



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101326440 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 24

(21) 申请号 200680014726. 4

(22) 申请日 2006. 02. 28

(30) 优先权数据

11/119, 262 2005. 04. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 10. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/007216 2006. 02. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02006/118647 EN 2006. 11. 09

(73) 专利权人 金伯利-克拉克环球有限公司

地址 美国威斯康星州

(72) 发明人 X·宋 保罗·克里斯多佛

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理

有限公司 11280

代理人 郭广迅 刘丹妮

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1608207 A, 2005. 04. 20, 权利要求 1, 说明书第 3 页最后 1 段至第 4 页第 1 段.

W0 03/058242 A2, 2003. 07. 17, 权利要求 1. 司士辉等. 抗体固载于 TiO2 多孔膜的压电免疫型细菌传感器. 《分析试验室》. 2004, (第 5 期), 全文.

审查员 黎舒婷

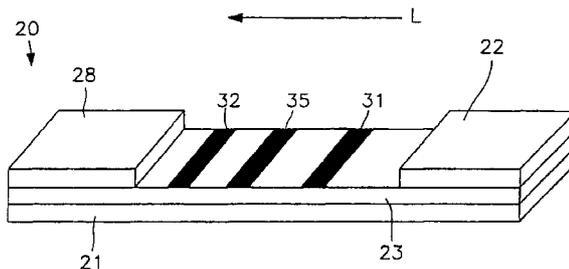
权利要求书1页 说明书22页 附图11页

(54) 发明名称

在钩状效应区域内具有检测能力的测定装置

(57) 摘要

本发明公开了一种用于检测测试样品中分析物的存在或数量的侧流测定装置。该装置采用多个区，其中一个用作测试样品中分析物是否处于“钩状效应”区域内的指示区。基于这种指示，可以选择针对分析物的浓度或浓度范围校正所测得信号强度的技术。例如，当确定测试样品落在“钩状效应”区域之外时，可采用剂量响应曲线的一部分来确定分析物浓度。另一方面，当确定测试样品落在“钩状效应”浓度之内时，可采用剂量响应曲线的另一部分来确定分析物浓度。或者，可以只将样品进行稀释以重新实施测定。本发明发明者发现这种检测技术可以简单、快速、准确地检测以任何浓度存在的分析物。



1. 一种用于检测测试样品中分析物的存在或数量的侧流测定装置,该侧流测定装置包括与缀合检测探针连通的多孔膜,其中所述分析物能够与该缀合检测探针形成复合物,所述多孔膜限定出:

检测区,该检测区内固定有第一受体材料,该第一受体材料设计成优先与所述分析物结合,而无论分析物是否与缀合检测探针复合,所述检测区能够产生可测量的检测信号;以及

指示区,该指示区位于所述检测区下游并且该指示区内固定有第二受体材料,该第二受体材料设计成优先与未复合的缀合检测探针结合,所述指示区能够产生可测量的指示信号;

其中所述可测量的指示信号的强度可与参比标准相比较以确定测试样品中的分析物浓度是否处于钩状效应区域内,所述参比标准表示处于分析物的饱和浓度或饱和浓度附近时指示信号的强度或强度范围;

其中所述多孔膜进一步限定出能够产生校正信号的校正区。

2. 权利要求 1 的侧流测定装置,其中所述第二受体材料具有至少一个与分析物相同的抗原决定部位。

3. 权利要求 1 的侧流测定装置,其中所述第二受体材料包括抗原。

4. 权利要求 3 的侧流测定装置,其中所述分析物是 C 反应蛋白。

5. 权利要求 1 到 4 中任意一项的侧流测定装置,其中所述第一受体材料包括抗体。

6. 权利要求 1 到 4 中任何一项的侧流测定装置,其中所述分析物的浓度至少部分决定于所述检测信号的强度。

7. 权利要求 1 到 4 中任何一项的侧流测定装置,其中所述分析物的浓度至少部分决定于所述指示信号的强度。

在钩状效应区域内具有检测能力的测定装置

[0001] 发明背景

[0002] 穿流 (flow-through) 测试中普遍采用了多种不同的分析方法和装置,用以确定测试样品中可能存在的分析物是否存在和 / 或浓度。例如,免疫测定法利用免疫系统机制,其中响应有机体病原性或外源性抗原的存在而产生了抗体。这些抗体和抗原,即免疫反应物能够彼此结合,由此引起能够用来确定生物样品中特定抗原的存在或浓度的高度特异性反应机制。

[0003] 有几种公知的免疫测定方法,这些方法利用由可检测的成分标记的免疫反应物,从而能够对分析物进行分析检测。例如,“夹心型”测定方式一般涉及使测试样品与检测探针混合,这些检测探针与分析物的特异性结合成员(例如抗体)缀合,从而在分析物与缀合探针之间形成复合物。然后使这些复合物与固定在检测区内的受体材料(例如抗体)相接触。分析物 / 探针缀合复合物与固定的受体材料之间发生结合,从而在定位能够检测以指示分析物存在的“夹心”复合物。这项技术可用于获得定量或半定量的结果。这些夹心型测定的一些实例在 Grubb 等人的 U. S. 4, 168, 146 和 Tom 等人的 U. S. 4, 366, 241 中有所描述。另一种技术是“竞争型”测定。在竞争性测定中,标记探针通常是和与分析物相同或类似的分子缀合。因此,标记探针与目标分析物竞争所存在的受体材料。竞争性测定法通常用于检测诸如半抗原之类的分析物,每个半抗原都是单价的并且仅能够结合一个抗体分子。竞争性免疫测定装置的实例在 Deutsch 等人的 U. S. 4, 235, 601、Liotta 的 U. S. 4, 442, 204 和 Buechler 等人的 U. S. 5, 208, 535 中有所记载。

[0004] 尽管这些装置具有优势,但当暴露于较高浓度的分析物时,许多常规的侧流测定都会遭遇准确度明显不足的问题。例如,当分析物以高浓度存在时,测试样品中相当大部分的分析物可能存在过量因而不能与缀合探针形成复合物。因此,到达检测区时,未复合的分析物与复合的分析物竞争结合位点。因为未复合分析物没有用探针标记,因而不能被检测到。因此,如果大量的结合位点被未复合的分析物所占据,则该测定可能显示出“假阴性”。该问题通常称为“钩状效应 (hook effect)”或“前带 (prozone)”。

[0005] 已经提出多种用于减少免疫测定中的“钩状效应”的技术。例如,Kuo 等人的美国专利 U. S. 6, 183, 972 中记载了一种多孔材料条带,通过它怀疑含有分析物的测试流体可以通过毛细作用流动。该条带具有至少两个其中固定有特异于分析物的第一抗原决定部位的抗体的不同的捕获区域。还采用了带可检测标记的特异于分析物第二抗原决定部位的抗体。当存在足够浓度时,分析物部分阻断了固定抗体与分析物第一抗原决定部位的结合。因此,在捕获区内形成了固定抗体、分析物和标记抗体的夹心形式。因而在各个不同的捕获区域中标记抗体发出的信号提供了一种独特于分析物浓度的信号模式。通过数学方法将这一组信号合并形成单调剂量响应曲线,以算出固定抗体与分析物第一抗原决定部位之间结合的阻断。

[0006] 然而,现在仍然需要一种以准确而简单廉价的方式测定“钩状效应”区域内分析物浓度的改进技术。

[0007] 发明简述

[0008] 根据本发明的一种实施方式,公开了一种用于检测测试样品中分析物的存在或数量的侧流测定装置。这种侧流测定装置包括与缀合检测探针连通 (in communication with) 的多孔膜。所述分析物能够与该缀合检测探针形成复合物。所述多孔膜限定出固定有第一受体材料的检测区,该第一受体材料设计成优先与分析物结合,而无论分析物是否与缀合检测探针复合。所述多孔膜还限定出位于检测区下游的指示区,其中该指示区中固定有第二受体材料。该第二受体材料设计成优先与未复合的缀合检测探针结合。所述检测区和指示区能够产生可测量的信号。该可测量的指示信号强度与参比标准相比较以确定测试样品中的分析物浓度是否处于钩状效应区域内。所述参比标准表示了在处于分析物的饱和浓度或饱和浓度附近时指示信号的强度或强度范围。

[0009] 本发明公开了一种定量或半定量地检测测试样品中的分析物的方法。该方法包括使测试样品与侧流装置的多孔膜接触。该多孔膜与缀合检测探针连通,并进一步限定出检测区和位于检测区下游的指示区。该方法包括测量检测区产生的检测信号强度以及指示区产生的指示信号强度。该方法进一步包括将测得的指示信号强度与参比标准相比较,所述参比标准表示在分析物的饱和浓度或饱和浓度附近指示信号的强度或强度范围。

[0010] 以下更详细地论述本发明的其它特征和方面。

[0011] 附图简要说明

[0012] 针对本领域的普通技术人员,本发明的全面和可实施的内容,包括其最佳方式,都参照附图在说明书的剩余部分进行了更加具体的阐述,其中:

[0013] 图 1 是本发明的侧流测定装置的一个实施方式的透视图;

[0014] 图 2 是根据本发明的一种实施方式,检测和指示区的分析物浓度和信号强度之间的关系曲线图;

[0015] 图 3 是用于本发明一种实施方式的机制在实施测定之前的示意图;

[0016] 图 4 表示了测定完成后图 3 的实施方式;

[0017] 图 5 表示了用于测定分析物浓度是否处于“钩状效应”区域内、并半定量或定量地测定该分析物浓度的方法的一种实施方式;

[0018] 图 6 是实施例 4 的剂量响应区线,其中绘制了信号强度与 CRP 浓度的关系;

[0019] 图 7 是实施例 5 的剂量响应区线,其中绘制了信号强度与 CRP 浓度的关系;

[0020] 图 8 是实施例 6 的剂量响应区线,其中绘制了信号强度与 CRP 浓度的关系;

[0021] 图 9 是实施例 8 的各缀合颗粒浓度的剂量响应曲线图,其中绘制了检测区产生的强度 (即 Rann 分数) 与 CRP 浓度的关系;

[0022] 图 10 是实施例 8 的各缀合颗粒浓度的剂量响应曲线图,其中绘制了指示区产生的强度 (即 Rann 分数) 与 CRP 浓度的关系;

[0023] 图 11 是实施例 9 的剂量响应曲线图,其中绘制了检测区和指示区的 Rann 分数与 CRP 浓度的关系,其中金颗粒尺寸为 40 纳米,缀合物光密度为 1.0,抗体线浓度为 0.5 毫克每毫升,CRP 线浓度为 0.5 毫克每毫升;

[0024] 图 12 是实施例 9 的剂量响应曲线图,其中绘制了检测区和指示区的 Rann 分数与 CRP 浓度的关系,其中金颗粒尺寸为 60 纳米,缀合物光密度为 1.0,抗体线浓度为 0.5 毫克每毫升,CRP 线浓度为 0.5 毫克每毫升;

[0025] 图 13 是实施例 9 的剂量响应曲线图,其中绘制了检测区和指示区的 Rann 分数与

CRP 浓度的关系,其中金颗粒尺寸为 40 纳米,缀合物光密度为 1.0,抗体线浓度为 0.1 毫克每毫升,CRP 线浓度为 0.5 毫克每毫升;

[0026] 图 14 是实施例 9 的剂量响应曲线图,其中绘制了检测区和指示区的 Rann 分数与 CRP 浓度的关系,其中金颗粒尺寸为 60 纳米,缀合物光密度为 1.0,抗体线浓度为 0.5 毫克每毫升,CRP 线浓度为 0.5 毫克每毫升;以及

[0027] 图 15 是实施例 9 的剂量响应曲线图,其中绘制了检测区和指示区的 Rann 分数与 CRP 浓度的关系,其中金颗粒尺寸为 40 纳米,缀合物光密度为 2.5,抗体线浓度为 0.1 毫克每毫升,CRP 线浓度为 0.5 毫克每毫升。

[0028] 附图标记在本说明书和附图中的重复使用意味着其代表本发明的相同或类似特征或部件。

[0029] 代表性实施方式详述

[0030] 定义

[0031] 正如本文所用的,术语“分析物”通常是指待检测的物质。例如,分析物可包括抗原性物质、半抗原、抗体以及这些物质的组合。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(包括那些为了治疗目的而施用的药物和那些为了违法目的而施用的药物)、药物中间体或副产物、细菌、病毒颗粒以及任何上述物质的代谢物或抗体。一些分析物的具体实例包括铁蛋白;肌酸激酶 MB(CK-MB);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;奎尼定;促黄体生成激素(LH);促卵泡激素(FSH);雌二醇、黄体酮;C-反应蛋白;脂蛋白(lipocalins);IgE 抗体;细胞因子;维生素 B2 微球蛋白;糖化血红蛋白(Gly. Hb);氢化可的松;毛地黄毒苷;N-乙酰普鲁卡因酰胺(NAPA);普鲁卡因酰胺;风疹抗体,例如风疹-IgG 和风疹 IgM;弓形体病抗体,例如弓形体病 IgG(Toxo-IgG)和弓形体病 IgM(Toxo-IgM);睾酮;水杨酸盐;对乙酰氨基酚;乙肝病毒表面抗原(HBsAg);乙肝核心抗原的抗体,例如抗-乙肝核心抗原 IgG 和 IgM(抗-HBC);人免疫缺陷病毒 1 和 2(HIV1 和 2);人 T-细胞白血病病毒 1 和 2(HTLV);乙肝 e 抗原(HBeAg);乙肝 e 抗原的抗体(抗-HBe);流感病毒;促甲状腺素(TSH);甲状腺素(T4);全三碘甲状腺原氨酸(全 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,和甘油三酯;以及 α -胎儿球蛋白(AFP)。滥用药物和受控物质包括但不限于安非他明;甲基安非他明;巴比妥酸盐,例如异戊巴比妥、司可巴比妥、戊巴比妥、苯巴比妥和巴比妥;苯二氮杂类,例如利眠宁和安定;大麻素类,例如印度大麻和大麻;可卡因;芬太尼;LSD;安眠酮;鸦片制剂,例如海洛因、吗啡、可待因、二氢吗啡酮、氢可酮、美沙酮、氧可酮、氧吗啡酮和鸦片;苯环利定;以及丙氧吩。其它可能的分析物在 Everhart 等人的 U. S. 6, 436, 651 和 Tom 等人的 U. S. 4, 366, 241 中有所记载。

[0032] 本文所用术语“测试样品”通常是指被怀疑含有分析物的生物材料。测试样品可以来自任何生物源,例如生理流体,包括血液、组织液、唾液、眼晶状体液、脑脊髓液、汗液、尿液、乳液、腹水、粘液、鼻液、痰、滑液、腹膜液、阴道液、月经、羊膜液、精液等等。除了生理流体,也可以使用其它的液体样品,例如用于实施环境或食品测定的水、食品等。此外,怀疑含有分析物的固体材料也可用作测试样品。测试样品可以从生物源获得后直接使用,或者在预处理后使用以改良样品的特性。例如预处理可包括用血液制备血浆、稀释粘稠液等等。预处理方法还包括过滤、沉淀、稀释、蒸馏、混合、浓缩、干扰成分的灭活、以及添加试剂、溶

菌等等。而且,有益的是,将固体测试样品改变成液态介质或者释放分析物。

[0033] 详细说明

[0034] 现在详细参照本发明的多个不同实施方案,其中的一个或多个实例在以下列出。每个实例都是为了解释本发明,而对本发明没有限定作用。事实上,对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的范围或精神的情况下能够对本发明作出多种修改和变型。例如,作为一种实施方案的一部分而阐述或描述的特征可用在另一种实施方案上,从而产生又一种实施方案。因而,本发明意在覆盖这样的修改和变型,即它们在所附的权利要求书及其等同方式的范围内。

[0035] 一般而言,本发明涉及一种用于检测测试样品中分析物的存在或数量的侧流测定装置。该装置采用多个区,其中一个用作测试样品中分析物是否处于“钩状效应”区域内的指示区。基于这种指示,可以选择针对分析物的浓度或浓度范围校正所测得信号强度的技术。例如,当确定测试样品落在“钩状效应”区域之外时,可采用剂量响应曲线的一部分来确定分析物浓度。另一方面,当确定测试样品落在“钩状效应”浓度之内时,可采用剂量响应曲线的另一部分来确定分析物浓度。或者,可以只将样品进行稀释以重新实施测定。本发明发明者发现这种检测技术可以简单、快速、准确地检测以任何浓度存在的分析物。

[0036] 参见图 1,例如,现在将更详细地描述可根据本发明制成的一种侧流测定装置 20 的实施方式。如图所示,装置 20 包含任选地由刚性材料 21 支撑着的多孔膜 23。通常,多孔膜 23 可以由测试样品能够通过的任何材料制成。例如,用来形成多孔膜 23 的材料可包括但不限于,天然的、合成的、或者天然存在并被合成改性的材料,例如多糖(例如,纤维素材料,如纸和纤维素衍生物,如醋酸纤维素和硝化纤维素);聚醚砜;聚乙烯;尼龙;聚偏二氟乙烯(PVDF);聚酯;聚丙烯;硅石;无机材料,如去活氧化铝、硅藻土、 $MgSO_4$ 或均匀分散在多孔聚合物基质中的其它无机细碎材料,其中所述聚合物是例如聚氯乙烯、氯乙烯-丙烯共聚物和氯乙烯-醋酸乙烯酯共聚物;布,包括天然存在的(例如棉)和合成的(例如尼龙或人造纤维);多孔凝胶,例如硅胶、琼脂糖、右旋糖苷和明胶;聚合物膜,例如聚丙烯酰胺等等。在一种特别的实施方式中,所述多孔膜 23 是由硝化纤维素和/或聚酯砜材料制成的。应当理解,术语“硝化纤维素”是指纤维素的硝酸酯,其可以是单独的硝化纤维素,或者是硝酸与其它酸,例如具有 1-7 个碳原子的脂肪族羧酸的混合酯。

[0037] 多孔膜 23 的尺寸和形状通常可以有所不同,如本领域技术人员很容易理解的那样。例如,多孔膜条带的长度可以从大约 10 到大约 100 毫米,在一些实施方式中为大约 20 到大约 80 毫米,而在一些实施方式中,为大约 40 到大约 60 毫米。膜条带的宽度范围也可以在大约 0.5 到大约 20 毫米,在一些实施方式中,为大约 1 到大约 15 毫米,而在一些实施方式中,为大约 2 到大约 10 毫米。同样,膜条带厚度通常足够小以允许基于透过的检测。例如,所述膜条带的厚度可以小于大约 500 微米,在一些实施方式中,小于大约 250 微米,而在一些实施方式中,小于大约 150 微米。

[0038] 如上所述,载体 21 承载着多孔膜 23。例如,如图 1 所示,载体 21 可以设置成直接邻接多孔膜 23,或者可以在多孔膜 23 和载体 21 之间设置一个或更多中间层。无论怎样,载体 21 通常都可由能够承载多孔膜 23 的任何材料形成。载体 21 可以由可透光的材料形成,例如透明的或光散射(例如半透明)材料。而且,通常希望载体 21 是不透液体的,这样液体流过膜 23 时不会泄漏通过载体 21。合适的载体材料的实例包括但不限于,玻璃;聚合物材

料,例如聚苯乙烯,聚丙烯,聚酯(例如,Mylar[®]薄膜),聚丁二烯,聚氯乙烯,聚酰胺,聚碳酸酯,环氧化物,甲基丙烯酸酯,和聚密胺(polymelamine)等等。为了向多孔膜 23 提供足够的结构支撑,通常将载体 21 选择成具有特定的最小厚度。同样,载体 21 的厚度通常也不会大到反过来影响其光学属性。因而,例如,载体 21 的厚度范围在大约 100 到大约 5000 微米,在一些实施方式中,为大约 150 到大约 2000 微米,而在一些实施方式中,为大约 250 到大约 1000 微米。例如一种适合的膜条带,厚度大约为 125 微米,可以购自 Millipore Corp. of Bedford, Massachusetts, 名为“SHF180UB25”。

[0039] 正如本领域所公知,多孔膜 23 可以浇注在载体 21 上,其中可以将得到的叠层冲切成预期的大小和形状。或者,所述多孔膜 23 可以仅利用诸如粘合剂之类的方式层压到载体 21 上。在一些实施方式中,是将硝化纤维素或尼龙多孔膜粘贴在 Mylar[®]薄膜上。粘合剂用于将多孔膜粘结到 Mylar[®]薄膜上,例如压力敏感型粘合剂。这类层压结构能够从 Millipore Corp. of Bedford, Massachusetts 买到。还有其它合适的层压测定装置结构的实例记载于 Durley, III 等人的美国专利 US 5, 075, 077 中,本文出于所有目的而引入它们的全文作为参考。

[0040] 装置 20 还可以包含吸收垫 28。所述吸收垫 28 通常接收已经迁移通过整个多孔膜 23 的流体。正如本领域内所公知,吸收垫 28 可以帮助促进毛细作用和流体流过膜 23。

[0041] 为了启动测试样品中分析物的检测,使用者可以直接将测试样品加到所述多孔膜 23 的一部分,然后通过多孔膜 23 样品沿着图 1 中箭头 L 所示的方向移动。或者,可以先将测试样品加到与多孔膜 23 流体连通的样品垫(未示出)上。可以用来形成样品垫的一些适宜材料包括但不限于,硝化纤维素、纤维素、多孔聚乙烯垫和玻璃纤维滤纸。如果需要的话,样品垫还可以含有以扩散或非扩散的形式附着于其上的一种或多种测定预处理试剂。

[0042] 在图示的实施方式中,测试样品从样品垫(未示出)移动到设置成与该样品垫一端连通的缀合垫 22。缀合垫 22 由测试样品能够通过的材料制成。例如,在一种实施方式中,缀合垫 22 由玻璃纤维制成。虽然仅示出一个缀合垫 22,但是应该理解,本发明中也可以使用多个缀合垫。

[0043] 为了帮助准确地检测测试样品中分析物是否存在,可将预定量的检测探针施加到该装置 20 的多个位点处。任何能够产生在视觉上或通过仪器设备可测得的信号的物质都可用作检测探针。合适的可检测物质可包括,例如发光化合物(例如荧光的、磷光的等等);放射性化合物;可见化合物(例如有色染料或金属物质,如金);脂质体或其它含有信号生成物质的囊泡(vesicles);酶和/或底物等等。其它合适的可检测物质记载于 Jou 等人的 U. S. 5, 670, 381 和 Tarcha 等人的 U. S. 5, 252, 459 中,本文出于所有目的而引入它们的全文作为参考。如果可检测物质是有色的,则理想的电磁辐射是互补波长的光。例如,蓝色的检测探针强烈地吸收红光。

[0044] 在一些实施方案中,可检测物质可以是能产生光学可检测信号的发光化合物。例如,合适的荧光分子可包括但不限于,荧光素、钨螯合物、藻胆蛋白、罗丹明,以及其衍生物和类似物。其它合适的荧光化合物有半导体纳米晶体,通常称作“量子点”。例如,所述纳米晶体可包含通式为 CdX 的核心,其中 X 为 Se、Te、和 S 等等。纳米晶体还可以由通式为 YZ 的包被壳所钝化,其中 Y 是 Cd 或者 Zn, Z 是 S 或 Se。其它合适的半导体纳米晶体实例还可以

记载于 Barbera-Guillem 等人的 U. S. 6, 261, 779 和 Dapprich 的 U. S. 6, 585, 939 中, 本文出于所有目的而引入它们的全文作为参考。

[0045] 此外, 合适的磷光化合物可包括一种或多种金属的金属配合物, 例如钌、铱、铈、铟、铍、钼、锆、铜、铁、铬、钨、锌等等。尤其优选的是钌、铱、铈、铂和钨。金属配合物可包含一个或多个有助于该配合物在含水或非含水环境中溶解的配体。例如, 配体的一些合适实例包括但不限于, 吡啶、吡嗪、异烟酰胺、咪唑、联吡啶、三联吡啶、菲咯啉; 联吡啶并吩嗪; 卟啉、卟吩及其衍生物。所述配体可以例如, 由烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、取代芳烷基、羧酸根、甲醛 (carboxaldehyde)、酰胺、氰基、氨基、羟基、亚氨基、羧基、氨基羧基、脒、胍、脲、酰脲基、含硫基团、含磷基团、N-羟基-琥珀酰亚胺的羧酸酯所取代。

[0046] 卟啉和卟吩金属配合物具有用亚甲桥偶联在一起的吡咯基, 从而与金属螯合的内部孔洞形成环状结构。这些分子中的许多在室温下在合适溶剂 (例如水) 中以及无氧环境下表现出强烈的磷光性质。能够表现出磷光性质的一些合适卟啉配合物包括但不限于, 铂 (II) 粪卟啉 -I 和 III, 钨 (II) 粪卟啉, 钌粪卟啉, 锌 (II)-粪卟啉 -I, 及其衍生物等等。类似地, 能够表现出磷光性质的一些合适卟吩配合物包括但不限于, 四-meso-氟苯基卟吩铂 (II) 和四-meso-氟苯基卟吩钨 (II)。还有其它合适的卟啉和 / 或卟吩配合物记载于 Schmidt 等人的 U. S. 4, 614, 723 ;Hendrix 的 U. S. 5, 464, 741 ;Soini 的 U. S. 5, 518, 883 ;Ewart 等人的 U. S. 5, 922, 537 ;Sagner 等人的 US. 6, 004, 530 ; 以及 Ponomarev 等人的 U. S. 6, 582, 930 中, 本文出于所有目的而引入它们的全文作为参考。

[0047] 还可以利用联吡啶金属配合物作为磷光化合物。合适的联吡啶配合物的一些实例包括但不限于, 二 [(4,4'-甲氧基)-2,2'-联吡啶]2-[3-(4-甲基-2,2'-联吡啶-4-基)丙基]-1,3-二氧戊环钌 (II); 二 (2,2'联吡啶)[4-(丁-1-醛)4'-甲基-2,2'-联吡啶]钌 (II); 二 (2,2'联吡啶)[4-(4'-甲基-2,2'-联吡啶-4'-基)-丁酸]钌 (II); 三 (2,2'联吡啶)钌 (II); (2,2'-联吡啶)[二-(1,2-二苯基膦基)亚乙基]2-[3-(4-甲基-2,2'-联吡啶-4'-基)丙基]-1,3-二氧戊环铱 (II); 二 (2,2'-联吡啶)[4-(4'-甲基-2,2'-联吡啶)-丁胺]钌 (II); 二 (2,2'联吡啶)[1-溴-4(4'-甲基-2,2'-联吡啶-4-基)-丁烷]钌 (II); 二 (2,2'-联吡啶)马来酰亚氨基己酸; 4-甲基-2,2'-联吡啶-4'-丁酰胺钌 (II) 等等。可表现出磷光性质的其它合适的金属配合物还记载于 Richter 等人的 U. S. 6, 613, 583 ;Massey 等人的 U. S. 6, 468, 741 ;Meade 等人的 U. S. 6, 444, 423 ;Massey 等人的 U. S. 6, 362, 011 ;Bard 等人的 U. S. 5, 731, 147 ;以及 Massey 等人的 U. S. 5, 591, 581 中, 本文出于所有目的而引入它们的全文作为参考。

[0048] 在一些情况下, 发光化合物可能具有较长的发光寿命和较大的“斯托克司频移”。术语“斯托克司频移”通常定义为, 发光辐射的谱线或波段移向比激发线或波段更长的发射波长。较大的斯托克司频移使得发光化合物的激发波长保持远离其发射波长, 并且由于激发和发射波长之间的较大差异使得较容易从发射信号中去除反射的激发辐射, 因而是人们所希望的。而且, 大斯托克司频移还使得来自样品中的发光分子和 / 或蛋白质或胶体的光散射的干扰降到最低, 这些蛋白质或者胶体存在于一些体液 (例如血液) 中。此外, 大斯托克司频移还使得对用来消除背景干扰的昂贵、高精度滤光片的需要最小化。例如, 在一些实施方案中, 发光化合物具有大于大约 50 纳米的斯托克司频移, 在一些实施方案中大于大约

100 纳米,而在一些实施方案中为大约 100 到大约 350 纳米。

[0049] 例如,具有大斯托克司频移的示例性荧光化合物包括钐(Sm(III))、镝(Dy(III))、铕(Eu(III))和铽(Tb(III))的镧系螯合物。在螯合物以相当短的波长激发之后所述螯合物可表现出强烈的红移、窄带、长寿命发光。通常,由于发色团位于分子中的镧系元素附近,所以螯合物具有强烈的紫外发射波带。由发色团激发之后,激发能量可以从激发的发色团传递到镧系元素上。之后是该镧系元素的荧光发射特性。例如,与荧光素仅为大约 28 纳米相比,铕螯合物的斯托克司频移在大约 250 到大约 350 纳米。同样,与其它荧光标记的大约 1 到大约 100 纳秒的寿命相比,铕螯合物的荧光寿命很长,其寿命大约为 100 到大约 1000 微秒。此外,这些螯合物具有窄发射波谱,通常在大约 50%的发射处带宽小于大约 10 纳米。一种合适的铕螯合物是 N-(对异硫氰酸根合苄基)二亚乙基三胺四乙酸-Eu⁺³。

[0050] 此外,本发明中还可以使用在水溶液或悬液中惰性、稳定并且具有固有荧光的镧系元素螯合物,从而无需胶束形成试剂,它们通常用来保护在水溶液或悬液中具有有限溶解度并存在猝灭问题的螯合物。这种螯合物的一个实例是 4-[2-(4-异硫氰酸根合苄基)乙炔基]-2,6-二([N,N-二(羧甲基)氨基]甲基)吡啶[参见:Lovgren, T. 等; Clin. Chem. 42,1196-1201(1996)]。一些镧系元素螯合物还表现出特别高的信噪比。例如,一种此螯合物是四配位基 β -二酮化物-铕螯合物[参见:Yuan, J. 和 Matsumoto, K.; Anal. Chem. 70,596-601(1998)]。除了上述荧光标记之外,适用于本发明的其它标记记载于 Mullinax 等人的 U. S. 6,030,840;Davidson 的 U. S. 5,585,279;Singer 等人的 U. S. 5,573,909;Wieder 等的 U. S. 6,242,268;Hemmila 等的 U. S. 5,637,509,本文出于所有目的而引入它们的全文作为参考。

[0051] 可检测物质,例如如上所述,可以单独使用或者与颗粒(有时称为“珠”或“微珠”)联合使用。例如,可以使用天然形成的颗粒,例如胞核、支原体、质粒、质体、哺乳动物细胞(例如红细胞影)、单细胞微生物(例如细菌)、多糖(例如琼脂糖)等等。此外,也可以利用合成颗粒。例如,在一种实施方案中,采用了标记有荧光或有色染料的乳胶微粒。尽管本发明中可以使用任何合成颗粒,但所述颗粒典型地是由以下物质构成:聚苯乙烯、丁二烯苯乙烯、苯乙烯丙烯酸-乙烯基三聚物、聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸乙酯、苯乙烯-马来酐共聚物、聚乙酸乙烯酯、聚乙烯基嘧啶、聚二乙烯苯、聚对苯二甲酸丁二醇酯、丙烯腈、氯乙烯-丙烯酸酯等等,或者其醛、羧基、氨基、羟基、或者酰肼衍生物。其它合适的颗粒记载于 Jou 等人的 U. S. 5,670,381,Tarcha 等人的 U. S. 5,252,459 和 Bodzin 等人的美国专利申请 2003/139886 中,本文出于所有目的而引入它们的全文作为参考。市场上可买到的合适荧光颗粒的实例包括 Molecular Probes, Inc. 出售的商品名为“FluoSphere”(Red 580/605)和“TransfluoSphere”(543/620)的荧光羧化微球,以及同样由 Molecular Probes, Inc. 出售的“Texas Red”,和 5-,6-羧基四甲基罗丹明。此外,市场上可买到的合适的有色乳胶微粒实例包括 Bang's Laboratory, Inc. 出售的羧化乳胶微珠。本发明中也可以采用金属颗粒(例如金颗粒)。

[0052] 当使用时,颗粒的形状一般可以变化。例如,在一种特别的实施方案中,所述颗粒是球状的。然而,应当明白的是本发明也可以构思其它的形状,例如板状、棒状、盘状、条状、管状、不规则形状等等。此外,颗粒的大小也可以有所不同。例如,颗粒的平均尺寸(例如直径)范围可以在大约 0.1 纳米到大约 100 微米,在一些实施方案中,为大约 1 纳米到大约

10 微米,而在一些实施方案中,为大约 10 到大约 100 纳米。

[0053] 在一些情况下,可能希望以一些方式改变检测探针使其更容易与分析物结合。在这种情况下,检测探针可以通过粘附于其上的某种特异性结合成员改性以形成缀合探针(conjugated probes)。特异性结合成员通常是指特异性结合对的成员,所述特异性结合对即两个不同分子,其中一个分子化学和/或物理结合到第二个分子上。例如,免疫活性特异性结合成员可包括抗原、半抗原、适配体(apptamers)、抗体(第一或第二)、以及其复合物(complexes),包括通过重组 DNA 方法或肽合成法制成的那些。抗体可以是单克隆或多克隆抗体,重组蛋白质或其混合物或片断,以及抗体和其它特异性结合成员的混合物。这种抗体的制备细节以及其用作特异性结合成员的适用性是本领域技术人员公知的。其它常规的特异性结合对包括但不限于生物素和抗生物素蛋白(或其衍生物),生物素和抗生物素蛋白链菌素,碳水化合物和外源凝集素,互补核苷酸序列(包括在 DNA 杂交测定中用来检测靶核酸序列的探针和捕获核酸序列),互补肽序列包括通过重组方法所形成的那些,效应物和受体分子,激素和激素结合蛋白,辅酶(enzyme cofactors)和酶,酶抑制因子和酶等等。此外,特异性结合对可包括是原特异性结合成员的类似物的成员。例如,可以使用分析物的衍生物或片段(即“类似物”),只要其具有至少一个与分析物相同的抗原决定部位。

[0054] 特异性结合成员通常可以利用任何各种公知的技术与检测探针相连。例如,利用羧基、氨基、醛基、溴乙酰基、碘乙酰基、硫醇基、环氧基和其它反应性或连接官能团,以及残余自由基和自由基阳离子,可以实现蛋白质的偶联反应,从而可以实现特异性结合成员与检测探针(例如,颗粒)的共价连接。表面官能团还可以作为官能化共聚单体被引入,因为所述检测探针表面可含有较高表面浓度的极性基团。此外,尽管所述探针通常在合成后进行官能化,例如用聚(苯硫酚)官能化,但所述探针也可以直接与蛋白共价连接而无需进一步改性。例如,在一种实施方案中,缀合的第一步是使用碳二亚胺活化探针表面的羧基。在第二步中,活化的羧酸基团与抗体的氨基反应形成酰胺键。所述活化和/或抗体偶联可以在缓冲液中进行,例如磷酸盐缓冲液(PBS)(例如,pH 值 7.2)或 2-(N-吗啉代)乙烷磺酸(MES)(例如,pH 值 5.3)。

[0055] 然后得到的检测探针例如可以与乙醇胺接触,用以阻断任何残余的活性位点。总之,该过程形成了缀合的检测探针,其中抗体与所述探针共价连接。除了共价连接外,本发明中还可以采用其它的连接技术,例如物理吸附。

[0056] 再参见图 1,多孔膜 23 限定出了用以进行测定的不同区。例如,多孔膜 23 限定出了含有第一受体材料的检测区 31。所述第一受体材料固定多孔膜 23 上并可以选自与上述特异性结合成员相同的材料,包括,例如,抗原;半抗原;抗体结合蛋白,例如蛋白 A,蛋白 G,或蛋白 A/G;中性抗生物素蛋白(neutravidin)(一种去糖基化(deglycosylated)抗生物素蛋白衍生物),抗生物素蛋白(66000 道尔顿的高度阳离子型糖蛋白),抗生物素蛋白链菌素(52800 道尔顿的非糖基化蛋白),或者 captavidin(一种硝化抗生物素蛋白衍生物);第一或第二抗体,及其衍生物或片段。在一些实施方式中,例如,第一受体材料是对测试样品中的抗原特异性的抗体。所述第一受体材料可以用作针对分析物和缀合检测探针之间形成的复合物的固定结合位点。具体而言,分析物例如抗体、抗原等,通常具有两个或多个结合位点(例如,抗原决定部位)。在到达检测区 31 后,这些结合位点之一被缀合探针的特异性结合成员所占据。然而,分析物的自由结合位点可以结合到固定的第一受体材料上。在

与所述的受体材料结合后,所述复合探针便形成了一种新的三元夹心复合物。

[0057] 测定装置 20 还含有位于检测区 31 下游的指示区 35。该指示区 35 含有固定在所述多孔膜 23 上的第二受体材料。该第二受体材料用作所述缀合检测探针的固定结合位点。为了在指示区 35 内实现预期的结合,通常希望所述第二受体材料能够区分与分析物复合在一起的那些检测探针和保持未复合状态那些检测探针。例如,在一种实施方式中,第二受体材料包括具有至少一个与分析物相同的抗原决定部位的分子,例如分析物分子或其衍生物或片断(即类似物),使得其能够特异性地结合到未与分析物复合的抗体缀合物上。

[0058] 或者,所述第二受体材料可以包括不是分析物分子或其类似物的生物材料,但其能够优先与未复合的缀合探针结合。在一种实施方式中,例如,第一受体材料可以是单克隆抗体,例如抗 CRP IgG₁。检测探针与不同于第一受体材料单克隆抗体的单克隆抗体如抗 CRP IgG₂ 缀合。在这种特殊的实施方式中,第二受体材料可以是第二抗体,例如羊抗人 IgGF(ab')₂,其 F_c 片断已被吸附,因而只与 IgG 的 F_{ab} 部分反应。因此,当不存在分析物时,第二抗体能够与抗 CRP IgG₂ 单克隆抗体的自由“F_{ab}”结合域结合。然而,当测试样品中存在抗原时,其首先与抗 CRP IgG₂ 单克隆抗体的“F_{ab}”结合域复合。所述抗原的存在使得“F_{ab}”结合域之后不能与第二抗体结合。通过这种方式,指示区 35 内的第二抗体能够优先与未复合的检测探针结合。

[0059] 尽管检测区 31 和指示区 35 提供了准确的结果,但有时难以确定在实际测试条件下测试样品中分析物的相对浓度。因此,测定装置 20 还可以包括校正区 32。在该实施方式中,校正区 32 形成于多孔膜 23 上,并位于检测区 31 和指示区 35 的下游。然而可选择地,校正区 32 还可以位于所述检测区 31 和 / 或指示区 35 的上游。

[0060] 校正区 32 具有第三受体材料,其能够与通过了膜 23 长度的任何校正探针结合。当使用时,校正探针可以含有与用于检测探针的可检测物质相同或不同的可检测物质。而且,所述校正探针还可以与例如如上所述的特异性结合成员缀合。例如在一种实施方式中,可以使用生物素化的 (biotinylated) 校正探针。一般来说,校正探针可以通过如下方式进行选择:使其不与检测区 31 和指示区 35 的第一或第二受体材料结合。校正区 32 的第三受体材料可以与检测区 31 或指示区 35 中使用的受体材料相同或不同。例如,在一种实施方式中,第三受体材料是生物受体材料,例如抗原,半抗原,抗体结合蛋白(例如蛋白 A,蛋白 G,或蛋白 A/G),中性抗生物素蛋白,抗生物素蛋白,抗生物素蛋白链菌素, captavidin; 第一或第二抗体,或其复合物。还希望采用各种非生物材料作为校正区 32 中的第三受体材料(例如聚电解质),例如 Song 等人的美国专利申请公开 No. 2003/0124739 中所述,本文出于所有的目的而引入其全文作为参考。

[0061] 当使用时,聚电解质可具有净正电荷或负电荷,以及通常成中性的净电荷。例如,具有净正电荷的聚电解质的一些合适实例包括但是不限于,聚赖氨酸(可从 Sigma-Aldrich Chemical Co., Inc of St. Louis, Missouri 买到),聚乙烯亚胺;环氧氯丙烷-官能化多胺和 / 或多酰氨基胺 (polyamidoamines),例如聚(二甲胺-共-环氧氯丙烷);聚二烯丙基二甲基氯化铵;阳离子纤维素衍生物,例如接枝有季铵水溶性单体的纤维素共聚物或纤维素衍生物;等等。在特定的实施方式中,可以使用 CelQuat[®] SC-230M 或 H-100(可从 National Starch&Chemical, Inc. 得到),其是含有季铵水溶性单体的纤维素衍生物。此外,具有净负电荷的聚电解质的一些合适实例包括但是不限于,聚丙烯酸类,例

如聚(乙烯-共-甲基丙烯酸, 钠盐)等等。应该明白的是,也可以使用其它的聚电解质,例如两性聚电解质(即具有极性和非极性部分)。例如,合适的两性聚电解质的一些实例包括但是不限于,聚(苯乙烯基-b-N-甲基 2-乙烯基吡啶鎓碘化物)和聚(苯乙烯基-b-丙烯酸),两者都可以从 PolymerSource, Inc of Dorval, Canada 获得。

[0062] 尽管通常可以使用任何聚电解质,但针对特殊应用选择的聚电解质根据检测探针、校正探针、膜等的性质可以有所不同。特别地,聚电解质的分布的电荷使其能够结合具有相反电荷的物质。因此,例如,具有净正电荷的聚电解质通常良好的具备结合带负电探针的能力,而具有净负电荷的聚电解质通常良好的具备结合带正电探针的能力。因此,在这种情况下,这些分之间的离子相互作用使得所需要的结合作用发生在校正区 32 内。然而,尽管离子相互作用主要用于在校正区 32 内实现期望的结合,但聚电解质也可以与具有相似电荷的探针结合。

[0063] 由于聚电解质设计成与探针结合,故通常希望该聚电解质基本上不扩散地固定在所述多孔膜 23 的表面上。否则,该探针将不易被使用者检测到。因此,所述聚电解质可以以这种方式应用到多孔膜 23 上:使其基本上不扩散到多孔膜 23 的基质中。特别地,所述聚电基质通常与多孔膜 23 表面上存在的官能团形成离子和/或共价键,从而使其保持固定在上面。尽管不是必需的,但所希望在聚电解质和多孔膜 23 之间形成共价键以更加持久地将聚电解质固定在上面。例如,在一种实施方式中,首先将用于形成聚电解质的单体形成溶液,然后直接施加到多孔膜 23 上。可以采用各种溶剂(例如有机溶剂、水等等)来制备该溶液。一经施加后,就采用加热、电子束辐射、自由基聚合等方式引发单体的聚合反应。在一些情况下,随着单体的聚合,它们与多孔膜 23 的某些官能团形成共价键,从而将所得到的聚电解质固定于其上。例如,在一种实施方式中,乙撑亚胺单体可以与一些多孔膜(例如硝化纤维素)表面上存在的羧基形成共价键。

[0064] 在另一种实施方式中,聚电解质可以在施加到多孔膜 23 之前形成。如果需要的话,可以利用有机溶剂、水等等首先将聚电解质形成为溶液。之后,将聚电解质溶液直接施加到多孔膜 23 上然后干燥。干燥之后,所述聚电解质可以与该多孔膜 23 表面上存在的某些具有与电解质相反的电荷的官能团形成离子键。例如,在一个实施方式中,带正电的聚乙烯亚胺可以与一些多孔膜(例如硝化纤维素)表面上存在的带负电羧基形成离子键。

[0065] 此外,所述聚电解质还可以利用各种公知的技术交联到所述多孔膜 23 上。例如,在一些实施方式中,可以使用表氯醇官能化的多胺和/或多酰氨基胺作为可交联的带正电聚电解质。这些材料的实例在 Keim 的美国专利 U. S. 3, 700, 623, Keim 的 U. S. 3, 772, 076 以及 Keim 的 U. S. 4, 537, 657 中有所记载,本文出于所有的目的引入它们的全文作为参考,并且据说它们由 Hercules, Inc., Wilmington, Del. 出售,商标名为 Kymene™。例如, Kymene™450 和 2064 是表氯醇官能化的多胺和/或多酰氨基胺化合物,其含有可以与一些类型的多孔膜(例如硝化纤维素)上存在的羧基形成共价键并且当固化时可与多孔膜的聚合物主链交联的环氧化物环和季铵基团。在一些实施方式中,交联温度范围可以在大约 50°C 到大约 120°C,交联时间范围可以是大约 10 到大约 600 秒。

[0066] 尽管上面已经描述了多种用于非扩散地将聚电解质固定多孔膜 23 上的技术,但应当明白的是,本发明中也可以采用任何其它的用于非扩散地固定聚电解质化合物的技术。实际上,上述方法仅用于举例说明可以用于本发明的技术。例如,在一些实施方式中,

可以向聚电解质溶液中加入一些可以基本上抑制这种聚电解质扩散到多孔膜 23 的基质中的成分。

[0067] 检测区 31, 指示区 35 和校正区 32 可以分别具有任意数量的不同检测区域, 使得使用者可以更好地确定测试样品中一种或多种分析物的浓度。每个区域可以包含相同的受体材料, 或者可以包含不同的受体材料。例如, 所述区可以包括两个或多个不同的区域 (如线、点等)。所述区域可以设置成方向基本上垂直于测试样品流动通过测定装置 20 的方向的线条形式。类似地, 在一些实施方式中, 所述区域可以设置成方向基本上平行于测试样品流动通过测定装置 20 的方向的线条形式。

[0068] 在一些情况下, 膜 23 还可以限定出对照区 (未示出), 其向使用者提供测定正确实施的信号。例如, 对照区 (未示出) 可以含有固定的受体材料, 该受体材料通常能够与探针或与固定在探针上的受体材料形成化学和 / 或物理键。这些受体材料的一些实例包括但不限于抗原、半抗原、抗体、蛋白 A 或蛋白 G、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白链菌素、第二抗体及它们的复合物。此外, 还希望利用各种非生物材料作为对照区受体材料。例如, 在一些实施方式中, 对照区受体材料还可以包括例如如上所述的聚电解质, 其可以结合未捕获的探针。由于对照区的受体材料仅特异于探针, 故无论分析物是否存在都会形成信号。对照区可以位于沿膜 23 上的任何位置, 但优选位于检测区 31 和指示区 35 的下游。

[0069] 尽管上面描述了多种装置构造的实施方式, 但应当明白, 本发明的装置通常可以具有任何需要的构造, 并且无需包含所有的上述元件。例如, 在 Lambotte 等人的 U. S. 5, 395, 754 ; Jou 等人的 U. S. 5, 670, 381 ; Malick 等人的 U. S. 6, 194, 220 中描述了各种其它的装置构造, 本文出于所有目的而引入它们的全文作为参考。

[0070] 无论测定装置 20 具有何种特殊的构型, 指示区 35 和检测区 31 都先后起作用以提高分析物的检测准确度。参见图 3-4, 现在将更加详细地描述检测过量浓度的抗原是否存在的方法的一种实施方式。首先, 如图 3 所示, 将含有抗原 A 的测试样品加入样品垫 (未示出) 并沿“L”方向移动到缀合垫 22, 其中分析物 A 与缀合有抗体的检测探针 41 以及缀合有生物素 (即“生物素化的”) 的校正探针 43 混合。在图 3 所示的实施方式中, 抗原 A 与缀合的检测探针 41 结合形成分析物 / 缀合探针复合物 49。由于有限存在的缀合检测探针 41, 一些抗原 A 保持游离。如图 4 所示, 游离抗原 A 和复合物 49 之后移动到检测区 31, 其中固定有抗体 51。游离抗原 A 和复合物 49 竞争固定抗体 51 上的结合位点。任何剩余的抗原 A 和复合物 49 移动到指示区 35, 其中固定有性质上与抗原 A 相同的分子 A*。然而, 由于抗原 A 和复合物 49 不具有结合分子 A* 的位点, 它们通常会通过指示区 35 直到到达吸收垫 28。最后, 生物素化的校正探针 43 移动通过检测区 31 和指示区 35 以与固定在校正区 32 内的抗生物素蛋白链菌素 (未示出) 结合。然后可以检测在检测区 31 和指示区 35 处捕获的任何检测探针 41 所产生的信号强度。此外, 校正区 32 处的校正探针 43 所产生的信号强度也可以被检测到, 并通常应当对任何分析物浓度来说都保持恒定。

[0071] 如果需要的话, 在一些实施方式中可以使用光学读取装置来测量探针强度。该光学读取装置的实际配置和结构通常可以有所不同, 如本领域技术人员很容易理解的那样。例如, 可以利用的光学检测技术包括但不限于, 发光 (例如荧光、磷光等), 吸光度 (例如荧光的或非荧光的), 衍射等等。例如, 在 Kaylor 等人的公开号为 2003/0119202 的美国专利申请中描述了一种适合的反射分光光度计, 本文出于所有目的而引入其全文作为参考。在

另一种实施方式中,可以使用反射模式分光光度计来检测显出荧光的探针的存在。例如,在 Song 等人的公开号为 2004/0043502 的美国专利申请中描述了适合的分光光度计和相关的检测技术,本文出于所有目的而引入其全文作为参考。同样地,透射模式检测系统也可以用来检测所述检测探针的存在。

[0072] 典型地,光学读取装置包含能够发射电磁辐射的照明源和能够记录信号(例如,透射或反射光,发射的荧光或磷光等)的检测器。照明源可以是本领域中已知的能够提供电磁辐射的任何设备,所述电磁辐射例如在可见或接近可见范围内的(例如,红外或紫外光)光。例如,可以用于本发明的合适照明源包括但不限于,发光二极管(LED),闪光灯,冷阴极荧光灯,电致发光灯等等。所述照明可以是复合的(multiplexed)和/或准直的(collimated)。在一些情况下,所述照明可以是脉冲化的以减小任何背景干扰。此外,照明可以是连续的或可以组合连续波(CW)和脉冲照明,其中将多个照明光束进行复合(例如,脉冲光束与CW光束复合),并且在CW光源引起的信号与脉冲光源引起的信号之间允许存在信号区别。例如,在一些实施方式中,用LED(例如,砷铝化镓红光二极管,或磷化镓绿光二极管,磷砷化镓绿光二极管,或者铟镓氮化物紫/蓝/紫外(UV)光二极管)作为脉冲照明源。适用于本发明的一种市场上可买到的合适UV LED激发二极管实例是 Model NSHU550E(Nichia Corporation),它在10毫安(3.5-3.9伏)的正向电流下发出750到1000微瓦的光能形成光束,该光束半高峰全宽为10度,峰值波长为370-375纳米,光谱半宽为12纳米。

[0073] 在一些情况下,照明源可以向所述测定装置提供漫射照明。例如,可以仅采用多点光源(例如LED)阵列来提供相对漫射的照明。能够以相对廉价的方式提供漫射照明的另一种特别符合需要的照明源是电致发光(EL)装置。EL装置通常是一种采用夹在电极之间的发光材料(例如磷光体(phosphor)颗粒)的电容结构,至少一个所述电极是透明的以使得光漏出。在所述电极之间施加电压可在发光材料之中生成变化的电场,其引起发光材料发光。

[0074] 检测器通常可以是本领域已知的能够感测信号的任何设备。例如,所述检测器可以是设置成用于空间辨别的电子成像检测器。这种电子成像检测器的一些实例包括高速线性电荷耦合器件(CCD),电荷注入器件(CID),互补金属氧化物半导体(CMOS)器件等等。这些成像检测器例如,通常是电子光传感器的二维阵列,尽管也可以使用线性成像检测器(例如,线性CCD检测器),所述线性成像检测器包括单线的检测器像素或者光传感器,例如用于扫描图像的那些。每个阵列都包括一套已知的唯一位点,其可以称为“地址”。在成像检测器中每个地址都被覆盖某一区域(例如,通常成方形或矩形的区域)的传感器所占据。这种区域通常称为“像素”或像素区域。例如,检测器像素可以是CCD、CID或CMOS传感器,或者其它可检测或测量光的任何装置或传感器。检测器像素的大小可以有很大不同,在一些情况下其直径或长度可以小到0.2微米。

[0075] 在另一些实施方式中,检测器可以是缺乏空间辨别能力的光传感器。例如,这种光传感器的实例可包括光电倍增装置,光电二极管,例如雪崩光电二极管或硅光电二极管等等。有时硅光电二极管很有优势,因为其廉价、灵敏、能够高速工作(上升时间短/高带宽),并且容易集成到大多数其它的半导体技术和单片电路中。此外,硅光电二极管物理尺寸小,这使得其很容易嵌入与基于膜的装置一起使用的系统中。如果使用硅光电二极管,则

发射的信号波长范围可以在其灵敏度的范围内,即 400 到 1100 纳米。

[0076] 一般来说,根据本发明可以实现定性、定量或半定量地检测分析物的存在或浓度。例如,如上所述,利用检测区 31 和指示区 35 处捕获的探针所产生的信号强度,以及可选择的校正区 32 处的信号强度,可以定量或半定量地测定分析物的量。图 2 图示了利用不同信号强度来测定分析物浓度的可能性。应当明白,信号强度并非必须遵循所示的关系,这种关系仅出于示例性的目的而给出。在这方面,图 2 示出了图 3 和 4 中指示区 35 和检测区 31 的检测探针信号强度的关系。仅出于说明的目的,所以图 2 不包括校正信号强度。然而,如上面所讨论的那样,校正信号强度可以用于校正所述结果。例如,可以将 I_d 与 I_o 之比与分析物浓度的关系绘制成曲线,从而得到上述剂量响应曲线。

[0077] 如图 2 所示,当测试样品中不存在抗原 A 时,所有的检测探针 41 都与指示区 35 内的抗原 A^* 结合,并产生处于最大值的指示信号强度 (“ I_o ”)。检测区 31 不产生信号。随着其浓度的提高,抗原开始与缀合探针 41 形成复合物 49。复合物 49 具有能够与检测区 31 处的抗体 51 结合的抗原决定部位。这使得指示信号强度 “ I_o ” 下降,也使得检测区 31 处生成检测信号强度 “ I_d ”。指示信号 “ I_o ” 的强度持续下降,而检测信号强度 “ I_d ” 持续增加,直到抗原 A 的浓度超过存在的缀合检测探针 41 的量。这被称为分析物的 “饱和浓度”。在饱和浓度下,游离分析物 A 和复合物 49 开始竞争检测区 31 处的结合位点。因此,检测信号强度 “ I_d ” 达到其最大值。该值通常已知,因为选择的检测探针 41 的量对应于检测区 31 处存在的抗体 51 的量。随着抗原浓度的进一步增加,由于检测区 31 内游离的未标记抗原 A 的存在增加,检测信号强度 “ I_d ” 开始下降。而且,在分析物饱和浓度或饱和浓度附近,理论上不会检测到指示信号强度,因为所有的检测探针 41 都与分析物 A 复合并接着与检测区 31 内的抗体 51 结合。然而,实际上,少量的检测探针 41 会与指示区 35 内的抗原 A^* 结合,因而仍然会产生较低的指示信号强度 “ I_o ”。

[0078] 根据本发明,可以选择性地采用图 2 的剂量响应曲线的不同区域,以将测得的检测信号强度转换成分析物浓度。例如,曲线的 “区域 A” 限定在分析物浓度 “ A_o ” 和 “ A_1 ” 之间。在该区域中,检测信号强度与分析物浓度几乎呈线性关系。因此,图 2 的 “区域 A” 可用于将测得的检测信号强度 “ I_d ” 准确地转换为实际的分析物浓度。同样, “区域 C” 限定在分析物浓度 “ A_2 ” 和 “ A_3 ” 之间定义的曲线。同样,在该区域,检测信号强度与分析物浓度几乎呈线性关系。因此,图 2 的 “区域 C” 可用于将测得的检测信号强度 “ I_d ” 准确地转换为实际的分析物浓度。限定在分析物浓度 “ A_1 ” 和 “ A_2 ” 之间的检测曲线的 “区域 B” 相对恒定,故其有时难以获得与分析物浓度之间的准确关系。因此,如果需要定量结果,使用者可以稀释之后的测试样品然后重新进行测定。或者,可以单独使用所述指示信号强度或者结合检测信号强度来提供定量结果。如果只需要半定量结果,则可以只说分析物浓度落在分析物 “ A_1 ” 和 “ A_2 ” 浓度范围之间。

[0079] 为了确定图 2 的剂量响应曲线的哪个区域最适于特定的测试样品,通常希望首先确定分析物浓度是否处于 “钩状效应” 区域内。在这种情况下,可以将测得的信号强度 “ I_o ” 与针对已知饱和浓度的分析物预测定的参比标准相比较。所述 “参比标准” 可以是单一的强度值,或者其可以包括一个取值范围,据信该范围对应于在一定误差余地内的饱和浓度。该取值范围上限和下限可以基于对相同的已知分析物饱和浓度进行多次测试时指示信号强度的变化程度选择。例如,图 2 中参比标准可以限定在强度值 “ I_1 ” 和 “ I_2 ” 之间,其分别

对应于分析物浓度“ A_1 ”和“ A_2 ”。大于参比标准（例如大于上限“ I_1 ”）的测得的信号强度“ I_0 ”可用作分析物浓度在“钩状效应”区域之外的指示，而等于或小于参比标准（例如小于上限“ I_1 ”）的测得的信号强度“ I_0 ”可用作分析物浓度在“钩状效应”区域之内的指示。

[0080] 例如，参见图 5，表示了用于测定分析物浓度是否处于“钩状效应”区域内的方法 100 的一种实施方式。采用数种变量作为该方法 100 中的输入值，包括测得的检测信号强度“ I_d ”，测得的指示信号“ I_0 ”，以及参比标准的上限 I_1 和下限 I_2 。方法 100 的第一步是确定所测得的信号强度“ I_0 ”是否大于上限“ I_1 ”。如果这样，则分析物浓度处于“钩状效应”区之外，可用剂量响应曲线的“区域 A”来将测得的检测信号强度“ I_d ”转换成分析物浓度。如果所测得的信号强度“ I_0 ”小于上限“ I_1 ”，则方法 100 的下一步是确定分析物的浓度是否在饱和浓度或其附近，或者其是否大大高于饱和浓度。这样，方法 100 确定所测得的信号强度“ I_0 ”是否小于下限“ I_2 ”，如果这样，则可用剂量响应曲线的“区域 C”来将测得的检测信号强度“ I_d ”转换成分析物浓度。如果所测得的信号强度“ I_0 ”大于下限“ I_2 ”而小于上限“ I_1 ”（即与参比标准相同），则方法 100 的最后一步是确定是否需要半定量还是定量的结果。如果需要定量结果，则方法 100 指示使用者稀释之后的测试样品然后重新进行测定。或者，还可以单独使用所测得的指示信号强度“ I_0 ”，或者与检测信号强度“ I_d ”结合使用来提供定量的结果。例如，如图 2 所示，指示曲线在检测信号曲线的“区域 B”相对呈线性。因此，在该区域内，指示曲线可提供准确的检测结果。而且，如果只需要半定量的结果，则方法 100 仅表明分析物浓度落在图 2 所示的分析物浓度“ A_1 ”和“ A_2 ”范围内。

[0081] 如上面所述的校正方法可以自动和 / 或手动进行。例如，可以任选地采用微处理器来自动选择所需要的校正技术并将检测器的测量值转换成表明分析物浓度的定量或半定量结果。所述微处理器可包括存储能力，以使使用者能够重新调用最后的几个结果。本领域技术人员应当知道，可以采用任何合适的计算机可读存储装置，例如 RAM, ROM, EPROM, EEPROM, 闪存卡, 数字视频光盘, Bernoulli 磁带等等。如果需要的话，可以将结果利用液晶 (LCD) 或 LED 显示器传送给使用者。

[0082] 参考下面的实施例可以更好地理解本发明。

[0083] 实施例 1

[0084] 证实了制备侧流测定装置的可行性。将长度大约 30 厘米的硝化纤维素多孔膜 (HF 120, 购自 Millipore, Inc.) 层压到载体卡片上。将 C 反应蛋白的单克隆抗体固定在该多孔膜上形成检测区。所述抗体来自 BioPacific, Inc. (Catalog#A58040136P), 浓度为 1 毫克每毫升。将 CRP 抗原固定多孔膜上形成指示区。所述抗原购自 Biogenesis Inc. of Kingston, New Hampshire, 浓度为 2.78 毫克每毫升。将 Goldline™ (一种聚赖氨酸溶液, 购自 British Biocell International) 在所述膜上制成条带形成对照区。指示区位于检测区和对照区之间。将纤维素芯吸垫 (Millipore Co.) 与所述膜的一端 (靠近对照区) 一起进行层压。然后将膜样品在 37°C 的温度下干燥 1 小时。

[0085] 通过将 180 微升缀合有 CRP 单克隆抗体 (BioPacific, Inc., Catalog#A58110228P) 的金颗粒, 375 微升蔗糖水溶液 (20%) 和 945 微升水混合形成颗粒悬浮液。所述金颗粒的颗粒尺寸为 40 纳米, 光密度为 56, 购自 British Biocell International。将所述悬液加载到 25 厘米长的玻璃纤维缀合垫 (Millipore Co.) 上。之后在 37°C 干燥所述玻璃纤维垫 2 小时制成缀合垫。接着将该缀合垫层压到所述多孔膜的另

一端（靠近检测区）。将纤维素芯吸垫（Millipore Co.）样品垫进一步层压到所述缀合垫上。将层压后的整个卡片切割成 4 毫米宽的侧流测定装置。

[0086] 实施例 2

[0087] 如实施例 1 那样制备侧流装置，只不过用 2.23 毫克每毫升的羊抗鼠 IgG(F_c) 来制备对照区。

[0088] 实施例 3

[0089] 证实了制备侧流测定装置的可行性。将长度大约 30 厘米的硝化纤维素多孔膜（HF 120, 购自 Millipore, Inc.）层压到载体卡片上。将在 0.1% 海藻糖水溶液中的 C 反应蛋白的单克隆抗体（BioPacific, Inc., Catalog#A58040136P）固定在该多孔膜上形成检测区。将 CRP 抗原固定在多孔膜上形成指示区。所述抗原购自 Biogenesis Inc. of Kingston, New Hampshire, 浓度为 2.78 毫克每毫升。将羊抗碱性磷酸酶（2.5 毫克每毫升, 购自 Fitzgerald Industries International, Inc. of Concord, Massachusetts）在所述膜上制成条带形成校正区。指示区位于检测区和校正区之间。将纤维素芯吸垫（Millipore Co.）与所述膜的一端（靠近 对照区）一起进行层压。然后将膜样品在 37°C 的温度下干燥 1 小时。

[0090] 将 160 微升缀合有兔抗羊 IgG 的金颗粒, 160 微升缀合有 CRP 单克隆抗体（BiosPacific, Inc., Catalog#A58 110228P）的金颗粒, 375 微升蔗糖水溶液（20%）和 785 微升水混合形成颗粒悬浮液。所述缀合有兔抗羊 IgG 的金颗粒的颗粒尺寸为 10 纳米, 购自 Sigma-Aldrich Inc. of St. Louis, Missouri。所述缀合有 CRP 单克隆抗体的金颗粒的颗粒尺寸为 40 纳米, 购自 British Biocell International。将所述悬浮液加载到 20 厘米长的玻璃纤维缀合垫（Millipore, Co.）上。之后在 37°C 干燥所述玻璃纤维垫 2 小时制成缀合垫。接着将该缀合垫层压到所述多孔膜的另一端（靠近检测区）。将纤维素芯吸垫（Millipore Co.）样品垫进一步层压到所述缀合垫上。将层压后的整个卡片切割成 4 毫米宽的侧流测定装置。

[0091] 实施例 4

[0092] 证实了利用实施例 1 的侧流测定装置检测分析物存在和数量的可能性。测试了十一个 (11) 测试装置。将 120 微升在 TBS 缓冲液中的 C 反应蛋白施加到各装置的样品垫上。测试不同浓度的 CRP, 即 0, 10, 50, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 20000, 100000, 和 500000 纳克每毫升。使所知装置展开 30 分钟。用基于反射的分光光度计检测各装置各区的颜色强度。各区的强度汇总于表 1 中。

[0093] 表 1 : 针对 CRP 浓度的强度

[0094]

CRP (ng/ml)	检测区	指示区	对照区
0	103.579	124.137	109.493
10	117.739	125.202	112.447
50	124.030	123.561	112.375
200	126.612	118.932	112.715
500	126.806	112.629	112.543
1000	127.710	112.268	115.873
2000	126.652	110.438	119.687
5000	121.435	107.235	122.621
20000	115.403	105.377	122.614
100000	111.264	104.776	121.352
500000	109.519	105.772	122.566

[0095] [0095] 图 6 中绘制了强度与 CRP 浓度的关系曲线。如图所示,指示区能够预测 CRP 浓度是否处于“钩状效应”区域内。

[0096] 实施例 5

[0097] 证实了利用实施例 2 的侧流测定装置检测分析物存在和数量的可能性。测试了十一个 (11) 测试装置。将 120 微升在 TBS 缓冲液中的 C 反应蛋白施加到各装置的样品垫上。测试不同浓度的 CRP, 即 0, 10, 50, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 20000, 100000, 和 500000 纳克每毫升。使所述装置展开 30 分钟。用基于反射的分光光度计检测各装置各区的颜色强度。各区的强度汇总在表 2 中。

[0098] 表 2 :针对 CRP 浓度的强度

[0099]

CRP (ng/ml)	检测区	指示区	对照区
0	100.349	117.180	107.962
10	112.441	116.806	108.131
50	115.145	113.111	107.717
200	117.522	108.417	108.247
500	119.923	109.125	110.521
1000	122.628	110.936	119.501
2000	121.988	110.253	124.617
5000	117.599	107.891	125.062
20000	112.510	106.006	123.860
100000	107.082	104.421	121.370
500000	102.879	101.487	117.520

[0100] 图 7 中绘制了强度与 CRP 浓度的关系曲线。如图所示,指示区能够预测 CRP 浓度是否处于“钩状效应”区域内。

[0101] 实施例 6

[0102] 证实了利用实施例 3 的侧流测定装置检测分析物存在和数量的可能性。测试了十一个 (11) 测试装置。将 120 微升在 TBS 缓冲液中的 C 反应蛋白施加到各装置的样品垫上。测试不同浓度的 CRP, 即 0, 10, 50, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 20000, 100000, 和 500000 纳克每 毫升。使所述装置展开 30 分钟。用基于反射的分光光度计检测各装置各区的颜色强度。各区的强度汇总在表 3 中。

[0103] 表 3 :针对 CRP 浓度的强度

[0104]

CRP (ng/ml)	检测区	指示区	对照区
0	0.0000	2.4660	0.3537
10	0.6791	3.0580	0.3354
50	1.8680	2.1970	0.2652
200	2.4970	1.8590	0.2746
500	2.2970	1.7490	0.2691
1000	2.1910	1.6990	0.3809
2000	1.1770	1.3200	0.2277
5000	0.7312	0.1133	0.3000
20000	0.3121	0.0000	0.2329
100000	0.2133	0.0000	0.2355
500000	0.1938	0.0000	0.2478

[0105] 图8中绘制了强度与CRP浓度的关系曲线。如图所示,指示区能够预测CRP浓度是否处于“钩状效应”区域内。

[0106] 实施例7

[0107] 证实了改变测定装置检测灵敏度的可行性。首先通过将缀合有CRP单克隆抗体(BiosPacific, Inc., Catalog#A58110228P)的金颗粒稀释在2毫摩尔Borax (pH7.2)中至光密度为10的浓度,形成颗粒悬浮液。所述金颗粒的颗粒尺寸为40纳米。利用“Kinematic 1600”试剂分配模块(Kinematic Automation, Inc. of Twain Harte, California)将该悬液以25微升每秒(5 μ l/cm, 5cm/s)的速度喷到34毫米长的玻璃纤维缀合垫(Millipore, Co.)上。使该玻璃纤维垫在室温和相对湿度小于20%的条件下干燥过夜。

[0108] 然后将该缀合点层压到长度大约30厘米的硝化纤维素多孔膜(HF180, 购自Millipore, Inc.)的一端。将C反应蛋白的单克隆抗体(BioPacific, Inc., Catalog#A58110228P)在PBS缓冲液中稀释到0.2到0.3毫克每毫升的浓度。CRP抗原也购自Biogenesis Inc. of Kingston, New Hampshire,并在TBS缓冲液中稀释到3.4毫克每毫升的浓度。利用“Kinematic 1600”试剂分配模块(Kinematic Automation, Inc. of TwainHarte, California)将试剂以5微升每秒(1 μ l/cm, 5cm/s)的速度在多孔膜上制成条带。固定的单克隆抗体在离所述膜一边10毫米的位置处形成检测区。将固定的CRP抗原在离所述膜另一边10毫米以及检测区下游5毫米的位置处形成指示区。将CF6纤维素/玻璃芯吸垫(Whatmanplc ofMiddlesex, United Kingdom)切割成20毫米的宽度并层压到硝化纤维素膜上。然后将层压后的卡片切割成4毫米宽的完全侧流浸渍条。

[0109] 将得到的测定装置放在壳体(可容纳14条浸渍条)中并利用活塞式移液管(positive displacement pipette)用1微升校正后的CRP血清(0到480微克每毫升)(购自Kamiya Biomedical Co. of Seattle, Washington)手工画条。将该血清条带放在离GF33垫边缘12mm的位点处。在血清应用位点上游施加110微升PBS缓冲液(pH7.2, 含2%的Tween 20)以沿着测试条带洗涤或“追赶”血清,从而测试该测定装置。使所述装置展开

30 分钟。用 0-11 范围的可见标尺（“Rann 标尺”）测定各装置各区的颜色强度，其中 0 表示没有颜色，11 表示最强烈的颜色。各区的强度汇总于表 4 和 5 中。

[0110] 表 4 :0.2mg/ml 检测抗体浓度的区中的强度

[0111]

CRP 浓度	检测区		指示区	
	初始	30 分钟后	初始	30 分钟后
0.0	5	6	10	10
0.5	7	8	10	10
1.5	10	10	10	10
2.5	10	10	10	10
5.0	10	10	9	9
7.5	10	10	8	8
10.0	10	10	-	8
20.0	10	10	8	8
48.0	8	9	6	5
80.0	6	6	2	2
160.0	4	4	0	0
480.0	2	2	0	0

[0112] [0112] 表 5 :0.3mg/ml 检测抗体浓度的区中的强度

[0113]

CRP 浓度	检测区		指示区	
	初始	30 分钟后	初始	30 分钟后
0.0	4	0	11	11
0.5	9	9	11	11
1.5	10	10	10	10
2.5	11	11	9	9
5.0	11	11	9	9
7.5	11	11	9	8.5
10.0	11	11	8	8
20.0	10	10	5	5
48.0	9	9	3	3
80.0	9	8	2	2
160.0	6	6	0.5	0.5
480.0	3	3	0	0

[0114] 如上面所表示,用于检测区的抗体浓度可以有所不同以提供不同的检测灵敏度。通过这种方式,可以选择性地控制抗体浓度以生成处于据信能更好地对应于测试条件的灵敏度范围内的剂量响应曲线。例如,可以调整抗体浓度,使在较高的分析物浓度下存在剂量响应曲线的线性区域。

[0115] 实施例 8

[0116] 证实了改变测定装置检测灵敏度的可行性。首先通过将缀合有 CRP 单克隆抗体 (BiosPacific, Inc., Catalog#A58110228P) 的金颗粒在 2 毫摩尔 Borax (pH7.2) 中稀释至光密度为 5、8、10、12、15、18 或 20 的浓度,形成颗粒悬浮液。所述金颗粒的颗粒尺寸为 40 纳米。利用“Kinematic 1600”试剂分配模块 (Kinematic Automation, Inc. of TwainHarte, California) 将该悬浮液以 25 微升每秒 ($5 \mu\text{L}/\text{cm}$, $5\text{cm}/\text{s}$) 的速度喷到 34 毫米长的玻璃纤维缀合垫 (Millipore, Co.) 上。使该玻璃纤维垫在室温和相对湿度小于 20% 的条件下干燥过夜。

[0117] 然后将该缀合点层压到长度大约 30 厘米的硝化纤维素多孔膜 (HF 180, 购自 Millipore, Inc.) 的一端。将 C 反应蛋白的单克隆抗体 (BioPacific, Inc., Catalog#A58110228P) 在 PBS 缓冲液中稀释到 0.1 毫克每毫升的浓度。CRP 抗原也购自 Biogenesis Inc. of Kingston, New Hampshire, 并在 TBS 缓冲液中稀释到 3.4 毫克每毫升的浓度。利用“Kinematic 1600”试剂分配模块 (Kinematic Automation, Inc. of TwainHarte, California) 将试剂以 5 微升每秒 ($1 \mu\text{L}/\text{cm}$, $5\text{cm}/\text{s}$) 的速度在多孔膜上制成条带。固定的单克隆抗体在离所述膜一边 10 毫米的位置处形成检测区。将固定的 CRP 抗原在离所述膜另一边 10 毫米以及检测区下游 5 毫米的位置处形成指示区。将 CF6 纤维素 / 玻璃芯吸垫 (Whatman plc of Middlesex, United Kingdom) 切割成 20 毫米的宽度并层压到硝化纤维素

膜上。然后将层压后的卡片切割成 4 毫米宽的完全侧流浸渍条。

[0118] 将得到的测定装置放在壳体（可容纳 14 条浸渍条）中并利用活塞式移液管（positive displacement pipette）用 1 微升校正后的 CRP 血清（0 到 480 微克每毫升）（购自 Kamiya Biomedical Co. of Seattle, Washington）手工画条。将该血清条带放在离 GF 33 垫边缘 12mm 的位点处。在血清应用位点上游施加 110 微升 PBS 缓冲液（pH7.2, 含 2% 的 Tween 20）以沿着测试条带洗涤或“追赶”血清，从而测试该测定装置。使所述装置展开 30 分钟。用上述“Rann”标尺测定各装置各区的颜色强度。结果如图 9-10 中所示。

[0119] 如图 9 所示，通过改变缀合颗粒浓度（如光密度所反映的）可以改变抗体响应曲线（“检测区”）和信号强度（例如“Rann”值）。类似地，如图 10 所示，通过改变缀合颗粒浓度也可以改变 CRP 响应曲线（“指示区”）和信号强度。因此，如上所述，可以选择性地控制缀合颗粒的浓度以生成处于据信能更好地对应于测试条件的灵敏度范围内的剂量响应曲线。

[0120] 实施例 9

[0121] 证实了改变测定装置检测灵敏度的可行性。制备用于首次试验的半条带（half-stick）测定装置。通过将抗体储备液稀释在 PBS0/0 中制备两种 CRP 单克隆抗体（BiosPacific, Inc., Catalog#A58110228P）溶液，浓度为 0.1 和 0.5 毫克每毫升。然后将每种溶液在长度大约为 30 厘米的单个硝化纤维素膜（HF 120, 购自 Millipore, Inc.）上制成条带。利用“Kinematic 1600”试剂分配模块（Kinematic Automation, Inc. of TwainHarte, California）将所述溶液以 5 微升每秒（1 μ L/cm 的分配速率，5cm/秒的床速）的速度制成条带。将一种 CRP 溶液（Biogenesis Inc. of Kingston, New Hampshire）在 PBS 0/0（pH7.2）中稀释到 0.5mg/mL，也利用 Kinematic 1600 在卡片上制成条带。使该卡片在 37°C 下干燥 1 小时，并与 20 毫米宽的纤维素纤维芯吸垫（Millipore CFSP203000）一起层压。利用“Kinematic 2360”切割机（Kinematic Automation, Inc. of TwainHarte, California）将该卡片切割成 4 毫米宽的条，从而得到 4 毫米宽的半侧流浸渍条（“半条带”）。

[0122] 测试时，使用不同尺寸预先缀合有 CRP 单克隆抗体（BioPacific, Inc., Catalog#A58110228P）的金颗粒悬浮液。本实施例中研究的尺寸是 40 和 60 纳米直径的金颗粒缀合物。将该颗粒缀合物在 TBS 1/0/1 中稀释到预期的测试光密度（OD），即 OD 1 和 OD 2.5。将来自 Scipac 的 CRP 标准品在 PBS 0/0 中稀释到 0-40 微克每毫升的浓度范围，使得一旦与等体积的金缀合物混合，它们将形成 0 到 20 微克每毫升的 CRP 测试范围。将 20 微升该 CRP 溶液和 20 微升金缀合物悬浮液加入 96 孔板中。然后将半条带样品放在板孔中，使测试进行 15 分钟，之后对得到的测试线进行视觉评分。利用范围在 0（测试线上无可见颜色）到 1（测试线上非常强烈的颜色）的“Rann 标尺”对各装置各区的颜色强度进行视觉评分。

[0123] 结果示于图 11-15 中。例如，如图 11-12 所示，在 0.2 到 20 微克每毫升的 CRP 浓度下，检测区 0.5mg/ml 的抗体浓度造成在指示区要么没有信号，要么信号很微弱（即 Rann = 1）。抗体浓度降低到 0.1mg/ml（图 13-14），增加了 CRP 线（“指示区”）信号强度，并得到较浅的 CRP 曲线。进一步，通过将金缀合物浓度提高到光密度 2.5，则抗体和 CRP 线的信号强度均增加（图 15）。该 CRP 线也在抗体信号达到其峰值（例如“钩状效应”点）的位点

附近开始下降。

[0124] 尽管已经就本发明的具体实施方式详细描述了本发明,但本领域技术人员应该理解,在领会上述内容之后,很容易构思这些实施方式的替换形式、变型方式和等同方式。因此,本发明的范围应当由所附权利要求书及其等同方式来确定。

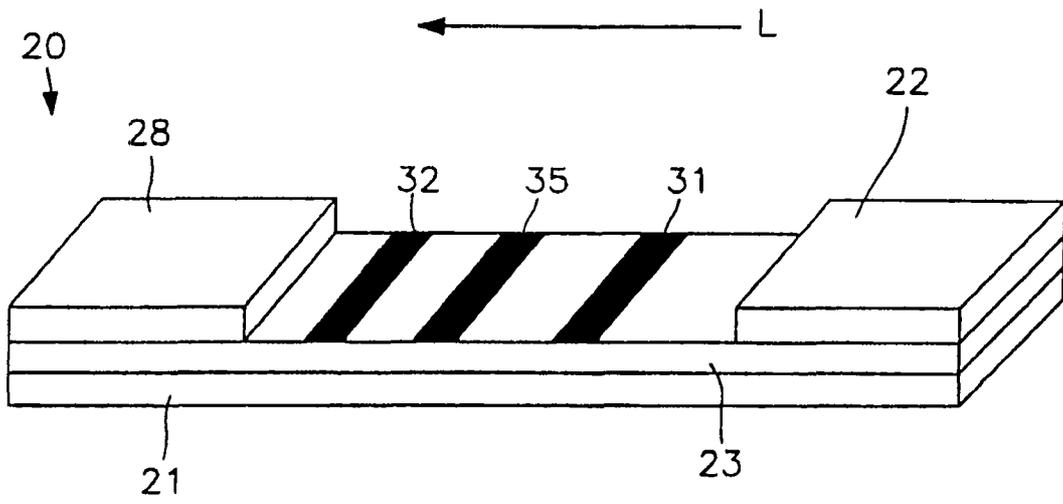


图 1

剂量响应曲线

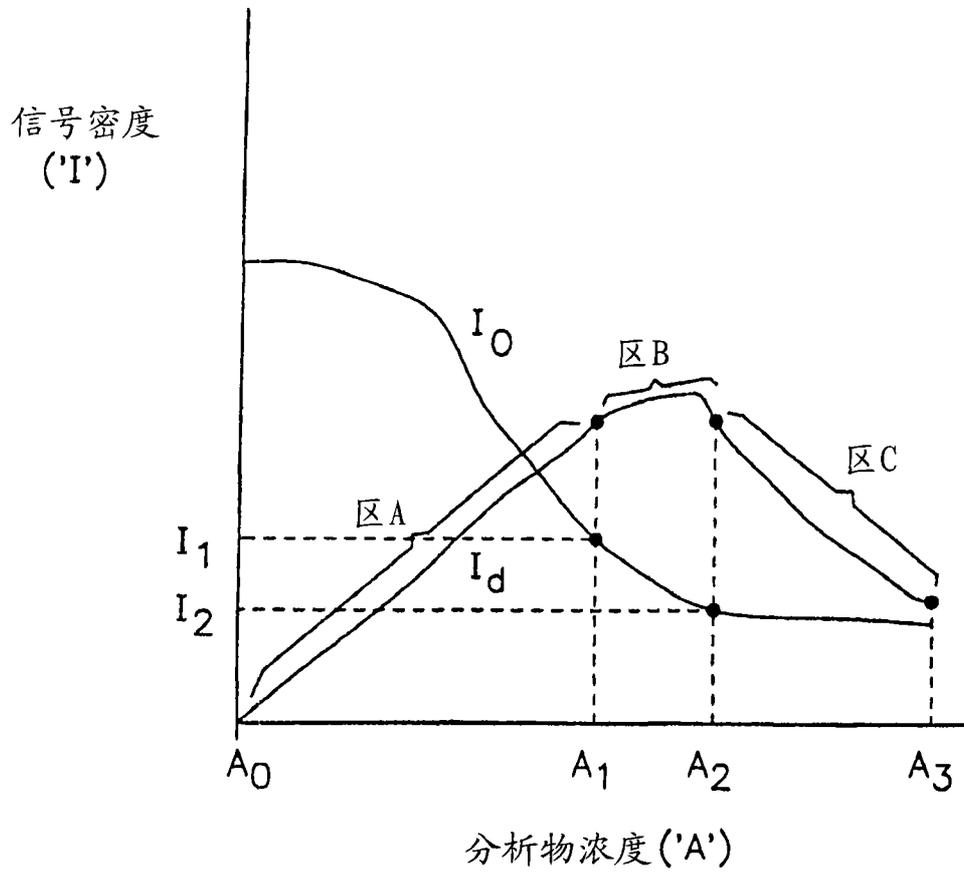


图 2

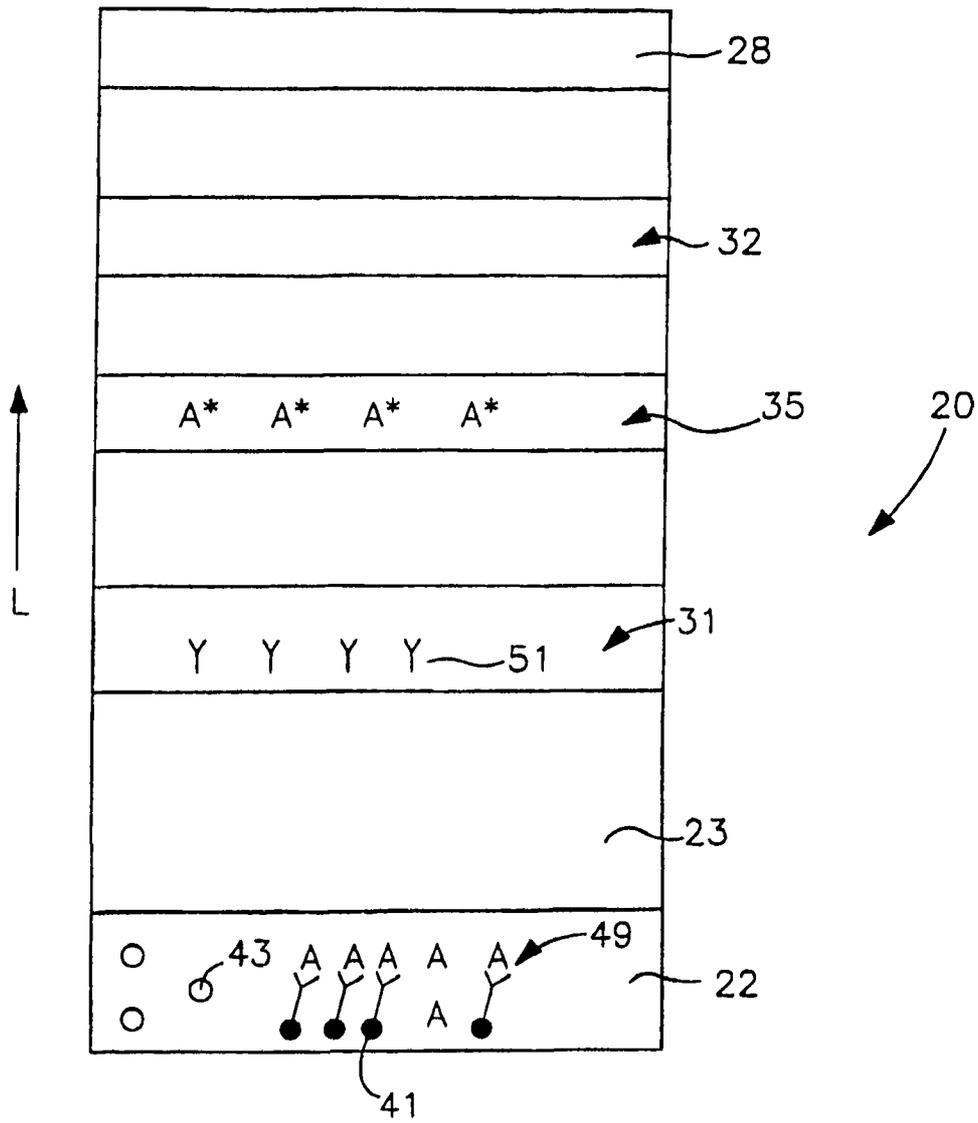


图 3

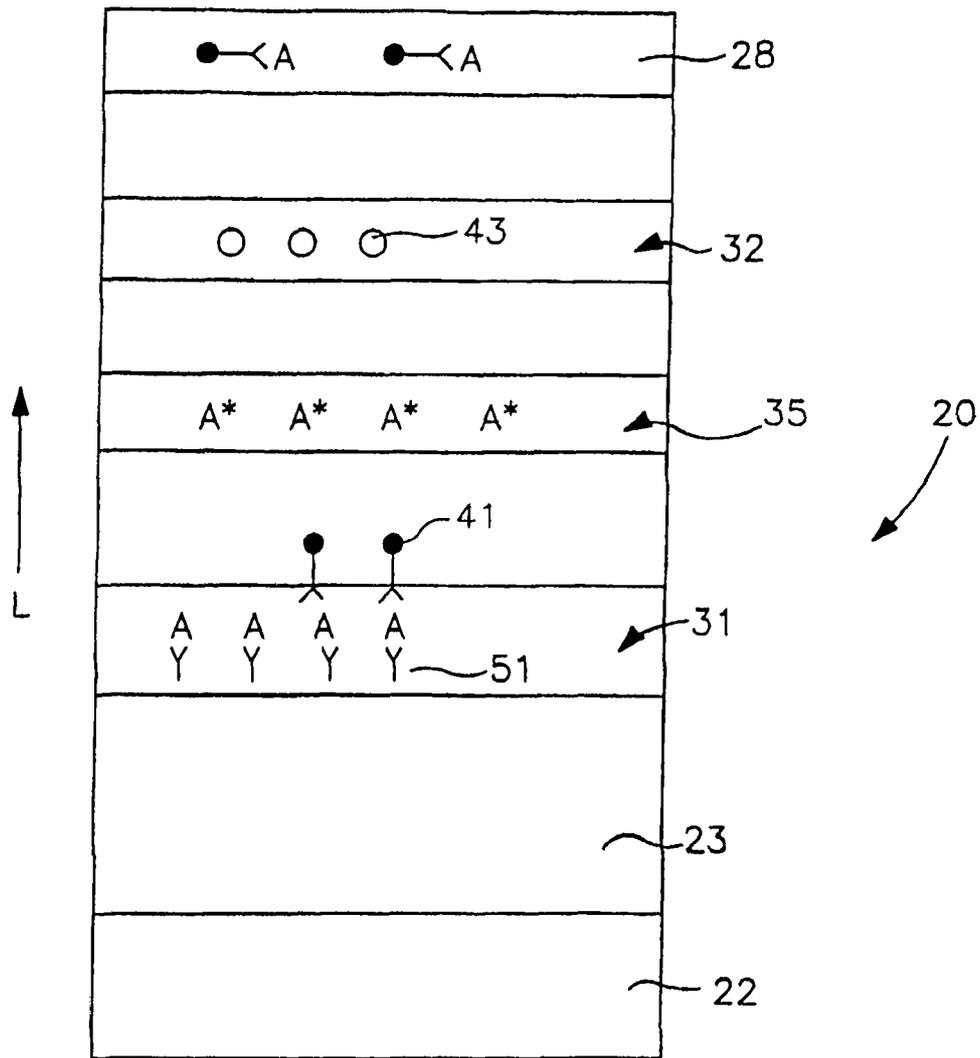


图 4

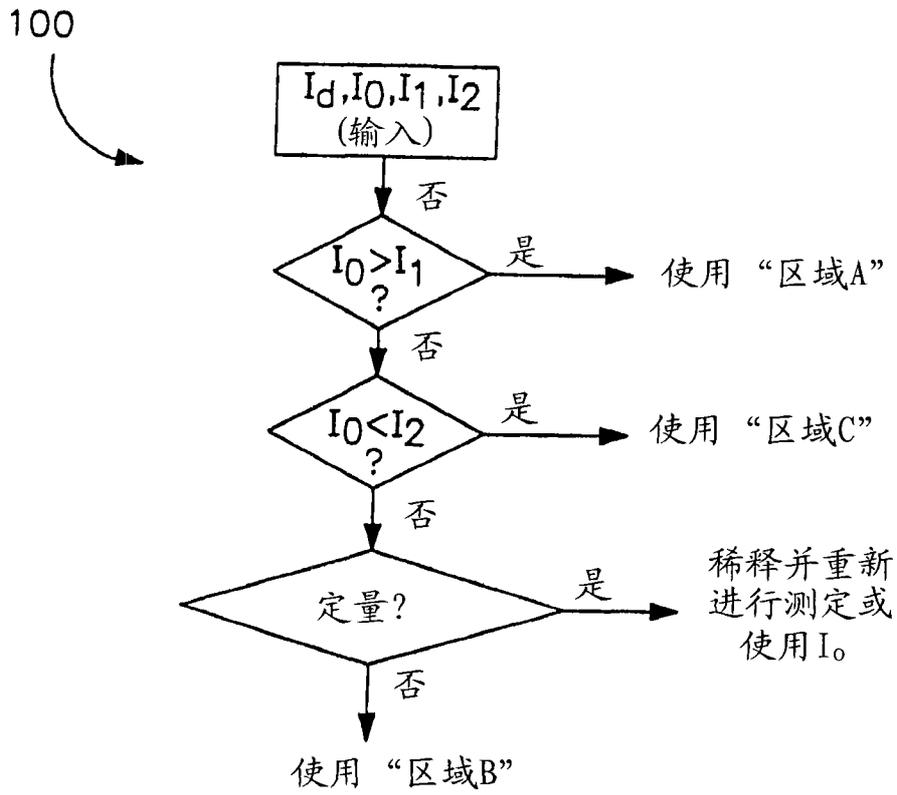


图 5

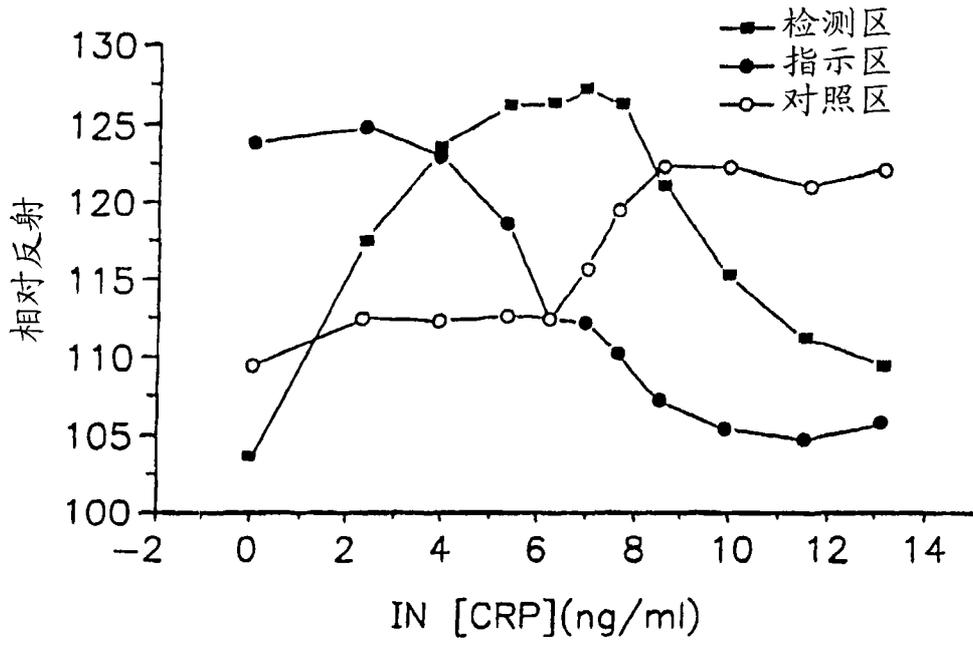


图 6

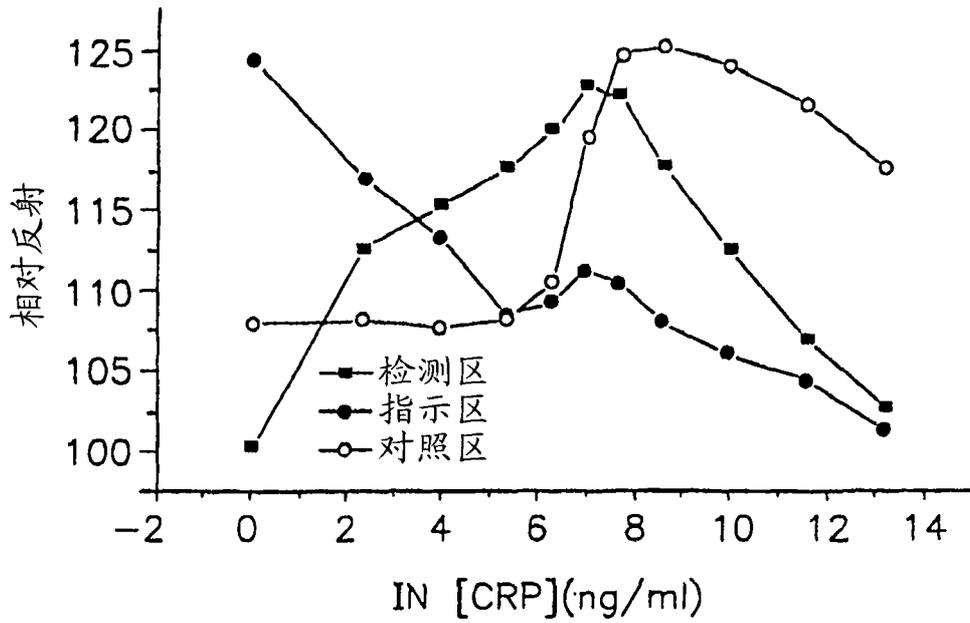


图 7

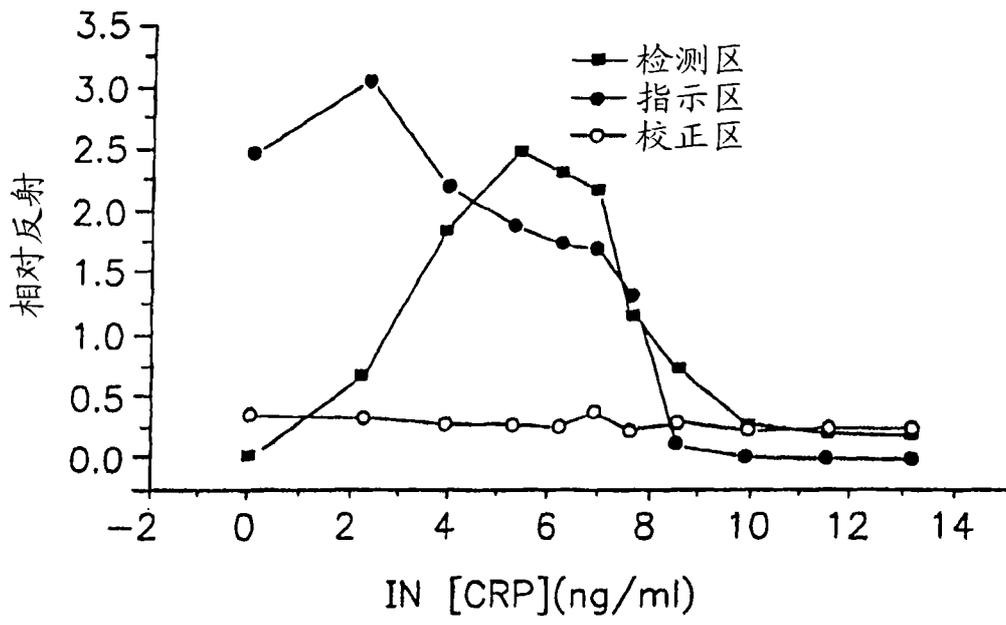


图 8

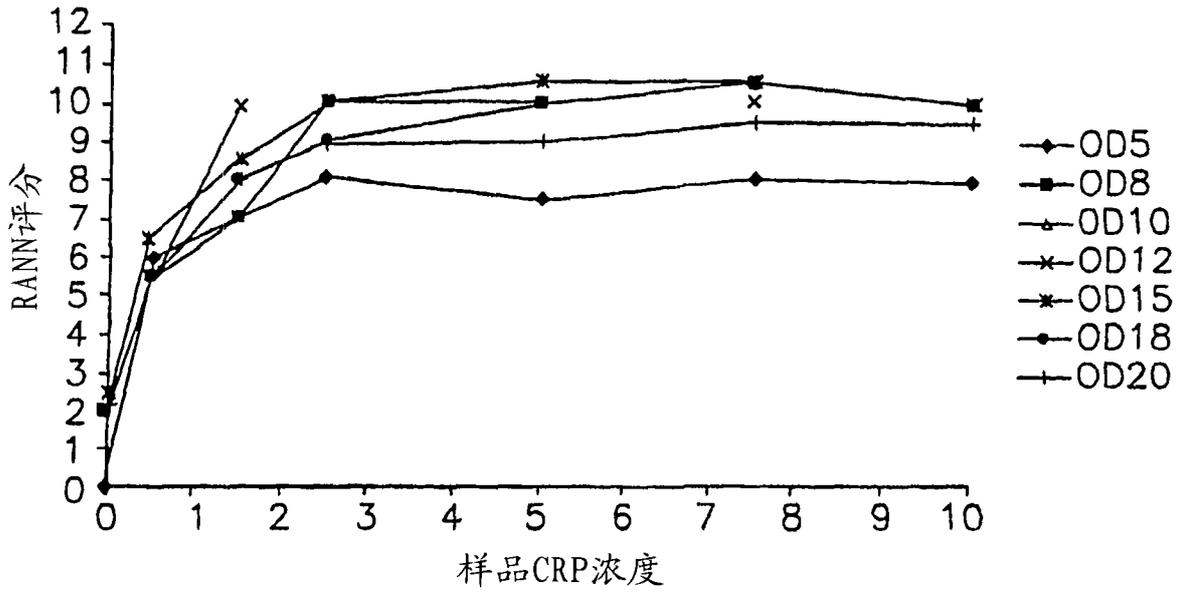


图 9

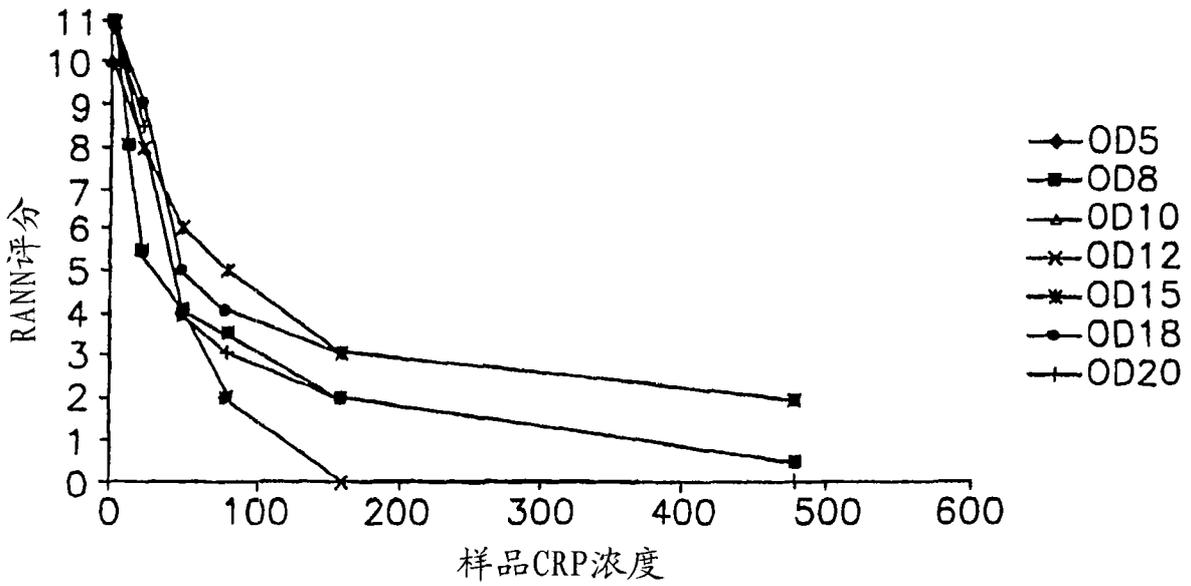


图 10

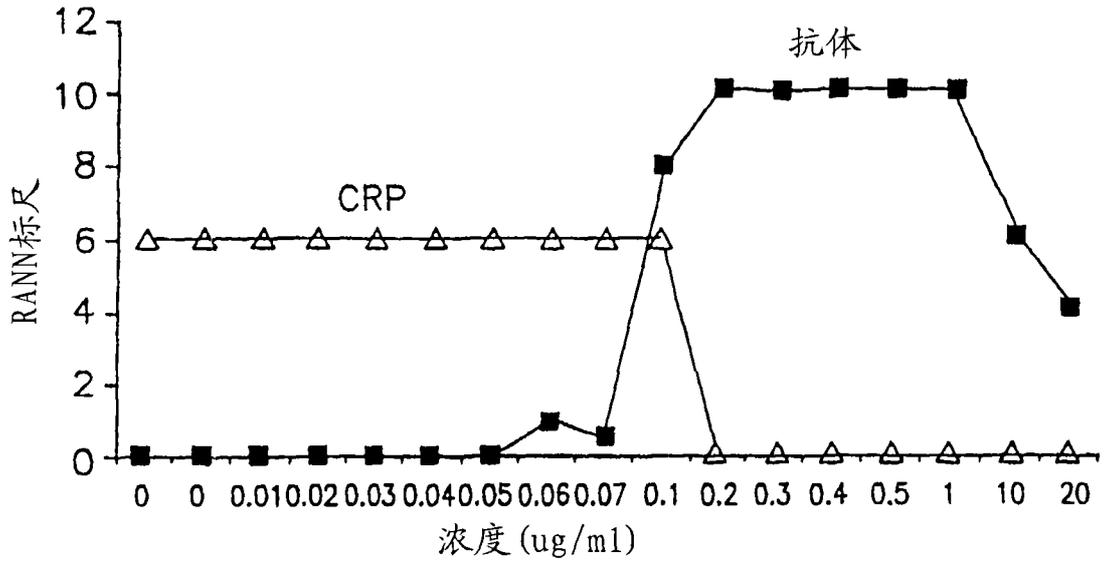


图 11

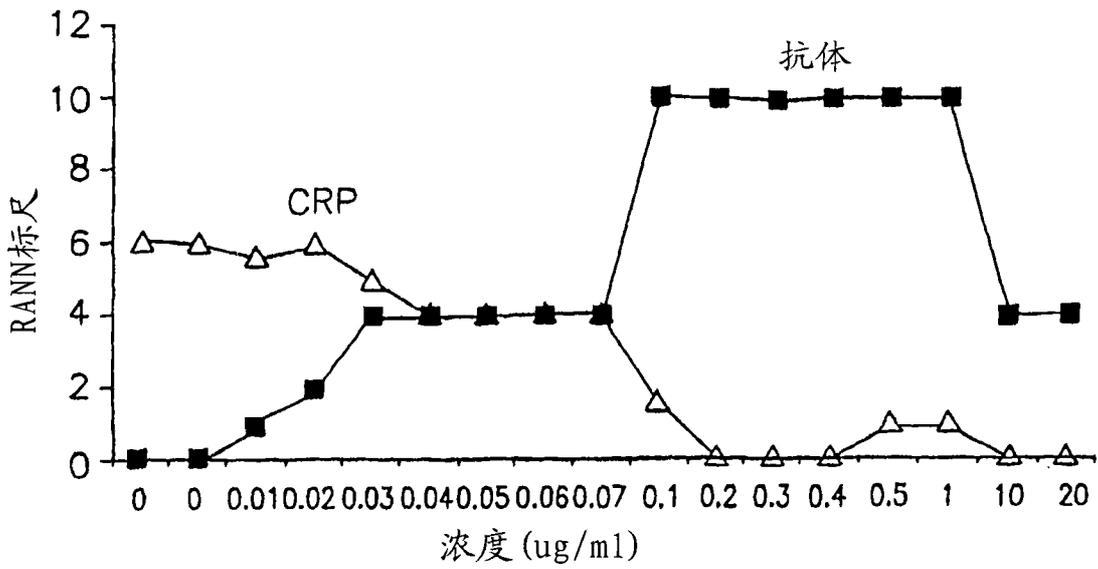


图 12

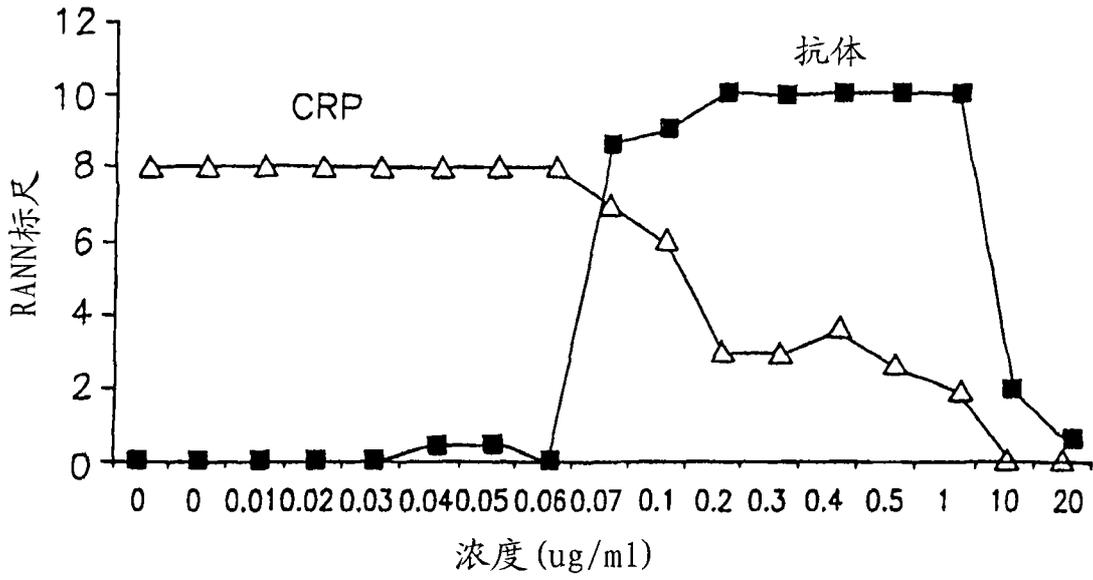


图 13

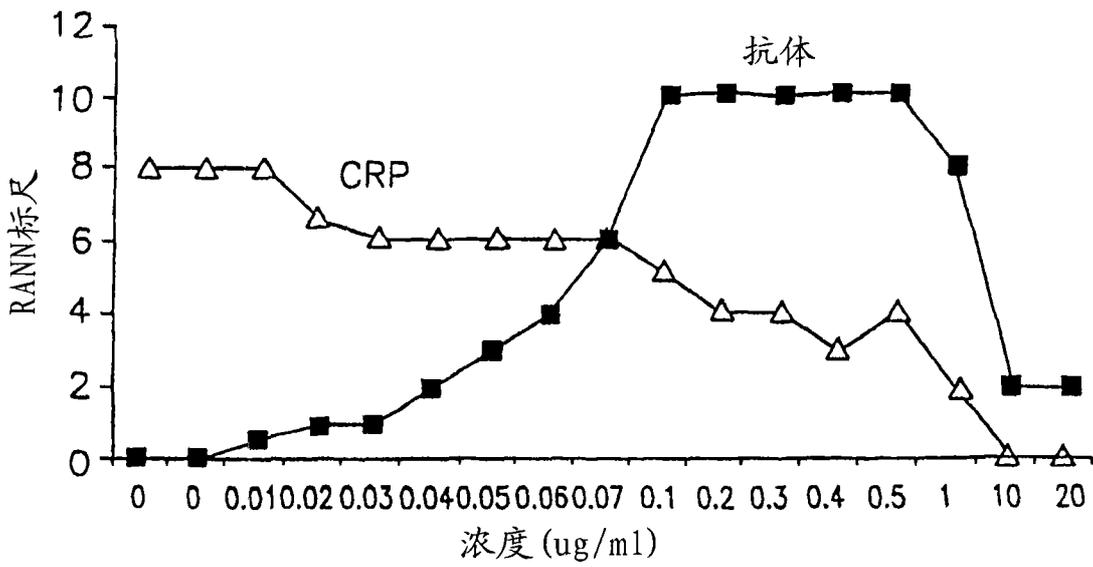


图 14

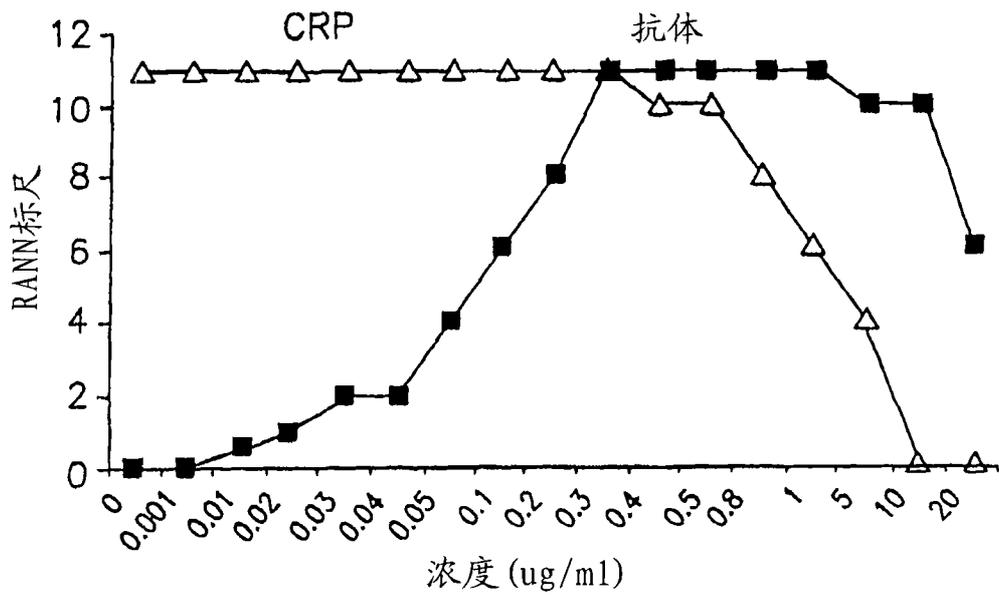


图 15