

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02824811.2

G01N 33/52

G01N 33/53

G01N 33/536

G01N 33/543

G01N 33/571

G01N 33/576

G01N 35/00

[43] 公开日 2005 年 7 月 27 日

[11] 公开号 CN 1646909A

[22] 申请日 2002. 12. 12 [21] 申请号 02824811.2

[30] 优先权

[32] 2001. 12. 12 [33] AU [31] PR9451

[32] 2002. 7. 11 [33] AU [31] 2002950212

[86] 国际申请 PCT/AU2002/001684 2002. 12. 12

[87] 国际公布 WO2003/050537 英 2003. 6. 19

[85] 进入国家阶段日期 2004. 6. 11

[71] 申请人 普罗托姆系统知识产权有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

[72] 发明人 安德鲁·约翰·斯隆

安德鲁·亚瑟·古利

罗伯特·艾利·科尔

大卫·埃·莫贝尔

[74] 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司

代理人 王 琦 宋志强

G01N 35/10 C12M 1/34

权利要求书 4 页 说明书 21 页 附图 6 页

[54] 发明名称 诊断试验方法

[57] 摘要

本发明披露了一种用于穿流型检测过程的方法和装置。该方法的特征在于：“预孵育步骤”，在该步骤中要进行分析的样品（通常为检测特定蛋白质的存在）和已知可结合到特定蛋白质上的检测分析物（通常为与胶体金或荧光标记连接的一种或多种抗体）一起结合一段所需的时间。该预孵育阶段发生在样品和检测分析物的混合物与连接在膜上的捕获分析物接触之前。提供该预孵育阶段可提高检测敏感度，并且可减少检测所需样品的体积。一种用于实施该方法的装置，其特征为：用于接受样品和检测分析物的预孵育腔室，其具有由膜形成的基底和在其上连接有捕获分析物的第二膜。在一种型式下，预孵育腔室在一个位置处支撑在第二膜上，但可以将它推至与载有捕获分析物的膜相接触的位置，如此使得液体通过捕获膜从孵育腔室迁移出来。在另一种型式下，孵育腔室基底的膜是疏水的，它的下侧与捕获膜相接触，当在预孵育室的内容物中加入湿润剂时，发生液体迁移。

1、一种用于检测至少一种预定反应物存在的方法，包括以下步骤：

a)提供第一多孔膜，在其上已结合有用于与该反应物相结合的捕获分析物；

b)将要进行检测的样品和多检测分析物放在一个腔室中，该腔室具有由第

5 二多孔膜形成的基底；

c)通过足够长时间使多检测分析物结合到，所述的至少一种反应物上，如果该反应物存在的化；

d)使腔室基底与第一多孔膜接触；和

e)使样品流过这些膜从而使得反应物与在第一膜上载有的捕获分析物相结

10 合。

2、如权利要求1所述的方法，进一步包括以下步骤：

当存在多检测分析物时在检查第一膜之前，移去腔室并用缓冲液洗涤第一膜。

3、如权利要求1所述的方法，进一步包括以下步骤：

15 当存在多检测分析物时，在取出并检查第一膜之前，通过在腔室中加入缓冲液来洗涤第一膜。

4、使用一种装置检测至少一种预定反应物存在的方法，该装置包括：

第一部件，包括第一多孔反应膜，在其上结合有捕获分析物用于结合将进行检测的反应物，该部件具有上表面和下表面；

20 第二部件，是吸收材料体，如薄纸等等，该部件设置在下面与第一部件的下表面相接触；

腔室位于第一部件之上，所述腔室具有侧壁和由第二膜形成的基底；和

在两个位置上有用于在第一部件之上支持腔室的装置，在第一位置处该膜与第一部件间有足够的距离以使液体不能从该腔室迁移到吸收材料体上，在第二位置处该膜与第一部件相接触如此使液体从腔室迁移通过第一、第二膜而到达吸收材料体。

25

该方法包括以下步骤:

a) 将腔室放在第一位置上时, 将要进行检测的样品和多检测分析物放在腔室中;

b) 通过足够长时间使多检测分析物结合到反应物上, 如果该反应物存在的化;

c) 将腔室压到第二位置使腔室基底与第一多孔膜接触;

d) 使样品流过第一和第二膜从而使反应物与在第一膜上载有的捕获分析物相结合, 如果该反应物存在的化。

5、如权利要求4所述的方法, 其中第二膜形成的腔室基底是疏水性的, 使样品流到第一和第二膜的步骤包括: 当使腔室移到第二位置之前在第二膜的上表面加入湿润剂。

6、使用一种装置测定至少一种预定反应物存在的方法, 该装置包括:

第一部件, 包括第一多孔反应膜, 在其上结合有用于结合被检测的反应物的捕获分析物, 该部件具有上表面和下表面;

第二部件是吸收材料体, 如薄纸等, 其设置在第一部件之下并与第一部件的下表面接触;

腔室位于第一部件之上, 该腔室具有侧壁及包括第二疏水膜的基底, 该膜有上表面和下表面, 该预孵育腔室支持在第一部件上, 该疏水膜的下表面与第一部件的上表面接触,

该方法包括以下步骤:

a) 将要进行检测的样品和多检测分析物放在腔室中;

b) 通过足够长的时间使多检测分析物结合到反应物上, 如果该反应物存在的化;

c) 在腔室中加入润湿剂;

d) 使样品流过第一和第二多孔膜从而使反应物与在第一膜上载有的捕获分析物相结合, 如果该反应物存在的化。

7、如权利要求 1~6 中任意一项所述的方法，其中样品为全血，样品中的全部红血球在腔室中由作为过滤器的第二膜除去，并且使血液中的血浆流到第一膜上。

8、如权利要求 1~6 中任意一项所述的方法，其中样品含有粒子材料，选自以下的组中，包括：谷物提取物、细胞或微生物提取物，其中粒子材料在腔室中由作为过滤器的第二膜除去。

9、如权利要求 1~6 中任意一项所述的方法，其中样品包括体液，如血浆、血清、尿液、唾液及痰液，并且其中第二膜为疏水膜。

10、如权利要求 1~6 中任意一项所述的方法，包括如下步骤：除去或中和将要进行测试的样品中的有害分析物，这些有害分析物会干扰样品分析物与腔室中第一膜上的捕获分析物结合。

11、如权利要求 10 所述的方法，其中与有害分析物结合的抗体或其他分析物被束缚到腔室的壁或基底上。

12、如权利要求 1~11 中任意一项所述的方法，其中将要进行测试的样品承载于一个吸收表面上，如拭子等，和包括如下步骤：在腔室内的提取液中旋转该拭子。

13、如权利要求 1~12 中任意一项所述的方法，其中多检测分析物包括选自以下组中的检测化合物，包括：抗体、配基和抗原。

14、如权利要求 13 所述的方法，其中抗体是免疫球蛋白。

15、如权利要求 13 所述的方法，其中多检测分析物包括两种或更多抗体。

16、如权利要求 13 所述的方法，其中多检测分析物包括三种或更多抗体。

17、如权利要求 15 或 16 所述的方法，其中至少一种抗体是对照抗体。

18、如权利要求 1~17 中任意一项所述的方法，其中多检测分析物包括选自以下组中的可检测成分，包括：胶体金颗粒、乳胶小球、有色染料和胶体碳。

19、如权利要求 18 所述的方法，其中可检测成分为胶体金颗粒。

20、如权利要求 18 所述的方法，其中可检测成分为连有有色染料的乳胶小

球。

21、如权利要求 18 所述的方法，其中可检测成分为胶体碳。

22、如权利要求 15 所述的方法，其中两种或多种抗体与胶体金颗粒结合。

诊断试验方法

技术领域

本发明涉及一种诊断测试方法，具体涉及一种用于进行检测方法的装置
5 和一种用该装置进行检测过程的方法。

背景技术

侧流和穿流型技术已用于诊断试验近 20 年。侧流型技术现在占据主导地位，因为侧流装置易于生产并且该检测可在简单的两个步骤中进行，其可适于全血分离。其结果为一种简单的装置能在本领域作为进行快速即时诊断
10 仪（Cole 等，1996，Tuberc. Lung. Dis. 77: 363-368）。然而，由于样品间的侧向扩散差异和各批分隔膜之间流率的不同，因此很难在多种疾病诊断中使用侧流技术。这意味着抗原或抗体信号强度可能在试验中变化也可能在不同批次试验中变化，从而导致不一致的结果。

与侧流型测试通常需要 5~10 分钟相比，已有的穿流型诊断测试可在少
15 于 2 分钟的时间内完成。然而，这种速度的优势常以损失灵敏度为代价。另一缺点是需要较大量的样品以获得与侧流相同的灵敏度。这在一些情况下可能是成问题的。例如，诊断全血中的分析物（反应物）需要从全血细胞中分离血浆。为此而需要较大的全血量将很快阻塞穿流型中使用的膜。

已很好的建立了穿流型检测的基本原理。该测试设计为确定样品中预定
20 分析物/反应物的存在，在一些情况下确定其数量。这些反应物常为蛋白质，但也可以进行其他反应物的测试。如果检测是测试患者有特定的疾病，可能会对患者体液进行测试以检测由患者产生的响应于某种感染的抗体或其他蛋白，或检测由细菌或病毒剂等所表达的引起疾病的蛋白。在通常的穿流化验中，确信含有反应物的液体样品通过连接有捕获分析物的膜吸入吸收垫

中，已知该捕获剂将与反应物结合。然后通常用缓冲液洗涤该膜，将含有检测分析物的液体加到该膜上，其中的检测分析物也与反应物结合，并包含可检测的示踪剂或标记物。检测分析物与结合到膜上的固定反应物结合，可以观察到或另外可以检测到以显示反应物的存在。

- 5 美国专利 4246339 披露了一种用于测定液体样品中存在预定反应物的检测装置。该装置包括在套筒顶和底部件之间形成储液池，以及用于在开口处偏压部件的弹性装置。顶部部件上形成了一系列试验池，每一个试验池具有由多孔膜形成的基底，捕获分析物固定在膜表面上。吸收装置位于底部部件上，在开口位置与膜相分离但在封闭位置与膜相接触。美国专利 4246339 披露了将由缓冲液稀释的待测血清加到试验池中，于室温下将该装置孵育 10
10 分钟，然后将套筒压下到封闭位置以使样品通过该膜进入吸收材料。当膜干燥时，洗涤该膜，然后用含有测定分析物的溶液覆盖该膜，该测定分析物在随后加入染色剂的步骤之后与固定反应物结合。

- 应理解美国专利 4246339 所述的方法有点时间拖延、耗时并且冗长的方法，同时也缺少敏感性。
15

- 在美国专利 5185127 中描述了更新的穿流装置，其披露了一种测定装置，包括过滤器层叠和具有基底部分和盖子的箱体。过滤器层叠具有在其上含有捕获分析物的亲水性膜，在美国专利 5185127 中称作结合剂。疏水膜位于亲水膜之下，吸收材料垫位于疏水膜之下。盖子包括向上延伸的凸缘，该
20 突缘可插入一个凹处。在使用中将含有反应物的样品（在美国专利 5185127 中称为分析物）放在测定装置的池中，此时反应物/分析物与捕获分析物/结合剂结合。由于水溶液未浸湿位于过滤器层叠中的亲水膜之下的疏水膜，因此不会发生测定溶液的流动。这样有所需要的充足的时间来完成测定分析物与反应物的结合。当判断结合完成时，通过加入浸润疏水膜的湿润剂使液体
25 开始流动。之后水溶液流入吸收垫。然后洗涤该膜，用测定分析物/示踪剂处理该膜，该测定分析物/示踪剂可以是与分析物特异性结合的抗体，该抗

体具有隐蔽结合在其上的标记物。美国专利 5185127 也缺少敏感性，不能与侧流或 ELISA 型式中所获得敏感性相等同。

一般信息

此处所用的术语“源自 (derived from)”或“衍生物 (derivative)”

5 表示可从特定的来源获得的特定整体，虽不必直接来自该来源。

除非上下文需要另外或特意限定为相反的含义，此处本发明作为单数所叙述的整体、步骤或部件清楚的包括单数和复数形式叙述的整体、步骤或部件。

本发明此处所描述的关于任何单独的实施例，尤其是关于检测装置或方法
10 的实施例已对本发明此处所述的其他实施例作了必要的修正。

整个说明书，除非上下文需要另外限定，词语“包括 (comprise)”，或变形如“包括 (comprises)”或“包括 (comprising)”可理解为意味着包括设定的步骤或部件或整体或一组步骤或部件或整体，但不排除其他步骤或部件或整体或部件或整体的组。

15 本领域的技术人员应理解除了那些特定的描述，此处描述的发明能允许变化和修饰。这可理解为本发明包括所有这样的变化和修饰。本发明也包括说明书中分别或总体提到的或指明的所有步骤、特征、组分和化合物，以及任何和所有的任意两个或更多步骤或特征的组合。

本发明不限于此处所述的特定示例的范围。清楚地，功能性等价产物、
20 组分和方法也属于本发明在此所述的范围内。

除非另外指明，未使用不当的试验方法来进行本发明，常规的免疫细胞化学技术例如免疫金标记和蛋白质组学。例如以下文本中所描述的这些的过程，这些文本并入作为参考：

胶体金—细胞化学标记的新前景 (Colloidal Gold-A New Perspective For
25 Cytochemical Marking)，Beesley J (1989)，Royal Microscopical Society Handbook 第 17 期，Oxford Science 发行，牛津大学出版 (平装本)；

对免疫细胞化学的介绍—当前技术及问题 (An Introduction To Immunocytochemistry-Current techniques and problems), Polak J 和 Van Noorden 5 (1984), Royal Microscopical Society Handbook 第 11 期, Oxford Science 发行, 牛津大学出版社 (平装本);

- 5 免疫细胞化学—现代方法及应用 (Immunocytochemistry-Modern Methods and Applications), Polak J 和 Van Noorden 5 (1986) (第二版), Butterworth Heinemann, 牛津 (精装本);

免疫细胞化学技术 (Techniques In Immunocytochemistry), Bullock G 和 Petrusz P (1982-1989) (4 卷) Academic 出版社 (平装本); 和

- 10 胶体金—原理、方法和应用 (Colloidal Gold-Principle, Methods and Applications), Hayat M, (1989-1990) (3 卷), Academic 出版社 (精装本)。

所有在本申请中引用的参考在此特别并入作为参考。

- 由于已有技术没有一致的术语, 为避免争议并起到清楚的目的, 以下说
15 明书中所使用的术语作了如下限定。术语“反应物”或“靶分析物”是指通过化验用来测定的大分子 (例如蛋白质或酶) 或其片段等。术语“捕获分析物”是指连接到膜上与并反应物结合的“捕获”化合物。术语“检测分析物”是指包含“检测”化合物的分析物, 该化合物也与反应物结合并且也是“可检测的”成分。可检测的成分通常不论是在可见光下还是在荧光下都能可见
20 地进行检测。

发明内容

- 在第一概括方面, 本发明提供了一种以“预孵育步骤”为特征的用于检测过程的装置和方法, 在此过程中反应物与检测分析物可结合在一起, 其效果为: 提高检测的敏感性而且减少试验所需的样品体积, 该预孵育步骤发生
25 在样品/分析物复合体与结合有一种或多种配基的反应膜反应之前。

在一个实施例中, 检测分析物是多检测分析物, 包括多于一种与可检测

成分结合的检测化合物。

这样，本发明的一个方面是提供一种用于试验过程的装置，包括：

第一部件，包括第一多孔反应膜，在其上结合有捕获分析物用于与将进行检测的反应物结合，该部件具有上表面和下表面；

5 第二部件，是吸收材料体，如薄纸等等，该部件设置在下面与第一部件的下表面相接触；

位于第一部件之上的腔室，所述腔室具有侧壁和由第二膜形成的基底；
和

有两个位置用于支持第一部件之上腔室的装置，在第一位置处该膜与第一部件间有足够的距离以使液体不能从该腔室迁移到吸收材料体上，在第二位置处该膜与第一部件相接触如此使液体从腔室迁移通过第一、第二膜而到达吸收材料体。

在相关方面本发明提供了一种使用本发明的装置检测预定反应物存在的方法，包括以下步骤：

15 a) 将要进行检测的样品和检测分析物放在腔室中，将腔室放在第一位置处；

b) 通过足够长时间使检测分析物结合到反应物上，如果该反应物存在的化；

c) 将腔室压到第二位置使腔室与第一多孔膜接触；

20 d) 使样品流过第一和第二膜从而使得反应物与在第一膜上载有的捕获分析物相结合，如果该反应物存在的化，
优选的，其中的检测分析物为多检测分析物。

此处所使用的“多检测分析物”是指包括多于一种与可检测成分结合的检测化合物的检测分析物。

25 本发明人意外地发现根据本发明的多检测分析物具有许多优点，包括下列任一项，如：

- 多检测化合物可以以最优结合效率与可检测成分结合，
- 由多检测化合物产生的检测分析物具有与每一种检测化合物类似的尺寸和物理特性，
- 可检测成分上的检测分析物的比例可以变化而不影响可检测成分的相对结合外形，
- 可进行定量比较，和
- 可检测成分对非特异性结合的能力降低。

因此，在优选实施例中本发明提供了一种用于测定存在至少一种预定反应物的方法，包括以下步骤：

- 10 a) 提供第一多孔膜，在其上结合有用于与至少一种反应物相结合的捕获分析物；
- b) 将要进行试验的样品和多检测分析物放在腔室中，该腔室具有由第二多孔膜形成的基底；
- c) 通过足够长时间使多检测分析物与至少一种反应物结合，如果该反
- 15 应物存在的化；
- d) 使腔室基底与第一多孔膜接触；并且
- e) 使样品流过这些膜从而使得反应物与在第一膜上载有的捕获分析物相结合。

优选的，检测化合物是一种抗原、抗体或配基。

- 20 由于抗体、抗原和配基具有优于其他分子能与目的蛋白、片段、或其抗原决定簇特异性结合的结合位点，它们可用作检测化合物。

抗体可通过商业手段得到，或者可通过传统方法生产。商业来源对本领域技术人员是公知的。

- 25 此处所使用的关于配合形成剂如抗体的术语“特异性结合”指优先与靶分析物（例如目的蛋白）联合的试剂。关于抗体，特别注意的是，应考虑到可能发生在分子和非靶蛋白质之间的一定程度的非特异性反应。尽管如此，

通过抗原的特异性识别的作用可以辨别特异性结合。

在另一个实施例中，检测化合物（抗体或配基）连接到一种成分上以便通过直接或间接标记抗体或配基，例如用放射性的、荧光、或酶标记（如辣根过氧化物酶）来检测样品中的靶分析物，从而使用本领域公知的技术检测
5 这些分析物。直接标记分析物具有与检测化合物联合或耦合的标记（可检测成分）。间接标记检测成分可以与标记的物质结合（例如标记的抗体能与显色剂结合）或可作用于其他物质产生可检测的结果。

可检测的成分可结合到抗体（或其他配基）上，并包括大分子胶体颗粒（例如胶体金颗粒）或粒子材料如乳胶小球，这些材料具有颜色、磁性或顺
10 磁性和生物学或化学活性的试剂，它们能直接或间接引起可检测的信号，这些信号为可视的、可电检测的或可进行其他的记录。这些分子可以是催化反应的酶，这些反应例如产生或改变颜色或引起电性质变化。它们可以是分子激发的，使得能级之间的电子迁移从而导致特征光谱吸收或发射。它们也可以是包括化学实体的生物传感器。在一个实施例中，检测化合物（抗体）与
15 胶体金颗粒联接。联接抗体与样品蛋白的结合产生了可通过肉眼或电子仪器读取而检测的可见信号，从而产生定量结果。也可以使用生物素/抗生物素蛋白或生物素/抗生物素蛋白链菌素和碱性磷酸酶检测系统。

其他标记物是本领域技术人员公知的。

优选的，检测成分选自包括以下物质的组：胶体金颗粒、乳胶小球、有
20 色的染料和胶体碳。

在一个实施例中，可检测的成分是胶体金。优选胶体金提供一致的反射特性。

在另一个实施例中，可检测的成分是与有色染料相连的乳胶小球。

在另一实施例中，可检测成分是胶体碳。

25 优选的，阳性结果是在检测中从“测试”样品发出的信号显著高于或低于从标准品发出的信号。

这样,本发明提供了腔室,其可作为发生预孵育步骤的预孵育腔,在该腔室中样品与多检测分析物结合,这样提高了测试的敏感性并减少了检测所需样品的体积。已发现预孵育阶段增加了试验的敏感性,几乎十倍于通常已有技术的穿流装置,而具有与侧流技术相等水平的敏感性,而同时于侧流型式所需的 10 分钟相比,仅使试验在大约 2 分钟内完成。

在一个实施例中,样品选自或来源于以下的组:农产品、微生物产品及生物产品。

在一个实施例中,农产品选自以下的组:种子、谷物或植物提取物。

在一个实施例中,样品含有粒子材料,选自以下的组:谷物提取物、细胞提取物及微生物提取物。

在另一实施例中,生物样品是体液或组织样品,选自以下的组:血液、血清、痰液和肺。

也不排除其他样品。

可采用标准方法来取得、制备和/或储存用于本发明的样品。例如,在一个实施例中,含有棉基质或类似材料的吸收性拭子可用作含有靶分析物的探针或表面或介质。在一个实施例中,洗涤该吸收性拭子除去靶分析物。优选的,然后将靶分析物和/或含有靶分析物的粒子材料溶解。

因此,在一个实施例中,可将研磨的小麦的上部悬浮液溶解,然后在腔室中与多检测分析物混合并预孵育,该多检测分析物含有连接有胶体金颗粒的抗 α -淀粉酶的第一抗体和同样连接有胶体金颗粒的对照第二抗体。然后使腔室内容物流到含捕获分析物的第一膜上,与固定的抗体结合形成可检测的信号,该捕获分析物是固定的抗淀粉酶的抗体、或者抗对照抗体和抗体/金复合体的形式。通过移去预孵育单元并用缓冲液洗涤反应膜而检测到该信号。

在另一实施例中,由于可在预孵育腔室中除去全部红细胞并使血浆流到含结合捕获分析物的反应膜上,因此也可将本发明用于检测全血中的反应

物。在这种形式下，在预孵育室基底上的基底膜通常具有适当的孔尺寸以保留红细胞并使血浆通过与第一膜接触。类似的，由于可在预孵育腔室中除去粒子物质从而不会阻塞反应膜上表面的反应区，因而可以用这种穿流形式分析含谷物提取物、细胞或微生物提取物的粒子样品。

- 5 该装置也可用于检测除血液之外的体液中的分析物，如血浆、血清、尿液、唾液和痰液。再此情况下，可通过使用疏水膜而使样品保留在预孵育腔室中。当预孵育腔室被压下时，对第二部件为获得有效的穿流毛细作用，用含洗涤剂的湿润剂使反应膜预湿或用吸湿的溶液封阻反应膜，这些吸湿溶液如蔗糖、海藻糖、果糖或者甘油。

- 10 这使反应膜的特性从非吸湿性变为吸湿性，从而在预孵育腔室基底上的膜与反应膜接触时，使样品流过到达第二部件。

在另一实施例中，如将疏水膜用作预孵育腔室的基底，该装置可以使疏水膜与反应膜接触，在需要时操作者在样品上加入湿润剂从而引起穿流。

这样，在一种相关方面，提供了一种用于检测的具有外壳的装置，包括：

- 15 第一部件，包含第一多孔膜，在其上结合有捕获分析物用于结合检测反应物，该部件具有上表面和下表面；

第二部件是吸收材料体，如薄纸等，其设置在第一部件之下并与第一部件的下表面接触；

- 20 位于第一部件之上的腔室，该腔室具有侧壁及包括第二疏水膜的基底，该膜有上表面和下表面，该预孵育腔室支持在第一部件上，使疏水膜的下表面与第一部件的上表面接触。

- 预孵育腔室也用于在溶液中或通过将抗分析物抗体结合在腔室表面上除去可能干扰试验的分析物，如人抗鼠抗体（HAMAS）。该腔室也可用于从吸收性表面（如拭子）提取目的分析物，通过在腔室内的提取溶液中旋转
25 拭子，该拭子自患者的喉咙拭取。该预孵育腔室可以是预过滤单元的一部分，在样品与第一部件上表面接触之前，也用来预过滤样品。

通过该方法可进行检测示例,在该方法中涉及两个反应步骤(将分析物与标记的抗分析物孵育,然后将该复合体结合到固相抗分析物上),它们是:

直接抗原检测

1. Ag^* (分析物) + Ab^*_1 (抗-Ag) -标记物
- 5 2. 固相- Ab_2 (抗-Ag) + Ag/Ab_1 (抗-Ag) -标记物复合体

直接抗体检测 (i)

1. Ab_1 (分析物 = 抗-Ag) + Ab_2 (抗- Ab_1) -标记物
2. 固相 $Ag + Ab_1$ (抗-Ag) / Ab_2 (抗- Ab_1) -标记物复合体

直接抗体试验 (ii)

- 10 1. Ab_1 (分析物 = 抗-Ag) + Ab_2 (抗- Ab_1) -标记物
2. 固相 Ab_3 (抗-Ag) / $Ag + Ab_1$ (抗-Ag) / Ab_2 (抗- Ab_1) -标记物复合体

间接抗原试验

1. Ag (分析物) + Ab_1 (抗-Ag) + Ab_2 (抗- Ab_1) -标记物
- 15 2. 固相 Ab_3 (抗-Ag) + Ag/Ab_1 (抗-Ag) / Ab_2 (抗- Ab_1) -标记物复合体

间接抗体试验 (i)

1. Ab_1 (分析物 = 抗-Ag) + Ab_2 (抗- Ab_1) + Ab_3 (抗- Ab_2) -标记物
2. 固相 $Ag + Ab_1$ (抗-Ag) / Ab_2 (抗- Ab_1) / Ab_3 (抗- Ab_2) -标记物复合体
- 20 合体

间接抗体试验 (ii)

1. Ab_1 (分析物 = 抗-Ag) + Ab_2 (抗- Ab_1) + Ab_3 (抗- Ab_2) -标记物
2. 固相 Ab_4 (抗-Ag) / $Ag + Ab_1$ (抗-Ag) / Ab_2 (抗- Ab_1) / Ab_3 (抗- Ab_2) -标记物复合体

- 25 *Ag 表示抗原

*Ab 表示抗体

也不排除其他类型的检测。

压电驱动打印机可用于将精确数量的多种疾病配基，如抗原或抗体或分析物，以微阵列分配到反应膜上，用于本发明第一方面的装置。可将配基或分析物以粒子的形式进行分配，例如易于识别结果的字母。通常，分配 100pl 液体反应物（1 滴），或其几倍数量的反应物，但是这会根据应用而变化。膜上点的最终尺寸受膜上的液体扩散的影响，其直径大约 55 微米或更大，但这也根据应用而变化。可以将液滴分配为直径 5~10 微米，因此可以加少量体积的液体反应物（例如 1~10 pl）。对抗体、抗原或其他反应物的微阵列的精确定量打印的使用，意味着使用这些反应物的精确定量的测试可用来进行单个样品的多疾病诊断。该阵列技术可用于对药物或所有诊断领域的其他标记物进行试验。

或者，采用日本 ATOM 医疗公司（ATOM Medical Corporation）生产的成人/新生儿注射泵 1235，这种泵通常是用于给药者给医院患者通过导管注射少量静脉液，可适于将单管道或多管道的捕获分析物施加到第一膜上，例如硝酸纤维素膜。

在一个优选实施例中，将用于检测肺结核、HIV、肝炎、梅毒和疟疾抗体的配基沉积在反应膜上。这可以从单个的血样中同时诊断肺结核、HIV、肝炎、梅毒和疟疾，而不需要中间的样品处理步骤。

使用本发明可对小体积的全血样品进行检测，从而本发明提供了一种快速诊断检测装置，该装置使用简单，可用于实验室和救护地(point-of-care)的诊断场所。例如，穿刺手指所得的血液就足够进行检测了。同样通过增加吸收材料（第二部件）的量，就可在该装置中使用大体积的样品。例如，可测定 10ml 的稀释液如尿液，从而检测低丰度的分子。

可以滴定量和/或浓缩物打印分析物和/或配基（抗原或抗体）。这样，在一个单独的筛选中，提供在溶液中一种分析物-配基水平的定量方法。

附图说明

本发明的特定实施例现仅通过示例的方式进行描述,并参照附图,其中:

图 1 是在第一位置时,体现本发明状况的装置的示意图;

图 2 是图 1 装置在第二位置的示意图;

5 图 3 表示本发明状况的检测装置或盒体的透视图;

图 4 是图 3 所示盒体部件的分解图;

图 5a~5d 显示了使用图 3 的装置进行检测中的各个阶段;和

图 6 是掺有 α 淀粉酶的未进行预孵育的样品与进行了一分钟预孵育的样品相比较的测试结果图。

10 具体实施方式

检测分析物制备

物质与胶体金结合产生了免疫金结合物(一般是免疫球蛋白),这些物质被动地结合形成稳定的含有抗体靶活性的复合体。产自本国 Proteome Systems 有限公司(PSL)的金胶体分散系由羟氨还原剂激活。基于假设脰
15 作为胶体中的部分而被部分保留,通过在结合步骤加入戊二醛使在胶体结构中的任何残余的脰与来自免疫球蛋白的自由胺之间形成席夫碱,从而使该免疫金结合物稳定。

对免疫球蛋白(浓度和 pH)优化的结合型式通过在特定 pH 值下相对于固定等分量的金胶体抗体浓度的滴定,并用盐溶液处理混合物而获得。当
20 用盐溶液处理时,胶体和抗体之间充分的结合的浓度比例避免了胶体从悬浮液中絮凝或聚集。因此,在低蛋白浓度下,加入盐导致胶体从悬浮液中凝结出来,但是当达到最佳抗体水平时,胶体在悬浮液中保持稳定(在 450nm 和 600nm 波长之间利用光谱方法测定胶体悬浮液的完整性)。抗体浓度值给定了形成稳定的免疫金共轭复合体所需的最小保护浓度。在滴定中使用
25 5mM 硼酸盐中含有 0.1~0.2mg/mL 抗体浓度,并且对多克隆抗体选择 pH 为

9, 该 pH 值通常高于等电点 (pI) 值的范围而与多克隆血清中免疫球蛋白的范围相交。在单克隆抗体来自杂交瘤细胞的情况下, 免疫球蛋白具有唯一的等电点, 胶体的 pH 值通常设定在抗体 pI 点之上 0.5 ~ 1 个单位。

用于结合的抗体浓度为由此处所述的滴定过程所确定的最小“保护”浓度的 110 %。

结合方案 (对单抗体)

测出所需的胶体体积 (假设 90 % 的产率, 该体积接近等于在对胶体光学密度测量下的最终结合物的体积)。

将 5vol % 戊二醛溶液加到快速搅拌的胶体中得到最终浓度为 0.002 % 的戊二醛。

加入戊二醛 5 分钟后, 将已计算量的抗体溶液加到快速搅拌的悬浮液中。如果要加入大量抗体 (>10mL), 则以稳定的滴流加入 (优选通过滴液漏斗)。

根据胶体的量 (200 mL ~ 5L), 在 30 ~ 90 分钟后, 悬浮液的 pH 值用 0.2M 磷酸从 pH9 降低到 pH7 (除非在 7.5 ~ 6 pH 之间进行结合)。

将已计算体积的 10 % (w/v) 牛血清白蛋白加入悬浮液, 使牛血清白蛋白在悬浮液中的最终浓度为 0.5 %。

当体积大于 1L 时, 将悬浮液搅拌 3 ~ 4 小时或过夜, 然后在 10,000rpm 离心 35 ~ 60 分钟 (根据体积及胶体尺寸)。

将悬浮物从离心悬上清液中除去, 将浓缩的液体在 pH7.2 含 0.2 % 牛血清白蛋白和 0.1 % 叠氮钠 (作为防腐剂) 的 2mM 硼酸中继续离心。

结合方案 (对多抗体)

对于结合至胶体上的多于一种的抗体, 对每种抗体进行保护浓度滴定 (用盐探查凝集)。所用多个抗体的体积是从滴定法中获得的各个抗体 (+10 %) 的体积。

如果所需要的抗体的结合程度与它们各自的最佳结合程度相等,则将抗体预混合并一起加到胶体中去(在加入戊二醛后)。然后进行上述单独结合的过程。如果所需要的每一种抗体都有特定的比率,则首先加入第一抗体,隔一段时间后加入第二抗体。对某些抗体的结合已确定了在胶体上结合程度的时间过程,第二抗体和其后抗体的结合程度以规则形式随加入第一抗体和加入其后抗体之间的时间间隔而递减。30~40 分钟的间隔之后,发现第二抗体结合的恒定结合程度大约为第一反应水平的 10%。在一些情况下,发现在所需浓度比率下,试验抗体和过程对照抗体之间的间隔为 5 分钟是最佳的。

10 在一个实施例中,第一抗体是鼠抗 α -淀粉酶在 pH8.3 下结合,第二抗体(对照)是羊免疫球蛋白 G。在另一实施例中,可同时加入两种第一抗体(例如抗人 IgG1 和抗人 IgG2),其后在适宜的间隔后加入对照抗体。

制备具有捕获分析物的膜

利用压电化学打印技术以适宜尺寸的阵列在蛋白质捕获膜基质(例如硝酸纤维素膜)上打印配基形式的捕获分析物,如抗原或抗体(如 TB、HIV-1)。用于本发明的适宜化学打印系统包括用于 DNA 诊断中分配液体的使用压电需求(drop on demand)喷墨打印技术或称为“CHEM-JET”的 Combion 公司合成过程。为探究 DNA 诊断所需液体得分配,已研制了八液体的打印机作为由标准技术院(Institute of Standards and Technology, 美国)建立的
20 Genosensor Technology Development (GTD) 项目的一部分。现在的研究聚焦于将寡聚核苷酸微点打印在固相支持物上。在由加利福尼亚技术学院研制的 CHEM-JET 技术中,将提供液体的小体积反应物喷在固体基质的特定点或地址上,如同喷墨打印机将墨喷在书页上。通过反复用一种或另一种构件块组返回每一地址,在此情况下对该过程修饰核酸,可以构成巨大的二维短
25 DNA 链(寡核苷酸)文库。在本申请人的共同未决国际专利申请 No.PCT/AU98/00265 中描述了一种包括成像装置的仪器,其整个内容在此作

为参考引用。在所述实施例中，以 100pl 液滴或其倍数（如 10nl）的形式将抗原打印在反应膜上。每一等分试样间隔 1mm。然而根据所选抗原的滴度和阵列尺寸可以增大/减小这些体积和间隔。例如，可以将液滴体积分配为低至 1 ~ 10 pl 的量。

- 5 在特定的优选实施例中，将抗原或抗体以点或线的阵列或字母的形状打印，以便于可以进行单个样品的定量的多分析物分析。

在已分配的抗原干燥后，使用下列溶液封闭（硝酸纤维素）膜上的非特异性蛋白结合位点：含 0.5 %（v/v）酪蛋白的磷酸盐缓冲盐溶液（PBS）+0.05 %（w/v）叠氮钠+0.1 %（v/v）吐温-20（PBSA 洗涤缓冲液）。然而也可选
10 择在打印抗原（或抗体）或其他配基后不封闭该膜。

在另一优选实施例中，可采用用于给患者进行液体静脉注射的注射泵技术来将单个或多个条带设置在硝酸纤维素膜上。

在穿流形式中使用免疫结合体

- 常在 520nm 波长下测定免疫结合体悬浮液的光密度。该值给出了胶体
15 浓度的相对测定值。从结合条件的知识中已知光密度 = 1 时抗体与胶体结合的程度，这可用于确定用于穿流试验的最佳体积（每 mL 胶体的抗体浓度×结合体的体积×结合体的光密度）。

- 当与外壳中的活性膜接触之前，向过滤装置中已进行预孵育的样品之中加入免疫结合体。这可以使样品中的分析物与已连接到胶体上的活性抗体发
20 生最大程度的结合。然后该混合物通过暴露于样品液的活性膜过滤时，该结合体:分析物复合体由固定在膜上的测试抗体捕获，同时程序控制抗原与连到结合体上的第二抗体结合。

对多分析物样品，当结合的抗体在胶体颗粒上达到最佳程度的结合时，结合体上的多抗体（可检测成分）可同样程度地结合到样品分析物上。

- 25 附图说明

现回到附图，图 1 显示了穿流试验装置 10，其使用了上述的硝酸纤维素膜。该装置的形式为箱体 12 并具有与之相联的可移动过滤架 14。在箱体
内有膜（通常为硝酸纤维素）16，如上所述，其上打印着配基形式的捕获分
析物，该膜位于吸收基质 18 的顶部。吸收基质优选包括多层吸收织物或吸
收垫，如吸墨纸，在特定实施例中为 24 层（双折），已发现这样具有理想的
5 孔隙率，使得多种溶液以最快速度流过。由于这种快速穿流导致产生较低
的背景，同时具有较高的反应特异性和信号分辨率，因此是重要的。

如图 1 所示，箱体顶部在它的上表面形成一个开口和一个截头的倒圆锥
体池，其侧面向下延伸到膜 16 上，形成具有倾斜侧面和由膜 16 构成基底的
10 腔室。

过滤单元架 14 放在箱体 12 的上表面之上。它也形成了倒锥形池形式的
腔室 21，也称为“预孵育腔室”，其具有斜侧的侧面和由 5 μ m Whatman 1
级膜或 0.22 μ m 亲水 Durapore 膜过滤器（澳大利亚 North Ryde 的 Millipore
公司）形成的基底 22。然而根据应用，其他形式的过滤器/膜及孔径也是适
15 宜的。该膜的功能是将要进行测试的样品在池或预孵育腔室 21 中保留足够
长的时间从而进行“预孵育步骤”。当膜 22 被压下到与膜 16 接触时，毛细
吸引力将样品从腔室 20 通过膜 22 和 16 吸进入织物 18。

为易于使用，设置了两个销 24，用以支撑着过滤架 14，使其在预孵育
步骤中以适当的距离保持在箱体 12 上，而在图 2 所示的该过程的第二阶段
20 中将过滤架推下以便于膜 22 和 16 接触。也可以移走该过滤架 14，使得可
检验膜 16 从而确定检测结果。

图 3~5d 表示了一种设计为体现图 1 和 2 特点的商业检测装置。

在这些图中，等价于图 1、2 所示部件的那些部件使用了同样的附图标
记。箱体 12 含有上模件 12a 和下模件 12b。多孔膜 22 由压平的过滤纸截头
圆锥 22a 的基底形成，并由过滤保持器 23 固定在适当位置。过滤单元架 14
25 具有两个浅凹 14a，当需压下过滤架以使膜 22 和 16 接触时，操作者的拇指

可压在上面。

图 5a~5d 说明了该装置的操作阶段。图 5a 表示过滤架从盒体 12 上分离。图 5b 表示处于腔室/池 21 的基底膜 16 相分离位置上的预孵育。图 5c、5d 表示该装置在过滤单元已压下后，使膜 22 与 16 接触从而使样品流到达吸墨纸 18 上。

如果用疏水膜代替膜 22，可以单独地在如图 3、4 所示的膜 22 始终与 16 接触的位置上操作该装置进行预孵育步骤。疏水膜 22 可避免在孵育腔室 21 中的样品流到反应膜 16 上。当腔室 21 中的检测分析物与反应物已结合足够时间后，将适当的湿润剂加到腔室中的样品中去，这样使样品流过疏水膜，通过反应膜 16 并进入吸收基质 20 中。

实施例 1

预过滤腔室的应用

将 Whatman 膜（纸）或 Reemay 过滤器（聚酯； 1cm^2 ）插入过滤架的腔室 21 中形成圆锥形保留容器（预过滤单元）。

样品与检测分析物一起用吸管吸到塑料预过滤腔室（ $50\sim 100\mu\text{l}$ ）中，该检测分析物以检测抗体（ $50\sim 100\mu\text{l}$ ）的形式与胶体金（颗粒尺寸为 $20\sim 50\text{nm}$ ）结合。当将样品轻缓地吸入以确保充分混合后，使样品与金结合体（O.D.4）在预孵育腔室中预孵育 30 秒。在 30 秒后将腔室压入试验盒体 12 的池 20 中。当与含有检测带的膜接触时，溶液滤过进入下面的吸收层 18。当溶液已滤过时弃去预过滤器 14，然后在反应膜上加入两滴 PBSA 洗涤缓冲液以洗去过剩的金结合体，以在膜 16 上显示出检测结果。

应用样品与检测分析物的预孵育使敏感度增加了大约 10 倍。而且，在预孵育腔室中保留了任何的微粒物质，所有这些物质可以除去以提供清楚的信号。使用预孵育腔室具有进行预孵育步骤和预过滤步骤的双重作用，这也使得可通过预孵育多分析物探针，如与不同检测分析物结合的胶体金，从而在反应膜上进行多分析物测定。而且，可在预孵育步骤中除去或吸去在试验

中导致假阳性或假阴性的干扰分析物或底物，例如通过抗 HAMA 抗体可吸收去抗鼠抗原的人抗体。

虽然上述的实施例涉及关于疾病的抗原，但可以使用免疫检测装置，例如变态反应测试试剂盒，检测滥用药物的测试试剂盒或分析如牛、猪的非人源样品的试剂盒，兽医测试，及农业测试如谷物质量测定，等等。

本发明的方法和装置特别适用于拭子，该拭子可以简单地放到腔室 21 中去，并在含结合到胶体金上的检测抗体（50~100 μ l）的液体中旋转该拭子 30 秒，然后将预过滤单元压下使膜 22 与 16 接触在一起。

可将任何配基与分析物的结合应用于本发明系统。配基的选择应适应在特定国家或群体中测定流行性疾病。例如，来自下面疾病组合的分析物可用于用该阵列诊断。

1. TB 和 HIV

2. B & C 型肝炎、HIV

3. 查格斯氏病（Chagas）、HIV、TB、梅毒（Syphilis）及 B & C 型肝炎

4. 疟疾（Malaria）、登革热（Dengue）、TB、查格斯氏病

或者可将代表不同种小麦或其他农产品的抗原打印在反应膜上，能在一个测试中测定多个品系。

实施例 2

该试验装置也可用于测定除血液之外的体液中的分析物，如血浆、血清、尿液、唾液及痰液。在该系统中，可使用疏水膜如 Reemay 或 Hollingsworth 和 Vose7303，来替代前面所述的 Whatman 1 级膜或 0.22 μ m 亲水 Durapore 膜过滤器，从而将样品保留在预孵育腔室 22 中。样品与检测分析物混合以经过所需的预孵育时间。当将预孵育腔室 22 压下到盒体 12 上时，为了在吸收层 18 上获得有效的穿流毛细作用，可进行下面两步操作中的一个：

1. 将含有捕获分析物的膜 16 用至少一滴洗涤缓冲液预润湿，该洗涤缓

冲液含有 0.01M 磷酸盐, 0.15M NaCl, 0.0 % 叠氮化物, 0.5 % 吐温 20 或任意含清洁剂的湿润剂。

2. 用吸湿溶液如蔗糖、海藻糖、果糖或甘油封闭含有捕获分析物的膜 16。这使得膜 16 的特性从非吸湿性变为吸湿性膜, 当预孵育腔室 22 的基底上的膜与膜 16 接触时, 使得样品流到吸收层 18 上。

实施例 3 (比较性示例)

未进行预孵育的样品与进行了 1 分钟预孵育的样品进行比较, 该样品以上述型式掺加了 α -淀粉酶。

操作:

- 10 在 6 % 的牛血清白蛋白溶液中掺加 0.1ng/ml、0.5 ng/ml、1ng/ml、10 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml、500 ng/ml 及 1000 ng/ml, 将它根据以下操作加到上述型式中去:

未进行预孵育:

- 15 I. 将预孵育腔室压下以使腔室的基底与含有抗 α -淀粉酶的捕获抗体的第一部件接触。

II. 将 60 微升含 0.5 % 吐温的盐溶液加到预孵育室中, 并使之过滤到第一膜下面的吸收材料上。

III. 将 100 微升掺有 α -淀粉酶的样品加到腔室中, 并使之过滤到第一膜下面的吸收材料上。

- 20 IV. 将 60 微升含 0.5 % 吐温的盐溶液加到预孵育室中, 并使之过滤到第一膜下面的吸收材料上。

V. 将 60 微升连有胶体金 (颗粒尺寸为 20 ~ 50nm) 的抗 α -淀粉酶抗体加到预孵育室中, 并使之过滤到第一膜下面的吸收材料上。

- 25 VI. 将 60 微升含 0.5 % 吐温的盐溶液加到预孵育室中, 并使之过滤到第一膜下面的吸收材料上。

VII. 移去预孵育室, 用光密度计扫描反应膜上的结果。以象素强度确定

信号强度。

进行一分钟预孵育：

I. 将 60 微升含 0.5 % 吐温的盐溶液加到第一膜上, 并使之过滤到下面的吸收材料上。

5 II. 将预孵育室悬在第一膜上, 使该腔室与膜之间存在空间。

III. 将 100 微升掺有 α -淀粉酶的样品和 60 微升连有胶体金 (颗粒尺寸为 20 ~ 50nm) 的抗 α -淀粉酶抗体在预孵育腔室中孵育 1 分钟。

IV. 将该腔室压下, 使它与第一膜接触, 使样品与抗体金结合体的混合物过滤到吸收材料上。

10 V. 将 60 微升含 0.5 % 吐温的盐溶液加到预孵育室中, 并使之过滤到吸收材料上。

VI. 移去预孵育室, 用光密度计扫描反应膜上的结果。以象素强度确定信号强度。

15 图上的每个数据点是使用上述装置的两次试验的平均值。该结果显示具有检测分析物的样品的预孵育具有最小的检测极限, 该极限为 α -淀粉酶的大约 500pg/ml 的象素密度处。与未进行预孵育的大约为 50 ng/ml 的最小检测极限相比, 显示了预孵育使敏感度增加了近 10 倍。

实施例 4 (比较性示例)

20 表明了具有检测分析物的样品进行了增加的预孵育时具有增强的敏感度。

用抗淀粉酶的免疫金结合体处理用 0.5 % 盐溶液稀释为 400 ng/mL 的淀粉酶样品, 以如下所示以不同方案等分, 应用穿流模式。

A. 在加入结合体之前, 将样品加到该模式中 (不存在过滤器) 并使之进行过滤, 然后当样品一通过该膜则加入等份量结合体。

25 B. 使样品以适当的比例与金结合体混合并立即等分为穿流模式。

C. 用方案 B 的方法使样品混合, 但是在 60 秒间隔后加入到穿流模式中。

以象素强度表示的结果显示在下表中（两个试验）

方案	样品峰	对照峰	样品区	对照区	S/PC 比率
A	82	286	657	2120	317
B	288	758	2062	5509	383
C	823	949	5843	6765	884

方案	样品峰	对照峰	样品区	对照区	S/PC 比率
A	89	516	588	3890	588
B	482	830	3736	6345	602
C	708	829	4506	5822	792

很清楚，当分析物与结合体探针进行预孵育时，在穿流模式上进行连续
5 的检测，样品信号的大幅度增加。当样品分别与检测捕获抗体进行孵育时，
在可检测的淀粉酶中检测水平（对 400ng/mL 样品）的差异在 7.5 倍~10 倍
之间增加。

如特定的实施例所示，本领域技术人员应理解对本发明可进行多种变化
和/或修改，而不会脱离本发明概括性描述的宗旨或范围。因此，无论从那
10 方面来说本发明实施例都认为是说明性的而不是限定性的。

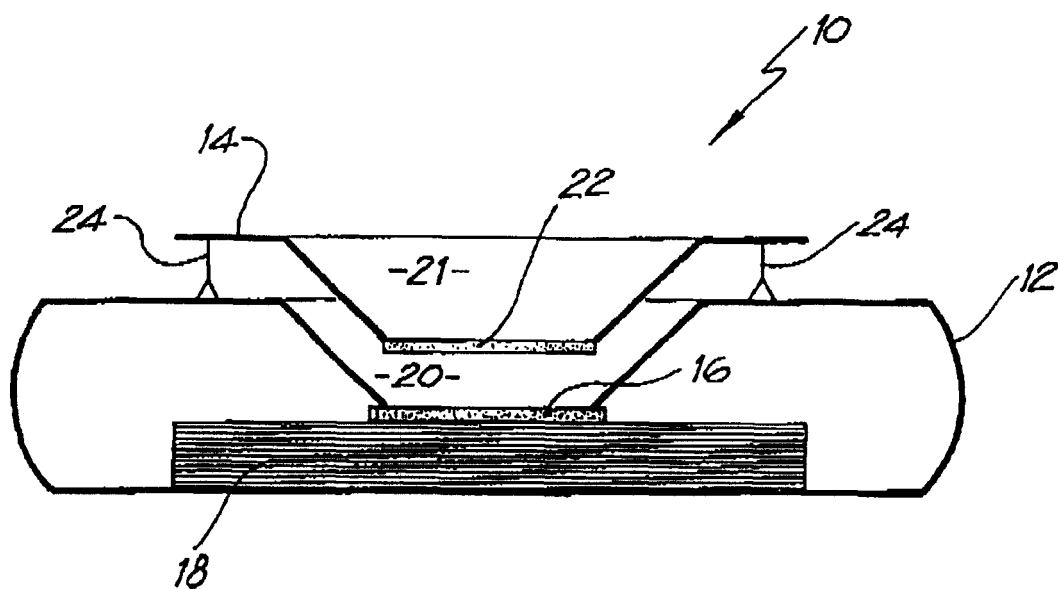


图 1

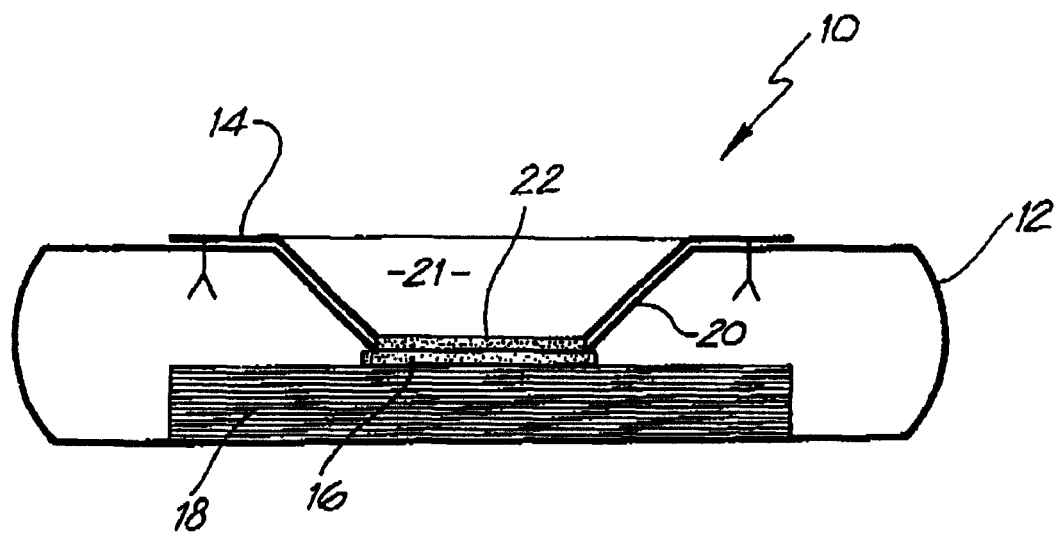


图 2

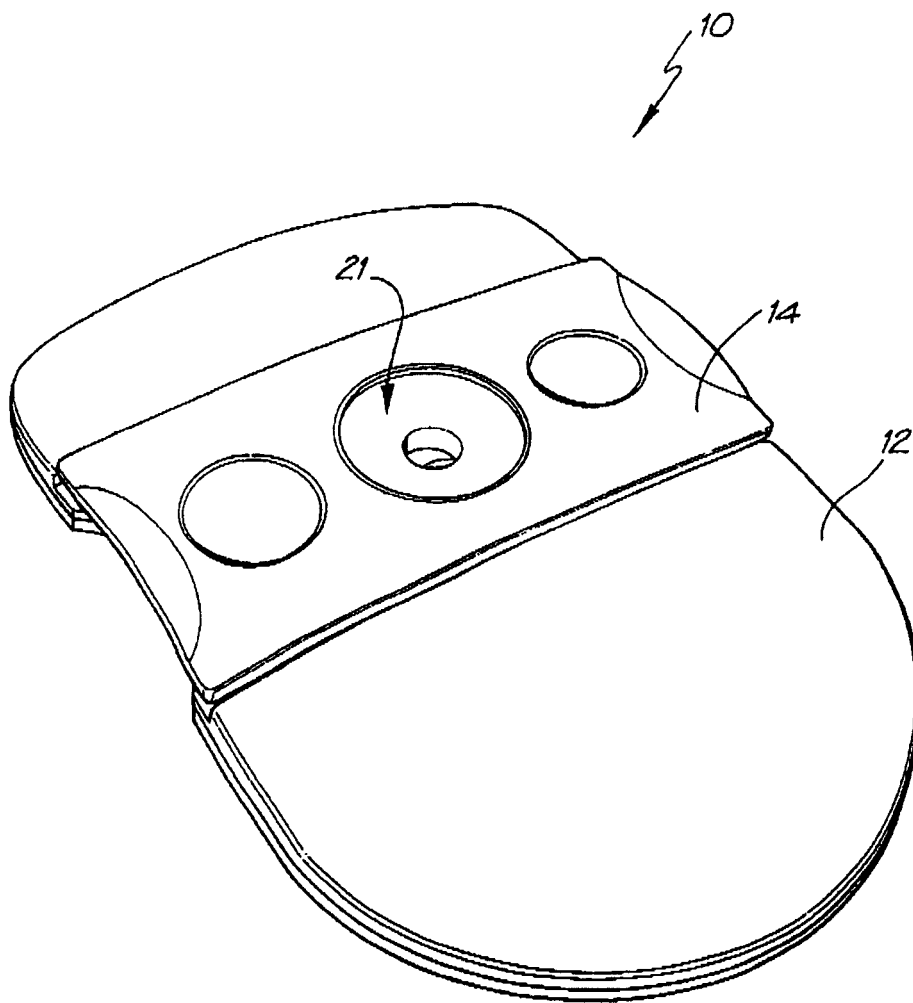


图 3

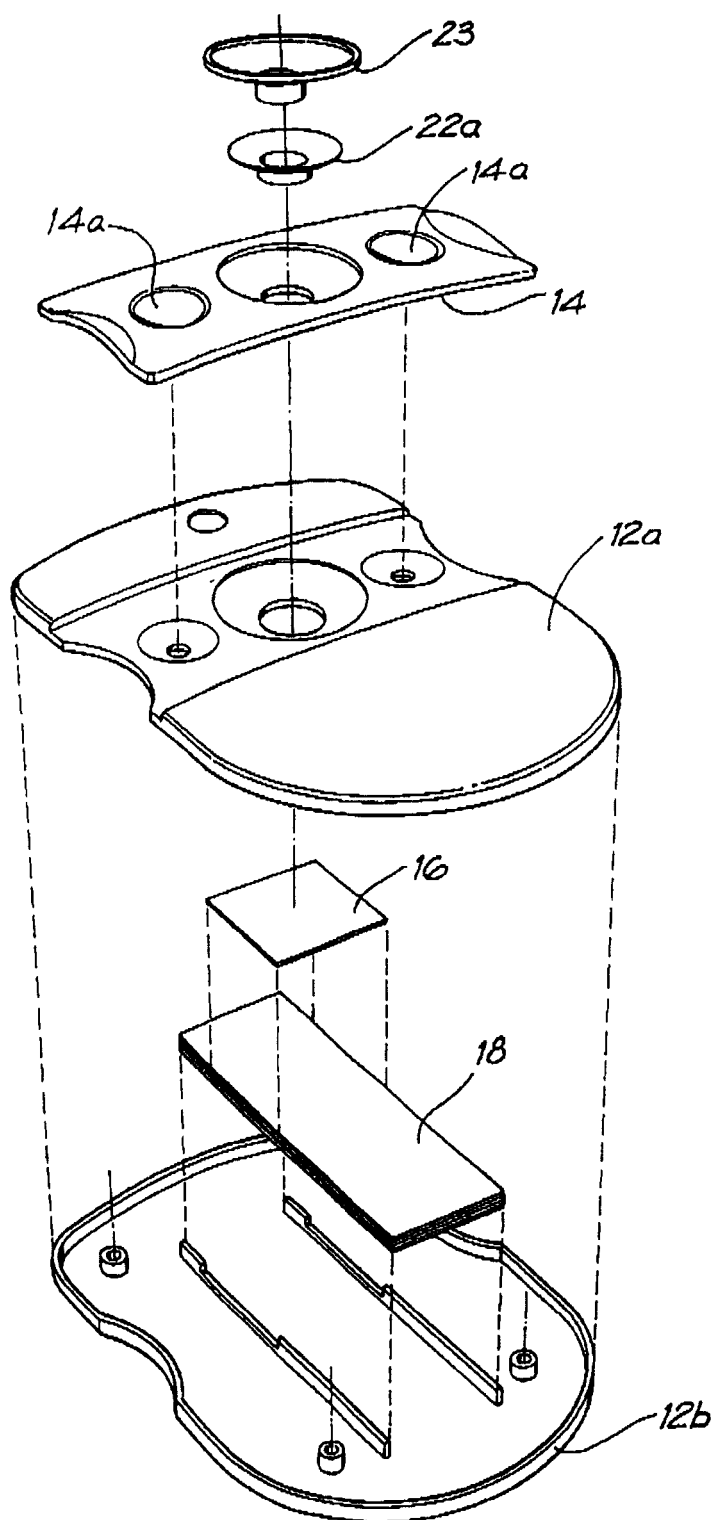


图 4

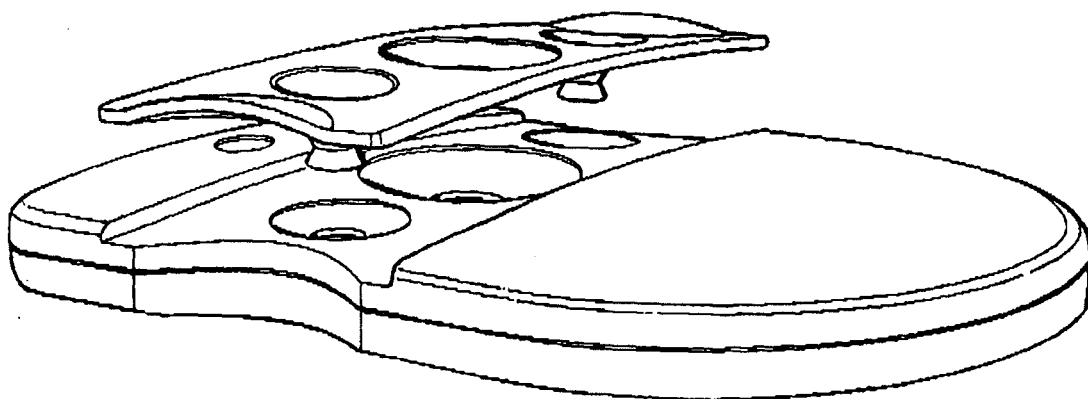


图 5a

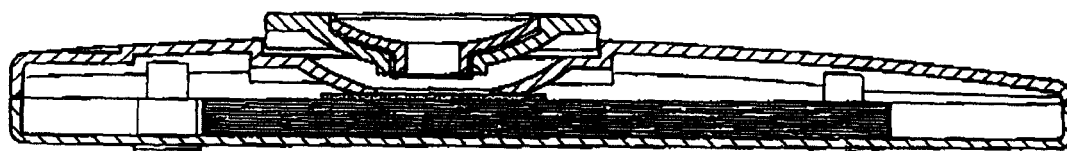


图 5b



图 5c

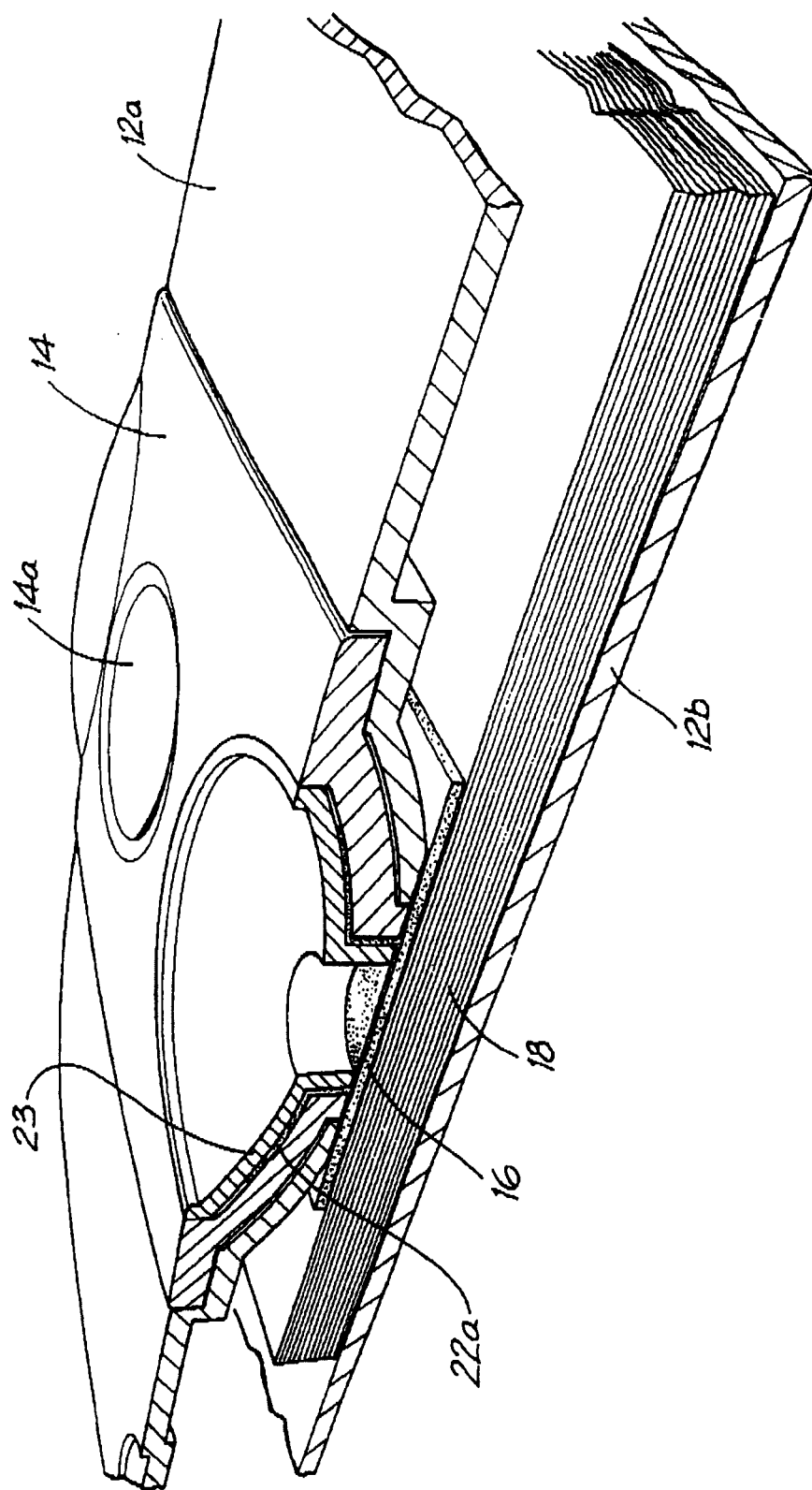


图 5d

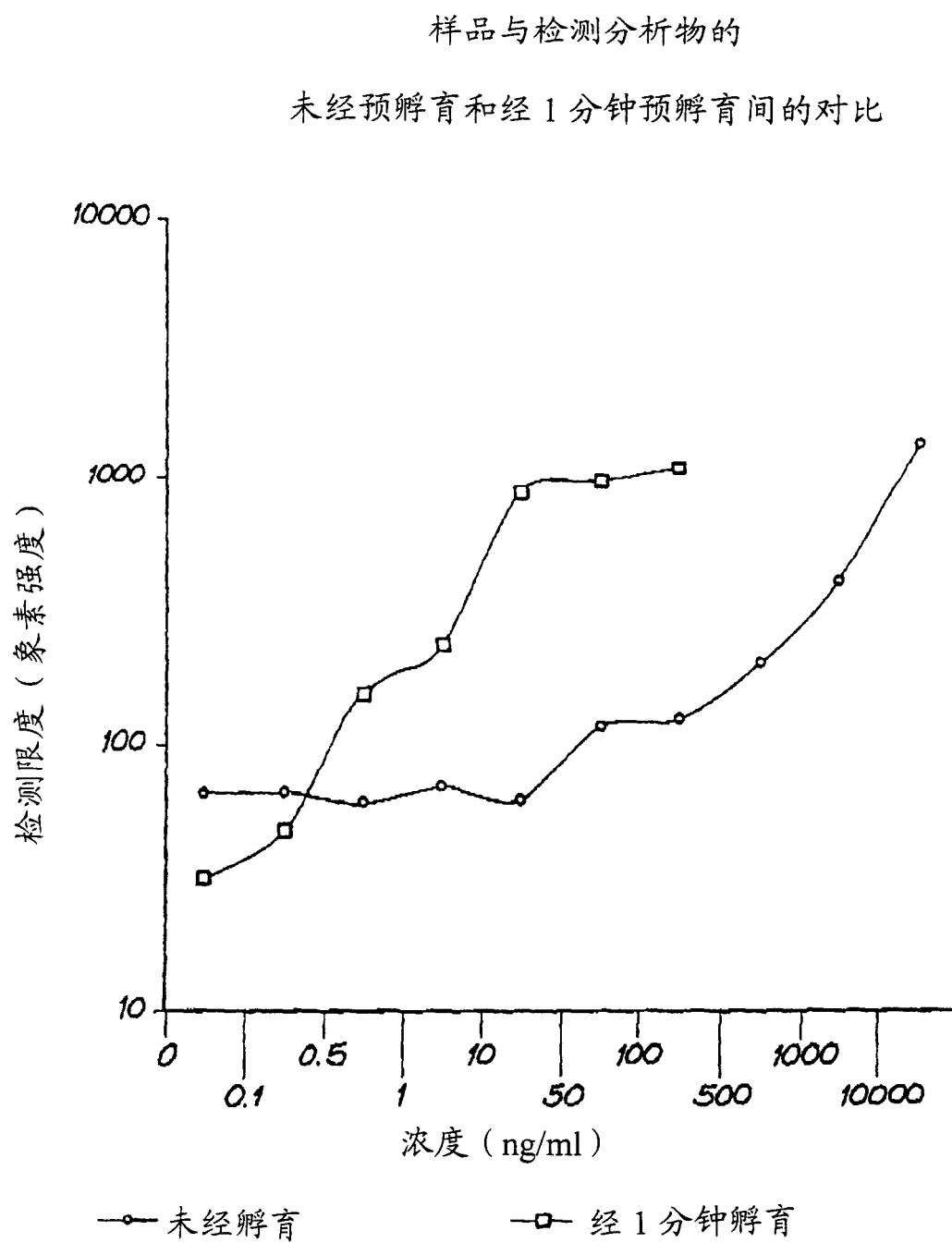


图 6

专利名称(译)	诊断试验方法		
公开(公告)号	CN1646909A	公开(公告)日	2005-07-27
申请号	CN02824811.2	申请日	2002-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	普罗托姆系统知识产权有限公司		
申请(专利权)人(译)	普罗托姆系统知识产权有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	普罗托姆系统知识产权有限公司		
[标]发明人	安德鲁约翰斯隆 安德鲁亚瑟古利 罗伯特艾利科尔 大卫埃莫贝尔		
发明人	安德鲁·约翰·斯隆 安德鲁·亚瑟·古利 罗伯特·艾利·科尔 大卫·埃·莫贝尔		
IPC分类号	G01N33/52 B01L3/00 G01N33/48 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/553 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/571 G01N33/576 G01N35/00 G01N35/10 C12M1/34		
CPC分类号	Y10S435/81 Y10S436/807 G01N33/54366 Y10S435/973 B01L2200/0642 B01L2300/16 B01L2300 /0825 B01L2400/0406 B01L3/5023 B01L2400/0633 Y10S436/81 G01N33/54306 Y02A50/58		
代理人(译)	王琦 宋志强		
优先权	2001PR9451 2001-12-12 AU 2002950212 2002-07-11 AU		
其他公开文献	CN100510747C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明披露了一种用于穿流型检测过程的方法和装置。该方法的特征在于：“预孵育步骤”，在该步骤中要进行分析的样品(通常为检测特定蛋白质的存在)和已知可结合到特定蛋白质上的检测分析物(通常为与胶体金或荧光标记连接的一种或多种抗体)一起结合一段所需的时间。该预孵育阶段发生在样品和检测分析物的混合物与连接在膜上的捕获分析物接触之前。提供该预孵育阶段可提高检测灵敏度，并且可减少检测所需样品的体积。一种用于实施该方法装置，其特征为：用于接受样品和检测分析物的预孵育腔室，其具有由膜形成的基底和在其上连接有捕获分析物的第二膜。在一种型式下，预孵育腔室在一个位置处支撑在第二膜上，但可以将它推至与载有捕获分析物的膜相接触的位置，如此使得液体通过捕获膜从孵育腔室迁移出来。在另一种型式下，孵育腔室基底的膜是疏水的，它的下侧与捕获膜相接触，当在预孵育室的内容物中加入湿润剂时，发生液体迁移。

