



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105247366 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201480019358. 7

安瓦·阿尔-兹云尼

(22) 申请日 2014. 01. 30

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

(30) 优先权数据

公司 11021

61/759, 395 2013. 01. 31 US

代理人 孙纪泉

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2015. 09. 29

G01N 33/53(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

G01N 33/543(2006. 01)

PCT/US2014/000015 2014. 01. 30

A61B 5/151(2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/120379 EN 2014. 08. 07

(71) 申请人 普瑞威尔公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 克里斯多夫·阿泰格卡

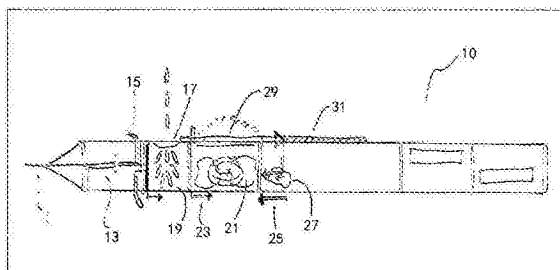
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

测试设备

(57) 摘要

本发明是一种用于测试个体中是否存在一种实体的装置。该实体可以是病原体、毒素或药物。所述设备适合从所述个体收集待测试的生物样品。所述测试装置包括贵金属纳米颗粒（即金、银或铜）来检测所述实体。测试结果从所述装置的窗口读出。使用聚集的贵金属纳米颗粒的当前视觉限制是直径在约 50nm 至约 75nm 的范围内的团块。特别用于该实体的一个或多个配体附着到两个或更多个金属纳米颗粒上。每个单独的纳米颗粒的直径在约 15nm 至约 35nm 的范围。附着到纳米颗粒和特别用于该实体的配体例如可以是抗体、抗体片段、寡核苷酸和寡核苷酸适配子。可以使用特别用于实体上不同位置的不同配体以增加目标存在时纳米颗粒的聚集潜力。样品采集后在装置内进行测试。检定的结果可迅速得知。可以被测试的条件包括例如病毒感染、细菌感染、暴露于毒素、和药物使用。作为示例描述了人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的检测。



1. 一种用于测试患者体内是否存在病原体的家用测试装置,其中,去除生物材料和测试所述生物材料的所述病原体的检定在单个装置中进行,所述装置包括用于接收生物材料的单元和用于测试所述材料中是否存在包含生物分子的目标实体的腔室,其中,所述生物分子的存在证实所述病原体的存在,其中,所述腔室包括能够检测到包含生物分子的所述目标实体是否存在的检定分子。

2. 根据权利要求 1 所述的装置,其中,所述病原体是 HIV。

3. 根据权利要求 1 所述的装置,其中,所述包含生物分子的目标实体是 HIV 病毒粒子的组分。

4. 根据权利要求 1 所述的装置,其中,所述检定分子是纳米颗粒。

5. 根据权利要求 4 所述的装置,其中,所述纳米颗粒是贵金属纳米颗粒。

6. 根据权利要求 5 所述的装置,其中,所述贵金属纳米颗粒是金。

7. 根据权利要求 1 所述的装置,其中,所述腔室包括足够的检定分子以检测足够的包括生物分子的目标实体,生物分子的量为新近感染的患者体内存在的 HIV 病毒粒子的量。

8. 根据权利要求 7 所述的装置,其中,所述患者在使用所述家用测试装置进行家庭测试之前被感染约 30 天或更短。

9. 根据权利要求 7 所述的装置,其中,所述装置能够检测到存在于从患者提取的所述生物材料中的一些 HIV 病毒粒子中的包括多个生物分子的多个目标实体。

10. 根据权利要求 9 所述的装置,还包括安全封闭物以防止在从患者去除所述生物材料之后生物材料污染另一个体。

测试设备

技术领域

[0001] 技术领域是一种在生物样品中采集、测试和报告检测到目标实体的装置。

背景技术

[0002] 对生物样品中的病原体、毒素和药物的检测在不断改进和完善。家用检测的成套用具被出售以测试多种状况,包括怀孕和性传播疾病(STDs)。在许多情况下,从家庭测试获得的知识对治疗的目的是有价值的并降低了将感染物传播给他人的风险。

[0003] 对于许多病毒、细菌和病原体没有简单的检测方法。怀疑与感染物有接触的,或者有感染症状的个体都需要从医疗机构的专业医务人员寻求诊断。在某些条件下,特别是HIV和其它病毒感染,标准的测试方式排除了早期检测,并在HIV的情况下,以测试体液中HIV抗体的存在,以及个体必须在怀疑感染的日期之后等待约6个月。因此,个体经常由于要求等待和可能还由于必须在医疗机构进行的测试的费用而放弃寻求诊断。在大多数这些状况下,接触或感染后的及时治疗会增加成功治疗的可能性。在感染状况下,及时诊断和治疗可以降低该状况向他人的传播。

[0004] 特别是,人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的检测对预防和治疗方案两者都是至关重要的。然而,即使在大范围流行开始之后30年,可用于测试HIV感染的实验室工具仍是不完美的,很少数的个体在近期感染后获得诊断和护理。超过3340万世界各地的人患有人类免疫缺陷病毒(HIV),而每年,2百万人死于其发展为获得性免疫缺陷综合症(AIDS)。发展中国家有六百万人急需抗逆转录病毒治疗,但由于有限的可及性和高成本,只有700,000人目前正在接受有效的治疗。

[0005] 测试生物样品中可检测的生物实体的方法正在由若干小组进行探索。许多研究小组主要侧重于优化和提高用于实验室和大规模诊断的现有技术能力,其用于由医疗专业人士在医疗机构中使用。

[0006] 关于包括HIV在内的病毒感染,一些小组已经开发出用于家庭筛选测试的成套用具,其使用抗体检测,但这些成套用具需要约6个月的等待期,以用于等待抗体出现在被感染的个体中。使用特别用于感染物的抗体作为检测检定的目标的缺点是对很多感染物人体仅在感染约4至6个月后才出现抗体。因此,检测特别针对感染物的抗体在个体感染后至少4至6个月内是不可能的。这种情况对婴儿而言尤为严重,对婴儿来说非常需要尽早检测到传染病。婴儿在感染后直到约一年都不会对病原感染物产生抗体。

[0007] 病原体的早期检测将有助于促进早期治疗以及减少这些病原体对他人的传染。对医学界来说具有极大优势的是,提供用于所有病原体,包括病毒、细菌原、毒素和药物的早期检测方法。

发明内容

[0008] 本发明是向个体提供测试生物样品中存在目标实体的机会的一种测试装置、成套用具、检定和方法。测试装置适于容纳从个体采集的生物样品。测试设备包括反应剂以检

定所收集的生物样品以检测感兴趣的目标实体。该检定是基于纳米颗粒的比色检定，从测试装置上或测试装置中的结果窗口可见地报告所述比色检定。其结果例如可以是比色的或定量的。在收集生物样品之后很快进行检定和报告结果。对于感染病，所述测试装置可以具有中和作用，使得该装置不携带可传染他人的活性感染实体。

[0009] 该检定法采用比色纳米颗粒方法来检测生物样品中的目标实体。进行该检定的方法包括从个体收集生物样品的步骤。样品被收集并容纳在测试装置内的腔室中。测试装置内还有进行基于纳米颗粒的比色检测检定所必要的反应剂。可以使用的反应剂包括具有缀合在其表面上的配体的多种贵金属纳米颗粒。配体特别用于结合被测试的生物样品中的目标实体或目标实体的组分。反应剂还包括用于进行检定的溶液和缓冲液、如有必要的话一种或多种拥挤剂 (crowding agents)、用于形成对照检定的反应剂，和对于进行基于纳米颗粒的比色检测检定必要的任何其它反应剂。在生物样品被收集之后，收集腔室可被关闭。样品可以例如通过从全血的其它成分中分离出血浆来预先制备，然后与试剂混合。所制备的样品可在装置中的检定腔室内与反应剂直接混合。当检定完成时，检定的结果显示在装置上的结果窗口中。比色检定用肉眼读取。对结果的显示选项包括在结果窗口中呈现颜色或颜色变化。定量可以用颜色或色调的强度来衡量，并且如果需要的话可以数字化成读数。使用传感器，比色检定的颜色可以例如被“读”成数量或颜色或两者兼有。定量可以包括通过光的波长和强度两者来测量所吸收或反射的光，或者可以包括测量结合到目标实体的纳米颗粒的量。

[0010] 该装置设计成向个体提供执行所述方法的所有步骤，而不需要专业医护人员的协助的机会。因此，个体可自行收集样品，将样品放在测试装置的有开口的腔室中，密封关闭该腔室，操纵装置上和装置中的部件以允许所述样品与包含用于检测检定的反应剂的溶液接触，并在装置的窗口中读取显示成颜色、或数字化的值或定量的结果。该检定的结果如果是数字化的，也可以报告给智能电话或其它智能设备。装置和成套用具部件的使用说明可以被包括在容纳装置和其它部件的盒子中。说明书将描述细节例如如何解释该装置的结果窗口中显示的颜色，或代表目标实体的检测的数值。通常，如果窗口中显示特定颜色（例如当使用金纳米颗粒时显示蓝色），样品将被认为对目标实体呈阳性。数值及其含义将通过校准来限定并在说明书中说明如何使用。

[0011] 本发明的测试装置、成套用具、检定和方法可用于检测所有类型的病原体，包括病毒、细菌原、毒素和药物。生物样品中可检测到的病原体的所有目标实体可形成本文所述的测试装置、成套用具和检定的设计基础。所述装置和发明的在不同目标实体之间有所不同的元件与以下有关：目标实体的性质、用于检测该实体的配体、被检定的目标实体的生物流体或组织、个体在怀疑感染或接触之后能收集生物样品的最佳时间，和被检测的目标实体中固有的其它特质细节。

[0012] 比色检测检定基于这样的原则：聚集至少尽可能接近纳米颗粒的直径的贵金属纳米颗粒与相同大小和材料的未结合的纳米颗粒、非聚集的纳米颗粒在不同的等离子共振频率上共振。因此，使用标记有特别用于结合目标实体（或目标实体的组分）的配体的纳米颗粒可以便于目标实体的检测。当纳米颗粒结合物很近地聚集在一起并形成团块时，溶液中出现变色。变色表示样品中存在目标实体。相互很接近的纳米颗粒与非聚集金属纳米颗粒反射不同频率的可见光。如果没有变色，金属纳米颗粒配体结合物保持未结合到任何目

标并因此生物样品对目标实体呈阴性。

[0013] 从个体收集的生物样品可以是流体或非流体。典型地,收集样品包括将少量的个体体液放在测试装置中具有开口的贮存器中。从个体收集的体液可以是例如血液、淋巴、唾液、或尿液。样品也可以是非流体材料,例如粘性或固体材料。可由个体收集的非流体的身体材料可包括例如皮肤、开放伤口的组织、痂、脓、毛发、分泌物、粘液或排泄物。所收集的量将是用于进行检定所需要的量,并且也是可合理收集的量。目标实体将在从个体收集的生物样品中找到,并且生物样品可以选自血液、精液、阴道分泌物、乳汁、羊水、或淋巴液。生物样品中发现的目标实体可以是,例如,细胞、蛋白质、肽、激素、核酸、病毒、细菌、有机分子、蛋白质、肽、核酸、脂质、脂肪酸、碳水化合物、药物、激素、细胞、元素、毒素、化学物质、代谢物,或含两种或多种的任何前述物品的复合物。

[0014] 因此,例如,在 HIV 感染的情况下,感染后 7 至 10 天可在血液中存在非常低水平的 HIV,数量级为每 50u1 血液 1 个 HIV 病毒粒子。因此,将收集大约 50u1 血液。一滴血液的体积取决于液滴的大小,记录为 20u1 至 50u1 之间的任何体积。如果装置中收集有两滴血液,收集到的体积将在约 40 至约 100u1 的范围内。不同的测试情况和不同的条件可能需要更多或更少的生物样品流体或质量。

[0015] 一种用于测试从个体收集的生物样品的成套用具可以包括具有用于样品收集、测试和显示测试结果的部件的测试装置。测试部件可以包括具有用于进行检测检定的反应剂的溶液,并包括缀合至特别用于目标实体的配体的多个贵金属纳米颗粒。该成套用具通常还包括用于成套用具内含物以及使用说明书的容器。所述测试装置可以包括用于从个体收集生物样品的腔室,以及具有预加载了用于进行检测的反应剂的腔室。该测试设备还包括窗口,个体可以从该窗口读取测试结果。所述测试装置可以包括定量。在传染性病原体的情况下,测试装置还可以包括一种中和或使活性病原体失活并且还在完成样品收集之后使其隔离而不发生接触的系统、反应剂或机械特征。

附图说明

[0016] 图 1 是 HIV 病毒粒子的卡通式示意图。

[0017] 图 2 是时间对可检测到的 HIV 子部分的图表。

[0018] 图 3 是测试装置的示意图。

具体实施方式

[0019] 所述测试装置、检定和成套用具用于在取自个体的样品中检测实体。测试检定可以由提供待测试的生物样品的个体自己进行,并且不需要实验室来收集或制备样品,或者临床医生来读取和解释测试结果。关于 HIV 测试,检测检定的灵敏性质提供了在疑似接触后 5 天内为个体测试病毒的机会。

[0020] 本发明的测试装置、测试成套用具、检定和方法包括使用基于溶液的贵金属纳米颗粒比色检测。纳米颗粒缀合到特别用于目标实体的配体。配体可以是特别用于目标实体或目标实体的组分的,并且可以有缀合到具有不同特性的相同或不同配体的纳米颗粒。在设计特定检定的配体时,目的是在存在目标实体的情况下发生多个纳米颗粒(通过它们的缀合的配体)结合目标实体或其组分时,促进纳米颗粒的聚集。金属纳米颗粒的聚集引起

溶液中的变色,例如通过金纳米颗粒,具有非聚集颗粒的溶液是红色,当纳米颗粒聚集时是蓝色。

[0021] 例如,具有直径为从约 10nm 到 30nm 的范围内的均匀尺寸的金纳米颗粒的溶液——纳米颗粒在溶液中的间隔距离大于任何一个纳米颗粒的任何一个直径——将对肉眼呈红色。如果溶液中的那些纳米颗粒被迫与其它纳米颗粒聚集并形成团块,其中每个纳米颗粒与一个或多个其它纳米颗粒间隔的距离都小于任何一个纳米颗粒的直径,该溶液的颜色变为蓝色。另外,在颜色从红到蓝的变化之间,某些情况下可以观察到代表团块的量的多个紫色色调。

[0022] 本发明的检定使用贵金属纳米颗粒以及适用于溶液中的贵金属纳米颗粒的等离子共振及聚集的原理进行。对于描述这种技术的最早的小组之一,参见 Robert Elghanian, James J. Storhoff, Robert C. Mucic, Robert L. Letsinger, Chad A. Mirkin 在 Science 277, 1078(1997) 发表的“Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles”; DOI:10.1126/science.277.5329.1078。Mirkin 描述了高度选择性的比色多核苷酸检测方法,该方法基于 mercaptoal-kylloligonucleotide-改性的金纳米颗粒探针。该未优化的系统可检测到约 10 飞克分子 (femtomoles) 的寡核苷酸。关于材料、反应剂和条件的更多技术细节以及用于进行检定的其它技术细节,参见 Nathaniel L. Rosi 和 Chad A. Mirkin 发表在 Chem. Rev. 2005, 105, 1547-1562 的“Nanostructures in Biodiagnostics”。Mirkin 的结论是,不断改进允许非常具体的金属配合的配体设计将导致施用纳米探针的更具选择性的金属离子检测。参见 Chemical Reviews, 2005, Vol. 105, No. 41555 中的“Nanostructures in Biodiagnostics”。Mirkin 的参考文献通过引用其全部内容并入本文。

[0023] 基于溶液的纳米颗粒检定使用比色纳米颗粒方法并利用分析物诱导的聚集事件,该事件导致可测量的变化以及纳米颗粒表面等离子体吸收带的变化。比色检测格式的简单化导致其用作检测广泛的各种分析物的一般方法。参见 Haes, A. J. ; Van Duyne, R. P. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 10596, 和 Riboh, J. C. ; Haes, A. J. ; McFarland, A. D. ; Yonzon, C. R. ; Van Duyne, R. P. J. Phys. Chem. B 2003, 107, 1772。Lui 和同事提供了对毒素的比色检测示例,这通过实施组装有寡核苷酸的纳米颗粒网来检测水介质和含铅涂料样品中的 Pb(II) 离子——其浓度可低至 100nM——而实现。参见 Liu, J. ; Lu, Y. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 6642。Lui 的小组还使用通过诱导适当设计的螯合基团 (chelating groups) 例如巯基羧酸而功能化的纳米颗粒的聚集而检测到的 Hg 毒素。金属离子桥接不同的金纳米颗粒的羧基部分,导致伴随胶体的颜色从红变成蓝。参见 Liu, J. ; Lu, Y. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 6642。Van Duvne 和 Lui 的参考文献通过引用其全部内容并入本文。

[0024] 贵金属纳米颗粒已被用于基于等离子共振——该等离子共振根据贵金属颗粒的大小控制可见光的吸光频率的变化——的原理检测生物样品中的实体。例如直径小于约 30nm 的金纳米颗粒在溶液中呈红色。一旦颗粒尺寸增加到超出 60nm,聚集导致溶液的颜色从红色变到蓝色。在红色和蓝色的变化之间,以及与聚集的纳米颗粒的生长尺寸有关,可以看见各等级的紫色。本发明使用通过将特别用于目标实体的配体附着到贵金属纳米颗粒 (即金、银或铜) 而形成的分析物。例如,溶液中的各自具有约 20-30nm 的直径的金纳米颗

粒在溶液中显示红色。如果被测试的生物样品中存在目标,则标记有特别用于目标的配体的纳米颗粒将围绕目标聚集,形成全部特别用于目标的缀合了配体的纳米颗粒的聚集体。约 20nm 至约 30nm 的尺寸范围内的两个、三个或更多个纳米颗粒的聚集体将形成大于 60nm 的团块。金纳米颗粒的等离子体共振则将反射的可见光波长改变成蓝色,溶液对肉眼呈现蓝色。

[0025] 测试装置和检定的设计中具体的考虑包括如下细节,例如用于杂化的信号由纳米颗粒的光学特性来控制的事实,这部分地取决于它们在聚合物聚集体内的间距。颗粒间的距离比平均粒径大得多的纳米颗粒聚集体呈红色,但随着这些聚集体中的颗粒间的距离减小到小于约平均粒径,颜色变成蓝色。这种转变——其归因于金 (Au) 的表面等离子共振——已在用于将纳米颗粒组织成聚集结构的基于寡核苷酸和基于非寡核苷酸两种方案中都观察到,并且已经进行理论研究。直径为 13nm 的金颗粒已被使用,因为它们可以容易地制备而尺寸偏差很小 (2nm) 并且显示出尖锐的等离子体吸收带 (最大吸光度在波长 520nm 处)。

[0026] 因此,本发明的检定的元素和考虑包括纳米颗粒的尺寸和量、纳米颗粒的形状、缀合到纳米颗粒的配体的性质和特征、用于配体的目标结合伙伴、向目标上相同或不同位置结合多个纳米颗粒的立体考虑、以及使用在测试装置的检定腔室内收集的生物材料的体积或质量进行检定的可行性。

[0027] 检定包括含有来自个体的流体或非流体材料的样品。所述样品可以是流体并且该流体可选自血液、淋巴液、精液、阴道分泌物、乳汁、唾液、尿液、脑脊液、胸膜液、心包液、羊水、滑液、和间质液。

[0028] 可在生物样品中检测到的病原体例如是病毒或细菌原。其它病毒感染物包括例如流行性感、肝炎、疱疹、乳头状瘤、腺相关病毒、黄病毒、登革热病毒、日本脑炎病毒、T 细胞亲淋巴性病毒、巨细胞病毒 (CMV)、Epstein-Barr 病毒、呼吸道肠道病毒、牛痘病毒、细小病毒、猫白血病毒、花椰菜花叶病毒、番茄丛矮病毒等,以及其它病毒引起的或病毒相关的感染。可以检测所有类型的细菌感染,诸如例如大肠杆菌感染、败血症、破伤风、以及其它常见的或不那么常见的细菌,包括可在病毒感染之后发生的继发性感染。此外,可以检测具有能作为本发明的测试装置和检定中的目标实体的基础的可检测的标记物的条件。这样的条件可以包括,例如退化性疾病如阿尔茨海默病和其它神经变性疾病,和涉及肌肉退化的疾病,增殖性疾病如癌症,和再狭窄、炎性疾病如自身免疫性疾病、过敏性疾病,和过敏,代谢性疾病如糖尿病,和消化功能紊乱,以及显示可检测标记的基因疾病。除了生物病原体,本发明可以检测毒素,如来自环境暴露的毒素,和药物,如性能增强的药物。通常,具有用作感染或疾病的标记物的目标实体的任何状况,以及可为其开发配体并用作基础以检测目标实体的任何状况,都可以是特定测试装置、成套用具、检定和方法的基础。

[0029] 如果个体对被测试的状况呈阳性,则目标实体存在于从个体收集的生物样品中。这种目标实体可以是,例如所述状况的标记物,或者也可以是被寻找的实际的毒素、药物、或病原体。因此,目标实体 (或目标实体的组分) 可以是,例如,核酸、核糖核酸、多肽、碳水化合物、蛋白质、肽、多肽、氨基酸、激素、类固醇、维生素、离子、代谢物、衍生物、类似物、多糖、脂质、脂多糖、糖蛋白、脂蛋白、核蛋白、寡核苷酸、抗体、免疫球蛋白、凝血因子、肽激素、蛋白激素、非肽激素、白介素、干扰素、细胞因子、细胞、细胞表面分子、微生物、小的有机分

子、病毒粒子、细菌、毒素、药物、细胞、细胞膜、膜组分、蛋白质复合物、抗原、半抗原、受体、大分子、或分子复合物。

[0030] 其它目标实体也可以在检定中使用。因此,由检定设定为目标实体可以是生物样品中发现的任何实体并被认为是所寻找的状况的标志物。目标实体可以是生物样品内找到的一个或多个分子、肽、寡核苷酸、小分子、元素和其它实体,并且具有可缀合到贵金属纳米颗粒的配体。

[0031] 所述配体使用已知缀合技术缀合到贵金属纳米颗粒。配体结合目标实体或目标实体的组分。目标实体的特定结合位置或组分可以根据状况不同而不同并且必须仔细选择。在选择目标实体或目标实体的组分时可以考虑的因素包括时间:问题可以是,例如,在病原体或感染物的生命周期中的什么时间目标实体出现在个体中。考虑因素还可以包括位置:问题可以是,例如,在个体中的什么位置发现目标实体,以及它是否存在于可收集到测试装置内的所述类型的生物样品中。特别用于目标实体或目标实体的组分的配体可以是,例如,抗体、抗原、受体、适体、蛋白质、多肽、小分子、核酸或能够结合目标实体或目标实体的组分的任何结合体。所述配体可以与目标上的结合成分(binding member)形成结合对,例如,结合对可以是抗原和特异抗体对,生物素和亲和素对,碳水化合物和乳糖对,互补核苷酸序列,互补肽序列,效应器和受体分子,酶辅助因子和酶,或酶抑制剂和酶。许多不同的配体和结合对都可用于在单个检定中检测目标。缀合到贵金属纳米颗粒且设计成用于结合目标实体的特异性配体或结合成分可包括特别用于结合并检测所列出的任何目标实体或目标实体的组分的配体,所述目标实体或目标实体的组分还包括基因、编码序列、密码子、非编码序列、线粒体 DNA、病毒 RNA、病毒 DNA、细菌 DNA、真菌 DNA、哺乳动物 DNA、cDNA、mRNA、RNA 片段、DNA 片段、寡核苷酸、合成的寡核苷酸、改性寡核苷酸、单链核酸、双链核酸、互补核苷酸序列、分支 DNA、用于复制核酸的组分、扩增子、天然核酸、合成的核酸、转录因子、连接酶、酶和它们的任何亚单位。

[0032] 本发明的因测试装置不同、检定不同而不同的各方面的特征主要在于,待检测的目标实体的性质并且包括以下各项:目标实体,用于结合目标实体的配体,和目标实体上的配体可结合的结合位置。

[0033] 其它考虑因素可以包括在目标实体是否以高亲和力结合至配体,以及结合过程中是否存在任何位阻或结合竞争问题。另外,在设计待缀合到纳米颗粒的配体时,配体是否可以通过便于纳米颗粒相互接近的方式结合目标实体使得在目标实体存在时发生变色的问题是一个担忧。最后,如果选择多于一种类型的配体来结合目标实体或目标实体的不同组分,问题是这些配体是否协作以导致检定中所需的变色。

[0034] 金属纳米颗粒的尺寸、形状和组合物可以系统地改变,以产生具有特定的放射性、吸收性和光散射特性的材料,这使得这些材料对于复用的分析物检测是理想的;纳米线和纳米管的成分也可被控制,因此当存在目标实体时允许测量和改变它们的导电特性。金和银纳米结构的等离子性质包括金属纳米颗粒的等离子体共振特性的独特的可调谐性,通过改变它们的大小、形状、成分和介质以允许纳米结构设计用于特定的生物应用。已知的纳米结构的几何形状——包括纳米棒、纳米壳和纳米颗粒对——可以表现出显著增强和可调谐的等离子共振,使它们非常适合于生物应用,包括检测和诊断。调谐纳米结构的形状(例如纳米棱镜、纳米棒或纳米壳)是增强局域型表面等离子体共振(LSPR)对生物样品和目标实

体的灵敏度的另一种方法。金属纳米颗粒对或组件显示出场耦合导致的有距离依赖性的等离子共振。一个普遍的缩放模型——使等离子共振频率与颗粒尺寸方面的颗粒间的距离相关——变得对生物系统内的状况的诊断可能有用。

[0035] 本文所提供的贵金属纳米结构的应用实施例可以很容易地推广到生物学和医学的其它领域,因为等离子纳米材料表现出很大的范围、通用性、以及它们的光学属性的系统可调性。那些最近受到纳米结构材料的发展很大影响的领域是生物学、生物物理学和医学。所述纳米生物学工件套件已经被贵金属纳米结构大大增强,其已被证明是对一系列生物应用包括生物物理研究、贵金属纳米结构的光学性质以及讨论近期研究进展是高度通用且可调谐的材料。

[0036] 金属纳米粒子可与目标为或识别用于实现分子特异性的配体的小分子或生物分子缀合。每个金属纳米颗粒都可以被认为是等同于高达百万染色分子的光学探针。这提供了用于提高探测灵敏度的大的余量。与染色剂不同,金属纳米颗粒耐光且不经受光至褪色,允许更高的光激发的能量和更长的探测时间。存在与 LSPR 相关联的加强的辐射和非辐射的属性的范围。因此光学探测策略可根据具体的生物应用来选择。不同的策略也可以组合。LSPR 的另一个独特的特性是,它可以通过改变纳米结构的尺寸、形状、成分或环境而被调谐以适应生物应用。10nm 尺寸范围内的金纳米颗粒在水中具有约 520nm 的强吸收最大值。对于银纳米粒子,这发生在大约 390nm 处。

[0037] 成套用具可以包括装置部件,用于测量与所聚集的贵金属纳米颗粒的控制量相比较的生物样品的混合物中等离子共振的量,以量化目标实体。当实体被检测时,该装置还可以包括样品中的实体量的定量。定量通常由与控制量相比较存在较大量实体时增加的颜色浓度来指示。定量也可以通过检测有多少纳米颗粒被结合到目标来实现。当装置是用于监测疾病的进展或消退时,定量是有用的。典型地,例如,个体可能希望了解特定的治疗是否有效。治疗是否有效可通过检测每单位体积的所测的体液中的病毒颗粒浓度测定降低而获知。从装置中的窗口识别聚集的贵金属颗粒的等离子共振频率的指标,与控制溶液中的非聚集的贵金属颗粒的等离子共振频率相比较,其中,与样品混合的颗粒的聚集表明样品对该实体呈阳性。该检定还包括测量来自聚集的等离子共振的量,与来自非聚集的颗粒的等离子共振的控制量相比较,从而对样品中实体的量进行定量。

[0038] 在手持装置内进行的检定可以从个体收集待测试样品并且可以在该样品内检测实体的存在。该检定可包括用配体附着到其外表面的贵金属纳米颗粒的检测溶液预加载手持装置的腔室。配体的性质包括其特别用于待通过检定来检测的实体上的组成部分。从个体收集样品并放置在装置的贮存器中。将样品与预加载的检测溶液混合,实体被允许接触具有特别用于目标实体上或目标实体内的组成部分的配体的分析物纳米颗粒。进行检定的方法可以包括将血液样品抽入测试装置,或允许血液从刺破的手指滴落到收集腔室内。从收集腔室,血液可被过滤并且等离子体可通过使流体流过内置于装置中的膜被隔离。压力和真空可用于使等离子体从收集腔室移动到检定腔室。在检定腔室中,样品可以接触反应剂以进行检定。

[0039] 为了将本发明作为整体举例说明,描述用于检测人类 HIV 感染的测试装置、成套用具、检定和方法。称为获得性免疫缺陷综合症或 AIDS 的威胁生命的传染病是由感染人类免疫缺陷病毒或 HIV 引起的。HIV 感染的早期检测可以通过在 HIV 感染的前 10 天内的隐蔽

期期间或刚过后减少病毒载量来在治疗 HIV 方面提供更大成功（见图 2）。本发明提供了能够在感染的前 5 至 7 天内检测到人类免疫缺陷病毒的巨大的优势。当前用于 HIV 的测试方法在感染后约 6 个月前不能检测到 HIV。此外，疑似接触 HIV 的婴儿只能在一岁之后再测试抗体。因此，当前的 HIV 测试的不足是深刻的。当前的测试使用 HIV 抗体作为检测 HIV 感染的目标实体。本发明适于使用多个不同的目标实体，这将在感染后仅约 5 天就指示生物样品中 HIV 的存在。为了用于测试 HIV 检定，生物样品可以是，例如，血液、精液、阴道分泌物、乳汁、其它含有血液的体液。只有来自 HIV 感染者的特定流体（血液，精液，阴道分泌物和乳汁）才可能传染 HIV。HIV 在血液、精液、阴道分泌物、乳汁、唾液和眼泪中可具有不同的浓度或量。

[0040] 在检定中可以作为目标实体的 HIV 病毒粒子的组分包括，例如，外壳蛋白 gp120、RNA 基因组或 HIV RNA 的序列，或衣壳蛋白 p24。例如，本发明可使用配体来检测来自 HIV 的 RNA、形成 HIV 基因组的衣壳套装的 p24 蛋白质、或识别并结合 HIV gp120 的涂层蛋白质的区域的配体。HIV 的其它目标实体，如其它蛋白质、酶或材料也可以用作检定用的目标实体以检测 HIV。可以使用用于目标实体的不同组分的配体，提高检测的可能性和阳性信号的强度。结合目标实体的不同组分的用于相同目标实体的不同配体可以被设计和在检定中一起使用以优化目标的检测。在 HIV 的情况下，例如，HIV 病毒粒子或 HIV 病毒粒子的组分可以是目标实体。因此，HIV 的 RNA 基因组、HIV 病毒粒子的组分，可以是目标实体，特别用于结合一个区域的 RNA 基因组的配体可用于检测病毒。可替代地，可以使用特别用于结合 RNA 基因组的不同序列或区域的不同配体。另外，例如，特别用于 HIV 病毒粒子的其它组分的配体可以另外使用，如特别用于外壳蛋白 p24 的配体，和特别用于 gp120 衣壳蛋白的配体。

[0041] 关于时间的考虑和目标实体的选择，特别是关于检测 HIV，所述检定可以使用在感染后约 5 天内存在于被感染个体的血液中的目标实体进行。现有技术和当前可用的 HIV 测试检测对 HIV 的抗体，而且这些抗体直到感染后约 6 个月才会出现在被感染的个体中。HIV 抗体直到感染后 12 个月才会出现在被感染的婴儿体内。相应地，可以在检定中用于检测 HIV 的目标实体包括在感染后约 5 天内被感染个体的血液中的存在的非常低水平的 HIV 病毒粒子或病毒粒子的组分。

[0042] 为了解决用于在从个体收集到测试装置内的生物样品中检测 HIV 的测试装置、测试成套用具、检定和方法的挑战，HIV 的结构、活动和生物学等方面应被理解和考虑。对理解人类 HIV 感染的结构性质和行为性质，以及理解可影响诊断及治疗的方面有指导意义地，参考 Feibig 等人在 AIDS2003, 17 :1871-1879 的 HIV 分期的文献“Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection”，其中对 HIV 感染初期的负载浓度进行了分析和讨论。Feibig 等人的文献在此通过引用整体并入本文。

[0043] HIV 在体内的生物学在此相关。释放的 HIV 颗粒显示出从 120-200nm 的很大的直径范围。HIV 上的大多数病毒粒子都有一个单核。HIV 病毒粒子涂覆有 gp120 的三聚体蛋白组合的 72 个刺状突起 (spikes)，病毒表面锚定有 gp41 蛋白，图 1。病毒核心（或衣壳）由蛋白质 p24 制成。核心的内部是 HIV 复制所需的三种酶，称为逆转录酶、整合酶和蛋白酶。核心内还保持有 HIV 的遗传物质，其包括两个相同的 RNA 链。HIV 是一种逆转录病毒并且其基因由 RNA（核糖核酸）组成。HIV 有九个基因：gag, pol, env, tat, rev, nef, vif, vpr 和

vpu。直径约 150nm 的病毒粒子将具有约 $70,685\text{nm}^2$ 的球形表面面积,其上驻留有 72 个刺状突起。HIV 有许多可能的标记物,包括 gp120 和 p24 抗体,以及 HIV RNA 序列。本发明的基于 RNA 的 HIV 检测测试具有约每滴血液 1 份 HIV 的灵敏度以便在疑似接触后约 5 天内检测到 HIV 感染。当前,还没有基于等离子体的非常低的病毒粒子检定被 FDA 批准用于诊断 HIV-1 感染,并且可能在感染后 15 天或之后检测的任何早期测试都不能在医疗机构以外进行。

[0044] 在用溶液检测 HIV 的情况下, HIV 病毒粒子上 的一个目标实体可以是 gp120, 因为病毒粒子涂覆有 gp120 蛋白。特别用于病毒粒子表面上的 gp120 蛋白的一部分的抗体可以缀合到金纳米颗粒。 HIV 病毒粒子的表面积 $\text{Surface Area} = 4\pi r^2$ 其中 $r = 1/2$ 半径约 150nm 或 $r =$ 约 75nm 的表面积约 $= 4 \times 3.14 \times 75^2 = 70685\text{nm}^2$ 。纳米颗粒的表面积例如在直径为 15nm 时 $= 4 \times 3.14 \times 7.5^2 = 706.5\text{nm}^2$ 。病毒粒子的表面积除以直径 15nm 的纳米颗粒的表面积似乎在病毒粒子表面上为 100 个纳米颗粒提供了结合空间。由于有 72 个 gp120 刺状突起, 每一个刺状突起有 3 个 gp120 蛋白, 采取保守的方法来预测空间问题等, 介于 20 和 60 个之间的纳米颗粒可以结合一个 HIV 病毒粒子, 创建一个庞大的纳米颗粒簇, 其将清楚地显示可见光谱从红色到蓝色的变化。如果纳米颗粒之间的距离小于任何一个纳米颗粒的直径, 发生可见光谱中显示的等离子体变化。因此, 纳米颗粒越小, 它们必须在结合其目标时相互更加接近以促进变色。等离子共振和变色的原理依赖于纳米颗粒的聚集, 目标分析物的低水平可被补偿以用于通过确保足够的适当直径的纳米颗粒缀合到病毒粒子的大量目标上, 使得纳米颗粒相互间隔的距离比纳米颗粒的直径更小。影响检定的灵敏度的另一个因素还在于多少配体缀合至每个纳米颗粒上。纳米颗粒涂覆有足够但不过量的结合配体以便于结合至 HIV 病毒粒子的组分。最后, 使用贵金属纳米颗粒缀合物的检测可通过所谓的“拥挤”检定技术来优化。拥挤是向溶液增加散装分子以在溶液中的实体之间产生空间并且还使所述实体在溶液中移动以更加靠近彼此。因此, 检测的优化可以通过添加公知的大分子而在检定中实现, 大分子是例如 8 千道尔顿 (8K) 的聚乙二醇 (PEG), PEG 20K, PEG 35K, 聚蔗糖 70, 聚蔗糖 400, 葡聚糖 70K, 葡聚糖 500K, 葡聚糖 2000K 等试剂。参见 BMC Biotechnology 2011, 11:50doi:10.1186/1472-6750-11-50。另参见 Hill CS: Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. Expert Rev Mol Diagn 2001, 1(4):445-455。这两篇文献均全文并入本申请。

[0045] 检测 HIV 可以通过首先用裂解剂 / 溶解剂 (lysing agent) 接触所述生物样品以裂解病毒粒子和病毒衣壳来完成。裂解剂可以是, 例如, 异硫氰酸胍。裂解剂将从衣壳释放 mRNA, 以及形成衣壳 p24 的蛋白。包含 HIV 基因组的互补序列的缀合到配体的纳米颗粒则可以沿着所述 RNA 的长度结合 HIV RNA (通过缀合的配体) 以及潜在的具有两个 RNA 链的单个病毒粒子将可使用基于纳米颗粒的比色检测法检测到。直径为至少 60nm 的聚集体, 以及优选多个这样的聚集体在 HIV RNA 上形成并且使溶液的红色变成蓝色。最佳地, 为了在溶液中使用整个 RNA 长度来通过纳米颗粒锁定目标, 纳米颗粒可以缀合到与 RNA 基因组上的序列互补的不同序列, 以增加溶液中聚集在一起的纳米颗粒的数量。可用于形成互补的配体以在基于比色纳米颗粒检测的检定中结合病毒粒子的 HIV 病毒粒子内的潜在的目标序列的细节参见 Moore MD, Nikolaitchik OA, Chen J, Hammarskjöld M-L, Rekosh D 等人 (2009 年) 的 Probing HIV-1 Genomic RNA Trafficking Pathway and Dimerization by

Genetic Recombination and Single Virion Analyses, PLoS Pathog 5(10):e1000627. doi:10.1371/journal.ppat.1000627。Moore 等人的参考整体并入本文。还需注意的是,从个体取得的血浆样本可以被裂解,和 RNA 可以被稳定化并被捕获在含有聚(dT)寡核苷酸和与病毒 RNA 互补的寡核苷酸的磁性颗粒上。

[0046] 用于检测传染物的测试装置和成套用具可以有确保活的病毒被灭活的装置或部件。在 HIV 的情况下——已知如果不在活细胞内传染则非常微弱甚至没有能力感染个体——并且通过在宿主体外发现的病毒粒子感染是不大可能的。然而,测试装置的设计可以包括在检定完成后中和活病毒的特征。由于 HIV 对碱性或酸性的变化非常敏感并因而低于 7 或高于 8 的 pH 水平不适合 HIV 的长期存活,可以在检定的之前、之后或期间通过添加酸或碱完成简单的用于病毒的灭活方案。由纽约血液中心(New York Blood Center)开发的溶剂/去污剂(S/D)灭活是迄今为止最广泛使用的病毒灭活方法。它主要用于血浆行业,但这个过程仅对包在脂质外膜内的病毒有效。在这种方法中使用的洗涤剂中断了病毒的脂质包膜中的分子之间的相互作用。大多数的包膜的病毒没有其脂质外膜就不能存活,所以当接触到这些洗涤剂时它们死亡。其它病毒可能仍然为活性,但无法繁殖,使其不具感染性。溶剂创建一个脂质包膜和洗涤剂之间的聚集反应在其中发生得更快的环境。通常使用的洗涤剂是 Triton-X100。

[0047] 该装置也可以设计成使得为了读取检定结果,保持生物样品的腔室必须关闭并密封。这可以通过具有定位在结果窗口上方的盖来实现,该盖滑动关闭并密封所述收集腔室和同时露出结果窗口。转到图 3,示出了具有尖端和可能的用于在指尖上刺开皮肤的刺血针 11 的测试装置 10 的示意图。控制杆 13 可以使用手柄 15 推出针或刺血针 11。具有开口 17 的收集腔室 19 设置成用于样品的收集。过滤器和抽取机构 23 拉动样品穿过过滤器 23 以与检定腔室 29 中的分析物 21 接触并混合。任选地,盖 29 可以在灭活溶液 27 被放置在检定腔室后滑动到位置 31 以对任何活病毒灭活。由于盖 29 滑动到右侧(在图中),灭活溶液被移动到检定腔室,以及盖 29 下面的结果窗口被打开以查看检定的结果。

[0048] 由于在实验室研究中使用的 HIV 浓度比血液或其它样本中的实际发现的浓度高得多,感染 HIV 的人类血液或其它体液的干燥降低了环境传播的理论风险,该风险已经被观察到基本为零。此外,HIV 在其活性宿主外部不能繁殖(不像很多细菌或真菌,其可以在适当的条件下繁殖);因此,HIV 不会在其宿主外部扩散或保持传染性。然而,作为预防措施,对于 HIV 测试成套用具和测试装置,可以有化学或物理方法来对生物样品中任何仍然活跃的活病毒灭活。

[0049] 进行检定的其它方面细节,包括关于要使用的最佳反应剂、溶液中这些反应剂的最佳浓度、如何使配体缀合到纳米颗粒、选择合适的配体、量化原则、纳米颗粒尺寸考虑、进行检定的溶液的最佳体积、产生足够强并在结果窗口中可见的颜色的考虑、以及其它这种细节,可以在下列期刊文章的一个或多个中找到。Fox, Matthew. "Accuracy of the Elisa HIV May 2010. Web. <<http://www.livestrong.com/article/133176-accuracy-elisa-hiv-test>>, Shah, I. 等人 2006. Efficacy of HIV PCR Techniques to Diagnose HIV in Infants Born to HIV Infected Mothers—An Indian Perspective. JAPI 54:197-199, "What Kinds of HIV Screening Tests Are Available in the United States?" HIV InSite. UCSF, 2011 年 8 月 3 日。Web. <http://hivinsite.ucsf>.

edu/insite? page = basics-01-01, Xu, J. 等人 2010 年。Highly soluble PEGylated pyrene-gold nanoparticles dyads for sensitive turn-on fluorescent detection of biothiols. *Analyst* 135:2323-2327, Lee, H. 等人 2009 年。Modeling sequence evolution in acute HIV-1 infection. *Elsevier* 261:341-360, Kim, Y. 等人 2009 年。Quantum dot-based HIV capture and imaging in a microfluidic channel. *BiosensBioelectron* 25:253-258, Wang, S. 等人 2010 年。Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings. *Biotechnology Advances* 28:770-781, Ahn, Chong H. 2004 年 1 月。Disposable smart lab on a chip for point-of-care diagnostics. *IEEE*, Vol 92, No. 1, Fend, Yanying. 2003 年 6 月。Passive valves based on hydrophobic microfluidics. *Mems Laboratory*, Rosina, J. Temperature Dependence of Blood Surface Tension. *Physiological Research Pre-Press Article*, Bush, Valeria and Richmond Cohen. 2009 年。The Evolution of Evacuated Blood Collection Tubes. *LabNotes*. Volume 19, No. 1, Winter, Jessica. "Gold Nanoparticle Biosensor." Ohio State University. 2007 年 5 月 23 日。Web http://www.nsec.ohiostate.edu/teacher_workshop/Gold_Nanoparticles.pdf, Stowell, Dan. "The Molecules of HIV: gp120." www.mcl.d.co.uk. 2006 年。Web. <<http://www.mcl.d.co.uk/hiv/?q=gp120>>。上文所引用的文章都通过引用整体并入, 用于支持从个体收集样品后在测试装置中容纳的生物样品上进行检定的细节。

[0050] 本发明的范围由这里描述的语言和细节的最广泛的解释来提供。这里提出的细节是为了举例说明本发明, 而不是限制。

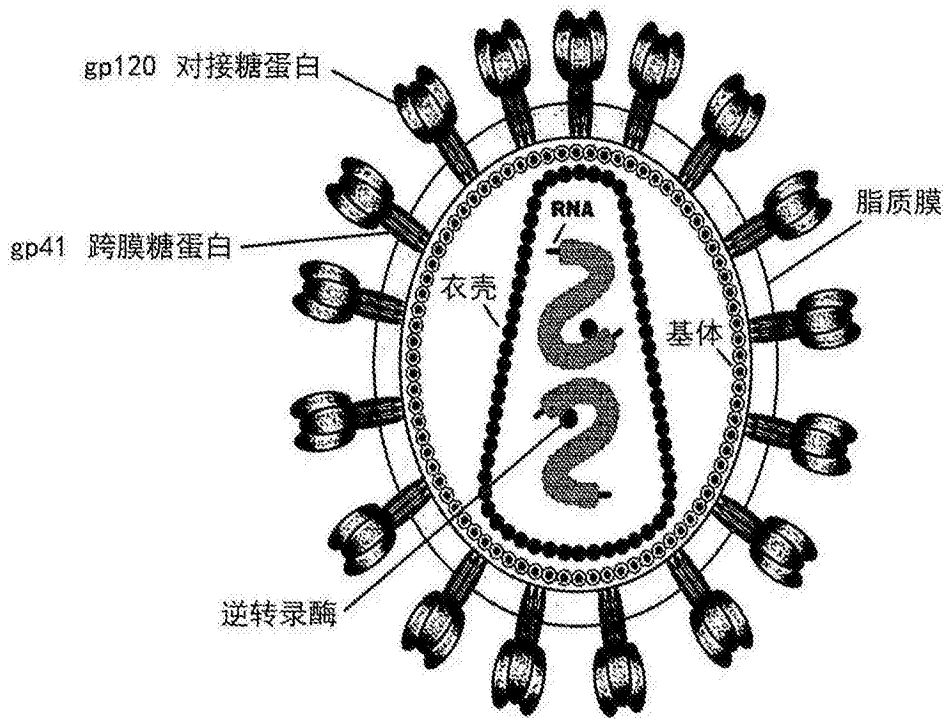


图 1

HIV感染的自然史和实验室分期

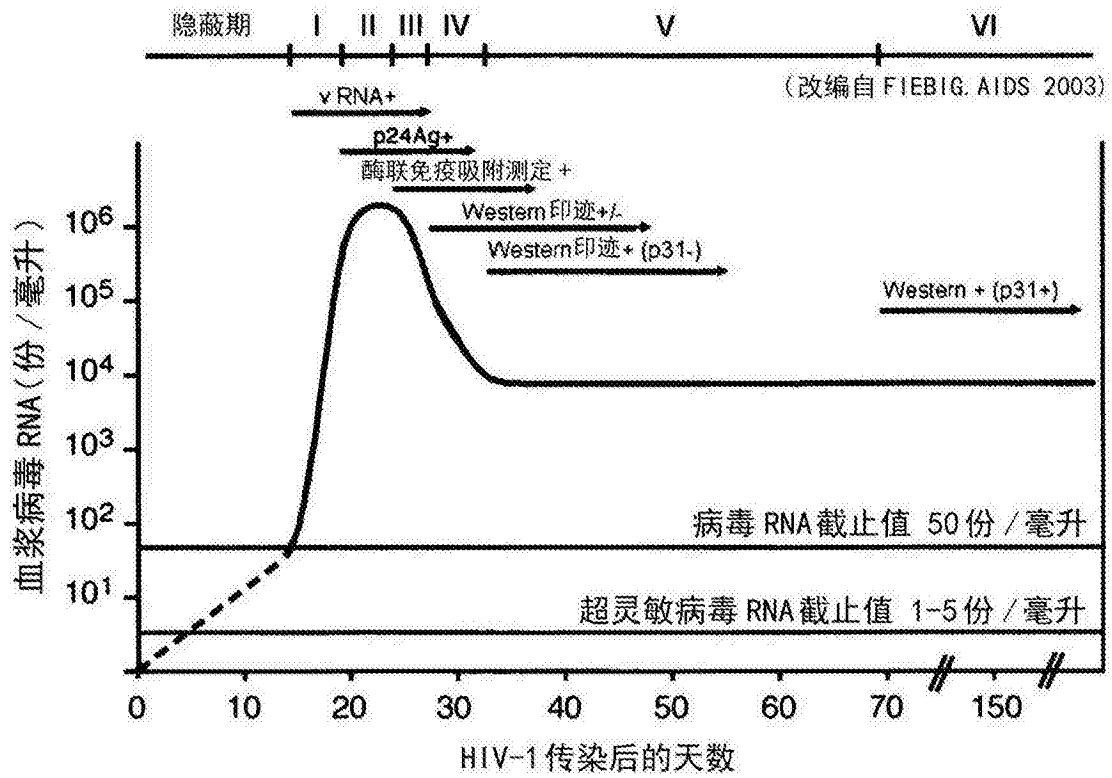


图 2

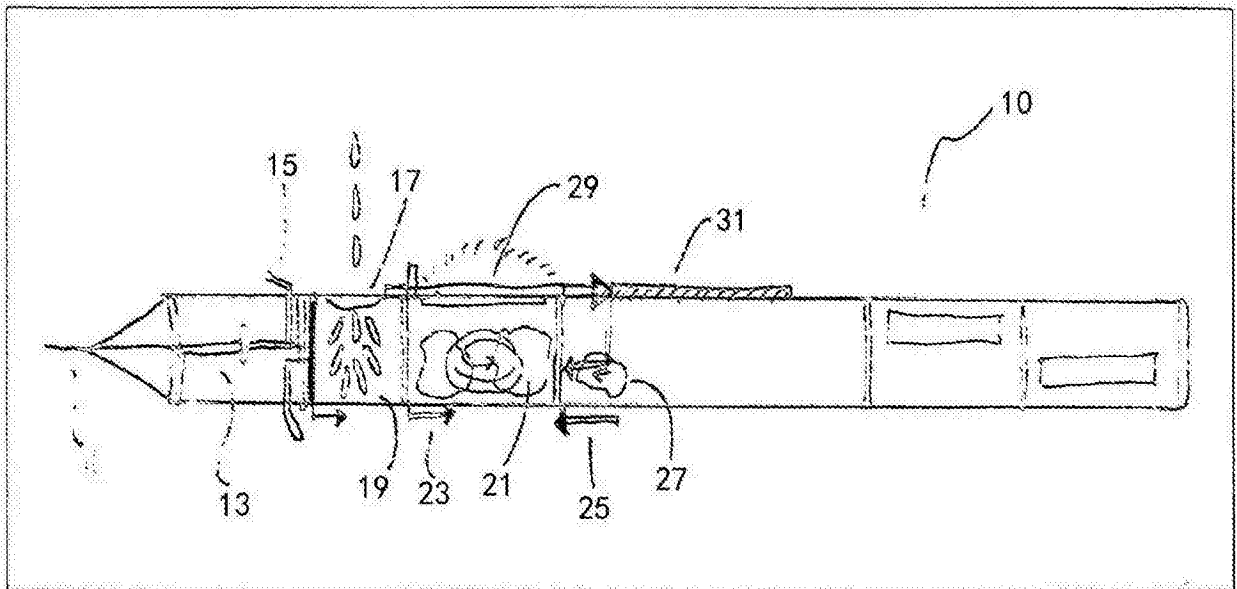


图 3

专利名称(译)	测试设备		
公开(公告)号	CN105247366A	公开(公告)日	2016-01-13
申请号	CN201480019358.7	申请日	2014-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	普瑞威尔公司		
申请(专利权)人(译)	普瑞威尔公司		
当前申请(专利权)人(译)	普瑞威尔公司		
[标]发明人	克里斯多夫阿泰格卡 安瓦阿尔兹云尼		
发明人	克里斯多夫·阿泰格卡 安瓦·阿尔·兹云尼		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 A61B5/151		
CPC分类号	G01N33/56988 A61B5/14546 A61B5/150022 A61B5/150358 A61B5/150824 A61B5/151 C12Q1/703 G01N21/78 G01N33/54346 G01N2333/162		
优先权	61/759395 2013-01-31 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种用于测试个体中是否存在一种实体的装置。该实体可以是病原体、毒素或药物。所述设备适合从所述个体收集待测试的生物样品。所述测试装置包括贵金属纳米颗粒(即金、银或铜)来检测所述实体。测试结果从所述装置的窗口读出。使用聚集的贵金属纳米颗粒的当前视觉限制是直径在约50nm至约75nm的范围内的团块。特别用于该实体的一个或多个配体附着到两个或更多个金属纳米颗粒上。每个单独的纳米颗粒的直径在约15nm至约35nm的范围。附着到纳米颗粒和特别用于该实体的配体例如可以是抗体、抗体片段、寡核苷酸和寡核苷酸适配子。可以使用特别用于实体上不同位置的不同配体以增加目标存在时纳米颗粒的聚集潜力。样品采集后在装置内进行测试。检定的结果可迅速得知。可以被测试的条件包括例如病毒感染、细菌感染、暴露于毒素、和药物使用。作为示例描述了人类免疫缺陷病毒(HIV)的检测。

