

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780041822.2

[43] 公开日 2009年10月7日

[11] 公开号 CN 101553729A

[22] 申请日 2007.11.9

[21] 申请号 200780041822.2

[30] 优先权

[32] 2006.11.10 [33] GB [31] 0622404.2

[86] 国际申请 PCT/GB2007/004290 2007.11.9

[87] 国际公布 WO2008/056165 英 2008.5.15

[85] 进入国家阶段日期 2009.5.11

[71] 申请人 平台诊断有限公司

地址 英国西约克郡

[72] 发明人 道格拉斯·罗伯特·艾文斯

杰拉德·约翰·阿兰

卡罗林·珍妮弗·拉德

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 张颖 樊卫民

权利要求书 5 页 说明书 25 页 附图 2 页

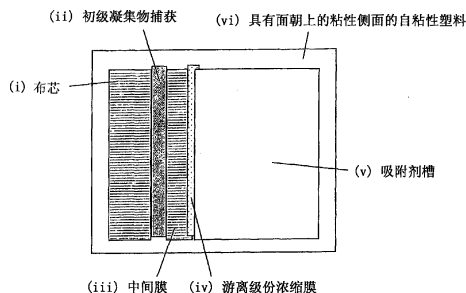
[54] 发明名称

饱和分析方法

[57] 摘要

本发明提供了修改形式的饱和分析方法，该分析方法是基于对游离的或未结合的标记试剂级份的测定(使得在存在被分析物的情况下信号增加)，并使用了捕获区来浓缩该未结合的或游离的标记级份，以避免损失灵敏性。优选情况下，该分析方法是膜分析方法。

具有初级凝集物捕获膜的试验片条的组件。



1. 进行饱和分析，以在样品中检测被分析物的方法，其特征为该方法包括将竞争性结合事件产生的标记的试剂的游离的或未结合的级份浓缩在指定的捕获区上的步骤。

2. 权利要求 1 的方法，其中饱和分析是免疫分析，包含下列步骤：

a. 被分析物和未标记的被分析物类似物竞争性结合标记的被分析物结合试剂

b. 将与被分析物类似物结合的标记的被分析物结合试剂级份与没有结合的标记的被分析物结合试剂的游离级份分离开

c. 固定和浓缩标记的被分析物结合试剂的游离级份

d. 检测被固定和浓缩的标记的被分析物结合试剂的游离级份。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中饱和免疫分析是凝集分析，包括下列步骤：

a. 被分析物和未标记的多价被分析物类似物竞争性结合标记的被分析物结合试剂

b. 将标记的被分析物结合试剂的凝集的和未凝集的级份分离开

c. 固定和浓缩标记的被分析物结合试剂的未凝集的级份

d. 检测被固定和浓缩的标记的被分析物结合试剂。

4. 权利要求 1 的方法，其中饱和免疫分析是包括下列步骤的免疫分析：

a. 被分析物和标记的被分析物类似物竞争性结合未标记的被分析物结合试剂

b. 将与被分析物结合试剂结合的标记的被分析物类似物级份与没有结合的标记的被分析物类似物的游离级份分离开

c. 固定和浓缩标记的被分析物类似物的游离级份

d. 检测被固定和浓缩的标记的被分析物类似物的游离级份。

5. 权利要求 1 或 4 的方法，其中饱和免疫分析是凝集分析，包括下列步骤：

- a. 被分析物和标记的多价被分析物类似物竞争性结合未标记的被分析物结合试剂
- b. 将标记的多价被分析物类似物的凝集的和未凝集的级份分离
- c. 固定和浓缩标记的多价被分析物类似物的未凝集的级份
- d. 检测被固定和浓缩的标记的多价被分析物类似物的未凝集的级份。

6. 权利要求 3 或 5 的方法，其中凝集的和未凝集的级份，通过使凝集的级份被固定的工具来分离。

7. 权利要求 6 的方法，其中凝集的级份通过初级捕获区被固定，初级捕获区含有其孔径阻止凝集的级份的毛细管膜。

8. 权利要求 1-5 任一项的方法，其中结合的或凝集的级份通过被固定的被分析物结合试剂或其它配体而被固定。

9. 权利要求 6 的方法，其中凝集的和未凝集的级份通过使溶剂流过多孔膜而层析分离。

10. 前述权利要求任一项的方法，其中标记的被分析物结合试剂的未凝集的或未结合的游离级份通过次级捕获区被固定和浓缩，次级捕获区含有其孔径阻止标记的试剂的毛细管膜。

11. 权利要求 10 的方法，其中标记的试剂含有可检测的基团。

12. 权利要求 1 到 11 任一项的方法，其中标记的被分析物结合试剂的未凝集的或未结合的游离级份通过次级捕获区被固定和浓缩，次

级捕获区含有被固定的被分析物结合试剂或配体或其它关联性结合配偶体。

13. 权利要求 12 的方法，其中通过次级捕获区固定和浓缩的标记的被分析物结合试剂的未凝集的或未结合的游离级份提供了可目测的指示。

14. 前述权利要求任一项的方法，其中可检测被分析物是抗体，被分析物结合试剂选自对被测定的抗体具有特异性的抗原、抗原类似物、半抗原、半抗原类似物和第二抗体。

15. 用于进行饱和分析以在样品中检测被分析物的试剂盒，该试剂盒包含：

- a. 用于分离竞争性结合步骤的结合的和未结合的产物的工具
- b. 次级捕获区。

16. 权利要求 15 的试剂盒，还包含多孔载体。

17. 权利要求 15 或 16 的试剂盒，其中用于分离竞争性结合步骤的结合的和未结合的产物的工具包括初级捕获区。

18. 权利要求 15 到 17 任一项的试剂盒，包含生物学的或非生物学的可检测基团。

19. 权利要求 18 的试剂盒，其中可检测基团包括微生物、细胞、大分子、金属溶胶颗粒、珠子、木炭、高岭石、膨润土或乳胶珠。

20. 权利要求 19 的试剂盒，其中可检测基团包括胶体金。

21. 权利要求 15-20 任一项的试剂盒，其中饱和分析是凝集免疫分

析，初级捕获区包含用于固定凝集的级份的工具。

22. 权利要求 15-21 任一项的试剂盒，其中可检测基团是可凝集的。

23. 权利要求 21 或 22 的试剂盒，其中初级捕获区含有其孔径阻止凝集的级份的毛细管膜。

24. 权利要求 15-23 任一项的试剂盒，其中用于分离竞争性结合步骤的结合的和未结合的产物的工具，包括其孔径允许在粒径的基础上层析分离结合的和未结合的产物的毛细管膜。

25. 权利要求 15-24 任一项的试剂盒，其中次级捕获区含有用于固定和浓缩标记的被分析物结合试剂的游离级份的工具。

26. 权利要求 25 的试剂盒，其中次级捕获区含有其孔径阻止未凝集的标记的试剂的毛细管膜。

27. 权利要求 26 的试剂盒，其中次级捕获区含有被固定的被分析物结合试剂或配体或其它关联性结合配偶体。

28. 权利要求 15-27 任一项的试剂盒，还包含：
a. 其上结合有两种或两种以上被分析物类似物基团的中心，
b. 能够与上述被分析物类似物基团结合的两种或两种以上标记的被分析物结合试剂。

29. 权利要求 15-28 任一项的试剂盒，还包含：
a. 其上结合有两种或两种以上被分析物结合试剂的中心，
b. 含有能够与上述被分析物结合试剂结合的两种或两种以上被分析物类似物基团的信号颗粒。

30. 权利要求 15-29 任一项的试剂盒，还含有缓冲液、施用工具、说明书、图表、干燥剂、对照样品、染料、电池和/或信号处理/显示工具。

31. 权利要求 15-30 任一项的试剂盒，其中多孔载体是固体基质，优选为纤维性的。

32. 权利要求 31 的试剂盒，其中多孔载体是纤维性的。

33. 权利要求 28-32 任一项的试剂盒，其中初级捕获区上游的孔径足以允许中心、标记的试剂、样品和任何凝集物的自由运动。

34. 用于进行饱和凝集分析以在样品中检测被分析物的装置，该装置含有载体，载体的近端用于接收样品，样品可以沿着载体向远端移动，其中载体含有：

- a. 含有阻止被凝集的级份的工具的初级捕获区，以及
- b. 含有阻止标记的试剂的工具的次级捕获区。

35. 权利要求 34 的装置，其中载体是多孔的。

36. 权利要求 35 的装置，其中初级和/或次级捕获区分别含有其孔径阻止凝集的级份或标记的试剂的毛细管膜。

37. 权利要求 34、35 或 36 的装置，被安装在罩壳或容器中。

38. 权利要求 37 的装置，其中装置是手持式的。

饱和分析方法

发明领域

本发明涉及用于在样品中检测被分析物的改进的分析方法。具体来说，本发明涉及分析装置，含有用于执行这样的分析的工具的试剂盒以及，在被分析物与被分析物类似物之间对被分析物结合试剂上的结合位点的结合竞争性的基础上，用于在样品中检测被分析物的分析方法。

发明背景

结合分析是用于在样品中检测和定量被分析物的已被确立的技术。它们对于在生物样品中检测和/或测量物质，以作为疾病诊断和预后的辅助工具、以及用于预测患者对疗法的反应，是特别有用的。它们通常采取各种不同格样（format）的免疫分析的形式，其中被分析物结合试剂是抗体或其功能片段。

大部分这样的分析方法是基于双位点的或“三明治”格样，它对于能够同时结合两种或两种以上抗体或受体的被分析物是非常有用的，但是不适合用于半抗原（半抗原由于其大小，通常在一个时候只能结合一个抗原）。对于半抗原分析来说，通常需要使用典型情况下用于抗原-抗体分析的饱和类型的分析方法。在这些分析方法中，样品被分析物与固定量的试剂被分析物（或被分析物类似物，它已经被化学修饰，使得它是例如可检测的或固定化的）竞争被分析物结合试剂（例如抗体）上有限数量的结合位点。在饱和分析方法中，被分析物和被分析物类似物的总数量大于被分析物结合试剂上结合位点的总数量。

这些分析方法可以是直接竞争格样（其中样品被分析物、类似物

和被分析物结合试剂同时进行反应），也可以是间接竞争格样（其中允许样品被分析物和被分析物结合试剂首先在一起相互作用，然后再与被分析物类似物反应）。后一种格样也被称为顺序分析法或返滴定分析法。竞争分析一般使用带有可检测的信号基团的被分析物类似物和未标记的抗体（通常连接到固相上）。密切相关的 1-位点免疫测定格样通常使用用可检测基团标记的抗体和固定化在固相上的被分析物类似物。

因此，与被分析物结合试剂结合的被分析物类似物的量将与样品中被分析物的量成反比，通过检测结合的被分析物类似物的量（对于竞争分析来说）或结合的被分析物结合试剂的量（对于 1-位点免疫测量分析来说），可以确定样品中被分析物的存在和/或量。检测信号的降低比来自与阴性背景的检测信号的增加更困难，通常会导致损失灵敏性，特别是如果检测是通过目测的话。测量游离的或未结合的信号克服了这个问题，但是通常情况下游离的级份存在于较大体积中并且是扩散的，这又会导致损失灵敏性。

对于靠近患者进行的分析方法存在着不断增长的需求，这主要是为了缩短提供结果所需的时间。这样的分析方法被称为床旁分析（Point-of-Care assays），一般要求执行起来简单耐用，因为它们是在非实验室的背景下，通常由非专业人员来进行的。理想情况下，它们应该是完全自足的，不需要辅助的设备（读数装置可能例外）。如果要有任何临床用途，床旁分析必需与基于实验室的分析方法具有相似的灵敏度。但是，常规的免疫分析方法通常包含了复杂的方案和检测系统，意味着它们通常不适合于床旁类型的应用。

已经开发了特定的床旁分析方法。最常用的是侧向流分析。通常，这些方法是基于标记的流动成分（例如有色颗粒标记的抗体）、固定化的成分（例如抗体条或点）以及膜，通过毛细作用使样品通过膜移动。在存在被分析物的情况下，在固定化的抗体捕获区形成了“三明

治”，导致发展出有色的线或点。常规的侧向流分析方法示例在例如美国专利 5,656,503 中（联合利华专利控股 B.V）。这些分析方法规定了固定化的抗体捕获区，尽管它在侧向流格样中与 Geigel 等(1982, Clin Chem 28: 1894) 中教导的径向格样不同。

对基本的侧向流格样进行了修改，以便能够进行竞争类型的分析。这样修改过的侧向流分析方法可以基于标记的流动成分（例如有色颗粒标记的抗体）、固定化的成分（例如条或点形式的被分析物类似物）以及膜，通过毛细作用使样品通过膜移动。在不存在被分析物的情况下，抗体标记的颗粒将与固定化的被分析物类似物结合，导致显出有色的线或点，在存在被分析物的情况下，抗体上的结合位点将被占据，使得颗粒标记的抗体的结合被减少或完全破坏，同时伴随着颜色减少或完全消失。这样的分析方法由例如 Biosite (US 5,143,852) 教导。但是，如上所述，检测颜色的减少可能是有问题的。

侧向流分析方法提供了许多优点，包括速度、方便性和相对低的成本。但是，它们有几个缺点。捕获成分（例如抗体）通常通过吸附在膜上进行固定，因此膜和/或抗体批次的变化可能导致被固定的抗体的量的变化。此外，某些抗体可能仅仅是松散地结合，当流体前沿通过时可能变得流动，导致信号的丧失。此外，因为只固定了一种抗体，它与被分析物只有在样品流过的时候才能够反应，所以由于短的温育时间，灵敏度可能降低。此外，必需为每种被分析物生产特异性包被的膜，因此增加了制造成本。

为了应对这些缺点，通过避免使用固定化的捕获抗体进行了尝试。例如，EP 297292 (Miles)、EP 310872 (Hygeia Sciences) 和 EP 0962771 (Mizuho) 描述了含有带有捕获区的膜和两种抗体包被的颗粒的系统，一种抗体未标记但较大，使得它被捕获区捕获，另一种较小并且是标记的，可以通过捕获区。在存在被分析物的情况下，小珠子变得与被捕获的大珠子结合，导致形成了有色的线。尽管这些方法避免了使用

预先固定的捕获抗体，但它们需要两种抗体包被的颗粒的群体以及捕获区。一般来说，这样的颗粒在本质上是疏水的，因此在存在生物流体的情况下以非特异性的方式引起聚集。

其它人尝试了更简单的格样，通过这种格样，能够自由运动通过膜的抗体包被的颗粒在存在被分析物的情况下可以引起凝集，使得它们的运动被停止。这种基于凝集的免疫分析方法在本技术领域是已知的，并且依赖于抗原或抗体所结合的颗粒的凝集来表明样品中相应抗体或抗原的存在。在一种更简单形式的凝集分析中，针对特定被分析物的抗体被结合到珠子或其它见的材料上。

具体来说，US 4,666,863 (Amersham) 公开了通过层析方法分离游离的和结合的标记物的方法。在一种变化形式中，它们教导了使用沿着膜的流动来分离凝集的和未凝集的抗体包被的有色颗粒。在分离之前，将反应混合物与交联试剂反应，使凝集物稳定。EP 293779 (Daiichi) 也公开了有色乳胶凝集反应，其中凝集的和未凝集的颗粒，通过允许未凝集乳胶通过但捕获凝集物的毛细管进行分离。EP 280559 (Kodak) 描述了用于多价被分析物的分析方法，在不存在被分析物的情况下，标记物可以通过滤器，但是在存在被分析物的情况下，形成了凝集物并被捕获。US 6,472,226 (Genosis) 描述了用于非常大的被分析物的不使用固定化抗体的侧向流分析方法。它们描述了双区系统，一个具有大的孔，另一个具有小的孔，使得被分析物可以通过大的孔，但是在到达小孔区时被捕获。这与能够通过两个区的小标记物（例如连接有抗体的金溶胶）结合使用。在存在被分析物的情况下，一部分抗体标记的金溶胶与被分析物结合，并捕获在小孔捕获区上。

总的来说，基于凝集的分析方法限于检测具有多个表位、能够形成大的、稳定的凝集物的大的被分析物。它们对具有较少表位、或仅有有限数量的可用表位正在使用的较小的被分析物的有效性，可能受到损害，因为减少数量的结合事件可能导致减弱的凝集和丧失灵敏性。

一种可选方案是所谓的膜凝集系统（Platform Diagnostics，英国专利申请 0523124.6），它基于毛细管膜中的免疫凝集反应，使得当被分析物存在时，形成了含有标记的信号基团的凝集物，它被捕获并产生可检测的信号。这种技术对于以前的系统、例如 Amersham International plc 开发的系统来说，是一种进步，但是仍然存在某些方面可以被进一步改进。首先，由被捕获的凝集物形成的“线”有些宽。尽管它本身不是问题，但与更常见的传统侧向流分析中观察到的稍微有些不同。这可能是系统必须适应各种不同大小的颗粒凝集物的捕获的结果，较小的颗粒凝集物可能也迁移到捕获区中。其次，由非被分析物介导的相互作用引起的标记的颗粒制备物中任何凝聚物的存在，可能导致背景信号和假阳性结果（同样适用于常规侧向流分析方法）。尽管这可以由制备和使用颗粒的适合的条件所克服，但发展避免了这种需要的系统、简化制造和制造更耐用的系统，将是有利的。

但是，总的来说，现有技术的膜凝集分析方法依赖于三明治原理来启动凝集反应。竞争或凝集-抑制分析方法（例如用于早期怀孕测试的血细胞凝集抑制分析）在本技术领域是已知的，但是主要被限制于在载玻片或反应孔中进行的分析，或其中的凝集通过观察颗粒图案的变化而目测检测的分析中。因为没有凝集的和未凝集的颗粒的分离，因此当它们没有暴露于强的剪切力例如毛细管力时，不需要形成强的、稳定的凝集物。

为了执行检测游离的或未凝集级份的颗粒的竞争膜凝集分析方法，以避免对分离区中的信号减少进行检测的需要，已经进行了尝试。Angenics Inc (US 4,459,361) 描述了颗粒免疫凝集系统，其中通过滤器对凝集的和未凝集的颗粒进行了分离，人们可以测量滤液中（未凝集的）的增加，也可以测量存留（凝集的）级份中的降低。Akers (EP 556202) 描述了类似的系统，其中通过将样品与其表面上具有被分析物特异性受体的有色颗粒相接触，形成了测试混合物。将测试混合物通过具有

大于有色颗粒但是小于颗粒-被分析物凝集物的孔的滤器，从而导致凝集物的捕获。混合物中被分析物的存在通过检查滤液的颜色来确定。

大多数现有技术中的竞争分析方法、包括许多描述的竞争性膜凝集系统，其中的另一个重要问题是终点为结合的标记物的信号的降低。尽管这可以使用定量信号的仪器进行精确的评估，但对于依赖于目测检测的分析方法（例如大多数床旁分析方法）来说，更加难以实现，特别是当被分析物浓度低、信号的降低小时。因此，依赖于这种信号的降低的分析方法对于这种应用来说是不普遍的。测量未凝集的或游离的级份的膜凝集系统受到信号扩散、从而损失灵敏性的困扰，这在其它分析格样中游离的测量中也是常见的。

竞争性膜凝集格样已经被设计成使用抗体标记的信号颗粒和由被分析物或被分析物类似物包被的中心（反之亦然），这克服了现有工艺的缺点。在不存在样品被分析物的情况下，中心分子与标记的颗粒交联，产生了稳定的凝集物，被捕获在膜上（因此形成了有色的线）。在存在样品被分析物的情况下，某些抗体位点将被占据，因此凝集反应（因此还有信号）减小或消失了。

已知在免疫分析方法中，过量的标记的试剂被检测在所谓的“测试完成线”上，这是位于测试条末端的区域，含有固定化的抗体或其它结合试剂，被设计以提供阳性对照，用于证实溶剂的正确流向和标记的检测颗粒的存在。但是，这种指示物可能只能在标记试剂总是过量的格样中用于可靠地报告测试的完成。因此，它们不适合于饱和分析格样，其中在不存在被分析物的情况下，大多数或所有标记试剂将在竞争结合步骤中被结合。

发明陈述

本发明提供了修改形式的饱和分析方法，解决了现有工艺中的许多问题。本发明基于对游离的或未结合的标记试剂级份的测定（使得

在存在被分析物的情况下发生信号的增加)，并使用了机构来浓缩该未结合的或游离的标记试剂级份，以避免损失灵敏性。这种饱和分析方法可以是任何适合的格样，但优选情况下是膜分析方法。

具体来说，本发明提供了修改形式的竞争性分析格样，包括在初级捕获区的下游使用了次级捕获区，次级捕获区能够捕获未结合的或游离的标记试剂颗粒。因此，在不存在样品被分析物的情况下，基本上所有的标记试剂颗粒被捕获在初级捕获区上，次级捕获区将是干净的。但是，在存在样品被分析物的情况下，某些标记样品颗粒保持未结合或游离，因此将通过初级捕获区到达次级捕获区，然后在这里被捕获，导致形成了线。

正如对专业技术人员来说显而易见的是，这种源自于任何饱和分析方法的捕获和浓缩未结合级份的原理，适用于任何格样的分析方法，其中这种游离级份可以与结合级份分离开、含有可检测的信号（优选可目测检测）、并且其中这种游离级份的大小是被测量的原始被分析物的度量。这种原理可用于凝集分析，其中凝集的级份与未凝集的颗粒分开。

本文使用的“饱和分析方法”是指任何其中特定的被分析物结合试剂（通常为抗体，但不必需是抗体）是有限的，并且存在过量的被分析物和/或被分析物类似物的分析方法。

“竞争分析方法”是一种被广泛使用的版本的饱和分析方法，其中未标记的抗体（或某些其它特定的被分析物结合试剂）与标记的被分析物类似物一起使用，后者与样品被分析物竞争有限数量的结合位点。

“被分析物类似物”是与被分析物竞争被分析物结合试剂上的结合位点的试剂。它可以仅仅是以某种方式固定、标记或化学修饰的被

分析物，因此可与被分析物区分开，或者可以是被分析物的合成的或多价的等价物，这依赖于分析的格样。

在饱和凝集分析的情况下，希望在多孔载体中形成稳定的、可检测的凝集反应。尽管使用可能发生多个结合事件的大的、多表位的被分析物可以实现合理的凝集，但使用较小的、可能仅含有几个表位的被分析物可能难以获得稳定的凝集。事实上，出于特异性的原因，通常希望只利用被分析物上的一个或两个表位。

为了克服这个问题，可以使用多价载体分子、也被称为中心，它含有与载体牢固结合的多个结合配偶体（例如被分析物类似物分子）。然后得到的中心可以将结合反应放大。通过这种方式，对于小的被分析物和/或在被分析物上只有受限数量的表位被使用的情况下，有可能获得强的、稳定的凝集，减少了对外部稳定化试剂的需要。

因此，多价被分析物类似物，是任何存在有多个针对被分析物结合试剂的结合位点的基团。一个例子是中心分子，多个被分析物类似物方便地通过结合配偶体例如抗体结合在其上。或者，被分析物类似物可以通过其它方式结合到中心分子上，例如直接共价键合、化学交联或使用其它高亲和性结合工具，例如与生物素酰化的分子结合的亲和素或链亲和素。

结合反应的放大通过使用多价中心分子来实现。中心可以由任何适合的材料形成，它们优选为均匀的、稳定的、其上可以连接结合配偶体。中心可以是可溶的或不溶的，尽管前者是优选的。中心的例子包括乳胶珠、聚苯乙烯微粒、玻璃珠、胶体金、细胞例如红细胞、纤维物质例如纤维素，以及大分子例如多糖和蛋白。优选的中心是多糖，包括葡聚糖，优选为氨基葡聚糖，琼脂糖、微晶纤维素，淀粉。其它适合的材料包括聚乙烯亚胺、聚乙烯甲苯或苯乙烯丁二胺共聚物、聚丙烯醛微球、聚氨酯、花粉颗粒、孢粉素、由聚甲基丙烯酸缩水甘油

酯外壳包绕的聚苯乙烯或聚乙烯萘核心、微晶纤维素或其组合，聚乙烯醇、甲基丙烯酸羟乙酯和甲基丙烯酸甲酯的共聚物、硅酮和二氧化硅、玻璃、橡胶、尼龙、硅藻土、硅石等。可溶的中心具有低的非特异性结合、增加的挠性、以及可用于将抗体或其它结合分子共价连接到其上的基团的增加的可利用性等优点。优选的可溶中心是可溶性蛋白和多糖，包括上述的，特别是氨基葡聚糖及其衍生物。中心的大小由多种因素决定，例如表面上容纳的结合配偶体的数量、确保中心在分析过程中的稳定性的空间立体因素、以及分析在其中进行的多孔载体的本质。例如，中心优选小得足以在不发生凝集事件的情况下通过膜的最小的孔。当中心由不溶性珠子形成时，它们的直径在 0.03-10 μm 的范围内，优选为 0.05 到 8 μm 。对于可溶性中心来说，例如对于氨基葡聚糖分子来说，可以在 250-2,500kDa 范围内，更优选为 500-2,500 kDa。

“被分析物结合试剂”是指任何能够以特定的和可重复的方式、以允许分析方法起作用的足够的亲和性结合被分析物的试剂。在大部分分析方法中，被分析物结合试剂是抗体或抗体有效的抗原结合片段或衍生物，是合理而可行的。单克隆抗体具有与限定的表位一致和可定量的结合性质的优点。但是，对于许多分析目的来说，多克隆的 IgG 级份更加有效，其表位特异性范围对于例如被分析物中的构象变化或空间限制具有较低的灵敏性。对于多表位被分析物来说，它们也允许与多个表位结合，使得被分析物分子可以高亲和性被结合。但是，依赖于被分析物的本质，其它的关联性结合分子也可以使用，例如受体（对于配体来说）、配体或配体类似物（对于受体来说）、适体、核酶或多核苷酸。

对于本技术领域的专业人员来说，显然对于某些应用和分析格样来说，使用多价被分析物结合试剂、更优选为存在有多个被分析物结合位点的中心的形式、而不是多价被分析物类似物，将是有利的。在许多分析格样中，只需要普通的技艺就可以设计出变化的形式，其中

被分析物类似物和被分析物结合试剂的角色，在被固定化、掺入到中心、被标记和/或连接到信号颗粒等方面被颠倒，并且这样的变化形式和改编也被本发明考虑在内。

“标记的试剂”是指含有可检测基团和被分析物结合试剂（或可选的被分析物或被分析物类似物，依赖于分析的格样）的颗粒。通常情况下可检测的基团是可目测检测的基团，允许通过肉眼容易地检测到信号颗粒的固定浓度。不排除其它形式的检测，例如荧光、化学发光、磁性或放射性标记。可检测基团也可以为标记的试剂提供固定化的工具。例如，含有乳胶珠的标记试剂可以被孔的尺寸太小而不能允许乳胶珠通过的毛细管膜的捕获区所挡住。可检测基团可以是生物的，也可以是非生物的。可以用作标记试剂的成分的适合的基团包括微生物、细胞、大分子、金属溶胶颗粒、珠子、以及木炭、高岭石或膨润土颗粒。最优选情况下，信号颗粒包含有色的乳胶珠。在高度优选的实施方案中，可检测基团是可凝集的。

“捕获区”是任何优选通过将级份与反应混合物中的剩余级份分离而浓缩和固定级份的工具。因此，在捕获区，一部分反应混合物例如未结合的级份，可以通过将其浓缩和固定在捕获区中而与反应混合物分离，同时剩余的反应混合物可以继续通过捕获区。通过这种方式，所述级份从下游液流中被阻止。因此，捕获区优选包含将一种级份与其它级份分离的工具。

竞争性结合步骤导致被分析物结合到被分析物结合试剂（通常为抗体）上。在凝集分析的情况中，产物是交联的被分析物与一种或多种形式的被分析物结合试剂的不溶性复合物，在这种情况下它可以与未凝集的游离级份通过物理过滤方便地分开。在膜结合分析方法中，这可以通过使流体流进具有较小的孔径、适合于捕获这样的不溶性多分子复合物的膜来完成，该膜同时允许未凝集的被分析物和标记的被分析物结合试剂通过。这种部件（feature）可以被称为初级捕获区。初

级捕获区也可以捕获任何通过非被分析物介导的方式形成的凝聚物，否则这些凝聚物可能引起假反应。

“次级捕获区”是指任何浓缩和固定从竞争性结合步骤产生的未凝集的或未结合的级份的工具。次级捕获区可以放置在初级捕获区的下游或远处，以便按照本文前面的描述浓缩和固定标记试剂的未结合的或游离的级份。次级捕获区也可以浓缩和固定未凝集的被分析物。除了允许目测检测之外，标记的试剂还可以提供将未凝集的颗粒固定在次级捕获区上的物理工具。这些可以包括例如胶体金颗粒或乳胶珠，它们可以被含有比初级捕获区使用的膜孔径小的另一个膜的次级捕获区捕获，该膜适合于捕获所用的标记试剂的尺寸。

其它格样的分析方法含有具有直接结合功能的初级捕获区。在简单的捕获分析的情况下，这可以包括被固定的抗体（或其它被分析物结合试剂）。或者，1-位点竞争分析方法使用固定的被分析物或被分析物类似物来结合标记的抗体。在任何一种情况下，功能性初级捕获区固定了竞争性结合步骤的一种产物，同时允许游离的级份通过。在这种分析方法的情况下，次级捕获区可以含有另一个区，其中适应于所使用的格样，作为固定的被分析物结合试剂、被分析物、被分析物类似物或其它固定游离的信号试剂的结合基团的区。

优选情况下，通过例如在尺寸或其它物理参数例如电荷的基础上进行过滤以限制级份流过捕获区，可以将级份不通过结合而捕获在初级和/或次级捕获区上。优选情况下，初级和/或次级捕获区是非免疫学的，意味着它们不包含捕获级份的免疫结合试剂。不具有结合功能的捕获区的优点是对于被捕获的级份的量没有限制，而如果使用结合试剂例如抗体来捕获级份的话，将会有这种限制。这导致通过捕获区的剩余级份的量减少，因此减小了捕获区之外的“背景”信号。

因此，本发明提供了进行饱和结合分析，以在样品中检测被分析

物的方法，其特征为所述方法包含竞争性结合事件产生的未结合的、游离的标记试剂的级份，被浓缩在指定的捕获区上的步骤。优选情况下，标记试剂含有可检测的基团。

优选情况下，饱和结合分析方法是包含下列步骤的免疫分析方法：

- a. 被分析物和未标记的被分析物类似物竞争性结合有限量的标记的被分析物结合试剂
- b. 将与被分析物类似物结合的标记的被分析物结合试剂级份与没有结合的标记的被分析物结合试剂的游离级份分离
- c. 固定和浓缩被分析物结合试剂的游离级份
- d. 检测被固定和浓缩的标记的被分析物结合试剂的游离级份。

或者，免疫分析方法包括下列步骤

- a. 被分析物和标记的被分析物类似物竞争性结合有限量的未标记的被分析物结合试剂
- b. 将与被分析物结合试剂结合的标记的被分析物类似物级份与没有结合的标记的被分析物类似物的游离级份分离
- c. 固定和浓缩标记的被分析物类似物的游离级份
- d. 检测被固定和浓缩的标记的被分析物类似物的游离级份。

在优选实施方案中，饱和免疫分析是含有下列步骤的凝集分析

- a. 被分析物和未标记的多价被分析物类似物竞争性结合有限量的标记的被分析物结合试剂
- b. 将标记的被分析物结合试剂的凝集的和未凝集的级份分离
- c. 固定和浓缩标记的被分析物结合试剂的未凝集的级份
- d. 检测被固定和浓缩的标记的被分析物结合试剂。

或者，凝集分析包含下列步骤

- a. 被分析物和标记的多价被分析物类似物竞争性结合有限量的未标记的被分析物结合试剂

- b. 将标记的多价被分析物类似物的凝集的和未凝集的级份分离开
- c. 固定和浓缩标记的多价被分析物类似物的未凝集的级份
- d. 检测被固定和浓缩的标记的多价被分析物类似物的未凝集的级份。

优选情况下，结合的或凝集的和未凝集的级份，通过对结合的或凝集的级份进行固定来分离。更优选情况下，结合的级份通过孔径阻止结合的级份的毛细管膜来固定。或者，结合的级份通过被固定的被分析物结合试剂、结合配偶体或其它关联配体来固定。在任何一种情况下，结合的级份被有效固定在初级捕获区上。

在可选的实施方案中，凝集的和未凝集的级份通过使溶剂流过多孔膜而层析分离。该实施方案分布有分散的特异性初级捕获区，其上固定有凝集的级份，通过使用适合的毛细管膜在粒径的基础上分离凝集的和未凝集的级份。颗粒随流体流过毛细管膜的移动速度与它们的大小成反比。因此，凝集物通过反应区的速度依赖于它们的大小，较大的凝集物移动得较慢，较小的凝集物和单独的颗粒移动得较快。在侧向流格样分析中，毛细管流前进到溶剂的前沿到达毛细管膜的末端，这时流体和颗粒的流动都将停止，颗粒越过的距离依赖于凝集物的大小。因此，通过将“次级”捕获区（即将捕获所有颗粒和凝集物的区域）放置在沿着膜、远离在不存在被分析物的情况下产生的大的凝集物所能达到的位置上，则只有在存在被分析物的情况下才能在捕获区中产生信号。

层析格样具有本发明的具有进一步改进的其它实施方案的所有优点，不需要修饰的初级捕获区（即改变膜的孔径、或结合的抗体或其它试剂），因此简化了制造，并且更廉价。

这种格样的另一个优点是它提供了增加的灵敏度。物理性初级捕获区可以捕获在不存在被分析物情况下形成的大的凝集物，以及在存

在低水平被分析物的情况下产生的稍微小些的凝集物。选择用于初级捕获区的可以清楚地辨别这两者的材料，可能是困难的。但是，通过使用动力学的、层析的格样，以及将次级捕获区放置在适当的位置，辨别从而检测低水平的被分析物是可能的。

对于任何描述的实施方案来说，标记的试剂的未凝集的或未结合的游离级份可以通过利用次级捕获区来固定和浓缩，该次级捕获区含有其孔径能够阻止或捕获标记的试剂的毛细管膜。

或者，次级捕获区可以含有固定的被分析物结合试剂，或其它能够以足够高的亲和性有效地固定未凝集的或未结合的标记试剂的游离级份、并产生目测可检测的指示、例如有色的线或区域的关联性结合配偶体或配体。可视信号的本质和颜色依赖于与试剂连接的标记物的本质。可以使用胶体金、乳胶颗粒或其它生色标记物。这样的连接的标记物除了提供可视信号之外，还可以提供通过形成常规尺度的信号颗粒以进行捕获的工具。

在任何可选方法中，结果是次级捕获区提供选定的被分析物的最初存在和/或浓度的方便的视觉指示。被捕获或结合在次级捕获区上的标记试剂的量，在由被分析物的量和每种分析方法的能力所决定的限度范围内，与被测量的原始被分析物的浓度成比例。

本发明的方法、分析、试剂盒和装置适合用于任何能够被被分析物结合试剂结合的被分析物的检测。优选的被分析物包括蛋白、糖蛋白、肽或多肽、碳水化合物、半抗原和核酸。特别优选的生物学相关的例子包括抗体、激素、激素受体、抗原、生长因子受体、维生素、甾体、代谢物、适体、完整生物体（例如真菌、细菌、病毒、原生动物和多细胞寄生生物）、治疗性或非治疗性药物，或其任何组合或片段。当可检测被分析物是抗体时，被分析物结合试剂可以是抗原、抗原类似物、半抗原、半抗原类似物或对被测量的抗体具有特异性的第

二抗体。

优选情况下，被分析物可以是免疫活性蛋白或多肽，例如抗原性多肽或蛋白。用于本发明的检测的最优选的被分析物包括 hCG、LH、FSH 和针对 HIV 的抗体。

设想了本发明可用于在单一分析中、优选甚至在单一样品中、检测两种或两种以上被分析物。因此，在任何分析方法中，可以提供两种或两种以上次级捕获区，每个特异性捕获特定的标记试剂。标记试剂可以通过任何适合的工具区分开，例如颜色。

另一方面，本发明提供了用于执行饱和分析以在样品中检测被分析物的试剂盒，该试剂盒包含：

- a. 用于分离竞争性结合步骤的结合的和未结合的级份的工具
- b. 次级捕获区。

优选情况下，试剂盒还含有有孔载体。

更优选情况下，用于分离竞争性结合步骤的结合的和未结合的级份的工具含有初级捕获区。

在一个优选实施方案中，饱和分析是凝集免疫分析，初级捕获区含有用于固定凝集的级份的工具。优选情况下，初级捕获区含有其孔径阻止了结合的或凝集的级份的毛细管膜。

或者，用于分离竞争性结合步骤的结合的和未结合的级份的工具，含有其孔径允许在粒径的基础上对结合的和未结合的产物进行层析分离的毛细管膜。在高度优选的实施方案中，竞争性结合步骤是凝集步骤，层析分离将凝集的复合物与未凝集的成分分离开。

优选情况下，试剂盒含有本文前面描述的标记的试剂。

优选情况下，次级捕获区含有用于固定和浓缩标记的结合试剂的游离级份的工具。在一个实施方案中，次级捕获区含有其孔径阻止游离的或未凝集的标记试剂的毛细管膜。或者，次级捕获区可以含有被固定的被分析物结合试剂，或其它能够以足够高的亲和性有效地固定游离的或未凝集的级份、并产生目测可检测的指示、例如有色的线或区域的关联性结合配偶体或配体。

优选情况下，试剂盒还含有

- a. 多价被分析物类似物，优选含有中心，其上结合有两种或两种以上被分析物类似物基团，以及
- b. 能够与该被分析物类似物基团结合的两种或两种以上标记的被分析物结合试剂。

或者，试剂盒还包含

- a. 中心，其上结合有两种或两种以上被分析物结合试剂，以及
- b. 能够与该被分析物结合试剂结合的两种或两种以上标记的被分析物类似物基团。

优选情况下，试剂盒还含有一种或多种其它成分，这些成分选自缓冲液、施加工具（例如滴管）、说明书、图表、干燥剂、对照样品、染料、电池和/或信号处理/显示工具。

优选情况下，多孔载体是固体基质，优选为纤维性的。

更优选情况下，初级捕获区上游的孔径足以允许中心、标记试剂、样品和任何被结合的级份或凝集物自由运动。

最后一方面，本发明还提供了用于执行饱和分析以在样品中检测

被分析物的装置，该装置含有载体，载体的近端用于接收样品，样品可以沿着载体向远端移动，其中载体含有：

- a. 含有用于阻止被结合的级份的工具的初级捕获区，以及
- b. 含有用于阻止标记的试剂的工具的次级捕获区。

优选情况下，载体是有孔的。优选情况下，初级和/或次级捕获区分别含有其孔径阻止了结合的级份或标记试剂的毛细管膜。

优选情况下，装置还包含干燥的、可重构形式的中心，其上结合有两种或以上被分析物结合试剂或可选的被分析物类似物基团。装置优选被安装在罩壳或容器中，更优选将是手持式的。

发明详述

下面将通过非限制性的实施例并参考图对本发明进行描述，在图中：

图 1 显示了具有初级凝集物捕获区的试验片条的组件。

图 2 显示了具有层析性凝集物分离膜的试验片条的组件。

图 3 显示了阳性与阴性示例试验结果的照片。

实施例 1. 抗体包被的聚苯乙烯微粒的制备

1. 将 100 μ l 含有 10%固形物的 200nm 蓝色聚苯乙烯微粒(“乳胶”) (Polymer Labs, Shropshire, UK)，200 μ l 无水乙醇、43 μ l 绵羊的 FITC 抗血清(Micropharm, Carmarthenshire, UK)和 657 μ l 的 pH 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲液进行混合。

2. 在室温温育 2 小时，同时轻轻搅拌，允许抗体吸附发生。

3. 加入 200 μ l 6% BSA 的 pH 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲液，边搅拌边继续温育 1 小时。

4. 将吸附混合物在 4000g 离心 20 分钟，然后在 8000g 离心 5 分钟，以形成柔软的乳胶沉淀。

5. 除去上清液并用 1 ml 乳胶稀释缓冲液(Omega Diagnostics, Alva,

UK) 替换。轻轻将沉淀重新悬浮。

6. 通过离心收集乳胶沉淀，并按照 5 中的描述清洗。

7. 将步骤 6 进一步重复两次，最后将乳胶沉淀重新悬浮在 900 μ l 乳胶稀释缓冲液中。

8. 通过用 690nm 处的光吸收进行评估，与标准的稀释系列进行比较，将乳胶固形物浓度调整到 1% w/v。

9. 通过载玻片凝集分析证实抗体的吸附，将 2 μ l 1%固形物的抗-FITC 乳胶与 1 μ l 在 pH 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲盐水中的 10-300 ng/ μ l 的 FITC-葡聚糖 (Sigma-Aldrich, FD2000S) 进行混合。

实施例 2. 抗体包被的聚苯乙烯微粒的制备

1. 将 100 μ l 含有 10%固形物的 200nm 蓝色聚苯乙烯微粒(“乳胶”) (Polymer Labs, Shropshire, UK)、200 μ l 无水乙醇、pH 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲盐水中的 750 μ g 小鼠 IgG (Sigma, 15381) 和 pH 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲盐水中的 110 μ g 抗-hCG (Medix Biochemica, Kauniainen, Finland, 克隆编号#5006) 进行混合。用 pH 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲盐水将体积调整到 1ml。

2. 在室温温育 2 小时，同时轻轻搅拌，允许抗体吸附发生。

3. 加入 200 μ l 6% BSA 的 pH 7.4 的 10mM 磷酸盐缓冲液，边搅拌边继续温育 1 小时。

4. 将吸附混合物在 3500g 离心 10 分钟，以形成柔软的乳胶沉淀。

5. 除去上清液并用 1 ml 乳胶稀释缓冲液(Omega Diagnostics, Alva, UK) 替换。轻轻将沉淀重新悬浮。

6. 通过在 8000g 离心 20 分钟来收集乳胶沉淀，并按照 5 中的描述清洗沉淀。

7. 将步骤 6 进一步重复两次，最后将乳胶沉淀重新悬浮在 500 μ l 乳胶稀释缓冲液中。

8. 通过用 690nm 处的光吸收进行评估，与标准的稀释系列进行比较，将乳胶固形物浓度调整到 1% w/v。

9. 通过载玻片凝集分析证实抗体的吸附，将 2.5 μ l 1%固形物的在

此制备的“测试”乳胶与等量的用适当的抗体“三明治配偶体”（以前使用同样的方法制备和证实的）包被的“对照”乳胶，加入 5 μ l 溶解在“合成尿液”（即大约 4.5 g/l KCl、7.5 g/l NaCl、4.8 g/l 磷酸二氢钠（单价碱）、18.2 g/l 尿素、2 g/l 肌酸酐、50mg/l HAS）中的 0-250 IU/ml 的 hCG 溶液（hCG 的浓度值按照第四版 I.S., NIBSC 进行赋值），进行混合。

实施例 3. hCG 中心试剂的制备

1. 将抗 hCG (α -亚基) 抗体在 pH 7.5 的 0.1 M 磷酸盐缓冲液中使用 1.6 x 15cm G25M Sephadex 柱进行脱盐，并测定浓度和产率。

2. 使用 8 倍摩尔数的 NHS-PEG-MAL 活化抗 hCG 抗体。将反应混合物在 20°C 温育 2 小时。用 100 倍摩尔量的甘氨酸淬灭反应，通过两次流过 1.6 x 15cm G50F Sephadex 柱将马来酰亚胺活化的抗 hCG 抗体脱盐到 5mM EDTA 的 pH 7.3 的 PBS 缓冲液中。测定被活化的抗体的浓度和产率。

3. 使用 1000 倍摩尔量的 2-亚氨基硫醇 (2-iminothiolane) (2-IT) 活化 500 kDa 的氨基葡聚糖。将反应混合物在 20°C 温育 110 分钟。使用 G25M Sephadex 介质将硫醇活化的氨基葡聚糖脱盐到含有 5mM EDTA 的 pH 7.3 的 PBS 缓冲液中。使用 Ellman 分析方法测定硫醇：氨基葡聚糖的掺入比率。

4. 将 25 倍摩尔量的马来酰亚胺活化的抗 hCG 抗体加入到硫醇活化的氨基葡聚糖中，将反应混合物在 15°C 温育 16 小时。使用 1000 倍摩尔量的 N-乙基马来酰亚胺淬灭反应混合物。在 2.6 x 50cm Superdex 200PG 柱上使用 pH 7.2 的 50mM PBS 缓冲液作为洗脱液对结合物进行纯化。测定结合物的浓度和产率，然后通过 0.2 μ m 的 Minisart 滤器进行过滤。

5. 最后，用 hCG 对抗 hCG 抗体-氨基葡聚糖结合物进行“预饱和”，通过将 70 μ l 抗 hCG 抗体-氨基葡聚糖结合物 (21.6 ng/ μ l) 与 30 μ l hCG 溶液 (178.5 IU/ml, 在“合成尿液”中 (即大约 4.5 g/l KCl、7.5 g/l NaCl、4.8 g/l 磷酸二氢钠 (单价碱)、18.2 g/l 尿素、2 g/l 肌酸酐、50mg/l HAS))

进行组合进行，然后在 4°C 温育 30 分钟。

实施例 4. 具有初级凝集物捕获膜的试验片条的制备

将膜材料切成如下的尺寸：

1. 布芯 (wick)，例如结合物释放垫片 8964 (Ahlstrom)，20mm x 50mm。
2. 初级凝集物捕获膜，例如 Fusion 5 (Whatman)，4mm x 50mm。
3. 中间膜，例如结合物释放垫片 8964 (Ahlstrom)，10mm x 50mm。
4. 游离级份浓缩膜，例如 Z-bind PES 膜，0.2 μ m (PALL)，3mm x 50mm。
5. 吸附剂槽，例如吸附剂垫片 222 (Ahlstrom)，50mm x 50mm。
6. 自粘性塑料 (x 2)，例如带有 D/C 亲水性 PSA 的 0.04"的透明聚酯 (G&L)，70mm x 100mm。

将上面材料的复合材料“卡片”按照图 1 中的显示进行装配。将相邻的膜材料按照显示那样对齐，以确保片条的连续部分之间的良好的流体转移。将第二片自粘性的塑料牢固地施加到上表面上，留下大约 10mm 的布芯暴露出来，用于施加样品/试剂。得到的“卡片”被切成 4mm 的片条，裁去任何多余的塑料。

实施例 5. 具有层析性凝集物分离膜的试验片条的制备

将膜材料切成如下的尺寸：

1. 布芯/分离膜，例如结合物释放垫片 8964 (Ahlstrom)，100mm x 50mm。
2. 游离级份浓缩膜，例如 Z-bind PES 膜，0.2 μ m (PALL)，4mm x 50mm。
3. 吸附剂槽，例如吸附剂垫片 222 (Ahlstrom)，10mm x 50mm。
4. 自粘性塑料 (x 2)，例如带有 D/C 亲水性 PSA 的 0.04"的透明聚酯 (G&L)，70mm x 120mm。

将上面材料的复合材料“卡片”按照图 2 的显示进行装配。将相邻的膜材料按照显示那样对齐，以确保片条的连续部分之间的良好的流体转移。将第二片自粘性的塑料牢固地施加到上表面上，留下大约 10mm 的布芯暴露出来，用于施加样品/试剂。得到的“卡片”被切成 4mm 的片条，裁去任何多余的塑料。

实施例 6. 使用具有初级凝集物捕获膜的试验片条测试荧光素

1. 将 2 μ l 含有 1%w/v 固形物的抗 FITC 乳胶（按照实施例 1 的描述在内部制备）与 1 μ l 荧光素溶液混合，并在室温温育 10 分钟。

2. 将 1 μ l 的 30ng/ μ l pH7.4 的磷酸盐缓冲盐水中的 FITC-葡聚糖“中心”加入到上面的混合物中，继续温育 5 分钟。

3. 然后将上述的反应混合物加到带有初级凝集物捕获膜的试验片条（按照实施例 4 中的描述装配）的靠近“布芯”端，然后加上大约 300 μ l 乳胶稀释缓冲液（Omega Diagnostics, Alva, UK），分三次加入，每次 100 μ l。

获得了下面的在游离级份浓缩膜上读到的结果。

表 1

	荧光素浓度 ng/ μ l	信号
实验 1	0	-
	0.1	+/-
	0.3	+
	1	+
	3	+
	10	+
	30	+
	100	+
实验 2	0	+/-
	1	++

	3	++
	10	++
	30	++
	100	++
	300	++

实施例 7. 使用具有层析性凝集物分离膜的试验片条测试荧光素
 试验使用具有层析性凝集物分离膜的试验片条（按照实施例 5 中的描述制备），按照实施例 6 中的描述进行。

获得了下面的在游离级份浓缩膜上读到的结果。

表 2

	荧光素浓度 ng/ μ l	信号
实验 1	0	-
	0.03	+/-
	0.1	+/-
	0.3	++
	1	++
	3	++
	10	++
实验 2	0	-
	0.03	+/-
	0.1	+/-
	0.3	+
	1	+
	3	++
	10	++

实施例 8. 使用具有初级凝集物捕获膜的试验片条测试抗 FITC 抗

体

1. 将绵羊 FITC 抗血清在正常绵羊血清（Micropharm, Carmarthenshire, UK）中稀释（如下所示）。

2. 将 1 μ l 每种稀释的抗血清与 1 μ l FITC-葡聚糖“中心”（10ng/ μ l，溶于 pH7.4 的磷酸盐缓冲盐水中）混合，在室温温育 10 分钟。

3. 将 2 μ l 含 1%w/v 固形物的抗-FITC 乳胶（按照实施例 1 的描述在内部制备）加入到上述混合物中，继续温育 5 分钟。

4. 然后将上述的反应混合物加到带有初级凝集物捕获膜的试验片条（按照实施例 4 中的描述装配）的靠近“布芯”端，然后加上大约 300 μ l pH7.4 的磷酸盐缓冲盐水，分三次加入，每次 100 μ l。

获得了下面的在游离级份浓缩膜上读到的结果：

表 3

FITC 抗血清稀释度	信号
0	+/-
1:10	+
1:3	+
1:1	+

实施例 9. 使用具有初级凝集物捕获膜的试验片条测试抗 FITC 抗
体

1. 将绵羊 FITC 抗血清在正常绵羊血清（Micropharm, Carmarthenshire, UK）中稀释（如下所示）。

2. 将 1 μ l FITC-葡聚糖“中心”（30ng/ μ l，溶于 pH7.4 的磷酸盐缓冲盐水中）与 1 μ l 1:100 的 FITC 抗血清混合，并在室温预温育 10 分钟。

3. 将 1 μ l 每种稀释的抗血清加入到 2 μ l 预温育的 FITC-葡聚糖“中心”（上述）中，在室温温育 10 分钟。

4. 将 2 μ l 含 1%w/v 固形物的抗-FITC 乳胶（按照实施例 1 的描述在内部制备）加入到上述混合物中，继续温育 5 分钟。

5. 然后将上述的反应混合物加到带有初级凝集物捕获膜的试验片条（按照实施例 4 中的描述装配）的靠近“布芯”端，然后加上大约 300 μ l pH7.4 的磷酸盐缓冲盐水，分三次加入，每次 100 μ l。

获得了下面的在游离级份浓缩膜上读到的结果：

表 4

FITC 抗血清稀释度	信号
0	-
1:3000	-
1:1000	+/-
1:300	+/-
1:100	++
1:30	+
1:10	+
1:3	+

实施例 10. 使用具有初级凝集物捕获膜的试验片条测试 hCG

1. 将抗-hCG 乳胶（2 μ l）（按照实施例 2 中的描述制备）与 2 μ l 含有 hCG（“样品”）合成尿液（参见实施例 3）混合，并在室温温育 10 分钟。

2. 将预先饱和的 hCG 中心试剂（4 μ l）（按照实施例 3 中的描述制备）与上述混合物混合，使其反应 2-5 分钟。

3. 然后将上述的反应混合物加到带有初级凝集物捕获膜的试验片条（按照实施例 4 中的描述装配，只是初级凝集物捕获膜的大小被减小到 3mm x 50mm）的靠近“布芯”端，然后加上大约 300 μ l 乳胶稀释缓冲液（参见上述），分三次加入，每次 100 μ l。

获得了下面的在游离级份浓缩膜上读到的结果：

表 5

HCG 浓度 (IU/ml)	信号
0	+/-
0.25	+/-
0.5	+/-
6.25	++
62.5	+++

图1. 具有初级凝集物捕获膜的试验片条的组件。

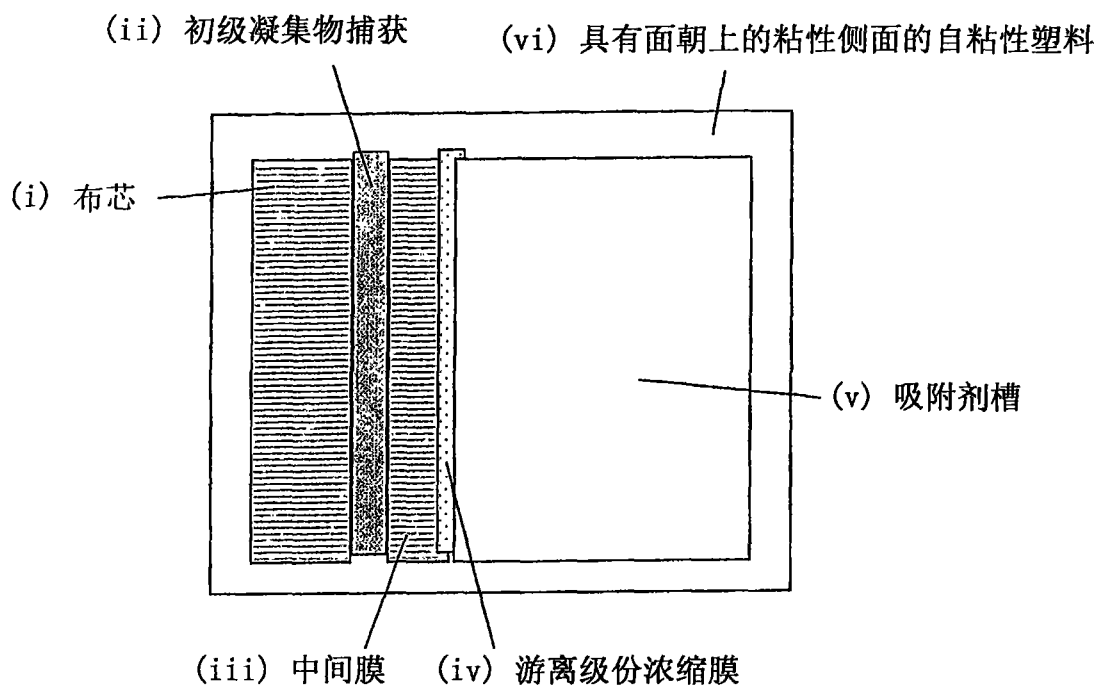


图1

图2. 具有层析性凝集物分离膜的试验片条的组件

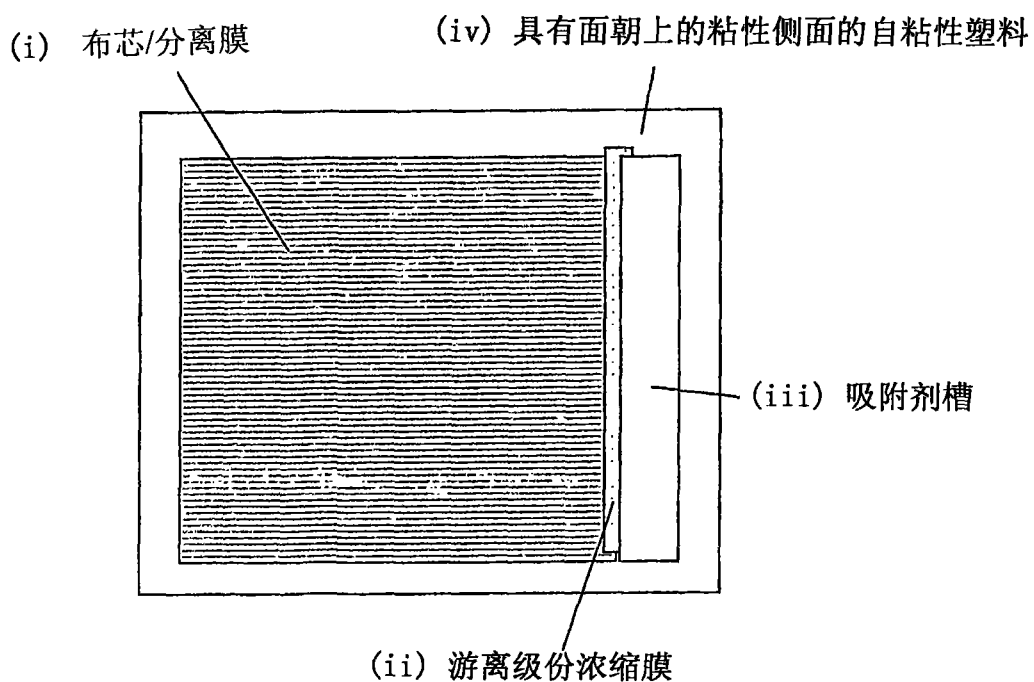


图2

图3. 阳性与阴性测试结果的照片

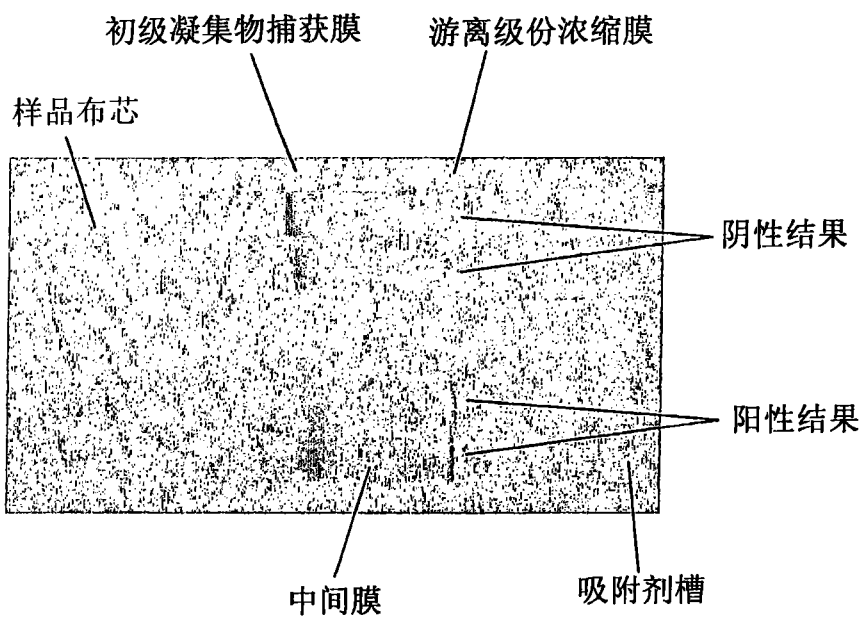


图3