



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105424940 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 23

(21) 申请号 201410472184. 1

(22) 申请日 2014. 09. 17

(71) 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明区思明南路
422 号

申请人 厦门万泰沧海生物技术有限公司

(72) 发明人 葛胜祥 张晶 戴伟明 张军
夏宁邵

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 林远成

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

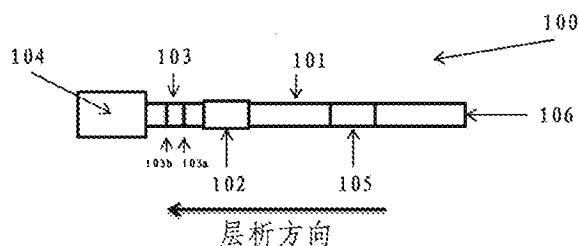
权利要求书4页 说明书23页 附图5页

(54) 发明名称

用于检测分析物的装置和方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫检测领域。更具体而言, 本发明提供了一种用于检测液体样品中的分析物的分析装置(例如试纸条), 包含所述分析装置的试剂盒, 以及使用所述分析装置来检测液体样品中的分析物的方法。本发明的分析装置的一个示例性实施方案可包括例如, 样品接收装置(101)、第一标记装置(102)、检测装置(103)(其包括检测区(103a)和任选的质控区(103b))、样品回收装置(104)、第二标记装置(105)和缓冲液添加装置(106)。



1. 一种用于检测液体样品中的分析物的分析装置,其包括:

(1) 用于接收液体样品的样品接收装置 (101);

(2) 在样品接收装置下游并且与之流体连通的第一标记装置 (102),其上涂覆了能够随流体移动的、特异性识别并结合所述分析物的结合分子,所述结合分子缀合了可检测的标记物;

(3) 在第一标记装置下游并且与之流体连通的检测装置 (103),其包括检测区 (103a) 和任选的质控区 (103b),其中所述检测区上固定有特异性识别并捕获所述分析物的捕获分子,并且所述任选的质控区固定有特异性识别并捕获所述结合分子的质控分子;

(4) 在检测装置下游并且与之流体连通的样品回收装置 (104);

(5) 在样品接收装置上游并且与之流体连通的第二标记装置 (105),其上涂覆了与第一标记装置相同的、能够随流体移动的结合分子;和,

(6) 在第二标记装置上游的缓冲液添加装置 (106),其用于接收额外的缓冲液。

2. 权利要求 1 的分析装置,其中,用样品接收-标记装置 (107) 来替换样品接收装置 (101) 和第一标记装置 (102),和/或,用缓冲液添加-标记装置 (108) 来替换缓冲液添加装置 (106) 和第二标记装置 (105)。

3. 权利要求 1 或 2 的分析装置,其还包括选自下列的一个或多个特征:

1) 所述液体样品是来自受试者的体液,或者来自培养物(例如细胞培养物,组织培养物等)的培养上清或者细胞匀浆物的上清;

优选地,所述体液选自全血、血清、血浆、唾液或口腔液、痰、眼晶状体流体、鼻流体、鼻咽或鼻咽拭子或抽吸物、汗液、尿液、乳、腹水液、粘液、滑液、腹膜液、经皮渗出物、咽渗出物、支气管肺泡灌洗液、气管抽吸物、脑脊髓液、精液、宫颈粘液、阴道或尿道分泌物、羊水;

优选地,所述受试者选自哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖类、鱼类和无脊椎动物,优选牛科动物、马科动物、羊科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物、啮齿类动物、灵长类动物例如人;

2) 所述液体样品在应用于本发明的装置之前进行了预处理;

优选地,所述预处理选自过滤、蒸馏、分离、浓缩、离心、稀释、干扰组分的灭活、试剂的添加(例如抗凝剂添加,抗氧化剂添加),免疫刺激,或其任何组合;

例如,所述预处理包括,向来自受试者的液体样品(例如全血)中添加结核分枝杆菌特异性抗原(例如 PPD)作为刺激物进行免疫刺激;

3) 所述分析物选自抗原,抗体,受体,配体,细胞因子,生长因子,免疫因子,趋化因子;

例如,所述分析物是 γ 干扰素,例如牛或人 γ 干扰素;

4) 所述样品接收装置 (101) 由选自玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布、多孔膜的材料制成;

5) 所述第一标记装置由选自玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布、多孔膜的材料制成;

6) 样品接收-标记装置由选自玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布、多孔膜的材料制成;

7) 所述结合分子是特异性识别分析物的结合试剂;

例如,当分析物为 γ 干扰素时,结合分子是特异性识别并结合 γ 干扰素的抗体;

8) 所述可检测标记物是能够发出或者产生可检测信号的物质,例如放射性同位素、发光物质、荧光物质或有色物质;

优选地,可检测标记物是荧光物质(例如有机荧光分子或者荧光蛋白或者镧系元素络

合物),或者是包裹了荧光物质(例如有机荧光分子或者荧光蛋白或者镧系元素络合物)的纳米颗粒;

优选地,所述荧光物质的发射波长为 400-800nm;优选地,所述纳米颗粒的粒径为 50-1000nm,如 200-300nm;

9) 所述检测装置包括,能充当用于固定/附着目的分子的支持物的任何材料,例如有机或无机的天然或合成的聚合物,例如玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布、多孔膜;

优选地,检测装置由多孔膜制成,例如硝酸纤维素膜;

10) 所述检测区中的捕获分子是特异性识别分析物的捕获试剂;

例如,当分析物为 γ 干扰素时,捕获分子是特异性识别并结合 γ 干扰素的抗体,优选,不同于结合分子的抗 γ 干扰素抗体;

优选地,所述检测区包括一条或多条检测线,其上固定有捕获分子;

11) 所述质控区中的质控分子是特异性识别结合分子的结合试剂;

例如,当结合分子是抗体时,质控分子是针对该抗体的抗抗体;优选地,所述质控区位于所述检测区的下游;

优选地,所述质控区包括一条或多条质控线,其上固定有质控分子;

12) 所述样品回收装置是能够使流体从上游向下游移动的装置,例如由多孔材料(例如纤维材料)制成的吸收垫;

优选地,用于制作样品回收装置(例如吸收垫)的材料选自,亲水聚乙烯材料或垫、丙烯酸纤维、玻璃纤维、滤纸或垫、烘干的纸、纸浆、纤维;

13) 所述第二标记装置由与第一标记装置相同或者不同的材料制成,并且其上涂覆有与第一标记装置相同的、能够随流体移动的结合分子;

优选地,所述第二标记装置由选自玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布和多孔膜的材料制成;

14) 所述缓冲液添加装置由选自玻璃纤维、微细玻纤、聚酯纤维膜、无纺布和 Fusion5 的材料制成;

15) 所述分析装置的底部还具有底板(201)和/或顶板(202);

优选地,所述底板(201)和/或顶板(202)由聚合物材料(例如塑料板,玻璃板,PVC板)制成;

优选地,所述顶板包括,位于样品接收装置或者样品接收-标记装置上方的样品接收孔(203),位于检测装置上方的检测窗口(204),以及位于缓冲液添加装置或者缓冲液添加-标记装置上方的缓冲液接收孔(205);

优选地,所述底板(201)和顶板(202)能够啮合在一起,从而封装所述分析装置;

16) 所述分析装置与不具有所述第二标记装置(105)或缓冲液添加-标记装置(108)的相同分析装置相比,定量检测上限提高了 5-10 倍,或者定量检测范围增加了 5-10 倍;和

17) 所述分析装置用于定性或定量检测液体样品中的 γ 干扰素,例如人 γ 干扰素或牛 γ 干扰素;

优选地,结合分子是经荧光物质标记的抗 γ 干扰素(例如人 γ 干扰素或牛 γ 干扰素)抗体,例如抗人 γ 干扰素或者抗牛 γ 干扰素的羊单抗或多抗、兔单抗或多抗、小鼠单抗或多抗或者大鼠单抗或多抗;捕获分子是相同或者不同的(优选不同的)抗 γ 干扰素抗体,例如抗人 γ 干扰素或者抗牛 γ 干扰素的另一种单抗或多抗,例如羊单抗或多抗、兔单

抗或多抗、小鼠单抗或多抗或者大鼠单抗或多抗；和 / 或，质控分子是与结合分子特异性结合的抗体。

4. 权利要求 1-3 任一项的分析装置，其中，所述分析装置是试纸条；

优选地，样品接收装置为用于接收液体样品的样品垫；第一标记装置为涂覆了结合分子的第一标记垫；检测装置为固定了捕获分子和质控分子的多孔膜（例如酸纤维素膜）；样品回收装置为吸水垫；第二标记装置为涂覆了结合分子的第二标记垫；和 / 或，缓冲液添加装置为缓冲液添加垫；

任选地，样品垫与第一标记垫一起构成了样品 - 标记垫；和 / 或，缓冲液添加垫与第二标记垫一起构成了缓冲液 - 标记垫；

优选地，多孔膜的长度为 4-6cm，和 / 或宽度为 3-6mm；

优选地，第一标记垫与吸水垫之间的距离为 15-25mm；第一标记垫的长度为 0.5-2cm（例如 1cm），和 / 或，第一标记垫的宽度为 3-6mm（例如 6mm）；

优选地，吸水垫为多层叠加的吸水滤纸。

5. 一种试剂盒，其包含权利要求 1-4 任一项的分析装置，并且任选地还包括选自下列的一种或多种物质：

1) 缓冲液，例如磷酸盐缓冲液（PBS），生理盐水，柠檬酸盐缓冲液等；

2) 标准品溶液，例如具有已知浓度的分析物溶液，例如 γ 干扰素溶液，例如重组人或牛 γ 干扰素溶液；

3) 免疫刺激原，例如结核分枝杆菌特异性抗原；

4) 样品采集装置，例如用于采血的装置；

5) 信号读取器，其用于读取质控区和检测区的信号；和

6) 使用说明书。

6. 用于检测液体样品中的分析物的方法，其包括，使用权利要求 1-4 任一项的分析装置。

7. 权利要求 6 的方法，所述方法包括下述的步骤 (a)：将所述液体样品应用于所述分析装置的样品接收装置 (101) 或者样品接收 - 标记装置 (107)；

优选地，所述方法还包括下述的步骤 (b)：即，在步骤 (a) 之前、同时或者之后，将缓冲液应用于本发明的分析装置的缓冲液添加装置 (106) 或者缓冲液添加 - 标记装置 (108)；

优选地，所述方法还包括下述的步骤 (c)：即，在步骤 (a) 之前，对液体样品进行预处理；优选地，所述预处理选自过滤、蒸馏、分离、浓缩、离心、稀释、干扰组分的灭活、试剂的添加（例如抗凝剂添加，抗氧化剂添加），免疫刺激，或其任何组合；

优选地，所述方法还包括下述的步骤 (d)：即，在步骤 (a) 之后，测量所述分析装置的检测装置（即，检测区和任选的质控区）的信号，从而确定液体样品中分析物的存在或者其量或水平；优选地，通过使用标准品绘制的标准曲线来将检测区所产生的信号转换成液体样品中分析物的量或水平；

优选地，所述液体样品是来自受试者的体液，或者来自培养物（例如细胞培养物，组织培养物等）的培养上清或者细胞匀浆物的上清；

优选地，所述体液选自全血、血清、血浆、唾液或口腔液、痰、眼晶状体流体、鼻流体、鼻咽或鼻咽拭子或抽吸物、汗液、尿液、乳、腹水液、粘液、滑液、腹膜液、经皮渗出物、咽渗出

物、支气管肺泡灌洗液、气管抽吸物、脑脊髓液、精液、宫颈粘液、阴道或尿道分泌物、羊水；

优选地，所述受试者选自哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖类、鱼类和无脊椎动物，优选牛科动物、马科动物、羊科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物、啮齿类动物、灵长类动物例如人；

优选地，所述方法用于定性检测分析物的存在和 / 或定量检测分析物（例如 γ 干扰素，例如牛或人 γ 干扰素）的水平；

优选地，应用至所述分析装置的液体样品的体积为约 10-500 μ l；和 / 或，应用至所述分析装置的额外缓冲液的体积为约 10-500 μ l。

8. 权利要求 1-4 任一项的分析装置用于制备试剂盒的用途，所述试剂盒用于执行权利要求 6 或 7 的用于检测液体样品中的分析物的方法。

9. 用于改进免疫层析装置以提高其定量检测上限和 / 或增加其定量检测范围的方法，所述免疫层析装置在改进前，在其样品接收装置上游不包含额外的标记装置，所述方法包括，在所述免疫层析装置的样品接收装置的上游设置第二标记装置 (105) 和缓冲液添加装置 (106)，或者缓冲液添加 - 标记装置 (108)，其中所述的缓冲液添加装置位于第二标记装置的上游；

优选地，所述免疫层析装置在改进前包括，权利要求 1-4 任一项中所定义的样品接收装置、第一标记装置、检测装置和样品回收装置，或者权利要求 1-4 任一项中所定义的样品接收 - 标记装置、检测装置和样品回收装置；

优选地，所述第二标记装置 (105)、缓冲液添加装置 (106) 和缓冲液添加 - 标记装置 (108) 是如权利要求 1-4 任一项中所定义的；

优选地，与未经改进的免疫层析装置相比，经改进的免疫层析装置的定量检测上限提高了 5-10 倍，或者定量检测范围增加了 5-10 倍。

用于检测分析物的装置和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测领域。更具体而言,本发明提供了一种用于检测液体样品中的分析物的分析装置(例如试纸条),包含所述分析装置的试剂盒,以及使用所述分析装置来检测液体样品中的分析物的方法。本发明的分析装置的一个示例性实施方案可包括例如,样品接收装置(101)、第一标记装置(102)、检测装置(103)(其包括检测区(103a)和任选的质控区(103b))、样品回收装置(104)、第二标记装置(105)和缓冲液添加装置(106)。

背景技术

[0002] 免疫层析法(immunochromatography)是上世纪90年代以来兴起的一种快速诊断技术,其原理如下:将特异性抗原/抗体预先固定于硝酸纤维素膜的某一区域;当该硝酸纤维素膜的一端接触液体样品(例如全血、血清、血浆等)时,由于毛细管作用,液体样品将沿着该膜向前移动,并且,当样品移动至固定有抗原/抗体的区域时,样品中的目的分析物(相应的抗体/抗原)即与预先固定的抗原/抗体发生特异性结合;随后,可通过使用免疫胶体金法或免疫酶染色法来使该区域显示一定的颜色,从而实现了对液体样品中的目的分析物的特异性检测。

[0003] 胶体金免疫层析技术是目前最主要的快速分析方法之一。以胶体金免疫层析技术为基础的试纸条也在快速检测领域中发挥了不可替代的作用。但是,灵敏度较低,实验结果的判读存在主观性,结果无法准确定量,是胶体金免疫层析技术的弊端所在。近年来,在胶体金免疫层析技术基础上进一步开发了荧光免疫层析定量技术,其在相当程度上克服了胶体金技术缺乏客观性,灵敏度低及无法定量的缺点。

[0004] 目前在已商品化的基于定量免疫层析技术的定量诊断试剂中,荧光分子应用最多。然而,这类荧光分子,当应用于免疫层析时,存在着一些无法避免的缺陷,例如,荧光寿命短、背景干扰高、光漂白等问题。为此,进一步开发了时间分辨荧光分子,其荧光寿命较长,可达1-2毫秒。通过利用时间分辨检测模式,基于时间分辨荧光分子的免疫层析能够将非特异性信号降低到可以忽略的程度,达到了极高的信噪比,并且还实现了如下优点:标记物制备简便、储存时间长、无放射性污染、检测重复性好、操作流程短、标准曲线范围宽等。因此,此类时间分辨荧光分子在免疫分析,尤其是快速免疫分析领域中具备良好的应用前景。

[0005] 此外,常规的免疫层析分析方法一般都是采用一步检测法。在一步检测法中,加入的样品首先和标记物结合形成免疫复合物,然后在虹吸作用下,向检测线及质控线方向移动,最终形成“三明治”结构的免疫复合物。这种检测法存在着如下的显著缺陷:当样品中的分析物的存在量巨大时,将会发生免疫学上的“HOOK”现象,即,原本应为强阳性的样品的检出结果变弱或者甚至呈现假阴性。因此,常规的一步法免疫层析装置通常仅具有有限的定量检测范围,并且不适合用于检测存在量巨大的分析物。

[0006] 一些采用两步法或者类两步法的免疫层析法虽然能够在一定程度上克服“HOOK”现象,但是此类两步骤的免疫层析法在检测灵敏度等方面的表现不尽人意。

[0007] 针对于一步免疫层析法（例如，“HOOK”现象）和两步免疫层析法（例如，检测灵敏度低）的上述缺点，本发明提供了一种新型的免疫层析装置，其通过在常规的一步法免疫层析装置的上游引入第二标记装置，使得在对目的分析物进行检测时，既能够避免产生“HOOK”现象，又能够保持高灵敏度，这显著增加了免疫层析装置和方法的定量检测范围（例如，显著提高了定量检测上限），并由此进一步改善了免疫层析装置和方法的应用。

发明内容

[0008] 在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

[0009] 如本文中所使用的，术语“上游”和“下游”是相对于液体样品的流动方向而言的。例如，在本发明的分析装置中，液体样品从样品接收装置流向样品回收装置，且额外添加的缓冲液从缓冲液添加装置流经样品接收装置，并最终流向样品回收装置，因此，样品接收装置位于缓冲液添加装置的“下游”，而又位于样品回收装置的“上游”。

[0010] 如本文中所使用的，术语“免疫层析装置”是指，通过免疫学原理（例如，免疫结合对的成员之间的相互作用）来检测目标分析物的层析装置。此类免疫层析装置是本领域技术人员公知的，并且可用于定性检测目标分析物的存在，和/或用于定量检测目标分析物的量（例如，利用使用具有已知浓度的标准品绘制的标准曲线来确定待测样品中的目标分析物的量）。此类免疫层析装置一般至少包括：用于接收样品的样品接收装置，用于标记分析物的标记装置，用于检测分析物的检测装置，和用于回收样品的样品回收装置。

[0011] 如本文中所使用的，术语“一步法免疫层析装置”是指，仅通过一个添加样品的步骤（即，将待检测的样品添加至免疫层析装置，通常是其中的样品接收装置），即可完成目标分析物的定性和/或定量检测的免疫层析装置。在此类免疫层析装置中，标记装置中通常含有可随液体样品移动的、特异性结合分析物的、标记有可检测物质的结合分子，并且，检测装置中通常含有固定的、特异性结合分析物的捕获分子。因此，当液体样品从样品接收装置流经标记装置到达检测装置时，样品中的分析物（如果存在的话）将与结合分子结合形成免疫复合物，并最终被捕获分子所捕获，由此，通过检测被检测装置中的捕获分子捕获的结合分子上所携带的可检测物质的量（例如其发出的信号），可间接确定分析物的量。

[0012] 如本文中所使用的，术语“分析物”指，待检测或测量并且具有至少一个表位或结合位点的化合物或组合物。例如，分析物可以是任何目的蛋白，包括但不限于抗原，抗体，受体，配体，细胞因子，生长因子，免疫因子，趋化因子等。分析物还包括但不限于，毒素、有机化合物、蛋白质、肽、微生物、细菌、病毒、氨基酸、核酸、碳水化合物、激素、类固醇、维生素、药物、污染物、杀有害生物剂和任何上述物质的代谢产物或针对任何上述物质的抗体。术语分析物还包括任何抗原性物质、半抗原、抗体、大分子及其组合。示例性分析物的非详尽列表显示于美国专利 4,366,241 中（第 19 栏，第 7 行到第 26 栏，第 42 行），其公开内容通过引用合并入本文。代表性分析物的进一步描述和列表可见于美国专利 4,299,916、4,275,149 和 4,806,311 中，所有所述专利通过引用合并入本文。

[0013] 如本文中所使用的，在本发明的分析装置的背景中，术语“固定的”意指，所描述的

物质（例如捕获分子，质控分子）是不可移动的，无论溶液是否通过流经该物质。

[0014] 如本文中所使用的，术语“定量检测上限”是指，分析装置所能够准确定量的分析物的最高水平或者最大量。术语“定量检测范围”是指，分析装置所能够准确定量的分析物的水平或量的范围。如下文所详细论述的，本发明的分析装置（例如试纸条）与不具有所述第二标记装置（105）或缓冲液添加-标记装置（108）的相同分析装置相比，其定量检测上限提高了5-10倍，或定量检测范围增加了5-10倍。因此，本发明的分析装置（例如试纸条）特别适合用于定性或定量检测存在量巨大的分析物。此类分析物例如由经刺激的体液样品（例如全血）所产生的 γ 干扰素，由培养的工程化细胞（例如大肠杆菌）表达或高表达的异源蛋白等等。

[0015] 本发明人在经过大量的研究后出人意料地发现：当在常规的一步法免疫层析装置的上游引入第二标记装置时，不仅能够有效避免免疫层析法产生“HOOK”现象，而且能够保持免疫层析法的高灵敏度。特别地，与常规的一步法免疫层析装置相比，本发明的分析装置具有显著更宽的定量检测范围。例如，本发明的分析装置的有效检测上限可以达到常规的一步法免疫层析装置的定量检测上限的5-10倍，从而特别适合用于定量检测存在量巨大的分析物。

[0016] 因此，在一个方面，本发明提供了一种用于检测液体样品中的分析物的分析装置（100），其包括：

[0017] (1) 用于接收液体样品的样品接收装置（101）；

[0018] (2) 在样品接收装置下游并且与之流体连通的第一标记装置（102），其上涂覆了能够随流体移动的、特异性识别并结合所述分析物的结合分子，所述结合分子缀合了可检测的标记物；

[0019] (3) 在第一标记装置下游并且与之流体连通的检测装置（103），其包括检测区（103a）和任选的质控区（103b），其中所述检测区上固定有特异性识别并捕获所述分析物的捕获分子，并且所述任选的质控区固定有特异性识别并捕获所述结合分子的质控分子；

[0020] (4) 在检测装置下游并且与之流体连通的样品回收装置（104）；

[0021] (5) 在样品接收装置上游并且与之流体连通的第二标记装置（105），其上涂覆了与第一标记装置相同的、能够随流体移动的结合分子；和

[0022] (6) 在第二标记装置上游的缓冲液添加装置（106），其用于接收额外的缓冲液。

[0023] 在一个优选的实施方案中，液体样品是来自受试者的体液，例如全血、血清、血浆、唾液或口腔液、痰、眼晶状体流体、鼻流体、鼻咽或鼻咽拭子或抽吸物、汗液、尿液、乳、腹水液、粘液、滑液、腹膜液、经皮渗出物、咽渗出物、支气管肺泡灌洗液、气管抽吸物、脑脊髓液、精液、宫颈粘液、阴道或尿道分泌物、羊水等。此类受试者可以是任何动物，包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖类、鱼类和无脊椎动物。哺乳动物的非限制性例子包括，牛科动物、马科动物、羊科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物、啮齿类动物、灵长类动物例如人。此外，液体样品还可以是来自培养物（例如细胞培养物，组织培养物等）的培养上清或者细胞匀浆物的上清。

[0024] 此外，在将液体样品应用于本发明的装置之前，还可以对液体样品进行适当的预处理。此类预处理包括，例如过滤、蒸馏、分离、浓缩、离心、稀释、干扰组分的灭活、试剂的添加（例如抗凝剂添加，抗氧化剂添加），免疫刺激等等，或其任何组合。例如，当待检测的液

体样品是全血时,可以向其中添加抗凝剂例如肝素,以避免血液凝固。或者,可对全血进行适当的稀释,以例如调整其粘稠度,以便适用于本发明的检测装置。或者,可以向来自受试者的液体样品(例如全血)中添加结核分枝杆菌特异性抗原(例如 PPD)作为刺激物,并通过检测经刺激的液体样品中是否产生了 γ 干扰素来确定液体样品所源自的受试者是否感染了结核分枝杆菌或者患有结核病。

[0025] 在一个优选的实施方案中,所述分析物可以是任何目的蛋白,包括但不限于抗原,抗体,受体,配体,细胞因子,生长因子,免疫因子,趋化因子等。分析物还包括但不限于,毒素、有机化合物、蛋白质、肽、微生物、细菌、病毒、氨基酸、核酸、碳水化合物、激素、类固醇、维生素、药物、污染物、杀有害生物剂和任何上述物质的代谢产物或针对任何上述物质的抗体。术语分析物还包括任何抗原性物质、半抗原、抗体、大分子及其组合。示例性分析物的非详尽列表显示于美国专利 4,366,241 中(第 19 栏,第 7 行到第 26 栏,第 42 行),其公开内容通过引用合并入本文。代表性分析物的进一步描述和列表可见于美国专利 4,299,916、4,275,149 和 4,806,311 中,所有所述专利通过引用合并入本文。在一个特别优选的实施方案中,所述分析物是 γ 干扰素,例如牛或人 γ 干扰素。

[0026] 在一个优选的实施方案中,样品接收装置(101)用于接收样品,其可以例如由玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布、多孔膜等制成。

[0027] 在一个优选的实施方案中,第一标记装置(102)用于对样品中的分析物(如果存在的话)进行标记,从而形成结合分子-分析物的免疫复合物。第一标记装置可以例如由玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布、多孔膜等制成。

[0028] 在另一个优选的实施方案中,将样品接收装置(101)和第一标记装置(102)合并在一起,构成样品接收-标记装置(107)。换言之,可以用样品接收-标记装置(107)来替换样品接收装置(101)和第一标记装置(102)。在该实施方案中,样品接收-标记装置(107)用于接收样品,并且同时对样品中的分析物(如果存在的话)进行标记,形成结合分子-分析物的免疫复合物。类似地,样品接收-标记装置可以例如由玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布、多孔膜等制成。

[0029] 在一个优选的实施方案中,结合分子是特异性识别分析物的结合试剂。例如,当分析物是抗原时,结合分子可以是特异性识别该抗原的抗体。或者,当分析物是抗体时,结合分子可以是被该抗体特异性识别的抗原。或者,当分析物是受体时,结合分子可以是特异性结合该受体的配体,或反之亦然。换言之,结合分子与分析物可以是任何免疫学结合对,例如抗原-抗体,抗体-抗原,受体-配体,配体-受体等。此类免疫学结合对是本领域技术人员所公知的,并且,可以根据实际的需要进行选择。并且,此类选择完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如,当意欲检测的分析物为 γ 干扰素时,结合分子即可以是特异性识别并结合 γ 干扰素的抗体。

[0030] 在一个优选的实施方案中,结合分子所缀合的可检测标记物可以是本领域已知的任何能够发出或者产生可检测信号的物质。此类可检测标记物是本领域技术人员所公知的,并且其选择完全在本领域技术人员的能力范围之内。

[0031] 例如,标记物可以是放射性同位素如 125 碘、酶、酶的底物、发光物质如异鲁米诺和吖啶酯、荧光物质如荧光素和罗丹明、生物素和有色物质如乳胶颗粒和胶体金等。标记用的酶可以是过氧化物酶(如辣根过氧化物酶 HRP)、碱性磷酸酶、 β 半乳糖苷酶和葡萄糖氧

化酶。对于这些酶,合适的底物有 2, 2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-6 磺酸)、鲁米诺-过氧化氢、邻苯二胺-过氧化氢(针对过氧化物酶)、对硝基苯磷酸盐、4-甲基磷酸伞型酮、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酸基)苯基-1, 2-二乙氧基烷(针对碱性磷酸酶)、对硝基苯- β -D-半乳糖和甲基伞形酮- β -D-半乳糖(针对 β 半乳糖苷酶)。其它的标记物包括量子点标记、生色团标记、酶标记、亲和配体标记、电磁自旋标记、重原子标记、标记有纳米微粒光散射标记或其它纳米微粒的探针、异硫氰酸荧光素(FITC)、TRITC、罗丹明、四甲基罗丹明、R-藻红蛋白、Cy-3、Cy-5、Cy-7、得克萨斯红、Phar-Red、异藻红蛋白(APC)、表位标记如 FLAG 或 HA 表位、以及酶标记如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、I²-半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶和半抗原偶联物如洋地黄毒苷或二硝基苯酚、或能够形成配合物的结合配对如链霉抗生物素蛋白/生物素、抗生物素蛋白/生物素或抗原/抗体配合物如包括兔 IgG 和抗-兔 IgG; 荧光基团如伞形三糖(umbelliferone)、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、伊红、绿荧光蛋白、藻红、香豆素、甲基香豆素、芘、孔雀绿、二苯乙烯、荧光黄、Cascade 蓝、二氯三嗪基荧光素、丹磺酰氯、藻红蛋白、荧光镧系络合物如包括铈和铽、Cy3、Cy5、分子信标(molecular beacons)和其荧光衍生物、发光材料如鲁米诺; 光散射或细胞质基因组共振材料如金或银颗粒或量子斑(quantum dot); 或放射性材料如¹⁴C、¹²³I、¹²⁴I、¹³¹I、Tc99m、³⁵S 或³H; 或球珠(spherical shell), 以及标记有本领域已知的任何其它信号产生标记物的探针。例如, 可检测的标记物包括但不限于荧光基团以及前面所述其它已知的, 如在 Joseph R. Lakowicz(Editor) 所编的 Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Pub Corp, 第二版(July1999) 和 Richard P. Hoagland 的第六版的 Molecular Probes Handbook 所描述的。在某些实施方案中, 标记物包括半导体纳米微晶如量子斑(即 Qdots), 参见 U. S. P.6, 207, 392。Qdots 可从 Quantum Dot Corporation 购得。用于本发明的半导体纳米微晶包括 Group II-V 半导体的纳米微晶如 MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaSe、BaTe、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、HgS、HgSe、HgTe 和其混合物以及 Group III-V 半导体的纳米微晶如 GaAs、InGaAs、InP、InAs 和其混合物。Group IV 半导体如锗或硅的使用, 或有机半导体的使用, 在某些条件下可能是方便可行的。半导体纳米微晶也可以包括合金, 其含有两种或多种选自于 Group III-V 化合物、Group II-VI 化合物、Group IV 元素和其组合物的半导体。

[0032] 在某些实施方案中, 将荧光能量受体连接到结合分子作为标记物。在一个实施方案中, 荧光能量受体可以通过化合物与单线态氧反应形成荧光化合物而形成, 或通过化合物与辅助化合物反应并将其转化为荧光化合物而形成。这类化合物可以包括于本发明装置中的缓冲液中。在其它的实施方案中, 荧光能量受体可以是包括化学发光剂或基团的化合物的一部分, 例如, 荧光能量受体可以包括稀土金属如铈、钐、铽等金属络合物。这些材料因其具有尖锐的发光谱带而特别具有吸引力; 而且, 镧系标记物如铈(III) 可以提供有效的长时间的信号发射, 同时不易光漂白, 因而可以使得含有处理/反应样品的测试装置在需要的情况下可以放置较长一段时间。在各种异源和同源免疫测定法中, 已经使用长寿命的荧光铈(III) 络合物纳米微粒作为标记物, 例如可以参见 Huhtinen et al. Clin. Chem. 2004Oct; 50(10):1935-6。但这些内部标记的纳米微粒与时间分辨荧光检测一起使用时, 测定性能可以改善。在异源测定中, 低浓度下测定的动态范围可以扩展; 而且, 通过使用检测抗体涂敷的高特异活性纳米微粒标记物, 而不是使用常规标记的检测抗体, 测定

的动力学特性也可以改善。在同源测定中,对于荧光共振能量转移来说,铈(III)纳米微粒是很有效的供体,从而可以进行简单、快速和高效的筛选。在一个实施方案中,标记物如此处披露的荧光标记物,包括与生物分子偶联的纳米微粒标记物。换句话说,纳米微粒可以用作检测或捕捉探针。例如,本发明中,可以利用连接到单抗或链霉抗生物素蛋白(SA)的铈(III)-标记的纳米微粒来检测样品中特定的分析物,如纳米微粒基的免疫测定。纳米微粒可以作为附着特定结合剂的底物,这些特定结合剂是针对分析物和检测(如标记物)或捕捉成分的。有关标记物的实例可以参见U. S. P4, 695, 554 ;4, 863, 875 ;4, 373, 932 ;和 4, 366, 241。U. S. P4, 313, 734 和 4, 373, 932 中则披露了胶体金属和染色颗粒。而U. S. P4, 954, 452 中则披露了如何制备和使用非金属的胶体 ;U. S. P4, 252, 459 中披露了用作标记物的有机聚合物乳胶颗粒。

[0033] 在一个特别优选的实施方案中,可检测标记物可以是荧光物质(例如有机荧光分子或者荧光蛋白或者镧系元素络合物),或者是包裹了荧光物质(例如有机荧光分子或者荧光蛋白或者镧系元素络合物)的纳米颗粒。在一个实施方案中,荧光物质的发射波长为400-800nm。在一个优选的实施方案中,包裹了荧光物质的纳米颗粒可以是乳胶颗粒、二氧化硅颗粒。优选地,纳米颗粒的表面可以是经化学修饰的,如经羧基修饰等。此外,纳米颗粒的粒径可以是50-1000nm,例如200-300nm。

[0034] 将可检测标记物缀合至结合分子的技术是本领域公知的。例如,可以通过顺丁烯二酰亚胺法(J. Biochem. (1976), 79, 233)、生物素活化法(J. Am. Chem. Soc. (1978), 100, 3585)、疏水结合法、酯活化法或异氰酸酯法("Enzyme immunoassay techniques", published in 1987 by Igaku Shoin)把标记物缀合到结合分子(例如抗原或抗体)上。

[0035] 在一个特别优选的实施方案中,可以通过共价交联法将纳米颗粒与结合分子连接。更优选地,可以通过EDC/NHS方法来进行纳米颗粒与结合分子的共价交联。

[0036] 在一个优选的实施方案中,检测装置可以包括,能充当用于固定/附着目的分子的支持物的任何材料。此类材料是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于,有机或无机聚合物、天然和合成聚合物,包括但不限于琼脂糖、纤维素、硝酸纤维素、乙酸纤维素、其他纤维素衍生物、右旋糖酐、右旋糖酐衍生物和右旋糖酐共聚物、其他多糖、玻璃、硅胶、明胶、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、人造纤维、尼龙、聚乙烯、聚丙烯、聚丁烯、聚碳酸酯、聚酯、聚酰胺、乙烯聚合物、聚乙烯醇、聚苯乙烯和聚苯乙烯共聚物、与二乙烯苯等交联的聚苯乙烯、丙烯酸树脂、丙烯酸盐/酯和丙烯酸、丙烯酰胺、聚丙烯酰胺、聚丙烯酰胺掺和物、乙烯和丙烯酰胺的共聚物、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯衍生物和共聚物、具有多种官能团的其他聚合物和共聚物、乳胶、丁基橡胶和其他合成橡胶、硅、玻璃、纸、天然海绵、不溶性蛋白质、表面活性剂、红细胞、金属、类金属、磁性材料或其他商购可得的介质或复合材料,其包含涂有材料的固体或半固体基质,所述材料改善该基质的亲水性质,例如聚苯乙烯。聚酯薄膜,聚乙烯,聚碳酸酯,聚丙烯,聚丁烯,金属例如铝、铜、锡或涂有右旋糖酐的金属的混合物,去垢剂,盐,PVP和/或用静电或等离子体放电处理,以对表面增加电荷从而对表面赋予亲水性质。

[0037] 在一个优选的实施方案中,检测装置可以例如由玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布、多孔膜等制成。在进一步优选的实施方案中,检测装置由多孔膜制成,例如硝酸纤维素膜。此类硝酸纤维素膜例如可从MDI公司、Millipore公司(例如HF135型号硝酸纤维素膜)、PALL

公司或者 Whatman 公司商购获得。

[0038] 在一个优选的实施方案中,检测装置中的检测区用于捕获上游形成的结合分子 - 分析物的免疫复合物,从而形成具有“三明治”结构的结合分子 - 分析物 - 捕获分子的免疫复合物。

[0039] 在一个优选的实施方案中,检测区中的捕获分子可以是特异性识别分析物的捕获试剂。例如,当分析物是抗原时,捕获分子可以是特异性识别该抗原的抗体。或者,当分析物是抗体时,捕获分子可以是被该抗体特异性识别的抗原。或者,当分析物是受体时,捕获分子可以是特异性结合该受体的配体,或反之亦然。换言之,捕获分子与分析物可以是任何免疫学结合对,例如抗原 - 抗体,抗体 - 抗原,受体 - 配体,配体 - 受体等。此类免疫学结合对是本领域技术人员所公知的,并且,可以根据实际的需要进行选择。并且,此类选择完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如,当意欲检测的分析物为 γ 干扰素时,捕获分子即可以是特异性识别并结合 γ 干扰素的抗体。

[0040] 特别优选地,结合分子 - 分析物之间的相互作用不会负面影响捕获分子 - 分析物之间的相互作用,且反之亦然。例如,当分析物是抗原时,结合分子和捕获分子可以是结合该抗原的不同表位的两种单克隆抗体。

[0041] 在本发明的分析装置中,质控区是任选的。然而,特别优选地,本发明的分析装置含有位于检测装置中的质控区。该质控区用于验证和确保检测的有效性,其能够捕获结合分子,从而形成结合分子 - 质控分子的免疫复合物。特别地,质控分子是特异性识别结合分子的结合试剂。例如,当结合分子是抗体时,质控分子可以是针对该抗体的抗抗体。换言之,结合分子与质控分子可以是任何免疫学结合对,例如抗体 - 抗抗体等。此类免疫学结合对是本领域技术人员所公知的,并且,可以根据实际的需要进行选择。并且,此类选择完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如,当使用特异性结合分析物(例如 γ 干扰素)的小鼠 IgG 抗体(即,结合分子)来特异性识别和结合分析物时,质控分子可以是特异性识别并结合小鼠 IgG 抗体的抗抗体,例如羊抗鼠单抗,羊抗鼠多抗,兔抗鼠单抗,兔抗鼠多抗,驴抗鼠单抗,驴抗鼠多抗等等。在特别优选的实施方案中,在检测装置中,所述质控区位于所述检测区的下游。

[0042] 可以通过任何已知的技术将捕获分子和质控分子分别固定在检测区(103a)和质控区(103b)上。例如,可以通过喷点仪器将捕获分子和质控分子固定在检测装置(例如多孔膜)上的检测区和质控区中。此类喷点仪器是本领域技术人员已知的,例如可购自 Biodot 公司的 XYZ3050 型喷膜仪。

[0043] 在一个优选的实施方案中,检测区包括一条或多条检测线,其上固定有捕获分子。例如,可通过任何已知的喷点仪器,将捕获分子喷点在检测线上。在一个优选的实施方案中,质控区包括一条或多条质控线,其上固定有质控分子。例如,可通过任何已知的喷点仪器,将质控分子喷点在质控线上。

[0044] 在一个优选的实施方案中,样品回收装置可以是任何能够使流体从上游(例如样品接收装置、缓冲液添加装置)向下游(例如检测装置、样品回收装置)移动的装置。例如,样品回收装置可采用毛细管作用和/或可允许压力和/或重力流体运动,以移动或转运测试流体,或可采用与毛细管作用分开的流体运动,其中流体被气体压力、流体压力的积累而泵动(例如,使用活塞或旋转、波纹管或其他类型的泵对测定流体直接泵动、由于电场的静

电运动、重力等)。例如,样品回收装置可以包括由多孔材料(例如纤维材料)制成的吸收垫,其能够通过虹吸作用或毛细管作用,促使流体从上游向下游移动。优选地,将吸收垫连接至样品回收槽,以避免样品或试剂从下游吸收垫回流至上游的检测区和质控区。此外,样品回收装置可以包括促使流体从上游向下游移动并避免其回流的泵。

[0045] 可用于制作样品回收装置(例如吸收垫)的材料包括但不限于,亲水聚乙烯材料或垫、丙烯酸纤维、玻璃纤维、滤纸或垫、烘干的纸、纸浆、纤维等。例如,样品回收装置(例如吸收垫)可以包含材料例如无纺 spunlaced 丙烯酸纤维,即 New Merge(可从 DuPont 获得)或 HDK 材料(可从 HDK Industries, Inc. 获得)、经处理以改善(例如降低)材料的疏水性质的无纺聚乙烯。

[0046] 在一个优选的实施方案中,第二标记装置可以由与第一标记装置相同或者不同的材料制成,并且其上涂覆有与第一标记装置相同的、能够随流体移动的结合分子。例如,第二标记装置可以由玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布、多孔膜等制成。

[0047] 在一个优选的实施方案中,缓冲液添加装置可以由玻璃纤维、微细玻纤、聚酯纤维膜、无纺布、Fusion5 等材料制成。

[0048] 在另一个优选的实施方案中,将缓冲液添加装置(106)和第二标记装置(105)合并在一起,构成缓冲液添加-标记装置(108)。换言之,可以用缓冲液添加-标记装置(108)来替换缓冲液添加装置(106)和第二标记装置(105)。在该实施方案中,缓冲液添加-标记装置(108)用于接收额外的缓冲液,并且该装置中涂覆的结合分子与额外的缓冲液一起流向下流装置,从而为样品中的分析物提供额外的结合分子。类似地,缓冲液添加-标记装置可以例如由玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布、多孔膜等制成。

[0049] 在一个优选的实施方案中,本发明的分析装置的底部任选地还具有底板(201)。此类底板可以由任何适当的材料(例如聚合材料)制成,例如塑料板,玻璃板,PVC板。在一个优选的实施方案中,底板为黑色 PVC 底板。

[0050] 在一个优选的实施方案中,本发明的分析装置的顶部任选地还具有顶板(202)。此类顶板可以由任何适当的材料(例如聚合材料)制成,例如塑料板,玻璃板,PVC板。在一个优选的实施方案中,顶板包括,位于样品接收装置或者样品接收-标记装置上方的样品接收孔(203),位于检测装置上方的检测窗口(204)(其用于观察和测量检测区和任选的质控区中的信号),以及位于缓冲液添加装置或者缓冲液添加-标记装置上方的缓冲液接收孔(205)。

[0051] 在一个优选的实施方案中,底板(201)和顶板(202)能够啮合在一起,从而封装整个本发明的分析装置(例如试纸条)。

[0052] 在一个优选的实施方案中,所述分析装置是试纸条。在进一步优选的实施方案中,样品接收装置为用于接收液体样品的样品垫;第一标记装置为涂覆了结合分子的第一标记垫;检测装置为固定了捕获分子和质控分子的多孔膜(例如酸纤维素膜);样品回收装置为吸水垫;第二标记装置为涂覆了结合分子的第二标记垫;和/或,缓冲液添加装置为缓冲液添加垫。在另一个优选的实施方案中,样品垫与第一标记垫一起构成了样品-标记垫;和/或,缓冲液添加垫与第二标记垫一起构成了缓冲液-标记垫。

[0053] 在一个优选的实施方案中,多孔膜的长度可以为 4-6cm,和/或多孔膜的宽度可以为 3-6mm。在一个优选的实施方案中,第一标记垫与吸水垫之间的距离为 15-25mm。在一个

优选的实施方案中,第一标记垫的长度可以为0.5-2cm(例如1cm),和/或,第一标记垫的宽度可以为3-6mm(例如6mm)。

[0054] 在一个优选的实施方案中,第一和/或第二标记垫由玻璃纤维、聚酯纤维、无纺布等材料制成。在一个优选的实施方案中,缓冲液添加垫由玻璃纤维、微细玻纤、聚酯纤维膜、无纺布、Fusion5 等材料制成。在一个优选的实施方案中,吸水垫为多层叠加的吸水滤纸。

[0055] 在一个优选的实施方案中,本发明的分析装置(例如试纸条)与不具有所述第二标记装置(105)或缓冲液添加-标记装置(108)的相同分析装置相比,定量检测上限提高了5-10倍,或者定量检测范围增加了5-10倍。因此,本发明的分析装置(例如试纸条)特别适合用于定性或定量检测存在量巨大的分析物。此类分析物例如由经刺激的体液样品(例如全血)所产生的 γ 干扰素,由培养的工程化细胞(例如大肠杆菌)表达或高表达的异源蛋白等等。

[0056] 例如,在一个优选的实施方案中,本发明的分析装置(例如试纸条)可用于定性或定量检测液体样品中的分析物,例如 γ 干扰素。

[0057] 本领域技术人员已经知晓,可通过定性或定量检测经分枝杆菌抗原刺激的体液样品(例如全血)中的 γ 干扰素来诊断体液样品所源自的受试者是否感染了结核分枝杆菌或患有结核病。

[0058] 特别地,结核病是由结核分枝杆菌引起的一种人畜共患性传染病,其特点在于:机体的多个组织器官中的结核结节形成,干酪样坏死(豆腐渣样)的发生,和钙化。结核分枝杆菌主要分三个型别:即,牛分枝杆菌(牛型)、结核分枝杆菌(人型)和禽分枝杆菌(禽型)。

[0059] 在全球范围内,每年有九百万患者的活动性结核病病因归结于结核分枝杆菌感染,而世界上三分之一的人口,也就是二十亿人患有潜伏性结核感染。虽然潜伏感染不发病,也不具有传染性,但存在发展成活动性结核病并具备传染性的风险。我国是结核病高负担国家,仅次于印度。结核病不仅给国家带来沉重的经济负担,而且导致了严重的社会负担。此外,牛结核病严重影响了动物的健康,并对牧场造成惨重的经济损失,其每年在世界范围内可造成达30多亿美元的经济损失。牛结核病在我国也被列为二类动物疫病。

[0060] 结核菌素试验是用于诊断结核感染的传统免疫学诊断方法,其具有操作简单易行、成本低廉等优点,并因此被广泛应用。然而,结核菌素试验也存在着显著的缺陷,包括例如:特异性低,容易发生交叉反应造成假阳性,以及,灵敏性低(特别是对于结核菌感染早期的患者、免疫受抑制患者等)。

[0061] 为了克服上述缺陷,近年来已开发了新的诊断结核病的技术,即,结核分枝杆菌特异蛋白的IFN- γ 释放试验,其灵敏度和特异性明显优于传统方法。并且,基于该方法已研制出了商品化的试剂盒,例如 QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay(Cellestis Ltd, Australia)和 T-SPOT. TB assay(Oxford Immunotec, UK)。已报道,这些试剂盒用于检测结核感染的敏感性可达70%-80%,且特异性可达88%-97%,从而为结核病的筛检提供了有效的手段。

[0062] 因此,本发明的分析装置(例如试纸条)由于其特别宽的定量检测范围,而特别适合用于诊断受试者是否感染了结核分枝杆菌或患有结核病(通过定性或定量检测来自受试者的、经刺激的液体样品例如全血中的 γ 干扰素水平)。

[0063] 因此,在一个优选的实施方案中,本发明的分析装置(例如试纸条)用于定性或定量检测液体样品中的 γ 干扰素,例如人 γ 干扰素或牛 γ 干扰素。在进一步优选的实施方案中,结合分子可以是经荧光物质标记的抗 γ 干扰素(例如人 γ 干扰素或牛 γ 干扰素)抗体,例如抗人 γ 干扰素或者抗牛 γ 干扰素的羊单抗或多抗、兔单抗或多抗、小鼠单抗或多抗或者大鼠单抗或多抗。此外,捕获分子可以是相同或者不同(优选不同的)抗 γ 干扰素抗体,例如抗人 γ 干扰素或者抗牛 γ 干扰素的另一种单抗或多抗,其可以是羊单抗或多抗、兔单抗或多抗、小鼠单抗或多抗或者大鼠单抗或多抗。此外,质控分子可以是与结合分子特异性结合的抗抗体。例如,当结合分子是抗 γ 干扰素的小鼠单抗或多抗时,质控分子可以是抗小鼠抗体,例如,羊抗鼠抗体(单抗或多抗)、兔抗鼠抗体(单抗或多抗)或驴抗鼠抗体(单抗或多抗)。

[0064] 在本发明的实施方案中,抗体可以是任何类别(例如,IgG、IgM、IgA、IgE、IgD或其任何组合),并且可以是任何亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其任何组合)。

[0065] 在另一个方面,本发明提供了一种试剂盒,其包含本发明的分析装置(例如试纸条),并且任选地还包括选自下列的一种或多种物质:

[0066] 1) 缓冲液,例如磷酸盐缓冲液(PBS),生理盐水,柠檬酸盐缓冲液等;

[0067] 2) 标准品溶液,例如具有已知浓度的分析物溶液,例如 γ 干扰素溶液,例如重组人或牛 γ 干扰素溶液;

[0068] 3) 免疫刺激原,例如结核分枝杆菌特异性抗原;

[0069] 4) 样品采集装置,例如用于采血的装置;

[0070] 5) 信号读取器,其用于读取质控区和检测区的信号;和

[0071] 6) 使用说明书。

[0072] 本发明的分析装置可以与读取器组合使用,所述读取器特别是具有内置计算机的读取器,例如基于反射和/或荧光的读取器。此类读取器还可以含有采用数据简化和曲线拟合算法的数据处理软件,任选用于精确测定生物学样品中分析物的存在和/或浓度。如本文使用的,读取器是指,用于检测和/或定量例如本发明分析装置的检测装置的信号/数据的仪器。信号/数据可以是肉眼可见的,但也可以是不可见的(例如放射性、不可见的荧光发射器)。优选的软件包含曲线拟合算法,以测定给定样品中分析物的存在或量。得自读取器的数据随后可以由医学诊断系统进一步处理,以提供医学状况的危险评估或诊断作为输出。

[0073] 在一个实施方案中,读取器可以是反射、透射、荧光、化学-生物发光、磁或电流测定读取器(或2个或更多的组合),取决于待从本发明的分析装置检测的信号。

[0074] 在一个实施方案中,读取器是检测荧光信号的UV LED读取器。荧光信号由发光二极管激发,所述发光二极管在光谱的UV区域中且在荧光信号(例如镧系元素标记)的吸收峰内发射。所发出的荧光信号通过光电二极管检测,并且检测的信号的波长可以使用长通滤光片进行限制,所述长通滤光片阻断杂散发射光,且接受波长在发荧光的标记的峰值发射波长处或周围的光。在其他实施方案中,长通滤光片可以由带通滤光片替换。此外,激发光可以通过带通滤光片进行限制。在另一个实施方案中,二极管是UV激光二极管。可以利用任何常规的UV、LED或光电二极管。

[0075] 在一个实施方案中,激发光的波长受短通滤光片限制。在另外一个实施方案中,激

发光的波长受带通滤光片和短通滤光片的组合限制。在再进一步的实施方案中,检测光的波长受带通和长通滤光片的组合限制。读取器经配置用于检测本文描述的任何可检测的标记物。在一个实施方案中,可检测的标记物是任何镧系元素。在一个进一步的实施方案中,使用的镧系元素是铈。

[0076] 在另一个方面,本发明提供了用于检测液体样品中的分析物的方法,其包括,使用上文所详细定义的本发明的分析装置。

[0077] 在一个优选的实施方案中,本发明的方法包括下述的步骤(a):将所述液体样品应用于本发明的分析装置的样品接收装置(101)或者样品接收-标记装置(107)。

[0078] 在一个优选的实施方案中,本发明的方法还包括下述的步骤(b):即,在步骤(a)之前、同时或者之后,将缓冲液应用于本发明的分析装置的缓冲液添加装置(106)或者缓冲液添加-标记装置(108)。进行步骤(b)的时间点可由本领域技术人员根据实际情况合理确定,只要施加的额外缓冲液能够携带第二标记装置(105)或者缓冲液添加-标记装置(108)中的结合分子,并使其与液体样品中的分析物(如果存在的话)结合即可。

[0079] 在一个优选的实施方案中,本发明的方法还包括下述的步骤(c):即,在步骤(a)之前,对液体样品进行预处理。此类预处理包括,例如过滤、蒸馏、分离、浓缩、离心、稀释、干扰组分的灭活、试剂的添加(例如抗凝剂添加,抗氧化剂添加),免疫刺激等等,或其任何组合。例如,当待检测的液体样品是全血时,可以向其中添加抗凝剂例如肝素,以避免血液凝固。或者,可对全血进行适当的稀释,以例如调整其粘稠度,以便适用于本发明的检测装置。或者,可以向来自受试者的液体样品(例如全血)中添加结核分枝杆菌特异性抗原(例如PPD)作为刺激物,并通过检测经刺激的液体样品中是否产生了 γ 干扰素来确定液体样品所源自的受试者是否感染了结核分枝杆菌或者患有结核病。

[0080] 在一个优选的实施方案中,本发明的方法还包括下述的步骤(d):即,在步骤(a)之后,测量所述分析装置的检测装置(即,检测区和任选的质控区)的信号,从而确定液体样品中分析物的存在或者其量或水平。在一个优选的实施方案中,通过使用标准品绘制的标准曲线来将检测区所产生的信号转换成液体样品中分析物的量或水平。在一个优选的实施方案中,使用上文论述的信号读取器来读取检测区所产生的信号,并任选地将该信号转换成液体样品中分析物的量或水平。

[0081] 在一个优选的实施方案中,液体样品是来自受试者的体液,例如全血、血清、血浆、唾液或口腔液、痰、眼晶状体流体、鼻流体、鼻咽或鼻咽拭子或抽吸物、汗液、尿液、乳、腹水液、粘液、滑液、腹膜液、经皮渗出物、咽渗出物、支气管肺泡灌洗液、气管抽吸物、脑脊髓液、精液、宫颈粘液、阴道或尿道分泌物、羊水等。此类受试者可以是任何动物,包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖类、鱼类和无脊椎动物。哺乳动物的非限制性例子包括,牛科动物、马科动物、羊科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物、啮齿类动物、灵长类动物例如人。此外,液体样品还可以是来自培养物(例如细胞培养物,组织培养物等)的培养上清或者细胞匀浆物的上清。

[0082] 在一个优选的实施方案中,所述分析物可以是任何目的蛋白,包括但不限于抗原,抗体,受体,配体,细胞因子,生长因子,免疫因子,趋化因子等。分析物还包括但不限于,毒素、有机化合物、蛋白质、肽、微生物、细菌、病毒、氨基酸、核酸、碳水化合物、激素、类固醇、维生素、药物、污染物、杀有害生物剂和任何上述物质的代谢产物或针对任何上述物质的抗

体。术语分析物还包括任何抗原性物质、半抗原、抗体、大分子及其组合。示例性分析物的非详尽列表显示于美国专利 4,366,241 中(第 19 栏,第 7 行到第 26 栏,第 42 行),其公开内容通过引用合并入本文。代表性分析物的进一步描述和列表可见于美国专利 4,299,916、4,275,149 和 4,806,311 中,所有所述专利通过引用合并入本文。在一个特别优选的实施方案中,所述分析物是 γ 干扰素,例如牛或人 γ 干扰素。

[0083] 在一个优选的实施方案中,本发明的方法用于定性检测分析物的存在和/或定量检测分析物(例如 γ 干扰素,例如牛或人 γ 干扰素)的水平。

[0084] 在一个优选的实施方案中,应用至本发明的分析装置的液体样品的体积可以为约 10–500 μ l,例如约 10 μ l、20 μ l、30 μ l、40 μ l、50 μ l、60 μ l、70 μ l、80 μ l、90 μ l、100 μ l、110 μ l、120 μ l、130 μ l、140 μ l、150 μ l、160 μ l、170 μ l、180 μ l、190 μ l、200 μ l、210 μ l、220 μ l、230 μ l、240 μ l、250 μ l、260 μ l、270 μ l、280 μ l、290 μ l、300 μ l、310 μ l、320 μ l、330 μ l、340 μ l、350 μ l、360 μ l、370 μ l、380 μ l、390 μ l、400 μ l、410 μ l、420 μ l、430 μ l、440 μ l、450 μ l、460 μ l、470 μ l、480 μ l、490 μ l 或 500 μ l,或其间的任何数值或范围。

[0085] 在一个优选的实施方案中,应用至本发明的分析装置的额外缓冲液的体积可以为约 10–500 μ l,例如约 10 μ l、20 μ l、30 μ l、40 μ l、50 μ l、60 μ l、70 μ l、80 μ l、90 μ l、100 μ l、110 μ l、120 μ l、130 μ l、140 μ l、150 μ l、160 μ l、170 μ l、180 μ l、190 μ l、200 μ l、210 μ l、220 μ l、230 μ l、240 μ l、250 μ l、260 μ l、270 μ l、280 μ l、290 μ l、300 μ l、310 μ l、320 μ l、330 μ l、340 μ l、350 μ l、360 μ l、370 μ l、380 μ l、390 μ l、400 μ l、410 μ l、420 μ l、430 μ l、440 μ l、450 μ l、460 μ l、470 μ l、480 μ l、490 μ l 或 500 μ l,或其间的任何数值或范围。

[0086] 本发明的方法/装置可用于诊断目的。例如,当将本发明的方法/装置用于检测疾病相关标志物(例如,病原体的抗原或代谢物,或宿主针对病原体所产生的抗体或细胞因子等)时,本发明的方法/装置可用于诊断疾病的存在或不存在,例如病原体感染的存在或不存在。例如,当将本发明的方法/装置用于检测经刺激的体液样品中是否产生了 γ 干扰素时,本发明的方法/装置可用于诊断体液样品所源自的受试者是否感染了结核分枝杆菌或者患有结核病。

[0087] 本发明的方法/装置还可用于非诊断目的。例如,当将本发明的方法/装置用于检测细胞培养物上清或者细胞匀浆物上清中的目的蛋白时,本发明的方法/装置可用于确定细胞是否分泌或者表达目的蛋白,以及所分泌或者表达的目的蛋白的量或水平。

[0088] 在另一个方面,本发明提供了,本发明的分析装置用于制备试剂盒的用途,所述试剂盒用于执行如上文所定义的用于检测液体样品中的分析物的方法。

[0089] 在另一个方面,本发明提供了用于改进免疫层析装置以提高其定量检测上限和/或增加其定量检测范围的方法,所述免疫层析装置在改进前,在其样品接收装置上游不包含额外的标记装置,所述方法包括,在所述免疫层析装置的样品接收装置的上游设置第二标记装置(105)和缓冲液添加装置(106),或者缓冲液添加-标记装置(108),其中所述的缓冲液添加装置位于第二标记装置的上游。

[0090] 在一个优选的实施方案中,所述免疫层析装置在改进前包括,如上文所定义的样品接收装置、第一标记装置、检测装置和样品回收装置,或者如上文所定义的样品接收-标记装置、检测装置和样品回收装置。在一个优选的实施方案中,所述的第二标记装置(105)、

缓冲液添加装置 (106) 和缓冲液添加 - 标记装置 (108) 是如上文所定义的。

[0091] 在一个优选的实施方案中,与未经改进的免疫层析装置相比,经改进的免疫层析装置的定量检测上限提高了 5-10 倍,或者定量检测范围增加了 5-10 倍。

[0092] 在一个优选的实施方案中,所述免疫层析装置为试纸条。在一个优选的实施方案中,所述试纸条在改进前包括,如上文所定义的样品垫、第一标记垫、多孔膜(例如酸纤维素膜)和吸水垫。

[0093] 发明的有益效果

[0094] 与现有技术相比,本发明的技术方案具有以下有益效果:

[0095] (1) 本发明的分析装置 / 方法具有快速、灵敏、方便且能定量检测的特点。

[0096] (2) 本发明的分析装置 / 方法在对目的分析物进行检测时,既能够避免产生“HOOK”现象,又能够保持高灵敏度。

[0097] (3) 本发明的分析装置 / 方法提供了显著更高的定量检测上限,以及显著更宽的定量检测范围。例如,本发明的分析装置(例如试纸条)与不具有所述第二标记装置 (105) 或缓冲液添加 - 标记装置 (108) 的相同分析装置相比,其定量检测上限提高了 5-10 倍,或者定量检测范围增加了 5-10 倍。

[0098] (4) 本发明的分析装置 / 方法特别适合用于定性或定量检测存在量巨大的分析物。

[0099] 下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将理解,下列附图和实施例仅用于说明本发明,而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述,本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

附图说明

[0100] 图 1 显示了本发明分析装置的示例性实施方案的示意图。特别地,图 1A-1D 显示了,本发明的示例性分析装置 (100),其例如可包括:

[0101] 如上文所定义的样品接收装置 (101)、第一标记装置 (102)、检测装置 (103) (其包括检测区 (103a) 和任选的质控区 (103b))、样品回收装置 (104)、第二标记装置 (105) 和缓冲液添加装置 (106),如图 1A 所显示的;

[0102] 如上文所定义的样品接收 - 标记装置 (107) (其用于替代样品接收装置 (101) 和第一标记装置 (102))、检测装置 (103) (其包括检测区 (103a) 和任选的质控区 (103b))、样品回收装置 (104)、第二标记装置 (105) 和缓冲液添加装置 (106),如图 1B 所显示的;

[0103] 如上文所定义的样品接收装置 (101)、第一标记装置 (102)、检测装置 (103) (其包括检测区 (103a) 和任选的质控区 (103b))、样品回收装置 (104) 和缓冲液添加 - 标记装置 (108) (其用于替代第二标记装置 (105) 和缓冲液添加装置 (106)),如图 1C 所显示的;或者,

[0104] 如上文所定义的样品接收 - 标记装置 (107) (其用于替代样品接收装置 (101) 和第一标记装置 (102))、检测装置 (103) (其包括检测区 (103a) 和任选的质控区 (103b))、样品回收装置 (104) 和缓冲液添加 - 标记装置 (108) (其用于替代第二标记装置 (105) 和缓冲液添加装置 (106)),如图 1D 所显示的。

[0105] 图 1A-1D 所显示的分析装置例如可以以试纸条形式存在。例如,样品接收装置(101)可以为用于接收液体样品的样品垫;第一标记装置(102)可以为涂覆了结合分子的第一标记垫;检测装置(103)可以为固定了捕获分子和质控分子的多孔膜(例如酸纤维素膜),并且其中的检测区(103a)和质控区(103b)可以以检测线和质控线的形式存在;样品回收装置(104)可以为吸水垫;第二标记装置(105)可以为涂覆了结合分子的第二标记垫;和/或,缓冲液添加装置(106)可以为缓冲液添加垫。此外,样品接收-标记装置(107)可以为由样品垫与第一标记垫一起构成的样品-标记垫;和/或,缓冲液添加-标记装置(108)可以为由缓冲液添加垫与第二标记垫一起构成的缓冲液-标记垫。

[0106] 进一步,在使用本发明的分析装置来进行分析物的检测或定量时,可以将怀疑含有分析物的液体样品添加至样品接收装置(101)或者样品接收-标记装置(107),并且,可以在此之前、同时或者之后将额外的缓冲液添加至缓冲液添加装置(106)或者缓冲液添加-标记装置(108)。

[0107] 图 2 显示了用于封装本发明的分析装置(例如试纸条)的底板(201)和顶板(202)的示意图,其中,顶板(202)例如可包括位于样品接收装置或者样品接收-标记装置上方的样品接收孔(203),位于检测装置上方的检测窗口(204)(其用于观察和测量检测区和任选的质控区中的信号),以及位于缓冲液添加装置或者缓冲液添加-标记装置上方的缓冲液接收孔(205)。

[0108] 图 3 显示了,使用两种试纸条(常规试纸条和实施例 1 制备的试纸条)来检测具有已知浓度的人 γ 干扰素的液体样品的检测结果。结果显示,当液体样品中 IFN γ 的浓度达到 1600pg/ml 或者更高(例如 3200 或 6400pg/ml)时,常规试纸条即无法对液体样品中的 IFN γ 的水平进行有效、准确的定量,出现了“HOOK”现象(含有 6400pg/ml IFN γ 的样品的信号值甚至低于含有 1600 或 3200pg/ml IFN γ 的样品的信号值)。也即,常规试纸条的有效定量检测上限仅能达到约 800pg/ml。相比之下,本发明的试纸条能够对高浓度(例如 3200 或 6400pg/ml)的 IFN γ 样品进行有效、准确的定量,而不会出现“HOOK”现象。

[0109] 图 4a 显示了,使用含有已知浓度的人 γ 干扰素的标准品(浓度不超过 1600pg/ml)和实施例 1 制备的试纸条绘制的线性回归曲线。图 4a 的结果显示,在人 γ 干扰素浓度不超过 1600pg/ml 的情况下,读取的信号值 A_T/A_C 与标准品中的人 IFN- γ 的浓度(pg/ml)之间呈良好的线性关系($R^2 = 0.9997$),从而,该试纸条能够用于有效、准确地定量样品中的人 γ 干扰素浓度。

[0110] 图 4b 显示了,使用含有已知浓度的人 γ 干扰素的标准品(浓度不超过 6400pg/ml)和实施例 1 制备的试纸条绘制的 S 型回归曲线(Logistic 四参数拟合)。图 4b 的结果显示,在人 γ 干扰素浓度不超过 6400pg/ml 的情况下,读取的信号值 A_T/A_C 与标准品中的人 IFN- γ 的浓度(pg/ml)之间呈良好的 S 型回归关系($R^2 = 0.9984$),从而,本发明的试纸条能够用于有效、准确地定量样品中的人 γ 干扰素浓度,其有效定量检测上限可达到,甚至超过 6400pg/ml。

[0111] 图 3-4 的结果表明,与常规的试纸条相比,本发明的试纸条具有显著更高的定量检测上限,显著更宽的定量检测范围,从而特别适用于检测存在量巨大的分析物。

[0112] 图 5 显示了,使用含有已知浓度的人 γ 干扰素的标准品和实施例 1 制备的试纸条绘制的标准线性回归曲线。结果显示,在人 γ 干扰素浓度不超过 1600pg/ml 的情况下,

读取的信号值 A_T/A_C 与标准品中的人 IFN- γ 的浓度 (pg/ml) 之间呈良好的线性关系 ($R^2 = 0.9984$), 从而, 该试纸条能够用于有效、准确地定量样品中的人 γ 干扰素浓度。

[0113] 图6显示了, 本发明试纸条的检测结果显示与商品化ELISA试剂盒的检测结果的对比。结果显示, 当用于检测血清样品中产生的 IFN γ 时, 使用本发明的试纸条获得的检测结果与使用商品化ELISA试剂盒获得的检测结果基本上一致 ($R^2 = 0.9373$)。这些结果再次证实了, 本发明的试纸条用于定量检测分析物的可靠性和准确性。

具体实施方案

[0114] 现参照下列意在举例说明本发明 (而非限定本发明) 的实施例来描述本发明。

[0115] 除非特别指明, 本发明中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法, 基本上参照 J. Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册, 第2版, 冷泉港实验室出版社, 1989, 以及 F. M. Ausubel 等人, 精编分子生物学实验指南, 第3版, John Wiley&Sons, Inc., 1995 中所述的方法进行。本领域技术人员知晓, 实施例以举例方式描述本发明, 且不意欲限制本发明所要求保护的围。

[0116] 一般实施方案

[0117] 下面以用于检测和 / 或定量 γ 干扰素的试纸条为例, 描述了本发明分析装置的一个示例性制备方法。然而, 本领域技术人员知晓, γ 干扰素对于本发明的实施不是必须的; 本发明的试纸条可用于检测和 / 或定量任何目的的分析物。该示例性制备方法包括如下步骤:

[0118] 1) 抗体的制备: 将抗体 (包括第一抗 γ 干扰素抗体 (例如抗 γ 干扰素小鼠抗体, 用作结合分子), 抗结合分子抗体 (例如羊抗鼠 IgG 抗体, 用作质控分子) 和第二抗 γ 干扰素抗体 (用作捕获分子)) 在半透膜中对缓冲液 (例如磷酸盐缓冲液, pH7.0-7.4) 进行透析。在整个透析过程中, 每两小时更换缓冲液一次, 一共进行三次, 并且更换缓冲液的时间间隔不小于 2 小时。

[0119] 2) 检测用多孔膜的制备: 将步骤 (1) 制备的抗结合分子抗体 (例如羊抗鼠 IgG 抗体, 用作质控分子) 和第二抗 γ 干扰素抗体 (用作捕获分子) 分别稀释到适当浓度 (例如, 1-2mg/mL), 然后通过喷点平台 (例如, 购自 Biodot 公司的喷点平台) 分别点印到多孔膜 (例如 HF135 型硝酸纤维素膜) 上, 形成质控线和检测线。随后, 将该多孔膜置于低湿度的干燥间进行干燥, 封存备用。

[0120] 3) 结合分子的荧光标记: 用缓冲液 (例如 50mM pH5.0MES 缓冲液) 洗涤荧光颗粒 (例如 1mg), 并将其重悬。然后, 称取 EDC (例如 0.5mg) 和 NHS (例如 1mg), 将其加入至荧光颗粒溶液中, 并在室温下在转床中孵育适当的时间 (例如 15 分钟)。随后, 离心溶液以收集荧光颗粒。之后, 用缓冲液 (例如磷酸盐缓冲液) 洗涤收集到的荧光颗粒 2 次并将其重悬。然后, 向荧光颗粒溶液中加入 50ug 步骤 (1) 获得的第一抗 γ 干扰素抗体 (用作结合分子), 并且在室温下孵育适当的时间 (例如 4 小时)。孵育后, 向溶液中加入封闭液 (例如, 包含 100mM 甘氨酸和 0.1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液), 并在室温下封闭适当的时间 (例如 30 分钟)。随后, 洗涤结合分子-荧光颗粒缀合物, 并将其以适当的浓度 (例如原浓度的 5 倍稀释浓度) 保存于封闭液中。

[0121] 4) 标记垫的制备: 用标记稀释液 (例如, 包含 5% 蔗糖、1% 牛血清白蛋白和 0.5%

Triton X-100 的磷酸盐缓冲液) 将结合分子-荧光颗粒缀合物稀释, 然后将其均匀滴加在标记垫材料(例如玻璃纤维)上, 从而制备成样品-标记垫和第二标记垫。将所获得的标记垫避光烘干, 并加入干燥剂封存备用。

[0122] 5) 缓冲液添加垫的处理: 将缓冲液添加垫浸渍在处理液(例如, 含有 1% 牛血清白蛋白和 0.5% Tween-20 的 10mM 磷酸缓冲液, pH7.4) 中, 并且在室温下处理适当的时间(例如 1 小时)。随后, 将其置于干燥间内晾干, 备用。

[0123] 6) 试纸条的组装: 将步骤(2) 制备的多孔膜(例如硝酸纤维素膜) 贴附在底板(例如 PVC 底板) 上, 其上游末端与步骤(4) 制备的第二标记垫的下游末端层叠。另外, 还将步骤(5) 制备的缓冲液添加垫与第二标记垫的上游末端层叠。层叠部分的长度例如可以为 1-2mm。然后, 将多孔膜(例如硝酸纤维素膜)、第二标记垫和缓冲液添加垫与底板(例如 PVC 底板) 一起压实, 并用斩切机切成适当宽度(例如 3-6mm, 如 4mm) 的试纸条。另外, 用斩切机将吸水滤纸切成 10mm×15mm 规格, 将步骤(4) 制备的样品-标记垫切成 6mm×10mm 规格。然后, 将多孔膜(例如硝酸纤维素膜) 的下游末端与吸水滤纸接触, 并且将样品-标记垫置于多孔膜(例如硝酸纤维素膜) 上, 位于检测线与第二标记垫之间。

[0124] 可通过如下步骤来使用如上制备的试纸条:

[0125] 在样品-标记垫上滴加样品, 并且同时在缓冲液添加垫上滴加额外的缓冲液。随后, 在虹吸作用下, 样品和缓冲液均朝向下流(即, 吸水垫) 流动。当样品中含有 γ 干扰素时, γ 干扰素将首先结合标记了荧光颗粒的第一抗 γ 干扰素抗体(例如抗 γ 干扰素小鼠抗体, 结合分子), 并且被固定在检测线上的第二抗 γ 干扰素抗体(捕获分子) 捕获。此外, 标记了荧光颗粒的第一抗 γ 干扰素抗体(例如抗 γ 干扰素小鼠抗体, 结合分子) 还将被固定在质控线上的抗结合分子抗体(例如羊抗鼠 IgG 抗体, 质控分子) 所捕获。由此, 在激发波长(例如 365nm 波长) 的发光二极管激发下, 直接或间接被捕获在检测线和质控线上的结合分子将发出发射波长(例如 615nm 波长) 的荧光条带。使用信号读取器来读取检测线和质控线上的荧光信号/数值。然后, 可根据标准曲线计算出样品中的 γ 干扰素的浓度或量。

[0126] 实施例 1. 用于检测人 γ 干扰素的试纸条的制备

[0127] 1. 抗体的准备和包被

[0128] 将本实验室自行制备的抗人 γ 干扰素抗体 C6H4(用作捕获分子) 对 0.01M PBS7.4 透析, 将抗人 γ 干扰素抗体 8A11(用作结合分子) 对 0.02M PB7.4 透析。在整个透析过程中, 每两小时更换缓冲液一次, 一共进行三次, 并且更换缓冲液的时间间隔不小于 2 小时。

[0129] 将羊抗鼠 IgG(购自北京万域美澜公司, 用作质控分子) 稀释到 2mg/mL, 将单抗 C6H4 稀释到 2mg/mL。然后, 通过 Biodot 喷点平台将这 2 种抗体分别点印到 HF135 型硝酸纤维素膜上, 形成质控线和检测线。随后, 将该硝酸纤维素膜置于低湿度(RH<30%) 的干燥间进行干燥, 封存备用。

[0130] 2. 结合分子的荧光标记

[0131] 使用 bangslab 公司生产的、粒径为 260nm 的荧光颗粒(Europium)。用 50mM MES 缓冲液(pH5.0) 洗涤荧光颗粒, 并将其重悬。然后, 称取 0.5mg EDC 和 1mg NHS, 将其加入至荧光颗粒溶液中, 并在室温下在转床中孵育 15 分钟。随后, 以 13000rpm 离心溶液 15 分钟,

以收集荧光颗粒。之后,用磷酸盐缓冲液洗涤收集到的荧光颗粒 2 次并将其重悬。然后,向荧光颗粒溶液中加入 50ug 步骤 (1) 制备的抗体 8A11(用作结合分子),并且在室温下孵育 4 小时。孵育后,向溶液中加入封闭液(包含 100mM 甘氨酸和 0.1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液),并在室温下封闭 30 分钟。随后,洗涤结合分子-荧光颗粒缀合物,并将其以原浓度的 5 倍稀释浓度保存于封闭液中。

[0132] 3. 标记垫的制备

[0133] 用标记稀释液(包含 5%蔗糖、1%牛血清白蛋白和 0.5% Triton X-100 的磷酸盐缓冲液)将结合分子-荧光颗粒缀合物稀释 40 倍,然后将其均匀滴加在玻璃纤维上,从而制备成样品-标记垫和第二标记垫。将所获得的标记垫避光烘干,并加入干燥剂封存备用。

[0134] 4. 缓冲液添加垫的处理

[0135] 将缓冲液添加垫浸渍在处理液(10mM 磷酸缓冲液, pH7.4, 含有 1%牛血清白蛋白和 0.5% Tween-20)中,并且在室温下处理 1 小时。随后,将其置于干燥间内晾干,备用。

[0136] 5. 试纸条的组装

[0137] 将步骤 (1) 制备的硝酸纤维素膜贴附在 PVC 底板上,其上游末端与步骤 (3) 制备的第二标记垫的下游末端层叠。另外,还将步骤 (4) 制备的缓冲液添加垫与第二标记垫的上游末端层叠。层叠部分的长度例如可以为 1-2mm。然后,将硝酸纤维素膜、第二标记垫和缓冲液添加垫与 PVC 底板一起压实,并用斩切机切成 5mm 宽度的试纸条。另外,用斩切机将吸水滤纸切成 10mm×15mm 规格,将步骤 (3) 制备的样品-标记垫切成 6mm×10mm 规格。然后,将硝酸纤维素膜的下游末端与吸水滤纸接触,并且将样品-标记垫置于硝酸纤维素膜上,位于检测线与第二标记垫之间。

[0138] 实施例 2. 用于检测牛 γ 干扰素的试纸条的制备

[0139] 1. 抗体的准备和包被

[0140] 将抗牛 γ 干扰素抗体 CC330(abdserotec 公司,用作捕获分子)对 0.01M PBS7.4 透析,将抗牛 γ 干扰素抗体 CC302(abdserotec 公司,用作结合分子)对 0.02M PB7.4 透析。在整个透析过程中,每两小时更换缓冲液一次,一共进行三次,并且更换缓冲液的时间间隔不小于 2 小时。

[0141] 将羊抗鼠 IgG(购自北京万域美澜公司,用作质控分子)稀释到 2mg/mL,将单抗 CC330 稀释到 2mg/mL。然后,通过 Biodot 喷点平台将这 2 种抗体分别点印到 HF135 型硝酸纤维素膜上,形成质控线和检测线。随后,将该硝酸纤维素膜置于低湿度(RH<30%)的干燥间进行干燥,封存备用。

[0142] 2. 结合分子的荧光标记

[0143] 使用 bangslab 公司生产的、粒径为 260nm 的荧光颗粒(Europium)。用 50mM MES 缓冲液(pH5.0)洗涤荧光颗粒,并将其重悬。然后,称取 0.5mg EDC 和 1mg NHS,将其加入至荧光颗粒溶液中,并在室温下在转床中孵育 15 分钟。随后,以 13000rpm 离心溶液 15 分钟,以收集荧光颗粒。之后,用磷酸盐缓冲液洗涤收集到的荧光颗粒 2 次并将其重悬。然后,向荧光颗粒溶液中加入 50ug 步骤 (1) 制备的抗体 CC302(用作结合分子),并且在室温下孵育 4 小时。孵育后,向溶液中加入封闭液(包含 100mM 甘氨酸和 0.1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液),并在室温下封闭 30 分钟。随后,洗涤结合分子-荧光颗粒缀合物,并将其以原浓度的 5 倍稀释浓度保存于封闭液中。

[0144] 3. 标记垫的制备:用标记稀释液(包含5%蔗糖、1%牛血清白蛋白和0.5% Triton X-100的磷酸盐缓冲液)将结合分子-荧光颗粒缀合物稀释40倍,然后将其均匀滴加在玻璃纤维上,从而制备成样品-标记垫和第二标记垫。将所获得的标记垫避光烘干,并加入干燥剂封存备用。

[0145] 4. 缓冲液添加垫的处理:将缓冲液添加垫浸渍在处理液(10mM磷酸缓冲液, pH7.4, 含有1%牛血清白蛋白和0.5% Tween-20)中,并且在室温下处理1小时。随后,将其置于干燥间内晾干,备用。

[0146] 5. 试纸条的组装:将步骤(1)制备的硝酸纤维素膜贴附在PVC底板上,其上游末端与步骤(3)制备的第二标记垫的下游末端层叠。另外,还将步骤(4)制备的缓冲液添加垫与第二标记垫的上游末端层叠。层叠部分的长度例如可以为1-2mm。然后,将硝酸纤维素膜、第二标记垫和缓冲液添加垫与PVC底板一起压实,并用斩切机切成5mm宽度的试纸条。另外,用斩切机将吸水滤纸切成10mm×15mm规格,将步骤(3)制备的样品-标记垫切成6mm×10mm规格。然后,将硝酸纤维素膜的下游末端与吸水滤纸接触,并且将样品-标记垫置于硝酸纤维素膜上,位于检测线与第二标记垫之间。

[0147] 实施例3. 人 γ 干扰素的检测

[0148] 1. 含有人 γ 干扰素的液体样品的制备

[0149] 用含有20% NBS的1×PBS将重组人IFN- γ (实验室自制)稀释成204800pg/ml、51200pg/ml、6400pg/ml、3200pg/ml、1600pg/ml、800pg/ml、400pg/ml、200pg/ml、100pg/ml、50pg/ml、25pg/ml、12.5pg/ml。

[0150] 2. 使用实施例1制备的试纸条来检测人 γ 干扰素

[0151] 将前一步骤中制备的各种含有人 γ 干扰素的液体样品(50u1)分别添加至根据实施例1制备的试纸条的样品-标记垫,随后立即将100u1PBS滴加至缓冲液添加垫。20分钟后,根据制造商的说明书,使用扫描式荧光免疫分析仪读取试纸条的检测线(A_T)和质控线(A_C)上的荧光信号,并记录结果(A_T/A_C)。

[0152] 3. 用作对照的常规试纸条的制备

[0153] 根据实施例1中所述的方法,制备标记垫(其涂覆有抗体8A11-荧光颗粒缀合物)和硝酸纤维素膜(其固定有羊抗鼠IgG和单抗C6H4,作为质控线和检测线)。

[0154] 此外,将样品垫浸渍在处理液(10mM磷酸缓冲液, pH7.4, 含有1%牛血清白蛋白和0.5% Tween-20)中,并且在室温下处理1小时。随后,将其置于干燥间内晾干,备用。

[0155] 随后,将制备的硝酸纤维素膜贴附在PVC底板上,且其下游末端与吸水滤纸接触。另外,将样品垫和标记垫依次放置在硝酸纤维素膜的检测线上游,然后压实,并用斩切机切成5mm宽度的常规试纸条。该常规试纸条沿液体样品流动方向依次包括,样品垫、标记垫、含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水滤纸,而不包含位于样品垫上游的缓冲液添加垫与第二标记垫。

[0156] 4. 使用常规试纸条来检测人 γ 干扰素

[0157] 将之前制备的各种含有人 γ 干扰素的液体样品(70u1)分别添加至根据前一步骤制备的常规试纸条的样品垫。20分钟后,根据制造商的说明书,使用扫描式荧光免疫分析仪读取常规试纸条的检测线和质控线上的荧光信号,并记录结果。

[0158] 5. 结果

[0159] 检测结果示于下面的表 1 和图 3 中。

[0160] 表 1 :使用两种试纸条检测人 γ 干扰素的检测结果

[0161]

人 IFN- γ 的浓度 (pg/ml)	读取的信号值 A_T/A_C	
	实施例 1 的试纸条	常规试纸条
204800	3.94	0.95
51200	3.95	1.52
12800	4.05	2.10
6400	4.00	2.34
3200	3.67	2.67
1600	2.88	2.50
800	1.39	1.45
400	0.68	0.77
200	0.33	0.38
100	0.16	0.15
50	0.08	0.08
25	0.04	0.03
12.5	0.02	0.01

[0162] 此外,还将读取的信号值 A_T/A_C 针对人 IFN- γ 的浓度 (pg/ml) 作图,其结果示于图 3 中。

[0163] 结果显示,当液体样品中 IFN γ 的浓度达到 1600pg/ml 或者更高 (例如 3200 或 6400pg/ml) 时,常规试纸条即无法对液体样品中的 IFN γ 的水平进行有效、准确的定量,出现了“HOOK”现象 (含有 6400pg/ml IFN γ 的样品的信号值甚至低于含有 1600 或 3200pg/ml IFN γ 的样品的信号值)。也即,常规试纸条的有效定量检测上限仅能达到约 800pg/ml。

[0164] 相比之下,本发明的试纸条能够对高浓度 (例如 3200 或 6400pg/ml) 的 IFN γ 样品进行有效、准确的定量,而不会出现“HOOK”现象 (参见,图 3)。

[0165] 与此同时,还注意到,当人 γ 干扰素的浓度不超过 1600pg/ml 时,本发明的试纸条能够通过线性回归曲线对样品中的人 γ 干扰素的浓度进行有效的定量检测。特别地,根据表 1 中的数据所绘制的线性回归曲线示于图 4a 中。图 4a 的结果显示,在人 γ 干扰素浓度不超过 1600pg/ml 的情况下,读取的信号值 A_T/A_C 与标准品中的人 IFN- γ 的浓度 (pg/ml) 之间呈良好的线性关系 ($R^2 = 0.9997$),从而,该试纸条能够用于有效、准确地定量样品中的人 γ 干扰素浓度。

[0166] 进一步,还注意到,当人 γ 干扰素的浓度不超过 6400pg/ml 时,本发明的试纸条还

能够通过 S 型回归曲线 (Logistic 四参数拟合) 对样品中的人 γ 干扰素的浓度进行有效的定量检测。特别地, 根据表 1 中的数据所绘制的 S 型回归曲线 (Logistic 四参数拟合) 示于图 4b 中。图 4b 的结果显示, 在人 γ 干扰素浓度不超过 6400pg/ml 的情况下, 读取的信号值 A_T/A_C 与标准品中的人 IFN- γ 的浓度 (pg/ml) 之间呈良好的 S 型回归关系 ($R^2 = 0.9984$), 从而, 本发明的试纸条能够用于有效、准确地定量样品中的人 γ 干扰素浓度, 其有效定量检测上限可达到, 甚至超过 6400pg/ml。

[0167] 这些结果表明, 与常规的试纸条相比, 本发明的试纸条具有显著更高的定量检测上限, 显著更宽的定量检测范围, 从而特别适用于检测存在量巨大的分析物。

[0168] 实施例 4. 血清样品中的人 γ 干扰素的检测

[0169] 1. 含有已知浓度的人 γ 干扰素的标准品的制备

[0170] 用含有 20% NBS 的 1×PBS 将重组人 IFN- γ 稀释成 800pg/mL、400pg/mL、200pg/mL、100pg/mL、50pg/mL、25pg/mL、12.5pg/mL, 作为含有已知浓度的人 γ 干扰素的标准品。

[0171] 2. 使用实施例 1 制备的试纸条来检测标准品

[0172] 将前一步骤中制备的标准品 (45u1) 分别添加至根据实施例 1 制备的试纸条的样品-标记垫, 随后立即将 100u1 PBS 滴加至缓冲液添加垫。20 分钟后, 根据制造商的说明书, 使用扫描式荧光免疫分析仪读取试纸条的检测线 (A_T) 和质控线 (A_C) 上的荧光信号, 并记录结果 (A_T/A_C)。检测结果示于下面的表 2 中。

[0173] 表 2: 使用实施例 1 制备的试纸条检测标准品的检测结果

[0174]

人 IFN- γ 的浓度 (pg/ml)	读取的信号值 A_T/A_C
800	2.88
400	1.41
200	0.6
100	0.32
50	0.15
25	0.09
12.5	0.04

[0175] 将读取的信号值 A_T/A_C 针对标准品中的人 IFN- γ 的浓度 (pg/ml) 作图, 绘制标准曲线, 并进行线性回归。结果示于图 5 中。结果显示, 在人 γ 干扰素浓度不超过 1600pg/ml 的情况下, 读取的信号值 A_T/A_C 与标准品中的人 IFN- γ 的浓度 (pg/ml) 之间呈良好的线性关系 ($R^2 = 0.9984$), 从而, 该试纸条能够用于有效、准确地定量样品中的人 γ 干扰素浓度。

[0176] 3. 对血浆样品中的人 γ 干扰素的检测

[0177] 从江苏东台地区流调人群采集了 20 份全血样品。所收集的全血样品用人结核分枝杆菌特异性抗原进行刺激, 并且在 37°C 恒温培养 22h。然后对经刺激的全血进行离心, 以

收集血浆。

[0178] 简言之,针对于每一份全血样品,取 3 个等分(每个等分的体积为 1ml),其中:一个等分添加特异性刺激抗原(ESAT-6 和 CFP10 各 1 μ g, 30 μ l)并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 22h,作为检测样品(T);另一个等分添加植物血凝素(PHA, 40 μ g, 30 μ l)并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 22h,作为阳性对照样品(P);最后一个等分添加相同体积的缓冲液,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 22h,作为阴性对照样品(N)。

[0179] 根据前一步骤描述的方法,使用实施例 1 制备的试纸条和扫描式荧光免疫分析仪来测量检测样品(T)、阳性对照样品(P)和阴性对照样品(N)的信号值,并计算经刺激的血浆样品所产生的人 γ 干扰素的量。计算方法如下:计算检测样品(T)的信号值与阴性对照样品(N)的信号值之间的差值(T-N),然后利用前一步骤绘制的标准曲线,计算 IFN γ 的量。此外,还根据制造商的说明书,使用商品化 ELISA 试剂盒(北京万泰生物药业股份有限公司)测量了经刺激的 20 份血浆样品所产生的 IFN- γ 的水平。结果示于下面的表 3 中。

[0180] 表 3:使用实施例 1 制备的试纸条或者商品化 ELISA 试剂盒检测经刺激的血浆样品中的人 γ 干扰素的检测结果

[0181]

样品编号	人 γ 干扰素的量 (pg/ml)	
	实施例 1 制备的试纸条	商品化 ELISA 试剂盒
1	143.907700	213.779000
2	8.756910	16.560590
3	105.320100	130.173300
4	80.969610	87.387350
5	113.451200	161.708900
6	25.157350	29.067460
7	59.655250	53.180080
8	206.167300	326.820800
9	56.964270	29.900170
10	3.183291	-14.938100
11	3.130840	-4.030831
12	111.631300	153.704500
13	3.729420	1.725924
14	51.622550	63.763500
15	21.961950	18.649290
16	2.832254	2.259652
17	41.243120	62.204830

[0182]

18	42.172720	38.003200
19	3.939937	3.156360
20	12.222920	22.148320

[0183] 另外,还将使用本发明的试纸条获得的检测结果针对使用商品化 ELISA 试剂盒获得的检测结果作图。结果示于图 6 中。结果显示,使用本发明的试纸条获得的检测结果与使用商品化 ELISA 试剂盒获得的检测结果基本上一致 ($R^2 = 0.9373$)。这些结果再次证实了,本发明的试纸条用于定量检测分析物的可靠性和准确性。

[0184] 尽管本发明的具体实施方案已经得到详细的描述,但本领域技术人员将理解:根据已经公开的所有教导,可以对细节进行各种修改和变动,并且这些改变均在本发明的保护范围之内。此外,还需要特别指出的是,本领域技术人员根据已经公开的所有教导,将完

全能够将本发明所公开的不同方面、不同技术特征的各种优选方案进行任意的组合,而不背离本发明的精神和范围。并且,由此所获得的各种技术方案也意欲涵盖在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

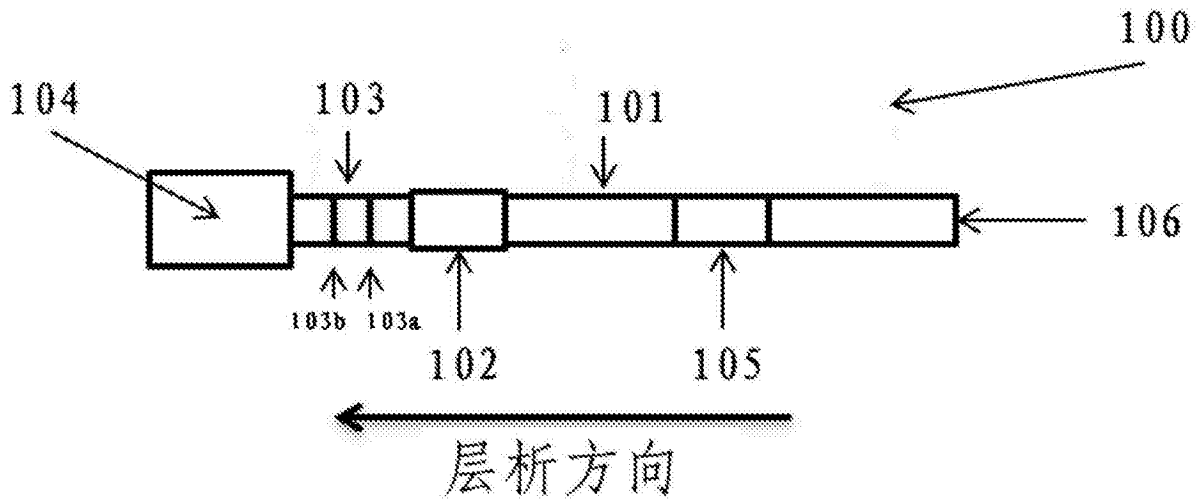


图 1A

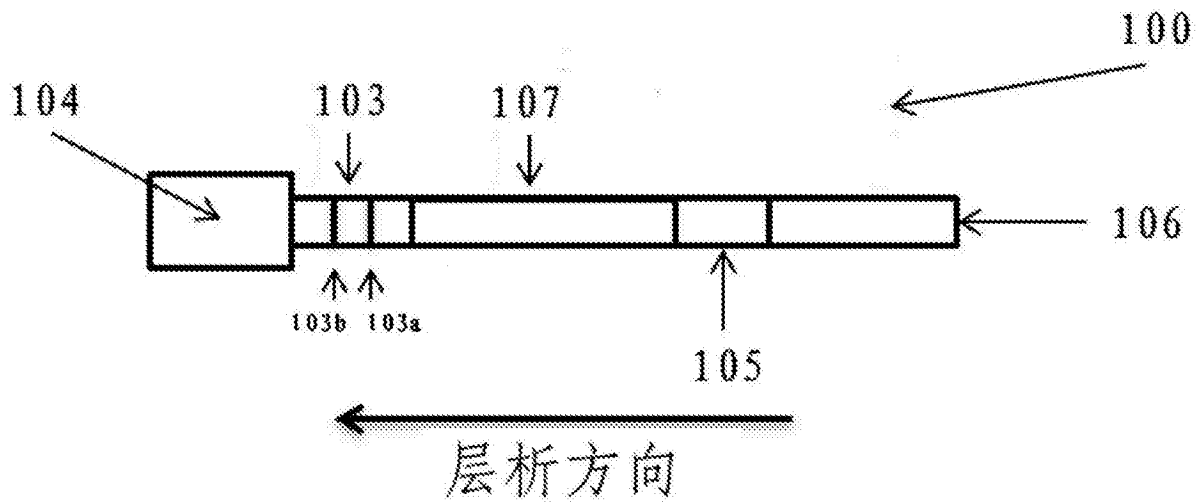


图 1B

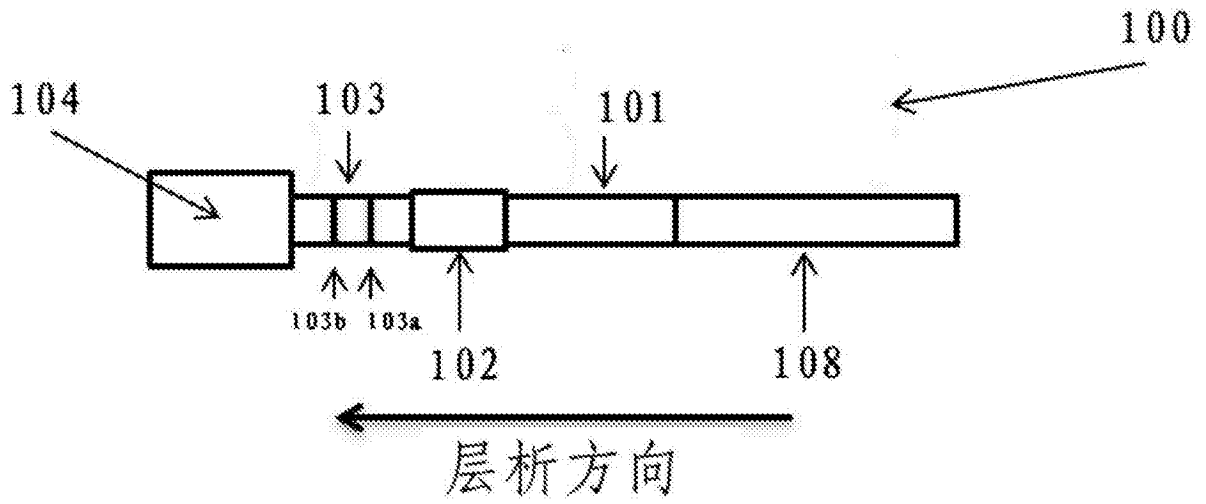


图 1C

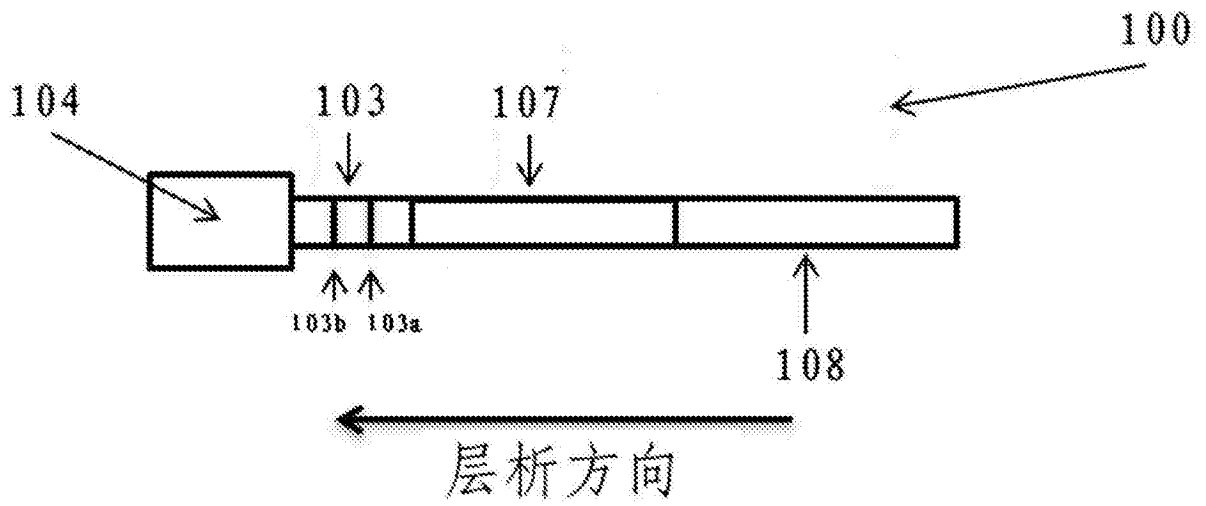


图 1D

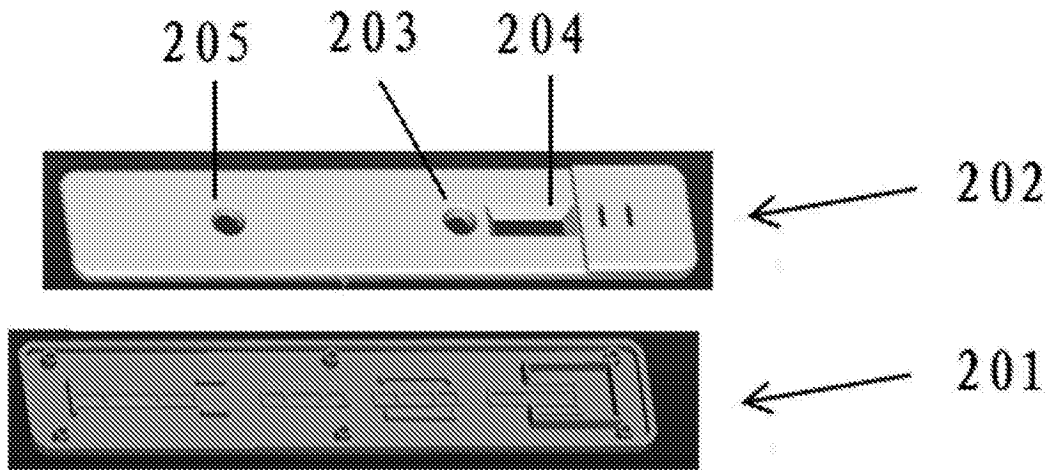


图 2

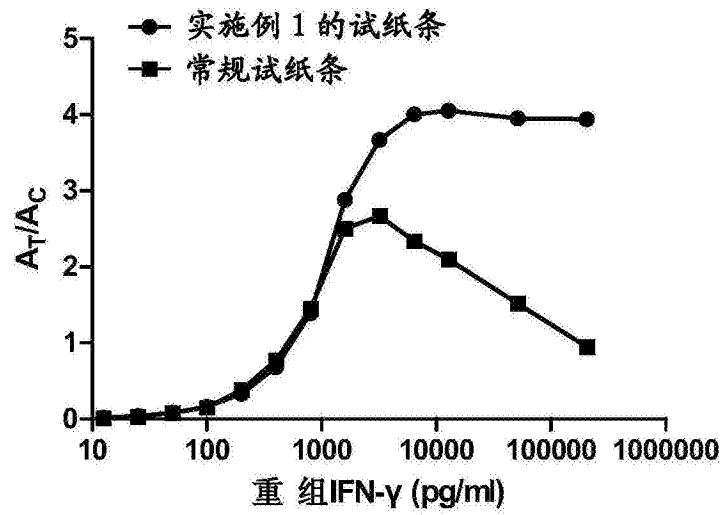


图 3

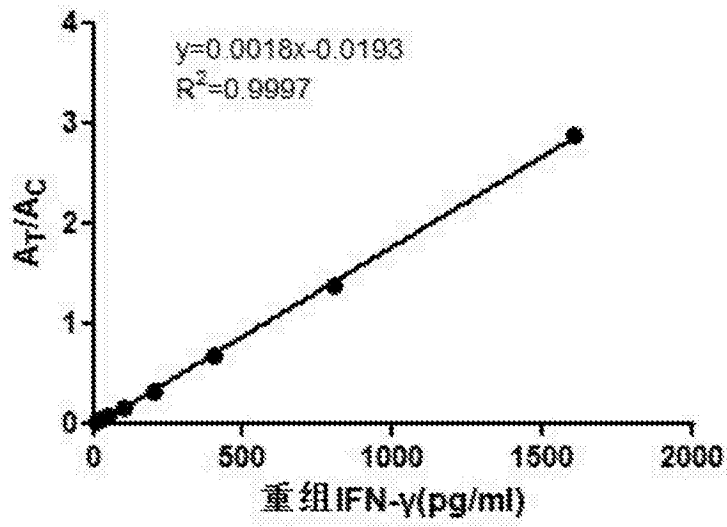


图 4a

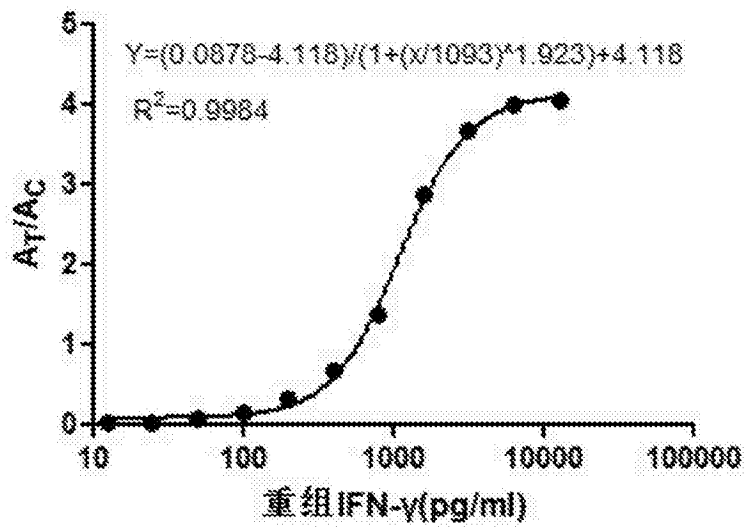


图 4b

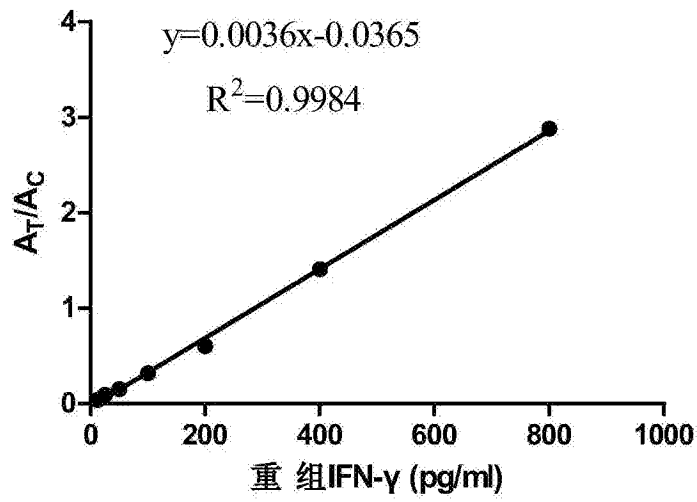


图 5

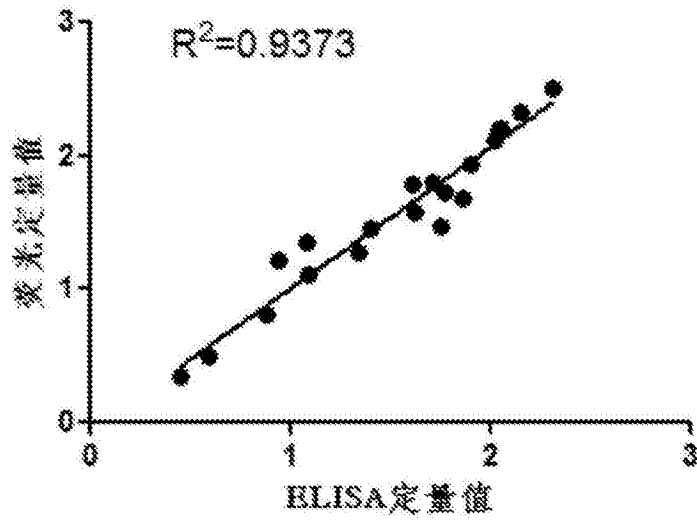


图 6

专利名称(译)	用于检测分析物的装置和方法		
公开(公告)号	CN105424940A	公开(公告)日	2016-03-23
申请号	CN201410472184.1	申请日	2014-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学 厦门万泰沧海生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	厦门大学 厦门万泰沧海生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学 厦门万泰沧海生物技术有限公司		
[标]发明人	葛胜祥 张晶 戴伟明 张军 夏宁邵		
发明人	葛胜祥 张晶 戴伟明 张军 夏宁邵		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/533		
代理人(译)	林远成		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫检测领域。更具体而言，本发明提供了一种用于检测液体样品中的分析物的分析装置(例如试纸条)，包含所述分析装置的试剂盒，以及使用所述分析装置来检测液体样品中的分析物的方法。本发明的分析装置的一个示例性实施方案可包括例如，样品接收装置(101)、第一标记装置(102)、检测装置(103)(其包括检测区(103a)和任选的质控区(103b))、样品回收装置(104)、第二标记装置(105)和缓冲液添加装置(106)。

