



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103146808 A

(43) 申请公布日 2013. 06. 12

(21) 申请号 201210299560. 2

(22) 申请日 2005. 11. 03

(30) 优先权数据

60/624, 950 2004. 11. 03 US

(62) 分案原申请数据

200580037985. 4 2005. 11. 03

(71) 申请人 意力速分子诊断股份有限公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 T·亚当斯 E·雅布隆斯基

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陶家蓉

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

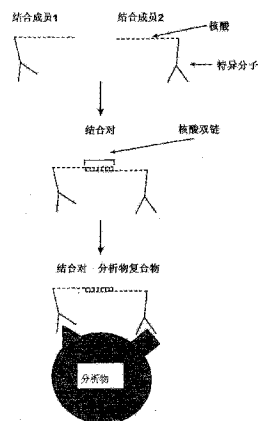
权利要求书12页 说明书28页 附图7页

(54) 发明名称

均相分析物检测

(57) 摘要

本发明提供具有确定和有限的稳定性的新结合对组合物,其包含用于均相、灵敏的分析物检测的核酸检测标记。还提供分析物尤其是临床相关性分析物的灵敏、均相检测的方法。还提供制备本发明结合配对的试剂盒以及实施本发明方法的试剂盒。



1. 一种结合对,其包含:

第一结合成员,其含有偶联于第一核酸的 5' 端的第一特异性分子;和

第二结合成员,其含有偶联于第二核酸的 3' 端的第二特异性分子,其中所述第一和第二核酸形成具有确定和有限的稳定性的双链体,其中所述第一特异性分子是第一抗体,所述第二特异性分子是第二抗体,其中所述抗体结合选自以下的分析物:

鱼精蛋白

组蛋白

白蛋白

球蛋白

硬蛋白

磷蛋白

粘蛋白

α_1 -脂蛋白

α_1 -抗胰蛋白酶

皮质激素传递蛋白

4.6S-后白蛋白

色氨酸-弱(Tryptophan-poor)

α_1 -糖蛋白

α_{1x} -糖蛋白

甲状腺素结合球蛋白

间- α -胰蛋白酶抑制剂

Gc-球蛋白

(Gc 1-1)

(Gc 2-1)

(Gc 2-2)

七珠蛋白

(Hp 1-1)

(Hp 2-1)

(Hp 2-2)

血浆铜蓝蛋白

乙酰胆碱酯酶

α_2 -脂蛋白

肌红蛋白

C-反应性蛋白

α_2 -巨球蛋白

α_2 -HS-糖蛋白

Zn- α_2 -糖蛋白

α_2 -神经氨酸糖蛋白

促红细胞生成素

β -脂蛋白

转铁蛋白

血红素蛋白

纤维蛋白原

纤溶酶原

β_2 -糖蛋白 I

β_2 -糖蛋白 II

免疫球蛋白 G

(IgG) 或 γ G-球蛋白

分子式： $\gamma_2\kappa_2$ 或 $\gamma_2\lambda_2$ 免疫球蛋白 A(IgA) 或 γ A-球蛋白

分子式： $(\alpha_2\kappa_2)^n$ 或 $(\alpha_2\kappa_2)^n$ 免疫球蛋白 M(IgM) 或 γ M-球蛋白

分子式： $(\mu_2\kappa_2)^5$ 或 $(\mu_2\lambda_2)_5$ 免疫球蛋白 D(IgD) 或 γ D-球蛋白 (γ D)

分子式： $(\delta_2\kappa_2)$ 或 $(\delta_2\lambda_2)$ 免疫球蛋白 E(IgE) 或 γ E-球蛋白 (γ E)

分子式： $(\epsilon_2\kappa_2)$ 或 $(\epsilon_2\lambda_2)$

游离 κ 和 λ 轻链

补体因子：

$C'1$

$C'1q$

$C'1r$

$C'1s$

$C'2$

$C'3$

β_1A

α_2D

$C'4$

$C'5$

$C'6$

$C'7$

$C'8$

$C'9$

血液凝固因子 I: 纤维蛋白原; 因子 II: 凝血酶原; 因子 IIa: 凝血酶; 因子 III: 组织凝血致活酶; 因子 V 和 VI: 促凝血球蛋白原, 加速球蛋白; 因子 VII: 前转化素; 因子 VIII: 抗血友病球蛋白 (AHG); 因子 IX: 血小板辅因子 II 血浆凝血激酶 (PTC); 因子 X: St-P 因子, 自身凝血酶原 III; 因子 XI: 血浆凝血活酶; 因子 XIII: 血纤维稳定因子;

肽和蛋白质激素

甲状旁腺激素 (甲状旁腺素)

甲状腺降钙素

胰岛素

高血糖素

松弛酞
促红细胞生成素
促黑激素（黑素细胞－刺激激素；垂体中间叶激素）
成长激素（生长激素）
促肾上腺皮质激素（促皮质素）
促甲状腺激素
卵泡刺激素
促黄体（生成）激素（促间质细胞激素）
催乳（Luteomammotropic）激素（催乳素，泌乳素）
绒毛膜促性腺激素（绒毛膜促性腺激素）
组织激素
分泌素
胃泌素
血管紧张素 I 和 II
缓激肽
人胎盘催乳激素
细胞因子
IL 1
IL 2
IL 4
IL 6
IL 8
IL10
EGF
TNF
NGF
癌抗原
PSA
CEA
 α -胎蛋白
酸性磷酸酯酶
CA19.9
CA125
组织特异性抗原
碱性磷酸酶
肌红蛋白
CPK-MB
肌钙蛋白
BNP

Pro-BNP

降钙素

髓磷脂碱性蛋白

来自神经垂体的肽激素

催产素

抗利尿激素

释放因子 (RF) CRF, LRF, TRF, 成长激素 -RF, GRF, FSH-RF, PIF, MIF 蓖麻毒素

白喉(Diphtheria) 毒素

肉毒杆菌毒素

葡萄球菌肠毒素 B

棒状杆菌

白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheria*)

肺炎球菌

肺炎双球菌(*Diplococcus pneumoniae*)

链球菌

酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)

唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*)

葡萄球菌

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)

奈瑟菌

脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)

淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhea*)

肠杆菌(Enterobacteriaceae)

大肠菌

大肠杆菌(*Escherichia coli*)

产气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)

肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)

沙门氏菌

伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhosa*)

猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)

志贺氏杆菌

痢疾志贺氏杆菌(*Shigella dysenteriae*)

施氏志贺杆菌(*Shigella schmitzii*)

阿糖迟醇志贺氏菌 (*Shigella arabinotard*)

弗氏志贺氏杆菌(*Shigella flexneri*)

鲍氏志贺氏杆菌(*Shigella boydii*)

索氏志贺氏杆菌(*Shigella sonnei*)

其它肠杆菌

普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)

奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)

变性杆菌种(*Proteus species*)

摩氏变形菌 (*Proteus morgani*)

绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)

粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)

嗜血杆菌－博德特氏菌属(*Hemophilus-Bordetella Group*)

流感嗜血杆菌 *Hemophilus influenza*,

Hemophilus ducryi

Hemophilus hemophilus

Hemophilus aegypticus

副流感嗜血杆菌(*Hemophilus parainfluenza*)

百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)

巴斯德菌属

鼠疫巴斯德菌(*Pasteurella pestis*)

土拉热巴斯德菌(*Pasteurella tularensis*)

布氏杆菌(*Brucellae*)

羊流产布氏杆菌(*Brucella melitensis*)

流产布氏杆菌(*Brucella abortus*)

猪流产布氏杆菌(*Brucella suis*)

需氧芽孢杆菌属

炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)

枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)

巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)

厌氧芽孢杆菌属

肉毒梭状芽孢杆菌 (*Clostridium botulinum*)

破伤风梭状芽孢杆菌 (*Clostridium tetani*)

产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*Clostridium perfringens*)

诺维(氏)动作状芽孢杆菌 (*Clostridium novyi*)

败血梭状芽孢杆菌 (*Clostridium septicum*)

溶组织梭状芽孢杆菌 (*Clostridium histolyticum*)

第三梭状芽孢杆菌 (*Clostridium tertium*)

双酶梭状芽孢杆菌 (*Clostridium bifermentans*)

产芽孢梭状芽孢杆菌 (*Clostridium sporogenes*)

分枝杆菌

人结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis hominis*)

牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)

鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)

麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)

副结核分枝杆菌(*Mycobacterium paratuberculosis*)

放线菌 (真菌样细菌)

布氏放线菌 (*Actinomyces Isaeli*)

牛放线菌(*Actinomyces bovis*)

内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)

星形诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*)

巴西诺卡氏菌(*Nocardia brasiliensis*)

螺旋菌

梅毒密螺旋体(*Treponema pallidum*)

细弱密螺旋体(*Treponema pertenue*)

品他病密螺旋体(*Treponema carateum*)

回归热疏螺旋体(*Borrelia recurrentis*)

出血性黄疸钩端螺旋体(*Leptospira icterohemorrhagiae*)

犬钩端螺旋体(*Leptospira canicola*)

睡病虫(*Trypanosomes*)

支原体

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)

其它病原体

立克次氏体 (细菌样诸虫)

普氏立克次氏体(*Rickettsia prowazekii*)

莫塞尔立克次氏体(*Rickettsia mooseri*)

立克 (氏) 立克次氏体(*Rickettsia rickettsii*)

康氏立克次氏体(*Rickettsia conori*)

澳洲立克次氏体(*Rickettsia australis*)

西伯利亚立克次氏体(*Rickettsia sibiricus*)

螨立克次氏体(*Rickettsia akari*)

恙虫热立克次氏体(*Rickettsia tsutsugamushi*)

衣原体 (不可分类的诸虫细菌 / 病毒(*unclassifiable parasites bacterial/viral*))

衣原体物质 (不确定的名称)

真菌

新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)

皮肤炎芽生菌(*Blastomyces dermatidis*)

Hisoplasma capsulatum

粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)

巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)

白色念珠菌(*Candida albicans*)
烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)
伞状毛霉菌(*Mucor corymbifer*) (伞状犁头霉(*Absidia corymbifera*))
稻根霉菌(*Rhizopus oryzae*)
Rhizopus arrhizua
藻状菌(*Phycomycetes*)
黑色根霉(*Rhizopus nigricans*)
Sporotrichum schenkii
Flonsecaea pedrosoi
Fonsecaea compact
Fonsecaea dermatidis
卡氏分支着色霉菌(*Cladosporium carrionii*)
疣状着色霉菌(*Phialophora verrucosa*)
构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)
足肿马杜拉分支菌(*Madurella mycetomi*)
灰色马杜拉分支菌(*Madurella grisea*)
波氏霉样真菌(*Allescheria boydii*)
琼塞尔梅氏瓶霉菌(*Phialophora jeanselmei*)
石膏样小孢子菌(*Microsporum gypseum*)
须疮癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*)
埃吉罗氏角质线菌(*Keratinomyces ajelloi*)
犬小孢子菌(*Microsporum canis*)

Microsporum adouini

红色发癣菌(*Trichophyton rubrum*)

病毒

腺病毒

疱疹病毒

单纯疱疹病毒(*Herpes simplex*)

水痘(*Varicella*) (禽痘(*Chicken pox*))

带状疱疹(*Herpes Zoster*) (Shingles)

B 病毒(*Virus B*)

细胞巨化病毒(*Cytomegalovirus*)

痘病毒

天花(*Variola*) (smallpox)

牛痘(*Vaccinia*)

牛痘病毒(*Poxvirus bovis*)

副牛痘(*Paravaccinia*)

传染性软疣(*Molluscum contagiosum*)

微小核糖核酸病毒

脊髓灰质炎病毒(Poliovirus)

柯萨奇肠道病毒(Coxsackievirus)

埃可病毒(Echoviruses)

鼻病毒(Rhinoviruses)

粘病毒

副流感(Parainfluenza) (1-4)

腮腺炎病毒(Mumps Virus)

新城疫病毒(Newcastle Disease Virus)

麻疹病毒(Measles Virus)

牛瘟麻疹病毒(Rinderpest Virus)

犬瘟热病毒(Canine Distemper Virus)

呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus)

风疹病毒(Rubella Virus)

虫媒病毒

东方马脑炎病毒(Eastern Equine Encephalitis Virus)

西方马脑炎病毒(Western Equine Encephalitis Virus)

辛德比斯病毒(Sindbis Virus)

屈曲病毒 (Chikugunya Virus)

塞姆利基森林病毒(Semliki Forest Virus)

Mayora Virus

圣路易斯脑炎病毒(St.Louis Encephalitis Virus)

普氏立克次氏体(Rickettsia prowazekii)

加利福尼亚脑炎病毒(California Encephalitis Virus)

科罗拉多蜱热病毒(Colorado Tick Fever Virus)

黄热病病毒(Yellow Fever Virus)

登革热病毒(Dengue Virus)

呼肠病毒

呼肠病毒 1-3 型(Reovirus Types 1-3)

逆转录病毒

人免疫缺陷病毒 I 和 II (HIV)

嗜人 T 淋巴细胞病毒 I 和 II (HTLV)

肝炎病毒

甲肝病毒

乙肝病毒

丙肝病毒

肿瘤病毒

劳舍尔白血病毒(Rauscher Leukemia Virus)

格罗斯病毒(Gross Virus)

马罗尼白血病毒(Maloney Leukemia Virus)

人乳头状瘤病毒(Human Papilloma Virus)。

2. 如权利要求 1 所述的结合对,其特征在于,所述第一和第二抗体是单克隆抗体。

3. 如权利要求 2 所述的结合对,其特征在于,所述第一和第二抗体独立地与同一抗原上的表位相互作用。

4. 如权利要求 2 所述的结合对,其特征在于,所述第一和第二抗体包含夹心对。

5. 如权利要求 4 所述的结合对,其特征在于,所述第一和第二特异性分子与不同分子相互作用。

6. 如权利要求 5 所述的结合对,其特征在于,所述不同的分子是同一细胞上的两种受体,其中所述两种受体可以在细胞分析物表面有多个拷贝的同一种受体,或不同的受体。

7. 如权利要求 1 所述的结合对,其特征在于,所述第一和第二核酸是单链核酸。

8. 如权利要求 1 所述的结合对,其特征在于,所述第一核酸包含 SEQ ID NO. 1,所述第二核酸包含 SEQ ID NO. :2 或 SEQ ID NO. :3。

9. 如权利要求 1 所述的结合对,其特征在于,所述第一和第二核酸各自独立地选自 DNA、RNA 或 PNA。

10. 如权利要求 1 所述的结合对,其特征在于,所述第一和第二核酸中的至少一个是嵌合 DNA/RNA、DNA/PNA 或 RNA/PNA 分子。

11. 如权利要求 10 所述的结合对,其特征在于,在所述第一核酸的 3' 末端和所述第二核酸的内部序列之间形成所述双链体。

12. 如权利要求 1 所述的结合对,其特征在于,所述核酸杂合体适于用 PCR、LCR、SDA 或 TMA 扩增。

13. 权利要求 1 所述的结合对的用途,其特征在于,用于制备用于检测分析物的方法的试剂盒,所述方法包括:

(a) 提供分析物;

(b) 提供结合对,其包含:

(i) 第一结合成员,其含有偶联于第一核酸的第一特异性分子;和

(ii) 第二结合成员,其含有偶联于第二核酸的第二特异性分子,其中所述第一和第二核酸形成具有确定和有限的稳定性的双链体;

(c) 使所述结合对与所述分析物接触,从而形成复合物;

(d) 加热所述复合物至超过所述双链体解链温度的温度,使所述双链体解离;

(e) 在允许结合于所述细胞的结合成员重新结合、但不允许过量的游离结合成员大量重新结合的条件下,孵育所述双链体,从而产生重新形成的双链体;

(f) 延伸所述重新形成的双链体的 3' 端;和

(g) 检测重新形成的双链体,从而检测所述分析物。

14. 如权利要求 13 所述的用途,其特征在于,在含有盐的水溶液中形成所述复合物,步骤(d)包括降低所述水溶液盐浓度。

15. 如权利要求 13 所述的用途,其特征在于,步骤(d)还包括稀释所述复合物。

16. 如权利要求 13 所述的用途,其特征在于,步骤(g)包括扩增含有重新形成的双链体的核酸分子并检测扩增产物。

17. 如权利要求 16 所述的用途,其特征在于,所述扩增用 PCR、LCR、SDA 或 TMA 完成。

18. 如权利要求 16 所述的用途,其特征在于,所述扩增用 PCR 采用只结合于通过步骤(f)中延伸重新形成的双链体的 3' 末端而产生的位点的引物来完成。

19. 如权利要求 16 所述的用途,其特征在于,所述扩增产物用选自以下的方法检测:溴化乙锭染色、银染、放射自显影、斑点印迹、狭线印迹和 southern 印迹。

20. 如权利要求 14 所述的用途,其特征在于,通过将检测分子掺入以下至少一种物质中来检测重新形成的双链体:第一单链核酸,第二单链核酸,结合对的双链区和扩增产物。

21. 如权利要求 20 所述的用途,其特征在于,所述检测分子选自:荧光分子、荧光淬灭分子、化学发光化合物、化学发光淬灭分子、生物发光分子、放射性分子和荧光核苷酸。

22. 如权利要求 13 所述的用途,其特征在于,第一和第二核酸中的至少一个是嵌合 DNA/RNA、DNA/PNA 或 RNA/PNA 分子,在步骤(d)解离双链体之前,用 RNA 酶消化步骤(c)中的复合物。

23. 如权利要求 17 所述的用途,其特征在于,通过将检测分子掺入扩增产物来检测扩增产物,所述检测分子选自:荧光分子、荧光淬灭分子、化学发光化合物、化学发光淬灭分子、生物发光分子、放射性分子和荧光核苷酸。

24. 结合对的用途,其特征在于,用于制备用于试剂盒,所述试剂盒用于包括以下步骤的方法:

(a) 提供第一结合成员和第二结合成员,所述第一结合成员包含偶联于第一单链核酸的 5' 端的、针对前列腺特异性抗原上的第一表位的单克隆抗体,所述第二结合成员包含偶联于第二单链核酸 3' 端的、针对前列腺特异性抗原上的第二表位的单克隆抗体,其中所述第一单链核酸与第二单链核酸杂交,从而在所述第一核酸的 3' 端和所述第二结合成员的内部序列之间形成确定和有限的稳定性的双链体,从而形成通过核酸双链连接的结合对;

(b) 将所述结合对与样品接触,从而形成结合对-PSA 复合物,其中所述样品含有存在于溶液中的 PSA;

(c) 加热所述结合对-PSA 复合物以解离核酸双链体;

(d) 在允许结合于 PSA 的结合成员重新结合、但不允许溶液中过量的游离结合成员大量重新结合的条件下,孵育所述结合对-PSA 复合物;

(e) 检测结合对复合物,从而检测 PSA。

25. 如权利要求 24 所述的用途,其特征在于,所述第一和第二单克隆抗体一起形成针对 PSA 的单克隆抗体夹心对。

26. 如权利要求 24 所述的用途,其特征在于,所述样品选自:血液样品、血清样品、血浆样品或组织样品。

27. 如权利要求 24 所述的用途,其特征在于,所述第一单链核酸包含 SEQ ID NO. :1,所述第二单链核酸包含 SEQ ID NO. :2 或 3。

28. 如权利要求 24 所述的用途,其特征在于,步骤(c)在 45℃进行,步骤(d)在室温进行。

29. 如权利要求 24 所述的用途,其特征在于,所述检测步骤包括扩增所述双链区。

30. 如权利要求 29 所述的用途,其特征在于,所述扩增包括以下步骤:

(a) 用 DNA 聚合酶延伸所述双链体的 3' 端,其中所述延伸产生至少一个引物结合位点;
和

(b) 用与步骤(a)中所述至少一个引物结合位点互补的至少一个引物在所述延伸的双链体上进行聚合酶链式反应。

31. 结合对的用途,其特征在于,用于制备试剂盒,所述试剂盒用于包括下列步骤的方法:

(a) 提供包含至少一个细胞的样品;

(b) 提供第一结合成员和第二结合成员,所述第一结合成员包含偶联于第一单链核酸 5' 端的、针对所述细胞上的表位的抗体,所述第二结合成员包含偶联于第二单链核酸 3' 端的、针对所述细胞上的表位的抗体,其中所述第一单链核酸与第二单链核酸杂交,在所述第一核酸的 3' 端和所述第二结合成员的内部序列之间形成确定和有限的稳定性的双链体,从而形成通过核酸双链连接的结合对;

(c) 将所述结合对与样品接触,从而形成结合对-细胞复合物;

(d) 通过加热至超过所述双链体解链温度的温度使核酸双链体解离,其中所述复合物中的所述结合成员被锁定在其在细胞内结合时非常接近的位置;

;

(e) 在允许结合于所述细胞的结合成员重新结合、但不允许过量的游离结合成员大量重新结合的条件下,孵育所述双链体,从而产生重新形成的双链体;

(f) 检测含有所述重新形成的双链体的核酸,从而检测所述细胞。

32. 如权利要求 31 所述的用途,其特征在于,所述细胞选自:细菌细胞、动物细胞、植物细胞或真菌细胞。

33. 如权利要求 32 所述的用途,其特征在于,所述动物细胞是人类细胞。

34. 如权利要求 33 所述的用途,其特征在于,所述人类细胞是患病细胞。

35. 如权利要求 31 所述的用途,其特征在于,所述第一核酸包含 SEQ ID NO.:1,所述第二核酸包含 SEQ ID NO.:2 或 3。

36. 如权利要求 31 所述的用途,其特征在于,所述第一和第二抗体是多克隆抗体。

37. 如权利要求 36 所述的用途,其特征在于,所述第一和第二抗体是同一多克隆抗体的等份。

38. 如权利要求 31 所述的用途,其特征在于,所述加热约在 45°C 进行。

39. 如权利要求 31 所述的用途,其特征在于,步骤(e)包括稀释所述复合物;并在室温孵育所述稀释的复合物。

40. 如权利要求 39 所述的用途,其特征在于,所述复合物稀释至少 10 倍。

41. 如权利要求 39 所述的用途,其特征在于,所述复合物稀释至少 100 倍。

42. 如权利要求 31 所述的用途,其特征在于,步骤(f)包括扩增包含所述重新形成的双链体的核酸。

43. 如权利要求 42 所述的用途,其特征在于,所述扩增包括以下步骤:

(a) 用 DNA 聚合酶延伸所述双链体的 3' 端,其中所述延伸产生至少一个引物的结合位点;和

(b) 用与步骤(a)中产生的结合位点互补的至少一个引物在所述延伸的双链体上进行聚合酶链式反应。

44. 如权利要求 43 所述的用途,其特征在于,所述至少一个引物包含 SEQ ID NO.:4 或

5。

45. 如权利要求 31 所述的用途,其特征在于,所述第一核酸通过其 3' 末端偶联于所述第一抗体,所述第二核酸通过其 5' 末端偶联于所述第二抗体。

46. 如权利要求 45 所述的用途,其特征在于,所述第一和第二核酸中的至少一个通过间隔分子连接于各自的抗体。

47. 结合对的用途,其特征在于,用于制备试剂盒,所述试剂盒用于包括以下步骤的方法:

(a) 提供第一结合成员和第二结合成员,所述第一结合成员包含偶联于第一单链核酸的 5' 端的、针对前列腺特异性抗原上的第一表位的单克隆抗体,所述第二结合成员包含偶联于第二单链核酸 3' 端的、针对前列腺特异性抗原上的第二表位的单克隆抗体,其中所述第一单链核酸与第二单链核酸杂交,从而在所述第一核酸的 3' 端和所述第二结合成员的内部序列之间形成确定和有限的稳定性的双链体,从而形成通过核酸双链连接的结合对

(b) 使所述样品与所述结合对接触,其中所述样品在溶液中含有肌钙蛋白 T,从而形成结合对-肌钙蛋白 T 复合物;

(c) 加热结合对-肌钙蛋白 T 复合物,解离所述核酸双链体;

(d) 在允许结合于所述分析物的结合成员与肌钙蛋白 T 重新结合、但不允许过量的游离结合成员大量重新结合的条件下,孵育结合对-肌钙蛋白 T 复合物;

(e) 检测结合对双链体,从而检测肌钙蛋白 T。

48. 如权利要求 47 所述的用途,其特征在于,所述第一和第二单克隆抗体形成对肌钙蛋白 T 的单克隆抗体夹心对。

49. 如权利要求 47 所述的用途,其特征在于,所述样品选自尿样、血液样品、血清样品、血浆样品或组织样品。

50. 如权利要求 47 所述的用途,其特征在于,所述第一单链核酸包含 SEQID NO.:1,所述第二单链核酸包含 SEQ ID NO.:2 或 3。

51. 如权利要求 47 所述的用途,其特征在于,所述步骤 (c) 在 45°C 进行,而所述步骤 (d) 在室温下进行。

52. 如权利要求 47 所述的用途,其特征在于,所述检测步骤包括扩增双链体区域。

53. 如权利要求 52 所述的用途,其特征在于,所述扩增包括用 DNA 聚合酶延伸所述双链体的 3' 端,其中所述延伸产生至少一个引物结合位点。

54. 如权利要求 53 所述的用途,其特征在于,所述扩增还包括用与步骤 (a) 中所述至少一个引物结合位点互补的至少一个引物在所述延伸的双链体上进行聚合酶链式反应。

均相分析物检测

[0001] 本申请是 2005. 11. 03 提交的 CN200580037985. 4, 题为“均相分析物检测”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及测定样品中分析物的存在或其浓度的方法、组合物和试剂盒。

背景技术

[0003] 出于诊断和监测疾病的目的, 临床化学领域需要测定生物液体中蛋白质、药物、有机体和其它分析物的浓度。例如, 心肌梗塞时, (某些) 蛋白质从心脏中释放出来。检测这些蛋白质的存在、浓度和其释放的时间过程可帮助诊断心脏病发作。

[0004] 当前在生物液体中检测到的大多数临床相关性蛋白存在的浓度大于 1 皮克 / 毫升。例如, 前列腺特异性抗原 (PSA) 是可用于前列腺疾病检测的血清蛋白, 其在男性中存在的正常浓度约为 0-4 纳克 / 毫升。PSA 水平高于 4ng/ml 可怀疑患有前列腺疾病, 尤其是前列腺癌。用常规的免疫检测技术不难检测该浓度范围。然而, 切除前列腺之后, PSA 的浓度降低到用常规技术检测不到的水平。已切除前列腺的癌症患者中 PSA 水平增加是癌症复发的指征。需要飞克 / 毫升灵敏度的实验来监测这些患者。

[0005] 据估计, 人类大约有 35, 000 个基因和多达 500, 000 种蛋白质。蛋白质相对于基因的多样性增加可归因于转录后修饰 (例如剪接) 和翻译后修饰 (例如磷酸化、糖基化)。这些修饰可显著改变蛋白质的功能。因此, 即使很细微的差别也可能是临床相关性的。目前在人血浆中只鉴定了 290 个蛋白, 虽然在 2D 凝胶中可看到上千个斑点。人血浆蛋白质组可能包括数以十万计的浓度极低以至现有技术难以检测到的蛋白质。目前还没有能够检测到大多数这些蛋白质的方法。

[0006] 临床试验中可用的样品量相对较少增加了检测某些低浓度分析物的困难度。因此, 蛋白质分析物的大多数免疫检测依赖于多相方法, 例如 ELISA (酶联免疫吸附测定), 其中将抗体结合的分析物与未结合的分析物物理分离。多相检测方法很复杂, 并且需要多个步骤 (例如, 与固相结合并重复进行洗涤步骤) 将结合的分析物与未结合分析物分离。这些步骤导致非特异性结合和灵敏度降低; 而且这些步骤费钱费时。因此, 需要避免非特异性结合的高灵敏性均相检测。

[0007] 已描述了小分子如药物的均相免疫检测 (不需要结合物质和游离物质的物理分离)。这些检测包括 SYVA's FRAT[®] 检测、EMIT[®] 检测、酶通道免疫检测、和荧光能量转移免疫检测 (FETI) (Dade Behring, Deerfield, Illinois); 酶抑制物免疫检测 (Hoffman LaRoche 和 Abbott Laboratories); 荧光偏振免疫检测 (Dandlicker), 以及其它检测方法。所有这些方法的灵敏度都有限, 只有少数几种方法, 包括 FETI 和酶通道检测, 适于大的多表位分析物。因此, 需要用于检测生物和临床样品中存在的大的和 / 或复杂的分析物的灵敏的均相方法。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供具有第一结合成员和第二结合成员的结合对,所述第一结合成员包含偶联于第一核酸的第一特异性分子,所述第二结合成员包含偶联于第二核酸的第二特异性分子,其中第一和第二核酸形成具有确定和有限的稳定性的双链体(duplex)。

[0010] 在某些实施方式中,第一和第二特异性分子可以是受体、配体或抗体。特异性分子可彼此相同或不同。在一个实施方式中,本发明特异性分子与同一细胞上的两种受体相互作用。在另一个实施方式中,第一和第二特异性分子均为单克隆抗体,它们可与相同抗原上不同的表位相互作用并因此包含夹心对。

[0011] 结合对的第一和第二核酸通常是单链核酸,可以是 DNA、RNA 或 PNA,但也可以是部分双链核酸或其类似物。在本发明某些实施方式中,至少一种核酸是嵌合 DNA/RNA 分子。本发明的核酸可通过其 5' 端或 3' 端偶联。在本发明一方面,结合对中的一条核酸通过其 5' 端偶联,另一条核酸通过其 3' 端偶联。核酸间的双链体可在核酸的末端之间形成,或可包含中间核酸序列。在优选实施方式中,核酸适于用 PCR、LCR、SDA 或 TMA 扩增。

[0012] 本发明还提供用结合成员检测分析物的方法。根据一个实施方式,将如上所述的结合对与分析物接触形成复合物。然后结合对核酸解离,然后再结合。重新形成的双链体(主要在分析物结合的结合对中发现)经 3' 延伸之后,通过可通过 PCR 扩增包含双链体的核酸来检测重新形成的双链体。当 PCR 引物只结合于通过重新形成的双链体的 3' 延伸而产生的位点而不与结合成员本身的核酸结合时,可大大减少背景。

[0013] 可用多种方法中的任意一种检测扩增产物,这些方法包括溴化乙锭染色、银染、放射自显影、斑点印迹、狭线印迹、southern 印迹、以及掺入荧光分子、荧光淬灭分子、化学发光化合物、化学发光淬灭分子、生物发光化合物或荧光核苷。

[0014] 在本发明一个实施方式中,结合对核酸之一是 DNA/RNA 嵌合分子,另一个是 DNA 分子,两个核酸之间形成的双链体具有短的 DNA/DNA 杂合区和较长的 DNA/RNA 杂合区。该实施方式中的完整双链体是稳定的,但可被 RNA 酶消化而变得不稳定,这进一步减少了不与分析物结合的结合对成员产生的背景。

[0015] 本发明多种实施方式可进行组合以产生兼具特异性和高灵敏度的均相检测试验,用于检测临床相关性蛋白质、病毒和细胞。

[0016] 附图简述

[0017] 图.1 表示结合对的组成(content)、构象和总体结合方案。

[0018] 图.2 提供包含 SEQ ID NO.:1 和 SEQ ID NO.:2 的核酸对的双链体形成、3' 延伸和 PCR 扩增的总体方案。

[0019] 图.3 提供包含 SEQ ID NO.:1 和 SEQ ID NO.:3 的核酸对的双链体形成、3' 延伸和 PCR 扩增的总体方案。

[0020] 图.4 显示 9 个以及 15 个碱基对重叠寡核苷酸链的实时 PCR 扩增(热启动)。

[0021] 图.5 显示均相 NADIA™ 的示意图。

[0022] 图.6 显示核酸对的取向和双链体形成,其中一条寡核苷酸 [SEQ ID NO.:1] 通过连接于其 3' 端的间隔分子(spacer)连接,而另一条寡核苷酸 [SEQ ID NO.:3] 通过其 5' 端直接连接。

[0023] 图 7. 表示将嵌合 RNA/DNA 寡核苷酸用于分析物检测的过程。“R”表示核糖核苷酸碱基的位置,“D”表示脱氧核糖核苷酸碱基的位置,“S”表示间隔分子的位置。

[0024] 图 8. 表示用均相 NADIA™ 检测 PSA。

[0025] 发明详述

[0026] 应理解,上文的一般性描述和下文的详细描述只是示范性和解释性的,而非限制本发明。本文所用的单数包括复数,除非另有说明。本文所用的“或”指“和 / 或”,除非另有说明。此外,使用的术语“包括”以及该术语的其它形式是非限制性的。

[0027] 本文所用各节的标题只是出于组织行文的目的,不应理解成限制所述的主体。本申请中引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、手册、和论文均全文明确纳入本申请,作为参考文献用于所有目的。

[0028] 定义

[0029] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,要定义和详细描述一些术语。

[0030] 除非另有明确定义,本文所用的相关术语、实验室操作、技术和方法是其所属领域所知的。标准化学符号和缩写可与这些符号所代表的全名互换使用。因此,例如,术语“氢”和“H”理解为具有相同的含义。标准技术可用于化学合成、化学分析、药物制备、配制(formulation)、递送以及患者治疗。标准技术可用于重组 DNA 方法、寡核苷酸合成、组织培养等。如本领域通常可实现的或如本文所述的,可根据生产商的说明书用试剂盒来实施反应和纯化技术。一般可根据本领域熟知的常规方法或如本文说明书全文所引用和讨论的各种一般性或更具体的参考文献中所述的方法来实施上述技术和操作。见,例如 Sambrook 等,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(第 2 版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)),Harlow & Lane,抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1988)),全文纳入本文作为参考用于所有目的。

[0031] 本文所用“结合成员”指特异性分子和核酸之间形成的偶联物。含有由结合成员核酸之间形成的、具有确定和有限的稳定性的双链体连接的两个结合成员的组合物称为“结合对”。结合对与分析物组合形成结合对-分析物复合物,本文简单地称为“复合物”。

[0032] 本文所用术语“分析物”指需要在试验中检测以及可能存在于样品中的任何物质。该分析物可以是任何物质而没有限制。在本发明优选实施方式中,分析物包括存在天然抗体或可制备其抗体的物质。分析物可以是例如,蛋白质、多肽、半抗原、糖、脂质、药物、细胞或多种生物或非生物分子中的任何其它物质,它们的复合物或组合。在另一个实施方式中,分析物是核酸。在另一个实施方式中,分析物是抗体。在另一个实施方式中,分析物是细胞(动物、植物、真菌、细菌等的细胞)或其亚组分或细胞器(如线粒体)。

[0033] 可用本发明组合物、方法和试剂盒检测的多价配体分析物一般是多(氨基酸),即多肽、蛋白质、多糖、核酸,或它们的组合。这些组合包括细胞组分、组织、细菌、病毒、细胞壁、细胞膜、细胞器、染色体、基因、线粒体、核等。根据本发明一方面,某些分析物不含有核酸。

[0034] 可用本发明方法对多种蛋白质分析物进行方便地检测。可将这些蛋白质分析物分类成各蛋白质家族,各家族有类似的结构特征、生物功能、与特定微生物(尤其是致病微生物)的关系等。本发明特别感兴趣的蛋白质家族包括例如,免疫球蛋白、细胞因子、酶、激素、癌抗原、营养标记、组织特异性抗原和生物战争物质。这些蛋白质分析物可存在于血液、血清、血浆、脊髓液、滑膜液、唾液、尿液、细胞或组织。

[0035] 以下是可用本发明组合物、方法和试剂盒检测的结构相关的蛋白质分析物类别的例子：

[0036] 鱼精蛋白

[0037] 组蛋白

[0038] 白蛋白

[0039] 球蛋白

[0040] 硬蛋白

[0041] 磷蛋白

[0042] 粘蛋白

[0043] 以下是可用本发明组合物、方法和试剂盒检测的人血浆中发现的临床重要性蛋白质的例子：

[0044] α_1 -脂蛋白

[0045] α_1 -抗胰蛋白酶

[0046] 皮质激素传递蛋白

[0047] 4.6S-后白蛋白

[0048] 色氨酸-弱(Tryptophan-poor)

[0049] α_1 -糖蛋白

[0050] α_{1x} -糖蛋白

[0051] 甲状腺素结合球蛋白

[0052] 间- α -胰蛋白酶抑制剂

[0053] Gc-球蛋白

[0054] (Gc 1-1)

[0055] (Gc 2-1)

[0056] (Gc 2-2)

[0057] 七珠蛋白

[0058] (Hp 1-1)

[0059] (Hp 2-1)

[0060] (Hp 2-2)

[0061] 血浆铜蓝蛋白

[0062] 乙酰胆碱酯酶

[0063] α_2 -脂蛋白

[0064] 肌红蛋白

[0065] C-反应性蛋白

[0066] α_2 -巨球蛋白

[0067] α_2 -HS-糖蛋白

[0068] Zn- α_2 -糖蛋白

[0069] α_2 -神经氨糖酸糖蛋白

[0070] 促红细胞生成素

[0071] β -脂蛋白

- [0072] 转铁蛋白
- [0073] 血红素蛋白
- [0074] 纤维蛋白原
- [0075] 纤溶酶原
- [0076] β_2 -糖蛋白 I
- [0077] β_2 -糖蛋白 II
- [0078] 免疫球蛋白 G
- [0079] (IgG) 或 γ G-球蛋白
- [0080] 分子式： $\gamma_2\kappa_2$ 或 $\gamma_2\lambda_2$
- [0081] 免疫球蛋白 A (IgA) 或 γ A-球蛋白
- [0082] 分子式： $(\alpha_2\kappa_2)^n$ 或 $(\alpha_2\lambda_2)^n$
- [0083] 免疫球蛋白 M (IgM) 或 γ M-球蛋白
- [0084] 分子式： $(\mu_2\kappa_2)^5$ 或 $(\mu_2\lambda_2)_5$
- [0085] 免疫球蛋白 D (IgD) 或 γ D-球蛋白 (γ D)
- [0086] 分子式： $(\delta_2\kappa_2)$ 或 $(\delta_2\lambda_2)$
- [0087] 免疫球蛋白 E (IgE) 或 γ E-球蛋白 (γ E)
- [0088] 分子式： $(\epsilon_2\kappa_2)$ 或 $(\epsilon_2\lambda_2)$
- [0089] 游离 κ 和 λ 轻链
- [0090] 补体因子：
- [0091] $C'1$
- [0092] $C'1q$
- [0093] $C'1r$
- [0094] $C'1s$
- [0095] $C'2$
- [0096] $C'3$
- [0097] β_1A
- [0098] α_2D
- [0099] $C'4$
- [0100] $C'5$
- [0101] $C'6$
- [0102] $C'7$
- [0103] $C'8$
- [0104] $C'9$
- [0105] 可用本发明组合物、方法和试剂盒检测的重要血液凝固因子包括下表中所列的例子：
- [0106]

表 1. 血液凝固因子

国际命名	名称
I	纤维蛋白原
II	凝血酶原
IIa	凝血酶
III	组织凝血致活酶
V和VI	促凝血球蛋白原，加速球蛋白
VII	前转化素
VIII	抗血友病球蛋白 (AHG)
IX	血小板辅因子II 血浆凝血激酶 (PTC)
X	St-P因子，自身凝血酶原III
XI	血浆凝血活酶
XIII	血纤维稳定因子

[0107] 可用本发明组合物、方法和试剂盒检测的重要激素包括：

[0108] 肽和蛋白质激素

[0109] 甲状旁腺激素（甲状旁腺素）

[0110] 甲状腺降钙素

[0111] 胰岛素

[0112] 高血糖素

[0113] 松弛肽

[0114] 促红细胞生成素

[0115] 促黑激素（黑素细胞－刺激激素；垂体中间叶激素）

[0116] 成长激素（生长激素）

[0117] 促肾上腺皮质激素（促皮质素）

[0118] 促甲状腺激素

[0119] 卵泡刺激素

[0120] 促黄体（生成）激素（促间质细胞激素）

[0121] 催乳（Luteomammotropic）激素（催乳素，泌乳素）

[0122] 绒毛膜促性腺激素（绒毛膜促性腺激素）

- [0123] 组织激素
- [0124] 分泌素
- [0125] 胃泌素
- [0126] 血管紧张素 I 和 II
- [0127] 缓激肽
- [0128] 人胎盘催乳激素
- [0129] 细胞因子
- [0130] IL 1
- [0131] IL 2
- [0132] IL 4
- [0133] IL6
- [0134] IL8
- [0135] IL10
- [0136] EGF
- [0137] TNF
- [0138] NGF
- [0139] 癌抗原
- [0140] PSA
- [0141] CEA
- [0142] α - 胎蛋白
- [0143] 酸性磷酸酯酶
- [0144] CA19.9
- [0145] CA125
- [0146] 组织特异性抗原
- [0147] 碱性磷酸酶
- [0148] 肌红蛋白
- [0149] CPK-MB
- [0150] 肌钙蛋白
- [0151] BNP
- [0152] Pro-BNP
- [0153] 降钙素
- [0154] 髓磷脂碱性蛋白
- [0155] 来自神经垂体的肽激素
- [0156] 催产素
- [0157] 抗利尿激素
- [0158] 释放因子 (RF) CRF, LRF, TRF, 成长激素 -RF, GRF, FSH-RF, PIF, MIF
- [0159] 蓖麻毒素
- [0160] 白喉(Diphtheria) 毒素
- [0161] 肉毒杆菌毒素

- [0162] 葡萄球菌肠毒素 B
- [0163] 细菌和病毒也是可用本发明组合物、方法和试剂盒检测的分析物。这些生物学分析物包括以下细菌和病毒等：
- [0164] 棒状杆菌
- [0165] 白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheria*)
- [0166] 肺炎球菌
- [0167] 肺炎双球菌(*Diplococcus pneumoniae*)
- [0168] 链球菌
- [0169] 酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)
- [0170] 唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*)
- [0171] 葡萄球菌
- [0172] 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)
- [0173] 白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)
- [0174] 奈瑟菌
- [0175] 脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)
- [0176] 淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhea*)
- [0177] 肠杆菌(Enterobacteriaceae)
- [0178] 大肠菌
- [0179] 大肠杆菌(*Escherichia coli*)
- [0180] 产气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)
- [0181] 肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)
- [0182] 沙门氏菌
- [0183] 伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhosa*)
- [0184] 猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)
- [0185] 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)
- [0186] 志贺氏杆菌
- [0187] 痢疾志贺氏杆菌(*Shigella dysenteriae*)
- [0188] 施氏志贺杆菌(*Shigella schmitzii*)
- [0189] 阿糖迟醇志贺氏菌 (*Shigella arabinotard*)
- [0190] 弗氏志贺氏杆菌(*Shigella flexneri*)
- [0191] 鲍氏志贺氏杆菌(*Shigella boydii*)
- [0192] 索氏志贺氏杆菌(*Shigella sonnei*)
- [0193] 其它肠杆菌
- [0194] 普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)
- [0195] 奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)
- [0196] 变性杆菌种(*Proteus species*)
- [0197] 摩氏变形菌 (*Proteus morgani*)
- [0198] 绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)
- [0199] 粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)

- [0200] 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)
- [0201] 嗜血杆菌 – 博德特氏菌属(Hemophilus-Bordetella Group)
- [0202] 流感嗜血杆菌 *Hemophilus influenza*,
- [0203] *Hemophilus ducryi*
- [0204] *Hemophilus hemophilus*
- [0205] *Hemophilus aegypticus*
- [0206] 副流感嗜血杆菌(*Hemophilus parainfluenza*)
- [0207] 百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)
- [0208] 巴斯德菌属
- [0209] 鼠疫巴斯德菌(*Pasteurella pestis*)
- [0210] 土拉热巴斯德菌(*Pasteurella tularensis*)
- [0211] 布氏杆菌(Brucellae)
- [0212] 羊流产布氏杆菌(*Brucella melitensis*)
- [0213] 流产布氏杆菌(*Brucella abortus*)
- [0214] 猪流产布氏杆菌(*Brucella suis*)
- [0215] 需氧芽孢杆菌属
- [0216] 炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)
- [0217] 枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)
- [0218] 巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)
- [0219] 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)
- [0220] 厌氧芽孢杆菌属
- [0221] 肉毒梭状芽孢杆菌 (*Clostridium botulinum*)
- [0222] 破伤风梭状芽孢杆菌 (*Clostridium tetani*)
- [0223] 产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*Clostridium perfringens*)
- [0224] 诺维(氏) 动作状芽孢杆菌 (*Clostridium novyi*)
- [0225] 败血梭状芽孢杆菌 (*Clostridium septicum*)
- [0226] 溶组织梭状芽孢杆菌 (*Clostridium histolyticum*)
- [0227] 第三梭状芽孢杆菌 (*Clostridium tertium*)
- [0228] 双酶梭状芽孢杆菌 (*Clostridium bifermentans*)
- [0229] 产芽孢梭状芽孢杆菌 (*Clostridium sporogenes*)
- [0230] 分枝杆菌
- [0231] 人结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis hominis*)
- [0232] 牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)
- [0233] 鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)
- [0234] 麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)
- [0235] 副结核分枝杆菌(*Mycobacterium paratuberculosis*)
- [0236] 放线菌(真菌样细菌)
- [0237] 布氏放线菌 (*Actinomyces Isaeli*)
- [0238] 牛放线菌(*Actinomyces bovis*)

- [0239] 内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)
- [0240] 星形诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*)
- [0241] 巴西诺卡氏菌(*Nocardia brasiliensis*)
- [0242] 螺旋菌
- [0243] 梅毒密螺旋体(*Treponema pallidum*)
- [0244] 细弱密螺旋体(*Treponema pertenue*)
- [0245] 品他病密螺旋体(*Treponema carateum*)
- [0246] 回归热疏螺旋体(*Borrelia recurrentis*)
- [0247] 出血性黄疸钩端螺旋体(*Leptospira icterohemorrhagiae*)
- [0248] 犬钩端螺旋体(*Leptospira canicola*)
- [0249] 睡病虫(*Trypanosomes*)
- [0250] 支原体
- [0251] 肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)
- [0252] 其它病原体
- [0253] 立克次氏体(细菌样诸虫)
- [0254] 普氏立克次氏体(*Rickettsia prowazekii*)
- [0255] 莫塞尔立克次氏体(*Rickettsia mooseri*)
- [0256] 立克(氏)立克次氏体(*Rickettsia rickettsii*)
- [0257] 康氏立克次氏体(*Rickettsia conori*)
- [0258] 澳洲立克次氏体(*Rickettsia australis*)
- [0259] 西伯利亚立克次氏体(*Rickettsia sibiricus*)
- [0260] 螨立克次氏体(*Rickettsia akari*)
- [0261] 恙虫热立克次氏体(*Rickettsia tsutsugamushi*)
- [0262] 衣原体(不可分类的诸虫细菌/病毒(*unclassifiable parasites bacterial/viral*))
- [0263] 衣原体物质(不确定的名称)
- [0264] 真菌
- [0265] 新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)
- [0266] 皮肤炎芽生菌(*Blastomyces dermatidis*)
- [0267] *Hisoplasma capsulatum*
- [0268] 粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)
- [0269] 巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)
- [0270] 白色念珠菌(*Candida albicans*)
- [0271] 烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)
- [0272] 伞状毛霉菌(*Mucor corymbifer*)(伞状犁头霉(*Absidia corymbifera*))
- [0273] 稻根霉菌(*Rhizopus oryzae*)
- [0274] *Rhizopus arrhizua*
- [0275] 藻状菌(*Phycomycetes*)
- [0276] 黑色根霉(*Rhizopus nigricans*)

- [0277] *Sporotrichum schenkii*
[0278] *Flonsecaea pedrosoi*
[0279] *Fonsecaea compact*
[0280] *Fonsecaea dermatidis*
[0281] 卡氏分支着色霉菌(*Cladosporium carrionii*)
[0282] 疣状着色霉菌(*Phialophora verrucosa*)
[0283] 构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)
[0284] 足肿马杜拉分支菌(*Madurella mycetomi*)
[0285] 灰色马杜拉分支菌(*Madurella grisea*)
[0286] 波氏霉样真菌(*Allescheria boydii*)
[0287] 琼塞尔梅氏瓶霉菌(*Phialophora jeanselmei*)
[0288] 石膏样小孢子菌(*Microsporum gypseum*)
[0289] 须疮癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*)
[0290] 埃吉罗氏角质线菌(*Keratinomyces ajelloi*)
[0291] 犬小孢子菌(*Microsporum canis*)
[0292] *Microsporum adouini*
[0293] 红色发癣菌(*Trichophyton rubrum*)
[0294] 病毒
[0295] 腺病毒
[0296] 疱疹病毒
[0297] 单纯疱疹病毒(*Herpes simplex*)
[0298] 水痘(*Varicella*) (禽痘(*Chicken pox*))
[0299] 带状疱疹(*Herpes Zoster*) (*Shingles*)
[0300] B 病毒(*Virus B*)
[0301] 细胞巨化病毒(*Cytomegalovirus*)
[0302] 痘病毒
[0303] 天花(*Variola*) (*smallpox*)
[0304] 牛痘(*Vaccinia*)
[0305] 牛痘病毒(*Poxvirus bovis*)
[0306] 副牛痘(*Paravaccinia*)
[0307] 传染性软疣(*Molluscum contagiosum*)
[0308] 微小核糖核酸病毒
[0309] 脊髓灰质炎病毒(*Poliovirus*)
[0310] 柯萨奇肠道病毒(*Coxsackievirus*)
[0311] 埃可病毒(*Echoviruses*)
[0312] 鼻病毒(*Rhinoviruses*)
[0313] 粘病毒
[0314] 副流感(*Parainfluenza*) (1-4)
[0315] 腮腺炎病毒(*Mumps Virus*)

- [0316] 新城疫病毒(Newcastle Disease Virus)
- [0317] 麻疹病毒(Measles Virus)
- [0318] 牛瘟麻疹病毒(Rinderpest Virus)
- [0319] 犬瘟热病毒(Canine Distemper Virus)
- [0320] 呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus)
- [0321] 风疹病毒(Rubella Virus)
- [0322] 虫媒病毒
- [0323] 东方马脑炎病毒(Eastern Equine Encephalitis Virus)
- [0324] 西方马脑炎病毒(Western Equine Encephalitis Virus)
- [0325] 辛德比斯病毒(Sindbis Virus)
- [0326] 屈曲病毒(Chikungunya Virus)
- [0327] 塞姆利基森林病毒(Semliki Forest Virus)
- [0328] Mayora Virus
- [0329] 圣路易斯脑炎病毒(St. Louis Encephalitis Virus)
- [0330] 普氏立克次氏体(Rickettsia prowazekii)
- [0331] 加利福尼亚脑炎病毒(California Encephalitis Virus)
- [0332] 科罗拉多蜱热病毒(Colorado Tick Fever Virus)
- [0333] 黄热病病毒(Yellow Fever Virus)
- [0334] 登革热病毒(Dengue Virus)
- [0335] 呼肠病毒
- [0336] 呼肠病毒 1-3 型(Reovirus Types 1-3)
- [0337] 逆转录病毒
- [0338] 人免疫缺陷病毒 I 和 II (HIV)
- [0339] 嗜人 T 淋巴细胞病毒 I 和 II (HTLV)
- [0340] 肝炎病毒
- [0341] 甲肝病毒
- [0342] 乙肝病毒
- [0343] 丙肝病毒
- [0344] 肿瘤病毒
- [0345] 劳舍尔白血病病毒(Rauscher Leukemia Virus)
- [0346] 格罗斯病毒(Gross Virus)
- [0347] 马罗尼白血病病毒(Maloney Leukemia Virus)
- [0348] 人乳头状瘤病毒(Human Papilloma Virus)
- [0349] 此外,可能需要检测患者的正常或患病组织或细胞。例如某些循环性癌症细胞或其它细胞的存在与否,可能能够诊断疾病。因此,人患者的内源性细胞是可用本发明组合物、方法和试剂盒方便地进行检测的分析物。
- [0350] 本文所用术语“样品”指等份的物质,通常是衍生自生物物质的水性溶液或水性悬液。待用本发明方法检测其是否存在某分析物的样品包括例如,细胞、组织、组织匀浆、裂解物、提取物、纯化或部分纯化的蛋白和其它生物分子和它们的混合物。通常用于本发明方法

的样品的非限制性例子包括人和动物的体液,如全血、血清、血浆、脑脊液、痰液、支气管洗出物、支气管抽吸物、尿液、淋巴液以及呼吸道、肠道和生殖泌尿道的各种外分泌物、泪液、唾液、乳汁、白细胞、骨髓瘤等;生物液体如细胞培养上清液;固定或未固定的组织样本;和固定或未固定的细胞样本。

[0351] 用于本发明方法的样品可根据试验形式和待检测的组织、细胞、提取物或其它材料特别是生物材料的性质而变化。从细胞或其它样品制备例如组织匀浆和提取物(如蛋白提取物)的方法是本领域熟知的,并且不难对其进行改变以获得与本发明方法相容的样品。

[0352] 本文所用术语“接触”一般指将一种组分、试剂、分析物或样品的通路提供给另一种组分、试剂、分析物或样品。例如,接触可包括将含有结合对的溶液与含有分析物的样品混合。含有一种组分、试剂、分析物或样品的溶液也可含有另一种组分或试剂,如二甲基亚砜(DMSO)或去污剂,它们有助于混合、相互作用、吸收或有利于组分、试剂、分析物和/或样品之间接触的其它物理或化学现象。在本发明一个实施方式中,接触包括用递送设备(如移液装置或注射器装置)将含有结合对的溶液加入含有分析物的样品中。

[0353] 本文所用术语“检测”指验证某给定分子存在的任何方法。用于实现该目的的技术可包括但不限于,PCR、核苷酸测序、PCR 测序、分子信号(beacon)技术、杂交、杂交然后PCR、荧光、放射性标记、磷光以及分光光度检测。可用于检测的试剂的例子包括但不限于,放射性标记、酶学标记(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶)、荧光、磷光、生物发光、化学发光、亲和标记(例如,生物素、抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白)以及本领域技术人员熟知的其它试剂。

[0354] 本文所用术语“可区分的”指实验性区分不同的标记物、物质或分析物的能力。在本发明某些实施方式中,本发明的结合对或本发明试验可用于检测多种分析物。在某些这种实施方式中,核酸标记不是由长度和序列均相同的序列组成。两种标记可含有相同的核心序列,但根据这些标记物的大小和/或不同序列可区分这些标记。在优选实施方式中,检测产物的长度不同。在其它实施方式,标记物的序列结合于不同的序列特异性探针。这些实施方式是非限制性的,预计本发明可采用其它实施方式。

[0355] 术语“多核苷酸”和“核酸(分子)”可互换使用,指任何长度的核苷酸多聚形式。多核苷酸可包括脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和/或它们的类似物。核苷酸可具有任何三维结构,可执行已知或未知的任何功能。术语“多核苷酸”包括单链、双链和三螺旋分子。“寡核苷酸”一般指单链或双链核酸的5至约100个核苷酸的多核苷酸,一般是DNA。寡核苷酸也称为低聚物或寡聚物,可从基因中分离,或用本领域已知方法合成(例如化学合成或酶学合成)。“引物”指为酶介导的核酸合成的起始提供3'-羟基的寡核苷酸,通常是单链。以下是多核苷酸的非限制性实施方式:基因、基因片段、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。核酸分子也可包括修饰的核酸分子,如甲基化核酸分子和核酸分子类似物。本领域已知嘌呤和嘧啶的类似物,包括但不限于,氮丙啶基胞嘧啶、4-乙酰基胞嘧啶,5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫脲嘧啶、5-羧甲基-氨基甲基尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、假尿嘧啶、5-戊氧基尿嘧啶(pentylnyluracil)和2,6-二氨基嘌呤。在脱氧核糖核苷酸中用作胸

腺嘧啶替代物的尿嘧啶也看作嘧啶的一种类似形式。

[0356] 糖(基)修饰(例如 2'-O-甲基, 2-氟等)和磷酸主链修饰(例如吗啉代、PNA'、硫化、二硫化等)可单独掺入,或组合掺入到本发明核酸分子中。在一个实施方式中,例如,本发明核酸可包括修饰的糖(基)和修饰的磷酸主链。在另一个实施方式中,本发明核酸可包括糖基、碱基和磷酸主链的修饰。

[0357] 术语“核酸标记物”指在核酸扩增反应(如 PCR 反应)中与合适设计的寡核苷酸引物一起使用时能够产生预计大小或具有其它所选特征的检测产物的核酸分子。本领域技术人员熟悉用于 PCR 的合适寡核苷酸引物的设计,通过商业途径和因特网可获得这些(设计)程序以有助于本发明的这一方面(见例如,http 网址 bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher)。核酸标记物可以是线形或环形的。在优选实施方式中,核酸标记物包括预先设定的、线形核酸序列,在其各个末端或末端附近有所选引物的结合位点。在环形 DNA 核酸分子中,引物在内部而不在末端,可以只用一条引物,例如,用于滚环扩增(Rolling Circle Amplification)。可用任何现有方法检测扩增的 DNA,包括但不限于,实时 PCR、SYBR[®] Green 染色或溴化乙锭染色等技术。在本发明其它实施方式中,扩增引物的结合位点侧接有限定长度的不确定的 DNA 序列,或包括除不确定序列之外的另一种可识别特征的 DNA 序列(如可检测序列)。在某些实施方式中,核酸标记物可通过扩增序列的大小或质量来识别;因此,不需要将引物之间的 DNA 序列限定到确切序列,而只需要限定其碱基数目。或者,不需要限定整个核酸标记物的大小和/或序列,而只要提供分子信号(见上)的结合位点。在其它实施方式中,位于引物结合位点之间的 DNA 序列包括 PCR 反应期间能检测的“特征性识别序列”。荧光信号的产生可以例如是序列特异性的(分子信号(Molecular Beacons), TaqMan[®], 荧光引物,如 LUX[™] 引物(Invitrogen(Carlsbad, CA.))或依赖于质量(SYBR[®] Green, 溴化乙锭)。提供的例子没有将可能的核酸标记方案完全列出,本领域技术人员知晓适用于本发明方法的其它标记物。

[0358] 本文所用术语“特异性分子”指能够特异性结合另一个分子的任何分子。在一个实施方式中,特异性分子是抗体。在本发明另一个实施方式中,特异性分子可包括但不限于:生物受体分子,如胰岛素受体;受体的配体(例如,胰岛素受体的配体胰岛素);抗原(例如能结合于抗体的抗原)以及对另一个分子具有亲和性的生物、化学或其它分子,如生物素和抗生物素蛋白。本发明特异性分子不必包含完整的天然存在的分子,而是可以仅由天然存在分子的一部分、片段或亚基组成,例如抗体的 Fab 片段。可用本领域任何已知方法产生特异性分子。例如,如本领域熟知的,可在由杂交瘤组织培养上清液或腹水制备的抗血清中发现抗体,或抗体可衍生自重组表达系统。可通过化学、酶学或其它方法产生例如抗体、受体或其它种类分子的片段、部分或亚基,得到例如已知的分子(例如 Fab, Fab')或新的分子。本发明还考虑特异性分子可包括重组、嵌合和杂合分子,如人源化和灵长类动物源化(primatized)抗体,以及其它非天然存在的抗体形式。本领域技术人员认可,描述各种抗体形式的上述非限制性例子还可扩展到其它特异性分子,因此,非抗体分子的重组、嵌合、杂合或截短形式可用于本发明方法中。

[0359] 本文所用术语“特异性结合”指在本发明具体规定的条件下,抗体或其它分子(尤其是本发明的特异性分子)与靶物质如抗原、配体或其它分析物结合的亲和力大于它与其它分子结合的亲和力。如本领域所知,抗体或抗体片段是含有可结合其它分子(如抗原)的

区域的多肽分子。在本发明多种实施方式中,“特异性结合”可指抗体或其它特异性分子与靶分析物分子结合的亲和力比它和与靶分子无关的分子结合的亲和力大至少约 10^6 倍,优选至少约 10^7 倍,更优选至少约 10^8 倍,最优选至少约 10^9 倍。通常,特异性结合指亲和力约在大于非特异性结合 10^6 – 10^9 倍的范围内。在一些实施方式中,特异性结合的特征是亲和力比非特异性结合大 10^9 倍。当本文中出现某个范围时,如“1–10”,该范围非限制性地指给定范围中的各整数或计量单位。因此,“1–10”表示 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 中的每一个以及它们之间的任何亚单位。

[0360] “多克隆抗体”或“PAbs”是抗体分子的异质性群体,所述抗体分子衍生自用抗原或其抗原性功能衍生物免疫的动物血清。为了产生多克隆抗体,可用抗原或半抗原–载体偶联物(任选补充有佐剂)注射免疫宿主动物如家兔、小鼠和山羊。多克隆抗体可以是未纯化的、从抗血清的其它分子中纯化的或部分纯化的。制备和纯化多克隆抗体的技术是本领域熟知的,描述于各种一般性和更具体的参考文献中,这些文献包括但不限于 Kabat & Mayer, 实验免疫化学(Experimental Immunochemistry), 第二版, (Thomas, Springfield, IL(1961)); Harlow & Lane, 抗体:实验室手册(Antibodies: A Laboratory Manual) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988)); 以及 Weir, 实验免疫学手册(Handbook of Experimental Immunology), 第 5 版 (Blackwell Science, Cambridge, MA(1996))。

[0361] “单克隆抗体”或“MAbs”是针对特定抗原的抗体的均质性群体,可用能产生抗体分子的任何技术来获得,如通过细胞系的连续培养。这些技术包括但不限于 Köhler 和 Milstein 的杂交瘤技术, Nature, 256:495–7(1975); 以及美国专利 4, 376, 110), 人 B 细胞杂交瘤技术 (Kosbor, 等, Immunology Today, 4:72(1983); Cote, 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2026–30(1983)) 和 EBV–杂交瘤技术 (Cole, 等, 单克隆抗体 And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., New York, 77–96 页 (1985))。这些抗体可以是任何免疫球蛋白种类,包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 及其任何亚类。产生本发明 MAbs 的杂交瘤细胞可体外或体内培养。体内产生高效价的 MAbs 是当前优选的方法。

[0362] 此外,可采用产生“嵌合抗体”的技术 (Morrison, 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851–6855(1984); Takeda, 等, Nature, 314:452–54(1985)), 该技术将具有合适抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与具有合适生物学活性的人抗体分子的基因进行剪接。嵌合抗体分子的不同部分可衍生自不同种类的动物,如具有衍生自鼠 MAbs 的可变区和人免疫球蛋白恒定区。

[0363] 或者,可采用产生单链抗体的技术(美国专利 4, 946, 778; Bird, Science 242:423–26(1988); Huston, 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879–83(1988); 和 Ward, 等, Nature, 334:544–46(1989))来制备适用于本发明的基因–单链抗体。通常通过氨基酸桥连接 Fv 区域的重链和轻链片段,产生单链多肽来形成单链抗体。

[0364] 可用已知技术产生能识别特异性表位的抗体片段。例如,这些片段包括但不限于:用胃蛋白酶消化抗体分子而产生的 $F(ab')_2$ 片段,和可通过 $F(ab')_2$ 分子的二硫桥还原而产生的 Fab 片段。或者,可构建 Fab 表达文库 (Huse, 等, Science, 246:1275–81(1989)) 以快速和简易地鉴定具有所需特异性的单克隆 Fab 片段。

[0365] 本文所用术语“半抗原”指能够被抗体识别的蛋白质性或非蛋白质小抗原决定簇。

除部分较大的半抗原外,半抗原通常不刺激动物中形成抗体。例如,小的肽半抗原常常偶联于载体蛋白,如钥孔戚血蓝素,以产生抗-半抗原抗体应答。“抗原”是能够在动物中产生抗体应答反应并被产生的抗体识别的大分子。抗原和半抗原均包含至少一个抗原性决定簇或“表位”,它是抗原或半抗原结合于抗体的区域。通常,半抗原的表位是整个分子。

[0366] 表位所用术语“夹心对抗体”或“夹心抗体对”指一对通常是单一特异性的抗体,例如单克隆抗体,它们适用于夹心形式的免疫检测。抗体对中的各抗体结合于相同分子上不同的表位,抗体对中的两个抗体可同时结合于该抗原。鉴定适用于夹心检测的抗体对的方法是本领域技术人员熟知的。本领域技术人员也认可,多种其它分子可用作夹心对。例如,受体分析物可夹在该受体的配体和结合于该受体上不参与配体结合的表位的抗体之间。因此,抗体和配体可用作受体分析物的夹心对。

[0367] “受体”或“生物学受体”通常指细胞表面中或表面上的分子结构,其特征是与特定物质(例如“配体”)选择性结合,并导致产生伴随这种结合的特定生理学效应。受体的例子包括肽激素、神经递质、抗原、补体片段、免疫球蛋白的细胞表面受体以及类固醇激素的细胞质受体。然而,本文所用的受体通常是分离和纯化的,并且不一定引发或能够引发生理学或其它生物学效应。本发明方法利用受体和特定物质的选择性结合。

[0368] 术语“配体”通常指结合于受体的分子。通常,配体是可溶性小分子,如激素或神经递质。

[0369] 术语“固相支持物”指可用于固定例如分析物、抗体或复合物的任何固相。合适的固相支持物是本领域熟知的,包括反应皿例如微滴定板的孔壁、试管壁、聚苯乙烯珠、顺磁性或非磁性珠、硝酸纤维素膜、尼龙膜、微粒如乳胶颗粒、以及绵羊(或其它动物)的红血细胞。固相支持物的一般材料包括但不限于,聚氯乙烯(PVC)、聚苯乙烯、纤维素、尼龙、乳胶及其衍生物。另外,固相支持物可被涂覆或衍生化或做其它改性以促进所需分子(例如分析物)的粘附和/或防止非特异性结合或其它不需要的相互作用。具体“固相支持物”的选择一般不是很重要,本领域技术人员可根据所采用的试验来选择。因此,乳胶颗粒、微粒、顺磁性或非磁性珠、膜、塑料管、微滴定孔的壁、玻璃或硅片以及红血细胞都是合适的固相支持物。可方便地选择固相支持物来进行多种检测方法。例如,可用 96 或 384 孔板来进行自动化试验,如通过机器人平台而自动操作的试验,和/或进行例如用板读数仪来检测的试验。对于包括用膜显像的化学发光或放射自显影检测步骤的本发明方法而言,固相支持物可以是薄膜,如硝酸纤维素或尼龙膜。根据实施夹心免疫检测的本发明一个实施方式,通常采用反应皿的孔壁。在本发明另外的实施方式中,顺磁性珠可用作固相支持物。将分子固定到固相支持物上的合适方法包括离子、疏水、共价相互作用等,以及它们的组合。然而,固定方法一般不重要,可包括非特征性吸附机制。因此,本文所用固相支持物可指不溶性或被后续反应变为不溶性的任何物质。可选择本身能够吸引并固定捕获试剂的固相支持物。或者,固相支持物能够保留另外的受体,该受体能够吸引和固定捕获试剂。所述另外的受体可包括与捕获试剂本身或与捕获试剂偶联的带电物质带有相反电荷的物质。在本发明另一个实施方式中,另外的受体分子可以是固定(连接)在固相支持物上并能够通过特异性结合反应固定捕获试剂的任何特异性结合成员。所述另外的受体分子能够在进行试验之前或试验进行中将捕获试剂间接固定到固相支持物上。因此,固相支持物可以是塑料、改性塑料、顺磁性或非磁性金属、试管的玻璃或硅表面、微滴定孔、片、珠、微粒、薄片或本领域一般技术人

员已知的其它构造。

[0370] “肽”一般指通过肽键连接的氨基酸短链。通常，肽链包含约 2-100 个氨基酸，更通常约 4-50 个氨基酸，最常见包含约 6-20 个氨基酸。“多肽”一般指通常比肽长的单个直链或分支链氨基酸序列。多肽长度一般包含至少约 100-1000 个氨基酸，更通常至少约 150-600 个氨基酸，常常约至少为 200-500 个氨基酸。“蛋白质”包括单个多肽以及多个多肽链的复合物，其中多个多肽可相同或不同。蛋白中的多条链可通过二级、三级和四级结构以及一级氨基酸序列结构来表征；或可通过二硫键连接在一起；可包括合成后修饰，如但不限于，糖基化、磷酸化、截短或其它加工。抗体如 IgG 蛋白通常由四个多肽链（即两条重链和两条轻链）组成，它们通过二硫键连接在一起。而且，蛋白质可包括其它组分如与其连接的金属（如铁、铜和硫）或其它部分。肽、多肽和蛋白质的定义包括但不限于生物学活性和非活性形式；变性和天然形式；以及其变体、修饰形式、截短形式、杂合形式和嵌合形式。本发明肽、多肽和蛋白质可衍生自任何来源或任何方法，包括但不限于提取自天然发生的组织或其它物质；在宿主生物体如细菌、真菌、植物、昆虫或动物细胞中重组产生；以及用本领域技术人员熟知的方法化学合成。

[0371] 本文所用术语“偶联物”指共价连接或通过其它方式连接在一起的两个分子。在一个实施方式中，通过将核酸共价连接于蛋白质、多肽或其它特异性分子而产生核酸偶联物。在本发明一个优选实施方式中，通过连接基团将蛋白质、多肽或其它特异性分子共价连接于核酸以形成偶联物。

[0372] 通过本发明方法来检测样品中分析物存在的“试剂盒”可例如包含至少一个容器装置，其中置有对所选分析物特异的结合对。试剂盒还可包含其它容器装置，所述容器装置含有以下一种或多种物质：进行分析物检测所需的缓冲液、溶液或其它试剂和材料；能够扩增结合对的核酸探针组分的试剂；以及在扩增后能够检测核酸组分存在的试剂。试剂盒优选还包含使用说明。如果试剂盒用于诊断目的，该试剂盒还可包含 FDA 批准使用的通知和其说明。

[0373] 具体地，具有隔间的试剂盒包括试剂装载于独立容器中的任何试剂盒。这些容器包括小的玻璃容器、塑料容器、纸或塑料条。这些容器使得能够将试剂从一个隔间有效转移到另一个隔间，这样，样品和试剂不会交叉污染，各容器中的物质或溶液能够以定量方式从一个隔间加到另一个隔间。这些容器可包括接收测试样品的容器、含有试验所用探针或引物的容器、含有缓冲液和试剂（如磷酸缓冲盐水、Tris 缓冲液等）的容器、和含有用于检测标记物核酸、扩增产物等的试剂的容器。本领域技术人员知道，已形成的结合对和 / 或制备结合对所需的材料、辅助材料和试剂不难加入到本领域熟知的已建立的试剂盒形式中。

[0374] 通过本发明方法将 DNA 偶联到抗体或其它特异性分子的试剂盒可包含至少一个容器装置，其中置有冻干的、有活性的 DNA。试剂盒还可包含其它容器，容器中含有以下一种或多种物质：能够在反应后检测核酸存在的试剂、缓冲液和物质。试剂盒优选还包含使用说明。本领域技术人员知道，本发明所述的有活性的核酸不难加入到本领域熟知的已建立的试剂盒形式中。

[0375] 均相分析物检测试验

[0376] 本发明总体提供利用新的核酸标记的结合对来进行分析物检测（尤其是均相灵敏的分析物检测）的组合物、方法和试剂盒，所述结合对在确定的条件下具有确定和有限的稳

定性。

[0377] 结合对

[0378] 在一个实施方式中,本发明提供用于检测分析物的结合对。本发明的结合对在两个结合成员之间形成,各结合成员具有偶联于核酸的特异性分子,如图 1 所示。结合成员的核酸组分在至少一部分长度上是互补的,并且可形成双链体,通过该双链体将结合对的两个成员结合起来(见图 1)。

[0379] 结合对的特异性分子组分

[0380] 各结合对的特异性分子指导结合对与所需分析物的相互作用。如上所述,本发明的特异性分子可以是能够与另一种分子如分析物相互作用的任何分子。在优选实施方式中,特异性分子以高特异性和亲和力与分析物相互作用。

[0381] 在本发明一个方面,特异性分子是受体。在另一个方面,特异性分子是配体。在本发明再另一个方面,特异性分子是抗体。

[0382] 结合对各特异性分子可以是相同类型的分子或可以是不同类型的分子。在另一个实施方式中,结合对中的两种特异性分子均为受体。在另一个实施方式中,结合对中的两种特异性分子均为配体。在另一个实施方式中,结合对中的两种特异性分子均为抗体。在另一个实施方式中,结合对中的两种特异性分子均为抗原。在另一个实施方式中,一种特异性分子是配体,另一种特异性分子是受体。在另一个实施方式中,结合对中的一种或两种特异性分子是核酸。在这种实施方式的一个方面,靶分析物是互补核酸。在这种实施方式的另一个方面,靶分析物是 DNA、RNA 或蛋白质,或它们的复合物的组分。在这种实施方式的另一个方面,靶分析物是包含核酸和蛋白质的复合物,结合对中特异性分子之一是与靶分析物的核酸组分互补的核酸,而结合对的另一种特异性分子是与靶分析物的蛋白质组分特异性结合的蛋白质(即抗体、抗原、配体、受体等)。在优选实施方式中,结合对的至少一种特异性分子是抗体。

[0383] 抗体作为特异性分子尤其有用。上文描述的所有类型的抗体都可用于赋予结合对特异性,这些抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、杂合抗体、重组抗体、人源化抗体、灵长类动物源化抗体、截短的抗体、单链抗体等。

[0384] 当用两种抗体形成结合对时,这两种抗体可具有相同或不同的特异性。在本发明一个实施方式中,两种抗体识别相同的表位,该表位在同一种分析物上多次出现。例如,结合对中的两种抗体可识别在细胞分析物表面有多个拷贝的受体。在另一个实施方式中,抗体识别一种分析物分子上不同的表位。在该实施方式的某些方面,两种抗体可同时结合到一个分析物分子。本发明该方面所说的“夹心对”抗体是本领域技术人员熟知的。

[0385] 结合对的核酸组分

[0386] 结合对中的各特异性分子偶联于核酸分子或以核酸分子(即,核酸标记物)“标记”。根据本发明一方面,核酸是单链的。另一方面,核酸是部分单链的。在另一个实施方式中,核酸都是 DNA、都是 RNA 或是 DNA 和 RNA 的混合物。在其它实施方式中,可采用核酸类似物或衍生物。在另一个实施方式中,PNA 用作核酸的部分或全部。特异性分子可偶联于核酸的 3' 或 5' 端。在本发明一个实施方式中,结合对的两种核酸的游离末端互补,从而它们可杂交形成具有有限和确定的稳定性的双链体核酸区域。在该实施方式的一个方面,形成双链体的游离末端是核酸的 3' 端。在另一个实施方式中,结合对中一种核酸的游离末端

与该结合对中另一种核酸非末端位点的序列互补。在本发明一方面,第一种核酸的 3'端与第二种核酸的内部序列形成双链体。在某些实施方式中,核酸通过一种或多种接头或间隔分子偶联于特异性分子。

[0387] 与需要它们执行的功能作用相比,本发明核酸的核苷酸序列不是很重要。因此,结合对的核酸组分的核酸序列以及长度可有显著变化,只要结合对的核酸组分仍然能够执行所需的功能。很重要的一点是,结合对中核酸的序列和长度不限于本文公开的示范性结合对的确切序列和长度。因此,结合对中核酸的长度和/或序列可不同。本发明结合对的核酸组分的一种重要功能是提供分析物检测的高灵敏标记。在一个实施方式中,扩增并检测核酸来度量分析物浓度。可用已知方法扩增核酸。示范性扩增方法包括多个美国专利中描述的方法,这些专利均全文纳入本文作为参考:PCR(见,例如美国专利 4,683,202),TMA(见,例如美国专利 5,399,491);SDA(见,例如美国专利 5,270,184),以及 LCR(见,例如美国专利 5,427,930)。

[0388] 多种核苷酸序列可用于扩增。类似地,核酸的长度可显著不同。在一个实施方式中,设计本发明的核酸以避免形成分子内发卡,从而可提高扩增的效率。在本发明某些方面,用非特异性插入的荧光燃料如SYBR[®] Green 检测核酸。根据该实施方式,检测信号的强度是检测到的核酸长度的函数。

[0389] 众所周知,核酸双链体的稳定性部分取决于双链体中核酸链之间互补区的长度。核酸之间的互补区或“重叠”较长可增加形成的双链体的稳定性。相反,较短的重叠使双链体稳定性较差。设计本发明核酸使其具有确定的稳定性,可通过改变长度、温度、溶剂和其它条件来控制这种稳定性。影响杂合体(双链)稳定性的因素包括但不限于,核酸标记的结合对的浓度、盐浓度、温度、有机溶剂如乙醇、DMSO、四甲基铵离子(TMA⁺)、碱基错配等。

[0390] 在本发明一方面,设计核酸以形成内结合对双链体。在本发明另一方面,在确定的条件下结合对的核酸双链体可解离,从而在某些条件下具有有限的稳定性。

[0391] 在本发明一个实施方式中,设计反应条件使结合于各自的靶分析物的结合对成员之间双链体的形成最大化,而使未结合靶分析物的结合对成员之间的双链体形成最小化。在另一个实施方式中,双链体在结合于分析物时保持稳定,但可被试验操作者选择性解离或解链。

[0392] 在这些条件下,热力学条件有利于使未结合的对不发生杂交。在本发明某些实施方式中,少于约 1%的结合对不与分析物结合。在其它实施方式中,少于约 0.1%、0.01% 或 0.001% 的结合对不与分析物结合。在其它实施方式中,可利用竞争性核酸(例如,与结合对核酸之间形成双链体的区域互补)阻止游离的结合(对)成员发生重新结合。可通过以下设计获得类似的效果:当结合对中的一种核酸不与其结合伴侣(partner)核酸杂交时,则该核酸形成小发卡结构。

[0393] 一旦在结合对和靶分析物之间形成复合物,则可用聚合酶延伸核酸双链体的 3'端以增强复合物的稳定性,如美国专利 5,635,602 所述,其内容全文纳入本文作为参考。

[0394] 可通过将多种标记的任意一种掺入结合对中的一种或两种核酸来检测本发明的核酸标记物。适用于本发明的标记物的例子包括嵌入性荧光分子如SYBR[®] Green 和溴化乙啶;FRET 荧光共振能量转移对,如荧光素和罗丹明;放射性化合物、生物发光化合物、化学发光化合物如吖啶酯;化学发光淬灭对;以及以序列特异性方式与核酸

杂交的试剂,如 Molecular Beacons(Kramer), **TaqMan**[®], 和荧光引物(例如 LUX[™] 引物;Invitrogen, Carlsbad, CA)。此外,可在双链体核酸对的 3' 延伸过程中掺入荧光核酸三磷酸(NTP 和 dNTP)。而且,也可能通过缺口翻译和其它方法掺入标记。

[0395] 核酸结合对分析物检测

[0396] 本发明还提供用结合对检测分析物的方法。在一个实施方式中,如上所述,分析物特异性结合对与分析物接触形成复合物。通过两种核酸之间形成的具有确定和有限的稳定性的分子间双链体将结合对的成员结合在一起。而且,通过与分析物结合,结合(对)成员被锁定在非常接近的位置,从而具有很高的局部浓度。然后,核酸双链体可解离和再结合。

[0397] 可用本领域已知的任何方法将双链体解离。在本发明一个实施方式中,可加热复合物至高于核酸双链体的解链温度,从而实现解离。在本发明另一方面,可降低盐浓度或离子强度。在本发明另一个方面,可在复合物中加入化学物质或生物物质使双链体解离。

[0398] 在本发明另一方面,可通过稀释来防止或消除未与分析物复合的结合对成员核酸的再结合。在另一方面,稀释或其它反应条件不会使过量游离结合成员的大量再结合。一般来说,不允许大量再结合的条件包括过量游离结合成员的再结合少于 5%,通常少于 1%,常常少于 0.1%,最常见少于 0.01%。根据该实施方式,结合对与分析物接触从而在结合对与分析物之间形成复合物。然后稀释复合物,从而有利于近端结合的核酸标记物的杂交而不利本体溶液的杂交。在这些条件下,标记物核酸的 3' 端延伸主要或仅仅发生在复合或杂交的标记物核酸中,而未复合的核酸没有杂交,因此不发生 3' 端延伸。

[0399] 根据本发明该方法,然后检测延伸的双链体以检测分析物。在本发明一个实施方式中,扩增包含双链体的核酸以进行检测。可用本领域已知的任何方法实现扩增。合适的方法包括但不限于,PCR、LCR、SDA 和 TMA。

[0400] 通常,核酸扩增方法依赖于 DNA 的引发性酶学合成。根据这些方法,具有游离 3' OH 的引物与单链 DNA 或 RNA 模板杂交。然后 3' OH 形成可用聚合酶延伸的起始位点,聚合酶的例子是本领域熟知的,包括但不限于,Taq DNA 聚合酶、DNA 聚合酶 I、DNA 聚合酶的 Klenow 片段、T4DNA 聚合酶、T7DNA 聚合酶、反转录酶、phi29DNA 聚合酶、Bst DNA 聚合酶、AccuPrime[™](Invitrogen)、Pfx DNA 聚合酶(Invitrogen)、FideliTaq[™] DNA 聚合酶(Amersham Biosciences)、Sequenase[™]、Thermo Sequenase[™] DNA、Hot Tub[™] DNA 聚合酶(Amersham Biosciences)、**Vent**[®]聚合酶(New England Biolabs)和 9° N_m DNA 聚合酶。

[0401] 在本发明一方面,PCR 的模板是核酸分子,其包含通过它们各自的特异性分子与分析物复合的两条核酸的双链区。本领域技术人员理解,PCR 模板可长于所需的 PCR 产物。两个单独的 PCR 引物可在(模板)内部杂交并启动 DNA 合成,各引物在一条核酸模板链的特定位点。通常,产生的 PCR 产物的 5' 末端由一条引物限定,3' 末端由另一条引物限定。

[0402] 然后可检测扩增产物,如通过溴化乙啶染色、银染、放射自显影、斑点印迹、狭线印迹或 southern 印迹。或者,可将检测分子掺入一种或两种核酸中、扩增产物中、或复合物的双链区中来完成检测。适用于本发明方法的检测分子包括但不限于,荧光分子、荧光淬灭分子、化学发光化合物、化学发光淬灭分子、荧光核苷酸、酶标记和放射性标记。

[0403] 在本发明某些实施方式中,将吡啶酯掺入复合物的双链区,将未形成核酸双链体的第一和第二结合对成员中的标记选择性水解,从而来实现检测。

[0404] 双链体的 3' 延伸和引物结合位点的产生

[0405] 本发明提供通过扩增结合对核酸双链体来检测分析物的方法,其中核酸标记物序列缺少一个或两个引物结合位点。根据该实施方式,在结合对与分析物结合之后产生引物结合位点。例如,在双链区之外,一条或两条核酸标记物序列可掺有与所需引物序列相同的序列。换句话说,结合对核酸中不存在扩增用的引物结合位点,只在核酸双链体的 3' 端扩增之后才形成引物结合位点。

[0406] 在该实施方式中,标记物核酸不存在与引物互补的区域(即没有引物位点)。然而杂交之后,可用合适的聚合酶延伸一条或两条标记物的 3' 端。所述延伸包括了与所需引物序列相同的序列,因此产生互补的引物结合位点,该结合位点可用于在后续扩增步骤中与引物结合(图 2 和 3)。在该实施方式一方面,除非在第一和第二核酸标记物之间形成双链区并进行后续的延伸,否则扩增用的引物不发生杂交也不启动核酸合成/扩增。在本发明另一方面,因为只有发生杂交的分子被检测到,因此降低了非特异性背景检测。

[0407] 已发现具有 5' 氨基 C₁₂ 间隔臂(间隔(Spacer) C₁₂CE 亚磷酰胺;12-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)十二烷基-1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺)和以下序列的 60 个碱基长度的寡核苷酸适用于本发明这一方面:

[0408] (1) 5' NH₃-C₁₂-GCTACGGCTAGATCGTGTCCATGCGCTTACGACTTCGATGCTCGGCTCGCTAGCTAGATG 3' [SEQ ID NO.:1]

[0409] (2) 5' NH₃-C₁₂-TCTCCAACCTCTTCAACGCCATGTTCTTATGATACGAGAGATTACGCGGAGGCATCTAGCT 3' [SEQ ID NO.:2]

[0410] (3) 5' NH₃-C₁₂-TCTCCAACCTCTTCAACGCCATGTTCTTATGATAC GAGAGATTCATCATCTAGCTAGCGAG-3' [SEQ ID NO.:3]

[0411] 寡核苷酸(1)[SEQ ID NO.:1]在其 3' 端分别以最后的 9 个和 15 个碱基与寡核苷酸(2)[SEQ ID NO.:2]和寡核苷酸(3)[SEQ ID NO.:3]互补。寡核苷酸之间形成的双链体的长度具有特定的 Gibbs 自由能(ΔG),该自由能受最邻近碱基序列的控制。见,Breslauer,等,Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A. 83:3746-3750(1986)。根据下式,在 50mM NaCl 中 9 个和 15 个碱基对重叠的解链温度(T_m 's)分别是 26° C 和 42° C:

[0412] $T_m = 64.9 + 41 * (yG + zC - 16.4) / (wA + xT + yG + zC)$

[0413] 其中,w、x、y、z 分别是序列中碱基 A、T、G、C 的数目。见,例如,<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>。在 25°C,50mM NaCl 中,当重叠链以大于 50nM 的浓度存在于溶液中时则发生杂交(>50% 双链)。平衡时链浓度小于 100pM 时,链主要以单体(<50% 杂合体)存在。根据热力学原理,互补的 DNA 链,如这些可在单链和双链形式之间转换的互补 DNA 链的形成是温度、DNA 浓度和盐作用的函数。杂交时,各链的 3' 端可作为与另一条链互补的核酸合成的起始位点。可在合适 DNA 聚合酶和三磷酸核苷酸存在下延伸各链,产生 111 个(图 2)或 105 个(图 3)碱基对的 DNA 双链。新形成的双链含有最初在部分重叠的结构中不存在的序列。在以下合适的下游引物存在下,可通过 PCR 指数复制这些新序列:

[0414] 5' GCTACGGCTAGATCGTGTCCA 3' [SEQ ID NO.:4]

[0415] 和

[0416] 5' TCTCCAACCTCTTCAACGCCATGTTC 3' [SEQ ID NO.:5]

[0417] 如果不形成第一链延伸产物,各链在存在这些引物时也不能复制。

[0418] 图 4 显示了 9 个和 15 个碱基对重叠寡核苷酸链的实时 PCR 扩增(热启动)。从该

图可看出,在各链以足够的浓度存在以确保一条链可能与另一条链足够接近从而发生杂交和第一链延伸之前,不发生扩增。如实时 PCR 阈值循环所检测到的,增加重叠链的浓度使模板的产生发生指数性增加。相反,稀释该浓度(如通过洗涤支持物)则指数性降低信号。显示了正常的 60 个单体模板的扩增,用于比较。

[0419] 结合对 - 分析物复合物的邻近效应

[0420] 利用重叠寡核苷酸标记的夹心免疫检测称为 NADIA™(核酸检测免疫试验(Nucleic Acid Detection ImmunoAssay))。已显示了 NADIA 的均相和非均相形式。图 5 显示了均相 NADIA 的示意图。

[0421] 以重叠寡核苷酸标记的抗体结合成员也显示出图 4 所示的 PCR 扩增效应。将这种 DNA-Ab 偶联到相同的抗原,或偶联到抗原覆盖的表面,使重叠寡核苷酸链固定在与另一条邻近的位置。这有效提高了两条链的相对浓度和形成模板的可能性。模板一旦形成,则在模板浓度和实时 PCR 阈值信号之间表现出线性关系。

[0422] 这种邻近效应能够大大降低使用捕获性支持物时(即在非均相检测中)由于模板 DNA-Ab 偶联物的非特异性结合而产生的背景信号。与前述 DNA-Ab 偶联物不同,独立的重叠寡核苷酸序列不是用于扩增的模板分子,它们本身不能用所选的引物组进行扩增。虽然重叠的偶联物仍然能够非特异性结合,但这种结合是随机的。相对少量拷贝的偶联物的随机非特异性结合大大降低了近距离相互作用和第一链延伸的可能性。

[0423] 邻近效应也可是本发明均相夹心检测形式的基础,该检测中不需要捕获性支持物。根据本发明方法,所采用的条件必须有利于邻近结合的重叠偶联物的杂交和第一链延伸但不利于本体溶液中的杂交。如图 4 所示,溶液中偶联物对的任何非特异性杂交都将引发信号。因此,本发明的一个实施方式需要采用尽可能低的保持可接受的复合物形成速率的偶联物浓度。也可调整重叠长度、盐条件和温度作用以使本体溶液中重叠序列的随机杂交最小化。

[0424] 细胞分析物的免疫检测

[0425] 已将针对大肠杆菌 0157 的亲合纯合的多克隆抗体偶联于重叠寡核苷酸链以证明检测完整微生物的非均相 NADIA 形式。已采用偶联于磁性颗粒的抗体(Dynal, Lake Success, NY)从水样品和肉类匀浆中分离和富集大肠杆菌 0157 细胞。据估计,细胞表面展示检测到的特定抗原的几千个拷贝。计算显示,随机分布位点之间的距离落在偶联于抗 - 大肠杆菌 0157 的重叠寡核苷酸的跨越距离中。这种情况下,邻近结合是因为单个抗原之间的距离,而不是因为同一蛋白质抗原上的独立表位。

[0426] 根据本发明方法(如下实施例所述),在三个独立的反应中用序列(1)、(2)和(3)标记多克隆抗 - 大肠杆菌 0157(KPL, Gaithersburg, MD),并保持为独立的偶联物。大肠杆菌 0157:H7 获自 ATCC(700728), 37° C 培养。获自液体培养物的细胞稀释在新鲜培养基中,室温与 10nM 重叠寡核苷酸-Ab 偶联物孵育 1 小时。洗涤产生的细胞 - 抗体复合物,离心除去过量的、未结合偶联物,并重悬在冷的 tris 缓冲盐水中,有效稀释重叠抗体试剂至 1.0pM 以下。将洗涤过的细胞同时划线在平板上,与 PCR 试剂混合物 33° C 孵育 10 分钟,然后在下游引物存在下进行 40 个循环的实时 PCR,进行检测。如 37° C 过夜培养物中的克隆形成所确定的,存在 10-50 个细胞,无需培养,就足以在 2-3 小时的试验中产生高于背景的信号。

[0427] 细胞分析物的均相检测

[0428] 本发明提供通过在细胞表面上与结合对试剂形成复合物从而检测完整细胞或病毒的方法。用于检测完整细胞(例如细菌细胞)的结合对试剂与检测具有两种或多种 MAb 的两个结合位点的蛋白质分析物时所用的结合对试剂类似。这种情况下,结合位点可包含嵌埋在细胞表面中的相同蛋白质。结合对试剂跨越各蛋白质单元之间的距离。

[0429] 可根据该方法检测的细胞包括细菌、动物、植物、昆虫和真菌细胞。在一个实施方式中,动物细胞是患病或健康的人类细胞。例如,该方法可采用包含针对细胞表面肿瘤抗原的抗体的结合对来检测循环癌细胞。

[0430] 用具有重叠 DNA 标记物的 3'-5' 偶联的结合对检测分析物

[0431] 通过采用包含一个结合对成员(5' 偶联物)和另一结合对成员(3' 偶联物)的结合对试剂可大大增强检测的灵敏性,如图 6 所示,所述一个结合对成员包含在 5' 端偶联于第一特异性分子(例如,夹心对的第一 MAb)的重叠对的第一核酸,所述另一结合对成员包含通过 3' 端偶联于第二特异性分子(例如,第二 Mab)的重叠对的互补第二核酸链。根据该方法,5' 偶联物的 3' 端与 3' 偶联物的内部序列杂交产生结合对,在此处,3' 端以背离形成的复合物中心的方向延伸至游离转动末端(3' 复合物的 5' 端)。与 3'-3' 重叠结合对相比,该方向提高了链延伸效率,因此提供了更大的聚合酶空间接触性并减小了最初聚合时产生的扭转应力。

[0432] 采用酶消化的均相检测

[0433] 通过采用包含偶联于单链核酸的特异性分子的结合对可提高分析物均相检测的灵敏度,所述特异性分子如抗体,所述单链核酸的 5' 端有脱氧核糖碱基,3' 端有核糖碱基。根据该方法,DNA/RNA 标记的 3' 端在整个 RNA 序列上互补,在 DNA 序列的较短一段上互补。在某些实施方式中,RNA 序列的长度至少约为 20 个碱基。在其它实施方式中,RNA 序列的长度至少约为 30、40、50 或 60 个碱基。根据本发明一方面,RNA 序列的长度为 26 个碱基。DNA-DNA 双链区较短,通常包含少于 15 个碱基对,常常少于约 12 个碱基对,优选少于约 10 个碱基对。在本发明的多个方面,DNA-DNA 双链区的长度是 12、11、10、9、8 或 7 个碱基对。

[0434] 根据该方法,在升高的温度下,分析物-结合对复合物的核酸双链区,尤其是 DNA/RNA 杂合双链区是稳定的,从而确保形成含有结合成员的复合物,所述结合成员在结合对复合物中锁定在特定方向和确定的彼此距离中。形成复合物后,可加入 RNA 酶消化复合的结合对和过量结合对中的 RNA 组分,产生由剩余的 DNA/DNA 双链连接的短的、相对不稳定的结合对。在一个实施方式中,RNA 酶是 RNA 酶 H。RNA 酶处理之后,升高温度,不稳定的结合对解离成各自的结合成员。降低温度时,只有那些固定在复合物位置上的结合成员才能迅速地重新结合。没有被分析物保持在邻近位置的解离的结合成员因为低浓度和短 DNA/DNA 双链有限的稳定性而不能重新形成结合对。在本发明一方面,具有较短的 3' DNA 重叠的核酸组分的结合成员降低了对复合物形成反应的稀释这一需要,并因此进一步提高了灵敏性。

[0435] 可用标准的亚磷酰胺化学方法来合成包含脱氧核糖和核糖核苷酸单体并具有 5' 氨基功能的核酸链。或者,可用 RNA 聚合酶以酶学方法填入短的 3' DNA/DNA 重叠。

[0436] 分析物的灵敏均相检测

[0437] 通过组合上述特征,设计了针对分析物如蛋白质抗原和微生物的均相检测,其灵敏性接近核酸检测。根据本发明的该方法,第一特异性分子(例如,夹心对的第一 MAb 或多克隆抗体的第一部分)偶联于嵌合 DNA/RNA 寡核苷酸的 5' 端。在该方法一方面,DNA/RNA

寡聚物的 RNA 部分在 3' 端含有 30 个碱基。通常,独特的引物位点位于 DNA/RNA 寡聚物的 5' DNA 末端。第二特异性分子(例如第二 MAb 或多克隆抗体的第二部分)偶联于 DNA 寡核苷酸的 3' 端,任选合成该 DNA 寡核苷酸使其具有一个或多个 3' 亚磷酸胺间隔分子以增加总长度。在该方法一方面,DNA 寡聚物的长度至少为 60 个碱基。通常,独特的引物结合位点位于 DNA 寡聚物的 5' 端。根据该方法,寡核苷酸形成相对较长的 RNA-DNA 杂合双链(通常长度为 20-40 个碱基),然后是较短的 DNA-DNA 杂合链(约为 7-15 个碱基)(图 7)。

[0438] 分析物复合物形成、RNA 消化、解链和再退火之后,可用聚合酶从暴露的 3' DNA 末端仅以一个方向延伸该实施方式中的结合对(图 7)。如上所述,消除了 3' 重叠造成的空间和扭转限制。结合对的酶消化产生短的、DNA-DNA 双链,其相对不稳定并因此使本体溶液中游离结合成员之间结合对的再形成最小化。

[0439] 应理解,根据本文的教导,将本发明的教导应用于具体问题或具体情况在本领域一般技术人员的能力范围之内。参考以下的非限制性实施例进一步阐释本发明。提供以下实施例,包括试验和所得结果,仅仅出于阐释的目的,不用于限制本发明。

[0440] 实施例

[0441] 实施例 1 :5' 氨基 DNA 模板的活化

[0442] 合成两条 60 个碱基的单链 DNA 序列 [SEQ ID NOS. 1 和 3],所述 DNA 序列含有通过 12- 碳间隔臂 (Glen Research, Sterling, VA) 连接于其 5' 端的单个伯胺基团。这些序列以 3' 末端最后的 15 个碱基互补。对两条链做相同的处理。将 5' 氨基 -DNA (350 μ g) 溶解在 25 μ l 0.05M 磷酸钠缓冲液, pH 7.0 中。以 10mg/ml 的浓度将二琥珀酰亚氨基辛二酸酯 (disuccinimidyl suberate) 溶解在无水 DMSO 中,立即将 50 μ l 等份加入 DNA 溶液中,温和吸打混合。室温 1 分钟后,将反应混合物注入 PharmaciaFPLC 系统中的 0.5x 20cm G-25(精细)柱上。柱在 5mM 柠檬酸中平衡,用 0.1M 氢氧化钠调至 pH5.4,室温以 0.5 毫升/分钟运行(develop)。将第一个洗脱峰的组分直接收集到埋在冰中的 Microcon[®] YM-10 离心超滤 (Millipore, Billerica, Mass.) 单元中。4 $^{\circ}$ C, 5000xg, 30 分钟,将辛二酸酯活化的模板 DNA 浓缩至 200-300 μ l。迅速地用 260nm 吸光度评估 DNA 浓度。将含有 1.0A₂₆₀ 单位的等份(约 30 μ l)加到含有 5 μ l 10% 甘露醇的微离心管中,立即在干冰/丙酮浴中冷冻。冷冻的等份冻干至干燥,在干燥氩气中密封,储存于 -20 $^{\circ}$ C。

[0443] 将冻干、活化的 DNA 偶联于含胺的小分子,以评估其活性。将溶于 0.1M 磷酸钠, pH 8.0 中的 50mg/ml 谷胱甘肽与化学计算量的 N- 乙基马来酰亚胺 (NEM) 反应。用氢氧化钠将 pH 重新调至 8.0。将一 A₂₆₀ 单位的辛二酸酯活化的 DNA 溶解于 NEM 处理的 10 μ l 谷胱甘肽中,然后用水稀释 25 倍至 4.0A₂₆₀ 单位/毫升。与 5' 氨基 DNA 相比,在 15% 聚丙烯酰胺 TBE- 尿素凝胶上电泳时,与烷基化的谷胱甘肽偶联导致条带的迁移较慢。在上述条件下纯化和冻干的辛二酸酯-活化的 DNA 与 NEM 处理的谷胱甘肽的偶联通常接近 100%,说明完全的辛二酸酯活化和胺反应性的保持。

[0444] 实施例 2 :夹心配对的抗 -PSA MAb 偶联到辛二酸酯活化的 DNA

[0445] 以前已报道过夹心配对的抗 -PSA 单克隆抗体 (cMAb 和 rMAb) 的标记。见美国专利申请序列号 10/701,347。在某些实验中,采用美国专利申请序列号 10/701,347 (其内容全文纳入本文作为参考)所述的方法,用包含 SEQ ID NO. :1 的单链 DNA 寡核苷酸标记 cMAb,将 rMAb 偶联到 SEQ ID NO. :2 或 SEQ ID NO. :3。

[0446] 对于本发明实验而言,从BiosPacific, Inc. (Emeryville, CA) 获得针对PSA上不同表位的夹心配对MAb,并将它们各自偶联于一条活化的重叠DNA序列。在室温下,在微离心管中10,000xg两次通过Microcon® 50离心超滤单元(Millipore, Billerica, Mass.),将100微升MAb(1mg/ml)用缓冲液交换,并浓缩到0.1M磷酸钠、0.15M氯化钠,pH 8.25中。通过离心将25-50 μ l的终体积收集到微离心管中,将其加入活化的DNA的冻干团块(如上述实施例1中制备)中。使偶联反应在室温下进行几个小时。

[0447] 用SDS和/或非变性蛋白质凝胶电泳评估抗体被DNA标记的程度。一条或多条DNA链掺入抗体结构增加了分子质量和负电性。在4%聚丙烯酰胺-SDS凝胶上电泳时,用DNA标记的抗体显示出清晰的、迁移较慢的条带,电泳迁移率与DNA掺入程度相对应。在4-12%非变性蛋白质凝胶电泳中,同样的偶联分子比相应的未衍生抗体迁移地快。在非变性凝胶上,对于较高数量级的偶联物的分离更加明显但确定性较差(less defined)。

[0448] 根据各抗体结构中赖氨酸胺基的相对反应性和其暴露程度,DNA偶联的程度在50-100%之间。发现偶联物的平均标记密度为2.5。在一些实验中,将含有抗体-DNA偶联物的反应混合物加入活化DNA的第二个冻干团块中以增加抗体被DNA标记的程度。

[0449] 用FPLC凝胶过滤层析从偶联物中去除未反应的DNA,该层析采用TBS平衡的Sephacryl™ S-200柱(Amersham Biosciences),流速为0.4毫升/分钟。第一个洗脱峰由偶联和未偶联的MAb组成。用FPLC阴离子交换层析获得纯净的偶联物,该层析采用20mM Tris缓冲液,pH7.4平衡的Mono Q™柱(Amersham Biosciences),流速为0.5毫升/分钟,用NaCl盐梯度(0.0-1.0M)洗脱。MAb-DNA偶联物在60-70%的盐(梯度)时洗脱。

[0450] 离心超滤分别浓缩MAb-DNA偶联物,并用BCA Protein Assay(Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL)检测蛋白质。将等量的两种偶联物混合以形成结合对,结合对杂交形成单一的分子。加入终浓度0.1%的叠氮化钠,将结合对试剂4° C储存。

[0451] 实施例3:前列腺特异性抗原的均相检测

[0452] 实施例2的结合对稀释到20pM,与含有0-1ng/ml PSA的等体积抗原系列稀释物混合。37° C孵育抗原-结合对混合物两小时。孵育形成包含一种抗原分子和一种结合对分子的结合复合物,结合对各成员的抗体区域结合于PSA抗原上不同的表位。避免存在任何盐以减少反应溶液中重叠寡核苷酸标记的杂交。孵育后,取出等份的孵育混合物,在10mM Tris, 0.1%BSA, pH8.0中1:100稀释,以将偶联物浓度降至1pM以下,45° C加热3分钟。加热步骤通过使溶液中游离的、未复合的结合成员以及抗原-复合的结合对中的结合成员的重叠双链区解离,从而有效地使结合对成员彼此分离。加入含400 μ M各引物(SEQ ID NOS.:4和5)的等体积2X PCR混合物(20mM tris-HCl, pH8.3;100mM KCl;7mM MgCl₂;400 μ M各dNTP;50U/ml AmpliTaq® (Applied Biosystems, Foster City, CA)。将温度降至23° C使与分析物-结合对复合物结合的DNA链优先退火并启动第一链延伸,室温孵育反应混合物3分钟。在这些条件下,由于它们邻近的位置和它们的方向,复合的结合对成员的互补DNA区域迅速地重新退火、重新形成结合对试剂的重叠杂合体。因此,复合的结合对的DNA区域可被Taq聚合酶延伸,从而形成PCR模板。然而,因为浓度太低,在扩增反应之前或扩增过程中,未复合的、游离结合对成员的重新退火达不到显著的程度。将反应溶液(50 μ l)转移到微滴定板孔中,密封并进行实时PCR热循环。3分钟内将温度从50° C梯度升至85° C,然后95° C保持2分钟。然后95° C,15秒;62° C,1分钟;进行45个循环。典型实验的结果

示于图 8。如该图所示,相对于背景(即相比较于不含 PSA 的对照样品),检测到含有 100fg/mlPSA 的样品。

[0453] 实施例 4:大肠杆菌 0157 的均相检测

[0454] 大肠杆菌细胞获自 ATCC(Manassas, VA),培养在液体培养基中。以 37° C 过夜培养的琼脂培养基上出现的菌落数来确定细胞浓度。

[0455] 针对大肠杆菌 0157 的多克隆抗体获自 KPL, Inc. (Gaithersburg, Maryland),根据实施例 1 和 2 所述的方法,将其与具有互补重叠序列的核酸标记物寡聚体偶联。各自用两条重叠寡核苷酸之一标记同一多克隆制剂的等份,纯化并以化学计算量组合以产生结合对试剂。

[0456] 将细菌细胞悬浮在中性缓冲液(10mM Tris,pH7.5)以停止其活跃生长,室温用等体积的 20-200pM 结合对试剂处理 2 小时。结合对中一种抗体成员与细胞表面蛋白的结合能够增强第二种成员的结合,形成分子桥连接细胞中两个邻近位点。然后将细胞悬浮液用 10mM Tris,pH7.51:100 稀释,加热到 45° -50° C 使过量的结合对试剂解离成独立的结合对成员。加入含有 400 μ M 引物的等体积 2X PCR 混合物,室温孵育该混合物 3 分钟。将反应混合物(50 μ l)转移到微滴定板孔中,密封,在实施例 3 所述条件下进行实时 PCR。在 PCR 之前,取样涂布到固体培养基上测定细菌细胞数目。45 个扩增循环之后,用该方法检测到的下限为 10-50 个完整细胞。

[0457] 实施例 5:用偶联的 DNA 标记物的 3' -3' 和 3' -5' 重叠进行 PSA 肌钙蛋白 T 的均相检测

[0458] 采用包含结合对成员的结合对试剂可增强检测的灵敏性,所述结合对成员由以下两条 DNA 链组成:实施例 1 所述的 5' 端偶联于夹心对中的一个 MAb 的重叠对的一条 DNA 链,和 3' 端偶联于另一个 MAb 的第二 DNA 链。5' 偶联物的 3' 端与 3' 偶联物的内部序列杂交,产生结合对,其中游离 3' 端的延伸背离形成的复合物的中心,朝向游离的转动末端。通过提供更大的聚合酶空间可获得性并消除起始聚合过程中产生的扭转应力,与以前描述的 3' -3' 重叠结合对相比,该方向可提高链延伸效率。

[0459] 如实施例 1 和 2 所述,用获自 Roche Diagnostics,Indianapolis, IN 的单克隆抗体夹心对形成该实施例中的结合成员,并纯化。5' DNA 标记物[SEQ ID NOS.6 和 7]由 60 个碱基组成,其 3' 末端有 9 个碱基互补。此外,SEQ ID NO.6 与 75 个碱基的 3' DNA 标记物[SEQ ID NO 8]内部的 9 个碱基序列互补。也可合成 3' DNA 标记物使其 3' 端含有一个或多个间隔亚磷酰胺(Spacer Phosphoramidites(Glenn Research)),从而弥补因内部杂交而丢失的结合对长度。将 SEQ ID NO.6 任意地与称为 MAK<TNT>M-7 的单克隆抗体偶联。SEQ ID NO.7 和 8 与单克隆抗体 MAK<TN-T>M-11-7 偶联。偶联化学和纯化方法不变。

[0460] 如实施例 3 所述,将含有稳定的内部重叠杂合区段的结合对稀释,与肌钙蛋白 -T 反应,在下游引物(SEQ ID NO.9 和 10)存在下扩增。游离和复合的结合对与相同序列的 3' -3' 重叠结合对具有类似的解链和再结合特性。在夹心复合物本身(bulk)可能阻碍 Taq 聚合酶行进的情况下,3' -5' 重叠序列起始聚合时向外(延伸)的方向提高了产生模板序列的效率。扩增更大量的起始模板分子将在实时 PCR 中产生更快的信号阈值和更大的检测灵敏性。用 3' -3' 重叠结合对试剂进行的肌钙蛋白 -T 均相检测显示出与 PSA(实施例 3)类似的检测灵敏性。用 3' -5' 重叠方向进行的肌钙蛋白 -T 均相检测使灵敏性提高 2-4 倍。

[0461] 实施例 6. 用 3'-3' 和 3'-5' 生物素 - 标记的重叠 DNA 进行链霉生物素蛋白的均相检测

[0462] 对链霉生物素蛋白的检测显示了均相免疫-PCR 形式中可获得极高灵敏度的一个例子。链霉抗生物素蛋白在该模型系统中作为“抗原”，其分子直径约为 60 埃。用硫代琥珀酰亚胺基 2- (生物素化氨基) 乙基 -1,3' 二硫代丙酸盐 (sulfosuccinimidyl 2-(biotinamido)ethyl-1,3' dithio propionate) (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) 标记 SEQ ID NO. 6、7 和 8 的末端氨基官能团, 用 FPLC 凝胶过滤层析纯化。完全伸展时, 各 DNA 标记物的长度超过 200 埃, 保证能够跨越实现重叠杂交所需的距离。

[0463] 将链霉抗生物素蛋白 (Prozyme, San Leandro, CA) 溶解于含有 0.05% 吐温 -20 和 0.05% 叠氮化钠, pH8.0 的 10mM Tris 中, 使其与终浓度为 10-100pM 的、生物素标记的 3'-3' 和 3'-5' 重叠 DNA 形成复合物。加入 2X PCR 混合物孵育 15 分钟, 加热到 37° C, 在下游引物 (SEQ ID NOS. 9 和 10) 存在下进行实时 PCR 循环, 以检测复合物。在 3'-5' 重叠构型中检测时, 输入约 500 个分子 (50 渺克) 可检测到链霉抗生物素蛋白, 在 3'-3' 方向检测时, 为 2000 个分子。

[0464] SEQ ID NO. 6

[0465] 5' (C6)NH₂ATATACCCCC GCTGCCATGA TATCACTCTG TATAAATTTG TATGCTATTC ACGATTGGGA 3'

[0466] SEQ ID NO. 7

[0467] 5' (C6)NH₂ACTCTTCGCA ACAGATCCAC ACGTACACAT CCAAACCTAGC TTCCACCACC ATCCCAATCG 3'

[0468] SEQ ID NO. 8

[0469] 5' ACTCTTCGCA ACAGATCCAC ACGTACGTCC CAATCGAAAG TAAACAGTTT AAACATATGT AGCGCGTCTC CTCAT NH₂(C6)3'

[0470] SEQ ID NO. 9

[0471] 5' ATATACCCCC GCTGCCATGA TATC 3'

[0472] SEQ ID NO. 10

[0473] 5' ACTCTTCGCA ACAGATCCAC ACGT 3'

[0474] 实施例 7: 用重叠 DNA 标记物的 3'-5' 构型进行 PSA 的均相检测

[0475] 可如实施例 1 和 2 所述形成和纯化该方法中所用的结合成员, 除了一条核酸链通过其 3' 端偶联之外。5' DNA 标记物是 60 个碱基的寡核苷酸, 其 3' 末端与 3' DNA 标记物内部序列的 15 个碱基互补。合成 3' DNA 标记物使其 3' 端含有间隔亚磷酰胺 (Glenn Research, Sterling, VA) 以弥补内部杂交造成的结合对长度损失。如上所述进行偶联化学和纯化。

[0476] 如实施例 3 所述, 将含有稳定的内部重叠杂合区段的结合对稀释, 与 PSA 反应并扩增。游离和复合的结合对与 3'-3' 重叠结合对具有类似的解链和再结合特性, 这是由 DNA 碱基配对的热力学特性所决定的。起始聚合时向外 (延伸) 的方向提高了产生模板序列的效率。扩增更大量的起始模板分子将在实时 PCR 中产生更快的信号阈值和更大的检测灵敏性。

[0477] 实施例 8:采用酶消化进行 PSA 的均相检测

[0478] 采用包含偶联于单链核酸的抗体的结合成员可提高蛋白质抗原和微生物均相检测的灵敏性,所述单链核酸的 5' 端具有脱氧核糖碱基,3' 端具有核糖碱基。用标准的亚磷酰胺化学方法合成含有 5' 氨基官能团的、由脱氧核糖和核糖核苷酸单体组成的核酸链。或者,可通过酶学方法用 RNA 聚合酶补入短的 3' DNA/DNA 重叠。由 DNA 和 RNA 组成的重叠核酸标记物的最初 26 个碱基由 RNA 亚磷酰胺开始合成。剩余的 59 个碱基用 DNA 亚磷酰胺合成,终止于 (C₁₂) 氨基官能团。5' 端的最初 25 个碱基代表独特的引物序列。接下来的 26 个 DNA 碱基与重叠链的 26 个 RNA 碱基互补。

[0479] 接下来的 9 个 DNA 碱基与重叠链中接下来的 9 个 DNA 碱基互补,因此 DNA/RNA 标记物在 3' 端的整个 RNA 序列互补,在 DNA 序列的约 9 个碱基互补。结合对由两个结合成员组成,它们通过相对较长的 DNA/RNA 双链和相对较短的 DNA/DNA 双链连接。当如实施例 2 和 3 所述与针对 PSA 的夹心 MAb 偶联并以化学计算量混合时,产生的结合对含有 110 个碱基的核苷酸桥,其中内部的 60 个碱基是配对的。

[0480] 采用实施例 3 所用的试剂检测 PSA。通过结合对中两个抗体成员识别两种 PSA 表位,从而结合对与分析物形成复合物。抗原-结合对复合物的核酸双链区,尤其是 DNA/RNA 杂合双链区,在升高的温度下是稳定的,这保证了形成的结合对复合物含有锁定在特定方向和特定的彼此距离的结合成员。形成抗原-结合对复合物后,将反应混合物稀释 10 倍,用 RNA 酶 H(Promega Corp., Madison, WI) 室温处理 30 分钟以消化复合的结合对和过量结合对的 RNA 链,产生由剩余的 DNA/DNA 双链连接在一起的短的、相对不稳定的结合对。加热至 45° C 3 分钟,使产生的结合对热解离,然后冷却至室温。在免疫复合物中,剩余的短 DNA/DNA 重叠链迅速地(如果仅仅是瞬时)重新结合。降低温度时,只有复合物中固定在位的结合对快速地重新结合。因为浓度低,并且短 DNA/DNA 重叠的稳定性有限,解离的结合成员不能重新形成结合对。结合对中包含具有缩短的 3' 重叠的 DNA 标记物减少了对复合物形成反应中稀释步骤的需要,因此与上述实施例 3 中的试验相比提高了检测灵敏度。如上所述,加入 PCR 混合物和引物,进行实时 PCR 扩增。

[0481] 实施例 9:采用酶消化和 3' -5' 构型进行 PSA 的均相检测

[0482] 通过组合上述特征,设计了针对蛋白质抗原和微生物的均相检测,其灵敏性接近核酸检测。夹心对的第一 MAb 偶联于嵌合 DNA/RNA 寡核苷酸的 5' 端。应理解,多克隆抗体的第一部分可代替 Mab 使用。DNA/RNA 寡聚物的 RNA 部分在 3' 端含有 30 个碱基。独特的(unique)引物位点位于 DNA/RNA 寡聚物的 5' DNA 末端。第二 MAb (可用多克隆抗体的第二部分代替)偶联于 64 个单体的 DNA 寡核苷酸的 3' 端,合成该 DNA 寡核苷酸使其具有几个 3' 亚磷酰胺间隔分子以增加总长度。64 个单体的寡核苷酸 5' 端的 25 个碱基代表独特的引物位点。接下来的 30 个碱基与 DNA/RNA 寡聚物的 30 个 RNA 碱基互补。最后的 9 个碱基与和 RNA 区段相邻的 DNA 区段互补(图 7)。

[0483] 将两个结合成员组合产生结合对,其中内部 9 个碱基对的 DNA/DNA 杂合体与 30 个碱基对的 DNA/DNA 相邻,如图 7 所示。形成免疫复合物、RNA 消化、解链和再退火之后,可用聚合酶从暴露的 3' DNA 末端开始仅沿一个方向延伸该结合对(见图 7)。如实施例 5 所述,消除了 3' 重叠造成的空间限制和扭转应力。结合对的酶消化产生短的、9 个碱基对的重叠,其稳定性相对较弱,因此使本体溶液中结合对的再形成最小化。如上所述进行 PCR 扩增。

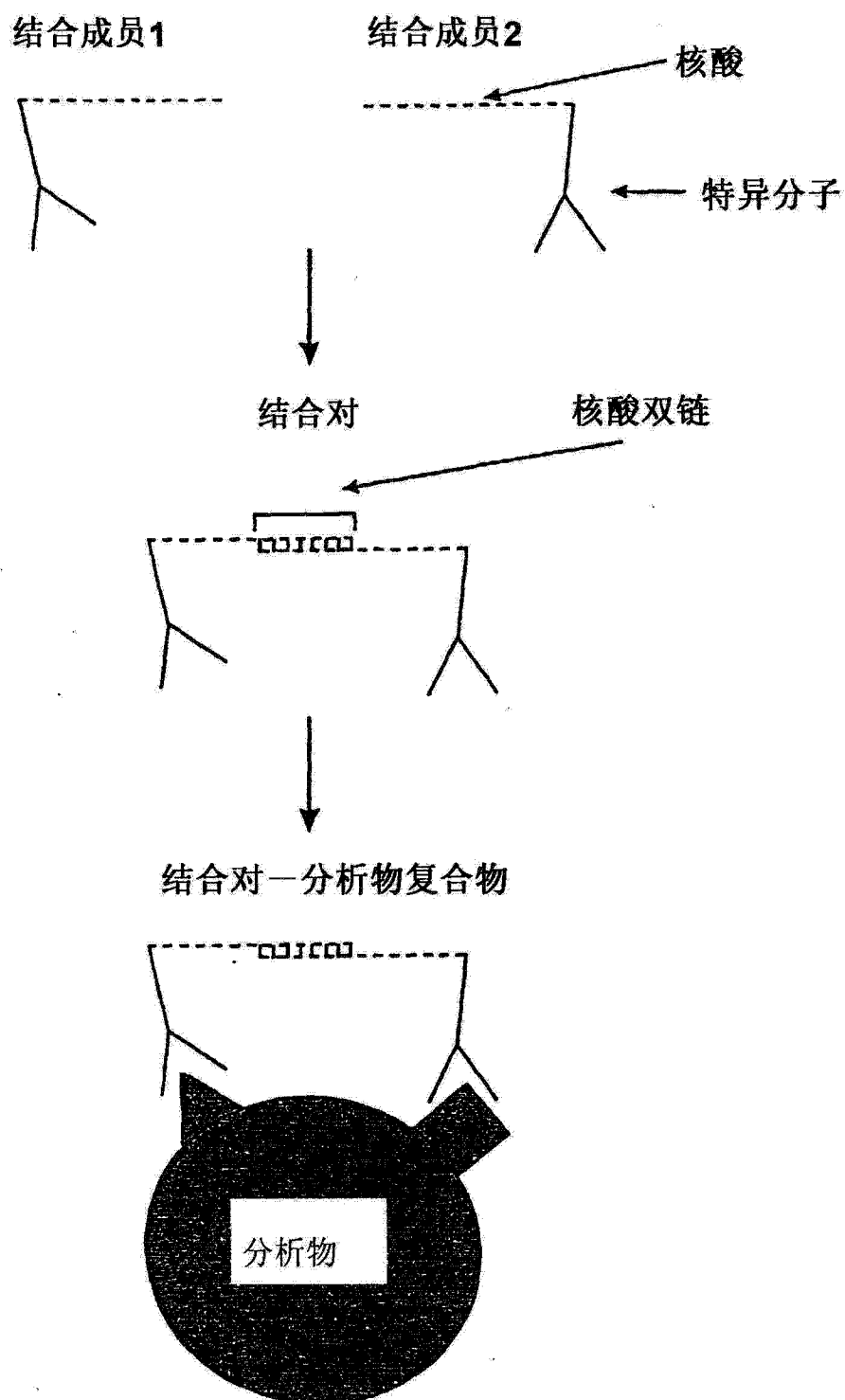


图 1

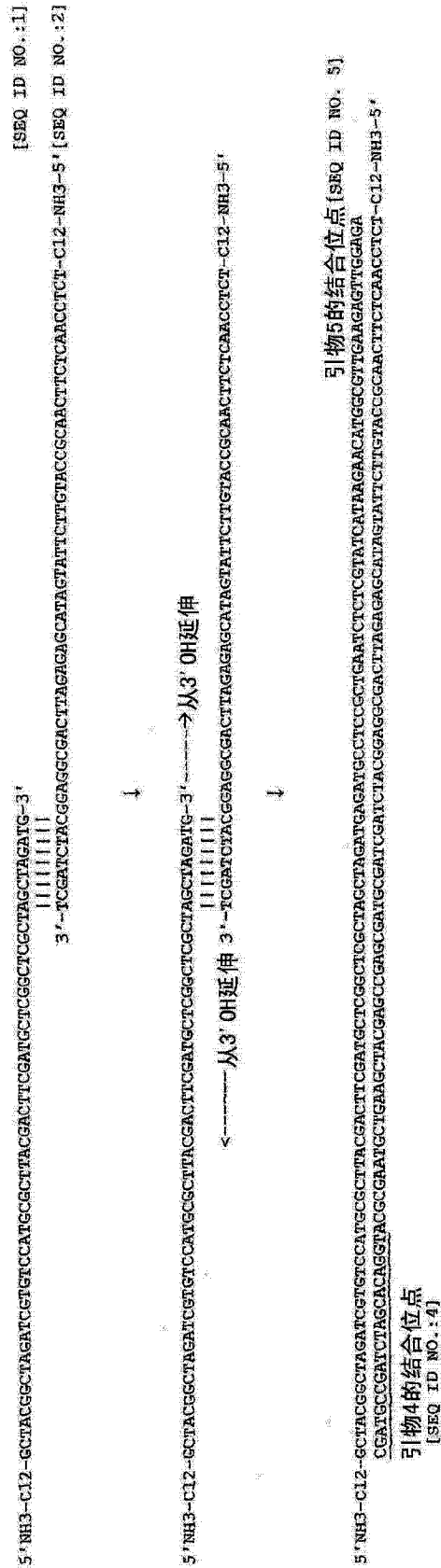


图 2

43

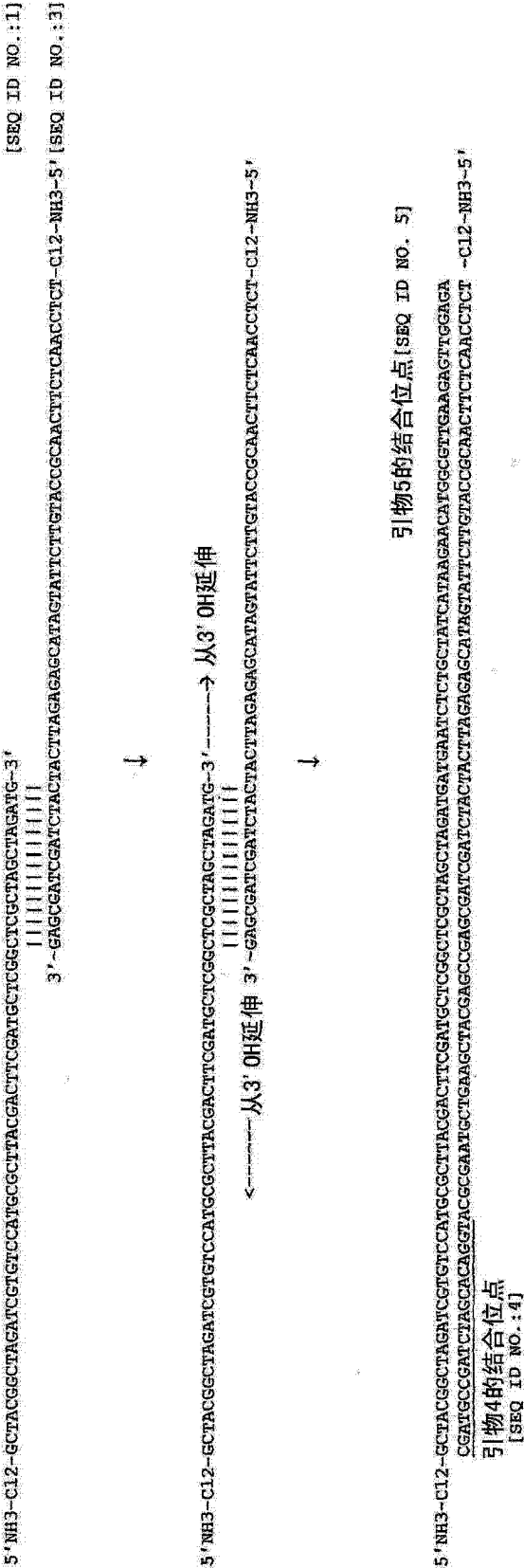


图 3

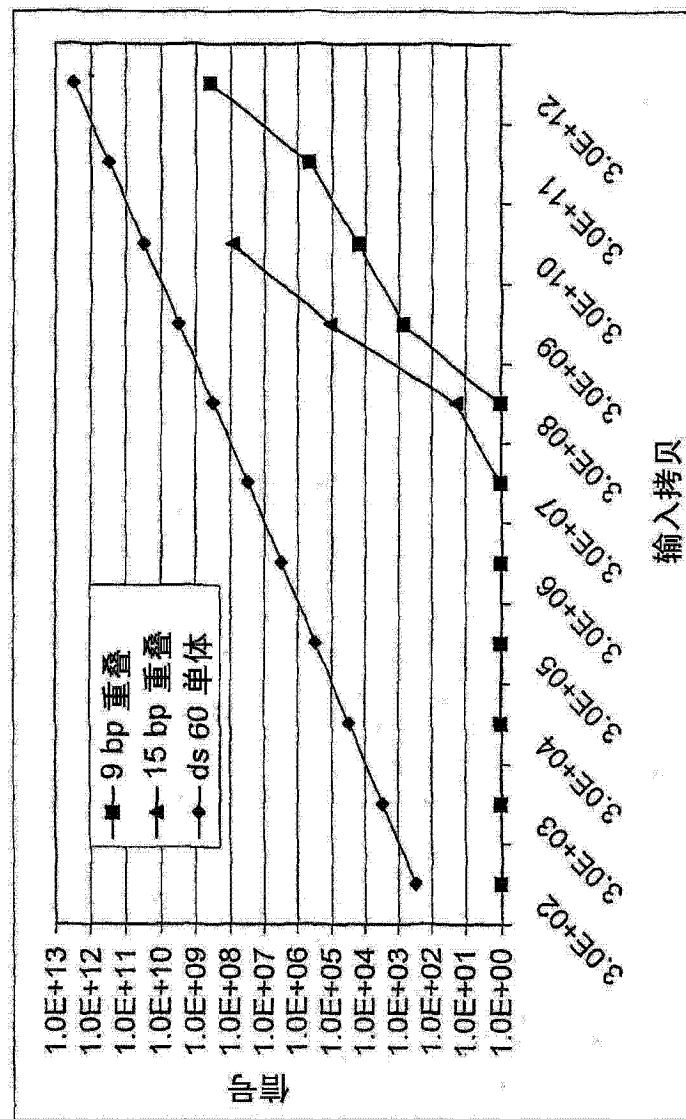


图 4

9和15碱基重叠DNA链的实时PCR

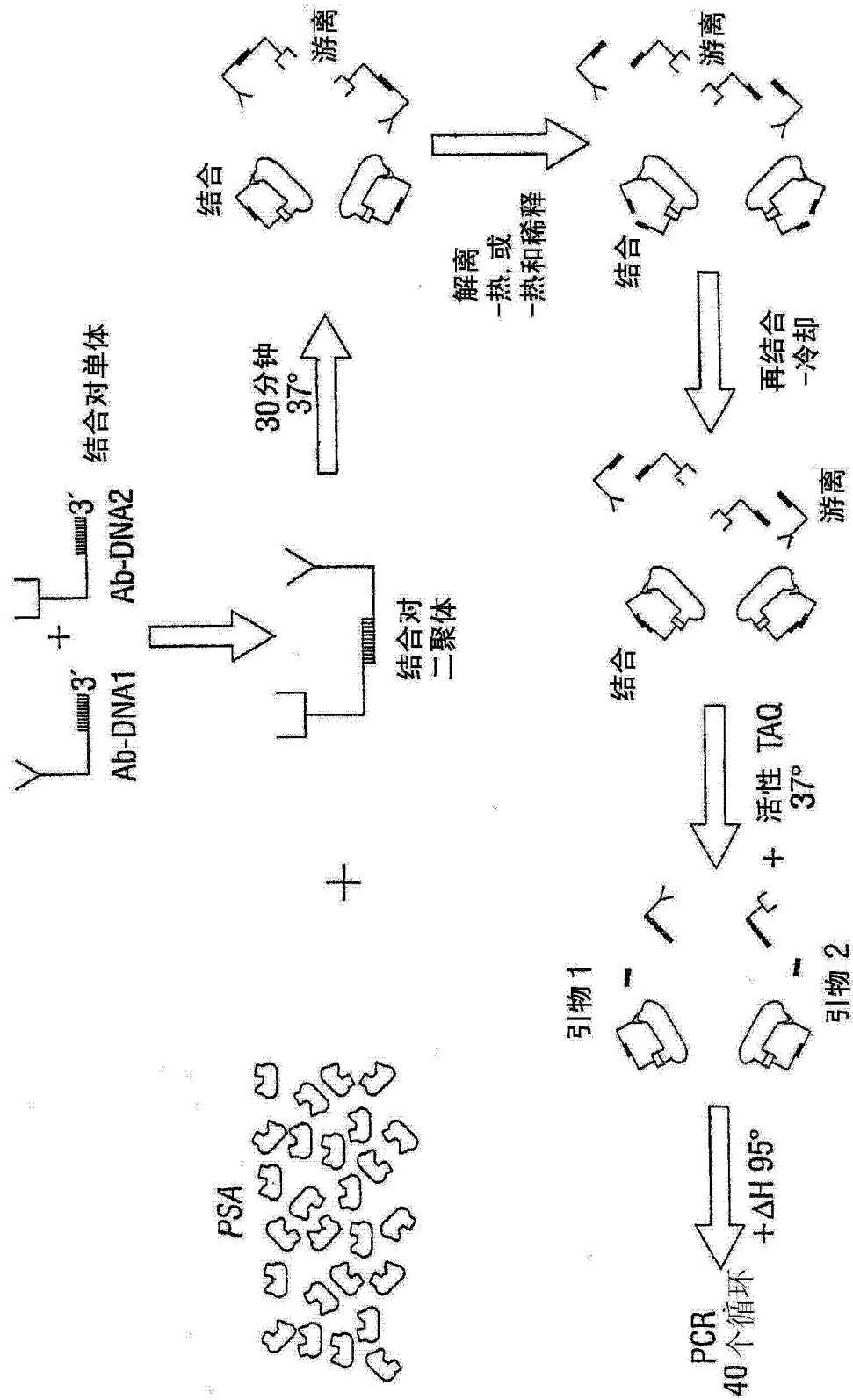


图 5

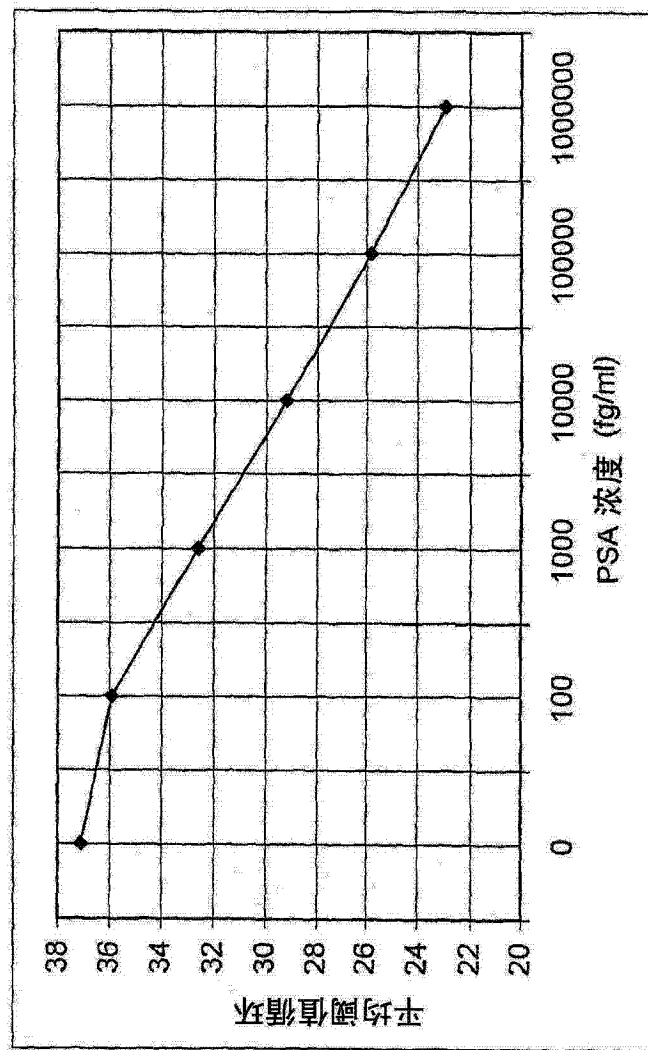


图 8