(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103026230 B
(45)授权公告日 2015.01.14

(21)申请号 201180036074.5
(22)申请日 2011.07.22
(30)优先权数据
61/367,281 2010.07.23 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.01.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/045053 2011.07.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/012748 EN 2012.01.26
(73)专利权人 卢米耐克斯公司
地址 美国得克萨斯州
(72)发明人 哈罗德·贝克 米夏埃拉·奥夫梅耶 谢里·邓巴
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 彭鲲鹏 卢蓓
(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)

(56)对比文件
US 4812414 A,1989.03.14,
US 2001/0026920 A1,2001.10.04,
WO 2008/036802 A2,2008.03.27,
CN 1636136 A,2005.07.06,
CN 1820201 A,2006.08.16,
CN 101133328 A,2008.02.27,
WO 2010/054385 A2,2010.05.14,
WO 96/10992 A1,1996.04.18,
CN 101545912 A,2009.09.30,

审查员 段晓露

权利要求书1页 说明书12页

(54)发明名称

共偶联以控制免疫测定中试剂的反应性

(57)摘要

本发明提供用于控制免疫测定反应性的方法和组合物。在一个实施方案中,提供一种用于制备免疫测定用基质的方法,其中将含有试剂和中性材料的组合物在适于将所述试剂和所述中性材料偶联至基质的条件下施加至所述基质。

CN 103026230 B

1. 一种控制多重免疫测定中试剂之反应性的方法，其包括：

(a) 鉴定在多重免疫测定中具有高反应性的试剂，所述试剂产生高于所述多重免疫测定之最大可用信号的测定信号；

(b) 将所述高反应性试剂与中性材料合并在组合物中；

(c) 将所述组合物在适于将所述高反应性试剂和所述中性材料偶联至基质的条件下施加至所述基质；和

(d) 确认与所述中性材料共偶联至所述基质的所述高反应性试剂之测定信号在所述多重免疫测定的可用信号范围内。

2. 权利要求 1 的方法，其包括控制所述多重免疫测定中具有高反应性的两种或更多种试剂的反应性。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述测定信号是化学发光信号或荧光信号。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述高反应性试剂是抗体或抗原。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述中性材料是血清白蛋白或非相关物种抗体。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述基质是颗粒或者孔表面。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述颗粒是微球。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述组合物中高反应性试剂与中性材料的比是 1 ： 120 至 6 ： 1。

9. 权利要求 1 的方法，其中将所述高反应性试剂和所述中性材料共价偶联至所述基质。

共偶联以控制免疫测定中试剂的反应性

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2010年7月23日提交的美国临时申请序列号No.61/367,281的优先权，其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] A. 技术领域

[0005] 本发明一般性地涉及分子生物学领域。更具体地，其涉及与免疫测定有关的方法和组合物。在一些特定的实施方案中，本发明涉及共偶联试剂以控制免疫测定中的反应性。

[0006] B. 背景技术

[0007] 期望的是，在免疫测定中产生的信号（例如，荧光、化学发光、放射性）的量落在检测装置的可用范围内和/或产生免疫测定的可接受剂量响应曲线。在分析一种分析物的单重(singleplex)测定中，通常通过调节测定中分析物的量来调节产生的信号的量。然而，在多重(multiplex)测定中，因为为了将一种分析物的可检测信号升高至高于最小可用水平而增加其量可能导致另一种分析物的可检测信号升高至高于最大可用水平，所以可能无法适当地调节所有分析物的量。同样，为了将分析物的可检测水平降低至低于最大可用水平或实现可接受的剂量响应曲线而降低分析物的量可能导致另一种分析物的可检测信号降低至低于最小可用水平。

[0008] 在多重测定中控制免疫测定反应性的方法一般集中在控制用于测定之后续步骤的试剂上。这一般是已连接有生物素基团或另一种功能性基团的“检测”抗体。所述功能性基团可以是酶，例如常用于ELISA和其他单重测定的辣根过氧化物(Horse Radish Peroxide)或碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase)。生物素或R-藻红蛋白是其他常用的功能性基团的实例。然而，控制用于测定之后续步骤的试剂在分析物浓度很高时具有提供不可靠信息的风险。在同一生物样品中的不同分析物的浓度可相差多于1,000倍。例如，TSH一般是pg/ml，而LH和FSH是ng/ml。如另一个实例，当对23三体(Trisomy23)、唐氏综合征(Down's Syndrome)进行测试时，测量hCG、E3和AFP。hCG以mg/mL计，E3以ng/mL计以及AFP以pg/mL计。这在浓度上是8个log的差异并且构成多重挑战。在一些情况下，对于不同样品之间的同一分析物可以有多于1,000倍的差异（例如，hCG一般是ng/ml，但是在怀孕期间增加至mg/ml）。因此，在最高浓度的分析物存在下和在包含显著不同浓度之分析物的样品中，需要可提供受控的反应性和平衡的测量值的方法和组合物。

发明内容

[0009] 在一个实施方案中，本发明提供了制备用于免疫测定之基质的方法，其包括：(a)获得包含试剂和中性材料的组合物；和(b)将所述组合物在适于将所述试剂和所述中性材料偶联或包被至基质的条件下施加至所述基质。在另一个实施方案中，本发明提供偶联或包被有试剂和中性材料的基质。在本发明的某些方面中，将所述试剂和所述中性材料共价偶联至所述基质。在又一个实施方案中，本发明提供包含基质、试剂和中性材料的试剂盒。所述基质、试剂和中性材料可分开包装在所述试剂盒中，或所述试剂和中性材料可在组合

物中一起提供，或者所述试剂和中性材料可以偶联或包被在所述基底上提供。

[0010] 在一个实施方案中，本发明提供了在多重免疫测定中控制试剂之反应性的方法，其包括：(a) 将高反应性试剂与中性材料合并在组合物中；和 (b) 将所述组合物在适于将所述高反应性试剂和所述中性材料偶联至基质的条件下施加于所述基质。在某些实施方案中，所述方法还包括确认与所述中性材料共偶联至所述基质的高反应性试剂之测定信号在所述多重免疫测定的可用信号范围内。

[0011] 在另一个实施方案中，本发明提供了控制多重免疫测定中试剂之反应性的方法，其包括：(a) 鉴定多重免疫测定中具有高反应性的试剂，所述试剂产生高于所述多重免疫测定之最大可用信号的测定信号；(b) 将所述高反应性试剂与中性材料合并在组合物中；(c) 将所述组合物在适于将所述高反应性试剂和所述中性材料偶联至基质的条件下施加至所述基质；以及 (d) 确认与所述中性材料共偶联至所述基质的高反应性试剂之测定信号在所述多重免疫测定的可用信号范围内。

[0012] 在本发明的某些方面中，所述方法包括控制在所述多重免疫测定中具有高反应性的两种或更多种试剂的反应性。在一些实施方案中，所述多重测定包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100、200、500、1000、2000 种或更多种试剂，其中这些试剂的一个子集在所述多重免疫测定中具有高反应性。在一些实施方案中，所述多重测定包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000 种（或其中可衍生的任何范围）试剂，其中这些试剂的一个子集在所述多重免疫测定中具有高反应性。在本发明的某些方面中，所述方法包括控制在所述多种免疫测定中具有高反应性的 3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100 种或更多种试剂的反应性。在一些方面中，所述方法包括控制在多重免疫测定中具有高反应性的 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000 种（或其中可衍生的任何范围）试剂的反应性。在本领域中已知多种检测技术并且其可用于产生所述测定信号。在一些实施方案中，所述测定信号是化学发光信号或荧光信号。在另一些实施方案中，所述信号是色度信号或放射性信号。可用的范围指对于误差在指定的限度内使得结果或信号可靠的值的集合。

[0013] 本文中使用的词组“多重”或语法上等同的表述指平行检测、分析或扩增每个样品中的多于一种感兴趣的目标分析物。分析多种不同的分析物（多重）可同时进行。检测在多种平台上进行，所述平台包括但不限于孔板 (well plate) 和珠阵列 (bead array)。

[0014] 所述基质可以是任何可用于免疫检测方法的基质。此类基质的非限制性实例包括聚苯乙烯微量滴定板中的孔或者微球。所述基质可例如由以下物质制得：硝酸纤维素、尼龙膜、玻璃、活化石英、活化玻璃、二氧化硅、聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜、聚苯乙烯基质、聚丙烯酰胺基基质、其他聚合物、共聚物或交联聚合物（例如聚（氯乙烯）、聚（甲基丙烯酸甲酯）、聚（二甲基硅氧烷）、光聚合物（其包含能够与目标分子形成共价连接的光反应性物质例如氮烯、碳烯和羰自由基））。在平面固体支持物上固定的分子通常通过它们在所述载体上的空间位置来鉴定。在非平面固体载体（例如微球（“珠 (bead)”））上固定的分子常常由所述载体的一些编码形式所鉴定，如下述。

[0015] 可对珠进行编码，使得珠的一个亚群可与另一亚群区分开。可通过多种技术进行编码。例如，所述珠可用具有不同发射光谱和 / 或不同信号强度的荧光染料进行荧光标记。在某些实施方案中，所述珠是 Luminex **MagPlex®**微球、Luminex **xTAG®**微球、

Luminex SeroMap™微球或Luminex **MicroPlex®**微球。另一些编码技术使用全息编码(holographiccoded)或条形码编码(barcoded)珠。亚群体中珠的尺寸也可用于将一个亚群体与另一个区分开。修饰珠的另一种方法是将磁性响应物质(例如Fe_3O_4)并入结构中。顺磁性和超顺磁性微球在无磁场时磁性可忽略,但是施加磁场诱导微球中磁畴的排列,从而导致微球被吸引至磁源。将荧光染料、珠尺寸和/或磁性响应物质合并到珠中可进一步增加可创建的珠之不同亚群体的数目。

[0016] 试剂指用于测试其他物质或与其他物质反应的物质。与试剂反应的物质可被称为分析物。分析物可以是待检测和/或定量的任何物质。分析物可存在于样品中,例如体液(包括但不限于全血、血清、唾液、尿液、精液)或环境样品(包括但不限于水或土壤)。在一些特定的实施方案中,所述分析物是抗原或抗体。所述分析物例如可以是,蛋白质、脂质、碳水化合物或核酸。在一些实施方案中,所述试剂是抗原、抗体、适配体或寡核苷酸。在本发明的一些方面中,所述试剂是连接有之后可在免疫测定中用于测量小分子的小分子靶标的蛋白质。例如,类固醇、小分子激素或其他小分子可连接至BSA并偶联至所述基质。这些的实例有孕酮分子、雌激素分子和甲状腺激素分子。这些蛋白质(最常是偶联有小分子的BSA)自身可偶联至微球或可与中性材料共偶联(如在没有偶联许多这些分子的BSA中)。

[0017] 本文中使用的术语“抗体”旨在广义地表示任何免疫结合剂(例如IgY、IgG、IgM、IgA、IgD和IgE及其抗原结合片段)。在一些实施方案中,所述抗体可以是,例如针对b型流感嗜血杆菌(Haemophilus influenza)(Hib)多糖和破伤风梭菌(Clostridium tetani)(Tet)和白喉杆菌(Corynebacterium diphtheriae)(Dip)类毒素、肺炎链球菌(Streptococcuspneumoniae)、脑膜炎球菌(Meningoccus)、脊髓灰质炎(Polio)、白喉(Diptheria)、破伤风(Tetanus)、HIV、HBV、HCV的抗体。

[0018] 在一个实施方案中,所述试剂是开发用于识别鸡IgY的兔多克隆抗体。在某些方面中,兔抗鸡抗体具有偶联至其的生物素以使得所述抗体能够与偶联至检测试剂(R-藻红蛋白)的链霉亲和素分子反应。在一些方面中,所述兔多克隆抗体偶联至微球。

[0019] 在另一个实施方案中,所述试剂是开发用于识别促甲状腺激素(TSH)的小鼠单克隆抗体。

[0020] 在一些实施方案中,所述试剂或分析物可以是蛋白质。在一些实施方案中,所述蛋白质例如可以是,IgY、胰岛素、TSH、破伤风毒素或类毒素、白喉毒素或类毒素、垂体激素、胰蛋白酶或者胰蛋白酶原。在某些方面中,所述IgY针对已经感染或怀疑已经感染动物的致病有机体(例如,病毒或细菌)是反应性的。被感染的动物可以是,例如脊椎动物(包括哺乳动物、啮齿动物和鸟类)。所述动物可以是人。在本发明的多种实施方案中,所述分析物是针对感染、传染性物质(例如,病毒、细菌、真菌)或朊病毒的抗体。

[0021] 所述中性材料是下述材料,即其对于所述测定中的试剂和样品是抗原性中性。在一些特定的实施方案中,所述中性材料是非特异性蛋白质,例如血清白蛋白(例如,牛血清白蛋白(BSA))、酪蛋白或非相关物种抗体。由于所述试剂和所述中性材料在偶联或包被至基质之前合并,所以所述试剂和所述中性材料共偶联或共包被至同一基质或所述基质的同一区域。例如,当所述基质是珠时,试剂和中性材料的混合物偶联至同一珠。当所述基质是孔时,试剂和中性材料的混合物偶联或包被至同一孔表面。在初始偶联或包被所述试剂/中性材料混合物之后,可添加额外的中性材料以“包被”基质的任何剩余可用表面。包被使

得封闭固定表面上的非特异性吸附位点，因此降低由非特异性结合而引起的背景。

[0022] 样品可包含不同浓度的感兴趣的不同分析物。因此，在多重测定中对实现来自每种分析物的测定信号都在所述测定的可用信号范围内可能是一个挑战。例如，如果第一分析物的测定信号超出了测定的最大可用信号，那么通过稀释样品不可能校正该信号，这是因为会导致第二分析物的测定信号低于测定的最小可用信号。本文中公开的方法和组合物通过将试剂和中性材料共偶联而在测定的试剂方应对该挑战。在组合物中用于偶联的试剂与中性材料的比可根据实现期望的测定信号而进行调整。在某些实施方案中，所述组合物中的试剂和中性材料的比是约 1 ： 1,000、1 ： 500、1 ： 200、1 ： 100、1 ： 120、1 ： 100、1 ： 80、1 ： 60、1 ： 40、1 ： 20、1 ： 10、1 ： 5、1 ： 2、1 ： 1、2 ： 1、4 ： 1、6 ： 1、8 ： 1、10 ： 1 或 20 ： 1 或者其中任何可衍生的范围。例如，所述范围可以是 1 ： 120 至 6 ： 1、1 ： 120 至 1 ： 60 或 1 ： 60 至 6 ： 1。偶联至基质的试剂和中性材料的比可根据实现期望的测定信号所需而进行调整。在某些实施方案中，偶联至所述基质的试剂与中性材料的比是约 1 ： 1,000、1 ： 500、1 ： 200、1 ： 100、1 ： 120、1 ： 100、1 ： 80、1 ： 60、1 ： 40、1 ： 20、1 ： 10、1 ： 5、1 ： 2、1 ： 1、2 ： 1、4 ： 1、6 ： 1、8 ： 1、10 ： 1 或 20 ： 1 或者其中任何可衍生的范围。例如，所述范围可以是约 1 ： 120 至 6 ： 1、1 ： 120 至 1 ： 60 或 1 ： 60 至 6 ： 1。

[0023] 预期本文中描述的任何方法或组合物可针对本文中描述的任何其他方法或组合物进行实施。

[0024] 在权利要求书中使用的术语“或（或者）”用于表示“和 / 或”，除非明确地表示仅仅替代性选项或者替代性选项是相互排斥的，但是本公开支持表示仅仅替代性选项和“和 / 或”的定义。

[0025] 整个该申请，术语“约（大约）”用于表示包括用于确定值的设备或方法的误差的标准偏差的值。

[0026] 根据长期以来的专利法，当无数量词修饰的名词在权利要求书或说明书中与词语“包含（包括）”一起使用时，表示一个（种）或更多个（种），除非有特别说明。

[0027] 术语“包含（包括）”（及其任何语法形式）、“具有（有）”（及其任何语法形式）和“含有”（及其任何语法形式）是开放式连接性动词。因此，“包含（包括）”、“具有（有）”或“含有”一个（种）或更多个（种）所记载步骤或要素的方法、组合物、试剂盒或系统拥有那些所记载步骤或要素，但是不限于仅拥有的那些步骤或要素；其可拥有（即，涵盖）未记载的要素或步骤。同样，“包含（包括）”、“具有（有）”或“含有”一个（种）或更多个（种）所记载的特征的方法、组合物、试剂盒或系统拥有那些特征，但是不限于仅拥有那些特征；其可拥有未记载的特征。

[0028] 任何本发明方法、组合物、试剂盒和系统的任何实施方案可由描述的步骤和 / 或特征组成或者基本由其组成，而不仅是包含（包括）/ 具有（有）/ 含有描述的步骤和 / 或特征。因此，在任一项权利要求中，术语“由……组成”或“基本由……组成”可替代以上引用的任何开放式连接动词，以从另外使用开放式连接动词中改变给出权利要求的范围。

[0029] 本发明的其他目的、特征和优势将从以下的细节描述而显而易见。然而，应理解，细节描述和特定的实施例在表明本发明的特定实施方案时仅以举例说明的形式给出，这是因为在本发明的精神和范围内的各种改变或修饰将从该细节描述中对本领域技术人员而

言是显而易见的。

具体实施方式

[0030] 本发明的实施方案提供了在测定开始时控制免疫测定反应性的方法和组合物，因此提供了在控制最高浓度分析物下反应性的同时对于所有测量水平的平衡控制。如上所述，集中于控制测定之后续步骤中所用试剂的常规用于控制免疫测定反应的方法在分析物浓度很高时容易提供不可靠的信息。另外，当可能简单地将较少试剂偶联至固相材料时，以下描述的研究表明，该方法导致不均一的偶联 / 包被表面，相比于本文中公开的共偶联或共包被方法所制备的那些，该表面在控制反应性上有效性较差，这是因为本文中公开的这些方法提供了反应性控制和偶联 / 包被表面均一性。

[0031] I. 免疫测定

[0032] 本文中描述的方法和组合物可用于控制免疫测定中的试剂的反应。本领域技术人员会理解存在用于进行免疫测定的不同方法，包括但不限于以下描述的那些。

[0033] 一些免疫检测方法包括：酶联免疫吸附测定 (enzyme linkedimmunosorbent assay，ELISA)、放射免疫测定 (radioimmunoassay，RIA)、免疫放射测定 (immunoradiometric assay)、荧光免疫测定 (fluoroimmunoassay)、化学发光测定 (chemiluminescent assay)、生物发光测定 (bioluminescent assay) 和蛋白质印迹 (Western blot) 等。各种有用的免疫检测方法的步骤描述于科学文献中，例如，Doolittle 和 Ben-Zeev，1999 ；Gulbis 和 Galand，1993 ；De Jager 等，1993 ；和 Nakamura 等，1987，其各自通过引用并入本文。

[0034] 将选定的生物样品与抗体在有效条件下接触一段时间从而足以使得形成免疫复合物（初级免疫复合物）通常是这样的：将抗体组合物简单地添加至样品并将混合物孵育一段时间，其长到足以使抗体与任何存在的抗原形成免疫复合物（即结合至任何存在的抗原）。该时间之后，通常将洗涤样品 - 抗体组合物（例如组织切片、ELISA 板、点印迹或 western 印迹）以移除任何非特异性结合的抗体物质，仅使得那些在初级免疫复合物内特异性结合的抗体用以检测。

[0035] 通常，免疫复合物形成的检测在本领域中公知并且可通过应用多种方法来实现。这些方法通常基于检测标记或标志物，例如任何那些放射性、荧光、生物和酶标签。关于使用这样的标记的专利包括美国专利 3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149 和 4,366,241，其各自通过引用并入本文。当然，可通过使用第二结合配体（如本领域已知的，例如第二抗体和 / 或生物素 / 抗生物素蛋白配体结合排列）发现额外的优势。在高浓度分析物的存在下，由免疫复合物产生的可检测信号的量可超出检测装置的最大可用范围。因此，本发明的实施方案提供控制免疫测定反应性的方法和组合物，因此可控制在最高分析物浓度下的反应性，由此由免疫复合物产生的可检测信号落在检测装置的可用信号范围内和由管理机构 (regulatory authority) 确定的可接受范围内。

[0036] 用于检测的选择性抗体可自身连接至可检测标记，其中技术人员之后会简单地检测该标记，由此允许确定组合物中初级免疫复合物的量。或者，可借助具有抗体结合亲和性的第二结合配体检测变得结合在初级免疫复合物内的第一抗体。在这些情况下，第二结合配体可连接至可检测标记。第二结合配体自身常常是抗体，因此其可被称为“第二”抗体。

初级免疫复合物与经标记的第二结合配体或抗体在有效条件下接触一段时间，以足以使得形成第二免疫复合物。之后，通常洗涤第二免疫复合物以移除任何非特异性结合标记的第二抗体或配体，并且之后检测第二免疫复合物中的剩余标记。

[0037] 其他方法包括通过两步法检测初级免疫复合物。如上文所述，具有抗体结合亲和性的第二结合配体（例如抗体）用于形成第二免疫复合物。洗涤之后，再次在有效条件下将第二免疫复合物与具有对第二抗体的结合亲和性的第三结合配体或抗体接触一段时间，其足以形成免疫复合物（第四免疫复合物）。通常将第三配体或抗体连接至可检测标记，使得检测因此形成的第四免疫复合物。该系统可提供信号放大（如果这是期望的）。

[0038] 如上文所述，免疫测定，以其最简单和/或直接的方式，是抗体结合测定。某些优选的免疫测定是本领域已知的多种类型的酶联免疫吸附测定(ELISA)和/或放射免疫测定(RIA)。

[0039] 在一个示例性ELISA中，将选择性抗体固定在选择的表现蛋白亲和性的表面（例如聚苯乙烯微量滴定板中的孔）上。之后，将怀疑含抗原的测试组合物（例如临床样品）添加至孔。在结合和/或洗涤以移除非特异性结合免疫复合物之后，可检测结合的抗原。检测通常通过添加连接有可检测标记的另一种抗体来实现。该类型的ELISA是简单的“夹心ELISA(sandwich ELISA)”。检测还可通过以下实现：添加第二选择性抗体，然后添加具有第二抗体结合亲和性的第三抗体，并且第三抗体连接有可检测标记。

[0040] 另一种ELISA（其中抗原是固定化的）涉及在检测中使用抗体竞争。在该ELISA中，将针对抗原的经标记抗体添加至孔，使之结合，和/或借助其标记进行检测。之后通过在与经包被的孔孵育期间将样品与针对抗原的经标记的抗体进行混合来确定未知样品中的抗原的量。样品中抗原的存在使得可用于结合至孔的针对抗原的抗体量减少，从而减少最终信号。这还适于检测未知样品中的针对抗原的抗体（其中将未经标记的抗体结合至抗原包被的孔）并且还降低可用于结合经标记的抗体的抗原的量。

[0041] 不论使用的形式，ELISA具有某些共有特征，例如包被，孵育和结合，洗涤以移除非特异性结合物质，以及检测结合免疫复合物。这些在下文有述。

[0042] 在用抗原或抗体对板进行包被中，技术人员通常用抗原或抗体的溶液孵育板的孔过夜或一段特定的时间。当抗原或抗体与中性材料共偶联时，抗原或抗体和中性材料一起孵育以包被板。之后将洗涤板的孔以移除不完全吸附的材料。之后，用关于测试抗血清的抗原中性的非特异性蛋白“包被”孔的任何剩余的可用表面。这些包括牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或奶粉溶液。包被使得封闭固定表面上的非特异性吸附位点，因此降低由抗血清非特异性结合至表面上而引起的背景。如果进行共偶联过程，那么同一中性材料可用于“封闭”步骤，或可使用不同的中性材料。

[0043] 在ELISA中，可能更习惯使用二级或三级检测方式而不是直接过程。因此，在将蛋白质或抗体结合至孔之后，用非反应性材料包被以降低背景，洗涤以移除未结合的材料，固定表面与生物样品接触以在有效使得免疫复合物（抗原/抗体）形成的条件下进行测试。之后，检测免疫复合物需要经标记的第二结合配体或抗体和连同经标记的第三抗体或第三结合配体的第二结合配体或抗体。

[0044] “在有效使得免疫复合物（抗原/抗体）形成的条件下”意指该条件优选包括用溶液（例如BSA、牛丙种球蛋白(bovine gamma globulin，BGG)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)/

吐温 (Tween)) 稀释反应物。这些添加的物质也趋于辅助降低非特异性背景。“合适的”条件还意指在足以使得有效结合的温度下或时间段中进行孵育。孵育步骤通常为在优选近似25℃至27℃进行约 1 至 2 至 4 小时左右，或可在约 4℃左右过夜。

[0045] 在 ELISA 中的所有孵育步骤之后，洗涤经接触的表面从而移除未复合的材料。优选的洗涤过程包括用诸如 PBS/ 吐温或硼酸盐缓冲液的溶液洗涤。在测试样品和初始结合材料之间形成特异性免疫复合物之后，随后洗涤，可测定甚至微量的免疫复合物的存在。

[0046] 为了提供检测方式，第二或第三抗体将具有关联标记以允许检测。优选地，这将是酶，该酶将基于与适当的显色底物孵育而发生显色。因此，例如，人们希望在易于其他免疫复合物形成的条件下将第一和第二免疫复合物与脲酶、葡糖氧化酶、碱性磷酸酶或氢过氧化酶－缀合抗体接触或孵育一段时间（例如，在含有 PBS 的溶液（例如 PBS- 吐温）中在室温下孵育 2 小时）。

[0047] 与经标记的抗体孵育之后，继而洗涤以移除未结合的材料，在过氧化物酶作为酶标记的情况下，例如通过与显色底物（例如尿素，或溴甲酚红紫 (bromocresol purple)，或 2,2′ －联氮基－双－(3- 乙基－苯并噻唑啉 -6- 磺酸 (ABTS)，或 H202) 孵育而对标记的量进行定量。之后，通过例如使用可见光谱分光光度计 (visible spectra spectrophotometer) 测量产生的颜色的度和将该值与使用已知量的分析物产生的类似值相关联来实现定量。

II. 多重测定

[0048] A. 阵列

[0049] 本发明可涉及使用阵列。阵列技术允许对基因表达和分子相互作用进行高通量筛选。蛋白质阵列技术在 Pandey 和 Mann(2000) 以及 MacBeath 和 Schreiber(2000) 中详细讨论，其各自通过引用特别并入本文。这些阵列（其通常包含点在玻璃载片上的或固定在微孔中的数以千计的不同蛋白质或抗体）使得技术人员同时检验大量蛋白质的生化活性和结合谱 (binding profile)。为了用这样的阵列检验蛋白质相互作用，可将经标记的蛋白质与固定在阵列上的每种目标蛋白质进行孵育。之后，分析阵列以确定经标记的分子结合了众多蛋白质中的哪些，蛋白质的数量和浓度，或者蛋白质的其他特征。本领域技术人员知道多种用于分析阵列的方法。

[0050] 1. 蛋白质生物芯片测定

[0051] 通常，生物芯片包括连接有捕获分子（“试剂”）阵列的基质，每种分子以使得可通过所选检测方法寻址的方式处于基质表面上离散且可鉴定的位置。中性材料可与基质上的一种或更多种捕获分子共偶联以降低基质上那些特定位置处的反应性。当捕获分子暴露于分析样品时，样品中的分析物可结合至表面上对其有亲和性的捕获分子。通过多种方式中的任意种来检测或表征分析物分子和捕获分子之间的捕获或相互作用。这样的检测或表征方法为本领域技术人员已知，并且包括但不限于检测荧光、发光、吸光度、反射比、透射比或折射率（例如，表面等离子体共振 (surfaceplasmon resonance)、椭圆光度法、共振镜法 (resonant mirror method)、衍射光栅耦合器波导法 (diffraction grating coupler waveguide method) 或干涉法），免疫测定（例如，ELISA)，气相离子光谱法 (gas phase ionspectrometry method)，原子力显微技术，或质谱分析法，以及尤其是 SELDI。可通过选择适当的检测方法实现样品中分析物的定量。

[0052] 2. 珠阵列

[0053] 也可在流式系统中或在珠阵列平台上分析基于微球的阵列。通常，珠阵列平台对在阵列上分布的珠和分析物进行成像。用该方法，珠阵列的图像与上述的芯片类似。然而，与其中通过在阵列上的空间位置鉴定分析物的芯片不同，珠阵列通常通过结合有经编码的微球来鉴定分析物。

[0054] 例如，Luminex(Austin，TX) 描述了用于根据其荧光来编码微球的方法，如在 Fulton 等，1997，Clin. Chem. 43 :1749-1756 和美国专利 No. 5,736,330 中教导的，其两者通过引用并入本文。该方法基于这样的原理 :可将具有独特荧光谱的荧光微球（珠）固定至不同分析物特异性粘合剂并且用于产生分析物特异性珠的基于荧光的阵列，其中每种珠类型针对独特的分析物是特异性的。该技术使用荧光染料的组合，该染料使得每种珠被独立地鉴定。将分析物特异性微球混合在一起并与用不同荧光颜色标记的探针相接触。将探针与经标记微球上的其配体或受体相结合并且用于确定在每种珠表面的特异性分子相互作用。可在流式细胞仪中读取样品，流式细胞仪允许单独鉴定每种微球并读取对应的探针结合信号。

[0055] 可通过表面羧酸盐 / 酯基团将微球共价偶联至几乎任何含有氨基酸的分子。或者，偶联抗生物素蛋白的微球可用于固定生物素化的分子 (Fulton 等，1997，Clin. Chem. 43 :1749-1756)。

[0056] 市售珠阵列的其他实例包括 Illumina 的 BeadXpress™ Reader 和 BeadStation500™。

[0057] 3. 抗体微阵列

[0058] 抗体微阵列是蛋白质微阵列的特定形式。常常将抗体微阵列用于一般研究以检测来自细胞溶解产物的蛋白质表达并且可用于例如针对检测来自血清或尿液的特异性生物标志物的诊断应用。

[0059] III. 实施例

[0060] 包括以下实施例以证明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应领会实施例中公开的技术表示由本发明人发现以在本发明的实践中很好发挥功能的技术，因此可被认为构成用于其实践的优选方式。然而，鉴于本公开，本领域技术人员应领会，在不背离本发明精神和范围的情况下，可在公开的一些特定实施方案中进行许多改变并且仍然获得同样或类似的结果。

[0061] 实施例 1- 共偶联过程

[0062] Luminex 微球的浓缩 :

[0063] 用 50 百万个 Luminex **MagPlex®** 微球来评价将活性试剂与中性材料混合以结合至 Luminex 微球的益处。在 1.5mL 微离心管中采用磁分离设备将 **MagPlex®** 微球浓缩至 0.5mL。在该洗涤过程中，通过磁表面将 **MagPlex®** 微球牵引至微离心管的一侧，使得将上清液有效地从微离心管移除。用活化缓冲液 (0.1M2-(N- 吗啉基）乙磺酸半钠盐，(MES) 缓冲液，pH6.2) 洗涤微离心管中的 **MagPlex®** 微球两次。

[0064] Luminex 微球的活化 :

[0065] 将 0.4mL 体积的活化缓冲液添加至每个微离心管中用于活化。以 50mg/mL 的浓度制备硫代 -NHS(N- 羟基硫代琥珀酰亚胺）和 EDC(1- 乙基 -3-[3- 二甲基氨基丙基] 碳化二

亚胺盐酸盐）。仅在将 0.05mL 体积的硫代 -NHS 和 EDC（各自提供 2.5mg）添加至每个含有 50 百万个**MagPlex®**微球的微离心管用于活化之前，用超声和涡流悬浮微球。将微球再次悬浮并将微离心管置于旋转器 (rotator) 上以在活化反应期间混合微球。20 分钟后，移出微离心管。

[0066] 活化后，用偶联缓冲液 (0.1M2-(N- 吗啉基）乙磺酸半钠盐，(MES) 缓冲液，pH5.0) 洗涤经活化的微球两次以移除过多的硫代 -NHS 和 EDC。将 1.0mL 体积的偶联缓冲液添加至每个含有 50 百万个微球的微离心管中。

[0067] 将蛋白质偶联至 Luminex 微球：

[0068] 将蛋白质添加至偶联缓冲液中的经洗涤的**MagPlex®**微球。如以下实施例中更详细讨论的，将不同量的活性试剂蛋白质（用于家禽血清测定 (Poultry Serology Assay) 的兔多克隆抗鸡 IgY 抗体或者经纯化的鸡 IgY；或者用于新生测定 (New Born Assay) 的小鼠单克隆抗促甲状腺激素抗体）与中性材料（经纯化的兔 IgG 或经纯化的牛 IgG) 合并以用于偶联至经活化的**MagPlex®**微球。

[0069] 实施例 2- 兔 IgG 与鸡 IgY 或者与兔抗鸡 IgY 共偶联改进家禽血清测定中的内部对照的功能

[0070] 材料：

[0071] 针对多个区域的 Luminex **MagPlex®**微球

[0072] 2.4mg/mL 的兔抗鸡 IgY- 结合至**MagPlex®**微球的试剂

[0073] 5.7mg/mL 的鸡 IgY- 结合至**MagPlex®**微球的试剂

[0074] 5.0mg/mL 的经纯化的兔 IgG- 结合至**MagPlex®**微球的中性材料

[0075] 生物素化的兔抗鸡 IgY 测定试剂

[0076] 链霉亲和素 -R- 藻红蛋白测定试剂

[0077] PBS-BSA 缓冲液

[0078] PBS- 吐温，BSA 缓冲液

[0079] 过程和观察：

[0080] 对于家禽血清测定内部对照的初始试剂偶联的要求：

[0081] 将兔抗鸡 IgY 和鸡 IgY 蛋白质偶联至**MagPlex®**微球以使其成为家禽血清测定中的内部对照。与兔抗鸡 IgY 偶联的微球用于指示鸡血清样品（含有 IgY）已添加至测定中。与鸡 IgY 偶联的微球用于指示检测抗体（生物素化的兔抗鸡 IgY）已添加至测定中。

[0082] 将 10μg 兔抗鸡 IgY 和 5μg 鸡 IgY 偶联至 5000 万个**MagPlex®**微球。将用样品稀释剂（具有作为防腐剂的**ProClin®** (2- 甲基 -4- 异噻唑啉 -3- 酮、5- 氯 -2- 甲基 -4- 异噻唑啉 -3- 酮和 1,2- 苯并异噻唑啉 -3- 酮）的牛和猪蛋白质）稀释至 1 ： 500 的鸡血清样品添加至含有捕获试剂（兔抗鸡 IgY 和鸡 IgY 蛋白质，其偶联至如上述的微球）的微量滴定板中的孔。样品与捕获试剂孵育之后，洗涤微量滴定板以移除未反应的样品，同时保留孔中的捕获试剂。之后添加检测试剂（生物素化的兔抗鸡 IgY)。与该检测试剂孵育之后，洗涤微量滴定板以移除未反应的检测试剂。之后添加报告试剂。与该报告试剂（链霉亲和素 -R- 藻红蛋白）孵育之后，洗涤微量滴定板以移除未反应的报告试剂。将缓冲液添加至孔并且使用 Luminex LX200™ 仪器测量内含物。确定所产生的信号在 Luminex LX200™ 仪器

的 23,000 至 44,000MFI 当量的范围内。这大大超出了 LX200™ 仪器的可用范围，其最大可用信号为约 20,000MFI。

[0083] 将这两种试剂以减少的量偶联至 5000 万个MagPlex®微球以试图降低测定中的总 MFI 响应。偶联的鸡 IgY 的数量是 1.68、1.24 和 0.84μg 的鸡 IgY 和 2.4、1.2、0.6μg 的兔抗鸡 IgY。对大多数偶联而言 MFI 响应保持高于 25,000MFI。在一些情况下，实现了信号降低（在一种情况中是 15,000MFI），但是该最低的信号并不对应偶联至最低量试剂的微球。在另一种情况下，观察到了降低，但是结果在 16,000 至 23,000MFI 的范围高度可变。重复实验得到了可变的结果，对于八次重复变异系数高达 36％。因此，推断在偶联反应中简单地降低试剂的量不提供可靠数据并且不能有效降低试剂的高反应性。

[0084] 共偶联以准备具有降低响应范围的家禽血清测定内部对照：

[0085] 将试剂和中性材料如以下组 1 至 4 中描述的进行混合并偶联至如上述实施例 1 中描述的 5000 万个微球。

[0086] 组 1- 将 2.5μg 兔抗鸡 IgY 抗体和 147.5μg 经纯化的兔 IgG 的混合物偶联至经活化的MagPlex®微球。

[0087] 组 2- 将 1.25μg 兔抗鸡 IgY 抗体和 148.75μg 经纯化的兔 IgG 的混合物偶联至经活化的MagPlex®微球。

[0088] 组 3- 将 2.5μg 鸡 IgY 抗体和 147.5μg 经纯化的兔 IgG 的混合物偶联至经活化的MagPlex®微球。

[0089] 组 4- 将 1.25μg 鸡 IgY 抗体和 148.75μg 经纯化的兔 IgG 的混合物偶联至经活化的MagPlex®微球。

[0090] 将用样品稀释剂稀释至 1 ： 500 的鸡血清样品添加至含有如组 1 至 4 中描述的捕获试剂的微量滴定板的孔中。样品和捕获试剂孵育之后，洗涤微量滴定板以移除未反应的样品，同时保留孔中的捕获试剂。之后添加检测试剂（生物素化的兔抗鸡 IgY）。与该检测试剂孵育之后，洗涤微量滴定板以移除未反应的检测试剂。之后添加报告试剂（链霉亲和素 -R- 藻红蛋白）。与该报告试剂孵育之后，洗涤微量滴定板以移除未反应的报告试剂。将缓冲液添加至孔并且使用 Luminex LX200™ 仪器测量内含物。

[0091] 使用上述混合物的目的是降低免疫测定响应至采用 LuminexLX200™ 仪器的小于 20,000MFI 的值。这在所有四组中都得到了实现。

[0092] 组 1- 测定响应是 17,000MFI。

[0093] 组 2- 测定响应是 12,000MFI。

[0094] 组 3- 测定响应是 19,400MFI。

[0095] 组 4- 测定响应是 13,900MFI。

[0096] 因此，推断将中性材料（例如兔 IgG）与活性试剂（兔多克隆抗鸡 IgY 或经纯化的鸡 IgY）共偶联至基质导致可靠地减少了测定中活性试剂的反应性。

[0097] 实施例 3- 在新生 4 重测定中试剂的共偶联

[0098] 将 300μg 小鼠单克隆抗促甲状腺激素抗体和 50μg 经纯化的牛 IgG 的混合物偶联至如上述实施例 1 中描述的经活化的MagPlex®微球。将 1 体积提取的血液样品添加至含有捕获试剂（小鼠单克隆抗促甲状腺激素抗体，其与经纯化的牛 IgG 共偶联至如上述

的MagPlex®微球）的微量滴定板的孔中。之后添加检测试剂（小鼠单克隆抗促甲状腺激素抗体）。孵育该样品、捕获试剂和检测试剂之后，洗涤微量滴定板以移除未反应的样品和检测试剂，同时保留孔中的捕获试剂。之后添加报告试剂（链霉亲和素 -R- 藻红蛋白）。与该报告试剂孵育之后，洗涤微量滴定板以移除未反应的报告试剂。将缓冲液添加至孔并且使用 Luminex LX200™ 仪器测量内含物。这导致了 14,000MFI 的测定响应，其在对用于产生 TSH 测定之标准曲线而言可接受的范围内。

[0099] ＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊

[0100] 在本公开的教导下，本文中公开的和要求保护的所有组合物和方法可在没有过度实验的情况下产生和实施。当本发明的组合物和方法已经在优选实施方案的方面中有所描述时，对于本领域技术人员而言很明显：在不背离本发明的理念、精神和范围的情况下，可将改变用于本文中描述的组合物和方法以及方法的步骤或步骤之顺序。更具体地，很明显：当实现同一或类似结果时，化学或生理二者相关的某些物质可替换本文中描述的物质。对本领域技术人员来说是明显的所有这样的类似替换和修改被认为是在由所附权利要求书所定义的本发明的精神、范围和理念之内。

[0101] 参考文献

[0102] 以下参考文献就它们提供对本文中所述那些补充的示例性过程上的或其他细节来说通过引用特别地并入本文。

[0103] U.S.Patent3,817,837

[0104] U.S.Patent3,850,752

[0105] U.S.Patent3,939,350

[0106] U.S.Patent3,996,345

[0107] U.S.Patent4,275,149

[0108] U.S.Patent4,277,437

[0109] U,S.Patent4,366,241

[0110] Bangham et al.,J.Mol.Biol.,13(1):238-252;253-259,1965.

[0111] De Jager et al.,Semin.Nucl. Med.,23(2):165-179,1993.

[0112] Deamer and Uster,In:Liposome Preparation:Methodsand Mechanisms,Ostro(Ed.),

[0113] Liposomes,1983.

[0114] Doolittle and Ben-Zeev,Methods Mol,Biol,,109:215-237,1999.

[0115] Freifelder,In:PhysicalBiochemistry Applications to Biochemistry and MolecularBiology,

[0116] 2nd Ed.Wm.Freeman and Co.,NY,1982.

[0117] Ghosh and Bachhawat,In:LiverDiseases,Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific

[0118] Receptors andLigands,Wu 钉 aL(Eds.),Marcel Dekker,NY,87-104,1991.

[0119] Gregoriadis,In:Drug CarriersinBiology andMedicine,Gregoriadis(Ed.),287-341,1979.

[0120] Gulbis and Galand,Hum.Pathol.,24(12):1271-1285,1993.

[0121] MacBeath and Schreiber, Science, 289(5485) :1760-1763, 2000.

[0122] Nakamura etal., In :Handbook of ExperimentalImmunology(4thEd.), Weir et al., (Eds).

[0123] 1 :27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.

[0124] Pandey and Mann, Nature, 405(6788) :837-846, 2000.

[0125] Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 :4194-4198, 1978.