

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 27/00 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780045790.3

[43] 公开日 2009年12月2日

[11] 公开号 CN 101595387A

[22] 申请日 2007.12.10

[21] 申请号 200780045790.3

[30] 优先权

[32] 2006.12.13 [33] SE [31] 0602682-7

[32] 2006.12.13 [33] US [31] 60/874,470

[86] 国际申请 PCT/SE2007/050967 2007.12.10

[87] 国际公布 WO2008/073042 英 2008.6.19

[85] 进入国家阶段日期 2009.6.11

[71] 申请人 瑞典生物传感器应用股份公司

地址 瑞典索尔纳

[72] 发明人 P·曼森 B·桑登

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 黄可峻

权利要求书2页 说明书8页 附图2页

[54] 发明名称

在测试体积中测试抗原的连续可重复方法

[57] 摘要

描述了采用流通分析装置例如压电石英晶体微量平衡装置(QCM)、椭率计装置和表面等离共振生物传感装置,在预先确定的测试体积中检测一种或几种不同的选择的靶抗原如炸药和/或麻醉剂的可能存在的连续可重复的方法。给所述装置配置了一个或几个流体连接的、单独操作的流通测试池,每一个池含有传感表面,每一个传感表面包含固定在其上的选择的经修饰的靶抗原,所述经修饰的抗原具有比靶抗原更弱的对所选择的抗体的亲和力,所述抗体对选择的靶抗原是特异的。一个测试池用于通过竞争模式分析靶抗原,而任选的其它测试池被单个地选择用于通过竞争模式或置换模式的分析。

1. 用流通分析装置在预先确定的包含缓冲溶液的测试体积中检测一种或几种不同的选择的靶抗原可能存在的连续可重复的方法, 所述流通分析装置包含一个或几个流体连接的、单独操作的流通测试池, 每个测试池含有传感表面, 每一传感表面包含固定在其上的选择的经修饰的靶抗原, 所述经修饰的抗原具有比所述靶抗原更弱的对所选择的抗体的亲和力, 所述抗体对选择的靶抗原是特异的, 所述方法包括以下步骤:

- a) 使所述缓冲溶液流通每一测试池,
- b) 单个地登记对于每一传感表面的基线值,
- c) 使等于测试体积的预定体积的含有预定量的一种或几种选择的抗体的缓冲液流通每一测试池,
- d) 通过与 b) 中的基线值相比较来单个地登记每一传感表面由于选择的抗体与经修饰的所讨论的靶抗原暂时结合所致的重量增加值,
- e) 将与步骤 c) 中相同预定量的选择的抗体添加至可能含有所述一种或几种靶抗原的测试体积, 用于靶抗原-抗体复合物的可能的形成,
- f) 使所述的测试体积流通每一测试池,
- g) 单个地登记每一传感表面上的重量值, 并且在有步骤 d) 中登记的重量增加值减少的情况下, 其是由于作为靶抗原-抗体复合物形成的结果的在该测试池中更少的抗体与经修饰的靶抗原的结合, 指示在所述的测试体积中存在靶抗原; 随后
- h) 用包含可能含有所述一种或几种靶抗原的缓冲溶液的连续的测试体积重复步骤 a)-g)。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中通过如下方法单个地检测测试体积中几种不同靶抗原中的一种或几种的存在: 通过将一种或几种对选择的靶抗原特异的选择抗体加入到步骤 a) 而不是步骤 c) 和 e) 的缓冲溶液中, 用于在所讨论的传感表面上暂时地形成经修饰的抗原-抗体复合物, 并且在步骤 g) 中单个地登记在每一传感表面上的重量值, 并且在与步骤 b) 中登记的基线值相比较存在重量损失的情况下, 其是由于作为靶抗原-抗体复合物形成的结果的来自该测试池的经修饰的靶抗原的抗体的置换, 指示在所述的测试体积中存在靶抗原。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中仅供任选或在用第一测试体积进行测试后如果需要的话, 才重复步骤 b)、c) 和 d)。

4. 根据权利要求3的方法,其中在第二至第一百个测试体积后重复步骤b)、c)和d)。

5. 根据权利要求1-4中任一项的方法,其中所述分析装置选自压电石英晶体微量平衡装置(QCM)、椭圆率计装置和表面等离共振生物传感器装置。

6. 根据权利要求1-5中任一项的方法,其中所述一种或几种不同的靶抗原选自炸药和麻醉剂。

7. 根据权利要求6的方法,其中所述炸药选自三硝基甲苯(TNT)、二硝基甲苯(DNT)、六氢-1,3,5-三硝基-1,3,5-三嗪(RDX)、八氢-1,3,5,7-四硝基-1,3,5,7-四嗪(HMX)、四硝酸季戊四醇酯(PETN)和硝化甘油(NG)。

8. 权利要求6的方法,其中所述麻醉剂选自可卡因、海洛因、苯丙胺、甲基苯丙胺、四氢大麻酚(THC)、苯并二氮杂革以及亚甲基二氧基-N-甲基苯丙胺(克斯他司)。

## 在测试体积中测试抗原的连续可重复方法

本发明涉及借助于流通分析装置在测试体积中检测一种或几种不同靶抗原的连续可重复的方法，所述流通分析装置具有一个或几个流通测试池，每一个池含有传感表面，诸如压电石英晶体微量平衡装置(QCM)、椭率计装置或表面等离子共振(SPR)生物传感器装置。

### 背景技术

表面等离子共振(SPR)生物传感器是敏感的实时技术，其可以被用于精确地提供关于在某些金属表面附近的分子相互作用的信息。其提供了检测浓度、结合速率常数和离解速率常数及亲和力和表位作图以及确定相互作用特异性的可能性[B. Liedberg 和 K. Johansen, Affinity biosensing based on surface plasmon detection, "Methods in Biotechnology, 卷 7: Affinity Biosensors: Techniques and Protocols", K. R. Rogers 和 A. Muchandani (编辑), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 第 31- 53 页]。可在 SPR 实验之前或在此期间将参与所研究的反应的组分中的一种固定在金属表面上。将该固定的分子暴露于连续流，可以往该连续流种注入相互作用的物质。该方法基于光学检测并且传感信号反映了在该表面处电介质函数或折光率的变化。这些变化可能由表面处的分子相互作用引起。

椭率计利用了光的偏振态的变化，当从表面反射时，光的偏振发生改变。当在流通池中表面组成发生改变时，反射光的偏振作用发生改变。因此可以从此类测量推导出有关薄膜厚度的信息。可以在如美国专利申请号 US2004/0142482 所描述的流通池中应用该方法。

压电技术基于公知的通过测量压电石英晶体的频率来实时测量质量改变的原理。压电石英晶体装置由在其两侧具有金属电极的石英晶体薄片组成。应用这些电极以感应与置于该电极上的质量改变直接相关的振荡共振的频率。因此压电晶体可以用于灵敏的质量检测并且因此被称为石英晶体微量平衡(QCM)。已经提出了许多方程来描述频率改变和在晶体上的质量沉积之间的关系。

有大量的专利指向通过应用压电晶体微量平衡来检测溶液中的预

先确定的化学物质或生物分子,例如,美国专利号 4,735,906、4,789,804、和 5,705,399。当在相同的测试溶液中存在几种待检测的单独的化学物质或生物分子(被分析物)时,则拥有可同时操作多个具有流通池的微量平衡的系统是有利的,所述流通池单个地对待检测的分析物中的一种是特异的。这样的系统已被公开在我们的国际专利申请 WO2004001392 中,并且其对于在短时间内筛选大量样本而言是特别有用的。

迄今已知的用于分析液体样本以通过应用特异的与靶抗原形成复合物的抗体来检测一种或几种靶抗原的分析方法被设计用于竞争反应或置换反应。在置换反应中,所需的抗体与固定的抗原衍生物的亲和力需要比抗体与液体样本中靶抗原的亲和力弱,而这在竞争反应中并不是必需的。

#### 发明详述

本发明提供了采用流通分析装置在预先确定的测试体积中检测一种或几种选择的靶抗原可能存在的连续可重复的方法。该分析装置配有一个或几个包含传感表面的流通测试池。单独地设计每一传感表面以使其具有固定在其上的修饰的抗原,所述抗原暂时地与对待检测的靶抗原具有更强亲和力的抗体结合。在本发明中在竞争反应分析装置中应用此类流通池。将测试体积中的选择的靶抗原与预定量的选择性抗体混合。通过与用经修饰的抗原功能化的感受器表面短暂的结合来测量没有与靶抗原形成复合物的抗体的量。该暂时的结合对于在传感表面上测量测试体积中的竞争性抗体-抗原复合物而言是足够的。在暂时的结合后,该抗体将从所述传感表面解离并将在样本体积通过池后被流动流体带走。现有技术中公开了竞争反应,诸如我们的国际专利申请 WO 2005050209,可通过降低流动流体的 pH(例如通过添加甘氨酸)来再生传感表面。当在连续流通分析装置中应用一个或若干个上述用于竞争反应的流通池时,在根据本发明分析下一体积之前不需要再生该传感表面。

本发明还提供了采用流通分析装置在预先确定的测试体积中检测一种或几种不同的选择的靶抗原的可能存在的连续可重复的方法,其中采用一个或几个单独操作的用于竞争反应的流通池以及一个或几个单独操作的用于置换反应的流通池来运行该装置同时。

因此,本发明提供了采用流通分析装置在预先确定的包含缓冲溶液

的测试体积中检测一种或几种不同的选择的靶抗原可能存在的连续可重复的方法，所述流通分析装置包含一个或几个流体连接的、单独操作的流通池，每一流通池含有传感表面，每一传感表面包含固定在其上的选择的经修饰的靶抗原，所述经修饰的抗原具有比靶抗原更弱的对所选择的抗体的亲和力，所述抗体对选择的靶抗原是特异的，所述方法包括以下步骤：

- a) 使所述缓冲溶液流通每一测试池，
- b) 单个地登记对于每一个传感表面的基线值，
- c) 使等于测试体积的预定体积的含有预定量的一种或几种选择的抗体的缓冲液流通每一测试池，
- d) 通过与 b) 中的基线值比较来单个地登记每一传感表面由于选择的抗体与经修饰的所讨论的靶抗原暂时结合所致的重量增加值，
- e) 将与步骤 c) 中相同预定量的选择的抗体添加至可能含有所述一种或几种靶抗原的测试体积，用于靶抗原-抗体复合物的可能的形成，
- f) 使所述的测试体积流通每一测试池，
- g) 单个地登记每一传感表面上的重量值，并且在有步骤 d) 中登记的重量增加值减少的情况下，其是由于靶抗原-抗体复合物形成的结果的在该测试池中更少的抗体与经修饰的靶抗原的结合作为，指示在所述的测试体积中存在靶抗原；随后
- h) 用包含可能含有所述一种或几种靶抗原的缓冲溶液的连续的测试体积重复步骤 a)-g)。

例如，为了通过这一竞争模式检测可能存在于测试体积中的靶抗原 AgC1，诸如 THC 或苯并二氮杂萘，给流通分析装置配备含有传感表面的流通测试池，在所述传感表面上固定有经修饰的抗原 mAgC1。使缓冲溶液连续地流通该测试池，并且记录传感表面的基线值。然后将与测试体积等体积的预定体积的含有预定量的选择抗体 AbC1 的缓冲溶液流通测试池，所述抗体 AbC1 对 mAgC1 比对 AgC1 有更弱的亲和力。通过与基线值相比较来登记传感表面上由于 AbC1 与 mAgC1 的暂时结合所致的重量增加值。由于它们与含有经修饰的抗原的表面的弱亲和力，在所述的含有抗体的测试体积通过后，大多数结合的抗体从该传感表面被直接释放。往可能含有 AgC1 的测试体积中加入相同预定量的 AbC1，用于可能的 AgC1- AbC1 复合物的形成，并将该测试体积流通测试池。登

记每一传感表面上的重量值，并且如果有较早登记的重量增加值减少的话，其是由于较少的 AbC1 与 mAgC1 的结合，这是形成了 AgC1- AbC1 复合物的结果，表明在测试体积中存在 AbC1。由于在传感表面上 AbC1 从 mAgC1 中快速释放，在使缓冲溶液短暂流过后即能够分析下一测试体积，不需要对传感表面进行任何再生。如果连续地重复该分析，不需要针对多个连续运行的测试体积的新基线值。在这种情况下，仅供任选或在用第一测试体积进行测试后(诸如在运行第二至第一百测试体积后)如果需要的话，才重复本发明方法的步骤 b)、c)和 d)。例如，在用第五至第五十测试体积进行测试后。

在另一实施例中，这一竞争模式被用于检测附加的靶抗原 AgC2。这时，除了用于检测 AgC1 的测试池之外，还给流通分析装置配备了在其上固定有经修饰的抗原 mAgC2 的传感表面的流通测试池。将抗体 AbC1 和 AbC2 加入到相同的预定体积中，并且如果靶抗原 AgC1 和 AgC2 由于与含有各自的经修饰的抗原 mAgC1 和 mAgC2 的测试池竞争而与它们各自的抗体 AbC1 和 AbC2 形成复合物的话，则检测到靶抗原 AgC1 和 AgC2。

上述两个实施例单个地举例说明了一种靶抗原和两种不同的靶抗原的检测。然而，应当理解，本发明的方法可以用于同时检测几种不同的靶抗原，例如 AgC3、AgC4 等。

本发明的方法将任选地包含这样一个实施方案，其中通过置换模式单个地检测在测试体积中几种不同靶抗原中的一种或几种的存在，通过将一种或几种对选择的靶抗原特异的选择抗体加入到步骤 a)而不是步骤 c)和 e)的缓冲溶液中，用于在所讨论的传感表面上暂时地形成经修饰的抗原-抗体复合物，并且在步骤 g)中单个地登记在每一传感表面上的重量值，在与步骤 b)中登记的基线值相比较存在重量损失的情况下，其是由于作为靶抗原-抗体复合物形成的结果的来自该测试池中的经修饰的靶抗原的抗体的置换，指示在所述的测试体积中存在靶抗原。在这一实施方案中，在流通缓冲溶液流入每一测试池之前，给流通缓冲溶液补充针对一种或几种不同的选择靶抗原的单个抗体。只有在固定了经修饰的抗原(其中所述抗体对所述经修饰的抗原具有特异性的亲和力)的池中，所述单个抗体才与传感表面结合。当测试体积含有所讨论的抗原时，该抗原将与抗体形成更强的复合物，并将抗体从传感表面上置换下来，并

且形成的所述复合物被流通的缓冲溶液带走。

例如，通过本发明的方法，除了通过这一竞争模式检测可能存在于测试体积中的靶抗原 AgC1 之外，还可通过置换模式在相同的测试体积中检测至少一种靶抗原 AgD1，诸如可卡因、海洛因或苯丙胺。在这种情况下，也给流通分析装置配备含有传感表面的流通测试池，在所述传感表面上固定有经修饰的抗原 mAgD1。在登记基线值之前，将预定量的选择的抗体 AbD1 加入到流动缓冲溶液中，其中所述的抗体 AbD1 对 mAgD1 比对 AgD1 具有更弱的亲和力。在这种情况下，当 AbD1 与测试池传感表面上固定的 mAgD1 短暂结合时获得基线值。当将含有 AgD1 的测试体积流通测试池时，如果 AgD1 存在于该测试体积中的话，由于形成了 AgD1-AbD1 复合物，AgD1 从固定的 mAgD1 置换出一些 AbD1。将这作为与基线值相比较的在传感表面上的重量损失进行登记。该复合物被流动缓冲溶液带走，因此在缓冲溶液短暂流动后，即使得传感表面做为待分析的下一测试体积好了准备。如果连续地重复该分析，对于多个连续运行的测试体积不需要新的基线值。在这种情况下，供任选或在用第一测试体积进行测试后如果需要的话，在这一置换模式中重复将抗体加入到流动缓冲溶液中。在实践中，在这一置换模式中，在每次新运行测试体积之前添加新鲜抗体是方便的。

在这一实施方案的另一实施例中，将这一置换模式用于检测附加的靶抗原 AgD2。这时，除了用于检测 AgD1 的测试池和至少一个用于竞争检测 AgC1 的测试池之外，还给流通分析装置配备含有在其上固定有经修饰的抗原 mAgD2 的传感表面的流通测试池。在登记基线值之前，将预定量的选择的抗体 AbD2 与 AbD1 一起加入到流通缓冲溶液中，其中所述抗体 AbD2 对 mAgD2 比对 AgD2 具有更弱的亲和力。当含有 AgD2 的测试体积流经测试池时，如果 AgD2 存在于该测试体积中的话，由于形成了 AgD2-AbD2 复合物，因此 AgD2 从固定的 mAgD2 中置换了 AbD2。将这作为与基线值相比较的在传感表面上的重量损失进行登记。

以上两个实施例单个地举例说明了在通过竞争模式检测至少一种靶抗原 AgC1 的同时，通过置换模式检测两种不同的靶抗原 AgD1 和 AgD2。然而，应当理解，本发明的方法可以用于同时检测几种不同的靶抗原，例如 AgD3、AgD4 等。

因此，本发明的方法可以用于在与通过置换模式检测一种或几种不

同抗原 AgD1、AgD2、AgD3、AgD4 等的相同的测试体积中通过竞争模式检测一种或几种不同抗原 AgC1、AgC2、AgC3、AgC4 等。

在本发明的一个实施方案中，将要用本发明的方法检测的一种或几种不同的选择的靶抗原选自炸药和麻醉剂。例如，所述炸药选自三硝基甲苯(TNT)、二硝基甲苯(DNT)、六氢-1,3,5-三硝基-1,3,5-三嗪(RDX)、八氢-1,3,5,7-四硝基-1,3,5,7-四嗪(HMX)、四硝酸季戊四醇酯(PETN)和硝化甘油(NG)，以及所述麻醉剂选自可卡因、海洛因、苯丙胺、甲基苯丙胺、四氢大麻酚(THC)、苯并二氮杂革，诸如氯氮革 (Librium®)、安定 (Valium®)、硝基安定、氟硝基安定(之前以商品名 Rohypnol、Clorazepate、Lorazepam、Oxazepam 销售)以及亚甲基二氧基-N-甲基苯丙胺(Ecstasy)。至少在一些国家中，诸如瑞典，将苯并二氮杂革归类为麻醉剂。

在流通分析装置中实施本发明的方法，所述装置包含一个或若干个流体连接的、单个操作的流通测试池，每一测试池含有传感表面，每一传感表面包含一种或几种固定在其上的选择的经修饰的靶抗原，其中所述经修饰的靶抗原比靶抗原对选择的抗体具有更弱的亲和力，所述选择的抗体对选择的靶抗原是特异的，所述分析装置选自压电石英晶体微量平衡装置(QCM)、椭率计装置和表面等离共振生物传感器装置(SPR)。

本说明书和权力要求书中的术语“抗体”意图包括任何单特异性的单克隆或多克隆抗体、抗体片段或具有针对预定抗原的亲合力的其每一个的衍生物。术语抗体还包含其它亲和力分子，诸如各种蛋白质和合成抗体。

所述抗体可通过专业生产商定制，购自不同的供应商，或通过从文献获知的方法合成，诸如从 Biosciences&Medicine. T.A. Springer, 编辑, Plenum Press, 1985 中的杂交瘤技术合成。

在本发明方法中应用的各个抗体的量例如是 0.01-0.8 mg/ml 缓冲溶液，并且在实践中，应用以 0.005- 0.1 mg/ml 的浓度含有每一抗体的约 10-100 微升缓冲溶液。用于竞争分析的典型方法是，在 100 微升的测试体积中混合约 5 微克适当的抗体(或多个抗体)和几纳克抗原，例如 THC 和/或苯并二氮杂革。混合数秒后，将该测试体积导入流通池。

缓冲溶液的例子可以是磷酸缓冲液(PBS)，并且其还可以含有稳定剂、溶解增强剂和/或防腐剂，并且可通过本领域技术人员基于所选择抗体的组成混合物选择。稳定剂例如可以是表面活性剂(例如，Tween® 20

或 Tween® 80 或类似物)和/或各种蛋白质(例如,白蛋白、酪蛋白或其它保护剂或封闭剂)的混合物。

应当理解,表述“在传感表面上固定的经修饰的抗原”包含结合抗体的抗原部位和流通池表面(通常为金属表面)之间的任何种类の間隔分子。此类间隔分子的实例被包含在我们的国际专利申请 WO2004001417 和 WO20041416 中。

可通过化学衍生化或通过酶修饰从靶抗原获得选择的经修饰的抗原,例如,通过引入官能团诸如酯或氨基基团(通过移除或替换最初的基团)或通过消除靶抗原分子的一部分,或向靶抗原分子中引入新官能团或侧链,以减少其对抗体的亲和力,从而修饰靶抗原。

优化抗体和经修饰的抗原之间的亲和力,以在与低浓度的靶抗原接触时给出重量损失而在与不含靶抗原的缓冲液接触时没有太大的重量损失,这是最重要的。因此,优化抗体与固定的经修饰的抗原之间的亲和力是非常重要的。

本发明确保能够在筛选状况下,例如在海关或机场乘客控制中,应用流通分析装置快速分析可能存在的麻醉剂和/或炸药,其中所述流通分析装置具有一个或几个流体连接的、单个操作的测试池,每一测试池含有传感表面,在所述表面上固定有一种、两种或多种不同的待检测的预定抗原的经修饰的抗原。

有趣的是,用滤纸、布等擦拭人类药物成瘾者的皮肤,并根据本发明进行的分析给出了对于测试的麻醉剂的良好分析结果。

现在将通过应用我们的国际专利申请 WO2004001392 中公开的多池压电石英晶体微量平衡装置(QCM)来举例说明本发明的方法。

#### 电极制备

根据我们的共同未决国际专利申请 WO20041416 和 WO20041417 制备分析装置流通池中的 QCM - 电极用于置换反应(并且也用于竞争反应)。用它们各自的经修饰的抗体表面包被在压电晶体(QCM-晶体)上的每一个金电极,所述修饰的抗体是预定的待检测靶抗原的衍生物。每一个固定的经修饰的抗原已被化学修饰以显示出比缓冲溶液中的靶抗原更弱的对抗体的亲和力。将表面修饰的 QCM-晶体插入到池的壳体(测试池)中,并且随后与仪器的流通系统连接。将缓冲溶液泵送通过连续的池,使其在数分钟内稳定。

可以如下描述典型的分析运行:

通过环接将测试体积引入到我们的国际专利申请 WO2004001392 中描述的自动仪器中的测试池中。通常已通过擦拭嫌疑表面和/或通过应用真空清洗器或一些种类的预浓缩器收集周围的烟雾,从而将待测试的样本收集至滤纸上。通过国际专利申请 WO 03/073070 描述的解吸方法的方式,或通过应用电离剂探头提取的方式(诸如描述于我们的国际专利申请 WO2004104559 中的那种),将在滤纸上收集的样本的靶抗原转移并纯化至含有缓冲溶液的测试体积中。当对测试池选择置换模式时,在将测试体积(样本)引入流之前,如上所述的那样将针对不同靶抗原的不同的单克隆抗体引入到各个测试池中。当对测试池选择竞争模式时,将抗体加入到测试体积中(样品塞)。

### 结果

在图 1 和图 2 中显示了用于通过竞争模式检测 THC, 以及通过置换模式单个地检测可卡因、海洛因和苯丙胺的四个流体串联的测试池运行的结果。

图 1. 从四个不同的对 THC、可卡因、苯丙胺和海洛因敏感的传感表面(QCM-池)得到的典型反应曲线。用可卡因(20 皮克/微升)和 THC 的抗体刺破样品塞。在 0 时间加入针对可卡因、苯丙胺和海洛因的抗体,并且在 45 秒引入具有 THC-抗体和可卡因的样品。如图所示,来自池 # 2(可卡因)的曲线显示出显著的重量损失。由于存在 THC-抗体,池 # 1(THC)的曲线显示了显著的重量增加值。

图 2. 从四个不同的对 THC、可卡因、苯丙胺和海洛因敏感的传感表面(QCM-池)得到的典型反应曲线。用 THC(20 皮克/微升)和针对 THC 的抗体刺破样品塞。在 0 时间加入针对可卡因、苯丙胺和海洛因的抗体,并且在 45 秒引入具有 THC-抗体和 THC 的样本。如图所示,只有 THC-池显示出结合抗体的显著的重量损失。显示了来自在样品塞中没有 THC 的空白样本的结果,作为对照。

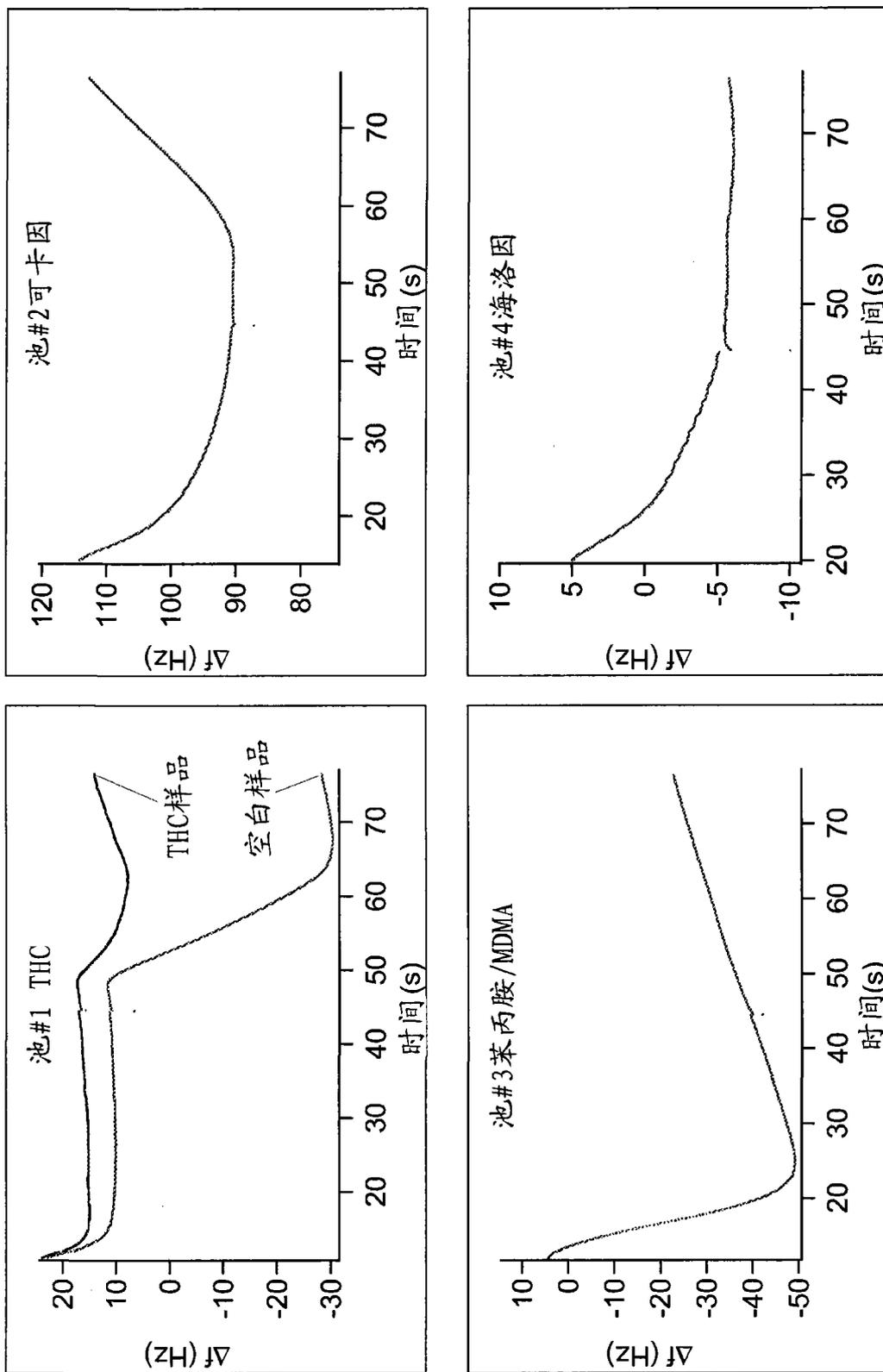


图 1

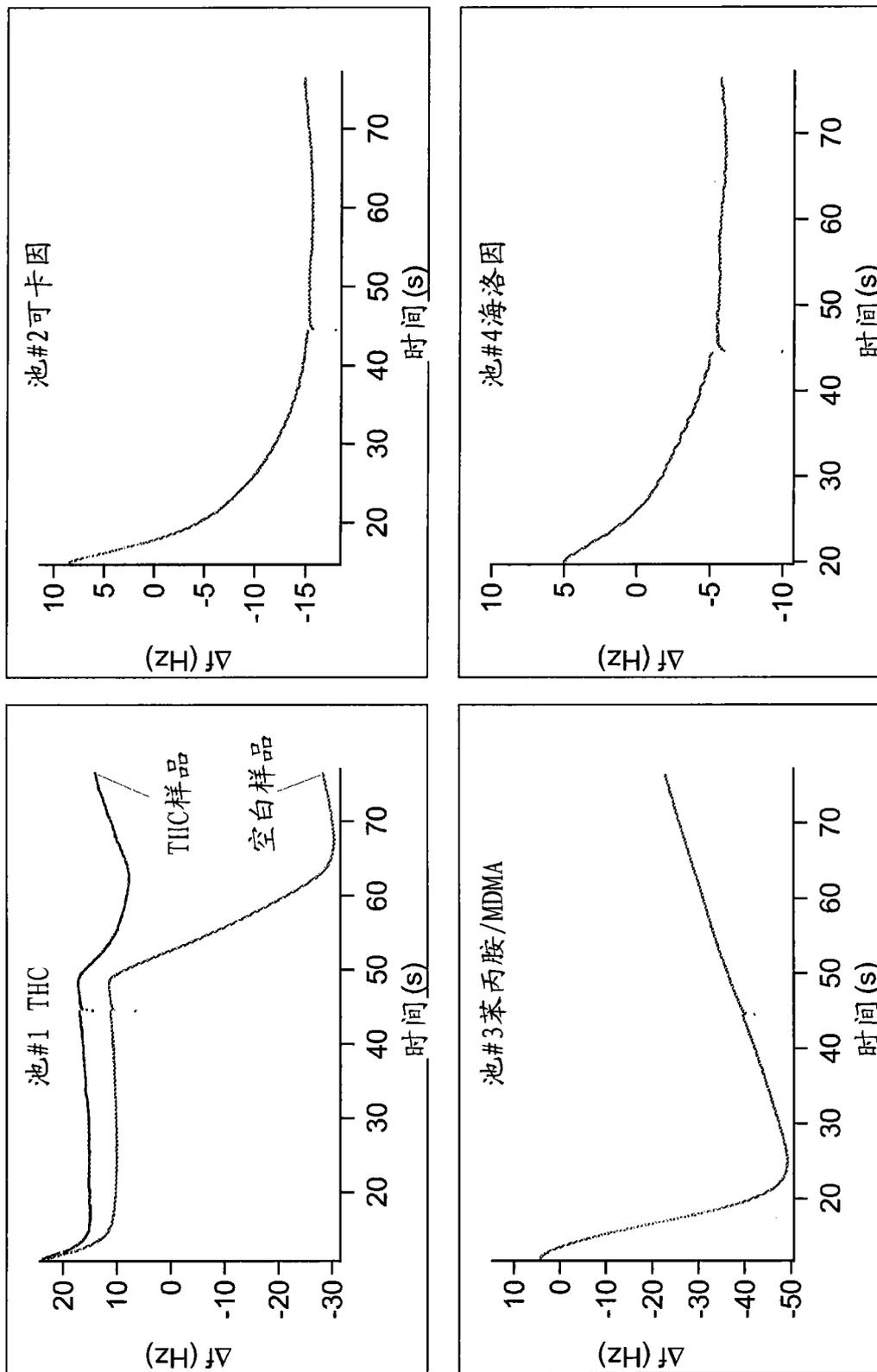


图 2