

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

G01N 33/50

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98125504.3

[43]公开日 1999 年 9 月 15 日

[11]公开号 CN 1228538A

[22]申请日 98.12.24 [21]申请号 98125504.3

[30]优先权

[32]97.12.24 [33]DE [31]19757980.9

[32]98.4.15 [33]DE [31]19816550.1

[71]申请人 曼海姆泊灵格股份公司

地址 联邦德国曼海姆

[72]发明人 J·克勒普 G·希勒尔 A·尼赫特尔

T·菲舍尔

M·赫施

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

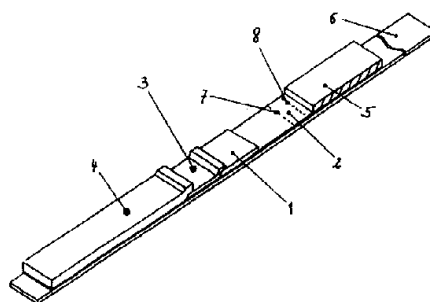
代理人 吴玉和 谭明胜

权利要求书 3 页 说明书 17 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 分析元件的多种功能结构及其用于测定分析物的应用

[57]摘要

本发明涉及用于检测分析物的分析元件,所述元件在能够各区之间进行液体转运的材料之中或之上,含有样品施加区和位于下游的检测区,其中检测区含有特异性结合对 1 之配对物 1,该配对物以能够与特异性结合对 1 的不是分析物之配对物 2 在接触时结合的方式被固定,其中特异性结合对 2 之经标记配对物 1 位于检测区的上游,它被浸渗在材料上,以使其可被液体脱附并能够与特异性结合对 2 之不是分析物的配对物 2 在接触时进行结合,本发明还涉及用所述分析元件检测分析物的方法。



ISSN 1008-4274

权利要求书

1. 用于检测分析物的分析元件，所述分析元件在能够在各区之间进行液体转运的材料之中或之上，含有样品施加区和位于下游的检测区，其中检测区含有特异性结合对 1 之配对物 1，该配对物以能够与
5 特异性结合对 1 之不是分析物的配对物 2 在接触时结合的方式被固定，其中特异性结合对 2 之经标记配对物 1 位于检测区的上游，并被浸渗在材料上，以使其可被液体脱附并能够与特异性结合对 2 之不是分析物的配对物 2 在接触时进行结合。

2. 权利要求 1 的分析元件，其中同属特异性结合对的配对物选自半抗原和抗体、抗原和抗体、植物凝血素和糖、配体和受体、抗生
10 素蛋白/链霉抗生物素蛋白和生物素、核酸和核酸。

3. 权利要求 1 的分析元件，其中所述特异性结合对 1 之配对物 1 是抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白。

4. 权利要求 1 的分析元件，其中所述特异性结合对 2 之配对物 1
15 是抗特异性结合对 2 之配对物 2 的抗体。

5. 权利要求 4 的分析元件，其中所述特异性结合对 2 之配对物 1 是抗地高辛配基或地高辛的抗体。

6. 权利要求 1 的分析元件，其中所述特异性结合对 2 之配对物 1 是用酶或直接标记物标记的。

20 7. 权利要求 6 的分析元件，其中将金属或乳胶颗粒用作直接标记物。

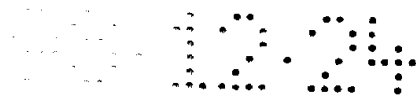
8. 权利要求 1-7 中任一权项的分析元件，其中所述特异性结合对 2 之经标记配对物 1 位于样品施加区。

9. 权利要求 1-7 中任一权项的分析元件，其中如果洗脱剂施加
25 区也位于含该经标记之配对物的区域的上游或者含经标记配对物的区域也是洗脱剂施加区，则所述特异性结合对 2 之经标记配对物 1 位于样品施加区的上游区中。

10. 权利要求 1-7 中任一权项的分析元件，其中所述样品施加区也是洗脱剂施加区。

30 11. 权利要求 10 的分析元件，其中特异性结合对 2 之经标记配对物 1 位于样品施加区和洗脱剂施加区的下游。

12. 权利要求 10 的分析元件，其中特异性结合对 2 之经标记配对



物 1 位于样品施加区和洗脱剂施加区。

13. 权利要求 1-12 中任一权项的分析元件，其中所述分析元件还含有携有特异性结合对 1 之配对物 2 的针对待测抗原或半抗原的抗体缀合物和携有特异性结合对 2 之配对物 2 的针对待测抗原或半抗原的抗体缀合物。

14. 权利要求 1-12 中任一权项的分析元件，其中所述分析元件还含有携有特异性结合对 1 之配对物 2 的针对待测抗体的抗原、半抗原或寡肽缀合物和携有特异性结合对 2 之配对物 2 的针对待测的相同抗体的抗原、半抗原或寡肽缀合物。

15. 利用特异性结合对检测分析物的方法，其中将含有特异性结合对 1 之配对物 2 和特异性结合对 2 之配对物 2 的、衍生于并代表分析物的物质与特异性结合对 2 之经标记配对物在权利要求 1-14 的用于测定分析物的分析元件中接触，通过在分析元件中液体转运使所述物质向位于样品施加区下游的检测区移动，在检测区与特异性结合对 1 之配对物 1 结合，并以特异性结合对 2 之配对物 1 的标记物为基础进行检测。

16. 权利要求 15 的方法，其中将与分析物结合的抗体加到分析物中，以便制备衍生于并代表分析物的物质，其中抗体的一部分携有特异性结合对 1 之配对物 2，而抗体的另一部分携有特异性结合对 2 之配对物 2。

17. 权利要求 15 的方法，其中将抗原、半抗原或寡肽加到分析物中，以便制备衍生于并代表分析物的物质，其中抗原、半抗原或寡肽的一部分携带特异性结合对 1 之配对物 2，而抗原、半抗原或寡肽的另一部分携带特异性结合对 2 之配对物 2。

18. 权利要求 15 的方法，其中分析物是被扩增的核酸，由此与核苷酸或寡核苷酸结合的特异性结合对 1 之配对物 2 或特异性结合对 2 之配对物 2 被掺入到核酸拷贝中，然后将扩增产物与携带了互补核酸所没有之结合对的配对物 2 的核酸杂交。

19. 权利要求 15 的方法，其中所述分析物是与两个核酸探针杂交的核酸，其中一个探针含有特异性结合对 1 之配对物 2，另一个含有特异性结合对 2 之配对物 2。

20. 含权利要求 1-14 中任一权项的分析元件和至少一种选自特异



性结合对 1 之配对物 2 和特异性结合对 2 之配对物 2 中的配对物的、
用于检测分析物的试剂盒。

21. 权利要求 20 的试剂盒，其中所述特异性结合对 1 之配对物 2
和特异性结合对 2 之配对物 2 分别在不同的容器中。

5 22. 权利要求 20 的试剂盒，其中所述特异性结合对 1 之配对物 1
和特异性结合对 2 之配对物 2 被存放在同一容器中。

23. 权利要求 20-22 中任一权项的试剂盒，其中所述特异性结合
对 1 之配对物 2 与核苷酸、寡核苷酸、核酸、抗体、半抗原或抗原或
代表抗原的表位或植物凝血素或配体受体缀合。

10 24. 权利要求 23 的试剂盒，其中所述特异性结合对 1 之配对物 2
是生物素。

25. 权利要求 20-22 中任一权项的试剂盒，其中所述特异性结合
对 2 之配对物 2 与核苷酸、寡核苷酸、核酸、抗体、半抗原或抗原或
代表抗原的表位或植物凝血素或配体受体缀合。

15 26. 权利要求 25 的试剂盒，其中特异性结合对 2 之配对物 2 是半
抗原，优选为高辛配基或地高辛。

说明书

分析元件的多种功能结构 及其用于测定分析物的应用

5 本发明涉及用于测定分析物的分析元件，所述元件在能够在各区之间进行液体转运的材料之中或之上，含有样品施加区和位于下游的检测区，其中检测区含有特异性结合对 1 之配对物 1，该配对物以能够与特异性结合对 1 之不是分析物的配对物 2 在接触时结合的方式被固定，本发明还涉及用特异性结合对检测分析物的方法。本发明还涉及
10 含分析元件的用于检测分析物的试剂盒。

分析元件是现有技术中已知的，其中检测分析物所需的试剂存在于载体材料内或载体材料上。例如美国专利 4861711，美国专利 5591645 和 EP-A-0291194。在这些文献中描述之分析元件的共同特征是它们特别适用于进行免疫检测法。它们包括样品施加区和位于其下游的检测
15 区。由于多孔载体材料内的毛细作用力，使液体样品迁移通过样品施加区和检测区之间的多个区，从而吸收检测分析物所需的试剂并使其与样品中的分析物反应。

将结合配对物固定在检测区，它能够与待测分析物特异性结合。在有不同分析物的情况下，需要将用于分析物的不同结合配对物固定
20 在固相上。

从美国专利 4861711 的图 1 并结合例如在第 5 栏 57 行至第 6 栏 48 行的描述可以知道，可将特异性结合对 1 之配对物 1 固定在检测区，该配对物不与分析物结合但可以通用，因为它与特异性结合分析物的物质上存在的特异性结合对 1 的配对物 2 一样可与表位结合，因此，
25 在检测反应过程中，将分析物的移动复合物和所述结合物质固定在检测区，并将其与未复合的移动反应组分分开。

分析物的特异性标记物质有很重要的作用，因为只有它与分析物结合，和随后由分析物和针对分析物之标记物质形成的复合物在检测区中的固定，以及从检测区中去除移动的未反应的反应组分可以表明
30 在液体样品中存在分析物。本领域已知的标记物质是特异于分析物的，即在夹心检测的情况下，它们是被标记的物质，例如与待测分析物（抗原或抗体）特异性反应的抗体或抗原。但是这需要取决于分析物，已制



备出分析物的不同的标记的特异性结合配对物。

本领域已知许多可用于标记的物质。过去，使用具有其所有缺点的放射性标记物，后来这些标记大部分被酶标记物所取代。现在，主要将颗粒标记物，特别是金或乳胶颗粒用于本领域以前所述文献中描述的分析元件中。由标记物和与分析物特异性结合的物质组成的缀合物的制备方法很复杂，而且如果要测定不同的分析物，则需优化每个独立的分析物-特异性结合配对物。另外，在分析元件中，必须根据每种具体需求来优化所述缀合物存在其上并于其上转运的材料。从这种意义上来说，常常需要解决上述所有稳定性问题。

因此，本发明的目的是提供分析元件的多种功能结构 (general purpose structure)，所述分析元件的使用不依赖于待测分析物，条件是該分析物或者一种由分析物衍生并代表該分析物的物质能够通过特异对结合来检测。

该目的是利用权利要求书中所述之本发明主题达到的。

本发明具体涉及用于测定分析物的分析元件，所述元件在能够在各区之间进行液体转运的材料之中或之上，含有样品施加区和位于下游的检测区，其中检测区含有特异性结合对 1 之配对物 1，该配对物以能够与特异性结合对 1 的不是分析物之配对物 2 在接触时结合的方式被固定，其特征在于特异性结合对 2 的经标记的配对物 1 位于检测区之上游，它被浸渗在一种材料上以使其可通过液体脱附，并在与特异性结合对 2 不是分析物的配对物 2 接触时能够结合，其中特异性结合对 1 之配对物 2 和特异性结合对 2 之配对物 2 特异性结合于待测分析物，或通过待测分析物是衍生于并代表分析物之物质部分的反应进行结合。

本发明还涉及用于检测分析物的试剂盒，该试剂盒含有上述分析元件以及选自特异性结合对 1 之配对物 2 和特异性结合对 2 之配对物 2 的至少一个配对物。

最后，本发明还涉及用特异性结合对检测分析物的方法，其特征在于将衍生于并代表分析物的、含有特异性结合对 1 之配对物 2 和特异性结合对 2 之配对物 2 的物质在本发明的分析元件中接触，以便用特异性结合对 2 的经标记配对物检测分析物，在分析元件中使所述物质通过液体转运向位于样品施加区上游之检测区移动，使其在检测区与特异性结合对 1 之配对物 1 结合并在特异性结合对 2 之配对物 1 的标记



物的基础上进行检测。

本发明分析元件的必要特征是液体可以在分析元件内向检测区移动。所述液体流例如可以在适当制备的中空体中借助重力来达到。通过作为重力之一种的离心力而能够进行液体转运的装置例见 EP-B0052769。但是本发明的分析元件优选含有借助毛细作用力能够使液体移动的吸附材料。就此而言，本发明分析元件中各个区的材料可以相同，也可以不同。如果希望实现其最佳功能，常见的情况是不同区由不同的材料组成。

适宜的吸附性毛细活性材料基本上是在所谓干试法中可用于吸收液体的那些材料，参见例如美国专利 4861711，5591645 或 EP-A0291194。已证明多孔材料例如硝酸纤维素膜的膜是可行的。但是，还可以用纤维性吸附基质材料例如羊毛织物或编织物。羊毛是特别优选的。纤维性基质材料可包括玻璃、纤维素、纤维素衍生物、聚酯、聚酰胺，还包括粘性人工羊毛和聚乙烯醇。用纤维素性纤维制备的羊毛，以聚酯和/或聚酰胺和含有羟基和/或酯基之有机粘合剂为基础的聚合物纤维可参见 EP-B326135，例如可将所述材料用于本发明。在欧洲专利申请 0571941 中，除玻璃纤维、聚酯纤维、聚酰胺纤维、纤维素纤维或纤维素衍生物纤维外，含有可溶的共聚酯纤维的羊毛材料也可用于本发明的分析元件。纸例如茶袋纸也是适宜的。

为了改善本发明分析元件的操作，可将吸附性毛细活性材料或不同的吸附毛细活性材料放在本身不透液体的坚硬的载体材料上，所述载体材料对基质材料中的液体流没有不利影响并就分析元件中所发生的反应而言为惰性的。聚酯箔是优选的载体材料，在所述载体材料上附着能够进行液体转运的基质材料。

在本发明的分析元件中，将每个区安放在载体材料上，它们在各自的顶端，彼此相接或部分在顶部并部分地彼此相接。一种特别优选的本发明分析元件是其中在载体材料上，将样品施加区和检测区以彼此相接的方式放置。在这一点上，彼此相接指这些区是相邻的并与另一区直接接触或者实质上放在由其他区隔开的同一平面上。

样品施加区是本发明分析元件上加入待测样品的区域，该区域中可测定所述样品中是否存在特定的分析物或衍生于和代表所述分析物的物质，并还可确定其存在的量。



检测区是本发明分析元件上的区域，其中可测定在加到分析元件上的样品中是否存在待测分析物或衍生于和代表所述分析物的物质。所述检测可以是定性的、半定量的或定量的。在这一点上，半定量指不能测定分析物或衍生于并代表分析物之物质的具体浓度值，而可测定分析物浓度所在的浓度范围。

将特异性结合对 1 之配对物 1 固定在检测区，固定的方式是它与特异性结合对 1 之不是分析物的配对物 2 接触时可以与之结合。通过化学反应，即通过形成共价键可达到固定的目的。但是，还可通过吸附力来达到该目的，所述吸附力包括除共价键外的所有可能性。通常将硝酸纤维素膜用于当被浸渗，而不存在共价结合时，蛋白质和核酸会与之紧密结合的检测区。

根据本发明，除特异性结合对 1 之配对物 1 外，还必须将特异性结合对 2 的经标记配对物 1 放在分析元件中。不必将该配对物固定，但该配对物必须以可被液体脱附的浸渗形式存在，即必须可由液体将该经标记的配对物转运到检测区。最好应可用尽可能少的液体将该标记配对物从它所浸渗的基质材料上完全即定量脱附下来。例如已证明 EP-B326135 中所述的羊毛特别适于作为基质材料。

特异性结合对是本领域已知的，包括例如下列对：半抗原和抗体、抗原和抗体、植物凝血素和糖，抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白和生物素以及核酸和核酸，配体和受体。在这一点上，抗原可以是人们可实验生产出针对它的抗体的任何分子。抗原还可以是抗体或抗体上被称为表位并可被抗体特异性识别并结合的特定位点。应将核酸理解为能够通过互补碱基结合之核酸的所有可能的形式。具体为但不限于 DNA、RNA 以及核酸类似物如肽核酸(参见例如 WO 92/20702 的 PNA)。配对和受体通常指两个配对物之间如激素和激素受体之间的特异性结合作用。

在本发明分析元件的优选实施方案中，特异性结合对 1 之配对物 1 是一种抗体，所述抗体可识别另一针对分析物之抗体上的表位。所述抗体所针对的表位对应于特异性结合对 1 之配对物 2。但是，特别优选将特异性结合生物素的抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白用作特异性结合对 1 之配对物 1。然后生物素形成特异性结合对 1 之配对物 2。

在本发明分析元件的优选实施方案中，特异性结合对 2 之配对物 1

是特异性结合对 2 之配对物 2 的抗体。根据本发明，优选所述特异性结合对 2 之配对物 2 优选是半抗原，最好是不存在于待测样品中的半抗原。特别优选洋地黄毒甙配基、洋地黄毒甙、地高辛配基或地高辛作为半抗原。

5 本领域免疫检测法中已知的基本上所有标记物均适于作为特异性结合对 2 之配对物 1 的标记物。具体地说，它们是放射性标记物或酶标记物如过氧化物酶，碱性磷酸酶或半乳糖苷酶或荧光团。但是特别优选使用所谓直接标记物，即其颜色可用肉眼识别而无需其他处理步骤的标记物。这类有用的标记物是例如不溶于水的颗粒如金属或乳胶
10 颗粒和颜料如硅酸盐，炭黑或硒。具体地说，优选将金属颗粒用作本发明标记物，特别优选胶体金用作标记物。可将所述标记物与特异性结合对 2 之配对物 1 共价或吸附结合，其中吸附包括除共价结合外的所有可能性。在用有色乳胶颗粒作为直接标记物的情况下，优选存在共价键。优选将胶体金属，具体为胶体金的吸附键用作直接标记物，
15 具体地说是胶体金。

抗体-金缀合物的制备方法例见 Roth, J. 光电显微镜细胞化学中的胶体金标记系统，in Bullock, G.R. and Petrusz, P. 编，免疫化学中的技术，第 2 卷，纽约，Academic 出版社，1983，216-284 页。

20 可将特异性结合对 2 之经标记的配对物 1 置于本发明分析元件的不同位置。这取决于例如所要进行的反应过程，样品量或者如果将分析元件用于检测液体样品的话，取决于分析物的浓度。

因此，将特异性结合对 2 之经标记的配对物 1 置于样品施加区，可将其放在样品施加区下游，样品施加区和检测区之间的位置，或者也可将其置于样品施加区上游。至少后一种情况的先决条件是，本发
25 明的分析元件除含有样品施加区外，还含有洗脱剂施加区。然后将所述洗脱剂施加区置于特异性结合对 2 之经标记的配对物 1 所在区的上游或者特异性结合对 2 之经标记的配对物 1 所在的区与洗脱剂施加区相同。因此，在本发明的分析元件上，洗脱剂施加区可位于样品施加区的上游或者在样品施加区的位置上。当待测样品不是液体或不表示
30 有足够的用于检测分析物(即用于将分析物和所需的试剂转运到检测区)的液体时，所述洗脱剂施加区总是与特异性结合对 2 之经标记的配对物 1 所在的区域是分开的。



上述本发明分析元件的结构广泛适用于检测可通过特异性配对结合而进行检测的任何分析物。为此，在本发明的分析元件中，将衍生于并代表分析物的，含有特异性结合对 1 之配对物 2 和特异性结合对 2 之配对物 2 的物质与特异性结合对 2 之经标记的配对物 1 接触，使其通过分析元件中的液体转运向位于样品施加区上游的检测区移动，在检测区与特异性结合对 1 之配对物 1 结合并以特异性结合对 2 之配对物 1 的标记物为基础进行检测。为了进行所述检测，特别有利的是，用液体从检测区除去未固定于检测区的移动反应组分。如果是液体样品，样品液体不足以从检测区除去移动的未固定反应组分时，可向分析元件中再加入液体，在这种情况下，液体可以加在样品施加区，也可加在特定的洗脱剂施加区。

可用不同的方法产生代表分析物的物质。在抗原作为分析物的情况下，例如，可将分析物与结合所述分析物的两种抗体反应。在这种情况下，其中的一种抗体携有特异性结合对 1 之配对物 2，另一种抗体携有特异性结合对 2 之配对物 2。如果例如分析物含有数拷贝的特定表位，则两种抗体可以相同。按照本发明，并不是一定需要直到两种抗体与分析物之间的夹心复合物已完全形成，才将分析物、携有特异性结合对 1 之配对物 2 的抗体和携有特异性结合对 2 之配对物 2 的抗体的混合物同本发明分析元件上之特异性结合对 2 之配对物 1 接触。最终，最重要的是，在检测分析结果时，检测区应在特异性结合对 1 之配对物 1 上含有一结合的夹心复合物。当将分析物与两种夹心-形成抗体的混合物加到本发明分析元件上时，所述夹心形成作用已经完成，但是，也可以在样品施加区和检测区之间的试剂液体转运过程中完成。在极端的情况下，夹心反应的完成发生在检测区。因此，术语“衍生于并代表分析物的物质”还包括产生所述物质之组分的混合物，只要这些组分在检测区能够产生衍生于并代表分析物的物质。

如果将抗体作为分析物来检测，则在与前述类似的反应中，可将抗原或代表抗原表位的寡肽用作分析物代替所述两种抗体，其中一部分抗原分子携带特异性结合对 1 之配对物 2，另一部分抗原分子携带特异性结合对 2 之配对物 2。为了确定待测抗体的双抗原夹心复合物，在不同情况下，可类似地应用上文有关抗原测定的描述，形成携有特异性结合对 1 之配对物 2 的抗原和携有特异性结合对 2 之配对物 2 的抗

原。

本发明多种功能的分析元件的结构还特别适用于检测核酸。为此，常常必须将待测核酸扩增以便使其数量足以用于检测。例如利用本领域技术人员熟知的聚合酶链反应 (PCR) 或连接酶链反应 (LCR) 可达到该目的。在利用 PCR 扩增的情况下，从用作引物的寡核苷酸开始，将核苷酸同互补于待测核酸的核酸连接并于引物相连，例如将特异性结合对 1 之配对物 2 或特异性结合对 2 之配对物 2 掺入与所述核苷酸或引物结合之核酸拷贝中。如果将用这种方法得到的扩增产物与核酸杂交，所述核酸携有互补扩增核酸并不具备的结合对的配对物 2，则可以使用衍生于并代表分析物的物质，所述物质被固定于在本发明分析元件上的检测区中的特异性结合对 1 之固定的配对物 1 上，然后用特异性结合对 2 之经标记的配对物可进行检测。

此外，如果有足够量的核酸可用，则可免除扩增，或者不用特异性结合对 1 或 2 之配对物 2 完成核酸的扩增。随后，通过与两个探针杂交产生代表分析物的物质，所述探针在每种情况下都携带特异性结合对 1 之配对物 2 和特异性结合对 2 之配对物 2。

特别优选将与未经标记的核苷酸混合的携有特异性结合对 1 之配对物 2 或特异性结合对 2 之配对物 2 的核苷酸用于扩增待测核酸，然后将携有特异性结合对 1 之配对物 2 或特异性结合对 2 之配对物 2 的扩增核酸与携有用于扩增之核苷酸混合物中不存在的特异性结合对之配对物 2 的核酸杂交。由此，可以得到核酸双链，其中每条链携带了不同的特异性结合对配对物。还可使用仅携带作为引物的配对物和未标记的核苷酸的寡核苷酸来代替携带特异性结合对 1 之配对物 2 或特异性结合对 2 之配对物 2 的核苷酸。特别优选将生物素用作特异性结合对 1 之配对物 2，将半抗原如荧光素、硷性蕊香红、地高辛或特别优选将地高辛配基用作特异性结合对 2 之配对物 2。使用引物时，已证明特别有利的物质是生物素化的物质。

由于生物素化核苷酸和引物可从市场上购买，或者试剂盒也可从市场上购买，所述试剂盒可以制备类似携带半抗原之核酸或核酸片段的物质，所述半抗原例如荧光素、硷性蕊香红、地高辛或尤其是高辛配基，本领域技术人员很容易得到衍生于并代表待测核酸的物质用于研究目的并利用本发明的分析元件对其进行迅速简单地检测。

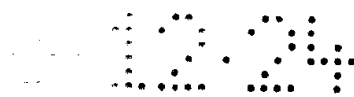


当然还可提供用于检测分析物的试剂盒，所述试剂盒不仅含有多
种功能的本发明分析元件，而且还含有特异性结合对 1 之配对物 2 或
特异性结合对 2 之配对物 2 或这两种配对物。例如可将这些配对物与
核苷酸、寡核苷酸、核酸、抗体、半抗原或抗原或表位或者与植物凝
5 血素或者配体受体结合。这些物质具有前述说明的含义。因此，除多
种功能的分析元件外，可将用于检测的组分或所有必需的其他试剂提
供给感兴趣的人。在这一点上，特异性结合对 1 之配对物 2 或特异性
结合对 2 之配对物 2 是否在不同的容器中或同在一个容器中并不重要。
这特别适用于其中利用两种抗体或通过夹心复合利用抗原检测待测分
10 析物的系统。如果想组装用于检测核酸的试剂盒，有利的是将携带特
异性结合对 1 之配对物 2 或特异性结合对 2 之配对物 2 的核苷酸或引
物与互补于待测核酸之核酸分开存放，所述核酸携带了不同于与核苷
酸或引物缀合之配对物的特异性结合对的配对物 2。

在分析物有很大不同的情况下，本发明所述的多种功能的分析元
15 件对于在研究和开发中用于分析物的检测是特别有利的。特别有利的
是，可将本发明的分析元件用于核酸检测。与特异性结合对 1 之配对
物 2 或特异性结合对 2 之配对物 2 缀合的各种核苷酸和寡核苷酸可从
市场上购买。同样还可用于用市售试剂盒很容易制备的核酸探针，所
述探针携带了特异性结合对 1 之配对物 2 或特异性结合对 2 之配对物 2。
20 具体地说，用这种方法很容易得到携带生物素和/或地高辛或地高辛配
基的核酸探针。

本发明分析元件的多种功能结构的有利之处还在于，经标记结合
配对物通常用分析物的经标记结合配对物表示免疫检测中的重要组
分。以前，通常根据分析物制备相应的标记结合配对物，然后在分析
25 元件上产生反应和贮存所需的最佳条件。在过去，这需要进行大量的
工作。现在，本发明的分析元件提供了一种可以被广泛使用的元件。
可以以很小的精力和较低的成本将特定试剂制成液体试剂。就所述试
剂在分析元件上的保存期而言，无需特别的优化工作。

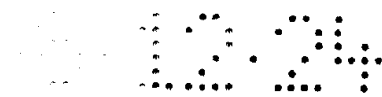
但是，如果需要的话，不仅可将本发明分析元件与作为液体试剂
30 的特定试剂一起用作通用的分析元件，而且还可从本发明的分析元件
开始，产生含有分析物具体检测所需全部试剂的分析元件。因此，对
于利用夹心复合物的形成进行抗原检测而言，可将所需抗体作为一个



整体放在本发明分析元件中，只要其中一个与特异性结合对 1 之配对物 2 缀合，另一个与特异性结合对 2 之配对物 2 缀合即可。同样利用夹心复合物的形成，可将本发明分析元件用于抗体的检测。在这种情况下，将所需抗原的一部分作为整体放在分析元件上，与特异性结合对 1 之配对物 2 缀合，抗原的另一部分与特异性结合对 2 之配对物 2 缀合。将所述缀合物放置在本发明分析元件的一个区中或彼此相邻的，在彼此顶部的或彼此相接的区中。在这种情况下，可将两个缀合物放在样品施加区或将其中一个缀合物放在样品施加区，将另一个放在样品施加区与检测区之间的区或者将两个缀合物分开放置或同时放在样品施加区与检测区之间的区。如果将洗脱剂区放在样品施加区的上游，除前述的可能性外，还可将携带特异性结合对 1 和 2 之配对物 2 的抗原或抗体分开放置或将其一起放在洗脱剂区和样品施加区之间。含检测分析物所需之所有试剂的所述分析元件具有本发明简单和通用结构的优点，而且使用者操作特别简单，因为仅加入一个样品，而且在检测区读出结果前，不需要其他处理步骤。

还可将本发明的分析元件用于检测数个分析物中的至少一种。例如，现在检测样品是否有 HIV 感染时，必需确定是否存在一种或多种抗体，即抗 HIV1 抗体、抗 HIV2 抗体或抗 HIV1 O 亚型抗体。针对一种型的抗体的存在就足以评估样品是阳性的。所发现的抗体究竟是抗哪种型的至少在筛选方法中是次要的。适用于所述检测的本发明分析元件在每种情况下含有一对抗原缀合物，所述缀合物针对待测样品中的一种抗体。每对含有与特异性结合对 1 之配对物 2 缀合的抗原和与特异性结合对 2 之配对物 2 缀合的抗原，其中，抗原与特定的抗体型特异性结合。在每种情况下，抗原缀合物可分开放置。但是，也可将所有的抗原缀合物混合并将其放置在一个区。对含特异性结合对 1 和 2 之配对物 2 的抗原或抗体缀合物的前述一般解释也适用于所述缀合物在本发明分析元件上的定位。

用于检测流感病毒的类似分析元件可检测甲型流感病毒和/或乙型流感病毒的存在。将含特异性结合对 1 和 2 之配对物 2 的抗甲型流感病毒的抗体缀合物以及含特异性结合对 1 和 2 之配对物 2 的抗乙型流感病毒的抗体缀合物用于此目的。如果至少存在两种病毒型中的一种，本发明的分析元件在检测区就会出现阳性结果。



此外，本发明的分析元件还可含有其他功能区。例如在本发明分析元件中提供一个区，其中将血浆或血清作为澄清液体与全血分开并保留血细胞，经证明这对于检测全血是有利的。然后，只将澄清液体转运到检测区。例如 EP-A-0045476 中所述的玻璃纤维羊毛适用于从全血中分离血浆或血清。将适用于从全血中分离血浆或血清的所述介质例如放在样品施加区或样品施加区和检测区之间。

本发明分析元件的多种功能的结构提供了大大简化分析元件之显色的基础，与以前所需的显色相比，所述分析元件携带了所有检测一种或多种分析物所需的试剂，因此可缩短显色时间。

图 1 和 2 中列出了两种本发明特别优选的分析元件。

图 1 是本发明多种功能的分析元件，所述元件含有一个载体箔(6)，
一个洗脱剂施加区(4)，
一个含特异性结合对 2 之经标记配对物 1 的区(3)，
一个样品施加区(1)，

一个检测区(2)，含有无色检测线(7)，检测线上含有特异性结合对 1 之固定的配对物 1，和无色对照线(8)，对照线含有针对特异性结合对 2 之配对物 1 的抗体，

以及液体收集区(5)。在载体箔(6)平面上，所述区基本上彼此相接排列，其中在这种情况下，“彼此相接”包括在液体转运的方向，前一区与后面的区轻微重叠的情况，以便确保将液体从一个区转移到另一个区。

图 2 所示的本发明分析元件是一个完全一体化的分析元件，即它含有完成分析物检测所需的所有试剂。它还适用于检测全血。彼此相接放置在载体箔(6)上的是：

一个样品施加区(1)，
一个含特异性结合对 1 和 2 之配对物 2 的区(9)，
一个含特异性结合对 2 之经标记配对物 1 的区(3)，
血浆或血清分离区(10)，

一个检测区(2)，含有无色检测线(7)，检测线上含有特异性结合对 1 之固定的配对物 1 和无色对照线(8)，对照线含有抗特异性结合对 2 之配对物 1 的抗体，

以及液体收集区(5)。



用下列实施例进一步说明本发明。

实施例 1

核酸的检测

a) 分析元件

5 制备图 1 的检测条。用热融粘合剂 (Dynapol®S 1358 来自 Huls Ag, 德国) 将下列材料彼此相接并轻微重叠地粘在 5 毫米宽, 10 厘米长的聚酯 (Melinex® 350 微米厚, 来自 Imperial Chemistry Industries, 英国) 制成的载体箔 (6) 上

10 - 1.5 mm 厚, 1.5 cm 长, 由 100 份玻璃纤维 (直径 0.49-0.58 微米, 长度 1000 微米) 和 5 份聚乙烯醇纤维 (Kuralon®VPB 105-2, 来自 Kuraray) 组成的羊毛作为液体收集区 (5), 面积重 180/m²,

- 1.5 cm 长硝酸纤维素膜 (CN11301 型, 来自 Sartorium, 德国) 作为检测区 (2),

15 - 8 毫米长羊毛, 含 80 份聚酯纤维, 20 份人工羊毛和 20 份聚乙烯醇, 厚度 0.32 毫米, 面积重 80g/m², 其制备描述于欧洲专利文件 0326135 的实施例 1 中, 作为样品施加区 (1),

20 - 8 毫米长羊毛, 含 80 份聚酯纤维, 20 份人工羊毛和 20 份聚乙烯醇, 厚度 0.32 毫米, 面积重 80g/m², 其制备描述于欧洲专利文件 0326135 的实施例 1 中, 含金缀合物的上述羊毛作为含特异性结合对 2 之经标记的配对物的区 (3) 和

- 30 毫米长羊毛 (Binzer TI 05 型, 来自 Binzer 德国) 作为洗脱剂施加区 (4)。

检测区 (2):

25 通过划线施用 (line dosing) 到前述硝酸纤维素膜上来加入链霉抗生物素蛋白水溶液 (7mg/ml)。为了达到该目的, 选择剂量以便形成宽度约 0.5 毫米的线。线 (7) 用于检测待测分析物。随后将所述膜风干。

30 在离链霉抗生物素蛋白线约 4 毫米处, 通过划线施用来加入抗小鼠 IgG (来源: DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg, 德国) 之兔 IgG 多克隆抗体水溶液 (0.5mg/ml)。在这种情况下, 选择剂量以便形成约 0.5 毫米宽的线。将该线 (8) 作为检测条功能的对照。随后将所述膜风干。

金缀合物羊毛 (3):

- 按照 Frens 的方法 (Frens, G., 不同颗粒大小的金分散剂的制

备：自然中在单分散金悬浮液中用于调节颗粒大小的控制性成核作用，物理科学 241(1973)，20-22)，通过用 0.01%(重量)含柠檬酸三钠的四氯金溶液还原，同时煮沸来制备平均颗粒直径约 40nm 的金溶胶。

5 -按照 Roth, J 的方法(用于光电显微镜细胞化学的胶体金标记系统, Bullock, G.R. and Petrusz, P. 编, 免疫化学中的技术, 第 2 卷, 纽约, Academic 出版社, 1983, 216-284)来制备抗体金缀合物。

10 将前述金溶胶溶液冷却到室温后, 用 0.2 M K_2CO_3 调整金溶胶的 pH 以便高于抗体等电点约 0.5-1.0 个 pH 单位。金溶胶的光密度(OD)(在 525 nm 和 1 厘米光路的吸收值)通常为 1.0。将抗地高辛配基的单克隆 IgG 抗体的透析溶液(MAB(地高辛配基)IgG)(来源:Boehringer Mannheim GmbH, 德国)加到金溶胶中。选择抗体溶液的量, 以便其在金溶胶溶液中的浓度通常为 2 μ g/ml。在室温搅拌 30 分钟后, 通过加入高度浓缩的牛血清白蛋白溶液(在结合物溶液中的终浓度: 1 mg/ml)来饱和金结合物。

15 用 20 mM Tris 缓冲液 pH8.0 通过超滤将金缀合物浓缩到光密度通常为 20。随后将缀合物溶液与终浓度为 100 μ M Brij®和 0.05%(重) NaN_3 混合。

-用浸渗缓冲液, 以 1: 1 的比例, 将用该方法制备的金缀合物(光密度, OD = 20)调整至光密度 OD = 10。浸渗缓冲液含下列组分:

20 占重量 1% 的蔗糖
200 mM HEPES
100 mM 氯化钠
140 mM 尿素
6 mM N-乙酰半胱氨酸
25 2 mM EDTA
占重量 0.1%吐温®20。

30 首先将聚酯-人工-羊毛-聚乙烯醇混合的羊毛以匀速拉伸通过含浸渗溶液的箱, 随后以 250 微米的间隔在两个不锈钢卷之间压, 然后用循环空气干燥器干燥。在所述条件下, 羊毛的浸渗作用通常约 270 ml/m²。

b) 检测砂眼衣原体的扩增产物

扩增 143 个碱基对的砂眼衣原体隐蔽性质粒片段(7.5kb)。为此,

使用砂眼衣原体引物和捕获探针套的引物 (Boehringer Mannheim, 德国)(引物 1: 20-聚体, 位置 274-295; 引物 2: 24-聚体, 位置 393-416rev).

5 -用 DIG-11-dUTP(地高辛配基的 DIG 链)和 5'生物素化捕获探针 (Boehringer Mannheim, 德国)进行标记。

10 -PCR 主混合物含有 2.5 U Taq 聚合酶, 10 μ l 10 倍 PCR 缓冲液, 该缓冲液含有 25mmol 氯化镁, 0.2 μ M 两种引物, 0.1 mmol 每种脱氧核苷酸和 0.02 mmol DIG-11-dUTP. 这产生 1: 5 DIG-11-dUTP 对脱氧核苷酸的标记化学计量学。用移液管通过加入 10 μ l 含约 100 拷贝/ μ l 隐蔽性质粒片段和蒸馏水的溶液, 而使主混合物达到 100 μ l. 将主混合物在 94 $^{\circ}$ C 解链 10 分钟, 然后进行 35 个循环, 其中每次在 94 $^{\circ}$ C 保持 40 秒, 在 52 $^{\circ}$ C 保持 30 秒, 在 72 $^{\circ}$ C 保持 45 秒。在用溴乙锭染色的 2.5%琼脂糖凝胶上检测 PCR 产物。

15 -为了进行杂交, 将 1 μ l 5'生物素-标记的捕获探针(位置 354-374)以 30 μ mol 的浓度加至 50 μ l 的扩增产物中。因此, 经标记的捕获探针以 0.6 μ mol 的浓度存在。随后在 95 $^{\circ}$ C, 将样品解链 5 分钟, 然后在 37 $^{\circ}$ C 杂交 15 分钟。

20 -为了在前述图 1 的检测条上检测核酸, 将 5 μ l 杂交产物加到样品施加区 (1)。然后, 将检测条的洗脱剂施加区 (4)在层析缓冲液中浸 5 秒钟, 必须小心不要将含金缀合物的区 (3)浸在液体中。层析缓冲液含有下列组分: 占重量 0.9%的氯化钠, 50 mM 磷酸钾, 占重量 0.09%的叠氮钠, 占重量 2%的牛血浆白蛋白和占重量 0.25%的吐温[®]20。

25 10 分钟后, 层析缓冲液从洗脱剂施加区 (4)迁移到液体收集区 (5)。在检测区 (2)肉眼可清楚地观察到 2 条红线, 这样红检测线(含链霉抗生物素蛋白)表示阳性结果, 而红对照线(含 PAB(小鼠 Fc γ))标分析元件功能正常。

实施例 2

检测甲型和乙型流感病毒

a) 分析元件

30 制备图 1 的检测条。分析元件的所有组分对应于实施例 1 中用于检测核酸所述的分析元件。

b) 流感病毒·特异性免疫试剂



从 Fitzgerald Industries Int. Concord, Massachusetts, USA 得到用于检测甲型和乙型流感病毒之核蛋白的抗体。

-为了制备抗甲型流感病毒之核蛋白的小鼠 IgG 的生物素标记的单克隆抗体,将生物素的琥珀酰亚胺酯衍生物以 6 倍摩尔过量加到在 0.1 M 磷酸钾 pH8.5 中的 20 mg/ml 抗体溶液中。在 25℃ 将混合物保温 90 分钟,同时搅拌。通过用赖氨酸补充溶液达到 10 mM 的终浓度来终止反应。透析除去过量的生物素化试剂,然后将溶液冷冻。

-用相似的方法制备抗乙型流感病毒之核蛋白的生物素化单克隆抗体。

-为了制备抗甲型流感病毒之核蛋白的地高辛配基化的 (digoxigenylated) 单克隆抗体,将溶解于二甲亚砜 (DMSO) 的琥珀酰亚胺酯衍生物以 4 倍摩尔过量加到在 0.1 M 磷酸钾中的 10 mg/ml 单克隆抗体溶液中,以便 DMSO 在溶液中的终浓度为 5% (体积)。在 25℃,将混合物保温 60 分钟,同时搅拌。通过加入 1 摩尔赖氨酸水溶液来终止反应以便赖氨酸的终浓度为 10 mM。通过对 20 mM 磷酸钾缓冲液 pH8.0 透析除去过量的地高辛配基化试剂,然后将溶液冷冻直至使用。

-用类似前述将抗甲型流感病毒之核蛋白的单克隆抗体地高辛配基化的方法来制备抗乙型流感病毒之核蛋白的地高辛配基化单克隆抗体。

所用的甲型和乙型流感病毒抗体是型特异性的,即甲型流感病毒抗体仅识别甲型流感病毒的核蛋白,而乙型流感病毒单克隆抗体仅识别乙型流感病毒的核蛋白。但是,所述抗体不是亚型特异性的,即抗甲型流感病毒的单克隆抗体并不识别所有的甲型流感病毒亚型。

c) 检测甲型流感病毒和/或乙型流感病毒

将稀释的病毒培养上清液用作样品材料以说明本发明分析元件的灵敏度。将病毒在 MDCK 细胞上培养,该细胞是永久的狗肾细胞系。33℃,在常规培养基中培养约 7 天。将 H3N2 亚型 (北京 32/92 系) 作为甲型流感病毒的代表培养,将 B/harbin7/94 系作为乙型流感病毒的代表培养。用培养基双倍稀释培养物上清液。

将 65 μ l 来自不同稀释度的培养物上清液,15 μ l 裂解缓冲液 (溶于含牛血清白蛋白的生理盐水的 6% Zwittergent®3-10), 在下列两种情况下,将 5 μ l 抗甲型流感病毒的生物素化单克隆抗体溶液和 5 μ l



抗甲型流感病毒的地高辛配基化单克隆抗体溶液移到 Eppendorf 管中以检测乙型流感病毒, 或将 5 μ l 抗乙型流感病毒的生物素化单克隆抗体溶液和 5 μ l 抗乙型流感病毒的地高辛配基化单克隆抗体溶液移到 Eppendorf 管中以检测乙型流感病毒(在每种情况下, 抗体缀合物储备液的浓度均为 20 μ g/ml)。通过振荡将裂解的样品简单匀浆, 然后将 80 μ l 移到图 1 检测条的金缀合物羊毛(3)上。随后, 将检测条的洗脱剂施加区(4)在层析缓冲液(占重量 0.9% 的氯化钠, 50 mM 磷酸钾, 占重量 0.09% 的叠氮化钠, 占重量 2% 的牛血浆白蛋白和占重量 0.25% 吐温®20)中浸大约 5 秒钟。在 10 分钟后, 在检测区(2)可读到检测结果。

在以 1: 64 稀释的甲型流感病毒的培养物上清液中, 观察到表明阳性结果的红检测线。在乙型流感病毒培养物上清液的情况下, 直至 1: 128 的稀释度仍可产生阳性结果。在所有情况下, 红色对照线均说明检测条的功能正常。

实施例 3

检测 HIV 抗体

a) 分析元件

制备图 2 的检测条。用热溶粘合剂(Dynapol®S 1358 来自 Huls Ag, 德国)将下列材料彼此相接并轻微重叠地粘在 4 毫米宽, 10 厘米长的聚酯(Melinex® 350 微米厚, 来自 Imperial Chemistry Industries, 英国)制成的载体箔(6)上

- 0.9 mm 厚, 1.4cm 长, 由 100 份玻璃纤维(直径 0.49-0.58 微米, 长度 1000 微米)和 5 份聚乙烯醇纤维(Kuralon®VPB 105-2, 来自 Kuraray)组成的羊毛作为液体收集区(5), 面积重 100g/m²,

- 1.5 cm 长硝酸纤维素膜(CN11301 型, 来自 Sartorium, 德国)作为检测区(2),

- 1.2cm 长羊毛, 由 100 份玻璃纤维(直径 0.49-0.58 微米, 长度 1000 微米)和 5 份聚乙烯醇纤维(Kuralon®VPB 105-2, 来自 Kuraray)组成的由 Brij®(占重量 1%)浸渗的上述羊毛作为血浆或血清分离区(10), 面积重 100g/m²,

- 12 毫米长羊毛, 含 80 份聚酯纤维, 20 份人工羊毛和 20 份聚乙烯醇, 厚度 0.32 毫米, 面积重 80g/m², 其制备描述于欧洲专利文件 0326135 的实施例 1 中, 含金缀合物的上述羊毛作为含特异性结合对 2

之经标记配对物的区(3),

- 12 毫米长羊毛, 含 80 份聚酯纤维, 20 份人工羊毛和 20 份聚乙烯醇, 厚度 0.32 毫米, 面积重 80g/m^2 , 其制备描述于欧洲专利文件 0326135 的实施例 1 中, 含有地高辛配基化和生物素化 HIV 抗原的上述羊毛作为含特异性结合对 1 和 2 之配对物 2 的区(9), 和

- 8 毫米长聚酯纤维(PE 280 HC, 来自 Seidengaze Thal 瑞士), 用湿润剂浸渗, 作为样品施加区(1)。

检测区(2):

通过划线施用到前述硝酸纤维素膜上来加入链霉抗生物素蛋白水溶液(4 mg/ml)。为了达到该目的, 选择剂量以便形成宽度约 0.4 毫米的线。该线用于检测 HIV 抗体。随后将所述膜风干。

在离链霉抗生物素蛋白线约 4 毫米处, 通过划线施用来加入抗小鼠 IgG(来源: DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg, 德国)之兔 IgG 多克隆抗体水溶液(0.5 mg/ml)。在这种情况下, 选择剂量以便形成约 0.4 毫米宽的线。将该线(8)作为检测条功能的对照。随后将所述膜风干。

金缀合物羊毛(3):

-按照实施例 1a 所述制备平均颗粒直径约 40nm 的金溶胶。

-按照实施例 1a 所述制备抗体-金缀合物。

-用浸渗缓冲液, 将用该方法制备的金结合物(光密度, OD = 20)调整至光密度 OD = 3(在 525nm 和 1 厘米光路的吸收值)。浸渗缓冲液含下列组分:

100 mM HEPES, Ph7.5

50 mM 氯化钠

占重量 0.5% 的蔗糖

70 mM 尿素

3 mM N-乙酰半胱氨酸

1 mM EDTA

占重量 0.1% 的吐温®20。

首先将聚酯-人工-羊毛-聚乙烯醇混合的羊毛以匀速拉伸通过含浸渗溶液的箱, 随后以 250 微米的间隔在两个不锈钢卷之间压, 然后用循环空气干燥器干燥。在所述条件下, 羊毛的浸渗作用通常约 270ml/m^2 。



含地高辛配基化和生物素化 HIV 抗原的羊毛(9):

在国际专利申请 PCT/EP95/02921 的实施例 1 中描述了从 HIV I 的 gp41 区域制备地高辛配基化肽和生物素化肽。在每种情况下, 将各个的肽两两配对作为地高辛配基和生物素衍生物。其在浸渗溶液中的混合浓度为 $0.7 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ 至 $3 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ 。另外, 浸渗溶液含有:

100 mM MES 缓冲液, pH6.0

50 mM 氯化钠

占重量 25% 的蔗糖

占重量 1% 的牛血清白蛋白

3 mM N-乙酰半胱氨酸

占重量 0.06% 的吐温®20

1 mM EDTA

首先将聚酯-人工-羊毛-聚乙烯醇混合的羊毛用该浸渗缓冲液浸渗, 然后用循环空气干燥器干燥。羊毛的浸渗作用通常约 270 ml/m^2 。

b) 检测 HIV 感染

将约 $60 \mu\text{l}$ 样品量(血浆或血清)加到前述图 2 之检测条的样品施加区(1)。15 分钟后, 肉眼观察检测区(2)。在对照线(8)位置上的红紫色线说明未反应的样品(未检测到 HIV 感染)。两种红紫色线, 一条在对照线(8)的位置, 另一条在检测线(7)的位置, 说明有反应的样品(可检测到 HIV 感染)。

说明书附图

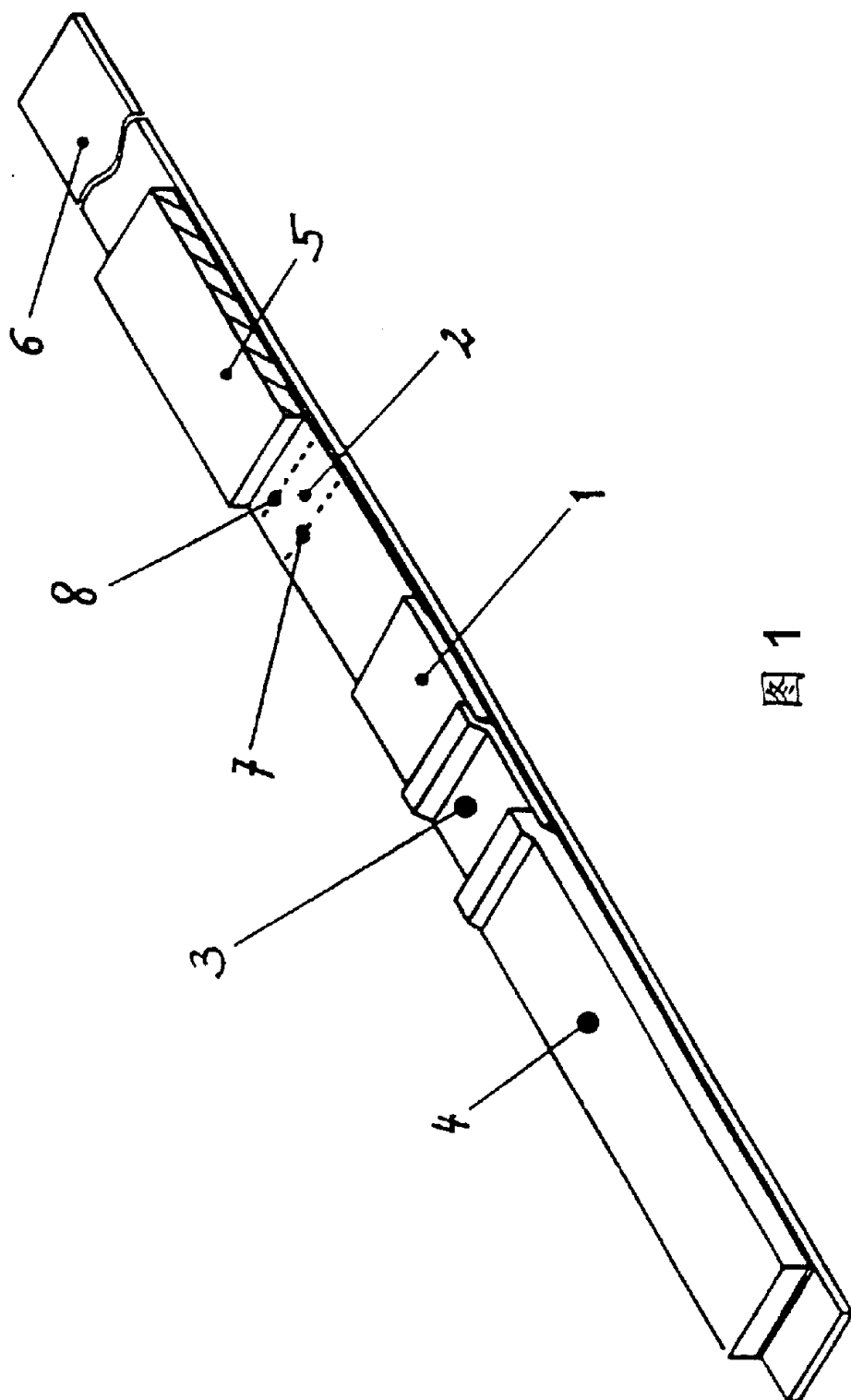


图1

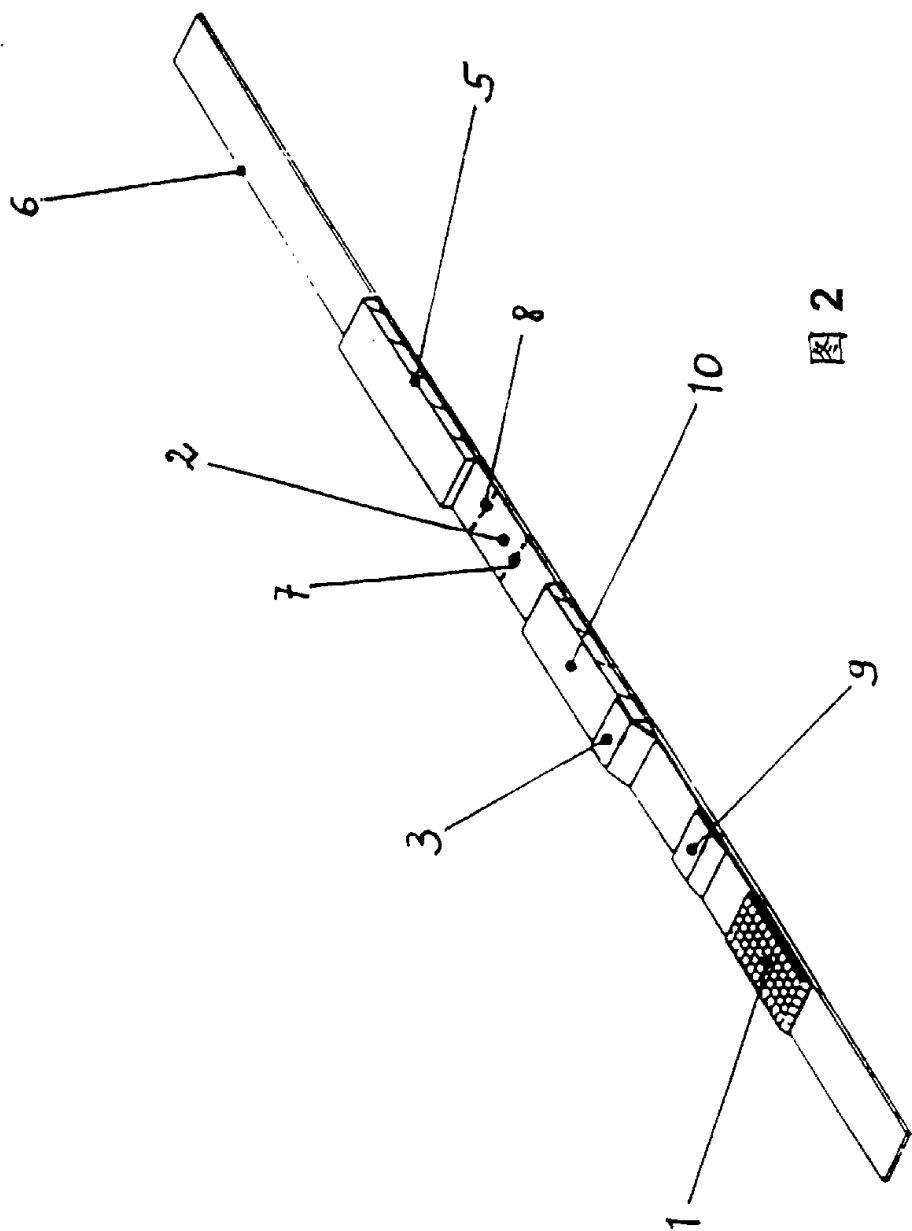


图 2