



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1902489 B

(45) 授权公告日 2012.07.04

(21) 申请号 200480015772.7

WO 0020866 A, 2000.04.13, 第 2 页第 21 行至第 8 页第 13 行以及附图 .

(22) 申请日 2004.03.19

US 6027943 A, 2000.02.22, 参见第 3 栏第 27 行至第 5 栏第 45 行以及附图 2 和 6.

## (30) 优先权数据

10/456,771 2003.06.06 US

EP 0291176 A1, 1988.11.17, 参见全文 .

## (85) PCT 申请进入国家阶段日

2005.12.06

EP 0306336 A, 1989.03.08, 参见第 4 栏第 21 行至 28 栏第 33 行以及附图 .

## (86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2004/008355 2004.03.19

EP 0262328 A, 1988.04.06, 参见第 11 栏第 48 行至第 36 栏第 4 行 .

## (87) PCT 申请的公布数据

WO2005/003732 EN 2005.01.13

EP 0512390 A, 1992.11.11, 第 6 页第 30 行至第 18 页第 50 行以及附图 .

## (73) 专利权人 优势诊疗技术公司

地址 美国加利福尼亚州

WO 0007015 A, 2000.02.10, 参见说明书第 6 页第 20 行至第 14 页第 11 行, 实施例 1 以及附图 1-3.

## (72) 发明人 戴维·查尔顿

审查员 王奕

## (74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有

限公司 33100

代理人 徐关寿

## (51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

## (56) 对比文件

CN 1397021 A, 2003.02.12, 全文 .

US 5656503 A, 1997.08.12, 全文 .

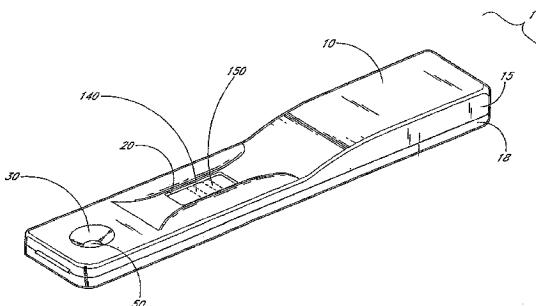
权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 5 页

## (54) 发明名称

对样品中分析物的诊断试验

## (57) 摘要

提供了诊断装置和方法。诊断装置优选地包括具有检测区 140 的试纸条。所分析的样品与检测区接触, 检测区包含目标分析物的特异性结合配体。如果样品中存在分析物, 则分析物与检测区中固定的结合配体相结合, 然后接触偶联物。该偶联物特异性地结合分析物, 产生表示存在分析物的可见信号。该装置可用于诊断患者特定疾病, 如 HIV 或肝炎。也可用于确定个体是否怀孕。



1. 一种用于检测液体样品中的目标分析物的诊断试纸条, 该试纸条包括 :  
偶联物来源区, 包括设计用来结合目标分析物的偶联物 ;  
用来接收液体样品的加样区 ; 和  
位于偶联物来源区下游的检测区, 包括固定的对于目标分析物特异性的结合剂,  
其中, 所述的加样区直接位于检测区上, 让来自加样区的部分液体样品在偶联物接触  
检测区之前接触所述的检测区。
2. 权利要求 1 的试纸条, 其中所述目标分析物是抗体。
3. 权利要求 2 的试纸条, 其中所述目标分析物是抗人类免疫缺陷病毒抗体。
4. 权利要求 2 的试纸条, 其中所述目标分析物是抗丙型肝炎抗体。
5. 权利要求 1 的试纸条, 其中所述目标分析物是抗原。
6. 权利要求 5 的试纸条, 其中所述目标分析物是人绒毛膜促性腺激素。
7. 权利要求 1 的试纸条, 其中所述偶联物来源区包括干燥的偶联物。
8. 权利要求 7 的试纸条, 其中所述偶联物来源区包括偶联物垫, 该偶联物垫包括干燥  
的偶联物, 并且与该试纸条流体连通。
9. 权利要求 7 的试纸条, 其中所述偶联物来源区是该试纸条的一部分。
10. 权利要求 1 的试纸条, 其中通过使偶联物来源区接触洗涤缓冲液使偶联物流向检  
测区。
11. 权利要求 10 的试纸条, 其中所述洗涤缓冲液含有封闭剂蛋白质和非离子型去污  
剂。
12. 权利要求 1 的试纸条, 其中所述偶联物含有结合成分和标记物。
13. 权利要求 12 的试纸条, 其中所述结合成分是蛋白 A。
14. 权利要求 12 的试纸条, 其中所述标记物选自胶体金、胶体银、胶体黑和染色的乳胶  
颗粒。
15. 权利要求 14 的试纸条, 其中所述标记物是胶体金。
16. 权利要求 15 的试纸条, 其中胶体金的粒径为约 20 纳米至约 80 纳米。
17. 权利要求 2 的试纸条, 其中所述偶联物含有与胶体金偶联的蛋白 A。
18. 权利要求 5 的试纸条, 其中所述偶联物含有与胶体金偶联的抗体。
19. 权利要求 1 的试纸条, 其中该试纸条包括硝酸纤维素膜。
20. 权利要求 1 的试纸条, 其中该试纸条还包括位于检测区下游的对照区, 该对照区包  
含能够结合所述偶联物的固定的对照结合剂。
21. 权利要求 20 的试纸条, 其中所述对照区包括固定的兔 IgG。
22. 权利要求 20 的试纸条, 其中所述对照区包括固定的蛋白 A。
23. 权利要求 1 的试纸条, 还包括与偶联物来源区流体连通的缓冲液垫。
24. 权利要求 1 的试纸条, 在检测区下游的位置处还包括与膜流体连通的吸收垫。
25. 权利要求 1 的试纸条, 还包括直接位于加样区上方的样品滤器。
26. 一种用于检测样品中的抗 HIV 抗体的试纸条, 包括 :  
检测区和位于该检测区上游的偶联物来源区 ;  
在所述检测区结合的固定抗原, 其中该固定抗原包括约 0.1  $\mu$  g 至约 0.5  $\mu$  g HIV 抗原 ;  
与所述偶联物来源区可扩散结合的偶联物, 其中该偶联物设计用来结合抗体 ; 和

用来接收液体样品的加样区，

其中，所述的加样区直接位于检测区上，让来自加样区的部分液体样品在偶联物接触检测区之前接触所述的检测区。

27. 权利要求 26 的试纸条，其中所述 HIV 抗原包括选自 GP120、P24 和 GP36 的一种或多种抗原。

28. 权利要求 26 的试纸条，其中所述偶联物包括蛋白 A。

29. 权利要求 28 的试纸条，其中蛋白 A 与胶体金偶联。

30. 一种检测液体样品中的目标抗体的方法，包括：

先使试纸条的检测区直接接触样品，其中该检测区包括固定的目标抗体特异性的抗原；以及

然后使接触过样品的检测区再接触设计用来结合目标抗体的偶联物。

31. 权利要求 30 的方法，其中所述偶联物包括蛋白 A。

32. 权利要求 31 的方法，其中蛋白 A 与胶体金偶联。

33. 权利要求 30 的方法，其中所述目标抗体是抗 HIV 抗体。

34. 权利要求 33 的方法，其中所述检测区包括选自 HIV-1 和 HIV-2 抗原的固定抗原。

35. 权利要求 34 的方法，其中所述 HIV 抗原选自 GP120 和 P24。

36. 权利要求 34 的方法，其中所述 HIV-2 抗原是 GP36。

37. 权利要求 30 的方法，其中所述液体样品选自全血、血清和血浆。

38. 一种免疫诊断妊娠试验试纸条，包括：

用于接收液体样品的加样区；

检测区，包括固定的第一抗 hCG 抗体；和

偶联物来源区，包括设计用来结合 hCG 的偶联物，

其中所述偶联物来源区位于所述检测区的上游；

其中，所述的加样区直接位于检测区上，让来自加样区的部分液体样品在偶联物接触检测区之前接触所述的检测区。

39. 权利要求 38 的妊娠试验试纸条，还包括与加样区流体连通的引流条。

40. 权利要求 38 的妊娠试验试纸条，其中所述偶联物包括第二 hCG 抗体。

41. 权利要求 40 的妊娠试验试纸条，其中所述第二 hCG 抗体与胶体金偶联。

## 对样品中分析物的诊断试验

[0001] 发明背景

[0002] 发明领域

[0003] 本发明涉及检测样品中分析物的侧流快速目测试验。

[0004] 相关技术描述

[0005] 侧流检测装置在本领域公知,在临床诊断中可以用来检测样品如体液中是否含有目标分析物。但是,这些装置一般需要比较大的样品体积和大量的偶联物。在能够读取试验结果之前也需要较长的等待时间。

[0006] 发明概述

[0007] 一方面,提供了一种免疫诊断试纸条,用于检测样品中的目标分析物。在一些实施方案中,分析物是抗体,如抗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 抗体或抗丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体。在另外一些实施方案中,分析物是抗原,如人绒毛膜促性腺激素 (hCG)。

[0008] 该诊断试纸条优选地包括含有设计用来结合目标分析物的偶联物的偶联物来源区,位于偶联物来源区下游并设计用来接收液体样品的加样区,和检测区。检测区位于偶联物来源区下游,包括能够特异性结合目标分析物的固定的结合剂。例如,如果目标分析物是抗体,则阳性检测区优选地包括固定的抗原。如果目标分析物是抗原,则阳性检测区优选地包括固定的抗体。偶联物包括能够结合目标分析物的第一结合成分和第二显示成分。

[0009] 试验中使用的样品可以是任何液体。优选的样品包括,例如,血液、血清、血浆、唾液和尿。将样品加到阳性检测区,接着使偶联物从偶联物来源区流出。偶联物流动穿过膜,接触已经结合到阳性检测区的所有分析物,产生可见信号。

[0010] 在一个优选实施方案中,试纸条包括具有固定的 HIV 抗原的检测区,用于检测抗 HIV 抗体。在该实施方案中,该试验可用于诊断患者的 HIV 感染。在另一个优选实施方案中,试纸条包括具有固定的 HCV 抗原的检测区,用于检测样品中的抗 HCV 抗体。在该实施方案中,该试验可用于诊断患者的 HCV 感染。在又一个实施方案中,试纸条包括具有固定的抗 hCG 抗体的检测区。在该实施方案中,该试验可用于确定个体是否怀孕。

[0011] 偶联物来源区优选地包括干燥的偶联物。例如,偶联物来源区可以是偶联物垫,偶联物在其上干燥。偶联物垫优选地与膜流体连通。在一些实施方案中,向加样区加样后,偶联物垫移动至与膜流体连通。在另一个实施方案中,偶联物来源区是膜的一部分,偶联物在其上干燥。

[0012] 优选地重悬浮干燥的偶联物,通过使偶联物来源区接触洗涤缓冲液使偶联物流动。在一个实施方案中,洗涤缓冲液含有约 0.1% 的封闭剂,优选的是封闭蛋白,如酪蛋白。洗涤缓冲液优选地也含有约 0.1% 的去污剂,优选的是非离子型去污剂,例如 TritonX100<sup>TM</sup>。在一个实施方案中,洗涤缓冲液含有约 0.025% HEPES,约 0.85% 氯化钠,约 0.1% EDTA,约 1% 甘露醇,约 0.1% 酪蛋白,和约 1% TritonX100<sup>TM</sup> 去污剂。

[0013] 在另一个实施方案中,偶联物悬浮于缓冲液中。通过将含有偶联物的缓冲液加至偶联物来源区上使偶联物流动至检测区。

[0014] 在一个特定的实施方案中,偶联物包括与胶体金偶联的蛋白 A。在其他实施方案

中,偶联物包括与胶体金偶联的抗体,优选单克隆抗体。优选地,胶体金的粒径为约 20 纳米至约 80 纳米。

[0015] 在另一个实施方案中,试纸条还包括位于膜上检测区下游的对照区。对照区优选地包括能够结合偶联物的对照结合剂。例如,如果目标分析物是抗体且偶联物包括抗体结合剂如蛋白 A,则对照结合剂可以是兔 IgG。如果目标分析物是抗原且偶联物包括该抗原特异性的单克隆抗体,则对照结合剂可以是例如蛋白 A。

[0016] 试纸条可以包括一种或一种以上的其他组件。缓冲液垫可以与偶联物来源区流体连通,这样向缓冲液垫上施加洗涤缓冲液可以使偶联物从偶联物来源区流出,穿过膜,接触到检测区。吸水带和吸水垫可以位于膜的下游,当缓冲液通过膜时用来吸收过量的缓冲液。干燥剂片也可以靠近膜,用来吸收过量的液体和湿气。

[0017] 试纸条可以任选地放置在外壳例如塑料外壳中。外壳优选地包括位于检测区和对照区上方的样品窗口,和位于检测区上游的缓冲液窗口。

[0018] 还提供了检测液体样品中的分析物的方法,包括将样品加到膜的检测区,然后使检测区接触一种偶联物,该偶联物能够结合目标分析物并产生指示结合的可见信号。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 显示根据本发明一个方面的检测卡。

[0021] 图 2 显示根据本发明一个方面的检测卡的顶视图。

[0022] 图 3 显示根据本发明一个方面的检测卡的侧视图。

[0023] 图 4 显示包括根据一个实施方案的试纸条的组件的剖视图。

[0024] 图 5 显示具有阳性结果的检测卡,表明在样品中检测到目标分析物。

[0025] 图 6 显示具有阴性结果的检测卡,表明在样品中未检测到目标分析物。

[0026] 图 7 显示根据本发明另一方面的带有样品杯的试纸条。

[0027] 优选实施方案详述

[0028] 提供了用于快速检测样品中是否含有分析物的诊断装置和方法。根据对用于检测样品中抗体或抗原的免疫诊断装置的概述,本领域技术人员会认识到本发明可以毫不困难地被变通以检测所有目标分析物。

[0029] 过去,免疫诊断装置一般包括预混合偶联物与将要分析是否含有抗体的样品。例如,在一些装置中,加入液体样品溶解干燥的偶联物,以便预混合样品与偶联物。如果含有要检测的抗体,则该抗体与偶联物结合,并且在包括固定抗原的下游检测区显示。但是在该系统中,偶联物与样品中其他抗体或其他化合物的非特异性相互作用导致偶联物信号淬灭。因此需要大量的偶联物。由于使用大量的偶联物,需要较长时间来清除反应,从而延长了获得试验结果所需的时间。另外,该试验的灵敏度使得为了产生可见的阳性信号,在检测区需要大量的抗原。

[0030] 本发明通过使检测区直接接触样品,从而使所有目标分析物都能够特异性结合固定的结合剂,克服了现有技术中存在的问题。例如,目标抗体能够结合固定的抗原。然后将偶联物与缓冲液加至检测区。缓冲液的溶剂前沿将未结合的化合物推出检测区,从而减少了与偶联物的非特异性相互作用。因此需要的偶联物的量大大减少,反应速度从而提高。另外,反应灵敏度也得以提高,从而允许检测区使用较少的抗原。

[0031] 例如,所述的装置和方法可以用来诊断患者的疾病与不适,例如人类免疫缺陷病

毒 (HIV) 或肝炎病毒。也可以用来确定个体是否怀孕。根据下文的内容, 其他用途对于本领域技术人员而言也是显而易见的。

[0032] 定义

[0033] 除非另外定义, 这里的所有科技术语都具有与本发明所属领域的技术人员通常所知的相同的含意。本发明的实行中可以使用与本文所述相似或相当的所有方法、装置和材料。

[0034] “目标分析物”是指将要检测它在样品中是否存在的任何分子或化合物。分析物可以包括但不限于: 病毒抗原, 细菌抗原, 激素如胰岛素、卵泡刺激素 (FSH)、促甲状腺素、松弛素、生长素和促性腺激素, 酶, 免疫球蛋白, 细胞因子, 药物, 癌抗原, 抗原性多糖, 和核酸。可以用提供的方法和装置在样品中检测的其他分析物对于本领域技术人员而言是显而易见的。特别优选的目标分析物包括抗-HIV 抗体、抗-HCV 抗体和人绒毛膜促性腺激素 (hCG)。

[0035] 术语“偶联物”是指设计用来结合目标分析物并产生可检测信号的组合物。偶联物一般包括与标记物偶联的结合成分。该结合成分使偶联物能够结合目标分析物, 任选地结合对照化合物。标记物产生可检测信号, 优选可见信号。在一个实施方案中, 只在偶联物与分析物结合时才产生可见信号。在一个优选实施方案中, 目标分析物是抗体且偶联物包括能够结合抗体的结合成分。例如, 第一结合成分可以是蛋白 A, 尽管也可以使用其他能够结合抗体的分子。在另一个实施方案中, 目标分析物是抗原且偶联物的结合成分包括能够结合抗原的抗体。抗体优选地是单克隆抗体。

[0036] 标记物是能够与结合成分附着或偶联并且能够产生可检测信号的任何分子或化合物。一种优选的标记物是胶体金。或者, 标记物还可以是例如染色的乳胶颗粒、胶体银或其他胶体金属、胶体黑或本领域公知的其他成分。优选地, 标记物的粒径不会干扰结合成分结合目标分析物的能力。例如, 当结合成分为蛋白 A 时, 标记物的粒径优选为约 5 纳米至约 120 纳米, 更优选约 20 纳米至约 80 纳米。

[0037] 偶联物优选地在可以稳定并保存该偶联物的“偶联缓冲液”中制备。在一个实施方案中, 如下文详细描述, 在偶联缓冲液中制备偶联物后, 偶联物可以在“偶联物垫”上干燥。在基底上干燥的偶联物被认为是“可扩散结合的”。如果能够引起扩散或流动, 例如将其与缓冲液接触, 则偶联物是“可扩散结合的”。例如, 通过干燥而可扩散结合到偶联物来源区上的偶联物可以用缓冲液溶解, 从而使其沿试纸条的膜流动。

[0038] “对照偶联物”是这样一种偶联物, 其中结合成分对于对照化合物是特异性的。当可能所有偶联物都与检测线上的分析物结合而无法用作对照时, 优选使用对照偶联物。对照化合物一般是所分析的样品中已知的, 并且能够结合对照带上的对照结合剂。任选地, 对照偶联物的结合成分对于检测膜的对照区中存在的化合物可能是特异性的。

[0039] 偶联物优选地存在于“偶联物来源区”中。偶联物来源区一般包括与之可扩散结合的偶联物, 如干燥的偶联物。或者, 偶联物来源区可能包括悬浮于缓冲液如洗涤缓冲液或偶联物缓冲液中的偶联物。在一个实施方案中, 偶联物来源区是偶联物垫, 包括干燥的偶联物, 与检测膜流体连通。在另外一个实施方案中, 偶联物来源区是检测膜的一部分, 偶联物在其上干燥。在另外一个实施方案中, 偶联物来源区是缓冲液垫, 可以向上面施加包含偶联物的缓冲液, 它与检测膜流体连通。偶联物来源区一般位于检测膜的检测区的上游, 从而在加入包含偶联物的溶液后或在可扩散结合的偶联物溶解后, 偶联物流动穿过检测膜, 与检

测区接触。

[0040] 偶联物优选地用如下文详细描述的“洗涤缓冲液”溶解。简单的说，洗涤缓冲液是优选含有“封闭剂”的缓冲溶液。封闭剂为本领域所公知，包括减少非特异性相互作用如非特异性抗体结合的任何分子或化合物。优选的封闭剂是蛋白质，如酪蛋白和牛血清白蛋白(BSA)。可用的其他封闭剂可以购到，本领域技术人员应当知道。

[0041] “样品缓冲液”是优选不含偶联物的缓冲溶液。在一些实施方案中，样品缓冲液含有封闭剂，而在另外一些实施方案中，它不含封闭剂。任选地可以在加样之前将样品缓冲液施加到膜上，如下文详细描述的。

[0042] “检测膜”是一种固体支持物，包括检测区，和任选的对照区。待分析的样品一般直接施加到检测膜上，使其接触检测区和对照区。检测膜可以是任何固体支持物，分析物结合剂和对照结合剂可以附着在上面。检测膜优选的是硝酸纤维素。

[0043] 检测膜为液体提供侧流通道。如果液体如液体样品或缓冲液能够从一个组件流向另一个组件，则称检测膜和试纸条的其他组件是“流体连通的”。如果试纸条的组件彼此接触，则它们是流体连通的。但是，本领域技术人员应当知道，流体连通不需要两个特定组件直接接触。

[0044] “检测区”、“检测带”和“检测线”可以交换使用，都是指检测膜上分析物结合剂所附着的区域。

[0045] “分析物结合剂”、“特异性结合配体”或“结合成分”是设计用来特异性结合目标分析物的任何分子或化合物。例如，但并非限于，分析物结合剂可以包括抗原、抗体、受体、其他多肽、肽、半抗原、凝集素、核酸包括寡核苷酸或小分子。在一个实施方案中，分析物结合剂是一种抗原，它对于样品中的待测抗体是特异性的。在另外一个实施方案中，分析物结合化合物是目标抗原特异性的抗体。

[0046] “对照区”、“对照带”和“对照线”可以交换使用，都是指膜上对照结合剂所附着的区域。

[0047] “对照结合剂”是能够特异性结合偶联物或对照偶联物的任何分子或化合物。

[0048] “试纸条”是指能够用来检测样品中是否含有分析物的完整装置。试纸条优选地至少包括具有检测区和对照区的检测膜。如下文所述，试纸条可以放置在外壳如塑料外壳中。或者，试纸条也可以没有外壳。如果放置在外壳中，试纸条和外壳一起可以被称为“检测卡”。

[0049] “检测卡窗口”和“样品窗口”是指检测卡外壳上的孔，通过它可以加样。检测卡窗口优选地位于检测区和对照区的上方。检测卡窗口也优选允许观察试验结果。

[0050] “缓冲液窗口”是指检测卡外壳上的孔，通过它可以施加缓冲液。在一个实施方案中，缓冲液窗口的位置优选地允许将缓冲液施加到缓冲液垫上。在另外一个实施方案中，缓冲液窗口的位置允许将缓冲液直接施加到检测膜上。

[0051] “体积指示剂窗口”是指检测卡外壳上的孔，通过它可以看到可见的样品体积指示剂。体积指示剂窗口位于样品窗口下游。样品体积指示剂发出信号指示已经有可接受的样品体积接触到检测区。样品体积指示剂可以是例如亚甲基蓝或其他有色化合物，施加至紧邻体积指示剂窗口上游的膜上。样品体积指示剂由于样品的移动而被携带穿过体积指示剂窗口，在窗口内产生可见信号。在其他实施方案中，样品体积指示剂是在接触样品时改变颜

色的化合物,例如 pH 指示剂。当需要大样品种体积时,例如当认为在样品中含有低浓度的目标分析物时,一般使用样品种体积指示剂。例如,在分析尿中是否含有 hCG 时,优选使用样品种体积指示剂。

[0052] “样品”是指将要分析其是否含有目标分析物的任何材料。样品优选为液体形式。代表性的样品包括但不限于体液例如全血、血浆、血清、唾液和尿。如下文更详细描述的,样品可以是固体。但是在此情况下,样品在用于试验前优选地溶解或提取。

[0053] “加样区”是膜上施加样品的位置。加样区优选地位于偶联物来源区的下游和检测区的上游。加样区更优选地包括检测区。样品可以直接施加到加样区,例如通过移液管,或者间接施加,例如通过与膜接触的引流条 (wick)。

[0054] 使用的术语“抗体”为其最宽的含意,包括例如但不限于完整抗体及单链抗体、抗体片段和嵌合抗体,只要它们保留需要的结合特异性。

#### [0055] 检测卡

[0056] 本文公开的诊断装置优选包括检测卡 1,如图 1-3 所示。图 1 示出了检测卡 1,包括塑料外壳 10,塑料外壳 10 具有扣合在一起的上部 15 和下部 18。塑料外壳 10 的上部 15 上有两个开口:样品窗口 20 和缓冲液窗口 30。样品窗口 20 允许将样品施加到容纳于塑料外壳 10 内的膜的加样区。加样区优选包括检测区 140。对照区 150 优选位于膜上检测区 140 的下游。缓冲液窗口 30 允许将缓冲液施加到偶联物来源区 50。膜是下文详述的试纸条的一部分。

[0057] 在一些实施方案中,进一步任选的体积指示剂窗口 (未示出) 位于检测区下游。如果有体积指示剂窗口,则它允许使用者观察检测区下游的膜上的指示剂,例如颜色改变。指示剂发出信号指示已经有足够体积的样品接触到检测区,使用者可以继续将检测区与偶联物接触,从而如下文所述检测结合的分析物,例如通过将缓冲液施加到偶联物来源区。

[0058] 图 2 示出了检测卡 1 的顶视图,显示了塑料外壳 10 上的样品窗口 20 和缓冲液窗口 30。膜检测区 140 通过样品窗口 20 可以达到,偶联物来源区 50 通过缓冲液窗口 30 可以达到。对照区 150 位于检测区 140 下游。尽管示出的样品窗口 40 是矩形的而示出的缓冲液窗口 30 是圆形的,但是窗口可以是任何形状或大小的。但是,它们的形状和大小优选地能够引导样品至膜的加样区 40,引导缓冲液至偶联物来源区 50。另外,样品窗口的结构被设计允许在获得阳性结果时观察检测区 140,以及对照区 150。

[0059] 图 3 示出了一个示例性检测卡 1 的侧视图。示出了塑料外壳 10 的上部 15 和下部 18。塑料外壳 10 的上部 15 的膨胀端 (60) 位于缓冲液窗口 (未示出) 的远端,允许在检测卡 (1) 内放置吸水材料,例如吸水垫或干燥剂片。膨胀端 (60) 的大小取决于所用吸水材料的量,从而取决于试验中使用的样品和缓冲液的体积。

#### [0060] 试纸条

[0061] 试纸条包括具有至少一个检测区的检测膜。目标分析物特异性的分析物结合剂结合或者固定到检测区。如果样品中含有目标分析物,则在试验结束时至少一部分检测区可见。在一个特定实施方案中,检测区包括固定的抗原,该试验允许检测样品如生物流体中的特定抗体。在另外一个实施方案中,检测区包括结合的抗体,该试验允许检测样品中的特定抗原。

[0062] 将样品施加到位于偶联物来源区下游例如偶联物垫下游的加样区。在优选实施方

案中,加样区包括检测区。但是在其他实施方案中,加样区位于检测区上游,样品从加样区向检测区流动。

[0063] 图4示出了试纸条的一个优选实施方案。用于检测样品是否含有目标分析物如抗体的试纸条100优选包括与偶联物垫120相接触的缓冲液垫110。偶联物垫120又接触包括检测区140和对照区150的检测膜130。膜130又接触吸水垫160。吸水垫160任选地接触另一吸水纸170。吸水垫160和/或任选的吸水纸170可能进一步接触任选的干燥剂180,如干燥剂片。

[0064] 在一些实施方案中,一个可移除的滤器架190与试纸条100连接。滤器架190包括滤纸200。当滤器架190与试纸条100连接时,滤纸200直接位于优选包括检测区140和对照区150的加样区上方。

[0065] 必须向检测区提供足够的样品,以确保如果样品中含有分析物则在试验结束时可见阳性结果。因此,对于怀疑在样品中低浓度存在的分析物,例如抗原如尿中的hCG,需要较大的样品体积。试纸条100可以设置为接收较大的样品体积。图7示出了一个这样的实施方案,其中样品杯500与试纸条100连接。样品杯500包括一个用于容纳一定体积液体样品的容器。样品杯一般在底部有一个开口,允许样品流出样品杯500并接触检测膜130。因此,样品杯500的位置使得样品从样品杯500向检测膜130的加样区流动,并接触检测区140和对照区150。加样区优选包括检测区140和对照区150,样品杯500直接位于检测区140和对照区150的上方。样品杯500任选地可包括滤器,样品在接触检测膜之前通过该滤器。

[0066] 当样品杯与检测卡连接时,样品可能沉积在样品杯中。在另外一个实施方案中,将样品置于检测杯中,检测杯然后与检测卡连接,从而使样品流到加样区。

[0067] 希望确保在偶联物流到检测区140之前,含有可检测量分析物(如果含有的话)的一定体积的样品接触检测区140。样品体积指示剂,例如指示染料,位于检测区140和对照区150下游,可以用来确定已有足量的样品接触检测区140和对照区150。例如,可以将指示染料如亚甲基蓝施加到检测膜下游的吸水垫160或吸水纸170上。液体样品沿吸水垫160或吸水纸170流动使染料流动,产生可见信号,例如可见的蓝色。该信号可以通过检测卡窗口中的体积指示窗口(未示出)观察。

[0068] 在一些实施方案中,特别是在施加大样品体积(大于约50 $\mu$ l)的实施方案中,偶联物垫120不与检测膜130流体连通。图7示出了一个这样的实施方案。偶联物垫120与检测膜130的分离防止了在样品接触检测区140之前偶联物与样品混合。在样品接触检测区140和对照区150之后,偶联物垫120移至与检测膜130流体连通。然后向缓冲液垫110上施加缓冲液,开始试验。缓冲液可以通过缓冲液窗口直接施加到缓冲液垫110上,或者通过折断容纳缓冲液的安瓿300施加,从而使缓冲液流到缓冲液垫110上。在一个实施方案中,在移动偶联物垫120与膜130流体连通之前将缓冲液施加到缓冲液垫110上。在可供选择的实施方案中,缓冲液直接施加到偶联物垫120上。

[0069] 使偶联物垫120移至与膜130流体连通的方法没有任何限制。在一个实施方案中,使用者滑动与偶联物垫120和任选的缓冲液垫110相连接的外壳可移动部分,从而使偶联物垫120接触膜130。移动偶联物垫120使之与检测膜110流体连通的机构优选地也可以折断缓冲液安瓿300。该机构还可以从试纸条110上取下样品杯500。

[0070] 干燥剂片 180 优选地与吸水纸 170 流体连通。选择干燥剂片 180 的大小,使其能够吸收施加到检测膜 130 上的全部体积的样品。干燥剂片和任何其他吸水材料位于加样区下游,促进样品穿过检测区流动。

[0071] 在其他实施方案中,用接触液体样品的引流条代替样品杯。样品沿引流条向检测膜的加样区流动,并接触检测区和对照区。在一个特定实施方案中,将引流条置于尿流中,以分析尿中是否含有分析物,例如 hCG。在这些实施方案中,在样品加至引流条期间中,偶联物垫优选地不与检测膜流体连通。在足够的样品接触检测区后,偶联物垫移至接触检测膜。移动偶联物垫的机构还可以用来移除引流条。随后将缓冲液加到缓冲液垫上,或者直接加到偶联物垫上,开始试验。如上所述,缓冲液可以通过缓冲液窗口直接加到缓冲液垫上。或者,缓冲液可以容纳在检测卡内的安瓿中,通过折断或以其他方式打开安瓿使缓冲液向缓冲液垫和 / 或偶联物垫流动。

[0072] 试纸条优选地容纳在外壳内,如图 2 所示并如上所述。

[0073] 图 5 显示阳性试验结果,表明样品中含有目标分析物。通过样品窗口 20 可见膜 130 的检测区 140 为一条线。另外,通过样品窗口 20 可见对照区 150 为一条线,表明偶联物从偶联物来源区 50 流出穿过检测区 140。相反,图 6 显示阴性结果。阴性结果是,通过样品窗口 20 只可见对照区 150 为一条线。而且,对照表明偶联物从偶联物来源区 50 流出穿过检测区 140。因此,检测区 140 没有线是不含结合的目标分析物的结果。

#### [0074] 试纸条的使用

[0075] 将要检测其是否含有特定目标分析物的样品加到检测膜的加样区上,使它接触检测区。在优选实施方案中,在偶联物接触检测区之前将样品施加至膜上,使之接触检测区。因此,如果样品中含有目标分析物,则目标分析物有机会在偶联物结合之前结合检测区中的分析物结合剂。

[0076] 如果试纸条在外壳内,优选地通过样品窗口加样。在此情况下,膜包括通过样品窗口可及的加样区。优选地加样区包括至少一个阳性检测区。更优选地,加样区包括检测区和对照区。或者,可以通过引流条或样品杯加样,使得样品向膜的加样区流动并接触检测区和对照区。

[0077] 如果试纸条不在外壳内,可以将样品直接施加到优选包括检测区和对照区的膜的加样区。或者,可以将样品加到膜上位于检测区上游的加样区,使之流动穿过膜,接触检测区。但是优选地在将偶联物加到膜上之前使样品接触检测区。

[0078] 在一个实施方案中,收集样品或将样品置于样品杯中。样品杯与外壳连接,允许样品向膜的加样区流动并接触检测区和对照区。如果样品体积大于约  $10 \mu l$ ,优选使用样品杯。样品杯可以任选地包括滤器,样品通过滤器之后接触膜。

[0079] 在另外一个实施方案中,将样品加到与膜接触的引流条上。引流条可使样品向膜的加样区流动并接触检测区和对照区。引流条优选地由玻璃纸、聚酯,纤维素或可使样品向包括检测区的膜上迁移的其他材料组成。如果检测卡在外壳内,则引流条可能从外壳突出,从而允许接近引流条以便加样。例如,如果要检测尿中是否含有特定分析物,例如 hCG,可以把引流条放置在受检者的尿流中。在另外一个实施方案中,引流条可以接触待分析的样品,例如体液,如唾液。

[0080] 优选地将待测样品以液体形式加到膜的加样区。可以分析的代表性样品包括但不

限于血清、血浆、全血、唾液和尿。固体或半固体样品在加样前可以增溶然后加到膜上或者提取。

[0081] 在其他实施方案中,在加样之前向膜上施加优选不含偶联物的样品缓冲液。在一些实施方案中,样品缓冲液含有封闭剂。优选地将样品缓冲液加到膜上的加样区。优选向膜上施加约  $1 \mu l$  至约  $25 \mu l$  的样品缓冲液,更优选约  $1 \mu l$  至约  $10 \mu l$ ,更优选约  $1 \mu l$  至约  $5 \mu l$ 。在一个特别的实施方案中,向膜的加样区施加  $5 \mu l$  样品缓冲液,然后加  $5 \mu l$  血清、血浆、全血或其他液体样品。如下文所述在 HCV 检测中,以及在使用粘性样品时,在施加洗涤缓冲液之前施加样品缓冲液是特别优选的。样品缓冲液的使用提高了试验的灵敏度,并且使粘性样品可以更快地流动。

[0082] 样品缓冲液优选含有缓冲剂和防腐剂。任选地,也可含有一种或多种去污剂和/或糖。可以使用任何缓冲剂,优选地以保持样品缓冲液的期望 pH 的量使用。样品缓冲液的 pH 优选为约 7.2 至约 7.6。例如,但并非限制,缓冲液可以选自 HEPES、Tris 和磷酸缓冲液。在一个优选实施方案中,样品缓冲液含有约 0.01% 至约 0.5% HEPES,更优选约 0.02% 至约 0.05% HEPES。在另外一个实施方案中,样品缓冲液含有约 0.01% 至约 0.5% 磷酸盐,更优选约 0.02% 至约 0.05% 磷酸盐。本领域技术人员能够调节缓冲剂的量以保持需要的 pH。

[0083] 样品缓冲液优选地还含有防腐剂,如叠氮钠或 Proclin。在一个优选实施方案中,样品缓冲液含有约 0.1% 至约 1.0% 叠氮钠,更优选约 0.1% 至约 0.2%,更优选约 0.2%。

[0084] 根据待测样品的性质,任选地将样品通过滤器加到膜上。优选过滤的代表性样品材料包括全血、粪便样品、尿、食物提取物和污物提取物。在一个实施方案中,全血通过滤膜加样。滤膜除去污染物而使分析物如抗体通过,从而提高了试验灵敏度。滤膜优选地容纳在必要时能够与检测卡或试纸条连接的容器中。如果与检测卡连接,滤膜优选地直接连接到样品窗口上方。过滤介质根据所要过滤的样品的类型来选择。本领域技术人员能够进行这种选择。例如对于全血样品,过滤材料可以是但不限于 Pall BTS-SP300<sup>TM</sup>。

[0085] 如上所述,滤器优选地通过一个可移除的滤器架与试纸条连接,但是对于特定用途,滤器可以永久固定。滤器架一般是扣合在检测卡外壳上的装置。该装置的设计和类型可能不同,但是一般是由聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或其他塑料制成的。

[0086] 检测区是膜的一部分,包被了能够特异性结合目标分析物的结合剂,优选蛋白质。例如,阳性检测区可以包被目标抗体特异性的抗原。在特定实施方案中,检测区包括结合的 HIV 抗原或肝炎抗原,如以下的实施例所详述。当检测区包括抗原时,优选使用约  $0.025 \mu g$  至约  $0.4 \mu g$  抗原。

[0087] 在其他实施方案中,在检测区固定目标抗原特异性的抗体。该抗体可以是多克隆或单克隆抗体。当检测区包括抗体时,优选施加约  $0.1 \mu g$  至约  $20 \mu g$  抗体,更优选约  $0.2 \mu g$  至约  $2 \mu g$ ,更优选约  $0.5 \mu g$  至约  $1 \mu g$ 。在一个特定实施方案中,检测区包括抗 hCG 抗体,优选抗 hCG 单克隆抗体。

[0088] 结合剂可以以任何希望的模式施加到膜上;因此可见的阳性试验结果可能是任何形状。在一个优选实施方案中,检测区是线形的,形成一条从膜的一侧向另一侧延长的线,从而在获得阳性结果时出现穿过样品窗口的一条垂直线,表明样品中含有分析物。在其他实施方案中,检测区的形状类似于一个符号,例如“+”。

[0089] 用一个试纸条能够检测一种以上的分析物。在这种情况下,在检测膜上制备另外

的阳性检测区。例如,第二个阳性检测区可以包括针对第二类抗体的抗原或针对第二类抗原的抗体。在另外的阳性检测区上的结合剂不一定与第一检测区上的结合剂具有相同的类型。因此,第一检测区上的结合剂可以是抗体,而第二检测区上的结合剂可以是抗原。这样可以分析样品中是否含有一种以上的分析物。

[0090] 每一个另外的阳性检测区都可能与第一检测区有不同的形状,从而使使用者能够容易地辨别阳性结果的性质。根据所要检测的其他分析物的类型,能够结合不同分析物的其他偶联物可能是必需的。例如,如果目标分析物是两种不同的抗体,可以使用单一的一种含有蛋白A的偶联物。但是,如果一种分析物是抗体而第二种分析物是抗原,则需要两种不同的偶联物,一种特异性结合该抗体,而另一种特异性结合该抗原。

[0091] 对照区优选地包括能够结合偶联物的对照结合剂。通过使对照区位于阳性检测区的下游,对照区上的反应表明偶联物迁移穿过检测区,如果含有目标分析物则可以在该检测区反应。如果偶联物设计用来识别抗体,则对照区优选地包括免疫球蛋白,例如兔 IgG。如果偶联物包括抗体,则对照区优选地包括抗体结合剂如蛋白A。对照区可以是任何需要的形状,如线形或符号,例如“-”。

[0092] 在其他实施方案中,对照区包括能够结合对照偶联物的对照结合剂。例如,对照区可包括  $\beta$ -gal,对照偶联物可包括与金偶联的  $\beta$ -半乳糖苷酶。

[0093] 结合剂和对照结合剂可以用本领域公知的任何方法加到检测膜上。施加方法一般是通过使检测膜接触结合剂,例如使用泵分配系统喷射或接触到检测膜上。这些系统可以购自例如 Kinematic Automation。

[0094] 当样品接触检测区时,如果样品中含有目标分析物,则目标分析物结合检测区上的结合剂。如下文所述,缓冲液沿膜迁移从检测区上洗去过量的未结合的分析物。

[0095] 向膜上加样后,向检测膜上施加洗涤缓冲液。优选地开始时施加约1滴至约20滴,更优选约1-5滴洗涤缓冲液。如果必须清除反应,则随后再施加洗涤缓冲液。

[0096] 洗涤缓冲液优选地将偶联物带至检测区。洗涤缓冲液可以直接施加到检测膜上。但是在优选实施方案中,洗涤缓冲液施加到上游的缓冲液垫上,它从该缓冲液垫流向检测膜。缓冲液垫可以由能够容纳缓冲液并且允许它以需要的速度向膜流动的任何材料制成。例如,缓冲液垫可以由选自玻璃纸、纤维素和聚酯的一种或多种材料制成。在一个优选实施方案中,缓冲液垫是 Whatman GF/DVA 玻璃纸。本领域技术人员能够根据诸如侧流试纸条的外壳设计、需要的流速及缓冲液垫所容纳的缓冲液量等因素,为缓冲液垫选择适当的材料。

[0097] 洗涤缓冲液可以直接施加到缓冲液垫上,例如使用移液器或滴管。但是在另外一个实施方案中,适量的洗涤缓冲液容纳在邻近缓冲液垫的容器中。例如,洗涤缓冲液可以容纳在玻璃或塑料安瓿中。在施加待测样品后,打破或者以其他方式打开容纳洗涤缓冲液的容器,使洗涤缓冲液接触缓冲液垫。

[0098] 为了提高试验灵敏度,洗涤缓冲液的组成可能不同。优选地,洗涤缓冲液含有缓冲剂、防腐剂、去污剂、糖和用来减少背景和 / 或非特异性结合的其他材料。

[0099] 可以使用能够保持需要的缓冲液 pH 的任何缓冲剂,优选约 7.2 至约 7.6。例如,但并非限制,缓冲液可以选自 HEPES、Tris 和磷酸缓冲液。在一个优选实施方案中,洗涤缓冲液含有约 0.01% 至约 0.5% HEPES,更优选约 0.02% 至约 0.2% HEPES,更优选约 0.02% 至约 0.05% HEPES。在一个特别优选的实施方案中,洗涤缓冲液含有 0.025% 的 HEPES。

[0100] 洗涤缓冲液还可含有防腐剂,例如叠氮钠或 Proclin。在一个优选实施方案中,洗涤缓冲液含有约 0.1%至约 0.5%叠氮钠,更优选约 0.1%至约 0.2%叠氮钠。

[0101] 优选含有浓度为约 1%、更优选约 0.85%的氯化钠或相当的盐。可能含有 EDTA, 优选浓度为约 0.1%。也可以含有糖,例如甘露醇。优选的甘露醇浓度为约 1%至约 5%。在一个优选实施方案中,甘露醇浓度为约 1%。

[0102] 洗涤缓冲液优选地还含有封闭剂。封闭剂可以是本领域公知的任何封闭剂。封闭剂优选的是蛋白质,如酪蛋白或牛血清白蛋白 (BSA)。洗涤缓冲液中优选含有浓度约 0.01%至约 0.5%,更优选约 0.02%至约 0.2%的封闭剂。在一个特别优选的实施方案中,洗涤缓冲液中含有浓度为约 0.1%的酪蛋白。

[0103] 洗涤缓冲液一般还含有去污剂,优选非离子型去污剂,如 TritonX100<sup>TM</sup> 或 Tween。优选含有浓度约 0.05%至约 1%,更优选约 0.1%至约 0.5%的去污剂。在一个特别优选的实施方案中,洗涤缓冲液含有浓度约 0.1%的 Triton X100。

[0104] 将洗涤缓冲液的 pH 调节为约 7-8,更优选约 7.2-7.6。在一个特别优选的实施方案中,洗涤缓冲液的 pH 约为 7.2。

[0105] 试纸条也包括偶联物来源区。在一个优选实施方案中,如下文所述,试纸条包括偶联物垫,偶联物在其上干燥。洗涤缓冲液从缓冲液垫流向偶联物垫,并与之接触。偶联物垫因而又接触检测膜。但是在一些实施方案中,偶联物垫在加样后与膜接触。特别是,当使用大样品体积时,优选地在样品接触检测区后,偶联物垫与膜接触。

[0106] 将足够的洗涤缓冲液加到缓冲液垫上,以溶解与偶联物垫可扩散结合的偶联物,并使偶联物沿检测膜向检测线和对照线流动。本领域技术人员可以根据诸如与偶联物垫结合的偶联物量、膜的大小和待分析的样品量等因素确定所要使用的缓冲液量。优选地,当缓冲液垫约为 2cmx5mm 时,向缓冲液垫上施加 1-10 滴缓冲液,更优选 2-5 滴,更优选 3-4 滴。

[0107] 在可供选择的实施方案中没有偶联物垫。在一个可供选择的实施方案中,洗涤缓冲液中含有浓度为约 0.20D/ml 至约 1.00D/ml 的偶联物。可以向缓冲液垫上施加含有偶联物的洗涤缓冲液。偶联物于是与洗涤缓冲液一起从缓冲液垫向膜流动,并接触检测区和对照区。在另外一个实施方案中,直接将含有偶联物的缓冲液垫加到检测膜上。含有偶联物的洗涤缓冲液可以容纳在安瓿中,通过折断或者以其他方式打开安瓿,使它向膜流动。优选地将含有偶联物的洗涤缓冲液加到膜上位于检测区上游的位置。但是在一些实施方案中,在加样后将含有偶联物的洗涤缓冲液直接加到检测区。

[0108] 在另外一个实施方案中,例如通过干燥,偶联物直接可扩散地结合到包括检测区和对照区的膜上。然后可以将洗涤缓冲液加到与膜接触的缓冲液垫上,或者直接加到检测膜上。洗涤缓冲液溶解干燥的偶联物,带着偶联物沿检测膜向检测区和对照区流动。

[0109] 在加样后含有偶联物的洗涤缓冲液优选地接触检测区,样品中所含的所有分析物都有机会结合固定的结合剂。因此,优选地在向检测区加样后将洗涤缓冲液加到试纸条上。

[0110] 制备如上所述的偶联物,用偶联物缓冲液稀释后在试验中使用。优选地用偶联物缓冲液将偶联物稀释为大约 30D/ml 制备工作偶联物。偶联物缓冲液的组成可能依偶联物的性质而不同。示例性偶联物缓冲液包括例如 HEPES、Tris、磷酸盐等缓冲液或本领域公知的其他类似的缓冲液。一种优选的偶联物缓冲液含有约 0.02%至约 0.2% HEPES 缓冲液,更优选约 0.025% HEPES。偶联物缓冲液还可含有盐,优选氯化钠。添加氯化钠使浓度为约

0.1%，更优选约0.85%。偶联物缓冲液中还可含有防腐剂，例如叠氮钠或Proclin，浓度为约0.1%至约0.2%。

[0111] 偶联物缓冲液优选地还含有EDTA(约0.1%)，浓度为约0.02%至约0.2%、更优选约0.15%的酪蛋白，浓度为约0.5%至约3%、更优选约1%的牛血清白蛋白(BSA)，浓度为约1%至约5%、更优选约1%的甘露醇，浓度为约1%至约5%、更优选约1%的蔗糖。缓冲液中可以含有Triton X100，浓度优选为约0.1%至约0.5%、更优选约0.1%。

[0112] 优选地调节偶联物缓冲液的pH为约7.2至约7.6，更优选约7.2。

[0113] 在一个实施方案中，用偶联物缓冲液稀释偶联物制备工作偶联物后，例如通过真空干燥，将工作偶联物在偶联物垫上干燥。优选地将偶联物垫切成适当大小的条，在试纸条中使用。在下面的实施例中，将偶联物垫切成5mm x 5mm的条。

[0114] 偶联物垫优选地由玻璃纤维、玻璃纸、聚酯或纤维素纸制成。这些材料在本领域公知，例如可购自Millipore、S&S和Whatman。在一个优选实施方案中，偶联物垫是可以购到的玻璃纤维偶联物垫GFCP203000(Millipore)。

[0115] 如上所述，洗涤缓冲液溶解干燥的偶联物并使偶联物从偶联物垫沿检测膜向检测区和对照区流动。

[0116] 检测膜可以是能够与蛋白质或其他结合剂共价或非共价结合的任何材料，偶联物能够与洗涤缓冲液一起沿检测膜流动。检测膜优选的是硝酸纤维素膜。本领域技术人员根据需要的灵敏度和检测时间和成本等因素能够选择具有较高或较低流速的其他膜用作检测膜。

[0117] 当偶联物与洗涤缓冲液一起流动穿过膜时，偶联物接触检测区。如果含有目标分析物并且该分析物与检测区上的结合剂结合，则缓冲液中的偶联物与该分析物结合。

[0118] 含有在检测区不结合的偶联物的洗涤缓冲液继续流动，穿过膜到达对照区。偶联物将与对照结合剂结合。洗涤缓冲液也从检测区和对照区带走未结合的样品。

[0119] 含有未结合的偶联物和未结合的样品的洗涤缓冲液然后流向与膜的下游端接触的吸水垫。吸水垫可以由本领域公知的任何吸水材料制成。吸水垫优选的是吸水纸，如S&S900<sup>TM</sup>纸。本领域技术人员可以根据试纸条的最终构造选择本领域公知的其他吸水纸。

[0120] 洗涤缓冲液可以继续流动，通过吸水垫，进入与吸水垫接触的吸水纸。如果必须吸收大量缓冲液，则优选使用吸水纸。

[0121] 也可以向试纸条中加入分子筛干燥剂片。在一个实施方案中，含有未结合的偶联物的缓冲液从吸水纸流到与吸水纸接触的干燥剂片内。干燥剂片容纳吸收的流体并防止回流到试纸条内。

[0122] 干燥剂片也可以使试纸条在使用前保持干燥。一种优选的干燥剂片是可从Sud-Chemie购到的0.395g Tri-Sorb板(产品编号为43-01)。

[0123] 本领域技术人员能够根据试纸条的最终构造，包括所要使用的样品和缓冲液的总量，为吸水垫、吸水纸和干燥剂片选择适当的大小和材料。

[0124] 整个试纸条优选地容纳在外壳如塑料外壳中。如上所述，在一个实施方案中，外壳包括样品窗口，通过样品窗口能够将样品加到包括检测区和对照区的膜上。外壳还可包括缓冲液窗口，通过缓冲液窗口能够将缓冲液加到缓冲液垫或膜上。外壳还可包括体积指示剂窗口，通过体积指示剂窗口能够观察指示有足够样品体积接触检测区的信号。足够的样

品体积是估计含有足够目标分析物的样品体积,如果样品中含有分析物则在试验完成时在检测区产生可见信号。例如,对于检测尿 hCG 的试验,足够的样品体积是大约 200  $\mu$  l 尿。

[0125] 优选地在向试纸条上施加洗涤缓冲液约 1 分钟至约 5 分钟后读取试验结果。在一个实施方案中,施加洗涤缓冲液约 2-4 分钟后,更优选约 3-4 分钟后读取结果。在一个特别优选的实施方案中,施加洗涤缓冲液 1 分钟后读取结果。如图 7 所示,对于阳性结果,检测线 (300) 将可见。可见的对照带 (400) 表示该试验正确地进行。如图 6 所示,如果对照线 (400) 可见但是检测线不可见,则表示为阴性结果。

[0126] 实施例 1 :HIV 检测卡的构建

[0127] 准备用于检测抗人类免疫缺陷病毒抗体的侧流快速目测试验。试纸条的排列基本如图 1 所示。

[0128] 试纸条包括一个两面均为粘性的塑料支座 (6cm x5mm)。该塑料支座的厚度为约 2 密耳至大约 20 密耳。

[0129] 通过用泵分配系统 (Kinematic Automation) 喷射,在硝酸纤维素膜 (Millipore HF09004) 上制备检测线和对照线。检测线包括一条垂直 HIV 抗原线。HIV 抗原是 HIV-1 重组糖蛋白抗原 (GP120 (约 0.15mg/ml) 和 P24 (约 0.1mg/ml)) 和 HIV-2 重组糖蛋白抗原 (GP36 (约 0.5mg/ml)) 的混合物,在含有 5% 海藻糖的 PBS 中制备,浓度为约 0.5mg/ml 至约 1.0mg/ml。向检测区上以垂直线的方式施加总量约 0.1  $\mu$  g 至约 0.5  $\mu$  g 的抗原。

[0130] 制备在检测线上含有单种 HIV-1 或 HIV-2 抗原的其他试纸条。

[0131] 对于所有试纸条,对照区包括一条垂直的对照抗体线。对照抗体是兔 IgG,用含有 5% 海藻糖的 PBS 稀释为 1mg/ml。向对照区上施加总量为在偶联物结合后足以产生可见对照线的对照抗原。

[0132] 对于每条试纸条,将适宜的硝酸纤维素膜切成约 2.5cmx5mm 的大小,并且贴在塑料支座上。

[0133] 使用可从 Sigma 购得的附着于胶体金的蛋白 A 作为该试验的偶联物。该偶联物用偶联物缓冲液稀释至约 30D/ml 的浓度。偶联物缓冲液含有 0.25% HEPES、0.85% 氯化钠、0.1% 叠氮钠、0.1% EDTA、0.1% 酪蛋白、1% 牛血清白蛋白、1% 甘露醇、5% 蔗糖和 0.1% TritonX100。调节缓冲液的 pH 为 7.2。

[0134] 将偶联物加至玻璃纤维偶联物垫 (Millipore GFCP203000) 上,使其干燥并切成 5mmx5mm 的条。将一条贴在最靠近每个试纸条检测区的硝酸纤维素膜的末端。

[0135] 然后将 Whatman GF/DVA 玻璃纸缓冲液垫 (2cmx5mm) 连接到每个试纸条的干燥的偶联物垫上,用作缓冲液垫。

[0136] 由 S&S900 纸制成的吸水垫 (2cmx5mm) 连接到最靠近对照区的硝酸纤维素膜的末端,另一张吸水纸 (2.5cmx5mm ;S&S470) 连接到该吸收垫上。吸水纸又接触 0.395g 干燥剂片 (Tri-Sorb, Sud-Chemie)。

[0137] 将试纸条置于塑料外壳内,制成类似于图 1-6 所示的检测卡。塑料外壳 (10) 包括一个暴露检测区 (140) 和对照区 (150) 的检测窗口 (20),和一个直接位于缓冲液垫上方的缓冲液窗口 (30)。塑料外壳上也作出标记,标出检测线和对照线的位置。

[0138] 检测卡用铝箔 (foil) 单个包装。

[0139] 实施例 2 :HIV 检测

[0140] 采用适当的静脉穿刺法从将要检测 HIV 的患者中获得全血样品,由该样品制备血清或血浆。样品在 2°C 至 8°C 下贮存,在 24 小时内使用,或者在 -20°C 下冻存,在 2 周内使用。冷冻的样品在使用前融化。

[0141] 从铝箔包装中取出 HIV 检测卡,该检测卡如实施例 1 所述,在对照区上包括 HIV-1 和 HIV-2 抗原的混合物。

[0142] 通过检测卡窗口的中心向膜上施加约 5 μL 含有 0.025% HEPES 和 0.2% 叠氮钠的样品缓冲液。

[0143] 含有待测血清或血浆的样品移液管垂直保持在检测卡的检测窗口上,将 5 μL 样品加到窗口中心的膜上。

[0144] 向缓冲液垫上加 4 滴洗涤缓冲液 (0.025% HEPES, 0.85% 氯化钠, 0.1% EDTA, 1% 甘露醇, 0.1% 酪蛋白, 1% TritonX100, pH7.2)。3 分钟后如果反应未被清除,则向缓冲液垫上再加 1 滴缓冲液。

[0145] 第一次添加缓冲液 1 至 5 分钟后读取试验结果。

[0146] 如图 5 所示,阳性结果包括通过样品窗口可见的两条线:检测线 (140) 和对照线 (150)。如果两条线可见,即使是一条线比另一条弱,也是获得了阳性结果。通过样品窗口只有一条对照线可见则表示为阴性结果,如图 6 所示。

[0147] 实施例 3:HCV 检测卡

[0148] 用于诊断丙型肝炎病毒的试纸条如实施例 1 所述制备。但是不同的是,在膜的检测线上喷上包含核心 (0.3mg/ml)、NS3 (0.4mg/ml) 和 NS4 (0.1mg/ml) 的丙型肝炎抗原混合物而不是 HIV 抗原。在检测线上总共施加约 0.4 μg HCV 抗原混合物。在对照线上喷有稀释为 1mg/ml 的兔 IgG。

[0149] 实施例 4:HCV 检测

[0150] 从铝箔包装中取出 HCV 检测卡,该检测卡如实施例 3 所述,在检测区上包括 HCV 抗原。

[0151] 通过检测卡窗口的中心向膜上施加约 5 μL 含有磷酸缓冲液和 0.2% 叠氮钠的样品缓冲液。

[0152] 由全血样品制备血清或血浆。含有待测血清或血浆的样品移液管垂直保持在检测卡的检测窗口上方,将 5 μL 样品加到窗口中心的膜上。

[0153] 向缓冲液垫上加 4 滴洗涤缓冲液 (0.025% 磷酸盐, 0.85% 氯化钠, 0.1% EDTA, 1% 甘露醇, 0.1% 酪蛋白, 1% TritonX100, pH7.2)。3 分钟后如果反应未被清除,则向缓冲液垫上再加 2 滴缓冲液。

[0154] 第一次添加缓冲液 1 至 5 分钟后读取试验结果。

[0155] 如图 5 所示,阳性结果包括通过样品窗口可见的两条线:检测线 (140) 和对照线 (150)。如果两条线可见,即使是一条线比另一条弱,也是获得了阳性结果。通过样品窗口只有一条对照线可见则表示为阴性结果,如图 6 所示。

[0156] 实施例 5:妊娠试验

[0157] 准备侧流快速目测妊娠试验。试纸条的排列基本如图 7 所示。

[0158] 每个试纸条都包括一个两面均为粘性的塑料支座 (6cmx5mm)。塑料支座的厚度为约 2 密耳至约 20 密耳。

[0159] 通过用泵分配系统 (Kinematic Automation) 喷射, 在硝酸纤维素膜 (Millipore HF09004) 上制备检测线和对照线。检测线包括一条垂直的抗人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 抗体, 优选单克隆抗体线。抗 hCG 抗体可以广泛购到, 例如购自 Research Diagnostics Inc. (RDI-CBL74 ;New Jersey, USA) 、Charles River Labs 和其他来源, 或者可以利用标准方法制备。向检测区上以垂直线的方式施加总量约 0.2  $\mu$  g 至约 1  $\mu$  g 的抗体。

[0160] 对照线包括一条垂直的蛋白 A 线。向对照线上施加总量为在偶联物结合后足以产生可见信号的蛋白 A, 一般约为 0.25  $\mu$  g。

[0161] 对于每条试纸条, 将适宜的硝酸纤维素膜切成约 2.5cmx5mm 的大小, 并且贴在塑料支座上。

[0162] 抗 hCG 第二抗体与胶体金连接, 用作试验的偶联物。胶体金 -hCG 抗体偶联物例如可以购自 Research Diagnostics Inc. 。另外也可以用众所周知的方法制备 hCG 抗体偶联物 (参见, 例如, 美国专利 No. 6, 485, 982, 在此引用作为参考)。该偶联物用偶联物缓冲液稀释至约 30D/ml 的浓度。偶联物缓冲液优选含有 0.25% HEPES、0.85% 氯化钠、0.1% 叠氮钠、0.1% EDTA、0.1% 酪蛋白、1% 牛血清白蛋白、1% 甘露醇、5% 蔗糖和 0.1% TritonX100。调节缓冲液的 pH 为 7.2。

[0163] 将偶联物加至玻璃纤维偶联物垫 (Millipore GFCP203000) 上, 将其干燥并切成 5mmx5mm 的条。

[0164] 将 Whatman GF/DVA 玻璃纸缓冲液垫 (2cmx5mm) 连接到每个试纸条的干燥的偶联物垫上, 用作缓冲液垫。

[0165] 由 S&S900 纸制成的吸水垫 (2cmx5mm) 连接到最靠近对照区的硝酸纤维素膜的末端, 另一张吸水纸 (2.5cmx5mm ;S&S470) 连接到该吸收垫上。吸收纸又接触干燥剂片 (例如 Tri-Sorb, Sud-Chemie), 该干燥剂片能够吸收相当一部分样品体积, 从而吸引样品和分析物穿过检测区。

[0166] 亚甲基蓝或另外一种指示剂沉积在位于检测区下游的吸水垫或吸水纸之一上。该体积指示剂的移动是表示已经有足够的样品接触检测区从而可以准确检测的信号。

[0167] 将试纸条置于塑料外壳内制成检测卡。塑料外壳包括一个位于检测区和对照区上方的检测窗口, 以允许观察试验结果。该外壳也包括一个体积指示剂窗口, 通过该窗口能够观察体积指示剂的移动。

[0168] 在有些检测卡中, 样品杯连接到检测窗口上方。样品杯包括一个容纳样品的容器, 它具有一个出口, 可使样品通过样品窗口流向检测膜的加样区。样品杯也可以在出口中包括滤器。向膜上加样之后, 取下样品杯, 从而能够观察到试验结果。

[0169] 在其他检测卡中, 有一个引流条从外壳的端部或侧部突出。该引流条提供一条通道, 样品能够沿着该通道流向加样区和检测区。

[0170] 外壳还具有一个机构, 该机构可将偶联物垫移动至与膜流体连通。

[0171] 在一些检测卡中, 外壳中在偶联物垫的上游还有一个含有洗涤缓冲液的安瓿。在其他检测卡中, 通过缓冲液窗口将缓冲液加至缓冲液垫上。

[0172] 击发该机构使偶联物垫移动接触检测膜, 折断了安瓿, 使缓冲液流到偶联物垫上。优选地约有 5 滴洗涤缓冲液接触偶联物垫。该机构的击发也从外壳上移除样品杯或引流条。

- [0173] 塑料支座上做出标记,标出样品窗口中检测线和对照线的位置。
- [0174] 实施例 6:带有样品杯的妊娠试验的应用
- [0175] 如实施例 5 所述准备带有样品杯的侧流快速目测妊娠试验。
- [0176] 收集受试者的尿液,向样品杯中加入约  $500 \mu\text{l}$ ,该样品杯与检测卡在样品窗口上连接。当在体积指示剂窗口中看到蓝色时,机构被击发,使偶联物垫与膜流体连通。这折断了含有缓冲液的安瓿并启动试验。取下样品杯,1 至 5 分钟后从样品窗口肉眼观察试验结果。
- [0177] 如图 5 所示,阳性结果包括通过样品窗口可见的两条线:检测线(140)和对照线(150)。如果两条线可见,即使是一条线比另一条弱,也是获得了阳性结果。通过样品窗口只有一条对照线 150 可见则表示为阴性结果,如图 6 所示。
- [0178] 实施例 6:带有引流条的妊娠试验的应用
- [0179] 如实施例 5 所述准备带有引流条的侧流快速目测妊娠试验。
- [0180] 受试者将引流条放置在他的尿流中。在体积指示窗口观察到蓝色表明已经有足够的样品体积接触到测试区。
- [0181] 外壳上的机构被击发,使偶联物垫与膜流体连通。这也折断了外壳内含有缓冲液的安瓿,并且通过使缓冲液流动到偶联物垫上,启动试验。移除引流条,1 至 5 分钟后从样品窗口肉眼观察试验结果。
- [0182] 如图 5 所示,阳性结果包括通过样品窗口可见的两条线:检测线(140)和对照线(150)。如果两条线可见,即使是一条线比另一条弱,也是获得了阳性结果。通过样品窗口只有一条对照线可见则表示为阴性结果,如图 6 所示。
- [0183] 已经结合某些优选实施方案描述了本发明,本领域技术人员应当理解,在不超出本发明范围的情况下,可以进行各种变化,并且可以将它的要素替换为其他相当的要素。另外,在不超出本发明基本范围的情况下,也可以进行许多改变以使本文的教导适应于特定的情况。因此,本发明不仅限于公开的所有具体实施方案,而是本发明包括落入权利要求书范围内的所有实施方案。

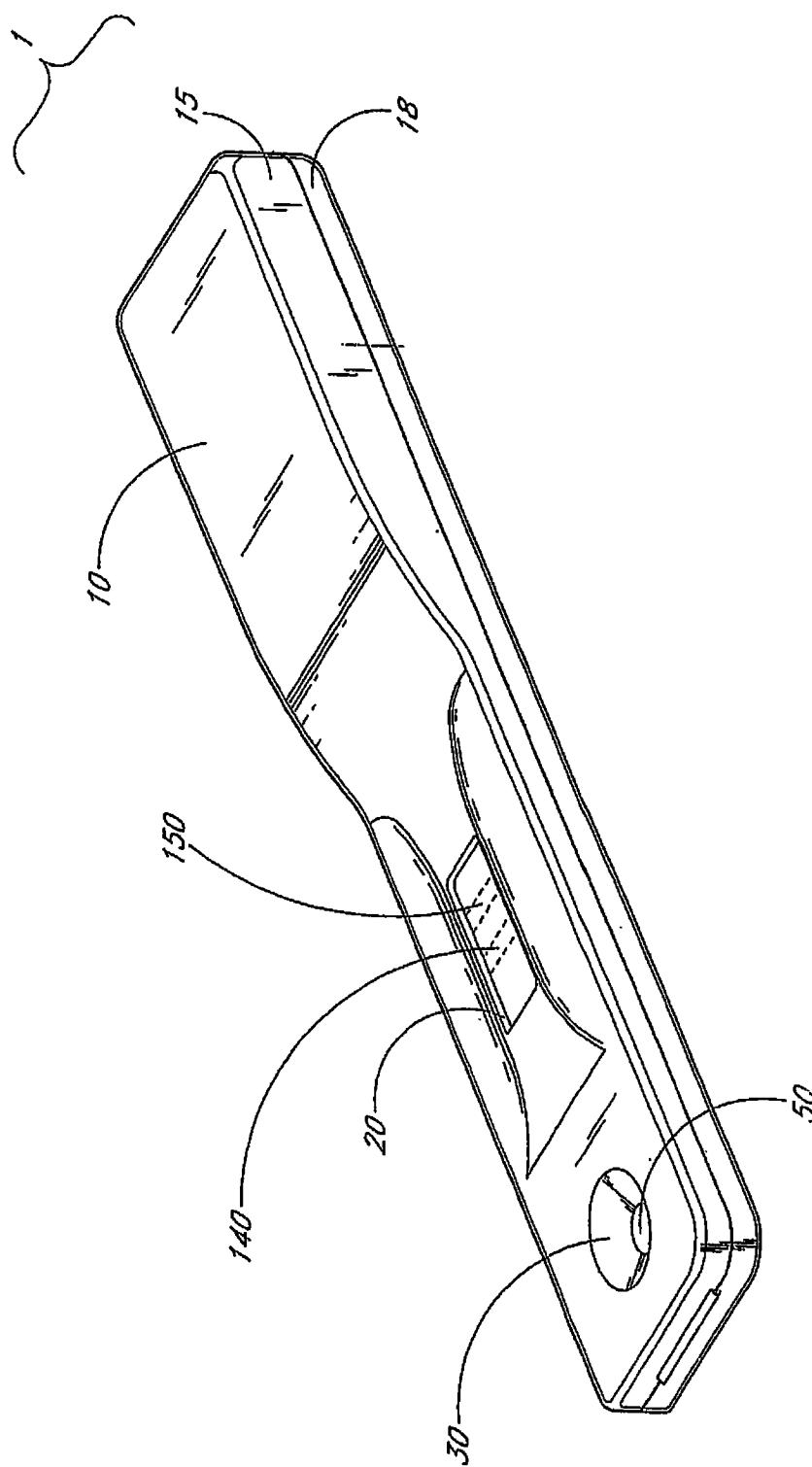


图 1

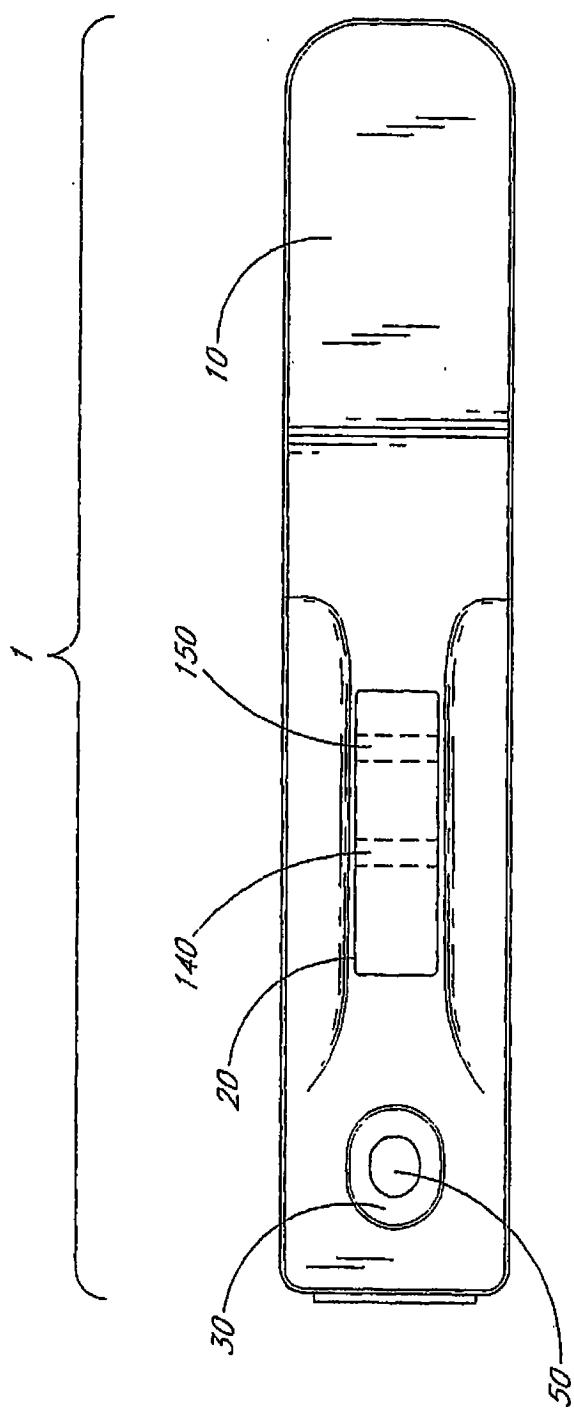


图 2

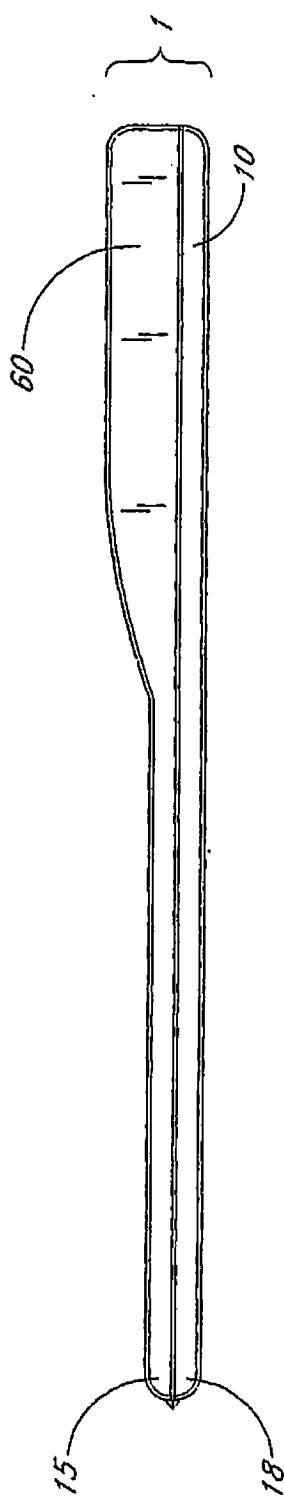


图 3

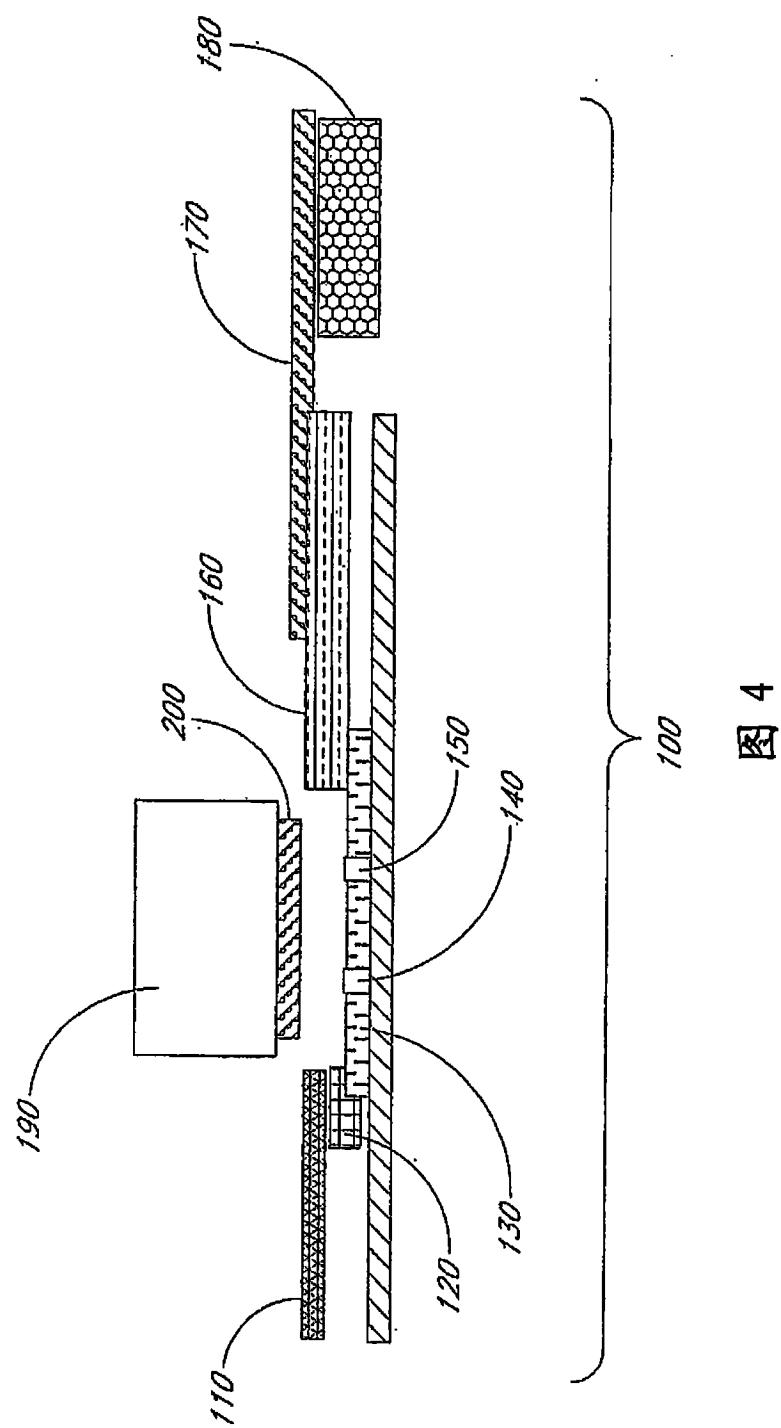


图 4

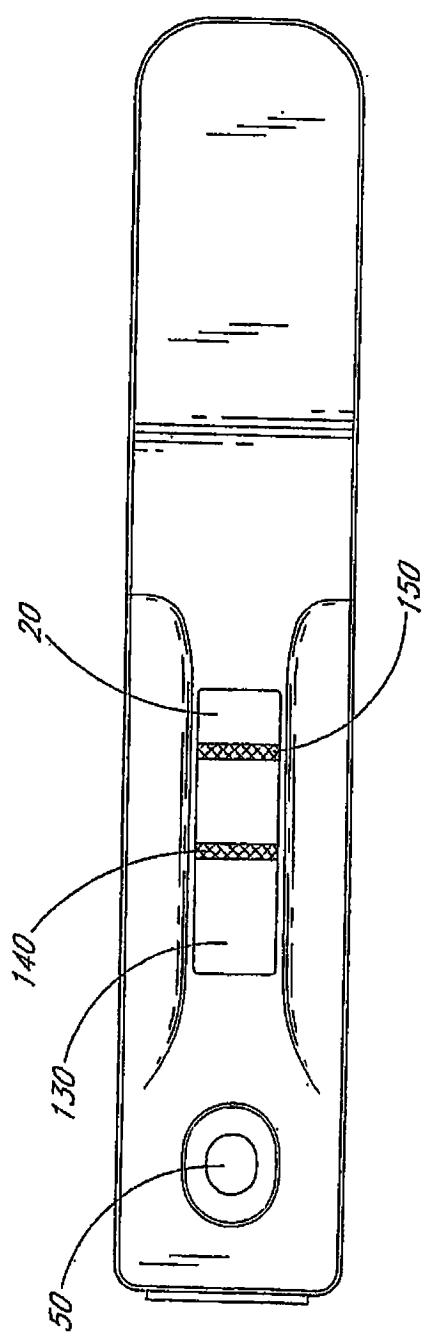


图 5

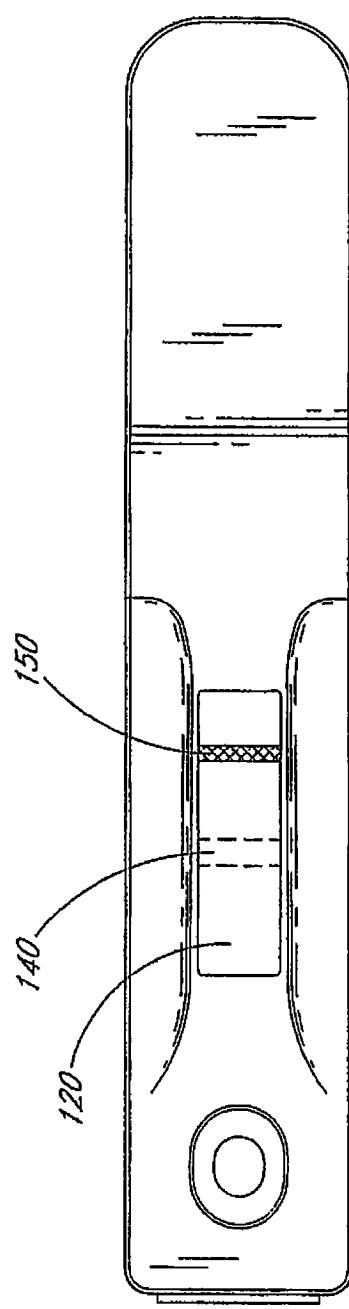


图 6

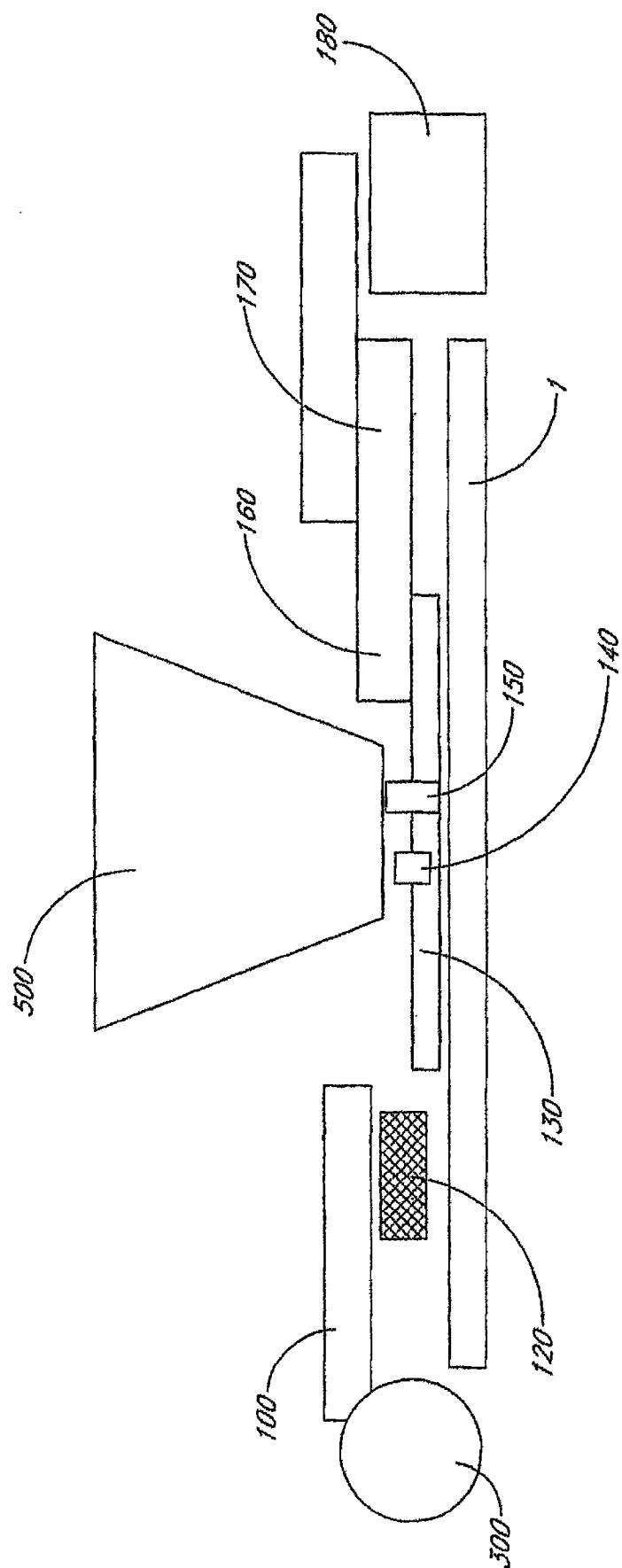


图 7

专利名称(译)	对样品中分析物的诊断试验		
公开(公告)号	<a href="#">CN1902489B</a>	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN200480015772.7	申请日	2004-03-19
[标]申请(专利权)人(译)	优势诊疗技术公司		
申请(专利权)人(译)	优势诊疗技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	优势诊疗技术公司		
[标]发明人	戴维查尔顿		
发明人	戴维·查尔顿		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558		
CPC分类号	G01N2333/16 Y10S435/973 Y10S435/805 G01N2333/59 G01N2333/18 Y10S436/828 Y10S435/971 G01N33/558		
审查员(译)	王奕		
优先权	10/456771 2003-06-06 US		
其他公开文献	<a href="#">CN1902489A</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

### 摘要(译)

提供了诊断装置和方法。诊断装置优选地包括具有检测区140的试纸条。所分析的样品与检测区接触，检测区包含目标分析物的特异性结合配体。如果样品中存在分析物，则分析物与检测区中固定的结合配体相结合，然后接触偶联物。该偶联物特异性地结合分析物，产生表示存在分析物的可见信号。该装置可用于诊断患者的特定疾病，如HIV或肝炎。也可用于确定个体是否怀孕。

