

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680034491.5

[43] 公开日 2008 年 11 月 5 日

[11] 公开号 CN 101300490A

[22] 申请日 2006.8.17

[21] 申请号 200680034491.5

[30] 优先权

[32] 2005.8.23 [33] US [31] 60/710,582

[86] 国际申请 PCT/US2006/032200 2006.8.17

[87] 国际公布 WO2007/024633 英 2007.3.1

[85] 进入国家阶段日期 2008.3.19

[71] 申请人 反应生医公司

地址 加拿大哥伦比亚郡

[72] 发明人 保罗·C·哈利斯

布莱恩·G·理查斯

[74] 专利代理机构 北京中原华和知识产权代理有限公司

代理人 寿 宁

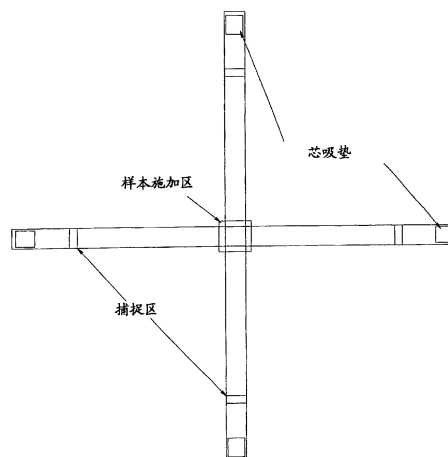
权利要求书 15 页 说明书 19 页 附图 2 页

[54] 发明名称

多重指向性免疫层析分析

[57] 摘要

本发明揭示定量测量流体样本中一种或一种以上所关注分析物的量的方法和适用于所述方法的套组。所述方法包括：提供固相装置，所述装置包含具有施加点、样本捕捉区、和控制捕捉区的膜，其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距；和提供样本收集装置，所述装置包含一个或一个以上分析物结合性颗粒群。在所述分析中，将流体样本引入所述样本收集装置中，并且将所得混合物施加到所述膜施加点。所述流体能够通过毛细作用将所述分析的组分输送到并通过所述样本捕捉区和所述控制捕捉区。所述流体样本中各所关注分析物的量与经校正的颗粒量相关（例如，直接相关或成反比），所述经校正的颗粒量可（例如）以相应样本捕捉区中的颗粒量与所述控制捕捉区中的颗粒量的比率测定。



1、一种定量测量流体样本中所关注分析物的量的方法，其包含：

a) 提供固相装置，所述装置包含包含施加点、样本捕捉区、和控制捕捉区的膜；所述样本捕捉区具有吸附于其上的样本捕捉剂，而所述控制捕捉区具有吸附于其上的控制捕捉剂；其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距；

b) 提供样本收集装置，所述装置含有分析物结合性颗粒群，其中所述分析物结合性颗粒上涂有分析物结合剂；

c) i) 将所述流体样本引入所述样本收集装置中，产生混合流体样本，并且随后将缓冲液引入所述混合流体样本中；ii) 将缓冲液引入所述样本收集装置中，并且随后引入所述流体样本；或 iii) 通过将固体引入缓冲液中来形成所述流体样本，且随后将所述流体样本引入所述样本收集装置中，

借此产生包含接触的分析物结合性颗粒的缓冲混合流体样本；

d) 将所述缓冲混合流体样本施加到所述膜的所述施加点；

e) 将所述膜维持在一定条件下，以能使流体通过毛细作用将接触的分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过所述样本捕捉区，借此使接触的分析物结合性颗粒与所述样本捕捉剂结合；并且同时能使所述样本中的流体通过毛细作用将接触的分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过所述控制捕捉区，借此使接触的分析物结合性颗粒与所述控制捕捉剂结合；

f) 进一步将所述膜维持在一定条件下，以能使所述样本中的流体通过毛细作用将未与所述样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何接触的分析物结合性颗粒输送到所述样本捕捉区之外或所述控制捕捉区之外；

g) 测定所述样本捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量；

h) 由所述样本捕捉区中分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物结合性颗粒的量测定经校正的分析物结合性颗粒的量；

其中所述流体样本中所关注分析物的量与所述经校正的分析物结合性颗粒的量直接相关。

2、根据权利要求1所述的方法，其中所述经校正的分析物结合性颗粒的量是以所述样本捕捉区中分析物结合性颗粒的量与所述控制捕捉区中分析物结合性颗粒的量的比率测定。

3、根据权利要求1所述的方法，其中所述经校正的分析物结合性颗粒的量是以所述样本捕捉区中分析物结合性颗粒的量与所述控制捕捉区中分析物结合性颗粒的量和所述样本捕捉区中分析物结合性颗粒的量的总和的比率测定。

4、根据权利要求1所述的方法，其中所述分析物和所述分析物结合剂为结合对的成员，并且所述结合对的一个成员是选自由以下物质组成的群组：孢子、蛋白质、激素、酶、糖蛋白、肽、小分子、多糖、凝集素、抗体、抗体片段、核酸、药物、药物连结物、毒素、病毒、病毒粒子、细胞壁的一部分、半抗原和受体。

5、根据权利要求1所述的方法，其中所述分析物结合剂是选自由以下物质组成的群组：抗体、抗体片段、半抗原、药物连结物和受体。

6、根据权利要求5所述的方法，其中所述分析物结合剂是抗体。

7、根据权利要求6所述的方法，其中所述样本捕捉剂是选自由以下物质组成的群组的抗体：针对与所述分析物结合性颗粒上的抗体相同的表位的抗体；和针对与所述分析物结合性颗粒上的抗体不同的表位的抗体。

8、根据权利要求5所述的方法，其中所述控制捕捉剂是抗免疫球蛋白抗体。

9、根据权利要求1所述的方法，其中所述流体样本是选自由以下物质组成的群组：全血、血浆、血清、尿液、脑脊髓液、唾液、精液、玻璃体液和滑液。

10、根据权利要求1所述的方法，其中所述流体样本包含悬浮固体。

11、根据权利要求10所述的方法，其中所述固体是选自由以下物质组成的群组：微粒样本、粉末样本、土壤样本和孢子。

12、根据权利要求1所述的方法，其中所述流体样本是选自由以下物质组成的群组：水、地下水、污水和废水。

13、根据权利要求1所述的方法，其中在步骤(d)中，将所述混合流体样本经由施加垫施加到所述施加点上。

14、根据权利要求1所述的方法，其中在步骤(f)中，所述样本中的流体通过毛细作用将未与所述样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何接触的分析物结合性颗粒输送到所述样本捕捉区或所述控制捕捉区之外的芯吸垫中。

15、根据权利要求1所述的方法，其中所述样本收集装置是选自由以下装置组成的群组：吸量管和吸量管吸头。

16、根据权利要求1所述的方法，其中所述分析物结合性颗粒群是经蒸发干燥、真空干燥或冷冻干燥。

17、根据权利要求1所述的方法，其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区呈放射状分散在所述施加点周围。

18、根据权利要求1所述的方法，其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区彼此相邻并且沿流体通过毛细作用流动的方向平行定位。

19、一种定量测量流体样本中所关注分析物的量的方法，其包含：

a) 提供固相装置, 所述装置包含包含施加点、样本捕捉区、和控制捕捉区的膜; 所述样本捕捉区具有吸附于其上的样本捕捉剂, 而所述控制捕捉区具有吸附于其上的控制捕捉剂; 其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距;

b) 提供样本收集装置, 所述装置含有分析物涂覆颗粒群, 其中所述分析物涂覆颗粒上涂有分析物或所述分析物的类似物;

c) i) 将所述流体样本引入所述样本收集装置中, 产生混合流体样本, 并且随后将缓冲液引入所述混合流体样本中; ii) 将缓冲液引入所述样本收集装置中, 并且随后引入所述流体样本; 或 iii) 通过将固体引入缓冲液中来形成所述流体样本, 且随后将所述流体样本引入所述样本收集装置中, 借此产生包含分析物涂覆颗粒的缓冲混合流体样本;

d) 将所述缓冲混合流体样本施加到所述膜的所述施加点;

e) 将所述膜维持在一定条件下, 以能使流体通过毛细作用将分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过所述样本捕捉区, 借此使分析物涂覆颗粒与所述样本捕捉剂结合; 并且同时能使所述样本中的流体通过毛细作用将分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过所述控制捕捉区, 借此使分析物涂覆颗粒与所述控制捕捉剂结合;

f) 进一步将所述膜维持在一定条件下, 以能使所述样本中的流体通过毛细作用将未与所述样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何分析物涂覆颗粒输送到所述样本捕捉区之外或所述控制捕捉区之外;

g) 测定所述样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量;

h) 由所述样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量测定经校正的分析物涂覆颗粒的量;

其中所述流体样本中所关注分析物的量与所述经校正的分析物涂覆颗粒的量成反比关系。

20、根据权利要求 19 所述的方法, 其中所述经校正的分析物涂覆颗粒的量是以所述样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量与所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量的比率测定。

21、根据权利要求 19 所述的方法, 其中所述经校正的分析物涂覆颗粒的量是以所述样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量与所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量和所述样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量的总和的比率测定。

22、根据权利要求 19 所述的方法, 其中所述分析物和所述样本捕捉剂为结合对的成员, 并且所述结合对的一个成员是选自由以下物质组成的群组: 孢子、蛋白质、激素、酶、糖蛋白、肽、小分子、多糖、凝集素、抗

体、抗体片段、核酸、药物、药物连结物、毒素、病毒、病毒粒子、细胞壁的一部分、半抗原和受体。

23、根据权利要求 19 所述的方法，其中所述样本捕捉剂是选自由以下物质组成的群组：抗体、抗体片段、半抗原、药物连结物和受体。

24、根据权利要求 23 所述的方法，其中所述样本捕捉剂是抗体。

25、根据权利要求 23 所述的方法，其中所述控制捕捉剂是抗免疫球蛋白抗体。

26、根据权利要求 19 所述的方法，其中所述流体样本是选自由以下物质组成的群组：全血、血浆、血清、尿液、脑脊髓液、唾液、精液、玻璃体液和滑液。

27、根据权利要求 19 所述的方法，其中所述流体样本包含悬浮固体。

28、根据权利要求 27 所述的方法，其中所述固体是选自由以下物质组成的群组：微粒样本、粉末样本、土壤样本和孢子。

29、根据权利要求 19 所述的方法，其中所述流体样本是选自由以下物质组成的群组：水、地下水、污水和废水。

30、根据权利要求 19 所述的方法，其中在步骤 (d) 中，将所述混合流体样本经由施加垫施加到所述施加点上。

31、根据权利要求 19 所述的方法，其中在步骤 (f) 中，所述样本中的流体通过毛细作用将未与所述样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何分析物涂覆颗粒输送到所述控制捕捉区或所述控制捕捉区之外的芯吸垫中。

32、根据权利要求 19 所述的方法，其中所述样本收集装置是选自由以下装置组成的群组：吸量管和吸量管吸头。

33、根据权利要求 19 所述的方法，其中所述分析物涂覆颗粒群是经蒸发干燥、真空干燥或冷冻干燥。

34、根据权利要求 19 所述的方法，其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区呈放射状分散在所述施加点周围。

35、根据权利要求 19 所述的方法，其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区彼此相邻并且沿流体通过毛细作用流动的方向平行定位。

36、一种定量测量流体样本中至少两种所关注分析物的量的方法，其包含：

a) 提供固相装置，所述装置包含包含施加点、至少两个样本捕捉区、和控制捕捉区的膜；所述第一样本捕捉区具有吸附于其上的第一样本捕捉剂，所述第二样本捕捉区具有吸附于其上的第二样本捕捉剂，并且所述控制捕捉区具有吸附于其上的控制捕捉剂；其中各样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距；

b) 提供样本收集装置，所述装置含有第一分析物结合性颗粒群和第二

分析物结合性颗粒群，其中所述第一分析物结合性颗粒上涂有第一分析物结合剂并且所述第二分析物结合性颗粒上涂有第二分析物结合剂；

c) i) 将所述流体样本引入所述样本收集装置中，产生混合流体样本，并且随后将缓冲液引入所述混合流体样本中；ii) 将缓冲液引入所述样本收集装置中，并且随后引入所述流体样本；或 iii) 通过将固体引入缓冲液中来形成所述流体样本，且随后将所述流体样本引入所述样本收集装置中，借此产生包含接触的第一分析物结合性颗粒和接触的第二分析物结合性颗粒的缓冲混合流体样本；

d) 将所述缓冲混合流体样本施加到所述膜的所述施加点；

e) 将所述膜维持在一定条件下，以能使流体通过毛细作用将接触的第一分析物结合性颗粒和接触的第二分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区，借此使接触的第一分析物结合性颗粒与所述第一样本捕捉区中的所述第一样本捕捉剂结合，并使接触的第二分析物结合性颗粒与所述第二样本捕捉区中的所述第二样本捕捉剂结合；并且同时能使所述样本中的流体通过毛细作用将接触的第一分析物结合性颗粒和接触的第二分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过所述控制捕捉区，借此使接触的第一分析物结合性颗粒和接触的第二分析物结合性颗粒与所述控制捕捉剂结合；

f) 进一步将所述膜维持在一定条件下，以能使所述样本中的流体通过毛细作用将未与样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何接触的第一分析物结合性颗粒和接触的第二分析物结合性颗粒输送到所述样本捕捉区之外或所述控制捕捉区之外；

g) 测定所述第一样本捕捉区中接触的第一分析物结合性颗粒的量、所述第二捕捉区中接触的第二分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区中接触的第一分析物结合性颗粒和接触的第二分析物结合性颗粒的量；

h) 由所述第一样本捕捉区中接触的第一分析物结合性颗粒的量，和所述控制捕捉区中接触的第一分析物结合性颗粒和接触的第二分析物结合性颗粒的量测定第一经校正的分析物结合性颗粒的量；并且由所述第二样本捕捉区中接触的第二分析物结合性颗粒的量，和所述控制捕捉区中接触的第一分析物结合性颗粒和接触的第二分析物结合性颗粒的量测定第二经校正的分析物结合性颗粒的量；

其中所述流体样本中所述第一所关注分析物的量与所述第一经校正的分析物结合性颗粒的量直接相关，并且所述流体样本中所述第二所关注分析物的量与所述第二经校正的分析物结合性颗粒的量直接相关。

37、根据权利要求 36 所述的方法，其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区呈放射状分散在所述施加点周围。

38、根据权利要求 36 所述的方法，其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区彼此相邻并且沿流体通过毛细作用流动的方向平行定位。

39、根据权利要求 36 所述的方法，其另外包含定量测量一种或一种以上额外所关注分析物的量，其中所述膜包含针对各额外所关注分析物的额外样本捕捉区，各额外样本捕捉区具有吸附于其上的样本捕捉剂；其中样本收集装置另外含有针对各额外所关注分析物的额外分析物结合性颗粒群；其中将所述膜维持在一定条件下，以能使流体通过毛细作用将接触的额外分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区，借此使接触的额外分析物结合性颗粒与各额外样本捕捉区中的所述额外样本捕捉剂结合；其中针对各所关注分析物的经校正的分析物结合性颗粒的量是由各相应额外样本捕捉区中接触的额外分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区中所有分析物结合性颗粒的量测定，并且其中所述流体样本中各所关注分析物的量与相应的经校正的分析物结合性颗粒的量直接相关。

40、根据权利要求 36 所述的方法，其中所述两种所关注分析物是相同分析物。

41、根据权利要求 40 所述的方法，其中将所述经校正的分析物结合性颗粒的量求平均值并且所关注分析物的量与经校正的分析物结合性颗粒的量的平均值相关。

42、一种定量测量流体样本中至少两种所关注分析物的量的方法，其包含：

a) 提供固相装置，所述装置包含包含施加点、至少两个样本捕捉区、和控制捕捉区的膜；所述第一样本捕捉区具有吸附于其上的第一样本捕捉剂，所述第二样本捕捉区具有吸附于其上的第二样本捕捉剂，并且所述控制捕捉区具有吸附于其上的控制捕捉剂；其中各样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距；

b) 提供样本收集装置，所述装置含有分析物结合性颗粒群，其中所述分析物结合性颗粒上涂有第一分析物结合剂和第二分析物结合剂；

c) i) 将所述流体样本引入所述样本收集装置中，产生混合流体样本，并且随后将缓冲液引入所述混合流体样本中；ii) 将缓冲液引入所述样本收集装置中，并且随后引入所述流体样本；或 iii) 通过将固体引入缓冲液中来形成所述流体样本，且随后将所述流体样本引入所述样本收集装置中，借此产生包含接触的分析物结合性颗粒的缓冲混合流体样本；

d) 将所述缓冲混合流体样本施加到所述膜的所述施加点；

e) 将所述膜维持在一定条件下，以能使流体通过毛细作用将接触的分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区，借此使接触的分析物结合性颗粒与所述第一样本捕捉区中的所述第一样本捕捉剂结合，

并使接触的分析物结合性颗粒与所述第二样本捕捉区中的所述第二样本捕捉剂结合；并且同时能使所述样本中的流体通过毛细作用将接触的分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过所述控制捕捉区，借此使接触的分析物结合性颗粒与所述控制捕捉剂结合；

f) 进一步将所述膜维持在一定条件下，以能使所述样本中的流体通过毛细作用将未与样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何接触的分析物结合性颗粒输送到所述样本捕捉区之外或所述控制捕捉区之外；

g) 测定所述第一样本捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量、所述第二捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量；

h) 由所述第一样本捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量测定第一经校正的分析物结合性颗粒的量；并且由所述第二样本捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量测定第二经校正的分析物结合性颗粒的量；其中所述流体样本中所述第一所关注分析物的量与所述第一经校正的分析物结合性颗粒的量直接相关，并且所述流体样本中所述第二所关注分析物的量与所述第二经校正的分析物结合性颗粒的量直接相关。

43、根据权利要求 42 所述的方法，其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区呈放射状分散在所述施加点周围。

44、根据权利要求 42 所述的方法，其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区彼此相邻并且沿流体通过毛细作用流动的方向平行定位。

45、根据权利要求 42 所述的方法，其另外包含定量测量一种或一种以上额外所关注分析物的量，其中所述膜包含针对各额外所关注分析物的额外样本捕捉区，各额外样本捕捉区具有吸附于其上的样本捕捉剂；其中所述样本收集装置中所述分析物结合性颗粒另外包含涂覆于针对各额外所关注分析物的所述分析物结合性颗粒上的额外分析物结合剂；其中将所述膜维持在一定条件下，以能使流体通过毛细作用将接触的额外分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区，借此使接触的分析物结合性颗粒与各额外样本捕捉区中的所述额外样本捕捉剂结合；其中针对各所关注分析物的经校正的分析物结合性颗粒的量是由各相应额外样本捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量测定，并且其中所述流体样本中各所关注分析物的量与相应的经校正的分析物结合性颗粒的量直接相关。

46、根据权利要求 42 所述的方法，其中所述两种所关注分析物是相同分析物。

47、根据权利要求 46 所述的方法，其中将所述经校正的分析物结合性颗粒的量求平均值并且所关注分析物的量与经校正的分析物结合性颗粒的量的平均值相关。

48、一种定量测量流体样本中至少两种所关注分析物的量的方法，其包含：

a) 提供固相装置，所述装置包含包含施加点、至少两个样本捕捉区、和控制捕捉区的膜；所述第一样本捕捉区具有吸附于其上的第一样本捕捉剂，所述第二样本捕捉区具有吸附于其上的第二样本捕捉剂，并且所述控制捕捉区具有吸附于其上的控制捕捉剂；其中各样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距；

b) 提供样本收集装置，所述装置含有第一分析物涂覆颗粒群和第二分析物涂覆颗粒群，其中所述第一分析物涂覆颗粒上涂有第一分析物或所述第一分析物的类似物，并且所述第二分析物涂覆颗粒上涂有第二分析物或所述第二分析物的类似物；

c) i) 将所述流体样本引入所述样本收集装置中，产生混合流体样本，并且随后将缓冲液引入所述混合流体样本中；ii) 将缓冲液引入所述样本收集装置中，并且随后引入所述流体样本；或 iii) 通过将固体引入缓冲液中来形成所述流体样本，且随后将所述流体样本引入所述样本收集装置中，

借此产生包含第一分析物涂覆颗粒和第二分析物涂覆颗粒的缓冲混合流体样本；

d) 将所述缓冲混合流体样本施加到所述膜的所述施加点；

e) 将所述膜维持在一定条件下，以能使流体通过毛细作用将第一分析物涂覆颗粒和第二分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区，借此使第一分析物涂覆颗粒与所述第一样本捕捉区中的所述第一样本捕捉剂结合，并使第二分析物涂覆颗粒与所述第二样本捕捉区中的所述第二样本捕捉剂结合；并且同时能使所述样本中的流体通过毛细作用将第一分析物涂覆颗粒和第二分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过所述控制捕捉区，借此使第一分析物涂覆颗粒和第二分析物涂覆颗粒与所述控制捕捉剂结合；

f) 进一步将所述膜维持在一定条件下，以能使所述样本中的流体通过毛细作用将未与样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何第一分析物涂覆颗粒和第二分析物涂覆颗粒输送到所述样本捕捉区之外或所述控制捕捉区之外；

g) 测定所述第一样本捕捉区中第一分析物涂覆颗粒的量、所述第二样本捕捉区中第二分析物涂覆颗粒的量和所述控制捕捉区中第一分析物涂覆颗粒和第二分析物涂覆颗粒的量；

h) 由所述第一样本捕捉区中第一分析物涂覆颗粒的量, 和所述控制捕捉区中第一分析物涂覆颗粒和第二分析物涂覆颗粒的量测定第一经校正的分析物涂覆颗粒的量; 并且由所述第二样本捕捉区中第二分析物涂覆颗粒的量, 和所述控制捕捉区中第一分析物涂覆颗粒和第二分析物涂覆颗粒的量测定第二经校正的分析物涂覆颗粒的量;

其中所述流体样本中所述第一所关注分析物的量与所述第一经校正的分析物涂覆颗粒的量成反比关系, 并且所述流体样本中所述第二所关注分析物的量与所述第二经校正的分析物涂覆颗粒的量成反比关系。

49、根据权利要求 48 所述的方法, 其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区呈放射状分散在所述施加点周围。

50、根据权利要求 48 所述的方法, 其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区彼此相邻并且沿流体通过毛细作用流动的方向平行定位。

51、根据权利要求 48 所述的方法, 其另外包含定量测量一种或一种以上额外所关注分析物的量, 其中所述膜包含针对各额外所关注分析物的额外样本捕捉区, 各额外样本捕捉区具有吸附于其上的样本捕捉剂; 其中样本收集装置另外含有针对各额外所关注分析物的额外分析物涂覆颗粒群; 其中将所述膜维持在一定条件下, 以能使流体通过毛细作用将额外分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区, 借此使额外分析物涂覆颗粒与各额外样本捕捉区中的所述额外样本捕捉剂结合; 其中针对各所关注分析物的经校正的分析物结合性颗粒的量是由各相应额外样本捕捉区中额外分析物涂覆颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量测定, 并且其中所述流体样本中各所关注分析物的量与相应的经校正的分析物涂覆颗粒的量直接相关。

52、根据权利要求 48 所述的方法, 其中所述两种所关注分析物是相同分析物。

53、根据权利要求 52 所述的方法, 其中将所述经校正的分析物涂覆颗粒的量求平均值并且所关注分析物的量与经校正的分析物涂覆颗粒的量的平均值相关。

54、一种定量测量流体样本中至少两种所关注分析物的量的方法, 其包含:

a) 提供固相装置, 所述装置包含包含施加点、至少两个样本捕捉区、和控制捕捉区的膜; 所述第一样本捕捉区具有吸附于其上的第一样本捕捉剂, 所述第二样本捕捉区具有吸附于其上的第二样本捕捉剂, 并且所述控制捕捉区具有吸附于其上的控制捕捉剂; 其中各样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距;

b) 提供样本收集装置, 所述装置含有分析物涂覆颗粒群, 其中所述分

析物涂覆颗粒上涂有第一分析物或所述分析物的类似物, 并且涂有第二分析物或所述第二分析物的类似物;

c) i) 将所述流体样本引入所述样本收集装置中, 产生混合流体样本, 并且随后将缓冲液引入所述混合流体样本中; ii) 将缓冲液引入所述样本收集装置中, 并且随后引入所述流体样本; 或 iii) 通过将固体引入缓冲液中来形成所述流体样本, 且随后将所述流体样本引入所述样本收集装置中,

借此产生包含分析物涂覆颗粒的缓冲混合流体样本;

d) 将所述缓冲混合流体样本施加到所述膜的所述施加点;

e) 将所述膜维持在一定条件下, 以能使流体通过毛细作用将分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区, 借此使分析物涂覆颗粒与所述第一样本捕捉区中的所述第一样本捕捉剂结合, 并使分析物涂覆颗粒与所述第二样本捕捉区中的所述第二样本捕捉剂结合; 并且同时能使所述样本中的流体通过毛细作用将分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过所述控制捕捉区, 借此使分析物涂覆颗粒与所述控制捕捉剂结合;

f) 进一步将所述膜维持在一定条件下, 以能使所述样本中的流体通过毛细作用将未与样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何分析物涂覆颗粒输送到所述样本捕捉区之外或所述控制捕捉区之外;

g) 测定所述第一样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量、所述第二样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量、和所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量;

h) 由所述第一样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量测定第一经校正的分析物涂覆颗粒的量; 并且由所述第二样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量测定第二经校正的分析物涂覆颗粒的量;

其中所述流体样本中所述第一所关注分析物的量与所述第一经校正的分析物涂覆颗粒的量成反比关系, 并且所述流体样本中所述第二所关注分析物的量与所述第二经校正的分析物涂覆颗粒的量成反比关系。

55、根据权利要求 54 所述的方法, 其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区呈放射状分散在所述施加点周围。

56、根据权利要求 54 所述的方法, 其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区彼此相邻并且沿流体通过毛细作用流动的方向平行定位。

57、根据权利要求 54 所述的方法, 其另外包含定量测量一种或一种以上额外所关注分析物的量, 其中所述膜包含针对各额外所关注分析物的额外样本捕捉区, 各额外样本捕捉区具有吸附于其上的样本捕捉剂; 其中分析物涂覆颗粒群另外包含涂覆于所述颗粒上的各额外所关注分析物; 其中将所述膜维持在一定条件下, 以能使流体通过毛细作用将接触的额外分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区, 借此使接触的额外

分析物涂覆颗粒与各额外样本捕捉区中的所述额外样本捕捉剂结合；其中针对各所关注分析物的经校正的分析物结合性颗粒的量是由各相应额外样本捕捉区中额外分析物涂覆颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量测定，并且其中所述流体样本中各所关注分析物的量与相应的经校正的分析物涂覆颗粒的量直接相关。

58、根据权利要求 54 所述的方法，其中所述两种所关注分析物是相同分析物。

59、根据权利要求 58 所述的方法，其中将所述经校正的分析物涂覆颗粒的量求平均值并且所关注分析物的量与经校正的分析物结合颗粒的量的平均值相关。

60、一种定量测量流体样本中多种所关注分析物的量的方法，其包含：

a) 提供固相装置，所述装置包含包含施加点、针对各所关注分析物的样本捕捉区、和控制捕捉区的膜；各样本捕捉区具有吸附于其上的为所关注分析物的结合配对物的样本捕捉剂，并且所述控制捕捉区具有吸附于其上的控制捕捉剂；其中各样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距；

b) 提供样本收集装置，所述装置含有分析物结合性颗粒群，其中各分析物结合性颗粒群上涂有针对所关注分析物的分析物结合剂，使得对各所关注分析物存在一个分析物结合性颗粒群；

c) i) 将所述流体样本引入所述样本收集装置中，产生混合流体样本，并且随后将缓冲液引入所述混合流体样本中；ii) 将缓冲液引入所述样本收集装置中，并且随后引入所述流体样本；或 iii) 通过将固体引入缓冲液中来形成所述流体样本，且随后将所述流体样本引入所述样本收集装置中，借此产生包含接触的分析物结合性颗粒的缓冲混合流体样本；

d) 将所述缓冲混合流体样本施加到所述膜的所述施加点；

e) 将所述膜维持在一定条件下，以能使流体通过毛细作用将接触的分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区，借此使接触的分析物结合性颗粒与针对各所关注分析物的所述样本捕捉区中的所述样本捕捉剂结合；并且同时能使所述样本中的流体通过毛细作用将接触的分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过所述控制捕捉区，借此使接触的分析物结合性颗粒与所述控制捕捉剂结合；

f) 进一步将所述膜维持在一定条件下，以能使所述样本中的流体通过毛细作用将未与样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何接触的分析物结合性颗粒输送到所述样本捕捉区之外或所述控制捕捉区之外；

g) 测定各样本捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量；

h) 由所述相应样本捕捉区中分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物结合性颗粒的量测定针对各所关注分析物的经校正的分析物结合性颗粒的量;

其中所述流体样本中所关注分析物的量与所述经校正的分析物结合性颗粒的量直接相关。

61、根据权利要求 60 所述的方法, 其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区呈放射状分散在所述施加点周围。

62、根据权利要求 60 所述的方法, 其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区彼此相邻并且沿流体通过毛细作用流动的方向平行定位。

63、一种定量测量流体样本中多种所关注分析物的量的方法, 其包含:

a) 提供固相装置, 所述装置包含包含施加点、针对各所关注分析物的样本捕捉区、和控制捕捉区的膜; 各样本捕捉区具有吸附于其上的为所关注分析物的结合配对物的样本捕捉剂, 并且所述控制捕捉区具有吸附于其上的控制捕捉剂; 其中各样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距;

b) 提供样本收集装置, 所述装置含有分析物结合性颗粒群, 其中所述分析物结合性颗粒群上涂有针对各所关注分析物的分析物结合剂, 使得对各所关注分析物存在分析物结合剂;

c) i) 将所述流体样本引入所述样本收集装置中, 产生混合流体样本, 并且随后将缓冲液引入所述混合流体样本中; ii) 将缓冲液引入所述样本收集装置中, 并且随后引入所述流体样本; 或 iii) 通过将固体引入缓冲液中来形成所述流体样本, 且随后将所述流体样本引入所述样本收集装置中, 借此产生包含接触的分析物结合性颗粒的缓冲混合流体样本;

d) 将所述缓冲混合流体样本施加到所述膜的所述施加点;

e) 将所述膜维持在一定条件下, 以能使流体通过毛细作用将接触的分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区, 借此使接触的分析物结合性颗粒与针对各所关注分析物的所述样本捕捉区中的所述样本捕捉剂结合; 并且同时能使所述样本中的流体通过毛细作用将接触的分析物结合性颗粒经由所述膜带输送到并通过所述控制捕捉区, 借此使接触的分析物结合性颗粒与所述控制捕捉剂结合;

f) 进一步将所述膜维持在一定条件下, 以能使所述样本中的流体通过毛细作用将未与样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何接触的分析物结合性颗粒输送到所述样本捕捉区之外或所述控制捕捉区之外;

g) 测定各样本捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区中接触的分析物结合性颗粒的量;

h) 由所述相应样本捕捉区中分析物结合性颗粒的量和所述控制捕捉区

中分析物结合性颗粒的量测定针对各所关注分析物的经校正的分析物结合性颗粒的量;

其中所述流体样本中所关注分析物的量与所述经校正的分析物结合性颗粒的量直接相关。

64、根据权利要求 63 所述的方法, 其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区呈放射状分散在所述施加点周围。

65、根据权利要求 63 所述的方法, 其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区彼此相邻并且沿流体通过毛细作用流动的方向平行定位。

66、一种定量测量流体样本中多种所关注分析物的量的方法, 其包含:

a) 提供固相装置, 所述装置包含包含施加点、针对各所关注分析物的样本捕捉区、和控制捕捉区的膜; 各样本捕捉区具有吸附于其上的作为所关注分析物的结合配对物的样本捕捉剂, 并且所述控制捕捉区具有吸附于其上的控制捕捉剂; 其中各样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距;

b) 提供样本收集装置, 所述装置含有分析物涂覆颗粒群, 其中各分析物涂覆颗粒群上涂有所关注分析物或所关注分析物的类似物, 使得对各所关注分析物存在一个分析物涂覆颗粒群;

c) i) 将所述流体样本引入所述样本收集装置中, 产生混合流体样本, 并且随后将缓冲液引入所述混合流体样本中; ii) 将缓冲液引入所述样本收集装置中, 并且随后引入所述流体样本; 或 iii) 通过将固体引入缓冲液中来形成所述流体样本, 且随后将所述流体样本引入所述样本收集装置中, 借此产生包含分析物涂覆颗粒的缓冲混合流体样本;

d) 将所述缓冲混合流体样本施加到所述膜的所述施加点;

e) 将所述膜维持在一定条件下, 以能使流体通过毛细作用将分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区, 借此使分析物涂覆颗粒与针对各所关注分析物的所述样本捕捉区中的所述样本捕捉剂结合; 并且同时能使所述样本中的流体通过毛细作用将分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过所述控制捕捉区, 借此使分析物涂覆颗粒与所述控制捕捉剂结合;

f) 进一步将所述膜维持在一定条件下, 以能使所述样本中的流体通过毛细作用将未与样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何分析物涂覆颗粒输送到所述样本捕捉区之外或所述控制捕捉区之外;

g) 测定各样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量;

h) 由所述相应样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量测定针对各所关注分析物的经校正的分析物涂覆颗粒

的量;

其中所述流体样本中所关注分析物的量与所述经校正的分析物涂覆颗粒的量成反比关系。

67、根据权利要求 66 所述的方法,其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区呈放射状分散在所述施加点周围。

68、根据权利要求 66 所述的方法,其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区彼此相邻并且沿流体通过毛细作用流动的方向平行定位。

69、一种定量测量流体样本中多种所关注分析物的量的方法,其包含:

a) 提供固相装置,所述装置包含包含施加点、针对各所关注分析物的样本捕捉区、和控制捕捉区的膜;各样本捕捉区具有吸附于其上的为所关注分析物的结合配对物的样本捕捉剂,并且所述控制捕捉区具有吸附于其上的控制捕捉剂;其中各样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距;

b) 提供样本收集装置,所述装置含有分析物涂覆颗粒群,其中对于各所关注分析物,所述分析物涂覆颗粒群上涂有所关注分析物或所关注分析物的类似物,使得对各所关注分析物存在分析物或分析物类似物;

c) i) 将所述流体样本引入所述样本收集装置中,产生混合流体样本,并且随后将缓冲液引入所述混合流体样本中; ii) 将缓冲液引入所述样本收集装置中,并且随后引入所述流体样本;或 iii) 通过将固体引入缓冲液中来形成所述流体样本,且随后将所述流体样本引入所述样本收集装置中,借此产生包含分析物涂覆颗粒的缓冲混合流体样本;

d) 将所述缓冲混合流体样本施加到所述膜的所述施加点;

e) 将所述膜维持在一定条件下,以能使流体通过毛细作用将分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过各样本捕捉区,借此使分析物涂覆颗粒与针对各所关注分析物的所述样本捕捉区中的所述样本捕捉剂结合;并且同时能使所述样本中的流体通过毛细作用将分析物涂覆颗粒经由所述膜带输送到并通过所述控制捕捉区,借此使分析物涂覆颗粒与所述控制捕捉剂结合;

f) 进一步将所述膜维持在一定条件下,以能使所述样本中的流体通过毛细作用将未与样本捕捉剂或所述控制捕捉剂结合的任何分析物涂覆颗粒输送到所述样本捕捉区之外或所述控制捕捉区之外;

g) 测定各样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量;

h) 由所述相应样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量和所述控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量测定针对各所关注分析物的经校正的分析物涂覆颗粒的量;

其中所述流体样本中所关注分析物的量与所述经校正的分析物结合颗粒的量成反比关系。

70、根据权利要求 69 所述的方法，其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区呈放射状分散在所述施加点周围。

71、根据权利要求 69 所述的方法，其中所述样本捕捉区和所述控制捕捉区彼此相邻并且沿流体通过毛细作用流动的方向平行定位。

多重指向性免疫层析分析

相关申请案

本申请案主张 2005 年 8 月 23 日申请的美国临时申请案第 60/710,582 号的权益。上述申请案的整个教示内容都并入本文用作参考。

背景技术

流体样本、尤其是体液样本中细胞和分析物的定量分析通常会为医师和患者提供重要的诊断和治疗信息。定量免疫分析是利用抗原 (Ag)-抗体 (Ab) 反应的特异性来检测和量化样本中的 Ag 或 Ab。在固相免疫分析中, 将一种试剂 (例如, Ag 或 Ab) 附着于固体表面, 从而促进已结合的试剂或分析物与游离试剂或分析物的分离。将固相暴露于含有与 Ag 或 Ab 结合的分析物的样本; 量化此结合的程度以便测量样本中的分析物浓度。然而, 将结合事件转换成可测量信号受到多种因素限制, 其中包括由颗粒在固相上移动的限制, 这会影响定量免疫分析的特异性和适用性。

发明内容

本发明涉及使用固相分析法 (例如, 夹心免疫分析或抑制免疫分析) 测量流体样本中所关注分析物的量的方法, 其中将所关注分析物和捕捉剂用作特异性结合对的部分; 还涉及用于所述方法的套组。

在本发明的方法中, 提供一种固相装置, 其包括具有施加点、一个或一个以上样本捕捉区 (一个与各所关注分析物对应) 和控制捕捉区的膜; 所述样本捕捉区和所述控制捕捉区与所述施加点大致等距 (例如, 彼此平行或放射状分散)。样本捕捉剂 (例如, 与所关注分析物结合的试剂, 诸如所关注分析物的抗体) 被吸附于各所关注分析物的样本捕捉区。控制捕捉剂 (例如, 与分析物结合性颗粒结合的试剂, 诸如抗免疫球蛋白抗体) 被吸附于控制捕捉区。还提供一种样本收集装置, 其含有以稳定形式储存的颗粒群, 诸如脂质体、胶体金或有机聚合物乳胶粒子。

在本发明的夹心免疫分析中, 所述颗粒为涂有针对所关注分析物的结合剂 (例如, 抗体) 或者涂有针对多种所关注分析物的结合剂的分析物结合性颗粒; 或者, 利用各自涂有针对一种所关注分析物的结合剂的不同分析物结合性颗粒群。在竞争分析或抑制分析中, 颗粒为涂有所关注分析物或者涂有多种所关注分析物的“分析物涂覆”颗粒; 或者, 利用各自涂有一种所关注分析物的不同分析物涂覆颗粒群。在任一类分析中, 都可使用比色标记、荧光标记、发光标记、化学发光标记或其它适当标记来对颗粒做标

记以便于检测。

在所述方法的一个具体态样中，将待评定一种或一种以上分析物的流体样本引入样本收集装置中，并且随后将缓冲液引入混合流体样本中。在所述方法的另一个具体态样中，将缓冲液引入样本收集装置中，并且随后引入待评定所关注分析物的流体样本。在所述方法的第三个具体态样中，通过将固体引入缓冲液中来形成流体样本，并且随后将流体样本引入样本收集装置中。在这些具体态样的任一具体态样中，都产生含有所述颗粒的缓冲混合流体样本。

在夹心分析中，样本中的所关注分析物与分析物结合性颗粒之间存在相互作用，从而在混合流体样本内产生接触的分析物结合性颗粒。将缓冲混合流体样本施加到固相装置中膜的施加点上。随后将固相装置维持在一定条件下以能使流体通过毛细作用将颗粒输送到并通过样本捕捉区，并且同时输送到并通过控制捕捉区。样本捕捉剂与接触的分析物结合性颗粒相互作用，从而将颗粒阻滞在样本捕捉区中。

流体的毛细作用还不仅使接触的分析物结合性颗粒移动到并通过样本捕捉区，而且同时也使其移动到并通过控制捕捉区，在所述控制捕捉区中，所述颗粒将与控制捕捉剂结合。流体的毛细作用继续使剩余未结合的颗粒移动通过样本捕捉区和控制捕捉区（例如，进入芯吸垫中）。然后测定被阻滞在各样本捕捉区和控制捕捉区中的分析物结合性颗粒的量。

接着测定流体样本中所关注分析物的量。举例来说，流体样本中所关注分析物的量可以 1) 被阻滞在与所述所关注分析物对应的样本捕捉区中的分析物结合性颗粒的量与 2) 控制捕捉区中分析物结合性颗粒的量的比率测定。或者，流体样本中所关注分析物的量可以 1) 被阻滞在与所述所关注分析物对应的样本捕捉区中的分析物结合性颗粒的量与 2) 控制捕捉区中分析物结合性颗粒的量和被阻滞在所述所关注分析物的样本捕捉区中的分析物结合性颗粒的量的总和的比率测定。

在竞争或抑制型分析中，将缓冲混合流体样本施加于固相装置中膜的施加点上。随后将固相装置维持在一定条件下以能使流体通过毛细作用将分析物涂覆颗粒输送到并通过控制捕捉区（所述颗粒将在其中结合控制捕捉剂）并且同时输送到并通过样本捕捉区。样本捕捉剂与分析物涂覆颗粒相互作用；样本捕捉剂和分析物涂覆颗粒之间的相互作用将使分析物涂覆颗粒被阻滞在样本捕捉区中。由于分析物涂覆颗粒和样本中的分析物（如果存在）竞争结合样本捕捉区中样本捕捉剂上的结合位点，因此被阻滞在样本捕捉区中的分析物涂覆颗粒的量与样本中分析物的量成反比。流体的毛细作用继续使剩余未结合的颗粒移动通过样本捕捉区和控制捕捉区（例如，进入芯吸垫中）。然后测定被阻滞在样本捕捉区和控制捕捉区中的分析

物涂覆颗粒的量。

接着测定流体样本中所关注分析物的量。举例来说，流体样本中所关注分析物的量与 1) 被阻滞在与所述所关注分析物对应的样本捕捉区中的分析物涂覆颗粒的量与 2) 控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量的比率成反比关系。或者，流体样本中所关注分析物的量与 1) 被阻滞在与所述所关注分析物对应的样本捕捉区中的分析物涂覆颗粒的量与 2) 控制捕捉区中分析物涂覆颗粒的量和被阻滞在样本捕捉区中的分析物涂覆颗粒的量的总和的比率成反比关系。

附图说明

图 1 描述固相装置上样本捕捉区和/或控制捕捉区的平行布置。

图 2 描述固相装置上样本捕捉区和/或控制捕捉区的放射状布置。

具体实施方式

本发明涉及使用分析、尤其是定量免疫层析分析定量测量一种或一种以上所关注分析物的量的方法，和用于所述方法的套组。

如本文所使用，分析是指分析样本以确定一种或一种以上分析物的存在、不存在或数量的活体外 (*in vitro*) 程序。本发明的分析利用至少一种所关注分析物和分析物结合剂。各所关注分析物和分析物结合剂为特异性结合对的成员，其中所述结合对的第一成员（例如分析物）与第二成员（例如，结合剂）特异性反应。结合对的一个或两个成员可为抗体。举例来说，结合对的第一成员（例如，所关注分析物）可为抗体，而结合对的第二成员（例如，结合剂）可为抗免疫球蛋白抗体；或者，结合对的第一成员（例如，分析物）可为抗原，而结合对的第二成员（例如，结合剂）可为抗体。

在一个具体态样中，所述分析是利用抗体作为所述程序的一个组分的免疫分析。在一优选具体态样中，免疫分析为夹心分析，是针对分析物的测试，其中使待评定分析物的存在或不存在或数量的流体样本与涂有分析物结合剂（诸如，针对分析物的抗体）的颗粒接触，并且将所得混合物施加于膜上，且随后通过毛细作用使其移动通过膜。检测到分析物与膜捕捉区中分析物结合剂涂覆颗粒之间的相互作用时，指示阳性结果，捕捉区中分析物结合剂涂覆颗粒的量与流体样本中分析物的量相关。在另一优选具体态样中，免疫分析为抑制或竞争分析，是针对分析物的测试，其中使待评定分析物的存在或不存在或数量的流体样本与涂有分析物的颗粒接触，并且将所得混合物施加于膜上，且随后通过毛细作用使系统移动通过膜。检测到分析物结合剂与膜捕捉区中分析物涂覆颗粒之间的相互作用时，指示阳性结果，捕捉区中分析物涂覆颗粒的量与流体样本中分析物的量成反

比关系。

在本发明分析的其它具体态样中，分析物与结合剂都不为抗体：例如，结合对的第一成员可为配体，而结合对的第二成员可为受体；或者，结合对的第一成员可为凝集素，而结合对的第二成员可为糖。在另一具体态样中，结合对的第一成员可为核酸（例如，DNA、RNA），而结合对的第二成员可为与所述结合对的第一成员特异性杂交的核酸。如本文所使用，特异性杂交是指第一核酸能够与第二核酸杂交，但不与第二核酸以外的任何核酸杂交（例如，当第一核酸与第二核酸具有比其与进行杂交的样本中的任何其它核酸高的相似性时）。杂交的“严格条件”是所属领域的术语，是指能使特定核酸与第二核酸杂交的培养和洗涤条件，例如温度和缓冲液浓度条件；所述第一核酸可与第二核酸完全（即，100%）互补，或者所述第一核酸与第二核酸可共有某种程度的、低于完全互补的互补性（例如，70%、75%、80%、85%、90%、95%）。举例来说，可使用使完全互补核酸与具有较低互补性的核酸相区别的某些高严格度条件。核酸杂交的“高严格度条件”、“中等严格度条件”和“低严格度条件”在 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M.等人, "*Current Protocols in Molecular Biology*", John Wiley & Sons, (1998), 所述文献的整个教导内容都并入本文用作参考) 中第 2.10.1-2.10.16 页和第 6.3.1-6.3.6 页中有说明。决定杂交严格度的确切条件不仅取决于离子强度（例如，0.2×SSC、0.1×SSC）、温度（例如，室温、42℃、68℃）和去稳定剂（诸如，甲酰胺）或变性剂（诸如，SDS）的浓度，而且还取决于以下因素：诸如，核酸序列的长度、碱基组成、杂交序列之间的错配百分比和其它不一致序列内所述序列的亚群出现的频率。因此，可通过改变一个或一个以上所述参数且同时保持两个核酸分子之间的一致性 or 相似性的程度来确定相当的条件。

不管分析物和结合剂的组成如何，这两个组分都将形成特异性结合对，其中第一成员将与第二成员特异性反应。结合对成员之间的特异性相互作用表明，结合对的第一成员优先结合所述结合对的第二成员或者以其它方式与所述结合对的第二成员相互作用，优选排除与分析中的另一化合物的任何结合。

如本文所使用，用语分析物或所关注分析物是指如上所述的结合对的第一成员。分析物为将测量数量的分子或化合物。分析物可为固体形式，诸如干物质（例如，粉末、微粒、孢子或其它颗粒），或可为流体形式（例如，已溶解或悬浮于流体中的如上所述的固体；或其它液体样本）。分析物的实例包括孢子、蛋白质（诸如激素或酶）、糖蛋白、肽、小分子、多糖、抗体、核酸、药物、毒素（例如，环境毒素）、病毒或病毒粒子、细胞壁部分，和其它化合物。在一优选具体态样中，分析物具有“免疫原性”，表明可

产生针对分析物或针对与载体结合的分析物（例如，半抗原-载体连结构，为此，可产生针对所述半抗原的抗体）的抗体（如下所述）。在一些代表性具体态样中，所关注分析物可为肌红蛋白（myoglobin）、CK-MB、肌钙蛋白 I（troponin I）、PSA、地高辛（digoxin）、茶碱（theophylline）、激素（例如，T-3 或 T-4）、滥用药物（LSD、THC、巴比妥类（barbituate）等）或炭疽芽胞杆菌（*Bacillus anthracis*）（炭疽（anthrax））的孢子。所关注分析物可为液体样本；或者，所关注分析物可为干（非流体）样本（例如固体，诸如微粒样本、粉末样本或土壤样本）。如果需评估一种以上所关注分析物，那么各所关注分析物为如上所述的结合对的第一成员，即，各所关注分析物与结合对的第二成员特异性反应。

在本发明的方法中，评定流体样本中一种或一种以上所关注分析物的存在或不存在，或数量。流体可为润湿膜材料；支持各所需反应物与其分析物结合剂之间的反应（诸如抗体/抗原反应）（即，不干扰抗体/抗原相互作用）；和粘度足够低能使流体通过毛细作用移动的的流体。在优选具体态样中，流体为水性溶液（诸如，体液）；含有所关注分析物的流体溶液；或者，流体样本可为具有许多组分的流体，诸如复杂环境样本（例如，污水、废水、地下水或其它水样本）或复杂生物流体（例如，全血、血浆、血清、尿液、脑脊髓液、唾液、精液、玻璃体液、滑液或其它生物流体）。在流体为生物流体的优选具体态样中，流体为全血、血浆或血清。需要时，可稀释流体样本；例如，如果将复杂生物样本用作流体样本，那么可用溶液（例如，水溶液）将其稀释。

如果所关注分析物不是呈溶液状态（例如，所关注分析物为如上所述的干样本或固体样本形式），那么可首先将其提取、悬浮或溶解于流体样本中。举例来说，如果所关注分析物为核酸，那么可将其从所需细胞提取到溶液（例如，水溶液，诸如下文所述的缓冲液）中；在另一实例中，如果所关注分析物为粉末或微粒材料（例如，粉末、微粒、土壤样本或孢子），那么可（诸如）通过获得所述干材料的样本（例如，使用药签或其它工具）并将所述干材料样本放入溶液（例如，水溶液，诸如下文所述的缓冲液）中，来将其悬浮或溶解于所述溶液中。因此，流体样本不仅可以指待评定所关注分析物的液体样本，而且还可以指提取、悬浮或溶解固体材料（待评定所关注分析物）的流体样本。

如本文所使用，分析物结合剂是指如上所述的结合对的第二成员。各分析物结合剂为与所关注分析物（结合对的第一成员）特异性结合的化合物，诸如抗体、半抗原或药物连结构、受体或另一结合配对物。在优选具体态样中，分析物结合剂为针对所关注分析物的抗体。

夹心分析

本发明的夹心分析利用固相装置。固相装置包括具有施加点、一个或一个以上样本捕捉区、和控制捕捉区的膜。固相装置可视情况包括在控制捕捉区之后的芯吸垫和邻近或覆盖施加点的施加垫。所述膜可以是由具有以下特征的物质制成：足够多孔以能使流体沿其表面和在其内部产生毛细作用；通过毛细作用使涂覆颗粒（例如，分析物结合性颗粒，如下所述）或颗粒与所关注分析物的复合物（例如，接触的分析物结合性颗粒，如下所述）移动的能力（即，其不能阻断颗粒或颗粒与所关注分析物的复合物）；和被含有分析物的流体润湿的能力（例如，水性流体的亲水性、有机溶剂的疏水性）。可通过（诸如）美国专利第 4,340,482 号或美国专利第 4,618,533 号中所述的方法来改变膜的疏水性以使膜具有适用于水性流体的亲水性；所述专利中描述将疏水性表面转变成亲水性表面。膜物质的实例包括：纤维素、硝酸纤维素、乙酸纤维素、玻璃纤维、尼龙（nylon）、聚电解质离子交换膜、丙烯酸共聚物/尼龙和聚醚砜。在优选具体态样中，所述膜是由硝酸纤维素制成（例如，具有聚酯薄膜背衬（Mylar backing）的硝酸纤维素膜）。

施加点（或施加区）为所述膜上可施加流体的位置。也可视情况使用施加垫；施加垫位于膜上与施加点紧密相邻或覆盖施加点。施加垫可以是由可将施加于所述垫的流体样本传送到膜施加点的吸收性物质制成。代表性物质包括纤维素、硝酸纤维素、乙酸纤维素、尼龙、聚电解质离子交换膜、丙烯酸共聚物/尼龙、聚醚砜或玻璃纤维。在一个具体态样中，所述垫为 Hemasep®-V 垫（Pall Corporation）。在另一具体态样中，所述垫为玻璃纤维垫。如果存在芯吸垫，那么其可同样由这种吸收性物质制成。

样本捕捉区是指膜上吸附有（例如，涂覆在膜上和/或渗透到膜内）样本捕捉剂的点。如本文所使用，术语“吸附”表示通过非共价相互作用固定或粘附试剂，这与使用化学方式产生两个连接分子之间共用电子的不可逆化学键的共价键联有所不同。吸附到膜上的试剂可能进一步移动，但这对本发明分析的影响微不足道。

对于特定所关注分析物来说，样本捕捉剂为分析物结合剂，诸如上文所述的结合剂。样本捕捉剂无需为与下文关于颗粒上的分析物结合剂所述相同的分析物结合剂；然而，各样本捕捉剂也因其特异性且优先结合其所关注分析物而与其所关注分析物形成结合对。在优选具体态样中，样本捕捉剂为针对其所关注分析物的抗体，其可针对与结合用作涂覆于颗粒上的分析物结合剂的抗体的表位相同的分析物表位，或针对与结合用作涂覆于颗粒上的分析物结合剂的抗体的表位不同的分析物表位。如果存在一种以上所关注分析物，那么将相应地存在一个以上样本捕捉区，即一个样本捕捉区对应一种所关注分析物。各样本捕捉区具有吸附于其上的样本捕捉剂，其中所述样本捕捉剂为针对其特定（相应）所关注分析物的分析物结合剂。

所述装置另外包括吸附于控制捕捉区中的控制捕捉剂。控制捕捉剂为与分析物结合性颗粒反应但不与待测量的任何分析物相互作用的试剂：例如，所述控制捕捉剂可与分析物结合剂涂覆颗粒上的分析物结合剂、所述颗粒上的另一材料或所述颗粒本身反应。举例来说，如果分析物结合剂为抗体，那么控制捕捉剂可为抗免疫球蛋白抗体。在优选具体态样中，各分析物结合剂为抗体，并且控制捕捉剂为抗免疫球蛋白抗体。控制捕捉剂被吸附于控制捕捉区中的膜上（涂覆在膜上和/或渗透到膜内）。

定位控制捕捉区和样本捕捉区，使其与施加点大致等距。举例来说，在本发明的代表性具体态样中，如果施加点长约 5 毫米并且捕捉区长约 1-2 毫米，那么施加点到样本捕捉区的距离可为约 20-50 毫米，优选为约 25-40 毫米，甚至更优选为 30-40 毫米；并且施加点中心到样本捕捉区中心的距离和施加点中心到控制捕捉区中心的距离大致等距。在一个具体态样中，所述距离变动 5 毫米或更少，并且甚至更优选变动 1 毫米或更少：例如，如果施加点中心到控制捕捉区中心的距离为 35 毫米，那么施加点中心到各样本捕捉区中心的距离将在 35 毫米 $\pm$ 5 毫米以内，也就是说，在 30 到 40 毫米的范围内；并且更优选在 35 毫米 $\pm$ 1 毫米以内，也就是说在 34 到 36 毫米的范围内。在特定具体态样中，“大致等距”表示使用标准制造设备测量时，距离尽可能接近：例如，如果制造设备的分辨度为毫米，那么大致等距将在 1 毫米以内。或者，在另一特定具体态样中，大致等距的分辨度可与施加点中心到样本捕捉中心的距离（路径长度）相关：例如，施加点中心到样本捕捉区中心的距离和施加点中心到控制捕捉区中心的距离之间的差异在施加点中心到样本捕捉区中心的距离的长度（路径长度）的 10%以内、优选在 7%以内、优选在 5%以内、更优选在 4%以内、更优选在 3%以内、甚至更优选在 2%以内并且甚至更优选在 1%以内。

在某些具体态样中，控制捕捉区和样本捕捉区呈放射状分散在施加点周围（例如参看图 2）；在其它具体态样中，控制捕捉区和样本捕捉区彼此相邻并且沿流体通过毛细作用流动的方向平行定位（例如参看图 1）。因此，各样本捕捉区和控制捕捉区与中心点的距离大致相等（例如，在放射状布置的情况下），或各样本捕捉区与控制捕捉区的距离大致相等（例如，在平行布置的情况下）。应注意，施加点到各样本捕捉区和施加点到控制捕捉区的毛细路径并不交叉：也就是说，从施加点到各捕捉区的流体流动路径不同并且不穿过任何其它流体流动路径。

此外，在优选具体态样中，样本捕捉区和控制捕捉区与施加点分开足够大距离，以便将毛管锋的速度延缓到足够低的速率从而能够使毛管锋到达样本捕捉区时捕捉颗粒。此外，所述距离必须足够大，以使总迁移（毛管锋移动通过整个膜）时间足够长，从而能够使流体样本中的游离分析物

与分析物结合性颗粒结合。膜上各组件之间的最佳距离可使用常规实验确定并加以调整。

另外，定量分析还使用样本收集装置。如本文所使用，样本收集装置是指可用于收集流体样本或者可沉积或储存所收集的流体样本的装置。样本收集装置可为可含有如下所述的分析物结合性颗粒并且可加入测量体积的流体样本的任何装置。代表性样本收集装置包括样本管、试管、小瓶、吸量管或吸量管吸头，或注射器。在优选具体态样中，样本收集装置为吸量管或吸量管吸头。

在一种所关注分析物的情况下，样本收集装置含有涂有分析物结合剂的分析物结合性颗粒群。如果存在一种以上所关注分析物，那么分析物结合性颗粒上涂有针对各所关注分析物的分析物结合剂：例如，针对第一所关注分析物的第一分析物结合剂；针对第二所关注分析物的第二分析物结合剂，等；使得存在与各所关注分析物对应的分析物结合剂。或者，样本收集装置可含有针对各分析物结合剂的分析物结合性颗粒群，也就是说，针对第一所关注分析物的分析物结合性颗粒群、针对第二所关注分析物的分析物结合性颗粒群，等；使得存在与各所关注分析物对应的分析物结合性颗粒群。颗粒群的规模视颗粒的尺寸和组成、固相装置中膜的组成和分析的灵敏程度而变化。所述颗粒群通常在约 1×10^3 与 1×10^9 之间的范围内，但也可视需要使用较少或较多的颗粒。在优选具体态样中，颗粒群为约 2×10^8 个颗粒。如果评定一种以上所关注分析物，那么相应地可视需要增加颗粒群（例如，如果评定三种所关注分析物，那么可将颗粒数增至三倍）。分析物结合性颗粒为可涂覆上各所关注分析物的分析物结合剂（结合对的第二成员）的颗粒。在优选具体态样中，分析物结合性颗粒为脂质体、胶体金、有机聚合物乳胶颗粒、无机荧光颗粒或磷光颗粒。在特别优选具体态样中，所述颗粒为聚苯乙烯乳胶珠粒，并且最特别地，为在不存在表面活性剂的情况下制备的聚苯乙烯乳胶珠粒，诸如不含表面活性剂的 Superactive Uniform Aldehyde/Sulfate Latexes (Interfacial Dynamics Corp., Portland, OR)。

颗粒的尺寸与膜的多孔性相关（对于流体样本中的分析物），也与所关注分析物的尺寸相关（例如，对于微粒分析物）：所述颗粒必须足够小以通过流体的毛细作用沿膜输送，而且（对于固体，例如微粒分析物）如下所述的接触的分析物结合性颗粒的复合物必须足够小以通过毛细作用沿膜输送。可对颗粒进行标记以便于检测。可通过不显著影响颗粒的物理特性的方式对颗粒进行标记；例如在内部对颗粒进行标记（也就是说，标记包括在颗粒内，诸如在脂质体内或在聚苯乙烯乳胶珠粒内部）。

代表性标记包括发光标记、化学发光标记、磷光标记、酶连接标记、

化学标记（诸如电活性剂，例如亚铁氰化物）和比色标记（诸如染料或荧光标记）。在一个具体态样中，使用荧光标记。在另一个具体态样中，使用磷光标记，尤其是“上转换（up-converting）”磷光颗粒，诸如美国专利第5,043,265号中所述的颗粒。

所述颗粒上涂有分析物结合剂，分析物结合剂是针对各所关注分析物的结合对的第二成员（例如，涂有一种以上分析物结合剂的颗粒；或不同的颗粒群，各颗粒群上涂有针对其分析物的一种分析物结合剂）。如上所述，分析物结合剂（结合对的第二成员）特异性且优先与其所关注分析物（结合对的第一成员）结合。代表性分析物结合剂包括抗体（或其片段）、半抗原、药物连结物、受体或其它结合配对物。在一个优选具体态样中，分析物结合剂为针对所关注分析物的抗体。抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体。如本文所使用，术语“抗体”还指足以与所关注分析物结合的抗体片段。另外，在另一具体态样中，也可使用与所关注分析物特异性结合的分子，诸如具有分析物结合位点的工程设计蛋白质（Holliger, P.和 H. R. Hoogenbloom, *Trends in Biotechnology* 13:79 (1995); Chamow, S. M.和 A. Ashkenazi, *Trends in Biotechnology* 14:52-60 (1996)）。在另一具体态样中，如果所关注分析物为药物，那么可将半抗原或其它药物连结物用作分析物结合剂。或者，在另一具体态样中，可使用与分析物结合的受体（例如，如果所关注分析物为配体）。如果分析物为具有已知特异性的抗体，那么可将颗粒上涂覆针对分析物抗体的抗原，或者可涂覆分析物抗体的抗体。此外，由于分析物和分析物结合剂形成结合对，故描述为代表性分析物的化合物或分子也可用作分析物结合剂，并且描述为代表性分析物结合剂的化合物或分子同样也可用作如本文所述的分析物。

样本收集装置内所含有的分析物结合性颗粒是以稳定形式储存于样本收集装置内。如本文所使用，术语“稳定形式”表示颗粒在储存期间不显著改变化学组成或物理状态的形式。稳定形式可为液体、凝胶或固体形式。在优选具体态样中，样本收集装置内所含有的分析物结合性颗粒是经蒸发干燥、冷冻干燥和/或真空干燥。

在特别优选具体态样中，样本收集装置为吸量管吸头，其中是真空干燥的分析物结合性颗粒。

为进行所述分析，使用如上所述的待评定所关注分析物的存在的流体样本。在一个具体态样中，将流体样本引入（抽吸入、倒入或以其它方式放入）样本收集装置中。举例来说，在一个具体态样中，将流体样本抽吸到包含吸量管吸头的样本收集装置中。将流体样本引入样本收集装置中将使流体样本与分析物结合性颗粒混合，从而形成“混合流体样本”。如果分析物结合性颗粒是经蒸发干燥、冷冻干燥或真空干燥，那么将流体样本引入

样本收集装置中可使分析物结合性颗粒在流体样本中再水合和悬浮。也将缓冲液(例如,对于稀释)引入混合流体样本中,形成“缓冲混合流体样本”。可通过将混合流体样本分配到含有缓冲液的“缓冲液容器”(例如,试管)中或者通过在引入流体样本之前将缓冲液引入样本收集装置中来形成缓冲混合流体样本。或者,如果所关注分析物为固体(例如,粉末、微粒、孢子或其它颗粒,如上所述),那么可通过将固体引入缓冲液容器中来制备如上所述的流体样本;在本具体态样中,缓冲混合流体样本是通过将流体样本(包含缓冲液)引入样本收集装置中来形成。在另一具体态样中,将缓冲液引入样本收集装置中,随后将流体样本引入样本收集装置中。

缓冲液可为支持所需反应物与分析物结合剂之间的反应(例如,不干扰抗体/抗原相互作用);并且粘度足够低从而能使流体通过毛细作用移动的水性流体。在一个具体态样中,缓冲液含有以下一种或一种以上组分:缓冲剂(例如,磷酸盐)、盐(例如,NaCl)、蛋白质稳定剂(例如,BSA、干酪素(casein)、血清)和/或去污剂(诸如,非离子去污剂)或表面活性剂(例如,通常可以表面活性剂工具套组形式获得的以下一种或一种以上试剂:NINATE 411、Zonyl FSN 100、Aerosol OT 100%、GEROPONT 77、BIO TERGE AS 40、STANDAPOL ES 1、Tetronic 1307、Surfnyol 465、Surfynol.485、Surfynol 104PG 50、IGEPAL CA210、TRITON X 45、TRITON X 100、TRITON X305、SILWET L7600、RHODASURF ON 870、Cremophor EL、TWEEN 20、TWEEN 80、BRIJ 35、CHEMAL LA 9、Pluronic L64、SURFACTANT 10 G、SPAN 60、CREL)。视情况,需要时,缓冲液可含有增稠剂。缓冲液的所述组分可为市售。例如,代表性缓冲液包括生理盐水或 50 mM Tris HCl (pH 7.2)。或者,可用水代替缓冲溶液;如本文所使用,术语“缓冲液”是指缓冲溶液或水。

为使分析物结合性颗粒进一步分散到流体样本中,需要时,可搅动(例如,涡旋、振动、上下吸取等)已引入流体样本和缓冲液的样本收集装置或者已引入混合流体样本的缓冲液容器。

在优选具体态样中,样本收集装置包含在尖部具有真空干燥的分析物结合性颗粒的吸量管吸头;将流体样本抽吸到吸量管中,借此使干燥的分析物结合性颗粒再水合并形成混合流体样本。在特别优选的具体态样中,将混合流体样本引入缓冲液容器中,产生缓冲混合流体样本;使用样本收集装置上下吸取缓冲混合流体样本,借此使分析物结合性颗粒进一步分散。如果缓冲混合流体样本中存在所关注分析物,那么分析物与其分析物结合性颗粒之间发生结合。分析物与分析物结合性颗粒的“结合”表明,涂覆于颗粒上的分析物结合剂与其所关注分析物相互作用(例如,结合)。本文中将被维持(培养)在能使流体中的分析物(如果存在)与吸附于接触区中的

分析物结合性颗粒相结合的条件下的分析物结合性颗粒称为“接触的分析物结合性颗粒”。接触的分析物结合性颗粒可具有或不具有与分析物结合剂结合的分析物，这取决于流体样本中是否存在各所关注分析物以及分析物是否已经与分析物结合性颗粒上的分析物结合剂结合。由于分析物结合性颗粒上存在多个分析物结合位点，因此与分析物结合性颗粒结合的分析物的存在和浓度会变化；与分析物结合性颗粒结合的分析物的浓度随流体样本中存在的分析物量成比例增加，并且分析物结合性颗粒被阻滞于样本捕捉区（如下所述）的可能性也同样随与分析物结合性颗粒结合的分析物量的增加而增加。因此，接触的分析物结合性颗粒群可包含具有各种量的与分析物结合剂结合的分析物的颗粒；以及不具有与分析物结合剂结合的分析物的颗粒（正如分析物结合性颗粒最初不具有与分析物结合剂结合的分析物）。另外，结合程度随条件的时间因素增加而增加：当大部分结合在一分钟内（例如，60秒，优选为小于60秒（例如，45秒、30秒或更少））发生时，额外的培养（例如，一分钟以上（2分钟、5分钟、10分钟、15分钟））导致额外的结合。如果存在一个以上分析物结合性颗粒群（例如，针对不同所关注分析物的单独群体），那么将被维持（培养）在能使流体中的分析物（如果存在）与分析物结合性颗粒结合的分析物结合性颗粒称为“接触的第一分析物结合性颗粒”、“接触的第二分析物结合性颗粒”等，并且统称为接触的分析物结合性颗粒。

将缓冲混合流体样本施加于固相装置中膜的施加点上或施加于施加垫（如果存在）上。在使膜与缓冲混合流体样本接触后，将所述膜维持在能使流体通过毛细作用移动到并通过膜的条件下。接触的分析物结合性颗粒因来自缓冲混合流体样本的流体的毛细作用而移动通过膜，并且所述接触的分析物结合性颗粒沿膜移动到并通过膜上的样本捕捉区，且还移动到并通过控制捕捉区。将所述膜维护在一定条件下（例如，足够时间和流体体积），以能使接触的分析物结合性颗粒通过毛细作用沿膜移动到并通过样本捕捉区，且移动到并通过控制捕捉区，并且随后到达捕捉区之外（例如，进入芯吸垫），借此将任何未结合的颗粒从捕捉区中除去。

通过接触的分析物结合性颗粒与针对各所关注分析物的样本捕捉区中的样本捕捉剂结合，并且同时通过一些接触的分析物结合性颗粒与控制捕捉区中的控制捕捉剂结合，一些接触的分析物结合性颗粒的移动被阻滞。在一个优选具体态样中，分析物结合剂为所需抗原的抗体，并且控制捕捉剂可为针对得到分析物结合剂的物种的免疫球蛋白的抗体。在本具体态样中，免疫球蛋白的抗体应不与样本的其它组分交叉反应：例如，如果测试人类样本，那么可将不与人类免疫球蛋白反应的抗体用作控制捕捉剂。

样本捕捉剂通过结合与接触的分析物结合性颗粒上的分析物结合剂结

合的所关注分析物来结合接触的分析物结合性颗粒。如本文所使用，用语样本-试剂-颗粒复合物是指样本捕捉剂与接触的分析物结合性颗粒的复合物。由于通过分析物与样本捕捉区中的样本捕捉剂相互作用来捕捉接触的分析物结合性颗粒，故接触的分析物结合性颗粒被阻滞在样本捕捉区中，从而形成样本-试剂-颗粒复合物。各样本捕捉区可能具有被阻滞的样本-试剂-颗粒复合物，这取决于样本中是否存在各特定所关注分析物以及其是否已经与接触的分析物结合性颗粒上的分析物结合剂结合。

控制捕捉剂通过结合接触的分析物结合性颗粒上的分析物结合剂来结合接触的分析物结合性颗粒。如本文所使用，术语控制-试剂-颗粒复合物是指控制捕捉剂与接触的分析物结合性颗粒的复合物。由于通过分析物结合性颗粒与控制捕捉区中的控制捕捉剂相互作用来捕捉接触的分析物结合性颗粒，故接触的分析物结合性颗粒被阻滞在控制捕捉区中，从而形成控制-试剂-颗粒复合物。如上所述，控制捕捉剂与分析物结合性颗粒（例如，分析物结合剂涂覆颗粒上的分析物结合剂，或所述颗粒上的另一材料，或所述颗粒本身）相互作用，但不与分析物本身相互作用。

毛细作用随后将未被阻滞在样本捕捉区或控制捕捉区中的任何接触的分析物结合性颗粒向前移动到这些区之外，借此除去未被阻滞的任何颗粒。在优选具体态样中，流体将未被阻滞的任何接触的分析物结合性颗粒移动到各样本捕捉区和控制捕捉区后的芯吸垫中。

需要时，可使用次级洗涤步骤。在将缓冲混合流体样本浸入膜或施加垫（如果存在）中后，可将缓冲液（例如，上文所述的缓冲液）施加到施加点。可在之后的任何时间使用次级洗涤步骤，只要不会稀释缓冲混合流体样本即可。如下所述，当检测分析物结合性颗粒时，次级洗涤步骤可帮助减少背景信号。

随后使用针对分析物结合性颗粒上所使用的标记类型的适当方式来检测被阻滞在各样本捕捉区（样本-试剂-颗粒复合物）中的分析物结合性颗粒的量。在优选具体态样中，通过光学方法，诸如通过测量分析物结合性颗粒标记的荧光量来检测所述量。或者，可使用电导率或电介质（电容）检测样本-试剂-颗粒复合物的量。或者，可使用释放的电活性剂进行电化学检测，诸如，如 Hayes 等人 (*Analytical Chem.* 66:1860-1865 (1994)) 所述的铈、铋、镓或碲离子，或如 Roberts 和 Durst (*Analytical Chem.* 67:482-491 (1995)) 所提出的亚铁氰化物。举例来说，如果使用脂质体，那么可通过在捕捉区中加入一滴去污剂来释放封装在脂质体内的亚铁氰化物，并且通过电化学方式检测所释放的亚铁氰化物 (Roberts 和 Durst, 同上)。如果使用螯合剂-蛋白质连结物来螯合金属离子，那么可通过在捕捉区加入一滴酸来释放离子并且可以通过阳极溶出伏安法 (Hayes 等人, 同上) 进行量化。同样，以

与检测样本捕捉区中分析物结合性颗粒的量相同的方式检测被阻滞于控制捕捉区中的分析物结合性颗粒的量。

在一个具体态样中，将检测出的分析物结合性颗粒的量通过与沿固相（例如，膜）的位置存在的标记量直接相关的曲线来表示。举例来说，可测定膜上各位置处（例如，样本捕捉区和控制捕捉区；和/或样本捕捉区与控制捕捉区之间的区域或者与样本捕捉区和控制捕捉区相邻的区域；和/或膜的其它区域）的检测颗粒量并且作为沿膜上位置的距离的函数绘图。随后可将颗粒量计算为曲线下面积的函数，其与所存在的标记的量相关。

接着测定经校正的分析物结合性颗粒的量，并且随后可使用适当算法由针对所关注分析物的经校正的分析物结合性颗粒量测定所述分析物的量。经校正的分析物结合性颗粒的量是基于与所关注分析物对应的样本捕捉区中和控制捕捉区中被阻滞的分析物结合性颗粒的量。举例来说，在一个具体态样中，经校正的分析物结合性颗粒的量是以样本捕捉区中存在的分析物结合性颗粒的量与控制捕捉区中存在的分析物结合性颗粒的量的比率（ R ）测定。随后可利用标准曲线由经校正的分析物结合性颗粒的量（所述比率）测定所存在的分析物的量。标准曲线是通过制备一系列对照样本产生，所述对照样本含有在待检测分析物的流体（诸如耗尽分析物的血清）中已知浓度的所关注分析物。然后对所述对照样本系列进行分析；测量各对照样本的 R 值；并且将 R 值作为对照样本中所包括的分析物浓度的函数绘图。通过测量含有未知量分析物的样本（“测试样本”）的 R 值来分析测试样本，并且通过参考标准曲线测定所述测试样本中分析物的浓度。如上所述，可产生一个标准曲线并且将其用于一组所有测试样本（例如，使用测试试剂的指定制备法得到的所有测试样本）；无需再产生各测试样本的标准曲线。在另一具体态样中，经校正的分析物结合性颗粒的量是以样本捕捉区中存在的分析物结合性颗粒的量与控制捕捉区中存在的分析物结合性颗粒量和样本捕捉区中存在的分析物结合性颗粒量的总和的比率（ R ）测定。随后可利用标准曲线由经校正的分析物结合性颗粒的量（所述比率）测定所存在的分析物的量。或者，还可使用其它比率和/或标准曲线测定样本中分析物的量。此外，需要时，可在计算比率（ R ）之前，将背景中存在的标记的量从样本捕捉区中存在的分析物结合性颗粒的量和控制捕捉区中存在的分析物结合性颗粒的量中扣除。

举例来说，在执行分析之后（液体已移动通过捕捉区并且达到捕捉区之外），可对整个膜或部分膜进行扫描，以评定捕捉区之前、捕捉区中和捕捉区之后各区域中经标记颗粒的量。所述扫描可主要在包括捕捉区的区域周围进行，但也可对扩展到这些区之外的区域进行。捕捉区外的区域中存在的颗粒为“背景”——也就是说，在样本和也存在于捕捉区的样本基质中的其

它组分的存在下与膜非特异性结合的颗粒。捕捉区中存在的颗粒量除捕捉剂所捕捉的特异颗粒外还包括此非特异性背景。可将背景颗粒量（在捕捉区之前和/或之后取得）从捕捉区中所测定的颗粒总量中扣除。由此得到经校正的背景量，这样可产生对于样本中存在的分析物量的较为精确的测定结果。

如果检测一种以上所关注分析物，那么使用与所述所关注分析物对应的样本捕捉区中阻滞的分析物结合性颗粒的量和控制捕捉区中阻滞的分析物结合性颗粒的量分别测定针对各所关注分析物的经校正的分析物结合性颗粒的量。因此，控制捕捉区中分析物结合性颗粒的量将用于测定所有所关注分析物的经校正的分析物结合性颗粒的量，但各单独样本捕捉区中分析物结合性颗粒的量仅用于测定所述特定所关注分析物的经校正的分析物结合性颗粒的量。

应注意，上文所述的评定多种所关注分析物的方法也可适用于分析所关注分析物都相同时的多种所关注分析物（即，一种分析物评定多次）。在本具体态样中，可将相同样本捕捉剂用于各样本捕捉区中。需要时，可对经校正的分析物结合性颗粒的量求平均值，并且所关注分析物的量将与所得经校正的分析物结合性颗粒的量的平均值相关。

“竞争”或“抑制”分析

与夹心分析类似，本发明的竞争或抑制分析是利用固相装置，所述固相装置包括具有施加点、一个或一个以上样本捕捉区和控制捕捉区的如上所述的膜。所述膜可视情况包括在控制捕捉区和/或样本捕捉区之后的芯吸垫，以及在施加点之前的样本垫。本具体态样也利用如上所述的样本收集装置。在某些具体态样中，竞争（抑制）分析的样本收集装置含有涂有所关注分析物（而非如上文针对夹心分析所述涂有分析物结合剂）或涂有所关注分析物的类似物的分析物涂覆颗粒群。在存在一种以上所关注分析物的其它具体态样中，分析物涂覆颗粒涂有所有不同的所关注分析物（或所关注分析物的类似物，或一种所关注分析物与另一种所关注分析物的类似物的组合等）；或者，样本收集装置含有一种以上分析物涂覆颗粒群（一个群对应一种所关注分析物）；各颗粒群涂有所关注分析物或所关注分析物的类似物。如本文所使用，分析物类似物是与分析物具有类似结合特性，即与如上所述的分析物结合剂形成结合对的化合物。分析物或分析物类似物可直接涂覆于颗粒上，或者可与颗粒间接结合。如下文所使用，用语分析物涂覆颗粒可以指涂有所关注分析物或所关注分析物类似物的颗粒。如上文关于夹心分析所述，颗粒群规模视颗粒的尺寸和组成、固相装置中膜的组成和分析的灵敏程度而变化。

如上所述，样本捕捉区是指膜上吸附有样本捕捉剂的点。样本捕捉剂

为分析物结合剂，诸如上文所述的结合剂。样本捕捉剂无需为与上文所述相同的分析物结合剂；然而，样本捕捉剂也因其特异性且优先结合其所关注分析物而与所关注分析物形成结合对。如果存在一种以上所关注分析物，那么如上所述将存在一个以上样本捕捉区。如上所述，在优选具体态样中，样本捕捉剂为针对分析物的抗体；其可针对与结合用作涂覆于颗粒上的分析物结合剂的抗体的表位相同的分析物表位，或针对与结合用作涂覆于颗粒上的分析物结合剂的抗体的表位不同的分析物表位。

所述装置另外包括与分析物涂覆颗粒反应，但不与待测量的分析物相互作用的如上所述的控制捕捉剂：例如，控制捕捉剂可与颗粒上的另一材料（例如，结合颗粒的分析物的载体；抗体）反应，或与颗粒本身反应。在优选具体态样中，样本捕捉剂和控制捕捉剂都为抗体。控制捕捉剂是吸附于控制捕捉区中的膜上（涂覆在膜上和/或渗透到膜内）。竞争分析的组件是以与上文关于夹心分析所述类似的方式定位。

为进行竞争分析，使用如上所述的待评定所关注分析物的存在的流体样本。在一个具体态样中，将流体样本引入（抽吸入、倒入或以其它方式放入）样本收集装置中。举例来说，在一个具体态样中，将流体样本抽吸到包含吸量管吸头的样本收集装置中。将流体样本引入样本收集装置中将使流体样本与分析物涂覆颗粒混合，从而形成混合流体样本。如果分析物涂覆颗粒是经蒸发干燥、冷冻干燥或真空干燥，那么将流体样本引入样本收集装置中可使分析物结合性颗粒在流体样本中再水合和悬浮。也将缓冲液（例如，如上所述）引入混合流体样本中，形成缓冲混合流体样本。可通过将混合流体样本分配到含有缓冲液的缓冲液容器（例如，试管）中或者通过在引入流体样本之前将缓冲液引入样本收集装置中来形成缓冲混合流体样本。在另一具体态样中，将缓冲液引入样本收集装置中，随后将流体样本引入样本收集装置中。或者，如果所关注分析物为固体（例如，粉末、微粒、孢子或其它颗粒，如上所述），那么可通过将固体引入缓冲液容器中来制备如上所述的流体样本；在本具体态样中，缓冲混合流体样本是通过将流体样本（包含缓冲液）引入样本收集装置中来形成。

为使分析物涂覆颗粒进一步分散到流体样本中，需要时，可搅动（例如，涡旋、振动、上下吸取等）已引入流体样本和缓冲液的样本收集装置或者已引入混合流体样本的缓冲液容器。

在优选具体态样中，样本收集装置包含在尖部具有真空干燥的分析物涂覆颗粒的吸量管吸头；将流体样本抽吸到吸量管中，借此使干燥的分析物涂覆颗粒再水合并形成混合流体样本。在特别优选的具体态样中，将混合流体样本引入缓冲液容器中，产生缓冲混合流体样本；使用样本收集装置上下吸取缓冲液容器中的缓冲混合流体样本，借此使分析物涂覆颗粒

进一步分散。

将缓冲混合流体样本施加于固相装置中膜的施加点上或施加于施加垫（如果存在）上。在使膜与缓冲混合流体样本接触后，将所述膜维持在能使流体通过毛细作用移动到并通过膜的条件。分析物涂覆颗粒（和分析物（如果样本中存在））因来自缓冲混合流体样本的流体的毛细作用而移动到并通过膜上的样本捕捉区，且同时移动到并通过控制捕捉区。将所述膜维持在一定条件下（例如，足够时间和流体体积），以能使分析物涂覆颗粒通过毛细作用沿膜移动到并通过样本捕捉区，且同时移动到控制捕捉区，并且随后到达捕捉区之外（例如，进入芯吸垫），借此将任何未结合的颗粒从捕捉区中除去。

通过分析物涂覆颗粒与样本捕捉区中的样本捕捉剂结合，以及通过一些分析物涂覆颗粒与控制捕捉区中的控制捕捉剂结合，一些分析物涂覆颗粒的移动被阻滞。分析物涂覆颗粒与样本中的分析物（如果存在）竞争结合样本捕捉剂。样本捕捉剂通过与分析物涂覆颗粒上的分析物结合来结合分析物涂覆颗粒。如本文所使用，用语样本-试剂-分析物涂覆颗粒复合物是指样本捕捉剂与分析物涂覆颗粒的复合物。由于通过分析物涂覆颗粒上所关注分析物与样本捕捉区中样本捕捉剂的相互作用来捕捉分析物涂覆颗粒，故分析物涂覆颗粒被阻滞在样本捕捉区中，从而形成样本-试剂-分析物涂覆颗粒复合物。

控制捕捉剂通过与除分析物本身外的分析物涂覆颗粒的任何组分结合来结合分析物涂覆颗粒。如本文所使用，用语控制-试剂-分析物涂覆颗粒复合物是指控制捕捉剂与分析物涂覆颗粒的复合物。如上所述，由于通过分析物结合性颗粒与控制捕捉区中控制捕捉剂的相互作用来捕捉分析物涂覆颗粒，故分析物涂覆颗粒被阻滞在控制捕捉区中，从而形成控制-试剂-分析物涂覆颗粒复合物。

毛细作用随后将未被阻滞在样本捕捉区或控制捕捉区中的任何分析物涂覆颗粒向前移动到捕捉区外。在优选具体态样中，流体将未被阻滞在任一捕捉区中的任何接触的分析物涂覆颗粒移动到控制捕捉区后的芯吸垫中。

随后检测各样本捕捉区中所阻滞的分析物涂覆颗粒的量。使用针对分析物涂覆颗粒上所使用的标记类型的适当方式检测分析物涂覆颗粒。在优选具体态样中，通过光学方法，诸如通过测量分析物结合性颗粒标记的荧光量来检测分析物涂覆颗粒的量。以与检测样本捕捉区中分析物涂覆颗粒的量相同的方式检测被阻滞在控制捕捉区中的分析物涂覆颗粒的量。在一个具体态样中，如上所述，将分析物涂覆颗粒的量通过与沿固相（例如，膜）的位置存在的标记量直接相关的曲线来表示。举例来说，可测定膜上

各位置处（例如，样本捕捉区和控制捕捉区；和/或样本捕捉区与控制捕捉区之间的区域或者与样本捕捉区和控制捕捉区相邻的区域；和/或膜的其它区域）的颗粒量并且作为沿膜位置的距离的函数绘图。随后可将颗粒量计算为曲线下面积的函数，其与所存在的标记的量相关。

测定经校正的分析物涂覆颗粒的量，并且随后可使用适当算法由经校正的分析物涂覆颗粒量测定分析物的量。经校正的分析物涂覆颗粒的量是基于样本捕捉区中和控制捕捉区中所阻滞的分析物涂覆颗粒的量。举例来说，在一个具体态样中，经校正的分析物涂覆颗粒的量与样本捕捉区中存在的分析物涂覆颗粒量与控制捕捉区中存在的分析物涂覆颗粒量的比率（ R ）成反比。随后可利用标准曲线由经校正的分析物涂覆颗粒量（所述比率）测定所存在的分析物的量。标准曲线是通过制备一系列对照样本产生，所述对照样本含有待检测分析物的流体（诸如耗尽分析物的血清）中已知浓度的所关注分析物。然后对所述对照样本系列进行分析；测量各对照样本的 R 值；并且将 R 值作为对照样本中所包括的分析物浓度的函数绘图。通过测量含有未知量分析物的样本（“测试样本”）的 R 值来分析测试样本，并且通过参考标准曲线测定所述测试样本中分析物的浓度。如上所述，可产生一个标准曲线并且将其用于一组所有测试样本（例如，使用测试试剂的指定制备法得到的所有测试样本）；无需再产生各测试样本的标准曲线。在另一具体态样中，经校正的分析物涂覆颗粒的量与样本捕捉区中存在的分析物涂覆颗粒的量与控制捕捉区中存在的分析物涂覆颗粒量和样本捕捉区中存在的分析物涂覆颗粒量的总和的比率（ R ）成反比。随后可利用标准曲线由经校正的分析物涂覆颗粒的量（所述比率）测定所存在的分析物的量。或者，可使用其它比率和/或标准曲线测定样本中分析物的量。此外，需要时，可如先前关于夹心分析所述，在计算比率（ R ）之前从样本捕捉区中存在的分析物涂覆颗粒的量和控制捕捉区中存在的分析物涂覆颗粒的量中扣除背景中存在的标记量。

如果存在一种以上所关注分析物，那么使用被阻滞在针对各所关注分析物的样本捕捉区中的分析物涂覆颗粒的量分别测定针对各所关注分析物的经校正的分析物涂覆颗粒量。

本发明的益处

本发明的方法提供与分析物结合性颗粒被嵌入固相装置的膜内的分析相比，灵敏性增强的分析。举例来说，对于夹心分析，由于在施加到膜之前将待分析所关注分析物的流体样本与分析物结合性颗粒混合，故在膜中发生捕捉反应之前存在较长的时间供所关注分析物与分析物结合性颗粒结合。此外，由于所关注分析物与分析物结合性颗粒之间的相互作用是在流体相中发生，因此与在固相装置的膜基质中存在的所关注分析物与分析物

结合性颗粒之间的相同相互作用相比，颗粒的活动性更高，从而使结合更有效。此外，对于夹心分析与竞争分析，可将数量比可能嵌入固相装置中多的颗粒包括进流体收集装置中；所述较多的数量进一步增强反应的灵敏性。另外，由于分析物结合性颗粒（或分析物涂覆颗粒）是在将缓冲混合流体样本施加到固相膜之前分散于所述缓冲混合流体样本中，故颗粒经由流体的毛细作用以连续方式通过捕捉区，而不是以快速波形式通过流体前缘波峰。因此，较低浓度的颗粒经过较长时间流过捕捉区：由此有效地增加了可“捕捉”颗粒的时间，使得在通过捕捉区的颗粒量有效减少的同时在捕捉区产生高特异性结合，从而避免当颗粒通过流体前缘波峰时发生的一些颗粒对其它颗粒捕捉的非特异性物理阻断。此外，可使用一种内部对照进行多种分析物的评定，从而便于同时分析数种化合物。另外，样本捕捉区和控制捕捉区的分析条件尽可能相似：这是因为它们与施加点等距，故各捕捉区的流速极为相似。而且，由于样本捕捉区和控制捕捉区是在先前从未遭遇任何捕捉区的情况下遇到液体，故由流过第一样本捕捉区进入随后的第二样本捕捉区所引起的任何可能的干扰得以消除。

尽管已特别地关于免疫分析描述本发明的分析，但所述分析也可类似地利用如上所述的其它结合对（例如，核酸、受体-配体、凝集素-糖），使用与上文所述相同的方法，且以所希望的组分作为分析物和分析物结合剂。

本发明的套组

本发明还包括用于本文所述方法的套组。套组组件可包括：特异性结合对的第一和/或第二成员、缓冲液和/或缓冲液容器、流体收集工具、一个或一个以上固相装置（视情况包含施加垫和/或芯吸垫）、至少一个样本收集装置、一个或一个以上缓冲液容器、用来产生标准曲线和/或其它标准曲线信息的对照样本、分析物结合性颗粒、分析物涂覆颗粒和/或对照颗粒、捕捉剂、抗体、辅助收集待评定所关注分析物的样本的工具（药签）、处理装置（例如，有害生物物质废物袋）和/或关于样本收集装置的其它信息或说明（例如，批次信息、有效期等）。举例来说，在一个具体态样中，套组包含至少一个样本收集装置，所述装置内具有分析物结合性颗粒；在优选具体态样中，套组包含至少一个吸量管吸头，所述吸量管吸头内具有蒸发干燥、真空干燥或冷冻干燥的分析物结合性颗粒。在另一具体态样中，套组包含至少一个如本文所述的固相装置和至少一个样本收集装置。在另一优选具体态样中，套组包含至少一个吸量管、至少一个或一个以上具有蒸发干燥、真空干燥或冷冻干燥的分析物结合性颗粒的吸量管吸头，和至少一个固相装置。此优选具体态样也可视情况含有关于与吸量管吸头中分析物结合性颗粒有关的标准曲线、批次信息和/或有效期的信息。在另一优选具体态样中，套组包含至少一个样本收集装置、至少一个具有干燥分析物

结合性颗粒的吸量管吸头、至少一个固相装置，和至少一个缓冲液容器。此优选具体态样还可视情况在缓冲液容器内含有缓冲液，和供收集固体样本的工具（例如，药签）。

尽管已参考本发明的优选具体态样特别展示和描述本发明，但所属领域技术人员应了解，可在不偏离随附权利要求所涵盖的本发明范围的情况下对其中的形式和细节进行修改。

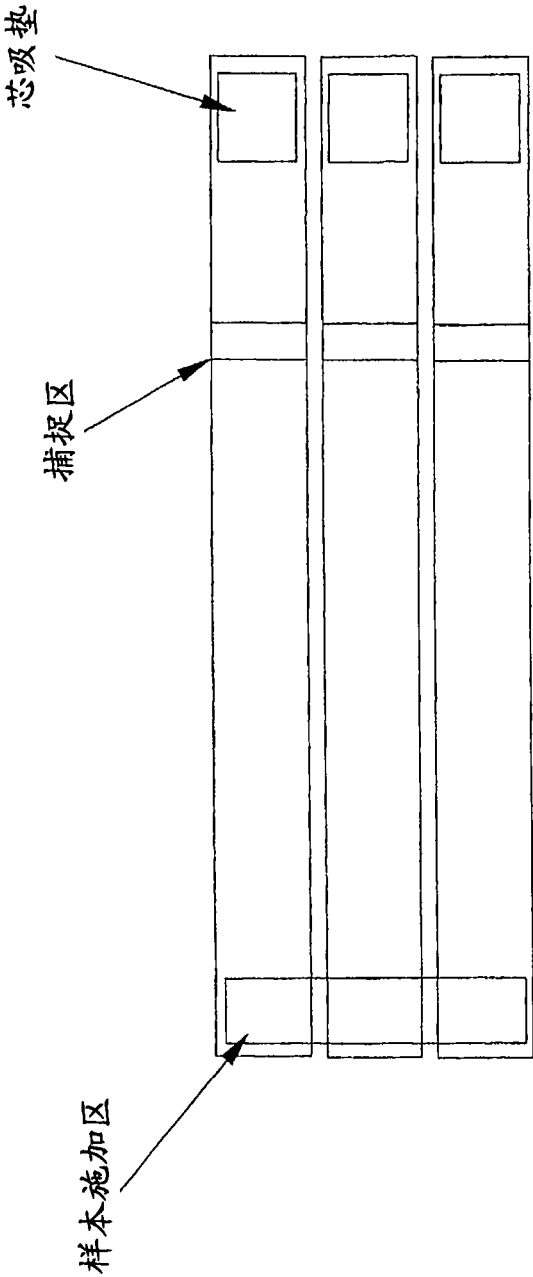


图 1

