



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110850081 A

(43)申请公布日 2020.02.28

(21)申请号 201911106057.9

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2015.03.06

G01N 33/558(2006.01)

(30)优先权数据

G01N 33/543(2006.01)

61/949,887 2014.03.07 US

G01N 33/532(2006.01)

61/953,870 2014.03.16 US

(62)分案原申请数据

201580023439.9 2015.03.06

(71)申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 D·T·卡梅 Y·T·赵 B·M·吴

G·L·莫斯利

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

11127

代理人 庞东成 张培源

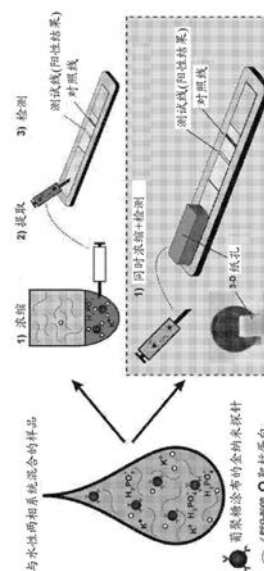
权利要求书3页 说明书77页 附图73页

(54)发明名称

用于整合分析物提取、浓缩和检测的装置

(57)摘要

本文公开用于整合分析物提取、浓缩和检测的装置和方法,其为使用水性两相系统和侧流分析来检测样品中的靶标分析物的装置和方法。这些装置和方法可用于诊断如血液或血清的生物样品中的疾病或病况。另外,这些装置和方法可用于检测食物样品或污染物(如环境毒素)、水样品中的过敏原。装置和试剂盒组件可便利地组装于便携式容器中并且可接受大多数设定中的致动。所述装置使用简单,需要未受训练的操作者简单地将样品添加至所述装置中。便利地,其检测所述靶标分析物所耗用的时间极短。因此,本文公开的装置和方法提供用于即时检验的新颖并且适用的方式。



CN 110850081 A

1. 一种用于浓缩样品中靶标分析物的纸流体装置,所述纸流体装置包括:
  - a. 多孔基质;和
  - b. 水性两相系统(ATPS)或其组分,其安置在所述多孔基质上或所述多孔基质中,  
其中,所述多孔基质被配置成当所述ATPS或其组分呈流体相时允许所述ATPS或其组分流动通过所述多孔基质并且具有充足的孔隙率以允许所述ATPS或其组分流动通过所述多孔基质,并且其中所述ATPS在水合时包含混合相溶液,所述混合相溶液在通过所述多孔基质时分离成为第一相溶液和第二相溶液。
2. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,所述ATPS或其组分选自第一相溶液、第二相溶液和混合相溶液组成的组,其中所述混合相溶液包含所述第一相溶液和所述第二相溶液的混合物。
3. 如权利要求2所述的纸流体装置,其中,所述ATPS或其组分在所述多孔基质的至少第一部分上和/或至少第一部分中脱水。
4. 如权利要求3所述的纸流体装置,其中,其中所述多孔基质的第一部分具有与所述多孔基质的第二部分不同的宽度。
5. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,构造所述装置从而使在对所述装置施加所述样品时将所述ATPS水合,由此提供呈流体相的ATPS或其组分。
6. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,构造所述ATPS和多孔基质,从而使得在使用时,所述第一相溶液和所述第二相溶液以不同速率流动通过所述多孔基质。
7. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,构造所述ATPS和多孔基质,从而使得在使用时,所述第一相溶液和所述第二相溶液沿不同方向流动通过所述多孔基质。
8. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,所述第一相溶液包括胶束溶液并且所述第二相溶液包括聚合物。
9. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,所述第一相溶液包括胶束溶液并且所述第二相溶液包括盐。
10. 如权利要求8所述的纸流体装置,其中,所述胶束溶液包括表面活性剂。
11. 如权利要求10所述的纸流体装置,其中,所述胶束溶液包括Triton-X。
12. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,所述第一相溶液包括聚合物并且所述第二相溶液包括聚合物。
13. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,所述第一相溶液包括聚合物并且所述第二相溶液包括盐。
14. 如权利要求13所述的纸流体装置,其中,所述第一相溶液包括聚乙二醇并且所述第二相溶液包括磷酸钾。
15. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中:  
所述第一相溶液包含选自由乙基羟基乙基纤维素、甲氧基聚乙二醇、甲基纤维素、聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)、聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮组成的组的组分;并且所述第二相溶液包含选自由硫酸铵、葡聚糖、Ficoll、羟基丙基葡聚糖、羟基丙基淀粉、硫酸镁、麦芽糊精、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、磷酸钾、柠檬酸钠和硫酸钠组成的组的组分。
16. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,所述装置包含这样的结构,该结构中:  
所述ATPS包含PEG和盐ATPS,其中所述PEG和所述盐沉淀在所述多孔基质中的相同区域

中;

所述ATPS包含PEG和盐ATPS,其中所述PEG和所述盐沉淀在所述多孔基质中的不同区域中,其中,所述基质包含含有所述盐的单一区域和含有所述PEG的单一区域,其中含有所述PEG的所述区域位于含有所述盐的所述区域的下游;

所述ATPS包含PEG和盐ATPS,其中所述PEG和所述盐沉淀在所述多孔基质中的不同区域中,其中,所述基质包含含有所述盐的第一区域、含有所述PEG的第二区域、含有所述盐的第三区域、和含有所述PEG的第四区域,其中第二区域位于第一区域的下游,第三区域位于第二区域的下游,并且第四区域位于第三区域的下游;或者

所述ATPS包含PEG和盐ATPS,其中所述PEG和所述盐沉淀在所述多孔基质中的不同区域中,其中,所述基质包含含有所述盐的第一区域、含有所述PEG的第二区域、含有额外PEG的第三区域、和含有额外PEG的第四区域,其中第二区域位于第一区域的下游,第三区域位于第二区域的下游,并且第四区域位于第三区域的下游;

其中,下游是相对于使用时分析物通过所述基质的流动方向.

17. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,所述多孔基质包含第一路径和第二路径。

18. 如权利要求17所述的纸流体装置,其中,第一相溶液优先流动通过第一路径并且第二相溶液优先流动通过第二路径。

19. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,所述装置包括结合靶标分析物以产生探针-分析物复合物的探针。

20. 如权利要求19所述的纸流体装置,其中,所述探针包括:

磁性粒子;和/或

选自由聚乙烯、聚丙烯、尼龙、聚甲醛、聚四氟乙烯(TEFLON®)、葡聚糖、聚氯乙烯和其组合组成的组的聚合物;和/或

选自由纤维素和甲壳质组成的组的生物聚合物;和/或

选自由金、银、钛、不锈钢、铝、铂、其合金和其组合组成的组的金属。

21. 如权利要求19所述的纸流体装置,其中,所述探针包含对所述第一相溶液或所述第二相溶液具有亲和力的涂层。

22. 如权利要求19所述的纸流体装置,其中,所述探针包含结合靶标分析物的结合部分。

23. 如权利要求22所述的纸流体装置,其中,所述结合部分选自由抗体或抗体片段、凝集素、蛋白质、代谢物、糖蛋白、核酸、小分子、聚合物和脂质组成的组。

24. 如权利要求19所述的纸流体装置,其中,所述探针包含可检测标记。

25. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,所述装置包括干燥接收纸,其中所述第一相溶液或所述第二相溶液优先朝向所述干燥接收纸流动通过所述多孔基质。

26. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,所述装置包含电泳缓冲液,并且其中第一相溶液和/或第二相溶液在与所述电泳缓冲液接触时更快地流动通过所述多孔基质。

27. 如权利要求1所述的纸流体装置,其中,所述多孔基质包含选自由纤维素、玻璃纤维、硝基纤维素、聚偏二氟乙烯、尼龙、电荷改性尼龙、聚醚砜和其组合组成的组的材料。

28. 一种浓缩样品中靶标分析物的方法,所述方法包括:

a. 将所述样品施加至权利要求1所述的装置;和

b. 使所述ATPS的组分流动通过所述多孔基质,以使所述分析物浓缩在第一相溶液、第二相溶液、或第一相溶液和第二相溶液之间的界面中。

## 用于整合分析物提取、浓缩和检测的装置

[0001] 本申请是分案申请,其原申请的国际申请号为PCT/US2015/019297,国际申请日为2015年03月06日,中国国家申请号为201580023439.9,进入中国国家阶段的进入日为2016年11月04日,发明名称为“用于整合分析物提取、浓缩和检测的装置”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2014年3月7日提交的美国临时申请号61/949,887和2014年3月16日提交的美国临时申请号61/953,870的权益,所述临时申请以引用的方式整体并入本文。

### 背景技术

[0004] 未知因素(一方面包括物质和材料并且另一方面包括疾病和病况)的鉴别对于许多不同行业来说是最重要的。酶和抗体用于多种情形中,包括但不限于医学诊断、食物测试和环境污染(例如毒素、病原体)。

### 发明内容

[0005] 本文描述作为用于医学、消费者和其它应用的适用工具的方法、装置、试剂盒和系统,包括在即时检验(POC)或使用点处执行的测试。即时检验或使用位置在某些应用中可包括卫生保健设施、流动诊所、工作场所、工厂、农场和家庭。本文所述的主体还适用于多种其它应用,举非限制性实例,包括空气污染物、毒素、食物和药品中的成分的鉴别,以及工业、军事和与空间相关的应用。尤其,本文提供快速、简单并且易于使用的测试。所述测试可由具有极少(如果有的话)临床诊断训练的个体执行。本文还描述用于以节省成本和时间的的方式获得测试结果的方法。这些测试尤其需要对于少量的生物分子可靠并且灵敏。此外,本文所述的测试可与多种不同环境(例如,其中温度和/或湿度变化极大)相容。因此,本文所述的用于即时检验或使用点的装置可需要最少量的设备并且在多种环境条件下稳定。

[0006] 本文还公开用于靶标分析物的检测的装置和方法,包括侧流分析(LFA)技术和水性多相系统。在某些实施方案中,这些装置和方法利用水性多相系统的浓缩能力连同LFA来提供相对于先前LFA分析的检测极限至少约100倍至约1000倍的改进,其接近或满足并且在某些情况下超过基于实验室的分析(如酶联免疫吸附测定(ELISA))的灵敏性。

[0007] 一般说来,在某些应用中,含有靶标分析物的所关注样品被应用于水性两相系统(ATPS)。如本文所述,已经开发用于从所述ATPS的单一相或界面浓缩并且提取靶标分析物并且随后在所述LFA上检测所述靶标分析物的方法和装置,在所述LFA中可对所述靶标分析物的存在进行检测和/或定量。或者或另外,所述靶标分析物可在整合ATPS-LFA系统上浓缩并且进行检测和/或定量。因此,可通过完美地整合所述ATPS与下游LFA检测来避免提取。在本文所述的某些应用中,这些装置仅需要用户添加所关注的样品。在多个实施方案中,这些装置可用于检测如血清、唾液、尿液、血液或拭子样品的生物样品中的靶标分析物。

[0008] 本文所公开的装置在某些实施方案中便利地组装以形成便携式诊断装置。本文所述的多种装置和方法证明是稳健的、通用的、可伸缩的、廉价的、具灵敏性的、简单并且精确的,从而需要最少训练、电力和设备。应注意,虽然下文论述一般是关于水性两相系统

(ATPS),但同样可执行三相或四相系统并且甚至更多相系统。

[0009] 为了说明这些概念如何运作,本文描述这些技术的实施例。这些实施例意图为说明性而非限制性的。使用本文提供的教导,可容易地执行整合ATPS和侧流检测的多种其它系统。应了解,本文所述的实施例和实施方案仅是出于说明性目的并且根据其的各种修改或变化将被推荐给本领域技术人员并且将包括在本申请的精神和范围以及随附权利要求书的范围内。本文所引用的所有公布、专利和专利申请针对所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0010] 本文所述的主体(包括本文所述的方法、装置、试剂盒和系统)的一方面是一种用于样品中靶标分析物的检测和/或定量的装置,所述装置包括:(a)侧流分析(LFA);和(b)水性两相系统(ATPS)。在某些应用中,所述ATPS包含分配于第一相溶液和第二相溶液中的混合相溶液。在一些实施方案中,所述分配所述混合相于所述第一相溶液和所述第二相溶液中发生于所述LFA内。在某些实施方案中,所述分配所述混合相于所述第一相溶液和所述第二相溶液中并未发生于所述LFA内。在某些应用中,所述靶标分析物与所述混合相溶液接触,并且在所述第一相溶液或所述第二相溶液分离时/后,所述靶标分析物分配于所述第一相溶液或所述第二相溶液中。在一些实施方案中,所述靶标分析物与所述混合相溶液接触,并且在所述第一相溶液或所述第二相溶液分离时/后,所述靶标分析物分配至所述第一相溶液和所述第二相溶液之间的界面处。在一些实施方案中,所述靶标分析物在分配时浓缩。

[0011] 在某些实施方案中,所述第一相溶液包含胶束溶液并且所述第二相溶液包含聚合物。在某些实施方案中,所述第一相溶液包含聚合物并且所述第二相溶液包含胶束溶液。在某些应用中,所述第一相溶液包含胶束溶液并且所述第二相溶液包含盐。在某些应用中,所述第一相溶液包含盐并且所述第二相溶液包含胶束溶液。在一些实施方案中,所述胶束溶液包含非离子表面活性剂。在一些实施方案中,所述非离子表面活性剂选自聚西托醇、鲸蜡硬脂醇、鲸蜡醇、油酰胺、癸基葡糖苷、IGEPAL、异鲸蜡醇聚醚、月桂基葡糖苷、甘油单月桂酸酯、诺乃洗涤剂、壬苯醇醚、NP-40、辛基葡糖苷、油醇、泊洛沙姆、五乙二醇单十二烷基醚、聚山梨醇酯、聚甘油、山梨聚糖、硬脂醇、Triton-X和Tween组成的组。在某些应用中,所述胶束溶液是Triton-X溶液。在一些实施方案中,所述Triton-X溶液选自Triton-X-100溶液和Triton-X-114溶液。

[0012] 在一些实施方案中,第一相溶液包含第一聚合物并且所述第二相溶液包含第二聚合物。在一些实施方案中,第一/第二聚合物选自聚乙二醇和葡聚糖。在一些实施方案中,所述第一相溶液包含聚合物并且所述第二相溶液包含盐。在一些实施方案中,所述第一相溶液包含盐并且所述第二相溶液包含聚合物。在一些实施方案中,所述第一相溶液包含聚乙二醇并且所述第二相溶液包含磷酸钾。在一些实施方案中,所述第一相溶液包含磷酸钾并且所述第二相溶液包含聚乙二醇。在某些实施方案中,所述第一相溶液选自如本文所述的表1的组分1并且所述第二相溶液选自表1的组分2。在某些实施方案中,所述第二相溶液选自如本文所述的表1的组分1并且所述第一相溶液选自表1的组分2。

[0013] 在一些实施方案中,所述靶标分析物选自蛋白质、抗原、生物分子、糖部分、脂质、核酸、固醇和其组合。在某些应用中,所述靶标分析物来源于选自由植物、动物、病毒、真菌、原生动物和细菌组成的组的生物。在一个实施方案中,所述装置进一步包括探针,其中所述探针与所述靶标分析物相互作用。

[0014] 本文所述的方法、装置、试剂盒和系统的另一方面是一种LFA装置,其包括一种或多种与至少1种靶标分析物,或至少两种不同靶标分析物,或至少3种不同靶标分析物,或至少4种不同靶标分析物,或至少5种不同靶标分析物,或至少7种不同靶标分析物,或至少10种不同靶标分析物,或至少15种不同靶标分析物,或至少20种不同靶标分析物,或甚至更大数目的靶标分析物相互作用的探针。在一些实施方案中,本文描述至少两种不同探针,或至少3种不同探针,或至少4种不同探针,或至少5种不同探针,或至少7种不同探针,或至少10种不同探针,或至少15种不同探针,或至少20种不同探针。在某些实施方案中,提供本文所述的探针,其包含选自自由合成聚合物、金属、矿物质、玻璃、石英、陶瓷、生物聚合物、塑料和其组合组成的组的材料。在某些实施方案中,提供本文提供的探针,其包含选自自由聚乙烯、聚丙烯、纤维素、甲壳质、尼龙、聚甲醛(DELTRIN®)、聚四氟乙烯(TEFLON®)、聚氯乙烯和其组合组成的组的聚合物。在一些实施方案中,所述聚丙烯为聚丙二醇。在一些实施方案中,所述聚乙烯为聚乙二醇。在某些实施方案中,提供探针,所述探针包含选自自由葡聚糖和聚乙二醇和其组合组成的组的生物聚合物。在某些实施方案中,提供探针,所述探针包含金属(例如,选自自由金、银、钛、不锈钢、铝、铂和/或其合金组成的组的金属)。

[0015] 在本文所述的方法、装置、试剂盒和系统的某些方面中,提供包含纳米粒子(例如,金纳米粒子)的探针。在某些实施方案中,所述探针包含涂层。在多个实施方案中,所述涂层可包含聚乙二醇或其它聚合物(例如,聚丙二醇),或接枝共聚物,例如聚(1-赖氨酸)-接枝-葡聚糖(PLL-g-dex(具有接枝至聚(1-赖氨酸)骨架上的葡聚糖侧链的接枝共聚物)等)。在一个说明性但非限制性实施方案中,所述涂层包含葡聚糖。在另一实施方案中,所述涂层包含亲水性蛋白。在某些应用中,所述涂层包含血清白蛋白。在某些实施方案中,所述涂层对所述第一相溶液或所述第二相溶液具有亲和力。在某些实施方案中,所述探针包含结合所述靶标分析物的结合部分。在某些实施方案中,所述结合部分选自自由抗体、凝集素、蛋白质、糖蛋白、核酸、小分子、聚合物和脂质和/或其组合组成的组。在一个实施方案中,所述结合部分为抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所述探针包含磁性粒子。在某些实施方案中,所述方法、装置、试剂盒和系统包括磁体。在某些实施方案中,所述磁体被配置成加速和/或增加所述靶标分析物分配于所述第一相溶液或第二相溶液中。在一个实施方案中,所述磁体被配置成加速和/或增加所述靶标分析物流动通过所述LFA。在某些实施方案中,所述磁体可吸引至和/或可脱离所述装置。在本文提供的方法、装置、试剂盒和系统的某些应用中,提供被配置成与所述ATPS接触放置的收集器,其中所述靶标分析物在所述收集器和所述第一相溶液和/或第二相溶液的界面处分配。在一些实施方案中,所述收集器包含选自塑料、中孔材料、硅石、聚合物(例如,聚丙烯、聚甲醛(DELTRIN®)、聚四氟乙烯(TEFLON®)等)、磁体、具有孔的材料、具有凹槽的材料和其任何组合的材料。

[0016] 在一些实施方案中,本文所述的方法、装置、试剂盒和系统包括包含可检测标记的探针。在一些实施方案中,所述可检测标记是自由比色标记、荧光标记、酶标记、显色标记(colorigenic label)、放射性标记和其组合组成的组。在一些实施方案中,所述LFA包括多孔基质。在某些应用中,所述多孔基质是充分多孔的以允许所述混合相溶液、第一相溶液、第二相溶液和/或靶标分析物流动通过所述LFA。在某些实施方案中,提供本文提供的多孔基质,其对于使所述混合相溶液、第一相溶液、第二相溶液和/或靶标分析物垂直地和/或水平地流动通过所述LFA和其任何组合来说充分长和/或足够深。在一些实施方案中,提供其

中所述第一相溶液以第一速率流动通过所述多孔基质并且所述第二相溶液以第二速率流动通过所述多孔基质的方法、装置、试剂盒或系统,其中所述第一速率和所述第二速率不同。在某些实施方案中,所述多孔基质包含选自纤维素、玻璃纤维、硝基纤维素、聚偏二氟乙烯、尼龙、电荷改性尼龙、聚醚砜和其组合的材料。在一些实施方案中,提供包含靶标分析物捕捉部分的 LFA,其中所述靶标分析物捕捉部分与所述靶标分析物相互作用。在某些实施方案中,提供包含竞争分析的LFA。在某些实施方案中,提供包含所述靶标分析物的LFA。在某些实施方案中,提供利用包含夹心分析的LFA的方法、装置、试剂盒和/或系统。在某些实施方案中,所述LFA包含探针捕捉部分,其中所述探针捕捉部分与所述探针或其组分相互作用。在某些实施方案中,所述混合溶液相溶液在LFA条上和/或LFA 条中脱水,并且在添加样品时,所述混合相溶液分配于所述第一相溶液和所述第二相溶液中。

[0017] 在本文所述的方法、装置、试剂盒和/或系统的某些实施方案中,提供包括具有足以容纳溶液的体积的孔的LFA。在某些应用中,所述溶液选自由以下组成的组:所述ATPS的至少一部分、所述第一相溶液的至少一部分、所述第二相溶液的至少一部分、所述靶标分析物的再悬浮溶液和其组合。在另外或额外实施方案中,提供包括孔的LFA,其中所述孔位于所述LFA中选自拐角、末端、中心、接合处、偏离中心处和弯曲处的位置处。在一些实施方案中,所述孔包括一个或多个选自滤垫、缓冲垫、表面活性剂垫、盐垫、探针垫、聚合物垫和其组合的垫。在某些实施方案中,提供包括条的LFA。在另外或额外实施方案中,限制条件是所述条根据选自图16、20和62-70 中描绘的结构的结构进行配置。在另外或额外实施方案中,提供其中所述条包括多个路径的LFA。在某些应用中,所述LFA进一步包括干燥接收纸。在一些实施方案中,所述装置包含电泳缓冲液。在一些实施方案中,提供包括用于向所述装置施用样品(例如,生物样品)的口的装置。在某些应用中,提供连接至所述ATPS的口。在一些实施方案中,提供LFA,其中所述ATPS和所述LFA进行整合,并且其中所述口连接至所述LFA。在某些实施方案中,所述口包括选自管、漏斗、阀、注射器、吸管、通道、柱塞、活塞、重力进料装置、泵和其组合的结构。在一些实施方案中,所述装置不需要电源。在某些实施方案中,所述ATPS和所述LFA在使用所述装置之前进行整合。在另外或额外实施方案中,所述ATPS和所述LFA在使用所述装置之前为独立的。在一些实施方案中,所述装置被配置成将所述LFA插入至所述ATPS中。

[0018] 在某些方面,本文所述的方法、装置、系统和/或试剂盒包括或利用如下装置,其包括:(a) 包括用于容纳所述ATPS的腔室的第一组件;和(b) 包括所述LFA的第二组件。在这方面的一个实施方案中,提供包括致动器的装置,所述致动器将样品和/ 或靶标分析物或两者递送至所述ATPS中。在某些实施方案中,提供进一步包括将溶液递送至所述LFA中的致动器的装置。在某些应用中,提供包含溶液的LFA,所述溶液选自由混合相溶液、第一相溶液和第二相溶液和其组合组成的组。在某些实施方案中,ATPS和LFA容纳于单一外壳中。在某些应用中,提供便携式LFA装置。

[0019] 在某些方面,提供用于检测和/或定量样品中的靶标分析物的方法、装置、系统和/或试剂盒,其中所述检测和/或定量包括:(a) 将样品应用于根据本文所述的装置;和(b) 在所述LFA上检测所述靶标分析物的存在或不存在。在某些实施方案中,所述方法涉及将样品应用于所述ATPS。在某些应用中,所述方法涉及将所述样品应用于所述LFA,其中将所述LFA和所述ATPS进行整合。在某些实施方案中,所述方法涉及在所述ATPS中浓缩所述靶标分析

物。在一个实施方案中,所述方法涉及在所述 LFA中浓缩所述靶标分析物。在一些实施方案中,所述方法利用一种或多种样品,所述样品选自来自生物(例如,植物、动物、藻类、真菌等)的组织/流体、食物样品、化学样品、药物样品和环境样品(例如,水样品、土壤样品等)和其组合组成的组。在一些实施方案中,提供选自血液样品、血清样品、血浆样品、尿液样品、唾液样品、支气管灌洗液、鼻样品、粪便样品、来自外伤或手术部位的样品和其组合组成的组的样品。在某些实施方案中,所述靶标分析物包含生物分子。在某些实施方案中,所述生物分子选自核酸、蛋白质、脂质、小分子、糖、抗体、抗原、酶和其组合组成的组。在某些实施方案中,所述样品来源于选自脊椎动物(例如,哺乳动物、鸟类等)、细菌、病毒、原生动物、藻类、真菌、原生动物、药物、病原体、毒素、环境污染物和其组分和其组合组成的组的来源。

[0020] 在某些方面,提供利用用于样品中靶标分析物的检测的纸流体装置的方法、装置、试剂盒和/或系统,其中所述纸流体装置连同水性两相系统(ATPS)使用。在某些实施方案中,所述装置包括其中安置有所述ATPS或其组分的多孔基质,其中所述多孔基质被配置成当所述ATPS或其组分呈流体相时允许所述ATPS或其组分流动通过所述多孔基质并且具有充足孔隙率以允许所述ATPS或其组分流动通过所述多孔基质。

[0021] 在某些实施方案中,所述纸流体装置包括所述ATPS或其组分。在某些实施方案中,所述ATPS或其组分选自第一相溶液、第二相溶液和混合相溶液和/或其组合组成的组,其中所述混合相溶液包含所述第一相溶液和所述第二相溶液的混合物。在某些实施方案中,所述ATPS和/或其组分在所述多孔基质的至少第一部分上和/或至少第一部分中脱水。在某些应用中,提供纸流体装置、方法、系统和/或试剂盒,其中所述多孔基质的第一部分具有与所述多孔基质的第二部分不同的宽度。在另外或额外实施方案中,提供利用样品使所述ATPS水合的纸流体装置、方法、系统和/或试剂盒,由此提供呈流体相的ATPS或其组分。在一些实施方案中,所述纸流体装置包括用于容纳选自所述混合相溶液、所述第一相溶液、所述第二相溶液、所述样品和其组合组成的组的内容物的孔。在某些应用中,所述纸流体装置包括用于将所述孔的内容物释放至所述多孔基质中和/或所述多孔基质上的致动器。在某些实施方案中,所述孔包括一个或多个选自滤垫、缓冲垫、表面活性剂垫、盐垫、探针垫、聚合物垫和其组合的垫。在一些实施方案中,所述第一相溶液和所述第二相溶液以不同速率流动通过所述多孔基质。在一个实施方案中,所述第一相溶液和所述第二相溶液沿不同方向流动通过所述多孔基质。在某些实施方案中,所述第一相溶液包含胶束溶液并且所述第二相溶液包含聚合物。在某些实施方案中,所述第一相溶液包含胶束溶液并且所述第二相溶液包含盐。在某些应用中,提供包含Triton-X(或其它表面活性剂)胶束溶液的纸流体装置。在一些实施方案中,所述第一相溶液包含聚合物并且所述第二相溶液包含聚合物。在某些实施方案中,所述第一相溶液包含聚合物并且所述第二相溶液包含盐。在某些实施方案中,提供纸流体组合物,其中所述第一相溶液包含聚乙二醇并且所述第二相溶液包含磷酸钾。

[0022] 一方面,提供包括纸流体装置的方法、装置、系统和/或试剂盒,其中所述第一相溶液选自表1的组分1并且所述第二相溶液选自表1的组分2。在某些应用中,提供根据图16、20和62-70中描绘的结构配置的装置、方法、系统和/或试剂盒。在某些应用中,提供包括第一路径和第二路径的多孔基质。

[0023] 另一方面,提供包括或利用纸流体装置的方法、装置、系统和/或试剂盒,其中第一相溶液优先流动通过第一路径并且第二相溶液优先流动通过第二路径。在一些实施方案中,提供纸流体装置,其中所述组合物/装置包括结合靶标分析物以产生探针-分析物复合物的探针。在某些实施方案中,提供纸流体组合物,其中所述靶标分析物在使用时结合于探针-分析物复合物中的探针。在一些实施方案中,提供包括磁性粒子的探针。在某些实施方案中,所述装置包括和/或所述方法利用经过定向以将磁性粒子吸引至所述多孔基质的一部分的磁场,其中所述磁场对所述磁性粒子的力增强了探针-分析物复合物朝向所述多孔基质的一部分的流动。在某些实施方案中,提供探针,所述探针包含选自由聚乙烯、聚丙烯、尼龙、聚甲醛(DELTRIN®)、聚四氟乙烯(TEFLON®)、葡聚糖和聚氯乙烯和其组合组成的组的聚合物。在一些实施方案中,所述聚乙烯为聚乙二醇。在一些实施方案中,所述聚丙烯为聚丙二醇。在一个实施方案中,提供探针,所述探针包含选自由胶原蛋白、纤维素和甲壳质组成的组的生物聚合物。在某些应用中,提供纸流体装置,其中所述探针包含选自由金、银、钛、不锈钢、铝、铂、其合金和/或其组合组成的组的金属。在一个实施方案中,提供包括纳米粒子(例如,金纳米粒子)的探针。在某些应用中,所述探针包含涂层。在某些实施方案中,所述涂层包含聚乙二醇。在一个实施方案中,所述涂层包含葡聚糖。在一个实施方案中,所述涂层包含聚丙烯。在一个实施方案中,所述涂层包含聚丙二醇。在某些实施方案中,所述涂层包含亲水性蛋白。在某些实施方案中,所述涂层包含血清白蛋白。在某些应用中,提供纸流体组合物/装置,其中探针具有对所述第一相溶液或所述第二相溶液具有亲和力的涂层。

[0024] 在本文所述的方法、装置、系统和/或试剂盒的某些方面,提供包括探针的纸流体组合物/装置,其中所述探针进一步包含结合所述靶标分析物的结合部分。在一些实施方案中,提供包含结合部分的纸流体装置,所述结合部分选自由抗体、凝集素、蛋白质、糖蛋白、核酸、小分子、聚合物、脂质和/或其组合组成的组。在某些实施方案中,提供包含结合部分的探针,所述结合部分包含抗体或抗体片段。在某些实施方案中,提供包括探针的纸流体装置,所述探针包含可检测标记。在一个实施方案中,所述可检测标记选自由比色标记、荧光标记、酶标记、显色标记、放射性标记和其组合组成的组。在某些应用中,提供进一步包括干燥接收纸的纸流体组合物,其中所述第一相溶液或所述第二相溶液优先朝向干燥接收纸流动通过所述多孔基质。

[0025] 在某些实施方案中,本文所述的方法、装置、系统和/或试剂盒包括纸流体装置/组合物,所述纸流体装置/组合物在使用时包含电泳缓冲液,其中第一相溶液和/或第二相溶液在与所述电泳缓冲液接触时更快地流动通过所述多孔基质。在本文所述主题的某些应用中,提供包括多孔基质的纸流体装置,所述多孔基质包含选自纤维素、玻璃纤维、硝基纤维素、聚偏二氟乙烯、尼龙、电荷改性尼龙、聚醚砜和/或其组合的材料。在一个实施方案中,提供包括包含靶标分析物捕捉部分的多孔基质的纸流体装置,其中所述靶标分析物捕捉部分与靶标分析物或其组分相互作用。在一个实施方案中,所述纸流体装置进一步包含所述靶标分析物。在一个实施方案中,所述多孔基质包含探针捕捉部分,其中所述探针捕捉部分与所述探针或其组分相互作用。在某些实施方案中,提供包含或促进竞争分析的LFA。在某些实施方案中,所述LFA包含夹心分析。在某些实施方案中,提供纸流体组合物,其中多孔基质被配置成当所述靶标分析物流动通过所述多孔基质时浓缩所述靶标分析物。在某些应用中,所述纸流体装置包含对照分析物,其中在所述多孔基质上所述对照分析物和所述靶标

分析物的比较提供了所述靶标分析物的定量。

[0026] 在某些方面,提供检测样品中的靶标分析物的方法,其中所述方法包括:(a)将所述样品应用于本文所述和/或要求保护的装置中;和(b)检测所述靶标分析物的存在或不存在。

## 附图说明

[0027] 前述发明内容以及以下详述当连同随附图式阅读时可更好地理解。所述图式意图为说明性而非限制性的。应理解,本公开不限于其中所示的精确布置、实施例和工具。

[0028] 图1(顶部)典型侧流免疫分析测试条的示意图。示出由LFA利用的两种示例性机制:夹心分析(底部左侧)和竞争分析(底部右侧)。

[0029] 图2示出使用具有ATPS的捕捉探针进行分析物浓缩的图示。所述探针捕捉靶标分析物并且极端地分配于所述相之一中。含有浓缩的探针的相可接着收集用于通过LFA进行后续分析

[0030] 图3示出使用具有ATPS的磁性捕捉探针进行分析物浓缩的图示。所述探针捕捉靶标分析物并且分配于所述相之一中。应用磁体,其进一步将磁性探针浓缩至较小体积。

[0031] 图4示出利用活塞和柱塞从ATPS转移浓缩的分析物至LFA测试条的便携式装置的一种说明性而非限制性设计。这种装置由浓缩腔室和检测腔室组成。在这一实施例中,分析物被浓缩至所述ATPS的底部体相中。为了收集样品,(1)压低柱塞。所述样品与ATPS溶液混合。随后(2),为了汲取溶液,将所述装置的尖端插入样品中,随后(3)释放所述柱塞,并且(4)用帽密封笔形(PEN)装置。在(5)所述分析物被浓缩至底部体相中之后,(6)通过将柱塞旋转至“测试”位置来起始检测步骤,所述旋转导致降低所述活塞,并且(7)通过止回阀将浓缩的分析物引导至检测腔室中。(8)挂钩锁定于凹槽中以确保所述活塞的移动受到控制,并且仅控制量的体积被引导至检测腔室中。

[0032] 图5示出以机械方式将LFA测试条插入至含有浓缩的分析物的顶相中的便携式装置的一种说明性而非限制性设计。为了汲取已经与ATPS溶液预混合的样品,(1)按压在所述装置的侧面上的按钮。在相分离完成并且所述分析物浓缩于顶部体相中之后,通过(2)按压检测按钮来起始检测步骤,所述按压会降低LFA测试条以允许所述条的样品垫与浓缩的分析物接触。最后,(3)可通过结果窗解释结果。

[0033] 图6A-6D示出实现密封孔(A)的便携式装置的一种说明性而非限制性设计(图6A)。ATPS溶液混入孔中。在相分离完成之后,通过刺破在所述孔的底部处的密封件来引起孔的流动,并且含有浓缩的分析物的底相朝向检测流动。这种方法可并入将分析物浓缩至顶相或底相中的装置中。如果分析物被浓缩至底相中,那么所述孔被压低至引起底相朝向检测流动的装置腔室中。或者,所述孔可从下面装载,并且按钮被添加至并入所述装置上的孔中。当这个按钮被向下按压时,其可使测试条与所述孔接触。图6B和图6C示出在所述测试条上1:1体积PEG:盐ATPS和9:1体积PEG:盐ATPS的结果。图6D说明用于刺破所述孔并且引起ATPS溶液流动通过LFA的示例性机制:压低与所述孔接触的按钮(底部图)或压低所述孔本身(顶部图)。

[0034] 图7示出便携式装置的一种说明性而非限制性设计。这种装置类似于图4中呈现的装置,但利用磁性探针。在底相形成期间,在笔帽附近的磁体进一步将磁性探针浓缩至较小

体积。当笔的按钮被压低时,磁性粒子涌过止回阀,从而起始检测。

[0035] 图8示出在界面处浓缩的现象的图示。归因于所述探针和ATPS的具体特性,所述探针分配至所述界面并且变得高度浓缩。所述界面可接着收集用于通过LFA进行后续分析。

[0036] 图9说明固体-液体界面浓度的观察结果。所述探针被发现留在含有PEG-盐ATPS的管的聚丙烯壁处。

[0037] 图10A-10B:(图10A)示出在PEG-盐ATPS中使用聚丙烯棒对分析物-探针复合物进行的实验收集。(图10B)示出固体-液体界面浓度的图示。所述探针接合于均质溶液中的靶标分析物。因为管壁是玻璃,所以所述探针优先地粘附于已经被插入至ATPS中的聚丙烯收集器。含有浓缩的探针的收集器可被取出并且所述探针再悬浮用于通过后续LFA进行检测。注意这些粒子仅当存在两相系统时粘附于固体聚丙烯。

[0038] 图11示出利用固体-液体界面浓度的便携式装置的图示。ATPS样品被添加至浓缩孔中并且收集棒被插入以收集探针。在所述探针粘附于所述收集棒之后,所述收集棒移动至检测孔,所述检测孔使探针再悬浮并且引起朝向LFA的流动以用于检测。

[0039] 图12A-图12C示出(图12A)当ATPS流动时,纸允许ATPS相分离发生。聚合物-盐ATPS用于这一实施例中。疏水并且更具粘性的相的庞大组分落在后面,而含有浓缩的靶标分析物的亲水并且较少粘性的相快速地流动通过纸。(图12B)1:1聚合物-盐ATPS相在纸中分离并且在5分钟内流动通过纸。(图12C)9:1PEG-盐ATPS也在5分钟内流动通过纸,但在聚合物贫乏相中的捕捉探针由于较小体积而无法轻易可见。

[0040] 图13A-图13C示出(图13A)纸孔允许更有效的ATPS相分离。疏水并且更具粘性的相的庞大组分由所述纸保留并且留在所述孔的上层中,而含有靶标分析物的亲水并且较少粘性的相快速地流动至底层。为了改进分析物的收集,可应用电泳缓冲液的添加以使样品涌出纸孔并且至膜上,同时保持相完整性。图13B示出1:1PEG-盐ATPS相在纸的层中分离并且流动通过膜以用于检测。图13C示出9:1PEG-盐ATPS由于含有高浓度的大PEG分子的富PEG相而更缓慢地流动通过膜。浓缩的盐相接着变成前缘。

[0041] 图14A-图14D例示了(图14A)3D纸孔的变化,其中我们使用浓缩孔和混合孔。为了开始所述分析,将与ATPS溶液混合的样品应用于浓缩孔。(图14B)缓冲液接着添加至浓缩孔中以加速相分离。(图14C)一旦浓缩的分析物已经到达混合孔,(图14D)另一缓冲液添加至混合孔中以促进流动并且使浓缩的分析物到达下游LFA测试条。

[0042] 图15A-图15B证明使纸条内ATPS所必需的组分脱水可如何在所述组分用样品溶液再水合后引起相分离(图15A)。在这一实验中,样品溶液由偏好富聚合物相的蓝色染料和偏好聚合物贫乏相的针对LFA的红色比色纳米粒子指示剂组成。FG是指玻璃纤维纸。(图15B)不具有脱水的ATPS组分的对照条件。

[0043] 图16A-图16E例示了使用脱水的PEG-盐ATPS组分的不同纸装置结构。(图16A)具有独立PEG和盐区段的简单结构。(图16B)具有组合的PEG和盐区段的简单结构。(图16C)并入多个重复区段以增强浓缩效率的实例。(图16D)其中PEG区段不在所述装置的直通流动路径中的图16C的实例的重复。(图16E)将相分离位点放置于所述流动路径的末端的结构的实施例。这一示意图中未示的LFA测试条被放置于所述装置的下游区域中。

[0044] 图17A-图17B示出(图17A)说明使仅PEG-盐纸诊断剂内的脱水的PEG区段偏移可如何用于通过汲取溶液至所述脱水的PEG区段中来进一步浓缩领先流体的示意图,所述脱水

的PEG区段形成基于尺寸排阻来排除所关注的分析物的富PEG相;和(图17B)验证浓缩效应的实验。

[0045] 图18A-图18B示出(图18A)引入电泳缓冲液以驱动含有浓缩的分析物的滞后相朝向LFA测试条的图示;和(图18B)关于引入电泳缓冲液以驱动含有浓缩的分析物的领先相朝向LFA测试条的说明性替代设计。

[0046] 图19示出使用具有不同纸材料的3D纸孔的流动改线设计的图示。富聚合物相更具疏水性并且优先流动至更具疏水性的纸,而聚合物贫乏相更优先流动通过亲水性纸。LFA测试条可附接于这一装置的下游区域中用于检测。

[0047] 图20说明并入磁性探针的使用以增强浓缩能力的纸装置布置的不同实施例。此处,磁体的位置提供作用于结合于靶标分析物的粒子的力。这有效地将所述粒子浓缩至具有LFA检测区的纸的侧面。

[0048] 图21A-图21C示出GMP被发现极端地分配于底部PEG贫乏相(图21A)中。这允许使用小的磁体(图21B)快速地从ATPS溶液(图21C)回收大多数GMP。

[0049] 图22示出(顶部)不使用和(底部)使用先前ATPS浓缩步骤的情况下用于检测Tf的LFA条的图像。

[0050] 图23A-图23D示出在含有(图23A)仅PEG、(图23B)仅盐或(图23C)1:1ATPS的溶液中的PGNP和PP吸管的图像。PGNP在ATPS存在下仅极端地分配至PP吸管。(图23D)所述PP吸管从(图23C)取出,并且这一图示出所述吸管可被抽出以容易地收集浓缩的PGNP用于后续检测分析。

[0051] 图24示出(顶部)不使用和(底部)使用先前ATPS浓缩步骤的情况下用于检测转铁蛋白(Tf)的LFA条的图像。

[0052] 图25示出所提出的便携式装置的图示。

[0053] 图26示出DGNP的示意图和其在使用ATPS改进LFA的检测极限的方法中的作用。

[0054] 图27示出关于LFA的竞争测试的阳性和阴性结果的图示。

[0055] 图28A-图28C示出(图28A)柠檬酸加帽或裸金纳米粒子、(图28B)PEG化金纳米粒子和(图28C)葡聚糖涂布的金纳米粒子在变化的%w/w磷酸钾溶液中的标准化可见光范围吸收光谱(400-700nm)。

[0056] 图29A-图29C示出在(图29A)0min、(图29B)30min和(图29C)12h,DGNP在我们的PEG-盐ATPS中的分配行为。

[0057] 图30示出在PEG/盐ATPS中在12h时期内的多个时间点的实验测量的Tf浓度因素。误差棒代表三次重复测量的标准偏差。

[0058] 图31A-图31B示出(图31A)不使用和(图31B)使用用PEG/盐ATPS的先前浓缩步骤的情况下用于检测Tf的LFA条的图像。

[0059] 图32示出使用MATLAB的LFA定量的结果。误差棒代表使用3次LFA测试条的测量的标准偏差。

[0060] 图33A-图33D示出分别极端地分配于上部富PEG和下部PEG贫乏相中的亮蓝FCF染料和葡聚糖涂布的金纳米粒子。(图33A)在25°C下,混合的1:1体积比率的ATPS相分离以形成(图33B)两个等体积相。(图33C)在25°C下,混合的9:1体积比率的ATPS相分离成为(图33D)较大的富PEG相和较小的PEG贫乏相。等量的亮蓝FCF和葡聚糖涂布的金纳米粒子添加

至两种ATPS中。所述9:1体积比率的ATPS的较深的紫色指示在底部PEG贫乏相中的金纳米粒子浓度已经显著地增加。

[0061] 图34A-图34B示出当ATPS流动时,纸膜允许ATPS相分离发生。富PEG结构域保留在纸膜的开始处附近,而PEG贫乏结构域快速地移动至前沿。(图34A)所述1:1体积比率的ATPS相分离并且在5min内流动通过纸膜。(图34B)所述9:1体积比率的ATPS也分离并且在5min内流动通过膜,但相分离不太有效,因为前沿在300秒时不太明显。

[0062] 图35A-图35B示出3-D纸孔允许进一步增强的ATPS相分离。在添加混合的ATPS与染料之后,富PEG结构域保留于孔的上层中,而含有浓缩的金纳米粒子的PEG贫乏结构域快速地流动至底层。(图35A)所述1:1体积比率的ATPS展示在3-D纸孔中增强的相分离并且PEG贫乏相在5min内流动通过膜。(图35B)所述9:1体积比率的ATPS也具有改进的相分离并且PEG贫乏相清晰可见。与图34A-图34B形成对比,前沿被充分界定并且具有深紫色,表示葡聚糖涂布的金纳米粒子的浓度。

[0063] 图36A-图36C示出3-D纸孔与PEG/盐ATPS和LFA组合用于Tf检测。(图36A)所述纸孔装置与硝基纤维素纸上的Tf竞争分析组合。当使用具有可见测试和对照线的(图36B)1:1或(图36C)9:1体积比率的ATPS溶液时,正确地诊断不含Tf的样品。

[0064] 图37A-图37B示出具有3-D纸孔的1:1体积比率PEG/盐ATPS允许Tf的检测极限的2倍改进,而9:1体积比率ATPS允许10倍改进。(图37A)常规LFA检测到1 ng/ $\mu\text{L}$ 的Tf,但无法检测到0.5ng/ $\mu\text{L}$ 的Tf,导致假阴性。具有3-D纸孔的1:1体积比率ATPS成功地检测到0.5ng/ $\mu\text{L}$ 的Tf。(图37B)常规LFA检测到1ng/ $\mu\text{L}$ 的Tf,但无法检测到0.1ng/ $\mu\text{L}$ 的Tf,导致假阴性。具有3-D纸孔的9:1体积比率ATPS成功地检测到0.1ng/ $\mu\text{L}$ 的Tf。

[0065] 图38示出示例性ATPS-LFA系统。

[0066] 图39示出LFA夹心分析的示意图。阳性结果(顶部)由在测试线和对照线处的两个条条指示,而阴性结果(底部)由在对照线处的单一条条指示。

[0067] 图40A-图40C示出在37°C水浴中孵育(图40A)10min、(图40B)30min和(图40C)24h之后的水性两相PEG-盐系统。白色纸填充有字母“X”以帮助目测各相的浊度。箭头表示宏观界面的位置。

[0068] 图41示出在PEG/盐ATPS中的多个时间点处M13的实验确定的浓度因素。误差棒代表三次重复测量的标准偏差。

[0069] 图42示出在PEG/盐ATPS中的多个体积比率下M13的实验确定的浓度因素。符号对应于实验数据,并且误差棒代表三次重复测量的标准偏差。实线对应于等式(6)中的预测。

[0070] 图43A-图43F不使用用PEG/盐ATPS的先前浓缩步骤的情况下用于检测M13的LFA。(图43A)示出其中未添加M13的阴性对照组。剩余溶液含有在(图43B)  $1 \times 10^{10}$ 、(图43C)  $3.2 \times 10^9$ 、(图43D)  $1 \times 10^9$ 、(图43E)  $3.2 \times 10^8$ 和(图43F)  $1 \times 10^8$  pfu/mL的浓度下的M13。

[0071] 图44A-图44F:使用先前浓缩步骤的情况下用于检测M13的LFA。图(图44A)示出其中未添加M13的阴性对照组。剩余溶液最初含有在(图44B)  $1 \times 10^9$ 、(图44C)  $3.2 \times 10^8$ 、(图44D)  $1 \times 10^8$ 、(图44E)  $3.2 \times 10^7$ 和(图44F)  $1 \times 10^7$  pfu/mL的浓度下的M13。

[0072] 图45使用(■)和不使用(▲)先前浓缩步骤的情况下关于M13的LFA信号强度。误差棒代表至少三次测量的标准偏差。

[0073] 图46示出PBS中的ATPS-LFA系统的示意图。

[0074] 图47示出基于竞争的LFA的图示和阳性和阴性结果的解释。

[0075] 图48A-图48D示出GNP的表面改性以影响ATPS中的分配行为：(图48A) GNP 的示意图和各组分的功能性。为了证明GNP在我们的PEG-盐ATPS中的分配行为可定制，使各种量的PEG缀合于GNP以操纵其分配行为：(图48B) 在缀合期间使用 5000:1PEG:GNP的摩尔比率，所得GNP优先分配于富PEG顶相中。(图48C) 在缀合期间使用1000:1PEG:GNP的摩尔比率，GNP分配于PEG贫乏底相中但聚集，因为所述相具有高盐浓度。这些聚集的GNP无法用于后续检测分析中。(图48D) 在缀合期间使用3000:1PEG:GNP的摩尔比率，所得GNP极端地分配于界面中。关于(图 48B)、(图48C)和(图48D)，在液体-空气界面的正顶部处观察到的红色是归因于反射而非归因于纳米探针的存在。

[0076] 图49示出使用PEG/盐ATPS界面提取步骤时不使用(顶部图)和使用(底部图)先前浓缩步骤的情况下用于检测PBS中的Tf的LFA的结果。

[0077] 图50示出使用PEG/盐ATPS界面提取步骤时不使用(顶部图)和使用(底部图)先前浓缩步骤的情况下用于检测PBS中的Tf的LFA的结果。

[0078] 图51示出使用PEG/盐ATPS界面提取步骤时不使用(顶部图)和使用(底部图)先前浓缩步骤的情况下用于检测合成尿液中的Tf的LFA的结果。

[0079] 图52示出使用胶束ATPS时靶标分析物的同时浓缩和检测。

[0080] 图53A-图53B示出实现PBS中1:9体积比率Triton X-114系统的相分离所需的时间的比较。亮蓝FCF染料和樱桃色BSA-GN分别为底部富胶束和顶部胶束贫乏相的比色指示剂。(图53A) 在25°C下，Triton X-114ATPS在试管中在8h内实现宏观相分离平衡。(图53B) 当3-D纸芯被应用于混合ATPS时，在30秒时在所述芯内已经观察到相分离，因为富胶束结构域保留在所述芯的底部附近并且胶束贫乏结构域能够更自由地沿所述芯向上流动。在离开所述芯时，不同相保持彼此分离，并且胶束贫乏相保持在前沿处在小体积内浓缩，指示在180秒(3min)时更完全的分离。

[0081] 图54A-图54B例示了整合所述纸芯和Triton X-114胶束ATPS与LFA。(图54A) 整合的诊断条由其中发生相分离的浓缩区、随后含有固定的测试和对照组分检测区组成。(图54B) .当分析不含pLDH的溶液时，在20min内确认真阴性测试。

[0082] 图55示出基于纸的1:9体积比率胶束ATPS在25°C下实现PBS中pLDH的检测极限的10倍改进。标准LFA检测到 $10\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ 的pLDH，但无法精确地检测到 $1\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ 的pLDH。整合的诊断条成功地检测到 $1\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ 的pLDH。

[0083] 图56示出基于纸的9:1体积比率胶束ATPS在25°C下实现未稀释FBS中pLDH 的检测极限的10倍改进。标准LFA检测到 $10\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ 的pLDH，但无法精确地检测到 $1\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ 的pLDH。整合的诊断条成功地检测到 $1\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ 的pLDH。

[0084] 图57A-图57D示出使用(图57A) 在玻璃纤维上的PEG 4600和磷酸钾、(图57B) 在玻璃纤维上的PPG 425和磷酸钾、(图57C) 在纤维素上的PEG 8000和葡聚糖9000 和(图57D) 在玻璃纤维上的PEG 4600和葡聚糖35000的相分离结果。

[0085] 图58A-图58B示出在不同纸类型上的相分离，引起(图58A) 盐相成为领先流体或(图58B) PEG相成为领先流体。

[0086] 图59A-图59D示出关于聚合物ATPS组分的脱水的不同设计，包括将疏水性聚合物(例如PEG)相放置于(图59A) LFA的窄区、(图59B) LFA的宽区的中心、(图59C) 从LFA的窄区

延伸至LFA的宽区的LFA区域和(图59D)主要地LFA的宽区中。

[0087] 图60示出在脱水聚合物ATPS-LFA系统上相分离的时间推移图像。

[0088] 图61示出在脱水聚合物ATPS-LFA系统上相分离的时间推移图像。

[0089] 图62示出一种设计,其中脱水纳米探针纸区段比检测膜的宽度宽(将宽度定义为垂直于流动方向但在流动平面内的尺寸)。

[0090] 图63A-图63B示出(图63A)不使用ATPS(图63B)或使用ATPS的情况下在宽设计LFA中的成功相分离。

[0091] 图64一个实验的图像,其中所述溶液由于聚合物ATPS中急剧地减慢检测膜内的流动的富PEG相的粘度而无法继续流动。

[0092] 图65示出急剧地减慢检测膜内的流动的富PEG相可通过留下不含PEG的空白间隔区进行处理。

[0093] 图66示出具有从流体的来源至LFA膜的恒定斜率的脱水LFA设计以减少留下的纳米探针的量。

[0094] 图67例示了使用PEG/盐ATPS的脱水ATPS-LFA系统。

[0095] 图68例示了具有含有脱水聚合物ATPS组分的纸垫的3D纸孔设计。

[0096] 图69A-图69B示出具有含有脱水聚合物ATPS组分的纸垫的3D纸孔LFA上的分离,其中所述孔位于(图69A)所述LFA的开始端和(图69B)不位于所述LFA的开始端。

[0097] 图70示出示例性2孔配置设计,其中存在2个由一定长度的水平纸隔开的不同3D孔。第一个孔含有脱水ATPS组分。第2个孔允许更多时间和空间用于相分离。

[0098] 图71示出MF1纸可与PEG-盐溶液中的血液样品相容。

[0099] 图72示出在MF1纸上过滤血液样品可为缓慢的。

[0100] 图73A-图73B示出在滤纸上使用(图73A)3层3-D孔或(图73B)5层3-D孔进行血液样品和PEG-盐溶液相分离的结果。

[0101] 图74示出在纸上使用3-D孔进行血液样品和PEG-盐溶液相分离的结果。

[0102] 图75示出使用包括过滤和浓缩纸层的3-D孔进行血液样品和PEG-盐溶液相分离的结果。

[0103] 图76示出使用夹心形式LFA进行病毒转运介质(VTM)中沙眼衣原体(*C. trachomatis*)的检测。

[0104] 图77示出使用夹心形式LFA和胶束ATPS进行变形链球菌(*S. mutans*)的检测。

[0105] 图78示出使用夹心形式LFA和PEG/盐ATPS进行变形链球菌的检测。

[0106] 图79示出使用竞争形式LFA和PEG/盐ATPS进行肌钙蛋白的检测。

[0107] 图80A-C示出关于添加混合ATPS至纸膜上的图示(图80A)和结果,其中所述ATPS的两个相被允许在流动通过所述纸之前在玻璃孔内充分分离。含有紫色葡聚糖涂布的金纳米粒子的PEG贫乏相(空心箭头)被观察到快速地流动通过所述纸,而含有蓝色染料的富PEG相(实心箭头)保留在所述纸膜的开始处。当使用(图80B)1:1体积比率ATPS或(图80C)9:1体积比率ATPS时,在所述纸膜内发生的增强的相分离为明显的。

[0108] 图81示出使用9:1体积Triton-X-PBS ATPS和3-D LFA在0.1ng/mL的FBS样品中进行pLDH的检测。

[0109] 图82示出在用于同时浓缩和检测的混合ATPS溶液中,或在相分离探针-分析物复

合物并且在一个相中浓缩之后在所述ATPS的这个相中添加至LFA中的探针-分析物复合物的图示。

### 具体实施方式

[0110] 本文提供允许在即时检验 (POC) 或使用点处执行并且提供用于医学、消费者和其它应用的适用工具的方法、装置、试剂盒和/或系统。本文提供的测试 (分析装置和/或系统) 是快速、简单并且易于使用的并且可由具有极少 (如果有的话) 临床诊断训练的个体容易地执行。所述测试为极其灵敏并且可靠的。在某些实施方案中, 所述装置和方法利用水性多相系统的浓缩能力连同LFA来提供意外令人惊讶的灵敏性, 例如相对于先前LFA分析的检测极限至少约10倍至约100倍的改进, 其接近或满足并且在某些情况下超过基于实验室的分析 (如酶联免疫吸附测定 (ELISA)) 的灵敏性。

#### [0111] I. 装置

[0112] 本文公开用于样品中靶标分析物的检测和/或定量的装置, 其利用 (例如, 被配置成提供) 侧流分析 (LFA) 和水性两相系统 (ATPS), 其中所述ATPS包含分离成为第一相溶液和第二相溶液的混合相溶液, 并且其中所述LFA包括用于检测所述靶标分析物的测试线和对照线。在一些实施方案中, 所述分离所述混合相成为所述第一相溶液和所述第二相溶液发生于所述LFA内。在一些实施方案中, 所述分离所述混合相成为所述第一相溶液和所述第二相溶液并未发生于所述LFA内。在一些实施方案中, 所述第一相溶液比所述第二相溶液更快地流动通过所述LFA并且被称作领先流体, 而所述第二相溶液被称作滞后流体。在一些实施方案中, 所述第二相溶液比所述第一相溶液更快地流动通过所述LFA并且被称作领先流体, 而所述第一相溶液被称作滞后流体。在一些实施方案中, 所述靶标分析物分配/浓缩于领先流体中。在一些实施方案中, 所述靶标分析物分配/浓缩于滞后流体中。

#### [0113] 配置和操作

[0114] 在一些实施方案中, 所述装置包括用于将所述ATPS和/或样品施用于所述装置的口。在一些实施方案中, 所述装置包括包括ATPS的第一组件和包括LFA的第二组件。在一些实施方案中, 所述第一组件和所述第二组件作为独立组件提供。在一些实施方案中, 所述第一组件和所述第二组件由用户接合在一起。在一些实施方案中, 所述第一组件具有连接至ATPS的第一口。在一些实施方案中, 所述第一组件包括用于ATPS的腔室。在一些实施方案中, 所述第一口连接至所述腔室。在一些实施方案中, 所述第一口被配置成用于将所述样品和/或靶标分析物施用于所述第一组件。在一些实施方案中, 所述第一口被配置成用于将ATPS或其组分施用于所述第一组件。在一些实施方案中, 第二口被配置成用于将所述样品和/或靶标分析物施用于所述第二组件。在一些实施方案中, 所述第二口被配置成用于将ATPS或其组分施用于所述第二组件。

[0115] 在一些实施方案中, 所述装置包括多个腔室。在一些实施方案中, 所述第一组件包括容纳样品和/或ATPS溶液并且允许相分离发生的第一腔室。在一些实施方案中, 所述第二组件包括容纳LFA并且在相分离已经发生之后促进将靶标分析物应用于 LFA的第二腔室 (例如, 检测腔室)。在一些实施方案中, 可添加额外腔室以促进流动, 如利用压力的差异或产生真空。在一些实施方案中, 所述装置从ATPS收集靶标分析物并且使用机械组件将其转移至LFA。

[0116] 在一些实施方案中,将ATPS和LFA进行整合(ATPS-LFA),即ATPS组件直接地或通过连接器接合至LFA组件。在某些实施方案中,ATPS和LFA作为独立组件提供,其例如由用户组装在一起,或其作为单一整合单元提供。在一些实施方案中,所述装置包括ATPS与LFA之间的连接(例如,ATPS-LFA连接器)。ATPS-LFA连接器的说明性而非限制性实例包括管、口、阀、漏斗、闸、泵、孔、通道、过滤器、其组合等。在一些实施方案中,所述整合装置包括在LFA上的脱水ATPS组分。在一些实施方案中,所述装置包括单一口,其中所述单一口连接至ATPS-LFA。在一些实施方案中,所述单一口被配置成用于将所述样品和/或靶标分析物施用于ATPS-LFA。在一些实施方案中,所述单一口被配置成用于将ATPS或其组分施用于ATPS-LFA。在一些实施方案中,所述口包含但不限于选自管、漏斗、阀、注射器、吸管、通道、柱塞、活塞、泵、其组合等的结构。

[0117] 在一些实施方案中,所述装置包括LFA条。在一些实施方案中,所述装置被配置成将所述LFA条插入至所述ATPS中。在一些实施方案中,ATPS和LFA容纳于单一外壳中。

[0118] 在一些实施方案中,所述装置进一步包括递送所述样品和/或靶标分析物至ATPS的致动器。在一些实施方案中,所述装置进一步包括将溶液递送至LFA的致动器。

[0119] 便携性

[0120] 在一些实施方案中,所述装置为便携式装置。在一些实施方案中,所述装置重小于约100盎司,小于约90盎司,小于约80盎司,小于约70盎司,小于约60盎司,小于约50盎司,小于约40盎司,小于约32盎司,小于约24盎司,小于约16盎司,小于约8盎司,小于约4盎司,小于约2盎司或小于约一盎司。在一些实施方案中,多个装置被包装于便携式容器中。在一些实施方案中,所述装置的最大长度为约1英寸、约2英寸、约3英寸、约4英寸、约6英寸、约7英寸、约8英寸、约9英寸、约10英寸、约12英寸、约14英寸、约16英寸、约18英寸、约19英寸、约20英寸、约24英寸、约26英寸、约28英寸或约30英寸。在一些实施方案中,所述装置被折叠至小于当其未折叠时其比例的比例,使得其可便利地进行传输和/或存储。

[0121] 图4例示了可使用活塞和柱塞系统组合ATPS与LFA的便携式装置。在一个说明性实施方案中,浓缩和检测腔室由止回阀或确保LFA条不会过早地与非浓缩样品接触的相似机制连接。所述活塞和柱塞系统可用于将样品汲取至浓缩腔室中。浓缩可在通过所述装置取样之前发生,通过在分析物提取之前预混合样品与ATPS溶液发生,或浓缩可在所述装置内部通过在浓缩腔室内预装载呈液体形式或呈脱水形式的ATPS溶液而发生。在相分离发生之后,用户可使用活塞/柱塞起始检测过程以通过止回阀将来自浓缩腔室的预定体积的浓缩分析物重定向至检测腔室。所述止回阀的位置可进行修改以将其中存在所述分析物的所需体相(顶相或底相)转移至LFA条。

[0122] 图5说明了展示用于应用于LFA条的顶部体相的收集的装置设计。在所说明的实施方案中,与ATPS溶液预混合的样品被汲取至装置中。在相分离之后,用户可通过按压按钮来起始检测步骤以允许LFA测试条与ATPS的顶相中的浓缩分析物接触。在多个实施方案中,ATPS溶液组分可以液体或脱水形式预装载于装置中提供。

[0123] 图6A-6D提供便携式盒装置的一个说明性而非限制性实施例。样品和ATPS溶液可首先装载至所述盒装置上的样品孔中。所述孔可设计为可脱离组件,其可在装载样品之后附接于所述盒。在相分离发生之后,检测步骤可通过LFA测试条或样品孔的机械位移来起始。

[0124] 图7例示了一种配置,其中磁性捕捉探针可应用于将ATPS和LFA整合于便携式装置中。与图4中所示的装置相似,所说明的装置可利用柱塞和活塞系统将已经通过外部磁体收集的浓缩分析物转移至检测腔室中。在一些实施方案中,所述装置不需要电源(例如电力)。

#### [0125] 检测时间

[0126] 在一些实施方案中,所述装置具有检测时间。在一些实施方案中,所述检测时间包括相分离时间。在一些实施方案中,所述检测时间包括流动时间。

[0127] 在一些实施方案中,所述检测时间(例如,在将样品应用于所述装置与在对照物/测试类似物处检测靶标分析物之间的时间)小于约2小时、小于约1.5小时、小于约1小时或小于约半小时。在一些实施方案中,所述检测时间小于约30分钟、小于约25分钟、小于约20分钟、小于约15分钟、小于约10分钟或小于约5分钟。在一些实施方案中,所述检测时间小于约5分钟、小于约4分钟、小于约3分钟、小于约2分钟或小于约1分钟。在一些实施方案中,所述检测时间小于约30秒、小于约20秒或小于约10秒。

[0128] 在一些实施方案中,所述相分离时间(例如,所述第一/第二相溶液与ATPS的混合相溶液分离所耗用的时间)小于约2小时、小于约1.5小时、小于约1小时或小于约半小时。在一些实施方案中,所述检测时间小于约30分钟、小于约25分钟、小于约20分钟、小于约15分钟、小于约10分钟或小于约5分钟。在一些实施方案中,所述相分离时间小于约5分钟、小于约4分钟、小于约3分钟、小于约2分钟或小于约1分钟。在一些实施方案中,所述相分离时间小于约30秒、小于约20秒或小于约10秒。

[0129] 在一些实施方案中,所述流动时间(例如,含有靶标分析物的溶液从样品垫到达LFA的测试线和对照线所耗用的时间)小于约2小时、小于约1.5小时、小于约1小时或小于约半小时。在一些实施方案中,所述流动时间小于约30分钟、小于约25分钟、小于约20分钟、小于约15分钟、小于约10分钟或小于约5分钟。在一些实施方案中,所述检测时间小于约5分钟、小于约4分钟、小于约3分钟、小于约2分钟或小于约1分钟。在一些实施方案中,所述流动时间小于约30秒、小于约20秒或小于约10秒。

#### [0130] 检测极限

[0131] 在一些实施方案中,所述装置具有检测极限,其中所述检测极限是必须存在于样品中以便进行检测的靶标分析物的最少量。

[0132] 在一些实施方案中,所述样品中靶标分析物的最少量为约0.01ng/ml、约0.05 ng/ml、约0.1ng/ml、约0.15ng/ml、约0.20ng/ml、约0.25ng/ml、约0.3ng/ml、约0.35ng/ml、约0.40ng/ml、约0.45ng/ml、约0.5ng/ml、约0.55ng/ml、约0.60ng/ml、约0.65ng/ml、约0.7ng/ml、约0.75ng/ml、约0.80ng/ml、约0.85ng/ml、约0.9ng/ml、约0.95ng/ml或约1ng/ml。在一些实施方案中,所述样品中靶标分析物的最少量为约1ng/ml、约10ng/ml、约20ng/ml、约30ng/ml、约40ng/ml、约50ng/ml、约60 ng/ml、约70ng/ml、约80ng/ml、约90ng/ml、约100ng/ml、约110ng/ml、约120ng/ml、约130ng/ml、约140ng/ml、约150ng/ml、约160 $\mu$ g/ml、约170ng/ml、约180ng/ml、约190ng/ml、约200ng/ml、约250ng/ml、约300ng/ml、约350ng/ml、约400ng/ml、约450ng/ml、约500ng/ml、约550ng/ml、约600ng/ml、约650ng/ml、约700ng/ml、约750ng/ml、约800ng/ml、约850ng/ml、约900ng/ml、约980ng/ml或约1000ng/ml。

[0133] 在一些实施方案中,所述靶标分析物的最少量为约1 $\mu$ g/ml、约2 $\mu$ g/ml、约3  $\mu$ g/ml、约4 $\mu$ g/ml、约5 $\mu$ g/ml、约6 $\mu$ g/ml、约7 $\mu$ g/ml、约8 $\mu$ g/ml、约9 $\mu$ g/ml、约10 $\mu$ g/ml、约11 $\mu$ g/ml、约

12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或约20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在一些实施方案中,所述靶标分析物的最少量为约10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或约100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在一些实施方案中,所述靶标分析物的最少量为约10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0134] 在一些实施方案中,所述靶标分析物的最少量为约1万亿分率、约10万亿分率或约100万亿分率。在一些实施方案中,所述靶标分析物的最少量为约1十亿分率、约10十亿分率、约100十亿分率、约1000十亿分率、约10,000十亿分率或约100,000十亿分率。在一些实施方案中,所述靶标分析物的最少量为约1千分率、约10千分率或约100千分率。

[0135] 在一些实施方案中,所述靶标分析物存在于细胞上或源于细胞。在一些实施方案中,所述样品具有细胞的最小浓度以便检测到存在于细胞上或源于细胞的靶标分析物。在一些实施方案中,细胞的最小浓度为约1个细胞/ $\text{ml}$ 样品、约10个细胞/ $\text{ml}$ 样品、约20个细胞/ $\text{ml}$ 样品、约30个细胞/ $\text{ml}$ 样品、约40个细胞/ $\text{ml}$ 样品、约50个细胞/ $\text{ml}$ 样品、约60个细胞/ $\text{ml}$ 样品、约70个细胞/ $\text{ml}$ 样品、约80个细胞/ $\text{ml}$ 样品、约90个细胞/ $\text{ml}$ 样品或约100个细胞/ $\text{ml}$ 样品。

[0136] 在一些实施方案中,细胞的最小浓度为约 $1 \times 10^0$ 个细胞/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^1$ 个细胞/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^2$ 个细胞/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^3$ 个细胞/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^4$ 个细胞/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^5$ 个细胞/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^6$ 个细胞/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^7$ 个细胞/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^8$ 个细胞/ $\text{mL}$ 或约 $1 \times 10^9$ 个细胞/ $\text{mL}$ 。在一些实施方案中,细胞的最小浓度为约 $1 \times 10^6$ 个细胞/ $\text{mL}$ 。

[0137] 在一些实施方案中,所述靶标分析物为病毒粒子并且存在于病毒上或源于病毒。在一些实施方案中,所述样品具有病毒粒子的最小浓度以便检测到存在于病毒上或源于病毒的靶标分析物。在一些实施方案中,所述样品中病毒粒子的最小浓度为约 $1 \times 100$  pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^1$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^2$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^3$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^4$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^5$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^6$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^7$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^8$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^9$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^{10}$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^{11}$ pfu/ $\text{mL}$ 或约 $1 \times 10^{12}$ pfu/ $\text{mL}$ 。

[0138] 在一些实施方案中,所述样品中病毒粒子的最小浓度为约 $1 \times 10^6$ pfu/ $\text{mL}$ 、 $2 \times 10^6$  pfu/ $\text{mL}$ 、 $3 \times 10^6$ pfu/ $\text{mL}$ 、 $4 \times 10^6$ pfu/ $\text{mL}$ 、 $5 \times 10^6$ pfu/ $\text{mL}$ 、 $6 \times 10^6$ pfu/ $\text{mL}$ 、 $7 \times 10^6$ pfu/ $\text{mL}$ 、 $8 \times 10^6$ pfu/ $\text{mL}$ 、 $9 \times 10^6$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^7$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $2 \times 10^7$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $3 \times 10^7$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $4 \times 10^7$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $5 \times 10^7$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $6 \times 10^7$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $7 \times 10^7$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $8 \times 10^7$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $9 \times 10^7$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^8$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $2 \times 10^8$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $3 \times 10^8$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $4 \times 10^8$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $5 \times 10^8$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $6 \times 10^8$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $7 \times 10^8$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $8 \times 10^8$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $9 \times 10^8$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^9$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $2 \times 10^9$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $3 \times 10^9$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $4 \times 10^9$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $5 \times 10^9$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $6 \times 10^9$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $7 \times 10^9$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $8 \times 10^9$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $9 \times 10^9$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $1 \times 10^{10}$  pfu/ $\text{mL}$ 、约 $2 \times 10^{10}$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $3 \times 10^{10}$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $4 \times 10^{10}$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $5 \times 10^{10}$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $6 \times 10^{10}$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $7 \times 10^{10}$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $8 \times 10^{10}$ pfu/ $\text{mL}$ 、约 $9 \times 10^{10}$ pfu/ $\text{mL}$ 或约 $1 \times 10^{11}$  pfu/ $\text{mL}$ 。在一些实施方案中,所述样品中病毒粒子的最小浓度为约 $1 \times 10^7$ pfu/ $\text{mL}$ 。在一些实施方案中,所述样品中病毒粒子的最小浓度为约 $1 \times 10^8$ pfu/ $\text{mL}$ 。在一些实施方案中,所述样品中病毒粒子的最小浓度为约 $1 \times 10^9$ pfu/ $\text{mL}$ 。

[0139] 温度

[0140] 在一些实施方案中,所述装置无论装置环境的温度如何均操作,不过当执行分析

时,所述温度当然必须低于装置材料的燃点/熔点/闪点并且低于所述装置的组分挥发、升华或降解时所处的温度并且高于所述装置的组分的凝固点。在一些实施方案中,所述装置在室温下操作。在一些实施方案中,所述装置在约-50摄氏度与约60摄氏度之间的温度下操作。在一些实施方案中,所述装置在约-10摄氏度与约45摄氏度之间的温度下操作。在一些实施方案中,所述装置在约10摄氏度与约30摄氏度之间的温度下操作。

[0141] 水性两相系统 (ATPS)

[0142] 在某些实施方案中,所述装置被配置成支持使用本文提供的所述装置的水性两相系统 (ATPS) 方法和分析。在一些实施方案中,所述ATPS包含相溶液。术语“相溶液”一般是指所述ATPS的第一相溶液或第二相溶液。在一些实施方案中,所述相溶液是呈混合溶液(例如,具有第一/第二相溶液)。在一些实施方案中,所述相溶液是从所述 ATPS的混合溶液分配之后的第一/第二相溶液。在一些实施方案中,所述相溶液是从所述LFA中的混合溶液分配之后的第一/第二相溶液。当其呈混合状态(例如,具有第一相溶液)时,其可指第二相溶液。在一些实施方案中,所述相溶液是所述LFA中的领先流体。在一些实施方案中,所述相溶液是所述LFA中的滞后流体。

[0143] 在一些实施方案中,所述ATPS包含最初混合的两种水溶液(例如,混合相溶液),即第一相溶液和第二相溶液。在一些实施方案中,所述混合相溶液是均质溶液。在一些实施方案中,第一相溶液和第二相溶液不混溶。在一些实施方案中,所述不溶混性是由温度的改变,和/或如盐的不同组分的浓度的改变驱动。在一些实施方案中,所述第一/第二相溶液包含如胶束、盐和/或聚合物的组分。在一些实施方案中,与所述 ATPS接触的靶标分析物基于其物理和化学特性(如尺寸、形状、疏水性和电荷)优先分布、分配和/或浓缩于第一相溶液中而非第二相溶液,或反之亦然。在一些实施方案中,所述靶标分析物(例如,哺乳动物细胞、细菌或病毒的组分)主要(或极端地)分配于所述ATPS的第一或第二相溶液中,并且因此浓缩于所述ATPS中。在一些实施方案中,所述靶标分析物通过调整第一相溶液与第二相溶液之间的体积比率来浓缩。在一些实施方案中,所述靶标分析物通过减少其中分配所述分析物的相的体积来浓缩。举例说明,在一些实施方案中,所述靶标分析物例如通过使用1:9体积比率的第一相溶液:第二相溶液在第一相溶液中浓缩10倍,因为其中极端地分配所述分析物的相的体积是总体积的1/10。

[0144] 在一些实施方案中,通过使用其它比率获得其它浓度。因此,在一些实施方案中,第一相溶液与第二相溶液的比率选自约1:1、约1:2、约1:3、约1:4、约1:5、约1:6、约1:7、约1:8、约1:9和约1:10的比率。在一些实施方案中,第一相溶液与第二相溶液的比率选自约1:20、约1:30、约1:40、约1:50、约1:60、约1:70、约1:80、约1:90 和约1:100的比率。在一些实施方案中,第一相溶液与第二相溶液的比率选自约1:200、约1:300、约1:400、约1:500、约1:600、约1:700、约1:800、约1:900和约1:1000 的比率。

[0145] 在一些实施方案中,第二相溶液与第一相溶液的比率选自约1:1、约1:2、约1:3、约1:4、约1:5、约1:6、约1:7、约1:8、约1:9和约1:10的比率。在一些实施方案中,第二相溶液与第一相溶液的比率选自约1:20、约1:30、约1:40、约1:50、约1:60、约1:70、约1:80、约1:90和约1:100的比率。在一些实施方案中,第二相溶液与第一相溶液的比率选自约1:200、约1:300、约1:400、约1:500、约1:600、约1:700、约1:800、约1:900和约1:1000的比率。

[0146] 在一些实施方案中,所述分析物大体上均匀地分配于第一相溶液与第二相溶液之

间,从而防止所述分析物的浓缩。在所述系统中,靶标分析物的浓缩是通过引入额外组件来实现,所述额外组件如捕捉所述靶标分析物的探针,并且其中所述探针主要分配于一个相中,由此增强所述靶标分析物的分配行为以使得能够浓缩。在一些实施方案中,含有浓缩分析物的第一/第二相溶液被收集并且应用于所述LFA。所述额外组件的使用不限于大体上均匀的分配系统。应了解,即使在所述分析物主要分配于一个相中的情况下,在一些实施方案中,所述分配也通过利用如上文所述的额外组件(例如探针)来改进。

[0147] 在一些实施方案中,所述第一/第二相溶液包括胶束溶液。在一些实施方案中,所述胶束溶液包含非离子表面活性剂。在一些实施方案中,所述胶束溶液包含清洁剂。在一些实施方案中,所述胶束溶液包含Triton-X。在一些实施方案中,所述胶束溶液包含类似于Triton-X的聚合物,举非限制性实例,如Igepal CA-630和Nonidet P-40。在一些实施方案中,所述胶束溶液基本上由Triton-X组成。

[0148] 在一些实施方案中,所述胶束溶液具有约0.01厘泊至约5000厘泊、约0.01厘泊至约4500厘泊、约0.01厘泊至约4000厘泊、约0.01厘泊至约3500厘泊、约0.01厘泊至约3000厘泊、约0.01厘泊至约2500厘泊、约0.01厘泊至约2000厘泊、约0.01厘泊至约1500厘泊、约0.01厘泊至约1000厘泊或约0.01厘泊至约500厘泊的粘度(在室温约25摄氏度下)。在一些实施方案中,所述胶束溶液具有约0.01厘泊至约450厘泊、约0.01厘泊至约400厘泊、约0.01厘泊至约350厘泊、约0.01厘泊至约300厘泊、约0.01厘泊至约250厘泊、约0.01厘泊至约200厘泊、约0.01厘泊至约150厘泊或约0.01厘泊至约100厘泊的粘度(在室温约25摄氏度下)。

[0149] 在一些实施方案中,所述第一/第二相溶液包含聚合物(例如聚合物溶液)。在某些实施方案中,所述聚合物为聚乙二醇(PEG)。在多个实施方案中,所述PEG可具有在1000与100,000之间的分子量。在某些实施方案中,所述PEG选自PEG-4600、PEG-8000和PEG-20,000PEG。在某些实施方案中,所述聚合物为聚丙二醇(PPG)。在多个实施方案中,所述PPG可具有介于100与10,000之间的分子量。在某些实施方案中,所述PPG选自PPG 425。在某些实施方案中,所述聚合物为葡聚糖。在多个实施方案中,所述葡聚糖可具有介于1000与1,000,000之间的分子量。在某些实施方案中,所述葡聚糖选自葡聚糖6000、葡聚糖9000、葡聚糖-35,000和葡聚糖-200,000。

[0150] 在一些实施方案中,所述聚合物溶液选自为约0.01%w/w、约0.05%w/w、约0.1%w/w、约0.15%w/w、约0.2%w/w、约0.25%w/w、约0.3%w/w、约0.35%w/w、约0.4%w/w、约0.45%w/w、约0.5%w/w、约0.55%w/w、约0.6%w/w、约0.65%w/w、约0.7%w/w、约0.75%w/w、约0.8%w/w、约0.85%w/w、约0.9%w/w、约0.95%w/w或约1%w/w的聚合物溶液。在一些实施方案中,所述聚合物溶液选自为约1%w/w、约2%w/w、约3%w/w、约4%w/w、约5%w/w、约6%w/w、约7%w/w、约8%w/w、约9%w/w、约10%w/w、约11%w/w、约12%w/w、约13%w/w、约14%w/w、约15%w/w、约16%w/w、约17%w/w、约18%w/w、约19%w/w、约20%w/w、约21%w/w、约22%w/w、约23%w/w、约24%w/w、约25%w/w、约26%w/w、约27%w/w、约28%w/w、约29%w/w、约30%w/w、约31%w/w、约32%w/w、约33%w/w、约34%w/w、约35%w/w、约36%w/w、约37%w/w、约38%w/w、约39%w/w、约40%w/w、约41%w/w、约42%w/w、约43%w/w、约44%w/w、约45%w/w、约46%w/w、约47%w/w、约48%w/w、约49%w/w和约50%w/w的聚合物溶液。在一些实施方案中,所述聚合物溶液选自为约10%w/w、约20%w/w、约30%w/w、约40%w/w、约50%w/w、约60%w/w、约70%w/w、约80%w/w或约90%w/w的聚合物溶液。在一

些实施方案中,所述聚合物溶液选自为约10%w/w至约80%w/w的聚合物溶液。在一些实施方案中,所述聚合物溶液选自为约10%w/w至约25%w/w的聚合物溶液。

[0151] 在一些实施方案中,所述第一/第二相溶液包含盐(例如,第一/第二相溶液为盐溶液)。在一些实施方案中,所述靶标分析物和/或探针-分析物复合物分配于所述盐溶液中。在一些实施方案中,所述靶标分析物和/或探针-分析物复合物分配于所述盐溶液中,其中所述盐溶液包含亲液盐(kosmotropic salt)。在一些实施方案中,所述靶标分析物和/或探针-分析物复合物分配于所述盐溶液中,其中所述盐溶液包含离液盐 chaotropic salt)。在一些实施方案中,所述盐选自镁盐、锂盐、钠盐、钾盐、铯盐、锌盐和铝盐。在一些实施方案中,所述盐选自溴化物盐、碘化物盐、氟化物盐、碳酸盐、硫酸盐、柠檬酸盐、羧酸盐、硼酸盐和磷酸盐。在一些实施方案中,所述盐是磷酸钾。在一些实施方案中,所述盐是硫酸铵。

[0152] 在一些实施方案中,所述盐溶液选自为约0.01%w/w、约0.05%w/w、约0.1%w/w、约0.15%w/w、约0.2%w/w、约0.25%w/w、约0.3%w/w、约0.35%w/w、约0.4%w/w、约0.45%w/w、约0.5%w/w、约0.55%w/w、约0.6%w/w、约0.65%w/w、约0.7%w/w、约0.75%w/w、约0.8%w/w、约0.85%w/w、约0.9%w/w、约0.95%w/w或约1%w/w的盐溶液。在一些实施方案中,所述盐溶液选自为约1%w/w、约2%w/w、约3%w/w、约4%w/w、约5%w/w、约6%w/w、约7%w/w、约8%w/w、约9%w/w、约10%w/w、约11%w/w、约12%w/w、约13%w/w、约14%w/w、约15%w/w、约16%w/w、约17%w/w、约18%w/w、约19%w/w、约20%w/w、约21%w/w、约22%w/w、约23%w/w、约24%w/w、约25%w/w、约26%w/w、约27%w/w、约28%w/w、约29%w/w、约30%w/w、约31%w/w、约32%w/w、约33%w/w、约34%w/w、约35%w/w、约36%w/w、约37%w/w、约38%w/w、约39%w/w、约40%w/w、约41%w/w、约42%w/w、约43%w/w、约44%w/w、约45%w/w、约46%w/w、约47%w/w、约48%w/w、约49%w/w和约50%w/w的盐溶液。在一些实施方案中,所述盐溶液选自为约0.1%w/w至约10%w/w的盐溶液。在一些实施方案中,所述盐溶液选自为约1%w/w至约10%的盐溶液。

[0153] 在一些实施方案中,所述第一/第二相溶液包含不与水混溶的溶剂。在一些实施方案中,所述溶剂包含非极性有机溶剂。在一些实施方案中,所述溶剂包含油。在一些实施方案中,所述溶剂选自戊烷、环戊烷、苯、1,4-二噁烷、二乙醚、二氯甲烷、氯仿、甲苯和己烷。

[0154] 在一些实施方案中,所述第一相溶液包含胶束溶液并且所述第二相溶液包含聚合物。在一些实施方案中,所述第二相溶液包含胶束溶液并且所述第一相溶液包含聚合物。在一些实施方案中,所述第一相溶液包含胶束溶液并且所述第二相溶液包含盐。在一些实施方案中,所述第二相溶液包含胶束溶液并且所述第一相溶液包含盐。在一些实施方案中,所述胶束溶液是Triton-X溶液。在一些实施方案中,所述第一相溶液包含第一聚合物并且所述第二相溶液包含第二聚合物。在一些实施方案中,第一/第二聚合物选自聚乙二醇和葡聚糖。在一些实施方案中,所述第一相溶液包含聚合物并且所述第二相溶液包含盐。在一些实施方案中,所述第二相溶液包含聚合物并且所述第一相溶液包含盐。在一些实施方案中,所述第一相溶液包含聚乙二醇并且所述第二相溶液包含磷酸钾。在一些实施方案中,所述第二相溶液包含聚乙二醇并且所述第一相溶液包含磷酸钾。在一些实施方案中,所述第一相溶液包含盐并且所述第二相溶液包含盐。在一些实施方案中,所述第一相溶液包含亲液盐并且所述第二相溶液包含离液盐。在一些实施方案中,所述第二相溶液包含亲液盐并且所述第一相溶液包含离液盐。

[0155] 在一些实施方案中,所述第一相溶液选自表1的组分1并且所述第二相溶液选自表1的组分2。在一些实施方案中,所述第二相溶液选自表1的组分1并且所述第二相溶液选自表1的组分2。

[0156] 在一些实施方案中,表1的组分悬浮或溶解于缓冲液中。在一些实施方案中,表1的组分悬浮/溶解于可与样品所来源的生物系统相容的缓冲液中。在一些实施方案中,表1的组分是悬浮/溶解于生理盐水溶液中。在一些实施方案中,表1的组分悬浮/溶解于PBS中。在一些实施方案中,表1的组分悬浮/溶解于水中。

[0157] 表1. 说明性水性两相提取系统

	组分 1	组分 2
	<b>聚合物/聚合物系统</b>	
[0158]	聚乙二醇	葡聚糖 Ficoll 聚乙烯吡咯烷酮 聚乙烯醇 羟基丙基淀粉
	聚丙二醇	葡聚糖 羟基丙基葡聚糖 聚乙烯吡咯烷酮
	聚乙烯醇	葡聚糖 羟基丙基葡聚糖
	聚乙烯吡咯烷酮	葡聚糖 麦芽糊精
	甲基纤维素	葡聚糖 羟基丙基葡聚糖
	乙基羟基乙基纤维素	葡聚糖
	<b>聚合物/盐系统</b>	
[0159]	聚乙二醇	磷酸钾 硫酸钠 硫酸镁 硫酸铵 柠檬酸钠
	丙二醇(PPG)	磷酸钾
	甲氧基聚乙二醇	磷酸钾
	聚乙烯吡咯烷酮	磷酸钾

[0160] 在一些实施方案中,所述装置进一步包括被配置成与所述ATPS接触放置的收集器,其中所述靶标分析物在所述收集器和所述第一相溶液和/或第二相溶液的界面处分配。在一些实施方案中,所述收集器包含选自塑料、中孔材料、硅石、聚丙烯、磁体、磁性粒子、顺磁性粒子、具有孔的材料、具有凹槽的材料和其任何组合的材料。在一些实施方案中,所述收集器包含聚丙烯。在一些实施方案中,收集器经过优化以增加靶标分析物收集。在一些实施方案中,所述收集器包括孔以最大化表面积。在一些实施方案中,所述孔的宽度为约1 $\mu$ m、约5 $\mu$ m、约10 $\mu$ m、约15 $\mu$ m、约20 $\mu$ m、约25 $\mu$ m、约30 $\mu$ m、约35 $\mu$ m、约40 $\mu$ m、约45 $\mu$ m、约50 $\mu$ m、约55 $\mu$ m、

约60 $\mu\text{m}$ 、约65 $\mu\text{m}$ 、约70 $\mu\text{m}$ 、约75 $\mu\text{m}$ 、约80 $\mu\text{m}$ 、约85 $\mu\text{m}$ 、约90 $\mu\text{m}$ 、约95 $\mu\text{m}$ 或约100  $\mu\text{m}$ 。在一些实施方案中,所述孔的宽度为约100 $\mu\text{m}$ 、约200 $\mu\text{m}$ 、约300 $\mu\text{m}$ 、约400  $\mu\text{m}$ 、约500 $\mu\text{m}$ 、约600 $\mu\text{m}$ 、约700 $\mu\text{m}$ 、约800 $\mu\text{m}$ 、约900 $\mu\text{m}$ 或约1mm。在一些实施方案中,所述孔的深度为约1 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 、约10 $\mu\text{m}$ 、约15 $\mu\text{m}$ 、约20 $\mu\text{m}$ 、约25 $\mu\text{m}$ 、约30 $\mu\text{m}$ 、约35 $\mu\text{m}$ 、约40 $\mu\text{m}$ 、约45 $\mu\text{m}$ 、约50 $\mu\text{m}$ 、约55 $\mu\text{m}$ 、约60 $\mu\text{m}$ 、约65 $\mu\text{m}$ 、约70 $\mu\text{m}$ 、约75 $\mu\text{m}$ 、约80 $\mu\text{m}$ 、约85 $\mu\text{m}$ 、约90 $\mu\text{m}$ 、约95 $\mu\text{m}$ 或约100  $\mu\text{m}$ 。在一些实施方案中,所述孔的深度为约100 $\mu\text{m}$ 、约200 $\mu\text{m}$ 、约300 $\mu\text{m}$ 、约400  $\mu\text{m}$ 、约500 $\mu\text{m}$ 、约600 $\mu\text{m}$ 、约700 $\mu\text{m}$ 、约800 $\mu\text{m}$ 、约900 $\mu\text{m}$ 或约1mm。

[0161] 侧流分析(LFA)

[0162] 在某些实施方案中,本文所述的装置和系统被配置成提供用于样品中靶标分析物的检测的侧流分析(LFA),其中所述LFA连同水性两相系统(ATPS)使用。在一些实施方案中,所述LFA包括其中安置有所述ATPS或其组分的多孔基质,其中所述多孔基质被配置成当所述ATPS或其组分呈流体相时允许所述ATPS或其组分流动通过所述多孔基质并且具有充足孔隙率以允许所述ATPS或其组分流动通过所述多孔基质。所述多孔LFA装置在本文中称作纸或纸流体装置并且这些术语可互换使用。如上文所述,如本文所用的纸不限于来自木材或其它纤维植物物质的浆状物的薄片,不过在某些实施方案中,涵盖所述纸用于本文所述的LFA装置中的用途。

[0163] 在一些实施方案中,所述多孔基质是充分多孔的以允许所述ATPS的混合相溶液、第一相溶液和/或第二相溶液和/或靶标分析物流动通过所述LFA。在一些实施方案中,所述多孔基质对于使所述混合相溶液、第一相溶液和/或第二相溶液和/或靶标分析物垂直地和/或水平地流动通过所述LFA来说充分长和/或足够深。在一些实施方案中,所述第一相溶液以第一速率流动通过所述多孔基质并且所述第二相溶液以第二速率流动通过所述多孔基质,其中所述第一速率和所述第二速率不同。在一些实施方案中,所述LFA的多孔基质包含选自烧结玻璃陶瓷、矿物质、纤维素、玻璃纤维、硝基纤维素、聚偏二氟乙烯、尼龙、电荷改性尼龙、聚醚砜和其组合的材料。

[0164] 流动时浓缩

[0165] 先前在ATPS中的相分离已经在滞止条件下执行。然而,我们最近发现ATPS可在所述溶液流动通过纸时相分离,我们将这称作“流动时浓缩”。这一发现是令人兴奋并且有趣的,因为所述纸已经被发现显著地加速浓缩过程。基于这一关键现象,我们已经设计一种纸流体装置来充分地整合组合的ATPS和LFA诊断剂所必需的组分。当所述ATPS在不同条件下流动通过不同类型的纸时研究所述ATPS是至关重要的以允许我们开发更复杂的纸流体检测装置。从使用不同ATPS(如聚合物-盐ATPS和胶束ATPS)时我们的实验数据可知,当将均质ATPS溶液应用于某些纸材料时,在所述溶液流动时将发生相分离和分析物浓缩。我们还证明了这一现象即使在制造具有变化的体积比率的ATPS时也得以保持,所述体积比率为例如顶相的体积除以底相的体积(参看例如图12A-图12C)。

[0166] 在一些实施方案中,所述LFA包括纸。在一些实施方案中,所述纸包括允许流体流动通过的多孔材料片。在一些实施方案中,所述纸包括多个允许流体流动通过的多孔材料片。在一些实施方案中,所述纸包含选自纤维素、玻璃纤维、硝基纤维素、聚偏二氟乙烯、电荷改性尼龙、聚醚砜等的材料。在一些实施方案中,所述纸为 HI-FLOWPLUS®膜。

[0167] 在一些实施方案中,所述纸为布纹纸。在一些实施方案中,所述纸为Whatman 纸。

在一些实施方案中,所述Whatman纸选自Whatman S17、Whatman MF1、Whatman VF1、Whatman Fusion 5、Whatman GF/DVA、Whatman LF1、Whatman CF1和Whatman CF4。

[0168] 在一些实施方案中,当所述靶标分析物流动通过所述LFA时,所述纸浓缩所述靶标分析物(例如,基于‘流动时浓缩’的装置)。在一些实施方案中,当所述靶标分析物水平地流动通过所述LFA时,所述纸浓缩所述靶标分析物。在一些实施方案中,当所述靶标分析物垂直地流动通过所述LFA时,所述纸浓缩所述靶标分析物。在一些实施方案中,当所述靶标分析物由于重力垂直地流动通过所述LFA时,所述纸浓缩所述靶标分析物。在一些实施方案中,当所述靶标分析物由于毛细管作用垂直地流动通过所述LFA时,所述纸浓缩所述靶标分析物。在一些实施方案中,所述纸具有影响何种相溶液将变为“领先流体”的特性。举非限制性实例,当使用PEG-盐ATPS时,将所述溶液添加至玻璃纤维纸中将使得盐相变为领先溶液,而使用纤维素纸将使得PEG相变为领先溶液。在一些实施方案中,所述纸内的相分离促进相分离。另举非限制性实例,胶束ATPS典型地在滞止ATPS中耗用数小时进行相分离,但如果应用于纸条,那么这一相分离在数分钟内发生。这通过使所述ATPS(其惯常为诊断过程中的速率决定步骤)变成我们的快速纸诊断分析的更可行选项而加速诊断过程。在一些实施方案中,所述‘流动时浓缩’装置包含PEG-盐ATPS。在一些实施方案中,所述‘流动时浓缩’装置包含胶束ATPS。在一些实施方案中,所述‘流动时浓缩’装置的LFA包含玻璃纤维纸。在一些实施方案中,所述‘流动时浓缩’装置的LFA包含硝基纤维素纸。

[0169] 在一些实施方案中,所述LFA包括:去除血细胞或其它微粒的过滤器;其中将包含靶标分析物的样品应用于所述LFA的样品垫;其中所述靶标分析物结合并且加以检测的检测区(例如测试线和对照线);和吸收应用于所述LFA的过量样品和/或溶液的吸收垫(例如,干燥接收纸)(参看例如图1顶部)。在一些实施方案中,所述对照线和/或测试线并非线路本身,而是区域或点。

[0170] 在一些实施方案中,所述LFA包括LFA条。术语“LFA”和“LFA条”在本文中可互换使用。在一些实施方案中,所述LFA条具有大于其宽度和深度的长度。在一些实施方案中,所述LFA为矩形的。在一些实施方案中,所述LFA具有选自圆形、卵形、正方形、多边形和不规则形状组成的组的形状。在一些实施方案中,所述LFA包含多个路径和/或接合点。在一些实施方案中,所述LFA条包括样品垫、检测区和吸收垫。在一些实施方案中,所述检测区位于所述样品垫与所述吸收垫之间,所述吸收垫芯吸所述样品与所述靶标分析物远离所述样品垫并且朝向检测区。

[0171] 夹心分析

[0172] 在一些实施方案中,所述LFA被配置成提供或执行夹心分析(参看例如图1,底部左图)。在一些实施方案中,所述夹心分析包含结合所述靶标分析物的捕捉部分。在一些实施方案中,所述装置包括探针。在一些实施方案中,所述探针包括可检测特性(比色、荧光、放射性等)。在一些实施方案中,所述探针包含与所述靶标分析物(例如抗体)相互作用的结合部分。在一些实施方案中,所述探针添加至样品中并且结合所述靶标分析物以形成探针-分析物复合物。在一些实施方案中,所述探针-分析物复合物应用于样品垫并且朝向吸收垫流动通过所述LFA。在一些实施方案中,所述探针-分析物复合物的靶标分析物结合于捕捉部分。在一些实施方案中,所述捕捉部分固定于测试线上并且所述探针-分析物复合物变得固定于所述测试线上。在一些实施方案中,所述探针为比色的,并且所述测试线将展现强颜色

(例如可检测信号),因为所述探针-分析物复合物聚集于测试线处,指示阳性结果。在一些实施方案中,在样品中不存在靶标分析物,并且所述探针-分析物复合物的探针不与所述捕捉部分相互作用,并且所述测试线的不存在指示阴性结果。在一些实施方案中,所述LFA包含在对照线上直接与所述探针和/或所述结合部分相互作用的探针捕捉部分,并且因此不考虑样品中靶标分析物的存在,所述探针/结合部分结合于所述探针捕捉部分并且聚集于对照线上。在一些实施方案中,所述探针捕捉部分为结合所述结合部分的二抗,其中所述结合部分为结合所述靶标分析物的一抗。在一些实施方案中,所述探针变得在对照线上固定并且加以检测,指示有效测试。在一些实施方案中,阳性结果(例如,靶标分析物存在于样品中)由在测试线和对照线处的可检测信号指示。在一些实施方案中,阴性结果由在对照线处的可检测信号指示。

#### [0173] 竞争分析

[0174] 在一些实施方案中,所述LFA被配置成提供或竞争分析(参看例如图1,底部右图)。在一些实施方案中,所述探针添加至样品中并且结合所述靶标分析物以形成探针-分析物复合物。在一些实施方案中,所述LFA包含固定于测试线上的靶标分析物。在一些实施方案中,所述探针由样品中的靶标分析物达到饱和并且所述探针将不结合于固定于测试线上的靶标分析物。在一些实施方案中,在测试线上不存在可检测信号指示阳性结果。在一些实施方案中,在样品中不存在靶标分析物,并且所述探针结合于测试线上的靶标分析物,指示阴性结果。在一些实施方案中,所述LFA包含在对照线上直接与所述探针相互作用的探针捕捉部分,并且不考虑样品中靶标分析物的存在,所述探针结合于所述探针捕捉部分并且聚集于对照线上。在一些实施方案中,所述探针变得在对照线上固定并且加以检测,指示有效测试。在一些实施方案中,阳性结果(例如,靶标分析物存在于样品中)由在测试线处无可检测信号但在对照线处有可检测信号指示。在一些实施方案中,阴性结果由在测试线和对照线处的可检测信号指示。

#### [0175] 孔

[0176] 在一些实施方案中,所述样品垫包括孔。在一些实施方案中,所述孔具有足以容纳溶液的体积,所述溶液选自由所述ATPS的至少一部分、所述第一相溶液的至少一部分、所述第二相溶液的至少一部分、所述靶标分析物的再悬浮溶液和其组合组成的组。

[0177] 在某些实施方案中,所述孔的体积在约1 $\mu$ L至约10 $\mu$ L范围内。在某些实施方案中,所述孔的体积在约1 $\mu$ L至约100 $\mu$ L范围内。在某些实施方案中,所述孔的体积在约1 $\mu$ L至约1000 $\mu$ L范围内。在某些实施方案中,所述孔的体积在约1 $\mu$ L至约5000 $\mu$ L范围内。在某些实施方案中,所述孔的体积在约1mL至约10mL范围内。在某些实施方案中,所述孔的体积在约1mL至约100mL范围内。在某些实施方案中,所述孔的体积在约1mL至约1000mL范围内。

[0178] 在一些实施方案中,所述再悬浮溶液包含用于使从所述ATPS浓缩/提取的靶标分析物再悬浮的缓冲液。

[0179] 在一些实施方案中,所述孔位于所述LFA中选自所述LFA的拐角、末端、中心、接合点、偏离中心处和弯曲处的位置处。在一些实施方案中,所述孔包括一个或多个选自盐垫、探针垫、聚合物垫和其组合的垫。在一些实施方案中,所述孔包括多个垫。在一些实施方案中,当流动通过所述多个垫时,所述第一/第二相溶液分离和/或所述靶标分析物浓缩。在一些实施方案中,当垂直地流动通过所述多个垫时,所述第一/第二相溶液分离和/或所述靶

标分析物浓缩。在一些实施方案中,当由于重力垂直地流动通过所述多个垫时,所述第一/第二相溶液分离和/或所述靶标分析物浓缩。在一些实施方案中,当由于毛细管作用垂直地流动通过所述多个垫时,所述第一/第二相溶液分离和/或所述靶标分析物浓缩。在一些实施方案中,所述孔为纸孔。在一些实施方案中,所述纸孔是与用于LFA中的典型纸条相比容纳更大体积的样品的三维纸结构。在一些实施方案中,所述纸孔由允许相分离发生和随后在领先流体中的分析物浓缩的纸材料构成。在一些实施方案中,所述领先流体的流动朝向使得能够进行分析物检测的吸收垫被定向(参看例如图13A-图13C)。

[0180] 在一些实施方案中,所述装置利用“流动时浓缩”机制,同时在所述孔中利用重力进一步加速流动和宏观相分离。在一些实施方案中,所述孔提供足以促进相分离的横断面面积,因为所述第一相溶液和所述第二相溶液可由于所述相溶液的粘度的差异以及对所述纸材料的亲和力的差异而以不同速度流动。在一些实施方案中,当所述相溶液穿过所述孔并且出现于领先流体中时,所述孔增强或加速相分离和/或靶标分析物的浓缩。在一些实施方案中,所述LFA测试条直接地连接至在下游位置中的所述孔,使得在领先流体中的浓缩分析物首先与所述LFA条接触并且检测步骤与所述浓缩过程并行地发生,进一步减少总体分析时间。

[0181] 在一些实施方案中,所述LFA包括多个孔。在一些实施方案中,所述LFA包括混合孔。在一些实施方案中,所述LFA包括浓缩孔。在一些实施方案中,所述ATPS 应用于其中发生相分离和/或靶标分析物的浓缩的浓缩孔。在一些实施方案中,所述浓缩分析物在相分离之后从所述混合孔取出并且应用于所述浓缩孔。在一些实施方案中,所述浓缩孔包含增强/加速所述浓缩孔和/或LFA中的相分离的电泳缓冲液(参看例如图14A-图14D)。

[0182] 在一些实施方案中,所述装置包括用于将所述孔的内容物释放至所述多孔基质中和/或所述多孔基质上的致动器。在一些实施方案中,所述致动器包括刺破所述孔的机构。

[0183] LFA中的脱水ATPS

[0184] 在一些实施方案中,所述ATPS或其组分在所述多孔基质的至少第一部分上和/或至少第一部分中脱水。在一些实施方案中,将样品应用于所述装置会使所述ATPS 水合,由此将ATPS或其组分转化为流体相。脱水可使所述装置更具用户友好性,因为用户仅需要将样品(例如,唾液)添加至所述装置中。在一些实施方案中,用户仅必须将所述样品的溶液应用于所述条以检测靶标分析物的存在/不存在。在一些实施方案中,所述样品的溶液流动通过所述LFA并且所述ATPS将再溶解,引起所述LFA 内的相分离和靶标分析物的随后浓缩(参看例如图15A-图15B)。

[0185] 在一些实施方案中,使对于给定的ATPS的所有必需组分混合以形成均质溶液,应用于所述纸,并且接着脱水。当样品溶液添加至脱水纸条中之后,所述ATPS组分将在所述样品流动时再水合,产生相分离。在其中含浓缩分析物的相不太粘并且可能含有少量聚合物或胶束的一些ATPS中,所述相将流动得更快并且所述浓缩分析物将出现于领先流体中并且将到达所述LFA以起始检测。另外,脱水ATPS组分区段长度和浓度可针对不同应用加以调节。

[0186] 在一些实施方案中,所述APTS在所述LFA上脱水。在一些实施方案中,第一 APTS组分在所述LFA上脱水。在一些实施方案中,第二APTS组分在所述LFA上脱水。在一些实施方案中,混合相溶液在所述LFA上脱水。在一些实施方案中,第一相溶液组分和/或第一APTS组分

在所述LFA的第一部分上脱水。在一些实施方案中,第二相溶液组分和/或第二ATPS组分在所述LFA的第二部分上脱水。在一些实施方案中,所述第一部分和所述第二部分相同。在一些实施方案中,所述第一部分和所述第二部分不同。举非限制性实例,在PEG-盐ATPS中,PEG和盐溶液分别脱水至不同纸部分或区段中(参看例如图16A-图16E)。在一些实施方案中,使第一/第二相溶液和/或ATPS组分在所述LFA的不同部分上脱水会提供第一/第二相溶液组分或ATPS组分的更均一浓度。在一些实施方案中,使第一/第二相溶液组分和/或ATPS组分在不同部分上脱水会使第一相溶液或ATPS组分在水合后沿第一方向流动并且第二相溶液和/或ATPS组分在水合后沿第二方向流动,其中所述第一和第二方向不同。在一些实施方案中,所述靶标分析物沿第一方向而非第二方向浓缩。在一些实施方案中,所述靶标分析物沿第二方向而非第一方向浓缩。在一些实施方案中,使第一/第二相组分和/或ATPS组分在不同部分上脱水会使所述靶标分析物沿第一/第二方向流动,而无需使所述样品沿第一/第二方向流动(参看例如图16D、16E、图17A和图17B)。在一些实施方案中,使第一/第二相组分和/或ATPS组分在不同部分上脱水会使所述靶标分析物流动得更快,使得检测更快。在一些实施方案中,使第一/第二相组分和/或ATPS组分在不同部分上脱水会允许增加的结果可靠性。在一些实施方案中,使第一/第二相组分和/或ATPS组分在不同部分上脱水会防止第一/第二相溶液组分和/或ATPS组分(例如,PEG-盐ATPS)的聚集。在一些实施方案中,所述第一/第二相组分和/或ATPS组分在多个区段中脱水。在一些实施方案中,所述第一/第二相组分和/或ATPS组分在多个区段中脱水,其中所述第一/第二相组分和/或ATPS组分组成盐溶液。在一些实施方案中,所述第一/第二相组分和/或ATPS组分在多个区段中脱水,其中所述第一/第二相组分和/或ATPS组分不包含疏水性聚合物(例如,PEG)。在一些实施方案中,脱水PEG不位于检测区附近,因为富PEG相减慢检测膜内的流动(参看例如图64)。在一些实施方案中,所述LFA条包括在检测区附近不含PEG或盐的空白间隔区(参看例如图65)。

[0187] 在一些实施方案中,所述探针被提供于探针缓冲液中。在一些实施方案中,所述探针缓冲液在所述LFA上脱水。在一些实施方案中,所述LFA包括所述探针和所述脱水的探针缓冲液。在一些实施方案中,所述探针缓冲液改进所述探针-分析物复合物通过所述LFA的流动。

[0188] 在一些实施方案中,与其中ATPS组分以液体形式添加的装置相比,ATPS组分的脱水会改进检测的极限。在一些实施方案中,液体形式ATPS组分的添加会稀释来自患者的样品溶液。在一些实施方案中,ATPS组分的脱水会允许不同的第一相溶液和/或不同的第二相溶液在流动期间产生,从而在将到达测试线 and 对照线的领先流体的前面将所述靶标分析物或探针-分析物复合物浓缩成小体积。在一些实施方案中,在领先流体的前面浓缩所述靶标分析物和或探针-分析物复合物将减少检测所必需的时期。

[0189] LFA设计/结构

[0190] 在一些实施方案中,所述LFA条具有从第一末端至第二末端不变化的宽度。在一些实施方案中,所述宽度被定义为垂直于所述LFA内的流动方向并且在长度的平面中的尺寸。在一些实施方案中,所述LFA条的第一部分具有第一宽度并且所述LFA条的第二部分具有第二宽度,其中所述第一宽度和所述第二宽度不同。在一些实施方案中,所述第一宽度大于所述第二宽度,而在其它实施方案中,所述第一宽度小于所述第二宽度。在某些实施方案中,预期所述LFA条包含超过两种宽度,例如所述条可持续地狭窄,或可在三个或更多个位

置处显示渐进性变窄。在一些实施方案中,所述第一部分包括样品垫并且所述第二部分包括检测区。在一些实施方案中,所述第一部分包括脱水的探针缓冲液并且所述第二部分包括检测区(参看例如图62)。在其中所述第一部分包括脱水的探针缓冲液并且所述第二部分包括检测区的一些实施方案中,检测的极限与其中包括样品垫的部分的宽度与包括检测区的部分的宽度相同的LFA条相比有所改进。在一些实施方案中,与其中LFA条的宽度不变化的LFA条相比,较宽的样品垫区段允许样品中更多的靶标分析物结合于探针。在一些实施方案中,与其中LFA条的宽度不变化的LFA条相比,较宽的样品垫区段允许较大体积的样品和因此更多的靶标分析物结合于探针。(参看例如图63A-图63B)。

[0191] 在一些实施方案中,所述LFA包括斜坡(例如,所述LFA的深度沿着所述LFA的长度的改变)。在其中所述LFA不包括斜坡的一些实施方案中,所述探针-分析物复合物的一部分被留在样品垫中。在其中所述LFA包括斜坡的一些实施方案中,与不具有斜坡的LFA相比,更多的探针分析物复合物流动通过所述LFA(参看例如图66)。

[0192] 在一些实施方案中,所述LFA包括包含脱水探针和/或探针缓冲液的一部分,所述脱水探针和/或探针缓冲液以相对缓慢速率再溶解以与以相对快速率再溶解探针/探针缓冲液相比,使探针允许具有较大体积的样品使所述探针上的结合位点更完全地饱和,从而引起竞争分析中改进的检测极限。在一些实施方案中,脱水的ATPS或其组分位于所述包含脱水探针和/或探针缓冲液的部分的下游以便使探针和靶标分析物在其到达所述ATPS或其组分之前有时间彼此结合。在一些实施方案中,所述ATPS(组分)将探针-分析物复合物浓缩至较小体积。在一些实施方案中,与其中由于分布于较大体积上而使得并非所有探针-分析物复合物均将到达测试和对照线的其它实施方案中相比,所述较小体积含有更多的流过测试和对照线的探针-分析物复合物。在一些实施方案中,所述装置的灵敏性和/或可靠性通过将探针-分析物复合物浓缩于较小的领先相中而增加。在一些实施方案中,检测时间通过将探针-分析物复合物浓缩于较小的领先相中而减少。参看例如图67,其描绘了使用PEG/盐ATPS的一种可能设计的图。

[0193] 在一些实施方案中,所述LFA根据图16A-图16E中描绘的结构进行配置。在一些实施方案中,所述LFA根据图20中描绘的结构进行配置。在一些实施方案中,所述LFA根据图62-70中描绘的结构进行配置。

[0194] 在一些实施方案中,所述LFA被设计成与包括磁性/顺磁性粒子或与磁性/顺磁性粒子复合的探针一起使用。在一些实施方案中,所述LFA包括纸条,所述纸条在所用纸条的末端具有分叉以分开ATPS第一和第二相溶液的流动。在一些实施方案中,LFA检测区位于所述分叉的尖端上,并且磁体位于所述尖端附近或所述尖端处(参看例如图20)。所述磁体将探针/探针-分析物复合物浓缩至流动至LFA检测区中的流体中,其引起增加的诊断灵敏性。相反地,在一些实施方案中,所述探针包括磁体或磁场,并且所述装置包括位于所述尖端附近或所述尖端处的磁性粒子或顺磁性粒子。

[0195] 在一些实施方案中,所述LFA包括3D结构。在一些实施方案中,所述LFA包括多孔基质的层,从而产生3D结构。在一些实施方案中,所述3D结构整合所述ATPS与所述LFA。在一些实施方案中,所述ATPS具有长的相分离时间(例如,胶束ATPS)并且相分离时间通过使用3D结构(例如,增加所述LFA条的高度)来改进。在一些实施方案中,当混合相溶液垂直地流动通过所述LFA(例如,通过多孔基质的层)时,所述相溶液分离成第一相溶液和第二相溶

液。

[0196] 在一些实施方案中,所述LFA具有厚度(例如高度、深度或垂直尺寸)。在一些实施方案中,所述厚度为约0.1mm至约30cm。在一些实施方案中,所述厚度为约0.1 mm至约1mm、约0.1mm至约10mm或约0.1mm至约1cm。在一些实施方案中,所述厚度为约1mm至约10mm、约1mm至约1cm、约1mm至约1.5cm、约1mm 至约3cm、约1mm至约3.5cm、约1mm至约4cm、约1mm至约4.5cm、约1mm 至约5cm、约1mm至约5.5cm、约1mm至约6cm、约1mm至约6.5cm、约1mm 至约7cm、约1mm至约7.5cm、约1mm至约8cm、约1mm至约8.5cm、约1mm 至约9cm或约1mm至约9.5cm或约1mm至约10cm。在一些实施方案中,所述厚度为约0.5cm至约5cm。

[0197] 多个路径

[0198] 在一些实施方案中,所述LFA包括第一路径和第二路径,或至少第一路径和第二路径。在一些实施方案中,所述第一相溶液优先流动通过所述第一路径并且所述第二相溶液优先流动通过所述第二路径。在一些实施方案中,所述靶标分析物可能不在流动通过纸期间浓缩于领先流体中。在一些实施方案中,所述LFA被设计成重定向流动,使得领先流体为第一流体以便以适时方式避开检测区。在一些实施方案中,重定向流动包括引入新的流动路径。在一些实施方案中,重定向流动包括并入3D纸结构。。在一些实施方案中,重定向流动包括提供或整合其中视流体的相而定存在优先流动的多个路径。在一些实施方案中,重定向流动包括组合上文关于重定向流动的方法。在一些实施方案中,重定向流动会增强相分离和/或引导所述靶标分析物流动通过检测区。

[0199] 在一些实施方案中,所述LFA通过包括含有电泳缓冲液的LFA区段和含有干燥接收纸的LFA区段而被配置成重定向流动,所述LFA区段在样品已经应用于所述 LFA之后被引入。在一些实施方案中,所述LFA通过包括含有电泳缓冲液的LFA区段和含有干燥接收纸的LFA区段而被配置成重定向流动,所述LFA区段在样品已经开始流动通过所述LFA之后被引入。在一些实施方案中,靶标浓缩于滞后流体中,在所述情况下,电泳缓冲液将使所述滞后流体改变路径(使其成为领先流体)至检测区(参看例如图18A)。在一些实施方案中,所述电泳缓冲液和干燥接收纸区段推动含有浓缩分析物的领先相至检测区(图18B)。

[0200] 在一些实施方案中,存在多种靶标分析物并且所述装置被配置成分配第一靶标分析物至第一相溶液中并且分配第二靶标分析物至第二相溶液中并且其中所述LFA包括用于第一相溶液至第一检测区的第一路径并且所述LFA包括用于第二相溶液至第二检测区的第二路径。在一些实施方案中,所述第一路径由第一类型的多孔基质制成并且所述第二路径由第二类型的多孔基质制成,其中所述第一类型的多孔基质和所述第二类型的多孔基质不同(例如,不同孔隙率、电荷、疏水性、三维结构等)。在一些实施方案中,所述第一类型的多孔基质比所述第二类型的多孔基质更具疏水性/亲水性(参看例如图19)。在一些实施方案中,富聚合物相溶液可优先流动通过更具疏水性的条,而含有浓缩分析物的聚合物贫乏相溶液可流动通过更具亲水性的纸。在一些实施方案中,所述靶标分析物通过“纯化”可含有可能影响下游LFA性能的污染物的富聚合物相来浓缩。在一些实施方案中,多种靶标分析物中的一种或多种靶标分析物分配于ATPS的不同相中。

[0201] 在一些实施方案中,所述探针包括磁性粒子并且所述探针-分析物复合物通过一个或多个磁体重定向。在一些实施方案中,所述一个或多个磁体沿着纸条放置以在/ 朝向所述LFA的特定位置(例如检测区)浓缩所述探针。或者,在一些实施方案中,所述探针包括

磁体并且所述探针-分析物复合物通过一种或多种磁性/顺磁性粒子重定向。在一些实施方案中,所述一种或多种磁性/顺磁性粒子沿着纸条放置以在/朝向所述LFA的特定位置(例如检测区)浓缩所述探针。

[0202] 探针

[0203] 在某些实施方案中,本文所述的系统和/或装置包括和/或本文所述的方法利用探针,其中所述探针包含结合靶标分析物以形成探针-分析物复合物的结合部分。如本文所用,除非另外规定,否则术语“靶标分析物”和“探针-分析物复合物”可互换使用。

[0204] 在一些实施方案中,所述靶标分析物单独优先分配于所述第一相溶液或第二相溶液或所述第一相溶液和第二相溶液的界面中。在一些实施方案中,所述靶标分析物单独极端地分配于所述第一相溶液或第二相溶液或所述第一相溶液和第二相溶液的界面中。

[0205] 在一些实施方案中,所述靶标分析物单独不优先分配于所述第一相溶液或第二相溶液或所述第一相溶液和第二相溶液的界面中。在一些实施方案中,所述靶标分析物单独不极端地分配于所述第一相溶液或第二相溶液或所述第一相溶液和第二相溶液的界面中。

[0206] 在一些实施方案中,所述探针-分析物复合物优先分配于所述第一相溶液或第二相溶液或所述第一相溶液和第二相溶液的界面中,由此使所述靶标分析物(或所述探针-分析物复合物)优先分配于所述第一相溶液或第二相溶液或所述第一相溶液和第二相溶液的界面中。

[0207] 在一些实施方案中,所述探针-分析物复合物极端地分配于所述第一相溶液或第二相溶液或所述第一相溶液和第二相溶液的界面中,由此使所述靶标分析物(或所述探针-分析物复合物)极端地分配于所述第一相溶液或第二相溶液或所述第一相溶液和第二相溶液的界面中。

[0208] 在一些实施方案中,措辞“优先分配”当关于分配所述靶标分析物(或探针-分析物复合物)至所述ATPS的第一/第二相溶液使用时指示,更大量的靶标分析物变得安置于优选的相溶液中而非所述ATPS的另一相溶液中。

[0209] 在一些实施方案中,措辞“极端地分配”当关于分配所述靶标分析物(或探针-分析物复合物)至所述ATPS的第一/第二相溶液使用时指示,约90%或更多的靶标分析物变得安置于优选的相溶液中而非所述ATPS的另一相溶液中。

[0210] 在一些实施方案中,更大量的靶标分析物分配于所述第一相溶液中。在一些实施方案中,超过约50%、或超过约55%、或超过约60%、或超过约65%、或超过约70%、或超过约75%、或超过约80%、或超过约85%、或超过约90%、或超过约95%、或超过约98%、或超过约99%的靶标分析物分配于所述第一相溶液中。在一些实施方案中,超过约99%、或超过约99.1%、或超过约99.2%、或超过约99.3%、或超过约99.4%、或超过约99.5%、或超过约99.6%、或超过约99.7%、或超过约99.8%、或超过约99.9%的靶标分析物分配于所述第一相溶液中。

[0211] 在一些实施方案中,更大量的分析物分配于所述第二相溶液中。在一些实施方案中,超过约50%、或超过约55%、或超过约60%、或超过约65%、或超过约70%、或超过约75%、或超过约80%、或超过约85%、或超过约90%、或超过约95%、或超过约98%、或超过约99%的靶标分析物分配于所述第二相溶液中。在一些实施方案中,超过约99%、或超过约99.1%、或超过约99.2%、或超过约99.3%、或超过约99.4%、或超过约99.5%、或超过约

99.6%、或超过约99.7%、或超过约99.8%、或超过约99.9%的靶标分析物分配于所述第二相溶液中。

[0212] 在一些实施方案中,更大量的分析物分配于所述第一相溶液和所述第二相溶液的界面中。在一些实施方案中,超过约50%、或超过约55%、或超过约60%、或超过约65%、或超过约70%、或超过约75%、或超过约80%、或超过约85%、或超过约90%、或超过约95%、或超过约98%、或超过约99%的靶标分析物分配于所述界面中。在一些实施方案中,超过约99%、或超过约99.1%、或超过约99.2%、或超过约99.3%、或超过约99.4%、或超过约99.5%、或超过约99.6%、或超过约99.7%、或超过约99.8%、或超过约99.9%的靶标分析物分配于所述界面中。

[0213] 在一些实施方案中,所述探针-分析物复合物被提取和/或收集应用于所述LFA(参看例如图2)。

[0214] 在一些实施方案中,所述探针和/或探针-分析物复合物再悬浮于溶液中(例如再悬浮溶液)。在一些实施方案中,所述再悬浮溶液包含水。在一些实施方案中,所述再悬浮溶液包含生理盐水溶液。在一些实施方案中,所述再悬浮溶液包含缓冲液。在一些实施方案中,所述再悬浮溶液包含磷酸缓冲生理盐水(PBS)溶液。在一些实施方案中,所述缓冲液包含乙酸。在一些实施方案中,所述缓冲液包含Tris。在一些实施方案中,所述缓冲液包含乙二胺四乙酸(EDTA)。在一些实施方案中,所述缓冲液包含硼酸。在一些实施方案中,所述缓冲液为硼酸盐缓冲液。在一些实施方案中,所述缓冲液为硼酸锂缓冲液。在一些实施方案中,所述缓冲液为硼酸钠缓冲液。

[0215] 在一些实施方案中,所述再悬浮溶液具有约2、约2.5、约3、约3.5、约4、约4.5、约5、约5.5、约6、约6.5、约7、约7.5、约8、约8.5、约9、约9.5、约10、约10.5、约11、约11.5或约12的pH。在一些实施方案中,所述再悬浮溶液具有约为9的pH。

[0216] 在一些实施方案中,所述装置包括或被配置成利用和/或在所述装置上执行的的分析利用1种探针。在一些实施方案中,所述装置包括或被配置成利用和/或在所述装置上执行的的分析利用至少两种不同探针,或至少3种不同探针,或至少4种不同探针,或至少5种不同探针,或至少7种不同探针,或至少10种不同探针,或至少15种不同探针,或至少20种不同探针。

[0217] 在一些实施方案中,所述探针包含选自由合成聚合物、金属、矿物质、玻璃、石英、陶瓷、生物聚合物、塑料和其组合组成的组的材料。在一些实施方案中,所述探针包含选自由聚乙烯、聚丙烯、尼龙(DELTRIN®)、聚四氟乙烯(TEFLON®)、葡聚糖和聚氯乙烯组成的组的聚合物。在一些实施方案中,所述聚乙烯为聚乙二醇。在一些实施方案中,所述聚丙烯为聚丙二醇。在一些实施方案中,所述探针包含选自由胶原蛋白、纤维素和甲壳质组成的组的生物聚合物。在一些实施方案中,所述探针包含选自由金、银、铂、钛、不锈钢、铝和其组合组成的组的金属。在一些实施方案中,所述探针包含纳米粒子(例如,金纳米粒子、银纳米粒子等)。

[0218] 在一些实施方案中,所述探针进一步包含涂层。在一些实施方案中,所述涂层包含聚乙二醇或聚丙二醇。在一些实施方案中,所述涂层包含聚丙烯。在一些实施方案中,所述涂层包含聚丙二醇。在一些实施方案中,所述涂层包含葡聚糖。在一些实施方案中,所述涂层包含亲水性蛋白。在一些实施方案中,所述涂层包含血清白蛋白。在一些实施方案中,所

述涂层对所述第一相溶液或所述第二相溶液具有亲和力。

[0219] 在一些实施方案中,样品中靶标分析物的量极低,使得所述分析物需要大体上浓缩以使得能够通过LFA进行检测。在某些实施方案中,大体浓缩在界面处实现,因为分析物浓缩的程度取决于其中所述分析物进行分配或浓缩的相的体积,并且在所述界面处的“体积”相对于体相极小。

[0220] 在一些实施方案中,所述探针优先(或极端地)分配至所述界面以便朝向界面驱动所述靶标分析物。在一些实施方案中,所述探针由于其表面化学优先(或极端地)分配至所述界面,其中所述表面化学。举非限制性实例,为了驱动所述探针-分析物复合物至聚合物-盐ATPS系统(如聚乙二醇-磷酸钾(PEG/盐)系统)的界面,所述探针结合于PEG(或PEG化)以促进与富PEG相的PEG-PEG相互作用,和/或用亲水性蛋白修饰以促进与PEG贫乏相的亲水性相互作用。使用所述用特异性抗体或能够结合于靶标的其它分子修饰的优化探针,在所述界面处捕捉并且收集靶标分析物。由于所述界面的体积极小,所述分析物高度浓缩并且应用于后续LFA(图8)。

[0221] 在一些实施方案中,制备能够分配至PEG/盐ATPS的界面的金纳米探针(GNP),并且优化操作条件以允许在GNP/分析物的极高回收下的快速相分离时间。举非限制性实例,在与来自ATPS的界面提取组合之后使用LFA证明转铁蛋白(Tf)检测的100倍改进(参看实施例5)。

[0222] 在一些实施方案中,所述探针-分析物复合物分配至所述ATPS中的固体-液体界面处。在一些实施方案中,所述固体为容纳所述ATPS的腔室的壁。在一些实施方案中,所述固体为收集器。在一些实施方案中,所述固体包含固体聚合物。在一些实施方案中,所述固体聚合物选自聚乙烯、纤维素、甲壳质、尼龙、聚甲醛(DELIRIN®)、聚四氟乙烯(TEFLON®)、聚氯乙烯和其组合。在一些实施方案中,所述固体聚合物包含聚丙烯(参看例如图9)。在一些实施方案中,所述探针-分析物复合物粘住所述固体并且高度浓缩,因为其在所述固体-液体界面处以小体积存在,并且未由体相的体积稀释。在一些实施方案中,所述体相被取出而不破坏浓缩分析物,并且通过洗涤进行收集,随后应用于所述LFA(图10)。在一些实施方案中,这种方法显著地浓缩所述分析物并且允许收集而不使用外力(例如磁体)。或者,所述探针包含磁性材料并且这种方法与磁体一起使用。在一些实施方案中,这些探针经过修饰以在所述界面处浓缩用于极端分析物浓缩。如上文所提及,这种方法可通过使用磁体提供未通过ATPS特异性地浓缩的靶标分析物与其它污染物的额外分离。在一些实施方案中,ATPS浓缩使得磁性探针能够更有效地起作用,因为所述磁性探针将首先在具体位置(界面)处浓缩成极小体积。因此,将需要较小磁体或较弱磁场来收集浓缩分析物。在一些实施方案中,ATPS界面浓缩与磁性探针的组合允许开发与目前发展水平相比更有效、快速并且更廉价的装置。

[0223] 结合部分

[0224] 在一些实施方案中,所述结合部分为结合所述靶标分析物的分子。在一些实施方案中,所述结合部分为特异性结合所述靶标分析物的分子。在一些实施方案中,“特异性结合”指示所述分子优先结合于靶标分析物或以大于其它分子的亲和力结合于靶标分析物。举非限制性实例,抗体将选择性地结合于针对其产生所述抗体的抗原。又,举非限制性实例,DNA分子将在严格条件下结合于大体上互补序列并且不结合于无关序列。在一些实施方

案中，“特异性结合”可指对分子的异质群体(例如，蛋白和其它生物制剂)中靶标分析物的存在起决定作用的结合反应。在一些实施方案中，所述结合部分结合于其特定靶标分析物并且并未大量结合于样品中存在的其它分子。

[0225] 在一些实施方案中，所述结合部分选自抗体、凝集素、蛋白质、糖蛋白、核酸、单体核酸、聚合核酸、适体、适体酶、小分子、聚合物、凝集素、碳水化合物、多糖、糖、脂质和其任何组合组成的组。在一些实施方案中，所述结合部分为能够与所述靶标分析物结合配对的分子。

[0226] 在一些实施方案中，所述结合部分为抗体或抗体片段。抗体片段包括但不限于 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、Fv'、Fd、Fd'、scFv、hsFv 片段、骆驼抗体、双功能抗体(diabody)和下文所述的其它片段。

[0227] 在一些实施方案中，“抗体”是指由大体上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码的一种或多种多肽组成的蛋白质。如本文所用，除非另外规定，否则术语“抗体”和“免疫球蛋白”可互换使用。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白基因为免疫球蛋白恒定区基因。在一些实施方案中，举非限制性实例，所述免疫球蛋白基因为κ、λ、α、γ、δ、ε或μ恒定区基因。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白基因为免疫球蛋白可变区基因。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白基因包含轻链。在一些实施方案中，所述轻链选自κ轻链、λ轻链或其组合。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白基因包含重链。在一些实施方案中，所述重链被分类为γ、μ、α、δ或ε，其又分别对应于免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0228] 在一些实施方案中，所述免疫球蛋白包含四聚物。在一些实施方案中，所述四聚物由相同的两对多肽链构成，各对具有一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50-70 kD)。在一些实施方案中，各链的N端界定主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链(V<sub>L</sub>)和可变重链(V<sub>H</sub>)分别是指这些轻链和重链。

[0229] 在一些实施方案中，所述抗体包含完整免疫球蛋白。在一些实施方案中，所述抗体选自通过用多种肽酶消化产生的多种充分表征的片段。在一些实施方案中，所述肽酶为胃蛋白酶。在一些实施方案中，所述胃蛋白酶消化铰链区中的二硫键以产生 F(ab)'<sub>2</sub>，所述 F(ab)'<sub>2</sub> 为 Fab 的二聚物，其本身为通过二硫键接合于 V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub> 的轻链。在一些实施方案中，F(ab)'<sub>2</sub> 在温和条件还原以打破铰链区中的二硫键，由此将 F(ab)'<sub>2</sub> 二聚物转化为 Fab' 单体。在一些实施方案中，所述 Fab' 单体基本上由具有铰链区的一部分的 Fab 组成。在一些实施方案中，所述 Fab' 片段以化学方式或通过利用重组 DNA 方法从头合成。在一些实施方案中，所述抗体片段通过完整抗体的修饰而产生。在一些实施方案中，所述抗体片段使用重组 DNA 方法从头合成。在一些实施方案中，所述抗体包括单链抗体(作为单一多肽链存在的抗体)。在一些实施方案中，所述抗体包括单链 Fv 抗体(sFv 或 scFv)，其中可变重链和可变轻链接合在一起(直接地或通过肽接头)以形成连续多肽。在一些实施方案中，所述抗体包括单链 Fv 抗体。在一些实施方案中，所述抗体包含共价连接的 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 异二聚体，其可由包括直接接合或通过肽编码接头接合的 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 编码序列的核酸表达。在一些实施方案中，所述 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 各自连接呈单一多肽链，并且 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 结构域非共价地缔合。在一些实施方案中，所述 Fab 在噬菌体上展示，其中一条链(重或轻)稠合至 g3 衣壳蛋白并且互补链作为可溶性分子被输出至周质。在一些实施方案中，所述两条链可在相同或不同复制子上编码。在一些实施方案中，各 Fab 分子中的两条抗体链翻译后组装并且二聚物经由一条链连接至例如 g3p 而并入至噬菌体粒子

中。在一些实施方案中,所述抗体已经在噬菌体上展现。

[0230] 在一些实施方案中,所述结合部分包含适体。在一些实施方案中,所述适体包含由核酸形成的抗体类似物。在一些实施方案中,所述适体不需要欲在一些分析中检测的标记的结合,所述分析如纳米CHEM-FET,其中重新配置将直接地进行检测。在一些实施方案中,所述结合部分包含适体酶。在一些实施方案中,所述适体酶包含由核酸形成的酶类似物。在一些实施方案中,所述适体酶仅在第二特异性分析物存在下用于改变配置以捕捉特异性分子。

[0231] 术语“小分子”或“小有机分子”是指尺寸与一般用于医药品中的那些有机分子相当的分子。所述术语排除了生物大分子(例如蛋白质、核酸等)。优选的小分子的尺寸在高达约5000Da、更优选地高达2000Da并且最优选地高达约1000Da的范围内。

[0232] 在一些实施方案中,所述抗体片段经由完整抗体的蛋白水解消化产生。在一些实施方案中,所述抗体片段直接地由重组宿主细胞产生。在一些实施方案中,所述Fab、Fv或ScFv抗体片段在大肠杆菌中表达并且从其分泌,因此允许大量这些片段的轻而易举的产生。在一些实施方案中,所述抗体片段从抗体噬菌体文库分离。在一些实施方案中,所述Fab'-SH片段可直接地从大肠杆菌回收并且以化学方式偶合以形成F(ab')<sub>2</sub>片段。在一些实施方案中,所述F(ab')<sub>2</sub>片段直接地从重组宿主细胞培养物分离。在一些实施方案中,所述Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段具有增加的体内半衰期。在一些实施方案中,所述Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段包含补救受体结合表位残基。用于产生抗体片段的其它技术对于熟练从业人员将为明显的。在某些实施方案中,所选择的抗体为单链Fv片段。在一些实施方案中,所述Fv或sFv具有缺乏恒定区的完整组合位点;因此,其适用于体内使用期间减少的非特异性结合。在一些实施方案中,所述抗体片段为“线性抗体”。在一些实施方案中,所述线性抗体片段为单特异性的。在一些实施方案中,所述线性抗体片段为双特异性的。

[0233] 在一些实施方案中,所述抗体片段为双功能抗体。在一些实施方案中,所述双功能抗体为具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可为二价或双特异性的。

[0234] 在一些实施方案中,所述抗体片段为单结构域抗体。在一些实施方案中,所述单结构域抗体为包含抗体的重链可变结构域的全部或一部分或轻链可变结构域的全部或一部分的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体为人单结构域抗体。

[0235] 在一些实施方案中,所述探针包含可检测标记。在一些实施方案中,所述探针具有可检测特性。可检测标记/可检测特性包括可通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、电化学、光学或化学方式检测的任何组合物。说明性的适用标记包括但不限于荧光纳米粒子(例如,量子点(Qdot))、荧光染料(例如荧光素、德克萨斯红、若丹明、绿色荧光蛋白等,参看例如Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)、放射性标记(例如<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>99</sup>Tc、<sup>203</sup>Pb、<sup>67</sup>Ga、<sup>68</sup>Ga、<sup>72</sup>As、<sup>111</sup>In、<sup>113m</sup>In、<sup>97</sup>Ru、<sup>62</sup>Cu、<sup>64</sup>Cu、<sup>52</sup>Fe、<sup>52m</sup>Mn、<sup>51</sup>Cr、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>77</sup>As、<sup>90</sup>Y、<sup>67</sup>Cu、<sup>169</sup>Er、<sup>121</sup>Sn、<sup>127</sup>Te、<sup>142</sup>Pr、<sup>143</sup>Pr、<sup>198</sup>Au、<sup>199</sup>Au、<sup>161</sup>Tb、<sup>109</sup>Pd、<sup>165</sup>Dy、<sup>149</sup>Pm、<sup>151</sup>Pm、<sup>153</sup>Sm、<sup>157</sup>Gd、<sup>159</sup>Gd、<sup>166</sup>Ho、<sup>172</sup>Tm、<sup>169</sup>Yb、<sup>175</sup>Yb、<sup>177</sup>Lu、<sup>105</sup>Rh、<sup>111</sup>Ag等)、酶(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶和ELISA中常用的其它酶)、多种比色标记、磁性或顺磁性标记(例如磁性和/或顺磁性纳米粒子)、自旋标记、不透射线标记等。

[0236] 或者或另外,所述探针结合于包含可检测标记的另一粒子。或者或另外,所述探针结合于具有可检测特性的另一粒子。在一些实施方案中,所述探针在检测区(例如,测试线、

对照线) 提供可检测信号。在一些实施方案中,所述可检测标记/特性选自自由比色标记/特性、荧光标记/特性、酶标记/特性、显色标记/特性和放射性标记/特性组成的组。在一些实施方案中,所述探针为金纳米粒子并且可检测特性为颜色。在一些实施方案中,所述颜色选自橘色、红色和紫色。

[0237] 在一些实施方案中,所述探针包含磁性和/或顺磁性粒子。在一些实施方案中,所述磁性粒子包含选自由铁、镍、钴和其组合组成的组的材料。在一些实施方案中,所述磁性粒子包含阿尔尼科合金(alnico)、铝-镍-钴合金。在一些实施方案中,所述磁性粒子包含稀土金属的合金。在一些实施方案中,所述稀土金属选自钐、钇、镧、铈、镨、钕、钷、铽、铈、镱、镱、镱、镱或其组合。在一些实施方案中,所述磁性组分包含稀土矿物质。在一些实施方案中,所述稀土矿物质包含天然磁石。在一些实施方案中,所述磁性粒子包含铁。在一些实施方案中,所述磁性粒子包含铁磁体材料。在一些实施方案中,所述铁磁体材料为软铁磁体材料。在一些实施方案中,所述软铁磁体材料包含退火铁。在一些实施方案中,所述软铁磁体材料包含锌、镍、锰或其组合。在一些实施方案中,所述软铁磁体材料选自锰锌铁氧体 ( $Mn_aZn_{(1-a)}Fe_2O_4$ ) 和镍锌铁氧体 ( $Ni_aZn_{(1-a)}Fe_2O_4$ )。在一些实施方案中,所述铁磁体材料为硬铁磁体材料。在一些实施方案中,所述硬铁磁体材料包含阿尔尼科合金或铁氧体。在一些实施方案中,所述硬铁磁体材料选自锶铁氧体  $SrFe_{12}O_{19}$  ( $SrO \cdot 6Fe_2O_3$ )、钡铁氧体  $BaFe_{12}O_{19}$  ( $BaO \cdot 6Fe_2O_3$ ) 和钴铁氧体  $CoFe_2O_4$  ( $CoO \cdot Fe_2O_3$ )。在一些实施方案中,所述磁性组分包含铁氧体。在一些实施方案中,所述铁氧体选自赤铁矿 ( $Fe_2O_3$ )。在一些实施方案中,所述磁性组分包含铁氧体。在一些实施方案中,所述铁氧体选自磁铁矿 ( $Fe_3O_4$ )。在一些实施方案中,所述磁性粒子包含  $Fe_3O_4$ 。在一些实施方案中,所述磁性粒子包含  $Fe_2O_3$ 。在一些实施方案中,所述磁性粒子基本上由  $Fe_3O_4$  组成。在一些实施方案中,所述磁性粒子基本上由  $Fe_2O_3$  组成。

[0238] 在一些实施方案中,所述磁性粒子为选自但不限于球、立方体、卵形、杆、胶囊形状、片剂形状、无特征随机形状的形状。

[0239] 在一些实施方案中,所述磁性粒子具有约1nm至约100 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,所述磁性粒子具有约20nm至约1 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,所述磁性粒子具有约10nm至约50nm的平均直径。在一些实施方案中,所述磁性粒子具有约100nm至约750nm的平均直径。在一些实施方案中,所述磁性粒子具有约500nm的平均直径。在一些实施方案中,所述磁性粒子具有约1 $\mu$ m至约15 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,所述磁性粒子具有约2 $\mu$ m至约10 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,所述磁性粒子具有约1 $\mu$ m至约5 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,所述磁性粒子具有约1 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,所述磁性粒子具有在其最宽点处约0.5 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径。

[0240] 图21A-图21C示出磁性探针如何用于浓缩ATPS中的分析物的一个说明性而非限制性实施例。使用对靶标分析物具特异性的抗体(或其它结合部分),所述靶标用磁性探针捕捉并且浓缩于ATPS中的一种体相中。在含有多种分子的复合物样品中, ATPS可非特异性地浓缩具有类似于靶标分析物或探针的物理化学特性的分子。然而,通过使用磁体或外部磁场,在检测之前实现结合于磁性捕捉探针的靶标分析物的进一步浓缩和分离。

[0241] 在一些实施方案中,所述装置包含磁性材料。在一些实施方案中,所述磁性材料为磁场的来源。在一些实施方案中,所述磁体包含选自磁铁矿、天然磁石、钴、镍、锰、铝、钒、

镉、陶瓷(例如铁氧体)和阿尔尼科合金的物质。在一些实施方案中,所述磁体包含矿石。在一些实施方案中,所述磁体包含铁矿石。在一些实施方案中,所述磁体包含稀土磁体。在一些实施方案中,所述稀土磁体选自钐钴磁体和钕铁硼磁体(NIB)。在一些实施方案中,所述磁体具有约0.1高斯、约0.2高斯、约0.3高斯、约0.4高斯、约0.5高斯、约0.6高斯、约0.7高斯、约0.8高斯、约0.9高斯或约1高斯的磁化强度。在一些实施方案中,所述磁体具有约1高斯、约2高斯、约3高斯、约4高斯、约5高斯、约6高斯、约7高斯、约8高斯、约9高斯或约10高斯的磁化强度。在一些实施方案中,所述磁体具有约10高斯、约20高斯、约30高斯、约40高斯、约50高斯、约60高斯、约70高斯、约80高斯、约90高斯、约100高斯、约110高斯、约120高斯、约130高斯、约140高斯、约150高斯、约160高斯、约170高斯、约180高斯、约190高斯、约200高斯、约250高斯、约300高斯、约350高斯、约400高斯、约450高斯或约500高斯的磁化强度。在一些实施方案中,所述磁体具有约100高斯的磁化强度。

[0242] 在一些实施方案中,所述磁体被配置成加速和/或增加所述靶标分析物分配于所述第一相溶液或第二相溶液中。在一些实施方案中,所述磁体被配置成加速和/或增加所述靶标分析物流动通过所述LFA。在一些实施方案中,所述磁体可吸引至和/或可脱离所述装置。在一些实施方案中,所述磁体被提供于所述收集器中/所述收集器上。

[0243] 在一些实施方案中,所述装置被配置成利用和/或包括一种或多种与至少1种靶标分析物,或至少两种不同靶标分析物,或至少3种不同靶标分析物,或至少4种不同靶标分析物,或至少5种不同靶标分析物,或至少7种不同靶标分析物,或至少10种不同靶标分析物,或至少15种不同靶标分析物,或至少20种不同靶标分析物相互作用的探针。

[0244] 靶标分析物/样品

[0245] 在多个实施方案中,本文所述的装置、系统和/或方法检测和/或定量一种或多种靶标分析物。在一些实施方案中,所述靶标分析物选自蛋白质、抗原、生物分子、糖部分、脂质、核酸、固醇、小有机分子和其组合。在一些实施方案中,所述靶标分析物来源于选自由植物、动物、病毒、真菌、原生动物和细菌组成的组的生物。

[0246] 在一些实施方案中,所述靶标分析物包含生物分子。在一些实施方案中,所述生物分子选自由核酸、蛋白质、脂质、小分子、代谢物、糖、抗体、抗原、酶和其组合组成的组。在一些实施方案中,所述糖为乳糖。

[0247] 术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”在本文中可互换使用。在一些实施方案中,所述蛋白质是指氨基酸残基的聚合物。在一些实施方案中,所述蛋白质是指其中一个或多个氨基酸残基为对应天然存在氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物。

[0248] 术语“核酸”或“寡核苷酸”在本文中可互换使用。在一些实施方案中,所述核酸包含共价连接在一起的至少两个核苷酸。在一些实施方案中,本发明的核酸为单链的。在一些实施方案中,所述核酸为双链的。在一些实施方案中,所述核酸为三链的。在一些实施方案中,所述核酸包含磷酸二酯键。在一些实施方案中,所述核酸包含核酸类似物。在一些实施方案中,所述核酸类似物具有骨架,所述骨架包含不同于磷酸二酯键和/或除了磷酸二酯键的键,举非限制性实例,如磷酰胺、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或O-甲基亚磷酰胺键联。在一些实施方案中,所述核酸类似物选自具有选自阳性骨架、非离子骨架和非核糖骨架的骨架的核酸类似物。在一些实施方案中,所述核酸含有一种或多种碳环糖。在一些实施方案中,

所述核酸包含其核糖-磷酸骨架的修饰。在一些实施方案中,执行这些修饰以促进如标记的额外部分的添加。在一些实施方案中,执行这些修饰以增加生理环境中所述分子的稳定性和半衰期。

[0249] 在一些实施方案中,所述生物分子来源于病毒。在一些实施方案中,所述生物分子为病毒粒子。在一些实施方案中,所述病毒粒子来源于病毒,其中所述病毒选自流感病毒、免疫缺陷病毒、呼吸道病毒组成的组。在一些实施方案中,所述病毒选自腺病毒、疱疹病毒、乳头瘤病毒、痘病毒、细小病毒、星状病毒、杯状病毒、细小核糖核酸病毒、冠状病毒、黄病毒、外衣病毒、戊型肝炎病毒、反转录病毒、正粘病毒、沙粒病毒、本雅病毒、线状病毒、副粘病毒、棒状病毒和呼肠孤病毒。在一些实施方案中,所述病毒选自轮状病毒、环状病毒、科罗拉多蜱热病毒、马尔堡病毒、风疹病毒、诺瓦克病毒、鼻病毒、埃巴病毒(Epstein Barr virus)和巨细胞病毒。在一些实施方案中,所述病毒为天花病毒。在一些实施方案中,所述病毒为肝炎病毒。在一些实施方案中,所述病毒为狂犬病病毒。在一些实施方案中,所述病毒为呼吸道合胞病毒。在一些实施方案中,所述病毒为腮腺炎病毒。在一些实施方案中,所述病毒为麻疹病毒。在一些实施方案中,所述病毒为埃博拉病毒。在一些实施方案中,所述病毒为脊髓灰质炎病毒。在一些实施方案中,所述病毒选自季节性H1N1、猪H1N1、H3N2 流感。在一些实施方案中,所述病毒为噬菌体。在一些实施方案中,所述噬菌体为 M13噬菌体。

[0250] 在一些实施方案中,所述生物分子来源于细菌。在一些实施方案中,所述生物分子为细菌粒子。在一些实施方案中,所述细菌属于选自链球菌属(*Streptococcus*)、衣原体属(*Chlamydia*)、分支杆菌属(*Mycobacterium*)和奈瑟氏菌属(*Neisseria*)的属。在一些实施方案中,所述细菌为变形链球菌。在一些实施方案中,所述细菌属于选自自由杆菌属(*Bacillus*)、博德特氏菌属(*Bordetella*)、包柔氏螺旋体属(*Borrelia*)、布鲁氏菌属(*Brucella*)、弯曲菌属(*Campylobacter*)、嗜衣原体属(*Chlamydomphila*)、梭菌属(*Clostridium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、弗朗西斯氏菌属(*Francisella*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、军团杆菌属(*Legionella*)、钩端螺旋体属(*Leptospira*)、李斯特菌属(*Listeria*)、分支杆菌属(*Mycobacterium*)、支原体属(*Mycoplasma*)、奈瑟氏菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、立克次氏体属(*Rickettsia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、密螺旋体属(*Treponema*)、弧菌属(*Vibrio*)和耶尔森氏菌属(*Yersinia*)组成的组的属。在一些实施方案中,所述细菌为肺炎链球菌。在一些实施方案中,所述细菌为沙眼衣原体。在一些实施方案中,所述细菌为淋病奈瑟氏菌。在一些实施方案中,所述细菌为结核分支杆菌。

[0251] 在一些实施方案中,所述细菌为金黄色葡萄球菌。在一些实施方案中,所述细菌为腐生性葡萄球菌。在一些实施方案中,所述细菌为大肠杆菌。在一些实施方案中,所述细菌为炭疽杆菌。在一些实施方案中,所述细菌为肉毒杆菌。在一些实施方案中,所述细菌为幽门螺旋杆菌。

[0252] 在一些实施方案中,所述细菌为口腔细菌。在一些实施方案中,所述口腔细菌引起牙周疾病。在一些实施方案中,所述口腔细菌选自牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、福赛类杆菌(*Bacteroides forsythus*)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、中间普雷沃菌(*Prevotella intermedia*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium*

nucleatum)、微需氧菌(Microaerophile bacteria)、伴放线菌放线杆菌(Actinomyces actinomycetemcomitans)、直肠弯曲菌(Campylobacter rectus)、嗜蚀艾肯氏菌(Eikenella corrodens)和真细菌(Eubacterium species)。

[0253] 在一些实施方案中,所述样品或靶标分析物来源于原生动物。在一些实施方案中,所述原生动物引起选自阿米巴病、贾第虫病、弓形体病、隐孢子虫病、毛滴虫病、恰加斯氏病、利什曼病、睡眠病、阿米巴痢疾、棘阿米巴角膜炎和原发性阿米巴脑膜脑炎组成的组的疾病。在一些实施方案中,所述原生动物属于已知引起疟疾的疟原虫属。在一些实施方案中,所述靶标分析物为疟原虫乳酸脱氢酶(pLDH)。

[0254] 在一些实施方案中,所述靶标分析物为食物过敏原。在一些实施方案中,所述食物过敏原为植物生物分子。在一些实施方案中,所述植物生物分子为植物蛋白。在一些实施方案中,所述植物蛋白为麸质。在一些实施方案中,所述食物过敏原为植物生物分子。在一些实施方案中,所述植物生物分子为植物蛋白。在一些实施方案中,所述植物蛋白为麸质。在一些实施方案中,所述食物过敏原为动物生物分子。在一些实施方案中,所述动物生物分子为多糖。在一些实施方案中,所述多糖为乳糖。

[0255] 在一些实施方案中,所述靶标分析物为蛋白质。在一些实施方案中,所述蛋白质存在于和/或来源于生物样品(例如,通过拭子收集的血液、血浆、血清、尿液、唾液、眼泪/眼液、体液)。在一些实施方案中,所述蛋白质为生物标记物。在一些实施方案中,所述蛋白质为疾病或病况的生物标记物。在一些实施方案中,所述靶标分析物为肌钙蛋白或其片段。在一些实施方案中,所述靶标分析物为转铁蛋白或其片段。

[0256] 在一些实施方案中,所述装置被配置成检测/定量样品中的多种分析物。在一些实施方案中,所述ATPS浓缩具有相似物理化学特性的多种分析物。在一些实施方案中,所述LFA能够测试多种靶标分析物。在一些实施方案中,所述LFA包括多个测试线。在一些实施方案中,所述LFA包括具有对第一靶标分析物具特异性的第一捕捉部分的第一测试线和具有对第二靶标分析物具特异性的第二捕捉部分的第二测试线,其中所述第一捕捉部分和所述第二捕捉部分不同。所述装置可包括约1个测试线、约2个测试线、约3个测试线、约4个测试线、约5个测试线、约6个测试线、约7个测试线、约8个测试线、约9个测试线或约10个测试线。

[0257] 在一些实施方案中,所述靶标分析物存在于样品中。在一些实施方案中,所述靶标分析物来源于样品。在一些实施方案中,所述靶标分析物从样品分离。在一些实施方案中,所述靶标分析物从样品纯化。

[0258] 在一些实施方案中,所述样品选自以下组成的组:来自生物的组织/流体;食物样品;化学样品;药物样品;环境样品;和其组合。

[0259] 在一些实施方案中,所述食物样品选自坚果、乳制品、小麦产品、大豆产品和蛋制品。在一些实施方案中,所述食物样品为豆类。在一些实施方案中,所述食物样品为水果。

[0260] 在一些实施方案中,所述样品选自以下组成的组:血液样品、血清样品、血浆样品、尿液样品、唾液样品、眼泪/眼液样品、拭子样品和其组合。

[0261] 在一些实施方案中,所述样品来源于选自细菌、病毒、原生动物、藻类、真菌、药物、病原体、毒素、环境污染物和其组分和其组合组成的组的来源。在一些实施方案中,所述样品为生物战剂。在一些实施方案中,所述样品为水样品。在一些实施方案中,所述水样品

是来自水测试设施。在一些实施方案中,所述水样品是来自水纯化设施。

[0262] 在一些实施方案中,所述样品来源于建筑物、无生命结构或化学溶液。在一些实施方案中,所述样品来源于地毯、油漆、防腐木、除臭剂、清洁产品、美容产品、一件衣服、驱虫剂、空气清新剂、地板、墙壁、天花板、油毡、塑料、杀虫剂和牙胶/ 牙膏。

[0263] II. 方法

[0264] 本文公开检测样品中的一种或多种靶标分析物的方法。还提供用于定量样品中的一种或多种靶标分析物的方法,其包括将所述样品应用于本文所公开的装置中的任一者,和在所述侧流分析上定量所述靶标分析物。还提供用于浓缩样品中的靶标分析物的方法。在多个实施方案中,所述方法包括将所述样品应用于本文所公开的装置中的任一者和在所述侧流分析上检测所述靶标分析物的存在或不存在。在多个实施方案中,所述方法包括将所述样品应用于本文所公开的装置中的任一者;和在水性两相系统中和/或在所述侧流分析上浓缩所述靶标分析物。本文公开分配/分离样品中的一种或多种靶标分析物的方法。在多个实施方案中,所述方法包括将所述样品应用于本文所公开的装置中的任一者,和在水性两相系统中和/或在所述侧流分析上分配/分离所述靶标分析物。在一些实施方案中,所述方法包括将所述样品应用于所述ATPS。在一些实施方案中,所述方法包括将所述样品应用于所述LFA。在一些实施方案中,所述方法包括将所述样品应用于所述LFA,其中将所述LFA和所述ATPS进行整合。

[0265] 在一些实施方案中,所述方法包括将所述样品应用于所述ATPS。在一些实施方案中,所述方法包括将所述样品应用于所述LFA,其中所述ATPS在所述LFA上脱水。

[0266] 在一些实施方案中,所述靶标分析物在所述ATPS的相溶液或界面中浓缩。在一些实施方案中,所述方法包括从所述相溶液或相间提取浓缩的靶标分析物并将其应用于所述LFA。在一些实施方案中,所述方法包括使所述ATPS与例如本文所述的收集器接触,其中所述靶标分析物、探针和/或探针-分析物复合物对所述收集器具有亲和力并且与所述收集器相互作用。在一些实施方案中,所述方法包括当所述收集器被插入至检测孔中时,检测在所述收集器上的靶标分析物(图11)。

[0267] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括从所述样品提取所述靶标分析物。在一些实施方案中,提取所述靶标分析物可包括使用ATPS。在一些实施方案中,提取所述靶标分析物可包括打破、溶解、研磨、混合、切碎、搅拌、离心或切割所述样品。在一些实施方案中,为了测试来自固体食物的食物过敏原,将所述样品首先进行研磨。在一些实施方案中,所述靶标分析物用提取缓冲液从研磨过的样品进行提取。在一些实施方案中,将所述研磨过的样品与所述ATPS溶液混合以从所述样品提取所述靶标分析物。

[0268] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括混合所述样品和/或靶标分析物与所述探针。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在将所述样品和/或靶标分析物应用于所述ATPS和/或LFA之前混合所述样品或靶标分析物与所述探针以产生探针-分析物复合物。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在将所述样品和/或靶标分析物应用于所述ATPS和/或LFA之前洗涤所述探针-分析物复合物。

[0269] III. 用途

[0270] 在一些方面,本文所述的方法和装置用于检测样品中的靶标分析物。在一些方面,本文所述的方法和装置用于定量样品中的靶标分析物。在一些方面,本文所述的方法和装

置用于检测和定量样品中的靶标分析物。

[0271] 在一些方面,本文所述的方法包括诊断病况或疾病。在一些实施方案中,所述方法可包括在本文所公开的装置的LFA上观察结果和基于所述结果确定诊断。在某些情况下,分析结果对诊断具决定性,而在其它情形下,分析结果可在差别诊断的情形中评估。在一些实施方案中,诊断病况或疾病需要用额外装置进行额外测试。

[0272] 传染病

[0273] 在一些实施方案中,所述病况或疾病为传染病。在一些实施方案中,所述传染病为呼吸道感染。在一些实施方案中,所述传染病为流感。在一些实施方案中,所述传染病为热带病。

[0274] 在一些实施方案中,所述传染病选自感冒、子宫颈癌、疱疹、天花、水痘、带状疱疹、肝炎、狂犬病、腮腺炎和脊髓灰质炎。在一些实施方案中,所述传染病为肺结核。在一些实施方案中,所述传染病为埃博拉。在一些实施方案中,所述传染病为疟疾。在一些实施方案中,所述传染病为麻疹。在一些实施方案中,所述传染病为百日咳。在一些实施方案中,所述传染病为破伤风。在一些实施方案中,所述传染病为脑膜炎。在一些实施方案中,所述传染病为梅毒。在一些实施方案中,所述传染病为乙型肝炎。

[0275] 性传播疾病

[0276] 在一些实施方案中,所述病况或疾病为性传播疾病。在一些实施方案中,所述性传播疾病选自衣原体、淋病、疱疹(HSV-1、HSV-2)、人类乳头状瘤病毒感染、梅毒、乙型肝炎、丙型肝炎、甲型肝炎、细菌性阴道病、阴虱、疥疮、滴虫病、阿米巴病、隐孢子虫病、贾第虫病、念珠菌病和志贺氏菌病。

[0277] 牙周疾病

[0278] 在一些实施方案中,所述病况或疾病为牙周疾病。在一些实施方案中,所述牙周疾病为齿龈炎。在一些实施方案中,所述牙周疾病为牙周炎。在一些实施方案中,所述牙周疾病是由于口腔中存在细菌变形链球菌而引起的。

[0279] 过敏原/毒素

[0280] 在一些实施方案中,所述靶标分析物为液体或食物样品中的污染物。在一些实施方案中,所述靶标分析物为液体或食物样品中的过敏原。在一些实施方案中,所述过敏原选自乳制品过敏、蛋过敏、大豆过敏、小麦过敏、贝类过敏和坚果过敏。在一些实施方案中,所述坚果过敏为花生过敏。在一些实施方案中,所述病况或疾病为对食物或食物组分的不耐受或敏感性。在一些实施方案中,所述病况或疾病为对麸质的不耐受。

[0281] 在一些实施方案中,所述靶标分析物为环境毒素。所述环境毒素选自杀虫剂和除草剂。在一些实施方案中,所述环境毒素选自霉菌和真菌。在一些实施方案中,所述环境毒素选自多氯联苯(PCB)和邻苯二甲酸酯。在一些实施方案中,所述环境毒素选自挥发性有机化合物、二噁英、石棉、重金属、氯仿和氯。

[0282] 本文所涵盖的多个实施方案可包括但无需限于以下一者或多者和其组合:

[0283] 实施方案1:一种用于样品中靶标分析物的检测和/或定量的装置,所述装置包括:  
a:侧流分析(LFA);和b:水性两相系统(ATPS),其中所述ATPS包括分离成为第一相溶液和第二相溶液的混合相溶液。

[0284] 实施方案2:实施方案1的装置,其中所述分离所述混合相成为所述第一相溶液和

所述第二相溶液发生于所述LFA内。

[0285] 实施方案3:实施方案1的装置,其中所述分离所述混合相成为所述第一相溶液和所述第二相溶液并未发生于所述LFA内。

[0286] 实施方案4:实施方案1-3中任一者的装置,其中所述靶标分析物与所述混合相溶液接触,并且其中所述靶标分析物分配于所述第一相溶液或所述第二相溶液中。

[0287] 实施方案5:实施方案1-3中任一者的装置,其中所述靶标分析物与所述混合相溶液接触,并且其中所述靶标分析物分配至所述第一相溶液和所述第二相溶液的界面。

[0288] 实施方案6:实施方案4或5的装置,其中所述靶标分析物在分配时浓缩。

[0289] 实施方案7:实施方案1-6中任一者的装置,其中所述第一相溶液包括胶束溶液并且所述第二相溶液包括聚合物。

[0290] 实施方案8:实施方案1-6中任一者的装置,其中所述第一相溶液包括胶束溶液并且所述第二相溶液包括盐。

[0291] 实施方案9:实施方案7或8的装置,其中所述胶束溶液包括表面活性剂。

[0292] 实施方案10:实施方案9的装置,其中所述表面活性剂选自由离子表面活性剂、包含两性离子的表面活性剂和非离子表面活性剂组成的组。

[0293] 实施方案11:实施方案7-10中任一者的装置,其中所述胶束溶液包括Triton-X。

[0294] 实施方案12:实施方案1-6中任一者的装置,其中所述第一相溶液包括第一聚合物并且所述第二相溶液包括第二聚合物。

[0295] 实施方案13:实施方案12的装置,其中所述第一/第二聚合物选自聚乙二醇、聚丙二醇和葡聚糖。

[0296] 实施方案14:实施方案1-6中任一者的装置,其中所述第一相溶液包括聚合物并且所述第二相溶液包括盐。

[0297] 实施方案15:实施方案14的装置,其中所述第一相溶液包括聚乙二醇并且所述第二相溶液包括磷酸钾。

[0298] 实施方案16:实施方案1-6中任一者的装置,其中所述第一相溶液选自表1的组分1并且所述第二相溶液选自表1的组分2。

[0299] 实施方案17:实施方案1-16中任一者的装置,其中所述靶标分析物选自由蛋白质、抗原、生物分子、小有机分子、糖部分、脂质、核酸、固醇和其组合组成的组。

[0300] 实施方案18:实施方案17的装置,所述靶标分析物来源于选自由植物、动物、病毒、原生动、真菌和细菌组成的组的生物。

[0301] 实施方案19:实施方案1-17中任一者的装置,其中所述装置进一步包括探针,其中所述探针与所述靶标分析物相互作用。

[0302] 实施方案20:实施方案19的装置,其中所述装置包括一种或多种与至少1种靶标分析物,或至少两种不同靶标分析物,或至少3种不同靶标分析物,或至少4种不同靶标分析物,或至少5种不同靶标分析物,或至少7种不同靶标分析物,或至少10种不同靶标分析物,或至少15种不同靶标分析物,或至少20种不同靶标分析物相互作用的探针。

[0303] 实施方案21:实施方案19或20的装置,其中所述装置包括至少两种不同探针,或至少3种不同探针,或至少4种不同探针,或至少5种不同探针,或至少7种不同探针,或至少10种不同探针,或至少15种不同探针,或至少20种不同探针。

- [0304] 实施方案22:实施方案19的装置,其中所述探针包括选自由合成聚合物、金属、矿物质、玻璃、石英、陶瓷、生物聚合物、塑料和其组合组成的组的材料。
- [0305] 实施方案23:实施方案19的装置,其中所述探针包括选自由聚乙烯、聚丙烯、纤维素、甲壳质、尼龙、聚甲醛、聚四氟乙烯、聚氯乙烯和其组合组成的组的聚合物。
- [0306] 实施方案24:实施方案19的装置,其中所述探针包括选自由葡聚糖、聚丙烯、聚乙二醇和其组合组成的组的生物聚合物。
- [0307] 实施方案25:实施方案19的装置,其中所述探针包括选自由金、银、铂和其组合组成的组的金属,
- [0308] 实施方案26:实施方案19的装置,其中所述探针包括纳米粒子。
- [0309] 实施方案27:实施方案19的装置,其中所述纳米粒子为金纳米粒子。
- [0310] 实施方案28:实施方案17-27中任一者的装置,其中所述探针包括涂层。
- [0311] 实施方案29:实施方案28的装置,其中所述涂层包括选自聚丙二醇和聚乙二醇的聚合物。
- [0312] 实施方案30:实施方案28的装置,其中所述涂层包括葡聚糖。
- [0313] 实施方案31:实施方案28的装置,其中所述涂层包括亲水性蛋白。
- [0314] 实施方案32:实施方案28的装置,其中所述涂层包括血清白蛋白。
- [0315] 实施方案33:实施方案28-32中任一者的装置,其中所述涂层对所述第一相溶液或所述第二相溶液具有亲和力。
- [0316] 实施方案34:实施方案28-33中任一者的装置,其中所述探针进一步包括结合所述靶标分析物的结合部分。
- [0317] 实施方案35:实施方案34的装置,其中所述结合部分选自由抗体、凝集素、蛋白质、糖蛋白、核酸、小分子、聚合物、脂质和其组合组成的组。
- [0318] 实施方案36:实施方案34的装置,其中所述结合部分为抗体或抗体片段。
- [0319] 实施方案37:实施方案18-35中任一者的装置,其中所述探针包括磁性粒子。
- [0320] 实施方案38:实施方案37的装置,其进一步包括磁体。
- [0321] 实施方案39:实施方案38的装置,其中所述磁铁被配置成加速和/或增加所述靶标分析物分配于所述第一相溶液或第二相溶液中。
- [0322] 实施方案40:实施方案38的装置,其中所述磁体被配置成加速和/或增加所述靶标分析物流动通过所述LFA。
- [0323] 实施方案41:实施方案38-40中任一者的装置,其中所述磁体可吸引至和/或可脱离所述装置。
- [0324] 实施方案42:实施方案1-41中任一者的装置,其中所述装置进一步包括被配置成与所述ATPS接触放置的收集器,其中所述靶标分析物在所述收集器和所述第一相溶液和/或第二相溶液的界面处分配。
- [0325] 实施方案43:实施方案42的装置,其中所述收集器包括选自塑料、中孔材料、硅石、聚丙烯、磁体、具有孔的材料、具有凹槽的材料和其组合的材料。
- [0326] 实施方案44:实施方案19-43中任一者的装置,其中所述探针包括可检测标记。
- [0327] 实施方案45:实施方案44的装置,其中所述可检测标记选自由比色标记、荧光标记、酶标记、显色标记、放射性标记和其组合组成的组。

- [0328] 实施方案46:实施方案1-45中任一者的装置,其中所述LFA包括多孔基质。
- [0329] 实施方案47:实施方案46的装置,其中所述多孔基质是充分多孔的以允许所述混合相溶液、第一相溶液、第二相溶液和/或靶标分析物流动通过所述LFA。
- [0330] 实施方案48:实施方案46或47的装置,其中所述多孔基质对于使所述混合相溶液、第一相溶液、第二相溶液和/或靶标分析物垂直地和/或水平地流动通过所述LFA 来说充分长和/或足够深。
- [0331] 实施方案49:实施方案46-48中任一者的装置,其中所述第一相溶液以第一速率流动通过所述多孔基质并且所述第二相溶液以第二速率流动通过所述多孔基质,其中所述第一速率和所述第二速率不同。
- [0332] 实施方案50:实施方案46-49中任一者的装置,其中所述多孔基质包括选自纤维素、玻璃纤维、硝基纤维素、聚偏二氟乙烯、尼龙、电荷改性尼龙、聚醚砜和其组合的材料。
- [0333] 实施方案51:实施方案1-50中任一者的装置,其中所述LFA包括靶标分析物捕捉部分,其中所述靶标分析物捕捉部分与所述靶标分析物相互作用。
- [0334] 实施方案52:实施方案1-51中任一者的装置,其中所述LFA被配置成当使用时提供竞争分析。
- [0335] 实施方案53:实施方案1-51中任一者的装置,其中所述LFA包括所述靶标分析物。
- [0336] 实施方案54:实施方案53的装置,其中所述LFA被配置成当使用时提供夹心分析。
- [0337] 实施方案55:实施方案18-54中任一者的装置,其中所述LFA包括探针捕捉部分,其中所述探针捕捉部分与所述探针或其组分相互作用。
- [0338] 实施方案56:实施方案1-55中任一者的装置,其中所述第一相溶液的组分和/或所述第二相溶液的组分在LFA条上和/或LFA条中脱水,并且在添加所述样品时,所述混合相溶液分配于所述第一相溶液和所述第二相溶液中。
- [0339] 实施方案57:实施方案1-56中任一者的装置,其中所述LFA包括孔,所述孔具有足以容纳溶液的体积,所述溶液选自由所述ATPS的至少一部分、所述第一相溶液的至少一部分、所述第二相溶液的至少一部分、所述靶标分析物的再悬浮溶液和其组合组成的组。
- [0340] 实施方案58:实施方案57的装置,其中所述充足体积为约1纳升至约5毫升。
- [0341] 实施方案59:实施方案57的装置,其中所述孔位于所述LFA中选自拐角、末端、中心、接合点、偏离中心处和弯曲处的位置处。
- [0342] 实施方案60:实施方案56-58中任一者的装置,其中所述孔包括垫。
- [0343] 实施方案61:实施方案60的装置,其中所述垫选自由盐垫、缓冲垫、滤垫、表面活性剂垫、探针垫、聚合物垫和其组合组成的组。
- [0344] 实施方案62:实施方案1-61中任一者的装置,其中所述LFA根据选自图16、20 和62-70中描绘的结构的结构进行配置。
- [0345] 实施方案63:实施方案1-62中任一者的装置,其中所述LFA包括多个路径。
- [0346] 实施方案64:实施方案1-63中任一者的装置,其中所述LFA包括干燥接收纸。
- [0347] 实施方案65:实施方案1-64中任一者的装置,其中所述装置包括电泳缓冲液。
- [0348] 实施方案66:实施方案1-65中任一者的装置,其中所述装置包括用于将所述样品施用于所述装置的口。
- [0349] 实施方案67:实施方案66的装置,其中所述口连接至所述ATPS。

- [0350] 实施方案68:实施方案66的装置,其中将所述ATPS和所述LFA进行整合,并且其中所述口连接至所述LFA。
- [0351] 实施方案69:实施方案66-68中任一者的装置,其中所述口包括选自由管、漏斗、阀、注射器、吸管、通道、柱塞、活塞、泵和其组合组成的组的结构。
- [0352] 实施方案70:实施方案1-69中任一者的装置,其中所述装置不需要电源。
- [0353] 实施方案71:实施方案1-70中任一者的装置,其中将所述ATPS和所述LFA在使用所述装置之前进行整合。
- [0354] 实施方案72:实施方案1-70中任一者的装置,其中所述ATPS和所述LFA在使用所述装置之前为独立的。
- [0355] 实施方案73:实施方案72的装置,其中所述装置被配置成将所述LFA插入至所述ATPS中。
- [0356] 实施方案74:实施方案72或73的装置,其中所述装置包括:a:包括用于容纳所述ATPS的腔室的第一组件;和b:包括所述LFA的第二组件。
- [0357] 实施方案75:实施方案1-74中任一者的装置,其中所述装置包括将所述样品和/或靶标分析物递送至所述ATPS中的致动器。
- [0358] 实施方案76:实施方案1-75中任一者的装置,其中所述装置包括将溶液递送至所述LFA的致动器。
- [0359] 实施方案77:实施方案76的装置,其中所述溶液选自由所述混合相溶液、所述第一相溶液、所述第二相溶液和其组合组成的组。
- [0360] 实施方案78:实施方案1-77中任一者的装置,其中所述ATPS和所述LFA被容纳于单一外壳中。
- [0361] 实施方案79:实施方案1-78中任一者的装置,其中所述装置为便携式装置。
- [0362] 实施方案80:一种检测和/或定量样品中的靶标分析物的方法,所述方法包括:a:将所述样品应用于根据实施方案1-78中任一者的装置;和b:在所述LFA上检测存在或不存在所述靶标分析物和/或定量所述靶标分析物。
- [0363] 实施方案81:实施方案80的方法,其中所述方法包括将所述样品应用于所述ATPS。
- [0364] 实施方案82:实施方案80的方法,其中所述方法包括将所述样品应用于所述LFA,其中将所述LFA和所述ATPS进行整合。
- [0365] 实施方案83:实施方案80-82中任一者的方法,其中所述方法包括在所述ATPS中浓缩所述靶标分析物。
- [0366] 实施方案84:实施方案80-83中任一者的方法,其中所述方法包括在所述LFA中浓缩所述靶标分析物。
- [0367] 实施方案85:实施方案80-84中任一者的方法,其中所述样品选自由来自生物的组织/流体、食物样品、化学样品、药物样品、环境样品和其组合组成的组。
- [0368] 实施方案86:实施方案80-85中任一者的方法,其中所述样品选自由血液样品、拭子样品、血清样品、血浆样品、尿液样品、唾液样品和其组合组成的组。
- [0369] 实施方案87:实施方案80-86中任一者的方法,其中所述样品来源于选自由细菌、病毒、原生动物、藻类、真菌、药物、病原体、哺乳动物、毒素、环境污染物和其组分和其组合

组成的组的来源。

[0370] 实施方案88:实施方案80-87中任一者的方法,其中所述靶标分析物包括生物分子。

[0371] 实施方案89:实施方案88的方法,其中所述生物分子选自由核酸、蛋白质、代谢物、脂质、小分子、糖、抗体、抗原、酶和其组合组成的组。

[0372] 实施方案90:一种用于样品中靶标分析物的检测的纸流体装置,所述纸流体装置包括多孔基质,其中所述多孔基质:a:被配置成接收和/或容纳ATPS或其组分,和b:被配置成当所述ATPS或其组分呈流体相时允许所述ATPS或其组分流动通过所述多孔基质并且具有充足孔隙率以允许所述ATPS或其组分流动通过所述多孔基质。

[0373] 实施方案91:实施方案90的纸流体装置,其中所述装置容纳所述ATPS或其组分。

[0374] 实施方案92:实施方案90或91的纸流体装置,其中所述ATPS或其组分选自由第一相溶液、第二相溶液和混合相溶液组成的组,其中所述混合相溶液包括所述第一相溶液和所述第二相溶液的混合物。

[0375] 实施方案93:实施方案91或92的纸流体装置,其中所述ATPS或其组分在所述多孔基质的至少第一部分上和/或至少第一部分中脱水。

[0376] 实施方案94:实施方案93的纸流体装置,其中所述多孔基质的所述第一部分具有不同于所述多孔基质的第二部分的宽度。

[0377] 实施方案95:实施方案94的纸流体装置,其中所述装置被配置成使得将所述样品应用于所述装置会使所述ATPS水合,由此提供呈所述流体相的ATPS或其组分。

[0378] 实施方案96:实施方案92-95中任一者的纸流体装置,其进一步包括用于容纳溶液的孔,所述溶液选自所述混合相溶液、所述第一相溶液、所述第二相溶液、所述样品、探针和其组合。

[0379] 实施方案97:实施方案96的纸流体装置,其中所述孔包括用于将所述孔的内容物释放至所述多孔基质中和/或所述多孔基质上的致动器。

[0380] 实施方案98:实施方案96或97的装置,其中所述孔包括垫。

[0381] 实施方案99:实施方案98的装置,其中所述垫选自由盐垫、缓冲垫、滤垫、表面活性剂垫、探针垫、聚合物垫和其组合组成的组。

[0382] 实施方案100:实施方案92-99中任一者的纸流体装置,其中当使用时,所述第一相溶液和所述第二相溶液以不同速率流动通过所述多孔基质。

[0383] 实施方案101:实施方案92-100中任一者的纸流体装置,其中当使用时,所述第一相溶液和所述第二相溶液沿不同方向流动通过所述多孔基质。

[0384] 实施方案102:实施方案92-101中任一者的纸流体装置,其中所述第一相溶液包括胶束溶液并且所述第二相溶液包括聚合物。

[0385] 实施方案103:实施方案92-101中任一者的纸流体装置,其中所述第一相溶液包括胶束溶液并且所述第二相溶液包括盐。

[0386] 实施方案104:实施方案102或103的纸流体装置,其中所述胶束溶液包括表面活性剂。

[0387] 实施方案105:实施方案104的纸流体装置,其中所述表面活性剂选自由非离子表面活性剂、包含两性离子的表面活性剂和离子表面活性剂组成的组。

- [0388] 实施方案106:实施方案105的纸流体装置,其中所述胶束溶液包括Triton-X。
- [0389] 实施方案107:实施方案93-101中任一者的纸流体装置,其中所述第一相溶液包括聚合物并且所述第二相溶液包括聚合物。
- [0390] 实施方案108:实施方案92-101中任一者的纸流体装置,其中所述第一相溶液包括聚合物并且所述第二相溶液包括盐。
- [0391] 实施方案109:实施方案108的纸流体装置,其中所述第一相溶液包括聚乙二醇并且所述第二相溶液包括磷酸钾。
- [0392] 实施方案110:实施方案92-101中任一者的纸流体装置,其中所述第一相溶液选自表1的组分1并且所述第二相溶液选自表1的组分2。
- [0393] 实施方案111:根据实施方案90-110中任一者的纸流体装置,其中所述装置根据选自图16、20和62-70中描绘的结构的结构进行配置。
- [0394] 实施方案112:根据实施方案90-111中任一者的纸流体装置,其中所述多孔基质包括第一路径和第二路径。
- [0395] 实施方案113:实施方案112的纸流体装置,其中所述第一相溶液优先流动通过所述第一路径并且所述第二相溶液优选流动通过所述第二路径。
- [0396] 实施方案114:实施方案90-113中任一者的纸流体装置,其中所述装置包括结合所述靶标分析物以产生探针-分析物复合物的探针。
- [0397] 实施方案115:实施方案90-114中任一者的纸流体装置,其中所述靶标分析物结合于探针-分析物复合物中的探针。
- [0398] 实施方案116:实施方案114或115的纸流体装置,其中所述探针包括磁性粒子。
- [0399] 实施方案117:实施方案116的纸流体装置,其中所述装置进一步包括经过定向以吸引磁性粒子至所述多孔基质的一部分的磁场,其中所述磁场对所述磁性粒子的力增强了探针-分析物复合物朝向所述多孔基质的所述部分的流动。
- [0400] 实施方案118:实施方案114-117中任一者的纸流体装置,其中所述探针包括选自自由聚乙烯、聚丙烯、尼龙、聚甲醛、聚四氟乙烯(TEFLON®)、葡聚糖、聚氯乙烯和其组合组成的组的聚合物。
- [0401] 实施方案119:实施方案114-118中任一者的纸流体装置,其中所述探针包括选自自由纤维素和甲壳质组成的组的生物聚合物。
- [0402] 实施方案120:实施方案114-119中任一者的纸流体装置,其中所述探针包括选自自由金、银、钛、不锈钢、铝、铂和其合金和其组合组成的组的金属。
- [0403] 实施方案121:实施方案114-120中任一者的纸流体装置,其中所述探针包括纳米粒子。
- [0404] 实施方案122:实施方案121的纸流体装置,其中所述纳米粒子为金纳米粒子。
- [0405] 实施方案123:实施方案114-122中任一者的纸流体装置,其中所述探针包括涂层。
- [0406] 实施方案124:实施方案123的纸流体装置,其中所述涂层包含选自聚丙二醇和聚乙二醇的聚合物。
- [0407] 实施方案125:实施方案123的纸流体装置,其中所述涂层包括葡聚糖。
- [0408] 实施方案126:实施方案123的纸流体装置,其中所述涂层包括亲水性蛋白。
- [0409] 实施方案127:实施方案123的纸流体装置,其中所述涂层包括血清白蛋白。

- [0410] 实施方案128:实施方案123-127中任一者的纸流体装置,其中所述涂层对所述第一相溶液或所述第二相溶液具有亲和力。
- [0411] 实施方案129:实施方案114-128中任一者的纸流体装置,其中所述探针包括结合所述靶标分析物的结合部分。
- [0412] 实施方案130:实施方案129的纸流体装置,其中所述结合部分选自由抗体、凝集素、蛋白质、代谢物、糖蛋白、核酸、小分子、聚合物和脂质组成的组。
- [0413] 实施方案131:实施方案129的纸流体装置,其中所述结合部分为抗体或抗体片段。
- [0414] 实施方案132:实施方案114-131中任一者的纸流体装置,其中所述探针包括可检测标记。
- [0415] 实施方案133:实施方案132的纸流体装置,其中所述可检测标记选自由比色标记、荧光标记、酶标记、显色标记、放射性标记和其组合组成的组。
- [0416] 实施方案134:实施方案90-133中任一者的纸流体装置,其中所述装置包括干燥接收纸,其中所述第一相溶液或所述第二相溶液优先朝向所述干燥接收纸流动通过所述多孔基质。
- [0417] 实施方案135:实施方案90-134中任一者的纸流体装置,其中所述装置包括电泳缓冲液,并且其中所述第一相溶液和/或所述第二相溶液在与所述电泳缓冲液接触时更快地流动通过所述多孔基质。
- [0418] 实施方案136:实施方案90-135中任一者的纸流体装置,其中所述多孔基质包括选自纤维素、玻璃纤维、硝基纤维素、聚偏二氟乙烯、尼龙、电荷改性尼龙、聚醚砜和其组合的材料。
- [0419] 实施方案137:实施方案90-136中任一者的纸流体装置,其中所述多孔基质包括探针捕捉部分,其中在使用时,所述探针捕捉部分与所述探针或其组分相互作用。
- [0420] 实施方案138:实施方案90-137中任一者的纸流体装置,其中所述多孔基质包括靶标分析物捕捉部分,其中在使用时,所述靶标分析物捕捉部分与所述靶标分析物或其组分相互作用。
- [0421] 实施方案139:实施方案138的纸流体装置,其中所述LFA被配置成当使用所述纸流体装置时提供夹心分析。
- [0422] 实施方案140:实施方案90-137中任一者的纸流体装置,其中所述多孔基质包括所述靶标分析物。
- [0423] 实施方案141:实施方案140的纸流体装置,其中所述LFA被配置成当使用所述纸流体装置时提供竞争分析。
- [0424] 实施方案142:实施方案90-141中任一者的纸流体装置,其中所述多孔基质被配置成当所述靶标分析物流动通过所述多孔基质时浓缩所述靶标分析物。
- [0425] 实施方案143:实施方案90-142中任一者的纸流体装置,其中所述纸流体装置进一步包括对照分析物,其中在所述多孔基质上所述对照分析物和所述靶标分析物的比较提供所述靶标分析物的定量。
- [0426] 实施方案144:一种检测或定量样品中的靶标分析物的方法,所述方法包括:a:将所述样品应用于根据实施方案90-143中任一者的装置;和b:检测存在或不存在所述靶标分析物和/或定量所述靶标分析物。

[0427] 实施例

[0428] 以下具体并且非限制性实施例欲解释为仅具说明性的,并且决不以任何方式限制本公开。无进一步详细描述,相信所属领域的技术人员可基于本文描述在最大程度上利用本公开。本文所引用的所有公布均以引用的方式整体并入本文。

[0429] 实施例1.具有PEG化金纳米探针的ATPS以用两相系统中的磁体或固体浓缩

[0430] 研究两种方法来整合水性两相系统(ATPS)与侧流免疫分析(LFA)以改进LFA的灵敏性。第一种方法利用磁体来收集可能从ATPS溶液捕捉靶标蛋白的磁性纳米探针。第二种方法利用最近发现的现象,其中纳米探针的表面化学被操纵,使得其可能分配至所述ATPS与聚丙烯表面之间的固体-液体界面,从而允许快速并且容易的收集而不使用注射器或磁体。

[0431] 据推测,为了有效地回收磁性纳米粒子,所述磁性纳米粒子的尺寸需要足够大以对磁场起反应。然而,如果所述粒子的尺寸过大,那么所述粒子在穿过LFA测试条时可能经历困难。

[0432] 为了解决这一问题,使用ATPS连同金涂布的磁性纳米探针(GMP)来首先捕捉样品溶液中的靶标生物分子。为了避免使用昂贵并且庞大的磁体来收集溶液或大的纳米探针中可能对较弱磁场起反应的粒子,使用ATPS首先被动地将GMP浓缩成ATPS的两个体相之一中的小体积。随后,使用廉价并且便携式磁体快速地回收所述GMP和捕捉的生物分子。由于GMP上的金涂层还充当LFA的比色指示剂,所述GMP被直接应用于LFA条。

[0433] 除了使用ATPS来改进所述GMP的磁性提取,还发现所述ATPS的相分离受益于GMP和磁力的使用。PEG-盐ATPS在大约数小时中完全地相分离。虽然由于底部PEG贫乏相中纳米探针的浓度由于富PEG结构域在宏观PEG贫乏相中的最少程度夹带而保持恒定,浓缩样品的提取可在所述系统到达平衡之前发生,但仍需要30min来获得足以提取用于后续LFA的体积的底相。或者,当引起相分离时,所述ATPS中的GMP极端地并且几乎立刻分配至PEG贫乏结构域。含有GMP的PEG贫乏结构域可能发现彼此并且在磁力的存在下更容易聚结,这可能归因于当所述GMP对磁场起反应时其拖动所述PEG贫乏结构域随其一起。这种力连同重力进一步促进PEG贫乏结构域的聚结,因此引起加速的相分离并且产生充足体积的底相用于在仅10min内进行提取。

[0434] 在这种研究中,首先制备足够小以穿过LFA测试条而无流动问题的GMP。这些GMP接着用于在产生9:1(顶相:底相)体积比率的PEG-盐ATPS溶液中捕捉模型蛋白转铁蛋白(Tf)。将小磁体(1/8"直径×1/32"厚)放置于所述溶液中以加速相分离。10min后回收所述GMP和捕捉的蛋白,取出小磁体并且将GMP-Tf复合物直接应用于LFA用于检测。

[0435] 虽然上述方法使用具有磁性纳米探针的ATPS有效地浓缩并且检测Tf,但仍需要小磁体。以下方法研究不使用外部磁场,而是操纵PEG化金纳米探针(PGNP)的表面化学以极端地分配至所述ATPS与聚丙烯(PP)表面之间的固体-液体界面处来提取靶标-纳米探针复合物的可能性。这种独特的现象被发现具ATPS特异性,因为当使用仅包含聚合物或盐的水溶液时,PGNP不分配至所述固体-液体界面处。此外,这种现象还被发现具材料特异性,因为PGNP将极端地分配至我们的ATPS中的聚丙烯(PP)表面处,而不是分配至玻璃表面处。

[0436] 为了促进PP-ATPS固体-液体界面处的靶标-PGNP复合物的收集,将用抗Tf抗体修饰的PGNP添加至含有Tf的ATPS溶液中,随后将市售PP吸管浸没至所述ATPS中。所述PGNP首

先捕捉所述ATPS中的靶标蛋白并且接着优先分配至PP表面处。10min后,从所述ATPS取出所述PP吸管,其中大量的蛋白-GNP复合物仍吸附至所述表面。这有效地消除了使用注射器手动提取浓缩的Tf-PGNP的需要。

[0437] 在这种研究中,PGNP分配至ATPS中的PP-液体界面处。这些PGNP接着用于捕捉产生1:1体积比率的PEG-盐ATPS溶液中的Tf。将PP吸管浸没至所述ATPS溶液中,并且10min后通过从所述溶液抽出所述吸管来回收所述PGNP和捕捉的蛋白。所述吸管上的PGNP-Tf复合物用电泳缓冲液洗涤并且直接应用于LFA用于检测。归因于与PP-ATPS界面相关的最小体积和从所述吸管洗去PGNP所需的小体积,将所述PGNP极端地进行浓缩,并且LFA中Tf的检测极限改进了50倍。

[0438] 为了制备LFA条,实施利用竞争机制的LFA测试。在所述竞争分析中,所关注的靶标固定于硝基纤维素膜上以形成测试线。所述纳米探针(GMP或PGNP)上固定的针对一抗的二抗构成对照线。在LFA中,当样品首先与所述纳米探针接触时,如果靶标分子存在于所述样品中,那么其将结合于在所述纳米探针上修饰的其特异性抗体。如果存在于所述样品中的靶标分子使所述纳米探针上的抗体饱和,那么这些纳米探针不再可结合于测试条上固定的靶标分子。结果,所述纳米探针不在测试线处形成可见条条,并且这指示阳性结果。另一方面,如果样品不含可使纳米探针上的抗体饱和的浓度的靶标分子,那么所述纳米探针上的这些抗体可结合于测试条上固定的靶标分子并且在测试线处形成可见条条。这指示阴性结果。此外,与样品中靶标分子的存在无关,所述纳米探针上的抗体将结合于对照线上固定的二抗,指示充足样品已经被芯吸通过测试线并且到达对照线。可见对照线的存在指示有效测试。

[0439] 为了制备GNP,用金涂布具有50nm直径的氧化铁磁体纳米粒子。简单地说,氧化铁粒子在0.01M柠檬酸钠中稀释并且搅拌10min。随后,将1%w/v氯化金溶液的4次添加应用于所述氧化铁纳米粒子溶液,其中以10min时间间隔进行搅拌。所述溶液在氯化金的添加之后从黑色改变为栗色。接着使用磁体回收所述金涂布的磁性纳米粒子。

[0440] 通过将小的钕磁体(1/8"直径×1/32"厚,KJ Magnetics,Philadelphia,PA)放置于饮用吸管的尖端处建构收集器。由Parafilm缠绕所述磁体以防止与溶液中的GMP的直接接触。

[0441] 为了了解所述GMP是否将极端地分配至所述PEG-盐ATPS的底部PEG贫乏相中,将30μL所述GMP添加至产生9:1体积比率的2mL ATPS溶液中。为了了解所述磁体的存在是否将加速相分离,使用或不使用磁性收集器执行分配实验。关于每一个实验,在10min和30min时测量所述底相的体积。

[0442] 接着测试GMP是否可与ATPS和LFA合并。首先,制备加标有多种浓度的Tf的2mL 9:1ATPS溶液。将30μL GMP应用于各溶液,随后添加所述磁性收集器。将所述溶液放置于25℃水浴中并且孵育10min。在所述孵育期之后,所述收集器从所述溶液中取出并且转移至含有50μL电泳缓冲液的管中。所述小的磁体从所述吸管中取出并且在所述吸管上收集的GMP通过在所述电泳缓冲液中振荡所述吸管持续数秒来洗去。所述吸管接着取出并且将LFA测试条浸渍于含有所收集的GMP的电泳缓冲液中。10min之后,所述测试条从所述管中取出并且使用Canon EOS 1000D照相机(Canon U.S.A.,Inc.,Lake Success,NY)拍摄所述测试条的图像。

[0443] 制备裸金纳米粒子以产生具有约25-30nm直径的粒径的透明、樱桃色溶液。为了制备PGNP,将320mg山羊抗Tf抗体与20mL胶态金溶液孵育30min,随后使用对于PEG:NP为5000:1的摩尔比率和30min的额外孵育添加硫酸化PEG2000。为了防止其它蛋白非特异性结合于所述胶态金的表面,将2mL 10%牛血清白蛋白(BSA)溶液添加至所述混合物中并且再混合15min。将所得溶液在孵育期期间在振荡器上轻轻地混合。为了去除游离的未结合抗体、PEG和BSA,所述混合物随后在4°C和9,000 g下离心30min。将PGNP的沉淀用1%BSA溶液洗涤,并且这一洗涤步骤重复两次。最后,将所回收的PGNP再悬浮于在pH 9.0下的3mL 0.1M硼酸钠缓冲液中。

[0444] 首先在玻璃管中制备产生1:1体积比率并且含有变化的Tf浓度的PEG-盐ATPS溶液。将5 $\mu$ L所述GNP溶液添加至Tf-ATPS溶液中,最终体积为1mL。充分混合所述ATPS溶液,并且将PP吸管插入至各ATPS溶液中。将所述溶液接着在25°C下孵育15min。对于各混合物,将所述PP吸管小心地从所述ATPS溶液中取出。假定PP-ATPS界面的总体积大约为1 $\mu$ L,使用49 $\mu$ L测试缓冲液洗涤从所述吸管中浸没于所述ATPS溶液中的部分吸附的Tf-GNP复合物以实现50 $\mu$ L的总体积。将所述吸管的内表面和外表面洗涤持续总计10秒。LFA测试条接着垂直地浸渍,使得样品垫与所述混合物接触。10分钟之后从所述混合物中取出所述条,并且使用Canon EOS 1000D照相机(Canon,U.S.A.,Inc.,Lake Success,NY)立即拍摄所述测试条的图像。

[0445] 这一研究中开发的GMP实现以下四种功能:(1)捕捉样品中的靶标蛋白;(2)极端地分配于ATPS的一个体相中;(3)由廉价、便携式磁体收集;以及(4)在被提取并且应用于LFA纸条之后直接用作LFA的比色指示剂。功能(2)和(3)通过将GMP放置于PEG-盐ATPS溶液中来证明。如图21A所示,观察到所述GMP由于在所述GMP与富PEG相中更大数目的PEG分子之间运作的排斥性、空间、排除体积相互作用而极端地分配于底部PEG贫乏相中。这使所述GMP浓缩成小体积,从而使得能够用小得多并且轻得多的磁体进行其收集(图21B)。此外,由于这些GMP在其与磁体紧密接近时极具反应性,所述粒子可能快速地回收并且转移用于后续检测(图21C)。最后但并非最不重要的,通过使用这种方法,所述GMP可能被收集为极小体积,由此使得能够进行靶标蛋白的极端浓缩。

[0446] 为了了解所述GMP在连同ATPS使用时是否可能改进LFA的灵敏性,执行具有或不具有先前浓缩步骤的初步LFA研究(图22)。

[0447] 第二种整合ATPS与LFA的方法是将PEG化金纳米探针(PGNP)驱动至所述ATPS与聚丙烯(PP)固体之间的固体-液体界面处。虽然类似于所述第一种方法,但这种方法不再需要外部磁体。这种机制需要ATPS。如图23A和图23B所示,当使用仅PEG或仅盐的水溶液时,所述PGNP不分配至所述固体-液体界面处。反而,所述PGNP似乎均匀地分散于各水溶液中,对所述固体-液体界面无偏好。由于发现所述PGNP仅在相分离的ATPS存在下分配至所述固体-液体界面处,在这一研究中使用具有1:1体积比率的ATPS,因为这种ATPS与具有其它体积比率的ATPS相比最快地进行相分离。图23C证明了10min之后所述PGNP在所述PP吸管上的极端分配行为。所述PP吸管还允许浓缩的靶标-PGNP复合物的容易提取。在所述吸管被抽出之后,使用电泳缓冲液容易地洗去所收集的PGNP并且直接应用于LFA(图23D)。

[0448] LFA结果展示于图24中。各测试展示了对照线的存在,其指示所述流体完全地流动通过所述条并且确认了所述测试的有效性。关于其中不存在Tf的阴性对照,测试线出现并

且因此指示真实阴性结果。在高Tf浓度 (10ng/μL) 下,测试线不出现并且因此指示真实阳性结果。然而,在针对不具有先前浓缩步骤的情况的较低Tf浓度下,可见的测试线出现,表明在样品中存在不足以使在PGNP上修饰的抗体饱和的量的 Tf。因此,这些测试指示假阴性结果。使用这种方法的LFA结果展示于上部图(图24 顶部)中。由于假阴性结果在不具有先前浓缩的LFA研究中在1ng/μL下出现,这指示LFA针对Tf的检测极限为10ng/μL。

[0449] 为了改进LFA的性能,将用于单一LFA测试的相同量的PGNP放置于具有1 ng/μL的Tf浓度的ATPS溶液中。通过与用于LFA条的体积相比使这种ATPS溶液的体积增加50倍,所述PGNP可能与50倍多的Tf相互作用并且因此可能实现更高的饱和程度。然而,由于所述PGNP也被稀释50倍,其需要在检测之前进行浓缩并且加以收集。通过将PP吸管放置于所述ATPS溶液中,所述PGNP极端地分配至所述吸管的表面。在所述ATPS溶液在室温下孵育10min之后,所述PP吸管从所述溶液中取出。不同于其中固体表面上的物质典型地不可回收的其它吸附现象,所述PGNP通过用电泳缓冲液冲洗所述吸管容易地回收。这种含有所述PGNP的缓冲液接着直接应用于LFA。使用这种方法的LFA结果显示于底部图(图24底部)中。由于0.2 ng/μL为证明真实阳性结果的最低浓度,LFA针对Tf的检测极限从10ng/μL改进至 0.2ng/μL,50倍改进。便携式装置将利用这两种方法并且使得用户能够以最少步骤操作所述分析(图25)。

[0450] 实施例2. ATPS和葡聚糖涂布的金纳米粒子

[0451] 传统柠檬酸盐加帽或裸金纳米粒子通常由于由表面柠檬酸盐离子的负电荷产生的静电排斥作用不在水溶液中聚集。然而,其将在具有较高离子强度的溶液中聚集,其中范德瓦耳斯(van der Waals)吸引相互作用变得大于静电排斥相互作用。葡聚糖涂布的金纳米粒子通过使用葡聚糖替代柠檬酸盐作为还原和稳定剂成功地制得。将葡聚糖涂布的金纳米粒子的稳定性与传统柠檬酸盐加帽金纳米粒子和常用的PEG涂布的金纳米粒子相比。优化PEG-盐ATPS的相分离行为以使得所述DGNP能够在室温下快速提取。所述DGNP的分配行为随后在所述PEG-盐ATPS中加以研究。转铁蛋白(Tf)为用于铁转运的常见血清蛋白,被选择作为模型蛋白生物标记物。LFA针对Tf 的检测极限接着使用和不使用所述预浓缩ATPS步骤,使用DGNP进行确定。LFA 的定量结果直观地加以解释,并且还执行计算机图像分析用于所述LFA结果的进一步定量验证。

[0452] 制备传统柠檬酸盐加帽或裸金纳米粒子。简单地说,将10mL ddH<sub>2</sub>O加热至 100°C,同时搅拌。当加热的溶液开始沸腾时,添加100μL 1%w/v氯化金(III)溶液。将所述溶液搅拌并且沸腾持续1min,之后添加25μL 6%w/v柠檬酸钠溶液。所述溶液快速地从深紫色改变为透明、深樱桃色,之后其冷却至室温并且存储于4°C下。

[0453] 在制备PEG涂布(PEG化)金纳米粒子之前,确定先前制备的裸金纳米粒子溶液的浓度。这一浓度用于确定任何给定的PEG:金纳米粒子摩尔比率所需的PEG的量,使用比尔定律(Beer's Law)用1cm的路径长度来计算:

$$[0454] \quad C = \frac{A}{\epsilon l} \quad (1)$$

[0455] 其中C为金纳米粒子的浓度(摩尔浓度单位),A为金纳米粒子的峰值吸光度值, $\epsilon$ 为摩尔消光系数( $M^{-1}cm^{-1}$ ),并且l为路径长度(cm)。为了确定 $\epsilon$ 值,首先通过动态光散射(DLS)使用Zetasizer Nano ZS粒子分析仪(Malvern Instruments Inc,Westborough,

Massachusetts) 定量所述纳米粒子的直径。所述摩尔消光系数接着从由BBInternational Life Sciences (Madison, WI) 提供的数据表读取, 其使所述 $\epsilon$ 值与金纳米粒子的直径相关。所述金纳米粒子的峰值吸光度值接着使用UV-可见光分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, Madison, Wisconsin) 定量, 并且所述浓度用等式 (1) 确定。

[0456] 甲氧基-聚乙二醇 (PEG)-硫醇 (MW 5000, Nanocs Inc., New York, NY) 用于修饰具有一层PEG的金纳米粒子表面。简单地说, 将5mL裸金纳米粒子溶液首先使用1N NaOH溶液调节至pH 9.0。所述甲氧基-PEG-硫醇以50,000:1PEG:纳米粒子摩尔比率添加至粒子溶液中以确保金纳米粒子表面将完全地被涂布。接着使所述混合物在室温下反应30min以允许所述PEG上的硫醇基与所述金纳米粒子形成配价键。游离PEG 通过在9000g下离心30min来去除。使所得PEG化金纳米粒子再悬浮于500 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O中。

[0457] 制备葡聚糖涂布的金纳米粒子。简单地说, 将12g葡聚糖 (MW 15,000-25,000) 溶解于160mL UltraPure无菌水 (Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA) 中, 并且将所述溶液加热至100 $^{\circ}$ C, 同时搅拌。当加热的溶液开始沸腾时, 添加2.16mL 1% w/v 氯化金 (III) 溶液。所述溶液搅拌并且沸腾持续20min, 直至所述溶液的颜色变为紫色。所述溶液接着冷却至室温并且存储于4 $^{\circ}$ C下。过量葡聚糖随后通过在9000g 下离心30min来去除。

[0458] 裸 (即, 柠檬酸盐加帽)、PEG化和葡聚糖涂布的金纳米粒子溶液分别与多种浓度的磷酸钾储备溶液混合。混合的溶液在室温下孵育30min。各样品的吸收光谱使用 UV-可见光分光光度计确定。临界凝聚浓度 (CCC) 被鉴别为所述GNP溶液在峰值吸光波长附近的吸收光谱的强度显著降低时的盐浓度。

[0459] 磷酸钾储备溶液 (5:1二价:一价) 在杜氏磷酸盐缓冲生理盐水 (Dulbecco's phosphate-buffered saline) (PBS) (Invitrogen, pH 7.4, 含有1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8.10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、138mM NaCl、2.67mM KCl和0.495mM MgCl<sub>2</sub>) 中制备。随后, 在PBS 中制备聚乙二醇 (MW 8000, VWR, Brisbane, CA) 储备溶液。使用所述储备溶液, 在产生9:1的富PEG (盐贫乏): PEG贫乏 (富盐) 体积比率的PEG和盐的规定浓度下制备2 mL在PBS中的PEG-盐ATPS溶液。所述ATPS溶液在室温下孵育最少12h之后, 测量这一体积比率。

[0460] 使用碘-125 (<sup>125</sup>I) 来放射性标记山羊抗Tf抗体 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) 的酪氨酸残基。简单地说, 通过IODO-BEADS (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 活化Na<sup>125</sup>I (MP Biomedicals, Irvine, CA)。随后, 所述活化的<sup>125</sup>I与山羊抗Tf抗体反应15min。所述放射性标记的抗体使用Sephadex G15尺寸排阻柱由游离<sup>125</sup>I纯化。所述放射性标记的抗体的比活性和浓度通过磷钨酸分析来确定。

[0461] 为了制备葡聚糖涂布的金纳米探针 (DGNP), 首先使用1N NaOH将10mL先前制备的葡聚糖涂布的金纳米粒子溶液调节至pH 9.0。随后, 将80 $\mu$ g山羊抗Tf抗体添加至所述葡聚糖涂布的金纳米粒子溶液中。接着使所述混合物在室温下反应30min 以允许所述抗体与所述粒子形成配价键。游离的未结合抗体通过在9000g下离心30 min来去除。所回收的DGNP进一步用1%牛血清白蛋白 (BSA) 溶液洗涤, 使得所述 BSA可能覆盖所述DGNP上的任何游离表面以防止非特异性结合。过量BSA和额外的未结合抗体通过在9000g下离心30min来去除。将所回收的DGNP再悬浮于1mL 0.1M硼酸钠缓冲液 (pH 9.0) 中。

[0462] 为了研究所述DGNP在所述PEG-盐ATPS中的分配行为, 定量所述ATPS溶液的各相中

DGNP的浓度。放射性标记的DGNP通过使放射性标记的山羊抗Tf抗体缀合于所述葡聚糖涂布的金纳米粒子上来制备。对于各分配实验,200 $\mu$ L放射性标记的DGNP溶液添加至PBS中的三个相同的PEG-盐ATPS溶液中,各溶液具有2mL的最终体积。所述混合物在25 $^{\circ}$ C下孵育30min、2h、4h和12h。小心地提取富PEG、盐贫乏顶相和PEG贫乏、富盐底相,并且测量各相的体积。各相中放射性标记的DGNP的量通过使用Cobra Series Auto-Gamma计数器测量缀合于所述DGNP的放射性标记的抗体的放射性来定量。

[0463] 竞争LFA用于这一研究中,并且详细示意图可见于图27中。首先,Tf蛋白固定于硝基纤维素膜上以形成测试线。可结合于所述DGNP上的一抗的抗IgG二抗也固定于固定的Tf蛋白的下游以形成对照线。如果Tf蛋白不存在于样品溶液中,那么所述DGNP将结合于印在所述条上的Tf,从而在测试线处形成可见条条。另一方面,如果Tf蛋白存在于样品中,那么其将首先结合于所述DGNP的表面上其特异性抗体。如果所述DGNP用Tf蛋白饱和,那么所述DGNP将回避印在所述条上的Tf,使得在测试线处不存在可见条条。过量DGNP仍将结合于对照线,指示所述流体确实流动通过所述条并且结果为有效的。概括说来,阴性测试由两个可见条条指示,其中一个在测试线处并且一个在对照线处,而阳性测试由对照线处的仅一个可见条条指示。

[0464] 在与所述ATPS组合之前执行不具有PEG-盐ATPS预浓缩步骤的LFA。在这一研究中,制备含有变化浓度的Tf的PBS溶液,并且一式三份测试各Tf浓度。对于各LFA条,将10 $\mu$ L相应的Tf溶液与10 $\mu$ L所述DGNP溶液和30 $\mu$ L测试缓冲液(0.2% BSA、0.3% Tween20、0.2% 叠氮化钠、0.1% 聚乙二醇、0.1M Trizma碱,pH 8)混合,所述测试缓冲液用于辅助样品流动通过所述测试条。经LFA测试条垂直地浸渍于各混合物中,使得样品垫与所述混合物接触。10min后从所述混合物取出所述条,并且结果直观地读取并且使用MATLAB定量。

[0465] 随后执行具有PEG-盐ATPS预浓缩步骤的LFA。在这些实验中,首先制备含有变化Tf浓度的ATPS溶液,并且一式三份测试各Tf浓度。由于底相的体积大约为200  $\mu$ L,将100 $\mu$ L所述DGNP溶液添加至Tf/ATPS溶液中,最终体积为2mL,以实现与不具有ATPS步骤的情况下执行的LFA测试类似的DGNP浓度。将所述ATPS溶液充分混合并且在25 $^{\circ}$ C下孵育30min。对于各混合物,提取20 $\mu$ L PEG贫乏底相并且与30 $\mu$ L测试缓冲液混合以匹配在不具有ATPS步骤的情况下用于所述研究中的体积。LFA测试条垂直地浸渍,使得样品垫与所述混合物接触。10min后从所述混合物取出所述条,并且结果直观地读取并且使用MATLAB定量。

[0466] 写出定制MATLAB脚本以定量地分析所得图像。在所述LFA测试完成之后立即使用Canon EOS 1000D照相机(Canon U.S.A., Inc., Lake Success, NY)拍摄所述测试条的图像。为了确保图像之间的一致性,控制光照并且各条以相同方式定向。这些图像被采集并且转化为8比特灰度级矩阵。沿着垂直于流动的轴并且平行于测试和对照线对强度求平均值,并且产生一维强度图。两个最大值被鉴别为对照和测试线,并且这两条线之间的距离使用阴性对照(其具有强测试和对照线)来校准。

[0467] 为了从样品数据集获得测试线强度,鉴别对照线的位置,并且使用先前校准的距离确定测试线位置。测试线区域被设定为定中心于这一测试线位置的15像素宽区域。这一测量的基线接着通过对来自位于测试线的两侧上的两个25像素宽区域的信号求平均值来确定。第一基线区域从测试线位置上游的25个像素开始并且继续上游25个像素,而另一区域从测试线位置下游的25个像素开始并且继续下游25个像素。测试线强度接着计算为测试

线区域的曲线下面积以捕捉结合于所述测试线的所有 DGNP的效应。

[0468] 测量裸、PEG化和葡聚糖涂布的金纳米粒子样品的临界凝聚常数(CCC)值以确定葡聚糖涂布是否提供PEG-盐ATPS溶液中的金纳米粒子的必要空间稳定性。所述金纳米粒子的吸收光谱的峰值吸收波长大约为535nm。因此,在多种磷酸钾浓度下观察到各类型的金纳米粒子在535nm附近的吸收光谱,这是因为磷酸钾为PEG-盐 ATPS的盐组分。结果展示于图28A-图28C中。关于各曲线,峰值吸光度值被指定为值1.0(或100%标准化吸光度),并且所述曲线的剩余吸光度值相应地进行调节。从这些曲线,确定裸金纳米粒子的CCC在0.3与0.4%w/w磷酸钾之间;PEG化金纳米粒子的CCC在7.5与10%w/w磷酸钾之间;并且葡聚糖涂布的金纳米粒子的CCC大于30%w/w磷酸钾。这些结果指示所述葡聚糖涂布的金纳米粒子在磷酸钾盐溶液中甚至比所述PEG化金纳米粒子更稳定。此外,由于30%w/w磷酸钾大于底相磷酸钾浓度(约10%w/w),预期所述葡聚糖涂布的金纳米粒子在我们的PEG-盐ATPS溶液中保持稳定并且具功能性。这由其在本文所述的研究中的成功使用确认。

[0469] 放射性标记的DGNP的分配行为首先在具有9:1富PEG:PEG贫乏体积比率的PEG-盐ATPS溶液中直观地观察到。最初,含有DGNP的PEG-盐ATPS溶液呈现不透明并且浅紫色(图29A)。呈暗紫色的底相接着出现,指示所述DGNP极端地分配于PEG贫乏底相中(图29B)。随时间推移,当富DGNP、PEG贫乏结构域移动至所述ATPS溶液的底部时,底相的体积增加。相比之下,发现当顶相具有极少紫色时,所述DGNP呈现最少程度分配于顶部富PEG相中。12h平衡时间之后,顶相和底相的体积不再改变并且顶相呈现透明,表面所有富DGNP、PEG贫乏结构域均到达所述ATPS溶液的底部(图29C)。大约30min之后,底相的颜色强度不随时间改变,表明底相中的DGNP浓度从30min至12h相对地保持恒定。

[0470] 放射性标记的DGNP在两个相之间的分配行为接着通过下文定义的分配系数( $K_{DGNP}$ )来定量:

$$[0471] \quad K_{DGNP} \equiv \frac{C_{DGNP, \text{顶部}}}{C_{DGNP, \text{底部}}} \quad (2)$$

[0472] 其中 $C_{DGNP, \text{顶部}}$ 和 $C_{DGNP, \text{底部}}$ 分别为顶相和底相中DGNP的浓度。 $K_{DGNP}$ 值被测量为 $0.00605 \pm 0.00010$ ,其与相对大DGNP应极端地分配于PEG贫乏底相中的观点一致。

[0473] 为了证明所述DGNP可能以可预测方式浓缩于所述PEG-盐ATPS中,在9:1PEG-盐ATPS溶液中测量所述DGNP的浓缩因数或浓缩倍数改进。所述浓缩因数被定义为底相中DGNP的浓度 $C_{DGNP, \text{底部}}$ 除以初始DGNP浓度 $C_{DGNP, \text{初始}}$ 。

$$[0474] \quad \text{浓缩因数} \equiv \frac{C_{DGNP, \text{底部}}}{C_{DGNP, \text{初始}}} \quad (3)$$

[0475] 关于所述浓缩因数的表达式可通过以关于所述ATPS溶液中的DGNP的摩尔平衡等式开始来推导:

$$[0476] \quad C_{DGNP, \text{初始}} V_{\text{总计}} = C_{DGNP, \text{顶部}} V_{\text{顶部}} + C_{DGNP, \text{底部}} V_{\text{底部}} \quad (4)$$

[0477] 其中 $V_{\text{顶部}}$ 和 $V_{\text{底部}}$ 分别为顶相和底相的体积。组合等式(2)和(3),并且重排等式(4)产生:

$$[0478] \quad \text{浓缩因数} = \frac{1 + \frac{V_{\text{底部}}}{V_{\text{顶部}}}}{K_{DGNP} + \frac{V_{\text{底部}}}{V_{\text{顶部}}}} \quad (5)$$

[0479] 由于所述DGNP的分配系数比V底部/V顶部小得多,所述浓缩系数可进一步简化为:

$$[0480] \quad \text{浓缩因数} \approx 1 + \frac{V_{\text{顶部}}}{V_{\text{底部}}} \quad (6)$$

[0481] 其表示所述浓缩因数仅为针对极端 $K_{\text{DGNP}}$ 值的体积比率的函数。此处,在9:1的体积比率或底相体积为总溶液的体积的1/10的情况下,预期浓缩因数为10。这由关于所述DGNP的分配实验确认,其中 $C_{\text{DGNP}}$ ,底部在12h孵育后测量。然而,由于在即时检验应用中无需等待12h来使所述ATPS实现宏观相分离平衡并且因为底相中的DGNP浓度在30min后与时间无关,所述浓缩因数在较早时间点测量。图30 示出所述ATPS溶液中的浓缩因数从30min至12h保持相对恒定。结果,底相在30 min时提取用于所述LFA应用。

[0482] 为了证明所述DGNP可用作LFA的比色指示剂,执行LFA用于Tf的检测而无预浓缩ATPS步骤。这一研究的结果展示于图31A中。由于在LFA条上观察到条条,推断出所述DGNP可用作比色指示剂。各测试展示了对照线的存在,其指示所述流体完全地流动通过所述条并且确认了所述测试的有效性。关于其中不存在Tf的阴性对照,所述测试线的出现指示了真实阴性结果。当使用高Tf浓度(3.16ng/ $\mu\text{L}$ 和1.0 ng/ $\mu\text{L}$ )时,测试线不存在,指示真实阳性结果。然而,在如0.316ng/ $\mu\text{L}$ 的较低浓度下,可见测试线出现,因此指示假阴性结果。这表明不具有预浓缩步骤的情况下LFA 针对Tf的检测极限为1ng/ $\mu\text{L}$ 。

[0483] 利用9:1PEG-盐体积比率溶液来证明LFA的检测极限可能通过浓缩用Tf饱和的DGNP而改进10倍。这一研究的结果展示于图31B中。在室温下孵育所述ATPS溶液持续30min之后,PEG贫乏底相中浓缩的DGNP被提取并且应用于LFA。类似于前一实验,对照线和测试线均在Tf不存在下出现,指示有效的阴性结果。在较高Tf 浓度(0.316ng/ $\mu\text{L}$ 和0.1ng/ $\mu\text{L}$ )下无测试线出现,而可见测试线首先在0.0316ng/ $\mu\text{L}$  下出现,指示具有预浓缩步骤的情况下LFA针对Tf的检测极限为0.1ng/ $\mu\text{L}$ 。这对应用于当使用DGNP和PEG-盐ATPS时LFA的检测极限的10倍改进。

[0484] 为了进一步验证LFA结果的直观解释,拍摄测试条的图像,并且定量测试线的强度。当使用预浓缩步骤时,针对各LFA的测试线信号在测试相同Tf浓度时较弱,指示Tf正在浓缩并且使所述DGNP饱和,其中饱和DGNP无法结合于测试线,指示阳性结果。对照线和测试线信号强度在与ATPS组合或不与ATPS组合的情况下在阴性对照中类似。这指示在两个实验中穿过LFA条的DGNP的量类似。LFA图的 MATLAB分析还证明了检测极限的改进(图32)。具体说来,图32中的两条曲线针对大约相同测试线信号相隔初始Tf浓度的10倍差异。

[0485] 实施例3.混合PEG-盐ATPS直接添加至所述LFA中

[0486] 在这一实施例中,用具有ATPS相分离和下游检测能力的下一代一体化装置优化灵敏性、速度和容易使用性。替代在所述ATPS的相分离之后应用浓缩样品,使得混合ATPS能够直接添加至基于纸的装置中。所述溶液在其朝向检测区流动时分离成为其两个相,从而允许浓缩和检测步骤同时发生并且进一步减少总体获得结果的时间。表明纸膜加速所述ATPS的宏观相分离。为了进一步利用这一现象,所述纸装置垂直地扩展,由此增加流动的横断面面积并且利用毛细管作用和/或重力对宏观分离的效应。除了促进相分离外,这种3-D组件还具有处理更大、更多稀释体积的样品的能力,引起更大的浓缩倍数改进。3-D纸结构内的ATPS和LFA的新颖性成功地产生模型蛋白Tf的检测极限的10倍改进,同时减少总体获得结果的时间并且维持容易使用性。这种装置提供相对于传统LFA测试的显著改进并且可修改

用于具有低特征性生物标记物水平的多种疾病的检测。这种新的平台技术具有高度灵敏性、低成本、快速、无设备,并且因此具有使资源贫乏区域内诊断性卫生保健的当前状态发生巨大变化的潜力。

[0487] 确定聚合物-盐ATPS溶液体积比率

[0488] 除非另外描述,否则所有材料、化学品和试剂均购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。聚乙二醇8000 (PEG, VWR, Brisbane, CA) 和磷酸钾盐 (5:1二价:一价比率) 溶解于杜氏磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS; Invitrogen, Grand Island, NY, pH 7.4, 含有1.47mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、8.1mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、137.92mM  $\text{NaCl}$ 、2.67mM  $\text{KCl}$ 和0.49mM  $\text{MgCl}_2$ ) 中。平衡体积比率(顶相的体积除以底相的体积)通过改变PEG和盐沿着相同连接线的 w/w组成来获得。发现1:1和9:1体积比率ATPS并且用于进一步实验。

[0489] 制备抗体修饰的葡聚糖涂布的金纳米探针 (DGNP)

[0490] 合成葡聚糖涂布的金纳米粒子。简单地说,6g来自白联珠菌属亚种的葡聚糖 (Mw. 15,000–25,000) 溶解于80mL过滤的UltraPure无菌水 (Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA) 中。将所述溶液搅拌并且加热至沸腾,之后添加1080 $\mu\text{L}$  1%w/v水合氯化金(III)溶液。所述反应混合物的颜色变为红紫色并且搅拌并且沸腾持续约20 min。使新形成的葡聚糖涂布的金纳米粒子离心以去除游离葡聚糖并且再悬浮于70 mL水中。为了形成官能化DGNP,使用1.5M  $\text{NaOH}$ 将所述葡聚糖涂布的金纳米粒子溶液的pH调节至9.0。关于每1mL葡聚糖涂布的金纳米粒子溶液,添加8 $\mu\text{g}$ 抗 Tf抗体 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)。所述反应混合物放置于振荡器上持续 30min以促进所述抗体与所述葡聚糖涂布的金纳米粒子之间的配价键的形成。游离抗体通过离心去除。使沉淀再悬浮于100 $\mu\text{L}$ 在pH 9.0下的0.1M硼酸钠缓冲液中。

[0491] 目测ATPS

[0492] 为了目测所述ATPS的两个相,由于表面等离子体共振而呈紫色的葡聚糖涂布的金纳米粒子和亮蓝FCF染料 (The Kroger Co., Cincinnati, OH) 添加至总计3g含有先前对于所述1:1和9:1体积比率确定的浓度的PEG和盐的PBS溶液中。将这些溶液通过涡旋充分混合并且在25 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育。当所述ATPS到达平衡时,拍摄所述溶液的图像。使用Canon EOS 1000D照相机 (Canon U.S.A., Inc., Lake Success, NY) 捕捉所有图像。

[0493] 所述ATPS的两个相接着在其沿着纸膜流动时进行目测。用VersaLASER 3.50 (Universal Laser Systems, Scottsdale, AZ) 对玻璃纤维纸的两个8 $\times$ 30mm条进行激光切割。随后,50mg含有亮蓝FCF染料和葡聚糖涂布的金纳米粒子的混合ATPS (对应于所述1:1或9:1平衡体积比率) 使用移液管逐滴添加至所述条的一端。在0、30、105 和300sec时捕捉所得流动的图像。还用来自商业智能手机 (Apple Inc., Cupertino, CA) 的8兆像素照相机拍摄视频。

[0494] 为了目测3-D纸孔内所述ATPS的相分离,140mg含有亮蓝FCF染料和葡聚糖涂布的金纳米粒子的混合ATPS添加至所述纸孔中。所述3-D纸孔通过在玻璃纤维的 8 $\times$ 60mm激光切割条的一个边缘上堆叠玻璃纤维纸的九个8 $\times$ 10mm激光切割条而形成。在所述混合ATPS应用于所述3-D纸孔之后,50 $\mu\text{L}$ 电泳缓冲液 (0.2%牛血清白蛋白 (BSA)、0.3%Tween20、0.1M Trizma碱, pH 8) 添加至所述3-D纸孔中。添加电泳缓冲液以辅助所述样品从所述纸孔流动至所述装置的余下部分。拍摄视频并且在0 和30sec时、在添加电泳缓冲液时和在流动完成

之后捕捉图像。

[0495] 检测Tf

[0496] 用于检测Tf的LFA测试

[0497] 组装利用竞争分析形式的LFA测试条。简单地说,用抗Tf抗体修饰的DGNP 首先添加至样品溶液中,并且使其结合存在于所述样品中的任何Tf以形成DGNP/Tf 复合物。为了验证使用LFA时Tf的检测极限,30 $\mu$ L电泳缓冲液和由15 $\mu$ L含已知量的PBS中的Tf和5 $\mu$ L所述DGNP组成的20 $\mu$ L样品溶液在试管中混合。所述LFA 测试条垂直地插入至所述具有浸没于所述样品中的样品垫的管中,并且所述流体被芯吸通过所述条朝向吸收垫。如果Tf存在,那么移动通过所述LFA条的DGNP/Tf复合物无法结合于固定于测试线上的Tf,指示在对照线处存在单一条条的阳性结果。或者,如果Tf不存在,那么DGNP上的抗体可结合于测试线上的Tf。由于这些探针展现紫红色,当DGNP在测试线处聚集时可见条条形成,指示阴性结果。与Tf的存在无关,DGNP上的抗体将始终结合于固定于对照线上的二抗。对照线处的条条表示所述样品完全地流动通过所述条,指示有效测试。因此,阴性结果由两个条条指示:测试线处的一个条条和对照线处的一个条条。相比之下,阳性结果由对照线处的单一条条指示。各Tf浓度一式三份进行测试。在10min之后在控制光照环境中通过Canon EOS 1000D照相机使代表性LFA条成像。

[0498] 用3-D纸孔检测Tf

[0499] 所述基于纸的装置的LFA组件从上述设置略有修改。具体说来,纤维素样品垫用5 $\times$ 20mm玻璃纤维纸替换,所述玻璃纤维纸连接含有测试和对照线的硝基纤维素膜。在样品垫开始处,使用由玻璃纤维纸的多个条构成的3-D纸孔。关于使用1:1体积比率ATPS的实验,所述孔由五层(四个5 $\times$ 7mm条加上底部样品垫)玻璃纤维纸构成。为了开始测试,将40 $\mu$ L含有已知浓度的Tf的混合1:1体积比率ATPS添加至所述纸孔中,随后添加50 $\mu$ L电泳缓冲液。10min之后捕捉图像。关于使用9:1体积比率ATPS的实验,使用20层的纸(十九个5 $\times$ 7mm条加上底部样品垫)来形成所述纸孔。将200 $\mu$ L含有已知浓度的Tf的混合9:1体积比率ATPS添加至所述纸孔中,并且使其孵育10min,随后添加100 $\mu$ L电泳缓冲液。另外10min之后,在控制光照环境中通过Canon EOS 1000D照相机捕捉图像。各Tf浓度一式三份进行测试。

[0500] 目测ATPS

[0501] ATPS与LFA的整合可能显著改进传统LFA测试的检测极限而不损害其优势。为此,首先有必要鉴别当流动通过所述纸膜时可能目测其相的ATPS。具体说来,使用PEG-盐ATPS,其在顶部形成更具疏水性的富PEG相并且在底部形成更致密并且具亲水性的PEG贫乏相。所述ATPS中的生物分子分配主要通过相对亲水性(由于生物分子倾向于偏好其中其经历最大相互吸引的相)和尺寸(由于大生物分子通常由于经历与富PEG相中更大数目的PEG分子的更大空间排除-体积相互排斥而不保留于富 PEG相中)来指示。亮蓝FCF染料添加至混合ATPS中,并且因为其小并且疏水性的,所述染料极端地分配于富PEG相中。紫色葡聚糖涂布的金纳米粒子也添加至混合ATPS中,并且因为其为大(如通过动态光散射所测量约为50nm直径)并且亲水性的,极端地分配于PEG贫乏相中。在相分离之前和之后拍摄1:1体积比率ATPS和 9:1体积比率ATPS的图像(图33A-图33D)。亮蓝FCF和葡聚糖涂布的金纳米粒子的量在所述1:1与所述9:1体积比率ATPS之间保持恒定。结果,在相分离之后,所述 9:1体积比率ATPS的顶相与所述1:1体积比率ATPS的顶相相比体积较大并且因此较少用蓝色染料浓

缩。另外,所述9:1体积比率ATPS的底相与所述1:1体积比率ATPS的底相相比体积小得多并且呈现更深的紫色色调,证明收缩底相可有效地浓缩所述ATPS内的葡聚糖涂布的金纳米粒子。预期所述9:1体积比率ATPS样品将浓缩所述纳米粒子达10倍,因为底相的体积变为总的样品溶液的体积的1/10。注意,当体积比率变得更极端时,可获得更大浓缩倍数改进,但所述系统也需要更多时间来分离。

[0502] 目测纸中的ATPS

[0503] 在所述纸膜上添加混合ATPS之后,观察到含有紫色葡聚糖涂布的金纳米粒子的PEG贫乏相快速地流动通过所述纸。同时,含有所述蓝色染料的富PEG相保持在所述纸膜的开始处(图34A-图34B)。这一结果类似于其中在引起通过所述纸的流动之前允许所述ATPS的两个相在玻璃孔内充分分离的情况(图80A-图80C)。当使用1:1体积比率ATPS时,在所述纸膜内发生的增强的相分离为明显的(图34A),并且所述1:1体积比率ATPS几乎立即在所述纸内相分离。如图33A-图33D所示,使用所述ATPS实现的紫色葡聚糖涂布的金纳米粒子的浓缩倍数为所述体积比率的函数。具体说来,由于所述粒子极端地分配至PEG贫乏相,1:1体积比率应产生所述粒子的2倍浓缩,因为其作为流动的前沿以初始体积的一半流动。纸膜内的所述相分离行为的一种可能的解释是富PEG结构域经历与所述纸的更多相互作用,使其不太移动。此外,富PEG结构域还更具粘性并且因此在穿过弯曲的纸网络时可经历更大困难。相比之下,PEG贫乏结构域较少与所述纸相互作用并且具较少粘性,使其快速地穿过所述纸网络并且在前沿处聚结。对于9:1体积比率ATPS,PEG贫乏结构域仅构成总体积的十分之一,使其更难以在富PEG结构域前面聚结并且流动。具体说来,在纸中发生宏观相分离所需的时间长于所述流体芯吸所述纸所耗用的时间,并且未观察到良好分离(图34B)。

[0504] 当使用1:1和9:1体积比率ATPS时,还观察到一些PEG贫乏结构域不使其成为流动的前沿。这指示并非所有PEG贫乏结构域均能够脱离富PEG结构域并且解释了为何在试管中测量的平衡体积比率不匹配所述纸膜上的芯吸距离比率。为了改进LFA,大多数PEG贫乏结构域需要到达宏观PEG贫乏相并且在到达检测区之前与宏观富PEG相分离。因此,需要额外组分进一步改进相分离现象。

[0505] 目测3-D纸孔装置中的ATPS

[0506] 设计利用3-D纸结构的纸孔以进一步增强相分离行为。使用3-D纸孔还允许重力有助于所述纸内的ATPS相分离,所述重力通常驱动试管中的相分离。所述3-D纸结构还增加垂直于流动的方向的横断面面积。更多体积可因此同时芯吸通过所述纸,从而使更多富PEG结构域通过其与所述纸的相互作用被阻止并且使PEG贫乏结构域更容易聚结。如图35A-图35B所示,所述3-D纸孔有助于相比先前所示的2-D纸膜更大的相分离效率。富PEG结构域保留在所述纸孔的顶层中,而含有浓缩的葡聚糖涂布的金纳米粒子的PEG贫乏结构域朝向所述纸孔的底层流动。另外,PEG贫乏结构域首先离开所述纸孔并且有效地与富PEG结构域分离。还添加电泳缓冲液以进一步驱动流体流动并且帮助任何剩余的PEG贫乏结构域涌过所述纸孔,并且预见这种添加可在将来自动化。注意当使用9:1体积比率ATPS时流动较慢(所述溶液在390sec后未到达条的末端),因为存在较大体积的更具粘性的富PEG相。

[0507] 使用3-D纸孔装置检测Tf

[0508] 在目测所述3-D纸孔装置内改进的ATPS相分离和流动行为后,对LFA是否可能与这种技术组合来改进检测极限提出疑问。不再使用亮蓝FCF染料,并且使用官能化抗Tf DGNP

替代所述葡聚糖涂布的金纳米粒子。所述DGNP同样分配至所述ATPS中的葡聚糖涂布的金纳米粒子,但也可捕捉样品中的靶标生物标记物并且充当 LFA的比色指示剂。

[0509] 鉴别出对于不并入所述ATPS和3-D纸孔装置的仅LFA对照的检测极限。为了在竞争形式中改进LFA相对于所述对照的检测极限,在所述DGNP上修饰的抗体需要结合于更多Tf。这可通过使相同数目的DGNP暴露于更大数目的Tf分子来实现,并且对于固定浓度的Tf,将需要增加所述溶液的总容积。尽管所述DGNP可在总容积的增加下实现饱和,但其由于体积倍数增加而被稀释。由于所述LFA条各自可能仅处理20 $\mu$ L样品,归因于稀释所述DGNP,将导致无效测试,因为将不足够的DGNP 结合于对照线。然而,当使用所述ATPS和3-D纸孔装置时,用Tf分子实现饱和的 DGNP极端地分配于PEG贫乏相中并且可能因此在纸上的流动前沿中浓缩,使得将引起有效测试。相应地,当使用预期使DGNP浓缩2倍的1:1体积比率ATPS时,样品体积增加2倍至40 $\mu$ L,导致与对照相比相同数目的DGNP进入检测区。同样,当使用预期使DGNP浓缩10倍的9:1体积比率ATPS时,样品体积增加10倍至200 $\mu$ L。由于含有所述DGNP的1:1和9:1体积比率ATPS中仅底相应通过检测区,所述装置的体积处理能力通过改变构成3-D纸孔的层的数目进行微调。为了适应样品体积的这种增加,用于1:1体积比率ATPS溶液内的Tf检测的3-D纸孔由5层纸构成,而对于9:1体积比率ATPS溶液的3-D纸孔增加至20层纸(图36B和C)以适应增加的体积。尽管层的数目显著增加,针对9:1体积比率ATPS的3-D纸孔与十分之一相比仍保持相对较小。

[0510] 当含有DGNP的ATPS溶液添加至所述纸孔中时,所述DGNP在其芯吸通过所述装置时快速地浓缩至所述溶液的前沿。所述DGNP在保留于所述纸孔中的所述溶液的剩余部分之前到达所述装置的检测区。对于所述竞争分析,测试线的存在指示阴性结果,而测试线的不存在指示阳性结果。当使用不含模型蛋白Tf的阴性对照时,在小于25min内,使用1:1和9:1体积比率ATPS的两种设置分别使测试和对照线处均产生可见条条,指示Tf的不存在和有效测试(图36A-图36C)。在验证所述3-D纸孔可与LFA组合以精确地评估阴性对照ATPS样品中Tf的不存在之后,当使用1:1 和9:1体积比率ATPS溶液时改变Tf浓度以发现检测极限。这些实验证明了相比常规LFA,Tf的检测极限的分别2倍和10倍改进(图37A-图37B)。对于具有3-D纸孔的9:1体积比率ATPS实验,使样品在所述装置内再孵育10min以使所述DGNP在添加电泳缓冲液之前具有充足时间来捕捉靶标蛋白并且宏观地进行相分离。1:1体积比率ATPS不需要这一孵育时期,因为所述DGNP在混合ATPS中进一步浓缩,使得所述DGNP更容易探测整个溶液。这些实验的结果显示当使用1:1体积比率ATPS 时,虽然常规LFA检测出在1ng/ $\mu$ L的浓度(测试线不出现的浓度)下的Tf,但这种基于3-D纸的诊断装置能够检测出在0.5ng/ $\mu$ L下的Tf(检测极限的2倍改进)。同样,当使用9:1体积比率ATPS时,所述基于3-D纸的诊断装置能够检测出在0.1ng/ $\mu$ L 下的Tf(检测极限的10倍改进)。这些结果表明具有所需体积比率的ATPS溶液可与适当定尺寸的3-D纸孔组合以显著地并且可预测地改进使用LFA时的生物标记物检测。

[0511] 实施例4. PEG-盐ATPS中M13噬菌体的检测

[0512] 为了增加在随时随地(PON)设定中组合ATPS与LFA的可行性,对所述系统进行以下修改:(1)用较短的相分离时间研究聚乙二醇(PEG)和磷酸钾(盐)ATPS,(2)检查生物分子分配的动力学行为,其允许提取时间的显著进一步减少,(3)通过修饰金表面上的PEG来确保用于LFA的金纳米探针指示剂与PEG-盐ATPS的富盐相的相容性,和(4)产生定制MATLAB脚本

以定量所观察的LFA信号强度。概述这些改变的直观表示展示于图38中。

[0513] 培养噬菌体M13

[0514] 大肠杆菌 (*Escherichia coli*/E.coli) 细菌菌株ER2738 (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA) 在8mL Luria肉汤 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 中在 37 °C 下在振荡孵育器中孵育6h。为了培养模型病毒噬菌体M13 (ATCC), 将少量冷冻M13添加至细菌培养物中。所述细菌培养物接着放置于在37°C下的振荡孵育器中持续14h。所述溶液在4°C和6000g下离心15min以使上清液中的M13与沉淀中的细菌分离。所述上清液从所述溶液提取并且通过0.22µm针筒过滤器 (Millipore, Billerica, MA) 过滤。这一储备M13溶液的稀释度使用如通过斑块分析所确定的M13 的浓度来计算并且因此, M13浓度以每mL斑块形成单元 (pfu/mL) 报告。除非另外描述, 否则所有试剂和材料均购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。

[0515] 发现所述PEG-盐系统的体积比率

[0516] 对于所述聚合物-盐ATPS, 聚乙二醇8000 (PEG, VWR, Brisbane, CA) 和磷酸钾 (5:1 二价:一价) 溶解于杜氏PBS (Invitrogen, Grand Island, NY, pH 7.4, 含有1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137.92mM NaCl, 2.67mM KCl和0.49mM MgCl<sub>2</sub>) 中。最终溶液以含有2% (w/w) Luria肉汤的总计5g质量制得以与涉及含有Luria肉汤的 M13样品的实验一致。平衡体积比率 (宏观顶相的体积除以宏观底相) 在最少12h (过平衡) 后通过在所述溶液的界面和顶部标记所述管的外部来测量。管接着排空, 干燥并且在天平上称重。添加水直至所述标记, 并且使用1g/mL作为水的密度来确定两个相的体积。通过改变初始PEG浓度、初始盐浓度并且保持在37°C下的温度常数来发现不同平衡体积比率。应注意, 这些体积比率在相同连接线上加以选择以确保生物分子的相似分配, 并且使用的具体操作条件列于表2中。

[0517] 表2. PEG-盐ATPS的测试比率

[0518]

体积比率	PEG-8000 (%w/w)	磷酸钾* (%w/w)
9:1	21.6%	3.83%
6:1	20.6%	4.19%
3:1	18.1%	5.18%
1:1	12.2%	7.50%

[0519] 分配并且浓缩M13

[0520] 对于各浓缩实验, 制备4种相同的5g PEG-盐溶液。在这些溶液中, 3种用于浓缩步骤 (n=3), 而1种用作对照以表示初始M13浓度。为了确保各溶液在相分离之前处于一个相中, 所有溶液均在4°C下平衡并且混合至均质。M13接着添加至所述4种溶液中以产生1×10<sup>8</sup> pfu/mL的总体初始浓度。为了确定M13浓度如何随时间改变, 9:1体积比率溶液在37°C水浴中孵育30min、1h、4h和24h。为了确定M13浓度如何随体积比率改变, 9:1、6:1、3:1和1:1体积比率溶液在37°C水浴中孵育30min。在各实验中, 将3种溶液的底相使用注射器小心地抽出。对照溶液经历相同孵育步骤以模拟与测试溶液相同的条件。然而, 在所述孵育之后, 所述对照再一次平衡至4°C并且混合至均质, 接着抽出等分试样来表示所述ATPS中M13的初始浓度。所提取的底相和对照溶液的M13浓度通过所述斑块分析来确定。

[0521] 制备金纳米探针

[0522] 制备胶态金纳米粒子。所述金纳米粒子的直径接着使用动态光散射 (DLS) 用

Zetasizer Nano SZ粒子分析仪 (Malvern Instruments Inc., Westborough, MA) 确定。随后,使用比尔定律确定金纳米粒子的浓度。所用的吸光度值处于峰值吸光度下,并且从由BBInternational Life Sciences提供的数据表获得摩尔消光系数(表3)。

[0523] 表3. 金纳米粒子特性

d (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	d (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
20	9.406E8	26	2.236E9
21	1.105E9	27	2.532E9
22	1.288E9	28	2.855E9
23	1.492E9	29	3.206E9
24	1.717E9	30	3.585E9
25	1.964E9		

[0525] 在所述金纳米粒子的定量之后,针对M13的外壳蛋白pVIIII的小鼠单克隆抗体 (Abcam Inc., Cambridge, MA) 以每1mL胶态金16 $\mu$ g抗M13的比率添加至纳米粒子溶液中以形成金纳米探针。所述溶液的pH使用0.1M NaOH调节至9.0以促进所述抗体与所述金之间的配价键,并且这一溶液在振荡器上混合30min。为了在LFA之前添加金纳米探针至PEG贫乏、富盐相中时提供空间胶态稳定化,使PEG-2000-SH (Nanocs, Boston, MA) 分子以5000个PEG-2000-SH分子:1个金纳米探针的摩尔比率结合于所述金纳米探针。所述溶液再混合30min。为了防止非特异性结合,100 $\mu$ L 10%牛血清白蛋白 (BSA) 溶液添加至1mL所述胶态金溶液中以阻断剩余过量表面,并且这一溶液混合30min。最终,所述溶液在4 $^{\circ}$ C和8600g下离心30min以去除游离抗体、PEG和BSA。修饰过的金纳米探针再悬浮于150 $\mu$ L在pH 9.0下的0.1M硼酸钠缓冲液中。

[0526] 组合ATPS与LFA

[0527] 为组合ATPS预浓缩步骤与LFA,将不同的M13浓度添加至9:1体积比率PEG- 盐溶液中。在37 $^{\circ}$ C下孵育30min之后,使用注射器提取浓缩的底相。关于使用和不使用预浓缩步骤的情况下执行的免疫分析之间的一致性,将M13添加至最初不含 M13的9:1溶液的底相样品中,因此形成对照溶液。随后,30 $\mu$ L所述底相样品和10  $\mu$ L抗M13修饰的胶态金探针溶液与30  $\mu$ L电泳缓冲液混合在一起。有助于样品流动通过测试条的电泳缓冲液由具有调节至8的pH的ddH<sub>2</sub>O中的0.2%w/v BSA、0.3% w/v Tween 20、0.2%w/v叠氮化钠、0.1%PEG-8000和0.1M Trizma碱组成。为了使抗体结合于M13,将所得溶液在添加LFA条之前混合并且孵育5min。组装所述LFA 条以实施夹心分析,如图39中示意性展示。10min之后,取出所述LFA条并且通过直观地检查所述LFA条上的测试和对照线来获得结果。

[0528] 定量分析LFA

[0529] 在控制光照环境中用Canon DSLR照相机完成测试之后立即拍摄所述LFA条的照片。为了定量LFA结果,写出定制MATLAB脚本。采集的图像转化为8比特灰度级矩阵。随后,所述矩阵分裂成两半,其中一个所得矩阵含有对照线并且另一个含有测试线。关于各半个矩阵,最小强度(最暗斑点)沿着垂直于对照或测试线的向量定位。这些最小值的平均位置用作15像素高的矩形区域的中心,所述区域跨对照或测试线的长度。随后,计算对照线区域中所有像素的平均灰度级强度( $I_{对照}$ )。相同程序应用于所述图像中含有测试线的剩余半个,产生测试线区域的平均灰度级强度( $I_{测试}$ )。15 像素宽并且在测试线上游50个像素的第三参考

区域的平均灰度级强度 ( $I_{\text{参考}}$ ) 用于如下标准化测试和对照线的强度:

$$[0530] \quad \text{信号}_{\text{对照}} = I_{\text{参考}} - I_{\text{对照}} \quad (7)$$

[0531] 针对对照线, 并且

$$[0532] \quad \text{信号}_{\text{测试}} = I_{\text{参考}} - I_{\text{测试}} \quad (8)$$

[0533] 针对测试线。注意高强度值对应于白区。

[0534] 生物分子分配

[0535] Triton X-114胶束ATPS可与LFA组合以实现LFA病毒检测极限的10倍改进。所述Triton X-114胶束系统耗用超过6h使两个相的体积平衡。相比之下, 这一研究中的聚合物-盐ATPS具有更快速的相分离。另外, 针对9:1体积比率使用30min的早期提取时间。

[0536] 由盐和显著参与氢键结相互作用的聚合物PEG构成的水溶液将经历宏观相分离。富PEG、盐贫乏相将在顶部形成, 而PEG贫乏、富盐相将在底部形成。大的亲水性生物分子极端地分配于底部PEG贫乏相中。关于这一实施例, 研究噬菌体M13, 在尺寸和形状方面类似于埃博拉和马尔堡病毒的模型病毒。由于M13具有900nm的长度和相对亲水性蛋白外鞘, 预期其极端地分配于底部PEG贫乏相中, 这是归因于相对于富PEG相中的那些, 与所述相中的PEG聚合物经历较少的排斥性、空间、排除体积相互作用。在水性两相胶束系统中, 观察到M13极端地分配于其中M13病毒粒子也经历较少的排除体积相互作用的宏观胶束贫乏相中。

[0537] 当所述溶液被加热并且相分离最初开始时, 富PEG (M13贫乏) 结构域和PEG贫乏 (富M13) 结构域在整个溶液中形成。假定这些微观结构域中的病毒浓度极快速地到达其平衡值, 并且相似结构域开始彼此聚结。当这些结构域长大后, 其密度的差异产生不均匀重力和浮力, 所述力使富PEG结构域上升并且使PEG贫乏结构域下降。这导致形成宏观顶部富PEG (M13贫乏) 相和宏观底部PEG贫乏 (富M13) 相。下文进一步解释这一过程的动力学和夹带或捕集的结构域的效应。

[0538] 由于预期所述病毒极端地分配于宏观底相中, 仅关注在提取时底相中的生物分子浓度。浓缩因数接着定义为宏观底相中病毒的浓度  $C_{\text{病毒, 底部}}$  除以初始总体浓度  $C_{\text{病毒, 初始}}$ 。

$$[0539] \quad \text{浓缩因数} = \frac{C_{\text{病毒, 底部}}}{C_{\text{病毒, 初始}}} \quad (9)$$

[0540] 可能消极地影响浓缩因数的一种潜在的问题是宏观底相中夹带的富PEG (M13贫乏) 结构域的存在。在平衡之前, 并非所有结构域均具有充足时间行进至其相应宏观相。然而, 当使用9:1的平衡体积比率时, 这不成问题。归因于与以所述9:1体积比率的富PEG结构域相关的较大体积, 所述结构域更容易聚结并且形成连续相。所述富PEG结构域还具有较小的行进距离以便到达宏观顶相, 因为宏观底相极小。结果, 在宏观底相中存在富PEG (M13贫乏) 结构域的最少程度夹带, 并且预期所述生物分子的浓度接近其平衡值。然而, 在宏观顶相中仍预期PEG贫乏 (富M13) 结构域的夹带。归因于与所述PEG贫乏结构域相关的较小体积, 这些结构域更难以聚结。其还必须行进更远距离通过更具粘性的富PEG宏观相来到达宏观底相。然而, 因为主要的问题是底相中的生物分子浓度并且LFA仅需要小体积, 所以有可能在30min时进行提取并且仍实现平衡预测的浓缩因数。

[0541] 直观检查所述9:1体积比率溶液随时间而变的相分离。最初, 富PEG和PEG贫乏结构域在整个溶液中形成。富PEG结构域快速地聚结并且形成连续相。所述溶液呈现混浊, 因为

夹带的PEG贫乏结构域使光散射(图40A)。当PEG贫乏结构域由于其较大密度聚结并且下降至底部时,从底部向上形成宏观底部PEG贫乏相。30min 之后,存在浑浊的宏观顶部富PEG相,所述相与透明的宏观底部PEG贫乏相分离(图 40B)。尽管所述顶相含有夹带的PEG贫乏(富M13)结构域,主要关注底相的浑浊度,因为其含有浓缩的生物分子。在一段长时期后,所有或大多数的PEG贫乏结构域已经行进至底部宏观相,并且所述系统接近平衡,如通过两个透明相所指示(图40C)。注意所述底相归因于不存在显著夹带的富PEG(M13贫乏)结构域而在30min时已经为透明的,表明在所述相中测量的病毒浓度应已经反映其平衡值。

[0542] 为了在30min时提取所述底相,需要确认宏观底部PEG贫乏(富M13)相不含显著富PEG(M13贫乏)结构域。浓缩因数接着被确定为时间的函数以指示所述底相中测量的M13浓度甚至在一段短时期后也等于其平衡值。具体说来,使用与图40A-图 40C中所用的那些(即,产生9:1平衡体积比率的那些条件)相同的温度和初始PEG和盐浓度执行M13分配实验,并且在30min、1h、4h和24h时提取底相(过平衡)。如图41所示,浓缩因数随30min与24h之间的提取时间保持恒定,证明宏观底部PEG 贫乏(富M13)相中富PEG(M13贫乏)结构域的夹带实际上为最小程度的。因此,对于后续研究,30min提取时间用于PON应用所必需的短时间。

[0543] 在ATPS中分配M13

[0544] 等式(9)中的浓缩因数可显示为体积比率的函数。使用摩尔平衡来使单一均匀相中病毒的初始摩尔数与两个所得相中病毒摩尔数的总和相等,获得以下表达式:

$$[0545] \quad C_{\text{病毒,初始}}V_{\text{总计}} = C_{\text{病毒,顶部}}V_{\text{顶部}} + C_{\text{病毒,底部}}V_{\text{底部}} \quad (10)$$

[0546] 其中 $C_{\text{病毒,顶部}}$ 为宏观顶相中的病毒浓度,并且 $V_{\text{顶部}}$ 和 $V_{\text{底部}}$ 分别为顶相和底相的体积。重排等式(10)产生针对浓缩因数的以下表达式:

$$[0547] \quad \text{浓缩因数} = \frac{1 + \frac{V_{\text{底部}}}{V_{\text{顶部}}}}{\frac{C_{\text{病毒,顶部}}}{C_{\text{病毒,底部}}} + \frac{V_{\text{底部}}}{V_{\text{顶部}}}} \quad (11)$$

[0548] 使用9:1体积比率ATPS,M13分配系数经过测量(顶相中的平衡浓度除以底相中的平衡浓度)小于0.0001。由于这一经过测量的分配系数比 $V_{\text{底部}}/V_{\text{顶部}}$ 值1/9小得多,可如下对这一表达式求近似值:

$$[0549] \quad \text{浓缩因数} \approx 1 + \frac{V_{\text{顶部}}}{V_{\text{底部}}} \quad (12)$$

[0550] 相应地,关于随体积比率而变的浓缩因数预测线性关系。所述浓缩因数随着增加的体积比率而增加,因为所述生物分子极端地分配于底相中,并且增加体积比率对应于收缩其中极端地分配M13的相。具体说来,如果使用9:1体积比率,那么预期M13 将浓缩10倍,因为其中极端地分配M13的相的体积是初始体积的1/10。随后,使用 30min提取时间对这进行测试,因为短时间为PON应用所必需的。在37°C下并且在产生9:1、6:1、3:1和1:1平衡体积比率的PEG和盐的初始浓度下执行M13分配实验。图42示出测试随体积比率而变的浓缩因数的实验的结果。为了在统计学上确定实验数据是否与模型预测一致,计算决定系数或R平方值。发现所述R平方值为0.858,表明实验数据与预测的值相当充分地一致,进一步确认了所述简单模型甚至关于30 min提取时间也是适当的。

[0551] 经由LFA检测M13

[0552] 在证明M13可能经由ATPS在30min内浓缩之后,制备胶态金探针和LFA条。在金探针的表面上修饰的PEG提供空间稳定性并且防止金探针在提取的富盐相的环境中聚集。图43A-图43F示出具有不经历预浓缩步骤的样品的LFA的结果。沿着对数刻度在相等间隔的点处选择M13浓度。含有多克隆抗IgG抗体的对照线或上部条条的存在指示有效测试,因为其确认了所述样品已经流动通过整个条。含有针对M13 的外壳蛋白pVIII的抗体的测试线或下部条条的存在指示M13的存在。如图43A所示的阴性对照不含M13,并且不存在预期的可见测试线。在剩余的图中,测试线的强度关于图43B中所示的最高M13浓度为最大的,并且线强度随降低的M13浓度而降低。测试线在 $3.2 \times 10^8$  pfu/mL下不再可见(图43E),指示大约 $1 \times 10^9$  pfu/mL的检测极限(图43D)。

[0553] 在LFA之前浓缩M13

[0554] 使用在 $1 \times 10^9$  pfu/mL下产生的检测极限,通过利用ATPS研究所述检测极限的可能改进。使用9:1体积比率溶液,基于等式(12)预测所述溶液产生大约10倍浓缩因数。在37°C下孵育30min之后,提取底相,并且准备样品用于LFA。图44A-图44F示出使用预浓缩步骤的LFA的结果。另外,关于不含M13的阴性对照不存在测试线(图44A)。在剩余的图中,初始M13浓度比图6A-6D中所示的那些小10倍,但LFA测试线强度匹配不具有预浓缩步骤的样品的那些。测试线强度随降低的M13浓度而降低,直至其在 $3.2 \times 10^7$  pfu/mL下不再可见,指示大约 $1 \times 10^8$  pfu/mL的检测极限(图44D)。这指示当应用ATPS浓缩步骤时检测极限的10倍改进。

[0555] 为了由LFA条的直观解释确认所述结论,将LFA图像转化为灰度级并且使用我们的定制MATLAB脚本针对背景检查测试线强度。使用和不使用ATPS浓缩步骤的情况下的结果显示于图45中。注意两条曲线针对大约相同测试线信号由初始M13浓度的10倍差异分开,进一步确认了我们的10倍浓缩改进。

[0556] 实施例5.用PEG-盐ATPS的界面提取检测生物血清中的转铁蛋白

[0557] 通过驱动靶标生物分子朝向两个体相之间的界面来优化使用单一ATPS步骤对生物分子进行的浓缩。由于界面区域表示与体积比率无关可形成的极小体积区域,这种新颖方法允许浓缩靶标而不依赖于极端体积比率(比1大得多或小得多的体积比率),所述极端体积比率具有长的相分离时间。反而,选择可最快地到达平衡的体积比率,并且这使提取时间在磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)中减少至10min内,这是相对于先前方法的显著改进。这种方法正在接近可在单一ATPS步骤中实现的最大倍数浓缩,因为界面的体积比两个宏观体相小得多,并且因此,所述生物分子可极端得多地浓缩。最后但并非最不重要的,增加样品体积会合意地增加可在界面处浓缩并且接着用LFA检测的靶标生物分子的总数。虽然对于使用极端体积比率浓缩体相中的靶标分子也是如此,但增加样品体积还增加相分离时间。在所提出的界面提取方法中,极端体积比率不再为必需的。图46以图片方式比较了界面提取与两个体相之一的提取。

[0558] 为了驱动靶标生物分子朝向所述界面,利用涉及GNP的捕捉机制。使用在粒子表面上修饰的特异性抗体,所述GNP首先捕捉样品中的靶标蛋白。优化所述GNP的表面化学,使得所述粒子将在相分离时分配至界面。由GNP捕捉的蛋白质接着在界面处进行提取。由于所述界面的体积极小,所述蛋白质高度浓缩并且随后应用于LFA 检测条。这一实施例提供了所制备的能够分配至PEG-盐ATPS的界面处的GNP的概述。接着研究最快地进行相分离并且还

允许GNP的最大程度回收的体积比率。随后,使用模型蛋白转铁蛋白(Tf),证明与ATPS界面提取步骤组合的LFA针对Tf的100倍改进。接着延伸所述研究以接近现实世界中的应用,并且针对血液取样所偏好的牛血清白蛋白(FBS)和合成尿液以及较小体积再优化所述系统。数据显示即使在更复杂系统中,ATPS界面提取也可在15-25min内执行并且引起LFA针对Tf的检测极限的100倍改进。

[0559] 这一实施例提供了可局限于界面处并且还充当LFA的比色指示剂的纳米探针的开发。这种方法不同于使用官能化磁性或金粒子来浓缩并且收集靶标生物分子的先前研究的提取方法,其中这些方法需要不适合即时检验装置的设备。这种方法是使LFA的检测极限改进100倍的有效并且快速的方法,所述改进接近在基于实验室与基于纸的免疫分析之间的灵敏性差距。具有增强的灵敏性的改进LFA将在诊断学领域中具有显著影响,更接近提供目前无法获得的即时检验溶液。另一方面,虽然其证明了这种方法可能改进LFA检测的性能,但这种预浓缩程序也可应用于其它检测方法。

[0560] 放射性标记抗Tf抗体

[0561] 除非另外描述,否则所有试剂和材料均购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO)。使用碘-125 ( $^{125}\text{I}$ ) 来放射性标记山羊抗人Tf多克隆抗体(目录号A80-128A, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)的酪氨酸残基。简单地说,通过IODO-BEADS(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)活化 $\text{Na}^{125}\text{I}$ (MP Biomedicals, Irvine, CA)。随后,所述活化的 $^{125}\text{I}$ 与山羊抗Tf抗体反应15min。纯化所述放射性标记的蛋白质,并且使用Sephadex G10尺寸排阻柱去除游离 $^{125}\text{I}$ 。使用磷钨酸分析来定量所述放射性标记的蛋白质的放射性和浓度。

[0562] 制备GNP

[0563] 制备裸金纳米粒子以产生具有约25-30nm直径的粒径的透明、樱桃色溶液。为了制备GNP,将320mg山羊抗Tf抗体与20mL胶态金溶液孵育30min,随后使用对于PEG:GNP为3000:1的摩尔比率和30min的额外孵育添加硫醇化PEG5000。为了防止其它蛋白质非特异性结合于所述胶态金的表面,将2mL 10%牛血清白蛋白(BSA)溶液添加至所述混合物中并且再混合10min。使所得溶液在孵育期间在振荡器上轻轻地混合。为了去除游离(未结合)抗体、PEG和BSA,将所述混合物随后在4°C和9,000g下离心30min。GNP的沉淀用1%BSA溶液洗涤两次。最后,将所回收的GNP再悬浮于在pH 9.0下的2mL 0.1M硼酸钠缓冲液中。

[0564] 分配GNP

[0565] 用放射性标记的抗Tf抗体修饰的GNP在不同条件下分配于所述ATPS中以确定可能产生最快并且最高GNP回收的体积比率。对于各分配实验,3种在杜氏磷酸盐缓冲生理盐水(PBS; Invitrogen, pH 7.4, 离子强度154mM)中的相同PEG-盐溶液被制备为5000 $\mu\text{L}$ 的总体积。使用具体浓度的PEG和磷酸钾制备具有三种不同体积比率(1:1、6:1和1:6)的PEG-盐ATPS溶液。随后,将10 $\mu\text{L}$ 用放射性标记的抗Tf抗体修饰的GNP添加至各ATPS溶液中。所述溶液在0°C下平衡以确保所述溶液为均质的。一旦获得在0°C下的平衡,所述溶液即在37°C下的水浴中孵育以诱导相分离,并且发现所述GNP分配于两个共存的相之间。在界面处的GNP使用移液管小心地抽出,并且抽出30 $\mu\text{L}$ 界面溶液以确保收集大多数(如果并非所有)在界面处的GNP。两个共存的相也分别使用移液管抽出。在界面处和在两个共存的相中的GNP的量通过使用Cobra Series Auto-Gamma计数器测量各区域中放射性的量来定量,因为所述

GNP结合于放射性标记的抗Tf抗体。在所述三个区域中的每一者中的GNP的定量的量是用于使用质量平衡计算在界面处GNP的回收百分率。

#### [0566] 制备LFA测试条

[0567] 在这一研究中实施利用竞争机制的LFA测试(图47)。在所述竞争分析中,将所关注的靶标固定于硝基纤维素膜上以形成测试线。所述GNP上固定的针对一抗的二抗构成对照线。当执行LFA时,样品首先与所述GNP接触,并且如果靶标分子存在于所述样品中,那么其将结合于在所述GNP上修饰的其特异性抗体。如果存在于所述样品中的靶标分子使所述GNP上的抗体饱和,那么这些GNP不再可结合于测试条上固定的靶标分子。结果,所述GNP不在测试线处形成可见条条,并且这指示阳性结果。另一方面,如果样品不含可使GNP上的抗体饱和的浓度的靶标分子,那么所述GNP上的这些抗体可结合于测试条上固定的靶标分子并且在测试线处形成可见条条。这指示阴性结果。此外,与样品中靶标分子的存在无关,所述GNP上的抗体将结合于对照线上固定的二抗,指示充足样品已经被芯吸通过测试线并且到达对照线。可见对照线的存在指示有效测试。

#### [0568] 执行使用Tf但不使用预浓缩的LFA

[0569] 在PBS中制备含有变化浓度的Tf的Tf储备溶液。随后,20 $\mu$ L各Tf储备溶液添加至10 $\mu$ L所述GNP悬浮液和20 $\mu$ L测试缓冲液(0.2%BSA、0.3%Tween20、0.2%叠氮化钠、0.1%PEG、0.1M Trizma缓冲液,pH 8)中,所述测试缓冲液用于辅助样品流动通过所述测试条。制备总计5种具有多种浓度的Tf(0(阴性对照)、0.001、0.01、0.1和1ng/ $\mu$ L)的样品溶液(各50 $\mu$ L)。测试条垂直地浸渍于各样品溶液中,其中样品垫将与所述溶液接触。10min之后,所述测试条被取出,并且由Canon EOS 1000D 照相机(Canon U.S.A., Inc., Lake Success, NY)立即拍摄所述测试条的图像。

[0570] 在FBS(HyClone, 优级,pH 7.4)中所执行的实验中,使用进一步浓缩的GNP悬浮液,使得GNP的体积可能针对较低体积实验适当地按比例减少。通过添加5 $\mu$ L Tf 储备溶液至5 $\mu$ L GNP悬浮液中,随后添加40 $\mu$ L测试缓冲液来调节所述FBS储备溶液中Tf的浓度以实现用于PBS实验中的相同最终Tf浓度。同样,使用合成尿液进行实验。

#### [0571] 针对Tf组合ATPS界面提取与LFA

[0572] 基于来自分配GNP实验的发现,1:1的体积比率用于在PBS中进行的研究。通过利用抗Tf抗体,所述GNP首先捕捉样品中的Tf,随后在界面处浓缩完整Tf-GNP 复合物。使用与分配GNP部分中所述的方案相似的方案,除了多种浓度的Tf也被加标至ATPS溶液中。简单地说,将10 $\mu$ L GNP悬浮液添加至产生1:1体积比率并且含有多种Tf浓度(0(阴性对照)、0.001、0.01和0.1ng/ $\mu$ L)的490 $\mu$ L Tf加标的ATPS 溶液中。所述溶液在0 $^{\circ}$ C下平衡以确保所述溶液为均质的。一旦获得平衡,所述溶液即放置于37 $^{\circ}$ C下的水浴中以引起相分离。10min之后,抽出30 $\mu$ L界面溶液,其含有浓缩GNP和Tf。这种界面溶液与20 $\mu$ L测试缓冲液混合以形成50 $\mu$ L样品溶液。LFA测试条垂直地浸渍于各样品溶液中,其中样品垫将与所述溶液接触。10min之后,所述测试条被取出,并且由Canon EOS 1000D照相机立即拍摄各条的图像。

[0573] 对于在FBS和合成尿液中进行的研究,需要首先调节PEG和磷酸钾浓度以实现 1:1 体积比率。FBS中的ATPS也更缓慢地进行相分离,并且替代用于PBS系统中的 10min孵育,所述溶液被保持于37 $^{\circ}$ C水浴中持续25min。另外,如早先所提及,体积减少。因此,并非使用5000 $\mu$ L(用于仅LFA的实验中的50 $\mu$ L Tf储备溶液的100 倍的体积)显示检测极限增加,在

FBS和合成尿液中执行的研究使用1000 $\mu$ L(用于仅 LFA的实验中的10 $\mu$ L Tf储备溶液的100倍的体积)显示相等改进。先前关于PBS所述的方案针对较低体积进行修改,使得5 $\mu$ L进一步浓缩的金悬浮液添加至995 $\mu$ L在 FBS或合成尿液中的Tf加标的ATPS溶液中。提取20 $\mu$ L界面区域,随后添加30 $\mu$ L 金缓冲液。将各LFA条浸渍于所述悬浮液中持续15min,接着被取出并且成像。

[0574] 为了组合ATPS界面提取与基于纸的LFA检测分析,在这一实施例中开发的GNP 具有三种功能。首先,在GNP的表面上修饰的特异性抗体捕捉存在于样品中的靶标蛋白。其次,PEG和蛋白质在GNP的表面上优化的配制使所述GNP分配至界面而非体相。最后,所述GNP直接用作LFA的比色指示剂,并且因此允许后续检测分析立即执行而无额外洗涤或其它制备步骤。所述GNP的示意图显示于图48A中。所述GNP具有3种组要组分:PEG聚合物、金纳米粒子和抗Tf抗体。各组分本身将驱动所述纳米粒子进入两个体相之一中。首先,修饰的PEG由于在粒子表面上的所述聚合物与顶相中的丰富聚合物之间的有利的PEG-PEG相互作用而驱动所述纳米粒子进入顶部富PEG相中(图48B)。具体说来,增加PEG:GNP的摩尔比率会改变所结合的PEG的构象以更密切地类似“刷”构象,从而扩展所暴露的表面积的量以增加 PEG-PEG相互作用。另一方面,金纳米粒子的大尺寸使所述纳米粒子分配于底部PEG 贫乏相中,其中其经历较少的与PEG聚合物的排斥性、排除体积相互作用。所述GNP 上的亲水性蛋白(抗Tf Ab和BSA)增加所述GNP的亲水性,并且还使其分配于底部 PEG贫乏相中,所述底部PEG贫乏相比顶部富PEG相更具亲水性。然而,由于底部 PEG贫乏相也富盐,所述纳米粒子在所述纳米粒子的表面上不存在足够PEG时聚集以提供充足空间稳定性(图48C)。组合起来,所述GNP的3种组分可改变并且微妙地平衡以最终驱动所述GNP至所述ATPS中的界面处(图48D)。

[0575] 在竞争LFA中,样品中靶标蛋白的成功检测依赖于所述GNP上由所述靶标实现饱和的抗体。如果所述抗体不饱和,那么所述GNP可结合于LFA上固定的靶标以形成测试线,指示假阴性结果。一种检测具有低浓度的所述靶标的样品的方式是增加样品体积。其将增加靶标分子的总数,而这又将针对给定的固定量的GNP潜在地导致所述抗体的饱和。然而,仅小体积可流动通过LFA测试条,并且由于所述GNP在这种方法中进行稀释,如果无足够GNP流动通过测试条,那么对照线将不可见,指示无效结果。由于ATPS界面提取的使用会提供使得用靶标蛋白实现饱和的GNP聚集在小体积中的快速并且有效的方式,这种方法可通过允许分析大得多的样品体积来实现低浓度的靶标蛋白的检测。

[0576] 测试三种体积比率以确定可能在最短的孵育时期内回收大多数GNP的最佳体积比率。结果显示于表4中。

[0577] 表4. 针对不同体积比率的GNP回收

	体积比率 (顶相:底相)	相分离时间	GNP 回收 (5000 $\mu$ L)
[0578]	1:1	10 min	84.1 $\pm$ 1.8%
	6:1	60 min	64.8 $\pm$ 1.8%
	1:6	30 min	70.9 $\pm$ 6.6%

[0579] 1:1体积比率最快地进行相分离并且允许GNP的最大程度回收。当通过增加温度来引起相分离时,形成微观富PEG和PEG贫乏结构域,并且相似的结构域将发现彼此并且聚结。

当所述结构域聚结时,其行进并且最终由于两个相之间的界面张力和密度差异而在顶部形成宏观富PEG、盐贫乏相并且在底部形成宏观PEG贫乏、富盐相。1:1体积比率快于6:1或1:6体积比率进行相分离,因为当存在大量的各相时,所述结构域具有更短时间来发现彼此并且聚结。关于更加不均匀的体积比率,较小体积的相的结构域可由于所述结构域经历困难聚结而被夹带于较大的连续相中。此外,6:1体积比率比1:6体积比率更缓慢地进行相分离,因为富PEG相为针对6:1体积比率的连续相,并且PEG贫乏结构域在更具粘性的富PEG连续相中经历更多困难来发现彼此并且移动至其相应宏观相。

[0580] 表5:针对不同体积比率的GNP回收

[0581]	体积比率 (顶相:底相)	相分离时间	GNP 回收 (5000 $\mu$ L)
	1:1	10 min	84.1 $\pm$ 1.8%
[0582]	6:1	60 min	64.8 $\pm$ 1.8%
	1:6	30 min	70.9 $\pm$ 6.6%

[0583] 由于所述GNP不分配于任一结构域中,当所述结构域聚结时其保留于所述结构域之间。最终,当相分离完成时,所述GNP作为薄红色膜出现于界面处。当使用1:1 体积比率时,GNP的回收是有效的,因为夹带在这一体积比率下降至最低并且因此较少GNP将在存在于夹带的结构域与连续相之间的界面处损失。由于1:1体积比率最快地进行相分离,同时产生最高程度GNP回收,其被用于后续实验中。

[0584] 为了证明通过并入ATPS界面提取步骤增强LFA,利用模型蛋白转铁蛋白(Tf)。Tf为用于铁转运的血清蛋白。为了产生LFA中Tf的检测极限,执行使用多种Tf浓度但不使用任何先前浓缩步骤的一系列LFA测试。如果样品含有足够Tf分子来使在 GNP上修饰的抗Tf抗体饱和,那么这些抗Tf抗体不在测试线处结合于硝基纤维素膜上固定的Tf并且因此不在测试线处形成可见条条。这指示阳性结果,所述结果在测试具有1ng/ $\mu$ L的Tf浓度的样品时观察到(图49,顶部图)。另一方面,如果不充足或无Tf存在于样品中使抗Tf抗体饱和,那么这些抗Tf抗体确实成功地结合于硝基纤维素膜上固定的Tf并且因此在测试线处形成可见条条。这指示阴性结果,所述结果在测试具有小于1ng/ $\mu$ L的Tf浓度的样品时观察到。由于1ng/ $\mu$ L是显示真实阳性结果的最低Tf浓度,这指示当执行不使用先前浓缩步骤的LFA时针对Tf的大约1 ng/ $\mu$ L的检测极限。

[0585] 为了确定ATPS界面提取步骤是否可能使用LFA使Tf的检测极限改进100倍,将相同量的所述GNP应用于具有比LFA的检测极限低100倍的Tf浓度(0.01ng/ $\mu$ L) 的ATPS溶液。样品体积从50 $\mu$ L增加100倍至5000 $\mu$ L以使Tf分子的总数保持相同。由于仅有限量的样品(50 $\mu$ L)可能应用于LFA测试条,在这种较大样品溶液中稀释的GNP需要浓缩并且应用于LFA。为了回收用所述靶标蛋白实现饱和的这些GNP,将所述溶液放置于37 $^{\circ}$ C下的水浴中并在10min内收集界面处的GNP。所述GNP接着进行提取并且直接应用于LFA测试条。这一研究的结果展示于图49的底部图中。以0.01ng/ $\mu$ L获得真实阳性结果,其显示检测极限的100倍改进。当比较具有相同 Tf浓度的样品时,使用这种方法在0.001ng/ $\mu$ L下的假阴性结果的测试线强度轻于不使用先前浓缩步骤的那些,指示捕捉更多Tf以使GNP难以结合于测试线。测试线强度也在Tf浓度降低时增加,当可用于使所述抗体饱和的Tf的量减少时预期这种情况。

[0586] 为了研究ATPS界面浓缩的有效性,测试用FBS制得的较低体积ATPS溶液以模拟抽

取自患者的小样品血液。归因于FBS的更复杂组成,针对所述FBS系统再优化所述在PBS中与ATPS一起使用的程序。FBS的较高蛋白质含量改变ATPS的体积比率,从而需要不同浓度的PEG和盐来形成1:1体积比率。由于在FBS中执行的实验也利用较小样品体积,GNP的体积必须按比例减少,并且制得进一步浓缩的GNP 储备液。另外,针对ATPS的孵育时间从10min延长至25min,因为所述FBS减慢相分离过程。另外,归因于包含FBS的复杂混合物,用于LFA测试的时间从10min 延长至15min。尽管血清代表更复杂基质,图50示出与ATPS界面提取组合的LFA 与不使用先前浓缩的LFA相比仍产生检测极限的100倍改进。使用10 $\mu$ L用于LFA 的样品,并且1000 $\mu$ L用于LFA的样品与ATPS界面提取组合。对于合成尿液系统执行相似优化方法,最终证明了类似的检测极限的100倍改进,如图51中所呈现。

[0587] 实施例6. 使用Triton-X-114ATPS和3-D LFA检测疟疾生物标记物

[0588] 将Triton X-114ATPS应用于3-D纸结构以确定所述纸设置是否也可能增强这种胶束系统的分离过程。所述Triton X-114胶束系统比所述PEG-磷酸盐ATPS缓慢得多地进行相分离,导致相分离时间从至少8h至约3min的甚至更大程度减少,从而将这种相分离现象在纸中的可应用性延伸至胶束ATPS。所述基于纸的设计接着与 LFA整合以形成一体化基于纸的诊断条,所述诊断条同时浓缩并且检测疾病生物标记物而无需用户干预。为了证明这一点,使用所述诊断条在磷酸盐缓冲生理盐水(PBS) 和未稀释胎牛血清(FBS)的溶液中检测疟疾生物标记物恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*) 乳酸脱氢酶(pLDH)。所述稳健的、单步自动化诊断条在20min内浓缩并且检测pLDH,证明当与传统LFA设置相比时pLDH检测极限的10倍改进。这种平台技术克服了上述限制并且可用于在资源贫乏设定中针对疟疾和其它疾病转变诊断分析的当前状态。材料和

[0589] 制备金纳米探针(抗pLDH GNP)

[0590] 制备具有24nm的平均流体动力学直径的金纳米粒子的溶液,其呈现为深樱桃色溶液。所述金纳米粒子的尺寸通过动态光散射测量用Zetasizer Nano SZ粒子分析仪(Malvern Instruments Inc,Westborough,Massachusetts)获得。

[0591] 在形成所述纳米粒子之后,1mL金纳米粒子溶液的pH首先使用1.5N NaOH调节至pH 9。随后,将16 $\mu$ L在0.5mg/mL的浓度下的小鼠单克隆抗恶性疟原虫/间日疟原虫LDH抗体(BBI Solutions,Cardiff,UK)添加至胶态金溶液中并且在振荡器上混合30min。为了防止其它蛋白非特异性结合于所述胶态金纳米粒子的表面,将200 $\mu$ L 10%w/v牛血清白蛋白(BSA)溶液添加至所述混合物中并且在振荡器上混合20min。为了去除游离、未结合抗体,所述混合物接着在4 $^{\circ}$ C和12,000rpm下离心30min,随后使胶态金纳米粒子的沉淀再悬浮于200 $\mu$ L 1%w/v BSA溶液中。所述离心和再悬浮步骤再重复两次,并且在第三次离心之后,使金纳米粒子的沉淀再悬浮于100 $\mu$ L在 pH 9.0下的0.1M硼酸钠缓冲液中。用抗pLDH抗体官能化的金纳米粒子将因此被称作抗pLDH金纳米探针(抗pLDH GNP)。未用抗体官能化的BSA涂布的金纳米粒子用于目测目的并且将因此被称作BSA-GN。

[0592] 制备和目测Triton X-114ATPS

[0593] Triton X-114ATPS的平衡体积比率(顶相的体积除以底相的体积)通过改变杜氏磷酸盐缓冲生理盐水(PBS;Invitrogen,Grand Island,NY,pH 7.4,含有1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、137.92mM NaCl、2.67mM KCl和0.49mM MgCl<sub>2</sub>)和FBS (Invitrogen,Grand Island,NY)的溶液中Triton X-114(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)的初始w/w浓度来发现。

使这些溶液进行相分离并且在温度控制水浴中在25°C下到达平衡。Triton X-114/PBS溶液中的BSA-GN展现有利分配至顶相,而Triton X-114/FBS溶液中的BSA-GN有利地分配至底相。从而,用于Triton X-114/PBS的1:9体积比率(即,顶相的体积除以底部的体积)和Triton X-114/FBS中的9:1体积比率的条件被发现并且用于进一步实验。这些体积比率允许纳米粒子的10倍浓缩。

[0594] 为了目测PBS中胶束ATPS的两个相,将100 $\mu$ L BSA-GN和4 $\mu$ L亮蓝FCF染料(The Kroger Co., Cincinnati, OH)添加至2.5g含有先前针对PBS中的1:9体积比率确定的Triton X-114浓度的溶液中。使这些溶液通过涡旋充分混合并且在25°C下孵育。每小时拍摄所述溶液的图像直至在8h时到达平衡。当所述溶液失去其浑浊外观时建立平衡,所有可见结构域均移动至其相应相,并且所测量的界面高度保持稳定。樱桃色BSA-GN和蓝色染料分别为胶束贫乏相和富胶束相的比色指示剂。使用Canon EOS 1000D照相机(Canon U.S.A., Inc., Lake Success, NY)在控制光照环境中捕捉所有图像。

[0595] 为了目测PBS中的胶束ATPS在3-D纸芯内的相分离,将200mg含有2 $\mu$ L亮蓝FCF染料和10 $\mu$ L BSA-GN的混合、均质溶液涡旋并且随后放置于25°C下的水浴中。所述3-D纸芯通过在玻璃纤维的5 $\times$ 40mm条的一个边缘上堆叠三张5 $\times$ 15mm玻璃纤维纸片而形成。在所制备的溶液在25°C下孵育5min之后,将所述3-D纸芯垂直地放置于所述溶液中,从而使所述纸堆叠吸收所述溶液。在0、30、60和180sec时捕捉纸条的图像。

[0596] 仅用LFA检测pLDH

[0597] 组装利用竞争分析形式的LFA测试条。固定的恶性疟原虫L-乳酸脱氢酶(pLDH; MyBioSource, San Diego, CA, USA)构成测试线并且对抗pLDH一抗具特异性的固定的山羊抗小鼠IgG二抗(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)构成对照线。如果足够pLDH存在以使样品中的GNP饱和,那么移动通过LFA条的pLDH-GNP复合物将不结合于测试线上固定的pLDH,导致在测试线处不存在可见条条。如果pLDH不存在,那么所述GNP上未被占据的抗体将结合固定的pLDH,并且有色条条将在测试线区域处形成。与pLDH的存在无关,所述GNP上的抗体将结合固定于对照线处的二抗并且形成可见线,指示样品成功流动通过所述条。因此,阴性结果由两个有色条条(一个测试线和一个对照线)鉴别,而阳性结果由对照线处仅一个有色条条鉴别。

[0598] 为了仅用LFA验证pLDH的检测极限,将抗pLDH GNP添加至样品溶液中并且被允许结合存在于所述样品中的pLDH以形成pLDH-GNP复合物。使由10 $\mu$ L抗pLDH GNP和10 $\mu$ L在PBS或FBS中的已知浓度的pLDH组成的20 $\mu$ L样品溶液与30 $\mu$ L电泳缓冲液(0.2%BSA、0.3%聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(Tween 20)、0.1M缓冲液,pH 8)在试管中混合。将所述LFA测试条垂直地插入至所述样品溶液中,所述样品溶液经由毛细管作用向上芯吸通过所述条朝向吸收垫。20min后在控制光照环境中拍摄来自PBS和FBS样品的测试条的图像。

[0599] 用基于3-D纸的LFA和ATPS检测pLDH

[0600] 所述LFA测试条的设计通过添加3-D纸芯略微进行修改。具体说来,连接至硝基纤维素膜的纤维素样品垫用5 $\times$ 20mm玻璃纤维垫替换。在这一玻璃纤维垫的顶部,堆叠另外三个5 $\times$ 15mm玻璃纤维片的条以形成总计四层的玻璃纤维纸。将所述玻璃纤维层用Scotch胶粘带(3M, St. Paul, MN, USA)紧密地缠绕。

[0601] 关于PBS样品中pLDH的检测,将含有10 $\mu$ L抗pLDH GNP和已知浓度的pLDH的200 $\mu$ L

充分混合的1:9体积比率ATPS添加至试管中。使所述溶液在25℃下孵育 5min以确保所述溶液变得浑浊,指示相分离的开始,并且允许GNP捕捉溶液中的pLDH。接着将所述3-D芯修改的LFA条放置于混合ATPS中,并且使所述流体通过所述3-D芯朝向吸收垫。20min之后捕捉所得检测区的图像。

[0602] FBS样品中pLDH的检测遵循极相似的方案,除了替代地制备200 $\mu$ L混合9:1 体积比率ATPS。包括孵育时间和所述线显现的时间在内的测试条件与针对PBS样品的那些一致。也在20min之后捕捉检测区的图像。

[0603] 试管中的Triton X-114ATPS相分离

[0604] 在超过某一温度的PBS溶液中,所述Triton X-114胶束ATPS形成顶部胶束贫乏相和底部富胶束相。存在于溶液中的分子基于其物理和化学特征(如疏水性和尺寸)分配于两个相之间。亲水性BSA-GN极端地分配于胶束贫乏相中,在很大程度上由所述纳米粒子与在富胶束相中的更大并且更丰富胶束之间的排斥性、空间、排除体积相互作用驱动。用特异性抗体官能化的纳米粒子可与靶标分子形成复合物,并且这些复合物也将极端地分配至胶束贫乏相。由于其表面等离子体共振而呈现樱桃色的非官能化BSA-GN用于在相分离后目测所得胶束贫乏相。相比之下,亮蓝FCF染料为小并且疏水性的,并且因此其极端地分配至富胶束相。当添加至混合ATPS溶液中时,所述蓝色染料用于在相分离后目测所得富胶束相。

[0605] 实现相分离所需的时间在不同两性系统之间改变。例如,虽然PEG-磷酸盐ATPS 相对于大多数两性系统快速地进行相分离,但Triton X-114胶束ATPS由于两相之间的小密度差异和界面张力而需要显著更长的时间量来实现宏观相分离平衡。所述相分离时间也在更极端的体积比率(如1:9或9:1)下增加,因为一个相成比例地变得小得多,并且所述相的微观结构域经历困难聚结。在25℃下在具体时间点拍摄PBS中1:9体积比率ATPS的图像;直至大约8h后才实现完全宏观相分离平衡(图53A)。所得胶束贫乏相体积经过测量为总溶液体积的十分之一,验证了1:9体积比率。

[0606] 使用纸膜增强Triton X-114ATPS相分离

[0607] 假设多个纸层是增强纸中的相分离的必要因素。因此,由多层薄、紧密结合纸条组成的“3-D纸芯”被设计成增加Triton X-114ATPS的相分离过程。当所述3-D芯竖立放置于PBS中的混合ATPS溶液中时,所述溶液沿所述条垂直向上流动。几乎在添加所述条之后即刻,含有GNP的胶束贫乏相快速地在含有所述蓝色染料的较慢移动的富胶束相前面流动(图53B)。注意在大约30秒后已经在所述条的3-D芯部分内观察到分离,其中在所述流体已经离开所述芯之后180秒(3min)时可见更完全分离。

[0608] 这些实验指示所述芯的额外层提供垂直于流动方向的增加的横断面面积以辅助微观相结构域的聚结并且允许更大体积在给定时间内芯吸通过所述纸。此外,预期较小粘性的胶束贫乏结构域在多孔纸中更快地前进并且聚结,而预期富胶束结构域由于其较大粘性和与所述纸材料的潜在有利相互作用而被阻止并且更缓慢地移动。结果,两相的宏观分离(显示为在约数小时内在试管中出现)在所述纸膜中在仅仅几分钟内被目睹。所述3-D纸芯的额外益处是较大体积的ATPS溶液的处理。一般说来,所述 3D芯中层的数目增加以适应较大体积的溶液。优化的因素包括条长度、宽度和条的数目。所述设计能够在所述芯的长度内实现完全相分离,并且使分离的胶束贫乏相前进以便离开所述芯所需的距离减至最低。这些基于纸的结构可潜在地用于增强需要甚至更长时间来分离的多种其它两相系统。

[0609] 增强FBS中的Triton X-114ATPS相分离

[0610] 与PBS溶液形成对比,在FBS样品中形成的Triton X-114ATPS替代地产生顶部富胶束相和底部胶束贫乏相。这可能是归因于由FBS中发现的额外蛋白质和盐引起的密度差异。由于所述GNP反而极端地分配至底相,接着有必要调整初始Triton X-114浓度以产生具有总体积的十分之一的浓缩底相或换句话说9:1体积比率。

[0611] 由于两相的定向在血清中反转,研究反转的定向以确定相分离在所述3-D纸芯中的效应。实际上,当将所述3-D芯放置于FBS中的混合ATPS中时,观察到极类似于PBS实验的那些的结果。因此,尽管所述密度差异驱动FBS中的胶束贫乏相至试管中的底部,但所述胶束贫乏相仍保持为沿3-D芯向上流动的较快的相。不管由试管中的相对相密度指示的相定向,所述胶束贫乏相因此为前沿。因此,更具粘性的富胶束相始终较慢地移动并且由多孔膜阻止,指示在被引入纸的胶束ATPS的流动行为中粘度效应支配任何密度效应。

[0612] 改进PBS中pLDH的基于LFA的检测

[0613] 由于含有浓缩GNP的胶束贫乏相在离开所述3-D纸芯时在前沿流动,所述芯被附着在LFA纸条的基于硝基纤维素的检测区的上游。此举使得能够从浓缩步骤无缝转变为检测步骤并且消除了对注射器提取的需要。针对整合的基于纸的诊断条的设计显示于图54A中。由多层玻璃纤维纸条组成的3-D芯(浓缩区)被连接至具有固定的对照和测试线的硝基纤维素膜(检测区),所述硝基纤维素膜接着连接至用作驱动流体流的接收器的吸收垫。所有组件均紧固于粘合背衬,并且所述3-D芯垂直地浸渍于浑浊ATPS溶液中。

[0614] 在pLDH检测测试中,不再使用亮蓝FCF染料,并且官能化抗pLDH GNP替代所述BSA-GN使用。所述抗pLDH GNP展现与所述BSA-GN极类似的分配行为,但将能够捕捉pLDH并且充当LFA中的比色指示剂。

[0615] 首先,使用20 $\mu$ L总样品体积鉴别出针对不并入所述ATPS和3-D纸芯的仅LFA 对照的检测极限。由于仅LFA对照能够在10 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ 下成功地检测pLDH,但无法在1 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ 下成功地检测pLDH,其检测极限被确定为10 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ 。为了通过检测较低浓度的pLDH来显示检测极限的改进,通过增加含有较低浓度的pLDH的溶液的总容积使仅LFA对照中所用的相同数目的GNP暴露于相同数目的pLDH分子。尽管体积增加将通常稀释GNP并且引起在给定的时间段内进入检测区的GNP的量的减少,预期所述ATPS和3-D芯的添加使所述GNP在前沿处浓缩成小体积。有效地,使所述 GNP暴露于相同量的在较低浓度下的pLDH,但接着浓缩成与由仅LFA对照处理的体积相似的体积。当使用预期使所述GNP浓缩10倍的1:9ATPS时,总样品体积增加10倍(至200 $\mu$ L)以确保当与仅LFA对照相比时相同量的GNP进入检测区中。

[0616] 图54B证明了在溶液中不含pLDH的阴性对照测试中使用经修改的LFA装置。当使经修改的LFA条浸渍于含有PBS中的抗pLDH GNP的ATPS溶液中时,所述 GNP快速地在3-D芯区段中浓缩至所述溶液的前沿,如通过在60-sec标记处的较深红色所示。所述溶液在不使用额外电泳缓冲液的情况下容易地流经硝基纤维素膜。所述GNP快速地到达检测区,而大量溶液保留于纸芯中。可见条条在20min内在对照和测试线区域中均出现,指示有效阴性测试。

[0617] 一旦有效阴性测试得到验证,即改变pLDH浓度以确定在1:9体积比率溶液中整合装置的检测极限。这些实验的结果证明了虽然常规LFA检测在10 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ 的浓度下的pLDH(产生真实阳性结果),但整合Triton X-114ATPS和LFA的诊断条能够检测在1.0 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ 下的pLDH,其为检测极限的10倍改进(图55)。

[0618] 改进FBS中pLDH的基于LFA的检测

[0619] 在FBS样品中使用经修改的操作条件重复这些实验以产生9:1体积比率。再一次,所述基于3-D纸的诊断装置通过成功地检测FBS中在1.0ng/ $\mu$ L下的pLDH证明了10倍检测极限改进,而仅LFA对照成功地检测了FBS中在10ng/ $\mu$ L下的pLDH,但无法检测在1.0ng/ $\mu$ L下的pLDH(图56)。在FBS样品中利用整合的基于纸的装置的实验证明了较慢的流体流动通过基于硝基纤维素的检测区。这可能归因于Triton X-114的较大初始浓度和增加所述样品的总体粘度的其它血清组分的存在。尽管对照和测试线信号在20min内完全显现(图56),但整个胶束贫乏相仅在给出额外10min的情况下流过检测区,导致背景噪声的减少(图81)。如同PBS中的以上测试的情况一样,FBS中的所有测试均不需要缓冲液中的任何先前稀释、提取步骤或辅助流动的电泳缓冲液添加。

[0620] 通过证明血清中疟疾pLDH的LFA检测的改进,所述装置可能用于改进疟疾快速诊断测试(RDT)的当前状态。尽管疟疾RDT的产量和使用增加,其在大多数情况下需要连同额外方法(如血膜显微镜检查)使用以验证结果。有限的灵敏性和容易使用性的变化是防止所述LFA在偏僻的受疟疾影响的设定中被用作可靠独立分析的两个因素。所述整合的基于纸的装置具有解决这两个问题的潜力。所述装置的整合的浓缩组件允许灵敏性的显著改进。另外,由于这些RDT中的多种需要在样品缓冲液中的稀释或使用电泳缓冲液来辅助流体流动,这种诊断装置通过消除这些步骤证明了用户友好性的改进。

[0621] 实施例7.比较LFA纸

[0622] 粘度可在确定哪个相将出现于前沿中时起作用。

[0623] 在ATPS组件与纸材料之间的相互作用(疏水性、排除体积、静电)可在确定哪个相将出现于前沿中时起作用(在玻璃纤维上,富PPG相在PPG/盐ATPS中领先,而富PEG相在PEG/盐ATPS中滞后;PPG比PEG更具疏水性)。

[0624] 研究纸上的不同ATPS以解决纸如何增强相分离过程。首先确定是否在纸中观察到相分离。假如这样的话,注意哪个相出现在前沿中。由于前沿将对应于在LFA中到达测试线的相,期望的是使这个相含有浓缩的靶标分子和纳米探针。

[0625] 表6. ATPS系统和LFA纸类型的组合

ATPS	纸类型	观察结果	图像
PEG (MW:8000)/ 磷酸钾	玻璃纤维	相分离: 富盐相领先, 富PEG相落在后面	参看图 31A- 图 31B
PEG (MW:8000)/ 磷酸钾	纤维素	相分离: 富PEG相领先, 富盐相落在后面	
Triton X114	玻璃纤维	相分离: 胶束贫乏相领先, 富胶束相落在后面	参看图 53A、 53B、54A、54B、 55、56
Triton X114	纤维素	纸中无相分离	

[0626]

	PEG (MW:20000)/ 磷酸钾	玻 璃 纤 维	纸中无相分离	
	PEG (MW:4600)/ 磷酸钾	玻 璃 纤 维	相分离：富盐相领先，富 PEG 相落在后面	<b>参看图 57A</b>
	PPG (MW: 425)/ 磷酸钾	玻 璃 纤 维	相分离：富 PPG 相领先 ，富盐相落在后面	<b>参看图 57B</b>
	PPG (MW: 425)/ 磷酸钾	纤维素	相分离：富 PPG 相领先 ，富盐相落在后面	
	PEG (MW:20000)/ 葡聚糖(MW: 35000)	玻 璃 纤 维	纸中无相分离	
	PEG (MW:20000)/ 葡聚糖(MW: 35000)	纤维素	纸中无相分离	
	PEG (MW:8000)/ 葡聚糖(MW: 9000)	玻 璃 纤 维	相分离：富 PEG 相领先 ，富葡聚糖相落在后面	
[0627]	PEG (MW:8000)/ 葡聚糖(MW: 9000)	纤维素	相分离：富 PEG 相领先 ，富葡聚糖相落在后面	<b>参看图 57C</b>
	PEG (MW:4600)/ 葡聚糖(MW: 6000)	玻 璃 纤 维	纸中无相分离	
	PEG (MW:4600)/ 葡聚糖(MW: 6000)	纤维素	纸中无相分离	
	PEG (MW:8000)/ 葡聚糖(MW: 6000)	玻 璃 纤 维	纸中无相分离	
	PEG (MW:8000)/ 葡聚糖(MW: 200000)	玻 璃 纤 维	纸中无相分离	
	PEG (MW:4600)/ 葡聚糖(MW: 200000)	玻 璃 纤 维	纸中无相分离	
	PEG (MW:4600)/ 葡聚糖(MW: 35000)	玻 璃 纤 维	相分离：富 PEG 相领先 ，富葡聚糖相落在后面	<b>参看图 57D</b>

[0628] 纸中的相分离随不同ATPS改变(例如,PEG/盐对PPG/盐)。

[0629] 不同纸材料改变相分离行为(例如,玻璃纤维对纤维素中的PEG/盐)。

[0630] 在一些情况下,更具粘性的相落在后面(例如,关于玻璃纤维材料,更具粘性的富PEG相针对PEG/盐系统滞后,而更具粘性的富葡聚糖相针对PEG/葡聚糖系统滞后。)然而,情况并非一向如此。

[0631] 在这一实施例中,改变ATPS中聚合物的浓度看来不改变哪个相领先的顺序。

[0632] 在这一实施例中,重力看来不改变纸上的相流动的顺序(例如,当PEG/盐ATPS 在管中进行相分离时,富盐相是其中的底相,但所述富盐相将在玻璃纤维上领先,与纸垂直地或水平地定向无关)。

[0633] 为了研究纸如何促进并且增强ATPS的相分离,将相同类型的ATPS (PEG/盐)应用于不同类型的纸。观察到不同结果。

[0634] 观察结果

[0635] 观察到将充分混合的ATPS应用于变化类型的纸不会产生相似结果。反而,相分离的速度极大地改变,相分离的延伸也是如此。更令人吃惊的是,某些纸类型可能转换哪个相

出现于领先流体中的顺序。关于结果，参看图58A-图58B和表7。

[0636] 表7. ATPS和LFA的组合

ATPS	纸类型	观察结果
PEG (MW: 8000)/ 磷酸钾	玻璃纤维： Whatman S17	相分离： 富盐相领先， 富 PEG 相落在后面
与上文相同	血液滤纸： Whatman MF1	相分离： 富盐相领先， 富 PEG 相落在后面
与上文相同	玻璃纤维： Whatman VF1	相分离： 富盐相领先， 富 PEG 相落在后面
[0637] 与上文相同	反应膜： Whatman Fusion 5	相分离： 富盐相领先， 富 PEG 相落在后面
与上文相同	Whatman GF/DVA	相分离： 富盐相领先， 富 PEG 相落在后面
与上文相同	血液滤纸： Whatman LF1	相分离： 富盐相领先， 富 PEG 相落在后面
与上文相同	纤维素： Whatman CF1	相分离： 富 PEG 相领先， 富盐相落在后面
与上文相同	纤维素吸收垫： Whatman CF4	相分离： 富 PEG 相领先， 富盐相落在后面

[0638] 实施例8. 用于LFA纸制备的一些方法

[0639] 溶剂中已知浓度的溶质通过微量移液管以40uL (溶剂) /1cm<sup>2</sup> (具有大约1-2mm 的高度的玻璃纤维纸) 的值添加至纸中。液滴在纸上的均匀分布的点处添加。在添加之后，所述纸轻轻地绕圆柱体(用移液管尖端) 卷动以帮助所述流体均匀地分布于所述纸内。

[0640] 将溶液吸移至形成液滴的非吸收剂表面(例如，聚丙烯)。纸区段与所述液滴在所述纸区段的一点、边缘或表面处接触。这种方法适用于制造独特并且具体的脱水设计。关于所述设计的实例，参看图59A-D。

[0641] 实施例9. 将具有富PEG相的血液样品应用于LFA纸

[0642] 执行第一个实验以发现可能阻止血液样品而不堵塞所述纸以允许ATPS的两个相向前流动的纸。以下实验成功地执行，其允许整合ATPS浓缩系统与用于滤出红血球的MF1纸。

[0643] 制备1:1PEG-盐溶液。取出顶部富PEG相。将所述富PEG相连同全血样品应用于滤纸条上。

[0644] 所述富PEG相仍能够移动通过所述滤纸。血液不使滤纸凝块。MF1独特地可与 ATPS相容。参看图71。

[0645] 研究无法过滤红血球或无法使ATPS相通过的其它纸类型。在LF1和S17上，血液未过滤。在MF1上，血液经过过滤，然而，流动缓慢。参看图72。

[0646] 执行第二个实验以获得允许纸上血浆的相分离和浓缩同时阻止血细胞的纸配置和类型。以下为3D纸孔设计过滤红血球同时允许ATPS相通过的能力的两个证明。

[0647] 首先，将具有PEG-盐ATPS的血液样品应用于具有3-D纸孔的纸。制备9:1PEG- 盐ATPS并且将小体积的全血样品引入所述PEG-盐溶液中。在开始时用具有变化量的纸组分的

3-D纸孔制备流动条。使用蓝色染料来目测富PEG相并且观察液体是否沿所述条向上芯吸。现在将含有全血样品的PEG-盐溶液应用于所述3-D孔。观察分离和浓缩。

[0648] 观察到蓝色液体前面向前流动。血液在3-D孔中保持在后面。参看图73A-图73B。

[0649] 其次,将具有PEG-盐ATPS的血液样品应用于具有3-D纸孔的滤纸。制备9:1 PEG-盐ATPS并且将小体积的全血样品引入所述PEG-盐溶液中。使用蓝色染料来目测富PEG相。使用金纳米粒子来目测富盐相。将现在含有全血样品的PEG-盐溶液应用于所述3-D孔并且观察分离和浓缩。

[0650] 还执行其中添加PBS而非金纳米粒子的条件。

[0651] 观察到蓝色液体前面正在芯吸通过所述孔。与对照条相比在ATPS条中存在更独特的蓝色相,其表明除红血球保留以外的相分离。参看图74。

[0652] 在使样品与ATPS组分接触并且在领先流体中浓缩靶标之前允许血细胞进行过滤的配置是所需的。这种替代配置将适用于其中红血球将影响相分离行为的情况。成功达成这一目的的一种实验设置是层化3-D纸孔内的过滤和浓缩纸类型。观察到当最初发送PEG相时,血液被阻止。参看图75。

[0653] 实施例10. 沙眼衣原体的ATPS-LFA检测

[0654] 将ATPS和LFA并入用于检测病毒转运介质的溶液中的沙眼衣原体抗原的单一基于纸的诊断装置中,所述溶液用于所获得的拭子样品的存储。

[0655] 制备抗沙眼衣原体DGNP

[0656] 1mL葡聚糖涂布的金纳米粒子(DGNP)溶液的pH首先使用1.5N NaOH调节至pH 9。随后,将16 $\mu$ g小鼠单克隆沙眼衣原体抗体添加至胶态金溶液中并且在振荡器上混合30min。为了防止其它蛋白质非特异性结合于所述胶态金纳米粒子的表面,将200 $\mu$ L 10%w/v牛血清白蛋白(BSA)溶液添加至所述混合物中并且在振荡器上混合20 min。为了去除游离、未结合抗体,使所述混合物接着在4 $^{\circ}$ C和9,000rpm下离心30min,随后使DGNP的沉淀再悬浮于200 $\mu$ L 1%w/v BSA溶液中。所述离心和再悬浮步骤再重复两次,并且在第三次离心之后,使DGNP的沉淀再悬浮于100 $\mu$ L在pH 9.0下的0.1M硼酸钠缓冲液中。

[0657] 使用LFA进行检测

[0658] 利用夹心分析形式的LFA测试条以类似于我们先前的研究的方式进行组装。在这种形式中,固定的沙眼衣原体抗体构成测试线并且对沙眼衣原体一抗具特异性的固定的二抗构成对照线。

[0659] 为了验证使用LFA对沙眼衣原体的检测极限,将DGNP添加至样品溶液中并且使其结合存在于样品中的沙眼衣原体。样品溶液由DGNP和在病毒转运介质(BD, Franklin Lakes, NJ)中的已知浓度的沙眼衣原体组成,其在试管中混合。将所述LFA测试条垂直地插入至所述样品溶液中,所述样品溶液经由毛细管作用向上芯吸通过所述条朝向吸收垫。10min后在控制光照环境中拍摄来自PBS和FBS样品的测试条的图像。

[0660] 沙眼衣原体抗原在病毒转运介质的溶液中进行检测。参看图76。所用的缀合物为具有对沙眼衣原体抗原上的脂多糖(LPS)具特异性的抗体的葡聚糖涂布的金纳米探针(DGNP)。使用常规LFA夹心形式,所述设置的检测极限被确定为大约10 $\mu$ g/mL。下一步骤将是使用合适的ATPS来浓缩生物标记物,将浓缩的样品应用于LFA,并且建立整合的系统的检测极限。

[0661] PBS中沙眼衣原体抗原的检测极限也被使用相同LFA设置确定为10 $\mu$ g/mL。

[0662] 还测试了用与来自Abcam的抗MOMP抗体复合的DGNP检测所述抗原。这些看来未成功地检测PBS或VTM溶液中的所述抗原,并且因此被忽略。

[0663] 实施例11. 变形链球菌的ATPS-LFA检测

[0664] 将ATPS和LFA并入用于检测变形链球菌的单一基于纸的诊断装置中,所述变形链球菌是可能导致龋齿(空洞)的优势细菌。

[0665] 制备抗变形链球菌DGNP

[0666] 1mL葡聚糖涂布的金纳米粒子(DGNP)溶液的pH首先使用1.5N NaOH调节至 pH 9。随后,16 $\mu$ g小鼠单克隆变形链球菌抗体添加至金溶液中并且在振荡器上混合 30min。为了防止其它蛋白质非特异性结合于所述胶态金纳米粒子的表面,200 $\mu$ L 10%w/v牛血清白蛋白(BSA)溶液添加至所述混合物中并且在振荡器上混合20min。为了去除游离、未结合抗体,使所述混合物接着在4 $^{\circ}$ C和9,000rpm下离心30min,随后使DGNP的沉淀再悬浮于200 $\mu$ L 1%w/v BSA溶液中。所述离心和再悬浮步骤再重复两次,并且在第三次离心之后,使DGNP的沉淀再悬浮于100 $\mu$ L在pH 9.0下的0.1M硼酸钠缓冲液中。

[0667] 使用LFA进行检测

[0668] 利用夹心分析形式的LFA测试条以类似于我们先前的研究的方式进行组装。在这种形式中,固定的变形链球菌抗体构成测试线并且对一抗具特异性的固定的二抗构成对照线。

[0669] 为了验证使用LFA对变形链球菌的检测极限,将DGNP添加至样品溶液中并且使其结合存在于样品中的变形链球菌。样品溶液由DGNP和已知浓度的变形链球菌组成,其在试管中混合。将所述LFA测试条垂直地插入至所述样品溶液中,所述样品溶液经由毛细管作用向上芯吸通过所述条朝向吸收垫。10min后在控制光照环境中拍摄测试条的图像。

[0670] 使用LFA和ATPS进行检测

[0671] 制备1:9Triton X-114胶束ATPS样品溶液,其由已知浓度的变形链球菌组成。使所述ATPS样品溶液在25C下孵育8小时以使相分离发生。对含有浓缩的变形链球菌的顶部胶束贫乏相进行提取并且与抗变形链球菌DGNP孵育。将所述LFA测试条垂直地插入所得混合物中,10min后在控制光照环境中拍摄所述测试条的图像。

[0672] 制备9:1PEG/磷酸钾ATPS样品溶液,其由已知浓度的变形链球菌组成。使所述ATPS样品溶液在25C下孵育30min以使相分离发生。对含有浓缩的变形链球菌的底部PEG贫乏相进行提取并且与抗变形链球菌DGNP孵育。将所述LFA测试条垂直地插入所得混合物中,10min后在控制光照环境中拍摄所述测试条的图像。

[0673] 使用LFA成功地检测变形链球菌(参看图77和78)。使用常规LFA夹心形式,所述设置的检测极限被确定为大约 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL。还证明了检测极限从 $1 \times 10^7$ 至 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL的10倍改进。

[0674] 下一步骤是合并ATPS和具有呈3D孔或3D芯形式的纸的LFA,以实现同时并且无缝浓缩和检测。

[0675] 实施例12. 肌钙蛋白的ATPS-LFA检测

[0676] 将ATPS和LFA并入将用于检测肌钙蛋白的单一基于纸的诊断装置中,所述肌钙蛋白是心肌梗塞的生物标记物。

[0677] 制备抗肌钙蛋白DGNP

[0678] 与上文实施例11中相同的程序,例外是使用抗肌钙蛋白抗体。

[0679] 使用LFA进行检测

[0680] 利用竞争分析形式的LFA测试条以类似于我们先前的研究的方式进行组装。在这种形式中,固定的肌钙蛋白构成测试线并且DGNP上对一抗具特异性的固定的二抗构成对照线。

[0681] 为了验证使用LFA对肌钙蛋白的检测极限,将DGNP添加至样品溶液中并且使其结合存在于样品中的肌钙蛋白。使含有DGNP和已知浓度的肌钙蛋白的样品溶液在试管中混合。将所述LFA测试条垂直地插入至所述样品溶液中,所述样品溶液经由毛细管作用向上芯吸通过所述条朝向吸收垫。10min后在控制光照环境中拍摄来自 PBS样品的测试条的图像。

[0682] 使用LFA和ATPS进行检测

[0683] 制备9:1PEG/磷酸钾ATPS样品溶液,其由已知浓度的肌钙蛋白组成。使所述 ATPS样品溶液在25C下孵育30min以使相分离发生。含有浓缩的肌钙蛋白的底部 PEG贫乏相被提取并且用抗肌钙蛋白DGNP孵育。所述LFA测试条垂直地插入所得混合物中,10min后在控制光照环境中拍摄所述测试条的图像。

[0684] 使用LFA成功地检测到肌钙蛋白(参看图79)。使用常规LFA竞争形式,所述设置的检测极限被确定为大约1ng/ $\mu$ L。成功地证明检测极限从1至0.1ng/ $\mu$ L的10倍改进。

[0685] 实施例13.脱水方法

[0686] 液体应用

[0687] 这种方法包括在脱水之前将含有欲作为溶质脱水的所需组分的液体溶液应用于纸。

[0688] 溶剂中已知浓度的溶质通过微量移液管以40 $\mu$ L(溶剂)/1cm<sup>2</sup>(具有大约1-2mm 的高度的玻璃纤维纸)的值添加至纸中。液滴在纸上的均匀分布的点处添加。在添加之后,所述纸轻轻地绕圆柱体(我们使用移液管尖端)卷动以帮助所述流体均匀地分布于所述纸内。将溶吸移至形成液滴的非吸收剂表面(例如,聚丙烯)。纸区段与所述液滴在所述纸区段的一点、边缘或表面处接触。这种方法在制造独特并且具体的脱水设计时是优选的。所述设计的实例见于图59A-D中。

[0689] 失败方法:将整个纸区段浸没于溶剂中使得所述纸过饱和,导致降低的实验稳健性,这可能归因于不均匀脱水。另外,添加超过60 $\mu$ L(溶剂)/1cm<sup>2</sup>(具有大约1-2mm 的高度的玻璃纤维纸),因为这也使所述纸区段过饱和。

[0690] 冻干

[0691] 这种方法在所需结果是所述组分将再溶解时是优选的。发现重要的是,冻干器在脱水之前已经新近解冻。不这样做会增加所述组分在所述纸内不均匀脱水的风险(例如,葡聚糖涂布的金纳米探针(DGNP)将在所述纸的边缘附近具有大得多的程度的分布)。

[0692] 急速冷冻和冻干

[0693] 使用液氮,通过将纸浸没于所述液氮中或将所述液氮倾倒在纸上使纸区段急速冷冻。然后将所述冷冻的纸区段快速地放入冻干器中,其中所述冷冻的液体升华。用于尝试这种方法的基本原理是设法减少在脱水过程期间所述溶质的迁移以确保对脱水过程的进一步控制(与在液态溶液的蒸发期间的溶质迁移形成对比)。然而,这种方法导致意外的流动

模式和相分离行为。以下为意外数据的慢速拍摄图像数据(参看图 60)。

[0694] 真空腔室

[0695] 类似于上文所述的‘冻干’,例外是将所述纸区段放置于真空腔室而非冻干器中。所述真空腔室的较低压力证明了不太一致的实验结果,这最可能归因于在脱水期间的不均匀溶质分布。

[0696] 烘焙

[0697] 将所述纸区段放置于在超过25摄氏度的温度(通常60摄氏度)下的烘箱腔室中。如果所需目标是再水合所述溶质同时防止其迁移性,那么这种方法可为优选的。关于这种观察到的效应的一种潜在解释是在烘焙方法期间的较高温度可导致所述溶质与纸之间的共价键或强相互作用。

[0698] 参看图61中对于脱水方法的失败的尝试,所述尝试由于不均匀脱水导致不均匀相分离。

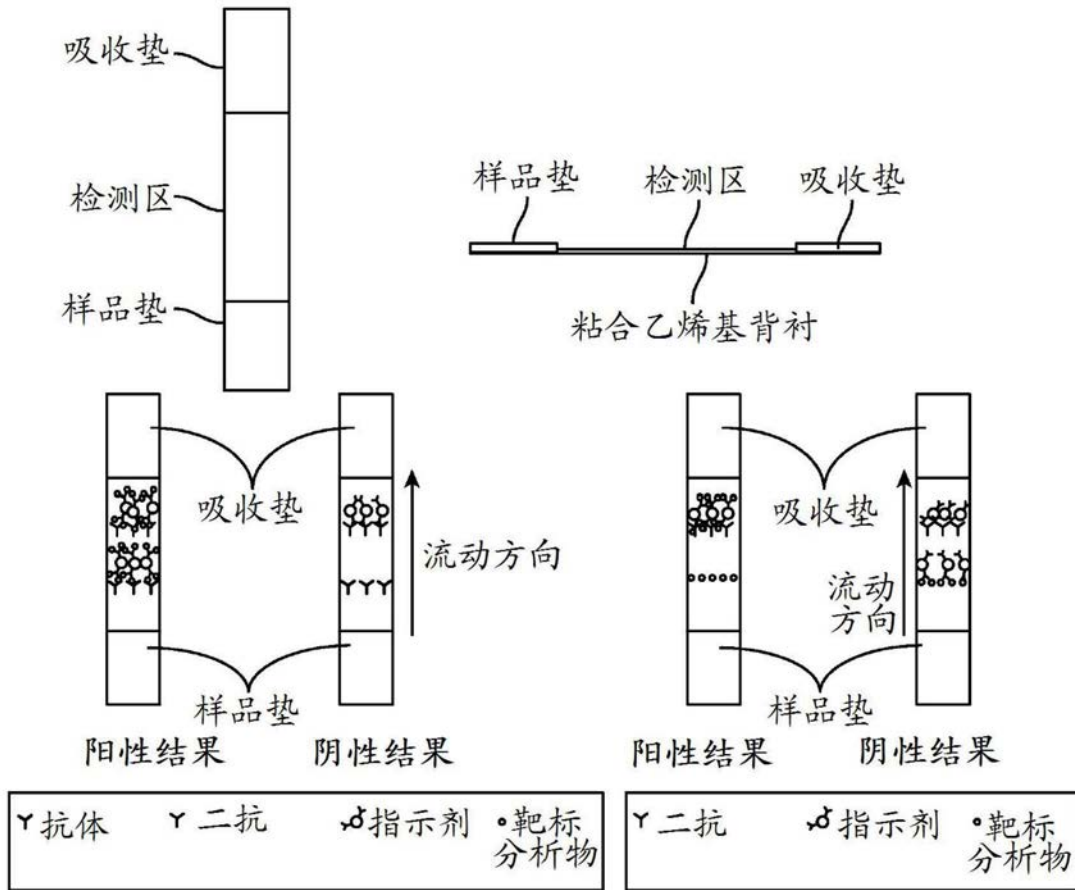


图1

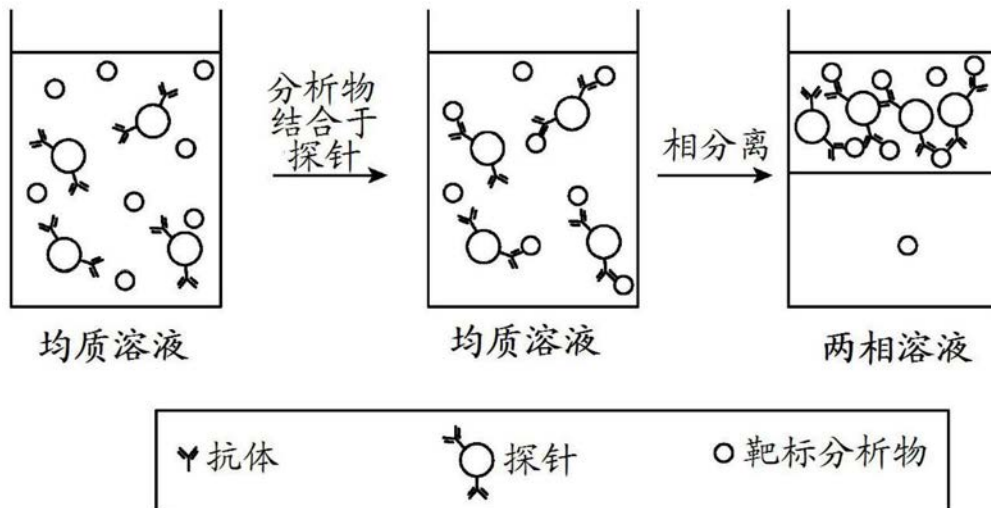


图2

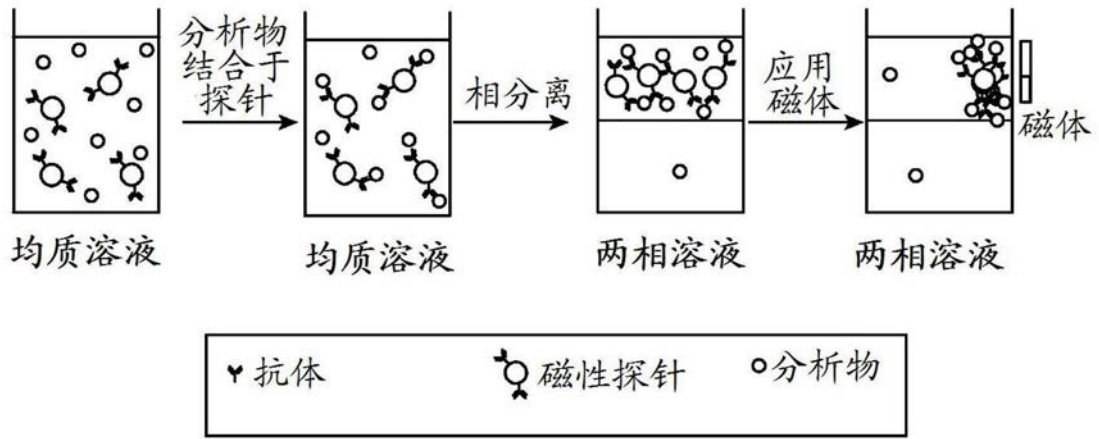


图3

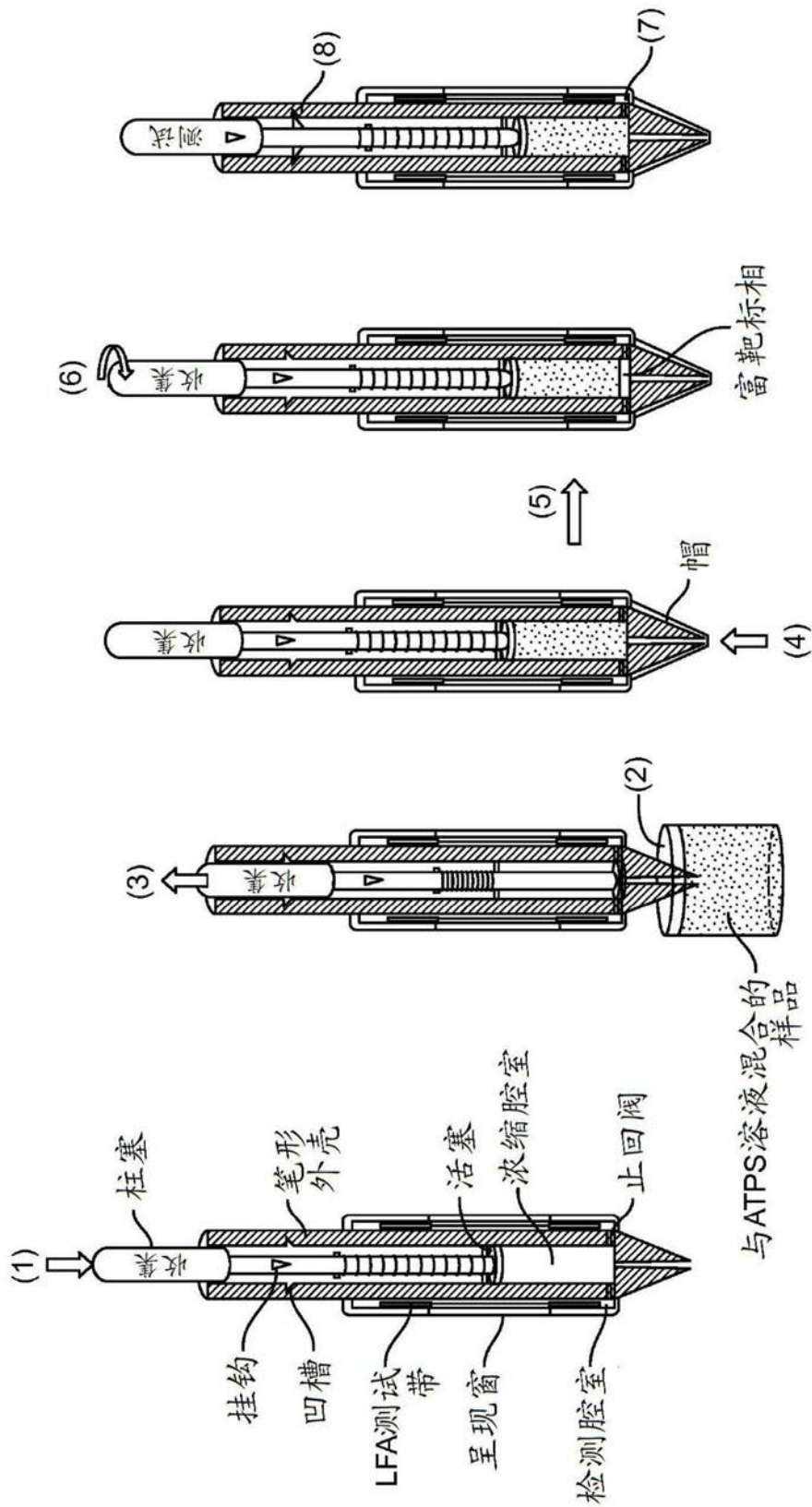


图4

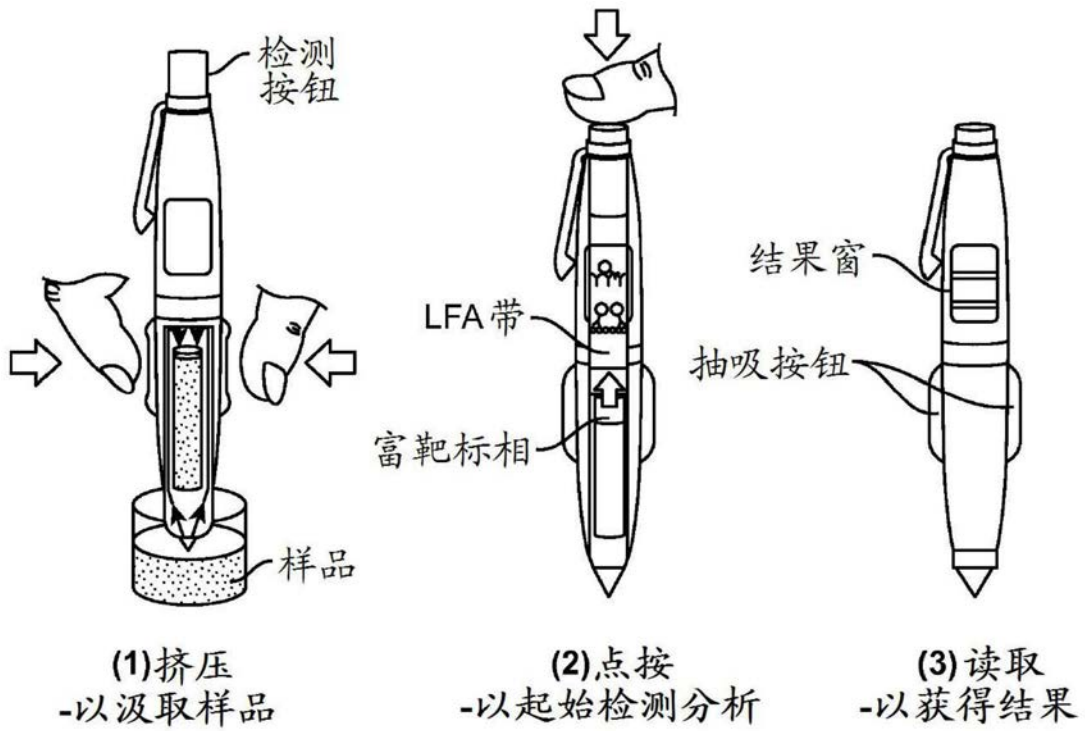


图5

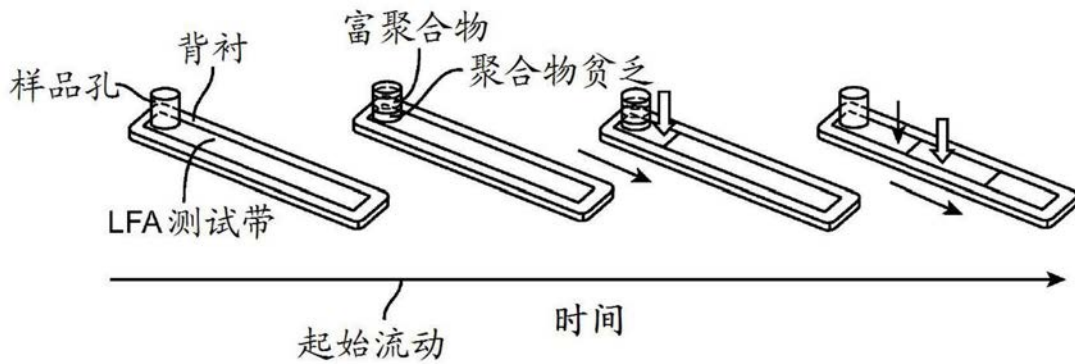


图6A

1:1体积比率

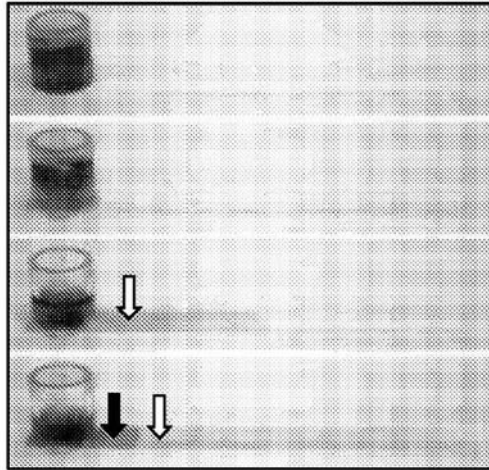


图6B

9:1体积比率

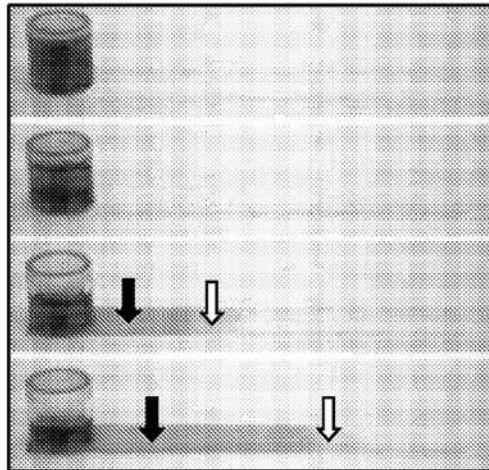


图6C

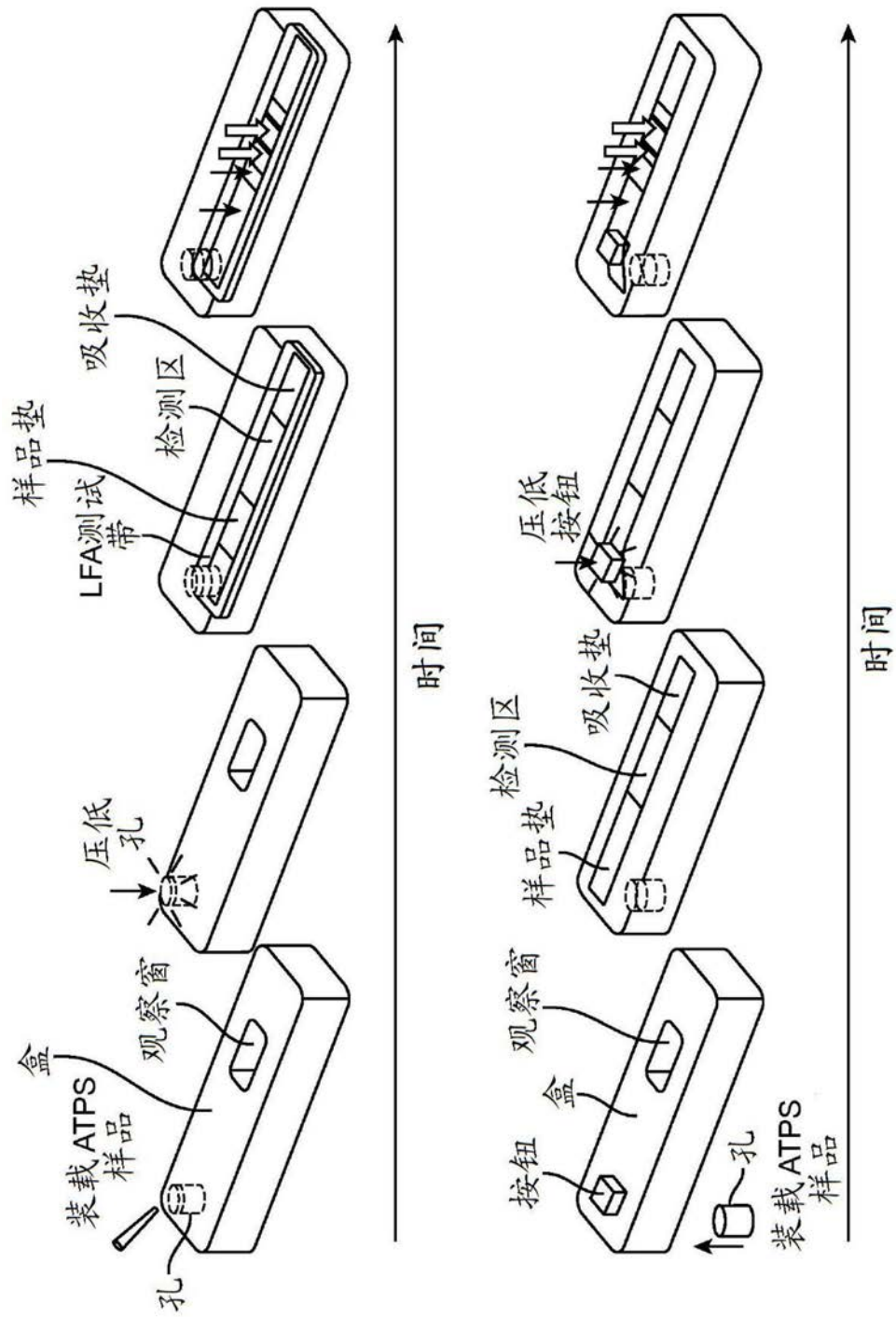


图6D

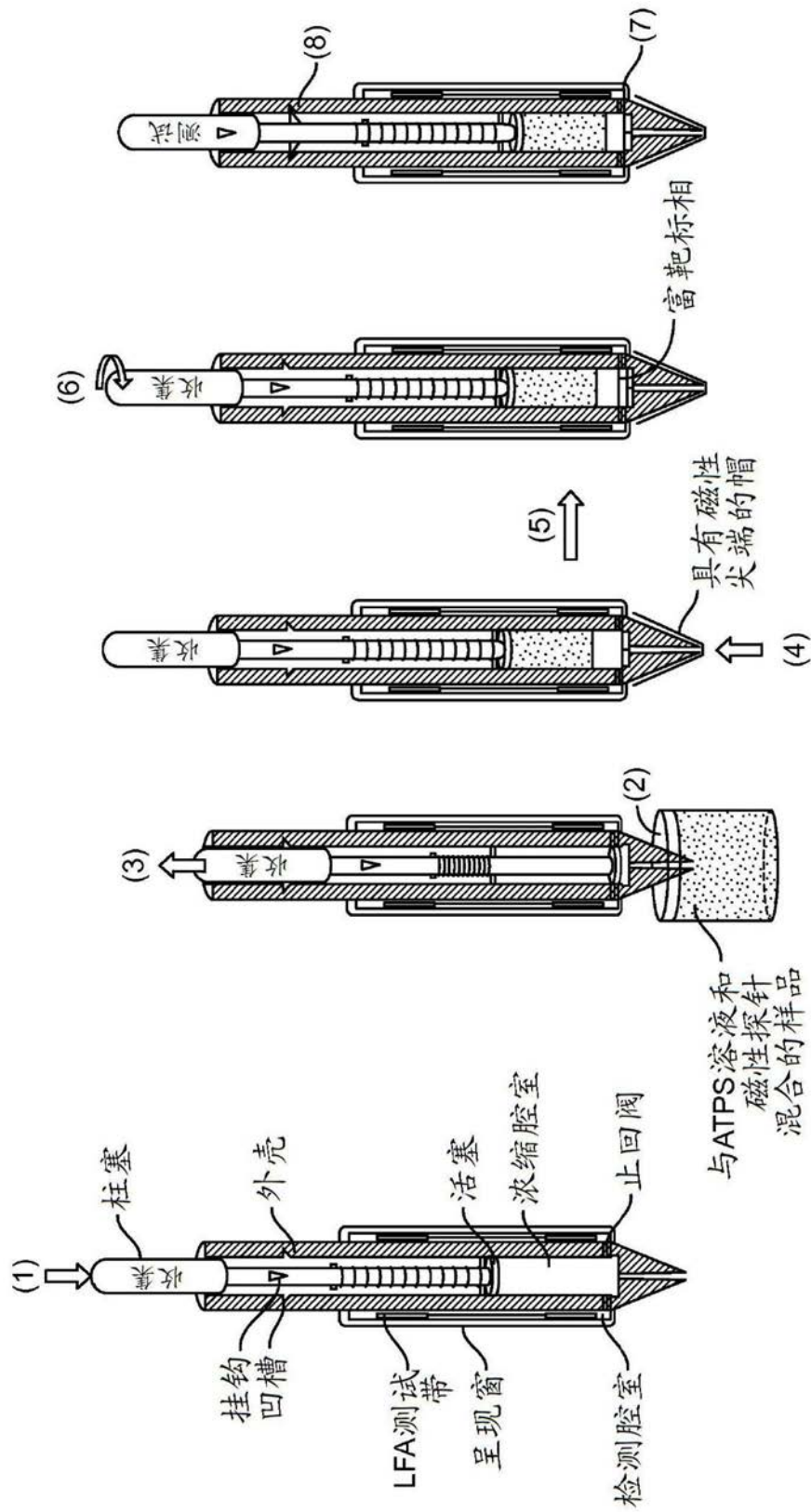


图7

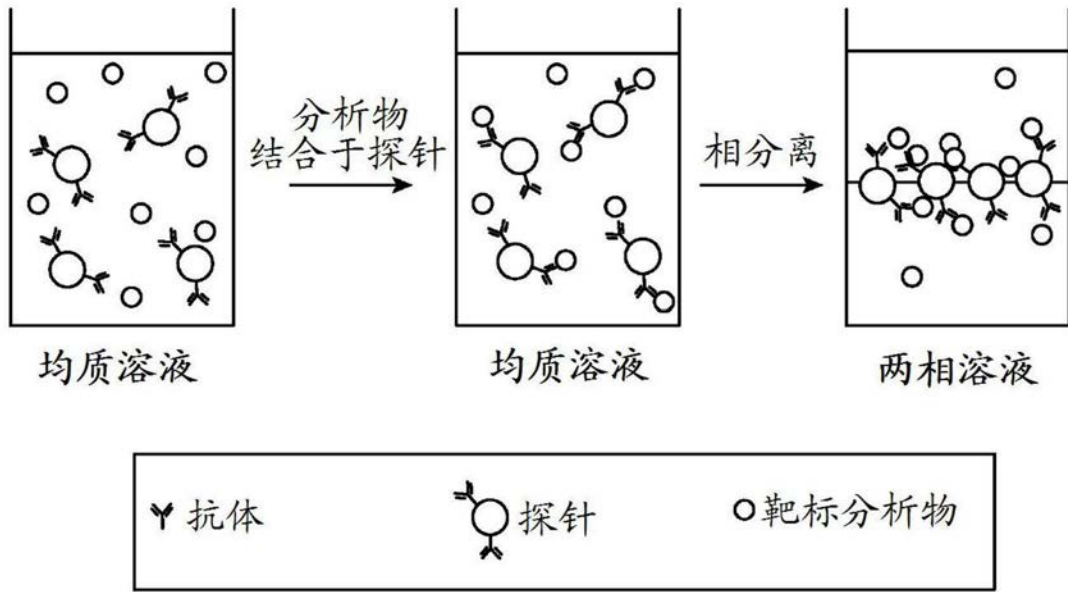


图8

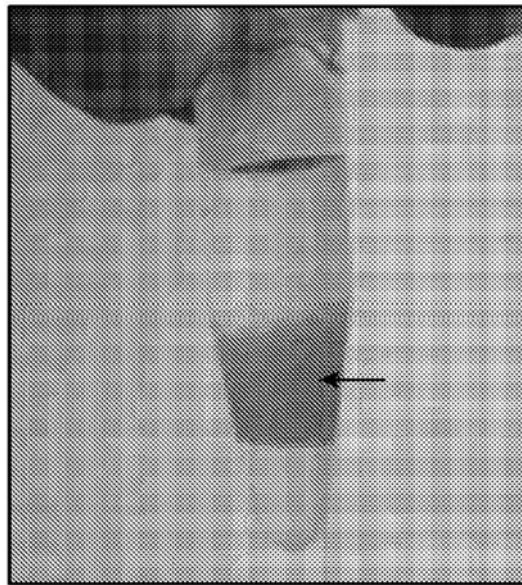


图9

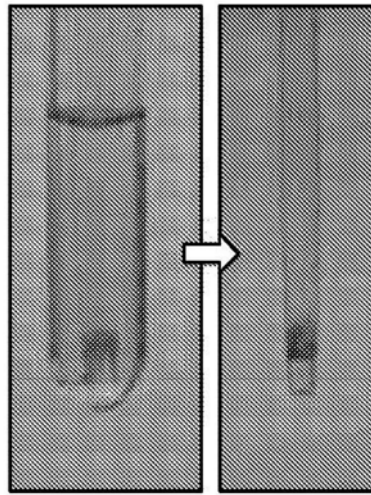


图10A

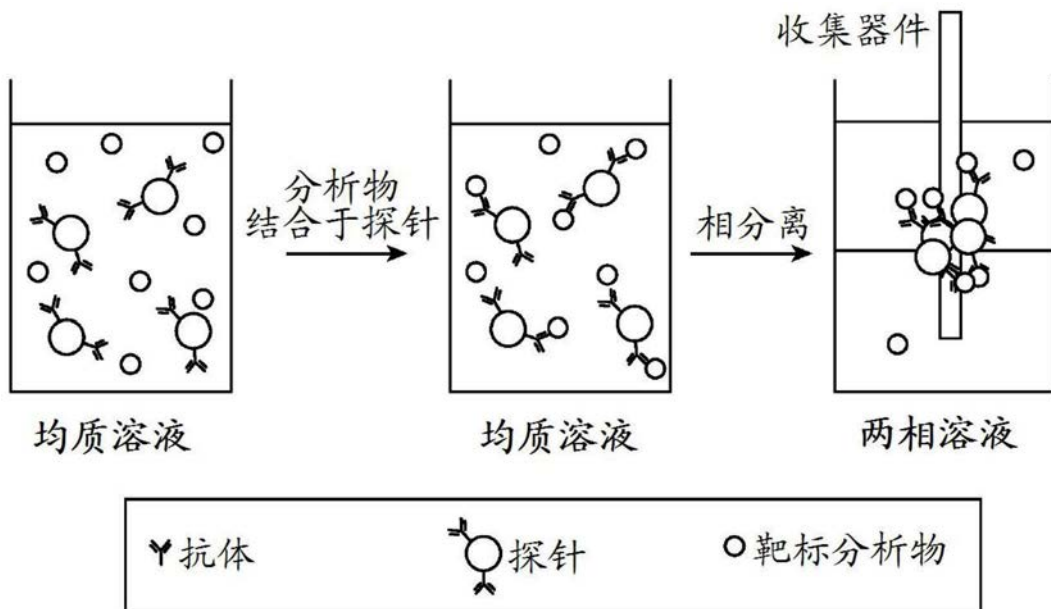


图10B

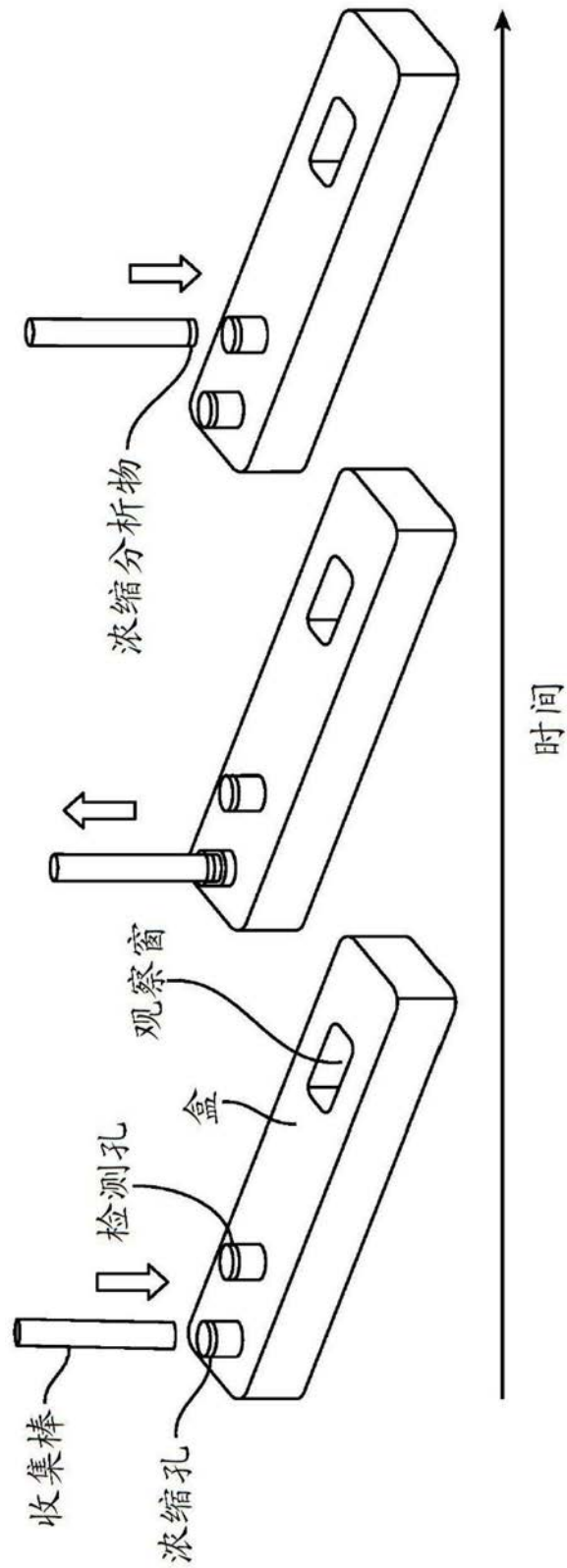


图11

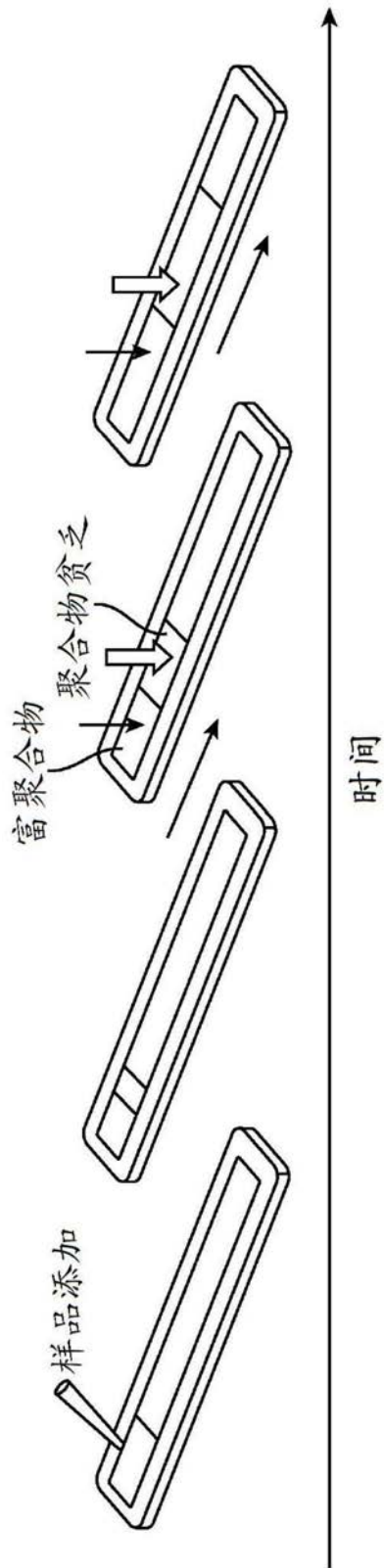


图12A

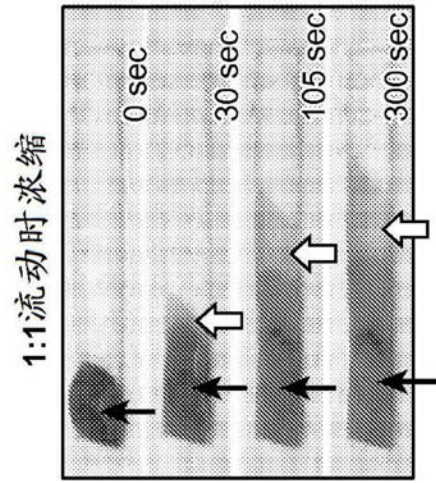


图12B

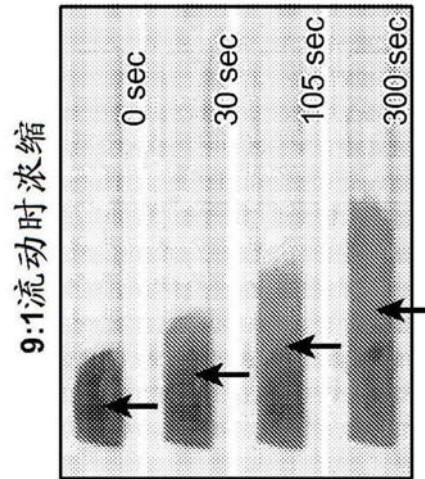


图12C

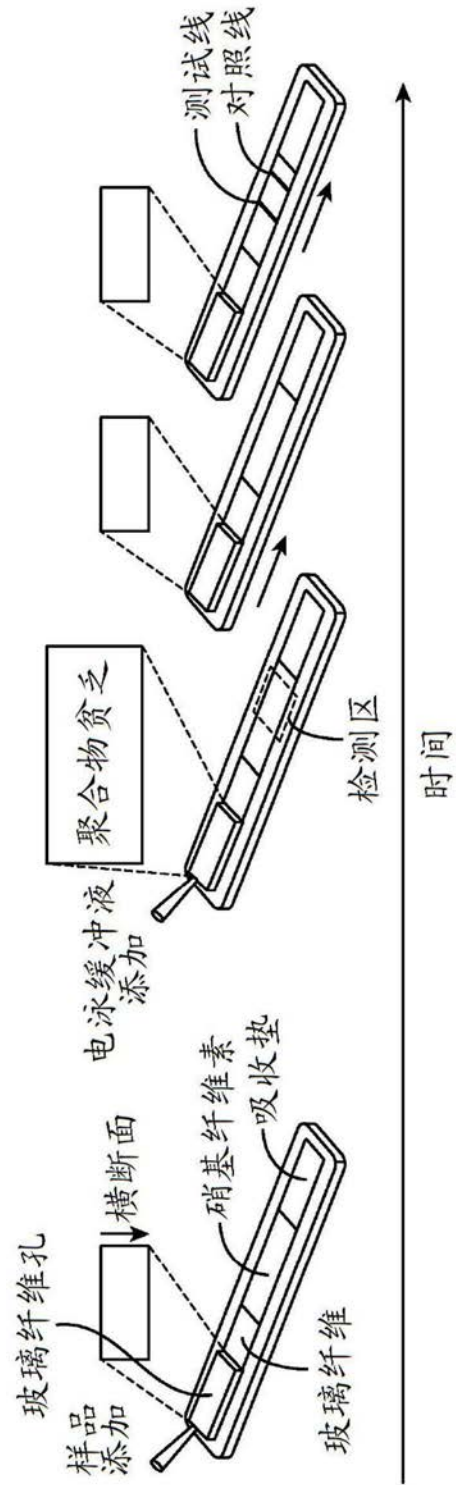


图13A

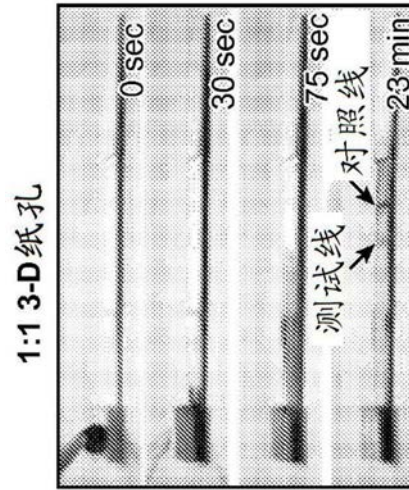


图13B

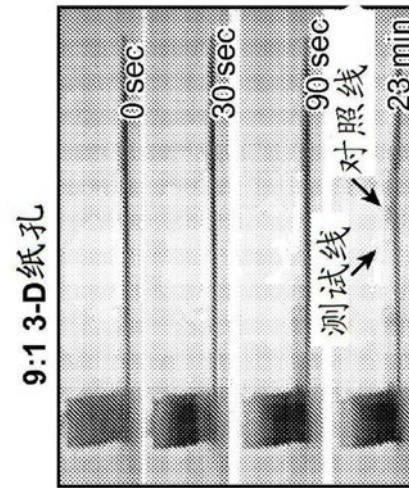


图13C

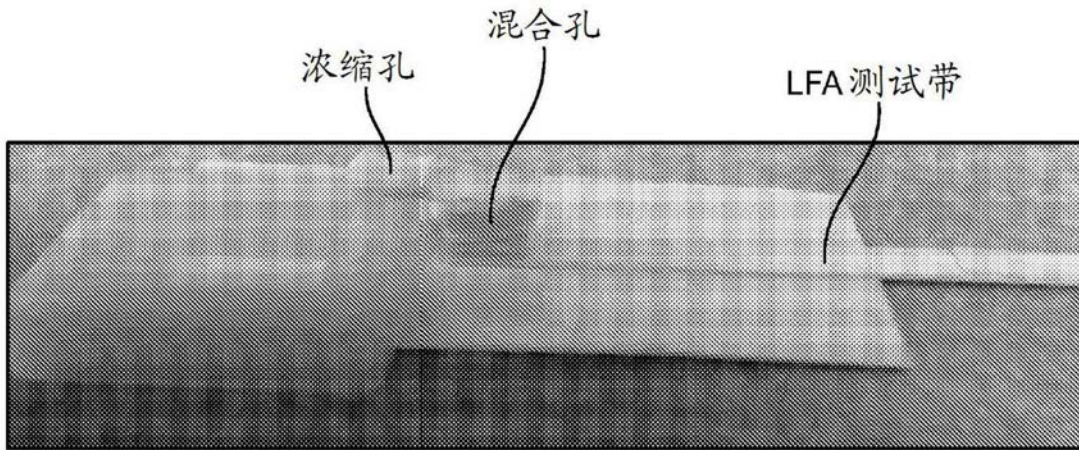


图14A

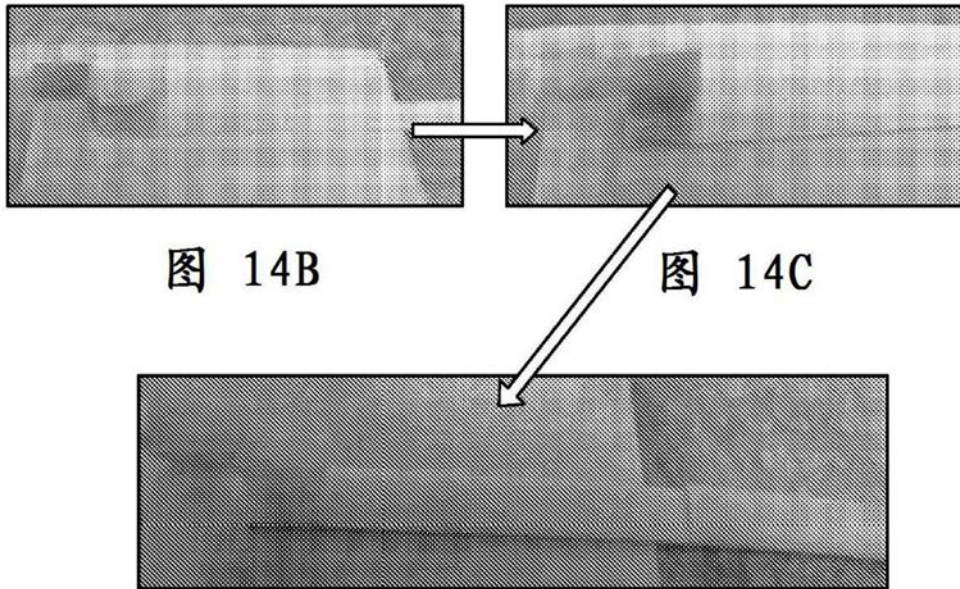


图 14B

图 14C

图 14D

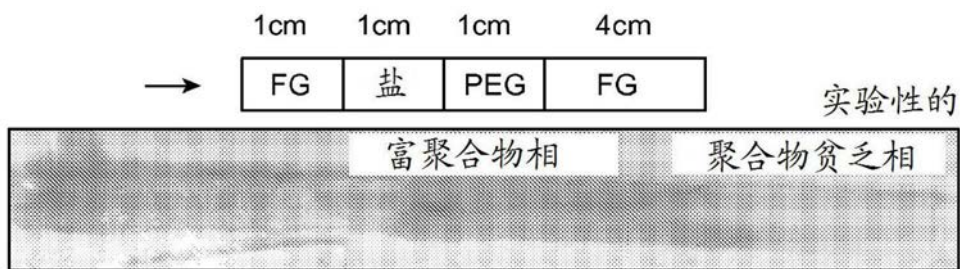


图15A

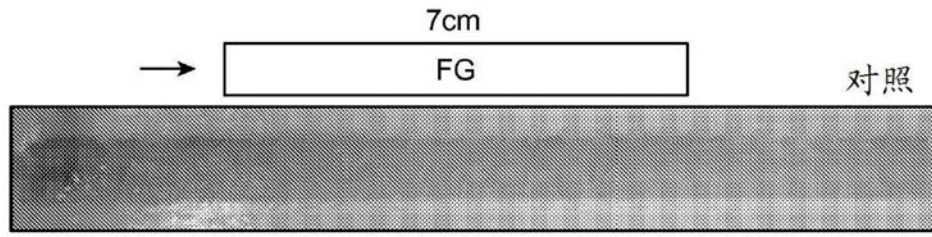


图15B

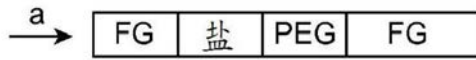


图16A

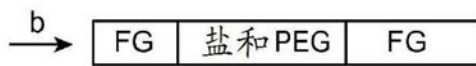


图16B



图16C

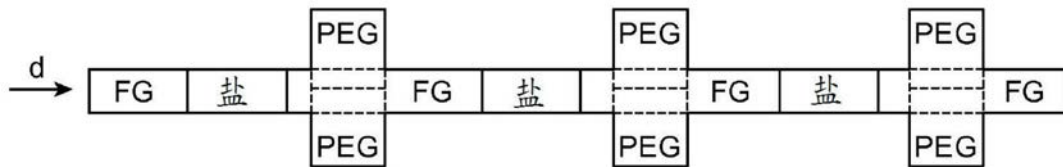


图16D

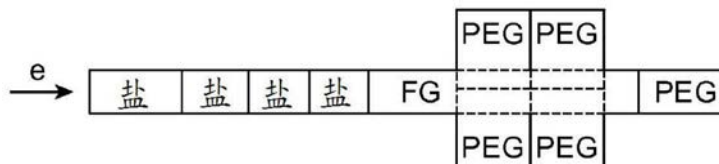


图16E

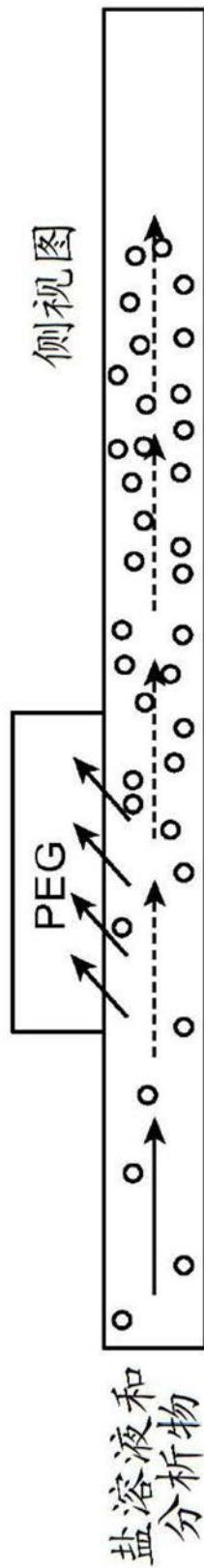


图17A

顶视图



图17B

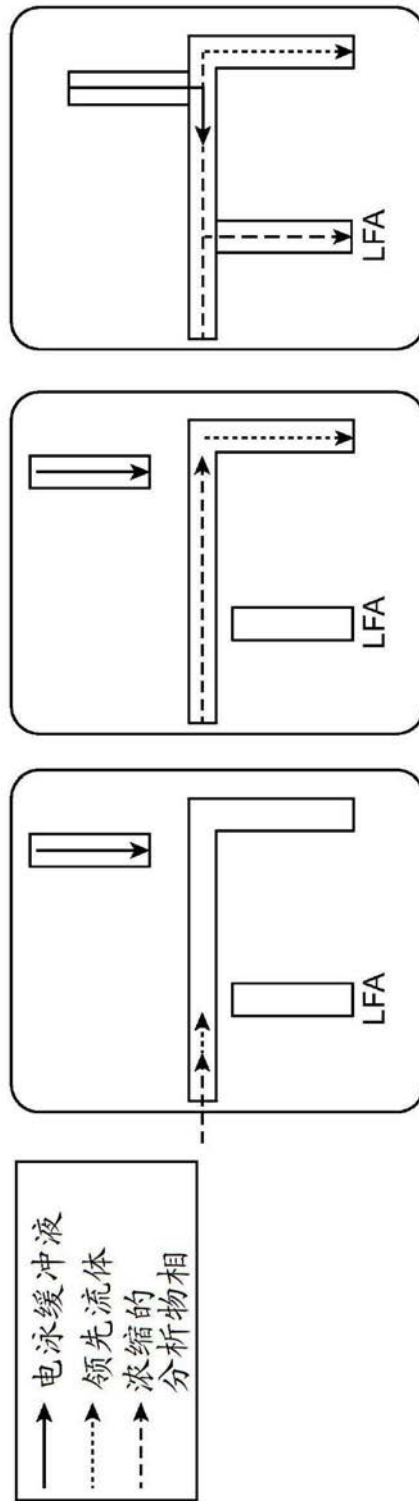


图18A

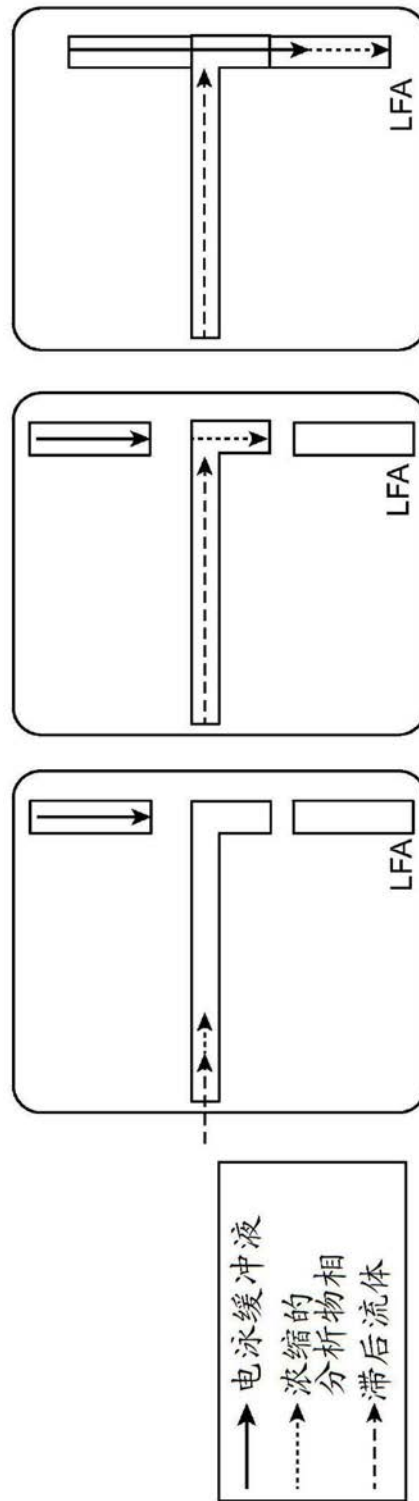


图18B

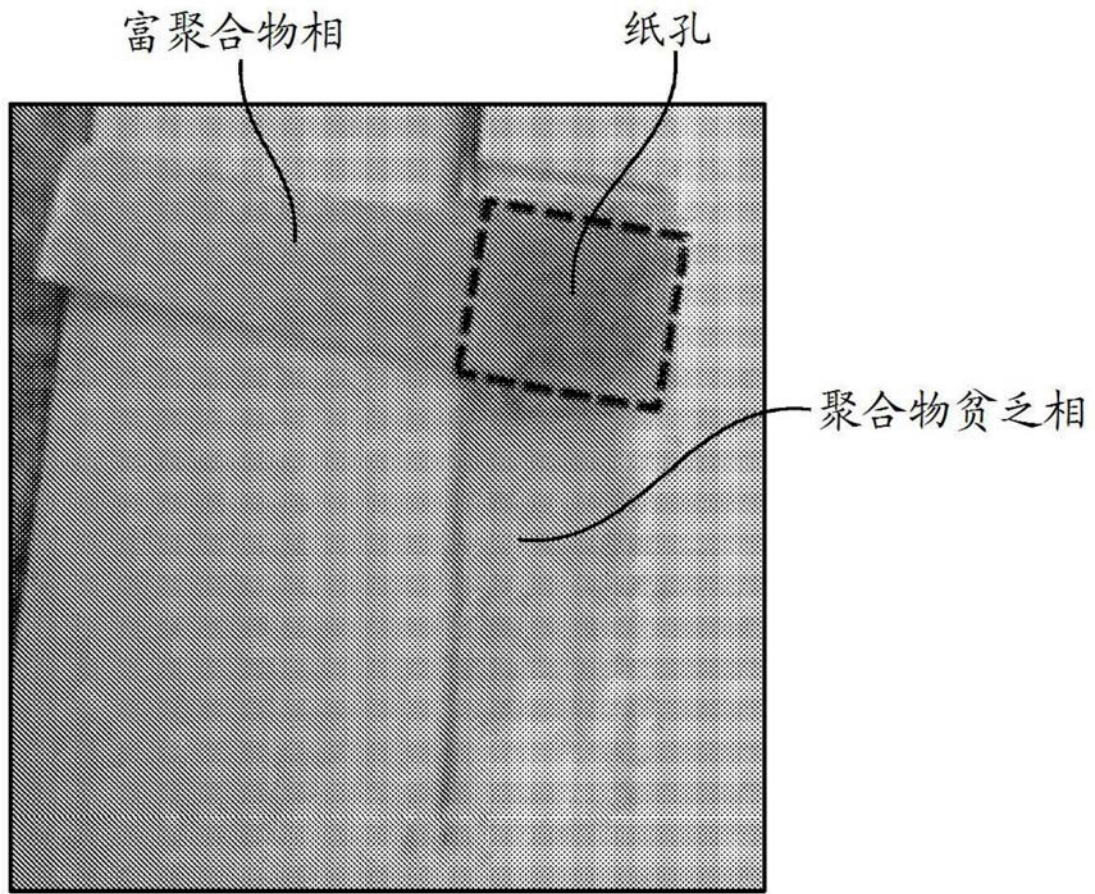


图19

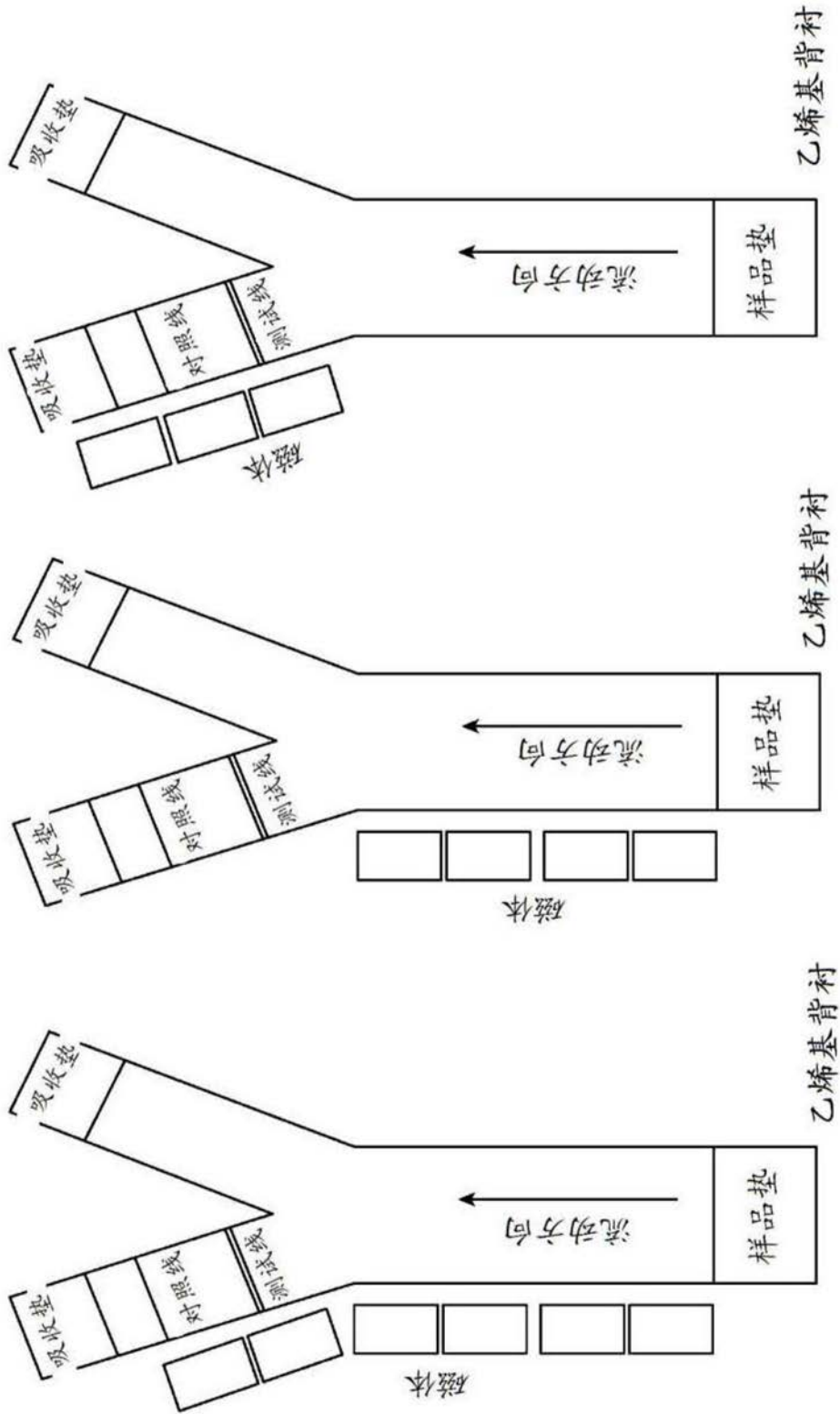
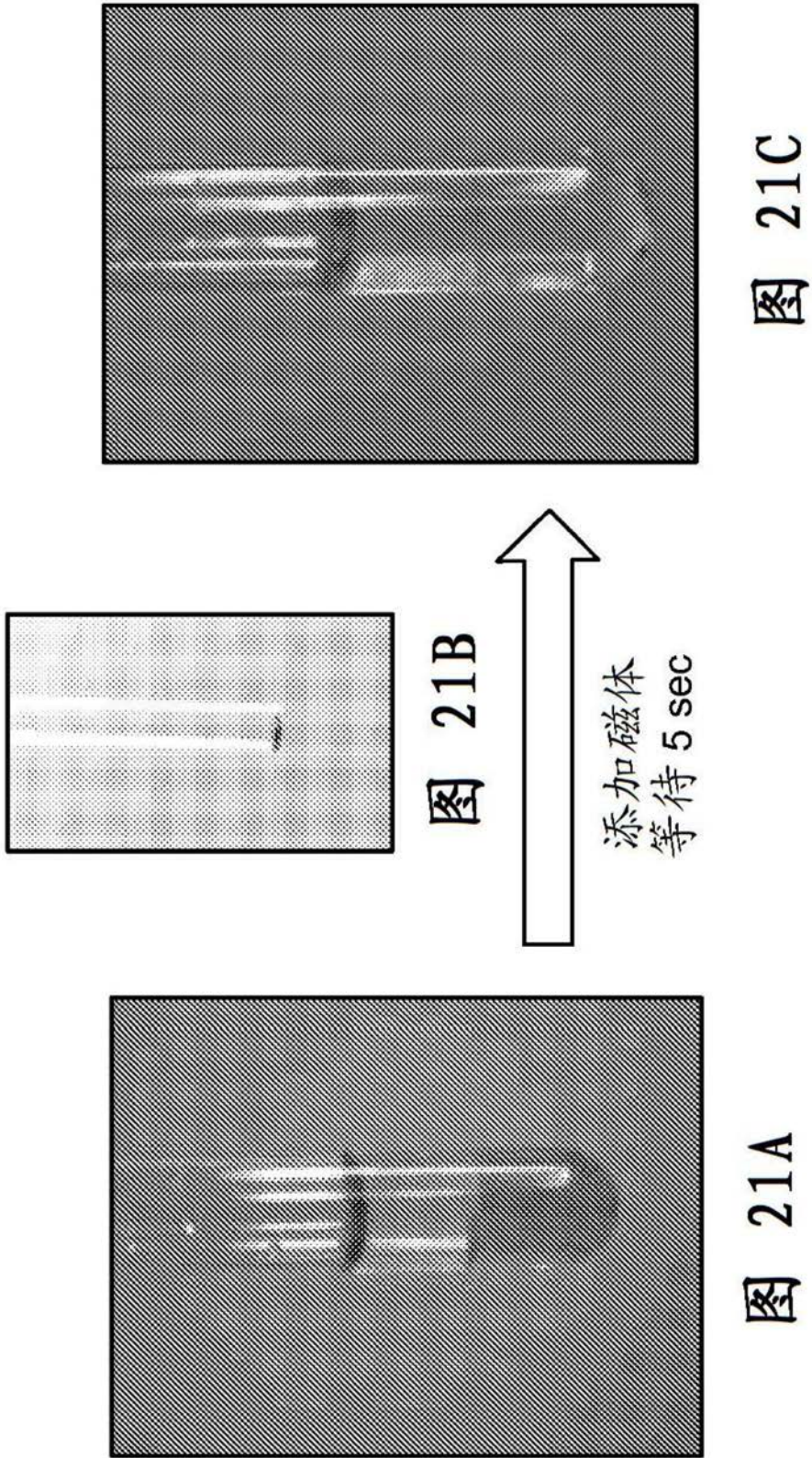


图20



0.005 μg/mL		
0.05 μg/mL		
0.5 μg/mL		
5 μg/mL		
50 μg/mL		
500 μg/mL		
对照 0 μg/mL		
	不使用 浓缩	使用 浓缩

图22

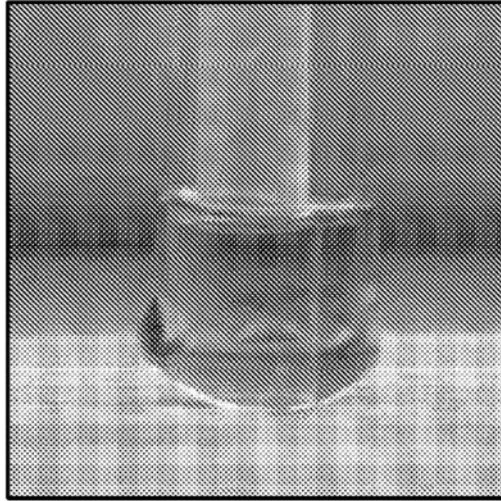


图23A

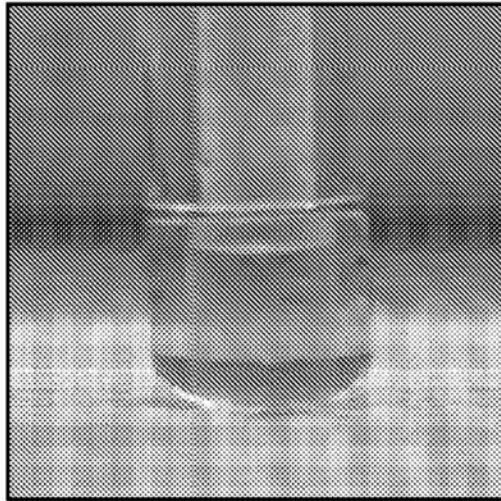


图23B

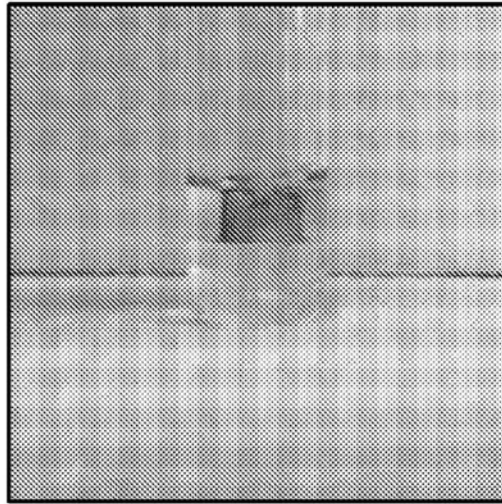


图23C

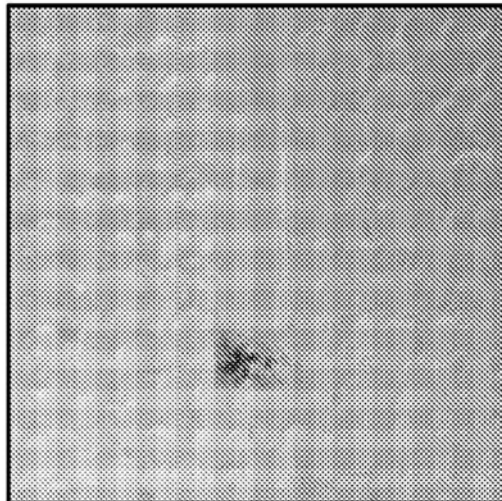


图23D




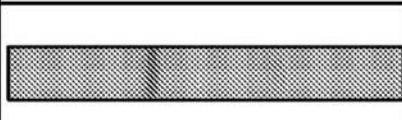
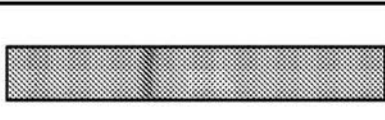
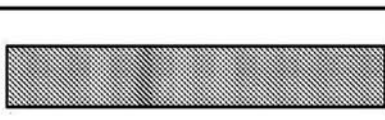

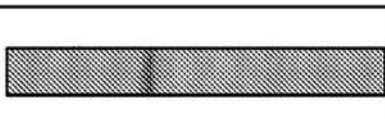
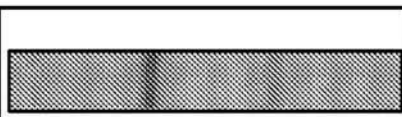
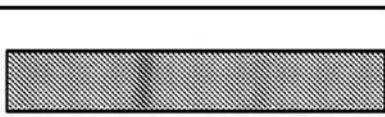
	仅LFA	LFA + ATPS
阴性对照		
10 ng/μL		
1 ng/μL		
0.2 ng/μL		
0.1 ng/μL		
0.01 ng/μL		

图24

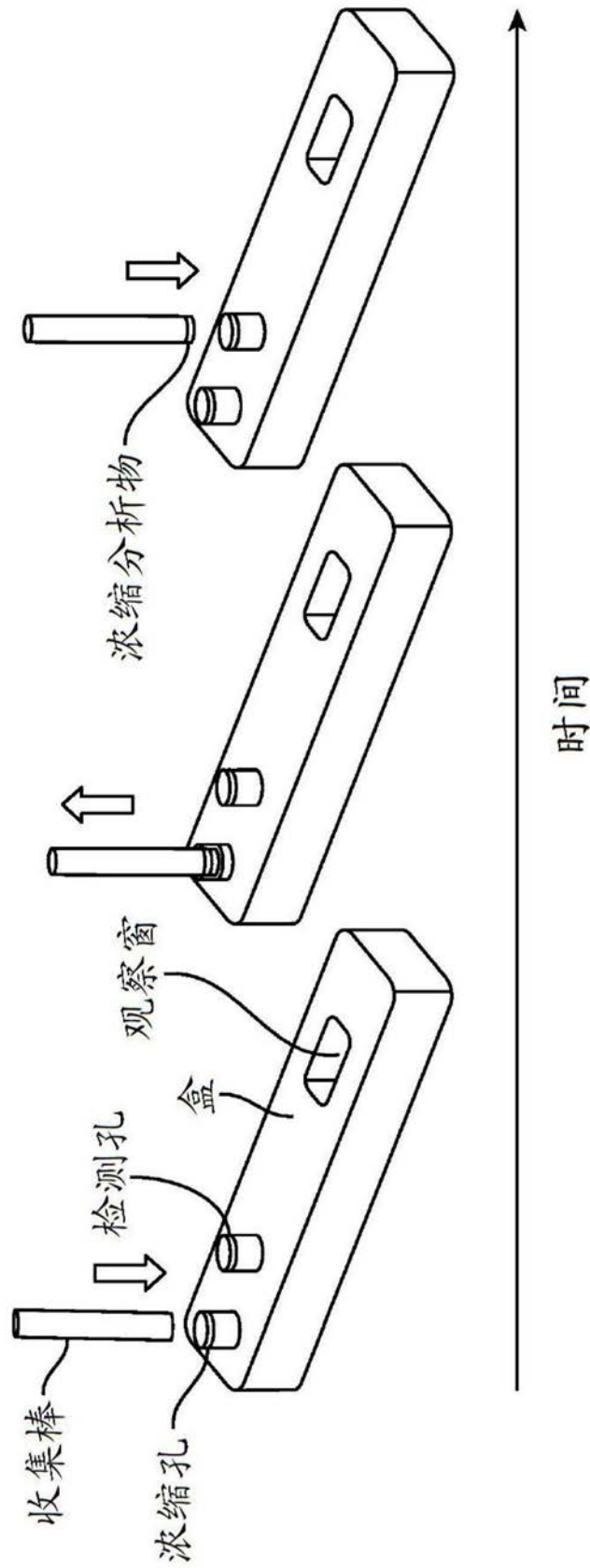


图25

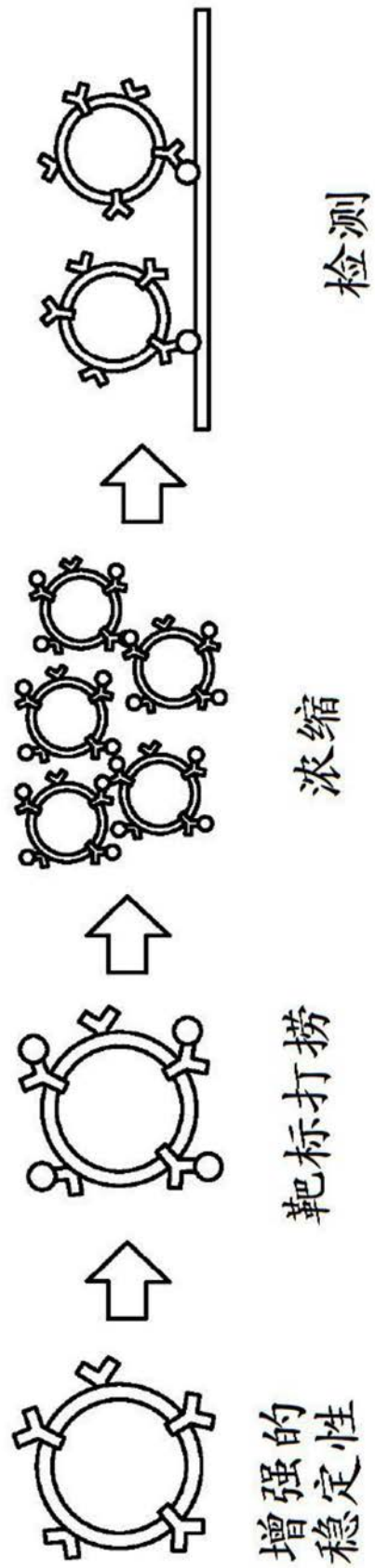


图26

竞争分析

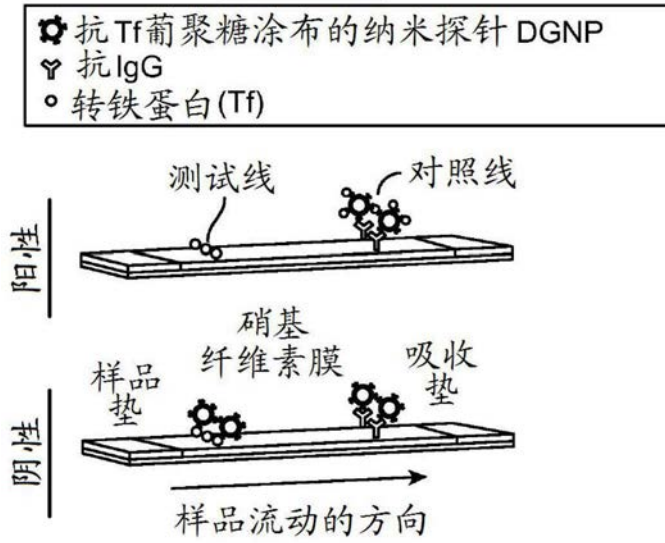


图27

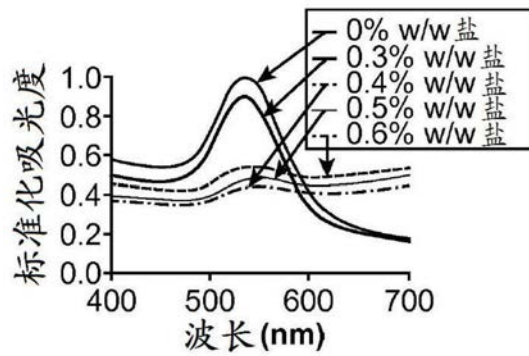


图28A

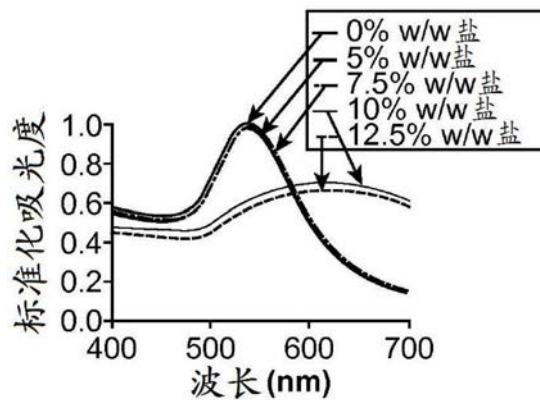


图28B

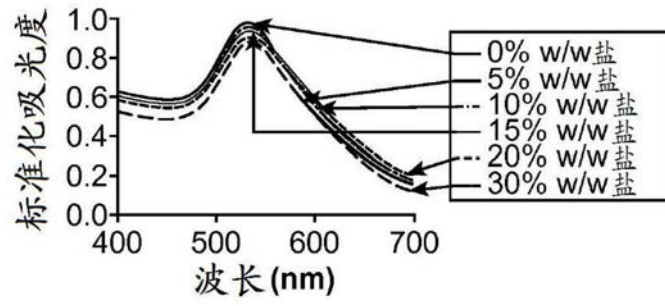


图28C

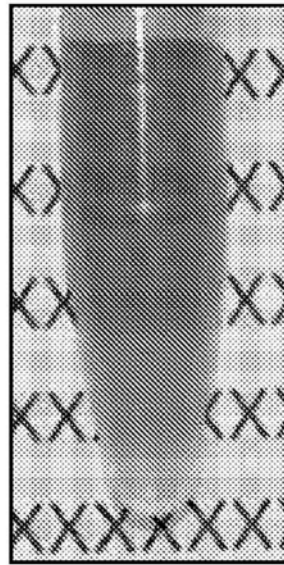


图29A

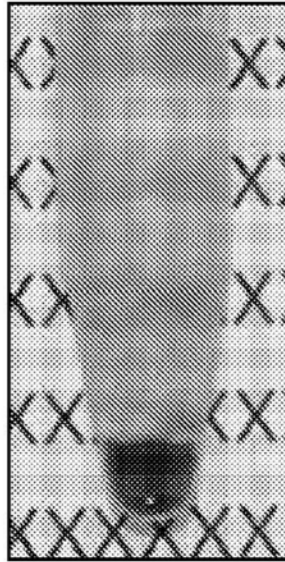


图29B

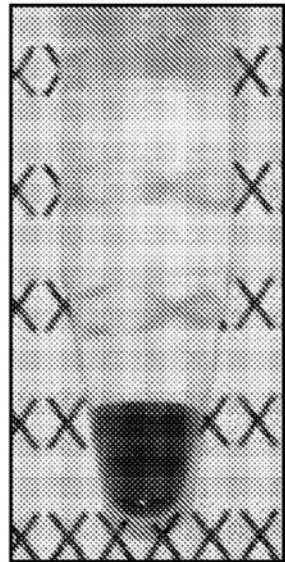


图29C

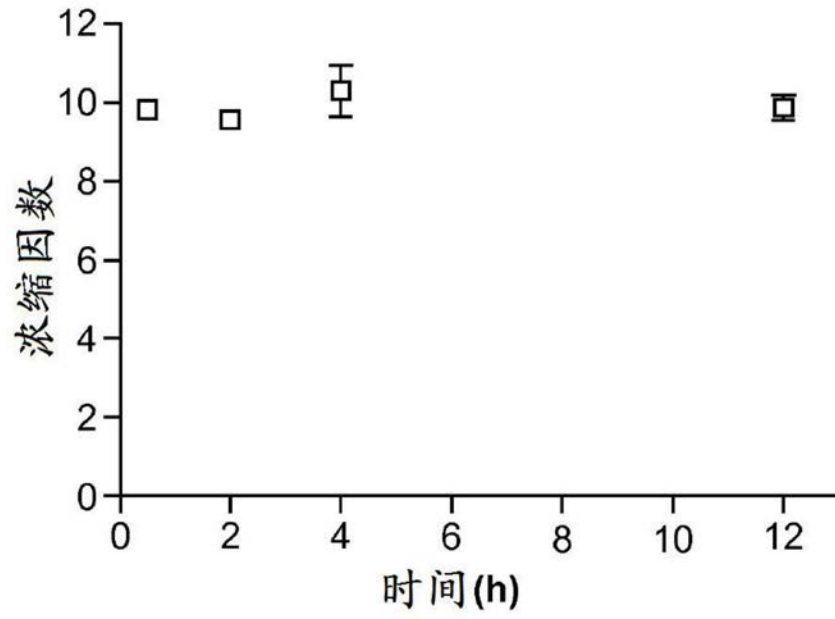


图30

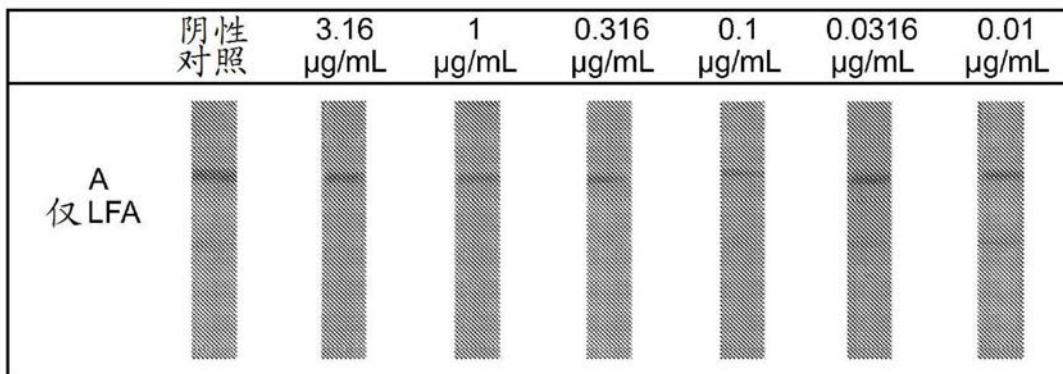


图31A

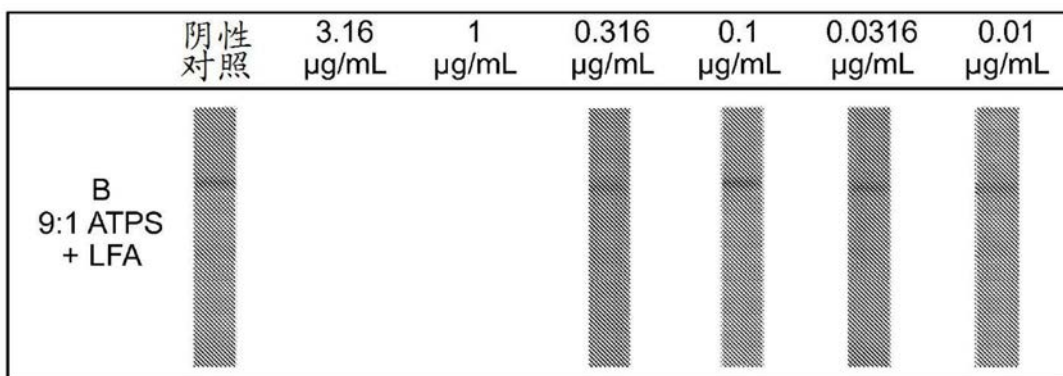


图31B

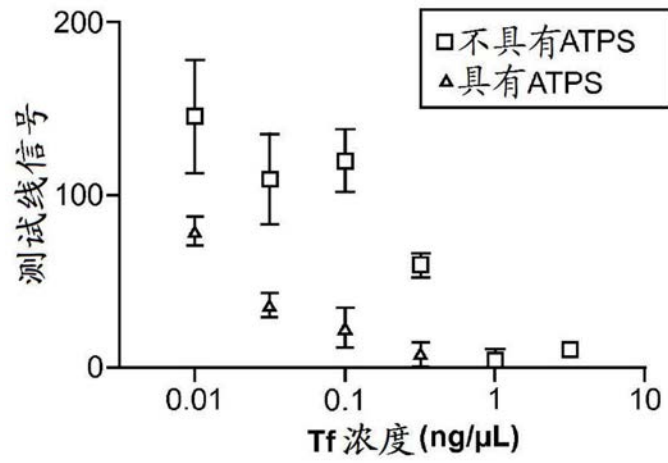
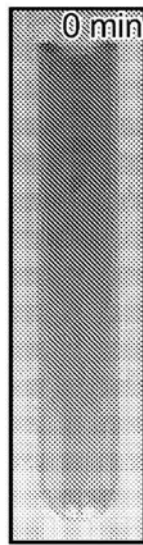


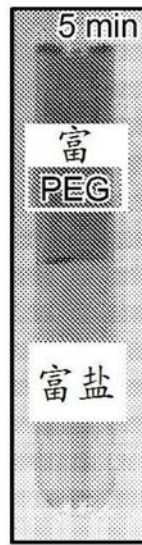
图32

1:1 ATPS



混合的

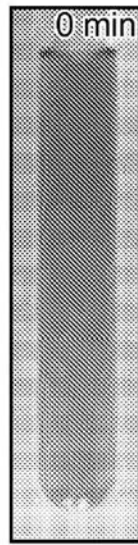
图 33A



相分离的

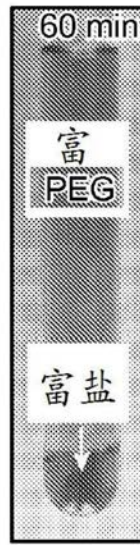
图 33B

9:1 ATPS



混合的

图 33C



相分离的

图 33D

1:1 纸膜

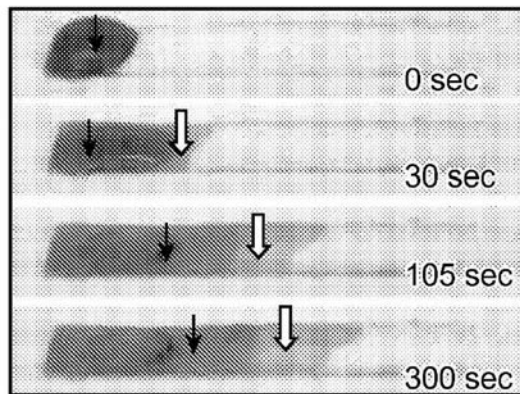


图34A

9:1 纸膜

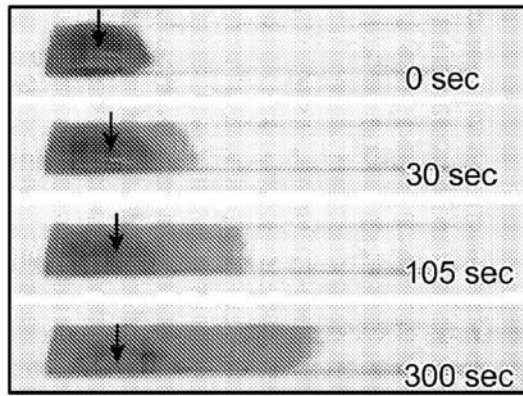


图34B

1:1 3-D 纸孔

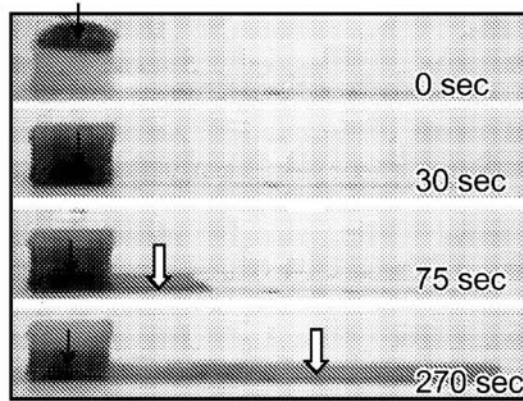


图35A

9:1 3-D 纸孔

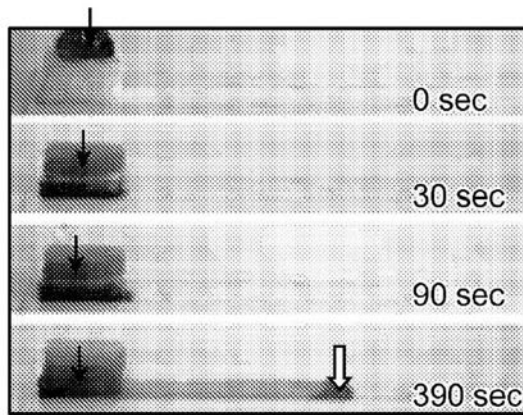


图35B

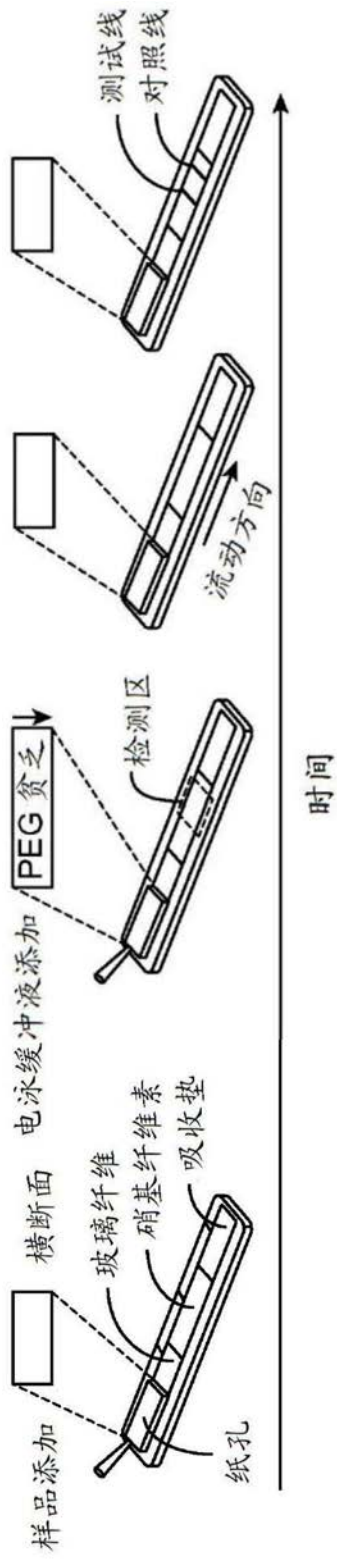


图36A

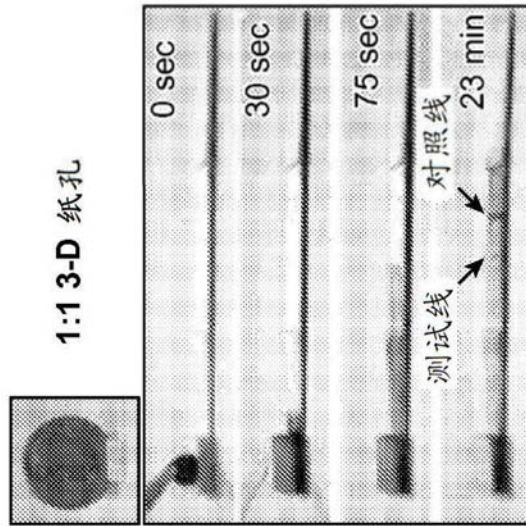


图36B

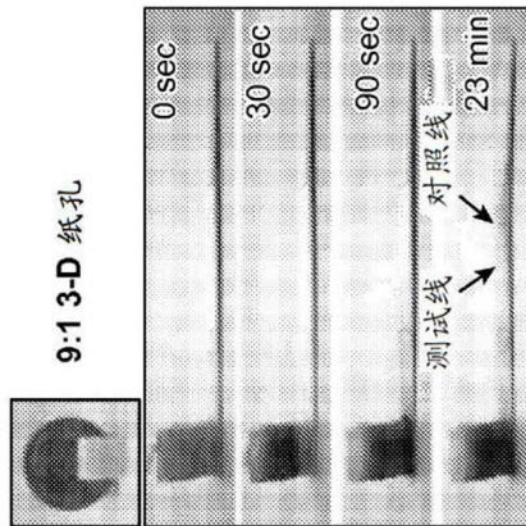


图36C

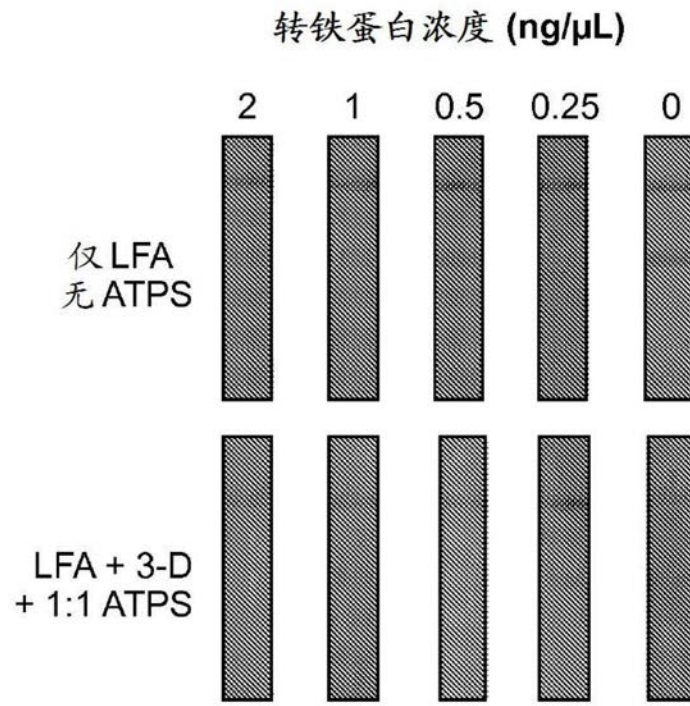


图37A

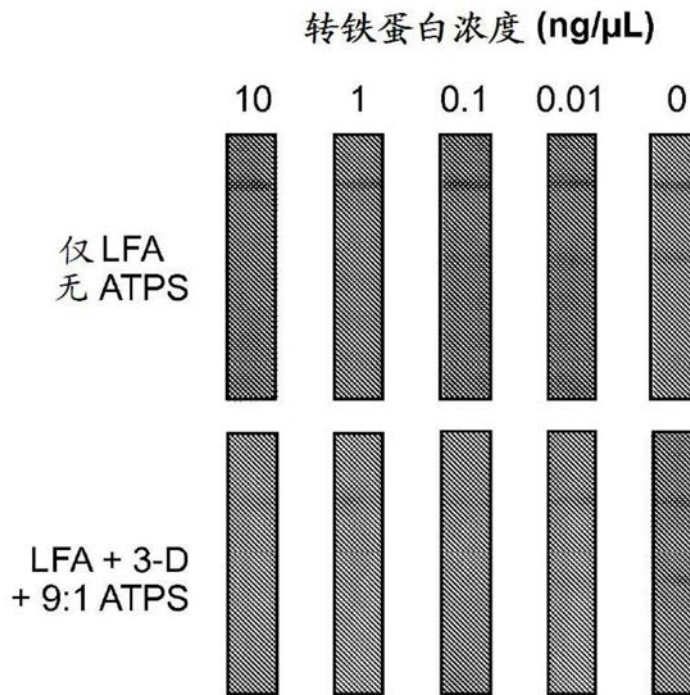


图37B

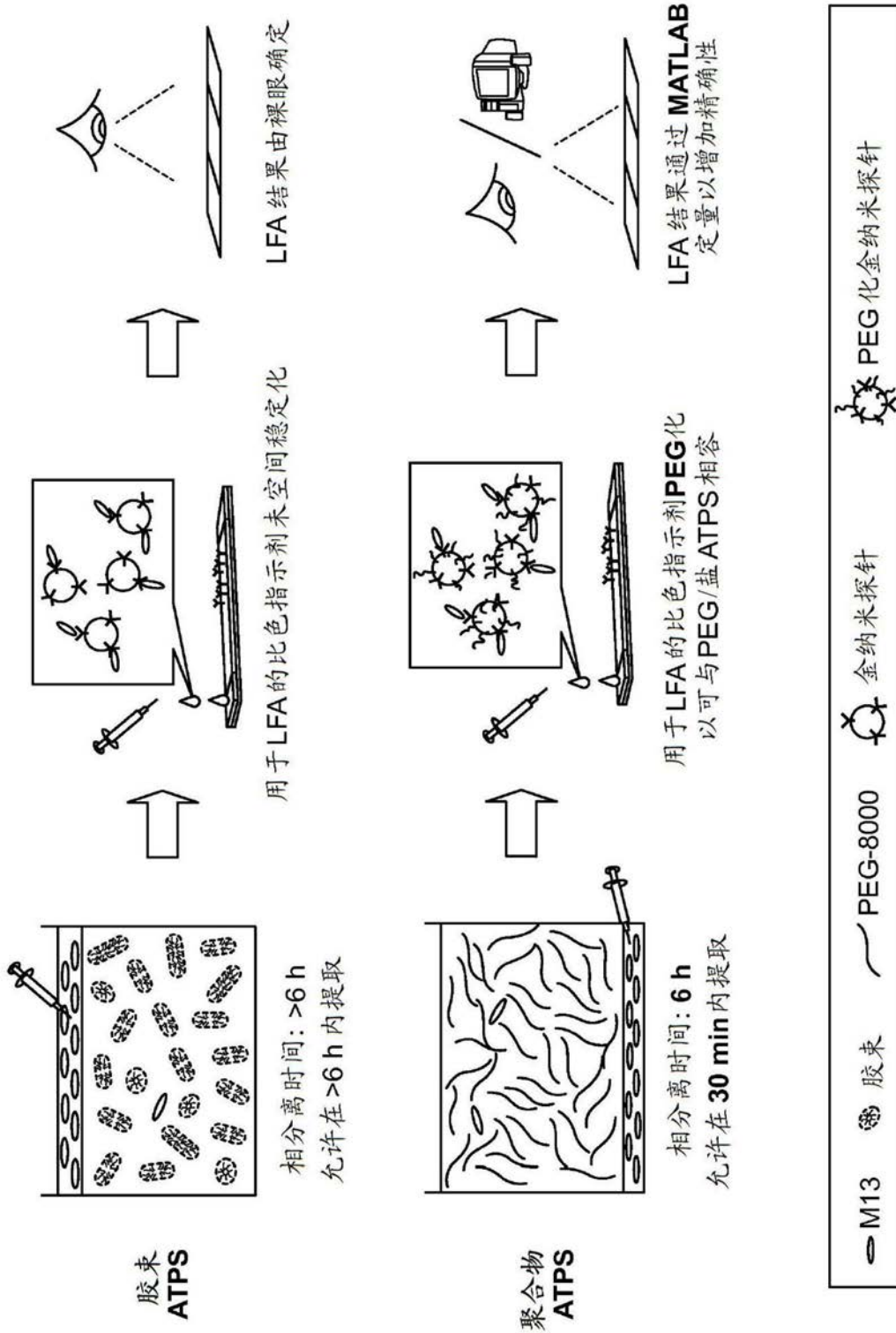


图38

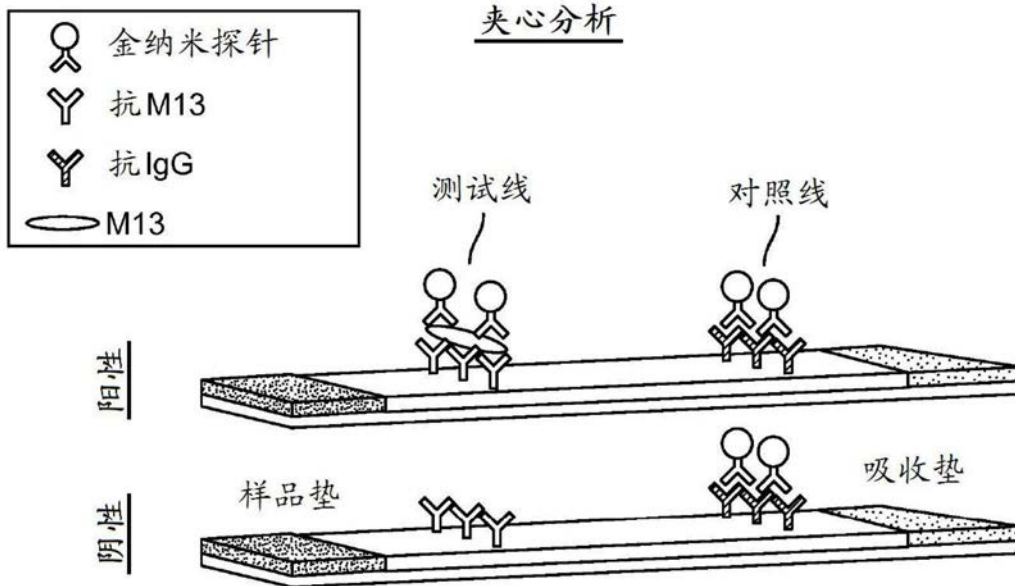


图39

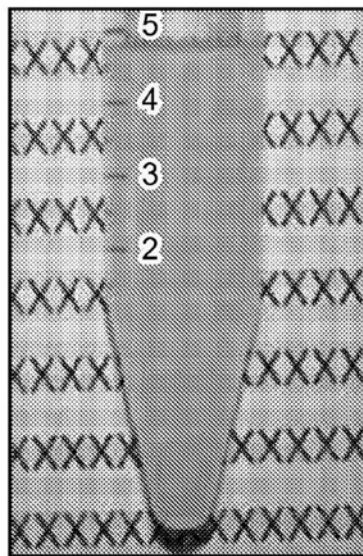


图40A

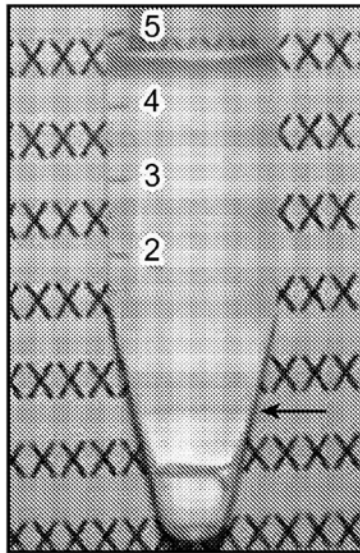


图40B

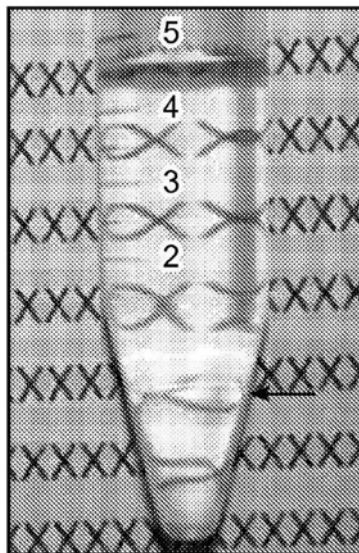


图40C

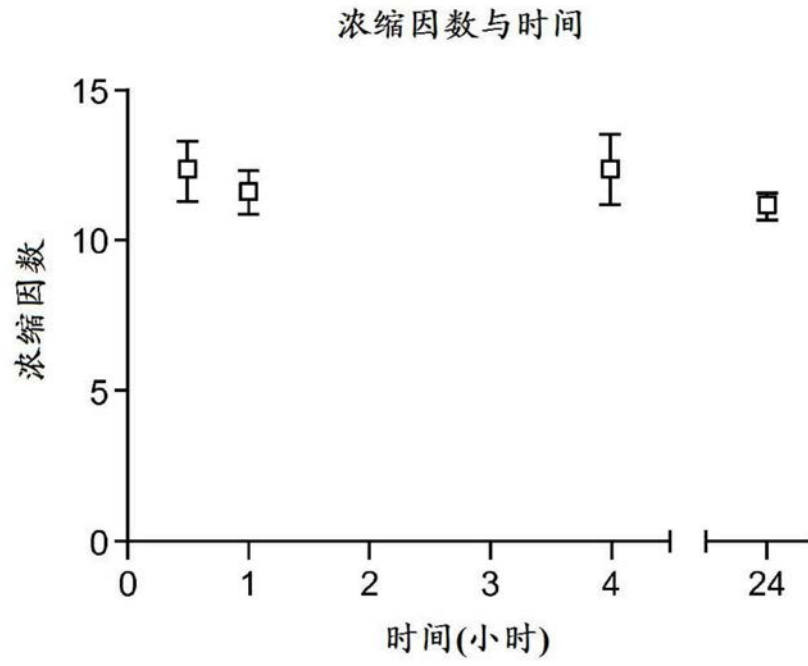


图41

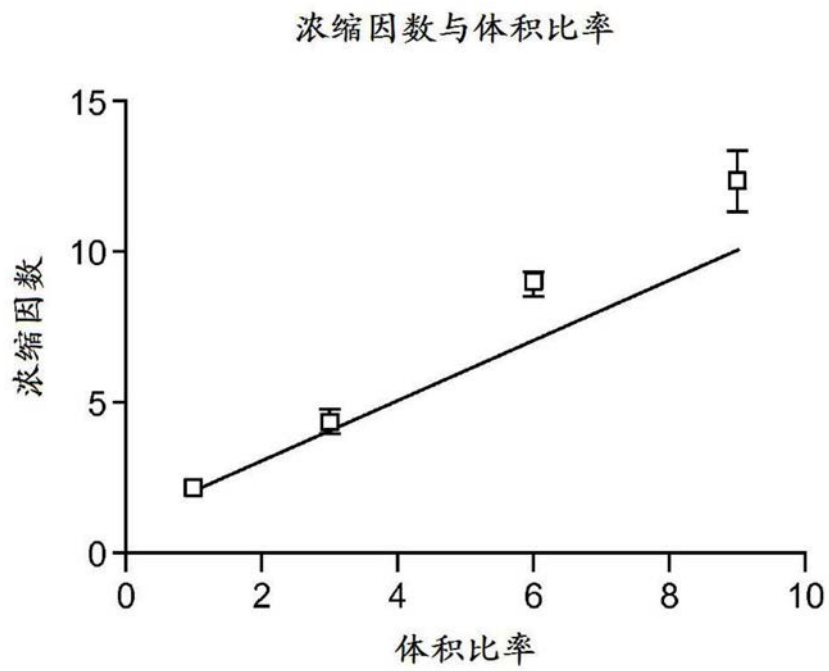


图42

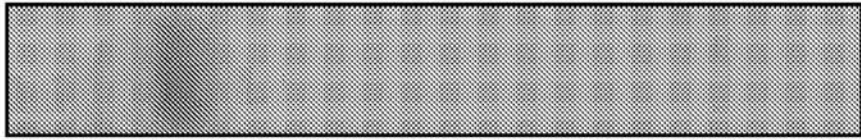


图 43A

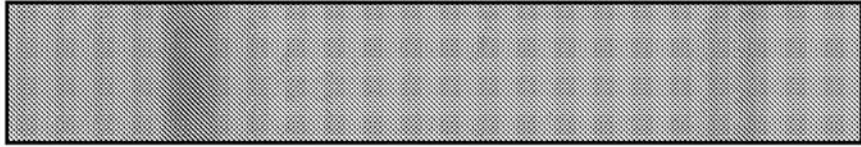


图 43B

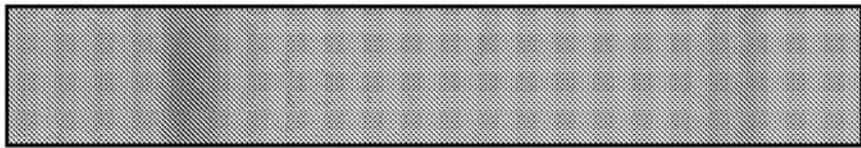


图 43C

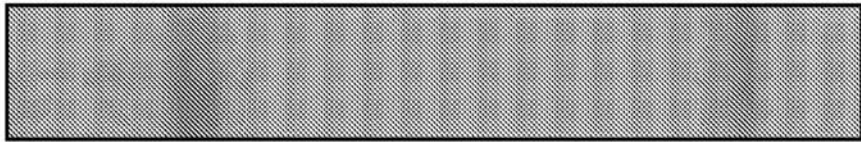


图 43D



图 43E

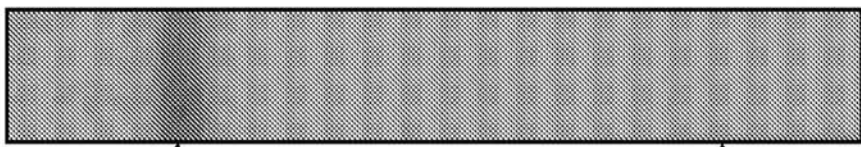


图 43F

对照线↑

测试线↑



图 44F

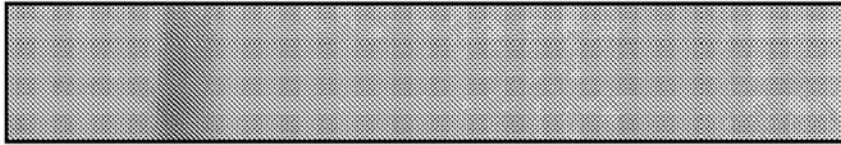


图 44E

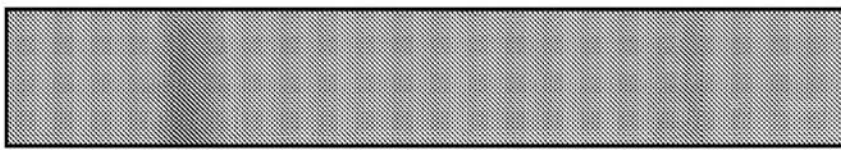


图 44D

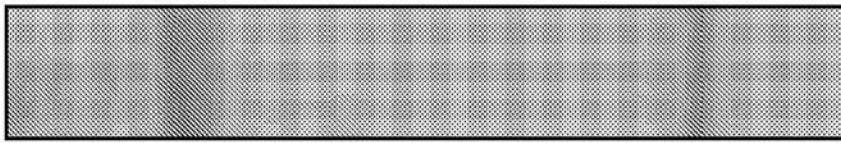


图 44C

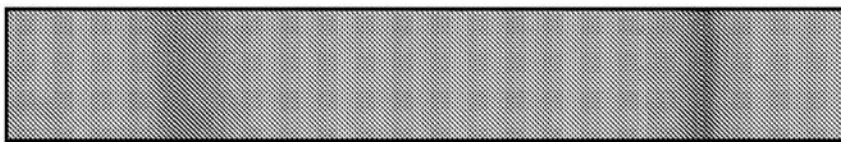


图 44B

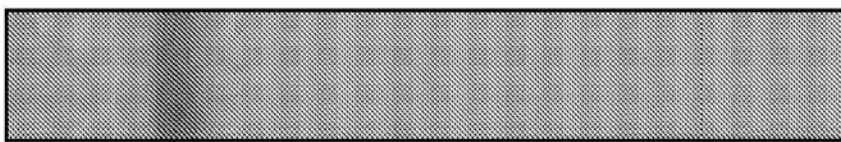


图 44A

↑  
对照线

↑  
测试线

针对 M13 的 LFA 强度

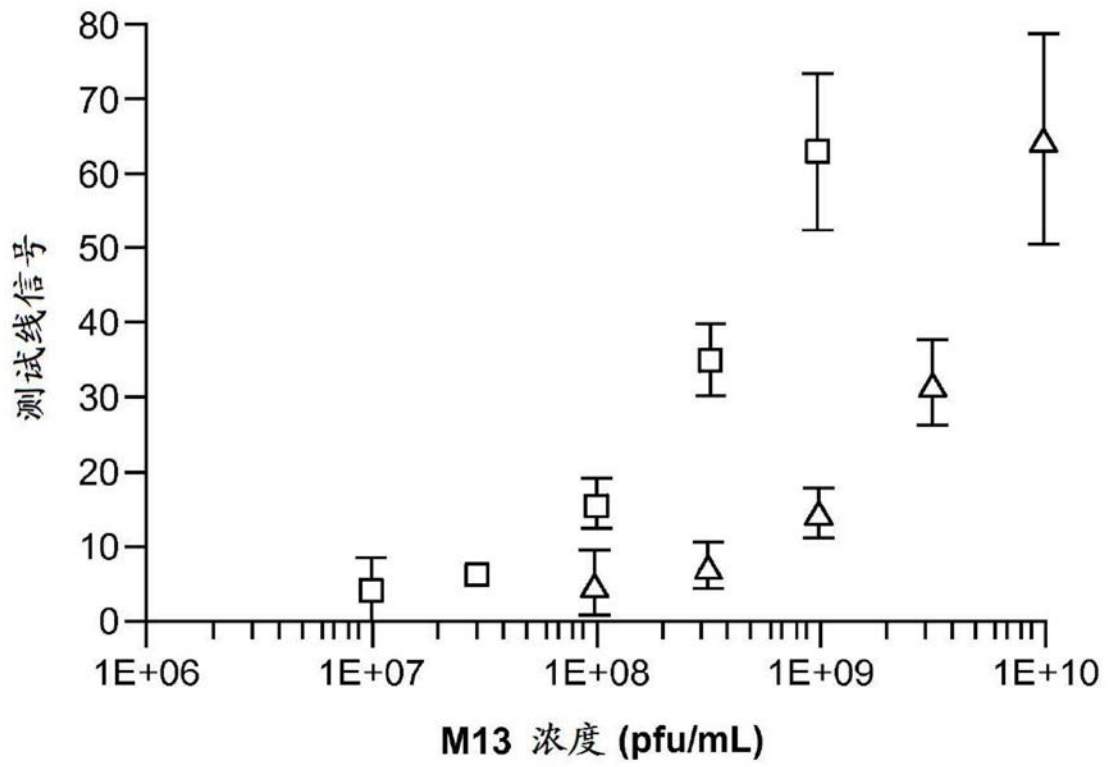


图45

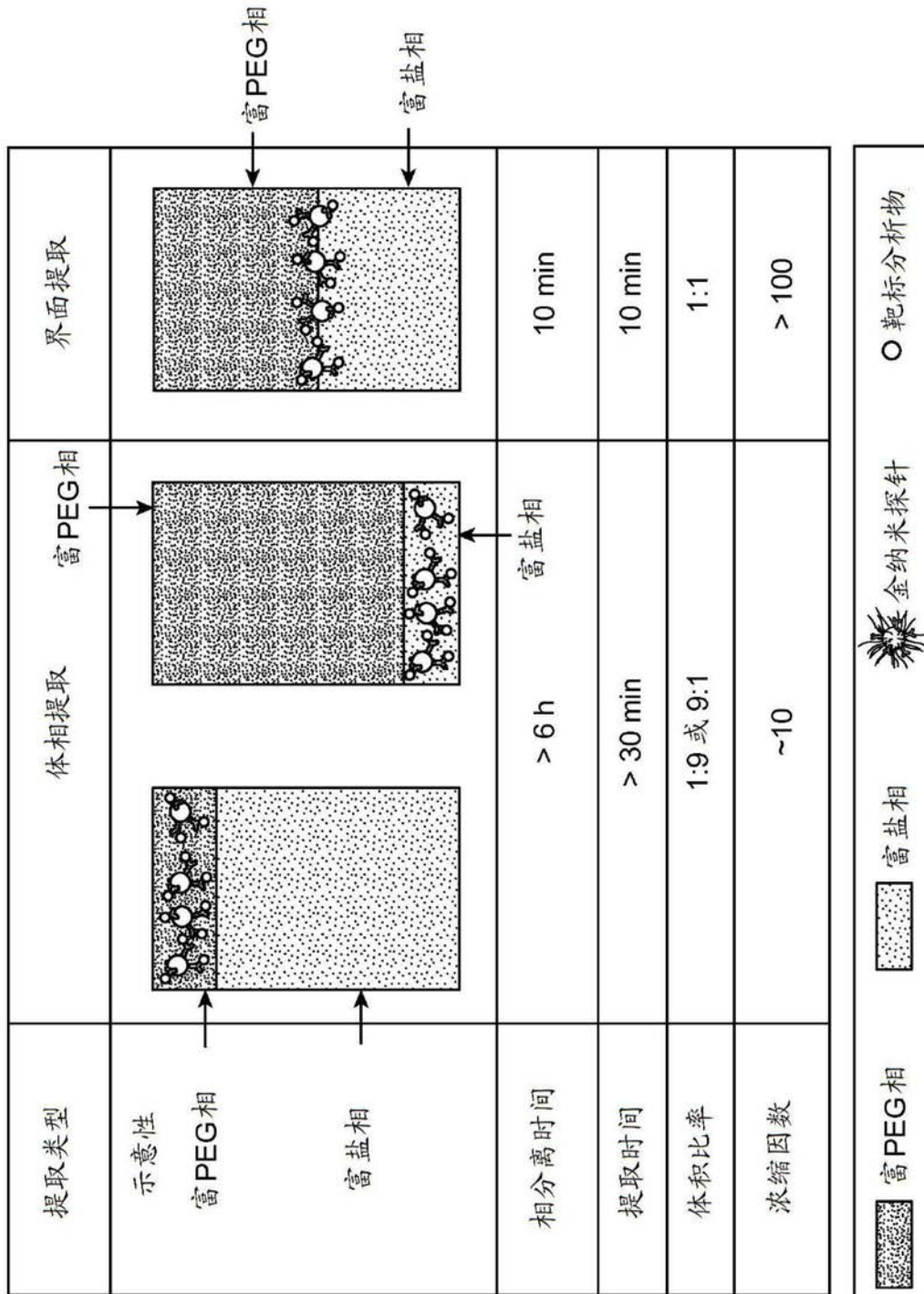


图46

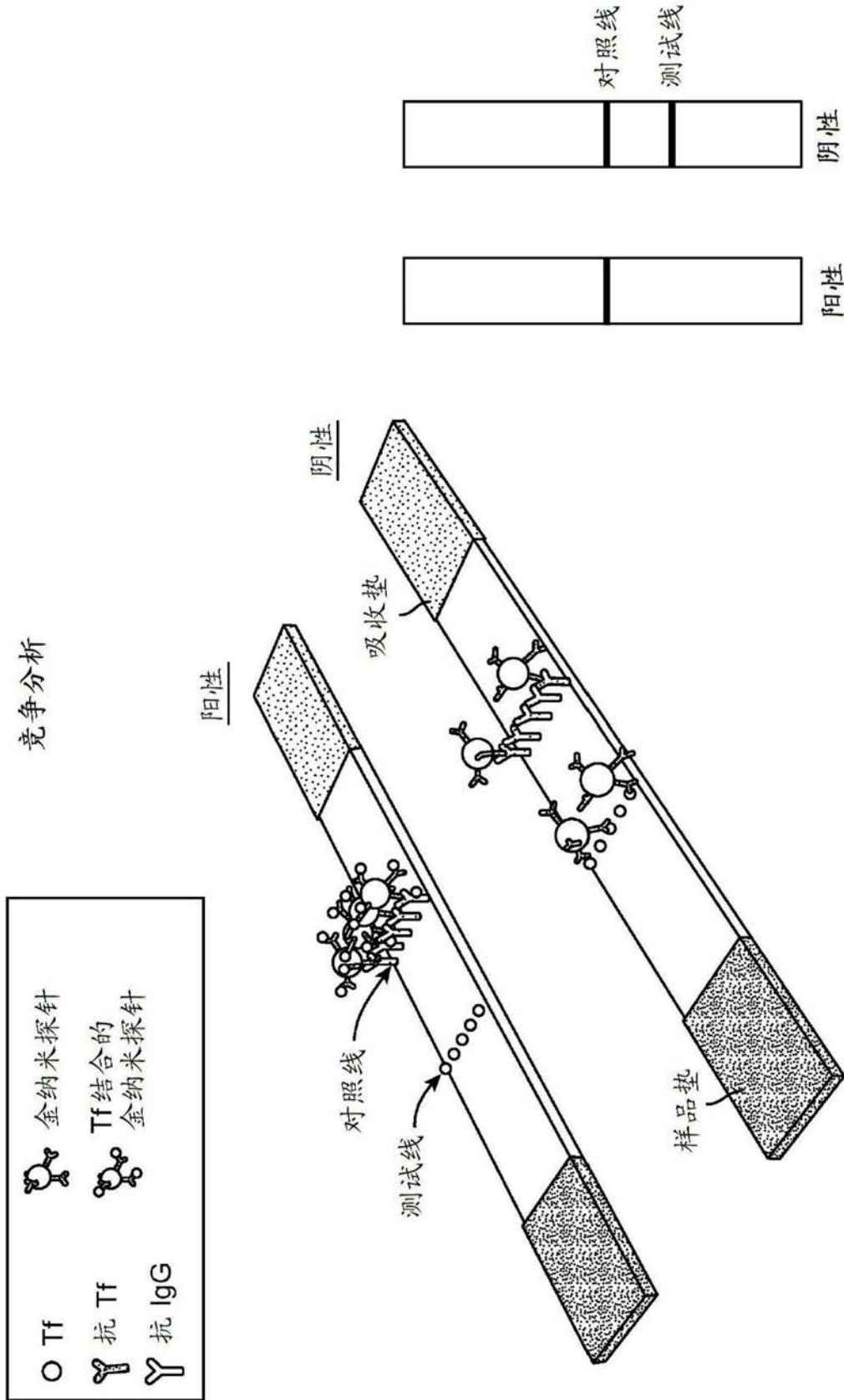
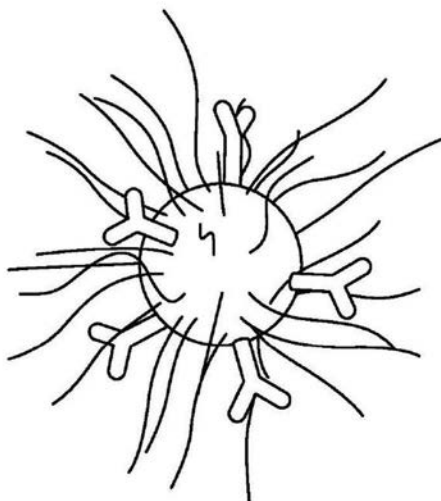


图47






 PEG	 金纳米粒子	 抗 Tf
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 防止 PEG 贫乏相的高盐环境中 GNP 的聚集</li> <li>▪ 通过增加 PEG-PEG 相互作用来增加纳米粒子的疏水性以驱动所述纳米粒子至富 PEG 相中</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 与富 PEG 相中的 PEG 的较大的排除-体积相互作用驱动所述纳米粒子至 PEG 贫乏相中</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 增加纳米粒子的亲水性以驱动所述纳米粒子至 PEG 贫乏相中</li> </ul>

图48A

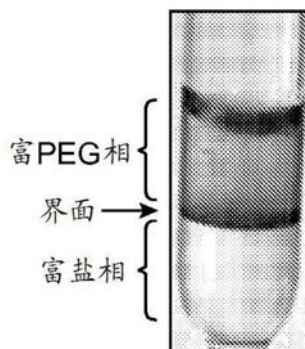


图48B

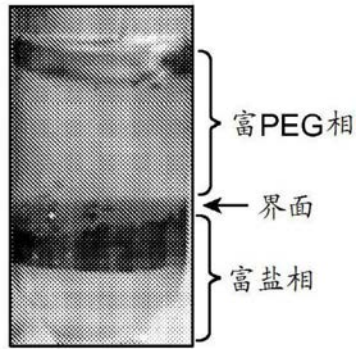


图48C

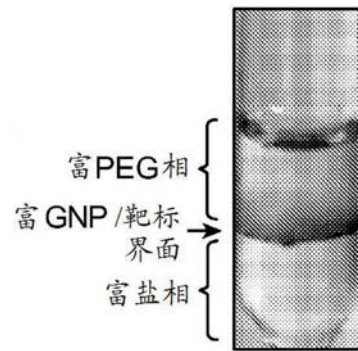


图48D


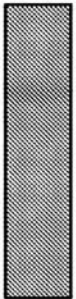







	阴性 (0 ng/μL)	1 ng/μL	0.1 ng/μL	0.01 ng/μL	0.001 ng/μL
仅 LFA (50 μL)					
ATPS 界面提取 + LFA (5000 μL)					

图49

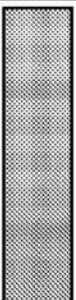








	阴性 (0 ng/μL)	1 ng/μL	0.1 ng/μL	0.01 ng/μL	0.001 ng/μL
仅 LFA (10 μL)					
ATPS 界面提取 + LFA (1000 μL)					

图50

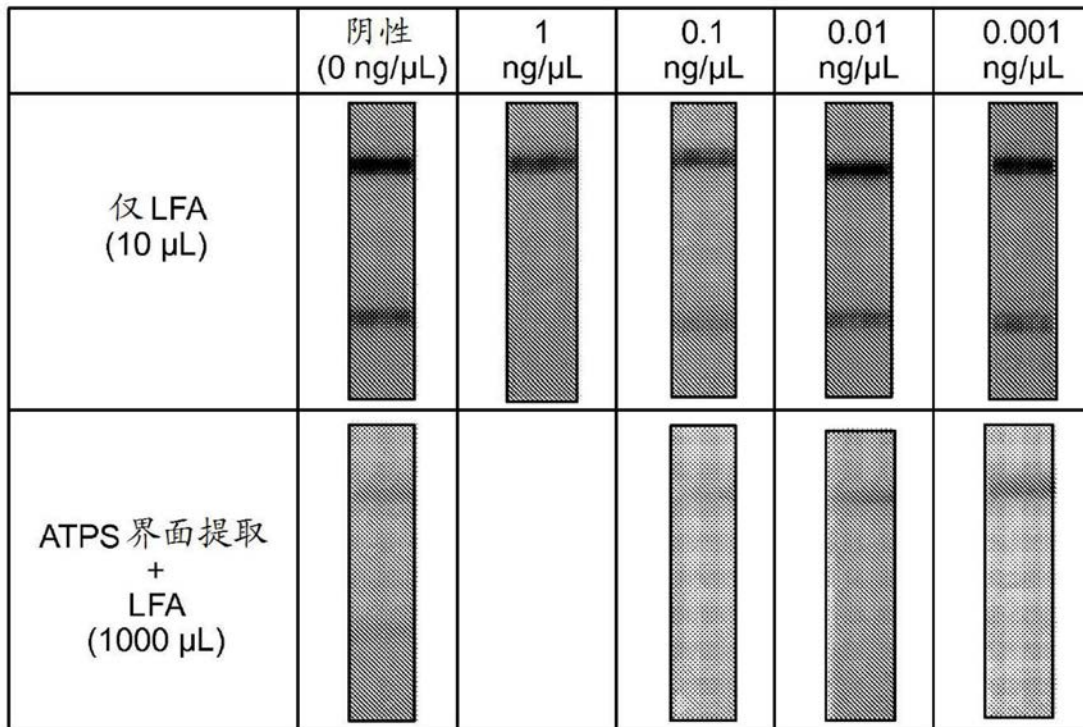


图51

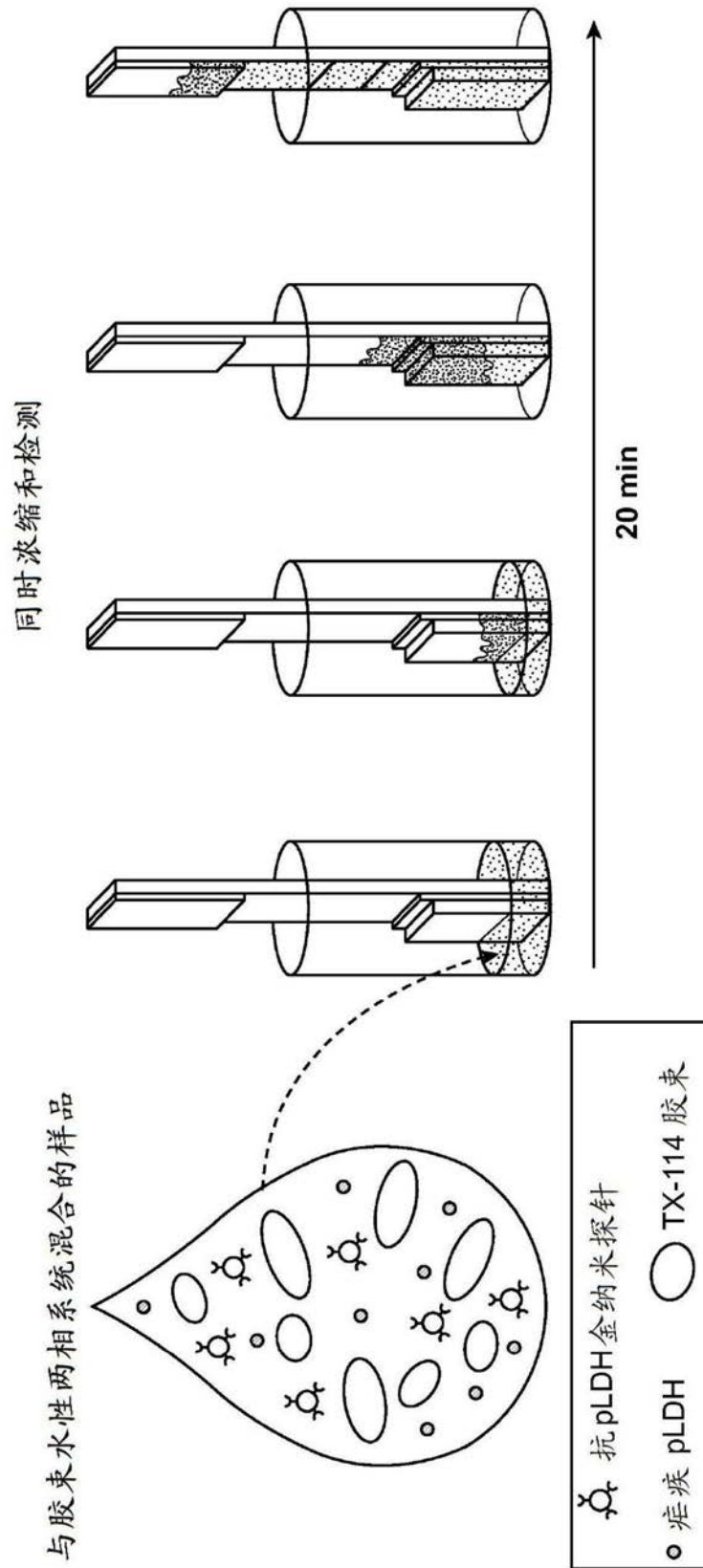


图52

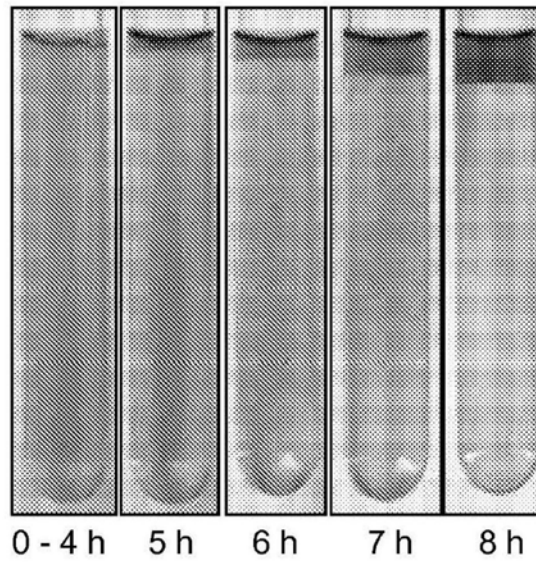


图53A

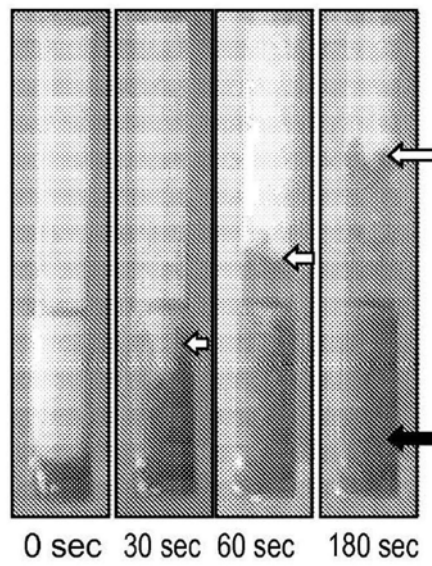


图53B

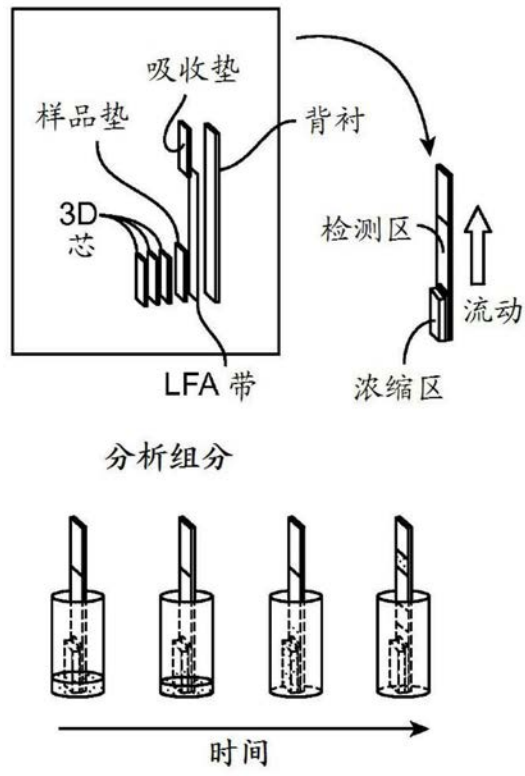


图54A

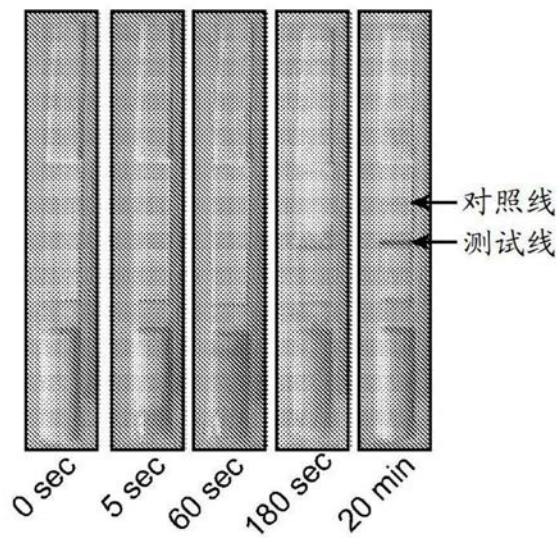


图54B

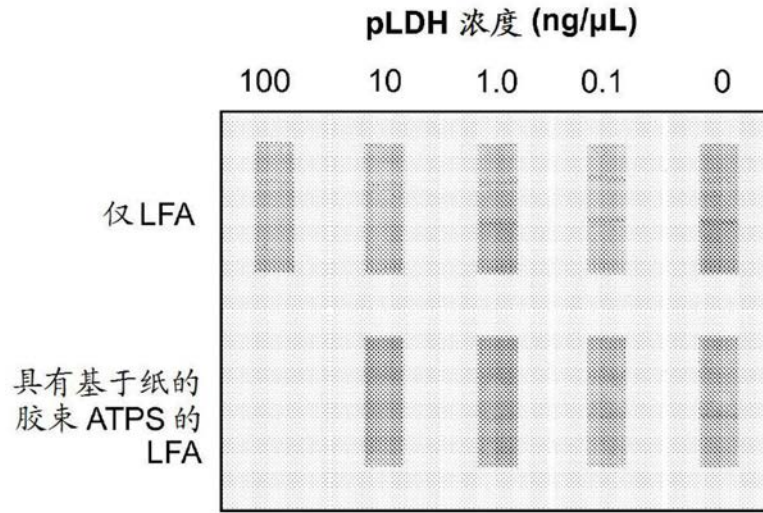


图55

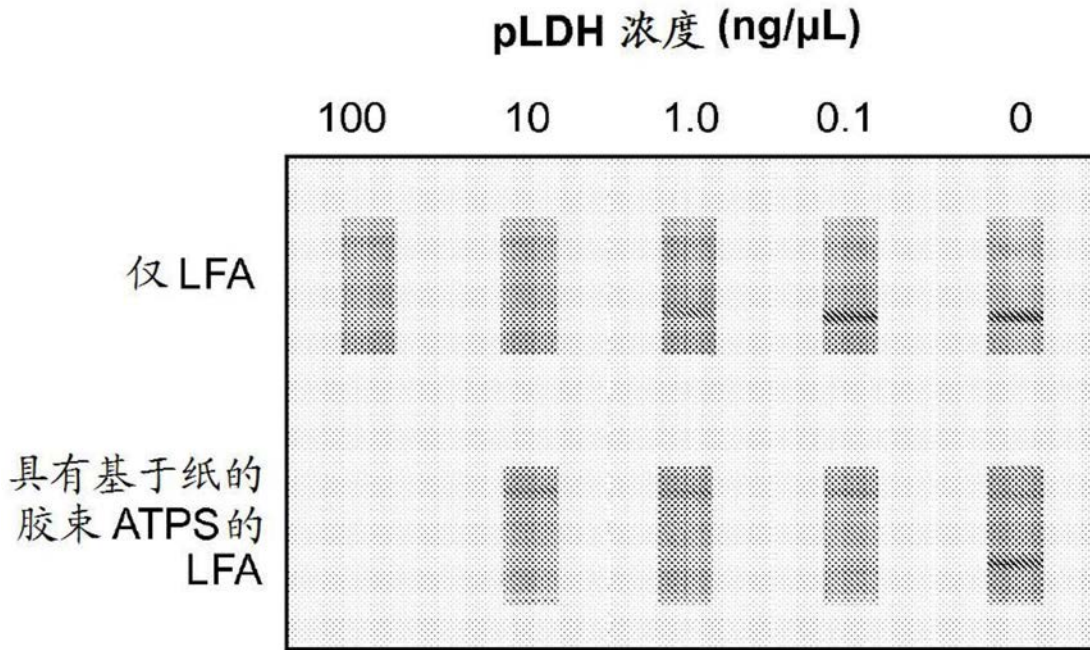


图56

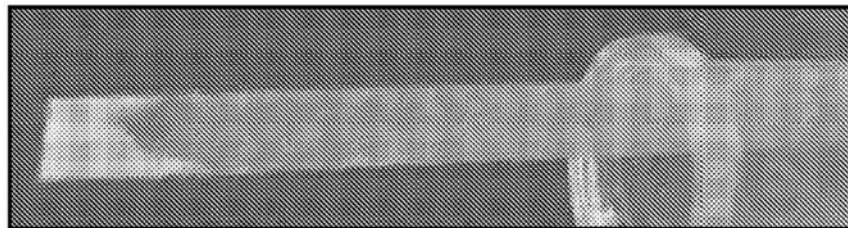


图57A

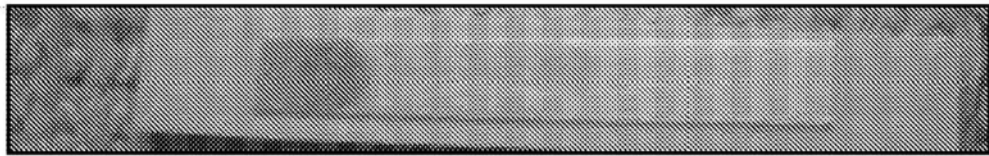


图57B

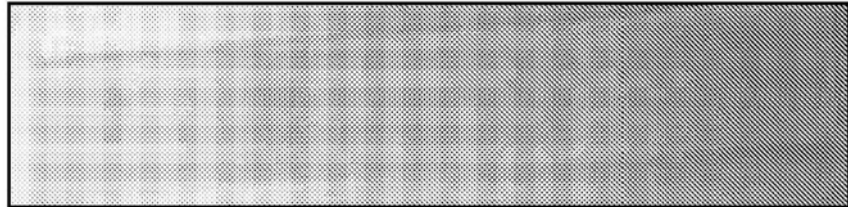


图57C



图57D

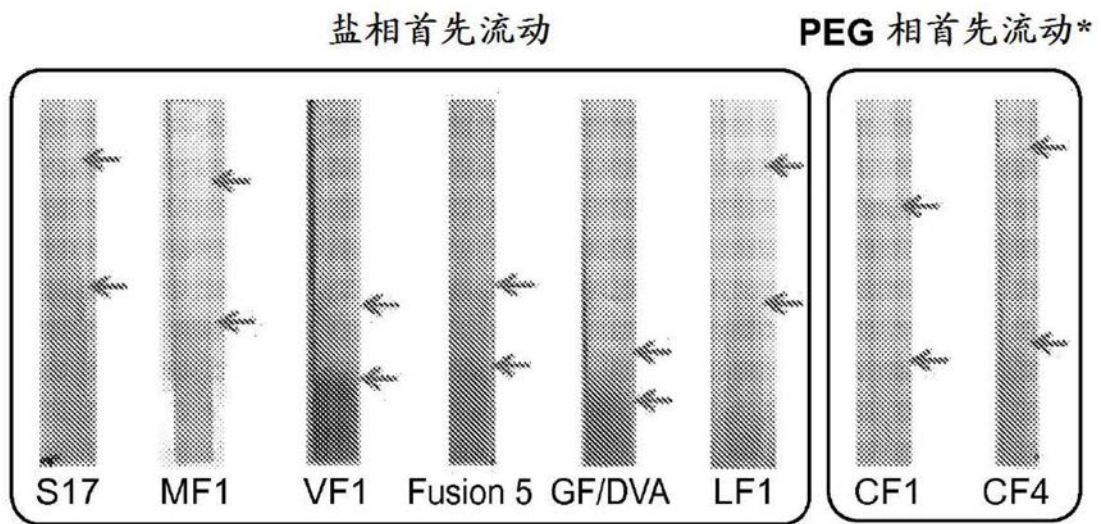


图 58A

图 58B

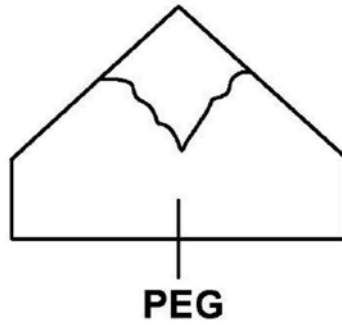


图59A

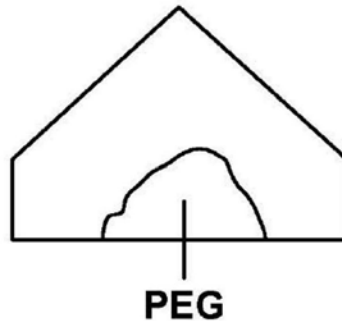


图59B

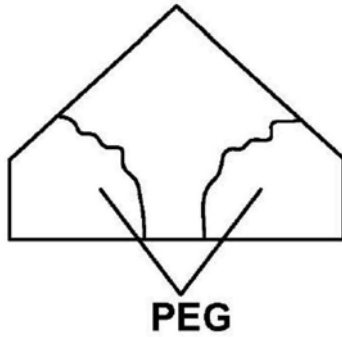


图59C

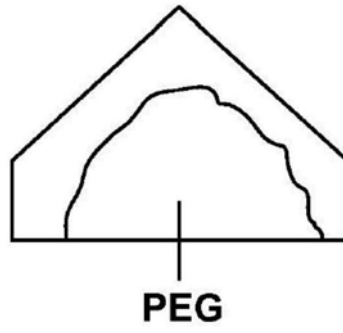


图59D

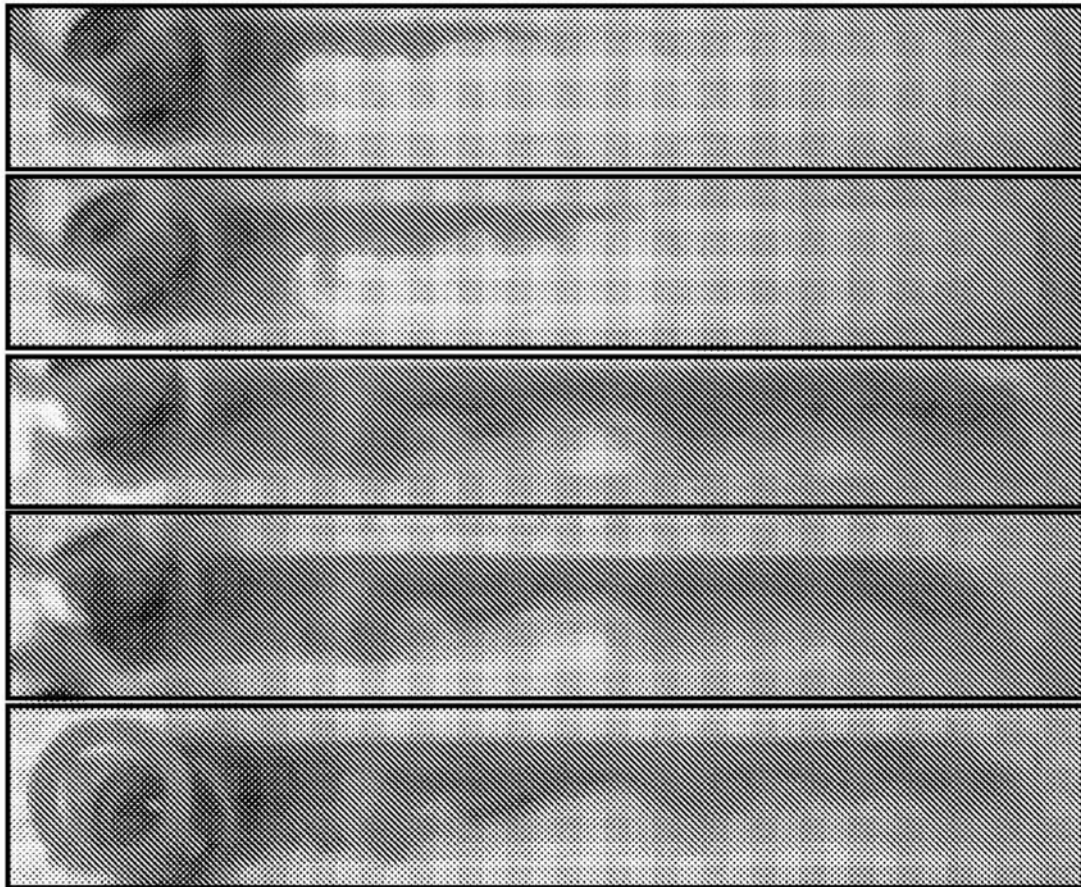


图60

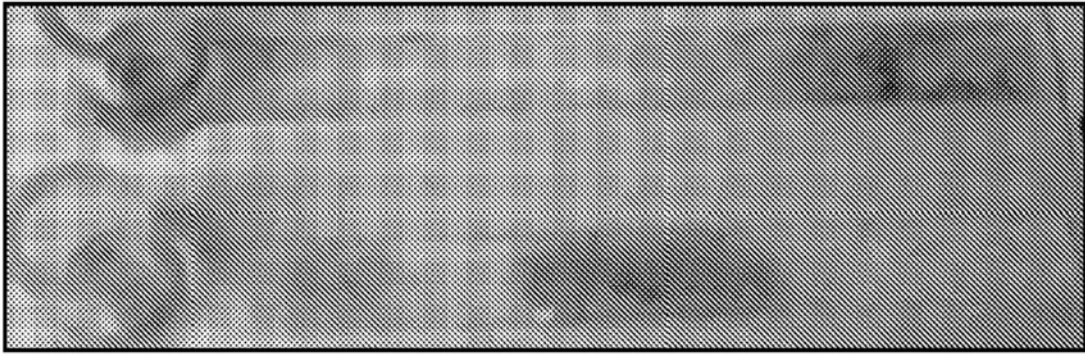


图61

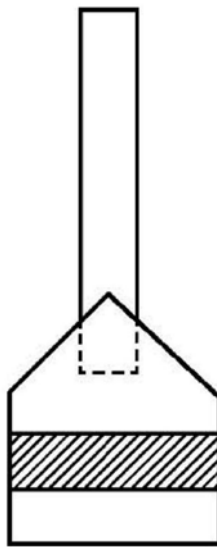


图62

不使用 ATPS



图63A

使用 ATPS

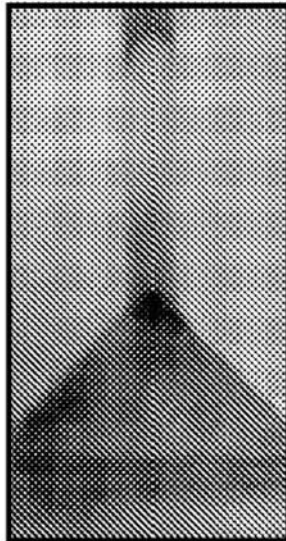


图63B

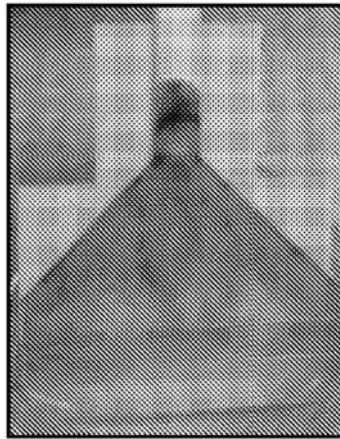


图64

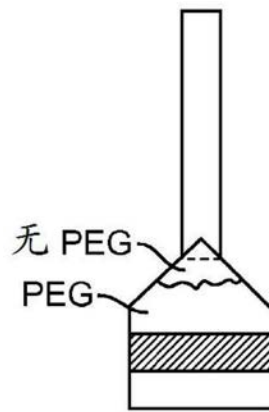


图65

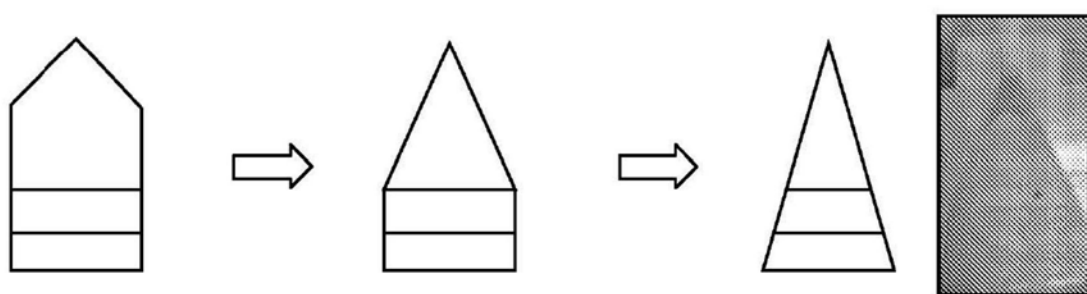


图66

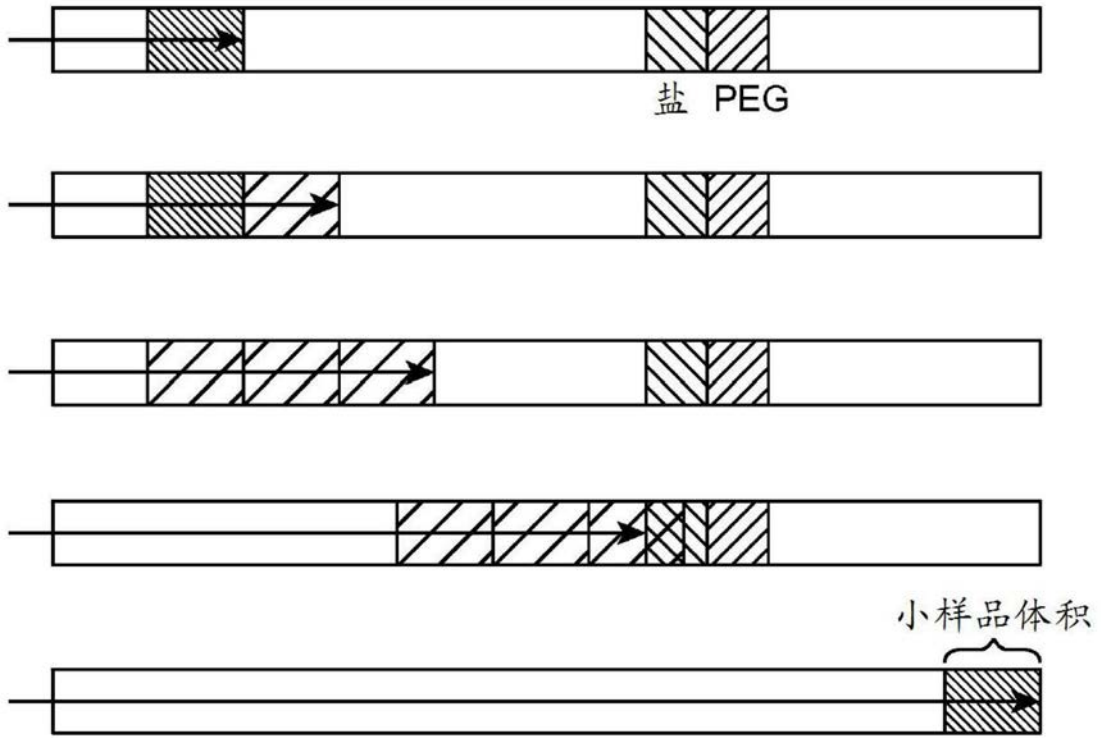


图67

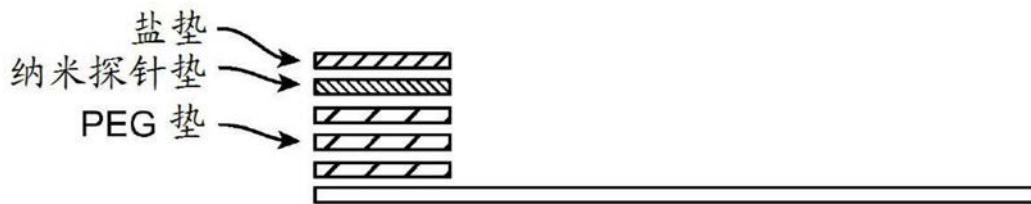


图68

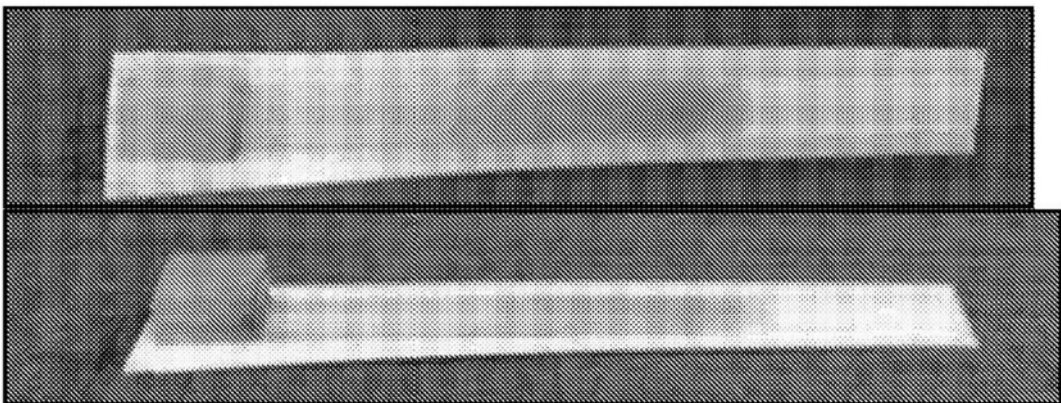


图69A

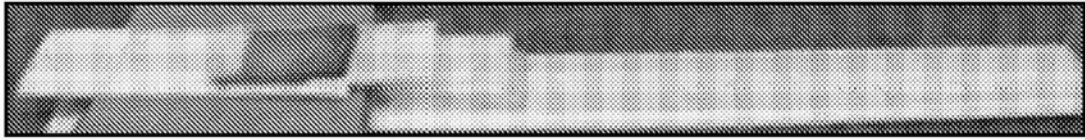


图69B

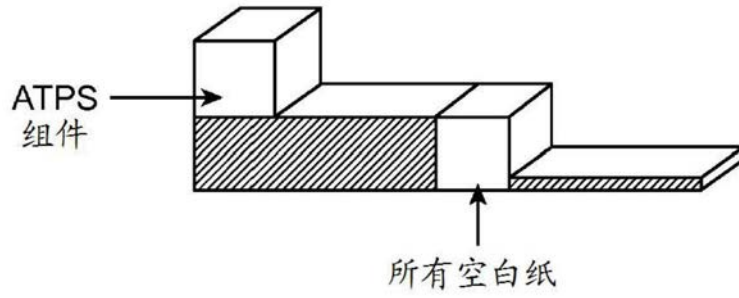


图70

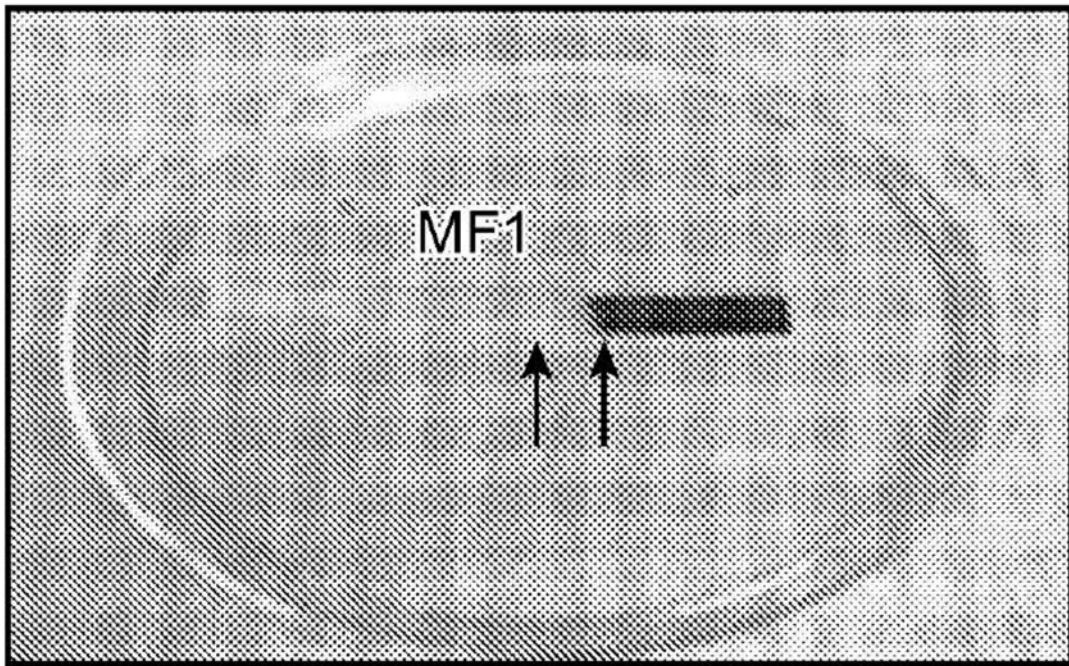


图71

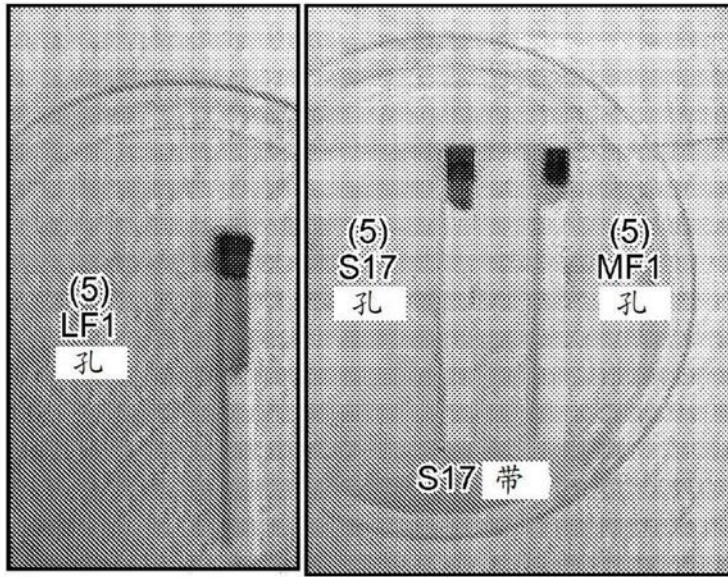
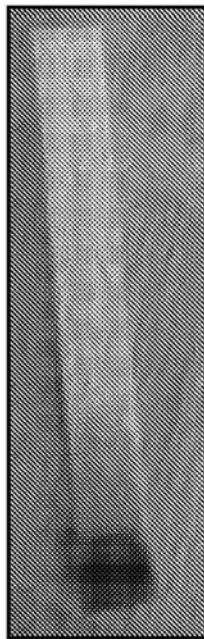
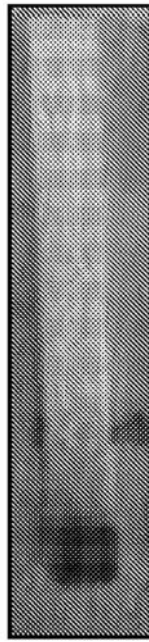


图72



3 层孔

图73A



5 层孔

图73B



图74



图75

沙眼衣原体浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )





	0	4.7	10	20
VTM 中的 LFA				

图76

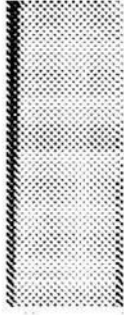
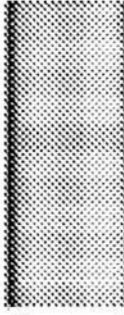



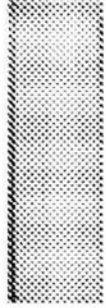
细胞/mL	$10^9$	$10^8$	$10^7$	$10^6$
无 ATPS				
ATPS				

图77






	阴性	1e8	1e7	1e6
无 ATPS				
具有 ATPS				

图78

	阴性	10 ng/ul	1 ng/ul	0.1 ng/ul
无 ATPS				
具有 ATPS				

图79

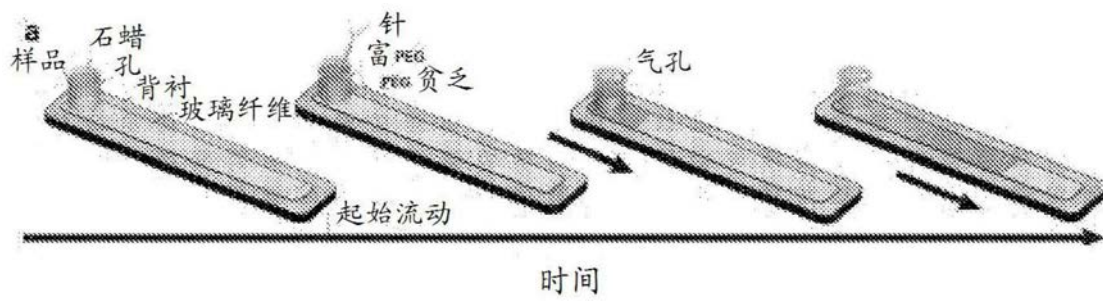


图80A

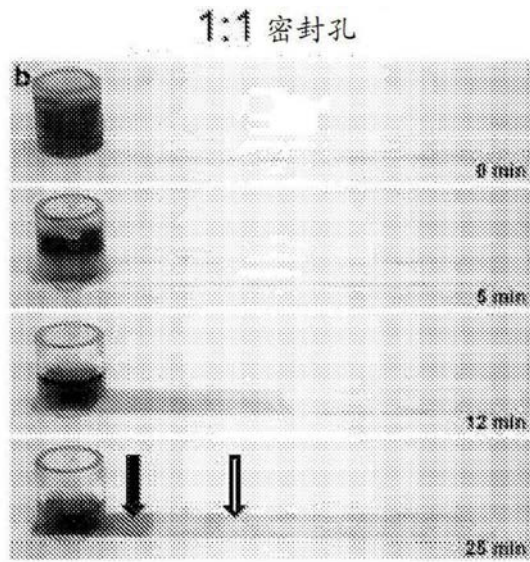


图80B

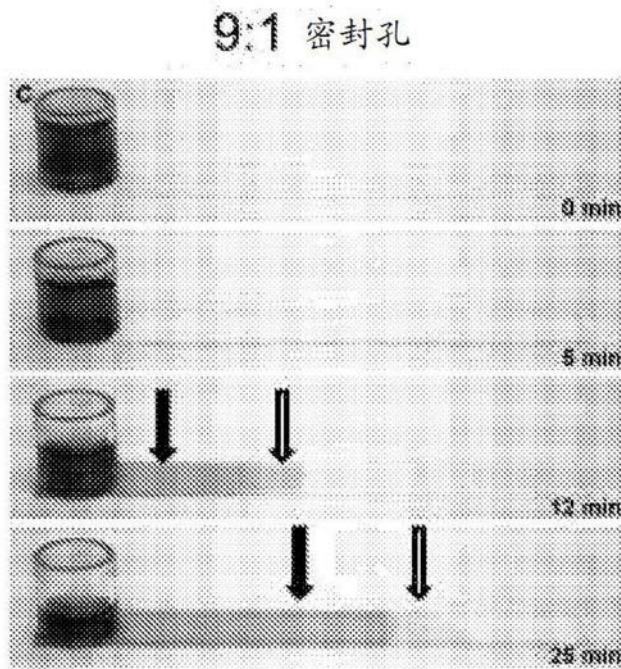


图80C

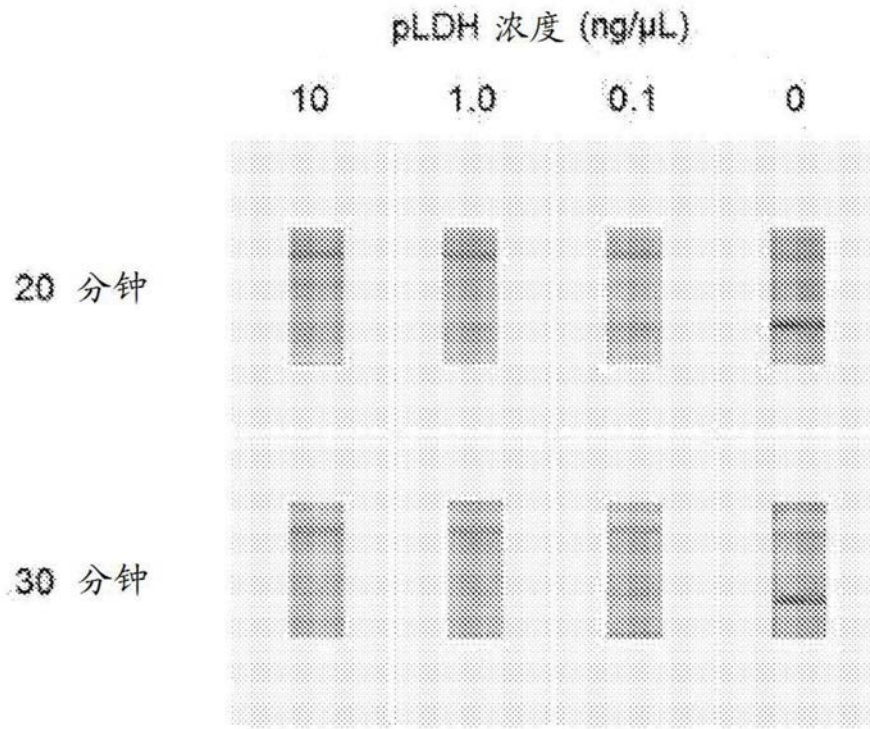


图81

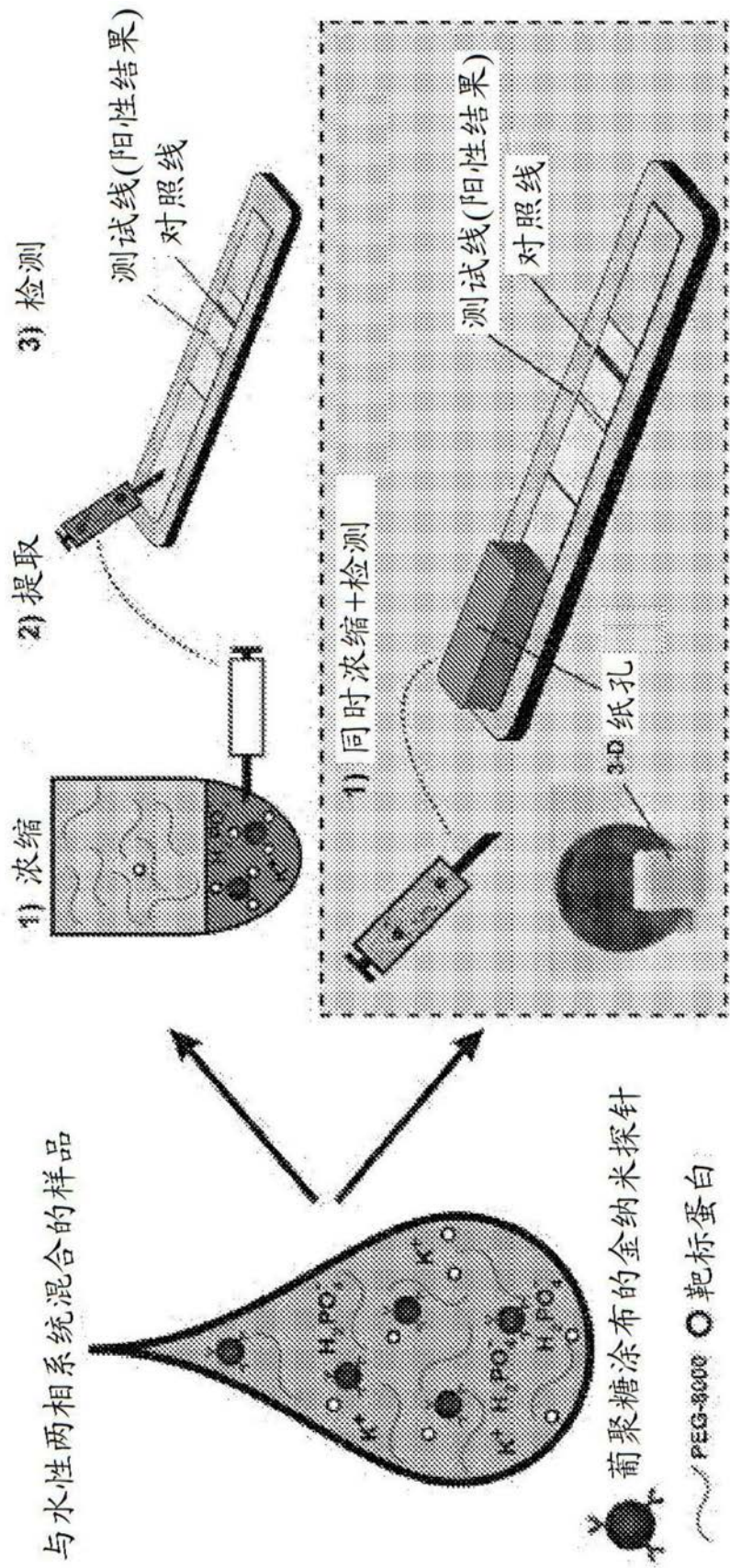


图82

专利名称(译)	用于整合分析物提取、浓缩和检测的装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN110850081A</a>	公开(公告)日	2020-02-28
申请号	CN201911106057.9	申请日	2015-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
[标]发明人	D T 卡梅 Y T 赵 B M 吴 G L 莫斯利		
发明人	D·T·卡梅 Y·T·赵 B·M·吴 G·L·莫斯利		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N33/54386 G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	张培源		
优先权	61/949887 2014-03-07 US 61/953870 2014-03-16 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本文公开用于整合分析物提取、浓缩和检测的装置和方法，其为使用水性两相系统和侧流分析来检测样品中的靶标分析物的装置和方法。这些装置和方法可用于诊断如血液或血清的生物样品中的疾病或病况。另外，这些装置和方法可用于检测食物样品或污染物(如环境毒素)、水样品中的过敏原。装置和试剂盒组件可便利地组装于便携式容器中并且可接受大多数设定中的致动。所述装置使用简单，需要未受训练的操作者简单地将样品添加至所述装置中。便利地，其检测所述靶标分析物所耗用的时间极短。因此，本文公开的装置和方法提供用于即时检验的新颖并且适用的方式。

