

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580013641. X

[51] Int. Cl.
G01N 33/72 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/28 (2006.01)

[43] 公开日 2007年4月18日

[11] 公开号 CN 1950703A

[22] 申请日 2005.4.29
[21] 申请号 200580013641. X
[30] 优先权
 [32] 2004. 4. 30 [33] US [31] 60/566,731
[86] 国际申请 PCT/AU2005/000613 2005.4.29
[87] 国际公布 WO2005/106498 英 2005.11.10
[85] 进入国家阶段日期 2006.10.30
[71] 申请人 恩特里克斯有限公司
 地址 澳大利亚新南威尔士州
[72] 发明人 H·M·钱德勒

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
 标事务所
 代理人 李华英

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 3 页

[54] 发明名称

检测生物样品中血红蛋白存在的装置和方法

[57] 摘要

一种装置和方法，用于检测生物样品中血红蛋白的存在，尤其是粪便样品中血液的存在作为上胃肠道或下胃肠道出血的指示剂。

1. 一种检测生物样品中的血红蛋白的装置, 包括载体基质, 所述载体基质包括:

(i) 用于接受所述生物样品的加样区域;

(ii) 与所述加样区域液体相通或者结合使用的底物区域, 其上施加或其中浸有假过氧化物酶底物, 所述假过氧化物酶底物包括过氧化物或过氧化氢试剂; 以及

(iii) 与所述底物区域液体相通或者结合使用的指示剂区域, 其上施加或其中浸有指示剂, 当存在血红素和所述假过氧化物酶底物时, 所述指示剂产生可检测的响应。

2. 如权利要求 1 所述的装置, 其中加样区域和底物区域结合成载体基质上的一个组合的加样/底物区域。

3. 如权利要求 1 所述的装置, 其中加样区域和底物区域为载体基质上液体相通的分离区域。

4. 如权利要求 1 所述的装置, 其中底物区域和指示剂区域结合成载体基质上的一个组合的底物/指示剂物区域。

5. 如权利要求 1 所述的装置, 其中底物区域和指示剂区域为载体基质上液体相通的分离区域。

6. 如权利要求 1 所述的装置, 其中载体基质进一步包括:

(viii) 与加样区域液体相通的第二底物区域, 其上施加或其中浸有可检测的抗球蛋白免疫相互作用分子, 所述免疫相互作用分子在球蛋白存在下形成可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物; 以及

(ix) 与所述第二底物区域液体相通的检测区域, 其中固定有抗球蛋白免疫相互作用分子, 所述被固定的免疫相互作用分子固定所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物。

7. 一种检测生物样品中的血红蛋白的方法, 包括以下步骤:

(i) 将所述生物样品施加至载体基质的加样区域, 所述载体基质包括所述加样区域、底物区域和指示剂区域;

(ii) 使所述生物样品与底物区域接触, 其中样品与包含过氧化物酶或过氧

化氢酶试剂的假过氧化物酶底物接触; 以及

(iii) 将所述样品和假过氧化物酶底物与指示剂区域接触, 其中所述样品和底物与指示剂接触, 所述指示剂在血红素和所述假过氧化物酶底物存在下产生可检测的响应。

8. 如权利要求 7 所述的方法, 其中生物样品与载体基质的一个组合的加样/底物区域中的假过氧化物酶底物接触。

9. 如权利要求 7 所述的方法, 其中生物样品与载体基质的与加样区域液体相通的单独底物区域中的假过氧化物酶底物接触。

10. 如权利要求 9 所述的方法, 其中通过允许或使得样品从载体基质的加样区域流动至底物区域, 从而使生物样品与底物区域中的底物接触。

11. 如权利要求 7 所述的方法, 其中生物样品与载体基质的一个组合的底物/指示剂区域中的假过氧化物酶底物和指示剂接触。

12. 如权利要求 7 所述的方法, 其中生物样品和底物与载体基质的与底物区域液体相通的单独指示剂区域中的指示剂接触。

13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中通过允许或使得样品和底物从载体基质的底物区域流动至指示剂区域, 从而使生物样品和底物与指示剂区域中的指示剂接触。

14. 如权利要求 7 所述的方法, 还进一步包括以下步骤:

(vi) 将所述生物样品与第二底物区域接触, 其中所述样品与可检测的抗球蛋白免疫相互作用分子接触, 从而在球蛋白的存在下, 形成可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物; 以及

(vii) 将所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物与检测区域接触, 其中所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物与固定的抗球蛋白免疫相互作用分子接触, 从而固定所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其中第二底物区域与加样区域液体相通, 允许或使得生物样品从加样区域流动至第二底物区域。

16. 如权利要求 14 所述的方法, 其中检测区域与第二底物区域液体相通, 允许或使得可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物从第二底物区域流动至检测区域。

17. 如权利要求 7 所述的方法, 其中所述生物样品为来自病患胃肠道的样品。

-
18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述样品为粪便样品。
 19. 如权利要求 18 所述的方法,其中样品为粪便样品,或者为含有粪便的水样品。
 20. 如权利要求 17 所述的方法,其中病患为人。
 21. 如权利要求 17 所述的方法,其中病患为牲畜。
 22. 如权利要求 21 所述的方法,其中牲畜为马。

检测生物样品中血红蛋白存在的装置和方法

本发明的领域

本发明总的涉及检测生物样品中血红蛋白存在的装置和方法。尤其是,本发明提供了一种检测生物样品中是否存在血液的装置和方法,尤其是检测粪便样品中是否存在指示上胃肠道或下胃肠道出血的血液的装置和方法。本发明的方法特别适用于诊断可以通过检测肠出血而进行检测的胃肠道疾病。

本发明的背景

肠内出血是目前最好的肠癌(也称为结肠直肠癌)的早期指标。通常通过筛查粪便检测是否存在血液来检验肠内出血的症状。该检验通常被称为粪便隐血检验(常常称为FOBT)。

FOBT 使用最广泛的为化学检验。这些检验通常需要将粪便加到浸有氧化时改变颜色的色原体指示剂的纸上,所述指示剂例如愈创树脂或 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)。当将显色剂溶液加到纸上时,显示蓝色则代表阳性结果。愈创树脂检验的优点在于便宜而且易于操作,但是与所预期的相比其不够精确(对人血并不是特异的)和敏感。然而,几个国际研究表明用这些检验来筛选病人可以通过早期检测癌前和癌病变来拯救生命。最常采用的愈创树脂检验检测血红蛋白的血红素,因为其在小肠中相对耐降解,这些检验可以检测小肠内任何地方的出血。对于结肠直肠癌筛查,这是不利的,因为这些肿瘤局限于大肠。

近来,已经出现了更加敏感和特异的免疫检验(例如免疫色谱检验),所述检验能够提高血液检测在结肠直肠癌筛查中的准确性。这些检验通常检测血红蛋白的球蛋白,该蛋白在通过上胃肠道后不能继续存在。因此,阳性免疫检验结果指示下胃肠道出血。然而与所有基于免疫的检验一样,这些检验具有“前带”或“高剂量环(hook)”效应,其中在具有大量分析物时,所述检验可以被抑制,从而可能忽略严重的出血。

血红蛋白的血红素具有假过氧化物酶活性,其催化过氧化物底物降解,并释放氧气。释放的氧气可以通过适当的在氧化时改变颜色的显色指示剂,例如愈

创树脂或 3, 3', 5, 5' -四甲基联苯胺 (TMB) 检测。粪便隐血检验 (FOBTs) 利用所述反应检测来自血红细胞血红蛋白的血色素以检测肠道内出血, 本领域还有大量的类似检验方式 (参见例如, 美国专利 Nos. 3996007; 4225557; 4789629; 5064766; 5100619; 5106582; 5171528; 5171529; 5182191)。典型地, FOBTs 涉及将粪便样品涂抹至浸有愈创树脂的纸上, 加入含有过氧化物的显色剂溶液。如果存在血红素, 在粪便样品上或其周围显示蓝色。这些检验的缺点包括:

- 所述粪便样品可能还含有来自摄取的食物过氧化物酶或假过氧化物酶, 当没有来自肠道的人血液时, 这些酶可能会产生 (假) 阳性反应。
- 来自摄取的肉的血红素还可以产生假阳性反应;
- 阳性检验产生的蓝色必须要在黑色的粪便背景下读取, 因此, 当血红素浓度较低时, 所述结果可能是模糊的;
- 产生阳性结果时, 颜色在粪便样品周围扩散, 强度变弱, 可能会褪色 (色彩改变的短暂性质还可以使检验结果的解释变得困难或不可靠);
- 含有过氧化物和其它试剂的显色剂溶液可能会干扰免疫化学检验, 所述免疫化学检验可以与该检验结合以区分上胃肠道和下胃肠道出血 (参见例如 Enterix Inc. 的国际专利公开 W000/29852, 该申请中将检测任何肠出血的色原体检验和仅仅检测下部肠出血的免疫化学检验结合在一起)。

FOBTs 还被描述具有过氧化物试剂, 例如干燥在纸基质上的氢过氧化枯烯 (参见, 例如 Lam 的美国专利 No. 4071318)。在该例中, 直接将所述检验试纸加入水中, 如果水中存在血红素, 则其显示颜色。典型地, 在排便之后将这些 FOBTs 加入含有粪便的便盆中, 从而检测由粪便释放至水中的血。这些检验的缺点包括:

- 粪便上或其中的血可能不会以足够的浓度扩散至水中以进行检测;
- 所述检验必须在粪便或卫生纸的背景下读取, 使得结果的解释比较困难;
- 如果粪便和试纸直接接触, 所述检验还受到饮食中的血红素或过氧化物酶的干扰;
- 未显色的试纸必须在生产后在干燥的环境下存储, 以防止过氧化物试剂的降解, 从而在试纸上显示颜色。

本发明简介

贯穿该说明书以及随后的权利要求书,除非本文另有要求,术语“包括”及其变体,例如“包含”或“含有”应被理解为包括所声明的完整物或步骤或完整物组或步骤组,但是不排除任何其它的完整物或步骤或完整物组或步骤组。

一方面,本发明提供了一种用于检测生物样品尤其是粪便样品中的血红蛋白的装置,包括载体基质,所述载体基质包括:

(i) 用于接受所述生物样品的加样区域;

(ii) 与所述加样区域液体相通或者结合使用的底物区域,其上施加或其中浸有假过氧化物酶底物,所述假过氧化物酶底物包括过氧化物或过氧化氢试剂;以及

(iii) 与所述底物区域液体相通或者结合的指示剂区域,其上施加或其中浸有指示剂,存在血红素和所述假过氧化物酶底物时,所述指示剂产生可检测的响应。

在本发明该方面的一个实施方案中,所述加样区域和底物区域可以结合成一个单独的组合物品施加/底物区域,其上施加或其中浸有假过氧化物酶底物。然而在优选实施方案中,所述加样区域和底物区域在载体基质上为液体相通的分离区域。

在另一实施方案中,所述底物区域和指示剂区域可以结合成一个单独的组合物品/指示剂区域,其上施加或其中浸有假过氧化物酶底物和指示剂。然而优选地,所述底物区域和指示剂区域在载体基质上为液体相通的分离区域。

另一方面,本发明提供了一种检测生物样品尤其是粪便样品中的血红蛋白的方法,包括以下步骤:

(i) 将所述生物样品施加至载体基质的加样区域,所述载体基质包括所述加样区域、底物区域和指示剂区域;

(ii) 使所述生物样品与底物区域接触,其中所述样品与包含过氧化物酶或过氧化氢试剂的假过氧化物酶底物接触;以及

(iii) 将所述样品和假过氧化物酶底物与指示剂区域接触,其中所述样品和底物与指示剂接触,所述指示剂在血红素和所述假过氧化物酶底物存在下产生可检测的响应。

在本发明该方面的一个实施方案中,在允许或使样品和底物流动至指示剂区域之前,所述生物样品可以在载体基质上的一个单独的组合物品施加/底物区

域与假过氧化物酶底物接触。然而在优选实施方案中,加样区域和底物区域为载体基质上的液体相通的分离区域,在允许或使样品流动至底物区域之前,将生物样品加至加样区域。

在另一实施方案中,通过允许或使样品从加样区域流动至所述底物/指示剂区域,所述生物样品可以在载体基质上的一个单独的组合底物/指示剂区域上与假过氧化物酶底物和指示剂接触。然而在优选实施方案中,载体基质上的底物区域和指示剂区域为液体相通的分离区域,在允许或使样品流动至底物区域而后允许或使样品和底物流动至指示剂区域之前,将生物样品加至加样区域。

在一特别优选实施方案中,本发明的装置和方法可以将如上所概括的检测生物样品中的血红素与检测球蛋白的免疫化学检验结合在一起,从而提供双重检验以区分上胃肠道出血和下胃肠道出血,这在检测下胃肠道疾病例如结肠直肠癌中尤其有用。

在该优选实施方案中,如上概括所述的装置的载体基质进一步包括,

(iv) 与加样区域液体相通的第二底物区域,其上施加或其中浸有可检测的抗球蛋白免疫相互作用分子,所述免疫相互作用分子在球蛋白存在下形成可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物;以及

(v) 与所述第二底物区域液体相通的检测区域,其中固定有抗球蛋白免疫相互作用分子,所述被固定的免疫相互作用分子固定所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物。

类似的,在该优选实施方案中,如上概括所述的本发明的方法进一步包括以下步骤:

(vi) 将所述生物样品与第二底物区域接触,其中所述样品与可检测的抗球蛋白免疫相互作用分子接触,从而在球蛋白的存在下,形成可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物;以及

(vii) 将所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物与检测区域接触,其中所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物与固定的抗球蛋白免疫相互作用分子接触,从而固定所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物。

优选地,允许或使所述生物样品从加样区域流动至与加样区域液体相通的第二底物区域,允许或使可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物从第二底物区域流动至与第二底物区域液体相通的检测区域。

本发明的详细描述

本发明提供了一种经改进的检测血红蛋白的检验模式,其尤其适用于检测做为肠出血的指示剂的血红蛋白。该模式还设计可以与检测球蛋白的免疫化学检验相配合,从而可以实现区分上肠道出血和下肠道出血的双重检验。

本发明涉及利用液体样品(怀疑包含有血液)从施加点经过含有检测血红素所需要的试剂的一个或多个区域的侧向流动。该检验模式的各组分的侧向流动设置具有以下优势:

- 阳性结果所产生的颜色随着所述流动到达载体基质的端部而聚集,从而浓缩所述颜色,有利于读取方便;
- 阳性反应的颜色不受任何粪便或其他模糊背景材料的影响;
- 饮食中的污染物,例如来自肉的血红素或食物中的过氧化物酶,在侧向流动上被稀释,在很多情况下被稀释至低于它们的阈值检测限;
- 加样区域可以含有增强剂,以促进下游检测组件对血红素的精确和敏感的检测;
- 不相容的或相互不稳定的组分或试剂(例如底物和指示剂试剂)可以位于分离的区域,从而可以长期保存,而不需要特殊的生产或存储预防措施;
- 由于所有的试剂可以浸在分离的区域,可以采用水、水/乙醇混合物或其它任何的惰性试剂以进行所述检验;
- 因此,显色血红素检验(其检测任何的肠出血)可以与免疫化学检验(专门用于下肠道出血)结合,从而允许对一个检验样品分辨上肠道出血和下肠道出血。

本发明提供了一种用于检测生物样品尤其是粪便样品中的血红蛋白的装置,包括载体基质,所述载体基质包括:

- (i) 用于接受所述生物样品的加样区域;
- (ii) 与所述加样区域液体相通或者结合使用的底物区域,其上施加或其中浸有假过氧化物酶底物,所述假过氧化物酶底物包括过氧化物或过氧化氢试剂;以及
- (iii) 与所述底物区域液体相通或者结合使用的指示剂区域,其上施加或其中浸有指示剂,存在血红素和所述假过氧化物酶底物时,所述指示剂产生可检测的响应。

本发明还提供了一种检测生物样品尤其是粪便样品中的血红蛋白的方法,

包括以下步骤:

- (i) 将所述生物样品施加至载体基质的加样区域, 所述载体基质包括所述加样区域、底物区域和指示剂区域;
- (ii) 使所述生物样品与底物区域接触, 其中所述样品与包含过氧化物酶或过氧化氢酶试剂的假过氧化物酶底物接触; 以及
- (iii) 将所述样品和假过氧化物酶底物与指示剂区域接触, 其中所述样品和底物与指示剂接触, 所述指示剂在血红素和所述假过氧化物酶底物存在下产生可检测的响应。

提及“生物样品”应当理解是指来自动物的生物材料的任何样品, 例如但是不局限于粪便、粘液、尿、活检标本, 以及引入动物体内然后排出的液体, 例如肺灌洗之后从肺排出的盐溶液或洗肠后排出的溶液。根据本发明的方法检验的生物样品可以直接进行检验, 或者在检验前需要某些形式的处理。例如, 活检样品在检验前可能需要均质化。进一步地, 对于不是液体形式的生物样品(例如可以为固体、半固体或脱水液体样品), 可能需要加入试剂, 例如缓冲液, 从而使样品流动起来。可以在将样品施加至载体基质之前, 将流动试剂与生物样品混合, 或者在将样品施加至载体基质之后, 将试剂加至样品上。为了便于样品沿着载体基质侧向流动(芯吸), 也可以要求采用流动试剂。优选地, 所述生物样品为胃肠道样品。“胃肠道样品”是指来自胃肠道的任何样品。例如, 粪便、粘液(例如来自直肠粘液拭子的粘液)、灌肠溶液或胃肠道活检样品。最优选地, 所述生物样品为粪便样品, 或者来自含有粪便的便盆的水样品。

本文中的术语“动物”包括人、灵长类、牲畜动物(例如羊、猪、牛、马、驴)、实验室的实验动物(例如小鼠、大鼠、兔、豚鼠)、作伴的动物(例如狗、猫)、捕捉的野生动物(例如狐狸、袋鼠、鹿)、鸟类(例如鸡、鹅、鸭、鸚鵡、鸵鸟)、爬行动物或鱼类。然而优选所述动物为人。

优选地, 形成本发明检验装置使用的载体基质为适当材料的测试条形式, 其允许基质的不同区带或区域之间液体相通。特别优选的材料为允许毛细管流动的材料, 例如具有开放小室的化学惰性的基质, 其中多孔塑料材料、滤纸和玻璃纤维为优选。其他适当的材料为本领域公知的(参见例如 Lam 的美国专利 4071318), 包括在本发明的范围内。

优选地, 载体基质的加样区域包括吸收垫, 例如无纺聚酯垫, 其中浸有溶解

样品中存在的任何红细胞的试剂,从而释放血红蛋白,减少与垫的结合,并促进样品从所述垫流动。尤其适合的溶解试剂为去污剂(例如 Triton X100)。将样品施加至垫之后,可以将流动剂例如水或水/乙醇混合物加至垫,使样品中任何血红素(和球蛋白)发生流动,允许或使得样品通过毛细管作用流动或芯吸通过载体基质至底物区域。

存在于底物区域中的假过氧化物酶底物包括作为主要试剂的过氧化物酶或过氧化氢酶试剂,可选地含有本领域技术人员公知的辅助稳定剂、增强剂和促进剂。适当的过氧化物酶或过氧化氢酶试剂包括例如 t-丁基过氧化氢、氢过氧化枯烯、二氢过氧化枯烯、2,5-二甲基己烷-2,5-二过氧化氢、对薄荷烷(paramenthane)过氧化氢或其混合物。其中,发现氢过氧化枯烯是最优选的。适当的稳定剂和增强剂也是本领域公知的,包括作为稳定剂的硼酸酯,例如三甲醇胺硼酸盐、三乙醇胺硼酸盐和三(正丙醇)胺硼酸盐,作为增强剂的 6-甲氧基喹啉(参见 Lam 的美国专利 4071318)。

存在于指示剂区域从而在血红素和假过氧化物酶底物存在下产生可检测的响应的指示剂优选为色原体,例如愈创树脂或联苯胺化合物例如联苯胺、0-联甲苯胺、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、2,7-二氨基芴以及这些化合物不同比例的混合物。再次,指示剂中可以含有本领域技术人员公知的稳定剂和/或增强剂。

优选地,在实施本发明的方法时,将样品加入加样区域中的吸收样品垫上,其中样品中的任何血红细胞被样品垫中的去污剂或其它溶解试剂溶解,释放血红蛋白。然后允许或使样品通过毛细管作用从样品垫流动至底物区域,采用水或水/乙醇作为流动剂,以进行检验并溶解干燥的假过氧化物酶底物(例如枯烯过氧化物)以及其它的位于该底物区域中的稳定和增强试剂。然后允许或使得样品和假过氧化物酶底物通过毛细管作用流动至指示剂区域,在这里通过与色原体例如愈创树脂或 TMB 的反应,产生可检测的颜色变化,检测样品中血红素的存在。

在本发明的优选方面,如上所详细描述,检测生物样品中的血红素与“双重检验”中的免疫化学检验结合,这允许区分检验样品的上肠道出血和下肠道出血。

因此,在此方面,本方明提供了一种如上概括所述的检验装置,其中载体基

质进一步包括,

(iv) 与加样区域液体相通的第二底物区域,其上施加或其中浸有可检测的抗球蛋白免疫相互作用分子,所述免疫相互作用分子在球蛋白存在下形成可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物;以及

(v) 与所述第二底物区域液体相通的检测区域,其中固定有抗球蛋白免疫相互作用分子,所述被固定的免疫相互作用分子固定所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物。

本发明检验装置的载体基质还可以包括除以上特别描述的区域之外的其它区域。例如,所述装置还可以包括位于指示剂区域和/或检测区域之后的一个或多个吸收垫,从而将流动液体前缘从加样区域吸收通过相互之间液体相通的各个区域从而实现检验。

在优选方面,本发明还提供了一种如上概括所述的方法,其中进一步包括以下步骤:

(vi) 将所述生物样品与第二底物区域接触,其中所述样品与可检测的抗球蛋白免疫相互作用分子接触,从而在球蛋白存在的情况下,形成可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物;以及

(vii) 将所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物与检测区域接触,其中所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物与固定的抗球蛋白免疫相互作用分子接触,从而固定所述可检测的球蛋白-抗球蛋白复合物。

在整个说明书中提及的“免疫相互作用分子”应当理解是指包括抗原结合部分的任何分子或所述分子的衍生物。本发明的该方面所考虑的例子包括但不限于单克隆和多克隆抗体(包括合成抗体)、杂交抗体、人源化抗体、催化抗体和T细胞抗原结合分子。优选地,所述免疫相互作用分子为抗体。

Enterix Inc. 申请的国际专利申请公开号 W000/29852 中对第二底物区域中存在的适当的可检测抗球蛋白免疫相互作用分子和检测区域中存在的适当的固定抗球蛋白免疫相互作用分子进行了全面的描述,该申请的内容通过引用的方式结合至本文。

可以通过本领域技术人员知晓的任何方便的方法“检测”球蛋白-抗球蛋白复合物的形成。在本文描述的本发明的优选方法中,通过芯吸生物样品前缘重新悬浮的抗球蛋白抗体与胶体金络合。由于球蛋白-抗球蛋白/胶体金络合物被载

体基质检测区域中浸渍的抗球蛋白捕获抗体捕获,在络合物的捕获过程中,由于此处胶体金浓度不断增加,在该点胶体金变成可视的粉红色条带。或者,所述抗球蛋白抗体可以为放射标记的,或酶促标记的,从而如果存在球蛋白,则加入底物时可以观察到颜色改变。

在本发明“双重检验”方面的一个优选实施方案中,血红素的检测如上详细描述。采用层析测试条检测生物样品中的球蛋白,所述测试条包括第二底物区域和检测区域。所述第二底物区域为固定的抗球蛋白抗体与胶体金颗粒偶联的区域,其经由通过的液体前缘再次悬浮,而检测区域为固定的抗球蛋白捕获抗体的区域。

在本发明的该优选方面,加至加样区域的生物样品流动或芯吸至第二底物区域,在该区域,存在于样品中的任何血红蛋白的球蛋白组份与偶连至胶体金颗粒的抗球蛋白抗体结合。通过的生物样品前缘将这些抗体再次悬浮,并且所述球蛋白-抗球蛋白络合物流动或芯吸至检测区域,在这里样品中存在的任何血红蛋白的球蛋白组份和结合在球蛋白-抗球蛋白络合物中的球蛋白组份与可检测的固定的抗球蛋白捕获抗体结合。

在该双重检验方面中,通过分析粪便样品中血液的存在,本发明可以用于诊断胃肠道出血。本发明没有局限于任何的理论或行为模式,色原体检验将确定来自胃肠道任何部位的出血(也就是说,胃肠道的上部和下部),这是因为其检测血红蛋白的血红素成分,而血红素在小肠(上胃肠道)中相对不容易降解。然而,血红蛋白的球蛋白组份不能在通过上胃肠道后保存下来。因此,粪便样品的阳性球蛋白结果指示出血发生在下胃肠道。因此,通过采用结合在一起的双重基于免疫和基于非免疫的检验,可以区分上胃肠道和下胃肠道出血,其中阳性血红素结果和阴性球蛋白结果指示上胃肠道出血,阳性血红素结果和阳性球蛋白结果指示下胃肠道出血。这对于例如诊断症状包括下胃肠道出血的结肠直肠癌来说是尤为重要的。

本发明的检验装置和方法的进一步特征将参照附图在以下进行更加全面的描述。

附图的简要描述

附图1为根据本发明优选实施方案的“双重”检验装置的示意图。

附图 2A 和 2B 为根据本发明的替换装置的示意图。附图 2A 显示了 FOBT 测试条, 附图 2B 显示了位于外壳内的 FOBT 测试条。

附图 3 为根据本发明的另一替换装置的示意图。

优选实施方案的描述

附图 1 示意性地显示了根据本发明的双重测试条形式, 其包括在单个测试条上液体相通的以下组件:

浸有 TMB 的指示剂试纸 (1);

浸有底物 (例如干燥的枯烯过氧化物) 的纸 (2);

样品垫 (例如浸有去污剂, 例如 Triton X100 的无纺聚酯) (3);

轭合垫 (例如金标记的抗人球蛋白抗体) (4);

固相 (例如固定有抗人球蛋白抗体线和程序控制线的硝酸纤维素膜) (5);

吸收垫 (6)。

组件 1、2 和 3 构成了本发明测试装置的基本组成。如果需要, 组件 1 和 2 可以结合在一起, 只要遵守预防措施以提供不同试剂的存储稳定性。组件 4、5 和 6 构成了本发明优选实施方案的其他组分, 所述实施方案包括免疫化学测试条, 以检测作为下肠道出血的人球蛋白。

将样品, 例如来自直肠指检 (DRE) 的粪便样品, 或者取自便盆中粪便周围的水样品加至样品垫 3 上, 在此通过样品垫上浸渍的去污剂将任何血红细胞溶解, 加入显色剂溶液。所述显色剂溶液可以为水, 或者可以包括缓冲液、乙醇和其它有助于反应并与两种测试类型相容的试剂。显色剂溶液使血红细胞释放的任何血红蛋白从样品垫流动, 并从垫 3 侧向移动以两个方向通过测试条的侧边区域。

如果存在, 血红素与底物区域 2 中的假过氧化物酶底物混合, 然后与指示剂区域 1 中的显色指示剂混合, 其中颜色在区域端部 1 中积聚。

如果存在, 用底物区域 4 中的金标抗体轭合物标记之后, 球蛋白在检测区域 5 中被检测。过量的显色剂溶液和其它试剂在吸收垫 6 中积聚。

显然, 附图 1 所示的双重测试条可以包装在适于接收垫 3 上的样品的外壳内, 其具有供视觉或测量检测指示剂区域 1 和检测区域 5 中的结果的设备 (例如窗口或类似孔隙)。

例 1

基于 Lam 的美国专利 No. 4071318 制备以下试剂溶液:

溶液 A:

水	10 mL
柠檬酸三钠	213 mg
柠檬酸	147 mg
EDTA	6.7 mg
月桂基硫酸钠	67 mg
甲基砷	667 mg
丙酮	1.67 mL

溶液 B (指示剂)

四甲基联苯胺 (TMB)	26.7 mg 溶解于其中
二甲亚砷	1.67 mL

溶液 C (底物)

氢过氧化枯烯	133.3 mg
6-甲氧基喹啉	33.3 mg
三乙醇胺硼酸盐	667 mg
溶液 A	5 mL

为了制备反应试纸,在用前混合溶液 A, B 和 C, 并加至 Whatman#1 纸上直至纸被浸湿。被浸透的反应试纸垂直悬挂,以排去多余的液体,并在暖气流中干燥大约 30 分钟。将手指刺破的血用水稀释,将所述稀释液加入小片的反应试纸中,来确定反应试纸的活性。1/100 的稀释立即显示强蓝-绿色,1/1000 产生强蓝色,1/10000 较慢的显示绿色,而 1/100000 稀释在 1-2 分钟之后产生界限不明确的浅蓝。将水单独加至反应试纸上不产生颜色,甚至直至干燥也不产生颜色。

在如附图 2A (FOBT 测试条) 和 2B (位于外壳内的 FOBT 测试条) 所示构造的装置中检测所述反应试纸。用双面胶 (3M#465, 3MMN) 将附图 2A 所示的垫 A, B, C 和 D 分层叠加至白色塑料 (高密实的聚苯乙烯) 背衬 (D) 上,并将所述层状物切割成大约 10mm 宽的测试条,从而制成 FOBT 测试条。然后将所述测试条放于防水的纸板外壳 (G) 中,所述外壳具有用于加入样品和试剂的端口 (E) 以及窗口 (F)。为了

便于读取测试结果, 垫 B 和 C 之间的分界位于测试外壳 (G) 的观察窗 (F) 的中心。

在附图 2A 所示的测试条中:

垫 A: 浸有 0.1% Triton X-100 去污剂的无纺聚酯织物 (例如, Ahlstrom 6613, Ahlstrom, PA)

垫 B: 反应试纸

垫 C: 白色塑料阻隔带

垫 D: 背衬

在该测试条中, 垫 A 为样品施加垫, 垫 B 为组合的底物/指示剂区域。

将用水 1/1000 稀释的血液通过样品端口 (E) 加入附图 2A 所示测试条的垫 A 上, 之后加入三滴水。液体从垫 A 迁移通过垫 B, 从而在 25 秒内在与垫 C 白色不透水的屏障层相贴的垫 B 的一端积聚了强蓝色。在垫 A 中单独加入水在测试窗中不会产生颜色。

例 2

为了 FOBT 测试条的长期稳定性, 制备底物和指示剂区域, 并分别层压至如附图 3 所示构造的测试条中, 其为附图 2A 所示测试条的变化形式。

在附图 3 的测试条中, 垫 A 为样品施加垫, 垫 B1 为底物区域, 垫 B2 为指示剂区域。如例 1 所述制备测试条, 采用底物纸 B1 和指示剂纸 B2 代替反应纸 B, 如下所述:

底物纸 B1: 制备溶液 C, 浸入 Whatman#1 滤纸, 并滴干;

指示剂纸 B2: 混合溶液 A 和 B, 浸入 Whatman#1 滤纸, 并滴干;

然后在低热中通过强迫通风将纸 B1 和 B2 完全干燥。

将用水 1/1000 稀释的 10 μ L 人血液加至附图 3 的测试条的垫 A 上, 然后加入三滴试剂, 所述试剂包括小牛血清白蛋白 (3%)、乙醇 (10%) 和溶解于 pH8.5 的 40mM 硼酸钠缓冲液的叠氮钠。蓝色聚集在膜 B2 和 C 的交界处。仅仅加入水样不产生颜色。

在供选实施方案中, 在生产过程中, 底物溶液 C 可以结合至垫 A 中, 测试条中省略了垫 B1。

例 3

结合使用如例 1 所述的 FOBT 测试条和市售的免疫化学 (ICT) 测试条 (InSure FIT, Enterix Inc., NJ)。采用这些 ICT 测试条检测作为下肠道出血指示剂的人

球蛋白。

将两个测试条 (FOBT 和 ICT) 头尾连接放置, 从而使 ICT 条的起始点与例 1 所述测试条的垫 A 接触。将 10 μ L 用水 1/1000 稀释的人血液加至垫 A, 之后加入四滴例 2 中所述的试剂。样品从施加点向两个方向迁移, 两个测试均显示阳性结果。当以同样方式对含有从牛样品抽取的经稀释的血液的水进行检测时, FOBT 测试条显示阳性结果 (即血红蛋白阳性), 而 ICT 测试条显示阴性结果 (即人球蛋白阴性)。单独加入水两个测试均显示阴性结果。

本领域的技术人员将认识到本文所述的本发明除了特别所述之外还可以进行变化和修改。应当理解, 本发明包括所有这些变化和修改。本发明还包括该说明书中单独或共同提及或暗示的所有步骤、特征、组成和化合物, 以及包括任意两个或多个所述步骤或特征的所有组合。

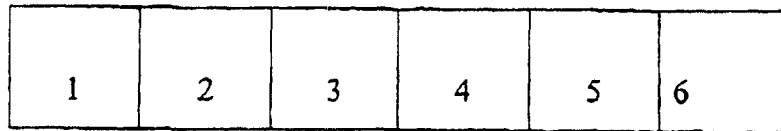


图1

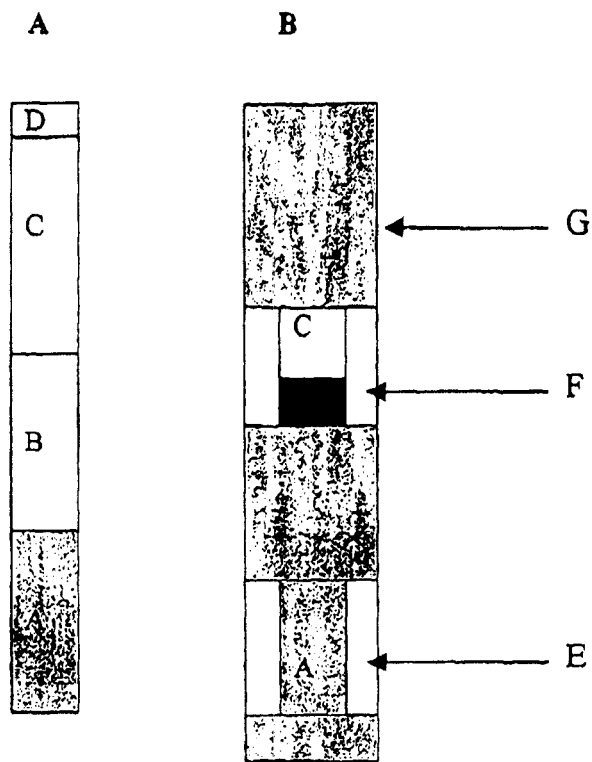


图2

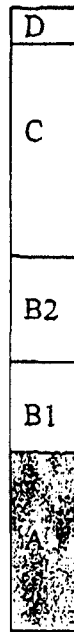


图 3

专利名称(译)	检测生物样品中血红蛋白存在的装置和方法		
公开(公告)号	CN1950703A	公开(公告)日	2007-04-18
申请号	CN200580013641.X	申请日	2005-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	恩特里克斯公司		
[标]发明人	HM钱德勒		
发明人	H·M·钱德勒		
IPC分类号	G01N33/72 G01N33/53 C12Q1/28		
CPC分类号	Y10S435/91 Y10S435/81 G01N33/725 C12Q1/28 Y10S436/91 G01N33/721 Y10S436/81		
代理人(译)	李华英		
优先权	60/566731 2004-04-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种装置和方法，用于检测生物样品中血红蛋白的存在，尤其是粪便样品中血液的存在作为上胃肠道或下胃肠道出血的指示剂。

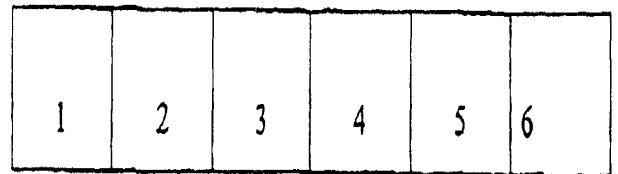


图1