

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/543

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93119931.X

[45] 授权公告日 2001 年 1 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1061142C

[22] 申请日 1993.12.21 [24] 颁证日 2000.10.14

[21] 申请号 93119931.X

[30] 优先权

[32] 1992.12.22 [33] US [31] 994,903

[73] 专利权人 西恩纳生物科技有限公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 W·P·汉森 M·仙纳拉佐

审查员 王 奕

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 9 页 说明书 22 页 附图页数 10 页

[54] 发明名称 一种基于微粒光散射的免疫分析方法

[57] 摘要

一种同时测定一个流体样品里一种或多种抗体, 抗原或半抗原被分析物的均质 免疫分析方法, 包括定量分析上述被分析物对光散射脉冲高度分布直方图统计 性变化的影响。该直方图变化是由较大直径的单分散性结合分子包被的多聚微 球体被较小直径的多分散性结合分子包被的胶态金属微粒所结合后产生的。为 同时分析多重被分析物, 给每种被分析物分配不同直径或折射率的微球体, 此 分析方法可用于正向结合、替换、抑制、竞争类型的系统里, 由取决于系统的 直方图线度变化来指导完成。

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

权利要求书

1. 一种基于微粒光散射的免疫分析方法，用于测定流体样品中的被分析物，包括以下步骤：

a) 使一个试剂组与所述流体样品结合，以形成混合物并使得发生一种反应，所述试剂组含有第一结合分子包被的单分散性微球体和比所述微球体小的第二结合分子包被的胶态金属微粒，或含有包括所述单分散性微球体和所述胶态金属微粒的免疫复合体，其中所述第一结合分子或第二结合分子中的至少一种结合所述被分析物，所述反应是形成所述免疫复合体或对所述免疫复合体解复合的过程，这样，已反应的混合物包括未复合形式的所述微球体、在免疫复合体中的微球体或两种形态的微球体，在所述已反应的混合物中，所述微球体与所述胶态金属微粒的结合程度取决于所述流体样品中的所述被分析物及其数量；

b) 用光学流动微粒分析仪检测由在所述已反应的混合物中的所述微球体散射的光，提供微球体的光散射信号；

c) 确定所述已反应的混合物中的所述微球体的所述光散射信号的统计分布的线度，使得所述统计分布的线度随已反应混合物中所述微球体与所述胶态金属微粒的结合程度变化；和

d) 使所述已反应的混合物中所述微球体的所述光散射信号的所述统计分布的所述线度与所述流体样品的被分析物的量关联。

2. 按照权利要求 1 的方法，其中所述第二结合分子包被的胶态金属微粒是多分散的胶态金属微粒。

3. 一种基于微粒光散射的免疫分析方法，用于测定流体样品中的被分析物，包括以下步骤：

a) 使一个试剂组与所述流体样品结合，以形成混合物并使得

发生一种反应，所述试剂组含有第一结合分子包被的多聚单分散性微球体和比所述微球体小的第二结合分子包被的胶态金属微粒，或含有包括所述单分散性微球体和所述胶态金属微粒的免疫复合体，其中所述第一结合分子或第二结合分子中的至少一种结合所述被分析物，所述反应是形成所述免疫复合体或对所述免疫复合体解复合的过程，这样，已反应的混合物包括未复合形式的所述微球体、在免疫复合体中的微球体或两种形态的微球体，在所述已反应的混合物中，所述微球体与所述胶态金属微粒的结合程度取决于所述流体样品中的所述被分析物及其数量；

b) 用光学流动微粒分析仪检测由在所述已反应的混合物中的所述微球体散射的光，提供微球体的光散射信号；

c) 确定所述已反应的混合物中的所述微球体的所述光散射信号的脉冲高度直方图形式的统计分布的线度，其中所述微球体的脉冲高度直方图与所述胶态金属微粒的脉冲高度直方图不重合，使得所述直方图的线度随已反应混合物中所述微球体与所述胶态金属微粒的结合程度变化；和

d) 使所述已反应的混合物中所述微球体的所述光散射信号的所述直方图的所述线度与所述流体样品的被分析物的量关联。

4. 按照权利要求 3 的方法，还包括下列步骤：在光学流动微粒分析仪中，检测包括所述微球体的参照混合物的光散射信号，确定在所述参照混合物中的所述微球体的光散射信号的直方图的线度，所述关联在已反应的混合物中所述微球体的光散射信号的直方图的线度的步骤包括这样的步骤：将这种线度与所述参照混合物中的微球体的所述光散射信号的直方图的线度进行比较，以确定由反应造成的线度变化。

5. 按照权利要求 1-3 之一的方法，其中所述光散射信号是

基本上为小角度的正向光散射信号。

6. 按照权利要求 1-3 之一的方法，其中所述光散射信号是基本上为直角的光散射信号。

7. 按照权利要求 3 的方法，其中所述第二结合分子包被的胶态微粒与所述第一结合分子包被的多聚微球体的结合被所述被分析物增加，并且该增加引起所述直方图之所说线度的增加。

8. 按权利要求 3 的方法，其中所述第二结合分子包被的胶态微粒与所述第一结合分子包被的多聚微球体的结合被所述被分析物减少，并且该减少引起所述直方图的所说线度的减小。

9. 按权利要求 3 的方法，其中所说的直方图线度组成是所述直方图之图形表示的标准化峰宽。

10. 按权利要求 1-3 之一的方法，进一步包括下列步骤：提供一个有效地减少在所述免疫分析中非特异性结合物质的干扰的所述金属微粒与所述多聚微球体的比例。

11. 按权利要求 10 的方法，其中所说的比例范围为 2-100,000:1。

12. 按权利要求 10 的方法，其中所说的比例范围为 1,000-10,000:1。

13. 按权利要求 1-3 之一的方法，其中所说的单分散微球体包括均质多聚微球体。

14. 按权利要求 1-3 之一的方法，其中所说的微球体包括平均直径在 0.02-100 μm 范围的微球体。

15. 按权利要求 1-3 之一的方法，其中所说的微球体包括平均直径在 0.05-10.0 μm 范围的微球体。

16. 按权利要求 1-3 之一的方法，其中所说的微球体包括平均直径在 0.5-5.0 μm 范围内的微球体。

17. 按权利要求 1-3 之一的方法，其中所说的胶态金属微粒选自金、铂、银和铜微粒。
18. 按权利要求 1-3 之一的方法，其中所说的胶态金属微粒是金微粒。
19. 按权利要求 1-3 之一的方法，其中所说的金属微粒的平均直径在 20nm-120nm 范围。
20. 按权利要求 1-3 之一的方法，其中所说的金属微粒的平均直径在 50nm-80nm 范围。
21. 按权利要求 1-3 之一的方法，其中所述微球体的平均直径与所述金属微粒的平均直径之比为 15: 1 至 30: 1。
22. 按照权利要求 4 的方法，其中在所述参照混合物中的所述微球体是非免疫化学敏化的单分散多聚微球体，并且其中用光学流动微粒分析仪检测光散射信号的步骤包括下列步骤：调节所述混合物样品流在所述分析仪中的直径范围在 $3 \mu\text{m}$ - $10 \mu\text{m}$ 范围，以对于所述参照混合物中的非免疫化学敏化的单分散多聚微球体，产生所述光散射信号围绕直方图平均值的图形的不大于约 2% 的偏差相关系数。
23. 按权利要求 1-3 之一的方法，其中所述使所述试剂组结合所述流体样品的步骤包括：使所述第二结合分子包被的胶态金属微粒与所述流体样品结合，形成第一混合物，并且孵育所述第一混合物，使得所述第二结合分子包被的胶态金属微粒结合所述被分析物，并且使得在第一混合物中未结合的胶态金属微粒的量与所述流体样品中被分析物的量成反比，然后使所述第一混合物与所述第一结合分子包被的微球体结合，形成所述已反应的混合物。
24. 按照权利要求 1-3 之一的方法，其中所述流体样品包括

多种被分析物，所述结合步骤包括下列步骤：提供对于每一所述被分析物的单一的试剂组，并且使所有所述试剂组与所述流体样品结合，使得所述已反应的混合物所有来自所有所述试剂组的微球体，所述检测步骤包括下列步骤：检测所有微球体的光散射信号，每一试剂组的微球体具有与其它试剂组的微球体不同的直径和折射率，并且所述确定所述光散射信号的统计分布的线度的步骤包括下列步骤：分离代表来自不同试剂组的微球体的光散射信号，形成单一的与每一种被分析物相关的统计分布，并且确定每一种单一的统计分布的线度。

25. 一种通过被分析物中介的结合反应来测定流体样品中的被分析物的方法，包括以下步骤：

- a) 在反应容器中，放入被与所述被分析物结合的第一结合分子包被的单分散性多聚微球体、被与所述被分析物结合的第二结合分子包被的多分散胶态金属微粒和含有被分析物的流体样品足以形成一种已反应的混合物的时间，所述已反应的混合物含有三种成分间的免疫复合体，由此至少所述某些所述微球体将结合进入所述免疫复合体；
- b) 用所述流动微粒分析仪检测被在所述免疫复合体中含有所述微球体的所述已反应混合物中的所述微球体散射的光，提供所述微球体的光散射信号；
- c) 测量所述光散射信号的脉冲高度分布直方图线度；
- d) 把 c) 步骤中获得的所说线度和在没有被分析物或胶态金属微粒存在下分析获得的由单分散多聚微球体组成的参照反应混合物的线度相比较，以确定 c) 中直方图线度的变化，和
- e) 将所述直方图线度变化和所说流体样品的所述被分析物浓度相关连。

26. 按权利要求 25 的方法，其中所述被分析物是抗原或半抗原，所述第一结合分子包括第一抗被分析物抗体，所说第二结合分子包括第二抗被分析物抗体。

27. 按权利要求 25 的方法，其中所述被分析物是抗体，所述第一结合分子和所说第二结合分子各自是一种与所说被分析物抗体结合的抗原或半抗原，或者其中所述第一结合分子包括结合被分析物抗体的抗原，第二结合分子包括对所述被分析物抗体为特异性的抗体。

28. 一种通过被分析物中介的替换反应来检测流体样品中的被分析物的方法，包括以下步骤：

a) 提供一种免疫复合体试剂，所述试剂包括为被分析物包被的单分散多聚微球体和被与被分析物结合的结合分子包被的多分散胶态金属微粒，或者包括为被分析物包被的多分散胶态金属微粒和被与被分析物结合的结合分子包被的多聚微球体；

b) 将所述免疫复合体试剂和含所述被分析物的流体样品相混合一段时间，这段时间足以使所述被分析物从所述免疫复合体上替换下一部分所说的胶态金属微粒；

c) 用光学流动微粒分析仪测定在步骤 b) 中用被分析物替换作用前后所述微球体散射的光，以提供所述微球体的光散射信号；

d) 确定在步骤 b) 中用被分析物替换作用前后所述微球体光散射信号的脉冲高度分布直方图线度，以确定这样的线度的变化；和

d) 将所述直方图线度的变化与所述流体样品里被分析物浓度相关连起来。

29. 按权利要求 28 的方法，其中所述被分析物是抗原或半抗原。

30. 按权利要求 28 的方法，其中所述被分析物是抗体，所述结合分子是相应的抗原。

31. 一种通过竞争型反应来检测流体样品中抗原或半抗原被分析物的方法，包括以下步骤：

a) 混合为抗被分析物抗体包被的多分散性金属微粒、被分析物、抗原或半抗原包被的单分散性多聚微球体和含被分析物抗原或半抗原的流体样品，以形成混合物，并维持混合物一段足于使竞争免疫复合体在混合物中形成的时间，由此至少某些所述微球体结合入所述免疫复合体；

b) 用光学流动微粒分析仪测定在形成所述竞争免疫复合体前后所述混合物中所述微球体散射的光，以提供微球体的光散射信号；

c) 确定形成所述竞争免疫复合体前后的所述光散射信号的光散射脉冲高度分布直方图线度；和

d) 将所述直方图线度变化和流体样品中被分析物浓度相关连起来。

32. 一种通过竞争性反应来检测流体样品中的被分析物抗体的方法，包括以下步骤：

a) 混合被与被分析物抗体结合的抗原或半抗原包被的多分散性金属微粒、含被分析物抗体的流体样品和被与所述抗原或半抗原结合的结合分子包被的单分散性多聚微球体，以形成混合物，并维持所述已反应的混合物一段足于使竞争免疫复合体形成的时间；

b) 用光学流动微粒分析仪测定在形成所述竞争免疫复合体前后所述已反应混合物中的所述微球体散射的光，以提供微球体的光散射信号；

c) 确定形成所述竞争免疫复合体前后的所述光散射信号的光散射脉冲高度分布直方图线度；和

d) 将所述直方图线度变化和流体样品中被分析物浓度相关起来。

33. 一种包括抑制型反应过程的检测流体样品中的被分析物的方法，包括下述步骤：

a) 提供用与被分析物共轭的第一结合分子包被的单分散多聚微球体，形成第一种反应物；

b) 提供用与被分析物结合的第二结合分子包被的多分散性金属微粒，形成第二种反应物；

c) 使一种含被分析物的流体样品与所述第二种反应物结合，形成第一混合物，并孵育所述第一混合物一段足以形成结合所述金属微粒的第一免疫复合体并留下某些未结合的金属微粒的时间，从而在所述第一混合物中未结合的金属微粒的数量与所述流体样品中的被分析物的浓度成反比关系；

d) 使所述第一混合物与所述第一种反应物结合，形成第二混合物，并孵育所述第二混合物以在所述微球体和未结合的金属微粒之间形成第二免疫复合体；

e) 用所述光学流动微粒分析仪测定所述第二混合物中所述微球体散射的光，以提供微球体的光散射信号；和

f) 测量所述光散射信号的脉冲高度分布直方图的线度；

g) 把 f) 的所述线度和一个参照反应混合物的相同线度进行比较，所述参照反应混合物是在无被分析物或金属微粒情况下由包被了的单分散性多聚微球体组成，以此来确定 f) 步骤所述直方图线度的统计性变化；和

h) 将所述直方图线度的变化与流体样品中被分析物浓度相关

连起来。

34. 按权利要求 33 的方法，其中所述被分析物是半抗原或抗原，所述第二结合分子是一种抗半抗原或抗抗原抗体。

35. 按权利要求 33 的方法，其中所述被分析物是一种抗体，而所述第二结合分子结合所述抗体。

36. 按权利要求 25 - 35 之一的方法，其中所述直方图线度是所述直方图的图形表示中的标准化峰宽。

说 明 书

一种基于微粒光散射的免疫分析方法

本发明主要涉及在流体样品中测量一种抗原、抗体或半抗原被分析物的均质免疫分析方法，是通过测量流动微粒分析仪里单分散性微粒发出的光散射信号来实现的。尤其特殊的是该发明涉及测量光散射信号的变化，这种光散射信号来自结合分子包被的单分散性多聚微球体，这是结合分子包被的多分散性胶态金属微粒的这些微球体与被分析物中间结合的结果。

抗体、抗原和许多半抗原呈现高亲合力，这不仅对它们的互补蛋白，而且对某些固态表面，例如塑料微量滴定平板的小孔、塑料试管壁、多聚微球体和胶态金属微粒的表面也是如此。这些特性的开发引出了诊断分析方法领域的一场革命，这些分析方法用于分析上面所述的象血清这样流体样品中的被分析物。

在固态支持物上进行抗原抗体相互作用的能力已极大地简化了从未使用的反应物及干扰物质中分离出包含被分析物的免疫复合体的步骤。生物流体样品中常存在这样一些干扰物。这些系统通常被称作“固相免疫分析”或“免疫吸附剂分析”，属于“异质性免疫分析”。异质免疫分析中的相分离步骤在减少非特异性结合物质的干扰方面很有价值，这些物质通常对分析方法的灵敏性有不利影响，这些分析麻烦且昂贵，而且是自动化系统中可靠性问题的焦点。

另外，这些异质性系统还有一个缺点，即要求免疫复合体的一部分或另一部分被一种易于定量的分子标记。这些分子通常被称作

“报告分子”，包括放射性同位素(放射免疫测定，RIA)，酶类(通常伴有生色团的酶联免疫测定，ELISA)，荧光分子(荧光免疫分析，FIA，)，化学发光分子(CIA)，金颗粒，光敏分子等等。作为回顾，可参考Kemeny, D. M., et al., *Immunology Today*, 7: 67 (1986)。更进一步来说，因为作为受体分子的生色团和荧光团的数目有限，且这些分子的发射谱大量重叠，所以不适用于用这些报告分子进行多重被分析物的同时分析。例如，Cambridge Biotech. 的对C. difficile Toxin A和Toxin B, HTLV-I和HTLV-II, HIV-1和HIV-2进行的同时性EIA分析就是不可分的。本发明大大地简化了从单个反应混合物中多重被分析物中信号的可分离性。

“均质免疫分析”这个术语用于没有相分离的免疫分析。这些系统包括结合蛋白包被的微粒凝集分析，由于它们在实现自动化时需要较少的步骤，而且自动化在机械、流动性、电子方面都简单，故很有用。无需相分离步骤的免疫分析的例子如下：胶乳微球体凝集、血细胞凝集和荧光消偏分析。对于单种被分析物的胶乳珠凝集分析的例子可在专利号为4521521, 4184849, 4279617, 4191739和4851329的美国专利上找到，对于单个液态样品中多重被分析物的分析之例可在Hansen的待批准的美国专利申请(申请号为883574)上找到。用于凝集或荧光消偏分析的散射浊度或比浊测定自动系统简单且建造费用便宜，与异质分析不同的是，它不需要频繁地保养复杂的相分离装置。

然而，从另一方面讲，由于体液里干扰物质的存在，均质免疫分析这一方法不能满足许多重要医学检测的高灵敏度要求，如不能满足酶联免疫分析(ELISA)和放射性免疫分析(RIA)的要求。对这个

问题的回顾可以看看例如Masson et al., Methods in Enzymology, 74: 115 (1981) 和 Collett—Cassart et al., Clin Chem., 27: 64 (1981)。本发明的一个重要方面是它是一种不受非特异性干扰的均质免疫分析方法，灵敏度至少可达 $5 \times 10^{-13} M$ 。这种灵敏度水平比原来的均质胶乳珠凝集分析技术要高2—3个数量级。看看几个例子： α —胎儿球蛋白 ($3 \times 10^{-10} M$, 以上提到的Collett—Cassart等)，尿内人绒毛膜促性腺激素 (HCG) ($6 \times 10^{-11} M$, Lentrichia et al., J. Immunol. Meth., 89: 657 (1986) (但是在被分析物水平二十倍于所标灵敏度极限时，只与放射免疫测定 (RIA) 表现出87%的相关性)，荧光消偏方法测定的血清地高辛 (digoxin) ($3 \times 10^{-10} M$, S. Wong in D. Chan, ed., Immunoassay Automation, Academic Press, 1992, P. 329)。

以前为消除或减少非特异性干扰物对均质免疫分析的不利影响所作的技术方法已普遍不能令人满意。这些方法包括：体液样品的高倍率稀释 (Fritz et al., J. Immunol., 108: 110 (1972)), 但是这样会等比例地减小灵敏度；使用抗体片段 (Masson, Id.), 但这种方法昂贵且不可靠；使用特殊的PH、离子强度和缓冲液类型等条件，和(或)加入螯合物或其它净化剂 (Masson, Id.), 但是这样会引入多重依赖因子，对每一种被分析物这些因子都必须选择成最佳的，这就使得分析过程极其昂贵和麻烦 (Lim et al., J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 20: 141 (1982))。

解决非特异性干扰这一难题还有其它方法，其中包括使用IgG包被的胶乳超微球体来抑制分析过程中的非特异性反应，该分析过程是使用了抗体片段的胶乳球体凝集分析。据报告，这样一种使用

了具有 $30\mu\text{m}$ 小孔的Coulter原理电阻流动颗粒分析仪的凝集方法的灵敏度约为 5×10^{-13} 到 $4\times 10^{-12}\text{M}$ (Sakai et al., Chem. Pharm. Bull., 37: 3010 (1989))。这种方法的弱点在于附加反应物(非特异性的、IgG包被的超微球体)会不断增加制造、质量监督以及贮存的费用。本发明可以消除这一重要弱点，它通过在所有一种反应物中把特异性免疫反应作用和提高特异性的作用相结合来实现的。另外，虽然Sakai等人使用的库氏(Coulter Principle)微粒计数器产生定量结果，但是在检测凝集时需要用到小孔($30\mu\text{m}$)，这就产生了一个众所周知的问题，即凝集反应时的堵塞现象(Masson, Id.)。本发明使用的鞘管式流动微粒分析仪有 $250-300\mu\text{m}$ 的小孔，消除了堵塞现象。这样一来，在Sakai等人的方法中，如果试图同时分析一种以上的被分析物，则特异性凝集微粒(二聚体、三聚体等)的分布就会产生一个问题——库氏(Coulter)体积重叠，而在本发明中却不存在这一问题，因为多聚体不会形成，而且能够进行多重同时性分析而不需要为消除重叠问题作数学运算。

原凝集免疫分析遇到的另一个问题是，在含有一微米或以上微粒的反应混合物完全反应期间，需要用机械搅拌器进行搅动(masson, Id.)，这就要求样品之间的严苛洗涤以防止样品互相遮盖。本发明进一步的优势在于目前就自动化方面来看，在有效时段内完成凝集反应而不需要进行样品的搅拌。

Schutt等人的欧洲专利0254430和美国专利5017009记载了对一种被分析物的散射全内反射(STIR)分析方法，该方法中使用胶态金颗粒来标记结合在涂覆的有光学特性的可见塑料平板上的蛋白质。这种免疫分析依靠的是对一种由瞬时波的扰动所散射回来的光的测

量，该波由在免疫反应中被带到分界面处的胶态金标记物引起。这种瞬时波被认为是入射光波全内反射的结果，这一测量方法的缺点是昂贵的光学特性塑料平板不能重复使用，而且用过一次就必须丢弃。

对于在流体样品中的抗原、抗体、半抗原的免疫分析方法还有一个重要的要求，即要把机械简单化和颗粒凝集均质性分析的低成本结合起来，同时要减少以固态支持物为基础的异质分析中常存在的那些干扰物所带来的不利影响，并要能比原有凝集分析方法有更高的效率和更宽的测量范围。这种需要将由下面更详细说明的本发明来满足。

本发明涉及一种新的免疫分析方法，可以同时检测和量化单个液体样品中一种或多种抗原、半抗原、抗体被分析物的浓度。本发明基于一次偶然且意外的观察结果，即当相对小的多分散性结合态的分子包被胶态金属颗粒结合到相对大的单分散性结合态的分子包被多聚微球体表面上时，这些多聚微球体的光散射脉冲高度分布直方图的线性度发生改变，而且这些在直方图线性度上的改变与引起线性度改变的被分析物的浓度能够相关联。光散射最好基本上是小角度的正向光散射或基本上是直角的光散射。为达到这个目的所要确定的适宜的直方图线度是直方图图示的标准化的峰宽，即在峰高一半处的峰宽。

在一个正向结合反应(夹层反应)实施例中，在被第一结合分子包被的单分散性大多聚微球体，被第二结合分子包被的多分散性小胶态金属颗粒，和与这两种结合分子都互补的被分析物之间，就形成了一个单分散性免疫复合体。可以把单分散性微粒免疫复合体的

光散射脉冲高度分布直方图线度和用作参照的直方图线度相比较（其是在没有金属颗粒存在的情况下由单分散性包被多聚微球体和在分析进行前后或进行中检测的联结被分析物得到的），还可以将因被分析物的存在而引起的直方图线度统计性增大与流体样品中该被分析物的浓度相关连起来。在本发明的一项替代性实施例中，在被被分析物包被的单分散性多聚微球体和被一种抗被分析物抗体包被的多分散性胶态金属微粒之间，一种免疫复合体反应物首先形成，测定免疫复合体相对被分析物暴露前后它的光散射直方图线度，它相对被分析物暴露后的直方图线度统计性改变就可与流体样品中被分析物浓度关连起来。在本发明的一项竞争性实施例中，为结合到单分散性多聚微球体上，它被与抗被分析物抗体互补的第一结合分子包被，被分析物与被抗被分析物抗体所包被的多分散性胶态金属微粒相竞争。若在微球体和金属微粒之间形成免疫复合体阶段减少被分析物，就会与流体样品中被分析物浓度成比例地减小光散射脉冲高度分布直方图线度。在一项抑制性反应实施例中，本免疫分析依赖于被分析物的抑制能力，即抑制被抗被分析物抗体包被的多分散性金属微粒结合到由结合分子包被的单分散性多聚微球体上。

本发明之一方面是披露上述创造性方法的正向结合、替代、竞争、抑制实施例的细节和范围。

另一方面，披露适用于实现本发明方法的多聚微球体和胶态金属微粒。

再一方面，披露采用这项创造性方法检测生物液体中特定被分析物的例子。

在本发明的又一方面，披露的是该创造性方法被应用来在单次

分析过程中同时分析同一液体样品中的多重被分析物。

还有一方面，即有包被的金属微粒的同时使用不仅是为了分析的目的，它还可以充当净化剂，将存在于生物样品中的非特异性干扰物质从免疫分析反应混合物中便利地清除。

参考以下最佳实施例和所附的权利要求的详细描述，以上及其它目的就会很明显了。

图1表示了多聚微球体和金属微粒(A)，以及金属微粒结合到单分散性多聚微粒前(B)与后(C)的光散射脉冲高度分布。

图2表示正向结合(例如夹层结构)分析的标准化峰宽参数和较正(例如标准)曲线。

图3表示一个人的血清甲状腺促进激素(TSH)分析的标准曲线(A)和与其它方法的比较。

图4表示人血清中的一条T4标准曲线(A)和与其它方法的比较。

图5表示一个IgG的胶乳—胶乳凝集分析。

图6表示了被分析物引起的胶态金微粒与胶乳微球体结合的动力学情况。

本发明是基于流动微粒分析法的一种新的免疫分析方法，用于流体样品中抗原、抗体和半抗原被分析物的分析。该方法利用了一个偶然且意外的发现，即当相对小的多分散性金属微粒在被分析物诱导的、与其浓度成比例的免疫化学反应中结合到相对大的单分散性多聚微球体上时，该多聚微球体制剂的某些物理性质的测量值会发生统计性改变。由流动微粒分析仪测量到的能够进行单分散的微粒特性举例如下：在一给定小孔直径下的电阻式流动微粒分析仪中绝缘微粒的所谓库氏体积(Coulter-volume)；在一个光学流动微粒

分析仪中单个微粒受一定波长光照射时的荧光发射；在一个光学流动微粒分析仪中的单分散性微球体基本在一给定方向被照射时光散射脉冲高度分布直方图。最后一个性质用在了本发明的新方法上，该新方法用来同时检测单个流体样品中的一种或多种抗原、抗体、半抗原被分析物。这个所说的最后一个性质还用在了一种能避免或减少生物液体样品中非特异性物质的有害的干扰效应的方法中，而这些干扰存在于旧的凝集免疫分析方法中。

在本发明中使用的光学流动微粒分析仪(FPA)采用鞘管式流体管和入射光束的光散射来传感和测量免疫化学诱导复合体的形成程度；该种复合体在相对小的多分散性胶态金属微粒和大量的相对大的单分散性多聚微球体之间形成，被引导的窄的样品流从流管中流过，入射光束最好是激光的散射光。最好基本是小角度的向前光散射或基本为直角光散射。测量方法是基于一个意外发现，即当上述多分散性金属微粒结合到多聚微球体表面而形成免疫复合体时，这些金属微粒引起该单分散性多聚微球体的光散射脉冲高度分布直方图线度的极大改变。而多分散性金属微粒自身在本发明测量条件下，在多聚微粒区域并不散射光(即使在金属微粒由于和血清中经常存在的非特异性结合物质反应而发生凝集以后)。当多聚微球体被第一种互补结合分子包被，金属微粒被另一种包被时，与这两种结合分子都互补的一种蛋白质(例如抗原或抗体)或半抗原被分析物就会把金属微粒交联到多聚微粒上，从而引起单分散性多聚微球体的光散射脉冲高度分布直方图线度的变化，与之比较的是在无金属微粒和被分析物情况下获得的参比直方图线度。已经发现上述直方图线度变化与流体样品里存在的被分析物的数量直接相关。

直方图线度在该单分散性多聚微球体的光散射脉冲高度分布直方图的位置没有明显移动的情况下发生上述变化，这表明多聚微球体的自聚集情况没有纠缠进来，这是一个重要的发现。

监测直方图变化的最佳线度是在光散射脉冲高度分布直方图的图形表示上的一半峰高处的峰宽。在本说明书中该线度即称为“标准化峰宽”或“NPW”（请看图2A例）。在上述的正向结合（夹层结构）免疫复合体形成方法中，直方图线度的变化是其图形表示上NPW的加宽及由此引起的围绕直方图平均值的偏差（CV）的相关系数增大。

也已经发现光散射脉冲高度分布直方图线度的统计性变化的测量可以作为在替代、竞争、和抑制型免疫分析方法中定量测定流体样品中的一种被分析物的基础。

在一个替代型实施例中，通过将被抗被分析物包被的多分散性胶态金属微粒免疫结合到被被分析物包被的单分散性多聚微球体上去，来预先制备免疫复合体反应物。这一反应物的光散射脉冲高度分布直方图的基线测定将表示出的线度类似于当两类微粒免疫复合时得到的结果，也就是说，如果检测的是线度它是一个宽NPW。当这一反应物与含有与包被金属微粒的结合分子互补的被分析物的溶液相混合时，金属微粒将会与所含被分析物浓度成正比地从免疫复合体反应物中被替代下来。直方图线度将回到类似于比照单分散性多聚微球体的那种情况，即直方图线度减小，也就是说NPW（和CV）将会被减小。多个标准平均值可以将NPW反映出来的线度减小的统计性程度与流体样品中的被分析物浓度相关连起来。

在一个竞争型实施例中，为结合到结合分子包被的多分散性金属微粒上去，结合分子包被的单分散性多聚微粒和被分析物互相竞

争。多聚微粒的NPW与被分析流体样品的浓度成反比，也就是说，高被分析物浓度将会“捕获”较大部分的金属微粒，只留下相对少的部分金属微粒与多聚微球体结合。这会产生相对窄的直方图，也就是一个小NPW。在以上两个实施例中，被分析物可以是抗原、半抗原或抗体，若按照本发明提供的指导线索选择合适的结合分子来包被微球体和金属微粒，是化验分析领域技术人员所熟知的技术。

在一个抑制型实施例中，将包含被分析物的样品和抗被分析物抗体包被的多分散性金属微粒孵育一定时间，无需要用达到平衡所需的那么多时间，可能在几小时的数量级上。然用加入被被分析物包被的单分散性多聚微球体，继续孵育又一段时间，数量级为几分钟，在这一段时间里被分析物抑制金属微粒结合到多聚微球体上去。在以上情况下测定直方图线度。由于高浓度的被分析物隔离金属微粒，结果是其产生了窄的直方图峰宽；低浓度的被分析物则产生相反结果。

如上所述，本发明实施例的重要特点在于所用孵育混合物在反应期间不需要搅拌。当加入反应混合物的反应成分时，只需简单搅拌(1—2分钟)以使混合物均匀。

多种商用多聚微粒可在本发明中使用，但最佳的是均质胶乳微球体。Bangs, L. B., 均质胶乳微粒, Seragen, Indianapolis, 1984。虽然“胶乳”这个术语严格说来是指组成乳液的聚异戊二烯，但它的含义已经被扩展了，在这里包括诸如聚丁二烯、聚苯乙烯之类的合成聚合物。均质胶乳微球体的平均直径在 $0.05-10\mu m$ 之间，最好在 $0.5-5.0\mu m$ ，而且具有稳定的憎水表面基团，上面紧紧地结合了蛋白质，从而产生稳定的亲水性胶态悬浮液。以上是本发明中

使用的适宜直径，虽然商用胶乳微球体直径可以达到100—120 μm 。具有高度单分散的直径的0.5—5.0 μm 直径的胶乳微球体可从以下公司得到：Polysciences, Inc., Warrington, PA 18976和Interfacial Dynamics Corp., Portland, OR 97220。对于这些商业制品，表示成平均值的百分比的直径标准偏差(即偏差的系数，或CV)约为1%到2%，最好CV不要超过2%。

从这些球状微粒得到的光散射脉冲高度分布直方图的CV是从FP A流管中穿过的样品流的相关直径和入射光(例如激光)的焦点线度的强函数。如果样品流相对较大，那么微粒会流经入射光束的不同强度区域，产生一个不应有的大的脉冲高度CV，即使微粒本身的CV小。因此要最佳地使用本发明，保持恒定大小的窄样品流是基本的，以下将详细讲述达到这一目的的方法。

虽然光学毛细流管中央小孔直径在100 μm —500 μm 间都适合用于本发明，250 μm 的中央小孔直径更适宜。最好把流体样品流集中在中心，并将其直径限制在3—10 μm 范围内。在一个最佳系统中，这种直径大小约为激光束宽度的1%—3%。在这些条件下，可以得到关于单分散性多聚微球体的小于2%的光散射脉冲高度分布直方图的CV值，而且是最佳的。目前上下文里所用的“单分散性”用来指一类微球体的数目，这类微球体产生CV不大于2%的小角度正向散射光脉冲高度分布直方图。若不控制样品流直径，以使非免疫化学敏感的比照单分散球状微粒的直方图CV约为2%或更小，则该方法的灵敏度会受不利影响，而且不容易观察到直方图的对称性拓宽或缩窄。

能够采用多种流体驱动装置来取得上述窄液流。其中包括步进电动机控制的注射泵和真空装置。本领域的技术人员会认识到最佳

模式是，其中液流直径在测量过程中能被直接或间接调节，并控制在合适的线度范围内的模式。还需要给流管配备液流中心化装置以便尽可能精确地把缩窄了的流体样品流限定在鞘管式流管的中心。要监控缩窄和中心化这两个方面，在免疫反应微粒测量期间的前、后或进行中监控样品流都是可能的。可以用一类比照数目的单分散性多聚微球体来实现以上两方面的任一方面。微球体的直径可以与分析用微球体相同或不同，并且不参加任何免疫结合反应。这类比照性微球体可作为一种警戒系统的一部分，该系统中的电子传感装置可以传感对所需CV值的偏差，然后反馈调节液流缩窄装置和液流中心化装置或其中之一，以此获得所需的CV值。

如上所述，为在正向结合(夹层结构)反应实施例中使用本发明方法，较大的单分散性微球体和较小的多分散性金属微粒都要用不同的互补结合分子包被。在被分析物是抗原或半抗原的情况下，单分散性多聚微球体被第一互补型的抗抗原或半抗原被分析物抗体所包被，该抗体可以是指向抗原第一抗原决定部位的单克隆(monoclonal)抗体。多分散性金属微粒被第二类抗抗原被分析物的抗体包被，该抗体可以是指向抗原被分析物第二抗原决定部位的单克隆(monoclonal)抗体。在抗原存在的情况下，发生典型的“夹层结构”反应，抗原把较小的金属微粒随机地交联到较大多聚微球体的表面上。当这种情况发生和随之形成的微粒型免疫复合体穿过前述光学流管时，我们意外地发现单分散光散射脉冲高度分布直方图的由直方图图形表示所反映出来的CV和标准偏差，其产生了围绕峰平均值大致呈对称拓宽了的峰。我们也发现该扩展与液体样品里被分析物的浓度有直接和定量的关系。

图1表示了本发明这一实施例的原理。图1A表示的是单分散性胶乳微球体(直径约 $1.0\mu m$)和多分散性胶态金属微粒(直径约 $20-120\text{nm}$)的相关直径。在上述较佳微粒直径的情况下，可以看到多聚微球体和金属微粒的大小之比在15-30:1间。这一特性为在每个多聚微球体上可以随机地结合有大量胶态金属微粒提供了可能。图1B表示胶乳微球体的光散射脉冲高度分布直方图。从胶乳微球体发出的脉冲高度信号值高，而代表直方图的峰的宽度很窄。这清楚地表明从自凝集的金属微粒发出的少量光散射不会和微球体产生的直方图相干扰，即不重叠。在被分析物中介下金属微粒结合到胶乳微球体上之后，正向结合反应中的胶乳直方图的峰发生扩宽(图1C)。即使在结合本发明各个实施例(图1D中的直方图D1、D2、D3、D4)来同时分析单个样品中的多重被分析物时，未结合的金微粒产生的信号不会有重叠。

在胶乳微球体表面产生稳定吸收蛋白的方法之概述可参考Seaman, G. V. F., ed., *Latex Based Technology in Diagnostics, Health & Science Communications*, Washington, D. C. 20005, 1990。

我们已发现本发明也可以在一个替代性实施例中实行。用这种方式实现本发明时，先分别将两种类型的微粒与互补结合分子孵育来使这两类微粒免疫化学敏化以形成一种含两种成分的免疫复合体反应物。在一个实施例中，大多聚微球体被被分析物稳定地包被。与被分析物互补的结合分子包被金属微粒。两种悬浮液混合形成一种试剂，在使用前可先贮存起来。然后将这种试剂与包含被分析物的流体样品混合。利用免疫复合体的形成，被分析物从多聚微球体上置换下一部分结合了的金属微粒。这一置换引起上述免疫复合体反

应物的光散射脉冲高度分布直方图的线度减小。这一减小与流体样品里存在的被分析物浓度成比例。

在一个竞争类型实施例中，被分析物和被分析物包被的多聚微球体相竞争着结合到抗体—被分析物包被的金属微粒上去。经过适当的孵育期之后，就可以测定悬液的FPA和直方图了。比照物仅由被包被的多聚微粒组成。

如前所述，在一个抑制型实施例中，被分析物与被抗被分析物结合分子包被的多分散性金属微粒孵育一定时间例如5—30分钟，在这段时间里被分析物结合上去并隔离开一部分金属微粒。未结合的金属微粒仍可自由地与随后加入并孵育的多聚微球体相结合，这些多聚微球体原已被结合分子（其可以是一种含被分析物的载体结合分子）包被，在一段短时间，例如5—10分钟孵育之后，比照和实验的单分散性多聚微球体的FPA就将显示出未结合的金属微粒的量，这个量反过来又与被分析物浓度成反比。

显然关于抗原性或半抗原被分析物和抗体包被的微粒已方便地描述了本发明的正向结合（夹层结构）反应、抑制、替代和竞争型实施例，但是应该明白本发明的范围包括了其中被分析物是存在于例如人血清和类似物中的抗体的分析。在用正向结合方式进行这些分析时，两种微粒都可以用与被分析物互补的抗原包被，或任选地，一种微粒可以用抗原包被，另一种用对准抗体被分析物的第二抗体包被。在这种方式里，有抗体被分析物存在时，小的多分散性金属微粒与单分散性多聚微粒复合，测量光散射脉冲高度分布直方图的前述统计性变化。

以上部分描述了流体样品中单个被分析物的分析。在本发明的

范围之内，可同时分析同一液体样品中的多重被分析物，而不需要象已有技术方法一样必须把样品分开以进行多重性分析。这一点可以通过分配给每一种所要测定的被分析物一个直径和(或)折射率和结合反应类型是独特的多聚微球体来实现。当然，不同大小微球体的包被情况由分配给被分析物的分析系统类型，例如正向结合、抑制、替代或竞争来决定。多重被分析物的分析系统可以相同或不同。本发明的这个实施例依靠FPA的电子部分来监控由每一类不同大小多聚微球体产生的光散射信号。监控每种尺寸的微球体的电子系统公布在申请编号为883, 574的待批准美国专利申请上，可供参考。简单说来，两个分析系统或其中之一可以分析从光检测器发来的信号，该光检测器接收多聚微球体发出的光散射信号。在一个以软件为基础的最佳分析系统里，从光散射探测器发出的脉冲进入一个模→数转换器，该转换器对每个脉冲的峰高取样，并将这些峰高值送入计算机，计算机按大小整理这些峰高值并将它们排成一个直方图，它可以是一个平滑的直方图，每一种被分析物有一个图。

结合分子包被的多聚微球体可以商业购买(Polysciences, Inc.)，或按以上Seaman, 1990中所说的方法来制备。在一个典型的包被操作程序中，微球体悬液和一定浓度的第一结合分子的缓冲溶液(PH为7—8)孵育一段时间，典型的为0.5—16小时，足以使结合分子与微球体的结合达到平衡。通过简单的离心作用回收已被包被过的微球体，通过短时间(例如15分钟)相对含一种惰性蛋白(例如脱脂干燥牛奶颗粒或血清白蛋白)的溶液进行暴露，非特异性结合位点被封锁。然后用至少4倍体积的冷藏缓冲液将被包被的微球体洗涤至少3遍。可以采用任何一种能使微球体悬液稳定贮存的贮藏缓冲

液。典型的贮藏缓冲液是0.5%BSA—0.1%NaN₃，在0.154MNaCl中，PH7.4或0.1%BSA—0.01%NaN₃，在10mMHEPES缓冲液中，PH7.5。

多分散性金属胶体可以由金属或金属化合物制成，例如金属氧化物、金属氢氧化物和金属盐。例子包括金属金、铂、银、铜，其中金最合适。所需范围微粒直径的胶体金的制备方法和用蛋白质包被金属微粒的方法之概述可参考：Roth, J., “The Colloidal Gold Marker System for Light and Electron Microscopy Cytochemistry,” in Bullock, G. R. et al., Techniques in Immunohistochemistry, 2: 217 (19), in Horisberger, M., SEM11: 9 (1981), in Weiser, H. B., In organic Colloid Chemistry, J. Wiley, N. Y. 1931, P. 1, in Leuvering, J. H. W., 美国专利4, 313, 734, 和 in Frens, G., Nature, Physical Science, 241: 20 (1973)，以上全部用作参考。

多分散性胶态金微粒悬液可从E-YLaboratories, Inc., San Matteo, CA94401得到，或按上述参考资料所述制备。在优选的方法中采用上述Frens (1973) 的方法来制备微粒直径大小在10—120nm间的多分散性胶态金微粒。虽然这种方法产生的金微粒大小的范围较宽，但在本发明中范围大小并不是一个关键因素。如上所述，这些大小的金微粒在本发明的条件下不产生可测量和干扰性的光散射。因此，本文所述的“多分散性金属微粒”指直径在20—120nm间的胶态金属微粒的数目。

在用抗体包被金微粒的一个方法中，用K₂CO₃将上述金微粒溶液滴定到PH=7.5。用来包被的分子例如抗体溶解在PH7.5的10mMHEPES缓冲液里，其中含有0.02%BSA充当稳定剂，并按十分之一体积加到金微粒溶液里。混合60分钟后，加入十分之一体积的0.1%脱脂

干燥牛奶固态物以封闭非特异性结合位点。用离心方法将微粒在贮藏缓冲液(10mM HEPES, PH7.5, 0.1%BSA, 0.01%NaN₃, 1%mannitol(甘露醇))里洗涤三遍，并立即使用或在4°C下贮存。包被金微粒的其它方法在以上Leuvering的参考资料里述及。

利用本发明，通过将适当互补的单克隆或多克隆抗体被动或共价地结合到胶态金属(如金)微粒和多聚(如胶乳)微球体上，据此可以进行诸如甲状腺促进激素(TSH)之类的多抗原决定部位的、高分子量抗原的高灵敏度分析。如果不兼顾蛋白质的免疫学整体性，和在分析条件下稳定地进行结合，则不能严格地获得蛋白质结合的准确方法。这种分析尤其倾向于用CV约2%的1.62 μm直径胶乳微球体(Interfacial Dynamics Corp.)。经电子显微镜测定的大小在50—80nm、有着多分散性大小的胶态金微粒按前述方法制备，是最佳的。

前面说过我已经发现当胶态金属微粒在相对多聚微球体为高密度下使用时，如2—100,000:1，可以充当“净化剂”，用于清除普遍存在于生物源液体样品(如血清)里的非特异性干扰物质。也就是说金属微粒不仅提供了本发明定量免疫分析的基础，同时减小了干扰物质的不利影响。虽然从这方面看有效的微粒比很宽，但数量级为1000—10000:1的金属微粒与多聚微球体之比是比较好的。

以下的例子仅用来说明本发明的几个实施例，并不欲限定本发明的范围。本发明的范围包含在说明书及其中所含权利要求中。

例1

血清TSH的正向结合(夹层结构)反应分析

采用下法将多分散性胶态金微粒(50—80nm)用第一抗TSH单克隆抗体(BioDesign International, Inc., Kennebunkport, ME 04046)

包被。用0.2M碳酸钾将胶态金微粒悬液调到PH7.5。按十分之一体积向此悬液中加入包被的抗体，其在10mMHEPES—0.02%BSA(PH=7.5)中被稀释。混合1小时后，混合加入十分之一体积的脱脂干燥牛奶固态物溶液。利用离心作用将微粒在含有1%BSA, 0.01NaN₃, 1%mannitol(甘露醇)的10mMHEPES缓冲液(PH7.5)中洗涤三次。

Hansen, 申请号为883, 574的美国专利申请中述及用第二抗TSH单克隆抗体包被1.62 μ m直径(直径CV约为2.0%)的聚苯乙烯(胶乳)珠，在此供参考。

按10,000:1的比例混合包被了的金微粒和包被了的胶乳微粒，形成反应物A。按一定体积将反应物A加入到含TSH的血清中，使胶乳微球体最终的密度约为 $2 \times 10^6 / \text{mL}$ ，血清为40%。室温下孵育60分钟后，如前述采用小角度正向光散射在鞘管式FPA中测量混合物。图3显示了标准化峰宽单位(图2中的“NPW”)是血清中被分析物TSH浓度(浓度范围为0—1.2 μ IU/mL)的函数。在血清中这个分析的灵敏度约为 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ 。

例2

甲状腺素(T4)的抑制型分析

按下法将单分散性胶乳微球体(直径1.62 μ m, Interfacial Dynamics Corp.)用人甲状腺球蛋白(Calbiochem Inc.)包被，形成反应物A。微球体在10mM, PH 7.5的HEPES缓冲液里与甲状腺球蛋白抗原孵育过夜。经离心作用回收微球体，用上述含BSA和NaN₃的HEPES缓冲液洗涤，贮存在含甘露醇的同一缓冲液里。

按下法用相对T4的抗体包被多分散性胶态金微粒(50—80nm直径)，形成反应物B。按十分之一体积向金微粒中加入含抗体和BSA

的10mMHEPES缓冲液(PH7.5)。在T4测定中，用来包被的是一种经IgG纯化的特别相对T4的多克隆抗体(OEM Concepts)。已被包被的微粒再用脱脂干燥牛奶粉的溶液进行后包被，以封闭其上的非特异性结合位点。经离心作用回收微粒，并用含BSA和NaN₃的10mMHEPES缓冲液(PH7.5)洗涤。洗涤后的微粒贮存在同样的缓冲液中，并加入甘露醇作为稳定剂。被包被了的金微粒稀释到一种分析用缓冲液中，其含有50mM甘氨酸(PH9)，10mMEDTA，0.01%氨基苯磺酸(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)，0.1%BSA，0.3M KI和0.01%NaN₃。

含T4的血清样品与反应物B共同孵育30分钟，然后加入反应物A使其微球体密度为 $2 \times 10^7 / \text{mL}$ 。再孵育30分钟后，用小角度正向光散射测定样品的直方图峰宽来在FPA中分析样品。

血清中的T4抑制金微粒与胶态甲状腺球蛋白的结合。高浓度的血清T4产生窄的直方图峰宽，低浓度血清T4则相反(图4A)。图4A中的曲线由标定血清(Biomerica, Inc., San Luis Obispo, CA)产生，并用作和标准EIA方法，即EMIT方法(Syva Corp., Palo Alto, CA)进行进一步比较的标准曲线。图4B表示了相关数据。在所示被分析物浓度范围内的相关性大于95%。

例3

在相同流体样品里的TSH和T4的同时性分析

为说明在相同液体样品里可以分析多重分析物，例1和例2里所述的TSH和T4免疫分析被结合起来。分别用平均直径为0.95 μm和1.62 μm的单分散性胶乳微球体的数目来分析T4和TSH。血清最终浓度为15%，金微粒的浓度为 $1 \times 10^{10} / \text{mL}$ ，对于T4胶乳微球体浓度为 $1 \times 10^8 / \text{mL}$ ，而对于TSH为 $5 \times 10^6 / \text{mL}$ 。

按以下顺序来进行反应。用例1所述方法来进行TSH分析反应。在这种反应30分钟后加入例2的反应物B。自此25分钟后，加入例2的反应物A，并将混合物孵育5分钟，然后进行FPA分析。

当用FPA系统和本发明的方法来分析中等浓度范围的被分析物时，对T4的结果是 $4\mu\text{g/mL}$ ，对TSH为 $2\mu\text{IU/mL}$ 。用本方法分析无T4而含 $2\mu\text{IU/mL}$ 中等范围水平的TSH样品时，T4测量值为0，TSH测量值为 $2\mu\text{IU/mL} \pm 10\%$ 。若使用含已知低浓度的TSH($0.3\mu\text{IU/mL}$)和已知中等浓度 $4\mu\text{g/mL}$ T4的样品，则本发明和已知值在10%以内相关。

本发明的方法允许同时性分析。这个实验说明使用本方法可以得到可独立的结果，且单一个过程中的各个分析间没有可觉察的交叉性干扰。

例4

本发明方法和测定IgE的标准胶乳—胶乳凝集方法的比较

为说明本发明在消除非特异性结合之不利影响这一方面的功效，用两种形式来分析人IgE。第一种形式中，按前述Masson等人的方法将抗IgE的多克隆抗体被动包被在胶乳微粒上，进行一般的胶乳微球体—胶乳微球体凝集，并监测单聚微球体的消失情况。胶乳微粒直径为 $1.62\mu\text{m}$ 。第二种形式用本发明的正向结合反应实施例。

为包被金属微粒，用 $0.2\text{M}\text{K}_2\text{CO}_3$ 将金微粒悬液滴定到PH7.5。按十分之一体积向这种悬液中加入溶在含0.02%BSA，PH7.5的10mMHEPES缓冲液里的小鼠单克隆人抗IgE(Biodesign International, Inc., Kennebunkport, ME, 04046)。混合60分钟后，按十分之一体积加入0.1%的脱脂干燥奶粉固体之溶液。用离心作用分离出微粒，用相同缓

冲液洗涤三次，贮存在含10mMHEPES, 0.01%BSA, 0.01%NaN₃, 1%mannitol(甘露醇)的贮存缓冲液里。

为包被胶乳微球体，将1.62 μ m胶乳微球体(Interfacial Dynamics Intnl., Portland, OR 97220)在10mMHEPES, PH7.5溶液里稀释到0.5%的密度，将该悬液与100 μ g/mL亲和纯化了的山羊抗人IgE的溶液在4°C下孵育过夜，经离心作用分离出微球体，并用HEPES缓冲液洗涤三次，最后贮存在含10mMHEPES, 0.1%BSA, 0.01%NaN₃, 1%mannitol(甘露醇)的缓冲液里。

为进行分析，胶乳和金微粒分别在分析缓冲液里稀释到 1×10^3 /mL, 和 2×10^{10} /mL。将50 μ l的被分析物血清样品等分试样加到450 μ l的微粒混合物中，用涡旋混合。最终血清稀释为10%。在23°C下孵育15分钟后，可以对反应混合物进行FPA分析了。分析缓冲液含0.05M甘氨酸, 0.1%BSA, 0.3MKI, 0.01%NaN₃, PH9.5。

一种商用的血清IgE的ELISA IgE分析方法(Ventrex Laboratories, Portland, ME)可以用作以上两种形式的参照标准。图5A表示了胶乳—胶乳凝集形式的相关性曲线，图5B则表示本发明方法的相关曲线。从图中数据可清楚地看到胶乳凝集法的相关性不好，而且灵敏度有限，可能是因为被分析物血清样品中干扰物质的影响。对比鲜明的是，本发明的胶乳微球体—金微粒方法与参照方法有出色的相关性(图5B)。

例5

直方图峰宽扩展的动力学。

进行例1分析所用的方法允许间歇性的反应混合物(含6 μ IU/mL TSH)的小角度正向光散射FPA分析。

在没有被分析物(图6中的一〇一)的情况下，被包被了的金微粒不结合到被包被了的胶乳微球体上去，而且直方图线度也没有变化。然而，在被分析物(图6中的一□一)存在的情况下，在单分散性胶乳微球体的直方图扩展有反映时从第一个时间点(2分钟)对结合进行检测。这个扩宽在反应的前20分钟里以线性比率延续，约在100分钟时达到平稳状态。

反
应
前
后

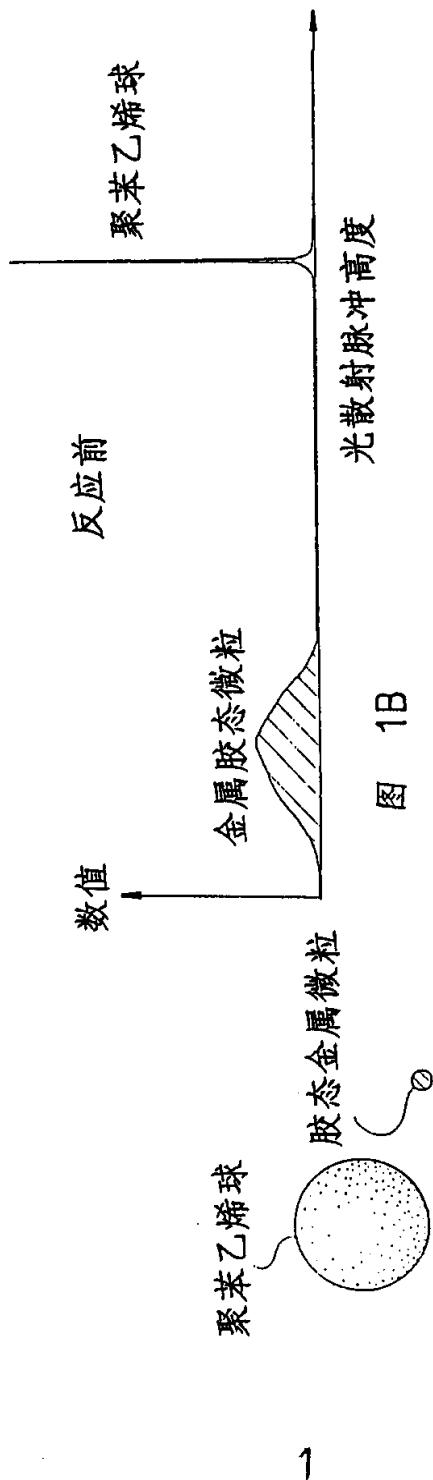


图 1B

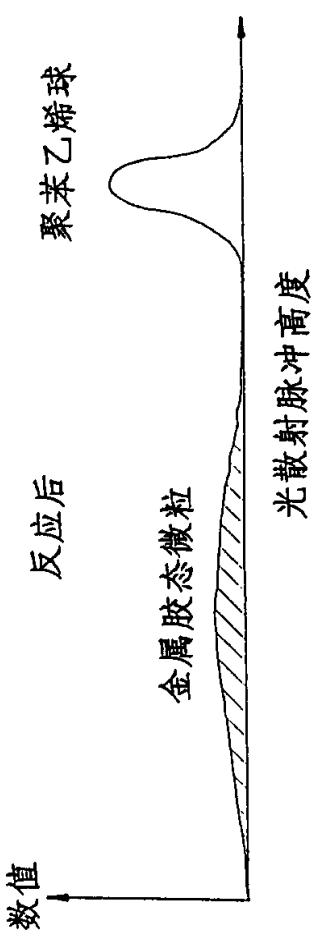


图 1C

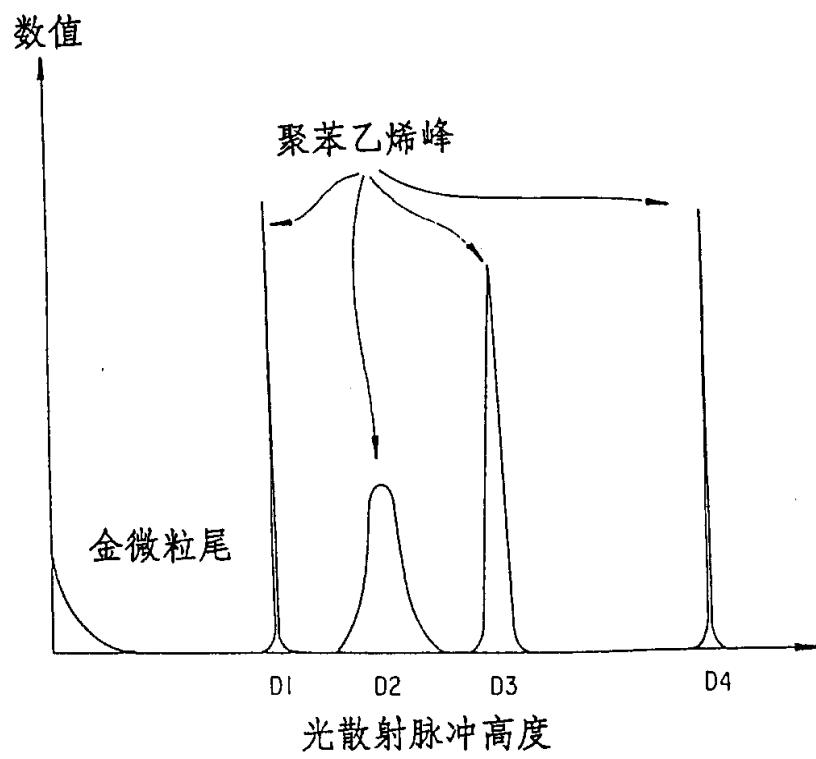


图 1D

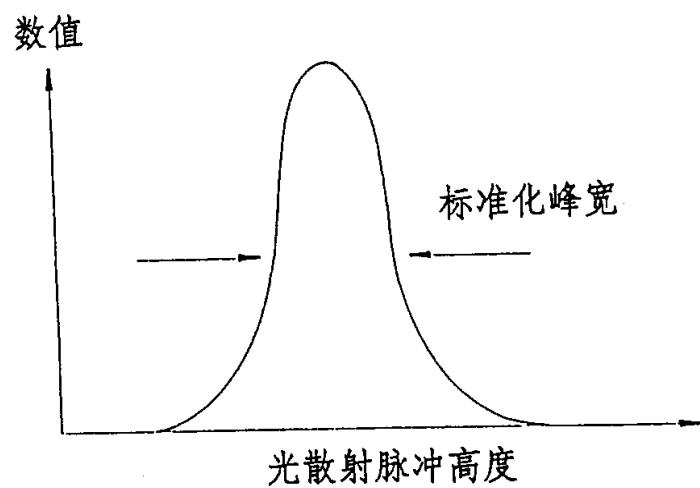


图 2A

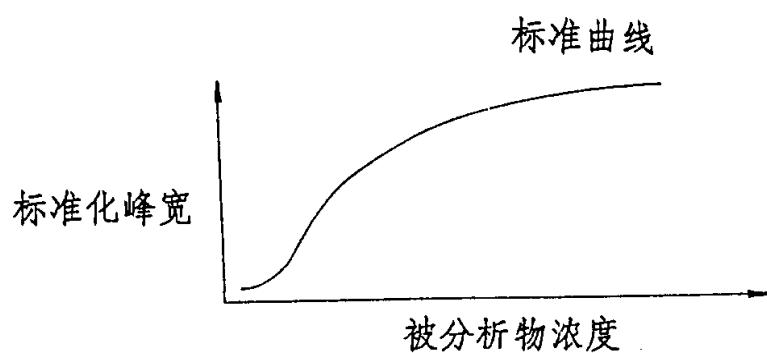


图 2B

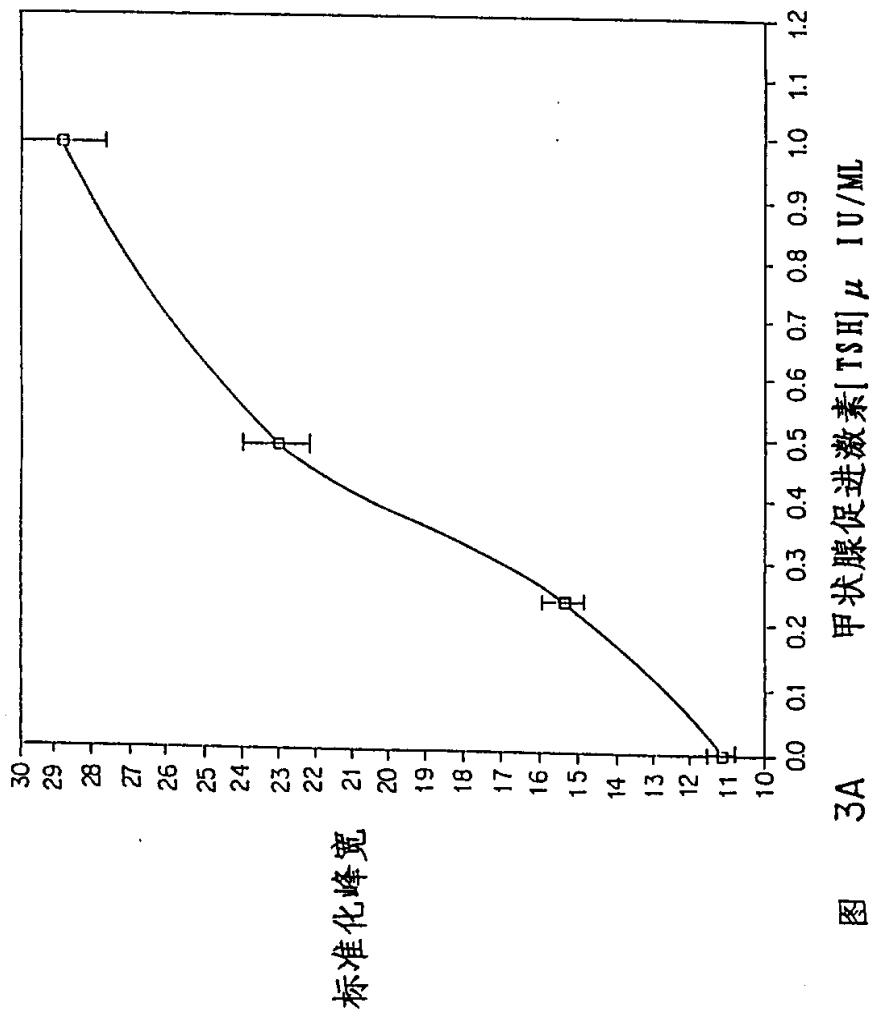


图 3A 甲状腺促进激素[TSH] μ IU/ML

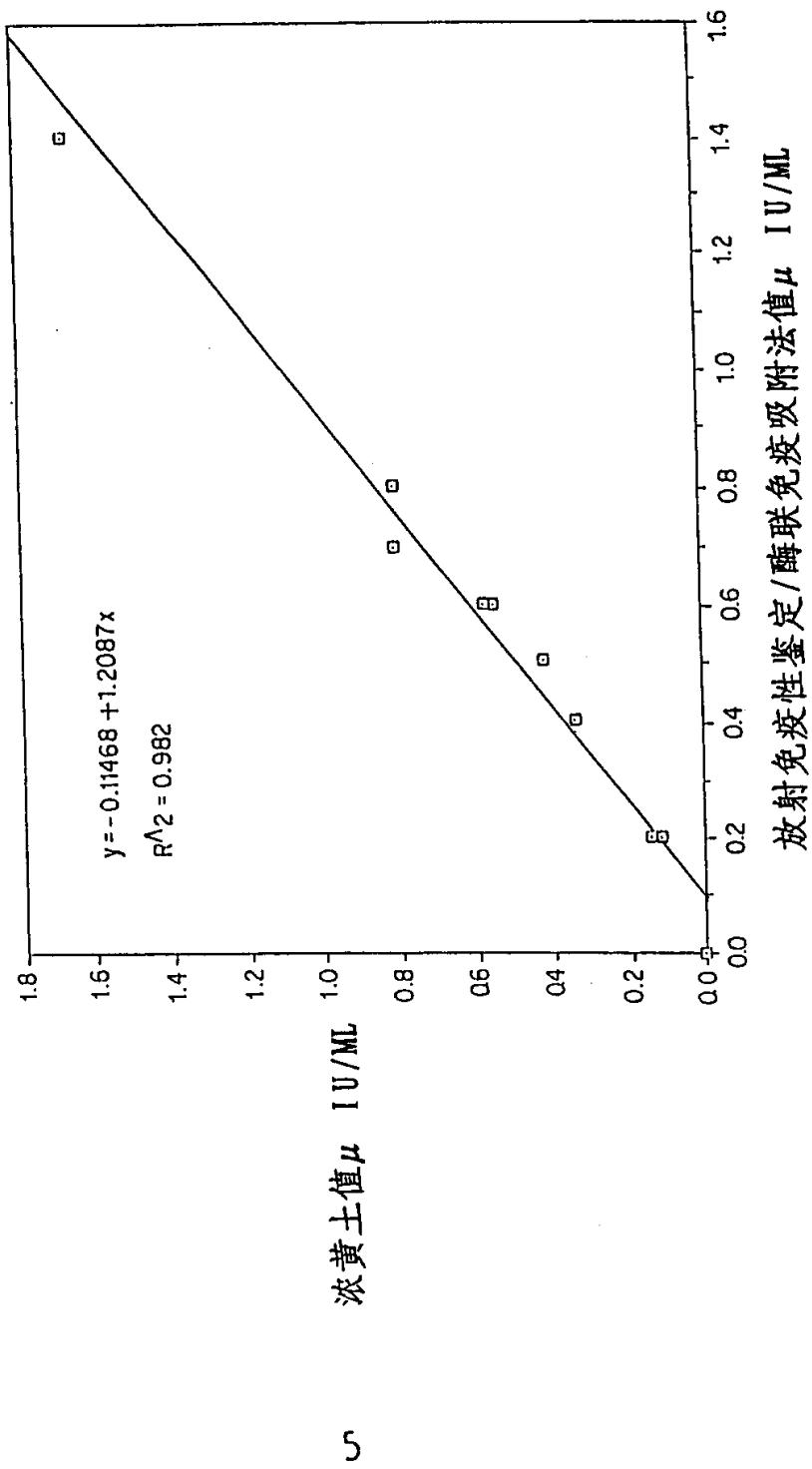


图 3B

直方图
标准化峰宽

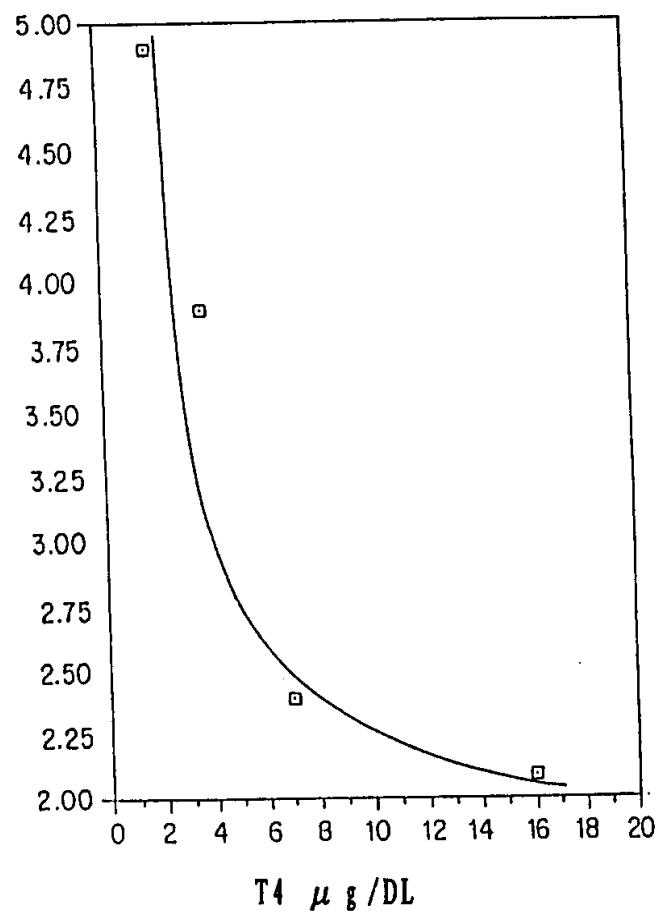


图 4A

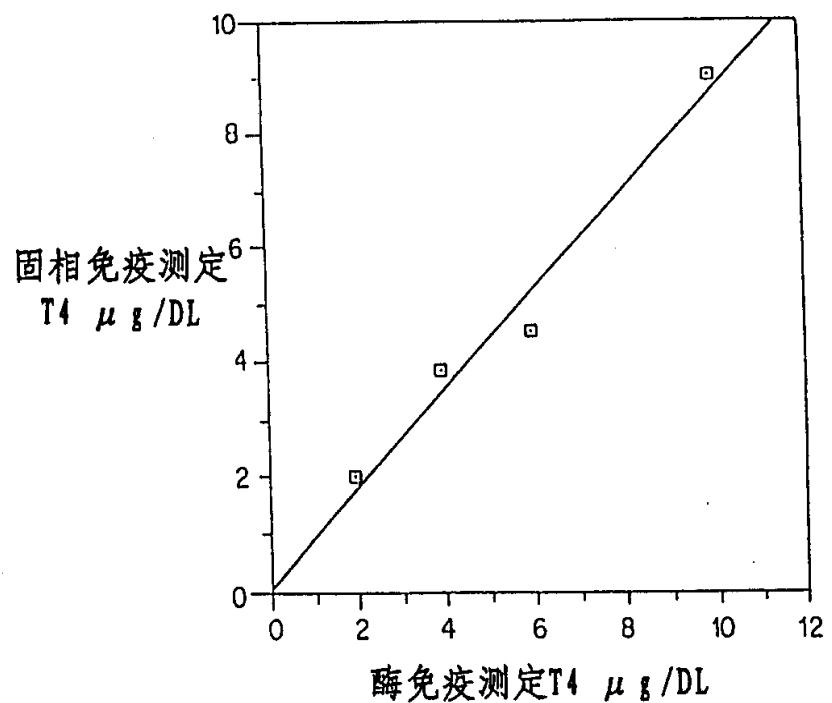
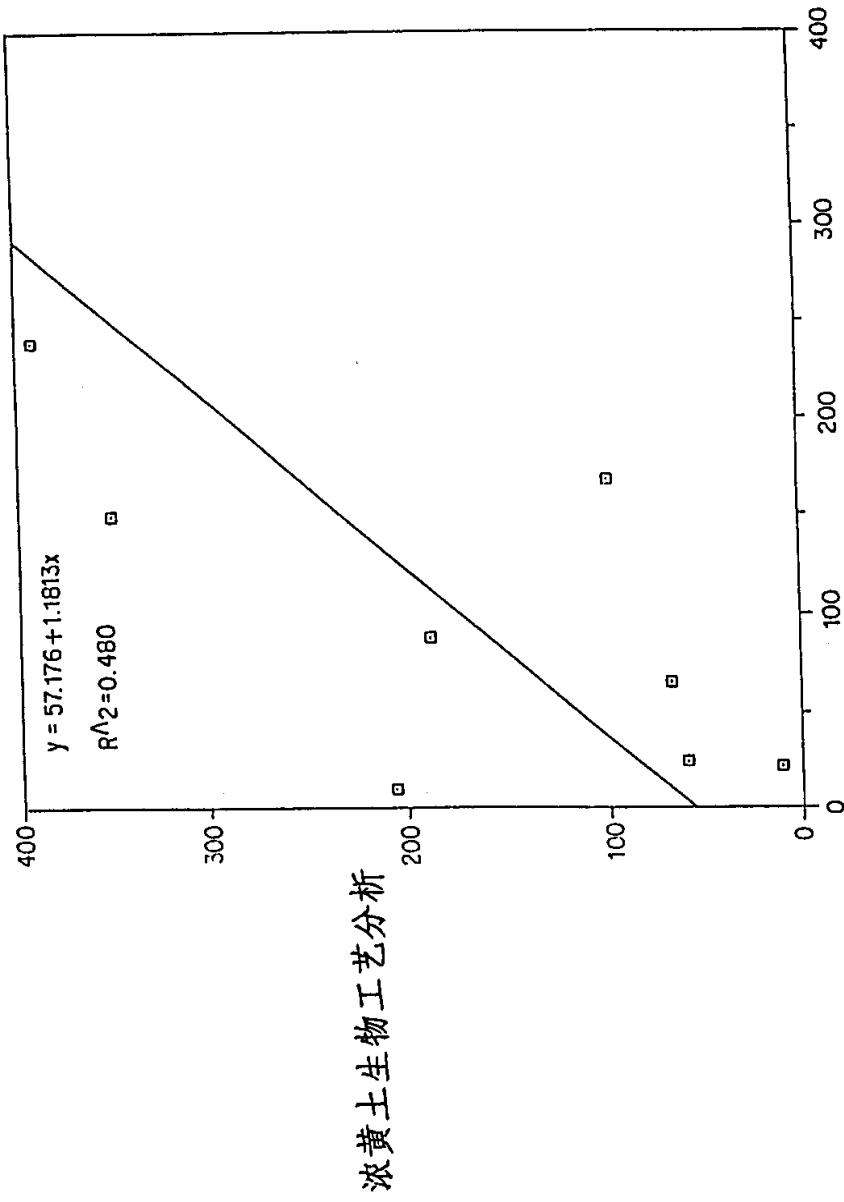


图 4B

商业可达到的分析

图 5A



浓黄土生物工艺分析

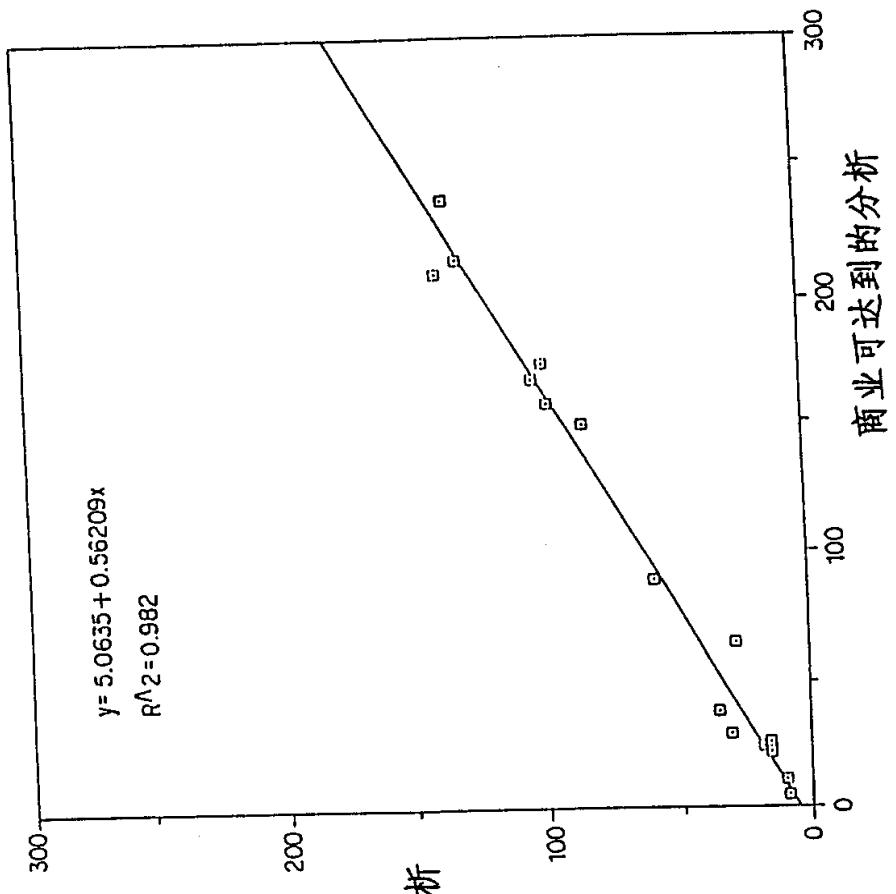


图 5B

浓黄土生物工艺分析

