



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104076143 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201410251375. 5

G01N 33/533 (2006. 01)

(22) 申请日 2004. 05. 03

(30) 优先权数据

60/467, 717 2003. 05. 02 US

(62) 分案原申请数据

200480011913. 8 2004. 05. 03

(71) 申请人 安克塞斯生物公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 崔永镐 郑宰安

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 张英 刘书芝

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

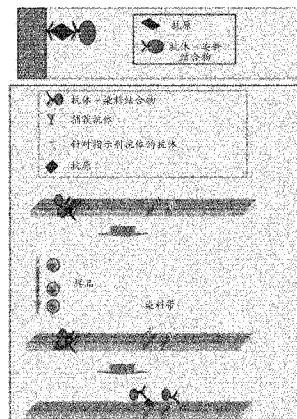
权利要求书1页 说明书17页 附图11页

(54) 发明名称

层析分析系统

(57) 摘要

本发明涉及层析分析系统。本发明涉及一种横流式测定格式分析物检测装置,包括:至少一个第一过滤元件,包括至少一个储存区(1),与至少一个第二过滤元件(11)接触,第二过滤元件连接至芯吸膜(6),其中用包括铈(III)螯合物的粒子共价标记的对分析物特异性连接配偶体被注入在储存区(1)上,每个粒子具有约30,000-1,000,000个铈(III)原子;俘获分析物/特异性连接配偶体复合物的至少一种特异性连接配偶体固定在芯吸膜(6)上;其特征在于第二过滤元件插入到第一过滤元件和芯吸膜(6)之间。



1. 一种横流式测定格式分析物检测装置,所述装置包括至少一个第一过滤元件,包括至少一个储存区(1),与至少一个第二过滤元件(11)接触,所述第二过滤元件连接至芯吸膜(6),其中用包括铈(III)螯合物的粒子共价标记的对分析物特异性连接配偶体被注入在所述储存区(1)上,每个粒子具有约30,0000-1,000,000个铈(III)原子;俘获所述分析物/特异性连接配偶体复合物的至少一种特异性连接配偶体固定在所述芯吸膜(6)上;

其特征在于所述第二过滤元件插入到所述第一过滤元件和所述芯吸膜(6)之间。

2. 根据权利要求1所述的装置,其中,所述装置分析的所述分析物选自自由抗原、抗体、核酸和半抗原组成的组。

3. 根据权利要求1所述的装置,其中,所述特异性连接配偶体选自自由抗原、抗体、核酸、生物素或生物素类似物、链霉抗生物素、抗生物素蛋白和半抗原组成的组。

4. 一种用根据权利要求1至3任一项所述的装置确定样品中存在分析物的方法,所述方法包括:

以横流式测定格式将一定量的样品施加于至少一个储存区(1),其中,所述样品迁移到发生化学反应的所述芯吸膜(6),其中信号的存在表示在所述样品中存在所述分析物,并且其中用包括铈(III)螯合物的粒子共价标记的特异性连接配偶体被注入在所述储存区(1)上,每个粒子具有约30,0000-1,000,000个铈(III)原子;至少一种特异性连接配偶体固定在所述芯吸膜上(6)。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述样品选自自由血液、血清、血浆、尿、唾液、汗和来自生物样品或环境样品的处理过的液体介质组成的组。

6. 根据权利要求4所述的方法,其中,可检测到所述样品中的多种类型的分析物。

7. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述分析物对病原体是特异性的。

层析分析系统

[0001] 本发明是申请日 2004 年 5 月 3 日、标题为“层析分析系统”申请号 200480011913.8 的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及分子,特别是生物分子的高灵敏度检测领域。本发明还涉及使用荧光标记物。

背景技术

[0003] 超灵敏的免疫测定方法被开发并用于临床诊断中,用以测量高度复杂的样品中浓度极低的特定化合物。虽然这些方法的灵敏度、可靠性、快速性、简单性以及成本已有稳定的改进,但仍需要进一步的提高,并且这也是可能的(参见 Hamp1 J 等人的 Upconverting phosphor reporters in chromatographic assays. *Analytical Biochemistry*, 2001; 288, 176-187; Unger M. 等人的 Single-molecule fluorescence observed with mercury lamp illumination. *Biotechniques* 1999; 27:1008-1014; 以及 Weiss S. 的 Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science* 1999; 283:1676-1683)。目前的趋势是向小型化发展,多种分析物方法已经引入了对它本身的挑战和对于免疫测定技术的要求。(Taylor JR 等人的 Probing specific sequences of single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles. *Anal Chem* 2000; 72:1979-1986; 以及 Zijlmans 等人的 Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting phosphors: a new reporter technology. *Anal Biochem* 1999; 267:30-36)。尤其是已经增加了对新标记技术的关注,这是因为通常使用的直接的或酶-放大的放射性报道物(reporter)、比色报道物、发光报道物或荧光报道物中没有一种能达到理想标记物的所有要求,对理想标记物的要求包括:对于特异活性、大小、无毒性、成本、稳定性、定位和检测的要求。可直接检测的标记物(诸如荧光团)遭受到有限的灵敏度,而酶-放大方法或离解-增强方法损失空间信息。

[0004] 最近,已经将基于高度特异的活性微粒标记物(诸如量子点、发光无机晶体、向上转换型磷光体、荧光纳米粒子、以及胞质基因共振粒子(plasmon resonant particle))的新型检测方法引入,用以对临床诊断以及生物研究、染色体研究和药物研究的未来要求作出响应。将这些亚微米大小的标记物连接到特异性结合的试剂上(诸如,核酸探针、受体、凝集素、酶、以及抗体),用以检测灵敏度等于或高于可得到的最好的常规标记物的特定分子。尽管存在大分子尺寸和明显的硬脂问题,但这些特定标记物也已经被成功地用于固相免疫测定。然而,已经认识到粒子-蛋白质生物结合物的生产、胶态稳定性以及非特异性结合可能仍需要进一步的改进。

[0005] 在 20 年前时间分辨荧光计和镧系元素报道物就被引入免疫测定。从那时起,离解-增强的镧系元素荧光免疫测定(DELFI[®])技术就已经被认为是最灵敏和最可靠的免疫测定平台之一。对于固有荧光的、惰性的和稳定的镧系元素螯合物和穴状化合物标记物

的研究已经导致了新型的同类和不同类测定（化验）的发展，期望将这些测定（化验）引入到例行的临床诊断中。而且，已知一种基于镧系元素共荧光的先进的离解-增强技术，该技术放大铈（III）、铽（III）、钇（III）和镱（III）的长寿命荧光。镧系元素螯合物荧光的一个独特的特征是在多种标记中没有自发淬灭，使得它们很理想，并且适用于高密度簇标记物，诸如染色的胶乳纳米粒子。用于 DELFIA 技术的高度荧光螯合物也可以用于荧光镧系元素（III）螯合物纳米粒子，这是因为胶乳内部的疏水环境保护荧光螯合物免受环境的影响（诸如溶剂淬灭）并稳定活动力弱的复合物。对于所有四种镧系元素的合适的螯合物的应用将能使基于纳米粒子、标记具有极低检测限以及直接的、表面读取测定的四重标记技术成为可能。

[0006] 使用典型的荧光染料检测样品中低水平的目标标记物有时是困难的，并且易于发生错误，这是因为特异性荧光信号往往较低的，并且通常与非特异性信号混合。此外，由测试样本生成的自身荧光会引起干扰。镧系元素（例如铈（EU））的复杂螯合物的荧光半衰期多达六个数量级，长于常规的荧光标记物。因此，来自镧系元素螯合物的发射可以通过使用具有适当延迟、计数和循环次数的时间分辨荧光计而与背景荧光（其具有较短的衰变半衰期）区分开。这种独特的染料使发光具有大于 500 μ s 的衰变时间，远远长于常规的荧光探针或自身荧光样品的发光衰变时间，后者通常具有小于 50ns 的衰变时间。因此，时间分辨荧光计可以实质上消除自身荧光。

[0007] 这些铈发光染料的特点是长波长发射（ \sim 610nm），其可以与激发峰值（ \sim 365nm）很好地分离开。这种异乎寻常大的斯托克司频移（移动）允许使用过滤器组合，这种组合可以有效地隔离需要的发光信号 (Harma et al., *Europium nanoparticles and time-resolved fluorescence of ultrasensitive detection of prostate-specific antigen*. 2001 ;47:561-568)。在 DELFIA 系统中，镧系元素离子从螯合结构中离解出来，并进入到荧光增强溶液中。这种附加的增强步骤要求提供一种能有效消除淬灭水并含有吸收能量的螯合化合物的环境，以便将能量进一步传递到镧系元素离子。镧系元素磷光体由于保护水的晶体结构而可以在没有任何增强步骤的情况下被直接检测到。使用镧系元素磷光体的缺点是缺乏能将所吸收的能量有效传递到镧系元素离子的光吸收基团。在 20 世纪 70 年代后期，Frank 和 Sundberg 认识到，通过这些特性结合到胶乳粒子中，可以制备具有非常高的特异性（比）活性的荧光粒子。他们制备了胶乳粒子，该乳胶粒子包含有与三正辛基氧化膦络合的噻吩甲酰三氟丙酮镧系元素螯合物（DELFA 技术中与三正辛基氧化膦络合的萘甲酰三氟丙酮），该络合物提供没有淬灭效应的粒子，但是在该粒子内部具有一个光吸收基团。聚合物外壳通过生成疏水环境有效地将荧光-淬灭水从螯合物的附近去除。使用这种粒子标记物可以进行极灵敏的测定 (Härmä et al., 2001, Soukka et al., 2001a)。这些纳米尺寸的聚合物标记物包含被 β -二酮俘获的 30,000-2,000,000 个铈分子，铈分子具有已知的镧系元素螯合物的最高量子产量之一 (Harma et al. *Europium nanoparticles and time-resolved fluorescence of ultrasensitive detection of prostate-specific antigen*. 2001 ;47:561-568)。这种封装（包封）对荧光效率没有负面影响。对于一个 100nm 大小的铈粒子，其荧光产量相当于大约 3,000 个荧光素分子。藻胆蛋白 B-PE（可能是已知的最具有荧光性的物质）具有相当于大约 30 个荧光素分子的荧光产量。由于一个 100nm 的粒子大约是藻胆蛋白 B-PE 直径的 10 倍，而其体积/质量是 1000 倍，以摩尔为基础比较，

这些铈粒子比 B-PE 的荧光性大 100 倍。这种粒子由于其巨大的荧光性、较宽的斯托克司频移和长寿命的发光将会使测定具有超灵敏性。封装：使 30,000-2,000,000 个铈分子存在于单一粒子中。

发明内容

[0008] 本发明涉及一种高度灵敏的分析（化验）系统，包括但不局限于以横流式（侧流式或横向流动式）测定格式（规格化）(lateral flow assay format) 使用的时间分辨的荧光染料，该系统确保提高的灵敏性，同时保持横流式测定的有利方面。

[0009] 在一个方面中，本发明涉及一种使用高度灵敏的铈粒子作为标记物的层析（色谱）测试系统。层析测定可以给出快速的结果，方便（大多数是一步）并具有合理的灵敏度。在另一方面，本发明涉及一种灵敏的核酸检测设备以及其中的系统。荧光稀土螯合物结合入基质的应用提供了高度灵敏的测定。

[0010] 在另一方面，本发明涉及一种基因材料检测系统，该系统经由基于核酸方法的非聚合酶链反应或聚合酶链反应，针对存在的诸如 RNA 病毒、DNA 病毒、细胞成分的 RNA 或 DNA 这样的分析物进行检测。这种检测系统的使用是快速容易的，并具有高灵敏度和特异性。

[0011] 本发明的优点包括以下方面：

[0012] 本系统是极端灵敏的，这是分析物检测的基本要求。

[0013] 本发明的产品可以现场使用，减少了将样品传输到现场外的需要。

[0014] 样品制备之后大约 15 分钟左右，有可能对本发明的产品发出阳性结果的即时警报。应该明白虽然本发明的系统的优点之一是检测系统的快速性，但本发明不局限于在任何特定时间所得到的结果。这些结果可以在大约 20 分钟、30 分钟、40 分钟或更长的时间内获得，这取决于不同的条件。

[0015] 这种一步法的测定过程实施简单，测试结果在 15 分钟左右读取，并且不需要任何额外步骤。

[0016] 本发明的产品可以由没有经过高等教育和具有专业技术的人员实施。

[0017] 本发明的产品可以在室温下存储，而其它商品一般需要冷藏。

[0018] 在本发明的另一方面，涉及一种关注点 (Point-of-Care) 检测或者用于各种分析物的各种检测设置，这是由于它：1) 步骤简单；2) 可现场使用；3) 利用稳定的试剂；4) 不需要特别的存储；以及 5) 快速的结果。

[0019] 本发明涉及一种分析物检测装置，该装置具有至少一个储存区域和芯吸膜，其中在该储存区域上注入经标记的特异性结合的配偶体 (partner)；而在该芯吸膜上的区域固定有至少一种化学成分。如在该装置中所使用的，该标记物可以是稀土螯合物，特别是镧系元素 (III) 螯合物，尤其是，该标记物可以是铈 (III)、铽 (III)、钆 (III) 或镱 (III)、或其组合。

[0020] 在该装置中，分析物可以不局限于抗原、抗体、核酸或半抗原。特异性结合的配偶体可以不局限于抗原、抗体、核酸、生物素或生物素类似物、链霉抗生物素（蛋白）、抗生物素蛋白或半抗原。并且该化学成分可以是抗原、抗体、核酸、生物素或生物素类似物、链霉抗生物素（蛋白）、抗生物素蛋白或半抗原。

[0021] 在本发明的一个方面，该装置可以是横流式的测定格式（规格化）装置。

[0022] 在本发明的另一方面,本发明涉及一种测定样品中存在至少一种类型的分析物的方法,该方法包括将一定数量的样品施加于上述装置,其中如果样品中存在至少一种类型的分析物,则该样品迁移到芯吸膜,在芯吸膜中发生化学反应,其中信号的存在指示该分析物存在于样品中。在本发明的实施中,该信号可以由稀土螯合物生成,特别是镧系元素(III)螯合物,尤其是,该标记物可以是铈(III)、铽(III)、钇(III)、或镱(III)、或其组合。

[0023] 在本方法中,该样品可以是生物样品。而且,该样品可以不局限于血液、血清、血浆、尿、唾液、汗液和来自生物样品或环境样品的经处理的液态介质。被检测的分析物可以是抗原、抗体、核酸或半抗原。并且该化学反应可以与抗原、抗体、核酸、生物素或生物素类似物、链霉抗生物素(蛋白)、抗生物素蛋白或半抗原进行。在样品中可以检测到多种分析物。用于本方法的装置可以不局限于横流式的测定格式装置。并且该分析物可以对病原体是特异性的。

[0024] 本发明还涉及一种包括隔间的试剂盒,其包括上述装置,以及用于使用上述装置的说明书。

[0025] 本发明还涉及高灵敏度的核酸检测系统。本发明的基于核酸的检测系统能够放大来自生物样品的低浓度的特定基因组的 DNA 或 RNA 序列的信号。这种方法也是独特的、特异的、简单的,并且该放大系统易于在可现场展开的(field-deployable)检测组件中操作。

[0026] 时间分辨荧光计技术是一种基于包埋有微小粒子的镧系统,其与低聚核苷酸、肽核酸(PNA)、抗原或抗体(共轭)结合。

[0027] 任何疾病标记物或环境物质(对于它们的检测都需要高灵敏度的工具)均可以使用这种技术。

[0028] 本发明的这些和其它目标将由本发明的下面的描述、作为参照的附图以及所附的权利要求而得到更加充分的理解。

附图说明

[0029] 本发明将由下文所给出的详细描述以及仅作为举例说明所给出的附图得到更加充分的理解,因此其不是对本发明的限制。在附图中:

[0030] 图 1 示出本发明的装置的原理描述。

[0031] 图 2 示出用于检测多种分析物的本发明的装置。

[0032] 图 3 示出测试装置的图片。

[0033] 图 4 示出快速层析检测系统的结构。

[0034] 图 5 示出 (A) 胶状金抗体结合物的图像结果, (B) 铈粒子的图像结果。

[0035] 图 6 示出快速核酸检测系统的结构。

[0036] 图 7 示出用于检测样品诸如来自生物病原体的特定 DNA 序列的测定(化验)原理的图解。

[0037] 图 8 示出用于测量时间分辨的镧系元素发射的仪器(Xiao, M and Selvin, PR. An improved instrument for measuring time-resolved lanthanide emission and resonance energy transfer. Review of scientific instruments 1999 ;70(10):3877-81)。

[0038] 图 9 示出测试设备的图片。

[0039] 图 10 示出一种测试条(带)的实施例。

- [0040] 图 11 示出一种测试条的实施例。
[0041] 图 12 示出一种测试条的实施例。
[0042] 图 13 示出一种测试条的实施例。
[0043] 图 14 示出一种测试条的实施例。
[0044] 图 15 示出一种测试条的实施例。
[0045] 图 16 示出一种测试条的实施例。
[0046] 图 17 示出一种测试条的实施例。
[0047] 图 18 示出一种测试条的实施例。
[0048] 图 19 示出一种测试条的实施例。

具体实施方式

[0049] 在本申请中，“一”和“一个 / 一种”用于指单个和多个对象。

[0050] 如在本文中所使用的，“底部组件”是指固体材料，其为测试条（带）提供支撑和结合。该支撑物可以由一已被切成大小适于包括全部的测定内容物而给用户提供方便的薄玻璃片、纸片或塑料片组成。

[0051] 如在本文中所使用的，“干的多孔载体”或“芯吸膜”是指一种多孔的足以允许液体迁移（移动）并接近过滤元件的物质。通常用于干的多孔载体的材料包括但不限于：尼龙、纤维素、聚砜、聚偏二乙烯二氟化物、纤维素乙酸酯、聚氨酯、玻璃纤维以及硝化纤维。

[0052] 如在本文中所使用的，“过滤器”可以由任何数量的过滤材料制成。通常使用的过滤材料可以包括但不限于：纤维素、聚酯、聚氨酯、尼龙和玻璃纤维。这种过滤区域可以包括贮藏带（垫）和吸收带（垫）。

[0053] 如在本文中所使用的，“荧光稀土螯合物”可以是在 U. S. 专利第 4, 259, 313 和 4, 283, 382 号中所描述的，将上述专利的全部内容结合于此作为参考。因此，本发明描述了使用长寿命荧光组合物的方法，该组合物是通过将稀土金属的螯合物（优选是镧和铽）结合到聚合物基质（诸如胶乳粒子）中而制备的。该螯合剂强烈地吸收光，并有效地将能量传递给金属。该胶乳结构给予荧光稀土螯合物水稳定性，该荧光稀土螯合物以前在含水液体中已遭受淬灭。然后将衍生自该胶乳并具有结合在胶乳中的稀土螯合物的聚合珠用作荧光标记物，以便通过将抗原、抗体、植物凝集素、碳水化合物或其它这类蛋白质化合物、脂质和核酸吸收或共价连接到聚合胶乳珠的表面而形成标记试剂。

[0054] 如在本文中所使用的，“注入（的）”是指被结合到测定系统中的试剂，其中将它们干燥或冻干到测定系统上去。

[0055] 如在本文中所使用的，“聚合物粒子”是指各种尺寸的球形或接近球形的聚合物粒子。优选地，大小为直径大约在 0.05–0.5 μm 之间。然而，应该明白本发明不局限于使用任何特定类型的聚合物粒子。在它最广泛的意义上，任何可以封装荧光染料的物质或粒子都本发明所涵盖。

[0056] 如在本文中所使用的，“特定（特异性）连接试剂”或“特定（特异性）连接剂”或“特定（特异性）连接配偶体”包括但不限于：抗体、抗原、半抗原、半抗原 – 大分子（例如牛血清白蛋白）结合物、抗生物素蛋白、链霉抗生物素（蛋白）、生物素、生物素 – 大分子（例如牛血清白蛋白）结合物、低聚核苷酸、肽核酸以及核酸基因物质。

[0057] 如在本文中所使用的,“标记物”是指一种被标记到特定连接试剂上的物质,它被标记有时间分辨的荧光染料。该标记物特异性地与固定在固相上的特定连接剂反应。特别是,当固定在固相上的特定连接剂是抗生物素蛋白或链霉抗生物素(蛋白)时,该标记物可以是生物素。当固定在固相上的特定连接剂是对标记物的半抗原有特异性的抗体时,该标记物可以是半抗原。

[0058] 如在本文中所使用的,“时间分辨的荧光计”是指一种使用设备,该设备用于测量荧光强度在短激发脉冲之后的时间相关性,激发脉冲也可以被制成发射波长的函数。

[0059] 层析放大

[0060] 在一个方面,本发明涉及一种适于快速层析测试的装置。

[0061] 本发明的测试可以在现场由一个具有最简单培训的外行实施,在给一次性测试装置(设备)或测试卡或测试条加入一两滴样品之后可以快速得到结果。结果可以目视读取而不需任何进一步的干预。在本发明的一个方面,所建议的测试的步骤可以如下:仅出于讨论的目的,测试可以根据抗原/抗体反应来讨论。然而,应该明白,该测定(测试)不局限于抗原/抗体复合物。对于任何感兴趣的分子(其特定连接配偶体是已知的),可以将特定连接剂用于和注入到装置中来对所感兴趣的分子的存在进行测定。这种所感兴趣的分子与它的特定连接配偶体可以包括但不局限于:抗原/抗体、配体/受体、核酸/核酸、核酸/抗体、脂质/特定连接配偶体(诸如抗体)、碳水化合物/特定的连接配偶体(诸如抗体)等。仅出于举例说明的目的,在下面的讨论中,主要讨论抗原/抗体以及核酸/核酸的相互作用,应该理解,使用特定连接配偶体的原理适用于来自任何样品源的任何类型的分子。

[0062] 将液态样品加入到该测试设备或测试卡或测试条中。当该液体由毛细作用传送(芯吸)/移动经过该卡时,目标抗原与嵌入染料带(垫)中的经标记的特定抗体发生反应。该材料流入膜中,其中一组未经标记的抗体被固定在至少一个不同的区域或多个区域内。被抗原标记的抗体复合物被保留/俘获,从而产生用于读取的经限定的线条。该线条可以由装配有时间分辨荧光计或任何其它合适的检测机器的读取器检测到。在分隔开的对照区域,该测试中被过量标记的抗体与嵌入的非特异性抗体发生反应,以便能为关键测试元件正常发挥作用提供保证,由此将其用作阳性对照。该测试的非限制性原理在图1中进一步示出。

[0063] 将液态样品加入到测试设备或测试卡或测试条(带)中。当该液体芯吸/移动经过该测试卡时,目标抗原与嵌入染料带中的经标记的特定抗体发生反应。该材料流入膜中,其中一组未经标记抗体被固定在至少一个不同的区域或多个区域中。被抗原标记的抗体复合物被保留/俘获,从而产生用于读取的经限定的线条。该线条可以由装配有时间分辨荧光计或任何其它合适的检测机器的读取器检测到。

[0064] 具有横流式测定的层析测定,例如,是一种放大系统。该液体样品中的目标抗原在利用毛细管吸力移动通过膜时被固定在膜上的高亲和力的抗体稳定地集中。其结果是,即使该抗原可能在实际样品中处于非常低的浓度,但在测试线条或测试区中所俘获的抗原的浓度比该样品中的浓度高得多。此外,毛细管迁移也连续地将目标抗原提供给经固定的抗体。

[0065] 通常,当该俘获抗体与抗原如在常规的测定中那样形成一种复合物时,围绕着固定在固相上的俘获抗体的微环境抗原的浓度降低。一般而言,这种围绕着固定在固相上

的抗体的抗原的耗减是测定灵敏性,特别是微型板测定和基于芯片的测定中的主要问题之一,因为这导致了围绕抗体的抗原浓度的实际降低。

[0066] 在一可选的实施例中,吸水性强的膜(例如硝化纤维)的三维结构为抗体连接到固相提供了更多的表面区域。这使得层析(色谱)测定比其它二维测定系统(例如微型板测定)具有更大的俘获容量。

[0067] 本发明还涉及多种分析物检测系统,它仅利用单一抽样来实现,并且本发明的层析测定不需要进一步的程序步骤。如果将各种抗体-染料结合物嵌入到染料带区域中并且将对每一种抗原特异性的抗体分别固定在膜上不同的区域,那么每一测试线条提供针对每一特定抗原和特定试剂的不同信息(图2)。还可以预期该装置可以检测多于一种类型的分析物。例如,作为实施例,参照图2,可以给测试区1注入以抗体来检测抗原;可以给测试区2注入以受体来检测配体;并且可以给测试区3注入以对于序列特定连接的核酸。

[0068] 在一个方面,本发明涉及一种使用单一粒子中包含大约30,000-1,000,000个镧原子的荧光镧粒子的信号放大系统。该系统可以是一种改进的层析测定,具有如下的优点,诸如:1)简单的测试步骤;2)可现场使用;3)使用稳定的试剂;4)不需要专门的存储器;以及5)快速的结果。经放大的信号可以由提供定量或定性结果的小的便携式读取器检测到。

[0069] 测试条可以封装在一容器内,该容器优选是一种可展开的塑料盒,但是也可以由任何物质制成并能够安全容纳内容物。测试盒可以包括多个窗口,优选至少有两个窗口或开口,至少一个用来查看对照线和/或测试线或测试带,另一个提供一槽(孔)来接收样品(图3)。参照图4,在该装置内部可以是一个优选具有两个带(垫)的测试带。第一带(垫),储存区1或样品槽,可以用于样品的接收和从样品中去除干扰物质。另外,第一带(垫)可以在特别设计的缓冲系统中包含镧粒子-特定连接配偶体结合物3。注入到储存区的经标记的特定连接试剂可以连接样品中的分析物,随后分析物/特定连接配偶体复合物通过毛细作用被传送通过芯吸膜6,直到形成测试带4,其中该分析物的另一特异性连接剂俘获该分析物/特定连接配偶体复合物,由此形成一测试带。该样品进一步通过毛细作用被传送并使连接配偶体与注入到芯吸膜的特定连接配偶体相遇,并形成了对照带5。第二带(垫)7为吸收带(垫),可以用于除去已通过该反应膜的过量液体。将第一带、第二带以及芯吸膜连接到塑料板2上。

[0070] 可以将两种类型的试剂分别固定在膜上作为细线条或细带。可以将对该(共轭)结合的抗体具有特异性的抗体固定在对照窗口,而将对分析物(诸如生物威胁剂(biothreat agent)或任何想要被检测到的试剂)具有特异性的抗体固定在检测窗口中(图3和4)。

[0071] 层析测定原理

[0072] 本发明的检测试剂盒被设计成一种自我实施的装置。如图1所示,它可以包含所有精确数量的试剂和成分,用来在加入样品后产生检测结果。该样品首先通过包含各种材料的储存垫。它可以包含:(a)缓冲液,用以优化样品的pH值,(a)去污剂,用以悬浮样品中的所有成分,以及(a)多孔过滤器,用以生成合适的通过装置的流量。该样品随后通过毛细管作用或扩散流动到染料区或染料带,在那里检测试剂与经标记的特定连接剂发生反应,经标记的特定连接剂优选被对试剂具有特异性的镧粒子标记物标记。反应复合物然后迁移通过芯吸膜,在那里试剂中未反应的连接部位(位点)与经固定的特定连接剂发生反应,并

在检测窗口中生成一线条或条带。耗损的样品和未结合的染料复合物的剩余物继续迁移到对照窗口,在那里对该结合抗体由特异性抗体被固定,以便保留染料复合物并形成对照线条。也可以预期,反应复合物可以在到达检测区域之前遇到对照区域。

[0073] 在本发明的一个方面,其结果是一种用于定性或定量检测生物试剂的固相层析测定。在检测步骤中,可以将大约 60 μ L 的液体样品添加到样品施加区,并且可以由仪器在大约 15 分钟左右提供结果。应该明白,虽然测定的快速性是本发明的系统的一个优点,但获得结果的确切时间可能根据条带和样品的不同而变化。因此,本发明不受任何特定的测定时间的限制。

[0074] 实施例 1

[0075] 在一个检测装置的实施例中,该装置包括以下特征:

[0076] 至少一个过滤元件 1,已经被注入一种或多种特定连接试剂,该特定连接试剂用包括被结合到聚合物粒子 3 中的荧光稀土螯合物的荧光标记物所标记;以及

[0077] 干的多孔载体 6(例如硝化纤维),其是多孔的,足以使液体迁移并接近过滤元件,其中

[0078] 至少一种特定连接试剂被固定在至少一个干的多孔载体区域(图 10)。

[0079] 实施例 2

[0080] 在另一检测装置的实施例中,该装置包括以下特征:

[0081] 至少一个第一过滤元件 1,已经被注入一种或多种特定连接试剂,该特定连接试剂用包括被结合到聚合物粒子 3 中的荧光稀土螯合物的荧光标记物所标记;

[0082] 至少一个第二过滤元件 11,插入到第一过滤元件和干的多孔载体之间,并且其多孔性足以使液体迁移;以及

[0083] 干的多孔载体 6(例如硝化纤维膜),其是多孔的,足以使液体迁移并接近第二过滤元件,其中

[0084] 至少一种特定连接试剂被固定在至少一个干的多孔载体区域(图 11)。

[0085] 实施例 3

[0086] 在另一检测装置的实施例中,该装置包括以下特征:

[0087] 至少一个第一过滤元件 1,其插入到第二过滤元件 11 和干的多孔载体 6 之间、其是多孔的足以使液体迁移,并且已经被注入一种或多种特定连接试剂,该特定连接试剂用包括被结合到聚合物粒子 3 中的荧光稀土螯合物的荧光标记物所标记;

[0088] 至少一个第二过滤元件 11,接近第一过滤元件 1,并且其是多孔的,足以使液体迁移;以及

[0089] 干的多孔载体 6(例如硝化纤维膜),其是多孔的,足以使液体迁移并接近第一过滤元件,其中

[0090] 至少一种特定连接试剂被固定在至少一个干的多孔载体区域(图 12)。

[0091] 实施例 4

[0092] 在另一检测装置的实施例中,该装置包括以下特征:

[0093] 底部组件 2;

[0094] 设置在底部组件 2 上的排列,该排列包括:

[0095] 至少一个过滤元件 1,已经被注入一种或多种特定连接试剂,该特定连接试剂用包

括被结合到聚合物粒子 3 中的荧光稀土螯合物的荧光标记物所标记 ; 以及

[0096] 干的多孔载体 6 (例如硝化纤维膜), 其是多孔的足以使液体迁移并接近过滤元件, 其中

[0097] 至少一种特定连接试剂被固定在至少一个干的多孔载体区 (图 13)。

[0098] 实施例 5

[0099] 在另一检测装置的实施例中, 该装置包括以下特征 :

[0100] 底部组件 2 ;

[0101] 设置在底部组件 2 上的排列, 该排列包括 :

[0102] 至少一个过滤元件 1, 已经被注入一种或多种特定连接试剂, 该特定连接试剂用包括被结合到聚合物粒子 3 中的荧光稀土螯合物的荧光标记物所标记 ;

[0103] 至少一个第二过滤元件 11, 其被插入到第一过滤元件 1 和干的多孔载体 6 之间, 并且其是多孔的, 足以允许液体移动 ; 以及

[0104] 干的多孔载体 6 (例如硝化纤维膜), 其是多孔的, 足以允许液体移动并接近第二过滤元件, 其中

[0105] 至少一种特异性连接试剂被固定在至少一个干的多孔载体区域 (图 14)。

[0106] 实施例 6

[0107] 在另一检测装置的实施例中, 该装置包括以下特征 :

[0108] 底部组件 2 ;

[0109] 布置在底部组件 2 上的排列, 该排列包括 :

[0110] 至少一个第一过滤元件 1, 其被插入到第二过滤元件 11 和干的多孔载体之间、其是多孔的足以允许液体移动, 并且已经被注入一种或多种特定连接试剂, 该特定连接试剂用包括被结合到聚合物粒子 3 中的荧光稀土螯合物的荧光标记物所标记 ;

[0111] 至少一个第二过滤元件 11, 其接近第一过滤元件 1, 并且是多孔的, 足以允许液体移动 ; 以及

[0112] 干的多孔载体 6 (例如硝化纤维膜), 其是多孔的, 足以允许液体迁移并接近第一过滤元件 1, 其中

[0113] 至少一种特定的连接试剂被固定在至少一个干的多孔载体区 (图 15)。

[0114] 实施例 7

[0115] 在另一检测装置的实施例中, 该装置包括以下特征 :

[0116] 底部组件 2 ;

[0117] 布置在底部组件 2 上的排列, 该排列包括 :

[0118] 至少一个过滤元件 1, 已经被注入一种或多种特定连接试剂, 该特定连接试剂用包括被结合到聚合物粒子 3 中的荧光稀土螯合物的荧光标记物所标记 ;

[0119] 至少一个第二过滤元件 11, 其已经被注入一种或多种对固定在干的多孔载体 6 中的特定连接试剂有特异反应性的标记物所标记的特定连接试剂, 其被插入到第一过滤元件 1 和干的多孔载体 6 之间, 并且其是多孔的足以允许液体移动 ; 以及

[0120] 干的多孔载体 6 (例如硝化纤维膜), 其是多孔的, 足以允许液体迁移并接近第二过滤元件, 其中

[0121] 至少一种特定连接试剂被固定在至少一个干的多孔载体区域 (图 16)。

[0122] 实施例 8

[0123] 在另一检测装置的实施例中,该装置包括以下特征:

[0124] 至少一个第一过滤元件 1,其插入到第二过滤元件 11 和干的多孔载体之间,其是多孔的足以允许液体移动,并且已经被注入一种或多种特定连接试剂,该特定连接试剂用包括被结合到聚合物粒子 3 中的荧光稀土螯合物的荧光标记物所标记;

[0125] 至少一个第二过滤元件 11,其已经被注入一种或多种对固定在干的多孔载体 6 中的特定连接试剂有特异反应性的标记物所标记的特定连接试剂,其接近第一过滤元件 1,并且是多孔的,足以允许液体移动;以及

[0126] 干的多孔载体 6(例如硝化纤维膜),其是多孔的,足以允许液体移动并接近第一过滤元件,其中

[0127] 至少一种特定的连接试剂被固定在至少一个干的多孔载体区(图 17)。

[0128] 实施例 9

[0129] 在另一检测装置的实施例中,该装置包括以下特征:

[0130] 底部组件 2;

[0131] 布置在底部组件 2 上的排列,该排列包括:

[0132] 至少一个过滤元件 1,已经被注入一种或多种特定连接试剂,该特定连接试剂用包括被结合到聚合物粒子 3 中的荧光稀土螯合物的荧光标记物所标记;

[0133] 至少一个第二过滤元件 11,其已经被注入一种或多种对固定在干的多孔载体 6 中的特定连接试剂有特异反应性的标记物所标记的特定连接试剂,其被插入到第一过滤元件 1 和干的多孔载体 6 之间,并且其是多孔的足以允许液体移动;以及

[0134] 干的多孔载体 6(例如硝化纤维膜),其是多孔的,足以允许液体移动并接近第二过滤元件,其中

[0135] 至少一种特定的连接试剂被固定在至少一个干的多孔载体区(图 18)。

[0136] 实施例 10

[0137] 在另一检测装置的实施例中,该装置包括以下特征:

[0138] 底部组件 2;

[0139] 设置在底部组件 2 上的排布,该排布包括:

[0140] 至少一个第一过滤元件 1,其插入到第二过滤元件 11 和干的多孔载体之间,其是多孔的足以允许液体移动,并且已经被注入一种或多种特定连接试剂,该特定连接试剂用包括被结合到聚合物粒子 3 中的荧光稀土螯合物的荧光标记物所标记;

[0141] 至少一个第二过滤元件 11,其已经被注入一种或多种对固定在干的多孔载体 6 中的特定连接试剂有特异反应性的标记物所标记的特定连接试剂,其接近第一过滤元件 1,并且是多孔的,足以允许液体移动;以及

[0142] 干的多孔载体 6(例如硝化纤维膜),其是多孔的,足以允许液体移动并接近第一过滤元件 1,其中

[0143] 至少一种特定的连接试剂被固定在至少一个干的多孔载体区(图 19)。

[0144] 层状结构测定

[0145] 抗体-抗体层状结构

[0146] 固定在固相上的特定连接剂(特异性连接物):单克隆抗体和/或多克隆抗体。被

荧光染料标记的特定连接试剂 ;被荧光染料标记的单克隆抗体和 / 或多克隆抗体。

[0147] 抗体—抗原层状结构

[0148] 抗体—抗原层状结构 1

[0149] 被固定在固相上的特定连接剂 ;对样品中的分析物抗体有特异性的抗原 (例如与人的抗 -HIV-1gp41 抗体特异性反应的 HIV-1gp41 抗原)

[0150] 被荧光染料标记的特定连接试剂 ;被荧光染料标记的次要 (次级) 单克隆抗体和 / 或多克隆抗体。这种抗体对样品中的主要 (初级) 抗体有特异性。

[0151] 抗体—抗原层状结构 2

[0152] 被固定在固相上的特定连接剂 ;次要单克隆抗体和 / 或多克隆抗体。这种抗体对样品中的主要抗体有特异性。

[0153] 被荧光染料标记的特定连接试剂 ;抗原 (被荧光染料标记的) 对样品中的分析物抗体有特异性 (例如与人的抗 -HIV-1gp41 抗体特异性反应的 HIV-1gp41 抗原)

[0154] 抗原—抗原层状结构

[0155] 被固定在固相上的特定连接剂 ;对样品中的分析物抗体有特异性的抗原 (例如与人的抗 -HIV-1gp41 抗体特异性反应的 HIV-1gp41 抗原)

[0156] 被荧光染料标记的特定连接试剂 ;抗原 (被荧光染料标记的) 对样品中的分析物抗体有特异性 (例如与人的抗 -HIV-1gp41 抗体特异性反应的 HIV-1gp41 抗原)

[0157] 这种格式 (规格) 包括 :

[0158] 被固定在固相上的特定连接剂 (例如抗生物素蛋白或链霉抗生物素 (蛋白));被标记物 (例如生物素) 标记的特定连接试剂,其对被固定在固相上的特定连接剂进行特异性反应 ;被荧光染料标记的特定连接试剂。

[0159] 这种格式适用于上述的所有测定格式 ;将被固定在固相上的特定连接剂替换为被固定在固相上的特定的连接剂 (例如抗生物素蛋白或链霉抗生物素) 以及被标记物标记的特定连接试剂。

[0160] 竞争测定

[0161] 格式 (模式) 1

[0162] 被荧光染料标记的特定连接试剂 (例如对半抗原具有特异性的抗体) :能够连接到感兴趣的样品中的分析物,用以形成反应复合物 (螯合物) 。

[0163] 被固定在固相上的特定的连接剂 (例如半抗原) :能够与被荧光染料标记的游离的特定连接试剂反应,并且能够从反应复合物中竞争转移分析物,并与被荧光染料标记的特定连接试剂反应。

[0164] 格式 2

[0165] 被固定在固相上的特定的连接剂 (例如对半抗原有效的抗体) :能够竞争连接到感兴趣的样品中的分析物上或被荧光染料标记的特定连接试剂 (例如半抗原) 上。

[0166] 被荧光染料标记的特定连接剂 (例如半抗原) :能够与感兴趣的样品中的分析物竞争。

[0167] 格式 3

[0168] 该格式包括 :

[0169] 被固定在固相上的特定连接剂 (例如抗生物素蛋白或链霉抗生物素) ;被标记物

标记的特定连接试剂（例如生物素），其对被固定在固相上的特定连接剂特异性反应；被荧光染料标记的特定连接试剂（半抗原）。

[0170] 这种格式适用于上述的所有测定格式；将被固定在固相上的特定连接剂替换为被固定在固相上的特定的连接剂（例如抗生物素蛋白或链霉抗生物素）以及被标记物标记的特定连接试剂。

[0171] 多分析物的检测

[0172] 根据本发明的另一实施例，在多于一种的特定类型的被标记试剂和相同数目类型的被固定试剂的存在下，允许检测单一液体样品中的多个分析物。该装置可以单向提供多种被标记试剂，其通过过滤元件被注入并且多种相应的被固定的物质被限定在干的多孔载体上的若干测定标记区中。在双向或多向实施例中，多于一组元件，诸如过滤元件和干的多孔载体与共同的储存区相连。

[0173] 试剂盒和用于使用该试剂盒的说明书

[0174] 本发明包括一种用于使用本发明的检测装置的试剂盒。该试剂盒可以包括一由纸板、塑料或任何其它固体物或塑料包制成的容器，该容器可以容纳检测装置。试剂盒中可以包括关于如何使用该试剂盒的说明书。这种说明书可以写在容器上或以书面的形式诸如说明书纸页放入容器内。用于使用试剂盒和检测装置的说明书除了纸的形式也可以是在网站上的电子格式。说明书也可以被放入用于销售试剂盒的目录中。

[0175] 实施例

[0176] 实施例 1：使用铈整合纳米粒子制备肌钙蛋白 I 检测条带

[0177] 制备被覆盖的抗 - 肌钙蛋白 I 纳米粒子

[0178] 利用 10mmol/L 的 N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺和 100mmol/L 的 N-羧基硫代丁二酰亚胺将铈整合纳米粒子的羧基活化 30 分钟。利用 50mM MES pH 为 6.1 的缓冲液冲洗被活化的粒子一次。加入 20mM/L 的抗 - 肌钙蛋白 I 抗体。孵育 2 小时之后，用 pH 为 6.1 的 50mM MES 缓冲液冲洗抗体被覆盖的粒子三次。

[0179] 制备染料带（垫）

[0180] 通过将含有抗 - 肌钙蛋白 I 抗体被覆盖的纳米粒子、0.2% 的吐温 -20、0.25% 的牛血清白蛋白、0.5% 的蔗糖、10mM pH 为 7.5 的磷酸钠溶液注入到测定为 8mm×305mm 的玻璃纤维过滤器的矩形片中，并在冷冻干燥机中的恒定真空下干燥。将该染料带在干燥器中存储并保持干燥直至使用。

[0181] 制备过滤带（垫）

[0182] 利用 0.05% 的吐温 -20、2% 的蔗糖、1% 的 BSA 和 100mM pH 为 7.4 的磷酸钠溶液处理玻璃纤维过滤器，然后在室温下风干。

[0183] 将抗体固定在膜上

[0184] 将双面透明胶带（尺寸为 305mm×25mm）贴到距离薄塑料板（305mm×60mm）的底端 20mm 的位置。将硝化纤维膜切成 305mm×25mm 大小并直接贴到双面胶带的顶端。通过喷射 30 微升 pH 为 7.5 在 10mM PBS 中的 1mg/ml 山羊抗 - 肌钙蛋白 I 抗体溶液将用于肌钙蛋白 I 的经固定的检测线的测定标记区限定在距离膜底端 9mm 的位置。对于对照条带，通过喷射将 1mg/ml 的多克隆抗 - 小鼠 IgG 抗体限定在距离膜底端 13mm 的位置。喷射之后，将该膜在室温下干燥约 12 小时。底部和芯吸膜被储存在干燥器中直到进一步处理。

[0185] 条带结构

[0186] 将染料带连接到硝化纤维膜的底端正下方的塑料底部, 而将过滤带靠近染料带连接。然后将塑料板切成多个长 60mm 宽 4mm 的条带, 使得每一条带都包含线性排列的硝化纤维膜、染料带和过滤带。

[0187] 测定方法和结果:

[0188] 当将 70 微升样品添加到过滤带时, 当条带暴露于 UV 光时在孵育之后可检测信号开始出现在测定标记区。

[0189] 实施例 2: 使用胶体金制备肌钙蛋白 I 检测条带

[0190] 制备金溶胶

[0191] 使 1400ml 的去离子水煮沸。添加氢金酸 (hydroauric acid) (299 至 305mg), 持续沸腾 5 分钟。将溶解在 10ml 蒸馏水中的柠檬酸钠 (440mg) 倒进金溶液, 将该溶液再沸腾 10 分钟。将该溶液冷却到环境温度。

[0192] 制备标记物

[0193] 利用 40mM 的碳酸钾将金溶胶的 pH 调节到 6.8。将在实施例 1 中使用的同样的单克隆抗体添加到 50ml 的金溶液中, 该溶液在环境温度下被剧烈搅拌 30 分钟。添加 1ml 15% 的牛血清白蛋白, 随后将该溶液在环境温度下连续搅拌约 15 分钟。通过以下过程回收胶体金-单克隆抗体结合物: 在 GSA 旋转器中以 10,000rpm 的速率离心 1 小时, 弃去上层清液, 随后将得到的沉淀悬浮于在 10mM pH 为 7.5 的磷酸钠中的 25ml 的 2% 牛血清白蛋白中。然后将悬浮液在 GSA 旋转器中以 10,000rpm 的速率旋转 1 小时。再次将上层清液弃去, 而将沉淀悬浮于 6ml 在 10mM pH 为 7.5 的磷酸钠中的 2% 牛血清白蛋白中。

[0194] 制备染料带

[0195] 通过将含有抗-肌钙蛋白 I 抗体被覆盖的胶体金、0.2% 的吐温-20、0.25% 的牛血清白蛋白、0.5% 的蔗糖、10mM pH 为 7.5 的磷酸钠溶液注入到测定为 8mm×305mm 的玻璃纤维过滤器的矩形片中, 并在冷冻干燥机中的恒定真空下干燥。将该染料带在干燥器中存储并保持干燥直至使用。

[0196] 制备过滤带

[0197] 利用 0.05% 的吐温-20、2% 的蔗糖、1% 的 BSA 和 100mM pH 为 7.4 的磷酸钠溶液处理玻璃纤维过滤器, 然后在室温下风干。

[0198] 将抗体固定在膜上

[0199] 将双面透明胶带 (尺寸为 305mm×25mm) 贴到距离薄塑料板 (305mm×60mm) 的底端 20mm 的位置。将硝化纤维膜切成 305mm×25mm 大小并直接贴到双面胶带的顶端。通过喷射 30 微升 pH 为 7.5 在 10mM PBS 中的 1mg/ml 山羊抗-肌钙蛋白 I 抗体溶液将用于肌钙蛋白 I 的经固定的检测线的测定标记区限定在距离膜底端 9mm 的位置。对于对照条带, 通过喷射将 1mg/ml 的多克隆抗-小鼠 IgG 抗体限定在距离膜底端 13mm 的位置。喷射之后, 将该膜在室温下干燥约 12 小时。底部和芯吸膜被储存在干燥器中直到进一步处理。

[0200] 条带结构

[0201] 将染料带连接到硝化纤维膜的底端正下方的塑料底部, 而将过滤带靠近染料带连接。然后将塑料板切成多个长 60mm 宽 4mm 的条带, 使得每一条带都包含线性排列的硝化纤维膜、染料带和过滤带。

[0202] 测定方法和结果：

[0203] 当将 70 微升样品添加到过滤带时，在孵育之后可检测信号开始出现在测定标记区。

[0204] 实施例 3：利用每一方法制备的条带的灵敏度比较

[0205] 检测在实施例 1 中制备的条带和在实施例 2 中制备的条带，以便比较其灵敏度。实施例 1 中制备的条带显示出 0.025 纳克 / 毫升的灵敏度，而实施例 2 中制备的条带显示出 0.5 纳克 / 毫升的灵敏度。使用铈纳米粒子制备的条带显示出比使用胶体金制备的条带高大约 20 倍的灵敏度。

[0206] 实施例 4：使用铈纳米粒子制备 hCG 检测条带

[0207] 制备抗 -hCG 被覆盖的纳米粒子

[0208] 利用 10mmol/L 的 N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺和 100mmol/L 的 N-羧基硫代丁二酰亚胺将铈整合纳米粒子的羧基活化 30 分钟。利用 pH 为 6.1 的 50mM MES 缓冲液冲洗被活化的粒子一次。加入 20mM/L 的抗 -hCG 抗体。孵育 2 小时之后，用 pH 为 6.1 的 50mM MES 缓冲液冲洗抗体被覆盖的粒子三次。

[0209] 制备染料带

[0210] 通过将含有抗 -hCG 抗体被覆盖的纳米粒子、0.2% 的吐温 -20、0.25% 的牛血清白蛋白、0.5% 的蔗糖、10mM pH 为 7.5 的磷酸钠溶液注入到测定为 8mm×305mm 的玻璃纤维过滤器的矩形片中，并在冷冻干燥机中的恒定真空下干燥。将该染料带在干燥器中存储并保持干燥直至使用。

[0211] 制备过滤带

[0212] 利用 0.05% 的吐温 -20、2% 的蔗糖、1% 的 BSA 和 100mM pH 为 7.4 的磷酸钠溶液处理玻璃纤维过滤器，然后在室温下风干。

[0213] 将抗体固定在膜上

[0214] 将双面透明胶带（尺寸为 305mm×25mm）贴到距离薄塑料板（305mm×60mm）的底端 20mm 的位置。将硝化纤维膜切成 305mm×25mm 大小并直接贴到双面胶带的顶端。通过喷射 30 微升 pH 为 7.5 在 10mM PBS 中的 1mg/ml 单克隆抗 -hCG 抗体溶液将用于 hCG 的经固定的检测线的测定标记区限定在距离膜底端 9mm 的位置。对于对照条带，通过喷射将 1mg/ml 的多克隆抗 - 小鼠 IgG 抗体限定在距离膜底端 13mm 的位置。喷射之后，将该膜在室温下干燥约 12 小时。底部和芯吸膜被储存在干燥器中直到进一步处理。

[0215] 条带结构

[0216] 将染料带连接到硝化纤维膜的底端正下方的塑料底部，而将过滤带靠近染料带连接。然后将塑料板切成多个长 60mm 宽 4mm 的条带，使得每一条带都包含线性排列的硝化纤维膜、染料带和过滤带。

[0217] 测定方法和结果：

[0218] 当将 70 微升样品添加到过滤带时，当条带暴露于 UV 光时在孵育之后可检测信号开始出现在测定标记区。

[0219] 实施例 5：使用胶体金制备 hCG 检测条带

[0220] 制备金溶胶

[0221] 使 1400ml 的去离子水煮沸。添加氢金酸 (hydroauric acid) (299 至 305mg)，持

续沸腾 5 分钟。将溶解在 10ml 蒸馏水中的柠檬酸钠 (440mg) 倒进金溶液,将该溶液再沸腾 10 分钟。将该溶液冷却到环境温度。

[0222] 制备标记物

[0223] 利用 40mM 的碳酸钾将金溶胶的 pH 调节到 6.8。将在实施例 4 中使用的同样的单克隆抗体添加到 50ml 的金溶液中,该溶液在环境温度下被剧烈搅拌 30 分钟。添加 1ml 15% 的牛血清白蛋白,随后将该溶液在环境温度下连续搅拌约 15 分钟。通过以下过程回收胶体金-单克隆抗体结合物:在 GSA 旋转器中以 10,000rpm 的速率离心 1 小时,弃去上层清液,随后将得到的沉淀悬浮于在 10mM pH 为 7.5 的磷酸钠中的 25ml 的 2% 牛血清白蛋白中。然后将悬浮液在 GSA 旋转器中以 10,000rpm 的速率旋转 1 小时。再次将上层清液弃去,而将沉淀悬浮于 6ml 在 10mM pH 为 7.5 的磷酸钠中的 2% 牛血清白蛋白中。

[0224] 制备染料带

[0225] 通过将含有抗-hCG 抗体被覆盖的胶体金、0.2% 的吐温-20、0.25% 的牛血清白蛋白、0.5% 的蔗糖、10mM pH 为 7.5 的磷酸钠溶液注入到测定为 8mm×305mm 的玻璃纤维过滤器的矩形片中,并在冷冻干燥机中的恒定真空下干燥。将该染料带在干燥器中存储并保持干燥直至使用。

[0226] 制备过滤带

[0227] 利用 0.05% 的吐温-20、2% 的蔗糖、1% 的 BSA 和 100mM pH 为 7.4 的磷酸钠溶液处理玻璃纤维过滤器,然后在室温下风干。

[0228] 将抗体固定在膜上

[0229] 将双面透明胶带(尺寸为 305mm×25mm)贴到距离薄塑料板(305mm×60mm)的底端 20mm 的位置。将硝化纤维膜切成 305mm×25mm 大小并直接贴到双面胶带的顶端。通过喷射 30 微升 pH 为 7.5 在 10mM PBS 中的 1mg/ml 山羊抗-肌钙蛋白 I 抗体溶液将用于 hCG 的经固定的检测线的测定标记区限定在距离膜底端 9mm 的位置。对于对照条带,通过喷射将 1mg/ml 的多克隆抗-小鼠 IgG 抗体限定在距离膜底端 13mm 的位置。喷射之后,将该膜在室温下干燥约 12 小时。底部和芯吸膜被储存在干燥器中直到进一步处理。

[0230] 条带结构

[0231] 将染料带连接到硝化纤维膜的底端正下方的塑料底部,而将过滤带靠近染料带连接。然后将塑料板切成多个长 60mm 宽 4mm 的条带,使得每一条带都包含线性排列的硝化纤维膜、染料带和过滤带。

[0232] 测定方法和结果:

[0233] 当将 70 微升样品添加到过滤带时,在孵育之后可检测信号开始出现在测定标记区。

[0234] 实施例 6:利用每一方法制备的条带的灵敏度比较

[0235] 检测在实施例 4 中制备的条带和在实施例 5 中制备的条带,以便比较其灵敏度。实施例 4 中制备的条带显示出 1.5mIU/ml 的灵敏度,而实施例 5 中制备的条带显示出 15mIU/ml 的灵敏度。使用钨纳米粒子制备的条带显示出比使用胶体金制备的条带高大约 10 倍的灵敏度。

[0236] 实施例 7:利用钨整合纳米粒子制备登革热病毒检测条带

[0237] 制备低聚核苷酸被覆盖的纳米粒子

[0238] 利用 10mmol/L 的 N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺和 100mmol/L 的 N-羟基硫代丁二酰亚胺将铈整合纳米粒子的羧基活化 30 分钟。利用 pH 为 6.1 的 50mM MES 缓冲液冲洗被活化的粒子一次。加入 20mM/L 的具有载体诸如牛血清白蛋白的低聚核苷酸。孵育 2 小时之后,用 pH 为 6.1 的 50mM MES 缓冲液冲洗低聚核苷酸被覆盖的粒子三次。

[0239] 制备染料带

[0240] 通过将含有低聚核苷酸被覆盖的粒子、0.2%的吐温-20、0.25%的牛血清白蛋白、0.5%的蔗糖、10mM pH 为 7.5 的磷酸钠溶液注入到测定为 8mm×305mm 的玻璃纤维过滤器的矩形片中,并在冷冻干燥机中的恒定真空下干燥。将该染料带在干燥器中存储并保持干燥直至使用。

[0241] 制备过滤带

[0242] 利用 0.05%的吐温-20、2%的蔗糖、1%的 BSA 和 100mM pH 为 7.4 的磷酸钠溶液处理玻璃纤维过滤器,然后在室温下风干。

[0243] 将低聚核苷酸固定在膜上

[0244] 将双面透明胶带(尺寸为 305mm×25mm)贴到距离薄塑料板(305mm×60mm)的底端 20mm 的位置。将硝化纤维膜切成 305mm×25mm 大小并直接贴到双面胶带的顶端。通过喷射 30 微升 pH 为 7.5 在 10mM PBS 中的 1mg/ml 低聚核苷酸-BSA 结合物的溶液将用于对登革热病毒特异性的低聚核苷酸的经固定的检测线的测定标记区限定在距离膜底端 9mm 的位置。喷射之后,将该膜在室温下干燥约 12 小时。底部和芯吸膜被储存在干燥器中直到进一步处理。

[0245] 条带结构

[0246] 将染料带连接到硝化纤维膜的底端正下方的塑料底部,而将过滤带靠近染料带连接。然后将塑料板切成多个长 60mm 宽 4mm 的条带,使得每一条带都包含线性排列的硝化纤维膜、染料带和过滤带。

[0247] 测定方法和结果:

[0248] 当将 70 微升样品添加到过滤带时,当将条带暴露于 UV 光时,在孵育之后可检测信号开始出现在测定标记区。

[0249] 实施例 8:利用具有聚合酶链反应的铈整合纳米粒子制备登革热病毒检测条带

[0250] 制备链霉抗生物素被覆盖的纳米粒子

[0251] 利用 10mmol/L 的 N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺和 100mmol/L 的 N-羟基硫代丁二酰亚胺将铈整合纳米粒子的羧基活化 30 分钟。利用 pH 为 6.1 的 50mM MES 缓冲液冲洗被活化的粒子一次。加入 20mM/L 的链霉抗生物素。孵育 2 小时之后,用 pH 为 6.1 的 50mM MES 缓冲液冲洗链霉抗生物素被覆盖的粒子三次。

[0252] 制备染料带

[0253] 通过将含有链霉抗生物素被覆盖的粒子、0.2%的吐温-20、0.25%的牛血清白蛋白、0.5%的蔗糖、10mM pH 为 7.5 的磷酸钠溶液注入到测定为 8mm×305mm 的玻璃纤维过滤器的矩形片中,并在冷冻干燥机中的恒定真空下干燥。将该染料带在干燥器中存储并保持干燥直至使用。

[0254] 制备过滤带

[0255] 利用 0.05%的吐温-20、2%的蔗糖、1%的 BSA 和 100mM pH 为 7.4 的磷酸钠溶液

处理玻璃纤维过滤器,然后在室温下风干。

[0256] 将抗 - 半抗原的抗体固定在膜上

[0257] 将双面透明胶带 (尺寸为 305mm×25mm) 贴到距离薄塑料板 (305mm×60mm) 的底端 20mm 的位置。将硝化纤维膜切成 305mm×25mm 大小并直接贴到双面胶带的顶端。通过喷射 30 微升 pH 为 7.5 在 10mM PBS 中的 1mg/ml 链霉抗生物素低聚核苷酸 -BSA 共轭结合物的溶液将用于抗 - 半抗原的抗体的经固定的检测线的测定标记区限定在距离膜底端 9mm 的位置。喷射之后,将该膜在室温下干燥约 12 小时。底部和芯吸膜被储存在干燥器中直到进一步处理。

[0258] 条带结构

[0259] 将染料带连接到硝化纤维膜的底端正下方的塑料底部,而将过滤带靠近染料带连接。然后将塑料板切成多个长 60mm 宽 4mm 的条带,使得每一条带都包含线性排列的硝化纤维膜、染料带和过滤带。

[0260] 测定方法和结果 :

[0261] 当将 2 微升样品和 70 微升显影 (develop) 液添加到过滤带时,当将该条带暴露于 UV 光时,在孵育之后可检测信号开始出现在测定标记区。

[0262] 在本文中所引用的所有参考文献全部结合于此作为参考。

[0263] 本领域技术人员将认识到,或者仅利用常规实验即能够确认在本文中所特定描述的本发明的特定具体实施例的多种等价物。

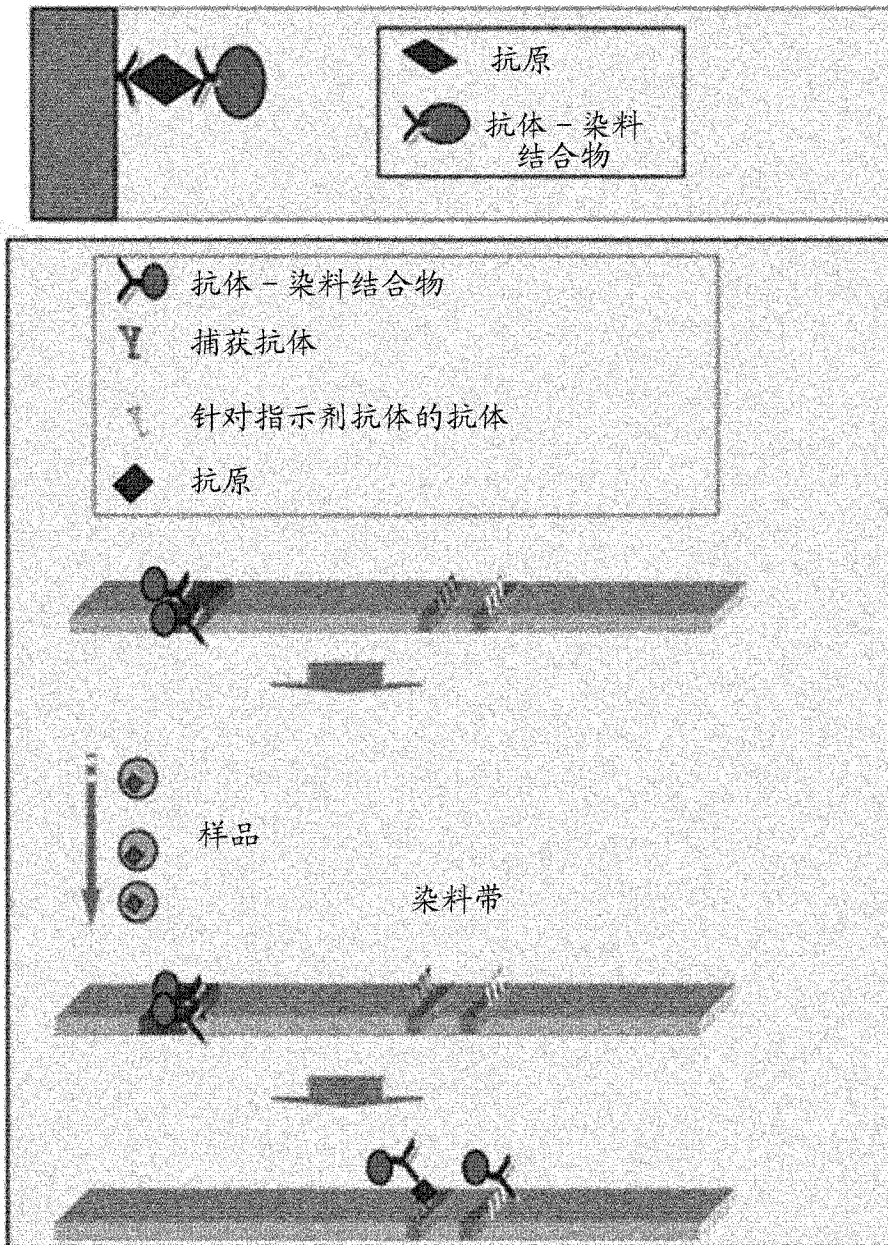


图 1

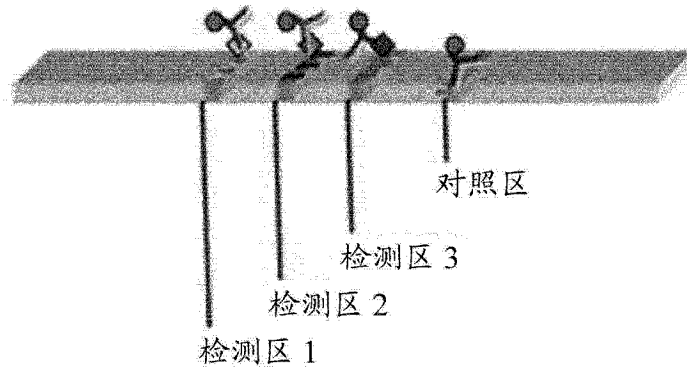


图 2

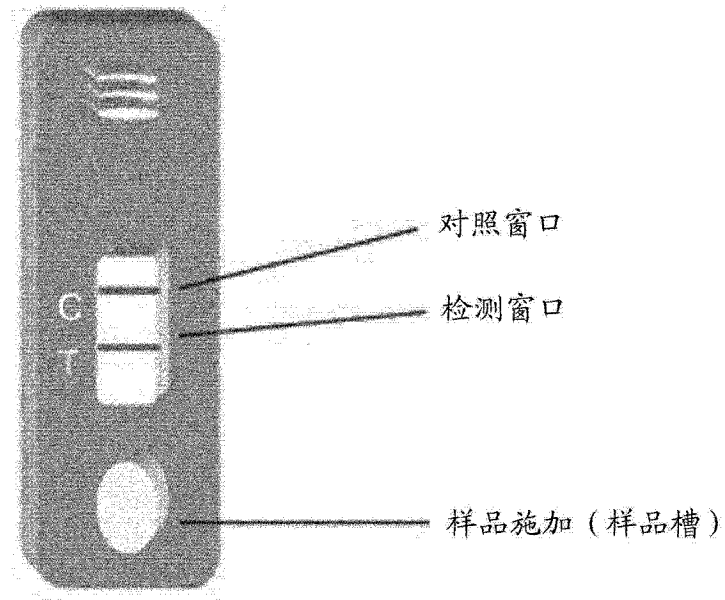


图 3

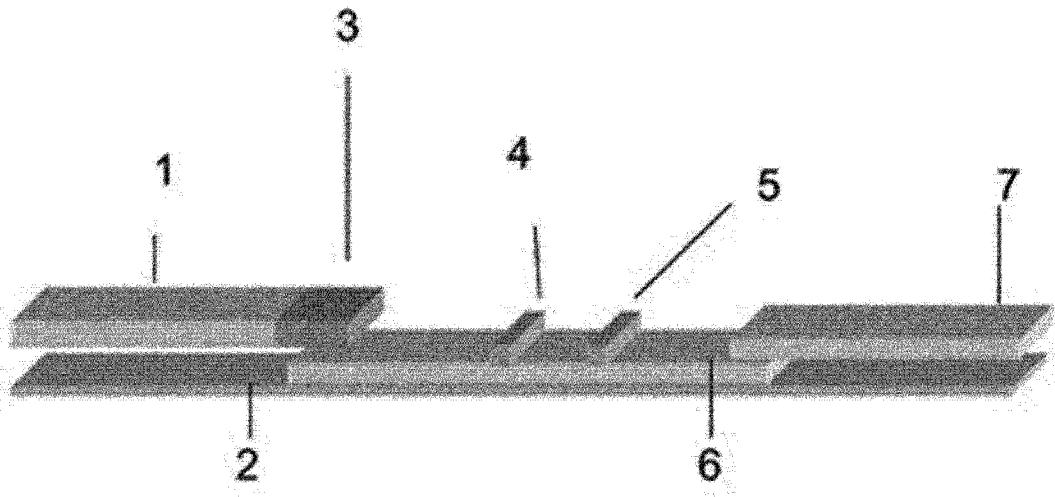


图 4

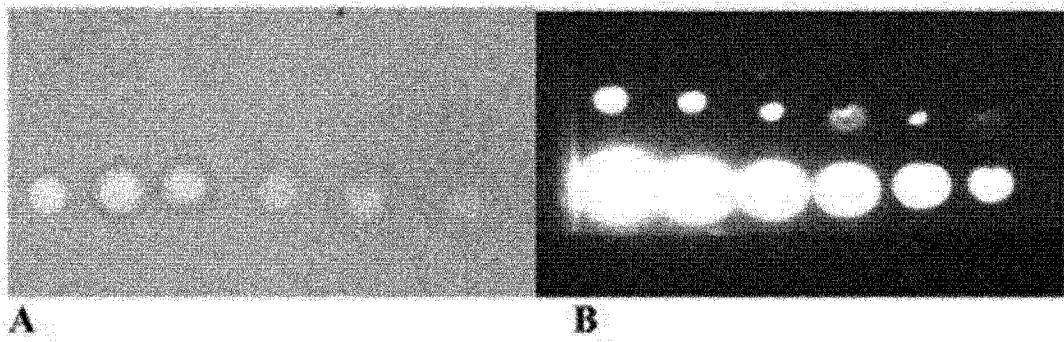


图 5

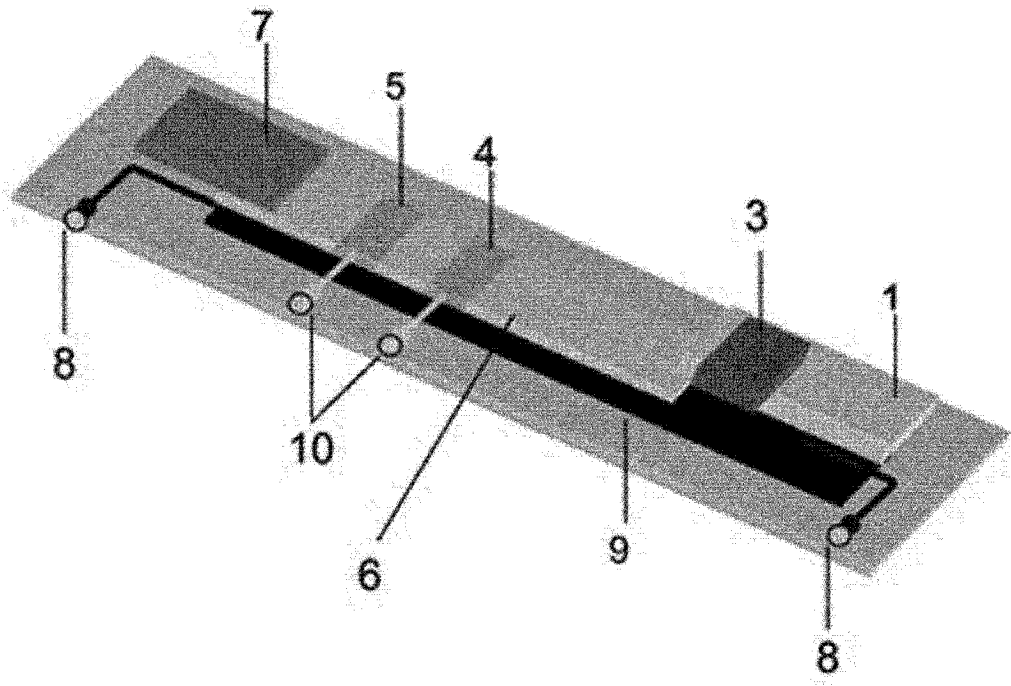


图 6

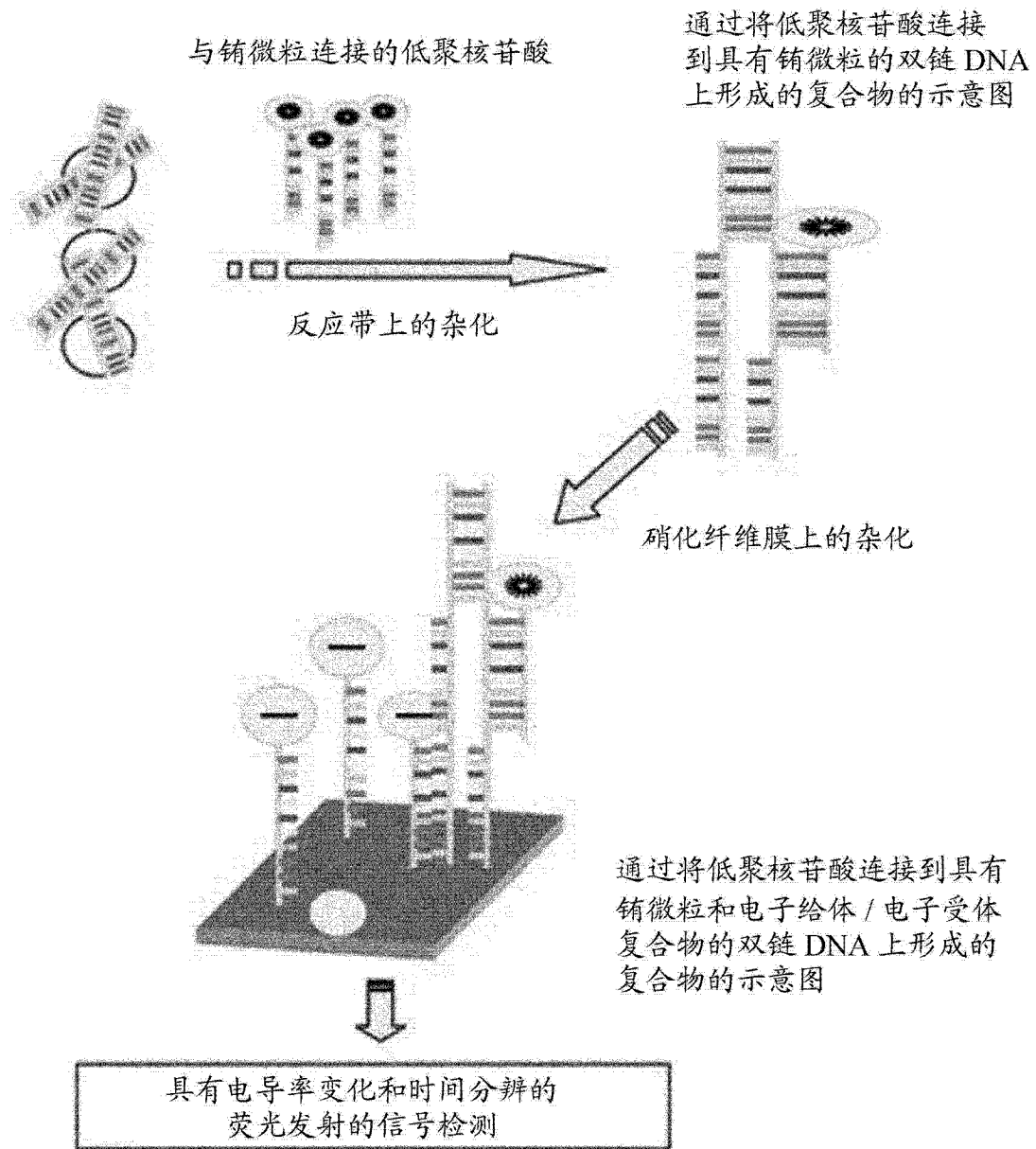


图 7

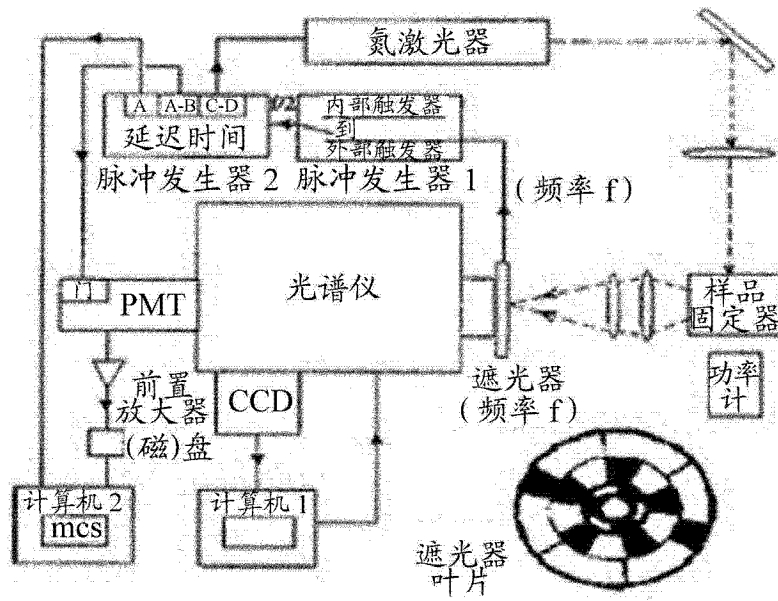


图 8

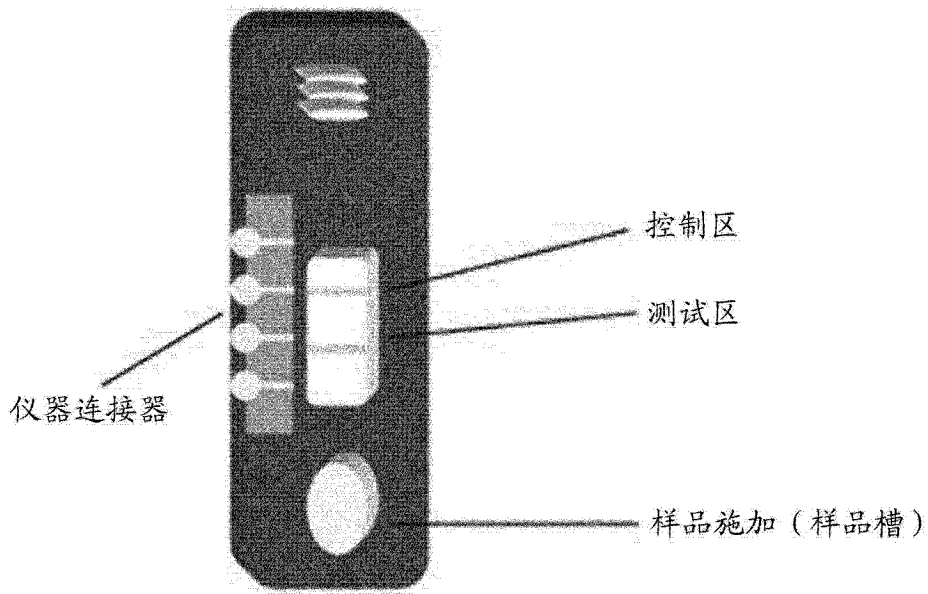


图 9

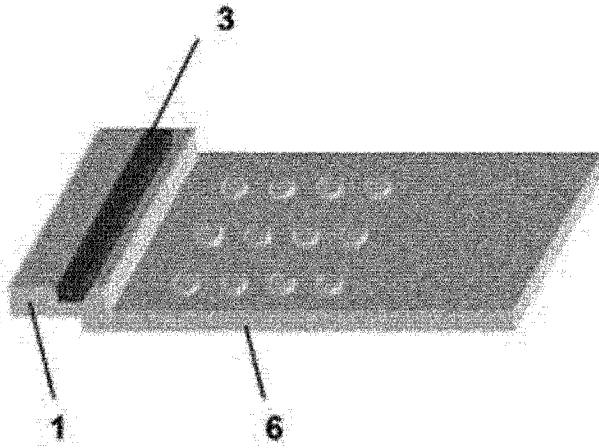


图 10

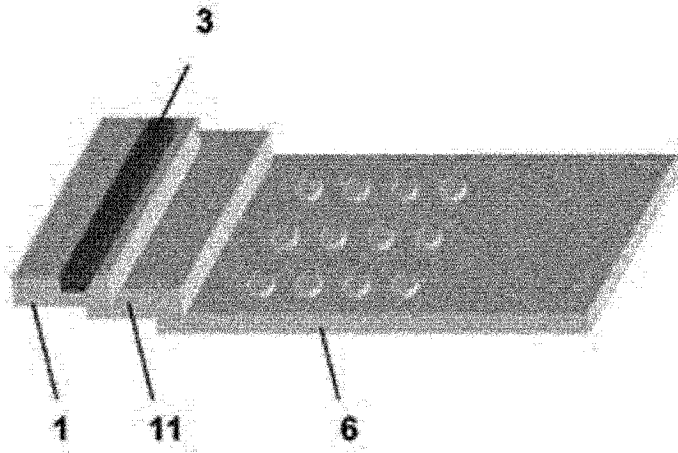


图 11

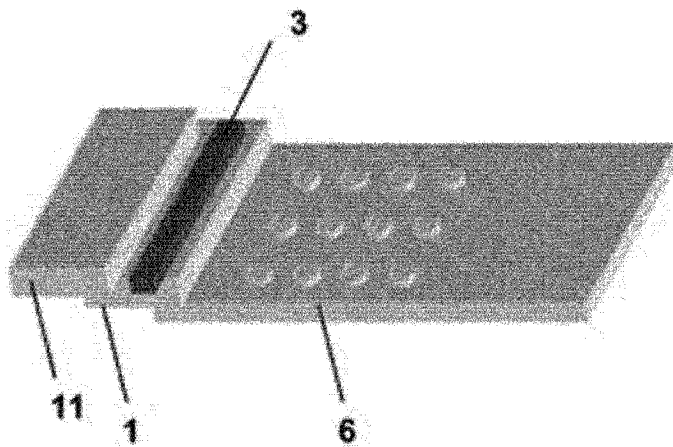


图 12

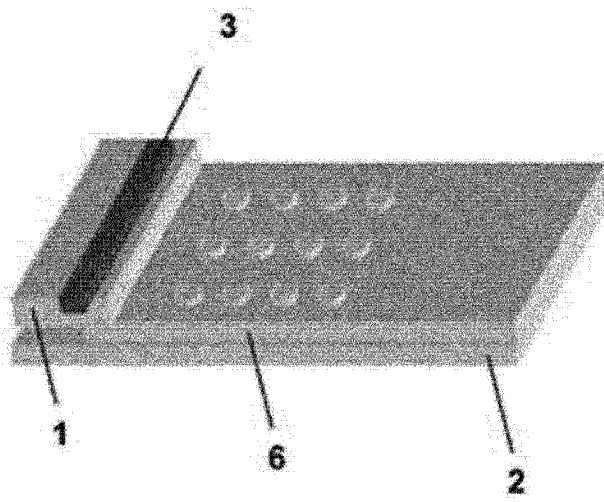


图 13

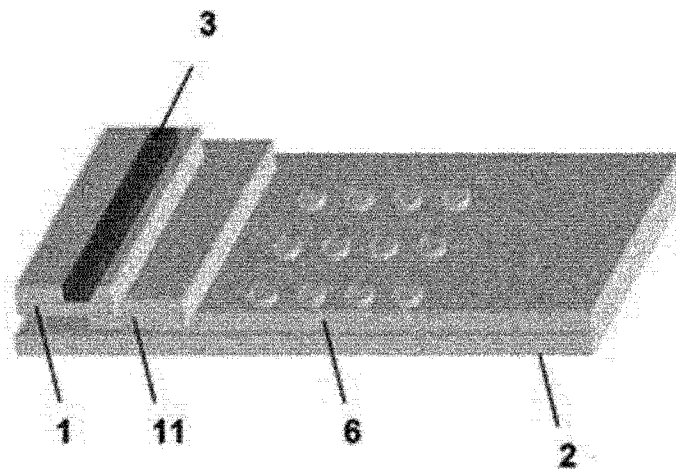


图 14

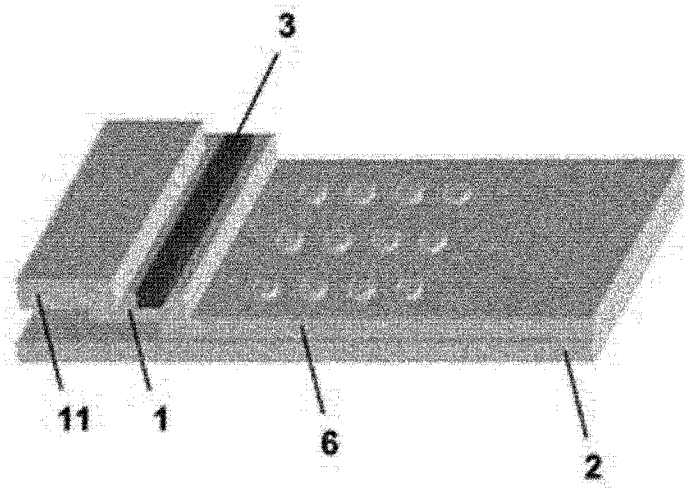


图 15

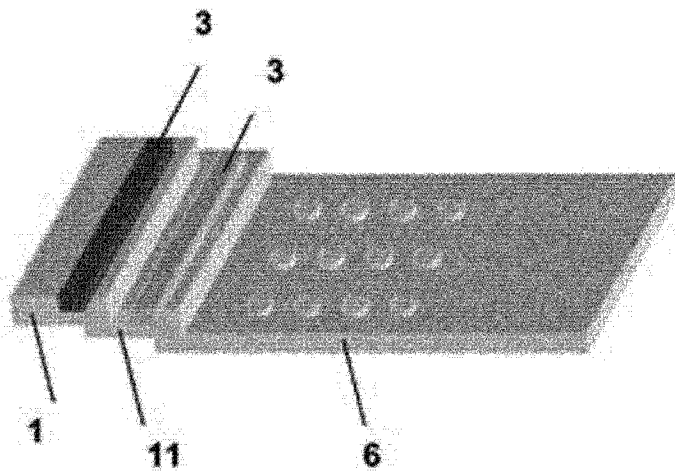


图 16

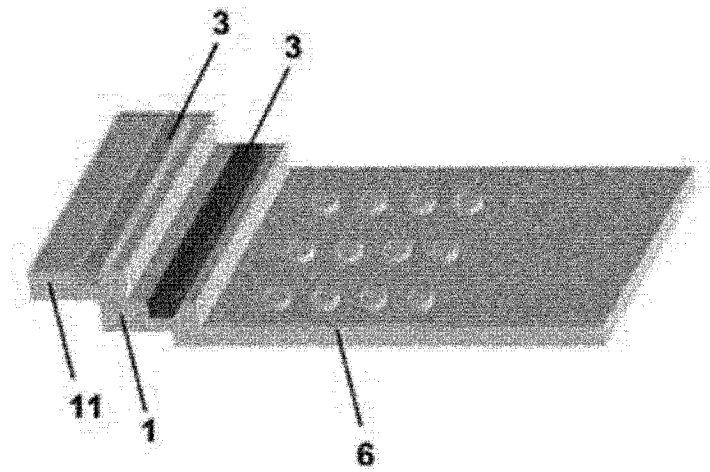


图 17

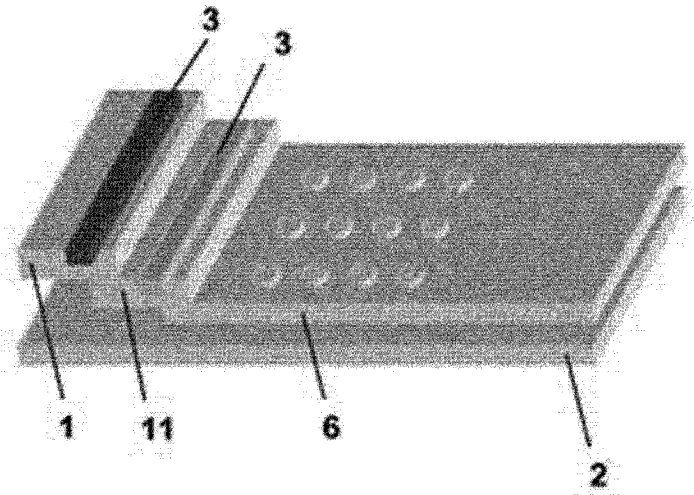


图 18

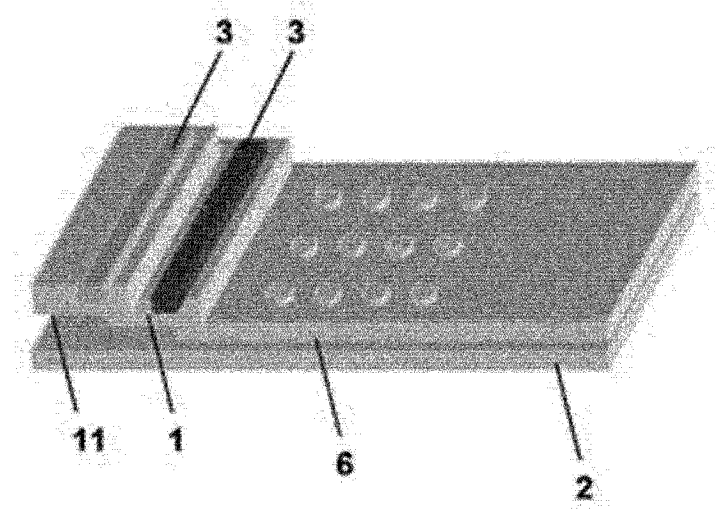


图 19

专利名称(译)	层析分析系统		
公开(公告)号	CN104076143A	公开(公告)日	2014-10-01
申请号	CN201410251375.5	申请日	2004-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	安克塞斯生物公司		
申请(专利权)人(译)	安克塞斯生物公司		
当前申请(专利权)人(译)	安克塞斯生物公司		
[标]发明人	崔永镛 郑宰安		
发明人	崔永镛 郑宰安		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533 C12N		
CPC分类号	G01N33/558 G01N21/8483 G01N33/54366 G01N33/533 G01N33/54306 G01N2458/40 Y10T436/143333		
代理人(译)	张英		
优先权	60/467717 2003-05-02 US		
其他公开文献	CN104076143B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及层析分析系统。本发明涉及一种横流式测定格式分析物检测装置，包括：至少一个第一过滤元件，包括至少一个储存区(1)，与至少一个第二过滤元件(11)接触，第二过滤元件连接至芯吸膜(6)，其中用包括钬(III)螯合物的粒子共价标记的对分析物特异性连接配偶体被注入在储存区(1)上，每个粒子具有约30,0000-1,000,000个钬(III)原子；俘获分析物/特异性连接配偶体复合物的至少一种特异性连接配偶体固定在芯吸膜(6)上；其特征在于第二过滤元件插入到第一过滤元件和芯吸膜(6)之间。

