

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/558

G01N 33/58 G01N 33/543

A61B 10/00 B01L 3/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02813315.3

[43] 公开日 2004 年 8 月 18 日

[11] 公开号 CN 1522371A

[22] 申请日 2002.4.26 [21] 申请号 02813315.3

[30] 优先权

[32] 2001. 4. 30 [33] NO [31] 20012150

[86] 国际申请 PCT/NO2002/000161 2002.4.26

[87] 国际公布 WO2002/095409 英 2002.11.28

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.30

[71] 申请人 厄灵·森德雷哈根

地址 挪威奥斯陆

[72] 发明人 厄灵·森德雷哈根

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

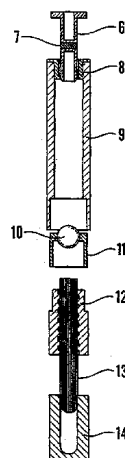
代理人 温宏艳 徐雁漪

权利要求书 6 页 说明书 37 页 附图 3 页

[54] 发明名称 利用着色颗粒的定量非仪器免疫测定及装置

[57] 摘要

用于测定样品中一种或多种分析物的浓度的定量化学分析方法。该方法包括 a) 将样品与一种含有信号提供物的试剂混合于容器中； b) 将上述容器与一种流体输送器连接； c) 使流体输送器与流体接收器接触。流体接收物含有对分析物具有特异性结合能力的固定化试剂。将流体接收物的图案或面积用作为测量样品中分析物浓度的量度。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其特征在于，将含有一种或多种分析物的样品与一种装在容器中的试剂混合，其中的试剂含有信号提供物，由此提供一种混合物，在
5 将上述容器与流体输送机连接后，该混合物被一种装在流体输送机中的流体输送机所吸收，并同时或随后地使流体输送机与包含流体接收物的流体接收器接触，该流体接收物包含具有针对一种或多种分析物的特异性结合能力的固定化试剂，或固定化分析物分子或其类似物或衍生物或片段，其中的混合物被输出到上述另一流体接收器中多孔的
10 流体接收物中，并产生一种图案，其中的图案或图案面积或图案组成部分的面积将用作为测量样品中一种或多种分析物浓度的量度。

2. 根据权利要求 1 的用于测定试样中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其特征在于以下步骤：

将样品与试剂混合，例如一种装在容器中的含有信号提供物的流体
15 试剂；

将一种包含流体输送物的流体输送机装入上述容器中，从而使上述流体输送机与装在容器中的上述混合物接触；

在实施上述化学分析的过程中，使流体输送机中的上述流体输送机一方面与试剂和试样的混合物，另一方面与另一流体接收器中多孔的流体接收物同时接触，其中所述的流体输送机中的流体输送机不是固定地与流体接收器中多孔的流体接收物持久接触，而是将其作为
20 实施该方法的一部分来使其接触，并且其中的上述另一流体接收器中多孔的流体接收物包含具有针对上述一种或多种分析物的特异性结合亲和力的固定化试剂，或上述固定化试剂由固定化分析物分子或其类似物或衍生物或片段组成；
25

由此可将上述混合物经由流体输送机传送，并将其滴入上述另一流体接收器中多孔的流体接收物中，并使其在其中延展开，由上述流体接收器中多孔的流体接收物中信号提供物的分布显现出的图案、图案面积和/或图案组成部分的面积可用作为测量样品中一种或多种分析
30 物浓度的量度。

3. 根据权利要求 1 的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其特征在于，上述容器是一种防漏液容器，并且〔另

一特征是)包含流体输送物的流体输送器被引导而通过一种防漏液阀门进入上述容器中,从而使上述流体输送物与上述容器中的混合物接触。

4. 根据权利要求 1-3 的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法,其特征在于,流体输送器中的流体输送物由一种适合用毛细管力或超压或负压来输送流体的多孔的流体输送物组成。

5. 根据权利要求 1-4 中的一项或几项的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法,其特征在于,在流体输送器中包括一种无孔尖头或管型传送器,不是将其固定地与流体接收器持久接触,而是只在进行定量化学分析方法过程中才将其与流体接收器接触。

6. 根据权利要求 1-5 中的一项或几项的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法,其特征在于,用于混合试剂和试样的上述容器是一种带有阀门的密闭容器,上述流体输送器可以在该阀门处与上述混合物接触,所述接触是通过:(如果方便)适宜的是,在上述容器的壁上开个凹槽,凹槽处壁较薄,当输送器以紧密连接的方式通过此处时而屈服,或者(如果方便)将流体输送器和上述容器拧接在一起,(如果方便)适宜的是,容器或输送器上具有一些小透气孔,以这样一种方式成形,即,不管将容器(和/或)与流体输送器维持在任何空间位置,都不会使上述混合物从容器或流体输送器中漏出来。

7. 根据权利要求 1-6 中的一项或几项的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法,其特征在于,用于混合试剂和试样的上述容器带有一个用于输入试样的(阀门)口,或者使用包含试样的第三种装置以及,如果需要,当第三种装置与其它装置连接或拧接在一起时,可作为上述容器的一个组成部分。

8. 根据权利要求 7 的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法,其特征在于,上述第三种装置不是容器的一部分,而是诸如玻璃毛细管等装置。

9. 根据权利要求 1-8 中的一项或几项的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法,其特征在于,上述流体接收器包含对一种或多种分析物、或对完整分析物分子或其类似物或衍生物或

片段具有亲和力的特异性结合分子，这些结合分子或者以固定化形式和/或以干燥形式存在，或者分散在颗粒表面或其中，或者直接分散到上述流体接收器中多孔的流体接收物中，并且在多孔的流体接收物中的分布既可以是均匀的，也可以是不均匀的，但这种分布方式是预先确定的。

10. 根据权利要求 1-9 中的一项或几项的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其特征在于，上述试剂包含信号提供物，这些信号提供物的形式包括着色颗粒、胶体、酶、荧光团或染料，该信号提供物可以与特异性结合分子相连或不相连，也可以与完整分析物分子或其类似物或衍生物或片段相连或不相连。

11. 根据权利要求 1-10 中的一项或几项的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其特征在于，上述试剂包括能够将细胞溶解在试样中的化学物质和/或调节酸度或离子强度的化学物质，或者使任何可能存在的颗粒保持分散的化学物质。

12. 根据权利要求 1-11 中的一项或几项的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其特征在于，上述流体输送器具有能滞留诸如红细胞或白细胞等细胞的孔径大小，但是该孔径又足够大以使上述信号提供物通过。

13. 根据权利要求 1-12 中的一项或几项的一种用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其特征在于，将试样中的血红蛋白用作为信号提供物。

14. 根据权利要求 1-13 中的一项或几项的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其特征在于，通过加入化学物质而对试样进行预处理，或者在与上述试剂混合之前对其进行分离或抽提，或者是，所提供的上述试剂已经与两种或多种不同试剂混合于上述容器中，或者是，将添加的化学物质混合于流体接收器中多孔的流体接收物中，以引起或增大或清除在上述流体接收器中显现的图案或图案面积和/或图案组成部分的面积。

15. 根据权利要求 1-14 中的一项或几项的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其特征在于，利用吸收测定法、反射测定法或荧光测定法，使用基于可见光、紫外光、红外光或近红外光的模拟式仪表或数字式仪表来图示、扫描或测量在上述流体接收

器中显现的图案或图案面积和/或图案组成部分的面积，然后在这些测定基础上确定试样中一种或多种分析物的浓度。

5 16. 根据权利要求 1-15 中的一项或几项的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其特征在于，使用一种防漏容器来混合试剂和试样，并且另一特征在于，流体输送器包含一种多孔的流体输送物，该流体输送物固定地与流体接收器中多孔的流体接收物持久接触。

10 17. 根据权利要求 1-16 中的一项或几项的用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其特征在于，试样是一种生物样品。

15 18. 一种用以实施用于测定试样中一种或多种分析物浓度的方法的装置，其特征在于，包括一种用于将试样与试剂混合的防漏液容器、一种包含流体输送物的流体输送器，以及一种包含流体接收物的流体接收器，将其组装可使流体输送器通过一种防漏液口与上述容器中的内合物接触，以及与包含流体接收物的流体接收器接触。

19. 根据权利要求 18 的装置，其特征在于，流体输送器中的流体输送物由一种适合用毛细管力或超压或负压来输送流体的多孔的流体输送物组成。

20 20. 根据权利要求 18-19 的装置，其特征在于，在流体输送器中包括一种无孔尖头或管型传送器，不是将其固定地与流体接收器持久接触，而是只在进行定量化学分析方法过程中才将其与流体接收器接触。

25 21. 根据权利要求 18-20 的装置，其特征在于，上述防漏液容器具有一个口，上述流体输送器可通过该口与上述试样和试剂的混合物接触，所述接触是通过：适合的是，上述容器在其壁上有个凹槽，凹槽处壁较薄，当输送器以紧密连接的方式通过此处时而屈服，或者是将流体输送器和上述容器拧接在一起，适合的是在容器或输送器上具有一些小透气孔，以这样一种方式成形，即，不管将容器与流体输送器维持在任何空间位置，都不会使上述混合物从容器或流体输送器中漏出来。

30 22. 根据权利要求 18-21 的装置，其特征在于，上述用于混合试剂和试样的容器配备一种用于从样品输送器中输入试样的口，例如一种

玻璃毛细管，或者是，样品输送器作为上述容器的一个组成部分，例如在口处与上述容器连接或拧接在一起的盖子。

23. 根据权利要求 18-22 的装置，其特征在于，上述流体接收器包含对一种或多种分析物、或完整分析物分子或其类似物或衍生物或片段具有亲和力的特异性结合分子，这些结合分子或者以固定化形式和/或以干燥形式存在，或者分散在颗粒表面或其中，或者直接分散到上述流体接收器中多孔的流体接收物中，并且在多孔的流体接收物中的分布既可以是均匀的，也可以是不均匀的，但这种分布方式是预先确定的。

24. 根据权利要求 18-23 的装置，其特征在于，上述容器包含带有信号提供物的试剂，这些信号提供物的形式包括着色颗粒、胶体、酶、荧光团或染料，该信号提供物可以与特异性结合分子相连或不相连，也可以与完整分析物分子或其类似物或衍生物或片段相连或不相连。

25. 根据权利要求 18-24 的装置，其特征在于，上述试剂包括能够将细胞溶解在试样中的化学物质和/或调节酸度或离子强度的化学物质，或者使任何可能存在的颗粒保持分散的化学物质。

26. 根据权利要求 18-25 的装置，其特征在于，上述流体输送器具有能滞留诸如红细胞或白细胞等细胞的孔径大小，但是该孔径又足够大以使上述信号提供物通过。

27. 根据权利要求 18-26 的装置，其特征在于，包括一种带有嵌入式毛细管（7）的塞子（6）、一种环绕塞子的密封套（8）、一种防漏液容器（9）、一种密封该容器（9）底部的口的可动球形物（10），其中的球形物（10）嵌入到阀门座（11）中，该阀门座与芯或毡尖导轨（12）密封装配，其中的芯或毡尖（13）是经密封并可动安装的，其中的毡尖（13）由一种可拆卸的帽（14）所保护。

28. 根据权利要求 18-26 的装置，其特征在于，还包括一种用以测量吸收、反射、荧光或其组合的扫描设备，例如基于可见光、紫外光、红外光、近红外光或其组合的模拟式仪表或数字式仪表；一种用于处理数据的处理器；一种显示设备；以及用于存储数据的设备。

29. 根据权利要求 18-28 的装置，其特征在于，还包括一种带有可动夹的支架，由此可将容器安装在相对于流体接收器来说标准化的位置上，从而只可能进行垂直的受控移动。

30. 根据权利要求 1-17 的方法的应用, 其中对诸如血液、唾液、粘液、粪便、痰和组织等生物样品中一种或多种分析物的浓度进行测定。

5 31. 根据权利要求 1 的方法的应用, 其中的分析物选自: 自身抗体、抗体、腐生物、细菌、其它感染剂、血红蛋白、白蛋白、CRP、U-白蛋白、糖化白蛋白、糖化血红蛋白、铁蛋白、ASAT、ALAT、LDH、肌红蛋白、肌钙蛋白 I、脂肪酸结合蛋白、淀粉酶、HCG、U-HCG、茶碱和抗生素。

10 32. 一种用于实施根据权利要求 1-17 的方法的试剂盒, 其特点在于, 包括根据权利要求 18-31 的装置、用于与试样混合的试剂、用于预处理或分离试样或混合至流体接收器中以清除信号的一些任选的添加试剂。

利用着色颗粒的定量非仪器免疫测定及装置

5 本发明涉及一种用于测定样品中一种或多种分析物浓度的方法、一种用于实施该方法的装置、运用该方法实施特定的分析，以及一种用于实施该方法的试剂盒。

在分析生物化学领域中，迫切需要一些用于对生物流体中的分析物进行快速定性和定量测定的方法，这些方法只需要尽可能少的分析步骤，并且实施该分析的技术人员不需要具备特殊的技能。

10 Johnson & Johnson Corporation 中的 Mochnal & al. of Ortho Diagnostic Systems 于 1986 年提交了一份专利申请，并在后来被授予欧洲专利 0250137B1。该发明提供一种用于对诸如尿液或血液等复杂试样中的分析物（即待测物）进行定量的方法，其特点在于，一种含有固定化结合分子的多孔薄膜片，以及使用了包被于胶体金颗粒上的其它分子，这些胶体金颗粒可与沿多孔薄膜片流动的等分试样接触。薄膜片上滞留有上述胶体金颗粒的部分的长度与试样中分析物分子的浓度成比例。

关于定量分析尿液中黄体化激素的方法描述、关于定量分析尿液中促性腺激素和血液中药用物质茶碱的方法描述都可作为说明这种方法的例子，在这些方法中，由可提供信号的胶体金颗粒在指定的测试薄膜片上产生的条带长度与试样中分析物分子的浓度正好成比例。这些试剂简单、灵敏，并且生产成本低，不需要信号显色剂，不需要特殊的设备，也不需要控制温度。尽管如此，Johnson & Johnson 公司和 Ortho Diagnostic Systems 至今都没有开发基于该技术的商品。

25 EP 0250137B1 中没有提供关于如何实现权利要求 1 的成分 C 的详细描述，也就是说，没有关于如何将流体转移至薄膜片上的详细描述。在该发明第 3 页末尾处指出，上述试剂装在一个容器中，并且使这些试剂与所述的含有固定化结合分子的薄膜片接触。仅在第 5 页第一行中找到关于如何实现权利要求 1 的成分 C 的实例，其中描述到，将上述薄膜片的一端浸入试样与试剂的混合物中。同样地，在实施例 7 的第 10 页第一行中也有将薄膜片浸入 10mm 深的描述。在实施例 3 中，

关于膜的描述除了薄膜片的详尽描述外没有给出更多的细节。因此，仅有的合理解释是不需要任何特殊的转移装置来将该薄膜片浸入试剂/试样混合物中。

当试图将这种浸渍技术用于定量时，该技术存在很多缺陷。一个缺陷是精确制备试剂/试样混合物可能需要训练和/或精确制备混合物的能力。由于要使上述薄膜片悬垂在试剂/试样混合物中，则需要制造一种用于支持薄膜片的装置，或者必须使用试管来支持薄膜片，该试管还能作为装试剂/试样混合物的容器。在这种试管中，液体往往沿薄膜片边缘与沿薄膜片中部的迁移率不同，从而容易形成不整齐的流动前沿。但是，EP 0250137B1 中描述的薄膜片非常适合用于定量分析生物变异相对较小的分析物，或者定量分析具有诸如所谓狭窄治疗宽度的药用物质（在血液中其治疗价值和毒性值差异很小）。

为本发明所知，使用与 EP 0250137B1 的原理相似的任何原理的仅有的商品是 Syva 公司（Later Dade Behring，世界上最大的诊断试剂公司之一）的基于免疫色谱酶的产品，有关描述见美国专利 443504，其中使用了管形容器和狭窄的薄膜片。关于该产品的描述见论文《酶免疫色谱—一种不需要仪器的定量免疫测定法》，发表于 1985 年的 *Clinical Chemistry* vol. 31, 1144-1150。但是，Syva 的产品使用了包括酶底物容器在内的若干试剂容器，并且该方法在操作中非常复杂。根据 Syva 在挪威的销售代表，尽管需求巨大，但由于工业生产的复杂和昂贵，该产品被停止使用。

EP 0250137B1 中描述的薄膜片可用于测量较大范围的浓度（也被称为较大动态测量范围），在该薄膜片的不同部分的每单位面积中含有不同数量的特异性结合分子。但是，该专利持有者从未经销这种薄膜片，并且在技术上和工业上很难实现这种具有高精度的产品。一种较为简单的方法是，在琼脂糖凝胶中利用 Mancini *et al.* 在径向免疫沉淀技术中提出的径向分析技术，*Immunochemistry*, 2: 235-254 (1965)。利用径向迁移可获得非常大的动态测量范围，因为在这种形式中，迁移长度与面积的平方根成正比。因此将半径从 1cm 增加至 3cm 可以使面积增加 9 倍，从而可将其应用于较大的浓度测量范围。

就在 Ortho 和 Sylva 对免疫色谱中面积测量原理的商业开发不太成功时，另一项对薄层免疫色谱主要原理的商业开发却进行地非常成

功，大多数人都可以从妊娠诊断试验中加以了解，有关文献可参阅，例如，Rosenstein & Bloomster 的美国专利 4,855,240 和 May & al. 的 EP 291 194, 1988。该技术的特点在于，将含有或不含有添加试剂的试样滴加到小孔中或滴加到贴在湿润的吸收膜片上的滤纸上，由此可使试样渗入多孔膜并沿多孔膜迁移。移动的液体使预先与信号提供物化学结合的干燥的特异性结合分子溶解，这些结合分子（通常为抗体）继而与来自上述试样的分析物分子结合。沿着迁移带还固定有一些其它的特异性结合分子，固定方式通常是垂直于迁移方向的条带，或诸如十字形等图案。当带有特异性结合分子的分析物分子经过含有固定化结合分子的所述条带或图案，而特异性结合分子连接有信号提供物时，这些信号提供物将在这些条带或图案部位富集。阳性测试结果显示为在特定条带或图案部位产生颜色或荧光。有许多公司生产和销售这种产品。

首先，从世界三家最大的诊断试剂公司中的两家及其产品清单中我们可以看出，这种形式的定性薄层免疫色谱的应用很广泛。美国 Bayer 公司销售的产品有 Clinitek hCG 验尿试纸和 Clinitek Microalbumin 验尿试纸。美国 Abbott 实验室销售的产品有 Fact Plus Pregnancy Test、TestPack hCG Combo、TestPack Chlamydia、TestPack Strep A、TestPack Rotavirus 和 TestPack RSV。至于规模较小但更专业的公司，我们会提到美国的 Nubenco Medical International，该公司销售用于测试人绒毛膜促性腺激素、促黄体生成激素、Chagas、衣原体、霍乱、CK MB、登革热、肌红蛋白、Strep A、乙型肝炎抗原、Tropnin I、血红蛋白便的各种试纸，以及用于测试 Deng 抗体、幽门缠绕杆菌抗体、乙型肝炎抗体、单核细胞增多症抗体、梅毒螺旋体抗体和结核分枝杆菌抗体的试纸，此外，还销售用于检测 α -胎儿蛋白、癌胚抗原和前列腺特异抗原等肿瘤标志的试验试纸。作为过滤材料的专业生产商的美国 Millipore 公司销售用于来自其 OEM 部门的这些测试类型的全套元件（组合试剂盒），即通常所说的 HiFlow 组合试剂盒。英国股票上市公司 Pall Gelman 还发行了用于制造这种产品的指南，即名为《免疫色谱，侧向流动或试验片开发建议》的小册子，该指南还可以从其互联网站点处下载。美国 Acon Laboratories 公司具有巨大的固有产量并销售这些测试类型，特别是针对中国市场，但是

该公司也将生产的测试试纸提供给其它公司以其用户商标转售，即通常所说的 OEM。

此外，还制造出用于测量这些条带或图案亮度的设备，但至今也很难设计出能提供足够精密和精确结果的化学物质和装置。为了克服这些限制，已开发出一些高度精细的技术，其中具有代表性的即 Polito & al. 编著的 US 6136610: 《用于完成侧向流动测定的方法和设备》。从 US 6136610 中可明显看出，要使这种方法用于定量还需要一些更复杂和先进的方法和设备，但是要获得工业上可重复的精密度和精确性是很复杂和昂贵的，所以至今也没有在商业范围内切实可行。

Roche Diagnostics 发展了各种各样的这类色谱学原理，其中利用信号提供物前进到测试段中后的显色强度作为用于测定尿中白蛋白含量的半定量方法。有关描述见 Diabetes care, 第 20 卷, 11 期, pp. 1642-1646。

Erich Cerny 的美国专利 5958790 描述了一种垂直滤膜免疫测定法，该方法的基础是垂直流动的等分样品经过含有特异性结合分子的滤膜，然后再与连接有诸如胶体金等信号提供物的分子结合。在定量实施方案中，通过用反射仪读出光反射强度可以使这种方法运用于商业上，并且该方法需要精确吸取试剂。利用体积校准移液器和反射仪可以使该方法进行非常精密的定量。

Hajizadeh 和 Wiljesuriya 在美国专利 6180417 和 EP1 046 913 A2 中描述了一种具有无孔吸收单元的免疫色谱条，在色谱条上这种吸收单元与吸收物直接接触。Bayer 能否解决限制生产这些类型的工业产品的工业难题还尚待分晓，但非常明显的是，Bayer 只描述了将其装置与定性分析产品结合应用。

既然上述侧向免疫色谱法或垂直免疫色谱法在不使用仪器的情况下不可能完成定量测定，那么 Ortho、其后的 Johnson & Johnson、Syva 以及其后的 Dade Behring 为什么不将其 EP 0250137 B1 和 US 4435504 中描述的侧向薄层色谱法进一步开发成为一些使用上述小孔或粘贴性滤纸条来使试剂能够滴注应用的商品化定量分析产品呢？根据 EP 0250137 B1 的原理，本发明人和许多同事尝试制造出能提供规律的和可再现的迁移图案及面积的小孔或粘贴性滤纸条，但是没有成功。边界效应和接触效应使得在工业规模上不可能产生可重复的溶液。多种

内衬、O型环和各种类型的胶水或粘着剂都没有尝试成功。因此，仍然需要一种工业上可重复的分析方法，其中信号提供物可重复地迁移，并且得到的图案或面积的大小可以被直接用以确定具有较大动态浓度测量范围的试样中一种或多种分析物的浓度，该方法还必须适合由没有受过专门实验训练的人员来完成。

因此，本发明的一个目的是，提供一种用于测定样品中一种或多种分析物浓度的方法、一种用于实施该方法的装置、运用该方法实施特定的分析，以及提供一种用于实施该方法的试剂盒。本发明已达到这些目的，并通过附属权利要求加以描述。

本发明涉及一种用于测定样品中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，将其中含有一种或多种分析物的样品与一种装在容器中的试剂混合，其中的试剂含有信号提供物，由此提供一种混合物，在将上述容器与流体输送器连接后，该混合物被一种装在流体输送器中的流体输送物所吸收，并同时或随后地使流体输送器与包含流体接收物的流体接收器接触，该流体接收物包含具有针对一种或多种分析物的特异性结合能力的固定化试剂，或固定化分析物分子或其类似物或衍生物或片段，其中的混合物被输出到上述另一流体接收器中多孔的流体接收物中，并产生一种图案，其中的图案或图案面积或图案组成部分的面积将用作为度量样品中一种或多种分析物浓度的量度。

更具体地说，本发明涉及一种用于测定试样中一种或多种分析物浓度的定量化学分析方法，其中的样品与诸如装在容器中的含有信号提供物的流体试剂混合；

将含有流体输送物的流体输送器装入上述容器中，从而使上述流体输送物与上述容器中的混合物接触；

在实施上述化学分析方法的过程中，使流体输送器中的上述流体输送物一方面与试剂和试样的混合物，另一方面与另一流体接收器中多孔的流体接收物同时接触，其中所述的流体输送器中的流体输送物不是固定地与流体接收器中多孔的流体接收物持久接触，而是将其作为实施该方法的一部分来使其接触，并且其中的上述另一流体接收器中多孔的流体接收物包含具有针对上述一种或多种分析物的特异性结合亲和力的固定化试剂，或上述固定化试剂由固定化分析物分子或其类似物或衍生物或片段组成，由此可将上述混合物经由流体输送器传

送，并将其滴入上述另一流体接收器中多孔的流体接收物中，并使其在其中延展开，由上述流体接收器中多孔的流体接收物中信号提供物的分布显现出的图案、图案面积和/或图案组成部分的面积可用作为度量样品中一种或多种分析物浓度的量度。

5 建立上述流体输送器中的流体输送物一方面与上述容器中试剂和试样的混合物之间的接触，另一方面与上述另一流体接收器中多孔的流体接收物之间的接触可包括同时接触，或者先与试剂和试样的混合物接触，或者是先与装在上述另一流体接收器中多孔的流体接收物接触。

10 本发明的一项特别优选的实施方案的特点在于，上述容器是一种防漏液容器，并且另一特征在于包含流体输送物的流体输送器被引导而通过一种防漏液阀门进入上述容器中，从而使上述流体输送物与装在上述容器中的混合物接触。

此外，本发明的特点还有，流体输送器中的流体输送物可由一种
15 适合用毛细管力或超压或负压来运送液体的多孔的流体输送物组成。

本发明的另一实施方案的特点在于，在流体输送器中包括一种无孔尖头或管型传送器，不是将其固定地与流体接收器持久接触，而是只在进行定量化学分析方法过程中将其与流体接收器接触。

20 本发明方法的另一特征在于，用于混合试剂和试样的上述容器是一种带有阀门的密闭容器，上述流体输送器可以在该阀门处与上述混合物接触，所述接触是通过：（如果方便）适宜的是，在上述容器的壁上开个凹槽，凹槽处壁较薄，当输送器以紧密连接的方式通过此处时而屈服（yield），或者（如果方便）将流体输送器和上述容器拧接在一起，（如果方便）适宜的是，容器或输送器上具有一些小透气孔，
25 以这样一种方式成形，即，不管将容器（和/或）与流体输送器维持在任何空间位置，都不会使上述混合物从容器或流体输送器中漏出来。

30 本发明的另一特征在于，上述用于混合试剂和试样的容器可以配备一种用于输入试样的阀门，或者使用包含试样的第三种装置以及，如果需要，当第三种装置与其它装置连接或拧接在一起时，可作为上述容器的一个组成部分。此外，上述第三种装置也可以不是容器的一部分，而可以是诸如玻璃毛细管等装置。

本发明的另一特征在于，上述流体接收器包含对一种或多种分析物、或对完整分析物分子或其类似物或衍生物或片段具有亲和力的特异性结合分子，这些结合分子或者以固定化形式和/或以干燥形式存在，或者分散在颗粒表面或其中，或者直接分散到上述流体接收器中多孔的流体接收物中，并且在多孔的流体接收物中的分布既可以是均匀的，也可以是不均匀的，但这种分布方式是预先确定的。

本发明的另一特征在于，上述试剂可以包含信号提供物，这些信号提供物的形式包括着色颗粒、胶体、酶、荧光团或染料，该信号提供物可以与特异性结合分子相连或不相连，也可以与完整分析物分子或其类似物或衍生物或片段相连或不相连。

本发明的另一特征在于，上述试剂可以包括将细胞溶解在试样中的化学物质和/或调节酸度或离子强度的化学物质，或者使任何可能存在的颗粒保持分散的化学物质。

此外，本发明的特点还有，上述流体输送器具有能滞留诸如红细胞或白细胞等细胞的孔径大小，但是该孔径又足够大以使上述信号提供物通过。

本发明的另一特征在于，可以使用试样中的血红蛋白作为信号提供物。

本发明的另一特征在于，可以通过加入化学物质而对试样进行预处理，或者在与上述试剂混合之前对其进行分离或抽提，或者，所提供的上述试剂已经与两种或多种不同试剂混合于上述容器中，或者，将添加的化学物质混合于流体接收器中多孔的流体接收物中，以引起或增大或清除在上述流体接收器中显现的图案或图案面积和/或图案组成部分的面积。

本发明的特点是，利用吸收测定法、反射测定法或荧光测定法，使用基于可见光、紫外光、红外光或近红外光的模拟式仪表或数字式仪表来图示、扫描或测量在上述流体接收器中显现的图案或图案面积和/或图案组成部分的面积，然后在这些测定基础上确定试样中一种或多种分析物的浓度。

此外，本发明的一项独特实施方案的特点在于，使用一种防漏容器来混合试剂和试样，并且另一特征在于，流体输送器包含一种多孔的流体输送物，该流体输送物固定地与流体接收器中多孔的流体接收

物持久接触。

本发明还涉及一种用以实施用于测定试样中一种或多种分析物浓度的方法的装置，包括一种用于将试样与试剂混合的防漏液容器、一种包含流体输送物的流体输送器，以及一种包含流体接收物的流体接收器，将其组装可使流体输送器通过一种防漏液口与上述容器中的内
5 含物接触，以及与包含流体接收物的流体接收器接触。

此外，本发明还涉及一种装置，其中的流体输送器中的流体输送物可由一种适合用毛细管力或超压或负压来运送液体的多孔的流体输送物组成。

10 本发明还涉及一种装置，其中的流体输送器中包括一种无孔尖头或管型传送器，不能将其固定地与流体接收器持久接触，而是只在进行定量化学分析方法过程中将其与流体接收器接触。

根据本发明，在另一项实施方案的装置中，上述防漏液容器具有一个口，上述流体输送器可通过该口与上述试样和试剂的混合物接触，
15 所述接触是通过：适合的是，上述容器在其壁上有个凹槽，凹槽处壁较薄，当输送器以紧密连接的方式通过此处时而屈服，或者是将流体输送器和上述容器拧接在一起，适合的是在容器或输送器上具有一些小透气孔，以这样一种方式成形，即，不管将容器与流体输送器维持在任何空间位置，都不会使上述混合物从容器或流体输送器中漏出
20 来。

此外，根据本发明，上述装置的特点还在于，上述用于混合试剂和试样的容器配备一种用于从样品输送器中输入试样的口，例如一种玻璃毛细管，或者，样品输送器作为上述容器的一个组成部分，例如在口处与上述容器连接或拧接在一起的盖子。

25 根据本发明，上述装置的特点是，上述流体接收器包含对一种或多种分析物、或完整分析物分子或其类似物或衍生物或片段具有亲和力的特异性结合分子，这些结合分子或者以固定化形式和/或以干燥形式存在，或者分散在颗粒表面或其中，或者直接分散到上述流体接收器中多孔的流体接收物中，并且在多孔的流体接收物中的分布既可以是均匀的，也可以是不均匀的，但这种分布方式是预先确定的。
30

此外，根据本发明，上述装置的特点还在于，上述容器包含带有信号提供物的试剂，这些信号提供物的形式包括着色颗粒、胶体、酶、

荧光团或染料，该信号提供物可以与特异性结合分子相连或不相连，也可以与完整分析物分子或其类似物或衍生物或片段相连或不相连。

根据本发明，在另一项实施方案中的装置的特点在于，上述试剂包括能够将细胞溶解在试样中的化学物质和/或调节酸度或离子强度的化学物质，或者使任何可能存在的颗粒保持分散的化学物质。

根据本发明，在另一项实施方案中的装置的特点在于，上述流体输送器具有能滞留诸如红细胞或白细胞等细胞的孔径大小，但是该孔径又足够大以使上述信号提供物通过。

根据本发明，在另一项实施方案中的装置的特点在于，包括一种带有嵌入式毛细管(7)的塞子(6)、一种环绕塞子的密封套(8)、一种防漏液容器(9)、一种密封该容器(9)底部的口的可动球形物(10)，其中的球形物(10)嵌入到阀门座(11)中，该阀门座与芯或毡尖导轨(12)密封装配，其中的芯或毡尖(13)是经密封并可动地安装的，其中的毡尖(13)由一种可拆卸的帽(14)所保护。

根据本发明，在另一项实施方案中的装置的特点在于，还包括一种用以测量吸收、反射、荧光或其组合的扫描设备，例如基于可见光、紫外光、红外光、近红外光或其组合的模拟式仪表或数字式仪表；一种用于处理数据的处理器；一种显示设备；以及用于存储数据的设备。

根据本发明，在另一项实施方案中的装置的特点在于，还包括一种带有可动夹的支架，由此可将容器安装在相对于流体接收器来说标准化的位置上，从而只可能进行垂直的受控移动。

本发明的另一项实施方案涉及上述方法的用途，其中测定了诸如血液、唾液、粘液、粪便、痰和组织等生物样品中一种或多种分析物的浓度。

根据本发明，在上述方法的另一用途中，分析物选自：自身抗体、抗体、腐生物、细菌、其它感染剂、血红蛋白、白蛋白、CRP、U-白蛋白、糖化白蛋白、糖化血红蛋白、铁蛋白、ASAT、ALAT、LDH、肌红蛋白、肌钙蛋白 I、脂肪酸结合蛋白、淀粉酶、HCG、U-HCG、茶碱和抗生素。

此外，本发明还涉及一种用于实施上述方法的试剂盒，包括上述装置、用于与试样混合的试剂、用于预处理或分离试样或混合至流体接收器中以清除信号的一些任选的添加试剂。

下文将结合附图和实施例对本发明进行更详细地描述。

图 1A、B 和 C 图解说明一种用于混合和输送试样-试剂混合物的装置的实施方案以及流体接收器。

图 2 图解说明第二种用于混合和输送试样-试剂混合物的装置的实施方案。

图 3A、B、C、D 和 E 图解说明图 2 所示实施方案的使用。

图 4 图解说明流体接收器的一种实施方案。

本发明提供一种使用一种单独的液体试剂来定量试样或试样原料中一种或多种分析物的方法及其装置。该试剂含有信号提供物，并且与一种容器结合使用，用于将样品 2、9——更迅速的是测试样品的等分试样——与试剂 15 混合，由此提供一种混合物、一种流体输送机 4 和 13、一种含有可吸收输送液的多孔物质 17（即流体接收物）的流体接收器 5 和 16。

根据本发明，还可能制造一种综合装置，其特征可以是类似于一种用于定量测定复杂试样中的分析物的笔状装置。在最优选的实施方案中，其外部形态可类似于一只具有毡尖或纤维尖 4、13 或钢笔尖的毡尖笔或钢笔或圆珠笔，由此可将装于容器的流体通过输送机滴落到由纸或滤料等材料制成的平面基质 5、17 上，例如硝酸纤维素或具有类似性质的更新式的改进型材料。该装置还包括一种带有嵌入式毛细管 7 的塞子 1、6，和一种固定毡尖 4、13 的毡尖导轨 3、12。

依据本发明（即本发明的用途），适用于定量分析的材料是体液或其浸出物，通常是尿液、唾液、血清、血浆、溶血液、抗凝血或全血、脑脊液、体液的浸出物或组分、或者是来自植物界的液体或提取物、或者是天然的液体或悬浮液或其它液态或悬浮态聚集体，例如污水等水性溶液。在本发明中所用的样品——更迅速的是试料的等分试样——与试剂混合于一种容器中。在用取样器将等分试样吸入之后，再将其加入上述容器中，该取样器可以是一种具有预定内体积的小毛细管，由于表面张力而使得试样排出毛细管内的空气，从而装满毛细管。这种毛细管可以是任何适当的形式，例如直线型或螺旋型或在一种装置的内部，该装置还可用作上述容器的塞子，从而可以用该装置将

容器密闭，用这种方法使得容器在试样与试剂混合时以及混合后，都能防漏液。举例来说，可以通过手动或借助仪器来摇晃容器以形成这种混合物，从而使试样掺入试剂中并混合。

用于混合试剂和试样的优选实施方案是一种防漏液容器，但不是必需的。在防漏液的实施方案中，其好处在于，可以握住该容器任何可能的空间位置，而不会使流体混合物漏出来，就像使用笔的情况一样，当创作所需作品时，最好可以握住笔的不同位置。

本发明的另一特征在于，流体输送器装入上述容器中，优选的是通过一种防漏液阀门。在一项优选实施方案中，这种流体输送器可以类似于毡尖笔或圆珠笔或墨汁笔的尖头那样，部分地或完全地包含一种能吸收流体的多孔物，也可以在其它设计样式中采用管状材料或芯或裂缝状装置的形式，例如笔尖或细金属管。因此，可将该试剂容器和上述输送器设计成类似于钢笔或墨汁笔的装置，其中的试剂/试样混合物经由笔尖或管型输送器或优选的为包含一种可吸收水性流体的多孔物的输送器来转移，但是与最常见的笔稍有不同的是，直到试剂与测试样品的等分试样混合之后，输送器才能与试剂接触。举例来说，实现这种设计的方法有，通过在上述容器的一侧壁上开个凹槽，该凹槽处壁较薄，当将流体输送器以紧密连接的方式通过此处时而屈服；或者通过将流体输送器和上述容器拧接在一起；或者通过给流体输送器配备一个被压入上述容器中的中空尖头。

在一种防漏液的实施方案中，为了避免容器中出现能阻碍流体输送的负压，通常需要让空气进入容器中以避免容器中出现负压，如果出现这种情况，当流体通过流体输送器从容器中输出时就会阻碍流体的输送。因此，使用小透气孔是非常有利的。使用小透气孔是很有效的，非常微小或狭窄小透气孔使得流体在表面张力作用下不能漏出，但是其大小又足以使空气分子扩散进容器中。

本发明还使用一种包含流体输送物的流体输送器，该流体输送器被装入到上述容器中，从而使得上述流体输送物与上述容器中的混合物接触。此外，一方面使上述流体输送器中的流体输送物与上述试剂和试样的混合物接触，另一方面使其与另一流体接收器中的流体接收物接触，既可以同时接触，也可以后发生流体接收物与流体输送物的接触。本发明的特点还有，上述流体输送器中的流体输送物不是固定

地与上述另一流体接收器中多孔的流体接收物持久接触，而只是在实施该方法的过程中将其发生这种接触。

本发明的一项特别优选的实施方案的特点在于，使用了一种装在上述流体输送器中的多孔的流体输送物。这种多孔的流体输送物与上述容器中试剂和试样的混合物，以及单独的流体接收器中多孔的流体接收物同时接触。从而将这种流体混合物通过输送器转移到流体接收器中多孔的流体接收物中。通过使用一种不是持久安装在流体接收器上或不与流体接收器中多孔的流体接收物持久接触的流体输送器，可以获得一种工业上可生产的用于进行一种可重复方法的装置，这种可重复方法用于使流体在上述流体接收器中的多孔物中的传输具有适当的和规律的分布图案。因此，上述流体可以在流体接收器中多孔的流体接收物中均匀而规律地展开。图 1-4 中对此进行了图示说明。

图 1a 显示用带有嵌入式毛细管的取样器采集血样，图 1b 显示将试样输入已包含本发明特有的试剂的容器 2 中，图 1c 显示通过流体输送器将试剂与试样的混合物从上述容器 2 中传递到流体接收器 5 中多孔的流体接收物中，并且还显示了在上述流体接收器中多孔的流体接收物中的流体分布图案。因此，根据在 EP 0252137 B1 中描述的原理，可以将信号提供物在流体接收器中多孔的流体接收物中扩散所产生的图案或图案面积或图案组成部分的面积用作为测量试样中一种或多种分析物浓度的量度，但是信号提供物的类型不局限于 EP 0250137 B1 中的描述。

图 2 中描述了另一种装置的实施方案，包括一个带有嵌入式毛细管 7 的塞子 6，例如可容纳 5 μ l 流体的毛细管；一个密封套 8；一个防漏液容器 9；一个将容器 9 的底部的口密封的球形物 10，该球形物嵌入在阀门座 11 中，该阀门座可容纳密封接头中的芯或毡尖导轨 12。在芯或毡尖导轨 12 中，密封并可滑动的接头中有芯或毡尖 13，并且该尖头由一种帽 14 所保护。除芯或毡尖是由一种流体输送物制成外，该装置的所有部分都是用适当的材料制成，例如塑料。

图 3 显示图 2 所示实施方案的使用方法。图 3A 显示一种装满诸如商品化试剂等试剂 15 的装置。流体输送器与试剂 15 不接触，并且用帽 14 保护毡尖 13。在图 3B 中，毛细管 7 装满一种试样，如血液，并且在图 3C 中，将塞子 6 下压，从而使毛细管 7 的内容物与试剂 15 接

触。在图 3D 中，通过摇动或搅动该装置使试剂 15 与试样混合。在图 3E 中，推动流体输送器 13 以挤压球形物 10，从而使球形物 10 移入容器 9 中，并使流体输送器与试样和试剂 15 的混合物建立接触。

图 4 显示一种流体接收器的实施方案，包括由塑料等适当材料制成的圆盘 16，其中装有流体接收物 17。灰色区 18 显示信号提供物扩散到多孔物 17 中所产生的图案。

特别优选的是，流体接收器中多孔的流体接收物是等厚的，其中均匀固定地分布着对上述一种或多种分析物具有特异性结合亲和力的固定化试剂，或者该固定化试剂包含固定化分析物分子或其类似物或衍生物或片段，因为这样可以使试样中分析物的浓度与信号提供物在流体接收器中多孔的流体接收物中形成的分布图案的面积成正比。

为了使本方法获得最大可能的动态测量范围，优选的是上述流体接收器中多孔的流体接收物为圆形，并且将上述流体输送器与上述流体接收器中多孔的流体接收物的中心接触，从而由信号提供物形成环形图案。如果用于混合试剂和试样的容器连同流体输送器都具有笔样设计，这种笔尖通常被置于流体接收器中多孔的流体接收物的中心，从而通过信号提供物可形成圆形图案，并且这些圆形图案可利用简单的方法进行测量。

如果上述试剂包含对分析物分子具有亲和力的固定化特异性结合分子，连接有信号提供物的上述分析物分子就会被固定化结合分子所捕获，并且形成圆形图案，其面积与分析物的浓度成正比，没有结合信号提供物的分析物分子将会迁移到上述流体接收器中多孔的流体接收物的外围。

在本发明所谓的竞争性实施方案中，完整分析物分子或其类似物或衍生物或片段都连接有信号提供物，并且这些分子将与上述流体接收器中的特异性结合分子相结合。在该竞争性实施方案中，可以利用相同温度下小分子的热力学运动比大分子快得多的热力学原理。试样中未与信号提供物结合的分析物分子将会与特异性结合分子发生非常快速的反应，然而，特别是连接有分析物分子的颗粒性信号提供物会比游离分析物分子的反应速度慢得多。因此，该实施方案中的颗粒性信号提供物将会形成外环，而试样中的分析物分子将形成没有信号的内环，优选的是内环的面积与试样中分析物分子的浓度成正比。

在本发明的另一实施方案中，在上述流体接收器的多孔流体接收物中使用了完整抗原或其固定化类似物或衍生物或片段。抗原是指能够与具有对该抗原的亲合力的特异性抗体发生反应的分子。该实施方案可以对试样中存在的特异性抗体进行测定。这些特异性抗体对特异性抗原具有亲合力。这在医学上尤其表现为常说的自身免疫性疾病和传染性疾

5 病，前者的特征在于患者针对其自身体内存在的抗原产生了抗体，后者则是患者针对感染剂产生了抗体。然后，一般是使用结合有信号提供物的竞争抗体，这些抗体通常是以多克隆或单克隆的形式在动物或细胞培养中产生；也可以用重组技术在细胞培养中产生，包括细菌培养；或在植物中产生。此外，还可以使用由包括噬菌体展示在内的组合化学库或生化库产生的抗体片段、类似物或衍生物，或竞争分子。有关这些技术和疾病情况的进一步描述可以在公开的现有的医学和生物化学专业文献中找到。

在本发明的各种实施方案中使用了许多不同的抗体。不优选使用普通的多克隆抗体，因为这些抗体在抗原存在的情况下具有凝集微球体的能力，而当使用单克隆抗体时，则不容易发生这种情况，单克隆抗体通常只与一个抗原决定簇结合。

如果分析物不是一种单体，而是包含具有相同抗原决定簇的若干亚基，那么将带涂层的微球体与能够使分析物分解为单体的试剂结合起来是很有利的。例如，使用诸如 DTPA 和 EDTA 等螯合剂可以将 C-活性蛋白分解为单体，这些螯合剂可与钙离子结合，然后使不同亚基分离。螯合剂的浓度必须比待分析的血样中钙离子和镁离子的浓度高。

此外，如果抗原具有一个以上重复的相同表位，就可能导致颗粒聚集，那么就应该选择另一种只与抗原上不存在多位置的一种表位具有反应性的抗体。

特别优选的是使用成对的单克隆抗体，这些成对的单克隆抗体经测试证明能结合抗原的不同表位而又不干扰其它抗体与抗原的结合，并且不引起颗粒聚集。

为了适应所形成图案的大小，有必要在上述试剂中加入校准竞争物。例如，可以在试剂中加入已知量的不带有信号提供物的特异性结合分子，这些分子可竞争结合试样中的分析物分子。此外，还可以加入已知量的完整分析物分子或其类似物或衍生物或片段，这些分子将

与存在的特异性结合分子反应，并因此影响所形成的图案。

本发明所述方法的基础是通过流体输送器将水性溶液运送至流体接收器内。本发明不局限于一种类型的输送力，但是水性溶液与多孔物接触时所产生的毛细管力将提供一种特别适用于本发明所述方法的输送力。此外，原则上还可以结合真空泵或压力泵来使用气体超压或气体负压（真空），但是一般说来，从实用角度看不太适合。

在上述流体输送器中发挥流体输送功能的物质通常可采用在印度墨汁笔尖或常说的毡尖笔中所使用的材料类型；典型的是——但不局限于——毛毡、海绵（天然的或合成的），但特别优选的是聚乙烯纤维（实心或中空纤维）、聚酯纤维（实心或中空纤维），或其它塑料聚合纤维（实心或中空纤维）。当采用中空纤维时，可以获得特别适用的毛细管效应，而在这些设计样式中，纤维之间可以形成毛细狭缝，因而也可以使用实心纤维。有些材料是胶合在一起的，另一些则是融合在一起或压在一起或模压或浇铸或铸造在一起的。

多孔物或流体接收物既可采用亲水物，也可采用疏水物。亲水物通常可提供良好的虹吸特性，而疏水物通常可提供较好的能固定特异性结合分子的性质。

比防漏液实施方案较不优选的设计样式是使用较大口的用于混合试剂和试样的容器。在该实施方案中还使用了一种流体输送器，但由于该实施方案不是防漏液的，所以流体输送通常可反重力流动，即从上述容器向上输送。在该实施方案中，最具特征的是包括一种含有多孔的流体接收物的输送器，其中的流体接收物能在流体与该物质接触时所产生的毛细管力作用下汲取流体，并且该流体接收物不会持久地与流体接收器中多孔的流体接收物物理接触。既要使该输送器与上述容器中的试剂和试样混合物接触，又要使其与流体接收器中多孔的流体接收物接触，通常是接触该流体接收器的中心以便流体混合物沿径向迁移到多孔的流体接收物中。

因此，本发明可部分采用上文所述的一种不与多孔流体接收物的图案形成位置固定接触或持久接触的独立流体输送器，并且部分采用一种用于混合试剂和测试样品等分试样的防漏液容器。由此可以获得一种受控的流体输送装置，与以前用于笔和书写工具中为了实现受控的书写或绘图一样，但在本发明中是为了形成受控的定量的图案面积

以对分析物分子进行化学定量。在本发明中优选使用这两种元件的组合。

在本发明较不优选的实施方案中，该方法的特征在于，使用一种防漏液容器以混合试剂和试样，并结合上述流体输送器和上述流体接收器共同构成一种含有连续的多孔的流体接收物的连续式装置。

优选的是上述信号提供物由颗粒性材料构成，通常是由金属胶体或聚合树脂构成，也可由乳胶构成，或者由炭黑粒子等碳粒子构成 (M. Lönneberg and J. Crilsson, J. Immun. Meth., 246: (2000), 25-36)。这种着色颗粒在文献中非常常见并为一般专业人员所熟知，并且可以从供应商，例如 Brithsh Biocell, UK 和 Bangs Laboratories, Indiana, USA 处公开获得。此外，这些公司还用物理或化学的方法生产出包被了抗原或抗体或其它结合分子或这些分子的衍生物、或完整分析物分子或其类似物或衍生物或片段的这种颗粒。所生产的聚合性颗粒和荧光颗粒都有各种尺寸和颜色。颗粒的尺寸和颜色强度必须与测量方法所需的灵敏度和容量相适应，还要与上述流体接收器中多孔的流体接收物的孔径相适应。此外，如果使用仪器的情况下，这些颗粒还必须与将要显示结果的或用于直接目测读数的仪器相适应，

小颗粒比大颗粒反应更快，并且每单位质量的小颗粒能够结合更多的结合分子，但是相对于所用的结合分子的数量，较大颗粒可以提供较强的颜色或荧光。

此外，信号提供物还可以包括直接与结合分子连接的荧光染料，但是通常会需要荧光扫描器来显示结果。直接连接于结合分子的染料可以很高的浓度用于分析物，并且利用来自血样本本身的血红蛋白分子是本发明的一项特殊实施方案，此时通常需提供对血红蛋白和分析物分子都具有亲和力的嵌合抗体。此外，酶也能用作为信号提供物，但是在该情况下，上述流体接收器通常必须含有一种包含补充溶液的酶底物，例如，含有一种以着色剂方式形成沉淀的底物。

上述结合分子可以包括单克隆抗体或多克隆抗体或抗原结合片段或其衍生物，也可包括 FAB 或 FAB2 或 FAB'2 片段，或用合成技术或生物技术的组合技术，包括噬菌体展示，所制备的聚合物，例如，具有天然的特异性结合活性的肽结合物或核酸 aptameres 或分子，如结合

珠蛋白或内因子或叶酸结合蛋白。如果在流体接收器中使用了特异性结合分子，并且信号提供物也连接了特异性结合分子，那么必须确定分析物分子能否与特异性结合分子同时结合。

5 本发明所特有的上述试剂还可以有效地包含能够溶解试样中细胞的化学物质，例如去污剂和/或调节 PH、离子强度或保持颗粒——如果需要——分散的缓冲物。

本发明的另一特点在于流体输送器中的上述流体输送物具有能滞留诸如红细胞或白细胞等细胞的孔径大小，但是该孔径又足够大以使上述信号提供物通过。

10 可用本发明方法进行分析的生物试样包括血液、血清、粘液、粪便、痰和组织。

如果需要加强信号提供物和分析物分子之间或分析物分子和流体接收器中的特异性结合物之间的结合强度，就可以同时使用若干类型的结合分子，或者使用具有针对分析物分子的不同部分的特异性的结合分子。

15 在本发明的某些设计样式中，在将试样装入上述容器之前对试样进行稀释或溶血或提取或变性或分离是有好处的。通常，为了避免超出本发明方法的结合量，以很高浓度存在的物质可能需要稀释。其它分析物，例如叶酸或维生素 B12，需要将其经诸如煮沸等方法进行变性，以便使分析物分子的结构暴露。在对低糖型转铁蛋白进行定量之前，通常必须将其与其它同型转铁蛋白分离，而在分析水样前，通常必须将其浓缩或滤膜提取。

20 在本发明较不优选的设计样式中，在用于混合试剂和试样的上述容器中的试剂可以被分成两个组成部分，最主要的原因是如果试剂混合成溶液会导致保存期缩短。举例来说，可以通过在使用前将两个组成部分立即混合来提供这种混合物，方法是，例如——但不局限于——将装于细颈瓶中的一部分试剂放入容器中，并且上述容器是由软塑料制成的，并且通过挤压上述软塑料容器使上述细颈瓶破碎，由此使试剂混合。最后一步操作可在混入试样中之前或之后完成。

30 作为选择，可以将两部分的分隔试剂分别储存在两种容器中，在使用前立即将这两种容器连接或拧接在一起，或者通过在使用前直接将一部分试剂或两部分试剂注入，这种方式或许与墨水被注入或吸入钢

笔一样。此外，如果上述试剂是现成的试剂，那么就可以按用芯使墨水进入笔的方法将其注入容器中或加入芯形式的容器中。另一样式是利用能放入笔样装置中的可替换芯，或工业生产的包含可使用试剂的芯。

5 上述多孔的流体接收物，其构成了整个或部分的流体接收器，可以由不同物质构成。该物质通常由具有相对较大孔径的硝酸纤维素构成，尤其在信号提供物如果是由颗粒性物质组成的情况下。近年来，已经得到更深入开发的物质，例如 Pall Gelman 的 Predator、亲水物和疏水物，以及尼龙、纤维素、其它天然聚合物和合成聚合物的衍生物。
10 这类物质通常可以从英国 Pall Gelman、美国 Millipore、德国 Schleier & Schull，以及许多其它公司得到。尽管具有疏水性的特异性结合分子通常也能够被固定在颗粒上，但是这些颗粒分散在多孔物中，并且由于其大小而固定多孔物中，即不会随流体流动而向前流动。

15 本发明方法的另一特征在于，可以直观地或用仪器显示结果，其方法是，利用吸收测定法、反射测定法或荧光测定法，使用基于可见光、紫外光、红外光或近红外光的模拟式仪表或数字式仪表来成像、扫描或测量在上述流体接收器中显现的图案或图案面积和/或图案组成部分的面积，然后在这些测定基础上确定试样中一种或多种分析物的浓度。正因为可用仪器或直观地显示结果，所以可通过印在流体接受器表面或其上透明物质上的校准标识来对结果显示校正。

本发明的方法尤其适用于分析 i. a 的浓度：

自体抗体，例如抗心磷脂抗体，

抗关节炎相关抗原的抗体，

25 抗 HIV、风疹和其它病毒，以及弓形体病的抗体，

血色素，

CRP，

U-白蛋白，

糖化白蛋白，

30 糖化血色素，

铁蛋白，

ASAT，

ALAT,

LDH,

肌血球素,

肌钙蛋白 I,

5 脂肪酸结合蛋白,

淀粉酶,

HCG,

U-HCG,

10 加上多种药学物质, 例如茶碱和各种抗生素, 以及多种其它分析物。

此外, 本发明还提供应用上述方法所需要的一些装置和试剂, 以及用于完成本发明方法的试剂盒。本发明涉及的装置包括:

一种用于应用本发明涉及的方法的试剂;

15 一种用于使试样, 更方便的是测试样品的等分试样, 与试剂接触的装置;

一种用于混合试样和试剂的容器, 优选的是一种防漏液容器, 更合适的是该容器部分用上述装置构成, 以便于试样与试剂接触;

一种包含多孔流体输送物或无孔物的流体输送器, 为了防漏液, 优选的是在上述容器中与上述试剂和试样的混合物接触;

20 一种包含多孔的流体接收物的流体接收器, 其中所述的装在其它流体接收器中的多孔的流体接收物含有一些具有针对上述一种或多种分析物的特异性结合亲和力, 或者上述试剂包括固定化分析物分子或分析物分子的类似物或衍生物或片段; 上述试剂优选以固定化形式存在, 并且, 如果需要, 上述试剂还包括用于预处理或分离试样或混合至流
25 体接收器以清除信号的一些分离的添加试剂。

最佳方案

30 在实施例 12、13、14 和 17 中描述了用于实施本发明方法的优选方案。

提供以下实施例的目的是用于举例说明, 无论如何都不应被认为

是限制本发明。

实施例 1: 包被有抗人肌红蛋白单克隆抗体的蓝色乳胶颗粒。

5 将 60mg 直径为 $0.117\mu\text{m}$; $\pm 0.017\mu\text{m}$; $\text{COOH} = 164\mu\text{eq/gram}$, 批号为 766 的 Estapor 蓝色羧化微球体 PSI90-21 清洗并对水透析, 然后悬浮于 2ml 水中。将 5mg 抗人肌红蛋白单克隆抗体 7005, 购自芬兰 Medix Biochemica Oy 公司, 对 3ml pH7.2 的 10mM 磷酸盐、15mM NaCl 缓冲液透析。将微球体悬浮液与 10ml pH7.2 的 10mM 磷酸盐、15mM NaCl 缓冲液进行混合。将 2mg 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺, 由美国
10 Sigma 公司提供, 溶解于 2ml 冷的 0.25ml pH = 6.0 的 10mM 磷酸盐、15mM NaCl 缓冲液。经剧烈混合使 $300\mu\text{l}$ 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺溶液与上述含有缓冲剂的微球体悬浮液混合。然后, 在剧烈混合下立即掺入 5ml 含有 5mg 单克隆抗体的溶液。

15 将悬浮液搅拌过夜, 然后在搅拌下掺入 5ml 含有 0.5% 小鼠正常血清的 0.02M 甘氨酸、0.01M 磷酸盐、0.3M NaCl 和 0.1% Tween (由 Sigma 公司提供) 的缓冲液。通过 $40000g$ 离心 20 分钟, 将微球体用含有 0.5% 小鼠正常血清的 0.02M 甘氨酸、0.01M 磷酸盐、0.3M NaCl 和 0.1% Tween
20 20 (由 Sigma 公司提供) 的缓冲液清洗 3 次, 然后重悬在含有 0.5% 小鼠正常血清的 0.02M 甘氨酸、0.01M 磷酸盐、0.3M NaCl 和 0.1% Tween (由 Sigma 公司提供) 的缓冲液使微球体达到预期的 2 w/v 的浓度。用轻微的超声使微球体分散。

根据 (1) 微球体的羧化程度、(2) 微球体表面所需抗体的浓度, 以及 (3) 结合规模, 需要对不同试剂的浓度进行某些调整。

25 体积越大, 所需 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺的浓度通常越高, 实际上, Merck 在其技术注解《与 NH_2 或 COOH 颗粒结合的 B4》(Estapor 颗粒技术注解 2000) 中推荐的 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺浓度更高, 根据本发明人的经验, 该浓度会导致微球体出现一定的过度结合和二聚体化。但是, 这种过度结合可通过将微球体悬
30 浮在更大体积中的方法来补偿, 该方法会导致 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺的消耗量增加。提供着色的功能化微球体的其它公司, 如 Bangs Laboratories Inc., U.S., 都有自己的方法来实现该目的。

根据待测分析物的浓度，优选的是单位重量结合力高的较小颗粒，在其它条件下也可优选单位重量结合力较低的较大微球体。但是，该尺寸必须要明显小于流体接收器的孔径大小，以使其能够在流体接受器中自由迁移。

5 抗体包被的效率取决于所用抗体的 pI。根据经验，最好是所用缓冲液的 pH 比所用单克隆抗体的 pI 高 0.5-0.8 个 pH 单位，但这个限制并不是绝对的。

对于本发明的不同实施方案，微球体表面所需的抗体量也不同。在某种程度上，这可通过在结合过程中调节抗体和微球体的浓度来实现。此外，还可以在结合过程中用非特异性抗体甚至其它蛋白将单克隆抗体稀释。例如，可以用白蛋白或牛 γ 球蛋白进行稀释。但是应注意，表面的 γ 球蛋白或抗体过多会使微球体变粘，从而不能在流体接收器中有效迁移（见下文）。

15 在大量使用已结合抗体的微球体之前，应该检测这些微球体能否在流体接收器中自由迁移，以及能否与流体接收器上的固定化抗原结合。

实施例 2：包被有茶碱类似物抗原的蓝色乳胶颗粒。

20 根据 C.E.Cook & al. 在 Research Communications, Chemical Pathology and Pharmacology, Vol.13, 第 497-505, 1976, 中的方法制备 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤与牛血清白蛋白的结合物。应使用温和的结合反应。通过调节包括 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤在内的反应物的浓度可以调节结合的程度，并且通过本领域熟知的光谱学方法进行监控。这

25 这样一来就可以获得每摩尔牛血清白蛋白结合 3 摩尔 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤的结合程度。作为选择，尽管不太理想，但也可以使用由英国 Immune System 有限公司提供的产品 Theohpylline-8-牛血清白蛋白。

30 利用实施例 1 中描述的方法，将 Estapor 蓝色羧化微球体 PSI90-21 结合到由 Chenucin Inc., California 提供的抗牛血清白蛋白的单克隆抗体上。将浓度为 0.1mg/ml 的 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤与牛

血清白蛋白的结合物和 2mg/ml 的颗粒溶解在实施例 4 中描述的试验溶液中。使悬浮液稳定 10 分钟，然后通过含有 0.25% v/v 小鼠正常血清的试验溶液中以 30,000g 离心来清洗三次，然后再通过轻微超声悬浮于试验溶液中。

5 更好的选择是利用实施例 1 中描述的耦联法直接将 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤与牛血清白蛋白的结合物结合到蓝色乳胶颗粒上。但是，为了确保牛血清白蛋白中不是所有氨基都被封闭，并且确保牛血清白蛋白的等电点没有降低太多，从而防止弱耦联率，就需要预先使 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤以低结合程度结合到牛血清白蛋白上。

在大量使用蛋白包被的微球体之前，应该检验这些微球体能否在流体接收器中自由迁移，以及能否与流体接收器中多孔物上的固定化抗原结合，参见实施例 8。

15 实施例 3: 包被有抗生蛋白链菌素并经单克隆或多克隆抗体生物素化的蓝色乳胶颗粒。

将购自 Merck Eurolab、产品编号为 K1010、平均直径为 185nm 的 Estapor 蓝色羧化微球体 PSI90-21 的悬浮液清洗并透析至含有 15mM NaCl 和 3.5vol.% 颗粒的 10mM 磷酸盐缓冲液，PH = 6.0。将 5mg 抗生蛋白链菌素 (Sigma) 对相同的缓冲溶液透析。

20 将 2mg 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺溶解于 0.25ml 冷的上述含有 15mM NaCl 的 10mM 磷酸盐缓冲液，pH = 6.0，并且在混合下立即向 1.5ml 上述颗粒悬浮液中加入 40 μ l，然后再加入 6ml 上述缓冲溶液并另外包括掺入的 2mg 抗生蛋白链菌素。将悬浮液室温搅拌 2 小时，

25 然后将其搅拌过夜。此后，在搅拌下掺入 5ml 含有 0.5% 的小鼠正常血清的 0.02M 甘氨酸、0.01M 磷酸盐、0.3M NaCl 和 0.1% Tween 20 (由 Sigma 公司提供) 的缓冲液。

30 通过在含有 0.5% 小鼠正常血清的 0.02M 甘氨酸、0.01M 磷酸盐、0.3M NaCl 和 0.1% Tween 20 (由 Sigma 公司提供) 的缓冲液中以 40,000g 离心 20 分钟来清洗微球体三次，然后再将微球体按照所需浓度重悬于含有 0.5% 小鼠正常血清的 0.02M 甘氨酸、0.01M 磷酸盐、0.3M NaCl 和

0.1%Tween 20(由 Sigma 公司提供)的缓冲液中。用轻微超声使微球体分散。

根据(1)微球体的羧化程度、(2)微球体表面所需抗体的浓度,以及(3)结合规模,需要对不同试剂的浓度进行某些调整。

5 体积越大,所需 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺的浓度通常越高,实际上,Merck 在其技术注解《与 NH₂ 或 COOH 颗粒结合的 B4》(Estopor 颗粒技术注解 2000)中推荐的 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺浓度更高,根据本发明人的经验,该浓度会导致微球体出现一定的过度结合和二聚体化。但是,这种情况可通过将微球体悬浮在
10 更大体积中的方法来补偿。该方法会导致 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺的消耗量增加。提供着色的功能化微球体的其它公司,如 Bangs Laboratories Inc., U.S., 都有自己的方法来实现该目的。

根据待测分析物的浓度,优选的是单位重量结合力高的较小颗粒,或者在其它条件下也可优选单位重量结合力较低的较大微球体。但是,
15 该尺寸必须要明显小于流体接收器的孔径大小,以使其能够在流体接受器中自由迁移。

由于亲和素比抗生蛋白链菌素的亲水性弱,所以其通常比抗生蛋白链菌素更优选。尽管结合过程非常相同,但由于亲和素具有高得多的 pI,所以选用较高的 pH。因而可以使用 pH=9.0 的 0.1M 的硼酸盐
20 缓冲液作为结合缓冲液,但是 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺就会水解的非常快,所以通常需要更好的冷却和较高的浓度。

此外,为了将所需抗体生物素化,需要将 1ml 溶液中的 5mg 单克隆抗体对 pH=7.2 的 0.15M 氯化钠、0.1M 磷酸盐缓冲液进行透析。

将购自 Pierce Chemical Company 的 2mg 硫代琥珀酰亚胺基-6-(生物素酰胺)己酸酯溶于 10ml 冷的蒸馏水中,2-8℃,然后将所得的 100μl
25 硫代-NHS-生物素溶液加入 1ml 抗体溶液中,并同时涡旋混合。将试管在冰箱中放置 2 小时。利用大小排阻色谱法,在 30cm 的 Superose6 柱(Amersham Pharmacia Biotech, UK)中用 pH=7.2 的 0.15M 氯化钠、0.1M 磷酸盐缓冲液作为洗脱液,将结合了生物素的抗体与游离生物素分离。使用 UV 监测设备,收集在游离生物素成分前被洗脱的蛋白组分。作为选择,使用排阻大小为 7000 道尔顿的透析膜,例如购
30 自 Pierce Chemical Company 的 cassette Slide-A-lyzer,对相同的

缓冲液进行透析。

通过使用由 N. M. Green 在 *Biochem. J.* 94, 23c-24c, 1965 中介绍的方法, 可以对生物素掺入到抗体中的情况进行监测。上述方法可以使每摩尔抗体带有 0.2 摩尔生物素。

5 使用的抗体可以是小鼠抗体、绵羊抗体、母鸡抗体、绵羊抗体、山羊抗体、人源化抗体, 或者是来自其它物种的抗体, 并且既可以是单克隆来源, 也可以是多克隆来源。大多数情况优选单克隆抗体, 因为当抗原存在时, 多克隆抗体易于聚集, 但是如果对其浓度进行调整, 还是可以使用多克隆抗体的。此外, 还可以使用抗体的免疫活性片段
10 及其肽和类似物, 以及其它具有所需结合特异性的结合物, 但是其后必须对其进行生物素化化学修饰。每个抗体分子上生物素基团的平均数量必须基本上低于 1, 因为多于 1 的生物素基团即使在不存在抗原的情况下也会使微球体聚集。此外, 如果需要较低的活性抗体组分, 可以在生物素化之前通过加入非特异性抗体或甚至其它蛋白来稀释特异性抗体 (但是, 计算生物素化的程度就会变得更困难了)。
15

将生物素化抗体与包被有亲和素或抗生蛋白链菌素的微球体混合, 以获得结合了特异性抗体的微球体。可以根据所加入生物素化抗体的量来调整微球体上结合的抗体量。使用由 N. M. Green 在 *Biochem. J.* 94, 23c-24c, 1965 中介绍的方法, 通过加入过量的生物素化抗体,
20 有可能测量溶液中没有结合到微球体上的游离生物素化抗体。

然后, 通过在含有 0.5% 小鼠正常血清的 0.02M 甘氨酸、0.01M 磷酸盐、0.3M NaCl 和 0.1% Tween 20 (由 Sigma 公司提供) 的缓冲液中以 40,000g 离心 20 分钟来清洗微球体三次, 再将微球体按照所需浓度重悬于含有 0.5% 小鼠正常血清的 0.02M 甘氨酸、0.01M 磷酸盐、0.3M NaCl
25 和 0.1% Tween 20 (由 Sigma 公司提供) 的缓冲液中。用轻微超声使微球体分散。

抗生蛋白链菌素或亲和素涂层没有直接将抗体与微球体结合好, 因为某些双生物素化抗体的存在可能引起颗粒聚集。

在大量使用微球体之前, 应该检验这些微球体能否在流体接收器
30 中自由迁移, 以及能否与流体接收器中固定化的的抗原结合。

实施例 4: 包被有抗人白蛋白抗体的胶体金

将 10ml 含有 1%氯化金的蒸馏水与 1 升沸腾的蒸馏水及 10ml 34mM 的柠檬酸钠一起混合 20 分钟, 调整 pH 值 = 4.2。从而形成胶体金。使悬浮液冷却至室温。加入 1ml 的 1% PEG20000 并混合, 调整 pH = 7.2。
5 使用传统技术, 例如通过测量 540nm 和 600nm 的光密度比来对胶体金颗粒大小进行估算。可以对该方法进行调整以获得平均大小为 30nm 和 50nm 之间的颗粒。所使用的玻璃器具必须是经过硅化的。使用 Slot 和 Geuze 在 Eur. J. Cell. Biol. 38:87-93, 1985 中描述的方法, 用芬兰 Medix Biochemical OY 公司提供的抗人白蛋白单克隆抗体克隆
10 6501 对胶体金颗粒进行标记, 并根据相同方法使标记达到饱和点。然后, 通常, 但不局限于, 将标记的胶体金以 10 μ l/ml 的蛋白浓度悬浮于含有 0.3M 甘露醇和 0.05% PEG20000 的 10mM PH=7.4 的 HEPES 缓冲溶液中。

可以使用其它抗体来代替上述的抗白蛋白抗体, 但可能需要对上述方法进行略微改动。
15

在使用包被的胶体颗粒制品之前, 应该检验这些微球体能否在流体接收器中自由迁移, 以及能否与流体接收器中固定化的的抗原结合。

20 实施例 5: 荧光青色素-5-茶碱结合物

按照 Chemical Pathology and Pharmacology 中的 Research Communications vol.13, p.497-505, 1976 和 Clinical Chemistry. vol.27, page 22-226, 1981 中的描述来合成 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤酞。
25 将二氨基丙醇溶解在无水四氢呋喃中。在另一烧瓶中, 将一半 equiM 量的上述 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤酞溶解在无水四氢呋喃中。边搅拌边将上述 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤酞溶液逐滴加到二氨基丙醇溶液中, 并且使所得溶液在室温下反应过夜。如果想要少消耗活性青色素染料, 可利用本领域技术人员所熟知的传统技术通过 HPLC 色谱对所得加成物进行选择性地纯化(见下文)。
30

然后, 将 6 倍于所用二氨基丙醇的 M 量的由英国 Amersham Pharmacia Biotech 公司提供的 Cy5 Fluorolink 活化青色素染料溶解在无水四氢

咪喃中，并且边搅拌边将其加到上文所述的溶液中。于暗处使所得混合物在室温下反应过夜。通过该方法，可获得 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤与 Cy5 Fluorolink 活化青色素染料以及水溶性的二氨基丙醇间隔物的不纯的加成物储液。用薄层层析法，在硅胶中用 n-丁醇：
5 醋酸:水 = 1:1:1 的混合物纯化带有 Cy5 Fluorolink 的含有水溶性二氨基丙醇间隔物的活化青色素染料的 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤加成物，但是为了获得良好的分离效果，仍然需要根据硅胶板的质量来调整洗脱混合物中 n-丁醇、醋酸和水的体积。使用传统方法洗脱后，将硅胶板干燥并目测和用紫外灯（并且任选地是在平行试验中喷射茚三酮）对其进行检查以确定带有 Cy5 Fluorolink 的 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤加成物的斑点。用剪刀和铲子分离带有 Cy5 Fluorolink 的 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤加成物的硅胶。将分离的硅胶重悬于 50%的醋酸中，由此将带有 Cy5 Fluorolink 的 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤加成物洗脱到溶液中。硅胶处于试管底部。
10 轻轻倒出含有纯化的带有 Cy5 Fluorolink 的 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤加成物的醋酸溶液，在低压下利用蒸发作用去除醋酸。作为选择，对更大的规模而言，可以用本领域技术人员所熟知的传统的 HPLC 分离技术来替代薄层层析。

20 实施例 6: 试验溶液

分析溶液的典型实例是 0.1M 的水性磷酸盐缓冲液，向其中加入终浓度为 0.3M 的 NaCl，另加入终浓度为 0.1%的去污剂 Triton X-100（由美国 Sigma 公司提供），并且通过传统方法用 HCl 或 NaOH 调整 PH 至
25 7.4。然后加入实施例 1-3 中任何一例中的信号形成颗粒，通常来自，但不局限于，0.01-0.1% w/v 的乳胶颗粒，或浓度为每 ml 胶体中含有 1-25 μ g 标记的免疫球蛋白的胶体金。再向溶液中加入来自所用抗体来源的任何物种的 0.25%正常血清。可以用 0.1% w/v 牛 γ 球蛋白来代替小鼠血清，除非其干扰测定，见实施例 8 中的描述。

30

实施例 7: 用于信号提供物的容器和待装入该容器中的包含流体输送物的流体输送器

如图 2 所示, 上述装置的一种实施方案可包括一个带有嵌入式毛细管 7 的塞子 6, 例如可容纳 5 μ l 流体的毛细管, 一个密封套 8, 一个防漏液的容器 9, 一个密封容器 9 的底部的口的球形物 10, 该球形物被封装在阀门座 11 中, 该阀门座可容纳密封接头中的芯或毡尖导轨 12。在芯或毡尖导轨 12 中的密封并可滑动的接头中有芯或毡尖 13, 并且该尖头用帽 14 保护。除芯或毡尖是由一种流体输送物制成外, 该装置的所有部分都是用适当的材料制成, 例如塑料。图 3 所示, 容器 9 中装满了试剂 15。毛细管 7 中装满了一种生物流体样品, 如血液, 肝素化或非肝素化, 该毛细管在本实施方案中可容纳 5 μ l 流体, 但是也可以将其制造成能够容纳其它体积, 将塞子 6 下压进入容器 9 中, 并且通过摇动容器 9 使试样和试剂 15 混合。试样体积是与容器 9 中的试剂体积相适应的。此外, 本发明还包括一种实施方案, 其中的毛细管中装满了肝素化或非肝素化的试样, 该试样随后将被装入容器 9 中。在用塞子 6 将容器封闭之后, 通过充分摇动容器使试样与试剂混合, 并且使流体接收器中的流体接收物 17 与试样-试剂混合物接触的方法可以是以下任何一种:

- 使流体输送物与上述混合物和流体接收物同时接触;
- 使流体输送物先与上述混合物接触, 然后再与流体接收物接触;
- 使流体输送物先与流体接收物接触, 然后再与上述混合物接触。

实施例 8: 包被有抗茶碱抗体的 HiFlow 硝酸纤维素滤料

用本领域技术人员所熟知的传统技术, 例如用硫酸铵沉淀法或使用 Amersham Pharmacia Biotech 的 Protein A 柱, 从英国 Immune System Limited 的绵羊抗茶碱血清中分离 IgG 组分。然后将抗体在 pH=7.2 的 10mM 磷酸盐、15mM 氯化钠缓冲液中进行透析, 并随后将其溶解在含有 2.5%v/v 乙醇的 10mM 醋酸铵溶液中。如果需要低结合能力, 可另外加入诸如清蛋白或酪蛋白等其它蛋白, 这些蛋白会在随后的吸附过程中与特异性抗体竞争。

可以将上述溶液喷射到 Hi-Flow 材料上, 也可将纸片浸泡在上述溶液中。然后, 将纸片在 37 $^{\circ}$ C 干燥两小时。接着在室温下, 在含有 2.5%v/v

乙醇和 0.01%w/v 3-(3-胆酰胺基丙基)二甲氨基-2-羟丙烷(购自美国 Pierce Chemical 公司)的 10mM 醋酸胺溶液中通过浸泡并搅拌来清洗纸片。

根据上述多孔物中所需的结合能力来改变特异性抗体的浓度。为了确定在该实施例中需要的抗体浓度,将含有 50ng 茶碱的 10 μ l 血清样与 2ml 实施例 4 中的含有 0.1%的实施例 2 中描述的蓝色乳胶微球体悬浮物(2mg 微球体)的试验溶液混合。

根据下文确定在 Hi-Flow Plus HF12004 中适宜的抗体浓度:能够使上述混合物迁移到流体接收器中使用的多孔物中。存在于溶液中的茶碱与多孔物中固定化的抗体的反应比其与微球体上结合物的反应快得多,并且封闭了滤料中蓝色微球体的结合。固定在高浓度上的特异性抗体会使溶液中游离茶碱在小面积内快速的结合,而低浓度的特异性抗体会导致需要较大的面积,以用于结合溶液中快速反应的游离茶碱,根据图 4,当固定化抗体的浓度很高时,区域(18)较小,而在固定化抗体的浓度很低时,区域较大。在转移过程中,当溶液中的游离茶碱上的监测液被消耗尽时,蓝色的微球体,其上固定有与牛血清白蛋白结合的 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤,开始与不再为游离茶碱所封闭的固定化抗茶碱单克隆抗体产生作用;根据图 4,在区域(18)以外的区域(17)中。换言之,即在内部较亮区(18)的外部产生了较暗的蓝色环区(17)。调整特异性抗体的浓度以获得适宜的在多孔 HiFlow 材料中的游离茶碱的结合能力,在此结合能力下分析物特定浓度与面积大小相对应。在该实施例中,发现在每立方厘米的材料上适宜固定 25-50 μ g 抗体。(根据文献提供的传统方法,例如使用放射性标记的抗原或酶连接的抗原与已知的标准抗原溶液竞争,可对固定有抗体的 HiFlow Plus HF12004 的结合能力进行确定)。如果需要非常高的结合能力,推荐使用英国 Immun System Ltd. 的多克隆抗体。

作为选择,可以使用其它的多孔物,例如,英国 Pall Gelman. 的 Predator PREDL3R 过滤材料,这些多孔物能够结合高浓度和高化学活性的结合蛋白,并且具有能够使携带信号的抗体结合物,例如着色乳胶颗粒或胶体金颗粒,自由迁移的孔径大小。

为了更好的实施,大多数此类多孔物都需要某些润湿剂,但是通

常忌用类似 CHAPSO 的去污剂，或者可以使用其它去污剂，尽管以低浓度使用。此外，必须利用本领域技术人员所熟知的技术来检测去污剂对抗体结合能力的影响。

5 实施例 9: 流体接受器中用于定量肌红蛋白的多孔物

将 Millipore 公司提供的 Hi-Flow Plus HF12004 切成适当大小的纸片。

在含有 2.5%vol/vol 乙醇的 10mM 醋酸胺溶液中溶解芬兰 Medix Biochemica OY 公司提供的小鼠抗肌红蛋白的单克隆抗体克隆 7004。如果需要低结合能力，可另外加入诸如清蛋白或酪蛋白等其它蛋白，这些蛋白会在随后的吸附过程中与抗体竞争。可以将上述溶液喷射到 Hi-Flow 材料上，也可将纸片浸泡在上述溶液中。然后，将纸片在 37 °C 干燥两小时。接着在室温下，在含有 2.5%vol/vol 乙醇和 0.01%w/v3-(3-胆酰胺基丙基)二甲氨基-2-羟丙烷（购自美国 Pierce Chemical 公司）的 10mM 醋酸胺溶液中通过浸泡并搅拌来清洗纸片。

根据上述多孔物中所需的结合能力来改变特异性抗体的浓度。如果需要低结合能力，可另外加入类似清蛋白或酪蛋白等其它蛋白，这些蛋白可以在随后的吸附过程中与抗体竞争。在该实施例中，将含有 10ng 肌红蛋白的 10 μ l 正常血清样与 2ml 实施例 4 中的含有 0.1%结合有实施例 1 中描述的抗肌红蛋白单克隆抗体的蓝色乳胶微球体悬浮物（2mg 微球体）的试验溶液混合，该溶液具有结合肌红蛋白超过 10ng 的结合能力（即采用较高的结合能力）。鉴定溶液中颗粒结合能力的方法有，通过文献中记载的传统方法，例如采用放射性标记的抗原，并在分离出颗粒后对结合能力进行测量，或者通过，例如平衡透析。

根据下文确定在多孔物中固定化的抗人肌红蛋白抗体的适宜浓度：能够使上述混合物迁移到流体接收器中使用的多孔物中。固定在高浓度的特异性抗体会导致在小面积内截获着色颗粒，而低浓度的特异性抗体会导致在较大面积内截获对应的颗粒溶液。调整特异性抗体的浓度以获得能够得到特定的分析物浓度所需面积大小的结合能力。

作为选择，可以使用其它的多孔物，例如，英国 Pall Gelman 的

Predator PREDL3R 过滤材料，这些多孔物能够结合高浓度和高化学活性的结合蛋白，并且具有能够使携带信号的抗体结合物，例如着色乳胶颗粒或胶体金颗粒，自由迁移的孔径大小。

为了更好的实施，大多数此类多孔物都需要某些润湿剂，但是通常忌用类似 CHAPSO 的去污剂，或者可以使用其它去污剂，尽管以低浓度使用。此外，必须利用本领域技术人员所熟知的技术来检测去污剂对抗体结合能力的影响。

实施例 10: 流体接受器中用于定量尿白蛋白的多孔物

将 Millipore 公司提供的 Hi-Flow Plus HF12004 切成适当大小的纸片。

利用实施例 9 中描述的方法将芬兰 Medix Biochemica OY 公司提供的小鼠抗肌白蛋白的单克隆抗体克隆 6502 固定在 Hi-Flow Plus HF12004 上。

根据上述多孔物中所需的结合能力来改变特异性抗体的浓度。如果需要低结合能力，可另外加入类似清蛋白或酪蛋白等其它蛋白，这些蛋白可以在随后的吸附过程中与抗体竞争。在该实施例中，将含有 0.02 μ g 人白蛋白的 10 μ l 正常血清样与 2ml 实施例 4 中描述的胶体金颗粒的试验溶液混合，以 10 μ g/ml 的蛋白浓度溶解于 10mM HEPES 缓冲液中，pH = 7.1，含有 0.3M 甘露醇，0.05%PEG20000。根据下文确定来自克隆 6502 抗白蛋白单克隆抗体固定在多孔物中的适宜浓度：能够使上述混合物迁移到流体接收器中使用的多孔物中。固定在高浓度的特异性抗体会导致在小面积内截获着色颗粒，而低浓度的特异性抗体会导致在较大面积内截获相应的颗粒溶液。调整特异性抗体的浓度以获得能够得到特定的分析物浓度所需面积大小的结合能力。

作为选择，可以使用其它的多孔物，例如，来自 Pall Gelman, U.K. 的 Predator PREDL3R 过滤材料，这些多孔物能够结合高浓度和高化学活性的结合蛋白，并且具有能够使携带信号的抗体结合物，例如着色乳胶颗粒或胶体金颗粒，自由迁移的孔径大小。

为了更好的实施，大多数此类多孔物都需要某些润湿剂，但是通

常忌用类似 CHAPSO 的去污剂，或者可以使用其它去污剂，尽管以低浓度使用。此外，必须利用本领域技术人员所熟知的技术来检测去污剂对抗体结合能力的影响。尤其要避免去污剂对胶体金的影响，因此在使用了去污剂之后再使用不含去污剂的适当缓冲液清洗。

5

实施例 11: 流体接收器

如图 4 所示，流体接收器的一种实施方案可包含由塑料等适当材料制成的圆盘 16，其中装有流体接收物 17。灰色区 18 显示信号提供物扩散到多孔物 17 中所产生的图案。在本发明的一项实施方案中，圆盘 16 可包含一种由透明塑料制成的原片，直径为 3cm，但其它度量值也处在本发明的思想范围内。圆盘的中央有一个洞或一个孔，用于放置流体输送器。此外，还可以在圆盘上印制线形、环形或与流体接收盘 16 相适应的其它形式的标度。将诸如充满上述固定化抗体的流体接收物 17 封固在圆盘中。流体接收物上的显示模式将取决于要进行的分析的类型。在一项实施方案中，试样中的抗原与所述试剂模式中的抗体-着色颗粒形成的复合物将在流体接收物上产生一种，例如，图 4 所示形状的含有抗原-抗体-颗粒-固定化抗体的夹层状复合物。

在竞争性测定的另一实施方案中，所述试剂含有与着色颗粒相连接的抗原，此时，试样中的游离抗原和抗原-着色颗粒复合物之间将存在与流体接收物的竞争性结合。由于后一种复合物的分子量较大，因而与固定化抗体的结合出现较晚，并且将在代表游离抗原与固定化抗体形成的复合物的圆环（未显示）外围显示出一条圆环。

竞争性测定的最后一种实施方案如实施例 17 所述，其中，所述试剂中的抗原与荧光团相连接，并且所述复合物具有与试样中游离抗原相类似的分子量。因此，在与流体接收物的竞争性结合中，将不会出现由尺寸导致的抗原荧光颗粒与固定化抗体结合的延迟，并且形成的图案将与所述第一种实施方案中形成的图案类似。

实施例 12: 全血茶碱定量测定

将 5 μ l 血吸到实施例 11 所述试剂容器顶部的经肝素处理的毛细管

腔中。推下毛细管，并通过温和振荡使毛细管内容物与试剂容器中的试剂相混合，其中的试剂含有 1ml 实施例 6 的试验溶液，该试验溶液含有实施例 2 描述的 0.1% 蓝色乳胶微球体悬浮液(1mg 微球体)和 0.25% v/v 正常小鼠血清。在该步骤中，茶碱与蓝色乳胶上存在的过量抗体反应，血细胞被 triton 裂解，血中的其它大多数颗粒也被 Triton X-100 溶解或驱散。

在本发明的一些实施方案中，允许悬浮液持续反应 1-5 分钟（特别是待测分析物的浓度极低时）。但是在包括本实施例在内的大多数实施方案中，结合反应都是在振荡过程中已接近完成。

然后将上文实施例 7 描述的流体输送器装入含有血样/试剂混合物的试剂容器中。将流体输送器的另一端置于上文实施例 11 描述的流体接收器中央，其中的滤料带有上文实施例 8 描述的固定化抗茶碱抗体。使样品/试剂混合物经过流体输送器流到所述流体接收器中。与微球体上的结合物相比，溶液中存在的茶碱与多孔物上的固定化抗体的反应速度要快得多，从而与滤料中的蓝色微球体有效地竞争性结合。当试验溶液中的游离茶碱在迁移过程中被全部消耗掉之后，结合有 8-(3-羧丙基)-1,3 二甲基黄嘌呤与牛血清白蛋白的结合物的蓝色微球体在无需所述竞争的情况下与固定化抗茶碱单克隆抗体结合，并在密度较低的内部区域之外产生一个深蓝色环。当流体接收器中的多孔滤料被液体饱和之后，经过流体输送器的液流自动停止。

观测流体接收器中形成的蓝色乳胶颗粒环内密度较低区域的大小，并与流体接收器表面印制的标识进行比较。为了建立一种在所需的全血茶碱浓度范围内可靠的标准定量方法，优选的是用已知人茶碱浓度的人全血作为校准物。选择微球体在试验溶液中的必需浓度和必需条件，以使蓝色乳胶颗粒形成的环具有适于观测的所需大小，并用于为所述流体接收器表面印制的标识指定适当的浓度值。

实施例 13: 人全血肌红蛋白定量测定

将 10 μ l 血吸到实施例 11 所述试剂容器顶部的经肝素处理的图 2,7 所示毛细管腔中。推下毛细管，并通过温和振荡使毛细管内容物与试剂容器图 3A, 15 中的试剂相混合，其中的试剂含有 1ml 实施例 6 的试

5 验溶液，该试验溶液含有实施例 1 所述带有抗肌红蛋白单克隆抗体的蓝色乳胶颗粒的 0.1% 悬浮液（1mg 微球体）以及 0.25% v/v 正常小鼠血清。在该步骤中，肌红蛋白与蓝色乳胶上的过量抗体反应，血细胞被 triton 裂解，血中的其它大多数颗粒也被 Triton X-100 溶解或驱散。在本发明的一些实施方案中，允许悬浮液持续反应 1-5 分钟（特别是待测分析物的浓度极低时）。但是在包括本实施例在内的大多数实施方案中，结合反应都是在振荡过程中已接近完成。

10 然后将上文实施例 7 描述的图 3D-E 所示流体输送器装入含有血样/试剂混合物的图 3B-C 所示试剂容器中。然后将流体输送器的另一端置于上文实施例 11 描述的图 4 所示流体接收器的中央，其中的滤料带有上文实施例 9 描述的固定化抗人肌红蛋白抗体。使样品/试剂混合物经过流体输送器流到所述流体接收器中。当流体接收器中的多孔滤料被液体饱和之后，经过流体输送器的液流自动停止。

15 观测流体接收器中形成的蓝色乳胶颗粒环（图 4, 18）的大小，并与流体接收器表面印制的标识进行比较。为了建立一种在所需的人全血肌红蛋白浓度范围内可靠的标准化的定量方法，优选的是用添加了已知浓度人肌红蛋白的人全血作为校准物。选择微球体在试验溶液中的必需浓度和必需条件，以使蓝色乳胶颗粒形成的环具有适于观测的所需大小，并且为所述流体接收器表面印制的标识指定适当的浓度值。

20 实施例 14: 尿白蛋白定量测定

将 1ml 悬浮在含有 0.3M 甘露醇和 0.05% PEG20000 的 10mM HEPES 缓冲液 pH 7.4 中的实施例 4 所述抗人白蛋白抗体包被胶体金颗粒密封在上文实施例 7 描述的图 2, 9 所示容器中。

25 将糖尿病性肾病患者的 10 μ l 尿样（或优选程度较低的稀释尿样）吸到上文实施例 7 描述的图 2, 7 所示自校准毛细管加样器中，并将所述样品装入含有所述抗人白蛋白抗体包被胶体金颗粒悬浮液的图 3B-C 所示试剂容器中。振荡该容器，然后静置 2 分钟，以使胶体金与样品中的白蛋白结合。

30 然后将上文实施例 7 描述的流体输送器装入装有尿样/试剂混合物的试剂容器中；见图 3D-E。将流体输送器的另一端置于上文实施例 10 所述具有固定化抗人白蛋白抗体的滤料的中央，这些滤料被装在支持

物中，从而成为实施例 11 描述的流体接收器。使样品/试剂混合物经过流体输送器流到所述流体接收器中。当流体接收器中的多孔滤料被液体饱和时，经过流体输送器的液流将停止。

5 观测流体接收器中形成的胶体金颗粒环（图 4,18）的大小，并与流体接收器表面印制的标识进行比较。

为了建立一种在所需的人尿白蛋白浓度范围内可靠的标准化定量方法，必须使上文实施例 10 所述多孔物中的固定化抗人白蛋白抗体具有适当的结合能力。尿白蛋白的预期浓度在不同患者群中有很大的差异，因而必需对预期患者群进行校准。该实施例在 0-200mg/L 尿的
10 浓度范围内都非常有效，甚至可以有效测定高达 500mg/ml 的浓度。如果白蛋白的浓度非常高，会使胶体金的结合能力达到饱和，并且在流体接收器中央会出现一个颜色浅得多的区域，该区域是未与胶体金结合的游离白蛋白先与流体接收物中的固定化单克隆抗体结合的结果。通过用已知人白蛋白浓度的人尿作为校准物，本领域的技术人员
15 可以对必需条件进行选择，以使胶体金颗粒形成的环具有所需的外径和适于观测的颜色强度，并用于为所述流体接收器表面印制的标识指定适当的浓度值。

若预计患者产生的尿具有极高的白蛋白浓度，则应减少毛细管取样器的尿样量，如减少至 2 μ l，并且应提高抗人白蛋白抗体包被胶体
20 金颗粒的浓度。

实施例 15: 测定全血样品中的抗甲状腺过氧化物酶抗体

25 抗人甲状腺单克隆抗体购自 HyTest, U.K., 根据实施例 1 的方法将其结合在羧化蓝色乳胶上。

人甲状腺过氧化物酶蛋白溶液来自 Binding Site Ltd., U.K, 根据实施例 9 的方法将其包被在购于 Millipore 的 Hi-flow Plus HF12004 上。尽管该原料含有载体蛋白和相当剂量的血清白蛋白，但是在甲状腺过氧化物酶包被方面表现良好。如果需要在多孔物中固定更高浓度的
30 的甲状腺过氧化物酶，可根据现有技术中众所周知的方法通过免疫层析去除 HyTest 产品中的血清白蛋白。

将 10 μ l 血吸到实施例 7 所述试剂容器顶部的经肝素处理的毛细管

腔中。推下毛细管，并通过温和振荡使毛细管内容物与试剂容器中的试剂相混合，其中的试剂含有 1ml 实施例 6 的试验溶液，该试验溶液含有上述带有抗甲状腺过氧化物单克隆抗体的蓝色乳胶微球体的 0.1% 悬浮液（1mg 微球体）以及 0.25% v/v 正常小鼠血清。在该步骤中，
5 来自患者样品的抗甲状腺过氧化物抗体与蓝色乳胶上的过量抗体反应，血细胞被 triton 裂解，血中的其它大多数颗粒也被 Triton X-100 溶解或驱散。使悬浮液静置反应 3 分钟。

然后将上文实施例 7 描述的流体输送器装入装有血样/试剂混合物的试剂容器中。再把流体输送器的另一端置于上文实施例 11 描述的
10 流体接收器的中央，其中的滤料带有固定化人甲状腺过氧化物酶。使样品/试剂混合物经过流体输送器流到所述流体接收器中。当流体接收器中的多孔滤料被液体饱和之后，经过流体输送器的液流自动停止。

观测流体接收器中形成的蓝色乳胶颗粒环的大小，并与流体接收器表面印制的标识进行比较。为了建立一种在所需的人全血抗甲状腺
15 抗体浓度范围内可靠的标准化定量方法，优选的是用已知抗甲状腺过氧化物抗体浓度的人全血作为校准物。根据待测定的临床患者群，选择甲状腺过氧化物抗原在多孔流体接收物中的必需浓度，并用已知抗甲状腺过氧化物抗体含量的校准物为所述流体接收器表面印制的标识
20 指定适当的浓度值。

实施例 16：用成像装置或扫描装置进行测量

在实施例 12、13、14 和 15 中使用的实施例 11 所述流体接收器的
25 表面可印制上校准标识，用于通过目测读取被测分析物的内容物。为了获得更精确的定量测定结果和更详细的记录，可以对流体接收器进行扫描或绘制。最简单的形式是将流体接收器置于与个人计算机相连接的平板扫描仪上。更高级的形式是用数码相机或数码扫描仪或荧光扫描仪来绘制流体接收器。大多数二维扫描仪都曾被使用，但用线性
30 扫描仪也可以测量诸如圆点的直径或矩形迁移路径的长度。Bremnes 和 Sundrehagen 的专利申请 PCT/GB98/00120 详细描述了用于测量流体接收器的这些扫描仪、相机和软件。

实施例 17: 全血茶碱浓度的荧光测量

5 将 5 μ l 血吸到实施例 11 所述试剂容器顶部的经肝素处理的毛细管腔中。推下毛细管并温和振荡, 以使毛细管内容物与试剂容器中的试剂相混合, 其中的试剂含有 1ml 实施例 6 的试验溶液, 该试验溶液含有实施例 5 描述的荧光青色素-5-茶碱结合物以及 0.25% v/v 正常小鼠血清。

10 然后将上文实施例 7 描述的流体输送机装入含有血样/试剂混合物的试剂容器中。再将流体输送器的另一端置于上文实施例 11 描述的流体接收器的中央, 其中的滤料带有上文实施例 8 描述的固定化抗茶碱抗体。使样品/试剂混合物经过流体输送机流到所述流体接收器中。溶液中存在的茶碱与滤料中的荧光茶碱结合物在结合方面相互竞争。当流体接收器中的多孔滤料被液体饱和之后, 经过流体输送器的液流
15 自动停止。

血样中的茶碱与荧光茶碱结合物都在流体接收器中结合(见图 4, (18)), 形成的面积与样品的茶碱浓度成正比。用荧光扫描仪在 648nm 激发波长下扫描流体接收器, 并测量流体接收器表面的青色素-5 的荧光。根据 Bremnes 和 Sundrehagen PCT/GB98/00120 的软件计算法描绘
20 和测量荧光的面积。为了建立一种在所需的人全血转铁蛋白浓度范围内可靠的标准定量方法, 可使用已知人茶碱浓度的人全血作为校准物。试剂容器中的青色素-5-茶碱结合物量须根据荧光扫描仪的灵敏度加以调整。

25 实施例 18: 用荧光微球体进行全血茶碱浓度的荧光测定

用青色素-5 荧光染料染色的产品编号 PC04N 的羧化微球体购自 Bangs Laboratories Inc., U.S., 并根据实施例 2 用茶碱类似物抗原进行包被。

30 将 5 μ l 血吸到实施例 11 所述试剂容器顶部的经肝素处理的毛细管腔中。推下肝素化毛细管, 并通过温和振荡使毛细管内容物与试剂容器中的试剂相混合, 其中的试剂含有 1ml 实施例 6 的试验溶液和 0.25%

v/v 正常小鼠血清，并含有实施例 2 的茶碱包被的微球体，但实施例 2 使用的 Estapor 蓝色微球体被替换成上文描述的 Bangs Laboratories 的青色素-5 染色的微球体。

5 然后将上文实施例 7 描述的流体输送器装入含有血样/试剂混合物的试剂容器中。再将流体输送器的另一端置于上文实施例 11 描述的流体接收器的中央，其中的滤料带有上文实施例 8 描述的固定化抗茶碱抗体。使样品/试剂混合物经过流体输送器流到所述流体接收器中。与微球体上的结合物相比，溶液中存在的茶碱与多孔物中的固定化抗体的反应速度要快得多，从而与滤料中的蓝色微球体有效地竞争性结
10 合。当试验溶液中的游离茶碱在迁移过程中被全部消耗掉之后，结合有 8-(3-羧丙基)-1,3-二甲基黄嘌呤与牛血清白蛋白的结合物的蓝色微球体在无需所述竞争的情况下与固定化抗茶碱单克隆抗体结合，并在荧光强度较低的内部区域之外产生一个强度更高的环。当流体接收器中的多孔滤料被液体饱和之后，经过流体输送器的液流自动停止。

15 用荧光扫描仪在 648nm 激发波长下扫描流体接收器，并测量流体接收器表面的青色素-5 的荧光。根据上文实施例 16 和 Bremnes and Sundrehagen 描述的软件计算法描绘和测量荧光强度较低的区域面积。为了建立一种在所需的全血茶碱浓度范围内可靠的标准化定量方法，可使用已知茶碱浓度的人全血作为校准物。

20

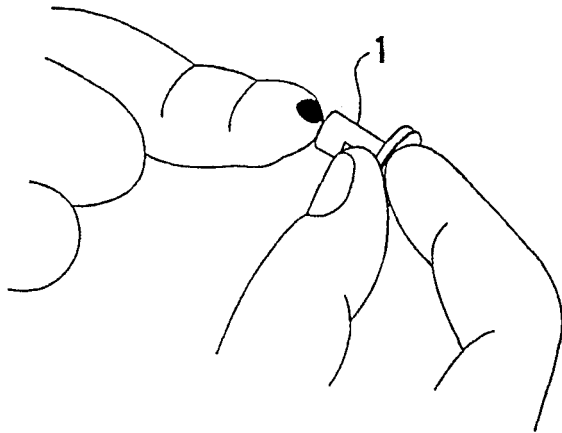


图 1A

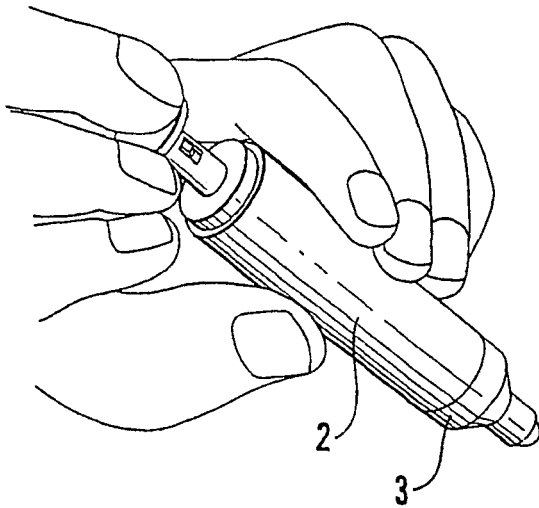


图 1B

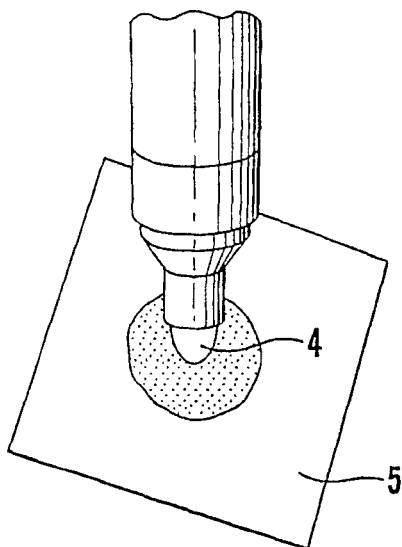


图 1C

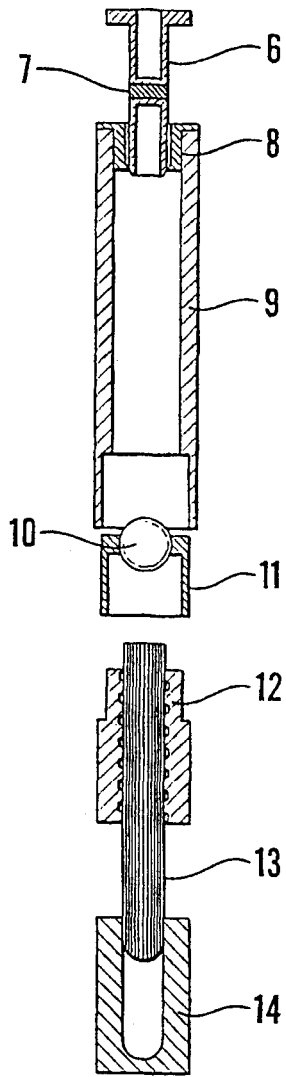


图 2

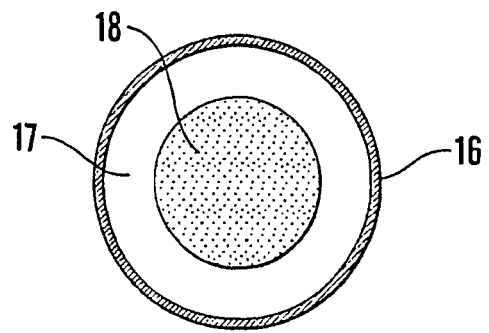
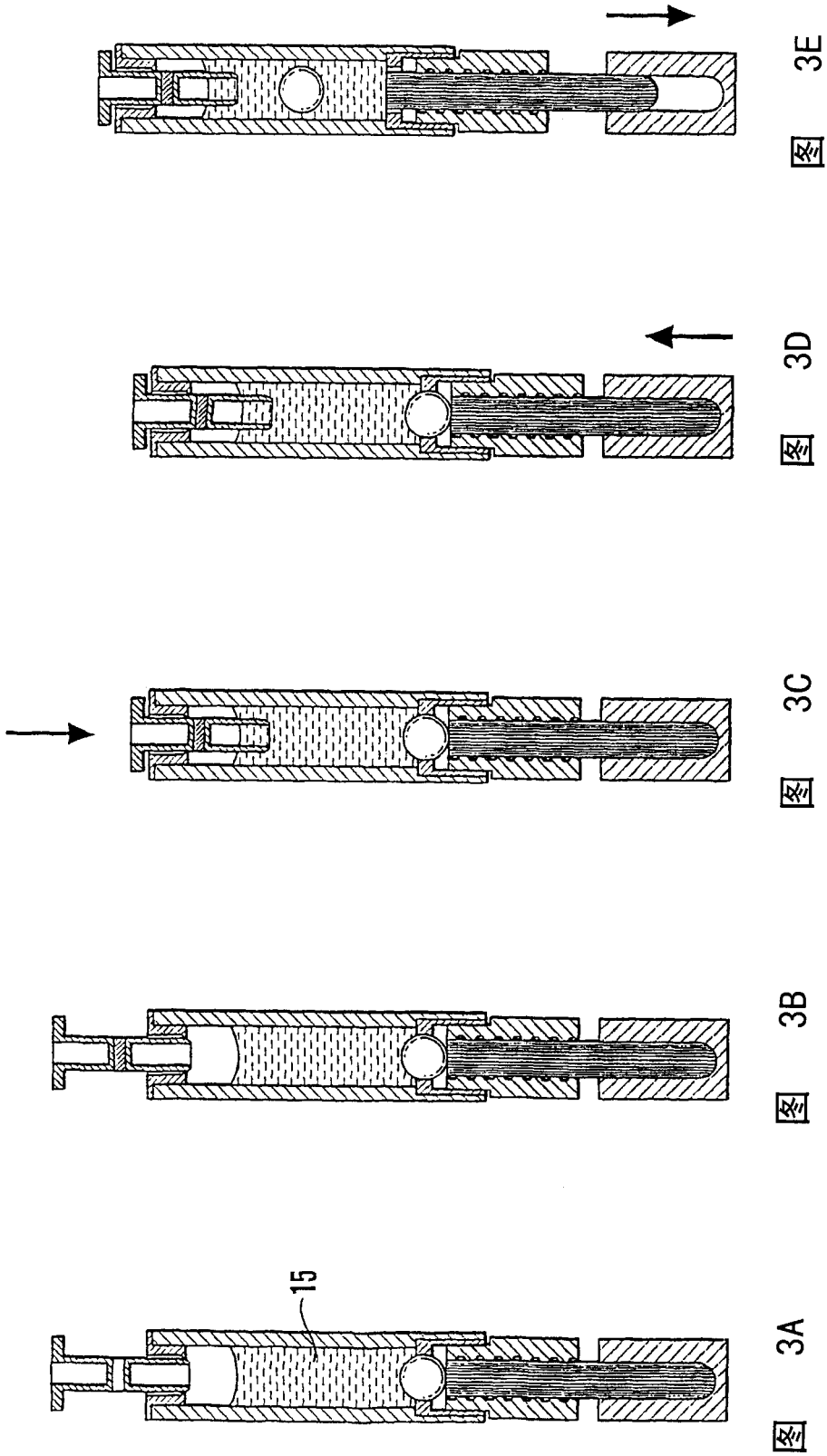


图 4



专利名称(译)	利用着色颗粒的定量非仪器免疫测定及装置		
公开(公告)号	CN1522371A	公开(公告)日	2004-08-18
申请号	CN02813315.3	申请日	2002-04-26
[标]发明人	厄灵森德雷哈根		
发明人	厄灵·森德雷哈根		
IPC分类号	G01N33/483 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/566 G01N33/58 A61B10/00 B01L3/00		
CPC分类号	G01N33/54366		
优先权	20012150 2001-04-30 NO		
其他公开文献	CN1256590C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

用于测定样品中一种或多种分析物的浓度的定量化学分析方法。该方法包括a)将样品与一种含有信号提供物的试剂混合于容器中；b)将上述容器与一种流体输送器连接；c)使流体输送器与流体接收器接触。流体接收物含有对分析物具有特异性结合能力的固定化试剂。将流体接收物的图案或面积用作为测量样品中分析物浓度的量度。

