

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710001266.8

[43] 公开日 2007年7月18日

[11] 公开号 CN 101000343A

[22] 申请日 2007.1.11
[21] 申请号 200710001266.8
[30] 优先权
 [32] 2006. 1. 14 [33] EP [31] 06000791.1
[71] 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司
 地址 瑞士巴塞尔
[72] 发明人 于尔根·克莱普

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司
 代理人 章社杲

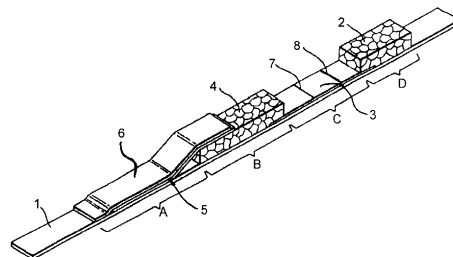
权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 1 页

[54] 发明名称

具有改进的对照区的免疫检测件

[57] 摘要

本发明涉及用于实施免疫夹层试验以确定来自液体样品的分析物的检测件，包含：试剂区或结合区，含有分析物结合伴侣和可直接或间接地通过视觉、光学或电化学方法被检测到的标记物（例如，酶、荧光标记物或直接标记物）的结合物，其中所述结合物可以被液体样品溶解；检测区，含有永久固定（即不能被液体样品解离）的用于该分析物或含该分析物的复合物的结合伴侣；以及对照区，含有永久固定的用于分析物结合伴侣和标记物的结合物的结合伴侣，其特征在于对照区另外含有永久固定的一种或多种用于分析物或含有分析物的复合物的结合伴侣。



1. 用于实施免疫夹层试验以确定来自液体样品的分析物的检测件，包含：

试剂区，其含有分析物结合伴侣和可以通过视觉、光学或电化学方法直接或间接地被检测到的标记物的结合物，其中所述结合物可被所述液体样品溶解；

检测区，其含有永久固定的用于所述分析物或含所述分析物的复合物的结合伴侣；以及

对照区，其含有永久固定的用于所述分析物结合伴侣和标记物的结合物的结合伴侣；

其特征在于，所述对照区另外含有一种或多种永久固定的用于所述分析物或含所述分析物的复合物的结合伴侣。

2. 根据权利要求1所述的检测件，其特征在于，在所述检测区和对照区中的永久固定的用于所述分析物或含所述分析物的复合物的结合伴侣是相同的。
3. 根据权利要求1所述的检测件，其特征在于，在所述检测区和所述对照区中的永久固定的用于所述分析物或含所述分析物的复合物的结合伴侣是不相同的。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的检测件，其特征在于，在所述对照区中的永久固定的用于分析物结合伴侣和标记物的结合物的结合伴侣是多半抗原。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的检测件，其特征在于，在所述检测区中的永久固定的用于所述分析物或含所述分析物的复合物的结合伴侣选自由以下物质组成的组：
 - 所述分析物的抗体或抗体的免疫活性片段；
 - 抗原、半抗原或多半抗原；以及
 - 抗生素蛋白链菌素或多抗生素蛋白链菌素。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的检测件，其特征在于，在所述对照区中的永久固定的用于所述分析物或含所述分析物的复合物的结合伴侣是选自由以下物质组成的组：
 - 所述分析物的抗体或抗体的免疫活性片段；
 - 抗原、半抗原或多半抗原；以及
 - 抗生素蛋白链菌素或多抗生素蛋白链菌素。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的检测件，其特征在于，在所述检测区中的永久固定的用于所述分析物的结合伴侣是所述分析物的抗体或抗体的免疫活性片段，并且在所述对照区中的永久固定的用于所述分析物的结合伴侣是所述分析物的抗体或抗体的免疫活性片段。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的检测件，其特征在于，在所述检测区中的永久固定的用于含所述分析物的复合物的结合伴侣是抗生素蛋白链菌素或多抗生素蛋白链菌素，并且在所述对照区中的永久固定的用于含所述分析物的复合物的结合伴侣是抗生素蛋白链菌素或多抗生素蛋白链菌素。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的检测件，其特征在于，在所述检测区中的永久固定的用于含所述分析物的复合物的结合

伴侣是抗生蛋白链菌素或多抗生蛋白链菌素,并且在所述对照区中的永久固定的用于所述分析物和/或含所述分析物的复合物的结合伴侣是:

所述分析物的抗体或抗体的免疫活性片段, 和/或
抗生蛋白链菌素或多抗生蛋白链菌素。

10. 用于检测来自液体样品的分析物的方法, 其中,

将所述样品施加至根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的检测件;

如果所述分析物存在于所述样品中, 则其与所述标记结合物发生反应而形成分析物-结合物复合物;

将在所述检测区中的所述分析物-结合物复合物结合至永久固定的用于所述分析物或含所述分析物的复合物的结合伴侣;

将在所述对照区中的未与所述分析物发生反应的标记结合物结合至永久固定的用于所述结合物的结合伴侣; 以及

将在所述对照区中的所述分析物-结合物复合物结合至永久固定的用于所述分析物或含所述分析物的复合物的结合伴侣。

具有改进的对照区的免疫检测件

技术领域

本发明涉及一种用于实施免疫夹层试验以确定来自液体样品的分析物的检测件（测试件，test element），其包括新的对照区，优选以免疫层析（免疫色谱，immunochromatographic）检测装置（测试条，test strip）或免疫（微流或毛细间隙）检测件的形式。

背景技术

用于分析诸如血液、血清、血浆、尿液、唾液、汗液等的液体样品的诊断化验经常包含应确保正确实施检测及其功能性的对照机制（control mechanism）。

当在自动化实验室仪器上进行诊断检测时，通常由于仪器自身确保和/或监控检测的正常进行，因此对于检测为内在性的对照机制是很少见的。在自动化实验室仪器的情况下，例如移液体积（pipetting volume）或孵育时间以及其它参数通常由自动化分析器自动监控。检测的功能性（涉及试剂和仪器）通常通过在一系列测量中另外确定的对照样品来确保。

在现场检验（即时检验，point-of-care (PoC)）环境下，即在专业实验室外的患者样品检测的情况下，经常进行单个测定。用于这种情况的检测件通常包含干燥试剂，其通过样品重新溶解，从而重新激活用于实际分析。免疫检测件如免疫层析测试条或免疫毛细管

间隙检测件已被证实在 PoC 环境下，特别是在免疫化验场所中很有用。该免疫检测件通常基于可由视觉或借助检测仪器（读出器）进行评价的光学可检测反应。在这种情况下，执行检测的人有一个特别的责任：因为在湿化学检测情况下，原来由自动化实验室仪器来执行的一些功能将不得不由实施检测的人来完成（例如，移取正确的样品体积或遵守测定时间）。

然而，在 PoC 环境下执行检测的人员通常并不是受过专门训练的雇员。PoC 场所中的检测经常由医生、护士、医师助理、药剂师或患者自己完成。相反，在专业实验室（例如，医院的中心实验室、大型实验室）中，检测则由经过专门训练的技术助理（例如 MTA）完成。

因此，检测供方开发了用于这些特殊“分散的”或 PoC 应用的所谓机载对照（on-board control），其在进行检测时响应于主要操作错误（如剂量不足）和/或响应于检测故障，从而使得使用者察觉到无效的检测结果。

在其根据所谓的夹层原理起作用的免疫检测件的特殊情况下，“机载对照”通常以对照线（control line）或对照区（control zone）（下文这两个术语以同义词使用）的形式来实现。

在理想情况下，这些对照线或对照区用来确保使用者确认已经采用足够的样品体积用于正确的检测实施，确保在检测件中浸渍或干燥的免疫化学试剂仍旧以可移动形式（migratable form）（即，以可在检测件中移动的形式）存在，以及确保对于功能至关重要的试剂的免疫学活性在一定范围内仍然存在。另外，对照线或对照区使得不正确的检测实施或检测件的不可用性被识别，因而有助于防止获得错误的检测结果。

典型的检测结构如下：

结合区 (conjugate zone) (也称试剂区 (reagent zone)) 通常位于样品施加区和检测区之间的检测件之中或之上。样品施加区和结合区也可以相同。结合区包含免疫结合伴侣 (结合配体, binding partner) (通常是抗体或其片段), 其作用于分析物并可再溶解和再解离, 从而被样品液体移动, 而所述结合伴侣通常结合 (所谓的结合物) 至信号产生酶或所谓的直接标记物 (例如, 金或有色胶乳颗粒、荧光标记)。

检测区包含不可逆固定的作用于分析物 (或由分析物形成的复合物) 的第二独立结合伴侣。

如果分析物存在于样品中, 则会因此以所谓夹层的形式 (即, 固定的结合伴侣、分析物和信号发生结合伴侣的免疫复合物) 在检测区中聚集并变得可见, 可选地, 在加入另外的试剂后变得可见。

在抗生蛋白链菌素 (streptavidin) -生物素原理 (作为所谓的间接夹层原理的代表) 的情况下, 第二结合伴侣以可移动生物素结合物形式也位于结合区。检测区包含不可逆固定的抗生蛋白链菌素。

过多的结合伴侣标记物或生物素的结合物与样品一起被输送到位于检测区“下游”的废物 (吸收区 (suction zone), 用来吸收过剩样品) 中。

对照区通常位于检测区和废物之间。

对于本领域的技术人员来说, 对照区的以下功能原理是已知的, 这里就它们的优缺点进行描述。

1. 分析物对照区

位于检测区和废物之间的对照区包含不可逆固定的分析物（或分析物类似物）。过量的结合伴侣-标记物结合物被结合至固定的分析物或分析物类似物，从而在对照线处产生可检测信号。

如今这种机制经常由多半抗原对照区覆盖，因此其优缺点将在第2部分更详细地进行描述。

分析物对照线的一个特殊缺点在于其制备足够量的分析物（例如抗原）通常是困难和费力的。

2. 多半抗原对照区

位于检测区和废物之间的对照区包括作用于结合物抗体的多半抗原。

优点：除了确保试剂能移动和为正确样品体积提供对照之外，在对照区中形成的信号还确保分析物结合伴侣和标记物的结合物的免疫活性。

缺点：当样品中的分析物浓度较高时，结合伴侣-标记物结合物结合抗原的能力在到达对照区之前已经饱和，并且对照区中的多半抗原不可再捕获结合物，从而对照机制失败。

在这种情况下，使用者必定错误地假定检测区中的检测结果是无效的。

当宽浓度范围必须在检测的删去值（cut-off value）（即测量范围的下限）和上限浓度范围之间被覆盖时，这是尤其频繁出现的缺点。例如，在用于验孕的情况下，其中激素 hCG 必须在尿液中以约

10~20 mIU/mL 的下限被检测到，另一方面，在妊娠头三个月的末期也观测到高达 500,000 mIU/ml 的 hCG 值。如此高的分析物浓度导致在对照区中的阴性结果，从而误导地伪装为检测区中的无效检测结果。

3. 抗 IgG 对照区（作为间接对照区的一种形式）

对照区包含作用于抗体-标记物结合物的抗体。这种对照区原理在验孕条中是非常广泛的。

实例：如果使用分析物特异性的标记小鼠抗体，则对照区包含例如作用于小鼠抗体的多克隆抗体（例如，PAB<鼠 Fcγ>S-IgG）。

优点：对照线的形成不受样品中高分析物浓度的影响。

缺点：通过这种机制检测不到正确的结合物的免疫活性。最近，对于检测件的新的批准，这已经引起了审批权威机构如美国的 FDA 的讨论。另一个缺点在于，当在利用血液的化验中使用消除干扰的抗体（interference-eliminating antibody）时，对照区中信号的强度大大降低。相对于分析物特异性的结合物抗体，消除干扰的抗体在检测中通常以 10~500 倍过量加以使用。相同种类的未结合抗体通常用作消除干扰的抗体，其因此也被对照线所捕获。

如果样品中缺少分析物，那么这种缺陷由以下事实加剧：在消除干扰的抗体存在下，大部分结合物已经结合在检测区中，并且低残留量的结合物经常导致对照区的彻底失败。

4. 不受消除干扰抗体影响的间接对照线

该对照线含有作用于结合物的“独立标记物”的结合伴侣。

实例：结合物的分析物特异性结合伴侣被另外的地高辛化（digoxigenylated）并在对照线处通过抗地高辛抗体捕获（参见，例如 US-A 2002-0055126）。

优点：对照线的结合能力不会因较高的分析物浓度而降低。此外，对照线的结合能力也不因消除干扰的抗体的存在而降低。

缺点：结合物抗体必须额外地进行特别修饰，导致额外的工作、成本和时间。此外，当存在较高内源性含量的选择性标记物时，对照线可能再次失败。

根据所描述的现有技术很明显，需要改进的对照线机制。

发明内容

本发明的目的在于消除现有技术的缺陷。更具体地，本发明的目的是为免疫检测件提供了一种对照机制，其在宽浓度范围的分析物上可靠地起作用，不依赖于测试制剂（尤其涉及使用所谓消除干扰的抗体）的组分，同时不受内源样品组分的影响。

通过本发明的主题实现了这个目的。

本发明涉及用于实施免疫夹层试验以确定来自液体样品的分析物的检测件，包含：试剂区，其含有分析物结合伴侣和可以通过视觉、光学或电化学方法直接或间接地被检测到的标记物的结合物，其中结合物可被液体样品溶解；检测区，其含有永久固定的用于分析物或含分析物的复合物的结合伴侣；以及对照区，其含有永久固定的用于分析物结合伴侣和标记物的结合物的结合伴侣；其中，对照区另外含有一种或多种永久固定的用于所述分析物或含所述分析物的复合物的结合伴侣，以及用于检测来自液体样品的分析

物的方法，其中，将样品施加至根据上述的检测件；如果分析物存在于样品中，则其与标记结合物发生反应而形成分析物-结合物复合物；将在检测区中的分析物-结合物复合物结合至永久固定的用于分析物或含分析物的复合物的结合伴侣；将在对照区中的未与分析物发生反应的标记结合物结合至永久固定的用于结合物的结合伴侣；以及将在对照区中的分析物-结合物复合物结合至永久固定的用于分析物或含分析物的复合物的结合伴侣。

首先，本发明涉及一种用于实施免疫夹层检测以确定来自液体样品的分析物的检测件，其除了新的对照区外，基本上从现有技术的许多变体都已得知。例如，检测件可以基本上由吸附材料如织物、膜、纸等组成（参见，例如 US 4,861,711、US-A 2002-0055126、WO 2005/111607），或液体输送可以受微流结构（部分地也通过诸如吸、压、离心的外力作用所驱动）或毛细通道的影响（参见，例如 US 6,156,270）。

检测件包含试剂区，其含有分析物结合伴侣（通常，如果分析物是抗原或半抗原，则为能结合分析物的抗体或免疫活性抗体，或如果分析物是抗体，则为抗原或半抗原）和可以直接或间接地通过视觉、光学或电化学方法结合物检测的标记物的结合物，其中该结合物可被液体样品再溶解。合适的标记物例如酶、荧光标记物、电化学活性基团或所谓的直接标记物如金属或碳标记物或有色胶乳。这个区也被称为结合区。

结合区可用作样品施加区或者独立的样品施加区可位于结合区之前或之后。除了上述的分析物结合伴侣和标记物的结合物外，结合区还可以包含另外的第二分析物结合伴侣（其通常又是能结合分析物的抗体或免疫活性抗体片段）和本身为结合对中的伴侣的标签物（tagging substance）的结合物。标签物可以是例如生物素或地

高辛配基 (digoxigenin), 并可用来固定在检测区和/或对照区中的由标记结合物、分析物和标签化结合物组成的夹层复合物。

检验元件另外包含检测区, 其含有用于分析物或含分析物的复合物的永久固定的结合伴侣 (即, 不能被液体样品解离的伴侣)。该固定的结合伴侣通常又是能结合分析物的抗体或免疫活性抗体片段或抗原或 (多) 半抗原。如果使用上述标签化结合物中的一种, 例如带有生物素或地高辛配基以及分析物结合伴侣, 那么固定的结合伴侣也可以是抗生蛋白链菌素或多抗生蛋白链菌素和抗地高辛配基抗体。

最后, 在检测件之中或之上存在有对照区, 其含有永久固定的用于分析物结合伴侣和标记物的结合物的结合伴侣, 例如以固定的多半抗原的形式, 其充当分析物类似物并能结合来自标记结合物的分析物结合伴侣。对本发明很重要, 对照区另外含有一种或多种用于分析物或含分析物的复合物的永久固定的结合伴侣。后一种结合伴侣可以选自上述的相同化合物以及检测区的固定的结合伴侣。在检测区和对照区中的这些固定的结合伴侣通常是相同的。然而, 它们也可能不相同, 例如除了多半抗原外, 用于生物素标签化结合物 (因此, 例如多抗生蛋白链菌素) 的结合伴侣被固定在检测区中, 而抗分析物抗体被固定在对照区中。在后一种情况下, 另外被固定在对照区中的抗分析物抗体应作用于 (另一个) 独立的抗原决定基, 因此是不被结合物抗体 (生物素标签化结合物和标记结合物) 所识别的。

本发明的另一主题是借助于根据本发明的检测件用于检测来自液体样品的分析物的方法。将样品 (其自身可以是液体或者如果其本身不是液体则能溶解或悬浮于液体例如缓冲液中, 从而可以被利用) 施加至检测件, 并且当其到达试剂区 (结合区) 时, 其溶解在那里以可移动形式存在的试剂。分析物 (如果存在于样品中) 被

引入接触在结合区中的标记结合物并反应而形成分析物-结合物复合物。样品和试剂的混合物随后到达检测区，在那里至少一部分的分析物-结合物复合物结合至用于分析物或含分析物的复合物的永久固定的结合伴侣。未与分析物反应的标记结合物在对照区中结合至用于结合物的永久固定的结合伴侣。另外，未在检测区中被捕获的分析物-结合物复合物的部分在对照区中结合至用于分析物或含分析物的复合物的永久固定的结合伴侣。

附图说明

基于以下实施例和附图，本发明将进一步得以描述说明。

图1示意性示出了以免疫层析测试条形式的根据本发明的检测件的一个优选具体实施方式。

图中数字和字母表示：

- A 样品施加区和结合区
 - B 红血球分离区
 - C 检测区
 - D 吸收区
- 1 支撑材料
 - 2 吸收织物 (suction fleece) (废物)
 - 3 带有检测线和对照线的层析膜
 - 4 红血球分离基质 (血液分离织物)

- 5 金结合织物 (标记结合物)
- 6 生物素结合织物 (标签结合物)
- 7 检测线 (固定的多抗生蛋白链菌素)
- 8 对照线

具体实施方式

图 1 所示的测试条对应于罗氏心肌 T 定量肌钙蛋白 T 测试条 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 其涉及除了根据本发明的对照线之外的结构和功能。用于确定其他分析物的类似测试条也可获得 (参见, 例如 US-2005-0118662-A1, 其中描述了相应的 NT-proBNP 测试条)

以下为连续位于塑性支撑材料 **1** 上: i) 样品施加区 **A**, 具有含有浸渍抗分析物抗体-金结合物 (可在此处被解离) 的纤维网材料 **5** 和含有浸渍抗分析物抗体-生物素结合物 (可在此处被解离) 的纤维网材料 **6**; ii) 红血球分离区 **B**, 含有作为红血球分离基质 **4** 的玻璃纤维织物, 其能够从全血中分离出红血球并产生基本上无色的血浆; iii) 检测区 **C**, 含有由硝化纤维制成的层析膜 **3**, 在其中或其上固定有多抗生蛋白链菌素检测线 **7** 和对照线 **8**; 以及 iv) 吸收区 **D**, 含有吸收织物以有利于样品通过层析膜 **3** 的移动, 同时用来接纳作为废物的移动样品。

织物 **5** 中的抗分析物抗体-金结合物 (也称为标记结合物) 和织物 **6** 中的抗分析物抗体-生物素结合物 (也称为标签结合物) 用来形成具有分析物的夹层, 膜 **3** 中固定的多抗生蛋白链菌素用来形成检测线 **7**。

根据本发明的对照线 8，在这种情况下，除了用于抗分析物抗体-金结合物的永久固定的结合伴侣（即，抗体特异性多半抗原（或分析物））外，还另外含有永久固定的用于含分析物的复合物的结合伴侣（即，在这种情况下下的多抗生蛋白链菌素）。

因此，对照线 8 主要通过低至中等分析物浓度的多半抗原/分析物结合而直接和免疫特异性地捕获标记结合物。在这种情况下，由于小量形成的夹层已经几乎全数被检测线 7 “上游”捕获，所以对照线 8 的抗生蛋白链菌素-生物素夹层部分尚未起作用。

在较高分析物浓度下，由于结合物已经被来自样品的分析物所饱和，所以对照线 8 的多半抗原结合物结合机制失败。然而，在这种情况下，以夹层复合物（标记结合物、分析物和标签结合物）形式存在的结合物被对照线 8 的抗生蛋白链菌素-生物素机制所捕获。这是因为动力学原因，检测线 7 没有捕获全部夹层复合物而层析“下游”的部分被对照线 8 结合。

在极高分析物浓度下，所谓的高剂量 Hook 效应 (high dose Hook effect) 可以在检测线 7 处的夹层格式中发生。其原因可解释如下：在有限量的分析物（相对于存在于检测件中的抗体的量，抗原缺乏）的情况下，抗原分子通过独立抗原决定基同时结合两个结合伴侣（标记抗体和标签抗体）。因此，形成所需的夹层复合物且分析物结合至结合抗体，其确保在检测区 7 中的固定（在这种情况下为可结合至抗生蛋白链菌素的生物素化抗体），以及结合至标记结合伴侣（在这种情况下，为金标记抗体），其确保分析物的可检测性。在较高分析物过量（相对于标记结合物和标签结合物的量）的情况下，两种夹层伴侣（即，一方面的标记结合物，另一方面的标签结合物）均结合至两种独立存在的分析物分子，使得虽然分析物在检测区 7 中通过标签结合物被结合，但由于没有结合至标记结合物，所以其不能被检测到。

如果高剂量 Hook 效应在检测线 7 处发生，则尽管为高分析物浓度，但这会模拟分析物阴性检测结果。不依赖于分析物的对照线 8（例如，基于固定的 PAB<鼠 Fcγ>S-IgG 抗体）在这种情况下显示出检测的正确起作用，这最终导致假阴性检测解释。在这种情况下，希望对照线 8 会发生如同检测线 7 的高剂量 Hook 效应，并且由于同时发生的失败而将检测结果表示为无效（因此至少不是假阴性的）。

精确地说这是具有新的对照线 8 的情况，并且另一个优点是，由于样品的高分析物浓度，所以当分析物到达对照区时，几乎没有游离的标记结合物（即没有结合至分析物的标记结合物），使得基于用于标记结合物的永久固定的结合伴侣（在这种情况下为多半抗原）的对照线 8 部分在样品-试剂混合物中不再找到结合伴侣。因此，仅基于用于分析物或含分析物的复合物的永久固定的结合伴侣（在这种情况下为抗生蛋白链菌素-生物素机制）的对照线 8 部分仍然是活性的。如果现在夹层形成被所述 Hook 效应阻止，则除了检测线 7 外，对照线 8 也会失败。因而，检测结果可被用户识别为无效而不会错误地作为“阴性的”。

本发明可以不仅限于应用到利用抗生蛋白链菌素-生物素结合的上面对详述的“间接夹层原理”。将“直接夹层原理”推广也是可能的。在这种情况下，夹层伴侣被不可逆地固定在检测线区域中。因此，除了多半抗原（作用于结合抗体）外，对照线含有固定在检测线的夹层抗体。应当注意到，在这种情况下，由于用于对照线区的夹层抗体和抗原一起已经形成抗原-抗体复合物，所以替换的使用抗原而不是多半抗原作为固定在对照区中的结合伴侣并不是优选的，因此新的对照线的两部分机制应至少部分地“中立”。因此，优选使用多半抗原，这是由于这种“合成抗原决定基”仅仅作用于可移动的结合物抗体而不作用于第二种夹层抗体。因此，其能发挥作用。

实施例 1

基于作为实例的用于检测来自全血的心肌肌钙蛋白 I (cTnI 或简称为: TnI) 的测试条对本发明描述如下。

a) 分析元件

制造根据图 1 的测试条

利用热熔胶 (Dynapol S 1358, 获自德国 Hüls AG), 将以下轻微依次相互重叠在一个由聚酯 (聚酯薄膜, 350 μm 厚, 获自英国 Imperial Chemistry Industries) 制成的 5 mm 宽、78mm 长的支撑薄片 1 上的每一个加以连接。

- 由 100 份玻璃纤维 (直径为 0.49~0.58 μm 、长为 1000 μm) 和 5 份聚乙烯醇纤维 (获自 Kuraray 的 Kuralon VPB 105-2) 组成的 1.5mm 厚和 7mm 长的织物, 具有每单位面积的重量为约 180 g/m^2 , 作为液体收集区 (废物) 2 (吸收区 D);

- 1.5 cm 长的硝酸纤维素膜 (CN 11301 型, 获自德国 Sartorius), 作为含有检测区和对照区 (检测区 C) 的层析膜 3。

- 由 100 份玻璃纤维和 10 份聚乙烯醇纤维 (两种纤维类似于液体收集区) 构成的 1.5mm 厚和 13mm 长的织物, 具有每单位面积的重量为约 180 g/m^2 , 作为血液分离织物 4 (红血球分离区 B);

- 以及由 80 份聚酯纤维、20 份粘胶短纤维和 20 份聚乙烯醇纤维构成的两个 18mm 或 20mm 长的织物, 具有厚度为约 0.32mm 和每单位面积的重量为约 80 g/m^2 (欧洲专利文件 EP 0 326 135 的实施例 1 中描述了其的制造), 含有金结合物 (金结合物织物 5), 作

为含有特异性结合对的标记伴侣和含有生物素结合物（生物素结合物 6）的区，其进一步作为含有特异性结合对的标签伴侣的区。

通过线计量将含水抗生蛋白链菌素溶液（4.5 mg/ml）施加到前述的检测区的硝酸纤维素膜 3 上。选择用于此的剂量以便（计量的量为 0.1ml/min，成网速度为 3m/min）形成约 0.4 mm 宽的线。这种线 7 用来检测待确定的分析物，并且每个测试条含有约 0.8 μg 的抗生蛋白链菌素。

在相同的计量条件下，在抗生蛋白链菌素线下游约 4mm 的距离处，施加含水的 1mg/ml TnI 多半抗原溶液（多半抗原的制备参见下面）、1mg/ml 的抗生蛋白链菌素溶液或多半抗原溶液和抗生蛋白链菌素溶液的 1:1 比例的混合物（没有含有 1mg/ml）。这些线 8 用来检查测试条的功能并且每个测试条含有约 0.15 μg 的多半抗原和/或 0.15 μg 的抗生蛋白链菌素。

接着将膜在空气中干燥。

多半抗原制备如下：具有对应于含心肌钙蛋白 I 的氨基酸（aa）27-43 的抗原决定基的氨基酸序列的肽（参见 FEBS, Vol. 270; No. 1, 2; page 57-61: Molecular cloning of human cardiac troponin I using polymerase chain reaction）通过本领域技术人员已知的典型肽固相合成法进行制备。由 β -丙氨酸、 ϵ -氨基己酸、 β -丙氨酸和半胱氨酸组成的肽残基用作用于连接至载体蛋白的 N-末端间隔区，使得肽具有的分子量为 1716.13。

肽随后借助于 MH（BPLA）/SH 肽进行连接，而 MH（BPLA）/SH 肽是以 10:1（多肽对载体蛋白）的摩尔比连接至作为载体蛋白的牛血浆白蛋白。

多半抗原随后在 40mg/ml 的海藻糖存在下被冻干并溶解脱盐的水中用于线计量。

以下将多半抗原称为 PH、TnI (27-43) [UZU-Cys-43]的氨化物(酰胺, amide)。

金结合物织物 5 制备如下: 根据 Frens 的方法 (Frens, G., Preparation of gold dispersions varying particle size: controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions in Nature: Physical Science 241 (1973), 20-22), 在煮沸时通过减少 0.01%重量的具有柠檬酸三钠的四氯金酸溶液来制备具有平均颗粒直径为约 40nm 的金溶胶。

根据 Roth, J 的方法 (The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry in Bullock, G.R. and Petrusz, P. Eds., Techniques in Immunocytochemistry Vol, 2, New York, Academic Press 1983, 216-284) 制备抗体-金结合物。

为此, 将金溶胶的 pH 值在将金溶胶溶液冷却到室温后用 0.2 M K_2CO_3 加以调节, 以使其比 <cTn I> 抗体的等电点高 0.5 pH 单位。克隆名为 M155 的单克隆 <cTn I> 小鼠抗体可商业上获自 HyTest 公司, 目录号为 No.4T21 (土尔库, 芬兰) (HyTest Company under the catalogue No. 4T21 (Turku, Finland)。这种单克隆抗体识别 cTn I 抗原决定基 aa 27-43。

金溶胶的光密度 (OD) (在 525nm 和 1cm 间隔的吸光率) 通常是 1.0。以水溶解形式加入 <cTn I> 抗体使得在加入到金溶胶溶液后, 其浓度为 1.2 $\mu\text{g/ml}$ 。在室温下搅拌 30min 后, 金结合物通过加入高浓度的牛血浆白蛋白溶液加以饱和 (在结合物溶液中的最终浓度为 1mg/ml)。

在室温下继续搅拌 30 分钟后，将饱和后的金结合物相对于 20mM Tris 缓冲液 (pH 7.0) 用 30KDa 的膜超滤浓缩到通常 20 的光密度，接着在结合物溶液中加入 100 μ M Brij 35 和 0.05%重量的 NaN₃，并在 4 $^{\circ}$ C、旋转下储存直至使用。

金结合物织物 5 浸有下列浸渍溶液：50mM HEPES (pH7.5)；1.0%重量的牛血浆白蛋白、1.0%的蔗糖、0.1%的吐温 20、MAB<cTn I>M155-IgG-40nm 的金溶胶结合物 (OD 4.5)。

为此，聚酯粘胶短纤维-聚乙烯醇混合的织物首先穿过含有浸渍溶液的槽，随后通过以 250 μ m 间隔布置的两个不锈钢辊将其挤出，最后用循环空气干燥器在 60 $^{\circ}$ C 下将其干燥。在所述的条件下，被织物吸收的浸渍溶液的量通常为 240 ml/m²。

生物素结合物织物 6 制备如下：克隆名为 16A11 的单克隆<cTn I>鼠抗体（从 HyTest 公司的目录号为 No.4T21 商业获得）用来制备生物素结合物。这种单克隆抗体识别<cTn I>抗原决定基 aa 87-91。

将生物素的琥珀酰亚胺酯以过量 8 倍摩尔的量加入到在 0.1M、pH 为 8.5 的磷酸钾溶液中的 10mg/ml IgG 的溶液中。将该混合物在 25 $^{\circ}$ C 下孵育 90 分钟同时搅拌。通过将赖氨酸加入该溶液至 10 mM 的最终浓度而停止反应。过量的生物素化试剂通过透析除去，并在 6%重量的蔗糖存在下、在-70 $^{\circ}$ C 下储存直至使用。

生物素结合物织物 6 用以下浸渍溶液浸渍：20mM 的 Tris (pH7.2)、50mM NaCl、1.0%重量的牛血浆白蛋白、1.0%重量的蔗糖、0.1%重量的吐温 20 和 7mg/l 的 MAB<cTn I>M-16A11-IgG 生物素 (XOSu 8:1)。其在类似于用于制备金结合物织物的条件下浸渍和干燥。

b) 测试条的评价

以下三个测试条变体（其仅对照线 8 的组成不同）根据在 a) 下描述的方法进行制造。用于制备对照线 8 的溶液在 3 个变体中含有以下物质：

变体 1: 1mg/ml 的多半抗原[pH, Tn I (27-43)]; 测试条具有传统的对照线。

变体 2: 1mg/ml 的抗生蛋白链菌素; 测试条具有用作对照线的第二个检测线试剂。

变体 3: 1mg/ml 的多半抗原和 1mg/ml 的抗生蛋白链菌素; 测试条具有根据本发明的对照线。

如上面已经描述的, 所有测试条变体均具有相同的含有 4.5mg/ml 抗生蛋白链菌素的检测线 7。

将对其加入增加量的 cTn I-C-T 复合物（商业上可获自 HyTest 公司, 目录号为 No.8T62）的 cTn I 阴性供体血液用来评价测试条。为此, 将 150 μ l 掺料供体血液作为样品通过每个测试条的吸液管加入到生物素结合物织物 6（其也用作样品施加区）, 并且对检测结果在 15 分钟后对于检测线和对照线的外观进行视觉评估, 同时也利用测量仪器（Roche Cardiac Reader, Roche Diagnostics GmbH, Order No. 1902229）通过反射测光法进行评价以量化线强度。在这种情况下, 100%的反射率表示没有检测或对照线区, 而 20%的反射率表示深暗红色线, 在此强度处, 测量装置的检测系统处于色彩饱和。

将结果总结于下表中。

cTn I 浓度 [ng/ml]	信号 (以[% 反射率]或视觉地*阳性 (+) 或阴性 (-))			
	检测线	对照线变体		
		1	2	3
0	100 (-)	20 (+)	100 (-)	20 (+)
1	65 (+)	30 (+)	80 (+)	20 (+)
10	25 (+)	45 (+)	60 (+)	20 (+)
50	18 (+)	96 (+/-)	40 (+)	35 (+)
250	30 (+)	98 (-)	65 (+)	65 (+)
1000	98 (-)	100 (-)	98 (-)	98 (-)

* 规定 (-) 或 (+) 指视觉结果分类:

(-) = 无可见线

(+) = 可见线

对结果解释如下:

检测线:

如所预期的, 检测线的强度首先随着分析物浓度的增加而增加 (在 1ng/ml 和 50ng/ml 的 cTn I 之间的反射率值降低), 经过强度最大值 (18%的反射率, 即色彩饱和), 然后因夹层格式引起的高剂量 Hook 效应而在极高浓度分析物强度处再度降低。所述高剂量 Hook 效应导致在 1000 ng/ml 的 cTn I 处, 在测试条的检测线上几乎为 100%的反射率 (视觉上为阴性), 从而形成假阴性检测线。

变体 1: “传统对照线”:

在不存在分析物的情况下, 金结合物通过结合至 M155 抗体/多半抗原 (aa 27-43) 而几乎全数积累在对照线上 (20%的反射率)。随着分析物浓度的增加, 对照线的色彩强度随之降低, 这是因为另一方面大部分金结合物被检测线以夹层复合物的形式捕获以及因为未被检测线捕获的部分金结合物已由于存在的分析物增加浓度而饱和从而不再足以被对照线的多半抗原所结合。在这种情况下,

层析的金结合物移动通过检测线和对照线进入废弃织物（位于其下游）。

样品中高于 50ng/ml 的 cTn I，虽然在这个浓度和在 250ng/ml 的浓度处检测线仍清楚地为阳性，但这导致对照线的失败（视觉上为阴性）。

然而，由于没有对照线，所以在这种情况下使用者必定错误地假定该检测结果无效。

将这个发现对应于现有技术，从而说明传统多半抗原对照线的局限。

变体 2: 第二检测线作为对照线:

由于没有形成夹层复合物，所以理所当然被认为是对照线的第二抗体蛋白链菌素检测线在没有分析物的情况下失败（涉及其作为对照线的功能）。因此，虽然阴性第一条检测线正确地反映了没有分析物，但检测结果也会被视为无效。

在存在分析物的情况下，抗体蛋白链菌素对照线和检测线一样检测形成的夹层复合物，尽管由于多数形成的夹层复合物已经被上游的检测线结合而导致的较低强度。

在极高分析物浓度（1000ng/ml cTn I）的情况下，由于对照线和检测线经历相同的机制（参照上面涉及的高剂量 Hook 效应），所以除了检测线外，对照线也会失败。

变体 3: 根据本发明的对照线:

如表中的测量和视觉分类所示，在没有分析物的情况下，对照线表示正确的检测结果（借助于多半抗原金结合机制）。

在中等浓度范围时，对照线通过两种附加的免疫机制产生信号。

在较高浓度范围时（50-250 ng/ml 的 cTn I）时，对照线主要通过抗生蛋白链菌素-生物素机制产生测量信号（在这种情况下，传统的多半抗原对照线已经处于分析物饱和状态并因此失败）。当检测线处存在高剂量 Hook 效应（1000 ng/ml 的 cTn I）时，对照线如所期望的也失败。

这些性能的总和表明这种新的对照线机制优于先前已知的技术方式。

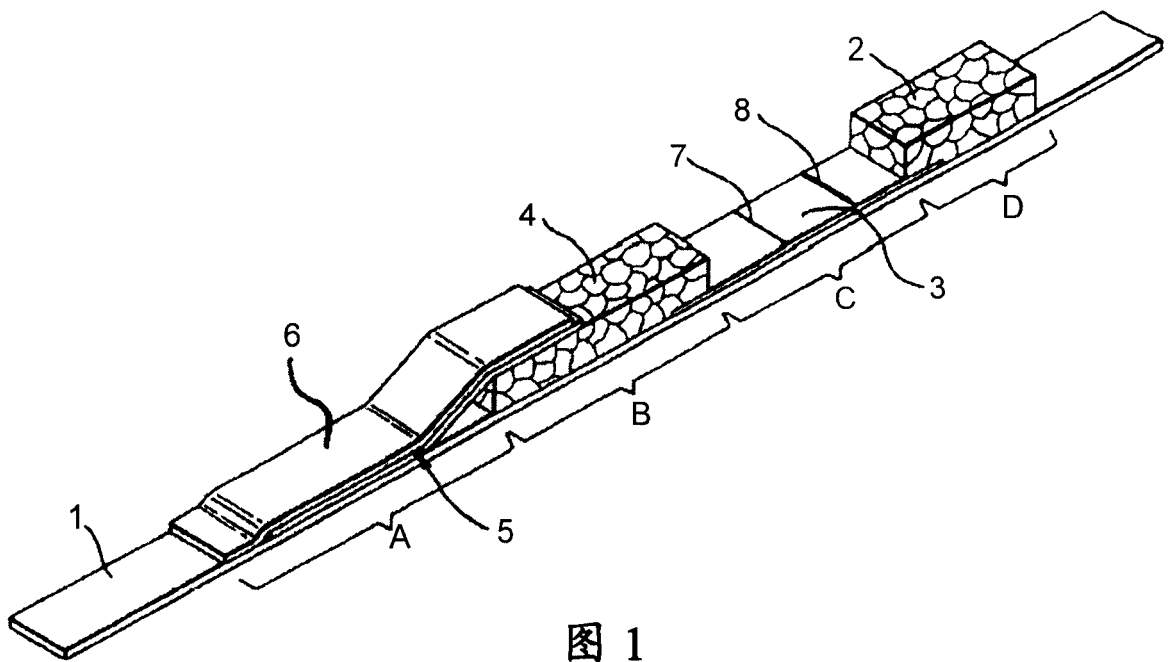


图 1

专利名称(译)	具有改进的对照区的免疫检测件		
公开(公告)号	CN101000343A	公开(公告)日	2007-07-18
申请号	CN200710001266.8	申请日	2007-01-11
申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	于尔根·克莱普		
发明人	于尔根·克莱普		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N33/54306		
优先权	2006000791 2006-01-14 EP		
其他公开文献	CN101000343B		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明涉及用于实施免疫夹层试验以确定来自液体样品的分析物的检测件，包含：试剂区或结合区，含有分析物结合伴侣和可直接或间接地通过视觉、光学或电化学方法被检测到的标记物(例如，酶、荧光标记物或直接标记物)的结合物，其中所述结合物可以被液体样品溶解；检测区，含有永久固定(即不能被液体样品解离)的用于该分析物或含该分析物的复合物的结合伴侣；以及对照区，含有永久固定的用于分析物结合伴侣和标记物的结合物的结合伴侣，其特征在于对照区另外含有永久固定的一种或多种用于分析物或含有分析物的复合物的结合伴侣。

