

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101213458 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 16

(21) 申请号 200680017877. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2006. 05. 22

G01N 35/10(2006. 01)

(30) 优先权数据

审查员 飞竹玲

11/135, 928 2005. 05. 23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 11. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/019791 2006. 05. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02006/127631 EN 2006. 11. 30

(73) 专利权人 西门子医疗保健诊断公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 M·J·普吉亚 J·A·普罗菲特

L·S·舒尔曼 C·T·齐默勒 H·郭

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 林森

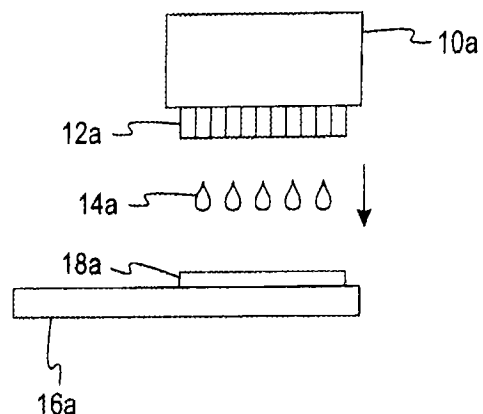
权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

诊断液体向诊断试剂上的分配

(57) 摘要

通过在包含试剂的表面上产生均匀样品层的方法沉积生物流体样品。在一个实施方案中,采用具有多个开口的喷嘴将样品同时沉积在包含试剂的表面上。在可选实施方案中,样品的单个滴以一定模式且优选以一系列平行的行被沉积在表面上。从通过光学方法获得的包含试剂的表面的光谱图像中读取在生物样品与试剂之间的反应。



1. 一种将生物流体的样品均匀地沉积在表面上的方法,所述表面具有包含用于与所述生物流体中的分析物进行反应的试剂的区域,所述表面相对于所述流体是疏水的;

所述方法包括:

(a) 将所述生物流体置于与喷嘴进行液体连通的储器中;

(b) 将所述生物流体以具有在 0.1 至 2mm 的范围内的直径的滴从所述喷嘴分配到所述包含试剂的区域上;

(c) 从包含试剂的区域的光谱图像中读取在所述生物流体与所述试剂之间的反应的结果;

其中足够的滴被分配以同时覆盖包含试剂的区域。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中滴以一系列行被分配从而覆盖包含试剂的区域。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中通过将光引导到所述光谱图像的预定部分上并测量从所述光谱图像的每个部分反射的光而读取在所述生物流体与所述试剂之间的反应的结果。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述喷嘴被设置成与所述试剂区域距离 1 至 5mm。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中喷嘴具有用于分配所述滴的开口,所述开口具有 100  $\mu\text{m}$  至 1000  $\mu\text{m}$  的直径。

6. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述光谱图像的所述预定部分由整个试剂区域组成。

7. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述光谱图像的所述预定部分由被一个滴所接触的区域组成。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中在由一系列滴接触的一系列区域中读取在所述生物流体与所述试剂之间的反应的结果。

9. 一种将生物流体的样品均匀地沉积在表面上的方法,所述表面具有包含用于与所述生物流体中的分析物进行反应的试剂的区域,所述表面相对于所述流体是疏水的;

所述方法包括:

(a) 将所述生物流体置于与喷嘴进行液体连通的储器中;

(b) 将一种或多种试剂液体置于与 (a) 的所述喷嘴或者第二喷嘴进行液体连通的一个或多个储器中;

(c) 将所述生物流体以具有在 0.1 至 2mm 的范围内的直径的滴从 (a) 的所述喷嘴分配到所述包含试剂的区域上;

(d) 将 (b) 的一种或多种试剂液体以具有在 0.1 至 2mm 的范围内的直径的滴从 (a) 的所述喷嘴或者第二喷嘴分配到所述包含试剂的区域上,所述分配在对 (c) 的所述生物流体进行所述分配之前、期间或之后发生;和

(e) 从包含试剂的区域的光谱图像中读取在所述生物流体与所述试剂之间的反应的结果;

其中足够的滴被分配以同时覆盖包含试剂的区域。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中 (b) 的一种或多种试剂液体在分配所述生物流体之前被分配到所述试剂区域上。

11. 根据权利要求 9 所述的方法,其中 (b) 的一种或多种试剂液体在分配所述生物流体

之后被分配到所述试剂区域上。

12. 根据权利要求 9 所述的方法,其中 (b) 的所述一种或多种试剂液体在分配所述生物流体期间被分配到所述试剂区域上。

13. 根据权利要求 9 所述的方法,其中滴以一系列行被分配从而覆盖包含试剂的区域。

14. 根据权利要求 9 所述的方法,其中通过将光引导到所述光谱图像的预定部分上并测量从所述光谱图像的每个部分反射的光而读取在所述生物流体与所述试剂之间的反应的结果。

15. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述喷嘴被设置成与所述试剂区域距离 1 至 5mm。

16. 根据权利要求 9 所述的方法,其中喷嘴具有用于分配所述滴的开口,所述开口具有 100  $\mu\text{m}$  至 1000  $\mu\text{m}$  的直径。

17. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述试剂区域的所述预定部分由整个试剂区域组成。

18. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述试剂区域的所述预定部分由被一个滴所接触的区域组成。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中在由一系列滴接触的一系列区域中读取在所述生物流体与所述试剂之间的反应的结果。

20. 一种用于测量生物流体的样品的分析物含量的装置,所述生物流体的样品被均匀地分配到包含用于与所述分析物进行反应的试剂的表面上,所述表面相对于所述流体是疏水的;

所述装置包括:

(a) 用于分配所述生物流体的样品的喷嘴,所述喷嘴包含具有 100  $\mu\text{m}$  至 1000  $\mu\text{m}$  的直径的一个或多个开口并被设置在所述包含试剂的表面上方 1 至 5mm 处;

(b) 用于将所述生物样品供应至 (a) 的所述喷嘴的储器;和

(c) 用于相对于所述表面对所述喷嘴进行定位或者相对于所述喷嘴对所述表面进行定位的工具,由此所述喷嘴开口将所述生物流体的样品分配到所述包含试剂的表面的预定区域上;

其中所述表面的所述预定区域是整个包含试剂的区域。

21. 根据权利要求 20 所述的装置,其中所述表面的所述预定区域是由所述喷嘴开口所分配的一个滴接触的区域。

22. 根据权利要求 20 所述的装置,进一步包括用于从包含试剂的表面的光谱图像中读取在所述生物流体与所述试剂之间的反应的结果的工具。

23. 根据权利要求 22 所述的装置,其中所述用于读取在所述生物流体与所述试剂之间的反应的结果的工具包括被引导到所述光谱图像的预定部分上的光的光源和用于测量从所述光谱图像的所述预定部分反射的光的检测器。

24. 根据权利要求 23 所述的装置,其中所述光谱图像的所述预定部分由整个包含试剂的表面组成。

25. 根据权利要求 23 所述的装置,其中所述光谱图像的所述预定部分由被一个滴所接触的区域组成。

26. 根据权利要求 23 所述的装置,其中所述光谱图像的所述预定部分由所述包含试剂的表面的部分组成。

27. 根据权利要求 20 所述的装置,进一步包括用于将试剂液体分配到所述包含试剂的表面上的工具。

28. 根据权利要求 27 所述的装置,其中所述用于分配包含试剂的液体的工具包括喷嘴,所述喷嘴包含具有  $100\ \mu\text{m}$  至  $1000\ \mu\text{m}$  的直径的一个或多个开口并被设置在所述包含试剂的表面上方 1 至 5mm 处。

29. 根据权利要求 28 所述的装置,进一步包括用于相对于所述包含试剂的表面对所述喷嘴进行定位或者相对于所述喷嘴对所述表面进行定位的工具,由此所述喷嘴开口将所述试剂液体分配到所述包含试剂的表面的预定部分上。

## 诊断液体向诊断试剂上的分配

### 发明领域

[0001] 本发明涉及用于测量生物样品中分析物的量的试剂和仪器,所述测量通过分析物与试剂进行反应以产生光学响应来实现。

### [0002] 发明背景

[0003] 已经开发出多种仪器来测量各种生物样品中分析物的量,所述生物样品例如尿、血液、唾液 (salvia) 或者黏液或组织的提取物。一般,样品液体被施加到包含与分析物发生反应的试剂的表面。该试剂产生可检测的响应,测量所述响应,并且所述响应与分析物的量相关。该表面本质上可以是亲水性或疏水性的,例如滤纸对比于聚苯乙烯。某些设备采用了组合,例如使用在疏水性聚苯乙烯柄上的亲水性滤纸垫的尿分析条试验。在通常的试验中,包含试剂的条被浸渍,也就是完全浸入液体样品中,并对样品中的分析物与试剂之间的反应进行测量,所述测量通常是通过光学方法来实现的。其它设备包括微芯片,所述微芯片采用了被连接至由聚苯乙烯模塑成型的毛细管的亲水性基底。试剂本身可以是水溶性的或者水不溶性的并且可以被干燥于支持表面上,如在试验条中那样。或者,它们可作为液体被加入到微芯片。其它液体试剂可被施加到已含有干燥试剂的表面上。一般,所述施加在已经施加样品后发生。出于与费用和便利性相关的明显的原因,样品体积应该尽可能地小。较不明显的是,在将少量液体试剂或生物样品施加到包含试剂的表面上时常常难以获得均匀且准确的响应。

[0004] 大多数生物样品和液体试剂将具有相当大的水含量且因此将与亲水性基底相容而与疏水性表面则不相容。当样品和试剂液体被分配时,所述样品和试剂液体迅速散布在亲水性基底上并被疏水性基底排斥。可通过毛细管作用或者直接地进行表面上的被分配的液体与试剂之间的接触。然而,当基底是相对疏水性的时,被分配的液体将在基底的表面上形成珠,这试图使其与表面的接触最小化。因此,被分配的液体并不均匀地散布在试剂上。与分配液体相关的另一个困难在于,干燥的试剂可能在本质上是水溶性的或者水不溶性的。水不溶性的干燥试剂可能不易于接近液体样品,或者可溶性试剂可能溶解并随着基底上的液体进行移动。因为试剂对样品的可测量的响应,例如显色,应该是均匀的以获得样品中分析物的准确读数,所以理想状况下该试剂应当与样品均匀地接触。

[0005] 与获得表面上的被分配液体与试剂之间的良好接触相关的另一个问题涉及到样品的物理性质。它们的物理性质如表面张力、粘度、总的固体含量、颗粒大小和附着力是有所变化的。因此,它们不易于以一致的体积被均匀地沉积在被试剂覆盖的基底上。同样地,随着液体样品量的减少,将一致量的具有变化性质的样品施加到试剂上变得越来越困难。相反,喷墨打印等依赖于为这种用途而开发出的并且具有一致的物理性质的液体。

[0006] 液滴的沉积是常见的操作。实例包括喷墨打印机,所述喷墨打印机是压电致动或者是气泡致动的,所述喷墨打印机从包含几飞升到几十纳升的直径为约 2 至 300  $\mu\text{m}$  (通常为 50  $\mu\text{m}$ ) 的多个小滴的受控沉积形成印刷物。已经提出了沉积小滴的其它方法,尽管它们与一般的喷墨打印机有所不同,但它们总体上采用压电原理来形成滴。其实例见于美国专利 5,063,396 ;5,518,179 ;6,394,363 ;和 6,656,432 中。通过注射器型移液管进行的较大

滴的滴沉积已知可在 3 至 100 $\mu$ L 的诊断系统中再现。这对应于约 2 至 6mm 的单个滴直径。这种移液管系统的商业化实例为 CLINITEK ALTAS<sup>®</sup> 尿分析分析仪。依赖于喷嘴的形状、泵的类型以及所施加的压力,滴的大小可大于或小于喷嘴的大小。

[0007] 在液体样品作为滴被分配到包含试剂的垫上时,特别地观察到上面讨论的问题。申请人发现,当样品作为滴被添加,而不是正如经常进行的那样通过将试剂垫浸入(将试剂垫浸渍)在样品液体内而完全覆盖试剂垫时,垫的表面与试剂间的相互作用形成不准确的响应。3 至 100  $\mu$  L 数量级的大滴在基底疏水性过强时不转移入试剂中而是在表面上形成气泡。如果表面是亲水性的,则所述大滴会以过多的流体覆没试剂。几飞升至几十纳升的较小滴在被沉积在疏水性过强的基底上时也会产生问题,这是因为它们缺少完全覆盖表面区域的体积并且将会以不均匀的模式随机地聚集。小滴还允许用于使水溶性试剂迁移的开放空间。这些微小的滴还倾向于蒸发液体且形成气溶胶,如果所述气溶胶包括尿或血液样品,则所述气溶胶被认为是具有生物危害性的。因此,如果液体要作为滴被沉积在试验垫上,而不是将垫浸渍在样品中,则需要改进。

[0008] 在被分配的液体与试剂之间完全接触后,可采用几种方法中的一种方法读取结果。通常采用光学方法,所述光学方法依赖于光谱信号以产生响应。结果必须是可再现的以成为有用的。光学测量受到被观察的试剂区域的影响且受到允许被分配的液体与试剂发生反应的时间的影响。视野内不均匀区域的形成和所需反应时间量的变化增大了误差。例如,对不均匀地散布在基底上的样品或试剂进行的测量在每次进行读取时给出不同的结果。

[0009] 对于开发和改进分析生物样品的方法的技术人员而言,提供准确且一致的结果是他们永远的目标。本发明人提出了新的方法,所述方法用于当液体生物样品或液体试剂被沉积在包含干燥的试剂的表面上时,特别是当样品作为滴被沉积时,改进所获得的结果。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明包括将生物流体和液体试剂(“液体”)均匀地沉积到具有包含与生物流体中的分析物进行反应的试剂的区域(“试剂区域”)的表面上,以及用于实现该方法的装置。由生物流体中的分析物与试剂进行的反应导致产生的光学响应作为光谱图像被观察到,可在图像的预定区域中对所述光谱图像进行检查。

[0012] 利用被设置在接近包含试剂的表面的位置处,例如处于距离该表面 1-5mm 的位置处的喷嘴来分配生物流体或液体试剂。该液体作为滴被分配,所述滴具有约 0.1 至 2.0mm (100 至 2000  $\mu$  m) 的平均直径和在从微升至纳升的范围内的平均体积。试剂区域,或者邻近该试剂区域的区域,为被分配的液体所覆盖,且所产生的反应作为使被分配的液体与包含试剂的表面进行反应所需时间的函数,在包含试剂的区域的预定区域内通过光学方法被读取。整个包含试剂的表面可同时被覆盖,或者可选择地,其可按照与试剂进行均匀反应的顺序以预定的滴模式覆盖。

[0013] 在一个实施方案中,喷嘴中的多个开口同时分配多个滴以覆盖试剂区域的预定区域(参见图 1)。喷嘴中的每个开口具有约 0.1 至 1.0mm 的直径且能够产生为该开口直径的约 50% 至 200% 的滴。喷嘴开口被排列,从而覆盖试剂区域的预定区域面积。因此,喷嘴开口足以同时或者以多次通过覆盖表面上的预定区域,这可通过移动滴分配喷嘴或者移动包含试剂的表面或者移动两者来进行。

[0014] 在第二个实施方案中,喷嘴中的一个开口分配滴(参见图2)。喷嘴中的开口具有约0.1至1.0mm的直径且能够产生为该开口直径的约50%至200%的滴。可通过移动滴分配喷嘴或者移动包含试剂的表面或者移动两者,以预定的一系列行在包含试剂的表面上来回移动,例如横过试剂表面的约1至100次通过,形成模式。

[0015] 在第三个实施方案中,生物流体或者液体试剂通过单孔喷嘴或者多孔喷嘴被分配到邻近试剂区域的表面上,从而使滴通过毛细管作用均匀地转移入包含试剂的区域内(参见图3)。可通过一系列行在表面上来回移动,例如横过试剂表面的约1至100次通过,形成分配模式。

[0016] 在其它实施方案中,液体试剂(或多种试剂)在沉积生物样品之前、沉积生物样品之后或者随着生物样品的沉积而被施加到试剂区域上。优选地,在已经分配生物样品之后施加液体试剂。

[0017] 将包含试剂的区域暴露于适当波长的光以光谱图像的形式提供了与在生物样品中的分析物与试剂之间发生的反应相关的信息,在图像的预定区域中对所述光谱图像进行读取以更准确地测量生物样品中分析物的量。所述预定区域可以是整个包含试剂的区域、其部分或者由单个滴所覆盖的区域。

[0018] 附图简述

[0019] 图1示出了本发明的第一个实施方案中的分配液滴的多孔喷嘴的剖面图。

[0020] 图2示出了本发明的第二个实施方案中的分配液滴的移动喷嘴的剖面图。

[0021] 图3示出了本发明的第三个实施方案中的喷嘴和液体的剖面图。

[0022] 图4示出了被分配的液体在高疏水性试剂表面上的散布区域。

[0023] 图5示出了被分配的液体在高亲水性试剂表面上的散布区域。

[0024] 图6示出了作为时间和滴大小的函数的被分配液体的光学扫描。

[0025] 优选实施方案描述

[0026] 定义

[0027] 对本文中使用的下列术语作如下定义:

[0028] “光谱图像”指的是包含试剂的区域对沉积在该包含试剂的区域上的生物样品的光学响应的详细视图,所述详细视图使得能够对整个包含试剂的区域的亚单位进行检查。

[0029] “亲水性”表面是具有在该表面与被置于其上的水滴之间的小于 $90^\circ$ 的接触角的那些表面。

[0030] “疏水性”表面是具有在该表面与被置于其上的水滴之间的 $90^\circ$ 或更大的接触角的那些表面。

[0031] “品质因数(FOM)”指的是经计算的性能量度,其中将在从存在和不存在分析物的样品获得的结果之间的平均差除以标准差的平方和的平方根,结果对没有分析物的样品与包含可检测的最低分析物浓度的样品进行了对比。

[0032] 通过本发明的方法实现的目标是用均匀的液体层覆盖包含试剂的表面,以获得改进的结果准确度。被分配的液体的每个部分与包含试剂的表面进行接触,且与试剂的相应部分进行直接接触,从而使得样品的每个部分中的分析物在液体被沉积的位置处发生反应。正如从下面进行的讨论中将要看到地,由于一般的包含试剂的表面相对于要与其进行反应的生物样品而言具有疏水性质或亲水性质,所以所述一般的包含试剂的表面可能不那

么适于分配滴。

[0033] 将包含试剂的表面浸渍在液体样品中实现了与试剂的完全且均匀的接触。本发明在无需浸入包含试剂的表面的情况下实现了相似的结果,并提供了几个优点。首先,通过分配滴而不是浸渍包含试剂的表面,使得需要更少的样品且通常减少了所需的干燥试剂和液体试剂的量。其次,可以去除诸如用手添加液体试剂的手工步骤。同样,自动分析变得更易于实现,在所述自动分析中,小的试验区域被置于卡或条上。卡或条或者喷嘴可被移动以允许对单个样品液体实施多个试验或者对多个样品实施单个试验。这导致能够根据需要分配到目标试剂区域上。

[0034] 对于本发明而言特别重要的是,可以获得的与标准的移液管系统相比改进了的准确度和精密度(可重复性)。改进的准确度和精密度由能够通过横过整个试剂区域观察聚焦光谱图像而读取作为时间和位置的函数的试剂对样品的响应的结果而产生。本发明中使用的小滴大小(直径在 0.1 至 1mm 的范围内)的特别优点在于它们易于被非常疏水的表面吸收,而大滴大小则不能。小滴大小的附加优点在于可分配出允许利用包含试剂的卡而无在相邻的试剂区域之间的遗留(carry-over)的模式。

[0035] 试剂对所吸收液体的作用

[0036] 实施了一系列试验以证实分配对于对生物样品与试剂的反应所进行的测量的准确度和精密度的影响。用 CHEKSTIX 液体(Bayer) 或者包含和缺乏要被检测的分析物的其它标准化的试验溶液对来自 MULTISTIX<sup>®</sup> 产品(Bayer) 的试剂进行试验。试剂表面的一些是疏水性的而其它试剂表面是亲水性的。被试验的试剂中的一些试剂是水溶性的而其它试剂是水不溶性的(参见表 1)。在所有的情况下,试剂都被包含在吸水性的(即吸收剂)材料的多孔垫上,所述吸水性的(即吸收剂)材料的多孔垫被置于作为基底的非多孔性聚苯乙烯膜之上。

[0037] 在第一项试验中,通过将包含试剂的垫的固定区域(5×5mm) 浸渍(浸入)在水性试验样品内而确定试剂的一般性能。通过该固定区域重量的变化来确定在浸渍后由试剂表面吸收的液体的最大体积。在第二项试验中,利用移液管将该相同最大体积作为大滴大小(1.7 至 20.4 μL) 分配到试剂表面上。通过 CLINITEK STATUS<sup>®</sup> 尿分析条读取器测量在分配大滴大小之后的试剂性能,并将所述试剂性能与当进行浸渍时的性能进行对比(参见表 2)。在第三项试验中,采用带有单个喷嘴的微型泵将一系列小滴大小(100nL 至 1μL) 分配到试剂表面上(图 1)。同样地,测量在分配小滴大小之后的试剂性能,并将所述试剂性能与在进行浸渍后的性能进行对比(参见表 2)。

[0038] 利用对一系列试验样品产生的响应测量作为品质因数(FOM) 的试剂性能,所述一系列试验样品缺乏或者包含被测量的分析物。品质因数(FOM) 计算为缺乏和包含低浓度分析物的两种试验样品的平均结果之间的绝对差除以在每个水平下观察到的标准差的平方和的平方根。较高的 FOM 值是优选的,但对于目前的试验而言,至少 7-10 的值表示可接受的性能。计算出被浸渍的试剂和使得样品液体作为大滴大小和理想滴大小被分配的试剂的品质因数(FOM) 值(参见表 1 和表 2)。

[0039] 表 1. 浸渍在试验液体中之后试剂表面的性能

[0040]

试剂用于	样品体积 ( $\mu\text{L}$ )	试剂垫的表面能	试剂的水溶性	FOM
尿胆素原	7.4	亲水性的	不溶	10.1
潜血	7.4	亲水性的	不溶	15.3
pH	7.4	亲水性的	不溶	21.0
蛋白质	8.3	亲水性的	可溶	38.0
肌酸酐	6.5	亲水性的	可溶	13.9
胆红素	14.1	亲水性的	可溶	28.1
比重	9.5	亲水性的	不溶	13.5
亚硝酸盐	20.4	亲水性的	非常可溶	19.9
白细胞	17.0	亲水性的	非常可溶	12.1
酮	6.5	亲水性的	非常可溶	11.3
清蛋白	8.3	疏水性的	不溶	13.0
葡萄糖	1.7	非常疏水的	不溶	19.2
无试剂的 聚苯乙烯	0.2	非常疏水的	NA	NA

#### [0041] 用移液管对滴移液与浸渍的对比

[0042] 显然,包含试剂的垫在被浸渍时依赖于组成吸收了变化量的液体(表1)。一般来说,非常疏水的试剂表面吸收的液体更少。具有70达因(dynes)/ $\text{cm}^2$ 的表面张力的非常疏水的聚苯乙烯表面保持了仅0.2 $\mu\text{L}$ 的膜。在具有相似表面能的干燥试剂中发现了所获得的液体量的明显变化,且这种变化受到试剂成分的影响。

[0043] 在采用移液管来分配相对较大的样品滴(1.7至20.4 $\mu\text{L}$ )的附加试验中未提供如所需的均匀的来自试剂的响应(参见表2)。大滴的FOM值比浸渍的FOM值低。当样品中含有分析物的结果与样品中不含分析物的结果之间的差别小且标准差大时,FOM值更小。因此,当采用大滴时,对样品液体中的分析物进行的测量的准确度和一致性更差。性能差有几个原因。大滴不能对非常疏水的试剂(例如葡萄糖)作出响应,原因在于所述滴不进入多孔垫并与干燥试剂相接触。滴在试剂表面上形成球且并不散布(参见图4,其中滴的直径并未随着液体的添加而增加)。另一个原因是,由于试剂随着滴在表面上的散布而进行迁移,所以被施加到具有水溶性液体(例如白细胞)的试剂上的大滴相对于浸渍而言具有差的响

应。大滴由于压倒了吸水容量而在多孔垫上产生了过多的液体,从而导致进行迁移。这还增加了将在应该接收单独的液体样品的干燥试剂区域之间发生遗留污染的可能性。造成大滴性能差的最后原因在具有水不溶性试剂(清蛋白)的疏水性表面中被观察到。在这种情况下,对被分配液体的差的吸收产生了不均匀的施加和不均匀的信号。

[0044] 通常情况下,滴被施加到每个垫的中间。观察到的液体覆盖度取决于滴的大小(参见与图4形成对比的图5)以及所施加的总体积。发现通过移液管用液体填充试剂垫的量经常小于通过浸渍发现的量。通常情况下,需要约6-8  $\mu\text{L}$  的总的液体体积以在用移液管移取与浸入试验溶液之间达到一致的性能。得到的结论是,与浸渍相比,当以滴沉积样品液体时,获得等同的性能需要样品的精确沉积。基于所获得的最佳FOM来选择以滴分配的理想液体体积(参见表2)。当沉积小滴时,利用多个滴来实现理想的总体积。得到的结论是,依赖于试验垫的性质,作为滴被沉积的液体体积应该有所变化以确保等同的性能。当这样做时,对于所有的试剂表面类型而言,利用小滴大小实现的FOM等于或超出了浸渍的性能(对比表1和表2)。

[0045] 表2. 沉积试验液体的滴之后试剂表面的性能

[0046]

	大滴大小 (1.7 $\mu\text{L}$ 至 20.4 $\mu\text{L}$ )		小滴大小 (100nL 至 1 $\mu\text{L}$ )	
	观察	FOM	观察吸收	FOM
试剂用于	观察	FOM	观察吸收	FOM
尿胆素原	吸收	9.8	吸收	11.2
潜血	吸收	14.9	吸收	17.3
pH	吸收	22.0	吸收	36.5
蛋白质	过度吸收	3.5	吸收	41.2
肌酸酐	过度吸收	8.4	吸收	14.1
胆红素	过度吸收	3.4	吸收	27.6
比重	吸收	9.6	吸收	13.3
亚硝酸盐	过度吸收	6.1	吸收	22.3
白细胞	过度吸收	2.3	吸收	15.3
酮	过度吸收	8.4	吸收	12.1
清蛋白	弱吸收	6.3	吸收	10.6
葡萄糖	不吸收	0.1	吸收	10.6

[0047] 体积和滴大小以及分配模式的作用

[0048] 除了需要将通过移液管将样品液体移液到试剂垫上所获得的结果的性能与液体体积相关联以外,确定所沉积的体积是如何对液体散布产生影响的也是重要的。已经开展了研究来评价液体滴量的增加对于在亲水性表面和非常疏水的试剂表面上的液体散布的作用。发现正如可能预期的情况那样,随着滴大小增加,亲水性试剂垫上的液体直径增加(参见图 5)。但是,对于非常疏水的试剂垫(葡萄糖)的情况而言,当使用大滴时,液体几乎不发生吸收和膨胀(参见图 4)。然而,令人惊奇的发现是,当滴大小小于 100nL 时,该液体则被瞬间吸收并发生膨胀(相对于滴大小而言)。也就是说,当滴小时,疏水性试剂垫的行为如同其是亲水性的。得到的结论是,优选沉积多个较小的滴以提供均匀的覆盖度。同样地,通过控制样品体积,应该可能更有效地利用可得到的试剂垫。

#### [0049] 疏水性表面的问题

[0050] 当试剂垫是非常疏水的时,例如在这些试验中使用的葡萄糖垫,液体样品难以以大的滴穿透该垫。(注意图 4 所示的关于液体吸收的试验结果)。在葡萄糖垫中,这种情况可以被有意地进行以限制样品液体的进入。由样品中的葡萄糖与试剂的反应所带来的颜色变化仅发生在液体接触到位于被置于表面上的滴的底部下面的表面的情况下。因此,优选将多个小滴沉积在限定区域上以获得最佳结果,而不是通过移液管移液大滴。当这种情况被进行时,可获得等于或优于浸渍性能的性能(注意表 2 中示出的利用小滴所获得的 FOM)。

#### [0051] 沉积到包含试剂的区域上

[0052] 图 1 示出了本发明的第一个实施方案,其中从液体室 10a 中供应喷嘴 12a,且多个喷嘴开口将滴 14a 分配到包含试剂的区域 18a 上,所述包含试剂的区域被支持在疏水性表面 16a 上。

[0053] 图 2 示出了本发明的第二个实施方案,其中从液体室 10b 中供应喷嘴 12b,且单个喷嘴开口将滴 14b 分配到包含试剂的区域 18b 上,所述包含试剂的区域被支持在疏水性表面 16b 上。在该实施方案中,使喷嘴移动或者使包含试剂的区域相对于喷嘴移动以便以预定模式沉积滴。

[0054] 液体也可被分配到非常疏水的基底上,例如聚苯乙烯基底的偏离试剂区域的部分上。这是本发明的第三个实施方案,示于图 3。液体室 10c 供应了喷嘴 12c,所述喷嘴将滴 14c 分配到与包含试剂的区域 18c 相邻的疏水性表面 16c 上。液体样品将通过毛细管作用迁移至包含试剂的区域。毛细管作用可通过聚苯乙烯中的将流体引导至试剂的毛细管来实现或者通过试剂区域中的借助于毛细作用将液体引入的毛细管来实现。对于大滴而言,液体接触是差的。比处于试剂中或者处于聚苯乙烯中的毛细管大的滴不转移入试剂中;相反,所述滴形成了气泡。

[0055] 在两个试验情形中,一滴 4 $\mu$ L 的大滴以及 40 滴 0.1 $\mu$ L 的小滴被施加到偏离葡萄糖试剂区域的聚苯乙烯上。在第一种情形中,试验滴被放置成与 4mm 长的 150 乘以 100 微米的微毛细管相接触,所述微毛细管与葡萄糖试剂区域相接触。大滴未在 60 秒内被转运通过毛细管,而较小的滴则在几秒钟内移动通过毛细管并进入试剂内。因此,仅在小滴的情况下才可测量到响应。在第二种情形中,试验滴被放置成与葡萄糖垫内部的毛细管相接触。大滴难以在小于 60 秒的时间内迁移进入垫内。由于垫包含多根毛细管,所以发生一些迁移。较小的滴易于进入垫。对于大滴的情形而言所确定的 FOM 小于 3,而对于小滴的情形而言,FOM 则为 22.1,从而证明了施加小滴带来的性能优势。当用包含用于检测 hCG、hbA1c 和

Uristatin 的免疫测定试剂的亲膜代替葡萄糖试剂时,对于小滴而言获得了相似的改进结果。

#### [0056] 水溶性试剂的问题

[0057] 当水溶性试剂存在于试剂表面中时,样品液体例如尿吸收所述水溶性试剂。随后,当液体在试剂区域上散布时,该水溶性成分随着液体在溶剂前部移动。这种迁移形成了不均匀的显色。关于水溶性成分的试验被用于进行迁移的测量。以大滴试验的白细胞试剂(包含水溶性成分)显示出基本上相同的结果,而不论样品的体积以及样品是否包含白细胞(FOM 小于 3,表 2)。然而,当试验垫被浸渍在样品液体中或者液体以小滴被施加时,易于确定白细胞的存在或不存在(FOM 大于 10,表 1 或表 2)。在进行浸渍或施加小滴的情况下,水溶性成分的散布都是明显的。由于重复施加小滴而实现的对试剂表面的同时覆盖限制了迁移并且使得发生的任何迁移为预测的模式。对于大滴(大于 3 $\mu$ L)的情况而言,随机聚集导致迁移的不均匀性。对于非常小的滴(小于 10nL)的情况而言,随机聚集还与蒸发一同发生。这不仅形成了不均匀的迁移而且还形成了缺乏被沉积的液体的开放空间。

[0058] 在一种可能的施加中,由于液体的散布受到滴体积和向试剂区域上的喷射模式的限制,所以可在连续的试剂表面(例如长的试剂带或者包含这种带的聚苯乙烯卡)上限定出多个试验区域,在分配喷嘴下面对所述连续的试剂表面进行进料。孔的间隔可被调节以允许在单独的试剂区域之间实现充分分离而不在不连续的反应区域之间形成液体连通。孔的间隔还可被调节以提供来自试剂的均匀响应并避免水溶性试剂的迁移。在试验情形中,表明可通过将分配模式正确地间隔开来而使得 1 $\mu$ L 及更小的滴在试剂带上以 5mm 乘以 6 被分离开来。通过光学读取头读取结果,所述光学读取头被这样放置,以将光引导在试验区域上并且在样品液体已经被喷雾在试验区域上之后的预定时间处接受反射光。

#### [0059] 将分配模式正确地间隔开来

[0060] 在一般的实施方案中,喷嘴将在试剂表面上方约 5mm 或更少的距离被间隔开。在图 1 至 3 中,喷嘴板被钻出孔,从而使滴垂直地落到试验区域上。该板也可以是弯曲的,以使滴以一定的角度下落。为了使交叉污染最小化,将使喷嘴与试验区域之间的距离尽可能的小,所述距离一般大于 1mm 且小于 5mm 以便获得准确的滴放置,如由滴大小以及它们的轨迹所决定的。

[0061] 正如用带所证实的那样,精确地沉积液体使得可能在包含试剂的基底上紧密地间隔开试验区域,同时避免了交叉污染。喷嘴开口的数目和大小将依赖于应用而有所变化,但是孔的直径应当大于 100  $\mu$ m,以避免形成气溶胶。由于喷嘴将被定径以将滴分配在给定大小的试验区域,所以一般情况是,当在试验区域上利用多个孔或多次通过时,喷嘴将至少大致具有试验区域的大小或者比所述试验区域的大小小得多。试验区域当然将是小的,比如说约 1 至 25mm<sup>2</sup>,并具有任何所需形状,虽然正方形或圆形是最普遍的。由于本发明的喷嘴提供了样品液体的准确放置,所以试验区域可被紧密地间隔开来,由此提高了分析的效率 and 准确度。依赖于试剂的水溶性,观察到,试验区域的间隔可紧密到约 1.3 至 10mm(从中心至中心),且相邻的边缘之间只有约 0.3 至 8mm。

#### [0062] 滴模式与光学图像的关系

[0063] 当采用将小滴分配到试剂区域上的这种方法时,有可能对读取试剂对样品的光学响应的方法进行改进。在常规技术中,通过将具有所需波长的光供应至所述区域并测量到

达光检测器的反射或透射光来确定对于整个试剂区域而言的试剂响应,例如显色。将所测量到的光的量与样品中的已经进行反应的分析物的量进行关联。实际上,读取出的的是试剂区域上所显颜色的平均值。更精确的测量将以对应于样品液体沉积的模式和方式对试剂区域进行照明。也就是说,光束可以在反应区域上来回移动(扫描)且可以每次一个点(像素)接收并测量反射或透射光。这种过程可被认为类似于常规电视机中阴极射线管在屏幕上扫描的模式。

[0064] 结果是,可在预定时间获得扫描的光谱图像以提供在试剂表面上的各个像素位置处的光谱信息。图 6 示出了在试剂表面上的沿 x 方向的光谱图像。在图 6 中,10 个像素等于 1mm,因此被检查的宽度为 10mm。结果可在选定的扫描区域上被平均并被报告为总的显色,随后将所述总的显色与试剂区域中存在的分析物进行关联。发现扫描的图像取决于时间和滴大小。当试剂包含水溶性成分时,由于正如前面提到地那样在溶剂前部发生了迁移,所以较大的滴大小(“C”)(8  $\mu$ L 或直径为 2.5mm)形成了更不均匀的模式,从而导致在滴的外边缘处较低的反射率。对于相同的试剂而言,在为试剂反应留出了足够时间的条件下,较小的滴大小(“A 和 B”)(20 滴直径为 0.5  $\mu$ m 的滴)形成了更均匀的模式。曲线 A 示出了进行分配之后不久的滴;曲线 B 示出了在更晚时间处的散布。对试剂的光学响应进行读取的这种方法特别良好地适用于将单独的滴分配成覆盖区域的轨迹,但这种方法也可与如上所述的其中利用了喷雾喷嘴的本发明的实施方案一起使用。

#### [0065] 滴大小的下限

[0066] 选择 100nL 的滴大小界限以适应作为样品液体的尿,所述尿包括对小于 100 $\mu$ m 的喷嘴孔送递一致大小的滴的能力造成影响粒子(例如细胞、管型、晶体、生物分子等)。进一步表明的是,大于 100  $\mu$ m 的孔直径允许充分的分离以便冲洗出粒子并防止产生遗留交叉污染。由于总的样品液体将等同于在作为单个滴由移液管送递的那种,在短时间段内比如说约 0.2 至 5 秒的时间段内送递了约 1 至 1000 个小滴,所以喷嘴孔被重复利用且必须不阻塞。所需的结果是,大于 100  $\mu$ m 的孔直径允许将数千滴的小滴均匀地沉积在反应区域上,以提供来自试剂的均匀响应。对于小于 100  $\mu$ m 的孔直径而言,观察到的附加问题是,液体在完成吸收之前蒸发以及气溶胶的形成。

[0067] 更一般而言,当流体是不含有颗粒的液体试剂且分配高度接近试剂表面时,被认为可使用直径小于 100  $\mu$ m 的滴。

#### [0068] 喷嘴排列

[0069] 可将来自源头的处于压力下的样品流体或试剂供应给喷嘴,所述源头例如可以是注射器泵、隔膜泵、加压容器、压电致动器、隔膜、蠕动、涡流、抽吸、离心等,其具有或不具有止回阀、分流器、气源以及通风。

[0070] 预期多种布置都落在本发明的范围内。可以预料到,喷嘴将被用在自动分析仪中,其中可利用它们对试验区域的优越覆盖度。例如,可使用多于 1 个喷嘴,所述喷嘴被排列成 1 至 20 个组,由 1 至 20 个液体源单独地或者成组地供应所述喷嘴。可单独地或成组地供应并更换所述喷嘴。由于在沉积了 100 至 1000 个样品之后可能需要更换所述喷嘴以进行清洗或处理,所以它们可能被以易于取出和更换的组进行制备。

[0071] 在另一实施方案中,并未通过从包含多个开口的喷嘴进行沉积而用样品液体同时覆盖整个试剂区域。相反,试剂区域被小滴以每次一个小滴覆盖,从而在试剂区域中扫描出

模式。该过程与喷墨打印机的类似之处在于，滴被沉积成行，但是与形成了通过无墨的空间分离开的字符不同，该过程覆盖了基本上所有的试剂区域且确保了所有的试剂与样品进行反应并尽可能地均匀。在这点上，沉积滴需要移动沉积喷嘴（或多个喷嘴）或者移动试剂区域或者移动两者。优选地，使试剂区域在固定的分配喷嘴（或多个喷嘴）下面移动。

[0072] 在约  $25\text{mm}^2$  的一般试剂区域中，可沉积一系列轨迹，所述沉积从一条边缘开始且沿平行的轨迹行进直至到达相对的边缘。每一轨迹的宽度可依赖于滴的大小以及每个滴在其落在试剂区域上之后的散布而有所不同。例如，对于具有 100 至  $1000\ \mu\text{m}$  的直径的滴而言， $25\text{mm}^2$  的试剂区域将被总计约 2500 至 25 个滴的约 50 至 5 个线性轨迹所覆盖。该过程将在仅约 0.01 至 2 秒的时间内被实现。可利用其它模式来覆盖整个反应区域，例如从区域中心开始并螺旋地向外移动直至到达区域的外边缘的圆形轨迹。

[0073] 在两个实施方案中，本发明包括具有一个或多个小孔的喷嘴（图 1 和图 2）的代用，所述一个或多个小孔具有约 100 至  $1000\ \mu\text{m}$  的直径。由于一般用于分析的单独的干燥试剂区域小，比如说约 1 至  $25\text{mm}^2$ ，所以喷嘴包括足够的开口，以尽可能少的通过用小滴覆盖可测量的量的试剂表面。由于这些小滴需要直径为约 100 至  $1000\ \mu\text{m}$  的喷嘴孔，所以对于要由喷嘴覆盖的每  $\text{mm}^2$  表面而言，孔的数目可在 1 至 10 个的范围内。

[0074] 除了利用单个喷嘴外，其它可能的排列包括多个喷嘴，每一个喷嘴由一个或多个容器来提供待分配的液体。喷嘴或多个喷嘴可从一个试验区域移动至另一试验区域，或者试验区域可在固定喷嘴下面移动。在一种排列中，采用多个喷嘴来将不同的液体样品分配到试剂上。例如，为了可用于 Clintek Atlas<sup>®</sup> 中，喷嘴必须被排列成将超过 40 个独立的尿样品分配到至少 12 个试剂上，所述 Clintek Atlas<sup>®</sup> 是自动尿分析仪 (Bayer Corporation)。喷嘴容器在样品之间还必须是可洗涤的。可选择的，可采用具有独立容器的喷嘴的排列，其中每个喷嘴分配独立的样品或者每个喷嘴分配相同的样品到独立的试验区域上。

#### [0075] 添加试剂

[0076] 在更常规的技术中，试剂被添加到吸水性表面，例如吸收剂垫上，且随后被干燥。该生物流体样品被添加，且在经过了足够的时间以进行显色或使得出现其它光学响应之后，包含试剂的表面被读取并与样品中分析物的量相关联。在本发明中，生物样品的精确沉积和试剂区域的光谱成像使得可能在对生物样品进行试验的时候根据需要沉积附加的试剂。

[0077] 在本发明的一个实施方案中，在生物样品已经被沉积在试剂区域上之后，附加的试剂（或多种试剂）被沉积在试剂区域的所有或选定部分上。

[0078] 可选择的，或者附加的试剂（或多种试剂）可在生物样品被置于试剂区域上之前沉积。这可用例如激活已经就位的其它试剂，或者用来添加具有较短的贮存期限的试剂，要不然可能无法使用所述具有较短的贮存期限的试剂。

[0079] 在又一实施方案中，附加的试剂（或多种试剂）可与生物样品同时被添加。该方法可提供细胞溶解、亲和反应、化学反应以及稀释所需的混合。

#### [0080] 在样品之后沉积液体试剂

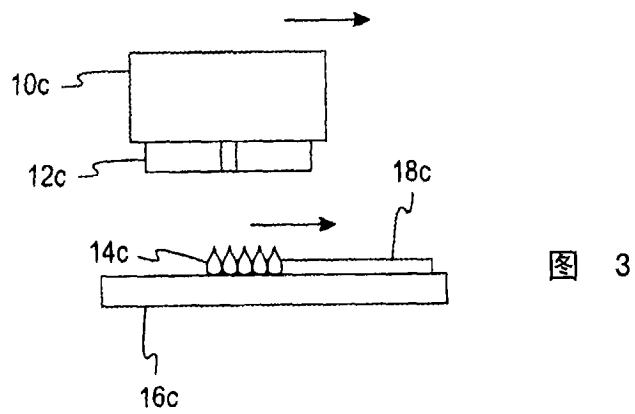
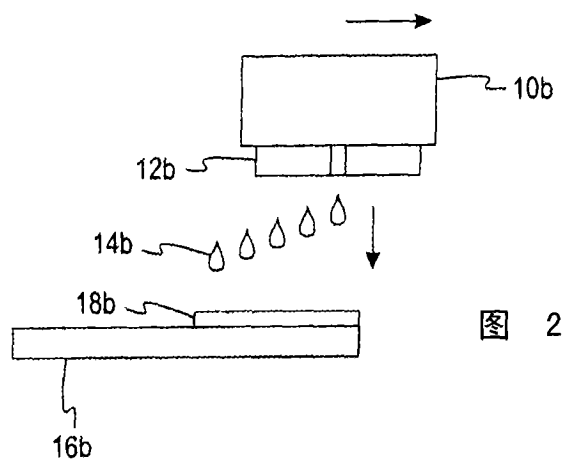
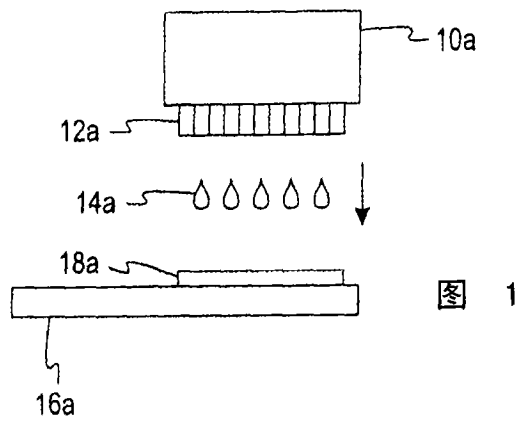
[0081] 液体可在样品已被添加之后被分配到试剂区域上。例如， $3\ \mu\text{L}$  的尿被添加到葡萄糖试剂上，随后添加  $3\ \mu\text{L}$  的 pH 6.5 的磷酸盐缓冲液。尿样品在 0 秒的时间与试剂进行液

体接触并且颜色反应开始进行。液体缓冲液在 10 秒后与试剂进行液体接触且颜色反应继续进行。当采用高比重的尿作为样品时,由于样品中的高氯化物含量抑制了葡萄糖试剂的结果,所以使得减小了 FOM。在样品之后施加第二液体试剂的情况下,由于稀释样品中溶解的盐被减少的缘故,所以低样品与高样品之间的变化被减小且 FOM 被改进了,如表 3 所示。

[0082] 表 3. 在分配样品随后分配试验液体之后葡萄糖试剂表面的性能

[0083]

	无第二液体试剂的小滴大小		有第二液体试剂的小滴大小	
	观察吸收	FOM	观察吸收	FOM
葡萄糖样品	观察吸收	FOM	观察吸收	FOM
低比重尿	吸收	10.6	吸收	12.2
高比重尿	吸收	5.4	吸收	11.3



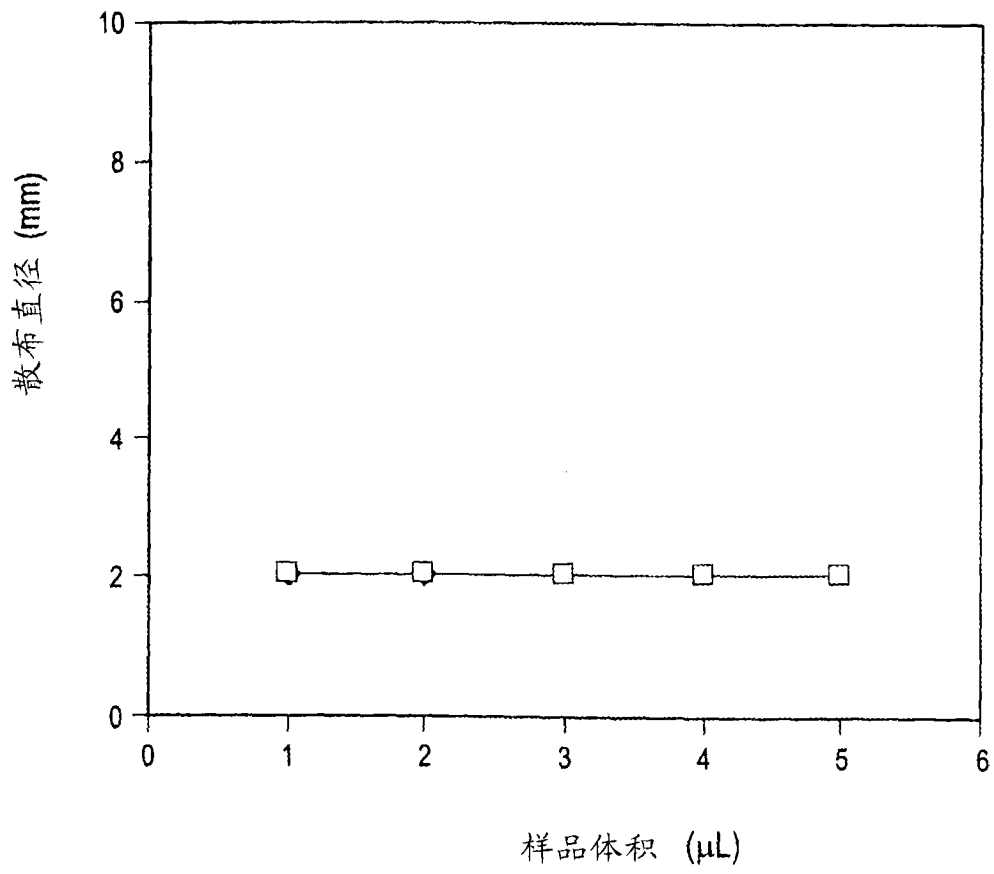


图 4

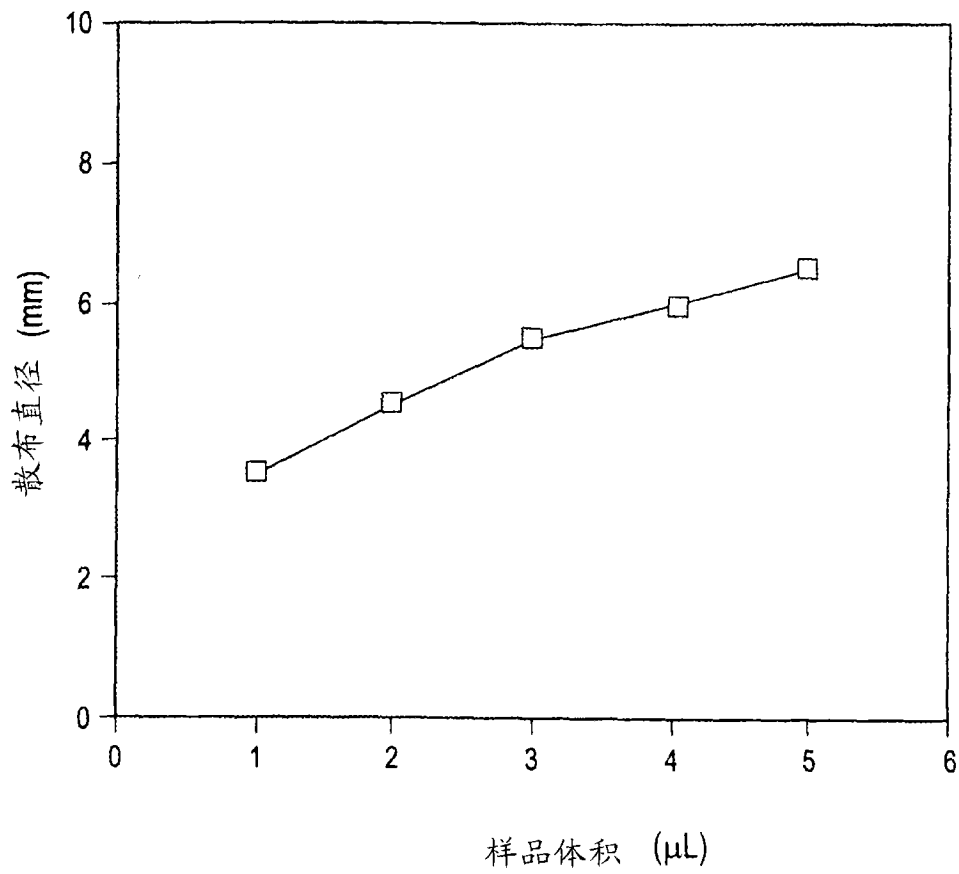


图 5

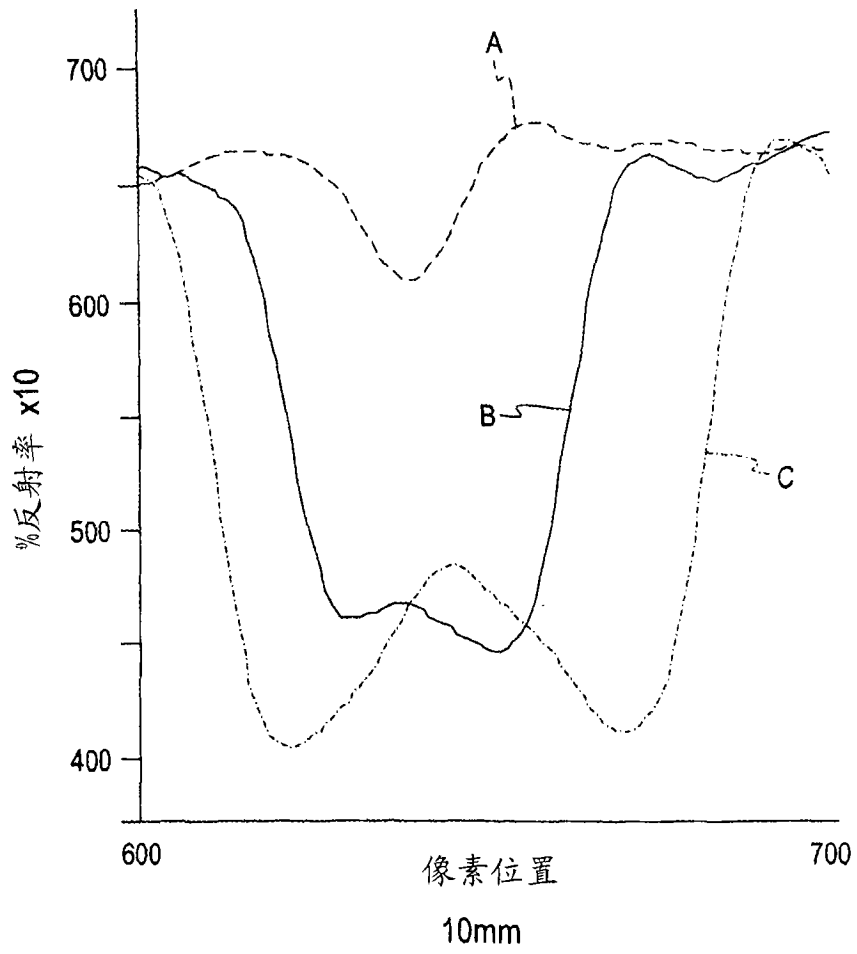


图 6