





所引用双字母代码及其它缩写符号，请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

---

(57) 摘要：

本发明涉及一种用单一捕获剂定量检测特异性分析物的方法及其试剂盒。用单一捕获剂定量检测特异性分析物的方法是：先使待测分析物与固相捕获剂结合，再将被捕获剂捕获的分析物用报道分子标记；之后将经过标记的分析物从复合物上洗脱下来，与新的固相捕获剂再结合，通过检测报道分子的标记信号来确定分析物含量。用于本发明方法的试剂盒，包括捕获装置、检测装置，以及用于标记的报道分子和分析物洗脱液。本发明的有益效果是只需一种捕获剂，能够检测许多目前无法检测的分析物，应用范围广、灵敏度高、检测噪音低，在疾病诊断、医学鉴定、新药研制、蛋白质微阵和芯片应用和基础研究等领域有很好的应用前景。

## 用单一捕获剂定量检测特异性分析物的方法及其试剂盒

### 技术领域

本发明属于生物工程技术领域，具体地说涉及一种用单一捕获剂定量检测特异性分析物的方法及其试剂盒。

### 背景技术

检测生物（包括人类）组织样本中特定蛋白质因子的含量，对于医学、生物学、农业等领域的应用和基础研究具有非常重要的意义。例如，检测病原微生物的特异性蛋白质组分是目前诊断传染病的重要手段；同样，测定癌症的早期生物标记性蛋白质因子含量的变化对于疾病的早发现早治疗和疗效观察极为重要。根据不同的应用目标，待测分析物可以是一种或几种蛋白质，也可以是数目不等的一组蛋白质，而近年来基因组学和蛋白质组学研究和应用的飞速发展，更要求能够同时多重性检测生物组织样本中几百几千种蛋白质乃至整个蛋白质组。

为满足这些要求，近年来各种检测方法应运而生，例如免疫检测技术、双向凝胶电泳、质谱分析和肽图谱分析等等。其中最方便、应用范围最广也是目前使用最多的是免疫技术中的酶联免疫吸附检测（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay，简称 ELISA）。经典的酶联免疫检测采用能够和同一种抗原的不同抗原决定簇结合的两种不同但是互相配合的抗体来完成，一种抗体和抗原的结合不干扰另一种抗体和同一抗原分子的结合。这种方法称为夹心酶联免疫吸附检测（Sandwich ELISA），其技术要点是：（1）将捕获抗体（capture antibody）包被在某一固相表面上（通常是微量板的微孔内部表面）；（2）加入生物样本或其它待测样本，使其中含有的分析物（抗原）与捕获抗体特异性结合，然后洗除未结合的非特异性物质；（3）加入标有报告分子（酶、生物素、荧光素等荧光基团或其他类型分子）的探测抗体（detection antibody），使

之与被捕获的分析物特异性结合，然后洗除未结合的探测抗体；（4）加入使报道分子产生信号的相关试剂（例如亲和素、酶的底物），然后测定信号强度，或者直接测定报道分子（例如荧光强度等）。根据信号的强度，参照分析物的已知浓度标准校准曲线，从而确定样本中分析物的浓度。虽然 Sandwich ELISA 特异性比较高，灵敏度也比较高，通常可达 0.5-2 ng/ml。但是该方法的应用有三个重要局限性。第一，如果要建立检测一种分析物的 Sandwich ELISA 检测方法，首先必须拥有针对该分析物的两种不同抗体（捕获抗体和探测抗体），而且要求这两种抗体对该抗原都拥有高度亲合力，同时它们之间必须互相配合，即捕获抗体和抗原蛋白质的结合不影响探测抗体对同一抗原分子的结合。这些要求在很大程度上限制了 Sandwich ELISA 的应用，这是因为，一种蛋白质被鉴定提纯后，在实际工作中往往要经过很多努力、很长时间才能获得上述能够互相配合的一对抗体。而对于那些分子量较小或者只有 1-2 个抗原决定簇的蛋白质（或蛋白质结构域），在实验中就更难获得两个互相配合的抗体。第二，Sandwich ELISA 方法通常要求在每种探测抗体上都用人工方法标记酶或其他信号分子。如果同时定量检测成百上千甚至上万种蛋白质，就要把每一种蛋白质的探测抗体都进行标记，这一工作量十分巨大，而且会因为人工标记条件和效率的不同而造成不同批量探测抗体之间的差异。此外，标记过程的化学修饰可能影响到探测抗体对抗原的结合。第三，在多重性检测多种蛋白质时，必须把所有蛋白质相对应的探测抗体都混合到一起，由此造成每个单一抗体的稀释和非特异性结合的增加，降低特异性信号和灵敏度，扩大检测噪音。这些局限性使 Sandwich ELISA 方法的应用受到很大限制，尤其是很难成为蛋白质组学（蛋白质芯片技术）研究应用的主要技术平台。

为了克服 Sandwich ELISA 的上述局限，人们提出并实验了若干种改进方法，例如，将生物样本中的所有抗原预先用荧光化合物等报道分子进行直接标记（Miller 等，2003. *Proteomics*. 3: 56-63）。然后与固定

在固相载体上的检测抗体结合，洗除非特异性物质后，直接检测结合在固相抗体上的被标记的抗原。这个方法虽然简单易行，只需要一种抗体（捕获抗体）就能够进行检测。但缺点是，第一，生物样本中含有成千上万种大小分子，其中很多会干扰标记效率，含量低的蛋白质往往难以有效地被标记。第二，标记过程本身可能修饰改变蛋白质分子上的抗原决定簇特征，降低甚至抑制与抗体的结合。实验结果已经证明，抗原预先标记检测方法通常本底噪音大，灵敏度低。为了提高检测灵敏度，最近还提出了在 Sandwich ELISA 方法中以 DNA 寡聚核苷酸来标记探测抗体，然后用聚合酶链反应（PCR）或滚环复制（rolling circle replication）方法扩增信号，这些方法虽然可以较大程度上提高检测灵敏度，但是检测手段过于繁琐、成本太高，而且上述 Sandwich ELISA 方法的几个局限性依然存在。

## 发明内容

为了克服现有免疫检测方法的不足，本发明公开了一种新的检测方法，只需采用一种捕获剂就能灵敏地、简便地定量检测分析物。这一方法称为“特异性分析物标记及再捕获法”，英文名称是“Specific Analyte Labeling and Recapture Assay”，简称 SALRA。其原理是将被捕获剂捕获的分析物用报道分子标记；再将经过标记的分析物从复合物上洗脱下来，与新的固相捕获剂再结合，通过检测报道分子的标记信号来确定分析物含量。SALRA 方法适用于各类基于固相方法的检测平台，例如微孔板、滤膜、蛋白质（抗体）芯片、微珠（beads），等等。SALRA 方法既可以用来检测一种或几种抗原，也可以用于多重性同时检测几十种几百种乃至成千上万种不同蛋白质；既可以检测抗体与抗原蛋白质的结合，也可以检测非免疫性的蛋白质-蛋白质结合或者蛋白质与其他类型分子的结合。同时，SALRA 方法还能被用来快速分离鉴定产生单克隆抗体的杂交瘤株系。本发明还提供了一种用于用单一捕获剂定量检测特异性分析物的方

法的试剂盒。

本发明用单一捕获剂定量检测特异性分析物的方法，其特征在于：

(1) 捕获分析物：将捕获剂包被到固相表面，成为捕获装置；加入待测生物样本，使捕获装置上的捕获剂与样本中的特异性分析物结合，形成捕获剂-分析物复合物；

(2) 标记复合物：用报道分子标记捕获剂-分析物复合物；

(3) 洗脱分析物：将经过标记的分析物从复合物上洗脱下来；

(4) 再捕获：将洗脱下的分析物中和及稀释后与检测装置上的捕获剂再结合，所说的检测装置是指包被了捕获剂的固相表面；

(5) 检测：洗去检测装置上未结合的非特异性物质后，通过检测报道分子的标记信号强度来确定分析物含量。

本发明方法中所说的捕获剂可以是抗体、抗体片段、非抗体类蛋白质、肽、寡聚核苷酸或小分子化合物，当捕获剂是抗体时，所说的抗体最好是单克隆抗体；本发明中所说的分析物是能与所说的捕获剂特异性结合的抗原蛋白质、抗体、其他蛋白质、肽、寡聚核苷酸适体、其他生物大分子及其复合物、小分子化合物、亚细胞结构，等等。

本发明方法中所说的报道分子，包括但不限于生物素、荧光素或其他荧光物质、酶、肽、寡聚核苷酸。

以下以抗体-抗原为例，来进一步说明用单一捕获剂定量检测特异性分析物的方法：

(1) 将捕获抗体（单克隆抗体）包被到固相表面，例如微量板、微孔表面、尼龙（或其它介质）滤膜表面、微珠表面，等等；该固相表面将用来捕获生物样本中的特异性抗原，称为“捕获装置”；根据检测系统、检测目标和样本特点的不同，捕获装置上包被的抗体或者是一种，或者是多种混合在一起（用于同时检测多种抗原）；包被完成后，洗去未结合的抗体分子，用过量的非特异性蛋白质（例如脱脂奶粉或牛血清蛋白）封阻固相表面上未结合的平面空间，然后再洗去非特异性蛋白质。

加入待测生物样本，使捕获装置上的抗体结合并“捕获”样本中的特异性抗原，形成紧密结合的抗体-抗原复合物；然后洗去未与抗体结合的非特异性蛋白质和其他组成成分。

(2) 用报道分子标记捕获剂-分析物复合物。例如加入能够共价标记修饰蛋白质侧链基团的小分子，这些小分子携带某种报道分子（生物素、荧光基团等），从而将报道分子连接到被结合到捕获装置抗体上的抗原蛋白质分子表面。例如，基于 N-羟基琥珀酰亚胺（N-hydroxysuccinimide, 简称 NHS）的化合物，包括 NHS-生物素、NHS-荧光素、NHS-肽或 NHS-寡聚核苷酸，能够将携带的报道分子（生物素、荧光素、肽、寡聚核苷酸等）共价结合在蛋白质的赖氨酸自由氨基上。以 NHS-生物素为例，由于赖氨酸几乎普遍存在于所有的蛋白质中，因此 NHS-生物素能够标记几乎的所有蛋白质。这里要着重指出的是，抗原和抗体的紧密结合使抗原分子上的特异性抗原决定簇受到保护而不被 NHS-生物素修饰，仍然保持对特异性抗体的结合能力。因此，在后续步骤中抗体-抗原复合物解离分开后，该抗原分子能够重新和同样的抗体结合形成新的复合物。除了生物素，根据检测系统和目标的不同也可以选用其他报道分子（信号基团），比如寡聚核苷酸或荧光基团（例如 NHS-荧光素），以荧光基团作为报道分子尤其适用于蛋白质芯片检测系统。除了 NHS，也可以用能够共价修饰蛋白质其它基团（如巯基、羧基或羟基）的活性小分子进行标记。

(3) 用含有过量自由氨基的溶液（例如 Tris-HCl 缓冲液）淬灭并除去未与蛋白质共价结合的游离 NHS-生物素。然后加入少量抗原洗脱液，让标记过的抗原蛋白质从抗体-抗原复合物上离解出来。可以采用 0.1 M 的柠檬酸（pH2.8）作为抗原洗脱液，或者使用目前市场上存在的抗原洗脱液（例如美国 PIERCE 公司的 ImmunoPure 洗脱液）。然后将含有抗原蛋白质的洗脱液移出，加入 3-10 倍体积的缓冲液（含有非特异性蛋白质如脱脂奶粉等）中和并稀释抗原洗脱液，以提高 pH 值，降低抗原洗脱液的

浓度，使之不再影响抗原蛋白质和同一抗体的再结合。

(4) 将中和的标记有报道分子的抗原加入到“检测装置”进行检测。根据检测系统和检测目标的不同，检测装置可以由微孔板、尼龙滤膜、微珠、玻璃或塑料薄片（蛋白质芯片）等固体表面承载。检测装置固相表面结合着和捕获装置上同样类型的抗体，并且已经经过非特异性蛋白质的封阻。然而，和捕获装置不同的是，检测装置上的抗体均单独存在，不混合在一起。如果捕获装置包被着的是混合在一起的多种抗体，这些抗体在检测装置上将被独立分开，互不混淆。如果检测装置的固相载体是微孔板，那么每个微孔只结合有一种抗体；如果检测装置的固相载体是蛋白质芯片，那么芯片上抗体成阵列分布，每种抗体在阵列中均占有独特的地理位置。检测装置上抗体的结合和封阻应该提前进行，当上述第“3”步骤完成，即捕获装置上被标记的抗原从抗体上洗脱下来并中和稀释后，能够立即转移至检测装置。

(5) 在检测装置上，已被标记的抗原与相应的特异性抗体重新结合（再捕获），洗去未结合的非特异蛋白质后，即可进行信号测定。比如，如果报道分子是生物素，可以加入标记有某种酶（通常为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）的亲合素蛋白，亲合素蛋白和生物素具有极强的亲和力，从而把所携带的酶固定在被再捕获的抗原分子表面。洗掉未结合的亲合素蛋白后，加入该酶的底物，使之产生颜色、荧光或发光，即可鉴定酶的活性。如果报道分子是荧光基因，则可以直接测读或扫描荧光强度。通过这些信号，能够计算出生物样本中该特异性抗原蛋白质的含量。

本发明的贡献在于，提供了一种只需要单一捕获剂就能定量检测特异性分析物的新流程如图 1 所示，而在本方法各步骤中涉及到的具体操作技术，如包被捕获剂的技术、捕获剂和分析物结合的技术、显示并测定报道分子信号强度的技术等，是本领域普通技术人员所熟知的。

一种用于本发明方法的试剂盒，其特征在于，包括捕获装置、检测装置，以及用于标记的报道分子和分析物洗脱液。

很显然，本发明公开的用单一捕获剂定量检测特异性分析物的方法，能应用在临床诊断、生物标记鉴定分析、蛋白质组学研究分析、新药靶位鉴定分析、临床药物动力学和药效学分析等领域。

和现有的酶联免疫检测相比，本发明所提出的 SALRA 检测方法有如下优点：

(1) SALRA 方法只需使用一种捕获剂就能定量检测分析物，也就是说只要一种抗体就能检测一种抗原蛋白质，显而易见，获得一个单克隆抗体比获得两个互相配对的单克隆抗体要容易的多。因此，对于那些目前还没有 Sandwich ELISA 检测方法的蛋白质，SALRA 能够迅速建立起检测方法。而且，SALRA 方法能够检测只拥有一个或几个相邻很近抗原决定簇的蛋白质分子或分子结构域，比如蛋白质的磷酸化状态、蛋白质的重要功能域及其活化状态、小肽、特异性寡聚核苷酸序列、有机化合物小分子，等等。因此，SALRA 的适用范围非常广泛，将有力促进蛋白质组学研究应用、疾病诊断、新药研制、食品及农产品卫生检查和化合物残留检测、环境保护等等各个领域的工作。

(2) SALRA 方法不需要标记抗体。无论同时检测多少种蛋白质，只需要一种标记小分子即可。

(3) 检测特异性高、噪音低。SALRA 方法有两个步骤确保检测的特异性和降低检测噪音：第一，捕获装置只捕获样本中的特异性分析物。进行标记时，绝大多数非特异性物质已经被洗去，因此只有结合在捕获剂上的分析物才能得到标记，而不是标记样本中所有的物质。第二，在检测装置上抗体重新捕获被标记分析物的过程中，将进一步洗去非特异物质，使之无立足之地。

(4) 灵敏度高。SALRA 方法标记分析物的过程本身就是重要的信号放大步骤。例如用 NHS-生物素标记抗原时，由于大多数抗原蛋白质都含有几个、十几个甚至几十个赖氨酸，因此可以被标记上几个、十几个或几十个生物素分子，使总体检测信号和检测灵敏度相应提高。同时，上

述确保检测特异性的两个步骤也为提高检测灵敏度开辟了空间：由于检测噪音低，研究人员可以选用比较温和的清洗条件来增强抗体对特异性抗原的捕获能力，这对于亲和力比较低的抗体-抗原体系非常重要。此外，由于捕获装置和检测装置是分开的，可以把来自捕获装置的抗原适当浓缩后加入到检测装置，从而提高检测灵敏度。例如，可以采用面积比较大的或者表面粗糙的微孔作为捕获装置的载体，增加捕获固相的表面积，同时缩小检测装置的平面面积，以提高特异性抗原的浓度。

(5) SALRA 方法尤其适合同步多重性检测多种蛋白质。多重检测时，只需在捕获装置上包被多种捕获剂的混合液，而在检测装置上则将这些捕获剂一一单独分开，就能同时定量检测多种分析物。采用 SALRA 方法只需要少量生物样本就能检测多种蛋白质，尤其适合小量样本（例如组织活体检查样本）的多重性检测和蛋白质组学检测。

(6) SALRA 的原理和方法也适用于检测非抗体-抗原关系的蛋白质-蛋白质之间或者蛋白质和其它分子之间的互作和结合。这些互作和结合对于研究生命运动、诊断疾病进程，研制新药都非常重要。例如，为了鉴定生物样本中某个蛋白质因子的含量，可以将能够和该蛋白质结合的另一种蛋白质作为捕获剂包被在捕获装置的固相表面，采用 SALRA 的原理，加入待测样本，然后用小分子标记待测蛋白质因子，洗脱后加入到检测装置上和同一种作为捕获剂的蛋白质重新结合，即可对其定量检测。除了蛋白质，还可以用其他物质作为捕获剂，比如肽、核酸、多糖、脂类、甚至小分子等等，来检测与其特异性结合的各类分析物，例如蛋白质、肽、核酸适体、小分子，等等。

## 附图说明

图1是本发明方法的流程示意图

图2是实施例1的检测结果图

图3是实施例2的检测结果图

## 具体实施方式

以下结合图 1 的步骤来进一步阐述本发明方法。

### 实施例 1: 单一性检测 (检测一种蛋白质)

在本实施例子中, 捕获装置和检测装置都是 96-孔微量板。捕获装置的每个微孔包被一种抗体, 用来检测一种抗原蛋白质。待测抗原蛋白质为四种细胞因子 (cytokines), 分别为 IL-1-beta、IL-4、IL-8 和 GM-CSF。其相应的抗体均为单克隆抗体。

#### (1) 捕获抗原蛋白质:

a. 包被捕获抗体: 取两个 96-孔微量板 (平底, 对蛋白质高度结合), 一个用于捕获样本中的抗原 (捕获装置), 另一个用于检测标记的抗原 (检测装置)。微孔内分别加入 100  $\mu$ l 浓度为 0.5  $\mu$ g/ml (稀释于 PBS 缓冲液) 的抗 IL-1-beta、IL-4、IL-8 或 GM-CSF 的单克隆抗体。每个微孔只加有一种抗体, 每个微量板上每种抗体加入 8 个微孔。将微量板置于 4 度过夜。

b. 封阻非特异性结合位点: 移去捕获装置和检测装置微孔中的抗体溶液, 用 PBS + 0.1% Tween 20 (PBST) 清洗 1 次。移去 PBST, 加入 400  $\mu$ l 的 2% 脱脂奶粉 (溶于 PBS), 在室温下进行封阻。捕获装置的封阻时间为一小时; 检测装置的封阻一直持续到使用前 (约 4 小时)。

c. 捕获抗原蛋白质: 移去封阻溶液, 根据抗体的分布, 分别在微孔中加入 100  $\mu$ l 不同浓度的四种细胞因子 (稀释于 PBS + 1% 脱脂奶粉)。室温下 1.5 小时。

#### (2) 标记抗原蛋白质:

移去未与固相抗体结合的细胞因子和非特异性物质, PBST 清洗 2 次, PBS 清洗 1 次。每一微孔加入 100  $\mu$ l 0.02% NHS-生物素 (溶于 PBS), 室温保持 30 分钟。移去 NHS-生物素, 用 10 mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 淬灭并清洗残余的 NHS-生物素 (室温下保持 5 分钟), 然后移去 Tris-HCl 缓冲液。

### (3) 洗脱抗原:

加入 20  $\mu$ l 抗原洗脱液 (使用美国 PIERCE 公司的 ImmunoPure), 室温下 15 分钟。与此同时, 移去检测装置微孔中的封阻溶液, 加入 180  $\mu$ l PBS + 1%脱脂奶粉。

### (4) 抗原再捕获:

将从捕获装置微孔中洗脱的抗原 (约 20  $\mu$ l) 转移至检测装置上含有对应抗体的微孔中。室温下 1 小时。由于检测装置微孔已经含有 180  $\mu$ l PBS + 1%脱脂奶粉, 抗原洗脱液被中和并稀释 10 倍, 不再影响到抗原和检测装置上特异性抗体的再结合 (再捕获)。

### (5) 检测:

a. 显示信号: 移去未结合的物质, 用 PBST 清洗 2 次, PBS 清洗 1 次。加入 100  $\mu$ l 辣根过氧化物酶-亲和素 (用 PBS + 1%脱脂奶粉稀释至 1  $\mu$ g/ml), 室温下 30 分钟。然后用 PBST 清洗 3 次, PBS 清洗 1 次。加入 100  $\mu$ l 过氧化物酶底物溶液 (0.3 mg/ml ABTS, 0.02%过氧化氢), 37 度 30 分钟。读测 405 nm 波长光吸收。

b. 检测结果: 图 2 显示实施例 1 的检测结果。供试的所有四个细胞因子的信号强度和浓度之间从 100 ng/ml 到 0.4 ng/ml 都展现按一定比例的线性关系, 证明 SALRA 方法能够在这一浓度范围检测这些蛋白质, 灵敏度都至少可达 0.4 ng/ml。

## 实施例 2: 多重性检测 (同时检测三种蛋白质)

在本实施例子中, 捕获装置和检测装置都是 96-孔微量板。捕获装置的每个微孔表面包被三种混合在一起的抗体, 用来同时检测三种抗原蛋白质。待测抗原蛋白质为三种细胞因子, 分别为 IL-1-beta、TNF- $\alpha$  和 IL-10。其相应的抗体均为单克隆抗体。

### (1) 捕获抗原蛋白质:

a. 包被捕获抗体: 取两个 96-孔微量板 (平底, 对蛋白质高度结合),

一个用于捕获（捕获装置），另一个用于检测（检测装置）。捕获装置微孔内加入 100  $\mu\text{l}$  抗 IL-1-beta、TNF- $\alpha$  和 IL-10 的三种抗体混合液，每种抗体的浓度均为 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ （稀释于 PBS 缓冲液），共加入 8 个微孔。而检测装置每个微孔只加有一种抗体，浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ （稀释于 PBS 缓冲液），每种抗体加入 8 个微孔。将微量板置于摄氏 4 度过夜。

b. 封阻非特异性结合位点：同实施例 1。

c. 捕获抗原蛋白质：移去捕获装置微孔中的封阻溶液，分别在微孔中加入 100  $\mu\text{l}$  上述三种细胞因子不同浓度的混合液（稀释于 PBS + 1% 脱脂奶粉）。室温下 1.5 小时。抗原混合液中三种细胞因子的浓度如表 1 所示：

表 1. 三种细胞因子的浓度 (ng/ml)

| 微孔# | IL-1-beta | TNF- $\alpha$ | IL-10 |
|-----|-----------|---------------|-------|
| 1   | 100       | 0.1           | 6.25  |
| 2   | 25        | 0.025         | 1.6   |
| 3   | 6.25      | 0             | 0.4   |
| 4   | 1.6       | 100           | 0.1   |
| 5   | 0.4       | 25            | 0.025 |
| 6   | 0.1       | 6.25          | 0     |
| 7   | 0.025     | 1.6           | 100   |
| 8   | 0         | 0.4           | 25    |

(2) 标记抗原蛋白质：

同实施例 1。

(3) 洗脱抗原：

加入 20  $\mu\text{l}$  抗原洗脱液（同实施例 1），室温下 15 分钟。与此同时，移去检测装置微孔中的封阻溶液，加入 60  $\mu\text{l}$  PBS + 1% 脱脂奶粉。

(4) 抗原再捕获：将捕获装置微孔中洗脱的抗原分别加入至检测装置上

的三个包被不同抗体的微孔，每孔 6  $\mu$ l。室温下 1 小时。由于检测装置微孔已经含有 60  $\mu$ l PBS + 1%脱脂奶粉，抗原洗脱液被中和并稀释，不再影响到被标记的抗原和检测装置上特异性抗体的再结合（再捕获）。

(5) 检测:

a. 显示信号: 同实施例 1。

b. 检测结果: 图 3 显示实施例 2 的检测结果。供试的三个细胞因子的信号强度和浓度之间从 100 ng/ml 到 0.4 ng/ml 都展现按一定比例的线性关系，证明 SALRA 方法能够多重性地同时检测多种蛋白质，本例中灵敏度都至少可达 0.4 ng/ml。

## 权利要求

- 1、一种用单一捕获剂定量检测特异性分析物的方法，其特征在于：
  - (1) 捕获分析物：将捕获剂包被到固相表面，成为捕获装置；加入待测生物样本，使捕获装置上的捕获剂与样本中的特异性分析物结合，形成捕获剂-分析物复合物；
  - (2) 标记复合物：用报道分子标记捕获剂-分析物复合物；
  - (3) 洗脱分析物：将经过标记的分析物从复合物上洗脱下来；
  - (4) 再捕获：将洗脱的分析物中和及稀释后与检测装置上的捕获剂再结合，所说的检测装置是指包被了捕获剂的固相表面；
  - (5) 检测：通过检测报道分子的标记信号强度来确定分析物含量。
- 2、根据权利要求1所述的定量检测方法，其特征在于：其中所说的捕获剂是抗体、抗体片段、非抗体类蛋白质、肽、寡聚核苷酸或小分子化合物。
- 3、根据权利要求2所述的定量检测方法，其特征在于：其中所说的抗体是单克隆抗体。
- 4、根据权利要求1所说的分析物是能与所说的捕获剂特异性结合的抗原蛋白质、抗体、肽、寡聚核苷酸适体、其他生物大分子及其复合物、小分子以及亚细胞结构。
- 5、根据权利要求1、2、3或4所述的定量检测方法，其特征在于，所说的报道分子是生物素、荧光素或其他荧光基团、酶、肽或寡聚核苷酸。

6、根据权利要求1所述的定量检测方法，其特征在于，其中所说的捕获装置的固相表面是试管、微量板、滤膜、测试纸或微珠；所说的检测装置的固相表面为微量板、滤膜、测试纸、微珠、玻璃或塑料薄片载体。

7、权利要求1所述的定量检测方法，在临床诊断、生物标记鉴定分析、蛋白质组学研究分析、新药靶位鉴定分析、临床药物动力学和药效学分析中的应用。

8、一种用于权利要求1所说的用单一捕获剂定量检测特异性分析物的方法的试剂盒，其特征在于，包括捕获装置、检测装置，以及用于标记的报告分子和分析物洗脱液。

附图

捕获分析物 → 标记复合物 → 洗脱分析物 → 再捕获 → 检测

图 1

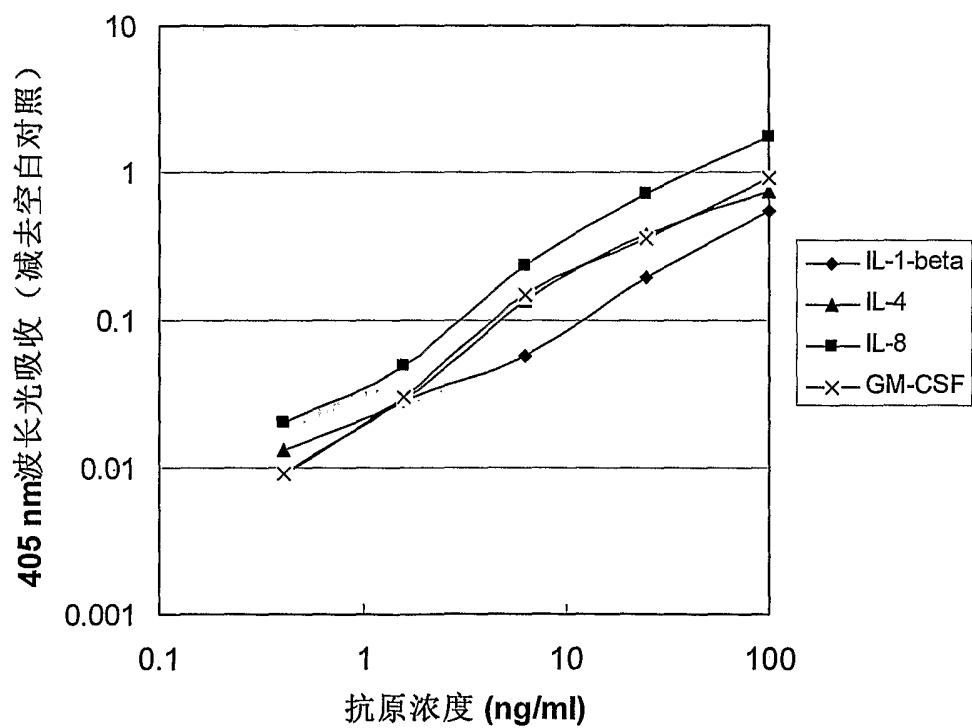


图 2

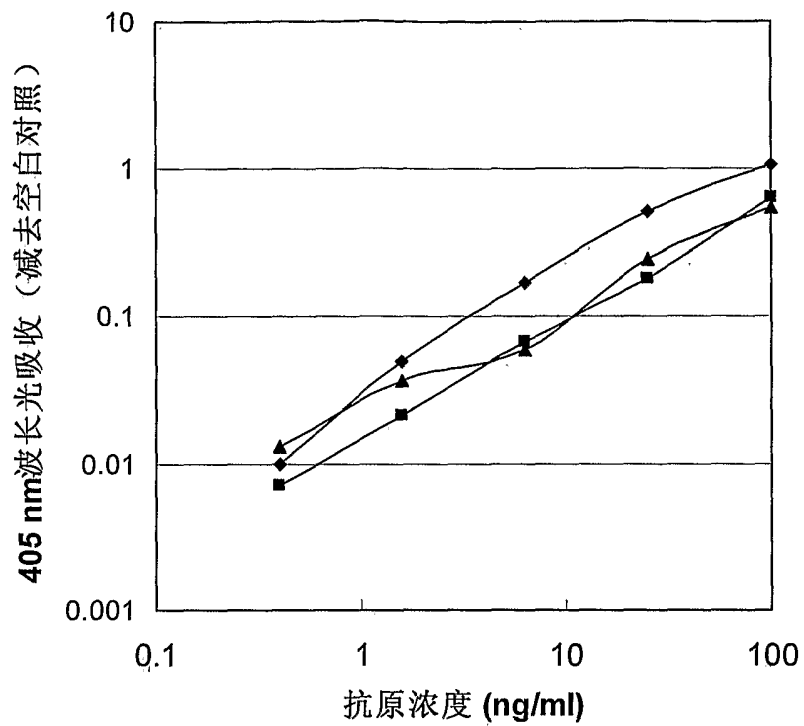


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2006/001099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC (2006.01): G01N33, C12Q1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese patent documents( 1985~)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT & CNKI & WPI & EPODOC & PAJ: entrap+, captur+, trapping, single, onefold, unitary, individual, alone, only, recaptur+, retrapping, elut+, eluate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages             | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | CN,A,1557965( ZHEJIANG UNIVERSITY)29.Dec.2004(29.12.2004), The whole document                  | 1-8                   |
| A         | CN,A,1617936(ATLANTIC BIOLABS INC et al.)18.May.2005(18.05.2005), The whole document           | 1-8                   |
| A         | US,A,5573921(DRAGERWERK AKTIENGESELLSHAFT)12.Nov.1996(12.11.1996), The whole document          | 1-8                   |
| A         | EP,A1,1347301(INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION ) 24.Sep.2003(24.09.2003), The whole document | 1-8                   |
| A         | JP,A,2004037394(TOA IYO DENSHI KK)05.Feb.2004(05.02.2004), The whole document                  | 1-8                   |
| A         | JP,A,2005035891(SUMITOMO BAKELITE CO LED)10.Feb.2005(10.02.2005), The whole document           | 1-8                   |
| A         | WO,A2,2004016802(PROTEOPLEX INC)26.Feb.2004(26.02.2004), The whole document                    | 1-8                   |

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

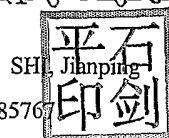
|  |  |
|--|--|
| * Special categories of cited documents:   | “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance   | “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date  | “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| “L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | “&” document member of the same patent family  |
| “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means   |  |
| “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed   |  |

Date of the actual completion of the international search  
23.Jul.2006(23.07.2006)

Date of mailing of the international search report  
10.AUG 2006 (10.08.2006)

Name and mailing address of the ISA/CN  
The state Intellectual Property Office, the P.R.China  
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China  
100088  
86-10-62019451

Authorized officer  
Telephone No. 86-10-62085767



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2006/001099

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication Date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| CN, A, 1557965                         | 29.Dec.2004      | None                    |                  |
| CN, A, 1617936                         | 18.May.2005      | WO, A1, 03064692        | 07.Aug.2003      |
| US, A, 5573921                         | 12.Nov.1996      | DE, C, 4229591          | 24.Mar.1994      |
| EP, A1, 1347301                        | 24.Sep.2003      | WO, A, 0244726          | 06.Jun.2002      |
|  |                  | AU, A, 2412802          | 11.Jun.2002      |
|  |                  | JP, A, 2002196002       | 10.Jul.2002      |
|  |                  | JP, A, 2002238544       | 27.Aug.2002      |
|  |                  | JP, A, 2002267672       | 18.Sep.2002      |
|  |                  | JP, A, 2003107089       | 09.Apr.2003      |
| JP, A, 2004037394                      | 05.Feb.2004      | None                    |                  |
| JP, A, 2005035891                      | 10.Feb.2005      | None                    |                  |
| WO, A2, 2004016802                     | 26.Feb.2004      | AU, A, 2003259041       | 03.Mar.2004      |
|  |                  | US, A, 2004063124       | 01.Apr.2004      |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2006/001099

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543 (2006.01) i

C12Q1/68 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号  
PCT/CN2006/001099

**A. 主题的分类**  
参见附加页  
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

**B. 检索领域**  
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)  
IPC (2006.01): G01N33, C12Q1

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献  
中国专利文献 (1985~)

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))  
CNPAT, 非专利期刊全文数据库: 捕获, 特异性结合, 单一, 单独, 唯一, 洗脱  
WPI & EPODOC & PAJ: entrap+, captur+, trapping, single, onefold, unitary, individual, alone, only, recaptur+, retrapping, elut+, eluate

**C. 相关文件**

| 类型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落  | 相关的权利要求 |
|-----|--|---------|
| A   | CN,A, 1557965 (浙江大学) 29.12 月 2004 (29.12.2004), 全文                           | 1-8     |
| A   | CN, A, 1617936 (美国大西洋生物实验室 等) 18.5 月 2005 (18.05.2005), 全文                   | 1-8     |
| A   | US, A, 5573921 (Dragerwerk Aktiengesellschaft) 12.11 月 1996 (12.11.1996), 全文 | 1-8     |
| A   | EP, A1, 1347301 (国际试药株式会社) 24.9 月 2003 (24.09.2003), 全文                      | 1-8     |
| A   | JP, A, 2004037394 (希森美康株式会社) 05.2月2004 (05.02.2004), 全文                      | 1-8     |
| A   | JP, A, 2005035891 (住友电木株式会社) 10.2月2005 (10.02.2005), 全文                      | 1-8     |
| A   | WO, A2, 2004016802 (PROTEOPLEX 公司) 26.2 月 2004 (26.02.2004), 全文              | 1-8     |


其余文件在 C 栏的续页中列出。  见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:  
 “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件  
 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利  
 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件  
 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件  
 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件  
 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件  
 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性  
 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性  
 “&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期  
23.7 月 2006 (23.07.2006)

国际检索报告邮寄日期  
**10 8月. 2006 (10.08.2006)**

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)  
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088  
传真号: (86-10)62019451

授权官员  
  
电话号码: (86-10)62085767

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2006/001099

| 检索报告中引用的<br>专利文件   | 公布日期         | 同族专利              | 公布日期        |
|--------------------|--------------|-------------------|-------------|
| CN, A, 1557965     | 29.12 月 2004 | 无                 |             |
| CN, A, 1617936     | 18.5 月 2005  | WO, A1, 03064692  | 07.8 月 2003 |
| US, A, 5573921     | 12.11 月 1996 | DE, C, 4229591    | 24.3 月 1994 |
| EP, A1, 1347301    | 24.9 月 2003  | WO, A, 0244726    | 06.6 月 2002 |
|                    |              | AU, A, 2412802    | 11.6 月 2002 |
|                    |              | JP, A, 2002196002 | 10.7 月 2002 |
|                    |              | JP, A, 2002238544 | 27.8 月 2002 |
|                    |              | JP, A, 2002267672 | 18.9 月 2002 |
|                    |              | JP, A, 2003107089 | 09.4 月 2003 |
| JP, A, 2004037394  | 05.2 月 2004  | 无                 |             |
| JP, A, 2005035891  | 10.2 月 2005  | 无                 |             |
| WO, A2, 2004016802 | 26.2 月 2004  | AU, A, 2003259041 | 03.3 月 2004 |
|                    |              | US, A, 2004063124 | 01.4 月 2004 |

主题的分类

G01N33/543 (2006.01) i

C12Q1/68 (2006.01)i