



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 35 316 T2 2008.03.06

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 082 614 B1

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: G01N 33/558 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 35 316.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US00/07965

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 919 643.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/058730

(86) PCT-Anmeldetag: 24.03.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 05.10.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 14.03.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 27.06.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 06.03.2008

(30) Unionspriorität:

277715 26.03.1999 US

439024 12.11.1999 US

525151 14.03.2000 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Idexx Laboratories, Inc., Westbrook, Me., US

(72) Erfinder:

CARPENTER, Charles R., Scarborough, ME 04074,  
US

(74) Vertreter:

Rüger und Kollegen, 73728 Esslingen

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR DETEKTION VON ANALYTEN IN FLÜSSIGKEITEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Testvorrichtungen und -verfahren zur Bestimmung von Analyten, die in Flüssigkeiten vorhanden sein können.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Die quantitative Bestimmung chemischer und biologischer Komponenten in wässrigen Probenlösungen, wie ganzem Blut, Plasma, Serum und Urin, ist wichtig für die zeitgerechte und genaue Diagnose verschiedener Erkrankungen ebenso wie für die Überwachung des Fortschrittes der medizinischen Behandlung von Erkrankungen. In vielen Fällen sind die gemessenen Analyten nur in winzigen Mengen vorhanden und sie sind häufig vermischt mit sehr viel größeren Mengen irrelevanter oder störender Komponenten. Einige Komponenten, wie rote Blutzellen, verhindern die Analyse der Probe, wenn sie vorhanden sind. Problematisch sind auch die Reagenzien und Indikatoren, die zum Nachweisen und Messen der Analyten benutzt werden, die häufig stark gefärbt sind und den Reaktionsprodukten hinsichtlich ihrer Absorptions-Spektren sehr ähneln. Zusätzlich erfordert die Messung von Analyten häufig mehrere unverträgliche Reagenzien, die separat gelagert und nacheinander zugegeben werden müssen. Jeder dieser Faktoren kann den Nachweis und die quantitative Bestimmung von Analyten in flüssigen Proben komplizieren.

**[0003]** An diese Probleme ist man in verschiedener Weise herangegangen. Analytische Verfahren, die beim klinischen chemischen Testen benutzt werden und andere Anwendungen können in zwei breite Kategorien von Assayformaten unterteilt werden: Flüssigchemie-Formate und Trockenchemie-Formate. Flüssigchemie-Systeme erfordern, dass Probe und flüssige Reagenzien in einer zeitlich abgestimmten Reihenfolge in Reaktionskammern abgegeben werden. Proben müssen häufig mit speziellen Puffern verdünnt werden, um störende Komponenten zu vermindern oder zu eliminieren und werden dann zu Reagenzien hinzugegeben, die zur Reaktion mit spezifischen Analyten vorgesehen sind. In einigen Fällen müssen Mehrfachreagenzien wegen der Stabilitätsprobleme unmittelbar vor dem Einsatz vorvermischt werden. In anderen Fällen können zusätzliche Reagenzien erforderlich sein, um farberzeugende ablesbare Reaktionen zu liefern. Die Resultate können erhalten werden durch Messen der Absorption von Licht durch die flüssige Probe. Reaktionen, die Abnahmen in der Reaktionsfarbe oder untergeordnete Unterschiede bei Farbänderungen einschließen, können weiter separate Rohre von Reagenzien erfordern, um die Resultate zu standardisieren oder als

Vergleich zu dienen.

**[0004]** Trockenchemie-Systeme nutzen Reagenzien, die getrocknet auf absorbierenden Oberflächen vorhanden sind. Die meisten kommerziell erhältlichen Produkte weisen mehrere Schichten von Reaktanten sandwichförmig angeordnet auf. Einige sind vertikal angeordnet und einige kombinieren vertikale und horizontale Anordnungen. In allen Fällen beruhen Trockenchemie-Systeme, die chromogene Reaktionen benutzen, auf der Messung an entweder der oberen oder Bodenoberfläche des endgültigen Reagenzkissens reflektierten Lichtes. Das Untersuchen ganzen Blutes präsentiert zusätzliche Probleme, da es ein separates Verfahren zum Abtrennen von roten Blutzellen von der Probe erfordert, wie Zentrifugieren oder den Einsatz Blut trennender Filter, die das Plasma zur Analyse abtrennen. Das Wesen der Trockenchemie-Analyse ist es, eine Flüssigreaktion zu enthalten, sodass gefärbte Reaktionsprodukte visualisiert werden können. Dies erfolgt mit Gelen und Polymeren, z.B., Vitros-(Johnson & Johnson) oder faserigen papierartigen Materialien, z.B. Seralyzer (Bayer Diagnostics). In allen Fällen muss die Reaktion bei einer Mischung von Probe, Verdünnungsmittel, Reaktanten und Produkt beobachtet werden, was zu Schwierigkeiten führen kann, Produkt vom Nichtprodukt zu unterscheiden. Da der gesamte oder ein Teil des ursprünglichen Reaktanten verbraucht wird, kann es unmöglich sein, sich auf das Ausgangsmaterial zurückzubeziehen, wie, eine Reagenz-Basislinie festzulegen. Im Gegensatz dazu behält die vorliegende Erfindung alle Komponenten für weitere Bewertungen zurück.

**[0005]** Verfahren, die eine genaue Reaktions-Einstellung erfordern, wie solche, die rasche Reaktionen oder das Messen einer Rate einer Änderung erfordern, ist es häufig schwierig, die genaue Startzeit der Reaktionen zu bestimmen. In den meisten Fällen hängt die Leistungsfähigkeit des Assay und daher die Zuverlässigkeit der Resultate von der Fähigkeit des Testsystems ab, gleichmäßig eine gewisse Menge von Flüssigkeit (üblicherweise Blutplasma oder -serum) zu einem Endreaktant-Material zu liefern. Dieses Material muss eine bekannte Menge der Flüssigkeit mit außerordentlicher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit absorbieren, damit die Resultate brauchbar sind. Die erforderlichen genauen Volumenmessungen zum Erhalt genauer Resultate mit diesen Arten von Assays präsentieren besondere Herausforderungen und machen es schwierig, mit ihnen zu arbeiten.

**[0006]** Sowohl Flüssig- als auch Trockenchemie-Systeme sind in der Konzentration von Reaktanten, die eingesetzt werden können, beschränkt. Diese Konzentrationen sind häufig aufgrund der Anwesenheit stark gefärbter Reaktanten begrenzt, die Licht bei Wellenlängen absorbieren oder reflektieren,

die mit dem Nachweis von Reaktionsprodukt interferieren oder diesen verdecken, da das Reaktionsprodukt Licht bei ähnlichen Wellenlängen absorbieren oder reflektieren kann. Es wurden verschiedene Verfahren bei Versuchen eingesetzt, dieses Problem zu lösen. Hochstrasser, US-PS 3,964,871, beschreibt einen ausgebaren Indikator zum Messen von Substanzen, der die Konzentration einer Substanz in einer gegebenen biologischen Flüssigkeit mit Indizien registriert, die in einer bequemen Notierung direkt ablesbar sind, was die Zuverlässigkeit beim Vergleich mit einer Farbintensitätsskala vermindert. Kim et al., US-PS 4,303,408, beschreiben Elemente mit interferierende Materialien reduzierenden Zonen, die interferierende Materialien vor der Reaktionszone entfernen. Trotz dieser Versuche sind nur marginale Verbesserungen möglich aufgrund der physikalischen Beschränkungen, die den Verfahren innwohnen.

**[0007]** US-PS 5,716,852, ausgegeben an Yager et al., lehrt ein Kanal-Zell-System zum Nachweisen der Anwesenheit und/oder Messen der Anwesenheit von Analyt-Teilchen in einem Probenstrom, umfassend einen laminaren Strömungskanal, zwei Einlässe in Flüssigkeits-Verbindung mit dem laminaren Strömungskanal, um einen Indikatorstrom in den laminaren Strömungskanal zu leiten, der eine Indikator-Substanz umfassen kann, die die Anwesenheit der Analyt-Teilchen durch eine nachweisbare Änderung in Eigenschaften anzeigt, wenn sie mit den Analyt-Teilchen und dem Probenstrom in Kontakt kommt. Der laminare Strömungskanal hat eine genügend geringe Tiefe, um ein laminares Fließen von Strömen zu gestatten und eine genügende Länge, um es Teilchen des Analyten zu gestatten, in den Indikatorstrom zu diffundieren, bis zum beträchtlichen Ausschluss der größeren Teilchen im Probenstrom, um einen Nachweisbereich zu bilden. Ein Auslass leitet die Ströme aus dem laminaren Strömungskanal unter Bildung eines einzigen vermischten Stromes. Yager offenbart die Bildung einer Reaktions-Grenzfläche, die sich zwischen zwei Flüssigkeiten bildet, die sich durch ein Kapillarrohr in der gleichen Richtung bewegen. Wir offenbaren die Erfindung einer stabilen Grenzfläche, die sich bildet, wenn sich zwei Flüssigkeiten treffen und in einer Strömungsmatrix stoppen, nachdem sie von entgegengesetzten Richtungen übertragen wurden. Das Yager-Patent beruht auf dem Prinzip laminarer Flüssigkeitsströmung, das im Stande der Technik bekannt war. Im Gegensatz dazu benutzt die vorliegende Erfindung saugfähiges Material, um die flüssige Grenzfläche physisch zu enthalten.

**[0008]** US-PS 5,187,100, ausgegeben an Matzinger et al., diskutiert eine Kontrolllösung zum Einsatz mit einem porösen Reagenten-Streifen und umfasst ein in Wasser dispergiertes flexibles halbfestes Polymer, wie Polyvinylacetat in destilliertem Wasser, mit geeigneten Glukosekonzentrations-Kontrollniveaus. Diese

Lösung ist brauchbar bei der Nachahmung ganzen Blutes in Verbindung mit porösen Reagenz-Streifen zum Bestimmen der Nachgiebigkeit der Streifen und mit Messgeräten zur Festlegung von Messungs- und Leistungsfähigkeit-Kriterien.

**[0009]** US-PS 5,147,606, ausgegeben an Charlton et al., lehrt eine diagnostische Vorrichtung, die Blut-Analyten mit einem Probenvolumen so wenig wie 2 Mikrolitern im Hämatokrit-Bereich von 0% bis 60% oder mehr nachweist. Dies erfolgt durch Benutzen eines Gehäuses mit verschiedenen Kammern und Abteilen zur Behandlung des Blutes. Eine Proben-Anwendungsöffnung in dem Gehäuse wird zum Einführen von Blut in eine Kammer zum Abmessen benutzt. Von der Kammer zum Abmessen fließt das Blut in eine Reaktionskammer zum Analysieren von Blut-Analyten. Blut, das in die Kammer zum Abmessen eintritt, fließt in eine Flüssigkeits-Kapillare, die anzeigt, dass eine angemessene Menge des Blutes in der Kammer zum Abmessen empfangen worden ist. Das Reaktionsabteil schließt ein Reagenz und einen Filter ein, wobei der Letztere zwischen der Kammer zum Abmessen und dem Reagenz angeordnet ist, sodass das Reagenz mit dem filtrierten Blut reagiert.

**[0010]** US-PS 4,839,297, ausgegeben an Freitag et al., lehrt eine Testapparatur zur analytischen Bestimmung einer Komponente einer Körperflüssigkeit mit einer Basisschicht und mindestens zwei planaren Testschichten, die sich im anfänglichen Zustand des Testträgers vor dem Ausführen der Bestimmung separat voneinander befinden, die jedoch durch äußere Manipulation in Kontakt miteinander gebracht werden können. Eine erste Testschicht und eine zweite Testschicht sind auf der Basisschicht im Wesentlichen nebeneinander, aber im ursprünglichen Zustand durch einen Spalt voneinander getrennt angeordnet, ein Kontaktlement wird bereitgestellt, das aus einem kapillaraktiven Material besteht, das so dimensioniert ist, dass es den Spalt überbrücken kann und das so montiert und angeordnet ist, dass es in einer ersten Position zumindest eine der Testschichten nicht berühren kann, dass jedoch durch externen Druck in eine zweite Position gebracht werden kann, in der es beide Testschichten in einer solchen Weise berührt, dass ein Flüssigkeitsaustausch zwischen den Testschichten möglich ist.

**[0011]** US-PS 4,637,978, ausgegeben an Dappen, offenbart einen Assay, brauchbar für die Bestimmung eines Analyten im ganzen Blut. Im Besonderen ist dieser Assay brauchbar zur quantitativen Bestimmung von Peroxid erzeugenden Analyten, wie Glukose oder Cholesterin, im ganzen Blut. Dieser Assay benutzt ein Mehrzonen-Element, das im Wesentlichen aus einem Träger besteht, auf dem sich in der Reihenfolge und in Flüssigkeits-Kontakt eine Registrierungszone und eine Reagenz/Ausbreitungs-Zone

befindet. Die Reagenz/Ausbreitungs-Zone hat ein Hohlraum/Porenvolumen und eine mittlere Porengröße, die wirksam ist für ganzes Blut, und enthält eine interaktive Zusammensetzung, die erforderlich ist für die Analyse. Eine solche Zusammensetzung ist in der Lage, bei Wechselwirkung mit dem Analyten eine Farbe zu liefern, die spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von mehr als etwa 600 nm nachgewiesen werden kann.

**[0012]** US-PS 5,408,535, ausgegeben an Howard III et al., offenbart ein Videoteststreifen-Lesegerät, das gleichzeitig Mehrreagenz-Teststreifen lokalisieren, farbanalysieren und einstellen kann, wie solche, die bei klinischen Assays auf Festkörperbasis benutzt werden. Das Lesegerät schließt einen Videobildgeber ein, der ein analoges Signal erzeugt, das in ein digitales Signal umgewandelt wird, das das Bild repräsentiert. Das digitale Signal wird in Form von Pixelanordnungen gespeichert, die Farbinformation enthalten. Das digitale Signal wird dann verarbeitet, um die erwünschten Testresultate zu errechnen, wie die Konzentration eines Bestandteils oder andere messbare Eigenschaften.

**[0013]** US-PS 4,160,008, ausgegeben an Fenocketti et al., lehrt eine Testvorrichtung zum Bestimmen der Anwesenheit eines Flüssigproben-Bestandteils. Die Vorrichtung umfasst ein Basis-Trägerteil, an dem ein Indikatorglied angebracht ist, das eine nachweisbare Antwort, wie eine Farbänderung, in Gegenwart des Probenbestandteils erzeugt. Das Indikatorglied umfasst eine obere Reagenzschicht, eine untere absorbierende Schicht und eine im Wesentlichen probenundurchlässige Sperrsicht zwischen der oberen und unteren Schicht. Das Indikatorglied ist an dem Basisteil entlang der unteren Seite der absorbierenden Schicht angebracht.

**[0014]** US-PS 4,042,335, ausgegeben an Clement, offenbart ein Mehrschicht-Element zur Analyse von Flüssigkeiten, wie die biochemischen und biologischen Flüssigkeiten. Die Erfindung schließt eine Reagenzschicht mit einer Zusammensetzung ein, die in Gegenwart einer vorbestimmten zu analysierenden Substanz (Analyt) interaktiv ist, um eine diffundierbare nachweisbare Spezies, z.B. einen Farbstoff, zu liefern, der nachgewiesen werden kann. Vorzugsweise kann zwischen der Reagenzschicht und der Registrations-Schicht eine Strahlung blockierende Schicht existieren, wie eine opake reflektierende Schicht, um den Nachweise der diffundierbaren Spezies innerhalb der Registrations-Schicht zu fördern. Eine sich ausbreitende Schicht ist von der Registrations-Schicht durch eine Reagenzschicht getrennt. Im Betrieb wird eine Flüssigkeitsprobe, die zu analysieren ist, auf die Reagenzschicht oder, falls vorhanden, auf eine sich ausbreitende Schicht aufgebracht. Enthält die Probe den Analyten, dann ergibt eine chemische Reaktion oder eine andere Interaktion mit der

Reagenzschicht eine nachweisbare Spezies, die über irgendwelche dazwischen liegenden Schichten, wie eine Strahlung blockierende Schicht, in die Registrations-Schicht zum Nachweis dort diffundiert, wie durch radiometrische Techniken, wie Reflexions-Spektrofotometrie.

**[0015]** US-PS 3,992,158, ausgegeben an Przybylowicz et al., offenbart ein integrales analytisches Element, das bei der Analyse von Flüssigkeiten eingesetzt werden kann, wobei das Element mindestens zwei übereinander liegende Schichten einschließlich einer sich ausbreitenden Schicht und einer Reagenzschicht in Flüssigkeits-Kontakt aufweist. Die sich ausbreitende Schicht, die eine isotrop poröse Schicht sein kann, breitet innerhalb sich selbst mindestens eine Komponente einer Flüssigkeitsprobe aus, die auf das Element aufgebracht ist, oder ein Reaktionsprodukt einer solchen Komponente, um eine gleichmäßige Konzentration von mindestens einer solchen Ausbreitungssubstanz an der Oberfläche der Ausbreitungsschicht zu erhalten, die der Reagenzschicht gegenüberliegt. Die Reagenzschicht, die vorzugsweise gleichmäßig für mindestens eine gelöste oder dispergierte Komponente der Flüssigkeitsprobe oder eines Reaktionsproduktes einer solchen Komponente durchlässig ist, kann eine Matrix einschließen, in der ein Material verteilt ist, das, z.B., mit einem Analyten oder einem Analyten-Reaktionsprodukt interagieren kann, um eine nachweisbare Änderung in dem Element zu erzeugen, wie eine durch Messung von elektromagnetischer Strahlung nachweisbare Änderung. In einer bevorzugten Ausführungsform kann das interaktive Material chemisch mit einem Analyten oder Analyten-Reaktionsprodukt reagieren, um eine Farbänderung in dem Element zu erzeugen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform kann die Proben-Ausbreitungsschicht chemisch beeinträchtigende oder andere unerwünschte Materialien ausfiltrieren und ein selektives Ausbreiten der Proben-Komponenten erhalten und/oder sie kann einen reflektierenden Hintergrund bereitstellen, der häufig brauchbar ist beim Erhalt analytischer Resultate.

**[0016]** US-PS 3,811,840, ausgegeben an Bauer et al., lehrt eine Testvorrichtung zum Nachweisen geringer Konzentrationen von Substanzen in Testflüssigkeiten, die einen absorbierenden Docht einschließt, der einen im Wesentlichen flachen Oberflächenabschnitt hat, der in einer flüssigkeitsundurchlässigen Hülle eingeschlossen ist, die eine darin ausgebildete Öffnung vorbestimmter begrenzter Fläche aufweist. Die Öffnung grenzt an den flachen Oberflächenabschnitt des Doctes und legt eine vorbestimmte beschränkte Fläche davon frei, wobei der Dacht ein Reagenz aufweist, das sich spezifisch mit der nachzuweisenden Substanz umsetzt. Im Gebrauch wird die Vorrichtung in die Testflüssigkeit eingetaucht, sodass die Öffnung untergetaucht ist, und man lässt die Vorrichtung darinnen, während die Testflüssigkeit die

Reagenzfläche benachbart der Öffnung kontaktiert und in den Rest des Dochtes wandert. Das Reagenz ist mit Bezug auf die Flüssigkeit immobilisiert.

**[0017]** US-PS 4,061,468, ausgegeben an Lange et al., offenbart einen Teststreifen zu Nachweisen von Komponenten in Flüssigkeiten, insbesondere Körperflüssigkeiten. Der Teststreifen schließt einen Halter und mindestens eine Indikatorsschicht ein, die Nachweis-Reagenzien enthält. Eine Oberfläche der Indikatorsschicht ist an dem Halter angebracht und die andere Oberfläche ist mit einem feinen Maschenwerk abgedeckt.

**[0018]** Die analytischen Vorrichtungen des obigen Standes der Technik benutzen die Flüssigkeits-Bewegung in nur einer einzigen Richtung. Weil keine Reaktions-Grenzfläche durch eine Bewegung von zwei Flüssigkeiten in entgegengesetzten Richtungen erzeugt wird, können die obigen Druckschriften nach dem Stande der Technik nicht benutzt werden, um die Reaktions-Intensität oder Reaktionsrate an einer Reaktions-Grenzfläche zu messen, wie durch die vorliegende Erfindung offenbart.

**[0019]** Die vorliegende Erfindung bietet eine Lösung der Probleme und Nachteile der oben diskutierten gegenwärtigen Systeme. Spezifisch bietet die vorliegende Erfindung Vorrichtungen, die alle für die Proben-Zubereitung und den Analyt-Nachweis erforderlichen Reaktanten enthält sowie Verfahren zu ihrer Anwendung. Die vorliegende Erfindung bietet Vorrichtungen und Verfahren, die die extreme Genauigkeit bei der Volumenmessung beseitigen, die nach einigen Verfahren erforderlich ist. Die Resultate von Assays, die mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt sind, werden in einem allgemeinen Ablesebereich der Vorrichtung abgelesen und es wird eine weite Vielfalt in der Reagenzchemie und den Reagenz-Konzentrationen geboten.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0020]** Die vorliegende Erfindung bietet eine Vorrichtung zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen mindestens eines Analyten in einer flüssigen Probe, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, durch Einsetzen eines flüssigen Reaktanten, der zur Reaktion mit dem Analyten unter Bildung eines nachweisbaren löslichen Reaktionsproduktes in der Lage ist. Die Vorrichtung umfasst ein Material zum Transportieren von Flüssigkeiten, kurz Flüssigkeits-Transportmaterial, das eine erste Zone ("Flüssigproben-Zone") zum Aufbringen der flüssigen Probe an einer Flüssigkeitsproben-Aufbringstelle und eine zweite Zone ("Flüssigreaktanten-Zone") zum Aufbringen eines flüssigen Reaktanten an einer Flüssigreaktanten-Aufbringstelle aufweist, wobei die flüssige Probe auf die erste Zone aufgebracht wird und der flüssige Reaktant auf die zweite Zone aufge-

bracht wird, die flüssige Probe von einer Flüssigproben-Kante in einer ersten Richtung zur zweiten Zone hin fließt und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante in einer zweiten Richtung, entgegengesetzt zu der ersten Richtung und zur ersten Zone hin fließt. Treffen sich die fließende Flüssigkeitsprobe und der fließende flüssige Reaktant, dann endet das Fließen, die Reaktanten diffundieren aufeinander zu und ein nachweisbares Reaktionsprodukt wird durch eine Reaktion zwischen dem flüssigen Reaktanten und dem Analyten an einer stabilen Reaktions-Grenzfläche gebildet, die an einem Übergang und visuell verschieden von der Flüssigkeitsprobe und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird, und weiter umfassend eine Einrichtung zum Kalibrieren einer Konzentration des flüssigen Reaktanten, wobei die genannte Einrichtung eine Kalibrierungszone mit einer Menge des Analyten umfasst, die Kalibrierungszone zwischen der ersten Zone und der Reaktions-Grenzfläche angeordnet ist, wobei bei der Anwendung der Analyt in der Analytenmenge in einer ersten Richtung zur zweiten Zone hin fließt und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante in einer zweiten Richtung entgegen der ersten Richtung und zur ersten Zone hin fließt, wobei, wenn sich der fließende Analyt in der genannten Menge des Analyten und das fließende flüssige Reagenz treffen, das Fließen aufhört und ein nachweisbares Kalibrierungsprodukt durch eine Reaktion zwischen dem Analyten in der genannten Menge des Analyten und des genannten flüssigen Reaktanten gebildet wird und eine stabile Kalibrierungsreaktions-Grenzfläche an einem Übergang zwischen und visuell verschiedenen von dem Analyten in der genannten Menge des Analyten und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird.

**[0021]** In einer anderen Ausführungsform bietet die vorliegende Erfindung auch eine Vorrichtung zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen mindestens eines Analyten in einer Flüssigkeitsprobe, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, umfassend ein Flüssigkeits-Transportmaterial mit einer ersten Zone ("Flüssigproben-Zone") zum Aufbringen der flüssigen Probe an einer Flüssigproben-Aufbringstelle und eine zweite Zone ("Flüssigreaktanten-Zone") für das Aufbringen eines flüssigen Reaktanten an einer Flüssigreaktanten-Aufbringstelle, wobei das Reagenz und die Flüssigkeit einen flüssigen Reagenz bilden, der ein Reaktanten-Reagenz enthält, das zur Reaktion mit dem in der flüssigen Probe vorhandenen Analyten in der Lage ist, um ein nachweisbares Reaktionsprodukt zu bilden, wobei, wenn die Flüssigkeitsprobe auf die erste Zone aufgebracht wird und der flüssige Reaktant auf die zweite Zone aufgebracht wird, die Flüssigkeitsprobe von einer Flüssigproben-Kante in einer ersten Richtung zu einer zweiten Zone fließt, das Reagenz rekonstituiert wird und das Reagenz und die Flüssigkeit ein flüssiges Reagenz bilden, das einen flüssigen Reaktanten

enthält, der zum Reagieren mit dem Analyten unter Bildung eines nachweisbaren Reaktionsproduktes in der Lage ist, und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante aus in einer zweiten Richtung entgegen der ersten Richtung und zu der ersten Zone hinfließt. Treffen sich die fließende Flüssigkeitsprobe und der fließende flüssige Reaktant, dann endet das Fließen und die Reaktanten diffundieren aufeinander zu und das nachweisbare Reaktionsprodukt wird durch eine Reaktion zwischen dem flüssigen Reaktanten und dem Analyten an einer stabilen Reaktions-Grenzfläche gebildet, die an einem Übergang zwischen und visuell verschieden von der flüssigen Probe und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird, und weiter umfassend eine Kalibrierungs-Zone mit einer Menge des Analyten, wobei die Kalibrierungs-Zone zwischen der ersten Zone und der Reaktions-Grenzfläche angeordnet ist, wobei im Gebrauch der Analyt in der genannten Menge des Analyten in einer ersten Richtung zur zweiten Zone hinfließt und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante aus in einer zweiten Richtung entgegen der ersten Richtung und zu der ersten Zone hinfließt, wobei, wenn sich der fließende Analyt in der genannten Menge des Analyten und der fließende flüssige Reaktant treffen, das Fließen aufhört und ein nachweisbares Kalibrierungsprodukt durch eine Reaktion zwischen dem Analyten in der genannten Menge des Analyten und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und eine stabile Kalibrierungsreaktions-Grenzfläche an einem Übergang zwischen und visuell verschieden von dem Analyten in der genannten Menge des Analyten und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird, wobei die Kalibrierungs-Grenzfläche weiter benachbart zur Reaktions-Grenzfläche liegt. Bevorzugte Merkmale der Vorrichtung finden sich in den Ansprüchen 3 bis 22.

**[0022]** Beschrieben wird auch eine Vorrichtung zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen eines Analyten in einer Flüssigkeitsprobe, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, durch Einsetzen eines Reagenz, das zum Binden an den Analyten und Bilden eines nachweisbaren Reaktionsproduktes von einem Substrat in der Lage ist, um eine Menge des Analyten zu einer Menge des nachweisbaren Reaktionsproduktes in Beziehung zu setzen. Die Vorrichtung umfasst ein Flüssigkeits-Transportmaterial, das zum Absorbieren einer Flüssigkeit und Verursachen einer Kapillarströmung der Flüssigkeit in der Lage ist. Das Flüssigkeits-Transportmaterial hat eine erste Zone zum Aufbringen der flüssigen Probe, enthaltend das Reagenz auf einem ersten Kissen, an dem der gleiche Analyt, der nachgewiesen und/oder quantitativ bestimmt wird, im Wesentlichen irreversibel gebunden ist, und eine zweite Zone für das Aufbringen einer Flüssigkeit auf ein zweites Kissen, das ein rekonstituierbares Substrat enthält. Wird die das Reagenz enthaltende flüssige Probe zu dem ersten Kissen hinzugegeben, dann wird die flüs-

sige Probe, die das Reagenz enthält, das nicht durch den Analyten gebunden wird, der im Wesentlichen irreversibel an das erste Kissen gebunden ist, von einer Flüssigproben-Kante in einer ersten Richtung zur zweiten Zone hinfließen. Wird die Flüssigkeit zu dem zweiten Kissen hinzugegeben, dann wird das Substrat in dem zweiten Kissen durch die Flüssigkeit zur Bildung eines flüssigen Reaktanten rekonstituiert, der zum Reagieren mit dem Reagenz in der Lage ist, und der flüssige Reaktant fließt von einer Flüssigreaktanten-Kante in einer zweiten Richtung entgegengesetzt zur ersten Richtung und zu der ersten Zone hin. Wenn sich die fließende Flüssigkeitsprobe, die das Reagenz enthält, das nicht durch den Analyten auf dem ersten Kissen gebunden wird, und der fließende flüssige Reaktant treffen, dann endet das Fließen und das nachweisbare Reaktionsprodukt wird durch eine Reaktion zwischen dem flüssigen Reaktanten und dem Reagenz gebildet, und eine stabile Reaktions-Grenzfläche wird an einem Übergang zwischen und visuell unterscheidbar von der flüssigen Probe und dem flüssigen Reaktanten gebildet.

**[0023]** Das Flüssigkeits-Transportmaterial, das in der vorliegenden Erfindung benutzt wird, ist vorzugsweise in der Lage, die flüssige Probe und das flüssige Reagenz durch Kapillarwirkung zu transportieren und dadurch die Bewegung der flüssigen Probe durch das Material zu erleichtern. Weiter ist das Flüssigkeits-Transportmaterial vorzugsweise in der Lage, eine definierte Grenzfläche mit geringem Vermischen der gegenüberstehenden Flüssigkeiten aufrechtzuhalten, während es Diffusion erlaubt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Flüssigkeits-Transportmaterial ein Nitrocellulosematerial, das auf ein rückwärtiges Material aus Polyvinylchlorid oder Polyester (d.h., Mylar<sup>TM</sup>) gegossen ist.

**[0024]** Ein oder mehrere rekonstituierbare Reagenzien können auf dem saugfähigen Material in einer oder mehreren Reagenzzonen enthalten sein. Durch die flüssige Probe zu rekonstruierende Reagenzien können auf dem Flüssigkeits-Transportmaterial an einer Stelle lokalisiert sein, die dichter zur Aufbringstelle für die Flüssigkeitsprobe ist als zur Aufbringstelle für die Verdünnungsmittellösung. Anders können Reagenzien, die durch die Verdünnungsmittel-Lösung zu rekonstituieren sind, auf dem Flüssigkeits-Transportmaterial an einer Stelle lokalisiert sein, die dichter zur Aufbringstelle für die Verdünnungsmittel-Lösung als zur Aufbringstelle für die Flüssigkeitsprobe ist. Die Flüssigkeitsströmung durch diese Reagenzienzonen rekonstituiert die Reagenzien, führt zu einer wirksamen Vorbehandlung der Probe oder Mischen und/oder Umsetzen eines Reagenz mit einem anderen. In anderen Ausführungsformen können das Reagenz oder die Reagenzien in einem absorbierenden Kissen enthalten sein, das in Kontakt mit dem Flüssigkeits-Transportmaterial an der Flüssigreaktanz-Zone angeordnet ist. Das absorbierende Kis-

sen kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Zellulose, Glasfaser, Polyester oder irgendeinem absorbierenden Polymer. Ein absorbierendes Kissen kann auf der Stelle angeordnet sein, auf die die Flüssigkeitsprobe aufgebracht wird, um die Flüssigkeitsprobe vorzubehandeln, bevor sie in das absorbierende Material eintritt, z.B., um rote Blutzellen aus einer rote Blutzellen enthaltenden Probe zu entfernen. Das Reagenz oder die Reagenzien können an mehreren Stellen auf dem Flüssigkeits-Transportmaterial vorhanden sein.

**[0025]** In eine anderen Ausführungsform kann das Flüssigkeits-Transportmaterial in der Lage sein, rote Blutzellen vom ganzen Blut abzutrennen, während die Flüssigkeitsprobe durch das saugfähige Material wandert. In verschiedenen Ausführungsformen kann das Flüssigkeits-Transportmaterial eine HEMASEP L®-Membran, eine HEMASEP V®-Membran oder eine SUPOR®-Membran (jeweils von Pall-Gelman, Port Washington, NY erhältlich), eine CYTOSEP®-Membran (Allstrom Filtration, Mont Holly Springs, PA) oder eine Nitrocellulose-Membran sein.

**[0026]** Die Menge des Analyten, die in der Probe vorhanden ist, wird bestimmt durch Messen der Menge des nachweisbaren Reaktionsproduktes und Bestimmen der Menge des Analyten aus der gemessenen Menge des Reaktionsproduktes. Das nachweisbare Reaktionsprodukt kann durch irgendwelche geeigneten, dem Fachmann bekannte Mittel gemessen werden. Wenn das Reaktionsprodukt, z.B., Licht bei einer speziellen Wellenlänge absorbiert, dann kann das Absorptionsvermögen bei dieser Wellenlänge gemessen und mit der Menge des Analyten in Beziehung gesetzt werden. Das Reaktionsprodukt kann alternativ, wie geeignet, mittels Durchlässigkeit, Reflexionsvermögen, Fluoreszenz, Lumineszenz oder durch elektrochemische Verfahren, z.B. elektrische Leitfähigkeit, gemessen werden.

**[0027]** Die Konzentration nicht umgesetzter Reagenzien auf dem Flüssigkeits-Transportmaterial kann einen Bezugswert, eine Kontrolle oder einen Blindwert für den Assay ergeben. Die Konzentration der nicht umgesetzten Probe auf dem saugfähigen Material kann auch einen Bezugswert, eine Kontrolle oder einen Blindwert für die Probe ergeben, z.B. eine rote Blutzellen enthaltende Probe kann auf Hämolyse überprüft werden. Die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung kann weiter eine Einrichtung zum Kalibrieren einer Konzentration des flüssigen Reagenz enthalten, indem man eine Menge des Analyten an einem Punkt benachbart, aber verschieden von dem Punkt in der ersten Zone hinzugibt, bei der die flüssige Probe hinzugegeben wurde, sodass sich der Analyt und der flüssige Reaktant treffen und ein nachweisbares Kalibrierungsprodukt erzeugen. Die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung kann weiter eine Einrichtung zum gleichzeitigen Aufbringen der flüssi-

gen Probe auf die erste Zone und des flüssigen Reaktanten auf die zweite Zone und einen Sensor umfassen, der das nachweisbare Reaktionsprodukt nachweisen kann. Der Sensor kann, z.B., eine CCD-Abbildungskamera oder eine optische Abbildungsvorrichtung sein.

**[0028]** Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen mindestens eines Analyten in einer flüssigen Probe bereit, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, durch Einsetzen eines flüssigen Reaktanten, der zur Umsetzung mit dem Analyten unter Bildung eines nachweisbaren löslichen Reaktionsproduktes in der Lage ist. Das Verfahren schließt die Stufen des Bereitstellens eines Flüssigkeits-Transportmaterials mit einer ersten Zone ("Flüssigproben-Zone") für das Aufbringen der flüssigen Probe an einer Flüssigproben-Aufbringstelle und einer zweiten Zone ("Flüssigreaktanten-Stelle") für das Aufbringen des flüssigen Reaktanten an einer Flüssigreaktanten-Aufbringstelle, Hinzugeben der flüssigen Probe zu der ersten Zone und des flüssigen Reaktanten zu der zweiten Zone, woraufhin die flüssige Probe von einer Flüssigproben-Kante in einer ersten Richtung zur zweiten Zone hin fließt und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante aus in einer zweiten Richtung, die der ersten Richtung entgegengesetzt ist und zur ersten Zone hin fließt. Treffen sich die fließende flüssige Probe und der fließende flüssige Reaktant, dann endet das Fließen, die Reaktanten diffundieren aufeinander zu und das nachweisbare Reaktionsprodukt wird durch eine Umsetzung zwischen dem flüssigen Reaktanten und dem Analyten an einer stabilen Reaktions-Grenzfläche gebildet, die an einem Übergang zwischen der flüssigen Probe und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und davon verschieden ist. Das nachweisbare Reaktionsprodukt wird dann nachgewiesen und gegebenenfalls gemessen. Das nachweisbare Reaktionsprodukt kann nachgewiesen und gegebenenfalls gemessen werden durch irgendein geeignetes Verfahren, wie, z.B., Absorptionsvermögen, Fluoreszenz, Lumineszenz, Durchlässigkeit oder elektrochemische Parameter, wie Änderungen im Leitvermögen.

**[0029]** In einer anderen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen eines Analyten in einer flüssigen Probe bereit, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, durch Einsetzen eines Reagenz, das zum Binden an den Analyten und Bilden eines nachweisbaren Reaktionsproduktes von einem Substrat in der Lage ist, um die Menge des Analyten zu einer Menge des nachweisbaren Reaktionsproduktes in Beziehung zu setzen. Das Verfahren umfasst das Bereitstellen eines Flüssigkeits-Transportmaterials, das zum Absorbieren einer Flüssigkeit und Verursachen einer Kapillarströmung

der Flüssigkeit in der Lage ist, wobei das Flüssigkeits-Transportmaterial eine erste Zone zum Aufbringen der das Reagenz enthaltenden flüssigen Probe auf ein erstes Kissen, enthaltend den Analyten, der im Wesentlichen irreversibel an das erste Kissen gebunden ist, und eine zweite Zone zum Aufbringen einer Flüssigkeit auf ein zweites Kissen aufweist, das ein rekonstituierbares Substrat enthält. Die das Reagenz enthaltende flüssige Probe wird zu dem ersten Kissen hinzugegeben und die Flüssigkeit zu dem zweiten Kissen, wobei die flüssige Probe danach von einer Flüssigprobenkante in einer ersten Richtung zu der zweiten Zone hin fließt und das Substrat durch die Flüssigkeit zur Bildung eines flüssigen Reaktanten rekonstituiert wird, der zur Umsetzung mit dem Reagenz in der Lage ist, und der flüssige Reaktant in einer zweiten Richtung entgegen der ersten Richtung und von einer Flüssigreaktantenkante aus zur ersten Zone hin fließt. Wenn die fließende flüssige Probe, die das Reagenz enthält, das nicht durch den Analyten auf dem ersten Kissen gebunden ist, und der fließende flüssige Reaktant sich treffen, dann endet das Fließen und das nachweisbare Reaktionsprodukt wird durch eine Umsetzung zwischen dem flüssigen Reaktanten und dem Reagenz gebildet und eine stabile Reaktions-Grenzfläche wird an einem Übergang zwischen der flüssigen Probe und dem flüssigen Reaktanten gebildet und ist visuell verschieden davon. Danach wird das nachweisbare Reaktionsprodukt nachgewiesen und kann weiter quantitativ bestimmt werden.

**[0030]** Das Reagenz kann eine Vielzahl von Reagenzien an einer Vielzahl von Stellen auf dem Flüssigkeits-Transportmaterial sein. Die flüssige Probe kann ganzes Blut, Blutplasma, Bluts serum, Urin oder irgendeine Körperflüssigkeit sein. Zusätzlich ist die Erfindung brauchbar für den Nachweis von Analyten in einer breiten Vielfalt von Materialien, wie Milch, Umweltproben und anderen Proben, die Zielanalyte enthalten. Die Reagenzien können weiter zu entweder der flüssigen Probe oder der Verdünnungsmittel-Lösung oder beiden vor dem Kontakt mit dem Flüssigkeits-Transportmaterial hinzugegeben werden. In diesem Aspekt schließen die Verfahren das Bereitstellen eines Flüssigkeits-Transportmaterials, wie oben beschrieben, ein, und das saugfähige Material braucht keine Reagenzien zu enthalten oder kann zusätzliche Reagenzien enthalten, die entweder getrocknet sind im Flüssigkeits-Transportmaterial oder in einem Kissen, das mit dem Flüssigkeits-Transportmaterial in Kontakt steht.

**[0031]** Die obigen und andere Aufgaben, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung in Verbindung mit der beigefügten Zeichnung deutlicher.

## KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

**[0032]** [Fig. 1](#) ist eine isometrische Ansicht des Teststreifens der vorliegenden Erfindung, der Orte von Aufbringstellen für flüssige Proben und Verdünnungsmittel-Lösung, Richtung des Verdünnungsmittel-Lösungs- und Flüssigproben-Fließens und die Stelle des Reaktionsproduktes nach Abschluss des Testes zeigt.

**[0033]** [Fig. 2](#) ist eine isometrische Ansicht einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, bei der ein getrocknetes Reagenzkissen, enthaltend ein oder mehrere Reagenzien, an einem Ende des Teststreifens angebracht ist und die Stelle des Aufbringens der Verdünnungsmittel-Lösung auf einem Abschnitt des getrockneten Reagenzkissens angeordnet ist.

**[0034]** [Fig. 3](#) ist eine schematische Darstellung der Konzentrationen von Analyt, Reagenz und Reaktionsprodukt an Stellen entlang dem saugfähigen Material und veranschaulicht, dass an der Grenzfläche die Konzentration nicht umgesetzten Analyten und nicht umgesetzter Reagenzien scharf abfallen, da sie reagieren und Reaktionsprodukt bilden, und dass die Konzentration des Reaktionsproduktes an der Grenzfläche entsprechend scharf steigt.

**[0035]** [Fig. 4A](#) bis [Fig. 4F](#) sind Fotografien, die Resultate eines Glukose-Assay im Verlaufe der Zeit zeigen, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt worden ist.

**[0036]** [Fig. 5A](#) bis [Fig. 5I](#) sind Fotografien, die Resultate von drei Konzentrationen von Calcium-Assays, die gemäß der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurden, über die Zeit zeigen.

**[0037]** [Fig. 6](#) ist eine graphische Darstellung der Farbintensität gegenüber der Zeit für sechs unabhängig abgelesene Reflexionswerte an einer Reaktions-Grenzfläche von einer Probe mit einer Albumin-Konzentration von 1,2 g/dl, bezogen auf einen Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde.

**[0038]** [Fig. 7](#) ist eine numerische Tabelle der Farbintensität gegen die Zeit für sechs unabhängig abgelesene Reflexionswerte einer Reaktions-Grenzfläche und der Mittelwert und die Steigung der Probe mit einer Albumin-Konzentration von 1,2 g/dl, bezogen auf einen Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde.

**[0039]** [Fig. 8](#) ist eine graphische Darstellung der Farbintensität gegen die Zeit für sechs unabhängig abgelesene Reflexionswerte einer Reaktions-Grenzfläche von einer Probe mit einer Albumin-Konzentration von 1,9 g/dl, bezogen auf einen Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde.

der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde.

[0040] [Fig. 9](#) ist eine numerische Tabelle der Farbintensität gegen die Zeit für sechs unabhängig abgelesene Reflexionswerte einer Reaktions-Grenzfläche und der Mittelwert und die Steigung einer Probe, die eine Albumin-Konzentration von 1,9 g/dl aufweist, bezogen auf einen Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde.

[0041] [Fig. 10](#) ist eine graphische Darstellung von Farbintensität gegen Zeit der gemittelten roten Reflexionswerte von Proben mit Albumin-Konzentrationen von 1,2 g/dl und 1,9 g/dl, bezogen auf einen Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt und über 15 Sekunden abgelesen wurde.

[0042] [Fig. 11](#) ist ein digitales Farbbild eines Assay, der mit der vorliegenden Erfindung von einer Probe mit einer Albumin-Konzentration von 1,2 g/dl ausgeführt wurde, innerhalb von 200 Millisekunden der Grenzflächenbildung und 2,0 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes.

[0043] [Fig. 12](#) ist ein digitales Farbbild eines Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde, von einer Probe mit einer Albumin-Konzentration von 1,2 g/dl, bei 3 Sekunden nach der Grenzflächenbildung und 5 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes.

[0044] [Fig. 13](#) ist ein digitales Farbbild eines Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde, einer Probe mit einer Albumin-Konzentration von 1,9 g/dl, innerhalb von 200 Millisekunden der Grenzflächenbildung und 2,0 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes.

[0045] [Fig. 14](#) ist ein digitales Farbbild eines Assays, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde, von einer Probe mit einer Albumin-Konzentration von 1,9 g/dl, bei 3 Sekunden nach der Grenzflächenbildung und 5 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes.

[0046] [Fig. 15](#) ist eine graphische Darstellung der Farbintensität gegen die Zeit für drei verschiedene Vorrichtungen zum Ablesen einer Probe mit einer Glukose-Konzentration von 50 mg/dl, bezogen auf einen mit der vorliegenden Erfindung ausgeführten Assay.

[0047] [Fig. 16](#) ist eine graphische Darstellung der Farbintensität gegen die Zeit für drei verschiedene Vorrichtungen zur Ablesung einer Probe mit einer Glukose-Konzentration von 150 mg/dl, beruhend auf einem Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde.

[0048] [Fig. 17](#) ist eine graphische Darstellung der Farbintensität gegen die Zeit für drei verschiedene Vorrichtungen zur Ablesung einer Probe mit einer Glukose-Konzentration von 250 mg/dl, beruhend auf einem Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde.

[0049] [Fig. 18](#) ist eine graphische Darstellung der Farbintensität gegen die Zeit für den Mittelwert von Proben mit einer Glukose-Konzentration von 50 mg/dl, 150 mg/dl und 250 mg/dl, beruhend aus einem Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt und über 4,5 Minuten abgelesen wurde.

[0050] [Fig. 19](#) ist eine graphische Darstellung der Farbintensität gegen die Zeit für Proben mit Calcium-Konzentrationen von 9,3 mg/dl und 13 mg/dl, beruhend auf einem Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde.

[0051] [Fig. 20](#) ist eine graphische Darstellung der Grenzflächenbreite gegen die Zeit für Proben mit Calcium-Konzentrationen von 9,3 mg/dl und 13 mg/dl, beruhend auf einem Assay, der mit der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde.

[0052] [Fig. 21](#) ist eine schematische Darstellung der verschiedenen Parameter, die in den Verfahren und den Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung gemessen werden können.

[0053] [Fig. 22](#) ist eine schematische Darstellung der Messung eines Teiles der Fläche der Produkt-Grenzflächenregion als eine Messung der Bioaktivität in einem Assay der Glukose-Konzentration.

[0054] [Fig. 23](#) ist eine schematische Darstellung der internen Kalibrierungs-Prozeduren, die in den Verfahren und Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung benutzt werden, und das Aufbringen des Analytüberschusses nahe dem Probenkissen in einem Streifenformat und die nachfolgende Bildung des Analytfleckes an der Reaktionsprodukt-Grenzfläche zeigt.

[0055] [Fig. 24](#) ist ein digitales Farbbild eines Glukose-Assays, das die interne Kalibrierungs-Prozedur der vorliegenden Erfindung demonstriert. Der kalibrierte Analyt (Glukose) wurde in einer Überschusskonzentration von etwa 100 mg/dl aufgebracht und der Glukose-Assay wurde gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung ausgeführt. Das Produkt an der Reaktions-Grenzfläche wurde bei 20 Sekunden

und 60 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe gemessen.

**[0056]** [Fig. 25](#) ist ein digitales Farbbild eines Assays auf alkalische Phosphatase, ausgeführt mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, bei 15 Sekunden und 120 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe, sowie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes an jedem Zeitpunkt.

**[0057]** [Fig. 26](#) ist ein digitales Farbbild eines Assays auf Gesamtbilirubin, ausgeführt gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, bei einer Konzentration von 4,73 mg/dl Gesamtbilirubin und gemessen bei 15 Sekunden und 275 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe, sowie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes bei jedem Zeitpunkt.

**[0058]** [Fig. 27](#) ist ein digitales Farbbild eines Assays auf Harnsäure, ausgeführt gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, bei einer Konzentration von 0,3 mg/dl Harnsäure und gemessen bei 5 Sekunden und 295 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe, ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes bei jedem Zeitpunkt.

**[0059]** [Fig. 28](#) ist ein digitales Farbbild eines Assays auf  $\gamma$ -Glutamyltransferase-Aktivität, ausgeführt gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, bei einer Konzentration von 380 U/l von  $\gamma$ -Glutamyltransferase-Aktivität und gemessen bei 15 Sekunden und 285 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe, ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes bei jedem Zeitpunkt.

**[0060]** [Fig. 29](#) ist ein digitales Farbbild eines Assays auf Amylase, ausgeführt gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, bei einer Konzentration von 16.800 U/l Amylase und gemessen bei 35 Sekunden und 275 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe, ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes bei jedem Zeitpunkt.

**[0061]** [Fig. 30](#) ist ein digitales Farbfoto eines Assays auf Kreatinin, ausgeführt gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, bei einer Konzentration von 150 mg/dl Kreatinin und gemessen bei 5 Sekunden und 295 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe, ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes an jedem Zeitpunkt.

**[0062]** [Fig. 31](#) ist ein digitales Farbbild eines Assays auf Cholesterin, ausgeführt gemäß dem Verfahren

der vorliegenden Erfindung, bei einer Konzentration von 96 mg/dl Cholesterin und gemessen bei 10 Sekunden und 300 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe, ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes bei jedem Zeitpunkt.

**[0063]** [Fig. 32](#) ist ein digitales Farbfoto eines Assays auf Gesamtprotein, ausgeführt gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, bei einer Konzentration von 6.200 mg/dl Gesamtprotein und gemessen bei 5 Sekunden und 295 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe, ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes bei jedem Zeitpunkt.

**[0064]** [Fig. 33](#) ist ein digitales Farbabsorptionsbild eines Assays auf Magnesium, ausgeführt gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, bei einer Konzentration von 4,7 mg/dl Magnesium und gemessen bei 5 Sekunden und 295 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe, ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der UV-Absorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen UV-Absorptionsbildes an jedem Zeitpunkt.

**[0065]** [Fig. 34](#) ist ein digitales Farbbild eines Immunoassays auf auf T4, ausgeführt gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, und gemessen bei 5 Minuten nach dem Aufbringen der Probe, ebenso wie die dazugehörige graphische Darstellung der Farbabsorption für einen ausgewählten Abschnitt des digitalen Farbbildes.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0066]** Die vorliegende Erfindung stellt Vorrichtungen zum Nachweisen von Analyten bereit, die in einer flüssigen Probe vorhanden sein können, durch Umsetzen eines flüssigen Reaktanten mit der flüssigen Probe und Bilden eines nachweisbaren Reaktionsproduktes. Die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung umfasst einen absorbierenden Streifen, hergestellt aus einem Flüssigkeits-Transportmaterial ("saugfähigen Material"), das in der Lage ist, flüssige Probe, Reagenzien und Verdünnungsmittel-Flüssigkeiten durch Kapillarwirkung zu absorbieren und zu transportieren. Analytische Reagenzien, die innerhalb des absorbierenden Streifens aufgelöst und verteilt werden können, können in den absorbierenden Streifen hinein oder in Reagenzien-Kissen in Kontakt mit dem absorbierenden Streifen getrocknet werden. Die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung ist besonders brauchbar für klinische chemische Anwendungen.

**[0067]** Wir haben das unerwartete Resultat beob-

achtet, dass sich zwei Flüssigkeiten, die von entgegengesetzten Enden eines saugfähigen Materials konvergieren, an einer sehr scharf definierten Grenzfläche treffen, wobei wenig Vermischen der beiden gegenüberstehenden Lösungen über Zeitdauern bis zu mehreren Minuten eintritt. Dies gestattet die Erzeugung einer stabilen Reaktions-Grenzfläche, wo sich die beiden einander gegenüberstehenden Flüssigkeiten, die Reagenzien oder Analyte enthalten, die zum Reagieren miteinander in der Lage sind, treffen, diffundieren und ein nachweisbares Produkt bilden. Das resultierende Produkt ist an der Grenzfläche für eine signifikante Zeitdauer lokalisiert, was die Analyse der Reaktionsrate und der Reaktionsprodukt-Bandintensität ohne die Notwendigkeit gestattet, Volumina der Ausgangsreagenzien zu messen. Da das Reaktionsprodukt sich visuell von den Reaktanten unterscheidet, können hohe Konzentrationen der Reaktanten benutzt werden. Dies gestattet den Einsatz großer Mengen gewisser Reagenzien, die endogen störenden Verbindungen entgegenwirken können, ohne Resultate aufgrund eng verwandter Absorptionsspektren oder Dichte nicht umgesetzter Reagenzien zu verdunkeln. Die vorliegende Erfindung umfasst eine signifikante Verbesserung gegenüber wegwerfbaren analytischen Reagenzsystemen nach dem Stande der Technik, da die nachweisbare Reaktionszone unterschieden und separat von den nicht umgesetzten Reagenzien ist, was den Einsatz von Reaktions-Indikatoren erlaubt, die nur untergeordnete Änderungen ebenso wie außerordentlich hohe Konzentrationen von Reaktanten zeigen.

**[0068]** Weil die Reaktanten, d.h., die flüssige Probe und die flüssigen Reaktanten, sich visuell vom Reaktionsprodukt unterscheiden, enthält das System eine eingebaute Probe sowohl der unumgesetzten flüssigen Probe als auch der unumgesetzten flüssigen Reaktanten-Lösung. Diese können als Bezug für gewisse Arten analytischer Reaktionen benutzt werden, wie solcher, die Dichteänderungen und nicht Spektraländerungen einschließen oder solcher, die ein Ausgangs-Reagenz oder einen Bezugswert erfordern.

**[0069]** Die Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung können aus irgendeinem Material hergestellt werden, das in der Lage ist Flüssigkeiten zu absorbieren und eine Kapillarströmung von Bereichen hoher Konzentration zu Bereichen geringer Konzentration auf der Vorrichtung zu verursachen, während eine definierte Reaktionsprodukt-Grenzfläche unter geringem Vermischen der gegenüberstehenden Flüssigkeiten aufrechterhalten wird. Die Materialien der Vorrichtung können aus Nitrocellulose-Membranen, Zellulose-Folien, porösem Polyethylen, Polymethersulfon oder Membranen einer Vielfalt anderer Materialien hergestellt werden. Poröse Kunststoffe, hergestellt aus einer Vielzahl von Polymeren, können auch benutzt werden, wie Polyethylen, Polystyrol

oder Polypropylen. Am bevorzugtesten sind saugfähige Materialien, hergestellt aus Nitrocellulose, die auf ein rückwärtiges Material gegossen ist, wie PVC oder Mylar<sup>TM</sup> (oder ein anderer Polyesterfilm). Ein Beispiel dieser Art porösen Materials ist das von Schleicher und Schuell, Katalognummer FF-170, erhältliche Material. Benutzt man Nitrocellulose, dann sollten die Nitrocellulose-Materialien zuerst vorbehandelt werden, um die Membranen hydrophil zu machen. Das Flüssigkeits-Transportmaterial kann an einem festen rückwärtigen oder Stützmaterial haften, wie PVC oder Polystyrol, um Haltbarkeit bei der Handhabung zu erhalten. Diese Materialien sind beispielsweise genannt und sollen nicht beschränken. Der Fachmann wird realisieren, dass eine Vielfalt von Materialien erfolgreich in der vorliegenden Erfindung benutzt werden kann, solange das Material die Eigenschaften hat, die Probe zu absorbieren, Kapillarwirkung zu unterstützen und dadurch die Bewegung der flüssigen Probe durch das Material zu erleichtern und eine definierte Grenzfläche mit geringem Vermischen der gegenüberstehenden Flüssigkeiten aufrechtzuerhalten.

**[0070]** Hinsichtlich hydrophiler absorbierender Materialien beeinflussen zwei Faktoren die Brauchbarkeit in der vorliegenden Erfindung. Als Erstes beeinflusst die Porengröße die Integrität der Reaktions-Grenzfläche. Mit zunehmender Porengröße breitet sich die Reaktions-Grenzfläche aus und wird diffuser. Zweitens nimmt mit zunehmenden Prozent Feststoffen (V/V) in der Membran die Signalintensität der Reaktions-Grenzfläche ab, vermutlich aufgrund eines geringeren Volumens der Reaktions-Flüssigkeit an der Grenzfläche. Vorzugsweise liegt die Porengröße in der Größenordnung von 5 µm, bezogen auf die derzeit erhältlichen Materialien. Es ist vorstellbar, dass ein Material geringer Porengröße und geringen Feststoffgehaltes ein ausgezeichnetes Material sein kann.

**[0071]** In bevorzugten Ausführungsformen zum Untersuchen von Proben die ganzes Blut oder Blutprodukte enthalten, die unerwünschte rote Blutzellen enthalten, kann das Flüssigkeits-Transportmaterial ein Material sein, das Plasma oder das Blutprodukt von den roten Blutzellen trennt. In diesen Ausführungsformen kann das Flüssigkeits-Transportmaterial eine HEMOSEP V<sup>®</sup>- oder HEMOSEP L<sup>®</sup>-Membran (erhältlich von Pall-Gelman Inc. Port Washington, NY) oder eine CYTOSEP<sup>®</sup>-Membran (erhältlich von Allstrom Filtration, Mount Holly Springs, PA) sein.

**[0072]** Die Verfahren und Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung sorgen dafür, dass die Probenzubereitung und -analyse in einer Stufe auf der gleichen Vorrichtung ausgeführt werden kann. Die Vorrichtung kann ein Streifen in Form einer allgemein rechteckigen Gestalt sein. Alternativ kann das saugfähige Material auch eine kreisförmige oder lineare Anordnung

oder eine sternförmige Konfiguration sein, die den zusätzlichen Vorteil hat, dass mehrere Analyten in einem einzigen Assay analysiert werden können. Der Fachmann wird natürlich realisieren, dass das saugfähige Material von irgendeiner Gestalt sein kann, die unter den speziellen Umständen vorteilhaft ist.

**[0073]** Die vorliegende Erfindung kann Reagenzien-systeme benutzen, die in der Lage sind, eine chemische Bewertung von Analyten auszuführen, die üblicherweise in biologischen Flüssigkeiten vorhanden sind. Solche Reagenzien-systeme sind im Stande der Technik bekannt. Von besonderem Interesse sind solche Reagenzien-systeme, die eine einzige Komponente benutzen, d.h., wo die Reaktion in einer einzigen Lösung stattfindet, statt solcher, die mehr als eine zeitlich bemessene Inkubationsstufe erfordern. Die vorliegende Erfindung liefert Einkomponenten-Reagenzien-systeme, zusammengesetzt aus mehreren verschiedenen chemischen Reagenzien, wobei die Reagenzien in räumlich getrennten Zonen auf den Streifen getrocknet sind. Wie in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt, können getrocknete Reagenzienstreifen der vorliegenden Erfindung benutzt werden, durch Aufbringen einer Verdünnungsmittel-Lösung ("Verdünnungsmittel-Lösung" ist definiert als irgendeine Flüssigkeit, die zum Auflösen eines Reagenz in der Lage ist. Irgendwelche Reagenzien, die zu der Verdünnungsmittel-Lösung hinzugegeben oder durch die Verdünnungsmittel-Lösung rekonstituiert werden, sollen als Teil der Verdünnungsmittel-Lösung in die Definition eingeschlossen sein) auf ein Ende des Streifens und einer flüssigen Probe ("flüssige Probe" ist als irgendein Flüssigkeit definiert, die einen Analyten enthält, der durch den Assay zu bestimmen ist. Irgendwelche Reagenzien, die zu der flüssigen Probe hinzugegeben oder durch die flüssige Probe rekonstituiert werden, sollen als Teil der flüssigen Probe in die Definition eingeschlossen sein), die durch den Assay nachgewiesen werden soll, auf das andere Ende. Bezugnehmend auf [Fig. 1](#), kann die flüssige Probe auf die Stelle **1** zum Aufbringen der flüssigen Probe in der Flüssigproben-Zone ("Flüssigproben-Zone" ist als ein Bereich auf dem saugfähigen Material definiert, der dichter zur Flüssigproben-Aufbringstelle ist als zur Stelle zum Aufbringen des flüssigen Reaktanten) aufgebracht werden und der flüssige Reaktant kann auf die Stelle **2** zum Aufbringen des flüssigen Reaktanten in der Flüssigreaktanten-Zone ("Flüssigreaktanten-Zone" ist als irgendein Bereich auf dem saugfähigen Material definiert, der dichter zur Stelle zum Aufbringen des flüssigen Reaktanten als zur Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe liegt) aufgebracht werden. Während die beiden Flüssigkeiten sich durch die Streifen aufeinander zu bewegen kann sich die Probe in Komponenten auftrennen. Werden, z.B., zelltrennende Streifen benutzt, dann kann sich die flüssige Probe in Plasma und rote Blutzellen auftrennen. Die flüssige Probe kann auch ein oder mehrere Reagen-

zien rekonstituieren, während sie sich durch das Flüssigkeits-Transportmaterial bewegt, und dadurch die Probe vorbehandeln, bevor die endgültigen Reaktionen auftreten. Der flüssige Reaktant wandert gleichzeitig vom gegenüberliegenden Ende des Streifens und kann gegebenenfalls nacheinander ein oder mehrere getrocknete Reagenzien auflösen, die in der Flüssigreaktanten-Zone des Streifens vorhanden sein mögen. Treffen sich die flüssige Probe und der flüssige Reaktant, dann bildet sich eine Reaktions-Grenzfläche zwischen den beiden transportierten Flüssigkeiten. Die Reaktionsprodukte nehmen ein sehr enges Band an der Grenzfläche ein und es werden die Rate und Intensität der Bildung gemessen. Gewöhnlich wird die Zunahme in der Menge des gebildeten Produktes (oder die Abnahme in der Menge des zugeführten Reagenz und/oder Analyten) als eine Funktion der Zeit gemessen. Alternativ kann die Menge des Produktes, Reagenz und/oder Analyten an einem oder mehreren festgelegten Zeitpunkten gemessen werden. Die Änderung in der Menge des gebildeten Produktes wird typischerweise gemessen durch Messen der Zunahme oder Abnahme im Absorptionsvermögen über die Zeit bei einer Wellenlänge, bei der das maximale Absorptionsvermögen nachgewiesen wird. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Reaktionsprodukte unter Benutzung der Reflexion gemessen. Der Fachmann wird jedoch feststellen, dass andere Mittel des Messens der Reaktionsprodukte ebenfalls benutzt werden können, wie durch den Gebrauch elektrochemischer Methoden (z.B. Messen von Änderungen im Leitvermögen), Fluoreszenz, Lumineszenz, Durchlässigkeit oder anderen im Stande der Technik bekannten Verfahren, die ein nachweisbares Signal ergeben, das in Beziehung steht zur Anwesenheit und/oder der Menge eines Reaktionsproduktes. Das resultierende Reaktantenband ist über mehrere Minuten stabil, wobei wenig Produktdiffusion in den umgebenden Bereich erfolgt, was einem angemessenen Zeit für die Bestimmung der Rate und Intensität der Farbentwicklung lässt.

**[0074]** [Fig. 2](#) veranschaulicht eine andere Ausführungsform der Erfindung, bei der ein oder mehrere Reagenzien, die auf dem saugfähigen Material vorhanden sein können, in Form eines getrockneten Reagenzkissens **3** vorhanden sein können. In dieser Ausführungsform befindet sich das getrocknete Reagenzkissen **3** auf einem Abschnitt der Stelle **2** zum Aufbringen der Verdünnungsmittel-Lösung.

**[0075]** Die Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe kann ein oder mehrere Kissen zum Behandeln der flüssigen Probe aufweisen, bevor man sie dem Reagenz aussetzt. Als ein Beispiel kann die Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe ein Blutproben behandelndes Kissen zur Vorbehandlung von Proben gesamten Blutes oder von Proben, die das gesamte Blut enthalten, aufweisen. Beispiele solcher Kissen

schließen Hemasept L oder, bevorzugter, Hemasept V (Pall Corporation) oder Glasfaser ein. Zusätzlich kann die Stelle zum Aufbringen des Reagenz weiter ein Kissen aufweisen, das ein getrocknetes Reagenz enthält, das durch Zugabe eines Verdünnungsmittels rekonstituiert werden kann. Dies ersetzt die Anforderung des Aufbringens eines flüssigen Reagenz durch die sehr viel einfachere Rekonstitution eines getrockneten Reagenz unter Benutzung eines Verdünnungsmittels.

**[0076]** In einigen Fällen mag es bevorzugt sein, das Verschwinden eines Reagenz oder Analyten statt des Erscheinen eines Produktes zu messen. So absorbiert, z.B., reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH), ein Kofaktor für viele Enzyme, Licht sehr viel stärker bei 340 nm als in seiner oxidierten Form, NAD. Wenn man die Aktivität eines Enzyms misst, das NADH als einen Kofaktor benutzt, dann kann es vorteilhaft sein, die Reduktion im Absorptionsvermögen bei 340 nm zu messen. Alternativ kann die Bildung von NADH als eine Zunahme des Absorptionsvermögens bei 340 nm gemessen werden.

**[0077]** [Fig. 3](#) ist eine graphische Darstellung, die hypothetische relative Konzentrationen von zu untersuchendem Analyten, Reaktionsprodukt und Reaktant an Stellen entlang dem saugfähigen Material zeigt. Die veranschaulichten relativen Konzentrationen können typisch für solche sein, die während eines Assays auf dem saugfähigen Material gefunden werden. [Fig. 3](#) veranschaulicht vier Arten von Assays, die auf dem saugfähigen Material auftreten können. Linie **70** repräsentiert gebildetes Produkt. Linien **50** und **60** bezeichnen "verbrauchten Analyten" bzw. "verbrauchtes Reagenz" und können eine Reaktion veranschaulichen, bei der das Reagenz oder der Analyt verbraucht wird, wie einen farbbindenden Assay, bei dem Farbe an einen Analyten gebunden wird, und sowohl Farbe als auch Analyt in dem Komplex "verbraucht" werden, wenn die Reaktion auftritt. An der Reaktions-Grenzfläche fallen die Konzentrationen nicht verbrauchten Analyten und nicht verbrauchten Reagenz scharf ab, während die Konzentration an Reaktionsprodukt scharf ansteigt. In anderen Arten von Reaktionen wird das Reagenz in der Reaktion nicht verbraucht. So wird, z.B., in enzymatischen Assays das Enzym nicht verbraucht, sondern es wandelt lediglich einen Analyten (oder ein Substrat) in ein nachweisbares Produkt um. In diesem Falle wird das nicht verbrauchte Reagenz durch Linie **80** repräsentiert und der verbrauchte Analyt durch Linie **50**. In einer anderen Art von Assay kann Reagenz verbraucht und Analyt nicht verbraucht werden, wie für ein Serumenzym (repräsentiert durch Linie **90**). Es gibt somit vier Arten von Assays, die auftreten können und in [Fig. 3](#) veranschaulicht sind: solche, bei denen Analyt verbraucht und Reagenz nicht verbraucht wird, solche, bei denen Analyt nicht verbraucht und Reagenz verbraucht wird, und solche,

bei denen Analyt und Reagenz beide verbraucht oder nicht verbraucht werden.

**[0078]** Weil die Reaktions-Grenzfläche visuell verschieden von der flüssigen Probe und der Reagenzlösung auf dem saugfähigen Material bleibt, schließt die Vorrichtung eine eingebaute Methodologie zum Bestimmen sowohl der Reagenz- als auch der Flüssigproben-Konzentrationen und -Verdünnungen ein. Werden getrocknete Reagenzien rekonstituiert, sorgt die Vorrichtung auch für die interne Berechnung von Bezugswerten, die das Ausmaß der Verdünnung von Reagenzien in der Verdünnungsmittel-Lösung und in der flüssigen Probe in Betracht ziehen (d.h., reflektieren das Ausmaß, zu dem die getrockneten Reagenzien, die vorhanden gewesen sein können, sich in der Verdünnungsmittel-Lösung oder der flüssigen Probe gelöst haben) und für die Messung von Hintergrundsignal, die alle brauchbar sein können für gewisse Arten analytischer chemischer Formate. So können, z.B., gewisse flüssige Proben Material enthalten, das Licht bei einer Wellenlänge oder dicht zu der des Reaktionsproduktes reflektiert, und dieses Signal muss daher von der endgültigen Reaktionsprodukt-Farbin-tensität abgezogen werden. In anderen Formaten, z.B., bei denen Resultate direkt in Beziehung zur Reagenz-Konzentration stehen, z.B., in Raten-Reaktionen, bei denen Analyten im Überschuss vorhanden sind, gestattet eine gleichzeitige Messung sowohl der Ausgangsreagenz-Konzentration als auch der Produkt-Konzentration durch reflektierte Lichtintensität bei verschiedenen Wellenlängen die Einstellung der resultierenden Analyt-Konzentrationswerte auf der Grundlage der Variabilität im Ausmaß der Reagenz-Auflösung. Ein Fachmann wird erkennen, dass das Verfahren der vorliegenden Erfindung die Messung zahlreicher anderer Parameter gestattet und brauchbar sein kann bei Messungen der Betriebsstabilität ebenso wie Kalibrierung und Berechnung von Hintergrund- oder Bezugswerten. Beispiele solcher Parameter schließen, ohne Einschränkung, ein:

1. den Abstand zwischen der Kante der Proben-Aufbringstelle und der Reaktions-Grenzfläche und die Änderung des Abstandes über die Zeit (A in [Fig. 21](#));
2. den Abstand zwischen der Kante der Reagenz-Aufbringstelle und der Reaktions-Grenzfläche und die Änderung des Abstandes über die Zeit (B in [Fig. 21](#));
3. den Abstand zwischen der Kante der Proben-Aufbringstelle und der Flüssigkeits-Grenzfläche und die Änderung des Abstandes über die Zeit (C in [Fig. 21](#));
4. den Abstand zwischen der Kante der Reagenz-Aufbringstelle und der Flüssigkeits-Grenzfläche und die Änderung des Abstandes über die Zeit (D in [Fig. 21](#));
5. den Abstand zwischen der Reaktions-Grenzfläche und der Flüssigkeits-Grenzfläche und die Rate der Änderung des Abstandes über die Zeit

- (E in **Fig.** 21);  
 6. die Fläche der Flüssigkeits-Grenzfläche (I in **Fig.** 21);  
 7. das Absorptionsvermögen oder Reflexionsvermögen des Proben-Hintergrundes (J in **Fig.** 21);  
 8. das Absorptionsvermögen oder Reflexionsvermögen des Reagenz-Hintergrundes (K in **Fig.** 21); und  
 9. das Absorptionsvermögen oder Reflexionsvermögen der Flüssigkeits-Grenzfläche und die Rate der Änderung im gleichen Parameter über die Zeit (L in **Fig.** 21).

**[0079]** Klinische chemisches Assays, seien sie auf Flüssigkeits- oder Festkörper-Grundlage, können durch kinetische Analyse (Rate der Produktbildung; G in **Fig.** 21) oder Endpunkt-Analyse (Menge der Produktion an einem oder mehreren gegebenen Zeitpunkten; F in **Fig.** 21) abgelesen werden. Vorzugsweise wird das nachweisbare Reaktionsprodukt gemessen durch Bestimmen der Rate der Produktbildung (G in **Fig.** 21). Hinsichtlich klinisch-chemischer Assays auf Festkörper-Grundlage bietet die vorliegende Erfindung den einzigen Weg zum Messen der Rate von einem wahren Zeit-Nullpunkt, da man den Beginn der Reaktion innerhalb von Millisekunden visualisieren und einstellen kann. Dies gestattet einem, Raten innerhalb der ersten paar Sekunden des Assays zu messen, was einzigartig und brauchbar ist. Zusätzlich kann die Breite des Reaktions-Grenzflächenbandes gemessen werden, das mit der Analyt-Konzentration korrelieren kann. Schließlich kann die gesamte oder ein Teil der Fläche des Grenzflächenbandes innerhalb einer interessierenden Region gemessen werden als eine Bestimmung der Gesamtproduktbildung (H in **Fig.** 21; **Fig. 22**). Diese Parameter kann man über die Zeit verfolgen oder die gleiche Region kann zwischen verschiedenen Proben verglichen werden, um ein relatives Maß der Produkt-Entwicklung und dadurch der Analyt-Konzentration zu liefern.

**[0080]** Der erwünschte Parameter kann gemessen werden unter Benutzung einer geeigneten abbildenden Vorrichtung. Besonders bevorzugt sind abbildende Vorrichtungen, die die quantitative Bestimmung der gemessenen Parameter durch, z.B., Umwandlung der gemessenen Werte für den Parameter in Daten gestatten, die zur Verarbeitung durch einen Computer geeignet sind. Beispiele solcher Vorrichtungen schließen Dreifarben-CCD-Abbildungskameras oder Dreichip-Abbildungsvorrichtungen ein, die optische Bestandteile und eine rotierende Filterscheibe benutzen können.

**[0081]** In einer anderen Ausführungsform kann eine nicht beeinträchtigende Komponente auf der Seite der flüssigen Probe des saugfähigen Materials getrocknet und an verschiedenen Punkten entlang des saugfähigen Materials untersucht werden, während

sie sich in der fortschreitenden Front der flüssigen Probe auflöst, um die Anwesenheit der Probe an der Grenzfläche zu bestimmen. So kann, z.B., eine Farbe mit einem Absorptionsspektrum, das sich von dem des Produktes unterscheidet, auf der Seite der flüssigen Probe des Kissens getrocknet werden. Die Messung dieser Farbe an der Seite der flüssigen Probe der Reaktions-Grenzfläche kann ausgeführt werden, um die Anwesenheit der flüssigen Probe an der Reaktionsstelle zu bestimmen.

**[0082]** In einer anderen Ausführungsform kann eine Menge des nachzuweisenden und/oder zu messenden Analyten an einem Fleck auf dem saugfähigen Material getrocknet werden, der zwischen der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe und der Stelle zum Aufbringen des flüssigen Reagenz liegt. Der Analyt wird mit einem Verdünnungsmittel rekonstituiert und das flüssige Reagenz und der Analyt fließen, wie oben beschrieben, aufeinander zu. Das flüssige Reagenz und der Analyt treffen sich und bilden ein nachweisbares Kalibrierungsprodukt. Die Berechnung der Menge des Reaktionsproduktes wird durch eine Bestimmung der Menge des an der Reaktions-Grenzfläche vorhandenen Reagenz unterstützt, die eine Funktion der Menge des nachweisbaren Kalibrierungsproduktes sein kann. Im Allgemeinen gibt es bei den Verfahren der vorliegenden Erfindung, die auf die Messung der Konzentration eines Analyten gerichtet sind, einen großen Überschuss an Reagenz gegenüber dem Analyten. Um jedoch die Menge des Reagenz an der Reaktions-Grenzfläche zu kalibrieren, wird die Situation umgekehrt, um einen Überschuss an Analyt mit Bezug auf das Reagenz zu erzeugen, durch Anordnen einer relativ großen Menge des Analyten auf dem saugfähigen Material in einer Position in Ausrichtung mit der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe (**Fig. 23**) aber verschieden davon. Der Analyt kann in Form eines einzigen Fleckes hoher Konzentration aufgebracht werden, doch wird er bevorzugter als ein Streifen oder Schlitz aus Analyt (**Fig. 23**) aufgebracht, da dies die Aufbringung der gleichen Menge an Analyt bei einer geringeren Konzentration gestattet, was die Möglichkeit von Problemen vermeidet, die mit hohen Konzentrationen an Analyt verbunden sind, wie Ausfällung oder Kristallisation des Analyten. Der so aufgebrachte Analyt wandert mit der Probe in Richtung der Reagenz-Aufbringstelle und bildet einen großen Produktfleck an der Reaktions-Grenzfläche (**Fig. 24**). Dieser Fleck kann in der gleichen Weise gemessen werden, wie das Reaktionsprodukt, das durch die Analytprobe erzeugt wird. Abweichungen von erwarteten Werten in der Messung des Kalibrierungsleckes können das Auftreten irgendeines einer Anzahl von Punkten signalisieren, die die Reagenz-Konzentration beeinflussen können, wie, z.B., Reagenz-Abbau, Reagenz-Zuführungsschwierigkeiten, Mangel an Reagenz-Auflösung, Ausfällung des Reagenz und Ähnliche.

**[0083]** Das oben beschriebene Kalibrierungs-Verfahren kann auch als ein positives Kontroll-Verfahren benutzt werden, um die Aktivität des Assays zu bestätigen, wo ein negatives Resultat häufig erwartet wird. Bei dieser Ausführungsform wird eine geringe Menge des Analyten auf das saugfähige Material aufgebracht und wandert in Richtung der Reagenz-Aufbringstelle.

**[0084]** Die Bildung eines nachweisbaren Kalibrierungs-Produktes an der Kalibrierungs-Grenzfläche zeigt, dass der Assay richtig arbeitet, und dass irgendein negatives Resultat der Abwesenheit des Analyten in der gleichzeitig mitlaufenden flüssigen Probe zuzuschreiben ist.

**[0085]** Das Folgende ist eine beispielhafte, nicht erschöpfende Liste der Analyten, die mit der vorliegenden Erfindung identifiziert werden können: Alanaminotransferase (ALT) (Enzymsubstrat), Albumin (farbstoffbindend), alkalische Phosphatase (Enzymsubstrat), Ammoniak (enzymatisch), Amylase (Enzymsubstrat), Aspartataminotransferase (AST) (Enzymsubstrat), Gesamtbilirubin (farbstoffbindend), Calcium (farbstoffbindend), Cholesterin (Gesamt) (enzymatisch), Kreatinkinase (CK) (Enzymsubstrat), Kreatinin (farbstoffbindend), 2-Glutamyltransferase (GGT) (Enzymsubstrat), Glukose (enzymatisch), Lactatdehydrogenase (Enzymsubstrat), Lipase (Enzymsubstrat), Magnesium (farbstoffbindend), Phosphor (farbstoffbindend), Protein (Gesamt) (farbstoffbindend), Triglycerid (enzymatisch), Harnstoffstickstoff (BUN) (enzymatisch) und Harnsäure (enzymatisch). Die oben angegebenen Reaktionstypen, Enzymsubstrat, farbstoffbindend und enzymatisch, können zu einer chromogenen und/oder Ultraviolett-Reaktion führen, um die oben aufgeführten Analyten zu identifizieren.

**[0086]** Die vorliegende Erfindung kann auch anstelle des flüssigen Reaktanten, der zur Reaktion mit dem Analyten in der Lage ist, ein Reagenz einsetzen, das zum Binden an den Analyten in der Lage ist. Das Reagenz kann irgendein Molekül sein, das in der Lage ist, an einen interessierenden Analyten zu binden, wie ein Antikörper, ein Rezeptor, ein Rezeptorkörper, ein Antikörperfragment, ein Abtid oder Ähnliche. Das Reagenz enthält weiter (d.h., ist konjugiert oder verbunden mit) ein Enzym oder Enzymfragment, das ein nachweisbares Reaktionsprodukt bei Inkubation des Reagenz mit einem geeigneten Substrat erzeugt. Es gibt zahlreiche bekannte Verfahren, um das Binden eines Analyten an ein solches Reagenz nachzuweisen. In einer Ausführungsform, hier in [Fig. 34](#) veranschaulicht, wird eine definierte Menge des Reagenz mit der flüssigen Probe vermischt, von der angenommen wird, dass sie den interessierenden Analyten enthält. Nach dem Vermischen bindet das Reagenz an irgendeinen in der flüssigen Probe vorhandenen Analyten, bildet einen fest verbun-

denen Komplex zwischen dem Analyten und dem Reagenz. Die Mischung wird dann auf ein Kissen aufgebracht, das an einem Ende des saugfähigen Flüssigkeits-Transportmaterials angeordnet ist. Das Kissen enthält eine definierte Menge des Analyten, der im Wesentlichen irreversibel an das Material gebunden ist, aus dem das Kissen besteht. Unter im Wesentlichen irreversibel verbunden wird verstanden, dass über den Zeitverlauf des Assay keine nachweisbare Menge des Analyten von dem Kissen dissoziiert. Das ungebundene Reagenz in der flüssigen Probe bindet an den Analyten, der an dem Kissen befestigt ist, während das Reagenz in der flüssigen Probe, in der vorher gebundener Analyt vorhanden ist, nicht an den Analyten auf dem Kissen bindet. Dieses Reagenz, in Form eines Reagenz/Analyt-Komplexes, bewegt sich dann durch das Flüssigkeits-Transportmaterial.

**[0087]** Zur gleichen Zeit fließt ein Substrat, das am anderen Ende des saugfähigen Flüssigkeits-Transportmaterials vorhanden ist, in Richtung der flüssigen Probe. An dem Punkt, an dem sich das Substrat und die flüssige Probe treffen, wird ein nachweisbares Reaktionsprodukt durch die Wirkung des Enzymabschnittes des Reagenz mit dem Substrat gebildet. Wie vorher, ist das resultierende Produkt an der Reaktions-Grenzfläche für eine signifikante Zeitdauer lokalisiert, was es leicht gestattet, die Reaktionsrate und Reaktionsprodukt-Intensität zu analysieren. Die Reaktionsrate und/oder Produkt-Konzentration können durch irgendwelche geeigneten Mittel, wie Anwendung einer Kalibrierungsreaktions- oder Standard-Kurve, in Beziehung gesetzt werden zu der Konzentration oder Menge des Analyten in der flüssigen Probe.

**[0088]** Das Reagenz kann irgendein Molekül sein, das zum Binden an den interessierenden Analyten in der Lage ist. Solche Moleküle können ein monoklonaler Antikörper oder einen Teil davon, ein Rezeptorprotein oder ein Abschnitt davon oder ein Abtid oder ein Abschnitt davon sein. Beispiele bekannter Antikörper-Bindeabschnitte schließen, ohne Einschränkung, ein ein F(ab)-Fragment, ein F(ab')-Fragment, ein F(ab')<sub>2</sub>-Fragment, ein Fv-Fragment, ein scFv-Fragment und Ähnliche. Ein Beispiel eines Rezeptorabschnittes, der in der vorliegenden Erfindung benutzt werden kann, ist ein Rezeptorkörper. Die Verfahren zum Erzeugen solcher Antikörper-Bindeabschnitte und Rezeptorkörper und zur Nutzung derselben in Bindereaktionen sind dem Fachmann bekannt. Das Reagenz, in welcher Form auch immer, muss in der Lage sein, spezifisch an den interessierenden Analyten in der flüssigen Probe bei einer genügenden Affinität für den Komplex zu binden, um bis zu dem Kissen zu wandern, das am anderen Ende des saugfähigen Flüssigkeits-Transportmaterials lokalisiert ist, ohne dass ein signifikanter Abschnitt des Komplexes dissoziiert. Tritt eine solche Dissoziation

auf, dann könnte das Reagenz an den Analyten binden, der an dem Kissen befestigt ist und nicht durch das Kissen hindurchgehen, um mit dem Substrat in dem saugfähigen Flüssigkeits-Transportmaterial zu reagieren.

**[0089]** Die Menge des Reagenz, die zu der flüssigen Probe hinzugegeben wird, sollte in einen Bereich fallen, der durch die Menge des Analyten im Kissen und durch die vorhergesetzte Menge des Analyten in der flüssigen Probe diktiert ist. Die Menge sollte mindestens die Menge sein, die erforderlich ist, den gesamten Analyten in der flüssigen Probe zu binden. Ist die zugegebene Menge des Reagenz geringer als die Menge des Analyten in der Probe, dann wird das berichtete Resultat geringer sein als die wahre Konzentration des Analyten in der flüssigen Probe. Die Menge des zu der flüssigen Probe hinzugegebenen Reagenz sollte jedoch nicht größer sein als die Menge des an das Kissen gebundenen Analyten. Ist die Menge des zu der flüssigen Probe hinzugegebenen Reagenz größer als die Menge des im Kissen vorhandenen Analyten, dann wird das berichtete Resultat größer sein als die wahre Konzentration des Analyten in der flüssigen Probe. Weiter sollte die Menge des Analyten in dem Kissen weit im Überschuss sein zu der Menge des Analyten, von der angenommen wird, dass sie in der flüssigen Probe vorhanden ist. Ist die Menge des Analyten in dem Kissen ungenügend, um das ungebundene Reagenz in der flüssigen Probe zu binden, dann wird das berichtete Resultat wieder größer sein als die wahre Konzentration des Analyten in der flüssigen Probe.

**[0090]** Das Reagenz ist mit einem Enzym verbunden, das mit dem Substrat reagieren kann, das vom anderen Ende des Flüssigkeits-Transportmaterials wandert. Das Reagenz und das Enzym können miteinander durch irgendwelche Mittel verbunden sein, die dem Fachmann allgemein bekannt sind, wie kovalente Bindung, Disulfidbrücke und Ähnliche, und sie sind kommerziell erhältlich von einer weiten Vielfalt von Verkäufern (z. B. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Das Substrat und das Enzym sind aneinander angepasst, sodass das Enzym auf das Substrat einwirkt, um ein nachzuweisendes Reaktionsprodukt zu erzeugen. Beispiele solcher Enzyme schließen alkalische Phosphatase,  $\beta$ -Galactosidase und Peroxidase ein. Für alkalische Phosphatase können akzeptable Substrate, ohne Einschränkung, sein p-Nitrophenolphosphat, 4-Methylumbelliferylphosphat oder BCIP/NBT (5-Brom-4-chlor-indolylphosphat/Nitroblautetrazolium). Die alkalische Phosphatase wirkt auf p-Nitrophenolphosphat-Substrat zur Erzeugung des nachweisbaren Reaktionsproduktes p-Nitrophenol. Alkalische Phosphatase wirkt auf 4-Methylumbelliferylphosphat unter Erzeugung des fluoreszierenden Produktes Methylumbelliferon. Für  $\beta$ -Galactosidase akzeptable Substrat können, ohne Einschränkung, einschließen o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-ga-

lactosid oder 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid ("X-gal"). Das Substrat o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactosid wird durch  $\beta$ -Galactosidase unter Bildung von D-Galactosid und dem nachweisbaren Reaktionsprodukt o-Nitrophenol gespalten. Für Peroxidase akzeptable Substrate schließen ein 3-Amino-9-ethylcarbazol ("AEC"), o-Phenyldiamindihydrochlorid ("OPD"), 4-Chlor-1-naphthol, 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (TAB) und Ähnliche. Die Konzentrationen des Substrates, die erforderlich sind, akzeptable Niveaus des nachweisbaren Produktes zum Einsatz in der vorliegenden Erfindung zu produzieren, können, wie erforderlich, für die ausgewählte Probe, den ausgewählten Assay und die ausgewählten Bedingungen geändert werden, wie der Fachmann leicht feststellen kann. Andere Substrate für diese Enzyme sind im Stande der Technik bekannt und können, wie geeignet, statt dessen eingesetzt werden. Zusätzlich können andere Enzym/Substrat-Paare, die dem Fachmann bekannt sind, bei den Verfahren und Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung, wie geeignet, eingesetzt werden.

**[0091]** Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Anwendung der vorliegenden Erfindung zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen spezieller Komponenten in einer flüssigen Probe. Diese Beispiele sind zur Veranschaulichung angegeben und nicht zur Einschränkung. Der Fachmann wird realisieren, dass die veranschaulichten Prinzipien und Techniken angewendet werden können, um eine Vielfalt von Analyten in einer Vielfalt flüssiger Proben nachzuweisen.

#### Beispiel 1

**[0092]** Dieses Beispiel veranschaulicht, wie eine Vorrichtung der vorliegenden Erfindung benutzt wurde, um die Anwesenheit und Konzentration (246 mg/dl) Glukose in einer Probe aus ganzem Blut zu bestimmen.

**[0093]** Eine HEMOSEP L®-Membran wurde an einer adhäsiven Kunststoffrückwand befestigt und in Streifen von 4 mm  $\times$  25 mm zerschnitten. Trinder-Reagenz (15  $\mu$ l) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), enthaltend Glukoseoxidase (15.000 U/l), 4-Aminoantipyrin (0,5 mM), p-Hydroxybenzolsulfonat (20 mM) und Peroxidase (10.000 U/l) bei pH von etwa 7,0 wurde auf einem Ende jedes Teststreifens getrocknet, der etwa eine Hälfte der gesamten Streifenfläche umfasste. Dies erfolgte durch gleichzeitiges Abgeben von 10  $\mu$ l Wasser auf ein Ende des Streifens (die Flüssigproben-Seite) und 10  $\mu$ l Trinder-Reagenz (bei 5-facher Konzentration) auf das andere Ende des Streifens (die Verdünnungsmittellösungs-Seite). Der Streifen wurde dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

**[0094]** Nach dem Trocknen wurden 15  $\mu$ l Wasser

zum äußeren Ende der Verdünnungsmittel-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der Verdünnungsmittellösung hinzugegeben und 15 µl des ganzen Blutes wurden gleichzeitig auf das andere Ende der Flüssigproben-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe aufgebracht. Die beiden Flüssigkeiten flossen aufeinander zu und ergaben schließlich vier bestimmte Bänder auf dem Streifen: ein rotes Blutzellen-Band, ein Plasma-Band, eine rot/braunes Trockenreaktionsprodukt-Chinonimin-Band (die Reaktions-Grenzfläche) und ein Band von unumgesetztem Trinder-Reagenz. Wie in [Fig. 4A](#) bis [Fig. 4F](#) gezeigt, entwickelte sich das durch Chinonimin-Farbstoff gefärbte Produkt-Grenzflächenband über mehrere Minuten, wobei die Entwicklungsrate und Farbintensität am Schluss proportional zur Ausgangs-Konzentration von Glukose in der Probe war.

### Beispiel 2

**[0095]** Dieses Beispiel veranschaulicht, wie die vorliegende Erfindung benutzt wurde, um Calcium in fötalem Kalbsserum nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen.

**[0096]** Drei Polyethersulfon-Membranen, wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, zubereitet und mit 50 µl verdünnter HCl bei pH 2,0 gewaschen. Ein Beispiel einer geeigneten Polyethersulfon-Membran zum Einsatz in der vorliegenden Erfindung ist eine SUPOR®-Membran (Pall-Gelman, Port Washington, NY). Der Fachmann wird realisieren, dass andere poröse Membranen mit ähnlichen Charakteristika auch in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können. 15 Mikroliter fötalen Kalbsserums, enthaltend 6,8, 13 und 18,6 mg/dl Calcium, wurden zu der Flüssigproben-Seite jedes Streifens an der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe aufgebracht, während gleichzeitig 15 µl angesäuerte rot/purpurne Arsenazo III-Farbstofflösung (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; Katalognummer 588, hergestellt gemäß den Instruktionen des Herstellers) auf die Verdünnungsmittellösung-Seite des Streifens bei der Stelle zum Aufbringen der Verdünnungsmittellösung aufgebracht wurden. In jeden Falle flossen die beiden Flüssigkeiten aufeinander zu und nach ihrem Treffen bildete sich eine diskrete Grenzfläche. Das blaue Reaktionsprodukt, Calcium-arsenazo III, entwickelte sich an der Produkt-Grenzfläche. Wie in den [Fig. 5A](#) bis [Fig. 5I](#) gezeigt, waren sowohl die Zeit für die Farbentwicklung als auch die Endintensität der blauen Farbe proportional der Ausgangs-Konzentration des Calciums in den flüssigen Proben.

### Beispiel 3

**[0097]** In diesem Beispiel wurden 1,2 g/dl- und 1,9 g/dl-Konzentrationen von Albumin in fötalem Kalbsserum mit der vorliegenden Erfindung unter Einsatz

von grünem Bromkresol-Farbstoff nach Einstellung auf pH 5,5 getestet.

**[0098]** Eine HEMOSEP L®-Membran wurde an einer adhäsiven Kunststoffrückwand befestigt und in Streifen von 4 mm × 25 mm geschnitten. BCG-Reagenz (15 µl; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; Katalognummer 631, hergestellt gemäß den Instruktionen des Herstellers mit der Ausnahme, dass eine Lösung 10-facher Konzentration des Reagenz benutzt wurde), wurde auf ein Ende jedes Teststreifens aufgebracht, umfassend etwa eine Hälfte der gesamten Streifenfläche. Serum (15 µl) wurde gleichzeitig auf das äußere Ende des Flüssigproben-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe aufgebracht. Die beiden Flüssigkeiten flossen aufeinander zu und ergaben schließlich drei bestimmte Banden auf dem Streifen: ein Serum-Band, ein Reaktionsprodukt-Band (die Reaktions-Grenzfläche), einschließlich eines Farbstoff/Albumin-Komplexes und ein Band von unumgesetztem BCG-Reagenz. [Fig. 5](#), [Fig. 7](#) und [Fig. 10](#) sind graphische Repräsentationen und [Fig. 5](#) und [Fig. 9](#) sind numerische Repräsentationen der Farbintensität des Reaktionsproduktes in Abhängigkeit von der Zeit für sowohl die 1,2 g/dl- als auch die 1,9 g/dl-Probe. Diese graphischen Darstellungen zeigen, dass der Assay, der gemäß der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde, eine beträchtliche Farbintensität innerhalb von 5 Sekunden vom Aufbringen der Probe auf den Teststreifen der vorliegenden Erfindung erzeugt, die proportional der ursprünglichen Analyt-Konzentration ist, basierend auf Neigung und Endfarbintensität.

**[0099]** [Fig. 11](#) bis [Fig. 14](#) sind Digitalfotographien der 1,2 g/dl- und 1,9 g/dl-Teststreifen bei 200 Millisekunden (2,0 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen) und 3,0 Sekunden nach der Grenzflächen-Bildung (5,0 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen). Diese Digitalbilder wurden mit einer Sony Progressive 3CCD-Kamera aufgezeichnet und die Digitaldaten wurden in einen Gateway PC geladen, wo eine ausgewählte Reihe von Pixeln der Bilder analysiert wurde unter Benutzung der INSPECTOR-Farbarsorptionssoftware von Matrox. Vergleicht man [Fig. 11](#) mit [Fig. 12](#) für die 1,2 g/dl-Probe und [Fig. 13](#) mit [Fig. 14](#) für die 1,9 g/dl-Probe, dann ist eine starke Zunahme der Rotabsorption (grüne Farbe) in unter drei Sekunden aufgetreten, wie durch Linie "R" in [Fig. 11](#) bis [Fig. 14](#) gezeigt, die die Zunahme der Rotabsorption (stärkere grüne Farbe) über die Reaktions-Grenzfläche repräsentiert. Allgemein wird in dieser Anmeldung eine Zunahme der Absorption bei einer gegebenen Farbe als eine Verminderung der Deflexion in der graphischen Farbdarstellung reflektiert. Das Testprotokoll der vorliegenden Erfindung erzeugt somit eine feststellbare Reaktion bei einer Reaktionsrate, dass der Test in 5 Sekunden nach der Probenzugabe und in drei Sekunden nach der Grenzflächen-Bildung

ausgeführt werden kann.

#### Beispiel 4

**[0100]** Dies ist ein anderes Beispiel, das das Protokoll von Beispiel 1 benutzt und veranschaulicht, wie eine Vorrichtung der vorliegenden Erfindung benutzt wurde, um die Anwesenheit und Konzentration von Glukose in einer Probe ganzen Blutes zu bestimmen. In diesem Beispiel wurden 50 mg/dl-, 150 mg/dl- und 250 mg/dl-Proben benutzt.

**[0101]** Eine HEMOSEP L®-Membran wurde an einer klebenden Kunststoffrückwand befestigt und in Streifen von 4 mm × 25 mm geschnitten. 15 µl Trinder-Reagenz (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Katalognummer 315, hergestellt gemäß den Instruktionen des Herstellers mit der Ausnahme, dass eine Reagenz-Lösung 5-facher Konzentration benutzt wurde), enthaltend Glukoseoxidase (15.000 U/l), 4-Aminoantipyrin (0,5 mM), p-Hydrolybenzolsulfonat (20 mM) und Peroxidase (10.000 U/l) wurden beim pH etwa 7,0 an einem Ende jedes Teststreifens hinzugegeben, umfassend etwa eine Hälfte der gesamten Streifenfläche. Serum (15 µl) wurde gleichzeitig zum äußeren Ende der Flüssigproben-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe hinzugegeben. Die beiden Flüssigkeiten flossen aufeinander zu und ergaben schließlich drei bestimmte Banden auf dem Streifen: ein Serum-Band, ein rot/braunes Chinoniminfarbstoff-Reaktionsproduktband (die Reaktions-Grenzfläche) und ein Band von nicht umgesetztem Trinder-Reagenz. [Fig. 15](#) bis [Fig. 18](#) zeigen die Rate der Entwicklung des Chinonimin-Farbstoffproduktes. Diese graphischen Darstellungen zeigen, dass der Assay, der gemäß der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde, innerhalb von zwei bis vier Minuten vom Aufbringen der Probe auf den Teststreifen der vorliegenden Erfindung eine beträchtliche Farbintensität erzeugt.

#### Beispiel 5

**[0102]** Dies ist ein anderes Beispiel der Benutzung des Protokolls von Beispiel 2 und veranschaulicht, wie die vorliegende Erfindung angewendet wurde, um Calcium in fötalem Kalbsserum nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen. In diesem Beispiel wurden 9,3 mg/dl- und 13 mg/dl-Proben benutzt.

**[0103]** Polyethersulfon-Membranen, wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, zubereitet und mit 50 µl verdünnter HCl bei pH 2,0 gewaschen. Fünfzehn Mikroliter fötalen Kalbsserums, enthaltend 9,3 mg/dl und 13 mg/dl Calcium, wurden zu der Flüssigproben-Seite jedes Streifens an der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe hinzugegeben, während gleichzeitig 15 µl angesäuerter rot/purpurner Arsenazo III-Farbstofflösung zur Verdünnungsmittellösungs-Seite des Streifens bei der Stelle zum Aufbringen der Verdün-

nungsmittellösung aufgebracht wurden. In jedem Falle flossen die beiden Flüssigkeiten aufeinander zu und bildeten beim Treffen eine diskrete Grenzfläche. Das blaue Reaktionsprodukt, Calcium-arsenazo III, entwickelte sich an der Grenzfläche. Bezugnehmend auf [Fig. 19](#) und [Fig. 20](#), die graphische und numerische Repräsentationen dieses Beispiels zeigen, zeigt [Fig. 19](#), dass der Assay, der gemäß der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde, eine beträchtliche Farbintensität innerhalb einer Minute vom Aufbringen der Probe auf den Teststreifen der vorliegenden Erfindung erzeugt.

**[0104]** [Fig. 20](#) zeigt die relative Stabilität der Grenzflächenbreite über die Zeit. Die Grenzflächenbreite verdoppelte sich in etwa von 100 Sekunden bis 250+ Sekunden.

#### Beispiel 6

**[0105]** Dieses Beispiel veranschaulicht, wie die vorliegende Erfindung benutzt wurde, um die gesamte alkalische Phosphatase in fötalem Kalbsserum nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen. In diesem Beispiel wurden Reihenverdünnungen alkalischer Phosphatase über einen 10-fachen Bereich in der Konzentration eingesetzt.

**[0106]** Nitrocellulose-Membranstreifen wurden mit verdünnter NaOH bei pH 10 gewaschen. Fünfzehn Mikroliter fötalen Kalbsserums, enthaltend verschiedene Verdünnungen alkalischer Phosphatase, wurden auf die Flüssigproben-Seite des Membranstreifens an der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe aufgebracht, während gleichzeitig 15 µl alkalische Phosphatase-Reagenz (Sigma, Katalognummer 245, hergestellt gemäß den Instruktionen des Herstellers mit der Ausnahme, dass eine doppelt konzentrierte Reagenz-Lösung eingesetzt wurde) zur Verdünnungsmittellösung-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der Verdünnungsmittellösung aufgebracht wurden. In jedem Falle flossen die beiden Flüssigkeiten aufeinander zu und bildeten beim Treffen eine diskrete Grenzfläche. Das Reaktionsprodukt, p-Nitrophenol, entwickelte sich an der Produkt-Grenzfläche. [Fig. 25](#) ist eine Digitalfotographie eines der Teststreifen, die die Produktbildung bei 15 Sekunden und 120 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen zeigt. Diese Digitalbilder wurden, wie für Beispiel 3 beschrieben, aufgezeichnet. [Fig. 25](#) zeigt, dass der Assay, der gemäß der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde, eine nachweisbare Farbintensität innerhalb von 15 Sekunden vom Aufbringen der Probe auf den Teststreifen der vorliegenden Erfindung und eine beträchtliche Farbintensität nach 120 Sekunden erzeugt.

#### Beispiel 7

**[0107]** Dieses Beispiel zeigt, wie die vorliegende Er-

findung zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen des Gesamtbilirubins in fötalem Kalbsserum angewendet wurde. In diesem Beispiel wurden 0,65 mg/dl-, 2,55 mg/dl-, 4,73 mg/dl-, 9,39 mg/dl- und 19,57 mg/dl-Proben benutzt.

**[0108]** Polyethersulfon-Membranen wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, zubereitet und mit Wasser bei pH 7,0 gewaschen. Fünfzehn Mikroliter einer kommerziellen Standardlösung, enthaltend 0,65 mg/dl, 2,55 mg/dl, 4,73 mg/dl, 9,39 mg/dl oder 19,57 mg/dl Bilirubin wurden zu der Flüssigproben-Seite jedes Streifens an der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe hinzugegeben, während gleichzeitig 15 µl des Gesamtbilirubin-Reagenz (Sigma, Katalognummer 550-4, rekonstituiert mit Natriumnitrit, wie durch den Hersteller angegeben, ausgenommen, dass eine 20-fach konzentrierte Reagenz-Lösung eingesetzt wurde) zu der Verdünnungsmittellösung-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der Verdünnungsmittellösung hinzugegeben wurden. In jedem Falle flossen die beiden Flüssigkeiten aufeinander zu und bildeten beim Treffen eine diskrete Grenzfläche. Das Reaktionsprodukt, Azobilirubin, entwickelte sich an der Produkt-Grenzfläche. **Fig. 26** ist eine Digitalfotographie der 4,73 mg/dl. **Fig. 26** zeigt die Produktbildung bei 15 Sekunden und 275 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen. Diese Digitalbilder wurden, wie für Beispiel 3 beschrieben, aufgezeichnet. **Fig. 26** zeigt, dass der Assay, der gemäß der vorliegenden Erfindung ausgeführt wurde, eine beträchtliche Farbintensität innerhalb von 15 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen der vorliegenden Erfindung erzeugt.

#### Beispiel 8

**[0109]** Dieses Beispiel veranschaulicht, wie die vorliegende Erfindung benutzt wurde, um Harnsäure in fötalem Kalbsserum nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen. In diesem Beispiel wurden Proben im Bereich von 0,15 mg/dl und 15,5 mg/dl eingesetzt.

**[0110]** Polyethersulfon-Membranen wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, zubereitet und mit Wasser bei pH 7,0 gewaschen. Fünfzehn Mikroliter fötalen Kalbsserums, enthaltend 0,15 mg/dl, 0,3 mg/dl, 0,6 mg/dl, 1,0 mg/dl, 3,7 mg/dl, 7,3 mg/dl und 15,5 mg/dl Harnsäure, wurden zu der Flüssigproben-Seite jedes Streifens an der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe hinzugegeben, während gleichzeitig 15 µl des Harnsäure-Reagenz (Sigma, Katalognummer 685, mit der Ausnahme, dass eine 3,3-fach konzentrierte Reagenz-Lösung eingesetzt wurde) zu der Verdünnungsmittellösungs-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der Verdünnungsmittellösung hinzugegeben wurden. In jedem Falle flossen die beiden Flüssigkeiten aufeinander zu und bildeten beim Treffen eine diskrete Grenzfläche. Das Reaktionspro-

dukt, ein Chinonimin-Farbstoff mit einer maximalen Absorption bei 520 nm, entwickelte sich an der Produkt-Grenzfläche. **Fig. 27** ist eine Digitalfotographie des 0,3 mg/dl-Teststreifens, die die Produktbildung innerhalb von 5 Sekunden und 295 Sekunden nach dem Aufbringen auf den Teststreifen zeigt. Diese Digitalbilder wurden, wie für Beispiel 3 beschrieben, aufgezeichnet und zeigen eine beträchtliche Produktintensität, die sich nach 295 Sekunden entwickelt hat.

#### Beispiel 9

**[0111]** Dieses Beispiel zeigt, wie die vorliegende Erfindung zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen von  $\gamma$ -Glutamyltransferase in fötalem Kalbsserum benutzt wurde. In diesem Beispiel wurden Proben im Bereich von 8 Einheiten/Liter (U/l) und 725 U/l-Proben eingesetzt.

**[0112]** Nitrocellulose-Membranen wurden mit Wasser bei pH 7,0 gewaschen. Fünfzehn Mikroliter fötalen Kalbsserums, enthaltend 8, 37, 107, 380 und 725 U/l von  $\gamma$ -Glutamyltransferase, wurden an der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe aufgebracht, während gleichzeitig 15 µl  $\gamma$ -Glutamyltransferase-Reagenz (Sigma, Katalognummer 419, hergestellt gemäß den Instruktionen des Herstellers mit der Ausnahme, dass eine 2-fache Konzentration der Reagenz-Lösung eingesetzt wurde) zu der Verdünnungsmittellösungs-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der Verdünnungsmittellösung hinzugegeben wurden. In jedem Falle flossen die beiden Flüssigkeiten aufeinander zu und bildeten beim Treffen eine diskrete Grenzfläche. Das Reaktionsprodukt, 5-Amino-2-nitrobenzoat, das eine maximale Absorption bei 405 nm aufwies, entwickelte sich an der Produkt-Grenzfläche. **Fig. 28** ist eine Digitalfotographie des 380 U/l-Teststreifens, die die Produktbildung bei 5 Sekunden und 285 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen zeigt. Diese Digitalbilder wurden, wie für Beispiel 3 beschrieben, aufgezeichnet und zeigen, dass eine beträchtliche Produkt-Entwicklung nach 285 Sekunden stattgefunden hatte.

#### Beispiel 10

**[0113]** Dieses Beispiel veranschaulicht, wie die vorliegende Erfindung angewendet wurde, um Amylase in fötalem Kalbsserum nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen. In diesem Beispiel wurden Proben im Bereich zwischen 88 Einheiten/Liter (U/l) und 16.800 U/l-Proben eingesetzt.

**[0114]** Nitrocellulose-Membranen wurden mit Wasser bei pH 7,0 gewaschen. Fünfzehn Mikroliter fötalen Kalbsserums, enthaltend 88, 362, 1.680 und 16.800 U/L von Amylase, wurden zu der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe hinzugegeben, wäh-

rend gleichzeitig 15 µl Amylase-Reagenz (Sigma, Katalognummer 419, hergestellt gemäß den Instruktionen des Herstellers mit der Ausnahme, dass eine 2-fach konzentrierte Reagenz-Lösung eingesetzt wurde) zu der Verdünnungsmittellösungs-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der Verdünnungsmittellösung hinzugegeben wurden. In jedem Falle flossen die beiden Flüssigkeiten aufeinander zu und bildeten beim Treffen eine diskrete Grenzfläche. Das Reaktionsprodukt, p-Nitrophenol, das eine maximale Absorption bei 405 nm aufwies, entwickelte sich an der Produkt-Grenzfläche. [Fig. 29](#) ist eine Digitalfotographie des 16.800 UI/l-Teststreifens, die die Produktbildung 35 Sekunden und 275 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen zeigt. Diese Digitalbilder wurden, wie in Beispiel 3 beschrieben, aufgezeichnet. Ein signifikantes Niveau der Produkt-Entwicklung trat nach 275 Sekunden auf.

#### Beispiel 11

**[0115]** Dieses Beispiel veranschaulicht, wie die vorliegende Erfindung benutzt wurde, um Kreatinin in fötalem Kalbsserum nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen. In diesem Beispiel wurden Proben im Bereich zwischen 75 mg/dl und 300 mg/dl benutzt.

**[0116]** Nitrocellulose-Membranen wurden mit Wasser bei pH 7,0 gewaschen. Fünfzehn Mikroliter fötalen Kalbsserums, enthaltend 75 mg/dl, 150 mg/dl und 300 mg/dl von Kreatinin, wurden zu der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe hinzugegeben, während gleichzeitig 15 µl Kreatinin-Reagenz (Sigma, Katalognummer 557-A und 557-B, hergestellt wie vom Hersteller instruiert mit der Ausnahme, dass eine doppelt konzentrierte Reagenz-Lösung benutzt wurde) zu der Verdünnungsmittellösung-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der Verdünnungsmittellösung hinzugegeben wurden. In jedem Falle flossen die beiden Flüssigkeiten aufeinander zu und bildeten beim Treffen eine diskrete Grenzfläche. Das Reaktionsprodukt, ein Janovski-Komplex, der eine maximale Absorption zwischen 480 und 520 nm aufwies, entwickelte sich an der Grenzfläche. [Fig. 30](#) ist eine Digitalfotographie des 150 mg/dl-Teststreifens, die Produktbildung 5 Sekunden und 295 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen zeigt. Diese Digitalbilder wurden, wie in Beispiel 3 beschrieben, aufgezeichnet und zeigen, dass sich ein signifikantes Niveau des Produktes nach 295 Sekunden gebildet hatte.

#### Beispiel 12

**[0117]** Dieses Beispiel veranschaulicht, wie die vorliegende Erfindung zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen von Cholesterin angewandt wurde. In diesem Beispiel wurden Proben im Bereich zwischen 61 mg/dl und 183 mg/dl eingesetzt.

**[0118]** Nitrocellulose-Membranen wurden mit Wasser bei pH 7,0 gewaschen. Fünfzehn Mikroliter einer kommerziellen Cholesterin-Standardlösung, enthaltend 61 mg/dl, 96 mg/dl, 160 mg/dl oder 183 mg/dl Cholesterin, wurden zu der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe hinzugegeben, während gleichzeitig 15 µl Cholesterin-Reagenz (Sigma, Katalognummer 352) zu der Verdünnungsmittellösung-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der Verdünnungsmittellösung hinzugegeben wurden. In jedem Falle flossen die beiden Flüssigkeiten aufeinander zu und bildeten beim Treffen eine diskrete Grenzfläche. Das Reaktionsprodukt, ein Chinonimin-Farbstoff mit einer maximalen Absorption bei 500 nm, entwickelte sich an der Produkt-Grenzfläche. [Fig. 31](#) ist eine Digitalfotographie des 96 mg/dl-Teststreifens, die Produktbildung 10 Sekunden und 300 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen zeigt. Diese Digitalbilder wurden, wie in Beispiel 3 beschrieben, aufgezeichnet. Ein nachweisbares Produktniveau wurde innerhalb von 10 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen gebildet und hatte sich nach 300 Sekunden beträchtlich vermehrt.

#### Beispiel 13

**[0119]** Dieses Beispiel zeigt, wie die vorliegende Erfindung angewendet wurde, um Gesamtprotein nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen. In diesem Beispiel wurden Proben im Bereich zwischen 2,1 g/dl und 8,2 g/dl eingesetzt.

**[0120]** Nitrocellulose-Membranen wurden mit Wasser bei pH 7,0 gewaschen. Fünfzehn Mikroliter fötalen Kalbs- oder Hunde-Serums, enthaltend 2,1 g/dl, 4,1 g/dl, 6,2 g/dl und 8,2 g/dl von Gesamtprotein, wurden zu der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe hinzugegeben, während gleichzeitig 15 µl alkalisches Biuret-Reagenz (Sigma, Katalognummer 541, hergestellt gemäß den Instruktionen des Herstellers, ausgenommen, dass eine 15-fache Konzentration in der Reagenz-Lösung benutzt wurde) zu der Verdünnungsmittellösungs-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der Verdünnungsmittellösung hinzugegeben wurden. In jedem Falle flossen die beiden Flüssigkeiten aufeinander zu und bildeten beim Treffen eine diskrete Grenzfläche. Das Reaktionsprodukt, ein purpurfarbener Kupfer-Proteinkomplex mit einer maximalen Absorption bei 540 nm, entwickelte sich an der Produkt-Grenzfläche. [Fig. 32](#) ist eine Digitalfotographie des 6,2 g/dl-Teststreifens, die Produktbildung 5 Sekunden und 295 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen zeigt. Diese Digitalbilder wurden, wie in Beispiel 3 beschrieben, aufgezeichnet. Ein signifikantes Produktniveau war nach 5 Sekunden nachweisbar und eine beträchtliche Menge des Produktes war nach 295 Sekunden gebildet.

## Beispiel 14

**[0121]** Dieses Beispiel veranschaulicht, wie die vorliegende Erfindung zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen von Magnesium in fötalem Kalbsserum benutzt wurde. In diesem Beispiel wurde eine Probe, enthaltend 4,7 mg/dl Magnesium, benutzt.

**[0122]** Nitrocellulose-Membranen wurden mit verdünnter NaOH bei pH 10,0 gewaschen. Fünfzehn Mikroliter fötalen Kalbsserums, enthaltend 4,7 mg/dl Magnesium, wurden zu der Stelle zum Aufbringen der flüssigen Probe hinzugegeben, während gleichzeitig 15 µl Magnesium-Reagenz (Sigma, Katalognummer 595, hergestellt, wie vom Hersteller beschrieben, ausgenommen, dass ein großer Überschuss an Magnesium-Reagenz (= 100x) eingesetzt wurde) zu der Verdünnungsmittellösung-Seite des Streifens an der Stelle zum Aufbringen der Verdünnungsmittellösung hinzugegeben wurden. In jedem Falle flossen die beiden Flüssigkeiten aufeinander zu und bildeten nach dem Treffen eine diskrete Grenzfläche. Das Reaktionsprodukt, ein Calmagit-Magnesium-Komplex, der eine maximale Absorption bei 520 nm aufwies, entwickelte sich an der Produkt-Grenzfläche. [Fig. 33](#) ist eine Digitalfotographie des 4,7 mg/dl-Teststreifens, die Produktbildung 5 Sekunden und 295 Sekunden nach dem Aufbringen der Probe auf den Teststreifen zeigt. Diese Digitalbilder wurden, wie in Beispiel 3 beschrieben, aufgezeichnet. Das Produkt war nach 5 Sekunden nachweisbar und war beträchtlich nach 295 Sekunden.

## Beispiel 15

**[0123]** Dieses Beispiel veranschaulicht, wie die vorliegende Erfindung zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen eines Haptens, Thyroxin ("T4"), gebunden an BSA als dem Analyten, eingesetzt wurde. Das T4-BSA wurde an Mäuse-anti-T4, konjugiert an alkalische Phosphatase, gebunden. In diesem Beispiel wurde Anti-T4-BSA bei Konzentrationen von 5 µg/ml und 50 µg/ml eingesetzt.

**[0124]** Nitrocellulose-Membranen wurden in Triton X-100 gewaschen und mit Wasser gespült. T4-BSA wurde an ein Kissen auf einer Seite des Flüssigkeits-Transportmaterials gebunden, während ein Substrat für alkalische Phosphatase, p-Nitrophenolphosphat, auf einem Kissen am gegenüber liegenden Ende des Flüssigkeits-Transportmaterials getrocknet wurde. Mäuse-Anti-T4-alkalische Phosphatase-Konjugat wurde zu dem Kissen hinzugegeben, das das gebundene T4-BSA enthielt, während Wasser gleichzeitig zu dem das Substrat enthaltenden Kissen hinzugegeben wurde. Die Flüssigkeiten flossen aufeinander zu und bildeten eine diskrete Grenzfläche. Das Reaktionsprodukt, p-Nitrophenol, entwickelte sich an der Produkt-Grenzfläche und wurde bei 405 nm gemessen. [Fig. 34](#) ist eine Digitalfotogra-

phie des Produktes, gebildet aus der Reaktion von Mäuse-Anti-T4-alkalische Phosphatase-Konjugat mit dem Substrat.

## Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen mindestens eines Analyten in einer flüssigen Probe, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, durch Einsetzen eines flüssigen Reaktanten, der zur Reaktion mit dem Analyten unter Bildung eines nachweisbaren löslichen Reaktionsproduktes in der Lage ist, durch Inbeziehungsetzen des Analyten zu dem nachweisbaren löslichen Reaktionsprodukt des Analyten und des flüssigen Reaktanten, umfassend:  
 ein Flüssigkeits-Transportmaterial, das zum Absorbieren einer Flüssigkeit und zum Verursachen einer Kapillarströmung dieser Flüssigkeit in der Lage ist, wobei das Flüssigkeits-Transportmaterial eine erste Zone zum Aufbringen der flüssigen Probe, von der angenommen wird, dass sie den genannten Analyten enthält, und eine zweite Zone zum Aufbringen des flüssigen Reaktanten aufweist, die derart angeordnet sind, dass bei Zugabe der flüssigen Probe zu der ersten Zone und des flüssigen Reaktanten zu der zweiten Zone die flüssige Probe von einer Flüssigproben-Kante in einer ersten Richtung zu der zweiten Zone hin fließt und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante aus in einer zweiten Richtung entgegengesetzt zu der ersten Richtung und zu der ersten Zone hin fließt, und  
 eine stabile Reaktions-Grenzfläche an einem Übergang zwischen der flüssigen Probe und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und visuell davon unterscheidbar ist, wobei beim Treffen der fließenden flüssigen Probe und des fließenden flüssigen Reaktanten das Fließen endet und das nachweisbare Reaktionsprodukt durch eine Reaktion zwischen dem flüssigen Reaktanten und dem Analyten gebildet wird, und  
 weiter umfassend ein Mittel zum Kalibrieren einer Konzentration des flüssigen Reaktanten, wobei das Mittel eine Kalibrierungszone umfasst, die eine Menge des genannten Analyten umfasst, wobei die Kalibrierungszone zwischen der ersten Zone und der Reaktions-Grenzfläche angeordnet ist, wobei im Gebrauch der Analyt in der genannten Menge des Analyten in der Kalibrierungszone in einer ersten Richtung zu der zweiten Zone hin fließt und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante aus in einer zweiten Richtung, die der ersten Richtung entgegengesetzt ist und zu der ersten Zone hin fließt; wobei beim Treffen des fließenden Analyten in der genannten Menge des Analyten und des fließenden flüssigen Reaktanten das Fließen endet und ein nachweisbares Kalibrierungsprodukt durch eine Reaktion zwischen dem Analyten in der genannten Menge des Analyten und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und eine stabile Kalibrierungsreakti-

ons-Grenzfläche an einem Übergang zwischen dem genannten Analyten in der genannten Menge des Analyten und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und visuell davon unterscheidbar ist.

2. Vorrichtung zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen mindestens eines Analyten in einer flüssigen Probe, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, durch Benutzen eines flüssigen Reaktanten, der zur einer Reaktion mit dem Analyten unter Bildung eines nachweisbaren löslichen Reaktionsproduktes in der Lage ist, durch Inbeziehungsetzen des Analyten zu dem nachweisbaren löslichen Reaktionsprodukt des Analyten und flüssigen Reaktanten, umfassend:

ein Flüssigkeits-Transportmaterial, das zum Absorbieren einer Flüssigkeit und zum Verursachen einer Kapillarströmung der genannten Flüssigkeit in der Lage ist, wobei das Flüssigkeits-Transportmaterial eine erste Zone zum Aufbringen der genannten flüssigen Probe, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, und eine zweite Zone zum Aufbringen einer Flüssigkeit auf ein Kissen aufweist, das einen rekonstituierbaren Reagenzien enthält, die derart angeordnet sind, dass bei der Zugabe der genannten flüssigen Probe zu der ersten Zone und der genannten Flüssigkeit zu der zweiten Zone die flüssige Probe von einer Flüssigkeitsproben-Kante in einer ersten Richtung zu der zweiten Zone hin fließt und das Reagenz rekonstituiert wird und das Reagenz und die Flüssigkeit ein flüssiges Reagenz bilden, das einen flüssigen Reaktanten enthält, der zur Reaktion mit dem genannten Analyten unter Bildung eines nachweisbaren Reaktionsproduktes in der Lage ist und dieser flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante aus in einer zweiten Richtung, die der ersten Richtung entgegengesetzt ist und zu der ersten Zone hin fließt, und

eine stabile Reaktions-Grenzfläche an einem Übergang zwischen der flüssigen Probe und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und visuell davon unterscheidbar ist, wobei beim Treffen der fließenden flüssigen Probe und des fließenden flüssigen Reaktanten das Fließen endet und das nachweisbare Reaktionsprodukt durch eine Reaktion zwischen dem Reaktanten und dem Analyten gebildet wird, und weiter umfassend eine Kalibrierungszone mit einer Menge des genannten Analyten, wobei die Kalibrierungszone zwischen der ersten Zone und der Reaktions-Grenzfläche angeordnet ist, wobei im Gebrauch der Analyt in der genannten Menge des Analyten in der Kalibrierungszone in einer ersten Richtung zur zweiten Zone hin fließt und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante aus in einer zweiten Richtung, die der ersten Richtung entgegengesetzt ist und zu der ersten Zone hin fließt; wobei beim Treffen des fließenden Analyten in der genannten Menge des Analyten und des fließenden flüssigen Reaktanten das Fließen endet und ein nachweisbares Kalibrierungsprodukt durch eine Re-

aktion zwischen dem Analyten in der genannten Menge des Analyten und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und eine stabile Kalibrierungsreaktions-Grenzfläche an einem Übergang zwischen dem Analyten in der genannten Menge des Analyten und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und visuell davon unterscheidbar ist, wobei die Kalibrierungs-Grenzfläche weiter benachbart der Reaktions-Grenzfläche liegt.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin die genannte Menge des Analyten, die zu der Kalibrierungszone hinzugegeben wird, im Überschuss zu der Menge des Analyten in der genannten flüssigen Probe ist, sodass die genannte Menge des Analyten, die zu der Kalibrierungszone hinzugegeben wird, genügt, um eine Menge des Kalibrierungsproduktes zu bilden, die die Bestimmung einer Menge des flüssigen Reaktanten gestattet.

4. Vorrichtung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin mindestens eine von der ersten Zone und der zweiten Zone ein Reagenz enthält.

5. Vorrichtung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, weiter umfassend ein Kissen, das auf der ersten Zone angeordnet ist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, worin das genannte Kissen wirksam ist zum Entfernen roter Blutzellen aus der Flüssigkeitsprobe.

7. Vorrichtung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, worin das nachweisbare Kalibrierungsprodukt mit einer Rate gebildet wird, die genügt, um seinen Nachweis innerhalb von etwa 15 Sekunden nach dem Aufbringen der genannten flüssigen Probe auf die Zone der flüssigen Probe zu gestatten.

8. Vorrichtung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, worin das Flüssigkeits-Transportmaterial ein Nitrocellulosematerial ist, das auf ein rückwärtiges Material gegossen ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, worin das rückwärtige Material eines aus Polyvinylchlorid oder einem Polyesterfilm (Mylar<sup>TM</sup>) ist.

10. Vorrichtung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 9, weiter umfassend ein Mittel zum Nachweisen und wahlweisen Messen einer Menge des genannten nachweisbaren Reaktionsproduktes.

11. Vorrichtung nach Anspruch 10, worin das Mittel zum Nachweisen und wahlweisen Messen einer Menge des nachweisbaren Reaktionsproduktes eines einschließt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Absorption, Reflexion, Durchlässigkeit, Fluoreszenz, Lumineszenz und Leitfähigkeit.

12. Vorrichtung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 11, weiter umfassend:  
ein Mittel zum gleichzeitigen Aufbringen der Flüssigkeitsprobe auf die erste Zone und des flüssigen Reaktanten auf die zweite Zone und einen Sensor, der wirksam ist, das nachweisbare Reaktionsprodukt nachzuweisen.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, worin der Sensor wirksam ist, das nachweisbare Reaktionsprodukt, das mindestens eine erwünschte Wellenlänge der Reflexion oder Absorption von  $\geq 250$  Nanometern hat, nachzuweisen.

14. Vorrichtung nach Anspruch 12, worin der Sensor wirksam ist, eine Menge des nachweisbaren Reaktionsproduktes nachzuweisen und zu messen, die proportional einer Konzentration des genannten Analyten ist, basierend auf einer Peakintensität der Reflexion oder Absorption des nachweisbaren Reaktionsproduktes.

15. Vorrichtung nach Anspruch 12, worin der genannte Sensor wirksam ist, eine Bildungsrate des nachweisbaren Reaktionsproduktes nachzuweisen und zu messen, die proportional einer Konzentration des genannten Analyten ist.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, worin die genannte Rate als eine Änderung einer Peakintensität der Reflexion oder Absorption des nachweisbaren Reaktionsproduktes über die Zeit errechnet ist.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, worin die Peakintensität der Reflexion oder Absorption über eine Linie gemessen ist, die im Wesentlichen senkrecht zu der Reaktions-Grenzfläche liegt.

18. Vorrichtung nach Anspruch 16, worin die Peakintensität der Reflexion oder Absorption innerhalb einer polygonalen Region gemessen ist, die die gesamte oder einen Teil der Reaktions-Grenzfläche umfasst.

19. Vorrichtung nach Anspruch 12, worin der Sensor wirksam ist, eine Menge des nachweisbaren Reaktionsproduktes nachzuweisen und zu messen, die größer ist oder gleich einer vorbestimmten Schwellenintensität der Reflexion oder Absorption, das die Anwesenheit des genannten Analyten anzeigen.

20. Vorrichtung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 19, worin das Flüssigkeits-Transportmaterial in der Lage ist, rote Blutzellen aus dem gesamten Blut abzutrennen.

21. Verfahren zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen mindestens eines Analyten in einer flüssigen Probe, von der angenommen wird, dass sie

diesen Analyten enthält, durch Anwenden eines flüssigen Reaktanten, der zum Reagieren mit dem Analyten unter Bildung eines nachweisbaren löslichen Reaktionsproduktes in der Lage ist, durch Inbeziehungsetzen des Analyten zu dem nachweisbaren löslichen Reaktionsprodukt aus Analyten und flüssigem Reaktanten, umfassend:

Bereitstellen eines Flüssigkeits-Transportmaterials, das zum Absorbieren einer Flüssigkeit und zum Verursachen eines Kapillarflusses der genannten Flüssigkeit in der Lage ist, wobei das Flüssigkeits-Transportmaterial eine erste Zone für das Aufbringen der flüssigen Probe, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, und eine zweite Zone für das Aufbringen des flüssigen Reaktanten aufweist; Hinzugeben der flüssigen Probe zu der ersten Zone und des flüssigen Reaktanten zu der zweiten Zone, wobei die flüssige Probe danach von einer Flüssigproben-Kante in einer ersten Richtung zur zweiten Zone hin fließt und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante in einer zweiten Richtung, entgegengesetzt zu der ersten Richtung, und zu der ersten Zone hin fließt; wobei beim Treffen der fließenden flüssigen Probe und des fließenden flüssigen Reaktanten das Fließen endet und das nachweisbare Reaktionsprodukt durch Reaktion zwischen dem flüssigen Reaktanten und dem Analyten und eine stabile Reaktions-Grenzfläche an einem Übergang zwischen der flüssigen Probe und dem flüssigen Reaktanten und visuell davon unterscheidbar gebildet wird, und Nachweisen des nachweisbaren Reaktionsproduktes.

22. Verfahren nach Anspruch 21, weiter umfassend das Kalibrieren einer Konzentration des flüssigen Reagenz durch Aufbringen einer Menge des Analyten auf eine Kalibrierungszone, wobei diese Kalibrierungszone zwischen der genannten ersten Zone und der Reaktions-Grenzfläche angeordnet ist, wobei bei Zugabe der Menge des Analyten zu der Kalibrierungszone der Analyt in der genannten Menge des Analyten in einer ersten Richtung zur zweiten Zone hin fließt und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante in einer zweiten Richtung entgegengesetzt zu der ersten Richtung und zu der ersten Zone hin fließt; wobei beim Treffen des fließenden Analyten in der genannten Menge des Analyten und des fließenden flüssigen Reaktanten das Fließen endet und ein nachweisbares Kalibrierungsprodukt durch eine Reaktion zwischen dem Analyten in der genannten Menge des Analyten und dem flüssigen Reaktanten und eine stabile Kalibrierungsreaktions-Grenzfläche an einem Übergang zwischen dem Analyten in der überschüssigen Menge des Analyten und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und visuell davon unterscheidbar ist, und Nachweisen des nachweisbaren Kalibrierungsproduktes.

23. Verfahren zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen mindestens eines Analyten in einer flüssigen Probe, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, durch Einsetzen eines flüssigen Reaktanten, der zum Reagieren mit dem Analyten zur Bildung eines nachweisbaren löslichen Reaktionsproduktes in der Lage ist, durch Inbeziehungsetzen des Analyten zu dem nachweisbaren löslichen Reaktionsprodukt des Analyten und des flüssigem Reaktanten, umfassend:  
 Bereitstellen eines Flüssigkeits-Transportmaterials, das zum Absorbieren einer Flüssigkeit und zum Verursachen einer Kapillarströmung der Flüssigkeit in der Lage ist, wobei das Flüssigkeits-Transportmaterial eine erste Zone zum Aufbringen der flüssigen Probe, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, und eine zweite Zone zum Aufbringen einer Flüssigkeit auf ein Kissen, das ein rekonstituierbares Reagenz enthält, aufweist, wobei bei der Zugabe der flüssigen Probe zu der ersten Zone und der Zugabe der Flüssigkeit zu der zweiten Zone die flüssige Probe von einer Flüssigproben-Kante in einer ersten Richtung zur zweiten Zone hin fließt, das Reagenz rekonstituiert wird und das Reagenz und die Flüssigkeit ein flüssiges Reagenz bilden, das einen flüssigen Reaktanten enthält, der zum Reagieren mit dem Analyten zur Bildung eines nachweisbaren Reaktionsproduktes in der Lage ist, und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante in einer zweiten Richtung entgegengesetzt zu der ersten Richtung und zu der ersten Zone hin fließt; wobei beim Treffen der fließenden flüssigen Probe und des fließenden flüssigen Reaktanten das Fließen endet und das nachweisbare Reaktionsprodukt durch Reaktion zwischen dem flüssigen Reaktanten und dem Analyten und eine stabile Reaktions-Grenzfläche an einem Übergang zwischen der flüssigen Probe und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und visuell davon unterscheidbar ist, und  
 Nachweisen des nachweisbaren Reaktionsproduktes.

24. Verfahren nach Anspruch 23, weiter umfassend das Kalibrieren einer Konzentration des flüssigen Reagenz durch Aufbringen einer Menge des Analyten auf eine Kalibrierungszone, wobei die Kalibrierungszone zwischen der ersten Zone und der Reaktions-Grenzfläche angeordnet ist, wobei bei der Zugabe der Menge des Analyten zu der Kalibrierungszone der Analyt in der genannten Menge des Analyten in einer ersten Richtung zur zweiten Zone hin fließt und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante in einer zweiten Richtung entgegengesetzt der ersten Richtung und zu der ersten Zone hin fließt; wobei beim Treffen des fließenden Analyten in der genannten Menge des Analyten und des fließenden flüssigen Reaktanten das Fließen endet und ein nachweisbares Kalibrierungsprodukt durch eine Reaktion zwischen dem Analyten in der genannten

Menge des Analyten und dem flüssigen Reaktanten sowie eine stabile Kalibrierungsreaktions-Grenzfläche an einem Übergang zwischen dem Analyten in der genannten Menge des Analyten und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und visuell davon unterscheidbar ist, wobei die Kalibrierungs-Grenzfläche benachbart der Reaktions-Grenzfläche angeordnet ist, und Messen des Kalibrierungsproduktes bei der gleichen mindestens einen erwünschten Wellenlänge der Reflexion oder Absorption des genannten Reaktionsproduktes.

25. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 24, worin mindestens eine von der ersten Zone und der zweiten Zone ein Reagenz enthält.

26. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 25, weiter umfassend das Bereitstellen eines Kissens, das auf der ersten Zone angeordnet ist.

27. Verfahren nach Anspruch 26, worin das Kissen wirksam ist, rote Blutzellen aus der flüssigen Probe zu entfernen.

28. Verfahren nach Anspruch 21 oder Anspruch 23, worin das nachweisbare Reaktionsprodukt in einer Rate gebildet wird, die genügt, um es innerhalb von etwa 15 Sekunden nach dem Aufbringen der flüssigen Probe auf die Flüssigproben-Zone nachzuweisen.

29. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 28, wobei der mindestens eine Analyt ein Glied einschließt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glukose, Calcium, Albumin, alkalischer Phosphatase, Ammoniak, Bilirubin, Harnsäure, 2-Glutamyl-Transferase, Amylase, Kreatin-Kinase, Kreatinin, Cholesterin, Gesamtprotein, Magnesium, Lactat-Dehydrogenase, Lipase, Phosphor, Triglycerid, Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase und Blutharnstoff-Stickstoff.

30. Verfahren nach Anspruch 22 oder Anspruch 24, worin die genannte Menge des genannten Analyten, die zu der Kalibrierungszone hinzugegeben wird, im Überschuss zu der Menge des Analyten in der flüssigen Probe ist, sodass die genannte Menge des genannten Analyten, die zu der Kalibrierungszone hinzugegeben wird, genügt, um eine Menge des Kalibrierungsproduktes zu bilden, das die Bestimmung einer Menge des flüssigen Reaktanten ermöglicht.

31. Verfahren nach Anspruch 22 oder Anspruch 24, wobei das nachweisbare Kalibrierungsprodukt mit einer Rate gebildet wird, die proportional zu einer Konzentration des Analyten ist.

32. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 29, worin das nachweisbare Reaktionsprodukt in einer Menge gebildet wird, die größer als oder

gleich einer vorbestimmten Schwellenintensität der Reflexion oder Absorption ist, die die Anwesenheit des Analyten anzeigt.

33. Verfahren zum Nachweisen und quantitativen Bestimmen mindestens eines Analyten in einer flüssigen Probe, von der angenommen wird, dass sie den Analyten enthält, durch Einsetzen eines Reagenz, das zum Binden an den Analyten und zum Bilden eines nachweisbaren Reaktionsproduktes von einem Substrat in der Lage ist, um eine Menge des Analyten mit einer Menge des nachweisbaren Reaktionsproduktes in Beziehung zu setzen, umfassend: Bereitstellen eines Flüssigkeits-Transportmaterials, das zum Absorbieren einer Flüssigkeit und zum Verursachen eines Kapillarflusses dieser Flüssigkeit in der Lage ist, wobei das Flüssigkeits-Transportmaterial eine erste Zone zum Aufbringen der flüssigen Probe, die das Reagenz enthält, auf ein Kissen, dass den Analyten enthält, im Wesentlichen irreversibel an das Kissen gebunden, und eine zweite Zone zum Aufbringen einer Flüssigkeit auf ein zweites Kissen, das ein rekonstituierbares Substrat enthält, aufweist; Hinzugeben der flüssigen Probe, die das Reagenz enthält, auf das erste Kissen und der Flüssigkeit auf das zweite Kissen, wobei die flüssige Probe danach von einer Flüssigproben-Kante in einer ersten Richtung zur zweiten Zone hin fließt und das Substrat durch die Flüssigkeit zur Bildung eines flüssigen Reaktanten rekonstituiert wird, der in der Lage ist, mit dem Reagenz zu reagieren, und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante in einer zweiten Richtung entgegengesetzt zu der ersten Richtung und zur ersten Zone hin fließt; wobei, wenn sich die fließende flüssige Probe, die das Reagenz enthält, das nicht durch den Analyten gebunden ist, der im Wesentlichen irreversibel an das erste Kissen gebunden ist, und der fließende flüssige Reaktant treffen, das Fließen endet und das nachweisbare Reaktionsprodukt durch eine Reaktion zwischen dem flüssigen Reaktanten und dem Reagenz und eine stabile Reaktions-Grenzfläche an einem Übergang zwischen der flüssigen Probe und dem flüssigen Reaktanten gebildet wird und visuell davon unterscheidbar ist, und Nachweisen des nachweisbaren Reaktionsproduktes.

34. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 33, worin das Flüssigkeits-Transportmaterial in der Lage ist, rote Blutzellen vom ganzen Blut abzutrennen.

35. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 34, worin das Flüssigkeits-Transportmaterial ein Nitrocellulosematerial ist, das auf ein rückwärtiges Material gegossen ist.

36. Verfahren nach Anspruch 35, worin das rückwärtige Material eines von Polyvinylchlorid oder einem Polyesterfilm (Mylar<sup>TM</sup>) ist.

37. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 36, weiter umfassend das Messen einer Menge des nachweisbaren Reaktionsproduktes.

38. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 37, worin die genannte Menge des nachweisbaren Reaktionsproduktes proportional einer Konzentration des Analyten ist, auf der Grundlage einer Peakintensität der Reflexion oder Absorption des nachweisbaren Reaktionsproduktes.

39. Verfahren nach Anspruch 37 oder Anspruch 38, worin die Stufe des Messens einer Menge des nachweisbaren Reaktionsproduktes das Messen einer Eigenschaft einschließt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Absorption, Reflexion, Durchlässigkeit, Fluoreszenz, Lumineszenz und Leitfähigkeit.

40. Verfahren nach Anspruch 39, worin das nachweisbare Reaktionsprodukt durch eine von Absorption und Reflexion gemessen wird.

41. Verfahren nach Anspruch 40, worin das eine von Absorption und Reflexion bei einer oder mehreren Wellenlängen von  $\geq 250$  Nanometern gemessen wird.

42. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 36, worin das nachweisbare Reaktionsprodukt in einer Rate gebildet wird, die proportional einer Konzentration des Analyten ist.

43. Verfahren nach Anspruch 42, worin die Rate als eine Änderung einer Peakintensität der Reflexion oder der Absorption des nachweisbaren Reaktionsproduktes über die Zeit errechnet wird.

44. Verfahren nach Anspruch 43, worin die Peakintensität der Reflexion oder Absorption über eine Linie gemessen wird, die im Wesentlichen senkrecht zur Reaktions-Grenzfläche verläuft.

45. Verfahren nach Anspruch 43, worin die Peakintensität der Reflexion oder Absorption innerhalb einer polygonalen Region gemessen wird, die die gesamte oder einen Teil der Reaktions-Grenzfläche umfasst.

46. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 36, worin das nachweisbare Reaktionsprodukt in einer Menge größer als oder gleich einer vorbestimmten Schwellenintensität der Reflexion oder Absorption gebildet wird, die die Anwesenheit des Analyten anzeigt.

47. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 46, weiter umfassend das Messen eines Gliedes, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: einem Abstand zwischen der Flüssigproben-Kante und

einem Mittelpunkt der stabilen Reaktions-Grenzfläche, einem Abstand zwischen der Flüssigreaktanten-Kante und einem Mittelpunkt der stabilen Reaktions-Grenzfläche, einem Abstand zwischen der Flüssigproben-Kante und einem Mittelpunkt einer stabilen Flüssigkeits-Grenzfläche, einem Abstand zwischen der Flüssigreaktanten-Kante und einem Mittelpunkt einer stabilen Flüssigkeits-Grenzfläche, einem Abstand zwischen dem Mittelpunkt der stabilen Reaktions-Grenzfläche und dem Mittelpunkt einer stabilen Flüssigkeits-Grenzfläche, einer Reflexion oder Absorption des nachweisbaren Reaktionsproduktes an einer Vielzahl festgelegter Zeitpunkte, einer Reflexion oder Absorption der stabilen Flüssigkeits-Grenzfläche an einer Vielzahl festgelegter Zeitpunkte, einer Rate der Änderung der Reflexion oder Absorption des nachweisbaren Reaktionsproduktes, einer Fläche der stabilen Reaktions-Grenzfläche, einer Fläche der stabilen Flüssigkeits-Grenzfläche, einem Hintergrundniveau der flüssigen Probe und einem Hintergrundniveau des flüssigen Reaktanten.

48. Verfahren nach Anspruch 33, weiter umfassend das Kalibrieren einer Konzentration des flüssigen Reagenz durch Aufbringen einer Menge des Reagenz auf eine Kalibrierungszone, wobei die Kalibrierungszone zwischen der ersten Zone und der Reaktions-Grenzfläche angeordnet ist, wobei bei Zugabe des Reagenz zu der Kalibrierungszone das Reagenz in einer ersten Richtung zu der zweiten Zone hin fließt und der flüssige Reaktant von einer Flüssigreaktanten-Kante in einer zweiten Richtung entgegengesetzt zu der ersten Richtung und zu der ersten Zone hin fließt;

wobei beim Treffen des fließenden Reagenz und des fließenden flüssigen Reaktanten das Fließen endet und ein nachweisbares Kalibrierungsprodukt durch eine Reaktion zwischen dem Reagenz und dem flüssigen Reaktanten und eine stabile Kalibrierungsreaktions-Grenzfläche an einem Übergang zwischen dem Reagenz in der Überschussmenge des Reagenz und des flüssigen Reaktanten gebildet wird und visuell davon unterscheidbar davon ist, und

Nachweisen des nachweisbaren Kalibrierungsproduktes.

49. Verfahren nach Anspruch 48, worin die Menge des Reagenz, die zu der Kalibrierungszone hinzugegeben wird, im Überschuss zu der Menge des Reagenz in der flüssigen Probe ist, sodass die genannte Menge des Reagenz, die zu der Kalibrierungszone hinzugegeben wird, zur Bildung einer Menge des nachweisbaren Kalibrierungsproduktes genügt, die die Bestimmung einer Menge des flüssigen Reaktanten ermöglicht.

50. Verfahren nach Anspruch 48, worin das nachweisbare Kalibrierungsprodukt in einer Rate gebildet wird, die proportional einer Konzentration des Reagenz ist.

51. Verfahren nach Anspruch 31 und 50, worin diese Rate als eine Änderung einer Peakintensität der Reflexion oder Absorption des nachweisbaren Kalibrierungsproduktes über die Zeit errechnet wird.

52. Verfahren nach Anspruch 51, dass die Peakintensität der Reflexion oder Absorption über eine Linie gemessen wird, die im Wesentlichen senkrecht zur Kalibrierungs-Grenzfläche verläuft.

53. Verfahren nach Anspruch 51, worin die Peakintensität der Reflexion oder Absorption innerhalb einer polygonalen Region gemessen wird, die die gesamte oder einen Teil der Kalibrierungs-Grenzfläche umfasst.

54. Verfahren nach Anspruch 51, worin die Peakintensität der Reflexion oder Absorption über eine Linie gemessen wird, die im Wesentlichen senkrecht zur Reaktions-Grenzfläche verläuft.

55. Verfahren nach Anspruch 51, wobei die Peakintensität der Reflexion oder Absorption innerhalb einer polygonalen Region gemessen wird, die die gesamte oder einen Teil der Reaktions-Grenzfläche umfasst.

56. Verfahren nach Anspruch 48, wobei das nachweisbare Kalibrierungsprodukt in einer Menge gebildet wird, die größer ist als oder gleich einer vorgebestimmten Schwellenintensität der Reflexion oder Absorption, die die Anwesenheit des Reagenz anzeigen.

57. Verfahren nach Anspruch 33, worin das Reagenz ein Enzym oder einen Teil davon umfasst, der mit einem monoklonalen Antikörper oder einem Teil davon konjugiert ist; wobei das Enzym oder ein Teil davon in der Lage ist, das nachweisbare Reaktionsprodukt aus dem Substrat zu bilden; der monoklonale Antikörper oder ein Teil davon in der Lage ist, an den Analyten zu binden.

58. Verfahren nach Anspruch 57, worin das Enzym ein Glied ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus alkalischer Phosphatase, β-Galactosidase und Peroxidase.

59. Verfahren nach Anspruch 57, worin der Teil eines monoklonalen Antikörpers ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem F(ab)-Fragment, einem F(ab')-Fragment, einem F(ab')<sup>2</sup>-Fragment, einem Fv-Fragment und einem scFv-Fragment.

60. Verfahren nach Anspruch 33, worin das Reagenz ein Enzym oder einen Teil davon umfasst, der mit einem Rezeptorprotein oder einem Teil davon konjugiert ist; wobei das Enzym oder ein Teil davon in der Lage ist, das nachweisbare Reaktionsprodukt von dem Substrat

rat zu bilden;  
wobei das Rezeptorprotein oder ein Teil davon in der Lage ist, an den Analyten zu binden.

61. Verfahren nach Anspruch 33, worin das Reagenz ein Enzym oder einen Teil davon umfasst, der an ein Abtid oder ein Teil davon gebunden ist;  
wobei das Enzym oder ein Teil davon in der Lage ist, das nachweisbare Reaktionsprodukt von dem Substrat zu bilden;  
das genannte Abtid oder ein Teil davon in der Lage ist, an den Analyten zu binden.

Es folgen 36 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

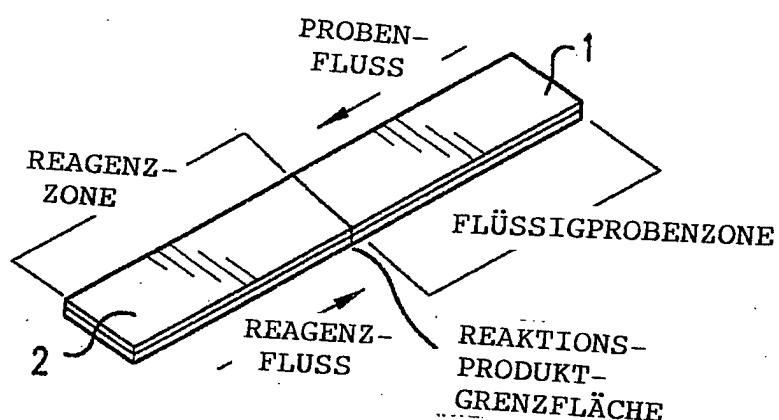


FIG.1

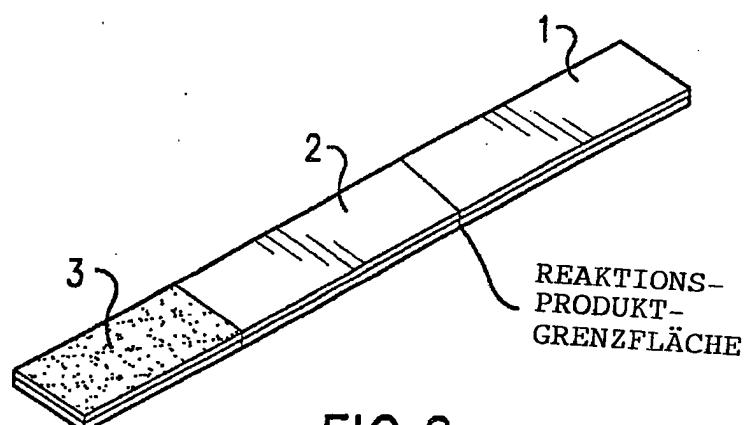


FIG.2

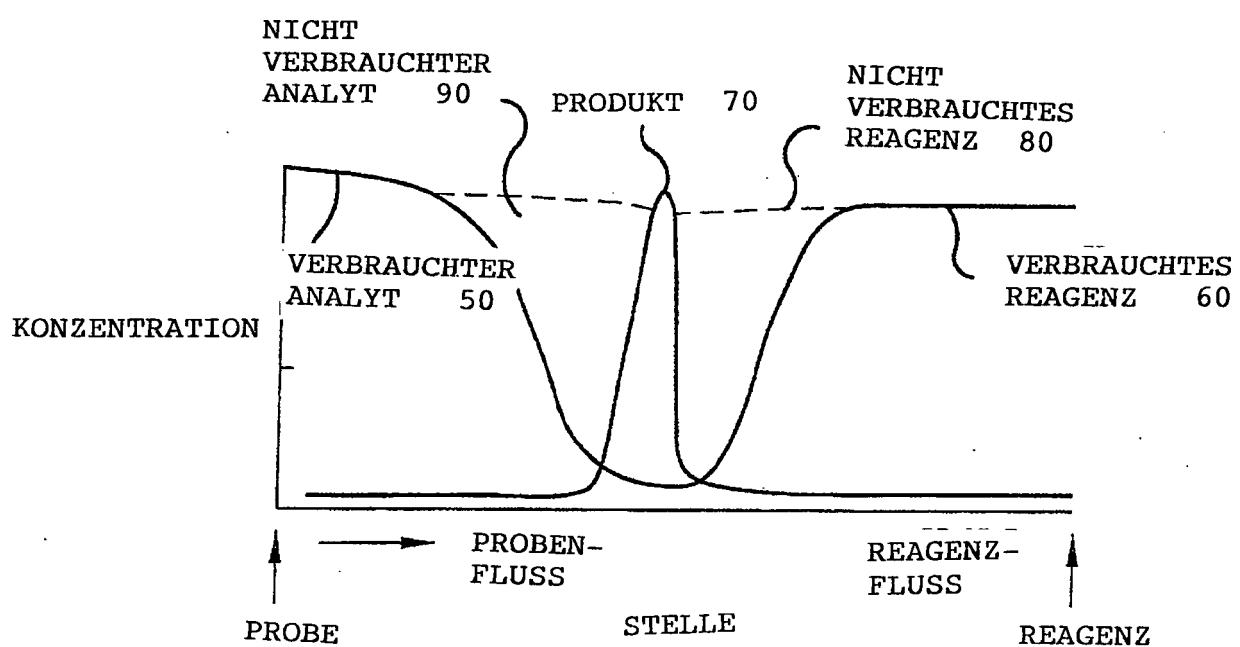
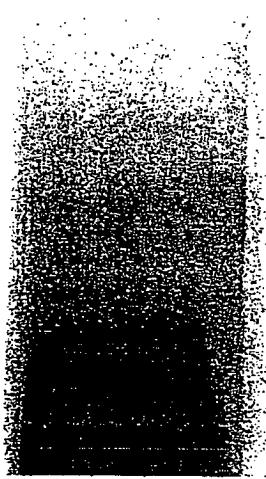


FIG.3

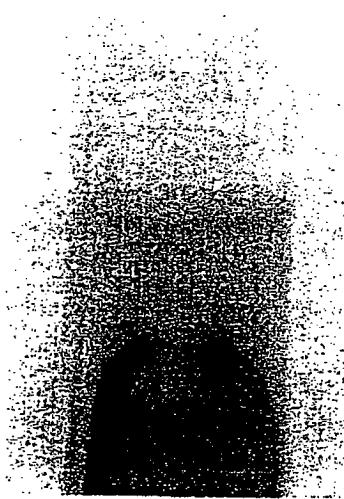
Glucose-Assay (Trinder-Reagenz, getrocknet auf Membran)

Getrocknetes Reagenz, streifenbildend bei Rekonstitution



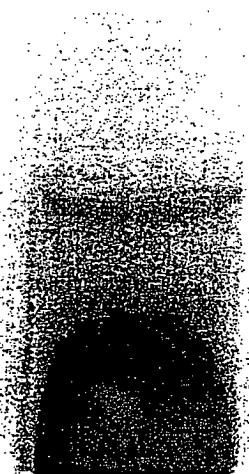
246 mg/dL Glucose, T=0

FIG.4A



T=5 SEKUNDEN

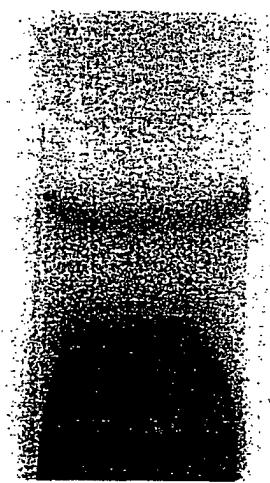
FIG.4B



T=10 SEKUNDEN

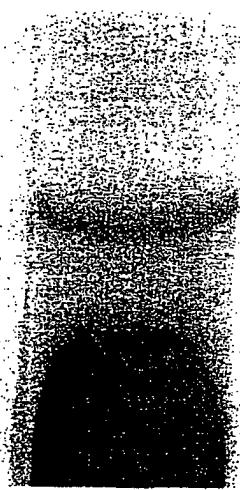
FIG.4C

Glucose-Assay (Frinder-Reagenz, getrocknet auf Membran)



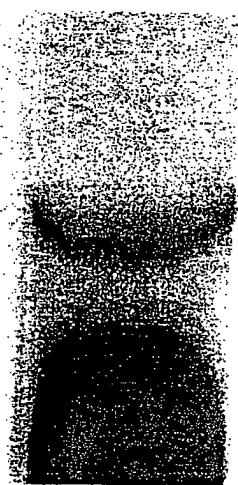
T=20 Sekunden

FIG.4D



T=30 Sekunden

FIG.4E



T=2 Minuten

FIG.4F

Calcium-Assay (Fötale Kalbsserum mit Arsenazo III)  
Normaler Canin-Bereich 9.7-12.2 mg/dL

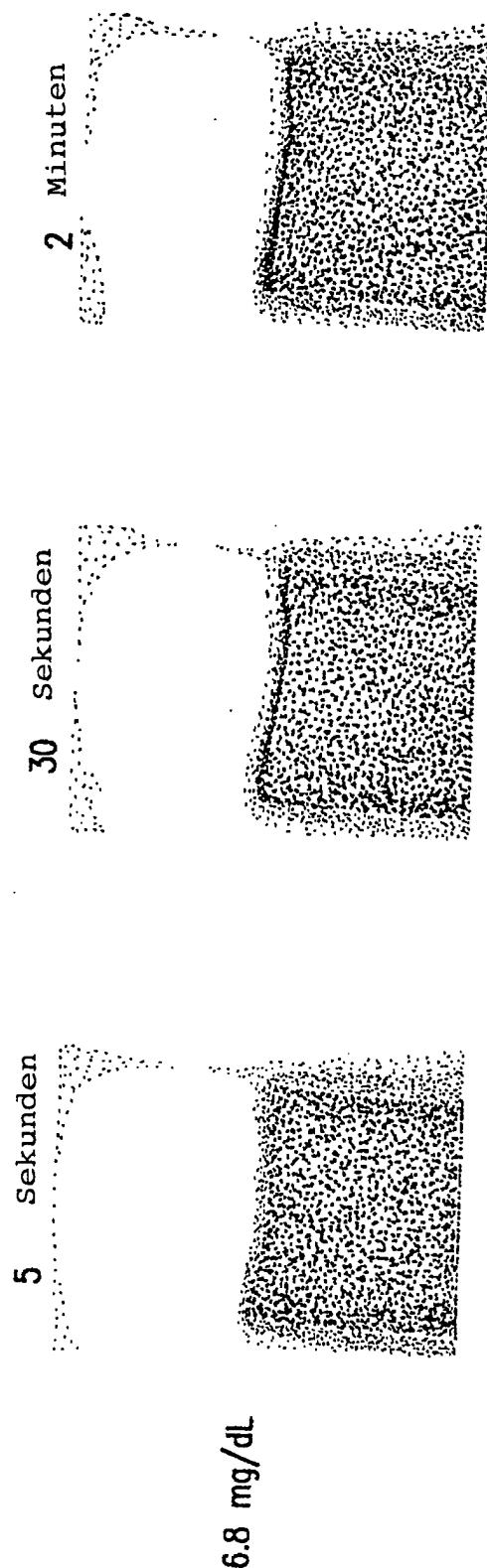


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

Calcium-Assay (Fötiales Kalbsserum mit Arsenazo III)  
Normaler Canin-Bereich: 9.7–12.2 mg/dL

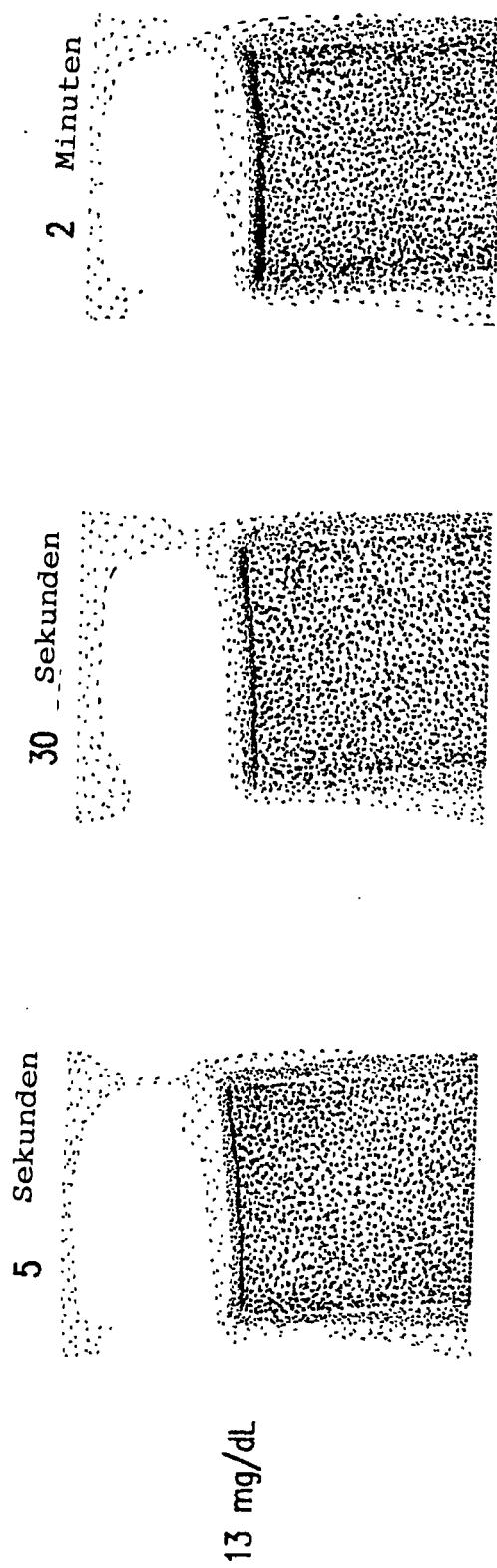


FIG. 5D

FIG. 5E

FIG. 5F

Calcium-Assay (Fötiales Kalbs serum mit Arsenazo III)  
Normaler Canin-Bereich 9.7-12.2 mg/dL

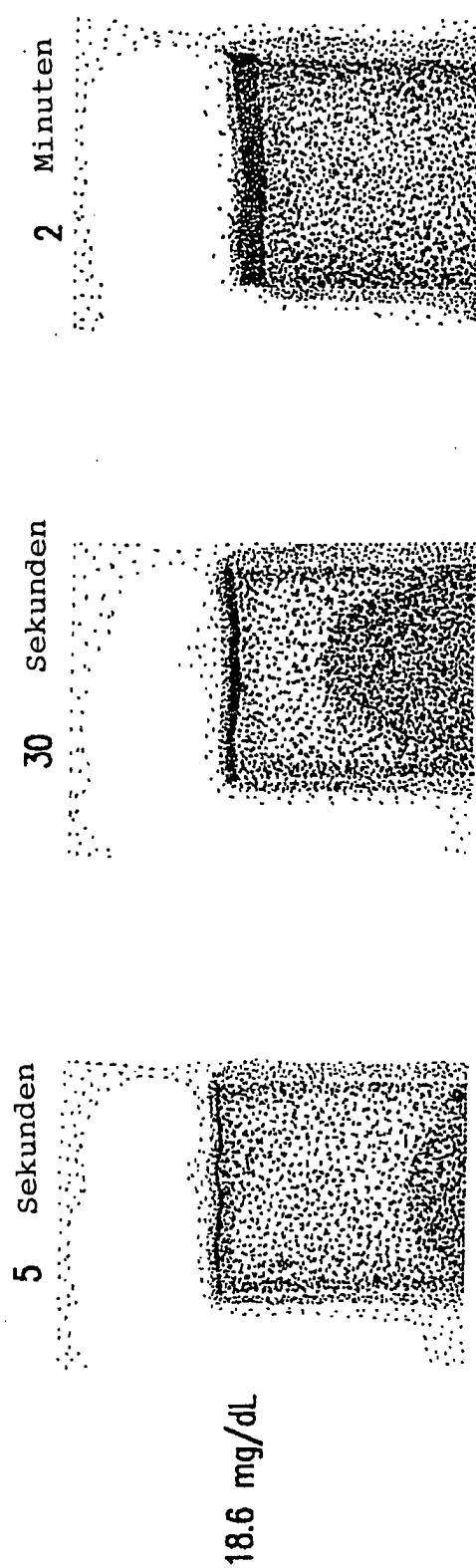


FIG. 5G

FIG. 5H

FIG. 5I

ALBUMIN GERING #3 STREIFENMAPPE

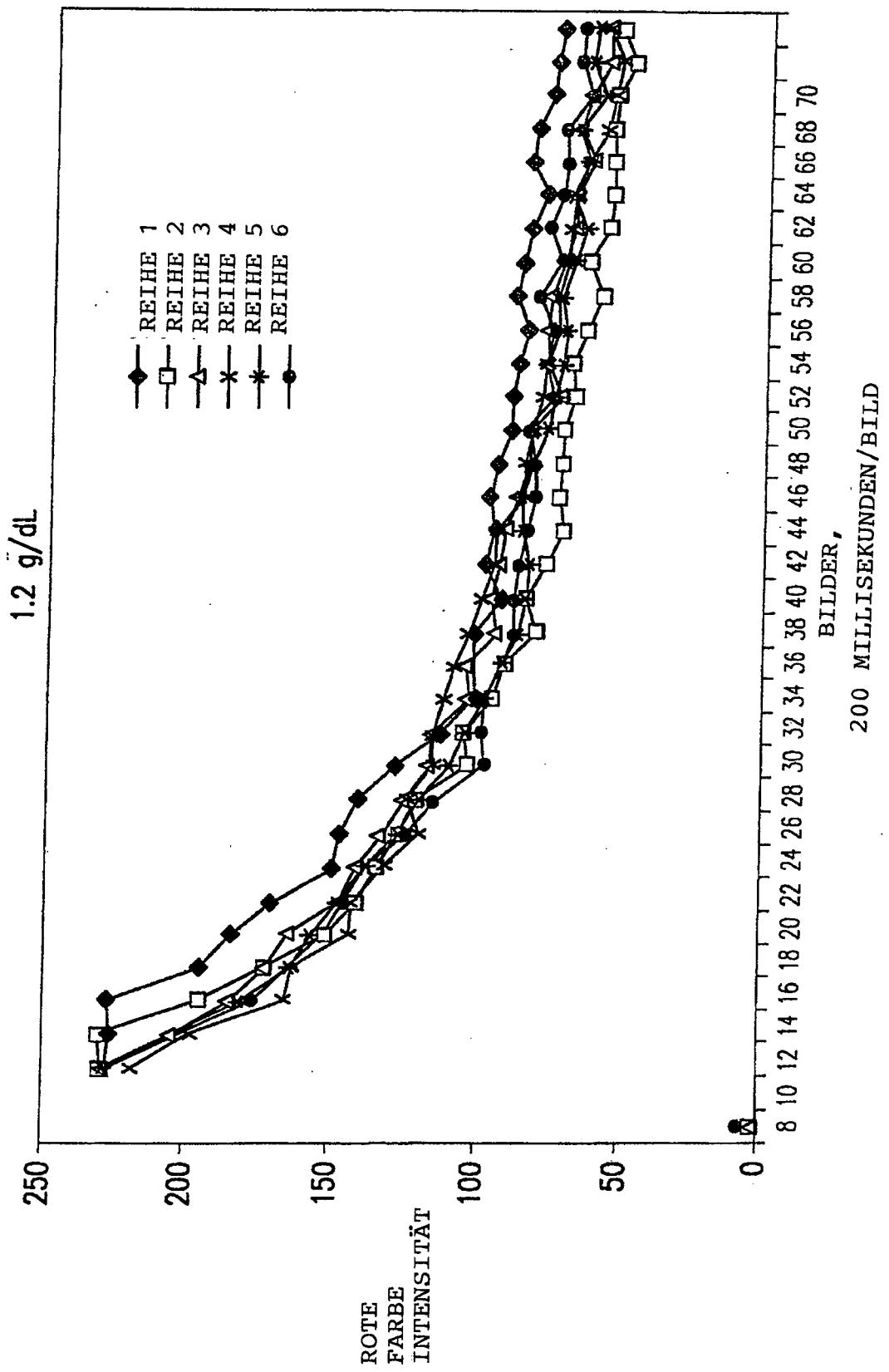


FIG.6

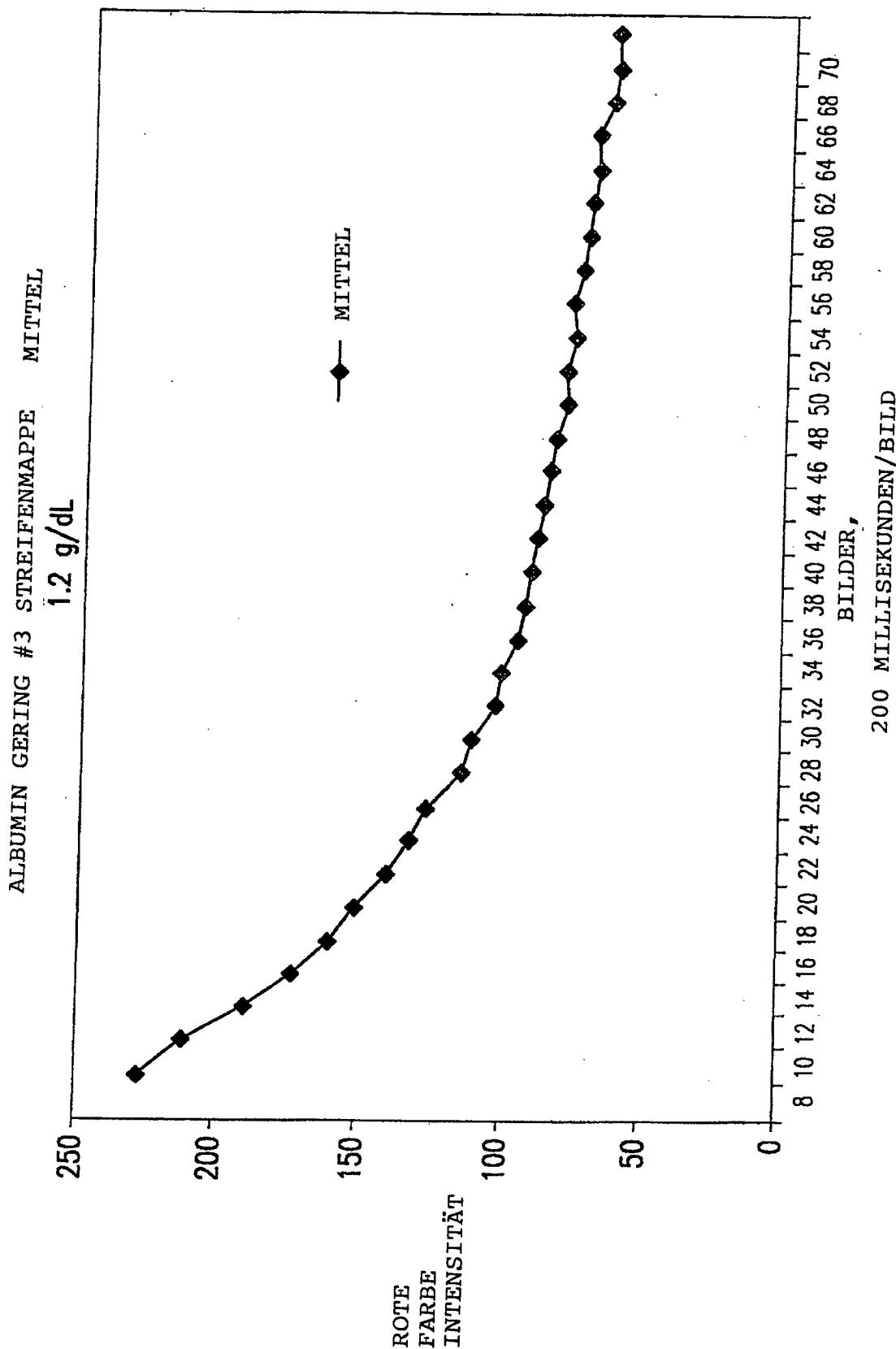
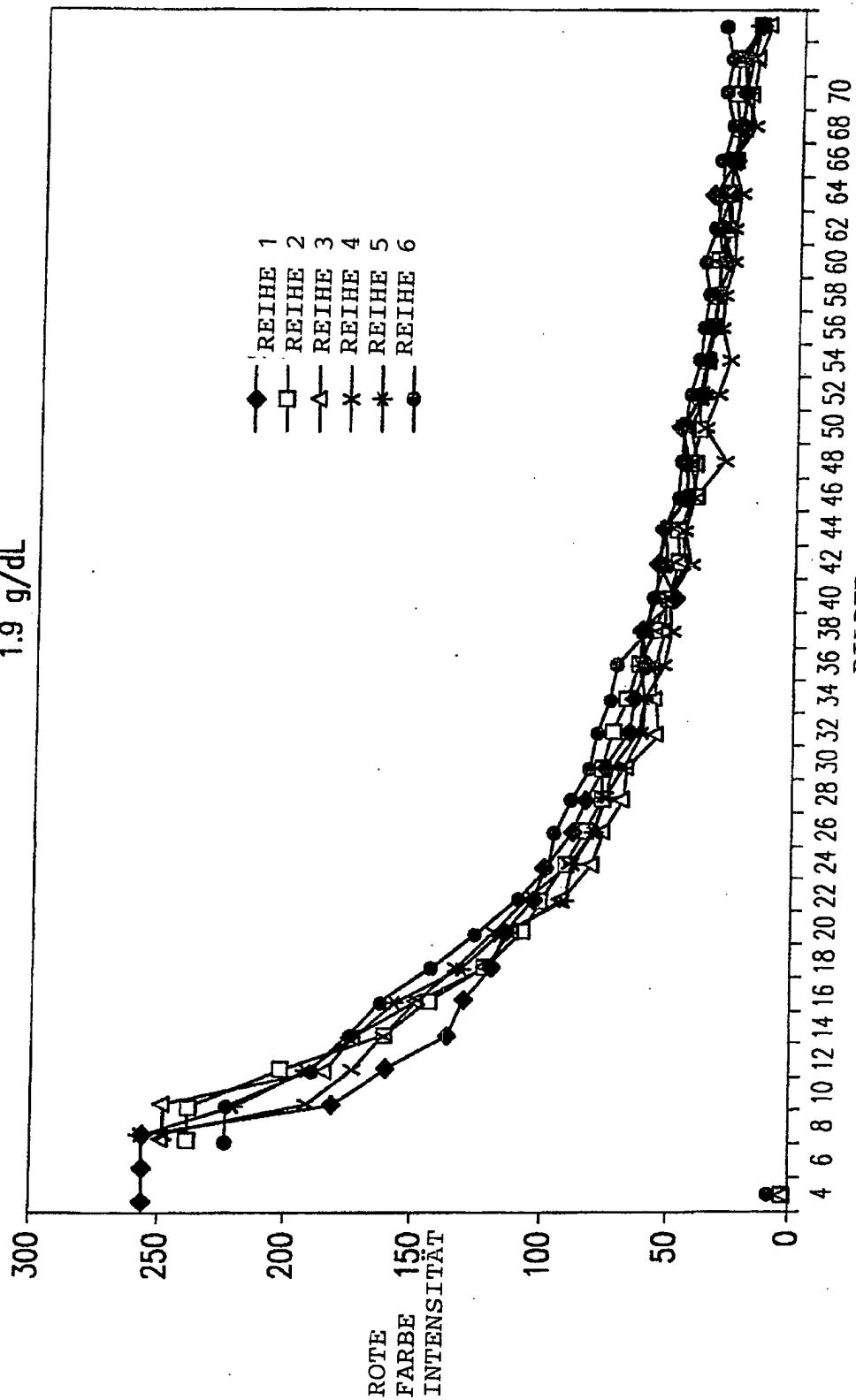


FIG.7

ALBUMIN HOCH #3 STREIFENMAPPE

1.9 g/dL



200 MILLISEKUNDEN / BILD  
BILDER,

FIG.8

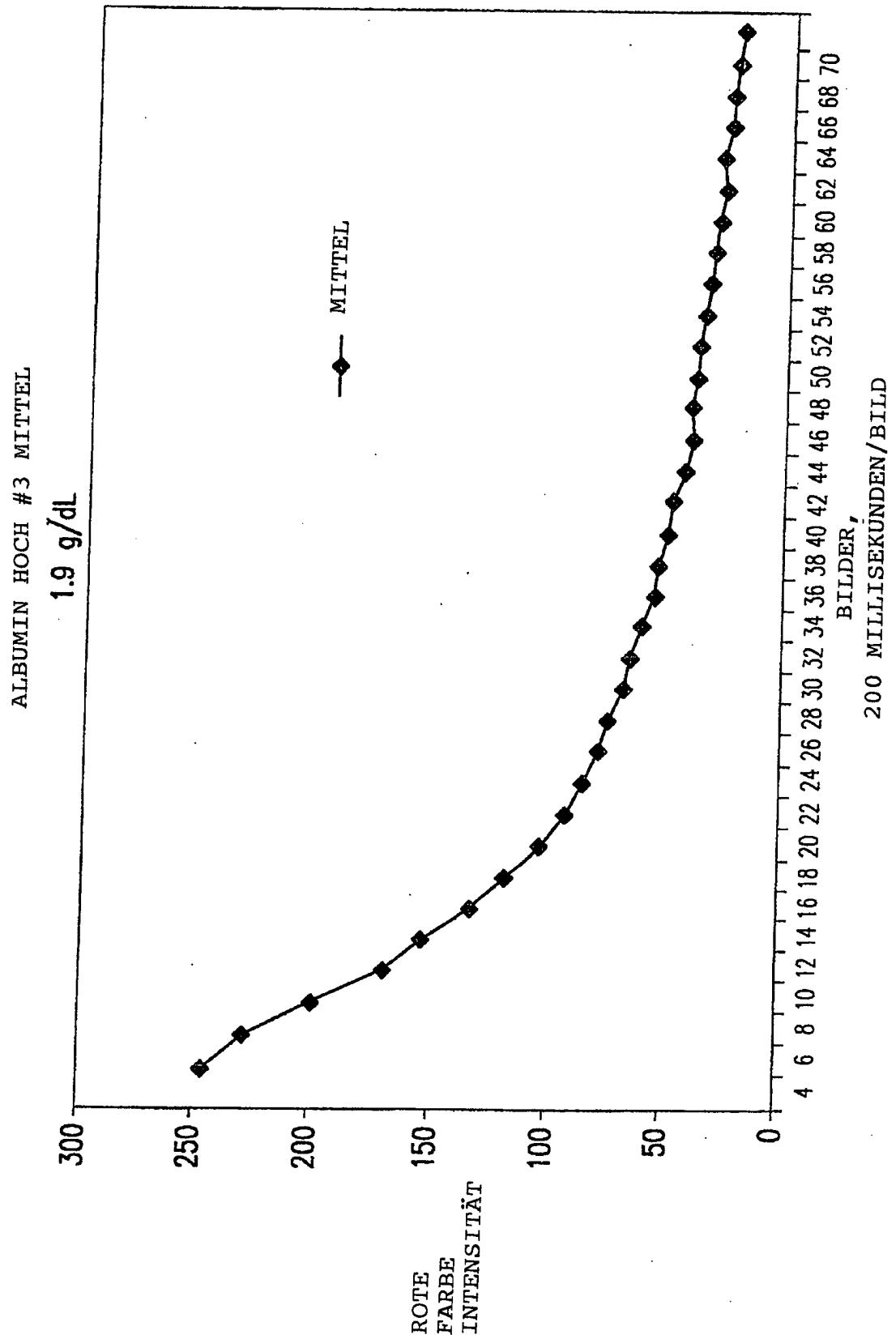


FIG.9

ALBUMIN-ASSAY MITTEL 6 ABLESUNGEN HOCH GEGEN GERING

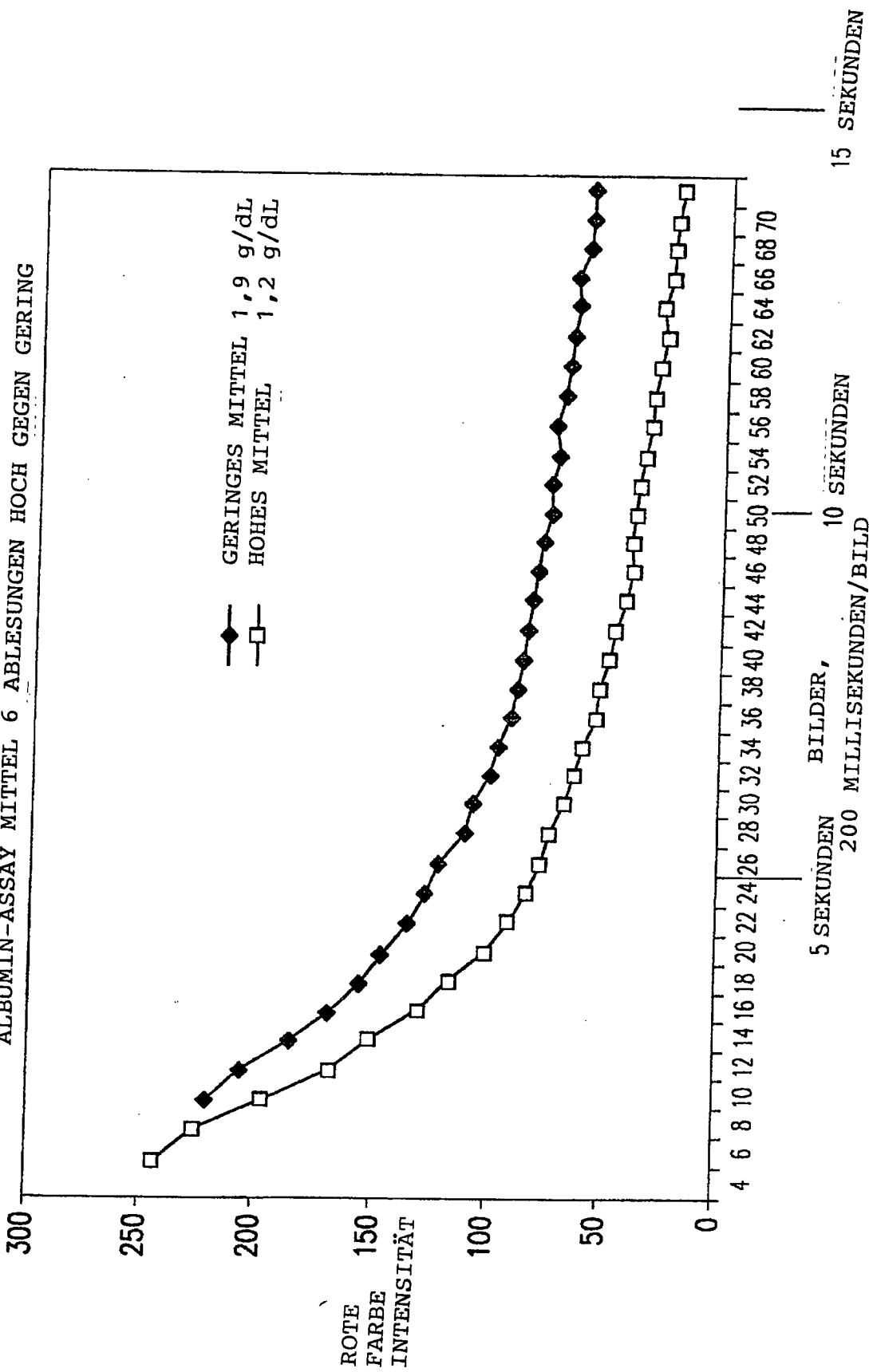


FIG.10

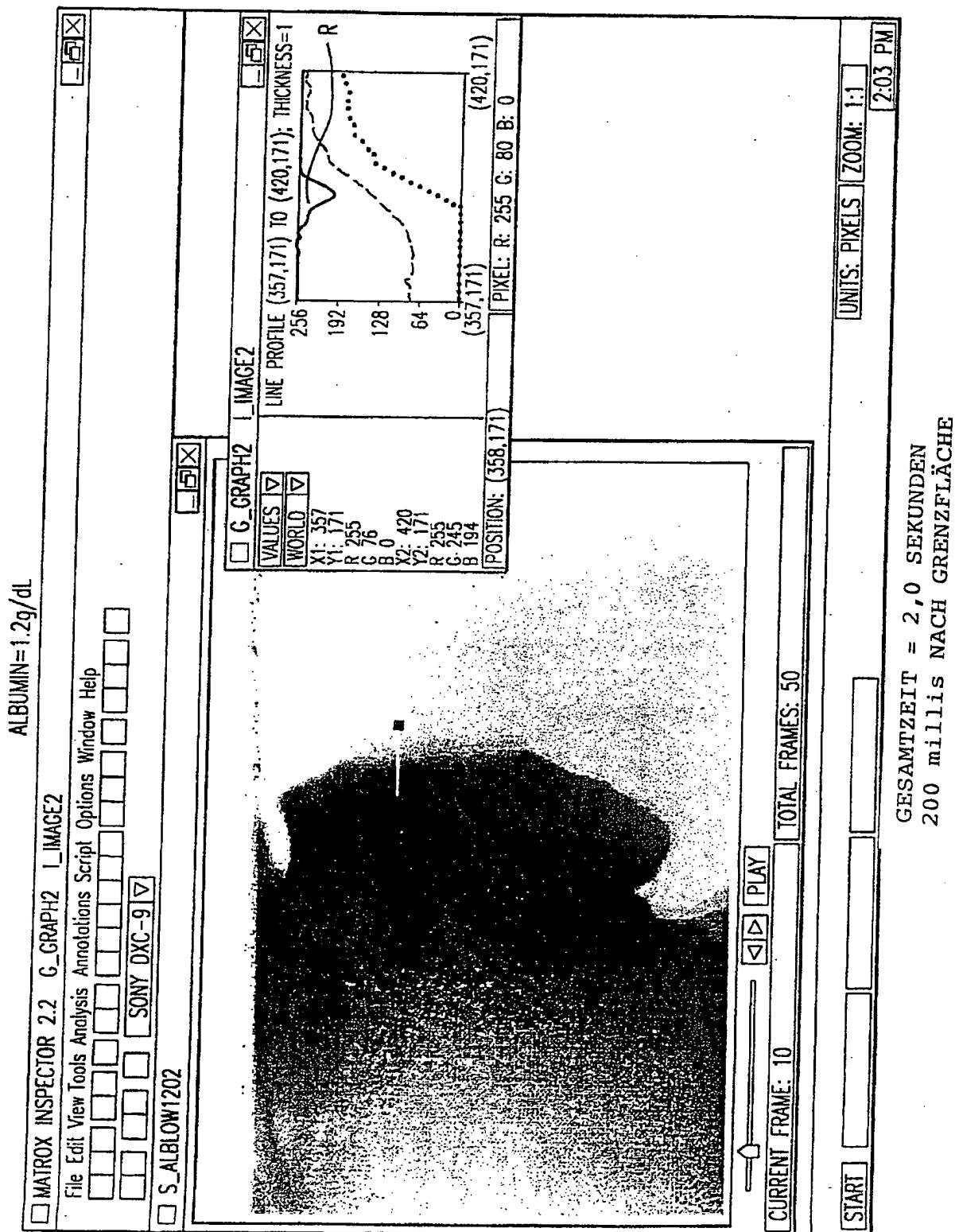


FIG. 11

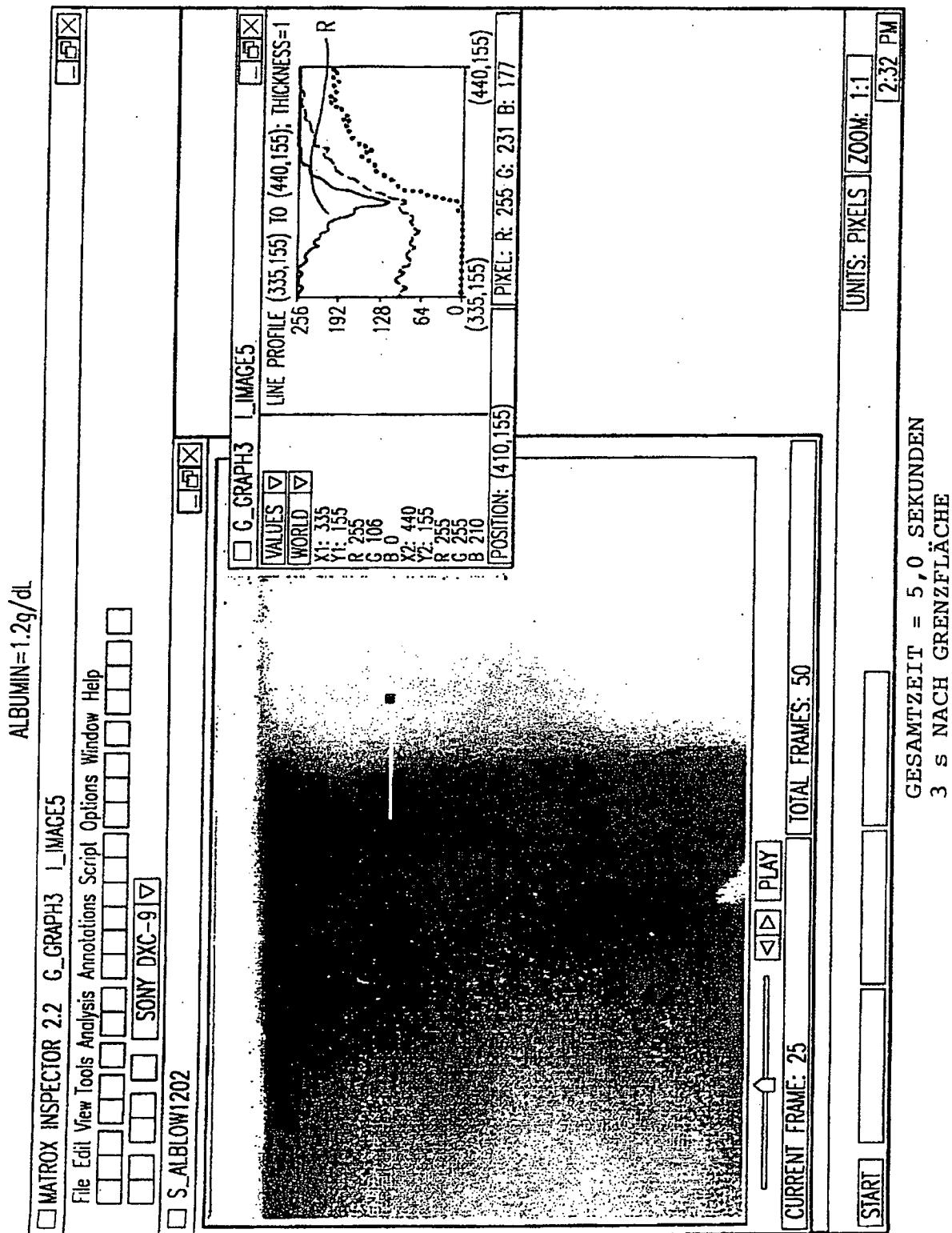


FIG. 12

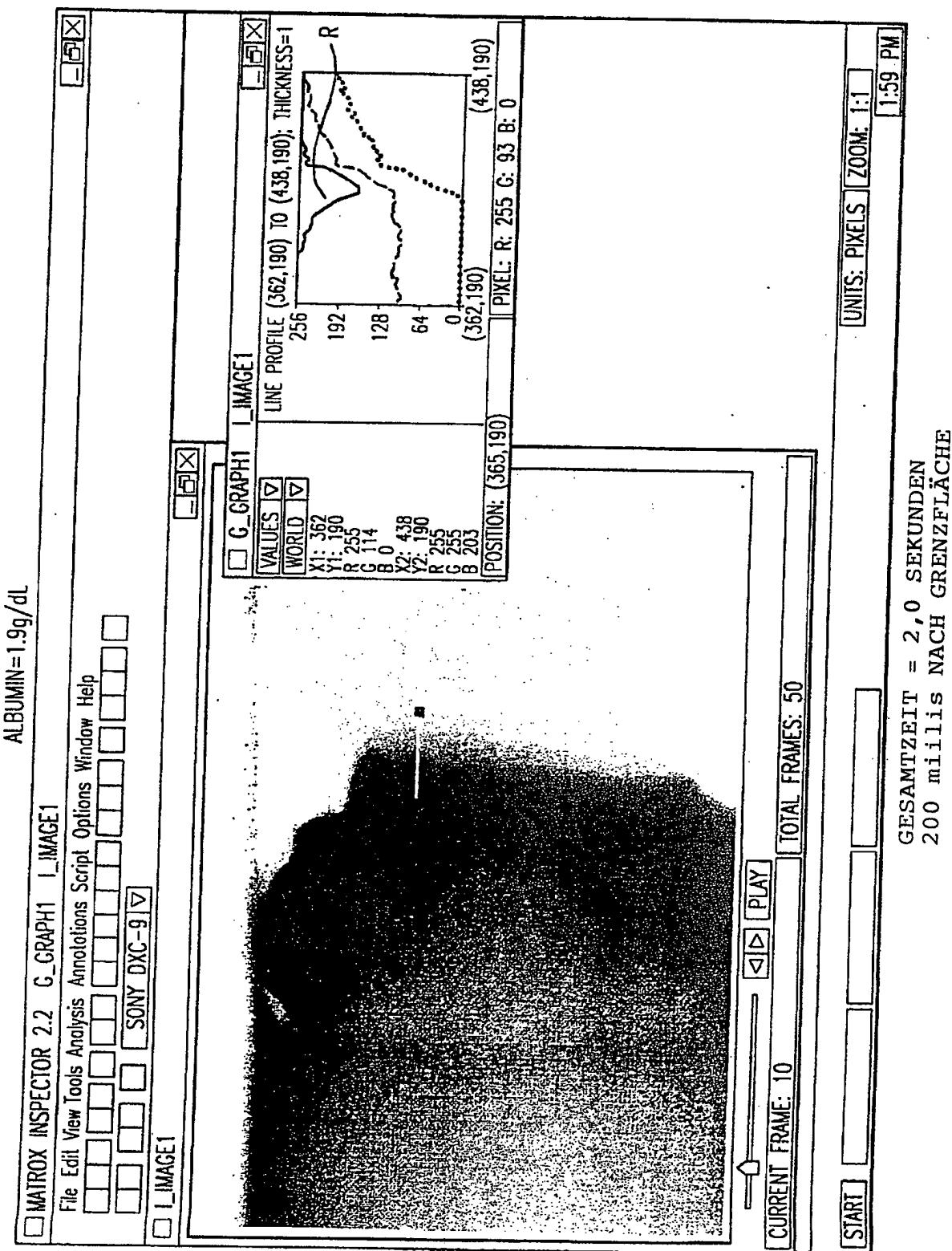


FIG. 13

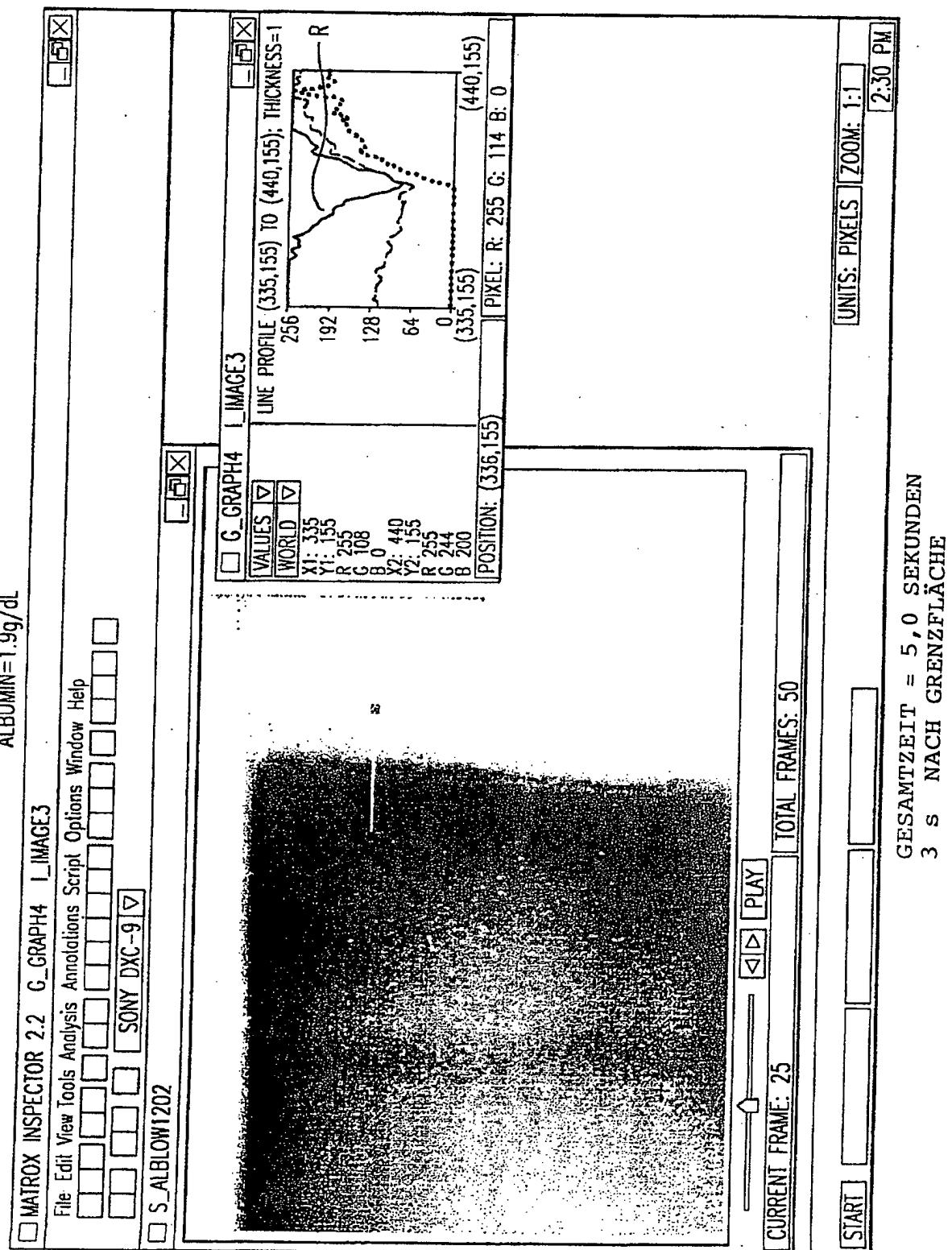


FIG. 14

**GESAMTZEIT = 5,0 SEKUNDEN**  
**3 s NACH GRENZFLÄCHE**

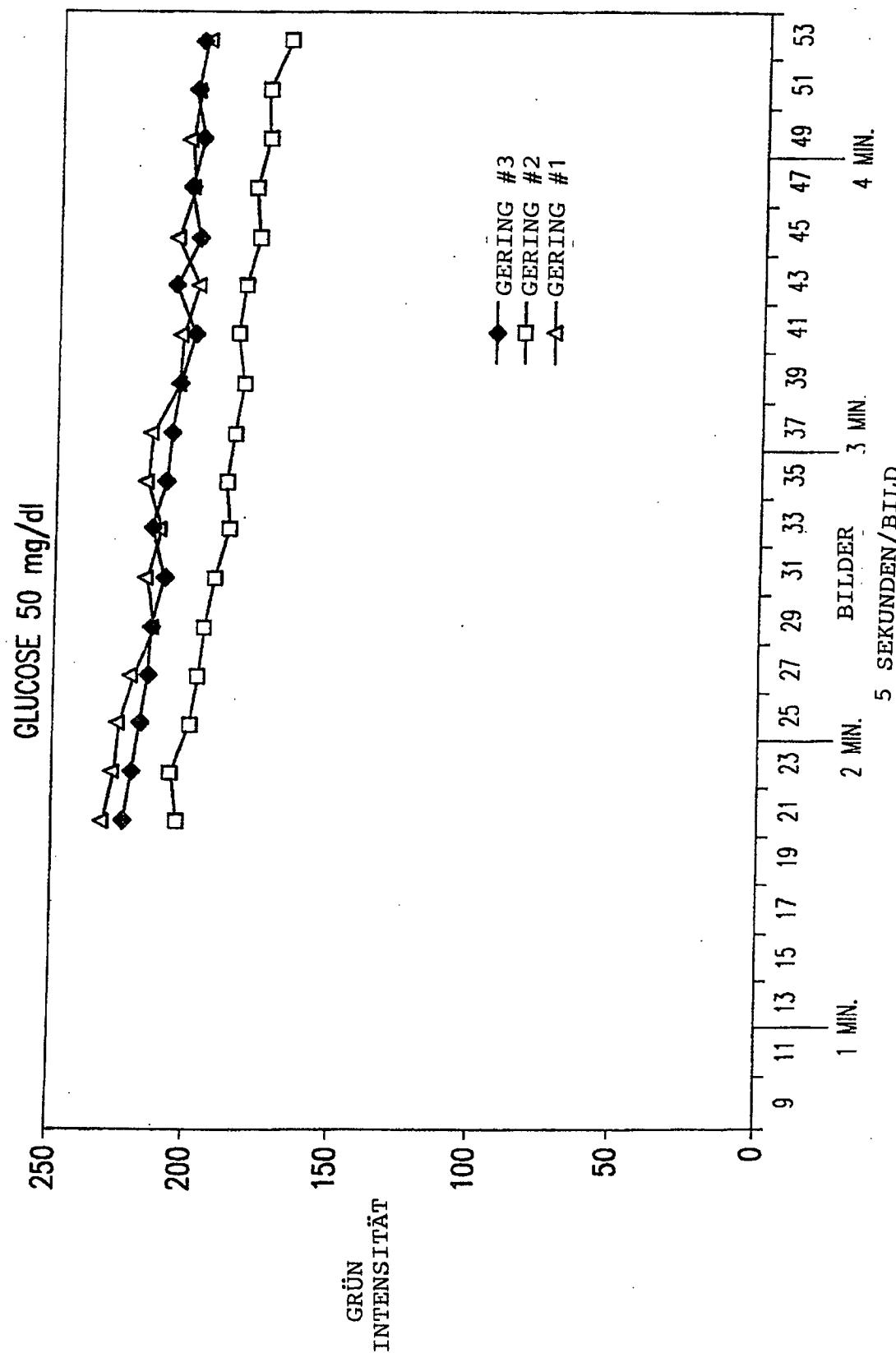


FIG. 15

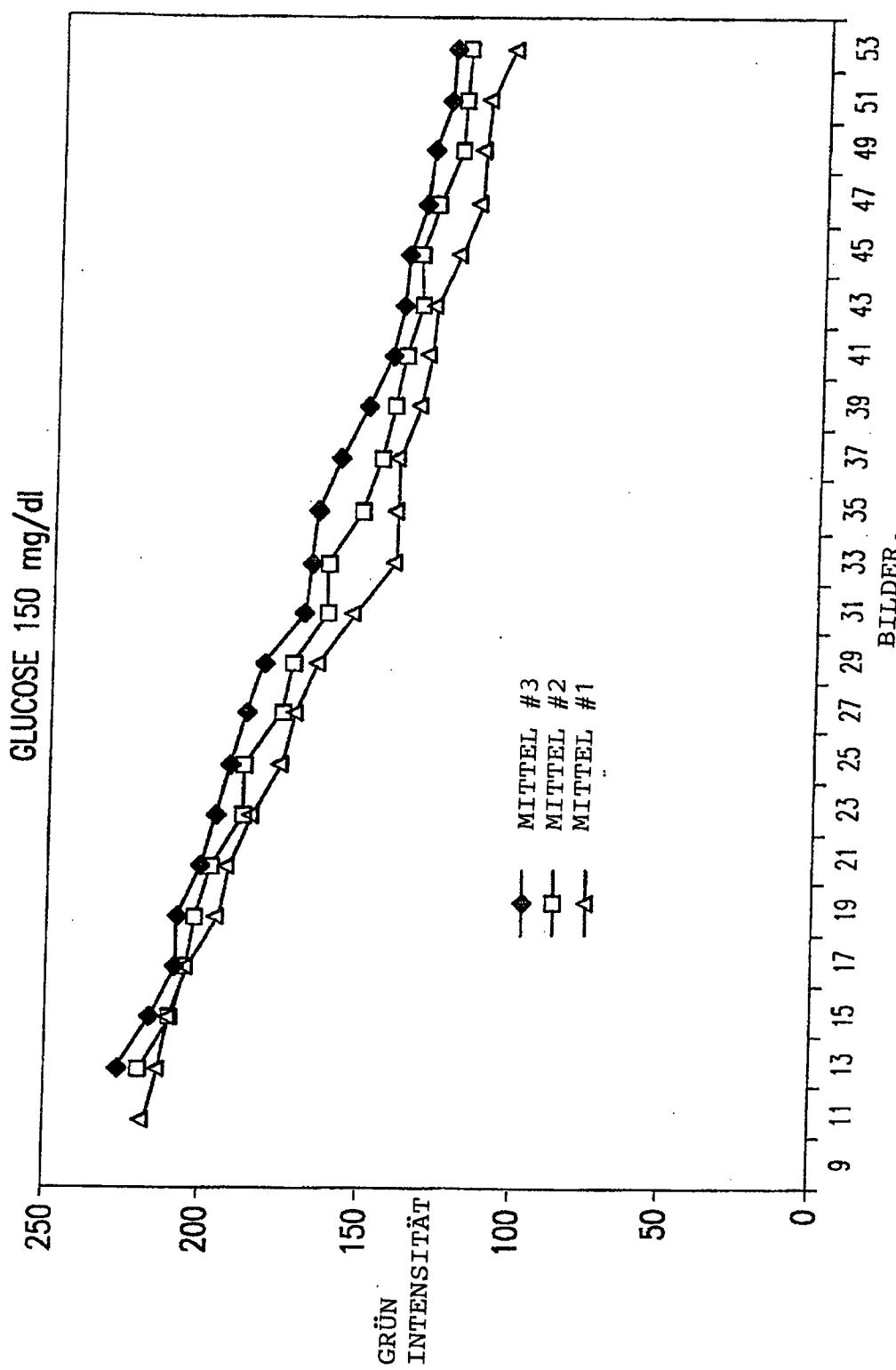


FIG. 16

5 SEKUNDEN/BILD

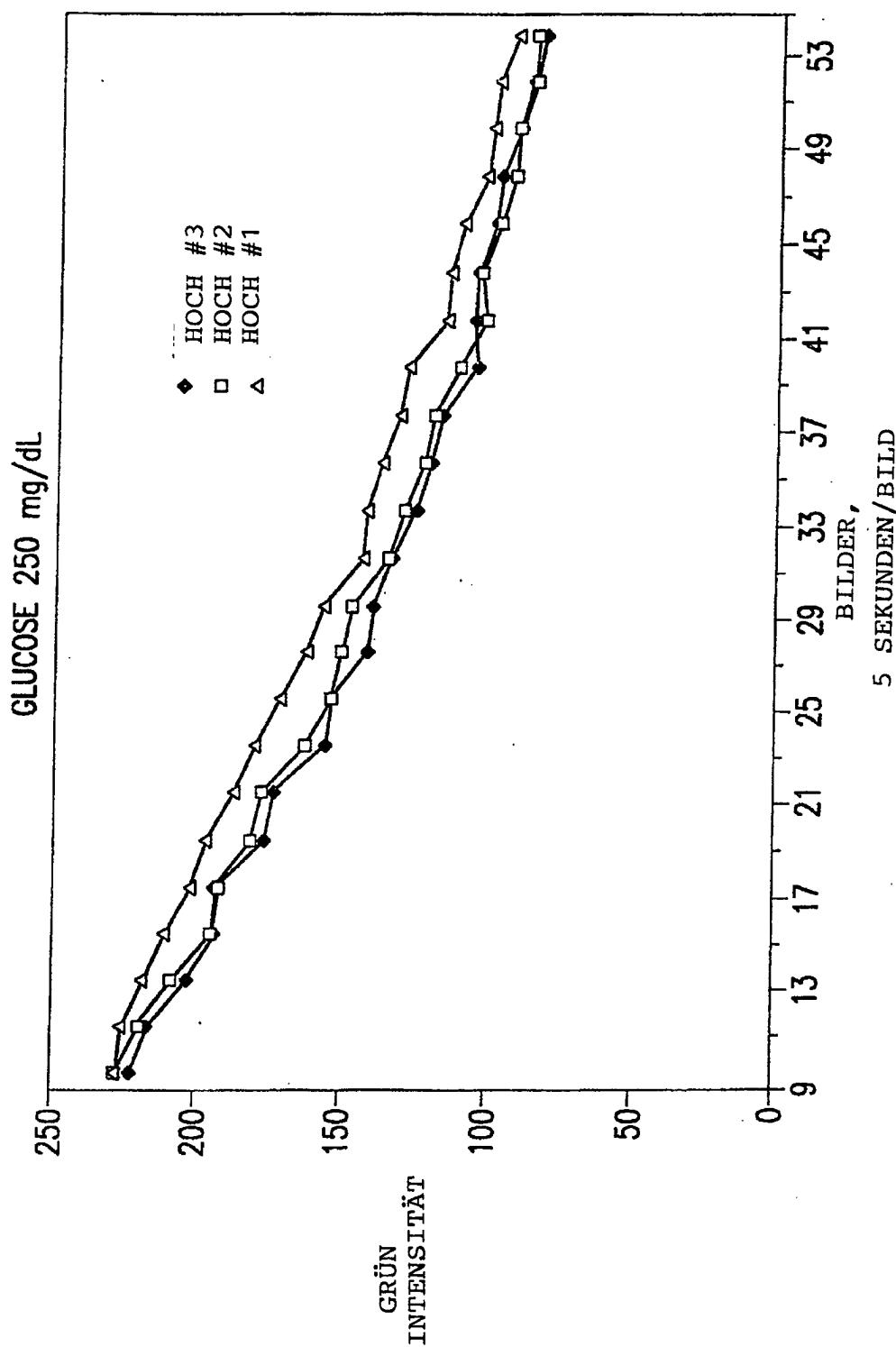


FIG. 17

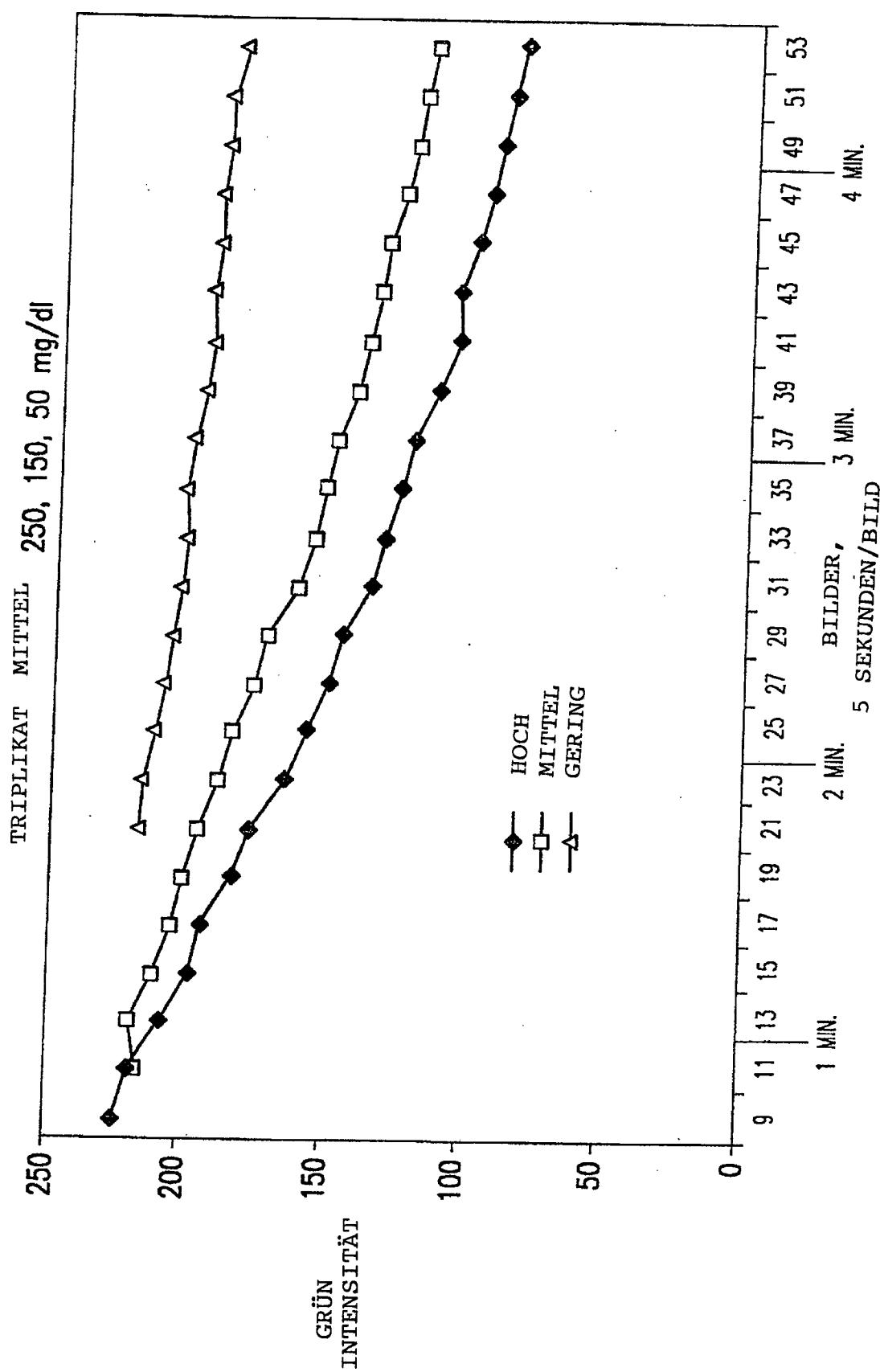


FIG. 18

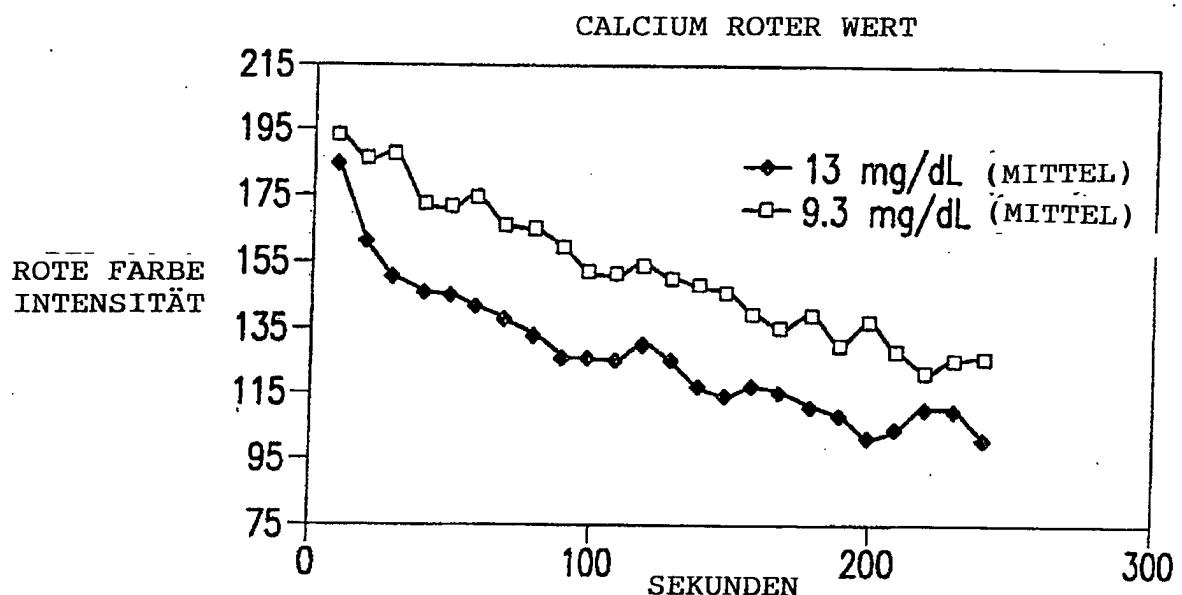


FIG. 19

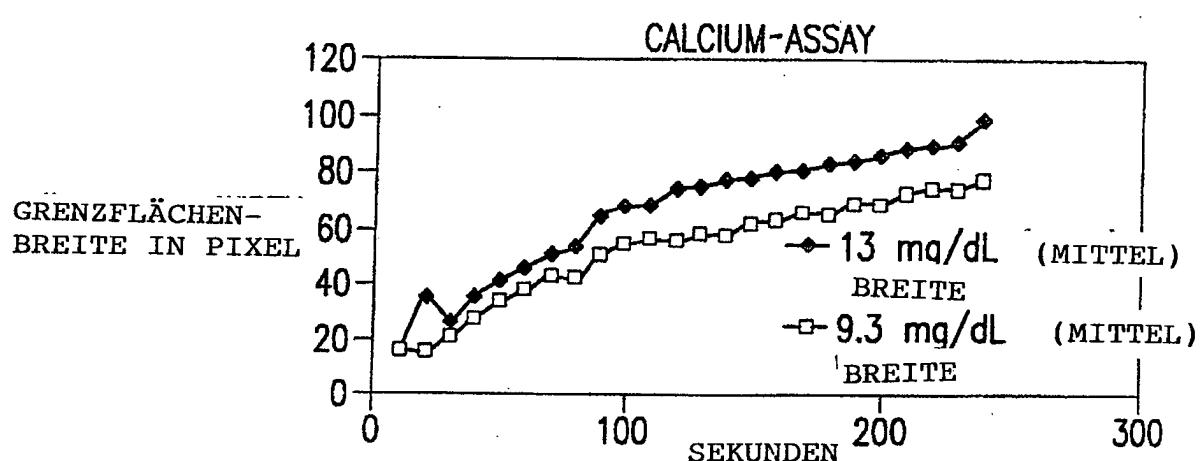


FIG. 20

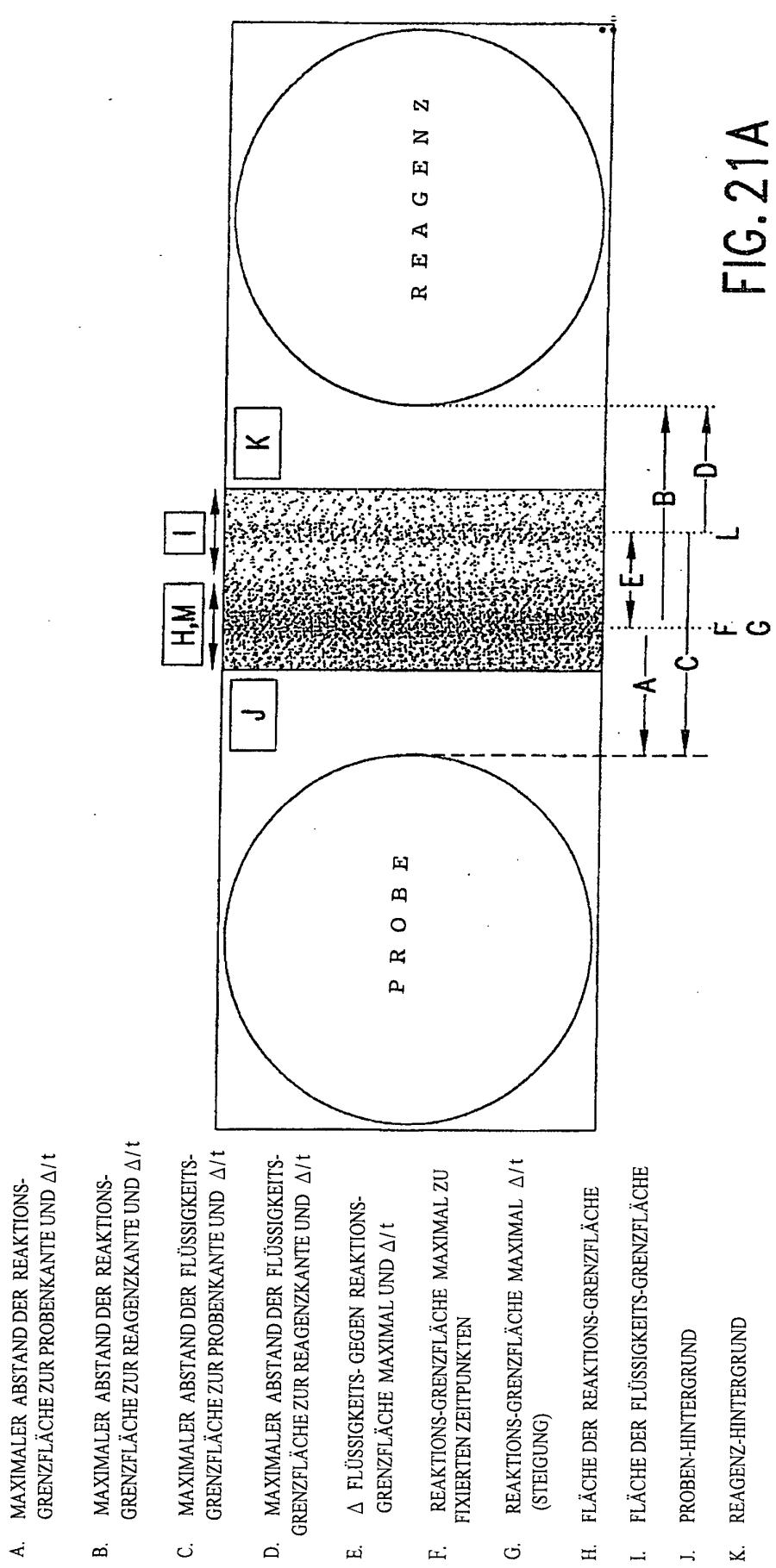
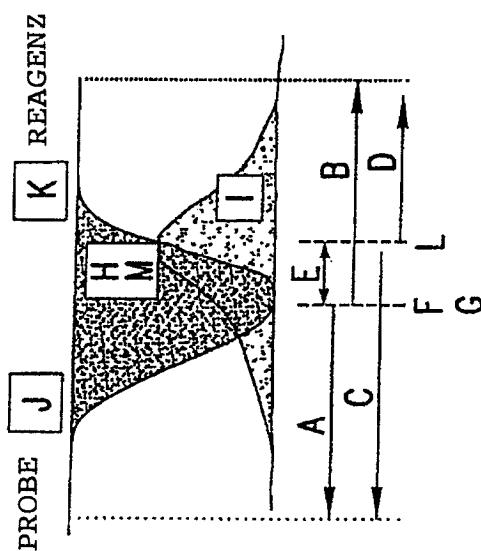


FIG. 21A

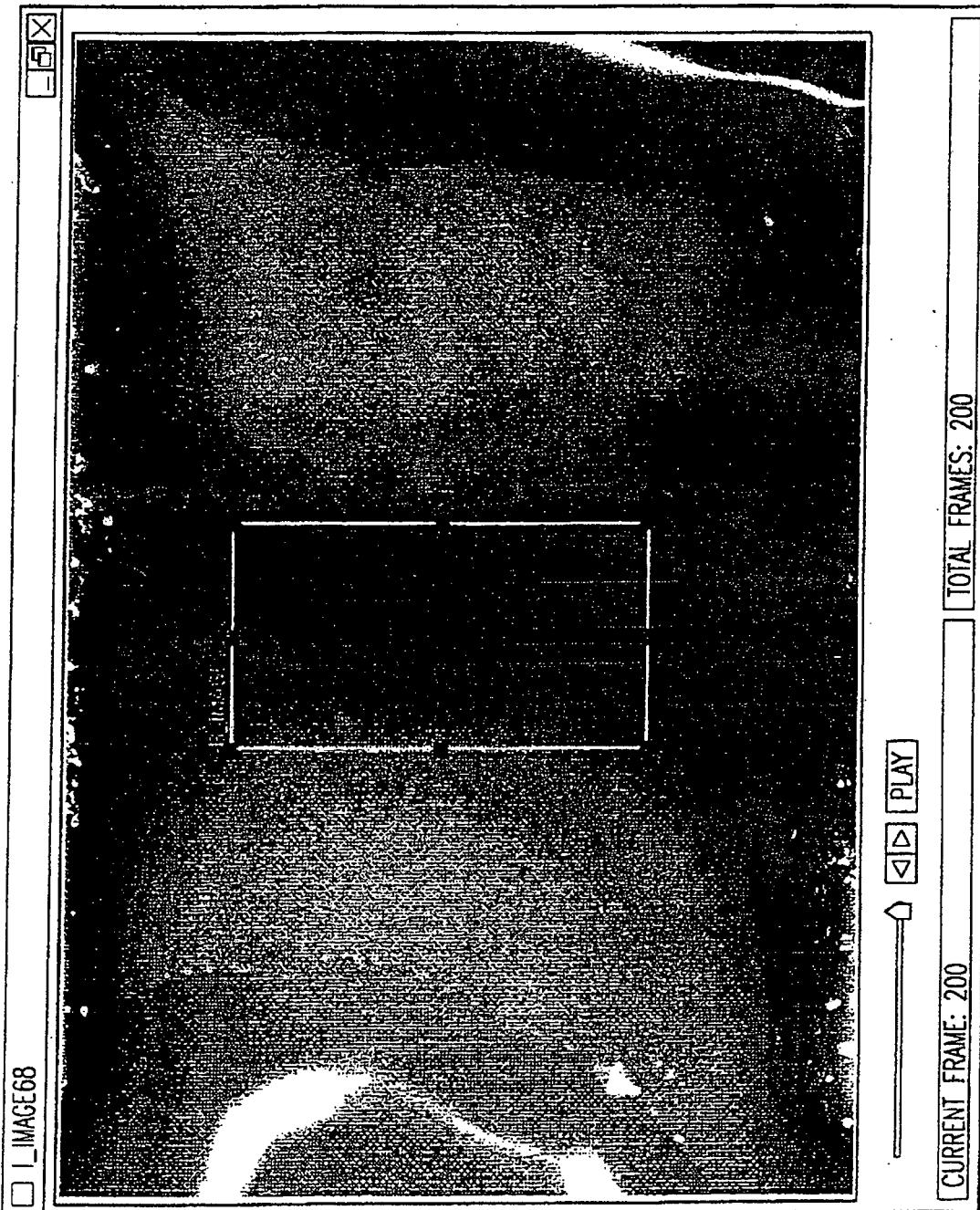
- A. MAXIMALER ABSTAND DER REAKTIONS-GRENZFLÄCHE ZUR PROBENKANTE UND  $\Delta/t$
- B. MAXIMALER ABSTAND DER REAKTIONS-GRENZFLÄCHE ZUR REAGENZKANTE UND  $\Delta/t$
- C. MAXIMALER ABSTAND DER FLÜSSIGKEITS-GRENZFLÄCHE ZUR PROBENKANTE UND  $\Delta/t$
- D. MAXIMALER ABSTAND DER FLÜSSIGKEITS-GRENZFLÄCHE ZUR REAGENZKANTE UND  $\Delta/t$
- E.  $\Delta$  FLÜSSIGKEITS-GEGEN REAKTIONS-GRENZFLÄCHE MAXIMAL UND  $\Delta/t$
- F. REAKTIONS-GRENZFLÄCHE MAXIMAL ZU FIXIERTEN ZEITPUNKTEN
- G. REAKTIONS-GRENZFLÄCHE MAXIMAL  $\Delta/t$  (STEIGUNG)
- H. FLÄCHE DER REAKTIONS-GRENZFLÄCHE
- I. FLÄCHE DER FLÜSSIGKEITS-GRENZFLÄCHE
- J. PROBEN-HINTERGRUND
- K. REAGENZ-HINTERGRUND
- L. FLÜSSIGKEITS-GRENZFLÄCHE MAXIMAL  $\Delta/t$
- M. REAKTIONS-GRENZFLÄCHE, FORM DER KURVE



**FIG. 21B**

FIG. 22

GLUCOSE GESAMTPRODUKT-ANALYSE



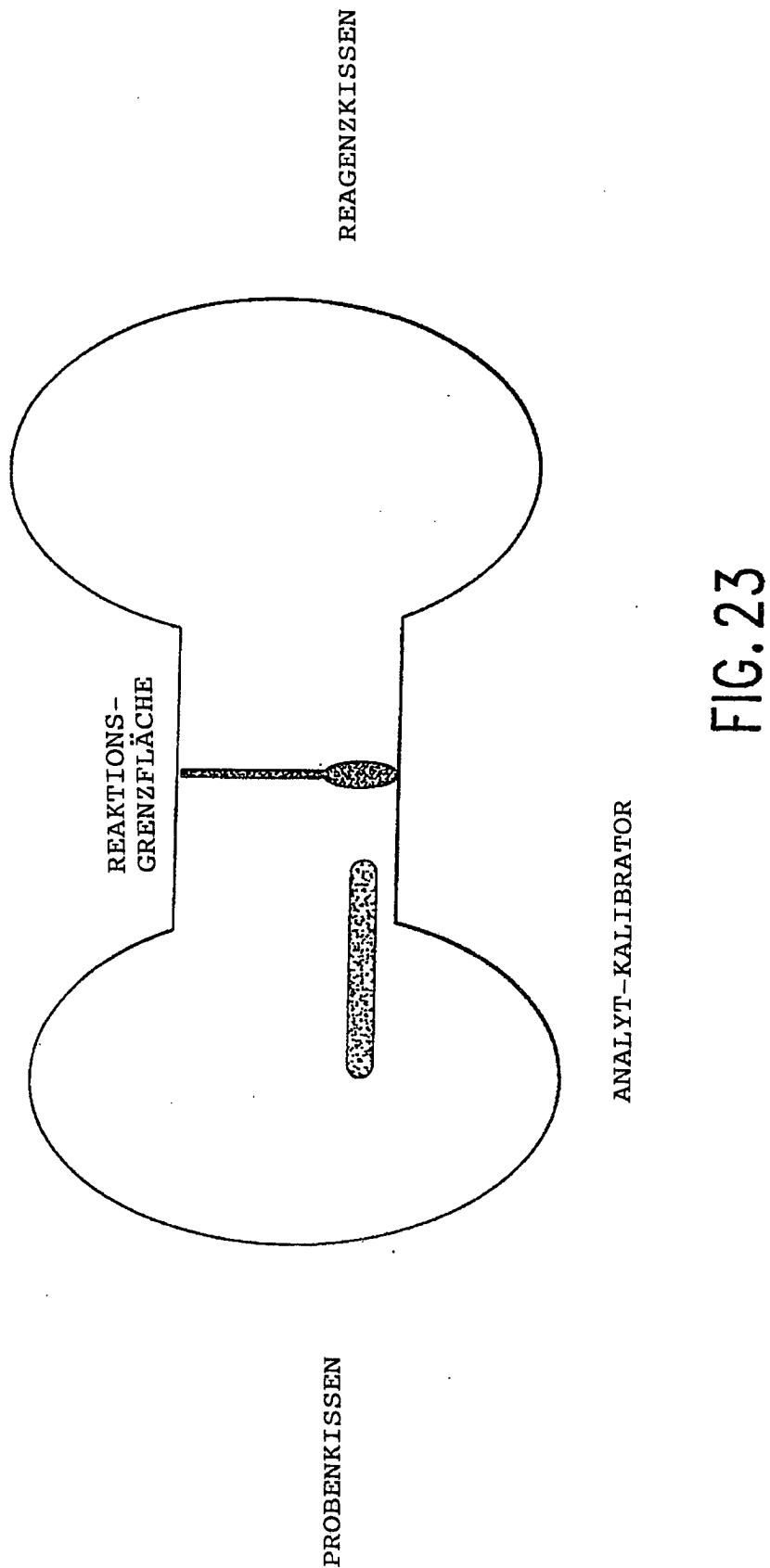


FIG. 23

## KALIBRIERUNGSFLECK ÜBERSCHÜSSIGER

GLUCOSE (10.000mg/dL GLUCOSE)

PROBE: FBS ( 100mg/dL GLUCOSE)

20 SEKUNDEN BIS 60 SEKUNDEN

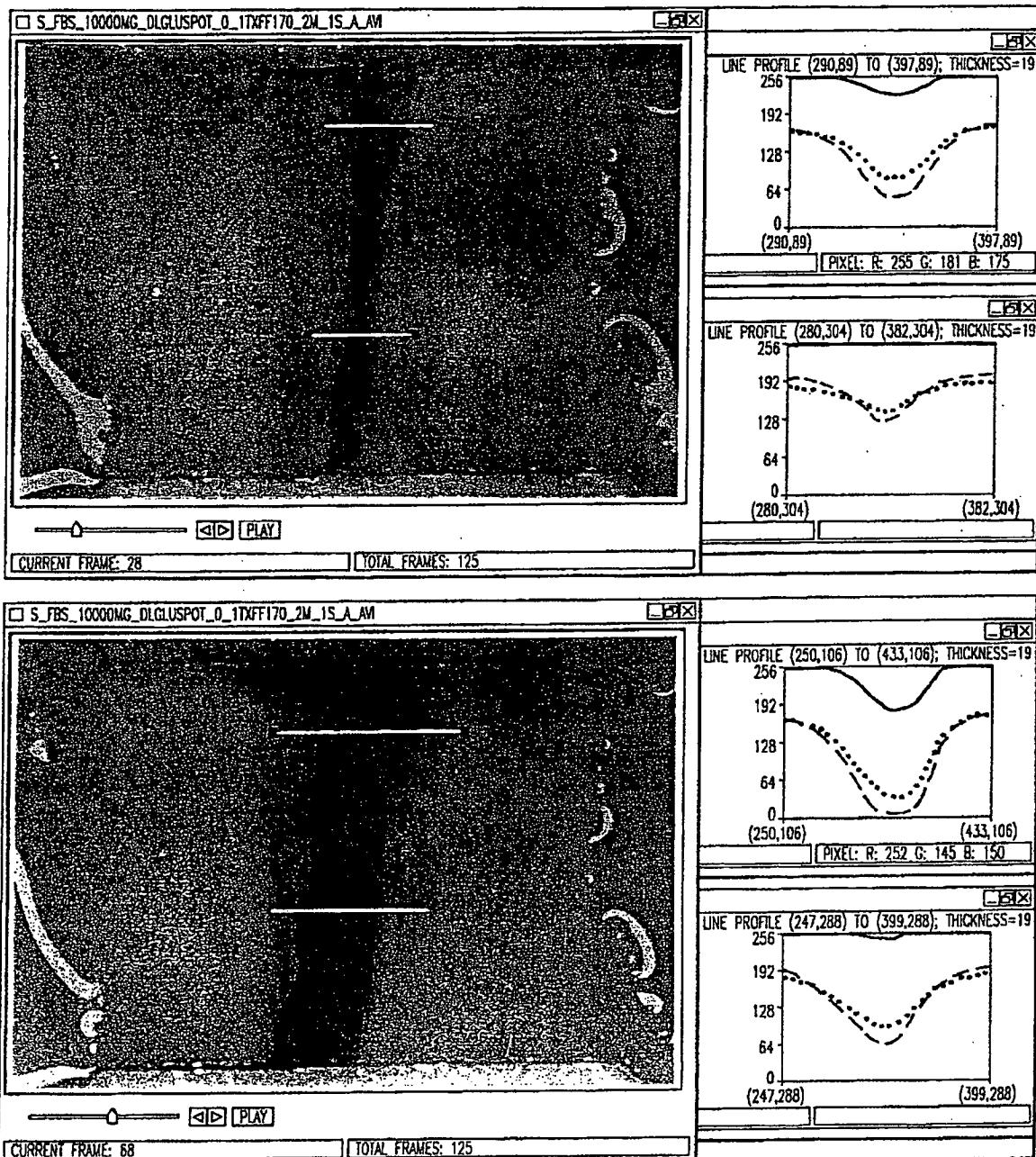


FIG. 24

ALKALISCHE PHOSPHATASE pH 10  
NITRO (1180) ZEIT (15s/120 s)

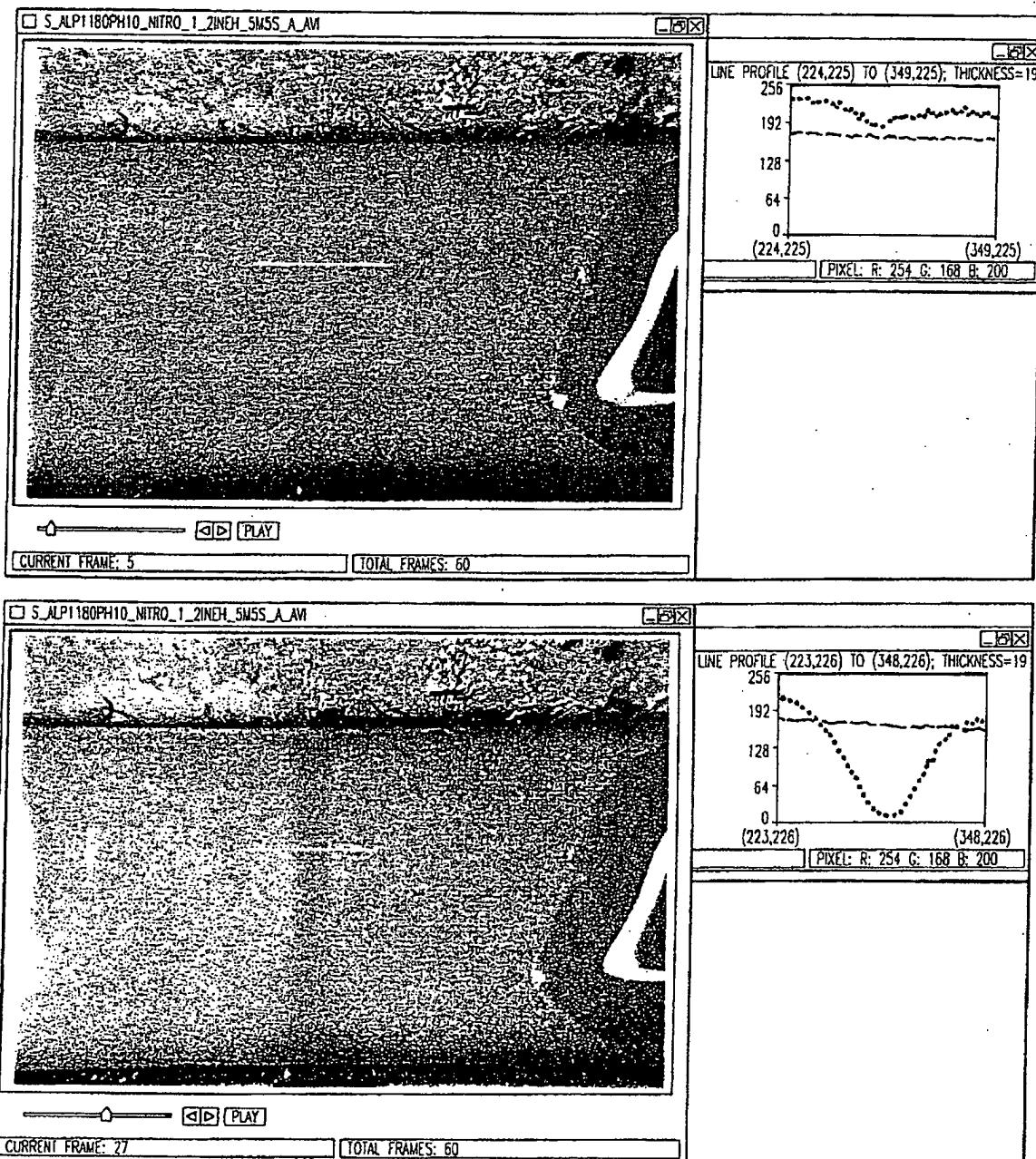


FIG. 25

GESAMTBILIRUBIN (4,73 mg/dL)  
ZEIT (15 s/275 s)

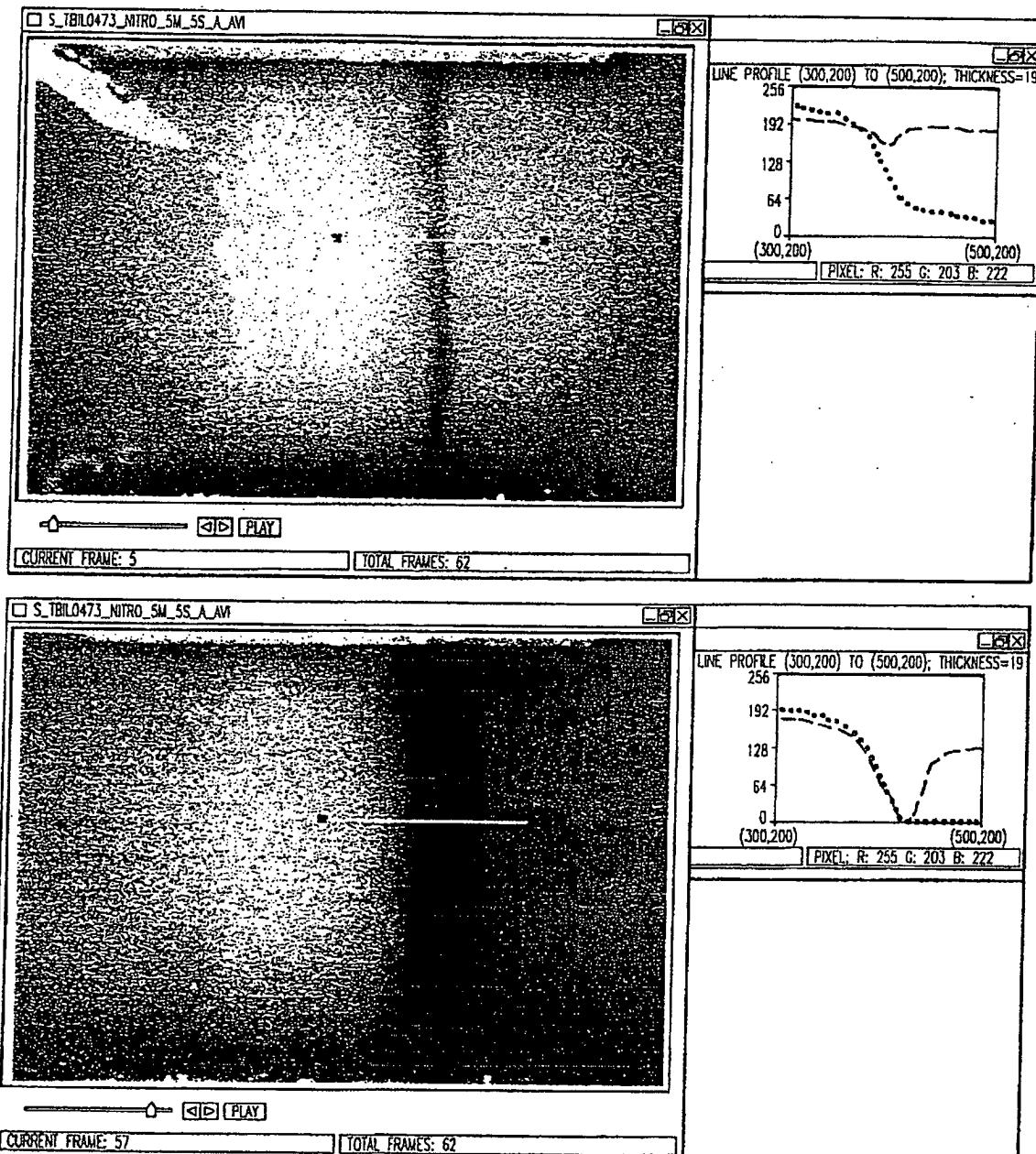


FIG. 26

HARNSÄURE SUPOR (0,3 mg/dL)  
ZEIT (5 s/295 s)

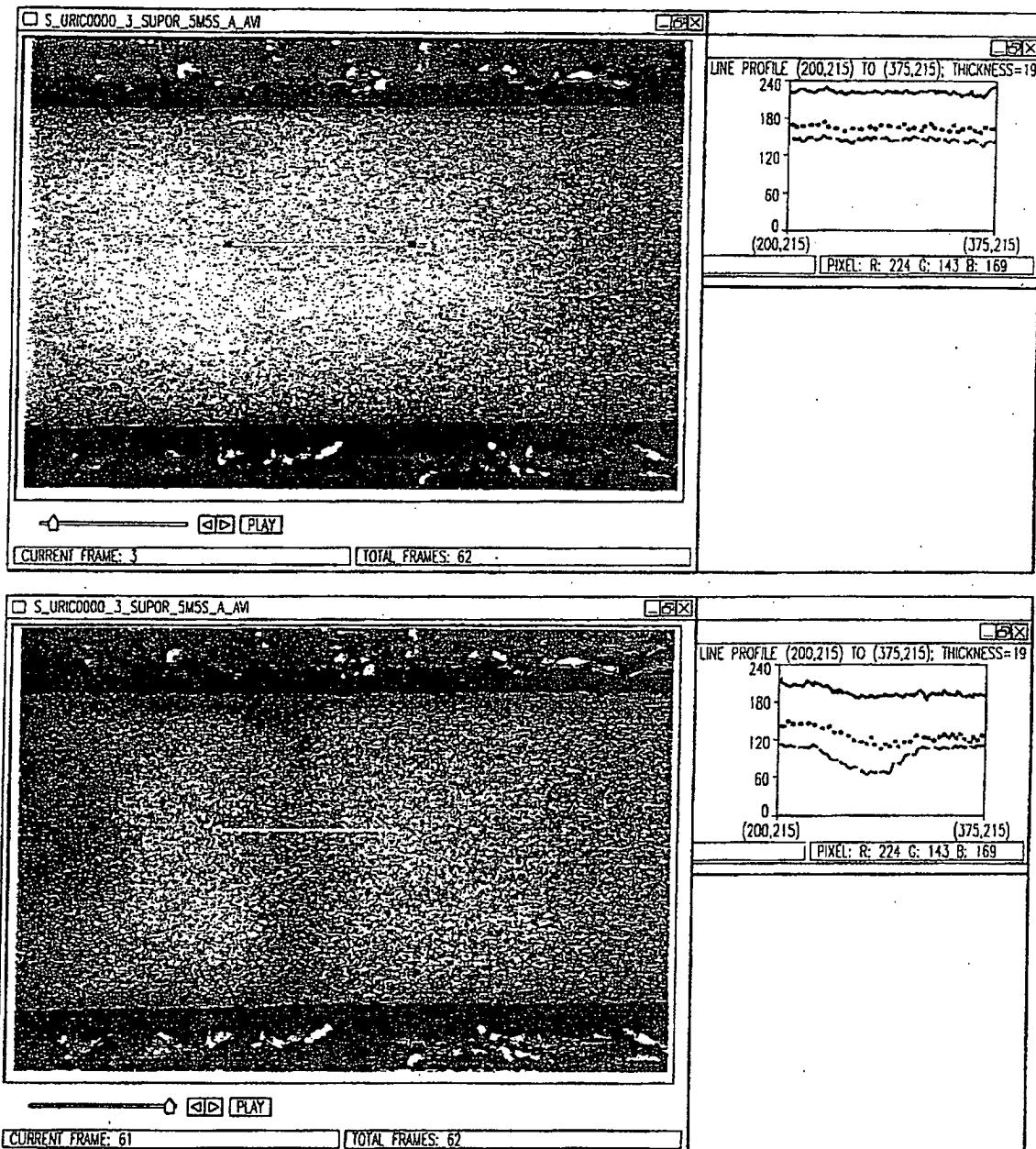


FIG.27

GGT pH 7 NITRO (380U/L)  
ZEIT (5 s/285 s)

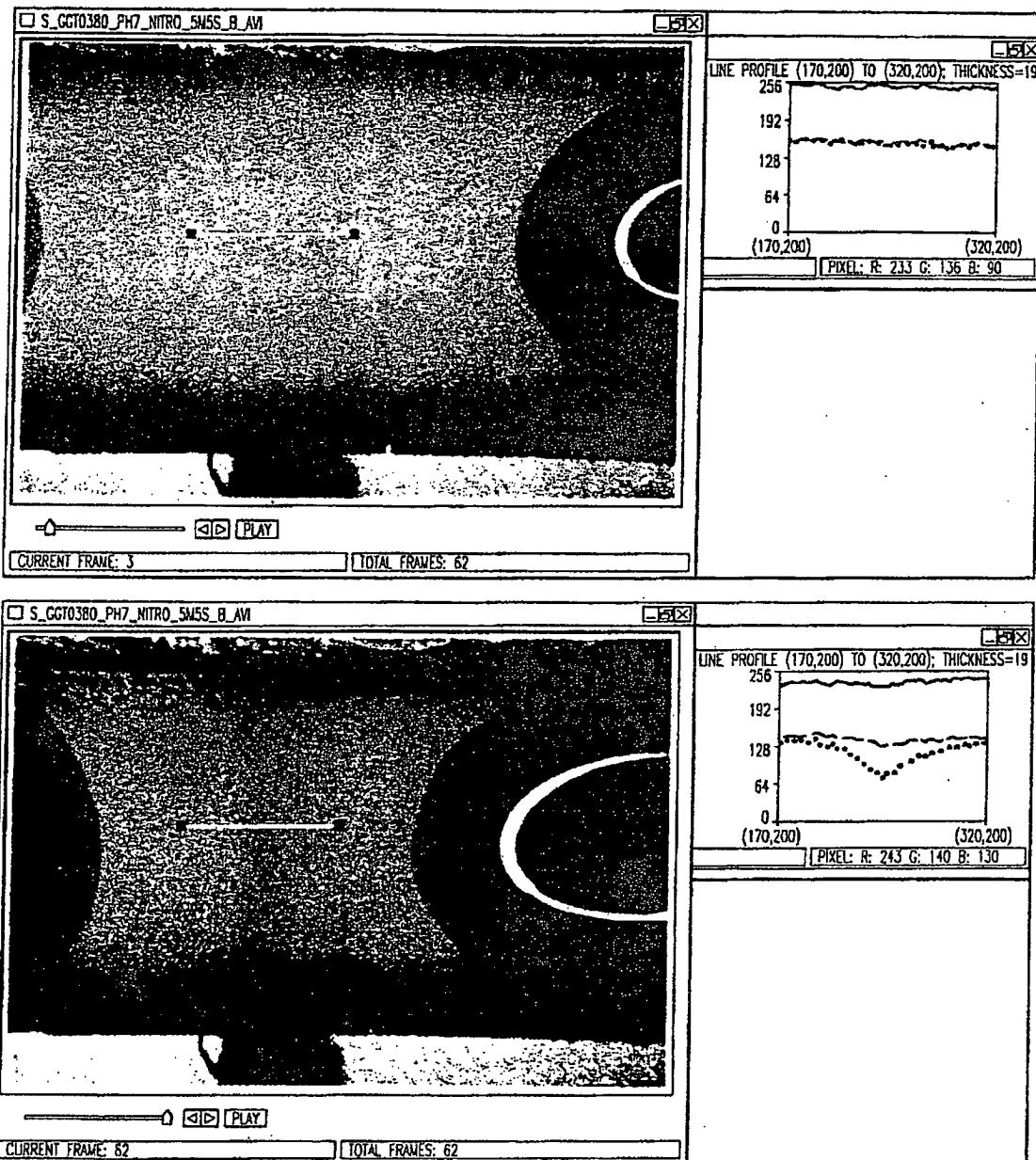


FIG. 28

AMYLASE (16.800 U/L) pH 7  
ZEIT (35 s/275 s)

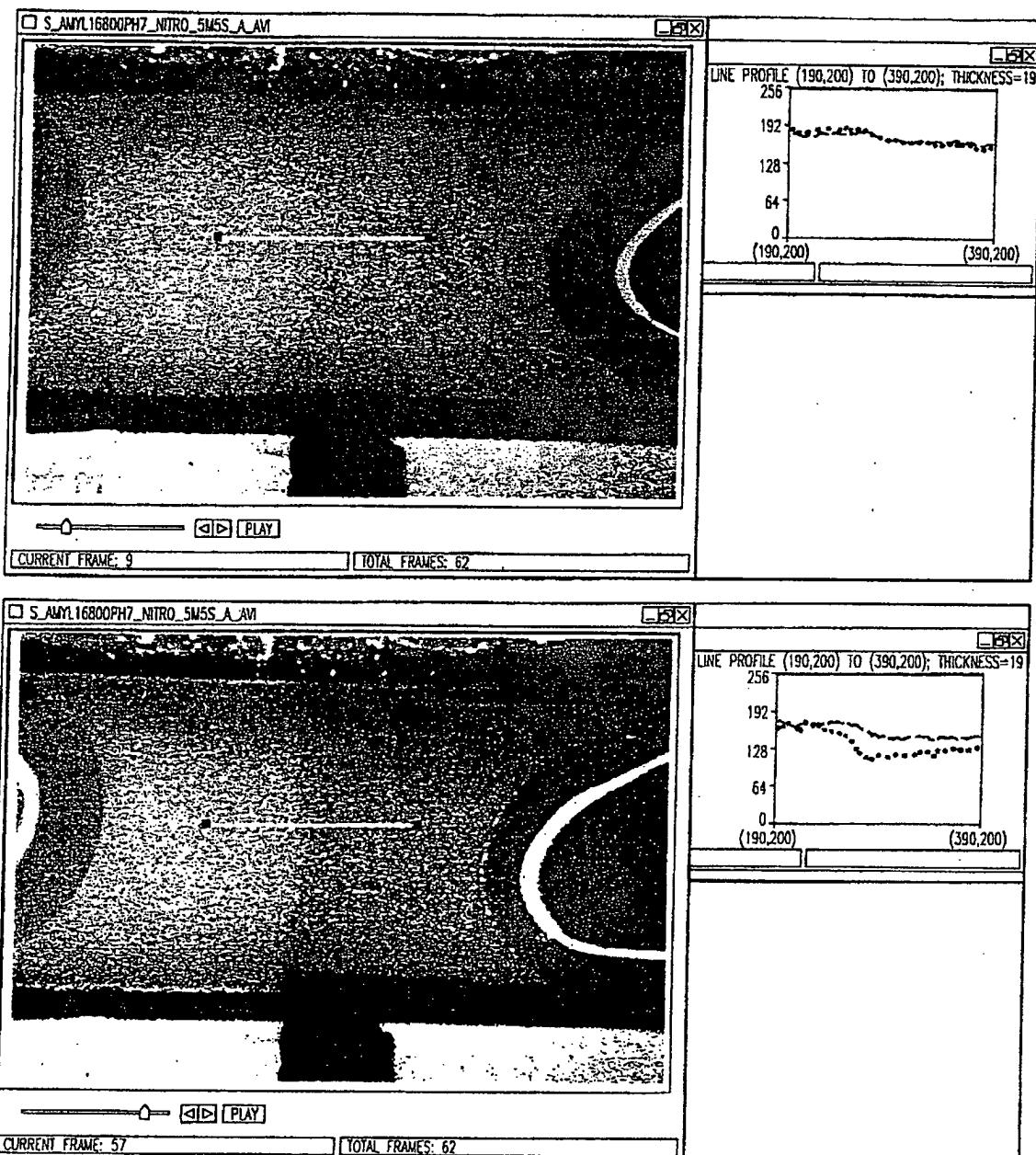


FIG. 29

CREATININ pH 7 (150 mg/dL)  
ZEIT (5 s/295 s)

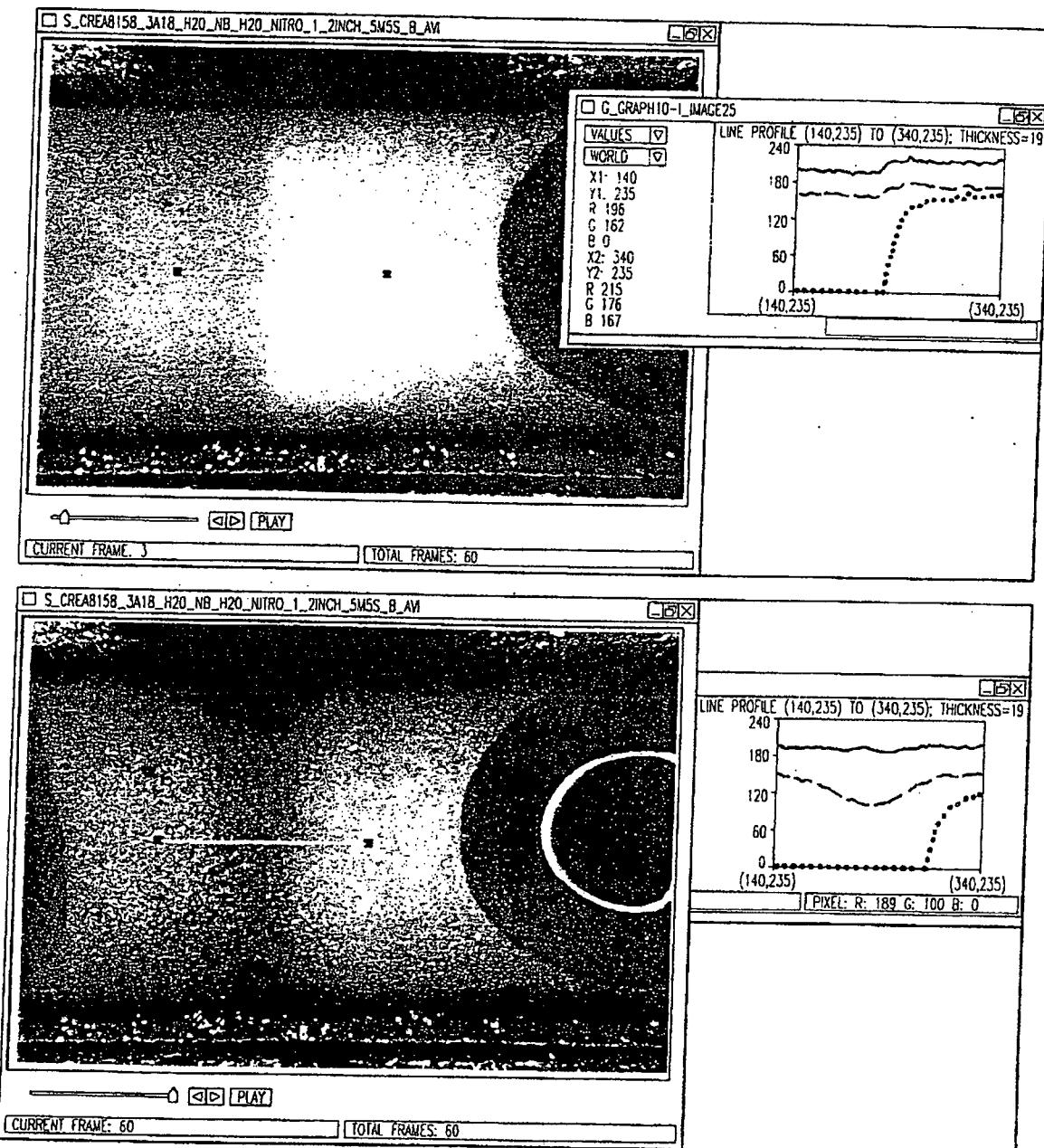


FIG. 30

CHOLESTERIN (96 mg/dL) pH 7  
ZEIT (10 S/300 s)

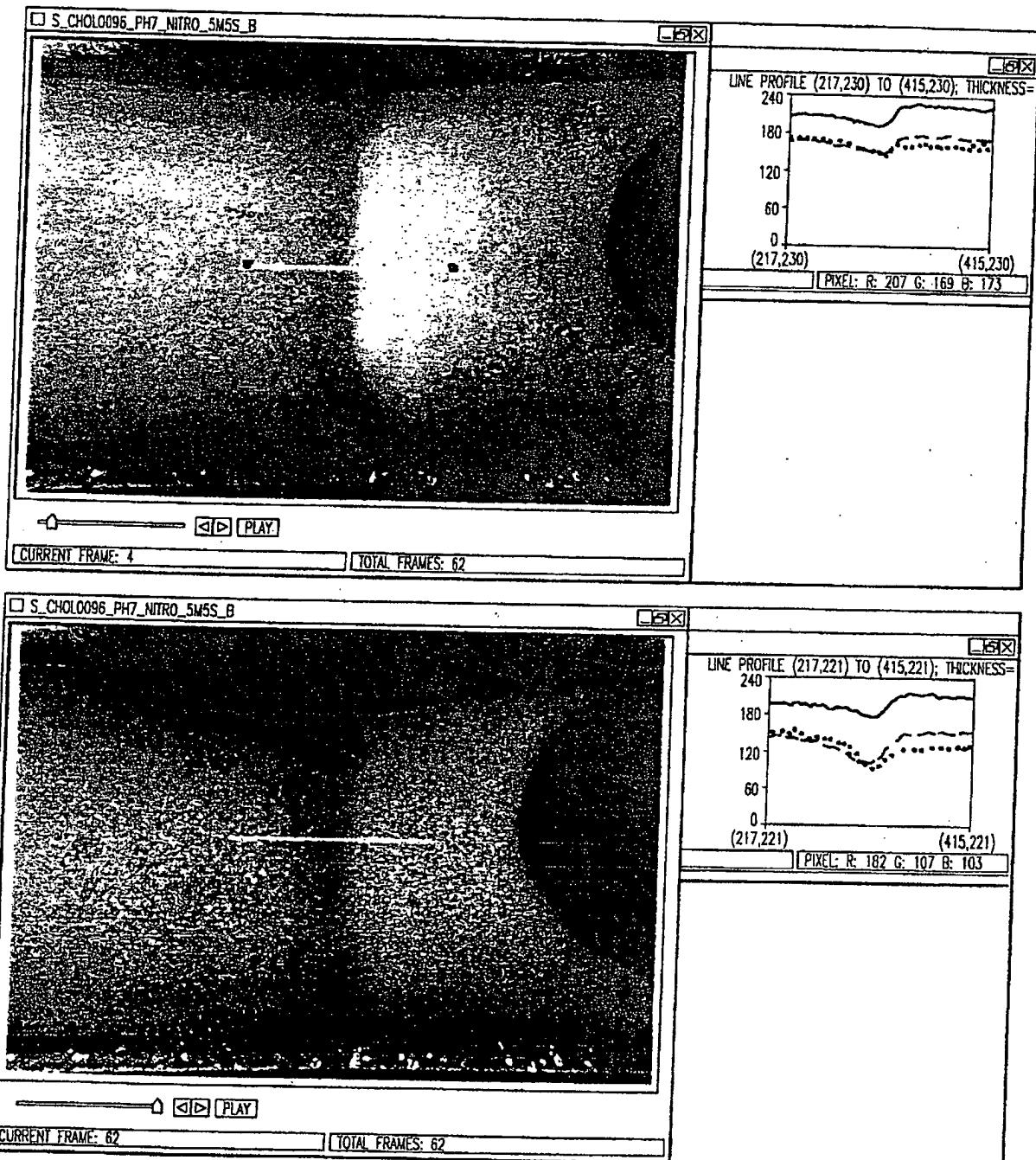


FIG. 31

GESAMTPROTEIN (6.200 mg/dL)  
ZEIT (5 s/295 s)

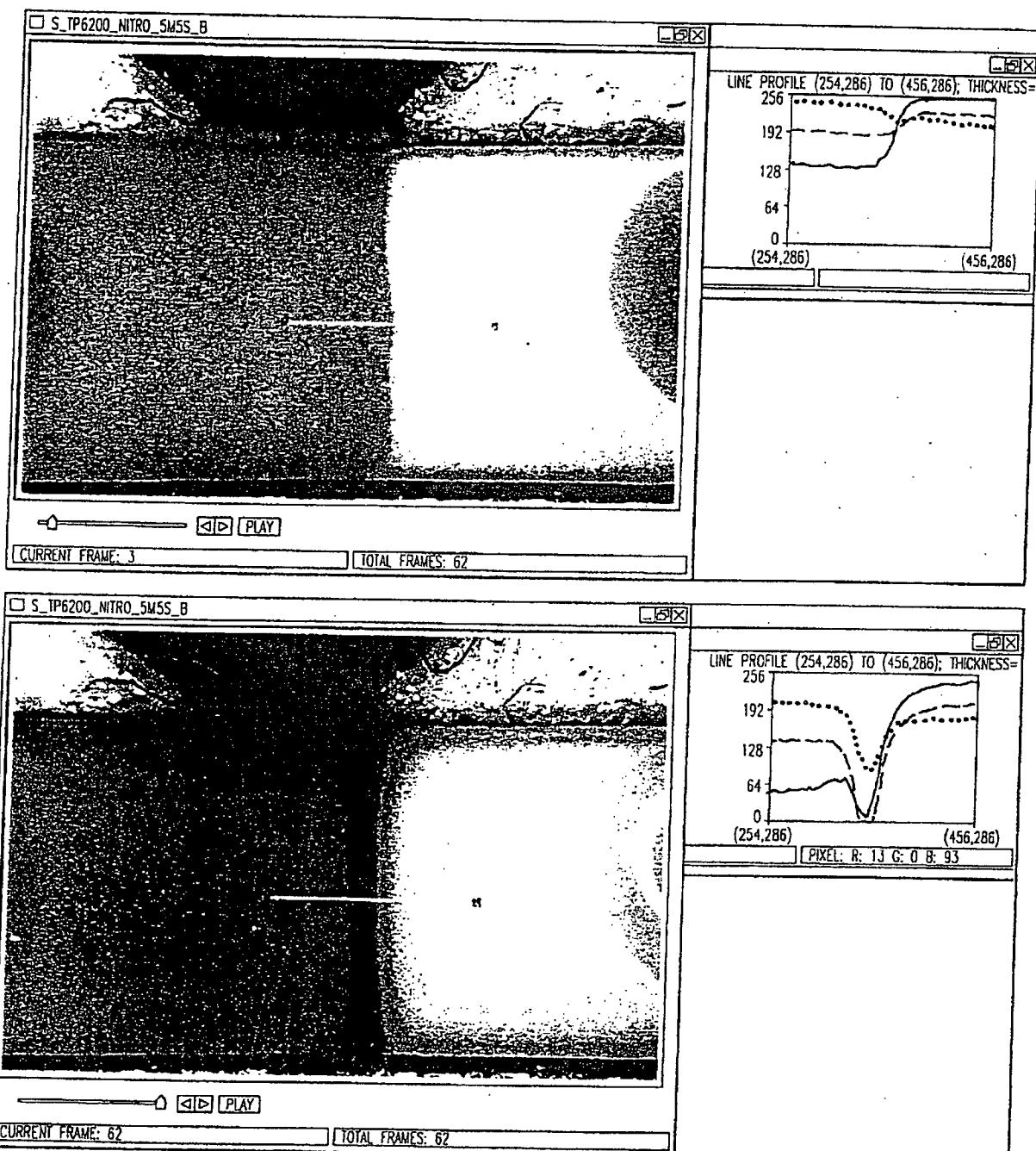


FIG.32

MAGNESIUM (4,7 mg/dL) pH 10  
ZEIT (5 s/295 s)

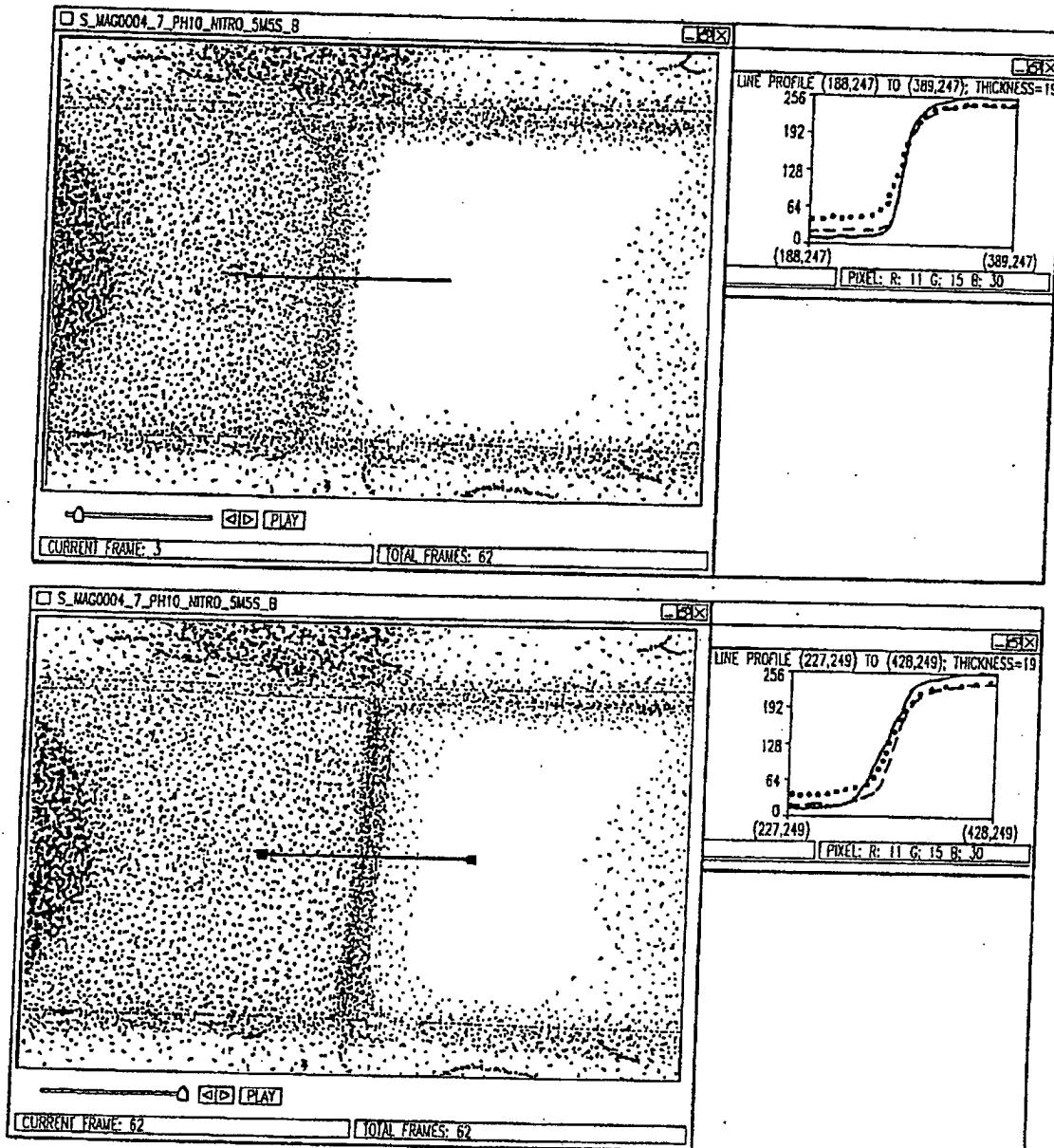


FIG. 33

ANTI-T4 - ALKALISCHE PHOSPHATASE-  
HAPTEM-ASSAY

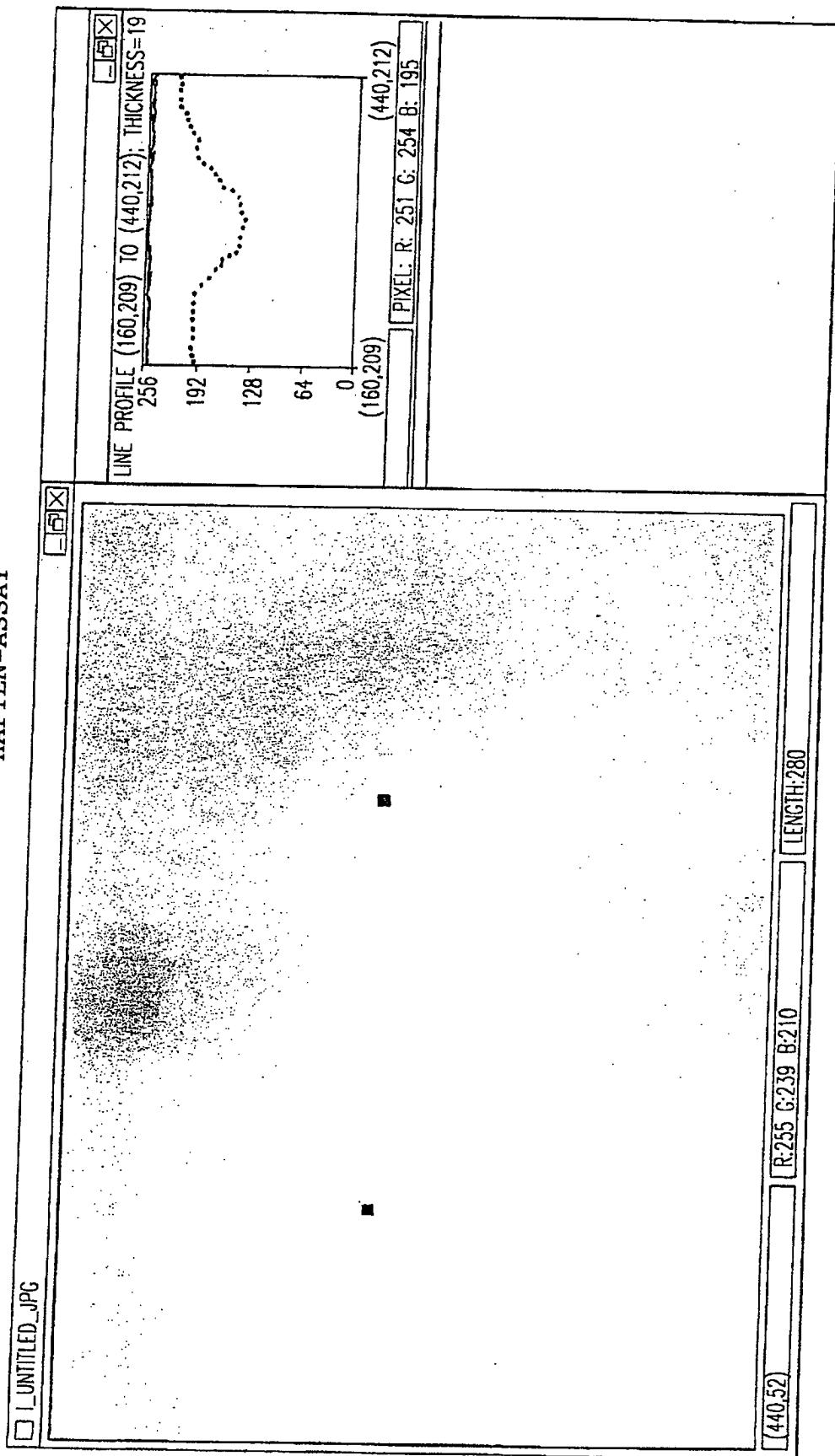


FIG. 34