



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102483410 A

(43) 申请公布日 2012.05.30

(21) 申请号 201080022980.5

(72) 发明人 史蒂文·帕特里克·泰瑞尔

(22) 申请日 2010.03.25

蒂莫西·罗伯特·盖革

## (30) 优先权数据

迪安·迈克尔·金斯敦

61/163,046 2009.03.25 US

克里斯多佛·保罗·马蒂森

61/163,044 2009.03.25 US

巴里·帕特里克·范特·赫尔

61/163,048 2009.03.25 US

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

61/163,050 2009.03.25 US

有限公司 11262

61/163,053 2009.03.25 US

代理人 李冬梅 郑霞

61/222,311 2009.07.01 US

(51) Int. Cl.

61/226,058 2009.07.16 US

G01N 33/558 (2006.01)

61/231,508 2009.08.05 US

## (85) PCT申请进入国家阶段日

2011.11.25

## (86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/028732 2010.03.25

## (87) PCT申请的公布数据

W02010/111536 EN 2010.09.30

## (71) 申请人 莱泽尔诊断公司

权利要求书 4 页 说明书 84 页 附图 13 页

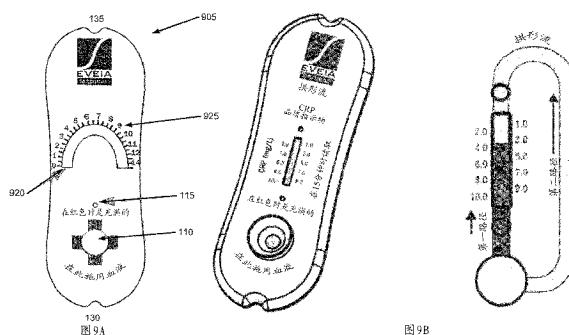
地址 美国科罗拉多州

## (54) 发明名称

用于分析流体变量的装置和方法

## (57) 摘要

提供用于分析流体变量的方法和装置，流体变量例如粘度、表面张力、分析物浓度、颗粒或聚集体的存在。装置通过测量由流体变量的固有性质导致的或由在流体迁移经过介质时流体变量的改变导致的经过介质的流体流动的停止或流速的变化分析流体变量。所提供的一种横向流动装置通过测量沿着多孔介质例如滤纸的共用元件的两个或更多个汇合臂的毛细管流的相对速率分析样品中的流体变量，其中臂中的至少一个已经通过响应于分析物的浓度影响流速的流动调节剂的加入来改性。



1. 一种检测分析物在流体中的存在或不存在的方法,包括:

将所述流体施用于介质;以及

确定所述流体在所述介质中的流动是否随时间停止或实质上减慢而不饱和所述介质;

其中:

所述介质和/或所述流体已经被改性,使得如果所述分析物在所述流体中存在,那么所述流体在所述介质中的流动将停止或实质上减慢而不饱和所述介质;并且

所述流体流动的停止或实质上减慢指示所述分析物在所述流体中的存在。

2. 一种检测流体变量改变流体流动的能力的存在或不存在的方法,包括:

将所述流体施用于介质;以及

确定所述流体在所述介质中的流动是否随时间停止或实质上减慢而不饱和所述介质;

其中:

所述介质和/或所述流体已经被改性,使得如果所述流体变量能够改变流体流动,那么所述流体在所述介质中的流动将停止或实质上减慢而不饱和所述介质;并且

所述流体流动的停止或实质上减慢指示所述流体变量改变所述流体流动的能力。

3. 一种分析分析物在流体中的量或浓度的方法,包括:

将所述流体施用于包括至少两个分支流动路径的介质,其中所述流体流入至少两个分支流动路径中;

比较在至少两个分支流动路径中的流体前沿的迁移距离;以及

基于所述迁移距离确定所述分析物在所述流体中的量或浓度;

其中:

所述至少两个分支流动路径中的至少一个已经被改性,使得所述流体在所述被改性的流动路径中的流动与分析物在所述流体中的量或浓度成比例地变化;

所述至少两个分支流动路径中的至少一个尚未被改性;并且

在所述至少一个被改性的流动路径和所述至少一个未被改性的流动路径中的流体前沿的迁移的相对距离指示所述分析物在所述流体中的量或浓度。

4. 一种评估流体变量改变流体流动的能力的方法,包括:

将所述流体施用于包括至少两个分支流动路径的介质,其中所述流体流入至少两个分支流动路径中;

比较在至少两个分支流动路径中的流体前沿的迁移距离;以及

基于所述相对迁移距离确定所述流体中的所述流体变量改变所述流体流动的能力;

其中:

所述至少两个分支流动路径中的至少一个已经被改性,使得所述流体在所述被改性的流动路径中的流动与所述流体变量改变所述流体流动的能力成比例地变化;

所述至少两个分支流动路径中的至少一个尚未被改性;并且

在所述至少一个被改性的流动路径和所述至少一个未被改性的流动路径中的流体前沿的迁移的相对距离指示所述流体变量改变所述流体流动的能力。

5. 根据权利要求3或权利要求4所述的方法,其中两个分支流动路径被线性介质含有,

并且所述流动路径是相对的。

6. 一种分析分析物在流体中的量或浓度的方法,包括:

将所述流体施用于至少两种包括至少两个平行的流动路径的分离介质,其中所述流体流入至少两个平行的流动路径中;

比较在至少两个平行的流动路径中的流体前沿的迁移距离;以及

基于所述相对迁移距离确定所述分析物在所述流体中的量或浓度;

其中:

所述至少两个平行的流动路径中的至少一个已经被改性,使得所述流体在所述被改性的流动路径中的流动与分析物在所述流体中的量或浓度成比例地变化;

所述至少两个平行的流动路径中的至少一个尚未被改性;并且

在所述至少一个被改性的流动路径和所述至少一个未被改性的流动路径中的流体前沿的迁移的相对距离指示所述分析物在所述流体中的量或浓度。

7. 一种评估流体变量改变流体流动的能力的方法,包括:

将所述流体施用于至少两种包括至少两个平行的流动路径的分离介质,其中所述流体流入至少两个平行的流动路径中;

比较在至少两个平行的流动路径中的流体前沿的迁移距离;以及

基于所述相对迁移距离确定所述流体中的所述流体变量改变所述流体流动的能力;

其中:

所述至少两个平行的流动路径中的至少一个已经被改性,使得所述流体在所述被改性的流动路径中的流动与所述流体变量改变所述流体流动的能力成比例地变化;

所述至少两个平行的流动路径中的至少一个尚未被改性;并且

在所述至少一个被改性的流动路径和所述至少一个未被改性的流动路径中的流体前沿的迁移的相对距离指示所述流体变量改变所述流体流动的能力。

8. 一种确定分析物在流体中的量或浓度的方法,包括:

将所述流体施用于包括汇合流动路径的介质,其中所述流体流入所述汇合流动路径中的每个中;

确定在所述流动路径中的流体前沿的汇合点;以及

基于所述汇合点确定所述分析物在所述流体中的量或浓度;

其中:

所述流动路径中的一个已经被改性,使得所述流体在所述被改性的流动路径中的流动与分析物在所述流体中的量或浓度成比例地变化;

所述流动路径中的一个尚未被改性;并且

在所述汇合流动路径中的流体前沿的所述汇合点指示所述分析物在所述流体中的量或浓度。

9. 一种确定流体变量改变流体流动的能力的方法,包括:

将所述流体施用于包括汇合流动路径的介质,其中所述流体流入所述汇合流动路径中的每个中;

确定在所述流动路径中的流体前沿的汇合点;以及

基于所述汇合点确定所述流体变量改变所述流体流动的能力;

其中：

所述流动路径中的一个已经被改性，使得所述流体在所述被改性的流动路径中的流动与所述流体变量改变所述流体流动的能力成比例地变化；

所述流动路径中的一个尚未被改性；并且

在所述汇合流动路径中的流体前沿的所述汇合点指示所述流体变量改变所述流体流动的能力。

10. 一种确定分析物在流体中的量或浓度的装置，包括：

曲线介质，其界定环绕开放空间的封闭流体路径；

其中所述介质被配置为在所述介质上的一个被界定位置处接收流体样品。

11. 根据权利要求 10 所述的装置，还包括至少部分地容纳所述曲线介质的壳体，并且还包括：

第一层，其在所述介质上方；以及

第二层，其在所述介质下方，其中所述第一层和所述第二层将所述介质容纳在它们之间。

12. 根据权利要求 10 或权利要求 11 所述的装置，还包括：

井，其用于接收一定量的流体；以及

毛细管储器，其提供通过竖直分离器连接所述井和在所述介质上的所述一个被界定位置的流体路径。

13. 根据权利要求 10-12 中任一项所述的装置，还包括刻度尺，所述刻度尺被配置为提供关于以相反方向从所述一个被界定位置流动的两种流体在所述介质中汇合的在所述曲线介质流体路径中的位置的指示。

14. 一种评估流体的凝结的方法，包括：

将所述流体施用于介质；以及

确定所述流体在所述介质中的流动是否随时间停止或实质上减慢而不饱和所述介质；

其中：

所述介质和 / 或所述流体已经被改性，使得如果所述流体具有凝结的能力，那么所述流体在所述介质中的流动将停止或实质上减慢而不饱和所述介质；并且

所述流体流动的停止或实质上减慢指示所述流体的凝结的能力。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述流体是全血或血浆。

16. 一种确定流体的凝结时间的方法，包括：

将所述流体施用于包括汇合流动路径的介质，其中所述流体流入所述汇合流动路径中的每个中；

确定在所述流动路径中的流体前沿的汇合点；以及

基于所述汇合点确定所述流体的凝结时间；

其中：

所述流动路径中的一个已经被改性，使得所述流体在所述被改性的流动路径中的流动与所述流体的凝结的能力成比例地变化；

所述流动路径中的一个尚未被改性；并且

在所述汇合流动路径中的流体前沿的所述汇合点指示所述流体的凝结的能力。

17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中所述流体是全血或血浆。
18. 根据权利要求 10-13 中任一项所述的装置, 其中所述曲线介质以具有侧面与弯曲端部相接的矩形侧的跑道的形状。
19. 根据权利要求 16 或权利要求 17 所述的方法, 其中所述介质以椭圆形的形状。
20. 根据权利要求 16 或权利要求 17 所述的方法, 其中所述介质以跑道的形状。
21. 根据权利要求 16、17、19 或 20 中任一项所述的方法, 其中所述汇合点沿着所述曲线介质的弯曲部分。
22. 根据权利要求 16、17、19 或 20 中任一项所述的方法, 其中所述汇合点沿着所述曲线介质的线性部分。

## 用于分析流体变量的装置和方法

### [0001] 相关申请

[0002] 本申请根据美国法典 35U. S. C. § 119(e) 要求于 2009 年 3 月 25 日提交的名称为“*A LATERAL FLOW DEVICE UTILIZING COMPETING FLOW RATES FOR QUANTITATIVE ANALYSIS*(利用竞争性流速进行定量分析的横向流动装置)”的美国临时申请序列号 61/163, 044 的优先权，并且还要求于 2009 年 3 月 25 日提交的名称为“*A LATERAL FLOW DEVICE UTILIZING COMPETING FLOW RATES FOR QUANTITATIVE ANALYSIS WITHOUT SAMPLE METERING*(利用竞争性流速进行定量分析而不需样品计量的横向流动装置)”的美国临时申请序列号 61/163, 046 的优先权，并且还要求于 2009 年 3 月 25 日提交的名称为“*A LATERAL FLOW DEVICE UTILIZING COMPETING FLOW RATES MODIFIED BY CHEMICAL PRECIPITATION FOR QUANTITATIVE ANALYSIS WITHOUT SAMPLE METERING*(利用通过化学沉淀改变的竞争性流速进行定量分析而不需样品计量的横向流动装置)”的美国临时申请序列号 61/163, 048 的优先权，并且还要求于 2009 年 3 月 25 日提交的名称为“*A LATERAL FLOW DEVICE UTILIZING COMPETING FLOW RATES MODIFIED BY IMMUNOCHEMICALLY MODIFIED BEADS FOR QUANTITATIVE ANALYSIS WITHOUT SAMPLE METERING*(利用通过在免疫化学上改性的珠改变的竞争性流速进行定量分析而不需样品计量的横向流动装置)”的美国临时申请序列号 61/163, 050 的优先权，并且还要求于 2009 年 3 月 25 日提交的名称为“*A LATERAL FLOW DEVICE UTILIZING COMPETING FLOW RATES TO[sic]COAGULATION FUNCTION*(利用竞争性流速削弱凝结功能的横向流动装置)”的美国临时申请序列号 61/163, 053 的优先权，并且还要求于 2009 年 7 月 1 日提交的名称为“*A LATERAL FLOW DEVICE UTILIZING COMPETING FLOW RATES MODIFIED BY IMMUNOCHEMICALLY MODIFIED MICROPARTICLES FOR QUANTITATIVE OR QUALITATIVE ANALYSIS WITHOUT SAMPLE METERING*(利用通过在免疫化学上改性的微粒改变的竞争性流速进行定量的或定性的分析而不需样品计量的横向流动装置)”的美国临时申请序列号 61/222, 311 的优先权，并且还要求于 2009 年 7 月 16 日提交的名称为“*A LATERAL FLOW DEVICE UTILIZING CESSATION OF CAPILLARY FLOW RATES FOR QUALITATIVE ANALYSIS*(利用毛细管流速的停止进行定性分析的横向流动装置)”的美国临时申请序列号 61/226, 058 的优先权，并且还要求于 2009 年 8 月 5 日提交的名称为“*A LATERAL FLOW DEVICE UTILIZING COMPETING FLOW RATES MODIFIED BY CHANGES IN VISCOSITY FOR QUANTITATIVE ANALYSIS WITHOUT SAMPLE METERING*(利用通过粘度的变化改变的竞争性流速进行定量分析而不需样品计量的横向流动装置)”的美国临时申请序列号 61/231, 508 的优先权。以上临时申请的主题内容以其整体以引用方式并入本文。本申请还与于以上同日提交的美国申请号 (Mintz Levin 代理人申请案第 40956-503001US 号) 相关。该美国申请的主题内容以引用方式并入本文。

### 发明领域

[0003] 用于通过分析经过介质的流体的迁移特征评估流体的变量的装置和方法，所述迁移特征例如流速和流体前沿的迁移距离。在一个实施方案中，本文提供的方法和装置通过

分析血液或血浆在多孔介质中的迁移测量血液或血浆的凝固时间。在其他实施方案中，提供用于通过测量流体前沿经过多孔介质的毛细管流动和 / 或迁移的速率测量流体样品中的分析物的方法和装置。本文提供的装置可以用于测量凝结速率、免疫化学测试、分析血液化学组分例如葡萄糖或胆固醇、监测传染性疾病或许多其他的流体浓度测量用途。

#### [0004] 背景

[0005] 从 1980 年中期介绍横向流动免疫测定测试起，横向流动免疫测定测试已经被广泛使用 [Rosen]。装置形式已经被证明是非常受欢迎的，这是由于其灵活性、低成本、使用的容易性和速度、以及用于新的测定的快速的开发周期。横向流动装置通常由塑料壳体和多孔的测试条组成。壳体保护测试条的部件并且将测试条的部件结合在一起，提供用于将样品施用于测试条的受控的设备并且提供指示物标记和使用说明。样品条是装置的核心，通常包括四个分离但是重叠的条，允许样品流体通过毛细作用从一个条或区域流动至下一个条或区域 [0' Farrel1]。第一区域是样品垫，样品垫将样品流体拉动入装置中并且可以进行对于使测定起作用所必需的处理（过滤、缓冲等等）。第二区域是共轭垫 (conjugation pad)，该共轭垫含有一些用于测定的一些干燥组分。在夹层类型的免疫测定的情况下，这些组分将通常是对于被共轭于检测剂例如酶或有色胶乳微珠的分析物特异的夹层的检测部分—单克隆抗体。这些组分被样品流体溶解，并且为反应可用。下一个区域是反应基质，该反应基质含有为读取结果所需的测定的组分，该组分通常被固定化在界限分明的检测区域中，以容易地作为目视指示物线读取。在夹层类型的免疫测定的情况下，这些组分将通常是对分析物特异的多克隆抗体。最后的区域是芯吸，其吸收过量的样品流体并且保持流体流过样品条的其余部分，直到反应达到完成。

[0006] 这些测定还可以使用酶介导的报道分子形式 (reporter format)。这样的一个实例可以由用于测量样品流体中的葡萄糖的测定表示。酶，即葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶，可以被结合于测试条的区域。样品可以以已知的比率与底物例如 3,3' - 二氨基联苯胺 (DAB) 混合并且样品可以被施用于测试条。当样品朝向具有固定化酶的区域迁移并且迁移经过该区域时，在样品内含有的葡萄糖将与葡萄糖氧化酶反应，生成过氧化氢和 d- 葡萄糖酸。进而，过氧化氢和 DAB 将与辣根过氧化物酶反应，以生成不可溶的褐黑色沉淀物，其将是作为指示物线可见的。

[0007] 以上测定还可以以竞争性的形式进行，这在样品流体中可能具有高浓度的分析物时或在夹层测定是不可行的情况下例如小分子分析物的情况下是有用的。在本策略的一个实例中，对分析物特异的多克隆抗体在指示物线处被固定化。共轭垫将包括被分析物包覆的胶乳珠。当分析物不存在时，珠将在样品流过时在指示物线处结合以产生可读信号。在样品流体中存在高浓度的分析物下，分析物将竞争在具有被结合于珠的分析物的检测区域中被固定化的抗体，产生被很大地减小的信号。

[0008] 上文描述的测定取决于报道分子在测试条上的特定的点处的积聚以形成指示物线。经过检测区域的样品流体的流速实际上确定温育时间，并且因此确定抗体必须具有的最小反应常数 [Brown]。样品中过高的分析物浓度实际上可以导致信号减少多至两个数量级，因为样品饱和捕获物和指示物抗体二者而不形成夹层结构，这是一种被称为“传感器中毒”的现象 [Qian]。最优条件取决于包括流速的许多因素，并且因此大量设计时间被耗费在试图最小化变化的流速的影响上。

[0009] 相反地,本文描述的装置依赖于作为分析工具的流速的改变和 / 或流体前沿的测量。

[0010] 概述

[0011] 本文提供的方法和装置的特征在于多种组分成分、制备的步骤以及生物物理的、物理的、生物化学的或化学的参数。如将对本领域技术人员明显的,本文提供的装置和方法包括下文描述的成分、步骤和 / 或参数的任何和所有排列与组合。

[0012] 本文提供用于通过测量流体前沿通过介质的运动或通过测量流速来分析或评估流体的变量的方法。介质可以是 :多孔的,例如玻璃纤维过滤器或硝酸纤维素;非多孔的,例如玻璃;或多孔材料和非多孔材料的混合物。还提供用于测量流体前沿通过介质的运动、评估迁移特征例如流速或迁移距离以及使用迁移特征来分析流体变量的装置。流体变量可以是作为流体的特征的性质,例如粘度或表面张力,或流体变量可以是在作为悬浮液的流体中或在溶液中存在的组分或分析物的性质,例如组分或分析物的量、浓度或结合 / 聚集 / 络合的程度。可以阻碍流体通过介质的流动的过程,例如凝胶、网络或聚集体的形成,可以使用本文提供的方法和装置来分析。流体变量可以作为流体的流速或在介质中的迁移距离的函数被直接地测量,或流体变量可以通过其与流动调节剂的相互作用被间接地分析。

[0013] 在“停流”方法中,流体变量可以通过流体通过介质的流动的停止来分析,流体通过介质的流动的停止由流体中阻碍流动的组分的存在导致或由流动调节剂的加入导致。流体前沿相对于介质的近端或远端的迁移距离可以用于分析流体变量,例如分析物的量 / 浓度或流体的粘度。在“分流”方法中,流体前沿的迁移同时通过介质中的两个分支的、平行的或相对的路径来实现。一个路径含有阻碍流体前沿的流速或迁移的流动调节剂,而另一个路径不含有该流动调节剂。然后,流体前沿经过路径中的每个的相对迁移距离可以用于分析关心的流体变量。在“拱形流”方法中,流体前沿沿着形成闭合回路的两个汇合的路径 (convergent path) 迁移;一个路径含有流动调节剂并且另一个路径不含有该流动调节剂。在闭合回路上的汇合点提供关心的流体变量的度量。

[0014] 本文提供的方法和装置可以分析流体中的流体变量,例如血液、乳、水、含有诸如蛋白质和核酸的生物分子的溶液,以及除了血液之外的生物流体,例如血浆、血清、尿、唾液、精液、灌洗液、宫颈流体、子宫颈阴道流体、阴道流体、胸部流体、乳汁、滑液、精液 (semen)、精液 (seminal fluid)、粪便、痰、脑脊液、眼泪、粘液、组织液、卵泡液、羊水、房水、玻璃体液、腹膜液、腹水、汗液、淋巴液、肺痰或其部分或组分。本文提供的方法和装置被设计为在护理点被采用,例如在家中、在医院急诊室或手术室中、在医院实验室和其他临床实验室中、在医生的办公室中、在野外或在不使用繁琐的高成本的装置的情况下期望获得迅速的和精确的结果的任何条件下。在一些实施方案中,本文提供的装置是一次性的。在另外的实施方案中,装置由层压塑料片和纸制成,由此相比于含有注射成型的或浇铸的零件的其他装置,提供显著的成本节约。

[0015] 本文提供使用多孔介质或多孔介质的彼此串联接触的多个元件来分析液体样品的化学组成的方法,所述多孔介质或所述多个元件被处理以允许期望的样品流体经过这些介质的毛细管流动,其中介质含有用于在多孔介质中的某一位置处引入样品流体,由此样品流体可以通过毛细管流动沿着一个或多个分离的路径运动的设备。分离的路径中的一个或多个或样品被以这样的方式处理,所述方式导致流动的停止,或导致流动的减少达到这

样的程度,即为了本方法的目的,其可以被视为液体样品的流动的停止,这样的流动停止取决于液体样品中以或高于某个阈值水平的一种或多种特定组分的存在。介质可以在包括下述的设备的装置中,所述设备用于测量液体前沿在多孔介质中沿着每个路径的与样品被引入的位置相比的位置,由此监测流动是否已经沿着每个路径停止,由此确定组分是否以或高于上述的阈值水平存在。在一些实施方案中,导致流动的停止的剂在被引入多孔介质的元件中之前与样品流体预混合。在其他实施方案中,导致流动的停止的剂在样品流体流过的多孔介质区域中存在。在又其他的实施方案中,对可能的液体路径中的至少一个的处理导致粘度的变化,因此导致流速的停止。在一些实施方案中,对可能的液体路径中的至少一个的处理导致聚合物凝胶或网络的形成,因此导致流速的停止。处理可以包括被引入流体中以增强聚合物凝胶或网络的流动限制性质的微颗粒。在一些实施方案中,微颗粒被对样品流体中的待测量的组分特异的粘合剂包覆或与该粘合剂共轭。在又其他的实施方案中,对可能的液体路径中的至少一个的处理导致不溶性沉淀物的形成,由此改变介质的渗透率并且导致流速的停止。在另外的实施方案中,免疫化学原理被用于导致胶乳微球或相似的剂的浓缩或附聚,由此改变介质的渗透率并且因此导致流速的停止。

[0016] 还提供用于分析液体样品的化学组成的方法,所述方法使用被处理以允许期望的样品流体经过多孔介质的毛细管流动的多孔介质的元件;以及用于在该多孔介质中的某一位置处引入样品流体,由此样品流体可以通过毛细管流动沿着两个或更多个分离的路径运动的设备。这些分离的路径中的一个或多个以导致液体样品的流速相比于未处理的路径改变的方式被处理,这样的流速变化取决于液体样品中的一种或多种特定组分的存在。用于实施方法的装置包括用于测量液体前沿在多孔介质中沿着每个路径的与样品被引入的位置相比的位置,由此进行沿着每个路径的相对流速的比较的设备。还提供用于使流速的这种比较与样品的化学组成相互关联的方法。在一些实施方案中,液体样品的体积是已知的,并且仅两个路径是可能的,使得仅对液体前沿中的一个的位置的测量是必需的。在其他实施方案中,对可能的液体路径中的至少一个的处理导致粘度的变化,从而改变流速。在又其他的实施方案中,对可能的液体路径中的至少一个的处理导致不溶性沉淀物的形成,由此改变介质的渗透率并且改变流速。在另外的实施方案中,免疫化学原理被用于导致胶乳微球或相似的剂的浓缩或附聚,由此改变介质的渗透率并且改变流速。

[0017] 还提供用于分析液体样品的化学组成的方法,所述方法使用被处理以允许期望的样品流体经过多孔介质的毛细管流动的多孔介质的元件,以及用于在该多孔介质中的单一位置处引入样品流体,由此样品流体可以通过毛细管流动沿着两个或更多个分离的路径运动的设备,其中这些路径在一个或多个公共点处汇合。这些分离的路径中的一个或多个以导致液体样品的流速相比于未处理的路径改变的方式被处理,这样的流速变化取决于液体样品中导致已经在免疫化学上被改性的聚合物的捕获或聚集的一种或多种特定组分的存在。样品流体被允许通过毛细管作用沿着这些路径中的每个同时地运动,直到流体前沿汇合,这有效地结束流体的所有运动并且由此界定测定的终点。流体前沿汇合的位置被用于确定沿着路径中的每个的相对流速,并且这种比较与样品的化学组成相互关联。在一些实施方案中,对分离的路径中的一个的处理包括除了已经在免疫化学上被改性的聚合物之外的已经在免疫化学上被改性的微颗粒的使用。在其他实施方案中,对分离的路径中的一个的处理包括除了已经在免疫化学上被改性的聚合物之外的尚未在免疫化学上被改性的微

颗粒的使用。在又其他的实施方案中，样品在两个或更多个点处被同时引入，由此界定分离的路径。在一些实施方案中，将据称含有分析物的样品与用对这种分析物特异的抗体在免疫化学上改性的聚合物混合，并且可选择地与被对这种分析物特异的抗体包覆的微颗粒混合，并且被处理的区域具有也对这种分析物特异的被固定化的抗体，使得聚合物或微颗粒将在受限制的区域中聚集，影响了流速。

[0018] 还提供用于分析液体样品的化学组成的方法，所述方法使用被处理以允许期望的样品流体经过多孔介质的毛细管流动的多孔介质的元件，以及用于在该多孔介质中的单一的位置处引入样品流体，由此样品流体可以通过毛细管流动沿着被界定的路径运动的设备。被界定的路径被以导致液体样品的流速的变化的方式处理，这样的流速变化取决于液体样品中一种或多种特定组分的存在，所述特定组分导致已经在免疫化学上被改性的聚合物或已经在免疫化学上被改性的聚合物和微颗粒的组合的捕获或聚集。样品流体被允许通过毛细管作用沿着被界定的路径运动，直到由在免疫化学上被改性的聚合物形成网络或凝胶停止了流体的所有的表观运动，由此界定测定的终点。流体前沿停止运动的位置与样品的化学组成相互关联。在一些实施方案中，微颗粒不在免疫化学上被改性。

[0019] 还提供用于分析液体样品的化学组成的方法，所述方法使用被处理以允许期望的样品流体经过多孔介质的毛细管流动的多孔介质的元件；以及用于在该多孔介质中的单一的位置处引入样品流体，由此样品流体可以通过毛细管流动沿着两个或更多个分离的路径运动的设备，其中这些路径在一个或多个公共点处汇合。这些分离的路径中的一个或多个以导致液体样品的流速相比于未处理的路径改变的方式被处理，这样的流速变化取决于液体样品中的一种或多种特定组分的存在。样品流体被允许通过毛细管作用沿着这些路径中的每个同时地运动，直到流体前沿汇合，这有效地结束流体的所有运动并且由此界定测定的终点。然后，流体前沿汇合以确定沿着路径中的每个的相对流速的位置被确定并且与样品的化学组成相互关联。在一些实施方案中，样品在两个或更多个点处被同时引入。

[0020] 还提供用于分析液体样品的化学组成的方法，所述方法使用被处理以允许期望的样品流体经过多孔介质的毛细管流动的多孔介质的元件，以及用于在该多孔介质中的单一的位置处引入样品流体，由此样品流体可以通过毛细管流动沿着两个或更多个分离的路径运动的设备，其中这些路径在一个或多个公共点处汇合。这些分离的路径中的一个或多个可以以下述的方式被处理：通过响应于液体样品中的一种或多种特定组分的存在诱导化学沉淀而导致液体样品的流速与未处理的路径相比的改变。样品流体被允许通过毛细管作用沿着这些路径中的每个同时地运动，直到流体前沿汇合，这有效地结束流体的所有运动并且由此界定测定的终点。流体前沿汇合的位置被分析以确定沿着路径中的每个的相对流速，并且将这种比较与样品的化学组成相互关联。在一些实施方案中，样品在两个或更多个点处被同时引入。在其他实施方案中，样品可以含有葡萄糖并且与DAB预混合，并且被处理的路径含有葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶，由此形成改变流动的不溶性沉淀物。在其他实施方案中，样品可以含有关心的分析物，并且样品与葡萄糖、DAB以及与辣根过氧化物酶共轭的分析物的抗体预混合，并且被处理的路径含有葡萄糖氧化酶以及分析物的第二非竞争抗体，由此在具有改变流动的不溶性沉淀物的检测区域处形成免疫复合物夹层结构。

[0021] 还提供用于分析液体样品的化学组成的方法，所述方法使用被处理以允许期望的样品流体经过多孔介质的毛细管流动的多孔介质的元件，以及用于在该多孔介质中的单一

的位置处引入样品流体,由此样品流体可以通过毛细管流动沿着两个或更多个分离的路径运动的设备,其中这些路径在一个或多个公共点处汇合。这些分离的路径中的一个或多个可以导致液体样品的流速与未处理的路径相比改变的方式被处理,这样的流速变化取决于液体样品中导致已经在免疫化学上被改性的微颗粒的捕获或凝集的一种或多种特定组分的存在。样品流体被允许通过毛细管作用沿着这些路径中的每个同时地运动,直到流体前沿汇合,这有效地结束流体的所有运动并且由此界定测定的终点。流体前沿汇合的位置可以被分析以确定沿着路径中的每个的相对流速,并且这种比较可以与样品的化学组成相互关联。在一些实施方案中,样品在两个或更多个点处被同时引入。在其他实施方案中,含有特定的分析物的样品与被对这种分析物特异的抗体包覆的微颗粒混合,并且被处理的区域具有也对这种分析物特异的被固定化的抗体,使得微颗粒将在受限制的区域中聚集,影响了流速。在其他实施方案中,被处理的区域含有被对待测试的分析物特异的多克隆抗体包覆的微颗粒,由此导致在分析物的存在下的凝集,阻塞了孔并且限制了流动。

[0022] 还提供用于分析血液样品的凝结能力的方法,所述方法使用被处理以允许期望的样品流体经过多孔介质的毛细管流动的多孔介质的元件,以及用于在该多孔介质中的单一的位置处引入样品流体,由此样品流体可以通过毛细管流动沿着两个或更多个分离的路径运动的设备,其中这些路径在一个或多个公共点处汇合。这些分离的路径中的一个或多个可以是以活化凝结路径的方式,由此增加了粘度,这进而可以导致流速的变化。样品流体可以被允许通过毛细管作用沿着这些路径中的每个同时地运动,直到流体前沿汇合,这有效地结束流体的所有运动并且由此界定测定的终点。流体前沿汇合的位置可以被分析以确定沿着路径中的每个的相对流速,并且这种比较与样品的凝结时间相互关联。在一些实施方案中,样品在两个或更多个点处被同时引入。

[0023] 还提供用于分析血液样品的凝结能力的方法,所述方法使用被处理以允许期望的样品流体经过多孔介质的毛细管流动的多孔介质的元件,以及用于在该多孔介质中的单一的位置处引入样品流体,由此样品流体可以通过毛细管流动沿着两个或更多个分离的路径运动的设备,其中这些路径在一个或多个公共点处汇合。这些分离的路径中的一个或多个可以是以活化凝结路径的方式被处理,由此增加了粘度并且导致流速的变化。样品流体可以被允许通过毛细管作用沿着这些路径中的每个同时地运动,直到流体前沿汇合,这有效地结束流体的所有运动并且由此界定测定的终点。流体前沿汇合的位置可以被分析以确定沿着路径中的每个的相对流速,并且这种比较与样品的凝结时间相互关联。在一些实施方案中,样品在两个或更多个点处被同时引入。在其他实施方案中,具有显著地小于多孔介质的孔径大小的尺寸的微颗粒可以被引入样品流体中,以便增强凝结对两个或更多个分离的路径之间的毛细管流速的差异的影响。在另外的实施方案中,微颗粒仅被沿着已经被处理以促进凝结的路径引入。在又其他的实施方案中,具有显著地小于多孔介质的孔径大小的尺寸的微颗粒可以被引入样品流体中,以便增强凝结对两个或更多个分离的路径之间的毛细管流速的差异的影响。

[0024] 还提供横向流动装置,该横向流动装置通过检测样品流体经过多孔介质例如滤纸的毛细管流动的速率的变化来测量样品中的特定的分析物的浓度。特别地,含有分析物的样品流体通过毛细作用沿着多孔介质的共用元件的两个或更多个汇合臂流动,其中臂中的至少一个已经通过响应于分析物的浓度影响流速的流动调节剂的加入来改性。流体前沿将

在由它们的相对流速确定的位置处汇合,这从而指示样品流体中的分析物的浓度。

[0025] 本文提供的另一个横向流动装置通过检测样品流体经过多孔介质例如滤纸的毛细管流动的速率的变化来测量样品中的特定的分析物的浓度。特别地,含有分析物的样品流体通过毛细作用沿着多孔介质的共用元件的两个或更多个臂流动,其中臂中的至少一个已经通过响应于分析物的浓度影响流速的流动调节剂的加入来改性。流体前沿在完成时距样品引入点的相对距离由它们的相对流速确定,这从而指示样品流体中的分析物的浓度。

[0026] 本文提供的其他横向流动装置通过检测样品流体经过多孔介质例如滤纸的毛细管流动的速率的变化来定性地测量样品中的特定的分析物的浓度。特别地,含有一种或多种分析物的样品流体通过毛细作用沿着经过多孔介质的元件或经过多孔介质的彼此串联接触的多重元件的路径流动,其中样品和 / 或流体路径已经通过使流动在特定的分析物的存在下停止的流动调节剂的加入来改性。如果流体或介质的性质不随时间变化,那么预期的是流体前沿的位置将与时间的平方根成正比 [Washburn],使得足够的量的样品流体将饱和多孔介质,如果被给予足够的时间的话。如果流体前沿在指定的一段时间之后尚未运动至少指定的距离,那么这指示毛细管流动已经停止,由此指示在样品流体中存在阈值浓度的分析物。

[0027] 流动调节剂的一个实例将是在分析物的存在下形成阻塞介质的孔的沉淀物从而限制流动的一组酶和底物。另一个实例将是在样品流体中悬浮并且具有显著地小于多孔介质的孔径大小的直径的胶乳微球,该胶乳微球通过普遍使用的免疫化学方法,将被使得在样品流体流过多孔介质的一些区域时在这些区域中聚集,由此限制流动。流动调节剂的又一个实例将是在特定的分析物的存在下改变样品流体的粘度由此减慢流动的剂。

[0028] 沉淀改变流速的用途的一个实例可以由用于测量样品材料中的葡萄糖的测定例示。在本实施方案中,酶,即葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶,可以被结合于测试条的区域。样品可以以已知的比率与底物例如 3,3' - 二氨基联苯胺 (DAB) 混合并且样品可以被施用于测试条。当样品朝向具有固定化酶的区域迁移并且迁移经过该区域时,在样品内含有的葡萄糖将与葡萄糖氧化酶反应,生成过氧化氢和 d- 葡萄糖酸。进而,过氧化氢和 DAB 将与辣根过氧化物酶反应,以生成不可溶的褐黑色沉淀物,其将用来局部地减小支持膜的孔径大小,从而减小局部流速。然后这种流速变化可以被测量并且与样品中存在的葡萄糖的量直接地相互关联。沉淀材料的量与样品中存在的葡萄糖的量成比例,从而存在更多葡萄糖将导致更多沉淀物形成,从而更多地减慢样品的液体部分的流动。还可能的是,使酶中的仅一种被固定化并且使另一种酶与行进经过测试条的样品混合,其目的是使沉淀物在膜的局部区域中形成,从而影响流速。此外,过程可以通过将底物和样品直接与酶混合来简单地进行,使得沉淀物将以非局部的方式形成但是仍然用来减小膜的孔径大小并且影响流速。本领域技术人员将认识到,许多其他类型的分析可以使用这种过程来进行,要求是可以导致沉淀物形成,这种沉淀物的量与待测量的分析物的量成比例,并且这种沉淀物可以影响样品的液体部分穿过膜的流速。其他潜在的底物体系包括但不限于,将碱性磷酸酶与普遍已知的底物对 BCIP/NBT 组合。

[0029] 在又一个实例中,沉淀物的局部形成可以通过在液体样品可以迁移经过的测试条局部区域中结合的抗体来导致。在意图测量样品中的 C 反应蛋白 (CRP) 的优选的实施方案中,可以采用可以结合于 CRP 分子或分子复合物的被指定为 a1 和 a2 的两种抗体。抗体 a1

可以共价地或非共价地与酶例如辣根过氧化物酶相关联。第二抗体 a2 可以是未被改性的或被诸如生物素的分子改性。在本实施方案中，被怀疑含有 CRP 的样品可以与抗体 a1、葡萄糖和沉淀底物例如 3,3' - 二氨基联苯胺 (DAB) 混合。测试条的某区域将具有被特异性地或非特异性地结合于样品施用点远端的区域的抗体 a2 和葡萄糖氧化酶。然后样品将迁移经过所准备的测试条，例如硝酸纤维素或尼龙膜，CRP 结合的抗体 a1 将通过结合于抗体 a2 而被保留，导致葡萄糖氧化酶的局部浓度以剂量响应的方式增加。膜结合的葡萄糖氧化酶将与被加入样品中的葡萄糖反应，生成过氧化氢，进而过氧化氢将与过氧化物酶标记的抗体 a1 反应，形成将以剂量响应的方式影响样品的液体部分的流速的不溶性沉淀物。这种流速变化可以被测量以确定样品中的 CRP 的浓度。注意，非结合的抗体 a1 也将导致沉淀物的形成，然而由于这种抗体存在的瞬时的本质，形成的量和速率将仅贡献于沉淀物形成的合理的恒定速率，该合理的恒定速率将在样品之间合理地一致。本领域技术人员将认识到，许多不同的目标可以使用这种途径来测量，主要要求是抗体结合导致可以与抗体结合的量成比例的方式影响样品的液体部分的流速的沉淀物的形成。此外，本领域技术人员将认识到这种体系可以被以竞争性结合的方式使用，其中在样品中存在的分析物将与被加入的目标分析物竞争，以导致向测试条的局部区域的结合的减少，导致待形成的沉淀物的局部形成的减少，从而以与样品中的目标的浓度成反比的方式增加样品的液体部分的流速。此外，本领域技术人员将认识到，抗体 a2 可以被以下物质生物素化或标记：结合于测试条的一些其他特异性的捕获标记物和特异性的捕获部分，例如结合生物素的蛋白，例如抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白 (neutraavidin) 或链霉抗生素蛋白，使两种抗体 (a1、a2) 能够被加入样品并且使全部的复合物能够被捕获，但是仅抗体 a2 以剂量响应的方式被捕获。本领域技术人员将认识到，有许多用于捕获抗体的方式，除了许多其他的之外，所述方式包括但不限于 His 标记、物种特异性的抗抗体、蛋白 A 和蛋白 G。其他潜在的底物体系包括但不限于，将碱性磷酸酶与普遍已知的底物对 BCIP/NBT 组合。

[0030] 凝结时间的测量是使用粘度监测样品的状态的一个实例。凝结描述血液通过其被凝块的复杂过程。

[0031] 凝血酶原时间 (PT) 测量凝结的非固有的路径。这种路径的诱导需要钙。该过程可以通过促凝血酶原激酶的引入来加速，促凝血酶原激酶是一种含有组织因子的盐脑提取物，引发非固有的路径。这种路径通过最终导致凝血酶（因子 IIa）的活化的蛋白质级联 (protein cascade) 进行，凝血酶是裂解纤维蛋白原的蛋白酶。纤维蛋白原是可溶解的蛋白质，但是当被裂解为纤维蛋白时，纤维蛋白原凝结为不可溶的凝胶。纤维蛋白多聚体的生成的结果是血液或血浆的增加的粘度和流动的阻碍，这作为结果，因此可通过本装置测量。

[0032] 钙是凝结级联中所需要的辅因子，因此用钙螯合剂例如柠檬酸盐处理的血液不凝块。凝结级联可以通过引入相对于柠檬酸盐摩尔过量的钙被再活化。对于本文描述的凝结测试来说，血液样品用柠檬酸盐来初始地处理。其他钙螯合剂例如 EDTA，产生相似的效果。装置的初始的竖直分离部件将血浆从血液分离。（测试还可以使用全血来进行。）被分离的血浆到达定量刻度盘并且在两个方向以相等的速率迁移。刻度盘的一个方向用钙处理，以允许凝结级联开始。刻度盘的这一侧还可以用促凝血酶原激酶或加速凝结的其他材料处理。刻度盘的另一侧保持不被处理，使得血浆在这个方向的迁移不由于凝结而被延迟。在刻度盘上的每个方向迁移的血浆最终在刻度盘的相对的侧上的某处相遇。血浆相遇的点直

接地指示血液样品凝结的能力。例如，完全地缺乏凝结的血液样品将在距血浆进入定量刻度盘之处的 180° 相遇，因为在每个方向迁移的血液将已经以相同的速率行进。对于具有越来越健康的凝结功能的血液样品，血浆在刻度盘上的汇合点越来越偏向刻度盘的发生凝结（以及因此血浆迁移的延迟）的侧。

[0033] 固有的或活化部分凝血活酶时间 (aPTT) 的缺乏被相似地测试。诱导固有的路径的因子，例如高岭土（不可溶的硅酸盐）或带负电荷的磷脂可以与钙共同地被引入定量刻度盘的一侧。血液被施用和暴露于柠檬酸盐，如上文描述的，然后血浆沿着刻度盘迁移，基于通过固有的路径的凝结在刻度盘上的其它地点汇合。

[0034] 本装置的用途还包括但不限于：(1) 凝结缺乏的基本监测。(2) 对服用抗凝剂的患者的监测，例如：在服用肝素的患者中监测 aPTT 并且在服用华法林的患者中监测 PT。(3) 促凝血酶原激酶生成测试 (TGT)，用于区别在患有甲型血友病的人中的因子 VIII 结块问题和如在乙型血友病个体中的因子 IX 结块问题。(4) 特异性因子的测试，用于确定凝结路径内的缺乏。

[0035] 存在使用与免疫化学原理组合的微米尺寸的聚苯乙烯珠来改变多孔介质的孔隙率 / 渗透率的多种可能的方式。流速的变化提供样品内的目标分析物浓度成反比的指示。珠在诸如横向流动纸 (Fusion 5, Whatman) 或硝酸纤维素膜 (Vivid) 的多孔膜的空隙容积内的积聚用来通过改变有效的孔隙率和渗透率来减弱被施用的样品的流动。珠的精确的积聚可以通过施用靶向期望的分析物的特异性的分子识别元件，例如抗体、蛋白质、核酸和它们的衍生物来实现。珠在膜上的期望的部分处的固定化将导致在为了特定的目标设计的测试条上的样品流速的变化。在本程序中描述的试剂和材料的组合提供快速的、分析物特异性的半定量的测试，以测量来自生物样品的溶解物，例如蛋白质、核酸和代谢物。

[0036] 在一个形式中，夹层结构免疫测定可以用于测量来自样品的 C 反应蛋白 (CRP)。样品与已知量的被 CRP 的抗体 (a1) 包覆的珠混合，并且然后被施用于横向流动膜或纸。膜或纸的一个部分还被中性抗生物素蛋白（或其他结合生物素的蛋白）以及与生物素共轭的第二抗 CRP 抗体 (a2) 包覆。中性抗生物素蛋白和 a2 抗体之间的相互作用生成在测试条内的目标特异性捕获部分。一旦样品被施用，那么样品将流过被固定化的中性抗生物素蛋白 - 生物素 - 抗体包覆的部分，并且被 a1 抗 CRP 蛋白包覆的珠将与样品中的 CRP 的量成比例地积聚。珠在测试条的该区域的积聚将有效地减少样品可获得的空隙容积并且延迟样品流动。当珠积聚时，有效的孔径大小以及测试条内的用于流体流动的可用空间被减少，并且在测试条的该部分处被固定化的珠的量与样品中的 CRP 的量成正比。该实例的其他情况可以由与样品混合的被 a1 抗体包覆的珠和与生物素共轭的 a2 抗体组成。还可能的是，使被 a1 抗体包覆的珠以及与 a2 生物素共轭的抗体被包覆在样品垫至试剂垫上，所述垫在被固定化的中性抗生物素蛋白部分之前并且在样品流过测试条时被样品占据。对于上文刚刚描述的后两种情况，测试条的一部分被中性抗生物素蛋白包覆，以允许捕获免疫复合物。这种施用将还包括具有较小的（纳米尺度）和较大的尺寸的珠、珠尺寸的组合、显色指示物珠、以及具有被合适地控制尺寸的流动基质的珠的耦合体 (coupling)，这取决于用于分析的成对的分离纸。显色指示物珠的使用允许它们用作报道分子，并且显色指示物珠向测试条中的迁移的缺乏或减少的迁移距离提供液体样品向条中的迁移以及目标分析物的存在的直接对应。珠还可以是非球形的被改进的形状、被不同的表面化学官能化、或与其他机制组

合,以影响多孔膜内的流速。非特异性的珠(不结合于分子识别元件的珠)的加入可以用于导致由特异性地识别目标分析物的被蛋白质或抗体包覆的珠产生的流速的进一步的减小,并且有效地放大信号。本方法可以适应竞争性测定形式,同时包括与样品分析物竞争的目标分析物。此处,进行竞争的目标分析物的存在将减少对目标特异性的珠的局部积聚,防止膜孔的堵塞,并且导致与样品中的目标的浓度成正比的增加的样品流速。对横向流动和其他免疫学技术熟悉的有经验者将认识到,许多其他类型的分析可以使用本方法来进行。这种测定的基本的方面是珠在流动基质内的特异性的积聚,导致由于为样品流动可用的空隙容积的减小而流速成比例的减小。

[0037] 这种类型的测定的可选择的方案使用珠在样品内的凝集来防止或减少样品在测试条上的流动。使用上文的CRP实例,样品与附着于珠的CRP的a1和a2抗体混合。然后样品被施用于多孔的横向流动膜条。如果样品含有CRP,那么珠将凝集,堵塞空隙容积,并且产生防止或减慢样品进入膜中的障碍物。当CRP不存在时,珠保持分散遍及样品并且允许样品流入膜中。珠在样品加入部位处的凝集有效地减小测试条内的孔径大小以及为流体流动可用的空间。凝集的程度以及在测试条的该部分处积聚的珠的量与样品中的CRP的量成正比。因此,样品和珠进入测试条中的流速是样品内的CRP浓度的直接指示物。如上述的,显色指示物珠的迁移提供液体样品向条中的迁移以及目标分析物的存在的直接对应。相似地,珠还可以是非球形的被改进的形状、被不同的表面化学官能化、或与其他机制组合,以影响多孔膜内的流速。非特异性的珠(不结合于分子识别元件的珠)的加入可以用于导致由特异性地识别目标分析物的被蛋白质包覆的珠产生的流速的进一步的减小,并且有效地放大信号。还可能的是,使被抗体包覆的珠在样品或试剂垫上,所述垫在被固定化的中性抗生物素蛋白部分之前并且在样品流过测试条时被样品占据。对横向流动和其他免疫学技术熟悉的有经验者将认识到,许多其他类型的分析可以使用本方法来进行。这种测定的基本的方面是珠在流动基质内的特异性的积聚,导致由于为样品流动可用的空隙容积的减小而流速成比例的减小。

[0038] 多种途径可以用于增强珠的局部膜孔阻塞并且响应于目标分析物减少样品流动。这些中的一个是将膜孔通过珠积聚的阻塞与被珠局部化引导的被酶介导的沉淀反应组合。在这种情况下,被酶或抗体酶融合包覆的珠的组合可以用于在特异性目标分析物的存在下产生局部沉淀物。非均一的局部沉淀物形成和珠积聚的组合将非常有效地引起样品流速的减小。非常小的沉淀物的存在将补充珠的孔阻塞,因为由于膜孔径大小的不同,局部沉淀将堵塞被珠保留开放的剩余的缝隙。可选择地,单独的或与珠或酶组合的水溶性聚合物的加入也将用来与目标分析物浓度成比例地减小流速。这些聚合物可以用作非特异性阻塞试剂,或被分子识别元件官能化以向珠积聚或沉淀物形成反应加入特异性。聚合物可以被共轭或融合于珠表面或酶,以加入形状和产生更不均一的阻断剂以限制流动。聚合物的被加入的非均一的体积将以与沉淀形成相同的方式起作用,以堵塞由于变化的膜孔径大小未被珠阻塞的剩余的缝隙,并且更有效地减小样品流速。

[0039] 装置的一个可能的实施方案将包括滤纸条,其中一个端部已经被流动调节剂处理并且另一个端部未被改性。样品流体将被分流成两半,并且被同时引入条的两端。如果特异性分析物存在,那么相比于从未被处理的端部的流动,流体将从被处理的端部更缓慢地流动,并且流体前沿将在更接近被处理的端部处相遇,而如果该分析物不存在,那么流体前

沿将在条的中心相遇。如果流动的限制取决于分析物浓度,那么前沿汇合的位置将是分析物浓度的指示。

[0040] 装置的另一个实施方案将使用圆形的或椭圆形的滤纸条(“刻度盘”),且样品在单一的位置处被引入,由此围绕刻度盘在两个方向流动,其中刻度盘的一个臂含有流动调节剂。于是,分析物的浓度将与前沿汇合在刻度盘上的位置相互关联。明显地,刻度盘可以具有将允许样品以两个或更多个方向初始地流动并且在测试完成时汇合的任何形状,但是圆形的形状应导致缓冲前沿的最小的变形。

#### [0041] 附图简述

[0042] 图 1A、图 1B、图 2 和图 3 示出了说明用于通过两个流体前沿沿着闭合回路的汇合点来分析流体变量的理论基础的示例性数据的绘图。

[0043] 图 4 示出了停流装置的示例性的实施方案的俯视图。

[0044] 图 5 示出了顶部覆盖物被除去的停流装置的俯视图。

[0045] 图 6 示出了停流装置的侧视横截面图。

[0046] 图 7 示出了形成停流装置的示例性的一组分层部件的分解图。

[0047] 图 8 示出了能够在装置中进行流体变量的分析的示例性的条介质部件。

[0048] 图 9A 示出了拱形流动装置的实施方案的俯视图,其中沿着两个汇合的流体路径 (converging fluid path) 迁移所经过的闭合回路介质的弯曲部测量汇合点。

[0049] 图 9B 示出了拱形流动装置的另一个实施方案,其中沿着两个汇合的流体路径迁移所经过的闭合回路介质的线性部分测量汇合点。

[0050] 图 10 示出了顶部覆盖物被除去的在 9A 中描绘的装置的俯视图。

[0051] 图 11 示出了 9A 中描绘的装置的侧视横截面图。

[0052] 图 12 示出了形成 9A 中描绘的装置的示例性的一组分层部件的分解图。

[0053] 图 13 示出了使能够通过测量沿着两个分离的路径(一个具有被改变的流速)的汇合点来分析流体变量的示例性的部件(闭合回路多孔介质)。

[0054] 图 14 示出了沿着多孔介质的 110mm 圆形条的血清的迁移、相对于血清的被削弱的凝结的血浆 (impaired coagulation plasma) 和健康的血浆流体前沿的迁移以及它们的汇合点。

[0055] 图 15 示出了图 14 中描绘的相对迁移距离和汇合点的图。

#### [0056] 详细描述

##### [0057] A. 定义

[0058] 除非另有定义,否则本文中所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的技术人员所普遍理解的意思相同的意思。除非另有说明,否则在贯穿本文的整个公开内容中提到的所有专利、专利申请、公布的申请和出版物、网址和其他被公布的材料,都以其整体通过引用并入。在本文的术语具有多个定义的情况下,以本节中的那些为准。在参照 URL 或其他这样的标识符或地址的情况下,应理解,这样的标识符可以变化并且在因特网上的特定的信息可以是易变的,但是等效的信息可以通过搜索因特网而找到。对其的参照证实这样的信息的可用性和公共的传播。

[0059] 如本文所使用的术语“流体”通常是指溶液、液体悬浮液或胶态悬浊液,包括溶胶,然而该术语还可以是指任何可流体化的组合物,无论是液体、固体还是气体。“可流体化的”

意指提供“流动”或“可变形”的能力,即物质被倾倒并且无障碍地采取其倾倒入的容器的形状的能力,的性质。“液体悬浮液”在本文中与“悬浮液”可互换地使用,并且是指其中固体颗粒(经常仅在微观可见的,例如血液中的红血球)被分散遍及在较小密度的液体中并且可以被从所述液体过滤但是由于系统粘度或分子间相互作用不容易沉降的体系。如本文所使用的“胶态悬浊液”是指其中固体颗粒被均匀地分散遍及液体的悬浮液。

[0060] 如本文所使用的术语流体还可以是指溶液。如本文所使用的术语“溶液”是指在单相中的两种或更多种成分的均匀混合物,溶液通常是液体但是也可以是冻结的液体或气体,其中不同的成分仅在分子水平可识别。例如,本文提供的方法和装置可以用于监测关心的分析物的聚集,其中分析物初始地在溶液中但是在聚集时形成固体颗粒。

[0061] 可以用于本文提供的方法和装置的示例性的流体包括但不限于诸如以下的流体:血液、乳、水、含有诸如蛋白质和核酸的生物分子的溶液,以及除了血液之外的生物流体,例如血浆、血清、尿、唾液、精液、灌洗液、宫颈流体、子宫颈阴道流体、阴道流体、胸部流体、乳汁、滑液、精液、精液、粪便、痰、脑脊液、眼泪、粘液、组织液、卵泡液、羊水、房水、玻璃体液、腹膜液、腹水、汗液、淋巴液、肺痰或其部分或组分。可以作为影响流速和/或流体前沿的迁移距离的流体变量或流动调节剂的分析物可以是作为悬浮液或在流体中的胶体存在的颗粒;可选择地,分析物可以被溶解在流体中,作为均质的溶液,并且可以在它们转化(例如聚集或与结合配偶子络合)以形成颗粒时改变流速或流体前沿的迁移。所收集的流体样品可以从任何源取得,如本文提供的或本领域已知的其它的。流体样品(例如血液)可以被直接地从受试者施用至本文提供的装置上,或它们可以在加载至装置上之前被收集和/或储存。

[0062] 如本文所使用的术语“流速”是指在标准的量的时间(通常是分钟)内运动经过介质的流体的量。

[0063] 如本文所使用的术语“流体前沿”是指流体在其沿着介质迁移时的前导边缘。正在迁移的流体的该前导边缘用于测量流速和/或迁移距离,流速和/或迁移距离进而用于分析流体变量或与流体变量相关联的评估参数。

[0064] 如本文所使用的术语“流体变量”是流体的影响,或可以导致影响,流体在多孔介质中的流动的任何组分、方面、性质或特征。一些流体变量可以取决于变量在流体中发生,例如在流体中悬浮的聚集体,的量和/或程度的方式影响流体的迁移。流体变量的实例包括但不限于流体中的溶液中的分析物的量或浓度、可以在流体内混合或在流体中悬浮的颗粒(包括胶体颗粒)、以及诸如粘度和表面张力的流体性质。对于流体血液来说,示例性的变量包括血糖浓度、血红蛋白浓度、诸如纤维蛋白原的凝血因子的浓度、以及粘度。

[0065] 如本文所使用的术语流体变量的“值”是指流体变量的定性的、半定量的或定量的度量。变量的值的实例包括以厘泊计的粘度的度量和以重量/单位体积计的分析物的浓度的度量。

[0066] 如本文所使用的,“粘度”是指包括液体的流体的决定对剪切力的内阻力或对“流动”的阻力的物理性质,并且通常以厘泊(cps)表示。

[0067] 如本文所使用的术语“内力”是指可以影响流体在介质中的运动的力。内力包括但不限于毛细管作用、芯吸、总体流动和压差。因此,内力是体系或装置所固有的力,并且不同于不由材料和/或含有介质的体系的设计产生的外力,例如重力和由泵供应的力。

[0068] 如本文所使用的术语“内部影响”是指流体和 / 或包括用于流体经过其流动的介质的体系所固有的,可以影响流体在介质中的运动的影响。内部影响包括但不限于流体中的悬浮液中的颗粒、阻碍流体流动的化学或生物反应、颗粒间附着和颗粒 - 介质附着。

[0069] 如本文所使用的术语“总体流动”是指流体和其组分的运动的性质,其中由诸如毛细力的力导致的流体的运动夹带流体的组分并且使它们流动。

[0070] 如本文所使用的术语“吸收容量”是指材料可以容纳的液体的量的度量。其被基于面积(例如克(gm)的液体每平方米的材料)或基于重量(例如克的液体每克的材料)报告。

[0071] 如本文所使用的术语“吸收”是指原子、分子或离子据此进入或渗透体相(例如液体、气体或固体)并且被体相的体积接纳的过程。

[0072] 如本文所使用的术语“吸附”是指分子向被称为吸附剂的表面的附着。多种具有不同强度的力可以促进这样的附着,包括但不限于范德华力、静电作用和化学键,例如离子键和共价键。

[0073] 如本文所使用的术语“血液组分”是指红血球、血小板、白血球、血浆、血清、诸如CRP的蛋白质、葡萄糖、凝血因子和任何其他天然地存在于血液中或可以从血液获得的组分。

[0074] 术语“参数”,如在本文中与“评估参数”可互换地使用的,是指与通过本文提供的方法和装置分析的流体变量相关联的性质。该性质可以用于识别和 / 或监测状态、条件或问题的原因或本质。例如,如通过血液中的葡萄糖的流速或迁移距离的变化评估的对血液中的葡萄糖的检测可以用于诊断和 / 或监测糖尿病。作为另一个实例,可以使通过本文提供的方法和装置对血液的减少的流速的检测与凝固时间相互关联,凝固时间是指示血浆是健康的还是凝结被削弱的参数。如本文所使用的术语“血液参数”是指与血液中存在的颗粒分析物(例如红血球、白血、凝血因子例如纤维蛋白原、血红蛋白或血小板)相关联的,可以用于识别和 / 或监测与血液有关的疾病或其他疾病的性质。示例性的血液参数包括凝固时间和血红蛋白浓度。

[0075] 如本文所使用的术语“血细胞比容”是指在血液已经被处理(例如通过离心)以将红血球与血浆分离之后被堆积的红血球的按体积计的百分比。如本文所使用的术语“血细胞比容”被认为等效于“血红蛋白浓度”并且与“血红蛋白浓度”线性相关(3%血细胞比容近似等于1g/dL的血红蛋白)。因此,在本文件内的所有对血细胞比容的指代也涉及血红蛋白浓度,并且本文提供的装置涉及血细胞比容和血红蛋白浓度二者。这两个血液参数都可以用于识别和监测疾病状态,例如贫血。

[0076] 术语“介质(medium)”、“介质(media)”、“基材”在本文中可互换地使用,并且是指流体的运动可以经过其发生并且流体前沿的测量可以经过其被实现的任何材料。流体经过介质的运动使得其流速和 / 或迁移距离直接地取决于流体的变量或可以被改变以取决于流体的变量。在本文提供的特定的用于分离流体混合物的组分的方法和装置中,介质是固体材料。在一些实施方案中,介质是多孔的并且流体的流速通过流体的一种或多种组分运动经过孔的相对能力来调节。在其他实施方案中,介质可以是非多孔的并且通道可以被蚀刻在非多孔的介质上以实现流体的迁移。示例性的介质材料包括但不限于滤纸、硝酸纤维素、玻璃纤维过滤器和玻璃。在本文提供的其中流体混合物是含水流体混合物的方法中,介

质是亲水性材料。如本文所定义的“差异迁移”是指流速被改变的流体和流速未被改变的流体在介质中迁移的不同的速率。

[0077] 术语流体的“液体组分”是指在基本上所有关心的固体组分或颗粒分析物已经被从流体分离之后剩余的流体的部分。与“颗粒”或“颗粒分析物”可互换地使用的术语“固体组分”，是指流体中的关心的固体颗粒；通常，它们是影响流体的流速或可以被改性以影响流体的流速的流体变量。在一些实施方案中，关心的固体颗粒是最初在流体中的溶液中并且在聚集时形成在流体中悬浮的固体颗粒的分析物的聚集体。如本文所使用的术语“固体颗粒”可以是指在约或以 0.001 微米 ( $\mu\text{m}$ ) 至约或以 500 微米的尺寸范围（平均长度、宽度或直径）内的颗粒，但是通常在约或以 0.5 微米至约或以 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0 或 50.0 微米的范围内。

[0078] 术语“团聚体”是指被范德华力或表面张力或静电力或其组合松散地保持在一起的一种或多种颗粒例如颗粒分析物的集合体 (association)。在一些情况中，被静电力保持的集合体可以被定义为“絮凝物”。为了本文的目的，“团聚体”也包括“絮凝物”。

[0079] 术语“聚集体”是指形成较大的固体颗粒（或，如果分析物最初在溶液中，颗粒）的一种或多种颗粒例如颗粒分析物或在溶液中的分析物的集合体。聚集体通常不容易被分裂，这抑制它们在介质中的迁移并且允许聚集的过程被监测。

[0080] 如本文所使用的，“可检测的标记物”或部分或成像标记物或部分是指用于成像关心的颗粒分析物的部分。这样的部分包括例如荧光部分、放射性核素、磁性上可检测的同位素或化合物、超声显像剂、发色团、胶乳微球或量子点。

[0081] 如本文所使用的，“结合配偶子”是特异性地结合于特定的分子或分子的类（关心的分析物）的化合物。如本文所使用的结合配偶子结合于分析物并且在一些实施方案中，可以促进或抑制颗粒聚集体的形成。结合配偶子的类型可以包括珠、蛋白质、核酸分子、碳水化合物、脂质、配体、药物、离子以及任何其他的可以特异性地结合于特定的分子的化合物。

[0082] 如本文所使用的，术语“近端”是指装置或装置的部件（例如指示物条）的更接近于流体样品被加载至装置上的点的端部。

[0083] 如本文所使用的，术语“远端”是指装置或装置的部件（例如指示物条）的更远离流体样品被加载至装置上的点的端部。

[0084] 如本文所使用的，术语“中部 (midsection)”或“中部 (middle section)”通常是指装置的指示物条的两侧是近端和远端的部分，在其上测量分析物的迁移、检测、聚集或其他性质。

[0085] 如本文所使用的，对“至少部分地”覆盖指示物条或装置的任何其他部件的壳体的指代意指装置的至少 10% 被覆盖。

[0086] 如本文所使用的，术语“尺寸”是指形状、长度、宽度和面积。

[0087] 如本文所使用的，术语“饱和”或“被饱和”是指液体或流体不再可以被其迁移经过的介质吸收或吸附的状态、点或阶段。

[0088] 如本文所使用的术语“扩散”是指流体从高浓度的区域向低浓度的区域的运动。

[0089] 如本文所使用的术语“附着”或“附着力”是指不相似的分子之间的分子间引力。附着的一个实例是流体分子和容纳流体的玻璃管的壁之间的分子间引力。

[0090] 如本文所使用的术语“毛细管作用”或“毛细力”是指由作用于在小的通路或容器例如管中的流体的附着力和表面张力导致的力,其用来使流体运动通过容器。当由在流体分子和容纳流体的容器的壁之间的分子间引力产生的附着力比流体内的由流体分子之间的分子间引力导致的内聚力强时,导致在容器的边缘处对流体的向上力。这种力将在容器边缘处的流体向上拉动,导致弯月面。同时,由在流体的表面处的流体分子之间的增强的内聚力产生的表面张力用来保持表面完整,导致整个流体表面的向上运动,而不仅是流体表面的边缘。这种力的组合被称为毛细力或毛细管作用。

[0091] 如本文所使用的术语“芯吸”或“芯吸力”是指作为在介质的孔中发生的毛细力的结果的流体通过多孔介质的运动。通常,多孔介质具有某种程度的毛细管作用,达到流体由于由例如纤维的小直径孔或附近产生的毛细力运动经过介质的程度。

[0092] 如本文关于在流体样品例如血液上进行的作用所使用的术语“计量”是指测量已知量的流体并且分析被加载入介质中的已知量的流体。

[0093] 本文中可互换地使用的术语“流动调节剂 (flow-modifier)”或“流动调节剂 (flow modifying agent)”是指改变流速和 / 或流体经过介质的迁移的剂或条件。因此,例如,虽然一些分子分析物例如蛋白质可以不直接地通过其在流体中的存在或量影响流体流动,但是其可以与另一种剂或条件反应、结合于另一种剂或条件或以其他方式被另一种剂或条件操纵,以通过例如阻塞孔和填充介质的空隙容积或增加流体的粘度来影响流体流动。流体的性质可以通过粘度、表面张力的变化或通过凝胶或网络经由聚合反应的形成来改性。有效的介质可以通过孔隙率、孔隙半径或渗透率的变化来改性。用于改变流体的流动的剂或条件在本文中被称为流动调节剂。

[0094] 如本文所使用的术语“闭合回路”是指允许流体沿着两个或更多个汇合的路径迁移的任何介质。流体可以被施用于闭合回路介质上的单一的加载区域,或其可以被施用在多于一个加载区域处,其从加载区域汇合并且在单一的点处相遇,该单一的点在本文中被称为“汇合点”。闭合回路可以采取多种形状,只要它们允许两个或更多个流体前沿汇合。示例性的形状包括圆形、椭圆形、卵形、具有两个线性侧和弯曲端部的长椭圆形(如图 9B 中的“跑道”形状)等等。

[0095] 如本文所使用的术语“汇合”是指运动朝向公共点和 / 或在公共点处相遇的两个或更多个流体路径,该公共点在本文中被称为“汇合点”。如本文所使用的术语“汇合点”是指多于一个流体前沿在其处汇合的点。“汇合点”通常在闭合回路介质(具有单一的流体施用区域)上,但是其还可以是指在具有一个开放端部和一个封闭端部的类似于马蹄铁的介质上的点(多于一个流体施用区域在单一的点处汇合)。

[0096] 如本文所使用的术语“曲线”是指至少部分地以弯曲的线为特征的流体轨线(由介质界定的路径)。曲线流体轨线遵循弯曲的路径,但是还可以沿着路径的一部分线性地运动。

[0097] B. 流体变量的分析的方法

[0098] 本文提供用于分析和评估流体的变量的方法。方法包括将流体施用于基材并且分析流体经过基材的运动,以基于经过基材的流体迁移评估流体的变量。因为流体的变量可以影响或可以导致影响流体经过基材的流动,因此可能的是通过分析经过基材的流体运动来评估流体变量。流体的变量可以取决于流体变量在流体中发生的量和 / 或程度的方式

影响或导致影响流体的迁移。因此可能的是,通过分析经过基材的流体运动来定量地评估流体变量。本文提供的用于分析流体的变量的方法和装置将在流体中存在的变量与流体迁移特征例如迁移距离和相对流速之间的这种相关性应用于变量在流体中的存在和 / 或量的确定。

[0099] 在本文提供的方法和装置中,流体运动的分析基于对流体流动的停止的检测。流动的停止可以通过对已经在介质中停止前进的流体前沿的检测或通过对流体经过其流动的两个或更多个路径的流体前沿的汇合的检测来检测。流动停止的点界定流体的迁移距离,流体的迁移距离指示流体的流动的速率。如本文描述的,可以使流速与流体变量例如诸如流体中的组分的量或浓度相互关联。因此,本文提供的方法和装置通过流体前沿确定使流体变量的定性的和 / 或定量的评估或测量成为可能。

[0100] 1. 流体和其变量

[0101] 本文提供用于分析流体的变量的方法。方法利用流体的流动特性作为流体的变量的存在、不存在、量或程度的指示。

[0102] a. 流体

[0103] 可以在本文提供的方法中被分析的流体包括但不限于液体,例如纯液体或液体混合物,包括两种或更多种液体的混合物或一种或多种液体和一种或多种固体或气体的混合物。纯液体具有固定比率的诸如水、醇和油的成分的恒定的组成。液体混合物包括例如含水混合物。液体固体混合物可以含有任何形式的固体,包括例如颗粒。

[0104] b. 流体混合物和组分

[0105] 流体混合物包括溶液、悬浮液、胶体、溶胶和不均匀混合物。如本文描述的,可以使用本文的方法和装置来分析的流体的变量中的一个是流体(如液体)混合物的组分(也被称为分析物)的存在、量或浓度。可以含有待在本文提供的方法中评估的分析物的液体混合物的实例包括但不限于体液、水样和饮料。体液包括从身体(例如,包括哺乳动物且尤其是人类的动物的身体)取得的或分泌的天然的体液,以及含有来自身体尤其是来自器官和身体部分的细胞的非天然的液体,尤其是洗液。体液的特定的实例包括但不限于血液、骨髓、脑脊液、唾液、汗液、尿、淋巴、泪液流体、组织液、阴道分泌物、痰、滑液、胸膜液、粘液、羊水、腹水、精液、粪便、积液、吸出物和来自器官的洗液(例如结肠、肺或支气管灌洗、膀胱灌注流体)。

[0106] c. 流体变量

[0107] 流体变量可以是影响,或可以导致影响,流体在多孔介质中的流动的流体的任何组分、方面、性质或特征。一些流体变量可以取决于变量在流体中发生的量和 / 或程度的方式影响流体的迁移。流体变量的实例包括但不限于可以在流体中的溶液中的分子实体、可以在流体内混合或在流体中悬浮的颗粒(包括胶体颗粒)、以及诸如粘度、表面张力、密度和与接触角相关联的与介质的附着力。

[0108] i. 作为流体变量的流体组分

[0109] 流体组分包括形成流体的任何一种或多种实体,例如元素(例如汞)或化合物(例如水、醇、油),或与流体混合的任何实体。可以与流体混合的实体包括任何固体、液体或气态组分,例如诸如分子实体和颗粒。流体组分可以被溶解在流体中(例如具有在分子或离子水平上的尺寸的颗粒)或不被溶解在流体中,例如诸如在流体中悬浮的颗粒。通常,

被溶解的颗粒具有在分子或离子水平上的尺寸。例如，颗粒通常在尺寸上小于 1 纳米。分子实体包括但不限于小分子，例如药物化合物（例如疗法药物）或其他药物（例如茶碱、地高辛、苯妥英、甲状腺素、可卡因和安非他命）、生物分子（例如氨基酸、脂肪酸、肽、多肽、寡肽、蛋白质、免疫球蛋白、脂质、磷脂、核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸、核酸、碳水化合物、寡糖、多糖和盐）和气体（例如氧气和二氧化碳）。

[0110] 大体上不可以被溶解在流体中的较大的颗粒通常在尺寸（例如直径）上是至少 1 纳米或大于 1 纳米。这样的颗粒尺寸包括例如 2 或更大纳米、1-5 纳米、1-10 纳米、10-20 纳米、1-100 纳米的尺寸，但是大多数较大的颗粒趋向于在直径上大于 100 纳米。例如，这样的颗粒可以在尺寸上是 5-200 纳米、1-500 纳米、1-1000 纳米、100-500 纳米、500-1000 纳米、至少 1000 纳米、1000 纳米或更大，或在尺寸上大于 1000 纳米、至少 1 微米、1 微米或更大、1-5 微米、5-8 微米、1-10 微米、10-50 微米、50-100 微米、1-100 微米、100-150 微米。因此，颗粒可以是使得它们是使用光学显微镜不可见的，或是在显微镜 (microscope)（例如显微镜 (microscopic)）、放大镜的辅助下或使用肉眼可见的。

[0111] 在特定的实施方案中，颗粒是约为红血球的尺寸的颗粒。例如，颗粒可以具有在 6-8 微米的范围内的直径。可以使用本文提供的方法来分析的示例性颗粒包括但不限于细胞（例如，血细胞，例如红血球（红细胞）和白血球（白细胞，包括无颗粒白细胞，例如淋巴细胞以及单核细胞；以及粒细胞，例如中性粒细胞、嗜碱粒细胞和嗜酸粒细胞））、凝血细胞（血小板）、滑液细胞以及癌细胞、微生物、细菌、酵母、颜料、颗粒以及这些和其他颗粒的聚集体。

[0112] ii. 粘度

[0113] 粘度是可以使用本文提供的方法来分析和评估的流体性质。粘度是由在流体中作用的分子力导致的流体流动的阻力的度量。因此，流体的粘度直接地影响流体的流动。通常，流体的流动性或运动的容易性与流体的粘度逆相关。

[0114] 许多因素可以影响流体粘度。这样的因素包括但不限于流体中的组分的浓度、聚集、凝集和聚合。因此，可以使用本文提供的方法来分析的流体变量还包括流体的组分的聚集、凝集和团聚。

[0115] (a) 组分浓度

[0116] 流体中的组分的量或浓度可以影响流体的粘度。特别地，存在生物组分的浓度对流体粘度的影响的多种实例。活的微生物例如细菌和藻类，可以影响它们在其中存在的流体的粘度。例如，莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)，一种单细胞的漂浮绿藻，已经被报道随着藻细胞的浓度增加而增加流体的粘度（见例如 Rafai 等人 (2010) *Phys. Rev. Lett.* 104 :098102），而枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)，一种单细胞的漂浮细菌，被报道减小流体的粘度（见例如 Sokolov 和 Aranson (2009) *Phys. Rev. Lett.* 703 :148101）。还已经报道，草莓汁的粘度随汁中的可溶性固体的浓度的增加而增加（见例如 Juszczak 和 Fortuna (2003) *EJPAU* 卷 6, 第 11 期 ;<http://www.ejpau.media.pl/volume6/issue2/food/art-11.html>）。此外，许多研究已经报道，血液的粘度随血液中的红血球部分（即血细胞比容）的增加而增加（见例如 Pries 等人 (1992) *Am. J. Physiol.* 96 :562 和 Eckmann 等人 (2000) *Anesth. Analg.* 91 :539）。

[0117] (b) 聚集

[0118] 流体中的组分例如颗粒的聚集也可以影响流体的粘度。例如，血液中的红血球聚集导致以低剪切速率发生的血液粘度的大部分增加（见例如 Moriarty 和 Gibson (2005) Curr. Opin. Cardiol. 20 :318–323）。根据对于红血球聚集提出的一种机制，在低剪切速率（减慢至静态的血液流动）的条件下，红细胞之间的范德华引力可以导致红血球的结合。同时，血浆蛋白质可以抵消带负电荷的红细胞膜之间的排斥力。大血浆蛋白质例如纤维蛋白原和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)，可以被吸收至红血球膜上并且作为利于红血球的聚集的桥联分子。由这些大分子向毗邻的红细胞表面的吸附导致的桥联力超出静电排斥的分解力 (disaggregating force)，则红血球聚集发生。

[0119] (c) 凝集

[0120] 流体中的组分例如颗粒的凝集也可以影响流体的粘度。凝集是指带有抗原的细胞、微生物或其他颗粒在特异性的免疫球蛋白或抗体的存在下聚从在一起。具有用于结合于抗原的多重部位的抗体用来将带有抗原的颗粒联接在一起以形成颗粒的凝集物或聚从块体。

[0121] 血液中的颗粒凝集的实例是具有不同的抗原类型的红血球的凝集。血型的出现是由于不同的红血球膜表面抗原或糖蛋白的存在：A 抗原、B 抗原和 Rh 抗原。A 型血含有携带 A 抗原的红血球并且还含有在血浆中的抗 B 抗原抗体。B 型血含有携带 B 抗原的红血球并且还含有在血浆中的抗 A 抗原抗体。AB 型血含有携带 A 抗原和 B 抗原的红血球并且不含有在血浆中的抗 A 抗原抗体或抗 B 抗原抗体。相反，O 型血含有缺乏 A 抗原和 B 抗原的红血球但是含有在血浆中的抗 A 抗原抗体和抗 B 抗原抗体。血型还取决于红血球是否携带在细胞膜表面上的 Rh 因子抗原。如果抗原存在，那么血液被称为对于 Rh 因子阳性的（即 Rh+），而如果抗原不存在，那么血液是对于 Rh 因子阴性的（即 Rh-）。Rh 阴性血液可以在暴露于 Rh 阳性红血球时产生抗 Rh 抗体。为了输血成功，血液供体和受体的 ABO 和 Rh 组必须是相容的。如果它们不是，那么来自被捐献的血液的红血球将由于对被捐献的红血球上的抗原特异的受体抗体的存在而凝集。

[0122] (d) 聚合

[0123] 通过流体内的多重单体的结合的聚合物形成也可以影响流体粘度。例如，纤维蛋白聚合物在血液凝块形成期间通过形成围绕活化的血小板的三维交联网络的纤维状蛋白纤维蛋白的聚合而产生。纤维蛋白聚合物的凝块结构已经与血液的粘度的增加相互关联（见例如 Kaibara (1996) Biorheology 33 :101）。

[0124] iii. 表面张力

[0125] 表面张力是可以使用本文提供的方法来分析和评估的流体的另一个性质。表面张力通过毛细管作用提供流动的动力。表面张力由在流体的表面处的流体分子之间的增强的内聚力产生。发生表面张力是因为，在液体的表面上的分子并不在所有侧被相似的分子包围并且因此它们被更多地吸引向液体表面处的毗邻的相似的分子。在流体前沿处的这些附着力通过沿着流体前沿界面的表面张力传递至本体流体。改变溶解物浓度导致表面张力的取决于溶解物的变化。通常，表面活性剂（洗涤剂）和醇趋向于降低水溶液的表面张力，而无机盐趋向于升高表面张力，而糖几乎没有影响。因此，在分析物的存在下导致表面活性剂、醇或无机盐的产生或破坏的任何反应都可以在本装置中用于确定浓度。

[0126] 2. 流体经过基材的运动

[0127] 在将力施加于流体时,流体基于流体组分例如颗粒的连续的相对运动而流动或运动经过基材。被施加以导致毛细管流动的力是流体分子和介质的表面之间的附着力。如果附着力大于流体分子之间的内聚力,在界面处的流体分子前进入介质中,并且以表面张力的形式的内聚力拉动本体流体。当诸如液体的流体在总的总体流动方向流过介质时,之前占据介质的物质(即气体,例如空气,或可能地另一种流体)被代替。流体前沿是正在流动的液体和被代替的物质的最前面(相对于总体流动的方向)的颗粒之间的边界。流体前沿是用于确定流体相对于流动被发起的点的迁移距离的点。本文提供的方法和装置利用流体前沿位置的检测来分析和评估流体变量。

[0128] 通常,流体前沿不是被清晰地界定的边界,而是扩散的,这是由于介质中的孔径大小和形状的分布。然而,通常可以进行介质的选择使得允许对流体前沿的位置的充分地客观的视觉确定。

[0129] 流体经过多孔介质的流动由作用在流体前沿处的毛细力促进,并且被作用贯穿介质中的流体柱的粘性力抵抗。因为流体前沿的几何形状是基本上恒定的,而流体柱的尺寸随时间增大,所以粘性力与毛细力相比变得较大(并且正在被力作用的流体的质量增加),并且流速随时间减小。

[0130] 孔的尺寸也影响流速。毛细力与孔隙半径成反比,而粘性力与孔隙半径的平方成反比。净结果是,流体在单一的通道的毛细管流动中的速度与孔隙半径成比例。然而,因为通常多孔介质具有孔隙半径的分布并且这些孔以复杂的方式互相连接,所以预测多孔介质的毛细管流动特征不是简单的事。

[0131] a. 基材

[0132] 基材也被称为介质,是流体例如液体的运动可以在其上或经过其发生的任何材料。在本文提供的特定的方法和装置中,基材是流体运动可以通过毛细管作用(即毛细作用)在其上或经过其发生的基材。流体在基材上或基材中或经过基材的运动使得流体的迁移距离将被流体的一个或多个变量的变化影响。在本文提供的用于分析流体变量的方法和装置中,基材是固体材料。在本文提供的特定的方法和装置中,基材是多孔介质。介质可以由在遍及介质的所有方面一致的材料(即单一的材料)制成,或可以在介质的特定的区域处在一些方面变化,如可以通过使用彼此流体连通的两种或更多种不同的材料或通过在介质中的一些位置处改性单一的材料来实现的。在本文提供的其中流体是含水流体混合物的方法中,介质是亲水性材料。用于在本文提供的方法和装置中的基材包括通过浮雕或光刻法来改性的表面。其他合适的基材可以包括纤维束或小表面通道。

[0133] 例如,介质可以是或含有天然的和/或合成的材料,该材料含有具有均一的或变化的尺寸的空间或洞。空间可以形成网或可以形成孔或通路,经过这些网、孔或通路,一些组分例如液体、分子、离子可以容易地运动(即介质对组分是易于可渗透),但是其他组分经过这些网、孔或通路的运动由于例如组分的尺寸和/或形状而被延迟或阻碍。虽然这些其他组分可以运动经过介质的空间,但是运动将以较慢的速率。因此,介质对这样的组分是更不可渗透的。一些组分可以具有使得它们在空间中或在向空间的入口处被捕集的尺寸和/或形状,并且因此将被从在介质中的运动排除。在这种情况下,介质被称为对该组分是不可渗透的。其他正在运动的组分可以完全地通过介质并且离开介质;然而,这样的运动以改变的速率,这是由于介质中的孔被所捕集的或较慢的正在运动的组分堵塞。因为对介质

最可渗透的流体组分的运动或流动经过介质的速率可以被对介质最不可渗透的组分的运动影响,所以流体前沿的迁移距离将变化,这取决于流体的组分的运动的行为。其中流体的一些组分的运动可以基于组分尺寸被阻碍的介质被称为尺寸排阻介质 (size exclusion medium)。这样的介质还可以用来有效地分离流体的组分。

[0134] 用于本文提供的方法和装置的其他介质可以是或含有具有提供与流体混合物的不同组分的不同程度的相互作用的性质的天然的和 / 或合成的材料。这样的介质可以基于流体的不同的组分的差别的亲合力差别地影响流体混合物中的组分的运动。例如,流体混合物的一些组分 (例如液体、分子和离子) 可以几乎不具有与介质的相互作用,或可以完全不与介质相互作用。这样的组分据说几乎没有或完全没有对介质的亲合力,并且将容易地运动经过介质。流体混合物的其他组分可以与介质相互作用或弱地结合于介质,达到有限的程度 (即具有低亲合力)。这些组分将被松散地且可逆地保留在介质中,并且将因此更缓慢地运动经过介质。流体混合物的还其他组分可以强地 (即具有高亲合力) 和 / 或不可逆地与介质相互作用,并且将在介质中运动短距离或完全不在介质中运动。流体混合物的组分与介质的相互作用可以是对该组分特异的,例如在抗体和抗原之间或在配体和受体之间,或可以是非特异性的。其中流体的一些组分的运动可以基于组分与介质的差别的相互作用或结合而被延迟的介质被称为基于吸附的介质。这样的介质可以用来有效地分离流体的组分。

[0135] 不同的多孔介质可以具有不同的尺寸的孔。在本文提供的方法和装置中将使用的多孔介质的孔径大小基于多种因素来选择,因素包括:(1) 流体的待与流体混合物的其他组分分离的任何组分的尺寸,(2) 流体中的其他组分的尺寸,(3) 使特定的组分在介质中运动或行进的所期望的程度,(4) 使流体前沿在介质中行进的所期望的距离,以及(5) 流体由于毛细管作用应当行进的期望的速度。例如,如果期望的是特定的组分在介质中运动得足够远以与其他组分分辨,但是不在介质中运动得远至与其他组分一样,并且该特定的组分是大固体或惰性颗粒 (例如胶乳微珠或微珠的聚集体),那么介质的合适的孔径大小将是约为该特定的组分的尺寸或略微地大于该特定的组分的尺寸但是显著地大于流体混合物的其他较小的组分的孔径大小。在另一方面,如果特定的组分是大的可变形的或以其他方式活性的颗粒 (例如血细胞或积极地运动经过小空间的其他这样的细胞),那么介质的合适的孔径大小将是约为该特定的组分的尺寸或略微地小于该特定的组分的尺寸但是显著地大于流体混合物的其他较小的组分的孔径大小。这样的介质将允许特定的组分在介质中的运动,使得如果期望的话,其可以被检测,但是将通过延迟该组分相对于其他组分的运动的运动将该组分与其他组分分离。因此,当期望将特定的组分从流体混合物分离时,介质的孔径大小将由介质抑制该组分相对于流体中的其他组分 (包括流体本身) 的迁移的能力来界定。对于在本文提供的方法和装置中使用的分离介质合适的孔径大小可以由本领域技术人员基于如本文提供的期望的结果和特定的有关因素的教导内容根据经验来确定。

[0136] 如上文描述的,孔径大小也对流体速度有影响,由此影响基于这些装置的测试的运行的时间长度。通常,具有较大的孔的介质将比具有较小的孔的介质运行得更快。通过导致介质中的孔径大小的减小,例如通过将颗粒捕获在孔的壁上或通过导致沉淀物在孔中的沉降,经过该介质的速度可以被减小,导致流体在一定量的时间内行进的距离的减少。通过改变有效的孔径大小来影响流体前沿行进的距离的能力对于本文描述的装置的操作是

关键的。

[0137] 具有相对小的孔径大小的介质可以被放置为与具有相对较大的孔的介质串联接触。当流体前沿从较大孔介质经过至较小孔介质时,在较小孔介质中获得的增大的毛细力与在较大孔介质中来自流体的较小的粘性力组合地,将导致流体的速度的增大。

[0138] 在本文提供的特定的方法和装置中,介质是具有能够将血细胞与血浆分离的孔径大小的任何材料。虽然红血球具有 7–8 μm 的平均直径,但是它们可以变形,使得直径被减小。因此,例如,本文提供的特定的实施方案的介质的合适的孔径大小可以在直径上是 1–8 μm、在直径上是 1–5 μm 或在特定的实施方案中在直径上是 2–3 μm。多孔介质还可以是由堆积的珠或堆积的或纺织的纤维制成的任何材料,使得有效的孔径大小适合于将血细胞与血浆分离。

[0139] 在本文提供的方法和装置的其他实施方案中,介质是以下任何材料:其中孔具有使得它们可以随着在导致 BCIP(5–溴–4–氯–3–吲哚基磷酸盐)的水解和 NBT(对氯氮蓝四唑)的还原的过氧化氢、过氧化物酶和 3,3'–二氨基联苯胺(DAB)的反应或碱性磷酸酶与底物对 BCIP/NBT 的反应时形成的沉淀物的增加的量越来越被封闭的尺寸。

[0140] 在本文提供的方法和装置的另外的实施方案中,介质是以下任何材料:其中孔具有使得它们可以随着与胶乳珠混合的生物素–抗生物素蛋白(或其他结合配偶子例如中性抗生物素蛋白)复合物的增加的量越来越被封闭的尺寸。

[0141] 在本文提供的方法和装置的特定的实施方案中,用于流体分析的流动路径由三种串联地流体连通的分离介质组成。从路径的近端向路径的远端依次地延伸的三种介质如下:结合于聚乙烯醇(PVA)的硼硅酸盐玻璃纤维(8975;Ahlstrom, Helsinki, 芬兰)、以嵌段聚酯为支撑的硝酸纤维素(Vivid 170;Pall Corporation, Port Washington, 纽约)、以及保留大于 2 μm 的颗粒的被 PVA 处理的玻璃纤维纸(LF1;Whatman, New Jersey, 美国)。确定了材料的这种组合用来放大孔堵塞的效果。初始的硼硅酸盐玻璃纤维材料被设计为将颗粒的流动从竖直导管转移至 Vivid 170 硝酸纤维素,使得珠适当地进入硝酸纤维素材料并且因此能够堵塞硝酸纤维素中的孔,正如对于流动改性来说所期望的。硝酸纤维素具有非常小的孔径大小,允许小的聚丛珠和 LPA–生物素聚集体聚集并且阻碍流动;因此,这是珠和 LPA–生物素的有效的聚丛将保持并且对流速施加影响之处。LF1 玻璃纤维纸置换较大的流体体积并且具有比硝酸纤维素弱的毛细力。因此,硝酸纤维素中的效果将导致位于远端的 LF1 玻璃纤维纸内的流动的显著的变化。

[0142] i. 材料

[0143] 可以在本文提供的方法和装置中用作流体流动的介质的材料的实例包括但不限于天然的、合成的或被合成地改性的天然存在的材料,例如多糖(例如纤维素材料,例如纸;和纤维素衍生物,例如乙酸纤维素和硝酸纤维素以及包覆纤维素);聚醚砜;聚乙烯;尼龙;聚偏二氟乙烯(PVDF);聚酯;聚丙烯;二氧化硅;无机材料,例如钝化氧化铝;硅藻土;MgSO<sub>4</sub>;或在具有聚合物例如氯乙烯、氯乙烯–丙烯共聚物和氯乙烯–醋酸乙烯酯共聚物的多孔聚合物基质中均一地分散的其他无机的细碎的材料;布,天然存在的(例如棉布)和合成的(例如尼龙或人造丝);多孔凝胶,例如硅胶、琼脂糖、葡萄聚糖和明胶;聚合物膜,例如聚丙烯酰胺;玻璃纤维;合成纤维;玻璃纤维和合成纤维的复合物;纺织的或非纺织的玻璃纤维纸(被包覆的或不被包覆的)、塑料纤维以及这些材料中的任何材料的共混物。

[0144] 在本文提供的方法和装置的特定的实施方案中使用的介质是纺织的或非纺织的玻璃纤维纸、被包覆的纤维素、塑料纤维材料或这些材料的共混物。在本文提供的其他实施方案中，介质材料含有任何对血细胞惰性的、不诱导严重的细胞溶解并且产生在  $1\text{--}8 \mu\text{m}$  范围内的间隔的材料的纤维或珠的长的束。珠优选被保持在适当的位置或附着在一起。

[0145] i i. 流体流动的路径

[0146] 一种或多种介质可以用于本文提供的方法和装置中。例如，可以使用一种介质或两种、三种或四种介质。在特定的实施方案中，采用两种介质或多于两种介质或四种介质。介质可以被定位为使得经过其的总体流体流动实质上正交（即竖直或垂直）于介质的平面（经常被称为横流）或实质上平行（即水平的或横向的）于介质的平面。如果使用两种或更多种介质，那么可以将介质竖直地、水平地放置，或可以采用竖直放置和横向放置的组合。在本文提供的方法和装置的特别的实施方案中，将一种介质相对于流体的总体流动横向地定位。在本文提供的方法和装置的另一个实施方案中，采用两种介质，例如多孔介质：(1) 第一介质被放置为使得经过其的总体流体流动相对于介质的平面竖直，并且 (2) 第二介质接着第一介质并且与第一介质流体连通，其中经过第二介质的总体流体流动相对于介质的平面横向。在本文提供的方法和装置的另外的特定的实施方案中，采用四种介质：第一介质被放置为使得经过其的总体流体流动相对于介质的平面垂直，并且三种另外的介质被定位为串联地流体连通并且接着第一介质，其中经过第二介质、第三介质和第四介质的总体流体流动相对于介质的平面实质上横向。因此，流体连通并且被串联地放置的两种或更多种介质可以以相对于彼此的任何方式被定位，只要从介质向串联中的介质的流体流动具有连续性。一连串介质中的流体连通可以以许多方式来实现。例如，彼此直接流体连通的两种介质可以被定位为使得它们重叠；即，一种介质的表面的一部分被层叠在另一种介质的表面的一部分上。两种介质还可以被定位为毗邻于彼此，没有表面的重叠。然而，通常，串联地流体连通的介质被定位为最大化介质之间的流体传递以及最小化流体流动的在连接点或接触点处的中断，以保持平稳的且连续的流体流动。通常，这通过介质的重叠来实现，即通过使一种介质的最宽的表面的某个部分与另一种介质的最宽的表面接触。介质表面的重叠的程度取决于在每种介质中的流体流动的类型而变化。通常，重叠的程度是使得在介质之间的流体传递的效率和速率被最大化，以便保持流体的恒定的向前运动的总体流动。如果介质被串联地放置以用于经过连接的介质的横向的流体流动，那么高效率的操作所需的表面重叠的程度根据经验来确定并且被最小化。如果介质被串联地放置以用于经过连接的介质的竖直流动，那么介质表面的重叠的程度被最大化。如果介质被串联地放置使得总体流体流动是经过一种介质竖直的而经过另一种介质横向的，那么重叠的程度通过将竖直流动介质的整个表面放置为与横向流动介质接触来最大化。

[0147] 通常，用于检测和 / 或定量流体中的组分的关心的组分的精细分离和高分辨率以横向流动形式进行。因此，通常除了被水平地放置的介质之外，并且为了提供关心的组分与流体混合物中的其他组分的初始粗分离和 / 或使流体混合物的组分呈现与横向流动介质交错的目的，和 / 或用于提供流体混合物向横向流动介质的受控的引入，在本文提供的方法和装置中可选择使用被竖直地放置的介质。

[0148] 由介质形成的流体路径的许多形式适合于在本文提供的方法和装置中使用。通常，为了将流体从第一点运动至第二点的目的，流体路径的形状被设计为促进流体的向前

运动的高效率的平稳的总体流动,且具有流体前沿的最小的变形。通常,这使用具有起始点和终点并且没有弯曲、折曲或转弯的直的线性路径来最容易地实现。这适用于这样的流体路径,无论该路径与一个或多个其他的流体路径汇合进入单一的路径中、连续的路径中还是进入公共的终点中。在本文提供的装置和方法的一些实施方案中,由装置中的用于每个类型的流动(即竖直的或水平的)的一种或多种介质形成的流体路径是线性路径。这些装置被设计为通过检测已经在介质中停止前进的流体前沿,或当样品流体的分离的等分试样被施用于线性流体路径的相对的端部时通过检测介质中的汇合点,来检测流体流动的停止。在本文提供的装置和方法的其他实施方案中,由一种或多种介质形成的流体路径是曲线的回路或闭合路径。曲线路径可以包括线性部分但是不是线性的,并且不具有在方向上的突然变化(即角)。方向的突然变化将不破坏装置的功能性,但是将通过扭曲流体前沿的形状,由此向汇合点的位置引入不确定性而降低实用性。曲线形状的实例包括但不限于椭圆形,包括圆形、卵形和跑道。因此,曲线路径包括具有开放空间的内部的椭圆形的、圆形的和卵形的以及跑道形的路径,如将是环或环形物。曲线路径是具有明确的且大体上窄的宽度并且具有在路径的两个侧上的明确的侧边界以限制以向前运动的方向的总体流动的闭合回路。因此,曲线路径是环,即路径的两个侧是清楚地可识别的,仅在单一的点处相遇或合并;因此,曲线路径环绕不间断的开放空间。

[0149] b. 实现流体在多孔介质中运动的力

[0150] 流体经过介质的运动是压力驱动的,或由外部场的施加来实现,外部场可以是重力场(由高度差或离心导致的压头)、电场(电渗流动)或甚至磁场(要求本身是铁磁性的流体或含有铁磁性的颗粒的流体)。毛细力也被称为芯吸力,可以作为由流体/空气界面(弯月面)的曲率产生的压差的结果来分析,但是不必要从这种透视图察看毛细作用以分析由毛细作用导致的流动。本文描述的所有装置都通过毛细力实现流体运动,然而如果流体路径不完全位于水平面中的话,重力可以增加或减少这些力。

[0151] 介质以及介质是其一部分的体系的设计也可以影响流体的运动。例如,介质的展示低毛细力的部分可以被放置为与介质的具有较高的毛细力的部分串联地流体连通。当流体前沿从前一种介质运动至后一种介质时,增加的毛细力将增加流体迁移的速度,这将对流体的变量例如流体组分的分离有影响。在另一个实例中,介质可以被压缩以最小化介质的厚度的变化性,由此控制流体的体积摄入(volumetric uptake)。沿着流动路径改变介质的形状还可以影响流速,虽然这些效应未被完全理解。例如,沿着流动路径减小介质的宽度(成锥形)增大流速,而增加宽度减慢流速。

[0152] 在可选择的方法中,在材料外部的力以及流体分析系统的设计与实现流体在一种或多种介质内的运动有关。这些辅助的原动力包括但不限于泵、重力和压力,以及外部的电场和磁场。流体在介质中的运动可以涉及内力和/或内部影响、外力和/或外部影响或内力和外力和/或内部影响和外部影响的组合。

[0153] c. 流体在多孔介质中的流动的停止

[0154] 在通过直接施用于多孔介质或在与流动分析介质流体连通的部位间接施用而将流体样品施用于分析其中的流体流动的多孔介质之后,由于作用于流体的原动力和/或影响,流体被允许运动经过介质,直到流动停止。流动可以由于许多原因停止。例如,因为被施用于介质的流体的量小于介质对流体的总容量,流动可以停止。在这种情况下,因为由在

流体的前边缘处的毛细力导致的液体的总体流动在液体被拉动穿过介质时导致液体的后边缘的形成,流动停止。在该后边缘处的毛细力与在前导边缘处的毛细力相反。由于扩散,流体运动可以在每个流体边缘处发生,但是没有发生总体流动。当不存在向介质施加的外力例如泵时,流体的流动停止。

[0155] 可选择地,因为被施用于介质的流体的量超出介质对流体的总容量,在分析介质中的流体流动可以停止。在这种情况下,因为介质被流体饱和,即在介质中没有用于另外的流体的剩余的空间,流动停止。在不存在某种类型的用于从饱和介质除去液体的体系时,流动停止并且没有发生流体和其组分在介质中的进一步迁移。

[0156] 本文提供的用于分析和评估流体变量的方法和装置被设计为用于通过检测已经在介质中停止前进的流体前沿,或通过检测流体流过的两个或更多个路径的流体前沿的汇合,来检测流体流动的停止。流动停止的点界定流体的迁移距离,流体的迁移距离指示流体的流动的速率并且进而指示影响或可以导致影响流体流动的流体变量的存在、不存在、量或程度。

### [0157] 3. 流体变量对流体迁移的影响

[0158] 本文提供的用于分析和评估流体变量的方法和装置是基于流体迁移特征和流体中的流体变量的存在和 / 或量或程度之间的相关性。这种相关性起因于流体变量影响流体流动的能力,例如通过影响介质中的迁移距离或流速。流体变量可以直接地和 / 或间接地影响流体迁移。直接地影响多孔介质中的流体迁移的流体变量是本身影响流体流动的流体变量。这样的变量的实例包括但不限于一些颗粒和分子以及流体性质。例如,颗粒由于其尺寸可以直接地影响多孔介质中的流体流动。大颗粒例如细胞和微生物,可以有效地阻塞介质中的孔,由此阻塞和减弱流体流动。流体中的一些分子的沉淀物也可以用来直接地阻塞介质的孔和由此减少流体流动。流体粘度可以具有对流体流动的显著的直接影响,这是由于当流体的粘度增加时增加的流动阻力。例如,红血球的聚集可以直接增加血液的粘度,由此减慢血液流动。

[0159] 间接地影响流体迁移的流体变量是不仅可以单独具有对流体流动的显著的影响而且可以被导致或操纵为基于其在流体中的存在和 / 或浓度影响流动的流体变量。因此,例如,虽然一些分子分析物例如蛋白质可以不直接地通过其在流体中的存在或量影响流体流动,但是其可以与另一种剂或条件反应、结合于另一种剂或条件或以其他方式被另一种剂或条件操纵,以通过例如阻塞孔和填充介质的空隙容积或增加流体的粘度来影响流体流动。因此,流体流动可以通过改性流体或有效的介质(即最初的介质和被固定化于该最初的介质的任何分子或颗粒的组合)来改变。流体的性质可以通过粘度、表面张力的变化或通过凝胶或网络经由聚合反应的形成来改性。有效的介质可以通过孔隙率、孔隙半径或渗透率的变化来改性。用于改变流体的流动的剂或条件在本文中被称为流动调节剂。

#### [0160] a. 介质的改性

[0161] 有许多可以改性流体迁移经过的介质使得流体的流动被影响的方式。

##### [0162] i. 多孔介质中的孔的堵塞

##### [0163] (a) 沉淀物的形成

[0164] 沉淀物在流体中的形成可以有效地堵塞多孔介质中的孔并且减小介质的孔隙率或渗透率。可以用于该目的的流动调节剂的一个实例是在特定的流体变量或分析物的存在

下形成堵塞孔并且因此堵塞流动的沉淀物的一组酶和底物。

[0165] 例如,沉淀物的局部形成可以通过液体样品可以迁移经过的介质局部区域中结合的抗体来导致。本文提供的意图测量样品中的分析物例如蛋白质(例如C反应蛋白(CRP))的浓度的方法的实施方案中,可以采用可以结合于分析物分子或分子复合物的被指定为a1和a2的两种抗体。抗体a1可以被共价地或非共价地与酶例如辣根过氧化物酶相关联。第二抗体a2可以是未被改性的或被诸如生物素的分子改性。在本实施方案中,被怀疑含有分析物的样品可以与抗体a1、葡萄糖和沉淀底物例如3,3'-二氨基联苯胺(DAB)混合。介质的区域将具有被特异性地或非特异性地结合于样品施用点的远端的区域的抗体a2和葡萄糖氧化酶。然后样品将迁移经过所准备的介质,例如硝酸纤维素或尼龙膜,与分析物合的抗体a1将通过结合于抗体a2而被保留,导致葡萄糖氧化酶的局部浓度以剂量响应的方式增加。与介质结合的葡萄糖氧化酶将与被加入样品中的葡萄糖反应,生成过氧化氢。进而,过氧化氢将与过氧化物酶标记的抗体a1和DAB反应,形成将以剂量响应的方式影响样品的液体部分的流速的不溶性沉淀物。这种流速变化可以被测量以确定样品中的分析物例如CRP的浓度。如果高于分析物的某一阈值浓度,那么该沉淀物可以导致介质中的流体流动的完全堵塞。

[0166] 注意,非结合的抗体a1也将导致沉淀物的形成;然而,由于这种抗体存在的瞬时的本质,形成的量和速率将简单地贡献于沉淀物形成的将在样品之间合理地一致的合理的恒定速率。本领域技术人员将认识到,许多不同的目标可以使用这种途径来测量,主要要求是抗体结合导致可以与抗体结合的量成比例的方式影响样品的液体部分的流速的沉淀物或可以堵塞样品的液体部分的流动的沉淀物的形成。

[0167] 此外,本领域技术人员将认识到这种体系可以被以竞争性结合的方式使用,其中在样品中存在的分析物将与被加入的目标分析物竞争,以导致向介质的局部区域的结合的减少,导致待形成的沉淀物的局部形成的减少,从而以与样品中的目标的浓度成反比的方式增加样品的液体部分的流速。

[0168] 此外,本领域技术人员将认识到,抗体a2可以被以下物质生物素化或标记:结合于介质的一些其他特异性的捕获标记物和特异性的捕获部分,例如结合生物素的蛋白,例如抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白或链霉抗生素蛋白,使两种抗体(a1、a2)能够被加入样品并且使全部的复合物能够被捕获,但是仅抗体a2以剂量响应的方式被捕获。本领域技术人员将认识到,有许多用于捕获抗体的方式,除了许多其他的之外,所述方式包括但不限于His标记、物种特异性的抗抗体、蛋白A和蛋白G。其他潜在的底物体系包括但不限于,将碱性磷酸酶与普遍已知的底物对BCIP/NBT组合。

[0169] (b) 微珠

[0170] 微珠或微球在多孔介质的孔中的积聚还可以导致孔的堵塞。例如,在样品流体中悬浮并且具有显著地小于多孔介质的孔径大小的直径的胶乳微球可以通过普遍使用的免疫化学方法,在样品流体流过多孔介质的一些区域时在这些区域中聚集,由此限制或堵塞流动。珠在诸如横向流动纸(Fusion 5, Whatman)或硝酸纤维素膜(Vivid)的多孔膜的空隙容积内的积聚用来通过改变有效的孔隙率和渗透率来减弱被施用的样品的流动,可能地达到使流动停止的点。珠的精确的积聚可以通过施用靶向期望的分析物的特异性的分子识别元件,例如抗体、蛋白质、核酸和它们的衍生物来实现。如果目标浓度足够高,那么珠在介

质上的期望的部分处的固定化可以导致在为了特定的目标设计的介质中的毛细管流动的完全停止。在本程序中描述的试剂和材料的组合提供快速的、分析物特异性的半定量的测试,以测量来自生物样品的溶解物,例如蛋白质、核酸和代谢物。

[0171] ii. 多孔介质中的孔径大小的改变

[0172] (a) 沉淀物的形成

[0173] 沉淀物在流体中的形成还可以用来减少孔径大小而不完全地堵塞孔。例如,沉淀改变流速的用途可以由用于测量样品材料中的葡萄糖的测定表示。在本直接的实施方案中,酶,即葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶,可以被结合于介质的区域。样品可以以已知的比率与底物例如 3,3' - 二氨基联苯胺 (DAB) 混合并且样品可以被施用于介质。当样品朝向具有固定化酶的区域迁移并且迁移经过该区域时,在样品内含有的葡萄糖将与葡萄糖氧化酶反应,生成过氧化氢和 d- 葡萄糖酸。进而,过氧化氢和 DAB 将与辣根过氧化物酶反应,以生成不可溶的褐黑色沉淀物,其将用来局部地减小介质的孔径大小,从而减小局部流速。然后这种流速变化可以被测量并且与样品中存在的葡萄糖的量直接地相互关联。沉淀材料的量与样品中存在的葡萄糖的量成比例,从而存在的更多葡萄糖将导致更多沉淀物形成,从而更多地减慢样品的液体部分的流动。

[0174] 还可能的是,使酶中的仅一种被固定化并且使另一种酶与行进经过介质的样品混合,其目的是使沉淀物在介质的局部区域中形成,从而影响流速。此外,过程可以通过将底物和样品直接与酶混合来简单地进行,使得沉淀物将以非局部的方式形成但是仍然用来减小膜的孔径大小并且影响流速。本领域技术人员将认识到,许多其他类型的分析可以使用这种过程来进行,要求是可以导致沉淀物形成,这种沉淀物的量与待测量的分析物的量成比例,并且这种沉淀物可以影响样品的液体部分穿过介质的流速。其他潜在的底物体系包括但不限于,将碱性磷酸酶与普遍已知的底物对 BCIP/NBT 组合。

[0175] (b) 微珠

[0176] 有使用与免疫化学原理组合的微米尺寸的聚苯乙烯珠来改变多孔介质的孔隙率 / 渗透率的多种可能的方式。流速的变化提供样品内的目标分析物浓度成反比的指示。珠在诸如横向流动纸 (Fusion 5, Whatman) 或硝酸纤维素膜 (Vivid) 的多孔膜的空隙容积内的积聚用来通过改变有效的孔隙率和渗透率来减弱被施用的样品的流动。珠的精确的积聚可以通过施用靶向期望的分析物的特异性的分子识别元件,例如抗体、蛋白质、核酸和它们的衍生物来实现。珠在介质上的期望的部分处的固定化将导致在为了特定的目标设计的测试条上的样品流速的变化。在本程序中描述的试剂和材料的组合提供快速的、分析物特异性的定量的测试,以测量来自生物样品的溶解物,例如蛋白质、核酸和代谢物。

[0177] 在一个实施方案中,夹层结构免疫测定可以用于测量样品中的分析物,例如 C 反应蛋白 (CRP)。样品与已知量的被分析物的抗体 (a1) 包覆的珠混合,并且然后被施用于横向流动介质或纸。介质或纸的一个部分还被中性抗生物素蛋白 (或其他结合生物素的蛋白) 以及与生物素共轭的第二抗分析物抗体 (a2) 包覆。中性抗生物素蛋白和 a2 抗体之间的相互作用生成在介质内的目标特异性捕获部分。一旦样品被施用于介质,那么样品将流过被固定化的中性抗生物素蛋白 - 生物素 - 抗体包覆的部分,并且被 a1 抗分析物蛋白包覆的珠将与样品中的分析物的量成比例地积聚。珠在介质的该区域的积聚将有效地减少样品可获得的空隙容积并且延迟样品流动。当珠积聚时,有效的孔径大小以及介质内的用于流

体流动的可用空间被减少，并且在介质的该部分处被固定化的珠的量与样品中的分析物的量成正比。该实例的其他情况包括与样品混合的被 a1 抗体包覆的珠和与生物素共轭的 a2 抗体。还可能的是，使被 a1 抗体包覆的珠以及与 a2 生物素共轭的抗体被包覆在样品垫至试剂垫上，所述垫在被固定化的中性抗生物素蛋白部分之前并且在样品流过介质时被样品占据。对于上文刚刚描述的后两种情况，介质的一部分被中性抗生物素蛋白包覆，以允许捕获免疫复合物。

[0178] 这种施用将还包括具有较小的（纳米尺度）和较大的尺寸的珠、珠尺寸的组合、显色指示物珠、以及具有被合适地控制尺寸的流动基质的珠的耦合体，这取决于用于分析的成对的分离纸。显色指示物珠的使用允许它们用作报道分子，并且显色指示物珠向介质中的迁移的缺乏或减少的迁移距离提供液体样品向条中的迁移以及目标分析物的存在的直接对应。珠还可以是非球形的被改进的形状、被不同的表面化学官能化、或与其他机制组合，以影响多孔膜内的流速。非特异性的珠（不结合于分子识别元件的珠）的加入可以用于导致由特异性地识别目标分析物的被蛋白质或抗体包覆的珠产生的流速的进一步的减少，并且有效地放大信号。本方法可以适应竞争性测定形式，同时包括与样品分析物竞争的目标分析物。此处，进行竞争的目标分析物的存在将减少对目标特异性的珠的局部积聚，防止膜孔的堵塞，并且导致与样品中的目标的浓度成正比的增加的样品流速。本领域技术人员将认识到，许多其他类型的分析可以使用本方法来进行。这种测定的重要的方面是珠在流动基质内的特异性的积聚，导致由于为样品流动可用的空隙容积的减小而流速成比例的减小。

[0179] 珠可以用于改变介质中的孔径大小的另一种方式使用珠在样品内的凝集来防止或减少样品在介质上的流动。例如，样品与附着于珠的分析物例如蛋白质（例如 CRP）的 a1 和 a2 抗体混合。然后样品被施用于多孔的横向流动介质。如果样品含有分析物，那么珠将凝集，堵塞空隙容积，并且产生防止或减慢样品进入膜中的障碍物。当分析物不存在时，珠保持分散遍及样品并且允许样品流入膜中。珠在样品加入部位处的凝集有效地减小介质内的孔径大小以及为流体流动可用的空间。凝集的程度以及在介质的该部分处积聚的珠的量与样品中的分析物的量成正比。因此，样品和珠进入介质中的流速是样品内的分析物浓度的直接指示物。如上述的，显色指示物珠的迁移提供液体样品向条中的迁移以及目标分析物的存在的直接对应。相似地，珠还可以是非球形的被改进的形状、被不同的表面化学官能化、或与其他机制组合，以影响多孔膜内的流速。非特异性的珠（不结合于分子识别元件的珠）的加入可以用于导致由特异性地识别目标分析物的被蛋白质包覆的珠产生的流速的进一步的减小，并且有效地放大信号。还可能的是，使被抗体包覆的珠在样品或试剂垫上，所述垫在介质的发生迁移的部分之前并且在样品流过介质时被样品占据。横向流动和其他免疫学技术的领域的技术人员将认识到，许多其他类型的分析可以使用本方法来进行。这种测定的重要的方面是珠在流动基质内的特异性的积聚，导致由于为样品流动可用的空隙容积的减小而流速成比例的减小。

[0180] 多种途径可以用于增强珠的局部膜孔阻塞并且响应于目标分析物减少样品流动。这些中的一个将膜孔通过珠积聚的阻塞与被珠局部化引导的被酶介导的沉淀反应组合。在这种情况下，被酶或抗体酶融合包覆的珠的组合可以用于在特异性目标分析物的存在下产生局部沉淀物。非均一的局部沉淀物形成和珠积聚的组合可以非常有效地产生样品流速

的减小。非常小的沉淀物的存在补充珠的孔阻塞,因为由于膜孔径大小的不同,局部沉淀将堵塞被珠保留开放的剩余的缝隙。此外,单独的或与珠或酶组合的水溶性的聚合物的加入也将用来与目标分析物浓度成比例地减小流速。这些聚合物可以用作非特异性阻塞试剂,或被分子识别元件官能化以向珠积聚或沉淀物形成反应加入特异性。聚合物可以被共轭或融合于珠表面或酶,以加入形状和产生更不均一的阻断剂以限制流动。聚合物的被加入的非均一的体积将以与沉淀形成相同的方式起作用,以堵塞由于变化的膜孔径大小未被珠阻塞的剩余的缝隙,并且更有效地减小样品流速。

[0181] b. 流体的性质的改性

[0182] 用于改变流体流动的另一种方式是改变流体在特定的分析物的存在下的性质。例如,流体粘度或表面张力可以被改变,并且聚合反应可以用于在流体中产生凝胶或网络,由此减慢或甚至停止流动。除了聚合物之外,微粒可以用于增加有效性。微粒可以以结合分析物的方式被包覆或共轭,以使得它们主动成为网络或凝胶的一部分,或可以不被包覆或不被共轭,使得它们被动地被捕获在网络或凝胶中。

[0183] 存在使用与免疫化学原理组合的在免疫化学上被改性的聚合物(在微颗粒的存在或不存在下)来改变经过多孔介质的流动特征的多种可能的方式。在所有情况下,样品中的分析物作为将聚合物交联至聚合物或将聚合物交联至微颗粒的桥(bridge)。交联是由于在许多免疫测定中形成的典型的夹层复合物(sandwich complex)的形成,其中分析物被与两种不同的聚合物分子或微颗粒联接的两种不同的抗体结合。当聚合物在分析物的存在下更高度地彼此交联时—无论直接地还是通过作为媒介物的微颗粒—流体的粘度增加,减慢流动。如果交联的程度足够高,那么凝胶将形成,导致流动的停止。

[0184] 如果两种抗体结合于分析物上的不同的表位以形成夹层复合物,那么这些抗体将是不同的,由 ab1 和 ab2 表示。如果使用一种聚合物,那么一个方案将是将 ab1 共轭于聚合物的一种制剂,并且将 ab2 共轭于聚合物的另一种制剂。然后可以将聚合物的这两种制剂以不同的比率混合,以调节系统以响应于分析物的不同的浓度范围。在另一个仅一种聚合物的方案中,抗体 ab1 和 ab2 可以以不同的比率共轭于聚合物的同一种制剂,使得所有的聚合物链都可以潜在地与 ab1 和 ab2 二者共轭。以上方案的任何组合还可以用于形成将使流动停止的凝胶或网络。

[0185] 被 ab1 或 ab2 或二者包覆的微颗粒可以被加入以上仅一种聚合物的方案中的任一个中,或被抗体包覆的微颗粒的合适的制剂可以代替以上方案中的任一个中的聚合物的类似的制剂。通常,微颗粒将具有与聚合物不同的对流速的影响。被捕获的或被固定化的颗粒可以通过改变多孔介质的有效的孔隙率、孔径大小和 / 或渗透率来影响流速。由聚合物和微颗粒的组合形成的凝胶或网络将与由单独的聚合物形成的凝胶或网络不同地表现。

[0186] 在所有以上方案中,ab1 和 ab2 可以是单克隆或多克隆抗体、抗体片段、适体或其他特异性粘合剂。聚合物可以是直链聚丙烯酰胺、支链聚丙烯酰胺、聚乙二醇、葡聚糖或可以被化学改性以允许粘合剂的共轭或键合的任何其他聚合物。微颗粒可以是胶乳或聚苯乙烯微球、胶体或允许粘合剂的共轭或包覆的任何球形的或不规则形状的颗粒。粘合剂可以被直接地共轭于聚合物或微颗粒,或可以使用媒介联接物。例如,直链聚丙烯酰胺和抗体二者都可以使用已知的化学来生物素化。聚合物可以与过量的中性抗生物素蛋白反应以防止分子内交联,然后被生物素化的抗体可以被加入以有效地将其共轭于聚合物。将抗体加入

聚合物可以在测定之前或在测定期间发生。

[0187] 血液或血浆凝结时间的测量是使用粘度来监测样品的状态的一个实例。凝结描述血液通过其被凝块的复杂过程。凝血酶原时间 (PT) 测量凝结的非固有的路径。这种路径的诱导需要钙。该过程可以通过促凝血酶原激酶的引入来加速, 促凝血酶原激酶是一种含有组织因子的盐脑提取物, 引发非固有的路径。这种路径通过最终导致凝血酶 (因子 IIa) 的活化的蛋白质串联进行, 凝血酶是裂解纤维蛋白原的蛋白酶。纤维蛋白原是可溶解的蛋白质, 但是当被裂解为纤维蛋白时, 纤维蛋白原凝结为不可溶的凝胶。纤维蛋白多聚体的生成的结果是血液或血浆的增加的粘度和流动的阻碍, 以及纤维蛋白凝胶的潜在的形成, 这作为结果, 因此可使用本文提供的方法和装置测量。

[0188] 4. 样品制备和向多孔介质的施用

[0189] 在进行本文提供的用于分析和评估流体变量的方法时, 将流体样品施用于分析介质。可以将样品直接地施用于将在其中分析流体迁移的介质 (即分析介质) 或施用于与分析介质流体连通的分离的样品接收或递送位置。

[0190] 被施用于介质的样品的量对于本文提供的方法和装置的不同的实施方案来说可以不同。在一些实施方案中, 例如流体流动的停止根据流体前沿在流体流过的两个或更多个路径中的汇合来检测的实施方案中, 被引入介质中的流体的量是使得其足以饱和多孔介质。因此, 被施用于介质的样品的量是使得其超过介质的吸收容量 (或介质的组合的吸收容量, 如果使用多于一种介质的话), 以使介质被流体样品饱和。样品的实际的量不需要是已知的, 只要量超过介质 (或多种介质) 的容量。饱和特定的材料所需要的流体的最小的量可以基于材料的吸收容量来确定或可以根据经验来确定。因为在本文提供的方法的这些实施方案中, 过量的而非具体量的样品被施用于介质, 所以计量或测量样品的精确的体积是不必要的。

[0191] 在本文提供的方法和装置的其他实施方案中, 被施用于介质的样品的量是使得其不超过介质 (或多种介质) 的吸收容量。在这些实施方案中, 被施用于介质的样品的量被预先确定和计量, 使得小于饱和介质所需要的量的已知量的样品被引入。例如, 在一个这样的实施方案中, 不足以饱和介质的已知体积的样品流体在单一的地点处被引入介质中并且从该共用的部位流入与该共用的部位流体连通的两个或更多个路径 (也被称为“臂”) 中。因为在这些方法中比较在两个或更多个非汇合的路径中的流体迁移距离, 所以流体前沿停止前进的点应当位于介质内, 如果流体饱和介质, 那么这将不是这种情况。因此, 在这些方法中, 不足以饱和介质的已知量的样品流体被引入介质中。流体的这样的量可以基于材料的吸收容量来确定或可以根据经验来确定。在本文提供的方法的特定的实施方案中, 被施用于介质的样品量可以在约  $10 \mu l$  至约  $200 \mu l$  的范围, 通常在约  $25 \mu l$  至约  $100 \mu l$  之间, 并且在一个实施方案中是约  $75 \mu l$ 。

[0192] 在本文提供的与用于分析和评估流体变量的方法一起使用的装置的特定的实施方案中, 装置包括表面, 流体样品可以在表面处被施用于装置。表面可以是凹形凹陷部, 该凹陷部形成用于接收流体样品的井而没有由样品在接触介质之前流出装置导致的样品的损失。样品接收表面与一种或多种分析介质流体连通。然而, 这样的样品递送井并不用来计量或测量样品的任何特定的体积。因此, 对于本文提供的其中已知量的样品流体被引入介质中的方法的实施方案, 样品在施用于介质之前被计量。对于其中被引入介质中的样品

流体的量仅需要足以饱和介质的方法的实施方案,被施用于介质(直接地或通过与上游元件例如井的流体连通)的样品的体积是被递送至装置的任何未知的量。

[0193] 取决于被施用于介质的流体和 / 或流体组分,流体样品可以在经过一种或多种介质迁移之前或期间被处理。这样的处理包括例如缓冲剂、防腐剂、染料或用来标记流体前沿以利于其在介质中的检测或目测的其他材料,以及抑制组分的凝结的添加剂。在本文提供的用于血液或血清的分析的方法的特定的实施方案中,抗凝剂可以被加入流体中以防止血液样品的凝固。

[0194] 钙是凝结级联中所需要的辅因子,因此用钙螯合剂例如柠檬酸盐处理的血液不结块。凝结级联可以通过引入相对于柠檬酸盐摩尔过量的钙被再活化。因此,在本文提供的用于评估凝结的方法和装置中,血液或血浆样品可以初始地用柠檬酸盐或另一种螯合剂来处理。其他钙螯合剂例如 EDTA,产生相似的效果。装置的初始的竖直分离部件将血浆从血液分离。(测试还可以使用全血来进行。)

#### [0195] C. 检测和 / 或定量流体的变量的方法

[0196] 本文提供用于检测和 / 或定量流体变量例如诸如流体的组分或流体的特征或性质的方法。因为这些和其他的流体变量形成在许多生物学、诊断、保健、兽医、农业的和商业的应用中使用的评估参数的基础。因此,本文还提供用于评估评估参数的方法。

[0197] 本文提供的用于检测和 / 或定量流体变量的方法包括将流体施用入或引入介质中,以进行汇合的或非汇合的流动,相对于经过一个、两个、至少两个、两个或更多个流动路径的流动或迁移分析汇合的或非汇合的流动。在方法的汇合流动实施方案中,以足以饱和介质的量的流体样品被施用于介质并且流过介质的两个或更多个或至少两个汇合的路径或臂。路径和 / 或流体样品中的一个或至少一个被改性,使得流体中的流体变量例如分析物的存在影响在被改性的路径中相对于未被改性的路径的流动。两个或更多个流体前沿的迁移距离通过检测两个或更多个流体前沿的汇合点来容易地确定。这些距离指示每个路径中的流体的流动速率。

[0198] 在本文提供的特定的方法中,流体中的特定的分析物的浓度通过检测样品流体经过多孔介质例如滤纸的毛细管流动的速率的变化来确定或测量。特别地,含有分析物的样品流体通过毛细作用沿着多孔介质的共用元件的两个或更多个汇合臂流动,其中臂中的至少一个已经通过响应于分析物的浓度影响流速的剂的加入来改性。流体前沿将在由它们的相对流速确定的位置处汇合,这从而指示样品流体中的分析物的浓度。前沿汇合提供测定的清晰的终点,而不是被严格约束的读取时间窗口。装置的优选的实施方案将在形状与圆或环形物相似的滤纸条(“刻度盘”)上的单一的点处引入样品流体,在刻度盘中刻度盘的一个臂被处理以导致流速响应于分析物的变化。样品流体通过毛细管作用围绕刻度盘的两个臂行进。围绕刻度盘的其中流体前沿汇合的点是分析物浓度的指示。

[0199] 本文提供用于改变在本文描述的装置或方法中的任一个中的流体路径中的流动的许多方法和材料,例如粘度调节剂、聚合诱导剂、孔径调节剂、基于免疫化学的特异性调节剂,包括抗体和微珠。基于本文提供的教导内容,技术人员可以确定另外的调节剂。

[0200] 在方法的其他实施方案中,流体路径是非汇合的线性路径。该横向流动装置通过检测样品流体经过多孔介质例如滤纸的毛细管流动的停止来测量样品中的具体分析物的浓度。特定地,含有分析物的样品流体的等分试样通过毛细作用沿着经过多孔介质的单一

的元件或多孔介质的彼此串联接触的分离的元件的至少一个路径流动。样品或介质被处理,使得如果样品中存在阈值浓度的特定的分析物,那么毛细管流动被减慢至停止。否则,一旦流体饱和介质,那么样品流体通过毛细管作用的流动停止。流速可以通过流体的变化或有效的介质(最初的介质和被固定化于该最初的介质的任何分子或颗粒的组合)的变化来改变。流体的性质可以通过粘度、表面张力的变化或通过凝胶或网络经由聚合反应的形式来改性。有效的介质可以通过孔隙率、孔隙半径或渗透率的变化来改变,例如通过微珠在分析物的存在下在孔的壁上的固定化。样品中的分析物浓度的定性分析可以通过确定在指定的一段时间已经过去之后缓冲前沿是否已经运动经过指定的距离来获得。因此,本文提供用于通过分析经过多孔介质的毛细管流动的速率来测量流体样品中的分析物的方法和装置。装置可以用于分析血液化学组分例如蛋白质、核酸或代谢物,监测传染性疾病,或许多其他的流体浓度测量用途。

[0201] 在本文提供的方法和装置的特定的实施方案中,流体流动的停止通过一种或多种介质中的一个、两个或更多个流体前沿的前进的停止、接近停止或实质上减慢来检测。本文描述的这样的装置依赖于作为分析工具的毛细管流动的停止。缓冲前沿的位置被用作分析物浓度的指示物,而不是报道分子或颗粒在具体的位置处的积聚被用作分析物浓度的指示物。这些装置中的一些趋向于展示阈值分析物浓度,当低于该阀值分析物浓度时流动可以被仅略微地限制,并且当高于该阀值分析物浓度时流动停止或接近停止。因此它们对于分析物浓度的定性分析来说是理想的。

[0202] 在一个实施方案中,不足以饱和介质的已知体积的样品流体在单一的地点处被引入介质中并且从该共用的部位流入与该共用的部位流体连通的两个或更多个路径(也被称为“臂”)中。在流体路径的一个或多个而不是全部即少于全部中的介质被改性,使得路径中的流体流动以取决于流体样品中的流体变量或分析物的存在、量、浓度或程度的方式被影响。流体在两个或更多个路径中的流动进行,直到样品体积被耗尽,在耗尽的点处流动停止并且两个或更多个分离的流体前沿在介质中停止前进。流体在每个路径中的迁移的距离通过测量从样品引入的点至每个流体前沿的距离来确定。这些距离指示路径中的流体流动的相对速率,将这些距离与样品中的流体变量或分析物的量、浓度或程度比较并且与样品中的流体变量或分析物的量、浓度或程度相互关联。在本实施方案的替代形式中,已知量的样品流体被引入不共享共用元件的两种或更多种分离介质中的每种中。分离的路径中的一个或多个而不是全部被改性以取决于分析物浓度的方式影响流体流动,并且在每个路径或臂中的流体迁移距离被测量和比较以定量地评估流体变量或分析物。

[0203] 在本文提供的被设计为用于通过检测流体前沿来检测流体流动的停止的方法和装置的另一个实施方案中,被引入介质中的流体的量是使得其足以饱和多孔介质,如果被给予足够的时间的话。因此,在流体前沿在期间将继续前进的有限的一段时间之后,介质将最终成为被流体充满并且流体前沿将不再存在。然而,在这些装置和方法中的介质和/或样品流体被改性,使得如果流体变量或分析物在流体中以在阀值量、浓度或程度或大于阀值量、浓度或程度的量、浓度或程度存在,那么流体的流动将完全地或实质上停止。在这些实施方案中,流体流动的停止根据流体前沿的前进的完全的停止或实质上减慢或显著的减慢来检测。因此,通过使用本文提供的这些特定的方法和装置,可能的是通过流体前沿前进的停止或实质上减慢来半定量地评估流体变量的存在。

[0204] 在本文提供的装置和方法的另外的实施方案中,流体流动的停止根据在流体流过的两个或更多个路径中的流体前沿的汇合来检测。例如,在特定的实施方案中,流体流动的停止根据在样品流体的分离的等分试样被引入线性介质的相对的端部并且被允许朝向介质的另一个端部流动时发生的流体前沿的汇合来检测。在另一个特定的实施方案中,流体流动的停止根据在相反的方向前进的流体前沿的汇合来检测。

[0205] 相比于依赖于分析物位置的基于报道分子积聚的确定的流体流动装置和方法,本文提供的被设计为检测朝向彼此流动的两个路径的汇合点的装置具有多种优点。相反,本文提供的装置的许多实施方案在本文中获得清楚的、明显的且界限分明的终点,因为分离的流体前沿的相遇或汇合点是每个流体路径的流体流动的停止点。

[0206] D. 用于分析流体的变量并且用于测量与流体变量相关联的参数的装置

[0207] 本文提供通过检测样品流体经过多孔介质例如滤纸的毛细管流动的速率的变化来分析样品中的流体变量的“拱形流”横向流动装置。具体地,含有分析物的样品流体通过毛细作用沿着多孔介质的共用元件的两个或更多个汇合臂流动,其中臂中的至少一个已经通过响应于流体变量例如分析物的浓度影响流速的流动调节剂的加入来改性。流体前沿将在由它们的相对流速确定的位置处汇合,这从而指示样品流体中的分析物的浓度。

[0208] 本文提供的另一个横向流动装置,即“分流”装置,通过检测样品流体经过多孔介质例如滤纸的毛细管流动的速率的变化来分析样品中的流体变量。具体地,含有分析物的样品流体通过毛细作用沿着多孔介质的共用元件的两个或更多个汇合臂流动,其中臂中的至少一个已经通过响应于流体变量例如分析物的浓度影响流速的流动调节剂的加入来改性。流体前沿在完成时距样品引入点的相对距离由它们的相对流速确定,这从而指示样品流体中的分析物的浓度。

[0209] 本文提供的另一个横向流动装置,即“停流”装置,通过检测样品流体经过多孔介质例如滤纸的毛细管流动的速率的变化来定性地评估样品中的流体变量。特别地,样品流体通过毛细作用沿着经过多孔介质的元件或经过多孔介质的彼此串联接触的多重元件的路径流动,其中样品和 / 或流体路径已经通过使流动在特定的流体变量例如分析物的存在下停止的流动调节剂的加入来改性。如果流体或介质的性质不随时间变化,那么预期的是流体前沿的位置将与时间的平方根成正比 [Washburn],使得足够的量的样品流体将饱和多孔介质,如果被给予足够的时间的话。如果流体前沿在指定的一段时间之后尚未运动至少指定的距离,那么这指示毛细管流动已经停止,由此指示在样品流体中存在阈值浓度的分析物。

[0210] “分流”的理论

[0211] 本文描述的装置依赖于作为分析工具的流速的改变。对于基于分析毛细管流动的速率的装置的分析和设计,具有描述这样的流动的理论是必要的。我们使用被称为 Washburn 方程的描述由于毛细力经过圆形管的瞬变流的方程的修改形式。我们已经修改了该方程,以根据现代流体运输理论描述这样的经过多孔介质的流动。

[0212] 为了描述经过毛细管的瞬变流, Washburn 以泊肃叶方程开始, 泊肃叶方程描述由于压差经过圆形通道的层流 :

[0213]

$$v_{ave} = \frac{\Delta P r^2}{8\mu L} \quad (1)$$

[0214] 其中  $v_{ave}$  是平均流体速度 (体积流速除以横截面积),  $r$  是通道的半径,  $\mu$  是粘度, 并且  $L$  是通道的长度。为了简单, 我们提出假设在通道壁处的非滑动条件并且假设在通道的入口处无压头的推导。对于被毛细管作用填充的通道, Washburn 使平均速度与流体前沿的速度相等, 并且相似地使通道的长度是流体前沿的位置  $x$ 。由表面张力产生的压力由  $(2\sigma \cos \alpha)/r$  给出 [Batchelor, Lambert], 其中  $\sigma$  是流体的表面张力, 并且  $\alpha$  是在流体和通道的壁之间的接触角。流体本身的柱的压头由  $gpx \sin \theta$  给出, 其中  $g$  是重力加速度,  $p$  是流体的密度, 并且  $\theta$  是通道的距水平的角度。将这些组合:

[0215]

$$\frac{dx}{dt} = \frac{(2\sigma \cos \alpha / r - g \rho x \sin \theta) r^2}{8\mu x} \quad (2)$$

[0216] 对于完全可润湿 (零接触角) 的水平通道, 容易地对该方程进行积分以给出作为时间的函数的  $x$ :

[0217]

$$x = \sqrt{\frac{\sigma rt}{2\mu}} \quad (3)$$

[0218] 虽然 Washburn 和其他人已经将这些方程也应用于多孔介质, 将这些材料模制为毛细管的聚集体, 但是更好的途径是以特定地适用于经过多孔介质的流动的方程开始。达西定律 (Ingham, Nield) 描述响应于压差的经过多孔介质的层流:

[0219]

$$v_{ave} = \frac{\Delta PK}{\varphi \mu L} \quad (4)$$

[0220] 其中  $K$  是介质的渗透率 (由达西定律定义, 使用面积的单位), 并且  $\varphi$  是孔隙率 (空隙容积或孔隙容积除以总体积)。达西定律通常依据过滤速度来表示 (容积流速除以横截面积, 在这种情况下孔隙率项被删去), 但是为了本发明的目的, 最好使用固有的速度或流体在孔中的速度。孔隙率在分母中的存在似乎是在计算上通过直观产生的, 因为其暗示更多孔的材料将具有较慢的流速。然而, 渗透率本身是孔隙率的函数, 通过对球状颗粒的填充床推导的 Carman-Kozeny 关系式来估计:

[0221]

$$K = \frac{r_p^2 \varphi^2}{k_{ck} (1-\varphi)^2} \quad (5)$$

[0222] 其中  $r_p$  是平均孔 (或颗粒) 半径, 并且  $k_{ck}$  是从约 35 至 50 变化的根据经验导出的常数。虽然与以上方程组合的该关系式导致在孔隙率减小时直观地满足速度的减小, 并且采用根据经验拟合的数据已经获得成功, 但是在高孔隙率时该关系式应当被谨慎地对待, 在高孔隙率时该关系式预测比通过实验获得的压降低的压降 [McCabe], 并且在孔隙率接近一致时  $K$  接近无穷大。

[0223] 根据 Washburn, 在流体前沿位置中, 达西定律被转换为微分方程:

[0224]

$$\frac{dx}{dt} = \frac{K(k_s \sigma - g \rho x \sin \theta)}{\varphi \mu x} \quad (6)$$

[0225] 在这种情况下,不容易界定由毛细管作用导致的压力,因为孔形状显著地偏离圆形,孔径大小遵循可变的分布,并且对于小于1微米的孔来说,接近零的接触角是不可能的,因为这将获得大于大气压的压降。所有这些考虑因素都被包含在常数  $k_s$  中,  $k_s$  将在零和介质的表面积体积比(倒置的长度单位)之间变化。

[0226] 这些参数的经验的拟合可以通过记录缓冲前沿随时间的位置然后将速度(由中心差分技术得到的)对位置的倒数作图来得到。如果多孔介质不是水平的,那么应当得到直线,该直线具有  $k_d/k_r$  的斜率(如下文定义的)和  $-g/k_r$  的截距(见图5)。 $k_d$  和  $k_r$  可以被分别认为是相对的驱动力和阻力。

[0227]

$$v = \frac{Kk_s \sigma}{\varphi \mu} \frac{1}{x} - \frac{K \rho g \sin \theta}{\varphi \mu} = \frac{k_d}{k_r} \frac{1}{x} - \frac{1}{k_r} g \sin \theta \quad (7a)$$

$$[0228] \quad k_d = \frac{k_s \sigma}{\rho}, \quad k_r = \frac{\varphi \mu}{K \rho} \quad (7b)$$

[0229] 对于通过毛细管作用经过水平的多孔介质的流体流动,得到以下的关系式:

[0230]

$$x = \sqrt{\frac{2k_s \sigma K t}{\varphi \mu}} = \sqrt{2 \frac{k_d}{k_r} t} \quad (8)$$

[0231] 从方程8清楚的是,毛细管流动的速率可以通过改变在根号下的常数中的任一个来改变,常数包括表面张力、渗透率、孔隙率或粘度。在大多数情况下,流体前沿的变化将与参数的变化的平方根成比例(将粘度增加为四倍将导致前沿位置加倍)。例外是孔隙率,孔隙率将显示出近似地成比例变化,因为渗透率也取决于孔隙率。

[0232] 作为简单的阐释,我们将这种理论应用于在本专利描述的装置,其中已知体积的样品流体被加入线性条的中心部,并且通过毛细管作用沿着条的两个臂流动。为了使计算易处理,我们进行大程度的简化,假定流速常数(如上文描述的)在整个测定中自始至终是恒定的(但是在两个臂之间不同)。当然,在实际的情况下,常数  $R_1$  和  $R_2$  将必须被对时间和介质长度二者积分。因此,调节的方程是:

$$[0233] \quad x_1 = \sqrt{R_1 t}, \quad x_2 = \sqrt{R_2 t}, \quad x_1 + x_2 = L$$

[0234] 其中  $L$  是两个流体前沿之间的距离并且通过体积  $\varphi w h L$  由样品体积来界定,  $w$  = 条的宽度并且  $h$  = 条的厚度。

[0235] 解出在完成时的  $x_1$  和  $x_2$ ,因此获得:

$$[0236] \quad x_1 = \frac{L}{1 + \sqrt{\frac{R_2}{R_1}}}, \quad x_2 = \frac{L}{1 + \sqrt{\frac{R_1}{R_2}}}$$

[0237] 如果  $R_2$  是  $R_1$  的四倍,那么流体前沿距样品引入点的距离  $x_1$  将是距离  $x_2$  的一半。

[0238] “拱形流”的理论

[0239] 对于基于分析毛细管流动的速率的装置的分析和设计,具有描述这样的流动的理

论是必要的。我们使用被称为 Washburn 方程的描述由于毛细力经过圆形管的瞬变流的方程的修改形式。我们已经修改了该方程,以根据现代流体运输理论描述这样的经过多孔介质的流动。

[0240] 为了描述经过毛细管的瞬变流, Washburn 以泊肃叶方程开始, 泊肃叶方程描述由于压差经过圆形通道的层流 :

[0241]

$$v_{ave} = \frac{\Delta P r^2}{8\mu L} \quad (1)$$

[0242] 其中  $v_{ave}$  是平均流体速度 (体积流速除以横截面积),  $r$  是通道的半径,  $\mu$  是粘度, 并且  $L$  是通道的长度。为了简单, 我们提出假设在通道壁处的非滑动条件并且假设在通道的入口处无压头的推导。对于被毛细管作用填充的通道, Washburn 使平均速度与流体前沿的速度相等, 并且相似地使通道的长度是流体前沿的位置  $x$ 。由表面张力产生的压力由  $(2\sigma \cos \alpha)/r$  给出 [Batchelor, Lambert], 其中  $\sigma$  是流体的表面张力, 并且  $\alpha$  是在流体和通道的壁之间的接触角。流体本身的柱的压头由  $gpx \sin \theta$  给出, 其中  $g$  是重力加速度,  $p$  是流体的密度, 并且  $\theta$  是通道的距水平的角度。将这些组合 :

$$[0243] \frac{d\lambda}{dt} = \frac{(2\sigma \cos \alpha / r - g\rho\lambda \sin \theta)r^2}{8\mu\lambda} \quad (2)$$

[0244] 对于完全可润湿 (零接触角) 的水平通道 ( $\sin \theta = 0$ ), 容易地对该方程进行积分以给出作为时间的函数的流体前沿的位置  $\lambda$  :

[0245]

$$\lambda = \sqrt{\frac{\sigma rt}{2\mu}} \quad (3)$$

[0246] 虽然 Washburn 和其他人已经将这些方程也应用于多孔介质, 将这些材料模制为毛细管的聚集体, 但是更好的途径是以特定地适用于经过多孔介质的流动的方程开始。达西定律 [Nield] 描述响应于压差的经过多孔介质的层流 :

[0247]

$$v_{ave} = \frac{\Delta PK}{\varphi\mu L} \quad (4)$$

[0248] 其中  $K$  是介质的渗透率 (由达西定律定义, 使用面积的单位), 并且  $\varphi$  是孔隙率 (空隙容积或孔隙容积除以总体积)。达西定律通常依据过滤速度来表示 (容积流速除以横截面积, 在这种情况下孔隙率项被从方程 4 删去), 但是为了本发明的目的, 最好使用固有的速度或流体在孔中的速度。孔隙率在分母中的存在似乎是在计算上通过直观产生的, 因为其暗示更多孔的材料将具有较慢的流速。然而, 渗透率本身是孔隙率的函数, 通过对球状颗粒的填充床推导的 Carman-Kozeny 关系式来估计 :

[0249]

$$K = \frac{r_p^2 \varphi^2}{k_{ck} (1-\varphi)^2} \quad (5)$$

[0250] 其中  $r_p$  是平均颗粒半径, 并且  $k_{ck}$  是从约 35 至 50 变化的根据经验导出的常数。一些研究者将使用孔隙半径作为以上方程中的  $r_p$ , 然而我们自己的理论推导表明这仅在

$(1-\varphi)^2$  项被近似值代替时是合理的（见下文）。虽然与以上方程组合的该关系式导致在孔隙率减小时直观地满足速度的减小，并且采用根据经验拟合的数据已经获得成功，但是在高孔隙率时该关系式应当被谨慎地对待，在高孔隙率时该关系式预测比通过实验获得的压降低的压降 [McCabe]，并且在孔隙率接近一致时  $K$  接近无穷大。此外，滤纸的横截面的显微图像显示出孔的宽分布，这未被在方程 5 中考虑。

[0251] 根据 Washburn，在流体前沿位置中，达西定律被转换为微分方程：

[0252]

$$\frac{d\lambda}{dt} = \frac{K(k_s \sigma - g \rho \lambda \sin \theta)}{\varphi \mu \lambda} \quad (6)$$

[0253] 在这种情况下，不容易界定由毛细管作用导致的压力，因为孔形状显著地偏离圆形，孔径大小遵循可变的分布，并且对于小于 1 微米的孔来说，接近零的接触角是不可能的，因为这将获得大于大气压的压降。所有这些考虑因素都被包含在常数  $k_s$  中， $k_s$  将在零和介质的表面积体积比（倒置的长度单位）之间变化。

[0254] 这些参数的经验的拟合可以通过记录缓冲前沿随时间的位置然后将速度（由中心差分技术得到的）对位置的倒数作图来得到。如果多孔介质不是水平的，那么应当得到直线，该直线具有  $k_d/k_r$  的斜率（如下文定义的）和  $-g \sin \theta / k_r$  的截距。 $k_d$  和  $k_r$  可以被分别认为是相对的驱动效应和阻力效应。

[0255]

$$v = \frac{Kk_s \sigma}{\varphi \mu} \frac{1}{\lambda} - \frac{K \rho g \sin \theta}{\varphi \mu} = \frac{k_d}{k_r} \frac{1}{\lambda} - \frac{1}{k_r} g \sin \theta \quad (7a)$$

$$[0256] \quad k_d = \frac{k_s \sigma}{\rho}, \quad k_r = \frac{\varphi \mu}{K \rho} \quad (7b)$$

[0257] 对于通过毛细管作用经过水平的多孔介质的流体流动，得到以下的关系式：

[0258]

$$\lambda = \sqrt{\frac{2k_s \sigma K t}{\varphi \mu}} = \sqrt{2 \frac{k_d}{k_r} t} \quad (8)$$

[0259] 从方程 8 清楚的是，毛细管流动的速率可以通过改变在根号下的常数中的任一个来改变，常数包括表面张力、渗透率、孔隙率或粘度。在大多数情况下，流体前沿的变化将与参数的变化的平方根成比例（将粘度减小为四倍将导致前沿位置加倍）。例外是孔隙率，孔隙率将显示出近似地成比例变化，因为渗透率也取决于孔隙率。方程 8 表明，对于具有恒定的流动参数的水平流动来说，将流体前沿的位置对时间的平方根作图获得直线。

[0260] 作为简单的阐释，我们将这种理论应用于在本专利描述的装置，其中样品流体围绕具有 L 的周长的圆形过滤器（“刻度盘”）的两个臂流动，流动在两个流体前沿汇合时停止。为了使关于至此提出的理论的计算易处理，我们进行大程度的简化，假定流速参数（如上文描述的）在整个测定中自始至终是恒定的（但是在两个臂之间不同）。因此，调节的方程是：

$$[0261] \quad x_1 = \sqrt{R_1 t}, \quad x_2 = \sqrt{R_2 t}, \quad x_1 + x_2 = L$$

[0262] 解出在前沿汇合时的  $x_1$  和  $x_2$ ，因此获得：

$$[0263] \quad x_1 = \frac{L}{1 + \sqrt{\frac{R_2}{R_1}}} \quad x_2 = \frac{L}{1 + \sqrt{\frac{R_1}{R_2}}}$$

[0264] 如果  $R_2$  是  $R_1$  的四倍, 那么流体前沿将沿着臂 2 在围绕刻度盘的路径的  $2/3$  点且沿着臂 1 的  $1/3$  点处汇合。

[0265] 以上的阐释依赖于沿着每个臂的流速参数是恒定的。通常, 这是不符合实际的假设。为了提出允许改变参数的理论, 我们必须以更基本的假设开始。我们因此提出以上理论的替代的推导, 使用牛顿第二定律作为起始点:

$$[0266] \quad \sum F = m \frac{d^2 \lambda}{dt^2}$$

[0267] 或

[0268]

$$F_{cap} - F_{visc} - mg \sin \theta = A_{xs} \lambda \varphi \rho \frac{d^2 \lambda}{dt^2} \quad (9)$$

[0269] 其中  $F_{cap}$  是由毛细作用导致的驱动力,  $F_{visc}$  是由流体粘度导致的阻力,  $mg \sin \theta$  是作用于流体的重力, 并且  $A_{xs}$  是滤纸的横截面积。为了保持内部一致性, 我们将使用方程 6 来得到有关的力, 将其重排, 并且在两侧乘以  $A_{xs} \varphi$ :

[0270]

$$\frac{A_{xs} \varphi^2 \mu \lambda}{K} \frac{d \lambda}{dt} = A_{xs} \varphi (k_s \sigma - g \rho \lambda \sin \theta) \quad (10)$$

[0271] 在方程的右侧的  $A_{xs} \varphi$  是得到重力的合适的形式 (在  $x$  或  $\lambda$  方向) 所必需的, 并且还将毛细压力转换为被施加穿过孔空间的力。然后方程 10 代表以恒定的速度的力的平衡, 使左侧代表对流动的粘滞阻力。明显地, 方程 10 中的项代表在方程 9 的左侧的力。代入:

[0272]

$$A_{xs} \varphi (k_s \sigma - \frac{\mu \varphi \lambda}{K} \frac{d \lambda}{dt} - g \rho \lambda \sin \theta) = A_{xs} \lambda \varphi \rho \frac{d^2 \lambda}{dt^2} \quad (11a)$$

[0273]

$$\frac{d^2 \lambda}{dt^2} + \frac{\mu \varphi}{K \rho} \frac{d \lambda}{dt} - \frac{k_s \sigma}{\rho} \frac{1}{\lambda} + g \sin \theta = 0 \quad (11b)$$

[0274]

$$\frac{d^2 \lambda}{dt^2} + k_r \frac{d \lambda}{dt} - k_d \frac{1}{\lambda} + g \sin \theta = 0 \quad (11c)$$

[0275] 如果加速度是零 (或接近于零), 那么方程 11 与方程 7 相同。事实上, 除了最初几百毫秒以外, 方程 11 的数值解 (四级 Runge-Kutta [Press]) 以五位有效数字与方程 7 相同。减小加速度项具有显著的优点, 即, 使所需要的时间步长从 10 微秒被增加至秒的数量级, 具有计算速度的相应增加。

[0276] 从以上方程不清楚的是, 在参数随  $x$  变化时如何进行建模。特别地, 如果宽度 (或厚度或孔隙率) 随  $x$  变化, 那么根据连续性, 速度必须也随  $x$  变化:

[0277]

$$\frac{d}{dx}(A_{xs}\varphi v_x) = 0 \quad (12)$$

[0278] (方程 12 依赖于简化的假设, 即所有的速度都在 X 方向, 并且密度  $\rho$  是恒定的。) 然而, 以上的推导已经假设流体整体地运动, 使速度随时间变化, 而不是在 x 方向。为了允许流动参数的变化, 在方程 11a 中提出的理论可以被再阐述为功 / 能量方程:

[0279]

$$\int_0^\lambda \sum F dx = \frac{1}{2} \oint v^2 dm = \frac{1}{2} \int_0^\lambda v^2 A_{xs} \varphi \rho dx \quad (13)$$

[0280] 因为在方程 13 中的积分限包括变量 ( $\lambda$ ), 所以被积函数还展示相等性。除去积分并且重排:

[0281]

$$v^2 = \frac{2}{(A_{xs}(\lambda)\varphi(\lambda)\rho)(F_{cap} - F_{visc} - mg \sin \theta)} \quad (14)$$

[0282] 在方程 14 的右侧的力可以从方程 11a 进行修改 (以微分形式, 如果必要的话)。毛细力仅在毛细管前沿存在。然而, 粘性力和重力必须被对润湿的纸的长度积分:

[0283]

$$v^2 = \frac{2}{A_{xs}(\lambda)\varphi(\lambda)\rho} \left( A_{xs}(\lambda)\varphi(\lambda)k_s\sigma - \int_0^\lambda \frac{A_{xs}(x)\varphi^2(x)\mu(x)}{K(x)} v_x dx - g \sin \theta \int_0^\lambda x A_{xs}(x)\varphi(x)\rho dx \right) \quad (15)$$

[0284] 如果流动是水平的, 那么重力项是零。将方程 12 应用于粘性力项:

[0285]

$$v^2(\lambda) = \frac{2}{A_{xs}(\lambda)\varphi(\lambda)\rho} \left( A_{xs}(\lambda)\varphi(\lambda)k_s\sigma - A_{xs}(\lambda)\varphi(\lambda)v(\lambda) \int_0^\lambda \frac{\varphi(x)\mu(x)}{K(x)} dx \right) \quad (16a)$$

[0286]

$$v^2(\lambda) = \frac{2}{\rho} \left( k_s\sigma - v(\lambda) \int_0^\lambda \frac{\varphi(x)\mu(x)}{K(x)} dx \right) \quad (16b)$$

[0287] 这是以  $v(\lambda)$  的二次方程:

$$v(\lambda) = \sqrt{\beta^2 + \frac{2k_s\sigma}{\rho}} \beta; \beta = \frac{1}{\rho} \int_0^\lambda \frac{\varphi(x)\mu(x)}{K(x)} dx \quad (17)$$

[0289] 方程 17 具有超过以前方程的两个优点。在  $x$  趋近于零时, 速度不趋于无穷大, 并且其允许所有的参数 (除了密度以外) 随  $x$  变化。当  $v(\lambda) = d\lambda/dt$  时, 方程 17 可以用在微分方程解算器例如四级 Runge-Kutta 中, 以得到作为时间的函数的  $\lambda$ 。 $\beta$  的积分形式允许孔隙率、粘度和渗透率随位置变化, 允许各种技术的模拟响应于分析物浓度而改变流速。

[0290] 在装置的一些实施方案中, 多孔介质的有效的渗透率可以通过以对分析物特异的方式将处理过的微珠捕获在孔内来改变。这通过减小孔隙率并且通过根据 Carman-Kozeny 关系式 (方程 5) 减小孔径大小, 将具有减小渗透率的效果。虽然 Carman-Kozeny 关系式是为了具有相对小的孔隙率的填充床开发的, 但是滤纸通常具有在 70% -90% 的范围内的孔隙率。根据方程 5 的渗透率在孔隙率接近 1.0 时趋近于无穷大。将是更合理的是, 渗透率趋近于使得当孔隙率接近 1.0 时方程 4 (经由多孔介质的流动) 近似方程 1 (经过开放通道

的流动) 的值。形式上:

[0291]

$$\lim_{\varphi \rightarrow 1} \frac{\Delta PK}{\varphi \mu L} = \frac{\Delta P r^2}{8 \mu L} \quad (18)$$

[0292] 使用方程 5 求渗透率 K, 假设方程 5 中的孔隙半径成为方程 1 中的半径, 并且使用值 45 作为  $k_{ck}$ :

[0293]

$$\lim_{\varphi \rightarrow 1} \frac{\varphi^2}{45(1-\varphi)^2} = \frac{1}{8} \quad (19a)$$

[0294] 在孔隙率趋近于单一时分母趋近于零的明显的问题通过实现对于低孔隙率来说方程 5 是近似值来避免。对该方程的预测可以在低孔隙率被保留, 同时通过在 $1-\varphi$ 项上使用泰勒级数展开并且然后截至前三项来满足方程 18:

[0295]

$$\frac{1}{1-\varphi} = 1 + \varphi + \varphi^2 + \varphi^3 \dots \approx 1 + \varphi + a\varphi^2 \quad (20)$$

[0296] 将此代入方程 19 中:

[0297]

$$\lim_{\varphi \rightarrow 1} \frac{\varphi^2(1+\varphi+a\varphi^2)^2}{k_{ck}} = \frac{1}{8} \quad (19b)$$

[0298] 使 $\varphi \rightarrow 1$ 并且解出 a:

[0299]

$$\varphi(1+\varphi+a\varphi^2) = 2 + a = \sqrt{\frac{k_{ck}}{8}} \quad (19c)$$

[0300] 当  $k_{ck} = 45$  时获得  $a = 0.37$ 。因此方程 5 成为:

[0301]

$$K = \frac{r_p^2 \varphi^3 (1 + \varphi + 0.37\varphi^2)^2}{45} \quad (21)$$

[0302] 如果方程 21 用于预测微珠在多孔介质中的捕获对该介质的渗透率的影响, 那么具有这如何可能发生的两个极端情况: 珠可以完全地塞满一些孔, 使所有其他的孔不受影响, 或珠可以被均匀分布在所有的孔上, 封闭它们的横截面。在第一种情况下, 孔隙率将被影响, 而平均孔隙半径  $r_p$  不被影响, 而在第二种情况下, 孔隙率和半径二者都将被影响。因为孔隙率等于在孔空间内的横截面积部分, 并且因为如果所有的孔都被均匀地封闭, 那么孔的数量将不改变, 所以得到以下的:

[0303]

$$\frac{r_{p1}^2}{r_{p2}^2} = \frac{\varphi_1}{\varphi_2} \quad (22)$$

[0304] 图 1A 示出了对于经过 Fusion-5 分离纸 (Whatman) 的 0.25" 宽条的水的竖直流动收集的数据。条被容纳在塑料壳体中。在时间零点, 条的底部 1mm 被浸没在含有蓝色染

料的水中。以周期性的间隔,液体前沿的位置被在壳体上标记,并且然后用卡尺测量。前沿的速度(以 cm/s 计)通过对位置数据的中心差分技术来确定。在图 1B 中将速度对  $1/x$  作图。线被拟合于该数据,并且  $k_d$  和  $k_r$ (方程 7b) 从斜率和截距获得。然后这些值用于使用四级 Runge-Kutta 法来积分方程 7a。然后将来自该模型的值在图 1A 中作为实线作图。

[0305] 图 2 是改变被捕获的微球在多孔介质中的分布对流速的影响。圆形示出了不具有任何微球的流。其他图示出了相等的量的微球的不同分布的结果。在每种情况下,微球的总体积将足以完全地填充多孔介质的 2mm 长度的孔隙容积。微球的分布以 30mm 开始,并且是恒定的,直到微球的体积被耗尽。对于用十字指示的试验来说,微球被分布穿过 20mm 长度,使得本部分中的孔隙率减少了 10%。对于用三角形指示的试验来说,微球被分布穿过 10mm 长度,使得本部分中的孔隙率减少了 20%。对于用正方形指示的试验来说,微球被分布穿过 6.7mm 长度,使得本部分中的孔隙率减少了 30%。对于用正方形指示的试验来说,微球被分布穿过 5mm 长度,使得本部分中的孔隙率减少了 40%。在每种情况下,假设微球被均匀地分布穿过孔,使得每个孔的孔面积与孔隙率的总减小成比例地减小。在这些情况下,方程 17 中的  $\beta$  项由以下给出:

[0306]

$$\beta(\lambda < x_s) = \frac{\mu\varphi_0}{\rho K_0} \lambda \quad (23a)$$

[0307]

$$\beta(x_s < \lambda < x_f) = \frac{\mu}{\rho} \left( x_s \frac{\varphi_0}{K_0} + \frac{(\lambda - x_s)\varphi_t}{K_t} \right) \quad (23b)$$

[0308]

$$\beta(\lambda > x_f) = \frac{\mu}{\rho} \left( (x_s + \lambda - x_f) \frac{\varphi_0}{K_0} + \frac{(x_f - x_s)\varphi_t}{K_t} \right) \quad (23c)$$

[0309] 其中  $\lambda$  是缓冲前沿的位置,  $x_s$  是微珠分布(被处理的介质)的开始位置,  $x_f$  是被处理的介质的最终位置,  $\varphi_0$  和  $K_0$  是不具有任何微珠的介质中的孔隙率和渗透率,  $\varphi_t$  是被处理的介质(微珠被加入)的有效孔隙率,并且  $K_t$  是使用由方程 22 给出的孔隙半径如由方程 21 给出的被处理的介质中的渗透率。更复杂的(并且更符合实际的)分布可以通过数值积分来处理,但是这种简单的分布更清楚地阐释了基本的原理,即较紧凑的分布(由较高浓度的分析物导致)导致较大的流动限制。

[0310] 图 3 示出了改变粘度对流速的影响。作为简单的凝结模型,在缓冲前沿从  $x_s$  运动至  $x_f$  时,在多孔介质的被处理的臂中的粘度从  $\mu_0$  变化至  $\mu_f$ 。所有其他参数保持一样。因此粘度是:

[0311]  $\mu(\lambda < x_s) = \mu_0 \quad (24a)$

[0312]  $\mu(x_s < \lambda < x_f) = \mu_0(1+a(\lambda - x_s)) \quad (24b)$

[0313]  $\mu(\lambda > x_f) = \mu_f \quad (24c)$

[0314] 其中

[0315]

$$a = \frac{1(\mu_f - \mu_0)}{\mu_0(x_f - x_s)} \quad (25)$$

[0316] 从方程 17 :

[0317]

$$\beta(\lambda < x_s) = \frac{\mu_0 \varphi}{\rho K} \lambda \quad (26a)$$

[0318]

$$\beta(x_s < \lambda < x_f) = \frac{\mu_0 \varphi}{\rho K} \left( \lambda + \frac{a}{2} (\lambda - x_s)^2 \right) \quad (26b)$$

[0319]

$$\beta(\lambda > x_f) = \frac{\varphi}{\rho K} \left( \mu_0 x_s + \frac{1}{2} (\mu_f + \mu_0)(x_f - x_s) + \mu_f (\lambda - x_f) \right) \quad (26c)$$

[0320]  $x_f - x_s$  的更大的值模拟更长的凝结时间。在图 3 中, 圆形示出了不具有粘度的任何变化的流。所有其他的示出了粘度从 1 厘泊至 10 厘泊的变化。粘度的变化对于所有的试验来说以 30mm 开始。对于十字来说, 粘度在 90mm 达到其的最大值 10 厘泊。对于三角形来说, 在 60mm 达到最大粘度。对于正方形来说, 在 40mm 达到最大粘度。用于凝结的更符合实际的模型将必定是更复杂的, 可能涉及方程 17 中的  $\beta$  项的数值积分。

[0321] 停流装置

[0322] 本文提供的装置包括以下的可以被以分层形式附着以产生被组装的装置的物理元件: 近端底部、近端壳体、近端覆盖物、竖直导管、指示物壳体、指示物条和远端顶部部分。不被特定的机制或配置束缚, 如此组装的元件可以如下地在装置内产生流体路径: 用于接收血液样品的近端并与体积毛细管储器流体连通, 以将样品通过远端出口孔转移至竖直导管的下侧, 并且在竖直导管的顶部和指示物条的近端之间有接触点。

[0323] a. 总体配置和尺寸

[0324] 本文提供的装置的尺寸的范围可以为约 0.125 至约 0.15、0.2、0.3、0.5、0.8、1、1.5、2、2.5 或 3 英寸宽并且约 0.5 至 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 英寸长。在一个实施方案中, 装置是 0.787 英寸宽乘 3.0 英寸长。在示例性的实施方案中, 组装好的装置在形状上是矩形的, 具有圆形的近端和远端。

[0325] 本文提供的示例性的装置的外壳体是刚性材料。可以使用本领域技术人员已知的许多刚性材料中的任何一种, 包括但不限于丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS), 黑色 (CYCLOLAC® MG47-BK4500); 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS), 黑色 (LUSTRAN® 433-904000); 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS), 黑色 (POLYLAC® PA-765); 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS), 黑色 (POLYLAC® PA-746); 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS), 浅灰色 (Platable) (LUSTRAN® PG 298-703693); 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS), 天然 (LUSTRAN® 433-000000); 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS), 天然 (POLYLAC® PA-765 (天然)); 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS), 雪白 (LUSTRAN® 348-012002); 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS), 白色 (LUSTRAN® 248-SB02664900); 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS), 黑色 30% 玻璃纤维 (RTP 600 605); 聚碳酸酯 / 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (PC/ABS), 黑色 (CYCOLOY® C1200HF-701); 聚碳酸酯 / 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (PC/ABS), 黑色 (CYCOLOY® C2950-701); 聚碳酸酯 / 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (PC/ABS), 黑色 (BAYBLEND® FR

110-901510) ;聚碳酸酯 / 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (PC/ABS), 黑色 (BAYBLEND® T85-901510) ;聚碳酸酯 / 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (PC/ABS), 天然 (BAYBLEND® FR110-000000) ;聚碳酸酯 / 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (PC/ABS), 天然 (BAYBLEND® T65-000000) ;聚碳酸酯 / 丙烯腈丁二烯苯乙烯 (PC/ABS), 天然 (CYCOLOY® C6800-111) ;乙缩醛聚甲醛 (POM), 黑色 10% 玻璃珠 (RTP 800GB 10) ;乙缩醛聚甲醛 (POM), 黑色 20% 玻璃珠 (RTP 800GB 20) ;乙缩醛聚甲醛 (POM) 共聚物, 黑色 (CELCON® M90 CD3068) ;乙缩醛聚甲醛 (POM) 共聚物, 天然 (CELCON® M90 CF2001) ;乙缩醛均聚物, 黑色 (DELRIN® 500CL BK601) ;乙缩醛均聚物, 黑色 (DELRIN® 500P BK602) ;乙缩醛均聚物, 天然 (DELRIN® 500P NC010) ;聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 即丙烯酸类, 透明 (PLEXIGLAS® V052-100) ;工程热塑性聚氨酯树脂 (ETPU), 天然 (ISOPLAST® 202EZ) ;高密度聚乙烯 (HDPE), 天然 (MARLEX® 9006) ;液晶聚合物 (LCP), 黑色 30% 玻璃纤维 (VECTRTA® E130i) ;低密度聚乙烯 (LDPE), 天然 (DOW™ LDPE722) ;线性低密度聚乙烯 (LLDPE), 天然 (DOWLEX™ 2517) ;尼龙 6 (聚酰胺 6), 天然 15% 玻璃纤维 (ZYTEL® 73G15L NC010) ;尼龙 6/12 (聚酰胺 6/12), 黑色 33% 玻璃纤维 (ZYTEL® 77G33L BK031) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 黑色 (ZYTEL® 101L BKB009) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 黑色 (RTP200UV) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 黑色 (HYLON® Select N1000EHL) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 天然 (ZYTEL® 103HSL) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 天然 (ULTRAMID® 1000-2) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 黑色 13% 玻璃纤维 (ZYTEL® 70G13 HS1L BK031) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 黑色 13% 玻璃纤维 (HYLON® Select N1013HL) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 天然 13% 玻璃纤维 (ZYTEL® 71G13L) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 天然 13% 玻璃填充 (ZYTEL® 70G13 HS1L NC010) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 黑色 14% 玻璃纤维 (ZYTEL® 8018HS BKB085) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 黑色 20% 玻璃纤维 (RTP 200203FR) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 黑色 33% 玻璃纤维 (ZYTEL® 70G33HS1L BK031) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 黑色 33% 玻璃纤维 (HYLON® Select N1033HL) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 天然 33% 玻璃纤维 (ZYTEL® 70G33 HSIL NC010) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 黑色 40% 矿物强化 (MINLON® 10B40 BK061) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 黑色抗冲改性剂, 橡胶 (ZYTEL® ST-801 BK010) ;尼龙 66 (聚酰胺 66), 天然抗冲改性剂, 橡胶 (ZYTEL® ST-801 NC010) ;聚对苯二甲酸丁二醇酯 (PBT), 黑色 (VALOX® 357-BK1066) ;聚对苯二甲酸丁二醇酯 (PBT), 黑色 (CRASTIN® S610, 与 600F20BK810 相同) ;聚对苯二甲酸丁二醇酯 (PBT), 黑色 (VALOX® 364-BK1066) ;聚对苯二甲酸丁二醇酯 (PBT), 天然 (VALOX® 357-1001) ;聚对苯二甲酸丁二醇酯 (PBT), 黑色 30% 玻璃纤维 (VALOX® 420SEO-BK1066-BG) ;聚对苯二甲酸丁二醇酯 (PBT), 天然 30% 玻璃纤维 (VALOX® 420 SEO Nat 1001) ;聚碳酸酯 (PC), 黑色 (LEXAN® 940-701) ;聚碳酸酯 (PC), 黑色 (MAKROLON® 2405-901510) ;聚碳酸酯 (PC), 透明 (MAKROLON® 2458-550115) ;聚碳酸酯 (PC), 透明 (LEXAN® HP1-112) ;聚碳酸酯 (PC), 红外 (LEXAN® 121 S-80362) ;聚碳酸酯 (PC), 深灰 (RTP 300 399X71833 S-94450) ;聚碳酸酯 (PC), 天然 10% 玻璃纤维 (RTP 300 301) ;聚碳酸酯 (PC), 天然 20% 玻璃纤维 (LEXAN® 3412R-131) ;聚碳酸酯 / 聚对苯二甲酸丁二醇酯 (PC/PBT), 黑色 (XENOY® 6620-BK1066) ;聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET), 黑色 30% 玻璃纤维 (RYNITE® 530-BK503) ;聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET), 黑色 35% 玻璃云母低翘曲 (RYNITE® 935BK505) ;聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET), 黑色 45% 玻璃矿物阻燃剂 (RYNITE® FR945 BK507) ;聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PETG), 透明 (EASTAR® 6763) ;聚丙烯 (PP), 天然 (RTP 抗静电 Permostat 100) ;聚丙烯 (PP) 均聚物, 黑色 (MAXXAM® FR PP 301 BLK1284-11S) ;聚丙

烯 (PP) 均聚物, 天然 (PRO-FAX® 6323) ; 聚丙烯 (PP) 均聚物, 天然 (PRO-FAX® 6523) ; 聚邻苯二甲酰胺 (PPA), 天然 35% 玻璃纤维 (ZYTEL® HTN 51G35HSL) ; 聚苯醚 / 聚苯乙烯 (PPE/PS), 黑色 (NORYL® 731-701) ; 聚苯醚 / 聚苯乙烯 (PPE/PS), 黑色 (NORYL® N300X-701) ; 聚苯醚 / 聚苯乙烯 / 聚酰胺 (PPE/PS/ 尼龙), 黑色 10% 玻璃纤维 (NORYL® GTX GTX810-1710) ; 聚苯硫醚 (PPS), 黑色 40% 玻璃纤维 (RYTON® R-4-02) ; 聚苯硫醚 (PPS), 天然 40% 玻璃纤维 (RYTON® R-4) ; 聚苯砜 (PPSU), 天然透明琥珀 (RADEL® R-5000NT) ; 通用聚苯乙烯 (GPPS), 透明 (STYRON™ 666DW2) ; 高抗冲聚苯乙烯 (HIPS), 天然 (STYRON™ 498) ; 聚砜 (PSU), 天然 (UDEL® P-3703NT 11) ; 丁二烯 (SB), 透明 (K-RESIN® KR01) ; 热塑性弹性体 (TPE), 黑色 (SANTOPRENE® 101-64) ; 热塑性弹性体 (TPE), 黑色 (SANTOPRENE® 101-73) ; 热塑性弹性体 (TPE), 黑色 (SANTOPRENE® 111-35) ; 热塑性弹性体 (TPE), 黑色 (SANTOPRENE® 111-45) ; 热塑性弹性体 (TPE), 黑色 (Santoprene 111-55) ; 热塑性弹性体 (TPE), 黑色 (SANTOPRENE® 111-87) ; 热塑性弹性体 (TPE), 天然 (SANTOPRENE® 211-45) ; 热塑性弹性体 (TPE), 天然 (SANTOPRENE® 211-64) ; 热塑性弹性体 (TPE), 天然 (SANTOPRENE® 251-70W232) ; 热塑性聚氨酯弹性体 (聚酯) (TPU- 聚酯), 天然 (TEXIN® 245) ; 和热塑性聚氨酯弹性体 (聚醚) (TPU- 聚醚), 天然 (TEXIN® 985-000000)。

[0326] 形成装置的顶部的外壳体还可以包括用于排气的开口。外壳体的顶部的一部分可以被定位在指示物条的窄中部的上方, 以利于在迁移经过条之后被分离的血细胞和血浆的界面的目测。外壳体的顶部的另外的部分可以包括被定位在指示物条的宽近端和宽远端上方的近端窗和远端窗, 其提供血液成功迁移经过条的视觉指示。部分可以具有用于察看指示物条以及近端突出部 (lobe) 和远端突出部的释放窗 (relieved window)。可选择地, 部分可以是透明的固体材料, 指示物条以及近端突出部和远端突出部可以通过透明的固体材料被察看。可以被使用的示例性的透明的固体材料是本领域的技术人员已知的并且包括但不限于通用聚苯乙烯 (GPPS), 透明 (STYRON™ 666DW2) ; 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PETG), 透明 (EASTAR® 6763) ; 聚碳酸酯 (PC), 透明 (MAKROLON® 2458-550115) ; 和聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 即丙烯酸类, 透明 (PLEXIGLAS® V052-100)。

[0327] b. 近端底部

[0328] 近端底部产生用于体积毛细管储器的闭合并且提供用于待施用的血液样品的表面。近端底部是实心的薄的刚性材料, 具有外表面和内表面。这样的材料是本领域的技术人员已知的并且包括但不限于苯乙烯、丙烯、丙烯腈甲基丙烯酸酯共聚物 (BAREX®)、聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PETG)、刚性聚氯乙二醇 (聚氯乙烯或 PVC) 和非晶聚对苯二甲酸乙二醇酯 (APET)。材料的厚度的范围可以在约 0.003 英寸至约 0.005、0.007、0.008、0.01、0.015、0.0175 或 0.020 英寸。在一些实施方案中, 厚度是 0.010 英寸。近端底部的外表面提供装置的面向外的实心的基部, 而相对的表面或内表面提供装置的面向内的底部。面向内的底部作为体积毛细管储器的底部并且还可以提供用于待施用的流体样品的表面。在示例性的实施方案中, 待施用的流体样品是血液。近端底部的内表面的流体样品施用区域可以被利于流体的保存、迁移或其他性质的材料包覆 (例如, 当流体是血液时, 近端底部的内表面可以被肝素或其他凝固抑制剂包覆以抑制血液样品的凝固, 和 / 或被诸如聚山梨醇酯 20 (即 Tween-20®) 的缓冲剂包覆以促进血液向体积毛细管储器中迁移)。

[0329] c. 近端壳体

[0330] 近端壳体被结合于近端底部。近端壳体设置毛细管储器的体积并且将流体样品引导至体积毛细管储器的远端出口。近端壳体还含有如对于近端底部描述的薄的刚性材料，并且在如对于近端底部描述的厚度的范围内。在示例性的实施方案中，刚性聚氯乙烯可以被用作该材料，以约 0.020 英寸的厚度。在一些实施方案中材料是对流体例如血液惰性的；示例性的材料包括塑料、玻璃和金属。材料可以以防止流体例如血液横穿其行进并且代替地在条内排他地行进的方式被制备、包覆或覆盖，以利于合适的分离。可以使用本领域的技术人员已知的任何产生疏水性表面的涂层，例如粘合剂。在一些实施方案中，近端壳体的大小和形状与近端底部的大小和形状相似或相同。

[0331] 近端壳体包括以具有约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.55、0.575、0.576、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9 或 1.0 英寸长的中心到中心的泪滴体的形状的洞。在一个实施方案中，泪滴体形状的洞是中心到中心 0.576 英寸长，其中与泪滴体的窄端的位置相比，泪滴体的宽端被定位在近端。可以使用转移胶膜 (adhesive transfer tape)、胶水或本领域的技术人员已知的其他粘合剂将近端壳体附着于近端底部。一旦被附着于近端底部，那么近端壳体中的洞的边缘提供体积毛细管储器的壁并且设置储器的体积。储器的体积可以在约 1 微升至约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 微升或更大的范围内。在一些实施方案中，储器的体积是约 25 至约 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40 微升。

[0332] 毛细管储器可以包括任何允许流体例如血液在其上通过的表面。在一些实施方案中，当流体是血液时，表面是亲水性的，或疏水性的但是具有使其成为亲水性的覆层。毛细管储器还可以用血液可以浸透入的多孔材料来代替，只要孔径大小大至足以防止血细胞 ( $\sim 1\text{--}8 \mu\text{m}$  颗粒尺寸) 在进入分离介质 (指示物条) 之前与血浆分离 (例如具有在直径上  $20 \mu\text{m}$  或更大的孔径大小的多孔材料)。在一些实施方案中，毛细管储器不存在并且流体例如血液被直接地施用于条。

[0333] 储器的泪滴体形状的宽的圆形端部可以用于将流体递送至装置。储器的边缘以及近端覆盖物的盖住体积毛细管储器的部分可以被抑制流体的降解和 / 或促进流体的迁移的物质或溶液包覆。在示例性的实施方案中，当流体是血液时，覆层可以是肝素和 / 或缓冲剂例如聚山梨酸酯 20 (即 Tween-20<sup>®</sup>) 溶液，以抑制血液的凝固并且促进血液向体积毛细管储器中迁移。

[0334] d. 近端覆盖物

[0335] 近端覆盖物被结合于近端壳体。近端覆盖物盖住体积毛细管储器并且提供远端出口孔。远端出口被控制尺寸和定位为促进向竖直导管中毛细管芯吸。近端覆盖物含有本领域的技术人员已知的并且如关于近端底部和近端壳体描述的薄的刚性材料。这样的材料可以包括苯乙烯、丙烯、丙烯腈甲基丙烯酸酯共聚物 (BAREX<sup>®</sup>)、聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PETG)、刚性聚氯乙二醇 (聚氯乙烯或 PVC) 和非晶聚对苯二甲酸乙二醇酯 (APET)。在一些实施方案中，材料是刚性聚氯乙烯。

[0336] 近端覆盖物的厚度的范围可以在约 0.003 英寸至约 0.005、0.007、0.008、0.01、0.015、0.0175 或 0.020 英寸。在一些实施方案中，厚度是 0.010 英寸。在其他实施方案中，近端覆盖物的大小和形状可以与近端壳体的大小和形状相似或近似相同。近端覆盖物含有两个洞；第一洞是圆形的，以直径上约 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 或 1.0 英寸的形

状，并且相对于第二洞被定位在近端。在一些实施方案中，第二洞小于第一（近端）洞；在一个实施方案中，其在直径上小于约 0.2 英寸并且在直径上是约 0.1、0.125、0.15、0.175、0.18 或 0.19 英寸。近端覆盖物使用转移胶膜、胶水或本领域的技术人员已知的其他粘合剂被附着于近端壳体，使得较大的近端圆洞被定位在由近端壳体形成的储器的泪滴体形状的宽的圆形端部上。在一些实施方案中，近端覆盖物的盖住体积毛细管储器的部分以及储器的边缘可以被抑制流体的降解和 / 或促进流体向体积毛细管储器中迁移的物质或溶液包覆。在示例性的实施方案中，流体是血液，并且覆层可以是肝素和 / 或缓冲剂例如聚山梨酸酯 20（即 Tween-20<sup>®</sup>）溶液，以抑制血液的凝固并且促进血液向体积毛细管储器中迁移。

[0337] 一旦被附着，近端覆盖物就盖住体积毛细管储器，留出用于血液样品递送储器的圆形开口。在近端覆盖物中的较小的远端圆洞提供体积毛细管储器的远端出口孔。远端出口孔被控制尺寸和定位为促进血液向竖直导管中毛细管芯吸。

[0338] e. 竖直导管

[0339] 在装置的一个示例性的实施方案中的竖直导管是聚乙烯干共混表面活性剂 (DBS) 过滤器。在待分析的流体是全血的实施方案中，竖直导管可以是能够以竖直取向将细胞从流体（即血浆或血清）分离（如果这样的分离是期望的的话）的材料，例如玻璃纤维过滤器（例如 Millipore AP25）。可以被使用的一种特定聚乙烯过滤器是 Porex x4897 聚乙烯干共混表面活性剂 (DBS) 圆盘（3/16 英寸直径），可以使用以下的规格：15–45  $\mu\text{m}$  孔径大小；1/16 英寸厚度（Porex, Fairburn, Georgia, 美国）。半圆形的或新月形的形状用于使在竖直导管的远端边缘上的任何点距指示物条的分辨区域的近端边缘的距离是一致的。这促进流体前沿在指示物条的分辨区域处汇合。

[0340] 竖直导管可以是玻璃纤维过滤器或任何具有合适的密度（例如以约 2–3  $\mu\text{m}$  孔径大小）的不会使分析物和 / 或其他流体组分降解（例如，如果分析物是细胞，那么材料不应当或应当最小地引起细胞溶解）的材料。示例性的材料包括玻璃、由包覆纤维素制成的纸、棉和合成纤维、或本领域的技术人员已知的各种纤维（材料）的共混物。玻璃是普遍的，因为其特别地诱导最小的细胞溶解。

[0341] 在一些实施方案中，竖直导管具有半圆形（新月形的）形状，这可以用于使在竖直的垫的远端边缘上的任何点距指示物条的分辨区域的近端边缘的距离一致。这促进流体前沿在指示物条的分辨区域处汇合。在其他实施方案中，过滤器的适合于该目的的形状可以包括但不限于半圆形、矩形、三角形和本领域技术人员已知的其他几何形状。通常，较好的分离通过较宽的而不是较长的竖直导管来实现。

[0342] 在一些实施方案中，导管不需要是独特的材料；而是，壳体可以被蚀刻以产生流体经过其行进的通道。不被任何理论束缚，被蚀刻的通道内的毛细力可以诱导流体例如血液在通道内迁移。通道的尺寸可以根据经验基于待在关心的颗粒分析物和流体的剩余组分之间实现的差异分离来设计。在一些实施方案中，通道的表面可以以防止流体例如血液横穿其行进并且代替地在条内排他地行进的方式被制备、包覆或覆盖，以利于合适的分离。可以使用本领域的技术人员已知的任何产生疏水性表面的涂层，例如粘合剂。

[0343] f. 指示物壳体

[0344] 指示物壳体被结合于近端覆盖物以及提供围绕分离组分的最小内部体积。这防止湿度和其他环境变量影响装置中的流体迁移特性。指示物壳体由本领域的技术人员已知

的薄的刚性材料制成并且包括但不限于苯乙烯、丙烯、丙烯腈甲基丙烯酸酯共聚物 (BAREX®)、聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PETG)、刚性聚氯乙二醇 (聚氯乙烯或 PVC) 和非晶聚对苯二甲酸乙二醇酯 (APET)。在一些实施方案中, 使用刚性聚氯乙烯。材料的厚度的范围可以在约 0.038 英寸至约 0.042 英寸; 在一些实施方案中, 厚度是 0.040 英寸。指示物壳体的大小和形状与近端覆盖物的大小和形状相似或相同。

[0345] 指示物壳体具有两个洞; 一个洞是圆形的, 以在直径上约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 或 1.0 英寸的形状, 并且相对于第二洞被定位在近端。第二洞具有与指示物条的形状相似或相同的形状 (具有线性部分的任何形状)。在示例性的实施方案中, 指示物壳体具有约 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45 或 0.5 英寸宽和 3、3.5、4、4.5 或 5 英寸长的窄矩形中部以及约 0.5 英寸至 1.0 英寸直径宽的圆形端部。

[0346] 指示物壳体被附着于近端覆盖物 (使用转移胶膜、胶水或本领域的技术人员已知的其他粘合剂), 使得壳体中的圆形的近端洞被直接地定位在近端覆盖物中的圆形的近端洞上方。在以这种方式定位指示物壳体时, 竖直导管被定位在第二 (哑铃或其他的具有在窄中部的侧面的宽端部的形状) 洞的近端宽圆形端部中并且垂直于第二洞的近端宽圆形端部的平面。指示物壳体提供围绕分离组分的最小内部容积。这防止湿度和其他环境变量影响装置中的流体迁移特性。

[0347] 指示物壳体的可选择的实施方案

[0348] 在一个实施方案中, 指示物壳体可以被设计为将指示物条压缩在两层粘合剂 (转移胶膜, 例如 3M 的 467MP 2.3mil s 转移胶膜、胶水或本领域的技术人员已知的其他粘合剂) 包覆的刚性材料之间。刚性材料的类型包括但不限于苯乙烯、丙烯、丙烯腈甲基丙烯酸酯共聚物 (BAREX®)、聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PETG)、刚性聚氯乙二醇 (聚氯乙烯或 PVC) 和非晶聚对苯二甲酸乙二醇酯 (APET)。在一个实施方案中, 材料是刚性聚氯乙烯。厚度的范围可以在约 0.1 至约 0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24 或 0.25 英寸。在一个实施方案中, 厚度是约 0.019 英寸至约 0.021 英寸。在另一个实施方案中, 材料是刚性聚氯乙烯并且厚度是 0.020 英寸。压缩可以最小化指示物条材料的厚度的变化性, 由此控制流体例如血液的体积摄入。指示物壳体的大小和形状与近端覆盖物的大小和形状相同。

[0349] 在一个实施方案中, 在指示物壳体中具有两个开口; 第一个是在直径上约 0.5 英寸的圆形开口。第二开口相对于第一开口被定位在远端, 并且以具有 0.25 英寸宽和 0.75 英寸长的窄矩形的中部和 0.5 英寸直径宽的圆形端部的哑铃的形状。在这种示例中, 具有哑铃形状开口的指示物壳体被限制为等于或略微地小于指示物条的标称厚度的厚度, 由此将指示物条压缩至界定的厚度。在一个实施方案中, 该厚度是约 0.012 英寸。哑铃的近端向下开放, 朝向近端洞, 以向竖直导管提供连续的空间, 同时保持竖直导管和指示物条之间的面对面接触。从哑铃形状的开口的近端向下下降的竖直的轴在形状上是半圆形的至全圆形的, 具有与上文的哑铃共享的近端表面。在一个实施方案中, 该开口以 0.35 英寸长略微地大于半月形。相较于其他示例, 指示物壳体使用 3M 的 467MP 2.3mil s 或其他转移胶膜、胶水或本领域的技术人员已知的其他粘合剂被附着于近端覆盖物, 使得覆盖物中的圆形的近端洞被直接地定位在指示物壳体中的圆形的近端洞上。

[0350] g. 指示物条

[0351] 指示物条是由三种分离的但是重叠的材料制成的横向流动多孔膜。具体地,从指示物条的近端向远端,使用以下三种材料:Ahlstrom 8975(具有355-508  $\mu\text{m}$  的厚度和19  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  的吸水率的具有PVA结合(聚乙烯醇)的硼硅酸盐玻璃纤维;Ahlstrom, Helsinki, 芬兰),嵌段Pall Vivid 170聚酯支持的硝酸纤维素(180  $\mu\text{m}$  厚,对水的150-225秒/4cm毛细管速度和45-59  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  蛋白质(BSA)结合容量;Pall Corporation, Port Washington, 纽约州),以及Whatman LF1(保留大于2  $\mu\text{m}$  的颗粒的247  $\mu\text{m}$  厚的被PVA处理的玻璃纤维纸;Whatman, New Jersey, 美国)。条在形状上是矩形的,遵循指示物壳体的第二洞的形状。条的宽度是2mm,并且条的总长度是78mm,如下地从近端向远端(具有总共4mm重叠):Ahlstrom 8975(20mm长度)、Pall Vivid 170(15mm长度)和Whatman LF1(47mm长度)。为了构建条,将部件对着标准的横向流动背衬(在一个侧上具有粘合剂覆层的PVC片)组装。首先,Vivid 170过滤器被在PBS中的1mg/ml中性抗生物素蛋白在室温堵塞1小时,然后在PBS中洗涤两次,每次5分钟,使用水漂洗两次并且允许在工作台上干燥过夜。过滤器被中性抗生物素蛋白包覆,以将随样品流体行进经过指示物条的生物素-中性抗生物素蛋白的任何聚集的颗粒将在条中停止的点集中,以在条中产生允许更少的流体经过的更紧的堵塞。不具有在溶液中的中性抗生物素蛋白分析物的流体样品不显示出沿着被中性抗生物素蛋白包覆的条的可见地停止的颗粒。部件被排布,使Vivid 170首先压在背衬上(使其自身的背衬与装置背衬接触)。然后Ahlstrom 8975和LF1被排布,具有在Vivid 170条的每个端部上的2mm的重叠。Ahlstrom 8975过滤器被允许悬垂在粘合性背衬上5毫米处。

[0352] 通过使用3M的467MP 2.3mil.转移胶膜,指示物条被附着于远端顶部的底部表面,如本文描述的远端顶部还与其外顶部表面形成装置的顶部。因此,条被压至装置的顶壁的下侧,使得条被夹在装置的顶壁和背衬之间。在指示物条和指示物条的背衬被附着于远端顶部的底部表面时,使用3M的467MP 2.3mil转移胶膜将远端顶部附着于指示物壳体,使得指示物条被定位在指示物壳体的第二洞(即矩形的切口)内,由此产生容纳指示物条的密封的内部容积。因此,指示物条被容纳在这样的空间中,其中由近端覆盖物提供的空间的底部或地板作为条的基部,指示物壳体中的矩形的洞提供围绕条的空间的壁,并且远端顶部的底部表面提供空间的顶壁。指示物条的Ahlstrom 8975过滤器的悬垂部的最近端位于竖直导管的被附着在近端覆盖物上的顶部上方并且与该顶部接触。可选择的远端垫可以被包括在指示物条的远端处,以在流体的毛细管流动未在指示物条中被停止的情况下,提供用于收集过量的样品流体的下沉部。如果分析物(例如中性抗生物素蛋白)在样品流体中以足够的浓度存在,那么将在流体经过介质的迁移之前被加入样品中的流动调节剂(例如LPA生物素)与分析物(例如中性抗生物素蛋白)结合,以形成交联网络,在交联网络中胶乳珠(其也可以在经过条的迁移之前被加入样品中)被截留,由此堵塞条的孔并且使样品的流动停止。过滤器中的流动的堵塞的量与样品中的分析物的量成正比。因此,如果流体前沿在样品流体加入之后的指定的量的时间内没有运动经过条中的指定的位置,那么这指示样品流体中的具体的分析物的浓度高于阈值。

[0353] 在装置的一些实施方案中,通过将干燥的溴酚蓝(BPB)以10mg/ml[重量比体积(w/v)]溶解入95%乙醇中制备的溶液可以被施用至指示物条的远端垫(或远端)的中心部上并且被允许干燥5分钟。蓝色提供对流体迁移至指示物条的远端垫的目测指示物,指

示条的饱和。

[0354] h. 远端顶部

[0355] 远端顶部印刷有指示装置的功能的图。图代表与已经在指示物条中迁移的分析物相关联的关心的参数的测量范围。在示例性的实施方案中,图代表 INR( 指示血液凝结时间 )。范围基于装置的校准来确定,装置的校准在下文描述。

[0356] 远端顶部由薄的刚性的透明材料制成,薄的刚性的透明材料例如但不限于苯乙烯、丙烯、丙烯腈甲基丙烯酸酯共聚物 (BAREX®)、聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PETG)、刚性聚氯乙二醇 (聚氯乙烯或 PVC) 和非晶聚对苯二甲酸乙二醇酯 (APET)。材料的厚度的范围可以在约 0.003 英寸至约 0.005、0.007、0.008、0.01、0.015、0.0175 或 0.020 英寸;在一个实施方案中,厚度是 0.010 英寸。远端顶部还包括在指示物壳体的远端处的在直径上约 0.005、0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045 或 0.05 英寸的空气逃逸开口,允许被位移的空气在血液被拉动入装置中时逃逸。在一个实施方案中,空气逃逸开口的直径在直径上是约 0.020 英寸。

[0357] 远端顶部的一个表面形成装置的面向外部的顶部。指示物条被附着 ( 使用转移胶膜或本领域的技术人员已知的其他粘合剂 ) 于远端顶部的相对的表面或底部表面,使得指示物条的窄矩形的部分与远端顶部的窄矩形的透明的部分对准,并且近端窗和远端窗分别与指示物条的宽近端和宽远端对准。窗利于目视观察达到指示物条的近端的足够的血液样品的存在以及血浆经过条到达饱和点的成功的迁移。因此形成的远端顶部 / 指示物条元件被附着 ( 使用转移胶膜或本领域的技术人员已知的其他粘合剂 ) 于指示物壳体的顶部表面,使得指示物条被定位在指示物壳体的第二洞内,由此产生容纳指示物条的密封的内部容积。

[0358] 分流装置

[0359] 分流装置在设计上将与上文描述的停流装置相似,在以下方面不同:(1) 样品将在线性指示物条的中心部处被引入,(2) 近端壳体中的容纳竖直垫并且允许样品引入的洞被定向为垂直于线性指示物条,与指示物条的列相反,(3) 竖直导管是矩形的,与圆形的或半圆形的相反。这样的装置在实施例 2 中描述。在其他实施方案中,流体路径可以从单一的点放射状地分支,代替在直径上相反的方向,或它们可以被施用以遵循平行的路径。

[0360] 拱形流动装置

[0361] 实施例 3 描述示例性的汇合路径装置的组装,汇合路径装置可以用于基于流体在被改性的和未被改性的路径中的迁移距离的比较 ( 并且因此间接地,流速的比较 ) 来定性或定量分析样品流体的组分。使用如本文描述的部件和规格组装装置。示例性的装置的外壳体是在装置的底部上是实心的并且具有在装置的顶部上用于将流体样品施用入近端井中的孔的刚性材料。在示例性的实施方案中,被组装的装置在形状上是矩形的,具有圆形的近端和远端。七个分离的物理元件以分层的方式被附着以产生被组装的装置,被组装的装置然后可以被组装入外壳体中。如此组装的元件如下地在装置内产生流体路径 : 用于接收流体样品的近端井与体积毛细管储器流体连通,以将样品通过远端出口孔转移至竖直导管的下侧,并且在竖直导管的顶部和被称为指示物刻度盘的多孔介质的环的近端部分之间有接触点。在装置的特定的实施方案中,多孔介质的环是椭圆形的 ( 例如蛋形的 ) 或以跑道的形状 ( 即具有两个平行的直线段,其在每个端部与圆形的半圆接合 )。在装置的其他实施

方案中,指示物刻度盘被线性的矩形的指示物条代替。

[0362] 线性流动和圆形(“拱形”)流体流动之间的关系

[0363] 使用线性横向流动实验预测拱形流结果

[0364] 将从线性条获得的数据转换为用于圆形条的假设的结果是简单的事情。假设,液体前沿随时间的沿着线性条的位置相应于沿着圆形条中的臂的位置。在圆形条的两个臂(被处理的和未被处理的)之间的假设的汇合点通过以下来得到:在相同的图上将沿着被处理的线性条情况下的前沿位置对时间作图并且将沿着未被处理的线性条情况下的条的周长减去了前沿位置对时间作图。这两条曲线的汇合点获得沿着被处理的臂的前沿汇合的预期的位置以及这种汇合发生的预期的时间。这在实施例6中阐释。

[0365] 示例性的装置

[0366] 现在描述用于分析血液样品中的流体变量的示例性的装置和方法。方法包括将被施用的血液暴露于凝结引发因子(clotting initiating factor)例如 $\text{Ca}^{2+}$ ,然后将被施用的血液集中至将流体的停止与被削弱的凝结相互关联的有刻度的指示物条上的过程。装置包括沿着测试条的指示物,其向用户指示血液已经迁移测试条的整个距离,由此提供测试是成功的指示。此外,装置包括沿着测试条的另一个部分的指示物,以向用户指示何时足够的血液已经被加入。

[0367] 图4示出了装置105的示例性的实施方案的俯视图。装置包括被配置为接收血液样品的井110。一个或多个指示物窗被定位在装置上,以向用户提供有关的信息。例如,第一指示物窗115提供关于何时足够量的血液已经被施用于装置的指示。第二指示物窗120提供关于装置是否已经正确地运行的指示。指示物窗可以被配置为显示预定的颜色(例如红色或蓝色)或其他的代表某个标准已经被满足的指示。刻度尺125被定位在装置的前部上,以指示INR值或凝固时间。被图示的装置的实施方案通常具有被配置为由用户把持的长形的形状(从近端130至远端135)。应认识到,装置的形状和尺寸可以变化。

[0368] 一个或多个标记物可以被设置在装置上以向用户提供多种信息中的任一种。例如,毗邻井110的标记物110包括诸如“在此施用血液”的语言,以向用户指示血液应当被施用于井110。多种其他标记物中的任一种可以被设置在装置上。

[0369] 图5示出了顶部覆盖物被除去的装置105的俯视图。图6示出了装置105的侧视横截面图。井110(被配置为接收血液)形成在装置的顶部中的开口并且向下朝向装置的底部延伸。如图6中所示的,井110的底部端部与从井110朝向装置的远端135延伸的毛细管储器205连通。如图5中所示的,毛细管储器在尺寸上以远端方向从井逐渐变细。

[0370] 毛细管储器205与竖直导管210连通,竖直导管210提供用于流体从毛细管储器205朝向被至少部分地定位在毛细管储器上方的长形的指示物条215的流动的路径。指示物条215可以是玻璃纤维滤纸。指示物条215沿着装置的长度向远端延伸并且在过量体积储器220处终止,过量体积储器220被配置为接收和收集过量体积的流体,如下文更完全地描述的。应明白,图6不被按比例绘制。在一个实施方案中,指示物条是不含染料的。为了阐明的清晰性,各种部件的深度和相对的尺寸可以被放大。

[0371] 装置105可以由各种被组装以共同地形成装置的部件形成。图7示出了形成装置105的示例性的一套分层部件的分解图。应明白,部件的配置可以变化并且不限于图7所示的内容。顶部覆盖物405形成装置的顶部层。指示物条215被定位为紧邻地在顶部覆盖物

405 的下方并且毗邻顶部覆盖物 405，使得指示物条 215 被附着于顶部覆盖物 405 的下侧。中间层 410 被定位在顶部覆盖物 405 下方并且包括切口 412，切口 412 包括围绕装置的分离器部件的指示物壳体。竖直导管 210 被控制大小和形状以被至少部分地定位在切口 412 内。竖直导管 210 被附着于层 415 的顶部，使得其向上延伸经过切口 412 并且与指示物条 215 连通。另外的中间层 420 被定位在层 415 下方和底部层 425 上方，底部层 425 形成装置的基部。层可以包括彼此对准以形成装置 105 的储器和 / 或通路的各种另外的切口，例如，诸如毛细管储器 205、井 110 和过量体积储器 220。

[0372] 图 8 示出了使在装置 105 中能够血液流动的示例性部件。部件具有被配置为分辨流体前沿在可测量的距离内的流速或迁移的变化的形状。竖直分离器 210 被定位在部件的一个端部处。在一个实施方案中，竖直导管是新月形的。毛细管储器形成在竖直导管 210 和指示物条 215 的第一端（近端）之间的路径。指示物条 215 的相对的第二端（远端）与过量体积储器 220 连通。

[0373] 现在描述示例性的使用装置的方法。将血液的样品通过在装置的顶部上的开口放置入井 110 中。血液样品施用区域可以被肝素包覆以抑制血液凝固，以及被温和的溶液 (mild solution)（例如 Tween-20<sup>®</sup>溶液）包覆以促进血液向体积毛细管储器 205 中迁移。血液经过井（例如通过附着性质）进入毛细管储器 205，如由图 6 中的箭头 X 和 Y 代表的。毛细管储器 205 的边缘（或装置的任何其他部分）可以被肝素包覆以抑制血液凝固，以及被温和的溶液（例如 Tween-20<sup>®</sup>溶液）包覆以促进血液向体积毛细管储器的远端出口迁移。

[0374] 血液从毛细管储器 205 流动至竖直分离器 210 的下侧，在此处血液被向上（例如通过毛细管性质和总体流动性质）朝向指示物条 215 拉动并且被拉动至指示物条 215 上。竖直导管 210 可以被定位和附着在控制血液流动的远端出口孔上，使得血液可以仅通过指示物条的毛细管作用进入装置的指示物区域并且因此不能够围绕指示物条流动并且避免在指示物条内被合适地分辨。通过竖直的分离部件的血液迁移具有一些固有的变化性。横向指示物条 215 的宽的近端缓和血液经过纸的不均匀流动，允许沿着竖直分离器 210 的远端面的血液前沿一致。

[0375] 血液沿指示物条 215 在近端向远端方向迁移，如由图 6 中的箭头 Z 表示的。沿着指示物条的血液流动提供基于凝固速率的可以被作为凝固时间或 INR 值可视地测量和读取（刻度尺 125）的分辨率。干的溴酚蓝可以存在指示物条的远端区域上。粉末染料在与包括血浆的液体接触时变为可见的蓝色。蓝色颜色提供血液已经成功地迁移至指示物条的远端垫的容易的指示物，指示成功的运行。在一个实施方案中，蓝色颜色可以通过窗 120 被观察到（图 4）。装置可以包括允许被位移的空气在血液被拉动入装置中时逃逸的空气逃逸开口。

[0376] 在另一个实施方案中，装置的壳体被配置为使得指示物条 215 在被定位在壳体内侧时被压缩。在这方面，指示物条 215 可以被定位在一对压缩指示物条 215 的层例如被粘合剂包覆的刚性材料之间。在一个实施方案中，粘合剂层是 467MP 2.3mils 转移胶膜（例如由 3M 制造的），并且刚性材料是诸如苯乙烯、丙烯、Barex、PETG、聚氯乙烯和 APET 的材料。在一个实施方案中，厚度的范围可以在 0.019 英寸至 .021 英寸，虽然厚度可以变化。在一个实施方案中，厚度是 0.020 英寸。压缩的功能是最小化指示物条材料的厚度的变化性，由

此控制流体例如血液的体积摄入。

[0377] 装置的配置可以适合于如下的被压缩的指示物条。再次参照图 7, 在层 410 中具有两个开口。第一个是圆形开口 413, 其可以例如在直径上是 0.5 英寸。第二开口(切口 412)相对于第一开口 413 被定位在远端, 并且以具有窄矩形的中部(例如在 0.25 英寸宽和 0.75 英寸长的范围内)和宽的圆形端部(例如具有约 0.5 英寸的直径)的哑铃的形状。在本实施方案中独特的是, 具有哑铃形状切口 412 的指示物壳体(即层 410)被限制为等于或略微地小于指示物条 215 的标称厚度(例如可以是约 0.012 英寸厚)的厚度, 并且被夹在顶部覆盖物 405 和层 415 之间, 由此将指示物条 215 压缩至界定的厚度。哑铃形状的切口 412 的近端向下朝向近端洞 413 开放, 以向层 415 和 420 中的竖直分离器 210 提供连续的空间, 同时保持竖直分离器 210 和指示物条 215 之间的面对面接触。通过竖直分离器 210 从哑铃形状的切口 412 的近端向下下降的竖直的轴在形状上是半圆形的至全圆形的, 具有与哑铃形状的切口 412 共享的近端表面。在一个实施方案中, 该开口以 0.35 英寸长, 略微地大于新月形或半月形。层 410(即指示物壳体)还起作用以提供围绕分离组分的最小内部空气空间, 由此最小化湿度和其他环境变量对装置中的血液迁移特性的影响。

[0378] 图 9A 示出了装置的另一个示例性的实施方案的俯视图, 其使用参考数字 905 来指代。本实施方案相似于图 4 的实施方案。在图 4 的实施方案和图 9A 的实施方案之间相同的参考数字指代相同的结构。装置包括被配置为接收血液的样品的井 110。一个或多个指示物窗被定位在装置上, 以向用户提供有关的信息。例如, 第一指示物窗 115 提供关于何时足够的量的血液已经被施用于装置的指示。第二指示物窗 920 提供关于装置是否已经正确地运行的指示。在本实施方案中, 第二指示物窗 920 具有曲线形状。例如, 图 9A 的实施方案具有拱形或半圆形的形状。其他的闭合回路形状, 例如卵形、具有弯曲的端部的矩形(“跑道”)、圆形、半圆形、椭圆形等等。

[0379] 在一些实施方案中, 指示物窗可以被配置为显示预确定的颜色(例如红色或蓝色)或其他的用于察看两个流体前沿的汇合点的指示。刻度尺 925 位于装置的前部上, 以指示值, 例如 INR 值或凝固时间。刻度尺具有符合或补充指示物窗 905 的形状的形状。被图示的装置的实施方案通常具有被配置为由用户把持的长形的形状(从近端 130 至远端 135)。应认识到, 装置的形状和尺寸可以变化。

[0380] 图 10 示出了顶部覆盖物被除去的装置 905 的俯视图。图 11 示出了装置 905 的侧视横截面图。井 110(被配置为接收血液)形成在装置的顶部中的开口并且向下朝向装置的底部延伸。如图 11 中所示的, 井 110 的底部端部与从井 110 朝向装置的远端 135 延伸的毛细管储器 205 连通。

[0381] 毛细管储器 205 与竖直导管 210 连通, 竖直导管 210 提供用于流体从毛细管储器 205 朝向被至少部分地定位在毛细管储器上方的长形的指示物刻度盘 1015 的流动的路径。指示物刻度盘 1015 可以是玻璃纤维滤纸。指示物刻度盘 1015 具有符合或补充尺 925 和指示物窗 920 的形状的卵形、圆形、椭圆形、“跑道”等等形状。

[0382] 在一个实施方案中, 指示物刻度盘 1015 由薄的玻璃纤维横向血液分离材料制成。指示物刻度盘 1015 以拱形或圆形的方式沿着装置的长度向远端延伸, 并且在沿着指示物刻度盘流动的流体在地点 1013 处汇合的地点 1020 处终止。在地点 1020 处, 达到纸的饱和并且不能发生进一步的流体迁移。为了阐明的清晰性, 各种部件的深度和相对的尺寸可以

被放大。

[0383] 装置 905 可以由各种被组装以共同地形成装置的部件形成。图 12 示出了形成装置 105 的示例性的一套分层部件的分解图。应明白，部件的配置可以变化并且不限于图 12 所示的内容。顶部覆盖物 405 形成装置的顶部层。指示物刻度盘 1015 被定位为紧邻地在顶部覆盖物 405 的下方并且毗邻顶部覆盖物 405，使得指示物刻度盘 1015 被附着于顶部覆盖物 405 的下侧。中间层 410 被定位在顶部覆盖物 405 下方并且包括切口 412，切口 412 包括围绕装置的分离器部件的指示物壳体。中间层 410 还包括指示物刻度盘 1015 的切口 413。竖直导管 210 被控制大小和形状以被至少部分地定位在切口 412 内。竖直导管 210 被附着于层 415 的顶部，使得其向上延伸经过切口 412 并且与指示物刻度盘 1015 连通。另外的中间层 420 被定位在层 415 下方和底部层 425 上方，底部层 425 形成装置的基部。层可以包括彼此对准以形成装置 105 的储器和 / 或通路的各种另外的切口，例如，诸如毛细管储器 205、井 110 和过量体积储器 220。

[0384] 图 13 描绘了共同地提供用于样品流体迁移的路径并且形成指示物刻度盘 1015 的部件。指示物刻度盘 1015 具有圆形的形状并且被耦合于竖直导管 210。样品的某种预处理可以在竖直导管中发生。样品流体从竖直导管 210 的下侧向上朝向指示物刻度盘 1015 的近端迁移并且迁移至指示物刻度盘 1015 的近端上。样品流体从近端 1305 围绕指示物刻度盘 1015 的两个侧流动。指示物刻度盘 1015 的一侧可以用响应于分析物的浓度改变流速的剂来处理。装置 905 的顶部具有确定流体前沿汇合的沿着指示物刻度盘 1015 的周长的位置的刻度（由尺 925 代表，图 9A），从而指示样品中的分析物浓度或其他的流体变量。

[0385] 图 1A、图 1B、图 2 和图 3 示出了对于经过 Fusion-5 分离纸 (Whatman) 的 0.25" 宽条的水的竖直流动收集的数据的表示。条被容纳在塑料壳体中。在时间零点，条的底部 1mm 被浸没在含有蓝色染料的水中。以周期性的间隔，液体前沿的位置被在壳体上标记，并且然后用卡尺测量。前沿的速度（以 cm/s 计）通过对位置数据的中心差分技术来确定。将速度对  $1/x$  作图，如图 15 中所示的（前四个时间点被省去，因为它们遭受易变性）。线被拟合于该数据，并且  $kd$  和  $kr$ （方程 7b）从斜率和截距获得。然后这些值用于使用四级 Runge-Kutta 法来积分方程 7a。然后将来自该模型的值在图 15 中作为实线作图。

#### [0386] E. 用于测量凝结的方法和装置

[0387] 凝结时间的测量是使用粘度监测样品的状态的一个实例。本文提供可以用于测量个人或样品中的凝结的装置。凝结被定义为血液形成凝块的过程。凝结是止血（从受损的血管失血的停止）的重要的部分，其中受损的血管壁被含有血小板和纤维蛋白的凝块覆盖，以停止流血并且开始修复受损的血管。凝结障碍可以导致流血（失血；不足的凝结）或凝块（血栓形成；过多的凝结）的增加的风险。因此，本文提供的装置可以用于通过测量样品中凝结活性的程度来检测和 / 或监测凝结异常。

#### [0388] 1. 凝结过程和因子

[0389] 凝结过程涉及最终导致污点凝块的形成的一系列相关的信号事件。需要血液的有效的凝结，以防止在损伤的部位处的过度失血。血管的破裂或损伤高度地暴露主要由纤维胶原组成的形成血栓的内皮下结缔组织，其结合和活化血小板并且刺激在损伤部位处的血小板聚集。被活化的血小板分泌刺激另外的血小板活化的因子以及其他分子，例如血清素、磷脂和脂蛋白，这些是凝固过程的重要的媒介物。纤维蛋白原是血浆的组分，也结合血小板

并且辅助被活化的血小板的聚从。被活化的血小板进而经历细胞形状的变化,以形成松弛的血小板栓子。肽酶的凝固级联被同时引发,产生活化分子,例如进一步活化血小板的凝血酶(来自凝血酶原的分裂)以及形成围绕血小板栓子以稳定凝块的交联聚合物的纤维蛋白(来自纤维蛋白原的分裂)。在凝块形成期间,凝血因子抑制剂也通过血液循环,以防止在损伤部位之外的凝块形成。凝结的具体的过程以及所涉及的因子在下文进一步详细地介绍。

[0390] 在正常条件下,血管内皮抵抗凝块形成。这种阻力由增强血管舒张、抑制血小板附着和活化、抑制凝结和促进纤维蛋白分裂的机制支持。血管内皮细胞分泌诸如一氧化二氮(NO)和前列腺环素的分子,这些分子抑制血小板聚集并且扩张血管。这些分子的释放活化可溶解的鸟苷酸环化酶(sGC)和依赖于cGMP的蛋白激酶I(cGKI)并且提高环磷酸鸟苷(cGMP)水平,这导致血管壁中的平滑肌的松弛。此外,内皮细胞表达细胞表面ADPase例如CD39,细胞表面ADPase通过将从血小板释放的ADP转化为腺嘌呤核苷酸血小板抑制剂来控制血小板活化和聚集。被在血管内皮细胞的表面上表达的其他膜蛋白包括作为抗凝血酶III的辅因子起作用的硫酸肝素蛋白多糖,抗凝血酶III抑制凝血酶和其他凝血因子。此外,血管内皮细胞分泌纤溶酶原以促进纤维蛋白溶解,这溶化和清除凝块。

[0391] 在血管损伤时,受损的血管壁将内皮下结缔组织暴露于正在循环的血液。与正常的内皮细胞相反,这种组织是极端地形成血栓的。层主要由诸如血管性血友病因子(vWF)和纤维胶原的蛋白质组成,蛋白质经由在血小板的表面上被表达的糖蛋白受体结合于正在循环的血小板。血小板糖蛋白受体复合物 GPIb-V-IX 结合 vWF,由此 vWF 可以将血小板桥联至胶原纤维。vWF 是多聚体糖蛋白,这有助于它的聚集血小板的能力。vWF 还用来稳定凝血因子,例如因子 VIII,并且促进它们在血流中的生存。此外,血小板整联蛋白受体  $\alpha_2\beta_1$  和 GPVI 可以直接地结合于胶原。胶原向  $\alpha_2\beta_1$  的结合可以利于向较低亲合力的 GPVI 受体的结合。与  $\alpha_2\beta_1$  和 GPVI 的胶原相互作用导致向损伤的部位的血小板附着并且还通过细胞内的信号级联的活化而促进血小板活化。

[0392] 在凝块形成期间,增强凝块的成熟的正反馈环路被活化。在血小板活化之后,血小板表面整联蛋白  $\alpha_{IIb}\beta_3$  的表达被刺激,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  可以结合于 vWF 和纤维蛋白原。GPIb-V-IX 与 vWF 的结合可以增强  $\alpha_{IIb}\beta_3$  对 vWF 的亲合力,以促进血小板附着。此外,一个纤维蛋白原分子可以结合于来自不同的细胞的多个  $\alpha_{IIb}\beta_3$  整联蛋白分子,从而增强血小板聚集。

[0393] 血小板活化刺激血小板  $\alpha$  和致密颗粒的释放。颗粒的被释放的内容物包括进一步有助于聚集和血小板活化的因子,例如 vWF 和 ADP。ADP 帮助刺激允许纤维蛋白原结合于  $\alpha_{IIb}\beta_3$  的血小板膜的改性,并且 vWF 有助于附着和聚集,如上文讨论的。

[0394] 除 ADP 之外,被活化的血小板还分泌诸如血清素和凝血烷 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)的也主动地调节血小板活化的因子。响应于凝血酶结合被活化的信号转导级联控制这些因子的释放。在血小板活化期间,凝血酶结合于血小板的表面上的与 G 蛋白耦合的受体。受体成为被刺激的,并且被活化的 G 蛋白活化磷脂酶 C-γ 2(PLC γ 2),磷脂酶 C-γ 2(PLC γ 2)水解磷脂酰肌醇 4,5- 二磷酸(PIP<sub>2</sub>)以生成三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>)和二酰甘油(DAG)。IP<sub>3</sub>通过结合于 IP3 受体来刺激来自内质网的细胞内钙(Ca<sup>2+</sup>)储存的释放。与结合于血小板的胶原组合的被释放的钙导致磷脂酶 A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)的活化。然后 PLA<sub>2</sub> 水解膜磷脂,例如磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰乙醇胺(PE),以生成花生四烯酸,花生四烯酸进而刺激 TXA<sub>2</sub> 的生成和释放。

[0395] 通过被活化的血小板生成 DAG 刺激蛋白激酶 C, 蛋白激酶 C 然后磷酸化血小板特异的 47kDa 蛋白质 (p47)。被磷酸化的 p47 蛋白质诱导血小板颗粒的释放, 如上文讨论的。细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  释放还活化肌球蛋白 - 轻链激酶 (MLCK), 肌球蛋白 - 轻链激酶磷酸化肌球蛋白的轻链。然后, 被磷酸化的肌球蛋白与肌动蛋白相互作用, 导致对凝块形成必需的血小板形态和运动性的变化。

[0396] 通过胶原结合的血小板活化还导致相似的信号级联的活化。当胶原结合于 GPVI 整联蛋白时, 其促进 GPVI 与 Fc 受体  $\gamma$ -链 (Fc $\gamma$ R) 的成簇。成簇诱导通过 Src 族激酶 Lyn 和 Fyn 来酪氨酸磷酸化 Fc $\gamma$ R, 这促进酪氨酸激酶 Syk 的结合和活化。Syk 进而磷酸化跨膜衔接蛋白质 LAT, 跨膜衔接蛋白质 LAT 然后组装主要由蛋白质组成的信号复合物, 蛋白质包括磷酸肌醇 3- 激酶 (PI3K)、PLC  $\gamma$  2、诸如 Gads、SLP-75 和 SLAP-130 的衔接蛋白质、以及 RhogTP 交换因子 Vav。然后 PI3K 可以调节蛋白激酶 B (PKB)、依赖于磷酸肌醇的激酶 (PDK1) 以及与整联蛋白联接的激酶 (ILK), 这可以调节整联蛋白表达和信号。PLC  $\gamma$  2 生成 IP3 和 DAG, 以使钙运动和活化 PKC, 如上文描述的。

[0397] 为了稳定的凝块形成, 交联的纤维蛋白多聚体必须被形成为围绕被活化的血小板栓子。纤维蛋白形成通过凝血因子级联的活化来产生, 凝血因子级联的活化与在血管损伤之后的血小板活化同时发生。两个汇合的路径可以被活化, 即固有的路径和非固有的路径。参与固有的和非固有的凝结级联的关键因子在表 1 和表 2 中列出。高分子量激肽原、前激肽释放酶和因子 XII、XI、IX 和 VIII 参与固有的路径, 而组织因子和因子 VII 复合物参与非固有的路径。两个路径在因子 X 的活化处汇合 (以生成 FXa), 通过被活化的因子 IX (FIXa) / 因子 VIII (FVIIIa) X 酶 (tenase) 复合物 (固有的) 的蛋白水解作用或通过被活化的因子 VII (FVIIa) / 组织因子 (TF) 复合物 (非固有的)。被活化的因子 X (FXa), 借助于因子 V、钙和血小板磷脂, 从凝血酶原生成凝血酶。进而, 凝血酶裂解纤维蛋白原以产生纤维蛋白并且还活化因子 XIII (转谷酰胺酶 (transglutaminase)), 因子 XIII 交联纤维蛋白多聚体以形成稳定的凝块。被活化的血小板的表面利于被活化的凝血因子复合物的形成并且从而参与级联的放大。

[0398] 用于初始化的主要的路径是非固有的路径; 固有的路径用来放大被活化的因子 X 的生成。在血管损伤之后, 血管壁中的组织因子 (TF) 被暴露和生成。TF 由内皮细胞、内皮下组织和单核细胞表达。当血管壁被破裂时, 由内皮下层产生的 TF 被暴露。在血管壁损害不存在时的内皮细胞破坏的情况下, 在血液和在细胞壁中的受损的内皮细胞层上被表达的 TF 之间进行接触。vWF 辅助血小板与受损的内皮的相互作用。TF 结合于 VII 并且进而催化因子 X 的活化。由非固有的路径生成的凝血酶然后导致固有的级联的因子 XI 的活化, 导致因子 IX 的活化。因子 IX 还可以被 TF / 因子 VII 复合物直接地活化。固有的级联还可以在前激肽释放酶响应于胶原与血管表面接触 (称为接触路径) 被转化为激肽释放酶时通过被因子 XII 调节的活化而被活化。

[0399]

| 表 1: 凝血因子      |   |          |   |
|----------------|---|----------|---|
| 因子             | 通用名   | 路径       | 特征  |
| 前激肽释放酶 (PK)    | Fletcher因子                                  | 固有的      | 具有HMWK和因子XII的功能   |
| 高分子量激肽原 (HMWK) | 接触活化辅因子;<br>Fitzgerald, Flaujeac Williams因子 | 固有的      | 激肽释放酶中的辅因子和因子XII活化, 在XI的因子XIIa活化中必需, 缓激肽(有效的血管扩张剂和平滑肌收缩的诱导剂)的前体 |
| I              | 纤维蛋白原                                       | 固有的和非固有的 |   |
| II             | 凝血酶原  | 固有的和非固有的 | 含有N末端的gla部分   |
| III            | 组织因子  | 非固有的     |   |
| IV             | 钙   | 固有的和非固有的 |   |
| V              | 前加速素, 易变因子,<br>加速 (Ac-) 球蛋白                 | 固有的和非固有的 | 蛋白质辅因子  |
| VI             | 促凝血球蛋白                                      | 固有的和非固有的 | 其是Va, 对于因子V冗余的  |
| VII            | 前转化素, 血清凝血酶原转变加速因子<br>(SPCA), 辅凝血致活酶        | 非固有的     | 具有gla残基的肽链内切酶   |
| VIII           | 抗血友病因子A, 抗血友病球蛋白<br>(AHG)                   | 固有的      | 蛋白质辅因子  |
| IX             | 克里斯马斯因子, 抗血友病因子B, 血浆促凝血酶原激酶组分<br>(PTC)      | 固有的      | 具有gla残基的肽链内切酶   |
| X              | Stuart-Prower因子                             | 固有的和非固有的 | 具有gla残基的肽链内切酶   |
| XI             | 血浆凝血致活素前体<br>(PTA)                          | 固有的      | 肽链内切酶   |
| XII            | 接触因子  | 固有的      | 肽链内切酶   |
| XIII           | 转谷氨酰胺酶原, 血纤蛋白稳定因子<br>(FSF), 纤维蛋白连接酶         | 固有的和非固有的 | 转肽酶   |

[0400]

[0401] 从 King(2010)<http://themedicalbiochemistrypage.org/blood-coagulation.html#clinical> 改编的表

[0402]

表2：凝血因子的功能分类

| 因子          | 活性   |
|-------------|--|
| 丝氨酸蛋白酶的酶原   |  |
| 因子XII       | 结合于在血管壁损伤的部位处的暴露的胶原，被高分子量激肽原和激肽释放酶活化                     |
| 因子XI        | 被因子XIIa活化  |
| 因子IX        | 在Ca <sup>2+</sup> 的存在下被因子XIa活化                           |
| 因子VII       | 在Ca <sup>2+</sup> 的存在下被凝血酶活化                             |
| 因子X         | 在组织因子和Ca <sup>2+</sup> 的存在下被X酶复合物以及被因子VIIa在被活化的血小板的表面上活化 |
| 因子II        | 被凝血酶原酶复合物在被活化的血小板的表面上活化                                  |
| 辅因子         |  |
| 因子VIII      | 被凝血酶活化；因子VIIIa是在因子X被因子IXa活化中的辅因子                         |
| 因子V         | 被凝血酶活化；因子Va是在凝血酶原被因子Xa活化中的辅因子。                           |
| 因子III(组织因子) | 作为因子VII的辅因子的内皮下细胞表面糖蛋白                                   |
| 纤维蛋白原       |  |
| 因子I         | 被凝血酶裂解以形成纤维蛋白凝块  |
| 转谷酰胺酶       |  |
| 因子XIII      | 在Ca <sup>2+</sup> 的存在下被凝血酶活化；通过共价交联稳定纤维蛋白凝块              |
| 调节蛋白质/其他蛋白质 |  |
| 血管性血友病因子    | 与内皮下结缔组织相关联；作为血小板糖蛋白GPIb/IX和胶原之间的桥接物                     |
| 蛋白质C        | 被结合于凝血调节蛋白的凝血酶活化为蛋白质Ca；然后降解因子VIIIa和Va                    |
| 蛋白质S        | 作为蛋白质C的辅因子；两种蛋白质都含有gla残基                                 |
| 凝血调节蛋白      | 在内皮细胞的表面上的蛋白质；结合凝血酶，凝血酶然后活化蛋白质C                          |
| 抗凝血酶III     | 最重要的凝结抑制剂，控制凝血酶以及因子IXa、Xa、XIa和XIIa的活性                    |

[0403]

[0404] 从 King(2010) <http://themomedicalbiochemistrypage.org/blood-coagulation.html#clinical> 改编的表

[0405] 2. 凝结障碍

[0406] 本文提供的装置可以用于监测遭受凝结障碍的受试者中的凝结活性。由血栓形成（非期望的血液凝块形成）引起的病状在发达国家是死亡和发病率的主要原因。这样的病状包括中风、心脏病、深部静脉栓塞和肺栓塞以及其他。相反地，诸如血友病和血管性血友病的病症的特征在于凝结缺乏，导致过度的流血。这些和其他的凝结障碍在下文详细地描述。

[0407] a. 血友病

[0408] 血友病是由一种或多种血液凝血因子的缺乏导致的流血病症。其以在组织损伤的部位形成血液凝块的下降的能力为特征。先天的与 X 有关的血友病包括甲型血友病和乙型血友病或克里斯多氏症，它们分别由 FVIII 和 FIX 的缺乏导致。甲型血友病以 10,000 分之 1 男性的比率发生，而乙型血友病以 50,000 分之 1 男性发生。

[0409] 患有血友病的患者遭受复发的关节和肌肉流血，这可以是自发的或响应于外伤。流血可以导致严重的剧痛，限制运动，并且导致包括滑液肥大的继发的并发症。此外，关节中的复发的流血可以导致慢性滑膜炎，慢性滑膜炎可以导致关节损伤，破坏滑膜、软骨和骨。

[0410] b. 血栓形成疾病和病状

[0411] 血栓形成疾病以高凝或有利于污点凝块的形成的止血反常为特征。示例性的血栓形成疾病和病状包括动脉血栓形成、静脉血栓形成、静脉血栓栓塞、肺栓塞、深部静脉栓塞、中风、缺血性中风、心肌梗塞（心脏病）、不稳定型心绞痛、心房颤动、肾损害、经皮腔镜冠状动脉成形术、弥漫性血管内凝血、脓毒症、人造器官、分流或修复物、以及其他获得性血栓形成疾病。

[0412] c. 血管性血友病

[0413] 血管性血友病（vWD）由血管性血友病因子（vWF）的遗传缺乏导致。vWD 是人类的最普遍的遗传流血病症。vWF 的缺乏导致有缺陷的血小板附着并且导致因子 VIII 的继发的缺乏。结果是 vWF 缺乏可以导致与由血小板机能障碍或血友病导致的流血相似地出现的流血。vWD 已经被区分为多种主要的亚型。I 型 vWD 是最普遍的并且作为常染色体显性特质被遗传。这种变体是由所有 vWF 多聚体的简单的量的缺乏导致的。2 型 vWD 还被进一步细分，取决于功能障碍的蛋白质在向血小板的结合的某些实验室测试中是否具有下降的或自相矛盾的提高的功能。3 型 vWD 在临幊上是严重的并且以 vWF 的隐性遗传和实际上不存在为特征。

[0414] d. 获得性凝结障碍

[0415] 获得性凝结障碍是诸如维生素 K 缺乏、肝病、弥漫性血管内凝血（DIC）的病状或疾病、或循环抗凝剂的发展的结果。血液凝结的缺陷是由病状或疾病导致的凝血因子的继发的缺乏的结果。例如，凝血因子从肝的产生经常在肝在患病状态中时被削弱。与凝血因子的减少的合成共同地，纤维蛋白溶解变得增加并且血小板减少（血小板的缺乏）被增大。凝血因子由肝的减少的产生还可以导致暴发型肝炎或妊娠的急性脂肪肝。这样的病状促进消耗可利用的凝血因子的血管内凝块。

[0416] 3. 药学凝结治疗

[0417] 本文提供的装置可以用于监测经历使用凝结调节剂的治疗的患者中的凝结活性。这样的凝结剂包括但不限于下文描述的抗凝剂和促凝剂。

[0418] 香豆素药物（基于化学苯并吡喃酮）例如 warfarin (COUMADIN) 以及氨基多糖、肝素和硫酸乙酰肝素，在临幊上用作抗凝剂。肝素作为抗凝剂，因为其结合于抗凝血酶 III 并且活化抗凝血酶 III，然后抗凝血酶 III 抑制凝结级联的丝氨酸蛋白酶。肝素在内衬脉管系统的肥大细胞的颗粒中是丰富的。响应于损伤，肝素被释放并且抑制凝结。香豆素药物通过抑制对凝血酶和因子 VII、IX 和 X 以及蛋白质 C 和 S 的功能必需的依赖于维生素 K 的 γ 羧化反应来抑制凝结。这些药物通过抑制维生素 K 的醌衍生物向它们的活性氢醌形式的还原来起作用。因为香豆素药物的作用模式，所以它们的最大的效果的实现耗费很多天。因此，肝素通常首先被施用，随后是华法林或与华法林有关的药物。

[0419] 纤溶酶原激活物也可用于控制凝结。因为 tPA 是对于凝块中的纤维蛋白的退化高度选择性的，所以其可以在血栓形成之后恢复冠状动脉的通畅，特别是在心肌梗塞之后的短时期期间。链激酶（来自链球菌的酶）是另一种具有疗法用途的纤溶酶原激活物。

[0420] 阿司匹林是血小板活化的抑制剂。通过抑制环氧合酶的活性，阿司匹林减少 TXA<sub>2</sub> 通过血小板的产生。

[0421] 阿司匹林还减少前列环素 (PGI<sub>2</sub>) 的内皮细胞产生，前列环素是血小板凝集的抑制

剂和血管扩张剂。

[0422] 其他类型的抗凝药物通过抑制血小板的活化和它们的后续的聚集来起作用。药物氯吡格雷 (PLAVIX®) 是血小板膜上的 ADP 受体的不可逆的抑制剂。当 ADP 结合于血小板时, 它们活化和聚集, 导致凝结响应的放大, 从而 PLAVIX® 干扰该过程。PLAVIX® 用于外周血管和脑血管疾病以及冠状动脉疾病的治疗, 以防止血栓性的斑块的形成。

[0423] 另一族的抗凝剂是抑制血小板聚集的 GPIIb-GPIIIa 拮抗剂。该族的药物包括 REOPRO® (阿昔单抗; 人类单克隆抗体)、INTEGRILIN® (依非巴肽; 来源于在东南侏儒响尾蛇的毒液中得到的蛋白质的环状六肽) 以及 AGGRASTAT® (替罗非班; 合成有机非肽分子)。

[0424] 虽然抗凝血药已经是在本文描述的凝结障碍的治疗或预防中的主要工具, 但是过分严格的抗凝剂疗法方案可以剧烈地由于出血而增加死亡的风险 (事实上, 无论原因如何, 抗凝剂的过分攻击性的使用与死亡的增加的风险有强的联系), 使得必须监测这样的患者的凝结能力。抗凝剂正常地被每日给予, 并且至少在疗法的早期阶段, 凝结活性的测试也紧跟在每日程序之后。

[0425] 在一些疾病或病状中, 需要促凝剂。例如, 凝血因子浓缩物用于治疗血友病, 以逆转抗凝剂的效果, 并且治疗在具有被削弱的凝血因子合成或增加的消耗的患者中的流血。凝血酶原复合物浓缩物、冷沉淀物和新鲜冰冻血浆是普遍使用的凝血因子产物。重组活化人类因子 VII 也被用于大多数流血的治疗。其他促凝剂包括凝血酸和氨基己酸, 凝血酸和氨基己酸抑制纤维蛋白溶解并且从而导致减少的流血。因为促凝剂疗法可以增加不需要的血栓形成的风险, 所以这些患者中的凝结活性的密切的监测是关键的。

#### [0426] 4. 凝结测量

[0427] 本文提供的装置可以用于测量凝结活性。本文提供的横向流动装置通过检测样品流体经过多孔介质例如滤纸的毛细管流动的速率的变化来测量血液样品的凝结能力。在一个实施方案中, 待测试的样品流体通过毛细作用沿着多孔介质的共用元件的两个或更多个汇合臂流动, 其中臂中的至少一个已经通过促进凝结级联的剂的加入来改性, 从而减小流速。流体前沿将在由它们的相对流速确定的位置处汇合, 这从而指示样品流体的凝结能力。在另一个实施方案中, 待测试的样品流体通过毛细作用沿着多孔介质的共用元件的两个或更多个分别的臂平行地流动, 其中臂中的至少一个已经通过促进凝结级联的剂的加入来改性, 从而减小流速。流体前沿将在由它们的相对流速确定的点处停止; 这些点的比较因此指示样品流体的凝结能力。在另一个实施方案中, 待测试的样品流体通过毛细作用沿着多孔介质的线性元件流动, 多孔介质的线性元件已经通过促进凝结级联的剂的加入来改性, 从而将流速减小至零。流体前沿将在由样品的停流确定的点处停止, 这从而指示样品流体的凝结能力。本文提供的装置的具体的用途包括但不限于:(1) 凝结缺乏的基本监测。(2) 对服用抗凝剂的患者的监测, 例如: 在服用肝素的患者中监测活化部分凝血活酶时间 (APTT) 并且在服用华法林的患者中监测凝血酶原时间 (PT)。(3) 促凝血酶原激酶生成测试 (TGT), 用于区别在患有甲型血友病的人中的因子 VIII 结块问题和如在乙型血友病个体中的因子 IX 结块问题。(4) 特异性因子的测试, 用于确定凝结路径内的缺乏。

[0428] 已经作出很大的努力来测量结块组分或评估血液凝结活性。大多数方法依赖于免疫学技术和凝块技术。血液凝结的体外测试的基础已经普遍是确定血液样品的浊度、粘度

或电导率由在凝块形成期间纤维蛋白原向纤维蛋白的转化导致的变化。因此，正常的血液样品趋向于产生高强度的凝胶凝块，而产生薄的水性的网类型的凝块的样品指示某种凝结异常。凝结障碍的筛选试验通常包括凝血酶原时间 (PT) 和活化部分凝血活酶时间 (APTT)，这在下文详细地描述。基于机械的和基于光密度的自动凝结仪器，提供关于在各种凝结测试中的凝固时间的终点的数据。纤维蛋白检测法 (fibrometer) 类型的仪器测量增加的电导率，增加的电导率可以与凝块的形成相互关联。基本上，凝结障碍的筛选试验被设计为检测在凝血因子中的一个或多个中的显著的异常并且将这种异常定位至凝结路径中的各个步骤。本文提供的装置还可以用于测量凝结活性并且可以通过剂的加入来改性以识别凝结路径中的具体异常。

[0429] 凝结活性的程度通常通过确定血液凝块形成所需要的时间的凝血酶原时间 (PT) 测试来测量。凝血酶原时间 (PT) 测量凝结的非固有的路径。这种路径的诱导需要钙。该过程可以通过促凝血酶原激酶的引入来加速，促凝血酶原激酶是一种含有组织因子的盐脑提取物，引发非固有的路径。这种路径通过蛋白质级联进行，通过首先活化因子 VII，因子 VII 进而活化因子 X，因子 X 在因子 V 的存在下将前凝血酶转化为凝血酶，凝血酶将纤维蛋白原转化为纤维蛋白。纤维蛋白原是可溶解的蛋白质，但是当被裂解为纤维蛋白时，纤维蛋白原凝结为不可溶的凝胶。纤维蛋白多聚体的生成的结果是血液或血浆的增加的粘度和流动的阻碍，这作为结果，因此可通过本文提供的装置测量。PT 绕过固有的凝结路径并且在患有因子 XII、XI、IX 和 VIII 的缺乏的患者中是正常的。PT 在患有因子 VII、X、V、前凝血酶或纤维蛋白原的缺乏的患者中是不正常的。

[0430] PT 时间通常通过临床实验室中的自动化仪器来测量，或通过其中手指血液被放置在一次性的测试条上的便携式仪器来测量。因为来自使用各种试剂（或甚至相同的试剂的不同的批次）的不同的制造商的测定可以得到不同的 PT 时间，所以世界卫生组织采用报告结果的标准作为国际标准化比值 (INR)，国际标准化比值是血液样品的 PT 除以标准化正规样品的 PT，的国际灵敏度指数 (ISI) 次幂，国际灵敏度指数是取决于产品和批次的校正因子：

[0431]

$$INR = \left( \frac{PT_{\text{测试}}}{PT_{\text{正常}}} \right)^{ISI}$$

[0432] 其中：

[0433]  $PT_{\text{测试}}$  = 凝血酶原时间 (测量值)

[0434]  $PT_{\text{正常}}$  = 正常的凝血酶原时间 (对照)

[0435] ISI = 国际灵敏度指数 (由制造商提供的经验常数)

[0436] PT 的正常范围是 12–15 秒，ISI 因子通常在 1.0 至 2.0 之间，并且 INR 的正常范围是 0.9–1.3。经历抗凝疗法的患者将通常具有在 2.0 至 3.0 之间的 INR；更高的水平被认为是极度危险的。为了减少操作者误差，ISI 值经常通过条型码或微芯片提供，使得仪器可以自动地进行向 INR 的正确转换。

[0437] 不幸地，最近的研究已经表明，INR 标准不能够使 PT 测量的不同实验室测定的结果协调一致，这是从 1990 年代早期已经知道的问题。

[0438] 如上文提出的，PT 测试通常反映非固有的凝结路径的完整性。非固有的路径的缺

乏可以使用本文提供的装置中的任一个来确定。非固有的因子活化剂例如促凝血酶原激酶,可以被加入本文提供的装置中的任一个的一个或多个部件中,其具有或不具有钙。在一个实施方案中,装置是线性流动装置,并且非固有的因子活化剂被加入竖直导管中。在另一个实施方案中,装置是分流装置,并且非固有的因子活化剂被加入横向流动条的一个臂中。在另一个实施方案中,装置是汇合流动装置,并且非固有的因子活化剂被加入圆形的多孔介质或近端垫的一侧中。

[0439] APTT 测量固有的路径的凝血因子,凝血因子包括可以由于可遗传的病症或肝素疗法而不正常的因子 XII、XI、IX、VIII、X、V、II 和 I。APTT 因此可用作手术前筛选并且用于监测肝素疗法。APTT 通常通过将活化剂加入血浆样品来进行,活化剂例如高岭土(不可溶的硅酸盐)、鞣花酸、二氧化硅或带负电荷的磷脂。这活化因子 XII 和 XI。磷脂在因子 VIII 被因子 IX、VIII 和 V 活化中代替血小板。血液凝结在这种凝固测试中通过加入钙来引发。因子 VII 是不受部分凝血活酶时间影响的唯一因子,并且 APTT 因此在患有因子 VII 缺乏的患者中是正常的。固有的路径的缺乏可以使用本文提供的装置中的任一个来确定。例如,诸如高岭土(不可溶的硅酸盐)、鞣花酸、二氧化硅或带负电荷的磷脂的固有的因子活化剂可以被加入本文提供的装置中的任一个的一个或多个部件中,其具有或不具有钙。在一个实施方案中,装置是线性流动装置,并且固有的因子活化剂被加入竖直导管中。在另一个实施方案中,装置是分流装置,并且固有的因子活化剂被加入横向流动条的一个臂中。在另一个实施方案中,装置是汇合流动装置,并且固有的因子活化剂被加入圆形的多孔介质或近端垫的一侧中。

[0440] 用于确定具体的凝结缺陷的另一种测试是促凝血酶原激酶生成测试(TGT)(W. H. Bell 和 H. G. Alton, Nature 174 :880-881, 1954)。在这种类型的测试中,患者的血清、血浆或血小板被代入除了待测试的因子(抗血友病因子、血浆凝血致活素前体、血浆凝血活酶组分或血小板)中的一个以外是完整的系统中,并且确定凝血活酶生成的速率。促凝血酶原激酶生成测试(TGT)可以用于例如区别在患有甲型血友病的人中的因子 VIII 结块问题和如在乙型血友病个体中的因子 IX 结块问题。本文提供的装置可以通过加入指示具体缺陷的各种凝血因子来改性以进行 TGT 测试,本领域技术人员为此进行和确定该测试。

[0441] 在一些实施方案中,本文描述的装置用于测量已经被钙螯合剂处理以防止结块的血液样品。钙是凝结级联中所需要的辅因子,因此用钙螯合剂例如柠檬酸盐处理的血液不结块。凝结级联可以通过引入相对于柠檬酸盐摩尔过量的钙被再活化。其他钙螯合剂例如 EDTA,产生相似的效果。在一些实施方案中,测试使用全血来进行。在其他实施方案中,装置的初始的竖直分离部件或竖直导管将血浆从血液分离。竖直导管可以是能够以竖直取向将细胞从流体(即血浆或血清)分离(如果这样的分离是期望的话)的材料,例如玻璃纤维过滤器(例如 Millipore AP25)。在汇合流动装置实施方案中,被分离的血浆到达指示物刻度盘并且最初以相等的速率在两个方向迁移。在特定的实施方案中,指示物刻度盘由薄的玻璃纤维材料制成。特别地,使用 MF1 玻璃纤维(Whatman, New Jersey, 美国)。刻度盘的一个方向被钙处理,以允许凝结级联引发。刻度盘的这一侧还可以被例如促凝血酶原激酶或可以加速凝结的任何其他材料处理。刻度盘的另一个侧保持不被处理,使得血浆在这个方向的迁移不由于凝结而被延迟。未被处理的侧可以可选择地含有溴酚蓝以帮助目测流体前沿的前进和/或确定汇合点。在刻度盘上的每个方向迁移的血浆最终在刻度盘的相对

侧上的某处相遇。血浆相遇的点直接地指示血液样品凝结的能力。例如,完全缺乏凝结的血液样品将在距血浆进入定量刻度盘之处  $180^\circ$  相遇,因为在每个方向迁移的血液将已经以相同的速率行进(不凝结的血液相遇的实际的地点可以被改变以允许刻度盘读取不同的 INR 范围)。对于具有越来越健康的凝结功能的血液样品,血浆在刻度盘上的汇合点越来越偏向刻度盘的发生凝结(以及因此血浆迁移的延迟)的侧。

[0442] 在分流装置实施方案中,被分离的血浆到达线性多孔条上的起始点,例如诸如横向条的中点,并且初始地以相等的速率在两个方向迁移。条的一个方向用钙处理,以允许凝结级联引发。条的这一侧还可以用例如促凝血酶原激酶或可以加速凝结的任何其他材料处理。条的另一个侧保持不被处理,使得血浆在这个方向的迁移不由于凝结而被延迟。在条上的每个方向迁移的血浆前沿最终在条的每个侧上的某处停止。血浆前沿停止的相对的点直接地指示血液样品凝结的能力。例如,完全缺乏凝结的血液样品将具有相对于起始点的相同的停止的前沿,因为在每个方向迁移的血液已经以相同的速率行进。对于具有越来越健康的凝结功能的血液样品,在条的被处理的侧上的血浆前沿的迁移距离相对于样品在未被处理的侧上的迁移距离减小。

[0443] 在停流装置实施方案中,被分离的血浆到达线性多孔条上的起始点,例如诸如横向条的近端,并且朝向远端迁移。条的一个或多个区域可以用钙处理,以允许凝结级联开始。条的一个或多个区域还可以用例如促凝血酶原激酶或可以加速凝结的任何其他材料处理。在装置的一些实施方案中,溴酚蓝可以被施用至指示物条的远端垫(或远端)的中心部上,以提供流体向指示物条的远端垫迁移的目测指示物,指示条的饱和。正在迁移的血浆前沿最终在条上的某处停止。血浆前沿停止的点直接地指示血液样品凝结的能力。例如,完全缺乏凝结的血液样品将比具有一些凝结活性的样品具有更长的迁移距离。对于具有越来越健康的凝结功能的血液样品,血浆前沿在条上的迁移距离减小。

[0444] F. 实施例

[0445] 实施例 1

[0446] 停流装置组装

[0447] 本实施例描述可以用于基于多孔介质中的流体流动的特征来定性或半定量分析样品流体的组分的示例性的装置的组装。使用如本文描述的部件和规格组装装置。在示例性的实施方案中,被组装的装置在形状上是矩形的,具有近端和远端。装置的尺寸是 0.787 英寸乘 5.3 英寸。示例性的装置的外壳体是在装置的底部上是实心的并且具有在装置的顶部上用于将流体样品施用入近端井中的孔的刚性材料(具体地,丙烯腈丁二烯苯乙烯(ABS),雪白;lustran 348-012002)。七个分离的物理元件以分层的方式被附着以产生装置,装置然后可以被组装入由 ABS 制成的外壳体中。如此组装的元件如下地在装置内产生流体路径:用于接收流体样品的近端井与体积毛细管储器流体连通,以将样品通过远端出口孔转移至竖直导管的下侧,并且在竖直导管的顶部和被称为指示物条的多孔介质的近端部分之间有接触点。在装置的特定的实施方案中,多孔介质在形状上是矩形的。

[0448] 装置的外表面的顶部的一部分是用于在流体前沿迁移经过多孔介质时察看流体前沿的位置的透明的固体材料。例如,在特定的实施方案中,窗在形状上是矩形的,被定位在指示物条的部分上方。在壳体中的该透明窗利于流体前沿的目测。外表面的顶部的另外的部分也可以是透明的固体材料,例如,诸如被定位在指示物条上的地点上方的提供流体

成功迁移入多孔介质中的可见指示的一个或多个窗。以下是对装置的部件和其组装的详细描述。

[0449] A. 近端底部

[0450] 近端底部是实心的薄的刚性材料，具有外表面和内表面（见例如图 7）。具体地，刚性聚氯乙烯用于构建以 0.01 英寸的厚度的近端底部。所有的形状可以使用 Allen Datagraph 模板制造器 (Allen Datagraph Systems, Inc., Derry, New Hampshire, 美国) 来生产。部件可以在计算机辅助设计 (CAD) 程序中被设计，然后由模板制造器“印刷”，模板制造器将塑料的片切割为期望的形状。近端底部的外表面提供装置的面向外的实心的基部，而相对的表面或内表面提供装置的面向内的底部。面向内的底部作为体积毛细管储器的底部并且提供用于待施用的流体样品的表面。近端底部的内表面的流体样品施用区域可以被物质（例如温和的 0.3% Tween-20®溶液）包覆以促进流体向体积毛细管储器中迁移。如果样品流体是血液，那么样品施用区域可以被含有 195U/ml 的肝素钠盐的 70% 乙醇的 20 μl 溶液包覆（以抑制血液样品的凝固）。

[0451] B. 近端壳体

[0452] 近端壳体是薄的刚性材料。具体地，刚性聚氯乙烯用于构建以 0.02 英寸的厚度的近端壳体。近端壳体的尺寸和形状与近端底部的尺寸和形状相同（见例如图 7）。在近端壳体中具有以 0.576 英寸长的中心至中心泪滴体的形状的洞，其中泪滴体的 0.5 英寸直径宽端部相对于泪滴体的 0.12 英寸直径窄端部的位置被定位在近端。近端壳体使用 3M 的 467MP 2.3 毫升转移胶膜 (3M, St. Paul, Minnesota) 被附着于近端底部。一旦被附着于近端底部，那么近端壳体中的洞的边缘提供体积毛细管储器的壁并且将储器的容积设置为 0.002 立方英寸 (33 μl)。储器的泪滴体形状的宽的圆形端部还作为流体递送储器。储器的边缘以及近端覆盖物盖住体积毛细管储器的部分可以共同地被物质（例如温和的 0.3% Tween-20®溶液）包覆以促进流体向体积毛细管储器中迁移。

[0453] C. 近端覆盖物

[0454] 近端覆盖物是薄的刚性材料。具体地，刚性聚氯乙烯用于构建以 0.01 英寸的厚度的近端覆盖物。近端覆盖物的尺寸和形状与近端壳体的尺寸和形状相同（见例如图 7）。在近端覆盖物中具有两个洞。一个洞在形状上是圆形的，在直径上 0.5 英寸，并且相对于在直径上 0.125 英寸的第二洞被定位在近端。近端覆盖物使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜被附着于近端壳体，使得较大的近端圆洞被定位在由近端壳体形成的储器的泪滴体形状的宽的圆形端部上。一旦被附着，那么近端覆盖物盖住体积毛细管储器，留出用于流体样品递送储器的圆形开口。在近端覆盖物中的较小的远端圆洞提供体积毛细管储器的远端出口孔。远端出口孔被控制尺寸和定位为促进流体向竖直导管中毛细管芯吸。如上文提到的，近端覆盖物盖住体积毛细管储器的部分以及储器的边缘可以共同地被物质（例如温和的 0.3% Tween-20®溶液）包覆以促进流体向体积毛细管储器中迁移。

[0455] D. 竖直导管

[0456] 在装置的一个示例性的实施方案中的竖直导管是聚乙烯 DBS 过滤器。在待分析的流体是全血的实施方案中，竖直导管可以是能够以竖直取向将细胞从流体（即血浆或血清）分离（如果这样的分离是期望的话）的材料，例如玻璃纤维过滤器（例如 Millipore AP25）。可以被使用的一种特定聚乙烯过滤器是 Porex x4897 聚乙烯干共混表面活性剂

(DBS) 圆盘 (3/16 英寸直径), 可以使用以下的规格 :15–45  $\mu\text{m}$  孔径大小 ;1/16 英寸厚度 (Porex, Fairburn, Georgia, 美国)。半圆形的或新月形的形状用于使在竖直导管的远端边缘上的任何点距指示物条的分辨区域的近端边缘的距离是一致的。这促进流体前沿在指示物条的分辨区域处汇合。竖直导管使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜被附着于近端覆盖物并且被直接地定位在远端出口孔上方。竖直导管被定位为垂直于壳体的平面。远端孔控制流体流动, 使得流体仅可以通过指示物条的毛细管作用进入指示物壳体, 并且因此不能够围绕指示物条流动并且避免在指示物条内被合适地分辨。

[0457] E. 指示物壳体

[0458] 指示物壳体是薄的刚性材料。具体地, 刚性聚氯乙烯用于构建以 0.04 英寸的厚度的指示物壳体。指示物壳体的尺寸和形状与近端覆盖物的尺寸和形状相同 (见例如图 7)。在指示物壳体中具有两个洞。一个洞在形状上是圆形的, 在直径上 0.5 英寸, 并且相对于第二洞被定位在近端。第二洞是以指示物条的形状的切口。在特定的实施方案中, 第二洞是矩形的切口, 具有 0.25 英寸的宽度和 3.5 英寸的长度。指示物壳体使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜被附着于近端覆盖物, 使得壳体中的圆形的近端洞被直接地定位在近端覆盖物中的圆形的近端洞上方。在以这种方式定位指示物壳体时, 竖直导管被定位在矩形的切口的近端中并且垂直于矩形的切口的近端的平面, 使得经过竖直导管的流体流动垂直于指示物壳体的平面。指示物壳体提供围绕多孔介质部件的最小内部容积。这防止湿度和其他环境变量影响装置中的流体迁移特征。

[0459] F. 指示物条

[0460] 指示物条是由三种分离的但是重叠的材料制成的横向流动多孔膜。具体地, 从指示物条的近端向远端, 使用以下三种材料 :Ahlstrom 8975 (具有 355–508  $\mu\text{m}$  的厚度和 19  $\mu\text{l/cm}^2$  的吸水率的具有聚乙烯醇 (PVA) 的硼硅酸盐玻璃纤维 ;Ahlstrom, Helsinki, 芬兰), 嵌段 Pall Vivid 170 聚酯支持的硝酸纤维素 (180  $\mu\text{m}$  厚, 对水的 150–225 秒 /4cm 毛细管速度和 45–59  $\mu\text{g/cm}^2$  蛋白质 (BSA) 结合容量 ;Pall Corporation, Port Washington, 纽约州), 以及 Whatman LF1 (保留大于 2  $\mu\text{m}$  的颗粒的 247  $\mu\text{m}$  厚的被 PVA 处理的玻璃纤维纸 ;Whatman, New Jersey, 美国)。条在形状上是矩形的, 遵循指示物壳体的第二洞的形状。条的宽度是 2mm, 并且条的总长度是 78mm, 如下地从近端向远端 (具有总共 4mm 重叠) :Ahlstrom 8975 (20mm 长度)、Pall Vivid 170 (15mm 长度) 和 Whatman LF1 (47mm 长度)。为了构建条, 将条部件对着标准的横向流动背衬 (在一个侧上具有粘合剂覆层的 PVC 片) 组装。首先, Vivid 170 过滤器被在 PBS 中的 1mg/ml 中性抗生物素蛋白在室温堵塞 1 小时, 然后在 PBS 中洗涤两次, 每次 5 分钟, 使用水漂清两次并且允许在工作台上干燥过夜。过滤器被中性抗生物素蛋白包覆, 以将随样品流体行进经过指示物条的生物素 - 中性抗生物素蛋白的任何聚集的颗粒将在条中停止的点集中, 以在条中产生允许更少的流体经过的更紧的堵塞。不具有在溶液中的中性抗生物素蛋白分析物的流体样品不显示出沿着被中性抗生物素蛋白包覆的条的可见地停止的颗粒。部件被排布, 使 Vivid 170 首先压在背衬上 (使其自身的背衬与装置背衬接触)。然后 Ahlstrom 8975 和 LF1 被排布, 具有在 Vivid 170 条的每个端部上的 2mm 的重叠。Ahlstrom 8975 过滤器被允许悬垂在粘合性背衬上 5 毫米处。

[0461] 使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜, 指示物条被附着于远端顶部的底部表面, 如本文描述的远端顶部还与其外顶部表面形成装置的顶部。因此, 条被压至装置的顶壁的下

侧,使得条被夹在装置的顶壁和背衬之间。在指示物条和指示物条的背衬被附着于远端顶部的底部表面时,使用 3M 的 467MP 2.3mil 转移胶膜将远端顶部附着于指示物壳体,使得指示物条被定位在指示物壳体的第二洞(即矩形的切口)内,由此产生容纳指示物条的密封的内部容积。因此,指示物条被容纳在这样的空间中,其中由近端覆盖物提供的空间的底部或地板作为条的基部,指示物壳体中的矩形的洞提供围绕条的空间的壁,并且远端顶部的底部表面提供空间的顶壁。指示物条的 Ahlstrom 8975 过滤器的悬垂部的最近端位于竖直导管的被附着在近端覆盖物上的顶部上方并且与该顶部接触。可选择的远端垫可以被包括在指示物条的远端处,以在流体的毛细管流动未在指示物条中被停止的情况下,提供用于收集过量的样品流体的下沉部。如果分析物(例如中性抗生物素蛋白)在样品流体中以足够的浓度存在,那么将在流体经过介质的迁移之前或在经过介质的迁移的早期被加入样品中的流动调节剂(例如 LPA 生物素)与分析物(例如中性抗生物素蛋白)结合,以形成交联网络,在交联网络中胶乳珠(其也可以在经过条的迁移之前或在经过条的迁移的早期被加入样品中)被截留,由此堵塞条的孔并且使样品的流动停止。过滤器中的流动的堵塞的量与样品中的分析物的量成正比。因此,如果流体前沿在样品流体加入之后的指定的量的时间内没有运动经过条中的指定的位置,那么这指示样品流体中的具体的分析物的浓度高于阈值。

[0462] 在装置的一些实施方案中,通过将干燥的溴酚蓝(BPB)以 10mg/ml[重量比体积(w/v)]溶解入 95%乙醇中制备的 2 μl 的溶液可以被施用至指示物条的远端垫(或远端)的中心部上并且被允许干燥 5 分钟。蓝色提供对流体迁移至指示物条的远端垫的目测指示物,指示条的饱和。

[0463] G. 远端顶部

[0464] 远端顶部是薄的刚性材料。具体地,刚性聚氯乙烯用于构建以 0.01 英寸的厚度的远端顶部。远端顶部的尺寸和形状与指示物壳体的尺寸和形状相同(见例如图 7)。远端顶部含有在指示物壳体矩形切口的远端处的圆形的 0.02 英寸直径洞,圆形的 0.02 英寸直径洞作为允许被位移的空气在流体被拉动入装置中时逃逸的空气逃逸开口。远端顶部的一个表面形成装置的面向外部的顶部。使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜,指示物条被附着于远端顶部的相对的(或底部)表面,使得指示物条与远端顶部的矩形的透明部分或窗对准。此外,远端顶部的近端透明部分或窗和远端透明部分或窗分别与指示物条的近端和远端对准。近端窗利于对施用在指示物条上的足够的流体样品的存在的目视观察,而远端窗利于对条的远端垫的目视观察,使得如果流体前沿到达条的远端并且饱和条,那么这可以被容易地确定。使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜,由此形成的远端顶部 / 指示物条元件被附着于指示物壳体的顶部表面,使得指示物条被定位在指示物壳体的第二洞(矩形的切口)内,由此产生容纳指示物条的密封的内部容积。

[0465] 远端顶部的面向外的表面或外壳体的外部印刷有指示装置的功能的图。例如,刻度尺或其他类型的用于确定流体前沿的位置的位置指示物用于确定样品是否含有阈值水平的分析物,或未被标记的窗可以被使用,使得如果流动在通过窗可见的介质部分内停止,那么这将指示阈值浓度已经达到。校准曲线用已知量(即标准样品)的分析物来准备,以确定用于条的分析物的阈值浓度的量。然后装置可以被调节(例如通过改变微珠浓度和位置、聚合物浓度、抗体浓度),直到期望的阈值浓度在指示物条上的期望的位置处被实现。如

果装置将被用于分析物的定量测量,那么标记将是在有关的范围内的浓度单元。其他的标记物可以提供一般的信息。

[0466] 实施例 2

[0467] 非汇合路径装置组装

[0468] 本实施例描述可以用于基于流体在被改性的路径和未被改性的路径中的流速的比较来定性或半定量分析样品流体的组分的示例性的装置的组装。非汇合路径装置或分流装置在设计上与停流装置相似,仅在三个方面不同:(1) 样品将在线性指示物条的中心部处被引入,(2) 近端壳体中的容纳竖直垫并且允许样品引入的洞被定向为垂直于线性指示物条,与指示物条的列相反,(3) 竖直导管是矩形的,与圆形的或半圆形的相反。

[0469] 使用如本文描述的部件和规格来组装装置。在示例性的实施方案中,被组装的装置在形状上是长椭圆形或矩形的,具有左端和右端以及从装置的中点在近端延伸的半圆形突出部。装置的尺寸是 5.0 英寸(从左至右)×1.58 英寸(从近端至远端,当在其最长的点处被测量时)。示例性的装置的外壳体是在装置的底部上是实心的并且具有在装置的顶部上用于将流体样品施用入近端井中的孔的刚性材料(具体地,丙烯腈丁二烯苯乙烯(ABS),雪白;lustran 348-012002)。七个分离的物理元件以分层的方式被附着以产生装置,装置然后可以被组装入由 ABS 制成的外壳体中。如此组装的元件如下地在装置内产生流体路径:用于接收流体样品的近端井与体积毛细管储器流体连通,以将样品通过远端出口孔转移至竖直导管的下侧,并且在竖直导管的顶部和被称为指示物条的多孔介质的中心部分之间有接触点。在装置的特定的实施方案中,多孔介质在形状上是矩形的。

[0470] 装置的外表面的顶部的一部分是用于在两个流体前沿从引入的中心点朝向多孔介质的两个端部迁移时察看两个流体前沿的位置的透明的固体材料。例如,在特定的实施方案中,窗在形状上是矩形的,被定位在指示物条的部分上方。在壳体中的该透明窗利于流体前沿的目测。外表面的顶部的另外的部分也可以是透明的固体材料,例如,诸如被定位在指示物条上的地点上方的提供流体成功迁移入多孔介质中的可见指示的一个或多个窗。以下是对装置的部件和其组装的详细描述。

[0471] A. 近端底部

[0472] 近端底部是实心的薄的刚性材料,具有外表面和内表面。具体地,刚性聚氯乙烯用于构建以 0.01 英寸的厚度的近端底部。所有的形状可以使用 Allen Datagraph 模板制造器(Allen Datagraph Systems, Inc., Derry, New Hampshire, 美国)来生产。部件可以在计算机辅助设计(CAD)程序中被设计,然后由模板制造器“印刷”,模板制造器将塑料的片切割为期望的形状。近端底部的外表面提供装置的面向外的实心的基部,而相对的表面或内表面提供装置的面向内的底部。近端底部的主体是 1.0" 乘 5.0",但是此外,具有在长侧的中心部处向一个侧的膨胀,这使宽度增加另外的 0.58"。这种膨胀调节体积毛细管储器。面向内的底部作为体积毛细管储器的底部并且提供用于待施用的流体样品的表面。近端底部的内表面的流体样品施用区域可以被物质(例如温和的 0.3% Tween-20®溶液)包覆以促进流体向体积毛细管储器中迁移。如果样品流体是血液,那么样品施用区域可以被含有 195U/ml 的肝素钠盐的 70% 乙醇的 20 μl 溶液包覆(以抑制血液样品的凝固)。

[0473] B. 近端壳体

[0474] 近端壳体是薄的刚性材料。具体地,两个刚性聚氯乙烯片用于构建以 0.02 英寸的

总厚度的近端壳体。近端壳体的尺寸和形状与近端底部的尺寸和形状相同。在近端壳体中具有以 0.88 英寸长的中心至中心泪滴体的形状的洞，其中泪滴体的 0.5 英寸直径宽端部相对于泪滴体的 0.12 英寸直径窄端部的位置被定位在近端。该洞被定位为使其长轴垂直于指示物条的轴，使得泪滴体的小端部被定位为直接在指示物条的中心部下方。近端壳体使用 3M 的 467MP 2.3 毫升转移胶膜 (3M, St. Paul, Minnesota) 被附着于近端底部。一旦被附着于近端底部，那么近端壳体中的洞的边缘提供体积毛细管储器的壁并且将储器的容积设置为 0.002 立方英寸 ( $33 \mu l$ )。储器的泪滴体形状的宽的圆形端部还作为流体递送储器。储器的边缘以及近端覆盖物盖住体积毛细管储器的部分可以共同地被物质（例如温和的 0.3% Tween-20<sup>®</sup>溶液）包覆以促进流体向体积毛细管储器中迁移。

[0475] C. 近端覆盖物

[0476] 近端覆盖物是薄的刚性材料。具体地，刚性聚氯乙烯用于构建以 0.01 英寸的厚度的近端覆盖物。近端覆盖物与近端壳体和近端底部的矩形的部分有相同的尺寸 (5 英寸 × 1 英寸)。近端壳体不包括在近端侧上的半圆形突出部或中心膨胀部。在近端覆盖物中具有一个洞。洞在形状上是椭圆形的，具有 0.06 英寸（在其最宽的点；从左至右）× 0.19 英寸（在其最宽的点；从近端至远端），并且被定位在近端覆盖物的中部中。近端覆盖物使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜被附着于近端壳体，使得椭圆形洞被定位在由近端壳体形成的储器的泪滴体形状的宽的圆形端部上。一旦被附着，那么近端覆盖物盖住体积毛细管储器，留出用于流体样品递送储器的椭圆形开口。如上文提到的，近端覆盖物盖住体积毛细管储器的部分以及储器的边缘可以共同地被物质（例如温和的 0.3% Tween-20<sup>®</sup>溶液）包覆以促进流体向体积毛细管储器中迁移。

[0477] D. 竖直导管

[0478] 在装置的一个示例性的实施方案中的竖直导管是能够以竖直取向将细胞从流体（即血浆或血清）分离的玻璃纤维过滤器（例如 Millipore AP25）。竖直导管在形状上是矩形的并且具有 0.13 英寸 × 0.25 英寸。竖直导管使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜被附着于近端覆盖物并且直接地位于远端出口孔上方。竖直导管被定位为垂直于壳体的平面。远端孔控制流体流动，使得流体仅可以通过指示物条的毛细管作用进入指示物壳体，并且因此不能够围绕指示物条流动并且避免在指示物条内被合适地分辨。

[0479] E. 竖直导管壳体

[0480] 竖直导管壳体是薄的刚性材料。具体地，两个刚性聚氯乙烯片被用于构建以 0.02 英寸的总厚度的近端覆盖物。竖直导管壳体与近端覆盖物具有相同的尺寸 (5 英寸 × 1 英寸)。在竖直导管壳体中具有一个洞。洞是圆形的，在直径上 0.50 英寸，并且被定位在竖直导管壳体的中部以调节竖直导管。竖直导管壳体使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜被附着于近端覆盖物，使得中心孔与近端覆盖物上的中心孔对准。

[0481] F. 指示物壳体

[0482] 指示物壳体是薄的刚性材料。具体地，刚性聚氯乙烯用于构建以 0.04 英寸的厚度的指示物壳体。指示物壳体的大小和形状与近端覆盖物的大小和形状相同。在指示物壳体中具有一个洞。洞是矩形的，具有 4.52 英寸（从左至右）× 0.53 英寸（从近端至远端），并且被定位在近端覆盖物的中部。指示物壳体使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜被附着于竖直导管壳体。在以这种方式定位指示物壳体时，竖直导管被定位在矩形的切口的中心部

中并且垂直于矩形的切口的中心部的平面,使得经过竖直导管的流体流动垂直于指示物壳体的平面。指示物壳体提供围绕多孔介质部件的最小内部容积。这防止湿度和其他环境变量影响装置中的流体迁移特征。

[0483] G. 指示物条

[0484] 指示物条是由 Whatman LF1(保留大于  $2 \mu\text{m}$  的颗粒的  $247 \mu\text{m}$  厚的被 PVA 处理的玻璃纤维纸;Whatman, New Jersey, 美国) 制成的横向流动多孔膜。条在形状上是矩形的,遵循指示物壳体的形状。条具有  $3.93$  英寸(从左至右)  $\times 0.04$  英寸(从近端至远端)。指示物条的厚度沿着指示物条的长度从左至右改变,使最厚的部分设置在装置的中部。条的最厚的中部部分具有  $0.25$  英寸厚度并且占据条的  $0.97$  英寸( $1.19$  英寸包括锥形的端部)的中心部分。条的剩余部分与该厚部分邻接并且具有  $0.04$  英寸厚度。

[0485] 使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜,指示物条被附着于远端顶部的底部表面,如本文描述的远端顶部还与其外顶部表面形成装置的顶部。因此,条被压至装置的顶壁的下侧,使得条被夹在装置的顶壁和背衬之间。在指示物条和指示物条的背衬被附着于远端顶部的底部表面时,使用 3M 的 467MP 2.3mil 转移胶膜将远端顶部附着于指示物壳体,使得指示物条被定位在指示物壳体的大卵形洞内,由此产生容纳指示物条的密封的内部容积。因此,指示物条被容纳在这样的空间中,其中由竖直导管壳体提供的空间的底部或地板作为条的基部,指示物壳体中的洞提供围绕条的空间的壁,并且远端顶部的底部表面提供空间的顶壁。可选择的垫可以被包括在指示物条的左端和右端,以在流体的毛细管流动未在指示物条中被停止的情况下,提供用于收集过量的样品流体的下沉部。

[0486] 在装置的一些实施方案中,通过将干燥的溴酚蓝(BPB)以  $10\text{mg/ml}$  [重量比体积(w/v)]溶解入  $95\%$  乙醇中制备的  $2 \mu\text{l}$  溶液可以被施用至指示物条的左垫和右垫的中心部上并且被允许干燥 5 分钟。蓝色提供对流体迁移至指示物条的左垫和右垫的目测指示物,指示条的饱和。

[0487] H. 远端顶部

[0488] 远端顶部是薄的刚性材料。具体地,刚性聚氯乙烯用于构建以  $0.01$  英寸的厚度的远端顶部。远端顶部的尺寸和形状与指示物壳体的尺寸和形状相同。远端顶部的一个表面形成装置的面向外部的顶部。使用 3M 的 467MP2.3mil. 转移胶膜,指示物条被附着于远端顶部的相对的(或底部)表面,使得指示物条与远端顶部的长的薄的矩形的透明部分或窗对准。半圆形凹口被在远端侧上从左剪切  $1.85$  英寸并且在近端侧上从左剪切  $3.15$  英寸,以允许滤纸的合适的对准。使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜,如此形成的远端顶部 / 指示物条元件被附着于指示物壳体的顶部表面,使得指示物条被定位在指示物壳体的洞内,由此产生容纳指示物条的密封的内部容积。

[0489] 远端顶部的面向外的表面印刷有指示装置的功能的图。例如,刻度尺或其他类型的用于确定条的每个臂的流体前沿的位置的位置指示物用于确定样品是否含有阈值水平的分析物,或未被标记的窗可以被使用,使得如果流动在通过窗可见的介质部分内停止,那么这将指示阈值浓度已经被达到。校准曲线用已知量(即标准样品)的分析物来准备,以确定用于条的分析物的阈值浓度的量。然后装置可以被调节(例如通过改变微珠浓度和位置、聚合物浓度、抗体浓度),直到期望的阈值浓度在指示物条上的期望的位置处被实现。如果装置将被用于分析物的定量测量,那么标记将是在有关的范围内的浓度单元。其他的标

记物可以提供一般的信息。

[0490] 实施例 3

[0491] 汇合路径装置组装

[0492] 本实施例描述可以用于基于流体在被改性的和未被改性的路径中的迁移距离的比较（并且因此间接地，流速的比较）来定性或定量分析样品流体的组分的示例性的汇合路径装置的组装。使用如本文描述的部件和规格组装装置。示例性的装置的外壳体是在装置的底部上是实心的并且具有在装置的顶部上用于将流体样品施用入近端井中的孔的刚性材料。在示例性的实施方案中，被组装的装置在形状上是矩形的，具有圆形的近端和远端（见例如图 9A 和 9B）。装置的尺寸是 5.3 英寸乘 1.5 英寸（12.5 乘 2.5cm）。七个分离的物理元件以分层的方式被附着以产生被组装的装置，被组装的装置然后可以被组装入外壳体中。如此组装的元件如下地在装置内产生流体路径：用于接收流体样品的近端并与体积毛细管储器流体连通，以将样品通过远端出口孔转移至竖直导管的下侧，并且在竖直导管的顶部和被称为指示物刻度盘的多孔介质的环的近端部分之间有接触点。在装置的特定的实施方案中，多孔介质的环是椭圆形的（例如蛋形的）或以跑道的形状（即具有两个平行的直线段，其在每个端部与圆形的半圆接合）。在装置的其他实施方案中，指示物刻度盘被线性的矩形的指示物条代替。

[0493] 示例性的装置的外表面是在装置的底部上是实心的并且具有在装置的顶部上用于将流体样品施用入近端井中的孔的刚性材料（具体地，丙烯腈丁二烯苯乙烯（ABS），雪白；lustran 348-012002（Proto Labs））。外表面的顶部的一部分是用于察看以相反的方向围绕汇合的路径运动的流体前沿的汇合的透明的固体材料。例如，在特定的实施方案中，窗是以马蹄铁的形状，被定位在卵形的指示物刻度盘的远端一半处上方。在另一个实施方案中，窗在形状上是矩形的，被定位在跑道形状的指示物刻度盘的直线部分上方。在壳体中的该透明窗利于对迁移经过指示物刻度盘的每个臂的两个分离的流体前沿汇合的界面的目测。外表面的顶部的另外的部分也可以是透明的固体材料，例如，诸如被定位在指示物刻度盘上的地点上方的提供流体成功迁移入多孔介质中的可见指示的一个或多个窗。以下是对装置的部件和其组装的详细描述。

[0494] A. 近端底部

[0495] 装置的近端底部是实心的薄的刚性材料，具有外表面和内表面（见例如图 12）。具体地，刚性聚氯乙烯用于构建以 0.01 英寸的厚度的近端底部。所有的形状使用 Allen Datagraph 模板制造器（Allen Datagraph Systems, Inc., Derry, New Hampshire, 美国）来生产。部件在计算机辅助设计（CAD）程序中被设计，然后由模板制造器“印刷”，模板制造器将塑料的片切割为期望的形状。近端底部的外表面提供装置的外部实心的基部，而相对的表面或内表面提供装置的内部底部。近端壳体的内表面作为体积毛细管储器的底部封闭物（bottom closure）并且提供用于待施用的流体样品的表面。在装置的一些实施方案中，近端底部的内部的流体样品施用区域被物质包覆以预处理流体，以利于其迁移。例如，如果流体样品是血液，那么样品施用区域可以被例如含有 195U/ml 的肝素钠盐的 70% 乙醇的 20 μl 溶液包覆（以抑制血液样品的凝固）并且被温和的 0.3% Tween-20®溶液包覆以促进血液向体积毛细管储器中迁移。

[0496] B. 近端壳体

[0497] 近端壳体是薄的刚性材料。具体地，刚性聚氯乙烯用于构建以 0.02 英寸的厚度的近端壳体。近端壳体的尺寸和形状（即长度和宽度）与近端底部的尺寸和形状相同（见例如图 12）。在近端壳体中具有以 0.576 英寸长的中心至中心泪滴体的形状的洞，其中泪滴体的 0.5 英寸直径宽端部相对于泪滴体的 0.12 英寸直径窄端部的位置被定位在近端。近端壳体使用 3M 的 467MP 2.3 毫升转移胶膜 (3M, St. Paul, Minnesota) 被附着于近端底部。一旦被附着于近端底部，那么近端壳体中的洞的边缘提供体积毛细管储器的壁并且将储器的容积设置为 0.002 立方英寸 ( $33 \mu l$ )。储器的泪滴体形状的宽的圆形端部还作为流体递送储器。因此，近端壳体设置毛细管储器的容积并且将样品流体引导至体积毛细管储器的远端出口。在装置的一些实施方案中，储器的边缘被物质包覆以预处理流体样品。例如，储器的边缘可以被温和的 Tween-20<sup>®</sup>溶液包覆，以促进样品流体向储器的远端出口迁移。在一些情况下，当流体样品是血液时，储器的边缘和近端覆盖物盖住体积毛细管储器的部分共同地被含有 195U/ml 的肝素钠盐的 70% 乙醇的  $10 \mu l$  溶液包覆以抑制血液样品的凝固并且被温和的 0.3% Tween-20<sup>®</sup>溶液包覆以促进血液向体积毛细管储器中迁移。

[0498] C. 近端覆盖物

[0499] 近端覆盖物是薄的刚性材料。具体地，刚性聚氯乙烯用于构建以 0.01 英寸的厚度的近端覆盖物。近端覆盖物的尺寸和形状（即长度和宽度）与近端壳体的尺寸和形状相同（见例如图 12）。在近端覆盖物中具有两个洞。一个洞在形状上是圆形的，在直径上 0.5 英寸，并且相对于第二洞被定位在近端，第二洞在直径上是 0.125 英寸。近端覆盖物使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜被附着于近端壳体，使得较大的近端圆洞被定位在由近端壳体形成的储器的泪滴体形状的宽的圆形端部上。一旦被附着，那么近端覆盖物盖住体积毛细管储器，留出用于流体样品递送储器的圆形开口。在近端覆盖物中的较小的远端圆洞提供体积毛细管储器的远端出口孔。远端出口孔被控制尺寸和定位为促进样品流体向竖直导管中毛细管芯吸。如上文提到的，近端覆盖物盖住体积毛细管储器的部分以及储器的边缘可以被物质包覆以促进流体样品向体积毛细管储器中迁移和迁移经过体积毛细管储器。

[0500] D. 竖直导管

[0501] 竖直导管是多孔材料。具体地，在示例性的实施方案中，竖直导管可以是玻璃纤维过滤器，例如，诸如带有具有以下规格的粘合剂树脂的 Millipore AP25 玻璃纤维过滤器： $2.0 \mu m$  孔径大小； $1200 \mu m$  厚度； $5.8 \text{mL/min/cm}^2$  水流速； $35 \text{mm}$  的  $\text{H}_2\text{O}$ ，以  $10.5 \text{fpm}$  或  $5.3 \text{cm/s}$  空气阻力； $63.6 \text{L/min/cm}^2$ ，以  $10 \text{psi}$  空气流速；以  $10.5 \text{FPM}$  的  $0.03\%$  DOP 穿透率； $110 \mu g/\text{cm}^2$  蛋白结合；以及  $140 \text{g/m}^2$  重量 (Millipore, Billerica, Massachusetts)。竖直导管的形状是  $3/16$  英寸直径圆形或半圆形，分别取决于指示物刻度盘是卵形的还是跑道形状的。使用圆形的或半圆形的形状，以使在竖直导管的远端边缘上的任何点距指示物刻度盘的分辨区域的近端边缘的距离是一致的（见例如图 13）。这种设计促进流体前沿从竖直导管通过并且进入指示物刻度盘中，使得流体前沿在指示物刻度盘的分辨区域处汇合。竖直导管使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜被附着于近端覆盖物并且直接地位于远端出口孔上方。竖直导管被定位为垂直于壳体的平面。远端孔控制流体流动，使得样品流体仅可以通过指示物刻度盘的毛细管作用进入指示物壳体，并且因此不能够围绕指示物刻度盘流动并且避免在指示物刻度盘内被合适地分辨（即流体被强迫流过指示物刻度盘）。当用于血液样品时，竖直导管可以具有从血浆过滤红血球（其可以干涉指示物刻度盘的读取）的另外的功能。

[0502] E. 指示物壳体

[0503] 指示物壳体是薄的刚性材料。具体地,刚性聚氯乙烯用于构建以 0.04 英寸的厚度的指示物壳体。指示物壳体的尺寸和形状(即长度和宽度)与近端覆盖物的尺寸和形状相同(见例如图 12)。在指示物壳体中具有两个洞。一个洞在形状上是圆形的,在直径上 0.5 英寸,并且相对于第二洞被定位在近端。第二洞在形状上是卵形的或跑道形状的,分别取决于指示物刻度盘是卵形的还是跑道形状的。对于装置的一个实施方案,卵形是圆形的并且洞在直径上是 4.5cm。洞的尺寸被确定为是被容纳在洞内的指示物刻度盘的尺寸。指示物刻度盘的尺寸基于正在被测量的浓度的范围或正在被测试的 INR 值以及围绕指示物刻度盘的流体的流动的速率来确定。为了计算条的周长,进行测试以确定样品必须行进多远(以及因此多长时间)以实现特定的分析物的浓度或 INR 值之间的最大的分辨率(在被确定的可接受的时间限制内)。无论迁移得最远的样品平均地移动多远,该距离都被加倍,以计算总周长。距离被加倍,因为从每个方向的竞争性的流动将以与迁移得最远的样品相同的速率或以接近迁移得最远的样品的速率行进,并且因此将围绕条在半途相遇。指示物壳体使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜被附着于近端覆盖物,使得壳体中的圆形的近端洞被直接地定位在近端覆盖物中的圆形的近端洞上方。在以这种方式定位指示物壳体时,竖直导管被定位在指示物壳体中的远端卵形(或跑道形状的)洞中并且垂直于该远端卵形(或跑道形状的)洞的平面。指示物壳体提供围绕指示物刻度盘部件的最小内部容积。这防止湿度和其他环境变量影响装置中的流体迁移特征。

[0504] F. 指示物刻度盘

[0505] 指示物刻度盘是多孔材料,在装置的示例性的实施方案中,指示物刻度盘被定位为使得流体横向地流过指示物刻度盘(见例如图 10、图 11、图 13)。在特定的实施方案中,指示物刻度盘由薄的玻璃纤维材料制成。特别地,使用 LF1 玻璃纤维(Whatman, New Jersey, 美国)。这是可以除去大于  $2 \mu\text{m}$  的颗粒的与聚乙烯醇结合的玻璃纤维过滤器。指示物刻度盘是环,并且在特定的实施方案中是卵形的或跑道形状的,相应于指示物壳体的第二较大的洞的形状。关于 2mm 宽的条,指示物刻度盘的外尺寸通常在周长上是在 4cm 至 15cm 之间,并且最普通地在周长上是 10cm。指示物刻度盘的形状可以在形状上是从圆形到跑道的任一种,其中跑道的两个平行的侧是几乎接触的。使用 3M 的 467MP 2.3mil. 转移胶膜,指示物刻度盘被附着于远端顶部的底部表面,如本文描述的远端顶部还与其外顶部表面形成装置的顶部。在指示物刻度盘被附着于其的底部表面时,远端顶部使用 3M 的 467MP 2.3mil 转移胶膜被附着于指示物壳体,使得指示物刻度盘被定位在指示物壳体的远端第二(卵形的或跑道形状的)洞内,由此产生容纳指示物刻度盘的密封的内部容积。指示物刻度盘因此被容纳在这样的空间中,其中由近端覆盖物提供的空间的底部或地板作为刻度盘的基部,指示物壳体中的远端第二洞提供围绕刻度盘的空间的壁,并且远端顶部的底部表面提供空间的顶壁。指示物刻度盘环的近端部分被定位在竖直导管的被附着在近端覆盖物上的顶部上方并且与该顶部接触。这种设计提供从竖直导管的下侧向上并且向指示物刻度盘的近端中的流体迁移。在进入指示物刻度盘之后,流体围绕指示物刻度盘的臂在两个方向(顺时针和逆时针)迁移,直到两个流体前沿在刻度盘中的点处汇合。在该点处,指示物刻度盘的多孔介质达到饱和并且不能发生进一步的流体迁移。

[0506] 在指示物刻度盘材料中可以包括染料以利于对刻度盘中的流体前沿的目测。在

装置的特定的实施方案中,在指示物刻度盘中包括溴酚蓝。干燥的溴酚蓝(BPB)以10mg/ml[重量比体积(w/v)]被溶解入95%乙醇中。2μl的这种溶液在一个点(位于刻度盘中的点的任一个侧上,流体在该点从竖直导管进入刻度盘)处被施用至指示物刻度盘上并且被允许干燥。粉末状的染料在与样品流体接触时成为可见的,并且使两个流体前沿的汇合点容易地可见。

[0507] 在装置的特定的实施方案中,指示物刻度盘的一个臂被处理以相对于在指示物刻度盘的另一个臂中的流体流动的速率,改变在该臂中的样品流体的流动的速率。对指示物刻度盘的臂的处理使得含有关心的分析物的流体的流动的速率将在臂中以取决于分析物浓度的方式被改变。在特定的装置中使用的处理将基于正在被测量的分析物而变化。本文描述处理的选择和处理的多个实施例。另外的处理可以由本领域技术人员基于本文提供的教导内容根据经验来确定。

[0508] G. 远端顶部

[0509] 远端顶部是薄的刚性材料,具有形成在远端顶部中的窗的透明材料的区域。具体地,刚性聚氯乙烯用于构建每层的刚性聚氯乙烯以一英寸的10/1000的厚度的指示物壳体。刻度被标记在外壳体或远端顶部上。远端顶部还含有两个圆形的切口区域:一个在远端处并且另一个在近端处。远端圆形切口是允许被位移的空气在样品流体被拉动入装置中时逃逸的空气逃逸开口。空气逃逸洞的尺寸简单地需要是足够大的,以允许在装置内的容积被液体替换时空气逃逸。在一个实施方案中,空气洞在直径上是3/32。近端圆形切口(在直径上0.5英寸)形成孔,样品流体经过孔被引入体积毛细管储器中并且被定位为在指示物壳体中的圆形的近端洞的正上方。

[0510] 远端顶部的尺寸和形状与指示物壳体的尺寸和形状相同(见例如图12)。远端顶部的一个表面形成装置的面向外壳体的顶部。使用3M的467MP 2.3mil.转移胶膜,指示物刻度盘被附着于远端顶部的相对的(或内部)表面,使得指示物刻度盘的一部分与远端顶部的一部分对准,该部分与外壳体上的窗对准。对于具有卵形的指示物刻度盘的装置来说,指示物刻度盘环的马蹄形的远端半部分与远端顶部的马蹄形的透明的部分对准。对于具有跑道形状的指示物刻度盘的装置来说,在刻度盘的左边的直部分与远端顶部的矩形的透明的部分对准。远端顶部中的第二透明窗是圆形的,在直径上1/8英寸,并且位于流体递送井孔和马蹄形的(或矩形的)透明窗之间。该圆形窗被定位在指示物刻度盘的近端边缘上方,在流体从竖直导管进入指示物刻度盘的点处或在该点附近。对于具有跑道形状的指示物刻度盘的装置的实施方案来说,第二圆形窗被定位在相对于矩形窗的远端的远端。圆形窗利于对到达指示物刻度盘的近端或远端的流体样品的存在的目视观察并且因此在足够的样品已经被施用时通知用户。

[0511] 使用3M的467MP 2.3mil.转移胶膜,如此形成的远端顶部/指示物刻度盘元件被附着于指示物壳体的顶部表面,使得指示物刻度盘被定位在指示物壳体的远端洞内,由此产生容纳指示物刻度盘的密封的内部容积。在远端顶部中的马蹄形的或矩形的透明窗利于对围绕指示物刻度盘的每个臂迁移的流体前沿的汇合点的目测。

[0512] H. 示例性的装置的校准

[0513] 远端顶部或外壳体的面向外的表面印刷有指示装置的功能的图。围绕卵形的指示物刻度盘的周长的远端半部分,或在矩形窗的长侧中的一个或两个上的刻度尺允许对两个

流体前沿的汇合的位置的读取。校准曲线用已知量或特征的正在被测定的流体变量（即标准样品）来制备，以确定对于不同量或特征的流体变量来说，两个流体前沿将在指示物刻度盘上汇合的位置。然后装置可以被调节（例如通过改变抗体、微珠、多聚体和沉淀剂的浓度和 / 或位置），直到对于不同的量 / 特征的流体变量来说，流体前沿汇合位置在指示物刻度盘上的期望的地点处被实现。如果装置将被用于分析物的定量测量，那么标记将是例如在有关的范围内的浓度单元。其他的标记物可以提供一般的信息。

[0514] 实施例 4

[0515] 分析物对多孔介质中的流体流速的影响

[0516] 在本实施例中，使用如下文描述的线性横向流动装置测试含有分析物（中性抗生物素蛋白）的流体样品的迁移距离。

[0517] A. 装置组装

[0518] 一套六个线性横向流动装置被组装以评估流体样品在分析物的存在或不存在下的迁移距离。装置相似于在实施例 1 中描述的装置，例外是这些装置不具有外壳体。20mm 宽的主横向流动条被首先组装，如下文描述的，并且 2mm 宽的分别的条被相继地从该主条切割。将主条部件靠着标准的横向流动背衬（具有在一个侧上的粘合剂覆层的 PVC 片）组装。从近端到远端，横向流动材料是：(1) 具有 PVA 结合的 20mm 硼硅酸盐玻璃纤维滤纸 (Ahlstrom 8975)，(2) 15mm 嵌段硝酸纤维素膜 (VIVID™ 170 ;Pa11)，以及 (3) 47mm 被 PVA 处理的玻璃纤维滤纸 (Whatman LF1)。在组装之前，硝酸纤维素膜 (VIVID™ 170 ;Pa11) 被在 PBS 中的 1mg/ml 中性抗生物素蛋白在室温堵塞 1 小时，在 PBS 中洗涤两次，每次 5 分钟，使用 H<sub>2</sub>O 漂洗两次，并且在室温干燥过夜。材料被排布，使第二部件 (VIVID™ 170 ;Pa11) 首先压在粘合性背衬上，使其自身的背衬与装置背衬接触。第一部件 (Ahlstrom 8975) 和第三部件 (Whatman LF1) 被相继地排布，使得它们在第二部件 (VIVID™ 170 ;Pa11) 的侧面，具有在第二部件 (VIVID™ 170 ;Pa11) 的每个端部上的 2mm 的重叠。此外，第一部件 (Ahlstrom 8975) 被排布，使得材料的一部分在距主条的近端上的粘合性背衬 5mm 附近悬垂。

[0519] 然后将总共六个 2mm 宽的分别的条从 20mm 宽的主条切割，并且使用实施例 1 中描述的部件来构建为分别的装置。2mm 宽的条被压至装置的顶壁的下侧，使得条材料被夹在装置的顶壁和背衬之间。被组装的装置包含 3/16 英寸直径聚乙烯垫 (POR-4897 ;POREX ®)，3/16 英寸直径聚乙烯垫形成在毛细管储器和第一条部件 (Ahlstrom 8975) 的悬垂的近端之间的桥接物。

[0520] B. 样品迁移测试

[0521] 在本实施例中，使用在本实施例的 A 部分中描述的装置测试含有分析物（中性抗生物素蛋白）的流体样品的迁移距离。流体样品通过将中性抗生物素蛋白 (Pierce) 或 PBS 加入被染色的胶乳珠和 LPA- 生物素在 PBS 中的主混合物来制备。

[0522] 在这些实验中使用的 LPA- 生物素根据以下方案来合成。以下反应在 15ml 螺旋盖管中进行：16 μl 20% APMA、984 μl 20% 丙烯酰胺、952 μl dH<sub>2</sub>O、40 μl 10% APS 和 8 μl TEMED。其被良好混合并且在室温静态温育 2 小时。4.0ml dH<sub>2</sub>O 被加入并且然后使用 1ml 吸管混合，试图实现相当均一的悬浮液。混合在旋转 / 摆动平台上连续进行，直到实现均一的悬浮液（约 4-6h）。4-6ml 的 LPA-NH<sub>2</sub> 悬浮液被转移至渗析管路并且在室温在 2L 烧杯中（使用搅拌）相对 1.8L dH<sub>2</sub>O 渗析 2 次，其中第一次渗析过夜并且第二次渗析 2-4 小时。将

LPA-NH<sub>2</sub> 从渗析管路回收并且转移至 15ml 螺旋盖管。然后使用茚三酮测定来确定碱性胺浓度 (basic amine concentration)。

[0523] LPA-NH<sub>2</sub> 的生物素化使用以下方案来实现。进行含有以下的反应 :1. 2ml LPA-NH<sub>2</sub> (约 1.7 μ M NH<sub>2</sub>)、112 μ l 500mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、8. 16 μ l 500mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、和 16. 7 μ l 2mg/ml 硫代-NHS-LC- 生物素 (在即将加入反应之前被悬浮在水中)。本反应被良好混合, 然后在 4°C 温育过夜。在过夜温育之后, 剩余的胺用乙酸酐如下地封端 :通过加入 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 将反应的 pH 调节至 ~ 7.0 ;在冰水浴中冷却溶液, 然后以 15min 间隔加入三个 2 μ l 部分的纯的乙酸酐, 在每次加入之后进行混合。将生物素化 / 乙酸酐反应产物使用 Pierce 20,000MWCO Slide-A-Lyzer 渗析暗盒相对于 dH<sub>2</sub>O 渗析 (使用 Pierce 推荐的方案)。

[0524] 在 LPA- 生物素的合成之后, 样品主混合物通过混合 15 μ l 的在 PBS 中的 53nm 被染色的胶乳珠 (Bangs Labs ;Cat#DS02B/8692) 的 1% 浆料、15 μ l 的在 PBS 中的 120nm 被染色的胶乳珠 (Bangs Labs ;Cat#DS02B/9112) 的 1% 浆料、15 μ l 的在 PBS 中的 14.7 μ M LPA- 生物素以及 155 μ l 的 PBS (总共 200 μ l) 来制备。将 80 μ l 的主混合物等分入两个管中。每个管用 20 μ l PBS 或 20 μ l 的在 PBS 中的 1mg/ml 中性抗生物素蛋白来增敏, 迅速混合 3 次, 并且立即用吸管通过装置的样品口或近端井移至测试条装置上。随时间记录流体前沿的迁移距离并对其进行比较。测试进行三份。对于每个时间点, 计算平均迁移距离和标准偏差。结果在以下的表 3 中呈现。

| 时间 (min) | 平均迁移距离 (mm) n=3 |      |            |      |
|----------|-----------------|------|------------|------|
|          | - 中性抗生物素蛋白      |      | + 中性抗生物素蛋白 |      |
|          |                 | 标准偏差 |            | 标准偏差 |
| 0        | 0               | 0    | 0          | 0    |
| 0.08     | 10.17           | 0.29 | 8.17       | 2.57 |
| 0.17     | 17.50           | 2.29 | 15.67      | 1.61 |
| 0.25     | 21.33           | 1.04 | 20.33      | 0.29 |
| 0.5      | 25.67           | 0.29 | 26.33      | 1.53 |
| 0.75     | 29.00           | 0.00 | 28.67      | 0.58 |
| 1        | 32.17           | 0.29 | 30.00      | 0.00 |
| 1.5      | 35.83           | 0.58 | 34.33      | 0.76 |
| 2        | 40.17           | 0.29 | 36.00      | 1.00 |
| 3        | 45.17           | 1.89 | 40.50      | 3.97 |
| 4        | 51.33           | 0.58 | 42.67      | 5.06 |
| 5        | 56.33           | 3.79 | 44.17      | 5.97 |
| 6        | 62.00           | 2.00 | 45.5       | 6.50 |
| 7        | 67.33           | 3.79 | 46.33      | 6.66 |
| 8        | 72.00           | 5.20 | 47.33      | 7.18 |
| 9        | 73.67           | 2.31 | 47.33      | 7.18 |
| 10       | 75.00           | 0.00 | 47.33      | 7.18 |
| 15       | 75.00           | 0.00 | 49.83      | 8.81 |
| 20       | 75.00           | 0.00 | 49.83      | 8.81 |

[0525]

[0526] 本实验的结果表明, 缺乏中性抗生物素蛋白的样品比含有中性抗生物素蛋白的样品迁移得更远。这些结果总是在两分钟之后的点被观察。在两分钟之前测量的迁移距离显示出几乎没有变化。因此, 分析物在流体样品中的存在基于测试条上的流体迁移的停止被可再现地检测。

[0527] 实施例 5 粘度对多孔介质中的流体流速的影响

[0528] 以下实施例描述被进行用于表明流体粘度差异可以如何影响多孔膜中的流体流速并且用于表明这种原理可以被如何用作测量血液样品的凝结的能力的基础的实验。

[0529] A. 装置组装

[0530] 使用被切割至 2mm 乘 80mm 的多孔滤纸 (Ah1strom 8975) 的单一的线性块来构建条。条被压至装置的顶壁的下侧。对于每个被组装的装置, 3/16 英寸直径的被促凝血酶原激酶处理的聚乙烯垫 (POR-4897 ;POREX ®) 被附着于装置, 使得圆盘形成在毛细管储器和条材料 (Ah1strom 8975) 的悬垂近端之间的桥接物。在组装之前, 每个 POREX ® 垫被 20 μl 的 20% 甘油 / 2x 促凝血酶原激酶 DS (Fisher Scientific Cat#292273DEM) 溶液处理并且在室温干燥过夜。

[0531] B. 血浆迁移

[0532] 在本实验中, 在将样品施用至部分 A 中描述的线性多孔条装置之后的各个时间点测量具有报道的国际标准化比值 (INR) 的人类血浆样品的迁移距离。

[0533] 可商购获得的 INR 对照血浆 (Fisher Scientific Cat#23-029-227) 根据制造商的说明书来制备。1.0、1.1、2.3 和 4.0 的 INR 样品使用上文描述的线性测试条来测试。对于每个 INR 血浆样品, 将 900 μl 的血浆样品与 100 μl 的 200nm 被染色的胶乳珠 (Polysciences Cat#15706) 的 2.59% 浆料混合。将 80 μl 的该混合物施用于每个装置, 并且记录迁移距离。对每个 INR 样品进行十次线性条测试。下表呈现在 0 至 240 秒之间的各个时间点的每个 INR 的样品平均迁移距离以及标准偏差。

| 时间 (秒) | 平均迁移距离 (mm) n=10 |      |         |      |         |      |         |      |
|--------|------------------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
|        | INR 1.0          | 标准偏差 | INR 1.1 | 标准偏差 | INR 2.3 | 标准偏差 | INR 4.0 | 标准偏差 |
| 0      | 0                | 0    | 0       | 0    | 0       | 0    | 0       | 0    |
| 5      | 7.60             | 0.57 | 7.6     | 1.29 | 8.15    | 2.14 | 9       | 1.58 |
| 10     | 13.05            | 1.01 | 12.8    | 1.99 | 13.7    | 2.90 | 14.35   | 1.92 |
| 15     | 17.85            | 1.55 | 17.75   | 2.18 | 18.1    | 3.36 | 18.5    | 2.00 |
| 20     | 22.15            | 1.27 | 22      | 2.61 | 22.15   | 4.44 | 22.8    | 1.99 |
| 30     | 28.25            | 1.62 | 29      | 3.04 | 28.05   | 5.12 | 29.5    | 2.21 |
| 45     | 28.75            | 2.07 | 31.45   | 2.63 | 35.3    | 5.56 | 37.35   | 2.42 |
| 60     | 28.75            | 2.07 | 31.45   | 2.63 | 39.45   | 4.59 | 45.1    | 2.51 |
| 75     | 28.75            | 2.07 | 31.45   | 2.63 | 41.2    | 3.58 | 51.1    | 3.07 |
| 90     | 28.75            | 2.07 | 31.45   | 2.63 | 41.65   | 3.59 | 54.75   | 3.00 |
| 120    | 28.75            | 2.07 | 31.45   | 2.63 | 41.65   | 3.59 | 55.35   | 3.10 |
| 240    | 28.75            | 2.07 | 31.45   | 2.63 | 41.65   | 3.59 | 55.35   | 3.10 |

[0534] [0535] 本实验表明, 具有较高的 INR 值的血浆样品一贯地比具有较低的 INR 的样品迁移得更远。这发生是因为具有较高的 INR 值的样品具有较长的凝结时间, 并且因此相对于不凝结的血浆, 在由凝结的血浆的增加的粘度导致的被凝结诱导的减慢发生之前迁移得更远。样品之间的迁移距离的分辨在 45 秒是明显的, 完全的分辨在 120 秒被观察到。因此, 可能的是, 基于经过多孔测试条的迁移距离合适地辨别在被测试的 INR 的范围内并且在 120 秒内具有不同的凝结性质的样品。

[0536] 在这些实验中使用的珠和染料辅助流体前沿的目测。例如, 珠随流体前沿迁移。然而, 少量的染料也被包括, 以帮助目测实际流体。在延长的一段时间 (即 30 分钟或更长) 之后, 血清将在珠已经在一些样品中停止之处逐渐流出血浆之外。这种血清具有染料的颜

色,因为珠仍然被含在血浆凝块内。

[0537] 使用标准的目视检查进一步分析上文的 INR 样品的凝结性质。具体地,将 30  $\mu$ l 的每种 INR 样品在 37°C 用吸管移入样品管中。将 60  $\mu$ l 的 37°C 促凝血酶原激酶 -DS(1.0 的 ISI) 强制分配入管中,然后柔和地用吸管吸取。凝固时间以目测方法或基于何时流体成为对吸管吸取有抵抗性(被首先观察到的任何一个)来确定。每个 INR 样品进行五次测试。基于平均凝结时间(凝血酶原时间)并且使用以下的用于 INR 计算的公式计算 INR 值:

[0538]

$$INR = \left( \frac{PT_{\text{测试}}}{PT_{\text{正常}}} \right)^{ISI}$$

[0539] 其中:

[0540]  $PT_{\text{测试}}$ =凝血酶原时间(测量值)

[0541]  $PT_{\text{正常}}$ =正常的凝血酶原时间(对照)

[0542] ISI=国际灵敏度指数(由制造商提供的经验常数)

[0543] 将每个样品的计算出的平均 INR 值与上文的血浆迁移结果比较。下表 5 呈现了对于标准试验的平均凝结时间(从左第 3 列)和相应的平均计算出的 INR(从左第 2 列),并且呈现了样品在多孔测试条上停止的平均距离(从右第 3 列)。

[0544]

表5: 血浆迁移对凝结时间

| 报道的 INR | 标准测试 (n=5) |      |      |        | 在多孔条中的迁移 (n=10) |      |        |
|---------|------------|------|------|--------|-----------------|------|--------|
|         | 计算的 INR    | 平均时间 | 标准偏差 | CV (%) | 平均距离 (mm)       | 标准偏差 | CV (%) |
| 1.0     | 1.0        | 16.8 | 0.84 | 4.98   | 28.75           | 2.07 | 7.21   |
| 1.1     | 1.2        | 19.0 | 0.71 | 3.72   | 31.45           | 2.63 | 8.36   |
| 2.3     | 2.3        | 34.0 | 1.0  | 2.94   | 41.65           | 3.59 | 8.62   |
| 4.0     | 3.7        | 49.6 | 2.41 | 4.86   | 55.35           | 3.10 | 5.60   |

[0545] 本实验表明,血浆在多孔条中的迁移距离与使用标准的视觉测定测量的凝结时间成比例。具体地,具有较长的凝结时间的样品一致地产生较长的迁移距离。因此,多孔介质中的血浆流动的测量能够产生血浆凝结性质的评估的可预测的结果。

[0546] 实施例 6

[0547] 预计粘度对汇合流动多孔介质中的流体流速的影响

[0548] 以下实施例描述被进行用于表明流体粘度差异可以如何影响线性多孔膜中的流体流速并且用于表明从线性流动装置获得的数据可以被如何用于预测在环流装置上的汇合的迁移值的实验。

[0549] A. 装置组装

[0550] 使用被切割至 2mm 乘 100mm 的被 PVA 处理的玻璃纤维纸(Whatman LF1)的单一的线性块来构建条。条被压至装置的顶壁的下侧,使得条材料被夹在装置的顶壁和背衬之间。对于每个被组装的装置,3/16 英寸直径的被促凝血酶原激酶处理的聚乙烯垫(POR-4897; POREX ®)被附着于装置,使得圆盘形成在毛细管储器和条材料(Whatman LF1)的悬垂近端之间的桥接物。在组装之前,每个 POREX ® 垫被 20  $\mu$ l 的 2× 促凝血酶原激酶 DS(Fisher Scientific Cat#292273DEM) 溶液处理并且在室温干燥过夜。

[0551] B. 血浆和血清迁移

[0552] 在本实验中,在将样品施用至部分 A 中描述的线性多孔条装置之后的各个时间点测量具有已知的凝结性质的人类血浆样品的迁移距离。

[0553] 健康的血浆 (Fisher Scientific Cat#176198)、凝结被削弱的血浆 (Fisher Scientific Cat#176214) 和血清 (没有凝固能力) 样品使用上文描述的线性测试条来测试。对于每个样品, 将 900  $\mu$ l 的血浆或血清样品与 100  $\mu$ l 的 200nm 被染色的胶乳珠 (Polysciences Cat#15706) 的 2.59% 浆料混合。将 80  $\mu$ l 的该混合物施用于每个装置, 并且记录迁移距离。对每个血浆或血清样品进行三次线性条测试。下表呈现在 5 秒至 900 秒之间的时间点的每个样品的样品平均迁移距离以及标准偏差 (不是对所有的样品都记录所有的时间点)。

| 表6: 血浆和血清迁移 |                   |                 |        |          |      |       |      |
|-------------|-------------------|-----------------|--------|----------|------|-------|------|
| 时间          |                   | 平均迁移距离 (mm) n=3 |        |          |      |       |      |
| 秒           | $\sqrt{\text{秒}}$ | 健康的血浆           | 标准偏差   | 凝结被削弱的血浆 | 标准偏差 | 血清    | 标准偏差 |
| 5           | 2.24              | 9.2             | 0.29   | 10.8     | 1.04 | 9.8   | 1.26 |
| 10          | 3.16              |                 |        |          |      | 14.5* | 0.71 |
| 15          | 3.87              | 14.5            | 0.00 J | 17.8     | 3.33 | 18.3* | 2.47 |
| 30          | 5.48              | 19.8            | 1.53   | 26.5     | 1.80 | 25.2  | 1.44 |
| 45          | 6.71              |                 |        | 32.0     | 1.80 | 31.3  | 2.02 |
| 60          | 7.75              | 24.8            | 1.76   | 35.7     | 1.76 | 36.0  | 1.73 |
| 120         | 10.95             | 30.8            | 2.36   | 44.2     | 0.76 | 50.3  | 2.93 |
| 180         | 13.42             | 35.7            | 2.75   | 51.2     | 1.76 | 61.8  | 2.02 |
| 240         | 15.49             | 40.5            | 3.50   | 55.8     | 1.44 | 71.5  | 3.04 |
| 300         | 17.32             | 43.8            | 3.55   | 60.7     | 3.25 |       |      |
| 360         | 18.97             | 46.3            | 4.04   | 67.3*    | 3.18 |       |      |
| 420         | 20.49             | 50.3            | 5.03   | 70.3     | 2.34 |       |      |
| 480         | 21.91             |                 |        | 74.5*    | 2.12 |       |      |
| 540         | 23.24             | 56.5            | 5.07   | 73.8*    | 1.06 |       |      |
| 600         | 24.49             | 59.2            | 5.62   |          |      |       |      |
| 660         | 25.69             | 61.3            | 6.43   |          |      |       |      |
| 720         | 26.83             | 61.3*           | 7.42   |          |      |       |      |
| 780         | 27.93             | 62.5*           | 7.78   | 76.5*    | 0.71 |       |      |
| 840         | 28.98             | 67.2            | 8.04   |          |      |       |      |
| 900         | 30.00             | 68.7            | 8.50   |          |      |       |      |

[0555] \* 计算出的平均迁移距离是基于两个测试的结果。

[0556] 如预期的, 不具有凝固能力的血清样品沿着测试条比血浆样品迁移得快。相反地, 健康的血浆样品 (具有最好的凝固能力) 沿着测试条比其他样品迁移得慢。例如, 在 240 秒 (4 分钟) 时, 健康的血浆样品已经迁移了平均 40.5mm, 凝结被削弱的血浆样品已经迁移了平均 55.8mm, 并且血清样品迁移了平均 71.5mm。

[0557] C. 预测在汇合流装置上的迁移时间和距离

[0558] 上文呈现的血浆和血清样品的迁移时间和距离数据使用线性流动装置来获得。这种数据使用直接的图解法来转换为用于圆形的或汇合流动条的假定的结果。假设, 液体前沿随时间的沿着线性条的位置相应于沿着圆形条中的臂的位置。在圆形条的两个臂 (被处理的和未被处理的) 之间的假设的汇合点通过以下来得到: 在相同的图上将沿着被处理的线性条情况下的前沿位置对时间作图并且将沿着未被处理的线性条情况下的条的周长减

去了前沿位置对时间作图。这两条曲线的汇合点获得沿着被处理的臂的前沿汇合的预期的位置以及这种汇合发生的预期的时间。在这种情况下, 血清数据代表沿着未被处理的臂的迁移。我们假设圆形条的周长是 110mm, 因此血清前沿的位置被减去 110mm。这在图 15 中以图形示出。交叉点显示出, 沿着被处理的臂迁移的健康的血浆将被预期在约 225 秒之后在沿着被处理的臂的约 40mm 处与未被处理的臂汇合, 而被削弱的血浆将在约 169 秒之后在沿着被处理的臂的 50mm 点处汇合。

[0559] 因此, 使用线性流动条获得的数据可以用于预测在圆形的或汇合流动装置上的汇合点。在 110mm Whatman LF1 圆上的血浆和血清样品之间的预测的汇合点的图形图示在图 14 中呈现。

[0560] 实施例 7

[0561] 粘度对汇合流动多孔介质中的流体流速的影响

[0562] 以下实施例描述被进行用于表明流体粘度差异可以如何影响汇合流动装置中的流体流速的实验。具体地, 本实施例表明凝结活性如何与环形的多孔介质上的汇合点相互关联。

[0563] A. 装置组装

[0564] 使用被附着于刚性聚氯乙烯背衬并且使用 Allen Datagraph 模板制造器 (Allen Datagraph Systems, Inc., Derry, New Hampshire, 美国) 切割为 3mm 乘 130mm 的被 PVA 处理的玻璃纤维纸 (Whatman LF1) 的单一的线性块来构建条。有背衬的条被压至装置的顶壁的下侧, 使得背衬压在装置的顶壁。在圆上的最近端点处切割并且除去每个条的一部分 (3mm 长度)。对于每个被组装的装置, 两个 3/16 英寸直径的聚乙烯垫 (POR-4897; POREX ®) 被附着于装置, 使得圆盘形成在毛细管储器和条材料 (Whatnotmton LF1) 的在将条的一部分切除时产生的两个近端之间的桥接物。在组装之前, 两个 POREX ® 垫中的一个被  $20 \mu\text{l}$  的 2x 促凝血酶原激酶 DS (Fisher Scientific Cat#292273DEM) 溶液处理并且在室温干燥过夜。毛细管储器被设计为使得其在远端处分岔, 以通向向上供入被处理的和未被处理的聚乙烯垫的下侧的两个洞。整个装置是 8cm 长乘 5.5cm 宽, 并且使用本专利内描述的标准方法被构建为一致。将溴酚蓝 (合计小于 1mg) 点在从未被处理的 porex 垫引出的臂上的围绕条的路径的四分之一处。

[0565] B. 血浆和血清迁移

[0566] 在本实验中, 在将样品施用至部分 A 中描述的圆形的多孔条装置之后的各个时间点测量具有已知的凝结性质的人类血浆样品的迁移距离。

[0567] 健康的血浆 (Fisher Scientific Cat#176198) 和血清 (没有凝固能力) 样品使用上文描述的圆形的测试条来测试。对于每个样品, 将  $135 \mu\text{l}$  的血浆或血清样品与  $15 \mu\text{l}$  的 200nm 被染色的胶乳珠 (Polysciences Cat#15706) 的 2.59% 浆料混合。将整个体积 ( $150 \mu\text{l}$ ) 的该混合物通过样品口或近端井施用于每个装置, 并且允许其经过样品通道向上流动至圆形条的近端左垫和近端右垫。定性地观察流体从通道向左垫和右垫二者的均匀的流动。在各个时间点记录圆形条的每个臂的迁移距离。对每个血清样品进行两次圆形条测试, 并且对每个健康的血浆样品进行三次圆形条测试。下表呈现样品在 0 至 180 秒之间的时间点的迁移距离。

| 时间 (秒) | 表7：汇合流动装置中的血浆和血清迁移 |    |        |    |        |    |     |    |     |    |
|--------|--------------------|----|--------|----|--------|----|-----|----|-----|----|
|        | 迁移距离 (mm)          |    |        |    |        |    |     |    |     |    |
|        | 健康的血浆1             |    | 健康的血浆2 |    | 健康的血浆3 |    | 血清1 |    | 血清2 |    |
|        | 左臂                 | 右臂 | 左臂     | 右臂 | 左臂     | 右臂 | 左臂  | 右臂 | 左臂  | 右臂 |
| 0      | 0                  | 0  | 0      | 0  | 0      | 0  | 0   | 0  | 0   | 0  |
| 30     | 34                 | 39 | 36     | 41 | 35     | 35 | 39  | 38 | 39  | 36 |
| 60     | 43                 | 47 | 45     | 55 | 44     | 49 | 52  | 52 | 51  | 51 |
| 90     | 47                 | 58 | 51     | 63 | 47     | 57 | 61  | 60 | 62  | 61 |
| 120    | 55                 | 66 | 55     | 69 | 52     | 67 | 66  | 64 | 64  | 66 |
| 180    | 47                 | 83 | 51     | 79 | 55     | 75 | 66  | 64 | 64  | 66 |

[0568] [0569] 如预期的,不具有凝固能力的血清样品以相等的速度沿着圆形的测试条的每个臂迁移。两个流体前沿在圆形条的180°点处汇合。相反地,健康的血浆样品(具有正常的凝固能力)沿着圆形的测试条的被处理的臂(左侧)较慢地迁移。因此,在健康的血浆的所有三种情况下,两个流体前沿的汇合点在圆形条的180°点的左侧。

[0570] 实施例8

[0571] 在免疫化学上被改性的珠对多孔介质中的流体流速的影响

[0572] 以下实施例描述使用被改性的线性测试条装置的测定。具体地,本装置已经被改性以导致在免疫化学上被改性的微珠在分析物的存在下的凝集,由此响应于分析物的浓度改变流速。

#### [0573] A. 装置组装

[0574] 一套八个横向流动装置被组装以评估流体样品在分析物的存在或不存在下的迁移距离。20mm宽的主横向流动条被首先组装,如下文描述的,并且2mm宽的分别的条被相继地从该主条切割。将主条部件靠着标准的横向流动粘合性背衬(具有在一个侧上的粘合剂覆层的PVC片)组装。从近端到远端,横向流动材料是:(1)具有PVA结合的20mm硼硅酸盐玻璃纤维滤纸(Ahlstrom 8975),(2)7mm嵌段硝酸纤维素膜(VIVID™170;Pa11),以及(3)60mm玻璃纤维基质材料(Whatman FUSION 5™)。在组装之前,硝酸纤维素膜(VIVID™170;Pa11)被在PBS中的1mg/ml中性抗生物素蛋白在室温堵塞1小时,在PBS中洗涤两次,每次5分钟,使用H<sub>2</sub>O漂洗两次,并且在室温干燥过夜。材料被排布,使第二部件(VIVID™170;Pa11)首先压在粘合性背衬上,使其自身的背衬与装置背衬接触。第一部件(Ahlstrom 8975)和第三部件(Whatman FUSION 5™)被相继地排布,使得它们在第二部件(Vivid 170;Pa11)的侧面,具有在第二部件(VIVID™170;Pa11)的每个端部上的1mm的重叠。此外,第一部件(Ahlstrom 8975)被排布,使得材料的一部分在距主条的近端上的粘合性背衬5mm附近悬垂。条的整个长度是80mm。

[0575] 然后将总共八个2mm宽的分别的条从20mm宽的主条切割,并且使用如实施例1中描述的刚性聚氯乙烯来构建为分别的装置。2mm宽的条被压至装置的顶壁的下侧,使得条材料被夹在装置的顶壁和背衬之间。被组装的装置包含3/16英寸直径聚乙烯垫(POR-4897;POREX®),3/16英寸直径聚乙烯垫形成在毛细管储器和第一条部件(Ahlstrom 8975)的悬垂近端之间的桥接物。

#### [0576] B. 线性装置的改性

[0577] 在将样品施用至上文描述的测试条装置之前,装置通过以下来改性:加入通过响应于具体分析物的浓度导致在免疫化学上被改性的微珠和线性聚丙烯酰胺的凝集而影响

流速的剂。在本实施例中,分析物是 C 反应蛋白 (CRP) 并且改性是把被抗 CRP 抗体包覆的珠、与生物素共轭的抗 CRP 抗体和 LPA- 生物素加入装置的 POREX ®垫。

[0578] 被抗 CRP 抗体包覆的珠如下地产生:将 50  $\mu$  l 的 53nm 聚苯乙烯珠的 10% 浆料与 143  $\mu$  l 的兔抗 CRP 抗体 (10mg/ml)、2.5  $\mu$  l 的 10% tween-20、254.5  $\mu$  l 的 H<sub>2</sub>O 和 50  $\mu$  l 的 10×PBS 组合。将 50  $\mu$  l 的 120nm 聚苯乙烯珠的 10% 浆料与 60  $\mu$  l 的兔抗 CRP 抗体 (10mg/ml) 和 2.5  $\mu$  l 的 10% tween-20、287.5  $\mu$  l 的 H<sub>2</sub>O 和 50  $\mu$  l 的 10×PBS 组合。将珠在 4°C 混合过夜,相对 1000ml 的 PBS+0.02% tween-20 渗析 3 次,并且储存在 1mg/ml BSA PBS+0.02% tween-20 中。

[0579] 为了开始实验,将 15  $\mu$  l 的 LPA- 生物素 (414.7  $\mu$  m;如在实施例 4 中描述的来合成) 与 30  $\mu$  l 的中性抗生物素蛋白 (1mg/ml) 混合并且在热混合器 (thermomixer) 上以 1200rpm 在 30°C 混合 5 分钟。然后将 15  $\mu$  l 的小鼠抗 hCRP 抗体 (5mg/ml) 引入并且混合另外的 10 分钟。将 4.5  $\mu$  l 的与每个尺寸的珠结合的抗体 (上文描述的 53nm 和 120nm 珠) 与 4  $\mu$  l 的 LPA- 生物素 - 中性抗生物素蛋白 - 抗体混合物和 0.5  $\mu$  l 的红色染料混合。将 13  $\mu$  l 的这种混合物施用于装置并且允许其浸透入位于毛细管储器和线性测试条之间的 POREX ®垫中。

[0580] C. CRP 样品迁移

[0581] 在等待 30 秒之后,将样品通过样品口或近端井加载。每个样品含有 100  $\mu$  l 的在 PBS 中的 1mg/ml BSA 中的 60ng/ml hCRP (AbD Serotec Cat#1707-2029) 或 100  $\mu$  l 的在 PBS 中的 1mg/ml BSA。随时间分析样品的迁移。对于每个样品类型进行总共四个测试。下表呈现在 0.8 至 35 分钟之间的时间点的每个样品类型的样品平均迁移距离以及标准偏差。

[0582] 为了比较多重测试,将每一对测试对 -CRP 样品的最终的迁移点归一化 (在第 35 分钟)。然后在统计学上分析所有四个 +CRP 和 -CRP 样品的百分比相对迁移。平均百分比相对迁移值和标准偏差被计算,并且在下表中呈现。

| 时间 (min) | 平均迁移距离 (mm) n=4 |       |       |       | 平均%相对迁移 |      |      |      |    |
|----------|-----------------|-------|-------|-------|---------|------|------|------|----|
|          | +CRP            |       | -CRP  |       | +CRP    |      | -CRP |      |    |
|          | 标准偏差            | 标准偏差  | 标准偏差  | 标准偏差  | 标准偏差    | 标准偏差 | 标准偏差 | 标准偏差 |    |
| [0583]   | 0.08            | 16    | 0.00  | 15.75 | 0.96    | 31   | 10   | 30   | 8  |
|          | 0.17            | 18.5  | 0.58  | 18.5  | 1.00    | 33   | 12   | 33   | 11 |
|          | 0.25            | 20    | 0.00  | 20    | 0.00    | 36   | 12   | 36   | 12 |
|          | 0.5             | 21.25 | 0.50  | 22.25 | 0.96    | 38   | 13   | 40   | 14 |
|          | 0.75            | 22.5  | 0.58  | 23.25 | 0.96    | 41   | 15   | 42   | 15 |
|          | 1               | 23.5  | 0.58  | 24    | 0.82    | 42   | 15   | 43   | 15 |
|          | 1.5             | 25.25 | 1.50  | 26.25 | 0.50    | 45   | 16   | 47   | 16 |
|          | 2               | 26.75 | 1.50  | 28.25 | 0.96    | 48   | 17   | 51   | 17 |
|          | 3               | 28.75 | 1.89  | 31.75 | 1.71    | 51   | 16   | 57   | 17 |
|          | 4               | 30.75 | 3.77  | 34.75 | 3.30    | 54   | 15   | 61   | 15 |
|          | 5               | 33.25 | 5.68  | 37    | 4.24    | 58   | 12   | 65   | 15 |
|          | 6               | 34.75 | 7.32  | 38    | 5.35    | 59   | 10   | 66   | 14 |
|          | 7               | 36    | 8.76  | 39    | 6.38    | 61   | 8    | 67   | 12 |
|          | 8               | 36.75 | 9.07  | 39.25 | 6.65    | 62   | 8    | 68   | 12 |
|          | 9               | 37.5  | 9.98  | 40    | 7.53    | 63   | 7    | 69   | 11 |
|          | 10              | 39.25 | 10.05 | 41.5  | 7.59    | 67   | 11   | 71   | 13 |
|          | 12              | 40.75 | 10.44 | 43    | 9.31    | 69   | 10   | 73   | 11 |
|          | 15              | 43.25 | 12.15 | 47.25 | 12.42   | 73   | 10   | 80   | 8  |
|          | 20              | 44.75 | 13.33 | 51.25 | 14.73   | 75   | 11   | 86   | 6  |
|          | 25              | 47    | 13.34 | 55.5  | 17.94   | 79   | 8    | 92   | 6  |
|          | 30              | 48.5  | 15.07 | 59    | 20.85   | 81   | 7    | 97   | 4  |
|          | 35              | 48.75 | 15.37 | 60.75 | 20.56   | 81   | 6    | 100  | 0  |

[0584] 分别的对的样品一致地表明, 虽然测试间的变化性保持为高的, 但 +CRP 样品比 -CRP 样品迁移得慢。为了从分析除去这样的测试间变化性, 计算百分比相对迁移, 其表明 +CRP 样品的一致地较低的相对迁移。因此, 推测, CRP 的存在导致免疫珠在测试条装置内的可测量的凝集, 导致较慢的经过多孔测试条的迁移。还推测, 由 LPA 导致的样品粘度增加改变流速。

[0585] 实施例 9

[0586] 通过有效地减小多孔介质的孔隙率或渗透率来改变流体流动

[0587] A. 沉淀

[0588] (1) 酶和 / 或底物的加入

[0589] 流动调节剂的一个实例将是在分析物的存在下形成阻塞介质的孔的沉淀物从而限制流动的一组酶和底物。沉淀改变流速的用途的一个实例可以由用于测量样品材料中的葡萄糖的测定表示。在本紧接的实施方案中, 酶, 即葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶, 可以被结合于测试条的区域。在汇合流动实施方案中, 未被改性的臂将缺乏葡萄糖氧化酶和 HRP。样品可以以已知的比率与底物例如 3,3' - 二氨基联苯胺 (DAB) 混合并且样品可以被施用于测试条。当样品朝向具有固定化酶的区域迁移并且迁移经过该区域时, 在样品内含有的葡萄糖将与葡萄糖氧化酶反应, 生成过氧化氢和 d- 葡萄糖酸。进而, 过氧化氢和 DAB 将与辣根过氧化物酶反应, 以生成不可溶的褐黑色沉淀物, 其将用来局部地减小支持膜的孔径大小, 从而减小局部流速。然后这种流速变化可以被测量并且与样品中存在的葡萄糖的量直接地相互关联。沉淀材料的量与样品中存在的葡萄糖的量成比例, 从而存在的更多葡萄糖将导致更多沉淀物形成, 从而更多地减慢样品的液体部分的流动。还可能的是, 使酶

中的仅一种被固定化并且使另一种与行进经过测试条的样品混合,其目的是使沉淀物在膜的局部区域中形成,从而影响流速。此外,过程可以通过将底物和样品直接与酶混合来简单地进行,使得沉淀物将以非局部的方式形成但是仍然用来减小膜的孔径大小并且影响流速。本领域技术人员将认识到,许多其他类型的分析可以使用这种过程来进行,要求是可以导致沉淀物形成,这种沉淀物的量与待测量的分析物的量成比例,并且这种沉淀物可以影响样品的液体部分穿过膜的流速。其他潜在的底物体系包括但不限于,将碱性磷酸酶与普遍已知的底物对 BCIP/NBT 组合。

[0590] (2) 分析物和酶的固定化

[0591] 在又一个实例中,沉淀物的局部形成可以通过液体样品可以迁移经过的测试条局部区域中结合的抗体来导致。在意图测量样品中的 C 反应蛋白 (CRP) 的优选的实施方案中,可以采用可以结合于 CRP 分子或分子复合物的被指定为 a1 和 a2 的两种抗体。抗体 a1 可以共价地或非共价地与酶例如辣根过氧化物酶相关联。第二抗体 a2 可以是未被改性的或被诸如生物素的分子改性。在本实施方案中,被怀疑含有 CRP 的样品可以与抗体 a1、葡萄糖和沉淀底物例如 3,3' - 二氨基联苯胺 (DAB) 混合。测试条的区域将具有被特异性地或非特异性地结合于样品施用点的远端的区域的抗体 a2 和葡萄糖氧化酶。然后样品将迁移经过所准备的测试条,例如硝酸纤维素或尼龙膜,CRP 结合的抗体 a1 将通过结合于抗体 a2 而被保留,导致葡萄糖氧化酶的局部浓度以剂量响应的方式增加。将 CRP 结合的抗体 a1 结合于抗体 a2 用来通过使葡萄糖氧化酶被保留在条的特定的区域中来增加葡萄糖氧化酶浓度,因此增加局部浓度。在装置的汇合流动实施方案中,未被改性的臂将缺乏沉淀反应必需的组分中的一种或全部。膜结合的葡萄糖氧化酶将与被加入样品中的葡萄糖反应,生成过氧化氢,进而过氧化氢将与过氧化物酶标记的抗体 a1 和 DAB 反应,形成将以剂量响应的方式影响样品的液体部分的流速的不溶性沉淀物。这种流速变化可以被测量以确定样品中的 CRP 的浓度。注意,非结合的抗体 a1 也将导致沉淀物的形成,然而由于这种抗体存在的瞬时的本质,形成的量和速率将简单地贡献于沉淀物形成的将在样品之间合理地一致的合理的恒定速率。本领域技术人员将认识到,许多不同的目标可以使用这种途径来测量,主要要求是抗体结合导致可以与抗体结合的量成比例的方式影响样品的液体部分的流速的沉淀物的形成。此外,本领域技术人员将认识到这种体系可以被以竞争性结合的方式使用,其中在样品中存在的分析物将与被加入的目标分析物竞争,以导致向测试条的局部区域的结合的减少,导致待形成的沉淀物的局部形成的减少,从而以与样品中的目标的浓度成反比的方式增加样品的液体部分的流速。此外,本领域技术人员将认识到,抗体 a2 可以被以下物质生物素化或标记:结合于测试条的一些其他特异性的捕获标记物和特异性的捕获部分,例如结合生物素的蛋白,例如抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白或链霉抗生素蛋白,使两种抗体 (a1、a2) 能够被加入样品并且使全部的复合物能够被捕获,但是仅抗体 a2 以剂量响应的方式被捕获。本领域技术人员将认识到,有许多用于捕获抗体的方式,除了许多其他的之外,所述方式包括但不限于 His 标记、物种特异性的抗抗体、蛋白 A 和蛋白 G。其他潜在的底物体系包括但不限于,将碱性磷酸酶与普遍已知的底物对 BCIP/NBT 组合。

[0592] B. 微珠有效地减小介质的孔径大小的用途

[0593] 有使用与免疫化学原理组合的微米尺寸的聚苯乙烯珠来改变多孔介质的孔隙率 / 渗透率的多种可能的方式。流速的变化提供样品内的目标分析物浓度成反比的指示。珠在

诸如横向流动纸 (Fusion 5, Whatman) 或硝酸纤维素膜 (Vivid) 的多孔膜的空隙容积内的积聚用来通过改变有效的孔隙率和渗透率来减弱被施用的样品的流动。珠的精确的积聚可以通过施用靶向期望的分析物的特异性的分子识别元件,例如抗体、蛋白质、核酸和它们的衍生物来实现。珠在膜上的期望的部分处的固定化将导致在为了特定的目标设计的测试条上的样品流速的变化。在本程序中描述的试剂和材料的组合提供快速的、分析物特异性的半定量的测试,以测量来自生物样品的溶解物,例如蛋白质、核酸和代谢物。多种途径可以用于增强珠的局部膜孔阻塞并且响应于目标分析物减少样品流动。这些中的一个是将膜孔通过珠积聚的阻塞与被珠局部化引导的被酶介导的沉淀反应组合。在这种情况下,被酶或抗体酶融合包覆的珠的组合可以用于在特异性目标分析物的存在下产生局部沉淀物。非均匀的局部沉淀物形成和珠积聚的组合将非常有效地引起样品流速的减小。非常小的沉淀物的存在将补充珠的孔阻塞,因为由于膜孔径大小的不同,局部沉淀将堵塞被珠保留开放的剩余的缝隙。可选择地,单独的或与珠或酶组合的水溶性聚合物的加入也将用来与目标分析物浓度成比例地减小流速。这些聚合物可以用作非特异性阻塞试剂,或被分子识别元件官能化以向珠积聚或沉淀物形成反应加入特异性。聚合物可以被共轭或融合于珠表面或酶,以加入形状和产生更不均匀的阻断剂以限制流动。聚合物的被加入的非均匀的体积将以与沉淀形成相同的方式起作用,以堵塞由于变化的膜孔径大小未被珠阻塞的剩余的缝隙,并且更有效地减小样品流速。

[0594] 实施例 10

[0595] 通过有效地增加流体的粘度来改变流体流动

[0596] A. 凝集

[0597] 这种类型的测定的可选择的方案使用珠在样品内的凝集来防止或减少样品在测试条上的流动。使用上文的 CRP 实例,样品与附着于珠的 CRP 的 a1 和 a2 抗体混合。然后样品被施用于多孔的横向流动膜条。如果样品含有 CRP,那么珠将凝集,堵塞空隙容积,并且产生防止或减慢样品进入膜中的障碍物。当 CRP 不存在时,珠保持分散遍及样品并且允许样品流入膜中。珠在样品加入部位处的凝集有效地减小测试条内的孔径大小以及为流体流动可用的空间。凝集的程度以及在测试条的该部分处积聚的珠的量与样品中的 CRP 的量成正比。因此,样品和珠进入测试条中的流速是样品内的 CRP 浓度的直接指示物。如上述的,显色指示物珠的迁移提供液体样品向条中的迁移以及目标分析物的存在的直接对应。相似地,珠还可以是非球形的被改进的形状、被不同的表面化学官能化、或与其他机制组合,以影响多孔膜内的流速。非特异性的珠(不结合于分子识别元件的珠)的加入可以用于导致由特异性地识别目标分析物的被蛋白质包覆的珠产生的流速的进一步的减小,并且有效地放大信号。还可能的是,使被抗体包覆的珠在样品或试剂垫上,所述垫在被固定化的中性抗生素蛋白部分之前并且在样品流过测试条时被样品占据。对横向流动和其他免疫学技术熟悉的有经验者将认识到,许多其他类型的分析可以使用本方法来进行。这种测定的基本的方面是珠在流动基质内的特异性的积聚,导致由于为样品流动可用的空隙容积的减小而流速成比例的减小。

[0598] 悬浮的颗粒的凝集可以通过增加流体 / 颗粒混合物的体积粘度来减慢流速。混合物的体积粘度与颗粒的颗粒直径和质量分数成比例 (Multiphase Flow and Fluidization :Continuum and Kinetic Theory Descriptions (多目流与流态化 :连续和

动力学理论说明);Dimitri Gidaspow(Academic Press,1994))。在颗粒凝集时,它们有效地成为具有更大的直径的颗粒,而不改变质量分数。如果凝集的程度取决于分析物浓度,那么流速将取决于分析物浓度。

[0599] B. 聚合

[0600] 有使用与免疫化学原理组合的在免疫化学上被改性的聚合物(在微颗粒的存在或不存在下)来改变经过多孔介质的流动特征的多种可能的。在所有情况下,样品中的分析物作为将聚合物交联至聚合物或将聚合物交联至微颗粒的桥。交联是由于在许多免疫测定中形成的典型的夹层复合物的形成,其中分析物被与两种不同的聚合物分子或微颗粒联接的两种不同的抗体结合。当聚合物在分析物的存在下更高度地彼此交联时—无论直接地还是通过作为媒介物的微颗粒—流体的粘度增加,减慢流动。如果交联的程度足够高,那么凝胶将形成,导致流动的停止。

[0601] 如果两种抗体结合于分析物上的不同的表位以形成夹层复合物,那么这些抗体将是不同的,由 ab1 和 ab2 表示。如果在本装置中使用一种聚合物,那么一个方案将是将 ab1 共轭于聚合物的一种制剂,并且将 ab2 共轭于聚合物的另一种制剂。然后可以将聚合物的这两种制剂以不同的比率混合,以调节系统以响应于分析物的不同的浓度范围。在另一个仅一种聚合物的方案中,抗体 ab1 和 ab2 可以以不同的比率共轭于聚合物的同一种制剂,使得所有的聚合物链都可以潜在地与 ab1 和 ab2 二者共轭。以上方案的任何组合还可以用于形成使流动停止的凝胶或网络。

[0602] 被 ab1 或 ab2 或二者包覆的微颗粒可以被加入以上仅一种聚合物的方案中的任一个中,或被抗体包覆的微颗粒的合适的制剂可以代替以上方案中的任一个中的聚合物的类似的制剂。通常,微颗粒将具有与聚合物不同的对流速的影响。被捕获的或被固定化的颗粒可以通过改变多孔介质的有效的孔隙率、孔径大小和 / 或渗透率来影响流速。由聚合物和微颗粒的组合形成的凝胶或网络将与由单独的聚合物形成的凝胶或网络不同地表现。

[0603] 所引用的参考文献

[0604] O ' Farrell B(2009). “Evolution in lateral-flow based immunoassay systems(基于横向流动的免疫测定体系的进展)”, Lateral Flow Immunoassay, RC Wong 和 HY Tse 编辑. Humana Press, 纽约。

[0605] Brown MC(2009). “Antibodies :key to robust lateral-flow assays(抗体:可靠的横向流动测定的关键)”, Lateral Flow Immunoassay, RC Wong 和 HY Tse 编辑. Humana Press, 纽约。

[0606] Rosen S(2009). “Market trends in lateral-flow immunoassays(横向流动免疫测定的市场趋势)”, Lateral Flow Immunoassay, RC Wong 和 HY Tse 编辑. Humana Press, 纽约。

[0607] Washburn EW(1921). “The dynamics of capillary flow(毛细管流动的动力学)”, The Physical Review 17 :3pp273–283。

[0608] Batchelor GK(1967). An Introduction to Fluid Dynamics(流体动力学入门). The University Press, 剑桥。

[0609] Lambert P(2007). Capillary Forces in Microassembly(微组件中的毛细力). Springer Science, 纽约。

- [0610] Nield DA(2002). “Modeling fluid flow in saturated porous media and at interfaces( 调节饱和多孔介质中和界面处的流体流动 )”, Transport Phenomena in Porous Media II. DB Ingham 和 I Pop 编辑. Pergamon Press(Elsevier Science)。
- [0611] Nield DA, BejanA(1992). Convection in Porous Media( 多孔介质中的对流 ). Springer-Verlag。
- [0612] McCabe WL, Smith JC, Harriot P(1985). Unit Operations of Chemical Engineering( 化学工程的单元操作 ). 第 4 版. McGraw-Hill Book Company.
- [0613] Qian S, Bau HH(2003). “A mathematical model of lateral flow bioreactions applied to sandwich assays( 应用于夹层结构测定的横向流动生物反应的数学模型 )”. Analytical Biochemistry. 322 pp 89–98.
- [0614] Bird RB, Stewart WE, Lightfoot EN(1960). Transport Phenomena( 迁 移 现 象 ). John Wiley and Sons.

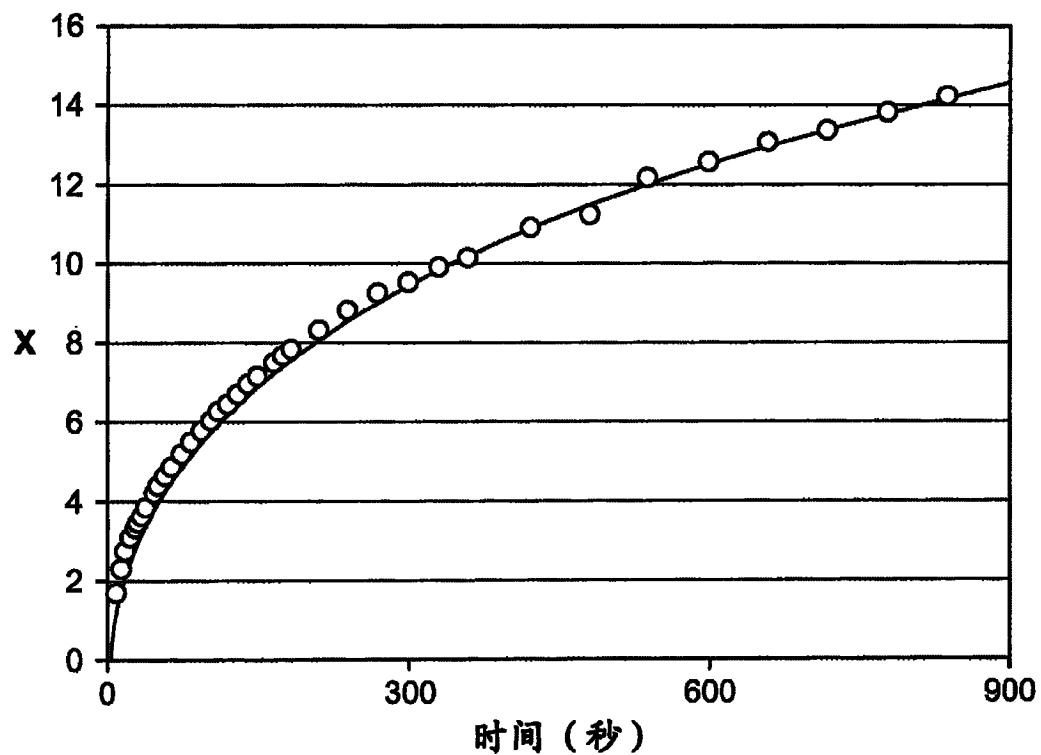


图 1A

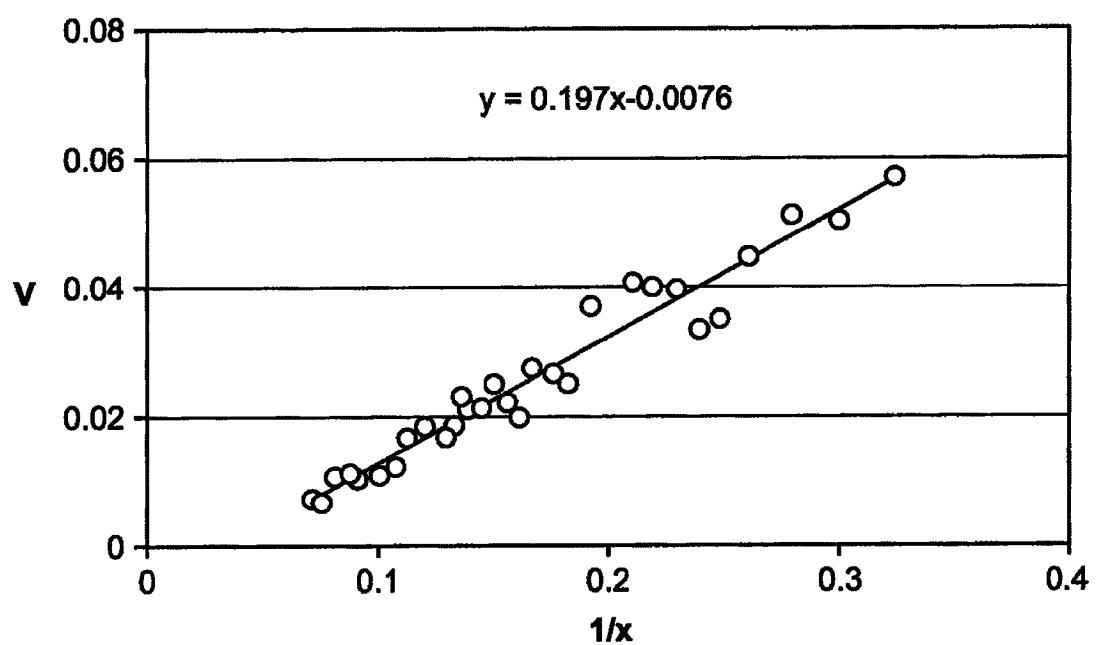


图 1B

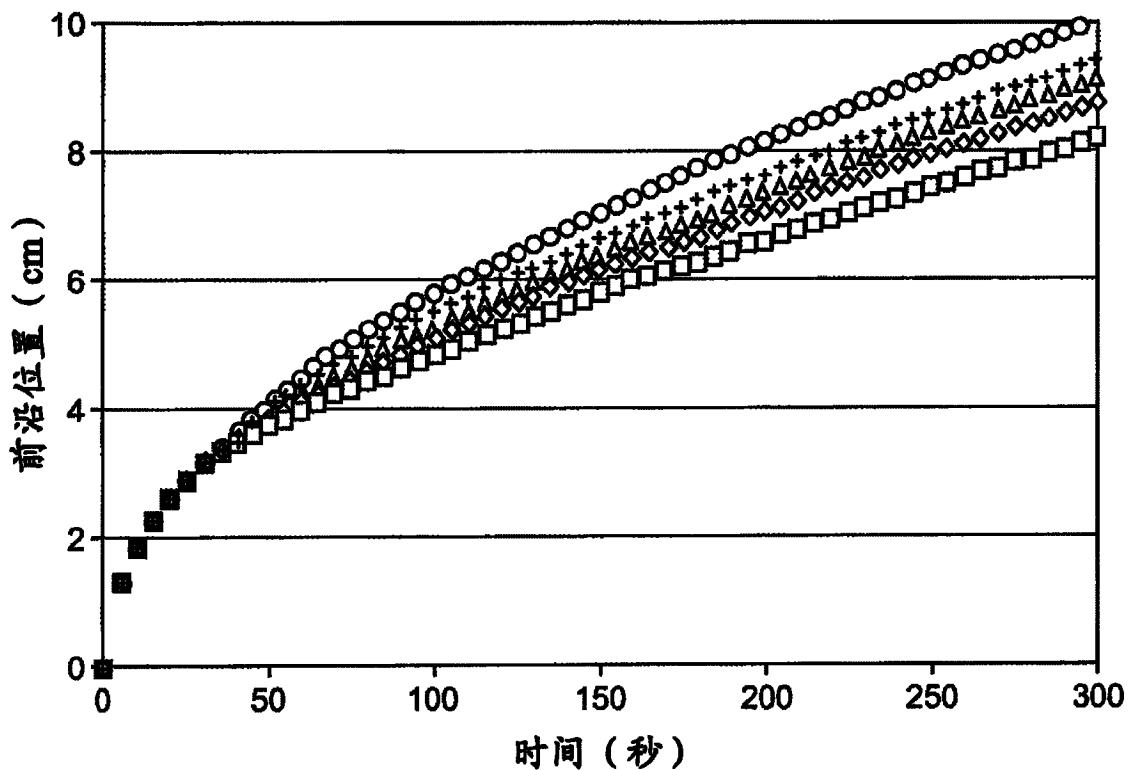


图 2

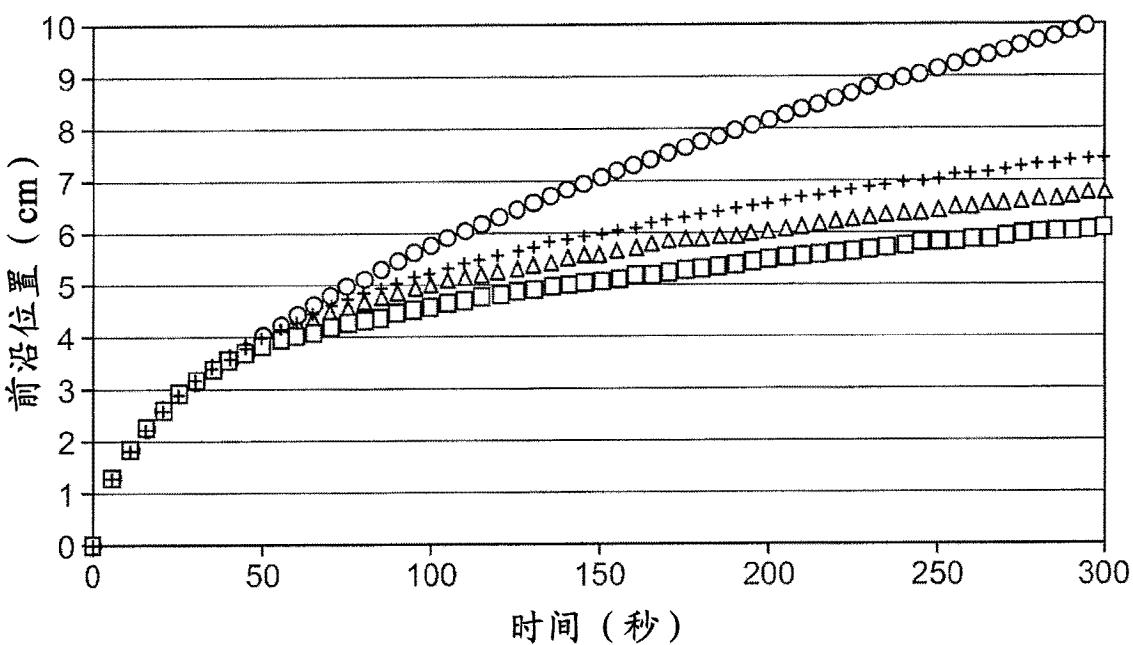


图 3

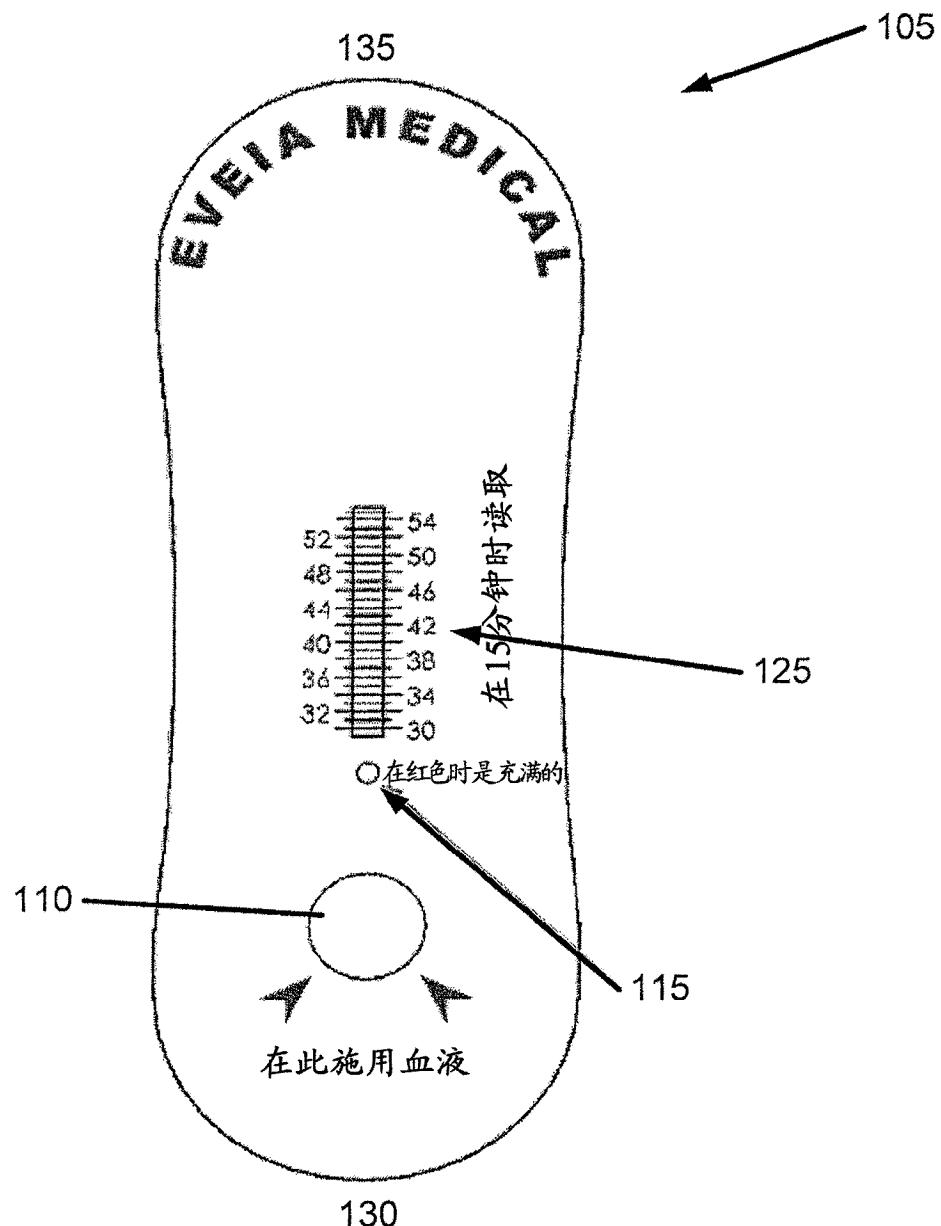


图 4

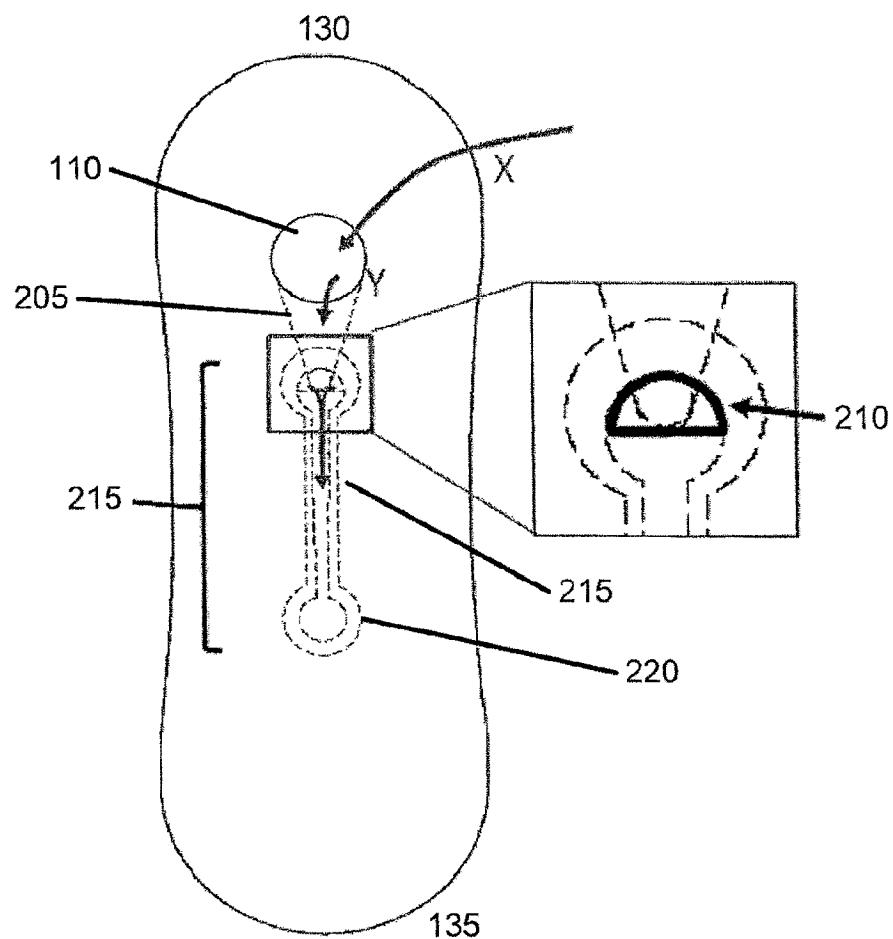


图 5

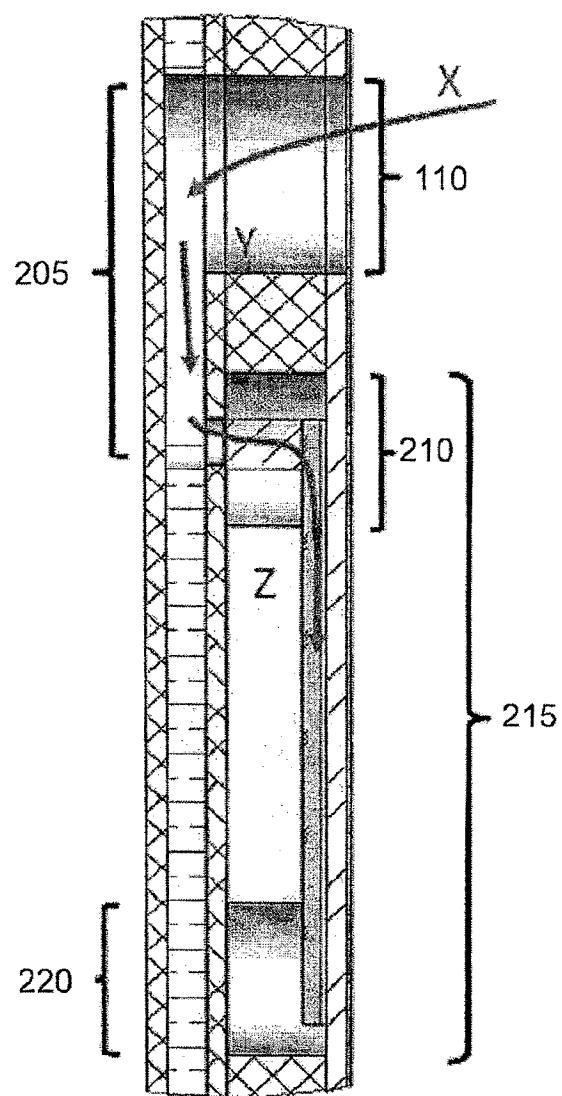


图 6

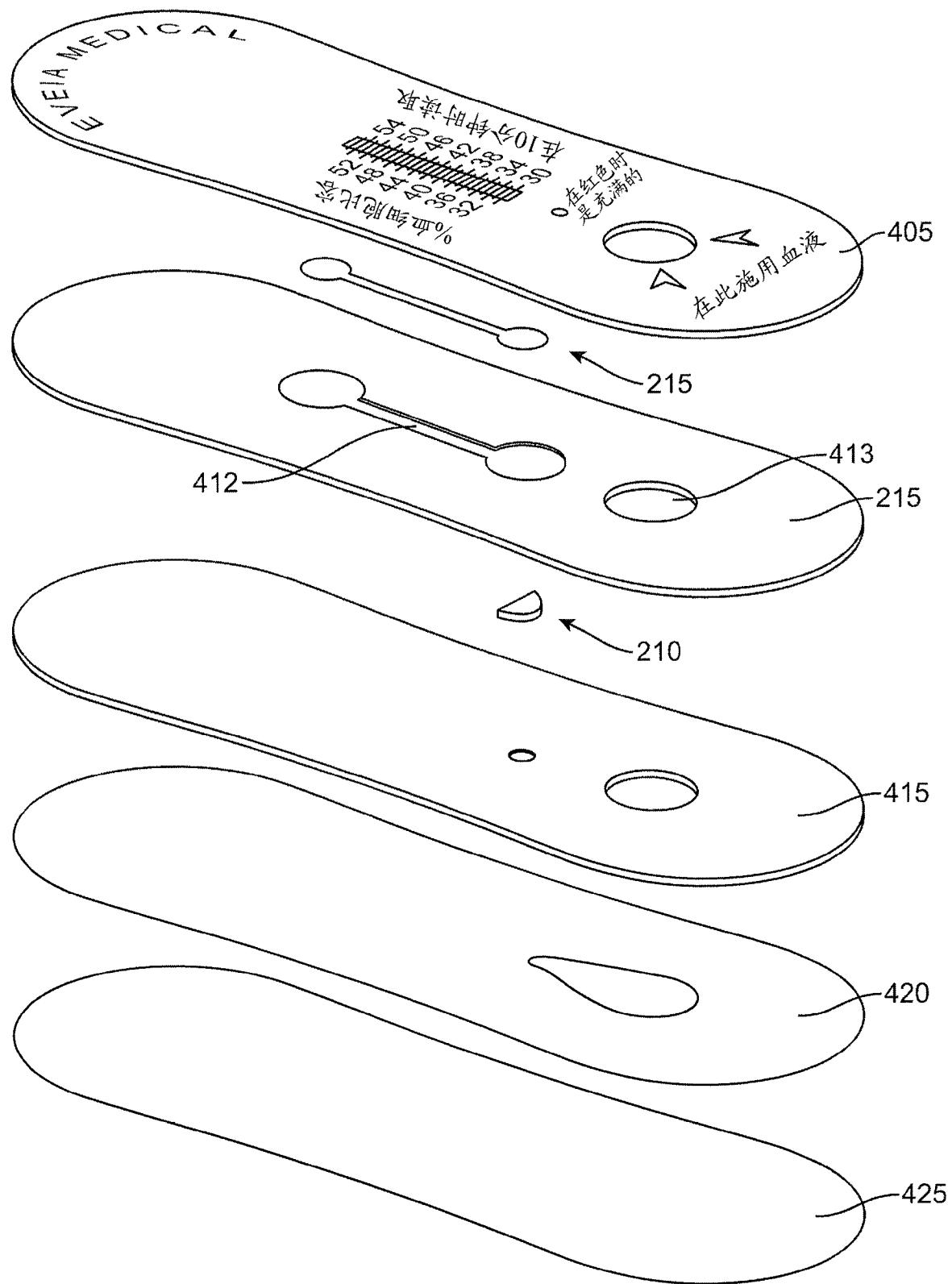


图 7

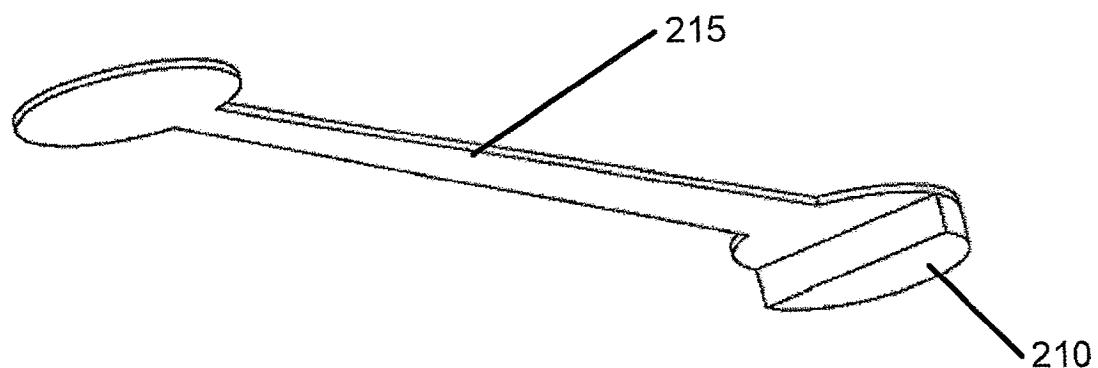


图 8

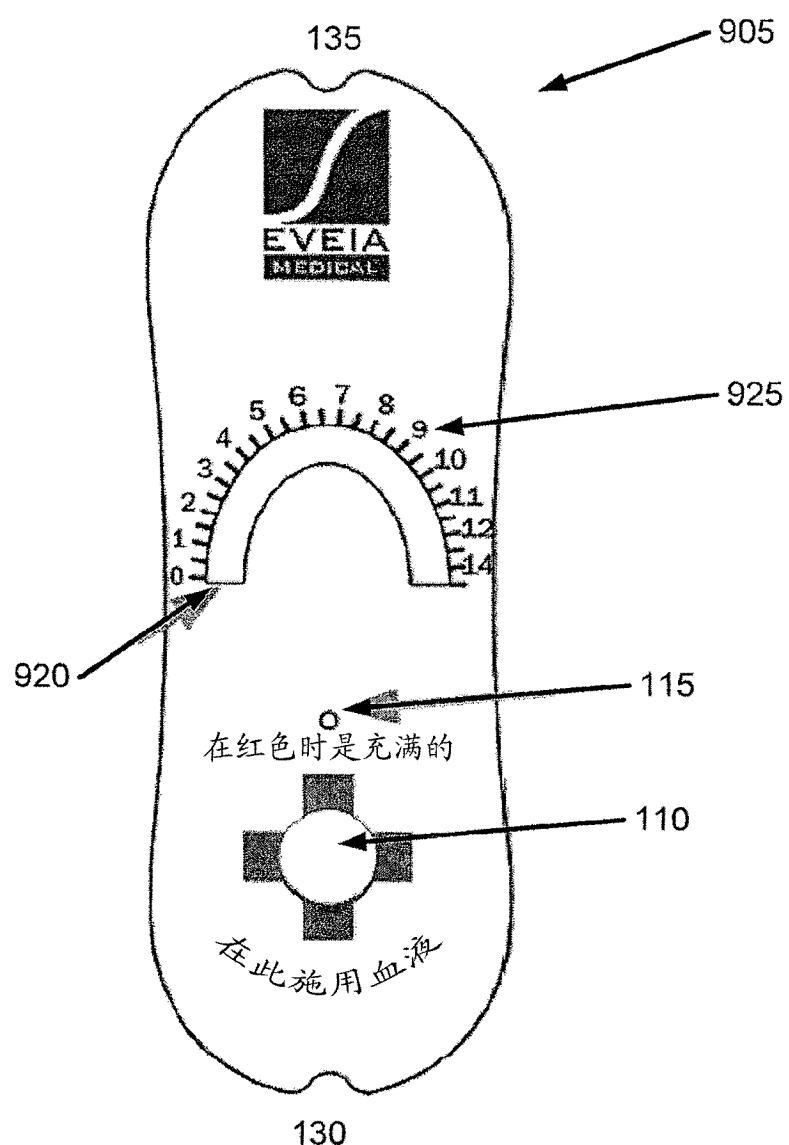


图 9A

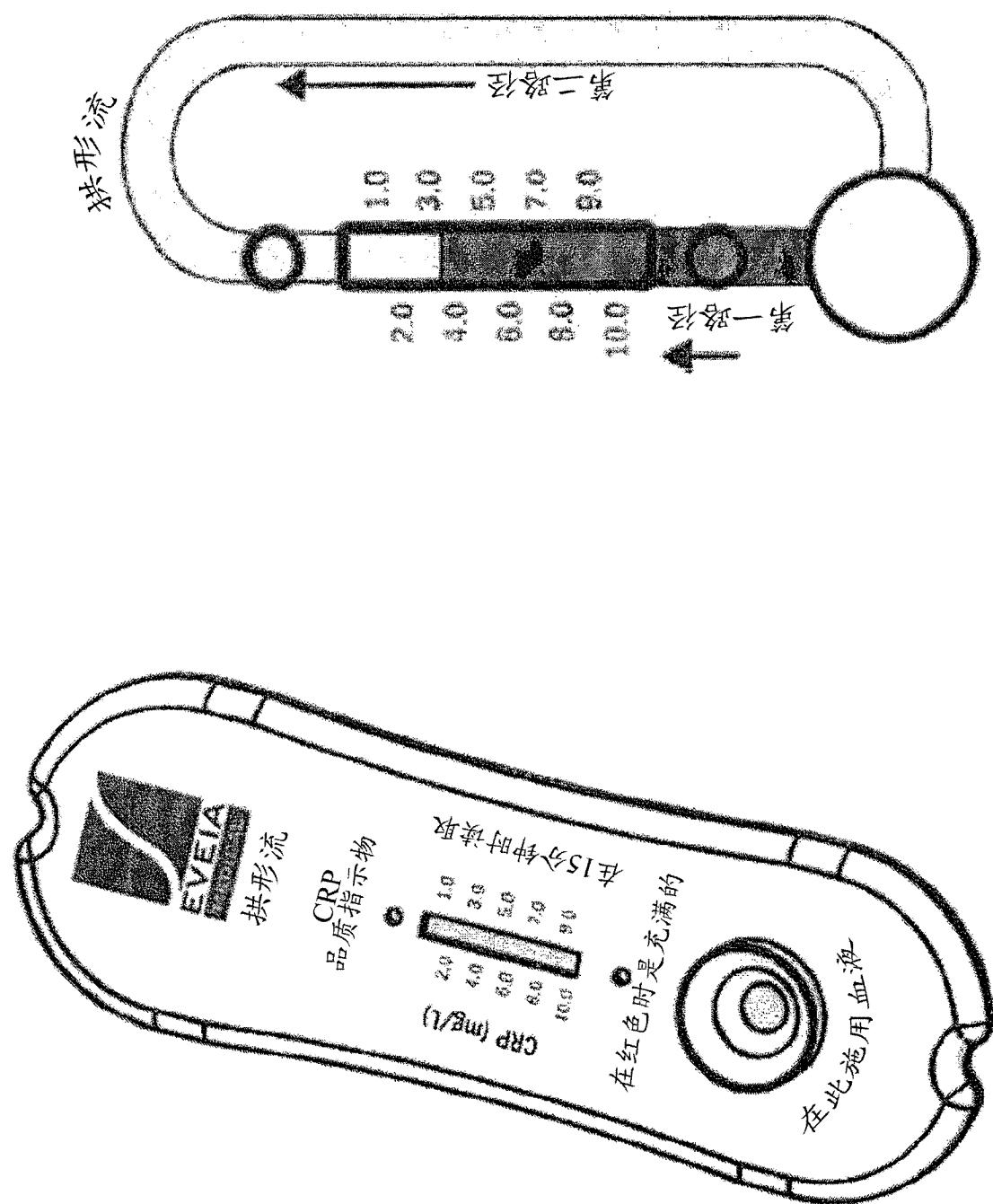


图 9B

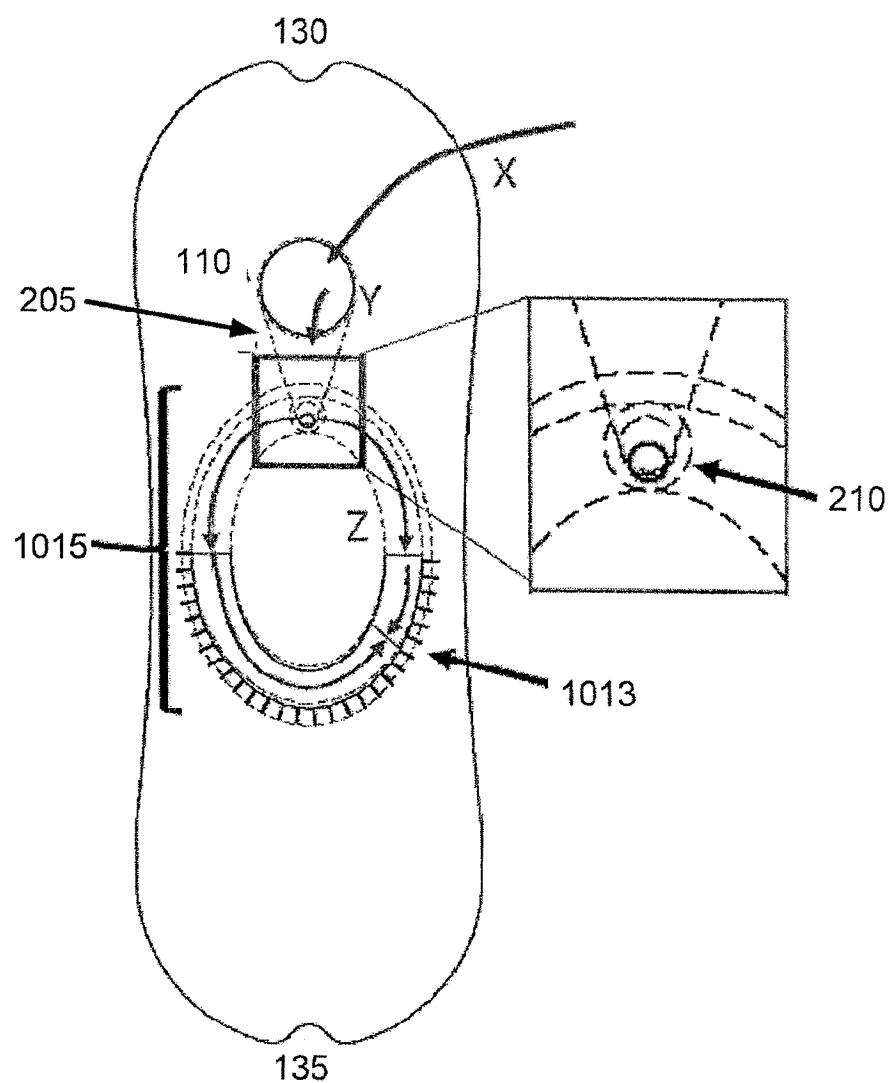


图 10

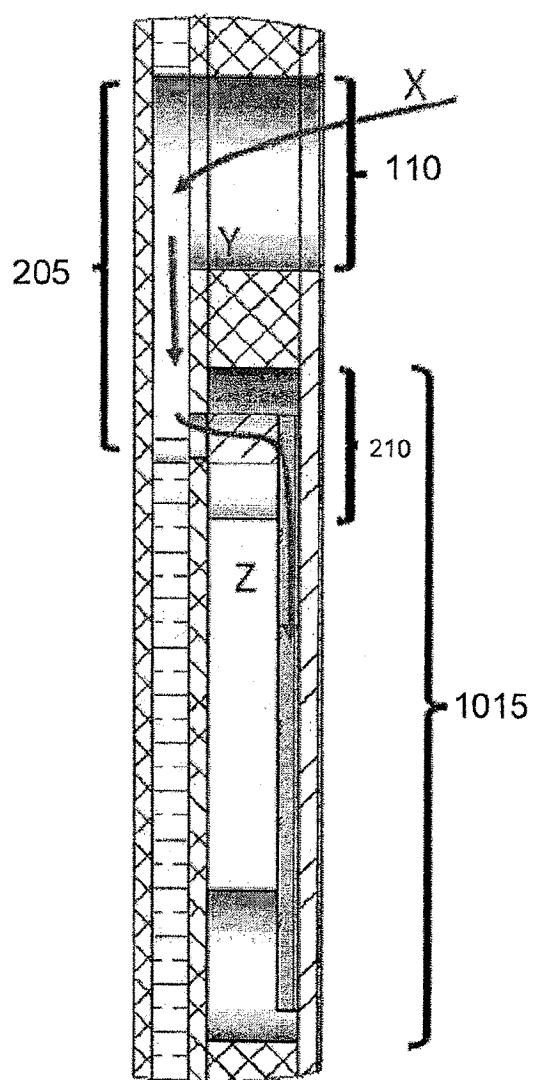


图 11

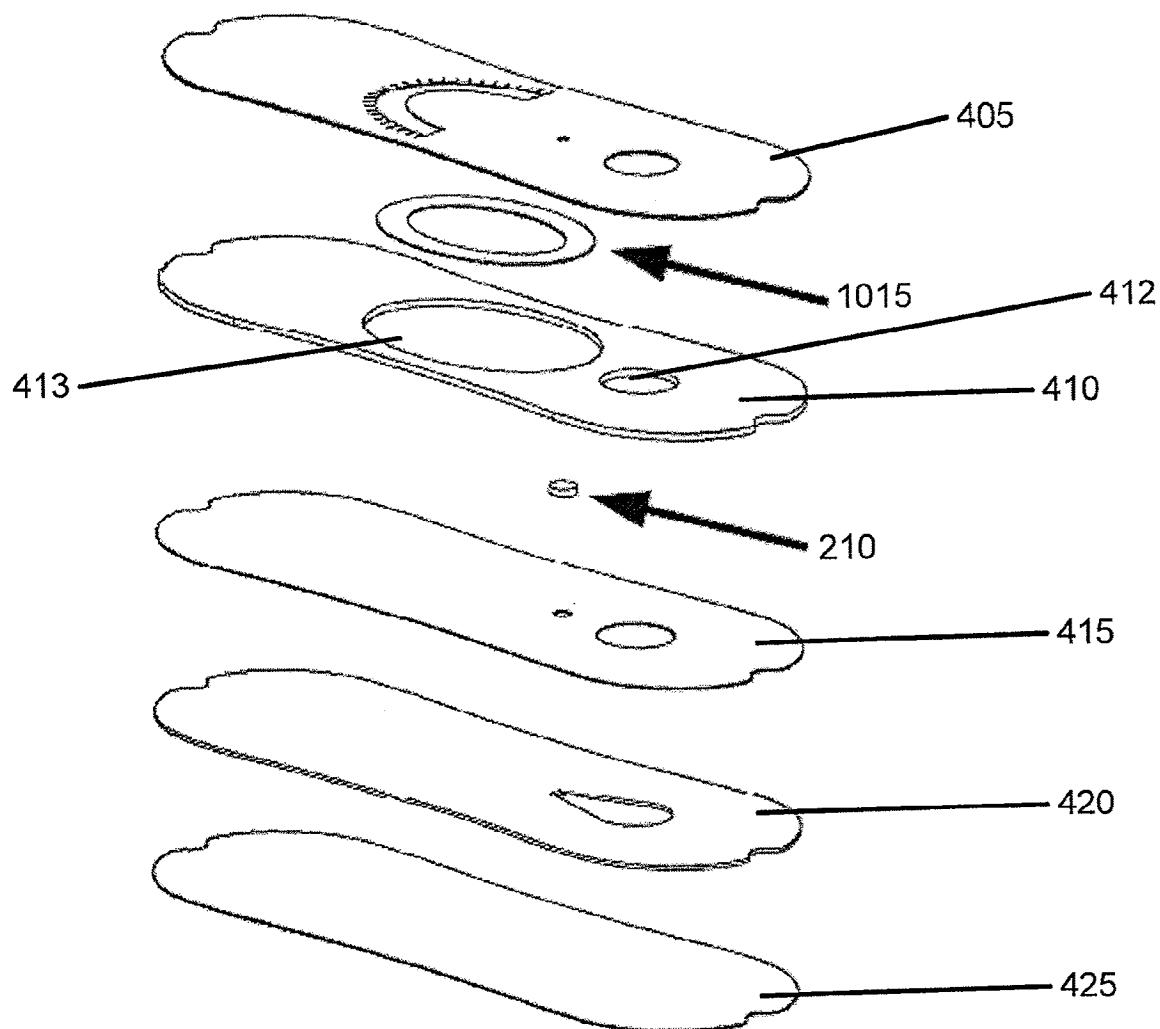


图 12

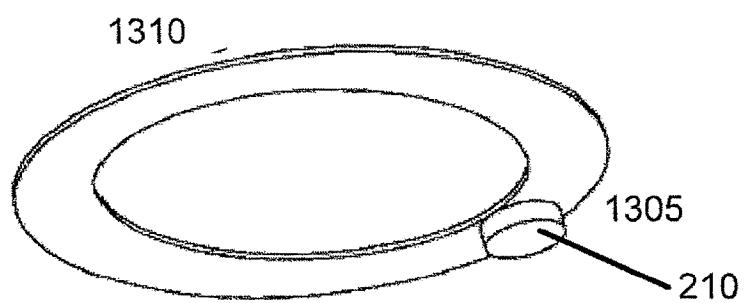


图 13

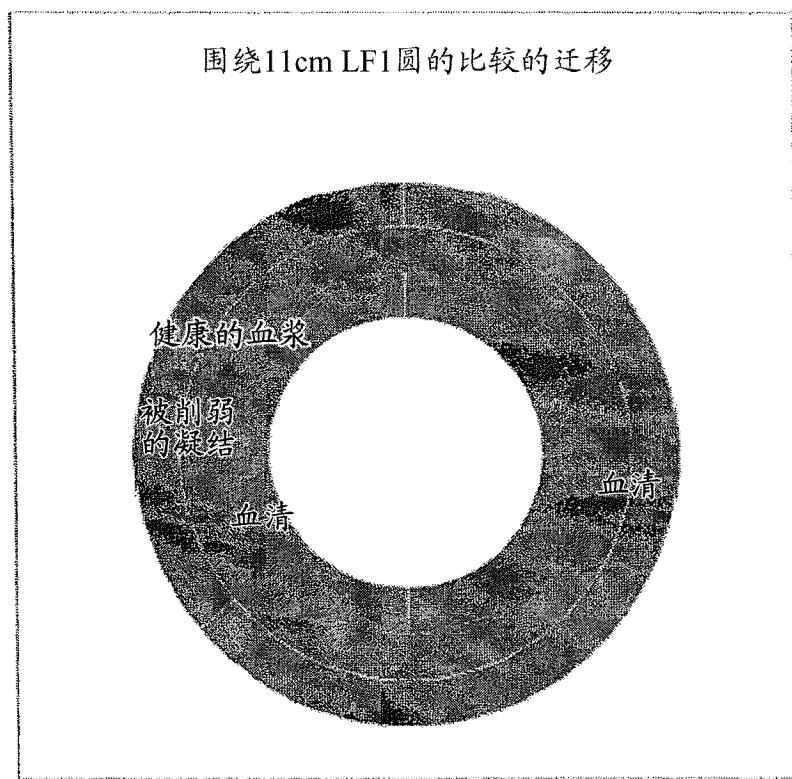


图 14

被凝固诱导的血浆经过圆形LFI纸的假设的迁移

