



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 19 230 T2** 2009.03.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 532 448 B1**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/543** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 19 230.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US03/18058**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 736 936.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/021003**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.06.2003**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **11.03.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.05.2005**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **20.02.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.03.2009**

(30) Unionspriorität:

228837 27.08.2002 US

(73) Patentinhaber:

Kimberly-Clark Worldwide, Inc., Neenah, Wis., US

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80802 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR**

(72) Erfinder:

**SONG, Xuedong, Roswell, GA 30076, US;
KAYLOR, Rosann, Cumming, GA 30041, US**

(54) Bezeichnung: **SELBST-KALIBRIERENDES SYSTEM FÜR MAGNETISCHES BINDUNGS-VERFAHREN**

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 eingelegt, 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**Hintergrund der Erfindung**

[0001] Verschiedene analytische Verfahren und Vorrichtungen werden häufig in Untersuchungsvorrichtungen zur Bestimmung der Anwesenheit und/oder Abwesenheit von Analyten in einer Untersuchungsprobe verwendet. Zum Beispiel verwenden Immuno-Untersuchungsvorrichtungen Mechanismen des Immunsystems, wobei Antikörper als Reaktion auf die Anwesenheit von Antigenen produziert werden, die für die Organismen pathogenen oder fremd sind. Diese Antikörper und Antigene, d. h. Immuno-Reaktanten, sind in der Lage, sich aneinander zu binden, so dass ein sehr spezifischer Reaktionsmechanismus verursacht wird, der verwendet werden kann, um die Anwesenheit oder Konzentration dieses besonderen Antigens in einer biologischen Untersuchungsprobe zu ermitteln.

[0002] Es gibt mehrere bekannte Immuno-Untersuchungsvorrichtungsverfahren, die Immuno-Reaktanten verwenden, die mit einer nachweisbaren Komponente markiert sind, so dass das Analyt analytisch detektiert werden kann. Zum Beispiel schließen Untersuchungsvorrichtungen der "Sandwich-Art" typischerweise das Mischen der Untersuchungsprobe mit Antikörpern mit dem Analyt ein. Diese Antikörper sind mobil und mit einer Markierung oder Sonde, wie gefärbtem Latex, ein kolloidales Metallsalz, oder ein Radioisotop, verbunden. Diese Mischung wird dann mit einem chromatographischen Medium in Kontakt gebracht, das ein Band oder eine Zone immobilisierter Antikörper an dem Analyt enthält. Das chromatographische Medium liegt oft in Form eines Streifens vor, der einem Messstab ähnlich ist. Wenn der Komplex des Analyts und des markierten Antikörpers die Zone der immobilisierten Antikörper auf dem chromatographischen Medium erreicht, tritt eine Bindung auf, und es werden die markierten Antikörper in der Zone lokalisiert. Dieses zeigt die Anwesenheit des Analyts an. Diese Technik kann verwendet werden, um quantitative oder semi-quantitative Ergebnisse zu erhalten. Einige Beispiele für solche Untersuchungsvorrichtungen der Sandwich-Art sind in den US-Patenten der Nr. 4 168 146 von Grubb et al. und 4 366 241 von Tom et al. beschrieben.

[0003] Eine alternative Technik ist die Untersuchungsvorrichtung der "Konkurrenz-Art". In einer Untersuchungsvorrichtung der "Konkurrenz-Art" ist der Marker typischer Weise ein markiertes Analyt oder Analyt-Analogon, dass für die Bindung eines Antikörpers mit einem unmarkierten Analyt, das sich in der Untersuchungsprobe befindet, in Konkurrenz befindet. Untersuchungsvorrichtungen der Konkurrenz-Art werden in der Regel zur Detektion von Analyten wie Haptenen verwendet, wobei jedes Hapten monovalent und in der Lage ist, sich nur an ein Antikörper-Molekül zu binden. Beispiele für Immuno-Untersuchungsvorrichtungen der Konkurrenz-Art sind in den US-Patenten Nr. 4 235 601 von Deutsch, et al., 4 442 204 von Liotta und 5 208 535 von Buechler et al. beschrieben.

[0004] Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtungen sind häufig für die Trennung von biologischen Spezies (z. B. Proteine, Zellen und Mikroorganismen) aus komplexen Proben verwendet worden, denn sie lassen sich leicht durch Magnetfelder manipulieren und erfordern keine besonderen und teuren Instrumente. Auf diese Weise können magnetische Immuno-Untersuchungsvorrichtungen ein schnelles und einfaches Verfahren zur Verfügung stellen, um die Anwesenheit oder Abwesenheit der Spezies zu ermitteln. In solchen Untersuchungsvorrichtungen sind verschiedene Signal-Erzeugungsmechanismen, einschließlich der Farbe (Absorption und Reflexion), Fluoreszenz, Chemolumineszenz, Radioaktivität und Enzymen, verwendet worden.

[0005] Allerdings erfordern konventionelle Magnetische-Bindungs-Immuno-Untersuchungsvorrichtungen in der Regel jedes Mal, wenn sie benutzt werden, um quantitative Informationen für Analyte zu erhalten, Kontrollproben, um eine Kalibrationskurve zu erzeugen. Insbesondere werden bei der Analyse für die Anwesenheit oder Abwesenheit einer biologischen Spezies innerhalb einer Untersuchungsprobe mehrere Kontrollproben gleichzeitig für bekannte Mengen der Spezies in einem Versuch dahingehend getestet, die Test-Untersuchungsvorrichtung zu in etwa gleichen Bedingungen zu kalibrieren. Leider ist diese Kalibrier-Technik oft unbequem, kostspielig und umständlich für den Tester.

[0006] US 5 466 574 offenbart eine Vorrichtung für eine magnetische Trennung zur Isolierung magnetisch markierter Substanzen aus einem nicht-magnetischen Medium. Die Zielsubstanz wird mit magnetischen Partikeln in Kontakt gebracht, die einen Rezeptor zur Bindung an die Zielsubstanz besitzen.

[0007] EP 0 724 156 offenbart ein Set für immunologische Untersuchungen biologischer Substanzen, das magnetische Partikel umfasst, die sich an die Analytsubstanz binden. Das Analyt in der untersuchten Probe wird mit Hilfe einer Kalibrationskurve detektiert.

[0008] Carriere et al. beschreiben in einem Artikel, „Whole Blood Capcellia CD4/CD8 Immunoassay for Enumeration of CD4+ and CD8+ Peripheral T Lymphocytes“, Clinical Chemistry, Bd. 45:1, S. 92, 1999, ein immunoenzymatisches Verfahren, in dem die Untersuchung auf der Trennung von T-Zellen unter Verwendung einer Anti-CD2-Magnetic-Bead-Suspension basiert.

[0009] Als solches besteht derzeit ein Bedürfnis für ein exaktes Kalibrierungssystem für Untersuchungsvorrichtungen, das leicht kontrollierbar und relativ kostengünstig ist.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt eine selbst-kalibrierte Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtung gemäß Anspruch 1 zur Verfügung.

[0011] In Übereinstimmung mit einer Ausführungsform der Erfindung wird eine selbst-kalibrierte Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtung (z. B. der Sandwich-, Konkurrenz-Art, etc.) für den Nachweis der Anwesenheit oder Menge eines Analyts, das sich in einer Untersuchungsprobe befindet, offenbart. Der Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtung umfasst Detektionssonden, die dazu geeignet sind, ein Detektionssignal zu erzeugen, und magnetische Kalibrationssonden, die dazu geeignet sind, ein Kalibrationssignal zu erzeugen, wobei die Menge des Analyts in der Untersuchungsprobe der Intensität des Detektionssignals kalibriert durch die Intensität des Kalibrationssignals (z. B. direkt oder umgekehrt) proportional ist. In einigen Ausführungsformen sind die Detektionssonden, Kalibrationssonden oder Kombinationen davon mit einem bestimmten Bindungselement gepaart. Das bestimmte Bindungselement kann zum Beispiel aus der Gruppe ausgewählt werden, die aus Antigenen, Haptenen, Antikörpern und Komplexen daraus besteht.

[0012] Generell können die Detektionssonden und Kalibrationssonden aus jedem Material, das in der Lage ist, ein nachweisbares Signal zu erzeugen, gebildet werden. Zum Beispiel werden in einigen Ausführungsformen solche Sonden aus der Gruppe ausgewählt, die aus Chromogenen, Katalysatoren, fluoreszierende Verbindungen, chemolumineszenten Verbindungen, phosphoreszierenden Verbindungen, radioaktiven Substanzen, direkt visuellen Markern, Liposomen und Kombinationen davon besteht. Zum Beispiel können die Detektionssonden und Kalibrationssonden fluoreszierende Verbindungen, wie fluoreszierende Partikel, sein. In einer bestimmten Ausführungsform sind die Detektionssonden fluoreszierende nicht-magnetische Verbindungen und die Kalibrationssonden sind fluoreszierende magnetische Partikel. Falls es gewünscht ist, können die fluoreszierenden magnetischen Partikel mit einem bestimmten Bindungselement gepaart oder blockiert sein.

[0013] In Übereinstimmung mit einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren für den Nachweis der Anwesenheit oder der Menge von einem Analyt, das sich in einer Untersuchungsprobe befindet, offenbart. Das Verfahren umfasst:

- i) Bereitstellen einer Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtung, die Detektionssonden, die dazu geeignet sind, ein Detektionssignal zu erzeugen, und magnetische Kalibrationssonden, die dazu geeignet sind, ein Kalibrationssignal zu erzeugen, umfasst;
- ii) Kontaktieren einer Untersuchungsprobe, die das Analyt enthält, mit den Detektionssonden und den Kalibrationssonden;
- iii) Trennen der Detektionssonden und der Kalibrationssonden von der Untersuchungsprobe unter Verwendung einer magnetischen Einrichtung;
- iv) Anregen der getrennten Detektionssonden (in Komplexen und/oder nicht in Komplexen) und der getrennten Kalibrationssonden (in Komplexen und/oder nicht in Komplexen), wobei die Anregung die getrennten Detektionssonden dazu veranlasst, das Detektionssignal auszusenden, und die getrennten Kalibrationssonden dazu, das Kalibrationssignal auszusenden;
- v) Messen der Stärke des Detektionssignals und der Stärke des Kalibrationssignals; und
- vi) Vergleichen der Stärke des Detektionssignals mit dem Kalibrationssignal, wobei die Menge des Analyts innerhalb der Untersuchungsprobe proportional zu der Stärke des Detektionssignals ist, das durch die Stärke des Kalibrationssignals kalibriert ist.

[0014] Die getrennten Detektions- und Kalibrationssonden (in Komplexen und/oder nicht in Komplexen) sind daher in der Lage, die Anwesenheit oder die Menge eines Analyts in der Untersuchungsprobe anzuzeigen. Genauer gesagt, ist die Menge des Analyts in der Untersuchungsprobe zur Intensität des Detektionssignals kalibriert durch die Intensität des Kalibrationssignals, das durch die getrennten Kalibrationssonden (in Komplexen und/oder nicht in Komplexen) in der Detektionszone erzeugt wird, proportional, das von den getrennten Detektionssonden (in Komplexen und/oder nicht in Komplexen) in der Detektionszone erzeugt wird. Zum Beispiel ist in einer Ausführungsform die Menge des Analyts in der Untersuchungsprobe zur Intensität des Detektionssig-

nals geteilt durch die Intensität des Kalibrationssignals proportional.

[0015] Die getrennten Detektionssonden und Kalibrationssonden können gleichzeitig oder getrennt voneinander angeregt werden. Auch kann die Intensität des Detektionssignals und des Kalibrationssignals gleichzeitig oder separat gemessen werden. Weiterhin umfasst in einer Ausführungsform das Verfahren weiterhin das Erzeugen einer Kalibrationskurve durch Auftragen von der Intensität des Detektionssignals kalibriert durch die Intensität des Kalibrationssignals für eine Vielzahl von vorbestimmten Analyt-Konzentrationen.

[0016] Weitere Merkmale und Aspekte der vorliegenden Erfindung werden im Folgenden in größerer Ausführlichkeit diskutiert.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0017] Eine vollständige und ausführbare Offenlegung der vorliegenden Erfindung einschließlich der besten Ausführungsart derselben, die an den Fachmann gerichtet ist, wird in dem weiteren Verlauf der Beschreibung besonders dargelegt, die auf die angehängten Figuren Bezug nimmt, in denen:

[0018] [Fig. 1](#) eine perspektivische Ansicht einer Ausführungsform einer Untersuchungsvorrichtung der vorliegenden Erfindung ist;

[0019] [Fig. 2](#) eine grafische Darstellung des Mechanismus ist, der für eine Ausführungsform einer Sandwich-Untersuchungsvorrichtung der vorliegenden Erfindung verwendet wird;

[0020] [Fig. 3](#) eine grafische Darstellung des Mechanismus ist, der für eine andere Ausführungsform einer Sandwich-Untersuchungsvorrichtung der vorliegenden Erfindung verwendet wird;

[0021] [Fig. 4](#) eine grafische Darstellung des Mechanismus ist, der für eine Ausführungsform einer Konkurrenz-Untersuchungsvorrichtung der vorliegenden Erfindung verwendet wird;

[0022] [Fig. 5](#) eine grafische Darstellung des Mechanismus ist, der für eine andere Ausführungsform einer Konkurrenz-Untersuchungsvorrichtung der vorliegenden Erfindung verwendet wird;

[0023] [Fig. 6](#) eine grafische Darstellung für eine Ausführungsform für das kovalente Paaren eines Antikörpers und von Carboxylat-Nanopartikeln ist;

[0024] [Fig. 7](#) die Anregungs(EX)- und Emissions(EM)-Spektren einer Kalibrationssonde (C) und einer Detektionssonde (FP) in Übereinstimmung mit einer Ausführungsform der Erfindung zeigt;

[0025] [Fig. 8](#) die normierte Fluoreszenz-Intensität gegen die Menge eines luteinisierenden Hormons (LH), wie in Beispiel 1 diskutiert, zeigt;

[0026] [Fig. 9](#) die normierte Fluoreszenz-Intensität gegen die Menge eines luteinisierenden Hormons (LH), wie in Beispiel 2 diskutiert, zeigt;

[0027] [Fig. 10](#) die normierte Fluoreszenz-Intensität gegen die Menge eines C-reaktiven Proteins (CRP), wie in Beispiel 4 diskutiert, zeigt.

[0028] Wiederholte Verwendung von Bezugszeichen in der vorliegenden Beschreibung und den Zeichnungen ist dazu gedacht, gleiche oder ähnliche Merkmale oder Elemente der Erfindung dazustellen.

Detaillierte Beschreibung der repräsentativen Ausführungsformen

Definitionen

[0029] Der hier verwendete Begriff "Analyt" bezieht sich im Allgemeinen auf eine Substanz, die zu detektieren ist. Analyte können z. B. antigene Substanzen, Haptene, Antikörper und Kombinationen davon einschließen. Analyte schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Toxine, organische Verbindungen, Proteine, Peptide, Mikroorganismen, Aminosäuren, Nukleinsäuren, Hormone, Steroide, Vitamine, Drogen(einschließlich solcher, die für therapeutische Zwecke verabreicht werden, wie auch solcher, die für unerlaubte Zwecke verabreicht werden), Bakterien, Viruspartikel und Metaboliten von oder Antikörpern zu einer der oben genannten Stoffe.

Konkrete Beispiele für einige Analyte schließen ein Ferritin, Kreatin-Kinase MIB (CK-MB), Digoxin, Phenytoin; Phenobarbital; Carbamazepin; Vancomycin, Gentamycin; Theophyllin, Valproinsäure, Chinidin; luteinisierendes Hormon (LH), follikelstimulierendes Hormon (FSH); Estradiol, Progesteron; IgE-Antikörper, Vitamin B2 Mikro-Globulin; glykiertes Hämoglobin (Gly, Hb); Cortisol; Digitoxin; N-Acetylprocainamid (NAPA); Procainamid; Antikörper gegen Röteln, wie Röteln-IgG- und Röteln-IgM; Antikörper gegen Toxoplasmose, wie Toxoplasmose IgG (Toxo-IgG) und Toxoplasmose IgM (Toxo-IgM); Testosteron; Salicylates; Acetaminophen; Hepatitis-B-Virus-Oberflächen-Antigen (HBsAg); Antikörper gegen das Hepatitis-B-Kern-Antigen, wie z. B. Anti-Hepatitis-B-Kern-Antigen IgG und IgM (Anti-HBC); menschliches Immunschwächevirus 1 und 2 (HIV 1 und 2); menschliches T-Zellen-Leukämie-Virus 1 und 2 (HTLV), Hepatitis Be-Antigen (HBeAg); Antikörper gegen Hepatitis Be-Antigen (Anti-HBe); die Schilddrüse stimulierende Hormon (TSH); Thyroxin (T4); Gesamt-Trijodthyronin (T3-Gesamt); freies Trijodthyronin (T3-frei); karzinoembryonisches Antigen (CEA) und Alpha-Fetal-Protein (AFP). Missbrauchsdrogen und kontrollierte Substanzen beinhalten, sind aber nicht begrenzt darauf, Amphetamin, Methamphetamin, Barbiturate, wie Amobarbital, Secobarbital, Pentobarbital, Phenobarbital, und Aarbital; Benzodiazepine, wie Librium und Valium; Cannabinoide, wie Haschisch und Marihuana, Kokain, Fentanyl; LSD; Methaqualon; Opiate, wie Heroin, Morphin, Kodein, Hydromorphen, Hydrocodon, Methadon, Oxycodon, Oxymorphone und Opium; Phencyclidin und Propoxyhene. Andere potentielle Analyte können in dem US-Patent Nr. 4 366 241 von Tom et al. beschrieben sein.

[0030] Der hier verwendete Begriff "Untersuchungsprobe" bezieht sich im Allgemeinen auf ein Material, das im Verdacht steht, das Analyt zu enthalten. Die Untersuchungsprobe kann direkt, wie aus der Quelle erhalten, oder nach einer Vorbehandlung, um die Eigenschaft der Untersuchungsprobe zu verändern, verwendet werden. Die Untersuchungsprobe kann aus jeder biologischen Quelle, wie einer physiologischen Flüssigkeit, darunter Blut, Speichel, Augenlinsenflüssigkeit, zerebrale spinale Flüssigkeit, Schweiß, Urin, Milch, Aszites-Flüssigkeit, Raucous, Synovialflüssigkeit, Peritoneal-Flüssigkeit, Fruchtwasser oder ähnliches, abgeleitet werden. Die Untersuchungsprobe kann vor der Verwendung vorbehandelt werden, wie etwa durch die Präparation von Plasma aus Blut, dem Verdünnen viskoser Flüssigkeiten und ähnliches. Verfahren der Behandlung können die Filtration, Destillation, Konzentration, Inaktivierung von störenden Komponenten und die Zugabe von Reagenzien einschließen. Neben physiologischen Flüssigkeiten können andere flüssige Proben, wie Wasser, Nahrungsmittel und dergleichen, für das Ausführen von Umwelt- oder Nahrungsmitteluntersuchungsvorrichtungen verwendet werden. Darüber hinaus kann ein festes Material, das im Verdacht steht, das Analyt zu enthalten, als die Untersuchungsprobe verwendet werden. In einigen Fällen kann es von Vorteil sein, eine feste Untersuchungsprobe zu verändern, um ein flüssiges Medium zu bilden oder das Analyt freizugeben.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0031] Nunmehr wird im Detail Bezug auf verschiedene Ausführungsformen der Erfindung genommen, von der eines oder mehrere Beispiele im Folgenden dargelegt werden. Jedes Beispiel wird zur Erläuterung der Erfindung, nicht zur Einschränkung der Erfindung, zur Verfügung gestellt. Zum Beispiel können Merkmale, die als Teil einer Ausführungsform illustriert oder beschrieben werden, in einer anderen Ausführungsform verwendet werden, um noch eine weitere Ausführungsform zu erhalten. Somit ist es beabsichtigt, dass die vorliegende Erfindung solche Änderungen und Abweichungen, wie sie in dem Bereich der angehängten Ansprüche und ihrer Äquivalente liegen, umfasst.

[0032] Im Allgemeinen ist die Erfindung auf eine selbst-kalibrierte Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtung (z. B. Sandwich, Konkurrenz, etc.) zum Nachweis der Anwesenheit oder der Menge eines Analyts, das sich in einer Untersuchungsprobe befindet, gerichtet. Die Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtung beinhaltet Detektionssonden, die dazu in der Lage sind, ein Detektionssignal zu erzeugen (z. B. fluoreszierende nicht-magnetische Partikel) und Kalibrationssonden, die in der Lage sind, ein Kalibrationssignal zu erzeugen (z. B. fluoreszierende magnetische Partikel). Die Menge des Analyts in der Untersuchungsprobe ist (z. B. direkt oder umgekehrt) der Intensität des Detektionssignals kalibriert durch die Intensität des Kalibrationssignals proportional. Es wurde entdeckt, dass das Selbst-Kalibrierungssystem eine präzise, preiswerte und leicht kontrollierbare Methode für die Bestimmung der Gegenwart eines Analyts in einer Untersuchungsprobe zur Verfügung stellt.

[0033] Bezugnehmend auf [Fig. 1-Fig. 2](#) wird zum Beispiel eine Ausführungsform einer Durchströmungs-Sandwich-Untersuchungsvorrichtung **20**, die nach der vorliegenden Erfindung gebildet werden kann, nunmehr im Detail beschrieben. Wie es gezeigt ist, enthält die Untersuchungsvorrichtung **20** eine poröse Membran **23**, die optional durch ein starres Material **21** unterstützt wird. Im Allgemeinen kann die poröse Membran **23** aus jedem einer Vielzahl von Materialien, durch die die Untersuchungsprobe zu passieren in der Lage ist, hergestellt sein. Zum Beispiel können die Materialien, die verwendet werden, um die poröse Membran **23** zu

bilden einschließen, sind aber nicht darauf beschränkt, natürliche, synthetische oder natürlich vorkommende Materialien, die synthetisch verändert sind, wie Polysaccharide (z. B. Zellulose-Materialien wie Papier und Zellulose-Derivate, wie z. B. Zelluloseacetat und Nitrozellulose); Quarz; anorganische Materialien, wie deaktivierte Tonerde, Kieselgur, MgSO_4 oder anderen anorganische fein geteilte Materialien, die gleichförmig in einer porösen Polymermatrix dispergiert sind, mit Polymeren wie Vinylchlorid, Vinylchlorid-Propylen-Copolymer und Vinylchlorid-Vinylacetat-Copolymer; Tuchstoff, sowohl natürlich vorkommender (z. B. Baumwolle) als auch synthetischer (z. B. Nylon oder Rayon); poröse Gele, wie Quarzgel, Agarose, Dextran und Gelatine; polymere Filme, wie Polyacrylamide und dergleichen. In einer bestimmten Ausführungsform ist die poröse Membran **23** aus Nitrozellulose- und/oder Polyester-Sulfon-Materialien gebildet. Es sollte sich verstehen, dass der Begriff "Nitrozellulose" sich auf Salpetersäure-Ester der Zellulose bezieht, die möglicherweise Nitrozellulose allein oder ein gemischter Ester der Salpetersäure und anderer Säuren, wie aliphatische Karboxyl-Säuren, die von 1 bis 7 Kohlenstoffatomen aufweisen, sein kann.

[0034] Die Untersuchungsvorrichtung **20** kann auch ein Dochtwirkungs-Pad **28** enthalten. Das Dochtwirkungs-Pad **28** erhält im allgemeinen Flüssigkeit, die durch die gesamte poröse Membran **23** gewandert ist. Wie es in dem Stand der Technik bekannt ist, kann das Dochtwirkungs-Pad **28** bei der Förderung der Kapillarwirkung und Flüssigkeitsströmung durch die Membran **23** unterstützen.

[0035] Um die Detektion eines Analyts in der Untersuchungsprobe zu initiieren, kann ein Benutzer direkt die Untersuchungsprobe auf einen Teil der porösen Membran **23** anbringen, durch die sie dann zur Erreichung einer oder mehrerer Detektions- und Kalibrationszonen (siehe weiter unten) wandern kann. Alternativ kann die Untersuchungsprobe zunächst auf ein Proben-Pad (nicht abgebildet) aufgebracht werden, das sich in Flüssigkeitsverbindung mit der porösen Membran **23** befindet. Einige geeignete Materialien, die verwendet werden können, um das Proben-Pad zu bilden, schließen ein, sind aber nicht darauf beschränkt, Nitrozellulose, Zellstoff, poröse Polyethylen-Pads und Glasfaser-Filterpapier. Falls gewünscht, kann das Proben-Pad auch eines oder mehrere Vorbehandlungs-Untersuchungsvorrichtungs-Reagenzien, die entweder diffus oder nicht-diffus beigefügt werden, enthalten.

[0036] In der abgebildeten Ausführungsform wandert die Untersuchungsprobe von dem Proben-Pad (nicht abgebildet) zu einem gepaarten Pad **22**, das sich in Verbindung mit einem Ende des Proben-Pads befindet. Das gepaarte Pad **22** besteht aus einem Material, durch das die Untersuchungsprobe zu passieren in der Lage ist. Zum Beispiel ist in einer Ausführungsform das gepaarte Pad **22** aus Glasfasern gebildet. Obwohl nur ein gepaartes Pad **22** gezeigt, sollte es sich verstehen, dass in der vorliegenden Erfindung auch andere gepaarte Pads verwendet werden können.

[0037] Zur Erleichterung der Detektion der Anwesenheit oder Abwesenheit eines Analyts in der Untersuchungsprobe können verschiedene Detektionssonden **41** auf das gepaarte Pad **22** aufgebracht werden. Während sie sich auf dem gepaarten Pad **22** befinden, bleiben diese Sonden **41** für die Bindung mit dem Analyt zur Verfügung, wenn es von dem Proben-Pad durch das gepaarte Pad **22** passiert. Nach der Bindung mit dem Analyt können die Sonden **41** später dazu dienen, die Anwesenheit oder Abwesenheit des Analyts zu identifizieren. Die Detektionssonden können sowohl für die Detektion als auch die Kalibrierung der Vorrichtung **20** verwendet werden. In alternative Ausführungsformen können allerdings getrennte Kalibrationssonden **43** ebenfalls auf das gepaarte Pad **22** für die Verwendung in Verbindung mit den Detektionssonden **41** verbracht werden, um die gleichzeitige Kalibrierung und Detektion zu erleichtern, wodurch Ungenauigkeiten, die durch konventionelle Untersuchungsvorrichtung-Kalibrations-Systeme oftmals erzeugt werden, eliminiert werden. Es sollte sich jedoch verstehen, dass die Detektionssonden **41** und/oder die Kalibrationssonden **43** zusammen oder getrennt voneinander an jedem Ort der Vorrichtung **20** verwendet werden können, und dass sie nicht auf das gepaarte Pad **22** verbracht werden müssen. Darüber hinaus sollte es auch verstanden werden, dass die Detektionssonden **41** und/oder Kalibrationssonden **43** auf dasselbe oder unterschiedliche gepaarte Pads verbracht werden können.

[0038] Jeder Stoff der im Allgemeinen in der Lage ist, ein Signal zu erzeugen, das visuell oder durch eine instrumentelle Vorrichtung nachweisbar ist, kann für die Detektionssonden **41** und/oder Kalibrationssonden **43** verwendet werden. Verschiedene geeignete Stoffe können Chromogene; Katalysatoren; fluoreszierenden Verbindungen; chemolumineszente Verbindungen; phosphoreszierenden Verbindungen, radioaktive Substanzen; direkt visuelle Marker, einschließlich der kolloidalen Metalle (z. B. Gold) und nicht-metallische Partikel, Farbstoffe, Enzyme oder Substrate oder organische Polymer-Latex-Partikel; Liposome oder andere Vesikel, die signalerzeugende Substanzen enthalten, u. ä. einschließen. Zum Beispiel sind einige Enzyme, die für den Einsatz als Sonden geeignet sind, in dem US-Patent Nr. 4 275 149 von Litman et al. offenbart. Ein Beispiel für ein Enzym/Substrat-System ist das alkalische Phosphatase-Enzym und das Substrat Nitro-Blau-Tetrazoli-

um-5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-Phosphat oder Derivative davon oder Analoge dazu, oder das Substrat 4-Methylbelliferyl-Phosphat. Andere geeignete Sonden können in dem US-Patent Nr. 5 670 381 von Jou et al. und 5 252 459 von Tarcha et al. beschrieben sein.

[0039] In einigen Ausführungsformen können die Detektionssonden **41** und/oder Kalibrationssonden **43** eine fluoreszierende Verbindung, die ein erkennbares Signal erzeugt, enthalten. Die fluoreszierenden Verbindungen können fluoreszierende Moleküle, Polymere, Dendrimere, Partikel und dergleichen sein. Einige Beispiele für geeignete fluoreszierende Moleküle schließen zum Beispiel ein, sind aber nicht darauf beschränkt, Fluorescein, Europium-Chelat, Phycobiliprotein, Rhodamin und ihre Derivate und Analoga. Darüber hinaus schließen einige kommerziell verfügbar Beispiele von geeigneten fluoreszierenden Partikel fluoreszierende Karboxylat-Mikrosphären ein, die von Molecular Probes, Inc. unter dem Handelsnamen "FluoSphere" (Red 580/605) und "TransfluoSphere" (543/620) vertrieben werden, wie auch "Texas Red" und 5- und 6-Karboxytetramethylrhodamine, die ebenso von Molecular Probes, Inc. vertrieben werden, ein.

[0040] Unabhängig von der verwendeten Technik, die angewandt wird, die Sonde mit einer Signalerzeugungsfähigkeit zu versehen, es ist in der Regel erwünscht, dass die Detektionssonden **41** und/oder die Kalibrationssonden **43** magnetisch reagierende Sonden sind. Im Allgemeinen wird ein Material als "magnetisch reagierend" oder "magnetisch" betrachtet, wenn es durch die Anwendung von einem Magnetfeld beeinflusst wird, zum Beispiel, wenn es angezogen wird oder abgestoßen wird oder eine nachweisbare magnetische Suszeptibilität oder Induktion aufweist. Beispielsweise schließen einige Beispiele von geeigneten magnetisch reagierenden Materialien, die verwendet werden können, um magnetische Eigenschaften einer Untersuchungssonde zu vermitteln, ein, sind aber nicht beschränkt auf, paramagnetische Materialien, superparamagnetische Materialien, ferromagnetische Materialien, fernmagnetische Materialien und metamagnetische Materialien. Konkrete Beispiele sind Metalle, wie Eisen, Nickel, Kobalt, Chrom, Mangan und dergleichen; Lanthanide Elemente, wie Neodym, Erbium und dergleichen; Legierungen, wie magnetische Legierungen aus Aluminium, Nickel, Kobalt, Kupfer und dergleichen; Oxide, wie Eisenoxid (Fe_3O_4), Eisenoxid (Fe_2O_3), Chromoxid (CrO_2), Kobaltoxid (CoO), Nickeloxid (NiO_2), Manganoxid (Mn_2O_3) und dergleichen; Verbundmaterialien wie Ferrite u. ä. und feste Lösungen, wie Magnetit mit Eisenoxid und dergleichen.

[0041] In einigen Ausführungsformen sind die Detektionssonden **41** und/oder die Kalibrationssonden **43** fluoreszierend und magnetisch. Fluoreszierende magnetische Sonden sind allgemein in dem Stand der Technik wohl bekannt und schließen oft eine magnetisch reagierende Komponente und eine fluoreszierende Komponente ein. In einigen Ausführungsformen können zum Beispiel eine oder mehrere Fluoreszenzfarbstoffe den magnetischen Partikeln zugefügt werden, um die Sonden auszubilden, während in anderen Ausführungsformen fluoreszierende(r) Farbstoff(e) auf nicht-magnetische Partikeln angewendet werden können, die in Verbindung mit magnetischen Partikeln stehen. Einige Beispiele von geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen schließen ein, sind aber nicht darauf beschränkt, monomethine Farbstoffe, trimethine Farbstoffe, pentamethine Farbstoffe, Chinolin-Farbstoffe, Quadratsäure-Farbstoffe u. a. Die monomethinen Farbstoffe, die Pyridines sind, weisen in der Regel eine blaue oder blau-grüne Fluoreszenz-Emission auf, während Quinoline in der Regel eine grün oder gelb-grüne Fluoreszenz-Emissionen besitzen. Die trimethinen Farbstoffe sind deutlich gegenüber roten Wellenlängen verschoben, während die pentamethinen Farbstoffe noch weiter verschoben sind, und sie oft eine Infrarot-Fluoreszenz-Emission zeigen. Konkrete Beispiele für solche Fluoreszenzfarbstoffe schließen ein, sind aber nicht darauf beschränkt, Phthalocyanines, 2,3-Naphthalocyanines, Quadrat- und Croton-Säure-Derivate. Weitere Beispiele für geeignete fluoreszierende magnetische Partikel werden angenommenermaßen in den US-Patent Nr. 4 731 337 von Luotola et al. und 6 268 222 von Chandler et al. beschrieben.

[0042] Wenn die Detektionssonden **41** und/oder die Kalibrationssonden **43** Partikel sind, wie es oben beschrieben wurde, kann der mittlere Durchmesser der Partikel-Sonden grundsätzlich wie gewünscht in Abhängigkeit von Faktoren, wie der Art der Partikel, die ausgewählt wird, die Porengröße der Membran und die Zusammensetzung der Membran variieren. Zum Beispiel kann in einigen Ausführungsformen der mittlere Durchmesser der Partikel-Sonden von etwa 0,01 Mikron bis etwa 1000 Mikron reichen, in einigen Ausführungsformen von etwa 0,01 Mikron bis etwa 100 Mikrometer, und in einigen Ausführungsformen von etwa 0,01 Mikron bis etwa 10 Mikrometer. In einer bestimmten Ausführungsform weisen die Partikel-Sonden einen mittleren Durchmesser von etwa 1 bis etwa 2 Mikrometer auf. Generell sind die Partikel im wesentlichen von Kugelgestalt, obwohl andere Formen, einschließlich, aber nicht beschränkt darauf, Platten, Stäbe, Stangen, unregelmäßige Formen, etc. für den Einsatz in der vorliegenden Erfindung geeignet sind. Wie es von den Fachleuten in dem Gebiet der Technik erkannt werden wird, kann die Zusammensetzung, Form, Größe und/oder Dichte der Partikel stark variieren.

[0043] Die Detektionssonden **41** und/oder die Kalibrationssonden **43** können in der Lage sein, (kovalent oder

nicht-kovalent) das Analyt zu binden oder physikalisch zu adsorbieren. Allerdings ist es oft gewünscht, die Sonden auf eine Weise zu verändern, so dass sie leichter dazu in der Lage sind, sich an das Analyt zu binden. In solchen Fällen, können die Detektionssonden **41** und/oder Kalibrationssonden **43** durch bestimmte spezifische Bindungselemente **90a** und/oder **90b** modifiziert werden, die an ihnen angebracht werden, um Sondenpaare zu bilden.

[0044] Spezifische Bindungselemente beziehen sich im Allgemeinen auf ein Element eines bestimmten Bindungspaares, das heißt zwei verschiedene Moleküle, wobei eines der Moleküle chemisch und/oder physikalisch an das zweite Molekül bindet. Beispielsweise können immunoreaktive bestimmte Bindungselemente Antigene, Haptene, Aptamere, Antikörper und Komplexe davon, einschließlich derjenigen, die durch rekombinante DNA-Verfahren oder Peptid-Synthese gebildet werden, einschließen. Ein Antikörper kann ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, ein Rekombinant-Protein oder eine Mischung oder Fragment (Mischungen oder Fragmente) davon sowie eine Mischung aus einem Antikörper und anderen bestimmten Bindungselementen sein. Die Einzelheiten der Präparation solcher Antikörper und ihre Eignung für den Einsatz als spezifische Bindungselemente sind den Fachleuten auf dem Gebiet der Technik wohl bekannt.

[0045] Andere häufige spezifische Bindungspaare schließen ein, sind aber nicht darauf beschränkt, Biotin und Avidin, Kohlenwasserstoffe und Lectine, komplementäre Nukleotid-Sequenzen (einschließlich Sonden- und Einfangs-Nukleinsäure-Sequenzen, die in DNA-Hybridisierungs-Untersuchungsvorrichtungen zur Detektion von einer Ziel-Nukleinsäure-Sequenz verwendet werden), komplementäre Peptid-Sequenzen einschließlich derjenigen, die durch rekombinante Methoden gebildet werden, Effektor- und Rezeptor-Moleküle, Hormon und Hormon bindende Proteine, Enzyme-Kofaktoren und Enzyme, Enzymhemmstoffe und Enzyme, und dergleichen. Darüber hinaus können spezifische Bindungspaare Elemente einschließen, die Analoga des ursprünglichen spezifischen Bindungselements sind. Zum Beispiel kann ein Derivat oder Fragment des Analyts, d. h. ein Analyt-Analogon, verwendet werden, sofern es mindestens ein Epitop mit dem Analyt gemeinsam hat.

[0046] Die bestimmten Bindungselemente **90a** und/oder **90b** können in der Regel an die Sonden **41** und/oder **43** unter Verwendung einer beliebigen einer Vielzahl von bekannten Techniken befestigt werden. Zum Beispiel kann eine kovalente Bindung der spezifischen Bindungselemente **90a** und/oder **90b** an die Sonden **41** und/oder **43** (z. B. Mikropartikel) unter Verwendung von Karbon, Amino-, Aldehyd, Bromacetyl, Iodacetyl, Thiol, Epoxid und anderen reaktiven oder verknüpfenden funktionellen Gruppen sowie residuale freie Radikale und radikale Kationen, durch die eine Protein-Kopplungsreaktion erreicht werden kann, erhalten werden. Eine Oberflächenfunktionsgruppe kann ebenso als Co-Monomer funktionalisiert werden, weil die Oberfläche der Mikropartikel eine relativ hohe Oberflächenkonzentration an polaren Gruppen enthalten können. Darüber hinaus sind, obwohl Mikropartikelsonden oftmals nach der Synthese funktionalisiert werden, in bestimmten Fällen, wie bei Polythiophenol, die Mikropartikel ohne die Notwendigkeit für eine weitere Veränderung zu einer direkten kovalenten Bindung mit einem Protein in der Lage. Zum Beispiel wird unter Bezugnahme auf [Fig. 6](#) eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung für das kovalente Paaren einer Sonde zeigt. Wie gezeigt, ist der erste Schritt der Paarung die Aktivierung von Karbongruppen auf der Oberfläche der Sonde unter Verwendung von Carbodiimid. Im zweiten Schritt lässt man die aktivierten Karbongruppen mit einer Aminogruppe eines Antikörpers reagieren, um eine Amidbindung zu bilden. Die Aktivierung und/oder Antikörper-Kopplung kann in einem Puffer, wie Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS) (z. B. pH-Wert von 7,2) oder 2-(N-Morpholino)Ethan-Sulfonsäure (MES) (z. B. pH-Wert von 5,3) auftreten. Wie dargestellt, können die sich daraus ergebenden Sonden dann zum Beispiel mit Ethanolamin geblockt werden, um die Sonde zu paaren. Neben der kovalenten Bindung können auch andere Befestigungstechniken, wie z. B. Adsorption, in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0047] Bezugnehmend wiederum auf [Fig. 1–Fig. 2](#) kann eine Untersuchungsprobe, die ein Analyt enthält, zunächst auf das Proben-Pad verbracht werden. Von dem Proben-Pad kann die Untersuchungsprobe dann auf das gepaarte Pad **22** wandern, auf dem sich das Analyt mit den Detektionssonden **41** und/oder den Kalibrationssonden **43** mischt. Abhängig von der Art der ausgewählten Sonden kann sich das Analyt mit den Detektionssonden **41** und/oder den Kalibrationssonden **43** binden, um Komplexe zu binden (siehe [Fig. 2](#)). Zum Beispiel wird in einer Ausführungsform eine Untersuchungsprobe, die ein Analyt enthält, gemischt mit (1) fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln **41**, die mit einem ersten Bindungselement **90a** gepaart sind und (2) fluoreszierenden magnetischen Partikeln **43**, die mit einem zweiten Bindungselement **90b** gepaart sind. In einem solchen Fall bildet das Analyt Sandwich-Komplexe **49** mit den fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln **41** und den fluoreszierenden magnetischen Partikeln **43**. Außerdem können, weil das gepaarte Pad **22** sich in Flüssigkeitsverbindung mit der porösen Membran **23** befindet, die Komplexe **49** von dem gepaarten Pad **22** zu einer Detektionszone **31** wandern, die sich auf der porösen Membran **23** befindet.

[0048] An der Detektionszone **31** werden die Komplexe **49** und jegliche ungebundenen gepaarten, fluoreszierenden magnetischen Partikel **43** dann durch eine magnetische Einrichtung **60** erfasst und von dem Rest der Untersuchungsprobe mit konventionellen Techniken getrennt. Ein Magnetfeld-Generator kann zum Beispiel verwendet werden, um ein Magnetfeld zu erzeugen, das eine Reaktion von den magnetisch reagierenden Sonden auslöst. Geeignete Magnetfeld-Generatoren schließen Permanentmagneten und Elektromagnete ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Der magnetische Trennungsvorgang schließt typischerweise das Mischen der Untersuchungsprobe mit den magnetischen Partikeln in einem flüssigen Medium, um das Analyt durch eine Affinitätsreaktion zu binden, und dann die Trennung der ungebundenen magnetischen Partikel und Analytkomplexe aus dem Untersuchungsprobenmedium durch die Anwendung eines Magnetfeldes ein. Die meisten, wenn nicht alle der magnetischen Partikel, mit Ausnahme derjenigen, die kolloidale Partikel sind, setzen sich mit der Zeit ab. Daher kann das flüssige Medium agitiert werden, so dass es die suspendierten Partikel für eine ausreichend lange Zeit hält, um es zu ermöglichen, dass die Bioaffinitäts-Bindungsreaktion auftritt. Beispiele für bekannte Agitationsverfahren schließen ein Schütteln, Wirbeln, Schaukeln, Rotation, oder ähnliche Manipulationen eines teilweise gefüllten Behälters. Einige Beispiele für kommerziell verfügbare geeignete Magnetrenneinrichtungen schließen die Dynal MPC-Serien von Trenneinrichtungen ein, die von Dynal, Inc., Lake Success, New York, hergestellt werden, die einen Permanentmagnet verwenden, der sich außerhalb eines Behälters befindet, der ein Testmedium enthält, und der lediglich zu der Trennung führt. Mischen der magnetischen Partikel in dem Test-Medium für die Affinität-Bindungsreaktion erfolgt getrennt. Darüber hinaus können andere Methoden zum Erfassen von magnetischen Partikeln in den US-Patenten Nr. 5 200 084 von Liberti et al.; 5 647 994 von Tuunanen et al.; 5 795 470 Wang et al. und 6 033 574 von Siddiqi beschrieben sein.

[0049] Sobald erfasst, kann das Fluoreszenz-Signal der fluoreszierenden magnetischen Partikel **43**, in Komplexen und nicht in Komplexen, und der Komplexe **49** mit konventionellen Techniken gemessen werden. Zum Beispiel können in einer Ausführungsform die Partikel **43** und Komplexe **49** mit derselben externen Quelle angeregt werden. In dieser Ausführungsform liefert die Quelle Strahlung mit einer Anregungswellenlänge, wodurch die Partikel **43** dazu veranlasst werden, Licht bei einer Wellenlänge zu emittieren, die von der Wellenlänge verschieden ist, die von den Komplexen **49** emittiert wird. Dieses ermöglicht es, dass die Anwesenheit der Komplexe **49** und Partikel **41** separat gemessen werden können. Alternativ können die Partikel **43** und Komplexe **49** auch separat unter Verwendung separater externer Quellen gemessen werden.

[0050] Im Allgemeinen ist Fluoreszenz das Ergebnis eines Drei-Stufen-Prozess, der in bestimmten fluoreszierenden Verbindungen auftritt. In der ersten Phase wird Energie von einer externen Quelle, wie z. B. einer Glühlampe oder einem Laser, zugeführt und von der fluoreszierenden Verbindung absorbiert, wodurch ein angeregter elektronischer Singlet-Zustand erzeugt wird. In der zweiten Phase existiert der angeregte Zustand für eine begrenzte Zeit, während der die fluoreszierende Verbindung konformen Änderungen unterzogen wird und sie auch einer Vielzahl von möglichen Interaktionen mit ihrer molekularen Umgebung unterliegt. Während dieser Zeit wird die Energie des angeregten Zustands teilweise dissipiert, woraus sich ein relaxierter Zustand ergibt, aus dem die Fluoreszenz-Emission stammt. Die dritte Phase ist die Phase der Fluoreszenz-Emission, in welcher Energie emittiert wird, wobei die fluoreszierende Verbindung in ihren Grundzustand zurückkehrt. Die abgestrahlte Energie ist niedriger als ihre Anregungsenergie (Licht oder Laser) und damit von einer längeren Wellenlänge. Diese Verschiebung oder dieser Unterschied in der Energie oder Wellenlänge erlaubt es, dass die Emissionsenergie detektiert und von der Anregungsenergie isoliert wird.

[0051] Die Fluoreszenz-Detektion nutzt in der Regel eine Wellenlängenfilterung, um die Emissionsphotonen von den Anregungsphotonen zu isolieren, und einen Detektor, der die Emissionsphotonen registriert und eine Ausgabe, in der Regel als ein elektrisches Signal oder eine fotografisches Bild, erzeugt, die aufgezeichnet werden kann. Es gibt im Allgemeinen vier bekannte Typen von Detektoren: Spektrofluorometer und Mikroplatten-Leser; Fluoreszenz-Mikroskope; Fluoreszenz-Scanner und Fluss-Cytometer. Ein geeigneter Fluoreszenz-Detektor für die Verwendung mit der vorliegenden Erfindung ist ein FluoroLog III Spektrofluorometer, das von SPEX Industries, Inc., Edison, NJ, vertrieben wird.

[0052] Wenn auch nicht erforderlicher Weise schließen die Kriterien von besonders gewünschten Detektions- und Kalibrationssonden-Paaren ein: (1) geringe oder keine Überlappung entweder der Absorptionsspektren oder der Fluoreszenz-Spektren, so dass Emissionsintensitäten separat gemessen werden können, (2) keinen signifikanten Fluoreszenz-Energie-Übergang zwischen den Detektions- und die Kalibrationssonden, wenn sie in große Nähe zueinander gebracht werden, so dass sie unabhängig emittieren; und (3) eine relativ große Emissions-Wellenlänge (z. B. mehr als etwa 600 nm), so dass die Autofluoreszenz von biologischen Flüssigkeiten eine minimale Auswirkung auf die Fluoreszenz-Messung hat. [Fig. 7](#) veranschaulicht zum Beispiel eine beispielhafte Kalibrationssonde und Detektionssonde, die Anregungsspektren mit geringer Überlappung besitzen, so dass sie unabhängig angeregt werden können.

[0053] Weiterhin kann auch, wenn es gewünscht ist, eine Technik in der vorliegenden Erfindung genutzt werden, die als "zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion" bekannt ist. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion ist dazu entworfen, Hintergrundsignale aus der Emissionsquelle oder von Streuprozessen (die aus der Streuung der Anregungsstrahlung resultieren) unter Ausnutzung der Fluoreszenz-Eigenschaften von bestimmten fluoreszierenden Materialien, wie lanthaniden Chelaten von Europium (Eu (III)) und Terbium (Tb (III)), zu verringern. Solche Chelate können nach der Anregung der Chelate in wesentlich kürzeren Wellenlängen eine stark rot-verschoben, schmalbandige, langlebige Emission zeigen. Normalerweise verarbeitet das Chelat ein starkes UV-Absorptionsband durch ein Chromophor, das sich in der Nähe des Lanthanids in dem Molekül befindet. Nach der Licht-Absorption durch das Chromophor kann die Anregungsenergie von dem angeregten Chromophor an das Lanthanid übertragen werden. Diesem folgt eine charakteristische Fluoreszenz-Emission des Lanthanids. Der Einsatz von einer gepulsten Anregung und einer zeitbeschränkten Detektion kombiniert mit Schmalband-Emissions-Filter ermöglicht die spezifische Detektion der Fluoreszenz von lediglich dem Lanthanid-Chelat und der Zurückweisung der Emission von anderen Arten, die in der Stichprobe vorhanden sind und die in der Regel eine kürzere Lebensdauer haben oder eine kürzere Emissions-Wellenlänge aufweisen. Andere zeitaufgelöste Techniken für die Messung der Fluoreszenz sind in den US-Patenten Nr. 5 585 279 von Davidson und 5 637 509 von Hemmila et al. beschrieben.

[0054] Unabhängig von der verwendeten Technik, die für die Messung der Fluoreszenz verwendet wird, kann die absolute Menge des Analyts durch einen Vergleich des Fluoreszenz-Signals der erfassten, fluoreszierende nicht-magnetischen Partikel **41** mit den erfassten, fluoreszierenden magnetischen Partikeln **43** festgestellt werden. Die Fluoreszenz-Intensität der erfassten, fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikel **41**, I_s , kann mit der Fluoreszenz-Intensität der erfassten, fluoreszierenden magnetischen Partikel **43**, I_c , verglichen werden. Die Gesamtmenge der erfassten fluoreszierenden magnetischen Partikel **43** ist im Voraus bestimmt und bekannt und kann somit für Kalibrationszwecke verwendet werden. Zum Beispiel ist in einer Ausführungsform die Menge des Analyts direkt zu dem Verhältnis von I_s zu I_c proportional. Auf der Grundlage des Intensitätsbereichs, in den die Detektionszone **31** fällt, kann der allgemeine Konzentrationsbereich für das Analyt bestimmt werden. Als Folge können die Kalibrierung und das Testen der Proben unter ungefähr den gleichen Bedingungen zur gleichen Zeit ausgeführt werden, wodurch zuverlässige quantitative oder semi-quantitative Ergebnisse mit erhöhter Empfindlichkeit zur Verfügung gestellt werden.

[0055] Falls es gewünscht ist, kann das Verhältnis von I_s zu I_c gegenüber der Analyt-Konzentration für eine Reihe von bekannten Analyt-Konzentrationen aufgetragen werden, um eine Kalibrationskurve zu erzeugen. Um die Menge eines Analyts in einer unbekannten Untersuchungsprobe zu bestimmen, kann sodann gemäß der Kalibrierkurve das Signalverhältnis zu der Analyt-Konzentration konvertiert werden. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass die Erfassungseffizienz der fluoreszierenden magnetischen Partikel in Komplexen und außerhalb von Komplexen in der Regel für eine bestimmte Untersuchungsprobe die gleiche ist. Dem gemäß wird nicht angenommen, dass die Unterschiede in der Erfassungseffizienz die Ergebnisse von Untersuchungsprobe zu Untersuchungsprobe signifikant stören, weil das Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten (d. h. I_s/I_c) anstatt der absoluten Fluoreszenz benutzt wird. Es sollte auch darauf hingewiesen werden, dass alternative mathematische Beziehungen zwischen I_s und I_c gegen die Analyt-Konzentration zur Generierung der Kalibrierkurve aufgetragen werden können. Zum Beispiel kann in einer Ausführungsform der Wert von $I_s/(I_s + I_c)$ gegen die Analyt-Konzentration zur Generierung der Kalibrierkurve aufgetragen werden.

[0056] Verschiedene andere Ausführungsformen sind auch in der vorliegenden Erfindung mit einbezogen. Zum Beispiel kann mit Bezug auf [Fig. 3](#) die oben beschriebene und in [Fig. 1](#) illustrierte Untersuchungsvorrichtung **20** geändert werden, um ein anderes Format einer Sandwich-Untersuchungsvorrichtung zu ergeben. In einer Ausführungsform kann zum Beispiel eine Untersuchungsprobe mit einem Analyt zunächst mit (1) fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln **141a**, die mit einem ersten Bindungselement **190a** gepaart sind, (2) fluoreszierenden magnetischen Partikeln **143**, und (3) nicht-fluoreszierenden magnetischen Partikeln **141b**, die mit einem zweiten Bindungselement **190b** gepaart sind, gemischt werden. In dieser speziellen Ausführungsform können die fluoreszierenden magnetischen Partikel **143** mit einem Blockmittel, wie β -Kasein, blockiert werden, um eine unspezifische Bindung an den Analyt zu verhindern, wodurch es nur solchen Partikeln **143** ermöglicht wird, als eine Kalibrationssonde zu agieren. Weiterhin können das erste bestimmte Bindungselement **190a** und das zweite bestimmte Bindungselement **190b** Analoga des Analyts sein.

[0057] Der Begriff "Blockmittel" bedeutet ein Reagens, das an der Sondenoberfläche haftet, so dass es "blockt" oder Nicht-Analyt-Materialien daran hindert, sich an die Oberfläche zu binden. Blocker können einschließen, sind aber nicht darauf beschränkt, β -Kasein, Albumin wie Rinder-Serum-Albumin, Pluronic oder andere Tenside, Polyethylenglykol, Polyvinyl-Alkohol, oder Schwefelderivate der oben genannten Verbindungen, und alle anderen Blockiermaterialien, die den Fachleuten in der Technik bekannt sind.

[0058] Wiederum mit Bezug auf [Fig. 3](#) bildet das Analyt Sandwich-Komplexe **149** mit den gepaarten, fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln **141a** und den gepaarten, nicht-fluoreszierenden, magnetischen Partikeln **141b**. Da sich das gepaarte Pad **22** in Flüssigkeitsverbindung mit der porösen Membran **23** befindet, können die Komplexe **149** von dem gepaarten Pad **22** zu der Detektionszone **31** auf der porösen Membran **23** wandern. Bei der Detektionszone **31** werden dann die Komplexe **149** und jegliche ungebundenen Partikel **143** und/oder **141b** durch die magnetische Einrichtung **60** erfasst und von dem Rest der Probe getrennt. Wie oben beschrieben, kann die absolute Menge des Analyts durch einen Vergleich der Fluoreszenz-Intensität der erfassten, fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikel **141**, I_s , mit der Fluoreszenz-Intensität der erfassten, fluoreszierenden magnetischen Partikel **143**, I_c , festgestellt werden. Insbesondere wird die Gesamtmenge der erfassten, fluoreszierenden magnetischen Partikel **143** zuvor bestimmt und ist im Voraus bekannt und kann so für Kalibrierungszwecke verwendet werden. Dem gemäß ist die Menge eines Analyts in dieser Ausführungsform zu dem Verhältnis von I_s zu I_c direkt proportional.

[0059] Darüber hinaus kann mit Bezug auf [Fig. 4](#) die oben beschriebene und in [Fig. 1](#) illustrierte Untersuchungsvorrichtung **20** auch geändert werden, um eine Konkurrenz-Untersuchungsvorrichtung zu bilden. In einer Ausführungsform kann zum Beispiel eine Untersuchungsprobe, die ein Analyt enthält, zunächst mit (1) fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln **241**, die mit einem ersten Bindungselement **290a** gepaart sind, und (2) fluoreszierenden magnetischen Partikeln **243**, die mit einem zweiten Bindungselement **190b** gepaart sind, gemischt werden. In dieser speziellen Ausführungsform kann das erste Bindungselement **290a** mit dem Analyt identisch sein, während das zweite Bindungselement **290b** ein Analog des Analyts sein kann.

[0060] Nach der Vermischung steht das Analyt mit den gepaarten, fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln **241** um die gepaarten, fluoreszierenden magnetischen Partikel **243** in Konkurrenz, so dass Komplexe **249a** des Analyts und der fluoreszierenden magnetischen Partikel **243** und Komplexe **249b** der fluoreszierenden magnetischen Partikel **243** und der fluoreszierenden, nicht-magnetischen Partikel **241** gebildet werden. Da sich das gepaarte Pad **22** in Flüssigkeitsverbindung mit der porösen Membran **23** befindet, können die Komplexe **249a** und **249b** von dem gepaarten Pad **22** zu der Detektionszone **31** wandern, die sich auf der porösen Membran **23** befindet. Bei der Detektionszone **31** werden dann die Komplexe **249a** und **249b** und jegliche ungebundene Partikel **243** von der magnetischen Einrichtung **60** erfasst und von dem Rest der Untersuchungsprobe getrennt. Wie oben beschrieben, kann die absolute Menge des Analyts durch einen Vergleich der Fluoreszenz-Intensität der erfassten, fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikel **241**, I_s , mit der Fluoreszenz-Intensität der erfassten, fluoreszierenden magnetischen Partikel **243**, I_c , in Komplexen oder außerhalb von Komplexen, festgestellt werden. Insbesondere wird die Gesamtmenge der erfassten, fluoreszierenden magnetischen Partikel **243** zuvor bestimmt und ist im Voraus bekannt und kann so für Kalibrierungszwecke verwendet werden. Dem gemäß ist die Menge eines Analyts in dieser Ausführungsform zu dem Verhältnis von I_s zu I_c umgekehrt proportional.

[0061] Unter Bezugnahme auf [Fig. 5](#) kann die oben beschriebene und in [Fig. 1](#) illustrierte Untersuchungsvorrichtung **20** auch geändert werden, um ein anderes Format einer Konkurrenz-Untersuchungsvorrichtung zu bilden. In einer Ausführungsform kann zum Beispiel eine Untersuchungsprobe mit einem Analyt zunächst mit (1) fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln **341a**, die mit einem ersten Bindungselement **390a** gepaart sind, (2) fluoreszierenden magnetischen Partikeln **343**, und (3) nicht-fluoreszierenden magnetischen Partikeln **341b**, die mit einem zweiten Bindungselement **390b** gepaart sind, gemischt werden. In dieser speziellen Ausführungsform kann das erste Bindungselement **390a** mit dem Analyt identisch sein, während das zweite Bindungselement **390b** ein Analog des Analyts sein kann. Weiterhin können die fluoreszierenden magnetischen Partikel **343** mit einem Blockmittel, wie β -Kasein, blockiert werden, um eine unspezifische Bindung an den Analyt zu verhindern, wodurch es nur solchen Partikeln ermöglicht wird, als eine Kalibrationssonde zu agieren.

[0062] Nach der Vermischung steht das Analyt mit den gepaarten, fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln **341a** um die gepaarten, nicht-fluoreszierenden magnetischen Partikel **341b** in Konkurrenz, so dass Komplexe **349a** des Analyts und der nicht-fluoreszierenden magnetischen Partikel **341b** und Komplexe **349b** der nicht-fluoreszierenden magnetischen Partikel **341b** und der fluoreszierenden, nicht-magnetischen Partikel **341a** gebildet werden. Da sich das gepaarte Pad **22** in Flüssigkeitsverbindung mit der porösen Membran **23** befindet, können die Komplexe **349a** und **349b** von dem gepaarten Pad **22** zu der Detektionszone **31** wandern, die sich auf der porösen Membran **23** befindet. Bei der Detektionszone **31** werden dann die Komplexe **349a** und **349b** und jegliche ungebundene Partikel **343** und/oder **341** von der magnetischen Einrichtung **60** erfasst und von dem Rest der Untersuchungsprobe getrennt. Wie oben beschrieben, kann die absolute Menge des Analyts durch einen Vergleich der Fluoreszenz-Intensität der erfassten, fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikel **341a**, I_s , mit der Fluoreszenz-Intensität der erfassten, fluoreszierenden magnetischen Partikel **343**, I_c , festgestellt werden. Insbesondere wird die Gesamtmenge der erfassten, fluoreszierenden magnetischen Par-

tikel **343** zuvor bestimmt und ist im Voraus bekannt und kann so für Kalibrierungszwecke verwendet werden. Dem gemäß ist die Menge eines Analyts in dieser Ausführungsform zu dem Verhältnis von I_s zu I_c umgekehrt proportional.

[0063] Obwohl oben verschiedene Ausführungsformen der Untersuchungsvorrichtungskonfigurationen beschrieben wurden, sollte es sich verstehen, dass eine Untersuchungsvorrichtung der vorliegenden Erfindung in der Regel jegliche gewünschte Konfiguration aufweisen kann. Zum Beispiel kann eine solche Konkurrenz-Untersuchungsvorrichtung, wie sie in [Fig. 4](#) gezeigt ist und oben beschrieben ist, verwendet werden, mit der Ausnahme, dass die Partikel **241** fluoreszierende, magnetische Partikel und die Partikel **243** fluoreszierende, nicht-magnetischen Partikel sind. Ebenso kann eine solche Konkurrenz-Untersuchungsvorrichtung, wie sie in [Fig. 5](#) gezeigt ist und oben beschrieben ist, verwendet werden, mit der Ausnahme, dass die Partikel **341a** nicht-fluoreszierende, magnetische Partikel und die Partikel **341b** fluoreszierende, nicht-magnetische Partikel sind. Darüber hinaus können neben membran-basierten Durchströmungs-Untersuchungsvorrichtungen andere Arten von Untersuchungsvorrichtungen ebenso in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wie Kapillar-, flüssigkeitsbasierte und lösungsbasierte Untersuchungsvorrichtungen. Verschiedene andere Untersuchungsvorrichtungskonfigurationen werden auch in den US-Patenten Nr. 5 395 754 von Lambotte et al.; 5 670 381 von Jou et al. und 6 194 220 von Malick et al. beschrieben.

[0064] Auch wenn verschiedene Ausführungsformen oben beschrieben wurden, die sich speziell auf die Verwendung von Fluoreszenz als den Mechanismus für die Kalibrierung und Detektion beziehen, sind außerdem andere bekannte Detektionsmechanismen gleichfalls in der vorliegenden Erfindung verwendbar. Zum Beispiel können in einigen Ausführungsformen die Detektions- und/oder Kalibrationssonden chemolumineszente oder phosphoreszierende Verbindungen sein. Chemolumineszente Sonden können zum Beispiel durch den Einsatz eines geeigneten Recktantens, wie es in dem Stand der Technik bekannt ist, angeregt werden. Noch weitere Ausführungsformen und Konfigurationen werden in der vorliegenden Erfindung ebenso bedacht.

[0065] So haben die gegenwärtigen Erfinder entdeckt, dass die Manipulation von magnetischen Partikeln dazu genutzt werden kann, um eine Trennung und Detektion eines Analyts zu erreichen. Insbesondere werden magnetische Trennungs- und Detektionstechniken (z. B. Fluoreszenz) in einem integrierten System ausgebildet. Darüber hinaus ist das System selbst-kalibriert, um die Forderung nach Kontrollekalibrierungsproben, wenn herkömmliche externe Kalibrierungstechniken verwendet werden, zu eliminieren. In einer Ausführungsform wird die Selbst-Kalibrierung durch den Einsatz von fluoreszierenden magnetischen Sonden erreicht. Die Fluoreszenz, die von den fluoreszierenden magnetischen Sonden und fluoreszierenden nicht-magnetischen Sonden emittiert wird, kann an der gleichen Untersuchungsprobe separat gemessen werden. Da die Anzahl der magnetischen Partikel vorherbestimmt ist, ist das System selbst-kalibriert, wenn die Menge der erfassten nicht-fluoreszierenden magnetischen Sonden und anschließend die Menge des Analyts bestimmt werden. Des weiteren kann, da die Fluoreszenz der Kalibrations- und Detektionssonden gleichzeitig unter gleichen Bedingungen gemessen wird, eine mögliche Störung aus vielfältigen Variationen, wie z. B. der Temperatur und einer Instrumenteninstabilität, vermieden werden, um die Detektionszuverlässigkeit und Konsistenz zu verbessern.

[0066] Die vorliegende Erfindung kann besser mit Bezug auf die folgenden Beispiele verstanden werden.

BEISPIEL 1

[0067] Die Fähigkeit der vorliegenden Erfindung, das Vorhandensein eines Analyts unter Verwendung einer Sandwich-Untersuchungsvorrichtung, wie einer solchen, die in [Fig. 3](#) gezeigt ist, zu detektieren, wurde demonstriert. Zunächst wurden die folgenden Komponenten sechs Eppendorf-Phiolen hinzugefügt:

- (1) 25 Mikroliter von kovalenten gepaarten nicht-fluoreszierenden magnetischen Partikeln (3 Milligramm pro Milliliter in einem PBS-Puffer);
- (2) 15 Mikroliter von kovalenten gepaarten fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln (2 Milligramm pro Milliliter in einem PBS-Puffer);
- (3) 10 Mikroliter fluoreszierender magnetischer Partikel, die durch β -Kasein blockiert waren (3 Milligramm pro Milliliter in einem PBS-Puffer), und
- (4) Luteinisierendes Hormon(LH)-Analyt von 0,10 Mikroliter (1 Mikrogramm pro Milliliter), 20 Mikroliter (1 Mikrogramm pro Milliliter), 40 Mikroliter (1 Mikrogramm pro Milliliter), 40 Mikroliter (2 Mikrogramm pro Milliliter) und 80 Mikroliter (2 Mikrogramm pro Milliliter).

[0068] Jeder der Eppendorf-Phiolen wurde eine angemessene Menge eines PBS-Puffers bis zu einem endgültigen Volumen von 150 Mikroliter hinzugefügt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten unter sanftem Schütteln inkubiert. Die magnetischen Partikel wurden dann durch eine magnetische Trenneinrich-

tung, erhalten von Dynal, Inc, getrennt. Das Überbleibsel aus jeder Phiole wurde entsorgt, und es wurden die magnetischen Partikel wieder in 1,5 Milliliter PBS suspendiert. 300 Mikroliter der fluoreszierenden magnetischen Partikelsuspension wurde für jede Messung der Fluoreszenz verwendet. Ein "Fluorolog Spectrofluorometer III", das von SPEX industries, Inc., Edison, NJ, erhalten wurde, wurde zur Messung der Fluoreszenz der Untersuchungsprobe unter Verwendung eines Rechter-Winkel-Modus verwendet. Eine Anregungswellenlänge von 470 Nanometer und eine Emissions-Wellenlänge von 560 Nanometer wurde für die fluoreszierenden magnetischen Partikel verwendet, während eine Anregungswellenlänge von 570 Nanometer und eine Emissions-Wellenlänge von 605 Nanometer für die fluoreszierenden, nicht-magnetischen Partikel verwendet wurde. Die Integrationszeit betrug 0,2 Sekunden.

[0069] Die normierte und kalibrierte Fluoreszenz-Intensität ist als eine Funktion der Dosis von LH in jeder Untersuchungsprobe in [Fig. 8](#) gezeigt. Die normierte Intensität wurde durch Dividieren der gemessenen Fluoreszenz-Intensität der Untersuchungsprobe durch die Fluoreszenz-Intensität einer Kontroll-Untersuchungsprobe erhalten. Die Kontroll-Untersuchungsprobe war die Untersuchungsprobe ohne das Analyt.

[0070] Die Partikel, die in Beispiel 1 verwendet wurden, wurden wie folgt gebildet:

Nicht-fluoreszierende magnetische Partikel

[0071] 125 Mikroliter von 10%-carboxylat-veränderte paramagnetische Partikel (0,35 Mikron, Estapor (R) Superparamagnetic micropheres, die von den Bang's Laboratories, Inc. erhalten wurden) wurden einmal mit 1,5 Milliliter eines Karbonat-Puffers und zweimal mit PBS unter Verwendung einer magnetischen Trenneinrichtung gewaschen. Die gewaschenen Partikel wurden wieder in 0,6 Milliliter PBS und 15 Milligramm Carbodiimide (von Polysciences, Inc.) suspendiert. Es wurde der Mischung ermöglicht, bei Raumtemperatur (RT) für 30 Minuten in einem Shaker zu reagieren. Die aktivierten Partikel wurden dann zweimal mit einem Borat-Puffer gewaschen. Die aktivierten Partikel wurden nochmals wieder in 1,2 Milliliter eines Borat-Puffers suspendiert. Danach wurden 30 Mikroliter eines LH β -monoklonalen Antikörpers (9,8 mg/ml, von Fitzgerald International Industries, Inc. erhalten) zu den aktivierten Partikeln hinzugefügt. Es wurde der Reaktionsmischung ermöglicht, bei Raumtemperatur in einem Shaker über Nacht zu reagieren. Sodann wurden die aktivierten Partikel gemischt und in 1 Milliliter eines 0,1 molaren Ethanolamin unter sanftem Schütteln für 15 Minuten inkubiert. Die Partikel wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und bei 4°C in einem Puffer, der 0,1 molares PBS, 0,15 molares NaCl, 1% β -Kasein, 5% Glycerin und 0,1% NaN_3 enthielt, gelagert.

Fluoreszierende nicht-magnetische Partikel

[0072] Die "fluoreszierenden nicht-magnetischen" Partikel wurden gemäß dem oben beschriebenen Verfahren kovalent gepaart, mit der Ausnahme, dass das Bindungselement ein LH α -monoklonaler Antikörper (9,8 Milligramm pro Milliliter, von Fitzgerald International Industries, Inc. erhalten) anstelle von einem LH β -monoklonalen Antikörper war. Die verwendeten Partikel waren carboxylat-veränderte FluoSpheres®-Mikrosphären, die von Molecular Probes, Inc. erhalten worden waren. Die Partikel hatten eine Partikelgröße von 0,5 Mikrometer und waren rot fluoreszierend mit einer Anregungswellenlänge von 580 Nanometern und einer Emissions-Wellenlänge von 605 Nanometern.

Fluoreszierende magnetische Partikel

[0073] 100 Mikroliter einer 2,76% Feststofflösung von fluoreszierenden superparamagnetischen Partikeln (von Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania, erhalten) wurden mit 1 Milliliter eines Borat-Puffers (0,1 molar, pH-Wert = 8,5) in einem Eppendorf-Röhrchen kombiniert. Solche Partikel haben einen mittleren Durchmesser von 1 bis 2 Mikrometer, und es wird von ihnen angenommen, dass sie eisenenthaltende Mikrosphären sind, die eine Polystyrol-Oberfläche besitzen, die eine passive Adsorption und funktionelle Gruppenreaktionen mit Proteinen ermöglicht. Die Partikel wurden durch eine magnetische Trennvorrichtung, erhalten von Dynal, Inc., getrennt und wieder in 200 Mikroliter von einer 10 Milligramm pro Milliliter-Lösung von β -Kasein in einem 0,1 molaren Borat-Puffer suspendiert. Die Suspension wurde für 30 Minuten mit leichter Vermischung inkubiert. Der oben genannte Schritt wurde zweimal wiederholt. Die getrennten Partikel wurden wieder in 200 Mikroliter einer PBS suspendiert und bei 4°C gelagert.

Luteinisierendes Hormon (LH)

[0074] Das "luteinisierende Hormon (LH)" wurde von Fitzgerald International Industries, Inc. erhalten.

BEISPIEL 2

[0075] Die Fähigkeit der vorliegenden Erfindung, das Vorhandensein eines Analyts unter Verwendung einer Sandwich-Untersuchungsvorrichtung, wie einer solchen, die in [Fig. 1](#) gezeigt ist, zu detektieren, wurde demonstriert. Zunächst wurden die folgenden Komponenten sechs Eppendorf-Phiolen hinzugefügt:

- (1) 5 Mikroliter von kovalenten gepaarten, fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln (2 Milligramm pro Milliliter in einem PBS-Puffer);
- (2) 15 Mikroliter von gepaarten, fluoreszierenden magnetischen Partikeln physikalischer Absorption (3 Milligramm pro Milliliter in einem PBS-Puffer), und
- (3) Luteinisierendes L Hormon(LH)-Analyt von 0, 5, 10 Mikroliter, 20, 40, 100 und Mikroliter (2 Mikrogramm pro Milliliter).

[0076] Jeder der Eppendorf-Phiolen wurde eine angemessene Menge eines PBS-Puffers bis zu einem endgültigen Volumen von 150 Mikroliter hinzugefügt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 25 Minuten unter sanftem Schütteln inkubiert. Die magnetischen Partikel wurden dann durch eine magnetische Trenneinrichtung, erhalten von Dynal, Inc, getrennt. Das Überbleibsel aus jeder Phiole wurde entsorgt, und es wurden die magnetischen Partikel wieder in 1,5 Milliliter PBS suspendiert. 300 Mikroliter der fluoreszierenden magnetischen Partikelsuspension wurde für jede Messung der Fluoreszenz verwendet. Ein "Fluorolog Spectrofluorometer III", das von SPEX Industries, Inc., Edison, NJ, erhalten wurde, wurde zur Messung der Fluoreszenz der Untersuchungsprobe unter Verwendung eines Rechter-Winkel-Modus verwendet. Eine Anregungswellenlänge von 470 Nanometern und eine Emissions-Wellenlänge von 560 Nanometern wurde für die fluoreszierenden magnetischen Partikel verwendet, während eine Anregungswellenlänge von 570 Nanometern und eine Emissions-Wellenlänge von 605 Nanometern für die fluoreszierenden, nicht-magnetischen Partikel verwendet wurde. Die Integrationszeit reichte von 0,2 Sekunden bis zu einer Sekunde.

[0077] Die normierte und kalibrierte Fluoreszenz-Intensität ist als eine Funktion der Dosis von LH in jeder Untersuchungsprobe in [Fig. 9](#) gezeigt.

[0078] Die Partikel, die in Beispiel 2 verwendet wurden, wurden wie folgt gebildet:

Fluoreszierende nicht-magnetische Partikel

[0079] Die "fluoreszierenden nicht-magnetischen" Partikel wurden, wie oben in Beispiel 1 beschrieben, gebildet.

Fluoreszierende magnetische Partikel

[0080] 2,76 Milligramm von fluoreszierenden superparamagnetischen Partikeln (2,5% Feststoffe in einer wässrigen Lösung) wurden von Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania, erhalten. Die Partikel wurden dreimal mit Borat-Puffer gewaschen und durch eine magnetische Trenneinrichtung von Dynal, Inc. getrennt. Die gewaschenen Partikel wurden wieder in einem 200 Mikroliter-Borat-Puffer suspendiert, und es wurden 82 Mikrogramm von einem β -luteinisierendem Hormon(β -LH)monoklonalen Antikörper (1 Milligramm pro Milliliter, erhalten von Fitzgerald Industries International, Inc.) hinzugefügt. Die Mischung wurde vorsichtig über Nacht bei Raumtemperatur gemischt. Die Partikel wurden dann von einer magnetischen Trenneinrichtung gesammelt und mit 200 Mikroliter β -Kasein (10 Milligramm pro Milliliter in Borat-Puffer) für 30 Minuten unter sanftem Mischen inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Die blockierten Partikel wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 0,1 molaren PBS gelagert.

Luteinisierendes Hormon (LH)

[0081] Das "luteinisierende Hormon (LH)" wurde von Fitzgerald International industries, Inc. erhalten.

BEISPIEL 3

[0082] Eine selbst-kalibrierte Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtung wurde mit einer nicht-kalibrierten Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtung verglichen.

Ohne Selbst-Kalibrierung

[0083] Zunächst wurden die folgenden Komponenten 5 Eppendorf-Phiolen hinzugefügt (Phiolen Nummern

2–6 in Tabelle I):

- (1) 15 Mikroliter kovalenter gepaarter nicht-fluoreszierender magnetischer Partikel (3 Milligramm pro Milliliter in einem 0,1 molaren PBS-Puffer);
- (2) 15 Mikroliter von kovalenten gepaarten fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln (2 Milligramm pro Milliliter in einem PBS-Puffer);
- (3) 20 Mikroliter luteinisierendes Hormon(LH)-Analyt (1 Mikrogramm pro Milliliter); und
- (4) 20 Mikroliter PBS.

[0084] Eine Kontroll-Eppendorf-Phiole wurde ebenfalls mit nur 20 Mikroliter PBS (Phiole Nr. 1 in Tabelle I) ausgebildet.

[0085] Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 20 Minuten unter sanftem Schütteln inkubiert. Die magnetischen Partikel wurden dann durch eine magnetische Trenneinrichtung, erhalten von Dynal, Inc, getrennt. Das Überbleibsel aus jeder Phiole wurde entsorgt, und es wurden die magnetischen Partikel wieder in 1,5 Milliliter PBS suspendiert. 300 Mikroliter der fluoreszierenden magnetischen Partikelsuspension wurde für jede Messung der Fluoreszenz verwendet. Ein "Fluorolog Spectrofluorometer III", das von SPEX Industries, Inc., Edison, NJ, erhalten wurde, wurde zur Messung der Fluoreszenz der Untersuchungsprobe unter Verwendung eines Rechter-Winkel-Modus verwendet. Eine Anregungswellenlänge von 570 Nanometern und eine Emissions-Wellenlänge von 605 Nanometern wurden verwendet, um Fluoreszenz-Messungen an verschiedenen Tagen durchzuführen.

[0086] Tabelle I zeigt die relativen Fluoreszenz-Daten für jeden Tag.

Tabelle I: Fluoreszenz-Messungen

Phiole	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6	Standard-abweichung %
Tag 1	13	254	215	263	285	291	11
Tag 2	12	235	207	300	263	299	15
Tag 3	12	183	176	213	270	266	20
Tag 4	18	265	226	275	282	293	10
Tag 5	9	207	193	246	236	244	10
Tag 6	14	227	202	252	262	274	12
Standard-abweichung %	23	13	8	11	6	7	

Mit Selbst-Kalibrierung

[0087] Zunächst wurden die folgenden Komponenten 5 Eppendorf-Phiolen hinzugefügt (Phiolen Nummern 9–13 in Tabelle II):

- (1) 15 Mikroliter kovalenter gepaarter nicht-fluoreszierender magnetischer Partikel (3 Milligramm pro Milliliter in einem 0,1 molaren PBS-Puffer);
- (2) 15 Mikroliter von kovalenten gepaarten fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln (2 Milligramm pro Milliliter in einem PBS-Puffer);
- (3) 20 Mikroliter von fluoreszierenden magnetischen Partikeln, die durch β -Kasein blockiert waren (3 Milligramm pro Milliliter in einem PBS-Puffer); und
- (4) 20 Mikroliter luteinisierendes Hormon(LH)-Analyt (1 Mikrogramm pro Milliliter); und
- (5) 20 Mikroliter PBS.

[0088] Eine Kontroll-Eppendorf-Phiole wurde ebenfalls mit lediglich 20 Mikroliter PBS (Phiole Nr. 8 in Tabelle II) ausgebildet.

[0089] Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 20 Minuten unter sanftem Schütteln inkubiert. Die magnetischen Partikel wurden dann durch eine magnetische Trenneinrichtung, erhalten von Dynal, Inc, getrennt. Das Überbleibsel aus jeder Phiole wurde entsorgt, und es wurden die magnetischen Partikel wieder in 1,5 Mil-

liliter PBS suspendiert. 300 Mikroliter der fluoreszierenden magnetischen Partikelsuspension wurde für jede Messung der Fluoreszenz verwendet. Das "Flourolog Spectrofluorometer III" wurde zur Messung der Fluoreszenz der Untersuchungsprobe unter Verwendung eines Rechter-Winkel-Modus verwendet. Eine Anregungswellenlänge von 470 Nanometern und eine Emissions-Wellenlänge von 560 Nanometer wurden für die fluoreszierenden magnetischen Partikel verwendet, während eine Anregungswellenlänge von 570 Nanometern und eine Emissions-Wellenlänge von 605 Nanometern für die fluoreszierenden, nicht-magnetischen Partikel verwendet wurde. Tabelle II zeigt die relativen Fluoreszenz-Daten für jeden Tag.

Tabelle II: Fluoreszenz-Messungen

Phiole	Nr. 8	Nr. 9	Nr. 10	Nr. 11	Nr. 12	Nr. 13	Standard-abweichung %
Tag 1	31/32	352/47	344/43	300/41	318/44	369/39	12
Tag 2	31/42	324/42	329/41	323/46	338/47	418/43	14
Tag 3	28/39	307/40	333/42	282/42	288/40	425/46	12
Tag 4	30/41	267/36	292/36	271/41	281/38	356/43	8,8
Tag 5	21/29	252/33	292/34	258/38	275/36	328/37	10
Tag 6	21/25	237/33	307/38	265/40	288/35	358/39	12
Standard-abweichung %	13	3	3	4	5	6	

[0090] Wie man aus dem Vergleich jeden Satzes der Proben für die beiden Systeme erkennen kann, waren die Standardabweichungen (Standardabweichung %) für das selbst-kalibrierte System auch unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen deutlich geringer als die Standardabweichungen ohne Selbst-Kalibrierung. Da das selbst-kalibrierte System weniger von den Mess-Bedingungen abhängig ist, wird es erwartet, dass die Standardabweichungen für das selbst-kalibrierte System sogar kleiner als die Standardabweichungen ohne Selbst-Kalibrierung sein würden, wenn die Bedingungen nicht sorgfältig kontrolliert werden.

[0091] Die Partikel, die in Beispiel 3 verwendet wurden, wurden wie folgt gebildet:

Nicht-fluoreszierende magnetische Partikel

[0092] Die "nicht-fluoreszierenden magnetischen" Partikel wurden gebildet, wie es oben in Beispiel 1 beschrieben wurde.

Fluoreszierende nicht-magnetische Partikel

[0093] Die "fluoreszierenden nicht-magnetischen" Partikel wurden gebildet, wie es oben in Beispiel 1 beschrieben wurde.

Fluoreszierende magnetische Partikel

[0094] Die "fluoreszierenden magnetischen Partikel" wurden gebildet, wie es oben in Beispiel 2 beschrieben wurde.

Luteinisierendes Hormon (LH)

[0095] Das "luteinisierende Hormon (LH)" wurde von Fitzgerald International Industries, Inc. erhalten.

BEISPIEL 4

[0096] Die Fähigkeit der vorliegenden Erfindung, das Vorhandensein eines Analyts unter Verwendung einer Sandwich-Untersuchungsvorrichtung, wie einer solchen, die in [Fig. 3](#) gezeigt ist, zu detektieren, wurde demonstriert. Zunächst wurden die folgenden Komponenten sechs Eppendorf-Phiole hinzugefügt:

(1) 30 Mikroliter von kovalenten gepaarten, nicht-fluoreszierenden magnetischen Partikeln (2 Milligramm

pro Milliliter in einem PBS-Puffer);

(2) 20 Mikroliter von kovalenten gepaarten, fluoreszierenden nicht-magnetischen Partikeln (2 Milligramm pro Milliliter in einem PBS-Puffer);

(3) 15 Mikroliter fluoreszierender magnetischer Partikel, die durch β -Kasein (1 Milligramm pro Milliliter in einem PBS-Puffer) blockiert waren, und

(4) C-reaktives Protein(CRP)-Analyt von 0, 5, 10, 20, 50, und 100 Mikroliter (0,2 Mikrogramm pro Milliliter in einem PBS).

[0097] Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 20 Minuten unter sanftem Schütteln inkubiert. Die magnetischen Partikel wurden dann durch eine magnetische Trenneinrichtung, erhalten von Dynal, Inc, getrennt. Das Überbleibsel aus jeder Phiole wurde entsorgt, und es wurden die magnetischen Partikel wieder in 1,5 Milliliter PBS suspendiert. 300 Mikroliter der fluoreszierenden magnetischen Partikelsuspension wurde für jede Messung der Fluoreszenz verwendet. Ein "Fluorolog Spectrofluorometer III", das von SPEX Industries, Inc., Edison, NJ, erhalten wurde, wurde zur Messung der Fluoreszenz der Untersuchungsprobe unter Verwendung eines Rechter-Winkel-Modus verwendet. Eine Anregungswellenlänge von 470 Nanometer und eine Emissions-Wellenlänge von 560 Nanometer wurde für die fluoreszierenden magnetischen Partikel verwendet, während eine Anregungswellenlänge von 570 Nanometer und eine Emissions-Wellenlänge von 605 Nanometer für die fluoreszierenden, nicht-magnetischen Partikel verwendet wurde. Die Integrationszeit reichte von 0,2 Sekunden bis zu 1 Sekunde. Die normierte Fluoreszenz-Intensität ist als eine Funktion der Dosis von CRP in jeder Untersuchungsprobe in [Fig. 10](#) gezeigt.

[0098] Die Partikel, die in Beispiel 4 verwendet wurden, wurden wie folgt gebildet:

Nicht-fluoreszierende magnetische Partikel

[0099] 125 Mikroliter von 10%-carboxylat-veränderte paramagnetische Partikel (0,35 Mikron, Estapor (R) Superparamagnetic micropheres, die von den Bang's Laboratories, Inc. erhalten wurden) wurden einmal mit 1,5 Milliliter eines Karbonat-Puffers und zweimal mit PBS unter Verwendung einer magnetischen Trenneinrichtung gewaschen. Die gewaschenen Partikel wurden wieder in 0,6 Milliliter PBS und 15 Milligramm Carbodiimide (von Polysciences, Inc.) suspendiert. Es wurde der Mischung ermöglicht, bei Raumtemperatur (RT) für 30 Minuten in einem Shaker zu reagieren. Die aktivierten Partikel wurden dann zweimal mit einem Borat-Puffer gewaschen. Die aktivierten Partikel wurden nochmals wieder in 1,2 Milliliter eines Borat-Puffers suspendiert. Danach wurden 30 Mikroliter eines Anti-C-reaktiven Protein (Anti-CRP 1) monoklonalen Antikörpers (Mab A5804, 2 mg/ml, erhalten von BiosPacific, Inc.) zu den aktivierten Partikeln hinzugefügt. Es wurde der Reaktionsmischung ermöglicht, bei Raumtemperatur in einem Shaker über Nacht zu reagieren. Sodann wurden die aktivierten Partikel gesammelt und in 1 Milliliter eines 0,1 molaren Ethanolamin unter sanftem Schütteln für 15 Minuten inkubiert. Die Partikel wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und bei 4°C in einem Puffer, der 0,1 molares PBS, 0,15 molares NaCl, 1% β -Kasein, 5% Glycerin und 0,1% NaN_3 enthielt, gelagert.

Fluoreszierende nicht-magnetische Partikel

[0100] Die "fluoreszierenden nicht-magnetischen" Partikel wurden gemäß dem oben beschriebenen Verfahren kovalent gepaart, mit der Ausnahme, dass das Bindungselement ein Anti-C-reaktives Protein (Anti-CRP2) monoklonaler Antikörper (2mg/ml, erhalten von BiosPacific, Inc.) anstelle von Anti-CRP1 war. Die verwendeten Partikel waren carboxylat-veränderte FluoSpheres®-Mikrosphären, die von Molecular Probes, Inc. erhalten worden waren. Die Partikel hatten eine Partikelgröße von 0,5 μm und waren rot fluoreszierend mit einer Anregungswellenlänge von 580 Nanometer und einer Emissions-Wellenlänge von 605 Nanometer.

Fluoreszierende magnetische Partikel

[0101] 100 Mikroliter einer 2,76% Feststofflösung von fluoreszierenden superparamagnetischen Partikeln (von Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania, erhalten). Solche Partikel haben einen mittleren Durchmesser von 1 bis 2 Mikrometer, und es wird von ihnen angenommen, dass sie eisenenthaltende Mikrosphären sind, die eine Polystyrol-Oberfläche besitzen, die eine passive Adsorption und funktionelle Gruppenreaktionen mit Proteinen ermöglicht. 1 Milliliter eines Borat-Puffers (0,1 molar, pH-Wert = 8,5) wurde den Partikeln dann in einem Eppendorf-Röhrchen hinzugefügt. Die Partikel wurden durch eine magnetische Trennvorrichtung, erhalten von Dynal, Inc., getrennt, und die Partikel wurden wieder in 200 Mikroliter einer 10 mg/ml-Lösung von β -Kasein in einem 0,1 molaren Borat-Puffer suspendiert. Die Suspension wurde für 30 Minuten mit leichter Vermischung inkubiert. Der oben genannte Schritt wurde zweimal wiederholt. Die getrennten Partikel wurden wieder in 200 Mikroliter einer PBS suspendiert und bei 4°C gelagert.

[0102] Das "C-reaktive Protein (CRP)" wurde von BiosPacific, Inc. erhalten.

[0103] Während die Erfindung ausführlich im Hinblick auf die speziellen Ausführungsformen derselben beschrieben wurde, wird es erkannt werden, dass die Fachleute auf dem Gebiet der Technik, nachdem sie ein Verständnis des Vorangegangenen erworben haben, sich leicht Veränderungen, Variationen und Äquivalente zu diesen Ausführungsformen vorstellen können. Folglich sollte der Geltungsbereich der vorliegenden Erfindung als derjenige der angehängten Ansprüche angesehen werden.

Patentansprüche

1. Eine selbst-kalibrierte Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtung (**20**) zum Detektieren der Anwesenheit oder Menge eines Analyts, das sich in einer Untersuchungsprobe befindet, wobei die genannte Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtung (**20**) umfasst:

Detektionssonden (**41**), die dazu geeignet sind, ein Detektionssignal zu erzeugen;
magnetische Kalibrationssonden (**43**), die dazu geeignet sind, ein Kalibrationssignal zu erzeugen;
eine magnetische Einrichtung (**60**), die dazu geeignet ist, die genannten Detektionssonden (**41**) und die genannten Kalibrationssonden (**43**) von der Untersuchungsprobe zu trennen;
ein Anregungsmittel, das dazu geeignet ist, die genannten Detektionssonden (**41**) und die genannten Kalibrationssonden (**43**) anzuregen; und
ein Auswertungsmittel, das dazu geeignet ist, die Menge des Analyts innerhalb der Untersuchungsprobe proportional zu der Stärke des Detektionssignals, das durch die Stärke des Kalibrationssignals kalibriert ist, auszuwerten.

2. Eine Untersuchungsvorrichtung (**20**), wie sie in Anspruch 1 definiert ist, in der die genannten Detektionssonden (**41**), die genannten Kalibrationssonden (**43**) oder Kombinationen aus diesen mit einem bestimmten Bindungselement (**90a**, **90b**) gepaart sind.

3. Eine Untersuchungsvorrichtung (**20**), wie sie in Anspruch 1 definiert ist, in der das genannte bestimmte Bindungselement (**90a**, **90b**) aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Antigenen, Hapten, Aptameren, Antikörpern und Komplexen davon besteht.

4. Eine Untersuchungsvorrichtung (**20**), wie sie in Anspruch 1 definiert ist, in der die genannten Detektionssonden (**41**) und die genannten Kalibrationssonden (**43**) aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus fluoreszierenden Verbindungen, chemolumineszierenden Verbindungen, phosphoreszierenden Verbindungen und Kombinationen daraus besteht.

5. Eine Untersuchungsvorrichtung (**20**), wie sie in Anspruch 4 definiert ist, in der die genannten Detektionssonden (**41**), und die genannten Kalibrationssonden (**43**) fluoreszierende Verbindungen sind.

6. Eine Untersuchungsvorrichtung (**20**), wie sie in Anspruch 5 definiert ist, in der die genannten fluoreszierenden Verbindungen Partikel sind.

7. Eine Untersuchungsvorrichtung (**20**), wie sie in Anspruch 1 definiert ist, in der die genannten Detektionssonden (**41**) fluoreszierende unmagnetische Verbindungen sind.

8. Eine Untersuchungsvorrichtung (**20**), wie sie in Anspruch 1 definiert ist, in der die genannten Kalibrationssonden (**43**) fluoreszierende magnetische Partikel sind.

9. Eine Untersuchungsvorrichtung (**20**), wie sie in Anspruch 8 definiert ist, in der die genannten fluoreszierenden magnetischen Partikel mit einem bestimmten Bindeelement (**90a**, **90b**) gepaart sind.

10. Eine Untersuchungsvorrichtung (**20**), wie sie in Anspruch 8 definiert ist, in der die genannten fluoreszierenden magnetischen Partikel blockiert sind.

11. Eine Untersuchungsvorrichtung (**20**), wie sie in Anspruch 1 definiert ist, in der die genannten Detektionssonden (**41**) dazu geeignet sind, sich mit dem Analyt zu binden.

12. Eine Untersuchungsvorrichtung (**20**), wie sie in Anspruch 1 definiert ist, weiterhin nicht-fluoreszierende

magnetische Partikel umfassend.

13. Eine Untersuchungsvorrichtung (20), wie sie in Anspruch 12 definiert ist, in der die genannten nicht-fluoreszierenden magnetischen Partikel dazu geeignet sind, sich mit dem Analyt zu binden.

14. Eine Untersuchungsvorrichtung (20), wie sie in Anspruch 1 definiert ist, in der die Menge des Analyts innerhalb der Untersuchungsprobe proportional zu der Stärke des Detektionssignals geteilt durch die Stärke des Kalibrationssignals ist.

15. Eine Untersuchungsvorrichtung (20), wie sie in Anspruch 1 definiert ist, in der die Untersuchungsvorrichtung (20) eine Untersuchungsvorrichtung (20) der Sandwich-Art ist.

16. Eine Untersuchungsvorrichtung (20), wie sie in Anspruch 1 definiert ist, in der die Untersuchungsvorrichtung (20) eine Untersuchungsvorrichtung (20) der Konkurrenz-Art ist.

17. Eine Untersuchungsvorrichtung (20), wie sie in Anspruch 1 definiert ist, in der die Detektionssonden (41) fluoreszierende unmagnetische Detektionssonden (41) sind, die dazu geeignet sind, ein Detektionssignal zu erzeugen, und die Kalibrationssonden (43) fluoreszierende magnetische Kalibrationssonden (43) sind, die dazu geeignet sind, ein Kalibrationssignal zu erzeugen, in der die Menge des Analyts innerhalb der Untersuchungsprobe proportional zu der Stärke des Detektionssignals ist, das durch die Stärke des Kalibrationssignals kalibriert ist.

18. Eine Untersuchungsvorrichtung (20), wie sie in Anspruch 17 definiert ist, in der die genannten Detektionssonden (41), die genannten Kalibrationssonden (43) oder Kombinationen davon mit einem bestimmten Bindungselement (90a, 90b) gepaart sind.

19. Eine Untersuchungsvorrichtung (20), wie sie in Anspruch 17 definiert ist, in der die Untersuchungsvorrichtung (20) eine Untersuchungsvorrichtung (20) der Sandwich-Art ist.

20. Eine Untersuchungsvorrichtung (20), wie sie in Anspruch 19 definiert ist, in der die Menge des Analyts innerhalb der Untersuchungsprobe direkt proportional zu der Stärke des Detektionssignals ist, das durch die Stärke des Kalibrationssignals kalibriert ist.

21. Eine Untersuchungsvorrichtung (20), wie sie in Anspruch 17 definiert ist, in der die Untersuchungsvorrichtung (20) eine Untersuchungsvorrichtung (20) der Konkurrenz-Art ist.

22. Eine Untersuchungsvorrichtung (20), wie sie in Anspruch 21 definiert ist, in der die Menge des Analyts innerhalb der Untersuchungsprobe umgekehrt proportional zu der Stärke des Detektionssignals ist, das durch die Stärke des Kalibrationssignals kalibriert ist.

23. Ein Verfahren zum Detektieren der Anwesenheit oder Menge eines Analyts, das sich in einer Untersuchungsprobe befindet, wobei das Verfahren umfasst:

- i) Bereitstellen einer Magnetische-Bindungs-Untersuchungsvorrichtung (20), die Detektionssonden (41), die dazu geeignet sind, ein Detektionssignal zu erzeugen, und magnetische Kalibrationssonden (43), die dazu geeignet sind, ein Kalibrationssignal zu erzeugen, umfasst;
- ii) Kontaktieren einer Untersuchungsprobe, die den Analyt enthält, mit den genannten Detektionssonden (41) und den genannten Kalibrationssonden (43);
- iii) Trennen der genannten Detektionssonden (41) und der genannten Kalibrationssonden (43) von der Untersuchungsprobe unter Verwendung einer magnetischen Einrichtung;
- iv) Anregen der genannten getrennten Detektionssonden (41) und der genannten getrennten Kalibrationssonden (43), wobei die Anregung die genannten getrennten Detektionssonden (41) dazu veranlasst, das Detektionssignal auszusenden, und die genannten getrennten Kalibrationssonden (43) dazu, das Kalibrationssignal auszusenden;
- v) Messen der Stärke des Detektionssignals und der Stärke des Kalibrationssignals; und
- vi) Vergleichen der Stärke des Detektionssignals mit dem Kalibrationssignal, wobei die Menge des Analyts innerhalb der Untersuchungsprobe proportional zu der Stärke des Detektionssignals ist, das durch die Stärke des Kalibrationssignals kalibriert ist.

24. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 23 definiert ist, in dem die genannten Detektionssonden (41) und die genannten Kalibrationssonden (43) fluoreszierend sind.

25. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 23 definiert ist, in dem die genannten Detektionssonden **(41)** und die genannten Kalibrationssonden **(43)** chemolumineszierend sind.
26. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 23 definiert ist, in dem die genannten Detektionssonden **(41)** und die genannten Kalibrationssonden **(43)** phosphoreszierend sind.
27. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 23 definiert ist, in dem das genannte Detektionssignal bei einer ersten Emissionswellenlänge gemessen wird.
28. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 27 definiert ist, in dem das genannte Kalibrationssignal bei einer zweiten Emissionswellenlänge gemessen wird.
29. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 28 definiert ist, in dem die genannte erste Emissionswellenlänge von der genannten zweiten Emissionswellenlänge verschieden ist
30. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 23 definiert ist, in dem die genannten Detektionssonden **(41)** unmagnetisch sind.
31. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 23 definiert ist, weiterhin das Erzeugen einer Kalibrationskurve durch Auftragen der Stärke des Detektionssignals, das durch die Stärke des Kalibrationssignals kalibriert ist, für eine Mehrzahl an vorbestimmten Analytkonzentrationen umfassend.
32. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 23 definiert ist, in dem die genannte Untersuchungsvorrichtung **(20)** eine Untersuchungsvorrichtung **(20)** der Sandwich-Art ist.
33. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 23 definiert ist, in dem die genannte Untersuchungsvorrichtung **(20)** eine Untersuchungsvorrichtung **(20)** der Konkurrenz-Art ist.
34. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 23 definiert ist, in dem die genannten getrennten Detektionssonden **(41)** und die genannten getrennten Kalibrationssonden **(43)** gleichzeitig angeregt werden.
35. Ein Verfahren, wie es in Anspruch 23 definiert ist, in dem die Stärke des Detektionssignals und des Kalibrationssignals gleichzeitig gemessen werden.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

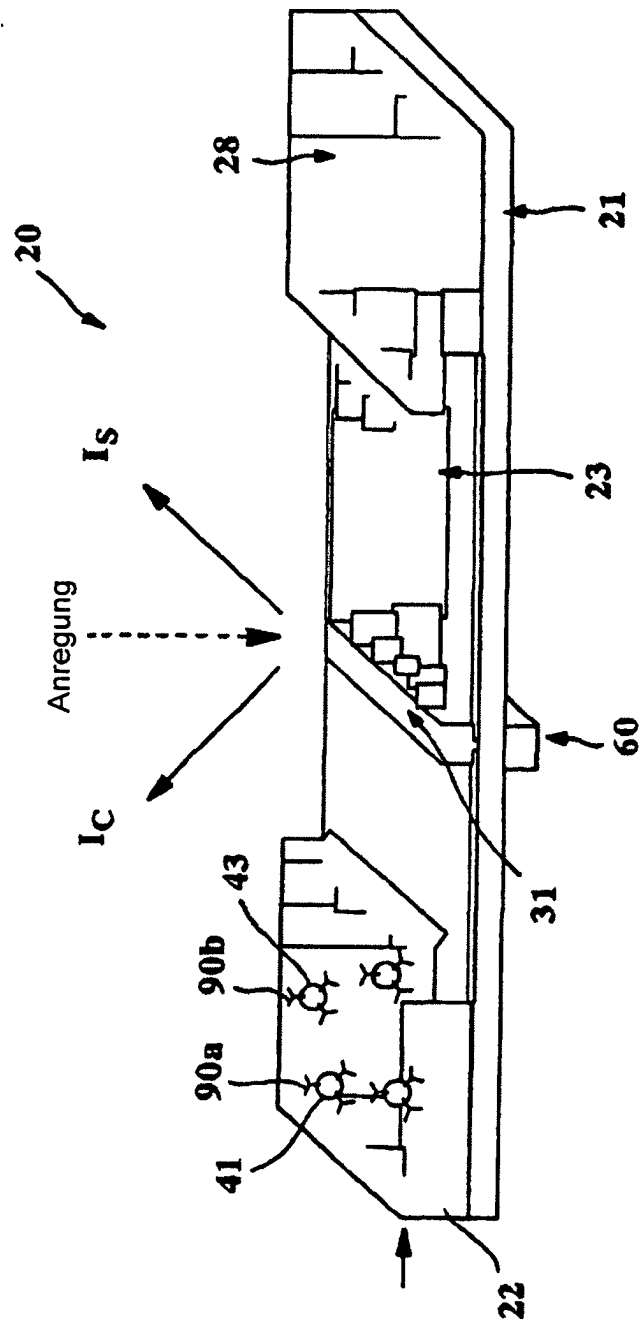


FIG. 1

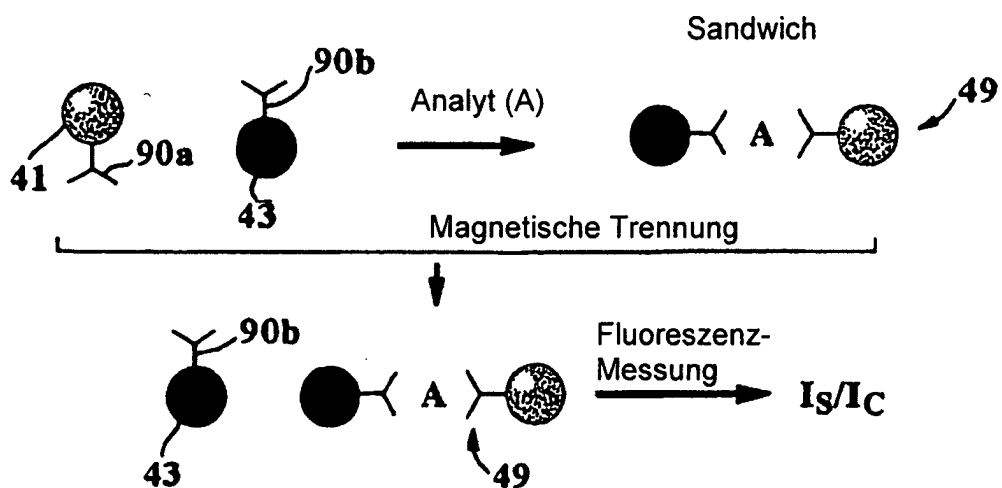


FIG. 2

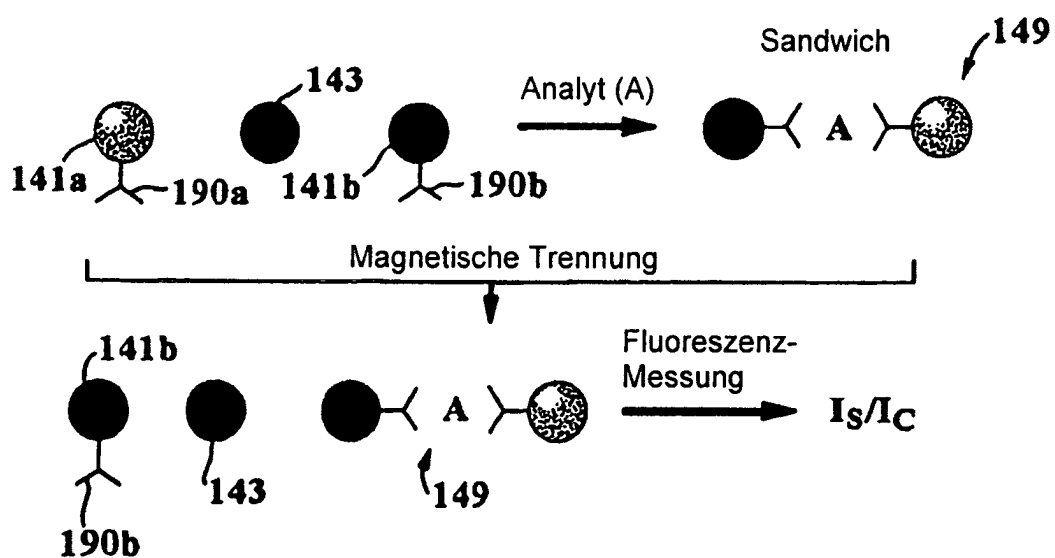


FIG. 3

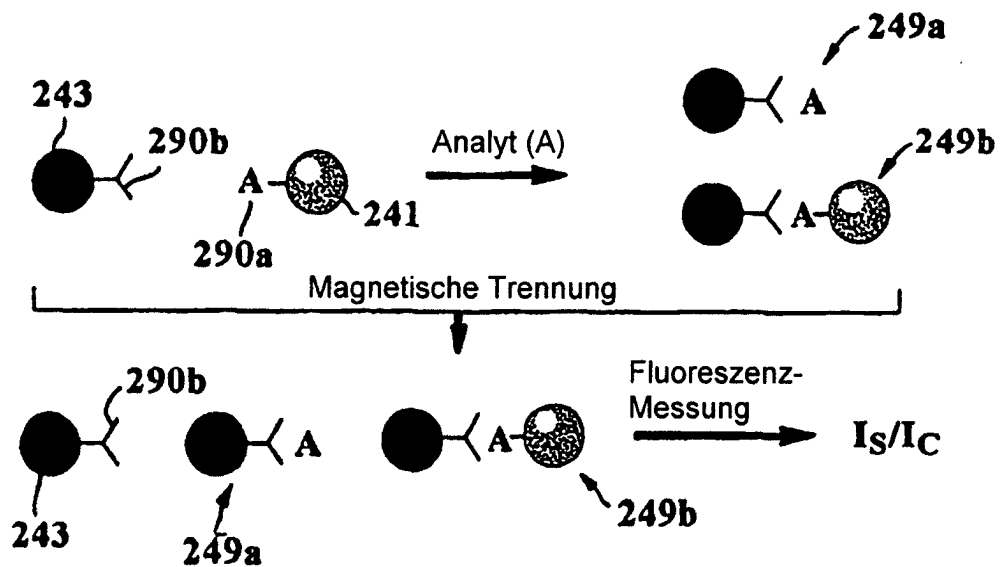


FIG. 4

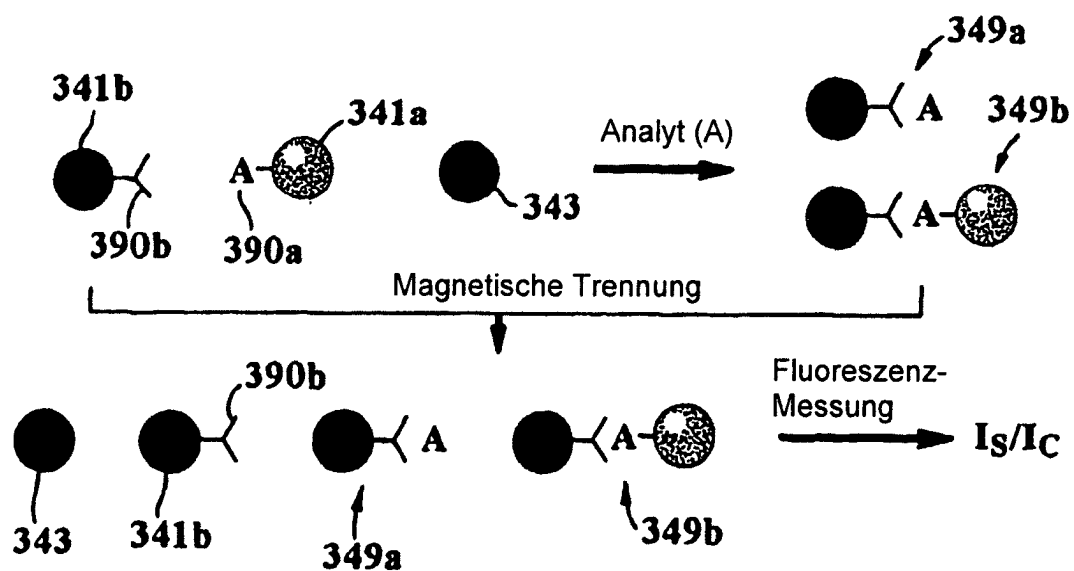


FIG. 5

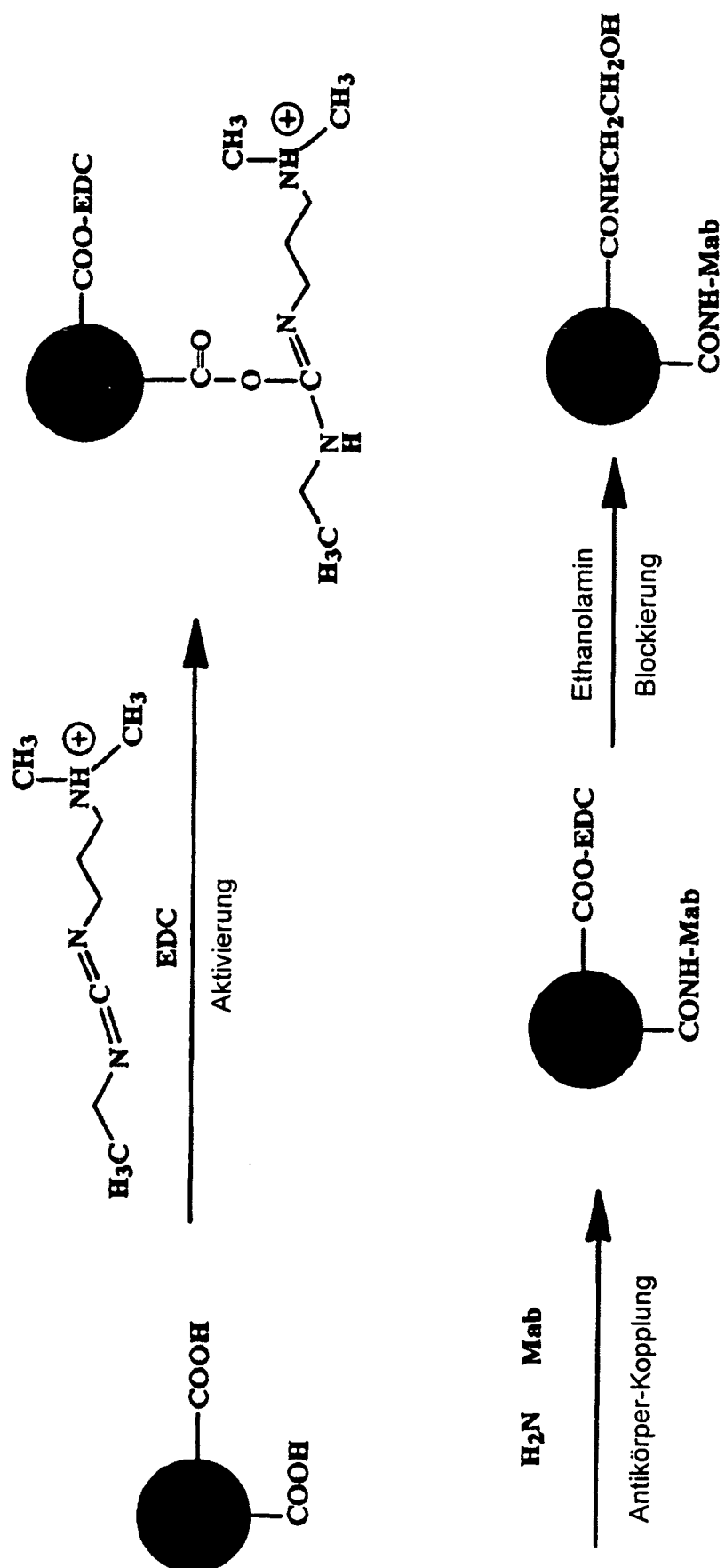


FIG. 6

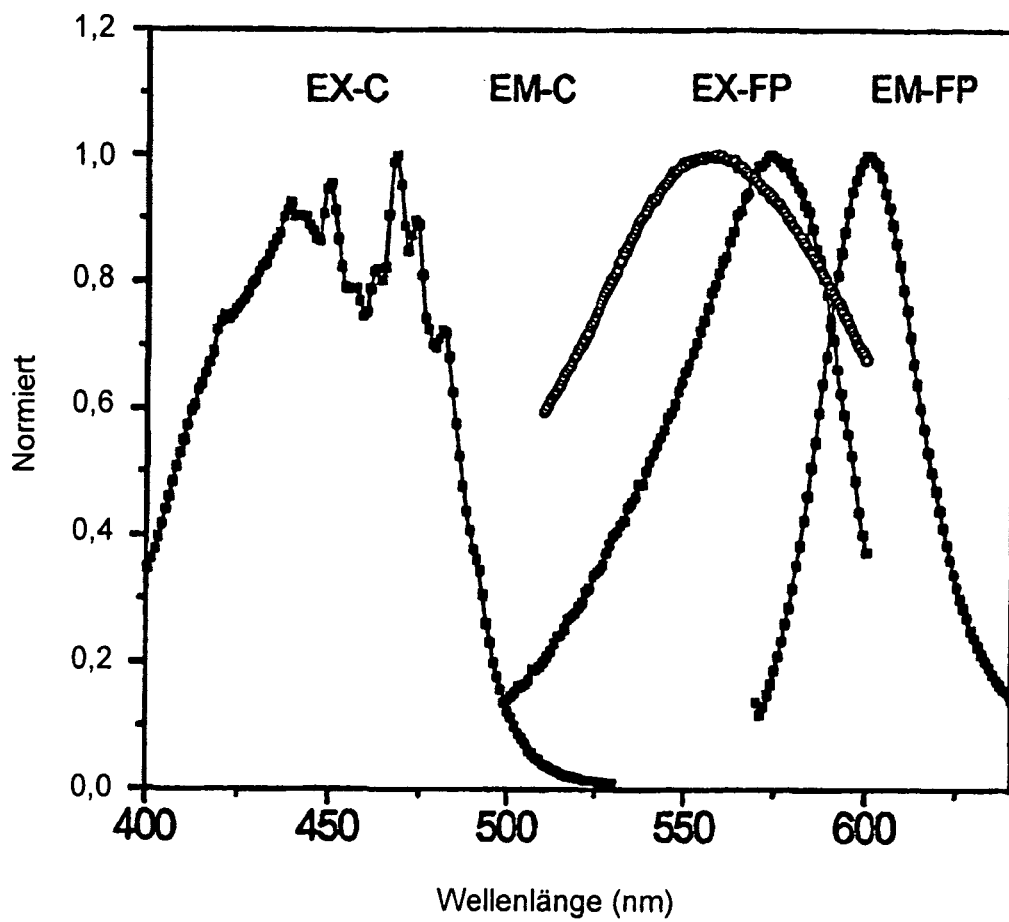


FIG. 7

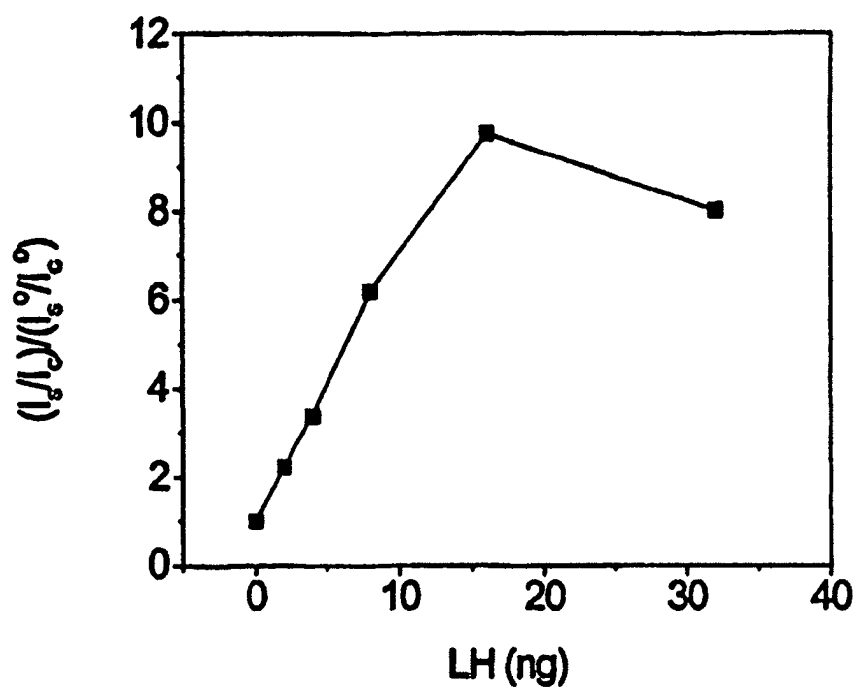


FIG. 8

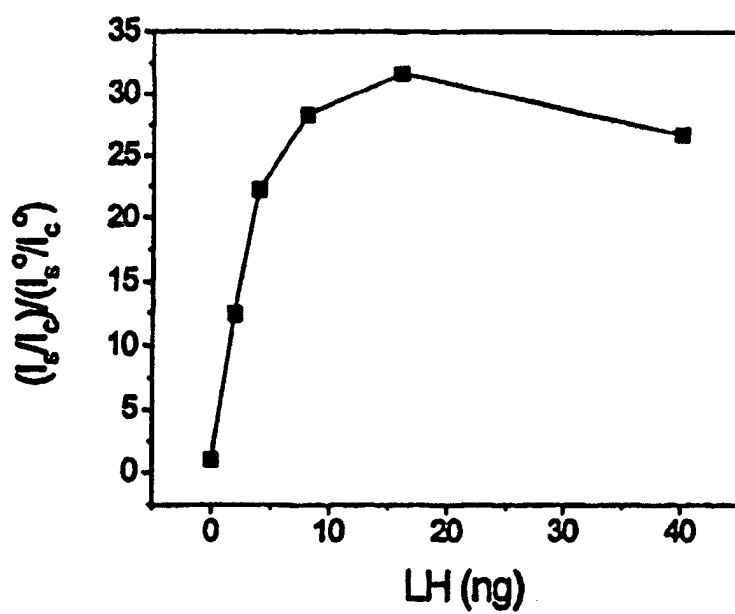


FIG. 9

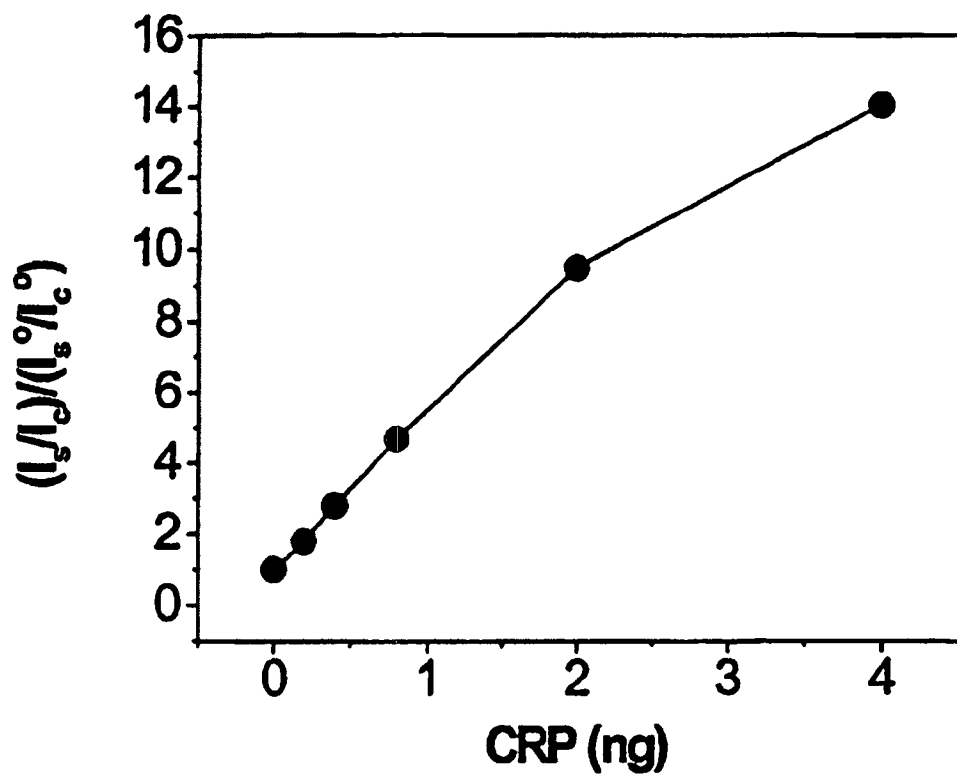


FIG. 10