

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103154735 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

(21) 申请号 201080028769.4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010.05.11

G01N 33/53(2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/538(2006.01)

61/177,272 2009.05.11 US

G01N 33/58(2006.01)

61/228,135 2009.07.23 US

C12Q 1/68(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.12.26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/034391 2010.05.11

(87) PCT申请的公布数据

W02010/132453 EN 2010.11.18

(71) 申请人 连接 DX 股份有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 R·L·伊根 G·P·利加德

D·D·布克 C·J·约翰逊

A·贝伦基 S·伍卡耶罗维驰

J·齐斯 S·卡斯塔南

(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 11038

代理人 罗菊华

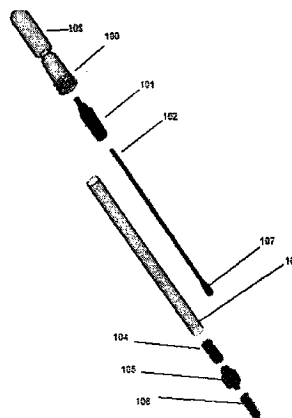
权利要求书4页 说明书67页 附图17页

(54) 发明名称

用于检测分析物的方法和组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于检测一种或多种分析物的方法和器械。分析物包括感染剂(例如致病性病毒)的试剂或组分,以及酶、蛋白质和生物标志。



1. 用于检测一种或多种分析物在样品中的存在、不存在或水平的系统,其包含:配置用于使患者样品与一种或多种免疫试剂混合以形成一种或多种可捕获和可检测的免疫复合物的样品收集装置;和包含用于捕获所述免疫复合物的横向流动膜的测试装置,其中所述样品收集装置和所述测试装置配置为形成气密密封和/或将所述样品通过分隔物释放到所述横向流动膜上。

2. 包含主体的样品收集装置,所述主体包含:

(a) 上部隔室,其包含上部密封区室和至少一个可破坏的密封,所述上部密封区室含有一种或多种溶液;

(b) 与所述上部隔室流体联系的样品收集器具;

(c) 与所述上部隔室流体联系的样品接受管,其中所述管包含刚性材料;其中当偶联在一起时,所述上部隔室和所述样品接受管配置为形成气密密封;

(d) 下部隔室,其与所述样品接受管流体联系,含有一种或多种试剂;和

(e) 其中所述试剂包含多个分析物结合组,其中每个组包含:

(i) 捕获探针,其包含:(1) 能够特异性结合靶分析物的结合部分,和(2) 捕获部分配偶体;和

(ii) 检测探针,其包含:(1) 能够特异性结合靶分析物的第二结合部分,和(2) 标记;和

(iii) 其中所述多个分析物结合组各自设计为结合不同的靶分析物。

3. 权利要求1的样品收集装置,其中所述捕获部分配偶体选自寡核苷酸、抗生物素蛋白、链霉亲和素、吡喃糖基 RNA (pRNA)、适体或其组合。

4. 权利要求2的样品收集装置,其中所述pRNA包含选自SEQ ID NO:120至SEQ ID NO:126的序列。

5. 权利要求1的样品收集装置,其中所述靶分析物是流感病毒或其组分。

6. 权利要求1的样品收集装置,其中所述提取溶液或所述试剂包含提取试剂。

7. 权利要求1的样品收集装置,其还包含网格膜,所述网格膜使所述下部隔室中的试剂与所述样品接受管的其余部分分离。

8. 权利要求7的样品收集装置,其中所述试剂还包含染料,所述染料能够指示所述样品与所述试剂的充分混合。

9. 权利要求1的样品收集用具,其中所述上部隔室包含至少2个亚隔室。

10. 权利要求9的样品收集装置,其中所述亚隔室各自含有溶液。

11. 权利要求1的样品收集装置,其中所述接触能够形成相对于环境压力的正压差异,所述正压差异能够从所述样品收集装置排出溶液。

12. 权利要求1的样品收集装置,其中所述下部隔室还包含当穿孔时能够释放溶液的分隔物。

13. 权利要求12的样品收集装置,其中所述分隔物包含氯丁橡胶。

14. 权利要求1的样品收集装置,其还包含存在于所述样品接受管上的第一和第二指示物,其中所述指示物提供在所述上部隔室和所述样品接受管之间的适当接触的指示。

15. 权利要求1的样品收集装置,其中所述样品收集器具与所述上部隔室附着。

16. 包含主体的测试装置,所述主体包含:

- (a) 所述主体中的横向流动膜；
- (b) 位于在所述隔室和所述横向流动膜之间存在的间隙的上游的隔室；
- (c) 一个或多个对照线路；和
- (d) 多个可寻址线路，每个线路包含捕获部分配偶体，其中所述捕获部分配偶体选自多个分子类别，并且任何 2 个邻近的可寻址线路包含不同类别的捕获部分配偶体。

17. 权利要求 15 的装置，其中所述多个可寻址线路中的至少一个包含含有 pRNA 的固定的捕获部分配偶体。

18. 权利要求 16 的装置，其中所述 pRNA 包含选自 SEQ ID NO :120-SEQ ID NO :126 的序列。

19. 权利要求 16 的装置，其中所述 pRNA 与锚定蛋白质连接。

20. 权利要求 18 的装置，其中所述锚定蛋白质是单克隆抗体或牛血清白蛋白。

21. 用于检测一种或多种靶分析物的方法，其包括：

(a) 从受试者中获得样品，并且在样品收集装置内混合所述样品，其中所述样品收集装置包含：

1. 上部隔室，其包含上部密封区室和至少一个可破坏的密封，所述上部密封区室含有一种或多种溶液；

2. 与所述上部隔室流体联系的样品收集器具；

3. 与所述上部隔室流体联系的样品接受管，其中所述管包含刚性材料；其中当偶联在一起时，所述上部隔室和样品接受管配置为形成气密密封；

4. 下部隔室，其与所述样品接受管流体联系，含有一种或多种试剂；和其中所述试剂包含多个分析物结合组，其中每个组包含：

a) 捕获探针，其包含：(1) 能够特异性结合靶分析物的结合部分，和 (2) 捕获部分配偶体；和

b) 检测探针，其包含：(1) 能够特异性结合靶分析物的第二结合部分，和 (2) 标记；和其中所述多个分析物结合组各自设计为结合不同的靶分析物；

(b) 破坏所述上部隔室的密封，以将一种或多种溶液释放到所述样品接受管内，从而释放来自所述样品收集器具的所述样品且使所述样品与所述试剂混合；

(c) 将 (b) 中形成的所述混合物应用于包含多个可寻址线路的测试条，其中所述可寻址线路各自包含固定的捕获部分配偶体，所述固定的捕获部分配偶体能够与 (a) (4) 中的不同的所述捕获探针结合，由此每个可寻址线路配置为结合不同的靶分析物；和

(d) 测定标记是否存在于一个或多个可寻址线路中；从而检测样品是否含有一种或多种靶分析物。

22. 权利要求 20 的方法，其中所述标记是铀。

23. 权利要求 20 的方法，其中所述一种或多种靶分析物是流感病毒或其组分。

24. 权利要求 20 的方法，其中所述可寻址线路中的至少一个包含选自 SEQ ID NO :120-SEQ ID NO :126 的 pRNA 序列。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述 pRNA 与锚定蛋白质缀合。

26. 权利要求 24 的方法，其中所述锚定蛋白质是单克隆抗体或牛血清白蛋白。

27. 权利要求 20 的方法，其中任何 2 个邻近的所述可寻址线路具有与之附着的不同类

别的固定的捕获部分结合配偶体。

28. 权利要求 26 的方法,其中所述不同类别的固定的捕获部分配偶体选自寡核苷酸、抗生物素蛋白、链霉亲和素、pRNA 和适体。

29. 检测样品中的一种或多种靶分析物的方法,其包括:将包含免疫复合物的样品应用于包含一个或多个可寻址线路的横向流动装置,其中所述一个或多个可寻址线路中的至少一个包含与之结合的 pRNA 捕获部分配偶体,并且其中所述 pRNA 选自 SEQ ID NO:120-SEQ ID NO:126。

30. 试剂盒,其包含:

(a) 包含吸水条的横向流动装置,所述吸水条包含 (i) 样品应用区带, (ii) 包含 2 个或更多个可寻址线路的多个检测区带,其中所述可寻址线路各自包含固定的试剂,其中至少 2 个邻近的所述可寻址线路包括选自 SEQ ID NO:120-SEQ ID NO:126 的不同的固定的 pRNA;

(b) 多个特异性结合试剂,其中所述试剂包含 2 个或更多个特异性结合对,其中所述对各自能够结合不同的靶分析物,并且其中每个对包含:

(1) 第一缀合物,其包含:(i) 能够特异性结合分析物的结合试剂,和 (ii) 能够特异性结合在所述可寻址线路之一上存在的固定的试剂的捕获试剂;和

(2) 第二缀合物,其包含:(i) 能够特异性结合 (b) (1) 的所述分析物的结合试剂和 (ii) 可检测的标记。

31. 用于检测一种或多种靶分析物的方法,其包括:

(a) 从受试者中获得样品,且将所述样品置于样品收集装置内;

(b) 释放一种或多种溶液,以使所述样品与所述溶液混合;

(c) 将 (b) 中形成的所述混合物应用于测试条;和

(d) 测定是否存在标记;

其中用于检测一种或多种靶分析物的所述方法的灵敏度是至少 70%。

32. 权利要求 30 的方法,其中所述样品收集装置包含:

1. 上部隔室,其包含上部密封区室和至少一个可破坏的密封,所述上部密封区室含有一种或多种溶液;

2. 与所述上部隔室流体联系的样品收集器具;

3. 与所述上部隔室流体联系的样品接受管,其中所述管包含刚性材料;其中当偶联在一起时,所述上部隔室和样品接受管配置为形成气密密封;

4. 下部隔室,其与所述样品接受管流体联系,含有一种或多种试剂;和其中所述试剂包含多个分析物结合组,其中每个组包含:

a) 捕获探针,其包含:(1) 能够特异性结合靶分析物的结合部分,和 (2) 捕获部分配偶体;和

b) 检测探针,其包含:(1) 能够特异性结合靶分析物的第二结合部分,和 (2) 标记;和其中所述多个分析物结合组各自设计为结合不同的靶分析物。

33. 权利要求 31 的方法,其在 (a) 后还包括这样的步骤,所述步骤包括,破坏所述上部隔室的密封,以将一种或多种溶液释放到所述样品接受管内,从而释放来自所述样品收集器具的所述样品且使所述样品与所述试剂混合。

34. 权利要求 32 的方法,其中所述测试条包含多个可寻址线路,其中所述可寻址线路

各自包含固定的捕获部分配偶体,所述固定的捕获部分配偶体能够与(a)(4)中的不同的所述捕获探针结合,由此每个可寻址线路配置为结合不同的靶分析物。

35. 权利要求 33 的方法,其中所述测定步骤包括,测定标记是否存在于一个或多个可寻址线路中。

36. 权利要求 30 的方法,其中所述灵敏度是至少 90%。

37. 用于检测一种或多种靶分析物的方法,其包括:

(a) 从受试者中获得样品,且将所述样品置于样品收集装置内;

(b) 释放一种或多种溶液,以使所述样品与所述溶液混合;

(c) 将(b)中形成的所述混合物应用于测试条;和

(d) 测定是否存在标记;

其中用于检测一种或多种靶分析物的所述方法的特异性是至少 70%。

38. 权利要求 36 的方法,其中所述样品收集装置包含:

1. 上部隔室,其包含上部密封区室和至少一个可破坏的密封,所述上部密封区室含有一种或多种溶液;

2. 与所述上部隔室流体联系的样品收集器具;

3. 与所述上部隔室流体联系的样品接受管,其中所述管包含刚性材料;其中当偶联在一起时,所述上部隔室和样品接受管配置为形成气密密封;

4. 下部隔室,其与所述样品接受管流体联系,含有一种或多种试剂;和其中所述试剂包含多个分析物结合组,其中每个组包含:

a) 捕获探针,其包含:(1) 能够特异性结合靶分析物的结合部分,和(2) 捕获部分配偶体;和

b) 检测探针,其包含:(1) 能够特异性结合靶分析物的第二结合部分,和(2) 标记;和其中所述多个分析物结合组各自设计为结合不同的靶分析物。

39. 权利要求 37 的方法,其在(a)后还包括这样的步骤,所述步骤包括,破坏所述上部隔室的密封,以将一种或多种溶液释放到所述样品接受管内,从而释放来自所述样品收集器具的所述样品且使所述样品与所述试剂混合。

40. 权利要求 38 的方法,其中所述测试条包含多个可寻址线路,其中所述可寻址线路各自包含固定的捕获部分配偶体,所述固定的捕获部分配偶体能够与(a)(4)中的不同的所述捕获探针结合,由此每个可寻址线路配置为结合不同的靶分析物。

41. 权利要求 39 的方法,其中所述测定步骤包括,测定标记是否存在于一个或多个可寻址线路中。

42. 权利要求 36 的方法,其中所述特异性是至少 90%。

43. 权利要求 30 的方法,其中用于检测一种或多种靶分析物的所述方法的特异性是至少 70%。

44. 权利要求 42 的方法,其中所述特异性是至少 90%。

## 用于检测分析物的方法和组合物

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求于 2009 年 5 月 11 日提交的美国临时申请 61/177, 272 和于 2009 年 7 月 23 日提交的美国临时申请 61/228, 135 的优先权, 所述美国临时申请各自在此通过引用合并入本文。

[0003] 关于政府支持的研究的声明

[0004] 本发明的部分在由疾病控制中心 (Center for Disease Control) 授予的合同号 200-2007-19345 下在美国政府的支持下。政府对于本发明的部分可拥有某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 本发明涉及用于样品 (例如得自受试者的生物学样品) 中的一种或多种分析物例如抗原的测定。特别地, 本发明涉及利用特异性靶向所选分析物的结合部分来检测一种或多种分析物的方法和装置。分析物可以是例如一种或多种感染剂。

[0007] 许多类型的测定已用于检测各种物质 (通常称为分析物或配体) 在身体样品中的存在。这些测定一般涉及抗原-抗体反应 (例如配体、抗配体、配体-受体), 并且可以利用包含放射性、酶促、荧光或可视觉观察的金属可溶性标签的合成的缀合物, 和用于观察结果的特别设计的反应器室。大多数目前的测试经设计用于进行定量测定, 但在许多情况下, 所需要的只是定性鉴定, 例如阳性/阴性指示。

[0008] 定性测定必须是非常灵敏的, 因为在测试流体中, 目的分析物的浓度通常较小。进一步地, 假阳性可以是麻烦的, 特别是对于凝集作用和其他快速检测法例如浸渍片和变色测试。已开发了使用金属可溶性标签或其他类型的有色粒子的夹心免疫测定和其他检测法。此类技术仍遭遇在经设计用于检测多个靶分析物的快速检测法中遇到的问题。此外, 随着高致病性试剂例如流感病毒的出现, 需要开发有效的实验室或及时现场护理系统 (Point of Care System), 其可以有效且精确地检测一种或多种感染剂, 包括感染剂的不同类型或亚型。

[0009] 例如, 流行性感冒通常可见于局部暴发流行或遍及全世界的流行中。流行可以在任何时间出现, 并且可以在很少的警告或无警告的情况下爆发地发生。受累人数可以从数百到数十万到数百万不等。流行可以是短期的, 持续数天或数周, 但较大的流行可以持续数月。尽管流行性感冒在大多数个体中通常很弱, 但它对于老人、非常年轻或虚弱的个体是危及生命的。然而, 流感的某些毒株例如 H1N1 和 H5 已显示即使在健康和年轻个体中也是致命的。因此, 需要开发有效检测病原体例如流行性感冒的一个或多个类型和亚型的装置和方法, 无论感染是由流行性感冒的一般或预期的亚型 (季节性流感) 还是由其可以是流行性或大范围流行性感冒的致病因子的亚型 (例如禽流感或猪流感) 引起。

[0010] 本发明的目的是, 提供用于检测生物学样品中的分析物的快速和灵敏的方法。另一个目的是, 提供具有高灵敏度和比常规测定更少的假阳性的测定。进一步目的是, 提供用于检测生物学样品中存在的低水平的分析物的器具或系统。另一个目的是, 提供测定系统, 其涉及最低限度数目的方法步骤, 且即使当由缺乏专门训练的人员使用时, 也获得可靠结果。

[0011] 本发明的一个目的是,提供用于测试感染剂的系统,其在数分钟内提供鉴定一种或多种感染剂的结果。

[0012] 进一步的目的是,提供其中在测试工具上的结果对于靶分析物而言同样特异和灵敏的系统,虽然结果可以在完成获得结果所需的反应后1到数小时读取。根据下述说明书、附图和权利要求,本发明的这些及其他目的和特征将是显而易见的。

[0013] 发明概述

[0014] 在本发明的一个方面,提供了样品收集装置,其配置为允许混合溶液中的样品,其中该溶液包含检测一种或多种靶分析物所需的试剂。样品收集装置可以配置为允许在样品收集装置的样品接受管组件和上部密封的隔室(chamber)组件之间气密密封,由此当样品收集装置与测试装置偶联时,接受管和上部密封的隔室能够压配(pressure-fit)在一起,提供帮助释放样品收集装置中含有的流体的正的反压(positive back pressure)。

[0015] 在另一个方面,本发明提供了包含横向流动膜、在横向流动方向的上游的包含流体的隔室的测试装置,其中所述隔室能够可控制地将流体释放到横向流动材料内。该装置包括含有一个或多个测试区带和一个或多个对照区的多个可寻址线路,和分配在每个可寻址线路中的多个捕获部分配偶体(partner)。在一个实施方案中,测试装置包括测试条。测试条包含至少2个邻近的可寻址的线路(其具有固定至其上的不同类别的捕获部分配偶体)。在一个实施方案中,每个可寻址线路经配置用于检测不同的靶分析物。

[0016] 在另一个方面,提供了用于检测一种或多种靶分析物的方法,其包括,使样品与试剂在样品收集装置中混合,以形成复合物,其中该复合物包含捕获探针、靶分析物和检测探针,并且其中该复合物通过存在于样品收集装置的远端的分隔物(split-septum)从样品收集装置释放到测试装置。允许复合物运行通过包含具有多个可寻址线路的测试条的测试装置,其中各个可寻址线路配置用于检测不同分析物,并且其中测试条的每个可寻址线路包含一个类型的固定的捕获部分配偶体的群体,其与样品收集装置中存在的捕获部分互补。在一个进一步的实施方案中,测试装置包含具有一个或多个对照线路的测试条。

[0017] 在另外一个方面,本发明提供了用于检测分析物的系统,其包含样品收集装置和测试装置。

[0018] 在另一个方面,本发明提供了试剂盒,其包含测试装置和多种特异性结合试剂。

[0019] 通过引用合并

[0020] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请通过引用合并入本文,其程度就如同每个单独的出版物或专利申请被明确并且单独地指出通过引用合并。

[0021] 附图简述

[0022] 本发明的新特征在附加的权利要求中进行阐述。通过参考下列发明详述和附图将能够更好地理解这些特征和优点,所述发明详述阐述了利用本发明的原理的示例性实施方案,并且在所述附图中:

[0023] 图1举例说明了样品收集装置。

[0024] 图2举例说明了样品收集装置:2A举例说明了样品收集装置,其显示上部隔室和取样部件的放大视图,2B举例说明了取样部件。

[0025] 图3举例说明了分解的样品收集装置的一个实施方案。

[0026] 图4举例说明了样品收集装置的一个实施方案。

- [0027] 图 5A-C 举例说明了样品收集装置上的部件指示物。
- [0028] 图 6 举例说明了样品收集装置上的分隔物。
- [0029] 图 7 举例说明了样品收集装置的出口区的示意图。
- [0030] 图 8 举例说明了样品收集装置的出口区的分配尖端的示意图。
- [0031] 图 9 举例说明了样品收集装置的出口区的示意图。
- [0032] 图 10 举例说明了在样品收集装置的出口区和测试装置的端口之间的界面的示意图。
- [0033] 图 11 举例说明了与测试装置偶联的示例性样品收集装置。
- [0034] 图 12 举例说明了包括样品收集装置和测试装置的诊断测试系统的一个实施方案。
- [0035] 图 13 举例说明了测试装置。
- [0036] 图 14 举例说明了测试装置的示意图,所述测试装置包含用于接受样品收集装置的分隔物的插管。
- [0037] 图 15 描述了测试装置的放大的示意图,所述测试装置具有用于接受样品收集装置的分隔物的插管。
- [0038] 图 16 举例说明了测试装置。
- [0039] 图 17 举例说明了测试装置的示意图。
- [0040] 图 18 举例说明了测试条上的多个分析物的 pRNA 结合的示意图。
- [0041] 图 19 举例说明了横向流动测试。
- [0042] 图 20 举例说明了与 12- 碳间隔子 (spacer) 连接的锚定分子苯二异硫氰酸酯 (PDITC)。
- [0043] 发明详述
- [0044] 本发明的各个方面涉及利用特异性结合部分和捕获部分来定性和 / 或定量分析样品中所选的分析物的装置和结合对测定。本发明在用于检测样品中可能存在的一种或多种感染剂的各种测定中是有用的。在本发明中有用的测定包括但不限于,竞争性免疫测定、非竞争性免疫测定、夹心免疫测定和阻断测定。
- [0045] 在一个实施方案中,样品收集装置 (SCD) 用于收集样品和 / 或用免疫反应性试剂处理样品,所述试剂提供检测工具和捕获工具。含有一种或多种分析物的样品在 SCD 中混合,形成可以贮存或与 SCD 中的特异性结合试剂反应的混合物,并且随后排出至测试装置 (TD),所述测试装置提供捕获样品中的分析物复合物的经固定的试剂。SCD 中的特异性结合试剂包含可检测的标记、信号或指示物,其可以通过肉眼或用仪器读取,如本文进一步描述的。此外,测试装置可以配置为允许检测多种分析物。此类分析物可以来自一种或多种感染剂,包括感染剂的不同毒株和 / 或亚型。检测可以包括一种或多种分析物的定性和 / 或定量测量。
- [0046] 在各种实施方案中,用于检测分析物的多个特异性结合试剂包含多个分析物结合组 (Analyte Binding Set),其中每组包含结合一种靶分析物 (例如抗原) 的特异性结合试剂。在某些实施方案中,包括多个分析物结合组,其提供第二组和后续组的特异性结合对 (其特异性结合第二种、第三种、第四种、第五种或更多种不同的分析物 (例如来自不同感染剂或感染剂亚型的抗原))。在一个实施方案中,SCD 可以包含 2、3 或 4 个不同的分析物

结合组,其中每组配置用于检测不同类型或亚型的流感病毒抗原。

[0047] 在各种实施方案中,特定的分析物结合组包含结合对于其配置该特定组的特定靶分析物所必需的试剂。在各种实施方案中,每个分析物结合组包含:(1)捕获探针和(2)标记探针,其中每个分析物结合组设计为特异性结合不同分析物。

[0048] 捕获探针(例如图18中的1802)包含:(i)与特异性分析物结合(直接或间接)的特异性结合试剂,和(ii)捕获部分配偶体(例如1807)。检测探针1801包含:(i)结合(直接或间接)与捕获探针结合的相同的特异性分析物的特异性结合试剂,和(ii)标记1809。可以使用的标记在本文中公开,并且包括例如铕标记。含有一种或多种分析物的样品在SCD中与一个或多个分析物结合组反应,以形成捕获探针、分析物和检测探针的复合物。当存在时,不同靶分析物的这些复合物在不同的可寻址线路上被捕获(例如1805和1812被固定的捕获部分配偶体1803、1811捕获)。

[0049] 在一个实施方案中,捕获探针包含与捕获部分配偶体直接或间接连接的靶抗体。捕获部分配偶体被排列在固体支持物(例如硝酸纤维素膜)上作为测试装置中的可寻址线路的同源的(cognate)经固定的捕获部分配偶体“捕获”。此类捕获部分在本文中称为捕获部分配偶体(Capture Moiety Partners, CMP(s))。如本文使用的,CMP意指与第二捕获部分配偶体特异性结合的分子。例如,CMP可以包含特定序列的第一pRNA分子,并且结合与第一分子互补的第二pRNA分子(捕获部分配偶体),当它们彼此接触时,允许2种分子的特异性结合。

[0050] 在各种实施方案中,CMP包括分子,包括但不限于pRNA或pDNA分子、适体及其同源靶、或链霉亲和素-生物素、或其他配体/受体对。对于CMPs的给定组,2种分子在下述意义上是相关的:它们彼此之间的结合使得它们能够区分它们的结合配偶体与具有相似特征的其他测定组分。

[0051] 在各种实施方案中,检测探针和捕获探针包含特异性结合分析物的试剂,其包括但不限于抗体或其功能片段。

[0052] 在一个实施方案中,对于缀合物捕获探针中存在的每种捕获部分配偶体,同源捕获部分配偶体被固定(“ICMP”,固定的捕获部分配偶体)在不连续位置(可寻址线路)中,所述不连续位置在存在于测试装置中的测试膜上可显现(例如图16)。如本文使用的,在ICMP背景中,术语“固定的”意指ICMP是不可移动的,无论溶液是否通过包含ICMP的测试条。

[0053] 将ICMP置于TD中存在的测试膜上,其中固定在可寻址线路上的ICMPs(例如1803、1811)能够特异性结合其同源捕获部分配偶体(即,存在于捕获探针中的那些)。例如,如果ICMP是pRNA分子,那么它将特异性结合在捕获探针1801上存在的其同源捕获部分配偶体(即,对于与同源捕获部分配偶体缀合的靶抗原特异的抗体),从而使得如果形成分析物-捕获探针复合物,那么此类复合物将被特定的可寻址线路上的ICMP“捕获”。如本文使用的,术语“可寻址线路”包括不连续,且与任何其他可寻址线路比较,位于测试条的不同区域中的线路、点或任何其他区域,其中不同的可寻址线路配置为通过在检测探针中具有不同的CMP(s)对来检测不同的分析物,且固定在测试装置上。

[0054] 在各种实施方案中,配置用于一种靶分析物的CMP和ICMP选自彼此特异性结合的任何2种分子,并且此类分子包括但不限于寡核苷酸、抗生物素蛋白和链霉亲和素、吡喃糖

基 RNAs (pRNAs)、吡喃糖基 DNAs (pDNAs)、适体及其结合配偶体、或任何配体及其结合配偶体。

[0055] 在一个实施方案中,测试装置包含膜,并且膜包含彼此邻近的至少 2 个可寻址线路,所述线路具有不同类型的捕获部分配偶体。应当理解,如在 2 个邻近的可寻址线路的背景中使用的,“不同类型”意指不同类型或种类的化学或物理实体,与具有不同结合特异性的相同类型的化学或物理实体相反。在一个实施方案中,膜具有不同的可寻址线路,其配置为检测多种不同的分析物,并且可寻址线路可以具有相同类型或种类的固定的捕获部分配偶体,或备选地,在另一个实施方案中,可寻址线路可以具有不同类型的捕获部分配偶体,但在 2 种情况下,可寻址线路都配置为各自检测不同的分析物。在一个实施方案中,通过选择不同类型或种类的捕获部分配偶体用于 2 个邻近的可寻址线路的每一个,本发明提供了消除或基本上减少不同可寻址线路之间的捕获部分配偶体之间的交叉反应性的测定。因此,通过增加特异性和 / 或灵敏度,改善了使用本发明的装置的用于多重分析物的测定的总体性能(例如实施例 1-3)。

[0056] 在某些实施方案中,CMPs 选自相同类型或种类的分子。例如,CMPs 可以具有不同对的捕获探针和 ICMP,其各自是寡核苷酸(例如 pRNAs 或 pDNAs),但具有不同结合对特异性,因此每个对配置为鉴定不同的分析物。在其他实施方案中,CMP 对选自不同类型的分子且另外配置为鉴定不同分析物。例如,pRNA 用于一种特异性分析物的 CMP 对,而不同类型的捕获部分配偶体(例如链霉亲和素)用于另一种分析物,并且不同的特异性结合配偶体例如抗原和抗体用作第三 CMP 对。在某些实施方案中,2 个或更多个不同类型或种类的捕获部分配偶体用于本发明的 SCD 和 TD 中(例如 2、3、4 个或更多个不同类型)。

[0057] 在某些实施方案中,所检测的不同分析物是病毒或病毒组分(例如多肽)。在多种实施方案中,不同抗原来自流感病毒和 / 或流感病毒的亚型。在一个实施方案中,可被检测的流感病毒是 A 型流感病毒和 / 或 B 型流感病毒,以及 A 型和 / 或 B 型流感病毒的亚型。一个实施方案涉及检测 A 型和 B 型流感病毒以及式 HxNy 的亚型,其中 x 可以是 1-16,并且 y 可以是 1-9,或其 xy 的任何组合。

[0058] 在其他实施方案中,所检测的不同分析物是一种或多种不同的感染剂和 / 或感染剂的一种或多种不同亚型,包括但不限于 HIV、HCV、HPV、HSV、细菌(例如分枝杆菌例如结核分枝杆菌)、或真菌(例如酵母)或其组合。

[0059] 在多种实施方案中,SCD 包含取样器具,其提供从受试者收集样品的工具。取样器具可以经由取样器具支架与上部隔室偶联(永久或可取出地)。取样器具可以排列在柄的远端,其中该柄可以是实心的、空心的或半渗透的。在某些实施方案中,取样器具是拭子、梳子、刷子、刮刀、棒、泡沫材料、絮凝基质或纺织基质(spun substrate)。

[0060] 在多种实施方案中,SCD 包含一个或多个密封隔室,其中密封用于排除 SCD 的第二隔室之间的流体联系。在某些实施方案中,密封包含脱离阀、翻板阀、扭转阀、螺旋阀、可破裂密封、可刺穿密封或可破坏阀。

[0061] 在进一步的实施方案中,打开密封可以允许上部隔室的内容物流动到样品接受管的一个或多个下部隔室。在其他实施方案中,上部隔室可以含有一个或多个安瓿,其阻止其中含有的溶液流动到下部隔室,除非施加压力以破裂、刺穿或破坏安瓿,从而释放其中的内容物。

[0062] 在另一个实施方案中,提供用于检测一种或多种分析物的 TD,其中该装置包含在主体中的横向流动膜,含有流体或溶液的在横向流动膜上游的隔室,其中在所述隔室和所述横向流动膜之间安排间隙,从而排除在隔室和横向流动膜之间的流体联系。在一个实施方案中,对隔室施加的压力迫使间隙闭合,从而在隔室和横向流动膜之间形成流体联系。在一个实施方案中,SCD 的远端配合到其内的开口直接排列在吸水垫上,所述吸水垫排列在间隙下游,但在横向流动膜上游。

[0063] 在一个实施方案中,测试装置隔室包含含有相同或不同溶液的一个或多个亚隔室。在其他实施方案中,隔室或亚隔室包含可破坏、可刺穿或可破裂的一个或多个安瓿。因此,当对此类安瓿施加压力时,可控制地释放内容物。如本文描述的,测试装置可以包含或不包含用于断开隔室与横向流动膜的流体联系的间隙工具。测试装置的间隙可以是 0-3.0、0.5-3.5、1.0-2.5、1.0-3.0 或 2.0-4.0mm。

[0064] 在某些实施方案中,测试装置可以包含容纳横向流动膜的主体,其中所述主体提供通过其可看见横向流动膜的一个或多个窗口 1610。在本文描述的多种实施方案中,TD 包含横向流动膜,其包含在排列在所述横向流动膜上的测试区带上游或下游的吸水基质和吸收基质。在某些实施方案中,在 SCD 或测试装置中提供用于收集小容量样品用于存档的基质。在一个实施方案中,提供此类存档工具的基质是收集小容量样品的滤器、膜或纸,并且所述基质随后可从装置中取出。

[0065] 在多种实施方案中,SCD 和 / 或 TD 包含一个或多个等同的可鉴定的标签,其可以从一个装置中取出且置于另一个装置上。

[0066] 在某些实施方案中,测试装置塑形为配合(专门接头形状)到读取器的接受端口内(当上游隔室已压低时),从而指示其中含有的洗涤缓冲剂或追踪缓冲剂已被释放通过横向流动膜。在此类实施方案中,测试装置和读取器中存在的专门接头提供验证测试装置的上游隔室中的追踪缓冲剂或溶液已被释放的工具,并且从而指示横向流动膜上游存在的任何样品已洗涤通过横向流动膜。由此,专门接头提供了阻止未处理的样品的读取的“安全工具”。

[0067] 在本发明的另一个方面,经处理的样品运行通过测试装置的横向流动膜,但可以置于一边 30 分钟至数小时。在多种实施方案中,多个样品可以运行通过测试装置,并且在约 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 小时后读取,具有一致且精确的信号。

[0068] 在本发明的某些方面,本文公开的装置用于检测可能存在于样品中的一种或多种分析物的方法中。在某些实施方案中,方法涉及检测感染剂的一种或多种毒株。在一个实施方案中,方法涉及利用本发明的装置来检测一种或多种流感病毒和 / 或其亚型。例如,提供了用于检测可能存在于单个样品中的 A 型流感病毒和 B 型流感病毒以及 A 型流感病毒的亚型的方法。

[0069] 在一个实施方案中,提供了用于测定受试者感染有流感病毒的大范围流行毒株、流感病毒的非大范围流行毒株、还是对于其可获得疫苗的流感病毒毒株的方法。

[0070] 在某些实施方案中,测试装置排除本身能够特异性结合靶抗原的任何试剂或结合试剂。测试装置包括 CMP,其设计用于通过与分析物、捕获探针和检测探针的复合物中的同源 CMP 特异性结合来间接捕获靶分析物。

[0071] 在本发明的一个方面,提供了检测来自测试装置的信号作为一种或多种分析物的

存在 / 不存在的指示的读取器,例如 UV LED 读取器。在多种实施方案中,检测到的信号是来自标记分子的荧光信号。在进一步的实施方案中,标记分子是镧系元素。在进一步的实施方案中,镧系元素是铈。在一个实施方案中,读取器包含 UV 光电二极管。在另一个实施方案中,读取器包含 UV 激光二极管。

[0072] 在某些实施方案中,SCD 中提供的多组分析物结合组可以含有一个类别的标记(例如其中每种检测探针包括相同荧光团或具有不同波长信号的不同荧光团)。在其他实施方案中,每种检测探针可以在缀合物中包括选自标记的多个不同类别的标记(例如金属和荧光团的组合)。各种检测探针可以具有相同或不同标记,并且它们可以来自相同或不同类别。在一个实施方案中,捕获部分是寡核苷酸例如 pRNA 或 pDNA,并且标记是铈。

[0073] 在本发明的另一个方面,读取器配置为包含至少一个硬性(hard)或持久的标准物。在另一个实施方案中,读取器配置为包含至少 2 种或更多种硬性标准物。在多种实施方案中,硬性标准物包含发出可检测信号的标记分子。在进一步的实施方案中,标记是荧光标记。在另一个实施方案中,荧光标记是镧系元素。在再进一步的实施方案中,镧系元素是铈。

[0074] 在本发明的另一个方面,本发明的 SCD 和测试装置用于方法中,以检测一种或多种分析物,其中此类分析物与疾病、病理学或其他生理学状况相关。在多种实施方案中,此类分析物是与和任何身体组织有关的状况相关的生物标志,所述身体组织包括但不限于心、肝、肾、肠、脑、胎儿组织或胰腺。在一个实施方案中,此类分析物与心脏状况(例如心肌梗塞)相关。

[0075] 在多种实施方案中,本发明的装置可以用于任何方法中,以检测分析物,例如得自受试者的样品中的抗原或蛋白质。在某些情况下,通过利用对于所需分析物特异的免疫反应性或特异性结合试剂的特定组(panel),本发明的方法或装置可以用于检测任何此类分析物。

[0076] 在本发明的几个方面中,测试装置包含含有用于提供洗涤 / 运行缓冲剂或液体的工具的上游隔室。在多种实施方案中,此类缓冲剂或液体包含另外试剂,例如信号 / 检测物分子(例如检测底物),其与检测探针中的标记相互作用,并且可以通过光学读取器或直接显现读取。在某些实施方案中,缓冲剂或液体存在于包含玻璃安瓿、膜袋、囊或填充成型袋(form filled pouch)的区室中。在进一步的实施方案中,例如通过对所述区室施加压力,此类区室被破裂、破坏或以其他方式断裂,导致其内容物的释放。在其他实施方案中,此类区室被附件或针刺破或切开。在再进一步的实施方案中,此类区室被防护工具保护,避免其内容物的意外或无意释放。

[0077] 样品收集装置。本发明的一个方面涉及样品收集装置(“SCD”),其包含收集生物学样品的必需工具,以及处理样品中的分析物与样品中的分析物反应所必需的试剂和缓冲剂,以便形成包含特异性结合试剂与其特异性靶分析物的复合物(例如,检测探针和捕获探针的多组分析物结合组与多种不同靶分析物(当存在于样品中时)形成复合物)。

[0078] 在一个实施方案中,如果存在特定分析物,那么它将被检测探针和捕获探针结合(例如分析物与来自 SCD 的样品中的两者结合),复合物中的捕获探针又将与在测试条上的限定或可寻址线路上的其同源的固定的配偶体捕获部分结合(如本文描述的)。

[0079] 在图 1 中所示的一个实施方案中,SCD 包含上部隔室组件 100。上部隔室组件 100

可以包含一个或多个区室。在某些实施方案中,上部隔室 100 包含半刚性或可压低材料。在其他实施方案中,上部隔室 100 包含硬或刚性材料。对于产生硬或刚性上部隔室 100 有用的材料包括例如硬塑料或玻璃。上部隔室中存在的一个或多个区室可以含有溶液,例如洗涤缓冲剂、提取缓冲剂、试剂溶液或其组合。

[0080] 在一个实施方案中,样品收集装置(例如图 1 和图 2)包含一起配合产生负的反压的组件,所述负的反压允许溶液以均一方式从 SCD 中释放,而无需外部挤压或操作 SCD。在一个实施方案中,上部隔室和样品接受管 103、210 的密封组件由硬或刚性材料制成,从而使得 2 个组件可以通过力形成气密密封(例如压入配合)。在一个进一步的实施方案中,当 SCD 与 TD 偶联时,样品收集器具与样品接受管通过压入配合偶联,在样品接受管中产生反压,所述反压可以从 SCD 的远端 106、211 排出任何溶液混合物。在一个实施方案中,SCD 和 TD 经由孔(例如分隔物)偶联。

[0081] 在一个实施方案中,样品收集器具(例如全体地 100、101、102、107 和 108,或图 2A)包含至少一个区室 108、201,其置于样品收集器具的近端或管或杆 102、203 的上游。

[0082] 在一个进一步的实施方案中,区室 108 是上部隔室的密封区室。在某些实施方案中,上部密封区室中的溶液是缓冲溶液。在多种实施方案中,存在于或加入至上部隔室中的溶液的体积是约 10–500  $\mu\text{l}$ ,或约 10  $\mu\text{l}$ 、20  $\mu\text{l}$ 、30  $\mu\text{l}$ 、40  $\mu\text{l}$ 、50  $\mu\text{l}$ 、60  $\mu\text{l}$ 、70  $\mu\text{l}$ 、80  $\mu\text{l}$ 、90  $\mu\text{l}$ 、100  $\mu\text{l}$ 、110  $\mu\text{l}$ 、120  $\mu\text{l}$ 、130  $\mu\text{l}$ 、140  $\mu\text{l}$ 、150  $\mu\text{l}$ 、160  $\mu\text{l}$ 、170  $\mu\text{l}$ 、180  $\mu\text{l}$ 、190  $\mu\text{l}$ 、200  $\mu\text{l}$ 、210  $\mu\text{l}$ 、220  $\mu\text{l}$ 、230  $\mu\text{l}$ 、240  $\mu\text{l}$ 、250  $\mu\text{l}$ 、260  $\mu\text{l}$ 、270  $\mu\text{l}$ 、280  $\mu\text{l}$ 、290  $\mu\text{l}$ 、300  $\mu\text{l}$ 、310  $\mu\text{l}$ 、320  $\mu\text{l}$ 、330  $\mu\text{l}$ 、340  $\mu\text{l}$ 、350  $\mu\text{l}$ 、360  $\mu\text{l}$ 、370  $\mu\text{l}$ 、380  $\mu\text{l}$ 、390  $\mu\text{l}$ 、400  $\mu\text{l}$ 、410  $\mu\text{l}$ 、420  $\mu\text{l}$ 、430  $\mu\text{l}$ 、440  $\mu\text{l}$ 、450  $\mu\text{l}$ 、460  $\mu\text{l}$ 、470  $\mu\text{l}$ 、480  $\mu\text{l}$ 、490  $\mu\text{l}$  或 500  $\mu\text{l}$ 。在一个实施方案中,溶液体积是直到 150  $\mu\text{l}$ 。在另一个实施方案中,溶液体积是直到 200  $\mu\text{l}$ 。在某些实施方案中,上部隔室 100 中的溶液是在密封区室中。密封可以经由阀结构打开、破坏或刺穿,以便提供在取样部件或样品收集器具的上部隔室 100 和杆 102 之间的流体联系。

[0083] 在一个实施方案中,上部隔室的密封隔室可以是能够被压缩的可挤压球(例如用户对球施加压力),从而控制溶液(例如缓冲剂)到取样器具的流速。在某些实施方案中,上部隔室包含球组件,其为包括溶液的自含式区室。此类溶液包括提取、裂解、试剂、缓冲剂或防腐溶液。在一个实施方案中,溶液是用于将生物学样品从取样器具向下转移到下部隔室的缓冲溶液。

[0084] 提取溶液应具有足够的体积,以确保存在的任何冻干的测定试剂(例如冻干的试剂珠)的润湿和/或从样品收集装置中提取样品。例如,当干拭子用作样品拭子时,对于润湿试剂和提取或释放样品足够的提取溶液体积是 70  $\mu\text{l}$ 。在一个实施方案中,提取溶液的体积是至少 30  $\mu\text{l}$ 、40  $\mu\text{l}$ 、50  $\mu\text{l}$ 、60  $\mu\text{l}$ 、70  $\mu\text{l}$ 、80  $\mu\text{l}$ 、90  $\mu\text{l}$ 、100  $\mu\text{l}$  或更大。本领域普通技术人员可以容易地测定提取溶液的足够的体积,以确保在下部隔室中含有的干拭子样品和冻干的试剂珠的润湿,所述下部隔室一般包括检测探针和捕获探针。

[0085] 上部隔室可以包含一个或多个区室。每个区室可以包含与其他区室中的溶液相同或不同的溶液。此类溶液可以包含需要的试剂,包括但不限于提取缓冲剂、还原剂、免疫反应试剂(例如包含检测标记的抗分析物特异性结合试剂(例如检测探针))和捕获探针(需要时)。

[0086] 用于本发明的 SCD 中的试剂可以包括一种或多种盐、螯合剂、抗凝剂、去垢剂、稳

定剂、稀释剂、缓冲剂、酶、辅因子、特异性结合成员、标记、粘液溶解药等。对于本领域技术人员显而易见的是,特定试剂和 / 或试剂的组合可以针对待测定的一种或多种特定分析物进行修改。一种或多种试剂可以是促进样品分析的化合物。此外,此类试剂可以容易地适合于在本发明的测试装置中使用。

[0087] 样品支架 101 可以与上部隔室组件 100 和取样部件接触。取样部件可以从包含样品接受管 103 的外壳和上部隔室 100 中取出。在某些实施方案中,取样部件具有杆 102 和样品收集器具或基质 107,这可以用于促进样品收集(例如拭子)。取样部件杆 102 的长度可以针对样品收集进行最佳化,例如设计为适合于从不同解剖部位收集样品的长度,所述解剖部位包括但不限于喉、口、鼻、耳、尿道、肛门和阴道。例如,装置(例如整合的配置)的长度可以是约 1-9 英寸,或约 2、3、4、5、6、7、8 或 9 英寸。取样部件可以置于样品接受管 103 内,以提供整合的配置。在此类配置中,取样器具在下部隔室混合或试剂组件 104 上游,且经由杆或管 102 与下部隔室混合或试剂组件 104 流体联系。

[0088] 在某些实施方案中,样品收集器具包括杆或管 102,其是空心的、实心的或半-孔性的。在某些实施方案中,当取样部件的杆或管是多孔的或吸收性的时,取样部件实际上提供了从上部隔室组件 100 到取样基质(例如拭子)107 的流体联系的通路。样品收集器具(例如 100、101、102、107 和 108)可以由样品支架 101 保持,所述样品支架 101 可以配合到上部隔室 100 的接受末端内。

[0089] 在某些实施方案中,样品收集器具中存在的杆或管 102 是延伸到上部隔室 100 内的部分,其具有闭合的末端。在一个实施方案中,杆或管 102 的末端部分被折断或破坏,从而打开上部隔室组件 100 向下通过取样部件到取样基质 107(例如拭子)之间的流体联系。

[0090] 在另一个实施方案中,样品收集装置包含杆或管,其提供在上部隔室之间的流体联系,但使用用于收集且保留样品的分离的组件(例如图 4,457 中所示)将样品置于样品接受管中。

[0091] 下部隔室混合或试剂组件 104 可以含有与一种或多种靶抗原特异性结合的试剂。下部隔室混合或试剂组件 104 可以包含一个或多个区室。例如,可以串联安排 2 个区室在下部隔室混合或试剂组件 104 中。下部隔室混合或试剂组件 104 可以与 luer 105 接触,所述 luer 105 与帽 106 接触。SCD 的取向是这样的,区室 108 在近端,并且帽 106 在远端。

[0092] 在一个实施方案中,样品收集装置配置为可替换不同下部隔室或混合区室(例如通过搭扣配合、或 SCD 和下部隔室区室的螺纹),从而下部隔室区室包含用于特定测定(例如检测特定靶分析物)的必需试剂,而上部隔室包含洗涤缓冲剂和 / 或提取试剂。在另一个实施方案中,可替换的下部隔室区室包含提取试剂以及形成本文描述的分析物-试剂复合物所需的试剂。

[0093] 在另一个实施方案中,SCD 的远端是开放的,由此在溶液从上部密封的隔室中释放之前,SCD 衔接(例如通过摩擦配合)到 TD 的接受端口内。在此类实施方案中,从 SCD 的远端到 TD 内的流体流动无需通过 luer 或阀结构调节,但流体流动可以经由例如在 TD 内产生的负压或在 SCD 和 TD 之间产生的差压、重力或毛细管流动来获得。

[0094] 在另一个实施方案中,SCD 的远端不利用阀,而是开放的。在缓冲剂从上部隔室中释放之前,SCD 可以与测试装置连接。在溶液从上部隔室中释放后,通过溶液从收集器具中释放和 / 或提取样品,并且将其与位于下部隔室中的试剂混合。混合物随后流动到测试装

置用于分析一种或多种分析物的存在。可以在下部隔室内包括水溶性膜,以减慢混合物离开 SCD 到测试装置上的流动。此类膜是常规的,并且可以设计为允许混合物滞留足以允许试剂和样品分析物的混合和反应的不同时间段。例如,此类膜可以由任何已知的蛋白质、多糖或成膜物 (film former) 制备。

[0095] 在一个实施方案中,如图 2A 中所示,SCD 具有与样品支架 202 附着的上部隔室组件 201、取样部件管或杆 203 和样品收集器具 204。

[0096] 在某些实施方案中,如图 2B 中举例说明的,包含必需试剂(例如检测/捕获特异性结合试剂等)的液体溶液可以安排在下部隔室 212 的试剂区域 208 中(也如放大视图中所示),其经由通过样品接受管 210 的转运与上部隔室组件 205 液体联系。来自上部隔室 205 的流体可以向下流动到样品收集器具 213 以提取样品。经提取的样品可以通过开口 206,其可以限制/控制从上部隔室 205 到下部隔室 212 的液体流动,所述下部隔室 212 包含例如开口以通过大小(例如孔的大小、基质类型或滤器)控制流动。下部隔室 212 可以含有试剂区域 208。在一个实施方案中,试剂区域 208 含有固体试剂 207,其包括作为干燥固体形成的、分开放置的或作为均一固体的必需试剂(例如免疫测定试剂,例如检测和捕获探针等)。下部隔室还可以包括滤器 209,并且在远端可以提供 luer 211。

[0097] 在一个实施方案中,上部隔室 330 包含阀 320,其允许上部隔室中的溶液的可控制释放。阀可以是本领域已知且与本文描述的系统相容的任何类型的阀。可以利用的另外的阀包括旋转、可破坏、旋塞、闸、球、翻板、针形、蝶形、夹管、波纹管、活塞、滑、塞、分流或调节阀。例如,阀可以是脱离阀、速动阀、翻板阀、扭转、螺旋、可破裂、可刺穿或可破坏阀。例如,当阀是速动阀时,用户对阀杆施加压力以破坏杆,由此零件的脱离允许缓冲剂经由杆进入样品收集管和下部隔室。在一个实施方案中,上部隔室在正压下,从而阀的打开或密封的破坏导致上部隔室中溶液的流出。在一个实施方案中,上部隔室在足够的正压下,从而上部隔室中的溶液在压力下流动,经由杆进入下部隔室。例如,当阀是速动阀时,用户施加压力以破坏速动阀杆,并且上部隔室中的溶液在轻微压力下流动,经由杆进入下部隔室。上部隔室可以是例如在 1、10、50、100、500、1000、5000、10000、20000、30000、40000、50000 或更多帕斯卡 (Pa) 的压力下。在一个实施方案中,速动阀具有一个塞。具有一个塞位置的速动阀系统对于阻止不完全折断是有用的,所述不完全折断可以导致空气渗漏到上部隔室内和流体的不完全递送。

[0098] 因此,当样品经由上部隔室 205 中提供的溶液(例如缓冲剂或洗涤溶液)向下洗涤时,产生包含溶液和样品的混合物,其向下行进到下部隔室混合或试剂组件 212,所述下部隔室混合或试剂组件 212 包含具有固体试剂 207 的试剂区域 208。固体试剂 207 可以被缓冲剂快速溶解,并且所得到的溶液可以是可能包含一种或多种目的分析物的样品和测定试剂(例如特异性结合试剂、标记检测和捕获探针等)的混合物。例如,固体试剂 207 可以包括在测定中使用的检测探针和捕获探针,其能够特异性结合靶分析物。在某些实施方案中,SCD 还可以包括 luer 锁紧接口 (luer lock) 211,其锁入测试装置内用于递送反应混合物用于后续检测。

[0099] 在多种实施方案中,SCD 包含固体形式的必需试剂(例如图 7,780、781、782;图 15,1530、1531、1532)。固体试剂组分包括在固体支持物(例如玻璃/塑料珠)上干燥、在固体支持物上冻干或与固体支持物结合或在混合或下部隔室中直接干燥的粉末、丸剂、

珠、冻干团块、压缩冻干的粉末。使用本领域已知的技术，例如 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coligan、John E 等人，编辑 1999) 中公开的技术，将此类试剂配制成固体形式。在一个实施方案中，当与液体样品接触时，固体试剂再水合。

[0100] 在另一个实施方案中，提供如图 3 中所示的具有上部隔室 330 的 SCD。在某些实施方案中，上部隔室 330 可以具有至少一个可破坏的密封 320 和边缘 335，其可以例如通过压配与样品接受管 310 接触。在一个进一步的实施方案中，当 SCD 经由 SCD 的底部或远端与测试装置偶联时，当压配（也即，压入配合）在一起时，上部隔室和样品接受管形成气密密封并且形成正压或反压，所述正压或反压迫使 SCD 中存在的内容物（例如样品混合物）均一释放，图 15。在一个实施方案中，SCD 的底部或远端通过与测试装置偶联的分隔物释放其内容物。在一个进一步的实施方案中，SCD 的分隔物通过在 TD 上存在的插管与 TD 偶联。

[0101] 在进一步的实施方案中，通过形成反压，TD 和 SCD 的偶联允许从 SCD 到 TD 并且通过测试膜的均一样品流动，从而使得形成的捕获探针 - 靶分析物 - 检测探针以均一的时间和速率经过 TD，进而允许在每个可寻址线路上进行有效捕获。均一流动允许通过增加测定的特异性和 / 或灵敏度来增强测定的性能，这在靶向多种不同的分析物时是更关键的。

[0102] 在一个实施方案中，SCD 还可以具有样品支架 380，其可以与上部隔室 330 和取样部件 340 接触。在一个实施方案中，样品支架 380 可以含有试剂例如粘液溶解剂（例如液体形式或冻干的）。样品支架可以具有管 385 以促进进入上部隔室 330 的球 325 内。例如，管 385 可以破坏上部隔室 330 中的阀。取样部件杆 340 可以具有样品收集器具 345，以促进样品收集。取样部件杆 340 可以配合到样品接受管 310 内，所述样品接受管 310 可以与下部隔室混合或试剂组件 360 接触。下部隔室混合或试剂组件 360 可以具有提取缓冲剂和 / 或试剂、网格膜 350 和至少一个珠 355，其含有固体试剂（例如提取试剂、免疫测定试剂例如检测和捕获探针等）。在某些实施方案中，下部隔室混合或试剂组件 360 可以具有超过一个的珠 355。例如，下部隔室可以具有多个珠，其中至少一个珠含有粘液溶解剂，一个珠含有捕获探针，并且一个珠含有检测探针。在其他实施方案中，单个珠可以包含超过一种的组分（例如提取试剂、检测探针或捕获探针中的 2 种或更多种）。在一个进一步的实施方案中，珠可以包含提供样品与 SCD 中存在的一种或多种试剂充分混合的颜色指示的染料。与染料相关的颜色的形成提供足够水合和混合（用于样品和试剂的反应）的指示。

[0103] 下部隔室 360 可以具有隔开物 370，其允许流体从下部隔室 360 行进到测试装置。隔开物可以由不同材料包括塑料或氯丁橡胶制成，以含有液体。SCD 的取向是这样的，上部隔室组件 330 在近端，并且隔开物 370 在远端。

[0104] 在某些实施方案中，样品接受管 310 由软或弹性材料制成。对于产生样品接受管 310 有用的材料是本领域众所周知的，并且包括软塑料。在其他实施方案中，样品接受管 310 可以由硬或刚性材料制成。对于产生硬或刚性样品接受管 310 有用的材料是本领域众所周知的，并且包括例如硬塑料或玻璃。在一个实施方案中，为了允许样品接受管与上部隔室或样品收集器具帽的压入配合，每种组件由硬塑料或玻璃制成，以允许压入配合和气密密封，这是提供反压所必需的。如上所述，反压允许液体混合物从 SCD 均一流动到 TD。在一个进一步的实施方案中，在 SCD 经由分隔物开口 1090、1517 与 TD 偶联的情况下，当与来自 TD 的插管或突出物 1420、1525 偶联时，此类均一流动无需任何另外的力或操作而实现。

[0105] 在另一个实施方案中，在正常操作过程中操作样品接受管 310，并且软或弹性材料

可以在使用过程中被挤压,导致液体离开样品的潜在反流。这种反流可以潜在降低与样品反应的流体的量,并且从而降低分析的精确度。通过将硬或刚性材料用于装置,操作者可以减少的液体反流操作 SCD。在另一个实施方案中,样品接受管 310 包含超过一个管。例如,样品接受管 310 具有硬或刚性外部管 315 和软或弹性内部管 317。在另一个实施方案中,SCD 配置具有套管,其提供使管/外套的侧面向与杆连接的拭子更靠近移动的工具,从而使得当流体离开拭子时,它将停留在拭子的紧邻附近中,进而改善从拭子中提取流体的效率。在一个实施方案中,样品接受管 310 与上部隔室组件 330 形成紧密配合,从而形成气密密封。气密密封可以在形成密封的边缘 335 上形成。在一个进一步的实施方案中,边缘 335 与样品接受管 310 紧密密封,从而在上部隔室组件 330 与样品接受管 310 密封闭合后在 SCD 内产生负的气压。

[0106] 在另一个实施方案中,上部隔室 330 与样品接受管 310 形成紧密密封,以阻止可能导致上部隔室流体的不完全递送的气体或液体渗漏。在某些实施方案中,上部隔室不含有任何通风口,所述通风口可以允许空气进入上部隔室 330 且阻止流体的完全释放。例如,当阀是速动阀并且上部隔室溶液在正压下时,一旦用户破坏速动阀,那么由上部隔室 330 和样品接受管 310 形成的紧密密封导致正压,迫使上部隔室溶液从上部隔室 330 通过样品接受管 310,在某些实施方案中,通过取样部件 340 到下部隔室 360。因此,在一个实施方案中,在将上部隔室 330 与样品接受管 310 偶联后,不需要产生压力(例如通过用户产生的压力)来使上部隔室溶液从上部隔室 330 移动到下部隔室 360。因此,通过去除关于用户施力以将上部隔室溶液移动到下部隔室混合或试剂组件 360 的必需性,这个过程避免了在施加压力中的用户不均一性和上部隔室溶液到下部隔室 360 的可能的不完全移动,或可以导致溶液渗漏或装置损坏的用力过度。通过使上部隔室 330 在正压下,还阻止了在挤压球且释放后可以发生的反流。

[0107] 在某些实施方案中,上部隔室 330 可以配置为与样品接受管 310 可移除地结合。在某些实施方案中,样品收集装置的上部隔室 330 和样品接受管 310 可以这样配置,以使得当上部隔室 330 与样品接受管 310 结合时,在样品接受管 310 的管腔内建立压力。在某些实施方案中,样品接受管 310 的近端和上部隔室 330 这样配置,以便压配在一起,其中在装配后,产生用于增加样品接受管 310 的界线内的压力的增压密封。样品接受管 310 和上部隔室 330 可以在 2 个元件配对后形成密封。这种密封允许在样品接受管 310 内建立气体压力例如气压,导致相对于环境压力和/或测试装置内的压力的正压。在某些实施方案中,在样品接受管 310 和上部隔室 330 形成密封后,可以将气体加入样品接受管,例如经由注射器和针引入气体。在某些实施方案中,在样品接受管内截留的气压是稳定的,并且超过环境压力或在测试装置内的压力的气压维持至少 1 分钟,或至少 2、3、4、5、10、30、60、120 或 240 分钟。

[0108] 在一个实施方案中,如图 11 中所示,SCD 1130 与第二组件(例如 TD)偶联,并且包含与 SCD 中存在的试剂和缓冲剂混合的样品的溶液被迫离开 SCD 1130,并且在 SCD 1130 配对后,通过分配尖端 1170 分配到测试装置 1135 内。如上所述,从 SCD 到测试装置的流体流动可以通过在 SCD1130 内建立的压力驱动。例如,由于在 SCD 1130 内截留空气,可以在 SCD1130 和测试装置 1135 之间形成正压差异。在插管 1105 和隔开物 1185 配对后,例如通过在隔开物 1185 中形成的裂口 1190,压力差异使液体离开更高压力的 SCD 1130 移动到更

低压力的测试装置 1135 内。建立的压力可以稳定持续一段时间,从而使得 SCD 1130 和测试装置 1135 之间的配对无需在装配 SCD 1130 后立即进行。进一步地,隔开物可以这样配置,以便在去除插管 1105 后,隔开物 1185 重新密封且从而阻止流体的任何丧失或样品的滴落。如由箭头指示的,流体沿着压力梯度从在 SCD1130 内建立的更高压力区域流动到相对更低压力的测试装置 1135,用于递送其中的样品。SCD 包括膜 1175,其可以使试剂团块保留在下部隔室中,或在某些情况下,可以用于保留存档样品。

[0109] 在一个实施方案中,取样部件不与含有样品接受管的外壳整合。在此类配置中,取样部件用于收集样品且将样品递送给样品接受隔室。样品接受隔室可以被打开或关闭,以允许样品引入样品接受管内。应当理解,本文公开的任何样品接受管可以具有各种几何形状,包括圆柱形、方形、三角形或任何多边形,根据需要。在某些实施方案中,外壳可以包含一个或多个可密封的开口,其可以打开以加入一种或多种所选试剂、缓冲剂或洗涤流体。

[0110] 例如,在一个实施方案中,将全血抽取到样品接受隔室内。随后,样品通过膜(例如使血细胞与血浆分离的膜,允许血浆通过)进入样品接受管的下部,以与各种试剂例如免疫测定所需的试剂混合。靶向特异性分析物所需的免疫试剂可以预先选择且作为固体基质排列在 SCD 中或通过开口加入,或排列在膜上。

[0111] 当排放全血样品时,膜可以充当滤器以排除血液组分的通过,从而允许仅血浆通过样品接受管的远端(其将配合到测试装置内)。

[0112] 在某些实施方案中,当溶液通过取样器具时,进行样品的提取步骤(例如当溶液包括提取缓冲剂时)。此外,下部隔室可以包含经提取的样品通过其流动的滤器。例如,如果滤器排列在下部隔室的近端,那么经提取的样品随后流动通过滤器,从而排除提取混合物的某些组分进入包含一个或多个固体试剂珠的试剂区域区室。此外,滤器工具还可以用于在 SCD 转运和贮存过程中限制试剂珠,且在使用和水合前使一种或多种珠滞留在下部隔室中。如本文所述,试剂珠可以包含检测和捕获探针两者,或 2 种分开的珠可以各含有检测或捕获探针。在另一个实施方案中,可以使用 3 种或更多种珠,其中至少一种珠具有粘液溶解剂,一种珠具有一种或多种捕获探针,并且一种珠具有一种或多种检测探针。在另一个实施方案中,来自上部隔室的溶液释放来自样品收集器具(拭子)的样品,并且冻干的提取缓冲剂团块可以在下部隔室中提供,从而使得提取可以在下部隔室中发生。备选地,提取可以在拭子水合时用来自上部隔室的流体以及在下部隔室中用冻干的试剂进行。

[0113] 过滤可以允许目的分析物以受控方式移行通过装置,伴随很少的干扰物质(如果存在的话)。当存在时,过滤通常提供了具有更高成功概率的测试,取决于待处理的样品的类型,如对于本领域技术人员而言显而易见的(例如全血样品对血浆)。在另一个实施方案中,SCD 还可以掺入用于避免与非靶分析物的交叉反应性和/或条件化样品的试剂,所述非靶分析物可能在样品中出现;取决于特定实施方案,这些试剂可以包括但不限于非 hCG 阻断剂、抗 RBC 试剂、基于 Tris 的缓冲剂和 EDTA。当考虑使用全血时,通常利用抗 RBC 试剂。在另外一个实施方案中,SCD 可以掺入其他试剂,例如辅助的特异性结合成员、流体样品预处理试剂和信号产生试剂(例如,与标记缀合物反应所需的底物)。

[0114] 在某些实施方案中,如图 4 中所示,样品接受管 450 可以含有分开的取样部件 457 和空心柄 455,其用于从上部隔室 410 到下部隔室 460 的试剂递送。上部隔室 410 可以与样品接受管 450 附着。样品支架 440 可以与管 430 一起在上部隔室 410 内。上部隔室 410 可

以具有边缘 420 以促进在上部隔室 410 和样品接受管 450 之间的气密密封。在这个实施方案中,此处显示为拭子的样品收集器具不与上部隔室附着,并且可以在使用前作为装置的部分提供。备选地,任何收集装置例如拭子可以与 SCD 分开使用,以收集样品,且随后具有经收集的样品的样品收集装置可以置于 SCD 内用于与来自上部隔室的流体和下部隔室的试剂混合。

[0115] 在图 5A-5C 中所示的实施方案中,可以产生例如通过印刷或以其他方式提供的指示线 505、510,从而使得它们在 SCD 的外部上可见,允许用户观察上部隔室 525 与样品接受管 520 的适当装配。此类指示线可以帮助预防用户错误,例如预防来自与 SCD 的样品接受管不适当装配(即,就座)的样品收集器具的空气和/或流体渗漏。SCD 的适当就座(seating)和装配是必需的,以允许产生可以帮助样品有效递送到 TD 内的压力,否则适当的气密密封可能无法形成或不足够。SCD 的不适当装配还可以促成流体样品从 SCD 到 TD 内的不均一分配,这可以导致弱的测定性能。SCD 可以具有一条或多条指示线。例如,SCD 可以具有附着至、刻至、印刷至样品接受管 520 的外部或以其他方式对于所述外部可见的 2 条指示线 505、510。上部隔室可以,但不是必需的,具有对应的指示线。在一个实施方案中,SCD 具有 2 条指示线(图 5A)。当 2 条指示线 505、510 在上部隔室 525 上可见时,指示用户 SCD 上部隔室和样品接受管未被适当装配(图 5B)。当仅下部指示线 510 在样品管 520 的外部上可见时,指示用户上部隔室 525 已与样品接受管 520 适当装配(图 5C)。指示线 505、510 可以是视觉上不同的,从而它们可以由用户容易地读取。在一个实施方案中,指示线 505、510 是不同颜色的,从而使得当一个颜色例如绿色可见时,用户被告知上部隔室 525 是适当就座的,但当 2 个颜色例如红色和绿色可见时,用户被告知上部隔室 525 与样品接受管 520 未适当装配(图 5B)。在图 5A-5C 中,提供了与上部隔室 525 附着的收集拭子 550 和测试装置界面 570 的非限制性例子。

[0116] 在一个实施方案中,下部隔室包含吸收性纸的小元件,在其上预定百分比的经提取的样品被滞留用于存档目的。在通过收集装置且使样品部分保留(用于存档目的)后,经提取的样品接触试剂溶液或固体(例如缀合物珠),并且下一个测定步骤在液体快速溶解缀合物珠时发生,且允许反应物与样品混合且起始测定。

[0117] 测试装置(TD)

[0118] 本公开内容提供了用于测定多种分析物在流体样品中的存在或不存在的测试装置,特别是免疫测定装置。一般而言,本公开内容的 TD 包括限定轴向流动通路的基底。一般地,基底进一步包括样品接受区带、一个或多个测试区带和一个或多个对照区带。在某些实施方案中,测试区包含测试和对照区带,这些共同地是可寻址线路。

[0119] 如本文在 TD 背景中使用的,术语“轴向流动膜”、“横向流动膜”、“测试膜”、“测试条”或“基底”可互换使用,且指这样的零件,其采用毛细管作用和/或允许压力和/或重力流体运动以移动或转运测试流体,或采用与毛细管作用分开的流体运动,当其中流体被气体压力、流体压力的积累泵动时(使用活塞或旋转、波纹管或其他类型的泵对测定流体直接泵动、由于电场的静电运动、重力等)。

[0120] 在本发明的一个方面,如图 13 和 14 中所述的测试装置 1410 包含开口/端口 1320、1430,本发明的 SCD 的远端可以,例如通过摩擦配合、luer 锁紧接口、接头或阀,衔接到其内。开口/端口 1430 提供通过其来自 SCD 的样品流动到 TD 内的孔。例如开口/端口可以

具有插管 1420,其在某些实施方案中将配合到 SCD 中存在的隔开物装置内。分隔物装置允许高流速、低预充容量和弹性,以使用 luer 滑索或 luer 锁紧接口连接。在某些实施方案中,血液分离膜可以排列在提供单向流动的端口上。在另一个实施方案中,此类膜还可以排列在 SCD 中(例如在样品收集器具的紧远侧)。在一个实施方案中,TD(图 13)包含在用于与 SCD 偶联的端口上游的隔室 1310,其中该隔室包含具有外壳或封套(cover)的洗涤缓冲剂的袋。

[0121] 在一个实施方案中,TD 的示例性例子在图 17 中显示。TD 可以具有上部外壳 1706 和下部外壳 1712。TD 可以具有排列在可压低隔室 1707 上的可去除的安全封套 1701。开口/端口 1702 提供样品通过其从 SCD 流动到 TD 内的孔。TD 可以含有具有信息例如患者 ID 1703 和批号 1705 的条形码。

[0122] 在一个实施方案中,TD 包含 2 个区段,其中一个区段包含其中应用样品的部分,并且第二上游区段包含洗涤或运行缓冲剂。在另一个实施方案中,上游区段可以包含一个或多个区室,所述区室可以含有相同或不同缓冲剂,其中每个区室可以分开或同时操作以排出其内容物。

[0123] 开口的上游是可以与开口 1702、1320 流体联系的缓冲剂区室 1708、1310,所述开口 1702、1320 在包含多个可寻址线路的测试膜的上游。在一个实施方案中,TD 开口 1702、1320 与吸水基质 1709 流体联系。

[0124] 在一个进一步的实施方案中,缓冲剂区室可以包含一个或多个亚区室,其含有一种或多种溶液。在 TD 背景中,亚区室可以由可穿透、可刺穿、可破坏(例如一个或多个安瓿)或可压低的气囊样材料(例如一个或多个袋)制成。如本文所述,此类区室可以通过施加压力进行操作,以便刺穿、破坏或压低区室,从而释放其内容物(例如用户用手指按压隔室封套)。此外,此类区室可以被手术刀、刺或附件(其在施加力(例如拇指往下压)到所述区室上之后侵入所述区室内)穿透。

[0125] 在另一个实施方案中,缓冲剂区室自身是半刚性的、易弯的、可压低的或气囊样的,从而提供用于挤压区室以排出其中的任何内容物的工具。因此,在某些实施方案中,用户可以对区室 1708、1310 施加压力,这将导致其中的内容物(无论是自含的,还是在亚区室中包含的)被释放。

[0126] 在某些实施方案中,区室 1708、1310 包含溶液,包括但不限于洗涤缓冲剂或追踪缓冲剂,其动员或增强经处理的样品混合物到测试条 1710 内的移动。一般地,在区室中的此类液体溶液可以包含洗涤缓冲剂、盐水或任何其他所需溶液。此外,在某些实施方案中,此类溶液可以包含试剂、酶、标记或化学化合物。洗涤缓冲剂可以动员任何未结合的标记,促使其沿着测试条移行通过检测区带,从而减少本底。洗涤缓冲剂可以进行最佳化,以经由流体压力推动测定混合物和/或减少本底信号,例如本底。洗涤缓冲剂可以包括约 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或更多蔗糖。在一个实施方案中,洗涤缓冲剂含有 20%蔗糖。

[0127] 在一个实施方案中,测试条 1710 的下游排列吸收基质 1711。在另一个实施方案中,测试膜可以分别与吸水基质和吸收基质之一或两者重叠或紧靠。此外,在某些实施方案中,TD 上部外壳 1706 或下部外壳 1712 可以包含身份(identity)标记 1703 和 1705,其确定且对应于在 SCD 上的等同的身份标记,并且还可以确定 TD 的批号(例如用于质量保证和

跟踪目的)。通过上部外壳的一个或多个窗口 1704、1610 允许结果的显现和读取(还参见, 例如图 16)。

[0128] 在另一个实施方案中,测试膜进一步包含排列在最后一个可寻址线路下游的吸收区带。在一个实施方案中,区室排列在横向流动 1620 膜的上游。在另一个实施方案中,吸水垫直接排列在样品入口之下。

[0129] 用于制造吸收基质的合适材料包括但不限于亲水聚乙烯材料或垫、丙烯酸纤维、玻璃纤维、滤纸或垫、烘干的纸、纸浆、纤维等。例如,横向流动膜吸收区带可以包含材料例如无纺 spunlaced 丙烯酸纤维,即 New Merge(可从 DuPont 获得)或 HDK 材料(可从 HDK Industries, Inc. 获得)、经处理以改善(例如降低)材料的疏水性质的无纺聚乙烯。

[0130] SCD 与 TD 的偶联

[0131] 在某些实施方案中,SCD 包含分隔物。具有含有分隔物的狭窄远端的 SCD 的示例性例子显示于图 6 中。SCD 610 具有在 SCD 的远端 630 的分隔物 620。

[0132] 在下部隔室混合或试剂组件 730 中的 SCD 远端的示例性例子显示于图 7 中。SCD 的远端可以含有具有直径减少的分配尖端 770 的出口区 703。如上所述,试剂珠 780、781、782 可以在下部隔室 730 中。

[0133] 在某些实施方案中,下部隔室 730 含有网格膜 775(还参见图 3、10 和 15,350、1075、1510),其包含在下部隔室 730 内的一个或多个珠 780、781、782。

[0134] 如图 8 和 9 中所示,在一个实施方案中,下部隔室 930 的分配尖端 870、970 包含隔开物 885、985,其可以包括裂口 890。在一个进一步的实施方案中,下部隔室还包含网格膜 975,其放置有且保护免疫试剂(例如包含本文描述的捕获探针和检测探针的珠)。在某些实施方案中,隔开物由弹性体材料例如橡胶或氯丁橡胶制成。

[0135] 在某些实施方案中,隔开物包括裂口。例如,裂口提供通过其可以插入插管的工具。在某些实施方案中,裂口保留截留在样品接受管内的空气,且保留通过连接样品接受管和上部隔室(以及“样品收集器具”)而产生的正压。

[0136] 在其他实施方案中,隔开物是可刺穿的,从而当刺穿时,在 SCD 和 TD 之间形成流体通路。在某些实施方案中,在刺穿后,隔开物是可再密封的。可再密封的隔开物阻止流体或空气逃离 SCD 或样品的任何滴落或丧失,即使在刺穿后。在一个实施方案中,隔开物由弹性体材料例如橡胶或氯丁橡胶制成,并且包括裂口 890。在某些实施方案中,隔开物保留在 SCD 内的压力和流体,直至它与 TD 的插管偶联,形成流体通道。裂口由于隔开物 620、885、985 的橡胶样、弹性体材料的压力而允许牢固闭合,且还允许插管 1005、1105、1235、1420 容易地经由裂口插入和通过,产生流体通路以允许流体流动到 TD 内。

[0137] 在一个实施方案中,参见图 10,TD 1035 的插管 1005、1105 在裂口 1090 处刺穿 SCD 的隔开物 1085、1185。SCD 可以包括网格膜 1075,以保留在下部隔室中的一个或多个试剂珠。在某些实施方案中,插管 1005、1105、1235、1420 可以具有任何合适的配置,如本领域已知的,并且可以是平头顶端或尖端的,并且可以是空心或实心的。

[0138] 在一个实施方案中,如图 15 中所示,SCD 1515 描述为与测试装置 1520 偶联。如所示的,测试装置包括具有试剂珠 1530、1531 和 1532(其用网格膜 1510 保持在合适位置)的下部隔室,并且测试装置的插管 1525 延伸通过 SCD 的分隔物 1517,用于样品与在 SCD 中包括的特异性试剂、检测探针和捕获探针(其与样品中存在的一种或多种分析物反应)的

反应产物的平滑递送。

[0139] 存档样品。在一个实施方案中,提供了用于存档部分样品的工具。在某些实施方案中,SCD 或 TD 或两者包含存档工具,其可以包含吸附或吸收基质(例如纸或膜)、限定长度的短毛细管、或小储库/区室,用于在下部隔室中保留样品的部分。

[0140] 在某些实施方案中,存档过滤器或膜位于装置中的在样品遇到反应试剂前的位置中(例如 206、350、775、975、1075、1175、1275、1510)。

[0141] 在另一个实施方案中,SCD 包含用于保留存档样品的工具。例如,在 SCD 下部区室内,滤纸和/或疏水膜可以配置为保留样品,用于存档目的。材料的各种组合可以用作存档的工具,从而可以单独或组合使用 1、2、3 种或更多种材料。在一个实施方案中,用于存档的工具包含可以彼此触及或不触及的 3 个盘。盘可以包含格栅部分和垫部分,其中垫部分设计为保留存档样品。垫部分可以包含任何吸附/吸收材料,并且可以包含盘的 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50% 表面积。此外,格栅部分可以包含相对于盘表面隆起的三维(“3D”)基质。此类 3D 突起可以提供试剂珠可以排列到其内的格栅。此类珠的大小可以测量为约 0.5、1、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4、4.5、5.0、5.5 到约 6.0mm。

[0142] 在一个实施方案中,可以提供用于存档样品的小储库的小区室置于 TD 中,与端口/开口邻近,用于将样品递送给 TD。此类存档区室可以配置为可取出的,或如此配置,使得存档样品在其上排列的基质自身可从所述区室中取出。例如,大小可配合到区室内的过滤器/膜材料可用于收集预定容量的样品(例如细胞、细胞组分、蛋白质、核酸等)。随后取出包含存档样品的过滤器/膜,且适当地贮存,例如干燥或冷冻。在一个实施方案中,存档材料是一种或多种细胞或细胞组分,包括但不限于蛋白质、肽、蛋白质片段或核酸分子。因此,样品可以保存用于进一步的测试,取决于存档分子的类型(例如,蛋白质对核酸)。此外,存档盘提供贮存样品的工具,且维持所述样品的稳定性约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21 至 30 天或更久。

[0143] 在另一个实施方案中,存档盘置于防腐溶液中,其延长所述存档样品的贮存时间约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 周。当然,取决于场地中的设置,样品可以无限贮存(例如在对样品实施冷冻后)。在另一个实施方案中,下部隔室中的反应区室可以从样品接受管中取出且置于外壳(例如塑料管)中。在一个实施方案中,区室保留小容量的样品混合物,其中可以加入防腐剂用于贮存。在另一个实施方案中,上部隔室中提供的溶液或下部隔室中的反应溶液还可以包括存档液体样品所需的防腐剂。此类防腐剂是本领域已知的。参见例如,美国专利 RE29061、Buccholz 等人 Transfusion 1999 Sep ;39(9)998-1004 ;在 Quiagen.com 可获得的 Quiagen 专门试剂。在一个实施方案中,保留存档样品用于后续测试(例如通过 RT-PCR)。

[0144] 在另一个实施方案中,SCD 不具有用于保留存档样品的任何玻璃料(frits)或工具。不具有用于保留存档样品的任何玻璃料或工具的 SCD 的例子显示于图 3 中,其中膜 350 使免疫试剂(例如 355)与样品接受管 310 的上部分离。

[0145] 样品鉴定。在一个实施方案中,SCD 还可在样品收集器具或样品接受管上的任何地方包括一种或多种鉴定标记(例如,允许至少 109 个独特值的条形码),信息例如患者 ID 可以在其内或其上附着至样品接受管。鉴定标记还可以用于记录 TD 的方法、批号和有效期。标记可以被剥离且可以是自粘性的。在一个实施方案中,至少一个标记保留在 SCD

上,而剥离的拷贝可以置于 TD 和 / 或任何设施文书工作或存档储库工具上。显示患者 ID 1703 和批号 1705 的条形码的示例性例子显示于图 17 中。条形码格式可以是通用标准,例如 Codabar。在其他实施方案中,鉴定标记可以是本领域已知的信号发射转发器,包括但不限于射频发射器、光发射器或电磁波发射器。

[0146] SCD 区室。在本发明的某些方面,SCD 在下部隔室中包含一个或多个区室,其可以包括试剂、滤器、膜和储库。在一个实施方案中,SCD 的上部隔室可以包含 1、2 个或多个区室,其各自可以进一步含有溶液。在某些实施方案中,此类区室可以包含相同或 2 种不同溶液、试剂、缓冲剂或其组合。进一步地,多个区室可以串联安排在下部隔室(例如串联的多个笼)中。此外,此类区室在本文公开内容中可以称为一个或多个“亚区室”。

[0147] 在一个实施方案中,区室相对于取样器具是远侧的,并且含有液体或固体试剂组分,所述组分包含对于一种或多种特定分析物(或分析物类型)特异的结合试剂。例如,液体或固体试剂组分可以包括特异性结合试剂(例如抗体),其能够特异性结合样品中可能存在的分析物。在某些实施方案中,在 SCD 中利用单个反应或混合区室(下部隔室),其对于取样器具是远侧的且与取样器具流体联系。在其他实施方案中,可以利用一个或多个区室,其中一个区室充当裂解或提取隔室,而对于第一区室是远侧的第二区室充当试剂-样品混合隔室。在进一步的实施方案中,过滤工具可以排列在一个或多个区室的近端,所述一个或多个区室相对于取样器具排列在远侧。过滤工具可以用于在样品分析过程中的任何点上从样品中去除某些组分,例如在提取/裂解前、在样品-试剂混合后、在处理过程中或在从 SCD 中释放前。此外,相同或不同过滤工具可以排列在多个区室上,如果此类多个区室存在于样品接受管中。

[0148] 为了确保试剂的适当反应和分析的结果,必须发生样品和结合试剂的混合,并且样品必须接触到结合试剂且与结合试剂充分相互作用且混合。在一个实施方案中,试剂-样品混合隔室具有混合指示珠。所述珠可以用当已发生适当混合时产生指示的材料包被。例如,混合珠可以用红色染料包被,从而在珠的存在下在样品和结合试剂的混合过程中,通过溶液变成红色来证实充分的接触和混合。一般地,染料应是可释放的、水溶性染料,其在释放后对于肉眼是可见的。优选地,染料不与样品分析物相互作用。各种颜色的各种合适的染料是本领域已知的,例如溴甲酚绿、溴甲酚蓝、品红、甲基绿、邻甲酚红、橙黄 G 和番红 O。这种染料指示物甚至允许初学者用户通过观察作为试剂已发生足够的混合的指示的红色的发展,利用装置且获得精确的可重现的结果。例如,珠可以这样设计,使得红色在混合 5-10 秒后产生。样品和结合试剂的混合可以混合 5、10、15、20、25、30、60 或更多秒。可替代地,样品和结合试剂的混合可以是 5-10、或 10-15、或 15-20、或 20-30 或 30-60 秒或更多。已显示,至少 5 秒的混合对于样品和结合试剂之间的适当相互作用是足够的。混合的例子显示于图 22 中。更长时间段(例如 30 秒)的混合不显著改善反应结果。混合可以通过几种方法来实现,包括轻弹 SCD、腕弹 SCD 和涡旋 SCD。

[0149] 样品。样品是待测试一种或多种分析物的存在和 / 或浓度的任何材料。一般而言,生物学样品可以是得自受试者例如非人动物或人且用于 TDs 中的任何样品。例如,生物学样品可以是任何体液样品、细胞或来自活组织检查的组织样品。体液样品可以包括但不限于血液、尿、痰、精液、粪便、唾液、胆汁、脑液、鼻拭子、鼻咽拭子、鼻咽抽吸物、鼻洗液、咽喉拭子、泌尿生殖道拭子、鼻抽吸物、脊髓液等。例如,在使用鼻拭子的情况下,干聚酯拭子可

以置于鼻孔内,沿着与口顶部相同的路线,并且停留在合适的位置数秒。它随后缓慢取出,伴随或不伴随旋转动作。2个鼻孔可以用相同拭子进行测试。在某些实施方案中,用于收集样品的拭子可以是样品收集装置(SCD)的部分。在其他实施方案中,用于收集样品的拭子可以与SCD分开,且在置于SCD中之前用于收集样品。作为另一个例子,在使用鼻咽拭子的情况下,弹性、薄聚酯拭子可以置于鼻孔内且回到鼻咽且停留在合适的位置数秒。它随后缓慢取出,伴随或不伴随旋转动作。第二拭子可以用于另一个鼻孔。作为另外一个例子,在使用鼻咽抽吸物的情况下,鼻咽流体可以通过抽吸例如通过管取出。将管置于鼻孔内,沿着与口顶部相同的路线。应用抽吸并且缓慢抽出管,伴随或不伴随旋转动作。来自另一个鼻孔的样品可以用相同管或不同管以相同方式收集。作为另外一个例子,在使用鼻洗液的情况下,患者可以就座于舒适位置中,头向后轻微倾斜。在某些实施方案中,患者可以通过说“K”使其咽喉后部保持关闭,同时将洗涤流体(例如盐水)置于鼻孔中。使用移液管,可以一次将1-1.5ml流体置于一个鼻孔内。患者随后将其头向前倾斜,并且让流体流动到收集皿内。这个过程可以交替鼻孔来回重复,直至已使用总共10-15ml流体。作为另外一个例子,在使用咽喉拭子的情况下,拭子伴随压力使用,以擦拭扁桃体和咽喉的后部。随后将拭子置于所提供的容器中。生物学样品还可以包括衍生自直接得自受试者例如人的样品的任何样品。例如生物学样品可以是血样的血浆或血清级分、收集的细胞或组织的蛋白质或核酸提取物、或来自以改善样品的可检测性的方式处理的样品,例如含有粘液溶解剂和去垢剂的裂解缓冲剂,所述粘液溶解剂分解鼻样品中的粘液,显著减少样品的粘度,所述去垢剂裂解病毒,从而释放抗原且使得其可通过测定来检测。样品可以来自任何受试者动物,包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖类、鱼类和无脊椎动物。哺乳动物的非限制性例子包括人、猪、马、牛、小鼠、猫、犬或绵羊。

[0150] 样品可以从任何生物学或非生物学来源收集。例如,样品可以衍生自任何生物学来源,例如生理学流体,包括血液、血清、血浆、唾液或口腔液、痰、眼晶状体流体、鼻流体、鼻咽或鼻咽拭子或抽吸物、汗、尿、乳、腹水液、粘液、滑液、腹膜液、经皮渗出物、咽渗出物、支气管肺泡灌洗液、气管抽吸物、脑脊髓液、精液、宫颈粘液、阴道或尿道分泌物、羊水等。此处,细胞组织例如毛发、皮肤和指甲刮取碎屑的流体匀浆物和肉提取物也视为生物学流体。预处理可以涉及由血液制备血浆,稀释或处理粘性流体等。处理方法可以涉及过滤、蒸馏、分离、浓缩、干扰组分的灭活、和试剂的添加。除生理学流体外,可以使用其他样品,例如水、食物产品、土壤提取物等,用于执行工业、环境或食物生产测定以及诊断测定。此外,怀疑含有分析物的固体材料可以用作测试样品(在它进行修饰以形成液体介质或释放分析物后)。生物学、工业和环境样品在测试前的选择和预处理是本领域众所周知的,并且无需进一步描述。

[0151] 其他感兴趣的领域包括兽医学疾病的诊断,肉、家禽、鱼的细菌污染的分析,食物工厂、餐馆、医院和其他公共设施的检查,环境样品包括海滩、海洋、湖泊或游泳池的水的污染的分析。通过这些测试进行检测的分析物包括病毒和细菌抗原以及化学品,包括例如重金属(例如铅、汞等)、杀虫剂、激素、药物及其代谢产物、烃和所有种类的有机或无机化合物。

[0152] 安全工具。在某些实施方案中,安全工具1701排列在可压低隔室1707上,从而使得隔室的内容物不会意外排放到与横向流动膜流体联系的通道内。安全工具可以是封套或

凸缘,其被提高或拉回以暴露可压低隔壁或在其上排列的按钮。

[0153] 此外,此类安全工具可以充当在 SCD 的远端上存在的特异性同源接头、luer 或阀的接头。因此,安全工具可以覆盖 SCD 的远端衔接到其内的开口,例如在样品释放到 TD 内之前。在一个另外的实施方案中,这样设计读取器,使得 TD 仅可以插入接受端口内,如果首先去除安全封套。例如,去除了安全封套的 TD 指示,样品已引入 TD 内,并且运行缓冲剂已从在开口(接头/安全封套)上游的区室 1708、1620 中释放。在一个实施方案中,开口排列在吸水垫 1709 上。

[0154] 间隙工具。在某些实施方案中,TD 包含排列在横向流动膜(例如吸水垫)和与缓冲剂储库流体联系的通道之间的间隙。间隙用于保持在按钮储库中含有的任何溶液与测定样品分离,直至根据测定发展的合适时间。例如,当用户对样品开口上游的区室 1708、1620 施加压力时,间隙被迫闭合,并且区室中含有的溶液朝吸水垫的方向流动且通过吸水垫,从而动员样品通过测试条。如上所述,溶液可以包含任何所需缓冲剂、试剂、化学化合物、染料、标记或珠。应当理解,本文公开的间隙实施方案可以适合于本文公开的任何 TD 配置。在某些实施方案中,间隙可以是约 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8、9 或 10mm。在一个实施方案中,间隙大于 0 且小于 3mm。

[0155] 在一个实施方案中,将经 SCD 处理的样品引入 TD 内,随后释放追踪或运行缓冲剂,且其跟随样品通过吸水垫且进入测试条内,其中特定模式的捕获部分结合其配偶体捕获部分。

[0156] 容器和溶液释放。在一个实施方案中,TD 是横向流动测试条,优选但不必一定包装在设计为由读取器读取的外壳中。在一个实施方案中,洗涤/运行缓冲溶液包含在箔、囊或水泡型小包(例如类似于番茄酱/调味品小包)中,其排列在 TD 中的样品进入端口上游。囊或小包可以这样设计,使得它对于 2 个正交轴是对称的,从而使得它可以容易地装载到 TD 内。因此,在一个实施方案中,当向下按压时,排列在小包上的 TD 的封套可以引起小包被破坏且释放其中的内容物。

[0157] 在一个实施方案中,上游洗涤/缓冲剂区室包含软膜(例如填充成形的密封包)或安瓿,其在施加最低限度的力(例如用户用手指按压)后容易地破裂/破坏。此类洋葱皮(onion skin)区室可以被硬的可去除的封套进一步覆盖,这预防洋葱皮的意外破坏。样品通过端口进入 TD,并且装置可以具有狭窄通道用于回收存档样品。

[0158] 在另一个实施方案中,按钮部分可以包含当压低按钮时刺穿小包(从而释放其中的内容物)的穿透附件。片弹簧或悬臂弹簧可以搁在小包和按钮之间,并且导致施加在小包上的压力以确保释放所有内容物。进一步地,TD 的几何学这样配置,以使得洗涤缓冲剂导向吸水垫。此外,按钮,弹簧和外壳的几何学还减少小包区域中的气泡,从而允许洗涤缓冲剂向任何方向流动,需要时,甚至抗重力(例如向上),但不回到小包的贮存区域内。

[0159] 产生的洞的数目和大小以及产生的洞的几何学可以相对于彼此进行调整,以便允许实现离开小包的洗涤缓冲剂的预定流动。在一个实施方案中,穿透附件(例如针)在小包顶部提供流体阻力障碍,允许流体朝吸水垫的方向离开小包的下部。穿透针还可以是逐渐变细的,以便达到或增强这种功能。在一个实施方案中,弹簧是按钮、顶部外壳或下层外壳的组成部分,或它可以是分开的组件,其经配置以易于配合且密封洗涤/运行缓冲剂隔室。在一个实施方案中,按钮的侧面设计为在压低按钮时使夹点降到最低。侧面还可以设计为

提供挡板型功能,使液体离开 TD 的危险降到最低。

[0160] 在另一个实施方案中,支持吸水条末端的零件的几何学设计为允许穿透零件(例如针)穿过小包且不允许小包在小包和支持零件之间形成密封。针的作用是穿透吸水垫和小包。在另一个实施方案中,仅穿透小包,且吸水垫定位于紧邻穿透的洞。

[0161] 在一个实施方案中,TD 中的洗涤/运行缓冲剂包含在可破坏/破裂的基质(例如安瓿)中。对密封膜或按钮施加的压力破坏安瓿,从而释放其内容物。在一个实施方案中,通道、沟槽或凹槽设计用于将缓冲剂导向吸水垫。

[0162] 在一个实施方案中,用于接受 SCD 远端的开口包含脱离环(“锁环”),其与 SCD 部件附着且当去除 SCD 时,从 TD 主体中脱离,从而释放来自在所述开口上游或紧上游的区室/储库的洗涤或运行缓冲剂。在另外一个实施方案中,当扭转至锁位置时,锁环允许样品分配到 TD 上,与此同时释放来自上游区室的缓冲剂或洗涤缓冲剂。例如,仅当环在锁位置中时,锁环包含与洗涤/缓冲剂区室的孔、通道或洞对齐的通道、洞或孔的几何学。此类锁环可以与任何一个或多个上游区室一起使用,这可以用于递送缓冲剂/洗涤液或任何其他液体。在一个备选实施方案中,SCD 可以包含锁环,其配合到 TD 主体内,并且从解锁位置扭转至锁位置。

[0163] 时间延迟工具。在本文的涉及从样品上游隔室(例如样品进入端口)释放洗涤/运行缓冲剂的任何实施方案中,可以将时间延迟零件配置到 TD 内,从而使得在引入样品和释放洗涤/运行缓冲剂之间经过一段时间。例如,干吸水垫基质在润湿时(即在洗涤缓冲剂释放后)膨胀,并且由于膨胀而与否则断开的吸水条连接。例如,应用样品,并且破坏/破裂包含洗涤缓冲剂的安瓿或基质,以将液体释放到干吸水垫部分内,所述干吸水垫部分膨胀且提供与含有样品的吸水垫部分的液体联系。从而样品/缓冲剂可以经由吸水垫运行通过测试条。

[0164] 在另一个实施方案中,将预定长度/密度的纤维膜置于洗涤缓冲剂区室和吸水膜之间,所述纤维膜可以延迟洗涤缓冲剂与吸水膜的接触,从而充当时间延迟机制。缓冲剂向下芯吸至纤维膜且在膜纤维的末端上积累,直至它到达吸水膜且与在吸水膜上排列的样品一起流通。在另一个实施方案中,缓冲剂在膜纤维的末端积累,直至存在足够体积以桥接分隔纤维膜与吸水膜的间隙。

[0165] 在其他实施方案中,将柱塞或弹簧机制配置到 TD 内,其通过减少区室/安瓿体积起作用,从而确保其中的内容物被分配到吸水垫上。通过用户对按钮施加压力,柱塞可以前进,或装载弹簧的柱塞可以以自动化方式(例如当置于读取器中时)推进。当它推进时,柱塞形成密封,从而使得液体离开的唯一方式是通过吸水垫。

[0166] 测试条。在一个实施方案中,样品通过 SCD 递送给测试条,所述 SCD 包括杆和拭子。测试条的上游是具有洗涤缓冲剂或其他流体的区室。测试条包括测试区带 A、B 和 C 和对照区带。经由缀合物标记,检测探针提供了可检测信号。随后将 TD 插入读取器内,在其中测量和/或检测来自标记的信号。在另一个实施方案中,在短的测定处理期已完成,测试条可以插入读取器中的可移动托盘内,进行极短的读取期(约 20 秒),这允许用一个读取器获得测试的高得多的通量。进一步地,在另一个实施方案中,测试条可以在加入样品前插入读取器内。

[0167] 在一个实施方案中,沿着测试条的液体转运基于毛细管作用。在一个进一步的实

实施方案中,沿着基底的液体转运基于非吸水横向流动,其中以基本上相等的速率携带液体样品的所有溶解或分散的组分,且以横向的相对未受损的流通过基质,这与例如在与一种或多种组分化学地、物理地、离子地或其他方式地相互作用的材料中发生的一种或多种组分的优先保留相反。参见例如,通过引用整体合并入本文中的美国专利 4,943,522。

[0168] 任何合适的材料可以用于制备本文公开的装置,此类材料包括刚性或半刚性、水不透性材料,例如玻璃、陶瓷、金属、塑料、聚合物或共聚物,或其任何组合。在某些实施方案中,SCD 或 TD 包含塑料、聚合物或共聚物,例如对破坏有抵抗力的那些,例如聚丙烯、异质同晶聚合物、聚碳酸酯或环烯烃或环烯烃共聚物。此外,本发明的装置可以通过合适的制造方法进行制备,例如但不限于注入塑型、吹塑、机械塑型或压塑。

[0169] 如本文使用的,测试条基质是指,使用本领域已知的常规方法使配偶体捕获部分与之连接的材料。多种材料可以用作基质,包括可以充当用于附着目的分子的支持物的任何材料。此类材料是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于,有机或无机聚合物、天然和合成聚合物,包括但不限于琼脂糖、纤维素、硝酸纤维素、乙酸纤维素、其他纤维素衍生物、右旋糖酐、右旋糖酐衍生物和右旋糖酐共聚物、其他多糖、玻璃、硅胶、明胶、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、人造纤维、尼龙、聚乙烯、聚丙烯、聚丁烯、聚碳酸酯、聚酯、聚酰胺、乙烯聚合物、聚乙烯醇、聚苯乙烯和聚苯乙烯共聚物、与二乙烯苯等交联的聚苯乙烯、丙烯酸树脂、丙烯酸盐 / 酯和丙烯酸、丙烯酰胺、聚丙烯酰胺、聚丙烯酰胺掺和物、乙烯和丙烯酰胺的共聚物、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯衍生物和共聚物、具有多种官能团的其他聚合物和共聚物、乳胶、丁基橡胶和其他合成橡胶、硅、玻璃、纸、天然海绵、不溶性蛋白质、表面活性剂、红细胞、金属、类金属、磁性材料或其他商购可得的介质或复合材料,其包含涂有材料的固体或半固体基质,所述材料改善条基质的亲水性质,例如聚苯乙烯。聚酯薄膜,聚乙烯,聚碳酸酯,聚丙烯,聚丁烯,金属例如铝、铜、锡或涂有右旋糖酐的金属的混合物,去垢剂,盐, PVP 和 / 或用静电或等离子体放电处理,以对表面增加电荷从而对表面赋予亲水性质。

[0170] 在一个实施方案中,横向流动膜包含多孔材料例如由 Porex Technologies Corp. of Fairburn, Ga., USA 制造的高密度聚乙烯片层材料。片层材料具有开孔结构,一般密度为 0.57gm/cc (在 40% 空隙体积下),平均孔直径为 1-250 微米,平均值一般为 3-100 微米。在另一个实施方案中,标记区带包含多孔材料,例如无纺 spunlaced 丙烯酸纤维 (类似于样品接受区带),例如 New Merge 或 HDK 材料。通常,多孔材料可以由一般不透水的层例如聚酯薄膜背衬或叠在其上。当采用时,背衬一般通过粘合剂 (例如 3M 444 双面胶带) 固定在基底上。一般地,不透水的背衬用于低厚度的膜。可以使用广泛多样的聚合物,条件是它们不与测定组分非特异性结合,并且不干扰流体样品的流动。示例性聚合物包括聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等。有时,基底可以是自我支持的。还可以使用顺应非吸水流动的其他膜,例如聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯、乙酸乙烯酯和氯乙烯的共聚物、聚酰胺、聚碳酸酯、聚苯乙烯等。在另外一个实施方案中,横向流动膜包含材料例如未处理的纸、纤维素掺和物、硝酸纤维素、聚酯、丙烯腈共聚物等。标记区带可以构建为提供吸水或非吸水流动,通常流动类型类似于或等同于样品接受区带的至少部分中提供的那种。在一个通常的实施方案中,标记区带包含无纺的织品例如人造纤维或玻璃纤维。适合于使用的其他标记区带材料包括美国专利 5,075,078 中公开的那些层析材料,所述专利通过引用合并入本文。

[0171] 在另一个实施方案中,用包括材料封闭剂和标记稳定剂的溶液处理测试条基质。

封闭剂包括牛血清白蛋白 (BSA)、甲基化 BSA、酪蛋白、酸或碱水解的酪蛋白、脱脂奶粉、鱼明胶等。稳定剂是易于获得和本领域众所周知的,并且可以例如用于稳定标记的试剂。在某些实施方案中,含有溶液的上游区室可以包含多个安瓿,其可以选择性地被刺穿或破坏以释放其内容物。因此,在一个实施方案中,在一个安瓿中含有封闭剂,所述安瓿用于预处理(例如“封闭”)测试条(即横向流动膜),同时另外的安瓿致力于洗涤样品通过测试条。

[0172] 区带、标记和试剂。在本文的各种公开内容中,测试条/横向流动膜包含多个测试区带。测试区带一般含有预先选择的配偶体捕获部分,其中预先选择的区域包含捕获部分,其是与分析物-特异性结合试剂例如单克隆抗体缀合的捕获部分的配偶体。在某些实施方案中,捕获探针可以包括多个类型的标记,以检测一种或多种分析物以及用于对照。这些多个类型的标记试剂可以使用各种读取器(例如能够检测来自荧光标记的不同波长的读取器)进行检测,或可以视觉检测或用能够检测不同波长或颜色的读取器进行检测。可替代地,相同标记可以用于各种分析物。因此,如果在相同装置中使用且进行捕获,那么通过区分检测到的标记,一种标记的试剂可以与另一种标记的试剂区分,和/或通过了解哪个可寻址线路提供结果,可以测定分析物。通常,基于单独的标记组分来差异检测具有不同特异性的标记试剂的能力不是必需的,因为在装置中存在限定的测试区带和对照区带,这允许标记试剂在指定区带中积累。

[0173] 在某些实施方案中,每个分析物结合组包括检测探针,其中特异性结合试剂与发出不同波长的不同荧光标记缀合。因此,当在 SCD 中提供多个分析物结合组时,每个分析物结合组利用不同于任何其他分析物结合组的标记。例如,与 A 型流感病毒特异性结合的第一组抗体可以与一个类型的荧光标记缀合(即,与第一种荧光标记缀合的检测探针特异性结合试剂),而例如针对 B 型流感病毒的第二组和后续组的特异性结合抗体(即,与第二种和后续荧光标记缀合的检测探针特异性结合试剂)可以各自包含与不同荧光标记缀合的可区分的检测结合试剂。当然,显而易见的是,检测探针也可以利用相同标记,或分析物结合组可以使用多种不同标记,例如一种或多种荧光标记、一种或多种金属、一种或多种生色团或任何其他合适标记。在一个实施方案中,荧光标记发出足够不同的波长,从而使得可以区分几个测试线路。

[0174] 本说明书提供了在单个免疫测定装置中的单个或多个对照区带的开发和使用,所述对照区带以相对于单独的测试区带的预定方式放置,从而允许容易地鉴定在装置中测试的一种或多种目的分析物。本说明书还提供了具有各种形状、物理或化学身份(identity)和颜色的对照区带的制备。部分地,此类对照区带的使用允许容易地使用免疫测定装置,并且允许在单个测定过程中鉴定多种分析物。

[0175] 在一个实施方案中,TD 不包括其中含有的能够与分析物特异性结合的任何试剂(例如对于 H5N1 或 H1N1 特异的抗体)。在此类实施方案中,与一种或多种目的分析物结合的试剂一般存在于 SCD 中。TD 可以包括能够与捕获探针的同源捕获部分配偶体特异性结合的捕获部分配偶体,并且从而捕获在测试区带的可寻址线路上的分析物。

[0176] 测试区一般包括一个或多个对照区带,其用于验证样品流动是如预期的。每个对照区带一般包含在空间上不同的区域,所述区域通常包括经固定的特异性结合对的成员,其与经标记的对照试剂反应。在某些实施方案中,对照区带含有目的分析物的真实样品,或其片段。在此类实施方案中,可以利用一个类型的经标记的试剂(例如经标记的试剂将与

分析物和对照结合),其中含有经标记的试剂的流体样品流动到测试区带和对照区带。不与目的分析物结合的经标记的试剂随后将与置于对照区带中的目的分析物的真实样品结合。在此类实施方案中,一般地,测定将以这样的方式配置,以便包含过量的经标记的试剂(例如足以结合分析物和对照)。在另一个实施方案中,对照区带含有对于经标记的试剂特异的抗体或另外提供经标记的试剂的固定。在操作时,经标记的试剂限制在一个或多个对照区带的每一个中,即使当任何或所有目的分析物在测试样品中不存在时。

[0177] 在某些实施方案中,将标记的对照试剂引入 SCD 或 TD 中的流体样品流内。例如,在 TD 中,对照试剂可以包括在上游溶液/缓冲剂储库中,这已在本文中描述。在另一个例子中,在样品应用于 TD 之前,可以将标记的对照试剂加入流体样品中,例如存在于 SCD 的混合亚隔室中的那些。

[0178] 标记的对照试剂和区带的示例性功能包括例如,确认样品的液体流有效溶解且动员来自 SCD 的标记的试剂,所述标记的试剂在一个或多个限定的测试区带中被捕获。此外,对照可以证实,足够量的液体正确地行进通过测试条的测试和对照区带,从而足够量的配偶体捕获部分可以与和特定分析物复合(即,经由抗原特异性结合试剂)的相应特异性捕获部分反应。进一步地,对照试剂证实,免疫复合物(例如分析物-特异性结合分析物的试剂)移行到包含测试和对照区带的测试区上,以这样的量穿过一个或多个测试区带,所述量使得标记的分析物的积累将产生可见或以其他方式可读取的信号(在一个或多个测试区带中存在阳性测试结果的情况下)。此外,对照区带的另外的功能可以是,充当参考区带,其允许用户鉴定作为可读取的区带展示的测试结果。

[0179] 因为 TD 可以掺入一个或多个对照区带,所以标记的对照试剂及其相应的对照区带优选这样开发,其使得在流体样品与装置接触后,每个对照区带将变得可见,且对于所有对照区带具有所需强度,无论一种或多种目的分析物存在或不存在。

[0180] 在一个实施方案中,单个标记的对照试剂将被测试条上的每个对照区带捕获。通常,如果存在多个对照区带,那么此类标记的对照试剂将排列在区带上或区带中,其量超过组合的对照区带的总结合容量的容量。相应地,对于对照标记特异的捕获试剂的量可以以这样的量排列,所述量允许在一个或多个对照区带中生成所需信号强度,且允许每个对照区带保留所需量的标记的对照试剂。在测定完成时,每个对照区带优选提供所需和/或预先设计的信号(在强度和形式方面)。涉及的预先设计的信号的例子包括,在每个对照区带中具有相等强度的信号,或在对照区带中遵循递增、递减或其他信号强度的所需模式。

[0181] 在另一个实施方案中,每个对照区带将对于独特的对照试剂特异。在这个实施方案中,标记区带可以包括多种和不同的标记的对照试剂,等于测定中的对照区带的数目,或相关地变动。一般地,每种标记的对照试剂可以被限制在一个或多个预先确定和特异的对照区带中。在一个或多个对照区带中积累后,这些标记的对照试剂可以提供相同的可检测信号(例如具有相同颜色),或提供可区分的可检测信号(例如具有不同的有色标记或其他检测系统)。

[0182] 在另外一个实施方案中,对照区带可以包括在先前实施方案中描述的 2 个类型的对照区带的组合。例如,一个或多个对照区带能够限制或结合单个类型的标记的对照试剂,并且相同测试条上的其他对照区带将能够结合一种或数种其他的特异性标记的对照试剂。

[0183] 在一个实施方案中,标记的对照试剂包含与特定结合对的成员偶联的可检测部

分。一般地,标记的对照试剂选择为不同于由工具识别的试剂,所述工具能够将目的分析物限制在测试区带中。进一步地,标记的对照试剂对于分析物一般不是特异性的。在一个通常的实施方案中,标记的对照试剂能够结合固定在对照区带上或对照区带中的特定结合对的相应成员或对照捕获配偶体。因此,标记的对照试剂被直接限制在对照区带中。

[0184] 在另一个实施方案中,形成标记的对照试剂的标记组分的可检测部分是是与下述相同的可检测部分:用作标记目的分析物的测试试剂的标记组分的那种。在一个通常的实施方案中,标记的对照试剂的标记组分不同于标记的测试试剂的标记组分,从而使得测定的结果可容易地确定。在另一个通常的实施方案中,对照标记和测试标记包括有色珠,例如有色乳胶。还通常地,对照和测试乳胶珠包含不同颜色。

[0185] 在一个进一步的实施方案中,标记的对照试剂包括链霉亲和素、抗生物素蛋白或生物素,并且对照捕获配偶体包括此类特异性结合对的相应成员,所述成员彼此容易地且特异性地结合。在一个例子中,标记的对照试剂包括生物素,并且对照捕获配偶体包括链霉亲和素。技术人员理解,可以备选地使用其他特异性结合对的成员,包括例如与分析物无关的抗原/抗体反应。在另外一个实施方案中,捕获配偶体可以包括本文公开的任何结合部分。

[0186] 对照区带的使用是有帮助的,因为对照区带中的信号的出现指示,在其下可以读取测试结果(即使是阴性结果)的时间。因此,当预期的信号出现在对照线路中时,可以注意到信号在测试区带中的存在或不存在。

[0187] 在再进一步的实施方案中,利用包含标志物的对照区带,当测试区域处于潮湿状态时,所述标志物在测试区域中变得可见。这个类型的对照区带在下述中描述:2001年9月10日提交的美国专利申请序列号09/950,366(目前悬而未决且作为美国专利申请公开号20030049167公开),和2002年9月10日提交的序列号10/241,822(目前悬而未决且作为美国专利申请公开号20030157699公开)。

[0188] 在某些实施方案中,利用这个类型的一个或多个对照区带。在另一个实施方案中,可以使用利用标记的对照试剂和对照区带的对照区带类型和当处于潮湿状态时展示对照区带的对照区带类型的组合。这允许获得对照区带,且同时还允许使用基于试剂的对照区带,以确定经SCD处理的样品中的试剂已有效再溶解和动员。此类实施方案还允许确定,特异性反应沿着通过例如TD、吸水条、测试条和吸收垫限定的通路如预期的发生。本公开内容还包括使用一个或多个对照区带,对于测定的每个对照区带,除在测试条的远端或下游末端上的对照区带外,当测试区域处于潮湿状态时,其变得可见。

[0189] 多分析物的测定。本说明书进一步提供建立快速的多分析物测定的工具,其是环境监控、医学的许多领域,特别是传染病领域中需要的。例如,涉及的装置包括对于A型流感或B型流感及其亚型(例如A型流感,H5N1或H1N1)的鉴别诊断有用的那些,其可以导致在一个步骤中对A型流感、B型流感和/或RSV进行差异处理或鉴别诊断。此类装置允许使用单个样品来一次测定多种分析物,并且有利地允许为了医生或一般而言的用户的利益,显著减少诊断过程的实践时间和持续时间。因此,在本发明的SCD中可以利用多种免疫试剂,其中所述多种试剂包含特异性探针的群体,其包含分别与标记和捕获部分缀合的特异性结合试剂。一般地,多种免疫试剂包含多个群体,所述多个群体各自对于不同分析物特异(与多种试剂内的其他群体相比较)。例如,多种免疫试剂可以对于一种病原体的几个类

型（例如 A 型流感，H5N1 和 H1N1）或几种不同的病原体（例如 A 型流感、B 型流感和 RSV）特异。

[0190] 利用本公开内容的装置和方法可以测定多种分析物。在用于测定样品中的一种或多种目的分析物的特定装置中，目的分析物的集合可以称为实验对象组 (panel)。例如，实验对象组可以包含 A 型流感病毒、B 型流感病毒、A 型流感病毒亚型、呼吸道合胞病毒 (RSV)、腺病毒和 / 或副流感病毒的不同类型（例如 1、2、3 型等）的任何组合。另一个实验对象组可以包含一种或多种上呼吸道感染的选择，包括例如肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*) 和 / 或肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)。另外一个实验对象组可以设计用于诊断性传播疾病，包括例如由衣原体属 (*Chlamydia*)、毛滴虫属 (*Trichomonas*) 和 / 或淋病 (*Gonorrhea*) 引起的疾病。在各种情况下，通过在 SCD 中掺入不同组的检测和捕获探针，特定实验对象组是容易获得的，所述探针设计为在 TD 上提供关于特定系列的分析物的信号，其已在本文中进行了描述。因此，特定 SCD 将提供检测分析物的特定实验对象组所需的所有试剂。在某些实施方案中，使用采用测试条的 TD 检测分析物，所述测试条具有对于目的分析物不是特异性的检测试剂，但含有对于由 SCD 供应的分析物 - 结合试剂特异的结合配偶体。因此，单个 TD 可以与包含用于分析物的不同实验对象组的免疫试剂的多种 SCD 一起使用，从而提供增强的效率和成本效益。在其他实施方案中，广泛范围的 TD 可以包含用于来自相关或不同病原体的几个系列的分析物的非特异性捕获探针，例如检测 HIV 和 HCV 抗原；HIV 和肺结核，A 型、B 型流行性感 冒和 A 型的亚型，细菌和病毒感染。

[0191] 例如，实验对象组可以任选包括多种目的分析物，包括 SARS 相关冠状病毒，A 型流感病毒；包含乙型肝炎表面 Ag 或 Ab、乙型肝炎核心 Ab、甲型肝炎病毒 Ab 和丙型肝炎病毒的选择的肝炎实验对象组；包含抗心磷脂 Abs (IgG、IgA 和 IgM 同种型) 的选择的磷脂实验对象组；包含类风湿因子、抗核抗体和尿酸的选择的关节炎实验对象组；包含 EB 核 Ag、EB 病毒衣壳 Ag 和 EB 病毒早期抗原的选择的 EB 实验对象组；其他实验对象组包括 HIV 实验对象组、狼疮实验对象组、幽门螺杆菌 (*H. Pylori*) 实验对象组、弓形虫属实验对象组、疱疹实验对象组、疏螺旋体属 (*Borrelia*) 实验对象组、风疹实验对象组、巨细胞病毒实验对象组、用分析物（包含肌钙蛋白的同种型与肌红蛋白和 / 或 CKMB 等）测试近期心肌梗塞的实验对象组。本领域技术人员理解，利用本文公开的装置，可以经由免疫测定法测定多个实验对象组。免疫测定法是本领域已知的。参见例如，CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coligan, John E. 等人，编辑 1999)。

[0192] 本领域技术人员已知的众多分析装置可以适合于检测多种分析物。例如，浸渍片、横向流动和流通装置，特别是其为免疫测定的那些，可以依照本文进行修饰，以便检测且区分多种分析物。示例性横向流动装置包括下述中描述的那些：美国专利 4, 818, 677、4, 943, 522、5, 096, 837 (RE35, 306)、5, 096, 837、5, 118, 428、5, 118, 630、5, 221, 616、5, 223, 220、5, 225, 328、5, 415, 994、5, 434, 057、5, 521, 102、5, 536, 646、5, 541, 069、5, 686, 315、5, 763, 262、5, 766, 961、5, 770, 460、5, 773, 234、5, 786, 220、5, 804, 452、5, 814, 455、5939, 331、6, 306, 642。可以进行修饰以用于可区分地检测流体样品中的多种分析物的其他横向流动装置包括美国专利 4, 703, 017、6, 187, 598、6, 352, 862、6, 485, 982、6, 534, 320 和 6, 767, 714。示例性浸渍片装置包括美国专利 4, 235, 601、5, 559, 041、

5, 712, 172 和 6, 790, 611 中描述的那些。本领域技术人员将理解, 上述专利可以且通常的确公开超过一种的测定配置, 并且同样在本文中提及, 用于此类另外的公开内容。有利地, 本文描述的改善可应用于各种测定, 特别是免疫测定配置。

[0193] 本发明的 SCDs 或 TDs 可以配置为与现有的分析物检测系统一起使用。例如, 本发明的 SCD 可以配置用于与现有的 TD 一起使用, 或现有的 TD 可以根据本文关于 TD 的公开内容进行配置 / 修饰。可以以此类方式进行修饰的某些示例性装置包括浸渍片、横向流动、药液筒、多路、微量滴定板、微流体、平板或测定或高通量平台, 例如下述中公开的那些: 美国专利 4, 235, 601、4, 632, 901、5, 559, 041、5, 712, 172 和 6, 790, 611、6, 448, 001、4, 943, 522、6, 485, 982、6, 656, 744、6, 811, 971、5, 073, 484、5, 716, 778、5, 798, 273、6, 565, 808、5, 078, 968、5, 415, 994、6, 235, 539、6, 267, 722、6, 297, 060、7, 098, 040、6, 375, 896、4, 818, 677、4, 943, 522、5, 096, 837 (RE35, 306) 、5, 096, 837、5, 118, 428、5, 118, 630、5, 221, 616、5, 223, 220、5, 225, 328、5, 415, 994、5, 434, 057、5, 521, 102、5, 536, 646、5, 541, 069、5, 686, 315、5, 763, 262、5, 766, 961、5, 770, 460、5, 773, 234、5, 786, 220、5, 804, 452、5, 814, 455、5939, 331 和 6, 306, 642。可以进行修饰以用于可区分地检测流体样品中的多种分析物的其他横向流动装置包括美国专利 4, 703, 017、6, 187, 598、6, 352, 862、6, 485, 982、6, 534, 320 和 6, 767, 714、7, 083, 912、5, 225, 322、6, 780, 582、5, 763, 262、6, 306, 642、7, 109, 042、5, 952, 173 和 5, 914, 241。示例性微流体装置包括美国专利 5, 707, 799、5, 837, 115 和 W02004/029221 中公开的那些。前述专利的公开内容各自通过引用整体合并入本文。

[0194] 在一个实施方案中, 参见图 12, 用户使用在取样部件 1250 上的样品收集器具 (例如拭子) 收集样品, 并且随后将其插入样品接受管 1220 内。上部隔室 1225 随后被压入到配合到样品接受管 1220 的开放的近端内。通过目视检查在样品收集管外部上的一个或多个指示物 505、510 的存在, 用户证实上部隔室 1225 正确就座到样品接受管 1220 内。在一个实施方案中, 如果仅指示物 510 从样品接受管 1220 的外部可见, 那么上部隔室 1225 是正确就座的, 并且形成了加压密封。样品收集装置 1210 的上部隔室 1225 压配到样品接受管 1220 的近端开放末端, 从而形成增压、密封单元后, 例如通过挤压或折断, 打开含有提取试剂 1260 的提取试剂隔室 1255 中的阀 1267, 并且提取试剂 1260 移动离开上部隔室 1225 且进入样品管 1220 内。上部隔室可以包括另一个区室或球 1257, 其可以手工操作, 以释放来自上部隔室的任何区室的内容物。在一个实施方案中, SCD 中的提取试剂包含在可破坏 / 破裂的基质 (例如安瓿) 中。对密封膜或按钮施加的压力破坏安瓿, 从而释放其内容物。提取试剂 1260 重构在下部隔室 1230 中含有且通过网格膜 1275 保留的冻干试剂珠 1280, 润湿取样器具 1250, 且从所述器具中提取样品, 在某些情况下, 用户例如通过 SCD 1210 的快速振荡或其他搅拌帮助提取样品。经重构的试剂珠 1280 和经提取的样品这样反应, 使得在经提取的样品内的目的分析物与捕获探针结合, 形成易于由 TD 检测的免疫复合物。

[0195] 例如通过使用在 SCD 1210 的装配过程中截留或建立的压力或重力流动, 含有免疫复合物的经提取的样品随后从 SCD 1210 分配到 TD 1215 内。将 SCD 1210 的分配尖端 1270 插入 TD 1215 的端口 1235 内, 从而使得插管 1005 插入通过隔开物 885 的裂口 890, 跨越样品接受管 1220 的分配尖端 1270, 产生流动通路。建立的压力和 / 或重力迫使流体样品通过流动通路进入 TD 1215 内。端口 1235 与 TD 1215 中的测试条 1265 例如横向流动膜

流体联系。测试条 1265 的测试区带通过测试装置的外壳 1240 的上表面中提供的孔或窗口 1290 可见。在从隔开物 1085 中取出插管 1005 后,裂口 1090 再密封且阻止任何溢出、浮质或污染。在流体样品内的免疫复合物在横向流动膜 1265 上的预定线路或点上结合或杂交。检测探针(经由其上含有的缀合物标记)提供可检测信号,其可以随后读取(例如用扫描装置或读取器),以测定哪些分析物存在于样品中(例如通过检测可检测的信号在测试装置上的一个或多个限定的线路上的存在)。

#### [0196] 读取器

[0197] 本文描述的系统和方法可以包括与读取器组合的免疫测定装置,所述读取器特别是具有内置计算机的读取器,例如基于反射和/或荧光的读取器。此类读取器还可以含有采用数据简化和曲线拟合算法的数据处理软件,任选与经训练的神经网络组合用于精确测定生物学样品中分析物的存在和/或浓度。如本文使用的,读取器是指,用于检测和/或定量例如包含在 TD 中的测试条上的数据的仪器。数据可以是肉眼可见的,但无需是可见的(例如放射性、不可见的荧光发射器)。所述方法可以包括下述步骤:对患者样品执行免疫测定,使用基于反射和/或荧光的读取器读取数据,且使用采用数据简化的数据处理软件处理所得到的数据。优选的软件包含曲线拟合算法,任选与经训练的神经网络组合,以测定给定样品中分析物的存在或量。得自读取器的数据随后可以由医学诊断系统进一步处理,以提供医学状况的危险评估或诊断作为输出。在备选实施方案中,输出可以用作进入后续决策支持系统例如神经网络内的输入,所述神经网络进行训练以评估此类数据。

[0198] 在多种实施方案中,读取器可以是反射、透射、荧光、化学-生物发光、磁或电流测定读取器(或2个或更多个的组合),取决于待从 TD 检测的信号(例如 LRE Medical, USA)。在一个实施方案中,读取器包含设计用于接受 TD 的接受端口,但其中 TD 可以插入接受端口内,仅当已压低样品入口上游的可压低(例如按钮)工具,从而允许 TD 配合到接受端口内时。因此,在此类实施方案中,仅当溶液储库的内容物(例如洗涤缓冲剂)已释放,确保样品已“运行通过”TD 中包含的横向流动膜时,可以将 TD 置于读取器中。

[0199] 在一个实施方案中,读取器是检测荧光信号的 UV LED 读取器。荧光信号由发光二极管激发,所述发光二极管在光谱的 UV 区域中且在荧光信号(例如镧系元素标记)的吸收峰内发射。所发出的荧光信号通过光电二极管检测,并且检测的信号波长可以使用长通滤光片进行限制,所述长通滤光片阻断杂散发射光,且接受波长在发荧光的标记的峰值发射波长处或周围的光。在其他实施方案中,长通滤光片可以由带通滤光片替换。此外,激发光可以通过带通滤光片进行限制。在另一个实施方案中,二极管是 UV 激光二极管。可以利用任何常规的 UV、LED 或光电二极管。

[0200] 在任何此类实施方案中,激发源和检测器可以固定在单个机器或模压块中。对于在测试条上生成的荧光信号的简化读取。在一个进一步的实施方案中,此类机器还包含硬性标准。

[0201] 在一个实施方案中,激发光的轴对于 TD 或 TD 中包含的测试条成 90 度。进一步地,发射光的轴对于测试条成 90 度以外的角度。

[0202] 在一个实施方案中,激发光的波长受短通滤光片限制。在另外一个实施方案中,激发光的波长受带通滤光片和短通滤光片的组合限制。在再进一步的实施方案中,检测光的波长受带通和长通滤光片的组合限制。读取器可以配置为检测本文描述的任何信号发射器

/ 标记。在一个实施方案中,标记是本文描述的任何镧系元素。在一个进一步的实施方案中,使用的镧系元素是铈。

[0203] 如本文所示,在一个实施方案中,读取器配置为包含一个或多个硬性标准。因此,读取器可以机械化,以提供容纳 0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5 或 3mm 标准(例如装入丙烯酸中的,如本文描述的)的器具(例如夹具),所述标准排列在约 3、4、5 或 6mm 中心上(例如参见图 5)。

[0204] 在一个实施方案中,读取器适配有用于 TD 的接受端口,所述 TD 自身可以配置有防护工具。在一个实施方案中,如果按钮开关未被压低,那么读取器将接受 TD 而不进行处理,或如果洗涤缓冲剂对照未产生阳性信号,那么读取器将接受且读取 TD,但将拒绝结果。在后一个实施方案中,在样品上游排列的区室/囊中的洗涤/运行缓冲剂可以含有读取器按程序检测的对照信号(例如在不同波长下发射的标记)。

[0205] 通过读取器获得的信号使用采用数据简化和曲线拟合算法的数据处理软件(任选与经训练的神经网络组合)进行处理,以给出关于每个测试线路的阳性或阴性结果,或定量测定样品中每种分析物的浓度,这与指示疾病或病症的危险或存在的结果关联。这个结果可以任选地输入决策支持系统内,并且进行处理以提供医学状况的危险的增强评估作为输出。在一个实施方案中,整个过程可以是自动化的和/或计算机控制的。

[0206] 及时现场护理系统的多分析物

[0207] 快速流行性感冒测试已推向市场多年。这些测试中的大多数是横向流动免疫测定测试,使用金或乳胶作为显现试剂。虽然大多数新的快速免疫测定能够区分 A 型流行性感冒与 B 型流行性感冒,但其中仅少数在一个测试条上具有用于 A 型和 B 型的测试线路。然而,这些测试无一设计为区分 A 型流行性感冒的亚型。因此,这些测试可能能够检测禽流感,然而,它们无一可以断定患者是受季节性 A 型流感病毒,还是受更严重的 A 型亚型例如称为禽流感的 H5N1(或 A 型流感的目前潜在的大范围流行亚型)感染。这些测试还可以检测猪流感,例如 H1N1 型。本发明基于下述概念进行设计:当应用时,将获得具有改善的重现性的高度灵敏的测定,能够检测 A 型、B 型和鉴别亚型 H5N1 或 H1N1 与季节性流感(亚型 H1 和 H3),并且易于使用。如本文描述的,已做出努力来应用具有新装置设计的多种新技术,例如样品与缀合物的预混合、追踪或洗涤缓冲剂的使用(以减少本底),采用独特的一般捕获试剂 pRNA(所述 pRNA 允许以高灵敏度检测多种分析物),高度灵敏的荧光标记等。这些方法的组合使得新的和高度有效的流行性感冒快速测试成为可能,所述流行性感冒快速测试灵敏得多,能够以低成本生产,易于操作且具有区分季节性流感与大范围禽流感 H5N1 或猪流感 H1N1(例如 2009H1N1)的能力。

[0208] 测定方法

[0209] 在一个实施方案中,测定方法包括下述步骤:应用取样器具至受试者或受试者的生物学样品,以收集样品(例如在鼻、口、喉、耳内擦拭,应用取样器具至得自受试者的生物学样品),将收集器具插入含有隔室的样品收集装置内,将溶液应用于样品收集装置(例如通过挤压上部隔室以破开速动阀,并且允许缓冲剂向下运行到取样器具,从而浸没在其上排列的生物学样品),且使缓冲剂和样品的混合物运行进入混合或试剂隔室(例如下部隔室),在其中多个捕获和检测探针与它们的特异性靶分析物结合。随后或同时,混合物从 SCD 的远端排出,进入 TD 内,所述 TD 包含设计用于捕获分析物和检测/捕获探针的复合物

的一个或多个固定的配偶体捕获部分,经由与捕获探针连接的互补捕获部分。因此,用于一种特定分析物的特定捕获探针设计与与固定的配偶体捕获部分互补。此外,如本文公开的,配偶体捕获部分排列在测试装置(例如横向流动膜)上在不同位置/模式/区带中,其中如果经由发出信号的标记进行检测,那么单个线路或一个或多个点允许定性和/或定量检测特定分析物。因此,通过使测试装置上的特定配偶体捕获探针模式化,测定法可以检测相同或相关的感染剂或甚至不相关的感染剂的实验对象组,如本文公开的。

[0210] 在某些实施方案中,利用夹心免疫测定形式,但可以使用任何常规形式,包括竞争测定。在测试条上执行的夹心免疫测定的例子在美国专利 4,168,146 和 4,366,241 中描述,所述专利各自通过引用合并入本文。竞争性免疫测定装置的例子是由美国专利 4,235,601、4,442,204 和 5,208,535 公开的那些,所述专利各自通过引用合并入本文。可以适合于竞争性免疫测定的某些另外的示例性装置包括浸渍片、横向流动、药液筒、多路、微量滴定板、微流体、平板或测定或高通量平台,例如下述中公开的那些:美国专利 6,448,001、4,943,522、6,485,982、6,656,744、6,811,971、5,073,484、5,716,778、5,798,273、6,565,808、5,078,968、5,415,994、6,235,539、6,267,722、6,297,060、7,098,040、6,375,896、7,083,912、5,225,322、6,780,582、5,763,262、6,306,642、7,109,042、5,952,173 和 5,914,241。示例性微流体装置包括美国专利 5,707,799 和 WO2004/029221 中公开的那些。

[0211] 一般而言,在此类测定中使用的示踪剂需要使用仪器和/或示踪剂的处理,以便检测在测定的结合和/或游离部分中的示踪剂作为分析物的量度。例如,在其中酶用作示踪剂的标记或标志的测定中,酶必须用合适的显像剂显现。当标记或标志是荧光材料时,在结合和/或游离部分中的示踪剂通过使用用于测定荧光的合适的仪器进行测定。

[0212] 备选地,在测定中使用的示踪剂是用微粒标记进行标记的配体,所述微粒标记当与支持物上的结合剂结合时或当结合与支持物上的结合剂结合的分析物时是可见的,无需进一步处理,并且其中配体被结合剂或分析物结合。还参见通过引用合并入本文的美国专利 4,703,017。

[0213] 在另一个特定方面,基于非核酸的筛选测试包括任何固相、横向流动或流通测试。一般而言,固相免疫测定装置掺入固体支持物,其上结合配体-受体对的一个成员(通常为抗体、抗原或半抗原)。固体支持物的常见早期形式是聚苯乙烯的平板、管或珠,其在放射性免疫测定和酶免疫测定的领域中是已知的。最近,许多多孔材料例如尼龙、硝酸纤维素、乙酸纤维素、玻璃纤维和其他多孔聚合物已用作固体支持物。

[0214] 在一个实施方案中,经由取样器具从受试者中收集样品,并且将样品放回到 SCD 装置的圆柱体外壳内。SCD 可以首先插入 TD 内,或在插入 TD 内之前,释放 SCD 的上部隔室中含有的溶液,以实现将样品和溶液洗涤进入混合和试剂隔室内。如本文公开的,包含靶向一种或多种不同分析物的检测和捕获探针的液体或固体试剂可以存在于混合和试剂隔室中。在混合后,如果存在分析物,那么形成分析物与检测和捕获探针结合的复合物。样品随后通过开口从 SCD 排出,进入到 TD 内,所述开口密封 SCD 和 TD,避免与外部环境接触(例如阻止任何溢出、浮质或污染)。样品混合物可以由于重力或 SCD 中气压的力(例如挤压上部密封隔室)流动到 TD 内。样品被毛细力和/或 TD 中存在的缓冲剂驱动,以便允许任何分析物-探针复合物通过 TD 中含有的检测区带(例如在横向流动膜上)。捕获探针和互补的

固定的配偶体捕获部分彼此结合或杂交（例如在横向流动膜上的预定线路或点中），从而检测探针（经由其上含有的缀合物标记）提供可检测信号，所述信号随后可以读取，以测定哪些分析物存在于经处理的样品中。

[0215] 在一个实施方案中，在读取结果前，在其上具有经处理的样品的 TDs 可以放置约 1、2、3、4、5、6 或 8 小时的时间段，并且仍提供与在处理 15 或 20 分钟内读取一样精确的结果。因此，产生的信号在长时段内是稳定的，从而使得结果的读取可以在测试实际执行后明显更迟的时间进行。这对于及时现场护理诊断是极大的改善，其中在野外条件中，通常在人力和时间上存在有限的资源，和其中测试背景可以是在不容易或无法快速到达的偏远区域中。

#### [0216] 结合试剂

[0217] 本发明的一个方面涉及，包含多个不同的分析物结合组的本发明的 SCD，其中各个特定的分析物结合组配置为结合相同靶分析物，并且其中提供不同的分析物结合组，以便结合且检测不同的靶分析物。例如，SCD 可以包含 1、2、3、4、5 个或更多个分析物结合组，其中与 SCD 中存在的任何其他组相比，各个组对于不同的靶分析物特异。因此，靶向相同靶分析物的分析物结合组包含：(1) 捕获探针，其包含 (i) 结合靶分析物的特异性结合试剂和 (ii) 捕获部分配偶体（例如 pRNA），和 (2) 检测探针。“检测探针”（也可以称为“标记探针”）也能够结合相同靶分析物且与可检测的标记连接。

[0218] 在一个实施方案中，捕获探针靶向缀合物的捕获部分配偶体能够与固定的结合配偶体结合，例如在测试装置中的横向流动膜上存在的结合配偶体。

[0219] 在一个实施方案中，检测探针包含分析物特异性结合试剂，其与可检测的标记结合（直接或间接地），并且在与含有靶分析物的样品接触后，与靶分析物形成复合物。此外，捕获探针将类似地结合相同靶分析物，从而形成检测探针-靶分析物-捕获探针复合物。此类复合物随后可以被固定的捕获部分配偶体固定（“捕获”）在固体支持物上，所述固定的捕获部分配偶体能够与捕获探针上存在的 CMP 特异性结合。所得到的复合物固定在固体支持物上并且通过可检测的标记进行检测。

[0220] 在一个实施方案中，SCD 包含多个不同的分析物结合组，其中每个组包含能够结合靶分析物的检测探针和捕获探针，所述靶分析物包括感染剂、引起疾病的微生物或其组分（例如抗原、多肽、核酸）。

[0221] 在多种实施方案中，TD 包含不连续地置于测试基质上的一个或多个可寻址线路（或测试区带），其中每个测试区带配置用于检测不同类型的感染剂或引起疾病的微生物或其组分。

[0222] 在另一个实施方案中，一个或多个测试区带配置用于检测相同感染剂的一个或多个不同类型或亚型。如本文使用的，在测试区带的背景中，术语“配置”意指，在任何一个可寻址线路中的 ICMPs 能够特异性结合分析物结合组的检测探针中存在的同源 CMPs，所述检测探针设计为结合用于测试区带的靶分析物。

[0223] 在一个实施方案中，TD 包含多个可寻址线路，其中至少 2 个邻近的可寻址线路包含不同类别的 CMP。在另一个实施方案中，TD 包含多个可寻址线路，其中至少 2 个可寻址线路包含的 CMPs 为 pRNA，并且其中至少一个可寻址线路包含抗生物素蛋白或链霉亲和素。例如，pRNAs 将是相同类型或类别的 CMP，而 pRNA 和抗生物素蛋白 / 生物素将代表不同类别

的 CMP。可以利用其他类别的 CMPs,包括其他特异性结合配偶体,例如抗原 / 抗体对,其中抗原不同于目的分析物。

[0224] 在一个实施方案中,测试条还包含一个或多个可寻址线路,其充当对照线路以确定测定适当地起作用。在一个实施方案中,对照线路具有在其上排列的抗体,所述抗体将与捕获探针中包含的分析物特异性结合试剂特异性结合。在一个例子中,在对照线路上排列的抗体是兔抗小鼠抗体,其中捕获探针中的抗体是针对目的分析物制备的小鼠抗体。

[0225] 在某些实施方案中,分析物结合组包含抗体对,其中所述对的每个抗体成员可以特异性结合相同靶分析物,其中一种抗体是捕获探针中的靶向抗体,并且另一种是检测探针中的检测抗体,其中每种抗体与抗原的不同表位结合,并且因此各自能够同时结合相同分析物 / 抗原,以形成“夹心”。

[0226] 除抗原和抗体特异性结合对成员外,其他特异性结合对包括例如但不限于,生物素和抗生物素蛋白、碳水化合物和凝集素、互补核苷酸序列、互补肽序列、效应子和受体分子、酶辅因子和酶、酶抑制剂和酶、肽序列或化学部分(例如地高辛 / 抗地高辛)和对于所述序列、化学部分或完整蛋白质特异的抗体、聚合酸和碱、染料和蛋白质结合剂、肽和特异性蛋白质结合剂(例如核糖核酸酶、S-肽和核糖核酸酶 S-蛋白质)、金属及其螯合剂等。此外,特异性结合对可以包括其为原始特异性结合成员的类似物的成员,例如分析物 - 类似物,或通过重组技术或分子工程制备的特异性结合成员。

[0227] 抗体

[0228] 在多种实施方案中,本发明的捕获探针和检测探针的特异性结合试剂包含靶分析物 - 特异性结合部分,其可以是抗体或其功能片段。

[0229] 在其他实施方案中,ICMP 是对于抗原特异的抗体,所述抗原随后用作捕获探针的组分,其中所述抗原充当固定的抗体的同源 CMP。

[0230] 如果使用抗体,那么它可以是单克隆或多克隆抗体、重组蛋白质或抗体、嵌合抗体、其混合物或片段、以及抗体和其他特异性结合成员的混合物。可以掺入检测分子内的结合对的其他例子公开于,例如美国专利 6,946,546、6,967,250、6,984,491、7,022,492、7,026,120、7,022,529、7,026,135、7,033,781、7,052,854、7,052,916 和 7,056,679 中。

[0231] “抗体”是指基本上由一种或多种免疫球蛋白基因或其片段编码的多肽,并且包括与特异性抗原结合的任何免疫球蛋白,包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性或双特异性抗体。完整抗体包含 2 条重链和 2 条轻链。每条重链由可变区和第一、第二和第三恒定区组成,而每条轻链由可变区和恒定区组成。抗体具有“Y”形状,其中 Y 的茎由经由二硫键结合在一起的 2 条重链的第二和第三恒定区组成。Y 的每个臂由与单条轻链的可变区和恒定区结合的单条重链的可变区和第一恒定区组成。轻和重链的可变区负责抗原结合。2 条链中的可变区一般含有 3 个高度可变环,称为互补决定区(CDRs)(轻(L)链 CDRs 包括 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3,重(H)链 CDRs 包括 HCDR1、HCDR2、HCDR3)(如由 Kabat, 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版(1991), 第 1-3 卷, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. 定义的)。3 个 CDRs 介于称为构架区(FRs)的侧接段之间,所述侧接段比 CDRs 更保守,且形成支架以支持高变环。重链和轻链的恒定区不参与抗原结合,但展示各种效应子功能。公认的免疫球蛋白基因包括  $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  和  $\mu$  恒定区,以及众多的免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为  $\kappa$  或  $\lambda$ 。重链分类为  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$  或  $\epsilon$ , 其

依次分别限定免疫球蛋白的种类和亚类,包括 IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgA1 或 IgA2、IgD 和 IgE。一般地,抗体是在其表面上或在腔中具有区域的免疫球蛋白,所述区域与另一种分子特异性结合,且从而定义为与另一种分子的特定空间和极性结构互补。抗体可以是多克隆或单克隆的。抗体可以包括完整免疫球蛋白或其片段。其片段可以包括 Fab、Fv 和 F(ab')<sub>2</sub>、Fab' 等。抗体还可以包括通过重组方法制备的嵌合抗体或其片段。抗体基于其重链的恒定区的氨基酸序列而被分配种类。抗体的主要种类是 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,这些种类中的几个分成亚类例如。

[0232] 除完整免疫球蛋白外,如本文使用的,术语“抗体”还指其免疫球蛋白片段(即,免疫球蛋白分子的至少一个免疫活性部分),例如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv 片段,单链抗体分子,由包含一个或多个 CDRs 的免疫球蛋白分子的任何片段形成的多特异性抗体。此外,如本文使用的,抗体可以包含移植到来自一种或多种不同的人免疫球蛋白的构架区的来自特定人免疫球蛋白的一个或多个 CDRs。

[0233] “Fab”,就抗体而言,指由通过二硫键与单条重链的可变区和第一恒定区结合的单条轻链(可变区和恒定区两者)组成的抗体部分。

[0234] “Fab' ”指包括部分铰链区的 Fab 片段。

[0235] “Fc”,就抗体而言,指由经由二硫键与第二条重链的第二和第三恒定区结合的第一条重链的第二和第三恒定区组成的抗体部分。抗体 Fc 部分负责各种效应子功能,但在抗原结合中不起作用。

[0236] “Fv”,就抗体而言,指具有完整抗原结合位点的抗体的最小片段。Fv 片段由与单条重链的可变区结合的单条轻链的可变区组成。

[0237] “单链 Fv 抗体”或“scFv”指由直接或经由肽接头序列彼此连接的轻链可变区和重链可变区组成的工程抗体(Houston 1988)。

[0238] “单链 Fv-Fc 抗体”或“scFv-Fc”指由与抗体的 Fc 区连接的 scFv 组成的工程抗体。

[0239] 如本文使用的,术语“表位”指抗原分子上的抗体与之结合的原子和/或氨基酸的组。

[0240] 如本文使用的,术语“单克隆抗体”指得自基本上均质的抗体群体的抗体或其片段,即群体中包含的个体抗体是等同的,除了可以以微量存在的可能天然发生的突变外。单克隆抗体是高度特异性的,针对抗原上的单个表位。单克隆抗体与多克隆抗体形成对比,所述多克隆抗体一般包括针对抗原上的不同表位的不同抗体。尽管单克隆抗体常规地衍生自杂交瘤,但单克隆抗体不受其产生方法限制。例如,单克隆抗体可以通过首先由 Kohler 等人,Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法制备,或可以通过重组 DNA 法(参见例如,美国专利 4,816,567)制备。

[0241] 如本文使用的,术语“嵌合抗体”指这样的抗体,其中重链和/或轻链的部分与衍生自特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体中的相应序列等同或同源,而重链和/或轻链的其余部分与衍生自另一个物种或属于另一个抗体种类或亚类的抗体中的相应序列等同或同源,以及此类抗体的片段,只要此类片段显示出所需的抗原结合活性(给予 Cabilly 等人的美国专利 4,816,567, Morrison 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6851-6855(1984))。

[0242] 本文使用的术语“人源化抗体”指其为人免疫球蛋白（受体抗体）的抗体或其片段，其中来自受体抗体的部分或所有 CDR 的残基被具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人物种（供体抗体）例如小鼠、大鼠或兔的 CDR 的残基替换。在某些情况下，人免疫球蛋白的 FR 残基由相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可以包含在受体抗体和输入的 CDR 或构架序列中都未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善且最佳化抗体性能。一般而言，人源化抗体将包含至少一个和一般 2 个可变结构域的基本上全部，其中 CDR 区的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的那些，并且 FR 区的全部或基本上全部对应于人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体最佳地还将包含免疫球蛋白 Fc 区（一般是人免疫球蛋白的 Fc 区）的至少部分。关于进一步的细节，参见 Jones 等人，*Nature*, 321 :522525 (1986) ; Reichmann 等人，*Nature*, 332 :323 329 (1988) ; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2 :593 596 (1992) 和 Clark, *Immunol. Today* 21 :397 402 (2000)。

[0243] 在某些实施方案中，抗 H5 单克隆抗体由小鼠杂交瘤细胞株 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 和 2F2 产生。这些单克隆抗体按产生其的杂交瘤细胞株命名。因此，通过小鼠杂交瘤细胞株 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 和 2F2 产生的抗 H5 单克隆抗体，分别命名为单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 和 2F2。单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 和 2F2 与亚型 H5 禽流感病毒的血凝素特异性结合。小鼠杂交瘤细胞株 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 和 2F2 在 2006 年 1 月 17 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (China Center for Typical Culture Collection) (CCTCC, Wuhan University, Wuhan, 中国)，具有保藏号 CCTCC-C200607 (杂交瘤细胞株 8H5)、CCTCC-C200605 (杂交瘤细胞株 3C8)、CCTCC-C200608 (杂交瘤细胞株 10F7)、CCTCC-C200606 (杂交瘤细胞株 4D1)、CCTCC-C200604 (杂交瘤细胞株 3G4) 和 CCTCC-C200424 (杂交瘤细胞株 2F2)。

[0244] 在多种实施方案中，提供了阻断单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 或 2F2 与亚型 H5 禽流感病毒的血凝素的结合的单克隆抗体。此类阻断性单克隆抗体可以结合血凝素上的被单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 或 2F2 识别的相同表位。可替代地，此类阻断性单克隆抗体可以与这样的表位结合，所述表位与由单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 或 2F2 识别的表位立体重叠。这些阻断性单克隆抗体可以使单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 或 2F2 与亚型 H5 禽流感病毒的血凝素的结合减少至少约 50%。可替代地，它们可以使结合减少至少约 60%、优选至少约 70%、更优选至少约 75%、更优选至少约 80%、更优选至少约 85%、更加优选至少约 90%、更加优选至少约 95%、最优选至少约 99%。

[0245] 待测单克隆抗体减少已知的单克隆抗体与 H5 血凝素的结合的能力可以通过常规竞争性测定进行测量，例如 *Antibodies :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane (1988) 中描述的那些。例如，此类测定可以通过下述执行：用抗原预包被微量滴定板，使预包被的平板与混合有所选浓度的标记的已知抗体的未标记的测试抗体的系列稀释物一起温育，洗涤温育混合物，和检测和测量在测试抗体的各个稀释度下与平板结合的已知抗体的量。测试抗体与已知抗体竞争与抗原的结合越强，已知抗体与抗原的结合就减少得越多。通常，抗原在 96 孔板上进行预包被，并且使用放射性或酶标记测量未标记的抗体阻断标记的抗体的结合的能力。

[0246] 单克隆抗体可以通过最早由 Kohler 等人，*Nature*, 256 :495 (1975) 描述的杂交瘤方法产生。在杂交瘤方法中，小鼠或其他合适的宿主动物通过注射免疫接种试剂和佐剂

(需要时)一次或多次来进行免疫接种。一般地,免疫接种试剂和/或佐剂将通过多次皮下或腹膜内注射在宿主动物中注射。使免疫接种试剂与已知在待免疫接种的宿主动物中是免疫原性的蛋白质缀合可以是有用的,所述蛋白质例如血清白蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。可以采用的佐剂的例子包括弗氏完全佐剂和 MPL-TDM。在免疫接种后,宿主动物制备产生或能够产生抗体的淋巴细胞,所述抗体将与用于免疫接种的抗原特异性结合。可替代地,淋巴细胞可以在体外进行免疫接种。收集所需的淋巴细胞,且使用合适的融合试剂例如聚乙二醇使之与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103, Academic Press, 1996)。

[0247] 将由此制备的杂交瘤细胞接种且培养在合适的培养基中,所述合适的培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT),那么用于杂交瘤的培养基一般将包括次黄嘌呤、氨甲蝶呤和胸苷 (HAT 培养基),所述物质阻止 HGPRT 缺陷的细胞的生长。

[0248] 优选的骨髓瘤细胞是有效融合,支持所选择的产生抗体的细胞稳定高水平地产生抗体,并且对培养基例如 HAT 培养基敏感的那些。其中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系,例如可从 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA 获得的衍生自 MOP-21 和 MC-11 小鼠肿瘤的那些,以及可从美国典型培养物保藏中心, Rockville, Md USA 获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已得到描述 (Kozbor, *J Immunol*, 133 :3001 (1984); Brodeur 等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第 51-63 页, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

[0249] 就针对抗原的单克隆抗体的产生测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基。优选地,杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合测定(例如放射性免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA)) 进行测定。单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过 Munson 等人, *Anal. Biochem.*, 107 :220 (1980) 的 Scatchard 分析进行测定。

[0250] 在鉴定产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,细胞可以通过有限稀释程序进行亚克隆且通过标准方法进行培养 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第 59-103 页, Academic Press, 1996)。用于这个目的合适培养基包括例如 DMEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,杂交瘤细胞可以在体内作为腹水肿瘤在动物中培养。

[0251] 通过常规免疫球蛋白纯化程序,例如蛋白 A-Sepharose、羟磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱,从培养基、腹水或血清中适当地分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0252] 本发明的单克隆抗体还可以通过常规遗传工程方法制备。编码单克隆抗体的重链和轻链的 DNA 分子可以从杂交瘤细胞中分离,例如通过 PCR 使用寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针能够与编码单克隆抗体的重链和轻链的基因特异性结合。随后,将 DNA 分子插入表达载体内。表达载体可以转染到否则不产生免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞内,例如大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞。宿主细胞在适合于表达抗体的条件下进行培养。

[0253] 本发明的抗体可以以高特异性和亲和力与 H5 血凝素结合。抗体应与血凝素的其

他亚型具有低交叉反应性,优选与血凝素的其他亚型没有交叉反应性。在一个方面,本发明提供了以小于  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  的  $K_D$  值与 H5 血凝素结合的抗体。优选地,  $K_D$  值小于  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 。更优选地,  $K_D$  值小于  $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 。最优选地,  $K_D$  值小于  $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 。

[0254] 本发明的抗体可以含有包含 2 条重链和 2 条轻链的常规“Y”形状结构。此外,抗体还可以是 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)<sub>2</sub> 片段或 Fv 片段,或常规“Y”形状结构的其他部分的片段,其维持与血凝素的结合亲和力。片段与血凝素的结合亲和力可以比常规“Y”形状抗体更高或更低。

[0255] 抗体片段可以经由完整抗体的蛋白酶解消化生成(参见例如, Morimoto 等人, J. Biochem. Biophys. Methods, 24 :107-117, (1992) 和 Brennan 等人, Science, 229 : 81(1985))。此外,这些片段还可以通过重组宿主细胞直接产生(在 Hudson, Curr. Opin. Immunol., 11 :548-557(1999); Little 等人, Immunol. Today, 21 :364-370(2000) 中综述)。例如, Fab' 片段可以从大肠杆菌中直接回收,并且化学偶联,以形成 F(ab')<sub>2</sub> 片段(Carter 等人, Bio/Technology, 10 :163-167(1992))。在另一个实施方案中,使用亮氨酸拉链 GCN4 来形成 F(ab')<sub>2</sub>, 以促进 F(ab')<sub>2</sub> 分子的装配。根据另一种方法, Fv、Fab 或 F(ab')<sub>2</sub> 片段可以直接从重组宿主细胞培养物中分离。用于产生抗体片段的其他技术对于本领域普通技术人员来说是显而易见的。

[0256] 在某些实施方案中,编码抗体或片段的分离的核酸分子与 H5 血凝素特异性结合。编码抗体的核酸分子可以从杂交瘤细胞中分离。分子的核酸序列可以使用本领域普通技术人员已知的常规技术进行测定。本发明的核酸分子还可以使用常规遗传工程技术以及化学合成进行制备。在一个实施方案中,分离的核酸分子编码抗 H5 (HA) 抗体的重链的可变区或核酸分子的部分。在另一个实施方案中,分离的核酸分子编码抗 H5 (HA) 抗体的轻链的可变区或核酸分子的部分。在另一个方面,分离的核酸分子编码抗体重链或轻链可变区的 CDRs。

[0257] 在一个实施方案中,分离的核酸分子编码单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 和 2F2 的重链和轻链的可变区。编码单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 和 2F2 的重链可变区的核酸序列分别显示于 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :20 和 SEQ ID NO :24 中。编码单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1 和 2F2 的轻链可变区的核酸序列分别显示于 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :26 中。在某些实施方案中,核酸分子的变性或简并类似物编码单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 和 2F2 的重链和轻链的可变区。

[0258] 在另一个实施方案中,分离的核酸变体与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :24 或 SEQ ID NO :26 的核酸序列共享序列同一性。在一个实施方案中,核酸变体与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :24 或 SEQ ID NO :26 的序列共享至少 70% 序列同一性、优选至少 75% 序列同一性、更优选至少 80% 序列同一性、更优选至少 85% 序列同一性、更优选至少 90% 序列同一性、最优选至少 95% 序列同一性。

[0259] 在某些实施方案中,编码抗体片段的分离的核酸分子能够与禽流感病毒的亚型 H5 特异性结合。

[0260] 在某些实施方案中,分离的核酸分子编码包含 SEQ ID NOs :28-30、SEQ ID NOs :

34-36、SEQ ID NOs :40-42、SEQ ID NOs :46-48、SEQ ID NOs :52-54、和 SEQ ID NOs :58-60 中所示的氨基酸序列的抗体重链可变区。在某些实施方案中,分离的核酸分子编码包含 SEQ ID NOs :31-33、SEQ ID NOs :37-39、SEQ ID NOs :43-45、SEQ ID NOs :49-51、SEQ ID NOs :55-57、和 SEQ ID NOs :61-63 中所示的氨基酸序列的抗体轻链可变区。

[0261] 在某些实施方案中,重组表达载体包含本发明的分离的核酸分子。还提供了用所述核酸分子转化的宿主细胞。本发明的一个方面是产生本发明的抗体的方法,其包括:在其中核酸分子被表达以产生抗体的条件下,培养宿主细胞,和从宿主细胞中分离抗体。

[0262] 抗体多肽序列

[0263] 单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 和 2F2 的重链和轻链可变区的氨基酸序列已由其各自的核酸序列推导。单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 和 2F2 的重链可变区的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :21、和 SEQ ID NO :25 中。单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1 和 2F2 的轻链可变区的氨基酸序列显示于 SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :19、和 SEQ ID NO :27 中。在一个方面,抗 H5 抗体包含重链可变区,其包含如 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :21、和 SEQ ID NO :25 中所示的氨基酸序列。在另一个方面,抗 H5 抗体包含轻链可变区,其包含如 SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :19、和 SEQ ID NO :27 中所示的氨基酸序列。

[0264] 在另一个方面,抗体重链包含可变区,其与 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :21、和 SEQ ID NO :25 中所示的氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性、优选至少 75% 序列同一性、更优选至少 80% 序列同一性、更优选至少 85% 序列同一性、更优选至少 90% 序列同一性、最优选至少 95% 序列同一性。

[0265] 在另一个方面,抗体轻链包含可变区,其与 SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :19、和 SEQ ID NO :27 中所示的氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性、优选至少 75% 序列同一性、更优选至少 80% 序列同一性、更优选至少 85% 序列同一性、更优选至少 90% 序列同一性、最优选至少 95% 序列同一性。

[0266] 单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1、3G4 和 2F2 的重链和轻链可变区的 CDRs 的氨基酸序列也已测定如下。

[0267] 单克隆抗体 8H5 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos :28-30 中。单克隆抗体 8H5 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos :31-33 中。

[0268] 单克隆抗体 3C8 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos :34-36 中。单克隆抗体 3C8 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos :37-39 中。

[0269] 单克隆抗体 10F7 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos :40-42 中。单克隆抗体 10F7 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos :43-45 中。

[0270] 单克隆抗体 4D1 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos :46-48 中。单克隆抗体 4D1 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos :49-51 中。

[0271] 单克隆抗体 3G4 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos : 52-54 中。单克隆抗体 3G4 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos :55-57 中。

[0272] 单克隆抗体 2F2 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos : 58-60 中。单克隆抗体 2F2 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos :61-63 中。

[0273] 表 1.6 个品系的单克隆抗体的 CDRs 氨基酸序列

[0274]

单克隆 抗体品 系	抗体重链 CDR 的氨基酸序列			抗体轻链 CDR 的氨基酸序列		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
8H5	GYTFSNYW (SEQ ID NO: 28)	ILPGSDRT (SEQ ID NO: 29)	ANRYDGYFGLDY (SEQ ID NO: 30)	SSVNF (SEQ ID NO: 31)	YSS (SEQ ID NO: 32)	QHFTSSPYT (SEQ ID NO: 33)
3C8	GYSFTNYG (SEQ ID NO: 34)	INTHTGEP (SEQ ID NO: 35)	ARWNRDAMDY (SEQ ID NO: 36)	ESVDSSDNSL (SEQ ID NO: 37)	RAS (SEQ ID NO: 38)	QQSIGDPPYT (SEQ ID NO: 39)
10F7	GYTFTSYW (SEQ ID NO: 40)	IDPSDSYT (SEQ ID NO: 41)	ARGGTGDFHYAMD Y (SEQ ID NO: 42)	QGISSN (SEQ ID NO: 43)	HGT (SEQ ID NO: 44)	QYVQFPYT (SEQ ID NO: 45)
4D1	GYTFTSYW (SEQ ID NO: 46)	IDPSDSFT (SEQ ID NO: 47)	ARGGPGDFRYAMD Y (SEQ ID NO: 48)	QGISSN (SEQ ID NO: 49)	HGT (SEQ ID NO: 50)	VQYVQFPYT (SEQ ID NO: 51)
3G4	GYTFTDYA (SEQ ID NO: 52)	INTDYGDT (SEQ ID NO: 53)	ARSDYDYFCGMD Y (SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 57)
2F2	GFSLTGYG (SEQ ID NO: 58)	IWAEGRT (SEQ ID NO: 59)	AREVITTEAWYFDV (SEQ ID NO: 60)	QSISDY (SEQ ID NO: 61)	YAS (SEQ ID NO: 62)	QNGHTFPLT (SEQ ID NO: 63)

[0275] 在另一个方面, 抗 H5 单克隆抗体重链或其片段包含下述 CDRs : (i) 选自 SEQ ID NOs :28-30 的一个或多个 CDRs ;(ii) 选自 SEQ ID NOs :34-36 的一个或多个 CDRs ;(iii) 选自 SEQ ID NOs :40-42 的一个或多个 CDRs ;(iv) 选自 SEQ ID NOs :46-48 的一个或多个 CDRs ;(v) 选自 SEQ ID NOs :52-54 的一个或多个 CDRs ;或 (vi) 选自 SEQ ID NOs :58-60 的一个或多个 CDRs。在一个实施方案中, 抗 H5 单克隆抗体重链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :28-30 中所示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。在另一个实施方案中, 抗 H5 单克隆抗体重链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :34-36 中所示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。在另一个实施方案中, 抗 H5 单克隆抗体重链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :40-42 中所示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。在另一个实施方案中, 抗 H5 单克隆抗体重链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :46-48 中所示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。在另一个实施方案中, 抗 H5 单克隆抗体重链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :52-54 中所示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。在另一个实施方案中, 抗 H5 单克隆抗体重链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :58-60 中所

示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。

[0276] 在一个方面,抗 H5 单克隆抗体重链或其片段中含有的 CDRs 可以包括来自 SEQ ID NOs :28-30、34-36、40-42、46-48、52-54 和 58-60 中所示的氨基酸序列的一个或多个氨基酸置换、添加和 / 或缺失。优选地,氨基酸置换、添加和 / 或缺失在不超过 3 个的氨基酸位置上发生。更优选地,氨基酸置换、添加和 / 或缺失在不超过 2 个的氨基酸位置上发生。最优选地,氨基酸置换、添加和 / 或缺失在不超过 1 个的氨基酸位置上发生。

[0277] 在另一个方面,抗 H5 单克隆抗体轻链或其片段包含下述 CDRs:(i) 选自 SEQ ID NOs :31-33 的一个或多个 CDRs;(ii) 选自 SEQ ID NOs :37-39 的一个或多个 CDRs;(iii) 选自 SEQ ID NOs :43-45 的一个或多个 CDRs;(iv) 选自 SEQ ID NOs :49-51 的一个或多个 CDRs;(v) 选自 SEQ ID NOs :55-57 的一个或多个 CDRs;或 (vi) 选自 SEQ ID NOs :61-63 的一个或多个 CDRs。在一个实施方案中,抗 H5 单克隆抗体轻链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :31-33 中所示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。在另一个实施方案中,抗 H5 单克隆抗体轻链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :37-39 中所示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。在另一个实施方案中,抗 H5 单克隆抗体轻链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :43-45 中所示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。在另一个实施方案中,抗 H5 单克隆抗体轻链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :49-51 中所示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。在另一个实施方案中,抗 H5 单克隆抗体轻链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :55-57 中所示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。在另一个实施方案中,抗 H5 单克隆抗体轻链或其片段包含分别具有 SEQ ID NOs :61-63 中所示的氨基酸序列的 3 个 CDRs。

[0278] 在一个方面,抗 H5 单克隆抗体轻链或其片段中含有的 CDRs 可以包括来自 SEQ ID NOs :31-33、37-39、43-45、49-51、55-57 和 61-63 中所示的氨基酸序列的一个或多个氨基酸置换、添加和 / 或缺失。优选地,氨基酸置换、添加和 / 或缺失在不超过 3 个的氨基酸位置上发生。更优选地,氨基酸置换、添加和 / 或缺失在不超过 2 个的氨基酸位置上发生。最优选地,氨基酸置换、添加和 / 或缺失在不超过 1 个的氨基酸位置上发生。

[0279] 表 2. 与 8H5 mAb 或 3C8 mAb 结合的 7aa 肽的氨基酸序列

[0280]

单克隆抗体	7 肽序列	序列号
8H5	H G M L P V Y	SEQ ID No: 64
	P P S N Y G R	SEQ ID No: 65
	P P S N F G K	SEQ ID No: 66
	G D P W F T S	SEQ ID No: 67
	N S G P W L T	SEQ ID No: 68
3C8	W P P L S K K	SEQ ID No: 70
	N T F R T P I	SEQ ID No: 71
	N T F R D P N	SEQ ID No: 72
	N P I W T K L	SEQ ID No: 73

[0281] 通过上述抗体的可变区或上述 CDRs 中的氨基酸置换、添加和 / 或缺失产生的变体维持与禽流感病毒的亚型 H5 特异性结合的能力。某些实施方案还包括此类变体的抗原结合片段。

[0282] 本发明的单克隆抗体变体可以通过常规遗传工程方法进行制备。可以使用本领域普通技术人员已知的方法将核酸突变引入 DNA 分子内。备选地, 编码重链和轻链变体的核酸分子可以通过化学合成进行制备。

[0283] 在另一个方面, 本发明的筛选方法包括步骤: (i) 在适合于肽表达的条件下培养肽展示文库; (ii) 使培养溶液与本发明的单克隆抗体接触; (iii) 选择与所述单克隆抗体特异性结合的噬菌体克隆。用于筛选的单克隆抗体可以包括但不限于单克隆抗体 8H5、3C8、10F7、4D1 和 3G4。

[0284] 表 3. 与 8H5 mAb 结合的 12aa 肽的序列

[0285]

肽节段  
编号

	氨基酸序列	碱基序列
121	MEPVKKYPTRSP (SEQ ID NO: 74)	ATGGAGCCGGTGAAGAAGTATCCGACGCGTTCTCTCT (SEQ ID NO: 75)
122	ETQLTTAGLRLL (SEQ ID NO: 76)	GAGACTCAGCTGACTACGGCGGGTCTTCGGCTGCTT (SEQ ID NO: 77)
123	ETPLTETALKWH (SEQ ID NO: 78)	GAGACGCCTCTTACGGAGACGGCTTTGAAGTGGCAT (SEQ ID NO: 79)
124	QTPLTMAALELF (SEQ ID NO: 80)	CAGACGCCGCTGACTATGGCTGCTCTTGAGCTTTTT (SEQ ID NO: 81)
125	DTPLTTAALRLV (SEQ ID NO: 82)	GATACTCCGCTGACGACGGCGGCTCTTCGGCTGGTT (SEQ ID NO: 83)
126	TPLTLWALSGLR (SEQ ID NO: 84)	ACGCCGCTTACGCTTTGGGCTCTTTCTGGGCTGAGG (SEQ ID NO: 85)
128	QTPLTETALKWH (SEQ ID NO: 86)	CAGACGCCTCTTACGGAGACGGCTTTGAAGTGGCAT (SEQ ID NO: 87)
129	QTPLTMAALELL (SEQ ID NO: 88)	CAGACGCCTCTGACTATGGCGGCTCTTGAGCTTCTT (SEQ ID NO: 89)
130	HLQDGSPPSSPH (SEQ ID NO: 90)	CAGACGCCTCTGACTATGGCGGCTCTTGAGCTTCTT (SEQ ID NO: 91)
131	GHVTTLSELLSLR (SEQ ID NO: 92)	GGGCATGTGACGACTCTTTCTCTTCTGTGCGCTGCGG (SEQ ID NO: 93)
132	FPNFDWPLSPWT (SEQ ID NO: 94)	TTTCCGAATTTTGATTGGCCTCTGTCTCCGTGGACG (SEQ ID NO: 95)
133	ETPLTEPAFKRH (SEQ ID NO: 96)	GAGACGCCTCTTACGGAGCCGGCTTTTAAGCGGCAT (SEQ ID NO: 97)

[0286] 分析物。在多种实施方案中，靶分析物是指示疾病、病症或状况在从其获得样品溶液的宿主中的存在的标志。

[0287] 如本文使用的，术语“分析物”指，待检测或测量并且具有至少一个表位或结合位点的化合物或组合物。分析物可以是对于其存在天然存在的分析物特异性结合成员或对于其可以制备分析物特异性结合成员的任何物质，例如碳水化合物和凝集素、激素和受体、互补核酸等。进一步地，可能的分析物包括可以被免疫检测的基本上任何化合物、组合物、聚集体或其他物质。即，分析物或其部分是具有至少一个决定簇位点的抗原或半抗原，或是天然存在的结合对的成员。

[0288] 分析物包括但不限于，毒素、有机化合物、蛋白质、肽、微生物、细菌、病毒、氨基酸、核酸、碳水化合物、激素、类固醇、维生素、药物（包括施用用于治疗目的的那些以及施用用于违禁目的的那些）、污染物、杀有害生物剂和任何上述物质的代谢产物或针对任何上述物质的抗体。术语分析物还包括任何抗原性物质、半抗原、抗体、大分子及其组合。示例性分析物的非详尽列表显示于美国专利 4,366,241 中（第 19 栏，第 7 行到第 26 栏，第 42 行），其公开内容通过引用合并入本文。代表性分析物的进一步描述和列表可见于美国专

利 4, 299, 916、4, 275, 149 和 4, 806, 311 中, 所有所述专利通过引用合并入本文。在某些实施方案中, SCD 或 TD 配置为检测多个不同的分析物。

[0289] 标记的试剂。术语“标记的试剂”指, 包含与特异性结合成员附着的可检测的标记的物质(例如检测探针)。附着可以是共价或非共价结合, 但附着的方法并不是关键的。标记允许标记的试剂产生与流体样品中分析物的存在相关的可检测信号。选择标记试剂的特异性结合成员组分, 以与分析物直接结合或借助于辅助特异性结合成员间接结合分析物, 这在下文更详细地描述。标记试剂可以在捕获区带上游的位点处掺入 TD 内, 它可以与流体样品组合以形成流体溶液, 它可以与测试样品分开加入测试装置中, 或它可以预沉积或可逆地固定在捕获区带上。此外, 可以在测定执行前或测定过程中, 借助于合适的附着方法来标记特异性结合成员。

[0290] “标记”指能够产生可通过视觉或仪器工具检测的信号的任何物质。适合于使用的各种标记包括, 通过化学或物理方式产生信号的标记。此类标记可以包括, 酶和底物、色原、催化剂、荧光或荧光样化合物和 / 或颗粒、磁性化合物和 / 或颗粒、化学发光化合物和 / 或颗粒、和放射性标记。其他合适的标记包括, 微粒标记例如胶体金属颗粒例如金、胶体非金属颗粒例如硒或碲、着色或有色颗粒例如着色的塑料或染色的微生物、有机聚合物乳胶颗粒和脂质体、有色珠、聚合物微胶囊、囊、红细胞、血影或含有直接可见的物质的其他囊泡等。一般地, 视觉上可检测的标记用作标记试剂的标记组分, 从而提供测试样品中分析物的存在或量的直接视觉或仪器读出, 而无需在检测位点使用另外的产生信号的组分。

[0291] 可以用于本发明的实践的另外的标记包括生色团、电化学部分、酶、放射性部分、发磷光基团、荧光部分、化学发光部分或量子点, 或更特别地, 放射性标记、荧光团 - 标记、量子点 - 标记、生色团 - 标记、酶 - 标记、亲和配体标记、电磁自旋标记、重原子标记、用纳米颗粒光散射标记或其他纳米颗粒标记的探针、异硫氰酸荧光素 (FITC)、TRITC、罗丹明、四甲基罗丹明、R-藻红蛋白、Cy-3、Cy-5、Cy-7、Texas Red、Phar-Red、别藻蓝蛋白 (APC)、表位标签例如 FLAG 或 HA 表位、和酶标签例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、I<sup>2</sup>-半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶, 和半抗原缀合物例如地高辛配基或二硝基苯基, 或能够形成复合物的结合对的成员例如链霉亲和素 / 生物素、抗生物素蛋白 / 生物素或抗原 / 抗体复合物(包括例如兔 IgG 和抗兔 IgG); 荧光团例如伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、曙红、绿色荧光蛋白、赤藓红、香豆素、甲基香豆素、苝、孔雀绿、芪、萤光黄、级联蓝、二氯三嗪氨基荧光素、丹酰氯、藻红蛋白、荧光镧系元素复合物例如包括铈和铽的那些、Cy3、Cy5, 分子信标及其荧光衍生物, 发光材料例如鲁米诺; 光散射或等离子共振材料例如金或银颗粒或量子点; 或放射性材料包括 <sup>14</sup>C、<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、Tc99m、<sup>35</sup>S 或 <sup>3</sup>H; 或球壳, 和用本领域技术人员已知的任何其他生成信号的标记进行标记的探针。例如, 可检测分子包括但不限于, 荧光团以及本领域已知的其他分子, 例如 Principles of Fluorescence Spectroscopy, Joseph R. Lakowicz (编辑), Plenum Pub Corp, 第 2 版 (1999 年 7 月) 和 Richard P. Hoagland 的 Molecular Probes Handbook 第 6 版中描述的那些。

[0292] 许多信号产生系统可以用于实现本发明的目的。信号产生系统生成与样品中分析物(即靶分子)的存在相关的信号。信号产生系统还可以包括产生可测量的信号所需的所有试剂。信号产生系统的其他组分可以包括在显现剂溶液中, 并且可以包括底物、增强子、激活子、化学发光化合物、辅因子、抑制剂、清除剂、金属离子、信号生成物质的结合所需的

特异性结合物质等。信号产生系统的其他组分可以是辅酶、与酶促产物反应的物质、其他酶和催化剂等。在某些实施方案中,信号产生系统提供通过外部工具、通过使用电磁辐射、希望地通过目视检查可检测的信号。示例性信号产生系统在美国专利 5,508,178 中描述。

[0293] 在某些实施方案中,核酸分子可以与检测探针连接(例如抗体连接的寡核苷酸),由此核酸充当利用核酸标记的标记。例如,在 SCD 中包含的试剂溶液或基质可以包含检测试剂,其包含用于提供可检测信号的多个寡核苷酸,由此对于分析物结合组(特异于特定分析物),缀合的寡核苷酸用不同染料预染色,与抗体的另一个亚群(特异于不同分析物)是以不依赖于序列的方式结合核酸分子的核酸染料比较。例子包括嵌入染料,例如菲啶和吡啶(例如溴化乙啶、碘化丙啶、碘化己啶(hexidium iodide)、二氢乙啶、乙啶同二聚体 -1 和 -2、单叠氮乙啶和 ACMA);某些小沟结合剂例如吡啶和咪唑(例如 Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hoechst 34580 和 DAPI);和各种核酸染料例如吡啶橙(也能够嵌入)、7-AAD、放线菌素 D、LDS751 和羟芪巴脘。所有上述核酸染料从供应商例如 Molecular Probes, Inc 商购可得。核酸染料的其他例子包括来自 Molecular Probes 的下述染料:花青染料例如 SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、POPO-1、POPO-3、YOYO-1、YOYO-3、TOTO-1、TOTO-3、JOJO-1、LOLO-1、BOBO-1、BOBO-3、PO-PRO-1、PO-PRO-3、BO-PRO-1、BO-PRO-3、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TO-PRO-5、JO-PRO-1、LO-PRO-1、YO-PRO-1、YO-PRO-3、PicoGreen、OliGreen、RiboGreen、SYBR Gold、SYBR Green I、SYBR Green II、SYBR DX、SYTO-40、-41、-42、-43、-44、-45(蓝色)、SYTO-13、-16、-24、-21、-23、-12、-11、-20、-22、-15、-14、-25(绿色)、SYTO-81、-80、-82、-83、-84、-85(橙色)、SYTO-64、-17、-59、-61、-62、-60、-63(红色)。其他可检测的标志包括化学发光和生色分子,光学或电子密度标志等。

[0294] 如上所述,在某些实施方案中,标记包含半导体纳米晶体,例如美国专利 6,207,392 中描述的量子点(即 Qdots)。Qdots 从 Quantum Dot Corporation 商购可得。在本发明的实践中有用的半导体纳米晶体包括 II-VI 族半导体的纳米晶体,例如 MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaSe、BaTe、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、HgS、HgSe 和 HgTe,以及其混合组合物;以及 III-V 族半导体的纳米晶体,例如 GaAs、InGaAs、InP 和 InAs 及其混合组合物。IV 族半导体例如锗或硅的使用或有机半导体的使用在某些条件下也可以是可行的。半导体纳米晶体还可以包括合金,其包含选自上述 III-V 族化合物、II-VI 族化合物、IV 族元素及其组合的 2 个或更多个半导体。

[0295] 在某些实施方案中,荧光能量受体作为标记与检测探针(即与检测物分子缀合的结合部分)连接。在一个实施方案中,荧光能量受体可以由于化合物而形成,所述化合物与单态氧反应以形成荧光化合物,或可以与辅助化合物反应,所述辅助化合物随后转换为荧光化合物。此类辅助化合物可以包含在 SCD 和 / 或 TD 中含有的缓冲剂中。在其他实施方案中,荧光能量受体可以作为化合物的部分掺入,所述化合物还包括化学发光剂。例如,荧光能量受体可以包括稀土金属例如铈、钐、铽等的金属螯合物。这些材料是特别有吸引力的,由于其具有窄的发光带。此外,当使用荧光读取器检测时,荧光标记例如铈提供超过金颗粒至少 2-3 个对数的增加的信号。此外,镧系元素标记例如铈(III)提供有效和延长的信号发射,且对光漂白有抵抗力,从而允许含有经处理的 / 经反应的样品的 TDs 在需要时放置延长的时间段。

[0296] 已显示,长寿命荧光铈(III)螯合物纳米颗粒可作为标记应用于各种异质和同质

免疫测定中。参见例如, Huhtinen 等人 Clin. Chem. 2004 Oct ;50(10) :1935-6。当将这些固有标记的纳米颗粒与时间分辨荧光检测组合使用时,可以改善测定的性能。在异质测定中,测定在低浓度下的动态范围可以被扩展。此外,测定的动力学特征可以通过使用检测抗体包被的高比活性纳米颗粒标记(而非常规标记的检测抗体)得到改善。在同质测定中,已显示,铈(III)纳米颗粒是荧光共振能量转移中的有效供体,使得能够进行简单和快速的高通量筛选。基于异质和同质纳米颗粒标记的测定可以用各种样品基质运行,例如血清、肝素血浆和粘液。

[0297] 在某些实施方案中,本文公开的标记(例如荧光标记)作为与生物分子缀合的纳米颗粒标记包含。换言之,纳米颗粒可以与检测或捕获探针一起使用。例如,可以利用与单克隆抗体或链霉亲和素(SA)连接的铈(III)标记的纳米颗粒来检测样品中的特定分析物(例如基于纳米颗粒的免疫测定)。纳米颗粒充当分析物的特异性结合试剂和检测(即标记)或捕获部分与之附着的基质。

[0298] 在本发明的多种实施方案中,利用的标记是镧系元素金属。镧系元素包括但不限于,铈、钐、铽或镱。非特异性本底荧光具有仅约 10ns 的衰变时间,从而此类本底在测量样品荧光前消失。此外,镧系元素-螯合物具有大的 Stokes 位移。例如,铈的 Stokes 位移是大约 300nm。在激发峰和发射峰之间的这个巨大差异意味着,荧光测量在其中本底的影响最小的波长下进行。此外,发射峰是非常窄的,这意味着检测器可以设置为极细的限度,并且来自不同镧系元素螯合物的发射信号可以彼此容易地区分。因此,在一个实施方案中,一种或多种不同的镧系元素可以在相同测定中利用。

[0299] 硬性标准。在一个实施方案中,荧光读取器配置为包含整合的或永久的标准(“硬性标准”)。如本文提及的,术语“硬性标准”意指,在检测/定量一种或多种分析物的方法中用于读取测试样品的装置包含内部的、整合的或永久的标准,并且针对该标准来读取用标记(其与在硬性标准中使用的那种相同)进行标记的样品。在一个实施方案中,硬性标准和测试标记包含镧系元素(例如铈 III)。

[0300] 在一个实施方案中,读取器是 LED,包含发出光谱的 UV A(400-315nm)部分的灯。发射光在光谱的可见部分中。某些示例性或常规的 LEDs 或光电二极管公开于美国专利 7175086、7135342 和 7106442 中,所述专利各自的公开内容整体合并入本文。

[0301] 在另一个实施方案中,读取器包含不同量的至少 2 个硬性标准(例如标记的低和高浓度),从而提供读取器的 2 个检查点。例如,将二(2)个镧系元素硬性标准(例如铈)永久固定在读取器载玻片上,并且可以在每个测试读取过程中进行读取。从而,这 2 个硬性标准可以用于测定检测下限(即,在分析物定量测定中或用于确定在定性测定中的最低检测阈值)。此处,读取荧光且将其作为荧光百分数(y 轴)针对浓度(x 轴)作图。在此类曲线图上,在关于各个硬性标准的 2 次读取之间的直线允许测量噪声(无标记)的截距,从而给出关于最低检测极限的量度。

[0302] 在某些实施方案中,TD 包含含有洗涤或运行缓冲剂的隔室(区室或液体囊),所述缓冲剂用于去除未结合的标记,以减少或消除本底噪声。在多种实施方案中,包含一个或多个硬性标准的装置提供了样品中存在的一种或多种分析物的精确性以及定量测量,所述分析物用与硬性标准中使用的那种相同的标记进行标记。

[0303] 在某些实施方案中,硬性标准包埋入或铸入聚合物材料中,包括玻璃、塑料、乙烯或

丙烯酸。此类包埋的标记可以铸成合适的形状 / 大小。备选地, 此类硬性标准可以切割至合适的大小, 以整合到读取器内。在一个实施方案中, 硬性标准以矩形、正方形、椭圆形、圆形或任何多边形形状切割。在一个实施方案中, 硬性标准切割成矩形形状, 其包含下述尺寸: 高度约 0.04、0.045、0.05、0.055、0.06、0.065、0.07、0.075、0.08、0.085、0.09、0.095、0.10、0.11、0.12、0.125、0.126、0.127、0.128、0.129、0.130、0.135、0.140、0.150 英寸; 宽度约 0.01、0.02、0.03、0.035、0.039、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95 或 1.0 英寸; 和长度约 0.01、0.02、0.03、0.035、0.039、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95 或 1.0 英寸。

[0304] 在一个实施方案中, 采用硬性标准作为参考的读取器用于跨群体标准化读取器, 例如针对预定的“金标准”读取器标绘后续的读取器性能, 如下表中举例说明的:

[0305] 表 4

[0306]

	金标准	测试
S0	1000	900
S1	5400	5000
S2	10200	11000
S3	19000	20000
S4	22000	23000
S5	50000	50000

[0307] 因此, 当 y 和 x 轴分别是测试读取器和金标准测量值时, 检测下限是跨越噪声水平 (在无标记的情况下进行读取) 的标绘线的截距。

[0308] 在一个实施方案中, TD 包含各自基于特定分析物进行设计的不同 pRNAs, 互补 SCD 包含与同源 pRNAs (其针对 TD 上固定的那些) 连接的多个捕获抗体, 并且其中所述多个捕获抗体包含特异于不同分析物的抗体的不同亚群。此外, SCD 试剂溶液或基质 (冻干的固体基质) 包含检测探针, 或多个铈 (III) 标记的抗体 (由对于不同分析物特异的抗体的相同亚群组成)。另外的镧系元素标记是本领域已知的, 例如公开于美国专利 7, 101, 667 中。还参见, 例如, Richardson F. S., " Terbiun(III) and Europium(III) Ions as Luminescent probes and Stains for Biomolecular Systems, " Chem. Rev., 82:541-552(1982)。

[0309] 读取器可以以定时或即时读取设置报道结果。在定时模式下, 在测试装置已插入读取器内后, 读取器不依赖于操作者而完成且报道结果。这允许操作者不依赖于机器工作的更大自由。即时读取模式提供实时结果, 允许进行分批测试。

[0310] pRNA。在本发明的一个方面, 互补吡喃糖基 RNA (pRNA) 序列的组合作为 CMPs 掺入本发明的 SCD/ 测试装置中, 从而允许同时、特异性检测多种不同靶分析物。已发现吡喃

糖基 RNA 具有比天然 RNA 更强和更有选择性的结合。此外,吡喃糖基-RNA 碱基以梯样方式(而不是螺旋方式)堆叠,这使得堆叠相互作用更有利且导致更高的结合亲和力。此外,pRNA 不与内源 RNA 或 DNA 相互作用且不受 RNA 酶降解,这使得 pRNA 理想地适合于在样品检测中使用。在一个实施方案中,在 pRNA 中使用吡啶。吡啶充当中性碱基。在多种实施方案中,一对同源 pRNA 序列之一固定在 TD 中的特异性条或测试区带中,而该对同源 pRNA 序列中的另一个与捕获探针中的分析物-特异性抗体连接,从而允许与指定的靶分析物结合。

[0311] 当研究多种分析物时,为了使结合对 pRNA 分子之间的交叉反应性降到最低,可以对结合对 pRNA 分子进行设计,以使交叉反应性降到最低。算法可以用于测定在结合配偶体之间的结合能。例如,已创建了结合程序 MFOLD(参见 <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>) 和 BINDIGO(参见 <http://rna.williams.edu/>) 来测量核酸结构的自由能,其利用 Smith-Waterman 算法的标定性质(Hodas 和 Aalberts(2004) *Nucleic Acids Research* 32: 6632-42)。使 pRNA CMPs 之间的结合最大化的算法用于增加特异性和选择性。通过使用这种方法,可以扫描大量 pRNA 序列,并将对于其配偶体序列具有低结合能(强结合)且对于非配偶体序列具有高结合能(弱结合)的序列选择作为理想的 pRNA 序列。

[0312] 在一个实施方案中,基于专门规则的系统用于开发 pRNA 结合对,以使交叉反应性降到最低,同时维持 pRNA 对的高特异性和选择性结合。基于专门规则的系统利用可以具有学习组分的知识库。此外,基于专门规则的系统可以利用来自实验或来自算法例如 MFOLD 和 BINDIGO 的信息,如上所述的。在一个实施方案中,已鉴定了所得到的 pRNA 对,其对于彼此具有高亲和力,而对于非同源对具有很少的亲和力或无亲和力。

[0313] 在某些实施方案中,pRNA CMPs 选自但不限于表 5 中所示的 pRNAs。

[0314] 表 5:

名称	4'-2'	SEQ ID NO:
102a10-3-NH2	TAGAACGAAG	98
102b10-3-NH2	CTTCGTTCTA	99
119a10-1-NH2	TCAGTGGATG	100
119b10-1-NH2	CATCCACTGA	101
3a10-1-NH2	GTATTGCGAG	102
3b10-1-NH2	CTCGCAATAC	103
102a8-2-NH2	AACGATTC	104
102b8-2-NH2	GAATCGTT	105
119a8-1-NH2	AGTGGATG	106
119b8-1-NH2	CATCCACT	107
3a8-1-NH2	GTATTGCG	108
3b8-1-NH2	CGCAATAC	109
4a8	ATGCCTTC	110
4b8	GAAGGCAT	111
[0315] 5a8	TGATGGAC	112
5b8	GTCCATCA	113
6a8	CAGTAGTG	114
6b8	CACTACTG	115
7a8	TTCCTGAG	116
7b8	CTCAGGAA	117
8a8	GACTCTCT	118
8b8	AGAGAGTC	119
4a9-In	ATGCDCTTC	120
4b8-In	GAADGCAT	121
5b9-In	GTCDATCA	122
6a6	CAGTAG	123
6b6	CTACTG	124
8a6	GACTCT	125
8b6	AGAGTC	126

[0316] 所有寡核苷酸具有 4' -C12 氨基和 2' - 己醇基团

[0317] 在一个实施方案中,当多种 pRNA 序列用于检测多种分析物时,选择 pRNA 对,以使其与其他 pRNA 的交叉反应性降到最低。交叉反应性的最小化允许生成更整洁的信号,且减少了可以产生假阳性结果的人工结合。选择表 5 中的某些 pRNA 序列,以使 pRNA 配偶体之间的结合达到最大,同时使其与其他结合对的结合降到最低。例如,SEQ ID NOs :120-126 的 pRNA 序列设计为使彼此的交叉反应结合降到最低。已进行特别选择(以使交叉反应性降到最低)的 pRNAs(例如 SEQ ID NOs :120-126)与其他 pRNA 结合对将具有减少至少 5%、

10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的交叉反应性。用于测定交叉反应性的测定是本领域已知的，并且包括例如竞争测定或ELISA。在另一个实施方案中，已进行特别选择（以使交叉反应性降到最低）的pRNA CMPs（例如SEQ ID NOs :120-126）将与其他pRNA具有减少的交叉反应性，其EC50浓度为1nM、5nM、10nM、20nM、30nM、50nM、100nM、250nM、500nM、1 μ M或更大。在另一个实施方案中，已进行特别选择（以使交叉反应性降到最低）的pRNA CMPs（例如SEQ ID NOs :120-126）将与其他pRNA具有减少的交叉反应性，其EC50浓度与非配偶体序列的结合相比，减少1X、2X、3X、4X、5X、6X、7X、8X、9X、10X或更多倍。在多种实施方案中，pRNAs用作CMPs和ICMPs。

[0318] 在多种实施方案中，固定在测试条的可寻址线路上的pRNA分子将与缀合有抗分析物结合试剂（例如抗病毒抗体）的互补pRNA特异性结合。

[0319] 在某些实施方案中，对于靶分析物的检测，掺入了一种或多种固定的pRNA的TD能够提供约0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、15、20、30、40或50ng/mL的灵敏度。在这个背景中，术语“约”指给定测量值的+/-5%。

[0320] 在某些实施方案中，掺入了一种或多种固定的pRNA的TD能够提供至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的灵敏度（针对对照测定），所述对照测定例如生长培养物或实时PCR测试，如实施例1中所述。灵敏度意欲描述测试测定所产生的阳性率。

[0321] 在某些实施方案中，对于靶分析物的检测，掺入了一种或多种固定的pRNA的TD能够提供约0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、15、20、30、40或50ng/mL的特异性。

[0322] 在某些实施方案中，掺入了一种或多种固定的pRNA的TD能够提供至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的特异性（针对对照测定），所述对照测定例如生长培养物或实时PCR测试，如实施例1中所述。特异性意欲描述测试测定所产生的阴性率。

[0323] 在某些实施方案中，利用接头例如蛋白质接头使pRNA与膜（即，测试条）附着。例如，pRNA可以与亲水蛋白质缀合。在一个实施方案中，接头蛋白质具有至少约500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7500、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、110000、120000、130000、140000、150000、160000、170000、180000、190000、200000、225000、250000、300000、350000至约450000的分子量。此类接头的大小可以为约5-10、6-11、7-12、8-13、9-14、10-15、11-16、12-17、13-18、14-19、15-20、16-21、17-22、18-23、19-24、20-25、21-26、22-27、23-28、24-29、25-30、35、40、45或50个AA长。接头可以是肽或多肽。在一个实施方案中，接头是BSA或IgG。

[0324] 在另一个实施方案中，接头是单克隆抗体。接头可以充当锚定蛋白质用于使pRNA与测试装置结合。锚定蛋白质缀合物可以使用本领域已知的标准方法进行纯化，例如通过Sephacryl-300柱纯化。在一个实施方案中，锚定蛋白质是接头IgG MAb 2-199-C(Abcam，

Cambridge, MA), 其是对于啮齿类动物细胞色素 C 特异的单克隆抗体。与 MAb 2-199-C 缀合的 pRNA 导致与单独的 pRNA 相比, 增加的信噪比。在另一个实施方案中, 锚定蛋白质是牛血清白蛋白 (BSA)。在一个特定实施方案中, 使用的 BSA 是单链 BSA。锚定蛋白质和 / 或间隔臂的使用允许条带化 (striping) 更大浓度的 ICMP, 从而增强本发明的测定的灵敏度和 / 或特异性。

[0325] 在另外一个实施方案中, 抗体可以经由分隔接头例如碳间隔子与 pRNA 分子附着。在一个实施方案中, 碳间隔子在一个末端具有磷酸基团。碳间隔子可以在碳间隔子中具有任何数目的碳原子, 例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30 个或更多个碳原子。接头分子的例子显示于图 20 (顶部结构) 中。磷酸基团可以例如在核苷酸的 4' 末端与核苷酸附着。在某些情况下, 激活化学基于用 1,4- 苯二异硫氰酸酯 (PDITC) 修饰氨基基团。PDITC 是在苯环上含有 2 个胺反应性异硫氰酸酯基团的同双功能交联剂。与胺修饰的 pRNA 寡聚物的过量的反应导致硫脲连接的形成, 留下第二个异硫氰酸酯基团游离, 以与含胺分子例如蛋白质偶联。PDITC 化学是有利的, 因为它在中性 pH 下和在干燥状态中足够稳定, 因此它可以通过反相 HPLC 纯化, 且贮存数月而不显著分解。此外, 当在微碱性 pH 下与蛋白质接触时, PDITC 激活的 pRNA 有效且选择性地与赖氨酸的伯氨基基团反应, 提供稳定的 pRNA-蛋白质连接。例如, 图 20 显示了与 12- 碳间隔子连接的 PDITC 结构。PDITC- 接头-磷酸可以加入结合配偶体中, 例如寡核苷酸或 pRNA 分子, 经由磷酸盐代替在寡核苷酸或 pRNA 分子的 4' 末端的新核苷酸。在某些实施方案中, 在与接头或蛋白质缀合前, 将 pRNA 维持在酸性 pH 下, 例如低于 pH 5、4、3 或 2。例如, 在缀合前, pRNA 可以在 pH 2.2 下维持稳定。在缀合反应前, 可以升高 pRNA 的 pH。例如, 在缀合反应前, pRNA 的 pH 可以升高至 pH 8.5。在其他实施方案中, 在与接头或蛋白质缀合前, pRNA 可以干燥贮存。

[0326] 在一个实施方案中, TD 包含通过锚定蛋白质与测试条结合的 ICMPs。在一个实施方案中, 与锚定蛋白质结合的 ICMP 是 pRNA。

[0327] 在一个实施方案中, pRNA 经由在 pRNA 分子和亲水蛋白质之间的共价键与亲水蛋白质 / 肽偶联。将包含 pRNA-蛋白质复合物的溶液应用于测试膜 (例如硝酸纤维素) 上的限定区域, 由此蛋白质锚以不可逆方式与膜结合。随后 pRNA 可应用于测定中。在一个实施方案中, 锚定 / 接头蛋白质是亲水蛋白质, 并且测试膜是硝酸纤维素。

[0328] 在另一个实施方案中, pRNA 经由接头与固定分子缀合。接头可以是碳接头, 并且可以在接头中具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 个或更多个碳。固定分子可以是例如二异硫氰酸酯, 例如 1,4- 苯二异硫氰酸酯。对与固定分子缀合的寡聚物实施合成后纯化。例如, 寡聚物可以通过凝胶过滤柱纯化, 以通过大小分离产物, 例如 Sephacryl-300 柱 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)。另外, 可以就试剂纯度分析寡聚物。例如, 基质辅助激光解吸 / 电离、飞行时间质谱法可以用于测定缀合的寡核苷酸产物的同一性和纯度。pRNA 分子对锚定蛋白质和 / 或抗体 (统称为“CMP 结合蛋白”) 的比例在混合物中可以改变, 以产生 pRNA-CMP 结合蛋白缀合物, 如它们在反应混合物中的浓度一样。一般而言, pRNA-CMP 结合蛋白缀合物的比活性 (摩尔 pRNA / 摩尔 CMP 结合蛋白) 越高, 测定性能越佳。pRNA 与 CMP 结合蛋白的最佳比率可以针对每个 pRNA+CMP 结合蛋白组合进行测定。超过某一比率, 向 CMP 结合蛋白中加入另外的 pRNA 可以导致生成在 CMP 结合蛋白起始材料中未观察到的高分子量 (HMW) 聚集体。这些 HMW 聚集体可以通过尺寸排阻色谱 (SEC)

观察到。不受理论束缚, HMW 聚集物的形成最可能是由于非特异性静电相互作用, 而不是由于在缀合反应过程中的蛋白质-蛋白质交联, 因为 pRNA 仅含有单个反应性部分 /pRNA 寡聚物, 如通过质量控制测试分析证实的。下述事实支持了这个理论: 当 pRNA-CMP 结合蛋白缀合物通过变性 SDS 毛细管电泳进行色谱分析时, 未观察到蛋白质-蛋白质交联。观察到的缀合的 CMP 结合蛋白的迁移率变动对应于 1、2、3 或 4 个 pRNA 分子 /CMP 结合蛋白的添加, 并且更高水平的 pRNA 掺入未分解成小心分解的种类。然而, 缀合物大小的变动不对应于共价蛋白质-蛋白质二聚体和三聚体。生成的污染性 HMW 材料的存在与 pRNA-CMP 结合蛋白缀合物的 pRNA 比活性 (摩尔 pRNA/ 摩尔 CMP 结合蛋白) 成正比, 这反映缀合反应中的反应物的比率。HMW 聚集物可以产生与条带化到硝酸纤维素上的 pRNA 测试线路的非特异性结合。在某些实施方案中, 可以执行 HMW 材料的去除, 以维持在测定中的特异性 pRNA/pRNA 相互作用。本领域已知的各种技术包括尺寸排阻色谱 (SEC) 可以用于从单体 pRNA-CMP 结合蛋白缀合物中去除 HMW 聚集物。通过增加 pRNA-CMP 结合蛋白缀合物的 pRNA 比活性, 而不引入与其他 pRNA 测试线路产生非特异性结合的材料, HMW 聚集物的 SEC 去除提供了用于增加测定灵敏度的机制。例如, 可以执行 HMW 材料与抗体-pRNA 缀合物的 SEC 分离, 且所述分离显示于 Sephacryl 300HR 色谱中。HMW 材料首先从柱中洗脱 (第 87-108 分钟), 随后为抗体-pRNA 缀合物 (第 108-125 分钟)。材料的 2 个其他峰在第 165-195 分钟时洗脱, 且代表未掺入的 pRNA。高比活性 pRNA 缀合物的产生可以通过去除 HMW 级分而得到改善, 以便维持关于结合特异性和灵敏度的良好测定性能。根据可以得自 SEC 色谱的单体非聚集的 pRNA-CMP 结合蛋白缀合物的各自得率, 设定关于 pRNA 比活性可以增加多高的限制。

[0329] 在某些实施方案中, pRNA 具有至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100% 的比活性 (相对于未去除 HMW 级分的 pRNA)。测定和定量酶促活性和底物特异性的方法是本领域技术人员众所周知的。

[0330] 在另一个实施方案中, (例如图 18), TD 1807 包含利用不同类别的 CMPs (例如抗体、核酸、pRNA、抗生物素蛋白 / 链霉亲和素 / 生物素的组合) 的多个可寻址测试线路。

[0331] 在图 18 中所示的一个实施方案中, 至少一个可寻址线路或特异性捕获区带 1805、1812 包含具有 pRNA 1803 的 pRNA ICMP 1804、1811, 所述 pRNA ICMP 1804、1811 与固体支持物 1808 (例如, 硝酸纤维素、聚苯乙烯、玻璃、塑料、金属等) 结合, 并且在与同源或互补 pRNA 序列 1807 的结合中是特异性的, 所述同源或互补 pRNA 序列 1807 与抗体缀合以形成对于特定靶分析物 1806 特异的捕获探针 1802、1810。检测探针 1801 含有也能够特异性结合分析物的与标记 1809 缀合的抗体。

[0332] 检测探针-靶分析物-捕获探针形成的免疫复合物可以被有效固定, 且可以与包含 ICMP 的可寻址线路特异性结合, 所述 ICMP 对于在所述捕获探针中包含的 CMP 特异 (例如互补或同源 pRNA 对)。

[0333] 在一个实施方案中, pRNA 分子包含在捕获探针中作为 CMP, 并且对于在捕获探针中使用的每种 pRNA, 在一个可寻址线路上排列互补的固定的 pRNA (即 ICMP)。在一个实施方案中, 测试条包括包含 pRNAs 的多个可寻址线路, 例如在测试条上的 1、2、3、4、5、6 或 7 个不同可寻址线路上。

[0334] 在一个实施方案中, TD 包含具有多个测试区带的测试条, 其中每个测试区带特异于不同分析物 (例如 A 或 B 型流行性感冒) 和 / 或亚型 (例如 A 型流行性感冒大范围流行

亚型和非大范围流行亚型)。在一个实施方案中(例如图 19), TD 包含具有至少 4 个测试区带的测试条,其中一个测试区带配置用于检测 A 型流感病毒或其组分,第二测试区带配置用于检测 A 型流感病毒的亚型例如 H1,第三测试区带配置用于检测 A 型流感病毒的第二个亚型例如 H3,并且第四测试区带配置用于检测 B 型流感病毒。在一个进一步的实施方案中,每个测试区带包含不同的 ICMPs,从而使得各自包含选自 SEQ ID NO:120-SEQ ID NO:126 的 pRNA 序列。

[0335] 测试装置可以组合地利用捕获部分的多个种类或类别(例如 pRNA 和抗生物素蛋白/链霉亲和素)。因此,例如,2 个测试区带可以利用 pRNA 作为配偶体捕获部分,而其他测试区带利用链霉亲和素/抗生物素蛋白-生物素、固定的抗体、或 DNA/RNA。为了明确起见,在捕获探针和排列在一个测试区带上的 ICMP 的背景中,基于它们对于彼此的特异性结合(例如 pRNA 与其互补 pRNA 结合,抗体与其靶抗原结合,抗生物素蛋白与生物素结合等),在本发明的多种实施方案中选择且利用 CMP 和 ICMP。

[0336] 为了进一步使 ICMPs 和/或 CMPs 之间的交叉反应性降到最低,可寻址线路可以这样配置,以便一个类型或类别的 ICMP 不紧靠具有相同类别的 ICMP 的邻近可寻址线路。例如,将抗体 ICMPs 置于可寻址线路 1、3 和 5 上,但将不同 ICMPs(例如 pRNA 或抗生物素蛋白/链霉亲和素/生物素)置于可寻址线路 2 和 4 上。

[0337] 在另一个实施方案中,可以使用相同类型的 ICMP,例如所有测试区带包含 pRNAs,但基于展示降低的交叉反应性,选择在任何 2 个邻近线路上的 pRNAs。在一个实施方案中,1、2、3 或 4 个测试区带各自包含不同 pRNA 序列,其中至少一个 pRNA 选自 SEQ ID NO:120-SEQ ID NO:126。

[0338] 在一个实施方案中,pRNA 这样隔开,以便存在隔开包含 pRNA 的每个可寻址线路的间隔线路,从而使得 pRNA 可寻址线路不紧邻另一个 pRNA 可寻址线路。

[0339] 在另外一个实施方案中,在不同的多个可寻址测试/捕获区带上使用不同类型的捕获配偶体的组合(例如抗体、核酸、pRNA、抗生物素蛋白/链霉亲和素/生物素的组合),从而使得特定类别的配偶体捕获部分不位于与相同类别的配偶体捕获部分邻近的可寻址测试/捕获区带上。例如,如果抗体配偶体捕获部分在可寻址测试/捕获区带 2 中使用,那么可寻址测试/捕获区带 1 和 3 将不含有抗体配偶体捕获部分,而是可以具有 pRNA、核酸、抗生物素蛋白/链霉亲和素/生物素配偶体捕获部分或对照或空白线路。通过用不同类别的配偶体捕获部分来间隔每个类别的配偶体捕获部分,可以降低在可寻址测试/捕获区带之间存在的交叉反应性的量。

[0340] 在一个实施方案中,用不同类别的配偶体捕获部分来间隔每个类别的配偶体捕获部分使交叉反应性的量降低至少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更大,从而提供更具特异性的测定。通过比较与不具有间隔类型的配偶体捕获部分的相似装置(例如,将抗体配偶体捕获部分置于邻近的可寻址测试/捕获区带上)的结合,可以针对降低的交叉反应性测量具有间隔类型的捕获配偶体的测试装置。

[0341] 各种浓度的 pRNA 可以与可寻址线路结合。在某些实施方案中,在测试线路上 pRNA 的浓度可以是 1.0pg/mm 条宽度-1000ng/mm 条宽度、或 2.0pg/mm 条宽度-500ng/mm 条宽度、或 2.5pg/mm 条宽度-200ng/mm 条宽度。在某些实施方案中,对于约 5mm 宽的测试条,

与测试条结合的 pRNA 浓度是 10ng/ 条 -10000ng/ 条、或 20ng/ 条 -5000ng/ 条、或 30ng/ 条 -4000ng/ 条。

[0342] 因此,本发明的 SCD/TDs 的关键方面是,它们可以配置为检测多种分析物,包括但不限于细胞、细胞组分(例如细胞标志、细胞表面标志)和蛋白质(例如酶)。

[0343] 在一个实施方案中,本发明的 SCD/TDs 在测定任何致病状况的方法中使用,对于所述致病状况,特定的对应的分析物是已知的或在未来鉴定。SCD 和 TD 可以配置为提供本文公开的捕获探针和检测探针的任何组合。例如,对应于心肌梗塞(MI)的多种分析物可以在检测/诊断 MI 中进行鉴定。各种状况的标志是本领域已知的,例如心脏标志公开于美国专利 5,604,105、5,710,008、5,747,274、5,744,358 和 5,290,678 中,所述专利各自的公开内容通过引用整体合并入本文。

[0344] 在一个实施方案中,样品和 SCD 缓冲剂和/或试剂的混合物在 SCD 中形成,且经由几种机制中的任何一种从 SCD 流动且通过 TD,所述机制包括毛细管作用、静水压力、或其他非毛细管作用(沿着固体材料/基质(例如测试条)的基底的表面或在固体材料/基质(例如测试条)的基底内)。如果存在靶分析物,那么形成包含捕获探针-分析物-检测探针的复合物,并且当运行通过测试条时,此类复合物将在指定的测试区带积累,产生可以通过肉眼或使用仪器读取器解释的信号。

[0345] 适体。在某些实施方案中,适体用作本发明的 SCDs 和 TDs 中的捕获部分配偶体或分析物-特异性结合试剂,或两者。适体包括从核酸的候选混合物中鉴定的核酸。在一个实施方案中,适体用于结合靶分析物,并且因此分析物是捕获探针、检测探针或捕获探针和检测探针两者中的分析物-特异性结合试剂。

[0346] 在多种实施方案中,适体包括与通过 SELEX 法分离(基于对靶分析物(例如本文公开的感染剂)的结合特异性)的核酸配体基本上同源的核酸序列。基本上同源意指,超过 70%,最优选超过 80%的一级序列同源性程度。如本文使用的,“SELEX”方法涉及所选的核酸配体的组合以及所选核酸的扩增,所述核酸配体以所需作用与靶分析物相互作用,例如与蛋白质结合。选择/扩增步骤的任迭代循环允许选择一种或少量核酸,其与来自库的靶抗原/生物标志最强烈地相互作用,所述库含有非常大量的核酸。继续选择/扩增程序的循环,直至达到所选目标。SELEX 方法在下述美国专利和专利申请中描述:美国专利申请序列号 07/536,428 以及美国专利 5,475,096 和 5,270,163。

[0347] 感染剂。在本发明组合和方法的多种实施方案中,感染剂可以是任何病原体,包括但不限于细菌、酵母、真菌、病毒、真核寄生虫等。在某些实施方案中,感染剂是流感病毒,副流感病毒,腺病毒,鼻病毒,冠状病毒,甲、乙、丙、丁、戊型肝炎病毒等,HIV,肠病毒,乳头状瘤病毒,柯萨奇病毒,单纯疱疹病毒或 EB 病毒。在其他实施方案中,感染剂是分枝杆菌属(Mycobacterium)、链球菌属(Streptococcus)、沙门氏菌属(Salmonella)、志贺氏菌属(Shigella)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、奈瑟球菌属(Neisseria)、梭菌属(Clostridium)或大肠杆菌。对于本领域技术人员显而易见的是,通过利用对于一种或多种感染剂的一个或多个类型或亚型特异的结合试剂(例如抗体)的不同实验对象组,本发明的组合和方法可容易地适合于不同感染剂。

[0348] 通常,感染剂的一般类型可以是感染剂的属类型或感染剂的任何主要或第一情况分型或鉴定。感染剂的亚型可以是感染剂的物种或菌株类型或感染剂的任何次要或后续分

型。感染剂的一般类型或亚型的鉴定可以经由各种合适的测试设置进行。例如,感染剂的一般类型的鉴定可以包括针对下述的一种或多种筛选测试:1) 感染剂的特定一般类型,2) 感染剂的某些所需或所选的一般类型,或3) 感染剂的所有或基本上所有相关的一般类型,或其组合。类似地,感染剂的亚型的鉴定可以包括针对下述的一种或多种筛选测试:1) 感染剂的一个或多个特定亚型,2) 感染剂的特定一般类型的一个或多个特定亚型,3) 基于与待测试受试者相关的另外信息选择的感染剂的一个或多个特定亚型,例如针对特定群体或地理位置的一个或多个怀疑的或预期的亚型,或4) 与针对一般类型进行测试的感染剂等同或相关的感染剂的一个或多个潜在大范围流行或流行的亚型,或其组合。

[0349] 根据另一个方面,所述方法可以任选或另外包括第二感染剂的一般类型和/或亚型的鉴定,所述第二感染剂与第一感染剂紧密相关,或备选地,第二感染剂的感染与第一感染剂的感染相关或可能偶联。例如,HIV感染可以与某些细菌感染相关,因此鉴定HIV以及分枝杆菌属和/或卡氏肺囊虫(*Pneumocystis carinii*)的一般类型和亚型将是有益的。因此,在一个实施方案中,所述方法包括病毒以及细菌的一般类型和亚型的鉴定。在另一个实施方案中,本发明的多种实施方案所提供的方法包括第一病毒以及第二病毒的一般类型和亚型的鉴定。例如,提供了用于鉴定HIV以及肝炎病毒的一般类型和亚型的方法。另一个例子是测试患者的流感病毒感染,其中已知在亚型内发生毒株的突变或变异,并且某些形式的流感病毒比其他的更致病得多。另一个例子是不同类型的HIV的检测,例如HIV-1和HIV-2。在一个方面,人免疫缺陷病毒(HIV)的一般类型的鉴定可以包括针对HIV的存在的筛选,而HIV的亚型的鉴定可以包括针对HIV-1、HIV-2和/或HIV的其他亚型的筛选。类似地,疱疹病毒例如单纯疱疹病毒(HSV)的一般类型的鉴定可以包括针对HSV的存在的筛选,而HSV的亚型的鉴定可以包括针对1型HSV和/或2型HSV或针对EB病毒(EBV)和EBV的亚型的筛选。

[0350] 在另外一个特定方面,肠病毒的一般类型的鉴定可以包括针对一种或多种肠病毒的存在性的筛选,所述肠病毒例如脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、埃可病毒、指定肠病毒等,而肠病毒的亚型的鉴定可以包括针对脊髓灰质炎病毒例如血清型1-3,柯萨奇病毒A例如血清型1-22和24,柯萨奇病毒B例如血清型1-6,埃可病毒例如血清型1-9、11-27、29-31,和指定肠病毒例如肠病毒68-71等的筛选。

[0351] 在一个实施方案中,本发明的方法和器械用于检测或鉴定A型流感病毒亚型和/或B型流感病毒和/或C型流感病毒。流感病毒属于正粘病毒科(Orthomyxoviridae)的正粘病毒属。具有螺旋对称的ssRNA包膜病毒。包膜颗粒直径为80-120nm。RNA与核蛋白(NP)紧密结合,以形成螺旋结构。基因组是分段的,具有8个RNA片段(C型流感病毒具有7个)。存在4个主要抗原,血凝素(H)、神经氨酸酶(N)、核蛋白(NP)和基质(M)蛋白。NP是存在3种形式(A、B和C)的类型特异性抗原,其提供用于分类人和非人流感病毒的基础。基质蛋白(M蛋白质)围绕核衣壳,并且构成颗粒质量的35-45%。此外,在表面上可观察到2种表面糖蛋白作为棒状突出物。血凝素(H)由2个亚单位(H1和H2)构成。血凝素介导病毒与细胞受体的附着。神经氨酸酶分子以较少的数量存在于包膜中。A型流感病毒的血凝素和神经氨酸酶抗原的抗原差异提供其亚型的分类基础,例如A/Hong Kong/1/68(H3N2)表示在1968年从患者中分离的A型流感病毒,且具有亚型H3N2。

[0352] 在多种实施方案中,本发明的方法和器械涉及检测或鉴定A型流感病毒,所述病

毒通过 HxNy 限定,其中 x 是 1-16,并且 y 是 1-9,或其 xy 的任何组合。例如在一个实施方案中,本发明的方法和器械用于检测 A 型流感病毒亚型 H1N5。因此,将靶向流感病毒的不同亚型的多个检测探针和捕获探针排列在本发明的 SCD 中。在几个实施方案中,测定可以利用检测探针的各种组合,以检测 A 型流感病毒(具有亚型 H1/H3 和大范围流行亚型 H5)和 B 型流感病毒。

[0353] 特别地,流感病毒的一般类型可以是基于核蛋白和基质蛋白抗原的抗原特征指定的任何类型,例如 A、B 或 C 型流感病毒,而亚型可以是流感病毒的基于抗原的一个或多个细分的类型,例如 A 型流感病毒或 B 型流感病毒的一个或多个亚型的特征在于表面抗原例如血凝素(H)或神经氨酸酶(N)。

[0354] 在一个实施方案中,流感病毒的一般类型的鉴定包括针对 A 型、B 型和 / 或 C 型流感病毒的筛选,而流感病毒例如 A 型病毒的亚型的鉴定包括针对 A 型的一个或多个预期的亚型的筛选,例如在测试时预期存在于群体中的亚型,和任选地一个或多个怀疑的亚型,例如针对爆发例如流行或大范围流行爆发进行监督的亚型。在另一个实施方案中,流感病毒的一般类型的鉴定包括针对 A 型和 B 型流感病毒的筛选,而流感病毒例如 A 型病毒的亚型的鉴定包括针对用于产生流感疫苗的一个或多个亚型的筛选,所述亚型例如当前的疫苗亚型或毒株(用于测试季节),包括预期在下一个流感季节期间流行的亚型和 / 或毒株。在另外一个实施方案中,流感病毒的一般类型的鉴定包括针对 A 型和 B 型流感病毒的筛选,而流感病毒例如 A 型病毒的亚型的鉴定包括针对用于产生流感疫苗的一个或多个亚型或毒株,和怀疑引起大范围流行爆发的一个或多个亚型或毒株的筛选,所述亚型或毒株例如一个或多个禽亚型或毒株例如 H5N1 或其衍生物,或一个或多个猪亚型或毒株例如 H1N1。

[0355] 在另外一个实施方案中,流感病毒的一般类型的鉴定包括针对 A 型和 B 型流感病毒的筛选,而流感病毒例如 A 型病毒的亚型的鉴定包括针对流行的一个或多个常见的或预期的亚型的筛选,所述亚型包括但不限于, a) H<sub>1</sub> 和 H<sub>3</sub>, b) H<sub>1</sub>、H<sub>3</sub> 和 H<sub>2</sub>, c) H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub> 和 H<sub>9</sub>, d) H<sub>1</sub>、H<sub>3</sub> 和 N<sub>1</sub>, e) H<sub>1</sub>、H<sub>3</sub>、N<sub>1</sub> 和 N<sub>2</sub>, f) H<sub>1</sub>、H<sub>3</sub> 和 N<sub>2</sub>, g) N<sub>2</sub>, 和 h) N<sub>1</sub> 和 N<sub>2</sub>。例如,用于 A 型流感病毒的亚型鉴定的筛选测试可以涉及鉴定 a)、b)、c)、d)、e)、f)、g) 或 h) 的亚型组中列出的任何一个亚型的存在,例如但不是必须的,鉴定亚型组中的特定亚型的存在。备选地,用于 A 型流感病毒的亚型鉴定的筛选测试可以涉及鉴定 a)、b)、c)、d)、e)、f)、g) 或 h) 中列出的每个和每一个亚型的存在或不存在,例如鉴定亚型组中的特定亚型的存在。

[0356] 在另外一个实施方案中,流感病毒的一般类型的鉴定包括针对 A 型和 B 型流感病毒的筛选,而流感病毒例如 A 型病毒的亚型的鉴定包括针对流行的一个或多个大范围流行的或非预期的亚型的筛选,所述亚型包括但不限于, a) H<sub>5</sub>, b) H<sub>5</sub> 和 H<sub>7</sub>, c) H<sub>5</sub>、H<sub>7</sub> 和 H<sub>9</sub>, d) N<sub>2</sub>、N<sub>7</sub> 和 N<sub>8</sub>, e) H<sub>5</sub> 和 N<sub>2</sub>, f) H<sub>5</sub> 和 N<sub>1</sub>, g) H<sub>5</sub> 和 N<sub>8</sub>, h) H<sub>5</sub>、N<sub>8</sub>、H<sub>7</sub> 和 N<sub>7</sub>, i) H<sub>5</sub>、H<sub>7</sub>、H<sub>9</sub>、N<sub>7</sub> 和 N<sub>8</sub>。例如,用于 A 型流感病毒的亚型鉴定的筛选测试可以涉及鉴定 a)、b)、c)、d)、e)、f)、g)、h) 或 i) 的亚型组中列出的任何一个亚型的存在,例如但不是必须的,鉴定亚型组中的特定亚型的存在。备选地,用于 A 型流感病毒的亚型鉴定的筛选测试可以涉及鉴定 a)、b)、c)、d)、e)、f)、g)、h) 或 i) 中列出的每个和每一个亚型的存在或不存在,例如鉴定亚型组中的特定亚型的存在。

[0357] 在另一个特定方面,肝炎病毒的一般类型可以是甲、乙和丙型病毒,其中每种病毒可能具有几个亚型,包括突变株。在一个实施方案中,肝炎病毒的一般类型的鉴定包括针对甲、乙和 / 或丙型肝炎病毒的筛选,而肝炎病毒的亚型的鉴定分别包括针对甲、乙和丙型肝炎

炎病毒的亚型或突变株的筛选。在另一个实施方案中,肝炎病毒的一般类型的鉴定包括针对乙型肝炎病毒的筛选,而肝炎病毒的亚型的鉴定包括针对乙型肝炎病毒的一个或多个亚型和 / 或突变株的筛选。在另外一个实施方案中,肝炎病毒的一般类型的鉴定包括针对丙型肝炎病毒的筛选,而肝炎病毒的亚型的鉴定包括针对丙型肝炎病毒的亚型 1-9 中的一个或多个的筛选。

[0358] 通常,就细菌感染剂而言,细菌感染剂的一般类型和亚型的鉴定包括针对细菌感染剂的属和一个或多个物种或菌株的筛选,其与感染和 / 或试剂的抗微生物抗性相关。在一个实施方案中,细菌感染剂的一般类型和亚型的鉴定包括针对分枝杆菌属和分枝杆菌属的一个或多个物种的筛选,所述物种包括但不限于结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌 (*M. avium*)、牛分枝杆菌 (*M. bovis*)、龟分枝杆菌 (*M. chelonae*)、偶发分枝杆菌 (*M. fortuitum*)、胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*)、麻风分枝杆菌 (*M. leprae*) 等。在另一个实施方案中,细菌感染剂的一般类型和亚型的鉴定包括针对沙门氏菌属和沙门氏菌属的一个或多个物种的筛选,所述物种包括但不限于伤寒沙门氏菌 (*S. typhi*)、肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*)。在另外一个实施方案中,细菌感染剂的一般类型和亚型的鉴定包括针对志贺氏菌属和志贺氏菌属的一个或多个物种的筛选,所述物种包括但不限于痢疾志贺氏菌 (*Sh. dysenteriae*)。在另外一个实施方案中,细菌感染剂的一般类型和亚型的鉴定包括针对链球菌属和链球菌属的一个或多个物种的筛选,所述物种包括但不限于肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*)、化脓性链球菌 (*S. pyogenes*) (A 群) 等。在另外一个实施方案中,细菌感染剂的一般类型和亚型的鉴定包括针对大肠杆菌和大肠杆菌的一个或多个菌株的筛选,所述菌株包括但不限于肠毒性菌株。

[0359] 根据本发明的多种实施方案,用于鉴定感染剂的一般类型和亚型的一个或多个筛选测试可以是本领域已知的或以后发现的任何合适的测试。例如,筛选测试可以是基于非核酸的测试,包括但不限于基于蛋白质、肽、氨基酸、配体或化学的测试。在一个实施方案中,提供了基于感染剂的一种或多种结构蛋白质(例如糖蛋白、包膜蛋白质、多糖等)的存在或不存在来进行检测的方法。在另一个实施方案中,测试是基于一种或多种抗原或表位或针对感染剂的抗体的存在或不存在。在另外一个实施方案中,测试是基于由感染剂释放或代谢的一种或多种物质的存在或不存在。在另外一个实施方案中,测试是基于衍生自宿主细胞的一种或多种物质的存在或不存在,所述物质与感染剂的感染相关或由感染剂的感染产生。

[0360] 在多种实施方案中,本发明的方法和器械可以检测一种或多种不同的感染剂。例如,取样器具可以包含多个不同抗体,其中存在抗体的多个亚组,由此抗体的每个亚组特异性结合不同感染剂。例如,多种抗体可以包含 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个亚组,其中多种抗体中的每个抗体亚组特异性结合不同感染剂。在某些实施方案中,本发明的方法和器械检测大范围流行的和非大范围流行的感染剂。在一个实施方案中,大范围流行的和非大范围流行的感染剂是流感病毒。在某些情况下,此类样品的收集和处理必需在及时现场护理的背景(例如在野外,没有大量的受试者来进行取样和处理,且具有有限的人力来实现此类取样)中发生。

[0361] 因此,在一个实施方案中,本发明的方法和器械用于在及时现场护理的背景中处理大量样品,其中测试结果可以在测试完成后某一时间段进行显现(即,读取)。例如,所述

时间段可以是 30 分钟、1 小时、1.5 小时、2 小时、2.5 小时、3 小时、4 小时或 5 小时。在某些实施方案中，与本文公开的试剂结合的方法和器械提供了高灵敏度和特异性，其中荧光结果可以在长时间内进行读取且获得非常相似的结果。因此，在某些实施方案中，可以收集且处理生物学样品，但将其放置在一边，以在显著的时间后读取，这在及时现场护理的背景中，或其中用有限的人力或时间收集大量样品以进一步处理样品的背景中是非常有利的。

[0362] 在本发明的另外一个方面，本发明的组合物和方法涉及检测样品中存在的任何一种或多种分析物。如上所述，例如，通过利用特异性结合与状况相关的标志的不同结合试剂，可以检测与 MI 相关的一种或多种分析物。因此，SCD 和 TD 可以包含诊断除感染性疾病外的疾病或病理学状况所需的试剂。

[0363] 在某些实施方案中，一种或多种分析物是与病理学状况或疾病相关的标志。在另一个实施方案中，一种或多种分析物是与营养状态或状况相关的多肽。在其他的实施方案中，一种或多种分析物是与细胞周期和生长相关的细胞标志。在另一个实施方案中，一种或多种分析物与细胞增殖和分化相关。在一个实施方案中，细胞标志与癌症相关。

**实施例**

[0364] 实施例 1. 在 2007 年澳大利亚流感季节期间的流行性感冒的检测

[0365] 在 2007 年澳大利亚流感季节期间，收集一组 121 个鼻咽拭子样品。在收集鼻样品后，将拭子置于 1mL 病毒转运介质中，并且根据标准方案剧烈混合 1 分钟，然后取出等分试样进行培养，并且冷冻其余样品。对于该测试，将拭子浸泡到其余样品内，并且使用 f1uID 测试进行测定。从每个样品取出另外 100 μL 等分试样，纯化核酸，并且运行用于 A 型流感病毒检测的实时 PCR 测定。

[0366] 表 6. 使用 4 线路 pRNA 捕获系统来检测 A 型流感的研究结果

	培养物 & PCR+	培养物-
<b>f1uID +</b>	25	3
<b>f1uID -</b>	2	91
<b>Sens.</b>	92.6%	=25/(25+2)
<b>Spec.</b>	96.8%	=91/(91+3)
<b>PPV</b>	89.3%	TP/(TP+FP)
<b>NPV</b>	97.80%	TN/(TN+FN)

[0368] 在 5 个培养物 -/f1uID+ 样品中，3 个样品被证实是阳性的（基于实时结果）。当将这些结果计算在内时，灵敏度、特异性、阳性预测值 (PPV) 和阴性预测值 (NPV) 分别为 92.6%、96.8%、89.3% 和 97.8%。PPV 计算为总阳性 (TP) 除以 TP 与假阴性 (FN) 的总和。NPV 计算为总阴性 (TN) 除以 TN 与假阴性 (FN) 的总和。如在 2 个数据集中可见的，所鉴定的缀合物 pRNA：蛋白质比率改善了测定性能。

[0369] 还用细菌 (n = 10)、病毒 (n = 10) 和潜在的抑制物质 (n = 15) 运行干扰和特异

性研究。在该测试过程中未检测到交叉反应性或显著的干扰。这些结果证实，fluID 快速流感测试对于流感病毒的检测和区分而言是高度灵敏和特异的测定。

[0370] 实施例 2. 使用滴定的培养的病毒进行季节性测定

[0371] 这个研究检查 A 和 B 分析物在使用滴定的培养的病毒的季节性测定中的分析性能。病毒的每个毒株都具有 TCID<sub>50</sub> 滴度，并且各自进行稀释，直至测定中不生成信号。每个稀释物使用商购可得的及时现场护理 A 和 B 型流行性感测定试剂盒以及 PCR 测试进行测试。在一个实施方案中，稀释灵敏度的结果表明，与商购可得的 A 和 B 型流行性感及时现场护理测定相比较，A 和 B 分析物以 2-3 个对数更灵敏，同时与 PCR 相比，仅以 1-2 个对数较不灵敏。

[0372] 实施例 3. 受感染的患者中的病毒滴度水平的检查

[0373] 这个研究检查与 Quidel QuickVue<sup>®</sup> 系统以及 PCR 分析相比较，使用本发明的系统的快速流感测试的分析性能。测定来自不同地理位置的 A 和 B 分析物。病毒的每个毒株都具有 TCID<sub>50</sub> 滴度，并且各自进行稀释，直至测定中不生成信号。每个稀释物使用商购可得的 Quidel QuickVue<sup>®</sup> 试剂盒以及 PCR 测试进行测试。稀释灵敏度的研究表明，与商购可得的流行性感测定相比较，本发明的系统在 A 和 B 型流感靶分析物的检测中更灵敏，同时与 PCR 相比，仅以 1-2 个对数较不灵敏。

[0374] 实施例 4. H5 以临床相关浓度在鼻样品中的检测的检查

[0375] 这个研究检查靶向鼻样品中的 H5 分析物（以临床相关浓度）的快速流行性感测试的分析性能。还测试 H1 和 H3 样品。病毒的每个毒株都具有 TCID<sub>50</sub> 滴度，并且各自进行稀释，直至测定中不生成信号。样品在低至 10<sup>2</sup> 的滴度下被检测到。

[0376] 实施例 5. 鼻样品与 PCR 的比较

[0377] 这个研究检查与 PCR 相比较，使用本发明的装置对鼻咽样品的快速流感测试的分析性能。在流感季节期间测试 164 个样品。在通过 PCR 发现为阳性的 34 个 A+ 流行性感样品中，使用本发明的装置检测到 100% 的样品。在通过 PCR 发现为阳性的 6 个 B+ 流行性感样品中，使用本发明的装置检测到 100% 的样品。在通过 PCR 发现为阴性的 123 个流行性感样品中，本发明的装置将 99.2% 的样品检测为阴性。在所述样品中，存在一个无法通过 PCR 确定的样品。

[0378] 实施例 6. 回溯鼻样品的检测

[0379] 100 个回溯收集的鼻抽吸物样品已通过培养进行了测试和确认。将本发明的装置与商购可得的系统比较。本发明的装置检测到 86-87% 的阳性样品，而其他商业系统检测到 69-80%。

[0380] 虽然已在本文中显示且描述了本发明的多种实施方案，但对于本领域技术人员显而易见的是，此类实施方案仅作为例子提供。本领域技术人员易于想到众多的变动、改变和置换，而不背离本发明。应当理解，本文描述的本发明实施方案的各种备选方案可以在本发明的实践中采用。预期下述权利要求限定本发明的范围，并且在这些权利要求及其等同物内的方法和结构由其覆盖。

[0381] 实施例 7. 使用多种流感分析物的病毒滴度水平的检查

[0382] 在这个实施例中，测试装置用于测定流感病毒的不同亚型。测试装置设计为具有含有分开的可寻址线路 1980 的测试条，以测定 A、H1、H3 和 B 分析物。测试装置的示例显示

于图 19 中。将 pRNA 捕获部分配偶体 1960 (例如 pRNA<sub>b</sub>、pRNA<sub>d</sub>、pRNA<sub>f</sub> 和 pRNA<sub>h</sub>, 其是 4 个不同的 pRNA 序列) 固定至测试条的不同可寻址线路 1980 (在图 19 中从左到右) 上。将来自样品收集装置的样品插入测试装置内在 1940 上, 在所述样品收集装置中样品已与捕获探针 1930 和检测探针 1910 混合。捕获探针具有各自与对于病毒抗原 1920 特异的抗体附着的 pRNA 分子 1950。图解显示了不同形状 of 病毒抗原 1920, 以表示来自不同病毒和来自相同病毒的不同毒株的抗原的存在。检测探针 1910 具有与铈标记 1970 结合的对于病毒抗原特异的抗体。样品由洗涤缓冲剂以毛细管流 1990 的方向携带。在一个实施方案中, 提供对照线路 1985 以评价测试性能。对照线路具有与之固定的兔抗小鼠抗体, 其将与针对 A 型流感、H1、H3 和 B 型流感生成的小鼠抗体结合。

[0383] 在捕获部分 1930 中包括的 pRNA 分子 1950 (pRNA<sub>a</sub>、pRNA<sub>c</sub>、pRNA<sub>e</sub> 和 pRNA<sub>g</sub>) 与其各自的 pRNA 捕获部分配偶体 1960 (pRNA<sub>b</sub>、pRNA<sub>d</sub>、pRNA<sub>f</sub> 和 pRNA<sub>h</sub>) 结合, 从而捕获具有病毒抗原 1920 和检测部分 1910 的复合物。每个分析物结合组 (ABS) 设计用于每种分析物 (即 A 型、H1、H3 和 B 型流感), 其中 4 个不同的 ABS 各自在分别的运行中包含: 具有连接至与在第一个测试区带上的固定的 pRNA 互补的 pRNA 的小鼠抗 A 抗体的捕获探针, 和具有与铈标记缀合的小鼠抗 A 型流感抗体的检测探针; 具有连接至与在第二个测试区带上的固定的 pRNA 互补的 pRNA 的小鼠抗 H1 抗体的捕获探针, 和具有与铈标记缀合的小鼠抗 H1 型流感抗体的检测探针; 具有连接至与在第三个测试区带上固定的 pRNA 互补的第三种 pRNA 的小鼠抗 H3 抗体的捕获探针, 和具有与铈标记缀合的小鼠抗 H3 型流感抗体的检测探针; 以及具有连接至与在第四个测试区带上的固定的 pRNA 互补的 pRNA 的小鼠抗 B 抗体的第四种捕获探针, 和具有与铈标记缀合的小鼠抗 B 型流感抗体的检测探针。

[0384] 在毛细管流动后, 为了检测不同的流行性感冒亚型, 测试装置针对在不同可寻址线路 1980 上的铈结合进行测试。

[0385] 实施例 8. 使用多种流感分析物的病毒滴度水平的检查

[0386] 在这个实施例中, 测试装置用于测定流感病毒的不同亚型。设计了具有含有分开的可寻址线路的测试条的测试装置, 以测定 A 型、H1、H3、H5 和 B 型流感的分析物。测试装置利用探针缀合物和检测探针的 5 个分析物结合组, 以在应用于测试装置前与样品收集装置中的样品反应。分析物结合组 1 包含: 具有与 pRNA 缀合的针对 A 型流行性感冒的抗体的捕获探针, 和含有与铈标记偶联的针对 A 型流行性感冒的第二种抗体的检测探针。组 2 包含: 包含与生物素缀合的针对 H1 的抗体的捕获探针, 和包含与铈标记偶联的针对 H1 的第二种抗体的检测探针。分析物结合组 3 包含: 具有与 pRNA 缀合的针对 H3 的抗体的捕获探针, 和包含与铈标记偶联的针对 H3 的第二种抗体的检测探针。

[0387] 分析物结合组 4 包含: 具有与链霉亲和素缀合的针对 H5 的抗体的捕获探针, 和包含与铈标记偶联的针对 H5 的第二种抗体的检测探针。分析物结合组 5 包含: 具有与 pRNA 缀合的针对 B 型流行性感冒的抗体的捕获探针, 和包含与铈标记偶联的针对 B 型流行性感冒的第二种抗体的检测探针。在可寻址线路 1、3 和 5 的每一个上, 固定不同的 pRNA, 在线路 1 上的 pRNA 能够捕获关于 A 型流行性感冒的免疫复合物, 线路 3 已固定能够捕获关于 H3 的免疫复合物的 pRNA, 并且线路 5 已固定能够捕获关于 B 型流行性感冒的免疫复合物的 pRNA。在可寻址线路 2 上固定的是能够捕获关于 H1 的免疫复合物的链霉亲和素, 并且在可寻址线路 4 上固定的是能够捕获 H5 的免疫复合物的生物素。

[0388] 该装置不具有含有相同类别的捕获部分配偶体（例如 pRNA 或抗生物素蛋白 / 链霉亲和素）的邻近可寻址线路。患者样品在样品收集器具上进行收集且插入样品收集装置内，将上部隔室就座到样品收集管上且密封装置。使上部隔室中的流体释放，以便液体流动经过拭子或收集器具且对其进行洗涤（从而将样品从收集器具释放到液体中）且向下流动到样品收集管的下部隔室内。包含患者样品的流体与在样品收集装置的下部隔室中的 5 个分析物结合组混合。如果存在目的分析物，那么样品发生反应且形成免疫复合物。

[0389] 将样品收集装置的分配尖端插入测试装置的端口内，并且将含有任何免疫复合物的样品混合物递送给测试装置。在递送样品混合物后，释放测试装置的洗涤缓冲剂。

[0390] 样品混合物由洗涤缓冲剂以毛细管流的方向携带。在毛细管流动后，为了检测不同的流行性感亚型，测试装置针对在不同可寻址线路上的结合进行测试。

[0391] 实施例 9. pRNA 缀合物到测试装置上的条带化

[0392] 在这个实施例中，制备 pRNA 缀合物且将其条带化到硝酸纤维素条上，用于本发明的测试装置中。

[0393] 材料与amp;方法

[0394] 化学药品。EZ- 接头 -NHS- 生色生物素购自 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)。硝酸纤维素膜 (SA3J107107) 购自 Millipore, 链霉亲和素 (SAEU) 乳胶颗粒 (目录号 2947-0701) 购自 Thermofisher Scientific (Seradyne)。

[0395] 合成下述 pRNA 寡聚物 :4a9- 吡啶, ATGCDCTC (其中 D 代表序列中的吡啶碱基); 4b8- 吡啶, GAADGCAT ;5a8, TGATGGAC ;5b9- 吡啶, GTDCATCA ;6a6, CAGTAG ;6b6, CTA CTG ;8a6, GACTCT ;和 8b6, AGAGTC。

[0396] 提取试剂 :50mM Tris, pH 8.5 ;0.75M NaCl ;1.5% 牛血清白蛋白 ;0.75% 消化的酪蛋白 ;25 μ g/mL 小鼠 IgG ;1.5% 皂苷 ;0.37% 月桂基硫代甜菜碱 3-12 ;50 μ l/mL 庆大霉素 ;0.095% 叠氮化钠和 0.0045% 硅酮止泡剂。使提取试剂球填充有 195 μ l 提取试剂。

[0397] 洗涤缓冲剂 :20% w/v 蔗糖, 50mM Tris, pH 8.5 ;0.75M NaCl ;1.5% 牛血清白蛋白 ;0.75% 消化的酪蛋白 ;1.5% 皂苷 ;0.37% 月桂基硫代甜菜碱 3-12 ;50 μ l/mL 庆大霉素 ;0.095% 叠氮化钠和 0.0045% 硅酮止泡剂。使洗涤缓冲剂小包填充有 110 μ l 洗涤缓冲剂。

[0398] 抗体。AAH5 抗 A 型流感核蛋白单克隆抗体购自 Meridian (Cincinnati, OH)。M4090913 抗 A 型流感核蛋白和 M2110171 抗 B 型流感核蛋白单克隆抗体购自 Fitzgerald Industries (Concord, MA)。2/3 抗 B 型流感核蛋白单克隆抗体购自 HyTest Ltd, (Turku, Finland)。9D5 和 4C10 抗 H1 血凝素以及 4D1、8H5 和 2F10 抗 H5 血凝素单克隆抗体购自 HX Diagnostics (Emeryville, CA)。2H11 和 1F4 抗 H3 血凝素以及 2-199C 抗细胞色素 C 单克隆抗体由 BioProcessing Inc, (Portland, ME) 生产。对照线路抗体兔抗小鼠 IgG Fc 片段特异性来自 Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA)。

[0399] 缀合 :

[0400] 生物素缀合在 75mM 硼酸钠缓冲剂, pH 9.0 中, 以 2 : 1 的生物素 : 抗体的比, 在室温下执行 2 小时。使用 Sephacryl S300, 通过尺寸排阻色谱纯化生物素缀合物, 以去除任何高分子量的污染物。执行 pRNA 与抗体或其他蛋白质的缀合, 使活化的 pRNA 与抗体在 75mM 硼酸钠缓冲剂, pH 9.0 中在室温下反应 14-18 小时。使用 Sephacryl S300, 通过尺寸

排阻色谱纯化 pRNA 缀合物,以去除任何高分子量的污染物。通过使 2 体积的生物素化抗体以 0.15mg/ml 与 1 体积的 0.2% SAEU 颗粒在室温下温育 2 小时(伴随搅动),使生物素化抗体与 SAEU 颗粒偶联。未结合的链霉亲和素用 1 体积的 10uM 生物素封闭另外 2 小时。通过中空纤维渗滤来洗涤偶联的颗粒。使用 0.2% SAEU 颗粒标准,通过荧光测定洗涤的珠的浓度。

[0401] 冻干的试剂团块:

[0402] 通过将 20  $\mu$  l 反应制剂分配到液氮内,将试剂冻干为 20  $\mu$  l 团块。冷冻的试剂团块随后被冻干且保持干燥,直至使用时。使用的试剂制剂如下:

[0403] pRNA 团块:pRNA-抗体缀合物;A、B、H1、H3、H5 各 0.05-0.5ug/20  $\mu$  l 试剂团块;10mM Tris,pH 8.0;1% BSA;和 0.3M 海藻糖。

[0404] 铈团块:铈缀合物;A、B、H1、H3 和 H5,1.0-10ug 铈-抗体珠/20  $\mu$  l 试剂团块;10mM Tris,pH 8.0;1% BSA;和 0.3M 海藻糖。

[0405] Tris(2-羧乙基膦HCl(TCEP)20  $\mu$  l 团块:17mM TCEP,10mM Tris,pH 8.0;1% BSA;和 0.3M 海藻糖。

[0406] 测试线路 pRNA 缀合物至硝酸纤维素的应用。

[0407] 将测试线路 pRNAs 与 2-199C 单克隆抗体缀合,且在含有 3% 甲醇的 PBS 缓冲剂中调整至 1.5mg/ml。使用 Imagen Technology IsoFlow™Dispenser,将测试线路缀合物以 0.075  $\mu$  l/mm 的速率分配到硝酸纤维素上。对照线路兔抗小鼠抗体以 1.2mg/ml 的浓度(不含甲醇)应用。应用次序是 4b9-In 缀合物、8a6 缀合物、6b6 缀合物、5b9-In 缀合物和对照线路。

[0408] SEQ ID NO:1 8H5 Vh 核苷酸序列

[0409]

```
caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata
tcctgcaagg ctactggcta cactttcagt aactactgga tagagtggat aaagcagagg
cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagcgatag aacaaactac
aatgggaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctccaa cacagcccac
atgcaactca gtagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aaatagatac
gacgggtatt attttggttt ggattactgg ggtcaaggaa cctcagtcgc cgtctcctca
gcc
```

[0410] SEQ ID NO:2

[0411]

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Arg Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala His  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Asn Arg Tyr Asp Gly Tyr Tyr Phe Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Ser Val Ala Val Ser Ser Ala

[0412] SEQ ID NO :3 8H5 Vk 核苷酸序列

[0413]

gaaatcgtgc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctagggga gaaggtcacc  
 atgagctgca gggccagctc aagtgtaat ttcgtttact ggtaccagca gaggtcagat  
 gcctcccca aactattgat ttactattca tccaacctgg ctctggagat cccacctcgc  
 ttcagtggca gtgggtctgg gaactcttat tctctcacia tcagcggctt ggagggtgaa  
 gatgctgcca cttattactg ccagcacttt actagttccc cgtacacggt cggagggggg  
 accaacctgg aaataaaacg g

[0414] SEQ ID NO :4 8H5 Vk 氨基酸序列

[0415]

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Phe Val  
 20 25 30  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Asp Ala Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ser Asn Leu Ala Pro Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Gly Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Thr Ser Ser Pro Tyr Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

[0416] SEQ ID NO :5 3C8 Vh 核苷酸序列

[0417]

cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc  
 tcctgcaagg cctctgggta cagcttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct  
 ccaggaaagg gtctaaagtg gatgggctgg ataaacacct acaccggaga gccagcctat  
 gctgatgact tcaagggacg gtttgccttc tctctggaaa cctctgccag cactgcctat  
 ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagatggaat  
 agagatgcta tggactactg gggctcaagga acctcgggtca ccgtatctag c

[0418] SEQ ID NO :6 3C8 Vh 氨基酸序列

[0419]

Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Ala	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys
			85					90						95	
Ala	Arg	Trp	Asn	Arg	Asp	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser
				100				105						110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115											

[0420] SEQ ID NO :7 3C8 VK 核苷酸序列

[0421]

gacattgtgc tgaccaatec tccagcttct ttggctgtgt ctcttgggca gagggccacc  
 atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttctgaca atagtcttat gcactggtac  
 cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct  
 gggatccctg ccaggttcag tggcagtggt tctaggacag acttcaccct caccattaat  
 cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtattgg ggatcctccg  
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg

[0422] SEQ ID NO :8 3C8 VK 氨基酸序列

[0423]

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Ser  
 20 25 30  
 Asp Asn Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn  
 65 70 75 80  
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile  
 85 90 95  
 Gly Asp Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

110

[0424] SEQ ID NO :9 10F7 Vh 核苷酸序列

[0425]

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagctg  
 tctctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg  
 cctggacagg gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgattctta tactaactac  
 aatcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac  
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagggggggg  
 acaggagact ttcactatgc tatggactac tgggggtcaag gcacctcggt cacctgatca  
 tcg

[0426] SEQ ID NO :10 10F7 Vh 氨基酸序列

[0427]

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Thr Gly Asp Phe His Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

[0428] SEQ ID NO :11-10F7 VK 核苷酸序列

[0429]

gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc  
 atcacttgcc atgcaagtca gggcattagc agtaatatag ggtgggtgca gcagaaacca  
 gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggaagatgg agttccatca  
 aggttcagtg gcagtggatc tggagcagat tattctctca ccatcagcag cctggaatct  
 gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatgttcagt tcccgtacac gttcggaggg  
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgg

[0430] SEQ ID NO:12 10F7 VK 氨基酸序列

[0431]

Asp	Ile	Leu	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Met	Ser	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Ile	Gly	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Gly	Leu	Ile
			35					40				45			
Tyr	His	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Val	Gln	Tyr	Val	Gln	Phe	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100					105							

[0432] SEQ ID NO:13. 人工序列 / 未知生物

[0433] catgggatgc tgccggtgta t

[0434] SEQ ID NO:14. 人工序列 / 未知生物

[0435] aattctgggc cttggctgac g

[0436] SEQ ID NO:15. 人工序列 / 未知生物

[0437] tgccgcctc tgtcgaagaa g

[0438] SEQ ID NO:16. 4D1 VH 核苷酸序列

[0439]

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaacctg  
 tcctgtaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg  
 cctggacaag gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgatagttt tactacctac  
 aatcaaaact tcaaagacag ggccacattg actgtagaca aatcatccag cacagcctac  
 atgcagctca gaagtctgac atctgaggac tctgcgggtct attactgtgc caggggggggt  
 ccaggagact ttcgctatgc tatggattac tggggccaag gcacctcggt caccgtctcc  
 tca

[0440] SEQ ID NO:17-4D1 VH 氨基酸序列

[0441]

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Asn	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
		20					25						30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			
Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Phe	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gln	Asn	Phe
	50					55					60				
Lys	Asp	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Gly	Pro	Gly	Asp	Phe	Arg	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

[0442] SEQ ID NO:18-4D1 VK 核苷酸序列

[0443]

```

gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc
atcacttgcc atgcaagtca gggcattagc agtaatatag ggtgggtgca gcagaaacca
gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggaagatgg agttccatca
aggttcagtg gcagtggtgc tggagcagat tattctctca ccatcagcag cctggaatcc
gaagactttg cagactatta ctgtgtacag tatgttcagt ttcctacac gttcggaggg
gggaccaagc tggaaataaa acgggct
    
```

[0444] SEQ ID NO:19-4D1 Vκ 氨基酸序列

[0445]

Asp	Ile	Leu	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Met	Ser	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Ile	Gly	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Phe	Lys	Gly	Leu	Ile
		35				40						45			
Tyr	His	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Val	Gln	Tyr	Val	Gln	Phe	Pro	Tyr
				85					90				95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala			
			100					105							

[0446] SEQ ID NO:20-3G4 VH 核苷酸序列

[0447]

```

cagggtccaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggggtctc agtgaagatt
tcctgcaagg gttctggcta cacattcact gattatgcta tgcattgggt gaagcagagt
catgcaaaga gtctagagtg gattggactt attaatactg actatgggtga tactacttac
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacaatg actgtagaca aatcctccaa cacagcctat
atggaacttg ccagactgac atctgaggat tctgccatct attactgtgc aagatcggac
tatgattact atttctgtgg tatggactac tgggggtcaag gaaccacggt caccgaatct
cta
    
```

[0448] SEQ ID NO :21-3G4 VH 氨基酸序列

[0449]

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1          5          10          15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35          40          45
Gly Leu Ile Asn Thr Asp Tyr Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50          55          60
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Ser Asp Tyr Asp Tyr Tyr Phe Cys Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100          105          110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Glu Ser Leu
115          120

```

[0450] SEQ ID NO :24-2F2 VH 核苷酸序列

[0451]

```

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagcg cctgtccatc
acatgcaccg tctcagggtt ctcatcaacc ggctatgggtg tacactggat tcgccagtct
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatgggctg agggaagaac cgactataat
tcagttctca aatccagact gagcatcaat aaggacaatt ccaggagcca agttttctta
gaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccaggtact actgtgccag agaggtgatt
actacggaag cctgggtactt cgatgtctgg ggccaaggaa cctcgggtcac cgaatct

```

[0452] SEQ ID NO :25-2F2 VH 氨基酸序列

[0453]

```

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1          5          10          15
Arg Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20          25          30
Gly Val His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35          40          45
Gly Met Ile Trp Ala Glu Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ser Val Leu Lys
50          55          60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Arg Ser Gln Val Phe Leu
65          70          75          80
Glu Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95
Arg Glu Val Ile Thr Thr Glu Ala Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100          105          110
Gly Thr Ser Val Thr Glu Ser
115

```

[0454] SEQ ID NO :26-2F2 VK 核苷酸序列

[0455]

gacattgtga tgactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtctct  
 ctttcctgca gggccagcca gagtattagc gactacttat actggtatca acaaaaatca  
 catgagtctc caaggcttct catcaaatat gcttcccaat ccactctctgg gatcccctcc  
 agattcagtg gcagtgatc agggtcagat ttcactctca ctatcaacag tgtggaacct  
 gaagatggtg gaatgtatta ctgtcaaaaat ggtcacacct ttccgctcac gttcgggtgct  
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgg

[0456] SEQ ID NO :27-2F2 VK 氨基酸序列

[0457]

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1			5						10					15	
Asp	Arg	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asp	Tyr
			20					25						30	
Leu	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	His	Glu	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Val	Gly	Met	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	Gly	His	Thr	Phe	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg.				

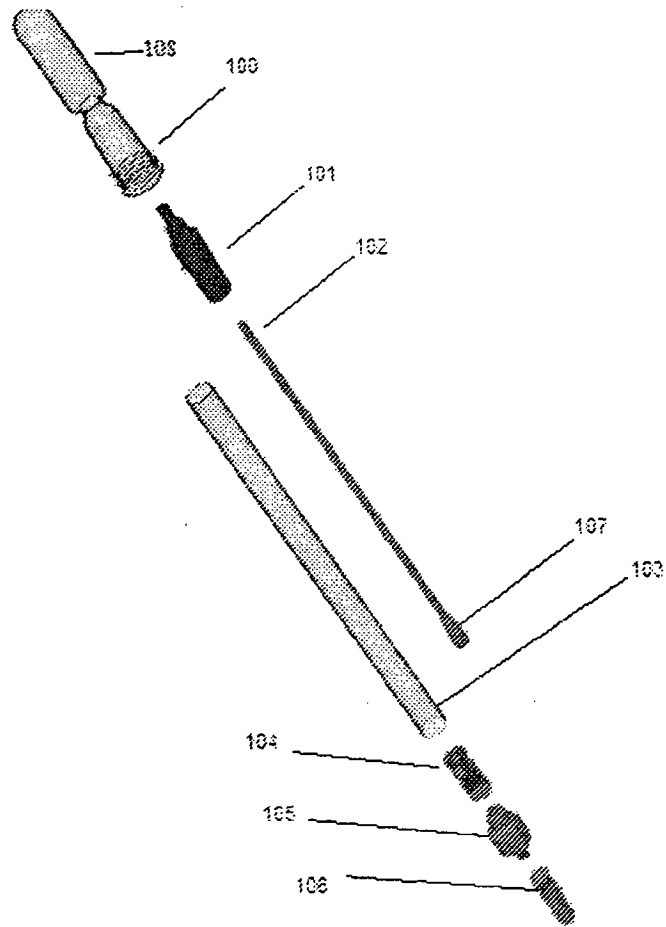


图 1

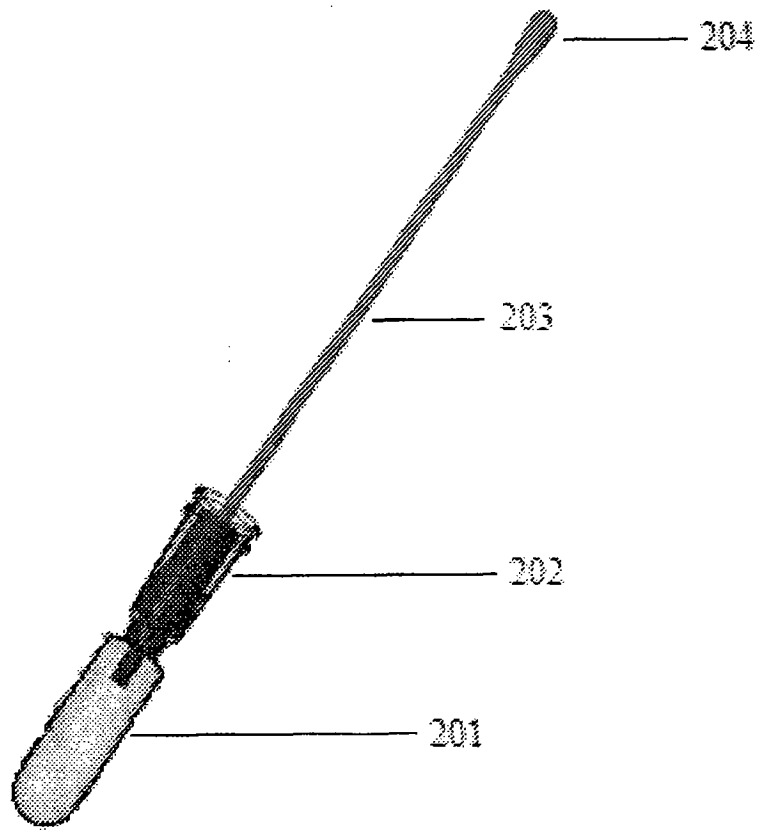


图 2A

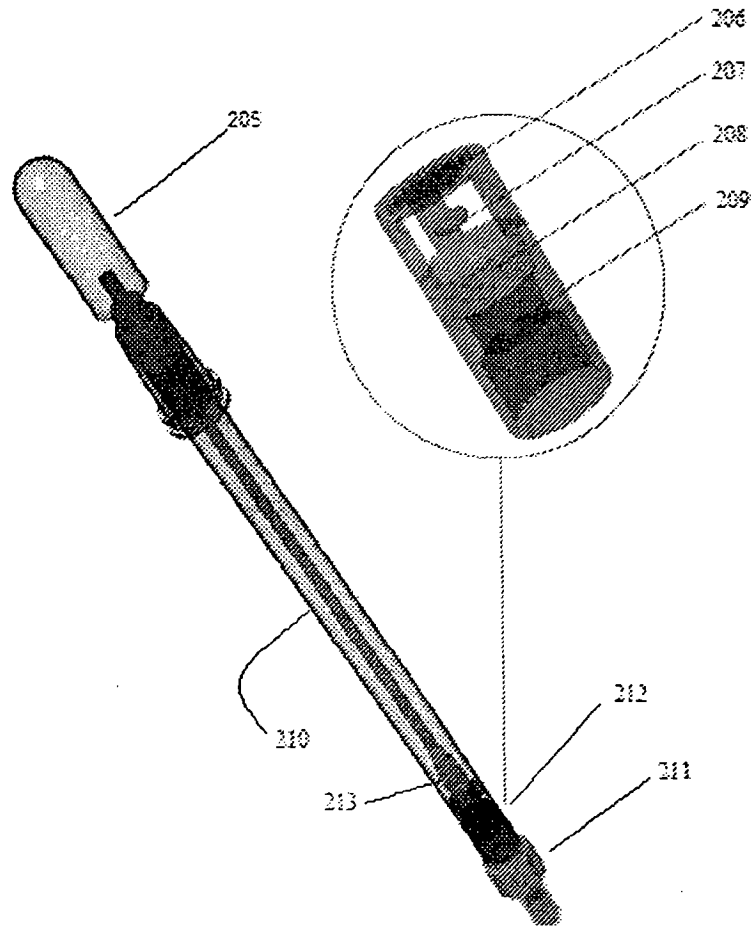


图 2B

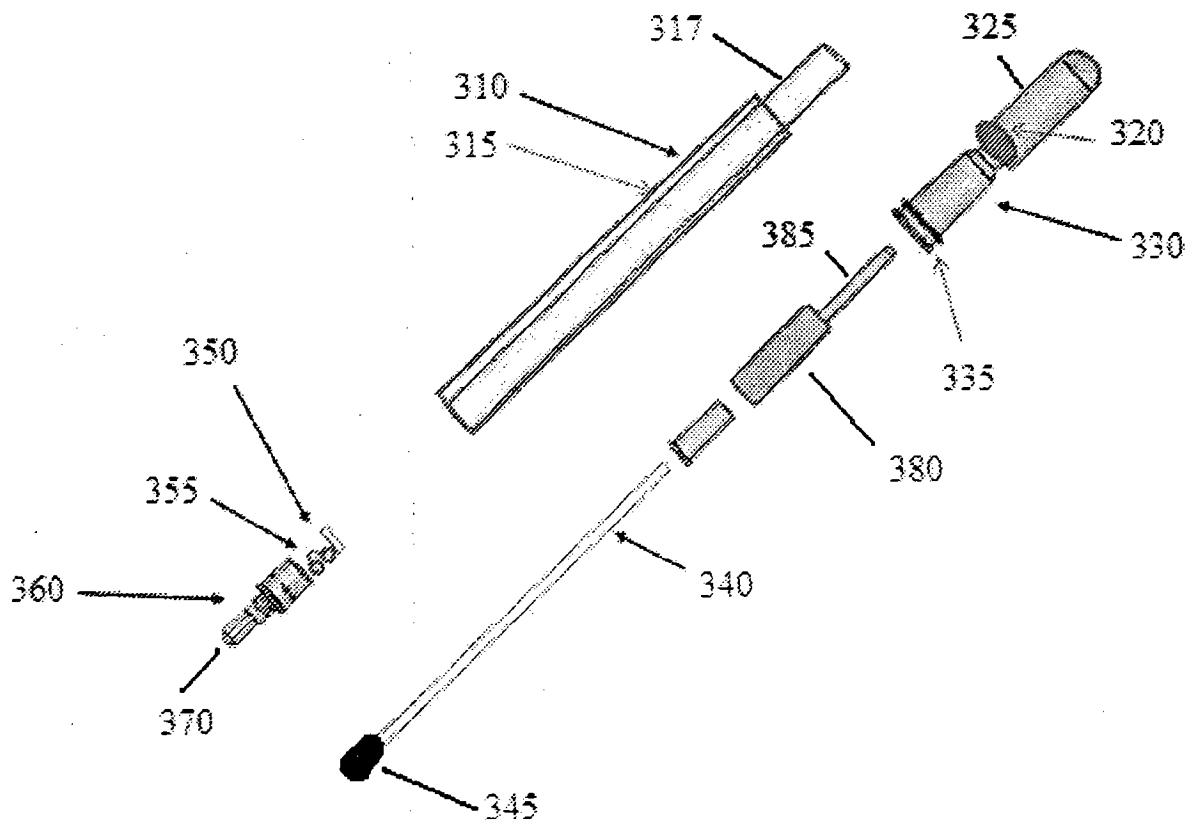


图 3

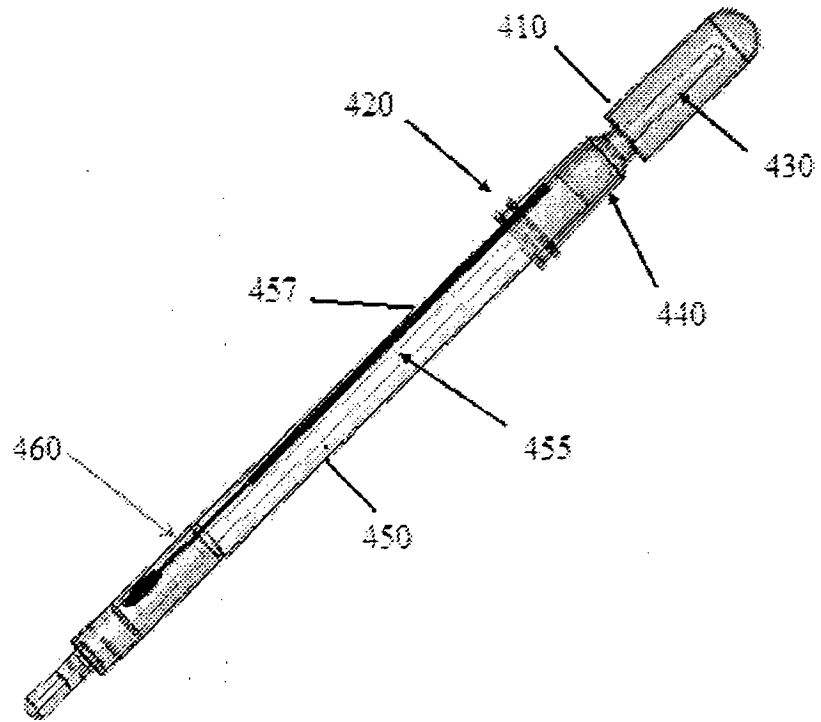


图 4

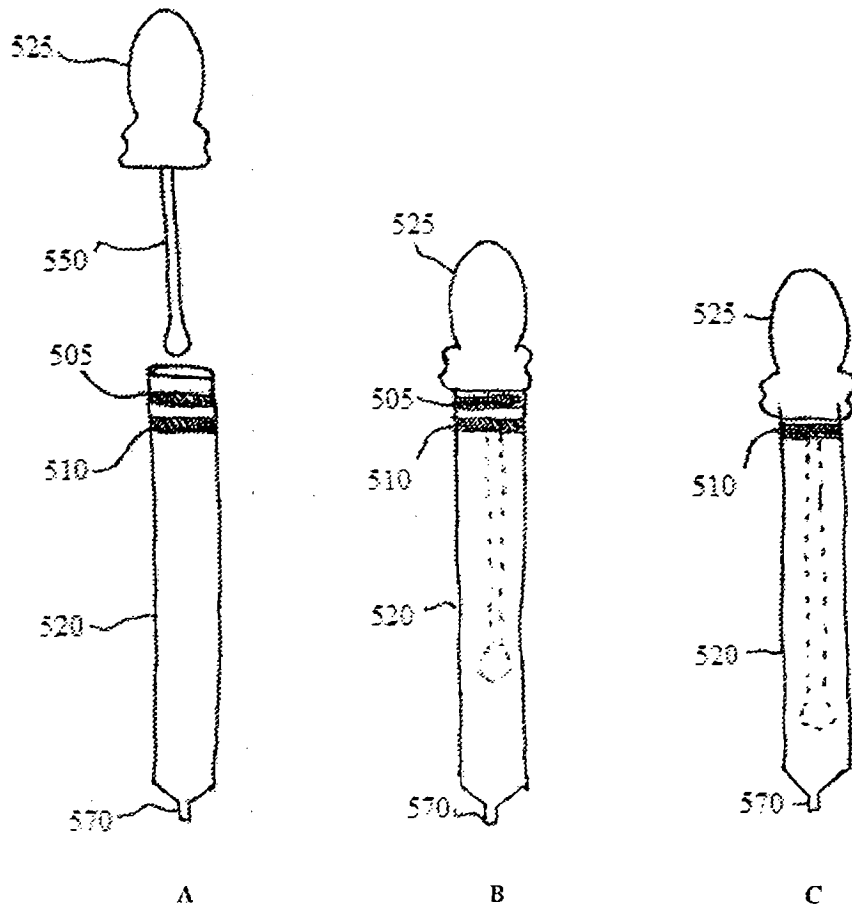


图 5

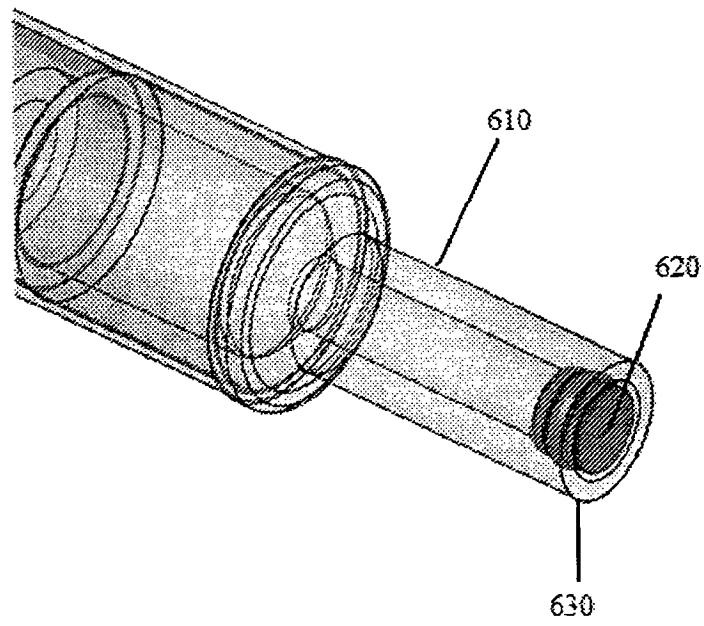


图 6

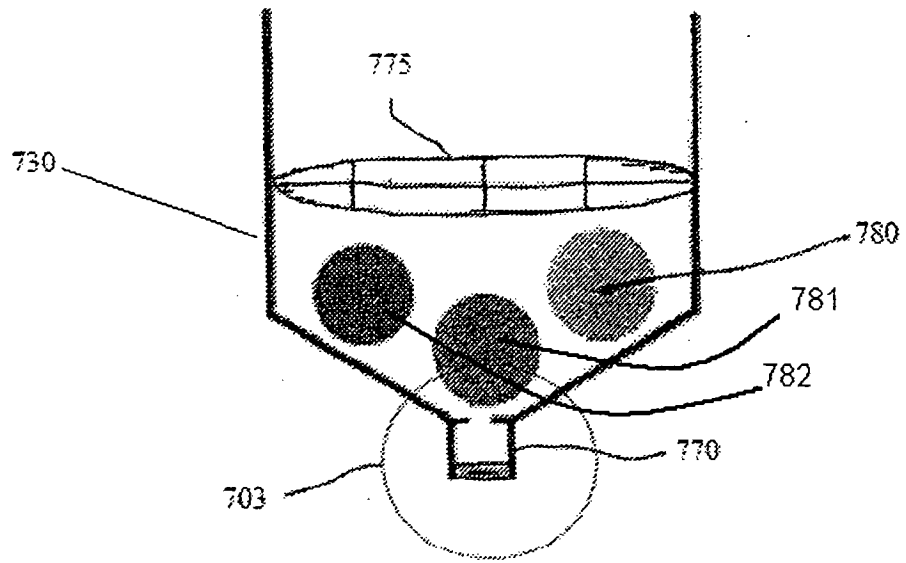


图 7

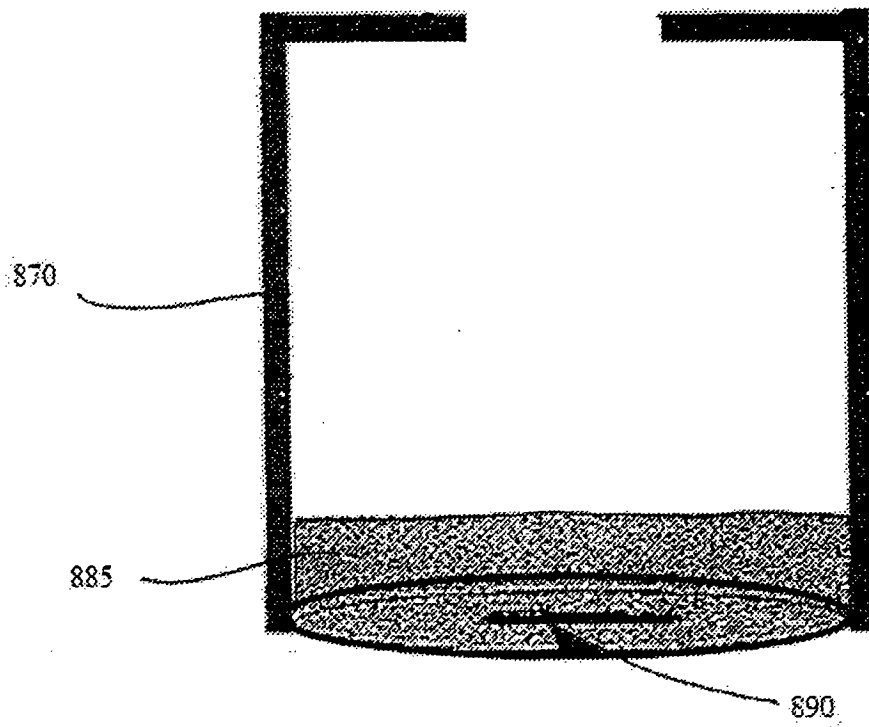


图 8

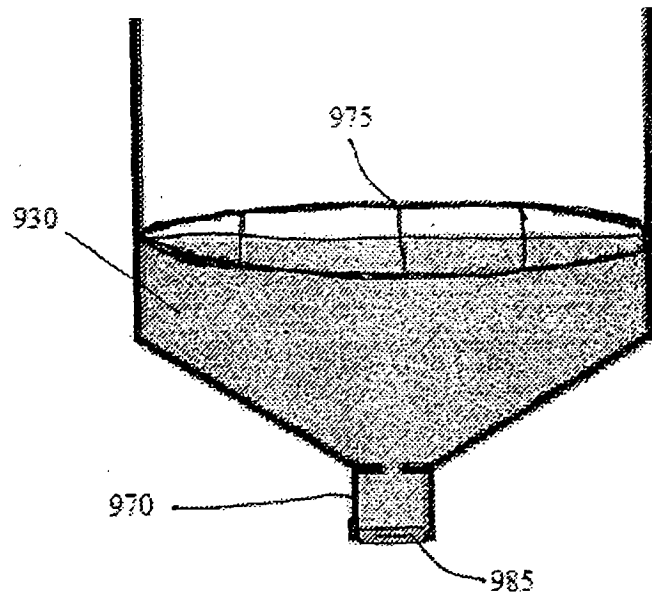


图 9

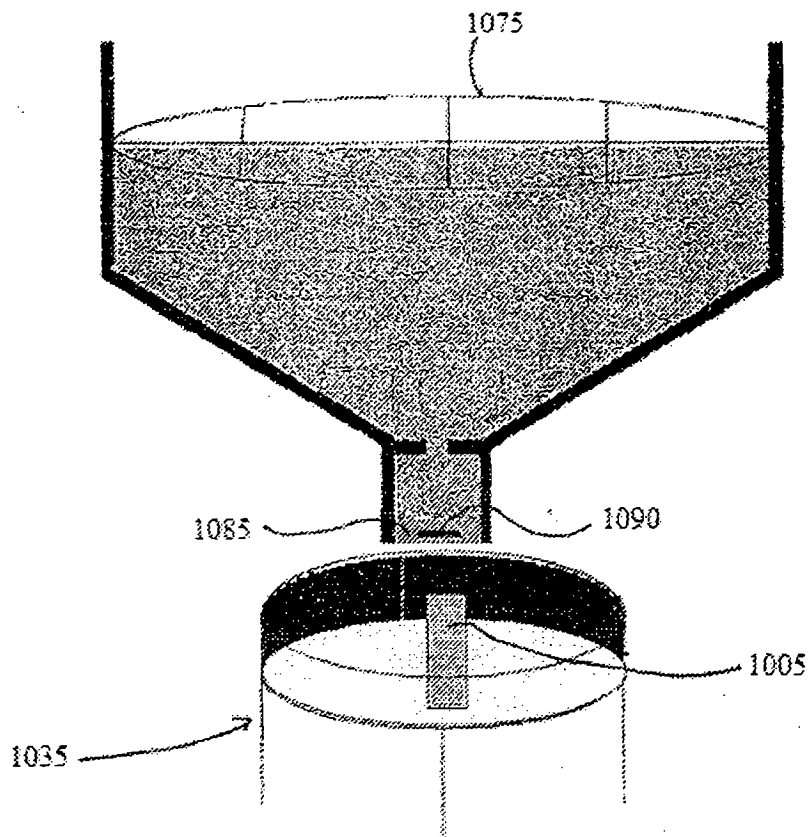


图 10

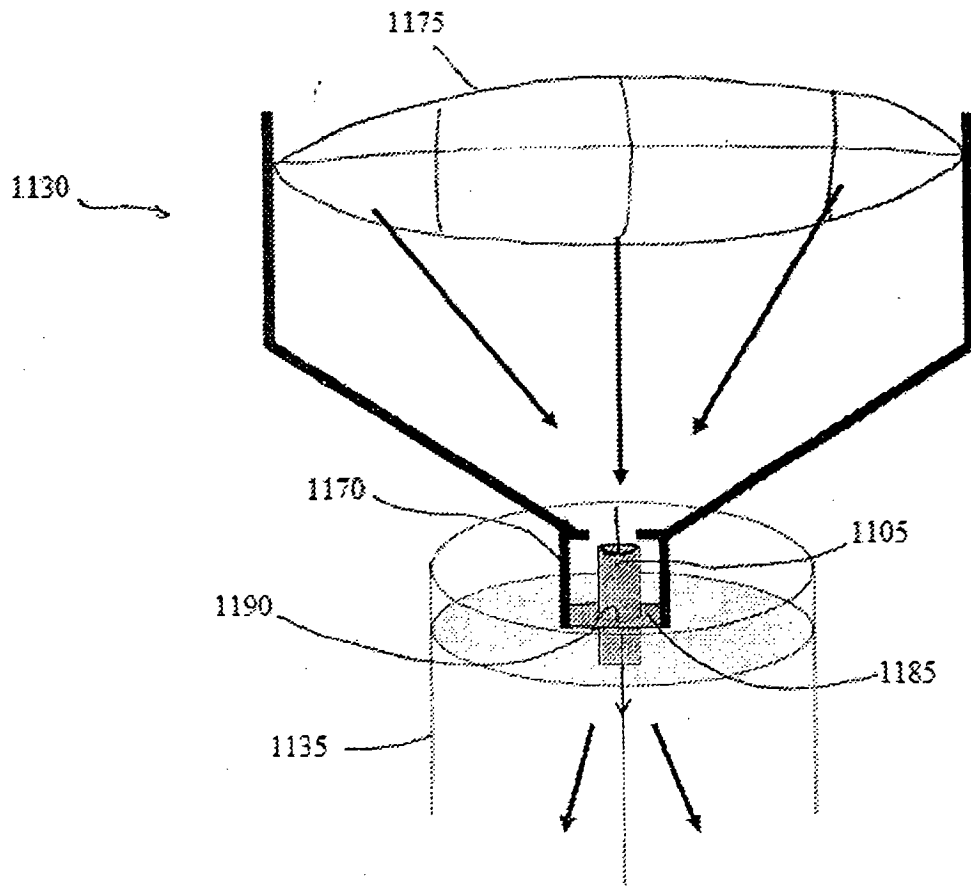


图 11

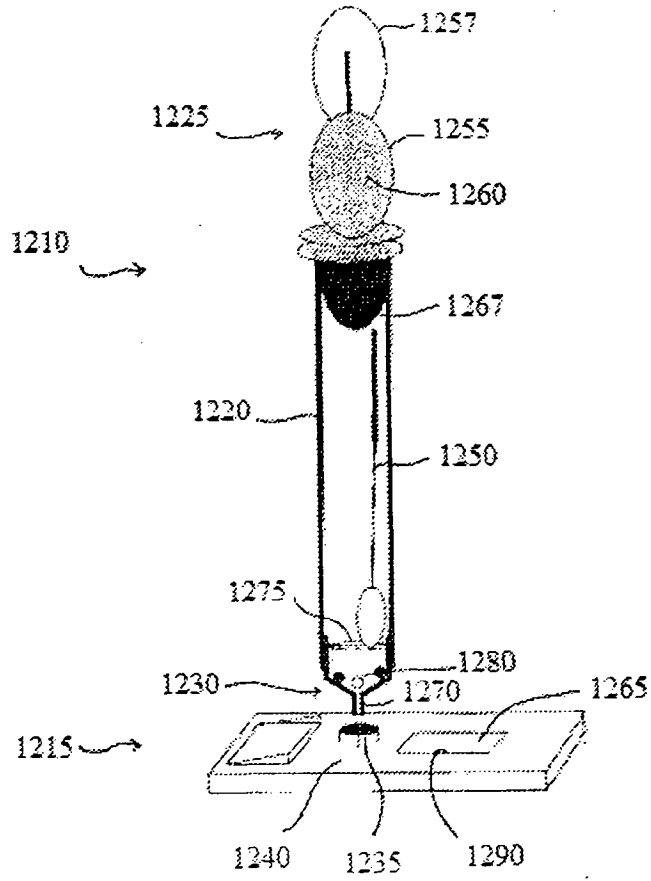


图 12

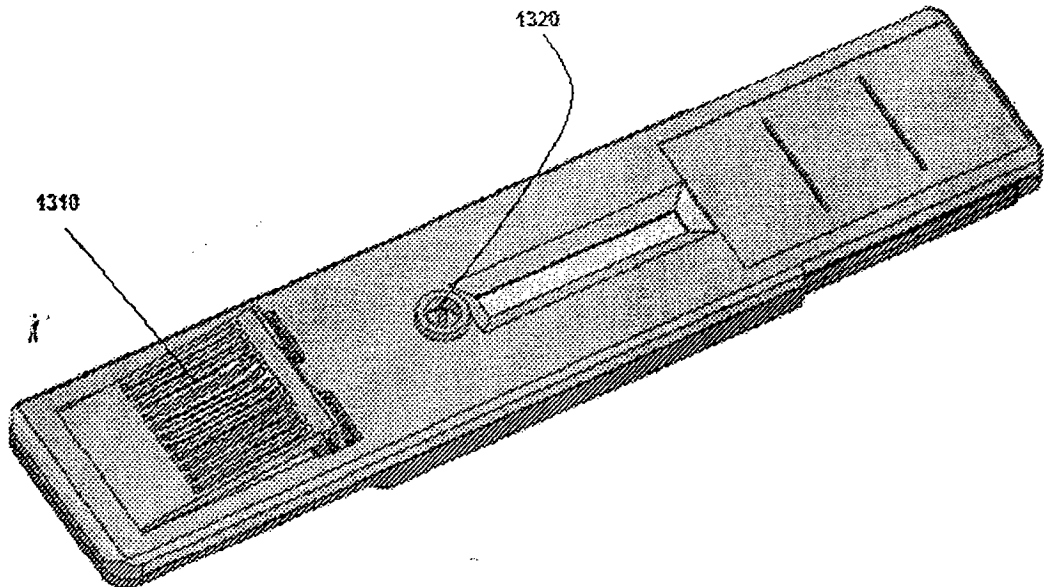


图 13

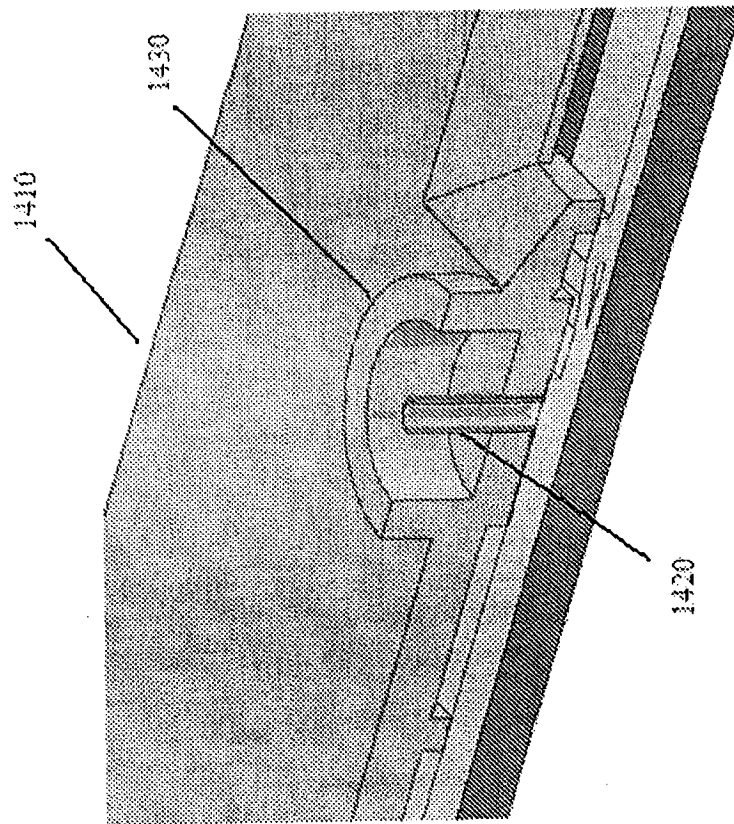


图 14

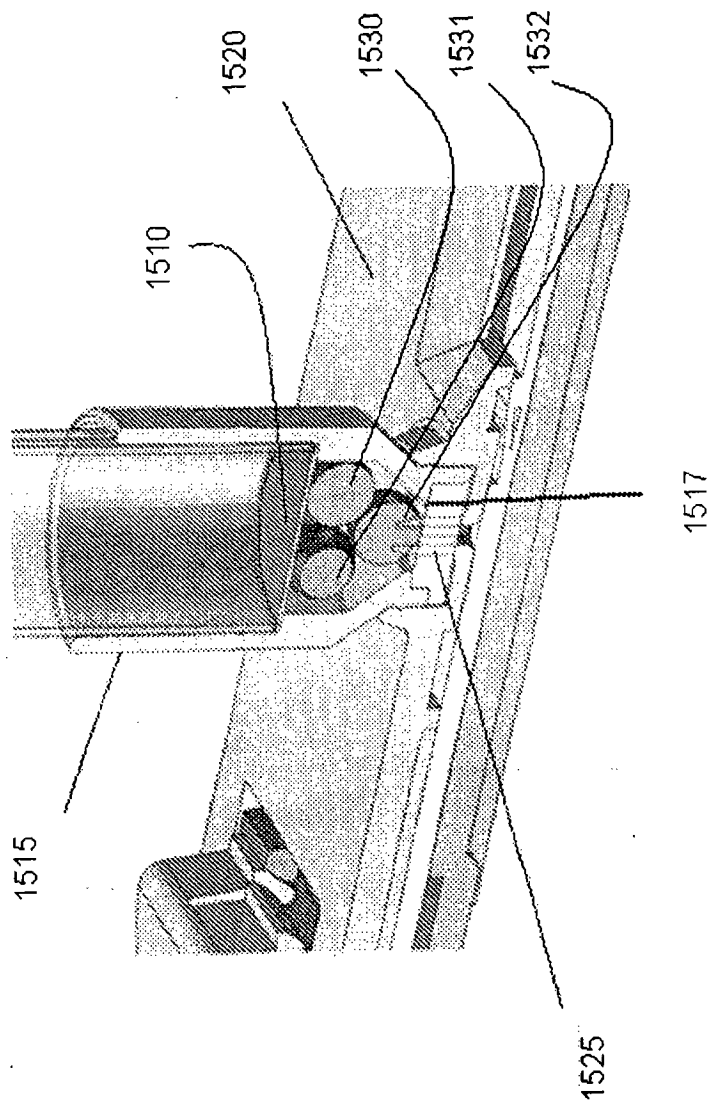


图 15

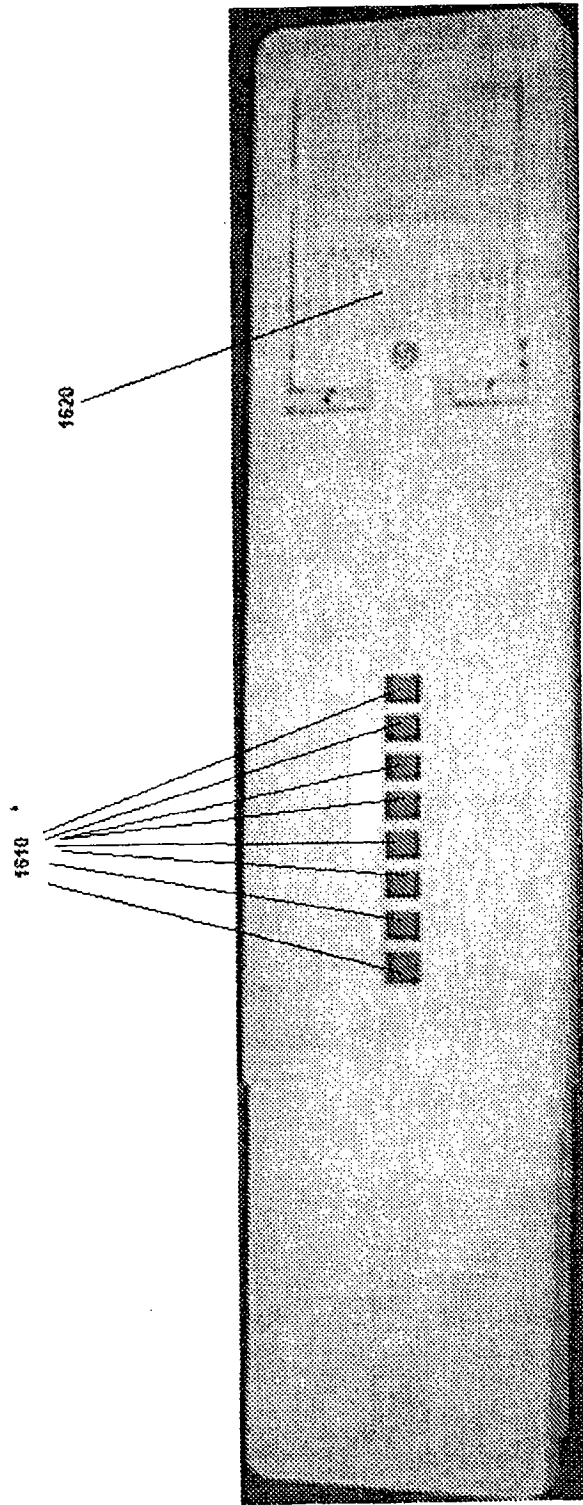


图 16

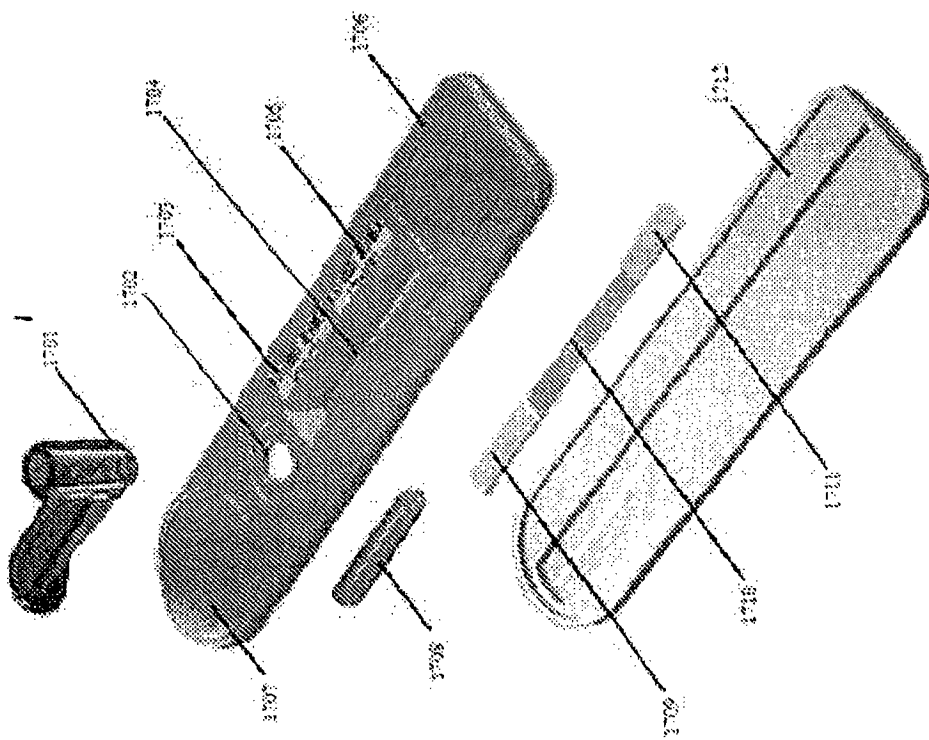


图 17

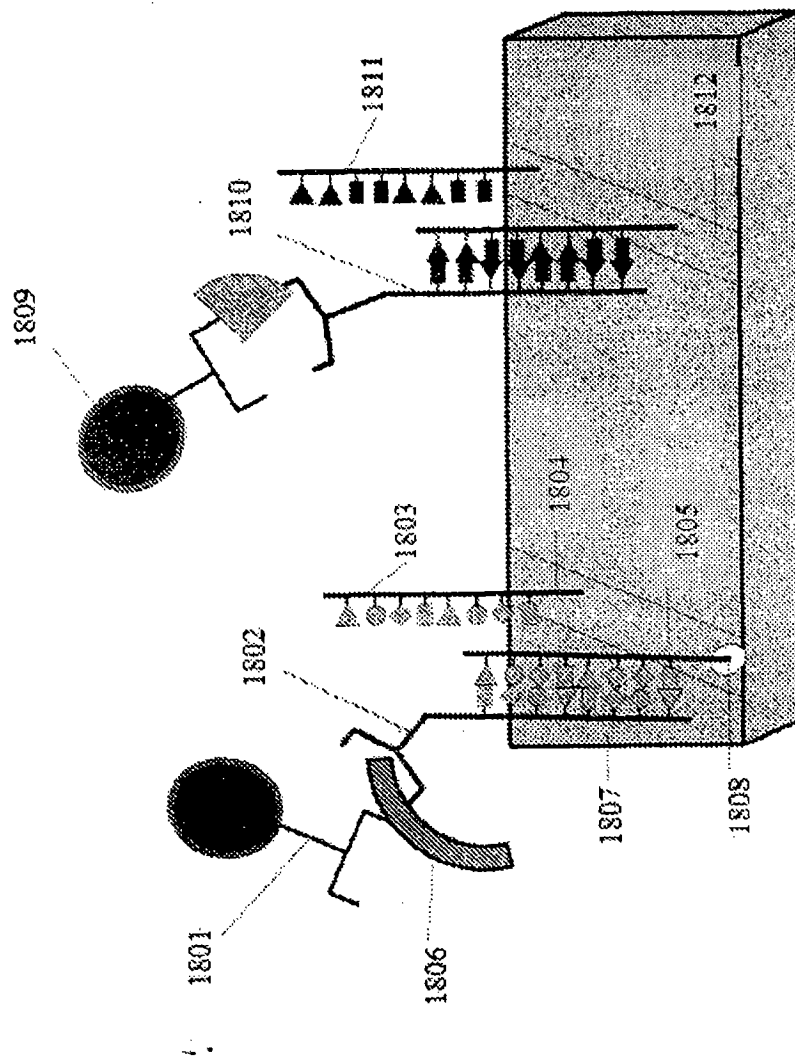


图 18

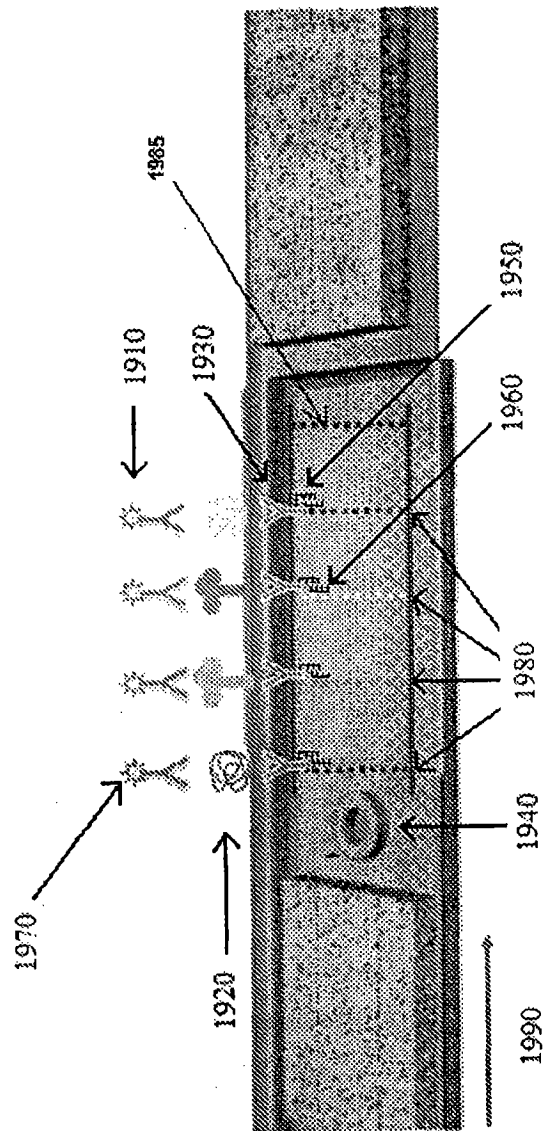


图 19

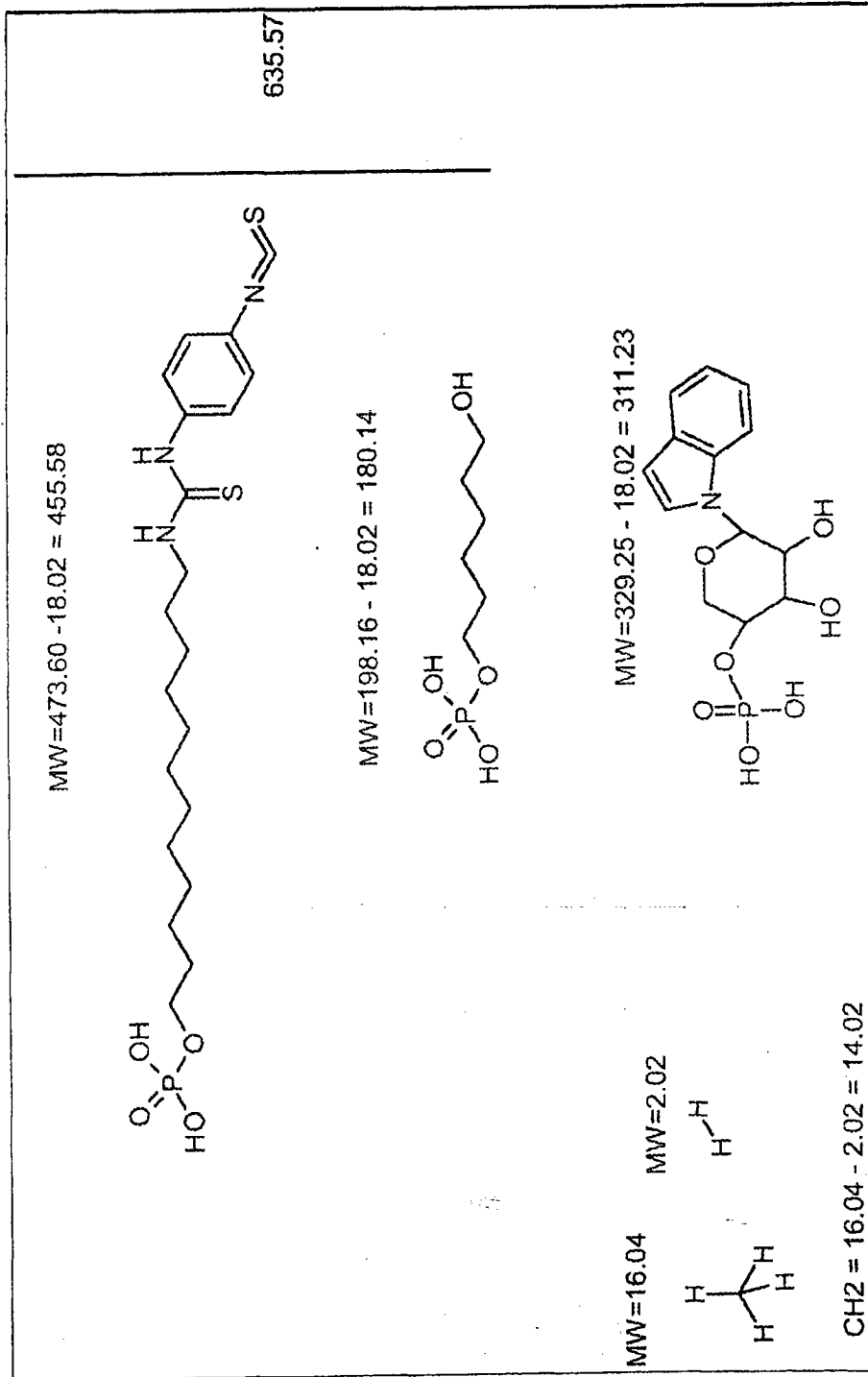


图 20

专利名称(译)	用于检测分析物的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">CN103154735A</a>	公开(公告)日	2013-06-12
申请号	CN201080028769.4	申请日	2010-05-11
[标]发明人	RL伊根 GP利加德 DD布克 CJ约翰逊 A贝伦基 S伍卡耶罗维驰 J齐斯 S卡斯塔南		
发明人	R·L·伊根 G·P·利加德 D·D·布克 C·J·约翰逊 A·贝伦基 S·伍卡耶罗维驰 J·齐斯 S·卡斯塔南		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/538 G01N33/58 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/558 C12Q1/6804		
优先权	61/228135 2009-07-23 US 61/177272 2009-05-11 US		
其他公开文献	CN103154735B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于检测一种或多种分析物的方法和器械。分析物包括感染剂(例如致病性病毒)的试剂或组分，以及酶、蛋白质和生物标志。

