



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101305282 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 03

(21) 申请号 200680042072. 6

G01N 33/543 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 11. 13

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/548 (2006. 01)

(30) 优先权数据

0523124. 6 2005. 11. 12 GB

0610973. 0 2006. 06. 03 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 05. 12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2006/004204 2006. 11. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02007/054714 EN 2007. 05. 18

(73) 专利权人 平台诊断有限公司

地址 英国西约克郡

(72) 发明人 卡罗林·珍妮弗·拉德尔

杰拉德·约翰·阿兰

道格拉斯·罗伯特·艾文斯

伊丽莎白·加纳尔

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 樊卫民

(51) Int. Cl.

G01N 33/58 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0293779 A1, 1988. 12. 07, 具体参见说明书第 3 页第 53 行 - 第 4 页第 20 行, 实施例 1, 权利要求 1-2.

EP 0293779 A1, 1988. 12. 07, 具体参见说明书第 3 页第 53 行 - 第 4 页第 20 行, 实施例 1, 权利要求 1-2.

EP 0516529 A2, 1992. 12. 02, 说明书第 4 页 54 行 - 第 5 页第 5 行.

GB 2045431 A, 1980. 10. 29, 全文.

WO 94/15193 A1, 1994. 07. 07, 全文.

US 6136545 A, 2000. 10. 24, 全文.

CN 1404577 A, 2003. 03. 19, 全文.

WO 02/04484 A2, 2002. 01. 17, 全文.

审查员 王晓媛

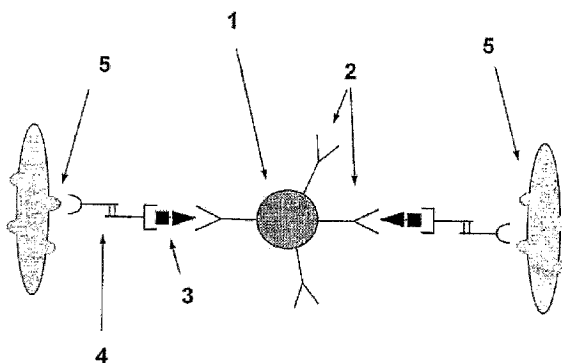
权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图 3 页

(54) 发明名称

凝集分析法

(57) 摘要

本发明涉及凝集分析法及相关试剂盒、试剂和装置。特别是公开了分析拥有不多的表位的小分析物的方法, 所述方法使用了多个分析物可能通过第一个表位结合的中心部分, 以及能够结合的第二个分析物表位并且也能够结合可检测颗粒的另外的部分。由此可能会形成稳定的凝集复合物, 其可以作为各种分析形式的基础。



CN 101305282 B

1. 一种用于进行凝集分析以检测样品中分析物的试剂盒,该试剂盒包含:
 - i. 结合两个或更多个第一结合伴侣的可溶的大分子中心,每个第一结合伴侣能够结合分析物的第一个表位;
 - ii. 包含结合或能够结合第二个表位的第二结合伴侣的部分,其中所述部分也能够结合可检测的颗粒;以及
 - iii. 包含一个或者多个毛细管通道的毛细管检测装置。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中能够结合第二个表位的所述部分与可检测颗粒结合。
3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中包含第二结合伴侣的所述部分进一步包含能够结合可检测颗粒的第三结合伴侣。
4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其中所述部分包含所述第二和第三结合伴侣的偶联物。
5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中分析物的第一和第二表位是不同的。
6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其中表位存在于分析物的不同结构域上。
7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中第二结合伴侣将分析物上的不同表位与受相应的第一结合伴侣靶定的表位相结合。
8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中第二表位对分析物是特异性的。
9. 根据权利要求1所述的用于检测单个样品内的第一、第二以及其它分析物的试剂盒,所述试剂盒包含两个或更多个第一结合伴侣,每一个都能够结合第一、第二和其它分析物之一,以及两个或更多个第二结合伴侣,每一个都能够结合所述的第一、第二和其它分析物之一,并且每一个第二结合伴侣结合或能够结合可检测颗粒。
10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其中每一个第二结合伴侣结合或能够结合不同的可检测颗粒。
11. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述中心是蛋白质或多糖。
12. 根据权利要求11所述的试剂盒,其中所述中心含有氨基葡聚糖或其衍生物。
13. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中结合伴侣选自蛋白质,寡核苷酸,糖,及其片段。
14. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中结合伴侣选自单克隆抗体,多克隆抗体,抗原,酶,受体,适配体,及其片段。
15. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中可检测颗粒是可凝集颗粒。
16. 根据权利要求1所述的试剂盒,进一步包含可凝集颗粒。
17. 根据权利要求3所述的试剂盒,其中第三结合伴侣能够结合可凝集颗粒上的血型糖蛋白分子。
18. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中可检测颗粒是微生物,细胞,大分子,金属胶体颗粒,珠子,炭,高岭土或膨润土。
19. 根据权利要求18所述的试剂盒,其中可检测颗粒是胶体金。
20. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述毛细管装置包含两个通道。
21. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中每一个通道包含上游和下游端,并且其中在上游端提供用于施加试剂样品的区域。

22. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其中一种或两种试剂在制造期间预先施加到毛细管装置的通道中。

23. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,进一步包含一种或多种检测器,信号处理器,显示器以及电源。

24. 根据权利要求 23 所述的试剂盒,其中一种或多种检测器、信号处理器、显示器、和电源是反应装置的整合部分。

25. 根据权利要求 23 所述的试剂盒,其中一种或多种检测器、信号处理器、显示器和电源作为单独的读数器提供,与所述装置可拆分和可操作地连接。

26. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,进一步包含一种或多种缓冲液,施加器,说明书,记录纸,干燥剂,对照样品,染料,或电池。

27. 根据权利要求 26 所述的试剂盒,其中施加器为移液管。

28. 一种毛细管装置,其包含一个或者多个毛细管通道,用于凝集分析以检测样品内的分析物,所述装置包含用于接受样品的近端以及样品可以流向的远端,其中毛细管装置包含干的、可复水形式的可溶的大分子中心,其结合有两个或更多个第一结合伴侣,每一个第一结合伴侣能够结合分析物的第一个表位。

29. 根据权利要求 28 所述的装置,进一步包含第二结合伴侣,可检测颗粒,和 / 或其它预先施加到毛细管装置的试剂。

30. 根据权利要求 29 所述的装置,其中第二结合伴侣,可检测颗粒,和 / 或其它试剂是干的、可复水的形式。

31. 根据权利要求 28 所述的装置,其容纳在装置或容器中。

32. 根据权利要求 28 所述的装置,其是手持的。

33. 根据权利要求 28 所述的装置,其中所述第二结合伴侣如权利要求 1 所限定。

34. 根据权利要求 28 所述的装置,其中可检测颗粒如权利要求 18 所限定。

35. 根据权利要求 28 所述的装置,其中所述第一和第二结合伴侣如权利要求 13 和 14 所限定。

36. 用于检测样品中分析物的凝集分析法,所述分析法包含下列步骤:

i. 将样品与包含一个或者多个毛细管通道的毛细管检测装置内的下列物质接触:

a) 结合两个或更多个第一结合伴侣的可溶的大分子中心,每一个结合伴侣能够结合分析物的第一个表位;

b) 包含第二结合伴侣的部分,所述第二结合伴侣能够结合分析物的第二个表位,其中所述部分也能够结合可凝集颗粒;和

c) 可检测颗粒;

ii. 使所述中心、包含第二结合伴侣的所述部分,样品和可检测颗粒反应;和

iii. 检测中心、偶联物、可凝集颗粒和分析物的凝集。

37. 根据权利要求 36 所述的分析法,其中能够结合第二个表位的部分与可检测颗粒结合。

38. 根据权利要求 36 所述的分析法,其中包含第二个结合伴侣的部分进一步包含能够结合可检测颗粒的第三结合伴侣。

39. 根据权利要求 36 所述的分析法,其中所述部分包含所述第二和第三结合伴侣的偶

联物。

40. 根据权利要求 36 所述的分析法,其中所述可凝集颗粒天然存在于样品中。

41. 根据权利要求 40 所述的分析法,其中所述可凝集颗粒是血红细胞。

42. 根据权利要求 36 所述的分析法,其中试剂和样品在施加到反应装置之前被混合,并且在预定时间后接着施加缓冲液。

43. 根据权利要求 36 所述的分析法,其中在一段预定时间后阅读显示器。

44. 一种用于检测样品中分析物的凝集分析法,所述分析法包含下列步骤:

i. 接触毛细管检测装置内的结合有两个或更多个第一结合伴侣的可溶的大分子中心,每一个第一结合伴侣能够结合分析物的第一个表位;能够结合分析物的第二个表位并且结合或能够结合可检测颗粒的第二结合伴侣;样品;和/或任选的可检测颗粒;

ii. 使毛细管检测装置内的所述中心、第二结合伴侣、样品和任选的所述可检测颗粒反应;和

iii. 检测中心、第二结合伴侣和分析物在毛细管装置中的凝集,其中凝集指示样品中分析物的存在和/或量。

45. 根据权利要求 44 所述的凝集分析法,其中所述中心、结合伴侣、可检测颗粒和分析物如权利要求 1 到 19 所限定。

46. 一种包装,包含权利要求 28 所述的一个或多个装置以及用于相同次数分析的充足的试剂。

凝集分析法

发明领域

[0001] 本发明涉及检测样品中的分析物的一种凝集分析法。特别是,本发明涉及基于多孔载体的分析和分析装置,包含用于进行此类分析的器的试剂盒,以及用于检测样品中分析物的分析方法。

[0002] 发明背景

[0003] 免疫分析是用于检测和定量样品中分析物的成熟技术。它们特别适用于作为疾病诊断和预后的辅助用于检测和 / 或测量生物样品中的物质,以及用于预测患者对治疗的反应。给诊断医学带来了革命的技术如放射免疫分析和酶免疫分析,建立在检测抗体 - 抗原相互反应的基础之上。许多检测系统是可行的,包括使用放射性或者酶标记的抗原、抗体或其复合物。很多需要与特异性底物孵育,以通过比色或荧光测量终点。

[0004] 尽管这些分析是灵敏的,但检测系统经常是复杂的,并且因而是昂贵的。通常,检测系统需要若干洗脱步骤,意味着传统分析通常不适合用于及时护理现场 (point-of-care) 型的评估。

[0005] 凝集免疫分析在现有技术中众所周知,并且依赖于结合了抗原或抗体的颗粒的凝集以指示样品中相应抗体或抗原的存在。在凝集分析的一种较简单的形式中,针对特定分析物的抗体结合到珠子或其它可见的材料上 (例如,乳胶凝集反应中的聚苯乙烯微粒)。通常,抗体是二价的,因此在分析物的存在下会导致乳胶珠形成团块。这样的团块指示阳性结果,并且肉眼可见。

[0006] W004/83859 描述了一种基于毛细管的凝集分析,包括一种毛细管通路,所述毛细管通路含有能够引起与分析物的凝集的试剂系统。所述试剂系统包含结合到毛细管壁预定位置的抗体,或者结合到放置在毛细管系统预定位置的珠子上的抗体。使用该毛细管通路时,样品沿着通路流动直到其到达凝集试剂系统。若分析物存在,则发生凝集,阻碍样品沿管子的进一步流动。施加样品预定的时间后,如果没有样品可以检测,而通路下游用于样品存在的检测器受到影响,则存在分析物,从而显示一个阳性的结果。该装置使用乳胶珠作为凝集器。

[0007] 对于更加接近患者进行分析的需求正在增长,主要是为了缩短提供结果所花的时间。此类分析誉为护理现场分析,并且通常需要牢靠和简单地实施,因为它们在非实验室的环境、通常由非专业人员进行。理想地,它们应该是自足式的并且不需要辅助设备 (除了可能的读数器的例外)。如果护理现场分析要有任何临床用途,它们需要与基于实验室的分析的灵敏度相似。然而,传统的免疫分析通常包含复杂的操作规范和检测系统,这就意味着它们通常不适合用于护理现场型的应用。

[0008] 特定的护理现场分析已被开发出来。最常见的是侧流分析。通常,它们基于标记的移动组分 (例如,有色彩的颗粒标记的抗体)、固定组分 (例如,抗体条或点) 以及膜,通过该膜导致样品在毛细作用下移动。在分析物存在下,在固定的抗体捕获区形成“夹心”,从而产生彩色的线或点。传统的侧流分析在例如 Unilever Patent Holdings B. Vd (US5, 656, 503) 中举例说明。这些分析规定了固定的抗体捕获区,虽然是侧流的形式而不

是 Gelgel 等人教示的放射形式 (Clin Chem28(9)pp1894-8,1982)。

[0009] 侧流分析提供了诸多优点,包括速度、便捷性以及较低的成本。但是,它们有几个缺点。抗体通常通过吸附到膜上而被固定,因此膜和 / 或抗体批次的变化会导致所固定的抗体量的变化。而且,一些抗体可能仅仅是松散结合的,当流体正面经过时可能会移动,从而导致信号的丢失。并且,由于一种抗体是固定的,它和分析物反应的仅有时间是样品流经的时间,因此会由于孵育时间短而降低灵敏度。还需要为每一分析物生产特定的包被膜,因而增加了制造成本。

[0010] 为了解决这些缺点,已经尝试避免使用固定的捕获抗体。例如, Miles(EP 297292)、Hygeia Sciences(EP 310872) 和 Mizuho(EP 0962771) 描述的系统,包括带有捕集区的膜,所述捕集区连接有 2 种抗体包被的颗粒,一种没有标记但是大,因此能够被该区捕集,另一个小并且被标记,能够通过该区。在分析物存在时,小珠子变成与被捕集的大珠子结合,从而形成彩色线。尽管这些方法避免了使用固定的捕获抗体,但除了捕集区之外,它们还需要两组抗体包被的颗粒。通常此类颗粒是疏水的性质,并且在生物流体的存在下能够引起非异性方式的凝聚。

[0011] 其他人尝试了较简单的形式,藉此包被抗体的颗粒能够透膜自由移动,当分析物存在时产生凝集,使得移动被停止。此类基于凝集的免疫分析在现有技术中是已知的,并且依赖于结合抗原或抗体的颗粒的凝集以指示样品中相应抗原或抗体的存在。在凝集分析一种较简单的形式中,针对特定分析物的抗体与珠子或其它可视材料结合。

[0012] 特别是, Amersham(US4, 666, 863) 公开了一种通过色谱手段将游离和结合的标记分离的方法。在一种变体中,他们教导了使用沿着膜的流动,分离凝集和非凝集的抗体包被的彩色颗粒。在分离之前,反应混合物与交联试剂混合反应,使凝集稳定化。Daiichi(EP 293779) 也公开了一种有色彩的乳胶凝集反应,其中凝集的和非凝集的颗粒通过毛细管分离,所述毛细管容许非凝集的乳胶通过但是捕集聚集体。Kodak(EP 280559) 描述了一种多价分析物的分析法,藉此分析物标记不存在时能够通过过滤器,但是当分析物存在时形成凝集物而被捕集。Akers(EP 556202) 描述了一个体系,其中通过样品与表面上有分析物特异性受体的彩色颗粒接触,形成测试混合物。测试混合物通过带孔的过滤器,所述过滤器的孔大于彩色颗粒但是小于颗粒 - 分析物的聚集体,因此产生聚集体的捕集。混合物中聚集体的存在通过检查滤出液的颜色确定。Genosis(US6, 472, 226) 描述了一种没有固定的抗体的侧流分析,用于非常大的分析物。他们描述了一个 2- 区域体系,一个有大孔,一个有小孔,使得分析物能够通过大孔但是到达小孔区域时被捕集。这个与能通过两个区域的小标记物(如胶体金)联用。分析物存在时,胶体金的一部分变得结合到分析物并且变得在小孔区域被捕集。

[0013] 常见的护理现场分析是膜侧流分析,通常用于尿样。尿包含的分析物数目有限,因此这类测定法的应用受限制。要用于含有分析物范围大得多的全血,通常必需过滤去除血细胞,否则会发生膜的堵塞和脱色。

[0014] 因此,已经开发了用于全血的分析系统,其不需要过滤血液。在美国专利 No. 4, 433, 059 中, Chang 公开了一种非毛细管凝集免疫分析法,其中两种抗体“尾对尾”地共价连接,利用对样品属于内源性的颗粒时,有利于自体凝集反应。一种抗体对于指示剂物质如红细胞携带的抗原具有特异性。所述抗体是单价的,因而避免了非特异性的凝集。另一

种抗体是二价的并且对分析物有特异性。分析物存在时,结合的抗体与分析物和红细胞交联,发生红细胞的凝集。

[0015] Agen 在多个专利申请 (US5, 413, 913, US4, 894, 347, W093/24630 以及 EP308242) 中描述了一种用于全血的非毛细管凝集系统,其中血样的红细胞被用作凝集颗粒。所述系统需要使用一种偶联物,所述偶联物包含两种抗体或抗体片段,一种直接抗红细胞抗原,另一种直接抗多表位分析物。分析物存在时,抗体将凝集红细胞。

[0016] 使用全血作为样品的基于毛细管的凝集系统之前已有公开,例如 US3, 951, 606 和 W099/35497。它们都给出了通过测定凝集的位置或哪种毛细管被堵塞来指示分析物的存在/量。这些分析都依赖于导致的毛细管完全堵塞的凝集。

[0017] 当前的大多数凝集分析中,颗粒的凝集是视觉检测的。然而,视觉终点是主观的并且难以电子记录数据。

[0018] 一个重要的考虑是,大体上,这些基于凝集的分析被限制于检测能够形成大而稳定的凝集物的有多个表位的大分析物上。对于表位较少的较小分析物,或者使用可利用的表位数量有限的分析物,由于结合事件的数目减少,可能导致聚集体减弱和灵敏度损失,它们的效力会受损。

[0019] 本发明的目的是对现有技术分析系统有关的上述问题的一部分或全部进行处理和改进。

发明内容

[0020] 本发明的基础是在分析物存在时产生稳定的、可检测的凝集反应。对于护理现场分析,该方法能够便捷地在多孔载体或者含有毛细管路径的装置内进行,尽管替代方法是可能的,特别是用于实验室分析。实际上,对于此类应用,可以使用基于例如比浊法的完全液相形式。尽管使用其中可能发生多重结合事件的大多表位分析物,可以实现适当的凝集,但是当用可能仅含有几个表位的较小分析物时,可能难以实现稳定的凝集。实际上,由于特异性的原因,通常理想的是只使用分析物上的 2 个表位。

[0021] 为克服它,本发明提供了一个中心 (hub),其包含结合到载体上的多个结合伴侣。产生的中心能够结合若干分析物分子,有效地使分析物呈现多表位性并且增强了它的有效结合能力。通过这种方式,对于小的分析物和/或使用分析物上有限数目的表位的情形下,可能获得强而稳定的凝集,减少了对外部稳定剂的需求。

[0022] 与现有技术中的基于膜的分析相比,通过使用用于增强分析物有效结合能力的特定试剂组合,并且能够产生更强更稳定的凝集反应本发明提供了一种灵敏度增强且制造简化的分析。本发明提供了一种分析,其避免或改善了对于要预先固定到膜上的结合伴侣提的需要。

[0023] 在样品中的分析物存在下,将会发生中心、分析物和第二结合伴侣的凝集,其优选可在装置内检测。本发明还适用于单个样品内的两个或更多个分析物的检测,优选地在单次分析内。在这样的具体实施方式中,可能提供有两个或更多个第一结合伴侣,每一个都能结合不同的分析物。它们可以提供在一个载体上,因而产生可以结合两个或更多个分析物的中心。或者,并且优选地,两个或更多个第一结合伴侣可以各自提供在分开的载体上,因而产生两个或更多个中心,每一个对不同的表位具有特异性。此外,提供有相应数目的第二

结合伴侣,每一个对不同的表位具有特异性,并且每一个与可以检测的颗粒结合或能够结合。优选地,对每一个待检测的表位提供不同的可检测颗粒,使得其存在与否能够被测定。

[0024] 分析物可以是任何部分,优选能够与结合伴侣结合的。为使中心与第二结合伴侣的凝集能够形成,本发明中可以检测的分析物有至少两个能与结合伴侣结合的结合位点或表位。非限制性的分析物的选择包括核酸、抗原、抗体、寡核苷酸、激素、激素受体、维生素、类固醇、代谢物、适配体、糖、肽、多肽、蛋白质、糖蛋白、有机体(例如真菌、细菌、病毒、原生动物和多细胞寄生虫)、治疗性或非治疗性的药物,或任何联合或其片段。优选地,分析物可以是免疫活性蛋白或多肽,例如抗原多肽或蛋白。通过本发明检测的最优选的分析物包括 hCG, LH, FSH 以及针对 HIV 的抗体。本领域技术人员清楚的是,抗体在测量免疫反应的证据中是特别重要的分析物。因此,精确测量特定抗体的血清滴度是本发明的一个重要方面。在此类分析中,将会体会,使用的分析物结合试剂通常是被测量的抗体特异性结合的抗原。

[0025] 分析物的有效结合能力的增强通过中心的使用得以实现,所述中心结合有能够结合分析物的第一个表位的两个或更多个第一结合伴侣。中心可以是任何适宜的材料形成,所述材料优选是均一稳定的并且结合伴侣能够与其连接。中心可以是可溶的或不可溶的,尽管前者是优选的。中心的例子包括聚苯乙烯乳胶珠、玻璃珠、胶体金、细胞例如红细胞、纤维材料如纤维素、大分子如多糖和蛋白质。优选的中心是多糖,包括葡聚糖优选氨基葡聚糖、琼脂糖、微晶纤维素、淀粉。其它适宜的材料包括聚乙烯亚胺、聚乙烯基甲苯、或者苯乙烯丁二胺共聚物、聚丙烯醛微球体、聚氨酯、花粉颗粒、孢子花粉素、被甲基丙烯酸多缩水甘油酯、微晶纤维素或其组合的壳包裹的聚苯乙烯或聚乙烯基萘核心、聚乙烯醇、甲基丙烯酸羟乙酯和甲基丙烯酸甲酯的共聚物、有机硅和硅石、玻璃、橡胶、尼龙、硅藻土、硅石等。可溶性的中心优势在于非特异性结合低和柔性增强,并且对共价交联抗体或其它结合上去的分子的基团可利用性增强。优选的可溶性中心是可溶性蛋白和多糖,包括上文中描述的那些,特别是氨基葡聚糖及其衍生物。中心的尺寸由因素如要容纳到表面上的结合伴侣的数目、确保分析期间中心稳定性的原子空间排列的因素,以及其中要进行分析的多孔载体的性质所规定。例如,优选中心足够小,用于在没有凝集事件时穿过膜上最小的孔。当中心由不溶性的珠子构成时,它们的直径在 0.03–10 μm 的范围,优选的是 0.05–8 μm 。对于可溶性的中心,它们可以在 250–2,500kDa 的范围,更加优选的是 500–2,500kDa,例如对氨基葡聚糖分子。

[0026] 在中心的表面上是能够结合分析物的第一个表位的第一结合伴侣。因此,分析物存在时,中心可以通过其表面上的第一结合伴侣与其结合。这就有效地集合起了许多分析物分子用于呈递给第二结合伴侣。因此,使用中心和第二结合伴侣的分析有着更高灵敏度和更广泛应用的潜力。

[0027] 为使中心有效,因而优选的是其表面上存在至少两个直接对抗分析物的特定表位的第一结合伴侣。但是,对抗中心表面上任何特定表位的结合伴侣的数目越大,则与分析物和第二结合伴侣的可能的相互作用的数量将会越大,因而凝集体的可能的尺寸就越大。因此,中心表面上结合伴侣的最佳数目是保持分析灵敏度的同时将结合伴侣之间或者中心和第二结合伴侣之间原子空间排列的干扰最小化。

[0028] 与中心结合的第一结合伴侣可能能够结合或直接对抗分析物的任何表位,条件是该表位与第二结合伴侣靶定的表位不同。当分析是用于检测单个分析物时,可能优选的是

结合到中心的所有第一结合伴侣能够结合分析物的同一表位,并且优选基本上相同。但是,在本发明的实施方式中,当需要在单个样品或单次分析中检测的两个或更多个分析物时,能够结合每个待测表位的第一结合伴侣可以提供到同一个中心或不同的中心。

[0029] 第二结合伴侣能够结合分析物的第二表位并且结合或能够结合可以检测的颗粒,优选同时结合。优选第二结合伴侣靶定分析物上不同于相应的第一结合伴侣所靶定的表位。第二结合伴侣可以通过许多直接或间接的方式与可检测颗粒结合。在一个实施方式中,第二结合伴侣结合双官能结合物中的第三结合伴侣,能够以特异或非特异的方式与分析物的表位和可检测颗粒结合。当结合伴侣是抗体或功能片段或其衍生物时,第三结合伴侣可以直接特异地结合可检测颗粒表面所存在的表位。在一个实施方式中,可检测的颗粒是血红细胞,因而第三结合伴侣可以是对血红细胞表面抗原具有特异性的抗体。

[0030] 在本发明的内容中,表位是结合伴侣能够结合的分析物上的单独的位点。因此,这里描述的被结合伴侣结合的表位可以设想是在相同或不同的分子上。优选为了空间排列的原因,优选分别被第一和第二结合伴侣识别的分析物上的第一和第二表位,位于空间分离的位点上。如果分析物有两个或更多个结构域,则为了避免空间位阻,最优选第二结合伴侣识别的表位位于与中心的第一结合伴侣的结构域不同的结构域上。例如,在 hCG 的情况下,第二结合伴侣直接对抗 β 链上的表位,而中心直接对抗 α 链上的表位。被第一和 / 或第二结合伴侣靶定的分析物表位优选对该分析物是特异性的,因此第一和第二结合伴侣对分析物的结合都只有在分析物存在时才发生。

[0031] 为了使中心、分析物和第二结合伴侣之间的凝集能够被检测,优选第二结合伴侣能够与分析物和可检测颗粒同时结合。因此,当分析期间可检测颗粒变得被结合,优选第二结合伴侣上对于可检测颗粒的结合位点与分析物结合位点有充分的距离,以促使与分析物和可检测颗粒同时结合。在测定之前第二结合伴侣与可检测颗粒结合的情况下,优选结合伴侣附着到可检测颗粒上,因此仍然能够结合分析物。可检测颗粒可以通过任何合适的方式与第二结合伴侣结合,如下文所描述。

[0032] 结合伴侣可以以任何适宜的方式,共价或非共价地,被结合或固定到非靶部分,例如中心或可检测颗粒。尤其在可检测颗粒在分析期间变得结合到第二结合伴侣的情况下,通常,结合会在结合伴侣上的结合位点与中心或可检测颗粒上的表位(或决定簇)之间形成。此类决定簇优选地是中心或可检测颗粒上固有存在的,但也可以是外来的。优选它是表面蛋白,优选血型糖蛋白。合适的手段包括共价连接例如化学连接,或通过非共价连接例如抗体-抗原相互作用、生物素-链霉亲和素、蛋白-蛋白相互作用、G 蛋白或 A 蛋白相互作用、或被动吸附。当采用共价连接时,这通常是在结合位点远端的结合分子的合适残基和中心分子的适于接近部分之间。优选共价连接在氨基酸之间形成,通常是氨基酸侧链,例如氨基、巯基、羧基、酚基或其它杂芳族或芳香族侧链。

[0033] 为实现上文所述的非共价连接,结合伴侣可以作为偶联物提供,其中上文中所述的结合伴侣进一步偶联能够结合中心 / 可检测颗粒的其它结合伴侣。该结合优选通过它们的分析物结合位点远端的位点,因而避免了与分析物结合的任何干扰。当结合伴侣是抗体时,此类位点可以是结合伴侣的尾部,使得偶联以尾对尾的方式进行。该偶联可以是共价的,例如通过结合伴侣的氨基酸的氨基、巯基、羧基、酚基或其它杂芳族或芳香族侧基,或优选通过硫醇基团。或者,交联可以是非共价的,如上文所述。

[0034] 本发明的结合伴侣可以是能够结合预定靶标（例如分析物或可检测颗粒）的任何物质，并优选其对所述预定靶标有优先的亲合力（即对该靶标有特异性）。因此，结合伴侣包括单克隆或多克隆抗体，抗原，包括酶或其它结合蛋白的蛋白质，受体，适配体，寡核苷酸，糖，及其片段。根据分析物和凝集颗粒的性质，结合伴侣从上述中选出，使得它们能够按需与每一个结合。优选地，结合伴侣可以是抗体，例如已知的免疫球蛋白如 IgG, IgM 等等，或单价或二价的 IgG 抗体片段，通常分别被称为 Fab 和 Fab' 与 $(\text{Fab}')_2$ ，或其片段。优选地，抗体通常是二价的抗体片段 $[(\text{Fab}')_2]$ ，或更优选单价的抗体片段 (Fab 或 Fab')。

[0035] 尽管优选结合伴侣直接与它们的靶标结合，但这并非严格必须的，并且结合可以通过媒介发生，如结合分析物的分子。所述媒介可以是样品中自然存在的，或者可以是单独提供的。它们包括受体、抗体、抗原、结合分子、激素受体、寡核苷酸、糖或者适配体，如上述与结合伴侣等等相关的叙述。

[0036] 可检测颗粒可以是生物的或非生物的，并且对于待分析的样品是外来的，或自然存在于样品中。“可检测”的意思是，使用任何适当的手段，在凝集存在或不存在下，它在多孔载体内的存在和 / 或位置是可以确定的。优选地，颗粒是固有可检测的颗粒，即它的检测基于颗粒的固有特征（如颜色）而非它对外部因素的作用。因此，该可检测颗粒使凝集的存在和位置能够被观察到，而不需要测量或评价凝集的外部因素如流速或吸光度。检测可以通过例如视觉或比色进行，或通过任何其它适宜的方法。可检测颗粒的例子包括微生物、细胞（如血红细胞）、大分子、金属胶体颗粒（如金或银）、珠子（优选聚苯乙烯乳胶）、炭、高岭土或膨润土。当颗粒是生物的并且对样品是外来的，那么它可以得自任何适宜的来源，并且在使用之前可以任选经过任何必要的预处理如洗涤、固定、防腐。在血红细胞的情况下，它们可以得自任何适宜的来源，优选的是动物如豚鼠或火鸡。血红细胞可以被抗体包覆，和 / 或用任何适当的方法防腐，或固定。使抗体能够被检测的标记可以是颗粒的固有部分，或可以用在此描述的方法附着到可凝集的颗粒上。对于全血测定，优选可检测颗粒是样品（适当处理以防止凝结，如用柠檬酸盐）本身的血红细胞。

[0037] 优选地，可检测颗粒也能够凝集，意味着它会凝集，或与其它（优选的是相似或等同的）可检测颗粒形成聚集体。可检测颗粒的凝集能力促使较大凝集物的形成，优选地包含 2 个或多个中心，因而有利于检测和增强稳定性。

[0038] 考虑到使用本发明的试剂提高凝集复合物的稳定性，本发明的第一个实施方式是在毛细管装置内进行反应。每一种试剂可以放置在装置中一个或多个预定的位置上，并且可以再次优选试剂放置在相同的位置，或它们应用在不同的位置上。在后一种情况中，优选中心在偶联物的上游。

[0039] 在分析物存在下，凝集的发生导致阻止了流体沿通路的流动或降低了流速。这个可以通过流体到达一个或多个设定点所花去的时间或流体在设定的时间内通过的距离来检测。流体在设定点的存在可以通过任意手段检测，包括但不限于，视觉检测流动，团块的形成，颜色的变化等等；光学手段例如反射计，测量光散射；流体检测；浊度法；电学手段和比浊法。优选的是非视觉检测手段，意味着在检测区域样品的有无不是由肉眼确定。这减少了人为误差的影响，并且在护理现场的环境下，意味着不需要使用者在进行分析期间持续监测。此外，结果是持久的和稳定的。优选的检测手段包括光电检测手段，意味着其可以，例如，包括光敏二极管 (LDD) 或光敏电阻阵列。要体会的是，根据由分析来确定的分析物，

某些光敏元件将接收光（即样品沿其流动没有受阻的毛细管的检测区域的元件）。光电探测器连有软件，这使得从光电探测器提供的特定信号来确定分析物。

[0040] 便利地，优选的光电探测器是用于通过光透射阅读条形码的类型（与光线反射相对）。在这样的实施方式中，反应装置中预定的区域（检测区域）可以是透光的，因而检测区域样品的存在与否可以通过在反应装置的一侧提供照明源和在装置的另一侧提供光电探测器来确定。便利地，反应装置可以用透光材料生产（例如聚碳酸酯）。

[0041] 检测器可以被设置用来检测到达检测区域的样品的存在，作为确认装置运转正常。换言之，如果样品没有在毛细管通路的检测区域被检测到，通常是对照毛细管，那么它必须假定反应装置没有正确运转，因此测试将需要用新的装置重复。还优选包含检测装置，用于检测在毛细管通路的上游区域存在的样品，以确保样品进入了这些通路，再次作为确认装置正常运转。

[0042] 如上文所述，进行本发明的分析的反应装置是一个容器，并且通常是手持的。优选是一次性使用类型的装置，因此它用于进行一次分析，然后丢弃。

[0043] 装置可以包含一个或多个其中进行测定是毛细管通路。优选提供 2 个毛细管通路，一个作为分析通路，另一个作为控制通路。但是，只要需要或有必要，可以设想提供另外的通路，用于检测单个样品的多个分析物。

[0044] 每一个毛细管通路有上游和下游端，优选在上游端有用来接受样品 / 试剂的区域或孔。该区域可以包含施加样品 / 试剂的衬垫，样品 / 试剂从其进入毛细管通路。所述衬垫可以由吸收性材料构成，优选纤维材料，如纤维素。纤维衬垫可以对毛细管道施加反毛细管力，并且衬垫材料的选择取决于毛细管道的尺寸，因为这些决定了毛细管力。或者，可以在毛细管通路的入口出区域设置单向阀，因而施加到所述区域的样品 / 试剂可以经阀的开口进入通路，但不能从该开口出去。或者，可以用移液管或其它适当的装置将液体直接加到通路中。

[0045] 如同一些已知的基于毛细管的凝集分析，例如 W004/083859，所述通路可以在通路的预定位点包含凝集试剂。优选装置的任一部分与样品接触，并且因此可以是整个或部分的区域或毛细管通路，优选流体将被检测的任一位点的上游。所有的试剂可以被混合并放置在毛细管的一个或多个位点，或被分别放置在不同的位点。分析物存在时，当流体到达最下游的试剂时，将开始阻滞流动。通常，沿毛细管通路的流速对照相邻毛细管通路中的对照样品测量，所述对照样品不能够凝集（例如由于缺少分析物）。

[0046] 在一个替代的方法中，试剂可以加在毛细管通路的上游端，与样品在同一个位置，与样品在一起或在样品之前。所述试剂可以预先混合，或分别加入。优选所述试剂包含中心，所述中心放置在包含偶联物的试剂的毛细管上游。为确定是否存在分析物，监测与标准比较的流速变化。

[0047] 优选反应装置的通路是毛细管。它可以由任何适宜的材料制成，优选与反应装置的其余部分相同，如聚碳酸酯，聚苯乙烯，或注射成型的塑料，任选是透明的。优选毛细管通路在单元表面形成为上端开口的通道，并且通过固定膜（如聚酯）或优选亲水性质封条对其封闭。其可以用任何适宜的方式，例如亲水性粘合剂，固定到装置主体上，最优选的是不“释气”和“蠕变”的。优选地，使用的任何手段不含有使蛋白质变性的成分（如氰化物），否则装置的功能会受到损害。模制该装置的塑料材料可以是疏水的，毛细管通路任选在制

造期间用亲水试剂处理,如在 0.1-10%的 Tween 20 洗涤。凝集剂和其它试剂可以供到上端开口的通路中。

[0048] 反应装置可以包含检测器和 / 或解读检测器提供的信号的器。通常,这些包括处理显示的结果的信号处理器,以及显示器。因此,可以提供一种整合的装置,包括测定、信号处理和显示所需要的所有器。或者,可以提供一个单独的读数器,包含信号处理和 / 或显示器,并且任选用于确定反应装置中预定位置处样品存在与否的检测装置,在此定义为检测区域。因此,虽然反应装置需要弃置,但信号处理 / 显示装置能够再次使用。这减少了分析的成本以及废弃物。

[0049] 当提供单独的读数器时,它可以是可拆卸的,并且用任何适宜的手段、以允许来自每一个检测装置的结果能够被获取和分析的方式,与反应装置可操作地连接。优选地,反应装置可松脱地安装在读数器上,使得进行分析时,读数器和反应装置成为一个临时整合的装置。因此,读数器和 / 或反应装置包含的器或布置使得安装时,检测器可以与反应装置中的检测区域连通,优选通过接触。尽管不是绝对必不可少,反应装置和读数器之一或二者上的器可以令组件接合,如紧固或锁定机构。在一个简单的实施方式中,测试装置中所述器包含构造(例如步骤构造),用于将单元定位到读数器中的协同步骤上。

[0050] 当提供检测器作为反应装置的一部分时,它们可以放置在一个或多个预定的合适位置。如上所述,在基于毛细管的反应装置中,每一个毛细管通路可以配置适合分析所使用的检测方法的检测器。检测器可以设在沿毛细管通路的一个或多个位置,并且至少在通路的下游区域,如此通过测量沿毛细管的流速获得关于样品中分析物的定量结果。因此,样品中分析物的量越大,凝集反应将越强烈,而沿通路的流速越慢。通过沿通路设两个或更多个检测器(means),并且测量样品到达每一个所花的时间,能够确定流速。通过将流速跟标准曲线进行比较可以估计分析物的量。

[0051] 检测器将检测在检测区域中任何液体的有无。液体通常是在此所描述的试剂和 / 样品,但是可以包括其它用于对照目的或验证单元可操作性的测试液体。

[0052] 检测装置与毛细管通路的一个或多个检测区域连通,以确定液体的存在与否。获得的结果对每个检测区域以是 / 否的形式指示,形成的图案通过电子器来解读为分析物的存在和 / 或量。毛细管通路的长度由凝集反应的时间比例,结合因素如通路的内横截面积以及样品和试剂的性质和流速来指示。它必须具有最小足够长度,若分析物存在时,有时间使凝集反应发生。通常,通路长度在 30-500mm 的范围内,更优选 35-45mm。根据制造和流动的准则,毛细管通路可以有任何横截面,例如圆形,方形或三角形。通路的截面可以是,边长 50-1000 μm 的等边三角形的形式。

[0053] 为方便起见,通路不一定是线型,而是可以采用任何适合反应装置尺寸和形状的形式。因此,通路沿其长度可以采用一系列弯曲或曲线。尽管任何容许试剂 / 样品流过的形式都是可以接受的,但优选的形式包括一系列以 180 度弯曲连接的平行的线型通路。当有两个或更多个通路时,它们可以彼此并排平行地运行,使流动易于视觉监测,或可以设置成装置上的单独构造。

[0054] 可以提供液体以辅助试剂 / 样品沿毛细管通路的流动,或增加反应体积,或提供额外的试剂,如前文提到电解质。缓冲液可以与试剂 / 样品一同或分开加入,包括在反应开始之后(追加缓冲液)。适宜的液体包括缓冲液如 PBS pH7.4,以及生理盐水。

[0055] 当分析的液体没有传导性时,可以在检测器的上游加入电解质。它可以是固体的,溶解之后使液体变得有传导性,或可以是预溶解的,例如以缓冲液的形式。

[0056] 信号处理和显示器可以任选配备电源或用于连接电源的器。如 W004/85389 中描述,电源可以是使用时被启动的电源。或者电源可以是传统的电池。

[0057] 信号处理器能够将来自反应装置中检测器的结果转换成显示器上的可读输出。优选,信号处理器还包括计时器,其在测试中合适的点启动。因此,通过与反应装置连接,信号处理器与检测器连通,将结果转换成数字或其它信号。然后该信号被传送至显示装置,其将信号以可读的形式呈递。这可以是是/否类型的结果,语言或符号的形式,或可以是定量结果,提供指示分析物存在量的值。优选在后一种情形下,提供一个数值,致使不需要再对结果进行解读。优选该装置如 PCT 申请 No. PCT/GB2005/004166 中所描述。

[0058] 在第二个实施方式中,本发明的分析是基于膜的,意味着试剂被导入到多孔载体上,并且任何凝集都在载体内发生。

[0059] 优选地,中心和可检测颗粒是不同的实体,优选由不同的材料或试剂构成。

[0060] 本发明的一个优点是试剂和样品可以以任意顺序以及任何组合施加到多孔载体,并且不要求将试剂固定在一个固定的位点,不像现有技术中的侧流分析,通常有将样品和试剂分别和以固定的顺序施加的限制。任何一种或多种试剂和/或样品可以在分析开始之前混合,或在单独的容器中(例如毛细管或孔),或在多孔载体本身内(例如在有孔的多孔载体的区域中,所述大孔允许凝集和非凝集的颗粒自由移动)。尤其是,优选在分析之前,它可以与中心、第二结合伴侣、和/或可检测颗粒结合。在施加到多孔载体之前,任何混合物可以短时间孵育,例如 1-6 分钟,优选 2-5 分钟。

[0061] 本发明的分析可以以各种形式进行。

[0062] 在一个“离线的”形式中,试剂和样品可以在导入到用于分离凝集和非凝集颗粒的多孔载体之前一起反应。或者,试剂和样品可以分别施加到多孔载体,或二者联合使得反应在载体内进行。在一个“湿的”形式中,在分析开始或即将开始时将试剂和样品施加到多孔载体。或者,分析可以是“干的”,其中在分析开始之前,一种或多种试剂已经被预先施加到多孔载体,方式是在例如通过润湿再次激活之前阻止它们多孔载体内自由移动。优选,任何预先施加的试剂在通过多孔载体时会被样品或其它流体重溶。

[0063] 因此,如上面关于第二个方面的叙述,本发明的装置可以包含带有中心的多孔载体、第二结合伴侣、可检测颗粒、和/或其它预先施加到其中的试剂,优选是干的、可复水的形式。此类试剂可以在多孔载体内的相同或不同位置一起或分开施加。预先施加到多孔载体上可以避免在先技术的缺点,因为(i)位置不必精确(与传统的侧流测定中的固定捕获线相比较,精确定位对使它可读并避免弥散或不清晰的结果是关键的)以及(ii)在已知的侧流分析中,固定捕获线和标记的抗体必需施加到不同的位置,需要两次通过施加装置,或更复杂的设备。在本发明中,试剂可以预混合,因此只需施加 1 次。将试剂预先施加到多孔载体的方法在现有技术中广为所知,并且包括干燥,脱水,空气干燥,真空干燥,冻干。通常地,这需要将试剂施加到膜上,然后在 25 ~ 30°C 温度范围内干燥 18 个小时。

[0064] 因此,每一试剂和样品可以以任何组合同时或依次添加。当依次添加时,可以优选样品在试剂之后加入,并且更优选第二结合伴侣在中心之后添加。

[0065] 任何试剂,尤其是预先施加的试剂,可以放置在多孔载体中的一个或多个预定位

置,并且此外,可以优选两个或更多个试剂放置在相同的位置,或将它们施加到分开的位置。在后一种情况中,优选中心在第二结合伴侣的上游。

[0066] 试剂和 / 或样品可以用任何适宜的手段施加到多孔载体,例如通过将多孔载体放置到盛有一个或多个试剂和 / 或样品的容器中,或通过直接将试剂 / 样品移取到载体上。在单次分析中可以使用施加方法的任意组合。

[0067] 样品中有分析物存在时,试剂发生凝集。分析期间形成的任何凝集将会沿着多孔载体朝向远端流动,直至膜内的预定位点(检测区域)处移动被阻止或减弱。通常,这是由于存在捕集凝集物的器,例如孔径减小或现有技术中技术人员已知的不依赖于预固定的特定结合试剂的任何其它合适的方法。因此,分析物存在时,凝集物在检测区域的位置积聚,从而允许检测。优选,凝集的检测是通过捕集凝集物实现的,例如,用色谱器。因此,为使发明有效果,有必要形成强的凝集反应,使得检测中固有的强剪切不会破坏凝集物。本发明中中心的使用使其能够实现。

[0068] 反应装置的通路是多孔载体,其是使试剂和流体从中通过的任何适宜的材料。优选的是固体基质,优选纤维性的。优选还是柔韧性,能够结合其它多孔的或无孔的材料,允许信号可视化,并且优选是吸水的,因而有利于流体通过毛细作用移动通过。适宜的材料包括纸,玻璃纤维,多孔塑料,烧结的(scintered)玻璃或塑料,纤维素颗粒,硝酸纤维素,琼脂凝胶或其它聚合物,或织造材料如布、尼龙或其它聚合的网状材料,或其它天然或合成的纤维材料。

[0069] 单一的条带内载体的孔径可以变化,例如为了捕集凝集物。优选地,任何检测区域上游的载体的孔径足以容许试剂、样品和凝集物的自由移动。在检测区域,为了阻止凝集物沿载体的进一步移动,孔径可以减小,从而使其可以检测。因此,检测区域的孔径可以小于可能在存在的待检测分析物中特异形成的任何凝集物,但又大到足够容许任何非凝集的试剂或样品自由移动。无疑地,这个可以根据因素如使用的中心、分析物和结合伴侣的性质而变化。

[0070] 整个或部分多孔载体可以用物质预处理以阻止或减少试剂和 / 或样品与载体的非特异性结合。合适的物质包括清洁剂如 Tween20™, TritonX-100™, 或十二烷基硫酸钠(SDS), 载体蛋白如牛血清白蛋白, 糖例如蔗糖、海藻糖等等。这些可以添加到载体, 优选在分析之前, 或添加到一个或多个试剂和样品中。

[0071] 多孔载体可以是适宜的尺寸和形状,与要进行的分析相适应。优选地,载体可以是条带状,有施加试剂和样品的近端,以及它们可以流向的远端。载体的尺寸通常取决于分析的性质和要施加的样品的多少,以及分析所需的持续时间。载体的厚度优选使得任何可视信号能够被检测并且不会“埋没”在载体中。优选地,载体的尺寸使得它可以设置在护理现场使用的手持装置里面。因此,当载体是条带状时,可以优选不超过大约 20mm 宽,优选宽约 1.0mm 和 12mm 之间,并且更优选宽约 3.0mm 到 8.0mm 之间,并且最优选 5mm 宽。载体的长度可能由凝集反应的时间范围、结合因素如载体的横截面积以及样品和试剂的性质和流速规定。它必须至少有足够的长度以容许若存在分析物的话凝集反应的有时间发生。通过延长分离 / 检测区域之前的部分,能够增加反应的时间(并且因此潜在提高了灵敏度),通过缩短条带可以加速分析。长度通常可以在大约 2.0cm 和 40cm 之间,优选长约 4.0cm 和 25cm 之间,更优选长约 6.0cm 和 20cm 之间,并且最优选长 6cm 和 15cm 之间。

[0072] 如果需要,分析速度可以通过添加粘度改变剂如淀粉甲基纤维素聚乙二醇白蛋白等进行调节。

[0073] 如在此所述,本发明中的多孔载体可以包含不同的区域。例如,其可以包括施加区域,在此试剂和样品可以施加到载体;在施加区域下游的检测区域,在此检测任何凝集;和/或预先施加一种或多种试剂的区域,其将在施加区域的下游但在检测区域的上游。优选地,每一个区域都是物理上区分明显的部分。为适合每种目的,这些区域可以全部由单一连续载体形成,或可以由物理上区分明显的载体形成。在后一种情形中,物理上区分明显的载体可以沿载体的长度设置或以层的形式层压,优选有小的重叠,优选在 1mm 的区域中。优选地,施加区域(或试剂释放垫)起着材料支撑体的作用,并且可以由任何适宜的材料构成,优选孔径为 0.05 μm 到 500 μm ,更优选 0.1 μm 到 100 μm ,并且最优选 0.2 μm 到 30 μm 。检测区域的捕集膜可以是类似的材料,但与施加区域相比,孔径减小。载体还可以在检测区域的上游包括毛细芯或槽,用于通过毛细作用吸引流体通过多孔载体。

[0074] 为防止多孔载体弄污或试剂的泄漏,优选在至少一侧并且优选两侧包上防水密封条。为使能够通过视觉检测凝集物,优选密封条是透明的。更优选,它可以粘贴到载体上而不会妨碍其性质。优选的密封条包括塑料多层涂层,优选本身有粘性。

[0075] 为提供刚性,优选将多孔载体放置在固体的无孔支撑体上。可以采用任何适宜的支撑材料,其不会妨碍载体的功能属性。适宜的支撑材料包括聚乙烯,聚丙烯,聚(4-甲基丁烯),聚苯乙烯,聚(对苯二甲酸乙二酯),尼龙,聚(丁酸乙烯酯),玻璃,陶瓷,金属,等等。

[0076] 优选地,并且尤其是本发明旨在由非专业人员使用的情况下,多孔载体可以容纳在装置或容器中,优选是手持的。装置优选全方位包围载体,同时容许试剂/样品施加到载体并且使任何凝集可见。因此,优选装置包含至少 1 个,优选 2 个或多个孔,容许看到检测区域并且能够暴露施加区域的载体。在一些优选实施方式中,载体可以从装置的施加区域延伸,因此有利于试剂/样品的施加。该装置还可以包含孔,或其它样品接受容器,与施加区域流体连通。或者,该装置可以包含容许与单独的容器接合的器。

[0077] 该装置可以由任何适宜的材料制成,优选是刚性的,防水的,不可渗透的,轻质的,和/或不包含使蛋白质变性的成分(如氰化物),否则装置的功能可能会受到损害。优选地,该装置由塑料材料制成。优选地,该装置是一次性使用类型的装置,因此它用于进行一次分析,之后丢弃。

[0078] 该装置可以包含一种或多种执行分析的多孔载体,例如当需要在单个装置中检测多个分析物时。当提供有两种或更多种载体时,它们可以相互并排平行运行,使得容易视觉监测流动,或从共同的样品施加区域呈放射状布置,等等。可以提供一种或多种额外的载体作为对照通路。

[0079] 检测优选通过看到(即用肉眼)由于含有可检测颗粒的凝集物的聚集引起的在检测区域的条带或信号。这能够快速阅读结果,并且避免了对辅助设备例如读数器和信号处理器的需要。也可以采用非视觉检测手段,并且包括分光光度测定法,荧光测定法,等等。后者减少了人为错误的影响,并且在护理现场的环境下,意味着不需要使用者在分析进行期间持续监测。此外,结果是永久的和稳定的。

[0080] 当采用非视觉检测方法时,则可能会需要检测器(如反射计,荧光计,等等)和信

号处理器。

[0081] 当采用视觉检测手段时,结果可以提供为有色彩的信号(例如以检测区域中的线的形式,优选是肉眼可见的)。当然,信号的性质取决于使用的标记和/或可检测颗粒。还提供是/否的指示,信号的强度和大小可以用于对结果定量,例如通过使用读数器(电子的或别的方式,带有任何相关的信号处理器)或,更简单地,通过参考标准曲线。合适的方法包括测量信号的反射比或吸收度,或将信号与标准曲线比较,例如给出了任何给定色彩的强度范围的色彩曲线,并且所述色彩曲线可能根据存在的分析物的量进行分级。

[0082] 可以提供流体以辅助试剂/样品沿多孔载体的流动,或增加反应体积,或提供额外的试剂如电解质。缓冲液可以与试剂/样品一同加入,或单独加入,包括在反应开始之后(追加缓冲液)。适宜的流体包括缓冲液如 PBS pH7.4,以及生理盐水。

[0083] 相应地,本发明提供一种用于进行凝集分析的试剂盒,供检测样品中分析物用,该试剂盒包含:

[0084] i. 结合两个或更多个第一结合伴侣的中心,每一个第一结合伴侣能够结合分析物的第一个表位;

[0085] ii. 包含第二结合伴侣的部分,所述第二结合伴侣结合或能够结合第二个表位,其中所述部分也结合或能够结合可检测颗粒。

[0086] 在本发明的一个实施方式中,包含第二结合伴侣的部分进一步包含能够结合可检测颗粒的第三结合伴侣。优选地,所述部分由第二结合伴侣的偶联物组成,所述第二结合伴侣能够结合分析物的第二表位和能够结合可检测颗粒的第三结合伴侣。在一个优选的实施方式中,第二和第三结合伴侣是经修饰的抗体,或其有功能的抗原结合片段。

[0087] 在一个可选择的实施方式中,第二结合伴侣直接结合可检测颗粒或它能够如此。因此这种情况下该试剂盒包含

[0088] i) 两个或更多个第一结合伴侣结合的中心,每个第一结合伴侣能够结合分析物的第一个表位;

[0089] ii) 能够结合分析物的第二表位并结合或能够结合可检测颗粒的第二结合伴侣。

[0090] 在一个优选的实施方式中,分析物的第一和第二个表位是不同的,更优选表位位于分析物的不同结构域上。还优选第二结合伴侣将分析物的不同表位与被相应的第一结合伴侣靶定的表位相结合。优选第二表位对分析物有特异性。

[0091] 在第一个高度优选的实施方式中,试剂盒是侧流的形式并且包含多孔载体。进一步优选多孔载体是固体基质,最优选纤维性基质。有利的是,多孔载体包含的检测区域的孔径阻止凝集物向所述检测区域的下游移动。优选所述检测区域上游的孔径足以容许中心、第二结合伴侣、样品和任何凝集物的自由移动。

[0092] 优选地,该试剂盒用于检测单个样品内的第一、第二和其它的分析物,包含两个或更多个第一结合伴侣,每一个都能够结合第一、第二和其它分析物中的一个,以及两个或更多个第二结合伴侣,每一个都能够结合所述第一、第二和其它分析物中的一个并且每个第二结合伴侣结合或能够结合可检测颗粒。更优选每个第二结合伴侣结合或能够结合不同的可检测颗粒。

[0093] 优选前述的中心包含第一结合伴侣能够结合的稳定的载体,并且在高度优选的实施方式中,该中心是可溶的。更优选该中心由蛋白质或多糖构成,并且最优选它含有氨基葡

聚糖或其衍生物。

[0094] 或者,中心是一个不溶的部分,优选血红细胞,聚苯乙烯乳胶珠,胶体金,或不溶的大分子。

[0095] 优选前述的结合伴侣选自单克隆或多克隆抗体,抗原,蛋白质,酶,受体,适配体,寡核苷酸,糖,及其片段。

[0096] 高度优选可检测颗粒是可凝集的颗粒并且进一步优选所述可凝集的颗粒包括在该试剂盒中。在一个优选的试剂盒的实施方式中,所述部分包含能够结合分析物的一个表位的第二结合伴侣,还包含能够结合可凝集颗粒(优选血红细胞)上的血型糖蛋白分子的第三结合伴侣。

[0097] 或者,可检测颗粒是微生物,细胞,大分子,金属胶体颗粒,珠子,炭,高岭土或膨润土。优选是胶体金颗粒。

[0098] 在一个可选择的实施方式中,该试剂盒进一步包含反应装置。优选该反应装置是毛细管检测装置,并且可进一步优选包含 2 个通路。还优选每一个通路包含上游和下游端,并且其中在上游端提供有一个区域用于施加样品和试剂。一种或这两种试剂可以在制造期间预先施加到毛细管设备的通路中。

[0099] 该试剂盒可以进一步包含一种或多种检测器、信号处理器、显示器和电源,其可以是反应装置的整合部分。

[0100] 本发明的另一个方面,提供了一种分析方法,其中,如前文所述,样品与中心和偶联结合分子接触,并且检测流动的阻滞。如果试剂组不是在毛细管通路中预先放置并且干燥的,它们和样品可以作为混合物或分别加入到反应装置。在前一种情形,在将混合物加入到毛细管通路之前,混合物可以短时间孵育,例如 1-6 分钟,优选 2-5 分钟。当使用追加缓冲液时,它可以在另一个短的时间间隔如 2 分钟后加入。为了确定流速,反应的计时优选地从加入缓冲液时开始。经过一段预定的时间之后,假定任何的凝集反应已经发生并且任何对照都已经到达毛细管通路的下游端。此时可以获取显示装置上的读数。

[0101] 相应地,提供了用于检测样品中分析物的凝集分析,所述分析包含的步骤是:

[0102] i 样品接触

[0103] a) 结合两个或更多个第一结合伴侣的中心,每个结合伴侣能够结合分析物的第一个表位;

[0104] b) 包含能够结合分析物的第二个表位的第二结合伴侣的部分,其中所述部分结合或能够结合可凝集的颗粒;和

[0105] c) 可检测颗粒;

[0106] ii 使所述中心、包含第二结合伴侣的部分、样品和可检测的颗粒反应;和

[0107] iii 检测中心、偶联物、可凝集颗粒和分析物的凝集。

[0108] 优选,能够结合第二表位的所述部分结合可检测颗粒。或者它包含第二结合伴侣并且进一步包含一个能够结合可检测颗粒的第三结合伴侣。在这种情况下,优选包含所述第二和第三结合伴侣的偶联物。

[0109] 在一个实施方式中,可凝集颗粒天然存在于样品中并且优选是血红细胞。试剂和样品可以在加入反应装置之前混合,并且在预定时间后接着施加缓冲液。此外优选地是通过显示装置显示结果,所述结果在预定时间段后读出。

[0110] 在一个示范的实施方式中,本发明提供了用于检测样品中分析物的凝集分析,该分析包含的步骤是:

[0111] i 将多孔载体与结合有两个或更多个第一结合伴侣的中心,每个第一结合伴侣能够结合分析物的第一个表位;能够结合分析物的第二个表位并且结合或能够结合可检测颗粒的第二结合伴侣;样品;和/或任选的可检测颗粒接触;

[0112] ii 使所述中心、第二结合伴侣、样品和任选的所述可检测颗粒反应;和

[0113] iii 检测中心、第二结合伴侣和分析物在多孔载体中的凝集,其中凝集指示了样品中分析物的存在和/或量。

[0114] 优选地,在分析开始之前,将中心、第二结合伴侣、样品和/或可检测颗粒施加到多孔载体。高度优选通过看到条带或信号来检测凝集。

[0115] 本发明的第三个方面,提供了用于凝集分析的装置,包含的多孔载体具有用于接受样品的近端以及样品沿着多孔载体流向的远端,其中多孔载体包含干的、可复水(reconstitutible)形式的中心,其结合有两个或更多个第一结合伴侣,每个第一结合伴侣能够结合分析物的第一个表位。

[0116] 本发明的试剂盒可以作为一个包装提供,其可包含一个单独的反应装置和单次分析用的充足试剂,例如用于护理现场的环境。或者,可以提供多个装置和用于相同数目的分析的充足的试剂。优选,在这种情况下,每次分析的试剂单独包装。任选上述提到的材料和器械可以包含在试剂盒中,例如缓冲液,可检测颗粒,施加器(如移液管),说明书,记录纸,干燥剂,对照样品,染料,电池和/或信号处理/显示器。

[0117] 最后,本发明提供了用于凝集分析以检测样品中分析物的装置,该装置包含的多孔载体具有用于接受样品的近端以及样品沿着多孔载体流向的远端,其中多孔载体包含干的、可复水形式的中心,所述中心结合有两个或更多个第一结合伴侣,每个第一结合伴侣能够结合分析物的第一个表位。

[0118] 优选该装置包含第二结合伴侣、可检测颗粒、和/或其它预先施加到多孔载体中的其它试剂,优选以干的、可复水的形式,并且容纳在优选能够手持的装置或容器中。

[0119] 本发明适于检测体液样品,例如尿液,全血,血液成分如血浆,精液,汗液,唾液,羊膜液,脑脊液,胸膜液,齿龈液,囊肿提取物,以及组织提取物。优选的是尿液和血液样品。当分析血液样品时,血液必需处理以防止凝固。

[0120] 整个本说明书的说明部分和权利要求,词汇“包含(comprise)”和“含有(contains)”及所述词汇的变化形式,例如“包含(comprising)”和“包含(comprises)”,意思是“包括但不限于”,并且不是为了(也没有)排除其它的部分,添加剂,成分,整数或步骤。

[0121] 整个本说明书中说明部分和权利要求,除非文中另有要求,单数包含有复数。特别是,当使用不定的物品时,除非文中另有要求,说明书应当理解为虑及复数和单数。

[0122] 结合本发明的具体方面、具体实施方式或实施例描述的特征、整数、特点、化合物、化学部分或基团应理解为可适于这里所述的任何其它方面、具体实施方式或实施例,除非其不相容。

[0123] 附图简要说明

[0124] 本发明将通过如下的非限定性实施例,并且参考附图进行说明,其中:

[0125] 图 1 显示了使用湿试剂的测试用膜条带的组件。标记的部分是：1, 吸液芯；2, 凝集物捕集膜；3, 吸收槽；4, 粘贴面朝上的自粘性塑料。

[0126] 图 2 显示了使用干燥的试剂的测试用膜条带的组件。标记的部分是：1, 吸液芯；2, 凝集物捕集膜；3, 吸收槽；4, 粘贴面朝上的自粘性塑料；5, 含有干燥的试剂的垫子。

[0127] 图 3 展示了一个膜条带的示例。标记的部分是：1, 覆盖整个膜条带的多层密封条；2, 用 Tween®处理过的吸收芯 GFD；3, 吸液芯 (Ahlstrom grade 8964)；4, Fusion 5 捕获膜；5, 含有干燥的试剂的试剂释放垫。

[0128] 图 4 显示了本发明的一个方面的示意图, 基于中心 (1) 的凝集分析, 展示第一结合伴侣 (2, 例如抗人绒毛膜促性腺激素或抗 hCG), 能够结合分析物 (3, 例如 hCG, 包括 α 和 β 亚单位) 的第一个抗原表位, 部分 (4) 包含能够结合分析物的第二表位的第二结合伴侣以及能够结合可检测颗粒的第三结合伴侣在一起的偶联物, 在这种情况下, 红细胞 (5) 带有第三结合伴侣特异结合的血型糖蛋白抗原决定簇。所有部分于是构成了稳定的凝集产物。

[0129] 图 5 显示了来自如实施例 15 所详细描述的使用可溶性中心和抗体结合物的分析结果。

[0130] 实施例

[0131] 实施例 1. 可溶性中心试剂 1 的制备

[0132] 1. 使用 $1.6 \times 15\text{cm}$ 的 G25M 葡聚糖凝胶柱, 将抗 hCG (α 亚单位) 脱盐到 pH7.5 的 0.1M 磷酸盐缓冲液中, 并测定浓度和收率。

[0133] 2. 使用 8 摩尔当量的 NHS-PEG-MAL 激活抗 hCG 抗体。将反应混合物在 20°C 孵育 2 小时。用 100 摩尔当量的甘氨酸淬灭反应, 并用两次过 $1.6 \times 15\text{cm}$ 的 G50F 葡聚糖凝胶柱, 将马来酰亚胺激活的抗 hCG 脱盐到 pH7.3 的 5mMEDTA, PBS 缓冲液中。测定激活的抗体的浓度和收率。

[0134] 3. 用 1000 摩尔当量的 2-亚氨基硫醇 (2-IT) 活化 500KD 的氨基葡聚糖。将反应混合物在 20°C 孵育 110 分钟。用 G25M 葡聚糖凝胶介质, 将硫醇激活的氨基葡聚糖脱盐到 pH7.3 的 5mM EDTA, PBS 缓冲液中。用 Ellman 分析测定硫醇: 氨基葡聚糖的掺入率。

[0135] 4. 将 25 摩尔当量的马来酰亚胺活化的抗 hCG 抗体加入到硫醇激活的氨基葡聚糖中, 并将反应混合物在 15°C 孵育 16 小时。用 1000 当量的 N-乙基马来酰亚胺淬灭反应。在 $2.6 \times 50\text{cm}$ 的 superdex 200 柱上用 pH7.2 的 50mPBS 缓冲液作为洗脱液纯化偶联物。测定偶联物的浓度和收率, 然后用 $0.2\mu\text{m}$ 的 Ministar 过滤器进行过滤。

[0136] 实施例 2. 可溶性中心试剂 2 的制备

[0137] 1. 使用 $1.6 \times 15\text{cm}$ 的 G25M 葡聚糖凝胶柱, 将抗 hCG (α 亚单位) 脱盐到 pH7.5 的 0.1M 磷酸盐缓冲液中, 并测定浓度和收率。。

[0138] 2. 使用 8 摩尔当量的 NHS-PEG-MAL 激活抗 hCG 抗体。将反应混合物在 20°C 孵育 2 小时。用 100 摩尔当量的甘氨酸淬灭反应, 并用两次过 $1.6 \times 15\text{cm}$ 的 G50F 葡聚糖凝胶柱, 将马来酰亚胺激活的抗 hCG 脱盐到 pH7.3 的 5mM EDTA, PBS 缓冲液中。测定激活的抗体的浓度和收率。

[0139] 3. 用 1000 摩尔当量的 2-亚氨基硫醇 (2-IT) 激活一个 500KD 的氨基葡聚糖。将反应混合物在 20°C 孵育 110 分钟。用 G25M 葡聚糖凝胶介质, 将硫醇激活的氨基葡聚糖脱盐到

pH7.3 的 5mM EDTA, PBS 缓冲液中。用 Ellman 分析测定硫醇：氨基葡聚糖的掺入率。

[0140] 4. 将 25 摩尔当量的马来酰亚胺激活的抗 hCG 抗体加入到硫醇激活的氨基葡聚糖中并将反应混合物在 15°C 孵育 16 小时。

[0141] 5. 使用 8 摩尔当量的 mPEG-SMB (10KD), 以“PEG”基团包覆偶联体。将反应混合物在 20°C 孵育 2 小时。用甘氨酸和 N-乙基马来酰亚胺淬灭反应。在 2.6×50cm 的 superdex 200 柱子上用 pH7.2 的 50mMPBS 作为洗脱液纯化偶联物。测定偶联物的浓度和收率, 然后过滤通过 0.2 μm 的 Ministar 过滤器。

[0142] 实施例 3. 使用湿试剂制备用于测试的膜条带

[0143] 膜材料被切成如下尺寸：

[0144] (i) 吸液芯, 例如 Surewick G028-14 (Millipore), 30mm×60mm。

[0145] (ii) 凝集物捕集膜, 例如 Fusion 5 (Whatman), 5mm×60mm。

[0146] (iii) 吸收槽, 例如 Absorbent Pad 222 (Ahlstrom), 55mm×60mm。

[0147] (iv) 自粘性塑料 (×2)

[0148] 例如具有 D/C 亲水性 PSA 的 0.04” Clear 聚酯 (G&L) 70mm×100mm。

[0149] 由上述材料的复合“卡片”组装成如图 1 所示。为确保条带的连续部分之间良好的液体运送, 毗邻的膜材料重叠大约 1mm。第二片自粘性塑料被牢固地施加到上表面。显示结果的“卡片”被切片成 5mm 的条带并且塑料被修整以容许试剂和样品进入到吸液芯。

[0150] 实施例 4. 含有干燥的试剂的膜条带的制备

[0151] 下列试剂混合物被移液到偶联物释放垫的条带 (例如 Ahlstrom8964) 上, 所述条带据测为 6mm×50mm。

[0152] 75 μl 抗 hCG 免疫金 (B. A. bHCG40, BBI)

[0153] 50 μl 抗 hCG 中心试剂 (制备如实施例 1 或 2 所描述)

[0154] 42 μl 1M Tris-HCl pH8.2, 20%海藻糖

[0155] 条带在 28°C 下干燥过夜。

[0156] 吸收槽材料 (GF/D, Whatman) 在 0.1% 的 tween 20 溶液中浸泡。过量的流体通过吸收纸之间的排放和吸出去除, 然后经处理的槽在 28°C 下干燥过夜。

[0157] 膜材料被切成如下尺寸：

[0158] (i) 吸液芯 (×2),

[0159] 例如偶联物释放垫 8964 (Ahlstrom), 7mm×50mm。

[0160] (ii) 凝集物捕集膜, 例如 Fusion 5 (Whatman), 5mm×50mm。

[0161] (iii) 吸收槽, 例如 Tween 处理的 GF/D (Ahlstrom), 50mm×50mm。

[0162] (iv) 自粘性塑料 (×2)

[0163] 例如含有 D/C 亲水性 PSA 的 0.04” Clear 聚酯 (G&L), 80mm×60mm。

[0164] 上述材料的复合“卡片”如图 2 所示组装。为确保条带的连续部分之间良好的液体运送, 毗邻的膜材料重叠大约 1mm。第二片自粘性塑料被牢固施加在上表面。显示结果的“卡片”被切片成 5mm 的条带并且塑料被修整以容许试剂和样品进入到吸液芯。

[0165] 实施例 5 用湿试剂的 hCG 测试

[0166] 下列试剂混合物在微量离心管中混合, 然后施加到膜条带的吸液芯端 (制备如实施例 3 所描述)。

[0167] 5 μ l 抗 hCG 免疫金 (B. A. bHCG40, BBI)

[0168] 5 μ l 抗 hCG 中心试剂 (制备如实施例 1 所描述)

[0169] 条带的吸液芯端被浸入到 250 μ l 0.01M PBS pH7.4, 含有 0-25IU/mlhCG 的 0.1% BSA 中, 条带方向垂直 (hCG 浓度值对照第四版 I. S., NIBSC 指定)。当测试完成, 即流体已经到达条带的顶部, 将凝集物捕集膜的彩色信号与标准彩色曲线 (DuLux 色彩范围 FR4, 50RR83/040-62RR21/444) 比较并且在 +/- 到 +++++ 的尺度上赋予信号一个值。获取数码照片, 以记录刚刚进行的测试的外观。

[0170] 获得下列结果:

[0171] 表 1

[0172]

HCG 浓度 mIU/ml	信号
0	+/-
250	+
5000	+
25000	++

[0173] 实施例 6. 用干燥的试剂 (中心试剂 1) 的 hCG 测试

[0174] 使用中心试剂 1 (见实施例 1), 如实施例 4 所描述制备含有干燥的试剂的膜条带。测试的进行是通过将每一条带的吸液芯端浸入到含有 0-25IU/ml hCG 的模拟样品 (合成的尿液) 中, 并且使条带方向垂直来运行 (hCG 浓度值对照第四版 I. S., NIBSC 指定)。

[0175] 当测试完成, 即流体已经到达条带的顶部, 将凝集物捕集膜的彩色信号与标准彩色曲线 (DuLux 色彩范围 FR4, 50RR83/040-62RR21/444) 比较并且用在 +/- 到 +++++ 的尺度上赋予信号一个值。获取数码照片, 以记录刚刚进行的测试的外观。

[0176] 获得下列结果:

[0177] 表 2

[0178]

HCG 浓度 mIU/ml	信号
0	+/-
25	+
250	+
1000	++
5000	++

25000	+++
-------	-----

[0179] 实施例 7. 用干燥的试剂 (中心试剂 2) 的 hCG 测试

[0180] 使用中心试剂 2 (见实施例 2), 含有干试的试剂的膜条带如实施例 4 所描述制备。测试的进行如实施例 6 所描述。获得下列结果:

[0181] 表 3

[0182]

HCG 浓度 mIU/ml	信号
0	+/-
25	+
250	+
1000	+++
5000	+++
25000	+++

[0183] 实施例 8. hCG 测试的总结

[0184] 免疫金以及抗 hCG 中心试剂的混合物与缓冲液 / 添加剂预混合并移液到试剂释放垫 (例如 Ahlstrom 8964) 的条带上, 所述条带测量为 6mm × 50mm。条带与干燥剂和湿度指示卡一起放置在密封的容器中, 并且使其在 28°C 下干燥过夜。

[0185] 试剂释放垫的条带、捕获膜、多层密封条和吸收槽用裁纸刀切割成一定大小。膜卡片被装配到多层密封条的胶水面, 相邻条带部分重叠 1mm (见图 2)。第二片多层密封条用于将膜条带完全密封。

[0186] 产生的膜卡片被用剪刀仔细剪成 5mm 宽的条带, 确保吸收槽周围的层压不会弹开。

[0187] 待测的 250 μl 等份的 hCG 溶液 (模拟尿样品) 被移液到微量滴定板的孔中。为膜条带的试剂释放垫端浸入到 hCG 溶液中, 保持条带垂直对准。使溶液运行到膜条带的最末端。对每一个待测的 hCG 浓度, 重复本步骤。用过的膜条带放置到一片 Whatman 滤纸上以清楚地看到信号。信号强度的赋值如实施例 5 中描述, 并且获取数码照片。然后将滤纸放置在组织培养皿中并放在 28°C 下干燥。

[0188] 实施例 9.

[0189] (i) 使用 G25M 葡聚糖凝胶介质, 将抗 hCG β 和抗血型糖蛋白抗体脱盐至 pH7.5 的 0.1M 磷酸盐缓冲液中。

[0190] (ii) 在抗血型糖蛋白抗体中加入 8 摩尔当量的 4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷羧酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (SMCC), 并且反应在 20°C 下孵育 70 分钟。使用 100 摩尔当量的甘氨酸淬灭反应, 并且马来酰亚胺激活的抗血型糖蛋白抗体用 G25M 葡聚糖凝胶介质脱盐至 pH6.5 的 0.5mM EDTA, PBS 缓冲液中。

[0191] (iii) 2.0 摩尔当量的 N- 琥珀酰亚胺基 S- 乙酰基硫代乙酸酯 (SATA) 被加入到抗 hCG 抗体中, 并且反应混合物在 20°C 下孵育 75 分钟。使用 50mM EDTA, 2.5M pH7.0 的羟胺缓冲液淬灭反应。使用 G25M 葡聚糖凝胶介质脱盐将硫醇激活的抗 hCG 抗体脱盐至 pH6.5 的 5mMEDTA, PBS 缓冲液中, 并测定硫醇: 抗体的掺入率。

[0192] (iv) 将 5 摩尔当量的硫醇激活的抗 hCG 抗体加入到马来酰亚胺激活的抗血型糖蛋白抗体, 并将混合物在 2-8°C 孵育 17 小时。反应混合物用 N- 乙基马来酰亚胺淬灭, 在 Superdex 200PG 介质上用 pH7.2 的 10mM PBS 缓冲液作为洗脱液, 纯化抗血型糖蛋白: 抗 hCG 偶联物。通过 280nm 紫外吸收测定偶联物的浓度, 加入 Prolin 300 至 1% (w/w) 并将偶联物过滤至 0.2 μm。

[0193] 实施例 10. 利用不溶的中心 (乳胶颗粒) 制备试剂 3

[0194] (i) 混合之下, 在 pH7.4 的含有 20% 乙醇的 10mM 磷酸盐缓冲液中 2 小时, 抗 hCG α 抗体以 10 倍的表面结合能力被动吸附到 3 μm 的聚苯乙烯乳胶微球上混合。

[0195] (ii) 过剩的表面结合位点用 1% 的 BSA 经 1 小时封闭。

[0196] (iii) 微球在 7000×g 离心 10 分钟成沉淀团, 然后在乳胶稀释缓冲液 (HEPES pH7.4) 中洗 3 次。

[0197] (iv) 抗体吸附通过碱性磷酸酶分析结合 hCG- 碱性磷酸酶偶联物确定, 以及通过与抗 hCG β 乳胶和 hCG 混合的载玻片凝集分析确定。

[0198] 实施例 10. 利用可溶的中心 (链霉亲和素复合物) 制备试剂 3

[0199] (i) 链霉亲和素和生物素化的抗 hCG 抗体在 10mM PBS pH7.4/0.1% BSA 中混合并在 4°C 孵育 2 小时以形成复合物。

[0200] 实施例 11. 制备毛细管检验装置的方法

[0201] 在试剂放入之前, 通过在 50% 乙醇中超声清洗, 然后在 Tween 20 溶液中洗涤, 以使表面亲水, 来制备 WO200408359 中公开的毛细管装置。使用之前, Tween 处理的检测装置被干燥并用压敏胶带密封。

[0202] 实施例 12. 进行载玻片凝集检验的方法

[0203] 将人血 (20 μl, 掺入所需浓度的 hCG) 与相同体积的可溶性“中心”复合物 (试剂 3, 实施例 3) 以及 5 μl 试剂 1 (0.1mg/ml) 混合。2-5 分钟后转移 20 μl 混合物到玻璃显微镜载玻片上并摇动 / 转动 30 秒钟。反应混合物放大 100 倍观看, 并评定凝集的程度。

[0204] 获得下列结果:

[0205] 表 4

[0206]

hCG 浓度	凝集强度
0mIU/ml	+/-
570mIU/ml	+
5,700mIU/ml	+++

[0207] 实施例 13. 使用不溶性中心试剂的毛细管凝集检验

[0208] 毛细管装置依照实施例 4 制备。

[0209] 试剂 1 依照实施例 1 制备。

[0210] 试剂 3 依照实施例 2 制备。

[0211] 反应混合物的集合如下：

[0212] 60 μ l 3% 的抗 hCG α 乳胶悬浮液（试剂 1）

[0213] 60 μ l 含有 hCG 的人类全血

[0214] 15 μ l 抗体偶联物 (99ng/ μ l) (试剂 3)

[0215] 反应混合物孵育 2-5 分钟，然后手动移液 20 μ l 导入到检测装置的流体贮存器的毛细管入口。随后通过毛细管力，将流体混合物吸入每一个毛细管径路的起始端。在向检测装置的流体贮存器加入 0.5ml pH7.4 的“追加缓冲液”之前，启动计时器并让其经过 2 分钟。在加入“追加缓冲液”时启动第二个计时器，并测量流体混合物到达毛细管装置末端所用的时间。

[0216] 实施例毛细管运行时间 vs hCG 浓度如下表所示。对于每一个 hCG 浓度 $n = 12$ 。

[0217] 来自“离线”实验的初步数据：

[0218] 表 5

[0219]

hCG 浓度	平均毛细管运行时间
0IU/ml	96.3 秒
0.57IU/ml	102.2 秒
5.7IU/ml	117.6 秒

[0220] 实施例 14. 使用可溶性中心的毛细管凝集检验

[0221] 试剂 1 依照实施例 1 制备。

[0222] 试剂 3 依照实施例 3 制备。

[0223] 毛细管装置依照实施例 4 制备，除了在用压敏胶带密封之前，试剂 1 和 3 沉积于该装置的检测毛细管径路中并在原位干燥。没有试剂放置在对照径路中。装置的密封如 W0200408359 中描述，并封闭以备用。

[0224] 进行本发明的反应的方法和步骤如下：

[0225] (i) 将 20 μ l 人类血液（掺入需要浓度的 hCG）导至制备好的检测装置的毛细管的起始端。（流体在毛细作用下被引到通路的第一个 10cm- 每个通路大约 10l）

[0226] (ii) 2 分钟后，向装置的流体贮存器加入 0.5ml PBS。（这引起了毛细管流动的恢复）

[0227] (iii) 记录从加入 PBS 到流体到达毛细管径路的末端所用的时间。

[0228] 获得的结果如图 5 所示：

[0229] 如图 5 所示，在两个分别的实验中，当血液样品 ($n = 12$) 中有 hCG 时，毛细管运行时间平均慢了 87 (实验 1) 和 141 (实验 2) 秒。

[0230] 本说明书中全部说明和权利要求，词汇“包含 (comprise)”和“含有 (contain)”及这些词汇的变化，例如“包含 (comprising)”和“包含 (comprises)”，意思是“包括但不限于”，并且不是为了（也没有）排除其它的部分，添加剂，成分，整数或步骤。

[0231] 本说明书中全部说明和权利要求,除非文中另有要求,单数包含有复数。特别地,当使用不定的物品时,除非文中另有要求,说明书应当理解为虑及复数和单数。

[0232] 结合本发明的具体方面、实施方式或实施例描述的特征、整数、特点、化合物、化学部分或基团应理解为可应用于这里所述的任何其它方面、实施方式或实施例,除非其不相容。

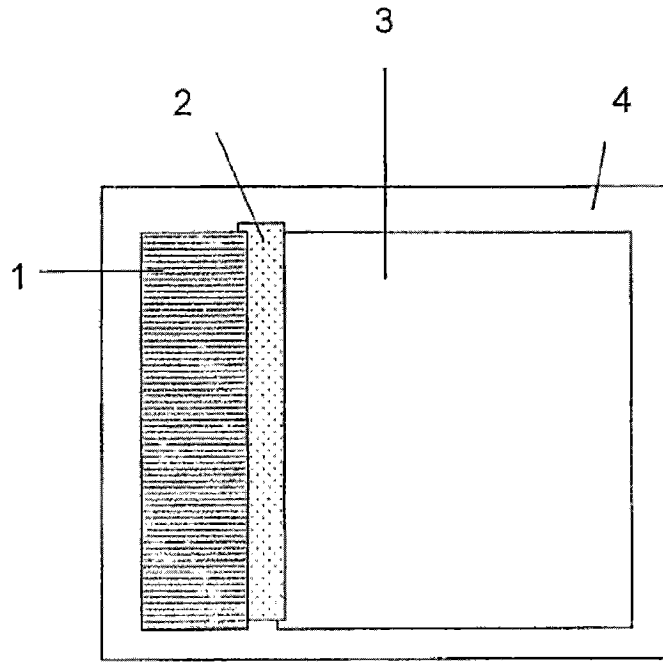


图1

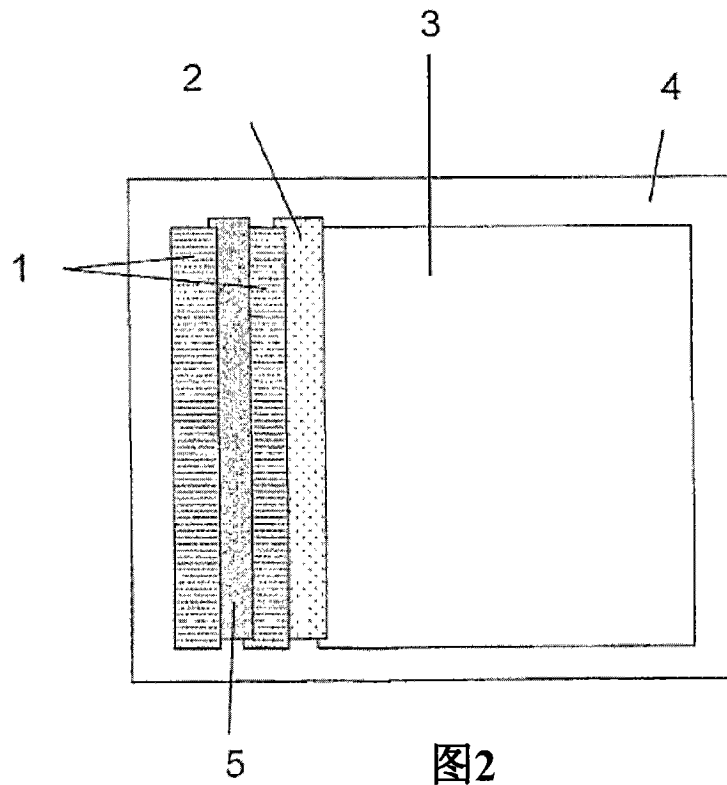


图2

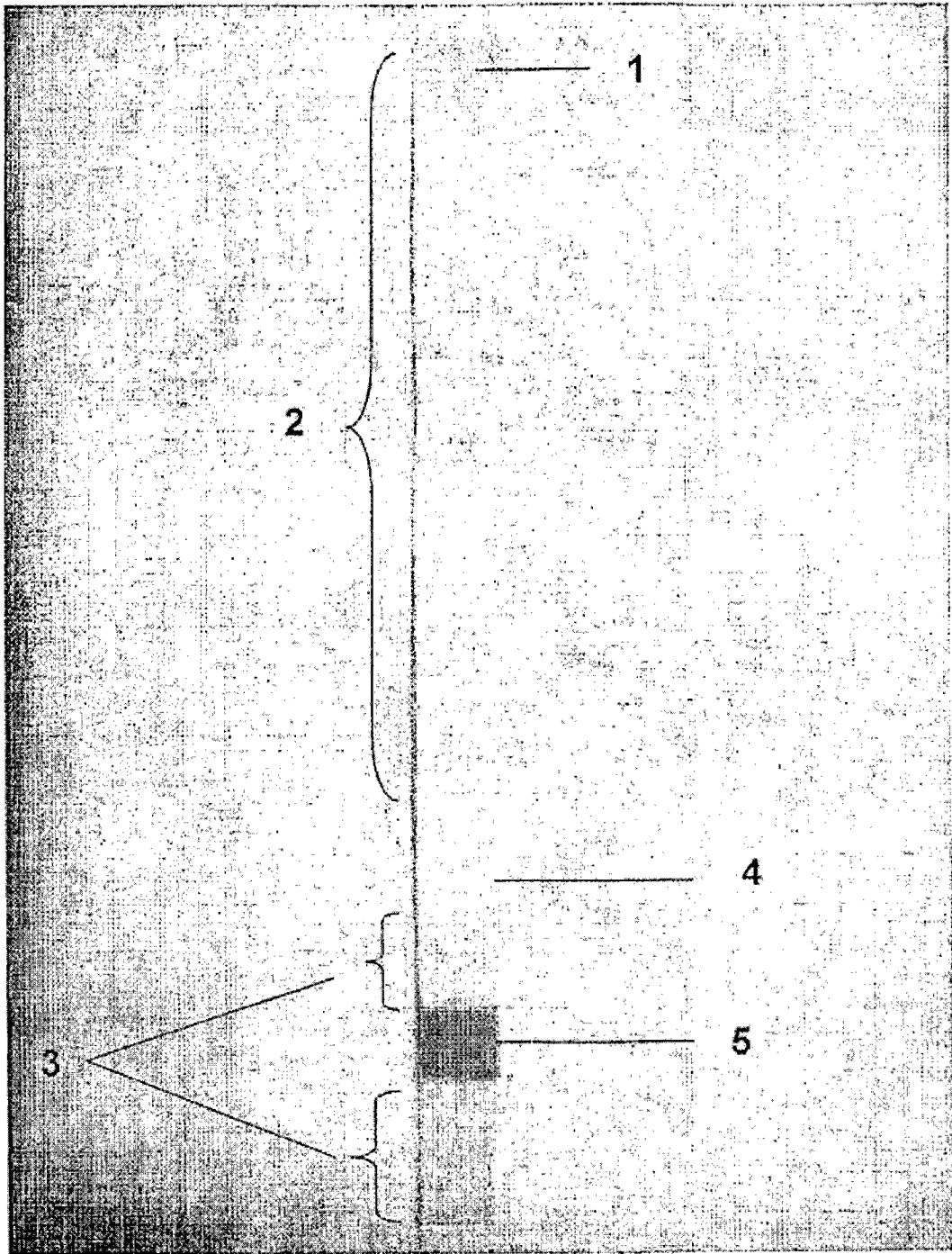


图 3

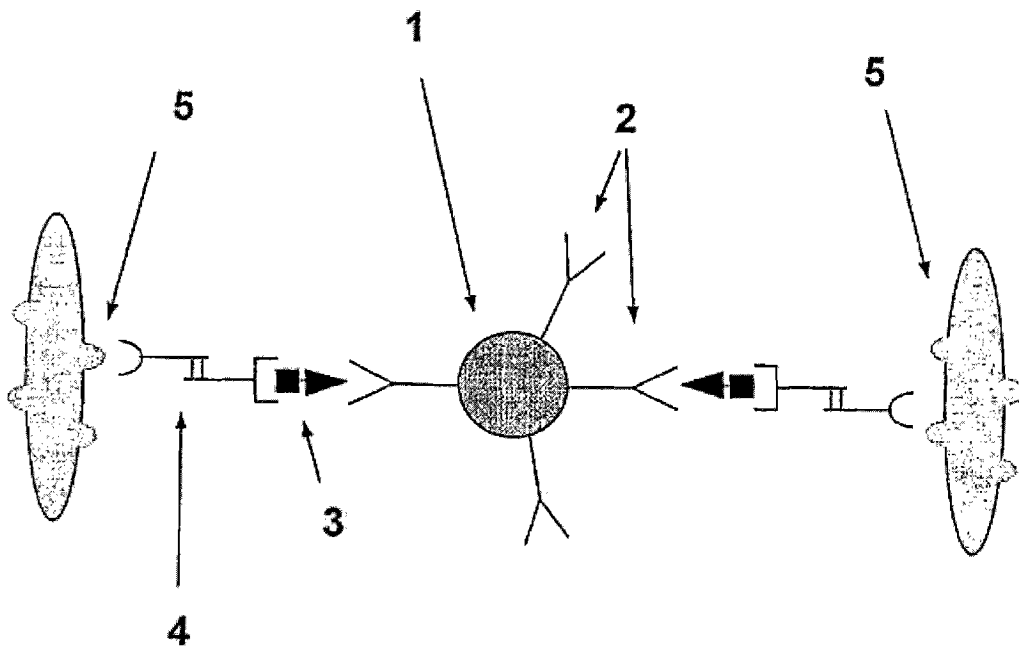


图 4

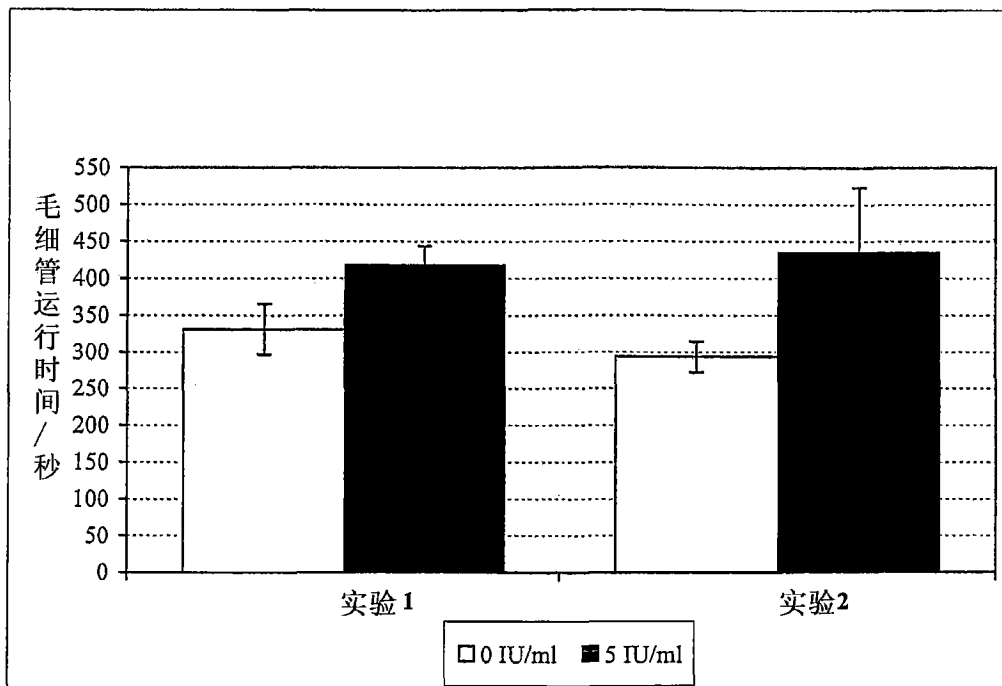


图 5

专利名称(译)	凝集分析法		
公开(公告)号	CN101305282B	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN200680042072.6	申请日	2006-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	平台诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	平台诊断有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	平台诊断有限公司		
[标]发明人	卡罗林珍妮弗拉德尔 杰拉德约翰阿兰 道格拉斯罗伯特艾文斯 伊丽莎白加纳尔		
发明人	卡罗林·珍妮弗·拉德尔 杰拉德·约翰·阿兰 道格拉斯·罗伯特·艾文斯 伊丽莎白·加纳尔		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/548		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/54306		
代理人(译)	杨青		
审查员(译)	王晓媛		
优先权	2006010973 2006-06-03 GB 2005023124 2005-11-12 GB		
其他公开文献	CN101305282A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及凝集分析法及相关试剂盒、试剂和装置。特别是公开了分析拥有不多的表位的小分析物的方法，所述方法使用了多个分析物可能通过第一个表位结合的中心部分，以及能够结合的第二个分析物表位并且也能够结合可检测颗粒的另外的部分。由此可能会形成稳定的凝集复合物，其可以作为各种分析形式的基础。

