



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111936852 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 09

(21) 申请号 201980015175.0

(22) 申请日 2019.01.24

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111936852 A

(43) 申请公布日 2020.11.13

(30) 优先权数据  
62/622,878 2018.01.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.08.25

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2019/015008 2019.01.24

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/147853 EN 2019.08.01

(73) 专利权人 贝克顿·迪金森公司  
地址 美国新泽西州

(72) 发明人 任汇森 杨健 G·刘

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245  
专利代理师 张全信

(51) Int.Cl.  
G01N 33/48 (2006.01)  
G01N 33/50 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/558 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 20140706862014.05.08  
CN 1057232202016.06.29

审查员 牛牧川

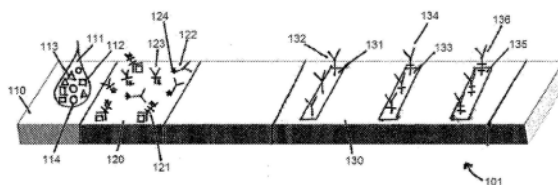
权利要求书8页 说明书32页 附图6页

## (54) 发明名称

区分细菌感染和病毒感染的多重横向流测定物

## (57) 摘要

本文描述的横向流测定装置、系统和方法测量样品中多种目标分析物的浓度,并且可以确定多种目标分析物的精确浓度,其中一种或多种目标分析物在样品中以高浓度存在和其中一种或多种目标分析物以低浓度存在。当在单次施加中将单个样品施加至单个横向流测定物时,包括当第一目标分析物在单个样品中以单个样品中第二目标分析物的浓度的百万分之一存在时,可以确定多种分析物中每种精确浓度。



1. 检测样品中以不同浓度存在的第一目标分析物和第二目标分析物的方法,所述方法包括:

提供横向流测定物,其包括:

第一复合物,其连接至所述横向流测定物的流动路径,所述第一复合物包括标记物、特异性结合所述第一目标分析物的抗体或其片段,和所述第一目标分析物,

标记的第二抗体或其片段,其连接至所述流动路径并配置为特异性结合所述第二目标分析物,

所述第一复合物下游的第一捕获区,所述第一捕获区包括对所述第一目标分析物具有特异性的第一固定化捕获剂,和

位于所述标记的第二抗体或其片段下游并包括对所述第二目标分析物具有特异性的第二固定化捕获剂的第二捕获区;

将所述样品施加至所述第一复合物和所述标记的第二抗体或其片段;

使所述第二目标分析物与所述标记的第二抗体或其片段结合以形成第二复合物;

使所述样品和所述第一复合物流动至所述第一捕获区,其中所述样品中的所述第一目标分析物和所述第一复合物竞争结合所述第一捕获区中的所述第一固定化捕获剂;

使所述流动路径中的所述第二复合物流动至所述第二捕获区并将所述第二复合物与所述第二捕获区中的所述第二固定化捕获剂结合;

检测来自所述第一捕获区中结合至所述第一固定化捕获剂的所述第一复合物的第一信号和来自所述第二捕获区中结合至所述第二固定化捕获剂的所述第二复合物的第二信号;和

使所述第一信号与所述样品中存在的所述第一目标分析物的浓度相关联。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中由结合所述第一捕获区中的所述第一固定化捕获剂的所述第一复合物检测的所述第一信号随着所述样品中所述第一目标分析物的浓度增加而降低,和其中由结合所述第二捕获区中的所述第二固定化捕获剂的所述第二复合物检测的所述第二信号随着所述样品中所述第二目标分析物的浓度增加而增加。

3. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括检测所述样品中第三目标分析物,其中所述横向流测定物包括:

标记的第三抗体或其片段,其连接至所述流动路径并配置为特异性结合所述第三目标分析物;和

位于所述标记的第三抗体或其片段下游并包括对所述第三目标分析物具有特异性的第三固定化捕获剂的第三捕获区。

4. 根据权利要求3所述的方法,进一步包括:

将所述样品施加至所述标记的第三抗体或其片段;

使所述第三目标分析物与所述标记的第三抗体或其片段结合以形成第三复合物;

使所述流动路径中的所述第三复合物流动至所述第三捕获区并将所述第三复合物与所述第三捕获区中的所述第三固定化捕获剂结合;和

检测来自所述第三捕获区中结合至所述第三固定化捕获剂的所述第三复合物的第三信号。

5. 根据权利要求4所述的方法,进一步包括使所述第三信号与所述样品中所述第三目

标分析物的浓度相关联。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一目标分析物包括C-反应性蛋白(CRP)和所述第二目标分析物包括干扰素-诱导的GTP-结合蛋白(Mx1)。

7. 根据权利要求3所述的方法,其中所述第三目标分析物包括降钙素原(PCT)。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品是全血样品、静脉血样品、毛细血管血样品、血清样品、或血浆样品。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中在将所述样品施加至所述横向流测定物之前不稀释所述样品。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第二目标分析物的浓度六个数量级的浓度存在。

11. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述第一目标分析物在所述样品中以1和999 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的浓度存在,和所述第二目标分析物在所述样品中以1和999  $\text{pg}/\text{ml}$ 之间的浓度存在。

12. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第二目标分析物的浓度至少一个数量级的浓度存在,其中所述数量级是一个数量级、两个数量级、三个数量级、四个数量级、五个数量级、七个数量级、八个数量级、九个数量级或十个数量级。

13. 根据权利要求3-5和7中任一项所述的方法,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第三目标分析物的浓度六个数量级的浓度存在。

14. 根据权利要求3-5和7中任一项所述的方法,其中所述第一目标分析物在所述样品中以1和999 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的浓度存在,和所述第三目标分析物在所述样品中以1和999  $\text{pg}/\text{ml}$ 之间的浓度存在。

15. 根据权利要求4所述的方法,其中由结合所述第一捕获区中的所述第一固定化捕获剂的所述第一复合物检测的所述第一信号随着所述样品中所述第一目标分析物的浓度增加而降低,和其中由结合所述第三捕获区中的所述第三固定化捕获剂的所述第三复合物检测的所述第三信号随着所述样品中所述第三目标分析物的浓度增加而增加。

16. 横向流测定物,其配置为检测样品中以不同浓度存在的第一目标分析物和第二目标分析物,所述横向流测定物包括:

第一复合物,其连接至所述横向流测定物的流动路径,所述第一复合物包括标记物、特异性结合所述第一目标分析物的抗体或其片段,和所述第一目标分析物;

标记的第二抗体或其片段,其连接至所述流动路径并配置为特异性结合所述第二目标分析物;

所述第一复合物下游的第一捕获区,所述第一捕获区包括对所述第一目标分析物具有特异性的第一固定化捕获剂;和

位于所述标记的第二抗体或其片段下游并包括对所述第二目标分析物具有特异性的第二固定化捕获剂的第二捕获区,其中,施加所述样品后,由所述第一捕获区发射的信号强度配置为指示所述第一目标分析物的浓度。

17. 根据权利要求16所述的横向流测定物,其中当将所述样品施加至所述第一复合物和所述标记的第二抗体或其片段时,所述第一复合物和所述标记的第二抗体或其片段从所

述横向流测定物的所述流动路径脱离。

18. 根据权利要求17所述的横向流测定物,其中当将所述样品施加至所述第一复合物和所述标记的第二抗体或其片段时,所述标记的第二抗体或其片段结合所述第二目标分析物以形成第二复合物。

19. 根据权利要求18所述的横向流测定物,其中,施加所述样品后,所述第一捕获区中的所述第一固定化捕获剂竞争性结合所述样品中已经流动至所述第一捕获区的所述第一复合物和所述第一目标分析物。

20. 根据权利要求19所述的横向流测定物,其中,施加所述样品后,所述第二捕获区中的所述第二固定化捕获剂结合所述样品中已经流动至所述第二捕获区的所述第二复合物。

21. 根据权利要求20所述的横向流测定物,其中第一信号发射自结合所述第一捕获区中的所述第一固定化捕获剂的所述第一复合物和第二信号发射自结合所述第二捕获区中的所述第二固定化捕获剂的所述第二复合物。

22. 根据权利要求21所述的横向流测定物,其中由结合所述第一捕获区中的所述第一固定化捕获剂的所述第一复合物发射的所述第一信号随着所述样品中所述第一目标分析物的浓度增加而降低,和其中由结合所述第二捕获区中的所述第二固定化捕获剂的所述第二复合物发射的所述第二信号随着所述样品中所述第二目标分析物的浓度增加而增加。

23. 根据权利要求16所述的横向流测定物,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第二目标分析物的浓度六个数量级的浓度存在。

24. 根据权利要求16所述的横向流测定物,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第二目标分析物的浓度至少一个数量级的浓度存在,其中所述数量级是一个数量级、两个数量级、三个数量级、四个数量级、五个数量级、七个数量级、八个数量级、九个数量级或十个数量级。

25. 根据权利要求16所述的横向流测定物,其中所述第一目标分析物包括C-反应性蛋白(CRP)和所述第二目标分析物包括干扰素-诱导的GTP-结合蛋白(Mx1)。

26. 根据权利要求16所述的横向流测定物,其中所述样品是全血样品、静脉血样品、毛细管血样品、血清样品、或血浆样品。

27. 根据权利要求16所述的横向流测定物,其中在将所述样品施加至所述横向流测定物之前不稀释所述样品。

28. 根据权利要求16-27中任一项所述的横向流测定物,其中在所述第一捕获区处发射的信号的强度的分辨率允许在高浓度时确定所述第一目标分析物的浓度。

29. 根据权利要求16-27中任一项所述的横向流测定物,其进一步包括:

标记的第三抗体或其片段,其连接至所述流动路径并配置为特异性结合第三目标分析物;和

位于所述标记的第三抗体或其片段下游并包括对所述第三目标分析物具有特异性的第三固定化捕获剂的第三捕获区。

30. 根据权利要求29所述的横向流测定物,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第三目标分析物的浓度六个数量级的浓度存在。

31. 根据权利要求29所述的横向流测定物,其中所述第一目标分析物在所述样品中以1和999  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的浓度存在,和所述第三目标分析物在所述样品中以1和999  $\text{pg}/\text{ml}$ 之间

的浓度存在。

32. 根据权利要求29所述的横向流测定物,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第三目标分析物的浓度至少一个数量级的浓度存在,其中所述数量级为一个数量级、两个数量级、三个数量级、四个数量级、五个数量级、七个数量级、八个数量级、九个数量级或十个数量级。

33. 根据权利要求29所述的横向流测定物,其中,施加所述样品后,从所述第三捕获区检测到的第三信号随着所述样品中所述第三目标分析物的浓度增加而增加。

34. 根据权利要求29所述的横向流测定物,其中所述第三目标分析物包括降钙素原(PCT)。

35. 测定测试条,其包括:

流动路径,其配置为接收样品;

样品接收区,其连接至所述流动路径;

检测区,其在所述样品接收区的下游连接至所述流动路径,所述检测区包括第一捕获区、第二捕获区、和第三捕获区,所述第一捕获区包括对第一目标分析物具有特异性的第一固定化捕获剂、所述第二捕获区包括对第二目标分析物具有特异性的第二固定化捕获剂、和所述第三捕获区包括对第三目标分析物具有特异性的第三固定化捕获剂;

第一复合物,其在第一阶段中连接至所述流动路径并且配置为在第二阶段中在所述样品存在的情况下在流动路径中流动至所述检测区,所述第一复合物包括标记物、特异性结合所述第一目标分析物的第一抗体或其片段,以及所述第一目标分析物;

特异性结合所述第二目标分析物的标记的第二抗体或其片段,所述标记的第二抗体或其片段在所述第一阶段中连接至所述流动路径并配置为在所述第二阶段中在所述样品存在的情况下在所述流动路径中流动至所述检测区;和

特异性结合所述第三目标分析物的标记的第三抗体或其片段,所述标记的第三抗体或其片段在所述第一阶段中连接至所述流动路径并配置为在所述第二阶段中在所述样品存在的情况下在所述流动路径中流动至所述检测区,其中由所述第一捕获区发射的信号强度配置为指示所述样品中所述第一目标分析物的浓度。

36. 根据权利要求35所述的测定测试条,其中所述流动路径配置为接收包括未标记的第一目标分析物的样品,和其中所述第一固定化捕获剂配置为竞争性结合所述样品中的所述第一复合物和所述未标记的第一目标分析物。

37. 根据权利要求35所述的测定测试条,其中在第三阶段所述第一复合物流动至所述第一捕获区并结合所述第一固定化捕获剂,和其中在第三阶段结合所述第二目标分析物的所述标记的第二抗体或其片段流动至所述第二捕获区并结合所述第二固定化捕获剂。

38. 根据权利要求37所述的测定测试条,其中在第三阶段所述第一复合物由第一捕获区发射第一信号,和其中在第三阶段结合第二目标分析物的所述标记的第二抗体或其片段由第二捕获区发射第二信号。

39. 根据权利要求38所述的测定测试条,其中所述流动路径配置为接收包括未标记的第一目标分析物的样品,和其中所述样品中由所述第一捕获区发射的所述第一信号随所述样品中所述未标记的第一目标分析物的浓度增加而降低。

40. 根据权利要求39所述的测定测试条,其中所述样品进一步包括未标记的第二目标

分析物,和其中由所述第二捕获区发射的所述第二信号随所述样品中所述未标记的第二目标分析物的浓度增加而增加。

41. 根据权利要求35所述的测定测试条,其中所述流动路径配置为接收包括未标记的第一目标分析物的样品,和其中在第一阶段或第二阶段所述第一复合物不特异性结合所述未标记的第一目标分析物。

42. 根据权利要求41所述的测定测试条,其中在第二阶段所述第一复合物配置为在所述流动路径中与所述未标记的第一目标分析物一起流动至所述第一捕获区。

43. 根据权利要求42所述的测定测试条,其中在第三阶段所述第一复合物配置为与所述未标记的第一目标分析物竞争结合所述第一捕获区中的所述第一固定化捕获剂。

44. 根据权利要求43所述的测定测试条,其中从结合所述第一捕获区中的所述第一固定化捕获剂的第一复合物发射的所述信号随所述样品中未标记的第一目标分析物的浓度增加而降低。

45. 根据权利要求35所述的测定测试条,其中所述流动路径配置为接收包括或不包括第一目标分析物的样品,和其中当所述样品不包括第一目标分析物时,在所述第二阶段所述第一复合物特异性结合所述第一捕获区中的全部或基本上全部的所述第一固定化捕获剂。

46. 根据权利要求45所述的测定测试条,其中,当所述样品不包括第一目标分析物时,由在所述第一捕获区中结合的所述第一复合物发射的所述信号是所述测定测试条的所述第一捕获区可以发射的最大光学信号。

47. 根据权利要求46所述的测定测试条,其中,当所述样品包括第一目标分析物时,由在所述第一捕获区中结合的所述第一复合物发射的所述信号小于所述最大光学信号。

48. 根据权利要求35所述的测定测试条,其中所述第一固定化捕获剂包括特异性结合所述第一目标分析物的抗体或抗体的片段。

49. 根据权利要求35所述的测定测试条,其中所述第一复合物在第一阶段集成至所述测定测试条的表面上。

50. 根据权利要求35所述的测定测试条,其中所述第一复合物通过喷洒包括所述第一复合物的溶液至所述测定测试条的表面上并干燥所述溶液集成至所述测定测试条的表面上。

51. 根据权利要求35所述的测定测试条,其中所述样品选自血液、血浆、尿液、汗液和唾液样品。

52. 根据权利要求35所述的测定测试条,其中所述样品选自全血、静脉血、毛细血管血、血清、和血浆。

53. 根据权利要求35-52中任一项所述的测定测试条,其中所述第一目标分析物包括C-反应性蛋白(CRP),所述第一复合物包括结合CRP的抗-CRP抗体或其片段,所述第二目标分析物包括干扰素-诱导的GTP-结合蛋白(Mx1),和其中所述第三目标分析物包括降钙素原(PCT)。

54. 根据权利要求35-52中任一项所述的测定测试条,其中所述样品进一步包括小于所述样品中未标记的第一目标分析物的浓度六个数量级的浓度的未标记的第二目标分析物。

55. 根据权利要求35-52中任一项所述的测定测试条,其中所述样品进一步包括小于所

述样品中未标记的第一目标分析物的浓度六个数量级的浓度的未标记的第三目标分析物。

56. 诊断测试系统,其包括:

根据权利要求35所述的测定测试条;

包括光源和检测器的读取器;和

数据分析器。

57. 根据权利要求56所述的诊断测试系统,其中当所述读取器检测到来自所述测定测试条的所述第一捕获区的第一光学信号是所述测试条的所述第一捕获区的剂量响应曲线的最大光学信号时,所述数据分析器输出在所述样品中没有第一目标分析物的指示。

58. 根据权利要求57所述的诊断测试系统,其中当所述读取器检测到来自所述测定测试条的所述第一捕获区的光学信号在所述最大光学信号的1%内时,所述数据分析器输出在所述样品中存在低浓度的第一目标分析物的指示。

59. 根据权利要求57所述的诊断测试系统,其中当所述读取器检测到来自所述测定测试条的所述第一捕获区的光学信号在所述最大光学信号的5%内时,所述数据分析器输出在所述样品中存在低浓度的第一目标分析物的指示。

60. 根据权利要求57所述的诊断测试系统,其中当所述读取器检测到来自所述测定测试条的所述第一捕获区的光学信号在所述最大光学信号的10%内时,所述数据分析器输出在所述样品中存在低浓度的第一目标分析物的指示。

61. 根据权利要求57所述的诊断测试系统,其中当所述读取器检测到来自所述测定测试条的所述第一捕获区的光学信号为所述最大光学信号的90%或小于90%时,所述数据分析器输出在所述样品中存在高浓度的第一目标分析物的指示。

62. 根据权利要求57所述的诊断测试系统,其中当所述读取器检测到来自所述测定测试条的所述第一捕获区的光学信号在所述最大光学信号以下时,所述数据分析器输出在所述样品中第一目标分析物的浓度的指示。

63. 根据权利要求57所述的诊断测试系统,其中当所述读取器检测到来自所述测定测试条的所述第二捕获区的第二光学信号时,所述数据分析器输出所述样品中第二目标分析物的浓度的指示,其中所述样品中第二目标分析物的指示的浓度小于所述样品中所述第一目标分析物的指示的浓度六个数量级。

64. 根据权利要求57所述的诊断测试系统,其中当所述读取器检测到来自所述测定测试条的所述第三捕获区的第三光学信号时,所述数据分析器输出所述样品中第三目标分析物的浓度的指示,其中所述样品中第三目标分析物的指示的浓度小于所述样品中所述第一目标分析物的指示的浓度六个数量级。

65. 根据权利要求56所述的诊断测试系统,其中当所述读取器没有检测到来自所述测定测试条的所述第二捕获区的第二光学信号时,所述数据分析器输出在所述样品中不存在第二目标分析物的指示。

66. 根据权利要求56所述的诊断测试系统,其中当所述读取器没有检测到来自所述测定测试条的所述第三捕获区的第三光学信号时,所述数据分析器输出在所述样品中不存在第三目标分析物的指示。

67. 根据权利要求56-66中任一项所述的诊断测试系统,其中所述第一目标分析物包括C-反应性蛋白(CRP),所述第一复合物包括结合CRP的抗-CRP抗体或其片段,所述第二目标

分析物包括干扰素-诱导的GTP-结合蛋白(Mx1),和所述第三目标分析物包括降钙素原(PCT)。

68. 确定样品中多种目标分析物中每种的存在或浓度的方法,所述方法包括:

当在第一阶段第一复合物、标记的第二抗体或其片段和标记的第三抗体或其片段每个都连接至流动路径时,将所述样品施加至权利要求35所述的测定测试条;

如果在所述样品中存在第二目标分析物,使所述第二目标分析物与所述标记的第二抗体或其片段结合,由此形成第二复合物;

如果在所述样品中存在第三目标分析物,使所述第三目标分析物与所述标记的第三抗体或其片段结合,由此形成第三复合物;

使所述第一复合物、如果形成的所述第二复合物、和如果形成的所述第三复合物与所述流动路径脱离;

在第二阶段使所述样品流动至所述检测区;

使所述第一复合物与第一捕获区中的第一固定化捕获剂结合,使如果形成的所述第二复合物与第二捕获区中的第二固定化捕获剂结合,和使如果形成的所述第三复合物与第三捕获区中的第三固定化捕获剂结合;

检测来自与所述第一捕获区中的所述第一固定化捕获剂结合的所述第一复合物的第一信号;

如果形成所述第二复合物,检测来自与所述第二捕获区中的所述第二固定化捕获剂结合的所述第二复合物的第二信号;

如果形成所述第三复合物,检测来自与所述第三捕获区中的所述第三固定化捕获剂结合的所述第三复合物的第三信号;和

使所述第一信号与所述样品中存在的所述第一目标分析物的浓度相关联。

69. 根据权利要求68所述的方法,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第二目标分析物的浓度六个数量级的浓度存在。

70. 根据权利要求68所述的方法,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第二目标分析物的浓度至少一个数量级的浓度存在,其中所述数量级是一个数量级、两个数量级、三个数量级、四个数量级、五个数量级、七个数量级、八个数量级、九个数量级或十个数量级。

71. 根据权利要求68所述的方法,进一步包括使所述第二信号与所述样品中存在的所述第二目标分析物的浓度相关联,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第二目标分析物的浓度六个数量级的浓度存在。

72. 根据权利要求68所述的方法,其中由结合所述第一捕获区中的所述第一固定化捕获剂的所述第一复合物检测到的所述第一信号随着所述样品中所述第一目标分析物的浓度增加而降低,和其中如果由结合所述第二捕获区中的所述第二固定化捕获剂的所述第二复合物检测到所述第二信号,则其随着所述样品中所述第二目标分析物的浓度增加而增加。

73. 根据权利要求68所述的方法,其中由结合所述第一捕获区中的所述第一固定化捕获剂的所述第一复合物检测到的所述第一信号随着所述样品中所述第一目标分析物的浓度增加而降低,和其中如果由结合所述第三捕获区中的所述第三固定化捕获剂的所述第三

复合物检测到所述第三信号,则其随着所述样品中所述第三目标分析物的浓度增加而增加。

74. 根据权利要求68所述的方法,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第三目标分析物的浓度六个数量级的浓度存在。

75. 根据权利要求68所述的方法,其中所述第一目标分析物在所述样品中以大于所述样品中存在的所述第三目标分析物的浓度至少一个数量级的浓度存在,其中所述数量级为一个数量级、两个数量级、三个数量级、四个数量级、五个数量级、七个数量级、八个数量级、九个数量级或十个数量级。

76. 根据权利要求68-75中任一项所述的方法,其中所述第一目标分析物在所述样品中以1和999  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的浓度存在,和所述第二目标分析物在所述样品中以1和999  $\text{pg}/\text{ml}$ 之间的浓度存在。

77. 根据权利要求68-75中任一项所述的方法,其中所述第一目标分析物在所述样品中以1和999  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的浓度存在,和所述第三目标分析物在所述样品中以1和999  $\text{pg}/\text{ml}$ 之间的浓度存在。

78. 根据权利要求68-75中任一项所述的方法,其中所述第一目标分析物包括C-反应性蛋白(CRP),所述第一复合物包括结合CRP的抗-CRP抗体或其片段,所述第二目标分析物包括干扰素-诱导的GTP-结合蛋白(Mx1)。

79. 根据权利要求78所述的方法,其中所述第三目标分析物包括降钙素原(PCT)。

## 区分细菌感染和病毒感染的多重横向流测定物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年1月27日提交的美国临时申请62/622,878的权益,其通过引用以其全部并入。

### 技术领域

[0003] 本公开一般地涉及横向流测定装置、测试系统和方法。更具体地,本公开涉及确定样品中多种分析物的存在和浓度的横向流测定装置,包括当一种或多种目标分析物以高浓度存在和一种或多种目标分析物以低浓度存在时。当在单次施加中将单个样品施加于单个横向流测定物时,可以确定多种分析物中每种精确浓度,包括当第一目标分析物在单个样品中以单个样品中第二目标分析物的浓度的百万分之一存在时。

### 背景技术

[0004] 包括本文描述的横向流测定物的免疫测定系统提供了可靠、廉价、便携、快速和简单的诊断测试。横向流测定物可以快速且准确地检测样品中目标分析物的存在与否,在某些情况下还可以定量样品中的目标分析物。有利地,横向流测定物可以是微创的,并且可以用作床旁测试系统(point-of-care testing systems)。已经开发了横向流测定物来检测多种医学或环境分析物。在夹心形式的横向流测定物中,针对目标分析物的标记的抗体被沉积在样品接收区中或附近的测试条上。标记的抗体可以包括例如与抗体结合的检测器分子或“标记”。当将样品施加到测试条上时,样品中存在的分析物被标记的抗体结合,该标记的抗体沿着测试条流到捕获区,在捕获区,针对分析物的固定抗体与标记的抗体-分析物复合物结合。固定在捕获线上的抗体可能与沉积在样品接收区中或附近的标记的抗体不同。检测捕获的复合物,并确定分析物的存在。在分析物不存在的情况下,标记的抗体沿着测试条流动,而穿过捕获区。捕获区信号缺乏表明分析物不存在。可以开发多重测定物以检测在施加于横向流测定物的单个样品中存在的超过一种的目标分析物,但是这种测定物具有许多缺点,包括抗体和目标分析物之间的交叉反应性;无法在单个测试事件中使用一个光学读取器检测施加于单个测试条的多种目标分析物;以及无法检测单个样品中以显著不同浓度存在的目标分析物。通常,必须首先将具有高浓度分析物的样品稀释,以测试高浓度分析物的存在或浓度。这种稀释进一步降低了样品中以低浓度存在的任何目标分析物的浓度,使得低浓度分析物无法检测。迄今为止,多重横向流测定物还不适合确定样品中多种分析物的数量和存在,其中一种或多种分析物以高浓度存在而一种或多种分析物以低浓度存在。

### 发明内容

[0005] 因此,本公开的方面是提供用于当样品中第一分析物以高浓度存在,而样品中第二不同分析物以低浓度(包括但不限于高浓度的百万分之一的浓度)存在时,检测样品中多种目标分析物的存在和浓度的改进的横向流测定物。

[0006] 在本公开的一个实施方式中,提供了检测样品中以不同浓度存在的第一目标分析物和第二目标分析物的方法。方法包括提供横向流测定物,其包括与横向流测定物的流动路径连接的第一复合物,该第一复合物包括特异性结合第一分析物的标记物、抗体或其片段,以及第一分析物。横向流测定物还包括连接至流动路径并配置为特异性结合第二分析物的标记的第二抗体或其片段。横向流测定物进一步包括在第一复合物下游的第一捕获区,第一捕获区包括对第一分析物具有特异性的第一固定捕获剂。横向流测定物还包括在标记的第二抗体或其片段下游并且包括对第二分析物具有特异性的第二固定捕获剂的第二捕获区。该方法还包括将样品施加到第一复合物和标记的第二抗体或其片段上;和使第二分析物与标记的第二抗体或其片段结合以形成第二复合物。该方法进一步包括使流体样品和第一复合物流动到第一捕获区,其中流体样品中的第一分析物和第一复合物竞争结合第一捕获区中的第一固定捕获剂;和使第二复合物在流动路径中流动到第二捕获区,并使第二复合物与第二捕获区中的第二固定捕获剂结合。该方法还包括检测来自在第一捕获区中结合至第一固定捕获剂的第一复合物的第一信号和在第二捕获区中结合至第二固定捕获剂的第二复合物的第二信号。

[0007] 在本公开的另一个实施方式中,提供了配置为检测在流体样品中以不同浓度存在的第一目标分析物和第二目标分析物的横向流测定物。所述横向流测定物包括连接至横向流测定物的流动路径的第一复合物,第一复合物包括与第一分析物特异性结合的标记物、抗体或其片段,和第一分析物;连接至流动路径并被配置为特异性结合第二分析物的标记的第二抗体或其片段;第一复合物下游的第一捕获区,该第一捕获区包括对第一分析物具有特异性的第一固定捕获剂;和标记的第二抗体或其片段下游并包括对第二分析物具有特异性的第二固定捕获剂的第二捕获区。

[0008] 在本公开的仍另一个实施方式中,提供了测定测试条。测定测试条包括配置为接收流体样品的流动路径;连接至流动路径的样品接收区;和连接至接收区下游的流动路径的检测区。检测区包括第一捕获区、第二捕获区和第三捕获区。第一捕获区包括对第一目标分析物具有特异性的第一固定捕获剂,第二捕获区包括对第二目标分析物具有特异性的第二固定捕获剂,和第三捕获区包括对第三目标分析物具有特异性的第三固定捕获剂。测定测试条还包括第一复合物,该第一复合物在第一阶段中连接至流动路径并且配置为在第二阶段中在流体样品存在的情况下在流动路径中流动至检测区。第一复合物包括标记物、特异性结合第一目标分析物的第一抗体或其片段,以及第一目标分析物。测定测试条进一步包括特异性结合第二目标分析物的标记的第二抗体或其片段,标记的第二抗体或其片段在第一阶段中连接至流动路径并配置为在第二阶段中在流体样品存在的情况下在流动路径中流动至检测区。测定测试条还包括特异性结合第三目标分析物的标记的第三抗体或其片段,标记的第三抗体或其片段在第一阶段中连接至流动路径并配置为在第二阶段中在流体样品存在的情况下在流动路径中流动至检测区。

[0009] 在本公开的仍进一步实施方式中,提供了诊断测试系统。诊断测试系统包括如上描述的测定测试条;读取器,其包括光源和检测器,以及数据分析器。

[0010] 在本公开的另一实施方式中,提供了确定流体样品中多种目标分析物中每一种的存在或浓度的方法。方法包括当在第一阶段中第一复合物、标记的第二抗体或其片段、以及标记的第三抗体或其片段各自与流动路径连接时,将流体样品施加至上述测定测试条。方

法还包括将第二分析物(如果流体样品中存在)与标记的第二抗体或其片段结合,从而形成第二复合物;将第三分析物(如果流体样品中存在)与标记的第三抗体或其片段结合,从而形成第三复合物;将第一复合物、第二复合物(如果形成)和第三复合物(如果形成)与流体路径脱离;在第二阶段中使流体样品流到检测区;在第一捕获区中使第一复合物与第一固定捕获剂结合,在第二捕获区中使第二复合物(如果形成)与第二固定捕获剂结合,和在第三捕获区中使第三复合物(如果形成)与第三固定捕获剂结合;在第一捕获区中检测来自与第一固定捕获剂结合的第一复合物的第一信号;如果形成第二复合物,则在第二捕获区中检测来自与第二固定捕获剂结合的第二复合物的第二信号;以及如果形成第三复合物,则在第三捕获区中检测来自与第三固定捕获剂结合的第三复合物的第三信号。

### 附图说明

[0011] 图1A和1B图解了在样品接收区施加流体样品之前和之后根据本公开的实例横向流测定物,其中流体样品包括第一目标分析物、第二目标分析物、和第三目标分析物。

[0012] 图2A和2B图解了在样品接收区施加流体样品之前和之后根据本公开的实例横向流测定物,其中流体样品不包括任何目标分析物。

[0013] 图3A和3B图解了在样品接收区施加流体样品之前和之后根据本公开的实例横向流测定物,其中流体样品包括第一目标分析物但不包括第二或第三目标分析物。

[0014] 图4A和4B图解了在样品接收区施加流体样品之前和之后根据本公开的实例横向流测定物,其中流体样品包括第二目标分析物但不包括第一或第三目标分析物。

[0015] 图5A和5B图解了在样品接收区施加流体样品之前和之后根据本公开的实例横向流测定物,其中流体样品包括第三目标分析物但不包括第一或第二目标分析物。

[0016] 图6A和6B在样品接收区施加流体样品之前和之后根据本公开的实例横向流测定物,其中流体样品包括第一和第三目标分析物但不包括第二目标分析物。

[0017] 图7A图解了实例横向流测定物的实例剂量响应曲线,诸如图3A和3B中所图解,其中流体样品仅包括浓度至多为150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的C-反应性蛋白(CRP),和其中流体样品不包括任何另外的目标分析物。

[0018] 图7B图解了实例横向流测定物的实例剂量响应曲线,诸如图4A和4B中所图解,其中流体样品仅包括浓度至多为1000 $\text{pg}/\text{mL}$ 的分析物2,和其中流体样品不包括任何另外的目标分析物,诸如分析物3或CRP。

[0019] 图7C图解了实例横向流测定物的实例剂量响应曲线,诸如图5A和5B中所图解,其中流体样品仅包括浓度至多为500 $\text{pg}/\text{mL}$ 的分析物3,和其中流体样品不包括任何另外的目标分析物,诸如分析物2或CRP。

[0020] 图8图解了根据本公开的实例横向流测定装置,其包括样品接收区和检测区。检测区可以包括流体样品中多种分析物的存在和/或浓度的指示,诸如但不限于CRP、PCT、和Mx1,包括当一种或多种目标分析物以高浓度存在和一种或多种目标分析物以低浓度存在时。

### 具体实施方式

[0021] 本文描述的装置、系统和方法精确地确定样品中多种目标分析物的数量或存在。

根据本公开的横向流装置、测试系统和方法在一种或多种目标分析物在样品中以升高的或高浓度存在和一种或多种目标分析物在样品中以低浓度存在的情况中精确地确定多种目标分析物的存在或数量。有利地,本文描述的横向流装置、测试系统和方法在单次测试事件中确定在将单个样品施加至一个横向流测定物(诸如单个测试条)后单个样品中以显著不同的浓度存在的目标分析物的存在或数量。因此,本文描述的横向流测定物能够同时检测单个样品中多种分析物,即使当分析物以显著不同的浓度范围存在时。

[0022] 本文描述的横向流测定物可以使用在单个测试条上的结合测定的组合,包括用于检测以高浓度存在的一种或多种分析物的测定物与用于检测以低浓度存在的一种或多种分析物的测定物组合。本文描述的横向流测定物的单个测试条可以包括具有单独捕获区的检测区,该单独捕获区对每种目标分析物具有特异性。例如,样品可以包括三种目标分析物:第一目标分析物、第二目标分析物、和第三目标分析物。横向流测定物的检测区因此将包括三个捕获区:对第一目标分析物具有特异性的第一捕获区,对第二目标分析物具有特异性的第二捕获区,和对第三目标分析物具有特异性的第三捕获区。

[0023] 在该非限制性实施例中,第一目标分析物可以在样品中以高浓度存在,诸如但不限于1-999 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围。当样品中第一目标分析物的浓度是零时,本文描述的横向流测定物可以在第一捕获区处产生最大强度的信号。增加第一目标分析物的浓度将信号从最大强度信号降低为减小的强度信号,该信号可以与第一目标分析物的浓度相关。在该实例中,第二目标分析物和第三目标分析物可以在样品中以低浓度存在,例如但不限于1-999 $\text{pg}/\text{ml}$ 的范围。本文描述的横向流测定物可以在第二捕获区和第三捕获区处产生信号强度,其中增加的信号强度分别与第二目标分析物和第三目标分析物的增加的浓度相关。因此,根据本公开的横向流测定物可以使用单个测定物诸如单个测试条来检测高浓度和低浓度分析物。

[0024] 根据本公开的横向流测定物可以测量在单次测试事件中施加至单个横向流测定物的单个未稀释的样品中以显著不同的浓度存在的多种目标分析物的存在和浓度。在不稀释样品的情况下测量非常不同的浓度(包括浓度相差六个数量级,或相差一百万倍)下的多种目标分析物的存在和浓度的能力提供显著的优势。例如,本文描述的横向流测定物的实施方式可以测量在施加至横向流测定物(诸如,单个横向流测定测试条)之前尚未稀释或进行预处理的全血、静脉血、毛细血管血、血清和血浆样品中存在的分析物。

[0025] 有利地,横向流测定物的实施可以同时检测与高浓度分析物在同一样品中存在的低浓度分析物,即使高浓度分析物具有大动态范围(包括但不限于CRP,其可以在样品中以较大动态范围存在)。另外,同时和精确检测在单个样品中以显著不同的浓度(浓度约为百万分之一)存在的多种目标分析物的浓度的能力具有显著的诊断益处。在本公开的横向流测定物的一个非限制性实施例中,可以使来自单个测试条的光学信号的测量与患者中病毒感染、细菌感染、或无感染的存在与否相关联。

[0026] 在由反射型标记物(诸如但不限于金纳米颗粒标记物)产生的光学信号的背景中,本文描述了通过根据本公开的测定物产生的信号。虽然参考“光学”信号本文描述了本公开的实施方式,但是应当理解,本文描述的测定物可以对于标记物使用任何合适的材料,从而产生可检测的信号,包括但不限于产生荧光信号的荧光型胶乳珠标记物和产生指示与测定物相关的磁场变化的信号的磁纳米颗粒标记物。

[0027] 根据本公开,横向流测定装置包括设计用于检测样品中高浓度分析物的标记的抗

体,其结合设计用于检测相同样品中低浓度分析物的标记的抗体。例如,样品可以包括高浓度的第一目标分析物,低浓度的第二目标分析物,和低浓度的第三目标分析物。为了检测高浓度的第一目标分析物,首先将第一复合物整合到横向流测定测试条接收区或标记物区的表面上,例如到缀合物垫上。第一复合物包括标记物、特异性结合第一目标分析物的第一抗体、和第一目标分析物。第一复合物在将流体样品施加至测试条时变为与标记物区非结合,并与流体样品一起行进至测试条的检测区,该流体样品可以包括第一目标分析物。检测区包括对每种目标分析物具有特异性的捕获区,并由此包括捕获第一目标分析物的第一捕获区,捕获第二目标分析物的第二捕获区,和捕获第三目标分析物的第三捕获区。样品(当存在时)中第一复合物和第一目标分析物在第一捕获区中与第一捕获剂结合。当样品中不存在第一目标分析物(否则其将与第一复合物竞争)时,第一捕获剂仅与第一复合物结合。因此,当样品中不存在第一目标分析物时,在第一捕获区处产生具有最大强度的第一信号。当样品中第一目标分析物以低浓度存在时,第一复合物与相对低量的第一分析物竞争与第一捕获剂结合,导致与具有最大强度的第一信号相同,或基本上相等(与其有限的方差范围内)的第一信号。当样品中第一目标分析物以高浓度存在时,第一复合物与相对高量的第一分析物竞争与第一捕获剂结合,导致小于具有最大强度的信号的第一信号。

[0028] 为了检测第二目标分析物(在该非限制性实施例中在样品中以低浓度存在),首先将与第二目标分析物特异性结合的标记的第二抗体整合到横向流测定测试条接收区或标记物区的表面上,例如到缀合物垫上。标记的第二抗体在将流体样品施加至测试条时变为与标记物区非结合,并与第二目标分析物结合以形成第二复合物。第二复合物与流体样品一起行进至测试条的检测区。第二复合物在第二捕获区中与对第二目标分析物具有特异性的第二捕获剂结合。结果,当样品中存在第二目标分析物时,在第二捕获区处产生第二信号。当样品中不存在第二目标分析物(或以低于可检测的水平存在)时,不形成第二复合物(或形成小于可检测量的第二复合物),并因此没有第二复合物在第二捕获区被捕获(或没有可检测量的第二复合物在第二捕获区被捕获)。在该情况中,标记的第二抗体与流体样品一起行进至测试条的检测区,但是在第二捕获区其不与第二捕获剂结合。结果,在第二捕获区没有检测到第二信号。第二信号的信号强度与第二目标分析物的浓度相关联,其中增加的信号强度与样品中第二目标分析物的增加的浓度相关联。

[0029] 类似地,为了检测第三目标分析物(在该非限制性实施例中在样品中以低浓度存在),首先将与第三目标分析物特异性结合的标记的第三抗体整合到横向流测定测试条接收区或标记物区的表面上,例如到缀合物垫上。标记的第三抗体在将流体样品施加至测试条时变为与标记物区非结合,并与第三目标分析物结合以形成第三复合物。第三复合物与流体样品一起行进至测试条的检测区。第三复合物在第三捕获区中与对第三目标分析物具有特异性的第三捕获剂结合。结果,当样品中存在第三目标分析物时,在第三捕获区处产生第三信号。当样品中不存在第三目标分析物(或以低于可检测的水平存在)时,不形成第三复合物(或形成小于可检测量的第三复合物),并因此没有第三复合物在第三捕获区被捕获(或没有可检测量的第三复合物在第三捕获区被捕获)。在该情况中,标记的第三抗体与流体样品一起行进至测试条的检测区,但是在第三捕获区其不与第三捕获剂结合。结果,在第三捕获区没有检测到第三信号。第三信号的信号强度与第三目标分析物的浓度相关联,其中增加的信号强度与样品中第三目标分析物的增加的浓度相关联。

[0030] 以上描述旨在说明流体样品可以包括以高浓度存在的第一目标分析物、低浓度存在的第二目标分析物、和以低浓度存在的第三目标分析物。本领域技术人员将认识到,实例旨在是示例性的,并且可以对本文描述的横向流测定物采用各种修改和变化。例如,流体样品可以包括仅两种目标分析物,其中第一分析物以高浓度存在和其中第二分析物以低浓度存在。可选地,流体样品可以包括三种目标分析物,其中第一目标分析物以高浓度存在,第二目标分析物以高浓度存在,和第三目标分析物以低浓度存在。此外,流体样品可以包括多于三种(诸如,四、五、六、七、八、九和十种)目标分析物,其具有高浓度的许多分析物和以低浓度存在的许多分析物的各种迭代(iteration)。在各种迭代的每个中,如上描述设计横向流测定物,从而同时并在单个横向流测定装置上检测高浓度分析物的数量和存在和低浓度分析物的数量和存在两者。

[0031] 本领域技术上人员将认识到,高浓度和低浓度是相对术语,并且下面的非限制性实施旨在是说明性的,非限制本公开。在下面描述的一些非限制性实施中,第一“低浓度”分析物在样品中以在相同样品中存在第二不同的“高浓度”分析物的浓度的百万分之一存在。根据本公开的横向流测定物可以测量以不同量级的浓度存在的分析物的存在和浓度,包括但不限于第一目标分析物以大于第二不同的目标分析物的浓度的一个量级、二个量级、三个量级、四个量级、五个量级、六个量级、七个量级、八个量级、九个量级、和十个量级存在。

[0032] 不受任何特定理论的约束,现在将描述对均整合在单个横向流测定物的标记物区中的第一复合物(其包括标记物、特异性结合第一目标分析物的第一抗体和第一目标分析物)连同特异性结合第二目标分析物的第二标记的抗体的操作,用于同时检测和量化高浓度分析物和低浓度分析物。不受任何特定理论的约束,第一复合物被用于掩盖常规夹心式横向流测定物剂量响应曲线的信号增加(当第一分析物浓度低时)的部分,由此在第一捕获区处产生第一剂量响应曲线,该曲线在第一目标分析物的浓度为零时以最大强度开始,并然后保持相对恒定(第一分析物处于低浓度)或降低(第一分析物处于高浓度)。特异性结合第二目标分析物的第二(或另外)标记的抗体在第二捕获区处产生第二剂量响应曲线,其随着第二分析物的浓度增加产生增加的信号强度。本公开的横向流测定物解决了与测量样品中多种目标分析物相关的缺陷,特别是其中一种或多种目标分析物以高浓度存在而一种或多种目标分析物以低浓度存在的情况。

[0033] 在一些情况中,例如,流体样品可以包含多种目标分析物,其中一种或多种目标分析物以高浓度存在,而一种或多种目标分析物以低浓度存在。特别地,一种或多种目标分析物可以在样品中以比以低浓度存在的一种或多种目标分析物的量大百万倍的量存在。以前,为解决此问题,需要两个或多个单独的测试来检测流体样品中以显著不同的浓度存在的分析物。例如,为了检测高浓度的分析物,可以对样品进行稀释以便将样品中的高浓度的分析物降低到可测试的浓度。样品稀释需要额外的物理步骤来稀释样品。另外,稀释还需要额外的步骤来计算分析物的量,从而导致算法更加复杂,这可能会影响样品中分析物的测量的量的准确性。此外,样品的稀释消除了检测低浓度存在的分析物的能力,因为稀释的样品导致低浓度存在的分析物的浓度低于可检测范围。因此,可以稀释具有高浓度和低浓度的分析物的单个样品以确定高浓度分析物的浓度,但是该相同的样品不适合于在常规的多重测定中确定低浓度分析物的浓度。

[0034] 为了检测低浓度分析物,可以使用夹心式横向流测定物。常规的夹心式横向流测

定法不适用于且在某些情况下无法准确确定高浓度分析物的数量。因此,单个样品中存在的高浓度分析物和低浓度分析物的检测以前需要将样品应用于多个检测测定物,每个测定物专门设计用于检测特定目标分析物在该目标分析物的特定动态范围内的存在。

[0035] 相反,本文描述的横向流测定物能够在单次测试中确定流体样品中多种分析物的存在和/或数量(诸如,将流体样品单次施加至单个横向流测定测试条),其中一种或多种目标分析物在流体样品中以高浓度存在,而一种或多种目标分析物在流体样品中以低浓度存在。

[0036] 本文描述的横向流测定物包括进一步有利特征。例如,当第一分析物处于高浓度时产生的信号很容易被检测到(例如,它们的强度在常规读取器通常可以辨别且间隔良好的光学信号范围内),它们在剂量响应曲线上不与零或低浓度的第一分析物产生的信号重叠,以及它们可用于计算高浓度和甚至非常高浓度时的高度精度浓度读数。在一些有利的实施中,当第一分析物以高浓度存在时产生的信号的强度水平不与当第一分析物以低浓度存在时产生的信号的强度水平重叠。

[0037] 本文描述的横向流测定物的实施方式在针对多种目标分析物的诊断测试中特别有利,其中多种目标分析物的相对浓度指示疾病状态。当一种目标分析物以高于正常或健康状态的浓度存在,但是与正常或健康状态相比,其他目标分析物没有变化时,可以肯定地确定具体疾病状态的诊断。

[0038] 可以通过本公开的横向流测定装置、测试系统和方法检测和分析物的实例包括但不限于以下蛋白:CRP、PCT、MX1、IP-10和TRAIL。本公开的实施例可以测量TRAIL蛋白的可溶形式和/或膜形式。在一实施方式中,仅测量TRAIL的可溶形式。

[0039] 装置、测试系统和方法的各种方面将在下文中参考附图进行更全面的描述。然而,本公开可以以许多不同的形式实现。基于本文的教导,本领域的技术人员应认识到,本公开的范围旨在覆盖本文公开的装置、测试系统和方法的任何方面,无论是独立于本公开的任何方面还是与本公开的任何其他方面组合实施。例如,可以使用本文阐述的任何数量的方面来实现装置或实践方法。

[0040] 尽管本文描述了特定的方面,但是这些方面的许多变化和排列组合都落入本公开的范围。尽管提到了一些好处和优点,但是本公开的范围并不旨在限于特定的好处、用途或目的。相反,本公开的方面旨在广泛地适用于不同的检测技术和装置配置,其中一些通过示例的方式在附图和以下描述中示出。详细描述和附图仅是对本公开的说明而不是限制,本公开的范围由所附权利要求及其等同物限定。

[0041] 本文描述的横向流装置是横向流色谱法中使用的分析装置。横向流测定物是在本文描述的横向流装置上进行的测定物。可以在测试条上实施横向流装置,但其他形式也可能适用。在测试条格式中,怀疑含有分析物的测试流体样品(例如通过毛细作用)流过测试条。测试条可由吸水材料制成,诸如纸、硝基纤维素和纤维素。流体样品在样品储器中接收。流体样品可以沿着测试条流到捕获区,其中分析物(如果存在)与捕获剂相互作用,以指示分析物的存在、不存在和/或数量。捕获剂可包括固定在捕获区中的抗体。

[0042] 横向流测定物可以在夹心格式中执行。本文将在产生光学信号的反射型标记物(诸如,金纳米颗粒标记物)的背景下描述本文描述的夹心式和测定物,但是应当理解的是,测定物可以包括配置为产生荧光信号的胶乳珠标记物,配置为产生磁信号的磁纳米颗粒标

记物,或配置为产生可检测信号的任何其他标记物。夹心型横向流测定物包括沉积在固体衬底上的样品储器处的标记的抗体。在将样品施加至样品储器后,标记的抗体溶解在样品中,其后抗体识别并结合样品中的分析物上的第一表位,形成标记物-抗体-分析物复合物。该复合物沿液体前沿(front)从样品储器通过固体衬底流动到捕获区(有时称为“测试线”),此处放置了固定的抗体(有时称为“捕获剂”)。在分析物是多聚体或在相同单体上含有多个相同表位的一些情况中,沉积在相同样品储器处的标记的抗体可以与固定在捕获区的抗体相同。固定的抗体识别并结合分析物上的表位,由此在捕获区捕获标记物-抗体-分析物复合物。标记的抗体在捕获区的存在提供可检测的光学信号。在一个非限制性实施例中,金纳米颗粒被用于标记所述抗体,因为它们相对廉价、稳定且基于金纳米颗粒的表面等离子共振性质容易提供可观察的颜色。在一些情况中,该信号提供定性信息,诸如样品中是否存在分析物。在一些情况中,该信号提供定量信息,诸如样品中分析物的数量的测量。

[0043] 横向流测定物可以提供定性信息,诸如关于样品中目标分析物存在与否的信息。例如,在捕获区任何可测量的光学信号的检测可以指示目标分析物在样品中存在(以一些未知的数量)。在捕获区任何可测量的光学信号的不存在可以指示目标分析物在样品中不存在或在检测限以下。例如,如果样品不含有任何目标分析物,样品将仍然可以使标记的试剂溶解并且标记的试剂将依然流动至捕获区。然而,标记的试剂在捕获区将不与捕获剂结合。相反,其将通过对照线(如果存在)流过捕获区,并在一些情况中,至任意的吸收区。一些标记的试剂将与沉积在对照线上的对照剂结合并发射可检测的光学信号。在这些情况中,不存在由捕获区发出的可测量的光学信号指示样品中不存在目标分析物,而存在由对照线发出的可测量的光学信号指示样品从样品接收区行进通过捕获区并到捕获线,如在横向流测定物的正常操作期间所预期的。

[0044] 一些横向流装置可以提供定量信息,诸如样品中目标分析物的数量的测量。具体地,当分析物以低浓度存在时,横向流测定物可以提供分析物的可靠定量。由横向流装置获得的定量测量可以是给定体积的样品中存在的分析物的浓度,其使用剂量响应曲线获得,该曲线使在捕获区检测到的信号的强度与样品中分析物的浓度相关联。实例信号包括光学信号、荧光信号、和磁信号。对于夹心型横向流测定物,如果样品不含有任何目标分析物,则样品中分析物的浓度为零并且没有分析物与标记的试剂结合形成标记物-抗体-分析物复合物。在该情况中,不存在流动至捕获区并与捕获抗体结合的复合物。因此,在捕获区观察不到可检测的光学信号,而信号振幅为零。

[0045] 当样品中分析物的浓度随着样品中分析物浓度的增加而增加时,检测到信号。发生这种情况是因为随着分析物浓度的增加,标记物-抗体-分析物复合物的形成增加。在捕获区固定的捕获剂与流至捕获区的增加数目的复合物结合,导致捕获区处检测到的信号增加。当分析物以低浓度存在时,这类测定物提供分析物的可靠定量。

[0046] 然而适用于定量以低浓度存在的目标分析物的上述测定物不适用于定量以高浓度存在的目标分析物。在这样的情况下,分析物的浓度可能超过可用于结合分析物的标记的试剂的量,使得存在过量的分析物。在这种情况下,未被标记的试剂结合的过量分析物会与标记物-抗体-分析物复合物竞争,与捕获区中的捕获剂结合。捕获区中的捕获剂将与未标记的分析物(换言之,未与标记的试剂结合的分析物)和标记物-抗体-分析物复合物结

合。然而,与捕获剂结合的未标记的分析物不发射可检测的信号。随着样品中分析物浓度的增加,与捕获剂结合的未标记的分析物(代替发射可检测信号的标记物-抗体-分析物复合物)的量也会增加。随着越来越多的未标记的分析物代替标记物-抗体-分析物复合物与捕获剂结合,在捕获区检测到的信号减少。

[0047] 将检测到的信号最初在低浓度下增加而检测到的信号在高浓度下减少的该现象称为“钩效应”。随着分析物浓度的增加,更多的分析物与标记的试剂结合,导致信号强度增加。在饱和浓度下,标记的试剂被样品中的分析物饱和(例如,可用数量的标记的试剂已全部或几乎全部与来自样品中的分析物结合),并且检测到的信号已达到最大信号强度。当样品中分析物的浓度继续增加到超过最大信号强度时,由于高于标记的试剂饱和点的过量分析物与标记的试剂分析物竞争结合捕获剂,因此检测到的信号存在减少。

[0048] 钩效应,也成为“前带效应”不利地影响横向流测定物,特别是目标分析物在样品中以升高的浓度存在的情况中。钩效应可以导致不准确的测试结果。例如,钩效应可以导致假阴性或不准确的低结果。具体地,当样品含有超过测试条上沉积的标记的试剂的浓度的升高水平的分析物时出现不准确的结果。在该场景中,当样品被放置在测试条上时,标记的试剂被饱和,而并非全部分析物被标记。未标记的分析物流动通过测定物并在捕获区激烈竞争结合标记的复合物,并由此减少可检测的信号。因此,由于单次检测到的信号对应低和高浓度两者,装置(或装置的操作者)不能够区分光学信号是否对应低或高浓度。如果分析物水平足够大,那么分析物完全激烈竞争标记的复合物,并且在捕获区观察不到信号,导致假阴性测试结果。

[0049] 精确定量单个样品中以高浓度和低浓度两者存在的多种分析物的实例横向流装置

[0050] 本文描述的横向流测定物、测试系统和方法解决了多重夹心型横向流测定物的这些和其他缺点。图1A-6B图解了可以精确测量多种目标分析物的数量的实例横向流测定物,其中在单个样品中一种或多种目标分析物以高浓度存在和一种或多种目标分析物以低浓度存在。图7A-7C提供图形化说明由本文描述的横向流测定物测量的光学信号的实例剂量响应曲线和具体地在捕获区检测到的光学信号的振幅(沿y轴测量)和施加至测定物的样品中分析物的浓度(沿x轴测量)之间的关系。应当理解的是,虽然根据本公开的测定物在产生光学信号的反射型标记物的背景下描述,但根据本公开的测定物可以包括配置为产生荧光信号、磁信号或任何其他可检测的信号的任何合适材料的标记物。

[0051] 本文描述的横向流测定装置、系统和方法能够检测样品中多种分析物的存在或确定样品中多种分析物的浓度,其中一种或多种分析物以高浓度存在和一种或多种分析物以低浓度存在。在一些实施方式中,样品中以高浓度存在的第一目标分析物可以比样品中也存在但以低、非常低或极低浓度的第二不同的分析物的量大1千万、9百万、8百万、7百万、6百万、5百万、4百万、3百万、2百万、1百万、500,000、100,000、50,000、10,000、5,000、1,000、500、100或10倍的量存在。在一些情况中,相比给定体积的流体样品中第一目标分析物,第二目标分析物以微量存在。例如,高浓度分析物可以以10至100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10,000,000至100,000,000 $\text{pg}/\text{mL}$ )的量存在,而低浓度分析物可以以10至100 $\text{pg}/\text{mL}$ 的量存在。

[0052] 图1A-6B中图解的实例横向流测定物101包括测试条,其具有样品接收区110、标记物区120、和检测区130,其中检测区包括第一捕获区135、第二捕获区133、和第三捕获区

131。图1A和1B图解了流体样品111已经施加至样品储器110之前和之后的横向流装置101，其中流体样品包括第一目标分析物112、第二目标分析物113和第三目标分析物114。在图解的实例中，测试条内，标记物区120在样品接收区110沿样品流动的方向的下游。在一些情况中，样品接收区110位于标记物区120内和/或与标记物区120共存。第一捕获剂136固定在第一捕获区135中，第二捕获剂134固定在第二捕获区133中，和第三捕获剂132固定在第三捕获区131中。

[0053] 在本公开的实施例中，第一复合物121整合在标记物区120上。第一复合物121包括标记物124、特异性结合第一目标分析物112的第一抗体、和目标分析物112。第二标记的抗体123整合在标记物区120上。第二标记的抗体123包括标记物124和特异性结合第二目标分析物113的第二抗体。第三标记的抗体122整合在标记物区120上。第三标记的抗体122包括标记物124和特异性结合第三目标分析物114的第三抗体。如图1A-6B中所图解，针对第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122中每个，标记物124是相同的。应当理解的是，针对第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122中每个，标记物124可以是一致的。可选地，针对第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122中每个，标记物可以是不同的。因此，针对多种目标分析物中每个，标记物可以提供相同或不同的光学信号。标记物可以是产生光学信号的反射型标记物，配置为产生荧光信号的乳胶珠标记物，配置为产生磁信号的磁纳米颗粒，或配置为产生可检测的信号的任何其他标记物。

[0054] 例如，标记物可以是任何物质、化合物、或可以检测的颗粒，诸如通过视觉、荧光、辐射或仪器机构检测。标记物可以是，例如，作为着色剂产生的颜料或油墨，诸如Brilliant Blue、132Fast Red 2R、和4230Malachite Blue Lake。标记物可以是微粒标记物，诸如蓝色胶乳珠、金纳米颗粒、着色的胶乳珠、磁性颗粒、碳纳米颗粒、硒纳米颗粒、银纳米颗粒、量子点、上转化无机发光材料、有机荧光团、纺织染料、酶、或脂质体。

[0055] 在一些情况下，形成第一复合物121、第二标记的抗体123、和第三标记的抗体122并施加至测试条，然后由操作者使用测试条。例如，在测试条制造期间，第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122可以整合在标记物区120中。在另一个实例中，在制造后且在将流体样品111施加至测试条之前，第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122整合在标记物区120中。第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122可以以多种方式整合到测试条中，下面将详细讨论。

[0056] 因此，在本公开的横向流装置的实施方式中，在已经将任意流体样品111施加至横向流装置101之前，形成第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122并整合在测试条上。在一个非限制性实施例，在将任何流体样品111施加至横向流装置101之前，形成第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122并整合到测试条的缀合物垫上。此外，在本公开的横向流装置的实施方式中，第一复合物121中的分析物不是来自流体样品111的分析物。

[0057] 为了进行施用测试条101的测试，如图1A和1B所示，将具有第一目标分析物112、第二目标分析物113和第三目标分析物114的样品111沉积在样品接收区110上。在标记物区120位于样品接收区域110的下游的图解实施方式中，样品111中的第一目标分析物112、第二目标分析物113和第三目标分析物114流入标记物区120，并与整合的第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122接触。样品111溶解第一复合物121、第二标记的抗

体123和第三标记的抗体122。在一个非限制性实施例中,样品111溶解第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122。释放将第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122保持在测试条的在标记物区120中的表面的键,使得第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122不再整合到测试条的表面上。第二标记的抗体123与样品中的第二目标分析物113结合,形成第二复合物,和第三标记的抗体122与样品中的第三目标分析物114结合,形成第三复合物。

[0058] 第一复合物121、第二复合物和第三复合物与样品111中的第一分析物112(未结合)一起沿流体前沿迁移到检测区130。在第一捕获区135的第一捕获剂136与第一复合物121和样品111中的第一分析物112结合。在第二捕获区133的第二捕获剂134与第二复合物结合,在第三捕获区131的第三捕获剂132与第三复合物结合。

[0059] 在本公开的实施例中,取决于样品111中第一分析物112的量,第一复合物121和第一分析物112彼此竞争以与第一捕获区135中的第一捕获剂136结合。在第一捕获区135处检测第一可检测的信号,其中在样品中存在第一目标分析物112的情况下,第一可检测的信号从最大强度的信号减小,因为第一目标分析物112与第一复合物121竞争在第一捕获区与第一捕获剂136结合。相反,在第二捕获区133检测第二可检测的信号,并且强度随着样品中第二目标分析物113的浓度增加而增加,因为第二目标分析物113形成了第二复合物,其在第二捕获区133处发射可检测的信号。类似地,在第三捕获区131检测到第三可检测的信号,并且强度随着样品中第三目标分析物114的浓度增加而增加,因为第三目标分析物114形成第三复合物,其在第三捕获区131发射可检测的信号。

[0060] 因此,根据本公开的横向流装置包括:第一复合物,其包括标记物、特异性结合第一目标分析物的第一抗体、以及第一目标分析物;特异性结合第二目标分析物的第二标记的抗体;以及特异性结合第三目标分析物的第三标记的抗体,其中每个在第一阶段(例如,在将流体样品施加到横向流装置之前)与横向流装置的标记物区结合,以及然后在第二后续阶段(例如,在将流体样品施加到样品接收区时)迁移通过测试条。在第三阶段(例如,在流体样品流到检测区域之后),第一复合物可以结合第一捕获区中的第一捕获剂,第二复合物可以结合第二捕获区中的第二捕获剂,和第三复合物可以结合第三捕获区中的第三捕获剂。因此,本文描述的第一复合物、第二标记的抗体和第三标记的抗体可以最初定位在横向流装置的第一区域(诸如,标记物区)中,然后(在与流体接触时)与流体一起迁移至第一区域的下流的横向流装置的其他区域,并随后与捕获区中的捕获剂结合。

[0061] 如上所述,流体样品111使第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122溶解。在一个实施中,在该过程中,样品111中的第一目标分析物112不与第一复合物121相互作用,或基本上不与之相互作用。不受任何特定理论的约束,在本文描述的横向流装置的该实施中,当样品111流过标记物区120时,第一目标分析物112不与第一复合物121缀合、结合或缔合。在本文描述的横向流装置的另一实施中,当流体样品111溶解第一复合物121时,样品111中的第一目标分析物112与第一复合物121相互作用。在一个非限制性实施例中,并且不受任何特定理论的约束,样品111中的至少一些第一目标分析物112与第一复合物121中存在的第一分析物交换。不受任何特定理论的约束,在该实施中,第一捕获区135中的第一捕获剂136可以结合至少一些第一复合物121,其中第一复合物121中的分析物是由样品111引入到装置101上的第一目标分析物112。

[0062] 如图2A和2B所示,当流体样品111中分别不存在第一目标分析物112、第二目标分析物113和第三目标分析物114时(或者它们以低于可检测的水平存在),第一复合物121使第一捕获区135处的第一捕获剂136饱和(例如,第一捕获区135中的每个第一捕获剂136分子与从标记物区120流出的一个第一复合物121结合)。第二捕获区133中的第二捕获剂134不与任何第二复合物结合,因为在不存在第二目标分析物113的情况下第二复合物不形成。在第二目标分析物113以低于可检测的水平存在的情况下,没有可检测数量的第二复合物形成。第三捕获区131中的第三捕获剂132不与任何第三复合物结合,因为在不存在第三目标分析物114的情况下第三复合物不形成。在第三目标分析物114以低于可检测的水平存在的情况下,没有可检测数量的第三复合物形成。在第一捕获区135中捕获的第一复合物121发射第一可检测光信号,该第一可检测光信号是可以从横向流装置101的第一捕获区135获得的最大强度信号。在样品111中不存在(或以小于可检测水平存在)第一目标分析物112的情景中,第一捕获区135处检测到的第一光学信号是第一捕获区处最大强度信号,因为在第一捕获区135处每个可用的第一捕获剂136都已经与第一复合物121结合。在第二目标分析物113不存在(或小于可检测水平)的情况下,没有第二复合物形成(或没有可检测量的第二复合物形成),并因此第二捕获剂134不捕获任何第二复合物(或任何可检测量的第二复合物),并且观察不到第二可检测的信号。类似地,在第三目标分析物114不存在(或小于可检测水平)的情况下,没有第三复合物形成(或没有可检测量的第三复合物形成),并因此第三捕获剂132不捕获任何第三复合物(或任何可检测量的第三复合物),并且观察不到第三可检测的信号。

[0063] 图3A-3B图解了流体样品111中仅存在第一目标分析物112而第二目标分析物113和第三目标分析物114在流体样品111中不存在或低于可检测水平存在的示例性横向流测定物。在该实例中,第一目标分析物112与第一复合物121竞争在第一捕获区135处与第一捕获剂136结合。结果是当样品111中第一目标分析物112的浓度增加,在第一捕获区135处被第一捕获剂136结合的第一目标分析物112的数量增加。因为第一目标分析物112不发射可检测的信号,并且因为在第一目标分析物113存在的情况下较少的第一复合物121与第一捕获区135处的第一捕获剂136结合,所以与当样品111中不存在第一目标分析物112时观察到的最大信号强度相比,第一可检测的信号降低。

[0064] 图7A中显示了描绘图3A和3B的实例横向流测定物的示例性剂量响应曲线。在图7A,在第一捕获区处检测到的第一目标分析物的信号强度(此处,由配置为结合CRP的第一捕获区测量的信号强度绘制为正方形)随样品中第一目标分析物的浓度增加而降低。相反,因为第二目标分析物和第三目标分析物在样品中不存在(或小于可检测的水平),所以第二目标分析物的第二信号(此处,由配置为结合分析物2的第二捕获区测量的信号强度绘制为三角形)和第三目标分析物的第三信号(此处,由配置为结合分析物3的第三捕获区测量的信号强度绘制为圆形)不增加。

[0065] 图4A-4B图解了流体样品111中仅存在第二目标分析物113而第一目标分析物112和第三目标分析物114在流体样品111中不存在或低于可检测水平存在的实例横向流测定物。在该实例中,第二目标分析物113与特异性结合第二目标分析物113的第二标记的抗体123结合,形成第二复合物。第二复合物与流体样品111一起流动至检测区130,其中第二复合物被第二捕获区133的第二捕获剂134结合。从第二捕获区133处结合的第二复合物发

射第二可检测的信号,指示流体样品111中第二目标分析物113的存在。当样品111中第二目标分析物113的浓度增加时,由第二捕获区133结合的第二复合物发射的第二可检测的信号强度增加。

[0066] 图7B中显示了描绘图4A和4B的实例横向流测定物的示例性剂量响应曲线。在图7B,第二目标分析物的信号强度(此处,由配置为结合分析物2的第二捕获区测量的信号强度绘制为三角形)随着样品中第二目标分析物的浓度增加而增加。针对第二目标分析物的所有浓度,第一目标分析物的信号强度(此处,由配置为结合CRP的第一捕获区测量的信号强度绘制为正方形)保持或基本上保持在最大值(在该实例中,大约70AU(任意信号强度单位)),指示第一目标分析物在样品中不存在(或小于可监测的水平)。第三目标分析物的信号强度(此处,由配置为结合分析物3的第三捕获区测量的信号强度绘制为圆形)不增加,指示第三目标分析物在样品中不存在(或小于可监测的水平)。

[0067] 图5A-5B图解了流体样品111中仅存在第三目标分析物114而第二目标分析物113和第一目标分析物112在流体样品111中不存在或低于可检测水平存在的实例横向流测定物。在该实例中,第三目标分析物114与特异性结合第三目标分析物114的第三标记的抗体122结合,形成第三复合物。第三复合物与流体样品111一起流动至检测区130,其中第三复合物被第三捕获区131的第三捕获剂132结合。从第三捕获区131处结合的第三复合物发射第三可检测的信号,指示流体样品111中第三目标分析物114的存在。随着样品111中第三目标分析物114的浓度增加,由第三捕获区131结合的第三复合物发射的第三可检测的信号强度增加。

[0068] 图7C中显示了描绘图5A和5B的实例横向流测定物的示例性剂量响应曲线。在图7C,第三目标分析物的信号强度(此处,由配置为结合分析物3的第三捕获区测量的信号强度绘制为圆形)随着样品中第三目标分析物的浓度增加而增加。针对第三目标分析物的所有浓度,第一目标分析物的信号强度(此处,由配置为结合CRP的第一捕获区测量的信号强度绘制为正方形)保持或基本上保持在最大值(在该实例中,大约70AU),指示第一目标分析物在样品中不存在(或小于可监测的水平)。第二目标分析物的信号强度(此处,由配置为结合分析物2的第二捕获区测量的信号强度绘制为三角形)不增加,指示第二目标分析物在样品中不存在(或小于可监测的水平)。

[0069] 图6A-6B图解了在流体样品111中仅存在第一目标分析物112和第二目标分析物113而第三目标分析物114在流体样品111中不存在或低于可检测水平存在的实例横向流测定物。该实例横向流测定物是图3A和3B与图4A和4B的组合,图解了可以存在超过一种目标分析物但不必须存在所有目标分析物(或不必须以可检测的水平存在)的迭代。在该实例中,样品中的第一目标分析物112与第一复合物121竞争以参考图3A和3B上面描述的方式与第一捕获区135处的第一捕获剂136结合。在第一捕获区135处检测到的第一可检测的信号随着第一目标分析物112的浓度增加而从最大信号强度开始降低,指示在流体样品111中第一目标分析物112的存在和数量。同时或近乎同时,第二目标分析物113与标记物区中的第二标记的抗体123结合,形成第二复合物。第二复合物流动至检测区并与第二捕获区133处的第二捕获剂134结合。第二可检测的信号随着第二目标分析物113的浓度增加而增加,指示流体样品111中第二目标分析物113的存在或数量。

[0070] 图1A-6B图解了垂直于测试条的纵轴布置的第一捕获区135、第二捕获区133和第

三捕获区131,其中第一捕获区135离样品接收区110最远而第三捕获区离样品接收区110最近。在该非限制性实施例中,第一复合物121将在到达第一捕获区135并结合固定在第一捕获区135的第一捕获剂136之前流过第三捕获区131和第二捕获区133。这些附图是说明性的,并且可以实现各种迭代、改变和修改。第一捕获区135、第二捕获区133和第三捕获区131的相对位置可以与图1A-6B图解的相对位置不同,使得流体样品111以与所示的顺序不同的顺序流过捕获区。例如,第一捕获区、第二捕获区和第三捕获区可以垂直于测试条的纵轴以各种顺序布置(例如3、2、1;3、1、2;1、2、3;1、3、2;2、1、3;或2、3、1)。此外,捕获区可以平行于而不是垂直于测试条的纵轴放置,使得每个捕获区与样品接收区均等距离。

[0071] 有许多方法确定横向流装置101的第一捕获区135的最大强度信号。在一个非限制性实施例中,可以凭经验确定从横向流装置101的特定第一捕获区135获得的最大强度信号并将其存储在查找表中。在一些情况下,最大强度信号是通过测试具有已知特征和构造的横向流装置101来凭经验确定的,例如,通过平均向已知规格和构造的横向流装置101施加浓度为零或几乎为零的第一目标分析物的样品时获得的最大强度信号来确定。在另一非限制性实施例中,可以使用给定横向流装置101的已知规格和构造(诸如,例如,整合在标记物区120上的第一复合物121的数量和具体特性)的理论计算来确定可以从横向流装置101的特定第一捕获区135获得的最大强度信号。

[0072] 进一步,应当理解的是,虽然本文提及“最大强度信号”,但是在预期最大强度的特定范围内的信号可以被视为基本上等于“最大强度信号”。另外,应当理解的是,“最大强度信号”可以指最大强度光学信号、最大强度荧光信号、最大强度磁信号、或以最大强度出现的任何其他类型的信号。作为一个非限制性实施例,在预期最大强度信号的1%内的第一捕获区135处的检测的信号被视为基本上等于在第一捕获区135的预期最大强度信号。如果最大强度信号为或大约70AU,则大约75.3AU至大约70.7AU的范围内的检测的信号将被视为基本上等于70AU的最大强度信号。作为另一实例,在关于图7A-7C描述的非限制性实施方式中,在预期最大强度信号的10%内的第一捕获区135处的检测的信号被视为基本上等于在第一捕获区135的预期最大强度信号。因此,在图7A-7C中图解的最大强度信号为或大约70AU的实例中,大约63AU至大约77AU的范围内的检测的信号被视为基本上等于70AU的最大强度信号。这些实例仅出于说明性目的提供,所以其他偏差可能是可接受的。比如,在根据本公开的横向流测定装置中,在与预期最大强度信号的偏差的任何合适范围(诸如但不限于,预期最大强度信号的1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、2.0%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、11%、12%、13%、14%、15%内)内的第一捕获区135处的检测的信号可被视为基本上等于在第一捕获区135的预期最大强度信号。

[0073] 如图7A所图解,在根据本公开的横向流装置的实施方式中,随着第一目标分析物的浓度增加在第一捕获区135处的第一信号逐渐降低是有利的。由于检测的第一信号的这种逐渐降低,本文描述的横向流装置的实施方式有利地允许检测器以高分辨率精确测量第一信号以及允许数据分析器以高精度确定第一目标分析物在高浓度时的浓度。

[0074] 另外,根据本公开,关于横向流装置中以高浓度存在的目标分析物的剂量响应曲线有利地以最大强度信号开始然后从该最大强度信号降低。这意味着,有利地,在以高浓度存在的第一分析物的剂量响应曲线中,剂量响应曲线中信号减小的部分中将没有与最大强

度信号具有相同振幅的信号。进一步,因为样品中第一分析物的浓度低时第一信号将与最大强度信号相同或有效地相同(例如,如上所描述,它们被视为基本上等于最大强度信号),所以对于零至低浓度的第一分析物,在相对恒定值(“最大强度信号”)处存在第一光学信号的平台(如下面将参考非限制性实施例详细讨论)。这意味着,有利地,第一剂量响应曲线中第一信号降低的部分中将没有与最大强度信号具有大约相同振幅的信号。因此,关于在本文描述的横向流装置的实施方式中以高浓度存在的分析物,避免了假阴性和不准确的低读数,并且允许检测单个样品中存在的高浓度分析物和低浓度分析物两者,而不需要在施加至单个横向流测定物之前对样品进行稀释或其他预处理。

[0075] 有利地,在本文描述的横向流装置的实施方式中,第一复合物121可以预配制以包括已知数量的第一目标分析物,然后沉积在缀合物垫上。在一些实施方式中,已知浓度的第一目标分析物在与测试条分开的反应容器中利用抗体或抗体片段和标记物分子进行培育。在培育期间,第一目标分析物缀合至、结合至抗体和标记物分子或与之缔合,从而形成上面描述的第一复合物121。在培育后,第一复合物121以精确已知的浓度直接添加到溶液或分离以去除过量的游离第一目标分析物,然后喷涂至缀合物垫上。将包括第一复合物121的溶液施加至测试条,诸如在上面描述的标记物区120上。在沉积期间,第一复合物121整合在测试条的表面上。在一个非限制性实施例中,第一复合物121整合到测试条的缀合物垫上。有利地,第一复合物121可以依然物理结合至并化学稳定在测试条的表面上,直到操作者将流体样品施加至测试条,于是第一复合物121与测试条分离并随流体样品一起流动,如上面所描述。

[0076] 类似地,第二标记的抗体123和第三标记的抗体122可以单独配制。例如,特异性结合第二目标分析物的第二抗体可以利用标记物分子进行培育,由此形成第二标记的抗体123。第二标记的抗体123可以沉积在测试条上,类似于第一复合物121的沉积,或以任何其他合适的方式。第二标记的抗体123可以依然物理结合至并化学稳定在测试条的表面上,直到操作者将流体样品施加至测试条,于是第二标记的抗体123与测试条分离,与流体样品中存在的任意第二分析物结合并随流体样品一起流动,如上面所描述。类似的方法可以用于第三标记的抗体,或任意另外的标记的抗体或复合物,用于检测另外的目标分析物。

[0077] 在一些实施方式中,第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122各自以范围为约0.1-20 $\mu$ L/测试条的量沉积。在一些实施方式中,第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122各自以如下量沉积在标记物区中:0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20 $\mu$ L/测试条。在一个非限制性实施例中,第一复合物121以约3 $\mu$ L/cm的量沉积,第二标记的抗体123以约7 $\mu$ L/cm的量沉积,和第三标记的抗体122以约7 $\mu$ L/cm的量沉积。

[0078] 可以通过许多不同的方式将包括第一复合物121的溶液、包括第二标记的抗体123的溶液和包括第三标记的抗体122的溶液施加至测试条。在一个实例中,利用空气喷射技术通过喷洒溶液将溶液施加到标记物区120。在另一实例中,通过倾倒溶液、喷洒溶液、将溶液配制成被置于或摩擦在测试条上的粉末或凝胶的溶液或任何其他合适的方法沉积溶液,以施加第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122。在一些实施方式中,在沉积之后,将第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122在沉积后通过在缀合

物垫上加热或吹气在测试条的表面上进行干燥。在测试条的表面上干燥第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122的其他机制是合适的。例如,真空或冻干也可用于干燥缀合物垫上的第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122。

[0079] 在某些情况下,第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122在沉积之前不添加到溶液中,而是直接施加到测试条上。可以使用任何合适的方法直接施加第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122,包括但不限于对在测试条的表面上第一复合物121、第二标记的抗体123和第三复合物121施加压缩或真空压力和/或将冻干颗粒形式的第一复合物121、第二标记的抗体123和第三标记的抗体122施加到测试条表面。

[0080] 本文描述的横向流测定物的实施方式不需要包括配置为确认样品接收区110中施加的样品已经如预期流至检测区130的对照线或区。在正常操作条件下,如果样品已经流至第一捕获区135,将总是从第一捕获区135发射一些可检测的信号。有利地,第一捕获区135可以定位在第三捕获区131和第二捕获区133两者的下游并且可以在视觉上指示样品111已经如预期流过所有三个捕获区,使得第一捕获区135有效起到对照线或区的功能。在正常操作情况下,如果样品已经流至第一捕获区135,即使第一目标分析物在样品中以极低浓度存在,将总是从第一捕获区发射可检测的信号。这是因为本公开的横向流装置产生第一剂量响应曲线,其对于零或低浓度的第一目标分析物依然在或接近最大强度信号。通过精心设计横向流测定物,即使在样品中存在生理可能的高浓度的第一分析物112的情况下,第一捕获区135上的信号可以显著降低,但是不完全消失。因此,在已经将样品施加至样品接收区110后在第一捕获区135不存在任何可检测的信号可以用于指示横向流测定物不能如预期操作(例如,样品没有如预期流动至第一捕获区135,或作为另一实例,在第一捕获区135处固定的第一捕获剂136有缺陷或失误)。因此,根据本公开的横向流装置的实施方式的进一步优点是第一捕获区135起到对照线的功能由此允许从测试条完全省略单独的对照线的功能。然而,应当理解,对照线可以包括在本文描述的横向流装置的实施方式中用于多种目的,包括但不限于观察线,用于归一化噪声,或用于检测血清中分析物的干扰。

[0081] 在一些情况中,横向流装置包括一个或多个对照区。对照区可以在检测区或与检测区分开。在一些实施方式中,对照区可以是阳性对照,其可以包括与蛋白缀合的小分子,诸如牛血清白蛋白(BSA)。特异性结合小分子的阳性对照标记的抗体可以沉积在缀合物垫上。当阳性对照标记的抗体用液体样品再水合时,其朝向阳性对照区流动并与小分子结合,形成半夹心。在阳性对照区处产生的阳性对照信号不依赖流体样品中存在的多种目标分析物的存在或浓度,并因此保持相对恒定的强度。然而,由于不均匀垫材料引起的缀合物垫上沉积的阳性对照标记的抗体的量的差异,在阳性对照区处产生的阳性对照信号的强度和在每个捕获区处产生的信号的强度可以在装置之间稍有不同,即使测试相同的样品。在装置之间,阳性对照区和捕获区的信号的强度变化是相同的。因此,阳性对照区可以用作参考线,以更好地测量捕获区处产生的相对信号强度并因此阳性对照区可以提供更精确的分析物浓度。

[0082] 横向流测定物可以另外包括阴性对照区。阴性对照区可以包括来自与捕获区中使用的抗体相同的种类的阴性对照抗体。来自一些血液样品的一些成分可干扰免疫测定。如果这类干扰物质在一个样品中存在,其将不仅干扰捕获区处的信号强度,还干扰阴性对照区处的信号强度。本文公开的读取器和数据分析器的实施方式可以处理从阴性对照区获得

的信号测量值,以矫正任何计算或提醒操作者无效结果。

[0083] 下面的非限制性实施例说明了本文描述的横向流装置、测试系统和方法的特征,但决不旨在限制本公开的范围。

[0084] 实施例1

[0085] 定量高和低浓度的蛋白的横向流测定物的制备

[0086] 以下实施例描述了本文描述的定量多种目标分析物的横向流测定物的制备。在该非限制性实施例中,目标分析物是单个样品中的蛋白:C-反应性蛋白(CRP)、分析物2(诸如但不限于降钙素原(PCT))、和分析物3(诸如但不限于干扰素诱导的GTP-结合蛋白Mx1)。在该非限制性实施例中,CRP在血清样品中以升高的或高的浓度存在,而分析物2或分析物3在血清样品中以低浓度存在。

[0087] CRP是血浆中发现的蛋白。CRP的水平响应于发炎和感染而升高。CRP因此是可用于诊断发炎和感染的发炎和感染的标志物。对象的血清中升高水平的CRP可以与对象中发炎和/或细菌感染相关联。健康人对象总CRP的正常水平范围为约 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在轻度发炎和细菌感染期间CRP的浓度范围为 $10-40\mu\text{g}/\text{mL}$ ;在活跃发炎和细菌感染期间为 $40-200\mu\text{g}/\text{mL}$ ;和在严重细菌感染和烧伤情况中,大于 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 。测量CRP水平并制图可用于确定疾病进展或治疗的有效性。

[0088] CRP因此在血浆中跨大动态范围存在,例如从约 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的低浓度至大于 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 的非常高的浓度。即使CRP在一些情况中可以以高灵敏度进行测量,但是这样的测量值通常具有低的特异性(例如,测量CRP可以对浓度的微小变化非常敏感,但是单个浓度测量可以与超过一种疾病状态或甚至无疾病状态相关联(发炎或其他非疾病症状))。本文描述的横向流装置、测试系统和方法的实施方式有利地允许CRP以非常高的灵敏度进行侧脸而同时测量同一单个样品中以低浓度存在的目标分析物的浓度,由此增加整个多重测定物的特异性。因此,本公开的实施方式在单次测试事件中,使用施加至单个横向流测定物的单个样品,非常精确地测量CRP在其大动态范围内的浓度,以及以CRP浓度的百万分之一存在的另外的目标分析物的浓度,包括在施加至单个测定物之前不稀释或预处理单个样品的情况中。例如,单个样品可以是未经稀释的全血样品;未经稀释的静脉血样品;未经稀释的毛细血管血样品;未经稀释的血清样品;和未稀释的血浆样品。

[0089] 分析物2是在病毒感染期间血液中升高的蛋白。分析物2的一个非限制性实例是PCT。PCT的血清浓度正常在 $<0.05\text{ng}/\text{mL}$ 附近,但是在全身性炎症特别是细菌感染的情况中,由许多身体组织产生大量的PCT。在脓毒症的情况中,PCT可以 $0.5-2\text{ng}/\text{mL}$ 的浓度存在。然而,下面的实施例不限于PCT,并且将提及第二目标分析物作为分析物2。

[0090] 分析物3是在病毒感染期间血浆中升高的蛋白。分析物3的一个非限制性实例是Mx1。然而,下面的实施例不限于Mx1,并且将提及第三目标分析物作为分析物3。

[0091] 确定CRP、分析物2和分析物3中每个的浓度或存在的测定物需要检测低浓度的分析物和同时检测高浓度的分析物。实际上,CRP浓度可以大于分析物2和/或分析物3的浓度一百万倍。此外,CRP的轻度增加、分析物2的增加和TRRAIL的检测可以指示病毒感染。检测到CRP和分析物2的水平增加而没有分析物3指示细菌感染。仅检测到CRP水平增加,而分析物2和分析物3检测不存在可以指示发炎。没有检测到CRP、分析物2、或分析物3(或检测到CRP在约 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的健康对象的范围内)可以是感染的阴性结果,指示对象不可

能遭受病毒或细菌感染。

[0092] 根据该非限制性实施例制备的测定物可以用于确定全血中或全血样品的级分中CRP、分析物2和分析物3(目标分析物)的存在和浓度,即使CRP高浓度而分析物2和分析物3低浓度时。测定物包括复合物,其包括标记物、特异性结合CRP的第一抗体或其片段和CRP。测定物进一步包括特异性结合分析物2的标记的第二抗体或其片段以及特异性结合分析物3的标记的第三抗体或其片段。

[0093] 为了制备测定物,与金纳米颗粒一起培育抗-CRP抗体以形成标记的抗-CRP抗体。与CRP一起培养标记的抗体以形成结合CRP的标记的抗体的复合物。利用空气喷射通过喷洒包括复合物的溶液将复合物以 $1.8\mu\text{L}$ /测试条的量沉积在缀合物垫(标记物区)上。

[0094] 抗-分析物2抗体与金纳米颗粒一起培育以形成标记的抗-分析物2抗体。利用空气喷射通过喷洒包括标记的抗-分析物2抗体的溶液将标记的抗-分析物2抗体以 $7\mu\text{L}$ /测试条的量沉积在缀合物垫上(标记物区)。抗-分析物3抗体与金纳米颗粒一起培育以形成标记的抗-分析物3抗体。利用空气喷射通过喷洒包括标记的抗-分析物3抗体的溶液将标记的抗-分析物3抗体以 $7\mu\text{L}$ /测试条的量沉积在缀合物垫上(标记物区)。加热缀合物垫以干燥至缀合物垫的复合物和标记的抗-分析物2抗体和标记的抗-分析物3抗体中每个。

[0095] 仔细考虑沉积在缀合物垫上的抗体-标记物-CRP复合物的量,以确保在捕获区处提供光学信号的最佳范围的必要量的复合物,这将允许测试系统定量升高水平的CRP。在缀合物垫上沉积过量的复合物将使剂量响应曲线位移,使得CRP的可定量浓度过高(潜在地产生非常高浓度的CRP(如果存在)的光学信号,但是不产生轻度至高浓度的光学信号)。在缀合物垫上沉积不足量的复合物使剂量响应曲线在其他方向上位移,导致可能不允许量化非常高的CRP浓度但是量化相对低的CRP浓度的信号。

[0096] 在该实施例中,添加至缀合物垫的抗体-标记物-CRP复合物的最佳量导致在缀合物垫上沉积 $50\text{ng}$ 的CRP,对应于 $70.06\text{AU}$ 的信号。在该量下,样品中未标记的CRP与抗体-标记物-CRP复合物的比例,由于他们竞争结合捕获区中的捕获剂,产生超过未标记的CRP浓度的最佳范围的强光学信号,由此允许信号的充足分辨率,并且样品中升高的CRP浓度可以被精确地定量。另外,沉积在缀合物垫上的标记的抗-分析物2抗体和标记的抗-Mx1抗体的量为约 $260\text{ng}$ /测试条。

[0097] 另外,制备具有检测区的测定物。检测区包括针对每种目标分析物的捕获区。因此,检测区包括第一捕获区,其包括特异性结合CRP的第一固定捕获剂;第二捕获区,其包括特异性结合分析物2的第二固定捕获剂;和第三捕获区,其包括特异性结合分析物3的第三固定捕获剂。

[0098] 在该实施例中,抗-CRP抗体以 $2.4\text{mg}/\text{mL}$ 的量以 $0.75\mu\text{L}/\text{cm}$ 沉积在第一捕获区处,抗-分析物2抗体以 $2.4\text{mg}/\text{mL}$ 的量以 $0.75\mu\text{L}/\text{cm}$ 沉积在第二捕获区处,和抗-分析物3抗体以 $3\text{mg}/\text{mL}$ 的量以 $0.75\mu\text{L}/\text{cm}$ 沉积在第三捕获区处。

[0099] 在该实施例中,检测区还包括阳性对照捕获区和阴性对照捕获区。制备阳性对照捕获区以确保测定物适当地起作用。在该实施例中,阳性对照捕获区包括利用生物素衍生的固定的牛血清白蛋白(BSA-生物素)。固定的BSA-生物素捕获在测试条上存在的标记的抗-生物素抗体,其与流体样品水合并流至阳性对照捕获区,指示测定物的适当功能。在阳性对照线处捕获标记的抗-生物素抗体,和阳性对照信号指示测定物的适当功能。阳性对照

信号可以还被用作参考线,用于确定第一捕获区、第二捕获区和第三捕获区的相对信号强度,从而增加目标分析物的浓度的精确度。

[0100] 阴性对照捕获区包括针对在流体样品中可能存在的干扰成分的固定的抗体。这类干扰成分可以干扰第一捕获区、第二捕获区、或第三捕获区,从而引起不正确的信号强度。干扰成分还将结合阴性对照捕获区。本文公开的读取器和数据分析器的实施方式可以处理从阴性对照区获得的信号测量值,以改正在第一捕获区、第二捕获区、和第三捕获区处测量的信号,或警告操作者测试是无效的。

[0101] 实施例2

[0102] 使用单个多重横向流测定物定量CRP、分析物2、或分析物3

[0103] 由于CRP相比分析物2(诸如但不限于PCT)和分析物3(诸如但不限于Mx1)的显著改变的浓度,夹心式横向流测定物一般不适合定量以高浓度存在的CRP并同时定量存在的分析物2和分析物3(低浓度或高浓度)。当在通常体积的样品中以任意浓度存在时,与CRP相比,分析物2和分析物3以1-999ng/mL或1-999pg/mL的范围存在,当在相同通常体积的样品中存在时,CRP以1-999 $\mu$ g/mL的范围内的浓度存在。确定CRP的升高的浓度先前需要连续稀释样品,导致低效而费力的过程,并且还使得已经低浓度的分析物2和分析物3的浓度降低到将不能检测的浓度。然而,使用本文描述的横向流装置、测试系统和方法,可以精确地、可靠地并快速地定量高浓度的CRP和显著较低浓度的分析物2和分析物3(例如,CRP浓度的百万分之一)。

[0104] 使实施例1中制备的横向流测定物与样品接触,该样品包括CRP、分析物2或TRAI的各种浓度,如下面表1中描述。通过在45 $\mu$ L的人血清中添加表1中所示的CRP、分析物2或分析物3的量制备流体样品。在横向流测定物上接受样品,并在30秒后用45 $\mu$ L的HEPES缓冲液进行追赶。十分钟后,测量光学信号。图7A-7C图解了得到的横向流测定物的剂量响应曲线。图7A显示了不存在分析物2或分析物3的情况下,增加浓度的CRP的剂量响应曲线。在图7A,CRP(绘制为正方形)的剂量响应曲线的信号强度随CRP的浓度增加而降低,与样品中存在的未标记的CRP与抗体-标记物-CRP复合物的竞争一致。在图7A,分析物2(绘制为三角形)和分析物3(绘制为圆形)的剂量响应曲线的信号强度依然处于零或零附近,指示在样品中不存在分析物2和分析物3(或分析物2和分析物3以可检测水平以下的水平存在)。

[0105] 图7B显示了不存在CRP或分析物3的情况下,增加浓度的分析物2的剂量响应曲线。在图7B,分析物2(三角形)的剂量响应曲线的信号强度随分析物2的浓度增加而增加。在图7B,分析物3(圆形)的剂量响应曲线的信号强度依然处于零或零附近,指示在样品中不存在分析物3(或分析物3以可检测水平以下的水平存在)。进一步,CRP(正方形)的剂量响应曲线的信号强度依然处于信号最大(接近70AU),指示在样品中不存在CRP(或CRP以低于可检测水平的水平存在)。

[0106] 图7C显示了不存在CRP或分析物2的情况下,增加浓度的分析物3的剂量响应曲线。在图7C,分析物3(圆形)的剂量响应曲线的信号强度随分析物3的浓度增加而增加。在图7C,IP-19(三角形)的剂量响应曲线的信号强度依然处于零或零附近,指示在样品中不存在分析物2(或分析物2以可检测水平以下的水平存在)。进一步,CRP(正方形)的剂量响应曲线的信号强度依然处于信号最大(接近70AU),指示在样品中不存在CRP(或CRP以低于可检测水平的水平存在)。

[0107] 表1:CRP、分析物2和分析物3的横向流测定物

血清样品中的 [CRP]( $\mu\text{g/mL}$ )	血清样品中的 [分析物 2]( $\text{pg/mL}$ )	血清样品中的 [分析物 3]( $\text{pg/mL}$ )	在第一捕 获区处的 信号(AU)	在第二捕 获区处的 信号(AU)	在第三捕 获区处的 信号(AU)
0	0	0	70.5	1.8	0.91
5	0	0	63.3	1.8	0.69
10	0	0	54.6	1.8	0.56
20	0	0	39.8	1.9	0.69
40	0	0	24.8	1.8	0.54
60	0	0	16.5	2.1	0.87
100	0	0	10.0	2.1	0.53
150	0	0	6.4	2.1	0.48
0	0	0	71.57	0.03	0.59
0	62.5	0	72.04	0.64	0.37
0	125	0	72.24	1.71	0.30
0	250	0	71.97	4.48	0.34
0	500	0	71.40	9.56	0.15
0	1000	0	72.45	18.51	0.25
0	0	0	71.57	0.03	0.59
0	0	31.25	71.09	0.00	1.45
0	0	62.5	71.65	0.00	3.00
0	0	125	70.98	0.00	5.64
0	0	250	71.69	0.00	10.62
0	0	500	71.51	0.00	19.72

## [0108] 实施例3

[0110] 使用单个多重横向流测定物同时定量CRP、分析物2、和分析物3

[0111] 实施例2说明了同时检测血清样品中CRP、分析物2、或分析物3的单个多重横向流测定物。该实施例进一步说明了检测血清样品中CRP、分析物2和分析物3中任何一个或多个的组合的存在的单个横向流测定物。

[0112] 使实施例1中所制备的横向流测定物与包括CRP、分析物2和分析物3的组合的样品接触,如下面表2中所描述。通过在 $45\mu\text{L}$ 的人血清替代物中添加量为 $40\mu\text{g/mL}$ 的CRP、量为 $500\text{pg/mL}$ 的分析物2或量为 $250\text{pg/mL}$ 的分析物3,或其组合制备流体样品,如表2中所示。在横向流测定物上接收样品,并在30秒后,用 $45\mu\text{L}$ 的HEPES缓冲液追赶。十分钟后,观察光学信号。图8图解了表2中每个条件的横向流测定装置。图8显示了在以下条件的六个横向流测定装置(从左至右):存在CRP、分析物2、和分析物3中每种(也参见图1A和1B);不存在CRP、分析物2、和分析物3(也参见图2A和2B);单独存在CRP(也参见图3A和3B);单独存在分析物2(也参见图4A和4B);单独存在分析物3(也参见图5A和5B);和存在CRP和分析物2两者(也参见图6A和6B)。在图8中,不具有样品中存在的CRP的横向流测定物导致在CRP捕获区处最大信号强度,而在样品中存在CRP的横向流测定物导致在CRP捕获区处降低的信号强度。相反,分析物2和分析物3的存在分别增加分析物2捕获区或分析物3捕获区处的信号强度。具有CRP、分析物2和分析物3的组合的样品指示各自分析物的存在,并且可以用来确定发炎、病毒感染、

或细菌感染。

[0113] 表2:测试CRP、分析物2和分析物3的组的横向流测定物

流体样品分析物	第一捕获区	第二捕获区	第三捕获区	指示
CRP、分析物 2、和分析物 3	中度降低的信号	增加的信号	增加的信号	病毒感染
无	最大信号	无信号	无信号	无分析物存在
CRP	降低的信号	无信号	无信号	发炎
[0114] 分析物 2	最大信号	增加的信号	无信号	分析物 2 存在
分析物 3	最大信号	无信号	增加的信号	分析物 3 存在
CRP 和分析物 2	降低的信号	增加的信号	无信号	细菌感染

[0115] 实施例2和3说明了当一种或多种目标分析物以高浓度存在并且一种或多种目标分析物以低浓度存在,本文描述的实例横向流测定物确定多种目标分析物的浓度的功效,即使当以高浓度存在的一种或多种目标分析物的浓度以大于低浓度的目标分析物的量百万倍的量存在时。实施例2和3采用两个确定两种低浓度分析物的夹心式横向流测定物结合配置为检测单个测试条上高浓度分析物的夹心式测定物,但是应当理解,本公开适用其他配置。作为另一非限制性实例,本文描述的横向流测定物可以采用一个确定一种低浓度分析物的夹心式横向流测定物结合配置为检测单个测试条上两种高浓度分析物的两个夹心式测定物。

[0116] 有利地,根据本公开的横向流测定物允许待精确确定的CRP的浓度在大于10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下,并同时允许待精确确定的分析物2和分析物3的浓度以低至30和1000 $\text{pg}/\text{mL}$ 的浓度。这在精确地诊断疾病和非疾病症状中是特别有利的,其中可以存在CRP、分析物2和分析物3中的一种或多种,诸如在发炎症状、病毒感染症状、或细菌感染症状中。根据本公开的横向流测定物可以通过在单个测定物中确定CRP、分析物2和分析物3中每个的浓度区分发炎、病毒感染或细菌感染。CRP、分析物2、和分析物3可以在单次测试事件中施加至单个测定物的单个样品中存在。

[0117] 此外,本文描述的横向流装置在一个单个测定物中定量样品中升高浓度的多种分析物,而不需要稀释样品。确定高浓度分析物的测定物经常稀释样品以降低测定物上的总分析物。稀释需要另外的物理步骤以及进一步的计算。另外,即使稀释可以有助于高浓度的分析物,但是低浓度的分析物受到稀释影响而降低了检测低浓度分析物的能力。因此,稀释不适合既检测低浓度分析物又检测高浓度分析物的单个测定物。本公开的横向流测定物能够基于在单次测试后在检测区处获得的信号确定多种分析物浓度间的微小差异。

[0118] 使用根据本公开的横向流测定物诊断症状的方法

[0119] 本文提供的一些实施方式涉及使用横向流测定物诊断医疗症状的方法。在一些实施方式中,方法包括提供本文描述的横向流测定物。在一些实施方式中,方法包括在横向流测定物的样品储器处接收样品。

[0120] 在一些实施方式中,样品获得自来源,包括环境或生物来源。在一些实施方式中,怀疑样品具有一种或多种目标分析物。在一些实施方式中,不怀疑样品具有任何目标分析物。在一些实施方式中,获得并分析样品,用于验证多种分析物的存在与否。在一些实施方式中,获得并分析样品,用于定量样品中的多种分析物。在一些实施方式中,样品中存在的一种或多种分析物中任一种的数量小于健康对象中存在的正常值,或在健康对象中存在的正常值处或附近,或高于健康对象中存在的正常值。

[0121] 在一些实施方式中,在横向流测定物的样品储器处接收样品包括使样品与横向流测定物接触。样品可以通过经由外部施加将样品引入样品储器接触横向流测定物,如用滴管或其他施加器。在一些实施方式中,样品储器可以直接浸没在样品中,诸如当将测试条浸入装有样品的容器中时。在一些实施方式中,样品可以倾倒、滴落、喷洒、放置或以其它方式与样品储器接触。

[0122] 本公开的实施方式中的复合物包括特异性结合目标分析物的抗体、标记物和目标分析物,并且可以沉积在样品储器内或其下游的缀合物垫(或标记物区域)上。装置可以包括第一复合物,该第一复合物具有特异性结合第一目标分析物的抗体、标记物和第一目标分析物。复合物用于确定可在样品中以高浓度存在的分析物的存在和/或数量。因此,还可以在装置上包括其他复合物,其中操作者有兴趣确定高浓度存在的一种以上目标分析物的存在和/或数量。

[0123] 装置可以进一步包括标记的抗体,其包括特异性结合目标分析物的抗体和标记物,但是不包括目标抗体。装置可以包括第二标记的抗体,其包括特异性结合第二目标分析物的第二抗体和标记物,并且装置还可以包括第三标记的抗体,其包括特异性结合第三目标分析物的第三抗体和标记物。标记的抗体用于确定可在样品中以低浓度存在的分析物的存在和/或数量。因此,还可以在装置上包括其他复合物,其中操作者有兴趣确定更多第二目标分析物和第三目标分析物的存在和/或数量。标记的抗体可以沉积在样品储器内或其下游的缀合物垫(或标记物区)上。

[0124] 第一复合物、第二标记的抗体和第三标记的抗体可以通过物理或化学键集成在缀合物垫上。在将样品添加到样品储器之后,样品溶解第一复合物、第二标记的抗体和第三标记的抗体,释放将第一复合物、第二标记的抗体和第三标记的抗体保持在缀合物垫的键。第二标记的抗体结合第二目标分析物(如果在样品中存在),形成第二复合物。第三标记的抗体结合第三目标分析物(如果在样品中存在),形成第三复合物。样品(包括或不包括第一目标分析物,包括第一复合物,第二复合物(当样品中存在第二目标分析物),和第三复合物(当样品中存在第三目标分析物))沿流体前沿通过横向流测定物流动至检测区。检测区可以包括用于捕获每种复合物的捕获区。例如,检测区可以包括用于捕获第一复合物的第一捕获区,用于捕获第二复合物的第二捕获区,和用于捕获第三复合物的第三捕获区。固定在第一捕获区的第一捕获剂结合第一分析物(如果存在)和第一复合物。当第一复合物在第一捕获区结合第一捕获剂时,检测到来自标记物的第一信号。第一信号可以包括如本文描述的光学信号。当在样品中存在低浓度的第一分析物时(诸如在健康水平处或以下的水平),在第一捕获区检测到最大强度信号。在升高浓度的第一分析物下(诸如健康值以上的水平),第一信号的强度降低的量与样品中第一分析物的量成比例。将第一信号与第一目标分析物的剂量响应曲线上的值进行比较,并确定样品中第一分析物的浓度。

[0125] 固定在第二捕获区的第二捕获剂结合第二复合物。当第二复合物在第二捕获区结合第二捕获剂时,检测到来自标记物的第二信号。第二信号可以包括如本文描述的光学信号并且可以具有与第一信号相同的波长,或可以具有与第一信号不同的波长。随着第二分析物的浓度增加,第二复合物的形成增加,导致第二捕获剂在第二捕获区处捕获的第二复合物的量增加,这导致第二信号强度增加。

[0126] 固定在第三捕获区的第三捕获剂结合第三复合物。当第三复合物在第三捕获区结合第三捕获剂时,检测到来自标记物的第三信号。第三信号可以包括如本文描述的光学信号并且可以具有与第一信号或第二信号相同的波长,或可以具有与第一信号或第二信号不同的波长。随着第三分析物的浓度增加,第三复合物的形成增加,导致第三捕获剂在第三捕获区处捕获的第三复合物的量增加,这导致第三信号强度增加。

[0127] 在一些实施方式中,第一分析物以升高的浓度存在。升高浓度的第一分析物可以指健康水平之上的第一分析物的浓度。因此,第一分析物的升高的浓度可以包括比健康水平高5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%或更高的第一分析物的浓度。在一些实施方式中,第一目标分析物包括C-反应性蛋白(CRP),其以约1至约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的量存在于健康个体的血清中。因此,样品中CRP的升高浓度包括15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更高的量。

[0128] 在一些实施方式中,第二分析物以升高的浓度存在。升高浓度的第二分析物可以指健康水平之上的第二分析物的浓度。因此,第二分析物的升高的浓度可以包括比健康水平高5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%或更高的第二分析物的浓度。在一些实施方式中,第二目标分析物包括降钙素原(PCT),其以小于约0.05 $\text{ng}/\text{mL}$ 的量存在于健康个体的血清中。因此,样品中PCT的升高浓度包括0.05 $\text{ng}/\text{mL}$ 或更高的量。在样品中存在约0.5至2.0 $\text{ng}/\text{mL}$ 的PCT可能是大的提升,并潜在地指示脓毒症。

[0129] 在一些实施方式中,第三分析物以升高的浓度存在。升高浓度的第三分析物可以指健康水平之上的第三分析物的浓度。因此,第三分析物的升高的浓度可以包括比健康水平高5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%或更高的第三分析物的浓度。在一些实施方式中,第三目标分析物包括Mx1,其在健康个体的血清中以一定量存在并且可以大于病毒感染存在时的量的升高的浓度存在。

[0130] 在一些实施方式中,在确定第一分析物、第二分析物或第三分析物或其组合以升高浓度存在于样品中后,诊断对象患有某种疾病。例如,CRP浓度升高而分析物2或TRAIL不增加,可以指示发炎。分析物2和CRP浓度升高而分析物3没有增加,可以指示细菌感染。CRP、分析物2和分析物3浓度全部升高可以指示病毒感染。在一些实施方式中,当确定CRP的浓度为15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、或200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更大而确定分析物2和分析物3两者的浓度在健康范围内时,做出发炎的诊断。在一些实施方式中,当确定CRP的浓度为15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、或200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更大和确定分析物2的浓度为0.05 $\text{ng}/\text{mL}$ 附近或大于0.05 $\text{ng}/\text{mL}$ ,而分析物3的浓度在健康

范围内时,做出细菌感染的诊断。在一些实施方式中,当CRP以低浓度存在和分析物2和分析物3浓度升高时,做出病毒感染的诊断。在非限制性实例中,当确定CRP的浓度没有升高(例如在约1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间),确定分析物2的浓度没有升高和确定分析物3的浓度升高时,做出病毒感染的诊断。

[0131] 包括炎症、细菌感染或病毒感染在内的症状的诊断可以通过在本文描述的单个横向流测定装置上单次施加单个样品来进行,即使一种目标分析物(诸如CRP)的浓度以显著大于另一种目标分析物(诸如分析物2和分析物3)的量存在。因此,单个装置能够准确地确定以大于低浓度存在的分析物1000万、900万、800万、700万、600万、500万、400万、300万、200万、100万、500,000、100,000、50,000、10,000、5,000、1,000、500、100或10倍的量存在的目标分析物的存在和/或浓度。

[0132] 上面描述的根据本公开的横向流装置、测试系统和方法的实例实施检测单次施加中施加至单个横向流测定物(诸如单个横向流测定物测试条)的单个样品中CRP、分析物2和分析物3的存在和/或浓度。应当理解的是,本公开不限于这些实例实施。例如,在另一非限制性实例中,根据本公开的横向流装置、测试系统和方法可以检测单次施加中施加至单个横向流测定物(诸如单个横向流测定物测试条)的单个样品中CRP、指示细菌感染和病毒感染的任何分析物、和指示病毒感染的任何分析物的存在和/或浓度。在一个非限制性实例中,根据本公开的横向流装置、测试系统和方法可以检测单次施加中施加至单个横向流测定物(诸如单个横向流测定物测试条)的单个样品中CRP、TRAIL、IP-10、Mx1和PCT(或这些的任意组合物中)的存在和/或浓度。在仍进一步非限制性实例中,根据本公开的横向流装置、测试系统和方法可以检测单次施加中施加至单个横向流测定物(诸如单个横向流测定物测试条)的单个样品中CRP并且TRAIL、IP-10、Mx1、和PCT中任一种的存在和/或浓度。应当理解的是,这些非限制性实例中列举的特定分析物是为了说明,而非限制本公开;使用本文描述的横向流装置、测试系统和方法可以检测和测量任何目标分析物。

[0133] 根据本公开的可以检测高浓度分析物的存在和浓度的多重横向流测定物的另外实施

[0134] 根据本公开的横向流装置、测试系统和方法在样品中一种或多种目标分析物以升高的或高浓度存在和样品中一种或多种目标分析物以低浓度存在的情况中精确地确定多种目标分析物的存在或数量。有利地,在单次测试事件中,将单个样品施加至一个横向流测定物(诸如单个测试条)后,本文描述的横向流装置、测试系统、和方法确定单个样品中以显著不同浓度存在的目标分析物的存在或数量。因此,本文描述的横向流测定物能够同时检测单个样品中多种分析物,即使当分析物以显著不同的浓度范围存在。上面关于图1A-6B中图解的非限制性实施方式描述了确定样品中以高浓度存在的一种或多种目标分析物的存在或数量的实例横向流装置、测试系统和方法。在2018年6月25日提交的国际申请号PCT/US2018/039347中描述了另外的实例实施,其通过引用以其全部并入本文。

[0135] 本公开的多重横向流装置、测试系统和方法可以使用另外的技术确定样品中以高浓度存在的一种或多种目标分析物的存在或数量。例如,可以在根据本公开的多重横向流装置、测试系统和方法中实施2018年12月3日提交的国际申请号PCT/US2018/063586中描述并通过引用以其全部并入本文的另外的横向流装置、测试系统和方法,从而确定样品中以高浓度存在的一种或多种目标分析物的存在或数量。

[0136] 在国际申请号PCT/US2018/063586中描述的实施例涉及测定测试条,其包括配置为接收流体样品的流动路径;连接至流动路径的样品接受区;捕获区;标记的抗体或其片段;和在流动路径中捕获区的上游的超大颗粒。捕获区在样品接收区下游连接至流动路径并且包括对目标分析物(诸如但不限于CRP)具有特异性的固定化捕获剂。标记的抗体或其片段在对目标分析物具有特异性的捕获区上游连接至流动路径。超大颗粒缀合至对目标分析物具有特异性的抗体或其片段,以形成具有大小和尺寸的抗体-缀合的超大颗粒,以当在测定测试条上接收流体样品时保留在捕获区的上游。在该实例实施中的流动路径配置为接收包括目标分析物(诸如但不限于CRP)的流体样品。标记的抗体或其片段和抗体-缀合的超大颗粒竞争以特异性结合目标分析物。当在测定测试条上接收流体样品时,标记的抗体或其片段配置为与结合的目标分析物在流动路径上一起流动至捕获区。在捕获区捕获结合目标分析物的标记的抗体并发射可检测的信号。

[0137] 在一些情况中,流动路径配置为接收包括或不包括目标分析物(诸如但不限于CRP)的流体样品。抗体-缀合的超大颗粒特异性结合已知数量的目标分析物,由此在捕获区的上游保留已知数量的目标分析物。

[0138] 在该实例中的测定测试条包括捕获区下游的对照区。对照区包括特异性结合不结合目标分析物并流过捕获区的标记的抗体或其片段的抗体。当流体样品不包括目标分析物时,标记的抗体或其片段流至对照区并仅在对照区发射光学信号,指示在流体样品中不存在目标分析物。固定化捕获剂包括对目标分析物具有特异性的抗体或其片段。在一些实施方式中,抗体-缀合的超大颗粒集成至测试条的表面。在一些实施方式中,超大颗粒包括金颗粒、胶乳珠、磁珠或硅珠。在一些实施方式中,超大颗粒的直径为约1 $\mu\text{m}$ 至约15 $\mu\text{m}$ 。在一些实施方式中,流体样品选自全血、静脉血、毛细血管血、血浆、血清、尿液、汗液或唾液样品。在一些实施方式中,目标分析物包括C-反应性蛋白(CRP)和缀合至超大颗粒的抗体或其片段包括结合CRP的抗-CRP抗体或其片段。

[0139] 测量高浓度目标分析物(诸如但不限于CRP)的存在或浓度的上述实施可以包括在根据本公开的单个多重横向流测定测试条上以检测样品中以显著不同的浓度存在的多种目标分析物。例如,在单次测试事件中,根据本公开的横向流装置、测试系统和方法的实施方式可以在单个测试条上使用用于确定单个样品中低浓度的两种分析物(诸如,例如,上面关于图4A-4B、5A-5B,和实施例2和3描述的第二目标分析物113和第三目标分析物114)的两个夹心式横向流测定物,结合配置为检测施加至单个测试条的同一单个样品中高浓度的目标分析物(诸如但不限于CRP)的国际申请号PCT/US2018/063586中描述的夹心式测定物。

[0140] 根据本公开的包括横向流测定物的实例测试系统

[0141] 本文描述的横向流测定测试系统可以包括横向流测定测试装置(诸如但不限于测试条)、包括配置为接受全部或部分测试装置的端口的壳体、包括光源和光检测器的读取器、数据分析器、和其组合。壳体可以由多种材料中任一种制成,包括塑料、金属或复合材料。壳体形成用于诊断测试系统的部件的保护壳体。壳体还可以限定贮藏器,贮藏器相对于读取器机械地配准测试条。贮藏器可以被设计成接收各种不同类型的测试条中的任一种。在一些实施方式中,壳体为便携式装置,其允许在各种环境中(包括在工作台上、在现场、在家中或在用于家庭、商业或环境应用的设施中)执行横向流测定物的能力。

[0142] 读取器可以包括用于光学检查测试条检测区的暴露区域并且能够检测检测区内

的多个捕获区的一个或多个光电子部件。在一些实施中,读取器包括至少一个光源和至少一个光检测器。在一些实施中,光源可以包括半导体发光二极管,并且光检测器可以包括半导体光电二极管。取决于测试条使用的标记物的性质,光源可以设计成发射特定波长范围内的光或具有特定偏振的光。例如,如果标记物为荧光标记物,诸如量子点,则光源将被设计成用波长范围内的光照射测试条的捕获区的暴露区域,该波长范围内的光引起来自标记物的荧光发射。类似地,所述光检测器可以被设计成选择性地捕获来自捕获区的暴露区域的光。例如,如果标记物为荧光标记物,则光检测器将被设计成选择性地捕获由标记物发射的荧光的波长范围内的光或特定偏振的光。另一方面,如果标记物为反射型标记物,则光检测器将被设计成选择性地捕获由光源发出的光的波长范围内的光。为这些目的,光检测器可以包括一个或多个光学滤波器,其限定捕获的光的波长范围或偏振轴。可以使用目视观察或分光光度计以检测来自发色基板的颜色;用于检测辐射的辐射计数器,诸如用于检测<sup>125</sup>I的伽马计数器;或者用于在存在特定波长的光的情况下检测荧光的荧光计,分析来自标记物的信号。在使用酶联测定物的情况下,可以使用分光光度计进行目标分析物的量的定量分析。如果需要,本文描述的横向流测定物可以是自动化的或机器执行的,并且可以同时检测来自多个样品的信号。此外,可以检测多种目标分析物的多个信号,包括每种目标分析物的标记物相同或不同时。

[0143] 数据分析器处理由读取器获得的信号测量值。通常,数据分析器可以在任何计算或处理环境中实现,包括在数字电子电路或计算机硬件、固件或软件中。在一些实施方式中,数据分析器包括处理器(如,微控制器、微处理器或ASIC)和模数转换器。数据分析器可以安装在诊断测试系统的壳体内。在其他实施方式中,数据分析器位于单独的装置(例如计算机)中,该装置可以通过有线或无线连接与诊断测试系统进行通信。数据分析器还可以包括用于经由无线连接将结果传输到外部源以进行数据分析或检查结果的电路。

[0144] 通常,结果指示器可以包括多种不同的机制中的任何一种,以指示一种或多种测定测试的结果。在一些实施中,结果指示器包括一个或多个灯(例如,发光二极管),其被激活以指示例如测定测试的完成。在其他实施中,结果指示器包括字母数字显示器(例如,两个或三个字符的发光二极管阵列),用于呈现分析测试结果。

[0145] 本文描述的测试系统可以包括向诊断测试系统的有源组件(包括读取器、数据分析器和结果指示器)供电的电源。电源可以由例如可更换电池或可充电电池来实现。在其他实施中,诊断测试系统可以由外部主机设备(例如,通过USB电缆连接的计算机)供电。

[0146] 实例横向流装置的特征

[0147] 本文描述的横向流装置可以包括样品储器(也称为样品接收区),在此流体样品被引入至测试条,诸如但不限于横向流装置中存在的免疫层析测试条。在一个实例中,样品可以通过外部施加被引入至样品储器,如利用滴管或其他施加器。样品可以被倒入或挤压至样品储器上。在另一个实例中,诸如当将测试条浸入容纳样品的容器中时,样品储器可以直接浸入样品中。

[0148] 本文所述的横向流装置可包括固体载体或基板。合适的固体载体包括但不限于硝酸纤维素、反应托盘的孔的壁、多孔板、试管、聚苯乙烯珠、磁性珠、膜和微粒(例如胶乳颗粒)。具有足够的孔隙度以允许标记的试剂进入并具有合适的表面亲和力以固定捕获剂的任何合适的多孔材料可以用于本文所述的横向流装置中。例如,硝化纤维素的多孔结构对

多种试剂例如捕获剂具有出色的吸收和吸附质量。尼龙具有类似的特性,并且也是适合的。微孔结构是可用的,在水合状态下具有凝胶结构的材料也是可用的。

[0149] 可用的固体载体的进一步的实例包括:天然聚合碳水化合物及其合成修饰的、交联的或取代的衍生物,比如琼脂、琼脂糖、交联的藻酸、取代的和交联的瓜尔豆胶、纤维素酯(特别是用硝酸和羧酸)、混合纤维素酯和纤维素醚;含氮的天然聚合物,比如蛋白质和衍生物,包括交联或修饰的明胶;天然烃聚合物,比如乳胶和橡胶;可以用合适的多孔结构制备的合成聚合物,比如乙烯基聚合物,其包括聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯及其部分水解的衍生物,聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、以上缩聚物的共聚物和三元共聚物,比如聚酯、聚酰胺,以及其他聚合物,比如聚氨酯或聚环氧化物;多孔无机材料,比如碱土金属和镁的硫酸盐或碳酸盐,其包括硫酸钡、硫酸钙、碳酸钙,碱金属和碱土金属、铝和镁的硅酸盐;以及铝或硅的氧化物或水合物,例如粘土、氧化铝、滑石、高岭土、沸石、硅胶或玻璃(这些材料可用作上述聚合材料的过滤器);以及以上种类的混合物或共聚物,比如通过在现有天然聚合物上引发合成聚合物的聚合而获得的接枝共聚物。

[0150] 本文所述的横向流装置可包括片或条形式的多孔固体载体,比如硝化纤维素。这种片或条的厚度可以在宽限度内变化,例如,约0.01至0.5mm、约0.02至0.45mm、约0.05至0.3mm、约0.075至0.25mm、约0.1至0.2mm或约0.11至0.15mm。这种片或条的孔径可类似地在宽限度内变化,例如约0.025至15微米,或更具体地约0.1至3微米;然而,孔径不旨在是选择固体载体的限制因素。固体载体的流速——如果适用——也可以在宽限度内变化,例如约12.5至90sec/cm(即50至300sec/4cm)、约22.5至62.5sec/cm(即,90至250sec/4cm)、约25至62.5sec/cm(即100至250sec/4cm)、约37.5至62.5sec/cm(即150至250sec/4cm)或约50至62.5sec/cm(即200至250sec/4cm)。在本文所述的装置的具体实施方式中,流速为约35sec/cm(即140sec/4cm)。在本文所述装置的其他具体实施方式中,流速为约37.5sec/cm(即150sec/4cm)。

[0151] 固体载体的表面可以通过引起试剂(例如捕获剂)与载体的共价键的化学过程活化。如下所述,固体载体可包括缀合物垫。可以使用许多其他合适的方法将试剂(例如捕获剂)固定在固体载体上,其包括但不限于离子相互作用、疏水相互作用、共价相互作用等。

[0152] 除非受到物理限制,否则固体载体可以以任何合适的形状使用,例如膜、片、条或板,或者可以将其涂布或粘合或层压至合适的惰性载体,比如纸、玻璃、塑料膜或织物。

[0153] 本文所述的横向流装置可包括缀合物垫,比如膜或其他类型的材料,其包含捕获剂。缀合物垫可以是乙酸纤维素、硝酸纤维素、聚酰胺、聚碳酸酯、玻璃纤维、膜、聚醚砜、再生纤维素(RC)、聚四氟乙烯(PTFE)、聚酯(例如聚对苯二甲酸乙二酯)、聚碳酸酯(例如,4,4-羟基-二苯基-2,2'-丙烷)、氧化铝、混合纤维素酯(例如,醋酸纤维素和硝酸纤维素的混合物)、尼龙(例如,聚酰胺、六亚甲基二胺和尼龙66)、聚丙烯、PVDF、高密度聚乙烯(HDPE)+成核剂“二苯甲酸铝”(DBS)(例如80u 0.024HDPE DBS(Porex))和HDPE。

[0154] 本文描述的横向流装置对在样品中以显著不同的浓度——诸如以高浓度(在10s至100s的 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和以低浓度(在1s至10s的 $\text{pg}/\text{mL}$ )——存在的目标分析物高度敏感。“敏感性”是指这样正确识别出的实际阳性的比例(例如,被正确识别为患有病况的感染、潜伏或有症状对象的百分比)。可以将敏感性计算为真阳性的数量除以真阳性的数量和假阴性的数量之和。

[0155] 本文所述的横向流装置可以准确地测量许多不同种类的样品中的多种目标分析物。样品可以包括从任何来源获得的样本或培养物,以及生物和环境样品。生物样品可以从动物(包括人类)获得,并且包括液体(fluid)、固体、组织和气体。生物样品包括尿液、唾液和血液制品,比如血浆、血清等。然而,这种实例不应被解释为限制适用于本公开的样品类型横向流。

[0156] 在一些实施方式中,样品是用于检测环境中的多种分析物的环境样品。在一些实施方式中,样品是来自对象的生物样品。在一些实施方式中,生物样品可以包括外周血、血清、血浆、腹水、尿液、脑脊髓液(CSF)、痰、唾液、骨髓、滑膜液、房水、羊水、耳垢、乳汁、支气管肺泡灌洗液、精液(包括前列腺液)、库珀液或射精前液、女性射精、汗液、粪便、头发、眼泪、囊肿液、胸膜和腹膜液、心包液、淋巴液、食糜、乳糜、胆汁、间质液、月经、脓液、皮脂、呕吐物、阴道分泌物、粘膜分泌物、粪便水、胰液、来自窦腔的灌洗液、支气管肺吸出物或其他灌洗液。

[0157] 如本文所用,“分析物”通常是指要检测的物质。例如,分析物可包括抗原性物质、半抗原、抗体及其组合。分析物包括但不限于毒素、有机化合物、蛋白质、肽、微生物、氨基酸、核酸、激素、类固醇、维生素、药物(包括用于治疗目的施用的药物以及用于非法目的施用的药物)、药物中间体或副产物、细菌、病毒颗粒和任何上述物质的代谢产物或抗体。一些分析物的具体实例包括铁蛋白;肌酸激酶MB(CK-MB);人绒毛膜促性腺激素(hCG);地高辛;苯妥英;苯巴比妥;卡马西平;万古霉素;庆大霉素;茶碱;丙戊酸;奎尼丁;黄体生成素(LH);卵泡刺激素(FSH);雌二醇;孕酮;C反应蛋白(CRP);脂蛋白;IgE抗体;细胞因子;TNF相关的凋亡诱导配体(TRAIL);维生素B2微球蛋白;干扰素 $\gamma$ -诱导蛋白10(IP-10);干扰素-诱导的GTP-结合蛋白(也称为耐粘液病毒(流感病毒)抗性1、MX1、MxA、IFI-78K、IFI78、MX、MX发动蛋白样GTP酶1);降钙素原(PCT);糖化血红蛋白(Gly Hb);皮质醇;洋地黄毒;N-乙酰普鲁卡因胺(NAPA);普鲁卡因酰胺;风疹抗体,比如风疹IgG和风疹IgM;弓形虫病抗体,比如弓形虫病IgG(Toxo-IgG)和弓形虫病IgM(Toxo-IgM);睾酮;水杨酸盐;对乙酰氨基酚;乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg);乙肝核心抗原抗体,比如抗乙肝核心抗原IgG和IgM(抗HBC);人类免疫缺陷病毒1和2(HIV 1和2);人T细胞白血病病毒1和2(HTLV);乙型肝炎e抗原(HBeAg);乙型肝炎e抗原抗体(抗HBe);流感病毒;甲状腺刺激激素(TSH);甲状腺素(T4);总三碘甲状腺原氨酸(总T3);游离三碘甲状腺原氨酸(游离T3);癌胚抗原(CEA);脂蛋白、胆固醇和甘油三酸酯;和甲胎蛋白(AFP)。滥用药物和管制物质包括但不限于苯丙胺;甲基苯丙胺;巴比妥类,比如阿莫巴比妥、司可巴比妥、戊巴比妥、苯巴比妥和巴比妥;苯二氮<sub>革</sub>类,比如甲氨二氮<sub>革</sub>(Librium)和苯甲二氮<sub>革</sub>(valium);大麻素,比如印度大麻和大麻(marijuana);可卡因;芬太尼;LSD;甲喹酮;阿片剂,比如海洛因、吗啡、可待因、氢吗啡酮、氢可酮、美沙酮、羟考酮、羟吗啡酮和鸦片;苯环利定;和丙氧基苯。为了感兴趣的生物或环境物质的目的,可以包括其他分析物。

[0158] 本公开涉及确定样品中多种分析物的存在和浓度的横向流装置、测试系统和方法,包括当一种或多种目标分析物以高浓度存在和一种或多种目标分析物以低浓度存在时。如上面所讨论,如本文所使用,“分析物”一般指的是待检测的物质,例如蛋白质。可以通过本文描述的横向流测定装置、测试系统和方法检测的蛋白质的实例包括但不限于:

[0159] TRAIL: TNF-相关凋亡-诱导配体(也称为Apo2L、Apo-2配体和CD253);代表性

RefSeq DNA序列是NC\_000003.12;NC\_018914.2;和NT\_005612.17,以及代表性RefSeq蛋白质序列登录号是NP\_001177871.1;NP\_001177872.1;和NP\_003801.1。TRAIL蛋白质属于肿瘤坏死因子(TNF)配体家族。

[0160] CRP:C-反应性蛋白;代表性RefSeq DNA序列是NC\_000001.11;NT\_004487.20;和NC\_018912.2,以及代表性RefSeq蛋白质序列登录号是NP\_000558.2。

[0161] IP-10:趋化因子(C-X-C基序)配体10;代表性RefSeq DNA序列是NC\_000004.12;NC\_018915.2;和NT\_016354.20,以及RefSeq蛋白质序列是NP\_001556.2。

[0162] PCT:降钙素原是降钙素激素的肽前体。该蛋白质的代表性RefSeq氨基酸序列是NP\_000558.2。代表性RefSeq DNA序列包括NC\_000001.11、NT\_004487.20和NC\_018912.2。

[0163] MX1:干扰素-诱导的GTP-结合蛋白Mx1(也称为干扰素-诱导的蛋白p78,耐干扰素-调节的GTP-结合蛋白,MxA)。该蛋白的代表性RefSeq氨基酸序列是NP\_001138397.1;NM\_001144925.2;NP\_001171517.1;和NM\_001178046.2。

[0164] 根据本公开的横向流测定装置、测试系统和方法可以测量TRAIL蛋白的可溶和/或膜形式。在一个实施方式中,仅测量TRAIL的可溶形式。

[0165] 本文所述的横向流装置可包括标记物。标记物可以采取许多不同形式,包括结合或能够结合至分析物、分析物类似物、检测试剂的分子或组合物,或通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段可检测的结合配偶体。标记物的实例包括酶、胶体金颗粒(也称为金纳米颗粒)、有色乳胶颗粒、放射性同位素、辅因子、配体、化学发光剂或荧光剂、蛋白吸附的银颗粒、蛋白吸附的铁颗粒、蛋白吸附的铜颗粒、蛋白偶联的硒颗粒、蛋白吸附的硫颗粒、蛋白吸附的碲颗粒、蛋白吸附的碳颗粒和蛋白质偶联的染料囊。化合物(例如检测试剂)与标记物的附连可以通过共价键、吸附过程、疏水键和/或静电键,比如在螯合物等中,或这些键和相互作用的组合,和/或可能涉及连接基团。

[0166] 术语“特异性结合配偶体(或结合配偶体)”是指通过取决于所涉及分子的三维结构的特异性的非共价相互作用的方式而相互作用的分子对的成员。典型的特异性结合配偶体对包括抗原/抗体、半抗原/抗体、激素/受体、核酸链/互补核酸链、底物/酶、抑制剂/酶、碳水化合物/凝集素、生物素/(链霉)亲和素、受体/配体和病毒/细胞受体,或其各种组合。

[0167] 如本文所用,术语“免疫球蛋白”或“抗体”是指结合特异性抗原的蛋白质。免疫球蛋白包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体和人源化抗体、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段,并且包括以下类别的免疫球蛋白:IgG、IgA、IgM、IgD、IbE和分泌的免疫球蛋白(sIg)。免疫球蛋白通常包含两条相同的重链和两条轻链。然而,术语“抗体”和“免疫球蛋白”也涵盖单链抗体和两链抗体。为了简单起见,贯穿本说明书,使用术语“标记的抗体”或“捕获抗体”,但是本文中使用的术语抗体是指作为整体或其任意片段的抗体。因此,可以想到的是,当指特异性结合目标分析物的标记的抗体时,该术语指特异性结合目标分析物的标记的抗体或其片段。类似地,当提及捕获抗体时,该术语是指特异性结合目标分析物的捕获抗体或其片段。

[0168] 根据本公开的横向流装置、测试系统和方法可以包括多克隆抗体。本文公开的测量任意目标分析物的多克隆抗体包括但不限于通过以下一种或多种的主动免疫从血清产生的抗体:兔、山羊、绵羊、鸡、鸭、豚鼠、小鼠、驴、骆驼、大鼠和马。根据本公开的横向流装置、测试系统和方法可以包括单克隆抗体。

[0169] 测量TRAIL的抗体包括测量TRAIL的单克隆抗体和多克隆抗体。在一些实施方式中,TRAIL抗体结合可溶性TRAIL和/或TRAIL的胞外结构域,如,氨基酸90-281。测量TRAIL的单克隆抗体的实例包括但不限于:小鼠,单克隆(55B709-3) IgG;小鼠,单克隆(2E5) IgG1;小鼠,单克隆(2E05) IgG1;小鼠,单克隆(M912292) IgG1 $\kappa$ ;小鼠,单克隆(IIIF6) IgG2b;小鼠,单克隆(2E1-1B9) IgG1;小鼠,单克隆(RIK-2) IgG1, $\kappa$ ;小鼠,单克隆M181 IgG1;小鼠,单克隆VI10E IgG2b;小鼠,单克隆MAB375 IgG1;小鼠,单克隆MAB687 IgG1;小鼠,单克隆HS501 IgG1;小鼠,单克隆克隆75411.11小鼠IgG1;小鼠,单克隆T8175-50IgG;小鼠,单克隆2B2.108 IgG1;小鼠,单克隆B-T24 IgG1;小鼠,单克隆55B709.3 IgG1;小鼠,单克隆D3 IgG1;山羊,单克隆C19 IgG;兔,单克隆H257 IgG;小鼠,单克隆500-M49IgG;小鼠,单克隆05-607IgG;小鼠,单克隆B-T24 IgG1;大鼠,单克隆(N2B2), IgG2a, $\kappa$ ;小鼠,单克隆(1A7-2B7), IgG1;小鼠,单克隆(55B709.3), IgG和小鼠,单克隆B-S23\*IgG1,人TRAIL/TNFS F 10MAb(克隆75411),小鼠IgG1,人TRAIL/TNFSF10 MAb(克隆124723),小鼠IgG1,人TRAIL/TNFS F 10MAb(克隆75402),小鼠IgG1。

[0170] 用于测量TRAIL的抗体包括针对以下非穷举性清单中的表位开发的抗体:小鼠骨髓瘤细胞系NS0-衍生的重组人TRAIL(Thr95-Gly281登录号#P50591),小鼠骨髓瘤细胞系,NS0-衍生的重组人(Thr95-Gly281,具有N-末端Met和6-His标签登录号#P50591),大肠杆菌衍生的,(Val114-Gly281,具有或不具有N-末端Met登录号#:Q6IBA9),人血浆衍生的TRAIL,人血清衍生的TRAIL,重组人TRAIL,其中第一氨基酸位于85-151位之间,和最后氨基酸在249-281位。

[0171] 测量CRP的抗体包括测量CRP的单克隆抗体和测量CRP的多克隆抗体。测量CRP的单克隆抗体的实例包括但不限于:小鼠,单克隆(108-2A2);小鼠,单克隆(108-7G41D2);小鼠,单克隆(12D-2C-36), IgG1;小鼠,单克隆(1G1), IgG1;小鼠,单克隆(5A9), IgG2a $\kappa$ ;小鼠,单克隆(63F4), IgG1;小鼠,单克隆(67A1), IgG1;小鼠,单克隆(8B-5E), IgG1;小鼠,单克隆(B893M), IgG2b, $\lambda$ ;小鼠,单克隆(C1), IgG2b;小鼠,单克隆(C11F2), IgG;小鼠,单克隆(C2), IgG1;小鼠,单克隆(C3), IgG1;小鼠,单克隆(C4), IgG1;小鼠,单克隆(C5), IgG2a;小鼠,单克隆(C6), IgG2a;小鼠,单克隆(C7), IgG1;小鼠,单克隆(CRP103), IgG2b;小鼠,单克隆(CRP11), IgG1;小鼠,单克隆(CRP135), IgG1;小鼠,单克隆(CRP169), IgG2a;小鼠,单克隆(CRP30), IgG1;小鼠,单克隆(CRP36), IgG2a;兔,单克隆(EPR283Y), IgG;小鼠,单克隆(KT39), IgG2b;小鼠,单克隆(N-a), IgG1;小鼠,单克隆(N1G1), IgG1;单克隆(P5A9AT);小鼠,单克隆(S5G1), IgG1;小鼠,单克隆(SB78c), IgG1;小鼠,单克隆(SB78d), IgG1和兔,单克隆(Y284), IgG。

[0172] 测量IP-10的抗体包括测量IP-10的单克隆抗体和测量IP-10的多克隆抗体。测量IP-10的单克隆抗体的实例包括但不限于:IP-10/CXCL10小鼠抗-人单克隆(4D5)抗体(LifeSpan Biosciences),IP-10/CXCL10小鼠抗-人单克隆(A00163.01)抗体(LifeSpan Biosciences),小鼠抗人IP-10(AbD Serotec),兔抗人IP-10(AbD Serotec),IP-10人mAb 6D4(Hycult Biotech),小鼠抗-人IP-10单克隆抗体克隆B-C50(Diaclone),小鼠抗-人IP-10单克隆抗体克隆B-C55(Diaclone),人CXCL10/IP-10MAb克隆33036(R&D Systems),CXCL10/INP10抗体1E9(Novus Biologicals),CXCL10/INP10抗体2C1(Novus Biologicals),CXCL10/INP10抗体6D4(Novus Biologicals),CXCL10单克隆抗体M01A克隆

2C1 (Abnova Corporation), CXCL10单克隆抗体 (M05), 克隆1E9 (Abnova Corporation), CXCL10单克隆抗体, 克隆1 (Abnova Corporation), IP-10抗体6D4 (Abeam), IP10抗体EPR7849 (Abeam), IP10抗体EPR7850 (Abeam)。

[0173] 用于测量IP-10的抗体还包括针对以下非穷举性清单中的表位开发的抗体: 重组人CXCL10/IP-10, 含77个氨基酸(aa 22-98)的非糖基化多肽链和N-末端His标签干扰素 $\gamma$ 可诱导的蛋白10 (125个aa长), 在大肠杆菌中产生IP-10His标签人重组IP-10, 其含有77个氨基酸片段(22-98)并具有8.5kDa的总分子质量, 具有氨基末端六组氨酸标签, 大肠杆菌衍生的人IP-10 (Val22-Pro98), 具有N-末端Met, 人血浆衍生的IP-10, 人血清衍生的IP-10, 重组人IP-10, 其中第一氨基酸位于1-24位之间和最后氨基酸在71-98位。

[0174] 测量降钙素原(PCT)的抗体包括测量PCT的单克隆抗体和测量PCT的多克隆抗体。测量PCT的单克隆抗体包括但不限于: 小鼠, 单克隆IgG1; 小鼠, 单克隆IgG2a; 小鼠, 单克隆IgG2b; 小鼠, 单克隆44D9 IgG2a; 小鼠, 单克隆18B7 IgG1; 小鼠, 单克隆G1/G1-G4IgG1; 小鼠, 单克隆NOD-15IgG1; 小鼠, 单克隆22A11 IgG1; 小鼠, 单克隆42IgG2a; 小鼠, 单克隆27A3 IgG2a; 小鼠, 单克隆14C12 IgG1; 小鼠, 单克隆24B2 IgG1; 小鼠, 单克隆38F11 IgG1; 小鼠, 单克隆6F10 IgG1。

[0175] 测量MxA的抗体包括测量MxA的单克隆抗体和测量MxA的多克隆抗体。测量MxA的单克隆抗体包括但不限于: 小鼠, 单克隆IgG; 小鼠, 单克隆IgG1; 小鼠, 单克隆IgG2a; 小鼠, 单克隆IgG2b; 小鼠, 单克隆2G12 IgG1; 小鼠, 单克隆474CT4-1-5IgG2b; 小鼠, 单克隆AM39, IgG1; 小鼠, 单克隆4812IgG2a; 小鼠, 单克隆683IgG2b。

[0176] 根据本公开的横向流装置包括捕获剂。捕获剂包括能够结合至分析物——其包括游离的(未标记的)分析物和/或标记的分析物(诸如本文描述的第一复合物、第二复合物、或第三复合物)——的固定化试剂。捕获剂包括未标记的特异性结合配偶体, 其对以下物质具有特异性: (i) 标记的目标分析物, (ii) 标记的分析物或未标记的分析物, 或(iii) 辅助特异性结合配偶体, 其本身对分析物具有特异性, 如在间接测定中。如本文所用, “辅助特异性结合配偶体”是结合至分析物的特异性结合配偶体的特异性结合配偶体。例如, 辅助特异性结合配偶体可以包括对另一种抗体具有特异性的抗体, 例如, 山羊抗人抗体。本文描述的横向流装置可以包括“检测区域”或“检测区”, 其是包括一个或多个捕获区域或捕获区的区域并且是可以检测到可检测信号的区域。本文所述的横向流装置可以包括“捕获区域”, 其是横向流装置的将捕获剂固定的区域。本文所述的横向流装置可以包括一个以上的捕获区域。在一些情况下, 将不同的捕获剂固定在不同的捕获区域中(诸如在第一捕获区域处的第一捕获试剂和在第二捕获区域处的第二捕获试剂)。在横向流基板上, 多个捕获区域可以相对于彼此具有任何取向; 例如, 第一捕获区域可以沿着流体流动路径在第二(或其他)捕获区域的远端或近端, 反之亦然。可选地, 第一捕获区域和第二(或其他)捕获区域可以沿着垂直于流体流动路径的轴线对准, 使得流体同时或大约同时接触捕获区域。

[0177] 根据本公开的横向流装置包括被固定的捕获剂, 使得在横向流装置的正常运行期间捕获剂的运动受到限制。例如, 在将流体样品施加至横向流装置之前和之后, 固定化捕获剂的运动受到限制。捕获剂的固定化可以通过物理手段来完成, 比如屏障、静电相互作用、氢键、生物亲和力、共价相互作用或其组合。

[0178] 根据本公开的横向流装置可以检测、鉴定并且在一些情况下定量生物制品。生物

制品包括由活生物体产生的化学或生化化合物,该活生物体可以包括原核细胞系、真核细胞系、哺乳动物细胞系、微生物细胞系、昆虫细胞系、植物细胞系、混合细胞系、天然发生的细胞系或合成工程化细胞系。生物制品可以包括大的大分子,比如蛋白质、多糖、脂质和核酸,以及小分子,比如主要代谢产物、次要代谢产物和天然产物。

[0179] 应当理解的是,虽然指示为示例性实施方式,但是描述、具体实例和数据以说明的方式给出,并且不旨在限制本公开的各种实施方式。根据本文所包含的描述和数据,本公开的各种改变和修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见,并且因而被认为是本公开的各种实施方式的一部分。

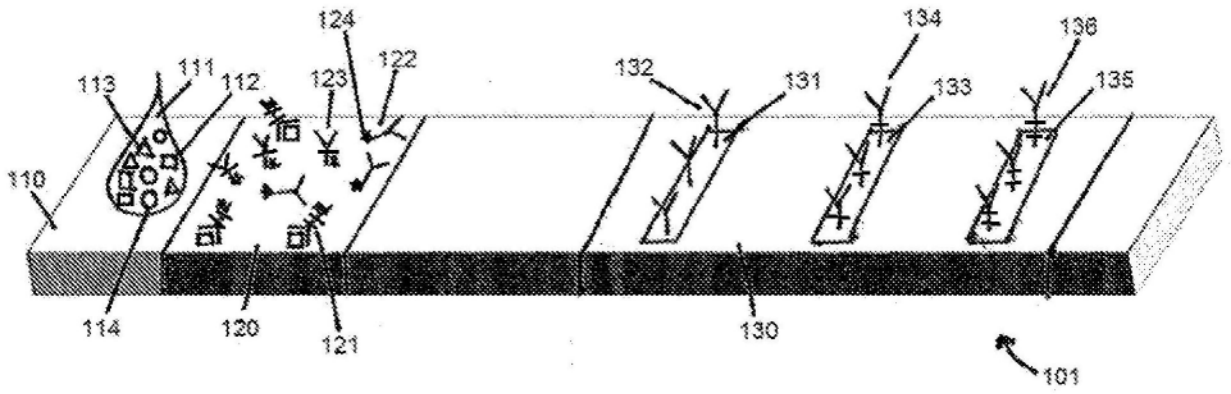


图1A

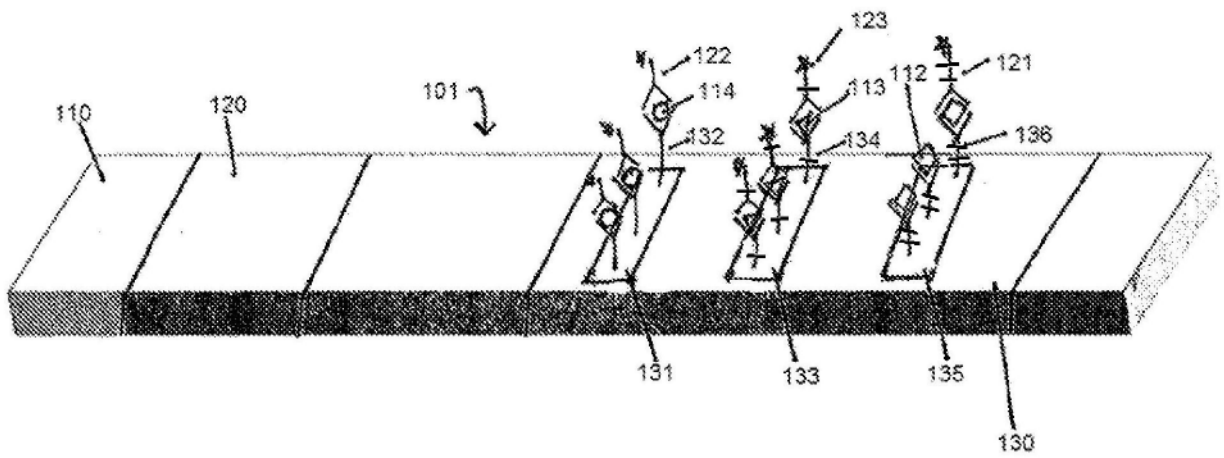


图1B

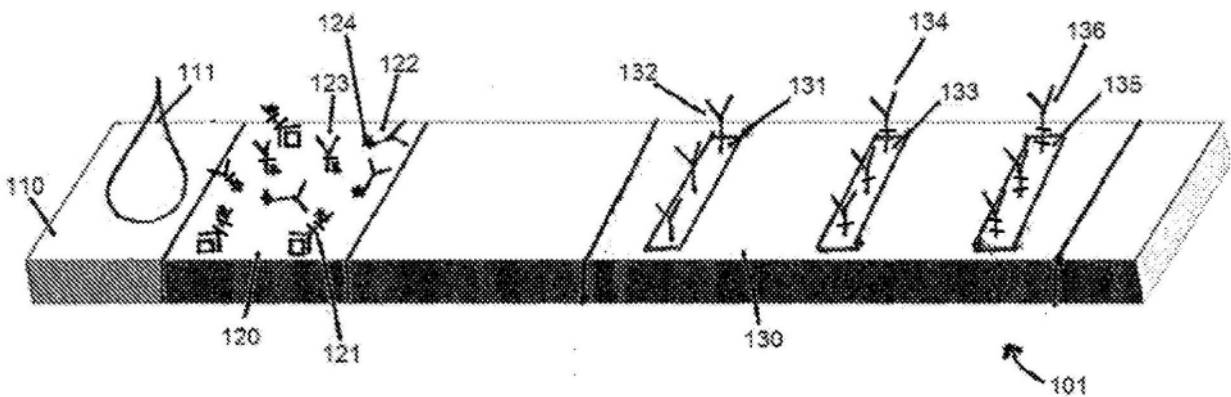


图2A

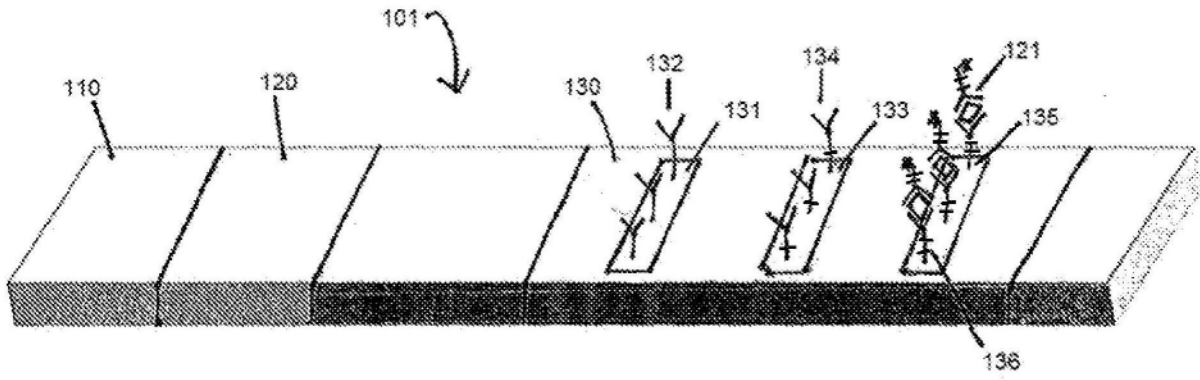


图2B

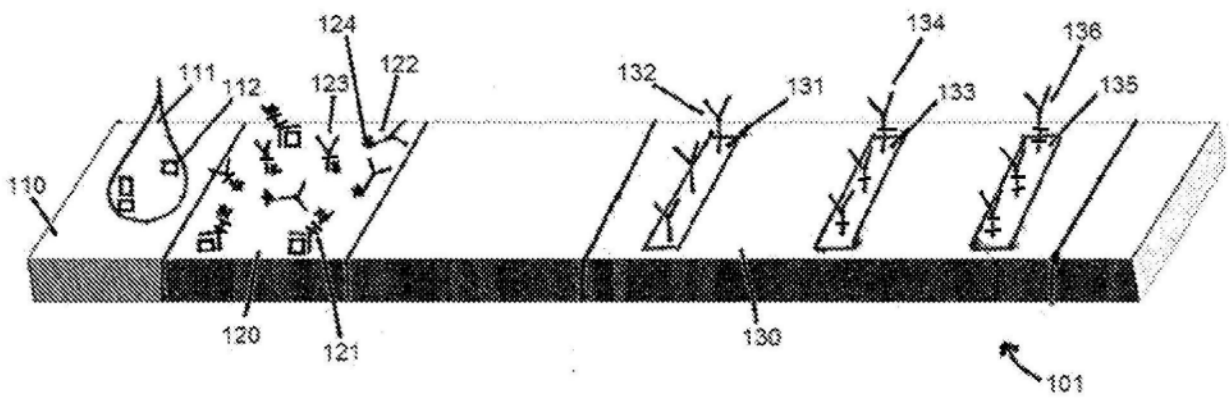


图3A

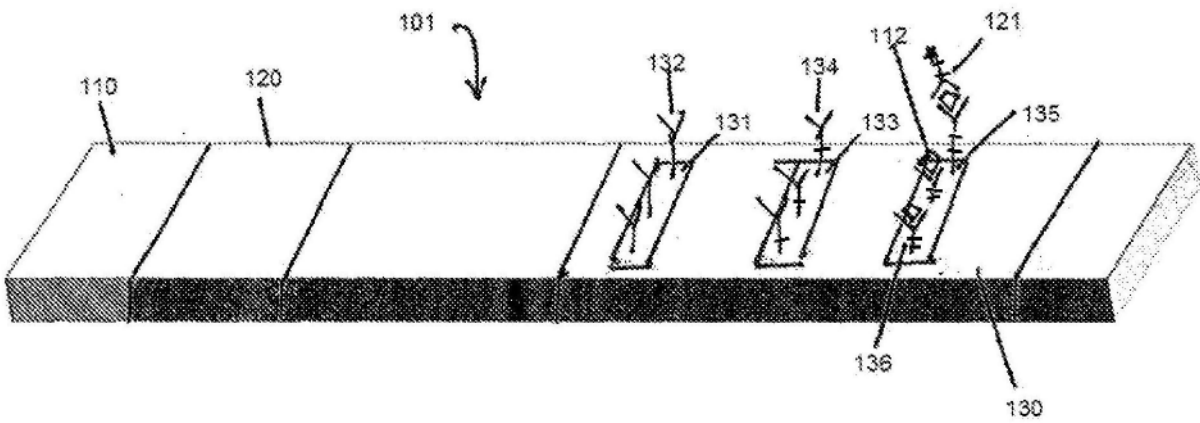


图3B



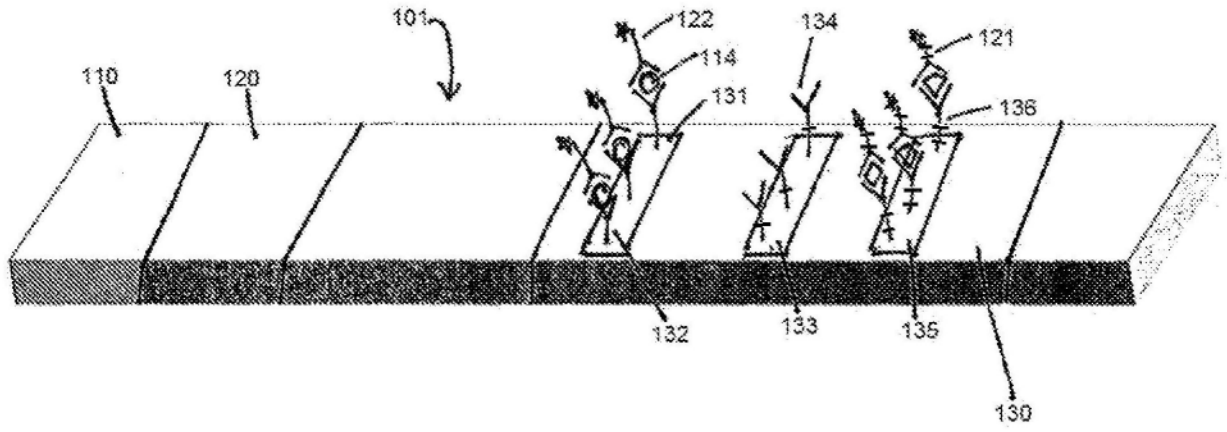


图5B

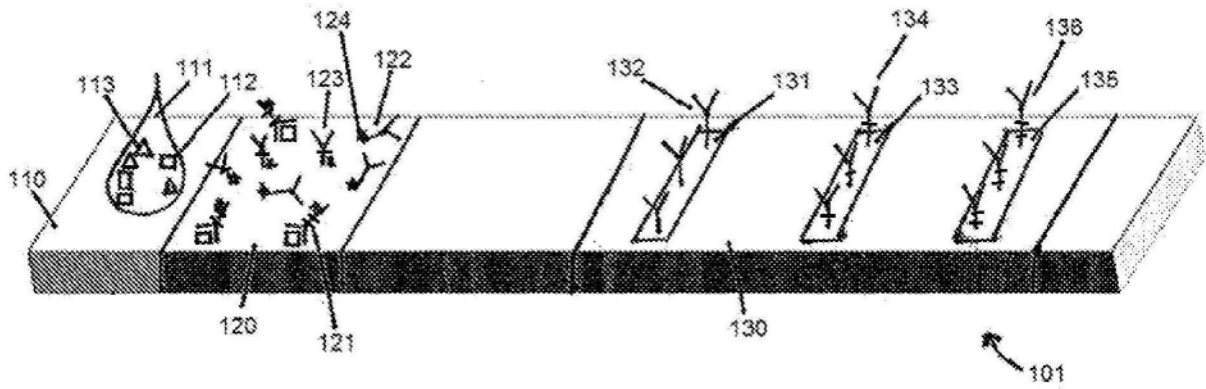


图6A

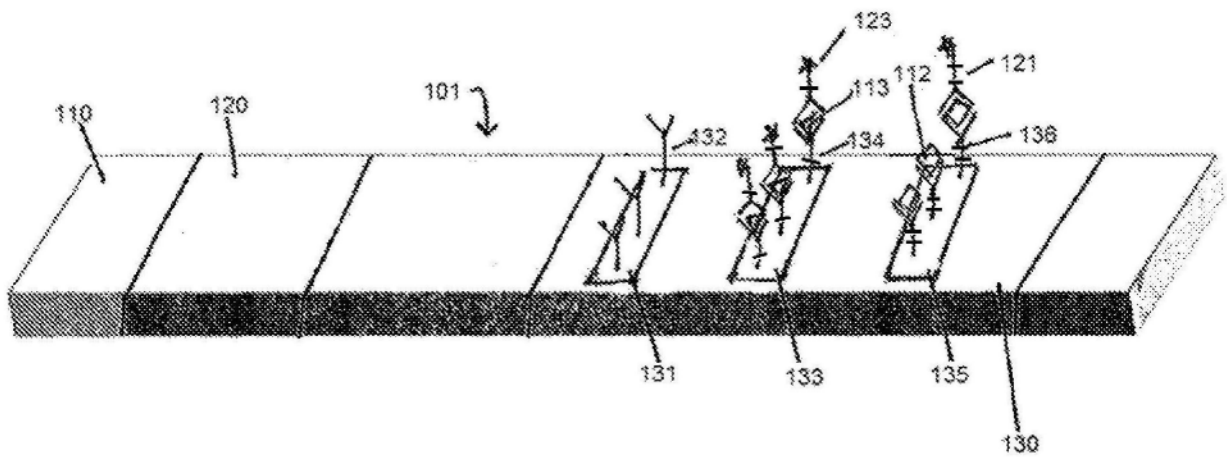


图6B

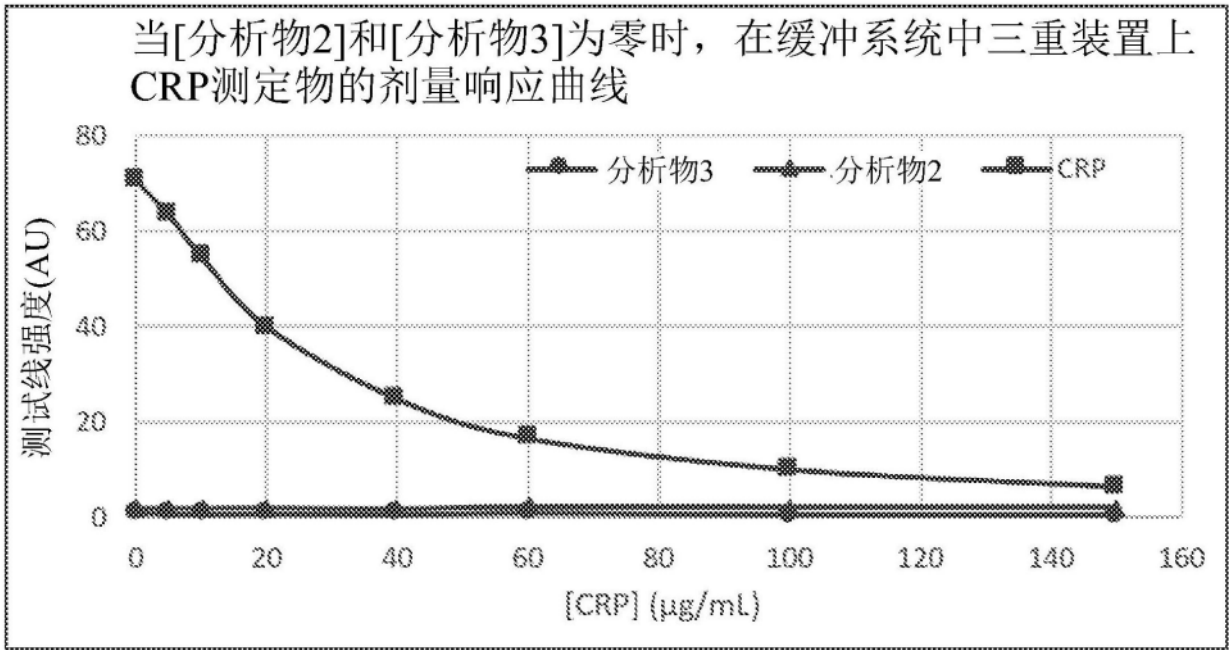


图7A

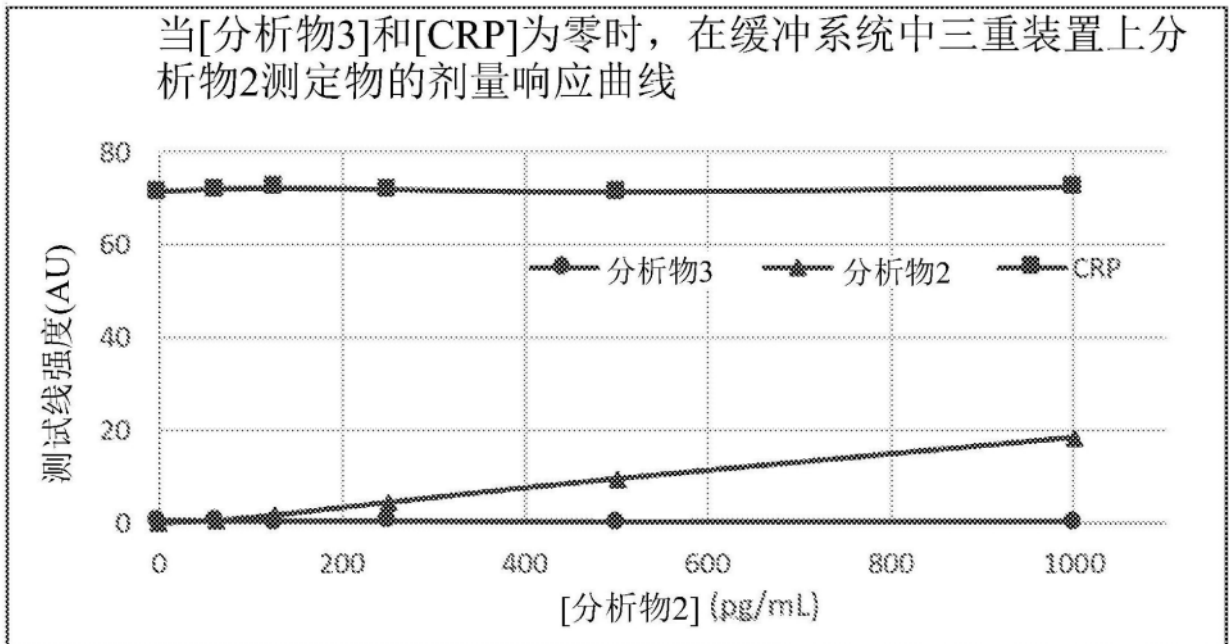


图7B

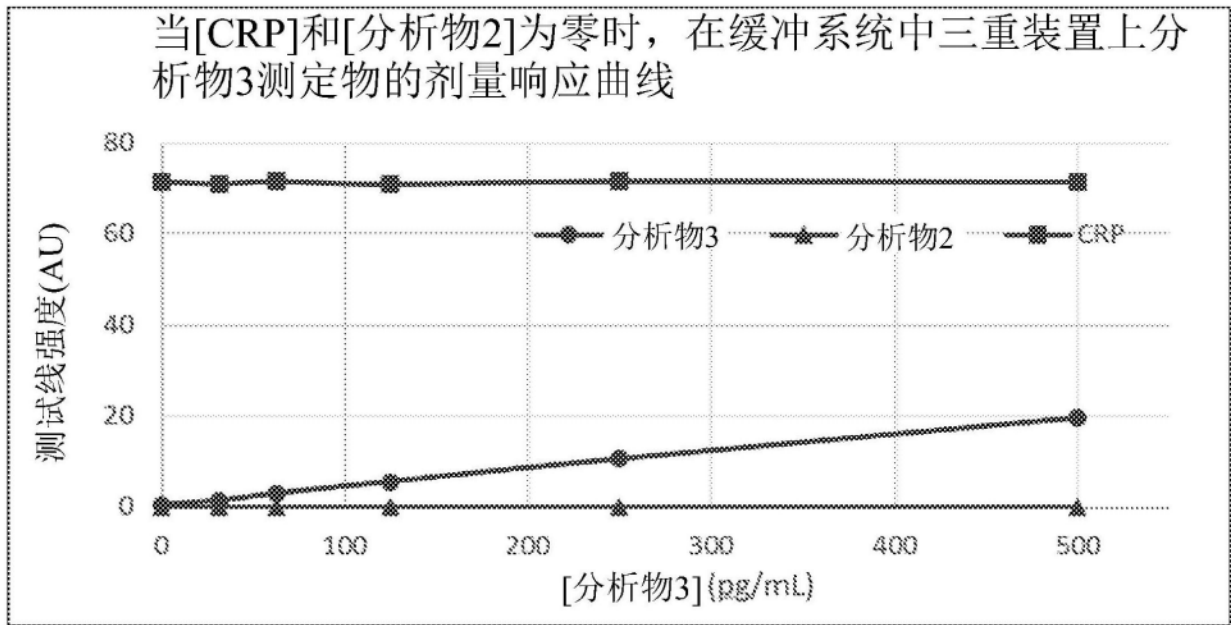


图7C

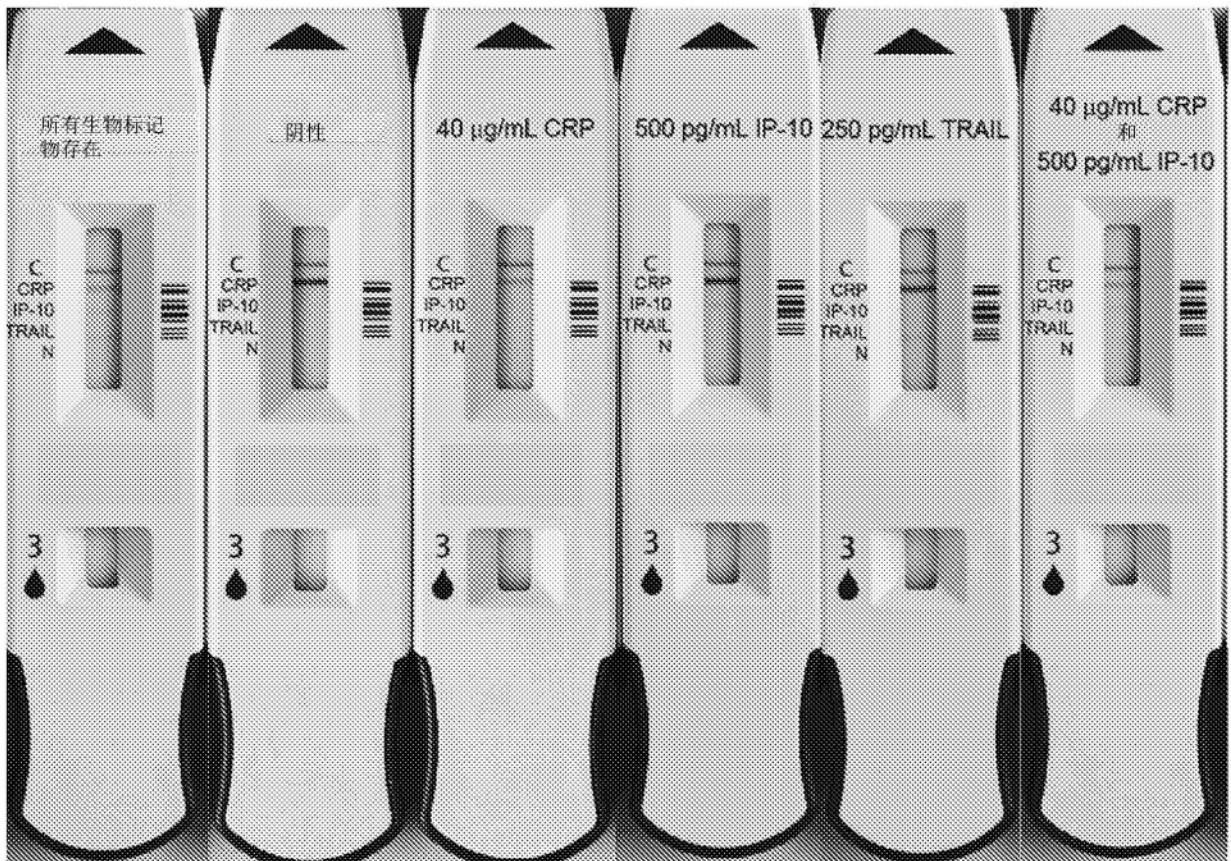


图8