



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102576007 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201080026366. 6

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 04. 14

G01N 33/538 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/169, 700 2009. 04. 15 US

61/169, 660 2009. 04. 15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 12. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/031079 2010. 04. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02010/120917 EN 2010. 10. 21

(71) 申请人 瑞莱诊断体系股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 H·刘 R·K·迪纳洛 J·Z·张

G·H·谢拉 Z·叶 X·何 Z·吴

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

G01N 30/92 (2006. 01)

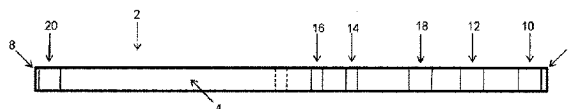
权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 13 页

(54) 发明名称

扩大测试条的动态范围

(57) 摘要

本发明提供具有扩大的动态范围的测试条用于进行试验以确定样品中分析物的存在或测量分析物的含量。还提供确定样品中分析物的存在或测量分析物含量的方法和检测前区样品的方法。



1. 一种测试条,所述测试条包括:

具有第一端和第二端的层析条,所述层析条包含至少一个第一反应区和第二反应区,其中各反应区含特异结合样品中可能存在的相同分析物的捕获剂;和

位于所述层析条第一端的吸收板,

其中所述测试条允许所述样品的侧流,从而随着在所述层析条中加入所述样品,该样品可流过各反应区,因此使反应区内的捕获剂结合至少部分分析物。

2. 如权利要求1所述的测试条,其特征在于,所述第二反应区中存在的捕获剂与所述第一反应区中存在的捕获剂相同。

3. 如权利要求1所述的测试条,其特征在于,所述第二反应区中存在的捕获剂与所述第一反应区中存在的捕获剂不同。

4. 如权利要求1所述的测试条,其特征在于,所述第二反应区中存在的捕获剂与所述第一反应区中存在的捕获剂相同,且其中存在于所述第一反应区的捕获剂的浓度或含量与存在于所述第二反应区的捕获剂的浓度或含量相同。

5. 如权利要求1所述的测试条,其特征在于,所述第二反应区中存在的捕获剂与所述第一反应区中存在的捕获剂相同,且其中存在于所述第一反应区的捕获剂的浓度或含量与存在于所述第二反应区的捕获剂的浓度或含量不同。

6. 如权利要求1所述的测试条,其特征在于,所述第二反应区中存在的捕获剂与所述第一反应区中存在的捕获剂相同,其中加入所述测试条的样品沿着所述测试条流向所述反应区直至其到达所述第一反应区,在所述第一反应区部分所述分析物被捕获剂俘获,因此消耗了分析物样品,其中所述样品继续流动直至其到达所述第二反应区,在所述第二反应区若样品中还剩有分析物,则其被所述捕获剂俘获,且其中检测样品中分析物的存在并任选地测量所述分析物含量。

7. 如权利要求3所述的测试条,其特征在于,所述第二反应区中存在的捕获剂的浓度或含量与所述第一反应区中存在的捕获剂的浓度或含量相同。

8. 如权利要求3所述的测试条,其特征在于,所述第二反应区中存在的捕获剂的浓度或含量与所述第一反应区中存在的捕获剂的浓度或含量不同。

9. 如权利要求1所述的测试条,其特征在于,所述测试条支持单向侧流。

10. 如权利要求1所述的测试条,其特征在于,所述测试条支持双向侧流。

11. 如权利要求1所述的测试条,其特征在于,所述测试条还包括第三反应区,其中所述第三反应区含有特异结合相同分析物的捕获剂,其中加入所述测试条的样品沿着所述测试条流向所述反应区直至其到达所述第一反应区,在所述第一反应区部分所述分析物被存在于该第一反应区内的捕获剂俘获,其中所述样品继续流动直至其到达所述第二反应区,在所述第二反应区所述分析物再次结合存在于该第二反应区内的捕获剂,其中所述样品继续流动直至其到达所述第三反应区,在所述第三反应区若样品中还剩有分析物,则其被存在于该第三反应区内的捕获剂俘获,且其中检测样品中分析物的存在并任选地测量所述分析物含量。

12. 如权利要求1所述的测试条,其特征在于,所述测试条还包括第三反应区,且其中存在于所述第二和第三反应区内的捕获剂与存在于所述第一反应区的捕获剂相同。

13. 如权利要求1所述的测试条,其特征在于,所述测试条还包括第三反应区,且其中

存在于所述第二或所述第三反应区内的捕获剂与存在于所述第一反应区的捕获剂不同,但其中各捕获剂特异结合所述样品中相同的分析物。

14. 如权利要求 1 所述的测试条,其特征在于,所述测试条还包括第三、第四、第五、第六、第七或第八反应区,且其中存在于任何反应区内的捕获剂可以但不必要与存在于任何其他反应区的捕获剂不同,且其中各捕获剂特异结合所述样品中相同的分析物。

15. 如权利要求 1 所述的测试条,其特征在于,其中所述测试条还含加入样品的样品添加区,其中样品加入时沿着所述测试条从所述样品添加区流向所述第一反应区和随后的第二反应区。

16. 如权利要求 15 所述的测试条,其特征在于,所述样品添加区位于所述层析条的第一端附近、第二端、或第二端附近。

17. 如权利要求 5 或 8 所述的测试条,其特征在于,所述测试条还含加入样品的样品添加区,其中样品加入时沿着所述测试条从所述样品添加区流向所述第一反应区和随后的第二反应区,且其中存在于所述第一反应区的捕获剂的浓度或含量比存在于所述第二反应区的捕获剂的浓度或含量高。

18. 如权利要求 5 或 8 所述的测试条,其特征在于,所述测试条还含加入样品的样品添加区,其中样品加入时沿着所述测试条从所述样品添加区流向所述第一反应区和随后的第二反应区,且其中存在于所述第一反应区的捕获剂的浓度或含量比存在于所述第二反应区的捕获剂的浓度或含量低。

19. 如权利要求 1 所述的测试条,其特征在于,当存在于所述样品中的分析物浓度为约 0.0001ng/ml- 约 1mg/ml 时,所述测试条能检测分析物的存在。

20. 如权利要求 15 所述的测试条,其特征在于,所述测试条还包括含偶联物的偶联区,其中所述偶联区位于所述样品添加区或所述样品添加区和所述第一反应区之间,且其中样品加入时沿着所述测试条在到达所述第一反应区和所述第二反应区之前从所述样品添加区流向所述偶联区。

21. 如权利要求 20 所述的测试条,其特征在于,所述测试条包括含所述偶联物的偶联板,其中所述偶联板位于所述偶联区内。

22. 一种包含层析条的测试条,所述层析条含至少两种反应区域,第一反应区和第二反应区,其中各反应区含特异结合样品中可能存在的相同分析物的捕获剂,且其中所述两种或更多的反应区扩大所述测试条的动态范围。

23. 如权利要求 22 所述的测试条,其特征在于,所述测试条还包括第三反应区,其中所述第三反应区含有特异结合相同分析物的捕获剂。

24. 如权利要求 22 所述的测试条,其特征在于,所述测试条的动态范围在所述分析物浓度的低端扩大。

25. 如权利要求 22 所述的测试条,其特征在于,所述测试条的动态范围在所述分析物浓度的高端扩大。

26. 如权利要求 22 所述的测试条,其特征在于,所述测试条的动态范围在所述分析物浓度的低和高端扩大。

27. 一种检测样品中存在分析物的方法,所述方法包括:

(a) 将样品递送给如权利要求 1 或 22 所述的测试条,

(b) 使所述样品沿着所述测试条流向所述反应区直至其接触所述第一反应区和随后的第二反应区；

(c) 通过在所述第一反应区内捕获至少部分分析物来逐渐耗尽所述分析物样品，且若所述样品中剩有所述分析物，则接着在所述第二反应区中捕获；

(d) 基于所述第一反应区、所述第二反应区或其组合内测量的信号强度，检测所述样品中分析物的存在；和任选地，

(e) 测量所述样品中所述分析物的含量。

28. 如权利要求 27 所述的测试条，其特征在于，所述测试条还包括第三反应区，所述第三反应区含有特异结合所述样品中相同分析物的捕获剂，其中检测所述样品中分析物的存在是基于所述第一反应区、所述第二反应区、所述第三反应区或其任何组合检测的信号强度。

29. 如权利要求 27 或 28 所述的方法，其特征在于，测定所述样品中分析物的存在或所述样品中分析物含量仅基于所述第一反应区的信号强度测量。

30. 如权利要求 27 或 28 所述的方法，其特征在于，测定所述样品中分析物的存在或所述样品中分析物含量仅基于所述第二反应区的信号强度测量。

31. 如权利要求 27 或 28 所述的方法，其特征在于，测定所述样品中分析物的存在或测量所述样品中分析物含量是基于所述第一反应区和所述第二反应区的信号强度的结合。

32. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，测定所述样品中分析物的存在或测量所述样品中分析物含量是基于所述第一反应区、所述第二反应区和所述第三反应区的信号强度的结合。

33. 如权利要求 27 所述的方法，其特征在于，所述信号为反射、荧光、发光、放射、或射频信号。

扩大测试条的动态范围

[0001] 本申请要求 2009 年 4 月 15 日提交的题为“Expanding the Dynamic Range of a Test Strip”(扩大测试条的动态范围)的美国临时申请第 61/169,660 号,和 2009 年 4 月 15 日提交的题为“Diagnostic Devices and Related Methods”(诊断装置和相关方法)的美国临时申请第 61/169,700 号的优先权,这两个公开通过引用全文纳入本文。

背景技术

[0002] 侧流试验为快速测试,其使用户可在医疗点环境下检测生物流体中感兴趣的分析物。然而用此方法的当前试验和测试条有许多缺点限制了其有效性。例如,相对于用包括在大型临床分析仪中进行的不同方法的试验,所述动态范围受限制。样品需要稀释从而可用所述侧流方法测量生理相关范围内的浓度。

[0003] 此外,许多所述当前试验倾向于展示高剂量钩效应(也称为前区),其中非常高浓度的分析物在侧流试验中可产生降低的响应或无响应。这种情况下无法区分高浓度样品的响应和含很少或不含分析物的样品的响应。

[0004] 因此,需要动态范围扩大的侧流试验方法,其省去稀释样品的需要且可检测高剂量钩效应对试验结果有影响的样品。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明部分基于发现具有扩大的动态范围的侧流试验方法,所述方法可省去稀释样品的需要且可测量前区样品。因此本发明提供用于检测样品中分析物的存在或测量其含量的试验和方法的测试条。

[0007] 本发明的一个实施方式中,提供了含层析条的测试条,所述层析条含至少两种反应区域,第一反应区和第二反应区,其中各反应区含特异结合样品中可能存在的相同分析物的捕获剂,且所述两种或更多的反应区扩大所述测试条的动态范围。

[0008] 本发明的另一实施方式中,提供了含层析条的测试条,所述层析条具有第一端和第二端,其包含至少一个第一反应区和第二反应区,其中各反应区含特异结合样品中可能存在的相同分析物的捕获剂。所述测试条在所述层析条的第一端还包括吸收板并允许所述样品的侧流从而随着在所述层析条中加入所述样品,该样品可流过各反应区,因此使反应区内的捕获剂结合所述样品中存在的至少部分分析物。

[0009] 本发明的另一实施方式中,提供了样品中分析物存在的检测方法。所述方法包括步骤:给本发明测试条递送样品;使所述样品沿着所述测试条流向所述反应区直至到达所述第一反应区和随后的第二反应区;通过在所述第一反应区内捕获至少部分分析物来逐渐耗尽所述分析物样品,且若所述样品中剩有所述分析物,则接着在所述第二反应室中继续;基于所述第一反应区、所述第二反应区或其组合内测量的信号强度,检测所述样品中分析物的存在;和任选地,测量所述样品中所述分析物的含量。

[0010] 附图简要说明

[0011] 图 1-11 描述本发明的测试条的不同实施方式。

[0012] 图 12 是相对强度(RI)相对于实施例 1 所述 CRP 试验的条带 T1 中 C 反应蛋白

(CRP) 浓度的标准曲线。

[0013] 图 13 中, RI 相对于与图 12 相同的 CRP 试验的条带 T2 中 CRP 浓度的标准曲线显示出条带 T2 的标准曲线相较条带 T1 的标准曲线移位到更高的 CRP 浓度。

[0014] 图 14 中, RI 相对于实施例 1 的两种条带 CRP 试验的 CRP 浓度的标准曲线显示出动态范围增加, 所述标准曲线中所述两种条带的结果与加入各条带的相对强度相结合。

[0015] 图 15 是实施例 2 所述的 CRP 试验的条带 T1 的标准曲线 (动态范围为 0.162-5.412mg/L)。

[0016] 图 16 中, 与图 15 相同的 CRP 试验的条带 T2 的标准曲线显示出条带 T2 的标准曲线相较条带 T1 的标准曲线移位到更高的 CRP 浓度 (动态范围 0.9-15mg/L)。

[0017] 图 17 中, 与图 15 相同的 CRP 试验的条带 T2 的标准曲线显示出条带 T3 的标准曲线相较条带 T2 的标准曲线移位到更高的 CRP 浓度 (动态范围 6.6-20.44mg/L)。

[0018] 图 18 的三种条带 CRP 试验的标准曲线显示出动态范围进一步提高, 所述标准曲线中结合了所有三种条带 (条带 T1 T2 和 T3) 的结果 (动态范围为 0.042-20.9mg/L)。

[0019] 图 19 的三种条带 CRP 试验的标准曲线显示出动态范围提高, 所述标准曲线中结合了三种条带中二种 (条带 T2 和 T3) 的结果 (动态范围为 0.25-19.58mg/L)。

[0020] 图 20 是具有动态范围 85.65pg/ml-约 3000pg/ml 的单测试条 NT-proBNP 试验的标准曲线。

[0021] 图 21 是具有动态范围 88.89pg/ml-约 15,000pg/ml 的两种测试条 NT-proBNP 试验的标准曲线。

[0022] 发明详述

[0023] 一方面, 本发明提供具有扩大的动态范围的测试条, 这可省去稀释样品的需要且可检测前区样品。在一个实施方式中, 所述测试条包含层析条, 所述层析条含至少两种反应区域, 第一反应区和第二反应区, 其中各反应区含特异结合样品中可能存在的分析物的捕获剂, 且所述两种或更多的反应区扩大所述测试条的动态范围。

[0024] 在另一个实施方式中, 所述测试条包含层析条, 所述层析条含至少两种反应区域, 第一反应区和第二反应区, 其中各反应区含特异结合样品中可能存在的分析物的捕获剂, 其中所述样品中所述分析物的存在待测定。如本文所述, 所述测试条可包括其他反应区, 例如, 总共 3、4、5、6、7、8、9 或 10 种反应区。所述层析条有第一端和第二端且所述测试条还可在所述层析条的第一端包括吸收板。

[0025] 本发明的测试条可为浸量尺或支持样品的侧流、单向或双向侧流的测试条, 从而当样品加入所述层析条时其流过各反应区, 区内存在的捕获剂结合所述样品中存在的至少部分分析物。

[0026] 可配置所述测试条, 从而检测样品中所述分析物的存在或测量所述分析物的浓度是基于一种或多种所述反应区检测的信号强度, 如所述第一反应区、所述第二反应区或其组合。

[0027] 本文所用术语“动态范围”例如测试条的动态范围指样品中分析物含量可用所述测试条精确测量的浓度范围。测试条的动态范围可扩大, 从而样品中分析物含量可用所述测试条精确测量的浓度范围增大。在一个实施方式中, 所述范围在分析物浓度的低端扩大, 从而使所述测试条精确测量样品的较低浓度。在另一个实施方式中, 所述范围在分析物浓

度的高端扩大,从而使所述测试条精确测量样品的较高浓度。在另一实施方式中,所述范围在分析物浓度的低和高端扩大。

[0028] 术语“层析条”和“薄膜条”本文可互换使用且指具有充足孔隙率以使流体沿着其表面流动并穿过其内部的任何材料条。所述流体可因毛细管作用、或任何其他现有已知或之后发现的方法而流动,使所述流体沿着薄膜流动。

[0029] 本文所用术语“第一反应区”指最靠近加入样品的所述层析条上区域的反应区域。在一个实施方式中,所述测试条含加入样品的样品添加区。然后所述第一反应区为最接近样品添加区的反应区,从而使样品在加入所述测试条时沿着层析条向所述反应区流动且到达所述第一反应区后再到达所述第二、第三、第四和随后的反应区。所述“第二反应区”位于所述第一反应区和所述第三反应区之间且距离其较近。与所述第一反应区、第二反应区等的使用相同,所述“最终反应区”位于所述样品添加区最远且其随着所述样品从所述样品添加区流到所述反应区时最后到达。

[0030] 如本文进一步描述,所述样品可加入所述层析条的第一或第二端。无论所述样品加到所述层析条的哪端,所述第一反应区为最接近所述层析条加样区 / 所述样品添加区的反应区。

[0031] 本文所用术语“分析物”指可存在于所述样品中的化合物且其在所述样品中的存在和 / 或浓度待测定。分析物可为天然存在或可制备其特异结合剂的任何化合物。所述术语“分析物”还指游离 / 未络合的分析物以及结合有一种或多种分析物结合剂的分析物,所述分析物结合剂可能或可能不被可检测地标记。分析物的示例包括但不限于蛋白质例如激素和其他分泌蛋白、酶和细胞表面蛋白;糖蛋白;肽;小分子;多糖;抗体(包括单克隆或多克隆抗体);核酸;药剂;毒素;病毒或病毒颗粒;部分细胞壁;和其他具有抗原表位的化合物。

[0032] 本文所用术语“分析物结合剂”指识别或结合所述分析物的部分(或组合物)。本文所用术语“捕获剂”指分析物结合剂的特例,其中识别和结合所述分析物的部分(或组合物)固定在所述层析条上从而当其结合所述分析物时,所述分析物被“捕获”在所述测试条上。示例性分析物结合剂包括但不限于抗体,抗原,肽,半抗原,工程改造的蛋白,核酸如 RNA、DNA、PNA 和其他改良的核酸,以及其他生物和化学分子。

[0033] 本文所用术语“抗体”包括抗体结合区域或片段、一种或多种 CDR、单链抗体、嵌合抗体、或人源化抗体。所述抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0034] 所述样品可为任何液体样品,例如生物样品如可能含有感兴趣的分析物的体液。在一个实施方式中,所述生物样品是血液、血浆、血清、唾液、粘液、尿液、宫颈粘液或羊水样品。在另一实施方式中,所述生物样品是全血样品。在另一实施方式中,所述样品不是生物样品,而是其中例如杂质或污染物待检测的液体。所述样品可以但不必要在沉积于所述测试条之前处理。在所述样品太粘稠甚至不能在所述测试条上均匀流动的某些情况下,所述样品可用降低所述流体粘稠度的试剂预处理,所述试剂包括但不限于一种或多种粘液溶解剂或粘蛋白酶。

[0035] 在一个优选实施方式中,预处理所述样品不包括稀释所述样品,因为本发明的测试条具有扩大的动态范围,因此省去了稀释所述样品的需要。在一个实施方式中,本发明测试条的动态范围可达到 3、4、5、6、或 7 个数量级倍数。本发明测试条的示例性动态范围

包括但不限于约 0.0001ng/ml–约 1mg/ml 在一个实施方式中,本发明测试条的动态范围为约 0.0001ng/ml–约 750、500、400、300、200、100、75、50、25、或约 10 μ g/ml,或约 0.0001ng/ml–约 9、8、7、6、5、4、3、2、或约 1 μ g/ml。在另一实施方式中,本发明测试条的动态范围为约 0.0001ng/ml–约 750、500、400、300、200、100、75、50、25、或约 10ng/ml,或约 0.0001ng/ml–约 9、8、7、6、5、4、3、2、或约 1ng/ml,或约 0.0001ng/ml–约 0.5、0.25、0.1、0.05、0.025、0.01、0.005、或约 0.001ng/ml。在另一个实施方式中,本发明测试条的动态范围为约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、或约 1 μ g/ml–约 1mg/ml,或约 1.5、2、2.5、3、4、5、7.5、10、15、20、25、30、35、40、45 或约 50 μ g/ml–约 1mg/ml。中间范围也考虑为本发明的部分。

[0036] 基于本发明的说明,按所需扩大所述测试条的动态范围在本领域技术范围之内。例如,所述动态范围可通过例如添加或去除一种或多种所述层析条的反应区来变化,即扩大或缩小。或者,所述动态范围可通过改变所述反应区内存在的捕获剂浓度来扩大或缩小。此外如本文所述,所述测试条的准确率和动态范围可通过改变从中检测或测量信号的反应区的选择而改善。

[0037] 本发明的测试条可仅包含一种捕获剂即所述第一、第二和其他(如果有)反应区中相同的捕获剂。或者,它们可包括都结合所述样品中同样分析物的多于一种例如两种、三种、四种、或更多俘获剂。在一个实施方式中,所述测试条包括两个反应区,各包含相同的捕获剂。在另一个实施方式中,所述测试条包括两个反应区,所述反应区含有结合相同分析物的 2 种不同捕获剂。在另一实施方式中,本发明测试条包括各含捕获剂的 3 种或更多反应区,所述捕获剂可以但不必要与所述测试条上任何其他捕获剂相同。

[0038] 此外,所述测试条的 2 种或更多反应区可含等量或等浓度的捕获剂,或所述反应区之间的浓度可不同。通常,可调整各反应区内的所述捕获剂的浓度以使所述测试条的动态范围扩大。

[0039] 在一个实施方式中,所述测试条的各反应区域含有含量/浓度相同的同一捕获剂。在另一实施方式中,所述测试条的各反应区含相同捕获剂,但所述捕获剂的含量或浓度可在区域之间不同,如各区的浓度彼此不同,或比方说 2 种反应区的浓度相同,但与所述第三反应区的不同。在另一实施方式中,所述反应区含有含量或浓度相同或不同的不同捕获剂。

[0040] 在一个示例性实施方式中,所述第一反应区即与所述样品添加区最近的反应区含有比所述第二、第三和其他反应区更高浓度的捕获剂。这在所述样品含高浓度分析物时尤其有用,尽管其在所述分析物以低浓度存在时(从所述第二反应区和所述第三和其他反应区(如果有)检测到很少或没有信号的情况)也有效。在另一实施方式中,所述第一反应区含比其他反应区更低浓度的捕获剂。

[0041] 在一些实施方式中,与所述其他反应区相比,所述第一或所述最终反应区含最高、最低或近似相等或相当浓度的捕获剂。在一个实施方式中,与所述其他反应区相比,所述最终反应区含最高或最低浓度的捕获剂。在另一实施方式中,所述第一或所述最终反应区所含捕获剂的浓度处于所述其他反应区之间。基于本申请的说明,本领域技术人员可根据待进行的试验类型和特征来改变所述捕获剂和/或所述捕获剂的浓度。

[0042] 如上所述,所述测试条可包括数个反应区,例如,3、4、5、6、7、8、9、10 或更多反应

区。所述数个反应区内各自存在的所述捕获剂结合所述样品中的相同分析物,但不必要与任何所述其他反应区内存在的俘获剂相同。

[0043] 所述反应区可为由所进行的试验种类决定的任何形状或尺寸。在一个实施方式中,所述反应区形成条带,本文也称为测试条带。在另一实施方式中,所述反应区形成点,其可为任何形状如近似圆形、椭圆形或正方形。

[0044] 本发明的测试条还可包括的特征为增加本发明测试条的使用方便、性能、灵敏度、准确率或其他特征。例如,所述测试条可包括样品添加区,其可以但不必要含样品过滤器。所述样品过滤器可从样品液体中分离样品中的细胞并使所述液体流过所述层析条。这允许不经过预处理使用样品如全血,因为其使所述液体流过所述层析条但保留所述细胞。

[0045] 本发明的测试条还可包括偶联区,任选包括偶联板。所述偶联区或偶联板(如果有)包括含标记有可检测标记的分析物结合剂的偶联物。加入所述层析条的液体如样品或缓冲液溶解所述偶联物并使其沿着所述测试条流动。在一个实施方式中,所述偶联区/偶联板可位于所述层析条上,在或接近所述样品添加区、或所述样品添加区和所述第一反应区之间的任何地方。样品加到所述测试条上时,其溶解所述偶联区/偶联板内的偶联物。样品中的分析物结合所述偶联物中的分析物结合剂并形成可检测的复合物。该可检测的复合物继续流过所述测试条直到其到达并被捕获入一个或更多所述反应区。

[0046] 在另一个实施方式中,所述测试条含所述样品过滤器和所述偶联板。所述样品过滤器可位于所述偶联板附近,或在一个实施方式中,通常位于所述偶联板之上从而使加入该样品过滤器的样品中的液体流向所述偶联板并从该偶联板流到所述层析条之上且沿其流动。所述样品过滤器可直接跨过所述偶联板、或者所述样品过滤器可偏移,虽然其仍允许液体从所述样品过滤器流向所述偶联板。

[0047] 在另一实施方式中,所述测试条包括缓冲区,任选包括加入缓冲液的缓冲板。所述测试条包括缓冲区时,所述偶联区或偶联板可位于所述层析条上,在或接近所述缓冲区、或所述缓冲区和所述反应区之间的任何地方。将缓冲液加入所述缓冲区或缓冲板时,其溶解所述偶联物并沿着载有该偶联物的所述层析条流向反应区,在该反应区内偶联物可结合所述样品中固定的分析物。

[0048] 在另一个实施方式中,所述测试条可含所述缓冲板和所述偶联板。所述缓冲板可位于所述偶联板附近,或在一个实施方式中通常位于所述偶联板之上从而使加入该缓冲板的液体流向所述偶联板并从该偶联板流到所述层析条之上且沿其流动。所述缓冲板可直接跨过所述偶联板、或者所述缓冲板可偏移,虽然其仍允许液体从所述缓冲板流向所述偶联板。

[0049] 在一些实施方式中,所述偶联物在所述测试条上不存在,但在所述样品加入该测试条之前加入到该样品中。存在于例如干粉或液体形式中的偶联物的预混合确保其完全溶解并增加所述试验的灵敏度。

[0050] 在所述测试条包括偶联物或所述样品加入所述测试条前预混合偶联物与该样品的实施方式中,至少有两种试剂结合所述分析物—经可检测地标记的试剂和固定于所述反应区内的一种或多种捕获剂。应注意,结合所述分析物的试剂中至少一种仅结合所述分析物且不结合样品中任何其他组分,即选择性或特异地结合所述分析物。在一个实施方式中,固定于所述反应区内的一种或多种捕获剂为分析物特异/选择性的且标记有可检测标记

的分析物结合剂可非选择性结合所述分析物。在另一个实施方式中,固定于所述反应区内的一种或多种捕获剂可非选择性结合所述分析物且标记有可检测标记的分析物结合剂为分析物特异/选择性的。在另一个实施方式中,所述捕获剂和经可检测标记的分析物结合剂为分析物特异/选择性的结合剂。

[0051] 附着所述分析物结合剂的可检测标记可包括多种目前已知或之后发现的材料,其使所述标记可被检测。可检测标记的示例包括但不限于颗粒、发光标记;量热标记,荧光标记;化学标记;酶;放射性标记;或射频标记;金属胶体;和化学发光标记。

[0052] 常见检测方法示例包括但不限于光学法如测量光散射、简单反射、光度计、光电二极管或光电倍增管;放射性(用盖革(Geiger)计数器等测量);电子传导率或电介质(电容量);释放的电活性剂的电化学检测,如铟、铋、镓或碲离子,如 Hayes 等所述 (Analytical Chem. 66:1860-1865(1994)) 或 Roberts 和 Durst (Analytical Chem. 67:482-491(1995)) 建议的亚铁氰化物,其中通过在所述检测区加入一滴去污剂释放包埋在脂质体中的亚铁氰化物,随后电化学检测所释放的亚铁氰化物。也可使用其他合适的常规方法。

[0053] 可能需要用相同的测试条检测两种或更多的不同分析物。在该情况下,可能需要在相同测试条上使用不同的可检测标记,各可检测标记检测不同分析物。例如,不同的可检测标记可附着不同分析物选择性的结合剂。在一个实施方式中,所述不同的可检测标记可为在不同波长发荧光的不同荧光剂。

[0054] 在一个实施方式中,所述可检测标记是颗粒。可使用的颗粒示例包括但不限于胶体金颗粒;胶体硫颗粒;胶体硒颗粒;胶体硫酸钡颗粒;胶体硫酸铁颗粒;金属碘酸盐颗粒;卤化银颗粒;硅颗粒;胶体金属(水合)氧化物颗粒;胶体金属硫化物颗粒;胶体硒化铅颗粒;胶体硒化镉颗粒;胶体金属磷酸盐颗粒;胶体金属铁酸盐颗粒;有机或无机层包衣的任何上述胶体颗粒;蛋白或肽分子;脂质体;或有机聚合乳胶颗粒如聚苯乙烯胶乳珠。

[0055] 在一个实施方式中,所述颗粒为胶体金颗粒。可用任何常规方法如 G. Frens, 1973 Nature Physical Science, 241:20(1973) 所述的方法制作胶体金颗粒。其他方法可如美国专利号 5,578,577;5,141,850;4,775,636;4,853,335;4,859,612;5,079,172;5,202,267;5,514,602;5,616,467;和 5,681,775 所述。

[0056] 颗粒大小的选择可影响因素如大量溶胶试剂和其偶联物的稳定性、从偶联板释放颗粒的效率和完整性、所述反应的速度和完整性。颗粒表面区域还可影响结合组分之间的位阻。也可基于所述薄膜条的孔隙率选择颗粒大小。所述颗粒优选足够小从而与所述液体(样品或缓冲液)沿着所述膜扩散。

[0057] 颗粒可经标记以帮助检测。标记的示例包括但不限于发光标记;比色标记如染料;荧光标记;或化学标记如电活性剂(如亚铁氰化物);酶;放射性标记;或射频标记。

[0058] 所述测试条中存在的颗粒数量可不同,这取决于所述颗粒的大小和组成、所述测试条和薄膜条的组成、和所述试验的灵敏度水平。颗粒数量通常为约 1×10^9 - 约 1×10^{13} 个颗粒,尽管可使用少于约 1×10^9 的颗粒。在优选实施方式中,颗粒数量为约 1×10^{11} 个颗粒。

[0059] 在一些实施方式中,所述测试条可包括检测对照且含一种或多种固定化对照结合剂的其他反应区。可结合所述对照结合剂的对照或对照试剂可置于所述测试条上各种位置或在试验中加入所述测试条。所述对照剂可标记有可检测标记如上述可检测标记,以在所述对照结合所述对照结合剂时协助检测该对照,所述对照结合剂固定在对照反应区,

本文也称为“对照区”或“对照条”。

[0060] 所述对照试剂和对照结合剂可联用以实现各种对照功能。例如,所述对照结合对可用来验证所述样品或缓冲液是否在所述测试条内合适地扩散。所述对照结合对也可作为内标使用并使分析物测量结果可在不同测试条之间比较。这可用于校正条与条的差异。用基于例如条的统计抽样的外部对照进行所述校对是不现实的。此外,不同测试条的批次之间和运行之间的差异可通过对照结合对的使用而最小化。而且,可减少非特异性结合影响。用外部、条外对照难以完成所有这些校正。

[0061] 本领域已知许多试剂可用作所述对照结合对的组分。例如,所述对照结合对的至少一种组分可为天然产生或工程改造的蛋白。所述对照结合对也可作为受体-配体对。此外,所述对照结合对的至少一种组分可为抗原、其他有机分子、或与对感兴趣的分析物非特异的蛋白偶联的半抗原。对照结合对的其他合适组分的描述可参考美国专利号第 5,096,837 号,且包括 IgG、其他免疫球蛋白、牛血清白蛋白 (BSA)、其他白蛋白、干酪素和球蛋白。

[0062] 对照试剂-对照结合剂对所需的特征包括但不限于大批量稳定性、对感兴趣的分析物的非特异性、测试中性能的重复性和预测性、分子大小、和彼此间结合的亲和力。

[0063] 在一个实施方式中,所述对照结合对的组分不结合所述测试条内可能存在的如来自所述样品的任何东西。在一个示例性的实施方式中,所述对照结合剂包括兔抗二硝基酚(抗 DNP) 抗体和所述对照试剂包括偶联 BSA(牛血清白蛋白)的二硝基酚。

[0064] 本发明测试条也可包括具有所述测试条长度的背衬条。所述背衬条可由任何稳定的无孔材料制成,所述材料足够结实以支持偶联其的材料和条。由于许多试验使用水作为扩散介质,所述背衬条优选对水基本不渗透。在一个实施方式中,所述背衬条由聚合膜制成,更优选聚氯乙烯膜。

[0065] 所述层析条和薄膜条可由具有充足孔隙率以使流体沿着其表面流动并穿过其内部的任何物质制成。所述流体可因毛细管作用、或任何其他现有已知或之后发现的方法而流动,以使所述流体沿着薄膜流动。所述薄膜条应有足够的孔隙率以使分子如所述偶联物移动。所述薄膜条应可被样品中所用的液体浸湿,所述样品含可检测的分析物(如水性液体的亲水性,有机溶剂的疏水性)。通过例如美国专利号 4,340,482 或 4,618,533 所述的过程可改变膜的亲水性从而使所述膜亲水以与水性液体一起使用,所述专利描述了亲水表面向疏水表面的转变。可用于形成所述薄膜条的物质示例包括:纤维素、硝酸纤维素、醋酸纤维素、玻璃纤维、尼龙、聚合电解质离子交换膜、丙烯酸共聚物/尼龙、和聚醚砜。在一个实施方式中,所述膜由硝酸纤维素制成。

[0066] 所述层析条可以但不必要为单一条。在一个实施方式中,所述层析条包括单一连续条。在另一实施方式中,所述层析条包括数个连在一起形成大条的小条。所述小条长度可较短但与所述大条宽度近似,或所述小条可较窄(宽度较小)但与所述大条长度近似,或所述小条比所述大条更短更窄。此外,所述小条可以但不必要包括不同层析条区域。另外,所述小条可彼此相邻但不重叠,或其可彼此部分或全部重叠。所述小条可以任意排列,只要所形成的大条使液体从其加入点向所述反应区流动。

[0067] 本发明测试条的吸收板可由吸收物质形成,其可吸收所述样品或缓冲液中所用的液体。所述吸收板的吸收能力应足够大以吸收递送至所述测试条的液体。适用于吸收板的物质示例包括纤维素和玻璃纤维。

[0068] 本发明测试条中任选存在的所述缓冲板、偶联板和样品过滤器可由任何吸收物质形成。可使用的物质示例包括纤维素、硝酸纤维素、醋酸纤维素、玻璃纤维、尼龙、聚合电解质离子交换膜、丙烯酸共聚物 / 尼龙、和聚醚砜。

[0069] 本发明的测试条还可含保护性的覆盖,所述覆盖可由任何不透水的材料制成,优选半透明或透明的。保护性覆盖中使用的优选材料包括透光材料如聚酰胺、聚酯、丙烯酸、玻璃、或相似的材料。基于所用检测方法,所述保护性覆盖可以透明或不透明。在一个实施方式中,保护性覆盖为光透明聚酯。

[0070] 在一个实施方式中,所述测试条含加入样品的样品添加区,其位于薄膜条的第一端附近。当在所述测试条加入所述液体样品时,所述样品双向流动,即流向所述第一端的吸收板,流向所述第二端,通过所述反应区。图 1-3 和 7-11 描述了本发明侧流测试条的示例性实施方式的俯视图。如图所示,测试条 2 具有薄膜条 4 并分别具有第一和第二端 6 和 8。具有吸收板 10 的吸收区位于所述膜的第一端且样品添加区 12 接近所述第一端但有一定距离。第一反应区 14 和第二反应区 16 位于所述样品添加区和所述第二端 8 之间的测试条上。其他反应区如第三反应区也可存在于所述测试条上,如虚线所示,其位于所述第二反应区 16 和所述第二端 8 之间。上述各区或区域彼此流体扩散连通。

[0071] 如图 2、3 和 8-11 所示,所述测试条还可包括偶联区和 / 或偶联板 18。在一个实施方式中,所述偶联区,如图 2 和 10 所示位于所述样品添加区,或如图 3 和 11 所示接近所述样品添加区。在这些实施方式中,加入所述测试条的样品溶解所述偶联物和所述分析物(如果样品中存在),通过结合所述偶联物内的经标记的分析物结合剂来形成可检测复合物。该可检测复合物沿着所述测试条流动并通过结合所述反应区内的捕获剂而固定化。可检测或定量该固定化的可检测复合物。在图 10 和 11 所示的检测条构型中,所述测试条还包括位于所述第二端 8 的缓冲区(其可以但不必要包括缓冲板)20。加入所述缓冲区 20 的缓冲液流向所述第一端并将多余的分析物和 / 或偶联物从所述反应区清洗掉。

[0072] 在另一实施方式中,如图 8 和 9 所示,所述偶联区 / 偶联板 18 分别位于或接近所述薄膜条 8 的第二端。在此实施方式中,将所述样品加入位于所述薄膜条 6 第一端附近的样品添加区 12 中,且将缓冲液加入所述缓冲区 / 缓冲板 20。所述样品沿着所述测试条双向流动且样品中的分析物(如果有)被所述第一和随后反应区内的捕获剂捕获 / 固定。存在于或接近所述薄膜条的第二端的偶联物被所述液体缓冲液溶解并沿着所述测试条流动直至其到达所述反应区,在该反应区内固定化的分析物结合所述偶联物内的分析结合剂以形成可检测或定量的固定化的可检测复合物。

[0073] 在图 1-3 和 7-11 所示例的实施方式中,可调整样品添加区 12 和吸收板 10 以及样品添加区 12 和所述反应区 14 和 16 之间的距离和 / 或流速,从而使样品在流过所述第一、第二、和随后(如果有)反应区前到达所述吸收板。

[0074] 在另一实施方式中,所述样品添加区位于所述薄膜条的第二端。当所述液体样品加入所述测试条时,其流过所述反应区并到达所述第一端的吸收板,在所述反应区内该样品中的分析物被所述捕获剂俘获,图 4-6 描述了本发明侧流测试条的示例性实施方式的俯视图。如图所示,测试条 2 具有薄膜条 4 并分别具有第一和第二端 6 和 8。具有吸收板 10 的吸收区位于所述膜的第一端且样品添加区 12 位于所述第二端。第一反应区 14 和第二反应区 16 位于所述样品添加区和所述吸收板 10 之间的测试条上。其他反应区如第三反应区

也可存在于所述测试条上,如虚线所示,其位于所述第二反应区 16 和所述吸收板 10 之间。上述各区或区域彼此流体扩散连通。

[0075] 如图 5 和 6 所示,所述测试条还可包括可分别位于或接近所述样品添加区的偶联区和 / 或偶联板 18。在这些实施方式中,加入所述测试条的样品溶解所述偶联物和所述分析物(如果样品中存在),通过结合所述偶联物内经标记的分析物结合剂来形成可检测复合物。该可检测复合物沿着所述测试条流动并通过结合所述反应区内的捕获剂而固定。可检测或定量该固定化的可检测复合物。

[0076] 如图 1-11 所示,本发明测试条可配制为允许单向侧流或双向侧流。未描述的其他测试条构型也可为本发明的考虑部分。例如,本发明测试条可配制以使所述样品添加区位于所述薄膜条的第二端且缓冲区 / 缓冲板接近所述第一端。

[0077] 此外,尽管图 1-11 所示的测试条的布局设计为线性,非线性布局也考虑为依照本发明的测试条。在一个实施方式中,本发明的测试条为“浸量尺”,即其中一端浸入或置于液体样品中的条且该液体样品沿着所述条流动。在另一实施方式中,本发明的测试条不是浸量尺,而是侧流测试条。

[0078] 另一方面,本发明提供了确定样品中分析物存在的方法。所述方法包括步骤:给本发明测试条递送样品和使所述样品沿着所述测试条流向所述反应区直至到达所述第一反应区和随后的第二反应区。所述方法还包括通过在各反应区内捕获至少部分分析物来逐渐耗尽所述分析物样品。例如,在含 2 种反应区,第一反应区和第二反应区的测试条中,当所述样品到达该第一反应区时至少部分所述分析物被该第一反应区内的捕获剂俘获,因此消耗了分析物的样品。当所述样品到达该第二反应区时,该样品被进一步消耗分析物。可基于所述第一反应区、第二反应区或其组合的信号存在(或缺失),或所述第一反应区、第二反应区或其组合的信号强度来检测样品中分析物的存在(或缺失)。任选地,所述样品中分析物的量和浓度可通过所述第一反应区、第二反应区或其组合的信号强度来测量。

[0079] 当所述测试条包括 3 种或更多反应区时,样品中分析物的存在或含量可通过任一反应区或其任何组合的信号或信号强度来测定。在一个实施方式中,检测仅 1 种反应区如第一反应区或最终反应区的信号或信号强度。在另一实施方式中,检测两种或更多反应区的组合的信号或信号强度。

[0080] 所述反应区的任何改变的信号可用于分析所述试验的结果。例如,在有三种测试条带的测试条上进行的试验中,各条带可分别用于低、中和高范围。这里所述第一反应区的信号(和拟合曲线)用于检测低浓度范围的样品值。对于浓度在中等范围的样品使用所述第二反应区的信号(和拟合曲线)且对于高浓度范围使用所述第三反应区的信号(和拟合曲线)。

[0081] 在另一实施方式中,可使用第一反应区的信号(和拟合曲线)和所述第二和第三反应区的信号(和拟合曲线)组合;即使用 $T1$ 和 $T2+T3$ (其中 $T1$ 、 $T2$ 和 $T3$ 分别代表所述第一、第二和第三测试条带的信号)。在此实施方式中, $T1$ 用于低浓度范围的样品且所述第二和第三测试条带的信号之和($T2+T3$)用于剩余浓度范围。

[0082] 在另一实施方式中,所有三种条带的信号之和(即 $T1+T2+T3$)用于全范围浓度。对于仅用两种条带的试验,可使用方法($T1$ 、 $T2$)和($T1+T2$)。

[0083] 在另一实施方式中,当所述第一测试条带所含俘获剂的浓度比含高浓度俘获剂的

第二测试条带低得多时,则 T2 可用于低浓度且 T1 用于中或高浓度范围。基于本文的说明,所用方法可由本领域技术人员经验性测定。

[0084] 本领域技术人员已知检测反应区信号的方法。可通过使用结合所述分析物的任何可检测标记来测量所述信号。可检测标记的示例包括但不限于发光剂、量热剂如染料、荧光剂、化学试剂如电活性剂、放射性试剂、或射频试剂。可检测试剂的选择是基于数种因素,包括所述试剂的大小和组成、所述层析条的组成、所述反应区的大小、试验灵敏度水平等,且所述因素在本领域普通技术范围之内。本领域技术人员也已知反应区信号强度的测量方法和样品中分析物含量或浓度的检测方法。该测量方法可以但不必要参考背景或基线进行。测量信号强度和定量分析分析物浓度的示例性方法如美国专利号 6, 528, 323 和 6, 767, 710 所说明,其各通过引用全文纳入本文。

[0085] 在一个示例性的实施方式中,本发明的测试条除了含 2 种或 3 种测试条带外,还包括 1 种或 2 种对照条带用于进行试验。试验完成后,用四种白色 LED 照射所述测试条并捕获所述条的数字图像。定位所述对照和测试条带并测定各条带的反射密度 (DR) 峰值。若此分析步骤所测 DR 用于计算结果,则沿着条向下流动的变化和其他因素会造成不同条所测结果的重复性较差。为了针对这些因素归一化所述结果,各测试条带的 DR 除以所述对照条带的 DR (若仅存在一对对照条带),或当存在两对照条带时则除以任一所述对照条带的 DR 或所述两对照条带的平均 DR。

[0086] 所述对照条带中存在的捕获剂不结合所述样品的任何组分且所述强度仅随着包被在所述层析条上对照的浓度和偶联板上偶联物含量而变化。理想条件下可预期条与条之间对照条带上产生的颜色强度会为常数。影响所测对照条带强度的变化会成比例地影响所述测试条带且因此该测试条带的信号可用一种或两种对照条带的值来归一化。本文中该归一化的值称为“相对强度”(RI)。

[0087] 为了用国际认可的单位测定相对于所测 RI 的所述分析物的实际值,需要测量响应曲线(也称标准曲线)。为了完成所述测量,用已知值的分析物在跨所述试验响应的全部范围生产样品。这些称为标准品。对制备的各标准品进行统计学显著数量的重复,相对各标准值产生的 RI 生成数据。对所述数据进行四参数逻辑曲线拟合。所得响应曲线(标准曲线)可用于将各测试条带的所测 RI 转换为该分析物的国际认可单位。

[0088] 对于结果基本上为阴性或阳性的试验如 HIV 试验,报道信号截止比 (S/CO)。如上所述,测量所述试验的响应,除了用于替代标准品的阴性和阳性临床样品。测量阳性和阴性样品的统计学显著数量后,计算阴性组的平均值和相关标准偏差 (SD)。确定 RI 截止值,其为偏离所述阴性均值的足够数量的 SD 从而假阳性在统计学上不可能出现,其还低于所述数据中阳性样品的最低 RI 值。现通过用所述试验 RI 除以所述截止 RI,将所述截止值用于计算所述结果的 S/CO。1.0 或更高的任何结果为阳性测定。

[0089] 如上所述,本发明方法中可使用数种数据还原/分析方法。在一个实施方式中,所述测试条包括 2 种或 3 种反应区或测试条带且各测试条带都生成标准曲线。在此实施方式中,所述方法包括使用第一测试条带的标准曲线直到超出预置的或饱和值。在该点时,所述方法切换使用所述第二测试条带的标准曲线。在三测试条带的情况下,可使用另一切换点,在该点时使用所述第三测试条带的标准曲线。在一些实施方式中,使用所述测试条带产生的总信号如总颜色。在这些实施方式中,基于所述总信号如颜色或相对强度产生标准曲线,

并通过加和所述 2(或 3) 种测试条带的总颜色用此曲线测量所述分析物的存在和 / 或含量。在一些实施方式中,可使用从所述第一测试条带到读取所述 2 种测试条带(或 3 种条带)之和的切换点组合。

[0090] 在另一实施方式中,所述测试条包括具有相同浓度捕获剂如抗体的 2 种或 3 种反应区,例如第一、第二和任选地第三测试条带。所述测试条还包括含偶联物的偶联区,所述偶联物被所述样品溶解并与所述分析物形成可检测复合物。当所述测试条用于试验时,所述第一测试条会‘接受’ 100% 浓度的分析物-偶联物复合物(下文简称为“分析物”)。然而,随后的测试条带(或多种测试条带),即所述第二和所述第三测试条带,会具有衰减水平的分析物,其衰减量取决于所述样品中存在的分析物浓度。某些时候,所述第一测试条带可能饱和且该测试条带的信号如颜色可为常数。高水平的分析物甚至可饱和两条带,所述第一和所述第二测试条带和所述第三测试条带可用于试验,其中此含量或浓度的分析物存在于在所述样品中。

[0091] 在另一实施方式中,所述测试条包含 2 种或 3 种测试条带,其中所述第一测试条带的捕获剂含量比含高浓度捕获剂的所述第二测试条带低很多(即所述第二条带会在低浓度分析物下饱和)。在此实施方式中,所述试验的动态范围扩大且曲线低端的灵敏度改善。当样品中分析物浓度较低时,因为仅有非常小的结合发生,所述第一条带对分析物浓度的影响非常小(这是由于所述第一测试条带中低浓度捕获剂和所述低浓度分析物的结合)。这种几乎不衰减的分析物随后流过所述第二测试条带(其被捕获剂大量包被)且因此合适的偶联物和捕获剂浓度选择可最大化所述分析物曲线的低端灵敏度。所述第二测试条带会快速饱和且甚至可发生前区想象。此实施方式中分析物的检测和 / 或定量在低浓度分析物的样品中可通过使用所述第二反应区(第二测试条带)的信号如颜色来进行,而在中和高浓度分析物中切换为所述第一反应区(第一测试条带)的信号如颜色。通常,在此实施方式中所述动态范围在低端(低水平分析物浓度)响应时扩大。

[0092] 尽管试验之间数据还原 / 分析的方法不同,但当所述样品中分析物浓度可能较低时,所述第一测试条带的信号可能高于所述第二测试条带,其随之又可能高于所述第三测试条带。在此实施方式中,可使用第一测试条带的标准曲线或基于所述 2 种(或 3 种)测试条带的总信号生成的标准曲线。当所述样品中分析物浓度可能较高时(但不是前区样品),可使用第三(或最终)测试条带的标准曲线或基于所述 3 种测试条带的总信号生成的标准曲线。

[0093] 在一个实施方式中,随着样品中分析物浓度增加,距离所述样品添加区较近的反应区的试验响应达到最大值且随后开始降低,而距离所述样品添加区较远的反应区的试验响应继续升高,导致距离所述样品添加区较远的反应区的响应与距离所述样品添加区较近的反应区的响应之比具有剂量依赖性升高。结果,接近所述样品添加区的反应区的给定响应可在剂量响应曲线中对应 2 种不同分析物浓度,一种低且一种非常高(前区)。

[0094] 在一个实施方式中,前区样品可通过以下方法检测。当所述样品引起一种或多种测试条带(如所述第一测试条带或所述第一和第二测试条带)形成前区,则使用下一个(如分别为第二或第三)测试条带的标准曲线。前区样品可通过对比例如所述第一条带和所述第二条带或所述第二条带和所述第三条带的信号来检测。若所述第一条带与所述第二条带相比,或所述第二条带与所述第三条带相比信号明显较低,则所述样品是前区样品。

[0095] 可结合各反应区的标准曲线（或个体响应曲线）以增加所述范围，该范围中增加的分析物剂量引起测试响应增大。

实施例

[0096] 以下实施例旨在说明本发明，而不以任何方式、形状、或形式对本发明构成明确或隐性限制。尽管它们可能是可能采用的典型实施例，但可替代采用本领域技术人员已知的其它方案、方法或技术。

[0097] 实施例 1：测试条制备和样品中 CRP 浓度测定

[0098] Thayer 等在美国专利号 6, 528, 323 中所述的测试条用包衣密理博 (Millipore) HF 120 硝酸纤维素制备（按到样品应用区距离的顺序）高对照 (HC) :0. 8mg/ml 兔抗 DNP, 测试条 1 (T1) :0. 5mg/ml 单克隆抗 CRP 12D8, 测试条 2 (T2) :0. 5mg/ml 单克隆抗 CRP 12D8, 和低对照 (LC) :0. 6mg/ml 兔抗 DNP。抗体溶于 PBS、5% 海藻糖、5% 甲醇以包衣，并用 IVEK 平台式压条机 (IVEK flatbed striper) 以 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 包被所述硝酸纤维素。包衣后，所述 HF 120 硝酸纤维素 37°C 孵育过夜，然后 60°C 热处理 4 天。

[0099] 用 24nm 金溶胶制备单克隆抗 CRP 抗体的免疫金偶联物，所述金溶胶通过 Frens 的方法 (Frens G., 1973. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. (在单分散金悬液中的受控晶核形成用于调控分子大小) Nature 241, 20-22) 改进制备，其中 160ml 1% 柠檬酸钠和 40ml 1M 乙酸钠的混合物加入到 8L 沸腾的 18 兆欧去离子水中。所述溶液再次加热到沸腾并加入 80ml 1% 氯化金水溶液。13 分钟后所述溶液变为亮红色且加热 20 分钟后停止并将所述溶液冷却至室温。通过在 100ml 所述金溶胶中加入 1ml 的 0. 2mg/ml 单克隆抗 CRP 7D9 和 0. 8mg/ml 非特异性小鼠 IgG 或 0. 2mg/ml 单克隆抗 CRP 10C11 和 0. 8mg/ml 非特异性小鼠 IgG 的混合物来制备偶联物。10 分钟后加入含 100mg/ml 牛血清白蛋白的 2ml 18 兆欧去离子水并室温悬浮搅拌 30 分钟。在 Beckman J2-21 离心机中以 13, 000RPM 沉淀所述混合物并将上清倾倒入含所述免疫金偶联物的红色小球。

[0100] BSA-DNP (二硝基苯基修饰的 BSA) 的免疫金偶联物用如下方法制备：通过在含 10mg/ml 无免疫球蛋白 IgG 的 10ml 1X PBS 中加入含 10 倍过量 DNP-X-SE (英杰 (Invitrogen) 公司分子探针) 的二甲基甲酰胺来制备 BSA-DNP。室温 1 小时后，所述反应混合物在艾本德微量离心机 (Eppendorf Microfuge) 中以 14, 000RPM 离心以去除黄色沉淀物。将上清浓缩到 1-1. 5ml 然后在 1X PBS 内用 Sephadex G-25 (法玛西亚 (Pharmacia) 公司) 色谱分析以将未反应的 DNP-X-SE 及其水解产物取出到 100ml 所述金溶胶中。通过在 100ml 的 28nm 金溶胶中加入 1ml 的 1mg/ml BSA-DNP 来制备 28nm 金的 BSA-DNP 免疫金偶联物。10 分钟后加入 2ml 含 100mg/ml 牛血清白蛋白的 18 兆欧去离子水并室温悬浮搅拌 30 分钟。在贝克曼 (Beckman) J2-21 离心机中以 13, 000RPM 离心所述混合物并将上清倾倒入含所述免疫金偶联物的红色小球。28nm 金溶胶的制备如 b. (上述) 所述，除了用 48ml 的 1% 柠檬酸钠替代 160ml。

[0101] 通过混合单克隆抗 CRP7D9-24nm 金偶联物 (参见上述 b.)、单克隆抗 CRP 10C11-24nm 金偶联物 (如上所述) 和 BSA-DNP 28nm 金 (如上所述) 来制备偶联板 (密理博 (Millipore) 玻璃纤维)。用 2mM 硼酸盐、0. 1% PEG 20, 000 将所述混合物稀释到合

适的浓度且随后与等量的 2mM 硼酸盐、0.1% PEG 20,000、10%海藻糖和 1%干酪素混合。1 : 20 稀释的最终包衣液中单克隆抗 CRP 7D9-24nm 金偶联物 (参见上述 b.) 对 OD 520 的作用为 0.65, 单克隆抗 CRP 10C11-24nm 金偶联物 (参见上述 b.) 为 0.39, 且 BDS-DNP-28nm 金为 0.39。所述偶联混合物在用 2mM pH 9 的硼酸盐、0.1% PEG 20,000、5%海藻糖和 0.5%干酪素预封闭的偶联板上形成条带。用 Biodot Quanti-3000 XYZ 分配平台 (Biodot Quanti-3000 XYZ Dispensing Platform) 以 2.5 μ l/cm 形成四条线。偶联板真空干燥过夜且随后 60°C 处理四天。

[0102] 样品板用 0.6055% Tris、0.12% EDTA. Na₂、1% BSA、4% Tween 20 和 3.33% HBR-1 中的浸涂 Ahlstrom 141 板材料预封闭。所述材料 37°C 干燥 2 小时然后真空干燥过夜。预封闭的样品板用 G&L 筒式剪切机 (G&L Drum Slitter) 切为 10mm 宽的条。

[0103] 缓冲板用 0.6055% Tris、0.12% EDTA. Na₂、1% BSA 和 4% Tween 20 中浸涂的 Ahlstrom 141 板材料预封闭。所述材料 37°C 干燥 2 小时然后真空干燥过夜。预封闭的缓冲板用 G&L 筒式剪切机切为 14mm 宽的条。

[0104] 用运动矩阵层合机 (Kinematics Matrix Laminator) 将由 70mm X 300mm 乙烯基背衬、包衣的 48mm X 300mm 硝酸纤维素片、10mm X 30mm 样品板、13mm X 300mm 偶联板和 14mm X 300mm 缓冲板组成的测试卡层压在一起并切成 3.4mm X 70mm 的条。所述条置于如 Thayer 等的美国专利第 6,528,323 号所述的盒子中。

[0105] 在 ReLIA 2 设备 (加州伯林格姆的 ReLIA 诊断系统公司 (ReLIA Diagnostic Systems, Burlingame, CA)) 中进行使用上述条的试验。将所述盒子置于所述设备的盒子盘中并输入样品特定信息。50 μ l 未稀释血清或血浆样品或 60 μ l 未稀释全血样品加入 Thayer 等的美国专利第 6,528,323 号所述的盒子的孔 1 中, 开始所述试验顺序。用传感器检测样品的添加且所述盒子退回所述设备中倒数计时 120 秒钟。结束时, 所述盒子盘从所述设备弹出且提示用户加入 100 μ l 偶联物释放缓冲液 (PBS 50mg/ml BSA)。仍用传感器检测缓冲液添加并开始所述测试顺序。在预定义的试验条件下 (33°C 下 20 分钟) 进行所述试验。结束时, 所述设备检测各测试和对照条带的反射密度 (DR) 并用连接所述设备的计算机获得结果。

[0106] 通过将人 CRP 浓缩液稀释到含很少或不含 CRP 的人血浆库中来制备 CRP 标准样品。此实施例的结果绘制为 RI (相对强度, 定义为所述测试条带的反射密度 (T1 或 T2) 除以高和低对照的反射密度均值) 的标准曲线。

[0107] 图 12、13 和 14 的结果显示 T1 的 RI 对比 CRP 浓度的动态范围约为 0.2-3mg/L CRP 且 T2 的 RI 对比 CRP 浓度的动态范围为约 3-约 20mg/L, 两标准曲线的结合产生的组合标准曲线的动态范围为约 0.2-20mg/L CRP。因此, 本实施例中描述的侧流试验准确地测量了患者样品中 0.2-20mg/L 的 CRP 浓度而不用样品稀释。

[0108] 实施例 2 : 3 条带 CRP 试验

[0109] 如实施例 1 所述精确制备所述条, 除了下述变化 : (1) 3 种而不是 2 种测试条带包被在所述硝酸纤维素上。用单克隆抗 CRP 12D8 以 0.2mg/ml 的浓度包衣 T1, 用单克隆抗 CRP 12D8 以 0.5mg/ml 的浓度包衣 T2, 用单克隆抗 CRP 12D8 以 1mg/ml 的浓度包衣 T3 ; (2) 山羊抗小鼠 IgG 以 1mg/ml 的浓度包衣所述高对照 (HC) ; (3) Thayer 等美国专利第 6,528,323 号所述测试条中条带的顺序为 (以与所述样品应用区的距离为顺序) : HC、T1、T2 和 T3 ; (4)

没有低对照 ;和 (5) 所述偶联板上没有包被 BSA-DNP 偶联物。

[0110] 如实施例 1 所述精确运行条。通过用 T1、T2、或 T3 的反射密度 (DR) 除以所述高对照 (HC) 的反射密度来计算 RI。

[0111] 图 15、16 和 17 证明 T1 RI 可用于检测约 0.25- 约 3mg/L 的 CRP 浓度,T2 RI 可用于检测约 2- 约 9mg/L 的 CRP 浓度且 T3 RI 可用于检测约 9- 约 20mg/L 的 CRP 浓度。然而,如图 18 和 19 所示,所述结合的 T2 和 T3 RI 值对比 CRP 浓度或所述结合的 T1、T2 和 T3 RI 值对比 CRP 浓度的标准曲线可用于扩大所述动态范围和检测约 0.25-20mg/L 的 CRP 浓度。

[0112] 除了用未稀释样品扩大侧流免疫试验分析的动态范围,3 条带 CRP 试验揭示出有关临床样品中分析物水平测量的其他信息。尽管通常的炎症由 6mg/L 或更高水平的 CRP 指示,但有时需要定量检测血清、血浆或全血中更高浓度的 CRP。然而,如本文所述的使用未稀释患者样品的试验产生所述高剂量钩效应,也称为前区。尽管患者样品中非常高浓度的 CRP (> 20mg/L) 不会将试验响应抑制到低于通常炎症的截止值,但可能报道不准确的 CRP 浓度。然而如表 1 所示,对于本文所述的 3 条带试验,随着 CRP 浓度升到 9mg/L 以上,T3 DR/T1 DR 的比例迅速升高,20mg/L 时 T3 DR/T1 DR 比例的均值达到 1.62。

[0113] 表 1

[0114]

标准品 mg/L	T3/T1 均值
6	0.092
9	0.249
12	0.542
15	0.953
20	1.608

[0115] 表 2 是上述 3 条带 CRP 试验中从 T2 和 T3 的组合标准曲线测量的 mg/L 表格,通过参考试验和所述 3 条带 CRP 试验的 T3 DR/T1 DR 比例检测 mg/L CRP。这些数据证明,所述参考试验和所述 3 条带 CRP 试验报道的 CRP 浓度低于 20mg/L 时,所述 T3 DR/T1 DR 比例高于 1.6。然而,当所述 3 条带 CRP 试验检测的 CRP 浓度低于 20mg/L 且所述参考试验检测的 CRP 浓度高于 20mg/L 时,T3 DR 与 T1 DR 的比例低于约 1.6。因此,T3 DR/T1 DR 高于 1.6 的样品是所述 3 条带 CRP 试验响应被所述高剂量钩效应抑制的样品,其含有高于 20mg/L 的 CRP。

[0116] 表 2

[0117]

样品	3 条带试验结果 (mg/L)	T3/T1	参考试验结果 (mg/L)
28	17.44	1.23	18.5

78	16.91	1.63	23
82	18.19	2.45	25.5
46	> 20	8.78	109.5
11	17.03	8.22	95
97	> 20	7.05	70.5
30	12.89	9.08	180.5
49	15.21	7.23	110
4	10.02	8.33	223

[0118] 实施例 3 :样品中 NT-proBNP 浓度的检测

[0119] DiNello 等在美国专利号 6,767,710 中所述的测试条用包衣密理博 (Millipore) HF 120 硝酸纤维素制备 (按与缓冲液应用区距离的顺序) 高对照 (HC) :1.0mg/ml 兔抗 DNP, 测试条 1 (T1) :1.5mg/ml 单克隆抗 NT-proBNP 15F11, 测试条 2 (T2) :1.0mg/ml 单克隆抗 NT-proBNP 15F11, 和低对照 (LC) :0.5mg/ml 兔抗 DNP。抗体溶于 PBS、5%海藻糖、5%甲醇以包衣并用 IVEK 平台式压条机以 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 包被所述硝酸纤维素。如实施例 1 所述制备单克隆抗 NT-proBNP 5B6 和单克隆抗 NT-pro BNP 11D1 与 48nm 金溶胶的偶联物, 并仍如实施例 1 所述将相同抗体偶联 120nm 金溶胶。还如实施例 1 所述制备偶联板。1 : 20 稀释的最终包衣液中单克隆抗 NT-proBNP 5B6-48nm 金偶联物对 OD 520 的作用为 1.3, 单克隆抗 proBNP 11D1-48nm 金偶联物为 1.3, 单克隆抗 NT-proBNP 5B6-120nm 金偶联物为 0.156, 单克隆抗 NT-proBNP 11D1-120nm 金偶联物为 0.156 且 BSA-DNP-28nm 金偶联物为 0.39。偶联板真空干燥过夜然后 60°C 处理 3 天。

[0120] 为了对比目的, 如上所述制备仅含一测试条带的硝酸纤维素条。包衣在这些条上的条带为 (按与样品应用区距离的顺序) :高对照 (HC) :1.0mg/ml 兔抗 DNP, 测试条带 (T) :1mg/ml 单克隆抗 NT-proBNP 15F11 和低对照 (LC) :0.5mg/ml 兔抗 DNP。抗体溶于 PBS、5%海藻糖、5%甲醇以包衣并用 IVEK 平台式压条机以 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 包被所述硝酸纤维素。如实施例 1 所述制备单克隆抗 NT-proBNP 5B6 和单克隆抗 NT-pro BNP 11D1 与 120nm 金溶胶和 BSA-DNP-28nm 金的偶联物。如实施例 1 所述制备偶联板。1 : 20 稀释的最终包衣液中单克隆抗 NT-proBNP 5B6-120nm 金偶联物对 OD 520 的作用为 0.65, 单克隆抗 proBNP 11D1-48nm 金偶联物为 0.65 且 BSA-DNP-28nm 金偶联物为 0.26。

[0121] 在 ReLIA 2 设备 (加州伯林格姆的 ReLIA 诊断系统公司 (ReLIA Diagnostic Systems, Burlingame, CA)) 中进行使用上述条的试验。将所述盒子置于所述设备的盒子盘中并输入样品特定信息。然后将 $50\mu\text{l}$ 等分的预湿缓冲液加入 DiNello 等的美国专利第 6,767,710 号所述盒子的孔 1 中。用传感器检测缓冲液的添加且所述盒子退回所述设备中倒数计时 120 秒钟。结束时, 所述盒子盘从所述设备弹出且提示用户加入 $100\mu\text{l}$ 血清 / 血浆样品或 $120\mu\text{l}$ 全血样品。仍用传感器检测样品加入并开始所述测试顺序。在预定义的

试验条件下 (33°C 下 20 分钟) 进行所述试验。结束时, 所述设备检测各测试和对照条带的反射密度 (DR) 且随后用连接所述设备的计算机获得结果。

[0122] 通过用 T1 或 T2 的反射密度 (DR) 除以所述高对照 (HC) 和低对照 (LC) 条带的反射密度均值来计算各条带的相对强度 (RI)。

[0123] 图 20 证明所述一条带 NT-proBNP 试验的动态范围为约 85.65pg/ml- 约 3000pg/ml。3000pg/ml 以上时, 所述标准曲线变平程度为高于 3000pg/ml 的浓度不能区别于 3000pg/ml。然而, 图 21 证明通过添加 2 种单独 RI 值将 T1 的 RI 和 T2 的 RI 相结合的 2 条带试验具有动态范围从约 88.89pg/ml 扩大到高于 10,000pg/ml, 使得用户能准确测量高于 3000pg/ml 的浓度而不用样品稀释。

[0124] 本发明中提及的所有专利和出版物通过引用清楚地全文纳入本文。

[0125] 尽管参考目前优选的实施方式描述了本发明, 但应该理解可作出不同改进而不背离本发明的精神。因此, 本发明的范围仅仅由所附权利要求书限制。

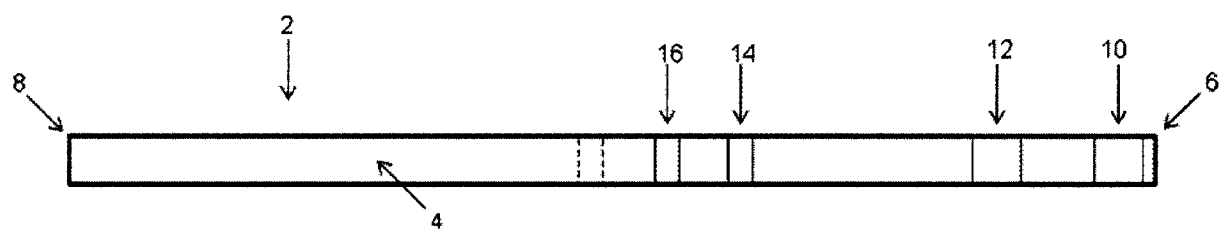


图 1

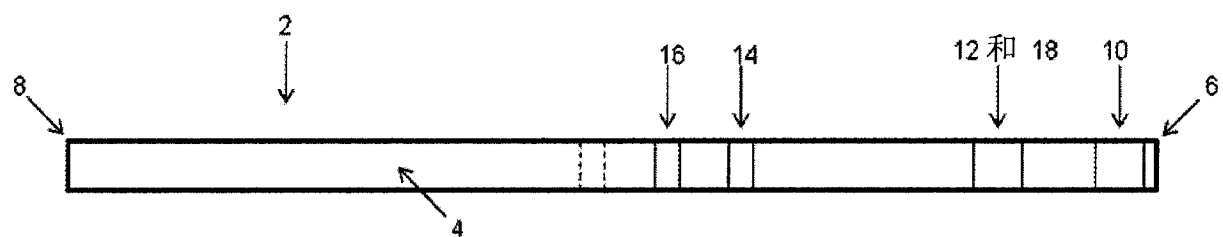


图 2

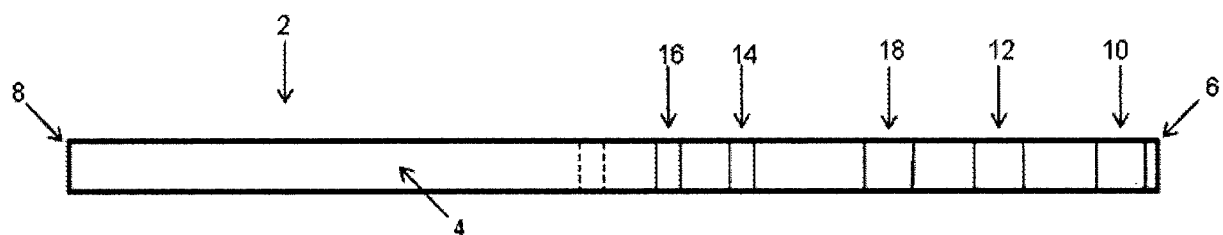


图 3

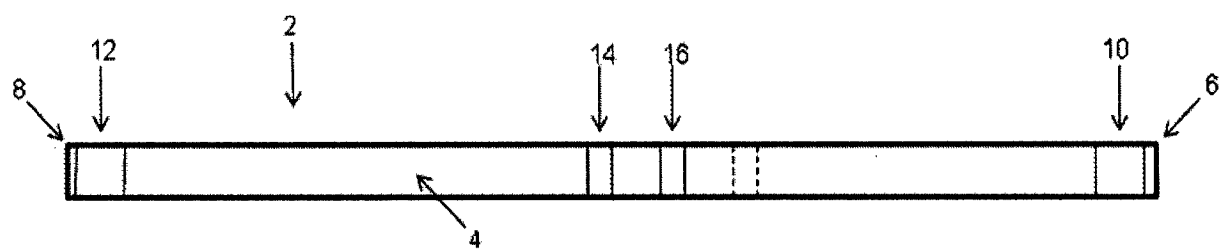


图 4

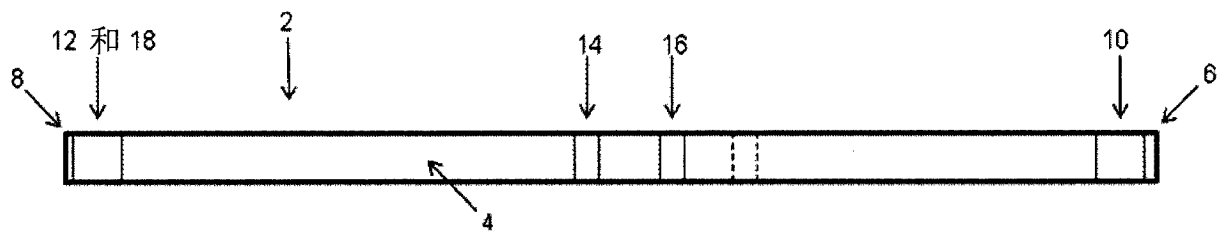


图 5

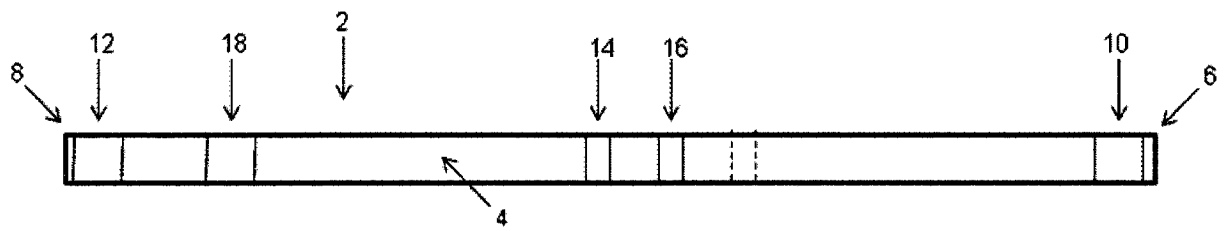


图 6

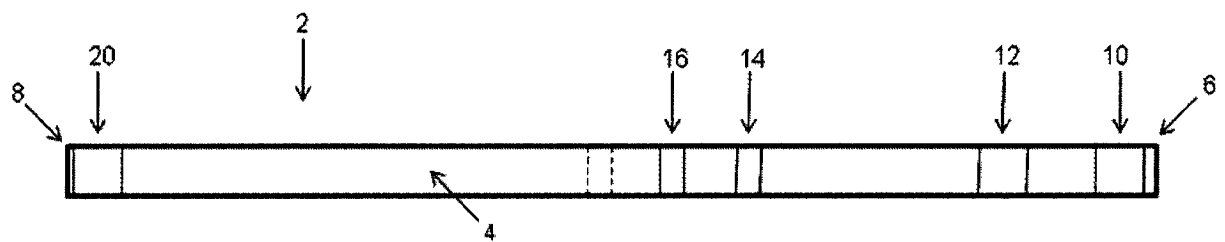


图 7

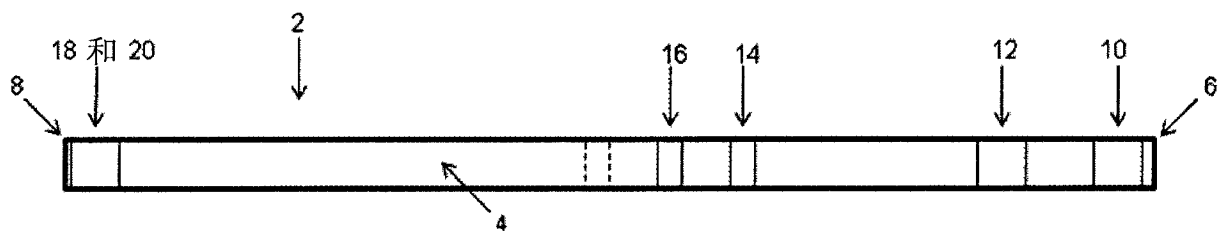


图 8

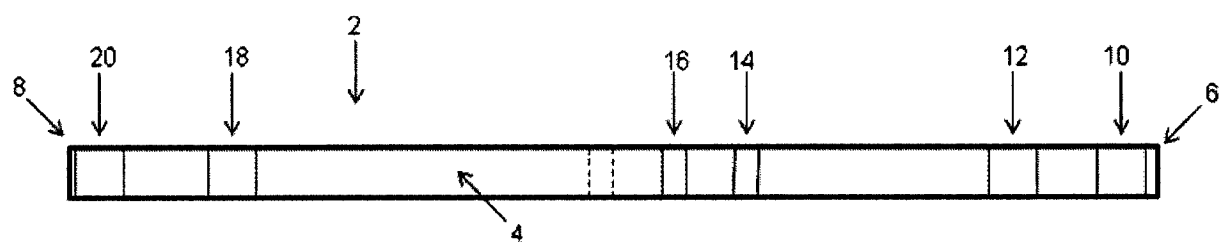


图 9

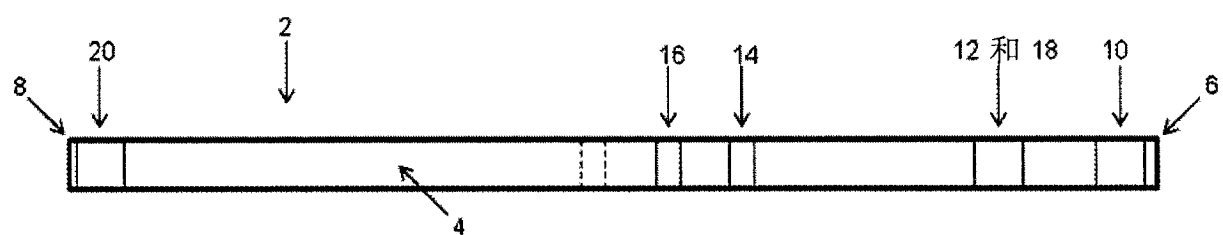


图 10

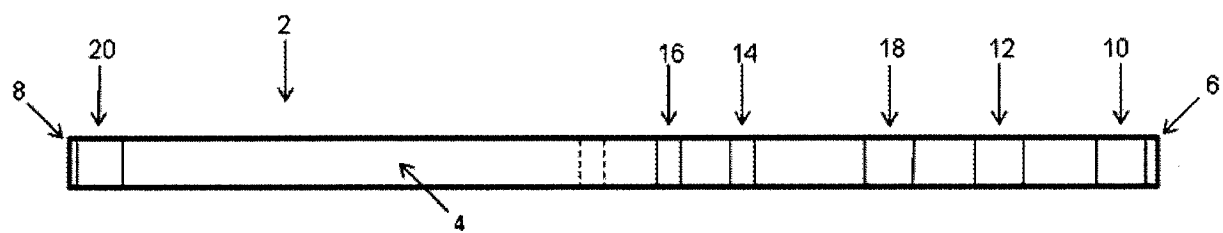


图 11

试验: CRP

批次: 18

数据点概述						
剂量	0.18 ng/ml	0.43 ng/ml	0.68 ng/ml	1.18 ng/ml	3.18 ng/ml	6.18 ng/ml
RI 均值	0.113	0.234	0.336	0.610	1.322	1.726
标准偏差	0.003	0.021	0.033	0.029	0.072	0.072
CV%	2.94	9.10	9.01	4.79	5.45	4.17
拟合的数据点						
剂量	0.18 ng/ml	0.43 ng/ml	0.68 ng/ml	1.18 ng/ml	3.18 ng/ml	6.18 ng/ml
重复 1	0.177	0.466	0.642	1.197	3.246	5.489
重复 2	0.161	0.393	0.715	1.154	3.306	5.641
重复 3	0.151	0.510	0.632	1.104	3.762	6.733
重复 4	0.159	0.427	0.712	1.255	2.992	7.700
重复 5	0.156	0.407	0.657	1.177	2.792	6.864
重复 6	0.154	0.423	0.798	1.099	3.152	5.255
剂量均值	0.160	0.438	0.693	1.164	3.208	6.281
标准偏差	0.009	0.043	0.062	0.059	0.329	0.964
CV%	5.78	9.80	9.01	5.06	10.26	15.35

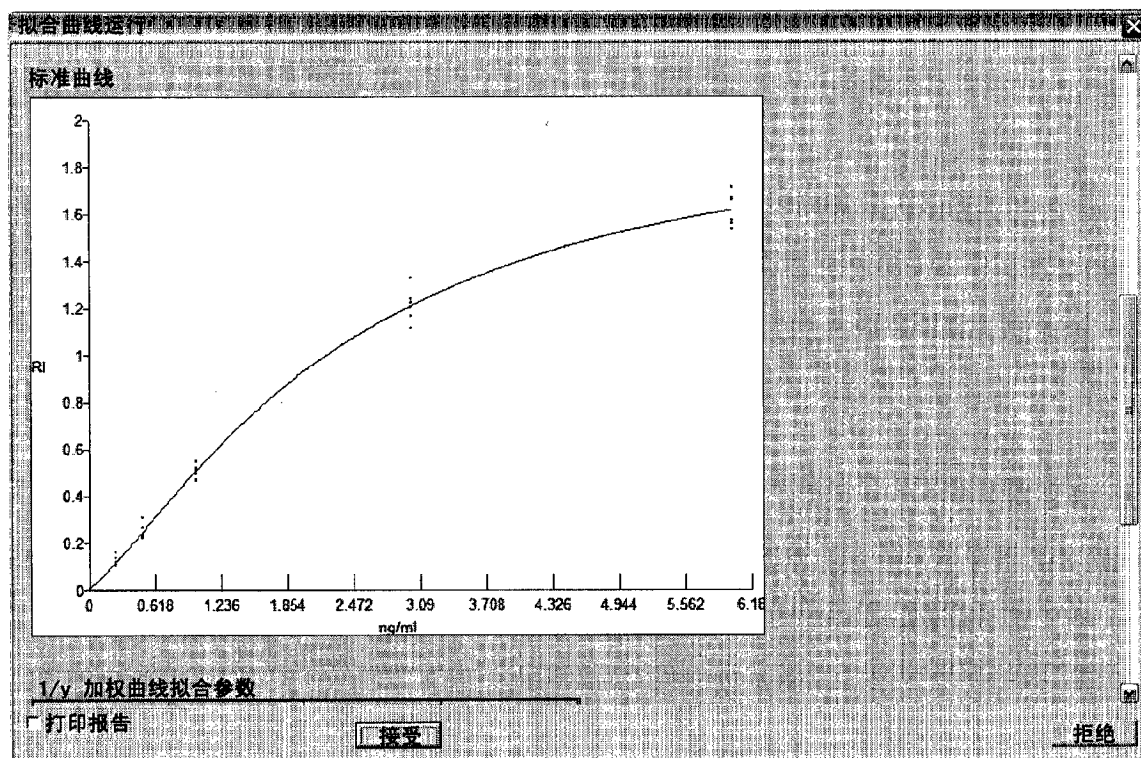


图 12

试验: CRP

批次: 18

数据点概述						
剂量	0.18 mg/L	3.18 mg/L	6.18 mg/L	9.18 mg/L	12.18 mg/L	20.18 mg/L
RI 均值	0.051	0.170	0.419	1.012	1.626	2.583
标准偏差	0.006	0.015	0.043	0.078	0.143	0.210
CV%	10.85	8.98	10.39	7.75	8.80	8.14
拟合的数据点						
剂量	0.18 mg/L	3.18 mg/L	6.18 mg/L	9.18 mg/L	12.18 mg/L	20.18 mg/L
重复 1	1.112	3.612	5.909	9.243	12.226	18.627
重复 2	-0.581	3.402	5.601	9.105	12.782	22.109
重复 3	0.816	3.351	6.156	10.224	12.177	18.427
重复 4	-0.670	3.311	5.863	9.716	12.888	17.784
重复 5	-0.652	3.019	5.548	9.131	14.491	21.353
重复 6	-0.442	3.498	5.210	9.251	12.868	18.246
剂量均值	-0.070	3.366	5.715	9.445	12.905	19.424
标准偏差	0.810	0.201	0.332	0.441	0.840	1.824
CV%		5.99	5.80	4.67	6.51	9.39

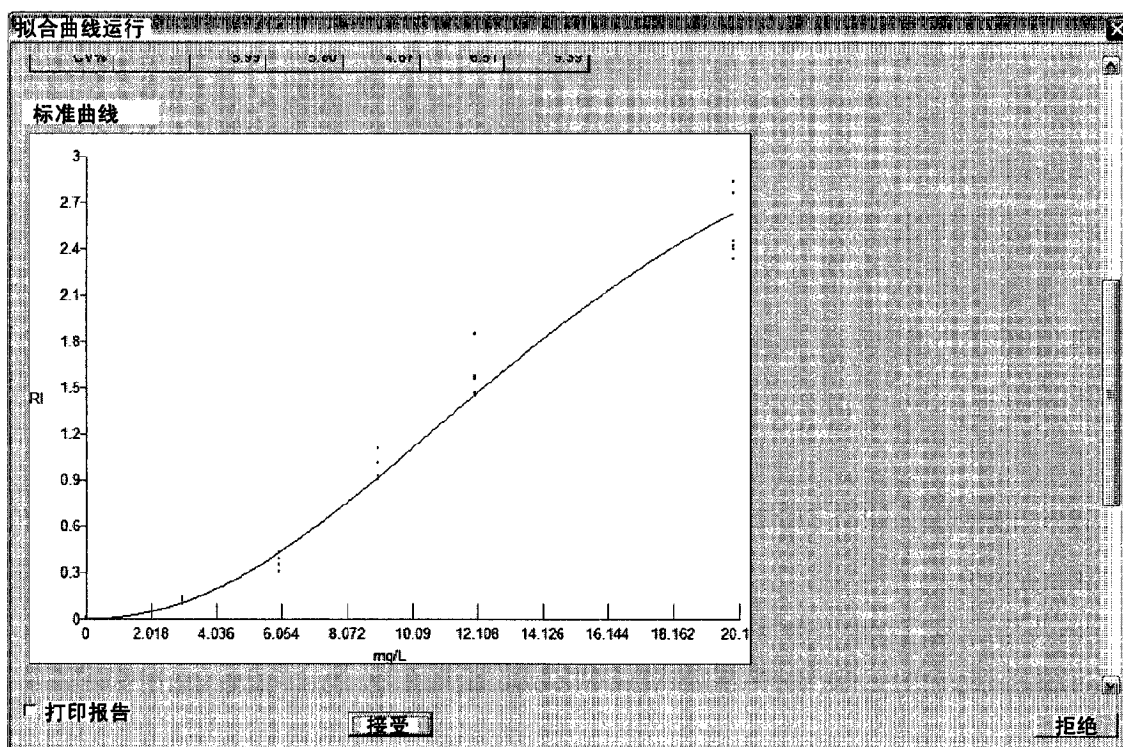


图 13

试验: CRP

批次: 17

数据点概述									
剂量	0.18 ng/ml	0.43 ng/ml	0.68 ng/ml	1.18 ng/ml	3.18 ng/ml	6.18 ng/ml	9.18 ng/ml	12.18 ng/ml	20.18 ng/ml
RI 均值	0.164	0.293	0.422	0.686	1.491	2.144	2.924	3.702	4.811
标准偏差	0.008	0.021	0.041	0.026	0.081	0.101	0.132	0.146	0.497
CV%	4.89	7.19	9.80	3.81	5.42	4.70	4.51	3.96	10.33
拟合的数据点									
剂量	0.18 ng/ml	0.43 ng/ml	0.68 ng/ml	1.18 ng/ml	3.18 ng/ml	6.18 ng/ml	9.18 ng/ml	12.18 ng/ml	20.18 ng/ml
重复 1	0.200	0.449	0.609	1.316	3.528	5.479	8.025	12.355	19.442
重复 2	0.166	0.377	0.717	1.278	3.515	5.384	9.397	12.382	30.416
重复 3	0.174	0.488	0.606	1.203	3.780	5.975	8.722	12.731	18.963
重复 4	0.164	0.399	0.709	1.361	3.277	6.036	9.449	12.314	16.878
重复 5	0.162	0.390	0.624	1.271	3.064	5.702	8.221	14.652	23.595
重复 6	0.164	0.404	0.832	1.208	3.434	5.075	9.159	13.132	19.160
剂量均值	0.172	0.418	0.683	1.273	3.433	5.608	8.829	12.928	21.409
标准偏差	0.015	0.042	0.088	0.061	0.244	0.368	0.607	0.900	4.926
CV%	8.45	10.05	12.90	4.82	7.10	6.56	6.88	6.97	23.01

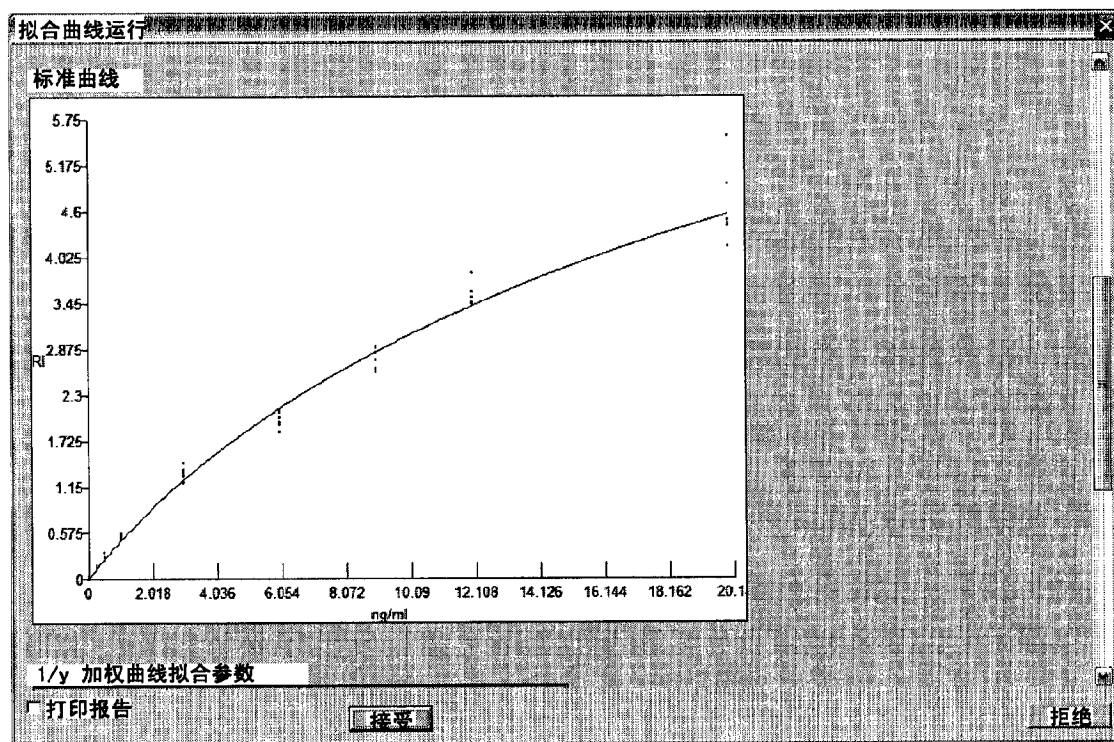


图 14

试验: CRP

批次: 9

数据点概述								
剂量	0 mg/L	0.25 mg/L	0.5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	3 mg/L	4 mg/L	6 mg/L
RI 均值	0.027	0.111	0.173	0.357	0.678	0.931	1.037	1.094
标准偏差	0.003	0.012	0.010	0.038	0.049	0.041	0.032	0.036
CV%	11.69	10.51	5.86	10.68	7.18	4.45	3.13	3.34
拟合的数据点								
剂量	0 mg/L	0.25 mg/L	0.5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	3 mg/L	4 mg/L	6 mg/L
重复 1	-0.018	0.371	0.538	1.062	1.929	3.116	4.092	5.151
重复 2	0.056	0.323	0.500	0.859	2.008	2.812	4.102	4.245
重复 3	-0.009	0.365	0.554	0.893	1.716	3.068	4.208	5.129
重复 4	-0.069	0.421	0.528	0.898	1.647	3.234	5.024	5.792
重复 5	0.030	0.375	0.499	1.045	1.975	3.603	3.897	5.725
重复 6	0.026	0.346	0.556	1.036	2.095	3.686	4.955	6.429
剂量均值	0.003	0.367	0.529	0.966	1.895	3.253	4.379	5.412
标准偏差	0.044	0.033	0.025	0.091	0.175	0.334	0.484	0.747
CV%	1720.02	8.94	4.75	9.47	9.25	10.26	11.04	13.80

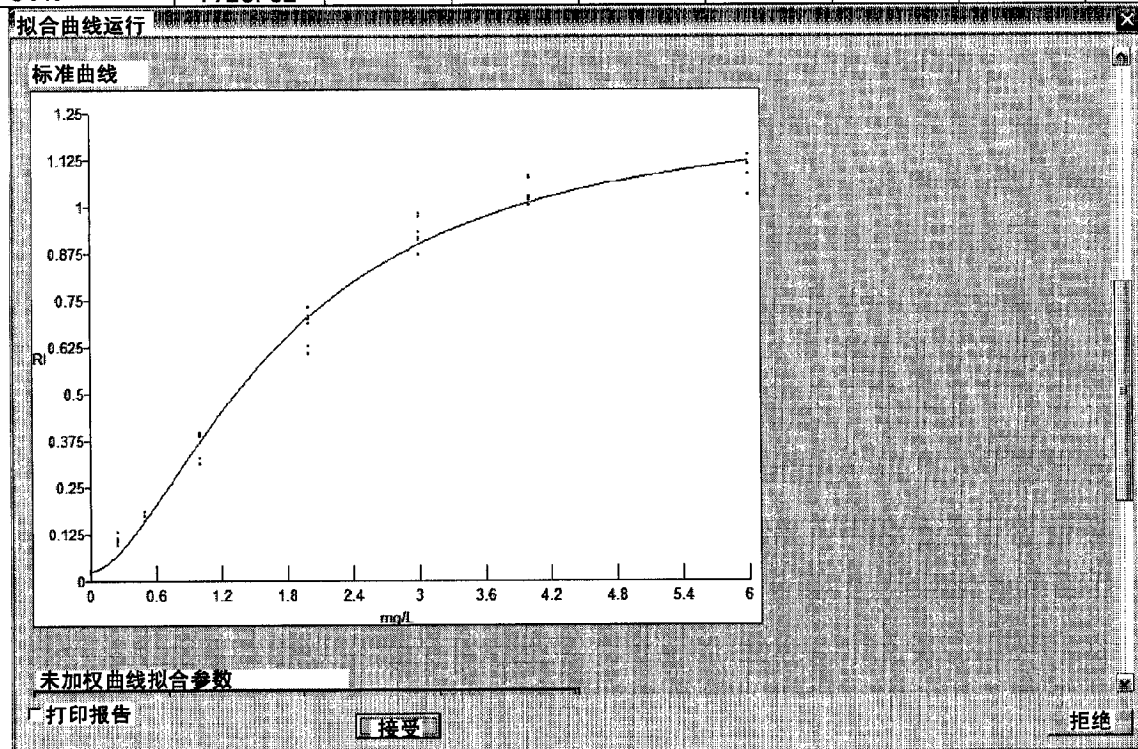


图 15

试验: CRP

批次: 9

数据点概述											
剂量	0 mg/L	0.25 mg/L	0.5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	3 mg/L	4 mg/L	6 mg/L	9 mg/L	12 mg/L	15 mg/L
RI 均值	0.013	0.043	0.066	0.122	0.254	0.458	0.690	1.290	1.778	2.010	2.049
标准偏差	0.003	0.008	0.010	0.013	0.035	0.063	0.090	0.112	0.112	0.156	0.110
CV%	22.69	19.48	15.05	10.85	13.63	13.81	13.07	8.67	6.31	7.77	5.38
拟合的数据点											
剂量	0 mg/L	0.25 mg/L	0.5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	3 mg/L	4 mg/L	6 mg/L	9 mg/L	12 mg/L	15 mg/L
重复 1	-	0.188	0.778	1.166	1.637	2.098	2.814	3.819	6.140	10.841	17.726
重复 2	-	0.371	0.746	1.021	1.429	2.304	2.838	3.609	5.317	8.044	11.808
重复 3	-	0.231	0.935	1.236	1.461	2.016	2.842	3.639	6.691	8.808	15.340
重复 4	-	0.385	1.024	1.007	1.537	2.154	2.963	4.059	6.211	8.474	10.114
重复 5	-	0.122	0.920	1.131	1.619	2.261	3.359	3.414	6.456	9.402	13.692
重复 6	-	0.318	0.841	1.193	1.571	2.428	3.177	4.234	5.683	10.757	18.128
剂量均值	0.040	0.874	1.126	1.542	2.210	2.999	3.796	6.083	9.388	13.757	15.077
标准偏差	0.310	0.105	0.093	0.084	0.150	0.222	0.306	0.505	1.180	3.482	5.115
CV%		12.02	8.27	5.44	6.79	7.42	8.05	8.30	12.57	25.31	33.93

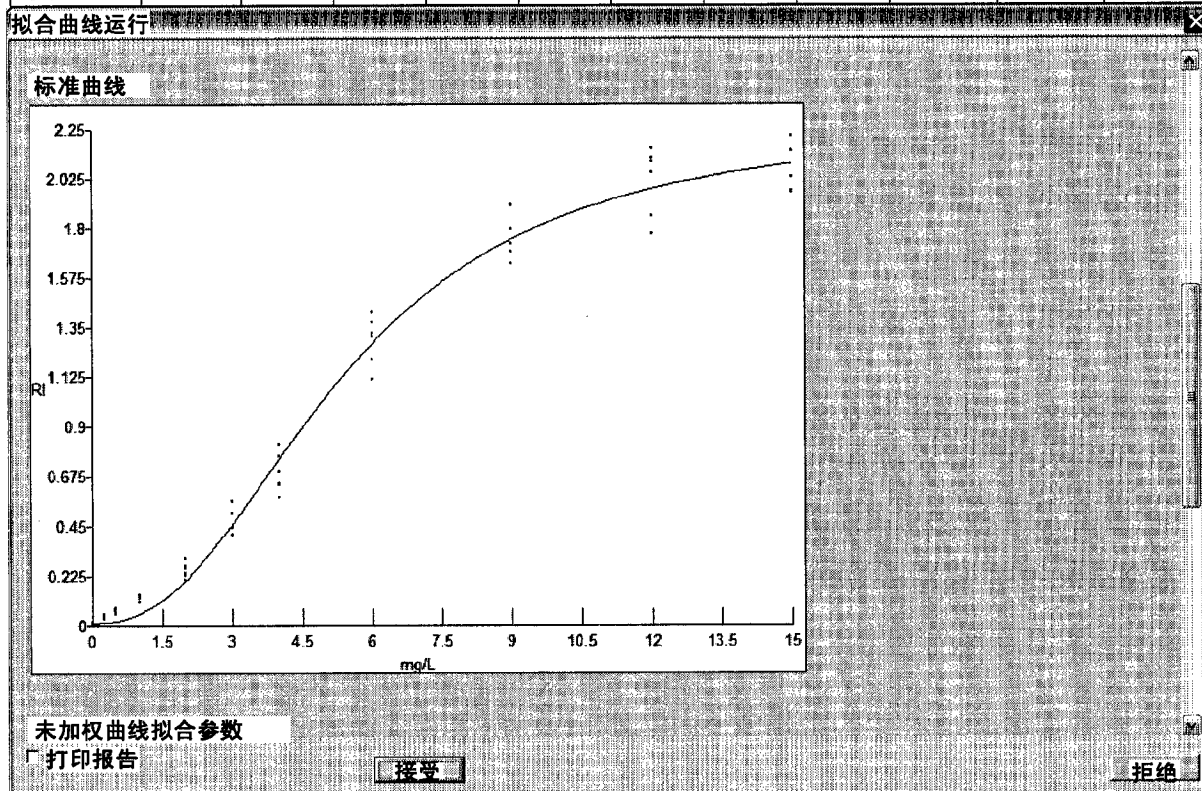


图 16

试验: CRP

批次: 10

数据点概述						
剂量	0 mg/L	3 mg/L	9 mg/L	12 mg/L	15 mg/L	20 mg/L
RI 均值	0.002	0.034	0.316	0.575	1.036	1.753
标准偏差	0.003	0.007	0.065	0.159	0.175	0.168
CV%	180.37	21.16	20.40	27.61	16.94	9.61
拟合的数据点						
剂量	0 mg/L	3 mg/L	9 mg/L	12 mg/L	15 mg/L	20 mg/L
重复 1	3.297	5.128	9.637	10.351	15.990	17.938
重复 2	-2.337	4.761	9.096	11.389	14.010	21.034
重复 3	-2.337	5.256	9.761	11.807	13.982	18.954
重复 4	-2.337	4.740	9.060	10.756	13.424	22.022
重复 5	-1.787	5.549	9.851	13.111	15.564	20.984
重复 6	-1.615	5.191	10.677	12.973	15.956	21.709
剂量均值	-1.186	5.104	9.680	11.731	14.821	20.440
标准偏差	2.219	0.310	0.593	1.134	1.142	1.627
CV%		6.07	6.13	9.66	7.71	7.96

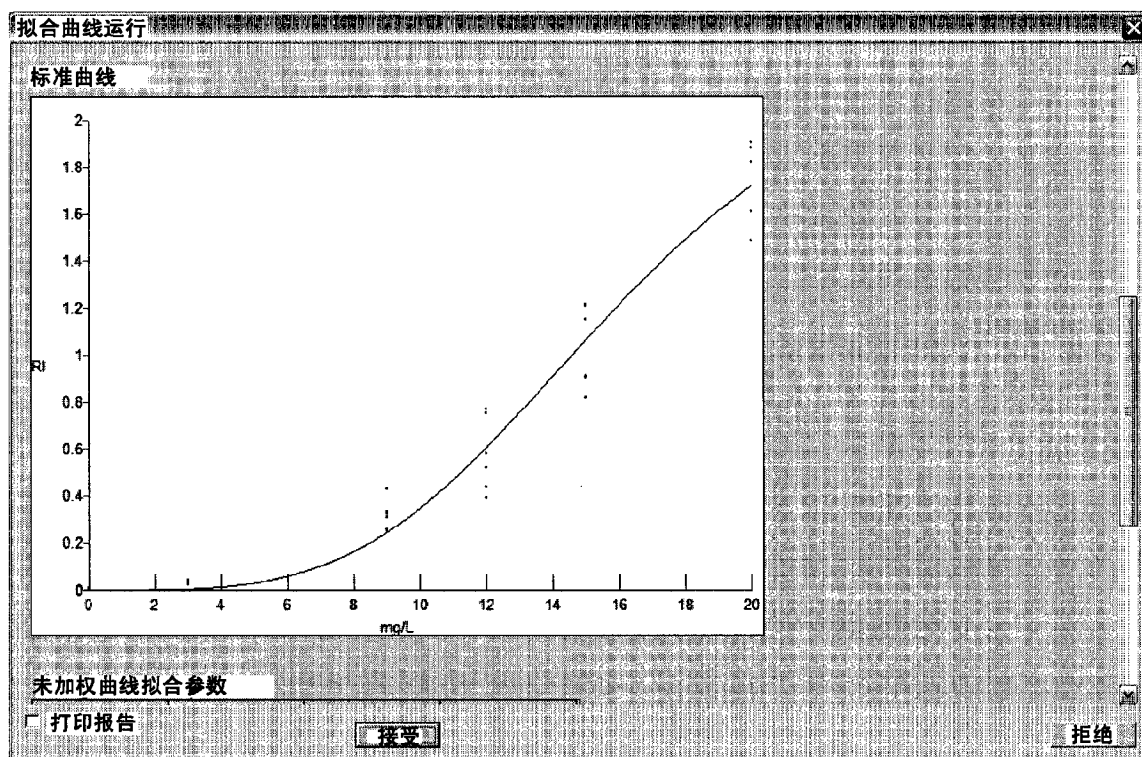
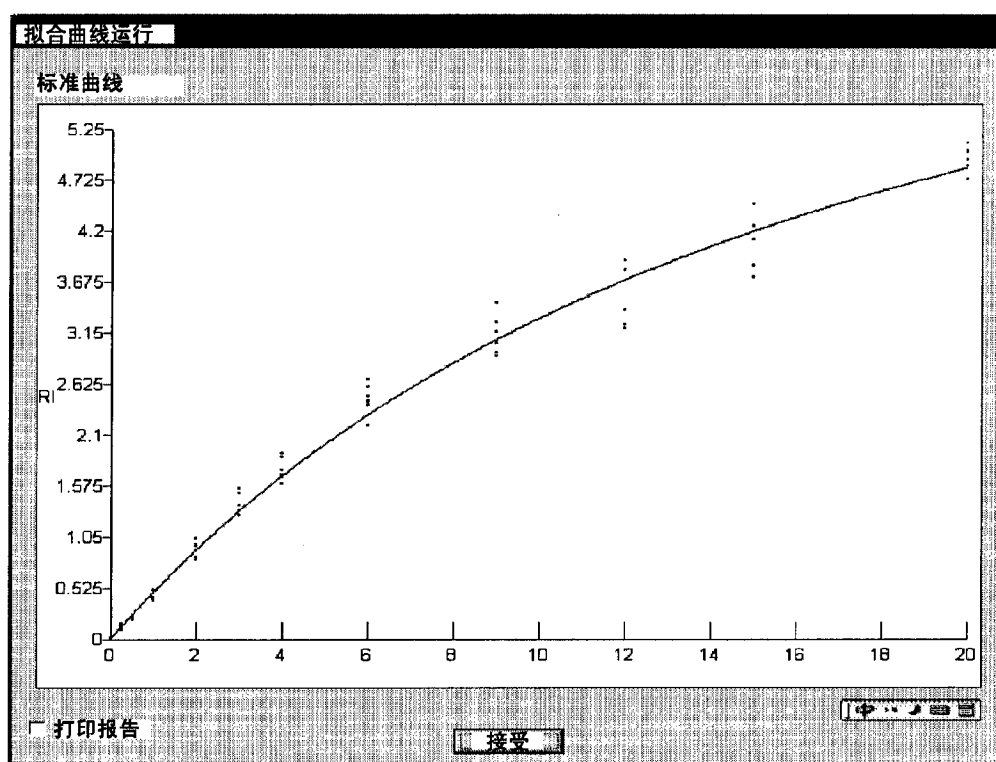


图 17

试验: HS-CRP

批次: 0



数据点概述												
剂量	0	0.25	0.5	1	2	3	4	6	9	12	15	20
RI 均值	0.042	0.161	0.249	0.491	0.955	1.423	1.778	2.503	3.161	3.600	4.071	4.983
标准偏差	0.007	0.019	0.019	0.054	0.082	0.106	0.127	0.166	0.205	0.331	0.288	0.133
CV%	15.75	11.86	7.65	11.01	8.61	7.46	7.12	6.63	6.50	9.19	7.08	2.68
拟合的数据点												
剂量	0	0.25	0.5	1	2	3	4	6	9	12	15	20
重复 1	0.010	0.243	0.448	1.069	1.979	3.016	4.168	6.495	9.780	10.399	15.289	21.706
重复 2	0.013	0.193	0.386	0.813	2.132	2.896	3.947	5.608	8.265	9.677	12.832	20.145
重复 3	-0.007	0.239	0.485	0.829	1.771	3.028	4.020	7.324	8.843	13.139	12.749	19.007
重复 4	-0.024	0.312	0.391	0.871	1.784	3.146	4.593	6.647	8.405	9.510	12.127	21.486
重复 5	0.001	0.262	0.404	1.051	2.096	3.624	3.755	7.018	9.327	12.518	14.448	20.702
重复 6	0.007	0.231	0.451	1.022	2.263	3.475	4.704	6.326	10.732	13.100	16.920	22.398
剂量均值	0.000	0.247	0.427	0.942	2.004	3.197	4.198	6.569	9.225	11.390	14.061	20.907
标准偏差	0.014	0.039	0.040	0.118	0.198	0.288	0.375	0.594	0.931	1.715	1.833	1.219
CV%		15.98	9.28	12.47	9.86	9.00	8.94	9.05	10.09	15.06	13.04	5.83

图 18

试验: HS-CRP 批次: 0

数据点概述												
剂量	0	0.25	0.5	1	2	3	4	6	9	12	15	20
RI 均值	0.015	0.050	0.076	0.134	0.277	0.492	0.741	1.409	2.094	2.585	3.084	3.900
标准偏差	0.004	0.008	0.012	0.017	0.037	0.068	0.096	0.150	0.166	0.262	0.278	0.129
CV%	28.15	15.60	15.65	12.52	13.35	13.87	12.94	10.68	7.95	10.15	9.00	3.31
拟合的数据点												
剂量	0	0.25	0.5	1	2	3	4	6	9	12	15	20
重复 1	0.104	0.379	0.651	1.105	1.678	2.578	3.957	6.687	10.275	11.635	16.184	19.994
重复 2	0.053	0.313	0.543	0.898	1.898	2.572	3.626	5.845	8.804	10.637	13.505	19.112
重复 3	-0.067	0.384	0.727	0.855	1.535	2.628	3.700	7.638	9.521	12.489	13.444	18.057
重复 4	-0.111	0.507	0.476	0.965	1.674	2.731	4.302	6.745	9.033	10.624	13.005	20.082
重复 5	-0.029	0.444	0.611	1.095	1.867	3.328	3.407	7.181	9.844	13.215	15.142	19.771
重复 6	0.055	0.405	0.609	1.038	2.057	3.051	4.472	6.278	10.804	13.654	16.551	20.453
剂量均值	0.001	0.406	0.603	0.992	1.785	2.815	3.911	6.729	9.714	12.042	14.639	19.578
标准偏差	0.083	0.066	0.087	0.104	0.189	0.309	0.412	0.635	0.755	1.290	1.529	0.867
CV%		16.16	14.36	10.45	10.61	10.97	10.54	9.44	7.77	10.71	10.44	4.43

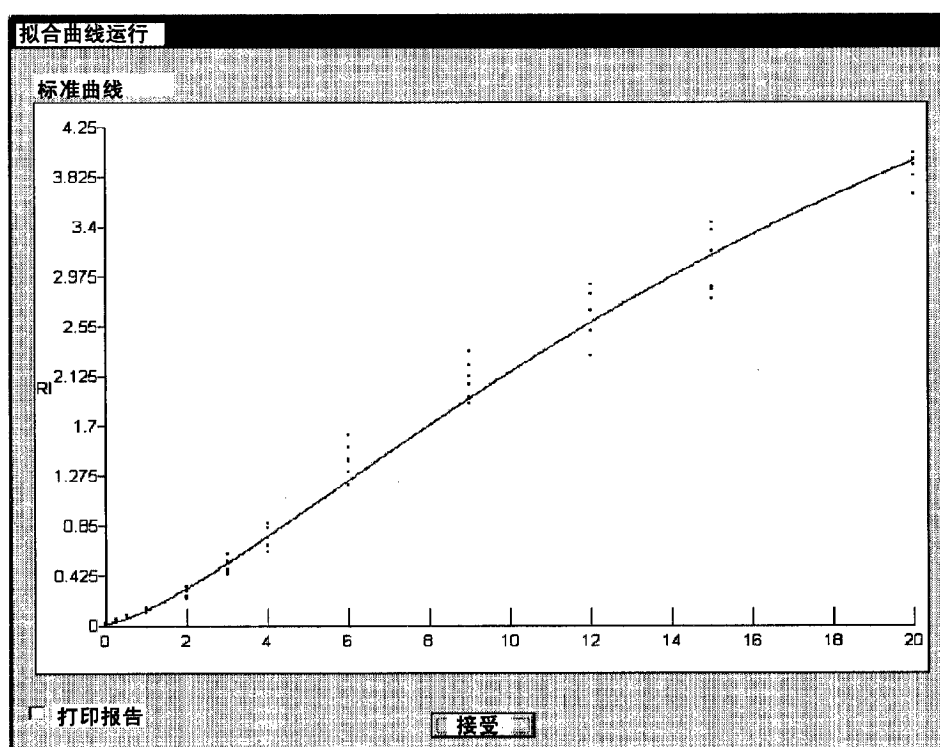


图 19

试验: NT-PROBNP 批次: 0

数据点概述									
剂量	0	125	187.5	250	312.5	500	1000	2000	3000
RI 均值	0.000	0.014	0.041	0.065	0.105	0.196	0.449	0.861	1.186
标准偏差	0.000	0.011	0.008	0.012	0.008	0.017	0.050	0.066	0.087
CV%		79.24	20.17	18.60	7.92	8.63	11.12	7.62	7.34
拟合的数据点									
剂量	0	125	187.5	250	312.5	500	1000	2000	3000
重复 1	-0.000	55.909	186.584	292.689	343.844	587.153	848.704	2054.653	2716.178
重复 2	-0.000	130.530	149.970	252.367	346.656	511.084	971.651	1638.42	3384.535
重复 3	-0.000	151.684	170.337	209.274	358.154	539.529	1129.688	1952.538	3629.695
重复 4	-0.000	50.313	171.777	269.605	339.628	503.568	1061.884	1805.472	3510.432
重复 5	-0.000	56.477	211.639	229.909	350.698	518.590	997.191	1962.452	2572.930
重复 6	-0.000	68.984	209.948	231.061	305.214	502.965	978.962	2132.069	3194.233
剂量均值	-0.000	85.650	183.376	247.484	340.699	527.148	998.013	1924.268	3168.001
标准偏差	0.000	43.902	24.231	30.316	18.495	32.330	94.625	177.910	432.723
CV%		51.26	13.21	12.25	5.43	6.13	9.48	9.25	13.66

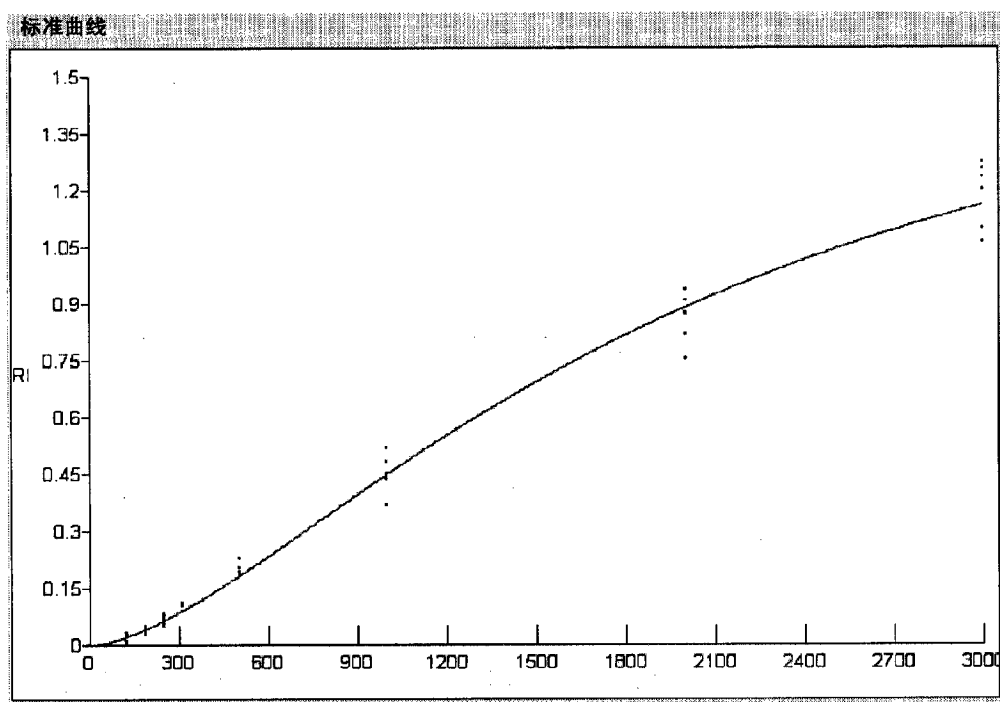


图 20

数据点概述									
剂量	0	100	250	500	1000	3000	6000	10000	15000
RI 均值	0	0.026	0.067	0.143	0.378	1.345	2.276	3.221	3.673
标准偏差	0	0.017	0.010	0.009	0.024	0.061	0.130	0.165	0.176
CV%	210	67.51	14.25	5.97	6.38	4.51	5.71	5.12	4.79
拟合的数据点									
剂量	0	100	250	500	1000	3000	6000	10000	15000
重复 1	-19.45	192.472	290.293	465.772	918.608	3114.462	6349.107	10101.46	16160.280
重复 2	25.42	153.208	227.303	434.089	959.056	3090.267	5740.476	10219.000	13069.185
重复 3	70.26	25.653	253.631	458.021	1064.186	3109.184	5909.982	11737.610	15216.409
重复 4	-19.45	128.187	291.974	441.742	937.718	2989.839	5073.399	10631.84	21163.376
重复 5	-19.45	61.099	273.513	446.942	1012.706	3157.747	5753.524	9101.474	14148.538
重复 6	-15.47	225.210	261.236	489.544	1062.175	2979.221	6353.711	9579.441	12047.307
重复 7	-19.45	113.486	226.018	442.961	980.854	2939.799	5373.630	9564.528	12872.031
重复 8	-12.39	90.463	236.715	486.854	1029.615	3362.413	5572.524	10483.65	14914.204
重复 9	-19.45	117.248	280.255	455.056	1035.152	2883.416	5247.478	10502.06	14826.606
Rep10	-15.32	16.706	213.215	492.038	962.498	3233.174	6281.324	13718.490	15280.222
剂量均值	-4.474	112.373	255.415	461.302	996.257	3085.952	5765.516	10563.96	14969.816
标准偏差	29.630	67.390	28.518	21.424	51.718	144.392	460.972	1324.274	2520.732
CV%		59.97	11.17	4.64	5.19	4.68	8.00	12.54	16.84

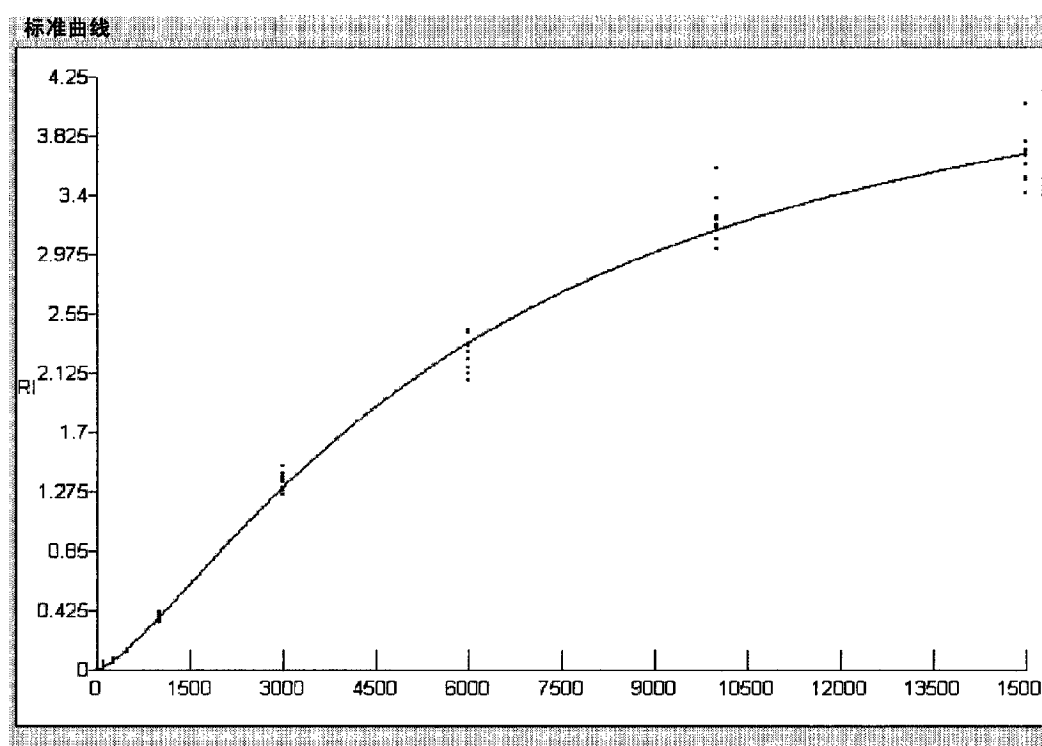


图 21