



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101918829 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 200880125143.8

(22) 申请日 2008.11.20

(30) 优先权数据

60/989,291 2007.11.20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.07.20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/084195 2008.11.20

(87) PCT申请的公布数据

W02009/079156 EN 2009.06.25

(71) 申请人 3M 创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 马尔科·G·博马里托

约瑟夫·J·斯托费尔

维诺德·P·梅农

瑞安·帕特里克·希默斯

布林达·B·拉克希米

蒂莫西·J·狄克曼

古斯塔沃·H·卡斯特罗

保罗·J·科比安

拉杰·拉贾戈帕尔

帕特里克·A·马赫

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219

代理人 郭国清 樊卫民

(51) Int. Cl.

G01N 33/00(2006.01)

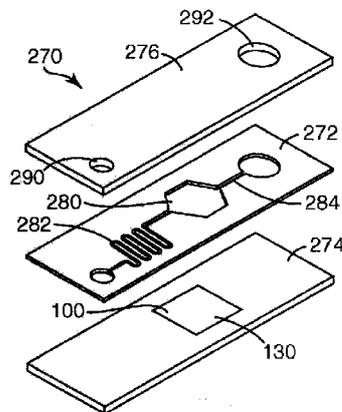
权利要求书 5 页 说明书 24 页 附图 6 页

(54) 发明名称

检测装置和方法

(57) 摘要

本发明申请公开了检测装置的实施例,所述检测装置包括在第一流路流路部分和第二流路流路部分之间的流路流路中的传感器组件。在所述的实施例中,所述传感器组件在聚合组合物中包括受体。所述受体被构造为与试验样品中的被分析物结合。在结合时,所述传感器组件响应于所述被分析物与所述受体的相互作用而发生可探测的变化。



1. 一种用于检测是否存在被分析物的装置,所述装置包括:  
主体,所述主体包括流路、流通膜以及设置在所述流通膜中或之上的比色传感器组件;

其中所述比色传感器包括具有含联乙炔的聚合物以及受体的聚合组合物,其中所述受体被并入所述聚合组合物以形成转换器,所述转导体在与一种或多种探测剂和 / 或被分析物结合时提供颜色变化。

2. 根据权利要求 1 所述的装置,其进一步包括设置在所述装置的主体内的样品流路的一个或多个不同区段中的一种或多种用于样品制备的试剂,其中所述一个或多个区段设置在所述比色传感器上游的所述样品流路中。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的装置,其进一步包括设置在所述装置的主体内的所述样品流路的一个或多个不同区段中的一种或多种用于间接被分析物检测的探测剂,其中所述一个或多个区段设置在所述比色传感器上游的所述样品流路中。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的装置,其中所述传感器组件包括聚二乙炔脂质体。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的装置,其中所述传感器组件包括呈一个或多个符号或文字形式的图案化传感器层。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的装置,其中所述流路包括形成第一和第二流路部分的第一流体通道部分和第二流体通道部分,其中所述流通膜隔开所述第一和所述第二流体通道部分。

7. 根据权利要求 6 所述的装置,其包括将流体从所述第一流路部分经过所述传感器组件引导到所述第二流路部分的压力源。

8. 根据权利要求 7 所述的装置,其中所述压力源是注射器、真空源、吸收垫、或毛细管压力中的一种。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的装置,其为侧向流装置。

10. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的装置,其为垂直流装置。

11. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的装置,其中所述样品流路包括至少两个部分,其中一个部分与另一个部分横切。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的装置,其中所述比色传感器组件在存在一种或多种目标被分析物和 / 或探测剂的情况下沉积在所述流通膜中或之上。

13. 一种用于检测是否存在被分析物的装置,所述装置包括:

主体,所述主体包括流路和形成多层结构的多个层,

所述流路由形成在第一层和第二层之间的第一流体通道部分和第二流体通道部分所限定;以及

设置在所述第一和第二层之间的传感器组件,其中所述传感器组件将所述第一流体通道部分与所述第二流体通道部分分离。

14. 根据权利要求 13 所述的装置,其中所述传感器组件包括比色传感器。

15. 根据权利要求 14 所述的装置,其中所述比色传感器包括具有含联乙炔的聚合物以及受体的聚合组合物,其中所述受体被并入所述聚合组合物以形成转导体,所述转导体在与一种或多种探测剂和 / 或被分析物结合时提供颜色变化。

16. 根据权利要求 13 至 15 中任一项所述的装置,其进一步包括在所述第一层和所述第二层之间的一个或多个中间层,其中所述中间层包括形成所述第一和第二流体通道部分中的至少一者的图案化部分。

17. 根据权利要求 16 所述的装置,其进一步包括设置在所述中间层的至少一者中的开口中的流通膜。

18. 根据权利要求 13 至 15 中任一项所述的装置,其中所述多层结构包括第一和第二外层、间隔层以及中间层,其中所述中间层设置在所述第一和所述第二外层之间,并且所述间隔层设置在所述第一外层和所述中间层之间并沿着所述多层结构形成第一流体通道部分。

19. 根据权利要求 18 所述的装置,其进一步包括设置在所述中间层的开口中的流通膜。

20. 根据权利要求 17 或 19 所述的装置,其进一步包括位于中间层和外层之间的吸收层或部分以引导流体穿过所述流通膜。

21. 根据权利要求 13 至 20 中任一项所述的装置,其中所述第一层包括透视部分以观察所述传感器组件。

22. 根据权利要求 13 至 21 中任一项所述的装置,其进一步包括设置在所述第一流体通道部分内的一个或多个小室。

23. 根据权利要求 22 所述的装置,其中所述一个或多个小室中的至少一个包括设置在其中的样品制备试剂和 / 或探测剂。

24. 根据权利要求 13 至 23 中任一项所述的装置,其中所述第一流体通道部分是弯曲的。

25. 根据权利要求 13 至 24 中任一项所述的装置,其中所述第一和第二流体通道部分定向于不同的方向上。

26. 根据权利要求 13 至 25 中任一项所述的装置,其中所述传感器组件设置在所述第一层和所述第二层之间的所述流通膜中或之上。

27. 根据权利要求 26 所述的装置,其中所述传感器组件当存在一种或多种目标被分析物和 / 或探测剂时沉积在所述流通膜中或之上。

28. 一种用于检测是否存在被分析物的装置,所述装置包括:  
主体,所述主体包括流路和形成多层结构的多个层,  
所述流路由形成在第一层和第二层之间的第一流体通道部分和第二流体通道部分限定;

插入在所述第一层和所述第二层之间的图案化层,其中所述图案化层形成小室、所述第一流体通道部分和所述第二流体通道部分;以及

传感器组件,该传感器组件设置在由所述图案化层形成的所述小室中。

29. 根据权利要求 28 所述的装置,其进一步包括设置在所述第一流体通道部分内的一个或多个另外的小室。

30. 根据权利要求 29 所述的装置,其中所述一个或多个另外的小室中的至少一个包括设置在其中的样品制备试剂和 / 或探测剂。

31. 根据权利要求 28 至 30 中任一项所述的装置,其中所述传感器组件形成或沉积在封闭于所述小室内的基底上。

32. 根据权利要求 28 至 30 中任一项所述的装置,其中所述传感器组件形成或沉积在所述第一层或所述第二层中的至少一者上。

33. 根据权利要求 28 至 32 中任一项所述的装置,其中所述传感器组件包括比色传感器。

34. 根据权利要求 33 所述的装置,其中所述比色传感器包括具有含联乙炔的聚合物以及受体的聚合组合物,其中所述受体被并入所述聚合组合物以形成转导体,所述转导体在与一种或多种探测剂和 / 或被分析物结合时提供颜色变化。

35. 根据权利要求 28 至 34 中任一项所述的装置,其中所述第一流体通道部分是弯曲的。

36. 根据权利要求 28 至 35 中任一项所述的装置,其中所述传感器组件设置在由所述图案化层形成的所述小室内的所述流通膜中或之上。

37. 根据权利要求 36 所述的装置,其中所述传感器组件当存在一种或多种目标被分析物和 / 或探测剂时沉积在所述流通膜中或之上。

38. 一种装置,所述装置包括:

样品流路;

包括传感器组件的区段;

一种或多种用于样品制备的试剂,所述一种或多种用于样品制备的试剂设置在所述传感器组件之前的所述样品流路的一个或多个不同区段中;以及

任选地,探测剂,所述探测剂设置在所述传感器组件之前的所述样品流路的不同区段中并不同于所述一种或多种样品制备试剂。

39. 根据权利要求 38 所述的装置,其中所述传感器组件设置在所述流通膜中或之上。

40. 根据权利要求 38 或 39 所述的装置,其中所述一种或多种试剂以及所述任选的探测剂设置在流通膜上或之中。

41. 根据权利要求 38 至 40 中任一项所述的装置,其中所述传感器组件包括呈一个或多个符号或文字形式的图案化层。

42. 根据权利要求 38 至 41 中任一项所述的装置,其为侧向流装置。

43. 根据权利要求 38 至 41 中任一项所述的装置,其为垂直流装置。

44. 根据权利要求 38 至 41 中任一项所述的装置,其中所述样品流路包括至少两个部分,其中一个部分与另一个部分横切。

45. 根据权利要求 38 至 44 中任一项所述的装置,其中所述传感器组件包括比色传感器。

46. 根据权利要求 45 所述的装置,其中所述比色传感器包括具有含联乙炔的聚合物以及受体的聚合组合物,其中所述受体被并入所述聚合组合物以形成转导体,所述转导体在与一种或多种探测剂和 / 或被分析物结合时提供颜色变化。

47. 一种用于样品制备和目标被分析物分析的装置,所述装置包括:

样品流路;

一种或多种用于样品制备的试剂,所述一种或多种用于样品制备的试剂设置在所述样品流路的一个或多个不同区段中;

包括探测剂的区段,所述区段设置在所述样品制备试剂中的至少一种下游的所述样品

流路中 ; 以及

包括比色传感器组件的区段, 其中所述比色传感器包括具有含联乙炔的聚合物和受体的聚合组合物, 其中所述受体被并入所述聚合组合物以形成转导体, 所述转导体在与一种或多种探测剂和 / 或被分析物结合时提供颜色变化。

48. 一种方法, 该方法包括 :

提供被疑包含一种或多种目标被分析物的试验样品 ;

提供根据权利要求 1 至 11、13 至 26、28 至 36 以及 38 至 47 中任一项所述的装置, 其中所述装置在与试验样品接触之前包括传感器组件 ;

任选地, 提供适用于对所述一种或多种目标被分析物进行间接分析的一种或多种探测剂 ;

引导试验样品的流从第一流路部分流到所述传感器组件下游的第二流路部分 ;

将所述试验样品暴露到所述传感器组件, 以将一种或多种目标被分析物和 / 或一种或多种探测剂结合到所述传感器组件, 如果所述目标被分析物存在于所述试验样品中, 则会引起所述传感器组件中出现可探测的变化 ; 以及

在与所述目标被分析物和 / 或探测剂结合时识别所述传感器组件中的所述可探测的变化。

49. 根据权利要求 48 所述的方法, 其中所述一种或多种探测剂设置在所述第一流路部分中的所述装置中。

50. 一种制备样品并分析所述样品中是否存在被分析物的方法, 所述方法包括 :

提供被疑包含一种或多种目标被分析物的试验样品 ;

提供根据权利要求 38 至 47 中任一项所述的装置, 其中所述装置包括传感器组件和一种或多种样品制备试剂 ;

引导试验样品的流从第一流路部分流到所述传感器组件下游的第二流路部分 ;

在所述第一流路部分中提供能有效地使所述试验样品与所述样品制备试剂中的至少一种之间发生反应的条件 ;

在能有效地使被分析物和 / 或探测剂结合到所述传感器组件并产生可探测的变化的条件下, 将所述试验样品暴露到所述传感器组件 ; 以及

在与所述目标被分析物和 / 或探测剂结合时识别所述传感器组件中的可探测的变化。

51. 一种检测是否存在被分析物的方法, 所述方法包括 :

提供装置, 所述装置包括 :

包括流路和形成多层结构的多个层的主体, 所述流路由形成在第一层和第二层之间的第一流体通道部分和第二流体通道部分限定 ; 以及

设置在所述第一和第二层之间的流通膜, 其中所述流通膜将所述第一流体通道部分与所述第二流体通道部分隔开 ;

提供被疑包含一种或多种目标被分析物的试验样品 ;

任选地, 提供适用于对所述一种或多种目标被分析物进行间接分析的一种或多种探测剂 ;

提供传感器组件 ;

组合所述试验样品、任选的探测剂以及传感器组件以形成混合物 ;

引导所述混合物的流从所述第一流体通道部分穿过所述流通膜到达所述第二流体通道部分,以收集所述传感器组件和被结合的目标被分析物和 / 或探测剂 ;以及

在与所述目标被分析物和 / 或探测剂结合时识别所述传感器组件中的可探测的变化。

52. 一种检测是否存在被分析物的方法,所述方法包括 :

提供装置,所述装置包括 :

包括流路和形成多层结构的多个层的主体,所述流路由形成在第一层和第二层之间的第一流体通道部分和第二流体通道部分限定 ;

插入在所述第一层和所述第二层之间的图案化层,其中所述图案化层形成小室、所述第一流体通道部分和所述第二流体通道部分以及

流通膜,该流通膜设置在由所述图案化层形成的所述小室中 ;

提供被疑包含一种或多种目标被分析物的试验样品 ;

任选地,提供适用于对所述一种或多种目标被分析物进行间接分析的一种或多种探测剂 ;

提供传感器组件 ;

组合所述试验样品、任选的探测剂以及传感器组件以形成混合物 ;

引导所述混合物的流从所述第一流体通道部分穿过所述小室内的所述流通膜到达所述第二流体通道部分,以收集所述传感器组件和被结合的目标被分析物和 / 或探测剂 ;以及

在与所述目标被分析物和 / 或探测剂结合时识别所述传感器组件中的可探测的变化。

## 检测装置和方法

### [0001] 政府权利

[0002] 根据美国国防部批准的合同 No. DAAD-13-03-C-0047 (计划 No. 2640) 的条款, 美国政府可享有本发明的某些权利。

### [0003] 相关专利申请的交叉引用

[0004] 本专利申请要求 2007 年 11 月 20 日提交的美国临时专利申请 No. 60/989, 291 的优先权, 其公开内容以引用的方式并入本文。

## 背景技术

[0005] 对常用抗生素具有耐药性的细菌的出现是影响对感染者的治疗的一个日益严重的问题。因此, 在早期确定此类细菌的存在并以较快的方式对此类细菌进行更好地控制就变得越来越重要。这也适用于多种其他微生物。

[0006] 一种引起广泛关注的此类微生物是金黄色葡萄球菌 (“S. aureus”)。这是一种病原体, 其可引起广谱感染, 包括: 表面损伤, 例如小面积的皮肤脓肿和伤口感染; 系统性的及危及生命的病情例如心内膜炎、肺炎以及败血症; 以及毒素症, 例如食物中毒和中毒性休克综合征。除了几种选择抗生素外, 一些菌株 (如, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌) 几乎对所有抗生素均具有耐药性。

[0007] 用于检测微生物, 特别是耐抗生素的细菌的现有技术通常是耗时的, 并通常涉及培养纯态的细菌。一种用于鉴别与急性感染相关的病原性葡萄球菌, 即, 人类和动物金黄色葡萄球菌以及动物中间葡萄球菌和猪葡萄球菌的此类技术是基于微生物凝结血浆的能力。描述了至少两种不同的凝固酶试验: 游离凝固酶的试管试验以及“细胞结合性凝固酶”或凝聚因子的载玻片试验。试管凝固酶试验通常涉及将脑心浸液肉汤中的过夜培养物与再造血浆混合, 将混合物培养 4 小时并通过缓慢倾斜试管来观察凝块形成。由于少量的菌株可能需要超过 4 小时才能形成凝块, 所以试验过夜培养已被推荐用于金黄色葡萄球菌。载玻片凝固酶试验通常更快和更经济; 但是, 10% 至 15% 的金黄色葡萄球菌菌株可能会产生阴性结果, 这需要通过试管试验来重新检查隔离菌群。

[0008] 尽管检测金黄色葡萄球菌以及其他微生物的方法已在现有技术中有所描述, 但是改进的检测方法和装置将具有优势。

## 发明内容

[0009] 本专利申请公开了在试验样品中, 以及任选地在样品制备中, 用于检测被分析物的检测装置的实施例。在图示实施例中, 检测装置在流动通路中 (在第一流动通路部分和第二流动通路部分之间) 包括传感器组件。在所述的实施例中, 传感器组件包括聚合组合物中的受体。受体被构造为与试验样品中的被分析物结合。在结合时, 传感器组件响应于被分析物与受体的相互作用而发生可探测的变化。

[0010] 本文所述的优选的传感器包括比色传感器。一类优选的比色传感器包括具有含联乙炔的聚合物以及受体的聚合组合物, 其中所述受体被并入聚合组合物中以形成转导体,

所述转导体在与一种或多种探测剂和 / 或被分析物结合时能提供颜色变化。

[0011] 本文所述的装置可以是侧向流装置、垂直流装置、或它们的组合。在某些实施例中,样品流动通路包括至少两个部分(其可以由两个或更多个样品通道部分限定),所述至少两个部分定向于不同方向上。例如,一个部分可以与另一个部分横切而定向。传感器组件优选地位于装置中并位于将第一流动通路部分与第二流动通路部分分离的流动通路内。传感器组件可以一个或多个符号或文字的形式位于图案化传感器层中。

[0012] 可以利用各种技术引导流体(如,试验样品)沿着流动通路(即,从第一流动通路部分到第二流动通路部分)流动经过传感器组件。例如,可以使用压力源,例如,注射器、真空源、吸收垫、或毛细管压力。

[0013] 在一个实施例中,提供了一种用于检测是否存在被分析物的装置,所述装置包括:主体,所述主体包括流动通路、流通膜以及置于流通膜中或之上的比色传感器组件;其中比色传感器包括具有含联乙炔的聚合物以及受体的聚合组合物,其中所述受体被并入聚合组合物中以形成转导体,所述转导体与一种或多种探测剂和 / 或被分析物结合时能提供颜色变化。

[0014] 在这个实施例中,装置可进一步包括设置在装置主体内的样品流动通路的一个或多个不同区段中的一种或多种用于样品制备的试剂,其中所述一个或多个区段设置在比色传感器上游的样品流动通路中。装置可另外包括,或者作为另外一种选择,包括设置在装置主体内的样品流动通路的一个或多个不同区段中的一种或多种用于间接检测被分析物的探测剂,其中所述一个或多个区段设置在比色传感器上游的样品流动通路中。

[0015] 这个装置的流动通路可以包括形成第一和第二流路部分的第一流体通道部分和第二流体通道部分,其中流通膜将第一和第二流体通道部分隔开。

[0016] 在一个实施例中,提供了一种用于检测是否存在被分析物的装置,所述装置包括:主体,所述主体包括流路和形成多层结构的多个层,所述流路由形成在第一层和第二层之间的第一流体通道部分和第二流体通道部分所限定;以及设置在第一和第二层之间的传感器组件,其中所述传感器组件将第一流体通道部分从第二流体通道部分分离。

[0017] 这个实施例的装置可在第一层和第二层之间进一步包括一个或多个中间层,其中所述中间层包括形成第一和第二流体通道部分中的至少一者的图案化部分。优选地,流通膜设置在中间层中的至少一个的开口中。这个多层结构可进一步包括位于中间层和外层之间的吸收层或部分,以引导流体穿过流通膜。

[0018] 在一个优选实施例中,这个装置的多层结构包括第一和第二外层、间隔层以及中间层,其中所述中间层设置在第一和第二外层之间,并且所述间隔层设置在第一外层和中间层之间并沿着多层结构形成第一流体通道部分。优选地,流通膜设置在中间层的开口中。这个多层结构可进一步包括位于中间层和外层之间的吸收层或部分,以引导流体穿过流通膜。

[0019] 在本发明的多层装置中,第一(外)层可包括透视部分以观测传感器组件。

[0020] 优选地,传感器组件设置在第一和第二层之间的流通膜中或之上。如果需要,传感器组件可在存在一种或多种目标被分析物和 / 或探测剂的情况下(即,在样品分析期间)沉积在此流通膜中或之上。

[0021] 在一个实施例中,提供了一种用于检测是否存在被分析物的装置,所述装置包括:

主体,所述主体包括流路和形成多层结构的多个层,所述流路由形成在第一层和第二层之间的第一流体通道部分和第二流体通道部分所限定;插入在第一层和第二层之间的图案化层,其中所述图案化层形成小室、第一流体通道部分和第二流体通道部分以及传感器组件设置在由图案化层形成的小室中。传感器组件可被形成或沉积在封闭在小室内的基底上。或者,传感器组件可被形成或沉积在第一层或第二层中的至少一层上。如果需要,传感器组件设置在由图案化层形成的小室内的流通膜中或之上。

[0022] 在一个实施例中,提供了一种装置,其包括:样品流路;包括传感器组件的区段;用于样品制备的一种或多种试剂,所述一种或多种试剂设置在传感器组件之前的样品流路的一个或多个不同区段中;以及任选地,设置在传感器组件之前的样品流路的不同区段中的探测剂,并且其与一种或多种样品制备试剂不同。传感器组件、一种或多种试剂、和/或任选的探测剂可设置在流通膜上或之中。

[0023] 在一个实施例中,提供了一种用于样品制备和目标被分析物分析的装置,所述装置包括:样品流路;一种或多种用于样品制备的试剂,其设置在样品流路的一个或多个不同区段中;包括探测剂的区段,其设置在样品制备试剂中的至少一种的下游的样品流路中;以及包括比色传感器组件的区段,其中所述比色传感器包括具有含联乙炔的聚合物以及受体的聚合组合物,其中所述受体被并入聚合组合物以形成转导体,所述转导体在与一种或多种探测剂和/或被分析物结合能提供颜色变化。

[0024] 本发明的装置可以包括一个或多个小室,其通常设置在第一流体通道部分内。此类小室可以包括设置在其中的一种或多种样品制备试剂和/或一种或多种探测剂(用于间接分析)。另外,流路和/或限定流路的流体通道(特别是第一流路和/或通道部分)是曲折的。这可有助于试验样品与样品制备试剂和/或探测剂的混合。

[0025] 在一个实施例中,提供了一种方法,其包括:提供被疑包含一种或多种目标被分析物的试验样品;提供本文所述的装置,其中所述装置在与试验样品接触之前包括传感器组件;任选地,提供适用于对所述一种或多种目标被分析物进行间接分析的一种或多种探测剂;引导试验样品的流从第一流路部分流到传感器组件下游的第二流路部分;将试验样品暴露到传感器组件以将一种或多种目标被分析物和/或一种或多种探测剂结合到上述传感器组件,如果目标被分析物存在于试验样品中,则会引起传感器组件出现可探测的变化;以及在与目标被分析物和/或探测剂结合时识别传感器组件中可探测的变化。如果需要,所述一种或多种探测剂可以设置在第一流路部分中的所述装置中。

[0026] 在另一个实施例中,提供了一种制备和分析样品中是否存在被分析物的方法,所述方法包括:提供被疑包含一种或多种目标被分析物的试验样品;提供本文所述的装置,其中所述装置包括传感器组件和一种或多种样品制备试剂;引导试验样品的流从第一流路部分流到传感器组件下游的第二流路部分;在第一流路部分中提供能有效地使试验样品与样品制备试剂中的至少一种之间发生反应的条件;在能有效地将被分析物和/或探测剂结合到传感器组件并产生可探测的变化的条件下,将试验样品暴露到传感器组件;以及在与目标被分析物和/或探测剂结合时识别传感器组件中的可探测的变化。

[0027] 本发明的任何装置的传感器组件均在使用前通常被涂覆、沉积、或以其他方式形成于装置内。在其中具有任选的探测剂的试验样品随后可被引入装置中,以用于与传感器组件相互作用。或者,然而,本文所述装置的传感器组件可在存在一种或多种目标被分析物

和 / 或探测剂时沉积在流通膜中或之上（在样品分析期间）。

[0028] 例如, 在一个实施例中, 提供了一种检测是否存在被分析物的方法, 所述方法包括: 提供一种装置, 其包括: 包括流路和形成多层结构的多个层的主体, 所述流路由形成在第一层和第二层之间的第一流体通道部分和第二流体通道部分限定; 以及设置在第一和第二层之间的流通膜, 其中所述流通膜将第一流体通道部分与第二流体通道部分隔开; 提供被疑包含一种或多种目标被分析物的试验样品; 任选地, 提供适用于间接分析一种或多种目标被分析物的一种或多种探测剂; 提供传感器组件; 结合试验样品、任选的探测剂以及传感器组件以形成混合物; 引导混合物的流从第一流体通道部分穿过流通膜到达第二流体通道部分, 以收集传感器组件以及结合的目标被分析物和 / 或探测剂; 以及在与目标被分析物和 / 或探测剂结合时识别传感器组件中的可探测的变化。

[0029] 在另一个实施例中, 提供了一种检测是否存在被分析物的方法, 所述方法包括: 提供一种装置, 其包括: 具有流路和形成多层结构的多个层的主体, 所述流路由形成在第一层和第二层之间的第一流体通道部分和第二流体通道部分限定; 插入在第一层和第二层之间的图案化层, 其中所述图案化层形成小室、第一流体通道部分和第二流体通道部分以及流通膜设置在由图案化层形成的小室中; 提供被疑包含一种或多种目标被分析物的试验样品; 任选地, 提供适用于间接分析一种或多种目标被分析物的一种或多种探测剂; 提供传感器组件; 结合试验样品、任选的探测剂以及传感器组件以形成混合物; 引导混合物的流从第一流体通道部分穿过小室内的流通膜到达第二流体通道部分, 以收集传感器组件和结合的目标被分析物和 / 或探测剂; 以及在与目标被分析物和 / 或探测剂结合时识别传感器组件中的可探测的变化。

#### [0030] 定义

[0031] 术语“被分析物”和“抗原”可互换使用并且是指小分子、病原及非病原生物体、毒素、膜受体及片段、挥发性有机化合物、酶和酶基质、抗体、抗原、蛋白质、肽、核酸及肽核酸。在某些优选的实施例中, 它们是指所关注的微生物（即, 微生物）所特有的各种分子（如, A 蛋白）或分子表位（如, A 蛋白的不同结合位点）、或微生物的整个细胞。这些包括细胞壁的组分（如, 细胞壁蛋白例如 A 蛋白以及凝聚因子, 其为在金黄色葡萄球菌中发现的与细胞壁相关纤维蛋白原受体）、外部细胞组分（如, 荚膜多糖和细胞壁碳水化合物）、内部细胞组分（如, 细胞质膜蛋白）等。

[0032] 术语“传感器组件”是指在与直接分析中的目标被分析物结合或与设计用于目标被分析物的间接分析的探测剂结合时能够显示出可探测变化的材料。通常, 传感器组件包括并入聚合组合物中的受体。受体通常被设计来与目标被分析物和 / 或探测剂结合。

[0033] 当术语“包含”及其变型出现在具体实施方式和权利要求中时不具有限制的意思。

[0034] 单词“优选的”和“优选地”指在某些情况下, 可提供某些有益效果的本发明实施例。然而, 在相同的情况或其它情况下, 也可以优选其它实施例。此外, 一个或多个优选实施例的详述并不意味着不可使用其它实施例, 且并无意于将其它实施例排除在本发明范围之外。

[0035] 如本文所用, 可互换使用“一”、“所述（该）”、“至少一种（个）”以及“一种或多种（一个或多个）”。

[0036] 用语“和 / 或”意指所列出的元件中的一种（个）或所有或者所列出的元件的任

何两种或多种（两个或多个）的组合。

[0037] 本发明的以上概述并非意图描述本发明每个公开的实施例或每种实施方式。以下描述更具体地举例说明示例性实施例。在本专利申请全文的几处，通过实例清单提供指导，可以不同组合使用这些实例。在每一种情况下，被引用的清单均仅用作一个代表性的组，不应被理解为是排他性的清单。

### 附图说明

[0038] 将结合附图进一步解释本发明所公开的主题，其中在几个视图中用相同的附图标号来表示相同的结构或系统元件。

[0039] 图 1 示出了在试验小室中的溶液中的传感器的一个实施例。

[0040] 图 2 示出了基底上传感器层或部分的一个实施例。

[0041] 图 3 示出了包括图案化传感器层或部分的类似于图 2 的传感器组件。

[0042] 图 4 是包括流路和传感器组件的装置的示意图。

[0043] 图 5 是包括多个流路和传感器组件的装置的示意图。

[0044] 图 6 是包括注射器或压力源的装置的示意图，所述注射器或压力源用于引导沿着装置的流路流动。

[0045] 图 7 是包括真空源的装置的示意图，所述真空源用于引导沿着装置的流路流动。

[0046] 图 8 是包括多层构造的装置的分解图，所述多层构造形成包括在第一流体通道部分和第二流体通道部分之间传感器组件的流路。

[0047] 图 9 是沿着装置的流路包括多个小室的装置的示意图。

[0048] 图 10-11 示意性地示出了包括流通膜（即，多孔膜）的侧向流装置的实施例，所述流通膜形成在装置的第一流路部分和第二流路部分之间包括传感器组件的流路。

[0049] 图 12 示意性地示出了在装置的流通膜上包括传感器组件的装置的实施例。

[0050] 图 13 示意性地示出了在流通膜上包括传感器组件的装置的实施例，所述流通膜使形成于小瓶内的多个流路部分分离。

[0051] 图 14 示意性地示出了传感器组件或图 13 所示实施例的部分。

[0052] 图 15 示意性地示出了具有多层结构并在流通膜上包括传感器组件的装置的实施例。

[0053] 图 16 是示出图 15 所示类型的装置的多层构造（即，多层结构）的分解图。

[0054] 尽管上述各图列出了本发明所公开主题的一个或多个实施例，正如本公开中所提到的，还可以想到其他实施例。在所有情况下，本公开通过示例性而非限制性的方式介绍本发明所公开的主题。应当理解，本领域内的技术人员可以设计出大量其他修改形式和实施例，这些修改形式和实施例也在本公开的原理的精神和范围内。

### 具体实施方式

[0055] 本文所示的实施例涉及检测试验样品中的被分析物的检测装置和方法。在某些实施例中，本发明还涉及制备供分析用的试验样品的装置和方法。

[0056] 本文所述装置的实施例包括响应于与试验样品中的被分析物的反应或结合而发生可探测的变化（如，颜色变化）的传感器组件。这些装置可以用于不仅涉及检测被分析

物的存在、还优选地涉及鉴定此类被分析物的方法,所述鉴定例如可以允许鉴定以被分析物为特征的微生物。在某些实施例中,分析样品包括确定被分析物的量。

[0057] 传感器组件通常包括并入聚合组合物的受体。受体通常被设计成与目标被分析物和 / 或设计用于间接地分析目标被分析物的探测剂结合。在结合时,聚合组合物发生转变或构象而产生可探测的变化,以指示试验样品中被分析物的存在。可探测的变化包括颜色变化、荧光变化、或指示被分析物的存在的其他可探测变化中的一种。其他可探测的变化包括,例如,通过诸如电压或电流装置的传感装置(未示出)来检测的电导或电阻的变化。优选的变化是颜色变化。

[0058] 特别优选的传感器组件是比色传感器,所述比色传感器包括具有含联乙炔的聚合物以及受体的聚合组合物,其中所述受体被并入聚合组合物以形成转导体,所述转导体在与一种或多种探测剂和 / 或被分析物结合时能提供颜色变化,如下面进一步详细所述。合适的比色传感器在 2007 年 11 月 20 日提交的本申请人受让人的共同待审专利申请 No. 60/989, 298 中有所描述。

[0059] 在图示实例中,被分析物可以直接或间接的模式检测,以显示在试验样品中病原体、生物体、毒素、或其他目标被分析物的存在。在检测给定目标被分析物的分析中,传感器可以在溶液中起作用或涂覆到基底上,如下面进一步详细的描述。

[0060] 简而言之,在溶液中,传感器可以用于直接或间接(竞争的)分析。在直接模式中,被分析物可以直接结合到产生可探测变化(如颜色变化)的传感器。在间接模式中,例如,首先允许探测剂在给定培养期间内与被分析物混合并相互作用。通常,在这个步骤完成后,传感器的溶液与被分析物-探测剂混合物结合。剩余的未结合的探测剂随后可以结合到产生可探测变化(例如颜色变化)的比色传感器。由于未结合的探测剂的浓度将与最初存在的被分析物的浓度成反比,所以所产生的可探测变化也与被分析物的浓度成反比,这就是此模式的间接性。如果由在溶液中进行的分析引起的可探测变化是例如颜色变化,则其可以目测观察到,尽管为了获得灵敏度,可使用适当的射流系统来将比色传感器材料集中到固相上,从而放大颜色变化。

[0061] 对于涂覆在基底上的传感器而言,类似的直接和间接分析也是可能的。在这些分析中,通过使用合适的射流系统将涂覆的比色传感器暴露到溶液相,而不是将传感器材料放置在溶液中。

#### [0062] 优选的比色传感器聚二乙炔组件

[0063] 适用于本发明的装置和方法中的优选的比色传感器包括聚合组合物,所述聚合组合物具有受体和含联乙炔的聚合物材料(聚二乙炔组件),其中所述受体被并入聚合组合物而形成转导体,所述转导体能与与一种或多种探测剂和 / 或被分析物结合时提供颜色变化。此类比色传感器可以用作分子识别事件的比色检测的基础。

[0064] 用于比色传感器的合适的联乙炔化合物在溶液中自组装以形成可以利用任何光化辐射(诸如,例如,UV 或电磁光谱可见范围内的电磁辐射)而聚合的有序组件。联乙炔化合物的聚合得到聚合反应产物,依据其构象和暴露于外界因素的情况而定,所述聚合反应产物具有小于 570 纳米(nm)、在 570nm 和 600nm 之间、或大于 600nm 的可见光谱中的颜色。通常,本文所公开的联乙炔化合物的聚合得到包括聚二乙炔主链的亚稳态蓝相聚合物网络。这些亚稳态蓝相聚合物网络在暴露到外界因素(例如热、溶剂或抗衡离子变化(如

果有的话)、或诸如物理应力)时便发生从浅蓝色到橘红色的颜色变化。

[0065] 在暴露到物理应力下时,本文所公开的联乙炔化合物和其聚合反应产物发生可见的颜色变化的能力使得它们可以用来制备用于检测被分析物的感测装置。由本文所公开的联乙炔化合物形成的聚二乙炔组件可以在生物感测应用中用作转导体。

[0066] 对用于给定感测应用的联乙炔分子的结构要求通常是因具体应用而异的。诸如全链长度、溶解度、极性、结晶度以及用于进一步分子改性的官能团的存在之类的特性一同决定联乙炔分子充当可用的感测材料的能力。

[0067] 例如,在对含水介质中的被分析物进行生物检测的情况下,联乙炔化合物的结构应当能够在水中形成稳定的分散液、有效地聚合为有色材料、合并用于结合到被分析物的合适的受体化学物以及通过颜色变化而对结合相互作用进行转换。这些能力取决于联乙炔化合物的结构特征。

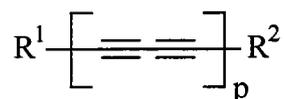
[0068] 本发明的联乙炔化合物具有上述的能力并可以方便有效地聚合为能发生所需颜色变化的聚二乙炔组件。另外,在仍形成稳定、可聚合溶液的同时,联乙炔化合物允许合并大量额外的非聚合物材料,例如下述的受体。

[0069] 所公开的联乙炔化合物可以快速高产的方式进行合成,包括高通量合成方法在内。联乙炔化合物主链中官能团(例如杂原子)的存在使得可容易地确定结构,以便符合给定感测应用的要求。联乙炔化合物可以通过将联乙炔添加到合适的溶剂(诸如水)中、用声波处理混合物、然后用通常在 254nm 波长的紫外光照射溶液而聚合为所需的包含网络的聚二乙炔主链。在聚合时,溶液发生到蓝紫色的颜色变化。

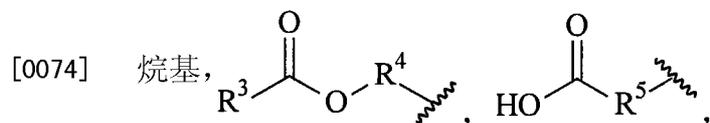
[0070] 可用于本发明的联乙炔通常包含等于 8 的平均碳链长且带有至少一个官能团例如羧基、伯胺和叔胺基、羧基甲基酯等。合适的联乙炔包括美国专利 No. 5, 491, 097 (Ribi 等人);PCT 公开 No. WO 02/00920 ;美国专利 No. 6, 306, 598 以及 PCT 公开 WO 01/71317 中所述的那些。

[0071] 在一个优选实施例中,聚二乙炔组件是下式的聚合组合物

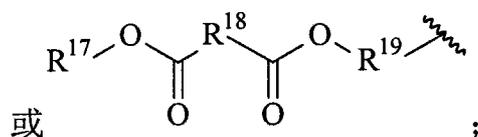
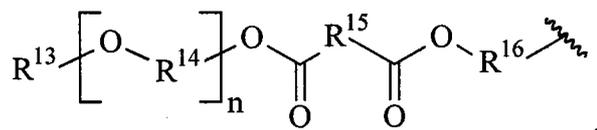
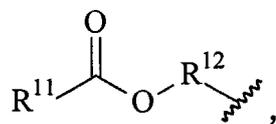
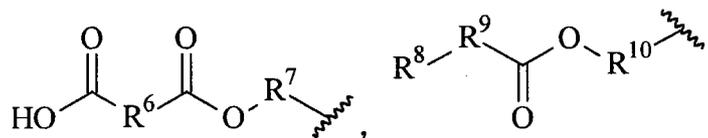
[0072]



[0073] 其中  $R^1$  为

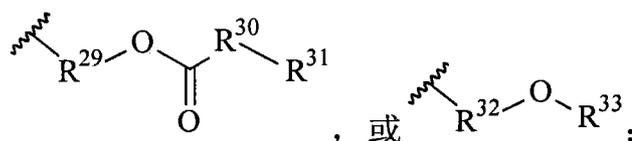
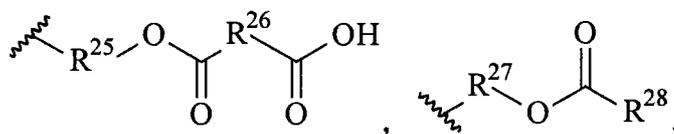
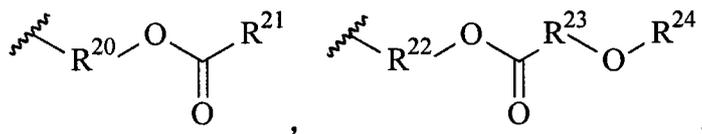


[0075]



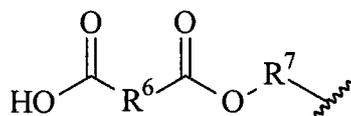
[0076] R<sup>2</sup> 为

[0077]



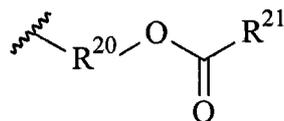
[0078] R<sup>3</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>13</sup>, R<sup>21</sup>, R<sup>24</sup>, R<sup>31</sup> 和 R<sup>33</sup> 独立地为烷基; R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>14</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>19</sup>, R<sup>20</sup>, R<sup>22</sup>, R<sup>25</sup>, 和 R<sup>32</sup> 独立地为亚烷基; R<sup>6</sup>, R<sup>15</sup>, R<sup>18</sup>, 和 R<sup>26</sup> 独立地为亚烷基、亚烯基、或亚芳基; R<sup>9</sup> 为亚烷基或 -NR<sup>34</sup>-; R<sup>10</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>27</sup>, 并且 R<sup>29</sup> 独立地为亚烷基或亚烷基-亚芳基; R<sup>11</sup> 和 R<sup>28</sup> 独立地为炔基; R<sup>17</sup> 为酯活化基团; R<sup>23</sup> 为亚芳基; R<sup>30</sup> 为亚烷基或 -NR<sup>36</sup>-; R<sup>34</sup>, 并且 R<sup>36</sup> 独立地为 H 或 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 烷基; p 为 1-5; 并且 n 为 1 至 20; 并且其中 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 不相同。示例性化合物在美国专利 No. 6, 963, 007 和美国专利申请公开 No. 04-0126897-A1 和 No. 04-0132217-A1 中得以进一步描述。在一个优选实施例中, R<sup>1</sup> 为

[0079]



[0080] 其中 R<sup>7</sup> 为乙烯基、三亚甲基、四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基、七亚甲基、八亚甲基、或九亚甲基, 并且 R<sup>6</sup> 为乙烯基、三亚甲基、亚乙烯基、或亚苯基; 并且其中 R<sup>2</sup> 为

[0081]

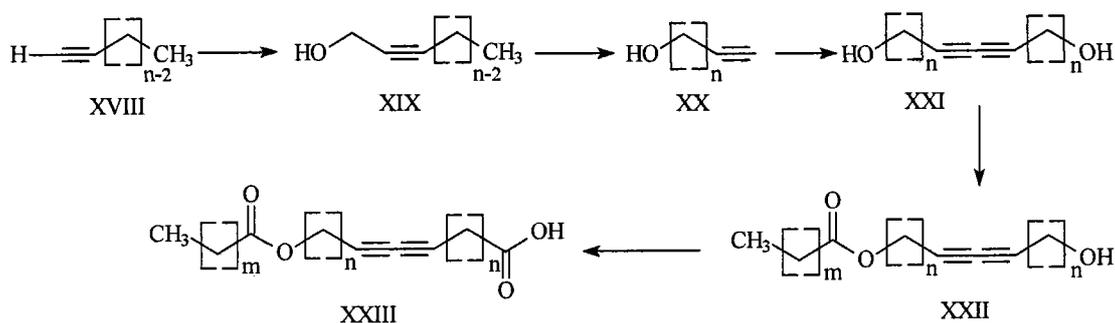


[0082] 其中  $R^{20}$  为乙烯基、三亚甲基、四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基、七亚甲基、八亚甲基、或九亚甲基, 并且其中  $R^{21}$  为十一烷基、十三烷基、十五烷基、十七烷基; 并且其中  $p$  为 1。

[0083] 本发明包括本文所述的包括异构体(诸如结构异构体和几何异构体)、盐、溶剂化物、多晶型物等的化合物。

[0084] 由式 XXIII 表示的联乙炔可按方案 1 中所概述的方法制备, 其中  $n$  通常为 1 至 4, 并且  $m$  通常为 10 至 14。

[0085]



[0086] 方案 1

[0087] 式 XXIII 的化合物可以由式 XXII 的化合物通过与合适的氧化剂在合适的溶剂例如 DMF (举例来说) 中经由氧化而制备。合适的氧化剂包括例如琼斯试剂和重铬酸吡啶鎓。上述的反应通常在  $0^{\circ}\text{C}$  至  $40^{\circ}\text{C}$ 、一般在  $0^{\circ}\text{C}$  至  $25^{\circ}\text{C}$  的温度下进行 1 小时至 48 小时, 一般为 8 小时。

[0088] 式 XXII 的化合物可以由式 XXI 的化合物通过与合适的酰基氯反应而制备。例如, 合适的酰基氯包括任何提供所需产物诸如月桂酰氯、1-十二酰氯、1-十四酰氯、1-十六酰氯以及 1-十八酰氯的酰基氯。例如, 合适的溶剂包括醚、四氢呋喃、二氯甲烷以及氯仿。上述的反应通常在存在三烷基胺或吡啶碱等碱的情况下, 在  $0^{\circ}\text{C}$  至  $40^{\circ}\text{C}$ 、通常在  $0^{\circ}\text{C}$  至  $25^{\circ}\text{C}$  的温度下进行 1 小时至 24 小时, 一般为 3 小时。

[0089] 式 XXI 的化合物为市售的(如, 其中  $n$  为 1 至 4) 或者可以由式 XVIII 的化合物通过化合物 XIX 和 XX 而制备, 如方案 1 中所概述以及 Abrams 等人在 *Org. Synth.*, 66, 127-31 (1988) 和 Brandsma 的 *Preparative Acetylenic Chemistry*, (纽约, Elsevier 出版公司, 1971 年) 中所述。

[0090] 如本文所公开的联乙炔化合物还可在存在合适的溶剂例如甲苯的情况下通过将式 XXII 的化合物与酸酐(例如琥珀酸、戊二酸、邻苯二甲酸的酸酐) 反应而制备。上述的反应在  $50^{\circ}\text{C}$  至  $125^{\circ}\text{C}$ 、一般在  $100^{\circ}\text{C}$  至  $125^{\circ}\text{C}$  的温度下通常进行 1 小时至 24 小时, 一般为 15 小时。

[0091] 包括聚二乙炔组件的传感器可以在将其转移到适当的支承件之前在无需形成的膜的情况下通过传统的 LB (Langmuir-Blodgett) 工艺获得。或者, 聚二乙炔组件可以利用已知的 LB 工艺形成在基底上, 如在 A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films*, 纽约, 学术出版社, 第 101-219 页 (1991) 中所述。

**[0092] 优选的比色传感器受体**

[0093] 比色传感器包括由并入溶液中的聚二乙炔组件内的受体形成的转导体。传感器可以通过在聚合之前或之后将受体添加到联乙炔单体而制备。受体能够通过包括物理混合、共价结合以及非共价相互作用（例如，静电相互作用、极性相互作用等）在内的各种方式使聚二乙炔组件功能化。

[0094] 在聚合时或其后，受体有效地与聚合物网络合并使得受体与被分析物或探测剂的相互作用，由于共轭烯-炔聚合物主链的扰动而引起可见的颜色变化。

[0095] 受体与聚二乙炔组件的合并提供能够响应于与一种或多种探测剂和 / 或被分析物的相互作用或结合而变形的结构形状。特别可用的受体是两亲性分子的组件，通常具有通过堆积参数来表征的杆状分子结构，所述堆积参数定义为： $v/(a_0l_c)$  (Israelachvili 等人, Q. Rev. Biophys., 13, 121 (1980))，其中  $v$  是分子的烃组分（例如，磷脂或脂肪酸的烃链）的体积， $a_0$  是极性首基（例如，磷脂的磷酸盐首基或脂肪酸的羧酸首基）的有效面积，并且  $l_c$  是所谓的临界长度，并主要描述了在其环境温度下分子的长度。受体的优选的两亲性分子是具有在  $1/3$  和  $1$  之间的堆积参数  $v/(a_0l_c)$  值的那些两亲性分子。

[0096] 可用的受体的实例包括（但不限于），脂质、表面膜蛋白、酶、凝集素、抗体、抗体片段、重组蛋白质、肽、肽片段等；合成蛋白质；核酸、核酸蛋白；c- 甙类；碳水化合物；神经节苷脂；以及螯合剂。在大部分实施例中，受体是磷脂。合适的磷脂包括磷酸胆碱（如，1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱）；磷酸乙醇胺；以及磷脂酰乙醇胺；磷脂酰丝氨酸；以及磷脂酰甘油，例如在 Silver 著的 The Physical Chemistry of Membranes, 第一章, 第 1-24 页 (1985) 中所述的那些。

[0097] 在一个实施例中，受体物理混合并分散在聚二乙炔中以形成其中结构本身具有对探测剂和 / 或目标被分析物的结合亲和力的结构。结构包括，但不限于，脂质体、胶束以及薄片。在一个优选的实施例中，结构是脂质体。尽管不想被理论束缚，但是据信磷脂模仿细胞膜，而聚二乙炔组件允许脂质体发生的物理-化学变化转化为可见的颜色变化。所制备的脂质体具有界定分明的形态、大小分布以及其他物理特征，诸如界定分明的表面电势。

[0098] 在脂质体中受体与联乙炔化合物的比例可以基于材料的选择以及所需的比色响应而变化。在大部分实施例中，磷脂与联乙炔化合物的比例将为至少 25 : 75，并且更优选地至少 40 : 60。在一个优选的实施例中，脂质体由联乙炔化合物组成：以 6 : 4 比例混合的  $\text{HO(O)C(CH}_2)_2\text{C(O)O(CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{C(CH}_2)_4\text{O(O)C(CH}_2)_{12}\text{CH}_3$  [琥珀酸单-(12-十四酰氧-十二-5,7-二炔基)酯]，和两性离子磷脂 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 [DMPC]。

[0099] 脂质体可以通过对悬浮在被称为制备缓冲液的缓冲溶液中的材料混合物进行探测剂声处理来制备。例如，制备缓冲液可以是低离子强度的 (5mM) N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙基磺酸 [HEPES] 缓冲液 (pH = 7.2)。另一种可用的制备缓冲液是低离子强度的 (2mM) 三羟甲基氨基甲烷 [TRIS] 缓冲液 (pH = 8.5)。

**[0100] 优选的比色传感器探测剂**

[0101] 本发明的比色传感器优选被设计成利用一种或多种探测剂可以与包含受体（例如磷脂）和聚合联乙炔二者的脂质体相互作用的方式。脂质体可被认为是生物膜的模型，并且其与探测剂（例如蛋白质）的相互作用可如 Oellerich 等人在 J. Phys. Chem B, 108,

3871-3878(2004);以及 Zuckermann 等人在 *Biophys. J.*, 81, 2458-2472(2001) 中所述。

[0102] 按脂质(分配在脂质体相中)与蛋白质浓度比来描述蛋白质与脂质体的相互作用是很方便的。在高脂质与蛋白质浓度比下,蛋白质将主要通过静电相互作用而吸附到脂质体的表面。随着蛋白质浓度增加,以及脂质与蛋白质浓度比降低,蛋白质继续静电吸附到脂质体的表面直到其完全饱和或包围脂质体。随着此过程进行,脂质体和蛋白质都会发生形态和构象变化,直到覆盖脂质体表面的蛋白质的疏水区段可以开始与脂质体结构的疏水内部相互作用。这时,蛋白质可以变得疏水结合并渗透脂质体结构,从而在脂质体结构内发生显著的形态变化,脂质体的大小和渗透性发生了很大的变化。最后,吸附的蛋白质的层可以通过脂质体的絮凝作用造成悬浮稳定性的损失,并最终造成脂质相的沉积。

[0103] 这些静电相互作用的存在不仅高度依赖于存在的蛋白质和脂质的类型,还依赖于它们所处的环境。尽管不期望被理论束缚,但据信给定缓冲液组合物的离子强度将有助于建立脂质体和带电蛋白质的表面电势,并因此大大增强其通过静电相互作用的能力。

[0104] 例如,在中性 pH(如,HEPES、TRIS)下的低离子强度(2-5mM)的缓冲液组合物中,带电探测剂可以静电吸附到聚二乙炔脂质体。尽管初始吸附其本身不会触发脂质体大小和形态的显著改变,并因此仅触发最初较小或可忽略的比色响应,但是如果存在过量于脂质的探测剂,则有可能探测剂将最后变得疏水结合到脂质体并渗透其内部膜结构。这时,人们会期望通过将探测剂并入脂质体结构内而赋予的较大的机械应力会显著改变聚二乙炔构象,从而引起伴随的易于观察的比色响应。

[0105] 或者,如果探测剂在中性 pH 下带负电,则其与聚二乙炔脂质体静电相互作用的能力就被严重地削弱,并且由于探测剂和含受体的聚二乙炔脂质体之间的疏水相互作用而产生比色响应的能力可能会降低。在这种情况下,使用中性 pH(如,磷酸盐缓冲液 PBS、咪唑缓冲液)的高离子强度缓冲液(大于 100 毫克分子(mM))将提供一种降低脂质体表面电势的方法(通过屏蔽脂质体的表面电荷),从而有助于非带电探测剂与脂质体的直接疏水相互作用,并引起蛋白质并入脂质体的结构内。因此,在这种情况下,缓冲液组合物帮助实现其他情况下可能不会发生的显著的比色响应。由于对脂质体表面电势的影响,尽管缓冲液组合物的较高离子强度可以在不存在探测剂的情况下引起显著的比色响应,但是我们已经确定当探测剂存在时,比色响应由于蛋白质-脂质体疏水相互作用而显著增强。这种结果具有非常实用的意义:在给定检测极限下的检测时间可以显著缩短,或反之,对于固定的分析时间,检测的极限可以显著降低。

[0106] 基于这种现象,可根据探测剂尤其是与给定的目标被分析物和聚二乙炔脂质体二者相互作用而触发比色响应的能力来选择探测剂。含聚二乙炔的脂质体的比色响应在直接分析的情况下与探测剂或探测剂-被分析物复合物的浓度成正比。

[0107] 用于特定应用探测剂的选择将部分取决于探测剂的大小、形状、电荷、疏水性及对分子的亲和力。根据环境的 pH,探测剂可以带正电、带负电、或为两性离子。在探测剂的 pH 低于等电点处探测剂带正电,并且高于这个点处探测剂带负电。如本文所用,术语“等电点”是指其中探测剂具有零的净电荷的 pH 处。

[0108] 为了设计使用聚二乙炔/磷脂体系的生化分析,知道受体(或探测剂)的等电点将会影响缓冲液组合的选择。具有较低等电点的探测剂可能需要更高离子强度缓冲液来获得脂质体形态的变化。较高的等电点可以用于低离子强度缓冲液如 HEPES 缓冲液以产生颜

色变化。

[0109] 探测剂可以是任何具有对目标被分析物和受体有亲和力的分子。用于本发明的可能的探测剂包括膜破坏肽 (membrane disrupting peptides), 例如丙甲菌素、爪蟾抗菌肽、短杆菌肽、多粘菌素 B 硫酸酯以及蜂毒肽; 纤维蛋白原; 抗生蛋白链菌素; 抗体; 凝集素; 以及它们的组合。参见, 如, 美国专利申请公开 No. 2004/132217。多粘菌素例如多粘菌素 B 硫酸酯对检测革兰氏阳性菌特别有用。

[0110] 抗体和抗体片段还可以用作探测剂。这包括能够与某些蛋白质选择性地发生反应的抗体分子的蛋白水解分裂或重组制备部分的区段。此类蛋白水解和 / 或重组片段的非限制性实例包括  $F(ab')$ 、 $F(ab)_2$ 、 $Fv$  以及包含通过肽键连接的 VL 和 / 或 VH 域的单链抗体 (scFv)。单链抗体可以共价或非共价地连接以形成具有两个或多个结合位点的抗体。单链抗体可以共价或非共价地连接以形成具有两个或多个结合位点的抗体。抗体可以用任何本领域的技术人员已知的可探测部分来标记。在一些方面, 人们希望测量的结合到被分析物的抗体 (第一抗体) 未被标记, 而是通过结合被标记的第二抗体或其它特异结合到第一抗体的试剂而间接地被检测。

#### [0111] 检测方法

[0112] 在本发明的方法中, 试验样品通常从或用样品收集装置收集或获得。在某些实施例中, 材料的样品通常利用缓冲溶液 (诸如举例来说水、生理盐水、pH 缓冲溶液、或任何其他从样品采集装置洗提被分析物或样品的溶液或溶液的组合) 从样品收集装置洗提 (或“释放”或“洗涤”)。

[0113] 可以与本发明的装置和方法一起使用的目标样品的实例 (如, 尿液、伤口渗出物)、目标和目标被分析物 (如, 目标微生物特别是细菌所特有的一种或多种被分析物)、样品收集步骤、样品制备步骤、样品制备试剂等在 2007 年 11 月 20 日提交的本申请人受让人的共同待审专利申请 No. 60/989, 298 中有所描述。

[0114] 根据本发明的用于分析一种或多种被分析物的方法包括直接和间接方法。优选的方法涉及间接检测。

[0115] 在一个实施例中, 上述提及的比色传感器的使用提供直接吸收测量或允许用肉眼目测来检测比色传感器中的颜色变化。在一些情况下, 探测剂可以与可与传感器直接相互作用的被分析物形成复合物, 从而得到其中比色响应与被分析物的浓度成正比的直接分析。

[0116] 在一个可供选择的实施例中, 本发明提供了一种用于通过选择具有亲和力的探测剂来与并入聚二乙炔组件的受体和被分析物二者结合而间接检测被分析物的方法。所选的探测剂将展示与被分析物的竞争亲和力。当目标被分析物存在时, 探测剂将结合到被分析物而非在聚二乙炔主链上的受体, 从而引起与被分析物浓度成反比的颜色变化。如果被分析物不存在, 探测剂将结合到合并到聚二乙炔主链上的受体。探测剂可以在被分析物接触传感器后接触传感器, 或者可以在混合物接触传感器之前与被分析物混合。

[0117] 在间接检测分析的一个实施例中, 探测剂和目标被分析物被允许在缓冲溶液中相互作用, 缓冲液随后放置成与传感器接触。游离在缓冲液中的探测剂的浓度取决于存在的目标被分析物的量: 被分析物浓度越高, 探测剂的剩余浓度越低。由于传感器的比色响应与可用的游离探测剂的量成比例, 所以比色响应与被分析物浓度成反比。

[0118] 在间接分析的一个特别优选的实施例中,传感器组件包括被构造为与多粘菌素 B 硫酸酯探测剂或其他试剂结合以检测革兰氏阴性或革兰氏阳性菌的聚二乙炔脂质体。多粘菌素 B 硫酸酯探测剂在适度搅拌下与试验样品混合以结合到细菌。聚二乙炔脂质体被用来检测未结合的多粘菌素以间接检测试验样品的细菌量。在未结合的多粘菌素与聚二乙炔脂质体结合时,聚二乙炔传感器组件发生颜色变化,其中所述颜色变化与试验样品中细菌的浓度成反比。

[0119] 检测分析通常还包括用于调节被分析物与转导物之间的相互作用的缓冲液组合物。缓冲液组合物提供能够在存在其他组分的情况下抵抗 pH 变化的体系,其由其中质子受体与质子的供体的比例接近 1 的共轭酸-碱对组成。另外,本发明的缓冲液组合物调节被分析物和比色传感器的组分之间的物理或化学相互作用。例如,缓冲液组合物的适当选择可以在抑制其他可能存在于样品中的潜在干扰蛋白质的相互作用的同时有利于蛋白质探测剂与聚二乙炔脂质体的相互作用。可能特别可用的缓冲液组合物包括 HEPES 缓冲液、咪唑缓冲液以及 PBS 缓冲液。合适的缓冲液组合物在 2007 年 11 月 20 日提交的本申请人受让人的共同待审专利申请 No. 60/989, 298 中有所描述。

[0120] 在一个实施例中,本发明的方法包括在缓冲液组合物中提供具有被分析物的试验样品;在缓冲液组合物中提供探测剂;结合实验样品和探测剂,其中探测剂显示出对被分析物比对受体更大的结合亲和力;以及用生物传感器检测变化。

[0121] 在一些分析中,探测剂可以通过碎片化或以其他方式溶解目标被分析物而在原位生成。探测剂还可以被视为对可用于与传感器直接相互作用的生物体特异的蛋白质、蛋白质片段或其他在外部存在于生物体细胞壁上的被分析物。例如,可以操作探测剂和被分析物之间的相互作用来排除与脂质体的相互作用。或者,探测剂可以与被分析物相互作用以形成复合物,所得的复合物与脂质体相互作用。探测剂可以与溶液中的传感器接触或涂覆在基底上。

[0122] 通过使用间接的检测方法,基于所使用探测剂的浓度,可得到能提供低检测水平的高灵敏度。对于这种检测策略而言,探测剂浓度可以选择成与所需的检测浓度水平相对应。利用探测剂的间接检测的方法允许在给定应用中为所需的灵敏度根据探测剂的类型和浓度设计体系。这使得转导物对多种目标被分析物是通用的。例如,单个转导物(聚二乙炔/受体组合物)可用来通过根据探测剂对被分析物的亲和力改变与转导物接触的探测剂来检测多种被分析物。

[0123] 在某些实施例中,比色传感器可以提供于简单小瓶体系中的溶液或悬浮液中,其中被分析物可以直接添加到包含具有对目标被分析物特异的转导物的溶液的小瓶。或者,系统可以在套件中包括多个小瓶,各小瓶包含包括具有对不同被分析物特异的合并受体的聚二乙炔组件的转导物。

[0124] 对于那些其中被分析物不能直接添加到聚二乙炔转导物的应用而言,可以使用二体小瓶体系。小瓶的一个隔间可包含用于被分析物的样品制备的试剂,其与包含由聚二乙炔组件形成的转导物的第二隔间物理分离。一旦样品制备完成,分离隔间的物理屏障就会被移除以允许被分析物与用于检测的转导物混合。

[0125] 或者,套件还可以包含用于试剂储存并在接触涂覆在二维基底上的比色传感器之前混合被分析物的小瓶。在一个实施例中,套件包括用于试剂储存和被分析物制备的小瓶,

将包含本发明转导物的顶盖系统 (cap system) 涂覆在基底上。

[0126] 传感器的溶液或悬浮液随后可以通过点涂并允许液体载体 (如, 水) 蒸发而涂覆在固体基底上。合适的基底可以包括高度平整的基底, 例如蒸镀金原子级平整硅 (111) 晶片、原子级平整硅 (111) 晶片、或浮法玻璃, 其为裸的并用自组装单层膜 (SAM) 修饰以按系统的方式改变其表面能; 或者具有高度纹理表面特征的基底, 其包括纸基底、聚合物油墨涂层、结构化聚合物膜、多孔膜以及膜材料。

[0127] 或者, 传感器的溶液或悬浮液可以通过合适孔径的膜挤出, 从而困陷聚二乙炔组件并得到涂层膜, 随后使涂层膜干燥。合适的膜一般是包括像聚碳酸酯、尼龙、PTFE、聚乙烯等之类的材料的具有 200nm 或更小孔径的那些。

[0128] 这些基底可以用联乙炔组件的聚合悬浮液涂覆, 或者悬浮液可以未聚合的形式涂覆, 并随后以涂层状态聚合。传感器的涂层重量通常会影响传感器的灵敏度。理想的是, 涂层重量应当设计成与被分析物结合并在合理的时间段内发生可探测的变化。涂层重量还应当优选在整个基底上是均匀的, 以均匀地将试验样品暴露到诸如传感器组件。

[0129] 聚二乙炔指示剂的比色响应通过测量色调角 ( $h^\circ$ ) 来表征。 $h^\circ$  的值范围从  $0^\circ$  到  $360^\circ$ , 其基本上测量了给定颜色的 RGB (红色、绿色、蓝色) 的值。纯红色对应  $0^\circ$  的  $h^\circ$  值, 纯绿色对应  $120^\circ$  的  $h^\circ$  值, 并且纯蓝色对应  $240^\circ$  的  $h^\circ$  值。色环是连续的, 因为从  $360^\circ$  到  $0^\circ$  没有不连续 (两值都对应纯红色)。平均而言, 优选的聚二乙炔指示剂的动态范围涵盖了从约  $260^\circ$  (蓝相) 到约  $360^\circ$  (红相) 的色调角区间。 $h^\circ$  值通过利用市售的分光光度计 (Avantes AvaSpec-2048-SPU2-SD256 可得自伊利诺斯州芝加哥市的 Wilkens-anderson 公司) 来直接测量颜色而确定。

[0130] 可以使用各种形式的比色传感器, 包括, 例如, 带形或标签形。参见, 如, 美国专利申请公开 No. 2004/132217。

[0131] 在某些实施例中, 本发明的比色传感器可以与其他已知的诊断方法配对使用, 以提供对细菌所特有的被分析物或其他目标被分析物的存在的多方面确定。

#### [0132] 装置设计

[0133] 比色传感器可以在溶液中起作用或者涂覆在基底上。优选地, 在本文所示的装置中, 传感器可以包括在装置内。例如, 传感器组件可以设置在样品流路中的膜上。作为另外一种选择或除此之外, 检测中 (如, 探测剂) 使用的各种样品制备试剂或其他试剂, 正如在 2007 年 11 月 20 日提交的本申请人受让人的共同待审专利申请 No. 60/989, 298 中所述, 可以设置在本文所述的装置中。

[0134] 在本发明的一个实施例中, 如本文所讨论的各种试剂可以干燥形式、固体或半固体形式设置。此类试剂可以利用各种技术例如真空干燥、和设备, 诸如对流烘箱以及低压冻干法进行干燥。对于干燥试剂而言, 可以使用干燥稀释液。示例性干燥稀释液可以包括例如缓冲液 (如, 磷酸盐缓冲液)、对共轭特异的二糖 (如, 海藻糖、蔗糖) 和多糖 (如, 甘油) 以及防腐剂 (如, 叠氮化钠)。

[0135] 其中具有试剂 (特别是, 其中具有固体或半固体形式的干燥试剂) 的装置的使用可以提供更高的效率、较少的样品污染、较少的样品转移损失、更好的稳定性以及更长的储存寿命。

[0136] 例如, 在装置的一部分中, 表面可以用包含多粘菌素的溶液涂覆并任选地干燥, 在

装置的下游部分中,表面可以用比色传感器涂覆并任选地干燥。随着试验样品沿着其流路流过装置,其将首先与探测剂接触形成试验样品和探测剂的混合物,并且此混合物随后将进一步沿着其流路流动以接触比色传感器。这样,探测剂在接触比色传感器之前与包含被分析物的试验样品相互作用。

[0137] 下面讨论的示例性实施例包括设置样品流路中的装置中的传感器(即,传感器组件)。作为另外一种选择或除此之外,用于检测的其他试剂(如,探测剂)和/或用于样品制备的试剂(如,溶解试剂)可以设置在样品流路中的装置中。此类试剂可以是固体或半固体形式的。

[0138] 图1-图7、图10、和图12是用于更好地理解射流装置的流路中的传感器组件的一般概念的概括一般化结构:在溶液中(图1);固体形式(图2);设计的形式(图3);在产生一个或多个流路的一个或多个流体通道中(图4-5);显示有任选的流量发生器(如,注射器/压力/真空源)(图6-7);侧流形式(图10)或在重力给料系统中(图12)。尽管其他传感器也可适用于在本文所述的装置,但此类实施例仅就比色传感器方面进行讨论。

[0139] 图8-9、11及图13-16是更详细结构,用于更好地理解实际装置、其制备方式以及其将怎样用于本文所述的方法中。

[0140] 概括地讲,如图1所示,传感器(即,传感器组件)100在传感器小室122中的溶液120中。如图所示,小室122可以设置在第一流路部分124和第二流路部分126之间的流路中。被疑包含目标被分析物的试验样品流入小室122以与溶液120混合。例如,在直接分析中,一经混合,目标被分析物(如果存在于试验样品)便与传感器组件100的受体结合以产生可探测的变化。

[0141] 由在溶液中进行的分析引起的颜色变化可以目测观察。或者,如果需要更高的灵敏度,合适的射流系统可以用来将比色传感器材料集中到固相上,从而放大颜色变化。

[0142] 图2示出了一个示例性实施例,其中传感器组件100由基底132(诸如薄膜、多孔膜(即,流通膜)、或其他基底)上的传感器层或部分130构成。在一个实例中,传感器层或部分130优选地包括沉积在薄膜或其他基底上的聚二乙炔脂质体。

[0143] 在图3所示的实施例中,传感器层或部分130以特定的图案沉积在基底132上以形成一种或多种符号或字母数字文字134。例如,在图示实施例中,传感器层或部分130以“+”符号134的图案形成以指示阳性试验结果。在与被分析物或探测剂结合时,“+”符号134相对于背景部分136变得可见以指示阳性试验结果。符号或文字134的图案通过已知的掩膜技术形成以产生所需图案的沉积传感器层或部分以及没有传感器层或部分130时的背景部分136。尽管图3示出了“+”符号,但是本申请不限于任何特定的符号或文字。

[0144] 本文所述的装置使用如前所述的传感器组件100以利用例如直接分析或间接分析来检测试验样品中目标被分析物的存在。对于间接分析,除了设置在本文所述装置中的传感器组件以外,一种或多种探测剂可以设置在传感器组件上游的装置内。

[0145] 图4示意性地示出了一个实施例,其中本专利申请的检测装置200包括装置200的主体201上的传感器组件100。在所示装置200中,传感器组件100设置在装置200的流路中(第一流路部分202和第二流路部分204之间)。在使用期间,试验样品沿着第一流路部分202经过传感器组件100,然后沿着第二流路部分204流动。随着试验样品流经传感器组件100,被分析物或探测剂与包含在传感器组件100内的受体结合以产生可探测的变化。

如图所示,样品在入口 206 注入流路并在出口 208 处从第二流路部分 204 收集或排出。

[0146] 尽管未示出,但探测剂可以设置在传感器组件上游的装置内的样品流路中(即,在第一流路部分 202 中)。另外,一种或多种样品制备试剂可以设置在传感器组件上游的装置内的样品流路(即,在第一流路部分 202 中)。样品流路部分,特别是上游或第一流路部分 202 可以是弯曲的,从而有利于样品与所用的任何样品制备试剂混合(不管其是否设置在装置中)。

[0147] 如图 4 所示,用于试验样品的流路同时包括在传感器组件 100 上游和下游的流路部分以引导经过传感器组件 100 的流动,用于试验样品中被分析物与传感器组件 100 的接触以产生可探测的变化。下游部分通常是废流。被分析物、任何样品制备试剂(如果设置在装置中)、探测剂(如果用于并设置在装置中)以及传感器组件 100 之间的反应时间和相互作用基于样品经过传感器组件 100 的速率和其他本文所讨论的变量而控制。

[0148] 图 5 示意性地示出了图 4 所示的装置,其在一装置 200-1 上包括多个传感器组件 100-1、100-2 以利用单个装置检测相同或不同的被分析物。例如,在直接分析中,包含在传感器组件 100-1 和 100-2 内的受体可以与试验样品中的不同被分析物结合以在试验样品中检测(不同的特征生物体或物质)不同被分析物的存在,或者可以结合到相同被分析物。如图 5 所示,传感器 100-1、100-2 还分别插入在第一流路部分 202-1、202-2 和第二流路部分 204-1、204-2 之间的流路中。试验样品经过入口 206 引进第一流路部分 202-1、202-2,并在出口 208 从第二流路部分 204-1、204-2 排出。尽管图 5 示出了单个入口 206 和出口 208,但是如果需要多个流路,则可以使用多个入口和出口。

[0149] 图 6 至图 7 示出了检测装置 240 的实施例,其中流路由流体通道形成,所述流路延伸通过装置的主体 241。如图所示,流路包括第一流体通道部分 242 和第二流体通道部分 244。如图所示,第一流体通道部分 242 在小室 246 的上游,并且第二流体通道部分 244 在小室 246 的下游。传感器组件 100 设置在第一流体通道部分 242 和第二流体通道部分 244 之间的流路中的小室 246 中。试验样品被注入第一流体通道部分 242,从第一流体通道部分 242 通过小室 246 经过小室 246 中的传感器组件 100 流到第二流体通道部分 244。经过传感器组件 100 的试验样品流体允许被分析物与传感器组件中的受体结合以响应于被分析物或探测剂的存在而产生可探测的变化,如前面所述。

[0150] 在图示装置中,传感器组件 100 的灵敏度受各种因素影响,所述因素包括例如,涂层重量、试验样品的流速、被分析物或探测剂的浓度、被分析物或探测剂的结合速率、流路或通道的横截面面积以及传感器组件 100 上或沿着流路或通道的压降。探测剂或被分析物结合到脂质体与探测剂或被分析物的结合速率  $k$  和探测剂或被分析物和受体的浓度或剂量成比例。试剂探测剂或样品的浓度或剂量与下式成比例:

$$[0151] \quad \text{剂量} \propto \sqrt{\frac{D}{F}}$$

[0152] 其中  $D$  是扩散系数;

[0153]  $l$  是长度;以及

[0154]  $F$  是流速;

[0155] 其中  $MW$  是间接分析中探测剂或直接分析中被分析物的分子量。

[0156] 压降可以通过哈根-泊肃叶(Hagen-Poiseuille)方程大致估计。优选地,最显著的压降应当穿过传感器组件以增强结合。

[0157] 可用的流速范围从 2.5 微升每分钟 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) 至  $1000\ \mu\text{L}/\text{min}$ , 最优的流速是在  $25\ \mu\text{L}/\text{min}$  至  $250\ \mu\text{L}/\text{min}$  的范围内。

[0158] 在图示实施例的每一个中, 试验样品暴露到传感器组件 100 的时间或期间基于试验样品穿过传感器组件 100 的流速而限制。一旦流体流经传感器组件 100, 其就不再暴露到传感器层或部分, 从而限制试验样品暴露到传感器组件 100 以提供在试验结束后不会显著变化的相对稳定的试验结果。

[0159] 本发明的实施例具有对用于间接分析的低分子量探测剂、或者对其中可能有小于 10 分钟内  $5\text{nmol}/\text{mL}$  的检测限制的直接检测的被分析物 (小于  $10\text{kDA}$ ) 的特定应用, 以及对于小于  $100\ \mu\text{L}$  的样品的特定应用。为了限制非特异结合, 可以使用另外的阻断剂 (例如牛血清白蛋白、二糖 (如, 蔗糖、海藻糖))。

[0160] 通过流体通道部分的流动、或沿着流路部分的流动可以通过, 例如, 重力或经过毛细管压力来引导。毛细管流动可以经由多孔介质或聚合物泡沫或通过毛细管道或通道而赋予。通道的大小和面积可设计用来提供所需的穿过传感器组件的流动。

[0161] 或者, 流动可以经由如图 6-7 所示的压力装置或其他压力源而被主动地引导。在图 6 示意性地示出的实施例中, 注射器 260 被用来将试验样品注入第一流体通道部分 242。试验样品在压力下经由注射器 260 注射以引导沿着流路通过第一流体通道部分 242、小室 246 以及第二流体通道部分 244 的流体流动。如图 6 所示, 装置包括开向第二流体通道部分 244 的排气孔 263 以允许困陷的空气或气泡的逃逸。排气孔 263 可以是具有渗透或半渗透覆盖物的与第二流体通道部分 244 流体连通的开口或者是没有覆盖物的开口。或者, 其他技术或装置包括诸如灌注技术或放气阀用来减少困陷的空气气泡或气体。在另一个实例中, 装置本身可以在试验期间定向以便空气气泡自然地转移。

[0162] 在图 7 所示的另一个实施例中, 流体可以经由真空源 264 引导。在这些装置中的某些目标真空源包括 (但不限于), 依靠机械作用来产生真空的那些。例如, 由使用者以操作杆或按钮形式激活的装有弹簧的机构; 允许使用者通过激活动作 (例如移除压敏粘合条) 来将受压缩的弹性体囊恢复到其未压缩的状态。如图所示, 真空源 264 连接到第二流体通道部分 244 以引导沿着流路或流体通道的流体流动。

[0163] 图 8 示出了由多层结构形成的检测装置 270 的分解图。多层构造形成在第一流体通道部分和第二流体通道部分之间包括传感器组件的流路。更具体地说, 图示装置的多层结构包括插入在第一或底层 274 和第二或顶层 276 之间的图案化层 272。图示地, 图案化层 272 可以是冲切膜层。当层 272、274、276 组装时, 层 272 上的图案 (即, 流体通道) 形成小室 280、第一流体通道部分 282 和第二流体通道部分 284。第一层或顶层 276 包括入口开口 290 和出口开口 292, 以分别提供进入第一流体通道的入口和离开第二流体通道部分 284 的出口。

[0164] 尽管如果需要可以使用许多其他材料, 包括聚乙烯、聚丙烯以及聚碳酸酯, 但是在图示实施例中, 层可以由聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 材料制造。第一和第二层 274、276 组装或连接到图案化层 272。这可以通过优选的粘合剂例如压敏粘合剂, 利用各种技术 (如, 胶粘层、热熔膜、热封膜、超声焊接) 来完成。此类层如胶粘层或热熔膜层通常会被图示为可能被或可能未被图案涂布的分离的层, 但是, 此类层未在图 8 中示出。

[0165] 在图 8 所示的实施例中, 传感器组件 100 设置在小室 (即, 池或井) 280 中。在图

示实施例中,传感器组件 100 包括沉积或涂覆在多层结构的层 274 上的层或部分 130。或者,传感器层或部分可被形成或沉积在层 276 上或在小室 280 中封闭的分离基底上。

[0166] 图 8 所示的实施例可以用于间接或直接分析。在间接分析中,被分析物通常将首先与小瓶中的探测剂混合,然后通过使用吸液管或注射器引入图 8 的装置中。流动可以是被动或主动的。在被动模式中,一旦引入,样品便在毛细管作用下流动通过装置;而在主动模式中,注射器可以用来将样品推压或拉吸通过装置。随着探测剂/被分析物混合物穿过在小室 280 中封闭的传感器组件 100,未结合到目标被分析物的探测剂可以扩散到达传感器组件 100 并引起可见的颜色变化。通常,颜色变化首先发生在流动的前缘(因此在小室 280 的上游端)并渐进地向下游移动到小室 280 的背面。样品中被分析物的浓度可以通过发生颜色变化的传感器组件 100 的长度来测量,其中发生从蓝色到红色的颜色变化的总长度与存在于样品中的被分析物的浓度成反比。

[0167] 在直接分析中,传感器组件 100 包括受体,以便当被分析物接触传感器组件 100 时其结合到此受体,并触发传感器组件 100 中可见的颜色变化。在这种情况下,样品可仅通过使用吸液管或注射器引入图 8 的装置中。如在间接分析中,流动可以是被动或主动的。检测以与上述间接分析相同的方式而可见,不同之处仅在于直接分析中发生从蓝色到红色的颜色变化的总长度与存在于样品中的被分析物的浓度成正比。

[0168] 如图所示,图案化层 272 的第一流体通道部分 282 包括弯曲通路。弯曲通路可有助于试验样品沿着流路的混合或搅拌。例如,弯曲通路可用来方便试验样品与样品制备试剂和/或探测剂的混合。此类样品制备试剂和/或探测剂可以在其应用到装置之前与样品预混合。或者,其可以设置(如,以固体或半固体的形式)在样品流路中(如,在第一流体通道部分 282 的弯曲通路内)。

[0169] 小至  $500\text{-}\mu\text{m}$  宽  $\times 25\text{-}\mu\text{m}$  厚的通道可以利用图 8 所示类型的多层结构来制造。例如,图 8 所示的图案化层 272 可以从  $50\text{-}\mu\text{m}$  变化至  $150\text{-}\mu\text{m}$  厚。层 272、274、276 的厚度优选足以限制变形以在流体通道的宽度上提供均匀的通道区域。如果需要,一个或多个的层可以是刚性的。刚性层的一个实例是玻璃层或晶片。此类刚性层可以减少流体通道或小室中心的翘曲的量,并从而为装置提供所需的流动参数。

[0170] 图 9 示出了其中样品在单个装置中同时混合并试验的检测装置 320。如图 9 所示,图示的装置 320 包括形成在装置的主体 321 上的混合小室 322,以在试验之前混合试验样品和探测剂或其他样品制备试剂。在图示实施例中,混合小室 322 接收来自多个入口 324-1、324-2 的试验样品(或洗提样品)和探测剂或样品制备试剂的流体。混合小室 322 经由流路的第一流体通道部分 326 连接到具有传感器组件 100 的小室 325。来自混合小室 322 的混合物通过第一流体通道部分 326 流到小室 325。混合物随后通过小室 325 流到第二流体通道部分 328。

[0171] 随着混合物流动通过小室 325,被分析物或探测剂与传感器组件 100 的受体 108 结合以产生可探测的变化 102。如图所示,第一流体通道部分 324 是弯曲的,以便在与传感器组件 100 接触之前混合样品和探测剂或样品制备试剂。在一个替代实施例中,装置仅包括一个入口以同时引进试验样品和样品制备试剂或探测剂。在所示的实施例中,流体可以被被动地或经由压力源或装置引导,如前所述。或者,混合小室或其他沿着流路的小室可以由易压缩构造形成,以便在施加压力时,流体便从小室 322 或小室 325 挤压出,以引导沿着所述

的流路的流体流动。

[0172] 在一个替代实施例中,样品制备试剂或探测剂沿着流路设置或设置在混合小室 322 中。一经接触,样品制备试剂便与诸如样品相互作用以释放被分析物。释放的被分析物随后可以与探测剂结合(在间接分析中),其随后沿着流路移动以与传感器组件相互作用。在一个图示实施例中,样品制备试剂或探测剂可以以固体或半固体形式(如,脱水形式)设置。试剂或探测剂随后被水合并检测前与试验样品混合。

[0173] 图 9 所示的实施例可以用于间接或直接分析。在间接分析中,被分析物和探测剂将通过使用诸如吸液管或注射器而引进图 9 装置的对应入口 324-1 和 324-2。流动可以是被动或主动的,如上所述。在流动通过第一通道部分 324 的弯曲通路的同时,探测剂和被分析物聚集在混合小室 322 中并进一步混合。随着探测剂/被分析物混合物穿过在小室 325 中封闭的传感器组件 100,未结合到目标被分析物的探测剂可以扩散到达传感器组件 100 并引起可见的颜色变化。通常,颜色变化首先发生在流动的前缘(因此在小室 325 的上游端)并渐进地向下游移动到小室 325 的背面。样品中被分析物的浓度可以通过发生颜色变化的传感器组件 100 的长度来测量,其中发生从蓝色到红色的颜色变化的总长度与存在于样品中的被分析物的浓度成反比。

[0174] 在直接分析中,传感器组件 100 包括受体,以便当被分析物接触传感器组件 100 时其结合到此受体,并触发传感器组件 100 中可见的颜色变化。在这种情况下,样品可仅通过使用吸液管或注射器而引进图 9 装置的入口中的一个 324-1。样品制备试剂对被分析物的直接检测可能是必需的。例如,目标被分析物可能需要溶解以便释放可探测的蛋白质目标。此类溶解试剂可以被引进图 9 装置的第二入口 324-2。如在间接分析中,流动可以是被动或主动的。在流动通过第一通道部分 324 的弯曲通路的同时,被分析物和样品制备试剂聚集在混合小室 322 中并进一步混合。经由样品的溶解而释放的目标随后可以与上述用于间接分析相同的方式检测,不同之处仅在于直接分析中发生从蓝色到红色的颜色变化的(传感器组件的)总长度与存在于样品中的被分析物的浓度成正比。

[0175] 尽管图 9 示出了沿着流路包括多个小室的装置的一个实施例,但本申请不限于所示的实施例,并且本申请的装置的替代实施例可以包括任何数量的小室以实现不同的样品制备或处理步骤。尽管图 9 示出了其中样品制备试剂和/或探测剂可以沿着样品流路设置的小室(即,池或井),但是可以预想到其他装置,其中各种样品制备试剂和/或探测剂可以设置在沿着流体通道的区段中(例如,在形成流路的流体通道中)。

[0176] 图 10 示出了包括传感器组件 100 和如前面所述的流路的检测装置 340 的一个实施例。在所示的实施例中,传感器组件 100 插入第一流路部分 342 和第二流路部分 344 之间的流路中。如图所示,流路沿着膜 350 形成在膜 350 的相对端 350a 和 350b 之间。膜 350 由吸收主体形成,例如由硝化纤维、尼龙、聚苯乙烯、聚丙烯、或其他合适的材料形成的膜,其具有方便沿着(即,流动通过)膜 350 流动以形成流路和装置 340 的第一和第二流路部分 342、344 的孔径。传感器组件 100 包括沿着膜 100 的中间部分沉积在膜上的传感器层或部分 352。在图示实施例中,吸收垫 354 连接到在传感器组件 100 下游的膜 350,以引导沿着膜 350 从第一流路部分 342 经过传感器组件 100 到达第二流路部分 344 的流体流动。吸收垫 354 可以由诸如玻璃纤维、纤维素等的材料制成。

[0177] 在一个示例性实施例中,膜由诸如硝化纤维材料形成。在一个示例性实施例中,传

感器层或部分 352 根据装置的构造而定,以平均 2-3 毫米 (mm) 宽并具有 4-100 微升每平方厘米 ( $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ) 涂层重量的细条涂覆在膜 350 上。对于在分析中使用而言,样品制备试剂(如,粘液溶解或裂解试剂)可以点涂在传感器层或部分 352 的上游,靠近样本添加到例如硝化纤维材料的位置。

[0178] 在图 11 所示的一个示例性实施例中,其中相同的数字用于指示图 10 中相同的部件,装置 340-1 包括在传感器组件 100 上游的垫 358。垫 358 包括与试验样品混合的探测剂,如前面针对间接分析所述。作为另外一种选择或除此之外,垫 358 可以包括一种或多种样品制备试剂。垫 358 可以由诸如,例如纤维素或玻璃纤维滤膜之类的材料制成。

[0179] 一种或多种样品制备试剂可以一起或分别添加进(图 10 和 11 的装置的)流路中的分离区段中,以便在流路中可以相继地进行若干样本处理。这些区段可以通过将涂覆有不同样品制备试剂的不同材料放置在通路中,或通过材料直接涂覆在流路中而构造。这些构造将允许在流路中相继的样本处理,其中这对下游检测是有利的。

[0180] 如果图 10 和图 11 的装置被用于间接分析,则试剂探测剂和目标含被分析物的样品可以首先在试管,例如,微量离心管中混合。在混合完成后,膜 350(即,350a)的第一端可以插进含探测剂/被分析物混合物的微量离心管。就此而言,混合物通常将开始经由毛细管作用而沿着膜 350 流动。当溶液到达传感器组件 100 时,未结合到存在的目标被分析物的探测剂可以引起传感器组件 100 的可见颜色变化。分析可以被设计以便当被分析物浓度超过某一阈值时,未结合的探测剂浓度低于可被传感器组件 100 检测的值。在此类间接分析中,颜色变化指示被分析物的浓度低于阈值,而没有可见的颜色变化指示高于阈值的被分析物浓度。

[0181] 如果图 10 和图 11 的装置被用于直接分析,则传感器组件 100 包括受体,以便当被分析物接触传感器组件 100 时其结合到此受体,并触发传感器组件 100 中可见的颜色变化。在这种情况下,膜的第一端可以插进包含将被分析的样品的微量离心管。就此而言,样品溶液通常将开始经由毛细管作用而沿着膜 350 流动。当溶液到达传感器组件 100 时,存在的目标被分析物可以引起传感器组件 100 的可见颜色变化。分析可以被设计以便当被分析物浓度超过某一阈值时,其可以引起传感器组件 100 的完全的颜色变化。在此类直接分析中,颜色变化指示被分析物的浓度高于阈值,而没有可见的颜色变化指示低于阈值的被分析物浓度。

[0182] 在间接分析中,图 11 的示例性装置与设置在共轭垫 358 上或之中的探测剂的一起使用可以免除在与装置接触之前对混合试剂探测剂以及含被分析物的样品的需要。含被分析物的样品可仅利用吸液管或注射器而滴加到共轭垫 358 上。随着样品润湿垫 358,试剂探测剂重组进溶液并可以与目标被分析物混合。间接分析的其余部分与上面所述的相同。

[0183] 在直接分析中图 11 的示例性装置的使用允许人们使用样品制备试剂。例如,目标被分析物可能需要被溶解以便释放可探测的蛋白质目标。在此类情况下,溶解试剂可以被并入垫 358。随着被分析物样品润湿垫 358、溶解试剂重组进溶液并可以与目标被分析物混合以将其溶解并释放可探测的蛋白质。直接分析的其余部分与上面所述的相同。

[0184] 适用于本文所公开的侧流实施例的示例性装置在例如美国专利 No. 5, 753, 517 或美国专利 No. 6, 509, 196 以及例如美国专利申请公开 No. 2003/0162236 和 No. 2003/0199004 中有所描述。此类装置可以同时用于样品制备和分析。

[0185] 例如,在一个实施例中,本发明提供了一种装置,其包括:样品流路;包括传感器组件的区段;一种或多种用于样品制备的试剂,其设置在传感器组件之前(即,上游)的样品流路的一个或多个不同区段中;以及任选地,探测剂,其设置在传感器组件之前的样品流路的不同区段中并与一种或多种样品制备试剂不同。

[0186] 在另一个实施例中,本发明提供了一种用于样品制备和目标被分析物分析的装置,其中所述装置包括:样品流路;一种或多种用于样品制备的试剂,其设置在样品流路的一个或多个不同区段中;包括探测剂的区段,其设置在样品制备试剂中的至少一种下游的样品流路中;以及包括比色传感器组件的区段,其中所述比色传感器包括具有含联乙炔的聚合物以及受体的聚合组合物,其中所述受体被并入聚合组合物以形成在与一种或多种探测剂和/或被分析物结合时提供颜色变化的转导体。

[0187] 图 12 示意性地示出了检测装置 380 的另一个实施例,所述检测装置在装置的主体 386 内的第一流体通道部分 382(限定第一流路部分)和第二流体通道部分 384(限定第二流路部分)之间的流路中包括传感器组件 100。在所示的实施例中,传感器组件 100 在流通膜 390 上包括传感器层或部分 130。膜 390 和传感器层或部分 130 设置在流路中并隔开第一流体通道部分 382 和第二流体通道部分 384。在图示实施例中,样品在入口 392(示意性地示出)引进第一流体通道部分 382,并通过流通膜 390 从第一流体通道部分 382 流到第二流体通道部分 384。样品流动在出口 394 从第二流体通道部分 384 排出。如所述,传感器层或部分 130 包括受体,所述受体被构造为来随着样品流经传感器层或部分 130 并通过流通膜 390 而与待分析物或探测剂结合。在结合时,传感器组件 100 发生可探测的变化以检测待分析物和/或探测剂的存在,如前面所述。

[0188] 流通膜 390 可以是具有小孔径(如,200 微米( $\mu\text{m}$ ))的多孔膜。示例性流通膜可由聚醚砜(商品名 SUPOR 可得自密歇根州安阿伯的 Pall 公司,0.2,0.45  $\mu\text{m}$ );聚砜(以商品名 I. C. E 或 Tuffryn 可得自密歇根州安阿伯的 Pall 公司,0.4  $\mu\text{m}$ );纤维素酯(以商品名 MF Millipore 可得自马萨诸塞州比勒里卡的 Millipore 公司,0.4  $\mu\text{m}$ );聚碳酸酯(以商品名聚碳酸酯膜可得自明尼苏达州明尼托卡的 G. E. Osmonics 公司,0.2  $\mu\text{m}$ ,0.4  $\mu\text{m}$ );或其他具有所需流通特性和传感器相容性的材料形成。在一个实施例中,传感器层或部分 130 在流通膜 390 的孔中包括扩散的脂质体。在图示实施例中,脂质体的涂层重量相对低,例如,约  $12 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。

[0189] 图 13 示出了检测装置 400 的另一个实施例,所述检测装置包括具有传感器层或部分 130 并分离流路的第一流体通道部分 406 和第二流体通道部分 408 的流通膜 402。在图示实施例中,流通膜 402 设置在形成装置 400 的主体以及装置 400 的第一和第二流体通道部分 406、408 的管 410 中。在图示实施例中,流通膜 402 在支承件 414 上支承在管 410 中,所述支承件 414 设置在第一和第二流体通道部分 406、408 之间的流路中。

[0190] 如图所示,在图示实施例中,支承件 414 包括多个滤层 416,其抵接管 410 的锥形部。但是,本申请不限于包括如图所示的多个滤层 416 的特定支承件 414。流通膜 402 抵接支承件 414。如图 13-14 协同所示,流通膜 402 的相对表面包括粘合剂层 420、422。粘合剂层 422 将流通膜 402 连接到支承件 414。如图所示,粘合剂层 420、422 具有在第一和第二流体通道部分 406、408 之间协同形成传感器过道 424 的间隙或开放空间。传感器过道 424 比第一和第二流体通道部分 406、408 窄,以便限定特定的流动面积,并将样品流体集中到形

成在传感器过道 424 中流通膜 402 上的传感器层或部分 130。

[0191] 从而,对于制造而言,传感器层或部分 130 沉积在流通膜 402 的内部区域内,并且粘合剂层 420、422 设置在流通膜 402 的外周附近以形成传感器过道 424。在图示实施例中,传感器层或部分沉积在流通膜 402 的单侧上,而粘合剂层或部分 420、422 设置在流通膜 402 的两侧上。但是,本申请不限于所示的具体实施例。如所示,流体被引导沿着流体通道穿过检测装置 400 以及通过真空源 430 穿过传感器通道 424。然而,如前所述,本申请不限于通过真空源来引导流体流动,还可使用其他的方法。

[0192] 图 15-16 示出了具有传感器层或部分 130 和流通膜 460 的检测装置 450(封闭的垂直井装置)的实施例,其中装置的主体由多层构造形成。如图所示,多层构造包括第一外层 454 的正面、背面或第二外层 456 以及一个或多个中间层。在所示实施例中,传感器组件 100 通过中间层 458 紧邻开口 457 而支承。传感器层或部分 130 设置在连接到紧邻开口 457 的中间层 458 的膜 460 上。多层结构还包括设置在面层 454 和中间层 458 之间的间隔层 462。间隔层 462 被图案化以形成入口 464(图 16 所示)和第一流路部分。吸收层 466 紧邻开口 457 而设置在中间层 458 和背层 456 之间以引导流体穿过通过流通膜 460 在开口 457 中形成的传感器过道。在这个实施例中,层 454、462 以及 458 形成封闭的垂直井 463(即,池或小室),层 454 和 458 形成井 463 的壁和入口 464 的壁。

[0193] 如本文所述,第一流路部分由沿着面层 454 和中间层 458 之间多层构造的长度而定向的通道形成以提供在第一方向的流动。装置还包括横越第一流路部分而形成的第二流路部分,以提供在大致横切第一方向的第二方向穿过流通膜 460 的流动。在图示实施例中,面层 454 可以由透明或透视膜形成,使得传感器组件 100 是可见的,以便在被分析物与传感器组件 100 的反应时识别可探测的变化。或者,面层 454 的一部分可以是透明或透视的以观察传感器组件 100。

[0194] 在图示实施例中,流体流动被引导经由吸收层 466 穿过流通膜 460。层 466 可以被图案化以形成在流通膜 460 下游的吸收区域,以形成横向流路或通道。尽管图 15-16 示出了分开的背面或外层 456,但是在替代实施例中,吸收层 466 可以形成装置的背层,并且本申请不限于所示的具体层。

[0195] 在图 15-16 的实施例的使用期间,射流样品通过入口 464 进入封闭的垂直井 463,并且流体积聚在其中。如果需要,样品制备试剂(例如,通过斑点 465 图示)可以在检测之前放置在将允许处理的流路中的任何位置(即,在传感器组件 100 上游的流路中)。尽管仅示出一个井(或池)463,但是这个实施例可以包括允许流体“积聚”的若干不同的“池”。这可以有用于样品制备(即,处理),例如,通过与池中探测剂或样品制备试剂相继地或同时地混合。

[0196] 在图示实施例的每一个中,试验样品暴露到传感器组件 100 的时间或期间基于试验样品穿过传感器组件 100 的流速而限制。一旦流体流过传感器组件 100,其就不再暴露到传感器层或部分,从而限制试验样品暴露到传感器组件以提供在试验结束后不会显著变化的相对稳定的试验结果。

[0197] 图 15-16 的装置可以利用下面的材料来构造:层 456 可以是聚氯乙烯绝缘带(SCOTCH Super 33Plus Vinyl Electrical Tape 可得自明尼苏达州圣保罗的 3M 公司),层 466 可以是玻璃纤维芯吸材料(Sterlitech GB 140 Glass Fiber 可得自华盛顿州肯特的

Sterlitech 公司),层 460 可以是 450-nm 多孔性聚醚砜膜 (Pall SUPOR 450Membrane 可得自密歇根州安阿伯的 Pall 公司),层 458 可以是在一侧具有压敏粘合剂的 0.8-mm 厚聚氯乙烯 (PVC) 衬底材料 (Diagnostic Consulting Network Miba-010 可得自加利福尼亚州欧文的 Diagnostic Consulting Network 公司),层 462 是在两侧具有压敏粘合剂的 1.6-mm 厚 3M Polyethylene blown foam(可得自明尼苏达州圣保罗的 3M 公司 3M 医学部),以及层 454 可以是 3M Polyester General Use Transparency Film(可得自明尼苏达州圣保罗的 3M 公司)。为了构造检测装置,膜层中的每一个可利用转模冲切到其合适的形状和大小。组装通过将流通滤膜 460 放置在中间层 458 粘合剂侧上的开口 457 之上而开始。其次,吸收层 466 可以放置在滤膜之上并设置在中间层 458 粘合剂侧上的开口 457 之上。这种初始层合物可将吸收层 466 倒放在背层 456 的粘合剂侧上,在边缘施加压力以保证背层 456 在中间层 458 附近粘附到中间层 458,从而形成密封。其次,衬垫可以从间隔层 462 的一侧移除,并且间隔层 462 的粘合剂侧层压到中间层 458 的非粘合剂侧。最后,衬垫可以从间隔层 462 的另一侧移除,并且外层 454 层压到间隔层 462 上的粘合剂层。可以用针来制造位于样品小室顶部的两个排气孔。

[0198] 本发明的任何装置的传感器组件在使用前都通常涂覆、沉积或以其他方式在装置内形成。在其中具有任选的探测剂的试验样品随后可以被引进装置用于与传感器组件相互作用。尽管在本文中描述装置似乎传感器组件在使用前已经并入其中,但是本领域的技术人员应理解,在此类装置中的传感器组件可就地形成。也就是说,本文所述的装置的传感器组件可在存在一种或多种目标被分析物和 / 或探测剂的情况下沉积在流通膜中或之上(在样品分析期间)。

[0199] 图 13-16 的装置可以类似地同时用于间接和直接分析。在间接分析的一个实施例中,例如,包含目标被分析物的样品通常首先与试剂探测剂混合。在完成此步后,溶液中的传感器组件随后可以添加到探测剂 / 被分析物混合物。在此时,未结合到目标被分析物的探测剂将引起溶液中传感器组件的可见颜色变化。颜色变化的程度与最初存在于样品中的被分析物的量成反比。最终的溶液混合物随后可以引进图 13-16 所示的任何装置,其中传感器组件可以收集并集中在流通膜上(如,图 13 的膜 402 或图 16 的膜 460)以在过程期间(即,就地)形成传感器层 130,从而允许使用者看见分析结果。

[0200] 或者,传感器组件可以作为流通膜(如,图 13 的膜 402 或图 16 的膜 460)上的涂层传感器层 130 而并入图 13-16 的装置。在这种模式下,在间接分析中,包含目标被分析物的样品通常首先与试剂探测剂混合。在混合后,探测剂 - 被分析物混合物被引进图 13-16 所示的任何装置中,并允许以给定的流速流动通过传感器层 130 和流通膜(图 13 的膜 402 或图 16 的膜 460)。随着样品溶液穿过传感器层,未结合到目标被分析物的探测剂可以引起传感器层 130 的可见颜色变化。颜色变化的程度随后通常将与最初存在于样品中的被分析物的量成反比。

[0201] 在直接分析中,传感器组件包括受体,使得当被分析物接触传感器组件时其结合到此受体,并触发可见的颜色变化。在一个实施例中,传感器组件可以在溶液中可以添加到包含被分析物的样品。这种溶液混合物随后可以引进图 13-16 的任何装置,其中传感器组件可以收集并集中以在流通膜(如,图 13 的膜 402 或图 16 的膜 460)上形成传感器层 130(在检测过程期间),从而允许使用者看见分析结果颜色变化的程度通常将与最初存在

于样品中的被分析物的量成正比。

[0202] 或者,传感器组件可以作为流通膜(如,图 13 的膜 402 或图 16 的膜 460)上的涂层传感器层 130 而并入图 13-16 的装置。在这种模式下,对于在直接分析中使用而言,包含被分析物的样品仅被引进图 13-16 的任何装置,并允许以给定的流速流动通过传感器层 130 和流通膜(如,图 13 的膜 402 或图 16 的膜 460)。随着样品溶液穿过传感器层,被分析物可与并入传感器组件的受体结合,从而引起传感器层 130 的可见颜色变化。颜色变化的程度将与最初存在于样品中的被分析物的量成正比。

[0203] 上文中的示例性实施例的讨论主要针对设置在样品流路中的装置中的传感器(即,传感器组件);然而,其他可用于检测的试剂(如,探测剂)和/或可用于样品制备的试剂(如,溶解剂)也可以设置在样品流路中的装置中。试剂可以通过各种已知的机制在此类装置内分离。例如,流路的一部分可包括一种试剂(如,样品制备试剂),并通过其自由在与样品接触便可以溶解的材料(如,水凝胶)制成的阀与在其中具有另一种试剂(如,探测剂)从流路的另一部分分离。其他的分离机制包括,例如,具有不同孔隙率或流体流速的膜/材料。

[0204] 本文所述的实施例实质上是示例性的。本领域的技术人员应理解,具有其他物理结构的其他装置可用来实现本发明的方法。此外,除了具体描述的那些以外,本文所述的具体装置可以用于各种方法(正如本领域的技术人员所理解的)。

[0205] 本文引用的所有专利、专利申请、出版物以及核酸和蛋白质数据库条款(包括(例如)GenBank 登录号)的完全公开内容全部以引用方式并入本文,如同每个都单独引入一样。在不脱离本发明的范围和精神的条件下,本发明的多种修改和更改对本领域的技术人员将变得显而易见,并且应当理解,本发明不得当地限制于本文示出的示例性实施例。

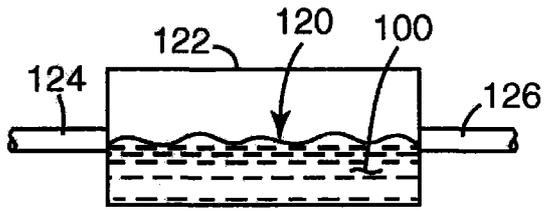


图 1

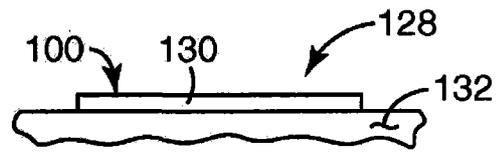


图 2

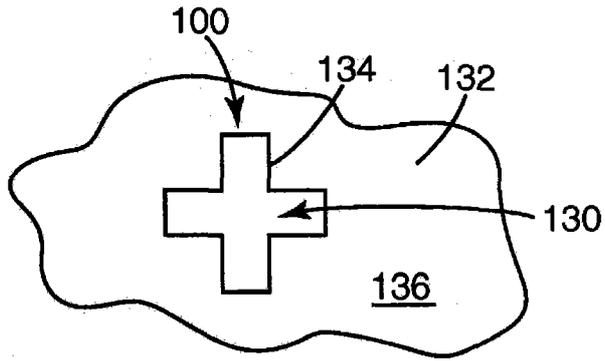


图 3

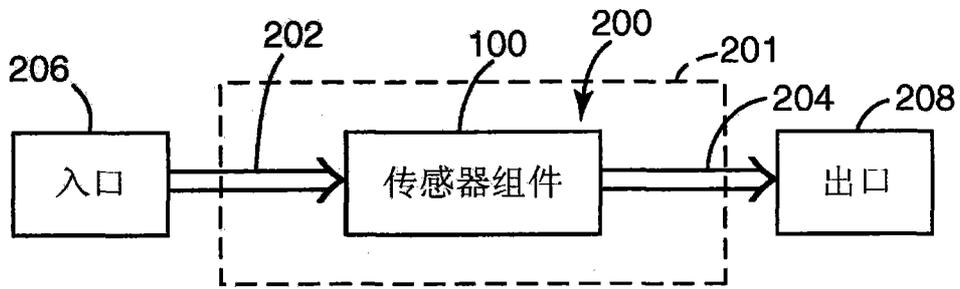


图 4

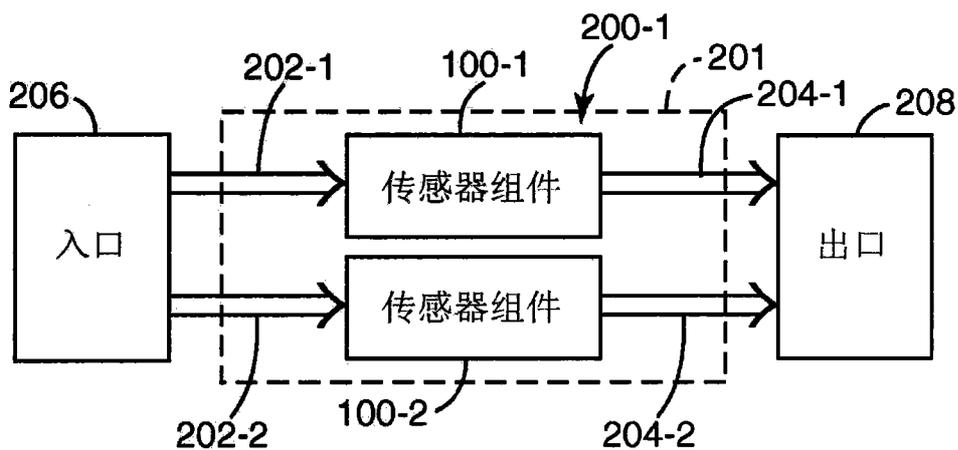


图 5

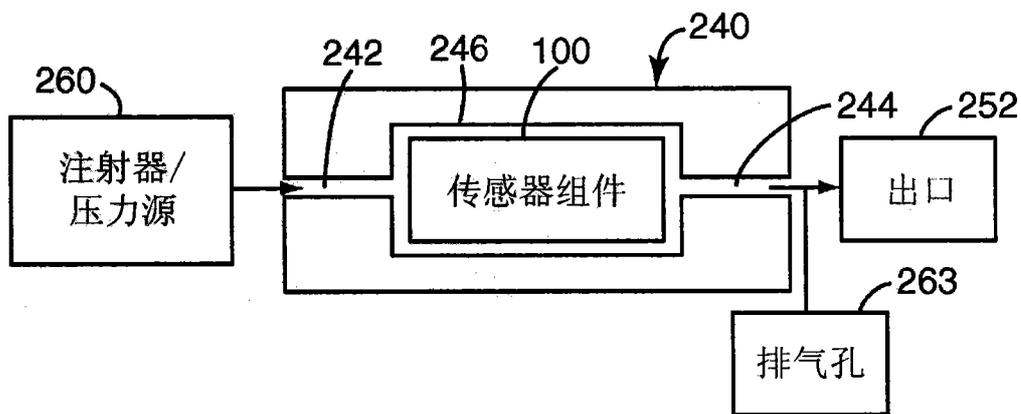


图 6

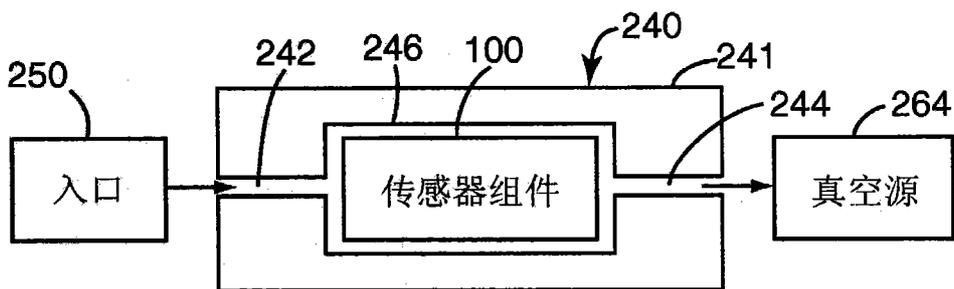


图 7

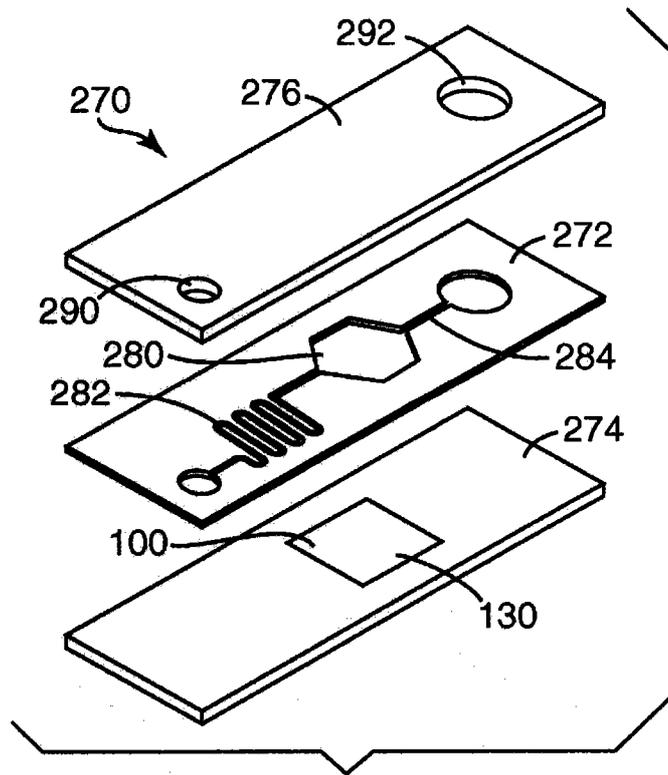


图 8

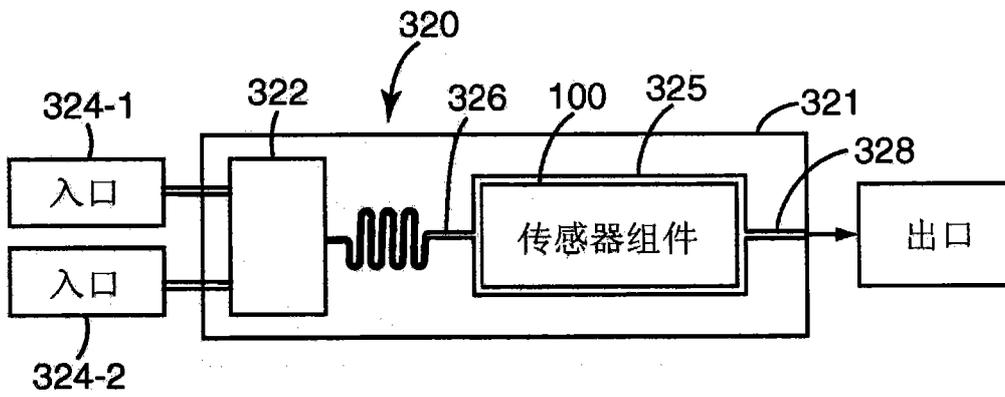


图 9

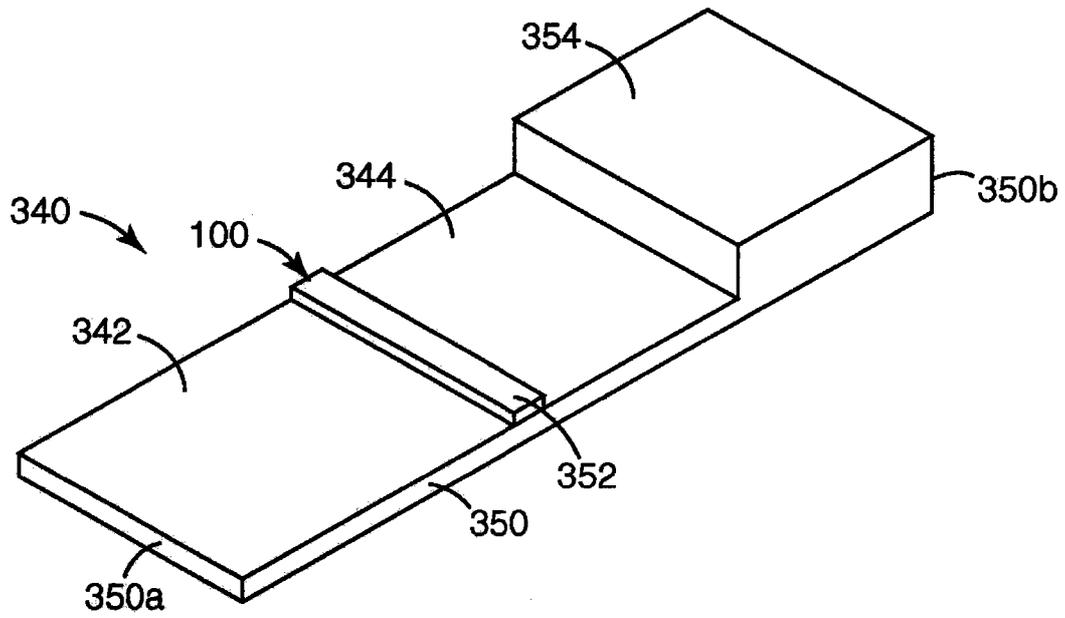


图 10

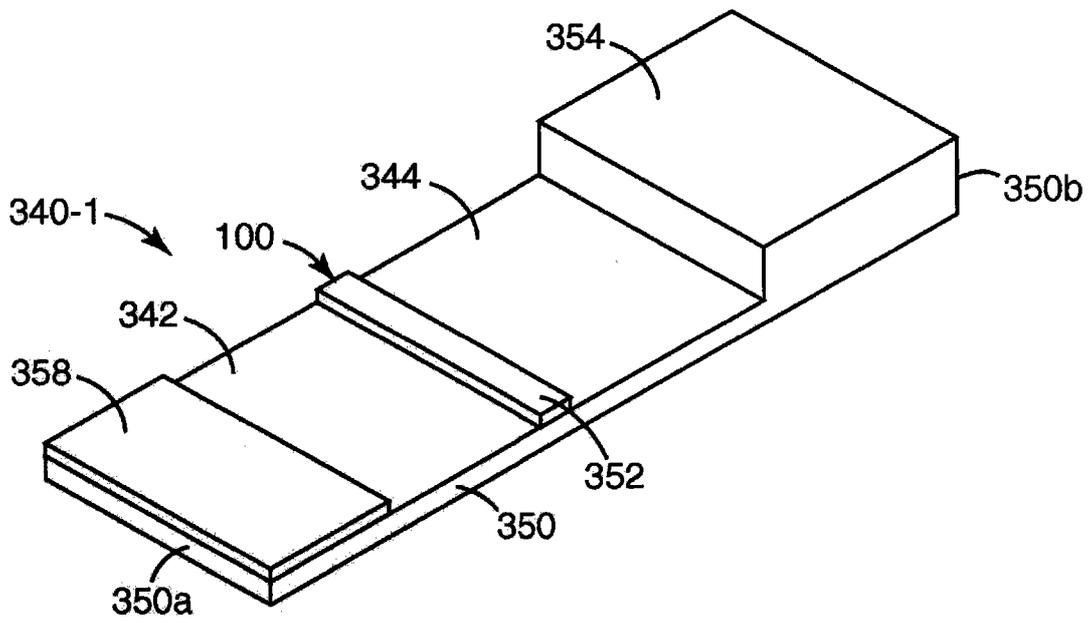


图 11

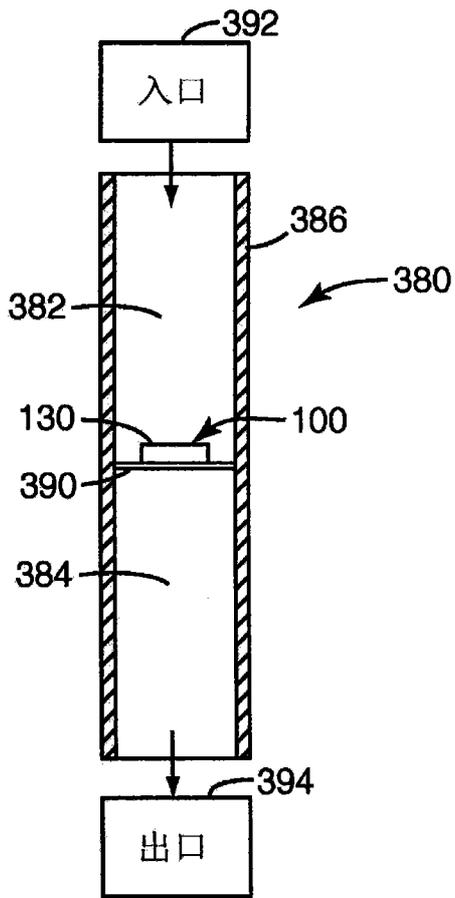


图 12

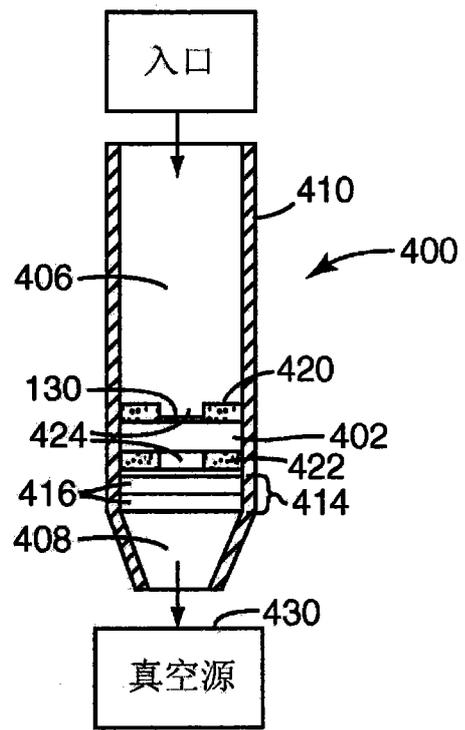


图 13

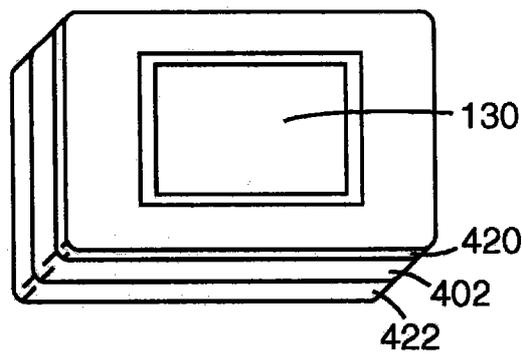


图 14

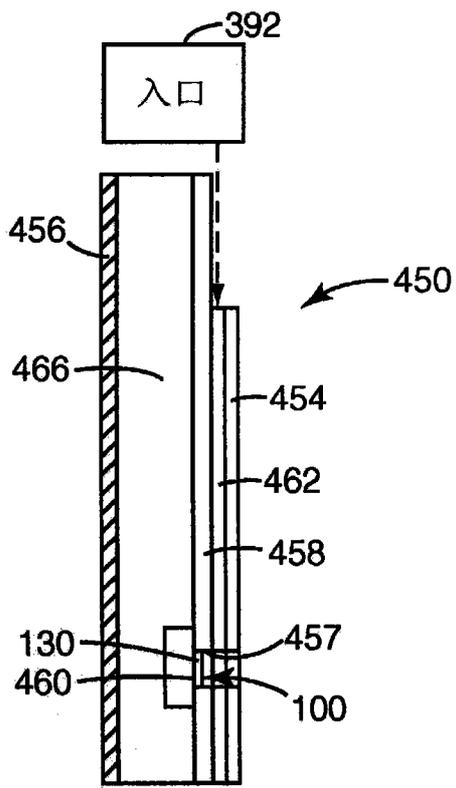


图 15

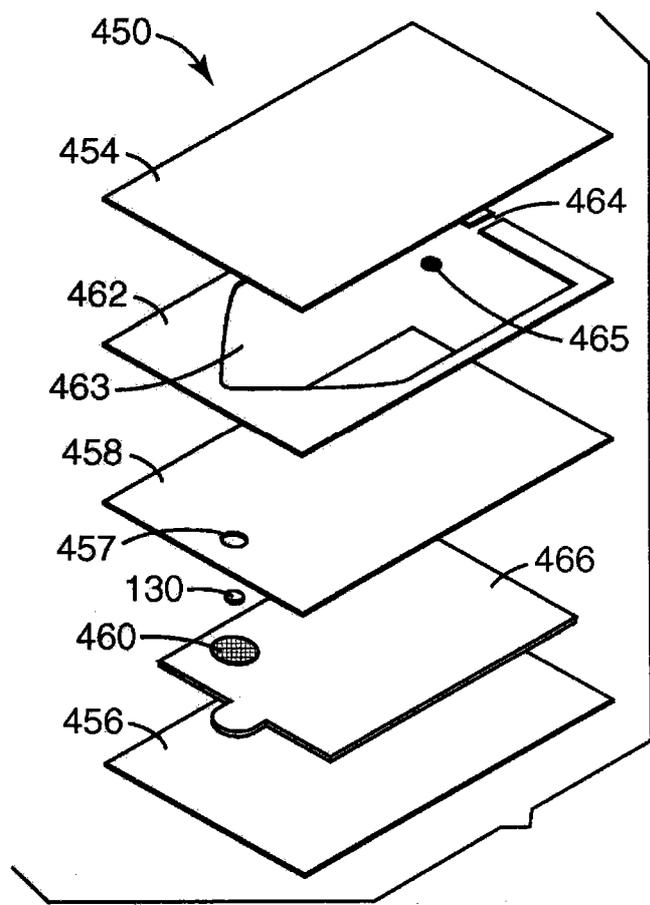


图 16