



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101137897 B

(45) 授权公告日 2011. 01. 19

(21) 申请号 200680007856. 5

(22) 申请日 2006. 03. 10

(30) 优先权数据

60/660, 695 2005. 03. 11 US

60/680, 884 2005. 05. 13 US

11/172, 298 2005. 06. 30 US

60/741, 628 2005. 12. 02 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 09. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/008688 2006. 03. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02006/099191 EN 2006. 09. 21

(73) 专利权人 生化诊断系统公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 J·埃斯范迪亚里

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 刘健 黄可峻

(51) Int. Cl.

G01N 15/06(2006. 01)

G01N 21/00(2006. 01)

G01N 31/22(2006. 01)

G01N 33/00(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/566(2006. 01)

B01L 3/00(2006. 01)

C12M 1/34(2006. 01)

C12M 3/00(2006. 01)

C12Q 1/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1384358 A, 2002. 12. 11, 全文.

US 2004/0161859 A1, 2004. 08. 19, 全文.

US 6602719 B1, 2003. 08. 05, 全文.

US 6706539 B2, 2004. 03. 16, 全文.

US 6617116 B2, 2003. 09. 09, 全文.

US 2002/0119497 A1, 2002. 08. 29, 全文.

US 2003/0143639 A1, 2003. 01. 31, 全文.

US 6365417 B1, 2002. 04. 02, 全文.

审查员 关元

权利要求书 4 页 说明书 20 页 附图 21 页

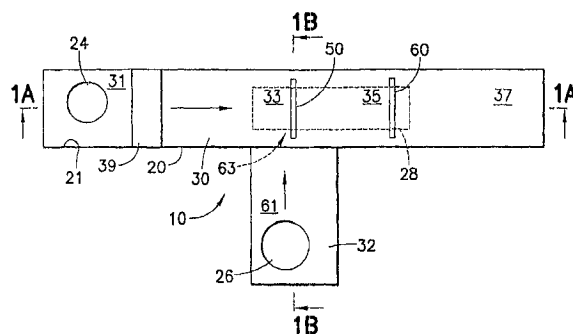
(54) 发明名称

双通道免疫测定装置

(57) 摘要

本发明的系统包括测试单元,其具有第一吸收性材料、第二吸收性材料和测试位点,所述第一吸收性材料限定出溶液的第一流动通道,第二吸收性材料限定出不同于针对样品的第一流动通道的第二流动通道,所述测试位点上面固定有抗原或抗体或其它配体结合分子,如适配体、核算等,该测试位点位于鉴别一种或多种配体的第一和第二吸收性材料的交点处。所述第一和第二吸收性条带在测试位点的位置彼此相接触。所述测试单元可用于验孕、HIV(包括不同的 HIV 抗原或肽),肺结核、朊病毒、尿/药检、心肌损伤标记物、癌标记物、Chagas 病、衣原体、口腔细菌(SM/LC)、流感病毒 A、流感病毒 B、腺病毒、轮状病毒、链球菌 A、其它细菌或病毒等等,以及兽医应用例如 CPV、

FIV、FeLV、以及心丝虫病等等,但其不限于这些应用。



1. 一种用于溶液并与具有标记物的缀合物结合使用的测试装置,该测试装置用于检测液态样品中是否存在配体,该测试装置包括:

a) 第一吸收性条带,其具有用于接收溶液的第一位点并限定了用于溶液和缀合物的第一迁移通道;

b) 不同于所述第一吸收性条带的第二吸收性条带,其具有用于接收液态样品第二位点并限定了用于样品的不同于所述第一迁移通道的第二迁移通道;以及

c) 测试位点,其位于所述第一吸收性条带和/或所述第二吸收性条带上面或里面,所述测试位点具有固定的配体结合机制,并且所述第一和第二吸收性条带在所述测试位点处相互接触,所述第二迁移通道从所述第二位点至少横向延伸到所述测试位点,使得施加到第二位点的液态样品需要时间以横向流动到测试位点而不是在施加后立即润湿该测试位点。

2. 根据权利要求1的测试装置,进一步包括:

d) 壳体,其限定了位于所述第一位点附近的第一开口,位于所述第二位点附近的第二开口,以及位于所述测试位点附近的视窗,通过该视窗可以看见所述测试位点。

3. 根据权利要求1的测试装置,进一步包括所述缀合物,其中所述第一吸收性条带承载着所述缀合物。

4. 根据权利要求3的测试装置,其中所述配体结合机制是针对所述配体的抗原或抗体,并且所述缀合物包括针对所述配体的抗原或抗体以及偶联到所述抗原或抗体上的标记物。

5. 根据权利要求4的测试装置,其中所述标记物是在可见光谱范围内可观察到的有色标记物。

6. 根据权利要求1的测试装置,其中至少所述第一吸收性条带包括对照位点。

7. 根据权利要求1的测试装置,其中所述第一吸收性条带和所述第二吸收性条带设置成“T”字构型。

8. 根据权利要求1的测试装置,其中所述第一吸收性条带和所述第二吸收性条带设置成“十”字构型。

9. 根据权利要求1的测试装置,其中所述第一吸收性条带具有第一孔径,所述第二吸收性条带具有第二孔径。

10. 根据权利要求9的测试装置,其中所述第二孔径大于所述第一孔径。

11. 根据权利要求10的测试装置,其中所述第一孔径在3到20微米之间,所述第二孔径在20到40微米之间。

12. 根据权利要求2的测试装置,其中至少所述第一吸收性条带包括对照位点,所述视窗中任何一个设计成可以观察到所述对照位点的尺寸,或者在所述壳体上提供第二个视窗以便可以观察所述对照位点。

13. 根据权利要求1的测试装置,进一步包括所述溶液,其中所述溶液含有缓冲液。

14. 根据权利要求1的测试装置,进一步包括所述溶液,其中所述溶液含有缓冲液和缀合物的子系统,所述缀合物具有针对所述配体的抗原或抗体和偶联到该抗原或抗体上的标记物。

15. 根据权利要求1的测试装置,其中所述固定的配体结合机制包括HIV抗原或抗体。

16. 根据权利要求 1 的测试装置,其中所述固定的配体结合机制包括抗原、抗体、适配体、核酸或酶,其用于检测怀孕、HIV、肺结核、朊病毒、尿 / 药检、衣原体、心肌损伤标记物、癌标记物、Chagas、口腔细菌、链球菌 A、流感病毒 A、流感病毒 B、腺病毒 / 轮状病毒、CPV、FIV、FeLV 以及心丝虫病中的至少一种。

17. 根据权利要求 1 的测试装置,其中所述第一吸收性条带包括第一薄膜和第一背衬层,所述第二吸收性条带包括第二薄膜和第二背衬层,所述第一吸收性条带和第二吸收性条带设置成使所述第一薄膜与所述第二薄膜相接触的形式。

18. 根据权利要求 17 的测试装置,进一步包括叠在所述第一吸收性条带下面或上面的第一粘性背衬卡片。

19. 根据权利要求 18 的测试装置,进一步包括叠在所述第二吸收性条带下面或上面的第二粘性背衬卡片。

20. 根据权利要求 1 的测试装置,其中所述第一吸收性条带和第二吸收性条带为同时整合到该第一吸收性条带和第二吸收性条带上的单个薄膜。

21. 根据权利要求 1 的测试装置,其中所述测试装置用于检测液态样品中多种不同配体的存在,而所述测试位点具有多个单独固定的用以分别结合所述多种不同配体中的每个的配体结合机制。

22. 根据权利要求 21 的测试装置,其中所述多种单独固定的配体结合机制包括肺结核抗原和至少一种 HIV 抗原。

23. 根据权利要求 21 的测试装置,其中所述多种单独固定的配体结合机制包括 p24 抗体和至少一种 HIV1 和 HIV2 抗原。

24. 根据权利要求 21 的测试装置,其中所述第一吸收性条带承载着多种不同的缀合物,其包括针对多种不同的配体的抗原和 / 或抗体以及偶联到该抗原和 / 或抗体上的标记物。

25. 根据权利要求 1 的测试装置,其中所述固定的配体结合机制设在含有各种不同的 HIV 抗原或抗体的至少四条线中。

26. 根据权利要求 25 的测试装置,其中所述不同的 HIV 抗原或抗体包括 p24、gp41、gp120、gp160 和 gp36 中的至少四种。

27. 根据权利要求 1 的测试装置,其中至少部分所述测试位点用可见的有色染料染色。

28. 一种与具有标记物的缀合物结合使用的测试装置,该测试装置用于检测液态样品中是否存在配体,包括:

a) 第一吸收性条带,其具有用于接收溶液的第一位点并限定了用于所述溶液和具有标记物的缀合物的第一迁移通道;

b) 不同于所述第一吸收性条带的第二吸收性条带,其具有用于接收液态样品第二位点并限定了用于样品的不同于所述第一迁移通道的第二迁移通道,所述第二迁移通道包括结合在中间结合剂上的抗体缀合物,所述抗体的选择使当样品中存在所述配体时与其结合;以及

c) 测试位点,其位于所述第一吸收性条带和 / 或所述第二吸收性条带上面或里面,所述测试位点具有固定的结合剂,所述中间结合剂和所述固定的结合剂选择成使其能够选择性地彼此良好结合,所述第一和第二吸收性条带在所述测试位点处相互接触,并且所述第

二迁移通道从所述第二位点至少横向延伸到所述测试位点,使得施加到第二位点的液态样品需要时间以横向流动到测试位点而不是在施加后立即润湿该测试位点。

29. 根据权利要求 28 的测试装置,其中所述第一吸收性条带承载着偶联到第二抗体上的标记物缀合物,该第二抗体的选择使当样品中存在所述配体时与其结合。

30. 根据权利要求 29 的测试装置,其中所述配体是 p24 抗原,所述与中间结合剂结合的抗体缀合物是与生物素结合的 p24 单克隆抗体,所述固定的结合剂是链亲和素。

31. 根据权利要求 29 的测试装置,其中所述配体是 p24 抗原,所述结合到中间结合剂上的抗体缀合物是与生物素结合的 p24 单克隆抗体,所述固定的结合剂是链亲和素,而所述偶联到第二抗体上的标记物是与 p24 单克隆抗体结合的有色乳胶缀合物。

32. 根据权利要求 1 的测试装置,其中所述第一吸收性条带和第二吸收性条带设置成非平行的构造。

33. 一种用于溶液并与具有标记物的缀合物结合使用的测试装置,该测试装置用于检测液态样品中是否存在配体,该测试装置包括:

a) 第一吸收性条带,其具有第一长度和第一宽度,所述第一长度显著大于第一宽度,还具有用于接收溶液的第一位点并限定了用于所述溶液和缀合物第一迁移通道;

b) 第二吸收性条带,其具有第二长度和第二宽度,所述第二长度显著大于第二宽度,所述第二吸收性条带不同于所述第一吸收性条带,其具有用于接收液态样品第二位点并限定了用于样品的不同于所述第一迁移通道的第二迁移通道;以及

c) 测试位点,其位于所述第一和第二吸收性条带的至少一个上面或里面,所述测试位点具有沉积在所述第一和第二吸收性条带的至少一个上面或里面的固定配体结合机制,所述第一和第二吸收性条带在所述测试位点处直接相互接触,并且所述第二迁移通道从所述第二位点至少横向延伸到所述测试位点,使得施加到第二位点的液态样品需要时间以横向流动到测试位点而不是在施加后立即润湿该测试位点。

34. 一种用于溶液并与具有标记物的缀合物结合使用的测试装置,该测试装置用于检测液态样品中是否存在配体,该测试装置包括:

a) 第一部分材料,其限定了用于接收溶液的第一位点并限定了用于所述溶液和缀合物第一迁移通道,其中所述材料是吸收性材料;

b) 第二部分材料,其限定了用于接收液态样品第二位点并限定了用于接收样品的不平行于所述第一迁移通道的第二迁移通道,其中所述材料是吸收性材料;以及

c) 测试位点,其位于所述第一和/或第二部分材料上面或里面,所述测试位点具有沉积在所述第一和/或第二部分材料上面或里面的固定配体结合机制,所述第一和第二部分材料在所述测试位点处相互接触,并且所述第二迁移通道从所述第二位点至少横向延伸到所述测试位点,使得施加到第二位点的液态样品需要时间以横向流动到测试位点而不是在施加后立即润湿该测试位点,其中所述材料是吸收性材料。

35. 根据权利要求 34 的测试装置,其中所述第一和第二迁移通道在所述测试位点处交叉。

36. 一种测试样品中是否存在配体的方法,所述方法包括:

a) 获得一种测试装置,其具有第一吸收性条带、第二吸收性条带和测试位点,所述第一吸收性条带具有用于接收溶液的第一位点并限定了用于该溶液和具有标记物的缀合物的

第一迁移通道,第二吸收性条带具有用于接收液态样品的第二位点并限定了用于样品的不同于所述第一迁移通道的第二迁移通道,所述测试位点位于所述第一和 / 或第二吸收性条带上面或里面,所述测试位点具有固定的配体结合机制,并且所述第一和第二吸收性条带在所述测试位点处相互接触,所述第二迁移通道从所述第二位点至少横向延伸到所述测试位点,使得施加到第二位点的液态样品需要时间以横向流动到测试位点而不是在施加后立即润湿该测试位点;

- b) 将样品施加到所述第二位点;
- c) 在施加样品之后,向所述第一位点施加所述溶液;以及
- d) 观察所述测试位点以确定该样品中是否有所述配体存在或不存在的指示。

37. 根据权利要求 36 的方法,其中

所述测试装置具有壳体,其限定了位于所述第一位点附近的第一开口和位于所述第二位点附近的第二开口,以及位于所述测试位点附近的视窗,通过该视窗可以看见所述测试位点,

所述加样步骤包括通过所述第二开口将样品滴到所述第二位点,

所述加溶液的步骤包括通过所述第一开口将溶液滴到所述第一位点,以及

所述观察步骤包括通过所述视窗观察。

38. 一种测试样品中是否存在配体的方法,所述方法包括:

- a) 提供一种具有带固定的配体结合机制和可见的溶解指示剂的测试位点的测试装置;
- b) 将样品施加到所述测试装置;
- c) 观察所述测试位点看所述可见指示剂是否消失;
- d) 在所述可见指示剂消失之后,向所述测试装置施加溶液;以及
- e) 在施加溶液之后,观察所述测试位点以确定该样品中是否有所述配体存在或不存在的指示,

其中所述测试装置具有第一吸收性条带和第二吸收性条带,所述第一吸收性条带具有用于接收溶液的第一位点并限定了用于该溶液和具有标记物的缀合物的第一迁移通道,第二吸收性条带具有用于接收样品的第二位点并限定了用于样品的不同于所述第一迁移通道的第二迁移通道,其中所述测试位点位于所述第一和 / 或第二吸收性条带上面或里面,并且所述第一和第二吸收性条带在所述测试位点处相互接触,

以及其中所述第二迁移通道从所述第二位点至少横向延伸到所述测试位点,使得施加到第二位点的液态样品需要时间以横向流动到测试位点而不是在施加后立即润湿该测试位点。

39. 根据权利要求 38 的方法,其中所述观察步骤包括观察所述测试位点以确定所述测试位点处是否捕获了具有标记物的缀合物。

双通道免疫测定装置

[0001] 发明背景

[0002] 1. 发明领域

[0003] 本发明主要涉及免疫测定装置及其使用方法。更具体来说,本发明涉及用于检测体液中的配体的快速层析测试条带。

[0004] 2. 现有技术

[0005] 已有多种配体-受体测定法被应用于检测体液,如血液、尿液或唾液中是否存在各种通常称为配体的物质。这些测定法涉及抗原抗体反应,包含放射性、酶、荧光或肉眼可见的聚苯乙烯或金属溶胶标记在内的合成缀合物,以及专门设计的反应腔。在所有这些测定法中,都具有受体,例如对所选配体或抗原具特异性的抗体,以及用于检测所述配体-受体反应产物是否存在、一些情况下还有其含量的手段。一些测试设计成用来进行定量测定,但在多数情况下需要的只是阳性/阴性的定性指示。这种定性测定法包括血型检测、大多数种类的尿检、验孕、以及 AIDS 检测。对于这些测试来说,优选肉眼可见的指示物,例如存在凝集现象或者颜色改变。

[0006] 即使是定性测定也必须非常灵敏,因为通常测试流体中目标配体的浓度较小。假阳性也很麻烦,特别是利用凝集反应和其它快速检测法例如浸渍条(dipstick)和变色测试的情况下。由于这些问题,人们开发出了所谓的“夹心”测定法和采用金属溶胶或其它种类有色颗粒的其它灵敏检测机制。

[0007] 在“夹心”测定法中,目标分析物例如抗原“夹在”标记抗体和固定在固相载体上的抗体之间。通过观察结合抗原-标记抗体复合物的存在和/或含量读取所述测定结果。在“竞争性”免疫测定法中,将结合到固相表面上的抗体与含有未知量抗原分析物的样品以及相同种类的标记抗原相接触。然后测定结合到固相表面上的标记抗原含量以提供对样品中抗原分析物含量的间接测定结果。

[0008] 由于这些和其它一些测定法可以同时检测出抗体和抗原,故其通常称为免疫化学配体-受体测定法或者简称为免疫测定法。

[0009] 固相免疫测定装置,无论是夹心还是竞争型的,均可提供对生物流体样品,如血液、尿液或唾液中的分析物的灵敏检测。固相免疫测定装置包括固相载体,其结合有配体-受体对的一部分,通常是抗体、抗原或半抗原。固相载体的早期通用形式有平板、试管、或聚苯乙烯珠,它们是放射性免疫测定和酶免疫测定领域公知的。近数十年来,采用了许多多孔材料作为固相载体,例如尼龙、硝酸纤维素、醋酸纤维素、玻璃纤维以及其它的多孔聚合物。

[0010] 已经记载了许多利用多孔材料作为免疫化学成分,如抗原、半抗原或抗体的固相载体的整套(self-contained)免疫测定试剂盒。这些试剂盒通常设计成浸渍式、连续流式、或者迁移式。

[0011] 在浸渍条测定的更通用形式中,典型的有家用怀孕和排卵检测试剂盒,是将免疫化学成分,例如抗体结合在固相上。将该测定装置“浸入”怀疑含有未知抗原分析物的样品中以进行培育。然后同时或者在培育期满之后加入酶标记抗体。然后洗涤该装置并插入含

有所述酶的底物的第二种溶液。如果存在的话,与所述底物相互作用的酶标记引起有色产物形成,它们要么作为沉淀物沉积到所述固相上,要么在所述底物溶液中产生可见的颜色变化。

[0012] 连续流(flow-through)式免疫测定装置设计成无需进行浸渍条测定法相关的大量培育步骤和繁琐的洗涤步骤。Valkris 等人的美国专利 US 4632901 中公开了一种装置,其包括结合到施加液态样品的多孔膜或滤片上的抗体(特异于目标抗原分析物)。随着液体连续流过所述膜,目标分析物与抗体结合。加入样品后接着加入标记抗体。对标记抗体的可见检测可提供样品中目标抗原分析物是否存在的指示。

[0013] Korom 等人的 EP-A0299359 公开了一种连续流装置的变形方式,其中用作反应物输送系统的膜中加入了标记抗体。

[0014] 浸渍条和连续流式免疫测定装置对于多个加样和洗涤步骤的需要增加了低训练程度的个人和家庭用户得到错误测定结果的可能性。

[0015] 在迁移式测定中,用需要进行测定的反应物浸渍薄膜。设置分析物检测区,在其中结合有标记的分析物并读取测定标记。例如,参见 Tom 等人的美国专利 US 4366241 和 Zuk 等人的 US 4596275。然而,由于样品中存在或形成了不希望有的固体成分,其阻断了标记分析物通往检测区的通道,因而降低了迁移式测定的灵敏度。

[0016] 迁移式测定装置内通常包含连接到有色标记(即缀合物)上的反应物,从而可以不用添加其它的物质就能够可见性地检测到测定结果。例如,参见 Bernstein 的美国专利 US 4770853。这些标记有胶体金颗粒,例如 Leuvering 在美国专利 US 4313734 中所述,染色溶胶颗粒,如 Gibnau 等人在美国专利 US 4373932 中所述,染色乳胶,如 May 等人的 WO 88/08534 中所述,以及脂质体包裹的染料,如 Campbell 等人的 US 4703017 中所述。这些有色标记通常受到合适固定化方法的限制。而且,它们需要相对大量的配体分子并涉及昂贵的反应物,因而增加了成本。因此,仍然需要一种极其可靠但又廉价快速的检测装置。而且还需要一种高灵敏度的测定法,其可采用小体积的样品同时提供准确的结果。

[0017] 发明概述

[0018] 因此本发明的一个目的在于提供一种快速检测的免疫测定装置。

[0019] 本发明的另一个目的在于提供一种使用简单并且结果准确的免疫测定装置。

[0020] 本发明的另一个目的在于提供一种无需使分析物沿着与含缀合物的缓冲液同样的路径迁移的免疫测定装置。

[0021] 本发明还有一个目的在于提供一种结构简单的快速检测免疫测定装置。

[0022] 本发明的另一个目的在于提供一种能够使用干燥或者液态缀合物系统的免疫测定装置。

[0023] 本发明的另一个目的在于提供一种在使用小体积样品时也可提供准确结果的高灵敏度免疫测定装置。

[0024] 本发明的另一个目的在于提供一种可适用于不同种类的体液的高灵敏度免疫测定装置。

[0025] 上述目的下面将进行详细论述,据此本发明同时提供了干燥和液态缀合物免疫测定装置系统。本发明的系统包括具有第一吸收性材料、第二吸收性材料和测试线或测试位点的测试单元,所述第一吸收性材料具有用于接收缓冲液(在干燥缀合物系统的情况下)

或者缀合物溶液（在液态缀合物的情况下）的第一位点，并且该第一吸收性材料限定了第一水平流动通道，所述第二吸收性材料具有用于接收样品的第二位点，并且该第二吸收性材料限定了不同于第一流动通道的第二水平流动通道，所述测试线或测试位点具有固定抗原或抗体或者其它的配体结合分子，如适配体、核酸等等，并位于所述第一和第二吸收性材料交界处的测试区内。鉴于本发明的目的，术语“不同的”当与短语“流动通道”或“迁移通道”结合使用时应当理解为“除通过测试区之外没有液体联通”。

[0026] 在本发明的测试单元设置在一壳体中的情况下，所述壳体具有邻近所述第一位点的第一开口和邻近所述第二位点的第二开口。在测试线上方的壳体上设有视窗。

[0027] 在本发明的优选实施方式中，所述第一吸收性材料和第二吸收性材料是彼此重叠的单独件，测试线印制在所述吸收性材料交界处的一个或者两个材料上。可替代性地但并非优选地，所述第一和第二吸收性材料可以彼此整合在一起。本发明的系统还优选包括可从视窗中看见的对照线或位点。

[0028] 根据本发明的一组实施方式，本发明的吸收性材料（以及将所述材料置于其中的壳体）排布成 T 字形，其中用于接收缓冲液或者缓冲液 - 缀合物溶液的第一位点位于所述 T 字形上面一横的一端附近，用于接收样品的第二位点位于所述 T 字形下面一竖的端部附近，并且所述吸收性材料在交点处彼此重叠。根据本发明的另一组实施方式，本发明的吸收性材料（以及将所述材料置于其中的壳体）排布成十字形，其中用于接收缓冲液或者缓冲液 - 缀合物溶液的第一位点位于其第一划的一端附近，用于接收样品的第二位点位于其第二画的一端附近，并且所述吸收性材料在交点处彼此重叠。当然，所述吸收性材料也可以排布成其它的构型，而无论所述吸收性材料排布成什么方式，所述壳体都可以呈其它的形状，例如矩形、正方形、不规则形等等。

[0029] 在本发明的一种实施方式中，所述第一和第二吸收性材料的材质、厚度和长度可以进行选择以调节液态样品和液态缓冲液到达所述测试位点的时间。

[0030] 在本发明的干燥缀合物系统中，干燥的缀合物设置在第一开口和测试位点之间。所述缀合物承载于所述吸收性材料的上面或内部，这样当缓冲液加入第一开口时，吸收性材料将缓冲液吸收到缀合物上，然后由缓冲液携带到测试位点。在本发明的液态缀合物系统中，设置有缓冲液 - 缀合物液态子系统，将其施加到第一开口中。然后所述吸收性材料将该缓冲液 - 缀合物子系统吸收到测试位点。

[0031] 根据本发明的一种方法，提供了一种包括测试单元的系统，该测试单元具有第一吸收性材料、第二吸收性材料和测试线或者测试位点，所述第一吸收性材料具有用于接收缓冲液（在干燥缀合物系统的情况下）或者缀合物溶液（在液态缀合物的情况下）的第一位点，并且该第一吸收性材料限定了第一水平流动通道，所述第二吸收性材料具有用于接收样品的第二位点，并且该第二吸收性材料限定了不同于第一流动通道的第二水平流动通道，所述测试线或测试位点具有固定抗原或抗体或者其它的配体结合分子，如适配体、核酸等等，并位于所述第一和第二吸收性材料交界处的测试区内。如果需要的话，也可以设置一壳体，其具有用于接收缓冲液或缀合物溶液的第一开口和用于接收样品的第二开口，以及位于所述测试线上方的视窗。将目标样品加到所述第二开口或位点中。经过预定时间之后，将诸如缓冲液之类的液体加到所述第一开口或位点中。如果所述吸收性材料承载着缀合物（即在干燥缀合物的系统中），则所述液体优选仅仅是缓冲液。如果所述吸收性材料不承载

缀合物（即在液态缀合物系统中），则所述液体优选是缓冲液-缀合物液态子系统。在各种情况下，在足以使缀合物迁移到测试位点（以及对照位点，如果有的话）的时间之后，观察测试位点（以及对照位点，如果有的话）以确定样品是否呈阳性。

[0032] 应当明白的是，本发明的系统可以用于不同种类的样品，例如血液、尿液、唾液以及粪便，并可用于测试任何配体的存在。在应用血液、唾液或粪便的情况下，可以在加入第二开孔之前先将所述血液、唾液或粪便进行稀释或与缓冲液混合。或者，在一些情况下，可以将所述样品加入开孔，然后再将稀释液加入同一孔中。

[0033] 本发明的测试单元优于现有技术，因为本发明的测试单元克服了缀合物和样品中的分析物之间的聚集/凝集问题，这在针对较大分析物如细菌的传统层析免疫测定中是个大问题。特别是在传统的层析免疫测定中，细菌和缀合抗体之间的复合物难以迁移到测试线并容易滞留在测试条带的底部或衬垫内。本发明中在样品到达测试位点之前分析物和缀合物之间没有复合物结合，因为所述分析物是通过其自己的通道施加到测试位点的，而缀合物也独自迁移。这样，本发明的系统极其灵敏和特异。

[0034] 对于本领域技术人员来说，参考详细说明并结合所提供的附图，本发明的其它目的和优点将更加显而易见。

[0035] 附图简要说明

[0036] 图 1 是本发明第一种实施方式的顶视示意图。

[0037] 图 1A 是沿图 1A-1A 线的横截面视图。

[0038] 图 1B 是沿图 1B-1B 线的横截面视图。

[0039] 图 2 是本发明第二种实施方式的顶视示意图。

[0040] 图 2A 是沿图 2A-2A 线的横截面视图。

[0041] 图 3 是本发明第三种实施方式的顶视示意图。

[0042] 图 4 是本发明第四种实施方式的顶视示意图。

[0043] 图 5 是本发明第五种实施方式的顶视示意图。

[0044] 图 6 是本发明第六种实施方式的顶视示意图。

[0045] 图 7 是本发明第七种实施方式的顶视示意图。

[0046] 图 8 是本发明第八种实施方式的顶视示意图。

[0047] 图 9 是本发明第九种实施方式的顶视示意图。

[0048] 图 10 是不采用壳体的本发明装置的顶视示意图。

[0049] 图 11 是表示本发明的测试装置相对于典型现有技术的 TB 测试装置的灵敏度比较表。

[0050] 图 12 包括两个表格和一个关键词，所述表格表示了本发明的测试装置与典型现有技术的 HIV1 和 HIV2 测试装置的灵敏度比较。

[0051] 图 13A-13G 是根据本发明的 HIV1/2 试剂盒产品的分解图/说明图，其中图 13A-13C 表示使用所述试剂盒产品的步骤，图 13D-13G 表示了各种可能的结果。

[0052] 图 14A-14G 是根据本发明的 HIV1/2 浸渍条测试产品的分解图/说明图，其中图 14A-14C 表示使用所述测试产品的步骤，图 13D-13G 表示了各种可能的结果。

[0053] 图 15A-15G 是根据本发明的 HIV1/2 筛选/确认试剂盒产品的分解图/说明图，其中图 15A-15C 表示使用所述筛选/测试产品的步骤，图 15D-15G 表示了各种可能的结果。

[0054] 图 16A-16E 是本发明的 HIV1/2 浸渍条实际获得的测试结果图。

[0055] 优选实施方式的详细说明

[0056] 现在参见图 1, 1A 和 1B, 提供了一种免疫测定装置测试单元 10, 其包括: 具有顶壁 21 并限定出第一和第二开孔 24、26 以及视窗 28 的 T 字形壳体 20; 以及第一和第二吸收性或吸湿性材料 30、32, 其在所述壳体中限定了垂直和水平的流动通道。所述第一吸收性材料 30 包括至少两个、优选三个或四个区域, 并且可以由多种材料制成。第一区域 31 (有时称为过滤区) 位于第一开孔 24 处并延伸到位于“T”字形交点处的第二区域 33 (有时称为测试区)。所述第一区域 31 优选包括滤片 31a, 衬垫 31b, 以及薄膜或吸收性或吸湿性材料 30 的第一部分, 所述衬垫的上面或里面沉积和固定有具有连接着有色标记的预定抗原或抗体的缀合物 39, 所述吸收性或吸湿性材料 30 通常由具有塑料背衬层 (未示出) 的硝酸纤维素制成。第一区域 31 适用于接收缓冲液, 以使所述缓冲液与所述缀合物接触从而固定所述缀合物, 并将携带所述缀合物的缓冲液吸收到第二区域 33。第二 (测试) 区域 33 包括薄膜 30 的第二部分, 优选在所述薄膜上印制具有固定抗原或抗体 (取决于所述测试单元设计成用于测试抗体还是抗原的存在) 的测试线 50, 如本领域所公知的那样。测试线 50 可以通过设置在所述壳体上的透明塑料视窗 28 看到。可选择的第三区域 35 (有时称为对照区) 包括所述薄膜 30 的第三部分, 其上也可以印制通常含缀合抗原的抗体 (或者在一些情况下是可结合缀合抗体的抗体, 或者甚至是可结合缀合抗体的抗原) 的对照线 60, 如本领域所公知那样。在设置第三区域 35 的情况下, 视窗 28 横在对照线 60 的上方。如果需要的话, 可以设置可选择的第四区域 37 (有时称为储液区) 作为吸收储液池, 这也是本领域所公知的。第四区域 37 包括相对较薄的吸收纸 31d。优选在所有的区域上重叠一个薄的, 并且优选是透明的塑料膜或卡片 38a, 其具有使所述吸收性材料保持在原位的粘合剂。卡片 38 可以在开孔 24 处切一道口, 使其不会阻碍液体进入开孔 24。

[0057] 第二吸收性材料 32 也可以由多种材料制成, 并优选包括 61、63 两个区域。第一区域 61 (有时称为过滤区) 包括滤片或衬垫 62 以及薄膜或吸收性或吸湿性材料 32 的第一部分, 32 通常由具有塑料背衬层 (未示出) 的硝酸纤维素制成。所述第一区域 61 位于第二开孔 26 处并延伸到第二区域 63。第二区域 63 包括与第一吸收性材料 30 的第二区域 33 相接触的薄膜 32 的第二部分。从图 1A 和 1B 中可以看出, 所述第一吸收性材料 30 重叠在第二吸收性材料 32 上, 使得所述薄膜彼此接触 (与接触薄膜或者相互接触的背衬层相对), 并使得测试线 50 有效地位于所述薄膜之间。因此, 取代于或者除了所述第一吸收性材料 30 的第二区域 33 之外, 测试线 50 还可以印制在第二吸收性材料 32 的第二区域 63 上。如果需要的话, 可以采用具有粘合剂的薄塑料膜或卡片 38b, 该粘合剂使所述第二吸收性材料保持在原位。

[0058] 在采用标准形式的具背衬层的硝酸纤维素条带作为第一和第二薄膜的情况下, 希望所述薄膜具有不同的孔径。例如, 如果薄膜 31 (用于缀合物迁移的) 的孔径为 3μ , 薄膜 32 (用于样品迁移的) 的孔径为 15μ , 则施加到薄膜 32 上的样品容易迁移并停留在样品薄膜 32 中而不容易迁移到缀合物薄膜 31 中, 对此下文中将更详细地进行论述。

[0059] 图 1 的免疫测定优选使用如下。首先, 将可能含有抗体 (或抗原) 的样品 (未示出) 加到所述第二开口或开孔 26 中, 并使其迁移通过所述第二吸收性材料 32 到达其与所述第一吸收性材料 30 的第二区域 33 相接触的第二区域 63。可选择地, 在将样品加到开孔

26 之后,可以将优选量的液体,如缓冲液加到开孔 26 中以帮助样品的迁移。无论怎样,样品都会到达测试线 50,其印制在所述第一吸收性材料的第二区域 33 顶面或者融合于其中。预定的时间之后,在这段时间内样品中的抗体(或抗原)(如果存在的话)有机会与固定在测试线 50 处的抗原(或抗体)结合,将优选量的液体,如缓冲液(未示出)加到所述第一开口 24 中。再过一段时间之后,这段时间足以使所述缀合物迁移到测试位点 50(以及对照位点 60,如果有的话),通过视窗 28 观察该测试位点 50(以及对照位点 60,如果有的话)以确定所述样品是否呈“阳性”。通常,当测试位点 50 和对照位点 60 均显出有色线时,即得到“阳性”实验,表明样品中存在抗体(或抗原)。当只有对照位点 60 显出有色线时,即得到“阴性”实验,表明样品中不存在抗体(或抗原)。

[0060] 通过以下方式可以加快本发明方法的实施:在所述壳体上设置数字和/或字母编号以标明所述开孔 26 是用于接收样品的(以及可选择的一些缓冲液)并且应当首先使用,而开孔 24 是用于接收缓冲液的并且应当第二步使用。

[0061] 本领域技术人员应当明白,所述免疫测定装置 10 具有如下功能。由于测试线 50 设置有固定在薄膜上的抗原(或抗体),如果测试样品中含有针对所述抗原的抗体(或者针对所述抗体的抗原),则所述抗体(或抗原)自身将在所述测试线处与所述抗原(或抗体)结合。之后,当使偶联到有色标记上并含有所述抗体的抗原(或者所述抗原的抗体)的缀合物 39 迁移到所述测试线时,如果所述测试样品中含有测试线 50 处已捕获的抗体(或抗原),则所述缀合物的抗原(或抗体)自身将结合于所述抗体(或抗原)上,并且所述有色标记将引起测试位点 50 处的有色线显色。如果所述测试样品中不含抗体(或抗原),则所述缀合物将不会使所述抗体(或抗原)在测试线 50 处结合,并且该测试位点 50 处将不会显出有色线。另一方面,由于对照线 60 设置有抗体(或抗原),所述缀合物的抗体(或抗原)总会与该对照线 60 处的抗体(或抗原)结合,从而当所述缀合物到达所述对照位点 60 时使得该对照位点 60 处的有色线显色。因此,如果将足量的缓冲液加到所述测试单元中,对照位点 60 处应当总会显现出有色线,从而给所述测试提供对照。

[0062] 现在参见图 2 和图 2A,表示了本发明的第二种实施方式。在图 1,1A,1B,2 和 2A 中,类似的附图标记用于表示类似的元件。因此,应当明白的是,图 2 和 2A 的第二种实施方式与图 1、1A 和 1B 的第一种实施方式之间的主要区别在于测试单元 10a 的第二吸收性材料 32a 呈钥匙形(优选通过冲压而成)。利用这种钥匙形设置,形成了区域 61a 以使其覆盖到狭窄的第二区域 63a。这样,几乎除所述测试线 50 以外,区域 63a 与所述第一吸收性材料 30 的第二区域 33 均有接触。本领域技术人员应当明白,图 2 的免疫测定测试单元 10a 可以与图 1 的测试单元 10 相同的方式使用,并以基本上相同的方式起作用。

[0063] 现在参见图 3,表示了本发明的第三种实施方式。在图 1,1A,1B 和 3 中,类似的附图标记用于表示类似的元件。因此,应当明白的是,图 3 的第三种实施方式与图 1、1A 和 1B 的第一种实施方式之间的主要区别在于,一种极薄的非多孔性材料 99,例如塑料,重叠在所述第二条带 32 上,位于第一硝酸纤维素条带 30 与第二硝酸纤维素条带 32 相接触的位置(除了在测试位点 50 处及其附近的狭窄区域)。由于材料 99 的缘故,条带 30 和 32 几乎只在测试线 50 的位置处彼此相接触。本领域技术人员应当明白,图 3 的免疫测定测试单元 10b 可以与图 1 的测试单元 10 相同的方式使用,并以基本上相同的方式起作用。

[0064] 现在参见图 4,表示了本发明第四种实施方式的免疫测定装置,其设有测试单元

10' (相对于图 1 的测试单元 10 稍有改变), 该测试单元 10' 包括: 具有顶壁 21' 并限定出第一和第二开孔 24'、26' 以及视窗 28' 的 T 字形壳体 20'; 以及第一和第二吸收性或吸湿性材料 30'、32', 其在所述壳体中限定了垂直和水平的流动通道。所述第一吸收性材料 30' 包括至少两个、优选三个或四个区域, 并且可以由多种材料制成。第一区域 31' (有时称为过滤区) 位于第一开孔 24' 处并延伸到位于“T”字形交点处的第二区域 33' (有时称为测试区)。所述第一区域 31' 优选包括滤片, 衬垫, 以及通常由具有背衬层的硝酸纤维素制成的薄膜 (其延伸到第二以及可选择的第三和第四区域), 所述衬垫上面或里面沉积和固定有具有连接着有色标记的抗原或抗体的缀合物 39'。第一区域 31' 适用于接收缓冲液, 以使所述缓冲液与所述缀合物接触从而固定所述缀合物, 并将携带所述缀合物的缓冲液吸收到第二区域 33'。第二区域 33' 上印制有测试线 50', 其如下文中所讨论那样位于所述第二吸收性材料 32' 下方。可选择的第三区域 35' (有时称为对照区) 可以设有对照线 60', 其通常含有缀合抗原的抗体 (或者在一些情况下是可结合缀合抗体的抗体, 或者甚至是可结合缀合抗体的抗原), 如本领域所公知那样。在设置有第三区域 35' 的情况下, 视窗 28' 横于所述对照线 60' 上方。如果需要的话, 可以设置可选择的第四区域 37' (有时称为储液区) 作为吸收储液池, 这也是本领域所公知的。第四区域 37' 包括相对较薄的吸收纸。优选在所有四个区域下设一个薄的塑料膜, 其具有使所述吸收性材料保持在原位的粘合剂。

[0065] 第二吸收性材料 32' 也可以由多种材料制成, 并优选包括 61'、63' 两个区域。第一区域 61' (有时称为过滤区) 位于第二开孔 26' 处, 并延伸到与第一吸收性材料 30' 的第二区域 33' 相接触的第二区域 63'。如果需要的话, 第二吸收性材料 32' 的第二区域 63' 可印制具有固定抗原或抗体 (取决于所述测试单元设计成检测抗体还是抗原的存在) 的测试线 50', 如本领域所公知那样。无论第二区域 63' 还是第二区域 33' 还是二者均设置有测试线 50', 所述测试线 50' 都可以通过壳体上设置的透明塑料视窗 28' 观察到。如图 4 (比较图 1) 所示, 第二吸收性材料 32' 重叠在第一吸收性材料 30' 上, 使得两个材料的薄膜至少在测试线位置处彼此接触。第二吸收性材料 32' 的形状可以如图 1 所示, 从而提供了一种具有背衬层的标准硝酸纤维素条带。或者, 材料 32' 的形状可以如图 2 所示, 使其与第一吸收性材料几乎只在测试线 50' 的位置处相接触。在另一种替代方式中, 材料 32' 的形状可以如图 1 所示, 并具有图 3 所示的非多孔薄膜, 使得材料 30' 和 32' 几乎只在测试线 50' 的位置处相互接触。

[0066] 本领域技术人员应当明白, 图 4 的免疫测定测试单元 10' 可以以与图 1 的测试单元 10 相同的方式使用, 并以基本上相同的方式起作用。

[0067] 现在参见图 5, 提供了一种免疫测定装置测试单元 10", 其包括: 具有顶壁 21" 并限定出第一和第二开孔 24"、26" 以及视窗 28" 的“T”字形壳体 20"; 以及 T 字形吸收性或吸湿性材料 30", 其在所述壳体中限定了垂直的流动通道。所述 T 字形吸收性材料 30" 包括至少三个、优选四个或五个区域, 并且可以由多种材料制成。第一区域 31" (有时称为过滤区) 位于第一开孔 24' 处并延伸到位于“T”字形交点处的第二区域 33" (有时称为测试区) 内。所述第一区域 31" 优选包括滤片, 衬垫, 以及通常由硝酸纤维素制成的薄膜及其背衬层, 在所述衬垫上面或里面沉积和固定有具有连接着有色标记的抗原或抗体的缀合物 39"。第一区域 31" 适用于接收缓冲液, 以使所述缓冲液与所述缀合物接触从而固定所述缀合物, 并将携带所述缀合物的缓冲液吸收到第二区域 33"。第二 (测试) 区域 33" 上印制有测试线

50”，其具有固定在膜上的抗原或抗体（取决于所述测试单元设计成检测抗体还是抗原的存在），如本领域所公知。测试线 50”可以通过设置在壳体上的透明塑料视窗 28”观察到。第三区域 61”（有时也称为过滤区）位于第二开孔 26”处，与第一和第二区域所确定的条带垂直，并延伸到第二区域 33”。可选择性的第四区域 35”（有时称为对照区）也可以印制通常含有缀合抗原的抗体（或者在一些情况下是可结合缀合抗体的抗体，或者甚至是可结合缀合抗体的抗原）的对照线 60”，如本领域所公知那样。在设置第四区域 35”的情况下，视窗 28”横于所述对照线 60”上方。如果需要的话，可以设置可选择的第五区域 37”（有时称为储液区）作为吸收储液池，这也是本领域所公知的。第五区域 37”包括相对较薄的吸收纸。优选所有区域的下方设一个薄的塑料膜，其具有使所述吸收性材料保持在原位的粘合剂。

[0068] 图 5 的实施方式与图 1-4 的实施方式的不同之处仅在于不是采用两个在测试区域彼此重叠单个材料条带，取而代之采用了一个 T 字形薄膜，其限定了具有区域 31”、33”、优选具有 35”和 37”的第一水平条带，以及具有区域 61”的第二（整体）条带，其在测试区域 33”处与第一条带接触。尽管图 5 的实施方式不能用不同孔径的材料来制备水平流动通道，但其保持了不同的迁移通道，而第一和第三区域除了通过第二（测试）区域之外彼此不流体连通。

[0069] 现在参见图 6，提供了一种免疫测定装置测试单元 110，其包括：具有顶壁 121 并限定出第一和第二开孔 124、126 以及视窗 128 的十字形壳体 120；以及第一和第二吸收性或吸湿性材料 130、132，其在所述壳体中限定了垂直的流动通道。所述第一吸收性材料 130 包括至少两个、优选三个或四个区域，并且可以由多种材料制成。第一区域 131（有时称为过滤区）位于第一开孔 124 处并延伸到位于“十”字形交点处的第二区域 133（有时称为测试区）。所述第一区域 131 优选包括滤片，衬垫，以及通常由硝酸纤维素制成的薄膜，在所述衬垫上面或里面沉积和固定有具有连接着有色标记的抗原或抗体的缀合物 139。第一区域 131 适用于接收缓冲液，以使所述缓冲液与所述缀合物接触从而固定所述缀合物，并将携带所述缀合物的缓冲液吸收到第二区域 133。第二（测试）区域 133 优选在所述薄膜上印制具有固定抗原或抗体（取决于所述测试单元设计成用于测试抗体还是抗原的存在）的测试线 150，如本领域所公知的那样。测试线 150 可以通过设置在所述壳体上的透明塑料视窗 128 看到。可选择的第三区域 135（有时称为对照区）上也可以印制通常含有缀合抗原的抗体（或者在一些情况下是可结合缀合抗体的抗体，或者甚至是可结合缀合抗体的抗原）的对照线 160，如本领域所公知那样。在具有第三区域 135 的情况下，视窗 128 横在对照线 160 的上方。如果需要的话，可以设置可选择的第四区域 137（有时称为储液区）作为吸收储液池，这也是本领域所公知的。第四区域 137 包括相对较薄的吸收纸。优选所述区域上重叠一个薄的塑料膜（通过图 1A 所示的方式），其具有使所述吸收性材料保持在原位的粘合剂。

[0070] 第二吸收性材料 132 也可以由多种材料制成，并优选至少包括 161、163、165 三个区域。第一区域 161（有时称为过滤区）位于第二开孔 126 处并延伸到与第一吸收性材料 130 的第二区域 133 相接触的第二区域 163。如果需要的话，取代于或者除了所述第一吸收性材料 130 的第二区域 133 之外，测试线 150 可以印制在第二吸收性材料 132 的第二区域 163 上。如图 6 中虚线所表示，第一吸收性材料 130 重叠在第二吸收性材料 132 上（如图 1

的实施方式中所示)。或者,可以使第二吸收性材料 132 重叠在第一吸收性材料 130 上(如图 4 的实施方式中所示),在这种情况下采用了粘合剂薄膜,并且应当适当地设置其它的元件。如果需要的话,可以设置可选择的第三区域 165(有时称为储液区)作为吸收储液池。第四区域 137 包括相对较薄的吸收纸。如果需要的话,可以采用具有粘合剂的薄塑料膜使所述第二吸收性材料保持在原位。

[0071] 图 7 中表示了本发明的第七种实施方式。在图 1、1A、1B 和 7 中,类似的数字用于类似的元件。因此,应当明白的是图 7 的第七种实施方式与图 1、1A 和 1B 的第一种实施方式之间的主要区别在于两条测试线 50A 和 50B 印制在第一吸收性材料 30 的区域 33 上和/或第二吸收性材料 32 的区域 63 上。这两条测试线 50A 和 50B 优选包括不同的固定抗原或抗体。例如,一条线(例如线 50A)可包括肽 HIV1 和/或重组抗原,如 gp41/gp120,而另一条线(例如线 50B)可包括肽 HIV2 和/或重组抗原,如 gp36。另一个例子是,其中一条线可包括肽 HIV1、HIV2 或 HIV1/2 和/或重组抗原,而另一条线包括肺结核抗原。如下面所讨论,在测试线包括不与单个缀合物(如蛋白 A)结合的固定抗体或抗原的情况下,可能希望使用具有连接着有色标记物的预定抗原或抗体的多种不同缀合物。本领域技术人员应当明白,图 7 的免疫测定测试单元 10c 可以以与图 1 的测试单元 10 相同的方式使用,并以基本上相同的方式起作用,只不过当测试线 50A 和对照位点 60 显出有色线时,获得“阳性”实验,表明样品中存在被测的第一抗体(或抗原);当测试线 50B 和对照位点 60 显出有色线时,获得“阳性”实验,表明样品中存在被测的第二抗体(或抗原);当测试线 50A 和 50B 以及对照位点 60 显出有色线时,获得“阳性”实验,表明样品中同时存在被测的第一和第二抗体(或抗原)。当只有对照位点 60(测试线 50A 和 50B 均无)显出有色线时,获得“阴性”实验,表明样品中不存在抗体(抗原)。当对照位点没有显出有色线时,获得无效测试结果。

[0072] 图 8 中表示了本发明的第八种实施方式。在图 1、1A、1B 和 8 中,类似的数字用于类似的元件。因此,应当明白的是图 8 的第八种实施方式与图 1、1A 和 1B 的第一种实施方式之间的主要区别在于三条测试线 50A、50B 和 50C 印制在第一吸收性材料 30 的区域 33 上和/或第二吸收性材料 32 的区域 63 上,并使用了两种不同的乳胶缀合物 39A、39B。三条测试线 50A、50B 和 50C 优选包括不同的固定抗原或抗体。例如,一条线(例如线 50A)可包括 p24 单克隆抗体,第二条线(例如线 50B)可包括肽 HIV1 和/或重组抗原,如 gp41/gp120,而第三条线(例如线 50C)可包括肽 HIV2 和/或重组抗原,如 gp36。在这种情况下,设置两种缀合物 39A、39B,其中缀合物 39A 是具有蛋白 A 并能与 HIV1 和 HIV2 抗体结合(如果存在的话)而不会与 p24 抗原结合的乳胶缀合物,缀合物 39B 是缀合到 p24 单克隆抗体上并能与样品中的 p24 抗原(如果存在的话)结合而不会与肽 HIV 和 HIV2 和/或重组抗原结合的乳胶珠。如图 8 所示,缀合物 39A 和 39B 位于迁移通道上不同的位点处(例如在一个衬垫的两个部分上,或者在两个相连的衬垫上)。然而,应当明白的是,缀合物 39A 和 39B 可以以混合物的方式施加到相同位置上。本领域技术人员应当明白,图 8 的免疫测定测试单元 10d 可以以与图 1 的测试单元 10 相同的方式使用,并以基本上相同的方式起作用,只不过线 50A、50B、50C 中的一条或多条以及对照线 60 显出颜色则表明 HIV 的“阳性”实验,只有对照位点 60 显出颜色表明“阴性”实验,而当对照线 60 没有显色时表明无效的实验。

[0073] 图 9 中表示了本发明的第九种实施方式。在图 1、1A、1B 和 9 中,类似的数字用于类似的元件。因此,应当明白的是图 9 的第九种实施方式与图 1、1A 和 1B 的第一种实施方式

之间的主要区别在于,第二吸收性材料 32^{'''} 包括具有滤片或衬垫 62^{'''} 的第一区域 61^{'''} (有时称为过滤区),上面具有连接着中间结合剂(无标记物)的抗体缀合物 39^{'''},所述测试区具有固定结合剂的测试线 50。所述中间结合剂和固定结合剂选择成使其能够非常好地彼此选择性结合。因此,例如,所述中间结合剂可以是生物素,固定结合剂可以是链亲和素。因而样品迁移通道中的缀合物 39^{'''} 可以是抗体,例如与生物素结合的 p24 单克隆抗体。同样,缓冲液迁移通道中的缀合物 39 优选是与抗体(例如单克隆抗体)缀合的乳胶标记物,该抗体可以与目标抗原结合。

[0074] 使用图 9 中设置成检测 p24 病毒的测试单元 10e,首先向第二吸收性材料 32^{'''} 中加入样品。当样品到达 p24 单克隆抗体-生物素缀合物 39^{'''} 时,如果样品中存在 p24 抗原(病毒)的话,其将与所述 p24 单克隆抗体-生物素缀合物结合,并迁移到条带 32^{'''} 的测试区 63^{'''},在其中生物素被位于条带 32^{'''} 和 / 或条带 31^{'''} 上测试线 50 处的链亲和素所捕获。因此,测试线 50 上将具有一种复合物,其中链亲和素连接着与 p24 单克隆抗体结合的生物素,p24 单克隆抗体又进一步结合着 p24 抗原。然后向第一吸收性材料 31 中加入缓冲液。所述缓冲液携带者乳胶标记物-单克隆抗体复合物 39 到达测试区 33,在此处复合物 39 的单克隆抗体与已有复合物上捕获的 p24 抗原结合,从而由于有标记物而呈现出有色线。如果样品中不存在抗原,则生物素-p24 单克隆抗体 39^{'''} 仍与链亲和素结合,使链亲和素、生物素和 p24 单克隆抗体的复合物滞留在测试线处。然而,当乳胶标记物单克隆抗体缀合物 39 到达测试区时,所述单克隆抗体没有可结合的抗原。因此,测试线 50 处不会捕获标记物缀合物 39,表现为“阴性”实验。

[0075] 本领域技术人员应当明白,图 9 的系统与本领域传统的测流层析系统相比具有较大的优势,因为中间结合剂(例如生物素)和固定结合剂(例如链亲和素)具有高度的亲和性,故其是一种极其灵敏的测试。

[0076] 现在参见图 10,提供了一种免疫测定试剂盒 200,包括刺血针 201,缓冲液包 202,采血环 203,酒精棉 204,粘性绷带 205,以及测试装置或测试单元 210。测试单元 210 类似于其它实施方式中的测试单元,除了某些地方,例如设置卡片背衬层 215 来代替壳体,以及设置在吸收性材料各部分上方的纸壳 217a、217b、217c。优选设置箭头标记来指示应向哪个方向推动纸壳 217a、217b 以从吸收性材料上去掉。更特别地是,测试单元 210 包括第一和第二吸收性或稀释性材料 230、232,其限定了垂直和水平的流动通道。所述第一吸收性材料 230 包括至少两个、优选三个或四个区域,并且可以由多种材料制成。第一区域 231(有时称为过滤区)位于第一吸收性材料的一端并延伸到位于“T”字形交点处的第二区域 233(有时称为测试区)。所述第一区域 231 优选包括滤片、衬垫,以及薄膜或吸收性或吸湿性材料 230 的第一部分,所述衬垫上面或里面沉积和固定有具有连接着有色标记的抗原或抗体的缀合物 239,所述 230 通常由具有塑料背衬层(未示出)的硝酸纤维素制成。第一区域 231 适用于接收缓冲液,以使所述缓冲液与所述缀合物接触从而固定所述缀合物,并将携带所述缀合物的缓冲液吸收到第二区域 233。所述第一区域的至少一部分通常被纸壳 217a 所覆盖。第二(测试)区域 233 包括薄膜 230 的第二部分,优选在所述薄膜上印制具有固定抗原或抗体(例如用于检测 HIV1/2 的肽 gp41/gp120 和 gp36)的一条或多条测试线(未示出)250,如本领域所公知的那样。测试线 250 处的吸收性材料可以是裸露的或者被透明的

塑料壳（未示出）所覆盖。可选择的第三区域 235（有时称为对照区）包括所述薄膜 230 的第三部分，其上也可以印制通常含有缀合抗原的抗体（或者在一些情况下是可结合缀合抗体的抗体，或者甚至是可结合缀合抗体的抗原）的对照线 260，如本领域所公知那样。所述第三区域同样可以是裸露的或者由透明塑料壳所覆盖。如果需要的话，可以设置可选择的第四区域 237（有时称为储液区）作为吸收储液池，这也是本领域所公知的。第四区域 237 包括相对较薄的吸收纸，并可以被壳 217b 所覆盖。优选在所述区域 231、235 和 237 下方设有使所述吸收性材料保持在原位的薄粘性条带（未示出）。所述粘性条带铺设在卡片 215 的上面。

[0077] 第二吸收性材料 232 也可以由多种材料制成，并优选包括 261、263 两个区域。第一区域 261（有时称为过滤区）包括滤片或衬垫 262 以及薄膜或吸收性或吸湿性材料 232 的第一部分，232 通常由具有塑料背衬层（未示出）的硝酸纤维素制成。所述第一区域 261 延伸到第二区域 263。该第一区域的至少一部分通常被纸壳 217c 所覆盖。所述第二区域 263 包括与第一吸收性材料 230 的第二区域 233 相接触的薄膜 232 的第二部分。所述第二吸收性材料 232 位于第一吸收性材料 230 下面，使得所述薄膜彼此接触，并使得测试线 250 有效地位于薄膜之间。因此，取代于或者除了所述第一吸收性材料 230 的第二区域 233 之外，测试线 250 可以印制在第二吸收性材料 232 的第二区域 263 上。优选区域 261 和 263 的下方设有使所述第二吸收性材料保持在原位的薄粘性条带（未示出）。所述粘性条带铺设在纸板 215 的上面。

[0078] 应当明白的是，可以改变图 10 的测试装置 210 以采用前述实施方式中的任何构造。

[0079] 使用者使用图 10 的试剂盒时，打开包含所有试剂盒元件的泡罩包装（未示出），去掉测试装置 210 的纸壳（如果有的话），打开酒精棉包装并用酒精棉 204 擦拭他 / 她的手指，用刺血针 201 刺破他 / 她的手指以取血。然后，使用者优选采用采血环 203 采一滴血（例如 5 微升），并将这滴血放在第二吸收性材料 232 的区域 261 的裸露部分上面。然后使用者可打开粘性绷带包装并将粘性绷带 205 贴在刺破的手指上。然后使用者打开缓冲液包装 202 并挤一滴（例如 30 微升）缓冲液在区域 261 中与所述血液相同的位置上。等待预期的时间（例如 5 分钟），以使血液迁移到测试区 263，之后使用者向第一吸收性材料 230 的第一区域 231 加两滴（例如 60 微升）缓冲液。在缓冲液加入区域 231 后等待一定的时间（例如 7 分钟），然后观察测试线 250 和对照线 260。测试线 250 和对照线 260 均显色表明是“阳性”实验，对照线 260 显色而测试线 250 处不显色表明是“阴性”实验。如果对照线 260 处不显色则表明实验结果无效。

[0080] 根据本发明的其它实施方式，为了代替在测试单元中设置具有连接着有色标记物的预定抗原或抗体的干燥缀合物沉积层，测试时可以根本不包括干燥的缀合物。而是采用（液态）缓冲液 - 缀合物子系统，并且无需缀合物衬垫（31b- 图 1A），这样所述薄的硝酸纤维素条带或者其它的吸收性材料可以直接偶联到滤片上（31a- 图 1A）。从而，在将样品滴到壳体中的第二开孔内并使其迁移到测试位点之后，将缓冲液 - 缀合物子系统滴在壳体中的第一开孔内并同样使其迁移到测试位点。

[0081] 根据本发明的另一些实施方式，为了取代设置在壳体顶部的视窗，可以在所述壳体底部设置视窗。

[0082] 本领域技术人员应当明白,本发明的实施方式可以采用许多不同的材料实现。例如,通常包括非常薄的嵌入膜、条带、片层或膜层的吸收性材料(一种或多种)可以由硝酸纤维素、滤纸、硅土制成,或者由例如,微孔或微粒的纺织或无纺纤维或其组合物制成。多种合适的材料及其组合记载于 Gordon 等人的美国专利 #4960691, Zuk 等人的美国专利 #4956275 中,这里引入二者全文作为参考。通常,硝酸纤维或其它吸收性材料设有如上所述的薄的非多孔性嵌入塑料背衬层。

[0083] 因此,根据本发明的其它一些实施方式,第一和第二吸收性材料的材质、厚度和长度可加以选择以调节液态样品和液态缓冲液(或缓冲液-缀合物子系统)到达测试位点的时间。通过对样品/分析物以及缓冲液或缓冲液-缀合物子系统设置单独的迁移通道,还可以选择材料以提高系统的灵敏度。

[0084] 在类似的方式中,应当明白的是吸收性材料可以以任何方式成型,并可采取任何尺寸,如本领域所知。因此,为了帮助加速吸湿,所述吸收性材料可以呈钥匙形,其中所述条带在接受缓冲液的第一开孔以及测试位点和对照位点处具有较小的宽度,而在储液池区域具有较大的宽度。这种设置表示在 Charlton 等人的美国专利 #5989921 中,这里引入其全文作为参考。在任何情况下,一般来说,测试条带长度显著大于宽度,并且宽度显著大于厚度。事实上,在本发明的至少一些实施方式中,所述条带在至少测试区域应当很薄(例如 1mm 厚)并且基本上透明,这样测试和对照线可以很容易通过测试条带看到。

[0085] 此外,所述壳体和吸收性材料可以集成在开放式的测流层析平台上,该平台上设有具有微柱的注模聚合物,所述微柱通过改变柱高度、直径、形状和/或间距能够精确控制流动。这种平台主要采用与壳体和吸收性材料相同的材料,并由 Amic AB of Uppsala, Sweden 出售,参见例如, www.amic.se。由于注模的聚合物通常可以是透明的,故整个壳体都可以看作视窗,通过它可以观察测试和对照线/位点。

[0086] 应当明白的是,根据所构建的测试类型(例如验孕、HIV、肺结核(TB)、朊病毒、尿/药检、心肌损伤标记物、癌标记物、Chagas 病、衣原体、口腔细菌(SM/LC)、流感病毒 A、流感病毒 B、腺病毒、轮状病毒、链球菌 A、其它细菌或病毒等等,甚至是兽医应用例如 CPV、FIV、FeLV、以及心丝虫病),所述目标抗体(或抗原)将有所不同,因而在测试条带中使用的抗原(或抗体)需要与之相适应。同样,所述缀合物的抗原或抗体也需要与之相适应。在一些情况下(例如 HIV),测试条带中可以采用与缀合物中相同的抗原,因为 HIV 抗体的结合位点会在测试位点处结合 HIV 抗原,其仍具有另外的 HIV 抗体结合位点用以结合抗原-缀合物,而在其它情况下,可能需要不同的抗原。类似地,应当明白根据所构建的测试类型,如果具有对照位点的话也需要与之相适应。因此,例如在 HIV 抗体检测实验中,测试区识别的配体为 HIV1 和/或 HIV2 抗体,则测试区的抗原可以是肽 HIV1(例如 gp41/gp120)和肽 HIV2(gp36),和/或重组抗原。缀合物可以是缀合到蛋白 A、蛋白 A/G、抗人 IgG/IgM、肽或重组抗原的有色乳胶珠或胶体金。

[0087] 本领域技术人员应当明白,缀合物的标记物可以采取多种形式,包括不同种类的金溶胶,有色乳胶珠,各种酶类等等。尽管本发明的优选实施方式提供了一种肉眼容易看见的检测信号,但应当明白本发明还包括可通过紫外线或其它技术如荧光镜来检测的其它标记物。因此,应当明白的是,可以提供一种能够通过诸如荧光镜或数字读取仪之类的自动读取装置读取的、采用本发明的测试单元的系统。

[0088] 本发明提高了灵敏度但不包括测试的特异性。灵敏度提高的主要原因是通过不同的迁移通道改进了样品到测试区的迁移,以及在缀合标记物与测试区复合物反应之前测试区中分析物与结合位点的有效结合。例如,在 HIV 测试的情况下,应用到第二吸收性条带上的血清样品中的 HIV 特异性抗体将迁移到测试区并与 HIV 测试线(一条或数条)结合。血液中再没有其它的免疫球蛋白 G(IgG) 会结合到测试区中固定的 HIV 抗原上。当缓冲液加入第一吸收性条带,使蛋白 A 与乳胶珠或胶体金的缀合物迁移到测试区时,所述蛋白 A 缀合物将与已在测试线处被 HIV 抗原所捕获的 HIV 抗体的 FC 部分结合。由于蛋白 A 与 HIV 抗体的 FC 部分之间的结合非常牢固,仅需要提供少量的 HIV 抗体就能检测到。这样就与血液样品中所有人 IgG(包括 HIV 抗体)在迁移到测试线之前都要与蛋白 A 结合的传统测流层析 HIV 测试系统形成了鲜明对比,因为蛋白 A 会非特异性地结合所有的 IgG。因此,全部的蛋白 A、IgG、胶体金/乳胶珠复合物都将迁移到含有 HIV 抗原的测试线处。而之后只有 HIV 抗体、蛋白 A、胶体金/乳胶珠缀合物会与 HIV 抗原结合。然而,由于样品中有大量的非相关 IgG 和少量的 HIV 抗体存在,因而风险在于没有足够的 HIV 抗体与蛋白 A 结合,故有色线不可见。

[0089] 通过比较基本上如图 10 所示的本发明的 TB 免疫测定法(“新一代”)与标准的快速测试 TB 免疫测定法(TB Stat-PakII),可以证实本发明提高了灵敏度。制备 16 个样品,两个一组,分为八个不同的抗体水平(32U/ml、8U/ml、2U/ml、1U/ml、1/2U/ml、1/4U/ml、1/8U/ml、以及 0U/ml 的对照)。比较实验的结果参见图 11,本发明的免疫测定法表现出比标准现有技术的测试提高了至少八倍的灵敏度(即,在 1/4U/ml 时本发明的免疫测定法检测到了阳性结果,而现有技术的测定法在 2U/ml 时检测到了疑似结果)。此外,20 个阴性样品没有表现出假阳性结果。

[0090] 通过比较基本上如图 10 所示的本发明的 HIV1 和 HIV2 免疫测定法(“NG HIV 测试”)与标准快速测试 HIV 免疫测定法(HIVStat-Pak),也可以证实本发明提高了灵敏度。制备不同稀释水平的样品(对于 HIV-1:1:64,1:128,1:256,1:1024,1:2048,1:4096,1:8192,对于 HIV-2:1:2,1:4,1:8,1:16,1:32,1:64,1:128,1:256,1:1024,1:2048)。比较实验的结果参见图 12,本发明的免疫测定法表现出比标准现有技术的测试提高了大约四倍的灵敏度(即,对于 HIV1 来说,本发明的免疫测定法在 1:4096 稀释比时检测到了最灵敏的阳性结果,而现有技术的测定法在 1:1024 稀释比时检测到了最灵敏的阳性结果;对于 HIV2 来说,本发明的免疫测定法在 1:512 稀释比时检测到了最灵敏的阳性结果,而现有技术的测定法在 1:128 稀释比时检测到了最灵敏的阳性结果)。此外,NG HIV 测试的 120 个阴性样品实验表现出的假阳性率低于 1%。

[0091] 据信本发明的免疫测定实验条带装置可以比现有技术的装置减少测定时间。特别是已知在常规的层析条带测试中血液、粪便或唾液迁移的非常慢。然而,在本发明的免疫测定实验条带装置中,由于对样品提供了单独的迁移通道,所采用的吸收性材料可以相对于目标测试进行特别选择以使其迅速迁移而不用关注其相对于缀合物迁移,因而测定时间相对于现有技术来说非常迅速。例如,第一吸收性材料 30、30'、30''、130、230 可以由具有较小孔径的材料制成(例如但不限于,小于 20 微米,更优选 3 到 15 微米),而第二吸收性材料 32、32'、32''、132、232 可以由具有较大孔径的材料制成(例如但不限于,大于 20 微米,更优选 25 到 40 微米)。在这种方式下,具有分析物的样品能够更容易地沿着其通道向下迁移,同

时,在较小孔径的第一吸收性材料上设置有高灵敏度的测试条带线。此外,如前面所提到,通过提供孔径大于第一吸收性材料孔径的第二吸收性材料,样品从第二吸收性材料到第一吸收性材料的迁移受到了适当的限制。

[0092] 具有较小孔径的吸收性条带(薄膜)实例包括来自 AdvancedMicrodevice of Ambala, India 的 MDI-08(8 微米),MDI-10(10 微米),MDI-15(15 微米),以及来自 Whatman, Inc., Floral Park, New Jersey 的 SP(3 微米),FP(5 微米),和 RP(8 微米)。具有较大孔径的吸收性条带实例有来自 Schleicher&Schuell Bioscienc, Inc., Keene, NewHampshire 的 P40(30 微米)。

[0093] 另外,据信在没有样品的情况下缀合颗粒的迁移具有更加均匀和一致的迁移性,从而提高了背景噪音的去除。

[0094] 本发明的免疫测定实验条带装置的另一个优点在于其克服了传统的层析免疫测定中由于存在大分析物(例如细菌)而引起的标记物缀合物与样品中分析物之间形成聚集/凝集的问题。现有技术中,细菌和缀合抗体之间的大复合物很难迁移到测试线。结果,所述复合物容易滞留在测试条带的底部或衬垫中。利用本发明,样品中的细菌直接施加到(过滤后)测试位点并固定于此,而标记物缀合物在没有样品的情况下自由迁移到测试位点。当标记物缀合物到达测试位点时,已被测试位点中的固定抗体所捕获的细菌与所述缀合物结合。因此,本发明的系统极其灵敏和特异。

[0095] 本发明的另一个优点在于能够高灵敏度地提供多种传染病的测试,当其印制成测试区中单独的线条时也不会由于交叉反应而有损特异性或者降低多种分析物的灵敏度。特别是在传统的测流层析测定中,样品和缀合物一起迁移。如果现有技术的装置中设置了多条测试线,则每条线都将滞留分析物或者与分析物发生交联反应,使得可见的结果在后来的线条中不断减弱。相反,利用本发明,含有数种分析物的样品将在没有缀合物的情况下迁移到测试区并同时到达数条线。因此,分析物可以等价的结合数条线,因而可以保持相同水平的灵敏度。然后,将缀合物引入不同的迁移通道并与已固定在所述线条上的复合物结合。例如,对于同时检测患者样品中的 HIV 和 TB 抗体来说,HIV 抗原和 TB 抗原固定成测试区中单独的线条,向一条条带施加样品以迁移并结合于测试区。然后向另一条带中加入缓冲液以使蛋白 A 胶体金或乳胶珠迁移并结合于 HIV 抗原-抗体复合物和 TB 抗原-抗体复合物上。由于测试的高灵敏度,如果存在的话将检测到 TB。这很重要,因为同时感染 HIV 和 TB 的患者中,TB 的抗体效价容易较低。

[0096] 根据本发明的另一种方式,其提供了用于多重感染疾病(例如 HIV 和 TB)的测试,可以使用不同颜色的乳胶颗粒来缀合设置在所述缀合垫中或者缓冲液中的不同抗原或抗体。结果,测试区将显现不同颜色的线条,其中一种颜色(例如红色)对应于一种疾病(例如 HIV),另一种颜色(例如蓝色)对应于另一种疾病(例如 TB)。

[0097] 本领域技术人员应当明白,向一个吸收性条带施加样品和向另一个吸收性条带施加缓冲液之间所等待的时间根据样品的粘度和用于接收样品的吸收性条带的各种性质而有所不同,例如这些性质包括,孔径和条带长度。因此,通常来说,测试装置中会包含说明书以指导使用者在向一条条带中加入样品(以及可选择性的缓冲液)之后等待预定量的时间(例如五分钟),再向另一条条带中加入缓冲液。在最高百分比的情况下为了获得最佳的结果,所选择的等待时间大大上长于实际所需。因此,根据本发明的另一种方式,为了减少等

待时间,在本发明的前述任何实施方式的测试位点处设置有可见的食用着色性或其它的水溶性染料。当样品和可选择的缓冲液加入测试装置时,在样品迁移到测试位点后,稀释了测试位点处的染料并且变得肉眼不可见,从而提供了一种可见的指示表明可以适当地向另一条带加入缓冲液而不会影响测试的效率。

[0098] 利用测试位点处具有可见染料的测试装置,使用者根据说明在测试位点处的颜色消失后加入缓冲液。因此,根据本发明的一种方法,用于测定液态样品中配体存在的测试装置设有具固定的配体结合机制和可见的溶解性指示物的测试位点。将样品施加到测试装置并观察测试位点以查看所述可见指示物否消失。然后,向测试装置中加入溶液(缓冲液)。一段时间后,在观察测试位点以确定样品中是否存在所述配体的指示。

[0099] 图 13A-13G 是根据本发明的 HIV1/2 试剂盒产品的分解图/说明图,其中在测试位点处采用了可见的染料。大致按照前述实施方式中任何一种方式构建该试剂盒产品,其中具有四个开口或视窗的塑料试剂盒壳体。四个开口中的第一个标记为 S+B,用以接收测试样品加缓冲液。四个开口中的第二个标记为 B,用以接收额外的缓冲液。四个开口中的第三个标记上数字 1、2、3、4 和 5,并设有对应于五种不同的 HIV 抗原或肽(优选分别为 p24、gp41、gp120、gp160 以及 gp36)的测试线。标记为 C 的第四个开口设有对照线。第三个开口中呈现出的测试线设有有色染料(例如蓝色)以使其可见。第四个开口中呈现出的对照线也设有有色染料(例如绿色)以使其可见。

[0100] 使用图 13A 所示的装置,向标有 S+B 的样品孔中加入优选大约 10 μ l 的血清或血液。然后如图 13B 所示,向样品孔中加入优选大约 30 μ l 的缓冲液。样品向测试区的迁移(通常借助缓冲液)使得测试区和对照线的染料消散。所述线条上染料的消失证明样品已到达测试区。同时,如图 13C 中所示,向标记为 B 的开孔中加入大约 90 μ l 的缓冲液以使缀合物标记物迁移到测试区。过一段时间之后读取结果。图 13D-13G 表示了四种结果的实例。图 13D 中,只看到对照线 C,因而表明是有效结果,测试样品对 HIV1 和 HIV2 抗体呈阴性。在图 13D 中,可以看见对照线和第 1、2、3、4 条线,因而表明是有效结果,测试样品对四种不同 HIV1 型抗体呈阳性而对 HIV2 型抗体呈阴性。在图 13F 中,可以看见对照线和第 5 条线,因而表明是有效结果,测试样品对 HIV2 型抗体呈阳性而对四种不同的 HIV1 型抗体呈阴性。在图 13G 中,对照线和第 1-5 条线全都可以看见,因而表明是有效结果,测试样品对四种不同的 HIV1 型抗体和 HIV2 型抗体均呈阳性。值得注意的是,如果看不见对照线 C,则不能认为测试结果有效。还应当注意的是第 1-4 条线中可以只有一条、两条或三条线表现出阳性结果,参见图 15A-15D 中所示,原因是样品不必包含或不包含全部四种不同的 HIV1 型抗体。

[0101] 图 14A-14G 是根据本发明的 HIV1/2 浸渍条测试产品的分解图/说明图。图 14A-14G 完全对应于上述图 13A-13G,只不过用视窗代替了所包含的塑料壳体,图 14A-14G 的测试产品是位于卡片上的浸渍条产品。

[0102] 图 15A-15G 是根据本发明的 HIV1/2 确认/测试试剂盒产品的分解图/说明图,其中在测试位点处采用了可见的染料。该确认/测试产品基本上与图 13A-13G 的产品相同,并大致按照前述实施方式中任何一种方式构建它,只不过 15A-15G 的产品设有具五个开口或视窗的塑料盒壳体,而不是图 13A-13G 产品中的四个。五个开口中的第一个标记为 S+B,用以接收测试样品加缓冲液。五个开口中的第二个标记为 B,用以接收额外的缓冲液。五个开口中的第三个标记为 T,对应于测试线,所述测试线具有第四个视窗中包含的所有 HIV 抗

原或肽。五个开口中的第四个标记标记上数字 1、2、3、4 和 5,并设有对应于五种不同的 HIV 抗原或肽(优选分别为 p24、gp41、gp120、gp160 以及 gp36)的测试线。标记为 C 的第五个开口设有对照线。第二和第三个开口中呈现出的测试线设有有色染料(例如蓝色)以使其可见。第四个开口中呈现出的对照线也设有有色染料(例如绿色)以使其可见。

[0103] 图 15A-15G 的筛选/证实测试产品使用方式与图 13A-13G 的产品相同。二者不同之处在于第三视窗 T 提供了数字的筛选结果,即对含 HIV 抗体的样品有是或否的响应。特别是由于测试线 T 含有设置在测试线 1-5 上的所有抗原或肽的组合,如果观察到了其它测试线 1-5 中的任何一条,则其就可以被观察到。测试线 1-5 提供了所述结果的细节,即检测到了那个或那些 HIV1 抗体,以及是否检测到了 HIV2 抗体。

[0104] 图 16A-16E 是本发明的 HIV1/2 浸渍试纸上获得的实际测试结果图。如图 16A 所示,可以看到对照线和一条线(gp36),表明是有效测试,所述样品对 HIV2 型抗体呈阳性。图 16B 表示可看到对照线和第一和第五条测试线,表明是有效测试,所述样品对与 p24 抗原结合的 HIV1 抗体以及 HIV2 型抗体(与 gp36 抗原结合的)呈阳性,而对 HIV1 抗体呈阴性。图 16C 表示可看到对照线和第二条测试线,表明是有效测试,所述样品对与 gp41 抗原结合的 HIV1 抗体呈阳性,而对其它 HIV1 抗体和 HIV2 型抗体呈阴性。图 16D 表示可看到对照线和第一、二和四条测试线,表明是有效测试,所述样品对与 gp24、gp41 和 gp60 抗原结合的 HIV1 抗体呈阳性,而对其它 HIV1 抗体和 HIV2 型抗体呈阴性。图 16E 表示可看到对照线和第一到五条测试线,表明是有效测试,所述样品对被测的所有 HIV1 抗体和 HIV2 抗体都呈阳性。

[0105] 实施例 1——HIV 测试

[0106] 制备用于接收样品和缓冲液的条带 1——用于采集和输送样品的测试条带制备如下。将 20-30 微米孔径(Whatman Inc., USA)的硝酸纤维素膜(5×25mm)层压到塑料卡片上。用 PBS、8.4 和 NP40 处理纤维素纸(S&S, Germany)的样品垫,并将其连接到硝酸纤维素膜上。用同样的方法制备多条测试条带 1。

[0107] 制备仅用于接收缓冲液并具有缀合物区和测试与控制线的条带 2——用于检测 HIV1 和 HIV2 抗体的测试条带制备如下。将合成 HIV1 肽 gp41、gp120 和合成 HIV2 肽 gp36 进行生物素化,然后与亲和素(Zymed, Inc., USA)混合。用 0.2 微米的过滤器过滤该混合液,并以 0.25-0.50mg/ml 的浓度固定在 10-15 微米孔径的硝酸纤维素膜(MDILtd., Ambella, India)上,利用 ISO-Flow 打印机(Imagine Technology, Inc. USA)将该硝酸纤维素膜用作测试线。将浓度为 0.25mg/ml 的蛋白 A(Zymed Inc., USA)以同样的方式固定以作为对照线。在 37℃ 下干燥所述薄膜一小时。然后将所述薄膜层压到薄膜背衬层(G&L, Inc. USA)上。利用多孔聚酯基质(Alstrom, Inc. USA)制备缀合物垫。用缀合有紫色胶体金颗粒的蛋白 A(Zymed Inc., USA)喷涂所述衬垫,所述胶体金颗粒大约 40nm, OD 60,并用缀合物缓冲液(50mM PBS, 蔗糖, BSA, VPA, Tween 20)进行了重悬,在 37℃ 下干燥一小时。通过将胶体金缀合物垫、样品垫(S&S, Inc., Germany)以及吸收垫(S&S, Inc., Germany)连接到附于层压卡片上的硝酸纤维素膜上,从而制备出测试条带(7.2×62mm)。用相同的方法制备对条测试条带 2。

[0108] 在试剂盒中组装条带 1 和条带 2——将条带 2(7.2×62mm)置于试剂盒底部,使其层压卡片位于最低部,缀合物垫、样品垫、测试和对照线面朝上。然后,将条带 1 置于试剂盒的底部。使条带 1 接触条带 2 的测试位点部位,其中条带 1 的硝酸纤维素膜与条带 2 的硝

酸纤维素膜相接触。然后将实际盒顶部置于实际盒底部上,所述试剂盒的顶部具有单独的样品和缓冲液开口,并在测试和对照位点部位上方具有视窗。用相同的方法制备多个组件(以下称为 Chembio DPP(双通道平台)HIV1/2 组件)。

[0109] 测试步骤——将 5 μ l 血清、血液加入所述样品开孔中,然后将立即将 1 滴 (40–50 μ l) 缓冲液 (PBS, pH 8.5–9.5, 鸡血清, EDTA, Tween20) 加入该样品开孔。等待一到两分钟直到所述样品到达测试区并且彩色线 (控制含量) 消失后,向所述缓冲液开孔中加入三或四滴 (大约 130–150 μ l) 相同的缓冲液。十五分钟后,读取测试结果。显现出两条粉色线 (测试和对照) 表明为阳性结果。显现出一条带 (对照) 表明是阴性结果。没有条带显现表明是无效结果。

[0110] 测试结果——在上述制备并组装的组件中测试来自 BBI Inc., USA 的商用混合 HIV1 和 HIV2 的固定 (panel) 特征,结果如下。

[0111]

PRZ-204 BBI	HIV 类型	Chembio DPP HIV 1/2	Western 印记 1, Cambridge Biotech	Western 印记 2, Genlabs	ELIA 1/2 Abbott
1	1	阳	阳	无效	阳
2	阴	阴	阴	阴	阴
3	2	阳	无效	阳	阳
4	2	阳	阳	阳	阳
5	1	阳	阳	无效	阳
6	2	阳	无效	阳	阳
7	1	阳	阳	无效	阳
8	2	阳	无效	阳	阳
9	1	阳	阳	无效	阳
10	1	阳	阳	无效	阳
11	2	阳	阳	阳	阳
12	2	阳	阳	阳	阳

13	1	阳	阳	无效	阳
14	1	阳	阳	无效	阳
15	2	阳	无效	无效	阳

[0112] 通过 Chembio DPP HIV1/2 和 ELIA1/2 Abbott 测试正确检测到了所有的样品。第 15 号样品用两种 Western 印记法测试并采用 ASTPHLD/CDC 标准 (MMWR, Vol. 38 S-7 1989) 结果都不确定, 而用 Chembio DPP HIV1/2 和 ELIA1/2 Abbott 测试为阳性。

[0113] 实施例 2——结合分枝杆菌 (TB)

[0114] 制备如实施例 1 中的测试装置, 仅改变了条带 2 用以检测 TB 抗体。对条带 2 的改变是通过: 获得浓度在 1.0mg/ml 的 TB 重组抗原 (F10、E6、P10、14、16) 混合物以代替 HIV 肽, 并以 0.5 μ l/cm 的量将该 TB 重组抗原固定在薄膜上的测试线中, 从而生成第一条测试线 (T1)。第二条测试线 (T2) 是浓度在 0.05mg/ml 的 TB 抗原脂阿拉伯糖酸甘露糖 (LAM), 也以 0.5 μ l/cm 的量将其固定在测试区。将用浓度为 0.25mg/ml 的 PBS 7.4 稀释的蛋白 A 固定作对照线。将缀合有大约 40nm 的紫色胶体金颗粒的蛋白 A/G (Pierce, USA) 和抗人 IgM (Sigma, USA) 施加到缀合物垫上。

[0115] 测试步骤——用于 TB 测试的测试步骤与实施例 1 相同, 只不过样品体积为 10 μ l 血清。

[0116] 测试结果——将总共 300 个商用 TB 样品 (Zeptomatrix Inc, USA) 用 DPP TB 测试产品检测。所有的阳性样品培养物呈阳性结果, 但一些样品涂片呈阴性并同时感染了 HIV。该地方性样品所达到的总灵敏度和特异性分别为 75% 和 90%。

[0117] 实施例 3——HIV 确认浸渍条

[0118] 如实施例 1 那样制备用于检测 HIV1 和 HIV2 抗体的确认测试条带形式的测试装置。然而条带 1 和条带 2 是用粘合剂 (G&L Inc, USA) 连接在层压卡片上而没有塑料壳体 (即“浸渍条”)。固定五种不同的抗原 HIV1 (p24、gp41、gp120、gp160) 和 HIV2 (gp36) (0.25–0.50mg/ml) 作为测试区域中五条不同的线。这些抗原是重组合成肽和天然抗原。将用浓度为 0.25mg/ml 的 PBS 7.4 稀释的蛋白 A 固定作对照线。将缀合有大约 40nm 的紫色胶体金颗粒的蛋白 A (Zymed, USA) 喷涂到缀合物垫上并用作检测系统。

[0119] 测试步骤——测试步骤与实施例 1 相同, 只不过使用的样品体积为 10 μ l 的血清。

[0120] 测试结果——用该测定法测定商用 HIV 固定样品 (BBI Inc, USA, Zeptomatrix Inc, USA 和 Teragenix Inc USA)。结果表明 DPP HIV 确认测试准确检测到了 HIV1 和 HIV2 样品, 与 Western 印迹法和 EIA 具有 100% 的相关性。

[0121] 实施例 4——HIV 测试

[0122] 制备基本上与实施例 1 的测试装置相同的测定装置, 区别在于各测试中的条带 1 做得较长, 使得其形成“十”字形构造以代替“T”字形。结果如实施例 1。

[0123] 实施例 5——HIV 测试

[0124] 制备基本上如实施例 1 的测试装置, 只不过将测试和对照线应用于条带 1 上而不是条带 2 上。结果如实施例 1。

[0125] 实施例 6——HIV 测试

[0126] 制备基本上如实施例 1 的测试装置,只不过在测试区域内测试线上固定针对 P24 HIV 抗原的多克隆抗体,而针对 P24 HIV 抗原的单克隆抗体缀合到胶体金上。结果表明可以检测到血清样品中皮克水平的 P24 抗原。

[0127] 实施例 7——螺旋体细菌

[0128] 制备基本上如实施例 1 的测试装置,只不过在测试区域内混合四种重组 *li*j 抗原 (A、B、C、D) 并固定作为测试线。对于缀合物来说,将缀合有大约 40nm 的紫色胶体金颗粒的蛋白 A/G (Pierce, USA) 和抗人 IgM (Sigma, USA) 应用于缀合物垫。利用来自巴西和泰国的大于 300 个地方性测试样品,所得到的急性期样品总灵敏度大约为 70%,康复期样品大约为 90%,特异性为大约 95%。

[0129] 本文已经记载和举例说明了多种免疫测定实施方式及其使用方法。尽管记载了本发明的特别实施方式,但并不意味着本发明仅限于此,其表示本发明的范围应大到本领域允许的程度,并且应该同样理解说明书。因此,尽管说明书中记载利用抗原/抗体反应进行配体结合,但也可以采用其它的配体结合机制,例如适配体结合、核酸结合、酶结合等等。同样,尽管记载该测试单元具有单条线用于检测一种配体,两条线用于检测两种配体,三条线用于检测三种配体,五条测试线用于检测五种配体,但应当明白可以采用不同数量的线来检测不同数量的抗体。在这种情况下,可以采用具有单个样品开孔的单个壳体,或者如果需要的话可以采用多个开孔。在采用多个开孔的情况下,可以将多个条带用于所提供的一种或多种样品。优选地,所述多个条带与具有缀合物迁移通道的单个条带相接触(例如重叠或在其下方)。可以提供设在两个适用于样品迁移的相邻条带上或通向其的单个开孔。此外,尽管所记载的测试单元在壳体顶壁具有开孔用于接收样品和缓冲液或者缓冲液-缀合物子系统,但应当明白也可以在所述壳体的端壁或侧壁设置一个或两个开孔。类似地,尽管记载的吸收性材料优选包括薄塑料背衬层,但应当明白也可以只在某些部位设置所述塑料背衬层或者根本不设置。在仅设置部分背衬层或不设背衬层的情况下,测试和对照位点可以位于所述吸收性材料的任何一侧或者两侧。而且,尽管所表示的测试条带和对照条带构造呈矩形(即线性),但应当明白所述测试和对照位点也可以有不同的构造,例如环形、方形、椭圆形、虚线等等。事实上,测试位点和对照位点的构造可以互不相同。同样,尽管本发明记载采用 T 字形壳体,并采用相互垂直的吸收性材料,但应当明白所述壳体也可以采用不同的形状(例如矩形、手枪形),同时使吸收性材料相互垂直。此外,如果需要的话,所述吸收性材料不必互相垂直,只要为分析物/样品以及缓冲液-缀合物子系统提供单独的迁移通道。因此,例如,可以提供 Y 型设置。实际上,在样品区域和吸收性材料位于测试和对照线上方(或下方)并通过壳体中的隔壁相隔开,并且所述测试和对照线可以从壳体另一侧的视窗看到的情况下,甚至可以提供矩形的设置。

[0130] 本领域技术人员还应当明白,除了包括对每条测试线单独的视窗之外,所述壳体还可以有其它方式的改变。同样,尽管本发明是结合使用加入缀合物迁移通道和可选择性的样品迁移通道的缓冲液进行说明的,但应当明白,可以根据需要选择一种或多种缓冲液,并根据要实施的一种或多种测试将其加入迁移通道。因此,通常使用的缓冲液例如磷酸盐缓冲液或 TRIS(三羟甲基甲烷氨)缓冲液。然而,本发明意在包括使用包括水在内的任何稀释液。此外,如果需要的话,所述稀释液可以在将样品加入到吸收性材料之前加入并混合

到样品中,或者可以先将样品沉积之后加入稀释液。同样,可以采用任何能够使缀合物迁移的稀释液,并且可将其与缀合物载一种液态缀合物系统中进行预混合,或者将其设置到干燥缀合物系统中缀合物的迁移通道上。因而本领域技术人员应当明白,在不偏离其要求保护的实质和范围的情况下本发明还可以做出其它的改变。

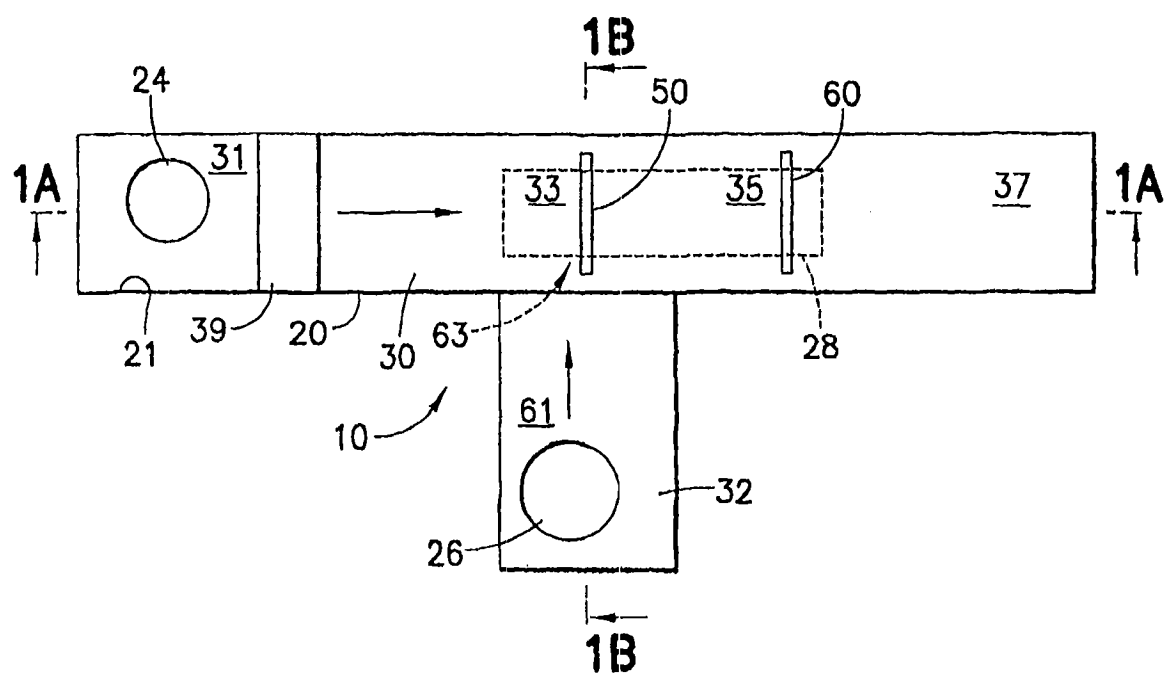


图 1

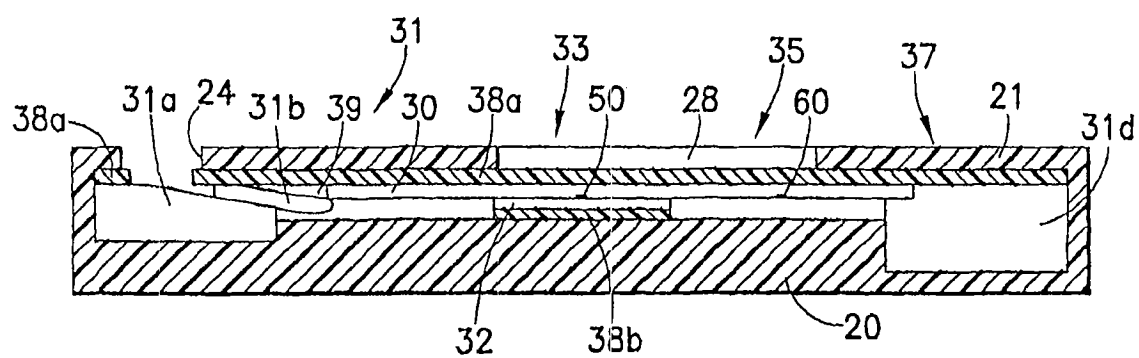


图 1A

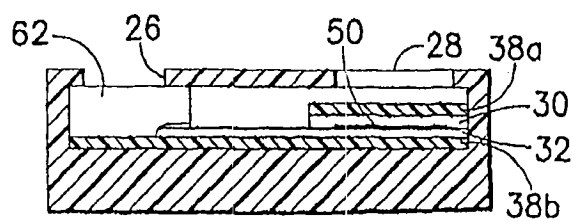


图 1B

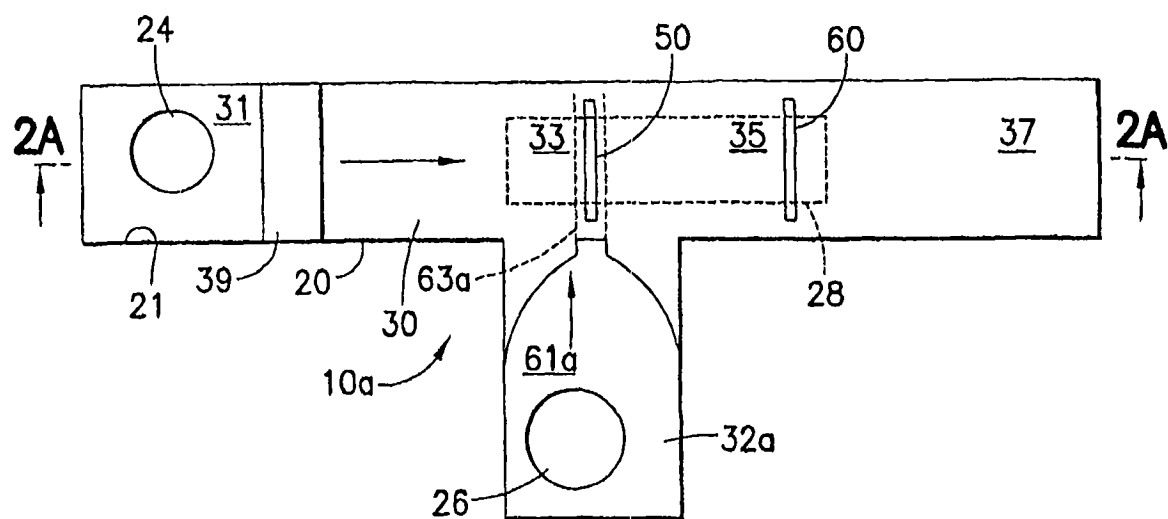


图 2

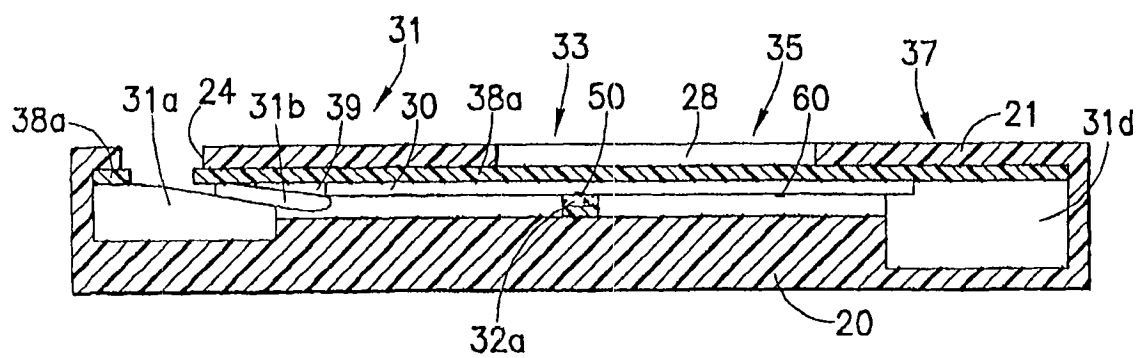


图 2A

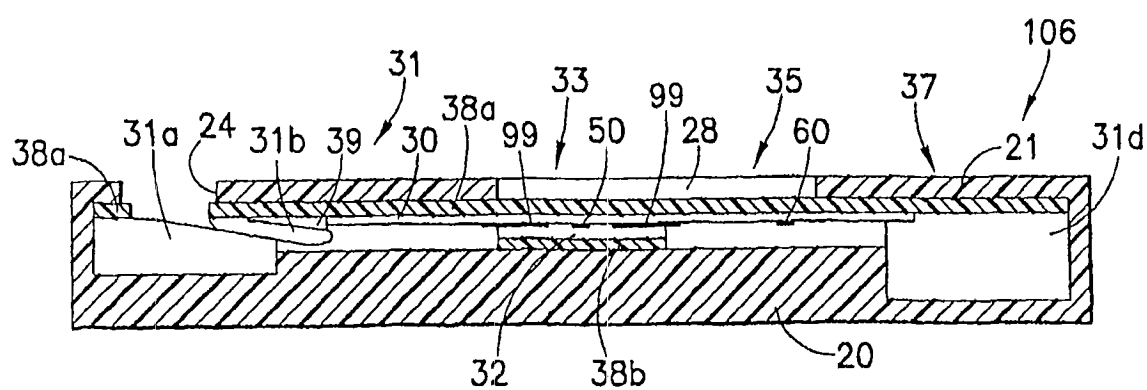


图 3

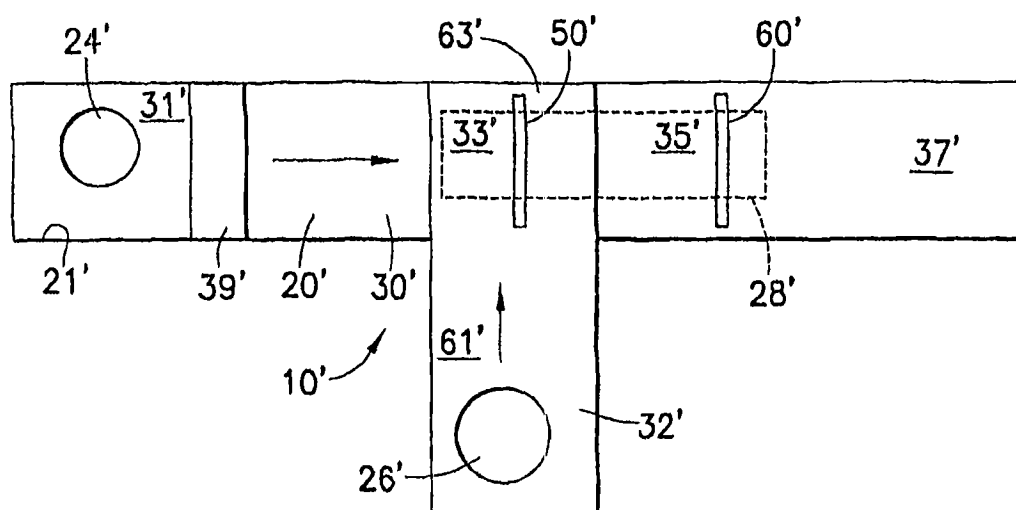


图 4

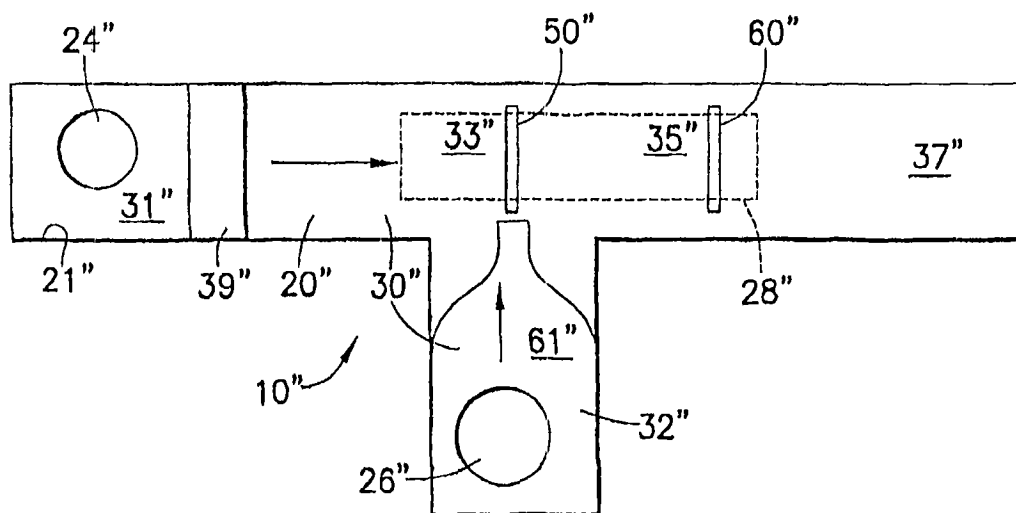


图 5

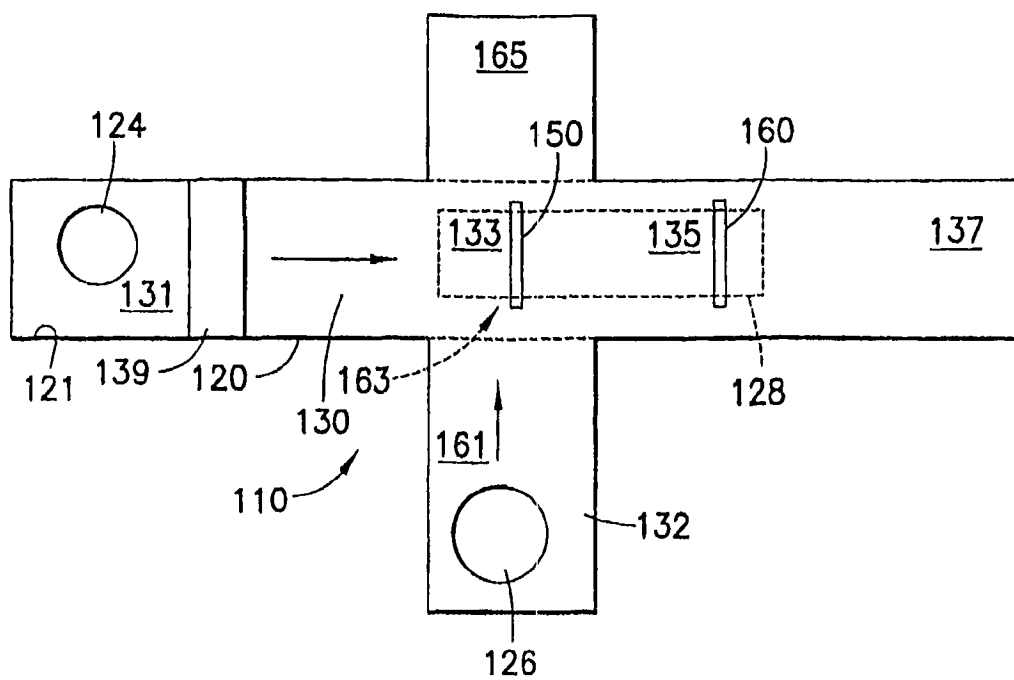


图 6

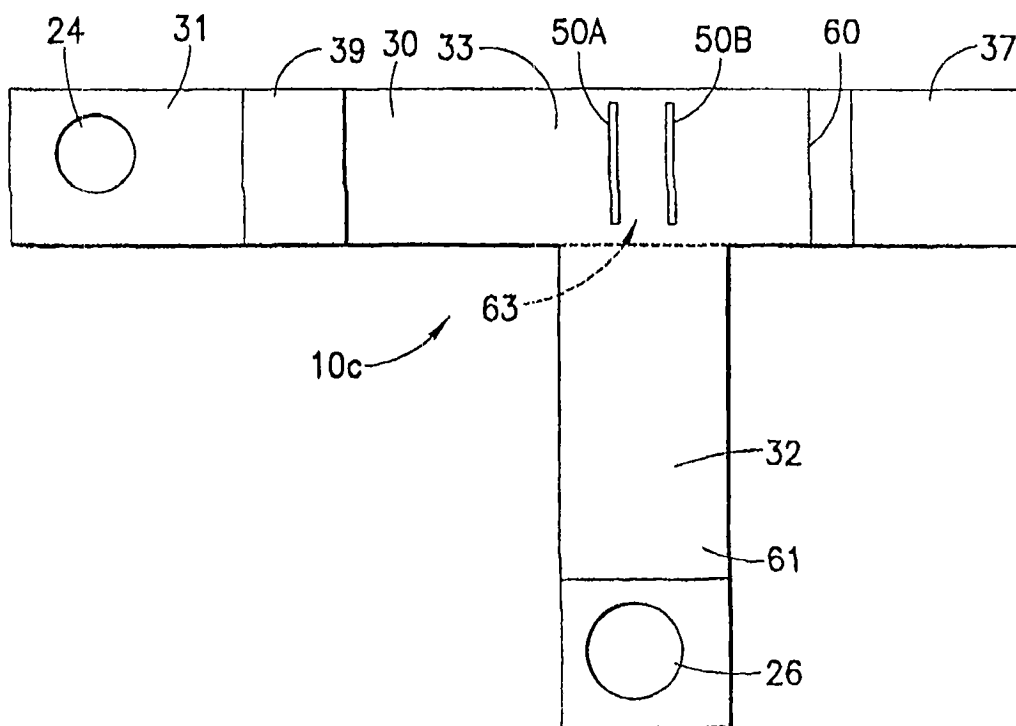


图 7

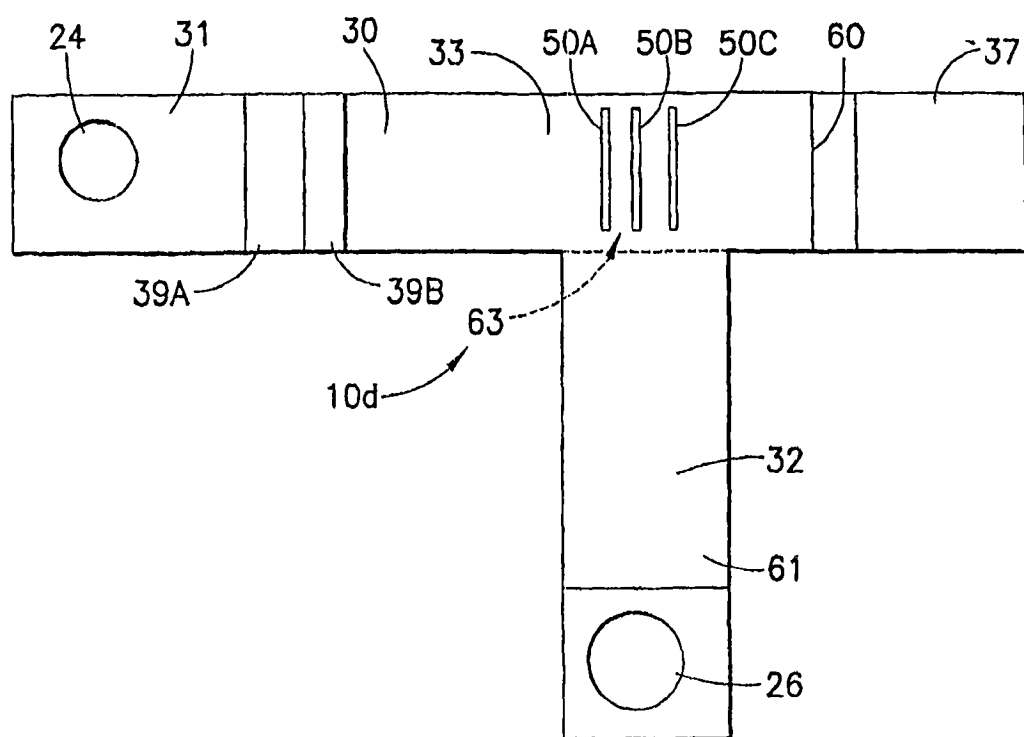


图 8

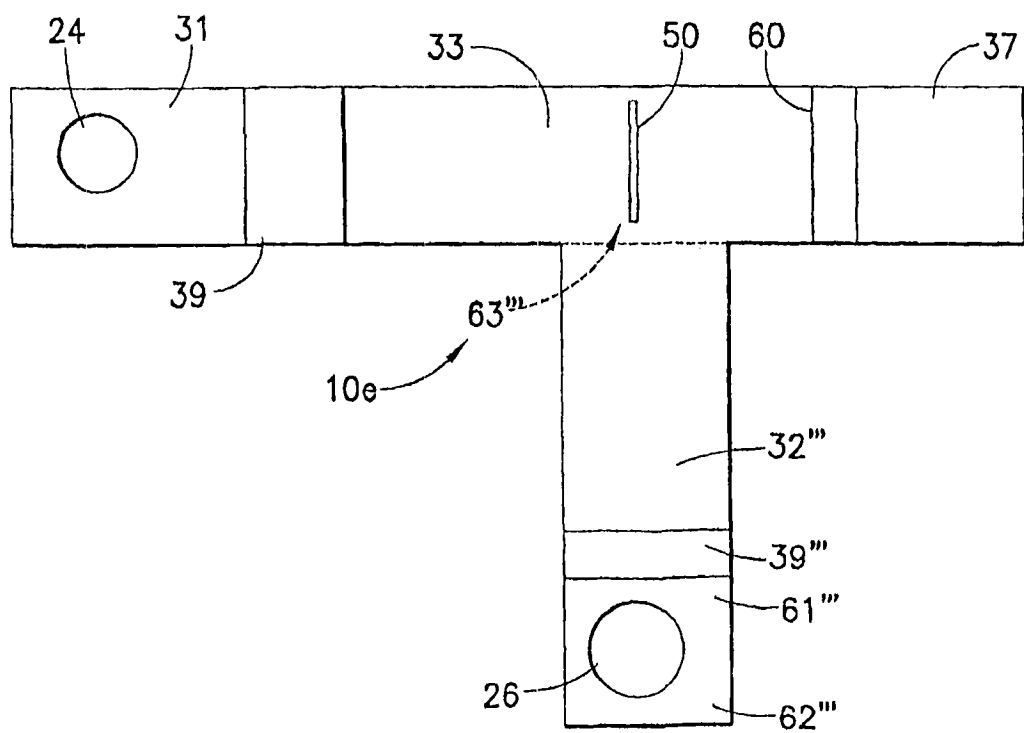


图 9

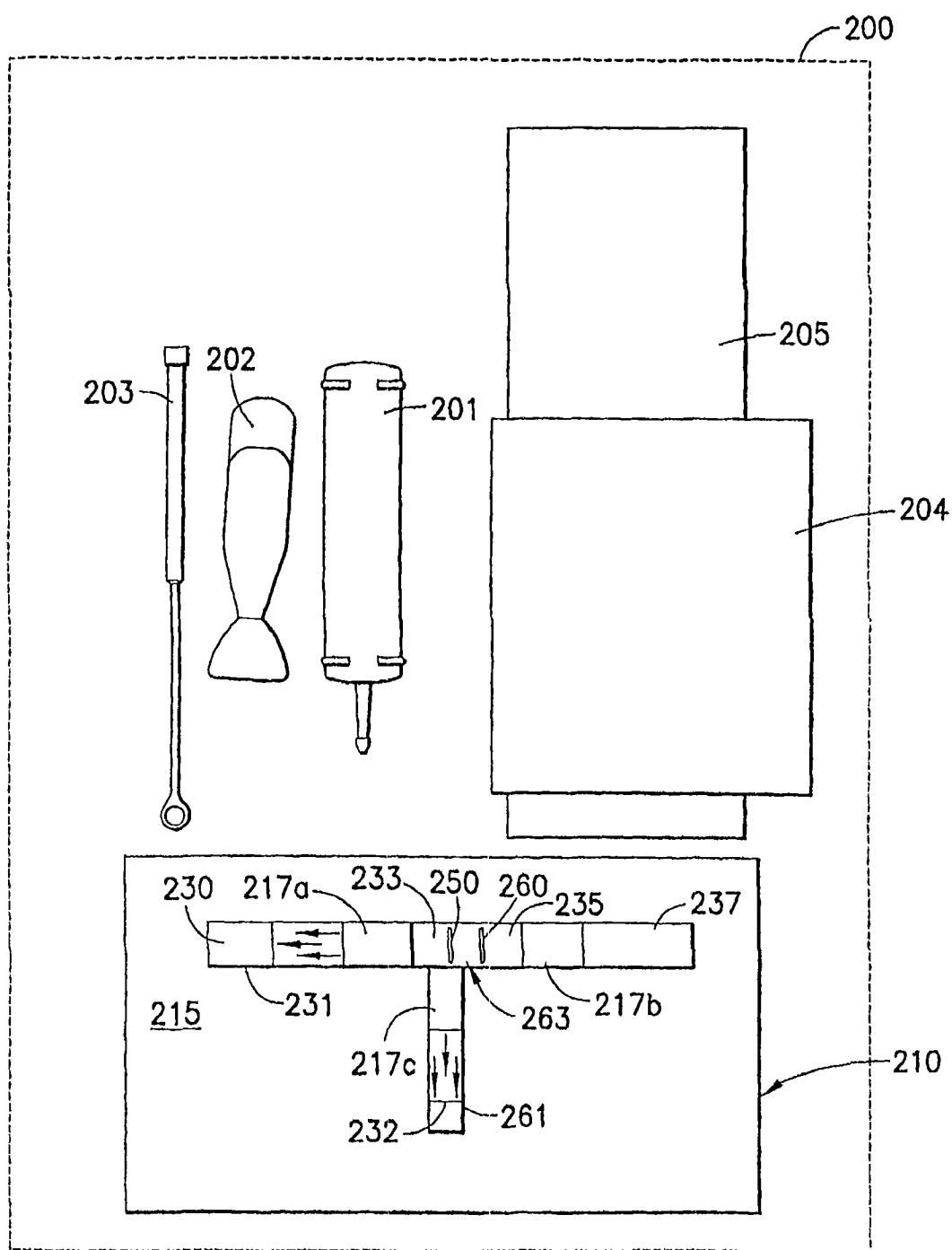


图 10

TB STAT-PAK II vs. 新一代TB测定

样品: TBGL对照

	TB STAT-PAK™ II	新一代
32 U/ml	+++	+++
8 U/ml	++	++
2 U/ml	+/-	+
1 U/ml	-	+
1/2 U/ml	-	+
1/4 U/ml	-	+
1/8 U/ml	-	-
0 U/ml	-	-

注: 稀释比 $\leq 1\text{U/ml}$, 用 2U/ml 的样品制成

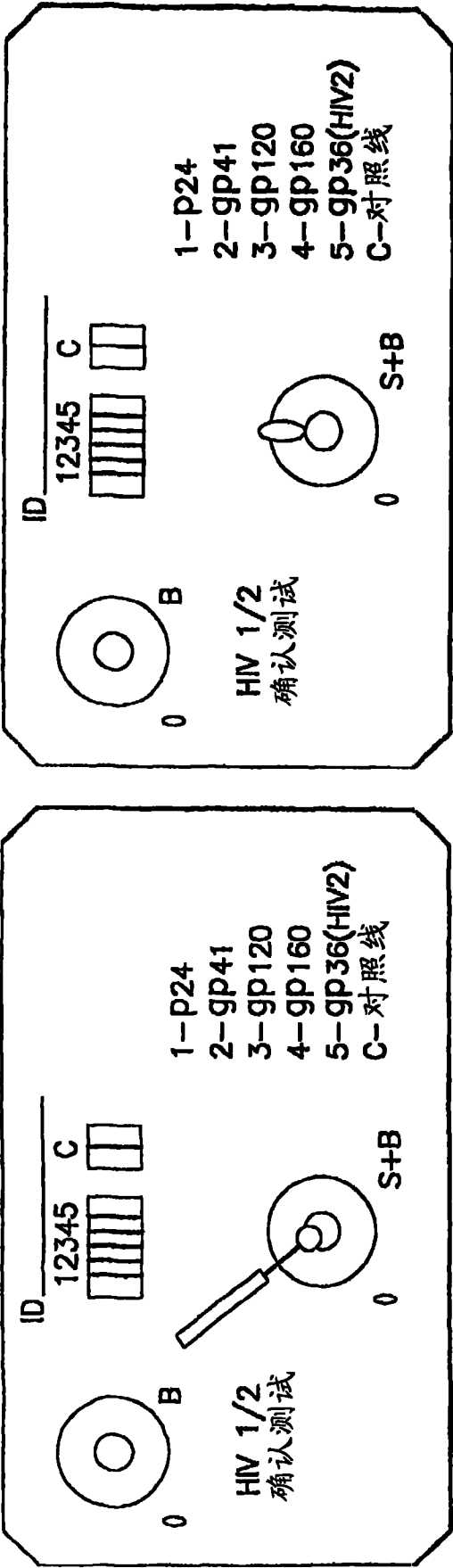
图 11

新一代(NG)HIV测试的实验结果

	稀释比	NG HIV 测试	HIV STAT-PAK™
HIV-1	1:64	3	3
	1:128	3	2
	1:256	3	3
	1:512	2	2
	1:1024	1	1
	1:2048	1	N
	1:4096	1	N
	1:8192	N	N
HIV-2	1:4	3	3
	1:8	3	3
	1:16	3	2
	1:32	2	2
	1:64	2	1
	1:128	2	1
	1:256	2	N
	1:512	1	N
	1:1024	N	N
	1:2048	N	N

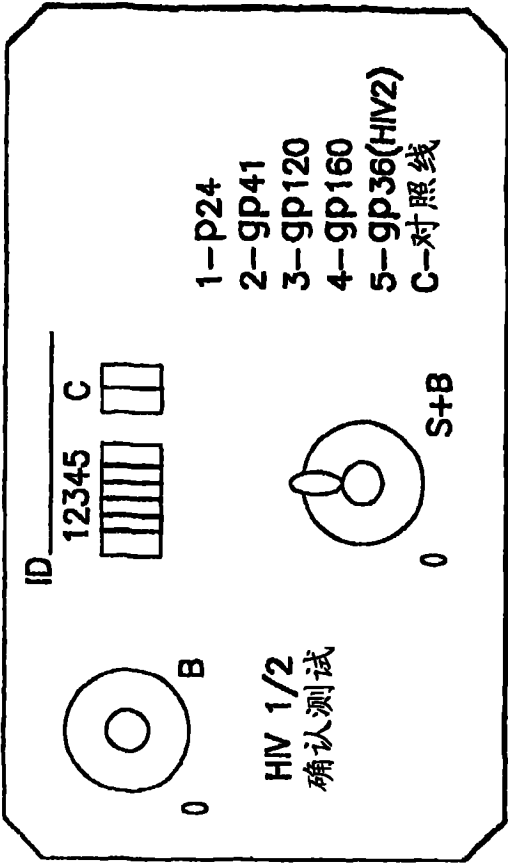
强度	结果
1	弱阳性
2	中阳性
3	强阳性
N	阴性

图 12



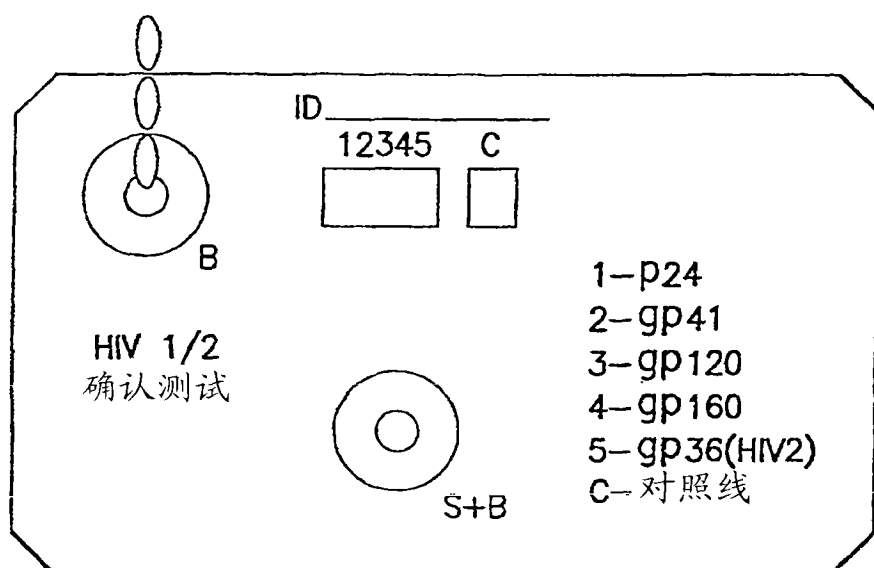
1. 向样品孔 (S+B) 中加入10 μ l 血清/血液

图 13A



1. 向样品孔 (S+B) 中加入1滴 (30 μ l) 缓冲液

图 13B



3. 当有色线完全消失后向缓冲液孔 (B) 中加入
3滴 (90 μ l) 缓冲液

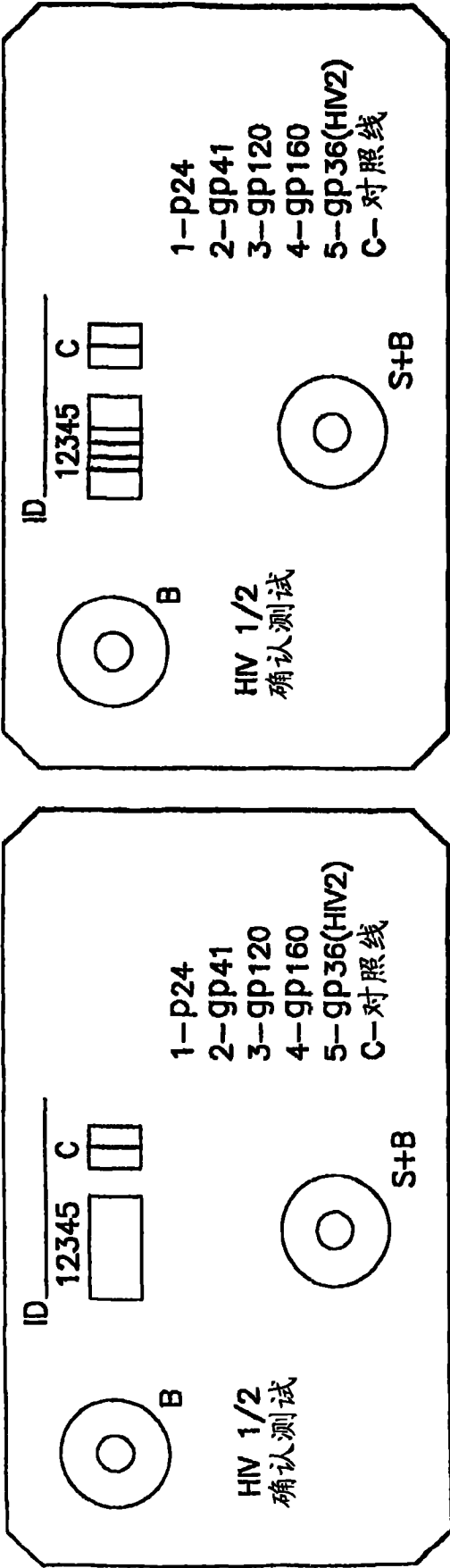
图 13C

4. 20分钟时读取结果

阴性结果:一条线
阳性结果表明存在一种或多种抗原
(2-6条线)

4. 20分钟时读取结果

阴性结果:一条线
阳性结果表明存在一种或多种抗原
(2-6条线)



阴性结果

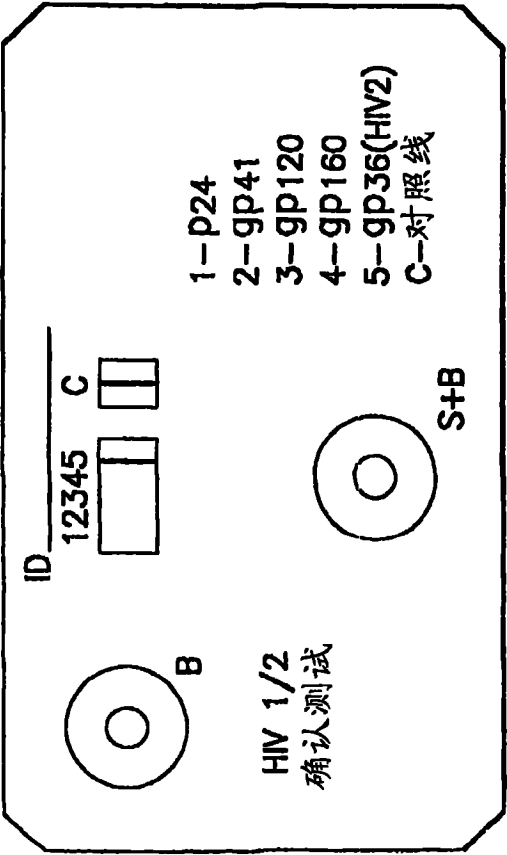
HIV1阳性结果
(至少两种HIV1抗原反应)

图 13D

图 13E

4. 20分钟时读取结果

阴性结果: 一条线
阳性结果: 表明存在一种或多种抗原 (2-6条线)

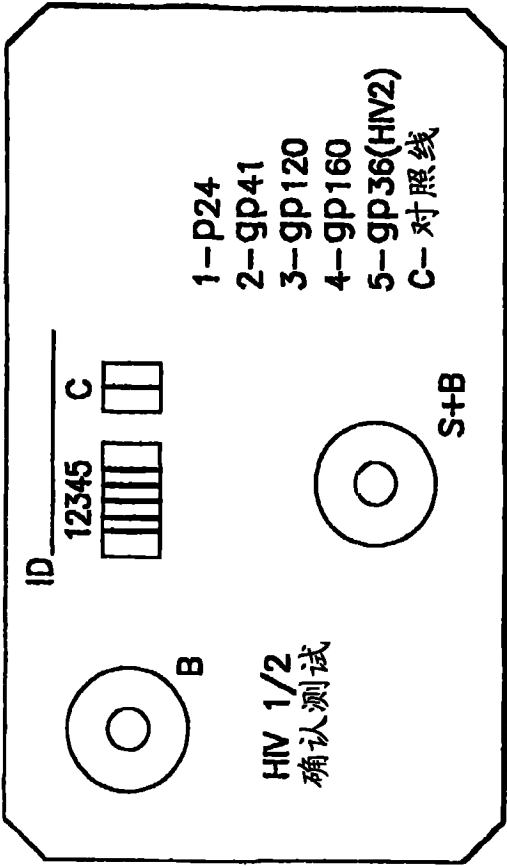


HIV2阳性结果
(只有HIV2抗原反应)

图 13F

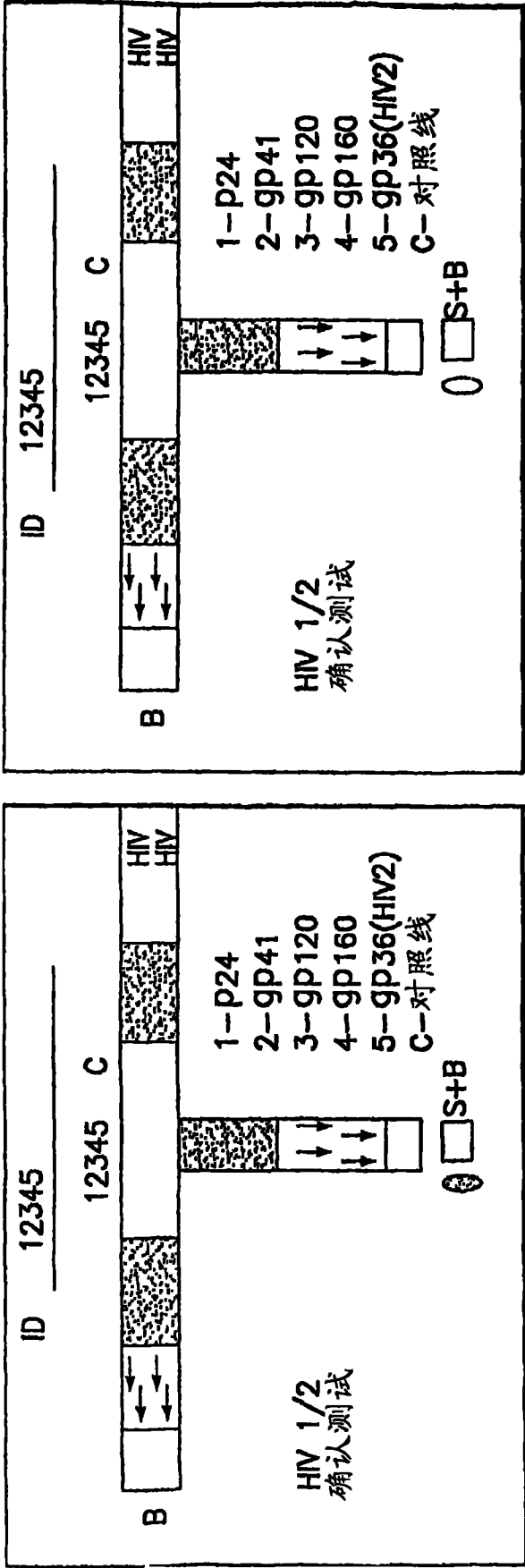
4. 20分钟时读取结果

阴性结果: 一条线
阳性结果: 表明存在一种或多种抗原 (2-6条线)



HIV1/2阳性结果
(至少两种HIV1抗原和HIV2抗原均反应)

图 13G

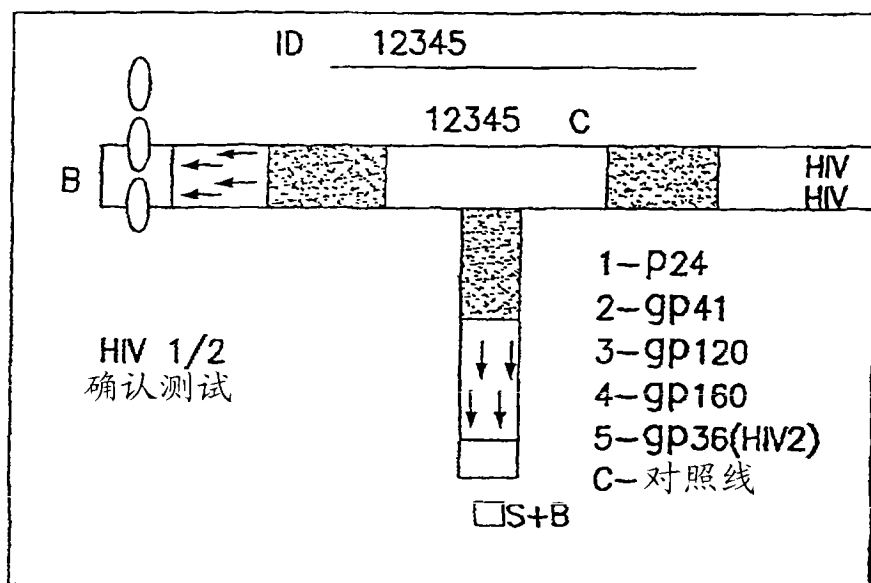


2. 向样品孔 (S+B) 中加入1滴 (30 μ l) 缓冲液

图 14B

1. 向样品孔 (S+B) 中加入10 μ l血清/血液

图 14A



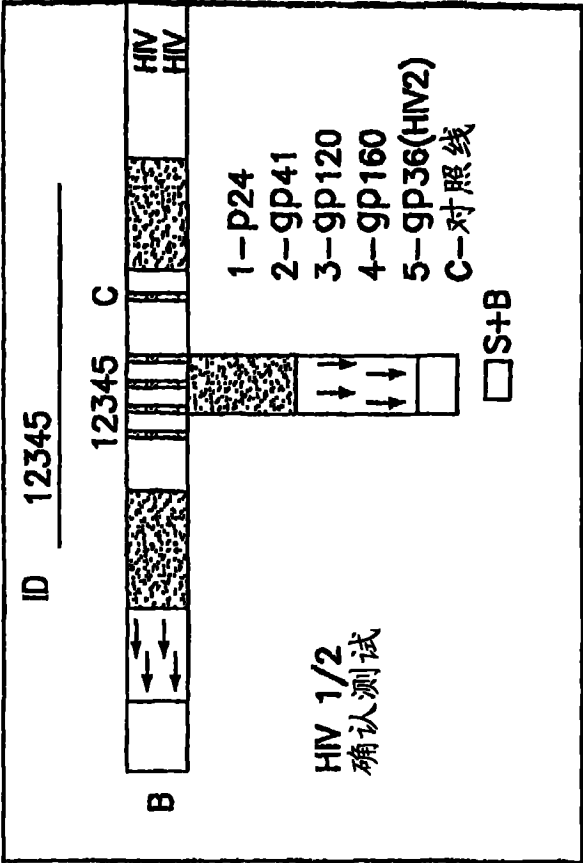
3. 当有色线完全消失后向缓冲液孔(B)中加入
3滴(90 μ l)缓冲液

图 14C

4. 20分钟时读取结果

阴性结果: 一条线

阳性结果: 表明存在一种或多种抗原 (2-6条线)



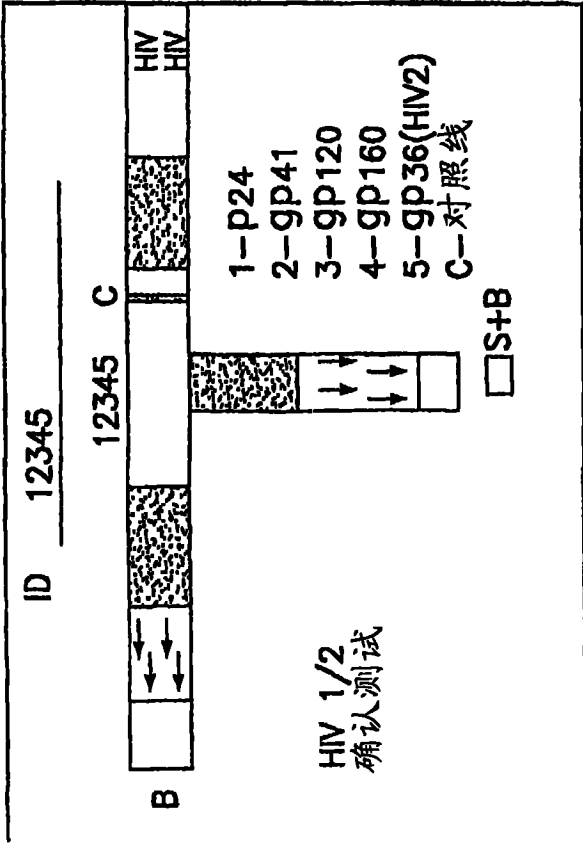
HIV1 阳性结果
(至少两种HIV1抗原反应)

图 14E

4. 20分钟时读取结果

阴性结果: 一条线

阳性结果: 表明存在一种或多种抗原 (2-6条线)



阴性结果

图 14D

4. 20分钟时读取结果

阴性结果: 一条线
阳性结果: 表明存在一种或多种抗原
(3-7条线)

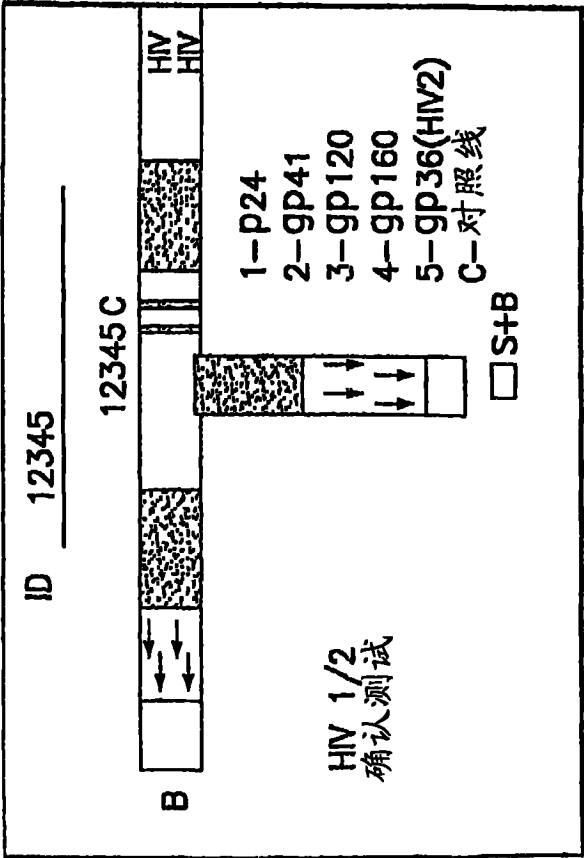


图 14F

4. 20分钟时读取结果

阴性结果: 一条线
阳性结果: 表明存在一种或多种抗原
(3-7条线)

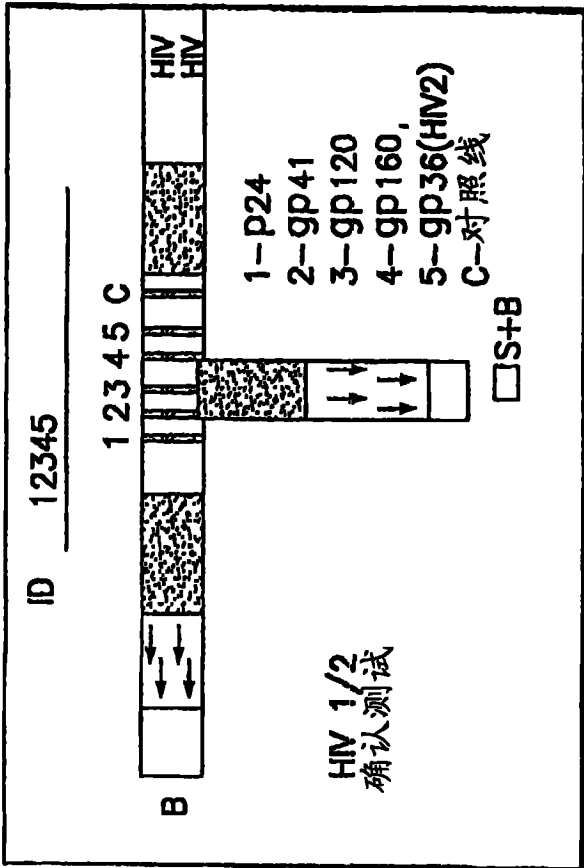
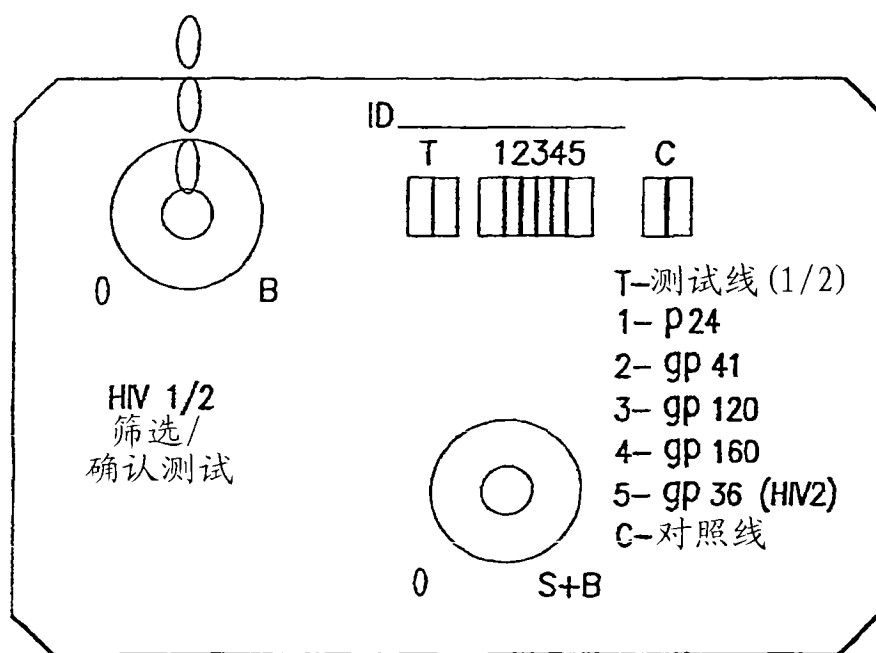


图 14G

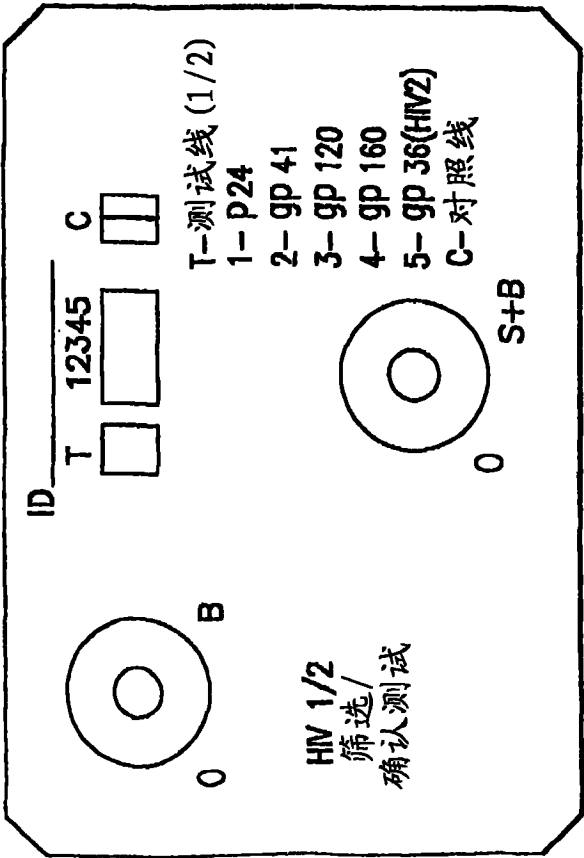


3. 当有色线完全消失后向缓冲液孔 (B) 中加入
3滴 (90 μ l) 缓冲液

图 15C

4. 20分钟时读取结果

阴性结果: 一条线
阳性结果: 表明存在一种或多种抗原
(3-7条线)

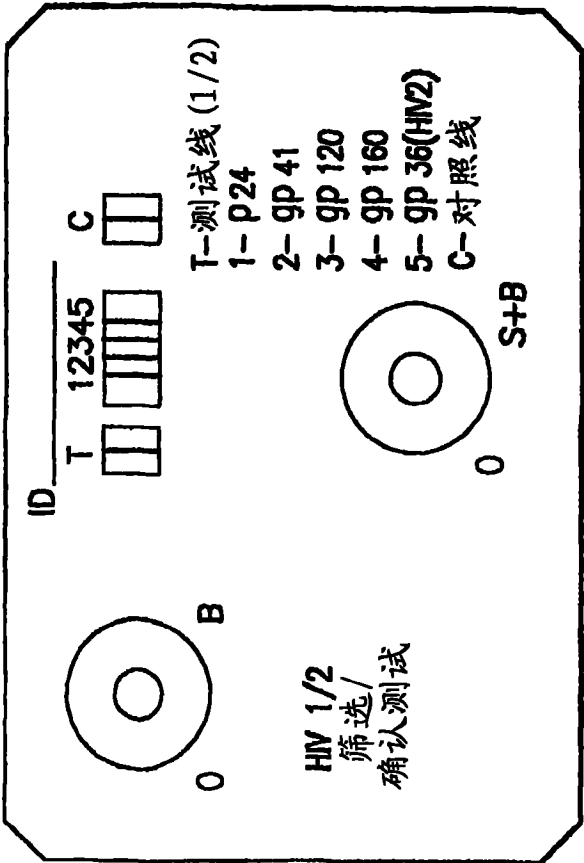


阴性结果

图 15D

4. 20分钟时读取结果

阴性结果: 一条线
阳性结果: 表明存在一种或多种抗原
(3-7条线)

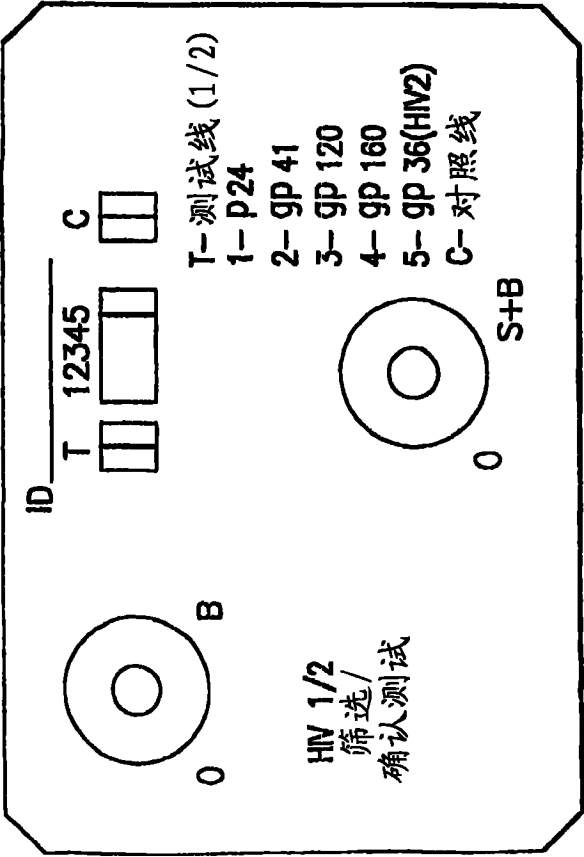


HIV1 阳性结果
(T和至少两种HIV1抗原反应)

图 15E

4. 20分钟时读取结果

阴性结果: 一条线
阳性结果表明存在一种或多种抗原
(3-7条线)

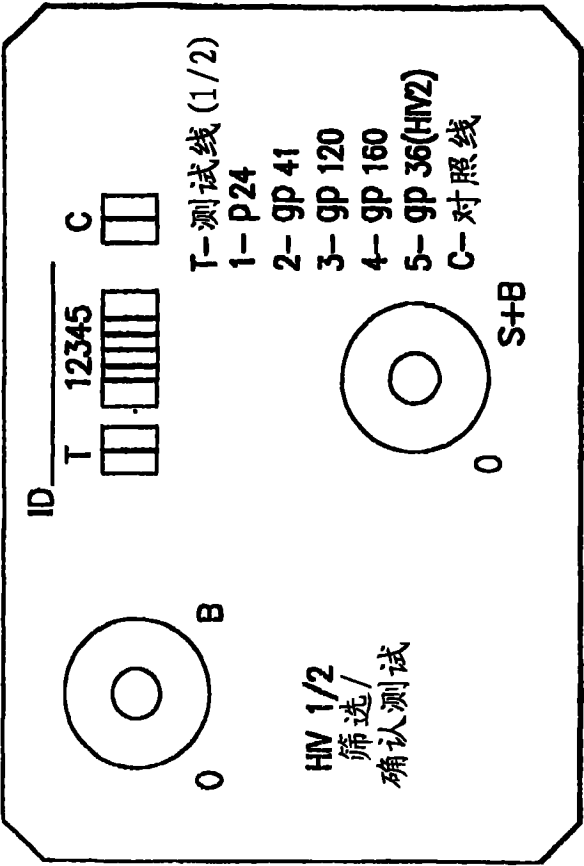


HIV2阳性结果
(T只和HIV2抗原反应)

图 15F

4. 20分钟时读取结果

阴性结果: 一条线
阳性结果表明存在一种或多种抗原
(3-7条线)



HIV1/2阳性结果
(T和至少两种HIV1抗原和HIV2抗原均反应)

图 15G

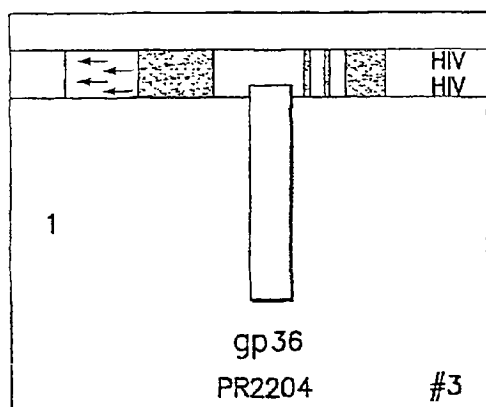


图 16A

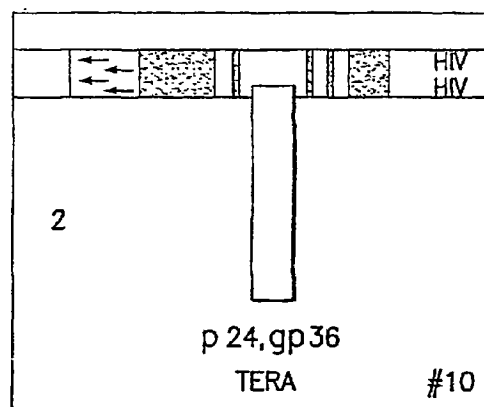


图 16B

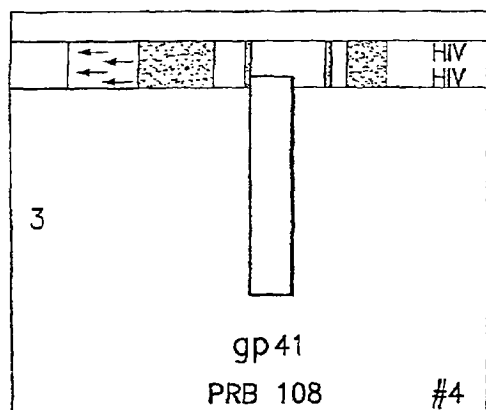


图 16C

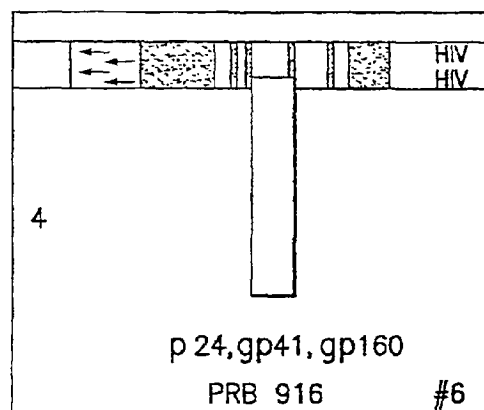


图 16D

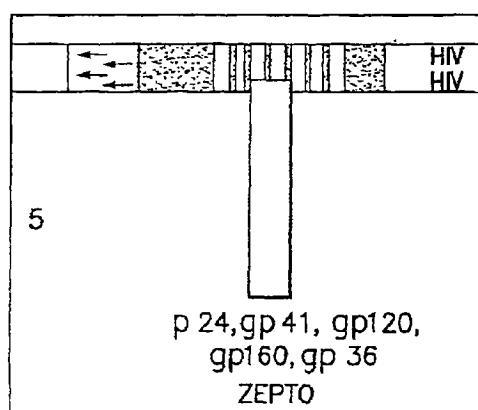


图 16E

专利名称(译)	双通道免疫测定装置		
公开(公告)号	CN101137897B	公开(公告)日	2011-01-19
申请号	CN200680007856.5	申请日	2006-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	生化诊断系统公司		
申请(专利权)人(译)	生化诊断系统公司		
当前申请(专利权)人(译)	生化诊断系统公司		
[标]发明人	J埃斯范迪亚里		
发明人	J·埃斯范迪亚里		
IPC分类号	G01N15/06 G01N21/00 G01N31/22 G01N33/00 G01N33/53 G01N33/566 B01L3/00 C12M1/34 C12M3/00 C12Q1/00		
CPC分类号	G01N33/54386 Y10S436/81 Y10S436/807 Y10S435/805 G01N33/558		
代理人(译)	刘健		
审查员(译)	关元		
优先权	60/741628 2005-12-02 US 60/680884 2005-05-13 US 60/660695 2005-03-11 US 11/172298 2005-06-30 US		
其他公开文献	CN101137897A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的系统包括测试单元，其具有第一吸收性材料、第二吸收性材料和测试位点，所述第一吸收性材料限定出溶液的第一流动通道，第二吸收性材料限定出不同于针对样品的第一流动通道的第二流动通道，所述测试位点上面固定有抗原或抗体或其它配体结合分子，如适配体、核算等，该测试位点位于鉴别一种或多种配体的第一和第二吸收性材料的交点处。所述第一和第二吸收性条带在测试位点的位置彼此相接触。所述测试单元可用于验孕、HIV(包括不同的HIV抗原或肽)，肺结核、朊病毒、尿/药检、心肌损伤标记物、癌标记物、Chagas病、衣原体、口腔细菌(SM/LC)、流感病毒A、流感病毒B、腺病毒、轮状病毒、链球菌A、其它细菌或病毒等等，以及兽医应用例如CPV、FIV、FeLV、以及心丝虫病等等，但其不限于这些应用。

