



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1646913 B

(45) 授权公告日 2013.06.19

---

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| (21) 申请号 03808096.6               | (51) Int. Cl.                                   |
| (22) 申请日 2003.04.10               | <i>G01N 33/543</i> (2006.01)                    |
| (30) 优先权数据                        | <i>G01N 33/558</i> (2006.01)                    |
| 10/120,774 2002.04.10 US          | <i>G01N 33/58</i> (2006.01)                     |
| 10/162,138 2002.06.03 US          | <i>G01N 33/538</i> (2006.01)                    |
| (85) PCT申请进入国家阶段日                 | (56) 对比文件                                       |
| 2004.10.10                        | WO 99/36780 A1, 1999.07.22, 说明书第 11 页第 31-33 行. |
| (86) PCT申请的申请数据                   | WO 01/50129 A2, 2001.07.12, 说明书第 2-13 页.        |
| PCT/CA2003/000539 2003.04.10      | 审查员 陈中伟   |
| (87) PCT申请的公布数据                   |   |
| WO2003/087822 EN 2003.10.23       |   |
| (73) 专利权人 反应生物医学公司                |   |
| 地址 加拿大不列颠哥伦比亚省                    |   |
| (72) 发明人 瓦利·K·丰                   |   |
| (74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有限公司 11111 |   |
| 代理人 戈晓美 张一军                       | 权利要求书3页 说明书19页                                  |

---

### (54) 发明名称

敏感性免疫色原图像测试

### (57) 摘要

公开了在液体样品中定量测量目标分析物的量的方法和在该方法中利用的试剂盒。这些方法包括提供具有膜的固相仪器,膜上具有加载的点,样品捕获带,和对照捕获带,其中样品捕获区域是在加载点和对照捕获带之间;并提供具有分析物结合颗粒的群体或涂敷有分析物的颗粒的群体的样品收集仪器。在这些实验中,在样品收集仪器中导入液体样品,在膜的加载点上加载得到的混合物。液体允许在毛细管作用下将测试的成分运输到或通过样品捕获带,随后加载到和通过对照捕获带。液体样品中分析物的量涉及了(例如,直接或逆转地)相关的颗粒的量,这可以令人确定为样品捕获带中的颗粒的量的比例和对照的捕获带中的可粒的量。

1. 定量测定液体样品中目标分析物的量的方法,包括:

a) 提供固相装置,该固相装置包括膜条带,该膜条带包括加载点、样品捕获条带和对照捕获带,其中样品捕获条带是在加载点和对照捕获条带之间;

b) 提供含有分析物结合颗粒的群体的样品收集仪器,其中分析物结合颗粒被涂敷有分析物结合试剂;

c) 在所述样品收集仪器中分别导入所述液体样品和缓冲液,或者导入缓冲液和固体目标分析物形成的液体样品,产生包括接触的分析物结合颗粒的缓冲的、混合的液体样品;

d) 在膜条带的加载点上加载缓冲的、混合的液体样品;

e) 将膜条带维持在允许液体在毛细作用下运输接触的分析物结合颗粒通过条带到样品捕获带并且通过样品捕获带的条件下,其中所述的样品捕获带具有在其上固定的样品捕获试剂;以及允许接触的分析物结合颗粒与样品捕获试剂结合;

f) 进一步将膜条带维持在允许样品中的液体运输接触的分析物结合颗粒在毛细作用下通过条带到对照捕获带并通过对照捕获带的条件下,所述的对照捕获带具有在其上固定的对照捕获试剂;以及允许接触的分析物结合颗粒与对照捕获试剂结合;

g) 进一步将膜条带维持在允许样品中的液体在毛细作用下把不结合样品捕获试剂或对照捕获试剂的任何接触的分析物结合颗粒运输至对照捕获带之外的条件下;

h) 确定样品捕获带中的接触的分析物结合颗粒的量和对照捕获带中的接触的分析物结合颗粒的量;

i) 从样品捕获带中的分析物结合颗粒的量中和对照捕获带中的分析物结合颗粒的量中确定校正的分析物结合颗粒的量;其中液体样品中的目标分析物的量与校正的分析物结合颗粒的量直接相关;

其中,所述分析物结合试剂是特异地结合分析物的化合物;

所述样品捕获试剂是能与分析物形成结合对的试剂;

所述对照捕获试剂与所述分析物结合颗粒反应,与分析物不反应;

所述校正的分析物结合颗粒的量是基于样品捕获带和对照捕获带中捕获的分析物结合颗粒的量确定的。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中校正的分析物结合颗粒的量作为样品捕获带中的分析物结合颗粒的量与对照捕获带中的分析物结合颗粒的量的比例而被确定。

3. 权利要求 1 所述的方法,其中校正的分析物结合颗粒的量作为样品捕获带中分析物结合颗粒的量与对照捕获带中分析物结合颗粒的量和样品捕获带中的分析物结合颗粒的量的总和的比例而被确定。

4. 权利要求 1 所述的方法,其中分析物和分析物结合试剂是结合对的成员。

5. 权利要求 1 所述的方法,其中分析物结合试剂是选自包括:抗体,抗体片段,半抗原,药物共轭物和受体的组。

6. 权利要求 5 所述的方法,其中分析物结合试剂是抗体。

7. 权利要求 6 所述的方法,其中样品捕获试剂是抗体,其选自以下抗体所组成的组,所述组包括:抗与分析物结合颗粒上的抗体相同的表位的抗体,和抗与分析物结合颗粒上的抗体的不同的表位的抗体。

8. 权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 (g) 中,样品中的液体在毛细作用下将任何不与

样品捕获试剂或对照捕获试剂结合的接触的分析物结合颗粒运输到对照捕获带之外并进入毛细垫。

9. 权利要求 1 所述的方法,其中分析物结合颗粒的群体是蒸发干燥的、真空干燥或冷冻干燥的。

10. 定量测定液体样品中目标分析物的量的方法,包括:

a) 提供固相装置,其包括膜条带,所述的膜条带包括加载点、样品捕获带和对照捕获带,其中样品捕获带是在加载点和对照捕获带之间;

b) 提供样品收集仪器,其中含有涂敷有分析物的颗粒的群体,其中涂敷有分析物的颗粒是用分析物涂敷的;

c) 在所述样品收集仪器中分别导入所述液体样品和缓冲液,或者导入缓冲液和固体目标分析物形成的液体样品,从而产生缓冲的、混合的包括涂敷有分析物的颗粒的液体样品;

d) 将缓冲的、混合的液体样品加载到膜条带的加载点;

e) 将膜条带维持在允许液体在毛细作用下运输涂敷有分析物的颗粒通过条带至样品捕获带和通过样品捕获带的条件下,所述的样品捕获带具有在其上固定的样品捕获试剂;并允许涂敷有分析物的颗粒与样品捕获试剂结合;

f) 进一步将膜条带维持在允许样品中的液体在毛细作用下运输涂敷有分析物的颗粒通过条带至对照捕获带和通过对照捕获带的条件下,所述的对照捕获带具有在其上固定对照捕获试剂;以及允许涂敷有分析物的颗粒与对照捕获试剂结合;

g) 进一步将膜条带维持在允许样品中的液体在毛细作用下把任何不与样品捕获试剂结合或者不与对照捕获试剂结合的涂敷有分析物的颗粒运输到对照捕获区之外;

h) 确定样品捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量和对照捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量;

i) 从样品捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量和对照捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量确定校正的涂敷有分析物的颗粒的量,其中在液体样品中的目标分析物的量是与校正的涂敷有分析物的颗粒的量成反比的;

其中,所述分析物结合试剂是特异地结合分析物的化合物;

所述样品捕获试剂是能与分析物形成结合对的试剂;

所述对照捕获试剂与所述涂敷有分析物的颗粒反应,与分析物不反应;

所述校正的分析物结合颗粒的量是基于样品捕获带和对照捕获带中捕获的分析物结合颗粒的量确定的。

11. 权利要求 10 所述的方法,其中将校正的涂敷有分析物颗粒的量确定为样品捕获带中涂敷有分析物的颗粒的量与对照捕获带中涂敷有分析物的颗粒的量的比例。

12. 权利要求 10 所述的方法,其中将校正的涂敷有分析物的颗粒的量确定为样品捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量与对照捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量和样品捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量的总和的比例。

13. 权利要求 10 所述的方法,其中分析物和样品捕获试剂是结合对的成员。

14. 权利要求 10 所述的方法,其中样品捕获试剂是选自包括:抗体,抗体片段,半抗原,药物共轭物和受体的组。

15. 权利要求 14 的方法,其中样品捕获试剂是抗体。
16. 权利要求 10 所述的方法,其中在步骤 (g) 中,样品中的液体在毛细作用下把没有与样品捕获试剂结合或与对照捕获试剂结合的任何涂敷有分析物的颗粒运输到对照捕获带之外并进入毛细垫中。
17. 权利要求 10 所述的方法,其中涂敷分析物的颗粒的群体是蒸发干燥的、真空干燥的或冷冻干燥的。
18. 权利要求 1 或权利要求 10 所述的方法,其中膜条带是由硝酸纤维素或玻璃纤维制成的。
19. 权利要求 1 或权利要求 10 所述的方法,其中颗粒是乳胶小珠。
20. 权利要求 1 或权利要求 10 所述的方法,其中所述颗粒是被标记过的。
21. 权利要求 20 所述的方法,其中标记选自包括发光和酶联分子的组的标记。
22. 权利要求 4 或权利要求 13 所述的方法,其中结合对的一个成员选自包括孢子、激素、肽、聚糖、核酸、药物、药物共轭物、毒素、病毒、细菌、细胞壁的一部分、半抗原和受体的组。
23. 权利要求 4 或权利要求 13 所述的方法,其中结合对的一个成员选自抗体片段或病毒颗粒。
24. 权利要求 6 或权利要求 15 的方法,其中对照捕获试剂是抗免疫球蛋白抗体。
25. 权利要求 1 或权利要求 10 的方法,其中液体样品选自包括:全血、血浆、血清、尿、脊椎液、唾液、精液、角膜液和滑液的组。
26. 权利要求 1 或权利要求 10 的方法,其中液体样品包括悬浮的固体。
27. 权利要求 26 所述的方法,其中固体选自包括,微粒样品和土壤样品的组。
28. 权利要求 22 的方法,其中孢子包括炭疽杆菌或球杆菌的孢子。
29. 权利要求 1 或权利要求 10 的方法,其中液体样品包括水。
30. 权利要求 1 或权利要求 10 的方法,其中目标分析物选自包括肌红蛋白、蓖麻蛋白、C 反应蛋白质、b- 利尿肽、CK-MB、肌钙蛋白 I 和 PSA 的组。
31. 权利要求 1 或权利要求 10 所述的方法,其中目标分析物选自包括土拉弗朗西斯菌、天花病毒或其他痘病毒的组。
32. 权利要求 1 或权利要求 10 所述的方法,其中在步骤 (d) 中,混合的液体样品通过加载垫加载到加载点。
33. 权利要求 1 或权利要求 10 的方法,其中样品收集仪器选自包括吸管和吸管尖的组。

## 敏感性免疫色原图像测试

[0001] 涉及的申请

[0002] 本申请要求 2002 年 6 月 3 日递交的美国申请号 10/162, 138 的优先权并是其的部分继续申请, 而该申请是 2002 年 3 月 10 日递交的美国申请 10/120, 774 的部分继续申请, 它们的整个内容都通过在此引述而合并于本文。

[0003] 发明背景

[0004] 在液体样品中, 特别是具体的体液样品中的细胞和分析物的定量分析经常提供医生和患者的关键的诊断和治疗信息。定量的免疫测试利用了抗原 (Ag)- 抗体 (Ab) 反应的特异性以检测和定量测量样品中 Ag 或 Ab 的量。在固相免疫测试中, 一个试剂 (例如, Ag 或 Ab) 附着于固体表面上, 促进游离的试剂或分析物与被结合的试剂或分析物的分离。将固相与含有结合 Ag 或 Ab 的分析物的样品接触; 定量这一结合的程度, 提供样品中分析物的浓度的测量。但是, 将结合事件转导成可检测的信号是受许多限制因素影响, 包括将颗粒运动限制于固相上, 这也影响了定量的免疫测试的特异性和应用。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明涉及利用固相测试 (例如, 三明治免疫测试或抑制免疫测试) 测量液体样品中的目标分析物的量, 其中目标分析物和捕获试剂可以用作特定的结合对的部分, 本发明还涉及在这一方法中利用的试剂盒。

[0007] 在本发明的方法中, 提供了固相仪器, 其包括具有应用点的膜条带、样品捕获带和对照捕获带; 样品捕获带是在接触区加载点域和对照捕获带之间的。样品捕获试剂 (例如, 结合目标分析物的试剂, 如结合目标分析物的抗体) 固定在样品捕获带中。将对照捕获试剂 (例如, 结合分析物结合颗粒的试剂, 如抗免疫球蛋白抗体) 固定在对照捕获带中。同样提供的是含有颗粒群体, 如以固定形式被存储的脂质体, 胶质金, 或有机多聚体乳胶颗粒的样品收集仪器。

[0008] 在本发明的“三明治”免疫测试中, 颗粒是涂敷有与目标分析物结合的试剂 (例如, 抗体) 的“分析物结合”颗粒。在“竞争”或“抑制”实验中, 颗粒是涂敷有目标分析物的“分析物涂敷层”颗粒。在任一类型的试验中, 可以利用色度计、荧光、免疫荧光、化学发光, 或其他适当的标记来标记颗粒, 以便简化检测。

[0009] 在这些方法的一个实施方案中, 将用于目标分析物中待评估的液体样品导入样品收集仪器中, 随后在混合的液体样品中导入一种缓冲液。在这些方法的另一个实施方案中, 在样品收集仪器中导入缓冲液, 随后导入用于目标分析物中待评估的液体样品。在这些方法的第三个实施方案中, 通过将固体导入缓冲液中, 形成液体样品, 所述的液体样品随后被导入样品收集仪器中。在这些实施方案中的任何一个中, 产生了含有颗粒的缓冲的, 混合的液体样品。

[0010] 在三明治实验中, 存在于样品中的目标分析物与分析物结合颗粒相反应, 导致在混合的液体样品中接触分析物结合颗粒。将缓冲的, 混合液体样品加载到固相仪器的膜条带的加载点上。然后, 在足以允许液体在毛细作用下运输颗粒到和通过样品捕获带的条件下维护固相仪器。

[0011] 样品捕获试剂与接触的分析物结合颗粒反应,导致在样品捕获带中捕获颗粒。液体的毛细作用进一步使接触的结合颗粒的分析物流动,不仅流动到样品捕获带及通过样品捕获带,而且流动到对照捕获带并通过对照捕获带,在那里使其结合对照捕获试剂。液体的毛细作用连续地使剩余的未结合的颗粒流动,以通过对照捕获带(例如,毛细垫)。然后确定在样品捕获带,和在对照捕获带中捕获的分析物结合颗粒的量。

[0012] 然后,确定液体样品中目标分析物的量。例如,可以确定液体样品中目标分析物的量,作为 1) 在样品捕获带中捕获的分析物结合颗粒的量,和 2) 在对照捕获带中的分析物结合颗粒的量之间的比例。作为替代,在液体样品中的目标分析物的量可以被确定,作为 (1) 在样品捕获带中捕获的分析物结合颗粒的量,和 2) 在对照捕获带中分析物结合颗粒的量与在样品捕获带中捕获的分析物结合颗粒的量的总和之间的比例。

[0013] 在测试的竞争或抑制类型中,在固相仪器的膜条带的加载点加载缓冲的、混合的液体样品。然后,将固相仪器保持在足以允许液体的在毛细作用下运输颗粒到并通过样品捕获带的条件下。

[0014] 样品捕获试剂与涂敷有分析物的颗粒反应;样品捕获试剂和涂敷有分析物颗粒的相互反应导致在样品捕获带中捕获涂敷有分析物的颗粒。由于在样品捕获带中样品捕获试剂上结合位点的样品中的涂敷有分析物的颗粒和分析物(如果存在)之间的竞争,在样品捕获带中捕获的涂敷有分析物的颗粒的量是与样品中的分析物的量成反比的。液体在毛细作用下进一步不仅使涂敷有分析物的颗粒流动到样品捕获带中,而且流动到对照捕获带上,在捕获带中它们结合了对照捕获试剂。然后,确定在样品捕获带和在对照捕获带中捕获的涂敷有分析物的颗粒的量。

[0015] 然后,确定在液体样品中的目标分析物的量。例如,在液体样品中的目标分析物的量反比于涉及下面的比例,1) 在样品捕获带中捕获的涂敷有分析物的颗粒的量,和 2) 对照捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量之间的比例。作为替代,在液体样品中的目标分析物的量反比于涉及下面的比例,1) 在样品捕获带中捕获的涂敷有分析物的颗粒的量,和 2) 在对照捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量与在样品捕获带中捕获的涂敷有分析物的颗粒的量的总和之间的比例。

[0016] 通过在这样的定量测试中的固相的液体的流动,对测试的动力学特性有作用:与颗粒结合的分析物的量,以及在固相上与位置相关的颗粒的定位是在于流量。固相反应剂的结构以及液体样品的黏度和其他因子从而可以对在测试的特异性的限制有作用。本发明的方法减少了对测试的动力学特性的一些约束,从而允许在溶液中更准确地确定目标分析物的量。例如,在三明治测试中,由于将为目标分析物而待测试的液体样品在加载到膜上之前与分析物结合颗粒混合,因此有更长的时间用于在发生在膜中的捕获反应之前将目标分析物与分析物结合颗粒相结合。另外,由于在目标分析物和分析物结合颗粒之间的反应发生在液体相中,由于更大的颗粒迁移力,因此相比于在固相仪器的膜的基质中的目标分析物和分析物结合颗粒之间的相同的反应,具有更快速和更有效的结合。在三明治测试和抑制(竞争)测试中,增加利用的颗粒的体积而不过度加载膜是可能的,从而增加测试的敏感性。另外,以连续的方式,颗粒在液体的毛细作用下通过捕获带,而不是依靠在液体前沿的冠羽上的快速的波,允许更有效地捕获颗粒,从而增强测试的敏感性。

[0017] 发明的详细说明

[0018] 本发明涉及利用实验,特别是定量的免疫色原测试和其试剂盒定量测定分析物的量的方法。

[0019] “实验”,如本文所用指确定一个或多个分析物的存在、不存在或其定量的样品的体外分析方法。分析物和分析物结合试剂是特定的“结合对”的成员,其中结合对(例如,分析物)的第一个成员特定地与第二个成员(例如,结合试剂)反应。结合对的一个或两个成员可以是抗体。例如,结合对的第一个成员(例如,目标分析物)可以是抗体,结合对的第二个成员(例如,结合试剂)可以是抗免疫球蛋白抗体;作为替代,结合对的第一个成员(例如,分析物)可以是抗原,结合对的第二个成员(例如,结合试剂)可以是抗体。

[0020] 在一个实施方案中,测试是利用抗体作为反应的成分的“免疫测试”。在优选的实施方案中,免疫测试是“三明治”测试,是分析物的测试,其中将待评估分析物的存在或没有,或量的液体样品与涂敷有分析物结合试剂,如抗分析物的抗体的颗粒接触,将得到混合物加载到膜上,随后在毛细作用下运动穿过膜。通过检测在膜的捕获带中的分析物和涂敷有分析物结合试剂的颗粒之间的相互作用表明了阳性结果,在捕获带中的涂敷有分析物结合试剂的颗粒的量与液体样品中的分析物的量相关。在另一个优选的实施方案中,免疫测试是“抑制”或“竞争”测试,这是一个分析物的测试,其中待评估分析物的存在或没有或量的液体测试样品是与涂敷有分析物的颗粒接触的,得到的混合物加载到膜上,随后在系统的毛细作用下运动穿过膜。通过检测膜的捕获带中的分析物结合试剂和涂敷有分析物的颗粒之间的相互作用表明阳性的结果,在捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量与液体样品中的分析物的量成反比。

[0021] 在本发明的测试的另一个实施方案中,无论分析物还是结合试剂都不是抗体:例如,结合对的第一个成员可以是配体,结合对的第二个成员可以是受体;或者,结合对的第一个成员可以是凝集素,结合对的第二个成员可以是糖。仍然在另一个实施方案中,结合对的第二个成员可以是核酸(例如,DNA, RNA),结合对的第二个成员可以是特异地与结合对的第一个成员杂交的核酸。如本文所用,“特异的杂交”是指第一个核酸与第二个核酸杂交的能力,方式是第一个核酸除了与第二个核酸杂交外不与任何核酸杂交(例如,当第一个核酸与第二个核酸,比样品中的任何其他核酸具有更高的相似性时,杂交将被执行)。杂交的“严格条件”是技术术语,指温育和洗涤条件,例如,温度状况和缓冲液浓度,允许特定的核酸与第二个核酸杂交;第一个核酸可以是完全与第二个互补的(即,100%),或第一个和第二个可以共享一些程度的互补,接近完全(例如,70%,75%,80%,85%,90%,95%)。例如,可以利用一些高度严格的条件,从那些更少的互补中区别完全的互补核酸。用于核酸杂交的“高度严格条件”,“中度严格条件”,和“低严格条件”解释在现代分子学方案中的2.10.1-2.10.16和6.3.1-6.3.6页上(Ausubel, F.M. 等人.,“现代分子学方案”, John Wiley&Sons, (1998),其全部内容都通过在此引述而合并于本文)。确定杂交的严格度的准确条件不仅依赖于离子强度(例如,0.2XSSC,0.1XSSC),温度(例如,室温,42°C,68°C),和不稳定试剂的浓度,如甲醛或变性剂,如SDS,而且依赖于因子,如核酸序列的强度,碱基组成,在杂交序列之间的错配的百分数,和在其他非相同的序列内该序列的亚组出现的频率。所以,通过改变一个或几个这些参数可以确定相等的条件,而同时维持了两个核酸分子之间的同一性或相似性的相似程度。

[0022] 不管分析物和结合试剂的组成,这两个成分仍然形成特异的结合对,其中第一个

成员与第二个成员特异地反应。在结合对的成员之间的特异的相互作用表明,结合对的第一个成员优选地与结合对的第二个成员结合或相互作用,优选地排除与测试中的另一个化合物的任意结合。

[0023] 如本文所用,术语“分析物”或“目标分析物”是指如上所述的结合对的第一个成员。分析物是分子或化合物,其量将被测量。分析物可以是固体形式,如干的物质(例如,粉末、颗粒、孢子、或其他颗粒),或可以是液体的形式(例如,如上所述的固体,所述的固体已经在液体中被溶解或被悬浮,或其他液体样品)。分析物的例子包括孢子,蛋白质,如激素或酶;糖蛋白;肽;小分子;聚多糖;抗体;核酸;药物;毒素(例如,环境毒素);病毒或病毒颗粒;细菌;其他感染剂或感染剂的产物;细胞壁部分;和其他化合物。在优选的实施方案中,分析物是“免疫原性的”,表明(如下所述)可针对该分析物,或针对与载体结合的分析物(例如,半抗原-载体共轭物,对其中的半抗原产生抗体)产生抗体。在一些代表性实施方案中,目标分析物可以是肌红蛋白;CK-MB;肌钙蛋白I;PSA;地高辛;茶碱;蓖麻蛋白;C-反应蛋白质;或b-排钠利尿剂肽。在其他代表性实施方案中,目标分析物可以是激素(例如,T-3或T-4)或滥用的药物(LSD,THC,巴比妥盐等等)。在其他的代表性实施方案中,目标分析物可以是感染剂或感染剂的产物,如土拉弗朗西斯菌[*Francisella tularensis*(兔热病的成因剂)];*Claustidia*或由此产生的毒素(肉毒素);Variola(天花)病毒或其他痘病毒(例如,牛痘,猴痘);或一个杆菌类型的孢子,如炭疽柑橘(炭疽)或克虏伯氏芽孢杆菌。目标分析物可以是液体样品;或者,目标分析物可以是干(非液体)样品(例如,固体,如颗粒样品,粉末样品或土壤样品)。

[0024] 在本发明的方法中,评估液体样品中目标分析物的存在或没有或量。液体样品可以是湿润膜物质的液体;支持目标分析物和分析物结合试剂如抗体/抗原反应(即,不干扰抗体/抗原相互作用)之间的反应;并且具有足够低的黏度以允许在毛细作用下就可以使液体运动。在优选的实施方案中,液体是水溶液(如体液)。液体样品可以是具有相对少成分的液体,例如含有目标分析物的水溶液;或者,液体样品可以是具有许多成分的液体,如复合物环境样品(例如,污水、废水、地下水、和其他水样品),或复合物生物液体(例如,整个血液、血浆、血清、尿、脊椎液、唾液、精液、透明的液体、滑液,或其他生物液体)。在优选的实施方案中,其中液体是生物液体,所述的液体是整个血液,血浆,或血清。如果需要,液体样品可以被稀释;例如,如果利用复合生物液体作为液体样品,则其可以被溶液稀释(例如,水溶液)。

[0025] 如果目标分析物不是在溶液中(例如,目标分析物是在干或固体样品中,如上所述),可以将它萃取、悬浮,或溶解于液体样品中。例如,如果目标分析物是核酸,可以从需要的细胞中萃取到溶液中(例如,水溶液,如下所述的缓冲液);在另一个例子中,如果目标分析物是粉末或特别的物质(例如,粉末,颗粒,固体样品,或孢子),可以被悬浮或溶解在溶液中(例如,水溶液,如下所述的缓冲液),如通过得到干物质的样品(例如,利用棉拭或其他仪器),并且将干物质的样品放置于溶液中。所以,“液体样品”可以不仅指大批评估目标分析物的液体样品,而且可以指液体样品,其中固体物质(为了目标分析物而待评估)被萃取、悬浮或溶解。

[0026] 如本文所用,“分析物结合试剂”指如上所述的结合对的第二个成员。分析物结合试剂是特异地结合分析物(结合对的第一个成员)的化合物,如抗体,半抗原或药物共轭

物,受体,或另一个结合伙伴。在优选的实施方案中,分析物结合试剂是目标分析物的抗体。

#### [0027] 三明治测试

[0028] 本发明的“三明治”测试利用了固相仪器。固相仪器包括具有加载点的膜条带,样品捕获条带,和对照捕获条带。固相仪器或者可以包括在控制捕获条带下的毛细垫,和与加载点邻接或覆盖加载点的样品垫。膜条带可以制成具有下面特征的物质:足够多孔以致于允许液体的毛细作用沿着它的表面和通过它的内部;有能力依靠毛细作用(即,它不阻断颗粒或颗粒与目标分析物的复合)允许被涂敷的颗粒(例如,分析物结合颗粒,如下所述)运动,或颗粒与目标分析物(例如,接触分析物结合颗粒的,如下所述)的复合;和通过含有分析物的液体湿润的能力(例如,水溶液的亲水性,有机溶剂的疏水性)。膜的疏水性可以通过如美国专利号 4,340,482,或美国专利号 4,618,533 中所述的那些方法使膜亲水,可用于水溶液而改变,这些专利中叙述了将疏水表面转化成亲水表面。膜物质的例子包括:纤维素、硝酸纤维素、纤维素乙酸、玻璃纤维、尼龙、聚电解质离子交换膜、丙烯酸共聚物/尼龙和聚醚磺。在优选的实施方案中,膜条带是由硝基纤维素制成的(例如,具有 Mylar 敷层的硝基纤维素膜)。

[0029] “加载点”处于膜上,可以加载液体的位置。“加载垫”或者也可以被选择利用;加载垫依靠在膜上,非常邻接或覆盖加载点。加载垫可以由吸附物质制成,其当液体样品被加载到垫上时,加载垫可以将液体样品递送到膜上的应用点上。代表性的物质包括纤维素、硝基纤维素、乙酸纤维素、尼龙、聚电解质离子交换膜、丙烯酸共聚物/尼龙、聚醚磺或玻璃纤维。在一个实施方案中,垫是 **Hemasep<sup>®</sup>**-V 垫(Pall 公司)。在另一个实施方案中,垫是玻璃纤维垫。如果存在毛细垫,可以相似地从这样的吸附物质中制成。

[0030] “样品捕获带”指膜条带上的点,在膜条带上固定了“样品捕获试剂”(例如,被涂敷和/或渗透通过膜)。样品捕获试剂是分析物结合试剂,如上所述的那些。样品捕获试剂不需要如上所述的相同的分析物结合剂;但是,样品捕获试剂也与目标分析物形成了结合对;因为它特异地和优选地结合目标分析物。在优选的实施方案中,样品捕获试剂是抗分析物的抗体;它可以抗如分析物的相同的表位,或者抗来自分析物不同的表位,所述的表位是结合在作为被涂敷在颗粒上的分析物结合试剂而使用的抗体上的表位。

[0031] 仪器另外包括固定在“对照捕获带”中的“对照捕获试剂”。对照捕获试剂是与分析物结合颗粒反应,但与待测试的分析物不反应的试剂,例如,对照捕获试剂可以与涂敷有分析物结合试剂的颗粒上的分析物结合试剂反应;可以与颗粒上的另一个物质反应;或与颗粒本身反应。例如,如果分析物结合试剂是抗体,对照捕获试剂可以是抗免疫球蛋白的抗体。在优选的实施方案中,分析物结合试剂是抗体,对照捕获试剂是抗免疫球蛋白的抗体。对照捕获试剂是固定于对照捕获带的膜上(被涂敷和/或渗透在膜上)的。

[0032] 定位对照捕获带,使样品捕获带在加载点和对照捕获带之间。在优选的实施方案中,对照捕获带是非常接近样品捕获带的,以致该测试成分的毛细作用的动力学在对照捕获带和样品捕获带中是相似的(例如,基本相同)。虽然它们非常接近,但对照捕获带和样品捕获带也被足够间隔开,以致在各个带中捕获的颗粒可以个别定量(例如,没有交联)。另外,在优选的实施方案中,样品捕获带是通过一个大距离的间隔从加载点分离,这个距离与样品捕获带和对照捕获带之间的小距离有关。毛细前沿的速度(在毛细作用下穿过膜的液体运动的边界)是与来自液体的加载点的毛细前沿的距离相关的。因为颗粒捕获是这一

测试中的速度限制步骤,当毛细前沿达到样品捕获带时,在加载点(其中毛细前沿使分析物结合颗粒运动)和捕获带(其中颗粒被捕获)之间的距离必须足以延迟毛细前沿的速度达到有关足够慢以允许颗粒的捕获。另外,该距离必须足够大以致于迁移的总时间(通过这个膜的毛细前沿的运动)足够长以致于能允许在液体样品中的游离分析物与分析物结合颗粒相结合。在膜条带的成分之间的最佳距离是可以确定的,并且可以利用常规实验来调节。

[0033] 定量测试另外利用了有关样品收集仪器。如本文所用,“样品收集仪器”指可以用于收集液体样品的仪器,或在其中收集的液体样品可以被存储或储存的仪器。样品收集仪器可以是能够含有分析物结合颗粒的任何仪器,如下所述,并且可以是加入测量的液体样品的体积的仪器。代表性样品收集仪器包括样品管、测试管、小瓶、吸管或吸管尖、针筒。在优选的实施方案中,样品收集仪器是吸管或吸管尖。

[0034] 样品收集仪器含有涂敷有分析物结合试剂的“分析物结合颗粒”的群体。颗粒群体的改变取决于颗粒的大小和组成、固相仪器的膜的组成、测试的敏感性的水平。群体通常的范围约在 $1 \times 10^3$ 和 $1 \times 10^9$ 之间,尽管如果需要可以利用更少或更多。在优选的实施方案中,群体是约 $2 \times 10^8$ 个颗粒。

[0035] 分析物结合颗粒是可以涂敷有分析物结合试剂(结合对的第二个成员)的颗粒。在优选的实施方案中,分析物结合颗粒是脂质体、胶质金、有机多聚物乳胶颗粒、有机荧光颗粒或磷光颗粒。在特殊优选的实施方案中,颗粒是聚苯乙烯乳胶小珠,最特殊地,是在没有表面活性剂,如无表面超活性均一甲醛/硫酸乳胶时已经制备的聚苯乙烯乳胶小珠(InterfacialDynamics Corp.,Portland,OR)。

[0036] 颗粒的大小涉及膜的多孔性(用于液体样品中的分析物)和涉及目标分析物的大小(例如,对于颗粒分析物):颗粒必须足够小以便能沿着膜,在液体的毛细作用下运输,同时(对于固体,例如颗粒分析物),对于接触分析物结合颗粒的复合物足够小,如下所述,以便能通过毛细作用沿着膜运输。可以标记颗粒以简化检测。通过不明显影响颗粒的物理特性的方法可以标记颗粒;例如内部标记颗粒(即,该标记包括在颗粒中,如在脂质体中或在聚苯乙烯乳胶小珠中)。代表性标记包括荧光标记;化学发光标记;磷光标记;酶联标记;化学标记,如电活性试剂(例如,铁氰酸);和颜色标记,如染料或荧光标记。在一个实施方案中,利用了荧光标记。在另一个实施方案中,利用了磷光颗粒,特别地是“上转换”磷光颗粒,如美国专利号5,043,265中所述。

[0037] 涂敷有分析物结合试剂的颗粒是结合对的第二个成员。如上所述,分析物结合试剂(结合对的第二个成员)特异地和优选地结合目标分析物(结合对的第一个成员)。代表性分析物结合试剂包括抗体(或其片断);半抗原、药物共轭物、受体或其它结合伙伴。在一个优选的实施方案中,分析物结合试剂是目标分析物的抗体。抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。如本文所用,术语“抗体”也指足以结合目标分析物的抗体片断。或者,在另一个实施方案中,也可以利用特异地结合目标分析物的分子,如具有分析物结合位点的工程化蛋白质(Holliger,P.and H.R.Hoogenbloom,Trands in Biotechnology,13:7-9(1995);Chamow,S.M.andA.Ashkenazi,Trands in Biotechnology,14:52-60:1996)。仍然在另一个实施方案中,如果目标分析物是药物,半抗原或群体药物共轭物可以用作分析物结合试剂。或者,在进一步的实施方案中,可以利用结合分析物的受体(例如,如果目标分析物是

配体)。如果分析物是已知特异性的抗体,那么颗粒可以涂敷有抗分析物抗体的抗原,或可以涂敷有抗分析物抗体的抗体。另外,因为分析物和分析物结合试剂形成结合对,如上所述的化合物和分子代表性分析物也可以用作分析物结合试剂,那些作为代表性分析物结合试剂的描述也可以相似地用于分析物,如本文所述。

[0038] 在样品收集仪器中含有的分析物结合颗粒以稳定的形式储存在样品收集仪器中。在本文使用的术语“稳定形式”表示了一个形式,其中颗粒不明显在储存过程中的化学状态或物理状态中改变。稳定形式可以是液体,凝胶和固体形式。在优选的实施方案中,在样品收集仪器内包含的分析物结合颗粒是蒸发性干燥的;冷冻干燥的;和/或真空干燥的。

[0039] 在特别优选的实施方案中,样品收集仪器是吸管尖,其中是真空干燥的分析物结合颗粒。

[0040] 为了进行测试,利用了如上所述的评估目标分析物的存在的液体样品。在一个实施方案中,在样品收集仪器中导入(拉出,注入,或放置于)液体样品。例如,在一个实施方案中,将液体样品拉出注入具有吸管尖的样品收集仪器。在样品收集仪器中导入液体样品导致将液体样品与分析物结合颗粒混合,形成“混合液体样品”。如果分析物结合颗粒是挥发性的,冷冻的,或真空干燥的,在样品收集仪器中导入液体样品可以导致液体样品中分析物结合颗粒的再水化和悬浮。缓冲液(例如,对于稀释)也被导入混合的液体样品中,形成“缓冲的、混合的液体样品”。缓冲的、混合的液体样品可以通过将混合的液体样品分散进含有缓冲液的“缓冲液容器”(例如,测试管)中而形成,或通过在导入液体样品之前在样品收集仪器中导入缓冲液而形成。或者,如果目标分析物是固体(例如,如上所述的粉末、颗粒、孢子或其他颗粒),可以通过在缓冲液容器中导入固体来制备如上所述的液体样品,在这样实施方案中,缓冲的,混合的液体样品是通过在样品收集仪器中导入液体样品(含有缓冲液)来形成的。在另一个实施方案中,在样品收集仪器中导入缓冲液,接着在样品收集仪器中导入液体样品。

[0041] 缓冲液可以是水液体,所述的水液体支持目标分析物和分析物结合试剂(例如,不干涉抗体/抗原相互反应)之间的反应,并且具有足够低的黏度以致允许通过毛细作用运动液体。在一个实施方案中,缓冲液含有一个或几个下面的成分:缓冲试剂(例如,磷酸);盐(例如,NaCl);蛋白质稳定剂(例如,BSA,酪蛋白,血清);和/或去垢剂,如非离子去垢剂或表面活性剂(例如,通常在表面活性试剂工具试剂盒中可得的一个或多个下面的试剂:NINATE411, Zonyl FSN100, Aerosol OT100%, GEROPON T-77, BIO-TERGE AS-40, STANDAPOL ES-1, Tetronic1307, Surfnyol465, Surfynol485, Surfynol104PG-50, IGEPAL CA210, TRITON X-45, TRITON X-100, TRITON X305, SILWET L7600, RHODASURF ON-870, Cremophor EL, TWEEN20, TWEEN80, BRIJ35, CHEMAL LA-9, Pluronic L64, SURFACTANT10G, SPAN60, CREL)。或者,如果需要,缓冲液可以含有增稠剂。缓冲液的这样的成分是商业可得的。代表性的缓冲液包括,例如,盐,或50mM Tris-HCl, pH7.2。或者,水可以代替缓冲溶液而被利用,如本文所用,术语“缓冲液”指缓冲溶液或水。

[0042] 为了进一步将分析物结合颗粒分散在液体样品中,如果需要,可以搅拌(例如,涡旋、振摇、抽吸等等),液体样品和缓冲液已经导入其中的样品收集仪器,或已经导入混合液体样品的缓冲液容器。

[0043] 在优选的实施方案中,样品收集仪器含有在它的尖内具有真空干燥分析物结合颗

粒的吸管尖；液体样品是被吸进吸管中的，从而再水化干燥的分析物结合颗粒，并形成混合的液体样品。在特别优选的实施方案中，在缓冲液容器中导入混合液体样品，得到缓冲液混合液体样品；利用样品收集仪器抽吸缓冲容器中的缓冲的混合液体样品，从而进一步分散分析物结合颗粒。如果在缓冲的，混合液体样品中存在目标分析物，结合则发生于分析物和分析物结合颗粒之间。分析物与分析物结合颗粒的“结合”表明，涂敷到颗粒上的分析物结合剂是与目标分析物相互作用的（例如，结合）。本文中，将已经在允许液体（如果需要）中的分析物结合固定在加载点域中的分析物结合颗粒的条件下保养（温育）的分析物结合颗粒称为“接触分析物结合颗粒”。根据是否液体样品中存在分析物，或是否分析物结合了分析物结合颗粒上的分析物结合剂，已接触的分析物结合颗粒可以或可以没有与分析物结合剂结合的分析物。因为在分析物结合颗粒上存在多个分析物结合位点，分析物结合分析物结合颗粒的存在和浓度改变了；结合分析物结合颗粒的分析物的浓度成比例地随着液体样品中存在的分析物的量增加，并且在样品捕获带（如下所述）中捕获的分析物结合颗粒的可能性同样地随着结合分析物结合颗粒的分析物的量的增加而增加。所以，接触的分析物结合颗粒的群体可以含有具有与分析物结合剂结合的各种量的分析物的颗粒，以及没有与分析物结合剂结合的分析物的颗粒（正如分析物结合颗粒最初没有与分析物结合剂结合的分析物）。另外，结合的程度随着条件的时间因子的增加而增加；虽然大部分结合在 1 分钟（例如，60 秒）内发生，但优选地少于 60 秒（例如，45 秒，30 秒，或更少），附加的温育（例如，超过 1 分钟（2 分钟，5 分钟，10 分钟，15 分钟）产生了附加的结合。

[0044] 缓冲的、混合的液体样品被应用到固相仪器膜条带的加载点上，如果存在加载垫，则还可以被加载到加载垫上。在将膜条带与缓冲的，混合的液体样品接触之后，在允许液体通过毛细作用运动到膜并穿过膜的条件，维护膜条带。作为来自缓冲的、混合的液体样品的毛细作用的结果，接触的分析物结合颗粒运动穿过膜，并且接触的分析物结合颗粒沿着膜运动穿过膜上的“样品捕获带”，并随后运动到“对照捕获带”和穿过“对照捕获带”。在允许接触的分析物结合颗粒在毛细作用下沿着膜运动到样品捕获带和穿过样品捕获带，随后运动到对照捕获带，随后沿着捕获带（例如，进入毛细垫），从而从捕获带除去任何非结合颗粒的条件下（例如，足够的时间和液体体积的条件下），维护膜条带。

[0045] 通过将接触的分析物结合颗粒与样品捕获试剂在样品捕获条带中结合，随后通过一些接触的分析物结合颗粒与对照捕获带中的对照捕获试剂结合，一些接触的分析物结合颗粒的运动被捕获。在一个优选的实施方案中，分析物结合试剂是需要的抗原的抗体，对照的捕获试剂可以是抗没有球蛋白种类的抗体，从这些免疫球蛋白种类中派生的分析物结合试剂。在这一实施方案中，免疫球蛋白的抗体应该是与样品的其他成分非交叉地反应的：例如，如果人样品是待测试的，那么与人免疫球蛋白不反应的抗体可以用作对照捕获试剂。

[0046] 通过与结合接触分析物结合颗粒上的分析物结合试剂的分析物结合，样品捕获试剂结合了接触分析物结合颗粒。如本文所用，术语“样品 - 试剂 - 颗粒复合物”是指样品捕获试剂和接触分析物结合颗粒的复合物。由于已接触的分析物结合颗粒通过分析物与样品捕获带中的样品捕获试剂的捕获，接触分析物结合颗粒在样品捕获带中被捕获，形成了样品 - 试剂 - 颗粒复合物。

[0047] 对照捕获试剂通过结合接触分析物结合颗粒上的分析物结合试剂，结合已接触的分析物结合颗粒。如本文所用，术语“对照 - 试剂 - 颗粒复合物”指对照捕获试剂和接触的

分析物结合颗粒的复合物。由于通过分析物结合颗粒与对照捕获带中的对照捕获试剂相互作用,捕获已接触的分析物结合颗粒,已接触的分析物结合颗粒是在对照捕获带中捕获的,形成对照-试剂-颗粒复合物。如上所述,对照捕获试剂与分析物结合颗粒相互作用(例如,与涂敷有分析物结合试剂的颗粒上的分析物结合试剂,或颗粒上的另一个物质,或与颗粒本身),但不与分析物本身相互作用。

[0048] 毛细作用随后运动任何已接触的分析物结合颗粒,这些颗粒没有在样品捕获带或对照捕获带中被捕获,沿着这些带,从而移动没有被捕获的任何颗粒。在优选的实施方案中,液体移动任何没有被捕获的已接触的分析物结合颗粒,进入跟随对照捕获带的毛细垫。

[0049] 如果需要,可以利用第二个洗涤步骤。在缓冲的,混合的液体样品已经浸泡在膜中或浸泡在加载垫中(如果存在)后,在加载点上可以加载缓冲液(例如,如上所述的缓冲液)。假如第二个洗涤步骤不稀释缓冲的,混合的液体样品,在其后的任何时间点可以利用第二个洗涤步骤。当接触分析物结合颗粒被检测时,如下所述,第二个洗涤步骤可以起作用减少背景信号。

[0050] 然后,在样品捕获带(样品-试剂-颗粒复合物)中捕获的分析物结合颗粒的量可以用在分析物结合颗粒上利用的标记的类型的适当的方法来检测。在优选的实施方案中,通过光学方法检测量,如通过测量分析物结合颗粒的标记的荧光的量。或者,可以利用电导或介电(容量)检测样品-试剂-颗粒复合物的量。或者,可以利用如 Hayes 等人 (Analytical Chem. 66 :1860-1865(1994)) 所述的释放的电活性试剂的电化学检测(如,铟,铋,镓或碲离子)或如 Roberts 和 Durst (Analytical Chem. 67 :482-491(1995)) 提出的亚铁氰化物。例如,如果利用脂质体,可以在捕获带中加入一滴去垢剂释放包囊在脂质体内的亚铁氰化物,和用电化学检测释放的亚铁氰化物 (Roberts and Durst, id)。如果利用螯合剂-蛋白质共轭物螯合金属离子,在捕获带中加入一滴酸将能释放离子,允许通过阳极条带伏安法定量 (Hayes 等人, id)。同样,以和样品捕获带中的分析物结合颗粒的量相同的方法检测对照捕获带中捕获的分析物结合颗粒的量。

[0051] 在一个实施方案中,利用直接涉及沿着固相(例如,膜条带)的位置存在的标记的量的曲线代表分析物结合颗粒的检测的量。例如,在膜条带上的各个位置的颗粒的检测量(例如,在样品捕获带和对照捕获带中和在其中或邻接样品捕获带和对照捕获带之间的区域,和/或膜条带的其他区域)可以确定,并且作为沿着膜条带的位置的距离的函数画图。然后,可以作为曲线下的面积的函数计算颗粒的量,该量涉及存在的标记的量。

[0052] 然后,确定修正的分析物结合颗粒的量,然后利用适当的计算,从修正的分析物结合颗粒量确定分析物的量。校正的分析物结合颗粒的量以在样品捕获带和对照捕获带中捕获的分析物结合颗粒的量为基础。例如,在一个实施方案中,校正的分析物结合颗粒的量作为在样品捕获带中存在的分析物结合颗粒量与对照捕获带中存在的分析物结合颗粒量的比例(R)而被确定。然后,从校正的分析物结合颗粒量(比例),利用标准曲线确定存在的分析物的量。通过制备一系列在待检测分析物的液体(例如,去除分析物的血清)中含有已知浓度的目标分析物的对照样品,产生标准曲线。在对照样品系列上进行测试,各个对照样品检测 R 值;以对照样品中包含的分析物的浓度的函数作划 R 值。通过检测测试样品的 R 值测试含有未知量的分析物(“测试样品”)的样品,通过作标准曲线确定测试的样品中的分析物的浓度。如上所述,可以产生一个标准曲线,用于一个批次的所有测试样品(例如,

用于利用测试试剂的特异的制备的所有测试样品) ;对各个测试样品再生标准曲线是不需要的。在另一个实施方案中,校正的分析物结合颗粒的量是作为存在于样品捕获带中的分析物结合颗粒的量的量与对照捕获带中存在的分析物结合颗粒的量和样品捕获带中存在的分析物结合颗粒的量的总量的比例被确定的。然后,可以利用标准曲线,从校正的分析物结合颗粒量(比例)确定存在的分析物的量。或者,也可以利用其他比例和/或标准曲线确定样品中的分析物的量。另外,如果需要,可以在计算比例(R)之前从存在于样品捕获带中存在的分析物结合颗粒的量和存在于对照捕获带中存在的分析物结合颗粒的量中减去背景中存在的标记的量。

#### [0053] “竞争”或“抑制”实验

[0054] 本发明的“竞争”或“抑制”测试实验,像“三明治”实验,利用了包括如上所述的膜条带的固相仪器,包括加载点,样品捕获带,对照捕获带。膜条带可以有选择地在对照捕获带之后包括毛细垫,在加载点之前包括样品垫。正如以前,“加载点”是在加载液体样品的膜上的位置。这种实施方案同样需要利用样品收集装置,如上所述。用于竞争(抑制)实验的样品收集装置含有“涂敷有分析物的颗粒”群体,其涂敷有目标分析物(代替涂敷分析物结合试剂,如“三明治”测试所述)或涂敷有目标分析物的类似物。如本文所用,分析物的“类似物”是具有与分析物相似的结合特征的化合物,因为其用如上所述的,与分析物结合试剂形成的结合对。分析物或分析物的类似物可以直接被涂敷在颗粒上,或可以间接结合到颗粒上。如下所述,术语“涂敷有分析物的颗粒”可以指用目标分析物或用目标分析物的类似物涂敷在颗粒上。如上面的关于三明治测试中所述,颗粒的群体可以根据颗粒的大小和组成,固相仪器的膜的组成和测试的敏感性的水平而改变。

[0055] 如上所述,样品捕获带指将样品捕获试剂固定在膜条带上的一个点。样品捕获试剂是分析物结合试剂,如上所述的那些。样品捕获试剂不需要如上所述的相同的分析物结合试剂;但是样品捕获试剂也与目标分析物形成了结合对,因为它特异地和优选地结合目标分析物。如上所述,在优选的实施方案中,样品捕获试剂是抗分析物的抗体;它可以直接抗分析物的相同的表位,也可以抗分析物的不同的表位,所述的表位与作为被涂敷在颗粒上的分析物结合试剂而使用的抗体相结合。

[0056] 仪器另外包括对照捕获试剂,如上所述,所述的对照捕获试剂可以与涂敷有分析物的颗粒反应,而不与待测量的分析物反应:例如,对照捕获试剂可以与颗粒上的另一个物质(例如,结合颗粒上的分析物的载体;抗体)反应,或与颗粒本身反应。在优选的实施方案中,样品捕获试剂和对照捕获试剂是抗体。对照捕获试剂是固定在对照捕获带中的膜上的(被涂敷在膜上和/或被渗透在膜内)。

[0057] 竞争测试的成分以关于“三明治”测试方法的如上所述的相似的方法定位。例如,在优选的实施方案中,对照捕获带接近邻接到样品捕获带,以致测试方法的成分的毛细作用的动力学在对照捕获带和样品捕获带中是相似的(例如,基本相同);并且仍然对照捕获带和样品捕获带也足够间隔开,以致在各个带中捕获的颗粒可以分别定量。另外,在优选的实施方案中,为了保证毛细前沿的速度足以慢到允许颗粒的捕获,迁移的总时间足够长以致允许分析物与样品捕获试剂的结合,通过一个在样品捕获带和对照捕获带之间与小距离相关的大距离的间隔就可以将加载点样品捕获带相分离。

[0058] 为了进行竞争实验,利用了如上所述的用于目标分析物的存在而待评估的液体样

品。在一个实施方案中,在样品收集仪器中导入(拉进、注入和其他的放入)液体样品。例如,在一个实施方案中,在含有吸管尖的样品收集仪器中注入液体样品。在样品收集仪器中导入液体样品导致液体样品与涂敷有分析物的颗粒混合,形成了“混合的液体样品”。如果涂敷有分析物的颗粒是被蒸发的、冷冻的、和真空干燥的,则在样品收集仪器中导入液体样品可以导致液体样品中分析物结合颗粒的再水化和悬浮。缓冲液(例如,如上所述)也导入了混合的液体样品,形成了“缓冲的、混合的液体样品”。所述的缓冲的、混合的液体样品可以通过将混合的液体样品分散进含有缓冲液的“缓冲容器”(例如,测试试管)中来形成,或通过在导入液体样品之前在样品收集仪器中导入缓冲液来形成。在另一个实施方案中,缓冲液可以被导入到样品收集仪器中,接着在样品收集仪器中导入液体样品。或者,如果目标分析物是固体(例如,粉末、颗粒、孔、或其他颗粒,如上所述),可以通过在缓冲液容器中导入固体制备如上所述的液体样品;在这一实施方案中,通过在样品收集仪器中导入液体样品(含有缓冲液)形成缓冲的、混合的液体样品。

[0059] 为了在液体样品中进一步分散涂敷有分析物的颗粒,如果需要,可以搅拌(例如涡旋、振摇、抽吸等等)已经导入液体样品和缓冲液的样品收集仪器,或已经导入混合液体样品的缓冲液容器。

[0060] 在优选的实施方案中,样品收集仪器含有在它的尖含有真空干燥的涂敷有分析物的颗粒的吸管尖;在吸管中注入液体样品,从而再水化干燥的涂敷有分析物的颗粒,形成混合的液体样品。在特别优选的实施方案中,在缓冲液容器中导入混合的液体样品,导致缓冲的混合的液体样品;在缓冲的容器中的缓冲的混合液体样品是利用样品收集仪器被抽吸的,从而进一步分散涂敷有分析物的颗粒。

[0061] 将缓冲的、混合的液体样品加载到固相仪器的膜条带的加载点上,或者加载到加载垫上(如果存在)。在膜条带与缓冲的、混合的液体样品接触后,在允许液体通过毛细作用运动到和穿过膜的条件下来维护膜条带。作为来自缓冲,混合液体样品的液体的毛细作用的结果,涂敷有分析物的颗粒(和分析物,如果存在于样品中)运动穿过膜,到达和穿过膜上的“样品捕获带”,随后达到和穿过“对照捕获带”。在允许涂敷有分析物的颗粒通过毛细作用沿着膜运动达到和穿过样品捕获带和随后达到对照捕获带,随后沿着捕获带(例如,进入毛细垫),从而从捕获带中除去任何非结合的颗粒的条件下(例如,足够的时间和液体体积)维护膜条带。

[0062] 通过将涂敷有分析物的颗粒与样品捕获带中的样品捕获试剂结合,随后将一些涂敷有分析物的颗粒与在对照捕获带中的对照捕获试剂结合,以终止一些涂敷有分析物的颗粒的运动。涂敷有分析物的颗粒与样品中的分析物(如果存在)竞争以与样品捕获试剂的结合。通过结合涂敷有分析物的颗粒上的分析物,样品捕获试剂结合涂敷有分析物的颗粒。术语“样品-试剂-分析物-涂敷-颗粒复合物”如本文所用,指样品捕获试剂和涂敷有分析物的颗粒的复合物。在样品捕获带中捕获涂敷有分析物的颗粒,由于颗粒上的分析物与样品捕获带中的样品捕获试剂相互作用捕获涂敷有分析物的颗粒,形成了样品-试剂-分析物-包衣颗粒复合物。

[0063] 除了分析物本身,通过结合涂敷有分析物的颗粒的任何成分,对照捕获试剂结合涂敷有分析物的颗粒。如本文所用,术语“对照-试剂-分析物-被涂敷的颗粒复合物”指对照捕获试剂和涂敷有分析物的颗粒的复合物。如上所述,在对照捕获带中捕获了涂敷有

分析物的颗粒,由于分析物结合颗粒与对照捕获带中的对照捕获试剂的相互作用捕获涂敷有分析物的颗粒,形成了对照-试剂-分析物-被涂敷的颗粒复合物。

[0064] 毛细作用随后沿着对照捕获带移动即没有在样品捕获带中也没有在对照捕获带中被捕获的任何涂敷有分析物的颗粒。在优选的实施方案中,毛细垫液体移动任何接触的涂敷有分析物的颗粒进入在对照捕获带后面的毛细垫中,所述的任何涂敷有分析物的颗粒是指那些没有在任何捕获带中被捕获的。

[0065] 然后,检测样品捕获带中捕获的涂敷有分析物的颗粒的量。使用在涂敷有分析物的颗粒上利用的标记类型上的适当的方法检测涂敷有分析物的颗粒。在优选的实施方案中,通过光学方法如通过检测分析物结合颗粒的标记的荧光的量检测涂敷有分析物的颗粒的量。以样品捕获带中涂敷有分析物的颗粒的量相同的方法检测对照捕获带中捕获的涂敷有分析物的颗粒的量。在一个实施方案中,如上所述,通过直接涉及沿着固相(例如,膜条带)的位置存在的标记的量的曲线来表示涂敷有分析物的颗粒的量。例如,在膜条带的各个位置上的颗粒的量(例如,在样品捕获带和对照捕获带,和/或在其中或邻接样品捕获带和对照捕获带中的区域,和/或膜条带的其他区域)是可以确定的,并且可以作为沿着膜条带的位置的距离的函数来画图。然后,可以作为在曲线下的区域的函数计算颗粒的量,这个量是与存在的标记的量相关的。

[0066] 确定校正的涂敷有分析物的颗粒的量,然后,利用适当的计算从校正的涂敷有分析物的颗粒的量确定分析物的量。校正的涂敷有分析物的颗粒的量是基于在样品捕获带和在对照捕获带中捕获的涂敷有分析物的颗粒的量的。例如,在一个实施方案中,校正的涂敷有分析物的颗粒的量是与样品捕获带中存在的涂敷有分析物的颗粒的量与对照捕获带中存在的涂敷有分析物的颗粒的量的比例(R)成反比。然后,可以利用标准的曲线,从校正的涂敷有分析物的颗粒量(比例)确定存在的分析物的量。通过制备含有液体中目标分析物的已知浓度的一系列对照样品产生了标准曲线,其中再所述的液体中分析物是待检测的(例如,分析物的耗尽的血清)。然后,在系列对照样品上进行测试;以包括在对照样品中的分析物的浓度的函数对R值画图。通过检测测试样品的R值测试含有未知量的分析物的样品(“测试样品”),通过参考标准曲线确定在测试样品中的分析物的浓度。如上所述,可以产生一个标准曲线,并且在一个批次中对所有的测试样品使用(例如,利用测试试剂的特定的制备对所有的测试样品);对各个测试样品再生标准曲线是不必要的。在另一个实施方案中,校正的涂敷有分析物的颗粒的量是与样品捕获带中存在的涂敷有分析物的颗粒的量的量,与存在于对照捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量和存在于样品捕获带中存在的涂敷有分析物的颗粒的量的总和的比例成反比。然后,利用标准曲线,从校正的涂敷有分析物的颗粒的量确定存在的分析物的量(比例)。或者,也可以利用其他比例和/或标准曲线来确定样品中的分析物的量。另外,如果需要,可以在计算比例(R)之前从样品捕获带中存在的涂敷有分析物的颗粒的量和存在于对照捕获带中的涂敷有分析物的颗粒的量中减去背景中存在的标记的量。

[0067] 本发明的优点

[0068] 当与在固相仪器的膜内包埋了分析物结合颗粒的测试比较时,本发明的方法提供了具有增强的敏感性的测试,其中。对于三明治测试,例如因为在应用到膜上之前,用于目标分析物的待测试液体样品与分析物结合颗粒混合,在膜中发生捕获反应之前,存在更长

时间用于目标分析物与分析物结合颗粒的结合。另外,由于在目标分析物与分析物结合颗粒之间的相互反应存在与液相中,由于更大的颗粒的迁移率,因此允许在固相仪器的膜的基质中存在比目标分析物和分析物结合颗粒之间相同的相互作用更有效的结合。同样,关于三明治和竞争测试,比可能被嵌在固相仪器中的颗粒,将有更多的颗粒可以包括在液体收集仪器中;更多的数目进一步增强反应的敏感性。另外,因为分析物结合颗粒(或涂敷有分析物的颗粒)在将缓冲的、混合的液体样品加载到固相的膜上之前是分散在缓冲的、混合的液体样品中的,颗粒在液体的毛细作用下以连续的方式通过捕获带,而不是在液体前沿的突起上以快的波形式。作为结果,颗粒的浓度越低,流过捕获带时间越长:所以,可以“捕获”的颗粒的时间有效地增加,而通过捕获带的颗粒的量有效地降低,从而避免了当颗粒通过液体前沿的突起时,避免了存在的其他物质阻止一些颗粒的捕获。

[0069] 尽管已经特别地在与免疫测试的关系中叙述了本发明的测试,利用了如上所述的相同的方法,和利用如分析物和分析物结合试剂的需要的成分,该测试可以相似地如上所述用于其他结合对,(例如,核酸,受体配体,凝集素-糖)。。

[0070] 本发明的试剂盒

[0071] 本发明也包括在本文的方法中利用的试剂盒。试剂盒成分可以包括:特定的结合对的第一个和/或第二个成员,缓冲液和/或缓冲容器,液体收集装置,一个或多个固相仪器(或者包括加载垫和/或毛细垫),至少一个样品收集仪器,一个或多个缓冲容器,用于产生标准曲线和/或其他标准曲线信息的对照样品,分析物结合颗粒,涂敷有分析物的颗粒,和/或对照颗粒,捕获试剂,抗体,辅助收集用于目标分析物的待评估样品的工具(例如,刷子),处置的仪器(例如,生物危害品袋),和/或其他关于样品收集仪器的信息或指导(例如,批次信息,出品日期等等)。例如,在一个实施方案中,试剂盒至少包括在其中具有分析物结合颗粒的一个样品收集仪器,在优选的实施方案中,试剂盒至少包括一个具有蒸发干燥、真空干燥或冷冻干燥分析物结合颗粒的一个吸管尖。在另一个实施方案中,试剂盒至少包括如本文所述的一个固相仪器,和至少一个样品收集仪器。在另一个优选的实施方案中,试剂盒包括至少一个吸管;具有蒸发干燥、真空干燥或冷冻干燥分析物结合颗粒的至少一个或多个吸管尖和至少一个固相仪器。这些实施方案也选择地含有关于涉及吸管尖中的分析物结合颗粒的标准曲线、批次信息和/或出品日期的信息,。仍然在另一个优选的实施方案中,试剂盒包括至少一个样品收集仪器;至少一个具有干燥分析物结合颗粒的吸管尖;至少一个固相仪器;和至少一个缓冲容器。这一优选的实施方案可以选择地在缓冲容器中含有缓冲液;和用于收集固体样品的工具(例如,刷)。

[0072] 本发明另外可以通过下面的实施例说明,这些实施例均不在任何方面为限制性的。

[0073] 实施例 1:与对照条比较,将乳胶滴定进缓冲液

[0074] 材料和方法

[0075] 设定实验如下。为了制备固相仪器(“测试柱体”),利用了预附着于Mylar底板的硝酸纤维膜。在样品捕获带中的膜上应用特定的抗体(样品捕获试剂),在对照捕获带中在膜上加载内部对照抗体(对照捕获试剂)。在加载抗体后,通过用聚乙烯醇(PVA)处理封闭了膜上的蛋白质结合位点,然后洗涤和干燥膜。然后,将膜切成5mm宽的条带,垂直于加载抗体的线。然后,将条带沿着两个垫组装成测试的柱体(固相仪器):a)在作用为滤器的

近末端的加载垫,分离血液细胞(如果利用了整个血液),或者,玻璃纤维垫(作用为炭疽实验的样品保持垫);和 b) 在玻璃纤维的远侧末端(沿着抗体线)的毛细垫,以便作用为浸泡在液体中的吸收垫,从近侧末端穿过膜,其中在远侧末端加了样品。

[0076] 压测试柱体,使其适合柱体中的一个开口和样品点上的一个“口”,压入垫中,以致保留液体样品直到它可以被吸收入垫和膜。柱体底部具有一个“窗口”,其中接触了膜的较低的表面(Mylar 背部),使可以在进行测试后读光学读数。在柱体中没有其他开口,尽管它没有密封。干燥柱体,然后用小的干燥囊封闭入铂囊中。

[0077] 如下是离心吸管尖(样品收集仪器)的构造:将利用各种类型的自体吸管的可得的吸管尖放置在架上,所述的架将其保持在  $12 \times 8$  矩阵,9mm 的中心的垂直方向上。自动系统递送了 5 微升的在各个尖中的涂敷有抗体的、染色的乳胶悬浮液。将悬浮液作为来自尖的小末端的约 1cm 的小滴(2mm)递送。悬浮液是在一种海藻糖(糖)溶液中,以便使悬浮液黏稠,以致它能停留在递送到尖的位置;当它干燥时帮助稳定蛋白质;和作为“胶”起作用,以致干燥的点停留在位置上。然后,在真空条件下干燥尖,再次干燥,在封闭之前作为柱体放置于相同的囊中。

[0078] 如下构成缓冲液小瓶:缓冲液小瓶具有一个密封的帽,含有预测定量的稀释液。一旦稀释小瓶注满,将它加帽并且放入测试试剂盒。缓冲液的量和组成对于各个不同类型的测试是不同的。调整量,以致将样品稀释到一个适合各个试验的水平。例如,肌红蛋白测试利用了 1 : 10 的稀释度的血液,肌原蛋白 I 试验利用了 1 : 3 的稀释度的血液。炭疽实验在计算实验中的损失后,利用了足够的缓冲液悬浮样品和乳胶。缓冲液可以是水基础的,包括几个不同的盐,缓冲液和去垢剂。例如,代表性分析物的代表性缓冲液包括如下:肌红蛋白,包括 122mM PB,100mM NaCl,3.3% BSA,1.1% Cremophor EL,0.05% ProClin300,pH7.2 的缓冲液是可以利用的;对于 CKMB,可以利用包括 115mM PB,115mM NaCl,2.3% BSA,0.25% Surfynol1104PG-50,0.3% 酪蛋白,40mM Phe,0.5% 羊血清,0.05% ProClin300, pH7.2 是可以利用的;对于 TnI,可以利用包括 124mM PB,124mM NaCl,3.24% BSA,0.76% 表面活性剂 10G,0.54% 酪蛋白,405mM GHCl,40mM Phe,10% 山羊血清,pH7.2。对于,炭疽,可以利用包括 138mM PB,138mM NaCl,3.6% BSA,0.84% 表面活性剂 10G,0.6% 酪蛋白,0.05% 高黏度甲基纤维素,0.05% ProClin300, pH7.2(缩写:PB = 磷酸缓冲液,NaCl = 氯化钠,BSA = 小牛血清白蛋白,Phe = 苯丙氨酸)。

[0079] 为了进行血液样品的实验,接着下面的过程是:

[0080] 将血液的样品吸入缓冲小瓶中,可以用任何类型的吸管或用有乳胶点(样品收集仪器)的吸管尖。这是一个简单的液体转移操作。然后用点的吸管尖混合样品和缓冲液,重复抽吸液体至少 10 次。在这一混合操作过程中,液体与乳胶点接触,引起它再水化,变成悬浮于稀释的样品基质中。一旦悬浮,在乳胶上的抗体开始结合样品中的抗体(如果存在)。

[0081] 然后,利用吸管(利用如上所述的相同的尖)转移一部分缓冲混合物到柱体中的相同的孔中。然后,将柱体放置于读数器中,其中:a) 稀释液开始浸泡在保留血液孔的样品垫中。液体流过垫并且接触硝酸纤维膜。液体(利用悬浮的乳胶)利用沿着膜长度的毛细作用流到变得潮湿的吸附垫上。当乳胶达到测试线(样品捕获带)时,是否样品中存在的任何抗原将通过固定的抗体捕获(样品捕获试剂)。如果抗原也通过乳胶上的抗体结合,也将借助在两个抗体之间的三明治的抗原捕获乳胶。在继续流动的测试系和以后没有遇到内

部对照抗体系（对照捕获带）没有捕获乳胶。这一抗体是指向乳胶本身的物质（抗体或其他物质）。由于这一捕获反应，乳胶部分是在内部对照系中捕获的。残留的液体和未结合的乳胶在条带的远端继续，并且保留在毛细垫中。当垫是饱和的OR，当样品完全吸收在样品垫中，液体流停止了，毛细压力得到了平衡。然后，读数确定了测试系中和内部对照系中的读数的量，通过与测试柱的批次中确定的标准的曲线比较，应用一个比例的方法确定样品中的抗原的量。

[0082] 为了用特定的抗原进行样品的测试（即炭疽孔），取样品如下。如果该物质是来自表面的样品（例如，桌子的顶部），利用下面的方法：在缓冲液小瓶中导入刷子，淹没刷子尖；然后，利用刷子温和地刷待测试的表面；然后，刷子放回缓冲液小瓶中，旋转允许将颗粒物质释放到稀释液中；除去刷子丢弃。然后接着上面的测试过程。如果待测试的物质是液体形式（例如，颗粒的液体悬浮液），进行下面的步骤：在干的刷子OR上加载测试液体的样品（10到30微升），将干刷子浸没在测试液体中；然后，在稀释液体中浸没刷子，温和旋转释放颗粒；除去刷子并丢弃。测试过程如上。如果待测试物质是粉末和颗粒形式，进行如下步骤：通过将湿的或干的刷子尖与粉末接触，将小量的物质刷进小瓶OR，在稀释液中加入小的粉末样品，然后将它放入稀释液的小瓶中。测试过程如上。

[0083] 结果

[0084] 利用如上所述的方法，利用在吸管尖中的干乳胶通过将乳胶颗粒滴定进缓冲液（稀释液），比较得到的结果进行测试，在膜条带（在乳胶加载位点“LAS”）上包衣乳胶颗粒得到结果，并且允许样品的液体在运动之前通过毛细作用运动通过LAS，通过样品捕获带和对照捕获带。样品是马血清标准和在基线（0）的血液M5和0.5ng/ml TnI。缓冲液（稀释液）是TnI稀释液，其中有200mMGHCl+10%山羊血清，0, 0.5x, 1x, 2x, 4x, 或8x乳胶颗粒。结果表示在表1。

[0085] 表1：与膜条带上的LAS的乳胶颗粒比较，在吸管中用缓冲液滴定乳胶颗粒的效果  
[0086]

| 马血清标准 R10 值            |      |       |       |       |            |            |
|------------------------|------|-------|-------|-------|------------|------------|
| 稀释液/条带                 | Conc | R10   | SD    | CV    | S:B<br>R10 | S-B<br>R10 |
| 有 LAS 条带的<br>对照        | 0    | 0.041 | 0.006 | 15.1% |            |            |
|                        | 0.5  | 0.054 | 0.004 | 6.6%  | 1.32       | 0.003      |
| 没有 LAS 条带<br>的 0.5x 乳胶 | 0    | 0.036 | 0.004 | 11.9% |            |            |
|                        | 0.5  | 0.071 | 0.001 | 1.8%  | 1.98       | 0.030      |
| 没有 LAS 条带<br>的 1x 乳胶   | 0    | 0.040 | 0.001 | 1.3%  |            |            |
|                        | 0.5  | 0.076 | 0.004 | 5.9%  | 1.90       | 0.031      |
| 没有 LAS 条带<br>的 2x 乳胶   | 0    | 0.049 | 0.002 | 3.6%  |            |            |
|                        | 0.5  | 0.090 | 0.007 | 8.1%  | 1.83       | 0.032      |
| 没有 LAS 条带<br>的 4x 乳胶   | 0    | 0.065 | 0.001 | 2.3%  |            |            |
|                        | 0.5  | 0.110 | 0.009 | 8.1%  | 1.71       | 0.035      |
| 没有 LAS 条带<br>的 8x 乳胶   | 0    | 0.101 | 0.003 | 2.6%  |            |            |
|                        | 0.5  | 0.141 | 0.002 | 1.7%  | 1.39       | 0.034      |
| 血液 M5R10 值             |      |       |       |       |            |            |
| 稀释液/条带                 | Conc | R10   | SD    | CV    | S:B<br>R10 | S-B<br>R10 |
| 有 LAS 条带的<br>对照        | 0    | 0.040 | 0.007 | 16.8% |            |            |
|                        | 0.5  | 0.054 | 0.004 | 7.4%  | 1.35       | 0.003      |
| 没有 LAS 条带<br>的 0.5x 乳胶 | 0    | 0.029 | 0.001 | 5.0%  |            |            |
|                        | 0.5  | 0.054 | 0.001 | 1.3%  | 1.85       | 0.023      |
| 没有 LAS 条带<br>的 1x 乳胶   | 0    | 0.033 | 0.001 | 4.4%  |            |            |
|                        | 0.5  | 0.073 | 0.005 | 6.4%  | 2.19       | 0.033      |
| 没有 LAS 条带<br>的 2x 乳胶   | 0    | 0.049 | 0.006 | 13.3% |            |            |
|                        | 0.5  | 0.087 | 0.004 | 4.5%  | 1.78       | 0.028      |
| 没有 LAS 条带<br>的 4x 乳胶   | 0    | 0.082 | 0.010 | 12.7% |            |            |
|                        | 0.5  | 0.135 | 0.011 | 8.5%  | 1.66       | 0.032      |
| 没有 LAS 条带<br>的 8x 乳胶   | 0    | 0.158 | 0.006 | 3.8%  |            |            |
|                        | 0.5  | 0.210 | 0.016 | 7.4%  | 1.33       | 0.030      |

[0087] 利用 0.5x, 1x, 2x, 和 4x 的乳胶稀释液得到了与对照 LAS 条带比较的显著增加的信号:背景 (S:B)。S:B 中的增加是由于阳性样品的特定的结合的和零样品的相似的背景中的增加。这导致了系统的敏感性中的增加。作为乳胶增加的量,成排的 TL 和 ISL 信号逐步增加。1x 乳胶稀释液给出了与对照 LAS 条带可比较的 TL 和 ISL 信号。所以,结论是,乳胶稀释液给出了比 RAMP 测试中对照 LAS 条带的更高的敏感性。

[0088] 实施例 2:比较标准曲线中 1x 乳胶稀释液对 LAP 条带的比较

[0089] 利用实施例 1 中所述的方法,利用吸管尖中的干乳胶,进行测试比较通过将乳胶

颗粒滴定进缓冲液（稀释液）得到的结果，结果是通过将乳胶颗粒涂敷到如上所述的膜条带（乳胶加载位点“LAS”）得到的。样品是在 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 和 3ng/ml 中突起的马血清标准和血液 M35。缓冲液（稀释液）是 TnI 稀释液，其中有 180mM GHCl+10%的山羊血清，有或没有 1X 乳胶颗粒。结果表示在表 2。

[0090] 表 2 :利用 1X 乳胶颗粒稀释液和全长膜条带的马血清和血液中的全标准曲线

[0091]

| 没有 LAS 条带(全长)的 R10 值 - 1X 乳胶稀释液  |          |        |        |        |            |            |
|----------------------------------|----------|--------|--------|--------|------------|------------|
| 样品                               | Tnl Conc | R10    | SD     | CV     | R10<br>S:B | R10<br>S-B |
| HS Stds                          | 0.0      | 0.018  | 0.001  | 5.6%   | -          | -          |
|                                  | 0.1      | 0.026  | 0.002  | 8.3%   | 1.45       | 0.005      |
|                                  | 0.2      | 0.030  | 0.001  | 2.7%   | 1.66       | 0.010      |
|                                  | 0.5      | 0.049  | 0.001  | 1.7%   | 2.72       | 0.029      |
|                                  | 1.0      | 0.071  | 0.003  | 3.8%   | 3.92       | 0.049      |
|                                  | 3.0      | 0.0164 | 0.013  | 8.0%   | 9.03       | 0.131      |
| 血液 M35                           | 0.0      | 0.017  | 0.002  | 10.1%  | -          | -          |
|                                  | 0.1      | 0.023  | 0.002  | 7.7%   | 1.37       | 0.003      |
|                                  | 0.2      | 0.026  | 0.001  | 5.3%   | 1.55       | 0.006      |
|                                  | 0.5      | 0.043  | 0.003  | 5.9%   | 2.50       | 0.021      |
|                                  | 1.0      | 0.064  | 0.003  | 4.2%   | 3.74       | 0.042      |
|                                  | 3.0      | 0.145  | 0.008  | 5.4%   | 8.55       | 0.119      |
|                                  |          |        |        | Avg CV | 5.7%       |            |
| R10 值 - 有对照条带(有 LAS)的对照稀释液(没有乳胶) |          |        |        |        |            |            |
| 样品                               | Tnl Conc | R10    | SD     | CV     | R10<br>S:B | R10<br>S-B |
| HS Stds                          | 0.0      | 0.034  | 0.001  | 2.5%   | -          | -          |
|                                  | 0.1      | 0.044  | 0.002  | 4.7%   | 1.31       | 0.007      |
|                                  | 0.2      | 0.42   | 0.004  | 10.0%  | 1.24       | 0.003      |
|                                  | 0.5      | 0.054  | 0.005  | 8.3%   | 1.62       | 0.015      |
|                                  | 1.0      | 0.063  | 0.008  | 12.1%  | 1.89       | 0.021      |
|                                  | 3.0      | 0.106  | 0.010  | 9.5%   | 3.14       | 0.061      |
| 血液 M35                           | 0.0      | 0.029  | 0.002  | 7.8%   | -          | -          |
|                                  | 0.1      | 0.035  | 0.005  | 13.6%  | 1.19       | -0.001     |
|                                  | 0.2      | 0.033  | 0.003  | 9.8%   | 1.13       | -0.002     |
|                                  | 0.5      | 0.042  | 0.002  | 5.1%   | 1.46       | 0.009      |
|                                  | 1.0      | 0.055  | 0.003  | 5.1%   | 1.89       | 0.021      |
|                                  | 3.0      | 0.101  | 0.006  | 5.7%   | 3.50       | 0.064      |
|                                  |          |        | Avg CV | 8.3%   |            |            |

[0092] 比较对照 LAS 条带,在稀释液和血液样品中整个标准曲线范围内 1X 乳胶稀释液得到了 S:B 的一致性的增加。不仅在更高的 S:B 中而且在血液中将 0.1ng/ml 的点与零的区别中,利用乳胶稀释液和 LAS 条带在更高的 S:B 中观察到更高的敏感性,而在零与 0.5ng/ml 中是没有明显的区别的。这些结果证明,利用乳胶稀释液在 RAMP 系统的敏感性中与 LAS 条带有明显的提高。

[0093] 实施例 3: 乳胶稀释液与对照 LAS 条带的滴定

[0094] 利用实施例 1 中如上所述的方法, 进行测试比较利用吸管尖中干乳胶将乳胶颗粒滴定进缓冲液(稀释液)得到的结果和通过将乳胶颗粒包衣到如上所述的膜条带上(在乳胶加载位点“LAS”)得到的结果。样品是 0 和 2000ng/ml 的炭疽孢子(炭疽杆菌)。缓冲液(稀释液)是有或没有 1X, 3X 或 6X 乳胶颗粒的稀释液。结果表示在表 3。

[0095] 表 3 利用乳胶颗粒稀释液和全长膜条带的炭疽的测试

[0096]

| BA 样品 R10 值          |      |       |       |       |            |            |
|----------------------|------|-------|-------|-------|------------|------------|
| 稀释液/条带               | Conc | R10   | SD    | CV    | S:B<br>R10 | S-B<br>R10 |
| 有 LAS 条带的对照稀释液(没有乳胶) | 0    | 0.010 | 0.001 | 11.3% |            |            |
|                      | 2000 | 0.016 | 0.003 | 17.2% | 1.54       | 0.002      |
| 没有 LAS 条带的 1X 乳胶稀释液  | 0    | 0.026 | 0.008 | 30.8% |            |            |
|                      | 2000 | 0.064 | 0.000 | 0.0%  | 2.46       | 0.030      |
| 没有 LAS 条带的 3X 乳胶稀释液  | 0    | 0.018 | 0.002 | 11.1% |            |            |
|                      | 2000 | 0.059 | 0.003 | 5.1%  | 3.28       | 0.036      |
| 没有 LAS 条带的 6X 乳胶稀释液  | 0    | 0.020 | 0.001 | 5.0%  |            |            |
|                      | 2000 | 0.066 | 0.005 | 7.6%  | 3.30       | 0.040      |

[0097] 观察到, 利用 1X, 3X 和 6X 的乳胶稀释液得到与炭疽测试的对照 LAS 条带比较 S:B 有明显的增加。S:B 对 3X 和 6X 乳胶稀释液比 1X 乳胶稀释液更高。这些结果证明, 利用乳胶稀释液, 在 RAMP 系统的敏感性比应用到炭疽测试的 LAP 条带有提高。

[0098] 参考优选的实施方案已经特定地显示和叙述了本发明后, 本领域的那些技术人员将理解, 各种形式和细节的变化可以在不脱离附加的权利要求包括的本发明的范围时得到。

|         |   |         |            |
|---------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 敏感性免疫色原图像测试   |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN1646913B</a>  | 公开(公告)日 | 2013-06-19 |
| 申请号     | CN03808096.6  | 申请日     | 2003-04-10 |
| [标]发明人  | 瓦利K丰  |         |            |
| 发明人     | 瓦利·K·丰  |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/543 G01N33/558 G01N33/58 G01N33/538 G01N21/78 G01N33/18 G01N33/24 G01N33/545 G01N33/552 G01N33/569 |         |            |
| CPC分类号  | G01N33/54386 G01N33/54313 G01N33/558 Y10S435/805 Y10S435/81 Y10S435/97                                    |         |            |
| 代理人(译)  | 张一军   |         |            |
| 审查员(译)  | 陈中伟   |         |            |
| 优先权     | 10/162138 2002-06-03 US<br>10/120774 2002-04-10 US  |         |            |
| 其他公开文献  | CN1646913A  |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>  |         |            |

#### 摘要(译)

公开了在液体样品中定量测量目标分析物的量的方法和在该方法中利用的试剂盒。这些方法包括提供具有膜的固相仪器，膜上具有加载的点，样品捕获带，和对照捕获带，其中样品捕获区域是在加载点和对照捕获带之间；并提供具有分析物结合颗粒的群体或涂敷有分析物的颗粒的群体的样品收集仪器。在这些实验中，在样品收集仪器中导入液体样品，在膜的加载点上加载得到的混合物。液体允许在毛细管作用下将测试的成分运输到或通过样品捕获带，随后加载到和通过对照捕获带。液体样品中分析物的量涉及了(例如，直接或逆转地)相关的颗粒的量，这可以令人确定为样品捕获带中的颗粒的量的比例和对照的捕获带中的可粒的量。