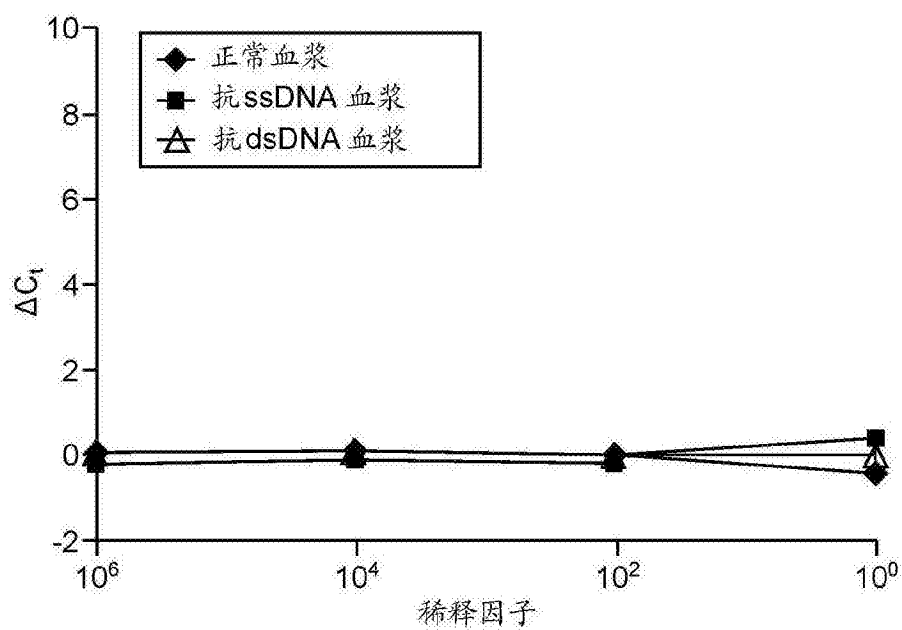


图18C

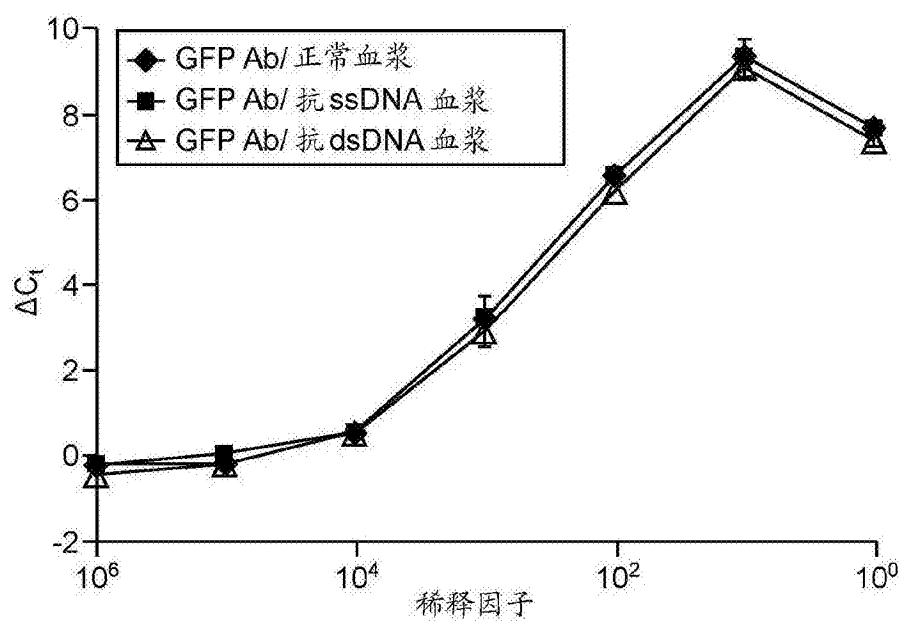


图18D

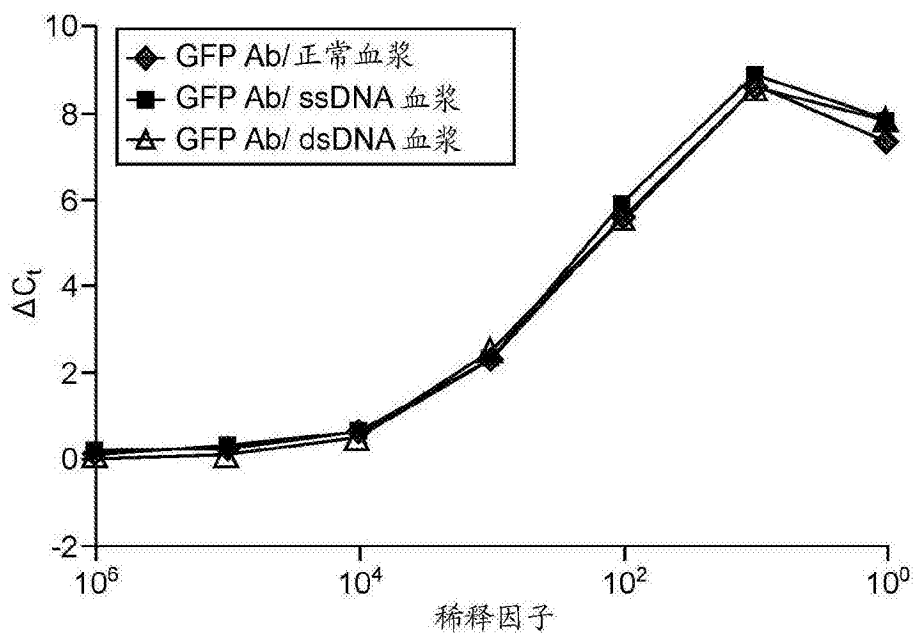


图19

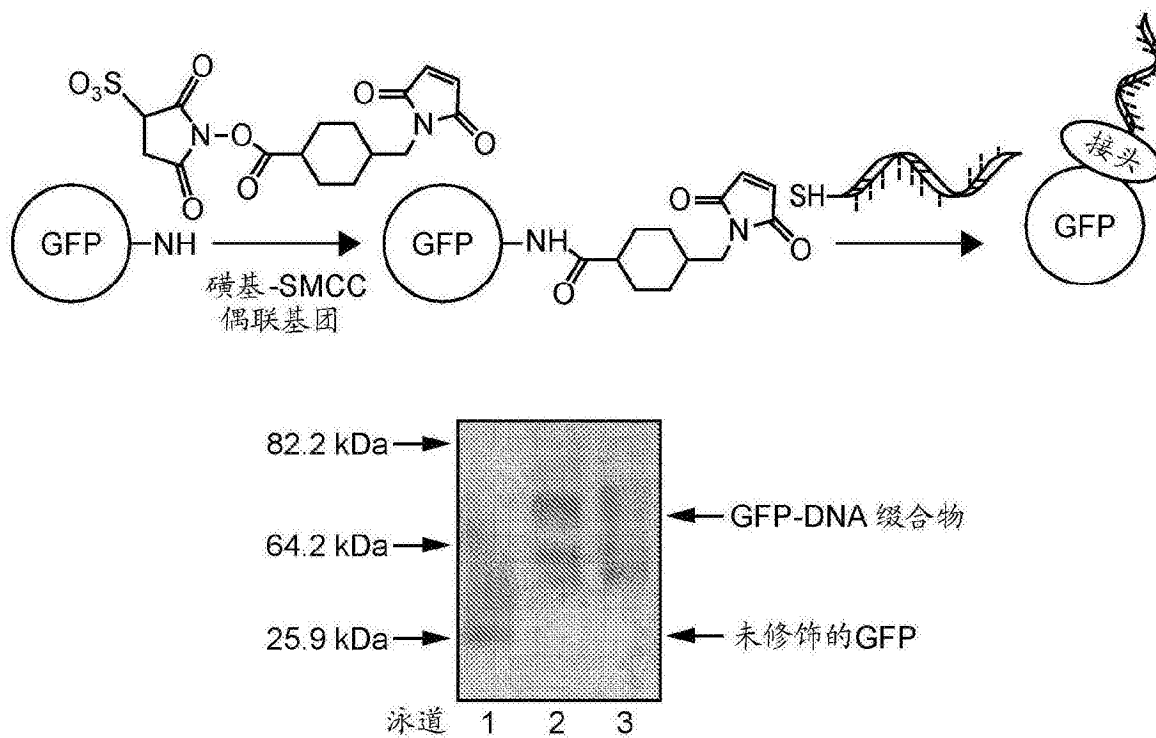


图20

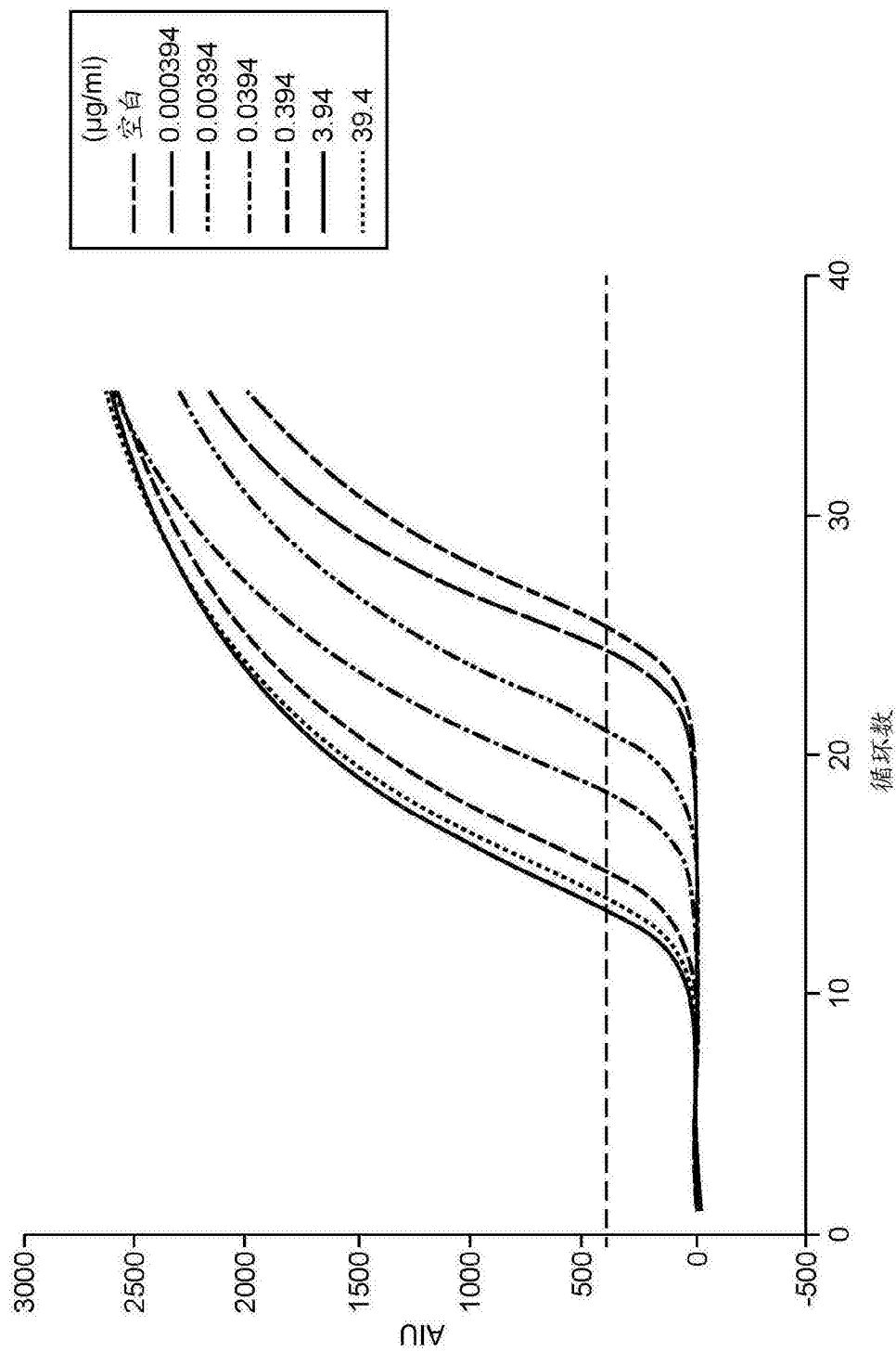


图21

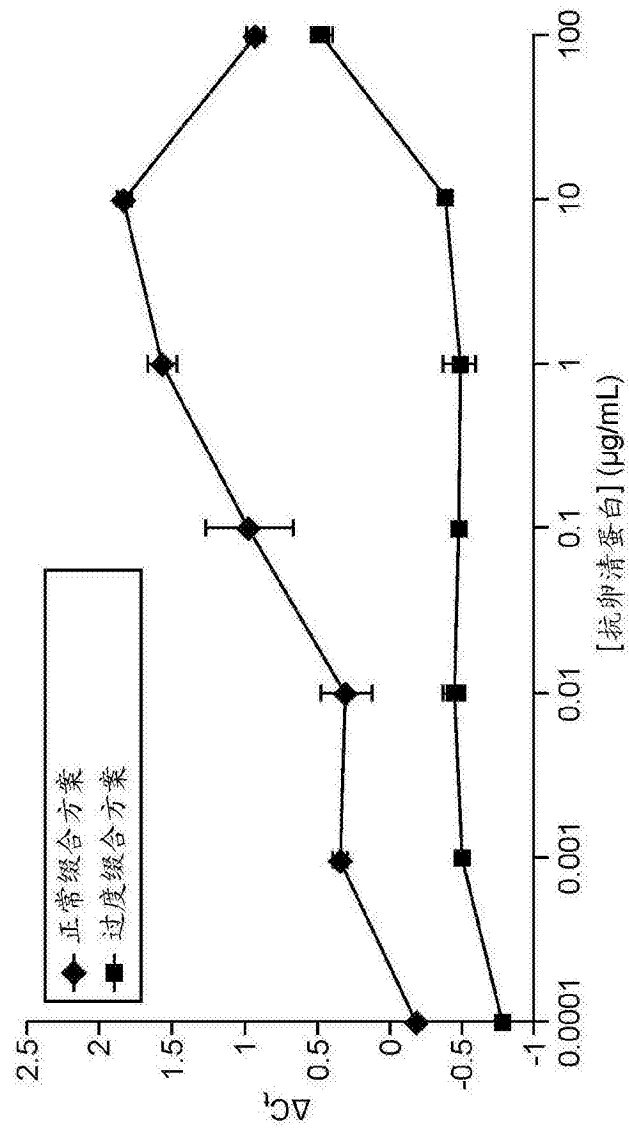


图22

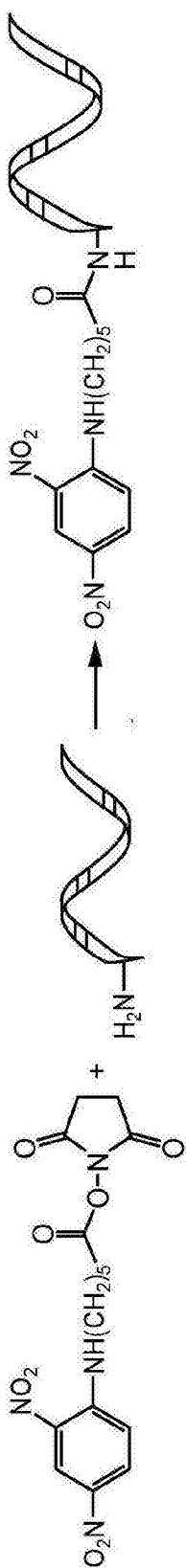


图23

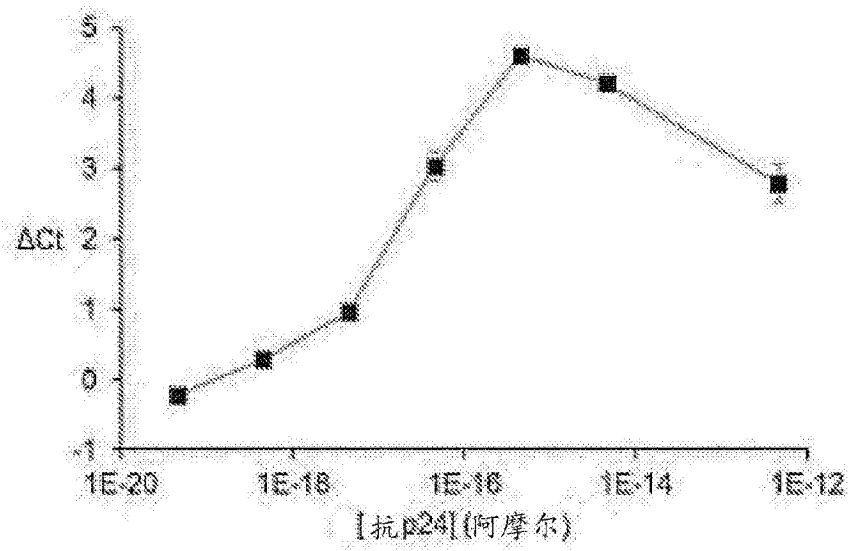


图24A

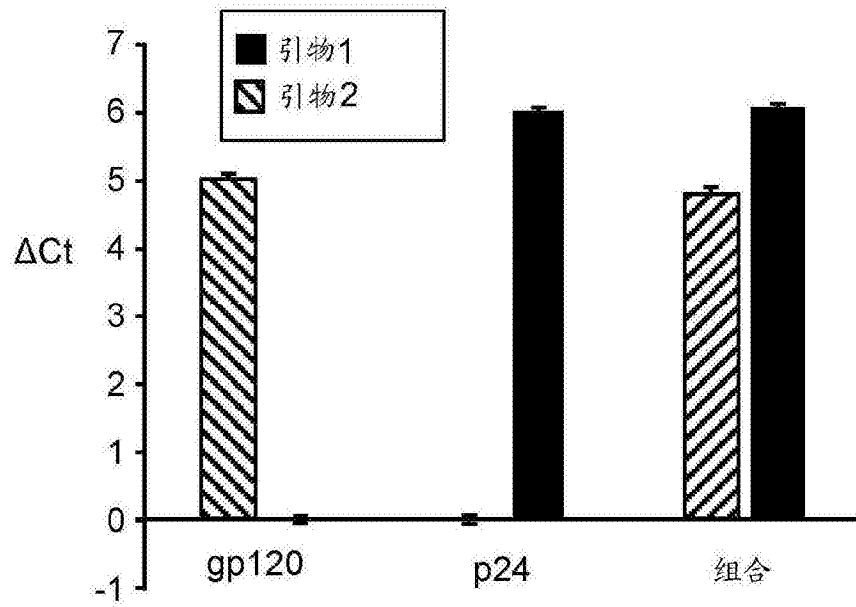


图24B

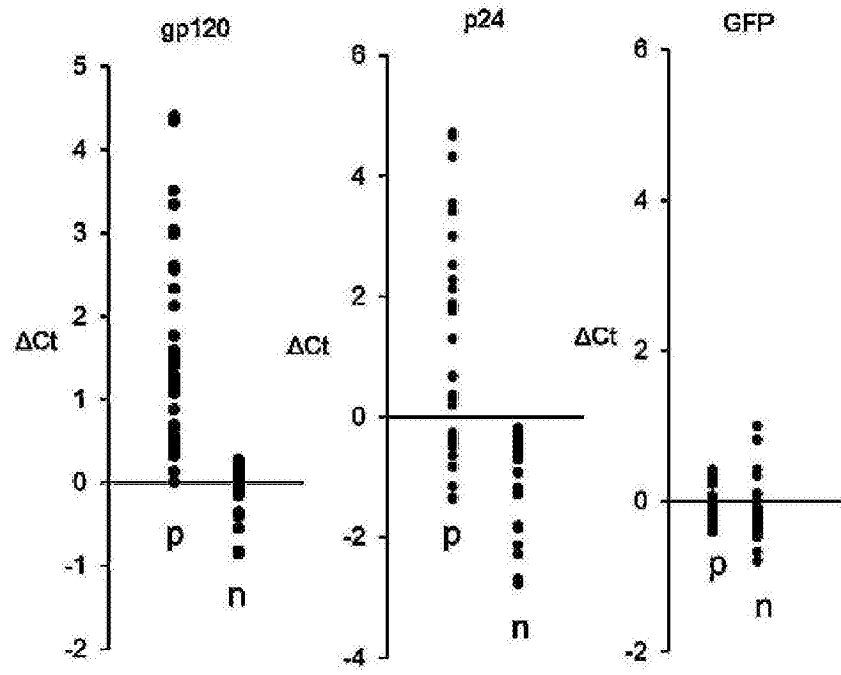


图25

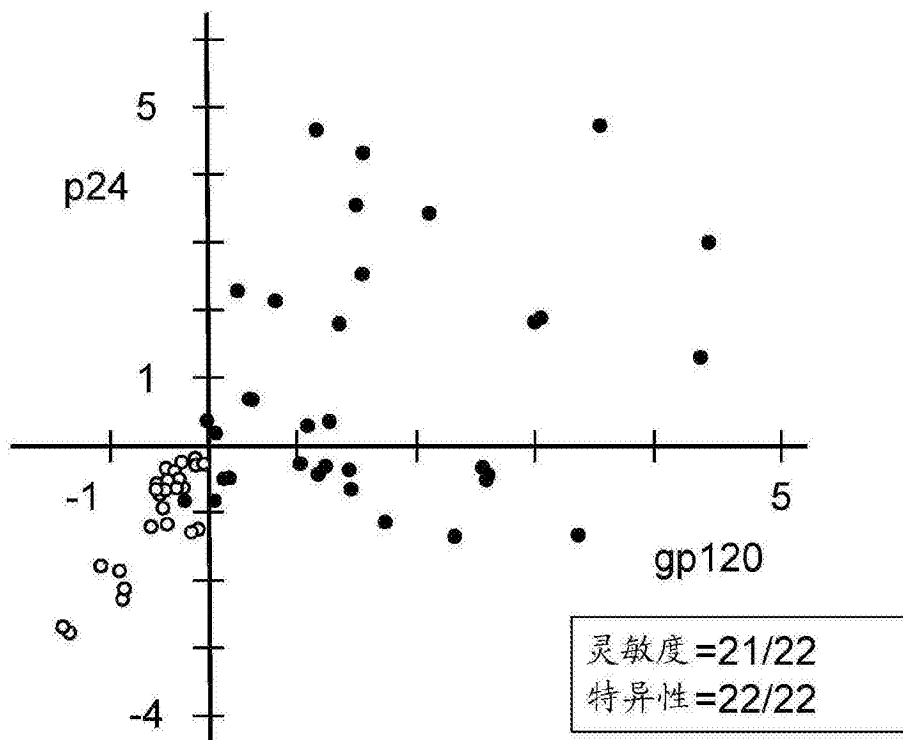


图26