



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111164095 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 201880057817.9

(22)申请日 2018.08.08

(30)优先权数据

62/542,612 2017.08.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/045749 2018.08.08

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2019/032669 EN 2019.02.14

(71)申请人 奥瑞许科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 G·耶尔伍德 M·里德

(74)专利代理机构 深圳永慧知识产权代理事务所(普通合伙) 44378

代理人 黄鑫

(51)Int.Cl.

G07K 14/16(2006.01)

G07K 16/10(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

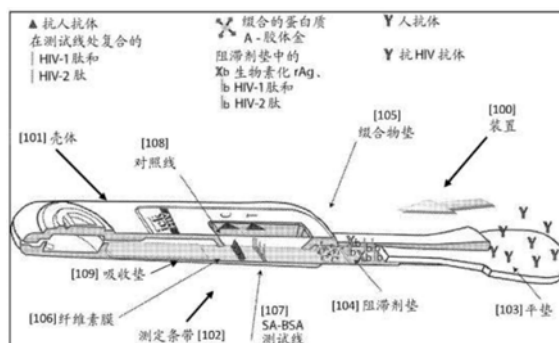
权利要求书3页 说明书15页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

用于改进分析物检测的测定方法

(57)摘要

本文公开了用于改进分析物检测的测定方法、侧向流测定测试条带和装置。分析物与靶标的结合既在液相中进行,也用固定在表面上的靶标进行,从而改进了分析物的检测。



1. 一种用于检测液体生物样品中的分析物的测定方法,所述测定方法包括:
 - a) 使怀疑含有分析物的所述液体生物样品与液相中至少一种配体-靶标缀合物接触,其中所述配体-靶标缀合物与至少一部分所述分析物结合以形成配体-靶标-分析物复合物;
 - b) 使所述生物样品中的分析物和来自步骤a)的所述复合物与受体-标记物缀合物接触,以形成分析物-受体-标记物复合物和配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物;
 - c) 在包含能够结合配体的捕获剂的表面上捕获来自步骤b)的所述标记复合物,其中所述捕获剂的一部分配体结合位点被配体-靶标缀合物占据,以在所述表面上形成配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物;以及
 - d) 检测在所述表面上捕获的所述配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物。
2. 根据权利要求1所述的测定方法,其中所述分析物是抗体并且所述靶标是抗原。
3. 根据权利要求2所述的测定方法,其中所述分析物是选自抗HIV-1和抗HIV-2的抗HIV抗体,并且所述抗原选自由HIV-1肽、HIV-2肽、rAg及其混合物组成的组。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的测定方法,其中所述配体是生物素。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的测定方法,其中所述液体生物样品选自由口腔液、全血和血浆组成的组。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的测定方法,其中所述受体是蛋白质A。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的测定方法,其中所述标记物是胶体金。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的测定方法,其中所述捕获试剂是链霉亲和素。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的测定方法,其中所述配体-靶标缀合物选自由生物素化HIV-1肽、生物素化HIV-2肽、生物素化rAg肽或其混合物组成的组。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的测定方法,其中所述测定方法在侧向流测定条带上进行,还包括使所述侧向流测定条带与显影剂溶液接触的步骤,其中,在接触之后,所述显影剂溶液移动穿过所述侧向流测定条带。
11. 根据权利要求10所述的测定方法,其中将所述液体生物样品添加到所述显影剂溶液中。
12. 根据权利要求10所述的测定方法,其中将所述液体生物样品添加到所述侧向流测定条带的样品接收部分。
13. 根据权利要求10所述的测定方法,其中将所述靶标-配体缀合物添加到所述显影剂溶液中。
14. 根据权利要求10所述的测定方法,其中将所述靶标-配体缀合物从所述样品接收区下游的所述侧向流测定条带的一部分洗脱下来以与所述分析物结合。
15. 一种用于从液体生物样品中检测分析物的侧向流测定条带,所述侧向流测定条带包括:
 - 样品接收区;
 - 所述样品接收区下游的阻滞剂区,其任选地含有配体-靶标缀合物;
 - 所述阻滞剂区下游的缀合物区,其含有标记物-受体缀合物;
 - 所述缀合物区下游的测试区段,其包含能够结合配体的固定的捕获剂,其中一部分所述配体结合位点被配体-靶标缀合物占据;

任选地,所述测试区段下游的所述侧向流测定条带上的对照区段,其指示测定完成;和任选地,吸收垫,其与所述侧向流测定条带流体连通并且位于所述对照区段下游。

16. 根据权利要求15所述的侧向流测定条带,其中所述分析物是抗体并且所述靶标是抗原。

17. 根据权利要求16所述的侧向流测定条带,其中所述分析物是选自抗HIV-1和抗HIV-2的抗HIV抗体,并且所述抗原选自由HIV-1肽、HIV-2肽、rAg及其混合物组成的组。

18. 根据权利要求15-17中任一项所述的侧向流测定条带,其中所述配体是生物素。

19. 根据权利要求15-18中任一项所述的侧向流测定条带,其中所述液体生物样品选自由口腔液、全血和血浆组成的组。

20. 根据权利要求15-19中任一项所述的侧向流测定条带,其中所述受体是蛋白质A。

21. 根据权利要求15-20中任一项所述的侧向流测定条带,其中所述标记物是胶体金。

22. 根据权利要求15-21中任一项所述的侧向流测定条带,其中所述捕获试剂是链霉亲和素。

23. 根据权利要求15-22中任一项所述的侧向流测定条带,其中所述对照区段包含抗人抗体。

24. 根据权利要求15-23中任一项所述的侧向流测定条带,其中所述配体-靶标缀合物选自由生物素化HIV-1肽、生物素化HIV-2肽、生物素化rAg肽或其混合物组成的组。

25. 一种试剂盒,所述试剂盒包括:

a) 用于从液体生物样品中检测分析物的侧向流测定条带,所述侧向流测定条带包括:样品接收区;

所述样品接收区下游的阻滞剂区,其任选地含有配体-靶标缀合物;

所述阻滞剂区下游的缀合物区,其含有标记物-受体缀合物;

所述缀合物区下游的测试区段,其包含能够结合配体的固定的捕获剂,其中一部分所述配体结合位点被配体-靶标缀合物占据,

任选地,所述测试区段下游的所述侧向流测定条带上的对照区段,其指示测定完成;和任选地,吸收垫,其与所述侧向流测定条带流体连通并且位于所述对照区段下游;以及b) 显影剂溶液。

26. 根据权利要求1所述的方法,其中所述分析物选自由以下组成的组:HIV抗体,HPV抗体,HCV抗体,埃博拉抗体,登革热抗体,寨卡抗体,幽门螺杆菌抗体,肝炎抗体,麻疹抗体,肝炎抗原,密螺旋体抗体,宿主或感染因子抗体,包括但不限于心磷脂、卵磷脂、胆固醇、脂多糖和唾液酸的病理学细胞标志物,腮腺炎抗体,风疹抗体,可铁宁,可卡因,苯甲酰芽子碱,苯并二氮杂革,四氢大麻酚,尼古丁,乙醇茶碱,苯妥英,对乙酰氨基酚,锂,地西洋,去甲替林,司可巴比妥,苯巴比妥,茶碱,睾酮,雌二醇,17-羟孕酮,孕酮,甲状腺素,促甲状腺激素,促卵泡激素,促黄体激素,转化生长因子 α ,表皮生长因子,胰岛素样生长因子I和II、生长激素释放抑制因子,IGA,性激素结合球蛋白,葡萄糖,胆固醇,咖啡因,皮质类固醇结合球蛋白,PSA,DHEA结合糖蛋白及其组合。

27. 根据权利要求15所述的侧向流测定条带,其中所述分析物选自由以下组成的组:HIV抗体,HPV抗体,HCV抗体,埃博拉抗体,登革热抗体,寨卡抗体,幽门螺杆菌抗体,肝炎抗体,麻疹抗体,肝炎抗原,密螺旋体抗体,宿主或感染因子抗体,包括但不限于心磷脂、卵磷

脂、胆固醇、脂多糖和唾液酸的病理学细胞标志物,腮腺炎抗体,风疹抗体,可铁宁,可卡因,苯甲酰芽子碱,苯并二氮杂~~草~~,四氢大麻酚,尼古丁,乙醇茶碱,苯妥英,对乙酰氨基酚,锂,地西洋,去甲替林,司可巴比妥,苯巴比妥,茶碱,睾酮,雌二醇,17-羟孕酮,孕酮,甲状腺素,促甲状腺激素,促卵泡激素,促黄体激素,转化生长因子 α ,表皮生长因子,胰岛素样生长因子I和II,生长激素释放抑制因子,IGA,性激素结合球蛋白,葡萄糖,胆固醇,咖啡因,皮质类固醇结合球蛋白,PSA,DHEA结合糖蛋白及其组合。

用于改进分析物检测的测定方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年8月8日提交的美国申请62/542,612的优先权;该申请的公开内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于改进分析物检测的测定方法、侧向流测定条带和装置。

背景技术

[0004] 免疫测定用于根据产生的抗体试剂的特异性和选择性对生物学上感兴趣的分子进行定量。对于即时检验(point-of-care testing),免疫测定通常以侧向流测定形式使用。参见,例如,美国专利号7,192,555和美国专利号6,303,081。固相侧向流装置并入了固体支撑条带,固体支撑条带结合分析物-靶标对的成员。常常将多孔材料如尼龙、硝酸纤维素、醋酸纤维素、玻璃纤维、纸和其它多孔聚合物用作固体支撑条带。可能含有目标分析物的样品在整个测定中沿固体支撑物流动。可以利用几种程序,包括使分析物或其衍生物结合到固定的靶标上并且检测分析物或其衍生物的存在,或者分析物或其衍生物可以反应形成产物,然后对产物进行检测。

[0005] 先前的侧向流测定条带已用于通过在测试线上的定向靶分子捕获样品中的分析物来检测各种分析物。例如,在一条HIV-1/2侧向流测定条带中,通过使链霉亲和素(SA)与锚蛋白如牛血清白蛋白(BSA)缀合,并用缀合物在硝酸纤维素的测试线位置划条纹来制备测试线。参见例如,美国专利号8,062,908、美国专利号7,192,555、美国专利号6,303,081、美国专利号7,541,194和OraQuickADVANCE[®]快速HIV-1/2抗体测试包插页。SA-BSA缀合物允许生物素化肽在测试线上的高活性和稳定呈递。在该侧向流测定条带中,预先负载了链霉亲和素的生物素结合位点,使得HIV-1和HIV-2肽已经位于SA的位点上,并在阳性患者样品在线上流动时捕获阳性患者样品中的抗HIV抗体。由于样本会沿条带向上迁移并遇到测试线,因此如果样本含有与固定在测试线处硝酸纤维素膜上的合成肽抗原反应的抗体,则会出现可见信号,从而定性指示样本中存在HIV-1和/或HIV-2抗体。参见上文。

[0006] 在典型的侧向流测定装置中,仅当含有分析物的液体试样迁移通过测试区段并在固/液界面处与其靶标结合时,才会在测试区段发生对分析物的特异性捕获。可以通过增加结合步骤来改进此类装置,在结合步骤中,分析物与溶液中的其靶标结合,这是本发明的主题。

发明内容

[0007] 本发明总体上涉及用于改进分析物检测的测定方法、侧向流测定条带和装置。根据本发明的测定方法从液体生物样品中检测目标分析物。根据本发明的测定方法:

[0008] a) 使怀疑含有分析物的所述液体生物样品与液相中至少一种配体-靶标缀合物接触,其中所述配体-靶标缀合物与至少一部分所述分析物结合以形成配体-靶标-分析物复

合物；

[0009] b) 使所述生物样品中的分析物和来自步骤a)的所述复合物与受体-标记物缀合物接触,以形成分析物-受体-标记物复合物和配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物；

[0010] c) 在包含能够结合配体的捕获剂的表面上捕获来自步骤b)的标记复合物,其中所述捕获剂的一部分配体结合位点被配体-靶标缀合物占据,在所述表面上产生配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物；以及

[0011] d) 检测在所述表面上捕获的所述配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物。因此,分析物与靶标的结合既用液相中的靶标进行,也用固定在表面上的靶标进行,从而改进了分析物的检测。

[0012] 本发明的测定方法可以是使用侧向流测定条带的侧向流测定。根据本发明的侧向流测定条带设计成从液体生物样品中检测目标分析物。根据本发明的侧向流条带包括：

[0013] 样品接收区；

[0014] 所述样品接收区下游的阻滞剂区,其任选地含有配体-靶标缀合物；

[0015] 所述阻滞剂区下游的缀合物区,其含有标记物-受体缀合物；

[0016] 所述缀合物区下游的测试区段,其包含能够结合配体的固定的捕获剂,其中一部分所述配体结合位点被配体-靶标缀合物占据,

[0017] 任选地,所述测试区段下游的所述侧向流测定条带上的对照区段,其指示测定完成；和

[0018] 任选地,吸收垫,其与所述侧向流测定条带流体连通并且位于所述对照区段下游。

[0019] 根据本发明的侧向流装置包括容纳根据本发明的侧向流条带的测定部分和用于观察测试区段和任选的对照区段的开口。

附图说明

[0020] 图1示出了容纳根据本发明的侧向流条带[102]的代表性装置[100],所述侧向流条带用于在运行侧向流测定之前改进抗体检测(为了说明抗HIV抗体的目的)。在平垫集样器[103]上示出了来自生物样品的抗HIV抗体。显示阻滞剂垫[104]包含生物素化HIV-1肽、生物素化HIV-2肽和生物素化rAg肽。显示缀合物垫[105]包含与胶体金缀合的蛋白质A。显示纤维素膜[106]上的测试线[107]具有固定的牛血清白蛋白和链霉亲和素,链霉亲和素上的一部分生物素结合位点与生物素化HIV-1肽和生物素化HIV-2肽结合。显示对照线[108]具有固定的抗人抗体。

[0021] 图2示出了容纳根据本发明的侧向流条带[102]的代表性装置[100],所述侧向流条带用于在侧向流测定期间,当样品到达测试线[107]时改进抗HIV抗体的检测。当含有抗HIV抗体的样品移至阻滞剂垫[104],一部分抗HIV抗体与生物素化HIV-1肽、生物素化HIV-2肽和生物素化rAg肽结合。当样品移至缀合物垫[105]时,与生物素化物结合的抗HIV抗体进一步与蛋白质A-胶体金缀合物结合。未结合的抗HIV抗体也与蛋白质A-胶体金缀合物结合。

[0022] 图3示出了容纳根据本发明的侧向流条带[102]的代表性装置[100],所述侧向流条带用于在运行侧向流测定之后,当样品流过对照线[108]并进入吸收垫[109]时,改进对抗HIV抗体的检测。在测试线[107]处,与链霉亲和素复合的生物素化HIV-1肽和生物素化HIV-2肽捕获与蛋白质A-胶体金缀合物复合的抗HIV抗体。同样在测试线[107]处,链霉亲和

素捕获与抗HIV抗体复合的生物素化肽的复合物,抗HIV抗体与蛋白质A-胶体金缀合物复合。在对照线[108]处,抗人抗体捕获生物样品中的任何人抗体。与蛋白质A-胶体金缀合物复合的抗HIV抗体可见,因为它们与对照线[108]上的抗人抗体结合。

具体实施方式

[0023] 本发明涉及用于改进分析物检测的测定方法、侧向流测定条带和装置。通过将分析物与液相中的靶标结合和分析物与固相上的靶标结合组合,实现改进的分析物检测。根据本发明的用于检测液体生物样品中的分析物的测定方法:

[0024] a) 使怀疑含有分析物的所述液体生物样品与液相中至少一种配体-靶标缀合物接触,其中所述配体-靶标缀合物与至少一部分所述分析物结合以形成配体-靶标-分析物复合物;

[0025] b) 使所述生物样品中的分析物和来自步骤a)的所述复合物与受体-标记物缀合物接触,以形成分析物-受体-标记物复合物和配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物;

[0026] c) 在包含能够结合配体的捕获剂的表面上捕获来自步骤b)的标记复合物,其中所述捕获剂的一部分配体结合位点被配体-靶标缀合物占据,在所述表面上产生配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物;以及

[0027] d) 检测在所述表面上捕获的所述配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物。

[0028] 根据本发明的测定方法提供了两种使分析物与靶标结合以将其带到表面的机制:

i) 样品中的分析物与表面固定的靶标结合;ii) 分析物与液相中的配体-靶标缀合物结合,随后将分析物-靶标-配体复合物捕获到表面。在后一种机制中,配体与表面捕获试剂之间的高亲和力确保从溶液中提取出分析物-靶标复合物。这种机制的组合提供了表面上固定的靶标的高活性和稳定呈递以捕获分析物,并且还为了液相中的结合提供了有利的溶液动力学。通过包括在溶液中的附加结合步骤,尤其是当给予更多时间形成较慢形成的复合物时,测定灵敏度提高。

[0029] 在本发明的测定方法中,所述测定在侧向流测定条带上进行。该方法还包括使侧向流测定条带与显影剂溶液接触。接触后,显影剂溶液移动穿过侧向流测定条带。在本发明的方法中,将液体生物样品置于显影剂溶液中,并且包含生物样品的所得显影剂溶液移动穿过测定条带到达侧向流测定条带上的下游点。在本发明的另一种方法中,将液体生物样品置于侧向流测定条带的样品接收区上,并且显影剂溶液接触侧向流测定条带,以促进生物样品从样品接收区流过测定条带到达下游点。

[0030] 使用本发明的测定方法进行分析的液体生物样品可以是含有目标抗体的任何液体生物样品,如生物流体。生物流体的实例包括但不限于尿液、血液、血浆、血清、口腔液、汗液、精液、粪便、痰、脑脊髓液、眼泪、粘液、羊水、母乳等。口腔液是口腔中存在的液体。口腔液是唾液和口腔粘膜渗出液的混合物。唾液是唾液腺产生的。口腔粘膜渗出液通过从毛细血管跨过颊粘膜进入口腔。口腔液含有病原体和抗体两者。生物流体样品如口腔液、全血、血浆和血清是本发明的免疫测定中可用的样品的优选类型。这些中的每一个都可以使用本领域已知的手段和技术获取。

[0031] 可以在多种基质中检测病毒感染(如HIV病毒感染),这些基质可以包括液体生物样品,如来自于具有临床体征和症状和/或流行病学风险因素的患者全血(静脉血或手指

针刺血)、血清和血浆、口腔液(例如,唾液和口腔粘膜渗出液)、尿液、精液和母乳。例如,在用于测量口腔液样品的方法中,将测试装置交给受试者,并指示受试者擦拭上下牙龈一次以用该装置的平垫收集唾液。在本发明的用于测量全血的方法中,医疗工作者将适当体积的血液放在装置上。液体生物样品的使用量可以根据液体生物样品和测定形式而变化。

[0032] 在本发明的测定方法中,分析物可以是抗体。病毒感染例如HIV病毒感染会导致在患者中产生抗HIV抗体。在优选的测定方法中,抗体是抗HIV抗体。抗HIV抗体可以是针对HIV-1或HIV-2的抗体。虽然针对HIV描述了本发明的测定方法,但是本发明的测定方法可以用于鉴定、确定和/或治疗任何感染。

[0033] 本发明的测定装置、侧向流测定条带和方法可用于检测(阳性或阴性,和/或定量)生物流体样品中的几乎任何分析物。而且,所述装置、侧向流测定条带和方法可用于同时检测一种或多种分析物。此类分析物可以包括但不限于HIV抗体,HPV抗体,HCV抗体,埃博拉抗体,登革热抗体,寨卡抗体,幽门螺杆菌抗体,肝炎抗体,麻疹抗体,肝炎抗原,密螺旋体(terponeme)抗体,宿主或感染因子抗体,包括但不限于心磷脂、卵磷脂、胆固醇、脂多糖和唾液酸的病理学细胞标志物,腮腺炎抗体,风疹抗体,可铁宁,可卡因,苯甲酰芽子碱,苯并二氮杂~~草~~,四氢大麻酚,尼古丁,乙醇茶碱,苯妥英,对乙酰氨基酚,锂,地西洋,去甲替林,司可巴比妥,苯巴比妥,茶碱,睾酮,雌二醇,17-羟孕酮,孕酮,甲状腺素,促甲状腺激素,促卵泡激素,促黄体激素,转化生长因子 α ,表皮生长因子,胰岛素样生长因子I和II,生长激素释放抑制因子,IGA,性激素结合球蛋白,葡萄糖,胆固醇,咖啡因,皮质类固醇结合球蛋白,PSA和DHEA结合糖蛋白。根据一种或多种目标分析物,可以从本领域已知的结合剂中选择与分析物结合的靶标和受体。

[0034] 如本领域已知的,抗体是指基本上由一个免疫球蛋白基因或多个免疫球蛋白基因或其片段编码的多肽或多肽复合物。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为 κ 或 λ 。重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,继而分别定义免疫球蛋白类别(同种型)IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。重链的恒定结构域构成抗体的Fc区。抗体的Fc部分决定了抗体类别。

[0035] 通常,抗体是一种免疫球蛋白,在其N端表面或腔中具有与另一分子结合并因此与另一分子的特定空间和极性组织互补的区域。抗体可以是多克隆的或单克隆的。抗体可包括完整的免疫球蛋白或其片段。其片段可以包括Fab、Fv和F(ab')₂、Fab'等。抗体还可以包括通过重组方法制备的嵌合抗体或其片段。抗原是能够与目标抗体特异性结合的任何化合物。抗原和目标抗体之间的特异性结合意指两个分子是相关的,使得它们彼此的结合能够区分结合其它测定或样品组分。

[0036] 靶标是指与分析物结合的组分。在本发明的测定方法中,分析物特异性结合靶标。在本发明的测定方法中,靶标可以是抗原。例如,当分析物是抗体时,靶标可以是其同源抗原。可替代地,当分析物是抗原时,靶标可以是特异性结合抗原的抗体。优选地,靶标是肽。在本发明的优选方法中,靶标选自HIV-1肽、HIV-2肽、rAg及其混合物。抗HIV-1抗体与HIV-1肽和rAg特异性结合。抗HIV-2抗体与HIV-2肽特异性结合。HIV-1和HIV-2合成肽可以与包膜(gp120、41)或p24或p17或来自该病毒的其它已知蛋白质的区域相对应。

[0037] 术语rAg是指任何抗原性HIV重组多肽。例如,美国专利第5,156,949号、美国专利第5,217,861号、美国专利第6,428,952号、美国专利第5,830,641号、美国专利第5,886,319

号和美国专利第6,544,728号描述了可用于HIV抗体的免疫测定的重组抗原。SEQ ID NO 1 中所示的核苷酸序列编码重组抗原rAg,也称为ORA-1、HIV-1 (hS 0D1-HIV1gp120-41)。SEQ ID NO 2是rAg的氨基酸序列。HIV的成熟包膜蛋白 (Env) 由非共价缔合的gp120-gp41异二聚体的同型三聚体组成。所得复合物从病毒表面作为刺突突出。表面蛋白gp120与人CD4、CCR5和CXCR4相互作用,形成P4HB/PDI-CD4-CXCR4-gp120复合物。rAg的这种重组设计扩展并包括了HIV-1肽序列。rAg抗原被抗HIV-1抗体识别。

[0038] 在本发明的方法中,靶标与配体缀合,形成配体-靶标缀合物。配体-靶标缀合物与分析物的结合导致配体-靶标-分析物复合物的形成。在本发明方法的步骤a)中,一些或所有分析物与配体-靶标缀合物结合。如果所有分析物均未与配体-靶标缀合物结合,则一些分析物仍未结合。

[0039] 配体用于将与配体缔合的材料引导至表面固定的捕获试剂。例如,配体-靶标-分析物复合物中的配体用于将复合物导向至固定的捕获试剂。在根据本发明的方法中,配体是生物素,并且配体-靶标缀合物是生物素化的肽。肽的生物素化可以使用本领域已知的方法和试剂进行。例如,NHS-生物素可用于标记肽的伯胺基。可以使用4'-羟基偶氮苯-2-羧酸试剂测试生物素化程度。在本发明的方法中,配体-靶标缀合物选自生物素化HIV-1肽、生物素化HIV-2肽、生物素化rAg及其混合物。在本发明的优选方法中,配体-靶标-分析物复合物是与生物素化HIV-1肽、生物素化HIV-2肽或生物素化rAg结合的抗HIV抗体的复合物。生物素能够与链霉亲和素进行强烈的非共价相互作用。在本发明的方法中,链霉亲和素是优选的捕获试剂。

[0040] 使液体生物样品与配体-靶标缀合物接触的步骤在液相中进行。优选地,配体-靶标缀合物存在于侧向流测定条带上,阻滞剂垫上,并且当液体接触配体-靶标缀合物时,它从阻滞剂垫上洗脱下来。在制备侧向流测定条带期间,可将配体-靶标缀合物放置在阻滞剂垫上并在膜上干燥。当液相中的分析物移动穿过阻滞剂垫时,配体靶标缀合物从阻滞剂垫上洗脱下来到液相中,可用于与分析物结合。在本发明的方法中,将配体-靶标缀合物放置在阻滞剂垫上以进行液相结合。在本发明的另一种方法中,将配体-靶标缀合物添加到显影剂溶液中。在本发明的另一种方法中,将配体-靶标缀合物放置在阻滞剂垫上以及显影剂溶液中。

[0041] 标记物可以是本身可见或能够产生可通过视觉或仪器手段检测的信号的任何物质。特定标记物的选择对本发明并不重要,但是标记物应该能够自行产生可检测的信号,或者可以通过仪器检测,或者可以连同—个或多个附加的信号产生组分如酶/底物信号产生系统一起检测。

[0042] 如本领域中已知的,标记物类型的选择涉及考虑待检测的分析物和所需的检测手段。可检测标记物的检测将取决于所选部分或试剂,并且可以通过现有技术中已知的任何方法来进行,例如,目测检查、紫外和可见分光光度法、荧光法、放射性计数等。通常,使用视觉上可检测的标记物。这允许直接目测或仪器读取样品中分析物的存在或量,而无需附加的信号产生组分。本领域已知并且适合用于本发明方法中的各种标记物包括本身可见或通过化学或物理手段产生信号的标记物。此类标记物可以包括酶和底物、色原、催化剂、荧光化合物、化学发光化合物和放射性标记物。本领域中已知的其它合适的标记物包括微粒状标记物,例如胶体金属颗粒如胶体金;胶体非金属颗粒如硒或碲;染色或有色颗粒,如染色

塑料或染色微生物；有机聚合物乳胶颗粒和脂质体；有色珠粒；聚合物微囊；囊；红细胞；红细胞血影或含有直接可见物质的其它囊泡等。美国专利第4,313,734号描述了金溶胶作为抗体标记物的用途。在根据本发明的优选测定方法中，可检测标记物是可以通过人眼以及仪器读取而看到的金属胶体颗粒，如金微粒或金纳米颗粒。在本发明的测定方法中，用作可检测标记物的胶体颗粒的粒径在20nm至80nm之间。对于仪器读取测定，通过使用分光光度计在特定波长下测量光密度(OD)来测量颗粒的浓度。然后将OD用作标记抗原总量的量度。在根据本发明的测定方法中，标记抗原的量应优选超过待检测的抗体以允许完全标记。

[0043] 受体-标记物缀合物用于结合分析物，以便产生可检测的复合物。根据分析物，受体可以是与分析物特异性或非特异性结合的任何分子。在本发明的优选方法中，受体是蛋白质A。蛋白质A可以与几种免疫球蛋白的Fc部分结合。在本发明的测定方法中，受体-标记物缀合物是蛋白质A-金胶体缀合物。可以通过本领域已知的技术使蛋白质附着于胶体金上。蛋白质A-金胶体缀合物可商购获得，例如，P-6730，购自Sigma Aldrich®。受体-标记物缀合物的其它实例包括金缀合抗原(桥接测定)和第二抗人重链或轻链特异性金缀合物。

[0044] 在本发明的测定方法中，受体也与分析物结合。受体与分析物结合，而与分析物是否也与靶标结合无关。因此，受体-标记物缀合物与分析物结合形成分析物-受体-标记物复合物，并且受体-标记物缀合物也与配体-靶标-分析物复合物结合形成配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物。使受体标记物与分析物或配体-靶标-分析物复合物反应的步骤在液相中进行。在使用侧向流测定条带的本发明方法中，优选地，配体-靶标缀合物存在于缀合物垫上，并且当液体接触受体-标记物缀合物时，将其从缀合物垫上洗脱下来。在制备侧向流测定条带期间，可将受体-标记物缀合物放置在缀合物垫上并在膜上干燥。当液相中的分析物移动穿过缀合物垫时，受体-标记物缀合物从缀合物垫上洗脱下来到液相中，可用于与分析物和分析物-靶标-配体复合物结合。在根据本发明的优选方法中，配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物是与抗体结合的生物素化肽，所述抗体与蛋白质A缀合的胶体金结合。

[0045] 在本发明的测定方法中，捕获试剂与配体结合，并用于将包含分析物的标记复合物带到固体支撑物上进行检测。优选地，所述捕获试剂固定在固体支撑物上。捕获试剂可以固定，也可以附着于允许将其从溶液中分离的其它组分上。捕获试剂的固定和附着以及位置取决于测定形式。例如，在本发明的一些测定方法中，可以将捕获试剂固定在侧向流测定测试条带上的特定区域、区段或线上，膜上的特定区域中，色谱柱的固体支撑物上或微量滴定板的孔中。在根据本发明的其它测定方法中，捕获试剂也可以包被在珠粒或其它颗粒上，以使得能够与溶液中的其余样品分离。在本发明的测定方法中，捕获试剂上的一部分配体结合位点与靶标-配体缀合物结合。在本发明的优选测定方法中，捕获试剂位于侧向流测定条带上的测试线处，并且一部分捕获试剂与靶标-配体结合，以使得能够捕获分析物，并且剩余的配体结合位点可自由捕获配体。

[0046] 捕获试剂与配体之间的亲和力允许配体-靶标-分析物-受体-标记物复合物被表面上固定的捕获试剂捕获。另外，分析物与靶标之间的亲和力允许分析物-受体-标记物复合物与固定在表面上的靶标结合。在本发明的优选测定方法中，捕获试剂是生物素结合蛋白，例如抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、链霉亲和素及其蛋白缀合物。优选地，捕获试剂是与BSA缀合的链霉亲和素，并且固定在硝酸纤维素表面上。在本发明的方法中，生物素化HIV-1和HIV-2肽通过与固定在表面上的链霉亲和素-BSA结合而固定在表面上，而链霉亲和

素的一部分生物素结合位点未被占据。

[0047] 根据本发明的优选测定方法从液体生物样品中检测抗HIV-1抗体和抗HIV-2抗体。所述方法：

[0048] a) 使怀疑含有抗HIV-1抗体和抗HIV-2抗体的液体生物样品与液相中的生物素化HIV-1、HIV-2和/或rAg肽接触,其中来自样品的至少一部分抗HIV-1抗体和抗HIV-2抗体与生物素化肽结合形成抗体-生物素化肽复合物:抗HIV-1-生物素化HIV-1肽、抗HIV-1-生物素化rAg肽,和/或抗HIV-2-生物素化HIV-2肽复合物;

[0049] b) 使生物样品中未结合的抗HIV-1抗体和抗HIV-2抗体以及步骤a)中形成的复合物与蛋白质A-金胶体缀合物接触以形成标记的抗体复合物和标记的抗体-生物素化肽复合物

[0050] c) 用固定在表面上的链霉亲和素捕获来自步骤b)的复合物,链霉亲和素上的一部分生物素结合位点被生物素化HIV-1和HIV-2肽占据

[0051] d) 检测表面上捕获的来自步骤c)的金胶体-蛋白质A-抗体-肽-生物素复合物。

[0052] 根据本发明的优选方法是侧向流测定方法。侧向流测定在侧向流测定条带上进行。在本发明的侧向流测定方法中,将液体生物样品施加到侧向流测定条带上,并且在侧向流测定条带上的测试线处检测生物样品中分析物的存在。

[0053] 侧向流测定条带是指用于侧向流色谱分析的条带。侧向流(色谱)测定通常涉及将怀疑含有待检测分析物的液体生物样品施加至侧向流(免疫色谱)测定条带的样品接收区。测定条带包含基质材料(例如纸、硝酸纤维素等。参见例如美国专利第5,569,608号),悬浮或溶解于其中的测试流体和分析物可以通过毛细管作用从样品接收区通过基质材料流到一个或多个捕获区段,在捕获区段中可见信号或不存在此类信号揭示存在或不存在所述分析物。显影剂溶液促进样品流过侧向流测定条带。在分析物的检测利用抗体或抗体片段的情况下,该测定可以称为侧向流免疫色谱测定,并且该条带称为侧向流免疫色谱条带。

[0054] 根据本发明的侧向流条带提供了两种在测试线处捕获目标分析物的机制:i)通过测试线位置的定向配体-靶标缀合物例如生物素化肽,捕获样品中的分析物,例如抗体;ii)捕获流动溶液相中与分析物复合的配体-靶标缀合物,例如生物素化肽。通过添加到显影剂溶液中将靶标-配体缀合物呈递给液相中的分析物或将其从垫组分(例如阻滞剂垫)上洗脱。在每种情况下,下面证明了显著(>5X)较低量的肽产生惊人的相似反应性样品响应。在根据本发明的侧向流条带中,部分占据的链霉亲和素-BSA(SA-BSA)的混合物使测试线对捕获功能开放,以将生物素化物质与样品一起运输到测试线位置。该测试线还含有生物素化HIV-1肽、HIV-2肽、重组HIV抗原(rAg)肽或其组合,以捕获与蛋白质A-金缀合物复合的抗HIV抗体。

[0055] 溶液中分析物与靶标的结合允许液相结合,其中它们能够从测试运行时间中受益,允许靶标与来自样品中的分析物一起有效孵育。例如,当含有抗HIV抗体的患者样品被显影剂溶液运输到装置中时,显影剂溶液会水合并洗脱垫的组分,展示出HIV表位的生物素化肽和重组蛋白可以利用溶液动力学和流向测试线的时间与样品中的抗HIV抗体更完全地复合。然后,高亲和力的生物素-链霉亲和素结合确保通过测试线处链霉亲和素上的固定的游离生物素结合位点从溶液中提取这些复合物。

[0056] 根据本发明的用于从液体生物样品中检测分析物的侧向流测定条带包括:

- [0057] 样品接收区；
- [0058] 所述样品接收区下游的阻滞剂区，其任选地含有配体-靶标缀合物；
- [0059] 所述阻滞剂区下游的缀合物区，其含有标记物-受体缀合物；
- [0060] 所述缀合物区下游的测试区段，其包含能够结合配体的固定的捕获剂，其中一部分所述配体结合位点被配体-靶标缀合物占据，
- [0061] 任选地，所述测试区段下游的所述侧向流测定条带上的对照区段，其指示测定完成；和
- [0062] 任选地，吸收垫，其与所述侧向流测定条带流体连通并且位于所述对照区段下游。优选地，本发明的侧向流条带被设计成液体样品流动方向连续地通过样品接收区、阻滞剂区、缀合物区、测试线、对照线和吸收垫。吸收垫有助于促进毛细管作用和流体单向流过条带的膜，并沿膜将含有分析物的液体从条带的一端拉到另一端。
- [0063] 图1-3说明了根据本发明的侧向流装置。侧向流装置[100]具有壳体[101]。该装置[100]含有侧向流测定条带[102]，其具有部分暴露于壳体[101]外部的平垫[103]，该平垫与置于纤维素膜[106]上的阻滞剂垫[104]和缀合物垫[105]流动连通，该纤维素膜具有作为其捕获区段的测试线[107]，和作为其任选对照区段的对照线[108]。纤维素膜106与任选的吸收垫[109]流体连通。流动方向用箭头表示。将一滴来自于受试者的样品施加到平垫[103]上。样品被芯吸(wicked)穿过装置壳体[101]内的侧向流条带[102]，从平垫[103]流向缀合物垫[105]，并流过纤维素膜[106]。如这里所描绘的，平垫[103]充当芯，以将液体生物物质递送到阻滞剂垫[104]。
- [0064] 使用本发明的侧向流条带分析的液体生物样品可以是含有目标抗体的任何液体生物样品，如生物流体。生物流体的实例包括但不限于尿液、血液、血浆、血清、口腔液、汗液、精液、粪便、痰、脑脊髓液、眼泪、粘液、羊水、母乳等。口腔液是口腔中存在的液体。口腔液是唾液和口腔粘膜渗出液的混合物。唾液是唾液腺产生的。口腔粘膜渗出液通过从毛细血管跨过颊粘膜进入口腔。口腔液含有病原体和抗体两者。生物流体样品如口腔液、全血、血浆和血清是本发明的免疫测定中可用的样品的优选类型。这些中的每一种都可以使用本领域已知的手段和技术来获取。如本领域中已知的，液体生物样品的使用量可以基于液体生物样品而变化。
- [0065] 本发明的侧向流条带可以用于检测是抗体的分析物。优选地，所述抗体是抗HIV抗体。抗HIV抗体可以是针对HIV-1或HIV-2的抗体。虽然针对HIV描述了本发明的侧向流条带，但是本发明的侧向流条带可以用于鉴定、确定和/或治疗任何感染。
- [0066] 侧向流测定条带的“样品接收区”是指侧向流测定测试条带中首先施加样品的区域。除了接收样品之外，样品接收区的功能可以包括，例如：所施加的样品的pH控制/改变和/或比重控制/改变，去除或改变可干扰或引起测定中的非特异性结合的样品组分，或引导和控制样品流向测试区域。过滤方面(如果存在)允许目标分析物以受控方式迁移通过或穿过侧向流测定测试条带，有很少(如果有的话)的干扰物质。过滤方面(如果存在)常常会提供具有较高成功概率和准确性的测试。在本发明的侧向流测定测试条带中，样品接收区还可以掺入可用于避免与液体生物样品中可能存在的非靶标分析物发生交叉反应和/或调节样品的试剂；根据特定的实施方案，这些试剂可以包括抗RBC试剂、基于Tris的缓冲剂、EDTA等等。当考虑使用全血时，经常利用抗RBC试剂。在本发明的另一种测定条带中，样品接

收区可以掺入其它试剂,如辅助特异性结合成员、流体样品预处理试剂和信号产生试剂。在根据本发明的侧向流测定装置中,平垫[103]用作样品接收区。

[0067] 在根据本发明的一些侧向流测定条带中,样品接收区可以是样品垫,并且可以由能够接收液体生物样品并在施加时吸收液体样品并且将液体样品传递到阻滞剂垫的任何材料制成。样品接收区中的垫可以构造为充当流体样品中可能出现的细胞组分、激素、微粒和其它某些物质的过滤器。适合用于本发明的测定条带中的样品垫材料还包括美国专利第5,075,078号中公开的那些施加垫材料,所述专利通过引用并入本文。适于样品施加区的材料包括但不限于亲水性聚乙烯材料或垫、丙烯酸纤维、玻璃纤维、滤纸或过滤垫、干纸、纸浆、织物等。

[0068] 样品接收区可由样品施加构件(例如,芯或平垫)构成。样品接收区段可以包括样品施加垫以及样品施加构件。样品施加构件常常由容易吸收本文所考虑到的各种流体样品中的任何一种并且以物理形式保持稳固的材料构成。通常,样品施加构件由诸如白色粘合聚酯纤维的材料构成。样品施加构件也可以用亲水整理剂处理。而且,样品施加构件定位成与侧向流测定条带的阻滞垫流体流动接触。这种流体流动接触可以包括重叠、邻接或交错类型的接触。常常样品施加构件,如果存在,则可以含有与示例性样品施加垫中所用的那些相似的试剂并且由与示例性样品施加垫中所用的那些相似的材料构成。液体生物样品可以直接施加到平垫[103]上。例如,可以将平垫[103]插入受试者的口腔中,并用作口腔液的收集垫。可以将其它流体(例如血液或血清)直接放置在平垫[103]上。也可以将液体生物样品稀释在小瓶中的显影剂溶液中,并且可以将平垫[103]放置在小瓶中。

[0069] 本发明的测定条带包括含有至少一种靶标-配体缀合物的阻滞剂区。在本发明的侧向流条带中,阻滞剂区是阻滞剂垫。如图1所示,阻滞剂垫[104]在平垫[103]的下游。如本领域中已知的,阻滞剂垫含有试剂以确保装置内对各种样品基质中存在的非特异性或干扰性物质的反应性最小。阻滞剂垫可由多种材料构成,只要它们不阻碍口腔液流向侧向流测定测试条带下游即可。此类材料包括但不限于纸、纤维素、硝酸纤维、聚酯、玻璃纤维等。可以选择材料以减少或消除试剂或口腔液从色谱测试条带向毛细管基质回流。阻滞剂垫中可存在缓冲剂和盐,以帮助调节pH和离子强度,以使靶标与分析物复合。阻滞剂垫可以用缓冲剂浸渍,以调节液体生物样品在流动时的样品pH以及与侧向流测定的相容性。阻滞剂垫也可以包括一种或多种阻滞试剂,其减少分析物和/或测定试剂的非特异性结合,从而减少假阳性的发生。示例性阻滞试剂包括但不限于牛血清白蛋白(BSA)、甲基化BSA、酪蛋白、脱脂奶粉、脱氧胆酸盐和正月桂酰肌氨酸。阻滞溶液还可以含有表面活性剂、防腐剂和其它试剂,以增强通过测试条带的流量,改善测定结果并保护样品完整性。通常,通过以下方式制备阻滞剂垫:将适当体积的阻滞溶液施加到垫上并干燥,然后再将其放置在侧向流测定条带上。

[0070] 本发明的侧向流测定测试条带的阻滞剂垫任选地用于维持配体-靶标缀合物试剂呈稳定状态,并促进它们快速有效地溶解,流动以及与液体生物样品中可能存在的目标分析物的特异性反应。图1-3说明了容纳根据本发明的侧向流条带的装置[100],其中阻滞剂垫还含有靶标-配体缀合物。当显影剂溶液与生物样品一起流过侧向流条带[102]时,靶标-配体缀合物从阻滞剂垫[104]上洗脱下来,生物样品中存在的至少一部分分析物与液相的靶标-配体缀合物结合。在本发明的侧向流条带中,靶标是抗原。优选地,所述抗原选自由

HIV-1肽、HIV-2肽、rAg及其混合物组成的组,并且配体是生物素。因此,阻滞剂垫上的优选靶标-配体缀合物包括生物素化HIV-1肽、生物素化HIV-2肽、生物素化rAg或其混合物。

[0071] 侧向流测定测试条带的缀合物区用于维持标记试剂和对照试剂呈稳定状态,并促进它们快速有效地溶解,流动以及与液体生物样品中可能存在的目标分析物的特异性反应。在根据本发明的侧向流测定测试条带中,缀合物区可以是缀合物垫。缀合物垫位于侧向流测定测试条带上,使得液体生物样品必须穿过或通过缀合物垫以迁移到测试区段或测试线。可替代地,可以将缀合物区编织到侧向流测定测试条带中,或者可以将其与侧向流测定测试条带成一直线放置在同一位置。与阻滞剂垫一样,缀合物垫可以用与该测定法相容并且基本上不阻碍口腔液和试剂流动的任何方便的材料(例如,硝酸纤维素)制成。适合用于本发明的缀合物垫材料包括美国专利第5,075,078号中公开的那些色谱材料,该专利通过引用并入本文。

[0072] 在根据本发明的侧向流测定测试条带中,缀合物垫携带受体-标记物缀合物以及释放和稳定剂,以允许在测试区段或测试线处检测抗原。根据分析物,受体可以是与分析物特异性或非特异性结合的任何分子。在本发明的优选侧向流测定条带中,受体是蛋白质A,并且标记物是金胶体。当显影剂溶液与生物样品一起流过侧向流条带时,受体-标记物缀合物从缀合物垫上洗脱下来,并且受体-标记物与分析物或与分析物-靶标-配体复合物结合。

[0073] 根据本发明的测定条带包括基质材料(例如,纸、硝酸纤维素等,参见,例如,美国专利第5,569,608号),悬浮或溶解在其中的测试流体和分析物可以通过毛细管作用流过所述基质材料。基质材料可以包括但不限于经过合成改性的天然、合成或天然存在的材料,如多糖(例如,纤维素材料,如纸和纤维素衍生物,如醋酸纤维素和硝酸纤维素);聚醚砜;尼龙;二氧化硅;无机材料,如减活氧化铝、硅藻土、硫酸镁或其它均匀分散在多孔聚合物基质(如氯乙烯、氯乙烯-丙烯共聚物和氯乙烯-乙酸乙烯酯共聚物)中的无机细碎材料;天然存在的织物(例如棉)和合成织物(例如人造丝);多孔凝胶,如硅胶、琼脂糖、葡聚糖和明胶;聚合物膜,如聚丙烯酰胺等。在本发明的优选测定条带中,基质材料是硝酸纤维素膜。不同类型的可商购的硝酸纤维素膜(例如,Millipore、HF90、GE FF120、Sartorius)具有不同的吸收能力和毛细管流量。

[0074] 在本发明的侧向流测定测试条带中,基质材料可以粘附到层压背衬上。背衬可以是塑料材料,例如迈拉(Mylar)或PVC或聚苯乙烯。在制备测定条带中,可以使用本领域已知的技术将基质材料层压到塑料卡上。具有层压背衬的硝酸纤维素膜是可商购的。

[0075] 在根据本发明的侧向流测定测试条带中,在缀合物区下游的测试区段或测试线用于指示分析物的存在。测试区段或测试线包括固定在侧向流测定条带上的捕获试剂和配体-靶标缀合物分子。捕获试剂可以是能够与配体特异性结合的任何化合物。在根据本发明的优选侧向流测定测试条带中,固定的捕获试剂是链霉亲和素。测试线还包括固定的靶标。靶标可以生物素化,并且与链霉亲和素结合,从而固定在测试区段上。因此,在本发明的侧向流测定条带中,测试线包含固定在条带上的链霉亲和素分子,其中一部分生物素结合位点被生物素化的靶标占据。在本发明的优选侧向流条带中,在添加任何样品之前测试区段包括具有可用生物素结合位点的链霉亲和素,以及与生物素化HIV-1肽、生物素化HIV-2肽、生物素化rAg或其混合物结合的链霉亲和素。蛋白质如链霉亲和素附着到硝酸纤维素上是本领域已知的。在本发明的优选侧向流测定条带中,链霉亲和素-BSA放置在测试线处硝酸

纤维素上。当样品移至测试线时,生物素化的靶标、生物素化的靶标-分析物复合物和生物素化的靶标-分析物-受体-标记物复合物将与测试区段上的链霉亲和素结合,分析物和生物素化的靶标-分析物-受体-标记物复合物将与测试线上的固定的靶标结合。通过测试线处标记物的可视化来检测分析物的存在。

[0076] 对照区段或对照线也可以放置在测试区段下游的侧向流测定测试条带上。对照线结合测试区段中未捕获的标记抗原。阳性对照线指示装置已正常运行。在根据本发明的用于测试来自于人的液体生物样品中的抗体的侧向流测定条带中,硝酸纤维素膜上的对照线用抗人抗体划条纹。

[0077] 吸附剂垫可存在于侧向流测定测试装置中对照线的下游。吸收垫不仅充当装置流体的末端储器,而且还可以吸取流体穿过侧向流测定测试条带。吸收垫应具有足够的芯吸特征,以防止测定条带上游的液体回流。吸收垫可由本领域已知的材料制成。

[0078] 如以上所讨论的,可以使用本领域已知的技术来制备和组装根据本发明的测定测试条带。根据本发明的测定测试条带可以处于壳体中。根据本发明的测定装置包括壳体,壳体具有开口或窗口的,以观察一个或多个捕获区段和控制区段。

[0079] 根据本发明的侧向流测定方法使用显影剂溶液。本发明的一个实施方案是一种试剂盒,其包含本发明的侧向流测定条带和显影剂溶液。显影剂溶液促进生物样品向装置中和向测定条带上的毛细流动。在本发明的测定方法中,可以收集口腔液并将其用作生物样品。为了收集口腔液,首先使用该装置的样品施加构件或收集垫来接收或收集生物液体样品。例如,可以使用装置的收集垫从受试者的口腔收集口腔液样品,然后放置在显影剂溶液小瓶中。收集垫芯吸随它一起携带口腔液的显影剂溶液,以进行侧向流测定测试。对于其它生物样品如全血、血清或血浆的收集,将样品直接添加到装有显影剂溶液的小瓶中或添加到收集垫上,随后将收集垫放入显影剂小瓶中以流过侧向流测定测试,从而运输样品。在根据本发明的特定测定方法中,将全血直接施加到样品施加区,例如,从手指针刺或静脉穿刺或针头获得的一滴全血(5 μ L至50 μ L),无需任何类型的事先稀释或处理。显影剂溶液通常是本领域已知的表面活性剂、盐、防腐剂、缓冲剂等的水溶液。可以使用缓冲体系,如磷酸盐、Tris-Cl硼酸盐、碳酸氢盐等。可以使用表面活性剂,如吐温20(Tween 20)、Triton X-100或其它非离子型去污剂。显影剂溶液中可以包括使用包括抗微生物和抗真菌物质的防腐剂,例如叠氮化钠。所用显影剂溶液的量应足以运输样品,但又不能太多而淹没测定或稀释结果,以致无法确定。

[0080] 实施例

[0081] 实施例1

[0082] 准备了侧向流测定装置。将划条纹的硝酸纤维素、阻滞剂垫、缀合物垫和吸附剂垫组装在测定卡背衬上。

[0083] 划条纹的硝酸纤维素:FF120硝酸纤维素在对照线处用抗人抗体(F(ab')₂、山羊抗人IgG)溶液划条纹,并且在测试线处用SA-BSA(部分与生物素化HIV-1和HIV-2肽预先复合)划条纹。

[0084] 阻滞剂垫:将生物素化rAg与生物素化HIV-1和HIV-2一起添加到阻滞剂垫溶液中。用常用阻滞剂碱缓冲液以及生物素化HIV-1和HIV-2肽和生物素化rAg处理阻滞剂垫。

[0085] 缀合物垫:使用柠檬酸盐还原法(Turkevich方法)配制胶体金,被动包被蛋白质A。

缀合物垫是通过将配制的金缀合物溶液喷涂到缀合物垫材料上制成的。使该缀合物垫适当干燥,然后将其放置在测定卡上的阻滞剂垫的正上方。

[0086] 一旦测定卡的所有主要组分均可用(阻滞剂垫、缀合物垫、硝酸纤维素、层压背衬、吸收垫),就将材料组装到测定卡上的层压背衬卡上。将测定卡切成测定条带,并将测定条带设置在装置壳体的底部中,并将收集垫放置在装置壳体底部的测定条带的上面。将装置壳体顶部压在一起,以使底部的插销与顶部的插槽接合,以完成组装。一旦组装,组装的装置被密封。

[0087] 所述测定方法通过以下方式进行:收集生物样品,将样品插入显影剂缓冲液中,然后插入测试装置并在大约20至40分钟后解释测定结果。使用测试装置的平坦样品收集垫收集口腔液样品,然后将测试装置插入显影剂溶液小瓶中。显影剂溶液促进样本流入装置中并流到侧向流测定测试条带上。

[0088] 实施例2

[0089] 血清转化盘:表1是来自于OraQuick ADVANCE[®]快速HIV-1/2测试的包装说明书中对血清转化盘性能的汇总。表2是用根据本发明的侧向流测定装置测试的血清转化盘的汇总。

[0090] 表1:在血清转化盘中使用OraQuick ADVANCE[®]快速HIV-1/2抗体测试装置的性能

| 盘数 | 一致结果的数量 | 装置早期检测到的数量 | EIA 早期检测到的数量 | 平均天数(装置) | 平均天数(EIA) | 延迟天数 |
|----|---------|------------|--------------|----------|-----------|--------------------------|
| 23 | 7 | 3 | 13 | 36.46 | 34.99 | 1.48 (95% CI -0.1 至 3.1) |

[0092] 表2:在血清转化盘中使用根据本发明的测试装置的性能

| 盘数 | 一致结果的数量 | 装置早期检测到的数量 | EIA 早期检测到的数量 | 平均天数(装置) ^a | 平均天数(EIA) ^a | 延迟天数 ^b |
|--|---------|------------|--------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|
| 21 | 11 | 4 | 6 | 36.19 | 35.95 | 0.24 (95%CI:-1.34 至 1.81) |
| ^a 使用 MiniTab [®] 统计软件计算的。 | | | | | | |
| ^b 延迟天数等于所述装置与美国 FDA 批准的 EIA 之间的平均差示灵敏度。 | | | | | | |

[0094] 当前批准的测试装置的包装说明书指示从OraQuick检测到HIV抗体时到EIA (ELISA免疫测定)检测到抗体时之间延迟1.48天,而根据本发明的装置指示延迟0.24天,基本等同于基于实验室的抗体测试的灵敏度。HIV主要通过性接触,与受感染的血液、血液制品或人体组织的接触传播以及由母亲传播给孩子 (Smith DK, Grohskopf LA, Black RJ等人, MMWR Recomm. Rep. 54:1-20 2005; Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ等人, Lancet Infect Dis. 6:726-732 2006。在全球范围内,大多数HIV传播是由于无保护的性接触而发生。据估计每次与受感染伴侣的性交行为的HIV传播率相对较低,但如果源患者的病毒载量很高,则

风险可能会大大增加(例如在急性HIV感染期间:Cohen MS, Pilcher CD, J. Infect. Dis. 191:1391-1393 2005)。增强灵敏度对于检测此类个体很重要。

[0095] 实施例3

[0096] 基于是否将其划条纹、从垫上洗脱下来或添加到显影剂溶液中来评估测定方法中使用的抗原量。对于以下每种情况,将3 μ L样品(PM2=HIV-1血浆样品;PM6=HIV-2血浆样品;PM10=HIV阴性血浆;9012-8-血清转化血浆样品)添加到液相中(显影剂)中,并将装置放置于该混合物中以开始测试。

[0097] 在表3所示的条件1中,用肽在硝酸纤维素上划条纹。估计每个装置每种肽的水平为82.1ng生物素化HIV-1和33.2ng生物素化HIV-2。

[0098] 表3

| | | |
|--------|----------|--------------------------|
| [0099] | 硝酸纤维素/条件 | 与HIV肽复合的经修饰抗生物素蛋白划条纹/条件1 |
| | 显影剂 | 显影剂A(750 μ L) |
| | 阻滞剂垫 | HIV阻滞剂 |
| | 样品 | 测试线响应 |
| | PM 2 | 反应性 |
| | PM 6 | 反应性 |

[0100] 在表4所示的条件2中,将肽添加到显影剂溶液中。在测试线上没有预结合的生物素化肽。估计每个装置每种肽的水平为13.3ng生物素化HIV-1和5.3ng生物素化HIV-2。

[0101] 表4

| | | |
|--------|----------|--|
| | 硝酸纤维素/条件 | 生物素结合蛋白划条纹/条件 2 |
| | 显影剂 | 掺有 100ng HIV-1 和 40ng HIV-2 生物素化肽的显影剂 A(750 μ L) |
| [0102] | 阻滞剂垫 | HIV 阻滞剂 |
| | 样品 | 测试线响应 |
| | PM 2 | 反应性 |
| | PM 6 | 反应性 |
| | PM 10 | 非反应性 |

[0103] 在表5所示的条件3中,将肽添加到阻滞剂垫中。估计每个装置每种肽的水平为14.4ng生物素化HIV-1和5.8ng生物素化HIV-2。

[0104] 表5

| | | |
|--------|----------|---|
| | 硝酸纤维素/条件 | 生物素结合蛋白划条纹/条件 3 |
| | 显影剂 | 显影剂 A(750 μ L) |
| [0105] | 阻滞剂垫 | 生物素化 HIV-1: 1800ng/mL 生物素化 HIV-2: 720ng/mL |
| | 样品 | 测试线响应 |
| | PM 2 | 反应性 |
| | PM 6 | 反应性 |
| | PM 10 | 非反应性 |

[0106] 在条件2和3中,生物素化肽存在于液相(显影剂溶液)中或从垫组分上洗脱下来,

并且在每种情况下,已证明,相对于用肽在测试线上划条纹时(条件1),显著降低(>5倍)的量的肽会产生惊人相似的反应性样品响应。利用侧向流平台的液相动力学极大地减少了保证装置反应性响应所需的免疫反应性物质的量。

[0107] 实施例5

[0108] 相比于固相呈递,通过使用重组蛋白来扩大表位覆盖范围也受益于溶液相。通过使用Zeptomatrix血清转化样品(9012-8)证明了这一点,该样品已被表征为p24和HIV EIA阳性并且代表急性感染。

[0109] 在条件4中,用rAg在硝酸纤维素条带上划条纹。估计每个装置的重组抗原(rAg)水平为189ng生物素化rAg。

[0110] 表6

| | |
|-----------------|--------------------|
| [0111] 硝酸纤维素/条件 | 1mg/mL rAg/条件4 |
| 显影剂 | 显影剂A (750 μ L) |
| 阻滞剂垫 | HIV阻滞剂 |
| 样品 | 测试线响应 |
| PM2 | 反应性 |
| 9012-8 | 非反应性 |

[0112] 在条件5中,将rAg添加到显影剂缓冲液中。用BBP在未与任何生物素化肽结合的硝酸纤维素上划条纹。估计每个装置的rAg水平为50ng生物素化HIV-1rAg。在这种条件下,PM2和血清转化样品9012-8在装置上具有反应性。相比之下,当将生物素化肽单独添加到显影剂中时(条件6),9012-8不具有反应性(表8)。

[0113] 表7

| | |
|---------------|--------------------------------------|
| 硝酸纤维素/条件 | 生物素结合蛋白划条纹/条件 5 |
| 显影剂 | 掺有 50ng 生物素化 rAg 的显影剂 A(750 μ L) |
| [0114] 阻滞剂垫 | HIV 阻滞剂 |
| 样品 | 测试线响应 |
| PM2 | 反应性 |
| [0115] 9012-8 | 反应性 |

[0116] 表8

| | |
|-----------------|-------------------------------------|
| [0117] 硝酸纤维素/条件 | 生物素结合蛋白(BBP)划条纹/条件6 |
| 显影剂 | 掺有50ng生物素化HIV-1肽的显影剂A (750 μ L) |
| 阻滞剂垫 | HIV阻滞剂 |
| 样品 | 测试线响应 |
| PM2 | 反应性 |
| 9012-8 | 非反应性 |

[0118] 实施例6

[0119] 将一部分肽在硝酸纤维素上划条纹具有令人惊讶的优势。下表9中显示了一系列血清转化样品,即样品9012-7、9077-14、965-4、109-7和204-3,它们均为HIV EIA阳性,其中

仅当肽存在于阻滞剂垫中,但预先结合在测试线上时,不存在反应性。当硝酸纤维素上肽的比例增加时,这些样品中的反应性提高,而HIV阴性样品则保持为阴性。

[0120] 表9

| 硝酸纤维素 | BBP 划条纹 | 含 25%肽的 BBP 划条纹 | 含 50%肽的 BBP 划条纹 |
|---------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| 显影剂 | HIV 显影剂 | | |
| 阻滞剂垫 | 含生物素化 HIV 肽和生物素化 rAg 的 HIV 阻滞剂 | | |
| 样品 | 测试线响应 | | |
| PM 2 | 反应性 | 反应性 | 反应性 |
| PM 6 | 反应性 | 反应性 | 反应性 |
| PM 10 | 非反应性 | 非反应性 | 非反应性 |
| 9012-7 | 反应性 | 反应性 | 反应性 |
| 9077-14 | 非反应性 | 反应性 | 反应性 |
| 965-4 | 非反应性 | 非反应性 | 反应性 |
| 109-7 | 非反应性 | 反应性 | 反应性 |
| 204-3 | 非反应性 | 反应性 | 反应性 |

[0121]

序列表

<110> 奥瑞许科技公司 (ORASURE TECHNOLOGIES, INC.)

<120> 用于改进分析物检测的测定方法

<130> 018.0087-W000

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 966

<212> DNA

<213> 合成

<400> 1

```

atggcgacga aggccgtgtg cgtgctgaag ggcgacggcc cagtgcaggg catcatcaat 60
ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aaggtgtggg gaagcattaa aggactgact 120
gaaggcctgc atggattcca tgttcatgag tttggagata atacagcagg ctgtaccagt 180
gcaggtcctc actttaatcc tctatccaga aaacacggtg ggccaaagga tgaagagagg 240
catgttggag acttgggcaa tgtgactgct gacaaagatg gtgtggccga tgtgtctatt 300
gaagattctg tgatctcact ctcaggagac cattgcatca ttggccgcac actggtggtc 360
catgaaaaag cagatgactt gggcaaaggt ggaaatgaag aaagtacaaa gacaggaaac 420
gctggaagtc gtttggcttg tgggtgaatt gggatcgccc aagttttccg tcctggcggt 480
ggcgatatga gagacaactg gagaagcgaa ttatacaaat acaaagtgat taagattgaa 540
ccattgggca ttgcccac caaagcgaag cgtagagttg tgcagcgca aaaacgtcag 600
gctagacaac tgttatctgg cattgttcaa cagcaaaata acttgctgag agctatcgaa 660
gcacagcaac atctgctgca actgactgtg tggggtatca agcagttgca agctcgcgtc 720
ctggcagtag aacgttatct gcgtgatcag caactgtag gtatttgggg ctgtagcggg 780
aaattgatct gcaccactgc cgttccgtgg aatgcgtctt ggtcaaacia gagtttagaa 840
gatatttggg acaatatgac ctggatgcaa tgggaacgtg aaattgacia ctacacaaac 900
acgatctaca cattattaga agaatcgag aaccagcagg aaaagaacga acaggaatta 960
ttatag 966

```

<210> 2

<211> 321

<212> PRT

<213> 合成

<400> 2

```

Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln
1           5           10           15
Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val
           20           25           30
Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val

```

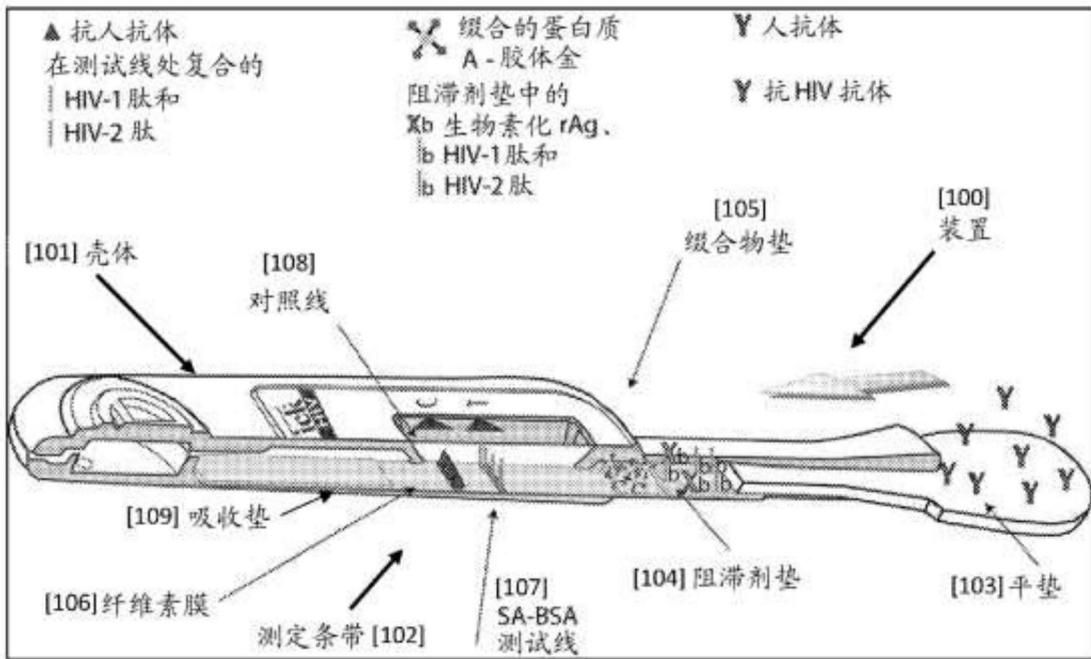



图1

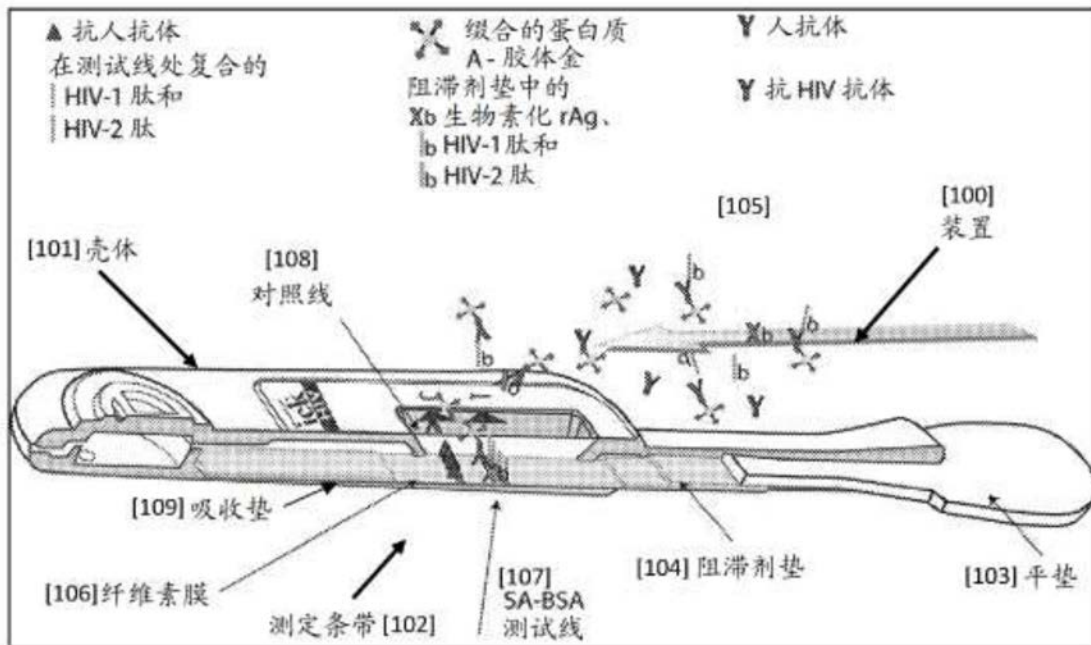


图2

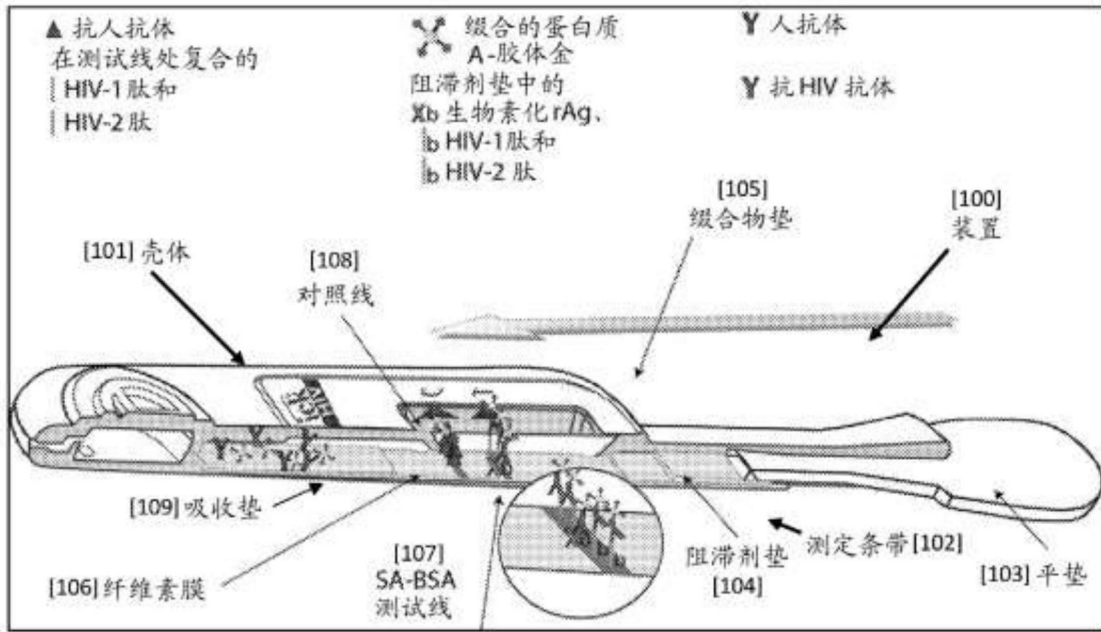


图3

| | | | |
|---------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于改进分析物检测的测定方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN111164095A | 公开(公告)日 | 2020-05-15 |
| 申请号 | CN201880057817.9 | 申请日 | 2018-08-08 |
| [标]发明人 | M里德 | | |
| 发明人 | G·耶尔伍德 M·里德 | | |
| IPC分类号 | C07K14/16 C07K16/10 G01N33/53 G01N33/536 | | |
| CPC分类号 | C07K16/1045 G01N33/5302 G01N33/536 G01N33/56983 G01N33/56988 | | |
| 代理人(译) | 黄鑫 | | |
| 优先权 | 62/542612 2017-08-08 US | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本文公开了用于改进分析物检测的测定方法、侧向流测定测试条带和装置。分析物与靶标的结合既在液相中进行，也用固定在表面上的靶标进行，从而改进了分析物的检测。

