

[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 200580047141.8

[51] Int. Cl.

C12Q 1/00 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12M 1/38 (2006.01)

G01N 33/554 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月23日

[11] 公开号 CN 101111603A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/567 (2006.01)

[22] 申请日 2005.11.23

[21] 申请号 200580047141.8

[30] 优先权

[32] 2004.11.24 [33] US [31] 60/630,152

[86] 国际申请 PCT/US2005/042902 2005.11.23

[87] 国际公布 WO2006/058286 英 2006.6.1

[85] 进入国家阶段日期 2007.7.24

[71] 申请人 技术实验室有限公司

地址 美国弗吉尼亚州

[72] 发明人 詹姆士·H·布尼

大卫·M·莱尔利

特蕾茜·D·威尔金斯

[74] 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所
代理人 刘新宇 李茂家

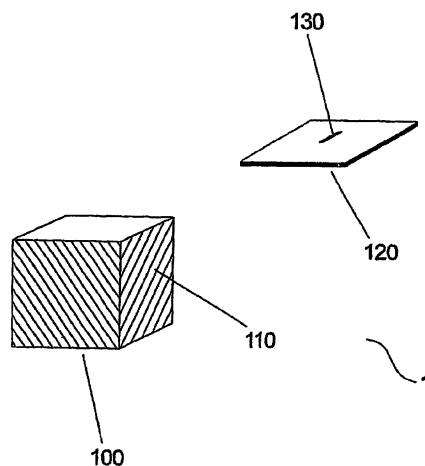
权利要求书6页 说明书60页 附图28页

[54] 发明名称

用于检测被分析物的设备和方法

[57] 摘要

本发明提供用于检测液体样品中的物质的检定和设备。该检定和设备利用多孔材料和含有特异结合成分的多孔膜间的被动扩散以能够检测目标物质。



1. 一种检测液体样品中至少一种目标物质的方法，所述方法包括：

提供包含或怀疑包含目标物质的液体样品；

将液体样品以足够的量施加到多孔材料以至少部分湿润多孔材料；

将该多孔材料与含有至少一种能够直接或间接结合目标物质的特异结合对成分的多孔膜接触；

保持该多孔材料和多孔膜接触足够量的时间，使存在于多孔材料中的液体扩散进入、穿出、通过和/或遍及该多孔膜，

其中，液体的扩散进入、穿出、通过和/或遍及多孔膜导致如果存在的目标物质直接或间接地结合到特异结合对成分；及

检测包含特异结合对成分和目标物质的复合物存在或不存在，

其中，至少一种复合物的存在表明液体样品中至少一种目标物质存在。

2. 根据权利要求1所述的方法，其进一步包括：提供包括该多孔材料和多孔膜的设备。

3. 根据权利要求1所述的方法，其中，该多孔材料过滤液体样品以去除具有大于预定值的尺寸的物质。

4. 根据权利要求3所述的方法，其中，该过滤是借助于来自液体样品的液体通过多孔材料的不连续渗透。

5. 根据权利要求1所述的方法，其中，该液体包含两种或多种目标物质。

6. 根据权利要求5所述的方法，其中，每一种目标物质与每一种其它目标物质不同。

7. 根据权利要求5所述的方法，其中，该液体包括粪便、血液、食品或环境样品。

8. 根据权利要求1所述的方法，其中，该目标物质是 *Clostridium difficile* 毒素A、*Clostridium difficile* 毒素B或两者。

9. 根据权利要求1所述的方法，其中，该目标物质是一种或多种毒素、细菌、病毒、细菌产物、酶或寄生虫。

10. 根据权利要求1所述的方法，其中，该目标物质是谷氨酸脱氢酶。

11. 根据权利要求1所述的方法，其中，该物质是动物或人类产物。

12. 根据权利要求1所述的方法，其中，该物质是抗体或乳铁蛋白。

13. 根据权利要求1所述的方法，其中，一种或多种该特异结合对成分是抗体，其中抗体的每一种与一种或多种其它抗体不同或相同。

14. 根据权利要求1所述的方法，其进一步包括在检测复合物的存在之前清洗该膜。

15. 根据权利要求1所述的方法，其中施加液体样品至多孔材料包括在与多孔膜空间上分离的多孔材料上的位置施加液体样品，由此至少液体样品的液体移动进入多孔材料，再进入多孔膜。

16. 根据权利要求15所述的方法，其中，该液体样品以渗透过程通过该多孔材料移动到达该多孔膜。

17. 根据权利要求1所述的方法，其进一步包括对该膜、该多孔材料或两者施加物理力。

18. 根据权利要求1所述的方法，其中，检测包括观察从结合到目标物质的标记物发出的信号。

19. 根据权利要求18所述的方法，其中，该信号由在特异结合对成分中或其周围形成的有色沉淀产物产生。

20. 根据权利要求1所述的方法，其进一步包括在施加液体样品至多孔材料之前将标记的结合物与该液体样品结合。

21. 根据权利要求20所述的方法，其中，该标记的结合物包括乳胶珠或其它有色颗粒、胶体金颗粒或结合至底物以产生可检测信号的反应性物质。

22. 根据权利要求18所述的方法，其中，该信号是不可见信号。

23. 根据权利要求1所述的方法，其中，该方法检测一种或多种核酸或其中一种或多种核酸是特异结合对成分。

24. 一种设备，其用于检测液体样品中至少一种目标物质，该设备包括：

(a) 包括用于接收液体样品的多孔材料的贮存器，

其中，该多孔材料能够吸收和传输液体样品的至少一部分，和

(b) 包含对目标物质或结合至目标物质的物质特异的特异结合对成分的多孔膜，

其中，该贮存器和多孔膜各自成形，以使多孔膜与多孔材料在包含特异结合对成分的多孔膜的至少一部分上直接接触。

25. 根据权利要求24所述的设备，其进一步包括包含贮存器的容器。

26. 根据权利要求24所述的设备，其进一步包括用于多孔膜的固定器。

27. 根据权利要求24所述的设备，其进一步包括清洗溶液接收垫。

28. 根据权利要求24所述的设备，其进一步包括液体样品施加垫。

29. 根据权利要求24所述的设备，其进一步包括过滤垫。

30. 根据权利要求24所述的设备，其中，该设备包括含有包含该多孔材料和该多孔膜的反应垫的容器，该容器包括用于多孔膜的固定器，

其中，该容器使压力施加在多孔膜和/或多孔材料上而使多孔材料的至少一部分被压紧。

31. 根据权利要求30所述的设备，其中，该压力使多孔膜和多孔材料在多孔膜的至少一部分上直接接触。

32. 根据权利要求30所述的设备，其中，该压力使液体以被动扩散在多孔膜和多孔材料之间通过。

33. 一种设备，其用于检测液体样品中至少一种目标物质，该设备包括：

(a) 包括用于接收液体样品的多孔材料的贮存器，

其中，该多孔材料能够吸收和传输液体样品的至少一部分，和

(b) 包含对目标物质或结合到目标物质的物质特异的特异结合对成分的多孔膜，

其中，该贮存器和多孔膜各自成形，以使多孔膜与多孔材料在包含特异结合对成分的多孔膜的至少一部分直接接触，

其中，该多孔膜和多孔材料是具有不同化学组成的不同元件。

34. 根据权利要求33所述的设备，其中，该多孔膜和多孔材料物理接触以使施加到多孔材料的液体样品扩散进入、穿出、通过和遍及该多孔膜。

35. 根据权利要求33所述的设备，其中，产生多孔膜和多孔材料间的物理接触以提高该设备的灵敏性。

36. 根据权利要求33所述的设备，其中，将该多孔材料和多孔膜构造成相互接触以使目标物质不需要以对设备单向的方

式穿过多孔膜以检测目标物质。

37. 根据权利要求33所述的设备，其中，该多孔材料和多孔膜以使在两者间简单、无方向的液体扩散发生的方式相互接触。

38. 一种设备，其用于检测液体样品中目标物质的存在或量，该设备包括：

用于接收液体样品的样品接收区域，

其中，该样品接收区域存在于多孔材料上；

用于过滤在样品接收区域接收的液体样品的样品过滤区域，

其中，该样品过滤区域存在于多孔材料上；

在检测区域包含与目标物质或结合到目标物质的物质特异地结合的特异结合对成分的多孔膜，

其中，该多孔膜是不同于任何多孔材料的元件，及

其中，该多孔材料和多孔膜至少在包含检测区域的一部分的范围物理接触，及

其中，该多孔材料和多孔膜以使存在于液体样品中的液体以基本无规、无方向的方式在包含检测区域的至少一部分的范围扩散进入、穿出、通过和遍及多孔膜的构造物理接触。

39. 根据权利要求38所述的设备，其进一步包括含该多孔材料和多孔膜的至少一部分的容器。

40. 根据权利要求39所述的设备，其进一步包括含清洗溶液接收区域的多孔材料。

41. 一种设备，其包括：

贮存器；和

多孔膜，其包含至少一种特异结合对成分，该特异结合对成分与至少一种目标物质或结合到此物质的物质特异地结合；

其中，该贮存器包括施加区域、过滤区域和反应区域；和
其中，该贮存器和该多孔膜在包含特异结合对成分的多孔膜的至少一部分和反应区域的至少一部分物理接触。

42. 根据权利要求41所述的设备，其进一步包括与贮存器或多孔膜物理接触的清洗溶液接收垫。

43. 根据权利要求41所述的设备，其进一步包括清洗溶液接收垫和液体不渗透膜，

其中，该清洗溶液接收垫与贮存器相邻，且该液体不渗透膜插入该贮存器和清洗溶液接收垫之间，且与两者物理接触。

44. 根据权利要求43所述的设备，其中，移去不渗透膜，导致贮存器的至少一部分和清洗溶液接收垫物理接触。

用于检测被分析物的设备和方法

相关申请的交叉引用

本申请依赖并要求在2004年11月24日提交的美国临时专利申请号60/630,152的权益和公开，其全部公开内容在这里整体引入以作参考。

技术领域

本发明涉及用于检测存在于液体中的物质的设备和方法。特别地，本发明涉及用于检测存在于得自身体组织或环境的液体样品中的小分子，如化学品或者生物产物的设备和方法。

背景技术

有各种设备和方法可用于检测样品中的物质的领域。该领域的一大部分利用与目标物质或结合于目标物质的分子特异地结合的膜结合分子。两种主要类型的设备和方法通常称为侧流和穿流。这些检测通常相对快速(小于1小时来检测物质)和灵敏(ng/ml范围)。

在穿流设备中，将样品借助毛细管作用拖动通过膜，并使物质(被分析物、抗原等)借助结合至特异的抗体、受体、肽等而保留在膜上。借助结合第二抗体或偶联到酶(例如，辣根过氧化物酶)、胶粒(例如，金溶胶)、或各种其它标记物和颗粒(例如，荧光标记物、顺磁珠)的其它分子来检测该结合。当样品被拖动通过膜时，结合很迅速地发生，然后再清洗膜(使缓冲液通过膜)，加入检测剂。结果为可检测的信号，如有色的斑点、线、加号等。

在侧流设备中，样品通过毛细管作用渗流过薄膜并通过一

条试剂如抗体或其它结合组分(结合肽、受体等)的线。在某些情况下,被分析物已经为附着有有色颗粒(例如,金溶胶、蓝色葡聚糖珠等)的抗体所结合。该抗原和抗体-金复合物被试剂线结合,有色的线出现。除非样品在加入到含有作为干燥剂的抗体-金溶胶结合垫之前可能在缓冲液中稀释,不涉及清洗且不使用液体试剂。

在其它形式的侧流设备中,样品通常与含有抗体-酶结合物的缓冲液混合。将其放置到膜上,通过沿着薄膜的侧流发生渗流。由于必须加入试剂,所以不会立即看到线。通常这种试剂为通过酶(例如,辣根过氧化物酶)转变为不溶有色沉淀的无色化合物。在这种情况下必须清洗以滤除未结合的酶,因此在膜的每一端有吸收剂垫且该膜一般比用于金-溶胶侧流的膜更多孔(这有利于清洗)。

尽管目前可用于检测液体样品中的物质的设备和方法对检测大多数目标物质适用和有效,仍需要具有更高速度、灵敏性和易于使用的设备和方法。

发明内容

本发明通过提供快速检测液体样品中的物质的灵敏和易于使用的设备和方法解决本领域的需求。本设备和方法使临床医生能够快速检测有机体,组织样品中的生物产物如毒素或其它生物材料如蛋白、核酸(DNA、RNA)、多糖,及药物或其它人造化学品。组织样品指含有来自一种或多种动物细胞或组织(包括血液系统)的生物材料的任何组合物,该组织包括但不限于人类和动物(例如,来自农场动物或伴侣动物的兽医样品,用于人类消费的肉如碎牛肉、牛排、咸猪肉,蛋,预制食品)的组织(例如,全血或其部分、肿瘤组织、尿、排泄物或排泄产物如

粪便和腹泻)。因此其包括在用于本发明的方法和使用本发明的设备之前不需要稀释的生物材料的液体或半液体样品。也可以检测包括表层土壤、地下土壤、岩石、和水及表层水的环境样品中的生物或化学物质。另外,也能够用于检测空气传播物质,其中该物质能够被俘获和溶解于液体中的。例如,气溶胶能够溶解或与液体结合而产生液体组合物,其可以用作检测目标物质的样品。

通常,本发明的方法利用物质通过膜的扩散,借助特异结合对成分直接或间接地检测那种物质。不同于目前使用的依赖于以单向的方式使物质漫过(over)或通过(through)含有对于该物质的特异结合对成分的膜的检测方法,本方法不依赖于这种物质的单向漫过或通过膜。更确切地,本发明依赖于物质通过、围绕(around)、漫过、穿过(across)和遍及(about)膜的简单扩散来检测物质,不需要相对于膜的一致运动方向性。令人惊讶的是:已发现通过、围绕、漫过、穿过和/或遍及含有对于目标物质的特异结合对成分的膜的简单扩散对快速和灵敏地检测物质是足够的。

因此,本发明的方法一般包括:提供含有或怀疑含有目标物质的液体;将液体以至少部分湿润多孔材料的足够量施加于多孔材料如垫;将多孔材料与包含能够直接或间接结合目标物质的特异结合对成分的多孔膜接触;和检测包含特异结合对成分和目标物质的复合物存在或不存在,其中这种复合物的存在表明在液体中该物质的存在。

粗略地讲,本发明的设备包括能够实施本发明的方法的组件的任何构造。更具体地,本发明的设备包括能够使含有或怀疑含有目标物质的液体样品保留在该设备的预定范围或区域的部件的任何构造,其中该范围或区域包括包含对该物质直接或

间接地特异的特异结合对成分的多孔膜。在该范围内，样品能够扩散穿过、通过等该膜。

在其最基本的形式中，本发明的设备包括(a)包括能够吸收和传送液体的多孔材料或垫的贮存器，和(b)包含对欲检测的物质特异的特异结合对成分的多孔膜。使该贮存器和该多孔膜各自成形以使多孔膜与多孔材料在包含特异结合对成分的多孔膜的至少一部分直接接触。在实施方案中，该垫和膜在包含特异结合对成分的多孔膜的至少一部分相互直接接触。该设备可以包括含有贮存器的容器。该设备可以包括用于多孔膜的固定器。在实施方案中，该设备包括相互接触的容器和固定器，两种元件之间的接触使多孔膜和多孔材料在包含特异结合对成分的多孔膜的至少一部分直接相互接触。另外，该设备可以包括样品施加垫(sample application pad)和清洗溶液接收垫。

附图说明

引入和构成本说明书的一部分的附图显示了几个本发明的实施方案且连同书面说明一起用于解释本发明的某些原则。为了更好地帮助解释描绘的实施方案的各种特征，这些图提供了本发明的某些实施方案的细节。因为这些图仅描绘了本发明的示例性的实施方案，因此，不把它们解释为将本发明的范围限定在在它们之中描绘的特殊细节。

图1是本发明的设备的基本构造的透视图，其包括多孔膜和贮存器。

图2是在图1中描绘的设备的构造的透视图，其中多孔膜直接与多孔材料接触。

图3是本发明的设备的构造的横截面侧视图，其包括借助活动铰链彼此直接连接的容器和固定器。

图4A是本发明的设备的构造的横截面侧视图，其中清洗溶液接收垫连接于样品接收和反应垫。

图4B是在图4A中描绘的设备的另一种构造的横截面侧视图，其中清洗溶液接收垫位于样品接收和反应垫下方。

图4C是其中可移动的液体不渗透挡板位于样品接收和反应垫与清洗溶液接收垫之间的本发明的设备的构造的横截面侧视图。

图5描绘了其中样品接收和反应垫延长超过反应区域形成包括分离的样品接收区域和反应区域的单元的本发明设备的构造的侧视图。

图6描绘了在图5中描绘包含在包括加样口和视窗的容器中的设备的横截面侧视图。

图7描绘了包括加样口和视窗的本发明的设备的构造的横截面侧视图。

图8描绘了其中用于多孔膜的固定器在膜的位置对反应垫施加压力以使在此范围的垫压紧的本发明设备的构造的横截面侧视图。

图9描绘了其中容器在膜的位置对反应垫从下面施加压力以使在此范围的垫压紧的本发明设备的构造的横截面侧视图。

图10描绘了本发明设备的构造的顶视图，其中显示了加样口和视窗。

图11描绘了本发明设备的另一个构造的顶视图，其中显示了加样口和视窗。

图12描绘了在膜上由视窗确定的区域中具有包括特异结合对成分和/或控制分子的区域的图11中描绘的设备的顶视图。

图13描绘了本发明设备的构造的横截面顶视图，其显示了单样品施加垫分叉为两个分离的反应垫和多孔膜，它们各自连

接于两个分离的清洗溶液接收垫。

图14A描绘了其中样品施加垫延伸超过由容器确定的区域的本发明设备的构造的顶视图。

图14B描绘了在图14A中描绘的本发明设备的构造的实施方案的横截面侧视图。

图14C描绘了在图14A中描绘的本发明设备的构造的实施方案的构造的横截面侧视图。

图15A是其中使用“蛤壳”容器的本发明设备的构造的侧视图。

图15B是在图15A中描绘的设备的下半部的顶视图。

图15C是在15A中描绘的设备的侧面的横截面，其中上半部位于下半部以上但不与下半部接触，且其中为了描述的目的去掉铰链使上下半部排成直线。

图15D是在图15A中描绘的设备的侧面的横截面，其中上半部和下半部通过配合摩擦(friction fit)连接。

图16描绘了其中该设备包括两个通过铰链连接的部分的本发明的设备的构造的横截面侧视图。

图17描绘了其中该设备包括不渗透挡板的本发明设备的构造的侧面横截面。

图18描绘了其中该设备包括不渗透挡板的本发明设备的构造的侧面横截面。

图19描绘了其中该设备包括连接上半部和下半部的铰链的本发明的设备的构造的侧面横截面。面板A描绘了设备处于加样和结合的关闭位置。面板B描绘了设备处于读取反应结果的打开位置。

图20描绘了其中该设备包括在设备的底部的加样口和在侧面的清洗溶液接收垫的本发明设备的构造的侧面横截面。

图21A描绘了当检测阳性样品时看起来的本发明设备的构造的顶视图。

图21B描绘了当检测阴性样品时看起来的本发明设备的构造的顶视图。

图21C描绘了当该设备和/或方法失败时本发明设备的构造的顶视图。

图21D描绘了当该设备和/或方法失败时本发明设备的构造的顶视图。

具体实施方式

在进行本发明和各种实施方案的描述之前，在此将定义本文使用的某些术语。用于本文的其它术语根据它们在本领域通常的定义使用或定义在本文中其它地方。

作为本文所使用的，物质是任何物质，其包括但不限于简单的、天然的有机分子如糖和短链酸；复杂生物分子如肽、核酸(例如，DNA、RNA、PNA)和多糖；及人造(无论通过生物方法制造还是通过化学合成)的分子如药物、工业试剂、杀虫剂和落叶剂。因此，物质可以是药物、激素(如在怀孕或排卵期间存在的激素)、蛋白质(包括抗体)、毒素、DNA(包括单链DNA)、RNA(包括双链RNA)、病毒或病毒蛋白或核酸、细菌或细菌蛋白或核酸、多糖、污染物等。因此其可以是细菌或病毒病原体或原核或真核的寄生虫。

例如，物质可以是活的有机体或病毒、或其任何部分，其包括但不限于大分子。因此，物质可以是革兰氏阳性或革兰氏阴性原核有机体，如真细菌或古细菌。细菌有机体的非限制性实例包括*Clostridium*种如*C. difficile*、*C. tetani*、*C. botulinum*和*C. perfringens*；*Escherichia coli*；*Salmonella*种如*Salmonella*

*typhimurium*和*Salmonella typhi*; *Bacillus*种如*Bacillus anthracis*和*B. cereus*; *Staphylococcus*种如*S. aureus*和*S. epidermidis*; *Streptococcus*种如*S. pyogenes*、*S. mutans*和*S. pneumoniae*; *Neisseria*种如*N. meningitidis*和*N. gonorrhoeae*; *Haemophilus*种如*H. influenzae*; *Bordetella*种如*B. pertussis*、*B. parapertussis*和*B. bronchiseptica*; *Listeria*种如*L. monocytogenes*; *Corynebacterium*种如*C. diphtheriae*和*C. pseudotuberculosis*; *Mycobacterium*种如*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. scrofulaceum*、*M. avium-intracellulare*和*M. leprae*; *Actinomycetes*种; *Klebsiella*种如*K. pneumoniae*; *Serratia*种如*S. marcescens*; *Proteus*种如*P. mirabilis*和*P. vulgaris*; *Shigella*种如*S. flexneri*; *Vibrio*种如*V. cholerae*; *Pseudomonas*种如*P. aeruginosa*; *Yersinia*种如*Y. pestis*; *Francisella*种如*F. tularensis*; *Brucella*种如*B. abortus*、*B. suis*和*B. canis*; *Treponema*种如*T. pallidum*; *Borrelia*种如*B. burgdorferi*; *Campylobacter*种如*C. jejuni*和*C. fetus*; *Legionella*种如*L. pneumophila*; *Rickettsiae*种; *Chlamydia*种如*C. trachomatis*和*C. psittaci*; 和*Mycoplasma*或*Acholeplasma*种。

当然, 物质可以为病毒或其任何部分。病毒的非限制性实例包括免疫缺陷病毒, 如人类免疫缺陷病毒(例如, HIV-1、HIV-2、HIV-O); 肝炎病毒, 如丙型肝炎病毒(HCV)、乙型肝炎病毒(HBV); 乳头状瘤病毒, 如人类乳头状瘤病毒(HPV); 及与人类或动物疾病有关的任何其它病毒。

因为物质可以是活的或非活的实体的任何部分, 物质可以是与神经变性疾病如阿尔茨海默(Alzheimer's)病或可传导性海绵样脑病如朊病毒病有关的蛋白质或其部分。因此, 物质可以是朊病毒蛋白或其部分。

物质的其它非限制性实例包括寄生虫或其任何部分。因此,

物质可以是 *Giardia* 种、*Cryptosporidium* 种或 *Entamoeba* 种的全部或部分。

作为本文所使用的，特异结合对成分是直接或间接地特异性地结合于另一种物质的物质。因此，特异结合对成分和其它的物质一同产生一对物质。由于该两种物质特异性地相互结合，两者都可以认为是彼此的特异结合对成分。然而，为了清楚的目的，一个称为特异结合对成分而另一个称为它结合到的物质。特异结合对成分的实例包括，但不限于抗体 - 抗原对(包括，但不限于其中一个抗体特异地结合到另一抗体的抗体 - 抗体对)、酶 - 底物对、互补的核酸对、蛋白 - 核酸对(如DNA和DNA - 结合蛋白对，包括但不限于操纵基因序列和转录因子)和蛋白 - 蛋白对(包括但不限于多亚单位蛋白的亚单位)。实例也包括结合于靶、受体、配基、人工抗体(例如，单链抗体、重组抗体、仅含有抗原结合区域的抗体、细菌产生的抗体或抗体部分)的人工肽。其它示例性的结合对成分包括在一个或多个核酸的部分或整体含有互补性区域的两个或多个核酸，其能够在适当的条件下特异性地结合或杂交。本发明旨在检测样品中的物质。然而，不应该认为物质必须是特异结合对成分的一种。而是，特异结合对成分可以是与另一种特异结合对成分特异性地反应且同时结合到样品中目标物质的物质(例如，结合到目标物质且同时特异性地被另一个抗体结合的抗体)。作为本文所使用的，结合到样品中目标物质的特异结合对成分(例如，抗体)的公开不仅包括直接结合到特定物质的特异结合对成分，而且包括结合于另一种结合于该物质的特异结合对成分的特异结合对成分。例如，特异结合对可以是生物素和抗生物素蛋白或链霉抗生物素。

目前用于本领域的快速的测试设备和方法，因为它们通过

吸取(sucking)样品通过涂布有抗体的膜(穿流设备或方法)或借助毛细管作用沿膜拖动(pulling)样品(侧流设备和方法)使物质(例如,抗原)和特异结合对成分(例如,抗体)结合。本发明不依赖于这些原则的任一种。根据本发明,包含特异结合对成分的多孔膜仅需要接触含有物质的多孔材料(例如,垫)。简单扩散进、扩散出多孔材料和膜使物质和特异结合对成分接触。本发明提供快速和灵敏地检测样品中的物质是令人惊奇的,因为广泛地认为简单扩散不足以检测物质,更别说借助结合于与固体载体例如膜相连的特异结合对成分而高灵敏性地检测了。的确,本发明提供有时与用于侧流或穿流的设备和方法可以相比的异常灵敏的物质检测。因为样品不必直接施加,不必直接流过包含特异结合对成分的膜,该检测也能够用于其它快速检测中堵塞膜的样品。

第一方面,本发明提供检测存在于液体样品中的物质的方法。本发明的方法使用来自包含多孔材料如垫的贮存器的物质被动扩散至多孔膜。这种扩散使得能够借助与多孔膜相连的特异结合对成分来直接或间接地检测物质。与目前使用的依赖于以单向的方式使物质穿过或通过含有对于物质的特异结合对成分的膜的普通检测方法不同,本方法不依赖于物质的这种单向的运动。而是,本发明依赖于物质的简单扩散通过、围绕、漫过、穿过和/或遍及于膜来检测物质,而不需要相对于膜的单向的运动。令人惊奇的是,已经发现简单扩散通过、围绕、漫过、穿过和遍及于含有对于目标物质的特异结合对成分的膜足以快速而灵敏地检测物质。

本发明的方法一般包括提供含有或怀疑含有目标物质的液体;将液体以足够量施加于多孔材料以至少一部分湿润多孔材料如垫;将多孔材料与包含能够直接或间接结合目标物质的特

异结合对成分的多孔膜接触；保持湿润的多孔材料和多孔膜接触足够量的时间以使多孔膜至少在包含特异结合对成分的区域变得湿润；检测包含特异结合对成分和目标物质的复合物存在或不存在，其中这种复合物的存在表明在液体中该物质的存在。

可以以许多方法提供含有或怀疑含有目标物质的液体。例如，可以将其以它从天然环境分离的形式(例如，可将全血，尿，腹泻粪便，和溪水、河水或湖水分离后直接使用)提供。因此，其可以是未稀释的样品。另外，可以将其以已经处理以除去一种或多种组分后的形式提供(例如，血液和粪便的液体部分可以在离心、过滤或固体物质沉淀后使用)。另外，当原样品为固体或基本为固体时，可以将液体如水加入样品中以提供液体特性。可以在提供液体之前或之时进行其它的液体处理或操作。可以使用任何处理或操作，只要其不使样品不能用于本发明的方法或本发明的设备。

该液体可以是任何液体，包括，但不限于水或含有水的组合物，如生物组织、生物组织的提取物和生物排泄物；有机溶剂或含有机溶剂的组合物；水和有机溶剂的组合或含水的和/或有机溶剂组合物的组合。例如，液体可以是生物液体，如血液或血液的部分、尿、粪便、唾液、痰液、黏液、精液、或匀浆化的组织。因此它可以是人类或动物组织的匀浆化的样品，如匀浆化的肉(例如，碎牛肉、羊羔肉、猪肉、鸡肉、鱼肉、蛋)。它也可以是固体样品的提取物，如粪便样品或可消费的肉类样品的水提取物。当要检定的组织不适于以分离的形式液化时，可以将水或其它液体加入到组织中以提供适当的液体特性。因为本发明适于检测具有宽的范围的粘度的液体中的物质，本方法适于检测存在于液体或半液体组合物中的物质。

必要时，液体中要检测的物质(如果存在)的量或浓度可以

调节以获得满意的检测。调节可以通过用与液体样品和本发明的设备部件相容的液体稀释来实现，或者可以通过使用适当的浓缩技术浓缩液体样品中的物质来实现，这种浓缩技术包括，但不限于离心、过滤、蒸发、亲和纯化或其类似技术。通常，要检测的物质以纳克(ng)至微克(μg)量存在于样品中。

将液体施加于多孔材料之前或之时，也可以加额外的组分于液体中。可以将基本不干扰特异结合对成分与物质或与结合于物质的特异结合对成分特异地复合的能力的任何物质加入到液体。在实施方案中，将液体施加于多孔材料之前或之时，将特异地与物质(如果存在)相互作用的标记物加入到液体中。例如，特异地与目标物质结合的抗体可以在将液体施加于多孔材料前加入液体中。抗体可以用能够直接或通过使用辅助材料检测的部分标记。示例性的部分包括，但不限于碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光化合物、顺磁珠、金或其它金属、乳胶珠、抗生物素蛋白(链霉抗生物素)和生物素。因此，在实施方案中，在将液体样品施加于多孔材料/垫之前或之时，将特异地结合于目标物质的抗体结合物加到液体样品中。

将液体以足够量施加于多孔材料以至少一部分湿润多孔材料。优选将足够量的液体施加以湿润与多孔膜在特异结合对成分所处的区域接触的多孔材料的部分。在优选的实施方案中，湿润整个多孔材料或基本整个多孔材料。在多孔材料延伸超过多孔膜覆盖的区域的实施方案中，优选将足够量的液体施加以至少在特异结合对成分所处的区域湿润多孔膜。

施加可以通过任何适当的技术完成，包括，但不限于将多孔材料浸入液体、将液体倒在多孔膜上、将多孔材料放在液体流的路径中(例如，浸入流动的河流、插入尿流)、将液体滴加到多孔材料上(例如，用滴眼器或移液器)和将半液体样品涂抹

在多孔材料上。可以通过直接施加于多孔材料或施加于另一个与多孔材料接触的多孔材料完成施加。同样，可以通过施加于本身远离另一个位置的多孔材料的区域并使液体迁移通过多孔材料到另一个位置来完成施加。

在本发明的实施中，施加的液体的至少一部分应该存在于与包含特异结合对成分的膜的部分直接接触的位置。因此，液体可以施加于多孔材料的部分，该部分邻近于多孔膜与孔材料接触或打算与多孔材料接触的区域(例如，在反应垫中，其包括检测范围或位置)或可以施加于远离反应垫范围的位置且可以将其迁移到该范围。当施加在远离的位置时，由于材料的多孔性，液体将通过多孔材料从施加位置迁移到达物质存在的检测位置(即，到达多孔膜接触的多孔材料上的位置)。

在远离检测位置的位置施加液体可以在物质检测之前使液体过滤。即，该多孔材料不仅可以用于将液体和其组分运输至检测位置，且可以用于阻止或阻碍样品中存在的某些组分的迁移，因此有效地用作仅使一定尺寸的物质迁移到检测范围的过滤系统。有各种不同的具有各种孔尺寸的多孔材料可以利用，可以选择适当的材料和孔尺寸以有效地滤出液体中不需要的组分。例如，当施加包含粪便的液体时，可能希望滤出大颗粒，如未消化或部分消化的食物或细菌。在这种情况下，可以选择具有这样的孔尺寸的多孔材料，该孔尺寸阻止或明显阻碍这些相对大的组分迁移而允许较小的组分如细菌蛋白、核酸、细胞外血蛋白、或其类似物基本不受阻碍地迁移通过材料。

本发明的方法也包括使多孔材料与包含能够直接或间接结合目标物质的特异结合对成分的多孔膜接触。多孔材料和多孔膜的接触可以在将液体施加到多孔材料之前或之后发生。另外，为了实现接触，是否引起材料或膜移动不重要。接触包括多孔

材料或多孔膜之一或两者的物理移动以实现接触。

尽管不是必须，一般当将液体在远离检测物质存在位置的位置施加于多孔材料时，多孔材料和多孔膜在施加液体之前相互接触。另一方面，当将液体在多孔材料和多孔膜接触的位置或该位置附近施加于多孔材料时，一般在该膜和材料接触之前施加液体。

已经发现，膜在特异结合对成分所处的位置与目标物质能够迁移通过的多孔材料的直接接触提高本发明的方法的灵敏性和速度。因此，优选多孔膜和多孔材料在该位置接触，或至少在该位置的一部分上接触。多孔材料和多孔膜间的接触应该是在特异结合对成分所处的膜的至少一部分，或在特异结合对成分所处的位置的膜的足够大的部分连续接触，这样如果目标物质存在于液体中，就可以识别可检测信号。即，在实施方案中，特异结合对成分结合到多孔膜的区域可能超过与多孔材料直接接触的区域，但是要进行足够量的接触从而能够检测液体中的物质的存在。

优选膜和材料直接接触；然而，一种或多种中间多孔的(intervening porous)、基本为亲水的材料可以插入多孔材料和多孔膜之间。在这种情况下中中间多孔的材料有效地作为第二多孔材料，因而可以认为是为了本发明目的的多孔材料或垫。因此，术语多孔材料或垫的使用包括提供相同或基本相同功能的多种材料。

在实施方案中，材料和膜的接触包括在膜和材料上施加压力以确保两者在特异结合对成分所处的区域的至少一部分完全或基本完全地接触。已经发现在某些情况下，尽管不是必须，在这个范围的压力可以提高该方法的性能。例如，它可以提高方法的灵敏性和可靠性。也可以提高多孔材料的渗透特性，这

样可以增加反应区域的样品量。压力可以进一步增加多孔材料和多孔膜间接触的量。即，在多孔材料包含加样位置和反应位置的实施方案中，已经发现在反应位置压紧多孔材料能够提高设备的灵敏性，从而提高本发明的检定或方法的灵敏性。尽管不欲限定于任何特殊的操作理论，但据信除了提高膜和材料之间的接触之外，压紧多孔材料的反应区域提高了液体迁移至与膜，特别是包含特异结合对成分的膜的部分接触的材料区域，防止液体迁移出该区域。事实上，该压紧使液体收集在压紧的区域。该提高的迁移至而不迁移出该区域使该区域的物质量增加(与未压紧的材料相比)，并提高物质(如果存在)扩散入多孔膜。

根据本发明的方法，保持湿润的多孔材料和多孔膜接触足够量的时间，使多孔膜至少在包含特异结合对成分的区域的一部分变得湿润。这样做能够使物质(如果存在于样品中)扩散通过、漫过、围绕和/或遍及于膜，且使其和与膜相连的特异结合对成分接触。尽管提供的时间量将依赖于以下因素变化：样品中的物质的量、多孔材料和膜的孔隙率、与膜相连的特异结合对成分的量、特异结合对成分对物质结合的特异性和强度、温度、及其它因素(所有这些可以由本领域熟练技术人员基于通常用于快速检测领域的时间、浓度、温度等来选择，而不需要过多的实验)，一般充分湿润膜应该在一分钟内发生。在优选的实施方案中，保持膜和材料接触至少三十秒，如约或精确的三十秒、约或精确的一分钟、约或精确的2分钟、约或精确的3分钟、约或精确的5分钟、约或精确的10分钟、约或精确的15分钟、约或精确的20分钟、约或精确的25分钟、或者约或精确的30分钟。作为这里所使用的，除非另有说明，时间、温度和其它列举的数值包括列举的数每一端5%的所述数值的范围。因此，列举的

“60秒”包括从57秒至63秒的任何量的时间。

保持膜和材料接触可以在任何温度下进行。然而，优选使用100℃以下的温度，如室温(20°-25℃)、30℃、37℃、40℃、或50℃。事实上，已经惊奇地发现本方法能够提供比使用同样特异结合对成分和物质的ELISA测试更高的灵敏性，虽然是在室温下而非37℃(ELISA所需的温度)下进行。

同样，可用使用任何适当的浓度或量的特异结合对成分和物质。用于结合配偶体(binding partner)(例如，抗原、酶的底物、核酸或核酸结合蛋白)的膜结合检测的各种特异结合对成分(例如，抗体、酶、核酸)的通常量是本领域公知的。例如，当特异结合对成分为抗体时，其可以以约0.5ng至约1000μg的量和在约0.5mm²至约100mm²以上的区域存在于膜上。要结合于膜的量可以根据以下因素选择：要检测的物质的量、由选择的标记物和信号产生系统本身产生的信号的量/强度及特异结合对成分在其上结合的区域尺寸。这些参数可以由本领域熟练技术人员根据每一种信号产生系统的公知特性来选择和调节。

在实施方案中，施加液体在多孔材料与多孔膜接触之前进行。在其它实施方案中，施加液体在多孔材料与多孔膜接触之后进行。因此，在实施方案中，多孔材料与多孔膜在施加液体之前相互接触。通常，多孔材料与多孔膜间的接触发生在施加样品之前或之后并不重要。进行接触的时间结合用于特定分析的设备的构造和设备容易使用来典型地选择。

该方法进一步包括检测包含特异结合对成分和目标物质的复合物存在或不存在，其中这种复合物存在表明液体中该物质的存在。根据本发明，如果样品含有目标物质，样品在多孔材料(即，反应垫)和多孔膜间的扩散将使物质能够与结合于膜的特异结合对成分接触。本发明的方法通过众多本领域认可的任

何检测方案检测由特异结合对成分和物质形成的复合物。例如，在物质暴露于特异结合对成分之前(例如，将样品施加于多孔材料之前、当样品迁移通过多孔材料时等)或已将足够的时间提供于物质和特异结合对成分以进行接触之后，可使对物质特异的抗体(除了结合于膜的特异结合对成分之外)暴露于物质。在一些情况下，用可检测的部分，如用可直接检测的标记物(例如，金属溶胶，如胶体金；染料溶胶；有色颗粒，如乳胶)；顺磁珠；及荧光化合物来标记抗体。也可以用间接标记物如当暴露于底物时产生可检测信号的酶(例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶)标记。在其它情况下，抗体将例如通过结合标记物至抗体的Fc部分用作标记物的特异结合对成分。标记物也可以包括其中一个或两个成分含有可检测部分或能够产生可检测部分的物质的特异结合对，如抗生物素蛋白(链霉抗生物素)/生物素对或任何其功能上的等同物。

如前面的段落所暗示的，用于目标物质的标记物可以作为多孔材料的组分提供。例如，其可以浸透(作为干物质或作为能够在多孔材料中干燥的液体溶液)于反应区域、加样区域、或样品迁移区域(在某些实施方案中位于加样区域和反应区域之间)。当液体样品迁移进入或通过多孔材料时，标记物溶解于液体并随液体迁移至反应位置且最终到达膜。在迁移进行期间或反应进行期间，标记物特异性地结合于物质(如果存在)，最终带来包含特异结合对成分、目标物质和标记物的膜结合复合物。在标记物包含于多孔材料的实施方案中，材料孔尺寸的选择至少一部分依赖于标记物或物质-标记物复合物的迁移特性。

物质的检测可以提供对样品中物质的定性、半定量、或定量的信息。定性检测提供告知操作人员样品中物质存在情况的信息，但未必是量。然而，通过在膜上放置已知量的特异结合

对成分、通过知道特异结合对成分能够结合的物质、及通过知道对于检测必须存在的物质-标记物复合物的量,可以提供半定量的物质检测方法。更具体地,通过知道这些量、及通过获得可检测的信号,操作人员将知道物质不仅存在于样品中,而且以至少产生可检测的信号必须的量存在。如果需要,通过将测试样品的信号强度与得自含有已知量的物质的样品的信号强度的标准曲线比较,可以获得样品量的定量测定。设计半定量和定量检定的各种方法是本领域公知的,在本发明中可以使用任何适当的方法。

检测结果也可以是在缺乏该物质或指示该物质存在的一些其它物质时,可检测信号的消失或者要不是产生的信号削弱。因此,本发明的方法包括所有类型的免疫检定(包括夹心型检定(sandwich-type assays)和竞争检定)和依赖于检测到或没有检测到至少一种特异结合对成分结合到目标物质的任何其它检定。

本发明的方法可以包括多个其它步骤,包括,但不限于提供一个或多个对照反应以确定该方法的一个或多个步骤是否成功地进行、确定一种或多种试剂是否如所期望地起作用、并且确定干扰该方法产生可靠结果的能力的物质是否存在于样品中。能够用作对照试剂的物质包括,但不限于要检测的物质或结构的类似物、特异地与另一个抗体反应的抗体、或能够特异地结合于目标物质的任何其它物质或用于检定的一些其它的试剂。因此,本发明的方法可以包括加入已知的物质,其包括要检测的物质以确定本方法的一个或多个步骤是否如所设计的起作用。这种对照反应对本领域熟练技术人员是众所周知的,对它们的设计和在此不需要详细说明。通常的对照反应将包括在特异地结合被标记的物质的多孔膜上或在第二多孔膜上提供第二区域以不仅表明标记物存在且发挥作用,而且表明标记

物已经有足够的时间与连接于膜的任何结合配偶体接触。当然，可能提供处于各个方向的多条线，其每一条提供关于本方法的各个方面重复的或不同的信息。

另外，本发明的方法能够检测除主要目标物质之外的样品中一种或多种物质。这些其它物质可以是天然存在于被测试样品中的其它物质、或可以是故意添加于样品中用作阳性对照的物质、标记物、竞争物等。因此，本发明的方法能够检测样品中两种或多种物质。当这样做时，能够在同一多孔膜上检测多种物质，或者在同一个设备或两个相同的设备上提供多张膜(除结合于膜的物质相同之外)。

本发明的方法可以包括一个或多个清洗步骤。尽管不限于任何特殊的方法，清洗一般用于其中使用间接标记物检测物质的实施方案中。例如，当使用利用底物产生信号的标记物(例如，辣根过氧化物酶)时，标记物一般相对于物质过量地存在于反应混合物中。另外，可能物质-标记物复合物可能相对于结合于膜的特异结合对成分过量地存在。在任一这样的情况中，过量的标记物，如果能够保存留于包含特异结合对成分的膜中和附近，会与标记物底物反应以产生信号，该信号代表非特异性信号或背景噪声。为了降低这种背景噪声，可以用适当体积的适当清洗溶液清洗膜。该清洗溶液可以一次或多次施加，这依赖于使用量和存在的未结合的标记物的量。同样，其它清洗步骤可以包括在方法的其它点中。在实施方案中，清洗步骤用于从膜上清洗未结合的结合物以提高检测灵敏性。本领域熟练技术人员熟知在特异性结合反应期间的不同点进行或不进行清洗步骤的优点和缺点，因而可以选择清洗步骤的类型和数目，以及清洗溶液，以用于本发明的每一个特定的实施方案。可以进行这种选择而不需过度的实验。

第二方面，本发明提供用于实施本发明的方法的设备。粗略地讲，本发明的设备包括能够实施本发明的方法的部件的任何构造。更具体地，本发明的设备包括任何数目和构造的能够使含有或怀疑含有目标物质的液体样品保留在设备的预定范围或区域的部件或元件，其中该范围或区域包括含对物质直接或间接地特异的特异结合对成分的多孔膜。

在其最基本形式中，本发明的设备包括(a)包括能够吸收和传输液体的多孔材料的贮存器，和(b)包含对欲检测的物质(样品中的物质或结合到那种物质的物质)特异的特异结合对成分的多孔膜，其中，该贮存器和多孔膜各自成形以能够使多孔膜与多孔材料在包含特异结合对成分的多孔膜至少一部分直接接触。该设备可以进一步包括含有贮存器或贮存器的一部分的容器。该设备可以进一步包括用于多孔膜的固定器。在实施方案中，该设备包括相互接触的容器和固定器，两个元件间的接触使多孔膜和多孔材料在包含特异结合对成分的多孔膜的至少一部分直接相互接触。

贮存器是该设备的物理和功能单元。其提供含有或怀疑含有目标物质的液体保留的面积和体积。其也提供扩散进和扩散出在这里称为反应垫或区域的包含特异结合对成分的多孔膜的液体贮液器。该贮存器可以是任何形状或尺寸，由任何适当的材料制作。该贮存器包括至少一种在这里也称为垫的多孔材料。然而，注意多孔材料在尺寸上未必限于由贮存器确定的范围。即，单一的多孔材料或多孔材料的组合在尺寸上可以限制在贮存器的范围或可以延伸超过贮存器的范围至加样范围和/或清洗范围、或存在于设备的特殊构造的任何其它范围。

多孔材料(在此也称为“垫”)可以由具有一种或多种液体能够通过的孔、洞或空间的任何材料制作。其因此可以是作为

吸收剂的任何材料。多孔材料的非限制性实例包括，但不限于纸产品，如吸水纸或滤纸(例如，Whatman[®]3mm纸、和Filtrona[®]产品)、合成聚合材料(例如，硝酸纤维、尼龙)、塑料和塑料球(例如，Porex[®]塑料珠；用于制作圆珠笔的材料)，如由聚丙烯、聚乙烯、聚偏二氟乙烯、乙烯乙酸乙烯酯、丙烯腈、和聚四氟乙烯制成的那些。其它的非限制性实例包括纳米颗粒/球/管。

材料的孔尺寸可以根据所需的特性选择。众多孔隙度对于可以制成多孔材料的各种材料是可以获得的。例如，如果欲施加的样品含有微粒的材料或固体(例如，粪便、土壤)，可以选择排斥或明显地减慢这些微粒材料或固体迁移的孔尺寸。同样，如果样品包含血液，可以选择排斥或明显地减慢血细胞和血小板迁移的孔尺寸。另外，如果样品在检测位置不含有不需要的任何物质(例如，已经预纯化至一定程度的样品)，可以不考虑过滤特性来选择材料的孔尺寸。通常，孔尺寸范围为约0.05微米至约0.5微米。

多孔材料可以从单一材料制作或可以包含多种不同的多孔材料。不同的特有材料可以以任何适当的构造来构造，如一层在另一层上叠层、两种材料首尾相连地邻接、或能够使液体从材料的一个范围流到另一个范围，如从液体施加位置到当与多孔材料接触时的多孔膜上的检测位置的任何其它构造。例如，多孔材料可以包括在液体施加位置(施加区域)的一种孔尺寸和材料，在检测位置(检测区域)的第二种孔尺寸和/或材料，在远离(相对于施加液体的位置)检测位置的第三个范围的第三种孔尺寸和/或材料(其可与第一个相同)，该第三个位置起清洗溶液接收位置(清洗接收区域)的作用。可以选择孔尺寸和材料，及其组合以适应基于样品的各种特性、欲检测的物质、设备的构造、或任何其它考虑的独特需要。多孔材料可以含有认为在实

施本发明时有用的物质，包括，但不限于物质的标记物、活性木炭、离子交换树脂和表面活性剂。另外，可以通过较少孔、无孔、或不渗透的材料，如疏水膜相互隔离多孔材料。这些膜可以在实施本发明的方法期间在某些点去除以使液体从一种可多种材料流到一种或多种其它材料。例如，两种多孔材料可以通过连接于拉环(pull tab)的无孔材料隔离。拉起该拉环去除无孔材料，使液体如清洗溶液能够流入多孔材料(例如，清洗垫)。

多孔膜是由能够使液体和预定尺寸的悬浮物质流过它的任何适当的材料制成的膜。通常，膜由本领域已知的材料制作以适于通过膜结合分子特异地结合于物质来检测目标物质。实例包括，尼龙膜、硝酸纤维素膜、聚乙烯吡咯烷酮膜、玻璃纤维等。

多孔膜包含至少一种特异结合对成分。以使其在设备的制作和使用条件下保持与膜相连的方式使该特异结合对成分与膜相连。通常，特异结合对成分通过共价、离子、或疏水键结合于膜。为了提高结合，可以在结合之前处理膜。同样，可以在结合之后处理膜以提高结合，或降低其它物质结合于膜上不同于特异结合对成分结合的位置的位置。特异结合对成分可以使用任何已知的技术结合于膜。另外，其可以以所需的任何形状、设计、图案、方向等(例如，线、十字、圆点、圆圈)和以任何所需的尺寸(例如，直径为0.1mm、1mm、2mm、3mm、4mm、5mm等的圆点；1mm粗5mm长的线、2mm粗1cm长的线等)结合于膜。在优选的实施方案中，其为线形，其提供了有利和方便的检测形状。在实施方案中，多孔膜包含两个或多个含有特异结合对成分的不同范围。在某些实施方案中，两个或多个范围包含相同的特异结合对成分。在其它的实施方案中，每一个范围包含不同的特异结合对成分。不同的特异结合对成分可以对

相同的物质是特异性的(以提供内部重现性对照),或可以对不同的物质是特异性的(例如,一种对目标物质是特异性的,而一种或多种对其它目标物质或对用于本发明的方法的试剂是特异性的)。

因此,多孔膜可以包含除特异结合对成分之外的其它组分。例如,它可以包含用作本发明方法的实施的对照的分子,如特异地结合用于检测样品中目标物质的标记物的抗体。它也可以包含第二特异结合对成分,该第二特异结合对成分对样品中的第二目标物质(包括有意加入到样品中以用作阳性对照的物质)特异。如以上所讨论的,特异结合对成分可以是结合对中的抗原或抗体、结合对中的受体或配体、或结合对的任一组分。因此,本发明意在为了检测其结合配偶体而将抗体、抗原、受体、配体、单链核酸等结合于膜。

在实施方案中,多孔膜与固定器接触。固定器可以将膜适当固定以使膜与反应垫在膜的至少一部分保持接触。如果需要的话,它还可以将膜固定在能够与反应垫接触放置的位置。例如,该固定器可以是接触膜的塑料环、方形物等。接触可以使膜保持在固定器上或简单地保持膜与反应垫接触。该固定器可以是该设备分离的物理组件或可以将它制作为该设备的整体部分,例如作为该设备的容器的整体部分。

贮存器可以位于容器内。容器可以由任何适当的材料制作,但通常由塑料制成。该容器提供对本发明的设备的基本结构强度和液体不渗透性,也可以提供其它的功能。在本发明的设备的基本构造中,容器含有反应垫并包括膜。可以以使膜与反应垫接触的任何适当的方式提供膜。例如,膜可以结合于通过铰链与容器相连的固定器。作为选择,膜可以结合于与容器集成的固定器,其中,该容器由一起装配以使膜与反应垫接触的两

个部分制作。其它适当的构造对本领域熟练技术人员是明显的，本发明可以包括所有这些构造。

本发明的设备还可以进一步包括含多孔材料的加样范围或区域(在此也称为样品施加垫)。如以上所述的，样品可以施加于贮存器或反应垫。然而，在实施方案中，将样品加在远离贮存器和反应垫的位置。在这些实施方案中，样品加在包含多孔材料的样品施加垫。样品施加垫的多孔材料可以是与用于反应垫中的材料相同的材料(即，它本身可以为同一元件或它可以是由相同的材料制作的两个分开的元件)。另外，它可以为不同的材料，其中使两种材料相互接触放置以使来自样品施加垫的液体可以通入反应垫。

加样区域的尺寸不重要。然而，优选加样区域和反应区域共同具有足够的吸收能力以吸收施加的整个样品。另外，加样区域可以包括不含有样品施加垫的敞开范围，该范围通常由样品施加垫的边缘和容器的侧面确定。该敞开区域可以设计以直接或以溢流接收所加的样品，其可以起作用以帮助过滤和保留存在于样品中的固体和大颗粒。

该设备可以进一步包括含多孔材料的清洗溶液接收区域或范围(在此也称为清洗溶液接收垫)。清洗溶液接收垫的多孔材料可以是与用于反应垫和/或样品施加垫的材料相同的材料(即，它本身可以为与反应和样品施加垫同一元件，或由可以是与其它垫之一或两者的材料相同的材料制作的分开的元件)。另外，它可以为与反应垫和样品施加垫之一或两者不同的材料。在这种情况下，清洗溶液接收垫与反应垫、施加垫或与两者接触放置以使来自膜的清洗溶液(流过反应垫)可以通入清洗液体垫。

在实施方案中，可移动的液体不渗透的或半渗透的挡板置

于清洗溶液接收垫和设备的一个或多个其它垫之间。挡板存在于实施方案中以确保没有来自反应垫或样品施加垫的液体进入清洗溶液接收垫直到清洗溶液加入设备中。尽管由于反应垫的液体流动和保留特性，挡板一般不必须，但为了增加确保提高液体存在于反应垫的量或任何其它原因，挡板可以包括在设备中。在其它实施方案中，将一块或多块液体不渗透挡板包括存在于设备中的一种或多种各种垫之间。

该设备可以包括样品施加垫或区域与反应垫或区域间的过滤垫或区域。尽管样品施加垫和反应垫能够提供样品的适当过滤，有时可能需要具有在样品暴露于膜之前额外的样品过滤。在这种情况下，可以提供过滤垫。在实施方案中，过滤垫仅仅是反应垫超出膜覆盖范围的延伸。另外，它可以仅仅是延伸超出加样范围的样品施加垫的延伸。在一些实施方案中，样品施加垫、过滤垫和反应垫是同一元件，基于在设备中的功能和位置而非物理特性指定各种“垫”（也称为“区域”）。过滤垫的主要功能是阻止或阻碍某些物质迁移到反应垫。这种过滤通过阻碍有色化合物、阻碍会引起背景噪声的大颗粒等可以对目标物质的检测有利。

从以上描述可以看出，反应垫、样品施加垫、和过滤垫全部可以由多孔材料(相同的材料或不同的材料)制作。同样，清洗溶液接收垫可由多孔材料制作。多孔材料起各种功能，但通常都用于牵引液体通过材料以致其进入另一种材料。例如，加样、过滤和反应垫能够使液体从施加位置移动到达检测位置(即，膜)，同时过滤各种固体和颗粒、有色材料或其它物质。清洗材料接收垫可以当将清洗溶液加到膜上时从反应垫牵引液体，从而使清液溶液能够带走可能干扰膜上物质的特异检测的不需要的物质。

多孔材料在每一个范围或区域起各种功能，这些功能与在包括多孔材料的设备的其它范围提供的功能明显重叠。为了易于描述，已经描述了对于设备的每一个特殊范围的多种功能；然而，不应该认为特性仅限于已经描述特性的范围。在不同实施方案中的多孔材料的特殊物理位置对本领域熟练技术人员是明显的，且每个范围的多孔材料的特殊功能同样是明显的。不应该认为特性限于那个范围。例如，在贮存器区域，多孔材料的主要功能是提供含有或怀疑含有目标物质的液体保留的范围或体积，提供液体扩散入和扩散出含有特异结合对成分的多孔膜的贮液器，及牵引液体进入反应范围。因此，在这个区域的多孔材料在此有时称为“反应垫”。然而，在某些实施方案中，反应垫也是样品接收范围，因此也起接收及一般地过滤样品的作用。另外，由于膜与反应垫接触放置，反应垫用作其中清洗膜的实施方案中的清洗溶液最初的接收器。因此，反应垫也用作最初的清洗溶液接收垫。

当然，其它元件也可以包含在本发明的设备中以提供各种优点。所有的这些额外元件应理解为被本发明所包括。另外，可以包括提供额外优点的额外方法步骤，且包括在本发明中。本领域熟练技术人员能够包括这些元件和方法步骤，而不需过度的实验和不偏离本发明的全部范围和精神。

在实施方案中，设备以试剂盒提供。试剂盒可以以一套或多套相同的或多个不同的各种构造仅包括设备。另外，试剂盒可以包含其它材料，例如实施本发明的方法的至少一个实施方案必需的一些或全部材料、试剂和设备。

试剂盒本身可以由任何适当的材料，如纸板、塑料、金属或玻璃制作。纸板和塑料是试剂盒的优选材料。制作试剂盒以适当地含有由试剂盒提供的所有部件。因此，为容纳试剂盒要

提供的选择的各各种部件，将它们设计为具有适当的尺寸、形状、和强度。

由试剂盒提供的部件可以在一个或多个容器中。本发明设备的容器在上文描述并可以由任何适当的材料制成，其包括已知用于制作这种性质的设备的任何各种塑料材料。用于其它部件的容器可以由任何适当的材料制成，包括但不限于塑料(例如，聚合物材料)、玻璃、金属、和橡胶。容器可以是任何形状或形式，因此可以是，例如瓶子、小瓶、罐、坛、或袋，如由金属、塑料、橡胶、玻璃、或织物制成的那些。容器优选可再密封或自动密封以在最初打开后保存未使用的内含物。

因此，在实施方案中，试剂盒包括一个或多个设备(例如，10、20、25、30、50、100个)和至少一个含有用于实施本发明的至少一个实施方案的部件的容器。例如，试剂盒可包括独立密封或两个或多个一同密封在可再密封袋中的25个设备。任选地，该袋可以含有干燥剂以保持其在存贮期间的低含湿量。试剂盒也可以以任何适当的容器和量/体积包括以下部件的任何一种或多种：用于稀释原始样品的稀释液(优选水性的)；清洗缓冲液(优选水性的)；特异结合对成分(例如，用于结合样品中目标物质的结合物，其可以被点样在设备的多孔膜上的抗体结合)；底物(例如，用于酶反应的或在其它情况下产生可检测的信号底物)；阳性对照(例如，以已知亲和性与点样在设备的多孔膜上的抗体结合的已知同一性的抗原)；移液器(例如，将一种或多种试剂加入样品或设备的一次性移液器)；试管、手套、敷料器棒(applicator stick)、移液器头。本领域熟练技术人员能够想到试剂盒的其它任选部件，所有这些其它部件包含在本发明中。

优选至少设备在插入试剂盒之前、期间、或之后灭菌。优

选其它部件的一个、一些或全部在插入试剂盒之前、期间、或之后灭菌。在高度优选的实施方案中，试剂盒中的每一部件是无菌的，或者在试剂盒中独立于一个或多个其它部件或者一同已灭菌。可以通过任何已知方式灭菌，包括但不限于液体过滤、用电磁辐射照射(例如，UV、 γ 照射)、化学灭菌(例如，用灭菌剂如酒精擦拭)等。

使用试剂盒的一个或多个组件、或实施本发明的方法的说明可以包括在试剂盒中。该说明可以以单独的部件如在纸、卡片、塑料纸等上打印的材料提供。另外，该说明可以提供在试剂盒本身上，例如，在试剂盒的侧面或顶部或底部。另外，说明可以提供在试剂盒部件的容器上。

现在转向附图，其描绘了本发明的各种非限制性具体实施方案，以各种相互的空间关系描述了以上描述的元件，描述了为进行本发明的方法的本发明的设备的各种构造的使用。要理解提供在附图中的任何尺寸仅作为实例提供，设备的实际尺寸和形状不限于附图中提供的那些。例如，尺寸可以与在附图中示例的尺寸相当或比它们更大或更小。另外，要理解附图不一定以相互间正确的比例描绘所有元件，为清楚的目的或其它原因一些进行了放大。

图1描绘了本发明的设备1的通常的基本构造。描绘在图1中的设备包括贮存器100，其以垫110的形式包括多孔材料(在此也称为“反应室垫”)。该设备还进一步包括多孔膜120，其沿膜中心的单条线包含对于以共价、疏水、或离子键连接的目标物质的特异结合对成分130。用该设备的这个构造实施本发明时，将含有或怀疑含有目标物质的液体样品在任何范围施加于贮存器100。然后将多孔膜120与贮存器100的多孔材料110接触位置，以使膜120和材料110至少在特异结合对成分130所在的膜

110的范围上形成连续的接触表面。然后使存在于多孔材料110的液体能够扩散进入、穿出、通过和围绕膜120,使物质(如果存在)接触特异结合对成分130并特异地结合于它。在物质已经标记的实施方案中,可以在这点实现结合的检测。在标记物还没有连接到物质的实施方案中,可以标记特异结合对成分-物质复合物,然后检测。在实施方案中,包括清洗步骤以降低背景。当进行清洗时,清洗溶液施加于膜120并使其渗入多孔材料110,由此去除未结合到膜120的材料,提高信噪比。在实施方案中,样品中的物质首先被特异结合成分结合,该特异结合对成分被特异地结合到与膜相连的特异结合对成分(例如,结合物),给予这两个特异结合对成分时间以反应。

图1的设备1当与其它元件组合使用时在以下各点也称为“反应室”。

对于图2,描绘了包括含多孔材料210的贮存器200的本发明的设备2。在这个实施方案中,多孔膜220与多孔材料210接触以使多孔膜220与多孔材料210在特异结合对成分230的范围连续接触。在使用设备的这个构造实施本发明的方法时,将含有或怀疑含有目标物质的液体样品在除了与多孔膜220接触的范围以外的任何范围施加于贮存器。然后使存在于多孔材料的液体能够扩散进入、穿出、通过和围绕膜220,使物质(如果存在)接触特异结合对成分230并特异性地结合于它。在物质已经标记的实施方案中,可以在这点实现结合的检测。在标记物还没有连接到物质的实施方案中,可以标记特异结合对成分-物质复合物,然后再检测。在实施方案中,包括清洗步骤以降低背景。当进行清洗时,清洗溶液施加于膜220并使其渗入多孔材料210,由此去除未结合到膜220的材料,提高信噪比。

图3描绘了本发明的设备3的另一个实施方案,其中将包括

多孔材料310的贮存器300包含在容器335中，其中多孔膜320被固定器336固定。在这个实施方案中，固定器336和容器335由塑料制作。固定器336与容器335集成，两者通过在铰链338处相对挠性的塑料部分连接。在其它实施方案中，使用其它材料和/或其它结构，其包括但不限于在提供铰链功能中的使用。

用本发明的设备的这个构造实施本发明的方法时，在多孔材料310的任何范围，直接或通过存在于贮存器300和容器335之间的空间如在范围331内，将含有或怀疑含有目标物质的液体样品施加于贮存器300。然后将包括膜320的固定器336通过铰链338向下搬动，以使膜320与多孔材料310至少在特异结合对成分(未描绘出)存在的膜320的一部分接触。卡子或凸缘337衔接固定器336使膜320保持与材料310接触，如上所述。然后使存在于多孔材料310的液体能够扩散入和扩散出膜320，使物质(如果存在)接触存在于膜320上的特异结合对成分(未描绘出)，并特异地结合于它。在物质已经标记的实施方案中，可以在这点实现结合的检测。在标记物还没有连接到物质的实施方案中，可以标记特异结合对成分-物质复合物，然后再检测。在实施方案中，包括清洗步骤以降低背景。当进行清洗时，清洗溶液施加于膜320并使其渗入多孔材料310，由此去除未结合到膜320的材料，提高信噪比。

图4A描绘了本发明的设备4，其中改进图3的设备3以包括与多孔材料410接触布置的清洗溶液接收垫440。清洗溶液接收垫440由可以与反应垫410相同或不同的多孔材料制作。在这个实施方案中，清洗溶液接收垫440是与反应垫410分离的垫；然而，在其它实施方案中，反应垫410和清洗溶液接收垫440是同一元件，区别主要基于功能。

更具体地，将含反应垫410的贮存器400包含在容器435中，

该容器435不仅包含贮存器400还包含清洗溶液接收垫440。多孔膜420被固定器436固定。在这个实施方案中，固定器436和容器435由塑料制成，且固定器436与容器435是整体的，两者在铰链438通过塑料的相对挠性的部分连接。在其它实施方案中，使用其它材料和/或结构，以例如提供铰链功能。

用本发明的设备的这个构造实施本发明的方法时，在反应垫410的任何范围，直接或通过存在于贮存器400和容器435之间的空间如在范围431内，将含有或怀疑含有目标物质的液体样品施加于贮存器400。然后将包括膜420的固定器436通过铰链438向下转动以使膜420与反应垫410在特异结合对成分(未描绘出)存在的膜420的至少一部分接触。卡子或凸缘437衔接固定器436使膜420保持与反应垫410接触，如上所述。然后使存在于反应垫410的液体能够扩散进入和扩散出膜420，使物质(如果存在)接触存在于膜420上的特异结合对成分(未描绘出)，并特异性地结合于它。在物质已经标记的实施方案中，可以在这点实现结合的检测。在标记物还没有连接到物质的实施方案中，可以标记特异结合对成分-物质复合物，然后再检测。

在实施方案中，包括清洗步骤以降低背景。当进行清洗时，清洗溶液施加于膜420并使其渗入反应垫410，由此去除未结合到膜420的材料，提高信噪比。一般施加于膜420的清液溶液的量超过垫410的保持容量(holding capacity)，该垫410已经用含有目标物质的液体湿润(至少一部分)的。在这种情况下，过量清洗溶液(和部分原始液体样品)通过反应垫410进入清洗溶液接收垫440。

图4B描绘了在图4A中描绘的本发明的设备4的另一个构造，其中清洗溶液接收垫440位于反应垫410下方。该设备的操作原则与图4A中描述的相同。然而，在这个构造中，不优选液

体施加在反应垫410和容器435之间的空间。在该图中，所有的元件具有与图4A中的元件相同的特性。

图4C描绘了在图4A中描绘的设备的另一个构造，其中清洗溶液接收垫440和反应垫410通过可移动的液体不渗透挡板445分离。在这个构造中，不渗透挡板445置于清洗溶液接收垫440和反应垫410之间，且通过狭槽446延伸到容器435的外部而暴露突起447。用这个构造实施本发明的方法与以上对图4A描述的相似。然而，由于不渗透挡板445阻止液体迁移进入清洗溶液接收垫440，不渗透挡板445一般在膜420和反应垫410接触后和对膜420施加清洗溶液之前移走。以这种方式的使用也限制原始样品从施加/反应垫410流入清洗溶液接收垫440，直至样品扩散入和扩散出膜420已经进行了所需量的时间。描绘在这张图中的所有其它元件与对图4A描述的元件相同。

在描绘在图5中的设备的另一构造中，将描绘在图1中的基本设计改变以生产设备5，以使贮存器500的多孔材料510延伸超出反应室(即，大于多孔膜520的面积)以提供包括样品施加垫551的液体样品施加区域550。在描述的实施方案中，样品施加垫551和反应垫510相同。然而，在其它实施方案中，将这两个元件分离并安排为它们相互物理接触以使液体可以从一个流到另一个。用设备的这个构造实施本发明时，将含有或怀疑含有目标物质的液体样品在加样区域550内的任何范围施加于样品施加垫551。由于它的多孔性，样品施加垫551使所施加样品的至少部分迁移到反应垫510，在那里它可以再通过被动扩散迁移入和迁移出多孔膜520，使目标物质(如果存在)接触并结合到多孔膜520上的特异结合成分(未描绘出)。如果需要可以如以上描述地进行检测和清洗。

图6描绘设备6，其为描绘于图5的本发明的设备的构造，但

改进以包括用于样品施加垫651和反应垫610的容器635,且包括用于多孔膜620的固定器636。在这个特定的实施方案中,容器635包括使液体样品施加到样品施加垫651的开口或孔655。设备的这个实施方案的使用能够如以上所讨论地进行。

图7描绘设备7,其为描绘在图6中的设备的构造,其中清洗溶液接收垫740邻近并接触反应垫710来设置。用设备的这个构造实施本发明时,样品施加于样品施加垫751后,液体迁移到反应垫710且液体扩散入和扩散出多孔膜720,将清洗溶液加到膜720,过量的清洗溶液(连同原始液体样品的一部分)流动通过反应垫710进入清洗溶液接收垫740。除了特殊指明的那些元件,描绘在此图中的所有元件与图6和/或图5中的那些相同,其中描绘的同样的元件为从图到图相同的元件。

图8描绘设备8,其为本发明的设备的构造,其中反应垫810由与液体样品施加垫851和清洗溶液接收垫840相同的材料制作,但与样品施加垫851和清洗溶液接收垫840相比,通过固定器836施加的压力压紧。在本发明优选的实施方案中,压力施加于膜820上,其使反应垫810压紧。该压紧提高样品在反应垫810的保留,并促进样品在反应垫810和膜820间扩散。除了特殊指明的那些元件,描绘在此图中的所有元件与图7、图6和/或图5中的那些相同,其中描绘的同样的元件为从图到图相同的元件。

图9描绘设备9,其为本发明的设备的构造,其中反应垫910由与液体样品施加垫951和清洗溶液接收垫940相同的材料制作,但与样品施加垫951和清洗溶液接收垫940相比,通过由容器935从下方(相对于多孔膜920)施加的压力压紧。在此图中,压紧来自成型为提供这种效果的形状的容器935。然而,在其它的等同实施方案中,容器935包括在反应垫910上提供压力的额外元件。通过容器935的压力施加提供以上对图8描述的和本说

说明书的其它地方讨论的相同的优点。除了特殊指明的那些元件，描绘在此图中的所有元件与图8、图7、图6和/或图5中的那些相同，其中描绘的同样的元件为从图到图相同的元件。

图10显示本发明的设备10的构造，从顶部看设备10的外面。在该图中，加样孔1055位于设备10的一端，多孔膜1020上方的设备10的开口设置检测窗1060，通过该窗可以观察目标物质(和任选的一个或多个对照反应)的存在的检测。孔1055和窗1060位于容器1035上。用设备的这个实施方案实施方法时，将样品加入位于口1055之下或附近的施加垫或反应垫，直接加到垫或加到垫与容器1035之间的空间。样品或其部分沿着垫移动至少直到它与膜1020接触，优选通过膜1020之下的反应垫(未描绘出)。样品的扩散进入、穿出、穿过和漫过膜1020使样品中的目标物质能够与连接于膜1020的特异结合对成分(未描绘出)接触。结合于膜上的特异结合对成分的物质检测可以通过透过窗1060观察膜而发生。

图11显示描绘于图10中的设备11的另一个构造。在这个构造中，加样口1155位于设备11的一角，检测窗1160和膜1120位于中间。用设备的这个实施方案实施本发明的方法时，将样品加到位于口1155之下或附近的施加垫或反应垫(未描绘出)，直接加到垫或加到垫与容器1135之间的空间。样品或其部分沿着垫移动至少直到它与膜1120接触。样品的扩散进入、穿出、穿过和漫过膜1120使样品中的目标物质能够与连接于膜1120的特异结合对成分接触。结合于膜上的特异结合对成分的物质检测可以通过透过窗1160观察膜发生。

图12显示本发明的设备12的构造的顶视图，其中多孔膜1220包含对目标物质特异的特异结合对成分1230和阳性对照1270。在这个构造中，两个元件都位于膜1220上以致它们在由

检测窗1260确定的范围内。没有具体讨论的描绘在图12中的所有元件与描绘在图11中的元件相同，且都具有相同的功能。根据以上公开进行本发明的方法的实施。实施使用此设备的这个实施方案的方法能够检测单一样品的未知物质同时提供设备和方法的性能的阳性对照。

图13显示本发明的设备13的构造，其中容器1335内的单一的样品施加垫1351分叉连接至两个分离的反应垫1310a和1310b，其每一个至少一部分位于不同的多孔膜1320a和1320b及不同的清洗溶液接收垫1340a和1340b之下且与它们接触。多孔膜1320a和1320b包含特异结合对成分1330a和1330b，其每一个对不同的物质特异。在设备的这个构造中，本发明的方法可以用于检测单一液体样品中两种不同的物质。在实施方案中，物质之一(天然的或添加的组分)已知存在于样品中，因此一张膜(1320a或1320b)作为方法和设备的阳性对照。

图14A描绘本发明的设备14的构造，其中样品施加垫1451延伸超过由容器1435确定的设备14的内部范围。样品施加垫1451与过滤垫1470、反应垫1410和清洗溶液接收垫1440是整体的。反应垫1410至少一部分在包含特异结合对成分1430的膜1420之下并与之接触。使用本发明的设备的这个构造实施本发明时，样品施加垫1451通过浸入液体、插入液体流(如尿流)中、借助移液施加样品于垫等与液体样品接触。液体样品穿过施加垫1451进入过滤垫1470中。在实施方案中，结合到目标物质的标记物(未描绘出)存在于过滤垫1470中并被液体溶解。标记物在通过过滤垫1470期间(和/或检定期间较晚的时间)结合于存在于样品中的物质。液体样品再通入反应垫1410，并扩散进入、通过、穿出和围绕膜1420。在实施方案中，结合到目标物质的标记物存在于反应垫1410表面中和/或反应垫1410表面上，并被

液体溶解。标记物在经过反应垫1410期间(和/或检定期间较晚的时间)结合到存在于样品中的物质。从反应垫1410扩散进入、通过、穿出、和围绕膜1420使目标物质(如果存在)或底物-标记物复合物与特异结合对成分1430接触。在使用直接标记物的实施方案中,它可以在较早的时间结合到物质(如以上刚描述的),或可以在物质结合到特异结合对成分的同时或之后结合到物质。一旦形成特异结合对成分-物质-标记物复合物,就可以检测物质的存在。在其中使用间接标记物的实施方案中,标记物可以在以上描述的任何时间加入。一旦形成特异结合对成分-物质-标记物复合物,可能存在于膜上的任何过量的标记物和其它物质就可以通过向膜1420施加清洗溶液洗去。清洗溶液通过膜1420并进入反应垫1410。由于有超过反应垫1410负载能力的过量的清洗溶液,液体被驱动进入清洗溶液接受垫1440、过滤垫1470或两者中。因为清洗溶液接收垫1440通常是干燥的或基本干燥(由于选择适当的体积量在施加区域1451加入),而过滤垫1470至少一部分湿润,清洗溶液接收垫1440通常吸收施加到膜上的清洗溶液的大部分。清洗可以重复必要的很多次以得到适当的信噪比。清洗后,可以加入用于间接标记物的底物,如果需要可以进行另一轮清洗以降低背景信号。特异信号的检测表明在原始样品中存在目标物质。

图14B描绘了图14A中描绘的设备14的另一个实施方案。在图14B的设备中,施用器垫1451包括吸收性塑料材料,将包含结合到目标物质的酶结合物的样品如尿直接施加到其上。样品加酶的结合物移动通过与施加垫1451为一个整体的过滤垫1470,并通过由容器1435已压紧的过滤垫1470进入容器1435。样品加酶的结合物移动通过过滤垫1470进入反应垫1410,该反应垫与过滤垫1470为一整体并已被容器1435以与过滤垫1470相

似的方式压紧。如果目标物质存在，在通过样品施加垫1451、过滤垫1470或反应垫1410期间，它将在施加前一混合就与酶结合物反应。使样品与膜1420接触足够的时间以使物质(或物质-标记物结合物复合物)扩散进入、穿出和通过膜1420，以接触特异结合对成分1430(未示出)并形成复合物。然后将清洗溶液施加到膜1420上，过量的清洗溶液移动通过膜1420，至少进入清洗溶液接收垫1440。通过检测由膜1420在特异结合对成分1430(未示出)处或附近产生的信号进行样品中物质的存在或不存在的检测。

图14C描绘了图14A和图14B中描绘的设备14的另一个构造。在这个构造中，样品施加垫1451、过滤垫1470、反应垫1410或这些的两者或全部的组合包含金结合物。特异地结合到目标物质的金结合物，当它穿过垫时，被施加的液体样品溶解并结合到物质(如果存在)。借助扩散进入、穿出、通过和围绕膜1420，液体(未过滤)一旦与膜1420接触，物质-金结合物就结合到特异结合对成分1430(未示出)，结果在液体与膜1420接触的约30秒之内或以上在特异结合对成分1430处或附近产生可检测的信号。液体中物质的存在通过在检测窗1460处的信号的检测(通常用肉眼)来测定而无需清洗步骤。

图15描绘本发明的设备15的构造。如图15A所示，容器1535为“蚌壳”型容器，其中上半部1535a和下半部1535b通过挠性的铰链1580沿边缘相互连接。

尽管在图中未描绘出，在实施方案中，膜的固定器与上半部1535a集成并确定了检测窗口的边缘。加样口也集成到上半部1535a并由上半部1535a中在施加垫上方位置的开口确定。上半部1535a还包括一个或多个销子或容纳销子的凹口，其中使销子与凹口的套合带来保持上半部1535a和下半部1535b在一起的摩

擦适配。

在通常的实施方案中，下半部1535b含有样品施加垫、过滤垫、反应垫和清洗溶液接收垫。它一般还包括一个或多个容纳销子的凹口或一个或多个销子，其中凹口与销子的套合(engagement)带来保持上半部1535a和下半部1535b在一起的摩擦适配。

图15B描述图15A中描述的设备15的一个实施方案的下半部的顶视图。在图中，样品施加垫1551与过滤垫1570、反应垫1510、和清洗溶液接收垫1540集成，其全部为2.2cm宽。反应垫1510比样品施加垫1551、过滤垫1570、反应垫1510、和清洗溶液接收垫宽出0.3cm(每边宽出0.15cm)以完全支承测量为0.75cm长×2.5cm宽的膜1520(未描绘出)。摩擦适配定位杆凹口(friction fit alignment post recesses)1581与钳位杆(clamp post)1582一样，作为容器1535b的部分存在。

图15C显示从在图15A和/或图15B中描绘的设备15的侧面的横截面，其中上半部1535a位于上方，但不与下半部1535b接触，其中为了描述的目的去掉铰链以使上半部和下半部对准。该图表明加样口1555和观察或检测窗1560的布局。

图15D是从在图15A、15B和/或15C中描绘的设备15的侧面的横截面，其中上半部和下半部通过摩擦适配连接。从图中可以看出，在这个实施方案中，上半部1535a和下半部1535b的连接导致反应垫1510在膜1520与反应垫1510接触的范围处和附近压紧。

图16描绘本发明的设备的另一个实施方案。在图16A中，设备以其关闭的状态描绘。在16B中，设备以其打开的状态描绘。在这个实施方案中，设备16包括含上半部1635a和下半部1635b的铰链的塑料容器。下半部1635b包括样品加载口1655，

并含有液体样品加载垫1651、过滤垫1670、和反应垫1610的一体化结合。上半部1635a通过挠性铰链1680连接到下半部1635b,其由与容器1635的其余部分相同的塑料材料制作。上半部1635a含有清洗溶液接收垫1640和多孔膜1620。多孔膜1620包括至少一种特异结合对成分(未描绘出)。

当处于关闭位置时,膜1620夹在反应垫1610和清洗溶液接收垫1640之间,且与两个垫接触,接触是在反应垫1610和膜1620之间在包括至少一种特异结合对成分(未描绘出)的膜1620的至少一部分上进行。样品通过施加口1655加到施加垫1651,样品移动通过施加垫1651和过滤垫1670进入反应垫1610。存在于反应垫1610的样品的部分扩散入和扩散出膜1620,并与特异结合对成分接触,其中,目标物质(如果存在)结合到特异结合对成分,并保留在膜1620上。

在物质与特异结合对成分反应足够量的时间后,通过两个活动的铰链1680的移动将上半部1635a与下半部1635b分离。如果使用直接标记物,它可以在这时加入或它可能已经存在于反应垫1610、过滤垫1670或施加垫1651,且已经结合到目标物质。当使用直接标记物时,物质存在的检测可以在这时进行,或可以清洗膜1620以提高信噪比。如果进行清洗,将清洗溶液加到膜1620,清洗溶液被清洗溶液接收垫1640吸收(流动通过膜1620后)。如果使用间接标记物,在上半部1635a和下半部1635b分离后,将标记物(或用于标记物的底物,如果标记物已经掺入施加垫1651、过滤垫1670、或反应垫1610)施加到膜1620,并使其与膜1620保持接触足够量的时间以与特异结合对成分结合的物质反应。然后将清洗溶液如上所述施加到膜1620。必要时,随后将间接标记物的底物施加到膜1620并使其保持接触足够量的时间以形成标记物和标记物底物间的复合物,或产生可检测的信

号。

图17描绘设备17，其显示其中在容器1735中液体不渗透塑料膜1745置于反应垫1710和清洗溶液接收垫1740之间的本发明的实施方案。在这个实施方案中，将已经净化去除大颗粒物质且其中已经加入结合物的液体样品施加到膜1720并使其流动进入反应垫1710，该反应垫与膜1720接触。提供充分的时间使样品在在反应垫1710和膜1720间扩散以使目标物质(如果存在)结合到至少一种特异结合对成分(未描绘出)。足够量的时间后，通过抽动突出板1747移走不渗透挡板1745。将清洗溶液施加于膜1720，过量的清洗溶液和未结合的底物、结合物、和结合物-底物复合物从膜1720清洗进入反应垫1710，然后再进入清洗溶液接收垫1740。然后再通过来自或靠近特异结合对成分(未描绘出)的信号的直接检测或通过加入用于标记物的底物来实现物质存在的检测。可以在这时进行一步或多步进一步的清洗。

图18描绘本发明的设备的另一个构造。在这个构造中，设备18包括容器1835，其包括邻近或连接于反应垫1810和膜1820设置的样品口1855和样品施加垫1851。清洗溶液接收垫1840位于反应垫1810下方且通过不渗透膜1845与反应垫1810分离。通过拉动突出板1847移走不渗透膜1845使清洗溶液接收垫1840和反应垫1810直接接触，并提供从膜1820到清洗溶液接收垫1840的连续流动。在实际中，除了样品加在加样口1855而非通过膜1820加入，设备的这个构造以与对图17描述的相似的方式使用。

图19描绘与图16中描绘的相似的本发明的实施方案。图19A描绘关闭位置的设备。图19B描绘打开位置的设备。从图19A中可以看到，设备19包括含通过铰链1980连接的上半部1935a和下半部1935b的容器。上半部1935a包括反应垫1910，其与样品施加垫1951集成并由固定器1936固定在适当位置。膜

1920位于反应垫1910和清洗溶液接收垫1940之间，并通过由固定器1936施加在膜1930上的压力与两者直接物理接触。下半部1936b包括与膜1920直接物理接触的清洗溶液接收垫1940。在用设备的这个构造实施本发明的方法的一个实施方案时，如图19A和19B的组合中所描述的，将样品(标记物结合物已经加到其上)施加到样品施加垫1951(其与反应垫1910和过滤垫1970集成)，使样品的液体移动到反应垫1910并扩散入和扩散出膜1920。将清洗溶液加到样品施加垫1951并通过液体的牵引通过反应垫1910和膜1920进入清洗溶液接收垫1940，结果其干燥。然后，将用于标记物结合物的底物施加到膜1420，通过围绕铰链1980的旋转使两半部1935a和1935b分离，因此露出膜1920。通过目视或非目视检测方法借助检定来自或邻近点样在膜1920上的特异结合对成分(未描绘出)的至少一种发出的信号来检测物质的存在。

图20是包括容器2035的本发明的设备20的构造，其中，施加垫2051与反应垫2010集成，且其中施加口2055位于膜2020和检测窗2060之上/下且在相对侧。清洗溶液接收垫2040与样品施加垫2051和反应垫2010直接接触且相对于施加口2055和检测窗2060来说位于这些垫的侧面。在用本发明的这个构造实施本发明的方法的实施方案时，将样品(结合物已经加到其上)通过施加口2055施加到施加垫2051，使样品穿越进入反应垫2010，并在反应垫2010与包含至少一种特异结合对成分(未描绘出)的膜2020间扩散。液体样品已经完全或基本完全牵引进入施加垫2051和反应垫2010后，将设备20颠倒，垫2010和膜2020间所需量的扩散发生。将清洗溶液施加到膜2020，并通过反应垫2010和样品施加垫2055牵引进入清洗溶液接收垫2040。根据已知方法和以上所公开的，将用于结合物的底物加入，并进行液体中

目标物质存在的检测。对于使用间接标记物的所有其它实施方案，优选温育(incubation)底物和标记物以获得最优的信号强度。

图21描绘本发明的设备的一个实施方案，其也在以下实施例中参考。通常，实施方案包含以上对其它实施方案讨论的元件。图21中描绘的设备的一个特殊的实施方案中，设备包括开在多孔膜上的反应窗，该多孔膜包括点样在其上的固定的抗体的两条线。例如，它可以包含具有抗*C.difficile*毒素A、毒素B、或两者的抗体的试验线(或“T”线)。它也可以包含第二条线(或“C”线)以用作内部对照，例如具有抗-IgG抗体或其它对其它抗原特异的抗体。在使用中，设备能够检测样品中目标物质，如毒素A和/或B的存在。例如，可以将样品加入含有稀释液(例如，含有0.02%乙基汞硫代水杨酸钠的缓冲蛋白溶液)和结合物(例如，在0.02%乙基汞硫代水杨酸钠的缓冲蛋白溶液中的对偶联于辣根过氧化物的毒素A特异的小鼠单克隆抗体和对偶联于辣根过氧化物酶的毒素B特异的山羊多克隆抗体)的混合物的管中。然后将稀释的样品-结合物混合物加到样品孔，其为在设备的外壳上的开口，且其开在用于接收样品的范围的多孔材料(过滤垫)上，其远离反应窗。通过样品孔将稀释的样品加到多孔材料后，设备可以在适当的温度下，例如室温，温育足够量的时间，例如15分钟。在温育期间，目标物质(例如，毒素A和/或B)(如果存在于样品中)结合到结合物(例如，抗毒素抗体-过氧化物酶结合物)。将样品施加到设备中后，物质-结合物(例如，毒素-抗体)复合物(如果存在)迁移通过至少一种多孔材料到达含有固定抗体的多孔膜。提供足够量的时间(例如，一分钟)使复合物扩散入和扩散出多孔膜。复合物(如果存在)被线上固定的抗体俘获。然后可以任选地用清洗缓冲液(如含有0.02%

乙基汞硫代水杨酸钠的缓冲溶液)至少在包含部分线的范围清洗多孔膜。随后可以添加底物(例如含四甲基联苯胺的溶液)来开发该设备。温育期(例如, 10分钟)后, 可以通过例如目视检查在反应窗下多孔膜上存在“T”线的范围线(例如, 蓝线)的出现来确定试验线处复合物的存在。在这个范围的线表明阳性检测结果。当线(例如, 蓝线)存在于反应窗下多孔膜上“C”的范围, 阳性对照反应已经发生, 其表明设备和方法正常工作, 结果(目标物质存在或不存在)是有效的。当试验对照物时, 对照物可以包括点样在膜上在“C”线上的抗体的适当的抗原, 例如缓冲水溶液中的抗原。图21A-D描绘了在此描述的线, 并表示各种可能的结果。

因此, 本发明提供检测液体样品中至少一种目标物质的方法, 该方法包括: 提供包含或怀疑包含目标物质的液体样品; 将液体样品以足够量施加到多孔材料上以至少部分湿润多孔材料; 使多孔材料与包含至少一种能够直接或间接结合目标物质的特异结合对成分的多孔膜接触; 保持多孔材料和多孔膜接触足够量的时间, 使存在于多孔材料中的液体扩散进入、穿出、通过、和/或遍及于多孔膜, 其中液体扩散进入、穿出、通过、和/或遍及于多孔膜导致欲结合的目标物质(如果存在)直接或间接地接触特异结合对成分; 检测包含特异结合对成分和目标物质的复合物的存在或不存在, 其中至少一种复合物的存在表明液体样品中至少一种目标物质的存在。在实施方案中, 该方法可以进一步包括提供包含多孔材料和多孔膜的设备。在实施方案中, 多孔材料过滤液体样品以去除具有大于预定值尺寸的物质。在实施方案中, 过滤借助液体样品的液体的不连续渗透通过多孔材料进行。在实施方案中, 该方法可以与包含两种或多种目标物质的液体联合使用, 可以使用本发明的单一设备和/

或的方法单一实施检测这些物质的一种、两种、或多种。因此，在方法的某些实施方案中，每一种目标物质与每一种其它目标物质互不相同，该方法检测它们的一种、两种、或多种。该方法可以对含有粪便、血液、食物、或环境样品(例如，地下水中的毒素物质)的液体样品实施。在示例性的实施方案中，该方法检测 *Clostridium difficile* 毒素 A 和 *Clostridium difficile* 毒素 B 之一或两者。在实施方案中，目标物质是一种或多种毒素、细菌、病毒、细菌产物、酶(例如，原核的、真核的)、或寄生虫。在一些实施方案中，目标物质是谷氨酸脱氢酶。它也可以是动物和人类产物、抗体或乳铁蛋白。

可以使用一种或多种特异结合对成分实施该方法。在实施方案中，特异结合对成分的一种或多种是抗体，其中每一种抗体与一种或多种的其它抗体相同或不同。

通常方法可以进一步包括在检测复合物的存在前清洗膜。

在实施方案中，施加液体样品到多孔材料包括在与多孔膜空间分离的多孔材料上的位置施加液体样品，由此至少液体样品的液体移动进入多孔材料，再进入多孔膜。在某些实施方案中，施加在远离检测区域的样品加载区的区域的液体样品通过渗透过程穿过多孔材料至多孔膜。在实施方案中，将物理力施加到膜、多孔材料、或两者，这种力提高本发明的设备和方法的灵敏性。

本发明的方法包括检测信号以确定目标物质的存在。在实施方案中，检测包括观察从结合到目标物质的标记物发出的信号。在特殊的实施方案中，信号由形成在特异结合对成分中或其周围的有色沉淀产物产生。因此可以通过检测复合物来检测。因此，该方法可以包括使标记的结合物与液体样品在将液体样品施加到多孔材料之前结合。标记的结合物可以包括结合到底

物以产生可检测的信号的乳胶珠或其它有色的颗粒、胶体金颗粒或反应性物质。在一些实施方案中，信号是不可见的信号。

本发明包括检测至少一种液体样品中目标物质的设备。在实施方案中，该设备包括：(a)包括用于接收液体样品的多孔材料的贮存器，其中多孔材料能够吸收和传输该液体样品的至少一部分，和(b)包含对目标物质或结合到目标物质的物质特异的特异结合对成分的多孔膜，其中贮存器和多孔膜各自成形以使多孔膜与多孔材料在包含特异结合对成分的多孔膜的至少一部分上直接接触。该设备可以包括含贮存器的容器、用于多孔膜的固定器、清洗溶液接收垫、液体样品施加垫、过滤垫、或这些元件的两个或多个。每个元件可以再分为两个或多个功能区域，尽管其可以任选地由相同材料制作，也可以由不同于一个或多个其它区域的材料制作。

在实施方案中，设备包括含反应垫的容器，该反应垫包括多孔材料和多孔膜，该容器包括用于多孔膜的固定器，其中该容器引起压力施加在多孔膜和/多孔材料上以使多孔材料的至少一部分压紧。当然，容器可以含有如以上所讨论的其它元件。多孔材料的压紧可以使多孔膜与多孔材料在多孔膜的至少一部分直接接触，并能够提高本发明的设备和方法的功能。例如，压力可以使一种或多种液体通过被动扩散在多孔膜和多孔材料间通过。

本发明因此提供用于检测液体样品中至少一种目标物质的设备，其中该设备包括：(a)包括用于接收液体样品的多孔材料的贮存器，其中多孔材料能够吸收和传输该液体样品的至少一部分，和(b)包含对目标物质或结合到目标物质的物质特异的特异结合对成分的多孔膜，其中贮存器和多孔膜各自成形以使多孔膜与多孔材料在包含特异结合对成分的多孔膜的至少一部分区

域直接接触，其中多孔膜和多孔材料是具有不同化学组成的不同元件。在实施方案中，多孔膜和多孔材料物理接触以使施加到多孔材料上的液体样品扩散进入、穿出、通过、和遍及于多孔膜。另外，可以建造设备以致产生多孔膜和多孔材料间的物理接触以提高设备的灵敏度。可以构造设备以致使多孔材料和多孔膜相互接触以使目标物质不需要对设备以单向的方式穿越多孔膜以检测目标物质。在示例性实施方案中，多孔材料和多孔膜以这样的方式相互接触，以致液体在两者间简单、无方向的扩散发生。

本发明因此提供用于检测液体样品中目标物质的存在或量的设备，该设备包括：用于接收液体样品的样品接收区域，其中该样品接收区域存在于多孔材料上；用于过滤在样品接收区域接收液体样品的样品过滤区域，其中该样品过滤区域存在于多孔材料上；在检测区域包含与目标物质或结合于目标物质的物质特异地结合的特异结合成分的多孔膜，其中该多孔膜是与任何多孔材料不相同的元件，其中该多孔材料和多孔膜至少在包含检测区域的一部分的范围物理接触，且其中该多孔材料和多孔膜以这样的构造物理接触：使存在于液体样品中的液体在包含检测区域的至少一部分的范围以基本无规、无方向的方式扩散进入、穿出、通过、及遍及于多孔膜。当然一个或多个区域可以存在于单一多孔材料或两种或多种不同的材料上。同样，它们可以存在于两种或多种不同的材料上，每种独立地选择以与一种或多种其它材料具有相同或不同的组成。如以上所提及的，设备可以包括含多孔材料和多孔膜的至少一部分的容器。在实施方案中，设备包括含清洗溶液接收区域的多孔材料。

将本发明的设备的其它示例性实施方案及在实施本发明的方法中的设备的使用提供在以下的实施例中，其它将由描述和

附图显而易见。

实施例

通过以下实施例将进一步解释本发明，其意欲为本发明纯粹的示例性说明，不应该认为在任何方面限制本发明。

实施例1: 本发明的设备和方法的实施方案的使用

如图21A-D所描绘的，本实施例详述了在本发明的设备的实施方案中本发明的方法的实施方案的典型体内使用和体内使用的指南，其中检测*Clostridium difficile*毒素A和B。该方案通常依照提供在TOX A/B QUIK CHEK™ kit(TechLab, Blacksburg, VA; cat. no. T5033)中的方案，其在这里完整引入以作参考。除非另有说明，提供在TOX A/B QUIK CHEK™ kit中的方案用于实施例。一般性指南提供在实施例和TechLab kit中，但不一定适用于本发明的方法的其它实施方案。

- 收集和处理的粪便样品 -

用于粪便样品的标准收集和处理的步骤是适当的。样品应该存放在2℃至8℃。优选存放24小时内的测试样品。如果不能在收集的72小时内进行测试，优选冷冻存放样品(低于或等于-10℃)。当数据表明一个冷冻-解冻循环不损害样品用于*C. difficile*毒素A和B，注意样品的冷冻和解冻，尤其是多次，可能导致由于毒素的降解引起的活性损失。已经保存在10%福尔马林、MF、SAF或PVA中的粪便样品或在运输介质如Cary Blair或C&S中的样品不如新鲜的样品或保存在其它组成中的那些给出最优的结果。

样品应该在进行检测之前彻底混合(例如，涡旋)。不推荐在稀释液中存放粪便样品。优选粪便样品一旦在稀释液中稀释立即测试样品。可以使用刻度为50、100、200和300μl的一次性移液器。

- 样品制备 -

- 任选使用前使所有的试剂和设备到达室温。

- 对每个欲检测的样品准备一个盒(设备)。

- 用塑料滴管将0.4ml - 0.6ml(例如, 0.425ml或0.5ml)稀释液加到每一个稀释试管中。

- 转移前均匀悬浮(例如, 涡旋)样品。对于液体/半固体样品, 吸取样品至从端部到第一刻度线的一半(25 μ l)。悬浮样品至稀释液中。使用相同的移液器通过轻轻地抽吸混合稀释的样品, 然后分配混合物数次。对于成形的/固体样品, 充分混合样品。使用木制施用器棒转移样品的一小部分(约2mm直径)至稀释液中。使用施用器棒乳化样品。作为任选的对照物, 将1滴阳性对照物或阴性对照物(样品稀释液)加到含有0.4ml稀释液的管中。

- 将1滴结合物加到稀释的样品中并借助涡旋混合管的内含物。

- 测试步骤 -

- 获取所需数目的盒, 每个样品一个, 每个阳性对照或阴性对照一个。适当地标记膜盒。

- 获取制备的样品。使用一次性移液器, 转移300-400 μ l稀释的样品 - 结合物混合物至盒的样品口并在室温下使盒温育15分钟。在结果窗中将看到正在增大的湿润范围。如果没有湿润范围出现在结果窗中, 将100 μ l稀释液加到样品口并再等5分钟。

- 15分钟后, 将300 μ l清洗缓冲液加到反应口。使清洗缓冲液完全进入反应口。

- 将2滴底物加到反应口并使盒在室温下温育10分钟。在10分钟结束时, 从检测窗读取结果。观察代表对照线的有色线(例如, 蓝线)的出现(见图21A)。线可以出现颜色弱至暗。

- 对结果的解释 -

阳性结果(图21A): 可以见到两条线, 一条在反应口的底部(对照线), 一条在反应口的顶部(测试线)。阳性结果表明存在 *C. difficile* 毒素和适当的活性对照物。

阴性结果(图21B): 仅在反应口的底部见到单一对照线。在反应口的顶部未见检测线。阴性结果表明不存在 *C. difficile* 毒素但存在适当的活性对照物。

无效结果(图21C和21D): 所有完成的反应应该在反应口的底部具有可见的对照线。如果在完成的盒上不存在对照线, 测试无效。

实施例2: 使用本发明的设备和组织培养检测 *Clostridium difficile* 毒素 A 和 B 的比较

本发明的设备的实施方案用于检测 50 个粪便样品中 *C. difficile* 毒素 A 和毒素 B 的组合, 并将结果与对相同的样品使用组织培养方法获得的结果比较。粪便样品中 *C. difficile* 毒素的组织培养检测是选择的本领域认可的检定, 因为认为它是检测毒素最灵敏的方法。实施例 1 中描述的方法用于检测毒素。

组织培养测试是由 TechLab, Inc.(cat. no. T5003) 制造的 *C. difficile* Tox-B Test kit, 步骤描述在产品插件中。简单地说, 将粪便样品用稀释液稀释 1:10 并通过 0.45 微米无菌滤器过滤。每一个粪便样品 (50 微升) 加到两个组织培养孔的每一个。一个孔接收 50 微升抗毒素以中和 *C. difficile* 毒素 A 和 B, 另一个孔接收 50 微升仅磷酸盐缓冲盐水。将人类的包皮组织培养的细胞在 37 °C 下温育 24 小时, 然后检查细胞的变圆 (rounding), 再在 48 小时检查。其中大于 50% 的细胞为圆形的孔认为是阳性。对于阳性整个反应, 含有抗毒素的孔应该是正常的, 而没有抗毒素的孔显示细胞的变圆。

表1显示检定的结果,并将本发明的方法和设备的结果与组织培养检定的比较。

表1:

N=50	A/B发明 阳性	A/B发明 阴性
组织培养物阳性	8	0
组织培养物阴性	1	41

灵敏性	88.9
特异性	100.0
制备的阳性值	100.0
制备的阴性值	97.6
相关性	98.0

结果表明本发明的设备和方法与组织培养表现得几乎相同。

实施例3: 使用本发明的设备和检测ELISA *Clostridium difficile*毒素A和B的比较

本发明的设备用于检测50个粪便样品中*C. difficile*毒素A和毒素B的组合,并将结果与对相同的样品使用ELISA获得的结果比较。实施例1中描述的方法用于检测毒素。

根据产品插件中的说明将TechLab, Inc. Tox A/B Test kit用于该实验。简单地讲,将粪便在样品稀释液中稀释1:5,并将100微升加到ELISA96孔板的孔。然后将50微升结合物溶液(含有已经结合到辣根过氧化物酶上的*C. difficile*毒素A和B的抗体)加到每个孔。孔在37℃下温育50分钟,然后将孔清洗以去除已经结合到毒素(已经结合到覆盖孔的抗体)的辣根过氧化物酶结合物。再通过加入100微升底物溶液并温育10分钟,接着加入50微升稀酸以停止反应来检测抗体和酶的夹层结构。阳性反应为具有450nm处的光密度大于0.12的那些孔。

表2显示检定的结果,并将本发明的方法和设备的结果与

ELISA检定比较。

表2:

N=50	A/B发明阳性	A/B发明阴性
C. DIFF. A/B II阳性对照	8	1
C. DIFF. A/B II阴性对照	1	40

灵敏性	88.9
特异性	97.6
预测的阳性值	88.9
预测的阴性值	97.6
相关性	96.0

结果表明本发明的设备和方法产生与使用的灵敏的ELISA方法可比较的结果。

实施例4: 研究本发明的设备和方法的相对灵敏度

测定本发明的设备和方法的灵敏性。使用的设备和方法是用于毒素A和B的 *TOX A/B QUIK CHEK™* 测试(TechLab, Inc.)的设备和方法。简单地讲,使用高度纯化的毒素A和B的系列两倍稀释液测定设备和方法的灵敏度。

对毒素A在浓度0.63ng/mL,对毒素B在浓度1.25ng/mL下测试始终为阳性。用一系列稀释的毒素A或毒素B测试的六个单独的测试(测试1至6)结果示于下表。

表3: 高度纯化的毒素A在 *TOX A/B QUIK CHEK™* 测试中的反应

	测试1	测试2	测试3	测试4	测试5	测试6
浓度 (ng/ml)						
1.25	+	+	+	+	+	+
0.63	+	+	+	+	+	+
0.32	+	+	-	+	+ / -	+ / -
0.16	-	-	+ / -	-	-	-
0.08	-	-	-	-	-	-

表4: 高度纯化的毒素B在TOX A/B QUIK CHEK™测试中的反应

	测试1	测试2	测试3	测试4	测试5	测试6
浓度 (ng/ml)						
1.25	+	+	+	+	+	+
0.63	-	-	-	-	+	+
0.32	-	-	-	-	-	-
0.16	-	-	-	-	-	-
0.08	-	-	-	-	-	-

示于表3和4中的数据代表在进行的特殊检测中获得的特殊结果。在其它检测中,经常可以看到对毒素A为0.16,对毒素B为0.32至0.63的灵敏度。

实施例5: 本发明的设备和方法的重现性和精度

为了测定本发明的设备和方法的重现性和精度,根据TechLab TOX A/B QUIK CHEK™测试提供的方案,如图21所描绘的,本发明的设备的实施方案使用本发明的方法的实施方案来测试。更具体地,在三个不同的实验室根据制造商的说明使用TOX A/B QUIK CHEK™ test(TechLab, cat. No. T5033)测试总共8个粪便样品、6个阳性和2个阴性。为了挑战临界值,在6个阳性样品中包括当通过本发明人分析时给出微弱线的2个弱阳性样品。将所有的样品通过被广泛认为是对*C. difficile*毒素A和B的存在高度灵敏和精确的测试的判断设备(predicate device)*C. DIFFICILE TOX A/B II*™ test(TechLab, cat. No. T5003)分类。所有的样品在 $\leq -10^{\circ}\text{C}$ 保持冷冻直至进行检定。每个实验室在不同的3天测试样品。将每个实验室的结果随后提交给本发明人并与本发明人自己的结果比较。以下显示的结果在不同的场所一致,并显示100%的相关性。在所有使用TOX A/B QUIK CHEK™ test的场所,阳性样品确定为阳性,阴性样品确定为阴性。

表5:使用根据本发明的设备和方法由本发明人测试粪便样品的重现性/精度

样品代码 (n = 8)	TOX A/B II TM ELISA	第一天	第二天	第三天
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
百分相关性	N/A	100	100	100

表6:使用根据本发明的设备和方法测试粪便样品的的外部重现性/精度

样品代码 (n = 8)	TOX A/B II TM ELISA	第一天	第二天	第三天
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
百分相关性	N/A	100	100	100

表7:使用根据本发明的设备和方法测试粪便样品的的外部重现性/精度

样品代码 (n = 8)	TOX A/B II TM ELISA	第一天	第二天	第三天
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+

TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
百分相关性	N/A	100	100	100

表8: 使用根据本发明的设备和方法测试粪便样品的外部重现性/精度

样品代码 (n = 8)	TOX A/B II TM ELISA	第一天	第二天	第三天
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-
百分相关性	N/A	100	100	100

如可看到的，设备和方法在四个不同操作者手中进行得良好。

实施例6: 冷冻 - 解冻对样品的影响

为了进一步表征根据本发明的设备和方法，设备的一个实施方案与根据本发明的方法联合使用以测定对已经进行至少一个冷冻 - 解冻循环的样品各自的适宜性。

使用如图21所描绘的本发明的设备的实施方案和本发明的方法的实施方案，其二者可在来自TechLab, Inc.(cat. no. T5033)的TOX A/B QUIK CHEKTM test中得到，于一个冷冻 - 解冻循环前后检测由6个阳性样品和2个阴性样品组成的总共8个粪便样品。这些样品以前已在C. DIFFICILE TOX A/B IITM (TechLab, Inc.; cat. no. T5033)测试中测试过毒素A和B的存在或不存在。结果见下表。还包括冷冻 - 解冻循环后C. DIFFICILE TOX A/B IITM test中残留的活性。结果表明冷冻 - 解冻循环后阳性样品仍为阳性，阴性样品仍为阴性。在任何样品中未观察到

阳性至阴性或阴性至阳性的转化。

表9: 冷冻 - 解冻循环对本发明的设备和方法的影响

样品代码 (n=8)	TOX A/B II TM ELISA (冷冻前)	发明 (冷冻前)	TOX A/B II TM ELISA (冷冻后)	发明 (冷冻后)
TL001	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-

实施例7: 样品在2°和8°C间存放72小时的效果

为了进一步研究本发明的设备和方法对检测样品中目标物质的用途, 使用根据本发明的设备和方法在时间为24、48和72小时, 特别地在 *TOX A/B QUIK CHEKTM test* (TechLab, Inc.; cat. no. T5033) 中, 根据制造者的说明测试6个阳性和2个阴性粪便样品(对于 *C. difficile* 毒素A和B)以评价粪便样品中毒素的稳定性。以下显示的结果证明设备和方法在每个时间间隔一致地进行。另外, 它表明 *C. difficile* 毒素在这些测试条件下至少稳定72小时。在每一个时间段所有阳性样品保持阳性, 阴性样品保持阴性。

表10: 样品在2℃和8℃间存放72小时的效果

样品 _{ns} (n = 8)	第1天	第1天	第2天	第2天	第3天	第3天
	<i>C. difficile</i> TOX A/B II TM 20min 检定	TOX A/B QUIK CHEK TM	<i>C. difficile</i> TOX A/B II TM	TOX A/B QUIK CHEK TM	<i>C. difficile</i> TOX A/B II TM 20min检 定	TOX A/B QUIK CHEK TM
TL001	+	+	+	+	+	+
TL002	+	+	+	+	+	+
TL003	+	+	+	+	+	+
TL004	+	+	+	+	+	+
TL005	+	+	+	+	+	+
TL006	+	+	+	+	+	+
TL007	-	-	-	-	-	-
TL008	-	-	-	-	-	-

实施例8: 使用方法和设备检测Clinical Lab Setting中的临床样品

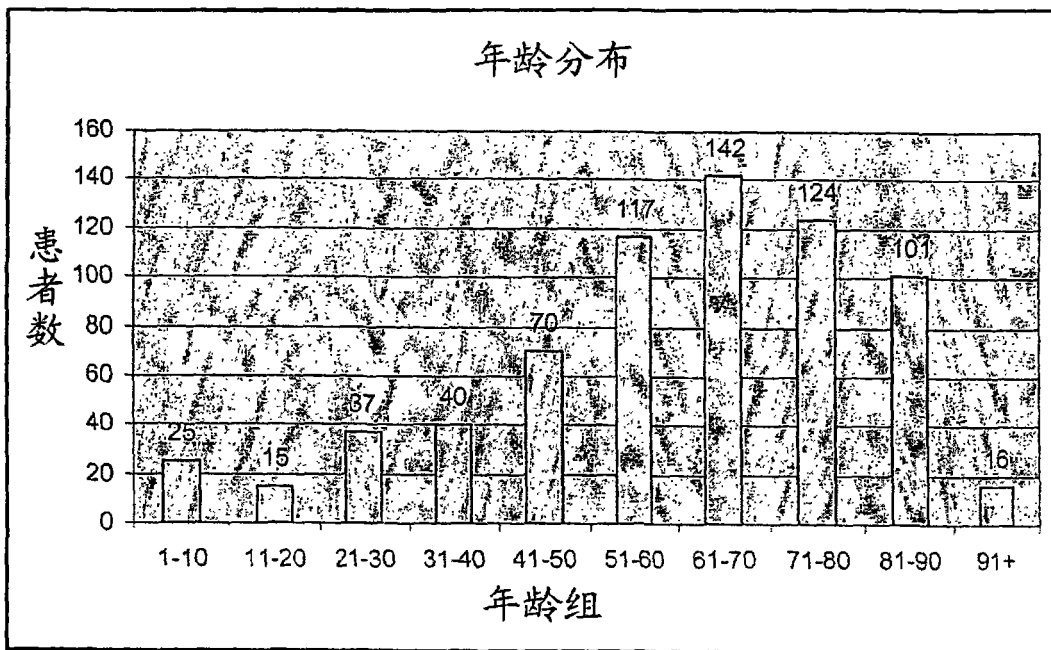
将以上用于实施例4-7的方法和设备用于检定怀疑含有*C. difficile*毒素A和B的临床样品。更具体地, 将与本发明的方法的实施方案联合, 以商品名TOX A/B QUIK CHEKTM(TechLab, cat. no. T5033)一同出售的本发明的设备的实施方案与组织培养检定在3个商业临床实验室和由本发明人比较。研究场所和研究者连同样品的数目和来源见下表。将本发明的设备和方法与组织培养检定比较, 因为组织培养检定被认为是检测粪便样品中*difficile*毒素的“金标准”。使用*C. DIFFICILE* TOX A/B IITM test或Meridian PremierTM Toxin A&B test来分析不一致的结果, 其二者为用于检测粪便样品中毒素A和B的微滴定ELISA。对于在这个实施例中本发明人进行的研究, 使用TechLab Inc的*C. DIFFICILE* TOX-B TEST assay进行组织培养检定。

当将本发明的设备和方法与组织培养检定比较时, 测定灵

敏性、特异性、阳性和阴性预测值及百分相关性。对于对组织培养检定的分析也测定95%置信区间。

可获得294名患者的性别特征。有177名女性(60.2%)和177名男性(39.8%)。可获得613名患者的年龄信息。年龄范围约从1岁到95岁，分布示于下表。表中每个条块上方的数字表示在特定年龄组的患者的数目。

表11: 临床研究的年龄分布



下表显示本发明的设备和方法的临床表现的总结。来自进行的所有5个临床研究的结果包括在该总结中。将本发明的设备和方法的结果与组织培养检定比较，不一致的结果通过C. DIFFICILE TOX A/B II™ test(现在讨论的本发明的设备和方法)或Meridian Permier™ Toxin A&B test来分析。结果表明与组织培养检定相比TOX A/B QUIK CHEK™ test分别显示90.2%和99.7%的灵敏性和特异性，相关性为98.0%。

表12: 本发明的设备和方法的临床表现的总结

n = 842	组织培养阳性样品	组织培养阴性样品
<i>TOX A/B QUIK CHEK</i> TM 阳性	138	2
<i>TOX A/B QUIK CHEK</i> TM 阴性	15	687
		95%置信区间
灵敏性	90.2	84.1-94.2
特异性	99.7	98.8-99.9
预测的阳性值	98.6	94.4-99.8
预测的阴性值	97.9	96.4-98.7
相关性	98.0	97.8-98.2

2个组织培养 - 阴性/*TOX A/B QUIK CHEK*TM - 阳性样品中, 1个在*TOX A/B II*TM test中为阴性。15个组织培养 - 阳性/*TOX A/B QUIK CHEK*TM - 阴性样品中, 12个在*C. DIFFICILE TOX A/B II*TM 测试或Meridian PremierTM Toxin A&B test中为阴性。

实施例9: 粪便样品稠度的影响

为了进一步表征本发明的方法和设备, 用方法的实施方案测试设备的实施方案以确定粪便样品的一致性对设备和方法的性能的影响。

在*TOX A/B QUIK CHEK*TM测试中稠度变化的粪便样品的反应示于下表。总共805个已知稠度的粪便样品包括在本检定中。使用组织培养检定或*TOX A/B QUIK CHEK*TM test的阳性反应的百分比在所有的三种类型粪便样品(液体、半固体及固体)中相似。所有样品提交*C. difficile*测试。提交的基础是患者的临床史, 不是样品的稠度。结果表明当测试不同稠度的样品时, 进行的*TOX A/B QUIK CHEK*TM测试与组织培养检定相似。

表 13: 在 *TOX A/B QUIK CHEK™* 测试中稠度变化的粪便样品的反应

样品号 (n = 805)	液体样品 (n = 487)	半固体样品 (n = 294)	固体样品 (n = 24)
组织培养 检定阳性	87(17.9%)	56(19.0%)	3(12.5%)
<i>TOX A/B QUIK CHEK™</i> 阳性	76(15.6%)	50(17%)	3(12.5%)

实施例 10: 使用本发明的设备和 ELISA 检测 *Clostridium difficile* 谷氨酸脱氢酶的比较

本发明的设备用于检测 49 个粪便样品中的 *C. difficile* 的谷氨酸脱氢酶抗原，且结果与使用 ELISA 的方法获得的结果比较。描述在实施例 1 中的方法用于检测毒素，并作以下改进。

如实施例 1 中的说明，用于设备的粪便样品用含有已经化学结合的到辣根过氧化物酶检测酶(结合物)的抗体(在该情况中是对 *C. difficile* 的谷氨酸脱氢酶特异的)的样品稀释液稀释。然后将混合的样品(300 微升)通过设备中的洞(施加口)施加到施加垫(渗透垫)，在室温下 15 分钟后将清洗溶液(盐水/洗涤剂混合)加到膜的顶部，接着再加入化学底物溶液。如实施例 1 中的说明目视读取结果。

如制造商产品插件中的说明使用 TechLab Inc. Tox A/B ELISA。简单地讲，粪便样品在样品稀释液中稀释 1:5 并通过涡旋混合。ELISA 板的每一个孔接收 50 微升含有对偶联到辣根过氧化物酶的谷氨酸脱氢酶特异的抗体的结合物溶液，再将 100 微升混合的样品加到每一个孔中。然后该板在 37°C 下温育 50 分钟以使结合到微孔的抗体和结合物溶液中的抗体结合谷氨酸脱氢酶。然后彻底清洗孔以去除未结合的辣根过氧化物酶。再将每 100 微升底物溶液加入每一个孔，温育 5 分钟，再通过加入 50

微升稀酸溶液停止反应。在ELISA读数器上读取于450nm的结果。阳性样品具有大于0.12的光密度。

表14显示检定的结果，并将本发明的方法和设备的结果与ELISA检定比较。

表14: 本发明的方法和设备与ELISA方法的比较

N = 49	发明阳性抗原	发明阴性抗原
C. diff. Chek阳性	9	0
C. diff. Chek阴性	0	40
灵敏性	100.0	
特异性	100.0	
预测的阳性值	100.0	
预测的阴性值	100.0	
相关性	100.0	

结果表明本发明的设备和方法产生与使用的灵敏ELISA方法相同的结果。因此，本发明的设备和方法适于检测许多目标物质。

对本领域熟练技术人员显而易见的是，在不偏离本发明的范围或精神下实施本方法及构造和使用本发明的设备时可以作各种改进和变化。来自对本说明书的思考和本发明的实施的本发明的其它实施方案对本领域熟练技术人员是显而易见的。说明和实施例意在仅当作示例。

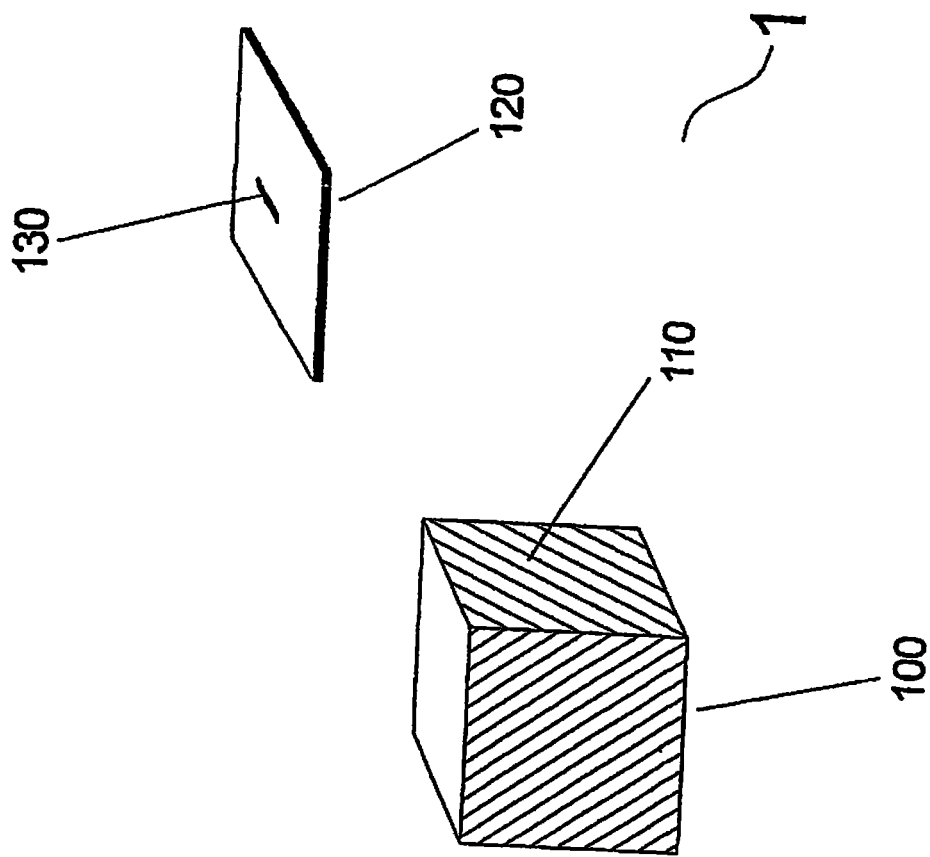


图 1

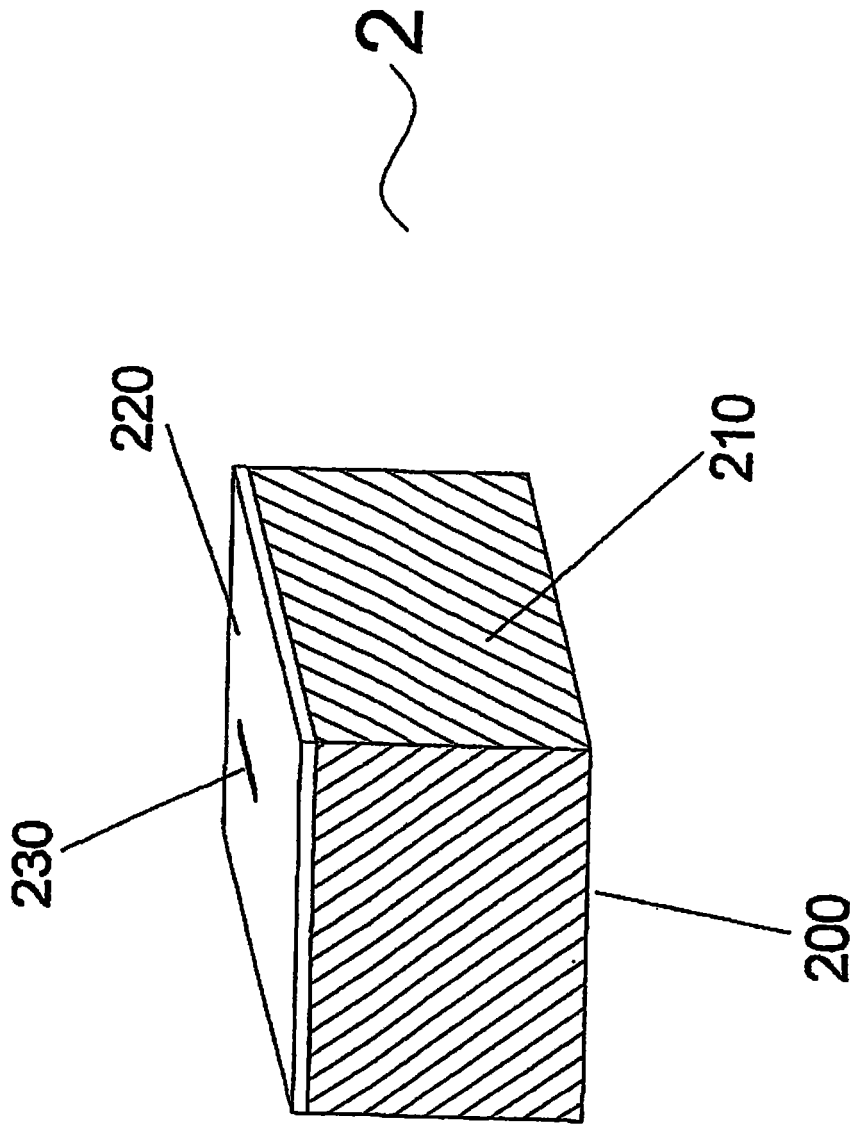
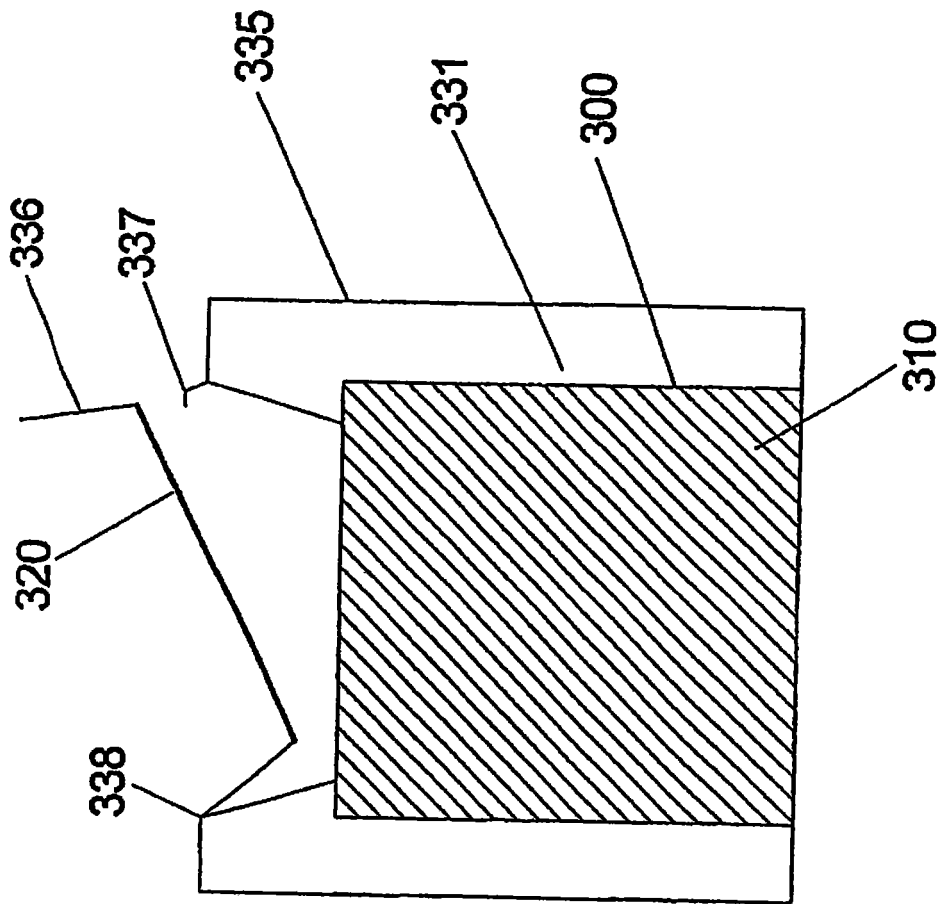


图 2



3

图 3

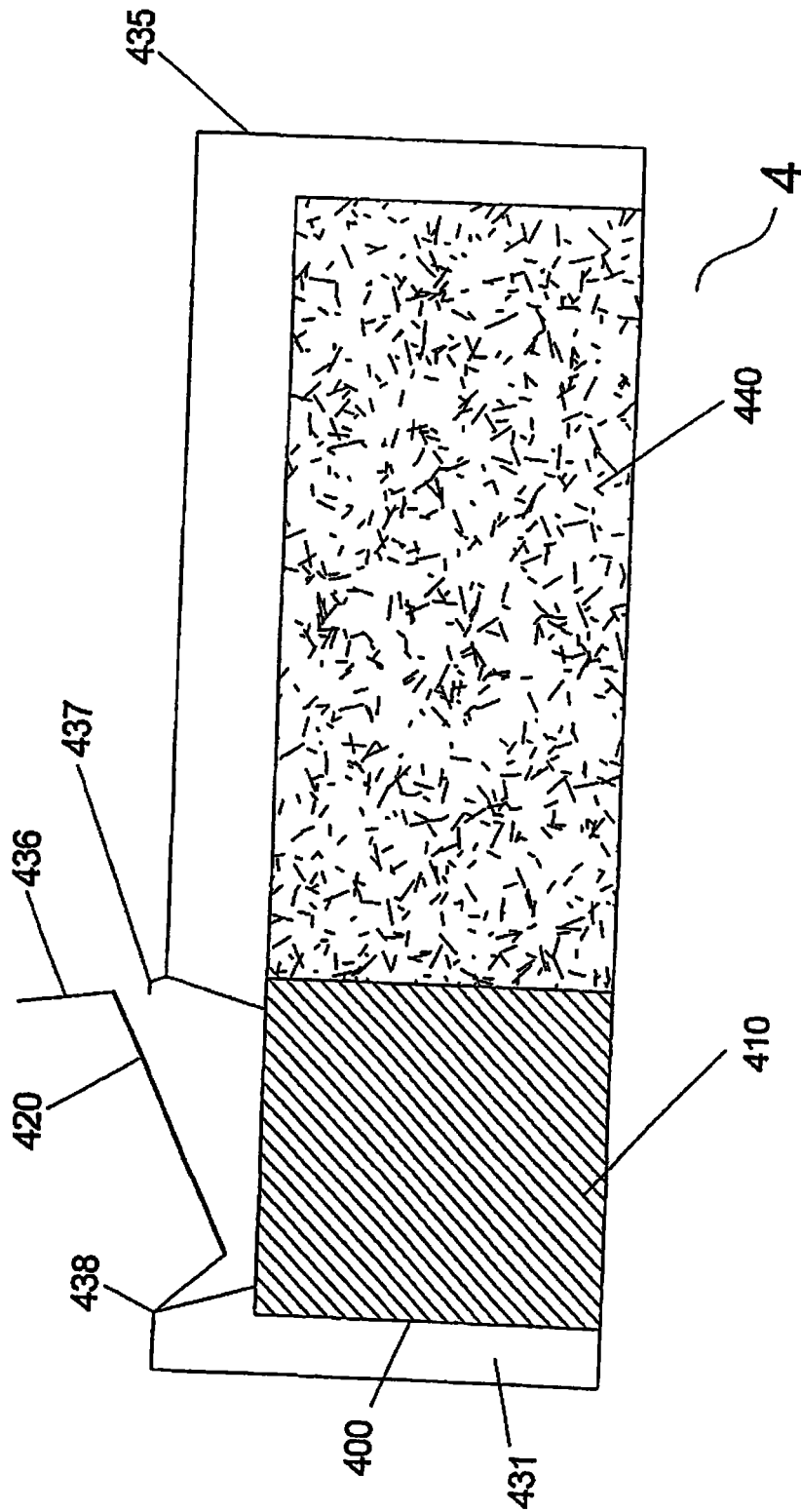


图 4A

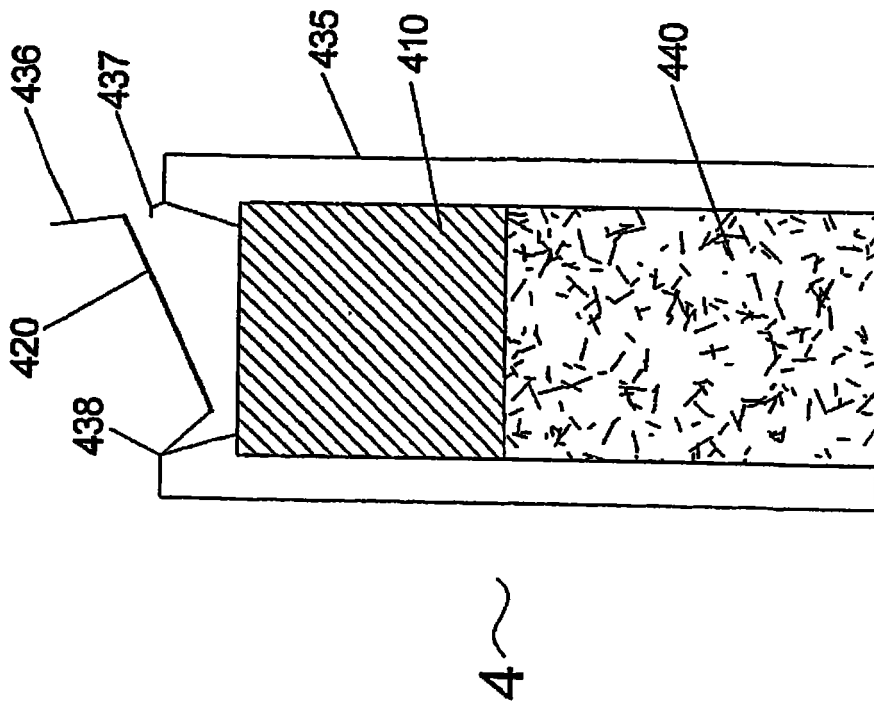


图 4B

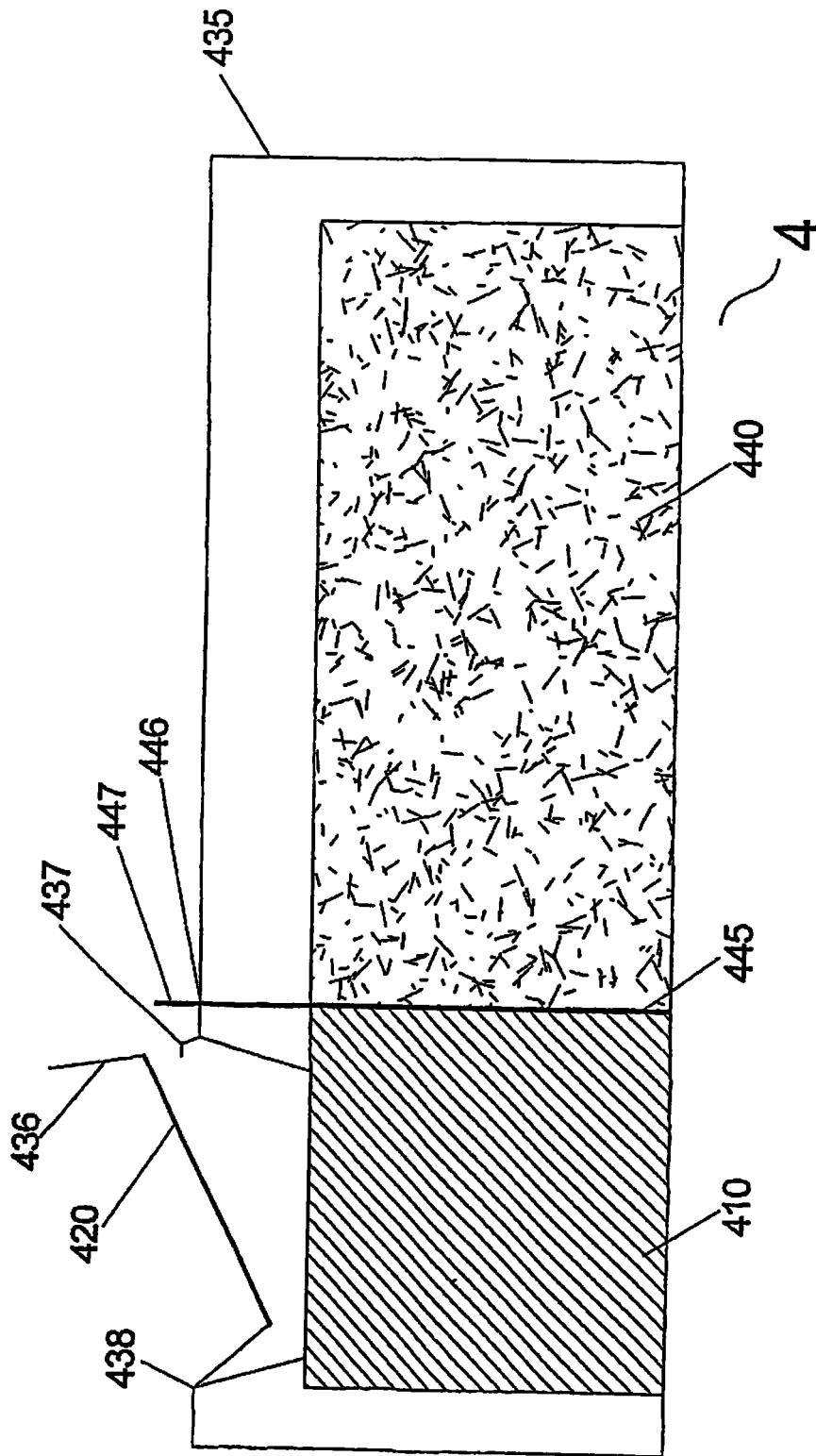


图 4C

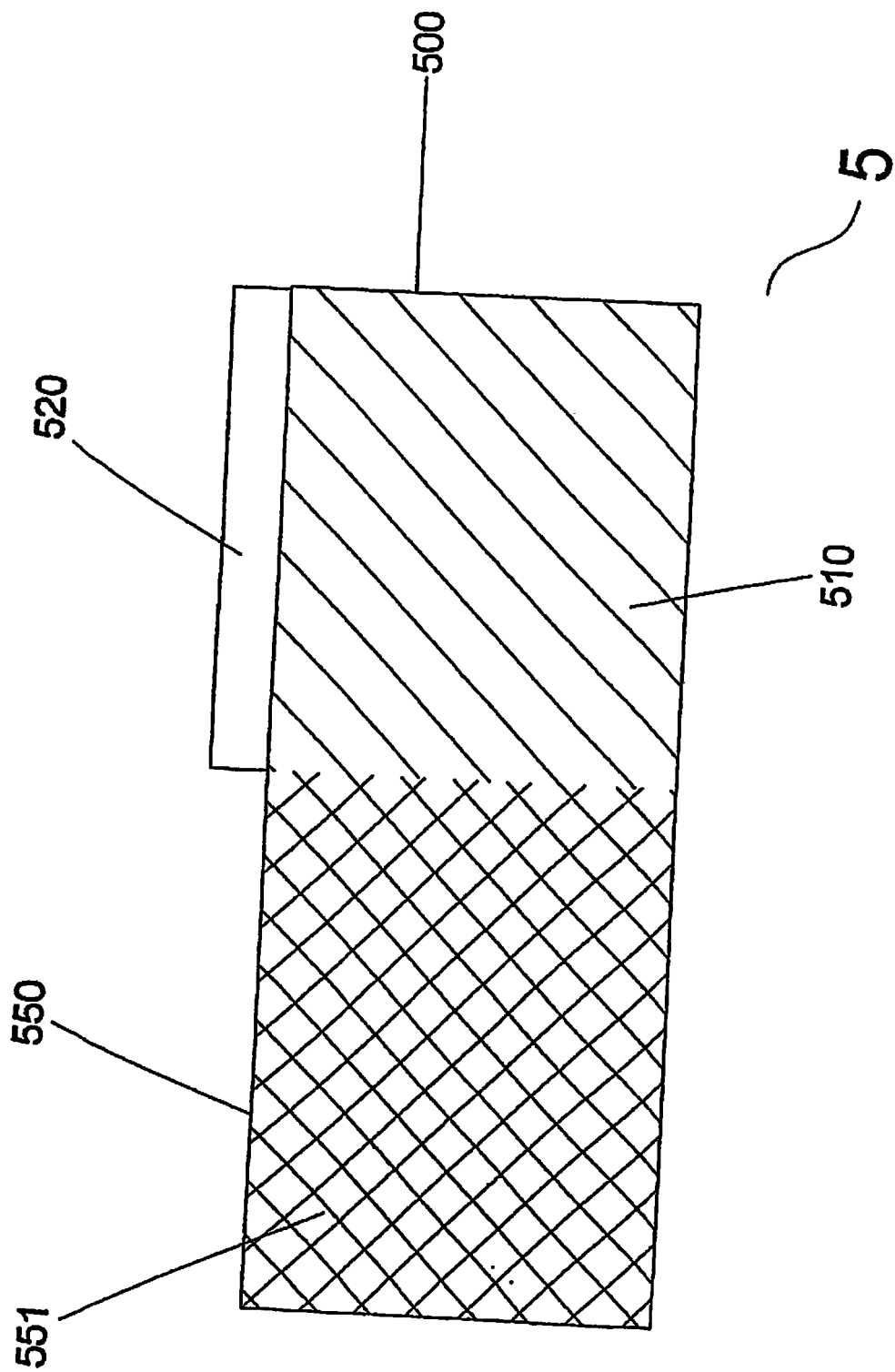


图 5

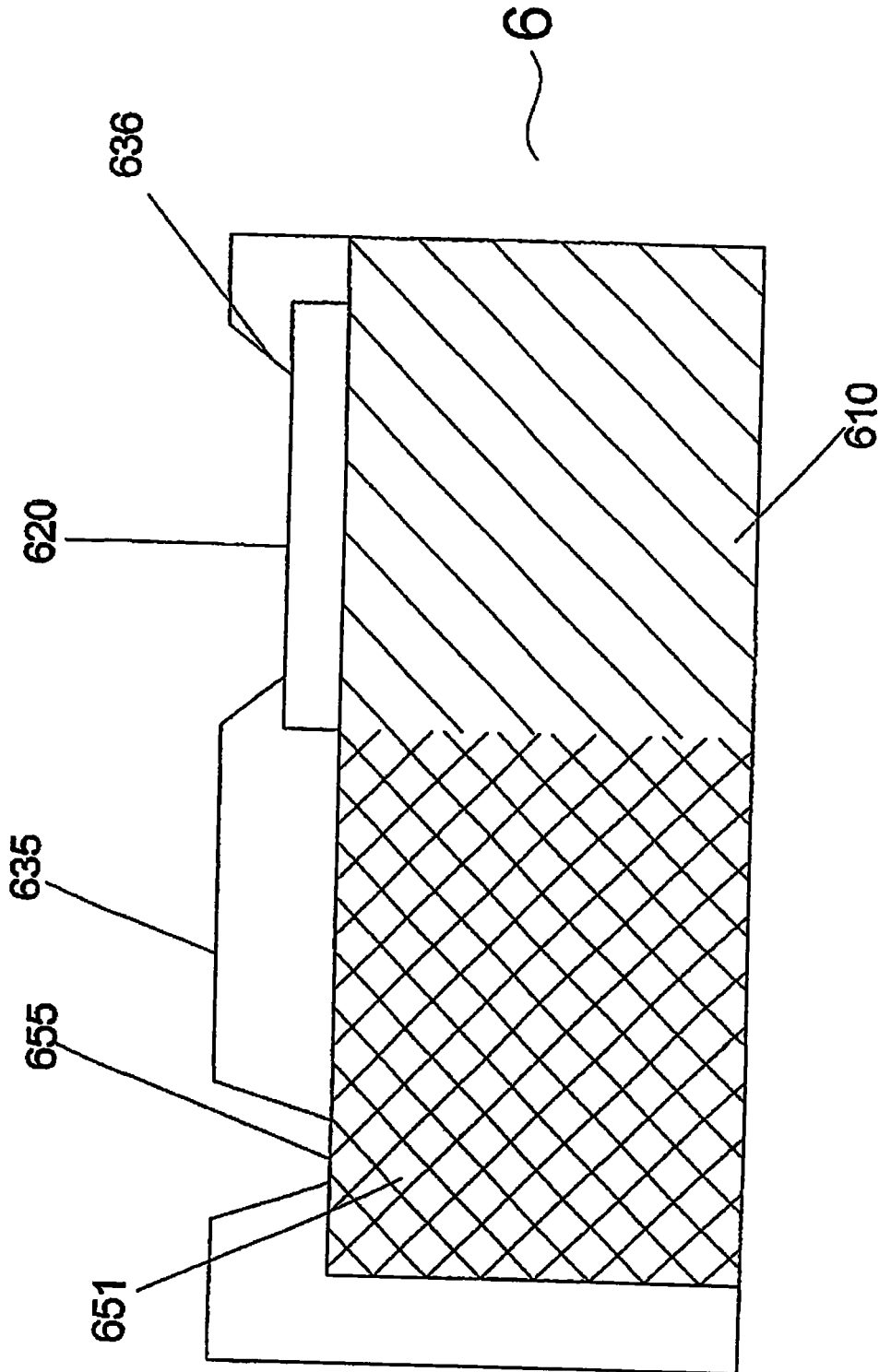


图 6

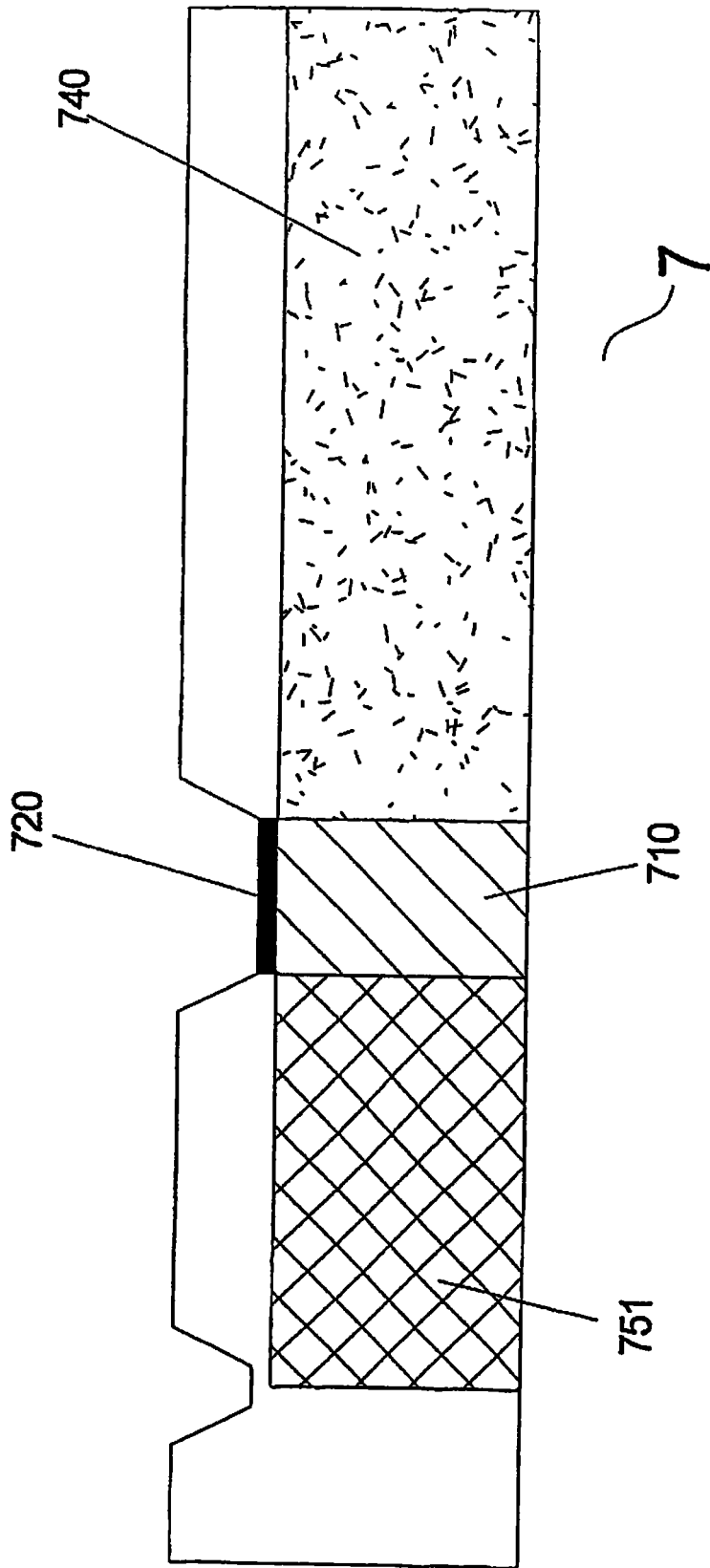


图 7

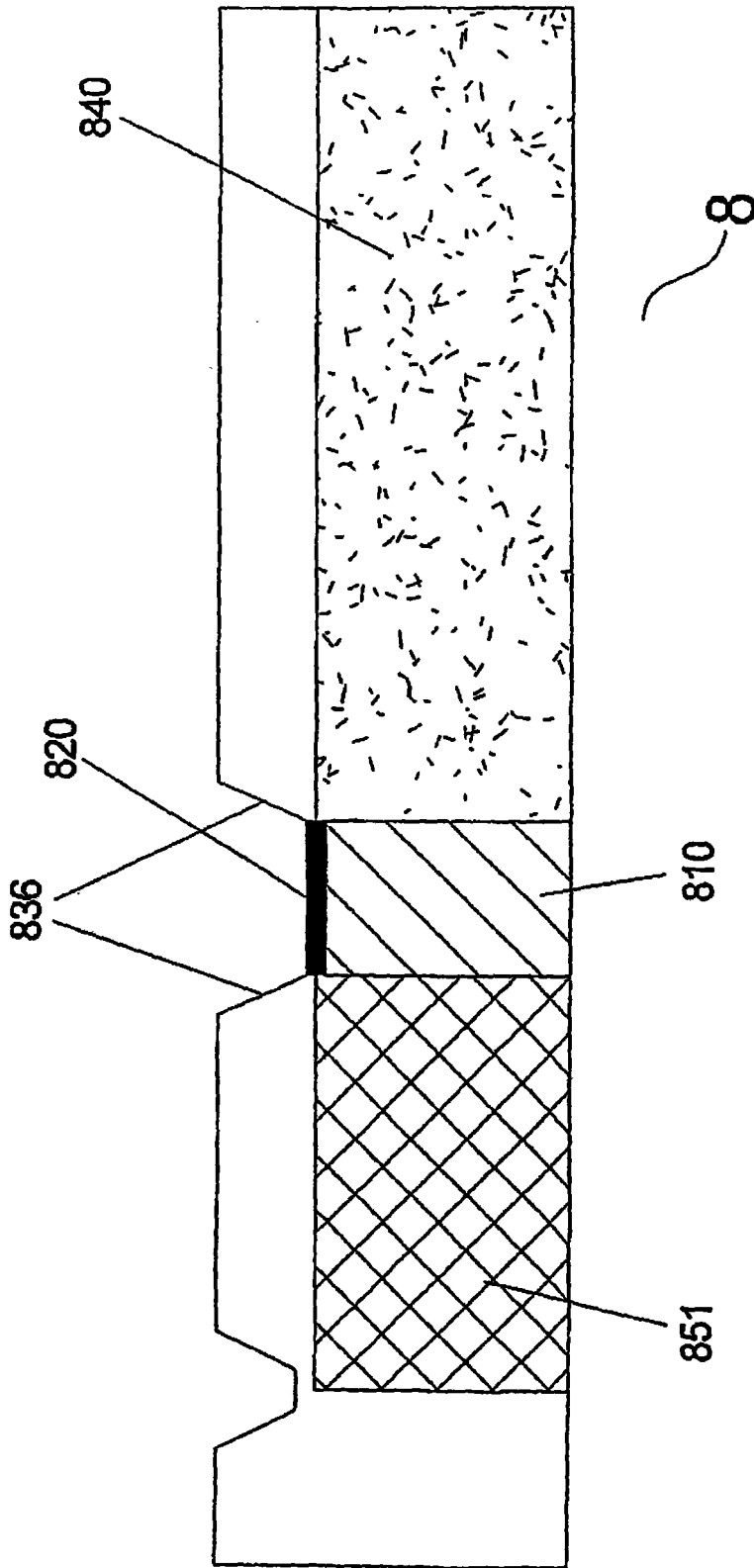


图 8

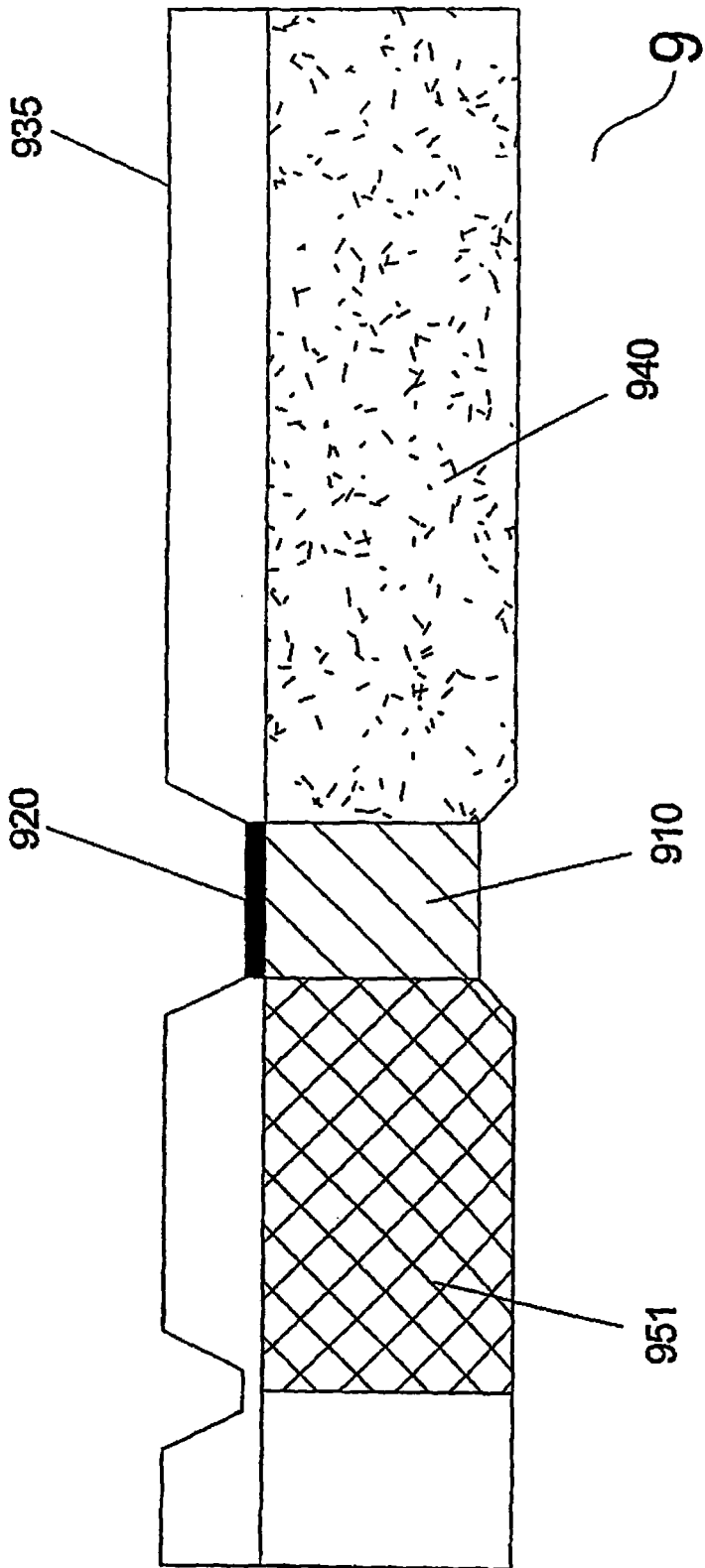


图 9

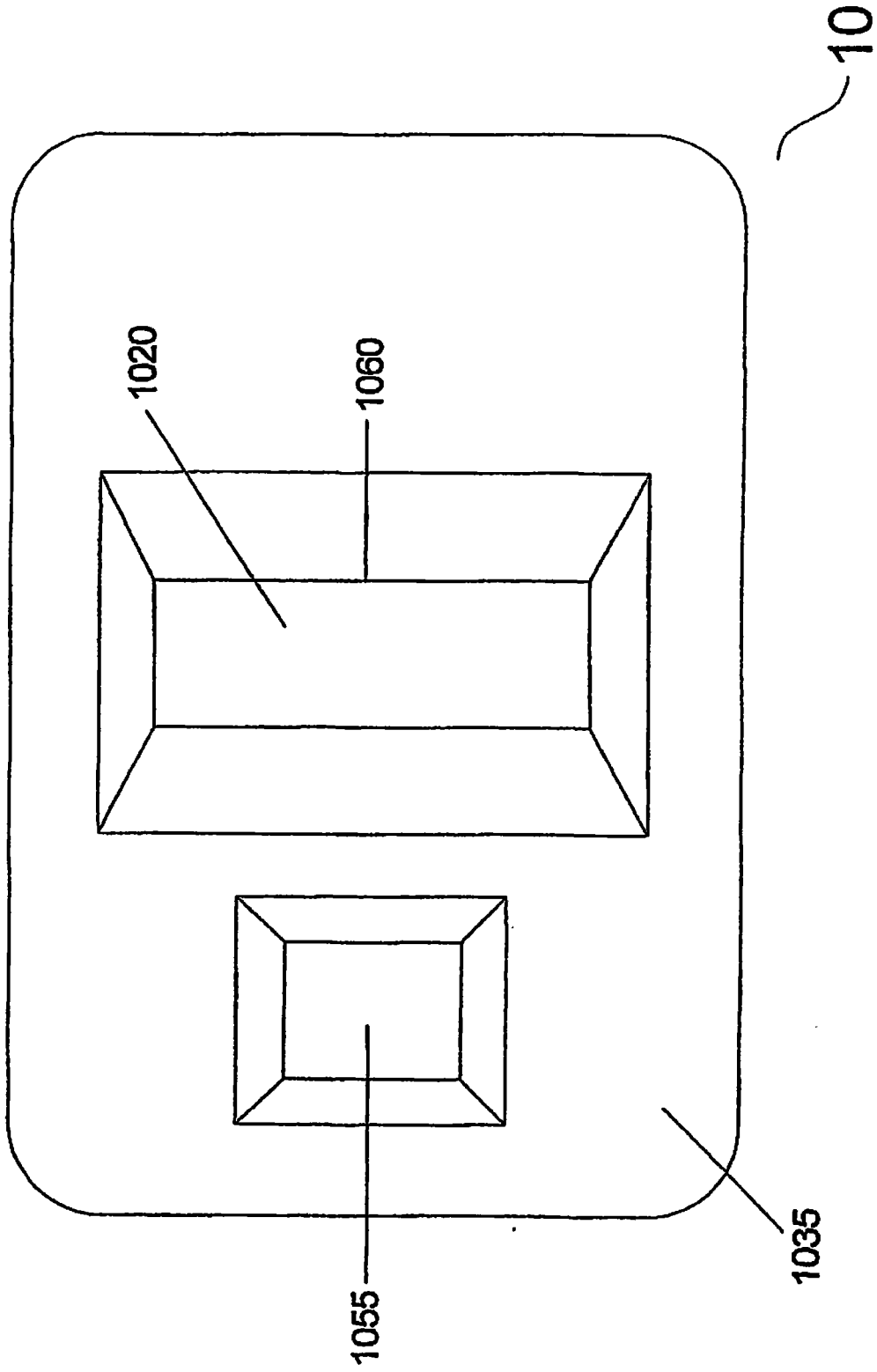


图 10

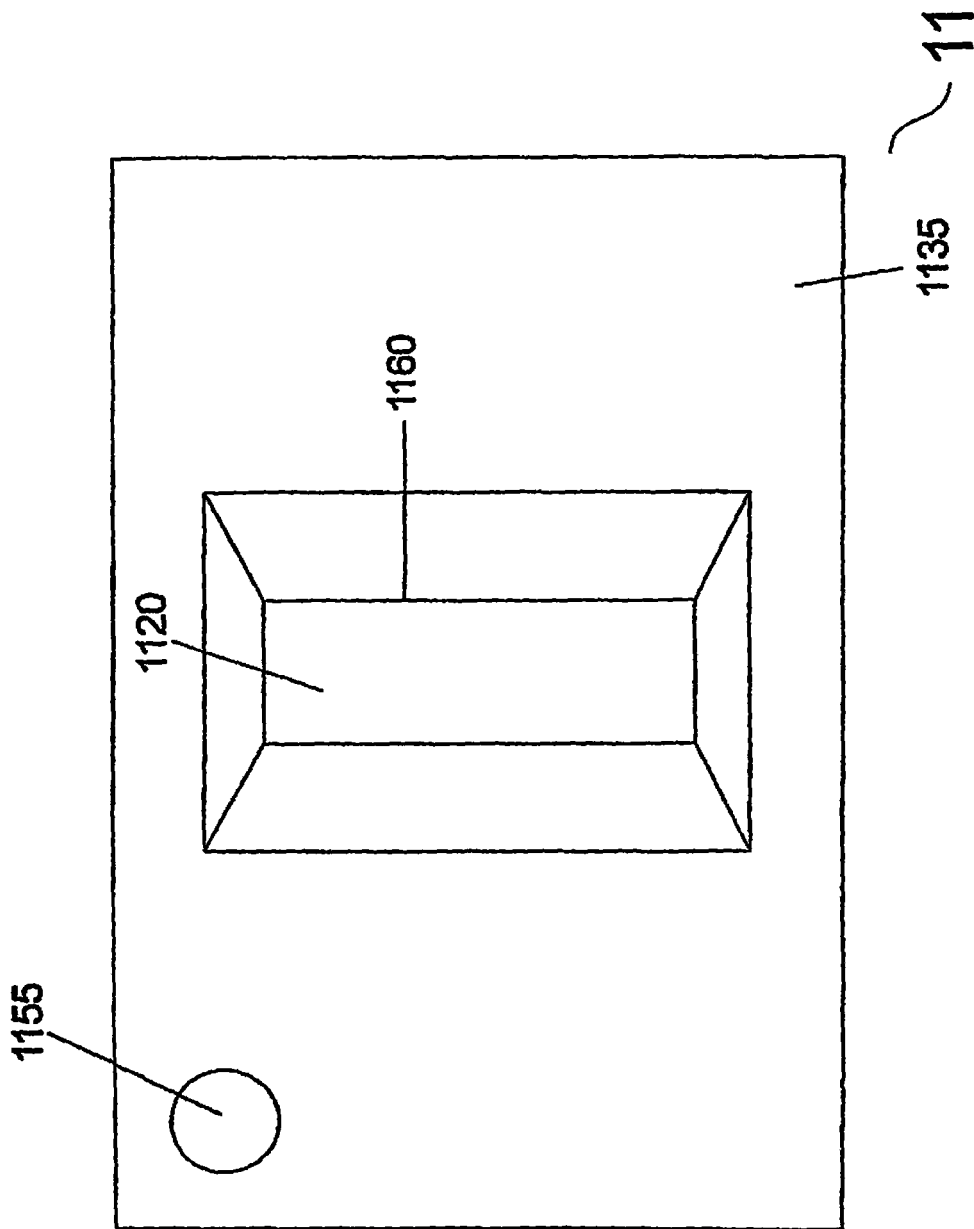


图 11

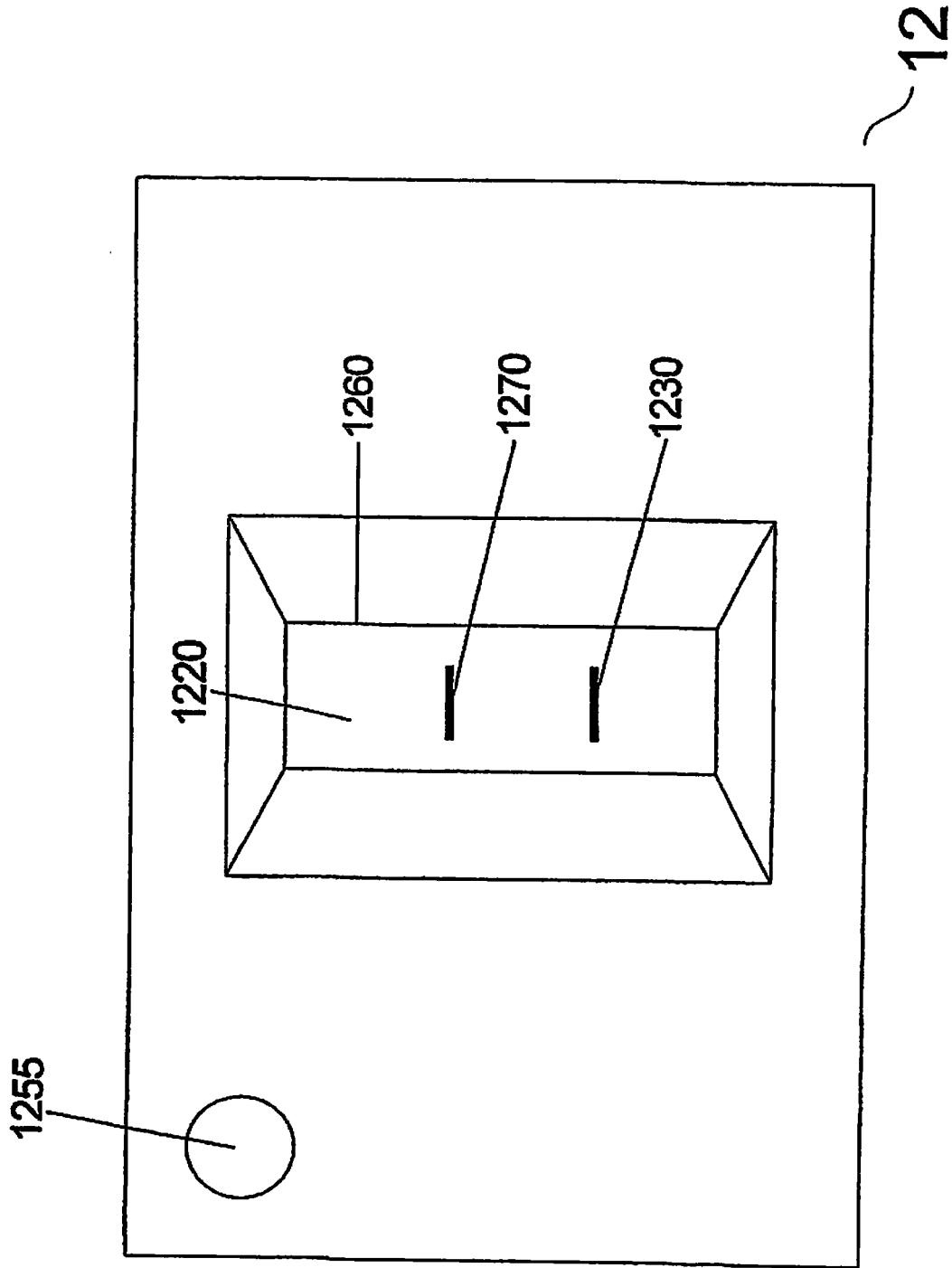


图 12

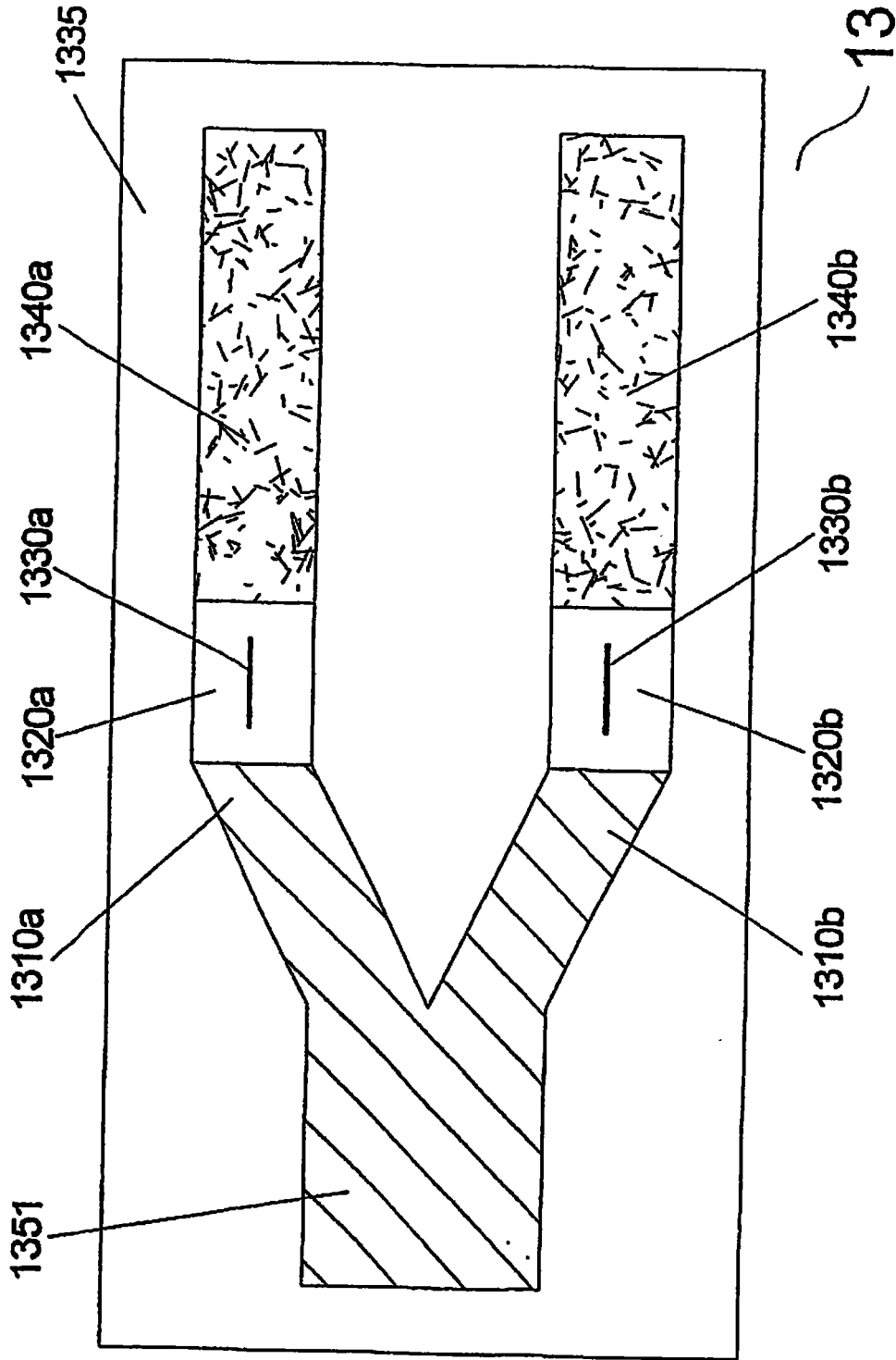


图 13

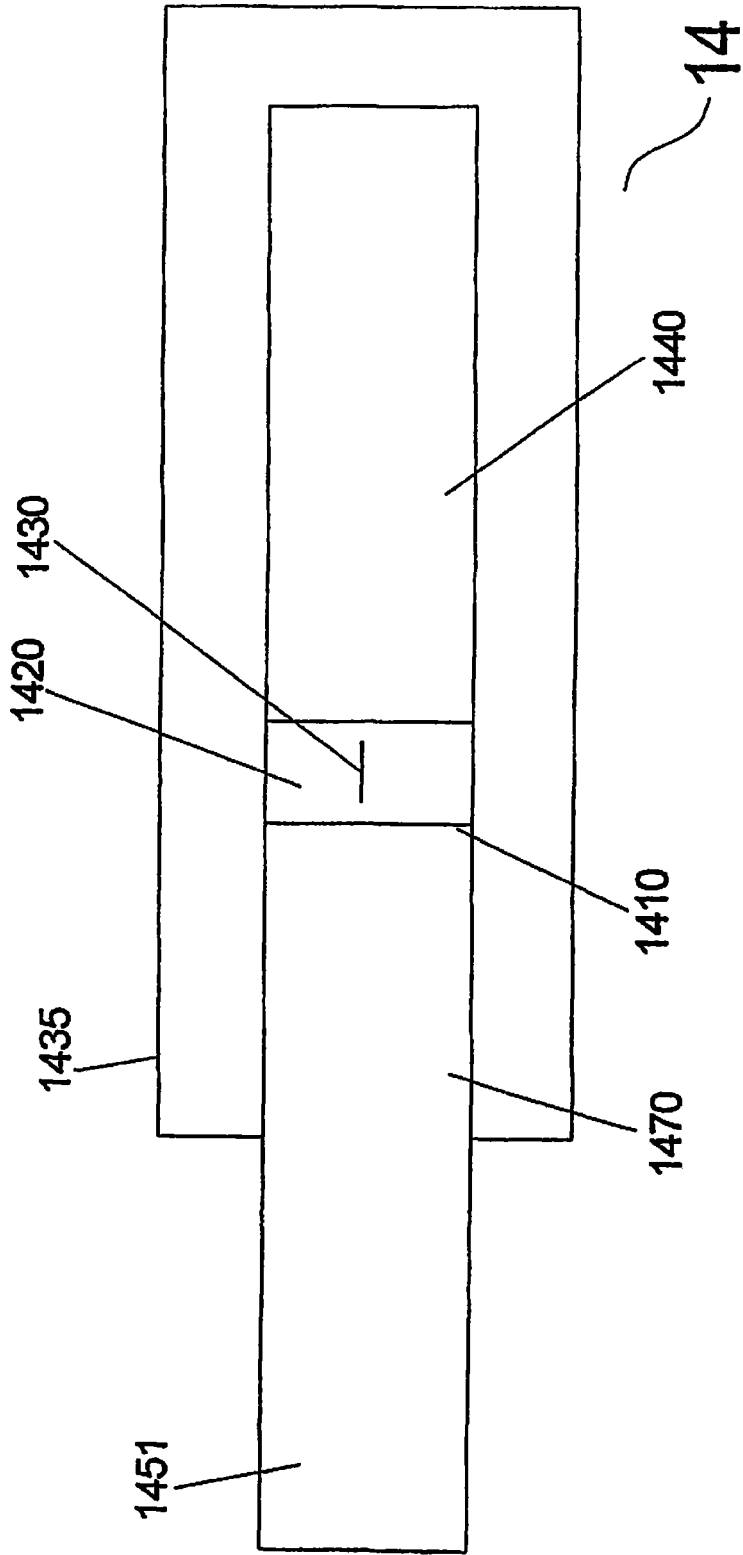


图 14A

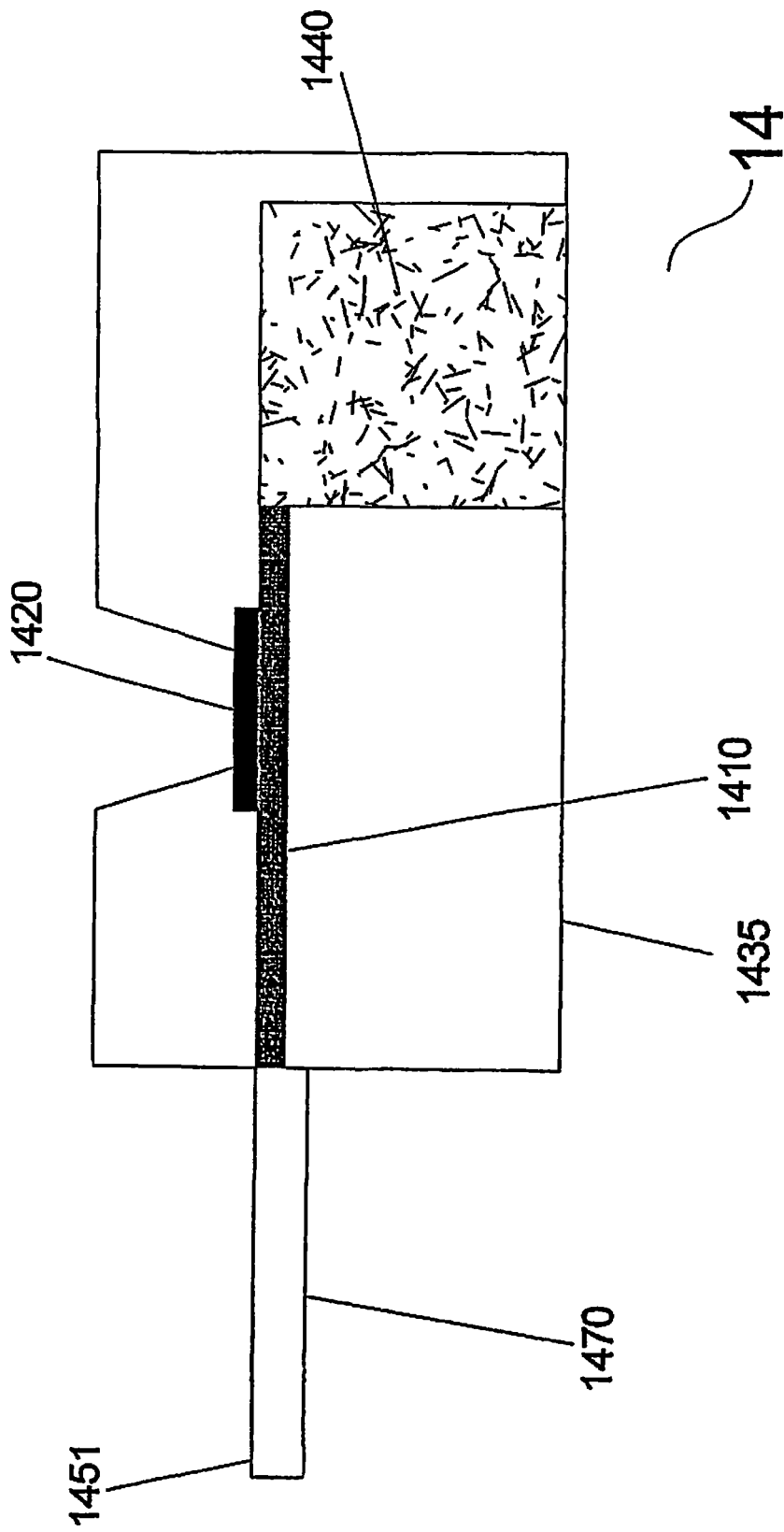


图 14B

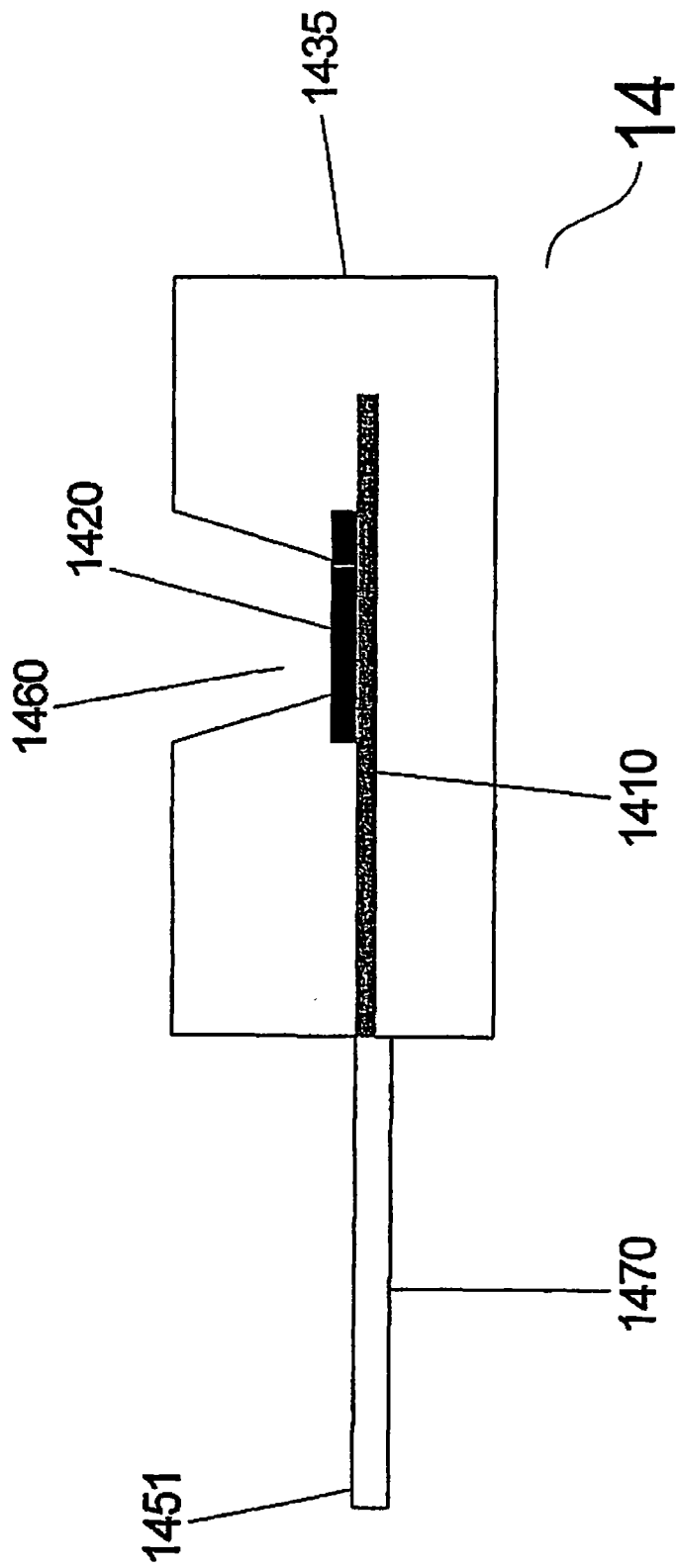


图 14C

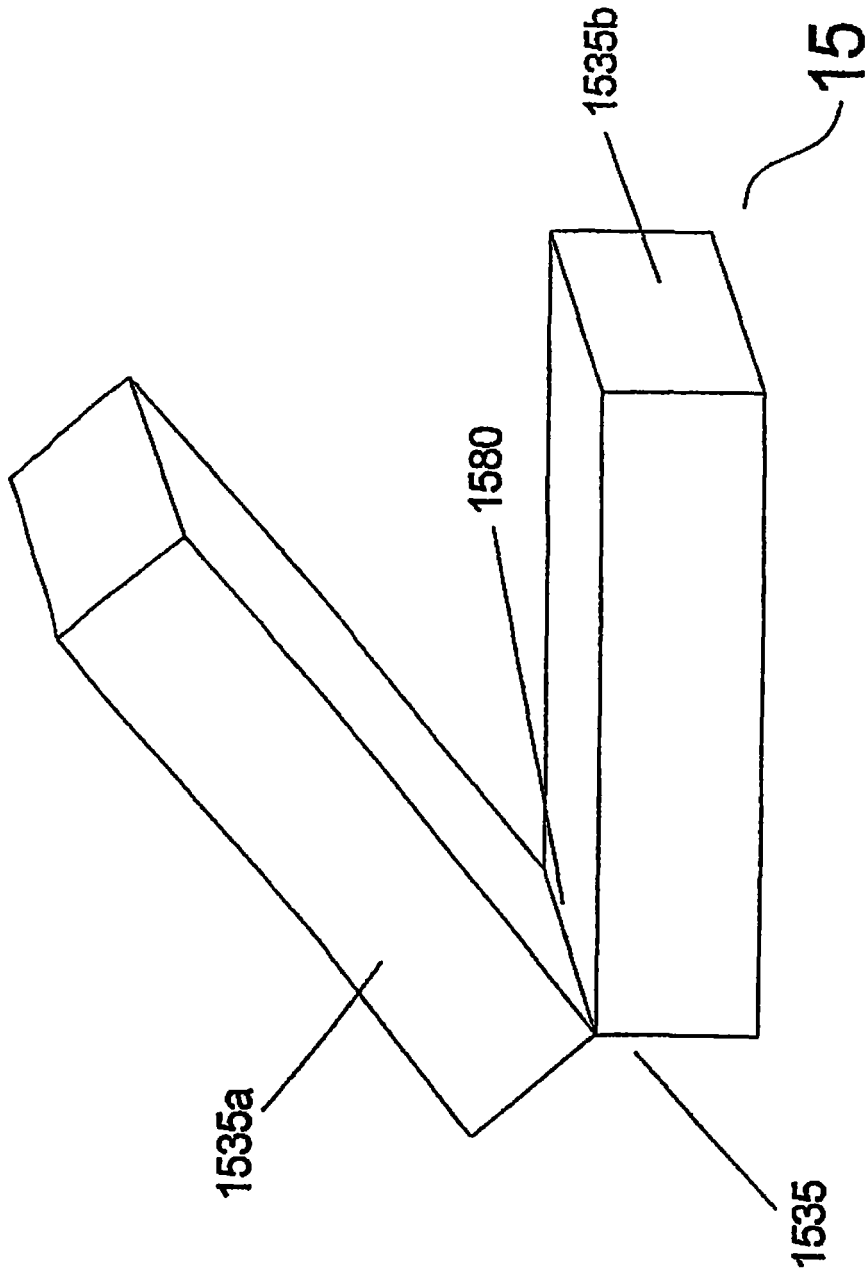


图 15A

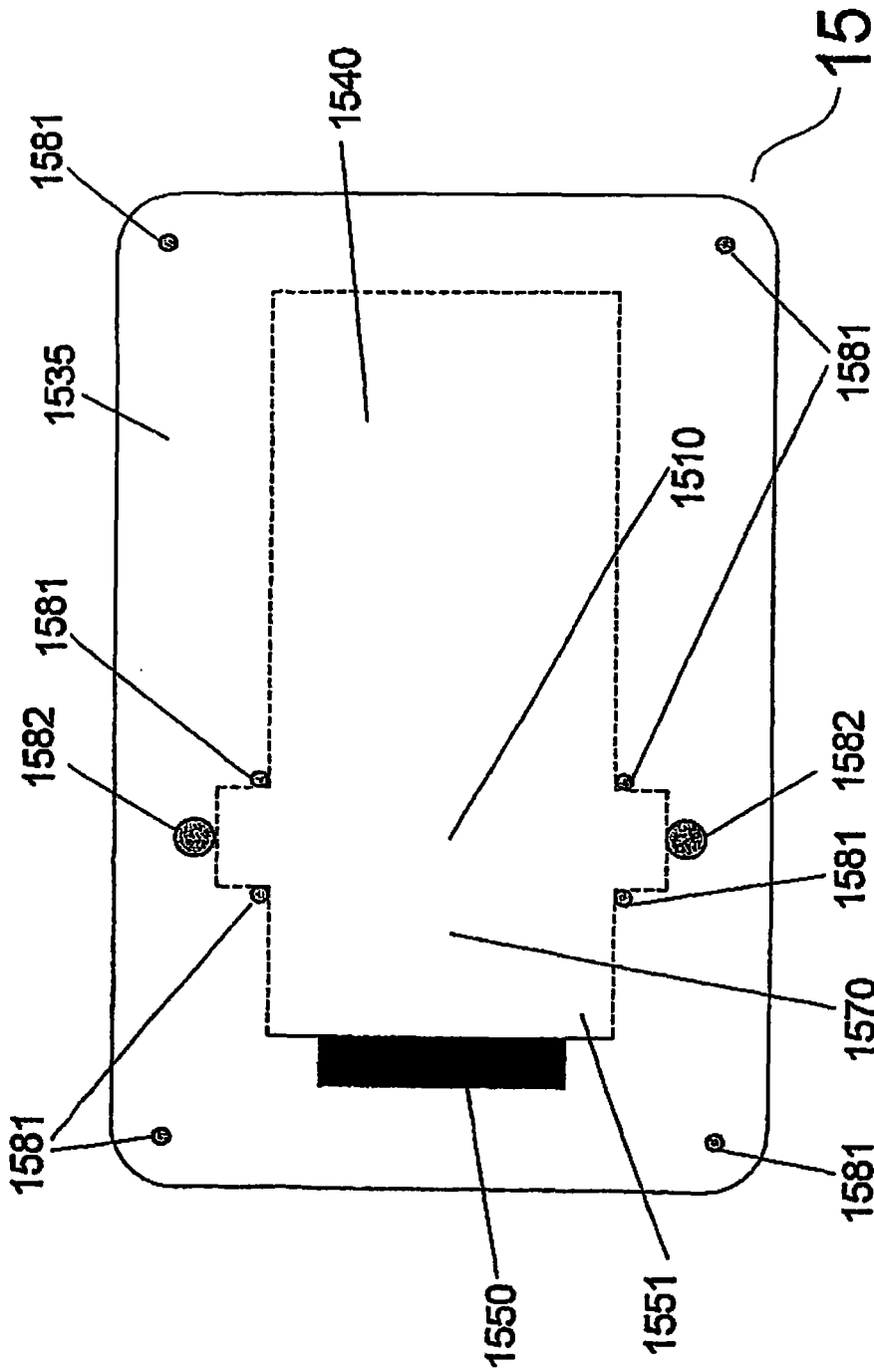


图 15B

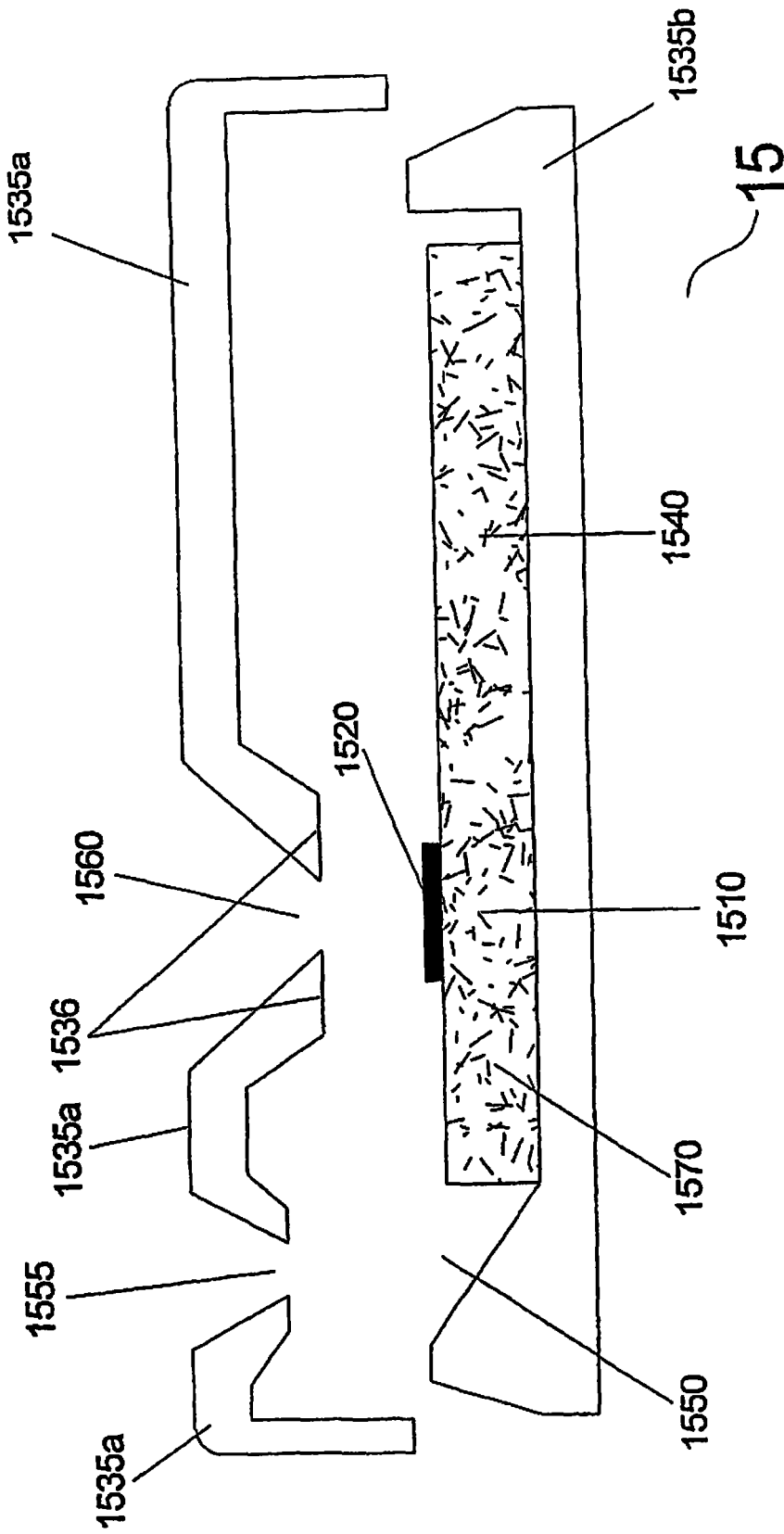


图 15C

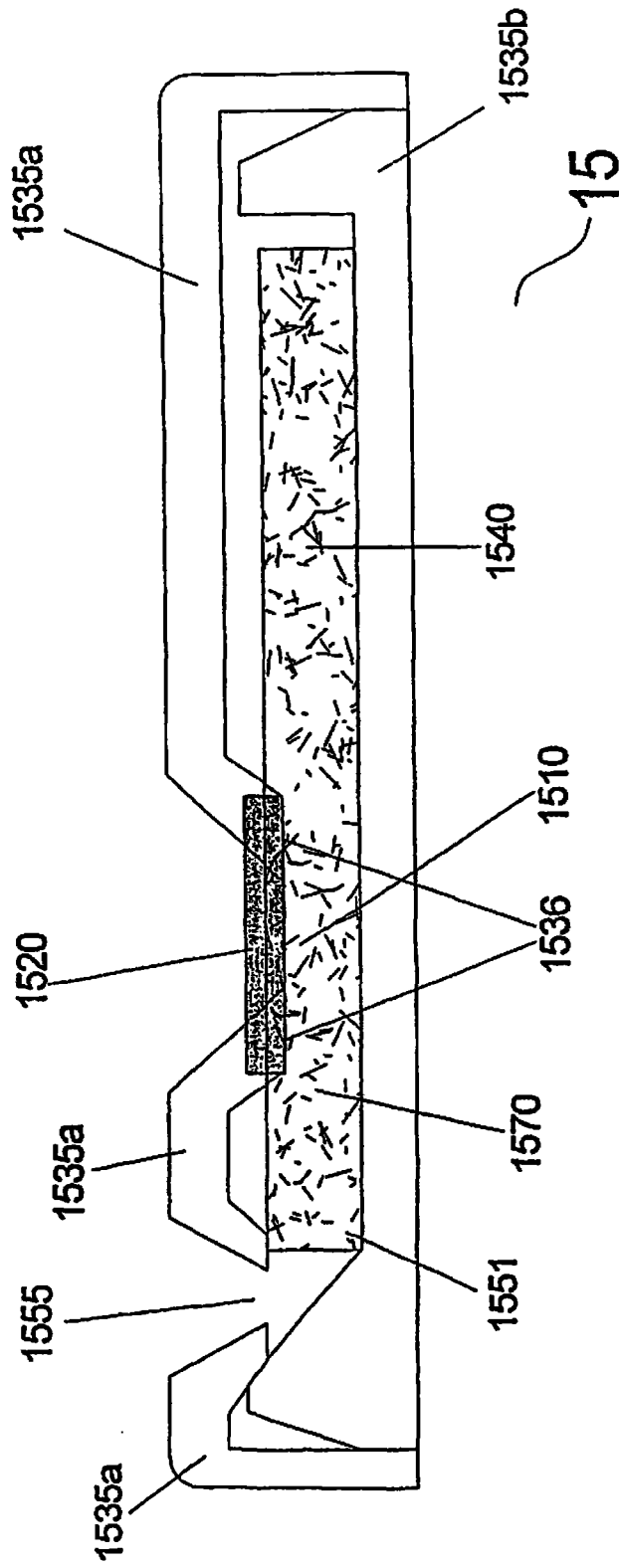


图 15D

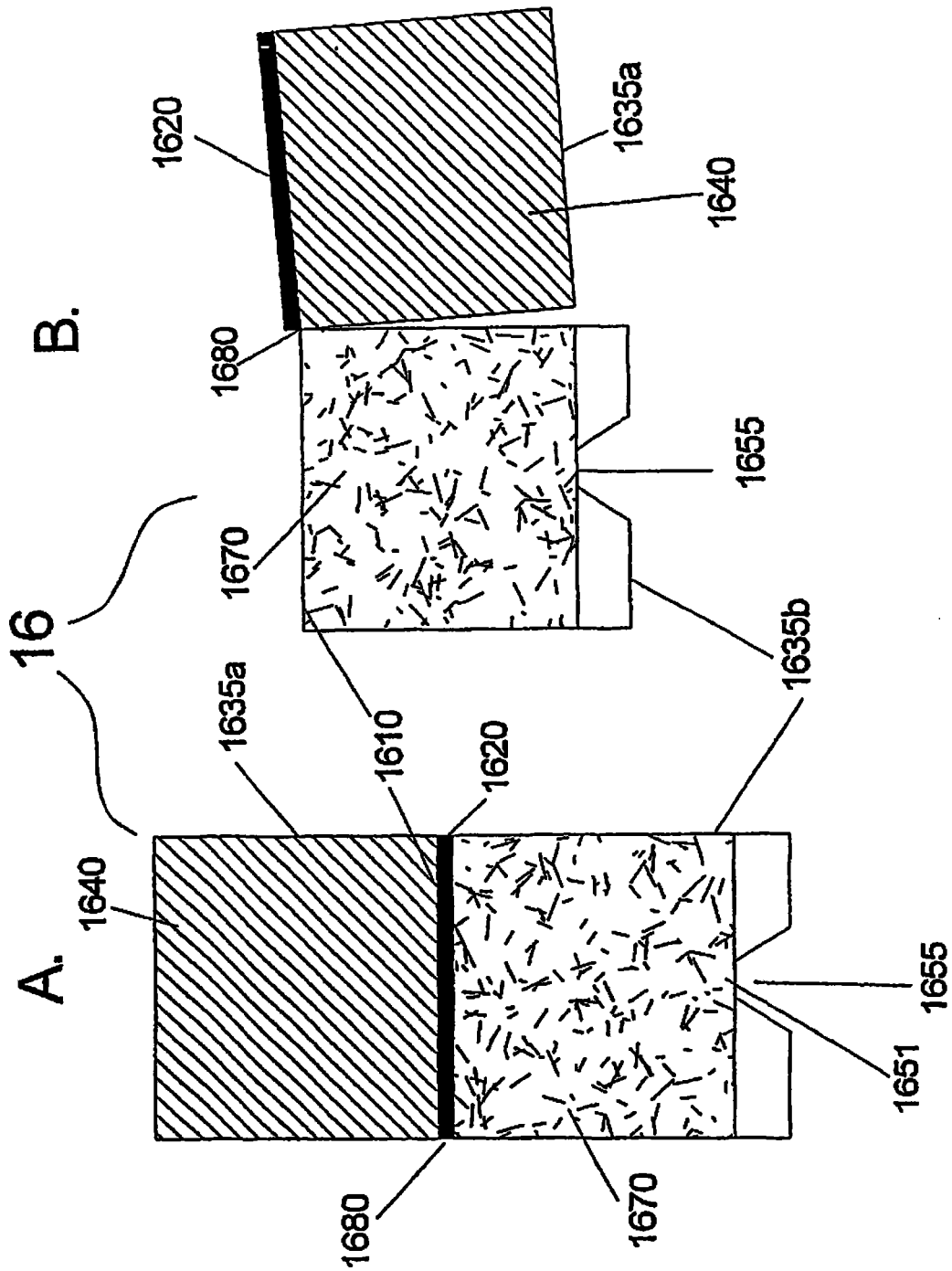


图 16

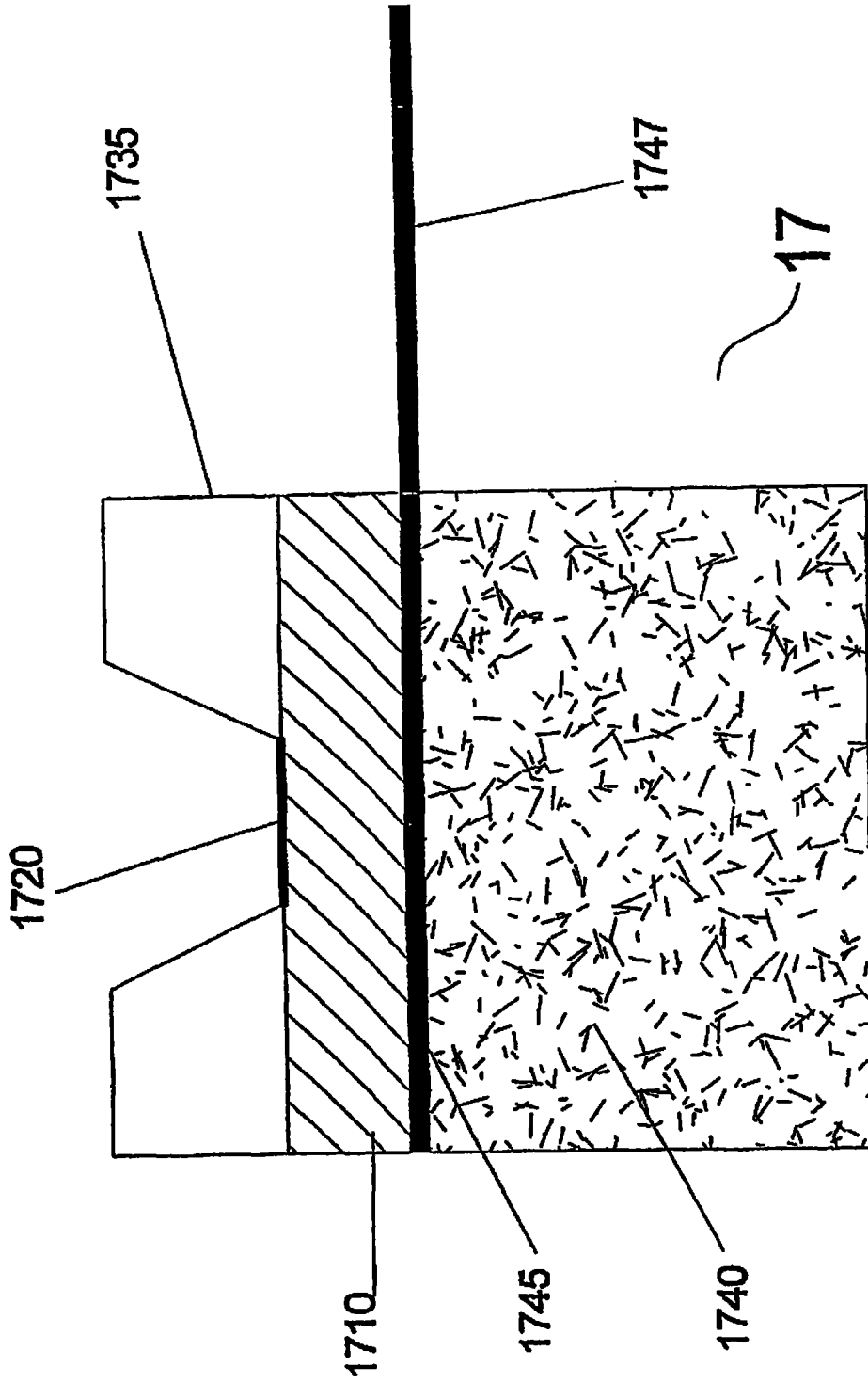


图 17

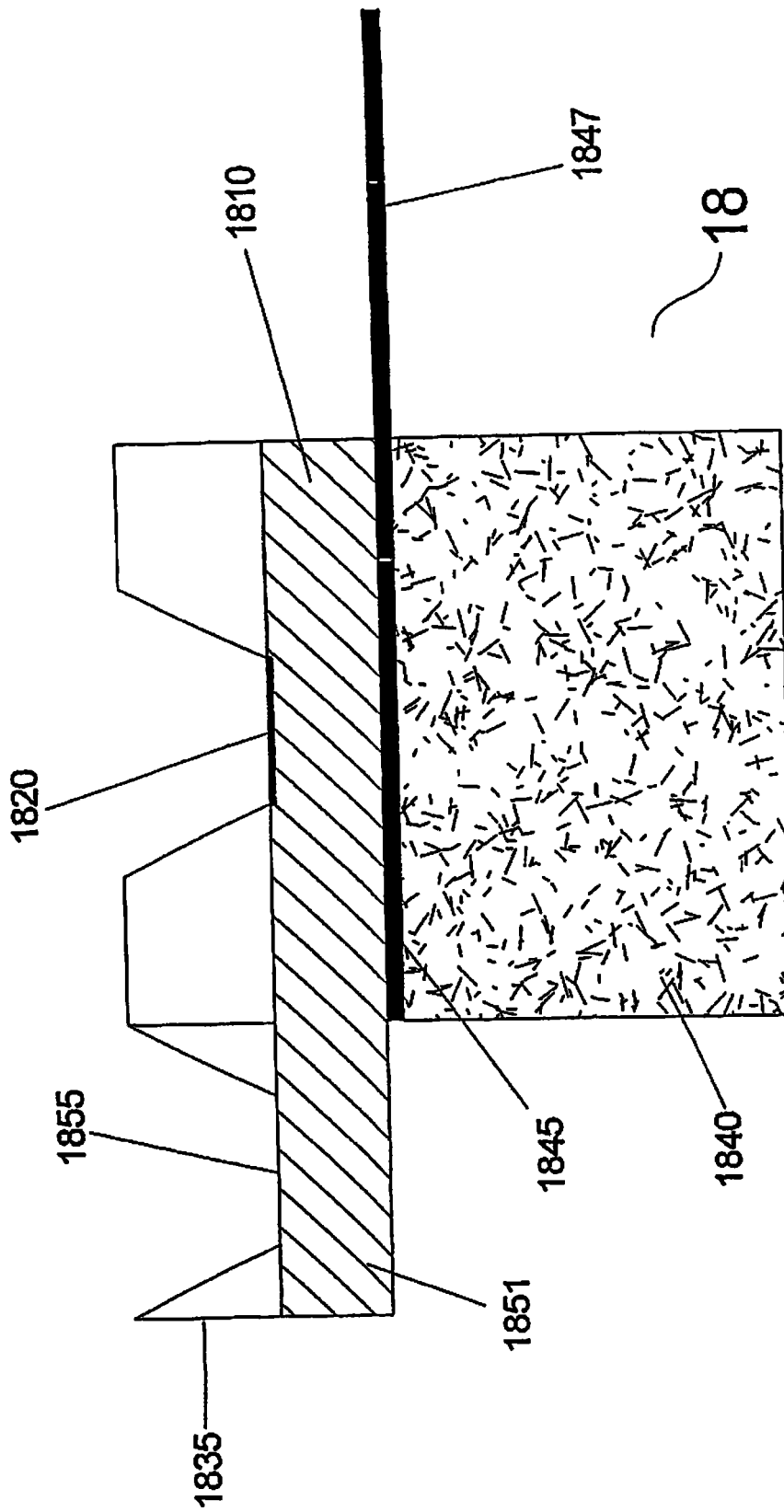


图 18

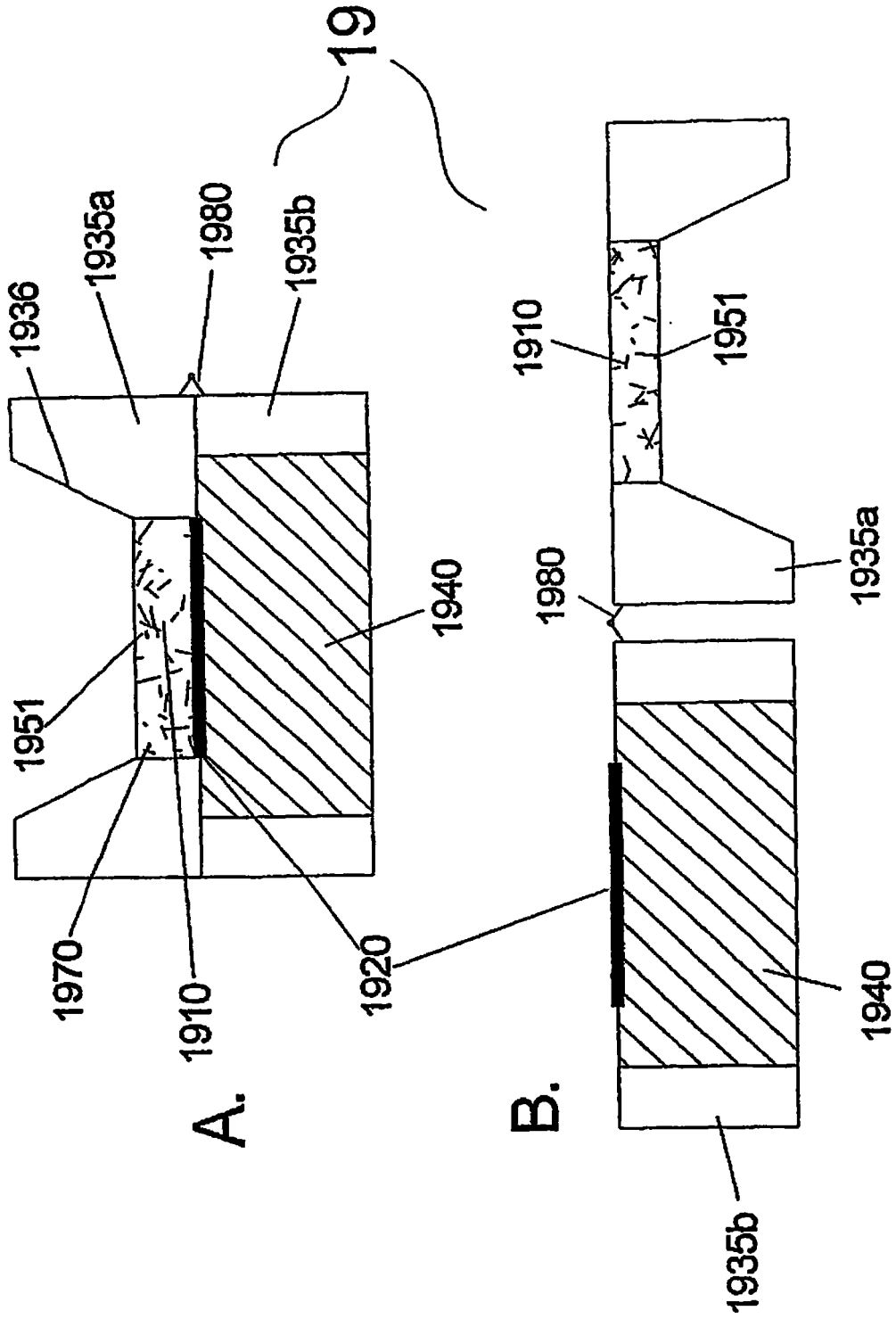


图 19

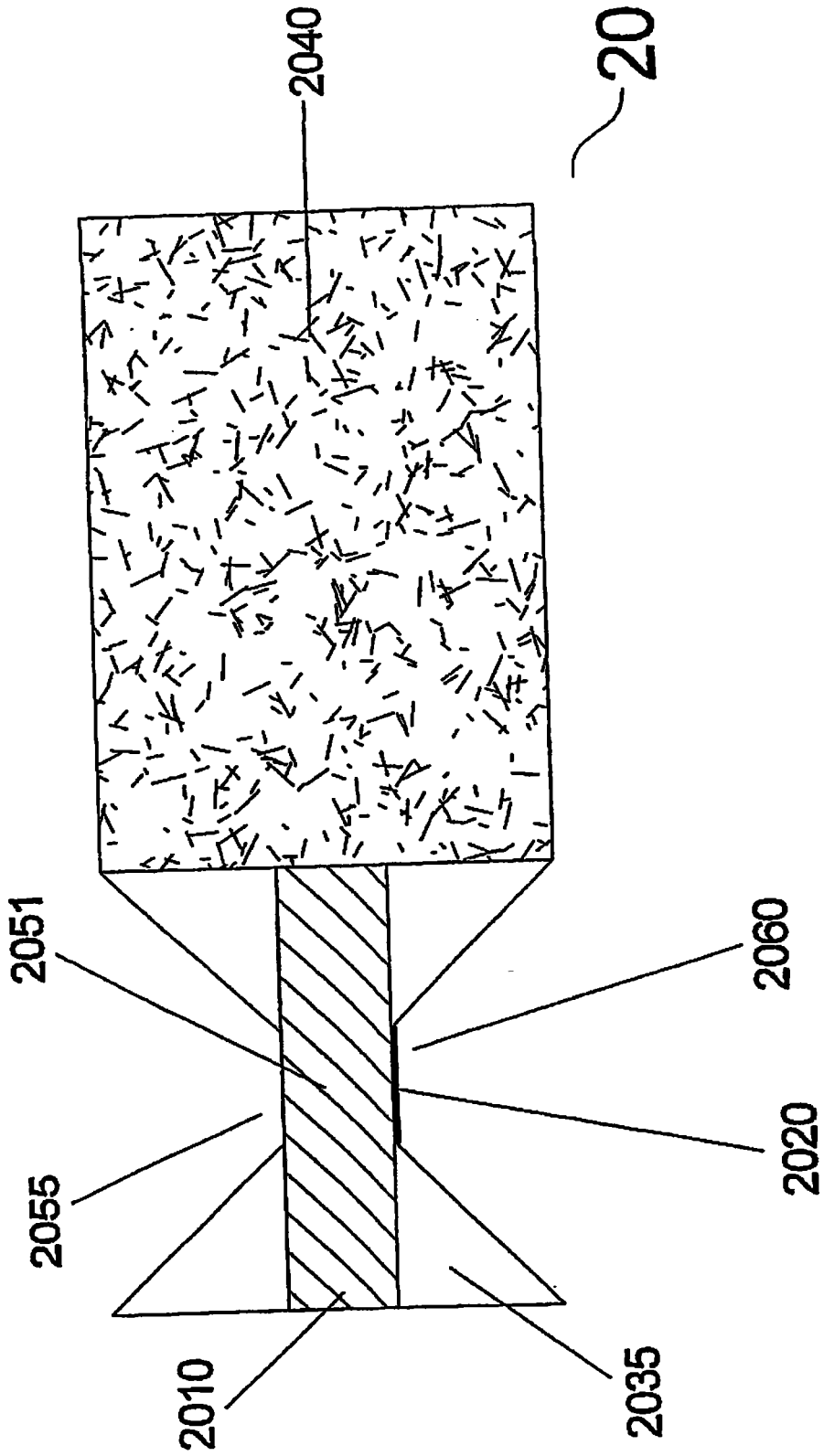


图 20

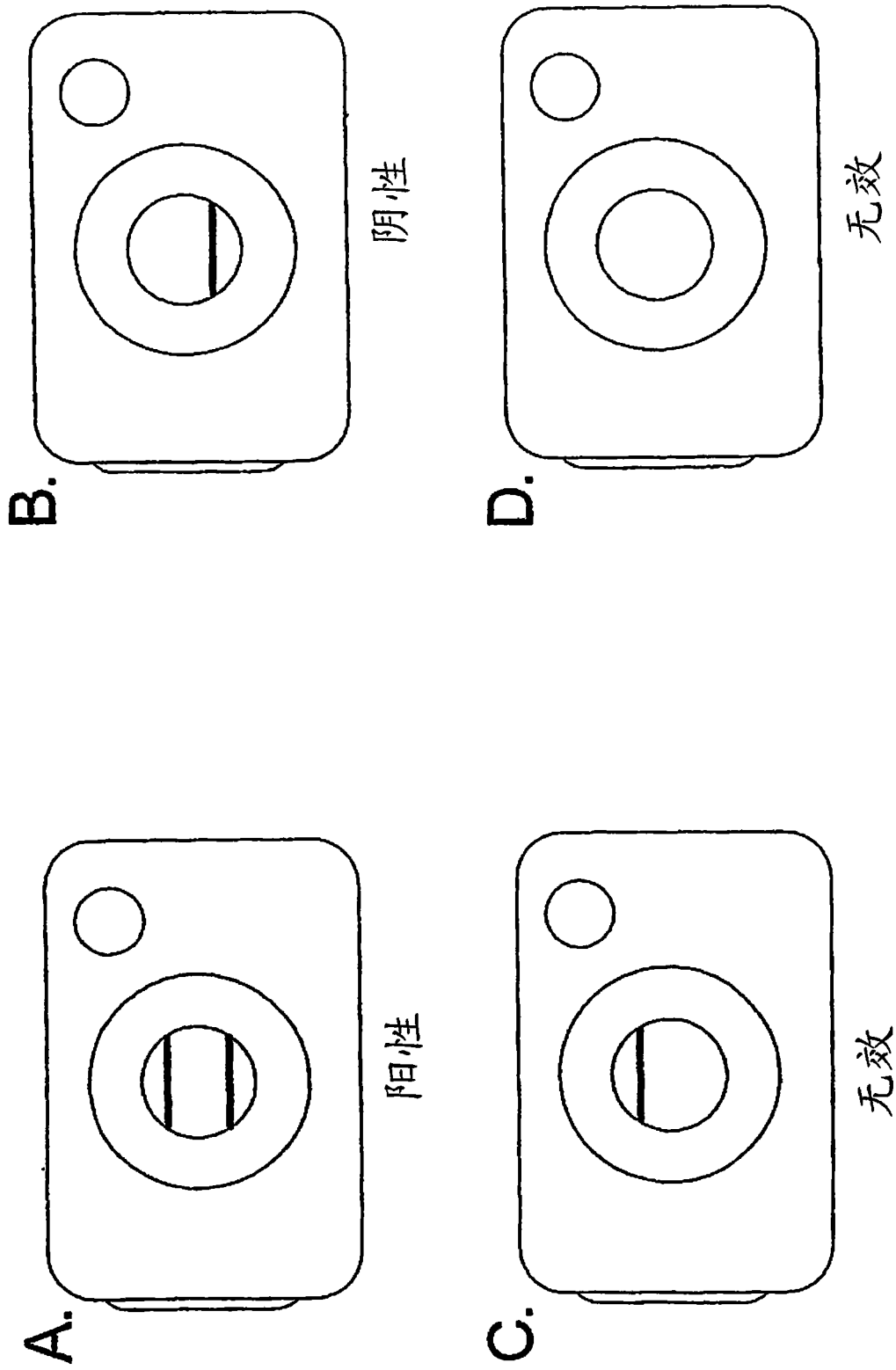


图 21

专利名称(译)	用于检测被分析物的设备和方法		
公开(公告)号	CN101111603A	公开(公告)日	2008-01-23
申请号	CN200580047141.8	申请日	2005-11-23
[标]发明人	詹姆斯H布尼 大卫M莱尔利 特蕾茜D威尔金斯		
发明人	詹姆斯·H·布尼 大卫·M·莱尔利 特蕾茜·D·威尔金斯		
IPC分类号	C12Q1/00 C12M1/36 G01N33/53 C12M1/38 G01N33/554 C12M3/00 G01N33/567		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N2333/33 G01N2333/906 G01N2333/79 G01N33/6803 G01N33/573 G01N33/6845 G01N2333/90611 G01N2333/90616 G01N2333/91097		
代理人(译)	刘新宇		
优先权	60/630152 2004-11-24 US		
其他公开文献	CN101111603B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供用于检测液体样品中的物质的检定和设备。该检定和设备利用多孔材料和含有特异结合对成分的多孔膜间的被动扩散以能够检测目标物质。

