



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105229468 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201480020367. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 06. 03

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/531(2006. 01)

10-2013-0064207 2013. 06. 04 KR

G01N 30/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2014/004961 2014. 06. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/196803 EN 2014. 12. 11

(71) 申请人 普默特株式会社

地址 韩国首尔

(72) 发明人 林国镇 金有三 郑明淑 金范俊

金美晶 崔东燮 李慧贞

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵蓉民 张全信

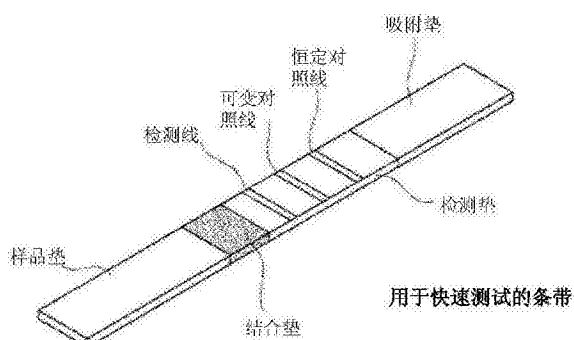
权利要求书2页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

具有可变对照线的用于快速检测的条带以及使用该条带的诊断试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及具有可变对照线的用于快速检测的条带、包括用于快速检测的条带的诊断试剂盒、以及用于通过同一使用定性和定量分析样品中分析物的方法。因为本发明的用于快速检测的条带具有可变对照线,所以由于钩效应克服所述分析物在定量分析方面的困难并且还利用所述肉眼以简单快速方式进行高度可靠的定量分析连同定性分析是可能的。此外,存在如下作用:所述分析物的动态范围可以通过所述检测线和所述可变控制线的互补效应来改进。



1. 一种具有结合垫和检测垫的用于快速检测的条带,其中所述结合垫具有与分析物反应的第一预定量的第一配体和结合到所述第一配体的信号检测标记,所述第一配体和所述标记在样品迁移之前或在样品迁移时彼此链接以形成结合物,并且所述结合物可以在所述样品迁移时迁移到检测垫,

其中所述检测垫具有彼此分离的检测线和可变对照线,

其中所述检测线与和所述样品中分析物反应的所述第二配体一起固定,并且

其中所述可变对照线与第二预定量的第三配体一起固定,所述第三配体等同于与所述第一配体反应的所述分析物或其类似物,从而能够与没有结合到所述样品中分析物的裸结合物反应。

2. 根据权利要求 1 所述的用于快速检测的条带,其中所述第一预定量的第一配体的一部分与所述样品中的分析物发生反应,以从而形成复合物,其中所述分析物结合到具有所述第一配体和所述标签的结合物,并且所形成的复合物的量随着所述样品中分析物浓度的增加而增加,然而所述裸结合物的量降低。

3. 根据权利要求 2 所述的用于快速检测的条带,其中具有所述第一配体、所述标签和所述分析物的所述复合物与在所述检测线处捕获的所述第二配体发生反应,没有结合到所述样品中的分析物并且具有所述第一配体和所述标签的所述裸结合物与在所述可变对照线处捕获的所述第三配体发生反应,并且可以通过测量来自所述检测线和所述可变对照线的信号来确定所述样品中的分析物是否存在或其量,或者上述两者。

4. 根据权利要求 3 所述的用于快速检测的条带,其中所述可变对照线的信号强度随着所述样品中分析物浓度的增加而降低。

5. 根据权利要求 4 所述的用于快速检测的条带,其中来自所述可变对照线的信号强度保持为恒定水平,直到所述样品中分析物的浓度达到 M 值,但是当所述浓度超过 M 值时所述信号强度逐渐降低,并且最后收敛为 0,其中在以所述第二预定量固定的所有第三配体通过所述裸结合物的反应达到饱和的情况下 M 值为所述样品中分析物的最大浓度。

6. 根据权利要求 1 所述的用于快速检测的条带,其中所述检测垫进一步具有用于确定所述样品迁移的恒定对照线,所述恒定对照线与报道分子一起固定。

7. 根据权利要求 1 所述的用于快速检测的条带,包括:

样品垫,将包含待分析的分析物的样品引入到所述样品垫内;

结合垫,该结合垫的一端连接到该样品垫;

检测垫,该检测垫的一端连接到该结合垫的另一端;

吸附垫,所述吸附垫的一端连接到所述检测垫的另一端,提供所述样品从所述样品垫运输的驱动力;和

放置在用于快速检测的条带的下侧上的固体支撑件。

8. 根据权利要求 7 所述的用于快速检测的条带,其中所述支撑件由选自下组的材料制成,该组由以下各项组成:硝化纤维、尼龙、聚偏氟乙烯、玻璃和塑料。

9. 根据权利要求 1 所述的用于快速检测的条带,其中是第一配体、所述第二配体和所述第三配体为蛋白质、抗原、抗体、DNA、RNA、PNA 或适体。

10. 根据权利要求 1 所述的用于快速检测的条带,其中所述标签为胶态金、乳胶粒、彩色的聚苯乙烯微粒、酶、荧光颜料、导电聚合物、发光物质或磁性颗粒。

11. 根据权利要求 1 所述的用于快速检测的条带,所述条带为免疫层析条。

12. 一种包括权利要求 1 至 11 中任一项所述的用于快速检测的条带的诊断试剂盒,所述诊断试剂盒附加地安装在盒中,其中所述试剂盒在下部盒中具有导向件和条带支撑件,在上部盒中具有样品接收孔,并且结果观察窗放置在对应于所述检测线和所述可变对照线的位置。

13. 根据权利要求 12 所述的诊断试剂盒,其中所述试剂盒配备有标准信号数据,所述标准信号数据包含用于含有处于多种浓度的所述分析物的样品的所述检测线和所述可变对照线的标准比色表。

14. 根据权利要求 13 所述的诊断试剂盒,其中可以通过利用所述肉眼进行定性或半定量分析来检查来自所述检测线和所述可变对照线的所述标记的信号是否存在及其强度。

15. 一种利用权利要求 1 至 11 中任一项所述的用于快速检测的条带进行分析物的定性或定量分析的方法,所述方法包括以下步骤:

将该样品引入到该结合垫或在该结合垫之前定位的垫内,并且允许该样品迁移(步骤 1);

检测来自所述检测线和所述可变对照线的标记的信号是否存在及其强度(步骤 2);和

将所述检测线和是可变对照线的信号强度与标准信号数据作对比以确定所述分析物的量,其中通过使包含处于多种不同浓度的所述分析物的所述样品中的每一个经历步骤 1 和步骤 2 来获得所述标准信号数据(步骤 3)。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中在步骤 2 中,利用光密度计检查来自所述检测线和所述可变对照线的标签的信号是否存在及其信号强度。

17. 一种用于定性或定量分析样品中一种或多种分析物的方法,所述方法包括使所述样品与吸附在固体支撑件上的配体发生反应,其特征在于对一个分析物施加了两种不同的反应机制。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述两种不同的反应机制为夹层反应和竞争性反应。

## 具有可变对照线的用于快速检测的条带以及使用该条带的 诊断试剂盒

### 技术领域

本发明涉及具有可变对照线的用于快速检测的条带、包括用于快速检测的条带的诊断试剂盒、以及用于通过使用该条带定性和定量分析样品中分析物的方法。

### 背景技术

免疫层析法,被称为快速检测方法,是用于通过短时期内的抗原-抗体反应来定性和定量分析少量分析物的方法,并且已经应用于多个领域,例如医疗领域、农业、牧畜业、食品、军事、环境等,连同用于多种疾病的诊断或检查。通常,利用包含与靶标分析物反应以产生变化的试剂的分析条,或者利用包括塑料盒和安装在该盒中的分析条的分析装置来实施该免疫层析法。图1是用于免疫层析法的常规分析条的截面视图。如图1所示,常规分析条由以下组成:用于接收液体样品的样品垫;包含结合物的结合垫,该结合物通过将产生由肉眼或传感器可检测的信号标记(例如,金颗粒)结合到配体(例如抗原或抗体)进行制备;检测垫,在该检测垫上形成了固定有特异性结合到该样品中分析物和/或该结合物的结合剂(抗体或抗原)的检测线以及用于确定该样品迁移的对照线;和用于最后接收该液体样品的吸附垫。将这些功能垫按以上描述它们的顺序连接成彼此部分地重叠,并且连续地安排在固体支撑件上。如果使用了安装在塑料盒中的分析条,则用于将样品引入到样品垫的样品接收孔形成在该盒的上部部分上,并且用于观察该检测结果的结果观察窗形成在该检测垫的结合剂被固定的位置上。在利用该分析条的免疫层析法中,当将液体样品注射到该样品垫内时,液体样品通过毛细作用沿该结合垫和该检测垫流动,并且最后被吸附垫吸附。例如,能够与靶标抗原结合的一个抗体在膜垫上固定成一条线(检测线),并且其他抗体与标记(例如金颗粒中的一个)结合,然后允许该样品迁移。当该样品跨越该结合垫迁移时,它的一部分产生抗原-金颗粒抗体的复合物,并且在固定的检测线处捕获该抗原-金颗粒抗体以形成“在检测线-抗原-金颗粒抗体处固定的抗体”。此时,该检测线由于金颗粒被染成红色。如此,包含于结合垫中的该结合物还与该液体样品一起迁移。如果靶标分析物存在于该样品中,则该结合物通过该分析物被结合到固定在该检测垫上的结合剂(通常称为“夹层反应”),或者该结合物或该分析物竞争性地结合到该结合剂(通常称为“竞争性反应”)。基于这种概念,该分析条用于利用肉眼或传感器来检测样品中分析物的存在。

### 发明披露

### 技术问题

先前所述的该快速检测方法,即利用快速试剂盒的免疫层析法,通常处于条带的形式,通过在长膜片上沿若干水平线固定单独的具体物质然后纵向切割它来制备该条带。因此,优势在于,它以简单方式进行大量生产是可能的;另外,与酶联免疫吸附测定等相比,不需要额外的洗涤步骤或第二级反应,并且该反应时间短至10分钟。因此,该免疫层析法在便利性方面为极好的。然而,缺点在于,它的检测极限为相对较低的,并且由于基于肉眼检测

的缘故,精确的定量分析为困难的。出于这个原因,该常规免疫层析法通常用于定性分析,并且在定量分析方面存在许多限制。

诸位发明人已经尽力改进该免疫层析条在定量分析连同定性分析方面的可靠性,并且因此,他们已经发现通过添加含有等同于分析物或其类似物的可控对照线,然后对比该检测线和该可变对照线之间的信号强度,定量分析为可能的。因此,本发明提供具有可控对照线的用于快速检测的条带,该条带可以用于利用肉眼进行样品中分析物的高度可靠的定量分析连同其定性分析。

#### 问题的解决方案

在一个方面,本发明提供用于与结合垫和检测垫进行快速检测的条带,其中该结合垫具有与分析物反应的第一预定量的第一配体和结合到该第一配体的信号检测标记,该第一配体和该标记在样品迁移之前或在样品迁移时彼此链接以形成结合物,并且该结合物可以在样品迁移时迁移到检测垫,

其中该检测垫具有彼此分离的检测线和可变对照线,

其中该检测线与和该样品中分析物反应的第二配体一起固定,并且

其中该可变对照线与第二预定量的第三配体一起固定,该第三配体等同于与该第一配体反应的该分析物或其类似物,从而能够与没有结合到样品中分析物的裸结合物反应。

在优选的实施例中,用于快速检测的条带的特征在于,该第一预定量的第一配体的部分与该样品中分析物发生反应,以从而形成复合物,其中该分析物结合到具有该第一配体和该标记的结合物,并且所形成的复合物的量随着该样品中分析物浓度的增加而增加,然而该裸结合物的量降低。

在另一个优选的实施例中,用于快速检测的条带的特征在于,具有第一配体、标记和分析物的该复合物与在该检测线处捕获的第二配体发生反应,没有结合到该样品中的分析物并且具有第一配体和标记的该裸结合物与在该可变对照线处捕获的该第三配体发生反应,并且可以通过测量来自该检测线和该可变对照线的信号来确定该样品中的分析物是否存在或其量或者上述两者。

仍在另一个优选的实施例中,用于快速检测的条带的特征在于,该可变对照线的信号强度随着该样品中分析物浓度的增加而降低。

还在另一个优选的实施例中,用于快速检测的条带的特征在于,来自该可变对照线的信号强度保持为恒定水平,直到该样品中分析物的浓度达到M值,但是当该浓度超过M值时该信号强度逐渐降低,并且最后收敛为0,其中在以该第二预定量固定的所有第三配体通过与该裸结合物反应达到饱和的情况下M值为样品中分析物的最大浓度。

还在另一个优选的实施例中,用于快速检测的条带的特征在于,该检测垫进一步具有用于确定样品迁移的恒定对照线,该恒定对照线与报道分子一起固定。

另外在另一个优选的实施例中,用于快速检测的条带的特征包括:

样品垫,将包含待分析的分析物的样品引入到该样品垫内;

结合垫,该结合垫的一端连接到该样品垫;

检测垫,该检测垫的一端连接到该结合垫的另一端;

吸附垫,该吸附垫的一端连接到该检测垫的另一端,提供该样品从样品垫运输的驱动力;和

放置在用于快速检测的条带的下侧上的固体支撑件。

还在另一个优选的实施例中,用于快速检测的条带的特征在于该支撑件由选自下组的材料制成,该组由以下各项组成:硝化纤维、尼龙、PVDF(聚偏氟乙烯)、玻璃和塑料。

还在另一个优选的实施例中,用于快速检测的条带的特征在于该第一配体、该第二配体和该第三配体为蛋白质、抗原、抗体、DNA、RNA、PNA 或适体。

还在另一个优选的实施例中,用于快速检测的条带的特征在于该标记为胶态金、乳胶粒、彩色的聚苯乙烯微粒、酶、荧光颜料、导电聚合物、发光物质或磁性颗粒。

还在另一个优选的实施例中,用于快速检测的条带为免疫层析条。

在另一方面,本发明提供包括如上所述额外安装在盒中的用于快速检测的条带的诊断试剂盒,其中该试剂盒在下部盒中具有导向件和条带支撑件,在上部盒中具有样品接收孔,并且结果观察窗放置在对应用于该检测线和该可变对照线的位置。

在优选的实施例中,诊断试剂盒的特征在于该试剂盒配备有标准信号数据,该标准信号数据包含用于含有处于多种浓度的分析物的样品的检测线和可变对照线的标准比色表。

在另一个优选的实施例中,该诊断试剂盒的特征在于可以通过用肉眼检查检测线和可变对照线的标记的信号是否存在及其强度,来实施定性或半定量分析。

仍在另一方面,本发明提供利用上述的用于快速检测的条带对样品中分析物进行定量或定性分析的方法,

该方法包括如下步骤:

将该样品引入到该结合垫或在该结合垫之前定位的垫内,并且允许该样品迁移(步骤 1);

检测来自该检测线和该可变对照线的标记的信号是否存在及其强度(步骤 2);和

将该检测线和该可变对照线的信号强度与标准信号数据进行对比以确定该分析物的量,

其中通过使包含不同已知浓度的该分析物的样品中的每一个经历步骤 1 和 2 来获得该步骤信号数据(步骤 3)。

在优选的实施例中,该方法的特征在于,在步骤 2 中,利用光密度计检查来自该检测线和该可变对照线的标记的信号是否存在及其信号强度。

仍在另一方面,本发明提供用于样品中一种或多种分析物的定量或定量分析的方法,包括使该样品与吸附在固体支撑件上的配体发生反应,其特征在于对一个分析物施加了两种不同的反应机制。

在优选的实施例中,该方法的特征在于该两种不同的反应机制为夹层反应和竞争性反应。

本发明的有利效应

因为本发明的用于快速检测的条带具有可变对照线,所以由于钩效应克服分析物在定量分析方面的困难并且还利用肉眼以简单快速方式进行高度可靠的定量分析连同定性分析是可能的。此外,存在如下作用:分析物的动态范围可以通过检测线和可变对照线的互补效应来改进。

## 附图说明

图 1 是示出了用于典型的免疫层析法中的分析条的横截面视图的示意图；

图 2 是示出了用于本发明的免疫层析法中的分析条的示意图；

图 3 是示出了在引入样品之前和之后，在本发明的用于快速检测的条带中检测线、可变对照线和恒定对照线的模式的示意图；

图 4 是根据本发明的一个实施例示出用于快速检测的条带的示意图；和

图 5 是根据本发明的一个实施例示出了分析多种样品中分析物浓度的结果的图，其中人类免疫球蛋白 G(IgG) 用作分析物。

#### 实施本发明的最佳方式

在一个方面，为了实现上述目的，本发明提供具有结合垫和检测垫的用于快速检测的条带，其中该结合垫具有与分析物反应的第一预定量的第一配体和结合到该第一配体的信号检测标记，该第一配体和该标记彼此链接以在样品迁移之前或样品迁移时形成结合物，该结合物在样品迁移时可迁移到检测垫，该检测垫具有彼此分离的检测线和可变对照线，该检测线与和样品中分析物发生反应的第二配体一起固定，并且该可变对照线与第二预定量的第三配体发生反应，该第三配体等同于与该第一配体发生反应的分析物或其类似物，从而能够与没有结合到样品中分析物的裸结合物发生反应。

本发明的特征在于，与等同于该分析物或其类似物的物质一起固定的可变对照线被添加到具有检测垫的常规分析条，在该检测垫上仅形成了用于确保该样品迁移的检测线和对照线，从而执行高度可靠的定量分析连同定性分析。

此外，本发明的特征在于，在没有专业分析仪的前提下用肉眼执行高度可靠的半定量分析是可能的。

在优选的实施例中，本发明的特征在于用于快速检测的条带为免疫层析条。

如本所用，术语“免疫层析法”是结合基于抗原 - 抗体反应在的免疫反应原则与基于样品和试剂沿介质通过流动相运动的色谱分析法原则的分析方法。简言之，待分析的抗体或抗原预先分配在多孔膜上并且固定到其上，然后允许血液从该膜的一端迁移向抗体或抗原以观察它与血液中抗原或抗体的反应。免疫反应通常是指抗原 - 抗体反应。然而，在本发明中，它还广义地包括特异性地彼此结合的受体和配体之间的反应连同抗原 - 抗体反应，但不局限于此。另外，该免疫反应包括通过特异性相互识别而发生的所有反应，例如酶和底物之间的反应。

免疫层析法可以发生在包含分析物的样品通过毛细作用沿流动相移动穿过介质时。因此，作为用于该免疫层析法的介质，可以制备和使用条带。用于快速检测的条带的特定部件及其功能将在下文进行描述。

可以使用标记以使用肉眼或传感器简单地检测抗原 - 抗体反应。能够特异性地结合到该分析物的配体可链接到该标记，以便使得该标记结合到目标分析物。

如本所用，术语“结合物”是指通过将该标记和该配体彼此链接而形成的结合物，并且该结合物与该标记链接以用于信号检测并且包括与样品中分析物发生反应的第一配体。为了区分第一配体与下文所述的其他配体，该第一配体是指与该标记结合以形成结合物的配体。

如本所用，该第一配体是指能够与该分析物发生反应并且特异性地结合到该分析物的物质。

可以物理地或化学地链接该标记和该第一配体。即,可以通过改变标记以具有反应基团经由被动吸附或共价键来链接该标记和该第一配体,但不限于此。可以通过本领域已知的方法实施该标记和该第一配体之间的链接。

然而,该标记和该第一配体可以在用于快速检测的条带中的样品迁移之前以结合物的形式存在于该结合垫上,或者在没有链接的前提下单独地存在于该结合垫上,并且然后它们彼此结合以在样品迁移期间形成该结合物。不论哪种情况,该标记和该第一配体在样品迁移期间以结合物的形式移动到该检测垫,因为它们没有固定在该结合垫上。

如本所用,术语“标记”是指产生可以用肉眼或传感器检测到信号的物质。该标记可以为胶态金(金颗粒)、乳胶粒、有色的聚苯乙烯微粒、酶、荧光颜料、导电聚合物、发光物质、磁性颗粒等,但不限于此。另外,该信号可以为通过该标记的固有性质自发产生的冷光,或者通过外部刺激产生的荧光。

如本所用,术语“配体”是指特异性地彼此结合的物质。例如,特异性地结合到抗原的抗体或者特异性地结合到具体受体的配体,彼此起作用以作为配体。该配体的非限制性例子包括蛋白质、抗原、抗体、DNA、RNA、PNA 或适体。另外,本发明中的配体可以为任何物质而无限制,只要它表现出如上所限定的特性。贯穿本说明书所使用的配体是指特异性地彼此结合的物质,如上文所限定,除非约束为特异性地结合到具体受体的配体。

在本发明的一个优选的实施例中,该标记和该第一配体预先彼此连接并且以结合物的形式存在于该结合垫上。在这种情况下,在已知浓度的溶液中单独地制备该标记和该第一配体,然后混合它们并且允许它们反应预定时间以便制备结合物溶液。这种结合物溶液分配在该结合垫上以制备包含该结合物的结合垫。此时,考虑到该标记和该配体的结合比率,可以确定每个溶液的浓度和混合比率。该标记与该配体的结合可以为一个标记与一个配体的结合,一个标记与多个配体的结合、或者多个标记与一个配体的结合。特异性结合比率并不重要,但是它可以在一个优选的实施例中保持预定比率。结合比率可以根据该标记和该配体的类型而改变,并且可以通过考虑它们的相对尺寸和结合位点的量来确定。例如,如果若干微米级乳胶微粒用作该标记并且抗体用作该配体,则多个抗体可以结合到一个乳胶微粒。优选地,为了将等量的抗体结合到乳胶表面中的每一个,可以控制抗体和乳胶溶液的浓度以及它们的混合比率,以使得抗体与乳胶表面的结合饱和,但不限于此。

如上所述,可以通过混合已知浓度的该标记和第一配体并且使它们发生反应来获得已知浓度的结合物溶液。结合物溶液可以呈分散的形式,其中具有预定浓度的该结合物分子均匀地分散在溶液中。

用于快速检测的条带为具有可变对照线的免疫层析条,该免疫层析条可以包括含有与分析物发生反应的第一预定量的第一配体和结合到该第一配体的信号检测标记的结合垫;以及单独地具有检测线和可变对照线的检测垫。

对应该样品中分析物的定量分析连同定性分析,该第三配体固定在该检测垫上以形成“可变对照线”。在本发明的用于快速检测的条带的可变对照线中,等同于与该第一配体发生反应的分析物或其类似物的物质可以固定作为第三配体,该第三配体能够与处于流动相在该检测垫中流动的裸结合物发生反应。没有结合到该样品中的分析物的裸结合物包含该第一配体,因此,该第一配体特异性地结合到等同于该分析物或其类似物的物质,即第三配体。

此外,预定量的该第三配体可以固定在该可变对照线上。即,该第二预定量是指固定在该可变对照线上的第三配体的特定量。通过固定该第二预定量的第三配体,可以控制可变对照线中的信号强度和该样品中分析物的可检测浓度范围,这使得高度可靠的定量分析成为可能。

在本发明中,为了区分第三配体与下文所述的其他配体,该第三配体是指固定在该检测垫上以形成该可变对照线的配体。

此外,为了检测该样品中的分析物,特异性地结合到该分析物并且选择性地捕获的第二配体固定在该检测垫上,从而形成“检测线”。在本发明的用于快速检测的条带的检测线中,与该样品中分析物发生反应的第二配体固定以便与分析物-结合物复合物(即处于流动相在该检测垫中流动的分析物)发生反应。该第二配体可以为等同于该第一配体或其类似物或特异性地结合到该分析物的第三物质的物质。当该样品中的分析物沿流动相迁移时,它结合到该结合垫中的结合物以形成复合物。因为这种复合物包括如上所述的分析物和特异性地结合到该分析物的第一配体,所以等同于第一配体或其类似物或者特异性地与该分析物结合的第二配体的该物质有助于通过结合到该分析物捕获该检测线中的复合物。

在本发明中,为了区分第二配体和下文所述的其他配体,该第二配体是指固定在该检测垫上以形成该检测线的配体。

如上所述,该免疫层析法利用基于沿介质包含该分析物的流动相迁移的色谱分析法。因此,在根据本发明使用用于快速检测的条带的免疫分析中,流动相对于包含该分析物的样品沿该条带迁移而言是需要的。因此,本发明的免疫分析试剂盒可以进一步包括缓冲液。缓冲液充当用于沿用于快速检测的条带移动该样品的流动相,并且还充当用于溶解该结合物的溶液。必要时,它充当用于稀释该样品的稀释剂。例如,就全血分析而言,可以进一步包括用于溶解血细胞,例如红细胞等的成分。作为缓冲液,可以在没有限制的前提下使用典型的缓冲液例如 10mM 至 1M 的磷酸盐缓冲液(PBS)、非离子或两性表面活性剂、或者它们的混合物,并且可以根据所需的反应,例如抗原-抗体反应等,适当地选择缓冲液。

该结合垫为具有如上文所述与该分析物发生反应的第一预定量的该第一配体和结合到该第一配体的信号检测标记,其中该第一配体和该标记在该样品迁移之前可以结合物的形式存在于该结合垫上,或者在没有它们之间链接的前提下单独地存在于该结合垫上,然后它们彼此结合以在样品迁移期间形成结合物。

在本发明中,仅预定量的该第一配体可以存在于该结合垫中。即,该第一预定量是指存在于该结合垫中的第一配体的特定量。因为该第一配体以第一预定量存在于该结合垫中,所以通过该第一配体与该靶标结合形成的复合物的量随着样品中靶标的浓度的增加而增加,然而没有结合到靶标的裸结合物的量降低,显示为反比。

优选地,在该结合垫中,该第一配体和该标记预先彼此链接,并且它们以结合物形式存在。此时,可以通过将已知浓度的结合物施加到垫来制备该结合垫,如上文所述。

此外,该结合垫可以进一步包括通过第四配体与标记结合而形成的第二结合物,待用作内部对照物。该第四配体是指能够特异性地或非特异性地与报道分子发生反应的配体。通过恒定对照线的报道分子来捕获第二结合物,从而确保该样品的迁移。将在下文进行该恒定对照线和该报道分子的详细说明。

该检测垫是用于流动相和样品迁移的介质,并且该流动相和该样品可以通过构成该检

测垫的多孔膜的毛细作用来迁移。此外,该检测垫具有彼此分离的检测线和可变对照线,并且进一步具有用于确保该样品迁移的恒定对照线。该检测垫的一端可以连接到该结合垫,并且它的另一端可以连接到该吸附垫,该吸附垫提供用于样品迁移的驱动力。该结合垫和该吸附垫部分地重叠到该检测垫上。该检测垫可以由多孔膜组成,并且该多孔膜可以为硝化纤维膜、玻璃纤维膜、聚醚砜 (PES) 膜、纤维素膜、尼龙膜或它们的组合,但不限于此。优选地,该检测垫可以为具有 5 至 15 微米孔径的硝化纤维膜。

将在下文更详细地描述利用本发明的用于快速检测的条带的定性或定量分析的原则。

在常规分析条中,该检测线形成在该膜垫上,并且在该检测线处捕获该迁移的分析物-结合物复合物以产生信号(夹层反应)。此时,信号强度随着该分析物的浓度增加而增加。然而,如果该分析物的浓度超过特定浓度,则信号强度由于钩效应而降低。这种现象是利用常规分析条进行分析物定量分析的巨大障碍。

然而,本发明的用于快速检测的条带的特征在于,将特定竞争性反应(在第一预定量的该第一配体与有限量的结合垫中的样品中分析物竞争性地发生反应的情况下)连同夹层反应施加到一个条带,因此,相比于常规免疫层析分析而言,执行更加快速、便捷的定量分析是可能的。

具体地讲,当将液体样品引入到本发明的用于快速检测的条带的样品垫内时,流动相和样品出现。在该结合垫中,第一预定量的该第一配体与该样品中有限量的分析物竞争性地发生反应。第一预定量的该第一配体的一部分与样品中的分析物发生反应以形成复合物,其中该分析物结合到包含第一配体和标记的结合物,然而未与该分析物发生反应的该第一配体的剩余部分作为裸结合物沿流动相迁移。本文中,因为该第一配体保持为第一预定量,所有形成的复合物的量随着该样品中分析物浓度的增加而增加,然而该裸结合物的量降低。

包含该第一配体、该标记和该分析物的复合物与迁移期间在该检测线处捕获的第二配体发生反应,然而未与该样品中分析物发生反应并且包含该第一配体和该标记的裸结合物与迁移期间在该可变对照线处捕获的第三配体发生反应。分别在该检测线和该可变对照线处捕获复合物和裸结合物,因为该第二配体固定在该检测线上并且该第三配体固定在该可变对照线上。

该复合物和该裸结合物两者皆包含标记,因此可以通过测量来自捕获该复合物和该裸结合物的该检测线和该可变对照线的信号来确定该分析物是否存在、该样品中它们的量、或者上述两者。

如上所述,该复合物的量随着该样品中分析物浓度的增加而增加,然而该裸结合物的量随着该样品中分析物浓度的增加而降低。因此,来自捕获该裸结合物的可变对照线的信号强度随着该样品中分析物的浓度增加而降低。

更具体地,来自该可变对照线的信号强度保持在恒定水平直到样品中分析物浓度达到 M 值,但是该信号强度在该浓度超过 M 值逐渐降低。最后,该信号强度收敛到 0。本文中, M 值是在以第二预定量固定的所有第三配体通过与该裸结合物发生反应达到饱和的情况下该样品中分析物的最大浓度。在本发明的一个实例中,当该样品中分析物的浓度在 0 至 90ng/ml 范围内时,来自该可变对照线的信号强度保持在最强水平,因此可见所有该第三配体与该裸结合物发生反应。因此,确认本发明的实例中的 M 值为约 90ng/ml (实例 2)。然

而, M 值根据第二预定量、以及该第三配体和该分析物的类型而改变, 因此, 可以由本领域的技术人员根据分析的目的适当地选择 M 值。

如上所述, 来自该检测线的信号强度随着该分析物浓度的增加而增加。然而, 该分析物的浓度超过特定水平, 信号强度由于钩效应而降低。根据本发明的分析物增加的浓度, 该检测线和该可变对照线的信号强度图形示于图 3 中。

因此, 通过测量来自该检测线和该可变对照线的标记的信号来执行该分析物的定性或定量分析是可能的。更具体地讲, 来自该检测线和该可变对照线的信号与已经预先制备的已知浓度的分析物的标准信号数据对比, 从而分析该分析物的浓度。可以通过利用肉眼检测该信号强度来半定量分析该浓度, 或者利用读取器例如光密度计更加精确地定量分析该浓度。

在本发明中, 该检测垫进一步具有用于确保该样品迁移的恒定对照线, 并且该报道分子可以固定在该恒定对照线上。

如本所用, 术语“恒定对照线”是指不考虑该样品或者该样品中分析物的浓度而产生恒定信号的部分。可以与形成该检测线和该可变对照线相似的方式形成该恒定对照线。然而, 可以通过在其上固定配体形成该恒定对照线, 其中所述配体没有结合到该靶标材料(分析物), 并且特异性地或非特异性地结合到并捕获与该样品一起沿该检测垫通过流动相迁移的该第二结合物的第四配体。可替代地, 可以通过在其上固定配体来形成该恒定对照线, 其中所述配体特异性地或非特异性地结合到并且捕获与该样品一起沿该检测垫通过流动相迁移的标记或标记-结合物质。因此, 作为该配体, 在不考虑该样品中分析物浓度及存在与否的前提下能够产生恒定信号的物质固定, 以形成该恒定对照线。待用于该恒定对照线的配体称为术语“报道分子”, 该报道分子的实例可以包括抗兔 IgG、抗鸡 IgY、链霉亲和素、牛血清白蛋白等。

通过改变在其上待固定的报道分子的浓度来形成该恒定对照线中的两个或更多。当固定在该恒定对照线上的报道分子的浓度增加时, 该恒定对照线能够恒定地产生强信号。

如果具体浓度的该报道分子被固定在该恒定对照线上, 则由此产生的信号强度保持在恒定水平, 因此可以确定处于对应于该报道分子信号强度的该检测线或该可变对照线的信号强度的分析物的浓度。可以通过改变该报道分子的浓度来形成若干恒定对照线, 从而形成具有不同信号强度的若干恒定对照线。这些信号强度与该检测线或该可变对照线的信号强度相比以用于定量分析。即, 该恒定对照线可以用作内部标准信号数据。

例如, 假设形成了两条恒定对照线, 并且它们产生 1 和 3 的信号强度。基于已知浓度的分析物, 可以预先确定, 当该检测线具有信号强度 1 时, 该分析物的浓度为 10ng/ml, 并且当该检测线具有信号强度 3 时, 该分析物的浓度为 30ng/ml。如果该检测线显示信号强度 2(得自未知浓度分析物的分析), 则可以简单地看出该号强度为对应于两条恒定对照线之间的中间值(相比于该恒定对照线的信号强度)的信号强度。

可以根据待使用的抗原-抗体反应正确地选择该检测线、该可变对照线以及该恒定对照线的大小和位置, 但不限于此。可以通过来自该恒定对照线的信号是否存在来确定该样品的成功迁移, 并且可以通过将该检测线和该可变对照线的信号强度与先前确定的标准信号数据对比来实施该分析物的定量分析。将在下文描述标准信号数据。

在本发明中, 在通过该检测线和该可变对照线的信号强度进行定量分析的情况下, 该

样品中分析物的动态范围可以为 1ng/ml 至 1mg/ml。在本发明的一个实例中,分析该样品中分析物的结构示出,该样品中分析物的动态范围宽至 5 至 100,000ng/ml (实例 2)。即,常规分析条示出下述现象,如果样品中分析物浓度超过特定浓度,则检测线的信号强度由于钩效应而降低,如上文所述。然而,本发明的用于快速检测的条带的特征在于,它进一步包括可变对照线,该可变对照线随着样品中分析物浓度的增加而逐渐降低,并且示出在仅具有检测线的常规条带中的限制的动态范围,通过该检测线和该可变对照线的结合扩展到钩效应的范围,因为该可变对照线不受钩效应影响。然而,该动态范围可以根据分析物的类型、固定在该检测垫上的配体的量、信号检测器等而改变,因此本发明的动态范围不限于上述范围。

将更详细地描述本发明的用于快速检测的条带。发明的用于快速检测的条带可以包括样品垫,将包含靶标分析物的样品引入到该样品垫内;结合垫,该结合垫的一端连接到该样品垫;检测垫,该检测垫的一端连接到该结合垫的另一端;吸附垫,该吸附垫的一端连接到该检测垫的另一端,提供该样品从样品垫运输的驱动力;和放置在用于快速检测的条带的下侧上的固体支撑件。图 2 示出了本发明的用于快速检测的条带的构造。

该固体支撑件可以由选自硝化纤维、尼龙、PVDF、玻璃和塑料组成的群体的材料制成。将条带附接到该固体支撑件上以增加该条带的耐久性,并且可以简单地处理和存储该条带。另外,还可简单地安装附加的外部盒。待用作固体支撑件的塑料材料可以为聚丙烯膜、聚酯膜、聚碳酸酯膜、有机膜等,但不限于此。

在另一方面,本发明提供包括安装盒中本发明的用于快速检测的条带的诊断试剂盒,其中在下部盒中包括导向件和条带支撑件,并且在上部盒中形成样品接收孔,并且结果观察窗放置在对应于该检测线和该可变对照线的位置。

发明的用于快速检测的条带可以进一步安装在盒中。用于将用于快速检测的条带放置在合适位置并且用于固定或压缩它的多个导向件和/或条带支撑件可以包括在该下部盒中。任选地,该导向件和条带支撑件还可以包括在该上部盒中,位于对应于该下部盒中导向件和条带支撑件位置的位置。即,该导向件和/或条带支撑件可以形成在该下部盒中,或者形成在该上部盒和该下部盒两者中,如果需要。另外,用于在对应于该检测线、该可变对照线和该恒定对照线的位置检测来自该标记的信号该样品接收孔和该结果观察窗可以包括在该上部盒中。该样品接收孔可以孔或裂缝的形式形成在该检测垫的一端,即,相对于该检测线与该吸附垫相对的端部和充分地与该检测线分离的点处,以使得该样品可以沿该膜迁移。该结果观察窗可以形成在放置该检测线和该可变对照线的该检测垫的点处,和/或如果需要,它可以被形成为包括该恒定对照线以使得其尺寸为能够用肉眼或传感器充分地辨别,如果进一步形成了该恒定对照线。可以在不限制其尺寸和形状的前提下形成它,只要该检测线、该可变对照线和该恒定对照线可以为能够分辨的。

可以利用典型的塑料材料,例如聚碳酸酯、丙烯腈丁二烯苯乙烯 (ABS) 等来制造该上部盒和该下部盒,但不限于此。可以单独地制造该上部盒和该下部盒,然后通过典型的连接构件(例如连接凹配件和凸配件)来装配。可替代地,它们可以整体形式进行制造。

此外,诊断试剂盒可以配备有标准信号数据,该标准信号数据包含用于含有处于多种浓度的分析物的样品的检测线和可变对照线的标准比色表。

如本所用,标准信号数据是指相对于包含可变已知浓度的分析物的样本,总结通过利

用本发明的用于快速检测的条带而获得的该检测线和该可变对照线的信号强度的数据。可以不同方式总结这些标准信号数据,该数据典型地总结为对应于每个分析物浓度的检测线和可变对照线的颜色。类似地,可以通过用于测量 pH 的石蕊试纸进行例证,该石蕊试纸提供有总结对应于每个 pH 的纸颜色的标准颜色表。具体地讲,当该使用了包含该标准颜色表的标准信号数据时,可以仅用肉眼来对比该分析物的信号强度与标准信号数据,因此进行简单和快速半定量分析是可能的。在此方面,该诊断试剂盒可以用于利用肉眼检查来自该检测线和该可变对照线的标记的信号是否存在及其强度,这使得执行定性或半定量分析成为可能。换言之,在将该样品施加到该试剂盒之后,利用肉眼将来自该检测线和该可变对照线的信号是否存在及其强度与配备有标准颜色表的标准信号数据进行对比,从而分析该样品中分析物是否存在及其浓度。

仍在另一个方面,本发明提供利用用于快速检测的条带进行样品中分析物的定性和定量分析的方法,该方法包括:将该样品引入到该结合垫或该结合垫之前定位的垫,并且允许该样品迁移(步骤 1);检测来自该检测线和该可变对照线的标签的信号是否存在及其强度(步骤 2);以及将该检测线和该可变对照线的信号强度与标准信号数据作对比以确定该分析物的量(步骤 3),其中通过使包含处于多种不同浓度的分析物的样品中的每一个经历步骤 1 和步骤 2 来获得该标准信号数据。

还在另一方面,本发明提供用于样品中一种或多种分析物的定量或定量分析的方法,包括使该样品与吸附在固体支撑件上的配体发生反应,其特征在于对一个分析物施加了两种不同的反应机制。适于本发明的方法的两种不同反应机制可以为夹层反应和竞争性反应。

利用本发明的用于快速检测的条带对样品中分析物进行定性和/或定量分析的方法的详细原则与上文所述一样。另外,该标准信号数据与上文所述一样。

可以下述顺序实施该特定分析方法。第一,可以将包含靶标分析物的液体样品引入到该结合垫或该结合垫之前定位的垫内。即,可以通过将该样品引入到该结合垫来将该液体样品引入到该条带内,但是可以优选地将其引入到在该结合垫之前定位的垫内,例如样品垫。另外,将缓冲液例如 PBS 添加到样品,均匀地混合它们,然后可以将该混合物以相同方式引入到该条带内。

当将样品加载(引入)到本发明的用于快速检测的条带上时,该样品开始迁移,然后通过该恒定对照线确保该样品的成功迁移。当确保了该样品的成功迁移时,检查来自该检测线和该可变对照线的标签的信号是否存在及其强度。从该检测线观察到的信号指示该分析物包含于该样品中(定性分析)。此外,可以通过对比该检测线和该可变对照线的信号强度与标准信号数据来确定该样品中分析物的浓度(定量分析)。

在本发明的一个特定实施例中,利用进一步具有该可变对照线的用于快速检测的条带实施人类免疫球蛋白 G(人类 IgG;分析物)分析。可确认用肉眼进行高度可靠的定量分析是可能的,尽管钩效应发生在 5 至 100,000ng/ml 范围的样品分析物的浓度情况下(表 1 和图 5)。

用于本发明的免疫分析法的样品可以包括所有生物样品,例如全血、血细胞、血清、血浆、骨髓、汗液、尿液、眼泪、唾液、皮肤、粘膜、头发等,上述所有皆分离自哺乳类动物,优选地,人类。优选地,该样品为血液。血液可以为通过移除血细胞制备的血清或血浆。如果使

用了全血,则可将用于溶解血细胞的成分添加到缓冲液。这些仅出于示意性目的,但是不具体地限制用于本发明的免疫分析法的样品。

本发明的免疫分析可以用于诊断疾病,其中全血主要用作样品,例如疟疾抗原 (Ag)、艾滋病病毒、丙肝、乙肝、梅毒、溃疡导致细菌、肿瘤标记物 (AFP、PSA、CEA)、肺结核、非典型肺炎、登革热、麻风病等。

#### 本发明的方式

在下文,本发明将参考实例进行更加详细的描述。然而,这些实例仅出于示意性目的,并且本发明不旨在限制这些实例。

#### 实例 1:制造用于快速检测的条带

##### A. 制造具有检测线、可变对照线和恒定对照线的检测垫

在硝化纤维膜上制造三条分析线。利用层压机在塑料卡上对该硝化纤维膜进行分层。此后,利用自动分配器分别将作为检测线的第二配体的山羊抗人类免疫球蛋白(来自美国 Arista 公司,山羊的抗人类 IgG),作为可变对照线的第三配体的人类免疫球蛋白(人类 IgG),和作为恒定对照线的报道分子的牛血清白蛋白(BSA)分配到其上,然后在 25~30 摄氏度下干燥 2 天(48 小时)。

##### B. 制备结合垫

将垫完全浸湿在包含 0.5% PVA(聚乙烯醇)的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(10mM, pH 8.5)中,然后在干燥器中完全干燥以用于该结合垫的预处理。

通过结合具有约 40nm 直径的金颗粒与山羊抗人类免疫球蛋白(来自山羊的抗人类 IgG)来制备第一结合物溶液,并且通过结合具有约 40nm 直径的胶态金颗粒与链霉抗生素蛋白来制备第二结合物溶液。将该第一结合物溶液和该第二结合物溶液施加到预处理的结合垫,并且在干燥器中完全干燥。随后,通过切成合适尺寸来制备垫。

##### C. 制备样品垫

将样品垫完全浸湿在包含 1%的 Triton X-100、0.5%的 NaN<sub>3</sub> 和 0.1%的 BSA 的 0.08M 硼酸缓冲液中,并且在干燥器中完全干燥。随后,通过切成合适尺寸来制备垫。

##### D. 制备吸附垫

在干燥器中完全干燥吸附垫,并且在没有处理的情况下进行使用。随后,通过切成合适尺寸来制备垫。

##### E. 制备用于快速检测的条带

将通过上述程序制备的检测垫、结合垫、样品垫和吸附垫根据图 4 的结构进行装配。

即,将具有粘着剂的样品垫附接成与结合垫的一端重叠,将检测垫的一端附接成与该结合垫的另一端重叠,并且将该检测垫的另一端附接成与具有指示顶部的粘着剂的吸附垫的一端重叠。使用切割器将这种装配体切成约  $2 \pm 1.0$ mm 的尺寸,并且最后制备图 4 中的条带。

在图 4 中,每个参考数字的意思与下文相同。

1:样品垫;  $16 \pm 4 \times 4 \pm 2$ mm

2:抗人类免疫球蛋白和金颗粒的结合垫;  $6 \pm 1.0 \times 4 \pm 2$ mm

3:硝化纤维检测垫;  $25 \pm 5 \times 4 \pm 2$ mm

4:塑料固体支撑件

5 :吸附垫 ; $18 \pm 4 \times 4 \pm 2 \text{mm}$

6 :抗人类免疫球蛋白 - 固定的检测线

7 :人类免疫球蛋白 - 固定的可变对照线

8 :牛血清蛋白 - 固定的恒定对照线

### 实例 2 :利用用于快速检测的条带进行免疫分析

将包含人类免疫球蛋白 (人类 IgG) 和磷酸缓冲液 (PBS) 的样品溶液中的每一个 100ml 添加到 96- 孔板。通过利用 0ng/ml、5.6ng/ml、11.2ng/ml、22.5ng/ml、45ng/ml、90ng/ml、187ng/ml、375ng/ml、750ng/ml、 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $3.12 \mu\text{g/ml}$ 、 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 、 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $25 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{g/ml}$  或  $100 \mu\text{g/ml}$  浓度的人类免疫球蛋白制备该样品溶液。

[0153] 将实例 1 中制备的用于快速检测的条带浸在包含样品溶液的 96- 孔板中,并且允许迁移 10 分钟。

图 5 是根据作为分析物的人类免疫球蛋白的浓度示出色层分离条带的发展的图。

另外,利用肉眼检测来自该检测线、该可变对照线和该恒定对照线的信号强度,并且示于下述的表 1 中。在此方面,通过颜色强度确定信号强度中的每一个,其中最高的颜色强度武断地视为 5,并且最低的颜色强度视为 0。

表 1

[表 1]

靶标的浓度 (ng/ml)	恒定对照线	可变对照线	检测线
0	3	5	0
5.6	3	5	0.5
11.2	3	5	1
22.5	3	5	2
45	3	5	2
90	3	5	2
187	3	4	3
375	3	4	4
750	3	4	4
1500	3	3	3
3120	3	3	3
6250	3	2	2

12500	3	1	2
25000	3	0.5	2
50000	3	0	2
100000	3	0	1

如表 1 所示,当样品中分析物 (IgG) 的浓度增加时,该检测线的信号强度逐渐增加,并且在约 375ng/ml 至 750ng/ml 的情况下观察到最强信号。之后,信号强度逐渐降低,这归功于上文提及的钩效应。因此,不能通过仅利用该检测线的信号强度来定量分析分析物。

例如,如果该检测线的信号强度为 2,则样品中分析物 (IgG) 的浓度可见在 40ng/ml 和 10  $\mu$ g/ml 附近。尽管该检测线显示相同的信号强度,但是该分析物浓度可以不同。

然而,当该样品中分析物 (IgG) 的浓度增加时,该可变对照线的信号强度逐渐降低。细节上,可见,在分析物浓度为 0 至 90ng/ml 情况下,信号强度几乎保持在最高水平 5。如此,如果分析物浓度为低,在检测线中没有钩效应发生,并且因此可以通过该检测线的信号强度确定分析物浓度。如果该分析物浓度增加,则该检测线的信号强度由于钩效应变得不规则。然而,该可变对照线的信号强度连续降低,因此,可以通过该可变对照线确定分析物浓度。

例如,如果该检测线的信号强度为 2,则该分析物可具有约 40ng/ml 和 10  $\mu$ g/ml 的两个浓度,如上文所述。然而,该可变对照线相对于该两个浓度表现出 5 或 2 的信号强度,指示该浓度的定量分析是可能的,不同于仅适于检测线的常规方法。

另外,可以发现,本发明的用于快速检测的条带具有 5ng/ml 至 100,000ng/ml 的分析物的宽动态范围。

#### 工业实用性

因为本发明的用于快速检测的条带具有可变对照线,所以由于钩效应克服分析物在定量分析方面的困难并且还利用肉眼以简单快速方式进行高度可靠的定量分析连同定性分析是可能的。此外,存在如下作用:分析物的动态范围可以通过检测线和可变对照线的互补效应来改进。

### 通常的分析条



图 1

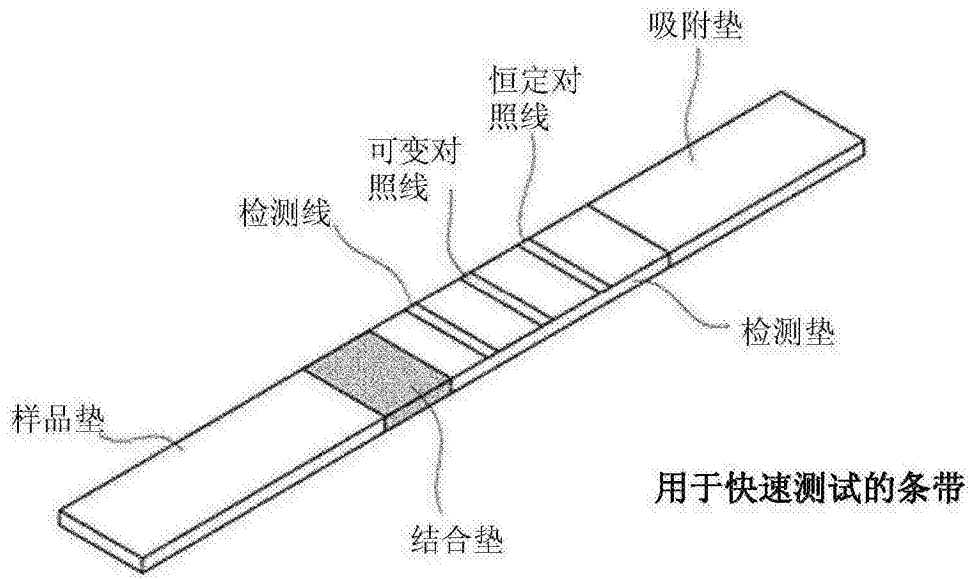


图 2

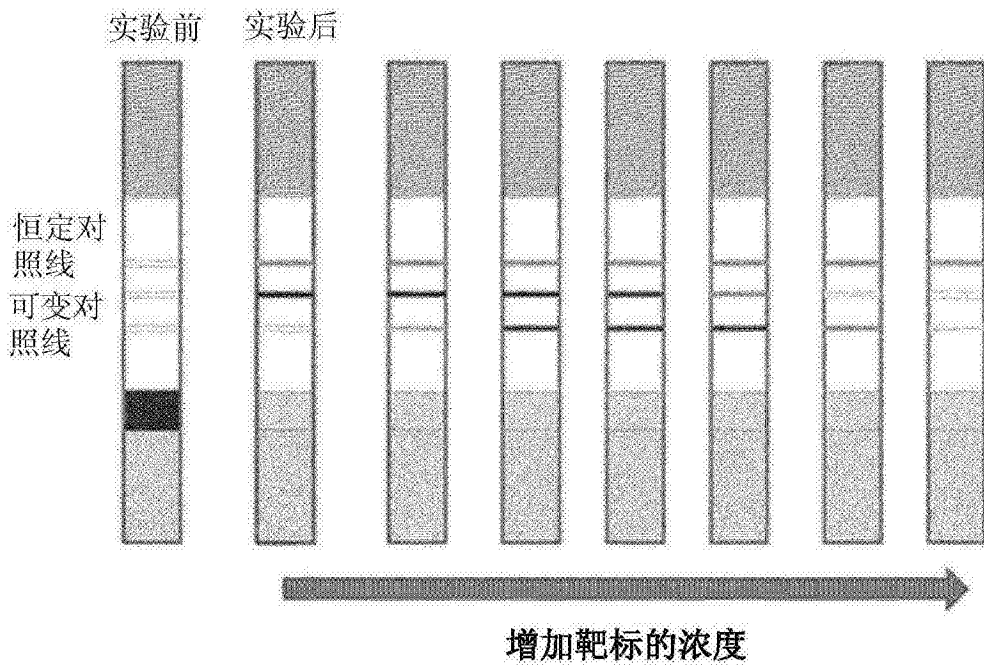


图 3

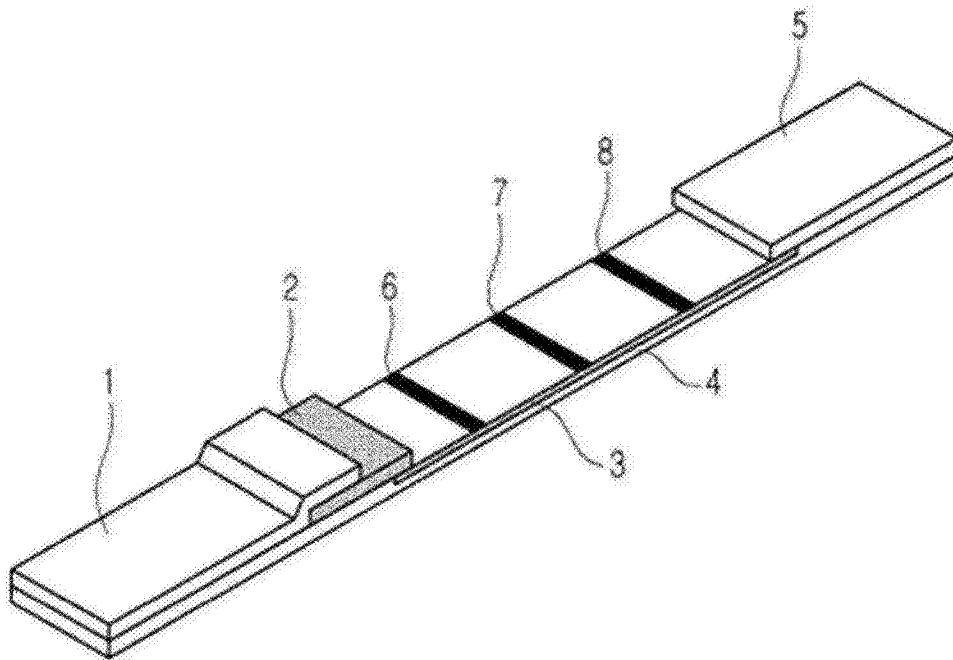


图 4

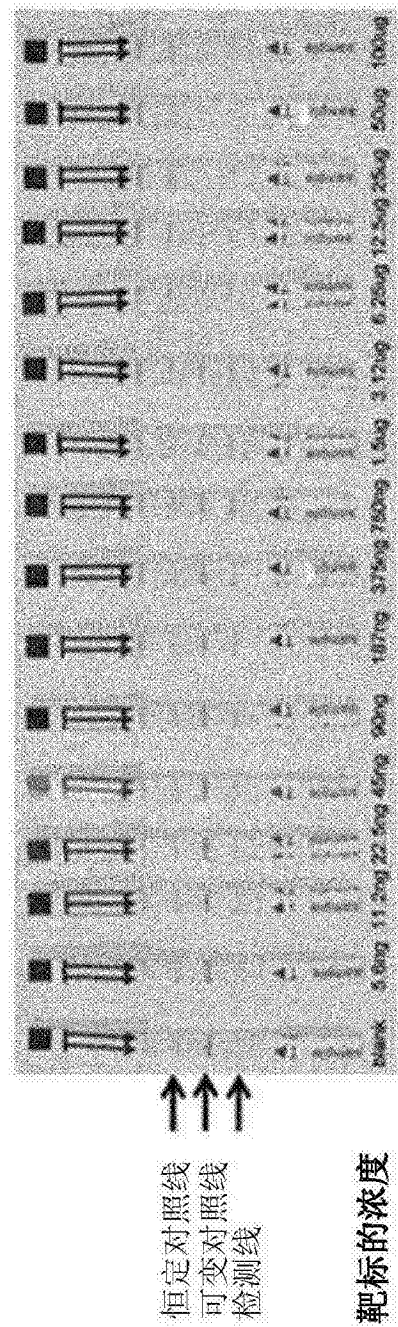


图 5

专利名称(译)	具有可变对照线的用于快速检测的条带以及使用该条带的诊断试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN105229468A</a>	公开(公告)日	2016-01-06
申请号	CN201480020367.8	申请日	2014-06-03
[标]申请(专利权)人(译)	普默特株式会社		
申请(专利权)人(译)	普默特株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	普默特株式会社		
[标]发明人	林国镇 金有三 郑明淑 金范俊 金美晶 崔东燮 李慧贞		
发明人	林国镇 金有三 郑明淑 金范俊 金美晶 崔东燮 李慧贞		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N30/00		
CPC分类号	G01N33/558		
代理人(译)	张全信		
优先权	1020130064207 2013-06-04 KR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及具有可变对照线的用于快速检测的条带、包括用于快速检测的条带的诊断试剂盒、以及用于通过同一使用定性和定量分析样品中分析物的方法。因为本发明的用于快速检测的条带具有可变对照线，所以由于钩效应克服所述分析物在定量分析方面的困难并且还利用所述肉眼以简单快速方式进行高度可靠的定量分析连同定性分析是可能的。此外，存在如下作用：所述分析物的动态范围可以通过所述检测线和所述可变控制线的互补效应来改进。

