



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101839908 A

(43) 申请公布日 2010.09.22

(21) 申请号 201010196737.7

(22) 申请日 2010.05.28

(71) 申请人 李金波

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 李金波

(74) 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代

理事务所 12201

代理人 李素兰

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

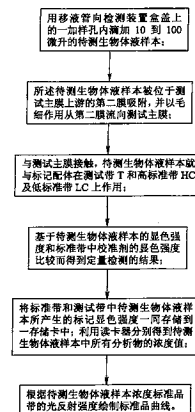
权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

生物体液样本定量检测装置及其检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种生物体液样本定量检测装置,包括设置在一盒体内的测试条,颜色强度数据的存储器及颜色强度数据的读取器;测试条的底层为一基片,基片上设置有具有多孔的测试主膜;测试主膜的上游设置有第二膜,第二膜上设置有一样本应用位点和一标记配体位点,通过毛细作用促使待测生物体液样本及其复合物、标记配体能流动;测试主膜的下游设置有第三膜,第三膜用于在测试主膜下游的尽头吸附已经通过测试主膜的待测生物体液样本;盒体的盒盖上设置有两个加样孔和一视窗,利用本发明检测装置可以用已知浓度标准品带的光反射强度绘制标准品曲线,从而对生物体液样本进行快速、有效、准确的定量分析。



1. 一种生物体液样本定量检测装置,包括设置在一盒体内的测试条,其特征在于:还包括颜色强度数据的存储器及颜色强度数据的读取器;

所述测试条的底层为一基片(1),所述基片(1)上设置有具有多孔的测试主膜(6);

所述测试主膜(6)具有一高标准带 HC、一低标准带 LC 和一测试带 T,所述高标准带 HC 和低标准带 LC 中具有校准试剂,所述测试带 T 上具有固定配体;

所述测试主膜(6)的上游设置有第二膜(54),所述第二膜(54)包括自下而上设置的至少两层无活性且具有多孔的膜(5)及一过滤膜(4),所述第二膜上设置有一样本应用位点和一标记配体位点,通过毛细作用促使待测生物体液样本及其复合物、标记配体能流动;

所述测试主膜(6)的下游设置有第三膜(2),所述第三膜(2)为一吸附垫,所述第三膜(2)用于与待测生物体液样本接触,通过所述第三膜(2)的毛细作用促使待测生物体液样本流过测试主膜(6),所述第三膜(2)用于在测试主膜(6)下游的尽头吸附已经通过测试主膜(6)的待测生物体液样本;

所述盒体包括盒盖,所述盒盖上设置有两个加样孔(S1、S2)和一视窗(W),所述两个加样孔的位置分别与盒内第二膜上样本应用位点和标记配体位点对正;所述视窗(W)与盒体内测试主膜(6)上高标准带 HC、低标准带 LC 和测试带 T 所限定的区域一致;

所述存储器用于存储高标准带 HC、低标准带 LC 和测试带 T 中待测生物体液样本所产生的颜色强度,所述存储器中有测量颜色强度的发光值与待测物浓度组成的关联式;所述存储器为电磁卡或 RFID 卡;所述读取器为光学读卡器,所述光学读卡器用于分别给出生物体液样本中所有分析物的浓度值。

2. 根据权利要求 1 所述生物体液样本定量检测装置,其特征在于:所述测试主膜(6)为包被硝酸纤维素膜,所述第二膜中的无活性且具有多孔的膜(5)为胶体金包被玻璃纤维膜,所述第二膜中的过滤膜(4)由非织物状的玻璃纤维或聚丙烯制作;所述吸附垫由高效的吸附材料制作。

3. 根据权利要求 1 所述生物体液样本定量检测装置,其特征在于:所述测试主膜(6)与第二膜之间采用一透明胶带(3)固定。

4. 一种生物体液样本定量检测方法,其特征在于,利用如权利要求 1 所述的检测装置进行检测,其中,所述测试主膜(6)为包被硝酸纤维素膜,所述第二膜中的无活性且具有多孔的膜(5)为胶体金包被玻璃纤维膜,所述第二膜中的过滤膜(4)由非织物状的玻璃纤维或聚丙烯制作;所述吸附垫由高效的吸附材料制作;所述标记配体的显色剂是金结合物,该标记配体用于结合待测生物体液样本和校准试剂;

其检测步骤如下:

步骤一、用移液管向检测装置盒盖上的一加样孔内滴加 10 到 100 微升的待测生物体液样本;

步骤二、所述待测生物体液样本被位于测试主膜(6)上游的第二膜吸附,并以毛细作用从第二膜(54)流向测试主膜(6);在此过程中,待测生物体液样本流经具有标记配体沉积的第二膜(54)区域,所述待测生物体液样本与标记配体结合,所述第二膜(54)上形成有已知量的高和低校准配体;

步骤三、与测试主膜(6)接触,待测生物体液样本就与标记配体在测试带 T 和高标准带 HC 及低标准带 LC 上作用;

步骤四、基于待测生物体液样本的显色强度和标准带中校准试剂的显色强度比较而得到定量检测的结果；即：待测生物体液样本中待测物含量越高，与标记配体结合的分析物就越多，与测试主膜测试带 T 中固定配体结合的标记配体或待测物复合物量就越高，从而标准带上的标记显色强度增加；随着待测生物体液样本中分析物含量增加，标记的显色强度就随之增加；

步骤五、将标准带和测试带中待测生物体液样本所产生的标记显色强度一同存储到到一电磁卡或 RFID 卡中；当将该电磁卡或 RFID 卡插入到光学读卡器中，该读卡器分别给出待测生物体液样本中所有分析物的浓度值；

步骤六、根据待测生物体液样本浓度标准品带的光反射强度绘制标准品曲线。

5. 根据权利要求 4 所述生物体液样本定量检测方法，其特征在于：若待测生物体液样本为全血，则：位于测试主膜上游的第二膜能过滤除去待测生物体液样本中的红细胞和白细胞，仅让血清流过。

6. 根据权利要求 4 所述生物体液样本定量检测方法，其特征在于：在第二膜上形成已知量的高和低校准配体后，加入缓冲液以促进所述待测生物体液样本在测试主膜上的流动；所述缓冲液的加样量为样本量的 2 到 5 倍之间；所述缓冲液包括任何制药可被接受的水的缓冲液，所述缓冲液不与样本及标记配体反应。

7. 根据权利要求 6 所述生物体液样本定量检测方法，其特征在于：所述缓冲液为磷酸缓冲液，是磷酸一钠盐或磷酸二钠盐；或所述缓冲液为柠檬酸缓冲液或林格氏液。

8. 根据权利要求 4 所述生物体液样本定量检测方法，其特征在于：所述校准试剂是待测生物体液样本中不存在的或不与待测生物体液样本中复合物发生免疫交叉反应的试剂；是以下其中之一：

(1) 2,4-二硝基苯代牛血清白蛋白 (BSA-DNP)，可从分子探针购进 (Eugene, OR, cat#A-23018) 并作为校准试剂来使用；

(2) 2,4-二硝基苯酚 (DNP) 是人体内不存在的小分子，所述 2,4-二硝基苯酚 (DNP) 作为半抗原，半抗原是指当其与大分子蛋白质载体偶联，或注射到能产生抗体的哺乳动物体内时，产生免疫原性的物质；所述能产生抗体的哺乳动物是指大鼠、小鼠、兔子、牛、马、绵羊或山羊。

9. 根据权利要求 4 所述生物体液样本定量检测方法，其特征在于：所述低标准区 LC 固化配体为牛甲状腺球蛋白抗体 (BTG)；所述高标准区 HC 固化配体为羊抗兔蛋白抗体；与固化配体结合的结合物是 BTG 金抗原和兔 IgG 金抗原。

10. 根据权利要求 4 所述生物体液样本定量检测方法，其特征在于：待测生物体液样本不仅限于抗原、抗体、激素、成瘾性药物、细胞蛋白质、DNA、心肌标志物、肿瘤或癌症标志物、自身免疫疾病标志物或任何能够产生抗体的大分子物质；

11. 根据权利要求 10 所述生物体液样本定量检测方法，其特征在于：所述待测生物体液样本为抗原，抗原是缔合了传染因子的抗原；其中，所述传染因子是病毒、细菌、真菌或朊病毒；

当传染因子是病毒时，病毒是 HIV、肝炎病毒 A、B、C、D、单一疱疹病毒、巨细胞病毒、乳头状瘤病毒、埃博拉病毒、SARS 病毒、鼻病毒或牛痘病毒；

当传染因子是细菌时，细菌是革兰氏阳性或革兰氏阴性菌；或炭疽杆菌、大肠杆菌、幽

门螺杆菌、淋病双球菌、沙门氏菌属或志贺氏菌属的种群；

当传染因子是真菌时，则是 *Mycosporum* 菌类或曲霉菌类。

12. 根据权利要求 10 所述生物体液样本定量检测方法，其特征在于：所述待测生物体液样本为激素，则从以下典型类群中筛选：人绒毛膜促性腺激素、甲状腺素、促甲状腺素、胰高血糖素、胰岛素、松弛素、促黄体生成素、促黑激素、生长激素、促卵泡生成素、胃泌素、缓激肽、抗利尿激素以及其它释放因子。

13. 根据权利要求 10 所述生物体液样本定量检测方法，其特征在于：所述待测生物体液样本为肿瘤或癌症标志物，则从以下典型类群中筛选：前列腺特异性抗原 (PSA)、癌胚抗原 (CEA) 或甲胎蛋白。

14. 根据权利要求 10 所述生物体液样本定量检测方法，其特征在于：所述待测生物体液样本为心肌标志物，则从以下典型类群中筛选：肌钙蛋白 I、肌钙蛋白 T、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、肌红蛋白、C 反应蛋白 (CRP)、脂肪酸结合蛋白 (FABP)、糖原磷酸化同工酶 (GPBB)、B 型尿肽 (BNP)、前 BNP。

## 生物体液样本定量检测装置及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测生物液体样本的系统,尤其涉及一种检测并定量测量样本中待检物的浓度。

### 背景技术

[0002] 抗原、激素类抗体、内分泌蛋白和其他类型蛋白的定量分析,常常能提供至关重要的临床数据。在生物领域,免疫测定法众所周知,其原理是试剂浸渍后,通过毛细作用到含有固定化试剂的膜上,在测试条带检测区与结合有可视标记物,如:乳胶颗粒、金属复合物的待测物反应。值得一提的是从金属溶胶中得到标记物,这种从金属溶胶中处理出来的标记物可与配体结合,然后进一步与待测物、配体或抗体结合。测试条已被大量用于定量检测体液,如尿液和血液中的待测物。检测人绒毛膜促性腺激素作为指示人怀孕的方法这可能是最早最普遍的方法。上述检测都是在测试条上进行的,其结果显示只需一步完成,例如,液体样本通过吸水膜,内部的待测物与相应的配体结合,结果可清晰地显示在与样本加载区分离的检测区上。进行上述检测,目前常用的测试装置一般含有插条和小盒,使用者无需额外的器具就可以进行检测。已知的检测装置基本上采用夹心检测和竞争抑制检测两种检测方法。

[0003] 夹心检测方法,是液体样本中的待测物与标记或示踪配体反应,生成复杂的待测物或标记物。这个反应发生要有待测物进入检测条,否则,标记配体将被完全沉积在测试条吸水膜上。在测试条上,结合有标记物的待测物通过毛细作用移到样本捕获区;在那里,通过固化捕获配体可得到待测物复合体。在金标记的情况下,样本检测区出现色带,则表明有待测物存在。这种检测装置还含有第二条固化配体带,一般不仅作为质控带与标记配体结合,甚至在无待测物存在的情况下,可以显示测试条的性能。

[0004] 竞争抑制检测方法,是待测物与标记配体都能与样本捕获区的固定化配体反应,这样待测物与标记配体共同竞争样本捕获区的固定化配体。任何待测物的存在都将取代标记配体的结合位置。标记配体捕获出现信号,则表示结果为阴性。

[0005] 现有技术中,基于测试条确定待测物有无的装置,多不能提供液体样本中待测物的准确量。即使检测装置内配有定量测试的标准品,也会因为温度、空气湿度、时间流逝、测试条差异、信号强度变化而不准确。

### 发明内容

[0006] 针对上述现有技术,本发明提供一种生物体液样本定量检测装置及方法,本发明可以提供对生物体液样本进行快速、有效、准确的定量分析。

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明生物体液样本定量检测装置予以实现的技术方案是:该检测装置,包括设置在一盒体内的测试条,还包括颜色强度数据的存储器及颜色强度数据的读取器;所述测试条的底层为一基片,所述基片上设置有具有多孔的测试主膜;所述测试主膜具有一高标准带 HC、一低标准带 LC 和一测试带 T,所述高标准带 HC 和低标准

带 LC 中具有校准试剂,所述测试带 T 上具有固定配体;所述测试主膜的上游设置有第二膜(54),所述第二膜(54)包括自下而上设置的至少两层无活性且具有多孔的膜及一过滤膜,所述第二膜上设置有一样本应用位点和一标记配体位点,通过毛细作用促使待测生物体液样本及其复合物、标记配体能流动;所述测试主膜的下游设置有第三膜,所述第三膜为一吸附垫,所述第三膜用于与待测生物体液样本接触,通过所述第三膜的毛细作用促使待测生物体液样本流过测试主膜,所述第三膜用于在测试主膜下游的尽头吸附已经通过测试主膜的待测生物体液样本;所述盒体包括盒盖,所述盒盖上设置有两个加样孔和一视窗,所述两个加样孔的位置分别与盒内第二膜上样本应用位点和标记配体位点对正;所述视窗与盒体内测试主膜上高标准带 HC、低标准带 LC 和测试带 T 所限定的区域一致;所述存储器用于存储高标准带 HC、低标准带 LC 和测试带 T 中待测生物体液样本所产生的颜色强度,所述存储器中有测量颜色强度的发光值与待测生物体液样本浓度组成的关联式;所述存储器为电磁卡或 RFID 卡;所述读取器为光学读卡器,所述光学读卡器用于分别给出生物体液样本中所有分析物的浓度值。

[0008] 本发明中,利用上述生物体液样本定量检测装置的检测步骤如下:

[0009] 步骤一、用移液管向检测装置盒盖上的加样孔内滴加 10 到 100 微升的待测生物体液样本;

[0010] 步骤二、所述待测生物体液样本被位于测试主膜上游的第二膜吸附,并以毛细作用从第二膜流向测试主膜;在此过程中,待测生物体液样本流经具有标记配体沉积的第二膜区域,所述待测生物体液样本与标记配体结合,所述第二膜上形成有已知量的高和低校准配体;

[0011] 步骤三、与测试主膜接触,待测生物体液样本就与标记配体在测试带 T 和高标准带 HC 及低标准带 LC 上作用;

[0012] 步骤四、基于待测生物体液样本的显色强度和标准带中校准试剂的显色强度比较而得到定量检测的结果;即:待测生物体液样本中待测物含量越高,与标记配体结合的分析物就越多,与测试主膜测试带 T 中固定配体结合的标记配体或待测物复合物量就越高,从而标准带上的标记显色强度增加;随着待测生物体液样本中分析物含量增加,标记的显色强度就随之增加;

[0013] 步骤五、将标准带和测试带中待测生物体液样本所产生的标记显色强度一同存储到一电磁卡或 RFID 卡中;当将该电磁卡或 RFID 卡插入到光学读卡器中,该读卡器分别给出待测生物体液样本中所有分析物的浓度值;

[0014] 步骤六、根据待测生物体液样本浓度标准品带的光反射强度绘制标准品曲线。

[0015] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0016] 本发明应用固相层析检测,如夹心检测,一种或多种待测生物体液样本与标记复合物结合,还可与测试条上面的固化校准试剂能与标记试剂结合。在标准品带上,所述标记试剂通过校准试剂被捕获,为测量检测带上待测生物体液样本浓度创造了一个平台。标准品带固化校准试剂与相应的标记试剂结合作为液体样本通过检测条。液体样本中的待测物就结合在样本捕获带上。利用这些条带上标记复合体的相对强度就可以得到待测生物体液样本的准确浓度。因此,膜上各种样本捕获带里的标记物(如:金胶结合物)的强度、深度就反映了待测生物体液样本的数量,同理,标准品带也能反映校准试剂的强度和浓度。所

以,商业上利用可视化装置将样本的光反射强度转化为测量浓度。最终,用已知浓度标准品带的光反射强度绘制标准品曲线。

#### 附图说明

- [0017] 图 1 是本发明测试装置的构成框图 ;  
[0018] 图 2 是本发明测试装置中测试条盒体的外观结构示意图 ;  
[0019] 图 3 是本发明测试装置中测试条结构分解示意图 ;  
[0020] 图 4 是本发明测试装置检测方法流程图。

#### 具体实施方式

[0021] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细地描述。

[0022] 为便于理解本发明,有关词语定义如下 :

[0023] 1、待测生物体液样本(以下简称待测物)中的抗原,是指能与抗体结合的物质。抗原可以是化合物、多肽、碳水化合物、核酸、脂类和其类似物,如病毒颗粒、亚单位、寄生物、宿主蛋白等。

[0024] 2、结合物,是指夹心检测法中提到的待测物配体,与竞争检测法中的待测物、标记物、示踪物配体一样。结合物可以从能与待测物结合的大分子或复合物中选取,如抗原-抗体复合物、抗体-抗原复合物。

[0025] 3、测试区(或带),是指结合物或待测物能附着其上的位置,例如:检测装置中测试条的一部分。

[0026] 4、测试条(或检测条),是指能够通过毛细作用,使含有待测物的液体样本和其他需要确定待测物浓度的抗原流动的多孔膜。一般的多孔膜有玻璃纤维、多孔硝化纤维、聚乙烯。发明的测试条都是由支持膜和过滤器组成。

[0027] 5、示踪物,是指标记有可测的、最好是标记有特殊可读标记物(如:胶体金、乳胶、包含染料、碳黑、及类似物的脂质体)的待测物或结合物配体。

[0028] 6、样本加载区,是指待测物检测区,也就是使液体样本移动到测试条上。

[0029] 7、液体待测样本,是指任何一种含有待测物的液体。检测的样本可以是体液,包括:从胎儿、新生儿、青年、成年人中获得的尿液、血液、汗液、淋巴液、腹腔内液、组织粗提物或匀浆,无生物活性的液体、如从河流、湖泊中得到的水,试验用水等。

[0030] 8、标记物,是指能直接或间接调节信号(如颜色变化)模式的大分子或复合物。这个信号用于指示检测样本中目标待测物的有无及浓度范围。标记物可能含有酶、荧光剂、脂质体、红血球、多聚物微胶囊、显色聚合体颗粒(乳胶)、也可能是含有金属复合物的胶体。各种各样的专利及应用为生产可视信号提供了大量文献。在本发明中,可以找到几种标记物类型专利的应用。美国专利:3,646,346 发现了放射性标记物;美国专利:3,654,090,3,791,932 和 3,817,838 发现了酶标记;美国专利:3,996,345 发现荧光标记物;美国专利:3,996,345 发现放射性标记物;美国专利:4,067,959 发现荧光或酶标记物;美国专利:4,104,099 发现化学发光标记物;美国专利:4,160,645 发现无酶催化剂标记物;美国专利:3,966,879 发现电泳技术可用于抗体区;美国专利:4,120,945 首次发现放射性免疫检测,在这种方法中,标记的待测物通过抗体可与固相支持物结合;美国专利:

4, 233, 402 发现成对酶标记物 ;美国专利 :4, 720, 450 发现化学诱导荧光标记物 ;美国专利 :4, 287, 300 发现酶负电荷标记物。另外, 标记物也可以是金属溶胶 ;金属或金属复合物, 如 :金属氧化物、氢氧化物、金属盐、金属复合物或与聚合物相混合或包被于聚合物中心的金属复合物。这些金属标记物可能是上面所提到的任何一种金属溶胶或金属复合物溶胶的脱水状态, 更可能是脱水状态的胶体金。

[0031] 9、标记反应, 是指当标记物与测试带或标准带上固化试剂连结时所生成的信号强度。伴有颜色生成的反射光装置是测量标记反应的好方法。

[0032] 10、复合物, 是指 (基于上下文) 任何由待测物和一个或多个配体, 或由标记配体与固化配体形成的多分子复合物。在夹心免疫测定法中, 比如以下复合物会产生 :待测物 / 标记配体双结合首先在检测中产生 (第一复合物), 待测物 / 标记配体 / 固化配体三结合出现在检测中 (第二复合物)。

[0033] 11、液体交流, 是指一种彼此接触但不加成的, 允许流体由一个通道流向另一通道的结构。

[0034] 12、化验, 是指使用测试条可以检测待测物的数种不同类型的检测模式。例如, 在夹心免疫测定法中, 当样本中目标待测物存在时, 它就与标记的示踪物结合并移动到测试条 (含有吸水膜) 指示区上, 形成第一复合物。指示物是一种能与目标待测物结合, 也能与标记物结合的分子, 标记物可以是金属标记物, 最好是胶体金。

[0035] 13、捕获带 (或捕获位点), 是指至少含有一个待测物结合试剂的色谱分析测试条上的区域或带。待测物结合试剂通常被固定在区或带上, 与可检测的试剂反应后, 在区或带上生成可测的结果, 能够反映样品中待测物含量或其存在的情况。“捕获带”可能是由一个以上能够捕获多个样本的捕获区组成, 在此情况下, 一个以上的待测物结合剂可以被使用。例如, 在本发明范围内, 两个检测的组合被认为是一个检测组, 可同时检测丙型肝炎病毒 (HCV) 和人类免疫缺陷病毒 (HIV), 或者同时检测乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 和梅毒螺旋体 (TP) 的抗体。还有其他的组合是可行的, 且在本发明范围内。

[0036] 14、结合物和检测试剂, 在此可与结合了检测试剂如 :显色剂、荧光剂、酶或化学发光剂的抗原或抗体互换。在本发明的实践中, “结合物”和“检测试剂”特异地结合要确定的待测物或固定在捕获带上的捕获物。在捕获带上, “结合物”和“检测试剂”产生可定量测量的反映当前待测物含量的值。正如下文所述, 捕获带上直接定量测量的密度不一定能反映结合在捕获带上当前待测物的数量, 但是发光值 (RLU) 所测量的带强度却能反映捕获带中当前待测物的含量。

[0037] 15、在此“标准带”包括固定在测试条校准区的校准试剂。校准试剂特异地与校准结合试剂结合而形成校准结合对。本发明中包含两个校准带。含有校准结合对的优点是它们可起到内部校准的作用, 即校准剂可能将捕获带中当前待测物的含量计算在内。校准剂可能用于校准测试条的变异性。其中一个可被指定为高校准 (HC), 另一个可被指定为低校准 (LC)。除此之外, HC 和 LC 的密度可用于确定标准品线。标准品线通过校准剂的 RLU 值可以生成一个回归方程, 用此来描绘两个变量之间的关系, 从而应用于每个定量检测实验。虽然, 常规的校准剂仍然在使用, 但是总体上人们还是愿意使用样本中不存在的或无免疫交叉反应的校准复合物, 如 2, 4- 二硝基苯代牛血清清蛋白 (BSA-DNP) 可从分子探针购进 (Eugene, OR, cat#A-23018) 并作为校准试剂来使用。2, 4- 二硝基苯酚 (DNP) 是人体内不存

在的小分子但可以作为半抗原,半抗原是指当其与大分子蛋白质载体偶联,或注射到能产生抗体的哺乳动物如大鼠、小鼠、兔子、牛、马、绵羊或山羊体内时,产生免疫原性的物质。低效校准区固化配体以牛甲状腺球蛋白抗体(BTG)为例;高校准区以羊抗兔蛋白抗体为例。与固化配体结合的结合物是BTG金抗原和兔IgG金抗原。

[0038] 如图1所示,本发明生物体液样本定量检测装置,包括设置在一盒体内的测试条,还包括颜色强度数据的存储器及颜色强度数据的读取器。

[0039] 如图3所示,所述测试条的底层为一不干胶基片1,所述不干胶基片1上设置有具有充足孔率的多孔测试主膜6,能让包含待测物及其复合物的检验物质通过毛细作用移到该膜上。常用的所述测试主膜6有多孔硝酸纤维、多孔聚丙烯或纸薄膜,所述测试主膜6最好采用包被硝酸纤维素膜,这些薄膜在技术上广为人知。

[0040] 所述测试主膜6上具有一高标准带HC、一低标准带LC和一测试带T,所述高标准带HC和低标准带LC中具有校准试剂,所述测试带T上具有固定配体,即:在检测带T区域,测试主膜上包含能与待测物结合的固化配体,并能更好的以带的形式贯穿测试主膜,就像在高标准带HC和低标准带LC上的校准试剂穿过测试主膜形成标准带一样。用于测试带区域和标准带区域的固化配体是不同的。标准带上固定已知量的校准试剂用于确定标准曲线,从而确定待测物的数量。测试主膜上的配体结合后,剩余的活性位点被封闭,从而允许待测物及其复合物、标记配体及其复合物自由地通过测试条。

[0041] 本发明中的测试条多孔测试主膜6的上游,还包含一个第二膜,所述第二膜包括自下而上设置的至少两层无活性且具有多孔的膜5及一过滤膜4,所述无活性且具有多孔的膜5不含能与通过膜的配体结合的部位,除此之外还包含用于检测膜上流体交流的固化配体带。该膜5采用胶体金包被玻璃纤维膜,该膜更可能由散的玻璃纤维或聚丙烯制成,同时具有充足的孔隙,允许待测物及其复合物、标记配体靠毛细作用而流动。所述第二膜的顶层为一过滤膜4,该过滤层4采用玻璃纤维膜,该过滤膜适用于从样本组分中将待测物分离出来,样本中的其他组分可能会干扰对待测物的检验。因此,在检测血液时红细胞或白细胞可以从包含待测物的血清中分离出来。第二膜因此包含一个样本应用位点和一个标记配体位点,应用位点的下游和测试膜接触点的上游,在夹心反应中与待测物反应,或在竞争反应中与检测区结合配体反应,以及标准带中复杂的标记配体与校正配体间的反应。标记试剂被吸附在该膜的上游,当它与液体样本接触时会从膜上流走,在与分析物反应条件下形成复合物从而能由上游膜继续流向测试膜。

[0042] 测试条中位于测试主膜6的下游还包含第三膜2,该第三膜2为一吸附垫,该第三膜2与液体接触,用于在测试主膜6的下游尽头能吸附已经通过测试膜的液体样本,也作为驱动力,通过毛细作用促使液体样本流过检测膜。这样的吸附垫最好是用高效的吸附材料来做,如:能够吸附样本同时能像测试条上添加任何缓冲液的纸张。

[0043] 如图2所示,所述箱体包括盒盖,所述盒盖上设置有两个加样孔S1、S2和一视窗W,所述两个加样孔S1、S2的位置分别与盒内第二膜上样本应用位点和标记配体位点对正;所述视窗W与盒体内测试主膜6上高标准带HC、低标准带LC和测试带T所限定的区域一致。

[0044] 如图1所示,本发明检测装置中的存储器用于存储高标准带HC、低标准带LC和测试带T中待测生物体液样本所产生的颜色强度,所述存储器中有测量颜色强度的发光值与待测物浓度组成的关联式;所述存储器为电磁卡或RFID卡;所述读取器为光学读卡器,所

述光学读卡器用于分别给出生物体液样本中所有分析物的浓度值。

[0045] 如图 4 所示,利用本发明检测装置进行检测基本上包括如下步骤:

[0046] 步骤一、用移液管向检测装置盒盖上的一加样孔内滴加一定量的包含可疑待测物的生物体液样本;通常加样量为 10 到 100 微升。

[0047] 步骤二、当测试条被装在一个盒体内时,盒体上将提供样本孔用于加样。所加样本被位于测试主膜上游的第二膜吸附,并以毛细作用从第二膜流向测试主膜;在此过程中,样本流经标记结合配体沉积的位于上游的第二膜区域。除了可与待测物结合的标记配体外,还会有已知量的高和低校准配体在该上游的第二膜上。

[0048] 如果样本为全血,该上游的第二膜还能作为过滤装置除去红细胞和白细胞,只让血清流过。加入缓冲液可以促进样本在测试条上的流动。缓冲液的加样量通常为样本量的 2 到 5 倍之间。合适的缓冲液包括任何制药可被接受的水的缓冲液,它不会和测试样本及控制配体反应。一般磷酸缓冲液可以是磷酸一或二钠盐,商业上可得到的为基础,其它的如柠檬酸缓冲液和林格氏液应用也很广泛。

[0049] 步骤三、与测试主膜接触,样本就与标记配位体在测试带和标准带上作用。本发明的最适标记物是能够在那些检测带和标准带中能产生颜色复合物的物质。虽然酶联配体或乳胶结合配体也可产生有色产物,配体利用毛细流原理用于定量检测上,但是构成配体最好的显色剂是金结合物,可以结合待测物和校准剂。

[0050] 步骤四、本发明的定量法是基于待测物样本的显色强度和标准带中校准剂的显色强度比较而得到结果的。因此测试样本中待测物含量越高,与标记配体结合的分析物就越多,与测试区中固定配体结合的标记配体/待测物复合物量就越高。随着样本中分析物含量增加,显色强度就随之增加。然而为了精确计算待测物的实际浓度,其它因素而不是待测物浓度必须被排除在任何计算结果之内。

[0051] 本发明的测试条目的是使用标准带中的校准试剂来提供一种精确的定量测定方法。为了更高的精确度,本发明在测试膜的测试区之前和之后的分开的标准区上使用两种校准试剂。由于一定量的校准试剂被固定在标准区上并且过量的校准标记结合物都沉积在上游带上,在给定的时间内就会在标准带上生成同样强度的颜色,适用于用同一种方法做的不同的测试条。标准曲线使用发光值可以获得每一个高校准和低校准区,为分析物的定量测定提供依据。一般说来,任何常规的校准试剂都能使用,首选的校准试剂是样品中不存在的或不与样品中复合物发生免疫交叉反应的试剂,如 2,4-二硝基苯代牛血清白蛋白(BSA-DNP),可从分子探针购进(Eugene,OR,cat#A-23018)并作为校准试剂来使用。2,4-二硝基苯酚(DNP)是人体内不存在的小分子但可以作为半抗原,半抗原是指当其与大分子蛋白质载体偶联,或注射到能产生抗体的哺乳动物如大鼠、小鼠、兔子、牛、马、绵羊或山羊体内时,产生免疫原性的物质。低效校准区固化配体以牛甲状腺球蛋白抗体(BTG)为例;高校准区以羊抗兔蛋白抗体为例。与固化配体结合的结合物是 BTG 金抗原和兔 IgG 金抗原。

[0052] 为了测定待测物的含量,有必要研究测试区的颜色强度与样品中待测物浓度之间的关系。这种关系可用曲线来描绘,通过准备一个高浓度的待测物溶液然后不断稀释,并测定颜色强度的变化可以获得。显然,此曲线在不同时间段内也是不同的。就测量样本中待测物含量来说,这些曲线与通过已知浓度的校准试剂获得的标准曲线之间是相互关联的。因而每个未知样品的测试都可获得三个不同的颜色强度。标准带的显色强度与标准浓度曲线

是有关联的,适用于样本中待测物及其数值的测试和计算。为了验证浓度标准值与两次曝光时间有关,以获得理想的发光值,标准浓度值和反射单位中标记反应相关,来对样品中待测物浓度进行验证。

[0053] 本发明定量检测的一种简化版本是,标准带上固定已知浓度的待测物作为校准试剂是可以做到的。这种情况下,只需要一种过量的单一标记配体去移动地沉积在接受样本的上游膜上。一个含有待测物的样品可分散移动的标记结合配体并允许待测物与配体反应而形成复合物。复合物和过量配体通过毛细作用被带到测试膜上,此处待测物结合标记配体复合物与固化抗体反应并被捕获而发生标记反应,常为颜色形式的反应。过量的标记配体在标准区与已知量的固化待测物反应而给出一个标准颜色强度反应。在对待测物浓度和标准带中校准剂的预先设定的颜色响应的基础上,样本中分析物的浓度可被确定。

[0054] 步骤五、虽然标准带和浓度计算的必要校正可以通过手动来完成,但现有技术中的商用设备可以测量测试带和标准带的颜色强度。标准带和测试带中待测物所产生的颜色强度可以一同存储到一存储器(如电磁卡或RFID卡)中。当电磁卡或RFID卡插入到用于商业上的光学读卡器,如Kaiwood Technology公司生产的读卡器,读卡器就会分别给出样本中所有任何分析物的浓度值。

[0055] 步骤六、根据待测生物体液样本浓度标准品带的光反射强度绘制标准品曲线。

[0056] 随着待测物定性检测技术的发展,待测物若是抗原,相应的复合物就是抗体;若待测物是抗体,相应的复合物就是抗原,这样标记结合物才能与待测物结合。例如用梯度化验测定血样中乙型肝炎表面抗原(HBsAg),捕获带中含有固定在检测带测试膜上的HbsAg-抗体。

[0057] 合适的待测物不仅限于抗原、抗体、激素、成瘾性药物、细胞蛋白质、DNA、心肌标志物、肿瘤或癌症标志物、自身免疫疾病标志物或任何能够产生抗体的大分子物质。待测物如为抗原,抗原可以是缔合了传染因子的抗原。传染因子可以是病毒、细菌、真菌或朊病毒。当传染因子是病毒时,病毒可以是HIV、肝炎病毒A、B、C、D、单一疱疹病毒、巨细胞病毒、乳头状瘤病毒、埃博拉病毒、SARS病毒、鼻病毒和牛痘病毒等病毒,且不仅限于这些病毒。当传染因子是细菌时,它可以是革兰氏阳性或革兰氏阴性菌。这些细菌可以是炭疽杆菌、大肠杆菌、幽门螺杆菌、淋病双球菌、沙门氏菌属和志贺氏菌属的种群,且不仅限于这些细菌。当传染因子是真菌时,则可以是Mycosporum菌类或曲霉菌类,且也不仅限于这些真菌。

[0058] 待测物如为激素,则可以从以下典型类群中筛选:人绒毛膜促性腺激素、甲状腺素、促甲状腺素、胰高血糖素、胰岛素、松弛素、促黄体生成素、促黑激素、生长激素、促卵泡生成素、胃泌素、缓激肽、抗利尿激素以及其它释放因子,然而其它生理上或病理上的激素也都可作为待测物。

[0059] 待测物若为肿瘤或癌症标志物,则可以从以下典型类群中筛选:前列腺特异性抗原(PSA)、癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白,其它癌症或肿瘤标志物也可以作为待测物。

[0060] 待测物若为心肌标志物,则可以从以下典型类群中筛选:肌钙蛋白I、肌钙蛋白T、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌红蛋白、C反应蛋白(CRP)、脂肪酸结合蛋白(FABP)、糖原磷酸化同工酶(GPBB)、B型尿肽(BNP)、前BNP等,其它心肌标志物也可作为分析物。

[0061] 本发明有很多例子,下例仅作有限说明。

[0062] 测试条上的一个多孔硝化纤维膜作为测试主膜,足够的人前列腺特异性抗原

(PSA) 固定在两个标准带（高标准带 HC 和低标准带 LC）上，当与金标记的 PSA 单克隆特异性抗体、相应浓度分别为 1 和 10ng/mL 混合时，就会产生相应的颜色强度。此外，PSA 单克隆抗体也会沉积在硝化纤维膜的测试带 T 上。标准带设计为样本首先与能显示颜色强度的低标准带 LC 接触，这条低标准带 LC 伴随有相当于 1ng/mL PSA 抗原的金标结合物，紧接着为高标准带 HC，能与等量为 10ng/mL 的 PSA 抗原结合。标准带上沉积的抗原和抗体允许与硝化纤维膜上的抗原决定簇反应并被永久固定在测试膜的标准带和测试带上。然后剩余的抗原决定簇使用标准技术进行封闭。对于特定的测试条，待测物与反应时间之间产生的颜色强度相关性被存储到存储卡上。

[0063] 硝化纤维膜（测试主膜）与非纺织的玻璃纤维膜（即位于测试主膜上游的第二膜）通过流体连接，在测试主膜上用已知技术沉积着抗体来结合 PSA 抗原来作为金标记。被分析的样品加在玻璃纤维膜的上游，下游则沉积着标记结合物。测试条化验还包括一个测试膜末端的样品吸收垫与下游通过流体相连接。

[0064] 通过盒盖上的加样孔将一滴大约 30 微升的怀疑含有 PSA 的血样滴在玻璃纤维膜上游的加样位点，紧随着加一滴大约 40 微升的磷酸缓冲液。玻璃纤维膜要足够厚以过滤红细胞和白细胞，但血清可以通过。血清与缓冲液以毛细作用通过上游膜到达标记结合物，金标抗体结合物重新分配并与样品中分析物形成复合物。缓冲液稀释的血清通过玻璃纤维膜到达多孔的硝化纤维膜，继以毛细作用通过整个硝化纤维膜。

[0065] 含待测物的金标复合物被沉积在测试带 T 上的 PSA 抗体捕获并显示微红色，颜色强度对应样品中相应的待测物浓度。过量的金结合物也可以被高和低标准带 LC 捕获，标准带上包含足够的校准试剂来捕获等量于 1 或 10ng/mL 的待测物。样品中若存在 PSA，则可以获得三条不同颜色强度的带。在通过测试带 T 和标准带 C 后，剩余的缓冲样品通过硝化纤维膜之后到达吸收垫并被储存在那儿。

[0066] 将含有颜色条（测试条）的小盒子插入带有存储卡的读卡器内，存储卡中有测量颜色强度的发光值与待测物浓度组成的关联式。使用的 CHR100 读卡器由 Kaiwood Industries 制造，它使用存储卡可将光强度转化为浓度值。光强度的测量在加样后 10 和 15 分钟后进行测量，如下所示：

[0067] 10 分钟测试结果：

[0068]

待测物	PSA 浓度	RLU
高校准	10ng/ml	10
低校准	1ng/ml	1
样品	X	4.04

[0069] 根据两点标准曲线，读卡器显示样品中 PSA 浓度为 4ng/mL。

[0070] 15 分钟测试结果：

[0071]

待测物	PSA 浓度	RLU
高校准	10ng/ml	23.9
低校准	1ng/ml	10.3
样品	X	19.49

[0072] 根据两点标准曲线,读卡器显示样品中 PSA 浓度为 4ng/mL。

[0073] 尽管上面结合图对本发明进行了描述,但是本发明并不局限于上述的具体实施方式,上述的具体实施方式仅仅是示意性的,而不是限制性的,本领域的普通技术人员在本发明的启示下,在不脱离本发明宗旨的情况下,还可以作出很多变形,这些均属于本发明的保护之内。

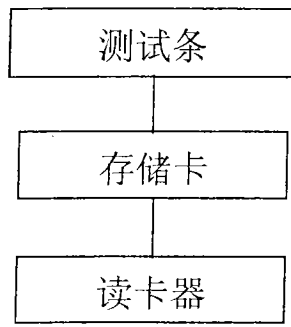


图 1

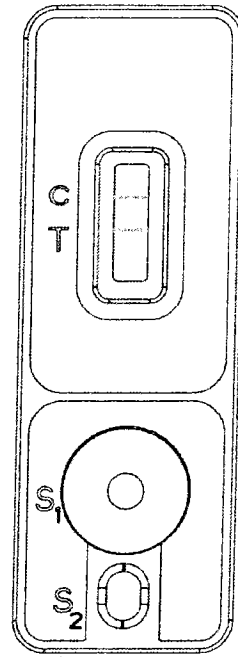


图 2

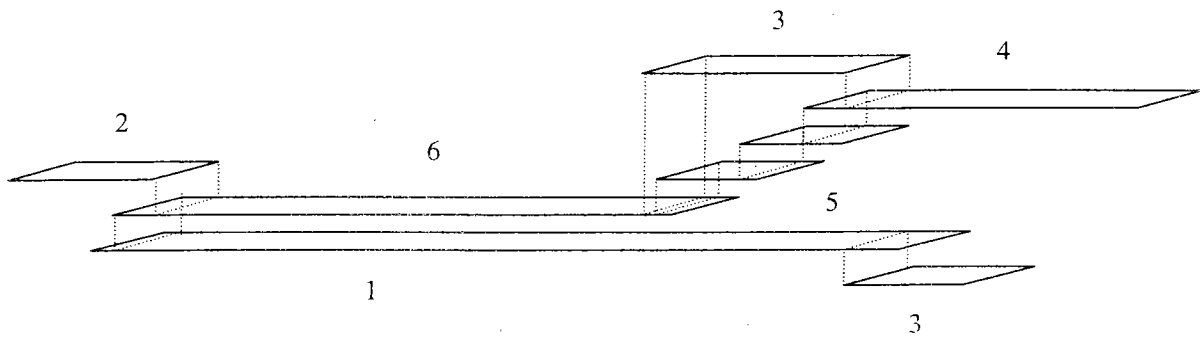


图 3

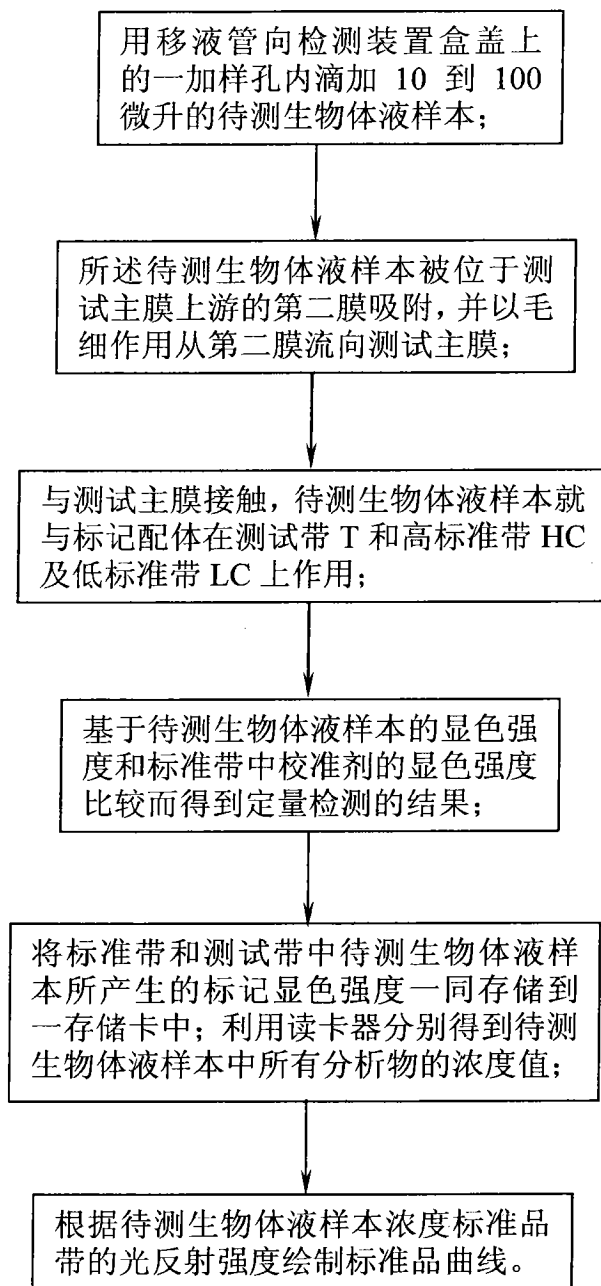


图 4

专利名称(译)	生物体液样本定量检测装置及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101839908A</a>	公开(公告)日	2010-09-22
申请号	CN201010196737.7	申请日	2010-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	李锦波		
申请(专利权)人(译)	李金波		
当前申请(专利权)人(译)	李金波		
[标]发明人	李金波		
发明人	李金波		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/52		
代理人(译)	李素兰		
其他公开文献	CN101839908B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种生物体液样本定量检测装置，包括设置在一盒体内的测试条，颜色强度数据的存储器及颜色强度数据的读取器；测试条的底层为一基片，基片上设置有具有多孔的测试主膜；测试主膜的上游设置有第二膜，第二膜上设置有一样本应用位点和一标记配体位点，通过毛细作用促使待测生物体液样本及其复合物、标记配体能流动；测试主膜的下游设置有第三膜，第三膜用于在测试主膜下游的尽头吸附已经通过测试主膜的待测生物体液样本；盒体的盒盖上设置有两个加样孔和一视窗，利用本发明检测装置可以用已知浓度标准品带的光反射强度绘制标准品曲线，从而对生物体液样本进行快速、有效、准确的定量分析。

