



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108139402 B

(45) 授权公告日 2022. 10. 18

(21) 申请号 201680059385.6	(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
(22) 申请日 2016.09.02	专利代理师 庞东成 张培源
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 108139402 A	(51) Int.Cl. G01N 33/569 (2006.01) G01N 33/558 (2006.01) G01N 33/545 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
(43) 申请公布日 2018.06.08	(56) 对比文件 CN 106662582 A, 2017.05.10 WO 2011159537 A2, 2011.12.22 Foad Mashayekhi 等. Enhancing the lateral-flow immunoassay for viral detection using an aqueous two-phase micellar system.《Anal. Bioanal. Chem.》. 2010, 第398卷第2955-2961页. (续)
(30) 优先权数据 62/214,801 2015.09.04 US	审查员 周洋
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2018.04.11	权利要求书3页 说明书27页 附图13页
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2016/050257 2016.09.02	
(87) PCT国际申请的公布数据 WO2017/041030 EN 2017.03.09	
(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会 地址 美国加利福尼亚州	
(72) 发明人 D·T·卡梅 Y·T·赵 B·M·吴 G·L·莫斯利	

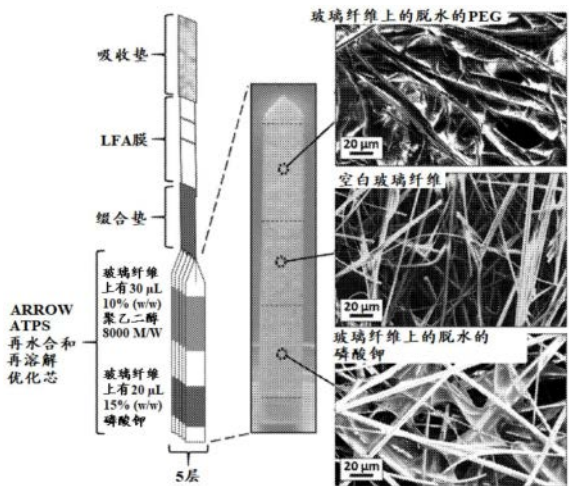
(54) 发明名称

用于临床应用的分析物收集、提取、浓缩和检测的方法和装置

(57) 摘要

在各种实施方案中,提供了用于检测和/或量化临床相关病原体(例如,细菌、真菌、病毒等)的装置和方法。在某些实施方案中,所述装置包括侧流测定,所述侧流测定在以下浓度下检测所述细菌:小于约 $6 \times 10^6$ 个细胞/mL、小于约 $3 \times 10^6$ 个细胞/mL、小于约 $1 \times 10^6$ CFU/mL或小于约 $50 \mu$ g/mL。在某些实施方案中,所述装置包括:水性两相体系(ATPS),所述水性两相体系包括混合相溶液,所述混合相溶液分离为第一相溶液和第二相溶液;以及侧流测定(LFA)。在某些实施方案中,所述装置包括流通系统,所述流通系统包括:浓缩部件,所述浓缩部件包括水性两相体系(ATPS),所述水性两相体系包括混合相溶液,所述混合相溶液分离为第一相溶液和第二相溶液;

以及检测部件,所述检测部件安置在所述浓缩部件下面。



CN 108139402 B

[接上页]

**(56) 对比文件**

Foad Mashayekhi 等. Enhancing the lateral-flow immunoassay for detection of

proteins using an aqueous two-phase micellar system.《Anal. Bioanal. Chem.》.2012,第404卷第2057-2066页.

1. 一种用于检测和/或量化样本中的细菌、真菌或病毒的装置,所述装置包括:  
水性两相体系(ATPS)再水合和再溶解优化芯(ARROW),所述ATPS在水合时包括混合相溶液,所述混合相溶液分离为第一相溶液和第二相溶液;以及  
侧流测定(LFA),所述侧流测定包括纸流体部件,  
其中,  
所述ARROW由层叠在一起的玻璃纤维纸片组成,  
在所述装置与所述样本接触之前,所述ATPS在所述ARROW上脱水,  
所述第一相溶液包含聚乙二醇(PEG),并且所述第二相溶液包含磷酸钾,  
脱水的所述磷酸钾在所述ARROW中定位于脱水的PEG的上游,并且  
在脱水的PEG与所述片的尖端之间留出空白区域,并且每个片的下游尖端逐渐变细来形成一个点。
2. 如权利要求1所述的装置,其中所述LFA包括多孔基质,所述多孔基质被构造成接纳和/或容纳ATPS或其组分。
3. 根据权利要求1或2所述的装置,其中所述LFA包括缀合垫;测试线,所述测试线包括结合所述细菌的抗体;对照线,所述对照线包括二级抗体。
4. 根据权利要求3所述的装置,其中所述LFA还包括吸收垫。
5. 根据权利要求3所述的装置,其中所述LFA还包括样本垫。
6. 一种用于检测和/或量化样本中的细菌、真菌或病毒的装置,所述装置包括:  
流通系统,所述流通系统包括:  
水性两相体系(ATPS)再水合和再溶解优化芯(ARROW),其中所述ARROW是包括一层或多层纸片的纸浓缩部件,所述ARROW包括水性两相体系(ATPS),所述水性两相体系包括混合相溶液,所述混合相溶液分离为第一相溶液和第二相溶液;以及  
检测部件,所述检测部件安置在所述ARROW下面,  
其中,  
在所述装置与所述样本接触之前,所述ATPS在所述ARROW中脱水,  
所述第一相溶液包含聚乙二醇(PEG),且所述第二相溶液包含磷酸钾,  
脱水的所述磷酸钾在所述ARROW中定位于脱水的PEG的上游,并且  
在脱水的PEG与所述片的尖端之间留出空白区域,并且每个片的下游尖端逐渐变细来形成一个点。
7. 根据权利要求6所述的装置,其中所述检测部件包括缀合垫和反应垫。
8. 根据权利要求7所述的装置,其中所述检测部件还包括槽状物。
9. 根据权利要求1所述的装置,其中所述LFA在不到10分钟内检测所述细菌。
10. 根据权利要求1所述的装置,其中所述装置被配置用于细菌的检测。
11. 如权利要求10所述的装置,其中所述细菌是口腔细菌、在尿液中发现的细菌、在阴道液中发现的细菌,或在阴道拭子上发现的细菌,或在子宫颈内膜拭子上发现的细菌。
12. 如权利要求11所述的装置,其中所述细菌是口腔细菌。
13. 如权利要求12所述的装置,其中所述口腔细菌包括普氏菌属、卟啉单胞菌属、链球菌属、粘放线菌、干酪乳酸杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、嗜酸乳酸杆菌、牙龈二氧化碳嗜纤维菌、具核梭杆菌或福赛斯拟杆菌。

14. 如权利要求12所述的装置,其中所述口腔细菌包括中间普氏菌、变黑普氏菌、牙龈卟啉单胞菌、变形链球菌。

15. 如权利要求11所述的装置,其中所述细菌是在阴道液中发现的细菌。

16. 如权利要求15所述的装置,其中所述细菌包括毛滴虫属、放线菌属、加德纳菌属、奈瑟菌属、衣原体属或密螺旋体属。

17. 如权利要求11所述的装置,其中所述细菌是在尿液中发现的细菌。

18. 如权利要求17所述的装置,其中所述细菌包括大肠杆菌、变形杆菌属、毛滴虫属、放线菌属、加德纳菌属、奈瑟菌属、衣原体属或密螺旋体属。

19. 根据权利要求12所述的装置,其中所述LFA包括检测变形链球菌的抗体。

20. 根据权利要求1所述的装置,其中所述装置还包括探针,所述探针与靶细菌、真菌或病毒发生相互作用。

21. 如权利要求20所述的装置,其中所述装置包括一种或多种探针,所述一种或多种探针与至少两种不同的靶细菌、真菌或病毒发生相互作用。

22. 根据权利要求20所述的装置,其中所述装置包括:至少两种不同探针。

23. 如权利要求20所述的装置,其中所述探针包括金属、矿物质、玻璃、石英、陶瓷、生物聚合物或塑料。

24. 如权利要求23所述的装置,其中所述探针包括聚乙烯、聚丙烯、纤维素、甲壳素、尼龙、聚甲醛、聚四氟乙烯或聚氯乙烯。

25. 如权利要求23所述的装置,其中所述探针包括生物聚合物,所述生物聚合物包括葡聚糖、聚丙烯或聚乙二醇。

26. 如权利要求23所述的装置,其中所述探针包括金、银或铂。

27. 根据权利要求23所述的装置,其中所述探针包括纳米颗粒。

28. 如权利要求27所述的装置,其中所述纳米颗粒是金纳米颗粒。

29. 根据权利要求23所述的装置,其中所述探针包括涂层。

30. 如权利要求29所述的装置,其中所述涂层包括聚丙二醇或聚乙二醇。

31. 如权利要求29所述的装置,其中所述涂层包括葡聚糖。

32. 如权利要求29所述的装置,其中所述涂层包括亲水性蛋白质。

33. 如权利要求29所述的装置,其中所述涂层包括血清白蛋白。

34. 根据权利要求29所述的装置,其中所述涂层对所述第一相溶液或所述第二相溶液具有亲和力。

35. 根据权利要求20所述的装置,其中所述探针还包括结合部分,所述结合部分与所述靶细菌、真菌或病毒结合。

36. 如权利要求35所述的装置,其中所述结合部分包括抗体、凝集素、蛋白质、核酸、小分子或脂质。

37. 如权利要求35所述的装置,其中所述结合部分是抗体或抗体片段。

38. 如权利要求37所述的装置,其中所述抗体是特异地结合所述细菌、真菌或病毒的抗体。

39. 根据权利要求1或6所述的装置,其中所述装置还包括信号增强试剂。

40. 如权利要求39所述的装置,其中所述信号增强试剂包含一种底物,所述底物与装饰

在探针表面上的酶发生反应来形成明显可视产物。

41. 如权利要求40所述的装置,其中所述信号增强试剂 包括银离子。

42. 根据权利要求1或6所述的装置,其中所述装置被配置成执行竞争测定。

43. 根据权利要求1或6所述的装置,其中所述装置被配置成执行夹心测定。

44. 根据权利要求1所述的装置,其中所述装置在以下浓度下检测分析物:小于 $6 \times 10^6$ 个细胞/mL。

45. 根据权利要求44所述的装置,其中,所述分析物是细菌。

46. 根据权利要求1所述的装置,其中在以下分析物浓度下会出现假阳性:小于 $2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

47. 一种用于检测和/或量化细菌的工具箱,所述工具箱包括:

根据权利要求1至46中任一项所述的装置;以及

用于收集生物样本的收集装置。

48. 如权利要求47所述的工具箱,其中所述收集装置包括用于收集口腔液的装置。

49. 如权利要求47所述的工具箱,其中所述收集装置包括用于收集血液的装置。

50. 如权利要求47所述的工具箱,其中所述收集装置包括尿液收集装置。

51. 如权利要求47所述的工具箱,其中所述收集装置包括用于收集阴道液或者从阴道拭子或从子宫颈内膜拭子收集所述阴道液的装置。

52. 如权利要求47所述的工具箱,其中所述收集装置包括用于收集环境样本的装置。

53. 一种检测和/或量化样本中的细菌、真菌或病毒的非诊断方法,所述方法包括:

i) 将所述样本施加到如权利要求1至46中任一项所述的装置;以及

ii) 检测流通装置的检测部件上所述细菌、真菌或病毒的存在与否和/或量化所述细菌、真菌或病毒。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述样本是环境样本、口腔样本、阴道液样本、尿液样本、来自阴道拭子的样本或来自子宫颈内膜拭子的样本。

55. 根据权利要求53或54所述的方法,其中在以下分析物浓度下会出现假阳性:小于 $2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

56. 根据权利要求53所述的方法,其中所述流通装置是侧流测定(LFA),所述侧流测定包括纸流体部件。

## 用于临床应用的分析物收集、提取、浓缩和检测的方法和装置

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年9月4日提交的USSN 62/214,801的权益和优先权,所述申请出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0003] 政府资助声明

[0004] [不适用]

### 背景技术

[0005] 已经使用测定来检测生物流体中各种物质或病原体的存在或浓度。在固相免疫测定中,将通常为对待检测的配体特异的抗体的受体固定在固体支撑物上。使可能包含待检测的分析物的测试流体与固体支撑物接触,并且在存在靶分析物时形成受体-分析物对。为了使受体-配体对可视,可以使用标记的抗体,所述标记的抗体结合到受体-配体对,之后目视检测结合到受体-配体对的标记的抗体。

[0006] 在所谓的夹心免疫测定中,分析物通常夹在标记的抗体与固定在固体支撑物上的抗体之间。

[0007] 诸如硝化纤维素、尼龙、醋酸纤维素、玻璃纤维和其他多孔聚合物的多孔材料已经被用作固相免疫测定中的固体支撑物。在所谓的侧流测定中,将即将检测其中的分析物的流体施加到多孔膜层的一端并且使所述流体在毛细力的作用下在侧向方向上流过所述膜以被能够结合待检测的分析物的固定的“受体”捕获。

[0008] 侧流免疫测定的一个普遍问题是测定的灵敏度和信号强度。

### 发明概要

[0009] 在各种实施方案中,提供了用于检测和/或量化临床相关病原体(例如,细菌、真菌、病毒等)的装置和方法。在某些实施方案中,所述装置包括侧流测定,所述侧流测定在以下浓度下检测细菌:小于约 $6 \times 10^6$ 个细胞/mL,小于约 $3 \times 10^6$ 个细胞/mL,小于约 $1 \times 10^6$ CFU/mL,或小于约50 $\mu$ g/mL。在某些实施方案中,所述装置包括水性两相体系(ATPS),所述水性两相体系包括混合相溶液,所述混合相溶液分离为第一相溶液和第二相溶液;以及侧流测定(LFA)。在某些实施方案中,所述装置包括流通系统,所述流通系统包括:浓缩部件,所述浓缩部件包括水性两相体系(ATPS),所述水性两相体系包括混合相溶液,所述混合相溶液分离为第一相溶液和第二相溶液;以及检测部件,所述检测部件安置在所述浓缩部件下面。

[0010] 本文预期的各种实施方案可以包括但不限于以下一者或多者:

[0011] 实施方案1:一种用于检测和/或量化样本中的细菌、真菌或病毒的装置,所述装置包括侧流测定,所述侧流测定在以下浓度下检测细菌:小于约 $6 \times 10^6$ 个细胞/mL,小于约 $3 \times 10^6$ 个细胞/mL,小于约 $1 \times 10^6$ CFU/mL,或小于约50 $\mu$ g/mL。

[0012] 实施方案2:一种用于检测和/或量化样本中的细菌、真菌或病毒的装置,所述装置包括水性两相体系(ATPS),所述水性两相体系包括混合相溶液,所述混合相溶液分离为第

一相溶液和第二相溶液;以及侧流测定(LFA)。

[0013] 实施方案3:如实施方案2所述的装置,其中LFA包括多孔基质,所述多孔基质被构造接纳和/或容纳ATPS或其组分。

[0014] 实施方案4:根据实施方案2至3中任一项所述的装置,其中所述LFA包括缀合垫;测试线,所述测试线包括结合所述细菌的抗体;对照线,所述对照线包括二级抗体;任选地吸收垫;以及任选地样本垫。

[0015] 实施方案5:一种用于检测和/或量化样本中的细菌、真菌或病毒的装置,所述装置包括:流通系统,所述流通系统包括:

[0016] 浓缩部件,所述浓缩部件包括水性两相体系(ATPS),所述水性两相体系包括混合相溶液,所述混合相溶液分离为第一相溶液和第二相溶液;以及

[0017] 检测部件,所述检测部件安置在所述浓缩部件下面。

[0018] 实施方案6:如实施方案5所述的装置,其中所述浓缩部件包括一层或多层纸。

[0019] 实施方案7:根据实施方案5至6中任一项所述的装置,其中所述检测部件包括缀合垫、反应垫和任选的槽状物。

[0020] 实施方案8:根据实施方案1至7中任一项所述的装置,其中所述LFA或所述流通系统在不到约10分钟内检测所述细菌。

[0021] 实施方案9:根据实施方案1至8中任一项所述的装置,其中所述装置被配置用于细菌的检测。

[0022] 实施方案10:如实施方案9所述的装置,其中所述细菌是口腔细菌、在尿液中发现的细菌、在阴道液中发现的细菌、或在阴道拭子上发现的细菌、或在子宫颈内膜拭子上发现的细菌。

[0023] 实施方案11:如实施方案10所述的装置,其中所述细菌是口腔细菌。

[0024] 实施方案12:如实施方案11所述的装置,其中所述口腔细菌包括普氏菌属(例如,中间普氏菌、变黑普氏菌等)、卟啉单胞菌属(例如,牙龈卟啉单胞菌等)、链球菌属(例如,变形链球菌等)、粘放线菌、干酪乳酸杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、嗜酸乳酸杆菌、牙龈二氧化碳嗜纤维菌、具核梭杆菌或福赛斯拟杆菌。

[0025] 实施方案13:如实施方案10所述的装置,其中所述细菌是在阴道液中发现的细菌。

[0026] 实施方案14:如实施方案13所述的装置,其中所述细菌包括毛滴虫属、放线菌属、加德纳菌属、奈瑟菌属、衣原体属或密螺旋体属。

[0027] 实施方案15:如实施方案10所述的装置,其中所述细菌是在尿液中发现的细菌。

[0028] 实施方案16:如实施方案15所述的装置,其中所述细菌包括大肠杆菌、变形杆菌属、毛滴虫属、放线菌属、加德纳菌属、奈瑟菌属、衣原体属或密螺旋体属。

[0029] 实施方案17:根据实施方案11至12中任一项所述的装置,其中LFA或检测部件包括检测变形链球菌的抗体。

[0030] 实施方案18:根据实施方案1至17中任一项所述的装置,其中所述ATPS在所述样本施加到所述装置之前与所述样本组合。

[0031] 实施方案19:根据实施方案1至17中任一项所述的装置,其中在装置与样本接触之前,所述ATPS在侧流测定上或在流通测定的浓缩部件中脱水。

[0032] 实施方案20:根据实施方案1至19中任一项所述的装置,其中ATPS包括混合相溶

液,所述混合相溶液在装置与样本接触之后分离为第一相溶液和第二相溶液。

[0033] 实施方案21:根据实施方案1至20中任一项所述的装置,其中ATPS包括胶束/表面活性剂溶液。

[0034] 实施方案22:如实施方案21所述的装置,其中第一相溶液浓缩在表面活性剂中并且第二相溶液具有低浓度的表面活性剂。

[0035] 实施方案23:根据实施方案1至20中任一项所述的装置,其中第一相溶液包含聚合物并且第二相溶液包含表面活性剂。

[0036] 实施方案24:如实施方案23所述的装置,其中所述聚合物包括葡聚糖。

[0037] 实施方案25:根据实施方案23至24中任一项所述的装置,其中表面活性剂包括非离子表面活性剂或烷基聚乙二醇醚表面活性剂。

[0038] 实施方案26:根据实施方案23至24中任一项所述的装置,其中表面活性剂包括非离子表面活性剂,所述非离子表面活性剂具有亲水聚环氧乙烷链和芳香烃亲脂或疏水基团(例如,Triton-X表面活性剂)。

[0039] 实施方案27:根据实施方案1至20中任一项所述的装置,其中第一相溶液包含第一聚合物并且第二相溶液包含第二聚合物。

[0040] 实施方案28:如实施方案27所述的装置,其中第一/第二聚合物包括聚乙二醇、聚丙二醇或葡聚糖。

[0041] 实施方案29:根据实施方案1至20中任一项所述的装置,其中第一相溶液包含聚合物并且第二相溶液包含盐。

[0042] 实施方案30:如实施方案29所述的装置,其中第一相溶液包含聚乙二醇。

[0043] 实施方案31:如实施方案29所述的装置,其中第一相溶液包含聚丙二醇。

[0044] 实施方案32:根据实施方案29至31中任一项所述的装置,其中所述盐包括磷酸钾、硫酸钠、硫酸镁、硫酸铵或柠檬酸钠。

[0045] 实施方案33:根据实施方案29至31中任一项所述的装置,其中所述盐是磷酸钾。

[0046] 实施方案34:根据实施方案2至20中任一项所述的装置,其中第一相溶液包含表1的组分1并且第二相溶液包含表1的组分2。

[0047] 实施方案35:根据实施方案1至34中任一项所述的装置,其中所述装置还包括探针,所述探针与靶细菌、真菌或病毒发生相互作用。

[0048] 实施方案36:如实施方案35所述的装置,其中所述装置包括一种或多种探针,所述一种或多种探针与以下各项发生相互作用:至少1种靶细菌、真菌或病毒,或至少两种不同的靶细菌、真菌或病毒,或至少3种不同的靶细菌、真菌或病毒,或至少4种不同的靶细菌、真菌或病毒,或至少5种不同的靶细菌、真菌或病毒,或至少7种不同的靶细菌、真菌或病毒,或至少10种不同的靶细菌、真菌或病毒,或至少15种不同的靶细菌、真菌或病毒,或至少20种不同的靶细菌、真菌或病毒。

[0049] 实施方案37:根据实施方案35至36中任一项所述的装置,其中所述装置包括至少两种不同探针,或至少3种不同探针,或至少4种不同探针,或至少5种不同探针,或至少7种不同探针,或至少10种不同探针,或至少15种不同探针或至少20种不同探针。

[0050] 实施方案38:根据实施方案35至37中任一项所述的装置,其中探针包括合成聚合物、金属、矿物质、玻璃、石英、陶瓷、生物聚合物或塑料。



- [0051] 实施方案39:如实施方案38所述的装置,其中探针包括聚乙烯、聚丙烯、纤维素、甲壳素、尼龙、聚甲醛、聚四氟乙烯或聚氯乙烯。
- [0052] 实施方案40:如实施方案38所述的装置,其中探针包括生物聚合物,所述生物聚合物包括葡聚糖、聚丙烯或聚乙二醇。
- [0053] 实施方案41:如实施方案38所述的装置,其中探针包括金、银或铂。
- [0054] 实施方案42:根据实施方案38至41中任一项所述的装置,其中探针包括纳米颗粒。
- [0055] 实施方案43:如实施方案42所述的装置,其中纳米颗粒是金纳米颗粒。
- [0056] 实施方案44:根据实施方案38至43中任一项所述的装置,其中探针包括涂层。
- [0057] 实施方案45:如实施方案44所述的装置,其中涂层包括聚丙二醇或聚乙二醇。
- [0058] 实施方案46:如实施方案44所述的装置,其中涂层包括葡聚糖。
- [0059] 实施方案47:如实施方案44所述的装置,其中涂层包括亲水性蛋白质。
- [0060] 实施方案48:如实施方案44所述的装置,其中涂层包括血清白蛋白。
- [0061] 实施方案49:根据实施方案44至48中任一项所述的装置,其中涂层对第一相溶液或第二相溶液具有亲和力。
- [0062] 实施方案50:根据实施方案35至49中任一项所述的装置,其中探针还包括结合部分,所述结合部分与靶细菌、真菌或病毒结合。
- [0063] 实施方案51:如实施方案50所述的装置,其中结合部分包括抗体、凝集素、蛋白质、糖蛋白、核酸、小分子、聚合物或脂质。
- [0064] 实施方案52:如实施方案50所述的装置,其中结合部分是抗体或抗体片段。
- [0065] 实施方案53:如实施方案52所述的装置,其中所述抗体是特异地结合细菌、真菌或病毒的抗体。
- [0066] 实施方案54:根据实施方案1至53中任一项所述的装置,其中所述装置还包括信号增强试剂。
- [0067] 实施方案55:如实施方案54所述的装置,其中所述信号增强试剂包含一种底物,所述底物与装饰在探针表面上的酶发生反应来形成明显可视产物。
- [0068] 实施方案56:如实施方案55所述的装置,其中所述信号增强物包括银离子。
- [0069] 实施方案57:根据实施方案1至56中任一项所述的装置,其中所述装置被配置成执行竞争测定。
- [0070] 实施方案58:根据实施方案1至56中任一项所述的装置,其中所述装置被配置成执行夹心测定。
- [0071] 实施方案59:根据实施方案1至58中任一项所述的装置,其中所述装置在以下浓度下检测分析物(例如,细菌):小于约 $6 \times 10^6$ 个细胞/mL,或小于约 $3 \times 10^6$ 个细胞/mL,或小于约 $1 \times 10^5$ 个细胞/mL,小于约 $1 \times 10^6$ CFU/mL,或小于约50 $\mu$ g/mL。
- [0072] 实施方案60:根据实施方案1至59中任一项所述的装置,其中在以下分析物浓度下会出现假阳性:小于约12ng/ $\mu$ L,或小于约10ng/ $\mu$ L,或小于约8ng/ $\mu$ L,或小于约6ng/ $\mu$ L,或小于约4ng/ $\mu$ L,或小于约2ng/ $\mu$ L。
- [0073] 实施方案61:一种用于检测和/或量化细菌的工具箱,所述工具箱包括:如实施方案1至60中任一项所述的装置;以及用于收集生物样本的收集装置。
- [0074] 实施方案62:如实施方案61所述的工具箱,其中所述收集装置包括用于收集口腔

液的装置。

[0075] 实施方案63:如实施方案61所述的工具箱,其中所述收集装置包括用于收集血液的装置。

[0076] 实施方案64:如实施方案61所述的工具箱,其中所述收集装置包括尿液收集装置。

[0077] 实施方案65:如实施方案61所述的工具箱,其中所述收集装置包括用于收集阴道液或者从阴道拭子或从子宫颈内膜拭子收集所述阴道液的装置。

[0078] 实施方案66:如实施方案61所述的工具箱,其中所述收集装置包括用于收集环境样本的装置。

[0079] 实施方案67:一种检测和/或量化样本中的细菌、真菌或病毒的方法,所述方法包括:

[0080] i) 将样本施加到如实施方案1至60中任一项所述的装置;以及

[0081] ii) 检测LFA或流通装置的检测部件上细菌、真菌或病毒的存在与否和/或量化所述细菌、真菌或病毒。

[0082] 实施方案68:一种检测和/或量化样本中的细菌、真菌或病毒的方法,所述方法包括:

[0083] i) 将样本施加到水性两相体系(ATPS);

[0084] ii) 将含有所述样本的ATPS或其组分施加到根据实施方案1至60中任一项所述的装置;以及

[0085] iii) 检测LFA或流通装置的检测部件上细菌的存在与否和/或量化所述细菌。

[0086] 实施方案69:根据实施方案67至68中任一项所述的方法,其中所述样本是环境样本、口腔样本、阴道液样本、尿液样本、来自阴道拭子的样本或来自子宫颈内膜拭子的样本。

[0087] 实施方案70:如实施方案69所述的方法,其中所述样本是颊样本或口腔液样本。

[0088] 实施方案72:根据实施方案67至70中任一项所述的方法,其中在以下分析物浓度下会出现假阳性:小于约12ng/ $\mu$ L,或小于约10ng/ $\mu$ L,或小于约8ng/ $\mu$ L,或小于约6ng/ $\mu$ L,或小于约4ng/ $\mu$ L,或小于约2ng/ $\mu$ L。

[0089] 附图简述

[0090] 图1示出在注射器中使用PPG/盐ATPS进行的快速靶标浓缩和简易提取。含有靶生物分子的样本(紫色)与ATPS溶液进行混合。在室温下孵育5至10分钟之后,靶标被极端地浓缩在底相中,并且可以通过按压注射器的柱塞来容易地提取并应用于后续检测步骤。

[0091] 图2示出某一测定,其中含有样本的ATPS施加到测定装置(例如,LFA)。

[0092] 图3示出证实用于检测变形链球菌的半定量侧流测定的概念的反应垫的示意图。对变形链球菌特异的抗体被固定在具有各种浓度的测试线上。显现出来的测试线的数目与样本中的变形链球菌的浓度相关,所述浓度可以用于预测龋齿产生的风险。

[0093] 图4示出用于检测靶生物分子的一体式点测试的示意图。ATPS组分和比色指示剂分别被脱水到浓缩部件和缀合垫上。用户可以简单地将样本溶液施加到装置。在此之后,会在浓缩部件内进行靶生物分子的浓缩。随后,所述溶液将再水合并结合到缀合垫上的比色指示剂,并且所得的指示剂-靶标复合物如由可视点所示将被捕获在反应垫上。

[0094] 图5示出使用PPG/盐ATPS和LFA对变形链球菌进行的浓缩和检测。

[0095] 图6示出对来自4名受试者的斑块中的变形链球菌的检测。较高的测试线强度指示

受试者中的较大的变形链球菌浓度。

[0096] 图7示出在刷牙之前和之后对斑块中的变形链球菌的检测。结果表明刷牙能有效去除变形链球菌并且降低产生龋齿的风险。

[0097] 图8示出单独使用LFA以及使用ATPS与LFA在PBS中对沙眼衣原体进行的检测。

[0098] 图9示出本文描述的装置与经过FDA批准的可商购的衣原体LFA在从沙眼衣原体阳性患者收集的临床尿液样本中的性能的比较。我们的装置能够提供真阳性结果(存在测试线),而商业测试会给出假阴性结果(不存在测试线)。

[0099] 图10示出使用夹心格式的本文描述的侧流测定(LFA)的一个实施方案。

[0100] 图11.整合的ARROW和LFA诊断设计。(左)整合的ARROW和LFA的设计布局。(中)ARROW的图像。(右)玻璃纤维上的脱水的PEG、空白玻璃纤维和玻璃纤维上的脱水的磷酸钾的SEM图像。玻璃纤维纸片的顶端和底端也是空白玻璃纤维。

[0101] 图12.证实ATPS组分再水合次序的重要性。当调换PEG和磷酸钾的再水合次序时,ARROW设计的单一薄片内的相分离随时间推移而可视化。特写图像被示出具有发生相分离的下游区域,并且因此第一图像是处在 $t=6$ 处而不是 $t=0$ 处。虚线(---)涵盖主要含有富含PEG的相的由淡蓝色标识的纸的区域。富含PEG的相、PEG贫乏的相和宏观的混合域区域的可视化和鉴别通过使BSA-DGNP和亮蓝染料的悬浮液流动来完成。

[0102] 图13.通过结合ARROW来改进对沙眼衣原体LFA的检测的极限。在存在和不存在ARROW的情况下,在变化的沙眼衣原体浓度下的LFA结果的比较。测试线定位于LFA条的底部,而对照线定位于LFA测试条的顶部。在针对 $0\text{ng}/\mu\text{L}$ 沙眼衣原体的最左侧图中示出了阴性对照结果。

[0103] 图14.测试线强度的量化。ARROW和LFA系统以及仅LFA系统的量化的LFA测试线强度的曲线图。

[0104] 图15.介于QuickVue、Phase型LFA与Phase型LFA+ATPS之间的头对头比较的代表性结果(样本#4,表2)。测试线(T)的存在指示真阳性结果。只有我们的LFA+ATPS存在指示真阳性结果的可视测试线。

## 具体实施方式

[0105] 在各种实施方案中,提供了用于临床应用的分析物收集、提取、浓缩和检测的方法和装置。在某些实施方案中,所述装置允许快速检测和/或量化生物样本(例如,口腔、尿液和阴道样本)中的细菌、真菌和病毒。

[0106] 在某些实施方案中,提供了侧流测定(LFA)装置(参见例如,图10)和/或流通(点)测定装置(参见例如,图4),所述测定装置是准确、灵敏、便携、一次性的,并且非常适合于在最少培训或设备下在护理点处使用。

[0107] 在某些实施方案中,侧流测定装置或流通测定装置可以直接与待测定的样本一起使用。在某些实施方案中,侧流测定装置或流通测定装置可以与某一样本一起使用,其中靶标(例如,靶分子、靶微生物等)在施加到所述装置之前已使用例如水性两相体系(ATPS)浓缩。在某些实施方案中,靶标(例如,靶分子、靶微生物等)使用例如ATPS在所述装置自身上进行浓缩。

[0108] 靶生物分子的浓度

[0109] 使用ATPS对靶生物分子进行的浓缩可以在散装液体中,或在例如侧流测定或流通(点)测定中,例如在纸膜中作为样本溶液流执行。

#### [0110] 液体ATPS中的浓缩

[0111] 在某些说明性实施方案中,收集的样本(例如,组织样本、诸如尿液、唾液和血液的生物流体、痰液、阴道液、精液、脑脊液、淋巴液、阴道拭子、子宫颈内膜拭子、来自牙齿的斑块等等)可以与悬浮溶液(例如,缓冲液)组合;或直接与ATPS溶液组合;或直接施加到纸或将含有样本的悬浮溶液施加到纸以使先前在纸上已变干的ATPS组分再水合。在一些情况下,可能需要由用户混合来实现充分混合的均质溶液。在各种实施方案中,可以使用聚合物/盐、聚合物/聚合物、胶束/聚合物或胶束ATPS。在以下描述的一个实例中,聚丙二醇(PPG):磷酸钾盐ATPS用于在10分钟内将变形链球菌(*S.mutans*)浓缩60倍(参见例如,图1)。如果靶分析物(例如,靶生物分子)很大,诸如细菌、真菌或病毒,则所述靶分析物会被极端地分配或分布到ATPS中的两个相中的一个中,所述相之后会被引入到LFA或流通测定中的下游检测部件。在某些实施方案中,如果靶分析物很小,诸如蛋白质、代谢物、激素,则装饰有特异性结合部分的大的探针可以用于捕获靶标,并且随后浓缩到ATPS中的一个相中以用于下游检测。在某些实施方案中,含有浓缩的靶分析物(例如,生物分子)的相可以通过使用移液管或滴管进行物理提取来引入到检测部件,或可以例如如图1所示经由注射器来引入。

#### [0112] 流体在纸上流动时浓缩

[0113] 在各种实施方案中,浓缩步骤也可以用纸来加速。例如,收集的样本可以与ATPS组分混合并且引入到可以有助于、增强和加速相分离的纸装置。靶生物分子可以在纸膜上的流的前沿中进行浓缩,并且可以无缝地引入到后续检测部件。

[0114] 可选地,ATPS组分可以预先脱水到纸膜上。在这种情况下,收集的样本可以直接施加到纸膜上,而无需与ATPS组分预先混合。

#### [0115] 靶生物分子的检测

[0116] 在各种实施方案中,本文考虑的测定系统中的检测部件可以是基于纸的检测部件。在某些实施方案中,基于纸的检测部件可以是呈侧流测试条(参见例如,图3和图10)或流通装置(点测试)(参见例如,图4)的形式。在各种实施方案中,两者的形状因素可以包含但不限于以下部件中的一者或多者:

#### [0117] 样本垫

[0118] 在某些实施方案中,样本垫在存在时可以将浓缩部件连接到检测部件。所述样本垫可以充当过滤器,所述过滤器可以将碎片、污染物和粘液从收集的流体中去除。所述样本垫还可以储存干燥的试剂,并且在再水合时,这些试剂可以(i)针对最优检测条件(pH、离子强度等)调整溶液;并且(ii)分解收集的样本中可能会影响检测的粘液、糖蛋白和其他粘性物质。用于样本垫的示例性材料包括但不限于:纤维素、硝化纤维素、玻璃纤维、棉花、织造或非织造纸等。垫子上的试剂可以包括但不限于:表面活性剂,诸如Triton X-100、Tween 20或十二烷基硫酸钠等;聚合物,诸如聚乙二醇、泊洛沙姆、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等;缓冲液,诸如磷酸盐缓冲盐水、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、硼酸钠、TRICINE等;蛋白质,诸如白蛋白等;酶,诸如蛋白酶等;盐,诸如氯化钠、磷酸钠、胆酸钠、磷酸钾等。在各种实施方案中,这些试剂可以通过以下方式施加到样本垫:(i)将纸材料浸泡在试剂溶液中,或(ii)经由毛细流使膜发生芯吸作用。经过处理的样本垫

可以通过以下各项来干燥：(i) 空气干燥(室温下静置)；(ii) 烘烤(使用烘箱或加热装置使其置于高温)；(iii) 真空；或(iv) 冻干。

#### [0119] 缀合垫

[0120] 在各种实施方案中，缀合垫在存在时可以含有脱水的比色指示剂，所述脱水的比色指示剂装饰有结合靶分析物的结合部分。在某些实施方案中，结合部分是对靶分析物(例如，细菌、真菌、病毒等)具有高亲和力的特异性结合部分。当样本溶液抵达缀合垫时，比色指示剂会被再水合。比色指示剂上的结合部分之后可以结合到靶分析物并且所得的复合物可以流动到反应垫。在某些实施方案中，比色指示剂可以包括金属颗粒，诸如金、银颗粒；聚合物颗粒诸如乳胶珠；以及封装可视或荧光染料的聚苯乙烯颗粒。用于缀合垫的说明性材料包括但不限于：纤维素、硝化纤维素、玻璃纤维、棉花、织造或非织造纸等。在某些实施方案中，比色指示剂可以如上所述施加并脱水到垫子上。

#### [0121] 反应垫

[0122] 在某些实施方案中，反应垫在存在时可以包括固定化试剂，并且当固定化试剂与样本溶液发生反应时，它们可以产生信号(例如，视觉信号)以指示靶分析物的存在与否或数量。用于反应垫的说明性材料包括但不限于：纤维素、硝化纤维素、玻璃纤维、棉花、织造或非织造纸等。

#### [0123] 侧流格式

[0124] 在侧流测试条的某些实施方案中，反应垫上的试剂将以垂直于流动方向的线的形式固定以确保所有样本都会与固定化试剂相互作用。试剂的浓度可以被优化来控制信号强度，并且因此控制测定的灵敏度。例如，可以通过按不同浓度固定多条相同试剂线来设计半定量测定。因此，每条线只有在达到靶生物分子的特定浓度时才会产生信号。靶生物分子的浓度之后可以通过对可视的线的数目进行计数来解释(参见例如，图3)。对于变形链球菌的检测，这种半定量测定可能特别可用来提供对龋齿的更好的预测，因为变形链球菌浓度与产生龋齿的风险高度相关。

[0125] 此外，多条不同试剂线可以固定在同一个条带上以检测多种靶分析物。这允许开发多路测定。

#### [0126] 流通格式

[0127] 在某些实施方案中，例如对于流通测试，代替线，试剂可以固定在整个反应垫上。如果存在靶分析物，则所述靶分析物会结合到缀合垫上的比色指示剂，并且在指示剂-靶标复合物结合到固定化试剂时被捕获在反应垫上。因此，如果存在靶生物分子，则会显现可视点。如果样本体积过小以至于无法沿侧流测试条往上芯吸，则可以使用这种测试。可视点的颜色强度与靶分析物(例如，生物分子)的浓度相关，而点的大小与样本体积相关。在某些实施方案中，浓缩部件可以直接放置到流通测试的顶上以消除对提取浓缩样本并将其施加到检测部件的需求(参见例如，图4)。

[0128] 在各种实施方案中，固定化试剂可以包括针对靶分析物的特异性抗体(一级抗体)、针对一级抗体的抗体(二级抗体)、抗原、蛋白质或抗原-蛋白质缀合物。用于反应垫的说明性材料包括但不限于：纤维素、硝化纤维素、玻璃纤维、棉花、织造和非织造纸等。在各种实施方案中，所述试剂可以如上所述施加并脱水到垫子上。

#### [0129] 槽状物

[0130] 在某些实施方案中,槽状物在存在时可以包括吸收垫,所述吸收垫收集过量流体并且防止可能会影响测试性能的回流。用于槽状物的说明性材料包括但不限于:纤维素、硝化纤维素、玻璃纤维、棉花、织造和非织造纸等。

#### [0131] 信号增强

[0132] 在各种实施方案中,可视信号强度可以被增强来提高检测测定的准确度。这可以通过在初始检测测定之后将额外的试剂引入到反应垫来执行。在某些实施方案中,信号增强试剂可以包含底物,所述底物与装饰在例如比色指示剂的表面上的酶发生反应来形成明显可视产物。举例来说,如果比色指示剂包括金探针,则信号增强可以通过银增强标记来实现,其中可以将含有银离子的增强试剂施加到反应垫,其中金探针结合到固定化线/点。在这种情况下,金探针可以充当成核位点,使得银可以沉积到颗粒上,从而产生增加的信号强度。在这些实例中,信号增强试剂可以在初始检测测定之后单独添加,或储存/脱水在纸装置上以自动/手动地释放。

[0133] 前述部件和测定格式是说明性的而非限制性的。使用本文提供的教义和实例,本领域技术人员可获得众多其他测定装置和配置,并且以下描述一些其他设计考虑因素和部件。

#### [0134] 侧流测定(LFA)或流通(点)测定

[0135] 如上文所解释,在某些实施方案中,本文描述的装置和系统被配置成提供用于检测样本中的靶分析物的侧流测定(LFA)或流通(点)测定,其中LFA或点测定单独或与水性两相体系(ATPS)结合使用。在一些实施方案中,LFA或点测定法包括其中安置有ATPS或其组分的多孔基质,其中多孔基质被构造成并具有的孔隙率足以允许ATPS或其组分在ATPS或其组分呈流体相时流过多孔基质。这类多孔LFA或点测定装置在本文中被称作纸或纸流体装置,并且这些术语可互换使用。

[0136] 如本文所使用,术语“纸”并不限于来自木浆或其他纤维植物物质的薄片,但是在某些实施方案中,这类纸在本文描述的装置中的使用是可预期的。纸更一般地指代通常呈片状的多孔材料,但是不限于允许流体流过的多孔材料。

[0137] 在一些实施方案中,多孔基质是足够多孔的以允许ATPS的混合相溶液、第一相溶液和/或第二相溶液和/或靶分析物流过LFA或流通测定。在一些实施方案中,多孔基质对于混合相溶液、第一相溶液和/或第二相溶液和/或靶分析物来说是足够长和/或足够深的以垂直和/或水平地流过LFA或流通(点)测定装置。在一些实施方案中,第一相溶液以第一速率流过多孔基质,并且第二相溶液以第二速率流过多孔基质,其中第一速率和第二速率是不同的。在LFA或点测定的一些实施方案中,多孔基质尤其包括材料,诸如闪光玻璃、陶瓷、矿物质、纤维素、玻璃纤维、硝化纤维素、聚偏二氟乙烯、尼龙、经过电荷改性的尼龙、聚醚砜以及其组合等等。

#### [0138] 流动时浓缩

[0139] 已发现ATPS可以在溶液流过多孔衬底(例如,纸)时进行相分离,我们称之为“流动时浓缩”。此外,还发现,流过纸明显加速了浓缩过程。基于这种现象,本文描述的侧流测定装置和流通测定装置可以包括纸流体部件,所述纸流体部件全面整合联合ATPS浓缩与LFA或流通检测所需的部件。已发现,当将混合的ATPS溶液施加到某些纸材料时,随着溶液的流动会发生相分离和分析物浓缩。我们还证实,即使在使ATPS具有变化的体积比(例如,顶相

的体积除以底相的体积)时,仍会保留这种现象。

[0140] 在一些实施方案中,LFA或点测定(例如,点测定的浓缩部件)包括纸。在一些实施方案中,纸包括允许流体从中流过的多孔材料片。在一些实施方案中,纸包括允许流体从中流过的多个多孔材料片(例如,如图4所示)。在一些实施方案中,纸包括一种或多种材料,诸如纤维素、玻璃纤维、硝化纤维素、聚偏二氟乙烯、经过电荷改性的尼龙、聚醚砜等等。在一些实施方案中,纸是HI-FLOWPLUS®膜。

[0141] 在一些实施方案中,纸是织造纸。在一些实施方案中,纸是Whatman纸。在一些实施方案中,Whatman纸包括Whatman S17、Whatman MF1、Whatman VF1、Whatman Fusion 5、Whatman GF/DVA、Whatman LF1、Whatman CF1和/或Whatman CF4。

[0142] 在一些实施方案中,在靶分析物流过LFA或流过流通测定的浓缩部件时,纸会浓缩靶分析物(例如,基于“流动时浓缩”的装置)。在一些实施方案中,在靶分析物水平地流过LFA时,纸会浓缩靶分析物。在一些实施方案中,在靶分析物垂直地流过LFA或流通测定时,纸会浓缩靶分析物。

[0143] 在一些实施方案中,纸具有影响哪个相溶液将成为“前导流体”的性质。作为非限制性实例,当使用PEG盐ATPS时,将溶液添加到玻璃纤维纸会使盐相成为前导溶液,而使用纤维素纸会使PEG相成为前导溶液。在一些实施方案中,纸内的相分离加速了相分离。同样作为非限制性实例,胶束ATPS通常要花几个小时来在停滞的ATPS中进行相分离,但是如果施加到纸条上,则在几分钟内就可发生这种相分离。这通过允许ATPS(它们传统上是诊断过程中的速率决定步骤)成为我们快速纸诊断测定的更可行的选项来加速所述诊断过程。在一些实施方案中,‘流动时浓缩’装置包括PEG盐ATPS(例如,如实施例中所示)。在一些实施方案中,“流动时浓缩”装置包括胶束ATPS。在一些实施方案中,LFA装置或流通测定装置包括玻璃纤维纸或硝化纤维素纸。

[0144] 在某些实施方案中,LFA或流通测定装置包括过滤器,所述过滤器去除碎片(例如,血细胞或其他微粒);样本垫,其中包含靶分析物的样本施加到所述装置;检测区(例如,测试线和对照线),其中结合了靶分析物并在其中对所述靶分析物进行检测;以及吸收垫(例如,干燥接收纸),所述吸收垫可以吸收施加到LFA或流通装置的过量样本和/或溶液(参见例如,图10)。在一些实施方案中,对照线和/或测试线本身不是线,而是区域或点。

[0145] 在一些实施方案中,LFA包括LFA条。术语“LFA”和“LFA条”在本文中可互换使用。在一些实施方案中,LFA条的长度大于其宽度和深度。在一些实施方案中,LFA是矩形的。在一些实施方案中,LFA具有为圆形、卵形、方形、多边形或不规则形状的形状。在一些实施方案中,LFA包括多个路线和/或接合点。在一些实施方案中,LFA条包括样本垫、检测区和吸收垫。在一些实施方案中,检测区定位于样本垫与吸收垫之间,所述吸收垫芯吸样本与靶分析物远离样本垫并且前往检测区。

#### [0146] 夹心测定

[0147] 在一些实施方案中,LFA或流通(点)测定装置被配置成提供或进行夹心测定(参见例如,以下申请的图1的底部左图:2015年3月6日提交的共同未决的PCT申请号:PCT/US2015/019297中,所述申请出于其中描述的LFA配置的目的以引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,夹心测定包括结合靶分析物的捕获部分。在一些实施方案中,所述装置包括探针。在一些实施方案中,探针包括可检测性质(比色、荧光、放射性等)。在一些实施方案

中,探针包括与靶分析物相互作用的结合部分(例如,抗体)。在一些实施方案中,探针添加到样本并且结合靶分析物来形成探针-分析物复合物。

#### [0148] 竞争测定

[0149] 在一些实施方案中,LFA包括竞争测定。在一些实施方案中,探针添加到样本并且结合靶分析物来形成探针-分析物复合物。在一些实施方案中,LFA包括固定在测试线上的靶分析物。在一些实施方案中,探针被样本中的靶分析物饱和并且探针不会结合到固定在测试线上的靶分析物。在一些实施方案中,测试线上可检测信号的缺乏指示阳性结果。在一些实施方案中,样本中不存在靶分析物,并且探针结合到测试线上的靶分析物,从而指示阴性结果。在一些实施方案中,LFA包括对照线上直接与探针相互作用的探针捕获部分,并且不管样本中如何存在靶分析物,探针都会结合到探针捕获部分并且累积在对照线上。在一些实施方案中,探针变得固定在对照线上并且加以检测,从而指示有效测试。在一些实施方案中,阳性结果(例如,样本中存在靶分析物)由测试线上不存在可检测信号而对照线上存在可检测信号指示。在一些实施方案中,阴性结果由测试线和对照线两者处的可检测信号指示。

[0150] 在夹心格式测定的一些实施方案中,探针-分析物复合物施加到样本垫并且穿过LFA或穿过流通装置而流向吸收垫。在一些实施方案中,探针-分析物复合物的靶分析物结合到捕获部分。在一些实施方案中,捕获部分固定在测试线或测试区域(例如,流通装置中的测试层)上并且探针-分析物复合物变得固定在测试线上或测试区域中。在一些实施方案中,探针是比色的,并且测试线或测试区域会展现出较重的颜色(例如,可检测信号),因为探针-分析物复合物会累积在测试线处或测试区域中,从而指示阳性结果。在一些实施方案中,样本中不存在靶分析物,并且探针-分析物复合物的探针不与捕获部分相互作用,并且测试线或测试区域中信号的缺乏指示阴性结果。在一些实施方案中,LFA包括对照线上(或例如流通测定装置的对照区域中)直接与探针和/或结合部分相互作用的探针捕获部分,并且因此不管样本中如何存在靶分析物,探针/结合部分都会结合到探针捕获部分并且累积在对照线上或对照区域中。在一些实施方案中,探针捕获部分是结合结合部分的二级抗体,其中结合部分是结合所述靶分析物的一级抗体。在一些实施方案中,探针变得固定在对照线上或对照区域中并且加以检测,从而指示有效测试。在一些实施方案中,阳性结果(例如,样本中存在靶分析物)由测试线(或测试区域)和对照线(或对照区域)处的可检测信号指示。在一些实施方案中,阴性结果由对照线处或对照区域中的可检测信号指示。

#### [0151] 水性两相体系(ATPS)

[0152] 在某些实施方案中,本文描述的装置被配置成与水性两相体系(ATPS)例如在注射器或其他容器中一起操作,或所述装置被配置成支持水性两相体系(ATPS)。在一些实施方案中,ATPS包括相溶液。术语“相溶液”通常指代ATPS的第一相溶液或第二相溶液。在一些实施方案中,相溶液是呈(例如,具有第一/第二相溶液的)混合溶液。在一些实施方案中,相溶液在其从ATPS的混合溶液分离之后成为第一/第二相溶液。在一些实施方案中,相溶液在其从LFA或流通测定中的混合溶液分离之后成为第一/第二相溶液。在某些实施方案中,相溶液在其处于(例如,具有第一相溶液的)混合状态时可以指代第二相溶液。在一些实施方案中,相溶液是LFA或流通测定中的前导流体。在一些实施方案中,相溶液是LFA或流通测定中的滞后流体。



[0153] 在一些实施方案中,ATPS包括最初混合的两种水溶液(例如,混合相溶液),即第一相溶液和第二相溶液。在一些实施方案中,混合相溶液是均质溶液,而在某些其他实施方案中,第一相溶液和第二相溶液是不混溶的。在一些实施方案中,第一相溶液和第二相溶液是不混溶的,但是第一相溶液的域与第二相溶液的域混合。在一些实施方案中,不混溶性受到温度的变化和/或诸如盐的不同组分的浓度的变化驱动。在一些实施方案中,第一/第二相溶液包括组分,诸如胶束、盐和/或聚合物。在一些实施方案中,与ATPS接触的靶分析物(例如,生物分子、细菌(或其片段)、真菌(或其片段)或病毒等等)会基于其物理和化学性质,诸如大小、形状、疏水性和电荷优先被分布、分配和/或浓缩到第一相溶液而非第二相溶液中,或反之亦然。在一些实施方案中,靶分析物(例如,细菌、真菌、病毒等)主要(或极端地)分配到ATPS的第一或第二相溶液中,并且因此浓缩于ATPS中。在一些实施方案中,靶分析物通过调整第一相溶液与第二相溶液之间的体积比来浓缩。在一些实施方案中,靶分析物通过减小其中分配有分析物的相的体积来浓缩。作为说明,在一些实施方案中,靶分析物例如通过使用第一相溶液与第二相溶液的1:9体积比而在第一相溶液中浓缩10倍,因为分析物极端地分配到其中的相的体积是总体积的1/10。

[0154] 在一些实施方案中,通过使用其他比率来获得其他浓度。因此,在一些实施方案中,第一相溶液与第二相溶液的比率包括以下比率:约1:1、约1:2、约1:3、约1:4、约1:5、约1:6、约1:7、约1:8、约1:9或约1:10。在一些实施方案中,第一相溶液与第二相溶液的比率包括以下比率:约1:20、约1:30、约1:40、约1:50、约1:60、约1:70、约1:80、约1:90或约1:100。在一些实施方案中,第一相溶液与第二相溶液的比率包括以下比率:约1:200、约1:300、约1:400、约1:500、约1:600、约1:700、约1:800、约1:900或约1:1000。

[0155] 在一些实施方案中,第二相溶液与第一相溶液的比率包括以下比率:约1:1、约1:2、约1:3、约1:4、约1:5、约1:6、约1:7、约1:8、约1:9或约1:10。在一些实施方案中,第二相溶液与第一相溶液的比率包括以下比率:约1:20、约1:30、约1:40、约1:50、约1:60、约1:70、约1:80、约1:90或约1:100。在一些实施方案中,第二相溶液与第一相溶液的比率包括以下比率:约1:200、约1:300、约1:400、约1:500、约1:600、约1:700、约1:800、约1:900或约1:1000。

[0156] 在一些实施方案中,分析物基本上均匀地分配在第一相溶液与第二相溶液之间,从而防止分析物的浓缩。在这类系统中,靶分析物的浓缩可以通过引入额外部件,诸如捕获靶分析物的探针来实现,并且其中探针主要分配到一个相中,从而增强靶分析物的分配行为以实现浓缩。在一些实施方案中,含有浓缩的分析物的第一/第二相溶液被收集并施加到LFA或流通测定装置。

[0157] 在一些实施方案中,第一/第二相溶液包括胶束溶液。在一些实施方案中,胶束溶液包含非离子表面活性剂。在一些实施方案中,胶束溶液包含清洁剂。在一些实施方案中,胶束溶液包含Triton-X。在一些实施方案中,作为非限制性实例,胶束溶液包含类似于Triton-X的聚合物,诸如Igepal CA-630和Nonidet P-40等等。在一些实施方案中,胶束溶液基本上由Triton-X组成。

[0158] 在一些实施方案中,胶束溶液在室温(约25℃)下具有以下粘度:约0.01厘泊至约5000厘泊、约0.01厘泊至约4500厘泊、约0.01厘泊至约4000厘泊、约0.01厘泊至约3500厘泊、约0.01厘泊至约3000厘泊、约0.01厘泊至约2500厘泊、约0.01厘泊至约2000厘泊、约0.01厘泊至约1500厘泊、约0.01厘泊至约1000厘泊或约0.01厘泊至约500厘泊。在一些实施

方案中,胶束溶液在室温下具有以下粘度:约0.01厘泊至约450厘泊、约0.01厘泊至约400厘泊、约0.01厘泊至约350厘泊、约0.01厘泊至约300厘泊、约0.01厘泊至约250厘泊、约0.01厘泊至约200厘泊、约0.01厘泊至约150厘泊或约0.01厘泊至约100厘泊。

[0159] 在一些实施方案中,第一/第二相溶液包含聚合物(例如,聚合物溶液)。在某些实施方案中,聚合物是聚乙二醇(PEG)。在各种实施方案中,PEG可以具有介于1000与100,000之间的分子量。在某些实施方案中,PEG包括PEG-4600、PEG-8000或PEG-20,000。在某些实施方案中,聚合物是聚丙二醇(PPG)。在各种实施方案中,PPG可以具有介于100与10,000之间的分子量。在某些实施方案中,PPG包括PPG 425。在某些实施方案中,聚合物是葡聚糖。在各种实施方案中,葡聚糖可以具有介于1000与1,000,000之间的分子量。在某些实施方案中,葡聚糖包括葡聚糖6000、葡聚糖9000、葡聚糖-35,000或葡聚糖-200,000。

[0160] 在一些实施方案中,聚合物溶液包括含约0.01%w/w聚合物、或约0.05%w/w聚合物、或约0.1%w/w聚合物、或约0.15%w/w聚合物、或约0.2%w/w聚合物、或约0.25%w/w聚合物、或约0.3%w/w聚合物、或约0.35%w/w聚合物、或约0.4%w/w聚合物、或约0.45%w/w聚合物、或约0.5%w/w聚合物、或约0.55%w/w聚合物、或约0.6%w/w聚合物、或约0.65%w/w聚合物、或约0.7%w/w聚合物、或约0.75%w/w聚合物、或约0.8%w/w聚合物、或约0.85%w/w聚合物、或约0.9%w/w聚合物、或约0.95%w/w聚合物、或约1%w/w聚合物的聚合物溶液。在一些实施方案中,聚合物溶液包括含约1%w/w聚合物、或约2%w/w聚合物、或约3%w/w聚合物、或约4%w/w聚合物、或约5%w/w聚合物、或约6%w/w聚合物、或约7%w/w聚合物、或约8%w/w聚合物、或约9%w/w聚合物、或约10%w/w聚合物、或约11%w/w聚合物、或约12%w/w聚合物、或约13%w/w聚合物、或约14%w/w聚合物、或约15%w/w聚合物、或约16%w/w聚合物、或约17%w/w聚合物、或约18%w/w聚合物、或约19%w/w聚合物、或约20%w/w聚合物、或约21%w/w聚合物、或约22%w/w聚合物、或约23%w/w聚合物、或约24%w/w聚合物、或约25%w/w聚合物、或约26%w/w聚合物、或约27%w/w聚合物、或约28%w/w聚合物、或约29%w/w聚合物、或约30%w/w聚合物、或约31%w/w聚合物、或约32%w/w聚合物、或约33%w/w聚合物、或约34%w/w聚合物、或约35%w/w聚合物、或约36%w/w聚合物、或约37%w/w聚合物、或约38%w/w聚合物、或约39%w/w聚合物、或约40%w/w聚合物、或约41%w/w聚合物、或约42%w/w聚合物、或约43%w/w聚合物、或约44%w/w聚合物、或约45%w/w聚合物、或约46%w/w聚合物、或约47%w/w聚合物、或约48%w/w聚合物、或约49%w/w聚合物和/或约50%w/w聚合物的聚合物溶液。在一些实施方案中,聚合物溶液包括含约10%w/w聚合物、或约20%w/w聚合物、或约30%w/w聚合物、或约40%w/w聚合物、或约50%w/w聚合物、或约60%w/w聚合物、或约70%w/w聚合物、或约80%w/w聚合物、或约90%w/w聚合物的聚合物溶液。在一些实施方案中,聚合物溶液包括含约10%w/w至约80%w/w聚合物的聚合物溶液。在一些实施方案中,聚合物溶液包括含约10%w/w至约25%w/w聚合物的聚合物溶液。

[0161] 在一些实施方案中,第一和/或第二相溶液包含盐并且由此形成盐溶液。在一些实施方案中,靶分析物(例如,细菌、真菌、病毒等)和/或探针-分析物复合物分配到盐溶液中。在某些实施方案中,盐溶液包含亲液盐(kosmotropic salt)。在某些实施方案中,盐溶液包含离液盐(chaotropic salt)。在某些实施方案中,盐包括以下一者或多者:镁盐、锂盐、钠盐、钾盐、铯盐、锌盐以及铝盐。在某些实施方案中,盐包括溴化物盐、碘化物盐、氟化物盐、碳酸盐、硫酸盐、柠檬酸盐、羧酸盐、硼酸盐或磷酸盐。在某些实施方案中,盐是磷酸钾。在一

些实施方案中,盐是硫酸铵。

[0162] 在一些实施方案中,盐溶液包括包含约0.01%w/w盐、或约0.05%w/w盐、约0.1%w/w盐、或约0.15%w/w盐、或约0.2%w/w盐、或约0.25%w/w盐、或约0.3%w/w盐、或约0.35%w/w盐、或约0.4%w/w盐、或约0.45%w/w盐、或约0.5%w/w盐、或约0.55%w/w盐、或约0.6%w/w盐、或约0.65%w/w盐、或约0.7%w/w盐、或约0.75%w/w盐、或约0.8%w/w盐、或约0.85%w/w盐、或约0.9%w/w盐、或约0.95%w/w盐、或约1%w/w盐的盐溶液。在一些实施方案中,盐溶液包括含约1%w/w盐、或约2%w/w盐、或约3%w/w盐、或约4%w/w盐、或约5%w/w盐、或约6%w/w盐、或约7%w/w盐、或约8%w/w盐、或约9%w/w盐、或约10%w/w盐、或约11%w/w盐、或约12%w/w盐、或约13%w/w盐、或约14%w/w盐、或约15%w/w盐、或约16%w/w盐、或约17%w/w盐、或约18%w/w盐、或约19%w/w盐、或约20%w/w盐、或约21%w/w盐、或约22%w/w盐、或约23%w/w盐、或约24%w/w盐、或约25%w/w盐、或约26%w/w盐、或约27%w/w盐、或约28%w/w盐、或约29%w/w盐、或约30%w/w盐、或约31%w/w盐、或约32%w/w盐、或约33%w/w盐、或约34%w/w盐、或约35%w/w盐、或约36%w/w盐、或约37%w/w盐、或约38%w/w盐、或约39%w/w盐、或约40%w/w盐、或约41%w/w盐、或约42%w/w盐、或约43%w/w盐、或约44%w/w盐、或约45%w/w盐、或约46%w/w盐、或约47%w/w盐、或约48%w/w盐、或约49%w/w盐和/或约50%w/w盐的盐溶液。在一些实施方案中,盐溶液包括含约0.1%w/w至约10%盐的盐溶液。在一些实施方案中,盐溶液含约1%w/w至约10%盐。

[0163] 在一些实施方案中,第一/第二相溶液包含与水不混溶的溶剂。在一些实施方案中,溶剂包括非极性有机溶剂。在一些实施方案中,溶剂包括油。在一些实施方案中,溶剂包括戊烷、环戊烷、苯、1,4-二恶烷、乙醚、二氯甲烷、氯仿、甲苯或己烷。

[0164] 在一些实施方案中,第一相溶液包括胶束溶液并且第二相溶液包含聚合物。在一些实施方案中,第二相溶液包括胶束溶液并且第一相溶液包含聚合物。在一些实施方案中,第一相溶液包括胶束溶液并且第二相溶液包含盐。在一些实施方案中,第二相溶液包括胶束溶液并且第一相溶液包含盐。在一些实施方案中,胶束溶液是Triton-X溶液。在一些实施方案中,第一相溶液包含第一聚合物并且第二相溶液包含第二聚合物。在一些实施方案中,第一/第二聚合物包括聚乙二醇和/或葡聚糖。在一些实施方案中,第一相溶液包含聚合物并且第二相溶液包含盐。在一些实施方案中,第二相溶液包含聚合物并且第一相溶液包含盐。在一些实施方案中,第一相溶液包含聚乙二醇并且第二相溶液包含磷酸钾。在一些实施方案中,第二相溶液包含聚乙二醇并且第一相溶液包含磷酸钾。在一些实施方案中,第一相溶液包含盐并且第二相溶液包含盐。在一些实施方案中,第一相溶液包含亲液盐并且第二相溶液包含离液盐。在一些实施方案中,第二相溶液包含亲液盐并且第一相溶液包含离液盐。

[0165] 在一些实施方案中,第一相溶液包含表1的组分1并且第二相溶液包含表1的组分2。在一些实施方案中,第二相溶液包含表1的组分1并且第二相溶液包含表1的组分2。

[0166] 在一些实施方案中,表1的组分悬浮或溶解在缓冲液中。在一些实施方案中,表1的组分悬浮/溶解在与从中获得样本的生物系统相容的缓冲液中。在一些实施方案中,表1的组分悬浮/溶解在生理盐水溶液中。在一些实施方案中,表1的组分悬浮/溶解在PBS中。在一些实施方案中,表1的组分悬浮/溶解在水中。

[0167] 表1.说明性水性两相提取/浓缩体系。

组分 1	组分 2
聚合物/聚合物体系	
聚乙二醇	葡聚糖 聚蔗糖 聚乙烯吡咯烷酮 聚乙烯醇 羟丙基淀粉
聚丙二醇	葡聚糖 羟丙基葡聚糖 聚乙烯吡咯烷酮
聚乙烯醇	葡聚糖 羟丙基葡聚糖
[0168] 聚乙烯吡咯烷酮	葡聚糖 麦芽糖糊精
甲基纤维素	葡聚糖 羟丙基葡聚糖
乙基羟乙基纤维素	葡聚糖
聚合物/盐体系	
聚乙二醇	磷酸钾 硫酸钠 硫酸镁 硫酸铵 柠檬酸钠
丙二醇(PPG)	磷酸钾
甲氧基聚乙二醇	磷酸钾
聚乙烯吡咯烷酮	磷酸钾

[0169] 如在实施例中所示,在某些实施方案中,ATPS包括聚合物/盐ATPS。已发现,包括聚乙二醇和盐或聚丙二醇和盐的ATPS可提供快速、灵敏而准确的分析物检测/定量。

[0170] 在一些实施方案中,本文描述的装置(例如,LFA或流通测定装置)还可以包括收集器,所述收集器被配置成与ATPS接触地放置,其中靶分析物在收集器与第一相溶液和/或第二相溶液的界面处进行分配。在一些实施方案中,收集器包含某种材料,所述材料为塑料、介孔材料、硅石、聚丙烯、磁体、磁性颗粒、顺磁性颗粒、具有孔的材料、具有凹槽的材料和/或其任何组合。在一些实施方案中,收集器包含聚丙烯。在一些实施方案中,收集器被优化来增加靶分析物收集。在一些实施方案中,收集器包括用于使表面积最大化的孔。在一些实施方案中,孔的宽度为约1 $\mu$ m、约5 $\mu$ m、约10 $\mu$ m、约15 $\mu$ m、约20 $\mu$ m、约25 $\mu$ m、约30 $\mu$ m、约35 $\mu$ m、约40 $\mu$ m、约45 $\mu$ m、约50 $\mu$ m、约55 $\mu$ m、约60 $\mu$ m、约65 $\mu$ m、约70 $\mu$ m、约75 $\mu$ m、约80 $\mu$ m、约85 $\mu$ m、约90 $\mu$ m、约95 $\mu$ m或约100 $\mu$ m。在一些实施方案中,孔的宽度为约100 $\mu$ m、约200 $\mu$ m、约300 $\mu$ m、约400 $\mu$ m、约500 $\mu$ m、约600 $\mu$ m、约700 $\mu$ m、约800 $\mu$ m、约900 $\mu$ m或约1mm。在一些实施方案中,孔的深度为约1 $\mu$ m、约5 $\mu$ m、约10 $\mu$ m、约15 $\mu$ m、约20 $\mu$ m、约25 $\mu$ m、约30 $\mu$ m、约35 $\mu$ m、约40 $\mu$ m、约45 $\mu$ m、约50 $\mu$ m、约55 $\mu$ m、约60 $\mu$ m、约65 $\mu$ m、约70 $\mu$ m、约75 $\mu$ m、约80 $\mu$ m、约85 $\mu$ m、约90 $\mu$ m、约95 $\mu$ m或约100 $\mu$ m。在一些实施方案中,孔的深度为约100 $\mu$ m、约200 $\mu$ m、约300 $\mu$ m、约400 $\mu$ m、约500 $\mu$ m、约600 $\mu$ m、约700 $\mu$ m、约800 $\mu$ m、

约900 $\mu$ m或约1mm。

[0171] LFA或流通(点)测定装置中的脱水的ATPS。

[0172] 在一些实施方案中,ATPS或其组分在包括LFA的多孔基质的至少第一部分上和/或者在流通测定装置的浓缩部件中脱水。在一些实施方案中,将样本施加到所述装置会使ATPS水合,从而将ATPS或其组分转化成流体相。脱水可以使所述装置更具用户友好性,因为用户仅需将样本(例如,唾液、血液、尿液、阴道液、精液、痰液、脑脊液、淋巴液或类似流体)添加到所述装置。在一些实施方案中,为了检测靶分析物的存在/不存在或为了量化分析物,用户只需要将样本的溶液施加到条带。在一些实施方案中,样本的溶液流过LFA或流通装置,并且ATPS被再溶解,从而触发LFA或流通装置内的相分离以及靶分析物的后续浓缩。

[0173] 在一些实施方案中,给定ATPS的所有必要组分被混合来形成混合溶液,施加到包括所述装置(例如,LFA或流通(点)测定)的纸,并且接着脱水。当样本溶液添加到脱水的纸时,ATPS组分将在样本流动时再水合,从而产生相分离。在含有浓缩的分析物的相不太粘的一些ATPS中,所述相会流动得更快并且浓缩分析物会出现于前导流体中并且会抵达LFA或流通测定的检测区来开始检测。另外,脱水的ATPS组分区段长度(或厚度)和浓度可以针对不同应用加以调整。

[0174] 在一些实施方案中,ATPS的两种(所有)组分都在LFA上或在流通测定中(例如,在分离部件中)脱水。在一些实施方案中,第一ATPS组分在LFA上(或在其中)或在流通测定中脱水。在一些实施方案中,第二ATPS组分在LFA或流通测定上或在其中脱水。在一些实施方案中,第一相溶液组分和/或第一ATPS组分在LFA的第一部分上或在流通测定的第一层(分离部件)中脱水。在一些实施方案中,第二相溶液组分和/或第二ATPS组分在LFA的第二部分上或在流通测定的第二层(分离部件)中脱水。在一些实施方案中,第一部分和第二部分是相同的。在一些实施方案中,第一部分和第二部分是不同的。作为非限制性实例,在PEG-盐ATPS中,PEG和盐溶液可以单独脱水到不同的纸部分或区段中(参见例如,以下申请的图16:于2015年3月6日提交的共同未决的PCT申请号:PCT/US2015/019297,所述申请出于其中描述的LFA配置的目的以引用的方式并入本文)或包括例如,流通测定的分离部件的单独的层中(参见例如,图4)。在一些实施方案中,使第一/第二相溶液和/或ATPS组分在LFA的不同部分上或在流通测定的不同层中脱水提供了第一/第二相溶液组分或ATPS组分的更均一的浓度。在一些实施方案中,使第一/第二相溶液组分和/或ATPS组分在不同部分上脱水允许第一相溶液或ATPS组分在水合之后在第一方向上流动并且允许第二相溶液和/或ATPS组分在水合之后在第二方向上流动,其中第一方向和第二方向是不同的。在一些实施方案中,靶分析物在第一方向,而不是第二方向上浓缩。在一些实施方案中,靶分析物在第二方向,而不是第一方向上浓缩。在一些实施方案中,使第一/第二相组分和/或ATPS组分在不同部分上脱水允许靶分析物在第一/第二方向上流动,而无需使样本在第一/第二方向上流动。在一些实施方案中,使第一/第二相组分和/或ATPS组分在不同部分上脱水允许靶分析物流动得更快,从而使得检测更迅速。在一些实施方案中,使第一/第二相组分和/或ATPS组分在不同部分上脱水可实现提高的结果可靠性。在一些实施方案中,使第一/第二相组分和/或ATPS组分在不同部分上脱水可防止第一/第二相溶液组分和/或ATPS组分(例如,PEG盐ATPS)的聚集。在一些实施方案中,第一/第二相组分和/或ATPS组分在多个区段中脱水。在一些实施

方案中,第一/第二相组分和/或ATPS组分在多个区段中脱水,其中第一/第二相组分和/或ATPS组分构成盐溶液。在一些实施方案中,第一/第二相组分和/或ATPS组分在多个区段中脱水,其中第一/第二相组分和/或ATPS组分不包括聚合物(例如,PEG)。在一些实施方案中,脱水的PEG不定位在检测区附近,因为富含PEG的相会减缓检测膜内的流动。在一些实施方案中,LFA条或流通测定在检测区附近可以包括空白间隔区,所述空白间隔区不包含PEG或盐。

[0175] 在一些实施方案中,探针(例如,分析物结合部分和相关联的检测试剂/材料)提供在探针缓冲液中。在一些实施方案中,探针缓冲液在LFA上或在流通测定中脱水。

[0176] 在一些实施方案中,与其中ATPS组分以液体形式添加的装置相比较,ATPS组分的脱水提高了检测的极限。在一些实施方案中,添加液体形式的ATPS组分会稀释来自受试者的样本溶液。在一些实施方案中,ATPS组分的脱水允许在流动期间产生不同的第一相溶液和/或不同的第二相溶液,从而在即将抵达测试线 and 对照线或流通测定的检测部件的前导流体的前面将靶分析物或探针-分析物复合物浓缩成小体积。在一些实施方案中,在前导流体的前面浓缩靶分析物和/或探针-分析物复合物会减少检测所需的时间周期。

[0177] 探针

[0178] 在某些实施方案中,本文描述的系统和/或装置和/或本文描述的方法利用探针,其中探针包括结合靶分析物来形成探针-分析物复合物的结合部分。

[0179] 在一些实施方案中,靶分析物单独优先分配到第一相溶液或第二相溶液或者第一相溶液和第二相溶液的界面中。在一些实施方案中,靶分析物单独极端地分配到第一相溶液或第二相溶液或者第一相溶液和第二相溶液的界面中。

[0180] 在一些实施方案中,靶分析物并不单独优先分配到第一相溶液或第二相溶液或者第一相溶液和第二相溶液的界面中。在一些实施方案中,靶分析物并不单独极端地分配到第一相溶液或第二相溶液或者第一相溶液和第二相溶液的界面中。

[0181] 在一些实施方案中,探针-分析物复合物优先分配到第一相溶液或第二相溶液或者第一相溶液和第二相溶液的界面中,从而使(探针-分析物复合物的)靶分析物优先分配到第一相溶液或第二相溶液或者第一相溶液和第二相溶液的界面中。

[0182] 在一些实施方案中,探针-分析物复合物极端地分配到第一相溶液或第二相溶液或者第一相溶液和第二相溶液的界面中,从而使(探针-分析物复合物的)靶分析物极端地分配到第一相溶液或第二相溶液或者第一相溶液和第二相溶液的界面中。

[0183] 在一些实施方案中,短语“优先分配”在相对于将靶分析物(或探针-分析物复合物)分配到ATPS的第一/第二相溶液使用时指示更大量的靶分析物变得安置于ATPS的优选相溶液中而非另一相溶液中。

[0184] 在一些实施方案中,短语“极端地分配”在相对于将靶分析物(或探针-分析物复合物)分配到ATPS的第一/第二相溶液使用时指示约90%或更多的靶分析物变得安置于ATPS的优选相溶液中而非另一相溶液中。

[0185] 在一些实施方案中,更大量的靶分析物分配到第一相溶液中。在一些实施方案中,大于约50%、或大于约55%、或大于约60%、或大于约65%、或大于约70%、或大于约75%、或大于约80%、或大于约85%、或大于约90%、或大于约95%、或大于约98%、或大于约99%的靶分析物分配到第一相溶液中。在一些实施方案中,大于约99%、或大于约99.1%、或大

于约99.2%、或大于约99.3%、或大于约99.4%、或大于约99.5%、或大于约99.6%、或大于约99.7%、或大于约99.8%、或大于约99.9%的靶分析物分配到第一相溶液中。

[0186] 在一些实施方案中,更大量的分析物分配到第二相溶液中。在一些实施方案中,大于约50%、或大于约55%、或大于约60%、或大于约65%、或大于约70%、或大于约75%、或大于约80%、或大于约85%、或大于约90%、或大于约95%、或大于约98%、或大于约99%的靶分析物分配到第二相溶液中。在一些实施方案中,大于约99%、或大于约99.1%、或大于约99.2%、或大于约99.3%、或大于约99.4%、或大于约99.5%、或大于约99.6%、或大于约99.7%、或大于约99.8%、或大于约99.9%的靶分析物分配到第二相溶液中。

[0187] 在一些实施方案中,更大量的分析物分配到第一相溶液和第二相溶液的界面中。在一些实施方案中,大于约50%、或大于约55%、或大于约60%、或大于约65%、或大于约70%、或大于约75%、或大于约80%、或大于约85%、或大于约90%、或大于约95%、或大于约98%、或大于约99%的靶分析物分配到界面中。在一些实施方案中,大于约99%、或大于约99.1%、或大于约99.2%、或大于约99.3%、或大于约99.4%、或大于约99.5%、或大于约99.6%、或大于约99.7%、或大于约99.8%、或大于约99.9%的靶分析物分配到界面中。

[0188] 在一些实施方案中,所述装置包括或被配置成利用和/或在所述装置上进行的测定利用1种探针。在一些实施方案中,所述装置包括或被配置成利用和/或在所述装置上进行的测定利用至少两种不同探针,或至少3种不同探针,或至少4种不同探针,或至少5种不同探针,或至少7种不同探针,或至少10种不同探针,或至少15种不同探针,或至少20种不同探针。

[0189] 在一些实施方案中,探针包括以下一者或多者:合成聚合物、金属、矿物质、玻璃、石英、陶瓷、生物聚合物、塑料和/或其组合。在一些实施方案中,探针包括聚合物,所述聚合物包括聚乙烯、聚丙烯、尼龙(DELRIN®)、聚四氟乙烯(TEFLON®)、葡聚糖以及聚氯乙烯。在一些实施方案中,聚乙烯是聚乙二醇。在一些实施方案中,聚丙烯是聚丙二醇。在一些实施方案中,探针包括生物聚合物,所述生物聚合物包括以下一者或多者:胶原蛋白、纤维素和/或甲壳素。在一些实施方案中,探针包括金属,所述金属包括以下一者或多者:金、银、铂、钛、不锈钢、铝或其合金。在一些实施方案中,探针包括纳米颗粒(例如,金纳米颗粒、银纳米颗粒等)。

[0190] 在一些实施方案中,探针还包括涂层。在一些实施方案中,涂层包括聚乙二醇或聚丙二醇。在一些实施方案中,涂层包括聚丙烯。在一些实施方案中,涂层包括聚丙二醇。在一些实施方案中,涂层包括葡聚糖。在一些实施方案中,涂层包括亲水性蛋白质。在一些实施方案中,涂层包括血清白蛋白。在一些实施方案中,涂层对第一相溶液或第二相溶液具有亲和力。

[0191] 在一些实施方案中,样本中的靶分析物的量非常低,以至于分析物需要充分浓缩来经由LFA或流通测定实现检测。在某些实施方案中,充分浓缩在界面处实现,因为分析物浓缩的程度取决于其中分配有分析物或有分析物浓缩的相的体积,并且界面处的“体积”相对于体相非常小。

[0192] 在一些实施方案中,探针优先(或极端地)分配到界面以便于朝向界面驱动靶分析物。在一些实施方案中,探针由于其表面化学性质而优先(或极端地)分配到界面,其中表面化学性质被优化来将探针驱动到界面。作为非限制性实例,为了将探针-分析物复合物驱动

到聚合物-盐ATPS系统,诸如聚乙二醇-磷酸钾(PEG/盐)系统的界面,将探针缀合到PEG(或将其PEG化)以促进与富含PEG的相的PEG-PEG相互作用,和/或用亲水性蛋白质装饰来促进与PEG贫乏的相的亲水性相互作用。使用这种用特异性抗体或能够结合到靶标的其他分子装饰的优化探针,靶分析物被捕获和收集在界面处。由于界面的体积非常小,因此分析物被高度浓缩和施加到后续LFA或流通测定的检测区域。

[0193] 在一些实施方案中,制备能够分配到PEG/盐ATPS的界面的金纳米探针(GNP),并且优化操作条件以在GNP/分析物的非常高的回收率下实现快速的相分离时间。

[0194] 在一些实施方案中,探针-分析物复合物分配到ATPS中的固液界面。在一些实施方案中,固体是容纳ATPS的腔室的壁。在一些实施方案中,固体是测定装置的收集器。在一些实施方案中,固体包含固体聚合物。在一些实施方案中,固体聚合物包括聚乙烯、纤维素、甲壳素、尼龙、聚甲醛(DELRIN®)、聚四氟乙烯(TEFLON®)、聚氯乙烯或其组合。在一些实施方案中,固体聚合物包括聚丙烯。在一些实施方案中,探针-分析物复合物粘住固体并且高度浓缩,因为所述探针-分析物复合物在固液界面处以小体积存在,并且未由体相的体积稀释。在一些实施方案中,体相在不破坏浓缩的分析物的情况下进行移除,并且通过洗涤进行收集,随后施加到LFA或流通测定装置。在一些实施方案中,这种方法显著地浓缩分析物并且允许在不使用外力(例如,磁体)的情况下进行收集。可选地,探针包括磁性材料,并且这种方法与磁体一起使用。在一些实施方案中,这些探针被修饰来在界面处浓缩用于极端分析物浓缩。如上所述,这种方法可以通过使用磁体提供未通过ATPS特异性地浓缩的靶分析物与其他污染物的额外分离。在一些实施方案中,ATPS浓缩使得磁性探针能够更有效地工作,因为磁性探针首先会在特定位置(界面)处浓缩成非常小的体积。因此,将需要较小磁体或较弱磁场来收集浓缩的分析物。在一些实施方案中,ATPS界面浓缩与磁性探针的组合允许开发与当前现有技术相比更有效、快速且更廉价的装置。

#### [0195] 结合部分

[0196] 在一些实施方案中,结合部分是结合靶分析物(例如,细菌、真菌、病毒等)的分子。在一些实施方案中,结合部分是特异地结合靶分析物的分子。在一些实施方案中,“特异地结合”指示分子优先结合到靶分析物或相较于其他分子以更大的亲和力结合到靶分析物。作为非限制性实例,抗体将选择性结合到针对其产生所述抗体的抗原。另外,作为非限制性实例,DNA分子将在严格条件下结合到基本上互补的序列而不结合到无关序列。在一些实施方案中,“特异性结合”可以指代对分子的异质群体(例如,蛋白质和其他生物制剂)中靶分析物的存在起决定作用的结合反应。在一些实施方案中,结合部分结合到其特定靶分析物并且不会大量结合到存在于样本中的其他分子。

[0197] 在一些实施方案中,结合部分包括抗体、凝集素、蛋白质、糖蛋白、核酸、单体核酸、聚合核酸、适体、适体酶、小分子、聚合物、凝集素、碳水化合物、多糖、糖、脂质或其任何组合。在一些实施方案中,结合部分是能够与靶分析物形成结合对的分子。

[0198] 在一些实施方案中,结合部分是抗体或抗体片段。抗体片段包括但不限于:Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、Fv'、Fd、Fd'、scFv、hsFv片段、骆驼科抗体、双功能抗体(diabody)以及下文描述的其他片段。

[0199] 在一些实施方案中,“抗体”指代由基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码的一种或多种多肽组成的蛋白质。如本文所使用,除非另外指明,否则术语“抗体”



和“免疫球蛋白”可互换使用。在一些实施方案中,免疫球蛋白基因是免疫球蛋白恒定区基因。在一些实施方案中,免疫球蛋白基因作为非限制性实例是 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 或 $\mu$ 恒定区基因。在一些实施方案中,免疫球蛋白基因是免疫球蛋白可变区基因。在一些实施方案中,免疫球蛋白基因包括轻链。在一些实施方案中,轻链包括 $\kappa$ 轻链、 $\lambda$ 轻链或其组合。在一些实施方案中,免疫球蛋白基因包括重链。在一些实施方案中,重链被分类为 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 或 $\epsilon$ ,它们反过来分别对应于免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0200] 在一些实施方案中,免疫球蛋白包括四聚体。在一些实施方案中,四聚体由相同的两对多肽链组成,各对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。在一些实施方案中,每条链的N端限定主要负责抗原鉴别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链( $V_L$ )和可变重链( $V_H$ )分别指代这些轻链和重链。

[0201] 在一些实施方案中,抗体包括完整的免疫球蛋白。在一些实施方案中,抗体包括经由各种肽酶消化产生的多种充分表征的片段。在一些实施方案中,肽酶是胃蛋白酶。在一些实施方案中,胃蛋白酶消化铰链区中的二硫键来产生 $F(ab)'_2$ ,即Fab的二聚体,它本身是通过二硫键连接到 $V_H$ - $C_H1$ 的轻链。在一些实施方案中, $F(ab)'_2$ 在温和条件下还原来打破铰链区中的二硫键,从而将 $(Fab')_2$ 二聚体转化为Fab'单体。在一些实施方案中,Fab'单体基本上由具有铰链区的一部分的Fab组成。在一些实施方案中,Fab'片段以化学方式或通过利用重组DNA方法从头合成。在一些实施方案中,抗体片段通过对整个抗体的修饰来产生。在一些实施方案中,抗体片段使用重组DNA方法从头合成。在一些实施方案中,抗体包括单链抗体(作为单一多肽链存在的抗体)。在一些实施方案中,抗体包括单链Fv抗体(sFv或scFv),其中可变重链和可变轻链(直接或经由肽接头)连接在一起来形成连续多肽。在一些实施方案中,抗体包括单链Fv抗体。在一些实施方案中,抗体包括共价连接的 $V_H$ - $V_L$ 异二聚体,其可以由包括直接连接或经由肽编码接头连接的 $V_H$ -和 $V_L$ -编码序列的核酸表达。在一些实施方案中, $V_H$ 和 $V_L$ 作为单一多肽链连接到彼此,并且 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域非共价地缔合。在一些实施方案中,Fab在噬菌体上展示,其中一条链(重链或轻链)融合到g3衣壳蛋白并且互补链作为可溶性分子输出到周质。在一些实施方案中,两条链可以在相同或不同的复制子上编码。在一些实施方案中,每个Fab分子中的两条抗体链翻译后组装并且二聚体经由一条链到例如g3p的连接而结合到噬菌体颗粒中。在一些实施方案中,抗体已在噬菌体或酵母上展示。

[0202] 在一些实施方案中,抗体片段经由完整抗体的蛋白水解消化获得。在一些实施方案中,抗体片段直接由重组宿主细胞产生。在一些实施方案中,Fab、Fv或ScFv抗体片段在大肠杆菌中表达并且从其分泌,由此允许便利地产生大量这些片段。在一些实施方案中,抗体片段从抗体噬菌体文库分离。在一些实施方案中,Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌中回收并且化学地偶联来形成 $F(ab')_2$ 片段。在一些实施方案中, $F(ab')_2$ 片段直接从重组宿主细胞培养物中分离。在一些实施方案中,Fab和 $F(ab')_2$ 片段具有增加的体内半衰期。在一些实施方案中,Fab和 $F(ab')_2$ 片段包括补救受体结合表位残基。用于产生抗体片段的其他技术对于熟练的从业人员将是显而易见的。在某些实施方案中,选择的抗体是单链Fv片段。在一些实施方案中,Fv或sFv具有缺乏恒定区的完整的组合位点;因此,它们适合于体内使用期间减少的非特异性结合。在一些实施方案中,抗体片段是“线性抗体”。在一些实施方案中,线性抗体片段是单特异性的。在一些实施方案中,线性抗体片段是双特异性的。

[0203] 在一些实施方案中,抗体片段是双功能抗体。在一些实施方案中,双功能抗体是具

有两个抗原结合位点的抗体片段,所述抗体片段可以是二价或双特异性的。

[0204] 在一些实施方案中,抗体片段是单结构域抗体。在一些实施方案中,单结构域抗体是包括抗体的重链可变结构域的全部或一部分或者轻链可变结构域的全部或一部分的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。

[0205] 在某些实施方案中,结合部分包括适体。在一些实施方案中,适体包括由核酸形成的抗体类似物。在一些实施方案中,适体不需要在诸如纳米CHEM-FET的一些测定中检测标记的结合,其中重构会直接地进行检测。在一些实施方案中,结合部分包括适体酶。在一些实施方案中,适体酶包括由核酸形成的酶类似物。在一些实施方案中,适体酶仅在存在第二特异性分析物的情况下用于改变构型来捕获特异性分子。

[0206] 在一些实施方案中,探针包括可检测标记。可检测标记包括可通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学方式检测的任何组合物。说明性的有用标记包括但不限于:荧光纳米颗粒(例如,量子点(Qdot));金属纳米颗粒,包括但不限于:金纳米颗粒、银纳米颗粒、铂纳米颗粒;荧光染料(例如,荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白等等,参见例如,Molecular Probes,Eugene,Oregon,USA);放射性标记(例如, $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{203}\text{Pb}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64\text{I}}\text{Cu}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{77}\text{As}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{169}\text{Er}$ 、 $^{121}\text{Sn}$ 、 $^{127}\text{Te}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{165}\text{Dy}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{151}\text{Pm}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{157}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{172}\text{Tm}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 等等);酶(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和ELISA中常用的其他酶);各种比色标记;磁性或顺磁性标记(例如,磁性和/或顺磁性纳米颗粒);自旋标记;不透射线标记等等。

[0207] 可选地或另外,探针可以结合到包括可检测标记的另一种颗粒。在一些实施方案中,探针在检测区(例如,测试线、对照线、测试区域、对照区域)处提供可检测信号。在一些实施方案中,可检测标记/性质包括以下一者或多者:比色标记/性质、荧光标记/性质、酶标记/性质、显色标记/性质和/或放射性标记/性质。在一些实施方案中,探针是金纳米颗粒并且可检测性质是颜色。在一些实施方案中,颜色是橙色、红色或紫色。

#### [0208] 样本收集

[0209] 在各种实施方案中,将要使用本文描述的装置和方法测定的样本包括生物样本。说明性生物样本包括但不限于:生物流体,诸如血液或血液部分、淋巴液、脑脊液、精液、尿液、口腔液、阴道液等等;组织样本;斑块样本;阴道拭子样本;子宫颈内膜拭子样本;细胞样本;组织或器官活检物或抽取物;组织学标本等等。

[0210] 在生物样本包括组织的情况下,在某些实施方案中,可以将组织溶解、均质化和/或研磨,并任选地悬浮在样本溶液中。在生物样本包括生物流体的情况下,流体可以在测定之前直接测定或悬浮在样本溶液中。在某些实施方案中,样本溶液可以用于保存或稳定生物样本或其组分,和/或可以用于提取或浓缩生物样本或其组分。在某些实施方案中,样本溶液可以包括缓冲液,任选地含有防腐剂和/或酶(蛋白酶、核酸酶等)和/或表面活性剂和/或ATPS组分。

[0211] 在某些实施方案中,特别是在护理点实施方案中,样本可以立即施加到测定装置或在适度的时间间隔之后施加到所述测定装置。在某些实施方案中,样本可以递送到在其中进行测定的远距离测试设施。

[0212] 用于收集生物样本的方法和装置对于本领域技术人员来说是众所周知的,例如,

如下所示：

[0213] 口腔液收集

[0214] 口腔液可以通过流口水到空瓶中，之后将流体转移到测定的浓缩部件来收集。

[0215] 口腔液还可以使用拭子和/或收集垫来收集。例如，可以将拭子或收集垫放入用户的嘴巴中以吸收口腔液。拭子或收集垫可以含有化合物，诸如薄荷提取物或酸提取物，以刺激口腔液产生。拭子或收集垫还可以用作过滤器来去除可能影响下游浓缩和检测步骤的食物残渣、污染物或粘液。在某些实施方案中，可以提取拭子或收集垫中的口腔液并且将其与水性两相体系(ATPS)的组分混合来用于浓缩。从收集装置提取口腔液可以例如通过将物理压力施加到拭子/垫子以挤出流体，或通过毛细管作用而将流体引入到浓缩部件来实现。另一种配置对应于以下内容：ATPS组分在拭子或收集垫下游脱水，使得进一步的用户交互是不必要的。

[0216] 斑块收集

[0217] 斑块可以经由刷子、拭子或牙签在牙齿的表面、牙龈下面或在牙齿之间进行收集。在某些实施方案中，收集的斑块之后可以在缓冲液或ATPS溶液中混合来用于后续浓缩。

[0218] 尿液收集

[0219] 在各种实施方案中，尿液可以用收集杯获得。收集的尿液之后可以在ATPS溶液中混合来用于后续浓缩，或在ATPS组分在浓缩部件中脱水的情况下直接施加到所述装置上。对于插管的患者，尿液可以从导管或从导管接收袋获得。

[0220] 阴道/子宫颈内膜拭子

[0221] 阴道或宫颈表面上和/或阴道液中的靶分析物可以通过可商购的拭子来收集。收集的拭子可以放入缓冲液中以释放靶标，或放入ATPS溶液中以用于直接浓缩靶生物分子。

[0222] 血液收集

[0223] 血液可以通过针(刺血针)刺并经由注射器等等收集在毛细管中来收集。

[0224] 说明性分析物。

[0225] 虽然可以使用本文描述的测定装置和方法来检测和/或量化基本上任何分析物，但是在某些实施方案中，分析物是临床相关的分析物(例如，细菌、真菌、原生动物、变形虫、病毒等等)。

[0226] 临床相关的靶标对于本领域技术人员来说是众所周知的。

[0227] 阴道液中的临床上重要的细菌

[0228] 查找阴道液或组织样本中的阴道毛滴虫、细菌性阴道炎和放线菌感染，在不执行其他诊断性测试的情况下，子宫颈抹片检查可能被认为是治疗的指征。无症状感染的治疗可以预防选定患者的并发症。念珠菌可以是阴道内的共生菌，因此无症状患者可能不需要治疗。在带子宫环(IUD)的用户中检测到较高的阴道毛滴虫和念珠菌感染率表明IUD会增加阴道感染和相关并发症的风险。

[0229] 淋病是由有机体的奈瑟氏淋球菌引起的细菌感染并且是临床上重要的病原体。类似地，由沙眼衣原体引起的衣原体感染以及由梅毒螺旋体引起的梅毒也是重要的性传播疾病，它们的快速诊断是令人希望的。

[0230] 尿液中的临床上重要的细菌

[0231] 大肠杆菌和变形杆菌是在尿液中被发现时通常指示泌尿道感染的细菌性病原体。

[0232] 口腔中的临床上重要的细菌

[0233] 革兰氏阴性口腔厌氧菌往往与牙周病相关联,一些菌种与牙周病的关联比其他菌种更频繁。这种厌氧菌包括但不限于:普氏菌属(例如,中间普氏菌、变黑普氏菌、产黑普氏菌、真口普氏菌等等);以及卟啉单胞菌属(例如,牙龈卟啉单胞菌)。

[0234] 另外,变形链球菌已经牵涉到龋齿的形成。本公开的其他临床上重要的细菌包括但不限于:粘放线菌、干酪乳酸杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、嗜酸乳酸杆菌、牙龈二氧化碳嗜纤维菌、具核梭杆菌、或福赛斯拟杆菌。

[0235] 将认识到,这些病原体是说明性的而非限制性的。本领域技术人员将认识到,本文描述的测定装置和方法可以用于检测和/或量化众多其他分析物。

[0236] 工具箱。

[0237] 在某些实施方案中,工具箱被提供来使用本文描述的装置和/或方法的实践。在某些实施方案中,提供了用于检测和/或量化分析物的工具箱,其中工具箱包括含有如本文描述的测定装置的容器。在某些实施方案中,工具箱另外含有用于收集样本的收集装置。在某些实施方案中,收集装置包括用于收集口腔液的装置、用于收集血液的装置、尿液收集装置、用于收集阴道液或从阴道拭子或从子宫颈内膜拭子收集所述阴道液的装置、或用于收集环境样本的装置。

[0238] 在某些实施方案中,工具箱另外含有试剂,诸如缓冲液、溶剂、ATPS体系的组分、检测试剂等等。

[0239] 在某些实施方案中,工具箱另外含有用于使用本文提供的测定装置的说明材料提供方法(例如,规程)。通常典型的是,说明材料都是以书面形式提供,并且可以印刷在工具箱部件本身上(例如,在盒子即容器的盖子上或在封皮上),或可以作为插入/说明页面或小册子提供。虽然说明材料通常包括书面或印刷材料,但是所述说明材料并不限于此。能够储存这类说明并将其传达给最终用户的任何介质都是预期的。这类介质包括但不限于:电子存储介质(例如,磁盘、磁带、盒式磁带、芯片、闪存)、光学介质(例如,CD ROM)等等。这种介质可以包括提供这类说明材料的互联网网站的地址。

[0240] 实施例

[0241] 提供以下实施例来说明,而非限制所要求保护的发明。

[0242] 实施例1

[0243] 变形链球菌的检测

[0244] 目标

[0245] 我们将ATPS和LFA结合到用于检测变形链球菌(*S.mutans*)的单一基于纸的诊断装置中,所述变形链球菌是会导致龋齿(蛀牙)的优势菌。以前,我们能够使用胶束ATPS来实现变形链球菌的10浓缩并且将LFA的检测极限提高10倍。在这些研究中,我们检查了用于这个过程的其他系统。确切地说,我们研究了PPG/盐ATPS,它们的相在试管溶液中比胶束ATPS和聚乙二醇(PEG)/盐ATPS更快地分离。PPG/盐ATPS另外需要更少的盐来实现相分离,这为生物分子结合到探针并为探针结合在测试线上提供了更加合适的环境。

[0246] 方法和材料

[0247] 制备抗-变形链球菌DGNP

[0248] 首先使用1.5N NaOH将1mL涂布葡聚糖的金纳米颗粒(DGNP)溶液的pH调整到pH 9。

随后,将16 $\mu$ g小鼠单克隆变形链球菌抗体添加到金溶液并且在振荡器上混合30分钟。为了防止其他蛋白质非特异性结合到胶态金纳米颗粒的表面,将200 $\mu$ L 10%w/v牛血清白蛋白(BSA)溶液添加到混合物并且在振荡器上混合20分钟。为了去除游离、未结合的抗体,使混合物接着在4℃和9,000rpm下离心30分钟,之后使DGNP的球粒再悬浮于200 $\mu$ L 1%w/v BSA溶液中。将离心和再悬浮步骤再重复两次,并且在第三次离心之后,使DGNP的球粒再悬浮于pH为9.0的100 $\mu$ L 0.1M硼酸钠缓冲液中。

#### [0249] 使用LFA进行检测

[0250] 利用夹心测定格式的LFA测试条以类似于以下申请中描述的我们先前的研究的方式进行组装:于2015年3月6日提交的共同未决的PCT申请号:PCT/US2015/019297,所述申请出于本文描述的测定格式和试剂的目的以引用的方式并入本文。在这种格式下,固定的变形链球菌抗体构成测试线并且对一级抗体特异的固定的二级抗体构成对照线。

[0251] 为了验证利用LFA对变形链球菌的检测极限,将DGNP添加到样本溶液并且使其结合存在于样本中的变形链球菌。将含有一些唾液、DGNP和已知浓度的变形链球菌的样本悬浮液在试管中进行混合。将LFA测试条垂直地插入到每份样本溶液中,所述样本溶液经由毛细管作用向上朝向吸收垫芯吸穿过所述条。在10分钟之后在受控光照环境中拍摄测试条的图像。

#### [0252] 使用LFA与ATPS进行检测

[0253] 制备顶相与底相体积比为60:1的PPG/磷酸钾ATPS样本溶液,所述样本溶液包括已知浓度的变形链球菌。将ATPS样本溶液在室温下孵育10分钟以允许进行相分离。对含有浓缩的变形链球菌的底部PEG贫乏的相进行提取并且用抗-变形链球菌DGNP进行孵育。将LFA测试条垂直地插入到所得混合物中,并且在10分钟之后在受控光照环境中拍摄测试条的图像(图5)。

[0254] 我们使用新的ATPS成功浓缩了变形链球菌并且将浓缩系数从10倍大幅提高到60倍。相分离时间也从几小时(在含有胶束ATPS的试管溶液中)提高到仅10分钟(在含有PPG/盐ATPS的试管溶液中)。然后,我们证实这种增强可以应用于后续检测步骤并且显示出LFA的检测极限的60倍的改进(图5),达到 $1 \times 10^5$ 个细胞/mL。整个测定在20分钟内完成。

#### [0255] 实施例2

##### [0256] 检测斑块中的变形链球菌

##### [0257] 目标

[0258] 我们研究了检测斑块中的变形链球菌的可行性。

##### [0259] 方法和材料

[0260] 使用牙签从受试者提取斑块。然后将收集的菌斑溶解在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。将如上所述制备的LFA测试条施加到所得溶液。在10分钟之后在受控光照环境中拍摄测试条的图像。

##### [0261] 结果。

[0262] 图6示出了对来自4名受试者的斑块中的变形链球菌的检测。较高的测试线强度指示受试者中的较大的变形链球菌浓度。

[0263] 图7示出了对刷牙之前和之后的斑块中的变形链球菌的检测。结果表明刷牙能有效去除变形链球菌并且降低产生龋齿的风险。

[0264] 实施例3

[0265] 衣原体检测

[0266] 目标

[0267] 我们将ATPS和LFA整合到单一基于纸的诊断装置中,所述诊断装置可以用于检测患者尿液或患者拭子样本中的沙眼衣原体(*C.trachomatis*)。

[0268] 方法和材料

[0269] 制备抗-沙眼衣原体DGNP

[0270] 首先使用1.5N NaOH将1mL涂布葡聚糖的金纳米颗粒(DGNP)溶液的pH调整到pH 9。随后,将16μg小鼠单克隆沙眼衣原体抗体添加到胶态金悬浮液并且在振荡器上混合30分钟。为了防止其他蛋白质非特异性结合到胶态金纳米颗粒的表面,将200μL 10%w/v牛血清白蛋白(BSA)溶液添加到混合物并且在振荡器上混合20分钟。为了去除游离、未结合的抗体,使混合物接着在4℃和9,000rpm下离心30分钟,之后使DGNP的球粒再悬浮于200μL 1%w/v BSA溶液中。将离心和再悬浮步骤再重复两次,并且在第三次离心之后,使DGNP的球粒再悬浮于pH为9.0的100μL 0.1M硼酸钠缓冲液中。

[0271] 使用LFA进行检测

[0272] 利用夹心测定格式的LFA测试条以类似于我们先前的研究的方式进行组装。在这种格式下,固定的沙眼衣原体抗体构成测试线并且对一级沙眼衣原体抗体特异的固定的二级抗体构成对照线。

[0273] 为了验证利用LFA对沙眼衣原体的检测极限,将DGNP添加到样本溶液并且使其结合存在于样本中的沙眼衣原体。将含有DGNP的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的悬浮液以及含有已知浓度的沙眼衣原体的PBS的溶液在试管中进行混合。将LFA测试条垂直地插入到样本溶液中,所述样本溶液经由毛细管作用向上朝向吸收垫芯吸穿过所述条。在10分钟之后在受控光照环境中拍摄测试条的图像。

[0274] 使用LFA与ATPS进行检测

[0275] 制备顶相与底相体积比为9:1的PEG/磷酸钾ATPS样本溶液,所述样本溶液包括已知浓度的沙眼衣原体。将ATPS样本溶液在室温下孵育30分钟以允许进行相分离。对含有浓缩的沙眼衣原体的底部PEG贫乏的相进行提取并且用抗-沙眼衣原体DGNP进行孵育。将LFA测试条垂直地插入到所得混合物中。在10分钟之后在受控光照环境中拍摄测试条的图像。

[0276] 结果

[0277] 图8示出了单独使用LFA以及使用ATPS与LFA在PBS中对沙眼衣原体进行的检测。图9示出了我们的装置与经过FDA批准的可商购的衣原体LFA在从沙眼衣原体阳性患者收集的临床尿液样本中的性能的比较。我们的装置能够提供真阳性结果(存在测试线),而商业测试会给出假阴性结果(缺少测试线)。

[0278] 实施例4

[0279] 具有脱水的ATPS组分的说明性诊断装置.

[0280] 在一个说明性实施方案中,脱水的ATPS诊断装置(图11)包括两个主要部件:ATPS再水合和再溶解优化芯(ARROW)和标准LFA。在所示的实施方案中,ARROW由层叠在一起的5张玻璃纤维纸片组成。考虑到ATPS的功能是浓缩靶病原体,ARROW能够芯吸大量样本溶液是非常重要的。首先用BSA对每个薄片进行预处理以便于防止样本溶液流动期间沙眼衣原体

的非特异性结合。在预处理之后,在每个玻璃纤维片的上游部分将20 $\mu$ L 15% (w/w) 磷酸钾脱水,同时每个玻璃纤维片的下游部分将30 $\mu$ L 10% (w/w) PEG 8000脱水。重要的是在脱水的PEG与薄片的尖端之间留出空白区域以允许PEG贫乏的相的收集,所述PEG贫乏的相含有浓缩的病原体。每个薄片的下游尖端逐渐变细来形成一个点,这有助于液体适当地过渡到缀合垫中。

[0281] 将由含有比色指示剂的缀合垫组成的诊断装置的LFA部分连接到具有印刷的一级和二级抗体的硝化纤维素膜上,之后连接到吸收垫。LFA部分通过将缀合垫的小的上游部分垂直地装配到ARROW中已切割出的狭缝中来与ARROW对接。

[0282] 玻璃纤维纸的空白玻璃纤维区域的SEM图像(图11)示出了基于多孔纤维的基质结构。脱水的PEG和磷酸钾区域显示出类似的多孔结构(加入了网状连接),所述多孔结构被认为含有其大部分相应的ATPS组分。这些图像证实脱水过程不会使玻璃纤维纸的多孔结构显著变形,这对于样本流体的适当芯吸来说是至关重要的。

[0283] PEG和磷酸钾的再水合次序的重要性

[0284] 研究了PEG和磷酸钾再水合次序对纸内相分离行为的影响。为此,利用包括BSA-DGNP和亮蓝染料的悬浮液,这允许在悬浮液流过纸张时实现相分离过程的可视化。简而言之,BSA-DGNP分配到由勃垦地酒红/浅紫色指示的PEG贫乏的相中,而蓝色染料分配到由浅蓝色指示的富含PEG的相中。含有BSA-DGNP和蓝色染料两者的宏观混合域的区域由深蓝色/深紫色指示。在玻璃纤维纸制备期间,更改脱水的ATPS组分的位置,使得一种情况使脱水的磷酸钾定位于脱水的PEG的上游(表示为“盐 $\rightarrow$ PEG”),而另一种情况使脱水的PEG定位于脱水的磷酸钾的上游(表示为“PEG $\rightarrow$ 盐”)。

[0285] 从这些结果(图12),我们注意到两个有趣的实验结果。首先,前导PEG贫乏的流体在‘盐 $\rightarrow$ PEG’情况下相较于‘PEG $\rightarrow$ 盐’情况具有明显更深的勃垦地酒红颜色,从而表明‘盐 $\rightarrow$ PEG’情况在前导流体中含有更多BSA-DGNP,并且因此能更有效浓缩大的物质。其次,富含PEG的相即图12中由虚线表示的区域在‘盐 $\rightarrow$ PEG’情况下相较于‘PEG $\rightarrow$ 盐’情况下的富含PEG的相随时间的推移展现出明显更大的体积增长。这表明在‘盐 $\rightarrow$ PEG’情况下,新形成的PEG贫乏的域能够离开混合域区域并且更有效地穿过随后的富含PEG的相并收集到前导PEG贫乏的相中。这会导致富含PEG的相随着混合域区域的变小而变大。这种现象的一个可能原因是在富含PEG的相中形成了连接到前导PEG贫乏的相的PEG贫乏的通道。对多孔介质内多相流体流的研究发现,粘性较小的流体在使粘性较大的流体移位时会形成优选通道。

[0286] 使用整合的LFA和ARROW对沙眼衣原体进行的检测的改进的极限

[0287] 我们证实我们的ARROW设计能有效地浓缩沙眼衣原体样本悬浮液,从而带来LFA的检测的改进的极限。为此,在存在和不存在ARROW部件的情况下,我们使LFA测试条上流满不同初始浓度的沙眼衣原体的样本溶液。我们从LFA图(图13)的结果中看到,仅LFA系统在约15.8ng/ $\mu$ L沙眼衣原体处开始显示假阴性结果,而整合的LFA和ARROW系统在约1.58ng/ $\mu$ L沙眼衣原体处开始显示假阴性结果。这在视觉上证实了检测极限的10倍改进。

[0288] 我们还使用定制的MATLAB程序来对LFA图像上的测试线的像素对比度进行量化(图14)。这允许我们在数量上对检测极限的改进进行评定。对于任何给定浓度的沙眼衣原体,与仅LFA系统相比较,我们发现整合的ARROW和LFA系统的测试线强度明显增加。例如,在50ng/ $\mu$ L沙眼衣原体下,仅LFA情况具有 $8.3 \pm 1.7$ 的像素对比度强度,而整合的ARROW和LFA

具有 $37.6 \pm 0.6$ 的像素对比度强度。另外,我们还见证了我们图上结果的确认,其中在图中所示的检测极限下观察到了相同的测试线强度8.3 (单独的LFA为50ng/ $\mu$ L,而整合的ARROW和LFA为5ng/ $\mu$ L)。

[0289] 我们想要验证这些数量实际上是生理相关的。使用剩余的临床尿液样本,我们的基于尿液的LFA (本身) 灵敏度较差,这与我们通过对尿液中的样本进行QuickVue测试获得的结果一致。然而,当将基于尿液的LFA与ATPS整合时,我们证实了灵敏度的显著改进,辨别出有87.5% (14/16) CT+尿液样本呈阳性结果。(表2)。图15中示出了这种头对头比较的实例。

[0290] 表2. 在检测剩余临床尿液样本中的ct的过程中经过FDA批准的QuickVue、相诊断'仅LFA测试与相诊断' LFA+ATPS测试之间的性能比较研究的总结。所有样本通过核酸扩增测试 (NAAT) 都被确认为ct+。与冷冻样本相对比,纯样本是新鲜收集的样本。

样本	类型	NAAT	QuickVue	Phase 型 LFA	Phase 型 LFA + ATPS
1	纯	+	-	+	+
2	纯	+	-	-	+
3	纯	+	-	-	+
4	纯	+	-	-	+
5	纯	+	-	-	+
6	纯	+	-	-	+
7	冻结	+	-	-	+
8	冻结	+	-	-	+
9	冻结	+	-	-	+
10	冻结	+	-	-	+
11	冻结	+	-	-	-
12	冻结	+	-	-	-
13	冻结	+	-	-	+
14	冻结	+	-	-	+
15	冻结	+	-	-	+
16	冻结	+	-	-	+

[0292] 应该理解本文所描述的实施例和实施方案仅出于说明目的,并且将建议本领域技术人员根据它们进行各种修改或变化,并且它们被包括在本申请的精神和范围以及随附权利要求书的范围之内。出于所有目的,本文所引用的所有出版物、专利和专利申请特此以引用的方式整体并入。



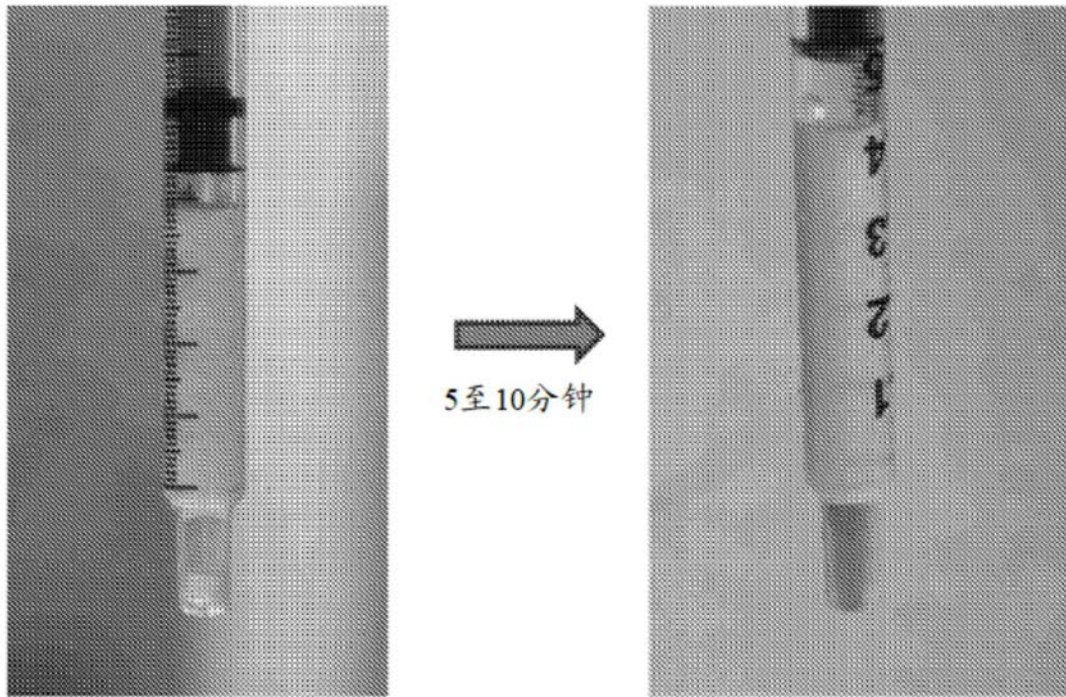
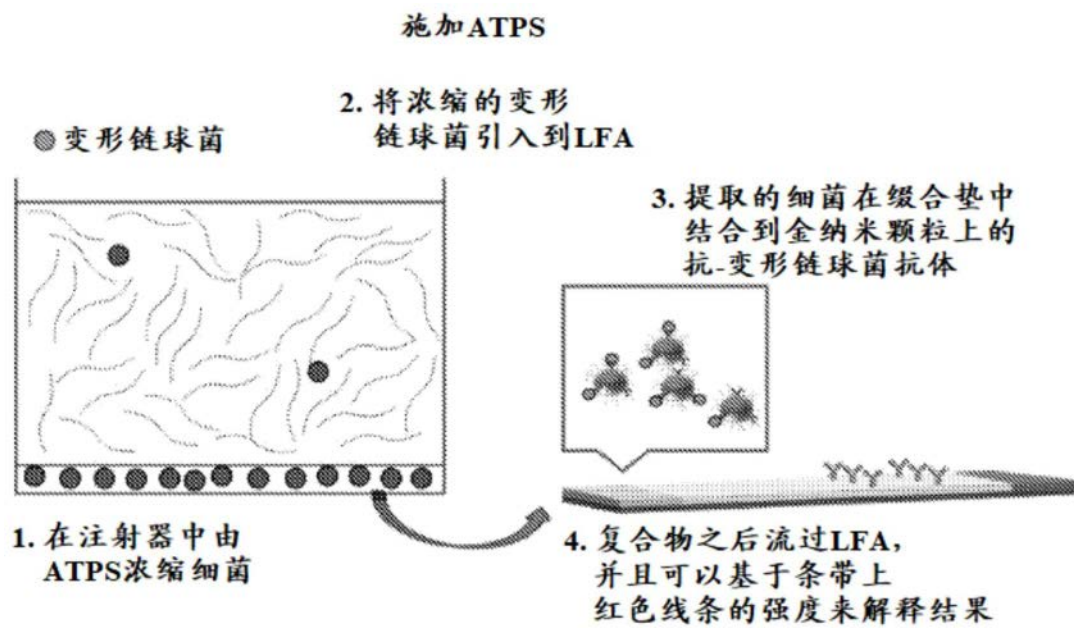


图1



整个测定在20分钟(10分钟ATPS + 10分钟LFA)内完成

图2

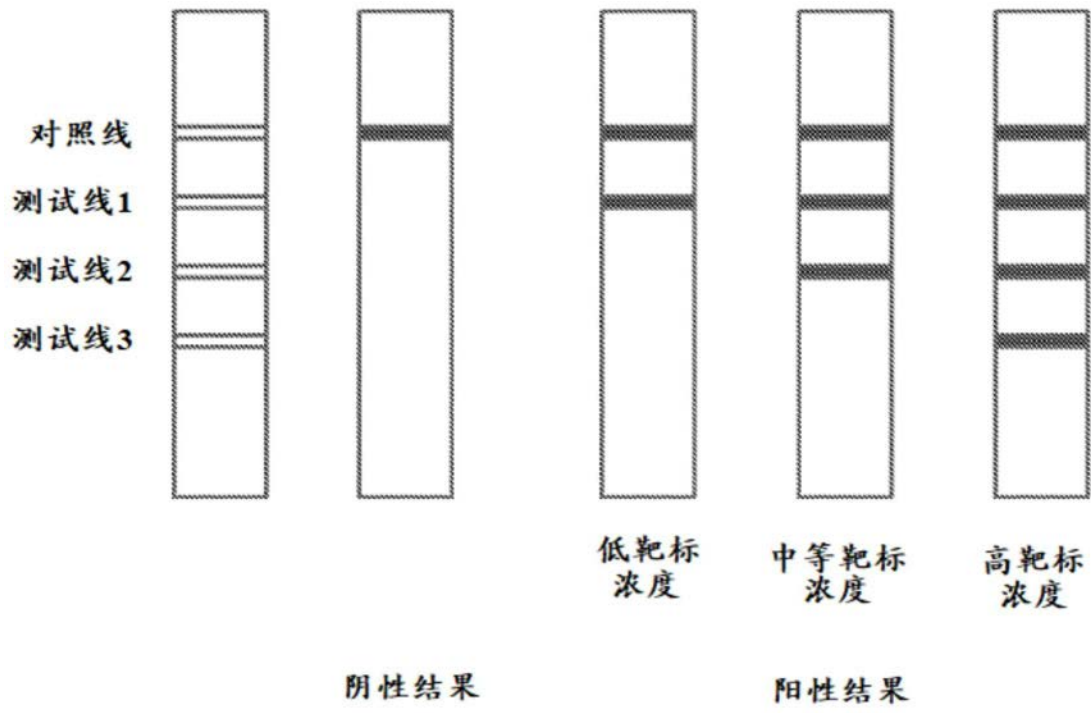


图3

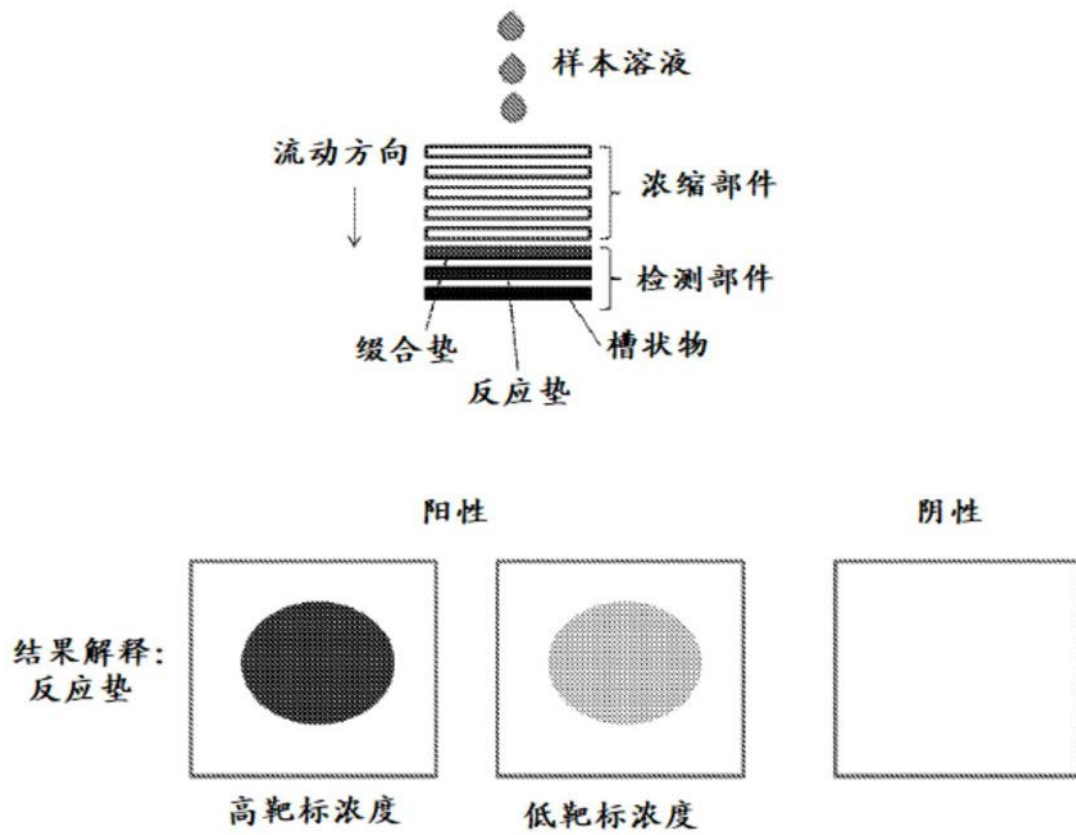


图4

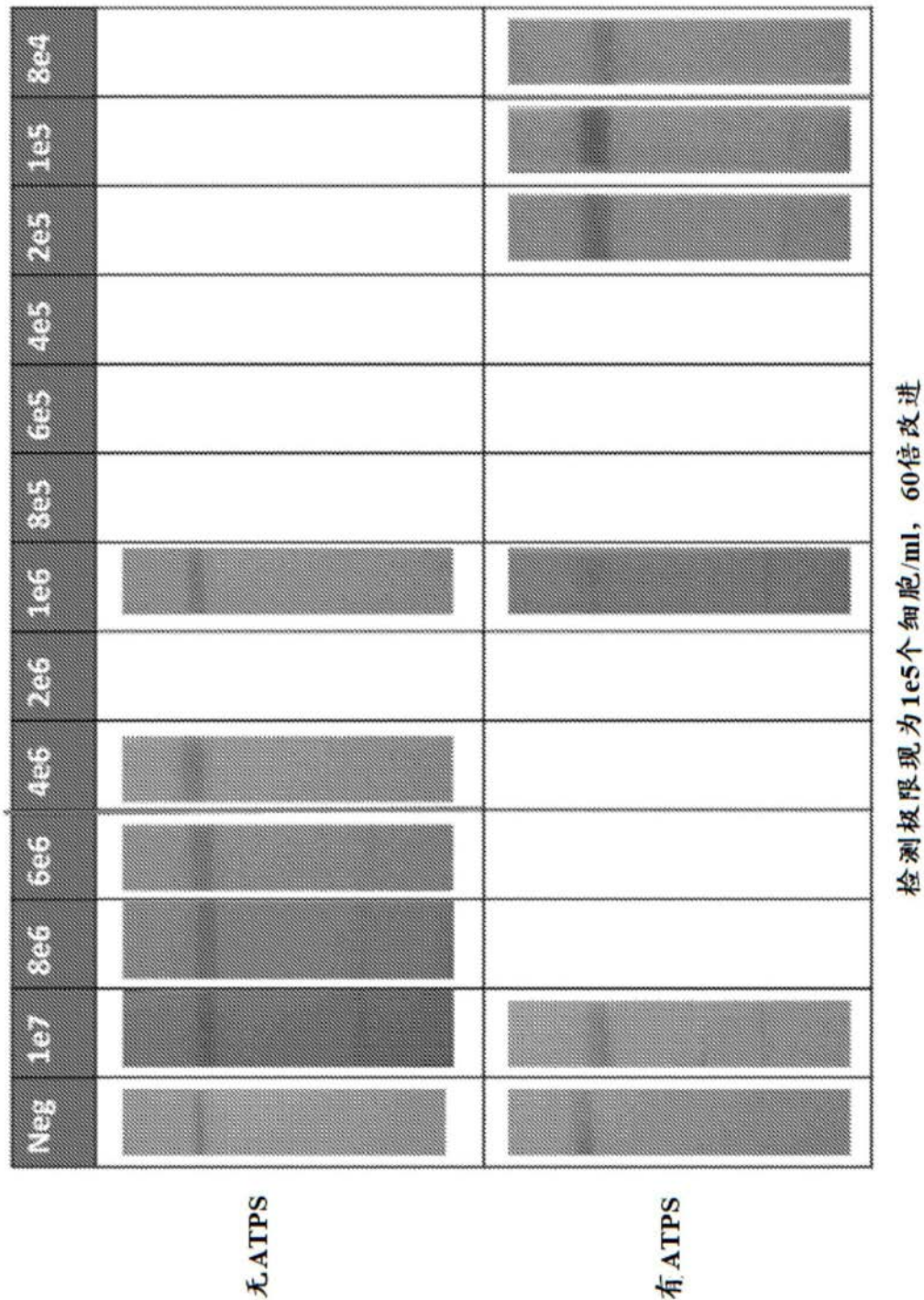


图5





图6



刷牙之前

刷牙之后

图7



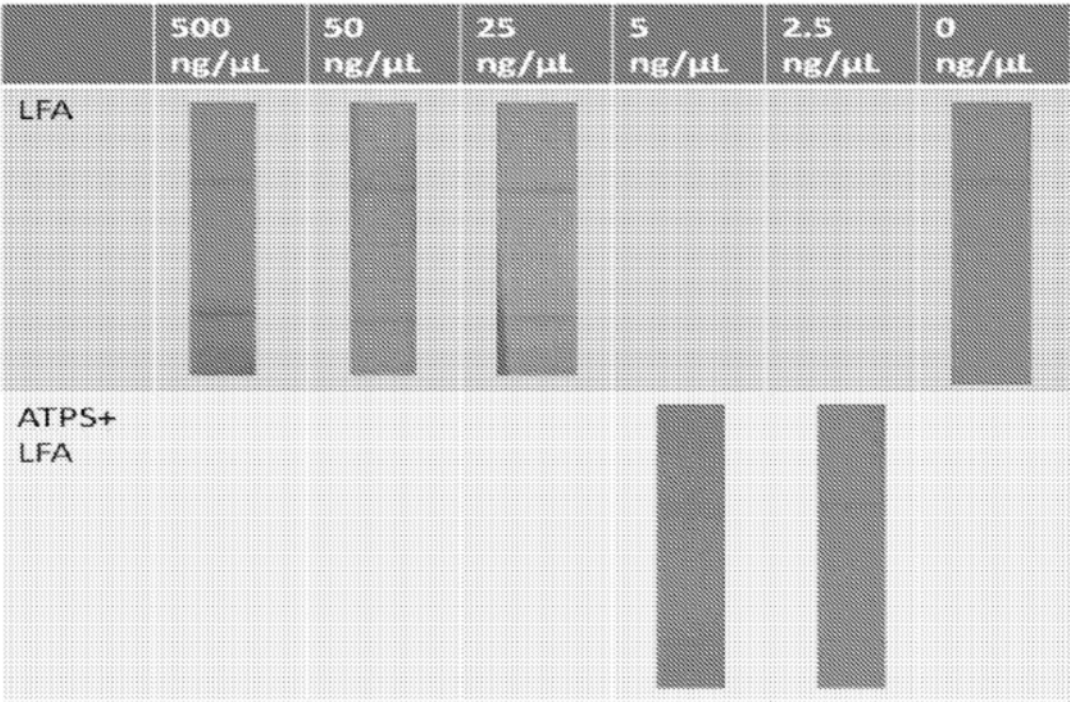


图8

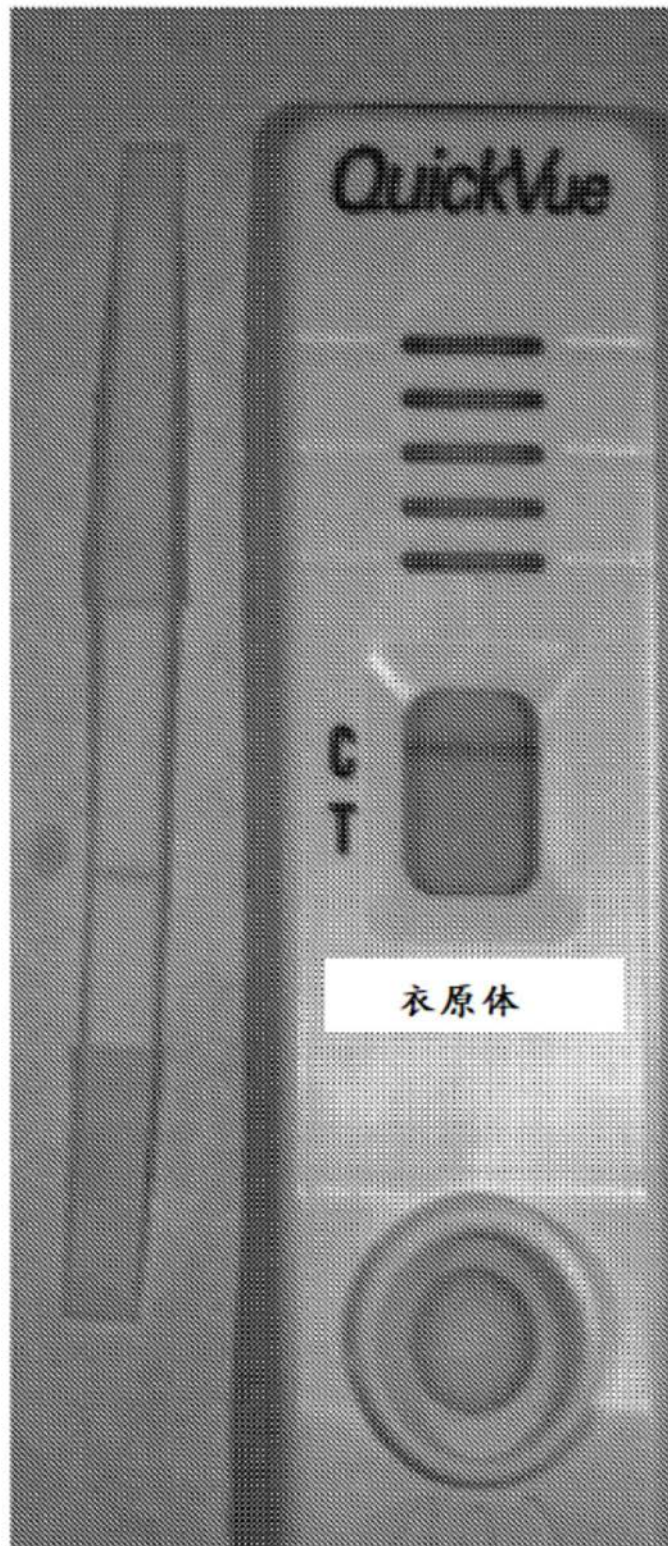


图9

建立LFA的检测极限

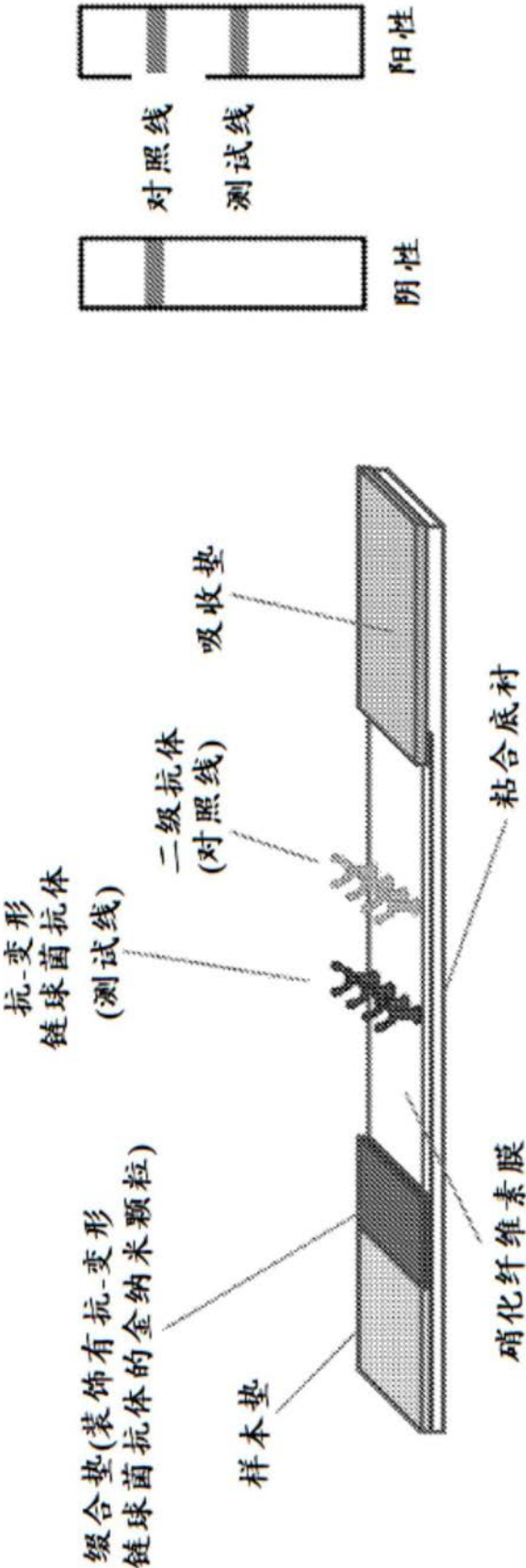


图10



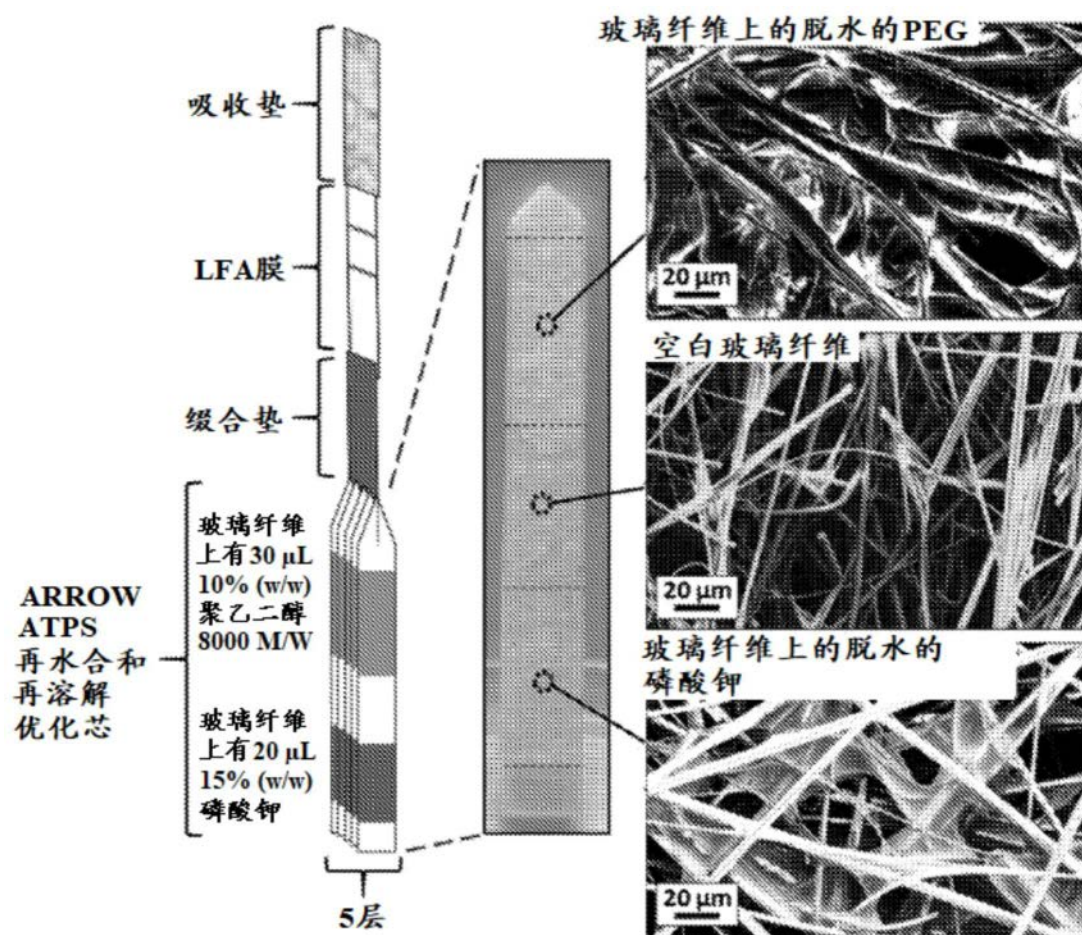


图11

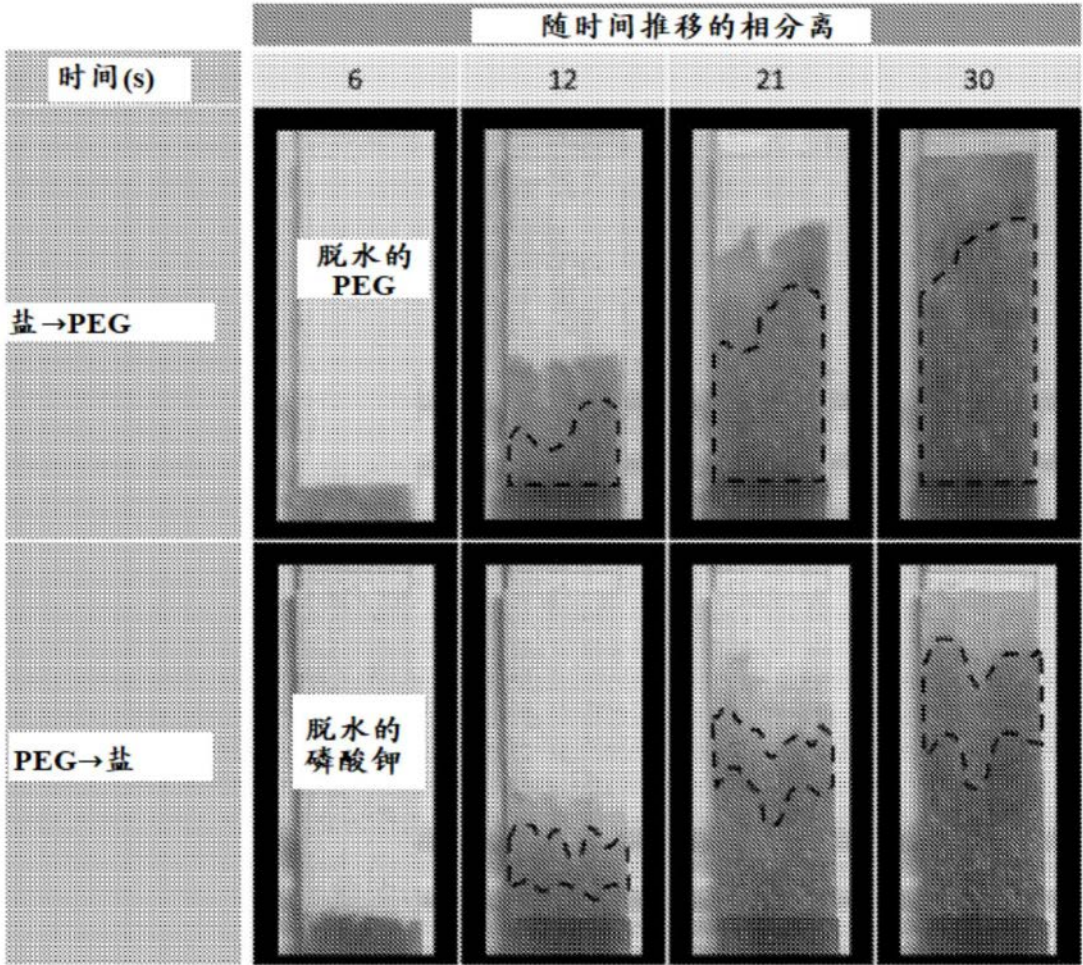


图12



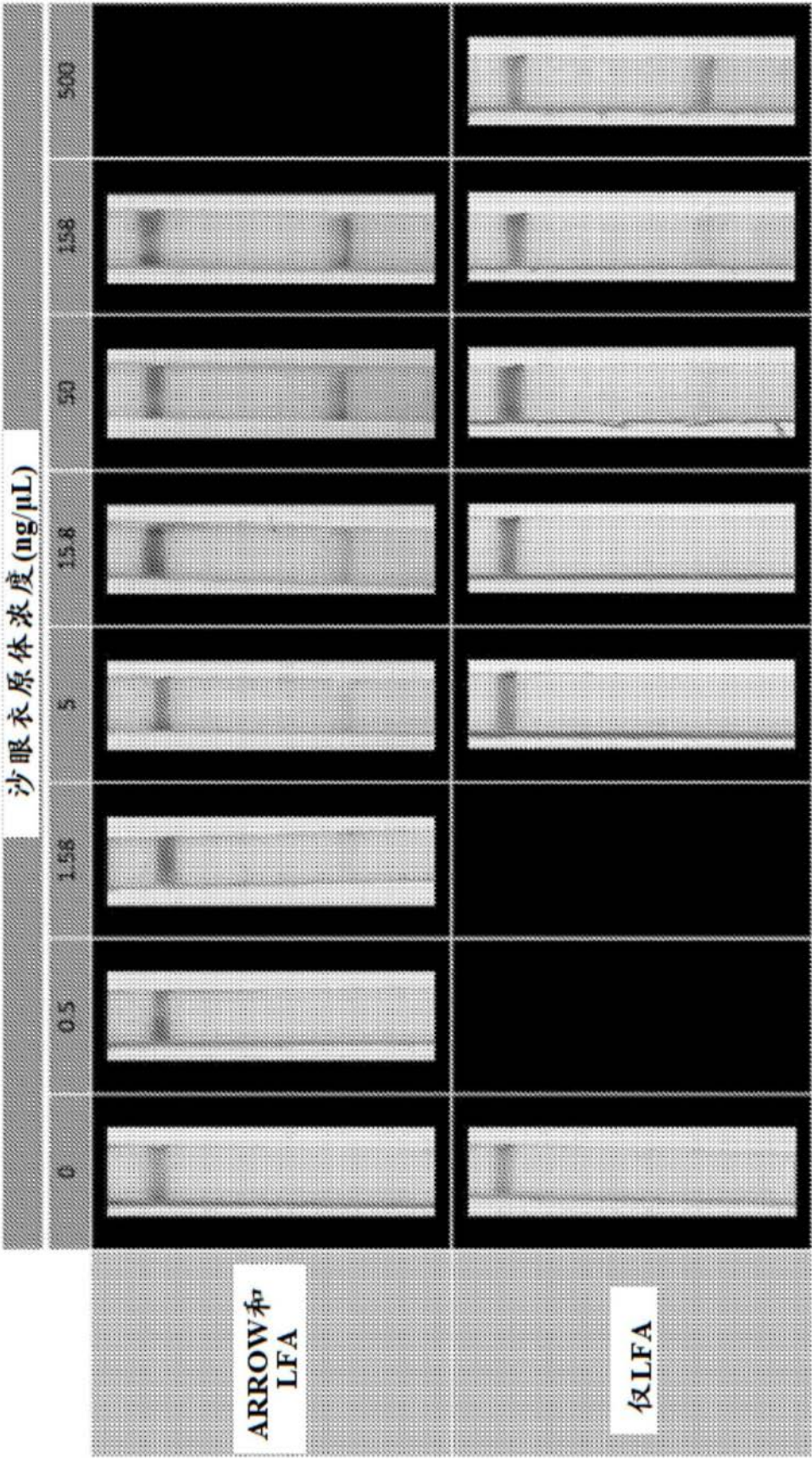


图13

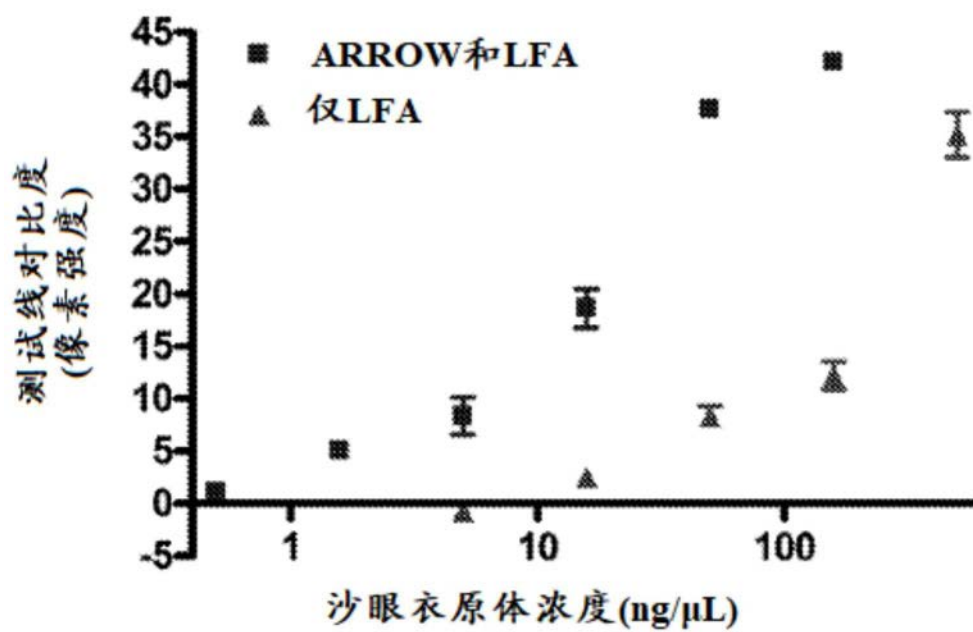


图14

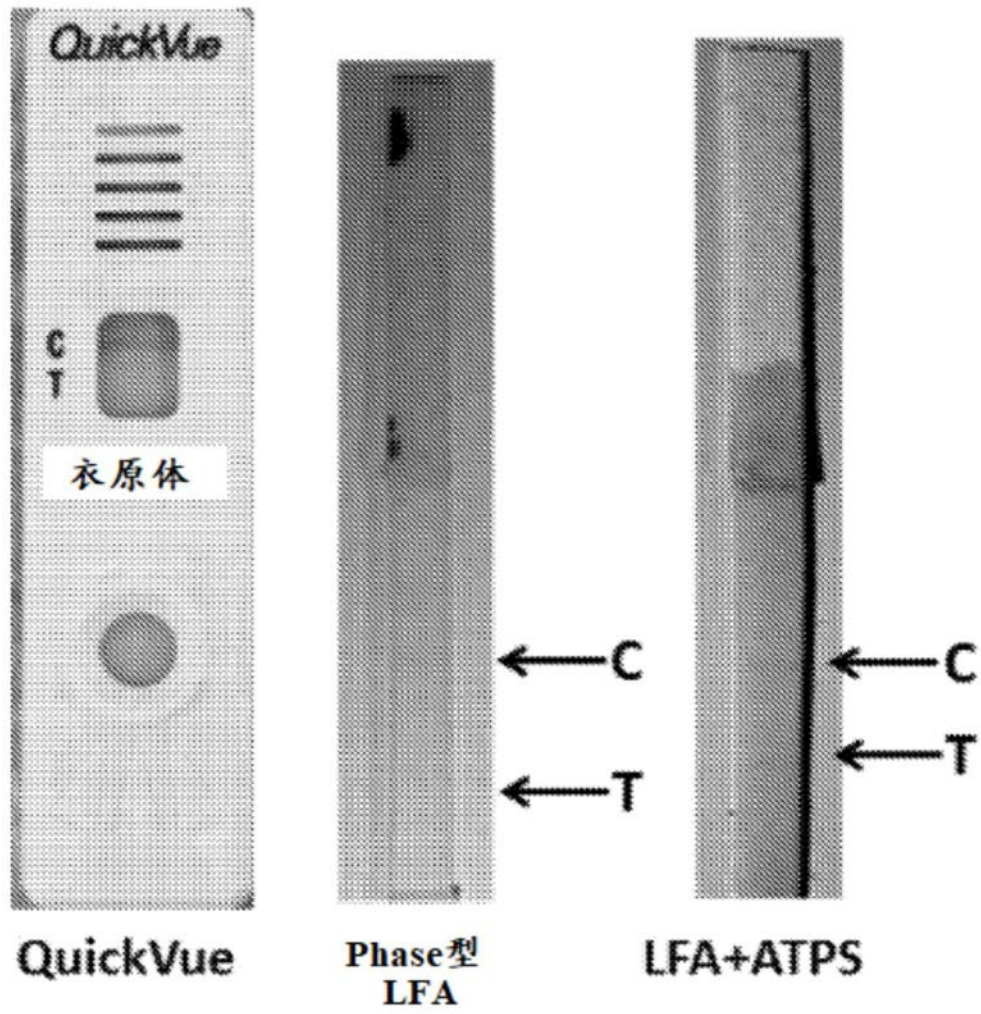


图15