

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/543

G01G 3/16 G01R 29/22

//G01N27/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98812572.2

[43] 公开日 2001 年 2 月 7 日

[11] 公开号 CN 1283270A

[22] 申请日 1998.11.24 [21] 申请号 98812572.2

[30] 优先权

[32] 1997.11.24 [33] SE [31] 9704354-1

[86] 国际申请 PCT/SE98/02129 1998.11.24

[87] 国际公布 WO99/30159 英 1999.6.17

[85] 进入国家阶段日期 2000.6.22

[71] 申请人 Q-森斯公司

地址 瑞典哥德堡

[72] 发明人 弗雷德里克·霍克

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

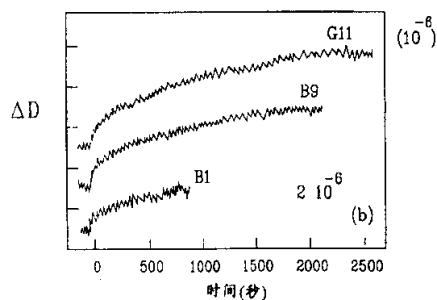
代理人 冯 谱

权利要求书 4 页 说明书 10 页 附图页数 3 页

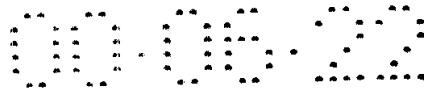
[54] 发明名称 用来检测生物物质的传感器

[57] 摘要

本发明涉及一种用来使用压电晶体微量天平测量在至少一种靶分子与至少一种受体分子之间的相互作用的方法,其中固定至少一种类型的分子,由此借助于一个驱动电路实现至少一种晶体的振荡,并且在驱动期间和/或在驱动电路断开之后测量耗散(D)和/或耗散变化(ΔD)。



ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1.一种使用压电晶体微量天平测量在至少一种靶分子与至少一种受体分子之间的相互作用的方法，其中固定至少一种类型的分子，

其特征在于，

把一种受体分子固定到一个压电晶体微量天平上，借助于一个驱动电路实现至少一种晶体的振荡，把一种靶分子呈现给包括固定的受体分子的晶体微量天平表面，并且允许在靶分子与受体分子之间的相互作用，及

在驱动期间和/或在驱动电路断开之后测量耗散(D)和/或耗散变化(ΔD)。

2.根据权利要求1所述的方法，

其特征在于，

在驱动期间和/或在驱动电路断开之后，也测量谐振频率(f)和/或谐振频率变化(Δf)。

3.根据权利要求1或2所述的方法，

其特征在于，

数量谐振频率和耗散因子是在晶体微量天平的表面上的过程的测量或特征，该表面影响谐振频率和/或耗散因子。

4.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，

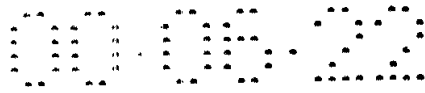
其特征在于，

使用一个或多个例如 XY 图，由压电晶体微量天平中的数量谐振频率和耗散因子组成的所谓 Df 特征，谐振频率在一根轴上，而耗散因子在另一根轴上。

5.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，

其特征在于，

靶分子和受体分子从如下组的一个或多个选择，包括抗体、合成抗体、抗体片、抗原、合成抗原、半抗原、核酸、合成核酸、细



胞、受体、激素、蛋白、蛋白侵袭子、药物、酶、碳水化合物、生物素、植物凝集素、细菌、病毒及糖类。

6.根据权利要求 5 所述的方法，

其特征在于，

靶分子是抗体，而受体分子是抗原。

7.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，

其特征在于，

受体分子以这样一种方式选择，从而它比靶分子小，和/或受体分子键接近靶分子处的一端，以产生一根大杠杆。

8.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，

其特征在于，

使用包括至少一个晶体带有连接到一个驱动电路上的至少一组电极的设备进行测量，以使一个晶体/多个晶体振荡，该设备布置成通过驱动和/或脱离驱动电路进行如下参数的实时手动或自动测量

(i) 耗散因子(D)、和/或其变化 ΔD ，或

(ii) 耗散因子(D)、和/或其变化 ΔD ，及谐振频率(f)和/或其变化(Δf),

并且测量耗散，或作为时间的函数测量耗散和频率。

9.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，

其特征在于，

压电晶体微量天平是 QCM (石英晶体微量天平)型的。

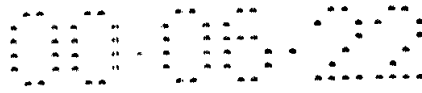
10.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，

其特征在于，

压电晶体微量天平涂敷有一个结合表面，该结合表面可以包括氧化物、金属氧化物、半导体、无机化合物、有机化合物、脂肪层、聚合物、抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素、生物素、蛋白、及自组织层。

11.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，

其特征在于，



在气相、真空或液相中进行测量。

12.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，其特征在於，

在基音频率以及在谐振频率和/或不同振荡幅值处进行测量。

13.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，其特征在於，

自动以及手动地进行测量。

14.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，其特征在於，

借助于不同种类的压电晶体，如石英，和不同的结晶切割，如AT和BT晶体切割，进行测量。

15.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，其特征在於，

作为时间的函数进行压电晶体的谐振频率和耗散的测量。

16.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，其特征在於，

测量用来得到对粘性和/或粘弹分子的相互作用的测量、和/或其对结合表面的影响。

17.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，其特征在於，

借助于使表面装有一种受体分子，确定一定靶分子，如抗体、抗体片、抗原、半抗原、核酸、合成核酸、细胞、细菌、受体、激素、蛋白、蛋白侵袭子、药物、酶、碳水化合物、生物素、植物凝集素、病毒、代谢产物、维生素及还包括其他成分的糖类。

18.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，其特征在於，

使试样流与检测器接触，从而作为时间的函数确定靶分子的数量。

19.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，

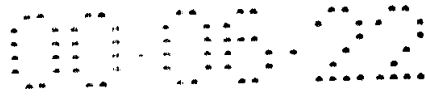
其特征在于，

利用是具有对要检测的分子互补顺序的单链核酸的受体分子，检测和/或确定在试样中包含一定顺序的核酸量。

20.根据以上权利要求的一项或多项所述的方法，

其特征在于，

通过把试样带到与装有分别对突变和正常顺序互补的受体核苷酸链的两个、或多个传感器表面同时接触，检测核酸中的点突变，并且确定他们的响应差别。



说 明 书

用来检测生物物质的传感器

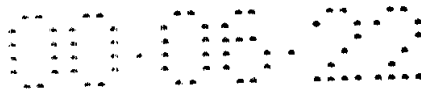
本发明涉及一种使用压电晶体微量天平测量在至少一种靶分子与至少一种受体分子之间的相互作用的方法，其中固定诸分子的至少一种。该方法包括耗散(D)或耗散(D)和频率的测量。

抗体防止疾病和感染。当人类例如暴露于抗原时，人体产生带有用于抗原的结合部位的抗体，由此固定抗原。因而，抗体能用来确定人类是否携带特有的抗原。通过呈现用于一定抗体的正确抗原和确定结合是否发生，进行检测。使用免疫传感器的最成熟分析法包括抗原/抗体复合物的放射性标记或用荧光标记。使用荧光的最常用方法称作 ELISA(酶标记免疫分析)。尤其把 ELISA 用来估计来自受治疗者的血液是否包含对特有疾病的抗体。首先把来自病毒或细菌的抗原结合到一个表面上。然后把该表面暴露于血液。如果血液包含对结合到表面上的抗原特有的抗体，则抗体将结合到抗原上。如果没有抗体存在，则表面根本不受影响。最后，通过向包含抗体的溶液呈现表面、用专用于抗原-抗体复合物的荧光组标记，检查抗体的存在。如果该表面包含抗原-抗体复合物，则标记的抗体将结合到能检测到的表面上。ELISA 是一种常用方法，并且大规模制造工业系统和试剂，这使得该方法相当便宜。然而，它存在几个严重缺点。它非常耗时，并且其完成通常用几个小时至一天。抗体结合的实时监视是不可能的，即给不出系统反应动力学的线索或信息。

由结合或吸收造成的压电晶体振荡频率的变化与晶体质量变化之间的线性关系的发现，使得有可能用重量分析监督抗原-抗体反应。压电晶体频率变化 Δf 与晶体质量变化 Δm 之间的数学关系由如下公式给出：

$$\Delta f = -\text{常数} \cdot \Delta m$$

在 1972 年第一次报告了为了分析目的把把压电晶体用于抗原-



抗体反应(A. Shons, F. Dorman, J. Najarian, *J. Biomed. Mater. Res.* 6:565)。用牛血清白蛋白(BSA)覆盖晶体, 并且通过频率的变化监视晶体上 BSA-抗体复合物的形成。从此以后进行了使用压电方法的多种抗原和抗体的研究。该领域的发展已经由 A. A. Suleiman 和 G. G. Guilbault, *Analyst.*, 119:2279(1994) 和 M. D. Ward 和 D. A. Butty, *Science*, 249:1000 (1990) 总结。

几个专利描述了 QCM (对于石英晶体微量天平的缩写, 即, 使用石英压电晶体的称重方法)如何用来分析抗原和抗体。在美国专利 US-A-4,242,096 (1980 年)中, 描述了如何通过使用抗原对晶体的吸收确定试样中抗原的存在。把抗原涂敷的晶体暴露于具有预定量抗体的试样, 因此通过使用标准图表由频率偏移能确定抗原的量。

在授予 Rice 的美国专利 US-A-4,236,893 (1980 年)和 US-A-4,314,821 (1982 年)中, 描述了其中使用 QCM 检测抗体的方法。在第一个所述的专利中, 抗原固定在涂敷有聚合物的晶体上。来自抗体结合的频率变化与抗体在试样中的浓度有关, 但分析受到对晶体的非特有结合的干扰。在第二个专利中, 描述了使用涂敷有抗抗体的晶体检测低分子化合物。通过在溶液中处理晶体进行所有这些分析, 并且然后在户外测量频率。借助于溶液/气体的该两步程序提高了关于振荡 QCM 的灵敏性, 但导致技术复杂, 并且干扰影响频率参数的水合/脱水。

液相压电免疫测定技术作为一种能进行溶液的静态分析和流动分析的技术, 具有技术上的优点。可是, 该方法由于小频率变化具有物理限制。液相压电免疫测定技术已经由 J. E. Roederer, G. J. Bastiaans 在 *Anal. Chem.*, 55:2333, (1983 年)和其美国专利 US-A-4,735,906 中指出。石英晶体这里用缩水甘油丙氧基三甲氧基甲硅烷(GOPS)改性, 并且表面改性的晶体以后另外用抗人体 IgG 抗体改性, 及然后用于人体 IgG 的压电检测。由 H. Muramatu, J. M. Dicks, E. Tamiya 和 I. Karube 在 *Anal. Chem.*, 59:2769, (1987 年)中描述了一种类似的方法, 其中石英晶体表面用 γ -氨丙基三乙氧基甲硅烷改性,

并且然后用蛋白质改性。表面改性的晶体然后用来确定人体 IgG 的浓度。

在 PCT 申请 WO97/04314 中，描述了一种其中使用压电晶体确定例如在溶液中的抗原-抗体复合物的结合的方法。在该系统中和在上述液相系统中的弱点在于，具有例如不同粘弹性的两种密切相关的抗体的分离是不可能的，因为仅测量谐振频率的变化。

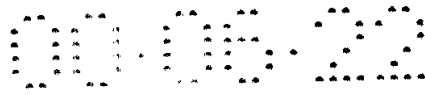
PCT 申请 WO96/35103 描述了一种用于测量谐振频率和/或压电谐振单元中的耗散因子的设备，其中把压电晶体连接到一个操作单元上，以实现所述晶体的振荡，在该处在断开晶体操作单元之后测量振荡。该装置能用来测量即有机材料对晶体一个表面的吸收。

US-A-5,653,939 描述了一种用于研究相对于靶核酸的试样的方法，该方法包括在几个位置上一组测试部位的形成，每个部位包括形成在其上具有已知结合特性的寡核苷酸探针，并且其中在每个测试部位处的探针以一种预定方式不同于在其他测试部位处的探针，从而探针测试部位和其结合特性的定位作用也是已知的，把测试物质涂敷到测试部位上，及在测试部位检测电磁性能的变化，这种变化由靶核酸对探针的结合产生。

本发明的目的在于，提供一种使用压电晶体微量天平测量在至少一种靶分子与至少一种受体分子之间的相互作用的方法，其中固定至少一种分子。在靶分子与受体分子之间的相互作用的特征包括耗散(D)的测量和/或耗散变化(ΔD)的测量。也有可能把耗散测量与谐振频率(f)和/或谐振频率变化(Δf)的测量相结合。

耗散根据本发明是用于靶分子-受体分子复合物的压电晶体微量天平测量的一个新量。以前一直仅确定谐振频率，而本发明提供一种既能够实现耗散又能够实现谐振频率测量的方法。

耗散变化和系统谐振频率的信息能与溶液中靶分子的浓度和在靶分子与受体分子之间的亲和力有关。这当不同的靶复合物具有粘弹性时是可能的，因为复合物的构造不同。另外，靶复合物不同地影响吸收层，这也影响测量结果。因而，在不同靶分子-受体分子复



合物之间的相互作用根据本发明，对于一定系统能与复合物耗散、或耗散和频率响应区分开。例如， f 和 D 一起比如说形成被测系统的某种类指纹。当靶分子与受体分子相互作用时，耗散的变化、或频率和耗散然后能用作过程的测量和/或特征。

该方法的使用根据本发明要求：

1. 受体分子具有对于靶分子的特殊性；
2. 一种把受体分子结合到压电晶体表面上的方法；
3. 适当的反应条件，以形成诸如靶分析物受体复合物之类的反应产物；及
4. 一种仅用来监视耗散变化和谐振频率、或耗散的设备。

就该表示而论，相互作用是意识到可以是但不一定是临时的、并且可以包括几个分子的所有种类的相互作用，并且也可以是反应产物相对于表面的相互作用。

用来把受体分子结合到压电晶体表面上的方法或者直接通过粘结、或者通过结合表面实现。

表示的靶分子与要检测的化合物有关，它包括但不限于抗原、抗体、药物、核酸、激素、蛋白质、酶及碳水化合物。靶分子必须能够结合到也可以是但不限于上述化合物的受体分子上。

靶分子和受体分子能形成靶复合物，例如，抗原-抗体、配体-受体、糖-植物凝集素、生物素-抗生物素蛋白、酶-酶解物、寡核苷酸-带有互补顺序的寡核苷酸、寡核苷酸-蛋白、寡核苷酸-细胞等。能检测这些靶复合物的形成，以及这些复合物的耗散。

压电晶体微量天平最好具有 QCM 型，并且最好在这里通过在液体中测量使用，但在气相或真空中也能进行测量。本发明对于例如免疫反应和特别是抗体-抗原反应是一种快速和敏感技术。与在液相中用于蛋白吸收动力学的实时测量的其他技术相比，例如与椭圆光度法相比，该技术比较便宜，因为石英晶体也用作其他应用领域中的传感器芯片。

本发明的进一步目的在于，提供一种具有根据本发明方法的优

点的仪器。

图 1 表示对于两种分离的、但相同处理的 TiO_2 晶体在 $1 \mu g/ml$ 浓度下在抗原 gG-2 的结合期间相对于时间的 Δf ;

图 2 表示对于两种分离的、但相同处理的 TiO_2 晶体在 $1 \mu g/ml$ 浓度下在抗原 gG-2 的结合期间相对于时间的 ΔD ;

图 3 表示对于石英晶体的三次单独测量的 Δf 相对于时间, 该石英晶体为了 0.5 mg/ml B9、G11、和 B1 的结合, 已经相同地用 TiO_2 -gG-2-Hb 处理;

图 4 表示对于石英晶体的三次单独测量的 ΔD 相对于时间, 该石英晶体为了 0.5 mg/ml B9、G11、和 B1 的结合, 已经相同地用 TiO_2 -gG-2-Hb 处理;

图 5 表示对于石英晶体的两次单独测量的 ΔD 相对于时间, 该石英晶体为了 0.5 mg/ml B9、G11、和 B1 的结合, 已经相同地用 TiO_2 -gG-2-Hb 处理。

本发明涉及一种使用最好是 QCM 型的压电晶体微量天平测量在至少一种靶分子与至少一种受体分子之间的相互作用的方法。

本申请者的具有公开号 504 199 的瑞典专利描述了在最好为 QCM(石英晶体微量天平)型的压电晶体微量天平中测量谐振频率和/或耗散因子的一种装置和一种技术。本发明是用于测量生物靶复合物方法的技术的进一步发展。

QCM 是一种极灵敏的天平, 设计成称重添加或从电极上除去的少量材料。根据本发明的 QCM 包括一个压电材料晶体盘, 该材料是石英的较好, 是 AT-或 BT 分割石英晶体更好。这样一种晶体能在切变模式中振荡, 具有约 1-10 nm 的幅值和具有基音频率

$$f = \text{常数} \cdot d^{-1}$$

其中 d 是晶体的厚度。对于 $d=0.17$ 是 $f=10 \text{ MHz}$ 。当交流场带到垂直于晶体的表面时, 振荡发生。交流场的频率应该集中在晶体的自然频率周围。在实际中, 在晶体的每一侧通过例如蒸发施加电极。然后把电极与外部振荡电路电气接触。该装置在便利的条件下能测

量石英电极上非常小的质量变化，在 1 ng/cm^2 甚至更小。

在理想条件下，如上所述，谐振频率的变化 Δf 相对于质量的变化 Δm 成比例，即

$$\Delta f = -\text{常数} \cdot \Delta m$$

常数的大小取决于晶体的选择和其切割。该公式假定表示为 Δm 的质量被刚性地确定，均匀地分布在电极上，跟随 QCM 的振荡而没有耗散损失。当涂敷质量包括粘性材料和/或不是均匀地分布在晶体的质量敏感区域上时，该公式一般无效。在该情况下，给定量的涂敷质量也能导致不同的频率移动，这与能对应于不同质量量的一定频率移动是相同的。因而在这些情况下，它可能仅具有测量谐振频率的有限值。

本发明的目的在于构造一种使用 QCM 技术来检测生物靶复合物的灵敏方法。这能通过由传感器测量系统的改进特征实现。通过同时测量 QCM 的 f 和耗散因子 D (耗散是所谓的 Q 因子的倒数)，显著增大研究系统的信息量和值。根据本发明的一种典型的测量方法是既测量 f 又测量 D ，作为时间的函数。量 f 和 D 测量系统的不同特征。 f 和 D 一起提供研究系统的一种指纹。然而，在某些系统中，耗散 D 的测量就足够了。

根据本发明的方法允许系统专用指纹。过程/系统的特征在于在 XY 曲线图或在任何坐标系中画出每次测量的相对于 ΔD 的 Δf ，使 Δf 在一根轴上而 ΔD 在另一根轴上。得到的图表，所谓的 Df 图表，是不明晰的，而是隐含的、时间依赖的，因为 $\Delta D - \Delta f$ 的每一对能放在图表中。 Df 图表的形状作为用于给定过程的指纹。

通过以其谐音(第 3 第 5 等)激励晶体并且对于每个谐音监视 Df 图表，能得到另外的指纹。也有可能同时使用晶体的不同切割，不只是 AT 切割，并且对于其不同的切割监视 Df 图表。而且在不同的振荡振幅处能测量 Df 图表。

叫做系统的 Df 指纹或 Df 特征的那种，根据本发明包括 Df 图表，对于在不同振荡频率、不同振荡模式和不同振幅下研究/测量的系统

能测量 Df 图表。

Df 图表的形状能立即揭示在不同类型的靶分子-受体分子复合物之间的相互作用是不同的，没有必须知道的相互作用的本质的详细说明。每个移动或层，例如在晶体表面上的非刚性和粘性层，因而每个具有 Df 特征。如果在一个频率和/或振幅处的两个系统的特征太类似，则在其他频率和振幅处差别可能增大。

对于使用根据本发明方法的要求：

1.受体分子具有对于靶分子的特殊性

受体能是如下化合物的任一种：抗体、合成抗体、抗体片、抗原、合成抗原、半抗原、核酸、合成核酸、心脏、受体、激素、蛋白、蛋白侵袭子、药物、酶、碳水化合物、生物素、植物凝集素、细菌、病毒及糖类。对受体分子的唯一要求是必须能够结合到靶分子上，该靶分子也能是上述化合物的任一种。靶分子和受体分子形成一种靶复合物，例如，抗原-抗体、配体-受体、糖-植物凝集素、生物素-抗生物素蛋白、酶-酶解物、寡核苷酸-带有互补顺序的寡核苷酸、寡核苷酸-蛋白、寡核苷酸-细胞等。受体分子也能以这样一种方式选择，从而它比靶分子小，和/或受体分子键接近靶分子处的一端以产生一根大杠杆。

2.用来把受体分子结合到压电晶体表面上的方法

受体分子经粘结或经另一个带有或不带有又一个层的表面，一起叫做结合表面，通过粘结或化学反应，能直接附着到压电晶体表面上。结合表面可以包括氧化物、金属氧化物、如 TiO_2 和 SiO_2 、半导体、无机化合物、有机化合物、脂肪层、聚合物、抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素、生物素、蛋白、及自组织层。结合表面的选择可能影响指纹，即一些表面，例如， TiO_2 可以放大分析的信号。

3.适当的反应条件，以形成诸如靶分析物受体复合物之类的反应产物

这些都取决于要研究哪种系统，并且在先有技术中知道哪些反应条件适于一定的系统。适当反应条件的例子是，但不限于，从 4°C

至 80°C, pH 4-9.0, 盐浓度在 1 μ M-1 M 之间。

4.仅监视耗散变化和谐振频率、或耗散的设备

使用包括至少一个晶体带有连接到一个驱动电路上的至少一组电极(直接施加到该晶体上或对该晶体处于靠近连接)的设备进行测量,以把一个晶体/多个晶体投入振荡,布置成通过驱动和/或脱离驱动电路进行如下参数的实时手动或自动测量

- (i) 耗散因子(D)、和/或其变化 ΔD , 或
- (ii) 耗散因子(D)、和/或其变化 ΔD , 及谐振频率(f)和/或其变化(Δf),

并且作为时间的函数测量耗散的测量、或耗散和频率。

在气相、真空、但最好在液相中可以进行测量。测量能在基音频率以及谐音、和/或振荡振幅下进行,并且它能自动以及手动地进行。

为了减小靶分析物的非特有结合,能使用阻滞剂。然后它覆盖在晶体表面上或在不涂敷有受体分子的结合表面处的诸区域或区域部分上。几种蛋白或其他分子能用作阻滞剂。然而,他们应该具有对靶分子较低的、或最低的可能亲合性。

也能进行试样流动的测量,这导致与检测器的接触,从而作为时间函数确定靶分子的含量。

不必是作为正在研究的主要目标的结合过程本身,而是作为结合结果的产物。也能进行靶复合物以何种方式影响结合表面、及粘性和/或粘弹分子如何相互作用的测量。另外,也能进行靶复合物分离的测量,例如由于来自外部的影响分离的抗原-抗体复合物。

根据本发明的方法也能用来,利用是具有对要检测的靶分子互补顺序的单链核酸的受体分子,检测和/或确定在试样中存在的一定顺序的核酸量。另外,通过把试样带到与装有分别对突变和正常顺序互补的受体核苷酸链的两个、或多个传感器表面同时接触,并且测量他们的响应差别,能检测核酸的点突变。

根据本发明,能设计一种利用根据上述的方法的装置。

下面给出一个系统作为一个例子，其中靶分子是抗体，而受体分子是抗原。因此根据本发明的 QCM 技术允许抗体-抗原反应的快速(小于一小时)实时测量。这通过在抗体结合到覆盖晶体表面的抗原上时的时间期间，测量耗散和频率移动来实现。另外，能测量抗体-抗原反应的动力学。

使用根据本发明的方法，反应动力学可能直接与如下参数相关

- (i) 在溶液中的抗体浓度，和
- (ii) 抗原与抗体之间的亲和性。

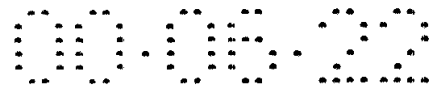
这两个参数对于例如医疗分析很重要。

受体分子是来自单纯疱疹病毒属类 2(HSV-2)的抗原糖蛋白 G(gG-2)。具有 120 kD 分子重量的这种蛋白使用螺旋 promatia 植物凝集素亲和性色谱仪从病毒感染的细胞膜提取。使用三种不同的靶分子，单细胞系 γ -球蛋白(IgG)抗体 B9、G11、和 B1，证实本发明。已知抗体 B9 和 G11 是类型特有的，并且不结合到除 HSV-2 之外的单纯疱疹病毒属蛋白上。使用 ELISA 技术，已经证明这些抗体对于 gG-2 上的两种不同表位是特有的(Liljequist, J. A., Tribala, E., Svennerholm, B., Jansson, S., Sjögren-jansson, E., Bergström, T., 提交给通用病毒学刊物(Journal of General Virology)1997年)。对于抗原的结合亲和性对于 B9 比对于 G11 约大 100 倍。对来自单纯疱疹病毒属类 1 的糖蛋白 C 类型特有的单细胞系抗体 B1 用作控制，因为知道它不结合到 gG-2 上。

氧化钛(TiO_2)用作基片表面。在反应之间，冲洗基片表面几次。因此它能使用高达 10 次，具有很高的重复性。

在把抗原结合到表面上时，使用具有 pH 9.6 的 50 mM TRIS/200 mM KCl 缓冲剂，并且对于抗体的结合，使用具有 pH 7.0 的 50 mM HEPES/200 mM KCl 缓冲剂。

对于两种分离的、但相同处理的 TiO_2 晶体，在 1 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下在抗原 gG-2 的结合期间，图 1 表示相对于时间的 Δf ，及图 2 表示相对于时间的 ΔD 。因此在抗体的检测之前固定抗原。在测量期间吸



收没有到达饱和，但当频率约达到 20 Hz 时中断抗原的结合。在第三谐音下进行测量。以很高的重复性进行抗原对不同晶体的结合，这表明在图 1 和 2 中。

为了避免抗体对自由表面的非特有结合，使用 30 $\mu\text{g/ml}$ 的血红蛋白(Hb)作为阻滞剂(牛血红蛋白, Sigma)。此后把 gG-2-Hb 表面暴露于要检测的抗体溶液。

图 3 和 4 表示三次单独测量的相对于时间的 Δf 和相对于时间的 ΔD ，把相同处理的 $\text{TiO}_2\text{-gG-2-Hb}$ 晶体用于 0.5 mg/ml B9、G11、和 B1 的结合。

控制抗体 B1 给出非常小 f 和 D 变化，这表示非特有结合很低。对于 B9 和 G11 的 f 和 D 的相应移动明显较高。也能看到，具有比 G11 高的亲和性的抗体 B9 以较高速率结合，并且给出比对于 G11 高两倍的频率变化，但没有任何较大的 D 移动变化。

结果表示在图 5 中，其中相对于 Δf 的 ΔD 给出 B9 和 G11 的结合。B9 和 G11 都呈现 Δf 与 ΔD 之间的线性，但对于 G11 斜率比对于 B9 约大 1.7 倍。也应该注意，斜率即 $\Delta D/\Delta f$ 在低和高浓度下对于相应抗体都是相同的。这表示对相同抗原上不同的表位特有的抗体能彼此区分开，不单是从对于反应的速度或绝对频率，而是从每 Δf 产生的 ΔD 。从 Df 特征得到的指纹使得有可能在专用于不同表位、但具有类似亲和性的抗体之间区分。这取决于这样一个事实：耗散观察变化由不同的构造引起，由不同的抗体表位反应由抗原-抗体复合物产生。另外，不同的抗原-抗体复合物影响吸收层不同。

因此，根据本发明，能够以不同于其耗散和频率解答的方式分离不同抗体-抗原反应。由于来自不同细菌和病毒感染的抗体能够以高灵敏度和专一性检测，这是很重要的。

说明书附图

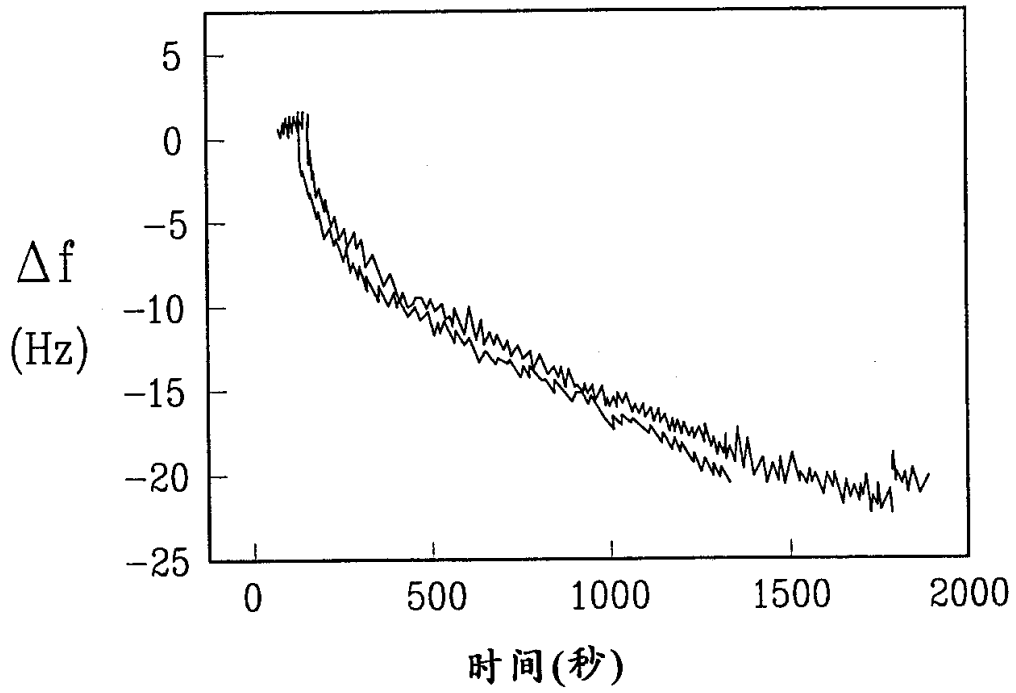


图1

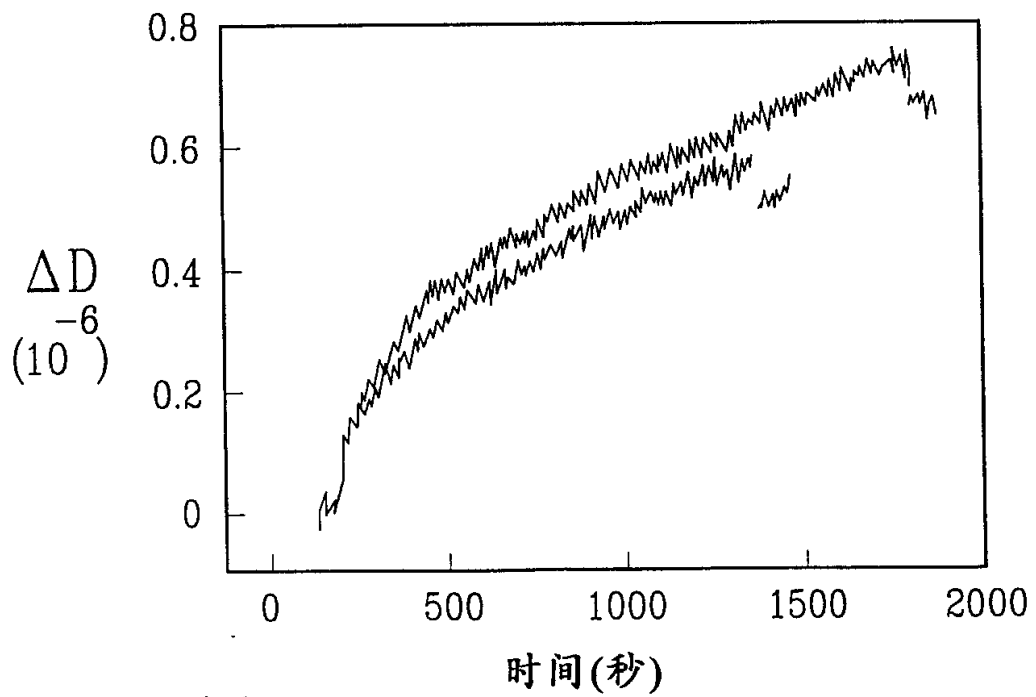


图2

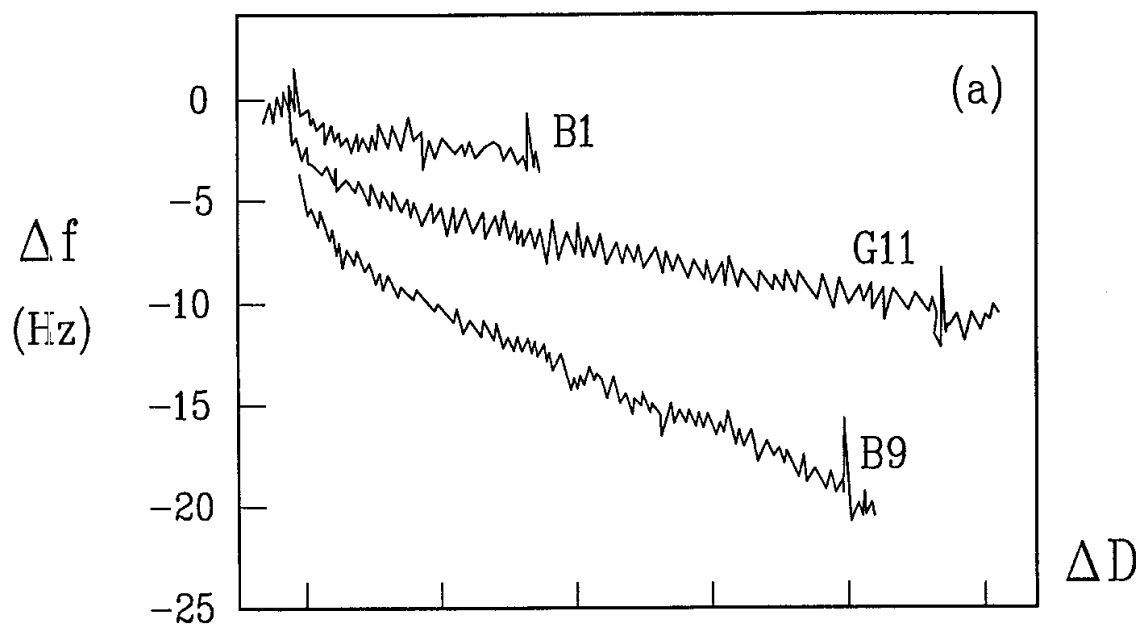


图3

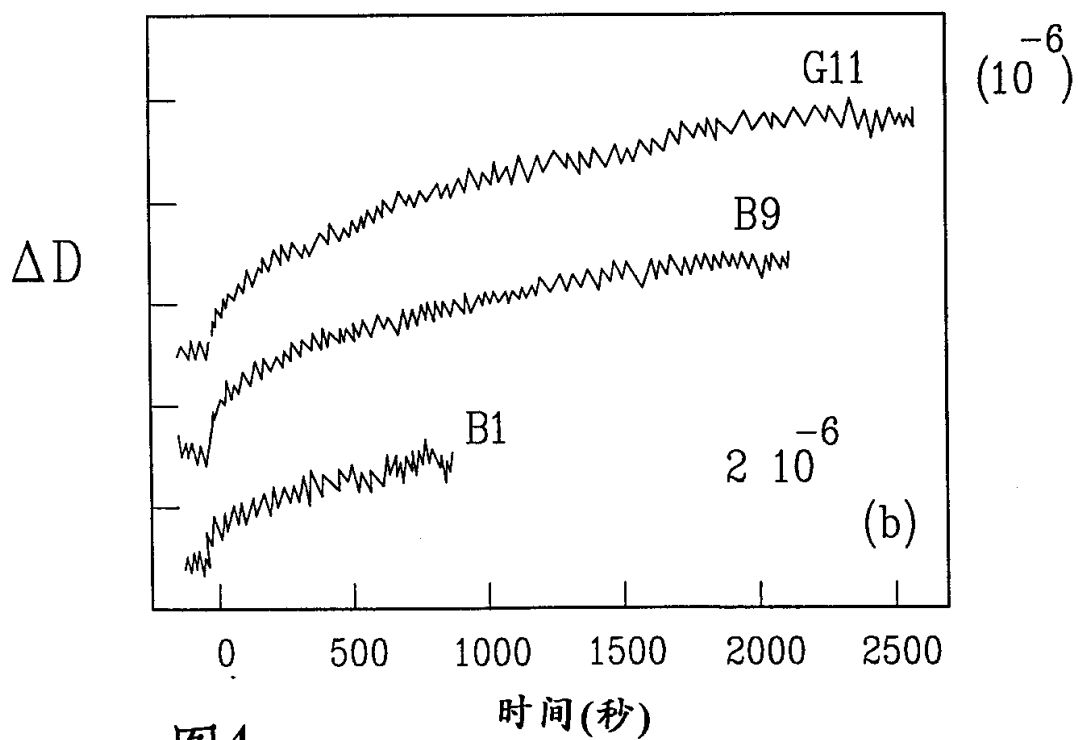


图4

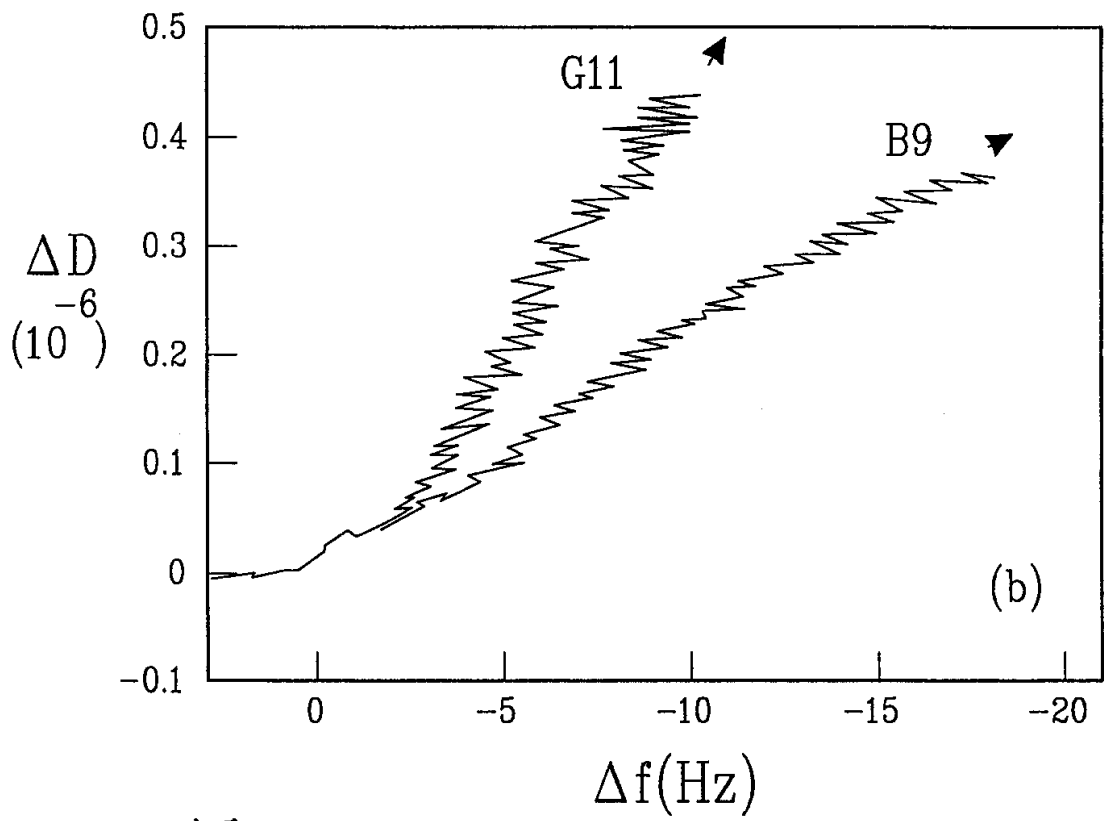


图5