



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93119290.0

[51]Int.Cl⁵

G01N 33 / 53

[43]公开日 1994年9月14日

[22]申请日 93.9.8

[30]优先权

[32]92.9.8 [33]US[31]941,667

[71]申请人 太平生物技术有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 杨锡铭 M·牛顿 刘平

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王景朝

G01N 30 / 00

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 包括改进流体流动的疏水装置的分析物检测器

[57]摘要

检测液体试样中分析物的免疫色谱检验装置,包括含有施加液体试样的入口和多个可渗液体材料的箱室,这些材料用于接收,处理和促使试样流经箱室的移动;最好,第一可渗液体材料用于接收液体试样;第二可渗液体材料位于第一可渗液体材料之下;第三可渗液体材料位于第二可渗液体材料之上;还有用于防止第一和第三可渗液体材料之间的液体连通的装置;与第三可渗液体材料液体接触的吸附芯材料接受试样;和位于箱室的试剂,以展示免疫检验的结果。

权 利 要 求 书

1. 免疫色谱检验装置，此装置包括：

具有试样导入口的箱室；

所述箱室内所述入口之下的第一可渗液体材料，用于接受通过所述入口而导入的液体试样和限定一试样接受区；

所述箱室内所述第一可渗液体材料之下的第二可渗液体材料，用于接受来自第一可渗液体材料的试样，所述第二可渗液体材料是吸附剂和限定一试样转移区；

所述箱室内靠近所述第一可渗液体材料的第三可渗液体材料，用于接受来自第二可渗液体材料的试样，所述第三可渗液体材料位于所述第二可渗液体材料的顶部；

包含嵌入所述第一和第三可渗液体材料之间的疏水材料的装置，以防止来自所述第一可渗液体材料的试样向第三可渗液体材料的直接转移；

与所述第三可渗液体材料有液体接触的长条吸附芯材料，用于接受来自第三可渗液体材料的试样；和

置于箱室内的用于展示试样免疫检验结果的试剂。

2. 根据权利要求 1 的检验装置，其中第一和第三可渗液体材料和疏水材料一起在物理上结合成一个整片，它与第二可渗液体材料分开。

3. 根据权利要求 1 或 2 的检验装置，其中第一可渗液体材料是一多孔材料。

4. 根据权利要求 1、2 或 3 的检验装置，其中第一可渗液体材料是多孔热塑性聚合物。

5. 根据权利要求 3 或 4 的检验装置，其中第三可渗液体材料是多

孔材料。

6. 根据权利要求 5 的检验装置，其中第三可渗液体材料是多孔的热塑性聚合物。

7. 根据权利要求 4 或 6 的检验装置，其中所述的多孔热塑性聚合物是高密度聚乙烯。

8. 根据权利要求 5、6 或 7 的检验装置，其中第一可渗液体材料的孔径比第三可渗液体材料的孔径要小。

9. 根据权利要求 1, 3, 4 或 7 的检验装置，其中第一可渗液体材料的孔径不大于 300 微米，和起过滤试样的作用。

10. 根据权利要求 1 的检验装置，其中还包括与所述长条吸附芯材料有液体接触的吸附材料。

11. 免疫色谱检验装置，此装置包括：一箱室，在此箱室内的试样接收区，与该试样接收区流体连通的可渗液体材料，与该可渗液体材料流体连通的长条吸附芯材料，和置于箱室内展示免疫结果的试剂，此试剂包括由可渗液体材料支持的检测试剂，以检测流体试样中某一分析物的存在，其改进之处在于此检测装置还包括一含有用于防止样品接收区和支持检测试剂的可渗液体材料之间的直接流体连通的疏水材料的装置，同时通过一第三材料使样品接收区和可渗液体材料之间实现间接流体连通。

12. 根据权利要求 11 的检验装置，其中试样接收区也用于对流体试样进行预处理。

13. 根据权利要求 12 的检验装置，其中是用取自人体对照流体试样免疫化的动物上的固定了的抗体对流体试样进行预处理。

14. 根据权利要求 13 的检验装置，其中所述对照流体试样在免疫色谱检验中显阴性。

15. 根据权利要求 11 的检验装置，其中可渗液体材料是多孔热塑

性聚合物。

16. 根据权利要求11的检验装置,其中疏水材料是不可渗液体的热塑性聚合物。

17. 根据权利要求16的检验装置,其中疏水材料是聚丙烯热熔粘结剂。

18. 根据权利要求11的检验装置,其中改进还包括检验装置中防止流溢的装置。

19. 根据权利要求18的检验装置,其中防止流溢的装置是一隔板,它控制从可渗液体材料向吸附芯材料的液体流动。

20. 根据权利要求18或19的检验装置,其中防止流溢的装置包括靠近隔板的凹池以收集箱室内汇聚的液体。

21. 根据权利要求11的检验装置,其中箱室还包括至少两个支持吸附芯材料的沿流体流动方向伸展的支梁,所述支梁在支梁之间限定至少一个凹槽,其中可汇聚过量液体。

22. 用于免疫色谱检验的试样处理垫,此处理垫包括:由疏水隔层分开的至少第一和第二可渗液体材料,和越过疏水隔层延伸的第三可渗液体材料,连接所述第一和第二材料和使它们之间形成液体连通。

23. 根据权利要求22的试样处理垫,其中至少一个所述可渗液体材料是多孔热塑聚合物。

24. 根据权利要求22或23的试样处理垫,其中所述的疏水隔层是聚丙烯、聚硅酮或橡胶。

25. 根据权利要求22或23的试样处理垫,其中所述疏水隔层是高密度聚乙烯。

26. 根据权利要求22的试样处理垫,其中所述可渗液材料中至少一种是玻璃纤维垫。

包括改进流体流动的疏水装置的分析物检测器

本发明是涉及适于检测生物试样中存在某特定分析物的医用检验装置,具体地,是涉及免疫学色谱检验装置。

可以得到许多检测生物试样中给定分析物的装置,它们的设计形式各异。除了这类装置需要大量试管、小瓶和支托结构外,免疫检验装置是装在各种外观、形状和颜色的箱室或壳体中。所谓一步法检验是用者把生物试样加到一个样品施加孔和得到相应于生物试样中有或没有某个被测分析物的阳性或阴性信号。这些检验装置是复杂的,它们必须把许多免疫色谱分析元件引入检验箱室中。因为一步法检验要求一个简便操作的有限装置,因此目的在于减小假阳性信号和改善检验灵敏度的设计变化对于本技术领域会做出明显的改进。

现在在本领域可以得到许多一步法免疫色谱检验装置。这些系统一般都是把样品加到一个接收孔。样品与常常是连接在色原塞上的特定试剂相接触。试样中可检测分子与试剂相络合和通过检验装置被吸住,在检验装置中它们通常最终被某一位置的对待测分析物特效的第二试剂所固定,并在此位置产生阳性的反应信号。检验中包括的其它信号还有阴性反应指示和检验完成指示。

这类免疫色谱检验装置有许多潜在问题。如果液体试样通过吸着芯材料(Wicking material)流动太快,可检测分子就不能被保持住。它们留在后面,因而不能准确地被检验装置检测。选择检验材料和它们的大小将决定液体通过检验装置的速度。这材料和尺寸也影响检测分子通过检验时流动的均匀度以及在样品中可检测的各种分析物的相容性。这些特征都会影响检验的准确性。

另外,由于吸着芯材表面水迹的存在也常常误导一步法检验的结果,这些水迹是由于表面下边液体的汇集造成的。在一步法检验中过量的液体不仅产生水迹,还会被错误地解释为阳性反应,而且过量

液体还能流溢一步法装置,造成假的阴性信号。

本发明公开的检验系统对本技术领域作出重大改进。例如,本发明除了防止液体流溢和水迹的出现,还提供在较短的检验时间内试样通过装置的更平稳的流动。本发明还提供在试样中各种分析物的广泛的兼容性。另外,此装置的构形还至少提供两个分开的反应室,它们互相没有直接的液体连通。这些分开的样品处理室可使许多连续的样品操作合并为一步法检验。

具体地,本发明包括一个检测液体试样中分析物的免疫色谱检验装置,和使用此装置的方法。此装置最好包括一个箱室,它包含施加液体试样的孔和装于箱室内的多个可渗透液体的材料,这些材料适于接收、处理和有利于样品通过箱室的移动。在本发明一个优选实施中,第一可渗液体材料用于接受液体试样,和第二可渗液体材料位于第一可渗液体材料的下边。第三可渗液体材料则位于第二可渗液体材料的上边,和为防止在第一和第三可渗液体材料之间液体的直接沟通而提供有一个装置。与第三可渗液体材料有流体接触的吸着芯材料则接受了试样。装在箱室内的试剂则显示了免疫学检验的结果。

本发明一种实施包括一个免疫色谱检验装置。此装置包括:一箱室,它有一导入试样的孔,在此孔之下用于接收通过此孔导入的液体试样和限定试样接收区的箱室内的第一可渗液体材料;在第一可渗透液体材料之下用于接收从第一可渗液体材料而来的试样的箱室内第二可渗液体材料,此第二可渗液体材料是吸附剂和限定试样转移区;靠近第一可渗液体材料的箱室内的第三可渗液体材料,用于接受从第二可渗液体材料而来的试样,此第三可渗液体材料位于第二可渗液体材料的顶部;插入第一和第三可渗液体材料之间的疏水材料,来防止试样从第一可渗液体材料向第三可渗液体材料的直接转移;与第三可渗液体材料有流体接触的一长条吸附芯材料,用于接收而来的试样;和可操作地位于箱室内的试剂,以显示试样免疫学检验的结果。在一种实施中,第一和第三可渗液体材料与疏水材料机械上联成一体为一整片,并与第二可渗液体材料分开。在另一种实施中,第

一可渗液体材料可以是多孔的热塑性聚合物。第三种可渗液体材料也可以是多孔的热塑性聚合物。在此两种情况下,有利地这多孔热塑性聚合物可以是高密度聚乙烯。第一可渗液体材料的孔径最好比第三可渗液体材料的孔径要小。第一可渗液体材料的孔径最好不大于300微米,因而能起到对导入装置的试样的过滤作用。

本发明的另一方面是涉及一改进的免疫色谱检验装置,它包括:一箱室,一试样接收区,一支载检测试剂的可渗液体材料以检测流体试样中分析物的存在,一长片吸附芯材料和可操作的位于箱室内的试剂以显示免疫检验的结果,其改进之处包括:防止在试样接受区和支载检测试剂的可渗液体材料之间的液体直接连通的装置。这检验的一种实施中,试样接受区可用于液体试样的预处理。而且,此液体试样也可以用取自来源于人体的对照液体试样免疫化的一动物的固定了的抗体进行预处理。优选的是对照液体试样在免疫色谱检验中呈阴性。

在本发明的检验中,防止第一和第三可渗液体材料之间液体的直接连通的装置可以有利地包括一疏水的隔层。例如这隔层可以是热熔的聚丙烯粘结剂,或别的不渗液体的热塑性聚合物。

本发明还包括用于免疫色谱检验的试样处理垫,它包括至少两个用疏水隔层隔开但与第三可渗液体材料相连的可渗透液体材料。优选地,至少一个可渗液体材料是多孔的热塑聚合物。疏水隔层可以有利地为聚丙烯、聚硅酮、橡胶或高密度聚乙烯。

在本发明另一优选实施中,还提供防止检验装置中发生流溢的装置。最好,此防止流溢的装置是一分配器,它控制液本从可渗液体材料向吸附芯材料的流动,和在更优选实施中,此装置还包括一个位于靠近分配器的凹池,以收集在箱室中流溢的液体。

本发明检验系统适用于,但不限于,本文公开的两种箱室设计。这检验系统还可采纳美国设计专利324,426主题的箱室设计。同样,本发明设计也可以并入其它任何数目的箱室中。本检验设计可用于采用显色的免疫色谱技术的生物试剂的定量和/或半定量分析中。

图1是适于实施本发明检验构型的优选箱室结构的顶视图。

图2是图1优选箱室构型的底视图。

图3是位于图1和图2例示的箱室内的本发明的免疫色谱元件最佳实施的截面图。

图4是组装成图1和图2箱室中免疫色谱元件的延展视图。

图5本发明另一最佳实施的顶视图。

图6是包含本发明优选免疫色谱元件的图5实施的截面图。

在本发明一种实施方案中，检验系统组装于图1所例示的箱室中，和在本发明另一种实施方案中，检验系统组装于图5所例示的箱室中。两套方案相应元件都用相同编号标记。参考图1，箱室装置10包含试样施加井12。适于向试样施加井12施加的试样包括，但不限于，体液，如尿、血、浆液、从拭子 (swab) 或排泄物的提取物、以及它们的组合。

此箱室还包含位于检验完成窗16和试样施加井12之间的结果窗14。在上壳表面还可包括一排气孔18。位于箱室顶部的其它开孔优选地可包括一干燥孔20和托槽22。在一实施例中，托槽22用于放置试样杯。

图2是图1所示相同箱室构型的底视图。最好，此箱室用放在下壳26内的免疫色谱试剂组装。上壳24沿顶端封死。图2提供了组装箱室下面的底视图。下壳表面28最好开成凹槽，以提供吸附芯材料的多台阶支托30，此吸附芯材与图4相关所讨论的免疫色谱组件相联。

图4是在本发明范围内以最小数目的免疫色谱元件完成的优选的拆开装置延展视图。色谱组件沿多台阶支托30铺设。在图4的实施，第一可渗液体材料32装在第二可渗液体材料34的顶部。在此实施中，第三可渗液体材料36再铺设在第二可渗液体材料的顶部。

此实施方案也包括装在第一可渗液体材料32和第三可渗液体材料36之间的疏水材料38。疏水材料38防止可渗液体材料32和36之间的液体连通。在本发明的优选实施中，第一可渗液体材料32、疏水材料38和第三可渗液体材料36组装成一个单一的单元—试样处理垫56。组件例如可用粘结剂或超声焊接来装配。此单元置于第

二可渗液体材料 34 的顶部，此两物件再置于支托 30 的第一台阶 40 之上。托臂 42 最好沿着下壳固定可在可渗液体材料的两个位置和支托上壳。疏水隔层 38 可包括任何不渗水材料，如热熔粘结剂（常用聚丙烯）、其它聚合的或别的不渗水粘结剂、塑性材料的片或块，这样的塑性材料如聚乙烯（包括高密度聚乙烯）、PVC、聚硅酮、橡胶等。

吸附垫 44 放在托臂 42 之间的支托的第二台阶 46 之上。吸附芯材放在支托的第三台阶 50 之上。吸附芯材的长度要延伸至第三台阶 50 之外，以与第三可渗液体材料和吸附垫 44 重叠和接触。

上壳置于下壳的顶上，以便试样施加井 12 与第一可渗液体材料 32 直接连通。吸附芯材 48 在结果窗 14 和检验完成窗 16 之下延伸。排气孔 18 则位于吸附垫 44 之上。此孔通过使垫在检验中干燥而有助于吸附芯的作用。

可渗液体材料 (32、34 和 36)、吸附材料 44 和吸附芯材料 48 分别被多台阶支托 30 的第一、第二和第三台阶 40、46 和 50 所支托。以截面所示的托臂 42 使可渗和吸附材料与上壳 24 支托互相对准。

免疫色谱试剂装在下壳 26 上。上壳 24 则用任何本领域已知技术固定在下壳 26 之上，这些技术包括但不限于螺纹连接和槽式接合、粘结剂、卡锁等。

图3 提供了图4 组装设备通过上壳 24 和下壳 26 的截面图。为便于说明，试样施加井是在装置的“顶部”和加于其上的试样是“向下”进入装置。当待测生物液体试样加到试样施加井 12 中，流体通过第一可渗液体材料 32 向下和进入第二可渗液体材料 34。液体穿过（图 3 中向左）第二可渗液体材料和向下进入第三可渗液体材料 36，并到达吸附芯材料 48。在第一和第三可渗液体材料之间的疏水材料 38 在它们之间充当了防止液体直接通过的隔层和引导液体从第一可渗液体材料通至第二可渗液体材料。

流体穿过吸附芯材（图3 中向左）是受如下因素所驱动：部分是由于试样多少、试样种类和试样粘度，也由于对吸附垫 44 材料的选择，以及（当然）由于毛细管作用。因此给定体积的尿要比等量的血浆可能更快地穿过该设备。流动除受吸附芯材的选择和大小的控制之

外还受可渗液体材料的选择的控制。本领域人员会可解到可渗液体材料 32、34、36 的孔隙大小是决定流速的重要因素。而且,第一可渗液体材料 32 的孔径尺寸最好既要足够小以过滤和保留试样中存在的不希望的颗粒,又要足够大以使流体按所希望的流速流过。第二可渗液体材料 34 应以对被测分析物最小的阻留而使试样流体和可溶解的缓冲剂填料(预先固定在可渗液体材料中)流过。

试样中液体通过设备的流速对于检验灵敏度是重要的。如果液体比分析物移动得快,那么在分析物被检测之前吸附芯作用就可能终止。如果液体移动太慢,检验时间拖长和阳性反应信号需要更长的检测时间。检验时间还受第一可渗液体材料 32 和吸附垫 44 之间的总长度的影响。

在本发明一优选实施中,第一和第三可渗液体材料是从不吸附的不反应的多孔材料,如高密度聚乙烯来制备的。用于实施本发明的高密度聚乙烯材料的一个实例是 POREXTM (Porex Technologies, Fairburn, Georgia)。POREXTM和其它类似产品是相当惰性的和能耐受各种不同化学品和 pH 范围。POREXTM或其它等价产品是制成具有各种孔径的,可以根据起过滤作用、改变试样流速或适合试样不同大小来选择具自各种孔径的 POREXTM。小的孔径可从试样中滤出颗粒,而中等孔径则可促进通过设备的流速。因此在本发明一种实施中,第一可渗液体材料最好用小孔高密度聚乙烯材料制备和第三可渗液体材料最好用中等孔径的高密度聚乙烯材料制备。适宜的孔径范围如下:小孔 70 ± 20 微米,中孔 150 ± 30 微米,大孔 300 ± 50 微米。

第二可渗液体材料最好是吸附材料,这种材料市售产品的例子有:Whatman 1-5 号纸,Ahlstrom 939-39 (70%棉、30%木材,厚度 0.79 毫米),Ahlstrom 9259-R (厚度 1.12 毫米)(Ahlstrom 过滤公司,Holly Springs, PA),Schleicher 和 Schnell 930^{*} (100%棉)或玻璃纤维垫,如 Gelman 超薄玻璃纤维 66078^{*} (Gelman 公司,Ann

Arbor, MI)。玻璃纤维垫用于全血检验,可在垫内保持血细胞,而让血清或血浆试样流过。用作第二可渗液体材料的材料应是可吸附的,足以接收来自第一可渗液体材料 32 的流体,但又不是吸附性太强,以致将液体滞留在第二可渗液体材料中而不是向第三可渗液体材料以及向吸附芯材料转移。其它可用于作为第二可渗液体材料的吸附性材料包括,但不限于,聚酯材料如非纺织聚酯纤维垫或片。吸附性材料可以是组合材料,包括如高级织物 (Cheesecloth) 的材料与 Whatman 吸附垫相组合。第二可渗液体材料也可以从适宜的棉花和木材纤维垫制备,这些纤维垫例如 Ahlstrom 生产的称之为 939-39^{*} 的 70% 棉、30% 木的垫材。

应指出第一、第二和第三可渗液体材料将一起协同促进试样以适宜的速度通过第三可渗液体材料的移动和到达吸附芯材料之上的移动。大多数免疫色谱检验的完成时间在 1-15 分钟范围内。对于一步法检验更优选的检验时间是 1-5 分钟。这速度在部分上是决定于每个可渗液体材料的厚度、试样的粘度和可渗液体材料的孔隙率。按每一个别分析物的要求,检测和使各种材料组合最优化是本领域技术人员熟知的。在实例 3 中给出了例示的材料和尺寸。

吸附芯材料最好是适宜的色谱材料,如硝化纤维、尼龙例如 BIODYNETM (INC 生化公司, Irvine, California) 以及其它。在一优选实施中,吸附芯材料是由孔隙范围在 1-30 微米的硝化纤维制备的。在另一实施中,吸附芯材是一类高密度聚乙烯,而在又一实施中,则以例如聚乙烯纤维素的层压或非层压的固体载体来提供吸附芯材。这些材料为吸附芯材提供稳定的操作,和可用于液体试样沿吸附芯材的沟流。固体载体的型式和吸附芯材孔隙的选择会影响流速。吸附芯材应适于固定捕获的分子如一种抗原或抗体,也应适于引入一种合适的标记染料。另外,吸附芯材料还可与载体材料如纤维素或聚乙烯相结合。本领域检验设计人员都会认识到给吸附芯材料加上载体材料会影响液体的流型和速度。

吸附垫 44 可以从各种吸附材料制备,此垫最好具有足够的吸附

性以驱动液体通过垫的毛细作用。具吸附性材料是本领域人员熟知的。适合的材料包括棉、纤维素材料、玻璃纤维等。在一实施中，吸附垫是从与第二可渗液体材料相同的材料制备的，和在另一实施中，这吸附垫要比第二可渗液体材料更具吸附性。吸附垫最好比第二可渗液体材料要厚些，和在又一实施中此垫是从含 70% 棉和 30% 木材的吸附性材料制备的。

本发明的检验设计构型特别适于免疫色谱检验，以鉴定在生物试样中某特定被测分析物是否存在。这构型适于检测流体试样中任何数目的分析物，如抗原或抗体。如上所述，检验尤其适于包括尿或血浆的生物试样。还应指出例如粘液或唾液的粘性试样可用适合的酶进行稀释或消化以减小粘度，和然后再施加于此检验系统。另外如类便或增溶的细胞制剂的生物固体样品，可在适合的缓冲液中悬浮或用核酸酶素等物处理以减小试样粘度，然后再用本检验装置进行分析。

为检测试样中具体的分析物，对该分析物特效的适合的抗原或抗体要用色原颗粒来标记，这些色原颗粒例如胶乳、硒、胶态金等。在本文所用的术语“检测试剂”是代表与分析物发生具体反应的特定抗体或抗原制剂。在本发明优选实施中，此色原颗粒是胶乳。下述的实例1 公开了将胶乳连接到检测试剂上的实用程序。从厂家可得到胶乳 (Magsphere, Pasadena, CA)，这胶乳具有许多加到胶乳粒子上的反应性基团。这些反应性基团可用于促进对检测试剂的连接。例如，胶乳可以羧基化或酰胺化。本领域人员能够选择适合的反应基团以有利于和所使用的检测试剂的连接。

同时，胶乳还可以各种不同颜色而获得。颜色除影响检验的灵敏度也影响检验的美学。例如，淡颜色的结合可能比深色难于检测，因此也会减低检验的灵敏度。在下述实例公开的优选实施中，是用深色胶乳颗粒来与对分析物特效的抗体或抗原连接。在一个更优选的实施中，则用兰色胶乳颗粒与抗体连接。在实例1 中，是用 $0.433 \mu\text{m}$ 胶乳与对人体绒毛膜促性腺激素 (HCG) 特效的抗体相连接。与抗体相连接的色原颗粒最好施加到第三可渗液体材料中。加到可渗液体材料

上的与抗体连接的色原颗粒的数量应仔细控制，以使得到最佳的检验灵敏度和使假阳性反应的出现最小。

本领域有各种方法将胶乳施加于可渗液体材料上。不管可渗液体材料的组成如何，作为最普通的施加方法，可渗液体材料用一种在连接色原的液体溶液中浸泡过的纤维或可编织材料封装起来。类似地，可渗液体材料也可以浸入连接色原的液体悬浮物中。乳胶粒子必须能随液流从可渗材料中移出。因此，在本发明一优选实施中，第三可渗液体材料是高密度聚乙烯和更优选地其孔径最好在 0.1 - 1.0 微米的范围内。

在优选的方法中，连接的胶乳用喷枪喷涂在如 POREX™ 的高密度聚乙烯上。喷涂有利地提供色原在可渗液体材料中的更均匀分布。用喷枪精细涂复材料的方法是本领域人员熟知的。本实例 2 给出了将色原施加在可渗液体材料上的方法。

图 4 提供了第一和第三可渗液体材料的优选构造。此处，第一可渗液体材料 32 是使用诸如不可渗热胶、热塑聚合物等的疏水材料固定于第三可渗液体材料上。用于本发明热塑性聚合物的一个例子是高密度聚乙烯。此材料可胶结或固定在第一和第三可渗液体材料上。第一可渗液体材料 32 固定于第三可渗液体材料上并藉疏水隔层 38 分隔，这种结合体构成了图 4 所示的样品处理垫。此垫可预先装配成独立单元。此单元可大量生产，也可以定制每个样品处理垫 56，包括任何数目的检测试剂或检测试剂的组合，以进行任何数目的适于对生物试样中分析物进行免疫色谱检验。连接的胶乳可在第一和第三可渗液体材料用疏水材料连结之前或之后施加到可渗液体材料上。

参考图 3，也可以另一种方式来实施这种结构，即适宜的疏水隔层处于第一与第三可渗液体材料之间以防止它们之间的流动。例如，在本发明另一实施中，上壳 24 可以制成带有一从上壳向下延伸至第二可渗材料 34 的凸臂，以限制第一和第三可渗液体材料之间的液体连通。

可渗液体材料的这种结构赋予免疫色谱检验很重要的优点。首

先，重大改进是第一可渗液体材料脱离与含有检测试剂的可渗液体材料的直接连通。第二，这些可渗液体材料在空间上的分开就能很好控制流体通过装置的流动。因此，装置就能更好地调适施加试样的不同速度。同样，此装置也能更好地在大范围内调适试样的体积。

可渗液体材料的立体连接和在选择与试样大小有关材料及材料的尺寸中的变化带来的另外的优点是这结构提供了一种可控制流体从第一可渗液体材料、通过第二可渗液体材料而到达第三可渗液体材料的速度的装置。因此，第一可渗液体材料可用作试样的预处理区。此外，第一可渗液体材料还可用作试样接受区。试样的预处理提供给免疫色谱检验法许多重大优点，这些都是以前没有公开的。

例如，生物试样总是含有妨碍流体通过装置流动的颗粒。许多试样可以通过离心而除去粗大颗粒。但是，为除去细小颗粒则需要高速离心，这些细小颗粒能明显改变流体流动，因而影响检验的灵敏度。在本发明的优选实施中，第一可渗液体材料的孔隙足够小（如50-90微米），可以捕获会影响检验准确度的颗粒。

作为另一种预处理方式，第一可渗液体材料可用于改善检验的特异性。例如，抗体或可与对照试样反应的 $F'(ab)_2$ 碎片可以固定在第一可渗液体材料上。又如，取自用阴性对照样本免疫化的动物上的多克隆抗体也可以连接在胶乳上和固定在第一可渗液体材料上。当生物试样通过可渗液体材料移动时试样中的非特异性分子将被吸附。这个试样纯化步骤有助于试样与检测试剂的非特异性结合。

作为预处理应用的一个例子，就是将此检验用于对血清中胚胎性癌抗原(CEA)的诊断。来自CEA阴性供体的血清注入兔子中以得到与人体血清有反应性的多克隆抗体制剂。使用免疫学领域的已知方法从高标定(high-titered)实验兔子身上得到的免疫球蛋白进行纯化。此免疫球蛋白是与白色胶乳络合和固定在第一可渗液体材料内。装置如前述组装。来自含有CEA患者的血清试样加到试样施加井中。当试样通过第一可渗液体材料时即与固定的兔抗人免疫球蛋白抗体接触。在血清中存在的普通抗原即被兔抗人免疫球蛋白所

识别。此抗原被固定在第一可渗液体材料中，因而减小在第三可渗液体材料中存在的 CEA 特异抗原的非特异结合。

还有另一种实施方式，即将其它分子或化合物加到第一可渗液体材料上来预处理生物试样。如可以加入酶来消化生物试样中的特异组分，以减小粘度或改进检验的灵敏度。也可以向第一可渗液体材料中加入缓冲剂以改变 pH 或加入化学填充剂。

生物试样中存在的分析物通过第一可渗液体材料或试样接受区和进入第二可渗液体材料。这第二可渗液体材料是预先浸泡在可流动胶乳的缓冲液中然后干燥后装在装置中。试样通过第二可渗液体材料或试样转移区，和再构成干燥的缓冲液。这可流动胶乳缓冲液最好含有与其它化合物在一起的洗涤剂，以有助于在第三可渗材料中存在的与胶乳结合的检测试剂的流动。缓冲液也可以含有酪素和蔗糖。缓冲液的 pH 值有利地在 7-9 范围内，更好为 8 左右。缓冲液较好地可含有例如 5-50mM 的三(羟基甲基)氨基甲烷 (TRIZMA, Sigma, St. Louis, Missouri) 或 2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇 (TRIS) 溶液，或更好地可含有 20mM 的 TRIS 缓冲液。缓冲液较好地还可含有 5-30% 蔗糖和更好地含有 20% 蔗糖以及 0.05-5% 的 Zwittergent 3-12, 和更好地含有 0.5% Zwittergent 3-12 以及 0.01-5% 酪素 (更好为 0.1% 酪素)。这样的缓冲液能有效地促进胶乳从多孔材料上的释放，和还可以用作印染 (printing) 缓冲液。在实例 3 中提供了促进检测试剂 (与胶乳相连接) 流动的适合缓冲液的实例。

经预处理和缓冲了的试样流到第三可渗液体材料，在此它与结合在胶乳上的检测试剂接触。胶乳在缓冲了的试样中流动和随着液体前沿到达吸附芯材料。试样中的分析物与连结在胶乳上的检测试剂结合，这结合物随液体通过吸附芯材料。

试剂在吸附芯材料上的固定就实现了试样中分析物的检测。吸附芯材料 48 进行了独特的改性处理，以检测特定的分析物。再参考图 4，将可目测的水平条或横放条 52 加在吸附芯材料相应于结果窗 14 的区域上，然后把吸附芯材料 48 装在支托的第三台阶上。可使用

任何数目的适合本领域可识别的化合物，以任何数目的方法来将水平条加于吸附芯材料上。一个优选方法是使用与连接在检测试剂上的色原颗粒相同的未连接的色原颗粒，将水平条喷涂在吸附芯材料48上。更具体地，色原颗粒是0.43微米的胶乳颗粒，和吸附芯材料是8微米的硝化纤维。用喷枪在一 Zwitterionic 洗涤剂

(Zwittergents™, Calbiochem, San Diego, California) 的缓冲空白 (buffer Void) 中将胶乳喷涂到吸附芯材料上，然后等其干燥。Zwittergents™ 有助于胶乳粒子的流动。因此当加入到第二可渗液体材料中的干燥的缓冲剂中已含有 Zwittergents 时在用于活动胶乳的缓冲液中就可以没有它了。用于本发明的 Zwittergents™ 包括 (但不限于): Zwittergents 3-8, 3-10, 3-12, 3-14 和 3-16。其它类型的洗涤剂或表面活性剂也可以使用，例如离子型或非离子型的表面活性剂。

与流体流动方向平行的垂直条也涂敷在吸附芯材料上。垂直条54最好与水平条52呈90°角和最好在水平条的中心。垂直条包括能与检验的分析物结合的抗体或其它蛋白。由于蛋白与吸附芯材料表面之间的疏水反应，此蛋白固定在吸附芯材料上。此固定的蛋白最好不同于检测试剂，和象检测试剂那样特异地识别待检测的分析物。本领域技术人员都知道与胶乳连接的检测试剂应基本上不妨碍分析物和垂直条54上的蛋白的结合。因此，在优选的实施中，检测试剂和作为垂直条而沉积的蛋白可识别分析物上不同的抗原决定部位。检验检测试剂结合与在垂直条上沉积蛋白的结合之间的干扰的方法是本领域熟知的，包括但不限于：酶联免疫吸附检验法、放射免疫检验法、韦斯特恩印迹法等。和水平条一样，垂直条最好也用喷枪喷涂于吸附芯材料上。此垂直条最好是无色的，以便在试样施加之前装置的目测仅显示水平条，而这水平条解释为阴性结果。

当试样从第三可渗材料通到吸附芯材料上时，试样中的分析物就与连接在检测试剂上的色原颗粒络合。当此络合物越过垂直条时，固定在垂直条上的蛋白就与分析物结合，并使色原颗粒沿垂直条浓

集。未与分析物结合的色原颗粒通过垂直条而流向吸附垫 44。通过对垂直条的目测,就能检测生物试样中分析物的存在。由于本发明的第一、第二和第三可渗液体材料的独特构造,以及与样品预处理步骤有关的(在此实施中,是与第一可渗液体材料有关)优点,使垂直条的显色更清晰。

图4所示的实施中,垂直条与水平条一起的显色在吸附芯材料的表面展现一个交叉的影线或“+”符号,这可从结果窗 14 看到。但本领域技术人员都会理解,可以有任何数目的垂直条与水平条的构型,它们都可视作检验分析物存在与否。

另外,检验装置最好包括一检验完成指示器。它可以透过检验完成窗 16 目视。在本发明一实施中,色原颗粒与对某一普通抗原的抗体相连接,这连接体也涂敷在可渗液体材料上。另一蛋白(例如第二抗体),它可识别普通抗原对连接色原的抗体的络合物,则涂敷在相应于检验完成窗 16 位置的作为检验完成指示器 58 的吸附芯材料上。固定在吸附芯材料上的第二抗体最好是无色。

例如,白蛋白是血清中存在的普通蛋白。在生物试样中存在的白蛋白,当它通过第三可渗液体材料时与连接在兰色胶乳上的对白蛋白具有特异性的抗体接触。此络合物通过吸附芯材料,越过垂直与水平条,而与位于相当检验完成窗 16 处的吸附芯材料的对白蛋白特异的第二抗体相接触。第二抗体与白蛋白-兰胶乳络合物结合。当检验完成窗 16 下面的区域变成兰色时,检验就完成了。

另一例子是实例2所使用的,BSA 与胶乳连接,和与络合的连接分析物的检测试剂一起并入第三可渗液体材料中。连接的 BSA 穿过吸附芯材料,和与固定在检验完成条 58 上的 BSA 抗体接触。除了为完成检验和程序控制提供指示外,BSA-胶乳加到胶乳印染溶液中还改善了胶乳的流动特性。

在另一实施中,可流动染料如溴苯酚兰、二甲苯青、得克萨斯红、食品染料或其它指示剂,也可涂敷在吸附芯材料或可渗液体膜上,其涂敷位置最好在施加待测试样前是使用者看不见的。在检验完成窗或在位于吸附垫 44 之上的另一窗中存在染料也可用于作为检验完

成的指示。

此外,应指出:如果生物试样是从对鼠、兔、羊蛋白或类似物敏化的个体上得到的,在一步法免疫色谱检验中可以产生假阳性反应。此抗体通过与动物特异抗体结合而模仿一个阳性信号。因此,此检验装置可设置一个第三窗以检出非特异结合。检出非特异结合就可使结果无效。例如,小鼠抗体用于检验,与胶乳连接的抗小鼠抗体可以施加在第三可渗液体材料上。在吸附芯材料上固定的其它抗小鼠抗体可用于捕获小鼠抗体络合物。在患者试样中存在的抗小鼠抗体会与胶乳连接体结合,并在吸附芯材料上被捕获。在此窗内的兰色信号将指示此检验无效。这些个体也可用其它已知方法检测。

在图5中所示的本发明另一实施中,制成的下壳26实现了图6详细展示的装置构型。在此实施中,托臂42环绕第一台阶40,以有助于第二可渗液体材料34和试样处理垫56的定位。与图3所示实施不同,在试样处理垫56和第三支托台阶50之间设置一隔板60。在优选的实施中,这隔板是铸塑或粘结在下壳表面的一个壁。此外,在隔板60和第三支托台阶50之间形成一凹池62。在此实施中,第三支托台阶50加以改制,以包括支梁64。支梁最好是在第三支托台阶50的表面沿纵长方向(流体流动方向)伸展的升高表面。在支托台阶50的表面的凸肋之间形成凹槽,此凹槽提供了液体汇聚的附加部位。在与实例3提供的尺寸有关的最佳实施中,支梁64高于第三支托台阶表面之上0.036"。而凹池62的高度则低于支托台阶表面。在此实施中从下壳28表面算起支梁64的高度等于从下壳28表面算起隔板60的高度。因此,在此实施中,吸附芯材料48接触第三可渗液体材料36、隔板62、支梁64和吸附垫44。另外,在此实施中,吸附芯材料的长度要短至不足3.7厘米,以使检验时间低于1分钟。

图5和图6的实施对于一步法检验具有许多明显优点。例如,在箱室内试样的汇聚和试样的流溢是对检验结果产生负面影响的问题。由于吸附芯材料容纳不下,在第三支托台阶上试样流体的不可控制的汇聚或过量就会造成流体在吸附芯材料48之下由于毛细作用的移动。如果这流体的移动比流过吸附芯材料的液体前沿快和在检

验完成之前吸附垫 44 就已达饱和的话, 则检验结果就是一个折衷。然而, 隔板 60 和凹池 62 一起控制了流体流动并接纳了箱室中过量的流体。而且, 设置了支梁 64 作为吸附芯材料 48 的支托。经仔细考虑, 当吸附材料 48 位于第三支托台阶 50 时, 吸附芯材料最好仅沿着流体支托台阶表面接触支梁 64。这些支梁最好不接触吸附芯材料的诊断表面, 包括置于结果窗之下的水平条 52 和垂直条 54。

减小第三支托台阶和吸附材料之间的接触给如本文所述的一步法装置带来重要的优点。首先, 和隔板 60 及凹池 62 一样, 支梁 64 防止试样流体在吸附芯材料上的流溢。过量流体沿支梁 64 之下的第三支托台阶 50 表面通过和到达吸附垫。另外, 减小吸附芯材料和第三支托台阶之间的接触明显减少吸附芯表面水迹的出现。水迹是由于在吸附芯材料之下积聚的阻留流体造成的, 和在吸附芯材料之下捕集的过量流体形成的水迹在其它检验装置中有可能被解释为假的阳性结果。

应指出: 无论在上述讨论和下面详述的实施例中都有各种变化。本领域人员会理解: 在使用不同的分析物/检测试剂的组合的不同生物样本中, 每个分析物/检测试剂组合以及诊断分析的方法都需要单独的试验和最优化。但是, 为适应试样的变化或为适应与具体分析物相关的变化, 本领域人员易于作出对本发明检验方法的变更。

实例1

试剂的胶乳连结

抗体或抗体碎片 $f(ab')_2$ 与均匀胶乳粒子连结的方法

两步连接程序: 针对待测分析物的抗体可以是多克隆或单克隆。在本检验中使用的实例是鼠抗 β -HCG 单克隆抗体, 或羊抗人 IgM 多克隆抗体。在连接前用胃蛋白酶消化可使抗体改性, 得到来自单克隆抗体或多克隆抗体的 $f(ab')_2$ 碎片。羧基化的均匀的胶乳粒子 (0.2 - 0.5 微米, 来自 Magsphere Inc) 或 Seradyn (Indianapolis, In), 浓度为 0.5% (重量/体积), 在 pH5.5 的 20 毫摩 MES 缓冲液中含有 0.2% EDAC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳化二亚

胺和 0.1% Sulfo-NHS (N-羟基磺基琥珀酰亚胺), 室温下活化 2 小时。在一 Amicon 搅拌器中洗涤而除去过量的 EDAC。接着将适量抗体加到胶乳悬浮液中 (此处重量比为 1 毫克抗 β -HCG 抗体对 35 毫克胶乳粒子)。此混合物在 pH 6.5 的 MES 缓冲液中室温下温养 2 小时。然后, 用声波输出探头对溶液进行声波处理, 使微聚集体碎裂。此连接胶乳在含有适宜试剂的印染溶液中以 3% (重量/体积) 的浓度再悬浮, 这些适宜的试剂可促进胶乳在多孔膜沿横向的流动。这些试剂如 20% 蔗糖、0.5% 酪素、0.5% ZwittergentTM 3-12 和 20 毫摩的 Tris-HCl、pH 8.5。用竞争放射免疫检定法来测定每个胶乳粒子上抗体的量。抗体在胶乳上的有用浓度较好为 5-100 微克抗体/毫克胶乳粒子和更好为 10-50 微克抗体/毫克胶乳粒子。在一具体实例中使用了平均为 26 微克抗体/毫克胶乳粒子。通过在 500 微米处的光吸收乘以常数 8.65 测定了在 0.1% Tween 中稀释 1:1000 的胶乳粒子的浓度。(上述常数是从实验配方推导出的, 此配方确定了用 0.1% TWEEN 20 准确稀释 1:1000 的溶液中 0.433 微米的胶乳粒子的干重)。抗体-胶乳在 4°C 下贮存备用。

一步连接程序:

一步连接程序也用于蛋白与胶乳的连接。在进行连接的反应中将胶乳粒子、所需抗体、牛血清白蛋白和碳化二亚胺一起混合。此程序促进与蛋白-胶粒的连接同时发生的蛋白-蛋白的连接, 并对某些蛋白产生较好的结果。

胶乳和其它分析物的连接:

均一的胶乳粒子可以与所需的其它分析物连接, 如从微生物或病毒中制备的纯化或部分纯化的提取物。一个例子是从 *Borrelia burgdorferi* 得到的纯提取物与胶乳粒子连结, 以使用本实例所介绍的连接程序来检测生物样本中抗-*Borrelia* 的特异抗体。

胶乳与牛血清白蛋白(BSA)对照物的连接:

为保证检验的正确进行和确定什么时候检验完成, 应包括一程序的对照物。将与 BSA 连接的胶乳(BSA-胶乳)加到要涂敷在第三

可渗液体材料上的胶乳印染溶液中。例如，用于血清/尿 HCG 检验的胶乳印染溶液最好含有 0.6% BSA - 胶乳和 0.8% 抗 β - HCG 胶乳。在 EDAC 存在下按 BSA 对胶乳粒子的比例为 1: 20 (重量/重量) 进行连接来制备 BSA - 胶乳。此连接的 BSA - 胶乳在印染溶液中达 3% 的悬浮和在 4°C 下贮存备用。

试样预处理:

蛋白连接在胶乳上和固定在第一可渗液体材料上。白色胶乳与 MAK33 抗体 (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indranapolis, Indiana) 连接, 以减小假的阳性信号。(MAK33 是针对肌酸激酶的, 但发现过量的鼠抗体可排除人抗鼠抗体造成的干扰, 此人抗鼠抗体在很多免疫检验体系的样品中可能存在。参见 Sears, H. F., Arch. Surg. 122: 1389, July - Sept, 1991)。

使用上述的两步反应制备连接物。此胶乳施涂在可渗液体材料上, 是在 20 毫摩 Tris - HCl, pH8.5 和没有其它胶乳印染溶液成分的情况下进行, 以有利于胶乳在多孔材料中的固定。

实例2

连接试剂的胶乳在可渗液体材料上的涂敷

胶乳印染溶液涂敷到疏水的多孔聚乙烯材料上 (X - 4899, Porex Technologies, Atlanta, GA), 胶乳印染溶液 (实例 1 提供) 使用喷枪 (Iwata, model (HP - BC2) 喷涂使沉积在第三可渗液体材料上。用纸刀将 POREX™ 切成 10 毫米 × 15 毫米的小条。在干燥剂存在下使切成的 POREX™ 小条风干, 然后装入反应装置。

将 70 微升白色 MAK33 - 胶乳手工涂敷在孔径为 50 - 70 微米的 POREX™ 上 (用于第一可渗液体材料) 和在干燥剂存在下室温干燥。

实例3

血清中人体绒毛膜促性腺激素例示诊断检验装置的装配。

在用检验元件组装箱室装置之前, 先用缓冲剂、试剂等处理可渗液体材料。用棉花滤片 (Ahlstrom 9259 - R) 制备的第二可渗液体材料

用含有 1% Tween、1% ZwittergentTM 3-12、1% 牛 γ -球蛋白、800 微克/毫升鼠 γ -球蛋白、1% 兔 γ -球蛋白、1% 酪素、10 微克/毫升抗-LH 抗体（为排除人尿中存在的痕量的促黄体激素）和在 200 毫摩 Tris HCl, pH8.5 中的 20 微克/毫升 MAK33 的垫缓冲液处理。使此垫在此缓冲液中浸泡和此滤片在 50°C 干燥 1 小时并在干燥剂存在下在室温下贮存。从 MEDIX Biochemica and Boehringer Mannheim (Indianapolis, Indiana) 得到抗体。其它试剂是从 Calbiochem, Sigma and Fluka 得到的。

第一和第三可渗液体材料连在一起形成接受了实例 2 公开的连接物的试样处理垫。用喷枪点射机将水平条、垂直条和试验完成指示器 58 喷涂在适当位置。水平条 52 是从兰色胶乳制备的。垂直条是使用对 HCG 的 α 碎片的兔多克隆抗体制备的。涂敷羊抗牛血清蛋白液作为试验完成指示 58 以产生试验完成线, 和兔 IgG 液 (4 毫克/毫升) 用于产生无效试验线。

为组装此检验装置, 第二可渗液体材料 (此处为棉花滤片) 置于下壳表面 28 的第一支托台阶 40 上。另一个多种样式的底垫 (硅胶干燥剂, Sg-145, 0.057" 厚) 置于第二支托台阶 46 上。试样处理垫 56 则放在第二可渗液体棉滤片顶部。将 8 微米硝化纤维膜小心地放在第三支托台阶上, 两端则分别与第三可渗液体材料 36 和吸收垫 44 相重叠。塑料上罩用按扣和凹槽锁紧机构卡在沿上下壳内表面的辅助位置上。

与 HCG 检验有关的例示装置的尺寸:

箱室尺寸	8.5 厘米 × 5.5 厘米 × 0.5 厘米
试样施加井	0.8 厘米 (直径)
结果窗	1.0 厘米 × 1.0 厘米
检验完成窗	0.5 厘米 × 0.2 厘米
第二可渗液体材料	1.6 厘米 × 1.0 厘米 × 0.05 厘米
第一可渗液体材料	1.0 厘米 × 1.0 厘米 × 0.15 厘米
第三可渗液体材料	1.0 厘米 × 0.3 厘米 × 0.15 厘米

虽然本发明的具体实施已详细描述, 本领域技术人员都清楚这些实施方案都是例示性的而不受此限制, 本发明真正范围在本权利要求书加以限定。

说明书附图

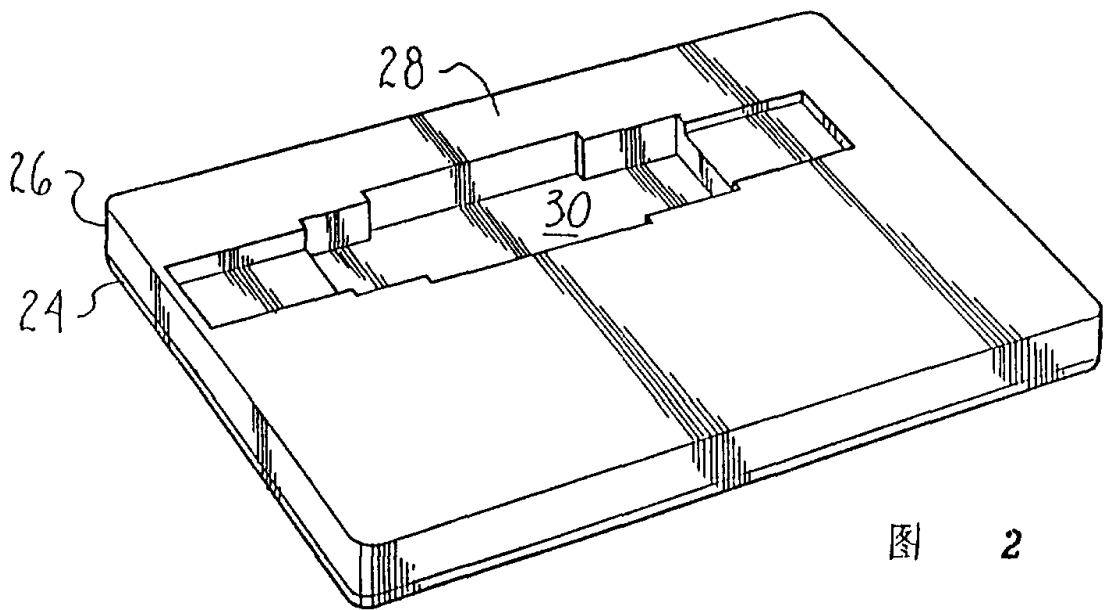
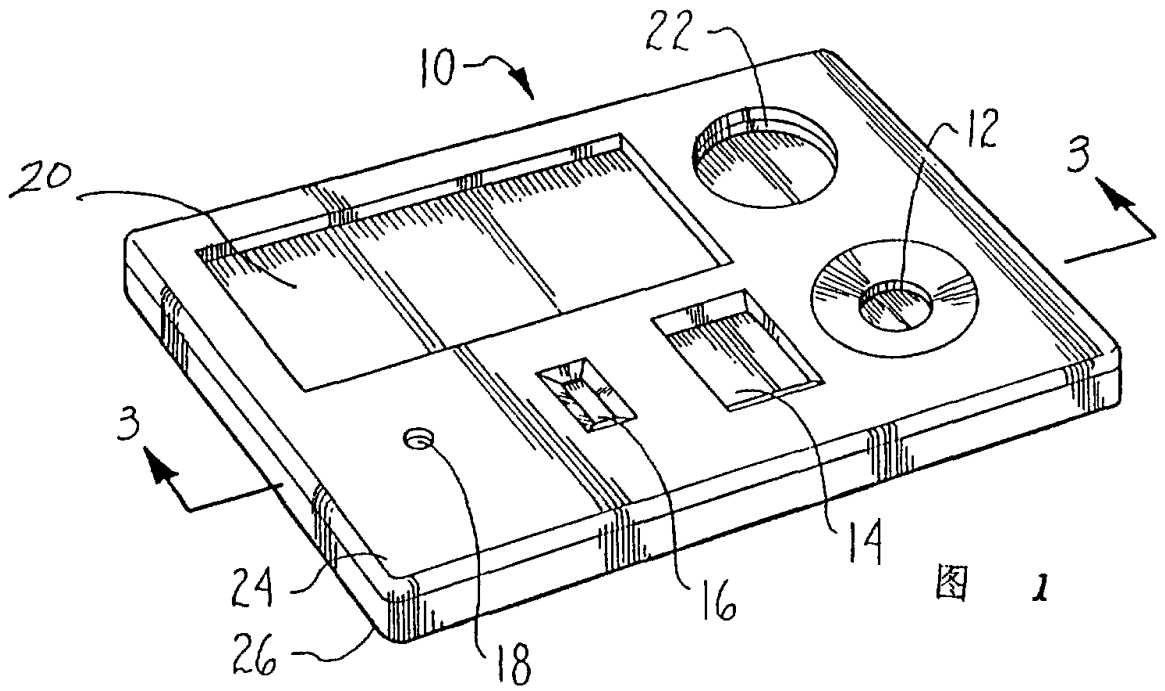
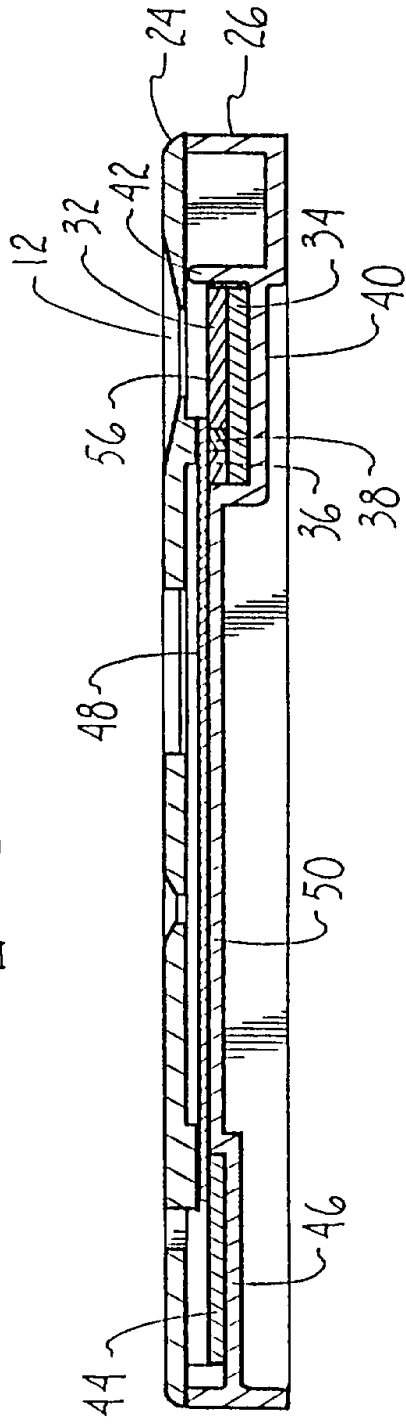


图 3



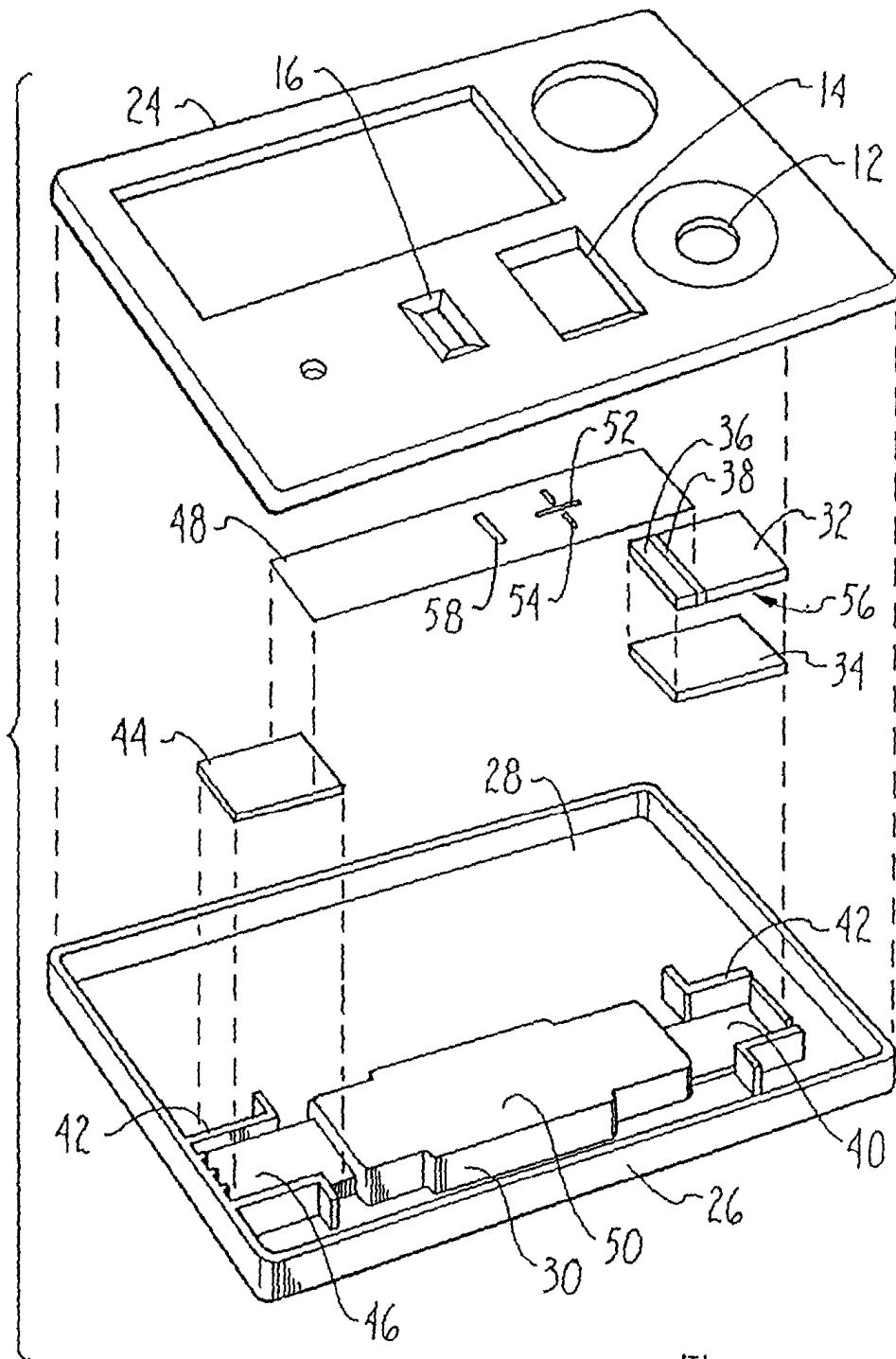


图 4

图 5

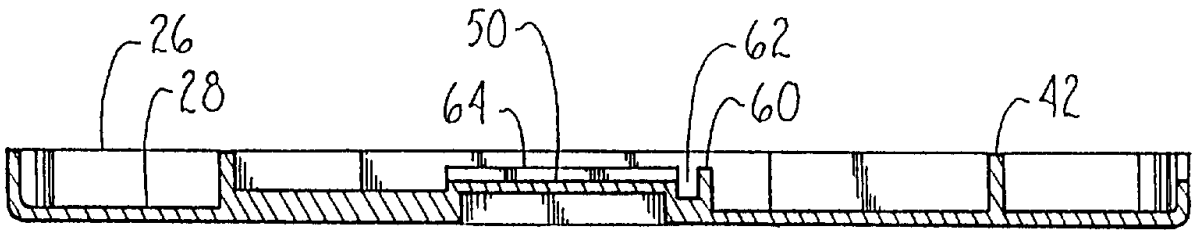
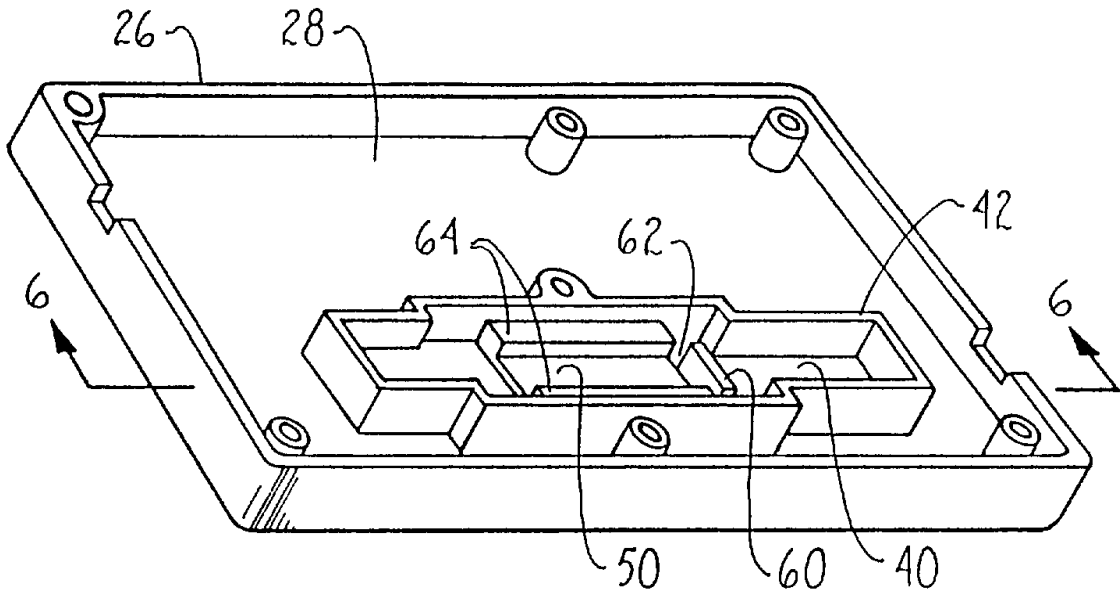


图 6