

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710069070.2

[43] 公开日 2007 年 11 月 28 日

[11] 公开号 CN 101078724A

[22] 申请日 2007.6.8

[21] 申请号 200710069070.2

[71] 申请人 艾博生物医药(杭州)有限公司

地址 310018 浙江省杭州市经济技术开发区
12 号大街(东)198 号

[72] 发明人 黄富强 陆维克 吴银飞 高 飞

[74] 专利代理机构 杭州九洲专利事务所有限公司
代理人 周涌贺

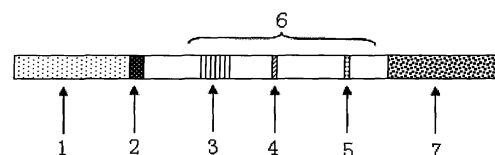
权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种用于检测被分析物质的检测装置和方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用于检测被分析物质的检测装置和方法,包括可移动区域、阻拦区域和检测区域,可移动区域包括可以随液体流动的带有标记物质的特异结合被分析物质的分子,该分子上还连接有与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子;阻拦区域上固定一种与被分析物类似的物质;检测区域上固定与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子。本发明的装置和方法,可以直观显示检测的结果,而且只需要操作一步就能完成反应,同时提高检测的灵敏度和准确性。



1. 一种用于检测被分析物质的检测装置，顺次包括可移动区域、阻拦区域和检测区域，其特征在于：可移动区域包括可以随液体流动的带有标记物质的特异结合被分析物质的分子，该分子上还连接有与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子；阻拦区域上固定一种与被分析物类似的物质；检测区域上固定与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子。
2. 根据权利要求1所述的用于检测被分析物质的检测装置，其特征在于，所述的特异结合被分析物质的分子与被分析物类似的物质的亲和力大于特异结合被分析物质的分子与被分析物质之间的亲和力。
3. 根据权利要求1或2所述的用于检测被分析物质的检测装置，其特征在于，所述的与被分析物质不相关的特异结合分子对选自于生物素/亲和素、生物素/链霉亲和素、若丹明/若丹明的抗体或者葡萄球菌蛋白/动物免疫球蛋白G。
4. 根据权利要求1或2所述的用于检测被分析物质的检测装置，其特征在于，所述的与被分析物类似的物质选自于：被分析物质对应的抗原或抗原片段；所述的特异结合被分析物质的分子选自于：被分析物质对应的抗体或抗体片段。
5. 根据权利要求1或2所述的用于检测被分析物质的检测装置，其特征在于，在所述的可移动区域上的与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子为生物素；在所述的检测区域上固定的与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子选自于亲和素或链霉亲和素。
6. 根据权利要求1或2所述的用于检测被分析物质的检测装置，其特征在于，所述的标记物质选自于：乳胶颗粒或胶体金颗粒。
7. 根据权利要求1所述的用于检测被分析物质的检测装置，其特征在于，所述的被分析物质为四氢大麻酚；所述的可移动区域包括浓度为0.0125%的可以随液体流动的带有乳胶标记的四氢大麻酚抗体，该抗体上还连接有生物素；阻拦区域上固定浓度为2.0mg/ml的四氢大麻酚抗原；检测区域上固定浓度为0.1mg/ml的链霉亲和素。
8. 一种采用权利要求1所述装置检测被分析物质的方法，其特征在于：其步骤如下：
 - a) 让样本和可移动区域接触，其中可移动区域包括可以随液体流动的带有标

- 记物质的特异结合被分析物质的分子，该分子上还连接有与被分析物质不相关的特异结合的分子对之一种分子；
- b) 让经过可移动区域的样本与阻拦区域接触，其中阻拦区域固定一种与被分析物类似的物质；
- c) 让经过阻拦区域的样本和检测区域接触，其中检测区域上固定与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子。
9. 根据权利要求 8 所述的检测被分析物质的方法，其特征在于，所述的特异结合被分析物质的分子与被分析物类似的物质的亲和力大于特异结合被分析物质的分子与被分析物质之间的亲和力。
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的检测被分析物质的方法，其特征在于，所述的与被分析物质不相关的特异结合分子对选自于生物素/亲和素，生物素/链霉亲和素，若丹明/若丹明的抗体或葡萄球菌蛋白/动物免疫球蛋白 G。
11. 根据权利要求 8 所述的检测被分析物质的方法，其特征在于，所述的可移动区域上的与被分析物不相关的特异结合分子对之一种分子为生物素；检测区域上与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子选自于亲和素或链霉亲和素。
12. 根据权利要求 8 或 9 所述的检测被分析物质的方法，其特征在于，所述的被分析物类似的物质选自于：被分析物质对应的抗原或抗原片段；所述的特异结合被分析物质的分子选自于：被分析物质对应的抗体或抗体片段。
13. 权利要求 8 或 9 所述的检测被分析物质的方法，其特征在于，所述的标记物质选自于：乳胶颗粒或金标颗粒。

一种用于检测被分析物质的检测装置和方法

技术领域

本发明涉及检测领域里的一种检测装置及检测方法，更具体的讲，涉及一种检测样本中是否存在被分析物质的装置以及使用该装置进行检测的方法，特别是检测样本中的半抗原小分子物质的装置和方法。

背景技术

利用免疫结合反应原理来检测样本中是否存在被分析物质的这一技术被广泛用在各个领域。可以用它来检测各种生物样本（唾液，血液，尿液，血清，汗液等等）的被分析物质来监测疾病和人类的健康状况（早孕，肿瘤，传染病，毒品等等）。这种检测技术的根本原理是建立在免疫分子之间具有特异结合的性能，例如抗体与抗原，半抗原/抗体，生物素与抗生物素等等。另外，很多这样的检测都可以在固体介质上完成，例如常用的横向流动试剂条，玻璃或塑料多孔盘中，免疫层析装置等等。通常，在免疫特异结合分子上可以再结合一些固体颗粒或者化学物质，这样可以通过肉眼或其他仪器设备来定性，定量或半定量的得出检测结果。这种固体颗粒可以是带颜色的胶体颗粒（乳胶或金颗粒），这种化学物质可以是带有发色基团的物质，这些物质在其他合适的条件下可以发出特定波长来显示检测结果。

利用这些原理的检测试剂条或装置在现有技术中都可以找到，例如如下一些专利描述的试剂条或含有试剂条的装置：US 4857453；US 5073484；US 5119831；US 5185127；US 5275785；US 5416000；US 5504013；US 5602040；US 5622871；US 5654162；US 5656503；US 5686315；US 5766961；US 5770460；US 5916815；US 5976895；US 6248598；US 6140136；US 6187269；US 6187598；US 6228660；US 6235241；US 6306642；US 6352862；US 6372515；US 6379620；和US 6403383。

免疫检测通常包括两种原理，三明治法和竞争法，其中用竞争方法来检测样本中的半抗原小分子物质最为常见。利用竞争法检测的方法和试剂以及检测装置在美国专利US4235601；US4442204，US5208535，US5229073里有详细的描述。这些装置都是描述在检测区域上或结果读取区域上没有颜色变化或没

有颜色线条出现的时候，检测结果判为阳性，表示检测样本可能存在被分析物质，相反，当检测区域或结果读取区域上出现颜色变化或者有颜色线条出现的时候，检测结果判为阴性，表示检测样本中可能不存在被分析物质。

美国专利5028535，5089391，5627526，5939272，5143852，5480792，5985579等专利中揭示了一种检测方法和装置，利用该装置检测半抗原小分子物质的时候，当样本中存在小分子物质或者小分子物质的浓度大于一个预先设计的值的时候，在检测区域上出现颜色变化或出现线条表示阳性结果，相反为阴性结果表示样本中不存在被分析半抗原小分子或者小分子的浓度小于一个预先设计的值，即直观显示阳性结果的检测方法或装置。

虽然利用这种装置和方法可以一次检测多个被分析物质，但是利用这种装置和方法先要把检测样本和反应试剂在一个反应孔上进行反应10-15分钟，然后把反应混合液体滴加到预先处理有抗体的硝酸纤维素膜上，最后还要用液体冲洗数次，这样存在整个反应时间长，而且操作步骤繁琐，不能一步完成整个检测反应等缺陷。

美国专利5798273揭示了一种试剂条，试剂条包括固定有被分析类似物质的捕获区域和检测区域，在检测区域上的物质可以结合带有标记物质的被分析物质类似物（标记物质-被分析物质类似物）。利用该试剂条也可以达到直观显示阳性结果的检测目的，但是这种检测必须要先把样本，抗体和标记物质形成混合溶液然后再把该混合溶液加到试剂条的样本接受区域上。

美国专利6699722，申请公开2006/0141639揭示了一种试剂条，该试剂条沿着液体流动方向依次包括样本接受区域，可移动区域，第一捕获区域和第二捕获区域，其中在可移动区域上包括可以随液体流动的带有标记物质的被分析物质类似物（标记物质-被分析物质的类似物），在第一捕获区域上固定有第一捕获抗体，在第二捕获区域上固定有第二捕获抗体，带有标记物质的被分析物质类似物的质量大于样本中的被分析物质。当样本中存在被分析物质的时候，被分析物质和带有标记物质的被分析物质类似物一起向前流动，由于两者的质量不同，在液体中流动的速度也不一样，被分析物质先于带有标记物质的被分析物质类似物到达第一捕获区域并被第一捕获抗体捕获固定，这样后到达的带有标记物质的被分析物质类似物经过第一捕获区域到达第二捕获区域上，从而

在第二捕获区域上显示颜色表示阳性结果。这种试剂条在实际中很难运用，而且检测结果也不准确。

发明内容

本发明的目的是提供一种新的用于检测被分析物质的检测装置和方法，以克服现有技术存在的上述缺陷。

本发明所说的检测装置，包括可移动区域，阻拦区域和检测区域，其中可移动区域上包括可以随液体流动的带有标记物质的特异结合被分析物质的分子，该分子上还连接有与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子；阻拦区域上固定一种与被分析物类似的物质；检测区域上固定与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子。

较佳的，上述特异结合被分析物质的分子与被分析物类似的物质之间的亲和力大于特异结合被分析物质的分子与被分析物质之间的亲和力。

当样本中不存在被分析物质的时候，可以随着液体流动的带有标记物质的特异结合被分析物质的分子处于游离状态，到达阻拦区域时，带有标记物质的特异结合被分析物质的分子与被分析物类似物质形成复合物，并且被固定在阻拦区域上，这样在检测区域上就不能捕捉到带有标记物质的分子从而直观表示为阴性结果。当样本中存在被分析物质的时候，带有标记物质的分子特异结合被分析物质形成复合物。该复合物到达阻拦区域的时候，阻拦区域上的与被分析物类似的物质不能和该复合物结合，从而在检测区域上与被分析物质不相关的分子对之另一种分子特异结合，在检测区域上捕捉到带标记物质而直观表示为阳性结果。

一个优选的方案，可移动区域上的特异结合被分析物质的分子可以随液体流动，在实际操作中，样本先和特异结合被分析物质的分子接触进行反应，然后在一同流到处理有与被分析物类似的物质的区域，这样可以让样本中的被分析物质（如果有）可以比较充分的反应，然后再和与被分析物类似物质进行反应，从而提高检测的灵敏度，不会造成假阴性，从而避免漏检。更佳的，调节带有标记物质分子的数量，当样本中被分析物质的浓度大于预先设定值的时候，在检测区域上的检测分子结合带有标记物质的分子从而直观显示检测的结果表示样本中的被分析物质大于预先设定的值。

优选的，所说的与被分析物质不相关的特异结合分子对包括，但不仅限于此，

生物素/亲和素 (biotin/avidin), 生物素/链霉亲和素 (biotin/streptavidin), 抗体/抗原 (antibody/antigen) (不包括抗被分析物质的抗体和被分析物本身), 若丹明/若丹明的抗体 (rhodamine/anti-rhodamine), 老鼠 IgG/鼠 IgG 的抗体 (Mouse IgG/anti-mouse IgG), 葡萄球菌蛋白/动物免疫球蛋白 G 等等。

优选的, 可移动区域上的与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子为生物素, 在检测区域上固定的与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子选自亲和素或链霉亲和素。

优选的, 与被分析物类似的物质选自被分析物质对应的抗原或抗原片段。

优选的, 特异结合被分析物质的分子选自被分析物质对应的抗体或抗体片段, 包括单克隆抗体和多克隆抗体。

优选的, 标记物质选自乳胶颗粒或胶体金颗粒。

优选的, 可移动区域上包括可以随液体流动的带有乳胶颗粒的特异结合被分析物质的抗体, 该分子上还连接生物素; 阻拦区域上固定被分析物的抗原; 检测区域上固定亲和素或链霉亲和素。

优选的, 该装置包括试剂条, 该试剂条顺次包括样本接受区域, 可移动区域, 阻拦区域, 检测区域, 检测控制区域和吸水区域。检测区域上可以直观显示检测结果, 有颜色变化或有线条出现表示阳性结果, 无颜色变化或没有线条出现表示阴性结果。

另一方面, 本发明提供一种检测样本中是否存在被分析物质的方法, 包括样本顺次经过可移动区域, 阻拦区域和检测区域, 通过以下步骤实现:

让样本和可移动区域接触, 其中可移动区域包括可以随液体流动的带有标记物质的特异结合被分析物质的分子, 该分子上还连接有与被分析物质不相关的特异结合的分子对之一种分子; 让经过可移动区域的样本与阻拦区域接触, 其中阻拦区域固定一种与被分析物类似的物质; 让经过阻拦区域的样本和检测区域接触, 其中检测区域上包括与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子。

较佳的, 特异结合被分析物的分子与被分析物类似的物质的亲和力大于特异结合被分析物质的分子与被分析物质之间的亲和力。

较佳的, 与被分析物质不相关的特异结合分子对选自生物素/亲和素, 生物素/链霉亲和素, 若丹明/若丹明的抗体, 葡萄球菌蛋白/动物免疫球蛋白 G 等。

优选的, 可移动区域上的与被分析物不相关的特异结合分子对之一种分子为

生物素；检测区域上与被分析物不相关的特异结合分子对之另一种分子选自于亲和素或链霉素。

较佳的，被分析物类似的物质选自于被分析物质对应的抗原或抗原片段。

较佳的，特异结合被分析物质的分子选自于被分析物质对应的抗体或抗体片段。

较佳的，标记物质选自于乳胶颗粒或金标颗粒。

定义：

除非另外定义，在此使用的所有技术和科学术语与该发明所属技术领域的一般技术人员所使用的术语具有相同的含义。

“顺次”表示沿着液体流动方向顺序排列的位置，比如，用于检测被分析物质的检测装置顺次包括可移动区域、阻拦区域和检测区域，表明的是这三者的位置关系，可以理解为可移动区域在前面位置，阻拦区域位于可移动区域和检测区域之间。

“检测”表示化验或测试一种物质或材料是否存在，比如，但并不限于此，化学物质、有机化合物、无机化合物、新陈代谢产物、药物或者药物代谢物、有机组织或有机组织的代谢物、核酸、蛋白质或聚合物。另外，检测表示测试物质或材料的数量。进一步说，化验还表示免疫检测，化学检测、酶检测等。

“直观的检测”表示检测的结果直接可以反映出样本中是否存在被分析物质或存在被分析物质的多少。例如，当样本中不存在被分析物质或被分析物质的浓度小于预先设立值的时候，在检测区域上不出现颜色变化或出现颜色线条表示阴性结果，相反，在检测区域上出现颜色变化或出现颜色线条，可以直接表示阳性结果。这种检测结果可以直接通过肉眼观察到，也可以通过仪器来读取。这样使检验者（例如医生）可以直接从检测结果得出样本中是否存在被分析物质或存在被分析物质的量是多少的结果。

“样本”包括体液（例如，尿液和其它体液，以及临床样本）。液体样本可能源自固体的或者半固体的样本，包括粪，生物组织和食物样本。这些固体的和半固体的样本可以通过任何适合的方法转变成液体样本，例如在一种适当的液体中混合，踩碎，浸软，孵育，溶解或者酶解固体样本（例如，水，磷酸盐缓冲液或者其它缓冲液）。“生物样本”包括源自活的动物、植物和食物的样本，也包括尿液、唾液、血液和血液成分、脑脊液、阴道拭子，精液、粪便、汗液、分泌物、组织、器官、肿瘤、组织和器官的培养物，细胞培养物和那里的条件介质，不管是人的还是

动物的。食物样本包括加工过的食物成分和最后的产品，肉，奶酪，酒，牛奶和饮用水。植物样本包括源自任何植物、植物组织、植物细胞培养物和那里的条件介质的样本。“环境样本”是那些源自环境的样本（例如，湖水样本或者其它水体的样本，污水样本，土壤样本，地下水样本，海水样本，废物废水的样本）。污水和相关的废物也可以包含在环境样本中。

“特异结合”表示一个分子通过物理或化学方式特异结合另一个分子，这两个分子之间的相互结合可以和其它结合相区别。这种两分子之间的特异结合除了包括抗原和抗原的抗体之外，还包括抗体和抗该抗体的另一抗体，生物素和抗生物素的蛋白，多肽片段之间，DNA 和 DNA，RNA 和 RNA，以及通过重组技术获得的特异结合配对分子等等。这种结合可以是直接的结合，还可以是通过它特异配对分子间接结合。这些特异结合是本领域技术人员结合本发明容易想到的。是指一种物质只能与相应的另一种物质专一结合。在一些具体方案中，特异性的结合分子可能是一种抗体或者一种抗体片段，一种抗原，一种结合配体的受体或者受体的片段，或者生物素-亲和素或者生物素-链霉素亲和素结合对的一个成分或者其它类型的结合对。

“被分析物质”在本发明的装置和方法中包括一些半抗原物质，这些半抗原包括毒品（如滥用药物）。“滥用药物”（DOA）是指非医学目的地使用药品（通常起麻痹神经的作用）。滥用这些药物会导致身体和精神受到损害，产生依赖性、上瘾并且/或者死亡。药物滥用的例子包括可卡因；安非他明（例如，黑美人、白色安非他命药片、右旋安非他命、右旋苯异丙胺药片、Beans）；甲基苯丙胺（crank、甲安非他明、crystal，speed）；巴比妥酸盐（如 Valium®，Roche Pharmaceuticals，Nutley，New Jersey）；镇静剂（即睡觉辅助药品）；麦角酸酞二乙胺（LSD）；抑制剂（downers，goofballs，barbs，blue devils，yellow jackets，安眠酮）；三环类抗抑郁剂（TCA，即丙咪嗪、阿密曲替林和多虑平）；苯环己哌啶（PCP）；四氢大麻醇（THC、pot，dope，hash，weed，等。）；鸦片制剂（即吗啡、鸦片、可待因、海洛因，羟二氢可待因酮）；抗焦虑药与镇静催眠药，抗焦虑药是一类主要用于减轻焦虑、紧张、恐惧，稳定情绪，兼有催眠镇静作用的药物，包括苯二氮卓类（benzodiazepines，BZ）、非典型 BZ 类、融合二氮 NB23C 类、苯氮卓类、BZ 受体的配体类、开环 BZ 类、二苯甲烷衍生物、哌嗪羧酸盐类、哌啶羧酸盐类、奎唑啉酮类、噻嗪及噻唑衍生物、其他杂环类、咪唑型镇静/止痛药、丙二醇衍生物-一氮

甲酸酯类、脂肪族化合物、蒽类衍生物等。使用该装置也可以用于检测属于医学用途但又容易服药过量的检测，如三环类抗抑郁药（丙米嗪或类似物）和乙酰氨基酚等。这些药品被人体吸收后会分解成不同的小分子物质，这些小分子物质存在于血液、尿液、唾液、汗水等体液中或部分体液存在上述小分子物质。

被分析物质还可以是人绒毛膜促性腺激素(hCG)，黄体生成素(LH)，卵巢刺激激素(FSH)，丙肝病毒(HCV)，乙肝病毒(HBV)，乙肝表面抗原，艾滋病病毒和任何滥用的药物。被分析物能够在任何的液体或者液化样本中检测到，例如尿液，唾液，口水，血液，血浆，或者血清。其它的被分析物的例子还有肌氨酐酸，胆红素，亚硝酸盐，蛋白质（非特异性的），血液，白细胞，血糖，重金属和毒素，细菌成分（例如，特定类型的细菌的特殊的蛋白质和糖分，例如大肠杆菌 0157:H7，金黄色葡萄球菌，沙门氏菌，产气荚膜梭菌，弯曲杆菌，单核增生李斯特菌，肠炎弧菌，或者腊状芽孢杆菌）。任何其它的适合侧流试验形式的被分析物都可以用本装置检测。

“被分析物类似的物质”包括，但并不限于此，在上述被分析物质（半抗原）上连接或耦联有蛋白分子可以引起免疫应答的抗原物质，还可以是被分析物质衍生的其他不同化学结构的物质并连接有免疫原蛋白的抗原物质，还可以是被分析物的派生物，异构体，同源体或者在结构或功能上类似的抗原物质。这些半抗原物质本身不会引起免疫应答产生抗体，只有连接或耦联上免疫原物质才能让动物体产生抗体。这些免疫原物质包括，但不局限于此，蛋白，自然或者合成的多肽或者一些糖类，例如血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin, KLH)、牛血红蛋白(Bovine gamma globulin, BGG)、牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)、牛甲状腺蛋白(Bovine Thyroglobulin, BTG)、卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)、抹香鲸肌球蛋白(Sperm Whale Myoglobin, SWM)、破伤风类毒素(Tetanus Toxoid, TT)、甲基化的牛血清蛋白(Methylated Bovine Serum Albumin, mBSA)、人免疫球蛋白 IgG 或 IgA (Human immunoglobulins IgG, IgA) 或者其他现有技术的免疫原蛋白。

抗体或抗体片段

“抗体”是指免疫球蛋白，无论是天然的还是部分或者全部合成的。这个术语还包括其中保持结合能力的抗体的衍生物，也包括任何含有与免疫球蛋白的结合域同源的或者很大程度上同源的结合域的蛋白质。这些蛋白质可能是源自天然物质，也可能是部分或者全部合成的。一种抗体可能是单克隆的或者是多克隆的。一种抗体

可能是任何免疫球蛋白类型中的一员，包括任何人类的免疫球蛋白类型：IgG, IgM, IgA, IgD, IgG 和 IgE。“抗体片段”是抗体的衍生物或者抗体的小于全长的一部分。抗体片段能够保留至少一个全长抗体的结合能力的显著位点。

抗体片段可以由任何方式生成。例如，抗体片段可以通过酶解或者化学裂解一个完整的抗体来生成，或者也可以通过从编码部分抗体序列的基因重组。换句话说，抗体片段可以部分地或者全部地重组产生。抗体片段可以是任意的单链抗体片段。换句话说，抗体片段可以包含多条相互联结的肽链，例如，通过二硫键相联结。抗体片段也可以是任意的一种多分子复合物。一个有功能的抗体片段通常包含至少大约 50 个氨基酸，而更多的抗体片段通常包含至少大约 200 个氨基酸。

详细描述

可移动区域

在检测装置中，可移动区域上包括与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子。当在检测区域上加入与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子的时候，在可移动区域上的与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子可以连接到特异结合分子对之另一种分子。被分析物质不相关的特异结合分子对包括，但不仅限于此，生物素/亲和素（biotin/avidin），生物素/链霉亲和素（biotin/streptavidin），抗体/抗原(antibody/antigen)（不包括抗被分析物质的抗体和被分析物本身），若丹明/若丹明的抗体（rhodamine/anti- rhodamine），老鼠 IgG/鼠 IgG 的抗体（Mouse IgG/anti-mouse IgG），葡萄球菌蛋白/动物免疫球蛋白 G 等等。更具体的讲，当在可移动区域上的带有标记物质的特异结合被分析物的分子上连接，标记，或耦联上与与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子的时候，在检测区域上就固定与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子。

较佳的，选用生物素/亲和素这对与被分析物不相关的特异结合的分子对。生物素是维生素 B 复合物的水溶性成分之一，可作为羧化酶的辅酶（又称为辅酶 R 或者维生素 H），参与各种羧化反应。生物素分子中有两个环状结构，其中 I 环为咪唑酮环，是与亲和素结合的主要部位；II 环为噻唑环，上有一戊酸侧链，其末端羧基是结合抗体和其他生物大分子的唯一结构。生物素分子小，结构简单，极易与抗体、核酸、多糖及多种酶等生物大分子以共价键稳定结合，同时对结合物的原始生物活性无不良影响。亲和素亦称抗生物素蛋白或卵白素，是从卵蛋白中提取的一

种碱性糖蛋白。天然亲和素是由4个亚单位组成的碱性糖蛋白，等电点为10.5。亲和素对生物素的亲和力极高，为抗原抗体反应的百万倍，具高度特异性和稳定性。亲和素性质极为稳定，每分子可结合4个生物素衍生物，其作为生物素化的分子之间的桥接物，起放大作用。同时，亲和素又是糖蛋白，可直接和各种生物分子如IgG及茶碱、蛋白质等耦联。

较佳的，选用生物素/链霉亲和素这对与被分析物不相关的特异结合的分子对。链霉亲和素（Streptavidin, SA）是链霉菌在培养过程中分泌的一种蛋白质产物。链霉亲和素PI为6.0，是一种与亲和素有相似特性的一种蛋白质，一个链霉亲和素分子也能结合4个生物素分子。由于其非特异性结合远比亲和素低，对聚苯乙烯、硝酸纤维素膜、DNA的非特异吸附比较低，在免疫组化中不会出现较强的背景色，是一种比较理想的特异结合的分子对。通过这样一个逐级放大的作用使液体移动到固定相时有尽可能少的含被分析物受体的物质能够通过（游离形式和复合物形式）此区域，减小了假阳性的可能性。

在检测装置中，可移动区域还包括可以随液体流动的特异结合被分析物质的分子，这种物质可以随着液体流动并通过阻拦区域，检测区域。这里所说的被分析物质包括样本中任何感兴趣的物质，包括但不限于，抗体，抗体片段，半抗原物质等等。

特异结合被分析物质的分子可以是被分析物质的抗体或抗体片段，等等，或者其他本领域一般技术人员熟悉的物质。特异结合被分析物质的分子通常被标记物质标记，这里的标记物质可以是酶，非水溶性颗粒，例如金属胶体颗粒（胶体金颗粒），乳胶颗粒等等，或者一些水溶性标记物质，还可以荧光标记物质。一个较佳的选择是选用乳胶颗粒作为标记物质，这是因为，乳胶分子相对其他标记物质比较大，带有乳胶颗粒的特异结合被分析物质的分子在经过阻拦区域时，大颗粒的物质速度比小颗粒物质慢，这样可以让带有标记物质的特异结合被分析物质的分子在阻拦区域上作稍长停留与阻拦分子进行充分反应，有利于减少检测结果的“假阳性”。

另外，在可移动区域上还可以包括一些带有标记物质的分子，这种分子和固定在检测控制区域上的分子结合起到验证检测结果是否有效或对照的作用，用来表示检测结果是否有效或者表示化验的完成等。

这些可以随液体流动的试剂可以被处理在固相上，例如一些吸水性材料上，比如玻璃纤维素，滤纸，硝酸纤维素膜上等等。特异结合被分析物质的分子和被分

析物质的类似物质通过常规手段处理在上述的载体上,当然在上述载体上还可以包括一些其他的试剂来改善或调节反应条件,例如处理一些缓冲溶液溶液试剂来调节反应的PH值等等。在这些固体表面处理试剂的方法以及试剂配置,选择也是本领域的一般技术人员通过查阅现有技术并结合本发明的技术可以容易完成的。并不是本发明的重点。

在一个优选的方式中,检测装置包括试剂条,在试剂条上,可移动区域可以位于阻拦区域的上游,也可以位于样本接受区域的下游,当然,可移动区域和阻拦区域以及检测区域可以位于同一个试剂条上。但是在检测装置中,也可以位于不同的试剂条上,只要沿着液体流动方向上,液体可以依次经过可移动区域,阻拦区域和检测区域就可以了。

亲和力大小

“亲和力”是指抗体与抗原结合的紧密程度,是单克隆抗体的另一个重要性质。亲和力越强,与抗原的结合越牢固。不同用途的单克隆抗体对亲和力有不同的要求。亲和力的高低是由抗原分子的大小、抗体分子的结合位点与抗原决定簇之间立体构型的合适度决定的。有助于维持抗原抗体复合物稳定的分子间力有氢键、疏水键、侧链相反电荷基因的库仑力、范德华力和空间斥力。亲和力常以亲和常数K表示,K的单位是L/mol,通常K的范围在 $10^8 \sim 10^{10}$ /mol,也有多达 10^{14} /mol。抗体亲和力的测定对抗体的筛选,确定抗体的用途,验证抗体的均一性等均有重要意义。

在当今小分子检测中,特别是毒品或药物滥用检测中,为了更好的区分药物滥用或吸毒患者与正常治疗性用药患者,在商业上常常需要提高检测的最低水平,即当患者体内含有某种较高浓度的待测物质时候,使检测的结果仍然为阴性。这样就不会让那些本来是因为治疗性用药者而被误认为是吸毒者。为了解决这一问题,在一个优选的方式中,选择特异结合被分析物质的分子与被分析物类似的物质的亲和力大于特异结合被分析物质的分子与被分析物质之间的亲和力更加有效,特别是要求提高检测的最低值(cut-off)时,采用此方法更加有效。详细的讲,特异结合被分析物质的分子和被分析物质之间的亲合力用K1表示,特异结合被分析物质的分子和被分析物类似物质之间的亲合力用K2表示,当选择这样的特异结合被分析物质的分子,即使K1小于K2的时候,需要样本中更多的被分析物质分子和被分析物质类似物质来竞争结合特异结合被分析物质分子上的位点,这样可以提高检测

的最低值（cut-off）的水平，即在相对高浓度被分析物质的时候还能使检测结果为阴性。

具体得说，可以选用被分析物质相应的抗原作为与被分析物类似的物质。当样本中存在被分析物质时，首先在可移动区域上与带有标记物质的特异结合被分析物质的分子结合形成复合物。在混合样本到达阻拦区域时，阻拦区域上的被分析物抗原和被分析物都能和带有标记物质的特异结合被分析物质的分子结合，两者因而形成竞争关系。由于被分析物抗原与带有标记物质的特异结合被分析物质的分子的亲和力大于被分析物质本身与带有标记物质的特异结合被分析物质的分子的亲和力，因而带有标记物质的特异结合被分析物质的分子优先选择与被分析物抗原结合。所以，如果样本中被分析物质的浓度比较低，在检测区域上则显示为阴性的结果，只有当样本中存在足够量的时候，在检测区域才能读到阳性的结果，通过这样的方法能达到提高检测的最低值（cut-off）的水平。

为了可以满足不同的检测要求，利用 K_1 小于或等于 K_2 的特异结合被分析物质的分子在本发明的技术方案中还是可行的。此外，本领域一般技术人员结合本发明所揭示的技术方案并结合现有技术所产生的其他技术方案也被包括在内。

阻拦区域

在一个优选的方案，在检测装置中，阻拦区域位于可移动区域的下游，在阻拦区域上固定一种与被分析物类似物质，这种物质能与特异结合被分析物质的分子结合，但是不能结合受体-被分析物复合物。这种分子可以是被分析物质的类似物，同源物，派生物，异构体或者是被分析物质的抗原或者抗原片段。

阻拦区域上的这些试剂可以处理在固相材料上，例如滤纸，纤维素膜，尼龙膜，一个优选的方案是硝酸纤维素膜。把阻拦分子处理在膜上的方法和方式是现有的公知技术。除此之外，阻拦区域上还可以包括其他一些辅助试剂，这些试剂可以改善阻拦分子固定在膜上效果，使阻拦分子更加稳定，分布更加均匀等等。这些辅助试剂的配置和出来都是现有技术公知的技术，本领域里的一般技术人员结合现有技术都可以完成。

另外，与被分析物类似的物质与特异结合被分析物分子的连接，耦联的方式和方法也是现有技术公知的技术，本领域里的一般技术人员结合现有技术都可以完成。

检测区域

在一个优选的方案中，在检测区域上固定的分子可以直接用来显示检测的结果。检测区域上的分子包括与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子。例如当相应的可移动区域上连接有与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子的时候，在检测区域上设置该分子对之另一种分子，当带有标记的可移动区域物质顺着液体流动方向到达检测区域时，与被分析物质不相关的两个特异结合分子可以互相结合，从而在检测区域上直观得读出阳性结果。实施本方案的优点在于，避免了被分子物质和与被分析物质特异结合过程中受复杂过程干扰而出现的“假阴性”结果，使检测结果更为准确。

另一个优选的方案中，检测区域上的分子除了包括与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子，还连接有特异结合被分析物质分子的抗体或抗体片段，或者不同来源的抗体。例如当特异结合分子为某种小分子物质的时候，可移动区域上特异结合该小分子物质的分子为该物质的抗体，固定在检测区域上的分子为该小分子物质的抗原；当特异结合被分析物质的分子为某种半抗原物质的单克隆抗体的时候，可移动区域上特异结合该半抗原物质的单克隆抗体的抗体（抗抗体），固定在检测区域上的分子为该半抗原物质的单克隆抗体。本实施方案的优点在于，除了与被分析物质不相关的特异结合分子对之间的耦联之外，还可以通过与可移动区域上的分子进一步特异结合。

更佳的，在检测区域上固定与生物素特异结合的亲和素或链霉亲和素，相应的可移动区域上连接有生物素分子。当带有标记的特异结合被分析物分子顺着液体流动方向到达检测区域时，由于生物素与亲和素或者链霉亲和素之间的特异结合，从而在检测区域上直观观察到阳性结果。

另一个优选的方案中，在检测区域上固定特异结合带有标记物质的分子，这种标记物质包括，但不限于此，酶，染料，荧光物质，化学发光物质，胶体金颗粒或乳胶颗粒。

另一个优选的方式为检测区域位于硝酸纤维素膜上，检测分子被固定在膜上的方法和方式是现有技术公知的技术。当然，在检测区域上还可以包括其他试剂，例如一些缓冲试剂，封闭试剂等等，这些试剂的添加可以改善检测区域上反应的环境，使检测反应更加准确。

检测装置

检测装置包括可移动区域、阻拦区域和检测区域。

在一个优选的方案中，检测装置包括基质材料组成试剂条。在试剂条上包括可移动区域、阻拦区域和检测区域。可移动区域上包括可以随液体流动的带有标记物质的特异结合被分析物质的分子，该分子上还连接有与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子，阻拦区域上固定与被分析物类似物质，检测区域上固定与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子。在一个具体方案中，试剂条条包含一种吸水材料，提供了支持液体流动的基质材料。“基质材料”是指支持液体流动和运输的一种材料。在一个具体方案中，基质材料是一种吸水材料。液体流过本装置是借助于毛细血管运动作用实现的。在不同的具体方案中，基质材料可以是单一材料构成的条状物，也可以是由多种在液体中相互作用的吸水材料合成，“吸水”的材料是指那些可以稳定地吸收水分并使水分在其中通过毛细血管运动作用运输的物质。吸水材料的例子包括硝化纤维，滤纸，玻璃纤维，聚酯和其它合适的物质。在一个具体是方式中，检测装置包括一接受样本的通道和观察检测结果的透明窗口，通过窗口通道可以读取检测的结果。这种含有试剂条的装置以及试剂条在装置中的位置关系是现有技术，例如如下专利或申请公开的装置都可以被运用到本发明的试剂条上，例如美国专利 6303081，6248598，6998273，6406992，6514769 等。

特异结合被分析物质的分子以及与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子在检测装置中的存在形式可以是固态或液体的形式存在，优选的方案中，特异结合被分析物质的分子以及与被分析物质不相关的特异结合分子对之一种分子以固态的形式存在于试剂条上。当有液体经过可移动区域的时候，可移动区域上的这些物质可以溶解在液体里形成液相随液体向下游移动。

更优选的，在检测装置还包位于可移动区域上游的样本接受区域和位于检测区域下游的吸水区域，在检测区域和吸水区域之间还包括检测结果控制区域。

检测方法

本发明提供一种检测样本中是否存在被分析物质的方法，包括样本顺次经过可移动区域，阻拦区域和检测区域，通过以下步骤实现：

让样本和可移动区域接触，其中可移动区域包括可以随液体流动的带有标记物质的特异结合被分析物质的分子，该分子上还连接有与被分析物质不相关的特异结合的分子对之一种分子；让经过可移动区域的样本与阻拦区域接触，其中阻拦区域包括与被分析物类似的物质；除去阻拦区域中带有标记物质的复合物；让经过阻拦区域的样本和检测区域接触，其中检测区域上包括与被分析物质不相关的特异结

合分子对之另一种分子。

优选的，让样本和带有标记物质的特异结合被分析物质的抗体进行反应，该抗体上还连接有生物素，用固定在固体介质上的与被分析物质类似的分子结合带有标记物质的特异结合被分析物的抗体，最后用固定在固体介质上的亲和素或链霉亲和素特异结合带有生物素的标记物质的分子来直观显示样本中的被分析物质是否存在或存在的数量。

优选的，可移动区域包括带有乳胶颗粒的特异结合被分析物质的单克隆抗体，该单克隆抗体上还连接有生物素，让样本先和该单克隆抗体接触；再用被分析物质的抗原阻拦游离的连接有生物素和乳胶颗粒的单克隆抗体；除去混合液中含有乳胶颗粒标记的复合物；再用亲和素或者链霉亲和素检测直观显示样本中是否存在被分析物质或存在数量的多少。

优选的，样本检测发生在一试剂条上，样本顺次通过样本接受区域，可移动区域，阻拦区域，检测区域，检测结果控制区域和吸水区域。

本发明取得的有益效果：使用本发明的这种检测装置和方法，当样本中存在半抗原分子的时候或者半抗原的浓度大于预先设定值的时候，显示的检测结果为直观阳性；当样本中不存在半抗原分子的时候或者半抗原的浓度小于预先设定值的时候，显示的检测结果为直观阴性。由此可见，本发明的方法，直观明确，现有技术中的试剂条都是在检测区域上没有颜色变化或不出现颜色线条的时候表示阴性结果，既表示样本中不存在被分析物质，相反，出现颜色变化或有线条出现表示阴性结果，即表示样本中存在被分析物质。另外，本发明的直观检测样本中的被分析物质的装置和方式和现有技术中的这些类似装置和方法比较，使检测的一步到位，灵敏度更高，更加准确，操作更加简便。

附图说明

图1 试剂条结构图。

1: 样本接受区域；2: 可移动区域；3: 阻拦区域；4: 检测区域；5: 检测结果控制区域；6: 硝酸纤维素膜；7: 吸水区域；

具体实施方式

以下结合具体实施例进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明，而非限制本发明的范围。

实施例 检测尿液中大麻 (THC)

结合附图 1 来说明试剂条各个部件的制作和处理：

样本接受区域 1。样本接受区域的材料为玻璃纤维，用缓冲溶液 (Borax 0.05M, pH 9.3；表面活性试剂: 2%的 S-17: (RHODASURF® ON-870)) 处理后在 37℃ 的烘箱里烘干。

可移动区域 2，包括 THC 的单克隆抗体(THC-Ab)，标记物质乳胶颗粒(latex)和生物素(Biotin)共同形成的标记物(Biotin-THC-Ab-latex)。

标记物 (Biotin-THC-Ab-latex)的制作：

- 1) 2.5 毫克/毫升的 THC-Ab (从免疫生物技术公司购买, Immunetic, Inc.) 在 1000 毫升的碳酸氢钠 (NaHCO_3) 缓冲溶液中 (PH=8.0) 透析 4 小时，形成溶液 1。
- 2) 先把生物素用纯水配制成 10mM，然后取 47 微升的生物素溶液与溶液 1 混合并在室温下搅拌 1 小时时间，形成溶液 2。
- 3) 把溶液 2 在 1000 毫升的磷酸缓冲溶液 (PH 为 7.4) 中透析 12 个小时，形成溶液 3。
- 4) 用分光光度计在 655 纳米下测定溶液 3 中的 Biotin-THC-Ab 的浓度，并配制成最终浓度为 0.5 毫克/毫升的溶液 4。
- 5) 在干净的玻璃容器中量取 3L 乳胶颗粒在适宜范围内 (35nm-40nm) 的乳胶溶液，并置入一搅拌子。将容器置于搅拌器上，进行搅拌。同时在乳胶溶液中加入 pH=7.0 的磷酸缓冲溶液后调整乳胶溶液 pH 至 6.8 左右。然后加入 25mg 的 Biotin-THC-Ab，持续搅拌反应 1h。
- 6) 将封闭完毕的乳胶溶液在 11000rpm 的速度下离心 35 分钟，去除上清。
- 7) 收集沉淀，用 washing buffer 调整使乳胶标记溶液的浓度在所需要的范围内，在 540 纳米波长下测定溶液的 OD 值。
- 8) 调节标记物(Biotin-THC-Ab-latex)最终的浓度为 0.0125%。

可移动区域 2 的处理。先把聚脂膜用缓冲溶液 (PVA 5g/L; Na_2HPO_4 7.1g/L; S-14 (Triton X-100) 0.1%; NaN_3 0.2g/L) 处理后在 37℃ 的烘箱里烘干，然后再在上

面处理标记物(Biotin-THC-Ab-latex), 标准为 1 微升/厘米, 处理的方式为用自动喷雾微处理机器进行喷洒。处理好后在 37℃的烘箱里烘干。

阻拦区域 3 的处理。在阻拦区 3 上处理带有 THC 的抗原 (BSA-THC-Ag), 其中 BSA 浓度 5g/L, 处理溶液的浓度为 0.6 毫克/毫升, 处理的标准为 2.5 微升/厘米, 处理的方式用自动微处理控制喷膜机自动处理三条线条。

检测区域 4 的处理。在检测区域 4 上处理链霉亲和素 (从 Fitzgerald, Inc 公司购买), 处理的标准为 1.0 微升/厘米, 处理的方式为用自动微处理控制喷膜机自动处理一条线条。

硝酸纤维素膜 6 包括阻拦区域 3、检测区域 4 和检测结果控制区域 5。把处理好的硝酸纤维素膜放在 37℃的烘箱里烘干。

试剂条的制作。把处理好的各个部件制作成宽 0.4 厘米, 长 10 厘米的试剂条, 让样本接受区域 1 和可移动区域 2、硝酸纤维素膜 6 (包括阻拦区域 3、检测区域 4 和检测结果控制区域 5) 和吸水滤纸 7 顺次叠加在一起, 这些部件都被粘在非吸水性卡片上。

检测被分析物 THC 的过程:

若样本中不含有 THC 或者含有少量 THC:

- 1) 将一定量的样本滴加在样本接受区域 1 上;
- 2) 样本流动到可移动区域 2 上并将可移动区域上的标记物质溶解到液体样本中, 标记物质不能结合。若样本中存在 THC, 则标记物质和 THC 结合形成复合物;
- 3) 经过可移动区域 2 的样本继续流动到达阻拦区域 3, 全部或者大量的标记物质和阻拦区域上的 THC 抗原结合从而被固定在阻拦区域上。若样本中含有一定量的 THC, 剩余的未被 THC 结合的标记物质被固定在阻拦区域上, 而标记物质和 THC 结合形成的复合物不能被阻拦。
- 4) 经过阻拦区域的样本继续流动到达检测区域 4, 没有或者很少的标记物质能和检测区域上的链霉亲和素结合, 因而体现为阴性结果, 表示样本中没有或者未达到判断含有 THC 的标准。

若样本中含有一定量的 THC:

- 1) 将一定量的样本滴加在样本接受区域 A 上;
- 2) 样本流动到可移动区域 2 上并将可移动区域上的标记物质溶解到液体样

本中，标记物质和 THC 结合形成复合物；

- 3) 经过可移动区域 2 的样本继续流动到达阻拦区域 3，剩余的未被 THC 结合的标记物质被固定在阻拦区域上，而标记物质和 THC 结合形成的复合物不能被阻拦。
- 4) 经过阻拦区域的样本继续流动到达检测区域 4，大量的结合了 THC 的带有生物素的标记物质在检测区域上和链霉亲和素特异结合，由于带有乳胶颗粒，在检测区域上可以看到粉红色的线或者区段，直观表示为阳性结果。

根据线或者区段颜色的深浅，判断样本中含有 THC 的量的多少。

本实施例按可移动区域和检测区域上物质不同浓度和处理的配比，分别设置下列几组实验来选取最佳的实施配比：

链霉亲和素(Sterpavidin)浓度分别设为：0.1mg/ml,0.2mg/ml,0.3mg/ml；

BSA-THC-Ag: 2.0mg/ml；

浓度为 0.0125%的 Biotin-THC-Ab-latex 分别选用 2ul，4ul 和 6ul，

按照两两组合的原则分为 9 组，包括 2ulBiotin-THC-Ab-latex 下的三种不同浓度的链霉亲和素的组合（A 组合），4ulBiotin-THC-Ab-latex 下的三种不同浓度的链霉亲和素的组合（B 组合），以及 6ulBiotin-THC-Ab-latex 下的三种不同浓度的链霉亲和素的组合（C 组合）。在已经过不同处理的检测装置上分别滴加不同的样本，包括阴性样本，标准品和三倍标准品（3X），10 分钟以后，根据检测区域显示的结果进行级别统计并得到以下结果：

表一：A 组合检测结果级别统计

Sterpavidin	2ul Biotin-THC-Ab-latex		
	阴性	标准品	3X
0.1 mg/ml	1	4	7
0.2 mg/ml	1	4	8
0.3 mg/ml	1	5	9

表二：B 组合检测结果级别统计

Sterpavidin	4ul Biotin-THC-Ab-latex		
	阴性	标准品	3X

0.1 mg/ml	2	5	7
0.2 mg/ml	2	5	8
0.3 mg/ml	2	5	8

表三：C 组合检测结果级别统计

Sterpavidin	6ul Biotin-THC-Ab-latex		
	阴性	标准品	3X
0.1 mg/ml	2	6	9
0.2 mg/ml	3	6	9
0.3 mg/ml	3	6	9

本实验数据中，根据本领域技术人员认可，一般判定显色 3 级以上为阳性可见，级别越高，显色越明显，阳性结果越稳定；而 1 级、2 级和 3 级被认为是阴性结果，级别越低，阴性结果更稳定。由以上三个表格结果可见，本实验中每个比例配比的结果都是比较理想的，其中最优的为 THC-Ab-latex 浓度 2ul/4mm 下的各组分配比检测结果。

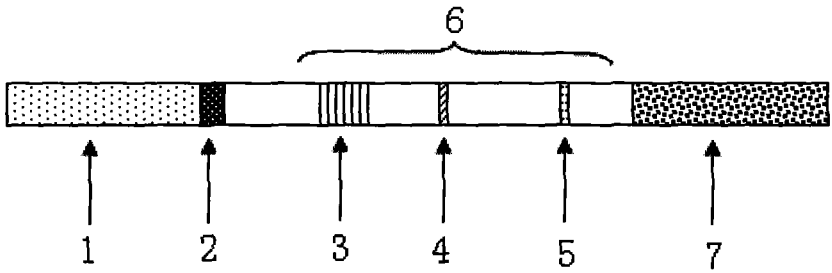


图 1

专利名称(译)	一种用于检测被分析物质的检测装置和方法		
公开(公告)号	CN101078724A	公开(公告)日	2007-11-28
申请号	CN200710069070.2	申请日	2007-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	艾博生物医药(杭州)有限公司		
申请(专利权)人(译)	艾博生物医药(杭州)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾博生物医药(杭州)有限公司		
[标]发明人	黄富强 陆维克 吴银飞 高飞		
发明人	黄富强 陆维克 吴银飞 高飞		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50		
其他公开文献	CN101078724B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测被分析物质的检测装置和方法，包括可移动区域、阻拦区域和检测区域，可移动区域包括可以随液体流动的带有标记物质的特异结合被分析物质的分子，该分子上还连接有与被分析物质不相关的特异结合分子对之一一种分子；阻拦区域上固定一种与被分析物质类似的物质；检测区域上固定与被分析物质不相关的特异结合分子对之另一种分子。本发明的装置和方法，可以直观显示检测的结果，而且只需要操作一步就能完成反应，同时提高检测的灵敏度和准确性。

