



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103858009 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 11

(21) 申请号 201280041999. 3

G01N 33/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 09. 14

(30) 优先权数据

61/535, 874 2011. 09. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 02. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/055542 2012. 09. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/040435 EN 2013. 03. 21

(71) 申请人 克里多生物医药私人有限公司

地址 新加坡新加坡城

(72) 发明人 温斯顿·王 斯蒂芬·昌-智·卡奥

(74) 专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限

公司 31220

代理人 郑立 高为华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

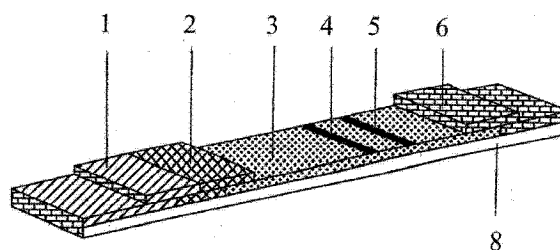
权利要求书5页 说明书18页 附图12页

(54) 发明名称

分子诊断检测设备及使用方法

(57) 摘要

本发明提供了用于分子诊断检测的侧向流动装置和使用方法。该方法适合检测或监测包括以非常低的浓度存在于生物样品中的生物性、化学性和材料性的目标物。本发明的方法和装置适用于无能量源的现场检测。



1. 一种检测测试样品中分析物的方法,所述方法包括;
 - i) 提供一个包括层析介质的侧向流动分析装置,所述装置包括:
 - (a) 位于检测区上游的上样区;
 - (b) 位于上样区和检测区之间的报告载体区,其中所述报告载体区包括报告载体,所述报告载体能和所述分析物形成复合物,所述报告载体包括一个载体及一个或多个高效酶盒;和
 - (c) 检测区,其中所述检测区包括分析物的捕获组分和指示剂;
 - ii) 将测试样品与点样区接触,其中所述测试样品从所述上样区沿所述层析介质通过所述报告载体区到达所述检测区并超过所述检测区;
 - iii) 将底物加入所述检测区,其中所述底物与含有报告载体的分析物在高效酶存在下发生反应;和
 - iv) 在所述检测区产生所述指示剂的应答,所述应答对应于所述测试样品中所述分析物存在与缺失。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述侧向流动装置还包括一个检测区下游的对照区,且所述对照区包括报告载体的捕获组分和指示剂;

在所述对照区加入底物,其中所述底物在含有报告载体的高效酶的存在下发生反应;并且

在所述检测区产生所述指示剂的应答,所述应答对应于所述报告载体的存在与缺失。
3. 根据权利要求1所述的方法,还包括维持反应温度。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述分析物是蛋白质。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述被测物是小分子。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述被测物是核酸。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述高效酶结合物包含抗体。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述高效酶结合物包括核酸。
9. 根据权利要求1的所述方法,其中所述高效酶结合物包括高效酶,所述高效酶选自以下酶组成的组:脲酶、磷酸胆碱磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、木糖还原酶、莽草酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、羧酸酯酶、新普鲁兰酶、枯草杆菌蛋白酶、4-肌醇六磷酸酶、乙酰胆碱酯酶、漆酶、细菌亮氨酸氨肽酶、三肽基肽酶 I、凝血因子 VIIa、胰蛋白酶、 β -呋喃果糖苷酶。
10. 根据权利要求3所述的方法,其中反应温度维持在约 4°C 至约 95°C,或更高的仍能保持酶活性的温度。
11. 根据权利要求7所述的方法,其中所述抗体与高效酶非共价的相互作用形成所述高效酶结合物。
12. 根据权利要求8所述的方法,其中所述核酸共价的结合高效酶形成所述高效酶结合物。
13. 根据权利要求7所述的方法,其中所述抗体共价的结合高效酶形成所述高效酶结合物。
14. 根据权利要求1所述的方法,在检测区进一步提供一种或多种无活性的酶原。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述高效酶结合物的活性通过监测高效酶辅助反应的效果而测定。

16. 根据权利要求 15 的方法,其中所述高效酶辅助反应的效果是质子释放。
17. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述质子释放产生 pH 变化。
18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述 pH 变化使用固定于膜上的 pH 敏感的 I- 羟基-4-[1-(2-羟基乙基磺酰基)苯偶氮基]-萘-2-磺酸钾指示剂聚合物测定。
19. 根据权利要求 17 的方法,其中所述 pH 变化使用 pH 敏感的醋酸纤维素偶联染料测定。
20. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述高效酶结合物的活性通过比色变化检测。
21. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述高效酶结合物的活性通过荧光发射检测。
22. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述高效酶结合物的活性通过电化学方法检测。
23. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述比色变化是由于银离子还原。
24. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述高效酶结合物的活性通过可溶性组分的沉淀检测。
25. 如权利要求 24 所述的方法,其中所述可溶性组分是蛋白质或 pH 敏感的聚合物。
26. 如权利要求 25 所述的方法,其中所述蛋白质是牛血清白蛋白。
27. 如权利要求 25 所述的方法,其中所述 pH 敏感的聚合物选自自由甲基丙烯酸、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸 2-(二甲氨基)乙酯和 N-羟甲基丙烯酰胺组成的组。
28. 根据权利要求 1 所述的方法,还包括在所述测试样品接触所述样品应用区之前,将前-报告载体加入所述测试样品中。
29. 根据权利要求 1 所述的方法,还包括在层析介质远端的吸收板。
30. 根据权利要求 1 的方法,其中所述底物是己酸烯丙酯,且所述高效酶为羧酸酯酶。
31. 一种检测测试样品中分析物的存在的侧向流动检测装置,所述侧向流动检测装置包括:
层析介质,所述层析介质包括:
位于检测区上游的上样区;
位于上样区和检测区之间的报告载体区,其中所述报告载体区包括能与分析物形成复合物的报告载体,所述报告载体包括载体和一个或多个高效酶盒;及
检测区,其中所述检测区包括分析物的捕获组分和指示剂,其中所述指示剂检测底物在高效酶催化下的反应,从而检测所述分析物的存在。
32. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,还包括一个对照区,其中所述对照区包括所述报告载体的捕获组分和检测高效酶存在下底物反应的指示剂;其中检测酶报告载体复合物和底物的产物,从而检测所述报告载体的存在。
33. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述高效酶结合物包括抗体。
34. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述高效酶结合物包括核酸。
35. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中高效酶结合物包括选自以下组中的高效酶:脲酶、磷酸胆碱磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、木糖还原酶、莽草酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、羧酸酯酶、新普鲁兰酶、枯草杆菌蛋白酶、4-肌醇六磷酸酶、乙酰胆碱酯酶、漆酶、细菌亮氨酸基氨基酸酶、三肽基肽酶 I、凝血因子 VIIa、胰蛋白酶、 β -呋喃果糖苷酶。
36. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述抗体与高效酶非共价相互作用形成高效酶结合物。

37. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述核酸与高效酶共价结合形成高效酶结合物。

38. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,在检测区进一步提供一种或多种无活性酶原。

39. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述高效酶结合物的活性通过监测高效酶辅助反应的效果而测定。

40. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述指示剂为 pH 敏感指示剂。

41. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述 pH 敏感指示剂为 1- 羟基-4-[1-(2-羟基乙基磺酰基)苯偶氮基]-萘-2-磺酸钾。

42. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述 pH 敏感指示剂为是 pH 敏感的醋酸纤维素偶联染料。

43. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述报告载体区包括结合物板。

44. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述上样区包括上样板。

45. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,还包括一个刚性或弹性的背衬材料。

46. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述抗体与高效酶通过非共价相互作用连接。

47. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述抗体或核酸共价连接于所述高效酶。

48. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,还包括一种或多种无活性酶原的来源。

49. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述检测区通过检测 pH 变化检测所述高效酶的产物。

50. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述 pH 变化使用 pH 敏感水凝胶测定。

51. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述检测区通过比色变化检测高效酶的产物。

52. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述检测区通过荧光放射检测高效酶的产物。

53. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述检测区通过电化学方法检测高效酶的产物。

54. 根据权利要求 51 所述的侧向流动检测装置,其中所述比色变化是由于银离子还原。

55. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,所述检测区通过可溶性组分的沉淀检测高效酶的产物。

56. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述可溶性组分是蛋白质或 pH 敏感聚合物。

57. 根据权利要求 56 所述的侧向流动检测装置,其中所述蛋白质是牛血清白蛋白。

58. 根据权利要求 56 所述的侧向流动检测装置,其中所述 pH 敏感聚合物选自甲基丙烯酸、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸 2-(二甲氨基)乙基酯和 N-羟甲基丙烯酰胺的组。

59. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,还包括在层析介质远端的吸收板。
60. 根据权利要求 31 所述的侧向流动检测装置,其中所述底物是己酸烯丙酯,且所述高效酶为羧酸酯酶。
61. 一种用于检测测试样品中分析物存在的侧向流动检测试剂盒,所述侧向流动检测装置包括:
- 多孔膜,所述多孔滤膜包括:
- 上样区;
- 位于上样区下游的报告载体区,其中所述报告载体区包括能与分析物形成复合物的报告载体;
- 位于报告载体区下游的检测区,其中所述检测区包括捕获组分和指示剂;及
- 高效酶的底物;其中所述底物在所述测试样品流过所述侧向流动装置后加入所述检测区,并且酶和底物的产物被检测。
62. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,还包括一个对照区,其中所述对照区包括所述报告载体的捕获组分和在高效酶存在时检测底物的反应的指示剂;其中检测酶报告载体复合物和底物的产物,从而检测报告载体的存在。
63. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述高效酶结合物包括抗体。
64. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述高效酶结合物包括核酸。
65. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中高效酶结合物包括选自以下组中的高效酶:脲酶、磷酸胆碱磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、木糖还原酶、莽草酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、羧酸酯酶、新普鲁兰酶、枯草杆菌蛋白酶、4-肌醇六磷酸酶、乙酰胆碱酯酶、漆酶、细菌亮氨酸基氨肽酶、三肽基肽酶 I、凝血因子 VIIa、胰蛋白酶、 β -呋喃果糖苷酶。
66. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述抗体与高效酶非共价结合形成所述高效酶结合物。
67. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述核酸与高效酶共价结合形成所述高效酶结合物。
68. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,在检测区进一步提供一种或多种无活性酶原。
69. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述高效酶结合物的活性通过监测所述高效酶辅助反应的效果而测定。
70. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述指示剂为 pH 敏感指示剂。
71. 根据权利要求 70 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述 pH 敏感指示剂为 1-羟基-4-[1-(2-羟基乙基磺酰基)苯偶氮基]-萘-2-磺酸钾。
72. 根据权利要求 70 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述 pH 敏感指示剂为 pH 敏感的醋酸纤维素偶联染料。
73. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述报告载体区包括结合物板。
74. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述上样区包括上样板。
75. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,还包括一个刚性或弹性背衬材料。
76. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述抗体与所述高效酶通过非

共价相互作用连接。

77. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述抗体或核酸共价连接于所述高效酶。

78. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,还包括一种或多种无活性酶原的来源。

79. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述检测区通过检测 pH 变化检测所述高效酶的产物。

80. 根据权利要求 79 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述 pH 变化使用 pH 敏感水凝胶测定。

81. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述检测区通过比色变化检测所述高效酶的产物。

82. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述检测区通过荧光放射检测所述高效酶的产物。

83. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述检测区通过电化学方法检测所述高效酶的产物。

84. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测试剂盒,其中所述比色变化是由于银离子还原。

83. 根据权利要求 61 所述的侧向流动检测装置中,所述检测区通过可溶性组分的沉淀检测所述高效酶的产物。

84. 根据权利要求 83 所述的侧向流动检测装置,其中所述可溶性组分是蛋白质或 pH 敏感聚合物。

85. 根据权利要求 84 所述的侧向流动检测装置,其中所述蛋白质是牛血清白蛋白。

86. 根据权利要求 84 所述的侧向流动检测装置,其中所述 pH 敏感聚合物选自甲基丙烯酸、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸 2-(二甲氨基)乙基酯和 N-羟甲基丙烯酰胺的组。

87. 根据权利要求 60 所述的侧向流动检测装置,还包括在层析介质远端的吸收板。

88. 根据权利要求 60 所述的侧向流动检测装置,其中所述底物是己酸烯丙酯,且所述高效酶为羧酸酯酶。

分子诊断检测设备及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学、分子诊断、核酸检测(NAT)、医学科学和生物技术的综合领域。本发明适合于检测或监测以非常低的浓度存在于样品中的痕量化学和 / 或生物目标物,包括但不限于生物样品、材料、有机或无机样品。痕量化学和 / 或生物目标物可以包括生物 / 化学产品、碎片或整个目标物,如核酸序列、细胞、病毒、病原体、化学品,在诸如药物基因组学、病原学检测 and 监控、确定遗传倾向易感性、进行临床试验的遗传分类、诊断学、预测学、传染病诊断和监测、生物防护、法医分析、亲子鉴定、动物和植物育种、食品检测、人体识别,遗传修饰生物检测、化学污染、食品安全、生产链的监测和跟踪以及生产的在线监视 / 控制的领域中,关于现场 / 位点 / 兴趣(point of care/site/interest) 和实验室的应用。

背景技术

[0002] 分子诊断已经成为生物检测和监测中的常规临床实验室程序。一份来自不同生物来源的生物样品的样本通常含有化学物、代谢物、大分子、细胞、病毒粒子、微生物和核酸序列的混合物。典型地,进行检测和监控存在两种常见的问题:背景干扰和检测极限(LOD)。也就是说,与该生物样品中其他背景成分相比,目标生物样品通常只以非常小的量存在。这样的非目标背景成分可能对下游的检测造成干扰。当样品中目标成分的拷贝不足时,LOD就成为了一个问题。LOD问题在化学分析中同样存在,这通常需要高度精密的仪器进行分析工作。例子包括用质谱检测在食品供应链中的邻苯二甲酸二(正丁基)酯塑化剂污染、牛奶中的三聚氰胺污染,土壤或食物中镉及重金属污染。背景干扰比污染物高一个数量级。例如,没有对实验室包括诸如气相色谱仪或质谱仪在内的仪器的全面处理,现场分析通常是很困难的。

[0003] 背景干扰通常通过在准备阶段纯化样品解决。通过一步或多步洗涤步骤捕获目标成分并将背景成分除去。典型的例子包括:酶联免疫吸附测定(ELISA)和不同的层析方法。当背景组分从已固定的目标中移除时,侧向流动平台也可以用来捕捉目标。关于核酸目标物纯化程序的另一个例子是纯化试剂盒,例如 Qiagen QIAamp DSP DNA 血液迷你试剂盒。

[0004] 对于核酸的检测极限问题一般首先通过扩增样品目标成分来解决,以允许后续的荧光发射、电的和电子的方法,例如伏安法、电流测量、电容测量或阻抗频谱。在这些检测或扩增方法中,需要电力以提供光或进行电 / 电子检测。解决低丰度核酸目标物检测极限问题的一个例子是,通过使用聚合酶链反应(PCR)在体外扩增核酸目标物。与目标序列的存在相关联的信号可通过荧光方法来进一步放大。每个被荧光标签标记的 PCR 扩增子,在使用荧光信标或探针检测扩增子时,可以在单个激发 / 测定期间产生 1000 或 10000 多个光子。另一个例子是弯曲菌属状生物体试验,其中幽门螺杆菌细胞在培养物增殖并由此被扩增,其中扩增细胞分泌的脲酶能在细胞的数量通过检测阈值后可进行检测。另一实例是 MRSA 的筛选。这种检测方法区分培养基中繁殖和扩增的细胞的菌落。

[0005] 然而,依赖于去除各种背景干扰和扩增检测组合的现有方法无法满足对目标物检

测方法的有效、低成本、快速、简易使用的要求,这种使用的要求在资源有限环境中是兼容的。需要向设备供电或提供温度孵育,现有试验需要电力能源,所以限制了这种技术在资源匮乏地区或情况下的使用。实施现有方法的时间很长。为产生足够的检测信号,需要很多小时或很多天来生产足够的生物目标物。用于病原体检测、代谢物测定或核酸序列检测的扩增步骤,通常需要昂贵的实验室仪器和训练有素的专业人员来使用仪器。对于 PCR,需要小心处理不稳定的试剂,必须特别谨慎以防止样品间污染。另外,进行 PCR 所需要的仪器昂贵又复杂。以上注意事项是阻碍 POC (现场检测) 使用或 30 分钟内提供快速样品 - 结果的苛刻的限制。本发明提供一种解决这些问题和其它需要的解决方案。

发明内容

[0006] 本发明提供了用于分子检测或诊断分析的方法和装置。本发明公开的方法适用于检测或监测在样品中以很低的浓度存在的一种或多种目标物,样品包括但不限于生物的、化学的和材料的,并且一般可以在缺少目标物的复制或片段或部分目标物的扩增时进行检测。本申请的方法和装置适合于现场检测而不需要使用电源。

[0007] 在一方面,本发明提供了一种检测分析物的方法,通过执行以下步骤 i) 提供一个包括层析介质的侧向流动分析装置,该装置包括:(a) 位于检测区上游的上样区;(b) 位于上样区和检测区之间的报告载体区,其中所述的报告载体区包括能和分析物形成复合物的报告载体,所述报告载体包括载体及一个或多个高效酶盒;和(c) 检测区,其中所述检测区包括分析物的捕获组分和指示剂;ii) 将测试样品与点样区接触,其中测试样品从上样区沿层析介质通过信号载体区到达检测区,并跑出检测区;iii) 将底物加入检测区,其中底物在含有报告载体的高效酶分析物存在下进行反应;以及 iv) 在检测区,指示剂产生反应,对应于检测样品中分析物的存在或缺失。

[0008] 另一个方面,本发明提供的一种用于检测分析物的装置,包括:层析介质,其包括:位于检测区上游的上样区;位于上样区和检测区之间的报告载体区,其中所述报告载体区包括能与分析物形成复合物的报告载体,所述报告载体包括载体和一个或多个高效酶盒;及检测区,其中所述检测区包括分析物的捕获组分和指示剂,其中所述指示剂检测底物在高效酶存在下的反应,从而检测分析物-酶-报告载体复合物的产物和底物,从而检测分析物的存在。

[0009] 在一方面,本发明提供的包含侧向流动装置的用于检测分析物的试剂盒,包括:多孔膜,包括:上样区;位于上样区下游的报告载体区,其中所述报告载体区包括能与分析物形成复合物的信号载体;位于报告载体区下游的检测区,其中所述检测区包括捕获组分和指示剂;及高效酶的底物;其中,在测试样品流经侧向流动装置后,在检测区加入底物,酶和底物的产物可被检测。

[0010] 在一些具体实施方式中,也能够用包括以下步骤的方法实施,这些步骤不是上面列出的顺序。例如,可以是(a) 固定怀疑含有分析物的样品中的分析物,(b) 连接报告载体和已经固定的分析物以形成报告载体-分析物复合物,此复合物包含有高效酶,(c) 提供高效酶的底物,以及(d) 测定高效酶催化反应的结果波动,例如,反应产物,由此测定分析物的存在。

[0011] 在该方面的具体实施方式中,分析物是蛋白质、核酸细胞、细胞或病原体的一部

分、病原体、病毒颗粒、细胞或细胞外基质的组分或小分子。在本方面的实施例中，报告载体包含抗体或核酸。

[0012] 在该方面的某些具体实施方式中，高效酶可以是脲酶、磷酸胆碱磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、木糖还原酶、莽草酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、新普鲁兰酶、枯草杆菌蛋白酶、4-肌醇六磷酸酶、乙酰胆碱酯酶、漆酶、细菌亮氨酸氨肽酶、三肽基肽酶 I、凝血因子 VIIa、胰蛋白酶、 β -呋喃果糖苷酶。

[0013] 在该方面的具体实施方式中，抗体与高效酶通过非共价相互作用相结合。可选择地，抗体或核酸与高效酶共价连接。

[0014] 在该方面的其他具体实施方式中，该方法进一步使用一种或多种无活性的酶原。酶原是一组复合物，该复合物是酶的无活性前体，并需要一些改变(如覆盖有活性酶的片段的水解)才有活性。

[0015] 在该方面的另一具体实施方式中，高效酶产物的检测是通过 pH 变化检测的，这可能使用含有金纳米颗粒的 pH 敏感水凝胶测定，该金纳米颗粒能对 pH 变化进行颜色改变应答。

[0016] 在该方面的进一步的具体实施方式中，高效酶的产物的检测是通过比色变化检测的，其中比色变化是由于高效酶辅助反应产生的波动，例如，染料材料的质子或脱质子化及银离子还原反应。

[0017] 在该方面的进一步的具体实施方式中，高效酶的产物的检测是通过高效酶-辅助反应的沉淀检测的，例如，可溶性组分的沉淀，可以是包括 BSA 的蛋白质或 pH 敏感聚合物，由于 pH 的变化形成聚集体。pH 值的变化导致聚合物表面电荷移位。作为表面电荷变化的结果，聚合物分子 3-D 结构变化并且该聚合物的疏水部分被暴露出来。该聚合物的疏水区域的暴露增加了熵。聚合物的这些疏水部分将形成非共价相互作用，从而形成聚集体。pH 敏感聚合物的例子包括：甲基丙烯酸、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸 2-(二甲氨基)乙酯和 N-羟甲基丙烯酰胺。

[0018] 在另一个方面，本发明提供了一种分子诊断装置包括(a)上样区，(b)报告载体区，其中所述报告载体区包含报告载体和高效酶，(c)高效酶底物的来源；和(d)检测区，在检测区中包含一个捕获组分。

[0019] 在该方面的一些具体实施方式中，该装置还设有一个阳性对照区。

[0020] 在该方面的一些具体实施方式中，上样区为上样板。

[0021] 在该方面的一些具体实施方式中，报告载体区为结合板。

[0022] 在该方面的一些具体实施方式中，检测区包括多孔膜。

[0023] 在该方面的一些具体实施方式中，该装置具有刚性或弹性背衬材料。

[0024] 在该方面的多种具体实施方式中，报告载体中包含有抗体或核酸。

[0025] 在该方面的某些具体实施方式中，高效酶可以是脲酶、磷酸胆碱磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、木糖还原酶、莽草酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、新普鲁兰酶、枯草杆菌蛋白酶、4-肌醇六磷酸酶、乙酰胆碱酯酶、漆酶、细菌亮氨酸氨肽酶、三肽基肽酶 I、凝血因子 VIIa、胰蛋白酶、贝塔呋喃果糖苷酶。

[0026] 在该方面的一具体实施方式中，抗体通过非共价相互作用与高效酶相连。可选择地，抗体或核酸与高效酶共价连接。

[0027] 在该方面的其他具体实施方式中,该方法进一步使用一种或多种无活性的酶原。

[0028] 在该方面的另一具体实施方式中,高效酶产物的检测是通过 pH 变化检测的,这可能使用含有金纳米颗粒的 pH 敏感水凝胶测定,该金纳米颗粒能对 pH 变化进行颜色改变应答。

[0029] 在该方面的进一步的具体实施方式中,高效酶的产物的检测是通过比色变化检测的,其中比色变化是由于高效酶辅助反应的影响,例如,染料材料的质子或脱质子化及银离子还原反应。

[0030] 在该方面的进一步的具体实施方式中,高效酶的产物的检测是通过高效酶-辅助反应的波动产生的沉淀检测的,例如,可溶性组分的沉淀,可以是包括 BSA 的蛋白质或 pH 敏感聚合物。pH 敏感聚合物的例子包括:甲基丙烯酸、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸 2-(二甲氨基)乙酯和 N-羟甲基丙烯酰胺。

[0031] 在进一步的另一个方面,本发明提供了一种分子诊断装置,包括(a)上样区,(b)前报告载体区,若有此区,所述前报告载体区包含报告载体和高效酶,(c)高效酶底物的来源和前报告载体的报告载体;和(d)检测区,在检测区中包含捕获组分。

[0032] 在进一步的另一个方面,本发明提供了一种分子诊断装置,包括检测区,该检测区中包含一个捕获组分。前报告载体、报告载体或底物可以顺序地加入检测区。

[0033] 在进一步的另一个方面,本发明提供了一种分子诊断装置,包括检测区,该检测区中包含一个捕获组分。该检测区可在多种试剂容器中安置或移动,该试剂容器包含以下一种或多种:前报告载体、报告载体和底物。

[0034] 在进一步地另一方面,本发明提供了一种分子诊断装置,该分子诊断装置利用了段落 [0031]、[0032] 和 [0033] 突出的过程的结合。

附图说明

[0035] 图 1 显示了目标物检测的一般步骤,包括样品制备、信号载体结合、信号载体固定、过量分子的去除及结果显示。

[0036] 图 2 显示了检测核酸的一般步骤。

[0037] 图 3 显示了在侧向流动装置上的实施。

[0038] 图 4A-4H 显示了侧向流动装置的各种具体实施方式。

[0039] 图 5A-5L 显示了侧向流动装置功能的各种具体实施方式。

[0040] 图 6A-6I 显示了检测核酸目标物的前报告载体的不同具体实施方式。

[0041] 图 7 举例阐明了带阳性测试结果的侧向流动装置。

[0042] 图 8 举例阐明了带阴性测试结果的侧向流动装置。

具体实施方式

[0043] 本发明大体上提供了一种用于检测在样品中检测极限 (LOD) 非常低的分析物和目标物的方法和装置,以减少或消除测定前对扩增步骤的需求。在此所公开的方法降低了样品纯度要求从而提供了非常少的复杂过程。本发明的方法和设备还提供了改进的样品制备过程,包括样品富集、纯化、标记和检测。

[0044] 一种用于检测试验样品中分析物的侧向流动分子诊断装置,包括层析介质,层析

介质包括：(a) 位于检测区上游的上样区；(b) 位于上样区和检测区之间的报告载体区，其中所述报告载体区包括能同分析物形成复合物的报告载体；(c) 高效酶的底物；和(d) 检测区，其中所述检测区包括分析物的捕获组分和高效酶的底物；其中酶和底物的产物被检测。

[0045] 检测试验样品中分析物存在的侧向层次分子诊断装置还可以进一步包括检测区下游的阳性对照区域。

[0046] 对床旁环境中使用的核酸检测装置的开发已经在尝试。一些产品通过将测试移至临床实验室外部分满足了上述需求。然而，这些方式并没有(1) 消除对扩增步骤和相关设备的依赖，(2) 降低检测材料的存储要求，(3) 消除对能从扩增中读取光信号的复杂分析仪器的依赖；或(4) 消除电力供应的依赖。扩增的核酸片段作为所述核酸扩增试验的结果，从根本上增加了样品之间交叉污染的风险。

[0047] 利用横向流动装置取代扫描仪或分析仪已有描述，如在 US2011086359、W02004092342、Anal. Chem, 2004, V76, P888 以及 Anal. Chem. 2009, V81, P1660 中。然而，这些方法，虽然不需要复杂的分析仪，没有预先扩增的直接测定还是缺乏灵敏度。例如，病原体的核酸检测一般需要 1,000 拷贝或更高以获得足够的灵敏度；其他报道描述了测定最少需要 100,000,000 拷贝的扩增目标物。这些方法需要扩增设备和试剂，这些对存储条件很敏感；需要专业人士进行目标核酸的扩增；以及对重复使用同一扩增设备的交叉污染的敏感。

[0048] 检测病原体也有快速试剂盒，如 CLO (http://www.medicinenet.com/helicobacter_pylori/article.htm#2diagnosis), 但这些方法都需要(1) 较长的孵育时间(从几小时到几天)以倍增生物目标物；(2) 专业人士进行活组织检查；以及(3) 专业人士解释结果。

[0049] 如此处所详细描述，本发明提供的方法和装置，检测前可最小化扩增或不扩增就可以检测包括生物学的、化学的或材料的一种或多种目标物。在某种程度上，这是通过使用稳定和良好的高效酶系统完成的，该高效酶系统无需预扩增就可以对生物学目标物进行直接测定。至于核酸检测，则降低了交叉污染的风险，因为目标物并未复制，且整个装置是一次性的。检测时间大大减少，样品 - 结果时间少于 1 小时或短短为 15 分钟。在本发明中使用的酶在室温下较稳定。在一些具体实施方式中，本发明能够在没有精密仪器情况下进行检测，从而使本发明适合应用于现场检测(POC)。

[0050] 因此，本发明提供的方法和设备显著地降低了现场检测的设置成本和设备要求，并适合于应用到一次性试剂盒中。这些特点允许消费者或其他人士无需使用前的培训就能直接操作的具体实施方式。此外，本发明的方法和装置可以与现有的工作流程相结合，以改善检测极限(LOD) 和 / 或检测时间。

[0051] 定义

[0052] 需要理解的是，本发明并不限于特定方法、试剂、化合物、组成或生物系统，这些当然可以改变。还需要理解的是，此处所使用的术语仅出于描述特定方面的目的，而不是为了进行限制。如在本说明书和所附的权利要求书中使用的，单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指代，内容另有明确规定除外。

[0053] 此处使用的词语“约”，当指可测量的值，如量、持续时间及类似物时，是指对额定值的包括 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ ，更优选为 $\pm 5\%$ ，甚至更优选为 $\pm 1\%$ ，甚至更优选为 $\pm 0.1\%$ 的

变化,因为这样的变化合适于执行所公开的方法。

[0054] 除非另有定义,此处使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属的领域的普通技术人员的通常理解相同的含义。虽然任何类似或等同于此处描述的方法和材料可以用于实践本发明的试验中,但优选的材料和方法是此处所描述的。

[0055] “分析物”或“目标物”是指待检测的化合物。这样的化合物可包括细胞、部分细胞或病原体、病原体、病毒颗粒、细胞的或细胞外基质、小分子、肽、蛋白质、核酸以及其它化学个体。

[0056] 层析介质可以由任何测试样品能够通过的各种各样的材料制成。例如,层析介质可以是由合成的或天然存在的材料形成的多孔膜,如多糖(例如,纤维素材料,如纸和纤维素衍生物,如醋酸纤维素和硝酸纤维素);聚醚砜;聚乙烯;尼龙;聚偏二氟乙烯(PVDF);聚酯;聚丙烯;二氧化硅;无机材料,如失活氧化铝、硅藻土、硫酸镁或其他均匀分布在多孔聚合物基体中的无机孔材料,该聚合物如氯乙烯、氯乙烯-丙烯共聚物和氯乙烯-乙酸乙烯酯共聚物;布,天然存在的(例如棉花)和合成的(例如,尼龙或人造丝);多孔凝胶,如硅胶、琼脂糖、葡聚糖和明胶;聚合物膜,如聚丙烯酰胺;等等。在一个特定的具体实施例中,层析介质是由硝化纤维素和/或聚醚砜材料形成的。需要理解的是,术语“硝基纤维素”是指纤维素的硝酸酯,其可以是单独的硝化纤维,或是硝酸和其他酸的混合酯,其他酸例如具有 1 至 7 个碳原子的脂肪族羧酸。

[0057] 层析介质的大小和形状通常可以变化,如本领域技术人员容易想到的。例如,多孔膜条带可长约 10 毫米至约 100 毫米,在一些具体实施方式中长约 20 毫米至约 80 毫米,在一些具体实施方式中,长约 40 毫米至约 60 毫米。膜条带的宽度也可为约 0.5 毫米至约 20 毫米,一些具体实施方式中为约 1 毫米至约 15 毫米,以及一些具体实施方式中为约 2 毫米至约 10 毫米。同样地,膜条带的厚度通常要足够小,以允许以透过为基础的检测。例如,膜条带的厚度可小于约 500 微米,在一些具体实施方式中小于约 250 微米,以及在一些具体实施方式中,小于约 150 微米。

[0058] 如上所述,支撑材料承载层析介质。例如,支撑件 21 可相邻于层析介质直接放置,如图 3 所示,或放置一个或多个介于层析介质和支撑材料间的中间层。无论何种情况,支撑材料通常可由任何能够承载层析介质的材料构成。支撑材料可以由可透射光的材料制成,如透明的或光学漫射(例如,半透明)材料。此外,一般预期支撑材料是不透液的,使得流过介质的流体不通过支撑材料泄漏。合适作为支撑的材料实例包括但不限于玻璃;聚合物材料,如聚苯乙烯、聚丙烯、聚酯(例如迈拉 RTM 膜)、聚丁二烯、聚氯乙烯、聚酰胺、聚碳酸酯、环氧化物、甲基丙烯酸酯和聚三聚氰胺;等等。为了给层析介质提供足够的结构支持,支撑材料的通常选取具有一定的最小厚度。同样,支撑件 8 的厚度通常不应大到对它的光学特性产生不利影响。因此,举例来说,支撑材料的厚度范围可从约 100 微米至约 5,000 微米,在一些具体实施方式中为约 150 微米至约 2,000 微米,在一些实施例中为从约 250 微米至约 1,000 微米。

[0059] 正如本领域众所周知的,层析介质可以加到(要层压结合的)支撑材料上,其中产生的薄片制品可模切至所需的大小和形状。可选择地,层析介质可以简单地层压到支撑材料上,例如用粘合剂。在一些具体实施方式中,硝化纤维素或尼龙多孔滤粘附于薄膜上。

[0060] 侧向流动装置还包含在远端安置的相邻于层析介质的吸收材料,该远端即离上样

区最远的层析介质端部。吸收材料辅助于促进通过层析介质的毛细管作用和流体流动。此外,该吸收材料接收已通过整个层析介质的流体,从而吸收任何未反应的组分以远离检测和对照区域,以帮助降低“假阳性”的可能性。可以适用于本发明的吸收材料包括但不限于以下材料,硝化纤维素、纤维素材料、多孔聚乙烯板、玻璃纤维滤纸,等等。吸收材料在插入到装置上之前可以是湿的或干的。预润湿可以有助于一些液体的毛细流动,但通常不是必需的。此外,如本领域中公知的,该吸收材料可使用表面活性剂处理以帮助毛细作用过程。

[0061] 上样区可以由单独的材料,如一块衬板来形成。可用于形成这样的样品衬板的一些合适的材料包括但不限于硝化纤维素、纤维素、多孔聚乙烯板和玻璃纤维滤纸。如果需要的话,上样区还可以含有一种或多种预处理试剂,可以是扩散性或非扩散性地附于上面。在图示的具体实施方式中,测试样品从上样区流至与上样区相连接的报告载体区。该报告载体区可以在层析介质上形成。可选择地,如图 3 所示,报告载体区由单独的材料或衬板形成。这样的试剂板可以由能让测试样品通过的任何材料形成,例如玻璃纤维。

[0062] “指示剂”是指任何各种各样的物质,如石蕊、酚酞、或溴麝香草酚蓝、1-羟基-4-[1-(2-羟基乙基磺酰基)苯偶氮基]-萘-2-磺酸钾、醋酸纤维素耦合 1-羟基-4-[1-(2-羟基乙基磺酰基)苯偶氮基]-萘-2-磺酸钾及类似物,通过特征性变化,尤其是颜色变化来指示其他物质的存在、缺失或浓度,或两种或两种以上物质间的反应程度。

[0063] “样品”指的是怀疑含有分析物或目标分子的任何来源。可利用本发明进行试验的样品的实例,除了别的外,包括有但不限于血液、血清、血浆、尿液、唾液、脑脊液、淋巴液、组织和组织及细胞的提取物、细胞培养上清、活检样本、石蜡包埋组织、土壤、水果、果汁、油、牛奶、食物、水。样品可以被悬浮或溶解在液体材料中,如缓冲液、提取液、溶剂等。

[0064] “报告载体”是指与目标物或分析物结合并形成复合物,并反应目标物或分析物存在情况的实体。报告载体包括蛋白或核酸或可以与分析物或目标分子形成复合物的其他部分。报告载体与高效酶盒相连接,能包括酶与底物的结合,仅在存在目标物或分析物时活化。酶盒包括有至少一种与报告载体连接的高效酶。

[0065] 在一些具体实施方式中,载体为抗体或低聚核苷酸。

[0066] “高效酶”或“高产酶”是指可以在接近扩散极限在高速率下生成产物的酶。

[0067] “捕获组分”通常是指能够特异性地识别及与目标物或分析物复合的分子,该分子不影响报告载体与相同目标物或分析物形成复合物的分子。一般地,捕获元件被固定于层析膜上的基质上。

[0068] “前-报告载体”通常是指在与报告载体结合前,与分析物特异性结合的分子。前-报告载体一般不含高效酶。

[0069] “高效酶结合物”通常是指与报告载体相连的高效酶。相互作用的本质是共价结合或非共价结合或二者的混合。

[0070] 组分与方法

[0071] 报告载体

[0072] A. 载体

[0073] 报告载体典型地包括两种组分:第一种组分是能够与目标物或分析物形成特异性复合物的载体,它可以是生物性的、化学性的或其他类型的。另一种组分是一个或多个高效酶盒。可以在本发明中应用的载体包括但不限于具有与至少部分目的核酸序列互补的序列

的核酸、抗体、适体、固体或多孔微粒以及具有与目标物的至少一部分互补的印压结构的合成聚合物。固体的、壳核的或多孔的微粒可以作为载体的一部分,能提高对流动的控制以引导载体流至反应板。这可以通过以下方式实现,改变载体的尺寸或密度或提供磁-驱动的粒子运动的使用,如果颗粒是可磁化的,例如,顺磁性粒子。

[0074] 在另一个具体实施方式中,不包括高效酶的前-报告载体形成前-报告载体-分析物复合物,称复合物 A。复合物 A 可以通过固定化剂捕捉和固定。单独的前-报告载体不与固定化剂结合。若没有分析物的存在,就不形成复合物,前-报告载体则被冲洗掉。

[0075] 报告载体对分析物具有特异性。前-报告载体可被用于与分析物形成复合物。当三种组分都存在于溶液中时就能产生这种结合。在一优选的具体实施方式中,前-报告载体可在样品溶液加入到侧向流动装置之前加入到样品溶液中。分析物前-报告载体复合物在信号载体区接触,在此报告载体与复合物结合。分析物在检测区被表面捕获剂所捕获和固定。分析物和前-报告载体的结合并不会抑制分析物的固定。当存在有分析物和前-报告载体时,所述二者的复合物通过检测区中的分析物和表面捕获剂的相互作用而被固定。随后,报告载体与该复合物结合后就可以被固定。当不存在分析物或前-报告载体分析物复合物时,报告载体则不能被固定,并随溶剂流动和选择性洗涤而流出检测区,在侧向流动装置上向下移动。

[0076] 前-报告载体的作用是多重的。一是增加目标分析物的特异性。酶与报告载体的结合可以限制背景非目标物的影响,以最大化目标分析物的结合选择性。对于核酸,结合的酶的位阻或库仑电荷效应会影响杂交的选择性。另一作用是通过级联结合,以增加信号放大过程。一个例子就是对小的分析物的检测。当分析物的分子尺寸过小时,很难能有多个报告载体与一个分析物形成复合物。当和前-报告载体形成复合物,即所述复合物 A 时,每个分析物分子有更大表面积。复合物 A 的形成产生了更大的表面积和官能团。增加的表面积和官能团能使得多于一个的报告载体连接到包括分析物的复合物上。更多的报告载体可以产生更多的信号,由此进一步提高信噪比。使用前-报告载体增加了目标物的表面积,以允许每个分析物发生更多的报告载体特异性结合。

[0077] 另一个具体实施方式减少了报告载体设计的复杂性,并增加了目标分析物的多样性,例如:病毒基因多态性或多个核酸序列目标物。可以设计多种前-报告载体的混合物,以与每个特异性基因型或序列反应。所有的前-报告载体都含有一个或一个以上的相对于报告载体特异性的标记。当使用相同的信号标记时,报告载体与标记特异性结合,但与前-报告载体没有差异。当使用不同的信号标记时,若对每个标记所设计的报告载体不同,可以分别地将多个目标物分组。

[0078] 图 6A-6I 显示出了检测核酸目标物时使用的前-报告载体的不同的例子。例如,如图 6B 和 6C 所示,前-报告载体包括有唯一的的目标物结合区(例如, I 到 N),每一个都有唯一的标记(例如, a1 到 a3)。每一个唯一的标记会由不同的报告载体所结合。这种变化的一个优点是,前-报告载体(因此,对相应的报告载体也是)结合于不同的目标物位点。这就减少了由于前-报告载体或报告载体同错误的反应点的错误结合而导致的假阳性结果。图 6D 显示出的例子中,其唯一的的目标物结合区(I-N)每个都携带有相同的标记(“a”)。如图 6E-6F 中,每个前-报告载体可与同一目标物的的部分杂交,而使用单一种类的结合有高效酶的报告载体检测。在进一步的例子中,拥有相同标记(“a”)的每一个前-报告载体能结

合到不同的目标物,相对于相同目标物的不同部分(图 6G-6I)。

[0079] “抗体”是指任何的免疫球蛋白,或者是可以应用于本发明实践中的、能结合到特异的抗原表位的完整分子或其片段。这样的抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化的、单链的、Fab、Fab'、F(ab)'² 片段和 / 或整个抗体的 F(v) 部分和其变异型。该术语包括所有的同种型,并可以用于本发明的实践中,包括 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。

[0080] “抗体片段”特指抗体完整序列中的不完整的或分离的一部分,其保持了母源抗体的抗原结合功能,并也可以应用于本发明中。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')² 和 Fv 片段;双特异抗体;线性抗体;单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0081] 应用于本发明中的完整的“抗体”包括通过二硫键互相连接的至少两个重链(H)和两条轻链(L)。每条重链包括一个重链可变区(此处缩写为 HCVR 或 VH)和一个重链恒定区。重链恒定区由三个结构域组成,CH1、CH2 和 CH3。每条轻链由一个轻链可变区(此处缩写为 LCVR 或 VL)和一个轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区可以进一步细分成超变区,称为互补决定区(CDR),散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成,从氨基末端至羧基末端以下述顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白结合至宿主组织或因子上,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。术语抗体包括完整抗体的抗原结合部分,保留结合的能力。结合的例子包括(i) Fab 片段,由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')² 片段,在铰链区由二硫键连接的两个 Fab 片段组成的二价片段;(iii) Fd 片段,由 VH 和 CH1 组成;(iv) Fv 片段,由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成,(v) dAb 片段(Ward et al., Nature, 341:544-546(1989)),其由 VH 结构域组成,以及(vi)分离的互补决定区(CDR)。

[0082] “单链抗体”或“单链 Fv(scFv)”也可应用在本发明中。此术语是指 Fv 片段的两个结构域 VL 及 VH 的抗体融合分子。尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 及 VH 由不同基因编码,它们可以通过重组方法结合,使用合成连接物将它们合成单个蛋白质链,其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子(称为单链 Fv(scFv);见,例如,Bird et al, Science, 242:423-426(1988); 和 Huston et al, Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879-5883(1988))。这样的单链抗体通过引用包括在术语“抗体”片段中,它们可通过重组技术或完整抗体的酶或化学切割来制备。

[0083] “单克隆抗体”可应用于本发明中。单克隆抗体是单一分子组成的抗体分子制剂。单克隆抗体的组成显示了对特定抗原决定簇的单一结合特异性和亲和性。

[0084] 可以应用于本发明的实践中的抗体特异性的非限制性实例,除了其他的外,包括对特定抗原特异的抗体;检测甲基化 DNA 的甲基化特异性抗体;以及检测磷蛋白的磷酸化特异性抗体。例如,病毒特异性抗体可用于检测样品中病毒粒子的存在。以上描述的所有抗体和片段均可以被能使抗体或片段结合于高效酶的基团所修饰。

[0085] 在一些具体实施方式中,核酸可被作为载体。如果使用核酸,能使用与目标核酸至少部分配对的序列的低聚核苷酸。合成核酸的方法是本领域公知的技术。本发明的核酸可以被能使核酸连接到高效酶上的基团修饰。载体核酸可以引入一个或几个选定的碱基与目标物的错配。利用人工引入的错配时,结合能量能根据焓和熵变结果调整至载体对于不同

样品的设计或工程选择性。

[0086] 除了包括天然碱基的低聚核苷酸,也可使用包含核苷酸类似物的低聚核苷酸,如肽核酸(PNAs)或锁核酸(LNAs)。相对于DNA和RNA,PNA的主链是由肽键连接的重复的N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元组成的。锁核酸(LNA)是经修饰的RNA核苷酸。LNA核苷酸的核糖部分由一个连接2'氧和4'碳的额外化学键修饰。此化学键“锁定”了3'-内切(北)构象的核糖,此核糖往往出现在A型双链体中。根据需要,LNA核苷酸能够与低聚核苷酸中的DNA或RNA残基混合。这样的低聚物可以化学合成和商业购买。

[0087] B. 高效酶或载体酶

[0088] 本发明的实践中,上文所述载体可以与各种高效酶或载体酶非共价或共价地相连。酶,尤其是在本发明实践中有用的酶,特征在于反应速率接近底物扩散极限。本发明的高效酶典型地具有 10^3 /秒/酶到 10^8 /秒/酶或更高的转化常量。

[0089] 适合的高效酶或载体酶的实例包括但不限于下列EC类,氧化还原酶(EC1)、水解酶(EC3)、裂解酶(EC4)、或连接酶(EC6)、或酶、类似酶的核酸、或催化产质子浓度反应的酶样催化剂。

[0090] 这些酶的例子是本领域公知的。可应用于本发明的酶及其特征和底物包括但不限于如下所示。

[0091] 1. 脲酶

[0092] EC编号:3.5.1.5,水解酶

[0093] a. 转化率: $2.97 \times 10^3 \text{S}^{-1}$

[0094] b. 底物:尿素

[0095] 参考文献1:PDB:lfwj。

[0096] 参考文献2:Pearson, M. A. et al, <Kinetic and Structural Characterization of Urease Active Site Variants> Biochemistry, 2000, 39 (29) p8575-8584

[0097] 2. 磷酸胆碱磷酸酶

[0098] EC号:3.1.3.75 又名磷酸乙醇胺

[0099] 产品规格:铜绿假单胞菌PA5292基因PA01基因野生型(通过质粒构建进行截断和修改)

[0100] a. 转化率: $5-7 \times 10^6 \text{S}^{-1}$

[0101] b. 底物:对硝基苯磷酸

[0102] c. 产物:对硝基酚

[0103] 参考文献1:Beassoni, P. R. et al. Current Microbiology, 200652 (6), p534-539

[0104] 3. β -半乳糖苷酶

[0105] EC号:3.2.1.23 来自马克思克鲁维酵母

[0106] a. 转化率: $2.7 \times 10^6 \text{S}^{-1}$

[0107] b. 底物:4-硝基苯基- β -D-半乳糖苷

[0108] 参考文献1:OConnell, S. et al. Applied Biochemistry and Biotechnology 2007V141 (1) p1-13

[0109] 4. 木糖还原酶

[0110] EC号:1.1.1.307 来自爱默生篮状菌

- [0111] a. 转化率 : $1-3 \times 10^5 \text{S}^{-1}$
- [0112] b. 底物 :D- 木糖、NADPH
- [0113] 参考文献 1 :Fernandes, S, et al. J. Biosci. 34(6) 2009p881-890
- [0114] 5. 莽草酸脱氢酶
- [0115] EC1. 1. 1. 25 大肠杆菌
- [0116] 种类 :野生型(莽草酸)、突变体 S22A、Y39F、D107A、S67A、T106A
- [0117] a. 转化率 : $1 \times 10^5 \text{S}^{-1}$
- [0118] b. 底物 :莽草酸、或奎尼酸、或 NAD⁺
- [0119] 参考文献 1 :Lindner, H. A. J. Bio. Chem. 2004V280, P7162-7169
- [0120] 6. 苹果酸脱氢酶
- [0121] EC 号 :1. 1. 1. 37 小麦或爱默生篮状菌
- [0122] a. 转化率 : $1 \times 10^5 \text{S}^{-1}$
- [0123] b. 底物 :NADH
- [0124] 参考文献 1 :Maloney, A. P. et al. Eur. J. Biochem 2712004p3115-3126
- [0125] 7. 新普鲁兰酶
- [0126] EC 号 :3. 2. 1. 135 来自嗜热脂肪土芽孢杆菌
- [0127] a. 转化率 : $1 \times 10^5 \text{S}^{-1}$
- [0128] b. 底物 :淀粉 (普鲁兰多糖膜又称 E1204)
- [0129] 参考文献 1 :Zareian, S et al., Enzyme Microb. Technol. 201046p57-63
- [0130] 8. 枯草杆菌蛋白酶
- [0131] EC 号 :3. 4. 21. 62 来自芽孢杆菌属
- [0132] a. 转化率 : $1 \times 10^5 \text{S}^{-1}$
- [0133] b. 底物 :Suc- 丙氨酸 - 丙氨酸 - 脯氨酸 - 苯丙氨酸 - 对硝基苯胺
- [0134] 参考文献 1 :Toogood, H. S. Biochem. J. 2000250, p321-328
- [0135] 9. 4- 植物磷酸酶
- [0136] EC 号 :3. 1. 3. 26 来自烟曲霉菌
- [0137] a. 转化率 : $3.5-4.1 \times 10^5 \text{S}^{-1}$
- [0138] b. 4- 硝基苯基磷酸盐或肌醇六磷酸
- [0139] 参考文献 1 :Rodriguez, E. et al. Biochem Biophys Res Commun. 2000268(2) p373-378
- [0140] 10. 乙酰胆碱酯酶
- [0141] EC 号 :3. 1. 1. 7
- [0142] a. 转化率 : $1.4 \times 10^5 \text{S}^{-1}$
- [0143] b. 底物 :乙酰胆碱
- [0144] 参考文献 1 :Rothenberg M. A. et al. J. Biol. Chem. 168(1)p223-231
- [0145] 11. 漆酶
- [0146] EC 号 :1. 10. 3. 2 来自担子菌纲提取
- [0147] a. 转化率 : $0.6 \times 10^5 \text{S}^{-1}$
- [0148] b. 底物 :2, 2' - 联氨基双 (3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸)

- [0149] 参考文献 1 :Jordaan, J. et. al., Enzyme Microb. Technol. 2004V34, P635-641
- [0150] 12. 细菌亮氨酸氨肽酶
- [0151] EC 号 :3. 4. 11. 10 来自肝片形吸虫
- [0152] a. 转化率 : $0.3 \times 10^6 \text{S}^{-1}$
- [0153] b. 底物 :L- 半胱氨酸 -7- 酰氨基 -4- 甲基香豆素
- [0154] 参 考 文 献 1 :Acosta, D. et al. Molecular and Biochem. Parasitology 2008, V158(1)p52-64.
- [0155] 13. 三肽基肽酶 I
- [0156] EC 号 :3. 4. 14. 9 来自盘基网柄菌
- [0157] a. 转化率 : $0.55 \times 10^6 \text{S}^{-1}$
- [0158] b. 底物 :丙氨酸 - 丙氨酸 - 苯丙氨酸 - 对硝基苯胺
- [0159] 参 考 文 献 1 :Krimper, R. P. Biochem and Molecular Biology International 1999 47(6)p1079-1088
- [0160] 14. 凝血因子 VIIa
- [0161] EC 号 :3. 4. 21. 21 来自人类
- [0162] a. 转化率 : $0.35 \times 10^6 \text{S}^{-1}$
- [0163] b. 底物 :N- 甲磺酰基 -D- 苯丙氨酸 - 甘氨酸 - 精氨酸 - 对硝基苯胺
- [0164] 参考文献 1 :Neuenschwander, P. F. et al. Biochemistry 2002 41p3364-3371
- [0165] 15. 胰蛋白酶
- [0166] EC 号 :3. 4. 21. 4 来自美洲大蠊
- [0167] a. 转化率 : $0.91 \times 10^6 \text{S}^{-1}$
- [0168] b. 底物 :o- 氨基苯甲酰基 -AGSRGAGQ- (2, 3- 二硝基苯基 - 乙二胺)
- [0169] 参 考 文 献 一 :Marana, S. R. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 2002 290p494_497
- [0170] 16. β - 呋喃果糖苷酶
- [0171] EC 号 :3. 2. 1. 26 来自海栖热袍菌
- [0172] a. 转化率 : $0.73 \times 10^6 \text{S}^{-1}$
- [0173] b. 底物 :蔗糖
- [0174] 参考文献 1 :Dipasquale, L. et al. Extremophiles 2009 13p345-354
- [0175] 分析物检测的灵敏度和特异性可以通过利用温度跃变或温度梯度进一步改善。一些最稳定的酶需要较高的温度以达到最佳活性或作为激活酶的触发器。因此,反应温度可以是高于室温,在该温度下,反应仍可进行。当温度低于最佳温度范围时,酶的活性大大降低。样品中的反应的污染物或背景分子可以在温度升至最佳区间之前先除去或中和。有一种反应污染物是可以被溶解溶液中的二氧化碳,这是对 pH 变化的干扰。升高温度会降低二氧化碳的溶解度,因此减少了这种干扰。提高温度可以通过物理方法如集中式太阳能、或通过放热化学方法如硫酸镁或氯化钙溶剂化的焓变化、或电学方法如热泵。热泵的一个例子是珀尔贴元件。出于同样的原因,通过降低温度,反应速率也可以被刻意降低来优化反应。化学方法的例子是硝酸铵的溶解。热泵通过切换电极性可用于降低温度。在一些具体实施方式中,反应温度为从约 4°C、10°C、20°C、30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C、90°C 至约

95°C, 或能仍能保持酶活性的更高温度, 或所述温度之间的任何温度。

[0176] 除了上述的酶和底物系统, 本发明可利用一个或两个或更多额外的酶原(B、C、D 或更多)。在这种具体实施方式中, 酶原 B 可以作为底物被报告组的酶盒 A 激活。一旦酶 B 被激活, 酶 B 可以进一步激活酶 C, 酶 C 将激活酶 D, 以此类推。在此种连接的系统中的有效转化常数是单个激活的酶原的转化常数的数倍。例如, 每种酶(B、C、D 及更多)的转化常数可以低至 10/ 秒 / 酶或 102/ 秒 / 酶。然而, 倍增的转化常数可超过 104/ 秒 / 酶。实施例包括血液凝固级联反应, 其中活化的因子 Xa 激活凝血酶, 凝血酶催化血纤维蛋白原成为纤维蛋白。活化的凝血酶也通过因子 VIIIa 和 IXa 激活因子 Xa。

[0177] C. 报告载体的形成

[0178] 载体可以通过非共价或共价方式与高效酶或载体酶连接。结合的实施例包括但不限于克隆和表达的嵌合蛋白质作为载体; 化学修饰碳二亚胺-NHS 反应、硫-金复合物、甲苯磺酰基-胺反应、甲醛连接, 二硫键结合、分子印迹和使用上述任何方法的位点导向的结合或随机结合的使用; 和非共价的: 通过生物素-亲和素或凝血酶-水蛭素的嵌合连接。

[0179] 进一步的实施例是可用于连接一个过程中的两个目的分子的偶联或交联化学过程, 一般被称为生物偶联, 这是本领域公知的。常见的耦合化学过程利用胺偶联赖氨酸残基(典型的是通过胺反应性琥珀酰亚胺酯)和巯基偶联半胱氨酸残基(通过巯基反应性马来酰亚胺)。其他的连接可以通过环加成反应或“点击化学”产生。例如, 见 *Bioconjugation Techniques*, Greg. T. Hermanson, Academic Press, 1996; " *Advances in Bioconjugation* ", Kalia, J. and Raines, R. T., *Current Organic Chemistry*, 14:138-147(2010)。

[0180] 可替换地, 如果两种蛋白质能结合, 载体可以使用标准的分子生物学和蛋白质纯化技术做成融合蛋白。编码所需融合蛋白的序列准备好后, 即可克隆到任何合适的载体或复制子中。许多克隆载体是本领域技术人员已知的, 选择合适的克隆载体是问题。用于克隆的重组 DNA 的载体和其转化的宿主细胞的实施例包括噬菌体 λ (大肠杆菌)、pBR322(大肠杆菌)、pACYC177 (大肠杆菌)、pKT230 (革兰氏阴性菌)、pGV1106 (革兰氏阴性菌)、pLAFR1 (革兰氏阴性菌)、pME290 (非大肠杆菌革兰氏阴性菌)、pHV14 (大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)、pBD9 (芽孢杆菌属)、pIJ61 (链霉菌属)、pUC6 (链霉菌属)、YIp5 (酵母菌属)、Ycpl9 (酵母菌属)和牛乳头状瘤病毒(哺乳动物细胞)。见上文 Sambrook 等; 上文 DNA 克隆; 上文 B. Perbal。基因可被启动子、核糖体结合位点(用于细菌表达)和可选择地, 操纵子(在本文中统称为“控制”的元素)所控制, 使得编码所需蛋白质的 DNA 序列, 在转化了包含该表达构建体的载体的宿主细胞中被转录成 RNA。编码序列能或不能含有信号肽或前导序列。前导序列可以在翻译后程序中被宿主去除。参见, 例如, 专利号为 4, 431, 739 ; 4, 425, 437 ; 4, 338, 397 的美国专利。

[0181] 表达载体随后用于转化宿主细胞。许多哺乳动物细胞系是本领域公知的, 并且包括从美国典型培养物保藏中心(ATCC)可获得的永生化细胞系, 例如但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、海拉细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝癌细胞(例如, HepG2)、Madin-Darby 牛肾("MDBK")细胞, 以及其他细胞。同样地, 细菌宿主如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和链球菌亚种, 也可用于现有表达构建体。本发明可应用的酵母宿主包括但不限于酿酒酵母、白色念珠菌、麦芽糖假丝酵母、多形汉逊酵母、脆壁克鲁维酵母、乳酸克鲁维酵

母、季也蒙氏毕赤酵母、巴斯德毕赤酵母、粟酒裂殖酵母和解脂耶氏酵母。杆状病毒表达载体使用的昆虫细胞包括但不限于埃及伊蚊、苜蓿银纹夜蛾、家蚕、果蝇、草地夜蛾和粉纹夜蛾。

[0182] 捕获组分

[0183] 捕获组分可以被固定在膜表面以捕获报告载体-目标物复合物。捕获分子可以识别并与目标物形成复合物,且不阻碍报告载体与同一目标分子形成复合物。只有与目标物形成复合物的报告载体才会被捕获组分所固定。如图1所示,报告载体-目标物捕获组分的固定产生了三明治结构的形成。非该结构一部分的报告载体是可溶的并会被液体流动或冲洗去除,例如,在侧向流动方式中。当应用洗涤溶液时,优选pH约8至约9.5的缓冲液。当使用质子生成酶和底物时,缓冲液的缓冲能力必须不大于预期pH值的变化。典型的洗涤缓冲液的浓度约0.03mM到约0.1mM。含有三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)和磷酸盐的水溶液、醇水溶液和盐水缓冲液,是此类合适的缓冲溶液的非限制性实施例。在一般情况下,捕捉组分为蛋白质或核酸。捕获组分可使用本领域中已知的方法固定到层析介质表面。参见,例如,Nakanishi et al., *Current Proteomics*, 5:161-197 (2008)。将核酸固定到表面的方法也是已知的。参见,例如,Wu et al., *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.*, 19:725-753 (2008)。在一个测试中可采用多种类型的捕获组分和报告载体,以检测多重目标物。例如,多重目标物可以是多个核酸或核酸和非核酸(如蛋白目标物)的组合。在本领域中公知的,包括共价和非共价的多种固定方法中的任何一种,都可以应用在本发明的实践中。

[0184] 常规检测方法

[0185] 图1显示了常规的目标物检测的各个阶段,包括样品制备、报告载体与目标物的结合、信号载体-目标物固定化、洗涤出去过量试剂及结果显示。

[0186] 制备样品:作为第一步,制备样品以用于本发明的方法和设备中。本领域技术人员所可知,此阶段的可能步骤会根据实施和目标分子类型而变化。应用于本阶段的步骤的实施例包括但不限于:提高目标分子浓度的方法、从细胞中提取核酸及样品纯化。在一些具体实施方式中,样品应用前不需要大量准备样品(例如,像血液或尿液的液体样品)。

[0187] 结合报告载体:如图1所示,该步骤使用了包含酶盒的报告载体。该报告载体将与想要测定的目标分子形成复合物。

[0188] 固定报告载体:捕获组分构成的固定剂阵列用于捕获生物目标物。如图1所示,由于固定剂捕获了与报告载体已形成复合物的目标物,就形成了固定剂-生物目标物-报告载体的三明治结构。在不同的具体实施方式中,针对不同的目标分子,在阵列中可以有多种固定剂(或捕获组分)。

[0189] 洗去过量分子:此可选步骤能洗去其它分子、过量样品、报告载体或其他未被固定剂阵列所捕获的分子。冲洗溶液从检测区上游加入,通过毛细作用迁移穿过检测区,如果存在对照区,也穿过对照区,到达测试条远端的吸收板。可选的洗涤溶液的量取决于测试条的尺寸和测试的性质,并很容易由本领域的技术人员确定。

[0190] 显示结果:在这个阶段被固定的报告载体与试剂、一般的底物混合,他们与载体上的高效酶或高产酶反应,快速生成可被观测的产物。也可加入一种或多种酶以加速产物的生成,从而形成级联反应。根据酶和试剂的选择,能采用不同的检测方法。这些包括但不限于例如pH值的变化、颜色变化、颜色密度的变化或发光,等等。应用于层析测试条的底物一

般以喷雾、涂抹、滴入或倾倒方式加入。

[0191] 图 2 显示了本发明在核酸检测中的应用。当应用于核酸目标分子时，一般的工作流程类似于图 1 所示。

[0192] 制备样品：在本应用中，样品制备可以包括常规步骤，例如核酸提取、样品浓缩、RNA 提取和核酸酶抑制。在一些应用中，DNA，如基因组 DNA，可能需要打断到一定尺寸，例如，在使用之前进行剪切。

[0193] 结合报告载体：在本应用中，高效酶或高产酶结合到形成为报告载体或酶盒的合成的多核苷酸上。在一些具体实施方式中，一个核酸目标物可以存在多于一个的多核苷酸。报告载体中的多核苷酸可以与目标核酸杂交。

[0194] 固定报告载体：如图 2 所示，固定剂阵列能包括一个或多个对目标核酸特异的多核苷酸。若存在匹配，则固定剂将与目标核酸杂交以形成报告载体 - 目标物 - 固定剂复合物。该复合物的形成锁定了报告载体。报告载体和固定剂中多核苷酸的选择可用于多种应用，包括但不限于检测单核苷酸变异、甲基化或目标物测序。

[0195] 洗去过量分子：在此阶段，过量分子和酶盒被洗去，留下结合的报告载体 - 目标物复合物。

[0196] 显示结果：报告载体随后与底物试剂发生反应，形成可观测产物。在一些具体实施方式中，可添加一种或多种附加酶以加速反应。

[0197] 侧向流动平台

[0198] 图 3 显示了本发明在侧向流动平台上的实施。为获得最佳性能，它的实施可以根据不同样品类型，相对于平台不同部分的不同组分的位置而变化。在图 3 中，样品板 1 在结合板 2 上游，结合板 2 在层析膜 3 上游，层析膜 3 在检测区(测试线) 4 上游，检测区 4 在对照区(对照线) 5 上游，对照区 5 在吸收板 6 上游。整个装置置于支撑材料 8 上。

[0199] 类似于其他形式的侧向流动，样品可以在样品板处进入装置，并最终通过背衬材料顶部的膜行进到达吸收板。报告载体可置于结合板上，且固定剂阵列可在感应线 and 对照线处。容易理解的是，对照线和感应线的顺序可以不同，在一些具体实施方式中，可以有 multiple 感应线。底物试剂和附加酶(如果需要)也可存在于对照和感应线处。

[0200] 样品穿过结合板，报告载体和目标物的复合物形成。当样本前端到达感应线，已与报告载体形成复合物的目标物将被阵列所固定。然后发生反应以形成足够的可被监测的产物。如果固定探针(捕获组分)与样品中的目标物不匹配，那么样品核酸会流过膜，在检测线留下极小浓度的酶。对照线作为装置上的阳性对照。阳性对照表明测试条是有功能的，从而最小化假阴性测试结果。

[0201] 图 7 显示了一个阳性的测试结果。检测区 4 显示了酶的存在，表明分析物 - 报告载体复合物在检测区已被捕获。阳性指示剂反应是测试样品迁移出检测区后，底物加入检测条的结果。对照区 5 也显示了酶的存在，表明未结合的报告载体迁移经过了检测装置，并在对照区被捕获，加入酶底物后产生指示剂的变化，检测到未结合报告载体的存在。

[0202] 图 8 显示了在检测区由于没有形成或捕获分析物报告载体复合物的阴性测试结果。对照区的阳性结果证明测试条功能正常，并且酶和报告载体都存在并有活性。

[0203] 以下特定方面的实施本发明的实施例仅出于描述性目的，而非以任何方式限制本发明的保护范围。

[0204] 实施例**[0205] 实施例 1 :侧向流动装置具体实施方式**

[0206] 图 4 显示了各种可用于本发明的实践中的侧向流动装置的具体实施方式。提供了上样区 1。箭头方向的流动产生了样品与报告载体上样区 2 中的报告载体 7 的结合。检测区 4 含有捕获组分(向上指向的实线箭头)和显示结果的材料,如底物,如果有必要,还含有附加酶原以进一步放大信号。提供了阳性对照区 5。如果有供样品移动的支撑脚手架基质,可以为化学涂层或多孔基质的膜或支链聚合物。如图 4B-4D 中,脚手架基质可以安装于固体无孔支持物 8 上,其可以是柔性的或多孔的。在一些具体实施方式中,检测区 1,可以包含一种类型的固定剂阵列 8 (如抗体、抗原、核酸等)或多种类型的固定剂阵列,该阵列置于检测区内的不同空间位置 4a, 4b 和 4c 上。图 4E 阐明了,无活性的酶原 9,可以置于固定剂阵列中,当它被激活时可导致系统的总的转化率。在进一步的具体实施方式中,在固定剂阵列周围的支撑脚手架基质可以包括 pH 敏感材料,如 pH 敏感水凝胶 10,例如金纳米颗粒 10a。这样的 pH 敏感材料可以用来检测酶的反应,该酶的催化活性产生 pH 变化。如图 4G 和 4H 所示,可用于实施本发明的表面 pH 敏感显示分子包括吡啶橙、花青、脂质体或荧光右旋糖酐 11 或可溶性分子例如 BSA12。

[0207] 实施例 2 :侧向流动装置的具体实施方式的操作

[0208] 图 5 显示了本发明不同具体实施方式的操作。样品目标物 13 被引入上样区 1(步骤 A)。如箭头所指示的方向的侧向流动携带样品目标物 13 与报告载体 7 接触(步骤 B)。进一步的侧向流动携带样品目标物与报告载体 14 的复合物进入检测区 5 (步骤 C)。检测区的捕获组分(向上指向的实线箭头)固定样品目标物和报告载体 15 的复合物(步骤 D 和 4-E)。在各种具体实施方式中,捕获组分可以是单一或多个变体(比较步骤 D 和 E 向上指向的箭头)。沿着捕获组分和固定的样品目标物和报告载体复合物的侧向流动移除诸如未结合的报告载体、未结合的样品目标物等等过量材料,并作为洗涤步骤(步骤 F)。在步骤 G 中,酶底物和其它可溶性分子可以应用于固定剂阵列区域。在各种具体实施方式中,酶可以是能将底物转化为产物 17, 18 的单一高效酶,或者也可以使用多重连接的酶原 19。一些可能的其他显示选择如步骤 J-L 所示。例如,反应产物 17 可以通过水凝胶颜色变化来测定,该水凝胶如含有金纳米粒子的 pH 敏感水凝胶 10、10b、21、22 (步骤 J)。其他显示选择可以是基于颜色变化(比如,银还原反应) 11、23、24 (步骤 K)。在另一个具体实施方式中,可溶性分子如 BSA 的 pH 敏感沉淀可用于显示结果 12、25 (步骤 L)。

[0209] 在当前公开的一个优选具体实施方式中,该装置也可以是一个侧向流动单元。整个装置成本非常低、便于携带、无需其他仪器以及敏感性高。该装置特征在于不同的方面。一是酶连接于结合物,另一个是,指示剂被涂抹或固定在检测区。酶促反应的产物与指示剂反应,在检测区产生可见的差异。

[0210] 指示剂可以是 pH 敏感的,当指示剂质子化状态改变时,该指示剂会改变颜色或荧光。在一具体实施方式中, pH 指示剂与载体膜分子发生反应,载体膜分子诸如醋酸纤维素。在另一具体实施方式中,所述 pH 指示剂被包裹于质子透过性塑料中[" Full-range optical pH sensor based on imaging techniques ", Capel-Cuevas, S., Cuellar, M. P., de Orbe-Paya, I., Pegalajar, M. C., Capitan-Vallvey, L. F., *Analytica Chimica Acta*, 681 (2010) 71-81]。在这两种情况下,所述 pH 指示剂在膜上的沉积不干扰在侧向流动

装置中的结合。

[0211] 在一个优选的具体实施方式中,指示剂被印或喷涂在结合板下游的膜上,形成一条线或一个区域。每条线或区域通过没有指示剂的膜的缓冲区域与另一线或区域分开。缓冲区域也能包括一层固定的缓冲成分以阻止不同的线/区域之间的交叉反应。

[0212] 在一具体实施方式中,染料(溴麝香草酚蓝)是混合溴百里酚蓝 2.1mg;三十二烷基甲基氯化铵(TDMAC) 2.8mg;癸二酸二辛酯(DOS) 19.6mg;乙二醇 19.6 毫克和四氢呋喃(THF) 1ml 而制备的。溴百里酚溶液的 pH 值为约 8 至约 9.5。指示剂聚合物溶液用气喷枪喷涂在膜上。气喷枪是岩田制作的高性能 C PLUS 气喷枪。只有侧向流动条上的对照/检测线才被聚合物/指示剂包被。喷洒后,在使用前整个条形物要置于干燥器中 16 小时。

[0213] 一个优选的具体实施方式中,pH 指示剂可以与聚合物如纤维素共价连接(US4,029,597)。在一具体实施方式中,为染料分子和纤维素的共价化学,特别设计了有羟基磺酰末端基团的 pH 敏感染料。PH 敏感的染料分子用硫酸在室温下处理,以形成末端为磺基酯基团。然后,硫酸中的染料溶液在去离子水中稀释,并用氢氧化钠中和。醋酸纤维素在此阶段加入到该溶液中。5 分钟后,溶液中加入碳酸钠,再过 5 分钟加入氢氧化钠。在强碱性条件下,磺基酯基团形成乙烯砜末端基团,且醋酸纤维素水解以形成具有末端羟基基团的纤维素。在相同碱性条件下,染料分子中的乙烯砜基团与纤维素的羟基基团反应,形成 pH 指示剂染料与纤维素之间的共价连接。最终的反应产物用去离子水洗涤。pH 敏感纤维素溶解在溶剂中以制备重量比为 10% 的溶液。优选水溶液。指示剂溶液喷涂在硝化纤维素膜上,以使 pH 指示剂染料固定于侧向流动装置上。

[0214] 羧酸酯酶的优选的底物溶液包括下列组分:

[0215] 10M 己酸烯丙酯

[0216] 0.1mM Tris pH8.5

[0217] 5% 异丙醇

[0218] 底物为己酸烯丙酯。水解后,一个己酸烯丙酯分子产生一个己酸和一个 2- 丙烯醇。反应起始 pH 值是由 0.1mM Tris 限定为 pH8.5。底物溶液的缓冲能力将小于 50 微摩尔。整体质子平衡在 pH8.5,将产生质子过剩,因此水解会导致 pH 值下降。

[0219] 水解产生的 pH 值的变化将导致指示剂例如上述的溴百里酚蓝的从蓝色变为黄色。

[0220] 在一个优选的具体实施方式中,装置与空气中二氧化碳隔离,这将缓慢地改变溶液的 pH 值至 pH6.5。隔离可以通过层压或加外壳来实现。

[0221] 优选的载体是直径为约 10nm 到约 500nm 的微颗粒。优选地,颗粒直径为约 10nm 到约 100nm。颗粒优选为乳胶的或金的。颗粒被涂覆有可与高效酶结合或复合的材料。优选的涂层为链霉亲和素。优选的颗粒为具有链霉亲和素涂层的 20nm 金粒子。优选的酶是羧酸酯酶。羧酸酯酶的优选底物是存于 5% 异丙醇中的,在 pH8 的 0.1mM Tris 缓冲液中的苯乙基丁酸酯和在 pH8.5 的 0.1mM Tris 缓冲液中的 10mM 己酸烯丙酯。

[0222] 优选的颗粒组成是 40nm Innovacoat 金颗粒,用以下方法涂覆链霉亲和素:

[0223] 1. 在 pH7.4 的磷酸盐缓冲液中制备 0.2mg/mL 的链霉亲和素溶液

[0224] 2. 将 42 μ L 取自 Innovacoat 金试剂盒中的反应缓冲液 <<http://www.innovabiosciences.com/gold-conjugation-kits/innovacoat-gold.html>> (200D40nm),

与 12 μ L 链霉亲和素溶液混合

[0225] 3. 将混合物 45 μ L 转移到部分 Innovacoat 金上。

[0226] 4. 在使用 5 μ L 试剂盒中猝灭剂中止前,在室温下孵育 10 分钟。

[0227] 5. 离心沉降颗粒并去除上清

[0228] 6. 用 100 μ L PBS 缓冲液重悬

[0229] 7. 重复步骤 5

[0230] 8. 用 50 μ L PBS 重悬,并加入终浓度 0.1% 的 BSA 和终浓度 0.01% (20KMW) 的聚乙二醇溶液

[0231] 9. 混合 1 μ L 生物素化抗体(大约 12 μ g/mL)、2 μ L 生物素化的羧酸酯酶(约 700ug/ml)、2 μ L 链霉亲和素修饰的 Innovacoat 金以形成报告载体合物即偶联物。

[0232] 尽管本发明特定方面已经进行了描述和图示,这些方面应仅被视为说明性的,并不限制本发明按照所附权利要求书的解释。

[0233] 本说明书中所引用的所有的出版物和专利申请都全文引入作为参考,就如每一个单独的出版物或专利申请特定地、单独地全文引入作为参考。

[0234] 虽然前面的发明为了清楚理解的目的,通过图示和举例的方式进行了详细的描述,但对本领域普通技术人员来说,不背离所附权利要求书的精神和范围的一定变化和修饰的启示是容易想到的。

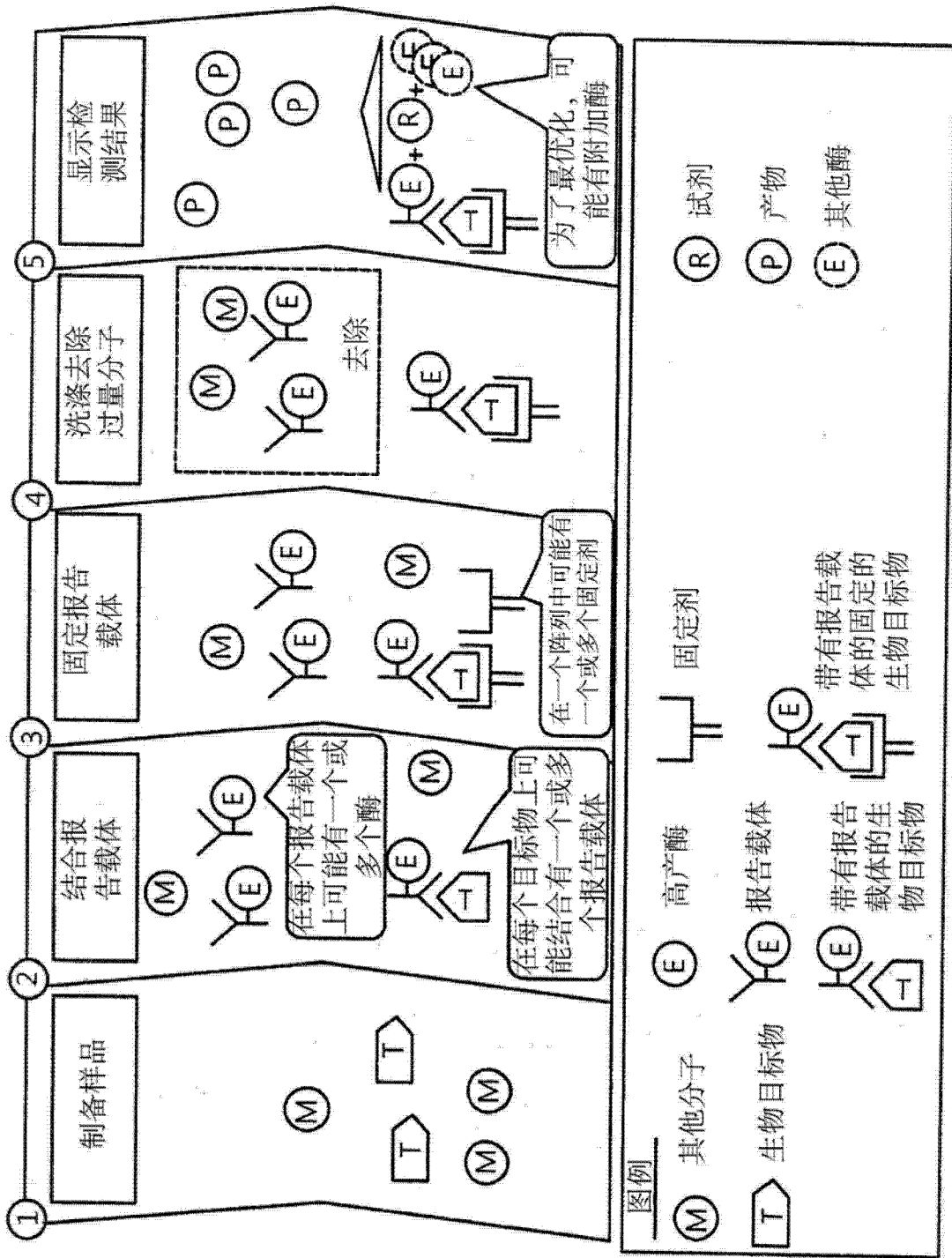


图 1

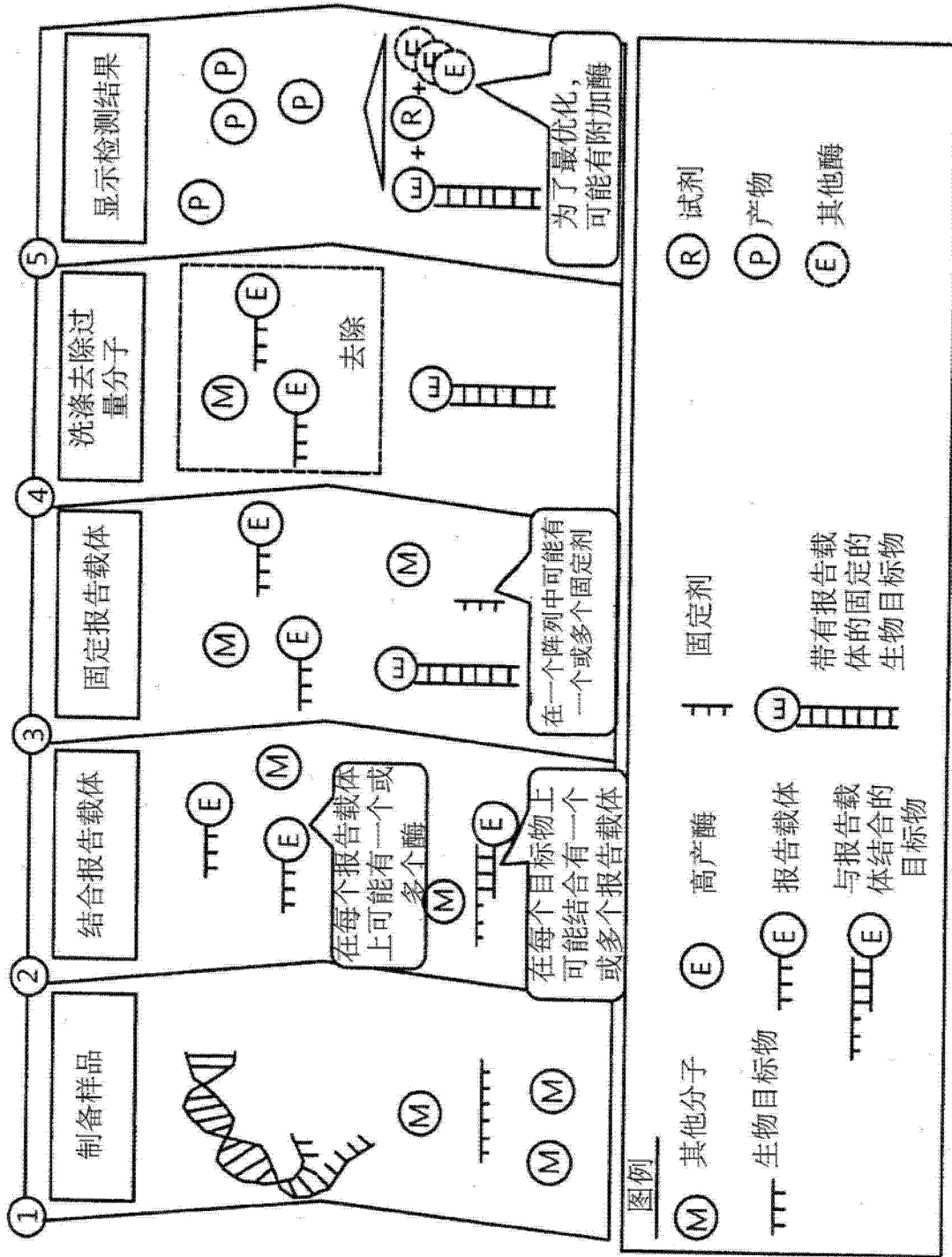


图 2

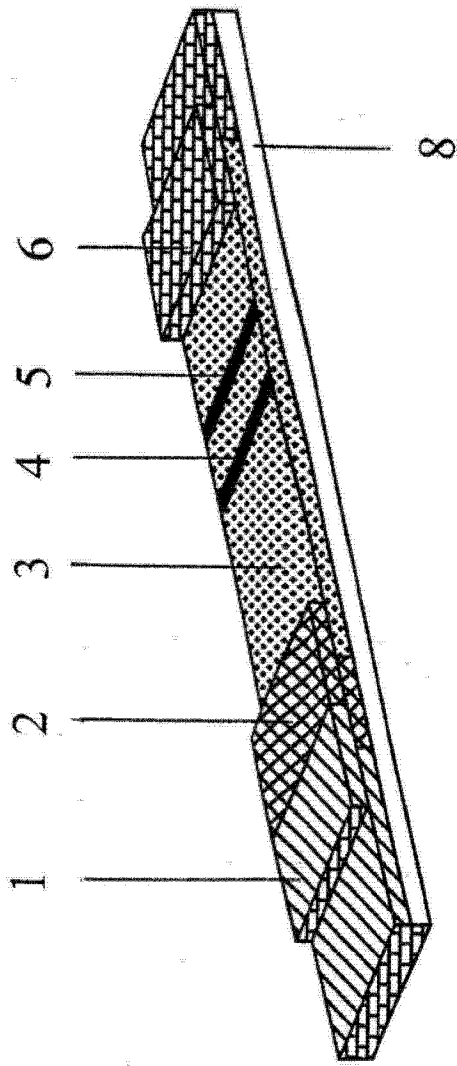


图 3

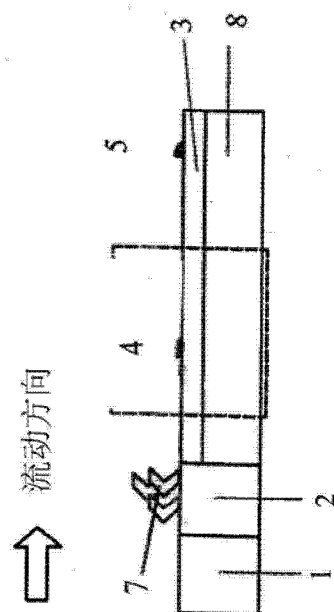


图 4A

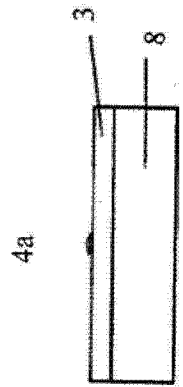


图 4B

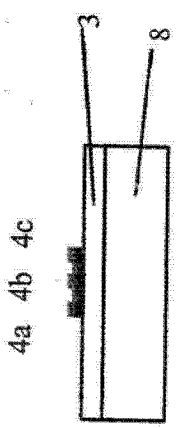


图 4C

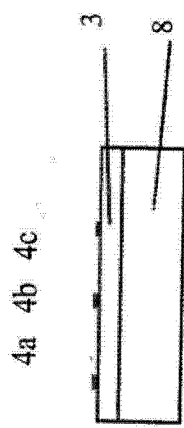


图 4D

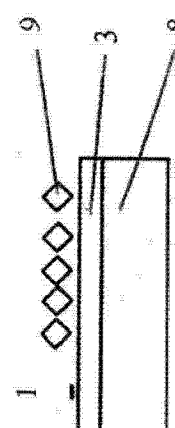


图 4E

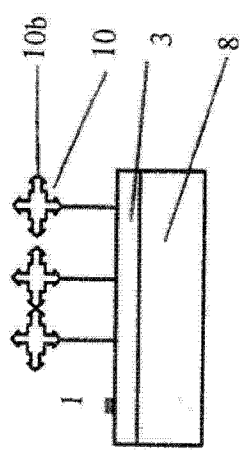


图 4F

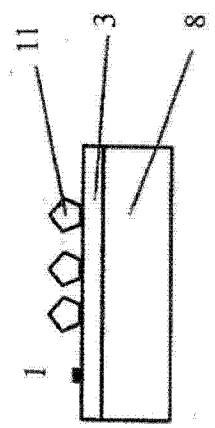


图 4G

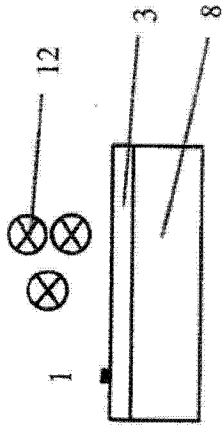


图 4H

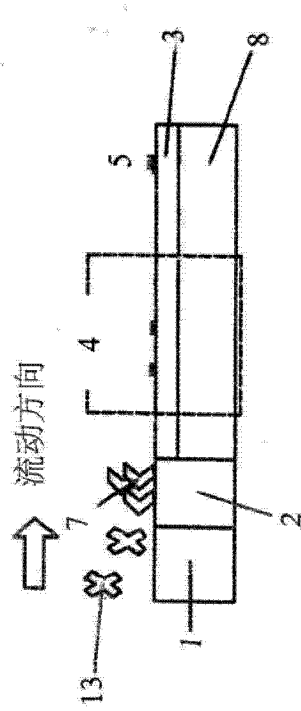


图 5A

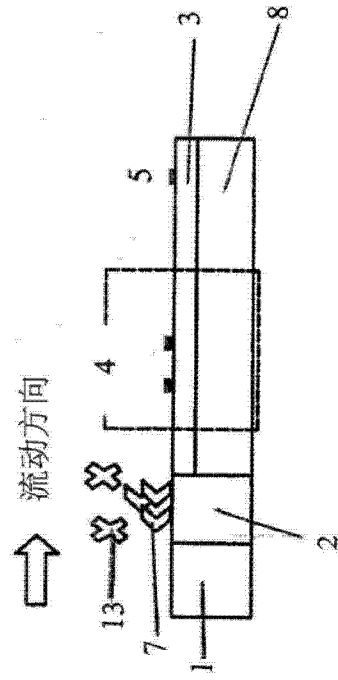


图 5B

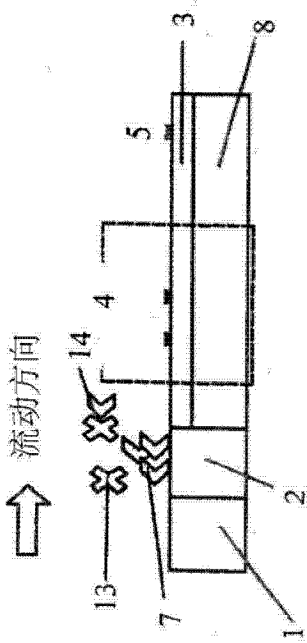


图 5C

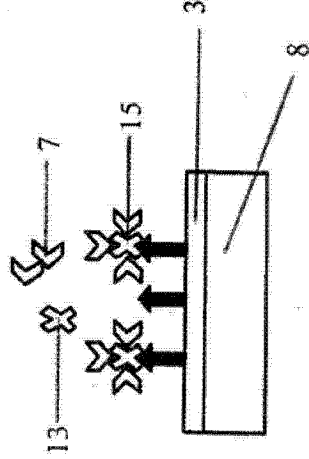


图 5D

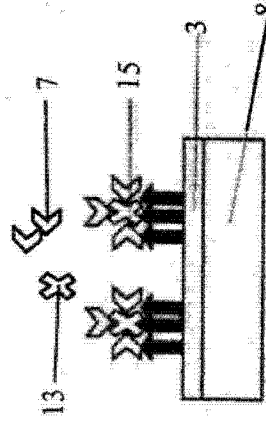


图 5E

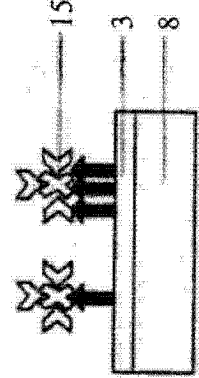


图 5F

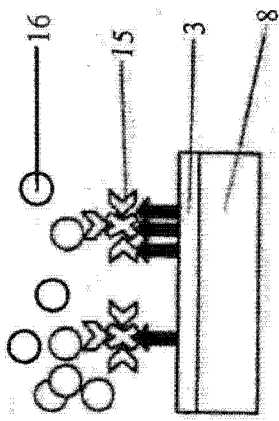


图 5G

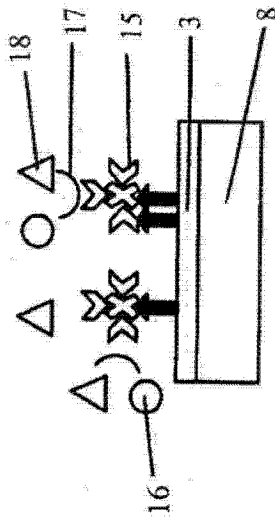


图 5H

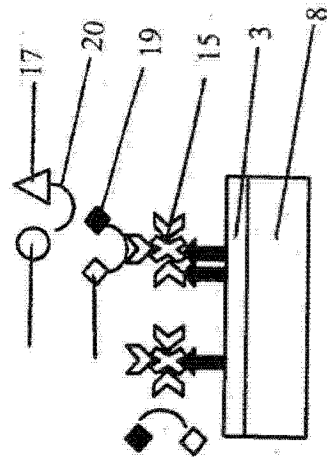


图 5I

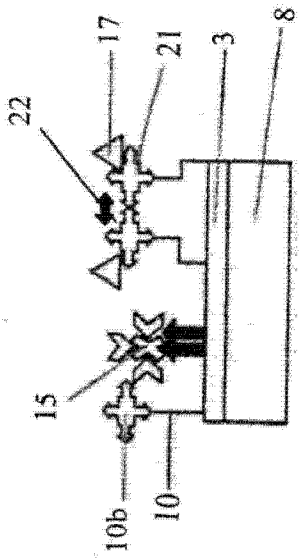


图 5J

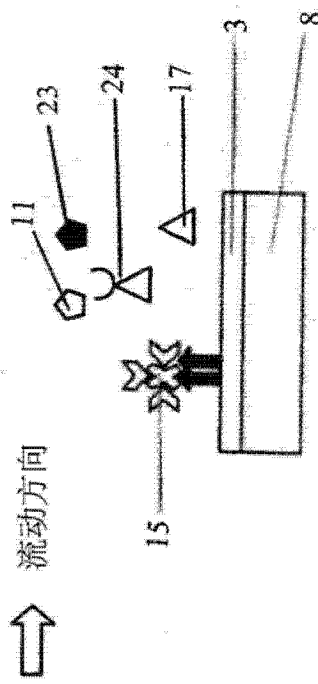


图 5K

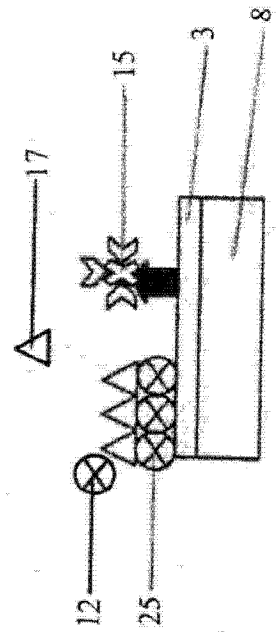


图 5L

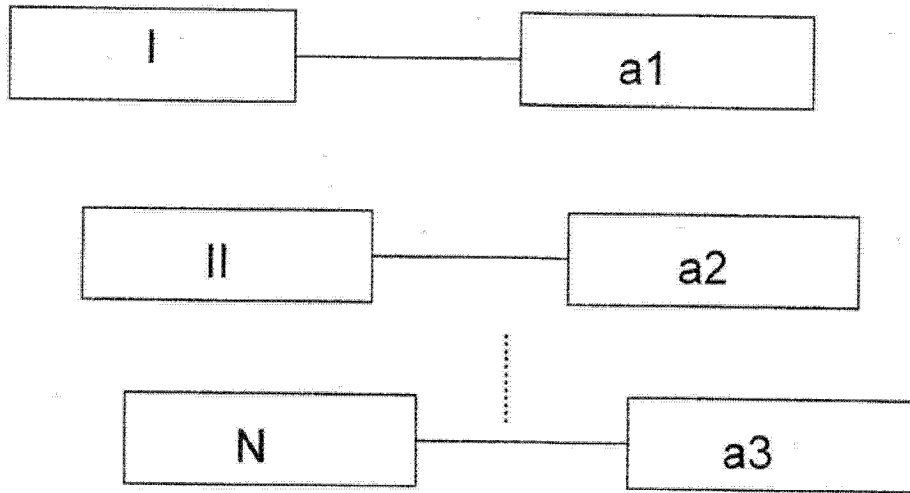


图 6A

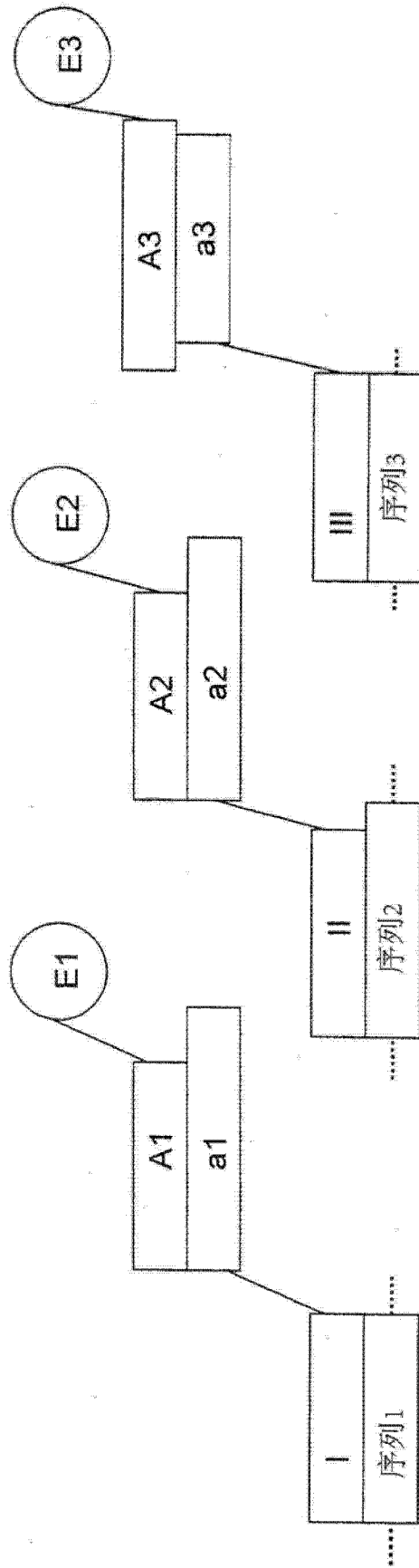


图 6B

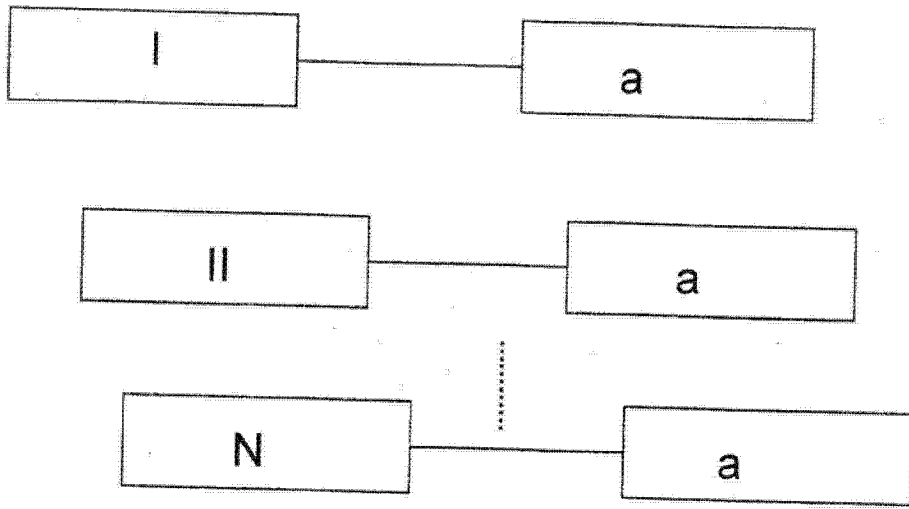


图 6C

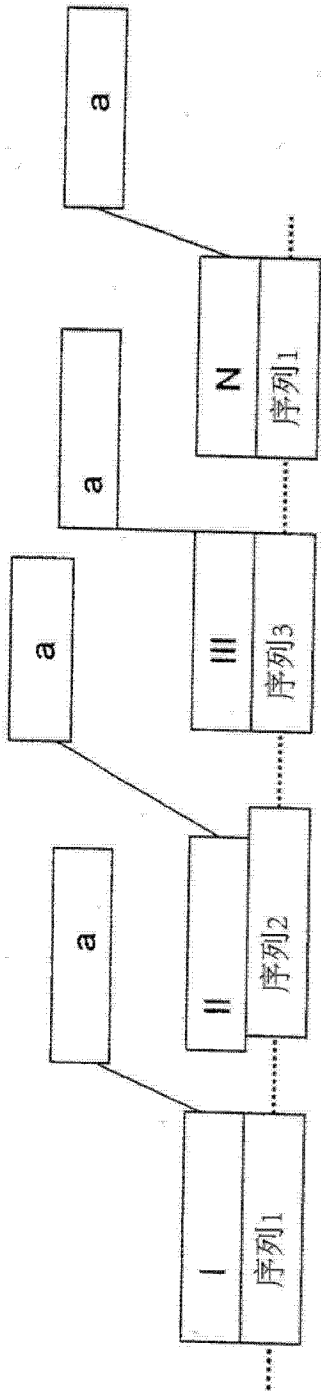


图 6D

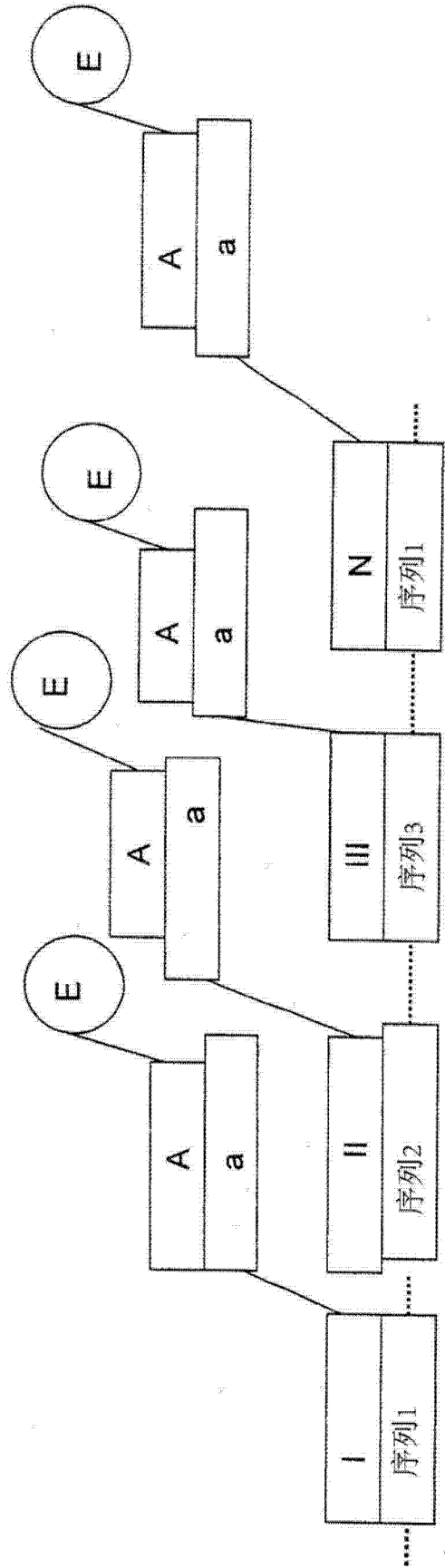
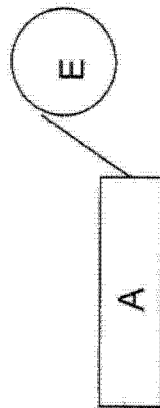


图 6E

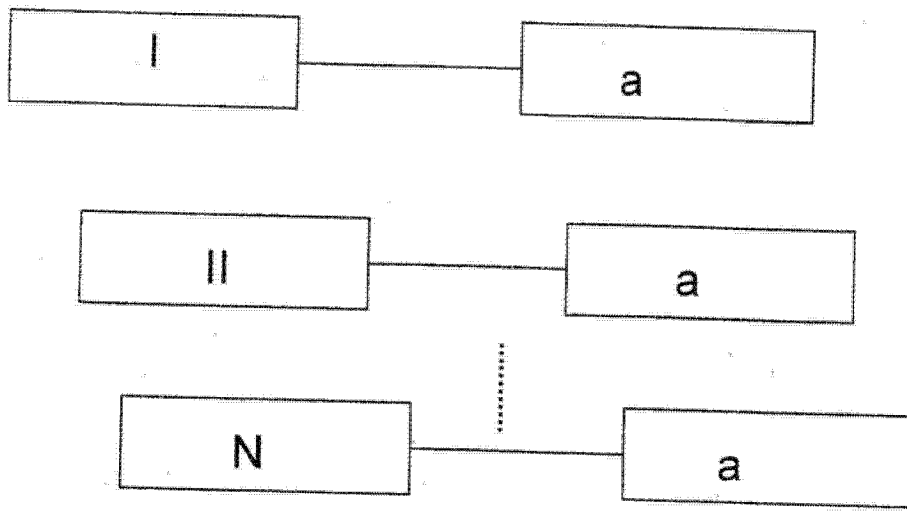


图 6F

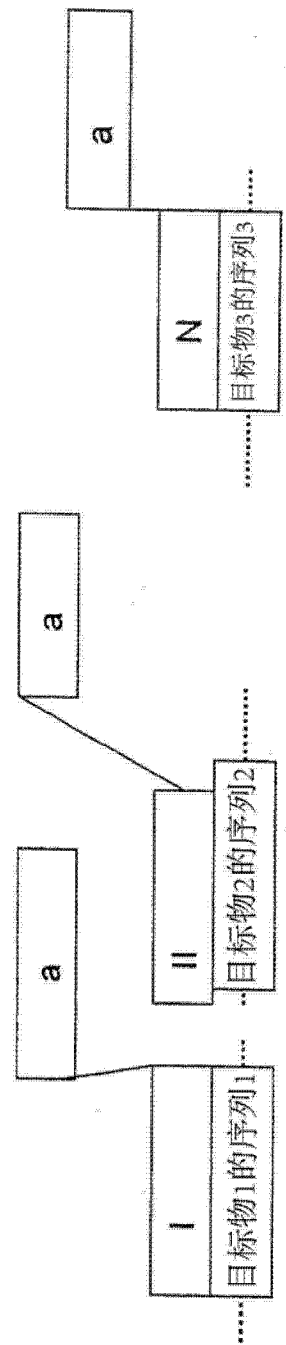


图 6G

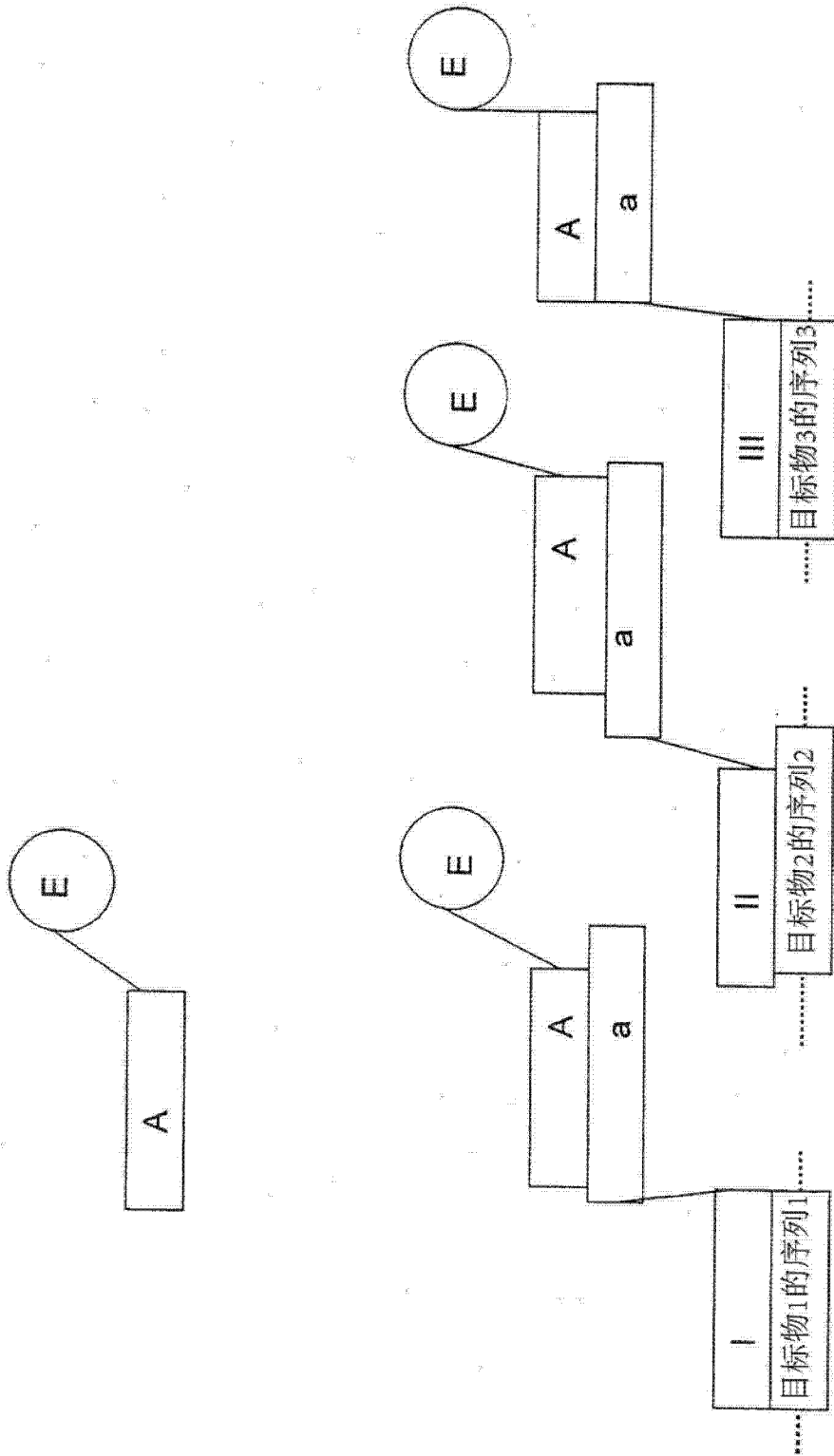


图 6H

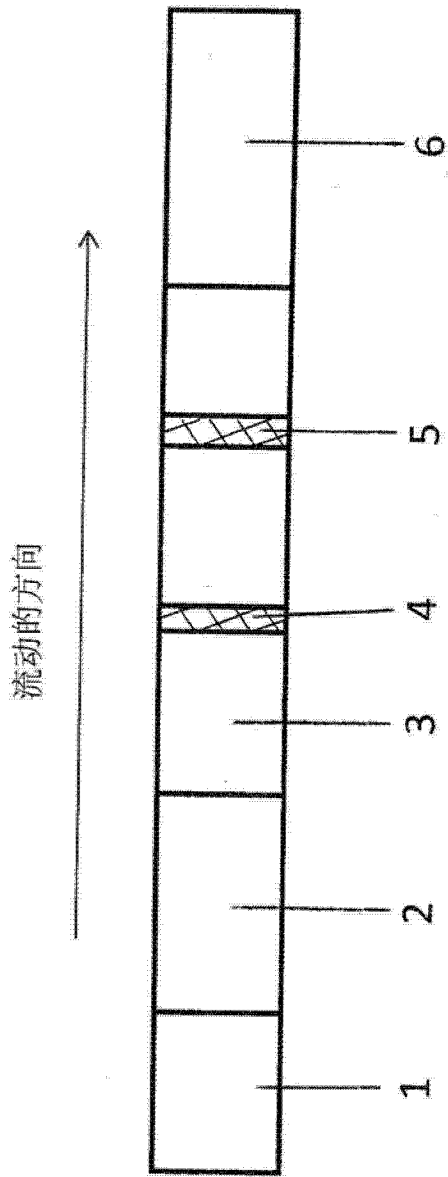


图 7

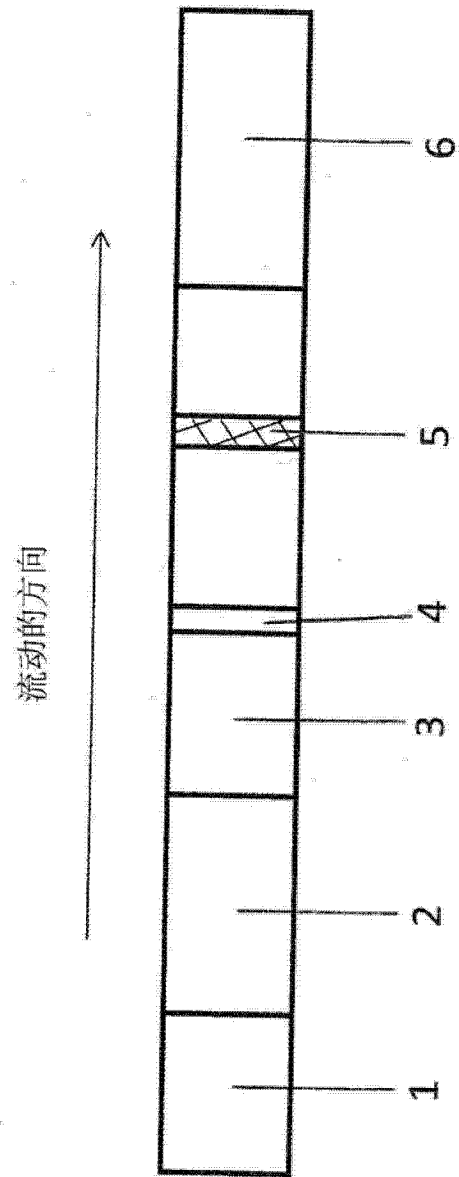


图 8

专利名称(译)	分子诊断检测设备及使用方法		
公开(公告)号	CN103858009A	公开(公告)日	2014-06-11
申请号	CN201280041999.3	申请日	2012-09-14
[标]发明人	温斯顿王 斯蒂芬昌智卡奥		
发明人	温斯顿·王 斯蒂芬·昌·智·卡奥		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/581 G01N33/54386 G01N21/80 G01N2021/752 G01N2021/757 G01N2333/918 G01N2458/15		
代理人(译)	郑立		
优先权	61/535874 2011-09-16 US		
其他公开文献	CN103858009B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于分子诊断检测的侧向流动装置和使用方法。该方法适合检测或监测包括以非常低的浓度存在于生物样品中的生物性、化学性和材料性的目标物。本发明的方法和装置适用于无能量源的现场检测。

