

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580015176.3

[51] Int. Cl.  
G01N 33/538 (2006.01)  
G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2007年4月25日

[11] 公开号 CN 1954212A

[22] 申请日 2005.5.10

[21] 申请号 200580015176.3

[30] 优先权

[32] 2004.5.12 [33] DE [31] 102004023402.7

[86] 国际申请 PCT/EP2005/005016 2005.5.10

[87] 国际公布 WO2005/111607 德 2005.11.24

[85] 进入国家阶段日期 2006.11.13

[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 J·斯平克 J·沙夫勒

L·博登贝克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘春元 王忠忠

权利要求书1页 说明书17页 附图5页

## [54] 发明名称

用于提高基于特定结合反应的测试单元、尤其是免疫测试单元的动态测量范围的方法

## [57] 摘要

本发明涉及一种用于提高基于特定结合反应的测试单元、尤其是免疫测试单元、尤其是可光学分析的免疫层析测试条的动态测量范围的方法。本发明能够把基于特定结合反应的测试单元、尤其是免疫测试单元的动态测量范围向较高的分析物浓度推移，而不必忍受在探测界限方面的损害。为此本发明建议，在测试单元之中或之上提供至少两个含有试剂的区，其中由于对分析物的不同的亲和性(比如对分析物的不同亲和性的抗体的情况)或者由于与分析物或与参与分析物探测的其他试剂相互作用的不同原理(比如在一个区中对准分析物的抗体和在另一区中分析物或分析物类似物)而产生不同强度的可探测的信号。至少两个区中的信号被考虑用于对分析物浓度-信号强度关系进行分析，并通过适当的方法(校准)被考虑用于确定分析物。

1. 用于借助基于特定结合反应的测试单元、尤其是免疫测试单元确定样品中分析物的浓度的方法，所述测试单元不仅具有分析物探测区而且还具有控制区，其中：

a) 使所述样品与所述测试单元相接触，并与对分析物特定的试剂相接触；

b) 只要存在于所述样品中，则所述分析物通过与特定试剂相互作用而产生在分析物探测区中可探测的信号，其中该信号依赖于样品中分析物的量；

c) 未与所述分析物或所述分析物探测区中的试剂进行相互作用的一部分特定试剂在所述控制区中产生可探测的信号，其中该信号同样依赖于样品中分析物的量；

d) 在所述分析物探测区和所述控制区中的信号被测量；

e) 使两个信号相互联系；

f) 由此产生的结果与标准曲线相比较；并且

g) 分析物浓度被确定。

2. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，在步骤e)中所述两个信号相互被计算。

3. 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于，不仅探测线的信号、而且控制线的信号用于建立所述标准曲线。

4. 根据权利要求1、2或3所述的方法，其特征在于，在分析物探测区和控制区中产生可探测的信号所述试剂对分析物具有不同的亲和性或反应性。

5. 根据权利要求4所述的方法，其特征在于，与在所述分析物探测区中相比，在所述控制区对分析物的较低亲和性或较小反应性的抗体参与信号形成。

6. 根据权利要求1、2或3所述的方法，其特征在于，在分析物探测区和控制区中产生可探测信号的所述试剂根据与分析物或与其他参与分析物探测的试剂相互作用的不同原理而产生不同强度的可探测的信号。

7. 根据权利要求6所述的方法，其特征在于，在所述分析物探测区中对准分析物的抗体被结合，在所述控制区中分析物或分析物类似物被结合。

## 用于提高基于特定结合反应的测试单元、尤其是免疫测试单元的 动态测量范围的方法

本发明涉及一种用于提高基于特殊结合反应的测试单元、尤其是免疫测试单元、尤其是可光学分析的免疫层析测试条的动态测量范围的方法。

免疫测试条是一种广泛流传的辅助装置，用于快速确定药品、孕激素、传染病或诸如肌钙蛋白 T 的所谓“心脏病标记 (Cardiac Markern)”。在此，不仅已经广泛应用于单纯在视觉上被读出并且仅提供“是-否”答案的定性测试，而且广泛应用于借助读出设备被分析的定量测试。

比如根据 WO 97/06439、EP 0 291194、US 5,591,645、US 4,861,711、US 5,141,850、US 6,506,612、US 5,458,852、US 5,073,484，用于免疫可探测的物质的快速检测长久以来对于大量不同的参数而言是公知的。这里，免疫探测试剂（基本是被标记的和未被标记的抗体或抗原）大多以干燥的形式被提供于载体上，其中该载体允许样品液体（尤其是体液，如血液、血清、血浆、尿液、唾液等）在该载体之上或之中输送。为此，该载体优选地是毛细活性的，比如是膜或具有毛细孔道的合成材料载体（比如在 US 5,458,852 中）。在技术领域经常称为免疫或免疫层析测试条或测试装置。该概念或表述“载体结合的免疫测试”或“载体结合的免疫测试单元”通常被用作同义词，并且在下文中也是可互换的。

在简单的系统中并尤其是在单纯的定性分析中（其中感兴趣的仅仅是表述“分析物存在或不存在”），通常是单纯在视觉上对这种免疫测试装置进行分析。尤其在孕激素快速测试领域中，该原理在市场上已得到广泛认同。

（准）定量免疫快速测试大多是借助与各个测试条相配合的相应测量设备被分析的。按照测试装置的用于探测分析物所用的试剂标记的种类而采用不同的测量原理。广泛流传并简单运用的是光学探测方法，尤其是对反射和荧光的测量。

根据现有技术的许多系统负责的是：分析物探测区（下文中也简

称为“探测区”)和控制区在空间上狭窄地被限定,并且以明显相互分开的方式被布置在测试装置上。为此,首先有利地已经证实将相应的结合试剂以线形或虚线形布置在测试装置上。为了对分析物探测区和控制区进行分析,在用于分析测试装置的测量设备中通常具有位置分辨的光学系统,比如相机芯片或者2维或3维的光电二极管阵列。光学系统的信号于是由相应的分析软件转换为浓度值并进行显示。

在现有技术的免疫测试装置的情况下,不能定量地检测样品中分析物的任意浓度。向下、也即就探测下限而言,测量范围例如由于所使用的结合伴侣(大多为抗体)的亲合性和选择性以及探测光学系统的灵敏度而在所使用的标记(Label)方面受限制。朝上、也即就动态测量范围而言,饱和效应限制测量范围。因此,在样品中可能以非常高的浓度存在的分析物的情况下,通常不可能在测试装置中提供适当数量的结合伴侣。尤其在分析物探测区和控制区中,其中结合伴侣以在空间上狭窄受限的方式被布置在测试装置上,不可能安置任意多的结合伴侣。这在下述情况中尤其存在问题,即在所述情况中要求分析物的低探测界限(从而人们努力在探测区中尽可能高度集中地、也即在紧凑的空间上安置结合伴侣,并因此由于结合位置的只是受限的可供使用性而在该测试装置上仅可能提供相对少量的结合伴侣),但是分析物在样品中的量可能是剧烈波动的,也即可能出现非常低以及非常高的分析物浓度。在分析物浓度高的情况下,达到具有相应探测试剂的探测区的饱和,使得得出分析物-探测信号关系的饱和特性:在高于某一分析物浓度时探测信号不再上升;分析曲线变得平缓并不再可能有意义地被分析。

而且变得严重的是:首先在三明治免疫测定法中在分析物浓度非常高的情况下不仅可以观测到曲线逐渐平缓,其中该曲线再现了分析物和探测信号之间的关系,而且可以观测到随分析物浓度上升而信号下降。这里称为所谓的“高剂量钩状效应(High-Dose-Hook-Effect)”:在分析物浓度非常高的情况下,观测到在三明治免疫测定法中首先随分析物浓度升高而升高的信号强度重又下降。这通过以下方面来解释:在测试中所提供的抗体的量不再足以在任何情况下都用分析物分子(抗原)来形成三明治复合物(也即具有每抗原

两个抗体的复合物)。更多地形成由分析物和各一个抗体组成的复合物,然而这种复合物本身不再被探测。从而也许可能导致错误的负的测量结果或导致低的测量结果,这自然是应当避免的。

相对于大多在大实验室中所采用的常规分析系统来说,特别是通过反射测量来确定信号的定量免疫测试条有时显示出明显的缺陷。特别是精度和动态测量范围在测试条中大多较差。这尤其限制了高度灵敏的三明治测定法的应用领域,例如对于期望尽可能大的测量范围的治疗监控。

此外,一方面在某些参数(比如肌血球素或D二聚物)中要求低的探测界限,而另一方面在样品材料中可能存在该分析物的非常高的浓度,有时远高于判断界限、即“正常病理的”。在这种情况下希望提供测试装置,所述测试装置具有尽可能大的测量范围,以便在不事先稀释样品的情况下获得可靠的测量值。对于把这种测试装置应用于相应疾病图像的过程控制中,这是尤其有利的。

在现有技术中并不是没有解决上述问题的构思。不过迄今还没有能够在所有方面令人信服的建议。尤其在免疫层析测试装置领域中目前还未令人满意地达到这种构思的转化。

US 6,248,597 描述了一种基于光散射的多相凝集免疫测定法,其中通过采用由具有不同散射特性的粒子组成的混合物来扩展动态测量范围。在此相对分析物具有高亲和性的结合伴侣被固定在引起大的光散射的粒子上。相反,相对分析物具有低亲和性的结合伴侣被固定在引起小的光散射的粒子上。

根据 US 5,585,241 公知一种类似的方法。为了提高动态测量范围,这里结合流动血细胞计数免疫测定法建议:用两个相对于相同的抗原而不同亲和性的抗体装载两种不同大小的粒子(用高亲和性的抗体装载小的粒子;用低亲和性的抗体装载大的粒子),并且为了通过形成三明治复合物来探测抗原而采用另一种可探测的被标记的抗体。所建议的系统在此利用两个不同的标准曲线工作(每个标准曲线用于每种粒子类别),并允许通过所研制的软件来进行定量的分析物确定。

为了避免在高分析物浓度时的钩状效应(“高剂量钩状效应”),US 4,743,542 公开了一种方法,其中除了相对于目标抗原的可探测的

被标记的抗体之外，还给样品简单地提供了一定量的相同的却未被标记的抗体。由此两种抗体竞争分析物分子，并且只有在较高的抗原浓度时才出现对钩状效应而言典型的过饱和（如果情况确实如此）。由此把动态测量范围向较高的浓度扩展，但是却以灵敏度为代价。对此在相同效果的情况下建议使用低亲和性的抗体。

US 4,595,661 描述了多相三明治免疫测定法，其中通过除了采用被固定的捕捉抗体之外还采用两种可溶的抗体来避免钩状效应，其中所述两种可溶的抗体对于抗原具有不同的亲和性和特性。具有较低亲和性的抗体在此仅在高抗原浓度时才对测量信号有显著贡献，并如此避免钩状效应可被察觉到。

根据 US 5,073,484 公知：借助多个离散的、在流动的载体中相邻的结合区来定量地探测免疫可探测的分析物。在样品中存在的分析物越多，就在越多的区中发生特定的结合和探测反应。在接触样品后具有颜色的区的数量在此与样品中分析物的量相关。为了提高精度以及为了扩展测量范围，US 5,073,484 建议增加结合区的数目。这里的缺点在于，对结合区的自动分析要求有相当耗费的光学系统，所述光学系统能够必要时检测和分析多个区，以便因此允许定量的分析物确定。对此，该测试装置由于相对大数量的在空间上相互分隔的离散的结合区而必须是相当长的。因此，为了保证样品可靠地扩散通过测试装置，必须以相对大的样品容积工作，这尤其由于样品采集的原因而尤其对于应当采用全血样品的情况同样是不利的。

WO 00/31538 描述了免疫层析测试条，其中除了分析物探测区外还在能吸入的基质 (Matrix) 上安置一个或多个控制区。分析物的配备有可探测标记的结合伴侣不仅在分析物探测区中、而且控制区中被结合在基质上。在此，在控制区中结合被准确限定的量的被标记的结合伴侣，其中该量不依赖于样品中分析物的量。优选地在控制区中结合不同量的被标记的结合伴侣，使得在该测试条上含有准内部的比较刻度。在对分析物探测区进行分析时，考虑控制区用于校准。为了尤其针对非线性浓度-测量信号关系提高动态测量范围，WO 00/31538 建议在测试条上设置附加的控制区。

根据 J.Hampl 等人的 “Upconverting Phosphor Reporters in Immunochemical Assays” (Analytical Biochemistry 288,

176-187 (2001) ) 公知：在利用荧光标记探测分析物的免疫层析测试条中，除了原本的包含有固定形式的分析物特定的抗体的探测区（“目标线”）外，还考虑包含有固定形式的种类特定的抗体的控制区（“控制线”）来对测量信号进行分析。由 OraSure Technologies, Inc., Bethlehem, PA, U.S.A., 在 [www.orasure.com](http://www.orasure.com) 上描述了一种类似的应用。因此，首先实现对“目标线”以及“控制线”的分析，以便消除测量信号的变化，其中所述变化取决于测试条的光学测量范围中液体的实际量。由此也间接地提高了探测方法（测定法）的灵敏度（于是实现了动态测量范围向较低浓度的扩展）。相反不论及动态测量范围向较高浓度的扩展。

免疫层析测试装置的动态测量范围的扩展事实上也可以如此来实现，即在分析之前把样品材料相应地进行稀释。但是如此所实现的测量范围扩展只是令人不满意的，因为为此需要一个潜在地在分析中导致误差的附加实施步骤。另外，尤其在以下情况中，即分析物在相似的样品中可能以也许非常高的浓度以及以也许非常低的浓度存在，只有分析物以高的浓度存在于样品中，受控制的样品稀释才是可取的，而在相反的情况中是不可取的，原因在于这里否则可能由于稀释而未超出探测下限，并且分析物在样品中错误地未被检测。

对于免疫层析测试条而言，迄今还不能在不损害分析物探测用的探测下限的情况下简单且可靠地把动态测量范围向较高的分析物浓度扩展。

本发明所基于的任务在于，消除现有技术的缺点。本发明的任务尤其在于，把基于特定结合反应的测试单元、尤其是免疫测试单元的动态测量范围向较高的分析物浓度扩展，其中这尤其应当如此来实现，即不必忍受在探测下限方面的损害。

该任务通过本发明的主题而得到解决。

本发明的主题是根据权利要求 1 所述的一种方法。本发明的优选实施方案是从属权利要求的主题。

本发明能够把基于特定结合反应的测试单元、尤其是免疫测试单元的动态测量范围向较高的分析物浓度推移，而不必忍受在探测界限方面的损害。为此根据本发明建议，在测试单元之中或之上提供

至少两个包含试剂的区，其中所述试剂由于对分析物的不同的亲和性（比如在对于分析物有不同亲和性的抗体的情况下）或者由于与分析物或其他参与分析物探测的试剂（比如一个区中的对准分析物的抗体和另一区中的分析物或分析物类似物）相互作用的不同原理而产生不同强度的可探测的信号。“相互作用的不同原理”在此比如可以是不同的测试原理，例如在一个区中的三明治复合物形成以及在另一区中的竞争测试导向。为了对分析物浓度-信号强度关系进行分析，考虑至少两个区中的信号，并且考虑通过适当的方法（校准）用于确定分析物。

为了更好地理解和可区分，在本发明的方法中重要的、位于测试单元之中或之上的两个区在下文中应当被称为分析物探测区（简称为：探测区）和控制区。如果所述名称按照通常的语言习惯是不常见的，比如如果在所述区中安置了不同亲和性的结合伴侣，并且因此才可以从分析物的阈值浓度起观测到信号，那么也应当保留所述名称。

本发明还包含以下方法，其中在一个测试单元上多于1个的探测区和/或多于1个的控制区被分析。比如该方法也可以被用于分析测试单元，其中所述测试单元包含具有高亲和性的结合伴侣的探测线、具有低亲和性的结合伴侣的探测线和控制区（比如包含固定的分析物类似物）。

本发明的解决方案尤其涉及在三明治测定法中通过对控制线的附加的定量分析来扩展免疫测试装置的测量范围。这通常仅作为用户所用的功能控制，并且不被考虑用于对分析物进行量化。但是随着分析物含量的增加，越来越多的抗体标记结合物（Konjugat）在信号线上被捕捉或用分析物得以饱和，使得越来越少的抗体标记结合物（比如抗体金结合物）在控制线上被结合。因此随分析物浓度的增加而该控制线的信号强度降低。通过在控制线和在信号线上同时测量信号强度（比如通过反射测量或荧光测量）并且利用适当的算法计算两个信号强度，可以明显改善动态测量范围以及校准曲线的斜度（并从而在较高浓度时的精度）。

类似地这也适用于基于不同于免疫结合反应的特定结合反应的测试单元。相应的特定结合反应对于技术人员是公知的。比如列举

以下的结合对:

抗体与半抗原、抗原或其他抗体(比如种类特定的抗体-抗体-相互作用),其中该种类的相应片段有时也是足够的;

生物素与抗生物素蛋白或链霉亲和素;

激素与激素受体;

糖与外源凝集素;

核酸与互补核酸;诸如此类。

为了更好地理解和清楚起见,下面应当着重讨论免疫结合对、也即结合对:抗体与半抗原或抗原或抗体,然而这不应当是对本发明的虽然优选、但不是唯一的实施方案的限制。

根据本发明的方法尤其用于借助免疫测试单元来确定样品中分析物的浓度。该测试单元在此不仅具有分析物探测区,还具有控制区。使样品与测试单元并与分析物特定的试剂相接触,只要分析物存在于样品中,则该分析物通过与特定的试剂相互作用而产生一个在分析物探测区中可探测的信号。该测量信号依赖于样品中分析物的量。不与分析物或者探测区中的试剂相互作用的一部分特定试剂在控制区中产生一个可探测的信号。在此重要的是:在控制区中可探测的该信号同样依赖于样品中分析物的量。在分析物探测区和控制区中的信号被测量,并相互建立关系,比如相互被计算。把计算的结果与标准曲线相比较,并最后确定分析物浓度。

根据本发明,适当的分析物是可以根据特定的结合对关系被探测的分析物。尤其对于免疫探测的优选情况而言,这是抗体、抗原、半抗原(分别包括其片段)。特别优选的是可免疫探测的分析物hCG、BNP、(NT-)proBNP、肌钙蛋白I、肌钙蛋白T、肌血球素、D二聚物、CRP、HIV、HCV、CD40、CK-MB、TSH等。

根据本发明,所有流动的或以流动形式可输送的样品材料适用于可以从中确定分析物的样品。尤其更适用的是体液,例如血液和由之导出的部分(血清、血浆)、唾液、尿液、脑脊髓液、精液、间质液、汗液等诸如此类。不流动的、但通过在溶剂中、尤其在水溶剂溶解或悬浮可被转化成流动状态的样品材料也是适合的。

根据本发明可采用的免疫测试单元对技术人员是公知的。借助这种测试单元的分析物探测以分析物与结合对之间的特定相互作用为

基础。这种相互作用包括结合对：抗原/抗体、抗体/抗体、半抗原/抗体、抗原片段/抗体、抗体片段/抗体等。如前所述，所述测试单元大多包含有能流动的材料（比如纸、毛状物、膜、毛细孔道），其中该材料必要时被固定在无活动的载体上。测试单元典型地各具有一个或多个样品施加区、吸入区、层析区、探测区、反应区和控制区。对于本发明重要的仅仅是具有至少一个（分析物）探测区和至少一个控制区。

在能流动的材料之中或之上在空间上狭窄受限的、与控制区相分隔的区域典型地用作分析物探测区，其中在根据目的使用测试单元的过程中结合作为分析物量度的种类（Spezies），使得所述种类可以在视觉上、以光学的方式或以其他方式被探测。典型地，在分析物探测区中通过特定的相互作用结合针对分析物的可探测的结合伴侣（例如相应被标记的抗分析物抗体）。为此，在分析物探测区中具有相应固定的结合伴侣、比如相对抗原的抗体（使得可探测的三明治复合物可以由固定的抗体、分析物和可探测的被标记的抗体形成）或其他结合对的种类、比如固定的（聚）（链）抗生物素蛋白（使得先前形成的三明治复合物可以由生物素化抗体、分析物和可探测的被标记的抗体形成）。这种探测区的构造、功能和其他变化对技术人员而言是公知的。

在能流动的物质之上或之中在空间上狭窄受限的、与分析物探测区相分隔的并且大多位于该分析物探测区下游的区域典型地用作控制区，其中在根据目的使用测试单元的过程中不依赖于样品中分析物的存在而结合种类，使得该种类可以在视觉上、以光学的方式或以其他方式被探测。该控制区通常用于测试单元的功能控制。控制区中的信号证明：样品按照顺序已经流过能流动的载体，并且理想的是相应的结合试剂能起作用。典型地，针对分析物的可探测的结合伴侣（比如相应被标记的抗分析物抗体）通过特定的相互作用而被结合在控制区中。为此在控制区中存在相应的、固定的结合伴侣、比如相对被标记的抗分析物抗体的抗体（使得可探测的复合物可以由固定的抗体和可探测的被标记的抗体形成）或者存在固定的分析物类似物（使得复合物可以由分析物和可探测的被标记的抗体形成）。这种控制区的构造、功能和其他变化对技术人员而言是公知

的。

在测试单元中所包含的或待添加到测试单元或样品中的特定试剂（同义地也被称为“特定结合伴侣”）与载体上的分析物或固定的结合伴侣进行选择性的（结合）反应。所述试剂允许直接或间接地推断出样品中所存在的分析物量。

只要优选的结合伴侣对于特定分析物探测的目的是活性的，则所述优选的结合伴侣是抗体（AK；用英语为 antibody 或 AB）、尤其是多克隆抗体（PAK；用英语为 polyclonal antibody 或 PAB）或单克隆抗体（MAK；用英语为 monoclonal antibody 或 MAB）、以及抗原与半抗原以及其片段。

优选地，一部分结合伴侣在测试装置上如此被提供，使得所述结合伴侣可以通过样品液体与该测试装置分开，比如通过浸渍诸如毛状物、膜等适当的载体物质，或者通过在相应的（毛细）孔道结构中施加并干燥。

但是也可以以溶解的试剂的形式添加结合伴侣中的至少一个以进行快速测试，比如给样品掺入试剂溶液或者在测试装置上施加与样品无关的试剂溶液。根据本发明，尽管是不太优选的，但也可以在一种溶液中或在多种溶液中使用所有的特定结合伴侣以进行快速测试。于是在测试装置上在探测区中仅存在一个另外的结合伴侣，其中该另外的结合伴侣可以捕捉相应被标记的特定的结合伴侣，并从而引起分析物间接地结合到快速测试的固相上。类似地，在控制区中存在一个结合伴侣，该结合伴侣可以捕捉相应的被标记的特定的结合伴侣，而不要求直接参与分析物。

不仅在探测区中、而且在控制区中，在那里固定的结合伴侣之一原则上产生可探测的信号。在此，虽然不是优选的，但是两个区中的信号可以基于不同的原理。而优选的是：不仅分析物探测区中、而且控制区中的信号都基于同一原理。可探测的信号比如是以光学的方式或在视觉上可检测的颜色变化、发光信号、尤其是荧光信号、放射性射线以及诸如此类。可探测的信号在此由相应被标记的种类（结合伴侣）产生，如前所述，所述种类在分析物探测区或控制区中被结合。根据本发明，作为结合伴侣的标记此外还可以考虑：单独的标记（比如采用彩色胶乳、聚合体标记、或半导体纳米晶体（所

谓的量子点)或金属(溶胶)标记(金、硒等))以及非单独的标记(酶、放射性同位素、荧光标记)等诸如此类。

按照所使用的标记,其他探测方法自然也是需要的并是可能的(比如荧光测量、放射性测量、酶活性确定等)。借助这些探测方法尤其利用相应构建的测量仪器可以对在分析物探测区和控制区中所产生的信号进行测量。这根据现有技术对于技术人员而言是公知的。但是,根据本发明重要的是:不仅分析物探测区中的信号、而且控制区中的信号由测量设备检测。用于分析测试单元的适当的测量设备和方法按照现有技术对技术人员而言是公知的。Roche Diagnostics GmbH,Mannheim 的系统“Cardiac Reader”作为测量设备的典型例子。这里免疫测试条借助一个或多个光源(比如 LED)被照亮,并通过位置分辨的反射测量来确定探测区(信号线)和控制区的灰度值。相应的测量和分析方法例如根据 US 5,717,778 是公知的。

根据本发明,不仅控制区中的信号、而且探测区中的信号被检测,并且通过适当的数学方法相互被计算。这例如在测量设备的中央计算单元中进行。根据本发明,重要的是两个信号至少在分析物的确定的浓度范围中依赖于分析物浓度。通过结合下文中的例子图解地进一步所阐述的适当的数学方法,(与对探测区中的信号的唯一分析相比)能够扩展测量单元的动态测量范围。

通常通过把测量值与相应的标准曲线进行比较来从探测区和控制区的所测量的信号中确定分析物浓度,其中该标准曲线通过测量具有已知分析物量的标准溶液来获得。优选地利用探测线的信号和控制线的信号来建立标准曲线。

本发明方法的一种可能的实现规定:在分析物探测区和控制区中产生可探测信号的试剂对分析物具有不同的亲和性或反应性。优选地,与在分析物探测区中相比,在控制区中对分析物的较低亲和性或较少反应性的抗体参与信号形成。

本发明方法的一种可替代的可能实现规定:在分析物探测区和控制区中产生可探测信号的试剂根据与分析物或者与其他参与分析物探测的试剂相互作用的不同原理而产生不同强度的可探测的信号。尤其可以在分析物探测区中结合对准分析物的抗体,并在控制区中

可以结合分析物或分析物类似物。也可能的是，在控制区中固定的结合伴侣与抗体的其他抗原决定基或者与以合成方式被添加到抗体中的异种结构单元相结合，或者相对要固定的抗体的种类特定的抗体被固定在控制区中。所有这些变型方案根据现有技术对技术人员是公知的。

在存在所谓的“高剂量钩状效应”的情况下能够把测量范围扩展到非常高的浓度。在这种情况下，在分析物浓度非常高的情况下信号线强度再次下降，原因在于所提供的抗体量不再足以在任何情况下都形成三明治复合物。更多地形成由分析物和各一个抗体（结合物）组成的复合物。在该浓度范围中控制线的强度或者浓度相关性可能太低而不可被分析。而信号线的强度下降可以根据浓度被分析。于是对于这种情况有三个分析范围：

1. 根据浓度的信号线强度增加
2. 根据浓度的控制线强度下降
3. 根据浓度的信号线强度下降

比如可以通过以下算法来实现在上述三个范围之间的自动区分：

A) 如果信号线处的反射大于  $X1\%$ ，并且控制线处的反射小于  $Y1\%$ ，则仅分析信号线并采用分析物浓度为从  $A1$  至  $A2$  mg/ml 的标准曲线。

B) 如果信号线处的反射小于  $X2\%$ ，并且控制线处的反射大于  $Y2\%$  并小于  $Y3\%$ ，则仅分析控制线并采用分析物浓度为从  $A3$  至  $A4$  mg/ml 的标准曲线。

C) 如果信号线处的反射大于  $X3\%$ ，并且控制线处的反射大于  $Y4\%$ ，则仅分析信号线并采用分析物浓度为从  $A5$  至  $A6$  mg/ml 的标准曲线。

借助以下的例子和附图来对本发明进行更详细的解释。尽管在该例子中仅示例性地给出了免疫测试装置，其中该测试装置利用金标记结合伴侣工作并且以反射测光方式被测量，但是本发明并不局限于此。除了确实基于抗原（或半抗原）抗体结合对的免疫相互作用外，也可以是其他的结合对，尤其是激素-受体、糖-外源凝集素、核酸-互补核酸、生物素-（链）抗生物素蛋白等诸如此类。除了金标记

之外，其他单独的标记也是可以的，比如采用彩色胶乳、聚合物标记、或半导体纳米晶体（所谓的量子点）或金属（溶胶）标记，以及非单独的标记（酶、放射性同位素、荧光标记）等诸如此类。按照所使用的标记，其他探测方法自然也是需要的并是可能的（比如荧光测量、放射性测量、酶活性确定等）。在多种实施可能性中的这些变型方案对技术人员而言是公知的。

在图 1 中示意性地示出了根据本发明可使用的免疫层析测试条形式的测试装置的一个优选实施方案。

在图 2 中根据样品中肌钙蛋白 T 的浓度（C 以 ng/ml 为单位）示出了在分析探测线（NS）和控制线（KS）时的相对反射值（R 以 % 为单位）。

在图 3 中示出了肌钙蛋白 T 测试条的校准曲线，其中所述校准曲线通过将例 2 中所详细阐述的算法 a）（现有技术）和 b）（本发明）应用于图 2 的测量值来得出。

在图 4 中示出了肌钙蛋白 T 测试条的校准曲线，其中所述校准曲线通过将例 2 中所详细阐述的算法 c）（本发明）应用于图 2 的测量值来得出。

在图 5 中根据样品中 NT-proBNP 浓度（C 以 ng/ml 为单位）示出了在分析探测线（NS）和控制线（KS）时的相对反射值（R 以 % 为单位）。

在图 6 中示出了 NT-proBNP 测试条的校准曲线，其中所述校准曲线通过将例 3 中所详细阐述的算法 a）（现有技术）和 b）（本发明）应用于图 5 的测量值来得出。

在图 7 中根据样品中 D 二聚物浓度（c 以 ng/ml 为单位）以三个部分图（分别覆盖不同的浓度范围）示出了在分析探测线（NS）和控制线（KS）时的相对反射值（R 以 % 为单位）。

图中的数字表示：

- 1 样品施加区
- 2 红血球分隔区
- 3 探测区
- 4 吸入区
- 5 载体材料

- 6 样品施加基质 (“生物素毛状物” 和 “金毛状物” )
- 7 红血球分隔基质
- 8 探测基质
- 9 第一线形固定区 (探测线; 分析物探测区)
- 10 第二线形固定区 (控制线; 控制区)
- 11 吸入基质

例子

- 1) 用于从全血中确定抗原的测试装置的制造 (参照图 1)

该测试装置 (图 1) 包含载体材料 (5), 在所述载体材料上施加有样品施加区 (1)、红血球分隔区 (2)、探测区 (3) 和吸入区 (4)。在该样品施加区 (1) 中布置有样品施加基质 (6), 该样品施加基质部分地与红血球分隔基质 (7) 重叠。该红血球分隔基质 (7) 在其一侧有些与探测基质 (8) (探测区) 重叠, 在该探测基质上固定有线 (9) 形式的聚链抗生物素蛋白作为探测线, 并固定有线 (10) 形式的例如作为合成的或重组的抗原肽的抗原或抗原类似物作为控制线。吸入区 (11) 有些与探测基质 (8) 重叠。在该样品施加基质 (6) 中安置有用于与要探测的分析物形成复合物所需要的所有试剂。在该情况中, 样品施加区由 2 个上下重叠的毛状物组成, 其中第一个 (“金毛状物”) 用相对分析物的金标记抗体来浸湿, 第二毛状物 (“生物素毛状物”) 含有相对分析物的生物素化抗体。分析物这里是血液中所具有的抗原, 尤其是肌钙蛋白 T、NT-proBNP 或 D 二聚物。

采用 350  $\mu\text{m}$  厚的聚酯膜 (Pütz (皮茨)) 作为载体层 5。采用 360  $\mu\text{m}$  厚的聚酯毛状物 (Roche Diagnostics (罗氏诊断)) 作为样品施加基质 6 的 “金毛状物” 或 “生物素毛状物”。采用 1.8 mm 厚的玻璃纤维毛状物 (Roche Diagnostics) 作为红血球分隔基质 7。采用 140  $\mu\text{m}$  厚的硝化纤维膜 (Sartorius (赛多利斯)) 作为探测基质 8。采用 1.8 mm 厚的玻璃纤维毛状物 (Roche Diagnostics) 作为吸入基质 11。如在图 1 中所示的那样, 各个部件 (6、7、8、11) 借助于热熔胶粘剂轻微重叠地粘到载体层 5 上。

所列举的例子的 “金和生物素毛状物” 的浸渍配方为:

proBNP 测试条:

“生物素毛状物”：100 mM Hepes pH7.4, 0.1% Tween<sup>®</sup>,  
相对分析物的生物素化抗体

“金毛状物”：100 mM Hepes pH7.4  
作为金结合物的相对分析物的抗体

#### 肌钙蛋白 T 测试条:

“生物素毛状物”：100 mM MES pH5.6  
相对分析物的生物素化抗体

“金毛状物”：100 mM 琥珀酸 pH5.6, 0.1% Tween,  
作为金结合物的相对分析物的抗体

#### D 二聚物测试条:

“生物素毛状物”：100 mM Hepes pH7.4, 0.1% Tween<sup>®</sup>,  
相对分析物的生物素化抗体

“金毛状物”：100 mM Hepes pH7.4  
作为金结合物相对分析物的抗体

#### 2) 对用于确定肌钙蛋白 T 的测试条的分析 (图 2 至 4)

按照例 1 的肌钙蛋白 T 测试条用全血样品装载, 给所述全血样品以不同的量添加了重组制造的肌钙蛋白 T。对所述条不仅按照两种根据本发明的方法 (变型方案 b) 和 c), 见下文) 来进行分析, 而且为了比较的目的按照通常的方法 (变型方案 a)) 来进行分析。在此对于探测线 (NS) (9) 和控制线 (KS) (10), 利用构造在 CCD 相机上的常规测量设备 (Cardiac Reader, Roche Diagnostics GmbH) 确定反射, 并且按照以下的算法计算信号:

$$a) \quad | \text{Rem NS} (0) - \text{Rem NS} (c) |$$

$$b) \quad | \text{Rem KS} (0) - \text{Rem KS} (c) | + | \text{Rem NS} (0) - \text{Rem NS} (c) |$$

$$c) \quad | \text{Rem KS} (0) - \text{Rem NS} (c) | * | \text{Rem NS} (0) - \text{Rem NS} (c) |$$

其中算法替代方案 a) 仅表示了按照现有技术对探测线的通常的分析。根据本发明, 在 b) 和 c) 中不仅考虑探测线信号而且还考虑控制线信号用于分析。

在所述式子中:

Rem NS (0) 表示在分析物浓度为 0 时探测线的以 % 为单位的反射

Rem NS (c) 表示在分析物浓度为 c 时探测线的以 % 为单位的反射

Rem KS (0) 表示在分析物浓度为 0 时控制线的以 % 为单位的反射

**Rem KS (c)** 表示在分析物浓度为  $c$  时控制线的以%为单位的反射。在图 2 中根据样品中肌钙蛋白 T 的浓度 ( $c$  以 ng/ml 为单位) 示出了在分析探测线 (NS) 和控制线 (KS) 时的相对反射值 ( $R$  以 % 为单位)。图 2 表明随分析物浓度的增加在探测线信号增加 (反射下降) 的同时控制线信号下降 (反射增加)。

在图 3 中示出了肌钙蛋白 T 测试条的校准曲线, 其中所述校准曲线通过将上述算法 a) (现有技术) 和 b) (本发明) 应用于图 2 的测量值来得出。在图 4 中示出了肌钙蛋白 T 测试条的校准曲线, 其中所述校准曲线通过将上文所详细阐述的算法 c) (本发明) 应用于图 2 的测量值来得出。在所述测试时利用对探测线的唯一分析 (算法 a)) 仅可实施约至 10 ng/ml 的浓度确定, 而按照算法 b) 和 c) 通过对 KS 和 NS 的分析还可以确定高于 20 ng/ml 的浓度。

### 3) 对用于确定 NT-proBNP 的测试条的分析 (图 5 至 6)

按照例 1 的 NT-proBNP 测试条用全血样品装载, 给所述全血样品以不同的量添加了合成的 NT-proBNP。对所述条不仅按照根据本发明的方法 (变型方案 b), 见下文) 来进行分析, 而且为了比较的目的还按照常规的方法 (变型方案 a)) 来进行分析。在此对于探测线 (NS) (9) 和控制线 (KS) (10), 利用构造在 CCD 相机上的常规测量设备 (Cardiac Reader, Roche Diagnostics GmbH) 确定反射, 并且按照以下的算法计算信号:

a)  $1 - \text{Rem NS} (c)$

b)  $\text{Rem KS} (c) : \text{Rem NS} (c)$

其中算法替代方案 a) 仅表示了按照现有技术对探测线的通常的分析。根据本发明, 在 b) 中不仅考虑探测线信号还考虑控制线信号用来分析。

式子中的缩写与例 2 中的含义相同。

在图 5 中根据样品中 NT-proBNP 的浓度 ( $c$  以 ng/ml 为单位) 示出了在分析探测线 (NS) 和控制线 (KS) 时的相对反射值 ( $R$  以 % 为单位)。图 5 表明随分析物浓度的增加在探测线信号增加 (反射下降) 的同时控制线信号下降 (反射增加)。

在图 6 中示出了 NT-proBNP 测试条的校准曲线, 其中所述校准曲线通过将上述算法 a) (现有技术) 和 b) (本发明) 应用于图 5

的测量值来产生。在所述测试时利用对探测线的唯一分析(算法 a)) 仅可实施约至 6 ng/ml 的浓度确定, 而按照算法 b) 通过对 KS 和 NS 分析还可以确定高于 14 ng/ml 的浓度。

#### 4) 对用于确定 D 二聚物的测试条的分析(图 7)

按照例 1 的 D 二聚物测试条(在探测线处固定有对准分析物的生物素化抗体; 而控制线由包含 D 二聚物结构单元的固定的纤维蛋白片段组成; 在其上可以结合自由的金结合物抗体) 用全血样品装载, 给所述全血样品以不同的量添加了包含 D 二聚物的纤维蛋白片段。对所述条不仅按照根据本发明的方法(变型方案 b), 见下文) 来进行分析, 而且为了比较的目的还按照常规的方法(变型方案 a)) 来进行分析。在此对于探测线(NS)(9) 和控制线(KS)(10) 利用构造在 CCD 相机上的常规测量设备(Cardiac Reader, Roche Diagnostics GmbH) 确定反射, 并且按照以下的算法计算信号:

##### a) Rem NS (c)

b) 1) 如果信号线处的反射大于 30% 并且控制线处的反射小于 40%, 那么仅分析信号线(Rem NS (c)) 并采用分析物浓度为 0 至 3  $\mu\text{g/ml}$  的标准曲线。

2) 如果信号线处的反射小于 50% 并且控制线处的反射大于 40% 并小于 70%, 那么仅分析控制线(Rem KS (c)) 并采用分析物浓度为 3 至 20  $\mu\text{g/ml}$  的标准曲线。

3) 如果信号线处的反射大于 30% 并且控制线处的反射大于 70%, 那么仅分析信号线(Rem NS (c)) 并采用分析物浓度为 20  $\mu\text{g/ml}$  至 1000  $\mu\text{g/ml}$  的标准曲线。

其中算法替代方案 a) 仅表示了按照现有技术对探测线的通常的分析。根据本发明, 在 b) 中不仅考虑探测线信号还考虑控制线信号用于分析。

式子中的缩写与例 2 中的含义相同。

在图 7 中根据样品中 D 二聚物浓度(c 以 ng/ml 为单位) 示出了在分析探测线(NS) 和控制线(KS) 时的相对反射值(R 以% 为单位)。

直至约 3  $\mu\text{g/ml}$  的 D 二聚物浓度, 可以象通常一样通过信号线的反射下降(强度增加) 来进行分析。直至约 20  $\mu\text{g/ml}$ , 可以对控制线

---

的反射增加（强度下降）进行分析。在分析物浓度超过 20  $\mu\text{g/ml}$  时，控制线信号的浓度相关性太小。从约 20  $\mu\text{g/ml}$  起直至 >1000  $\mu\text{g/ml}$ ，可以把信号线的反射增加（强度下降）用于分析。因为测量范围下限为 <0.5  $\mu\text{g/ml}$ ，所以可以获得 >1000 的动态因子。

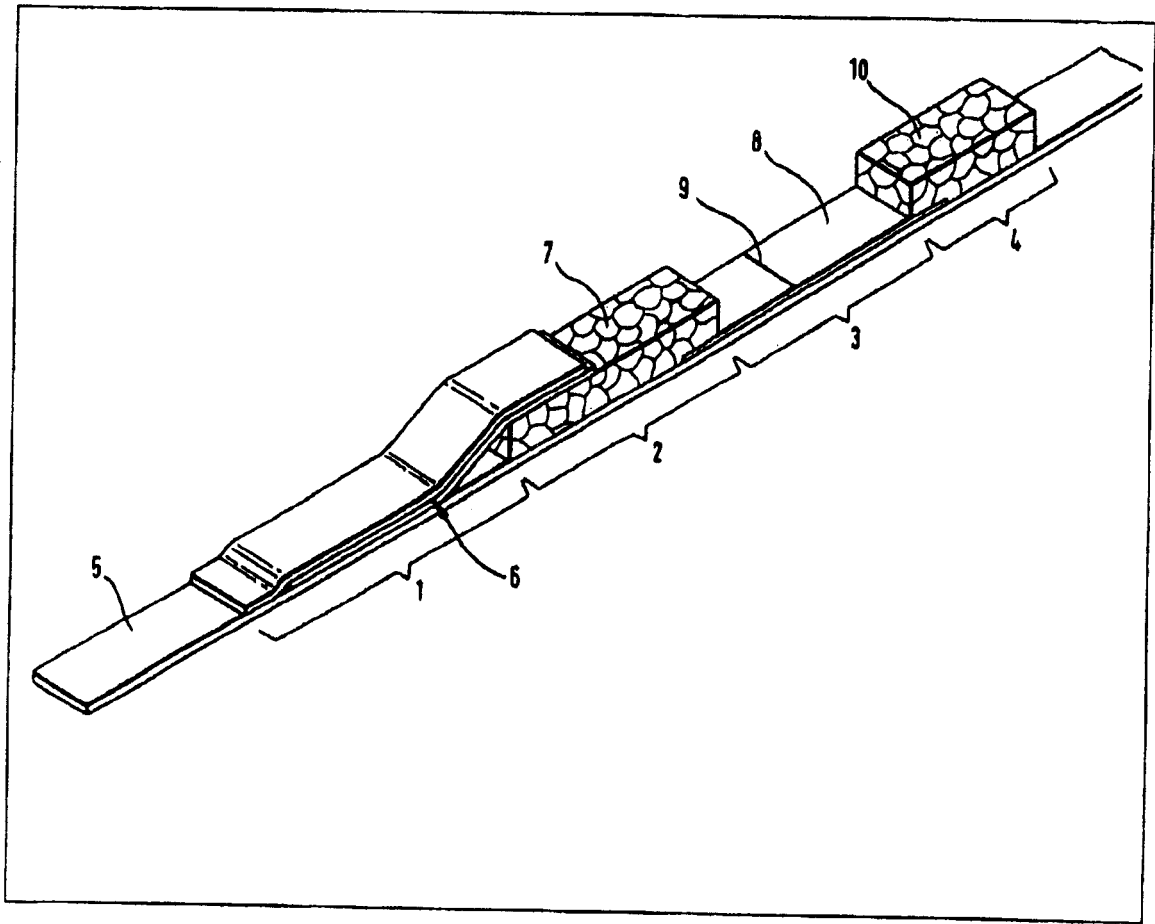


图 1

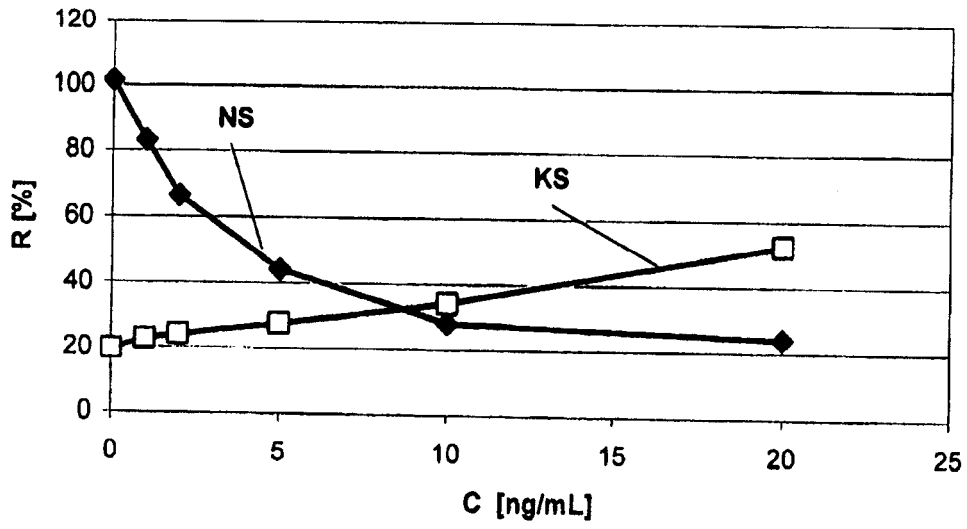


图 2

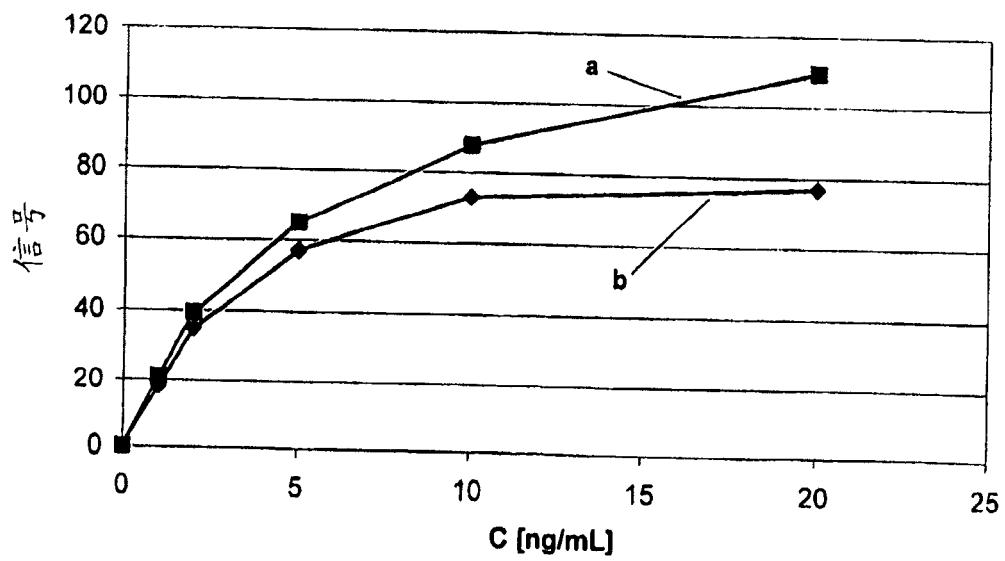


图 3

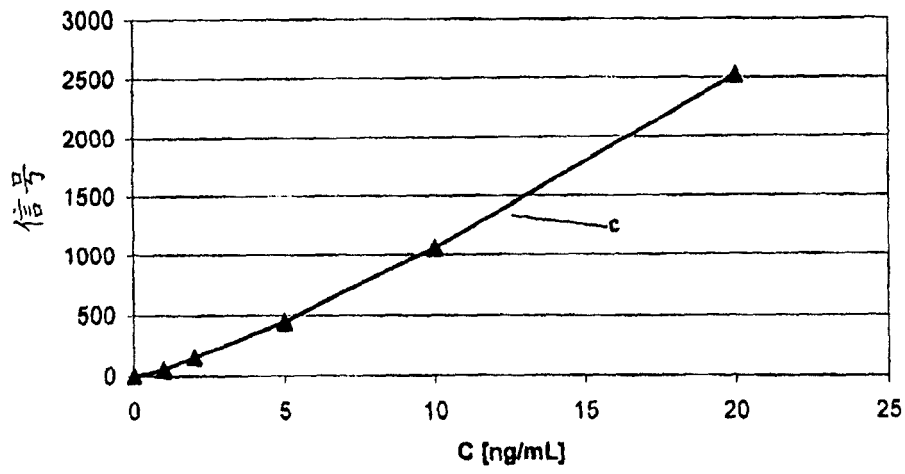


图 4

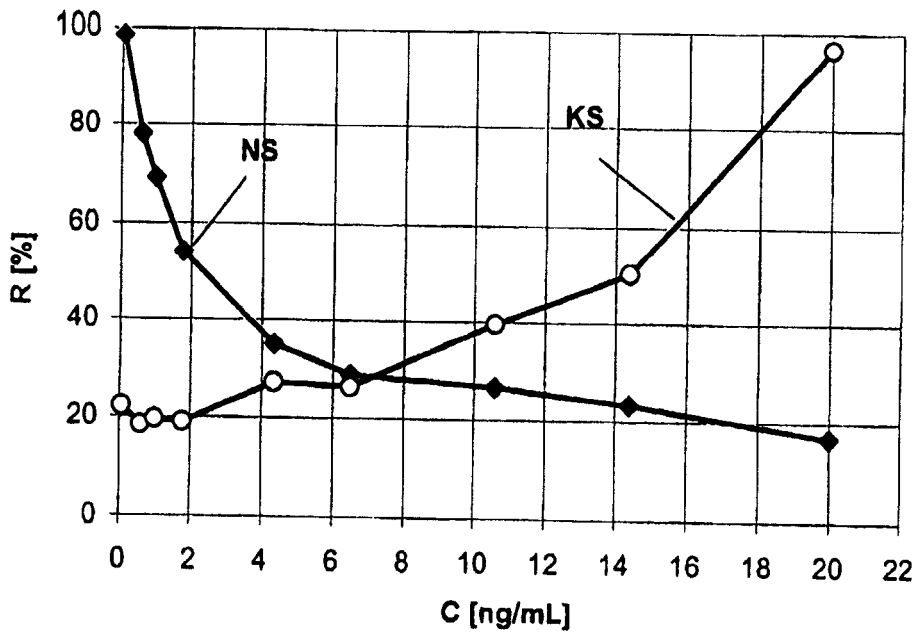


图 5

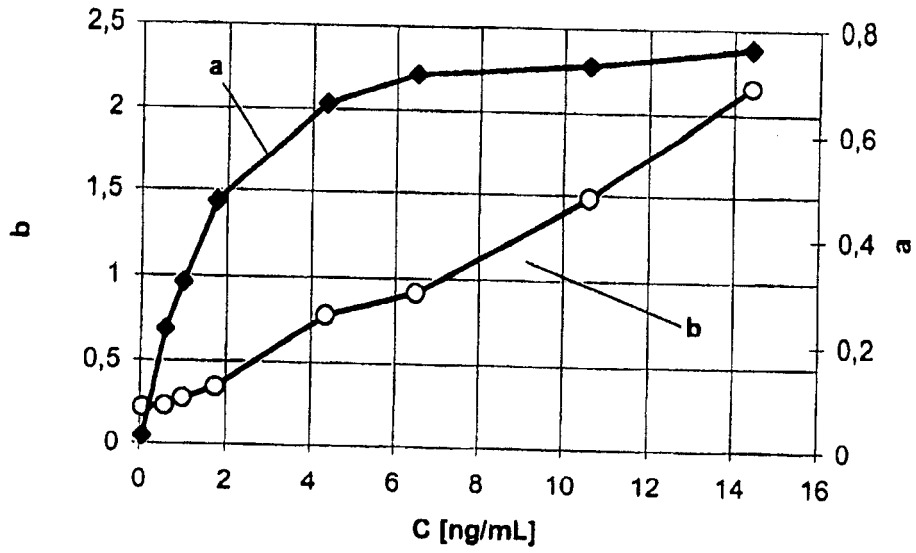


图 6

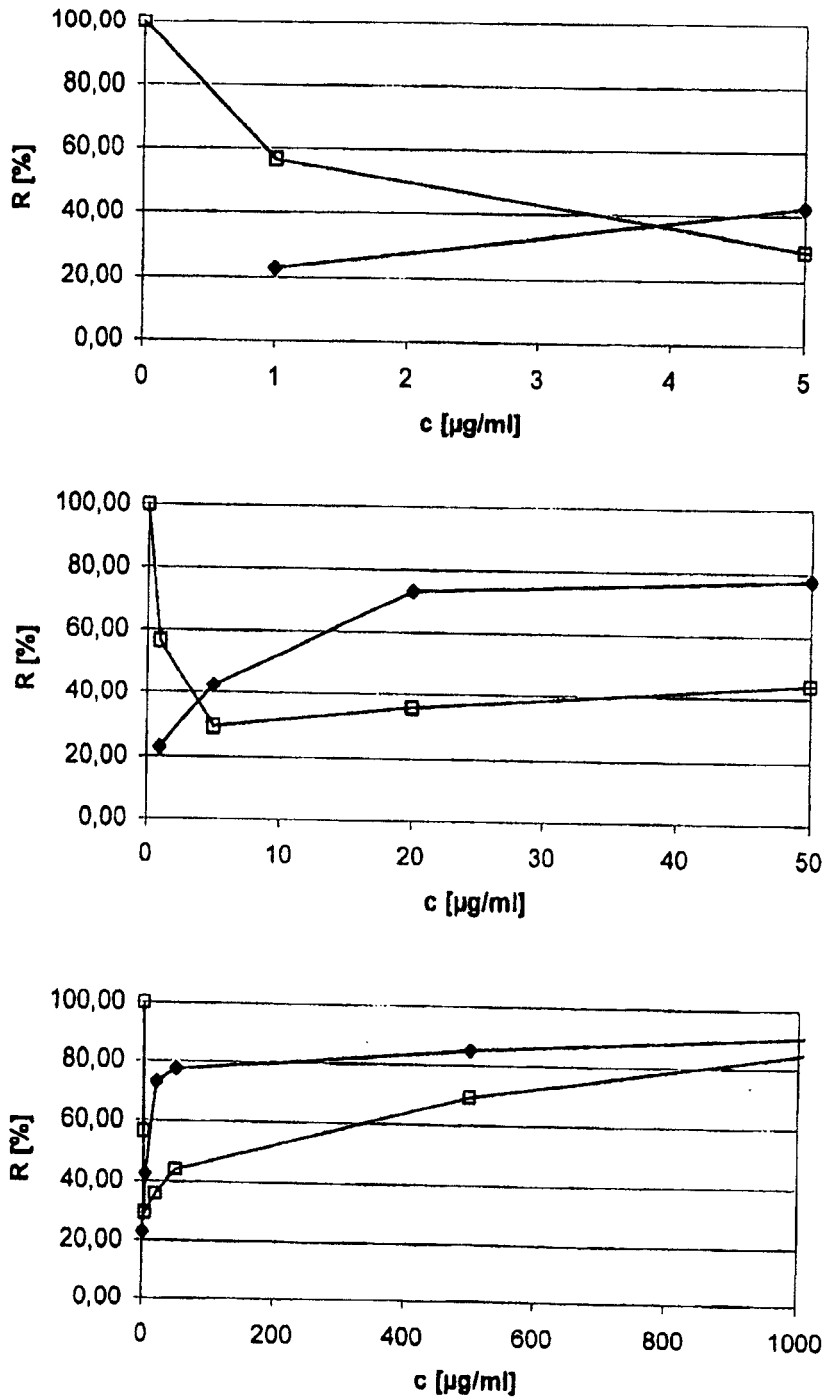


图 7

专利名称(译)	用于提高基于特定结合反应的测试单元、尤其是免疫测试单元的动态测量范围的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1954212A</a>	公开(公告)日	2007-04-25
申请号	CN200580015176.3	申请日	2005-05-10
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	J斯平克 J沙夫勒 L博登贝克		
发明人	J·斯平克 J·沙夫勒 L·博登贝克		
IPC分类号	G01N33/538 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54386 G01N33/538		
代理人(译)	刘春元 王忠忠		
优先权	102004023402 2004-05-12 DE		
其他公开文献	CN1954212B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种用于提高基于特定结合反应的测试单元、尤其是免疫测试单元、尤其是可光学分析的免疫层析测试条的动态测量范围的方法。本发明能够把基于特定结合反应的测试单元、尤其是免疫测试单元的动态测量范围向较高的分析物浓度推移，而不必忍受在探测界限方面的损害。为此本发明建议，在测试单元之中或之上提供至少两个含有试剂的区，其中由于对分析物的不同的亲和性(比如对分析物的不同亲和性的抗体的情况)或者由于与分析物或与参与分析物探测的其他试剂相互作用的不同原理(比如在一个区中对准分析物的抗体和在另一区中分析物或分析物类似物)而产生不同强度的可探测的信号。至少两个区中的信号被考虑用于对分析物浓度 - 信号强度关系进行分析，并通过适当的方法(校准)被考虑用于确定分析物。

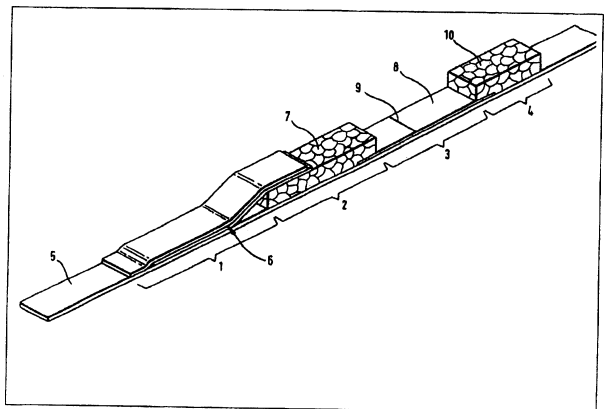


图 1