



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02819646.5

[45] 授权公告日 2008 年 10 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 100427950C

[22] 申请日 2002.8.2 [21] 申请号 02819646.5

[30] 优先权

[32] 2001. 8. 3 [33] US [31] 60/309,477

[32] 2002. 6. 6 [33] US [31] 10/163,675

[86] 国际申请 PCT/CA2002/001210 2002.8.2

[87] 国际公布 WO2003/012443 英 2003.2.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.5

[73] 专利权人 麦美华股份有限公司

地址 加拿大安大略

[72] 发明人 陈景华

[56] 参考文献

WO8911654A1 1989.11.30

US5185264A 1993.2.9

WO0155723A1 2001.8.2

CN1124524A 1996.6.12

US5879951A 1999.3.9

US4087567A 1978.5.2

EP0806666A2 1997.11.12

审查员 王灵菇

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

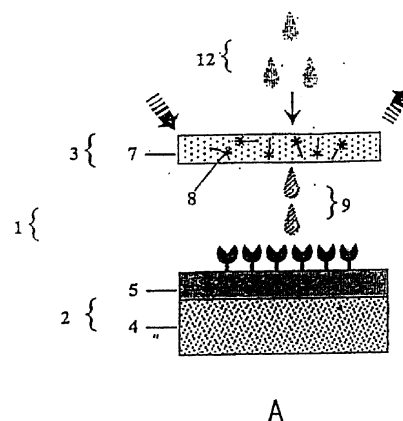
权利要求书 6 页 说明书 50 页 附图 6 页

[54] 发明名称

快速诊断装置,分析方法及多功能缓冲液

[57] 摘要

本发明提供了用于检测液体试验样品(9)中靶分析物(10)的改进的快速诊断装置(1),以及分析方法和多功能缓冲试剂。该二步分析法利用对偶元件流通装置(1),该装置分别包含试验单元(2),能接收液体样品(9)的后置过滤单元(3),以及多功能缓冲液(12)。试验单元(2)包含带有能与靶分析物(10)特异性结合的固定化捕获试剂(6)的反应区(5),支持反应区(5)的吸收区(4),以及与反应区(5)侧向流体相通的任意的血液分离区。后置过滤单元(3)包含浸渍有干式指示剂(8)的标记区(7),该指示剂被置于在分析过程中能与试验单元(2)的反应区(5)短暂流体相通的位置上。该快速诊断分析系统与其它常规分析相比,其分析试剂的数量、方法步骤以及完成分析所需的时间都有所减少。



1、用于测定液体试验样品(9)中靶分析物(10)的存在或缺乏的向下或垂直流通测试装置(1)，包括：

——试验单元(2)，包括与吸收区(4)垂直相通的反应区(5)，其中反应区(5)含有固定化捕获试剂(6)，所述捕获试剂(6)能与感兴趣的靶分析物(10)结合，从而形成特异性结合相互作用的二元复合物，所述吸收区包括位于反应区下面的吸收材料，以助于向下或垂直液体流过所述反应区；以及

——可拆卸的后置过滤单元(3)，包括含有干式指示剂(8)的标记区(7)，其中指示剂(8)能够与特异性结合相互作用中的一种成分结合，从而在由缓冲剂(12)再溶解之后产生视觉可检测的信号；以及

其特征在于，后置过滤单元(3)进行改变以适应所述试验单元(2)，随后形成二元复合物，这样所述试验单元(2)的反应区(5)和后置过滤单元(3)的标记区(7)相邻放置，从而在将缓冲剂(12)施加到标记区(7)之后，使再溶解的指示剂(8)从标记区(7)直接向下或垂直到反应区(5)。

2、根据权利要求1的装置(1)，其特征在于，所述特异性结合相互作用是抗体-抗原相互作用。

3、根据权利要求1的装置(1)，其特征在于，指示剂(8)能够在不干扰靶分析物(10)和捕获试剂(6)之间相互作用的位点上，与靶分析物(10)结合。

4、根据权利要求1的装置(1)，其特征在于，指示剂(8)能够在干扰靶分析物(10)和捕获试剂(6)之间相互作用的位点上与捕获试剂(6)结合。

5、根据权利要求2的装置(1)，其特征在于，靶分析物(10)是一种抗原，而捕获试剂(6)是该抗原的单克隆抗体或亲和纯化的多克隆抗体。

6、根据权利要求1的装置(1)，其特征在于，反应区(5)包括这样一种材料：该材料的孔径允许从液体试验样品(9)中分离和过滤未结合的组分，并且该材料的厚度允许足量的捕获试剂(6)被固定于其上。

7、根据权利要求6的装置(1)，其特征在于，所述材料的孔径范围从0.1至12.0微米。

8、根据权利要求7的装置(1)，其特征在于，所述材料的孔径范围从0.2至0.8微米。

9、根据权利要求6的装置(1)，其特征在于，所述材料的厚度范围从0.05mm至

3.0mm。

- 10、 根据权利要求9的装置(1)，其特征在于，所述材料的厚度范围从0.1mm至1.0mm。
- 11、 根据权利要求6的装置(1)，其特征在于，所述材料是硝酸纤维素膜。
- 12、 根据权利要求1的装置(1)，其特征在于，反应区(5)包含固定于其上的两种或更多种不同的捕获试剂(6)，所述捕获试剂(6)位于多个可识别和分离的区域中从而能够同时分析一个液体试验样品(9)中的多种靶分析物(10)。
- 13、 根据权利要求1的装置(1)，其特征在于，反应区(5)还包括固定的控制试剂，所述控制试剂固定在与捕获试剂(6)可区别开和可分开的区域中。
- 14、 根据权利要求1的装置(1)，其特征在于，通过插入间隔层(25)而使吸收区(4)与反应区(5)分开，所述间隔层具有在其上限定出的一个或多个开口，从而允许反应区(5)和吸收区(4)之间流体相通。
- 15、 根据权利要求14的装置(1)，其特征在于，间隔层(25)是刚性或半刚性的流体抗性材料。
- 16、 根据权利要求1的装置(1)，其特征在于，吸收区(4)包含一层或多层材料，所述材料能够通过毛细作用芯吸流体并吸收相当大体积的流体。
- 17、 根据权利要求16的装置(1)，其特征在于，两层或更多层包含相同或不同的材料。
- 18、 根据权利要求16的装置(1)，其特征在于，所述材料为醋酸纤维素。
- 19、 根据权利要求1的装置(1)，其特征在于，标记区(7)包含过滤材料，所述过滤材料具有的孔径能够确保干式指示剂(8)被缓冲剂有效地再溶解并被层流体流动转移至反应区(5)。
- 20、 根据权利要求19的装置(1)，其特征在于，所述过滤材料是玻璃纤维材料。
- 21、 根据权利要求1的装置(1)，其特征在于，指示剂(8)包含有直接标记物。
- 22、 根据权利要求21的装置(1)，其特征在于，所述直接标记物是胶体金。
- 23、 根据权利要求1的装置(1)，其特征在于，所述试验单元(2)和所述后置过滤单元(3)被容纳在合适的容器中。
- 24、 根据权利要求1—23中任一项所述的装置(1)，其特征在于所述试验单元(2)适合测定全血试验样品(9')中靶分析物(10)的存在或缺乏，所述装置(1)还包括：

与反应区(5)侧向相通的侧向流动血液分离区(100)，其中血液分离区(100)具有限定出用于接收全血试验样品(9')的区域的第一端(101)，以及直接与反

应区(5)相通的第二段(102)。

25、 根据权利要求24的装置(1)，其特征在于，血液分离区(100)包括这样一种材料：该材料能够从全血试验样品(9')中选择性截留有效数量的红血细胞，从而产生基本上无红血细胞的流体部分，所述流体部分能够不受损地从血液分离区(100)的第一端(101)流至反应区(5)。

26、 根据权利要求25的装置(1)，其特征在于，所述材料为玻璃纤维基质。

27、 根据权利要求25的装置(1)，其特征在于，所述材料包括一种疏水载体，所述载体能够减少全血试验样品(9')和无红血细胞的流体部分在沿着血液分离区(100)迁移时的渗漏。

28、 根据权利要求24的装置(1)，其特征在于，将试验单元(2)和后置过滤单元(3)存放在合适的容器中。

29、 如权利要求1—23中任一项所述的装置(1)，其特征在于所述缓冲剂(12)是多功能缓冲液，包括：维持PH在7.0至10.0之间的生物缓冲液；至少一种能减少分析试剂的非特异性结合并同时避免抑制特异性结合相互作用的表面活性剂；具有分子量为 2×10^2 至 2×10^6 D的作为分散和悬浮剂的高分子量聚合物；维持多功能缓冲液的PH在7.0至10.0的PH稳定剂；减少抗体的非特异性结合的离子盐；至少一种防腐剂，以减少细菌和微生物的生长；以及防止全血试验样品凝集的钙螯合剂；其中，所述生物缓冲液、表面活性剂、高分子量聚合物、PH稳定剂、离子盐、防腐剂和钙螯合剂全都处于有效浓度。

30、 根据权利要求29的装置(1)，其特征在于，所述生物缓冲液的浓度从5至100mM。

31、 根据权利要求30的装置(1)，其特征在于，所述生物缓冲液的浓度从5至30mM。

32、 根据权利要求31的装置(1)，其特征在于，所述生物缓冲液的浓度为5 mM。

33、 根据权利要求29所述的装置(1)，其特征在于，所述生物缓冲液为磷酸盐缓冲液。

34、 根据权利要求29的装置(1)，其特征在于，所述表面活性剂的浓度从0.01至0.50% (w/v)。

35、 根据权利要求34的装置(1)，其特征在于，所述表面活性剂的浓度从0.05至0.10% (w/v)。

36、 根据权利要求35的装置(1)，其特征在于，所述表面活性剂的浓度为

0.07% (w/v)。

37、 根据权利要求 34 所述的装置(1), 其特征在于, 所述表面活性剂是 Triton®X-100。

38、 根据权利要求 29 的装置 (1), 其特征在于, 所述离子盐的浓度从 0 至 300mM。

39、 根据权利要求 38 的装置 (1), 其特征在于, 所述离子盐的浓度从 50 至 200mM。

40、 根据权利要求 29 所述的装置 (1), 其特征在于, 所述离子盐是氯化钠。

41、 根据权利要求 29 的装置(1), 其特征在于, 所述聚合物是分子量为 10kD 至 1500kD 的聚乙烯吡咯烷酮。

42、 根据权利要求 41 的装置 (1), 其特征在于, 聚乙烯吡咯烷酮聚合物的浓度为从 0.1 至 3.0% (w/v)。

43、 根据权利要求 42 的装置 (1), 其特征在于, 聚乙烯吡咯烷酮聚合物的浓度为从 0.5 至 2.5% (w/v)。

44、 根据权利要求 43 的装置 (1), 其特征在于, 聚乙烯吡咯烷酮聚合物的浓度为 1.4% (w/v)。

45、 根据权利要求 29 的装置 (1), 其特征在于, 所述钙螯合剂是 EDTA。

46、 根据权利要求 45 的装置 (1), 其特征在于, EDTA 的浓度从 5.0 至 100.0mM。

47、 根据权利要求 46 的装置 (1), 其特征在于, EDTA 的浓度从 10.0 至 50.0mM。

48、 根据权利要求 47 的装置 (1), 其特征在于, EDTA 的浓度为 20.0mM。

49、 根据权利要求 29 的装置 (1), 其特征在于, 所述 pH 稳定剂为 TRIS 缓冲液。

50、 根据权利要求 49 的装置 (1), 其特征在于, 所述 pH 稳定剂的浓度从 20 至 30mM。

51、 一种用于测定液体试验样品 (9) 中靶分析物 (10) 的存在或缺乏的方法, 包括以下步骤:

——将液体试验样品 (9) 放置在权利要求 1—23 中任一项所限定的向下或垂流通测试装置 (1) 的试验单元 (2) 的反应区 (5) 上;

——使液体试验样品 (9) 流过反应区 (5) 进入吸收区 (4);

——使后置过滤单元 (3) 适应试验单元 (2), 以使后置过滤单元 (3) 的标

记区(7)和试验单元(2)的反应区(5)相邻放置,从而使直接向下或垂直液体从标记区(7)流到反应区(5);

——施加缓冲剂(12)至后置过滤单元(3)中,以便使干式指示剂(8)再生;
——使再生的指示剂流过反应区(5)并进入吸收区(4),并从反应区(5)上洗脱任何未结合的反应剂进入吸收区(4);以及

——除去后置过滤单元(3),以观察由反应区(5)上存在或不存在视觉可检测的信号而决定的试验结果。

52、根据权利要求51的方法,其特征在于,缓冲试剂(12)是多功能缓冲液,包括:维持PH在7.0至10.0之间的生物缓冲液;至少一种能减少分析试剂的非特异性结合并同时避免抑制特异性结合相互作用的表面活性剂;具有分子量为 2×10^2 至 2×10^6 D的作为分散和悬浮剂的高分子量聚合物;将多功能缓冲液的PH维持在7.0至10.0之间的PH稳定剂;减少抗体的非特异性结合的离子盐;至少一种防腐剂,以减少细菌和微生物的生长;以及防止全血试验样品凝集的钙螯合剂;其中,所述生物缓冲液、表面活性剂、高分子量聚合物、PH稳定剂、离子盐、防腐剂和钙螯合剂全都处于有效浓度。

53、一种用于测定全血试验样品(9')中靶分析物(10)的存在或缺乏的方法,包括以下步骤:

——将全血试验样品(9')放置在权利要求24—28中任一项所限定的装置(1)的血液分离区(100)的第一端(101)上;

——使全血试验样品(9')沿血液分离区(100)侧向流动,且无红血细胞的样品达到反应区(5);

——使无红血细胞的样品垂直或向下流过反应区(5)进入吸收区(4);

——使后置过滤单元(3)适应试验单元(2),这样后置过滤单元(3)的标记区(7)和试验单元(2)的反应区(5)相邻放置,以使直接向下或垂直液体从标记区(7)流到反应区(5);

——施加缓冲剂(12)至后置过滤单元(3)中,以便使干式指示剂(8)再生;

——使再生的指示剂流过反应区(5)进入吸收区(4),且从反应区(5)上洗脱任何未结合的反应剂进入吸收区(4);以及

——除去后置过滤单元(3),以观察由反应区上存在或不存在视觉可检测的信号而决定的试验结果。

54、根据权利要求53的方法,其特征在于,缓冲试剂(12)是多功能缓冲液,包括:维持PH在7.0至10.0之间的生物缓冲液;至少一种能减少分析试剂的非特

异性结合并同时避免抑制特异性结合相互作用的表面活性剂；具有分子量为 2×10^2 至 2×10^6 D 的作为分散和悬浮剂的高分子量聚合物；将多功能缓冲液的 PH 维持在 7.0 至 10.0 之间的 PH 稳定剂；减少抗体的非特异性结合的离子盐；至少一种防腐剂，以减少细菌和微生物的生长；以及防止全血试验样品凝集的钙螯合剂；其中，所述生物缓冲液、表面活性剂、高分子量聚合物、PH 稳定剂、离子盐、防腐剂和钙螯合剂全都处于有效浓度。

55、一种用于检测怀疑含有分析物（10）的液体试验样品（9）或全血试验样品（9'）中的靶分析物（10）的检测试剂盒，其特征在于：

——权利要求 1—28 中任一项所述的装置（1）；以及

——缓冲试剂（12），所述缓冲剂（12）使干式指示剂（8）再生并从反应区（5）上洗脱未结合的反应剂。

56、根据权利要求 55 的检测试剂盒，其特征在于，缓冲试剂（12）是多功能缓冲液，包括：维持 PH 在 7.0 至 10.0 之间的生物缓冲液；至少一种能减少分析试剂的非特异性结合并同时避免抑制特异性结合相互作用的表面活性剂；具有分子量为 2×10^2 至 2×10^6 D 的作为分散和悬浮剂的高分子量聚合物；将多功能缓冲液的 PH 维持在 7.0 至 10.0 之间的 PH 稳定剂；减少抗体的非特异性结合的离子盐；至少一种防腐剂，以减少细菌和微生物的生长；以及防止全血试验样品凝集的钙螯合剂；其中，所述生物缓冲液、表面活性剂、高分子量聚合物、PH 稳定剂、离子盐、防腐剂和钙螯合剂全都处于有效浓度。

57、根据权利要求 55 的检测试剂盒，进一步包含：

——完成诊断分析的说明书；以及

——一对移液管，这对移液管分别将试验样品（9）和缓冲试剂（12）施加到试验单元（2）和后置过滤单元（3）上。

58、根据权利要求 55 的检测试剂盒，其特征在于，将试验单元（2）和后置过滤单元（3）存放在合适的容器中。

快速诊断装置，分析方法 及多功能缓冲液

相关申请的交叉引用

本申请要求以下临时申请的优先权：申请日为 2001 年 6 月 7 日、序列号为 60/296147，和申请日为 2001 年 8 月 3 日、序列号为 60/309477。

发明领域

本发明提供了用于检测液体试验样品中靶分析物的快速诊断装置、分析方法和多功能缓冲液。该分析方法使用一种多功能缓冲试剂和流通装置，该装置包括与可取下的后置过滤器单元连接的试验单元。本发明还提供了一种该流通装置的应用方法，一种试剂盒以及一种制备该多功能缓冲液的配方。

发明背景

诊断分析已在医药研究领域成为一种必不可少的工具，其用于检测生物液体和组织样品中的多种成分，如药物、激素、酶、蛋白质、抗体和感染物。许多这样的分析操作的基本原理是在两种或多种成分之间发生特异性识别和结合反应，从而形成可以随后检测的复合物。通常，这些成分涉及俘获剂（如受体），该俘获剂特异性识别并结合到液体试验样品（如全血、血浆、血清、尿液、唾液等）中感兴趣的靶分析物（例如配体）上。而且，在反应中包括可目视检测的指示剂，该指示剂识别并结合到任何与捕获剂复合的分析物上，从而产生表明阳性反应发生的信号。尤其是，以抗体识别及与抗原的选择性结合反应为基础，设计免疫分析作用，因此多年来已证明，免疫分析在临床应用于检测多种传染性疾病是极其有价值的。

然而，为了得到精确的结果，免疫试验常常在进行一系列耗时步骤时需要准确，和操作复杂实验室设备的技术知识。因此，它们在诊断传染性疾病的使用中基本上局限于临床使用，这样的临床使用需要作出判断必需的资源，其包括经高级训练的技术人员和配备适宜诊断设备的试验室。

以此为基础，利用许多技术，免疫诊断试验将在快速识别及传染性疾病的诊断中发展更多简单的方法。由于这种分析使得更少地使用具有有限资源的传

统环境（例如，医生诊室或家庭）变得更为可能，因此检测生物样品中分析物的简单定性试验的这种需要变得更迫切。不论在公共健康诊所还是在乡村环境，优选的是，在没有复杂仪器和经专业训练的人所拥有的必须技能及知识的帮助下，进行检测液体试验样品中靶分析物的测定。

考虑使用改进的诊断试验的另一重要因素是，在许多第三世界国家缺少或只能有限获得制冷机和冰箱。在此基础上，更需要发展在室温下能长时间保持其稳定性和完整性的分析试剂。现在，一些诊断装置和方法需要使用几种在其储存和操作温度下依温度而改变稳定性的分析试剂。一些这样的试剂在室温下是稳定的，也能短时间储存，而另一些则相对不稳定且很快开始变质，从而会对整个分析的敏感性和可靠性造成不利影响。这样，商业中最易取得的诊断装置至少需要一种或多种保存在低温下的必需试剂，以确保其稳定性。因此，诊断装置结合有能在室温下储存并长期保持稳定同时维持其所有或大部分初始活性的试剂，很清楚此类诊断装置比现有装置具有优势。以此为基础，考虑到简化诊断试验并因此使之更实际且可广泛操作，这样的因素是：使分析试剂（例如，混合、洗涤、稀释溶剂等）的数量最小并在试验设计中整合步骤。

那些使用简单、快速并可靠的免疫诊断试验对提高筛选和诊断服务是有利的。根据美国疾病控制和预防中心的报告，快速诊断试验可使健康护理人员在试验时于几分钟内将试验结果提供给患者，因此潜在地提高了咨询和测试程序的整体效率。也可想到与其它传统装置相比，简化诊断装置和分析可能会降低制作和操作成本，因此使之在过渡时期经济适用并且使用起来更易于担负。这对第三世界国家尤为需要，在这些国家简单、快速、灵敏并经济的诊断装置和分析是最令人满意的。

为了这一目的，已产生了大量各种各样形状、构造、设计的分析装置，用于检测液体试验样品中存在的靶分析物，这些装置包括层析试验条、量尺、侧向流动和流通系统，这里仅举几个例子。许多这样的装置都使用了反应膜，在其上固定有能识别并结合靶分析物的捕获剂。本质上，进行这种分析的方法一般包括将怀疑含有靶分析物的液体试验样品通过过滤直接或间接施加到反应膜上。如果样品中存在靶分析物，它将与捕获剂结合。然后应用随后的方法来确定靶分析物是否已连接到捕获剂上，因此而显示样品中存在的靶分析物。

美国专利 4,517,288（Giegel 等人）披露了使用惰性多孔材料进行配体结合

测定的方法。具体的说，该专利披露了将一种特异于感兴趣的配体（如抗原）的免疫结合材料（如抗体）固定多孔材料的限定试验区内，并在试验区上加入将要被固定结合材料捕获的配体。将结合材料固定到多孔材料上可通过任何传统的方法而获得，包括吸收、共价结合、使用联结剂等等。然后将也会识别并与配体结合的酶标指示剂加到试验区上，在其上指示剂所固定的量与存在于该区域上的配体量成正比。然后在试验区中央加入溶剂以除去任何未结合的指示剂，这样，在有或没有合适的分析仪器情况下，都可以确定所产生的信号。

美国专利 4,094,647、4,235,601 和 4,361,537（Deutsch 等人）中描述了更复杂的特异性结合分析，这些分析使用了能通过毛细作用传送展开液的层析试验条。该试验条具有如下设计：用于接受样品的第一区、浸渗有能通过展开液传送的第一试剂的第二区，及浸渍有第三试剂的第三区。另外，该装置包括测定区和延迟成分，该延迟成分可以是第二试剂或试验条材料。该第一试剂能够与包括以下成分的组合中的一员反应以便根据所测特性形成一定量的产物：（1）样品，（2）样品和第二试剂，或（3）与样品竞争的第二试剂。样品与第一区接触，然后将该试验条浸入展开液中，以使样品及第一试剂移动，而形成反应产物。延迟成分减慢产物或第一试剂（移动试剂）的传送，使得在空间上区分这两种物质，然后在测定位置测定移动成分的量。

Deutsch 等人的装置所作的改变在美国专利 4,960,691（Gordon 等人）中有所描述，该装置也使用长条层析材料（即试验条）、溶剂载体和固定试剂来分析抗原、抗体或聚核苷酸。实际上，该试验条有三个分离区，包括：浸渗有与感兴趣分析物反应的固定试剂的第一区、用于接收怀疑含有分析物的试验样品的第二区，和浸渗有与分析物选择性结合的固定试剂的第三区，从而使分析物形成固定形态。每个区顺序等距离沿该试验条的纵轴彼此相邻排列。该装置任选地包括浸渗有指示剂的第四和第五区，该指示剂提供了检测分析物存在的一种方式。该方法包括：在第二区放置试验样品，然后在试验条一端加入溶剂，其中第一区的位置使得分析物和第一试剂顺序移动并最终到达第三区。第二区和第三区之间的关系是这样的：在第一试剂到达第三区之前将分析物逆着溶剂传送的方向固定在第三区上。在第一试剂到达第三区之前，通过溶剂传送，将任何与第一试剂反应的有干扰作用的非分析样品成分从第三区上除去。该专利还披露了用于完成各种多步分析操作的多路和单路装置。

美国专利 4,168,146 (Grubb 等人) 披露了用于进行夹心免疫试验的试剂条的使用。该试验条由吸水性载体材料构成, 抗体通过吸附、吸收或共价结合而附着在其上。优选的试验条材料包括含纤维素纤维的材料, 如滤纸、离子交换纸和层析纸。该专利还披露了如下材料的使用, 诸如纤维素薄层层析盘、醋酸纤维素盘、淀粉和三维交联材料, 如交联葡聚糖凝胶(瑞典乌普萨拉的 Pharmacia 精细化学公司)。通过用适量体积的怀疑含有抗原的试验样品浸湿试验条, 而进行免疫分析。任何存在于试验样品中的抗原通过毛细作用沿试验条移动。然而, 由于结合抗体延迟了特异性抗原的移动, 试验样品中抗原的浓度决定了固定时间段内抗原的移动范围。然后, 该诊断装置的抗原区通过加入标记抗体而显示。

包括一系列方法步骤的免疫诊断流通系统在美国专利 4,632,901 (Ualkirs 等人) 中有所披露。第一步骤包括: 取怀疑含有特异性结合对中的第一成分(如抗原)的液体试验样品, 并将它倾注到多孔材料上, 在该材料上固定有特异性结合对中的第二成分(如抗体)。由于受吸收材料毛细作用特性的影响, 液体试验样品以垂直方向向下通过多孔材料并经过固定抗体。然后, 存在于样品中的任何抗原被固定抗体所捕获。第二步骤包括: 使单独的标记抗体溶液通过该多孔材料, 以便标记抗体可结合到已被固定抗体捕获的抗原上, 从而形成三员复合物。然后, 任何未反应或未结合的标记抗体经第三步骤从多孔材料上冲洗去, 该步骤一般称为洗脱步骤, 其中使用合适的试剂, 然后是温育期。最后, 第四步骤包括: 加入含有与第二溶液的抗体标记物反应的底物的单独溶液, 从而产生可见的颜色变化, 表示感兴趣抗原的存在。为了易于准确实施该方法, 该装置以如下方式设计: 利用毛细作用, 使样品通过该吸收材料, 并进入该装置的底部。

在美国专利 4,446,232 中由 Liotta 描述的免疫诊断流通系统使用了设置在三个分离层中的两个不同反应区的组合体。第一反应区包括由多孔材料制成的两个层, 其中第一和第二层分别浸渗有可溶性酶联抗体和固定抗原。第三层或第二反应区含有固定指示剂, 该指示剂与连接到第一反应区抗体上的酶反应, 从而产生颜色。如果液体样品含有感兴趣的抗原, 那么在将样品加到第一反应区后, 其中含有的抗原将与可溶性酶联抗体结合并经短暂的温育期后扩散到第二反应区。当酶与指示剂反应产生颜色时, 将检测到抗原的存在。相反, 如果液体样品不含有任何抗原, 那么利用液体试验样品扩散的酶联抗体将移动到第一反应

区的第二层上，在那里它与固定抗原结合。所发生的结合反应避免任何酶联抗体到达第二反应区，在那里该酶联抗体可能与指示剂反应。从而，在这样特定的情况下，未观察到颜色，表明液体试验样品中无抗原存在。

虽然上述方法和装置都提供了用于进行免疫诊断分析的紧凑并可靠的方式，但至于它们的使用仍存在几个问题。尤其是，在测定是否存在靶分析物的过程中，多数情况下所遇到的一个缺陷是，需要使用一系列溶剂来进行几次加样及洗脱步骤。为避免不需要的交叉反应并除去随后会干扰结果的任何过量未结合试剂及底物，在该分析设计的各个阶段洗脱步骤都是必需的。令人遗憾的是，为了研制改进并简化形式的免疫诊断测定，这却只能使整个过程复杂并实际上减小了所需的有效性水平。这样，需要继续使用几个加样、洗脱和温育步骤已实际上使这些操作限于临床环境，在这种环境下，可由技术人员和复杂设备来仔细地精密监控并进行该分析。

而且，使用层析试验条或量尺的免疫诊断分析受以下问题的困扰：在分析过程的多个阶段连续用一种或多种溶剂进行处理。当每一溶液加入该装置时，或当每一装置浸入连续溶液中时，溶液溢出的机会或溶液与使用者之间接触的机会会增大，这样将可能导致污染和降低试验的可靠性。

根据所采用的分析方法和仪器，试验样品常常需要在加样前用合适的试剂进行稀释，这样它会更容易地贯穿该多孔材料并 / 或不会超过标记试剂的浓度。然而，试验样品的稀释由于包括了额外的步骤和试剂，不仅会降低所进行分析的速度和简易性，而且由于分析物浓度与所产生的检测信号的相关性，也会降低分析的敏感性。

与使用一些免疫诊断装置有关的另一些缺点，特别是那些与侧流技术相关的缺点是，在操作的各阶段它们特别需要长的温育期。根据感兴趣分析物的相对移动、所使用的试剂及溶剂类型以及不同反应区之间的位置关系，必须有充足的时间，以便使所有不同成分沿层析固相材料有效移动。而且，由于移动试剂趋于堆积在而不是跳过反应区外围，侧面流动技术常常会出现不精确的结果。结果，这些试剂常在该区域上相互作用并产生颜色产物，这很容易误认为是正确的阳性或阴性结果。

因此，本发明提供了一种用于检测液体试验样品中靶分析物的改进的快速诊断装置、分析方法以及多功能缓冲液，它们是有效、可靠并可实际操作的。

该简化的两步实验方法使用了一种多功能缓冲试剂和对耦部件流通装置，该装置包括与可拆卸的后置过滤系统连接的试验单元，它们可以分别接收液体试验样品和多功能缓冲液。

多功能缓冲液作为一种洗脱剂、稀释剂、湿润剂、溶解剂的组合，不会以牺牲该诊断分析的灵敏性和特异性为代价。而且，该缓冲液的配方能够保护并优化蛋白质的稳定性，并且使可导致误差信号产生的非特异性反应最小化（如果不可消除的话）。

发明概述

本发明目的是，通过提供一种改进装置、方法及多功能缓冲试剂克服与已有快速诊断分析相关的缺陷。

利用本发明的简化装置和单独的缓冲试剂，可以容易地进行定性和半定性分析（1）操作并读取，（2）需要最少步骤，（3）不需要长的温育期，和（4）非常敏感、特异和可靠。通常，仅需要一滴（50 μ L）的液体试验样品就可以进行分析。而且，本发明的装置和分析方法特别具有以下优点：它不仅方便和使用简单，而且该装置和试剂还可储存于室温下很长时间而不会减小活性或分析的敏感性。

与本发明有关的性质组合涉及实施诊断分析的流通技术，该分析基于两个或多个互补成分之间的特异性结合反应。在此基础上，本发明的快速诊断装置、分析方法及多功能缓冲液在各种特异性结合对分析方法中具有广泛的适用性，这些分析方法必须使用可识别并结合感兴趣靶分析物的捕获剂。例如，本发明的装置可用于免疫诊断分析，以检测液体试验样品中的抗原或抗体，并适用于夹心或竞争检测形式。

因为分析装置和过程基于流通形式进行操作，因此靶分析物和指示剂之间的反应动力学非常快并完全。而且，由于该分析方法的最终步骤涉及，在分析物已与捕获剂复合之后将可溶性指示剂加入到靶分析物中，因此与传统分析相比，本发明的方法提高了该分析的准确性。相反，最传统的分析方法需要在加入到捕获剂中之前使指示剂和液体试验样品预混合。结果，由于在分析设计的起始阶段可能指示剂与存在于试验样品中的污染物接触而不是只与感兴趣的分析物接触，而降低了分析的整体敏感性。

改进的快速诊断装置有利于与多功能缓冲试剂联合使用，以便基于两种或更多种互补成分之间的特异性结合反应原理检测液体试验样品中的靶分析物。

本发明的装置包括：作为第一部件、能接收液体试验样品的试验单元，其与能接收多功能缓冲液的第二部件连接，该第二部件称为后置过滤单元。该试验单元包括（1）含有固定捕获剂的反应区，该捕获剂能特异性识别并结合靶分析物，（2）支持反应区的吸收区，可任选的（3）在侧流中与反应区相通的血液分离区。后置过滤单元包括充满了干态指示剂的标记区，当加入多功能缓冲液时该指示剂是可溶的。该试验单元的反应区如此定向：后置过滤单元的标记区在将液体试验样品加到试验单元后能处于液体连通状态。

在免疫诊断分析的情况下，例如，当感兴趣的分析物是抗原时，抗体，优选为该抗原的单克隆抗体或亲和纯化多克隆抗体，作为捕获剂被结合到反应区上。在一个优选实施例中，反应区包括适合于固定捕获剂的多孔膜，并对指示剂具有较低的非特异性结合。通过加入蛋白封闭剂，使多孔反应膜表面上的任何非特异性结合位点失活。当样品通过毛细作用从反应膜向正下方的吸收区扩散时，固定捕获剂的特异性和亲和性使它有效结合并浓缩存在于限定区域内的液体试验样品中的任何分析物。

如果样品通过反应膜聚集，反应模型免疫分析的敏感性（即检测非常低水平的靶分析物的能力）就能够增加。因而，反应膜上分析物的聚集通过吸收材料而获得，它形成了在反应膜正下方的吸收区，该吸收区将液体试验样品吸入，仅将所捕获的分析物留在反应膜的上表面。由于吸收材料与反应膜液体相通，基于其所具有的物理特征（如孔的大小、芯吸力等等）选择该材料，该材料能有效吸引液流通过反应膜，充分持有分析样品和试剂液体并为该膜提供支持。

为了便于检测全血样品中的靶分析物，本发明的另一实施例提供了一种试验单元，其能接收并从红血球（RBC）中分离出全血样品的液体部分，同时将样品的无 RBC 液体部分传送到反应区，以检测分析物。这种特定性质对避免在为检测分析物而进行的颜色反应目视过程中的任何干扰是有用的（即，使用提供可直接目视检测信号的“直接”标记物而不需仪器的帮助），也避免了在不能得到合适设备来进行如此操作的情况下预先提取血清或血浆的需要。

这样，在待分析的液体试验样品是全血的情况中，试验单元任选的特征是，血液样分离区与反应区侧流相通。一般，血液分离区的作用是，选择性保留全血样品中所含有的细胞成分（即红血球）并将血样中的剩余部分（包括任何分析物）传送到反应区。与反应区侧距较短的血液分离区的第一端限定出在将分

析物送到反应区之前用于接收全血样品的区域。血液分离区的第二端与反应区邻近，这样与反应区直接流体联通，从而促进血样中不含 RBC 的液体部分从第一端向反应区毛细运动，以便直接分析靶分析物。这样，实际上血液分离材料用作一种侧流材料，来选择性地将有效数量的红血球从全血中除去，以避免干扰分析物的可视检测，同时使样品中的其他成分相对未受消弱地流过试验单元。

在一个优选实施例中，血液分离区是加长或矩形的多孔材料条，其使用疏水性载体或垫并具有能使它优先将样品中的红血球俘获或保留在血液分离区内的本质特征。载体或垫构成对血液分离材料的支撑并在无 RBC 液体成分沿该材料向反应区移动时减小全血样品的渗漏。

该装置的第二部件称为后置过滤单元，包括充满干态指示剂的标记区。后置过滤单元的标记区在将液体试验样品加到试验单元后不久，能与试验单元的反应区以短暂的流体联通设置。通过用永久性检测指示剂浸渗后置过滤单元的标记区，可消除进行分离再增溶步骤的需要，这些步骤涉及精确测定、加入并预混适当溶剂，它们会增大使用者误差的可能性。在一个优选实施例中，标记区包括基于孔的大小选择的过滤介质，这些孔大得足以在干态指示剂通过加入多功能缓冲液而再溶解时，使它可以通过扩散过程容易地流过多孔过滤介质的裸露区域。后置过滤单元的形状和尺寸使得当标记区与试验单元的反应区在试验过程中暂时流体联通时，它能持有并有效引导多功能缓冲液通过多孔过滤介质。

根据本发明的另一重要方面，提供了使用“直接”标记特异性结合材料（即胶体颗粒标记材料）的方法和装置，这些结合材料干燥于过滤介质上，因此当存在多功能缓冲液时能快速再溶并转移到反应区上。直接标记物在本领域中是公知的并且在用于快速诊断系统中时具有很多优点。直接标记物不需要仪器的帮助或加入辅助试剂就能产生目视检测信号，并且当以干燥状态储存时是稳定的。通过将它以干燥形态结合在过滤介质中而提供指示剂，是便宜和方便的储存该试剂的方式。用于进行诊断试验的优选标记物是胶体金属颗粒，更优选的是胶体金，虽然其他直接标记物也可以使用，这些标记物包括但不限于，非金属溶胶、干燥溶胶、乳胶颗粒、炭溶胶和含有有色体的脂质体。

根据本发明的另一重要方面，提供了一种适宜用作诊断分析中多功能试剂的含水组合物，其包括：（1）使 pH 保持在 7.0-10.0 之间的生物缓冲液；（2）

减少试验试剂非特异性结合同时避免抑制特异性结合反应的至少一种表面活性剂；(3) 一种作为分散悬浊剂的高分子量聚合物，其具有大约 2×10^2 — 2×10^6 D 的分子量；(4) 使多功能缓冲液的 pH 保持在 7.0-10.0 的 pH 稳定剂；(5) 减小抗体非特异性结合的离子盐；(6) 用于减少细菌和微生物生长的至少一种防腐剂；和 (7) 用于避免全血试验样品凝结的钙螯合剂；其中生物缓冲液、表面活性剂、高分子聚合物、pH 稳定剂、离子盐、防腐剂和钙螯合剂全部为有效浓度。

改进的缓冲液配方不需要辅助添加剂或通过试验仪器保养和检查。然而更重要的是，该缓冲剂的多功能特性使它能作为一种洗脱液、稀释剂、再溶解剂及溶剂传送剂的组合，因而在试验设计中不需几种分离的溶液和操作步骤。这种单独的多功能缓冲液的研制通过减少操作该分析所需的时间和手工步骤极大简化了该试验过程，因而将使用者误差的可能性最小化。而且，在流通形式中使用该多功能缓冲液可促进干燥指示剂在再溶解之后马上从后置过滤单元向试验单元快速释放和强化质量转移。由该多功能缓冲液显示的另一个功能特性是，它保持蛋白质的稳定性，从而保护并使发生在互补结合成分（即捕获剂和靶分析物）之间的特异性结合反应最优化。而且，当干燥指示剂再溶解时，缓冲液有助于使特异性结合反应中产生的信号最大化，并使另外可能导致产生错误信号的的反应膜的非特异性结合最小化。

根据本发明的另一方面，提供了一种简单的用于进行诊断分析的两步操作，包括 (1) 在试验单元的反应区放入液体试验样品，或者如果是全血样品，就将液体试验样品加到血液分离区的第一端，其后不久是试验单元和后置过滤单元相互保持可操作的连接，以使后置过滤单元的标记区与试验单元的反应区短暂流体联通，和 (2) 在后置过滤单元上加入多功能缓冲液，之后除去后置过滤单元以观察试验结果。在将多功能缓冲液加到后置过滤单元上后，缓冲剂通过标记区扩散，从而使指示剂再生并将它传送到可与任何捕获分析物结合的反应区上。如果液体试验样品中存在分析物，在反应区出现可检测的信号，该信号可以是目测的颜色，这样在除去后置过滤单元后就可测定分析物是否存在。由本发明提供的重要优点是，捕获剂的结合亲和力和能使再生指示剂流束中的分析物暴露固定化和最优化，以使分析物在反应区聚集，从而有效地从未聚集的指示剂的背景流中分离出来。

本发明还提供了用于检测怀疑含有分析物的液体试验样品中靶分析物的诊

断试剂盒。实质上，该试剂盒包括成套组合物：（1）由上述的试验单元和后置过滤单元组成的快速诊断试验装置；（2）用于使干燥指示剂再生的多功能缓冲剂；和（3）用于进行诊断分析的说明书。该试剂盒优选地包括用于容纳试验单元和后置过滤单元的适宜容器，以便保护固相材料和干燥指示剂免于污染，同时使分析装置的操作简易方便。或者，该试剂盒还包括用于分别在试验单元和后置过滤单元上加入试验样品和多功能缓冲液的装置（如一次性移液管）。

附图简述

图 1A 图示说明了本发明的流通诊断装置的第一实施例，包括试验单元和后置过滤单元；

图 1B 图示说明了用于分析全血试验样品的本发明的流通诊断装置的第二实施例，包括试验单元和后置过滤单元；

图 2A 图示说明了试验样品加到含靶分析物的试验单元的反应区上；

图 2B 图示说明了在试验样品已完全通过反应区并进入试验单元的吸收区后靶分析物与捕获剂复合；

图 2C 图示说明了与试验单元的反应区流体联通的后置过滤单元，在其上加有多功能缓冲液；

图 2D 图示说明了在将多功能缓冲液加到后置过滤单元后，再溶解的指示剂与复合捕获剂和分析物反应；

图 3A 图示说明了将试验样品加到不含靶分析物的试验单元的多孔反应膜上；

图 3B 图示说明了在试验样品已通过反应膜扩散并进入试验单元后的未复合吸收材料后捕获剂；

图 3C 图示说明了与试验单元的反应区流体联通的后置过滤单元，在其上加有多功能缓冲液；

图 3D 图示说明了指示剂在通过反应区扩散进入试验单元的吸收区后，通过多功能缓冲液再溶解而未发生反应的指示剂；

图 4 显示了容纳试验单元和后置过滤单元的适宜容器的一种示例的分解剖面图；

图 5 显示了图 4 的容器的组合形式的放大剖面图；

图 6 图示说明了包括形成血液分离区材料的试验单元部分的第二实施例，该

血液分离区与反应区流体联通；和

图 7A 是用于接收并分析全血样品的含两个储液囊试验盒的上部件的顶视平面图；和

图 7B 是用于接收并分析全血样品的含两个储液囊试验盒的下部件的顶视平面图。

尽管本发明在许多不同形式下的实施例都是令人满意的，此处仍要详细描述本发明的优选实施例，应理解此处所披露的作为本发明原理的示例并不是将发明限定于所说明并描述的实施例中。本发明的范围将通过所附权利要求及其等价物进行限定。

发明详述

除非另有限定，此处所使用的所有科学技术术语具有本发明所属领域普通技术人员所一般理解的意思。也必须指明，在说明书和所附权利要求书中所用的单数形式“一种”、“一个”和“该”包括复数对象，除非上下文另有清楚的说明。例如，“抗原”或“抗体”的意思包括多个抗原分子或抗体。

此处所表达的范围可以从“大约”或“近似”一个特定的值和/或至“大约”或“近似”另一特定的值。当表示该范围时，另一实施例包括从一个特定的值和/或到另一特定的值。类似的，当通过使用前述词“大约”表示近似值时，可以理解为该特定值形成另一实施例。

如整个所披露的内容所使用的那样，除非另有说明，以下词应作为具有以下含义理解：

吸收区——术语“吸收区”确定为包括渗透性（如多孔或纤维性）材料构成的一层或多层，这些层可以是相同或不同的，并能够通过毛细作用吸收或芯吸液体。该吸收区也应可以吸收大量体积的液体，该体积等于或大于材料本身的总容量，这样才具有高吸收能力。

分析物（或靶分析物）——生物源液体试验样品中待检测的感兴趣的化合物或组合物。分析物的示例可包括药物、激素、多肽，包括免疫球蛋白的蛋白质、多糖、核苷酸，以及这些物质的组合。

抗体——一种免疫球蛋白，无论天然或部分或全部合成产生。该术语也包括任何具有本身是或类似于抗体结合功能区的结合功能区的多肽或蛋白质。这些物质可以源于天然，或者它们也可一部分或全部合成产生。抗体的示例是免疫

球蛋白同型和它们同型的子类；包含抗原结合功能区的片段，如 Fab、scFv、Fv、dAb、Fd；和双抗。

用于实施本发明的免疫分析的抗体包括那些与各种分析物反应的物质，对存在于生物液体中的分析物检测是所需要的。这样的抗体优选为 IgG 或 IgM 抗体或其混合物，它们实际上不与能结合非分析物分子的抗体相连。该抗体可以是单克隆或多克隆的，并且可从商业上获得或可以通过鼠腹水、组织培养或其他本领域已知技术获得。对于多克隆抗体所产生的杂交瘤过程的典型描述可见于 Wands J.R.和 V. R. Zurawski , Gastroenterology80: 225 (1981); Marshak-Rothstein A. 等人; J. Immunol. 122: 2491 (1979); Oi V.Y. 和 L.A. Herzenberg “Immunoglobulin Producing Hybrid”, Mishell B. B.和 S.M. Shiigi (eds) Selected Methods In Cellular Immunology, San Francisco: W. H. Freeman 出版, 1979; 和 Kung 等人的美国专利 4,515,893。希望使用具有不同抗原特异性的单克隆抗体混合物或单克隆抗体和多克隆抗体的混合物。根据本发明进一步设计使用抗体分子片段作为特异性结合试剂，包括半抗体分子和本领域公知的 Fab、Fab'或 F(ab')片段。尽管抗体有特定的来源或类型，然而优选的是，它们一般是纯化的。抗体可以通过色谱柱或其他传统的装置来纯化，但优选采用已知的亲和纯化技术进行纯化。根据本发明，抗体材料也可用胶体颗粒来进行标记，并用于夹心试验来检测抗原分析物，或用于竞争试验来检测抗体分析物。

抗原—用于进行本发明的免疫测定的抗原和半抗原包括那些天然或合成的材料，当根据本发明使用时，该抗原是与分析物抗体特异性反应的抗原决定簇。合成抗原包括那些根据传统化学合成形成的抗原和那些根据重组 DNA 技术形成的抗原。根据本发明，抗原材料也可用胶体颗粒进行标记，并用于夹心分析中，来检测抗体分析物或在竞争分析中检测抗原分析物。

血液分离区—该术语“血液分离区”包括多孔和/或纤维性材料，该材料能从全血样品中截留住红血球（RBC）而允许不含 RBC 的液体（包括任何靶分析物）借助于毛细作用以侧流移动。

毛细作用—此处所使用的术语“毛细管”包括毛细管或其他使液体穿过多孔材料、纤维材料或吸收材料的通道或通路。基于该材料能纵向或横向引导流体而不使用外部装置的本质特性来选择该材料，这种材料与试验单元的反应膜，毛细联通。

捕获剂—任何能识别分析物的特定空间和/或化学结构的化合物或组合物。在分析物是特定免疫球蛋白种类的情况下，捕获剂可以是由该免疫球蛋白识别的特定蛋白或抗原表位（*epitope*）。另一些种类的捕获剂包括自然产生的受体、抗体、抗原、酶、Fab 片段、凝集素、核苷酸、抗生物素蛋白、蛋白 A 等等。

液体试验样品—分析液体试验样品，以便在试验单元的反应膜上形成可检测的反应产物。在优选的分析实施例，液体试验样品来源于生物（例如全血、血浆、血清、尿液、唾液等等），并怀疑含有能被固定在反应膜上的捕获剂结合的靶分析物，通常为抗原、抗体或半抗原。

指示剂—一种共轭物，包括与靶分析物特异性结合的成分和能目视检测的、与特异性结合成分共轭结合的标记物。而且，该指示剂可由与标记物共轭的普通标记蛋白组成，如蛋白 A、蛋白 G 或抗 IgG。例如，在靶分析物为抗体的分析中，优选指示剂是用胶体金标记的蛋白 A。其他指示剂还包括针对感兴趣的抗体的标记抗人抗体，例如由胶体金标记的羊抗人 IgG，用于检测液体试验样品中的人抗体。

标记物—标记物可以是任何与特异性结合成分结合或共轭的分子或能产生信号的普通标记物蛋白。在该主体发明中，标记物优选为“直接”标记物，其能够不加入辅助试剂就自发产生一种可检测的信号，并通过目视方式而不用仪器的帮助就可以容易地检测到。本发明的优选实施例使用胶体金颗粒作为标记物。其他适宜的标记物包括其他种类的胶体金属颗粒，微小的有色颗粒（如染料溶胶），和有色乳胶颗粒。许多这样的物质是本领域技术人员公知的。

标记区—术语“标记区”确定为，包括浸渗有干燥指示剂的多孔材料，该干燥指示剂可以在其上加入缓冲剂时很容易地再溶解。

反应区—术语“反应区”确定为，包括在其上结合有分析试验中所使用的捕获剂或其他分子的多孔材料，和其他多孔支持材料，若有的话，支持材料形成了反应区的下表面。

特异性结合成分—这描述了一种或多种特异性结合反应的互补成分，它们彼此具有结合亲和性。这种特异性结合成分可以自然生成或合成产生。特异性结合反应的一个成分在其表面具有一个区或一个腔，其可以特异性结合另一互补成分，并因而与该互补成分的特异性空间和/或化学结构互补。特异性结合对的典型示例为抗原-抗体、生物素-抗生物素蛋白/抗生物素蛋白链菌素、激素-激

素受体、受体-配体、酶-底物等等。

1.0 介绍

本发明提供了一种用于检测液体试验样品（诸如体液）中的靶分析物的改进的快速诊断装置、分析方法和多功能缓冲液。该快速诊断装置不仅使用简单、制作经济，而且它还可靠得足以用于敏感的分析试验而不需长温育期、额外的洗脱步骤、或样品稀释。由于该分析方法可以根据怀疑含有的靶分析物而变化，因此本发明对多种生物分析技术都是适用的。例如，可以快速准确分析液体试验样品（如血清、血浆、全血、唾液、尿液等）中的抗原、抗体、自然或合成类固醇、激素等等。

这种用于本发明实践中的快速诊断装置是对耦部件流通系统，包括分别能接收液体试验样品和多功能缓冲液的试验单元和后置过滤单元。该试验单元包括含有固定捕获剂的反应区和支持该反应区的吸收区，该捕获剂能特异性识别并结合到靶标记物上。该试验单元的反应区如此定向：即，使得在试验区的反应区上加入液体试验样品之后不久，后置过滤单元的标记区能与其保持短暂的液体联通。为了便于检测全血样品中的靶分析物，本发明的另一实施例提供了一种试验单元，其进一步包括与反应区侧流体联通的血液分离区，由此，与反应区侧面短距离相距的血液分离区的第一端形成用于接收全血样品的区域。血液分离区的第二端可与反应区稍稍重叠，由此确保与其直接流体联通。后置过滤单元包括含有干燥指示剂的标记区，并能在试验过程中与试验单元的反应区保持短暂的流体联通。

该分析设计是简单的两步过程，包括（1）将液体试验样品沉积在试验单元的反应区上，或者如果是全血样品，就将液体试验样品加到血液分离区的第一端，其后不久，是试验单元和后置过滤单元可操作地连接，以使后置过滤单元的标记区与试验单元的反应区短暂流体联通，和（2）在后置过滤单元上加入多功能缓冲液，并除去后置过滤单元以观察试验结果。多功能缓冲液被动地通过后置过滤单元的标记区扩散，从而使指示剂再溶解并将它传送到试验单元的反应区，在那里它将与同捕获剂复合的相应分析物结合。如果分析物存在于液体试验样品中，可检测的信号就出现在反应区中，在从试验单元上除去后置过滤单元之后，该信号可以容易地观察到。由本发明的方法所提供的优点是，加强了试验的敏感性和可靠性。这通过使彻底捕获分析物的机会最大化而获

得，甚至当分析物处于低浓度时。而且，利用本发明的分析方法，完全减少了可能增加样品和试剂污染的操作分析步骤。

2.0 特异性结合反应

本发明的分析装置用于定性和半定性检测液体试验样品中存在的靶分析物。适于在该分析装置中进行检测的分析物基本上是这样的特异性结合反应成分：一种成分可以识别并常常非共价结合到互补的另一成分上，以便形成能容易地直接或不直接检测到的稳定复合体。该特异性结合反应的成分可以认为是靶分析物和捕获剂，并且可包括多种来源于生物的参与免疫反应的物质，如抗生物素蛋白和生物素、细胞表面受体和效应剂、DNA 和 RNA 等等。关于特异性结合成分的披露，可参见美国专利 3,996,345 (Ullman 等人)。

当应用于结合分析中时，本发明的分析装置可设计为检测任意数量的具有特异性结合对方的靶分析物。该分析物一般是肽、蛋白质、糖、糖蛋白、类固醇、或其他特异性结合对方存在于生物体系或能够合成的有机或无机分子。该结合分析方法基本上包括分析物（即第一特异性结合成分）特异性结合到在固相材料上固化的捕获剂（即第二特异性结合成分）上，另外再与指示剂（包括与辅助第二特异性结合成分连接的标记物或普通的标记物蛋白）结合。捕获剂固定到固相材料上，形成“捕获位点”，这样便于从试验样品的其他成分中分离或除去靶分析物。通过直接或间接与指示剂的结合部分结合，获得标记物，该标记物能使指示剂产生表示液体试验样品中存在分析物的可检测信号。一般，在不干扰靶分析物和捕获剂之间的特异性结合反应的位点处，将辅助第二特异性结合成分结合到靶分析物上。一个不排除在本发明之外的示例是，作为抗原-抗体反应的结果出现的特异性结合反应。

本领域的技术人员应理解，虽然此处所描述的快速诊断分析装置通过形成免疫复合物主要用于测定抗原或抗体，但是实际上其可用性更宽，不仅限于这些分子。最低限度，该装置仅需要第一成分，该成分识别并结合特异性结合反应的第二成分。该第一成分适宜称为靶分析物，而第二成分为捕获剂。虽然抗原和抗体是靶分析物和捕获剂的优选实施例，但是起代表性或替换性作用的是，该装置可与各种捕获剂和分析物分子一起使用。例如，激素受体分子是一种捕获剂分子，并能连接到试验单元的反应区上，并用于分析相应的激素分析物。或者，激素可连接到反应区上，用于分析激素受体 (Hermanson G. T. (1996))

Bioconjugate Techniques, Academic 出版社)。

该系统也适于检测 DNA 序列。例如,将怀疑含有 DNA 序列的液体试验样品作为靶分析物沉积于反应区上,并与已知的作为捕获剂的、固定于反应区上的互补 DNA 序列结合。然后,标记的 DNA 探针通过多功能缓冲剂传送到反应区上。如果发生杂交,标记的 DNA 探针就以一种可见的检测形式存在于反应区表面。这种系统描述于 Poilky-Cynkin R.等人的文章中, Clin. Chem. 31/9, 1438 (1985)。

这样,对于本领域技术人员来说,可适用于本发明的诊断装置和方法中的许多捕获剂-靶分析物对的组合都是显而易见的。

3.0 分析装置和方法

3.1 夹心技术

本发明的优选实施例采用直接结合(夹心)分析形式。这种形式基于发生在以下成分之间的特异性结合反应原理:包含第一特异性结合成分的靶分析物、包含固定于固相材料上的第二特异性结合成分的捕获剂,和包含辅助第二特异性结合成分的干燥指示剂,或普通标记物蛋白。当含有靶分析物的足量液体试验样品与固定化捕获剂反应并且其后加入指示剂时,前面提到的成分就形成三元复合物。一般,该诊断分析依赖于第二特异性结合成分特异性识别并结合第一特异性结合成分的能力。根据待检测的靶分析物类型,利用包括由可视检测部分标记的辅助第二特异性结合成分的指示剂来检测这样的结合是否存在。反应之后所检测和测定的指示剂数量与试验样品中存在的分析物数量相关。例如,在夹心免疫测定形式中,含有抗原(即靶分析物)的试验样品与固定于固相材料上的第一抗体(即捕获剂)接触。然后用指示剂处理该固相材料,该指示剂也就是用可视检测部分标记的第二抗体。接着第二抗体与由固定在固相材料上的第一抗体所固定的相应抗原结合,然后可目视检测任何颜色的变化,其表示试验样品中存在抗原。

这样,在最简单的实施例中,图 1A 提供了本发明的分析装置 1 的图示说明,其包括两个分离的部件,试验单元 2 和后置过滤单元 3。该试验单元 2 包括具有由吸收区 4 支持的下表面的反应区 5。反应区 5 直接接收液体试验样品 9,并且由于其内含有固定化的捕获剂 6,因此可提供清楚的可视试验结果,捕获剂 6 能够通过特异性结合反应识别并结合感兴趣的靶分析物。在一个优选实

施例中，反应区 5 包括适合固定捕获剂 6 的多孔膜，并与指示剂 8 具有较低的非特异性结合。吸收区 4 优选地由渗透性材料构成，该材料具有下列本质特征：能通过毛细作用吸引液体，充分持有试剂和样品液，而且为反应区 5 提供支持。后置过滤单元 3 包括浸渗有干燥指示剂 8 的标记区 7。干燥指示剂 8 包括标记物和特异性结合成分，该特异性结合成分也识别并并结合感兴趣的分析物，但只是在干扰靶分析物和捕获剂之间的特异性反应的位点处。标记区 7 优选地包括基于具有足够大的孔尺寸而选择的过滤介质，以便当干燥指示剂 8 通过加入多功能缓冲液 12 而再溶解时，它可以容易地通过扩散过程而流过标记区 7 的暴露区。后置过滤单元 3 的形状和尺寸使得：当在试验过程的最终步骤其与试验单元 2 的反应区 5 短暂流体联通时，会持有并有效引导多功能缓冲液通过标记区 7。

图 1B 提供了本发明第二实施例的分析装置 1 的图示说明，其包括两个分离的部件，试验单元 2 和后置过滤器单元 3，其中试验单元 2 还包括血液分离区 100，其能接收并从红细胞（RBC）中分离全血样品 9 的液体部分，同时将不含 RBC 的液体部分（包括任何分析物）传送至反应区 5，以便直接进行分析。用于血液分离区 100 的优选材料可基于其所具有的本质特性来选择，该特性能使它在液体部分以侧方向移向反应区 5 时，优先捕获或截留样品 9 中的红细胞。

图 2 图示说明了使用图 1A 装置的本发明的方法。在该特定示例中，图 2A 显示了含有靶分析物 10 和其他非基本组分 11 的液体试验样品 9，并将该样品加到试验单元 2 的反应区 5 上。当液体试验样品 9 扩散通过反应区 5 并进入下面的吸收区 4 时，游离分析物 10 与连接在捕获剂 6 上的适宜位点接触并形成复合体，同时将未结合的非基本成分 11 继续吸入下面的吸收区 4（图 2B）。如图 2C 所示，随后在加入多功能缓冲液 12 之前使后置过滤单元 3 的标记区 7 与反应单元 2 的反应区 5 保持流体联通。在利用缓冲液 12 使干燥指示剂 8 再溶解之后不久，将指示剂 8 传送到试验单元 2 的反应区 5 上，在那里它将同与捕获剂 6 复合的任意分析物 10 进行结合。指示剂 8 与分析物 10 的结合反应产生了可见的检测信号，从而在除去后置过滤单元 3 之后显示容易观察的阳性结果，如图 2D 所示。

图 3A 图示说明了当不含靶分析物的液体试验样品 9 加到试验单元 2 的反

应区 5 上时, 使用图 1A 所示装置的本发明方法。当液体试验样品 9 扩散通过反应区 5 并进入下面的吸收区 4 时, 非基本组分 11 完全绕过捕获剂 6, 使连接位点未占据 (图 3B)。如图 3C 所示, 随后在加入多功能缓冲液 12 之前使后置过滤单元 3 的标记区 7 与试验单元 2 的反应区 5 处于流体联通。在利用缓冲液 12 使干燥指示剂 8 再溶解之后不久, 将指示剂 8 传送到试验单元 2 上, 在那里它扩散通过反应区 5, 由于缺少任何与捕获剂 6 复合的靶分析物, 因此指示剂 8 经过捕获剂 6 并进入下面的吸收区 4。在除去后置过滤单元 3 之后, 由于缺少指示剂 8 与复合分析物之间的结合, 将检测不到颜色信号, 从而显示阴性结果。

为了便于检测全血样品中的靶分析物, 本发明的另一实施例提供了一种具有血液分离区的试验单元, 该血液分离区能接收并将全血样品中的液体部分与红血球 (RBC) 分离开, 同时将不含 RBC 的液体部分 (包括任何分析物) 传送到反应区, 进行直接分析。如图 6 所示, 血液分离区 100 优选为多孔材料加长条, 基于以下本质特性选择该多孔材料: 当液体部分以侧面方向移向反应区 5 时, 能优先捕获或截留样品 9' 中的红血球。虽然形状和尺寸不是严格的, 但优选的是, 该血液分离区 100 为矩形, 具有适宜的尺寸, 以使之在样品 9' 不含 RBC 的液体部分到达反应区 5 之前, 有效地将大量红血球从全血样品 9' 中除去。这样, 实际上, 血液分离材料的功能是, 作为从全血样品 9' 中除去有效数量红血球的侧流材料, 以免干扰分析物的可见检测, 同时允许包括任何分析物的其他样品组分以未受减弱的运动方式流到反应区 5 上。优选的是, 将疏水性载体 103 固定到血液分离区 100 的下表面上, 以便在全血样品不含 RBC 的液体部分移动到反应区 5 的同时提供支持并减少液相渗漏。载体 103 优选地与血液分离区 100 的形状和大小相同。

与反应区 5 相距较短侧面距离的血液分离区 100 的第一端 101 限定出用于在将分析物引入反应区 5 之前接收全血样品 9' 的区域。血液分离区 100 的第二端 102 邻近并可以与反应区 5 稍重叠, 从而促进血样 9' 的不含 RBC 的液体部分从血液分离区 100 向反应区 5 毛细运动。为确保样品从一个区向另一个区最优传送, 血液分离区 100 和反应区 5 必须彼此接触。因而, 优选的是, 血液分离区 100 和反应区 5 在彼此相对支托时彼此稍重叠。

这样, 两步试验设计任选地同时将红血球从全血样品 9' 中分离出去, 以便

对所需要的分析物进行试验而不需要额外的步骤。例如，在全血样品 9' 含有分析物的情况下，将样品 9' 简单地加到试验单元的血液分离区 100 的第一端上，而不是加到反应区 5 上。当血样 9' 不含 RBC 的液体部分以侧向移动到达反应区 5 时，游离的分析物最终同与捕获剂连接的适宜位点接触并形成复合物。这样，与图 2 所示的方法步骤相同，将未结合的非基本组分吸入到反应区之下的吸收区。随后在加入多功能缓冲液之前使后置过滤单元的标记区与试验单元的反应区保持流体联通。在利用缓冲液使干燥指示剂再溶解之后不久，将指示剂传送到试验单元的反应区上，在那里它同与捕获剂复合的任何分析物进行结合。指示剂与靶分析物的结合反应产生了可见的检测信号，从而在除去后置过滤单元之后显示容易观察的阳性结果。

3.2 竞争反应技术

本领域的技术人员可以推出将本发明应用于竞争分析和非竞争分析（如夹心法），以分析适宜的感兴趣的靶分析物。在竞争形式中，能结合第二特异性结合成分（即捕获剂）的是指示剂的辅助第一特异性结合成分（与“夹心”技术中的辅助第二特异性结合成分相反）。换言之，指示剂的辅助第一特异性结合成分与靶分析物（即第一特异性结合成分）竞争结合到捕获剂的连接位点上。辅助第一特异性结合成分包括，例如靶分析物的类似物或其他可靠试样，该物质具有与第一结合成分竞争的结合亲和性。当将液体试验样品沉积到反应区上时，任何靶分析物（如果存在的话）将与捕获剂（即第二结合成分）的适宜连接位点相结合，这样在加样后，就潜在阻止了指示剂的辅助第一结合成分与捕获剂的结合。如果液体试验样品含有靶分析物，则由于指示剂不能与捕获剂结合而未出现颜色信号，以显示阳性结果。或者，如果试验样品不含有任何靶分析物，则由于指示剂能与捕获剂的未占据连接位点结合，就存在显示阴性结果的颜色信号。

4.0 试验单元

如前所述，本发明的诊断装置包括作为第一部件的试验单元，该试验单元具有包含能够特异性识别并结合靶分析物的固定化捕获剂的反应区、支持该反应区的吸收区，以及任选的与反应区保持侧流体联通的血液分离区。该试验单元的反应区如此定向：即，在液体试验样品加到试验区之后不久，该后置过滤单元的标记区能与其保持短暂的流体联通。

4.1 反应区

术语“反应区”确定为包括：多孔材料，该多孔材料将捕获剂和其他在分析试验中使用的分子结合在其上；以及形成反应区下表面的其他多孔支持材料（如果有的话）。

反应区材料的选择对于发明并不是严格的。用于制作本发明装置的材料是本领域所公知的。多孔材料，如那些已在美国专利 4,670,381、4,632,901、4,666,863、4,459,361、4,517,288、4,552,839 中所描述的，可单独组成或与玻璃纤维、醋酸纤维素、尼龙或多种合成或自然材料组合。

反应区的优选材料是具有一定孔径的膜，该孔径允许其他非基本组分从所分析的试验样品中分离并过滤出去。通过扩散控制液体试剂的流动，并且该膜在用诸如蛋白质、去污剂或盐这些试剂处理之前或之后对指示剂具有较低的非特异性结合。存在许多多孔膜、薄片、或商业上可获得的纸，它们抑制疏水性并适合于本发明的实践。反应膜可以是任何形状和厚度，但常常是平坦且薄的。通过加入与反应膜的下侧相接触的纤维或亲水性材料（吸收垫），在试验的分离步骤中可促进液相反应物从固相颗粒中吸收、扩散或过滤出来。暴露于固相颗粒的区域尺寸可通过使用疏水性材料来控制，疏水性材料是诸如塑料、塑料叠片或其他类似物质，将该物质放置在与反应膜接触的位置上并封闭反应区，以使仅有的不大于约 150mm² 的表面区域暴露于颗粒固相中。

该膜的孔隙率对液体流速和试验的敏感性有较大影响。膜的孔尺寸越大，给定液体的流速就越大。当流速增加时，样品中靶分子与固定于反应膜上的受体之间能够反应的时间减少，这样就减少了分析的敏感性。而且，较大的孔为固定受体分子提供了较小的表面，这是会降低分析敏感性的另一参数。对大部分分析来说，膜的孔隙率优选在大约 0.1-12.0 微米的范围内，更优选为 0.2-0.8 微米。

膜的芯吸力也会影响试验敏感性并取决于膜材料的厚度和性质。芯吸力可以作为每单位时间标准溶液的迁移距离来测定。通常，选择具有相对低芯吸力的膜可以增加分析的敏感性。这样，除了孔隙率，反应膜的总厚度影响分析的敏感性，因而也是必须考虑的。

反应膜的厚度是反应膜上下两表面之间的距离，其可以根据给定诊断试验所需的流体特征而改变。通常，该厚度为大约 0.05mm-3.0mm，更通常为大约 0.1 mm-1.0 mm。特别对一些免疫分析来说，发现，当反应膜的厚度大于约

0.1 mm 时, 优选为约 0.2-1.0 mm 时, 可获得较高的敏感性。而且, 据信, 具有相对薄反应膜并非纸面的已有技术装置, 如小于 0.1 mm 厚的硝化纤维膜, 使样品横向流过反应膜而不是向下流过反应膜的中央。另一方面, 较厚的反应膜使更多可用的捕获剂与靶分析物结合, 从而进一步增加分析的敏感性。这样, 应如此选择膜的厚度: 即, 可将足够数量的结合剂固定, 以捕获试验组分。然而, 如果膜的厚度太大, 可能会导致过度延迟液体试验样品通过该膜。

应考虑的另一因素是, 基于适合捕获剂的固定而选择反应膜的材料。只要分析操作不受到不利影响, 反应膜就可以是能固定诊断分析中所用的捕获剂的任何适宜的多孔材料。适宜的材料包括硝化纤维(支持或不支持)、玻璃纤维、聚酯、硝酸纤维素、聚酯、多糖、尼龙和其他能直接或间接与所选择的捕获剂结合的自然或合成材料。一般该膜包含使捕获剂分子结合的负电荷。带电的某些膜材料包括醋酸纤维素, 其由于硝基而具有部分负电荷。

在一些情况下, 从商业上可获得过滤器, 其已将用于将生物分子(如抗体或抗原)连接到表面上的反应物固定到它们的内和/外表面上。各种过滤器的示例包括纤维素过滤器(滤纸)、聚酰胺膜(如由 Pall 公司制作的多种聚酰胺膜), 和各种其他微孔膜, 如那些可从 Amicon, Geleman 和 Schleicher & Schuell 商业获得的膜。例如, 以下的膜可从 Pall 公司获得: Biodyne[®], 一种 N66 聚酰胺多孔膜(Pall 的美国专利 4,340,479); Carboxydyne[®], 一种亲水性的多孔无皮尼龙 66 膜, 其具有在其表面通过羧基官能团表征的控制表面特性; 和 Immunodyne[™], 一种由三氯代-s-三嗪处理的 Carboxydyne[®]膜制备修饰化的 Carboxydyne[®]膜。其他由 Millipore 公司制备的微孔膜描述于美国专利 4,066,512 和 4,246,339 中。

其他材料可以作预处理以提供带电膜。例如, 用羧基或氨基衍生的聚酯可以提供带负电或正电的膜。可以用酸处理尼龙, 以破坏肽键, 从而带正电(由于胺基)和带负电(由于羧基)。

用作反应膜的优选材料是, 由类似于滤纸的多孔纸支持的硝化纤维膜, 或其他类型的具有类似特征的硝化纤维膜。有代表性的示例是商业上可获得的由 Schleicher 和 Schuell 生产的商品名为 BCA-T-KOTE 的产品。该材料比单独的硝化纤维更具有充分的耐受力, 并且能不用其他任何支持部件即可使用, 同时更易于操作和装置的组配。而且, 已发现, 使用纸衬底硝化纤维作为反应区的分析装置可增进某些免疫分析的敏感性。

其他商业上可获得的材料来自 EY Laboratories 公司(加利福尼亚州的 San

Mateo; 目录号为 PBNC15-1, PBNC15-10, PBNC15M-1, 和 PBNC15M-10)。

4.2 捕获剂的固定

在通常的系统中, 将捕获剂固定在反应区的多孔膜上, 它将特异性识别并结合所分析液体试验样品中存在的任何靶分析物。这样的试剂, 通常为免疫蛋白例如抗体或抗原, 它可以直接或间接通过吸收、吸附或共价结合固定到诸如硝化纤维这样的材料上。当怀疑含有特异性结合反应的靶分析物的液体试验样品加到含有固定捕获剂的反应区上时, 它将不扩散结合到反应区上。这样, 通过适宜地施加怀疑含有感兴趣靶分析物的液体试验样品, 可以在反应区中央的准确限定区域中获得很高的靶分析物浓度。在适当的情况下, 捕获剂可以覆盖于反应区的上表面上, 或者是一种在反应区的多孔材料基质中捕获的颗粒。因而, 此处所使用的术语“固定化”确定为包括任何将捕获剂固定在多孔材料上的方式。

本发明方法的第一步骤是, 将捕获剂固定于反应区限定区域内。可以通过以下方法实现固定: 吸附、吸收、由挥发性溶剂溶液蒸发沉积、捕获剂和反应膜之间的共价结合、或免疫固定。例如, 共价结合可以包括将捕获剂通过耦合剂(如卤化氰, 例如溴化氰)或通过使用戊二醛(gluteraldehyde)(如 Grubb 等人在美国专利 4,186,146 中所描述的)结合到反应区上。免疫固定到反应膜上可以通过吸收, 或直接通过共价键, 或通过本领域技术人员所公知种类的连接。进行这些过程的适宜方法已经给定, 例如 Iman 和 Hornby 在 *Biochemical Journal* (129 卷, 255 页) 中所描述的; Campbell, Hornby 和 Morris 在 *Biochem. Biophys. Acta* (1975) 384 卷, 307 页中所描述的; 和 Mattisson 和 Nilsson 在 *F.E.B.S. letters* (1977) 104 卷 78 页中所描述的。也参见, 例如美国专利 4,376,110 和 4,452,901。而且, 适宜用作耦合抗体的化学预处理材料可以从商业上购买。

免疫固定对于本发明的实践是优选的。例如, 如果本装置中使用的是利用抗体作为捕获剂的夹心免疫法, 那么通过使用分配/印刷技术(美国加利福尼亚州的 BioDot)的吸收方式, 用抗体浸渗反应膜。这涉及将一种或多种分离的抗体通过将它们直接喷到反应膜上而施加到膜上。以上技术使用商业打印装置(称为 B_{IO}J_{ET}QUANTI³⁰⁰⁰)最易获得, 并且在不同条件下以变化的流束宽度提供免疫蛋白流束。使用这种技术时, 可能很快在反应膜上沉积一系列的线或其他离散模式, 在该模式下, 每一条含有一种用于结合一种或多种抗原的具有不同抗原特异性的抗体。这样, 能进行试验的抗原数量是以离散形式施加的不同抗

体数量的函数。

根据使用者希望利用该诊断分析的检测极限，捕获剂可以单独或以不同组合沉积在各种构型的反应区上，从而产生不同的检测或测定形式。例如，将选作捕获剂的两种或多种不同特异性结合成分的板条加到同一反应膜的不同区域上，由此单个液体试验样品中存在的多种分析物同时进行分析，例如检测 HIV 和 HCV。优选的是，将捕获剂沉积在离散的试验区中，该试验区的面积基本上小于反应区中所使用的多孔材料的整个表面积。用于分布捕获剂的便利的各种图形可以包括但不限于：数字、字母、点、线和符号等等，它们在分析已完成时显示可检测的信号。优选的是，离散试验区的图形是以单线的形式出现，以加强试验结果的可见性。

4.3 捕获剂

由于本发明装置的设计是用于检测液体试验样品中靶分析物的方法，因此必须提供一种捕获剂来识别并特异性结合靶分析物。本领域的任一普通技术人员可以理解，术语“特异性结合”是指发生在两种或多种互补非同一组份之间的反应，以形成复合体。这样的结合对示例包括：抗原和抗体、激素（和其他胞内信使）和细胞受体，糖和凝集素。特异性结合对的一个成分可以固定到反应区上，而另一成分是试验样品中所检测的分析物。示范性的但并不排除在本发明之外的是，作为抗体-抗原反应的结果而发生的特异性结合反应。然而，应认识到，由于抗体可以作为另一抗体的抗原，因此诸如抗原、抗体这些术语的使用不是相互排他的。

由于特异性抗体相对于抗原制备起来相对容易，因此本发明的优选实施例可以是，利用连接到反应膜上的单克隆抗体，来检测液体试验样品中存在的特异性抗原。该单克隆抗体属于抗体的任何种类或子类，包括 IgA、IgD、IgE、IgG（如果是人，是 1-4 个子类；如果是鼠类，为 1、2a、2b、3），或 IgM。也可以使用抗体的活性结合片段，如 Fab、Fv、F(ab')₂ 等等。单克隆抗体的制备是本领域公知的，它通过以下方式而完成：根据已知技术，融合来自宿主的脾细胞，使该脾细胞对骨髓瘤细胞的抗原致敏；或通过用适当的转化载体将脾细胞转化，从而使该细胞永生化。细胞可以在所选定的培养基中培养、克隆并筛选，从而选择结合所设计的抗原的单克隆抗体。可以发现有关单克隆和多克隆抗体制备的许多参考文献（例如 Kohler 和 Milstein (1975) Nature (伦敦) 256, 495-497; Kennet R. (1980) in Monoclonal Antibodies (Kennet 等人, Eds.pp.365-367, 组

约, Plenum 出版社)。

4.4 对照区

除了捕获剂之外, 暴露的反应区上的限定区域也可以含有对照分子。在这点上, 产生于试验位点的颜色可与一种或多种标准对照物的颜色比较, 以确定实际是否稳定以及试验是否恰当操作。一般, 当测定靶分析物的存在时, 诊断装置具有抗体内置对照物, 是指人免疫球蛋白 G (IgG)、IgM、IgE、或 IgA。这样当将液体试验样品加到诊断装置上时, 不论样品中是否存在靶分析物, 免疫球蛋白都与对照区结合。例如, 通过使用蛋白 A 来构建适宜的对照物, 其已披露于美国专利 5,541,059 (Chu) 中。其他适宜的对照物是本领域公知的。

4.5 封闭反应区

如前所述, 捕获剂和任选使用的对照物通常只施加到反应区暴露表面的限定区域上。捕获剂常加到反应区中央的区域中, 从而使反应区暴露的表面周围区域没有任何捕获剂连接在其上。另一方面, 在一些情况下, 将整个试验区的暴露表面用捕获剂覆盖是适当的。但是, 如果将捕获剂固定到反应区暴露表面的限定区域上, 该区域的多孔材料或膜就可以用封闭组合物来处理, 而该组合物避免靶分析物和样品的其他成分与反应区非特异性结合。对于非特异性结合不重要的试验来说, 封闭步骤是不需要的。同时, 使用高质量纸衬底硝化纤维在一些分析中就不用封闭步骤。然而, 如果需要封闭步骤, 可以使用普通的封闭溶液, 其包括牛血清白蛋白 (BSA) 或其他不干扰分析的试剂材料或不与分析的试剂材料发生交叉反应的蛋白。BSA 所使用的量通常为 1-10%。

通常封闭处理发生在分析装置已组装并且捕获剂固定到试验区上之后。施加覆盖反应区暴露表面的足量封闭组分。在封闭组分干燥后, 该分析装置已经可以使用了。

4.6 吸收区

如果样品通过反应区而聚集, 则可以增加反应膜型免疫分析的敏感性 (即检测非常低水平靶物质的能力)。使用一些装置, 通过在反应区之下具有吸收材料或垫, 使样品通过反应区而聚集, 这些材料或垫通过下面的吸收材料吸收加到反应区表面的样品。吸收区由任何能通过毛细作用芯吸液体的材料 (如棉花或纸) 制成。使用各种吸收材料来聚集样品的基于膜的免疫分析技术列举于美国专利 5,185,127、5,006,464、4,818,677、4,632,901 和 3,888,629 中。

在反应区下表面之下设置吸收材料, 以便与反应区直接流体联通。这样,

吸收材料的上表面与反应区的下表面直接相邻。流体联通接触包括吸收材料与反应区直接物理接触，其包括吸收材料的一部分通过插入间隔层与反应区相分离，该间隔层在其中有开口。因而，间隔层仍使反应区与吸收区之间直接接触，因而使分析试剂能均匀地从分析装置的上表面流到下表面。虽然未严格限定该装置的操作，但间隔层也适合支持反应区的多孔膜。间隔层可以由任何刚性或半刚性材料制成，该材料不与同本发明关联使用的试剂结合或反应。用于间隔层 25 的材料示例是玻璃纤维、纸、亲水聚丙烯或纤维素。该间隔层 26 的厚度一般为 0.1mm-1mm。在本发明的一些实施例中，由于需要易于制作并降低成本，因此通常使吸收材料的上表面与反应区的下表面直接相邻。

用于吸收区的材料的选择并不严格，可以使用各种纤维过滤材料，其包括一层或多层相同或不同的材料，只要所选择的材料适于靶分析物和分析试剂即可。本发明可以使用任何传统采用的能够通过多孔膜（例如通过毛细作用）吸收或芯吸液体的吸收材料。吸收材料应能吸收的液体试验样品体积等于或大于该材料本身的总容积。可使用的已知材料包括醋酸纤维素纤维、聚酯、聚烯烃或其他这样的材料。吸收材料通过如下方式收集样品：提供均一“吸力”以便将井中的样品通过反应区传递并吸入下面的吸收材料中。这样，当进行分析时，吸收体也作为持有样品和各种所使用的试剂的储液囊。而且，当用于相对大体积的液体的分析中，吸收材料应具有高的吸收能力，以避免或使样品和试剂从吸收体向后流入反应膜的可能性最小化。

当具有反应区材料时，吸收材料的芯吸力可能是重要的参数。芯吸时间定义为，水流过吸收材料的一段规定距离所需要的时间，它与材料的厚度和孔隙率有关。芯吸力的大小可以随材料的不同而发生很大的变化，因而通过改变所用的吸收材料，可改变分析装置的特性和样品及试剂的流速。

4.7 血液分离区

为了便于检测全血样品中的靶分析物，本发明的另一个实施例提供了一种试验单元，该单元能接收并从红血球（RBC）中分离全血样品的液体部分，其特征是血液分离区与反应区保持侧面流体联通。血液分离区的功能是，选择性地截留包含在全血样品中的细胞组分（即红血球）并将血样中不含 RBC 的剩余液体部分（包括任何分析物）传送到分析区，以便进行最后的分析。该特定特征可用于避免在检测分析物的可视颜色反应过程中发生的任何干扰，并避免在不能获得合适装置来进行该操作的环境下需要初提血清或血浆。

各种用于从血液的液体部分中分离出血细胞的方法阐述了使用分离涂层、红血球聚集和凝集剂、具有不对称孔尺寸的材料、含聚合物的基质及多层系统，这里仅举几个例子，如 Grubb 等人的美国专利 3,768,978、Greenspan 的美国专利 3,902,964、Vogel 等人的美国专利 4,477,575、Zuk 的美国专利 4,594,372、Hillman 等人的美国专利 4,753,776、Vogel 等人的美国专利 4,816,224、Aunet 等人的美国专利 4,933,092、Trasch 等人的美国专利 5,055,195、Jeng 等人的美国专利 5,064,541、Roesink 等人的美国专利 5,076,925、Sand 等人的美国专利 5,118,428、Tanaka 等人的美国专利 5,118,472、Makino 等人的美国专利 5,130,258、Hillman 等人的美国专利 5,135,719、Forney 等人的美国专利 5,209,904、Maddox 等人的美国专利 5,212,060、Koenhen 等人的美国专利 5,240,862、Wilk 等人的美国专利 5,262,067、Kiser 等人的美国专利 5,306,623、Ogura 等人的美国专利 5,364,533 和 Kass 等人的美国专利 5,397,479。

在一个优选实施例中，血液分离区是加长或矩形多孔材料条，其具有能使它优选并有效地在血液分离区中捕获或截留红血球的本质物理特性。位于距反应区较短侧面距离处的血液分离区的第一端限定出，用于在试验设计的第一步且在将靶分析物引入反应区之前接收全血样品的区域。与反应区直接流体联通的血液分离区的第二端有助于促进不含 RBC 的血样的液体部分从血液分离区的第一端移动到反应区，以进行最后的分析。为了确保样品从一个区向另一个区最优传送，该血液分离区和反应区必须彼此接触。因而，所选择的血液分析区与反应区的材料可以彼此稍稍重叠，以确保全血样品中不含 RBC 的部分恰当移动。

各种材料都可用于血液分离区，如玻璃纤维、玻璃纤维/纤维素混合物、纤维素或其他合适的材料，包括合成材料，如尼龙。优选地使用可渗透的玻璃纤维基质作为血液分离材料，以便从全血中分离红血球。商业上可获得各种不同厚度和吸收性级别的玻璃纤维材料来促进血液分离，其包括例如可从 Shleicher & Schuell（美国新罕布什尔州的 Keene）获得的 GF-24、GF-25 和 #33；可从 Ahlstrom（美国宾夕法尼亚州的 Mount Holly Springs）获得的 G143、G144 和 G167；可从 Whatman（美国新泽西州的 Fairfield）获得的 GFQA30VA、GF/P30、GF/DE30、GF/SE30、GF/CM30VA、GF/CM30、F075-14、F487-09、GF DVA、GFVA20 和 GD-2。

有用的玻璃纤维/纤维素混合材料包括 F255-0790 玻璃/10 纤维素、F255-09

70 玻璃/30 纤维素、F255-11 50 玻璃/50 纤维素和 F255-12 50 玻璃/50 纤维素，它们可从 Whatman 获得。

有用的纤维素材料包括可从 Schleicher & Schuell 获得的 598。混杂的或其他不在上述种类之列的材料也可使用，包括 HemaSep V 和 Leukosorb；根据该主题发明制作的物品可从 Pall BioSupport（美国纽约的 Port Washington）获得。

一种有用的尼龙材料是尼龙 6.6 传送膜，其可以 Biodyne B（纽约 Port Washington 的 Pall Specialty Materials 公司）的商品名而在商业上获得。而且，可以使用从 Whatman 获得的名称为“PlasmaSep”的材料。

虽然血液分离区的形状和尺寸未严格限定，但优选的是，其具有窄矩形形状及适宜的尺寸，该尺寸可使之在样品的液体部分从该区的第一端向第二端迁移的过程中能从全血样品中有效除去足够量的红血球。这样，实际上，当优选窄矩形，以引导血样的液体部分到达反应区时，该尺寸可以根据血液分离区的选定材料的本质特性（例如吸收性、迁移率等）来变化。在优选实施例中，使用从 Whatman 获得的玻璃纤维材料 F487-09 来制成血液分离区，其尺寸为宽度为约 4-7mm，长度为约 10-15 mm，厚度为约 0.2-1.0 mm。更优选的是，血液分离材料为，约 7 mm 宽、约 10 mm 长、约 0.5 mm 厚。使这些尺寸最优化，以便能接收并分离全血样品的总体积，例如两滴血。

血液分离材料优选地具有刚性或半刚性固定到其下表面上的载体或垫，以便支持并减少不含 RBC 的全血样品的液体部分向反应区迁移的过程中发生的渗漏。用作载体或垫的适宜材料包括：例如疏水性材料，如聚碳酸酯、聚乙烯、聚酯薄膜、聚丙烯、乙烯基树脂、玻璃纸和聚苯乙烯等等，还有防水或防液体卡板或类似材料。载体或垫可以通过使用防液体粘接剂的方式直接或间接固定到血液分离材料上。适宜的粘接剂是本领域公知的。载体可以是便于操作的任意形状和几乎任意尺寸。这样，载体优选的形式为，具有类似于血液分离材料或与之相同的长度和宽度的加长或矩形条。

5.0 后置过滤单元

如上所述，本发明的诊断装置包括作为第二部件的后置过滤单元，包括浸渗有干燥指示剂的标记区。

标记区的材料的选择并不严格，可以是任何适宜的吸收性多孔或拥有毛细作用的材料，通过该材料，多功能缓冲液和再溶解的指示剂可通过芯吸作用而传送。选择的标准是，该材料使得当加入多功能缓冲液时干燥指示剂再溶解并

混合，并开始将缓冲液和刚溶解的指示剂传送到试验单元的反应区。

可以使用自然的、合成的、或自然产生经合成修饰的材料作为过滤介质，包括但不限于：纤维素材料，如纸、纤维素、玻璃纤维、布、聚氯乙烯膜等等。虽然优选的过滤介质是硝化纤维，但应以如下能力来选择该材料：即，它能够释放指示剂，从而用多功能缓冲液使之再生。而且，流过过滤介质的液流呈薄层，与乱流特征相反，该乱流使缓冲液与指示剂充分混和。

5.1 指示剂

采用指示剂来检测试验样品中靶分析物的存在在本领域内是公知的。根据所采用的诊断分析的类型，将指示剂中所采用的标记物共轭结合到特异性结合成分或一般标记物蛋白（即蛋白 A、蛋白 G、抗体 IgG）上，而后者直接或间接与靶分析物结合。标记物与特异性结合成分之间形成的指示剂可以是任何常用的类型，包括金属复合标记物，放射性标记物、酶标记物，荧光标记物，放射性标记物，化学发光标记物以及类似物。

快速诊断装置设计中一个重要的考虑因素是，指示剂的生成中所选择的标记物应该发出容易检测的信号，即容易被眼睛检测到的强烈的颜色区域。这样，本发明重要的优选实施倒是，采用连接到特异性结合成分之一上的“直接标记物”。直接标记物在本领域内是公知的，并且在快速诊断系统中的应用具有很多优势。直接标记物的例子包括但不限于：金属溶胶、非金属溶胶、染料溶胶、乳胶颗粒、碳溶胶以及含有带彩色体的脂质体。它们的一些优点是，它们能被用来产生视觉可检测的信号而无需添加其它试剂，无需仪器的帮助就容易被肉眼看到，并且由于它们在干燥状态下被贮存时是稳定的而很容易用于诊断装置中。至于后者，它们的稳定性和与缓冲液接触的瞬间释放可以通过采用可溶性釉料来实现。从以上所述来看，间接标记物，例如一种酶（例如碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶）是不太优选的，因为它们通常要求在检测可视信号之前添加一种或多种底物。

非金属溶胶，例如硒、碲和硫磺的溶胶可以根据美国专利 US4,654,452(Yost 等人)所公开的方法生产。染料溶胶颗粒可通过 Gribnau 等人的专利 US4,373,932 以及 May 等人的专利 WO88/108534 中所公开的方法生产，如 May、Supra,Snyder 的专利 EP-A 0280559A 和 0281327 中所公开的染色乳胶，以及 Campbell 等人的专利 US4,703,017 中公开的包裹于脂质体中的染料。胶体形式的聚合染料物质在特异性结合分析中的用途还已被 Hirschreid 的专利 US4,166,105 所公开，

它涉及到通过含有反应活性功能团的聚合物而将荧光染料分子连接到分析物特异性抗体上,从而制备出具有与特异性抗原反应活性的标记特异性结合试剂。感兴趣的还包括 Leuving 的专利 US4,313,734 中涉及的金属溶胶; Leuving 等人, “Sol Particle Immunoassay(SPIA)”, Abstract, Journal of Immunoassay, 1(1), pp. 77-91(1980); Leuving Dissertation(1984), Sol Particle Immunoassay (SPIA): The Use of Antibody Coated Particles as Labeled Antibodies in Various Types of Immunoassay; Uda 等人, Anal. Biochem. 218(1994), 259-264, DE-OS 4132133, page 3, lines 16-18, for applications as markers and Tang 等人, Nature 356 (1992), 152—154; Eisenbrann 等人, DNA and Cell Biology 12 (1993), 791—797。而且已知的非金属胶体颗粒,例如碳微粒 (Van Amerongen, Antibiotic’ 92(1993), 193—199) 也是可以采用的。Moeremans 等人的申请号为 EPO158,746 中公开了在夹心点涂覆分析中采用胶体金属颗粒作为标记物。目前最为常见的是采用胶体金颗粒。

在直接标记物中,金属溶胶是优选的,更为优选的是金溶胶颗粒,例如 Leuving 的专利 US4,313,734 中所公开的那些。Leuving 的专利 US4,313,734 中公开了采用金属溶胶颗粒作为标记物,用于在含水试验介质中进行免疫学成分的体外测定。特别是公开了用于测定抗原或抗体的免疫分析试剂盒,它采用一种或多种标记成分,这些标记成分是通过将成分耦连到颗粒尺寸至少为 5nm 的金属、金属化合物或用金属或金属化合物包被的聚合物核的含水溶胶分散颗粒上而获得的。

根据本发明所采用的金属溶胶颗粒可以通过本领域公知的方法来制备。举例来说,金溶液颗粒的制备公开在 G. Frens, Nature, 241, 20—22 (1973) 上的一篇文章中。此外,金属溶胶颗粒可以是金属或金属化合物或包被了金属或金属化合物的聚合物核,所有这些已在如上所述的 Leuving 专利中描述过了。从这点看,金属溶胶颗粒可以是铂、金,银或铜或具有特征颜色的任何金属化合物。

5.2 胶体金颗粒

适合作为本发明标记物的胶体颗粒包括,那些可以结合到特异性结合成分或一般标记物蛋白质而不会干扰这些试剂或其它试剂或分析物的活性的颗粒。

特别适合作为本发明标记物的胶体颗粒包括那些由金属或金属化合物组成

的颗粒，其中金属和金属化合物是从包括以下物质的组合中选择的：铂、金、银和铜、碘化银、溴化银、氢氧化铜、氧化铁、氢氧化铁或铁的水合氧化物、氢氧化铝或铝的水合氧化物、氢氧化铬或铬的水合氢氧化物、硫化铅、硫化汞、硫酸钡和二氧化钛。优选的胶体金属颗粒包括那些由金制成的颗粒。

胶体金颗粒标记物与其它常用的标记物相比使用更简单。例如，它们无需其它标记物（例如放射性同位素和不同的酶）的检测所必需的设备，它们不需要添加底物的额外步骤。

胶体金颗粒的生产可根据本领域公知的方法来进行。本发明感兴趣的是，那些在免疫学分析过程中采用胶体颗粒分散体的参考文献。特别是，Frens, *Nature*, 241, 20—23 (1973) 所公开的方法，该方法采用含水柠檬酸钠还原氯化金而生产具有可变尺寸的金溶胶颗粒。来自金属颗粒标记物的视觉可检测信号的颜色取决于金属颗粒的种类和颗粒尺寸，而后者可以通过改变反应物的浓度来进行控制。例如，胶体金颗粒产生的颜色范围从橙色到红色到紫色，其取决于溶胶颗粒的尺寸。

选择胶体金试剂是由于其不寻常的特性，包括在聚集于固体表面上时使肉眼能接受的颜色变强的能力，将与固体表面的非特异性结合最小化的能力，以相对一致的颗粒尺寸进行制备，以及易于冻干和再溶解。胶体金颗粒可以采用通过还原四氯化金酸的许多方法制备，可以产生从 5nm 至 10nm 的各种颗粒尺寸。优选的颗粒尺寸是从 15 至 20nm。胶体金颗粒可以带有在添加结合底物之前就吸收在其表面上的媒介结合物，但是直接连接是更令人满意的。通过严格控制反应混合物的浓度、离子强度以及 PH 值吸收所选择的结合底物。生产胶体金原材料的方法或连接结合物的方法的选择对于本领域技术人员来说是已知的。在用胶体金进行的标记完成之后，试剂被差异离心或过滤，以控制颗粒尺寸。利用凝胶过滤法获得颗粒尺寸也是已知的。胶体金标记的试剂可以在带有或不带有作为指示剂的上述固相颗粒存在的情况下被用作胶体悬浮液或作为冻干试剂。

然后，最终包被和稳定化的胶体金属颗粒可以被连接到各种蛋白质上。可经受冷冻干燥或其它形式的干燥例如温育器、空气干燥以及喷雾干燥的任何蛋白质都可用于本发明。本发明所用的蛋白质包括但不限于：多克隆或单克隆抗体、抗原、凝集素、蛋白 A、蛋白质 C、细菌素以及类似物。在那些免疫诊断分

析是夹心形式的例子中,采用抗体作为捕获试剂,用于测定作为靶分析物的抗原,指示剂的结合成分通常是具有针对结合在第一抗体上的抗原的特异性的第二抗体,但是该抗体与抗原的结合位点与第一抗体不同。另一方面,指示剂的结合成分通常是抗原的类似物或其它可靠的例子,这些成分能够在与靶分析物在竞争性情况下所结合的位点相同的位点上结合到捕获试剂上。

有关合成带色颗粒共轭物的细节和工程原理参见 Horisberger, Evaluation of Colloidal Gold as a Cytochromic Marker for Transmission and Scanning Electron Microscopy, Biol.Cellulaire, 36, 253—258 (1979); Leuvering 等人, Sol Particle Immunoassay, J.Immunoassay, 1 (1), 77—91 (1980); 以及 Frens, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, Nature, Physical Science, 241, pp. 20—22 (1973)。Surek 等人, Biochem and Bio phys Res. Comm, 121, 284—289 (1984) 公开了利用蛋白质 A 标记的胶体金颗粒检测固定在硝酸纤维素膜上的特异性抗原。

5.3 干燥过程——糖/上釉的处理

根据本发明的一个重要方面,后置过滤单元的标记区在多孔材料的厚度内实质上包含布满干式指示剂,指示剂随后通过添加多功能缓冲液而再溶解。这样,通过在本发明的装置内掺入一种分析试剂,使得通过消除添加和/或先混合指示剂的步骤,而减少分析过程中的必要步骤的数量成为可能。

为了有助于指示剂在后置过滤单元的标记区被多功能缓冲液浸湿时能自由迁移,后置过滤单元在施加有指示剂的区域用釉料进行预处理。举例来说,釉化可以通过以下步骤来完成:在后置过滤单元的相应区域沉积一种糖或纤维素水溶液(例如蔗糖的或乳糖的),同时避免过滤单元的剩余,并且进行空气干燥。随后指示剂可以被施加到釉化部分。

利用一种或多种糖(例如,葡萄糖、乳糖、漏芦糖和蔗糖)的釉化过程在采用本发明的干式指示剂时具有很大的优势,因为糖(1)用作蛋白质稳定剂;(2)提高干式指示剂的长期稳定性,以及(3)作为快速释放剂。根据本发明的一个优选实施例,蔗糖在完成分析中与其它糖相比是最好的,因为(1)它的可溶性,(2)干燥时间短;(3)分析结果的整体灵敏性;(4)用作防腐剂,以及(5)使用经济。

6.0 缓冲剂

为了确保分析过程各个步骤的进行，例如干式指示剂的再溶解、液体试验样品的稀释、封闭分析反应发生的膜表面、促进关键试剂的转移和 / 或从反应区洗掉未结合的反应物，常规诊断分析通常需要采用两种或更多的流体试剂。由于这些步骤中的每一个都涉及到混合和制备不同的反应物，因此由于 PH 值、离子强度、添加剂、缓冲液的类型和强度、温度等因素的不同而需要不同的液体试剂配方。例如，再溶解过程通常要求采用生理缓冲液（例如缓冲的盐或双蒸水），封闭过程采用的液体试剂是用任意数量的动物血清白蛋白、动物胶以及脱脂牛奶配制的，而洗脱和/或稀释过程涉及到采用包含不同数量表面活性剂或去垢剂的中性 PH 值的缓冲磷酸盐，以便去除任何非特异性结合反应物。而且，为了确保使用者使用合适的液体试剂来正确地完成分析的每一步骤，试剂本身必须被清楚地标记并且彼此容易区分，从而避免任何可能的混淆和使用者犯错。

本发明的一个重要方面是，通过提供一种在二步分析过程中单一使用的多功能缓冲液来克服如上所述与使用几种分析试剂相关的各种问题。多功能缓冲液被制成可以充当包括以下成分的组合再溶解试剂：干式指示剂、使再溶解的指示剂从后置过滤单元的标记区进入试验单元的反应区的转移促进试剂，以及从反应区去除未结合反应物的洗脱试剂。为了简化完成分析所需的步骤和试剂的数量，多功能缓冲液被专门配制，以便用来与干式指示剂共轭。因此，特别有益的是，利用多功能缓冲液和干式指示剂作为组合体系，因为在分析过程中，多功能缓冲液可以实现最佳灵敏性和较高的特异性，同时还避免了干式指示剂在溶液中的聚集和失活。

多功能缓冲液的组成可以根据具体分析的需要而变化，例如为了测定试检样品中靶分析物的存在而采用的特异性捕获试剂和指示剂，以及分析物本身的自然特性，这对于本领域人员来说是显而易见的。一般来说，多功能缓冲液包含在分析中具有基本功能的化合物，它们的特性使得它们可以充当稀释剂，洗脱剂以及再溶解剂。然而，由于本发明的反应区已经用常规封闭剂在捕获试剂固定之后进行了预处理，因此缓冲液配方无需包括非特异性封闭剂。本发明所提供的使用多功能缓冲液的方法实质上涉及到，在二步分析法的最后一步向后置过滤单元滴加缓冲液，从而使干燥的指示剂再溶解。本发明还提供了包含作为一种组分的多功能缓冲液的试剂盒。

因此,本发明提供了一种改进的缓冲液,该缓冲液作为多功能缓冲液没有降低分析灵敏性或特异性,它包含:(1)维持PH值在大约7.0至10.0之间的生物缓冲液;(2)至少一种能减少分析试剂的非特异性结合,同时避免对特异性结合相互作用产生抑制的表面活性剂;(3)作为分散和悬浮剂的高分子量聚合物,其分子量范围从大约 2×10^2 至大约 2×10^6 D;(4)使多功能缓冲液的PH值维持在大约7.0至10.0之间的PH稳定剂;(5)减少抗体的非特异性结合的离子盐;(6)至少一种减少细菌和微生物生长的防腐剂;以及(7)一种防止全血样本凝集的钙螯合剂;其中生物缓冲液、表面活性剂、高分子量聚合物、PH稳定剂、离子盐、防腐剂以及钙螯合剂都在有效浓度上。

本发明的改进的多功能缓冲液组合物可以包括常规缓冲液,例如磷酸盐缓冲液、MES(吗啉代乙磺酸)缓冲液、BIS-TRIS缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、TRIS-HCL缓冲液以及硼酸盐缓冲液,有效浓度范围为大约5至100mm,优选范围为大约5至30mm,最优选的范围为大约5mm。较优选的缓冲液为磷酸盐缓冲液,其优选地包括磷酸钠、磷酸氢钠、磷酸二氢钠,浓度为保证缓冲液PH值有效的浓度。本发明缓冲液的PH值范围为大约7.0至大约10.0。

本发明中所采用的生物去垢剂(表面活性剂)可以包括非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、两性离子表面活性剂以及阳离子表面活性剂。用于本发明的非离子去垢剂包括聚氧乙烯甜菜碱月桂酸酯(Tween®20)、聚氧乙烯甜菜碱油酸酯(Tween®80)、聚氧乙烯醚(Triton®,Brij®)以及辛基酚乙烯氧化物(Nonidet®)。优选地采用非离子去垢剂。最优选的非离子去垢剂是Triton®X-100。非离子去垢剂充当分散剂,从而减少了抗体/抗原与反应膜的非特异性结合,这种非特异性结合是非特异性反应导致靶分析物连接到固相上的结果,它会导致分析背景的增加。尽管生物去垢剂通过无极或疏水相互作用减少了这样的结合,但是非离子去垢剂是优选的,因为它们在减少非特异性结合的同时还能避免抑制特异性结合。有效的生物去垢剂的浓度为从大约0.01至大约0.50%(W/V),优选地从大约0.05至大约0.10%(W/V),最优选的浓度为大约0.07%(W/V)。

离子盐提供了阳离子和阴离子的来源,这些离子有助于减少由于离子相互作用而引起的除分析物抗体之外的抗体非特异性结合的发生频率。能用于形成多功能缓冲液的盐是NaCl和KCl,最优选NaCl。氯化钠的有效浓度为从大约0至300mm,优选的为大约50至200mm。

高分子量聚合物的功能是作为分散和悬浮剂，同时还负责维持抗体的结合能力。缓冲液中可以采用的高分子量聚合物的例子是：聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、葡聚糖、聚乙二醇（PEG）以及聚乙烯醇等等。在生产缓冲液中，优选使用的高分子聚合物为 PVP；最优选的为 PVP-40，在其有效浓度上。本发明缓冲液的 PVP 的有效浓度范围从大约 0.1 至大约 3.0%（W/V），优选的范围从大约 0.5 至 2.5%，最优选浓度为大约 1.4%。本发明所选择使用的高分子聚合物可以包括分子量从大约 10KD 至大约 1500KD 的 PVP、分子量从大约 10KD 至大约 2000KD 的葡聚糖、分子量从大约 200D 至大约 10000D 的聚乙二醇（PEG）以及分子量从大约 10000D 至大约 100000D 的聚乙烯醇。其它高分子量聚合物的例子包括，聚凝胺（海地美溴铵）、甲基纤维素、阿拉伯胶、硫酸鱼精蛋白、Melquat(丙烯酰胺与二甲基-N-2-丙烯-1-氯化铵)、Celquat(季铵化纤维素醚)和麦格纳絮凝剂，以有效的浓度提供。

优选的是，在多功能缓冲液组合物中包括钙螯合剂，例如乙二胺四乙酸（EDTA）或其盐，从而减少或防止手指针刺取血的全血试检样品通过凝集过程可能导致的血凝块。钙螯合剂除了 EDTA 以外，同样可以使用例如柠檬酸、柠檬酸盐以及亚乙基双四乙酸。生物聚合物（即非螯合剂）例如肝素和硫酸脱乙酰壳多糖，也可以使用，它们将使血液凝集过程中的特异性凝集因子失活。被包括在缓冲液组合物中的 EDTA 的有效浓度从大约 5mm 至 100mm，更优选的为从大约 10mm 至大约 50mm，最优选为大约 20mm。

PH 稳定剂的功能是维持缓冲液的 PH 值范围在大约 PH7.0 至 10.0 之间。典型的 PH 稳定剂包括缓血酸氨氢氯化物，当然其它已知的稳定剂也可用于此组合物中。缓血酸氨氢氯化物的有效浓度优选地从大约 20 至 30mm。

7.0 储存箱

一般来说，包含试验单元和后置过滤单元的分析组合体可以容纳在合适的容器中，从而形成分析仪器。优选地，该容器应当保护固相材料和干燥的指示剂不被污染并且能为分析装置的处理提供便利。而且，容器应该是防漏的，从而确保流体的保存以及使用后的安全处理。

图 4 和 5 所示的装置 13 提供了这种容器的典型例子，它可以被包括在并入本发明的流通装置的试剂盒中。装置 13 包括两个可拆分的元件，即试验筒 14 和后置过滤罩 15，在分析期间当这两个元件以短暂流体相通被放置时就彼此垂

直并分开。储存箱能够在压缩下维持试验单元的多个层，从而在其间提供连续均一的接触，因而确保液体均匀地流过装置 13。储存箱由塑性材料制成，可以是任何能被模塑的各种一次性商业塑料，例如，聚乙烯、聚丙烯、苯乙烯、ABS、聚丙烯酸酯、聚苯乙烯及类似物。

尽管装置 13 的两个元件具有这里所描述的特定构造和尺寸，但是任何其它合适的设计或改变也是可行的，只要元件仍然能够在分析期间的单一移动中彼此短暂连接即可。连接这两个元件的方式并不重要，只要它们能正确对准，以便在后置过滤罩 15 与试验筒 14 的相互连接上实现最佳的流体相通。例如，根据图 4 和 5 所示的设计，后置过滤罩 15 可以与试验筒 14 的贮液槽 22 摩擦匹配。虽然在此没有示出，但是后置过滤罩 15 可以任意铰连至试验筒 14 上，从而避免两个元件可能丢失或错位。另一方面，这两个元件能够在单一水平移动中可滑动和翻转地向彼此靠拢，只要后置过滤单元啮合在试验单元之上的适当校准线上即可。在这个特定例子中，这两个元件的合适校准可以通过使用导轨来实现，或进行投影设计，以便与装置或储存箱中所形成的凹部校准，这还作为两个元件的相互连接方式。

储存箱的精确尺寸对于分析装置的功能不是必需的，但是一般地，装置具有便于运输、操作和装配的尺寸。储存箱的一般长度范围从大约 2 至 5cm，优选 3.5cm。宽度从大约 1 至 3cm，优选 2.5cm。储存箱的高度范围从大约 0.5 至 5cm，优选 1.3cm。

图 4 提供了包含试验单元 2 和后置过滤单元 3 的装置 13 的分解图，而图 5 提供了完全装配起来的装置 13 的放大垂直截面图。本发明的装置 13 在其完全装配形式下包含两个分离的元件，称为包括试验单元 2 的试验筒 14，以及包括后置过滤单元 3 的后置过滤罩 15。检测筒 14 和后置过滤罩 15 被设计成在分析期间短暂连接。装置 13 在设计和结构上倾向于简单，可以采用易于获得的材料制造。

如图 4 所示，装置 13 的试验筒 14 容纳试验单元 2，该单元包括顶部元件 16 和底部元件 17。底部元件 17 的外缘带有略微呈锯齿状的脊 18，它使得元件 17 与顶部元件 16 的边缘 19 相匹配并相互连接，从而形成装配好的试验筒 14。本领域技术人员应该明白，虽然图 4 和 5 中所示的试验筒呈矩形，但是该试验筒并不局限于这种特定的构造，只要它能在与反应膜 21 的直接接触中适合容

纳吸收材料或垫 20 即可。

包含在试验筒 14 的顶部元件 16 之内的是储液槽 22，它与试验单元 2 的暴露反应膜 21 呈直线。储液槽 22：(a) 提供了将液体试验样品引入反应区的凹部，(b) 为引入多功能缓冲试剂而提供了可行的后置过滤罩 15 的连接，以及 (c) 允许在除去后置过滤罩 15 之后观察反应膜 21 上的试验结果，即检测指示剂区上的颜色，或荧光，或其它信号。如图所述，围绕储液槽 22 的上表面略微弯曲并且向后延伸，从而在一部分反应膜 21 形成了杯状贮存末端。这样，被引入储液槽 22 中的试验样品的量不会被装置 13 中的任何元件分流。内壁 23 的构造和储液槽 22 的尺寸是这样选择的：即，储液槽 22 在分析过程中能与后置过滤罩 15 相连并形成可靠联合。优选地，储液槽 22 和后置过滤罩 15 都具有漏斗形构造。这样，在储液槽 22 和后置过滤罩 15 位于操作位置并且多功能缓冲液被施加到过滤罩 15 上时，这种构造将允许适量的缓冲液接触并通过少量表面积的反应膜 21。这样，通过选择与后置过滤罩 15 相匹配的储液槽 22 的尺寸，装置 13 的操作可以被简化，因而，例如，多功能缓冲液 12 在分析过程的单一步骤中可以被分送至储液槽 22。

根据图 4 和 5 所示的实施例，后置过滤罩 15 借助于储液槽 22 的内壁 23 与过滤罩 15 的外壁 33' 之间的磨擦匹配，可拆卸地连接至试验筒 14 的储液槽 22 上。也可以采用其它方式实现后置过滤罩 15 与试验筒 14 可拆卸的连接。此外，后置过滤罩 15 的外壁 33' 高度要略微低于储液槽 22 的内壁 23 的高度，这样在过置滤罩 15 连接到储液槽 22 上时，后置过滤罩 15 的基底 24 立即停止在反应膜 21 之上而不与其接触。储液槽 22 和后置过滤罩 15 的尺寸可以变化而不影响装置 13 的工作，尽管下述近似尺寸被确定是比较满意的：储液槽 22 具有 1.5cm 的顶部和底部直径以及 0.6cm 的厚度；后置过滤罩 15 具有 0.9cm 的底部直径、1.1cm 的顶部直径以及 0.5cm 的厚度。

如上所述，本发明的试验单元包括反应膜 21 和吸收垫 20，其中反应膜 21 的下表面受吸收垫 20 的上表面支持。反应膜 21 包含能与靶分析物结合的捕获试剂，反应膜 21 实质上限定出在分析期间各种特异性结合反应发生的反应区。如前所述，反应膜 21 可以由多种生物惰性、多孔材料形成。

直接位于反应膜 21 下表面之下并且与之流体相通的是限定出吸收区的吸收垫 20。在本发明易于制造并降低成本的实施例中，吸收垫 20 的整个上表面

通常与反应膜 21 的下表面直接毗邻。试验单元可以任选地包括反应膜 21 和吸收垫 20 之间的分隔装置，该分隔装置一般不能结合感兴趣的靶分析物。根据如图 4 所示的实施例，间隔层 25 的形式分隔装置使反应膜 21 的一部分与吸收垫 20 分离。虽然对于装置 13 的工作无关紧要，但是间隔层 25 能确保反应膜 21 就位并且使分析试剂均匀地从分析装置 13 的上表面流到下表面。

间隔层 25 具有由边缘 27 所限定出的开口 26，该边缘 27 具有与反应膜 21 相似的周长尺寸和形状，从而在膜 21 和间隔层 25 被密封在一起以形成压合块时，能使反应膜 21 的上和下表面进入。参照图 4，该图示出了装置 13 的一个实施例，反应膜 21 上表面的一部分完全被暴露，从而当进行诊断分析时液体试验样品和分析试剂可以被直接加入到反应膜 21。反应膜 21 的尺寸要能完全覆盖开口 26。优选地，反应膜 21 将具有与开口 26 相同的形状，但是尺寸比开口 26 略微要大，从而它能够在开口 26 的边缘与间隔层 25 的下表面密封在一起。然而，反应膜 21 和开口 26 的形状也可以不同并且不受图 4 所示构造的限制。这样，围绕开口 26 的边缘 27 和反应膜 21 暴露的上表面联合在一起基本上限定出试验区。而且，在装置 13 的试验筒 14 被装配之后，吸收垫 20 仍然能够接触直接位于反应膜 21 之下的反应膜 21 的下表面。间隔层 25 和吸收垫 20 的尺寸选择要与试验筒 14 的基底匹配，从而确保吸收垫 20 与反应膜 21 的下表面适当对准并且以流体相通。一般来说，吸收垫 20 上表面的表面积通常大于反应膜 21 的表面积，但与间隔层 25 的表面积相似。

所选择的吸收垫 20 具有的毛细孔径能够在不使用额外方式的情况下引导液体试验样品通过反应膜 21。这样，吸收垫 20 很方便地就可以既提高又直接引导试剂流过反应膜 21。吸收垫 20 具有足够的尺寸和组分，从而它能吸收多余的样品、指示剂和缓冲液。吸收垫 20 所采用的材料可以是任何渗透性且可湿性并且在分析过程中对所采用分析试剂完全呈惰性的材料。吸收垫 20 具有与容纳反应膜 21 的间隔层 25 基本上相同的周长尺寸和形状。吸收垫 20 的精确厚度对于本发明的功能来说不是必需的，一般从大约 2 至 10mm。

装置的第二个元件是漏斗形后置过滤罩 15，它能很快地提供在单次应用中完成分析所需的合适数量的多功能缓冲液。后置过滤罩 15 包括后置过滤单元 3 以及顶部和底部均为开放末端的内套筒 28 和外套筒 29。套筒 28 和 29 的底部开口 30, 30' 的尺寸决定特定分析所需的流速。容易得到的套筒的开口直径

为 12.6 至 15.2mm，优选地，开口 30，30' 的直径为 9.5mm。

在装配形式种，后置过滤罩 15 包含漏斗 31，该漏斗具有在其顶部向外延伸形成的凸缘 32，32' 以及支撑性侧壁 33，33'。外套筒 29 的支撑性侧壁 33 终止于基底 24。基底 24 的开口 30' 允许流体流过漏斗 31 而流入试验筒 14。本发明的后置过滤单元 3 通过后置过滤罩 15 的内套筒 28 和外套筒 29 而被安全地容纳在后置过滤罩 15 的基底 24 中。在外套筒 29 的基底 24 处一体形成的内领 34 能够支持后置过滤单元 3，从而在内套筒 28 摩擦匹配进入外套筒 29 时，后置过滤单元 3 能保持永久定位。

后置过滤单元包含限定出标记区且布满干式指示剂的过滤介质。干式指示剂在缓冲液加入到后置过滤罩 15 上之后，被多功能缓冲液再溶解和运输至反应膜 21。后置过滤单元 3 的过滤介质的选择对于发明是无关紧要的，可以是任何合适的吸收性、多孔或具有容积性的材料，只要多功能缓冲液和再溶解的指示剂能通过芯吸作用被运送即可。选择的标准是，当加入多功能缓冲液时，该材料允许再溶解并混合干式指示剂，并诱发缓冲液以及新溶解的指示剂转移至试验单元 2 的反应膜 21 上。

在使用装置 13 时为了便于操作，在后置过滤罩 15 的延伸凸缘 32 上安装了手柄 35，当过滤罩 15 固定到储液槽 22 时，它略微延伸至储液槽 22 边缘之外，使得从试验筒 14 到后置过滤罩 15 的过转移变得容易。

本发明试验筒的变型示例如图 7A 和 7B 所示，其中使血液分离区与反应区侧向流体相通，用于检测全血样品中的分析物。

如图 7A 所示，试验筒带有结构与底部元件 17 完全匹配的顶部元件 16，在这个特定实施例中，试验筒的顶部元件 16 限定出第一开口或储液槽 22 形式的内部凹穴。储液槽 22 的作用是：(a) 为多功能缓冲试剂的引入提供后置过滤罩的可行性连接，并且 (b) 允许在除去后置过滤罩之后观察膜上的试验结果，即检测指示区中的颜色或荧光或其它信号。这样，选择储液槽 22 的构造和尺寸的基本要点在于，它能连接到后置过滤罩上，从而实现在后置过滤单元的标记区和试验单元的反应区之间短暂的流体相通。

顶部元件与储液槽 22 相隔较短的横向距离，且限定出储液槽 104 形式的第二开口，如图所示，它具有倾斜边，或者可以是任何方便的形状或尺寸或构造，它在全血样品应用中能有效提供进入血液分离区第一端的凹穴。在把全血

样品引入储液槽 104 并且进行短暂的温育以使无 RBC 的流体沿着血液分离区充分分离和迁移到反应区之后, 后置过滤罩要可操作地连接到储液槽 22 上, 从而确保完成二步分析过程, 以使靶分析物的最终测定得以进行。

如图 7B 所示, 试验筒的底部元件 17 提供了具有多个作为吸收垫固体附件的支持壁的第一基底结构 105, 这样, 它能在适当的地方安全地接收或容纳吸收垫。此外, 还提供了具有多个作为血液分离区支撑架的具有相同高度的突出柱的第二基底结构 106。第二基底结构 106 相对于第一基底结构 105 的位置和构造是这样的: 在血液分离区位于底部元件 17 中的时候, 血液分离区与反应区相邻并位于其直角平面的水平线中。虽然在那里描述的基底结构 106 具有多个支持血液分离区的边缘和中心的支持柱和 / 或壁, 但是任何数量的结构或部署都是可行的, 只要血液分离区在试验筒是安全装配好的时候相对于反应区是安全而正确定位的。

8.0 方法

在实践中, 本发明的装置可广泛用于测定液体试验样品中靶分析物的存在, 它采用至少一种捕获试剂, 以便在反应膜上形成可检测的产品来指示样品中分析物的存在。分析装置和仪器尤其适于免疫分析, 其中样品成分是免疫对的组分之一, 包括抗原、抗体或半抗原。免疫对包括两个免疫学上彼此结合的成分。特异性免疫对包括抗原及其抗体 (单克隆抗体或亲合纯化多克隆抗体, 包括其片段), 或者生物学功能半抗原及其抗体。虽然单克隆抗体比多克隆抗体具有已知的优点, 但是这两种免疫试剂都可以用于本发明。这样, 为简化起见, 本发明的分析方法和装置在免疫分析中的应用将采用抗原-抗体免疫对来说明。液体试验样品是生物学提取的, 例如尿液或血液, 捕获试剂和指示剂可以包含抗体或抗原, 这取决于感兴趣的分析物以及是否采用夹心或竞争性技术。

采用本发明的分析装置进行免疫分析非常简便而快速, 并且能够定性或半定量。分析装置可以在许多不同类型的分析中使用。例如, 靶分析物可以是激素、抗体、抗原、蛋白质等。非穷举的可能的靶分析物列表被美国专利 US5,006,464 (chu 等人) 所公开。免疫分析的形式取决于待检测的靶分析物, 这是本领域人员公知的。本领域人员应该清楚, 为了使特定靶分析物检测得到最大灵敏度, 可以改变分析装置和 / 或分析过程的各个组分, 例如用于制造反应膜的材料孔积率、厚度和类型。分析中所采用的分析装置要求无样品处理

并且整个分析过程在不到 1 分钟的时间里完成。

本发明的分析装置可用于各种流通免疫分析过程，包括竞争性和更好的夹心分析。如上所述，反应膜被捕获试剂包被，通常是特异性抗体或其片段。可替换地，如果靶分析物是抗体，捕获试剂是特异性抗原。在这两种情况下，在捕获试剂被施加到膜上之后，优选的是，采用惰性蛋白质填满所有未被占用的结合位点，以防止任何其它分析试剂非特异性的结合，例如指示剂结合到膜上。在本发明公开的内容中，术语“惰性蛋白”指的是，与分析中的任何其它成分都不发生免疫等活性反应并且基本上不与分析介质中其它蛋白非特异性结合的蛋白质，要理解的是，惰性蛋白可以与不构成本发明分析部分的其它材料发生免疫活性反应，代表性而非限制性的合适惰性蛋白例子是，白蛋白和酪蛋白。

首先对于测定抗原的夹心分析而言，捕获试剂将是待测定抗原的特异性第一抗体，而指示剂将包含待测定抗原的特异性第二抗体。第一抗体，优选单克隆体或亲和纯化多克隆抗体，结合在反应膜上作为捕获试剂。第一抗体的选择取决于它识别和结合感兴趣的抗原上特异性位点的能力。形成指示剂的一部分的第二抗体的选择基础是，它能识别和结合到感兴趣的抗原的另一个不同位点上，这样不会干扰第一抗体与抗原的相互结合。本领域人员将明白，通过颠倒抗原和抗体的角色，也可以实现夹心分析。例如，免疫对的固定化成分可以是抗原，用于检测试验样品中感兴趣的抗体，而采用标记的抗人抗体或蛋白 A 作为指示剂。

结合图 4、5 和 7，采用不同于全血的流体样品，本发明的方法通过储液槽的引导直接将一定体积的流体沉积在反应膜 21 的上表面上。经由储液槽 22 施加到分析装置 B 的液体试验样品和多功能缓冲试剂的数量根据本发明不同实施例而有所变化。一般地，对于给定的实施例，加入预先决定的且未稀释的试验样品，而多功能缓冲液通常过量加入。预定体积的样品优选地采用标准无菌移液管来滴加至储液槽 22 的中心，以便维持样品和固定化捕获试剂之间的均匀连接。在本发明的一个优选实施例中，仅需要在储液槽中加入一滴液体实验样品。当液体试验样品通过毛细管作用引导流过吸收垫 20 时，任何存在于试验样品中的游离抗原都开始与固定在反应膜 21 表面的抗体相接触。当液体试验样品扩散进入下层吸收垫 20 时，游离抗原被抗体固定。后置过滤罩 15 随后与试验筒 14 的储液槽 22 连接并形成可靠的联系。预定体积的多功能缓冲液被

储液槽中的标记物所测定，或优选地采用第二个标准无菌移液管来滴加。缓冲试剂滴加至后置过滤罩 15 的中心应该促进后置过滤单元 3 的均匀连接和渗透，以便使干式指示剂完全再溶解。而且，缓冲试剂的体积应该在特异性结合相应作用发生之后足以从反应膜上分离任何未结合的指示剂。在缓冲液流接触并随后散布过反应膜 21 时，未结合的试剂与结合的试剂分离，根据本发明的优选实施例，10 至 15 滴缓冲液可以被加入到后置过滤罩 15 上。在加入多功能缓冲液且随后包含标记抗体的干式指示剂再溶解时，标记抗体被缓冲液转送至反应膜 21，在那它将与被固定抗体结合的任何抗原结合。由于多功能缓冲液的体积和化学性质，无需为了去除未结合的标记抗体的单独洗脱步骤。随后测定反应膜上标记抗体的存在，以指示样品中靶抗原的存在。标记抗体与抗原的结合反应产生表示阳性结果的视觉可测的信号，在除去后置过滤罩 15 之后很容易直接观察到该结果。

本发明也适合于竞争性结合技术，例如美国专利 US4,366,241 (Tom 等人) 公开的内容。在这样的用于检测液体试验样品中的抗原的系统中，免疫对的对对应成分即抗体被固定在反应膜 21 的表面。然而，指示剂的结合成分将是具有与固定在反应膜 21 的抗体竞争性结合亲合力的靶抗原的可靠样品。在液体试验样品沉积在反应膜 21 上之后，如果存在抗原，则指示剂中的辅助抗原竞争与抗体结合的位点。由于固定抗体有限，样品中的抗原和标记抗原发生竞争。如果在试验样品中没有抗原存在，标记抗原就聚集在反应膜 21 上。这样，颜色的存在显示阴性结果，即样品中缺乏可检测水平的抗原。如果抗原存在，由于具有已被靶抗原占据的结合位点的固定抗体所结合的标记抗原数量减少，因此导致颜色不会加深。相应地，标记物发出的信号与样品中抗原的数量呈反比。而且，与夹心分析相比，竞争性结合分析的完成是通过颠倒抗原和抗体的角色。例如，免疫对中的固定成分是抗原，用于检测与标记抗体竞争的试验样品中感兴趣的抗体。

作为进一步的考虑，本系统通过采用相应数量的在反应区上固定的免疫试剂，可以扩展到包括液体试验样品中两种或更多种感兴趣分析物的同时检测。作为例子，所选择的第一抗体可以具有与不同抗体的特定亚基的反应活性。如果第二抗体仅仅对一种抗原的亚基特异，这样的第二抗体就可以被用作固定抗体，并且单个的标记第一抗体可被用作感兴趣抗原的广泛标记抗体。另一方面，如果预测到能被合适的结合伴所识别的抗原可能存于液体试验样品中，则可采

用两种不同类型的固定抗体，例如在一个共同感染患者样品中所发现的抗 HCV 抗体和抗 HIV 抗体。

在分析全血样品的情况下，本发明的方法基本上与以上相同，只是一定体积的样品被直接沉积到储液槽 104 中，该槽通过其内限定的开口与血液分离区直接接触（也参考图 7A）。施加到储液槽 104 的全血样品的量和施加到储液槽 22 的多功能缓冲试剂的量可随本发明实施例的不同而变化。一般，对于给定的实施例，将加入预定的并且未稀释量的试验样品，而多功能缓冲试剂通常是过量的。预定体积的样品优选地采用标准无菌移液管来滴加至储液槽 104 的中心，从而确保试验样品和血液分离区的均匀接触。在本发明的优选实施例中，仅需要在储液槽 104 中加入两滴全血样品。在短暂温育后，含任意抗原的无 RBC 的全血样品部分沿血分离区横向迁移至反应膜 21。由于无 RBC 的液体试验样品在毛细作用下被引导流过吸收垫 20，因此可能存在于试验样品中的任意游离抗原开始与固定在反应膜 21 表面的抗体接触。当液体试验样品带着非必需成分浸润进入吸收垫 20 下面时，游离抗原与抗体结合。后置过滤罩 15 随后与试验筒 14 的储液槽 22 连接并形成可靠联合。预定体积的多功能缓冲液可通过储液槽 22 的标记物来测定，或优选地采用第二个标准无菌移液管滴加。缓冲试剂滴加至后置过滤罩 15 的中心应该促进后置过滤单元 3 的均匀接触和渗透，以便使干式指示剂被完全再溶解。而且，在特异性结合相互作用发生之后，缓冲剂的体积应该足以使任意未结合指示剂从反应膜 21 分离出来。在缓冲试剂流接触并随即浸润反应膜 21 时，未结合的试剂与结合反应剂相分离。根据本发明的优选实施例，可添加至后置过滤罩 15 的缓冲液为 10 至 15 滴。在加入多功能缓冲液且随后包含标记抗体的干式指示剂再溶解时，标记抗体被缓冲液转移至反应膜 21，在那它将与被固定抗体结合的任意抗原复合。鉴于多功能缓冲液的体积和化学特性，无需为了去除未结合的标记抗体而采用单独的洗脱步骤。然后，测定反应膜 21 上标记抗体的存在，以指示样品中靶抗原的存在。标记抗体与抗原的结合反应产生了指示阳性结果的视觉可检测信号，在除去后置过滤罩 15 之后很容易观察到该结果。

9.0 检测试剂盒

根据本发明，生产的试剂盒包括快速分析装置、多功能缓冲液，以及描述液体样品中测定靶分析物存在的分析方案的说明书。本发明的诊断装置包括试验单元和后置过滤单元，通常以诊断试剂盒形式包装，以便用于感兴趣靶分析

物的测定。一般，试剂盒包括流通分析装置（优选地贮存在合适的容器中）、多功能缓冲液、一次性塑料移液管和描述实现分析方法的方法的说明书。根据所完成分析的类型（即夹心或竞争型）以及待测定的液体样品中的靶分析物，说明书中包括分别加到试验单元和后置过滤单元中的相应数量的试验样品和多功能缓冲液。此外，还将包括样品和缓冲液的加入所需的时间段和产生结果所需的时间。

本发明的优选试剂盒采用图 1—3 所示和描述的流通诊断装置。优选地，流通诊断装置被容纳在可包括在检测试剂盒中的合适容器内，该装置包含两个可拆分元件，每一元件单独包含试验单元和后置过滤单元，它们以垂直、间隔形式排列。特别是，容器的设计应该允许试验单元和后置过滤单元彼此可靠连接，以使反应区和标记区在分析进行期间的单一移动中彼此以短暂流体相通来定位。贮存试验单元的容器应该在压缩下能维持试验单元层，从而为各层之间提供连续而均匀的接触，以使流体均匀流过装置。图 4、5 和 7 提供了能被包括在检测试剂盒中、并入本发明流通装置的容器类型的示例。

本发明通过随后的非限制性例子将得以更进一步的理解。随后提供的例子仔细描述了本发明的优选的方法和材料。提供这些例子的目的是说明本发明的构思，而不是意图限制本发明的范围，本发明的范围由权利要求书来限定。

10.0 例子

以上是对本发明装置、方法和试剂的概述。夹心型反应可以用来检测 *Helicobacter pylori*。这样，借助以下提供的实例，捕获试剂是施加到试验单元的反应膜上的 *Helicobacter pylori* 溶液。虽然染料溶胶、金溶胶或带色乳胶颗粒都可以连接到蛋白 A 上，以形成指示剂，但是在本例中所采用的优选可视标记物是胶体金颗粒。采用包含试验单元和后置过滤单元的装置（例如如图 4 和 5 所示），以及通过本发明的二步快速分析，可以在不到 3 分钟的时间里测定血清试验样品中的抗 *Helicobacter pylori* 抗体。

10.1 诊断分析装置的制备

图 4 和 5 所示的装置 13 包含试验筒 14 和后置过滤罩 15，它代表了容纳本发明的试验单元 2 和后置过滤单元 3 的合适容器。

A、试验筒

容纳快速检测装置的试验单元的试验筒是由清洁的工业级白色聚丙烯塑料制成，并且具有顶部元件 16 和底部元件 17。两者由 16 孔膜同步制成，并且精

确设计,以确保这两个元件压在一起时能紧密贴合密封。这些元件由香港的 Top View 国际有限公司单独包装提供,并且在加拿大的哈利法克斯 Med Mira 实验室的制造工厂装配。

- 外观: 清洁的白色光滑塑料结构。
- 牢固的配合,以产生防漏容纳效果,从而确保安全容纳所有施加液体。
- 严格保持尺寸规格: 2.5cm 宽, 3.5cm 长, 1.3cm 高。
- 严格保持储液槽 22 开口的尺寸为: 直径 1.6cm, 所形成的筒深为 0.5cm。
- 储液槽 22 的位置严格保持在试验筒 14 的顶部元件中。

B、反应区

用于反应区的材料是一种膜 21, 例如硫酸纤维素, 其平均孔径为 0.45 微米 (Whatman, 英国) 并且切割成 12mm×12mm。膜 21 是 0.2mm 厚纸背衬的硫酸纤维素并且经特殊处理, 以增强对蛋白质的结合能力。由制造商 (whatman, 英国) 给出的规格说明书表明, 它具有 80—90mg 蛋白质/cm² 的结合能力, 6ml/min/cm² 的水流速以及 3.5bar 的起泡点。所制备的反应膜 21 具有两个免疫活性检测位点, 称为检测区和控制区, 每个区以不同垂直线的形状制备。控制线和检测线相互垂直但不接触, 两者之间相互提供了清楚的差异。膜的检测区通过采用印刷装置 (Bio jet Quanti 3000 分配器) 施加 *Helicobacter pylori* 的磷酸盐缓冲液 (PH 7 至 9.5) 而得以制备。控制区通过施加一种特异性校准抗原制备物而类似地被制备, 该抗原制备物能与通常存在于生物液体试验样品中的所有 IgG 抗体簇结合而不考虑 *Helicobacter pylori* IgG 抗体状况, 这样就用作控制区。膜在室温中干燥 10 分钟后, 用 1%牛血清白蛋白的 0.1M 磷酸钠缓冲溶液进行处理, 并且在外界温度中完全干燥大约 24 小时。

C、任选的间隔层

支持反应膜 21 的间隔层 25 可通过确保反应膜 21 上表面的外缘处于间隔层 25 的下表面内而制备, 从而使反应膜 21 的上表面通过间隔层 25 的开口暴露出来。反应膜 21 的上表面采用抗流体粘合剂密封到间隔层的下表面, 从而在限定出开口 26 的间隔层 25 的边缘 27 和反应膜 21 未暴露的上表面之间形成不透性密封。这种安排有助于使流体相对于横截面向下直接通过反应膜 21, 并且进入吸收垫 20 下面。所购买的间隔层 25 可以是带有水溶性粘合剂已贴附在下表面的或者在制造过程中施加粘合剂。间隔层 25 是一种聚苯乙烯材料, 其中插入了棕色纸背衬双面带 (Hatifax Folding 公司, Nova Scotia, 加拿大)。反应膜 21 通过双面带固定至间隔层 25。装配好的间隔层 25 大约有 29.0mm×20.5mm

的面积,厚度为 1.0mm,并且位于吸收垫 20 的上表面,而吸收垫则位于试验筒 14 的基底,如图 4 和 5 所示。

D、吸收区

吸收区包含垫 20,它直接位于反应膜 21 下面,并且固定在试验筒 14 的底部元件 17 内。垫 20 由孔积率为 40ml/min 的加厚加压的醋酸纤维素构成 (Filtrona, Richmond 有限公司, Richmond, VA)。它由合成纤维制成,而不采用树脂或粘合剂,具有极好水平的含水流体容纳性。特异性空间为 80 至 85%,可吸收 6 倍干重的流体至全部空间体积的 90%。它对 2.5 至 9.5 的 PH 具有抗性。垫 20 被割成特定形状,即 2.2cm 宽度,3.2cm 长度以及 0.5cm 高,垫 20 牢固地配置在试验筒 14 的底部元件 17 内,从而形成被压缩的反应膜 21 与吸收垫 20 的复合体,以确保多孔材料之间的连续流体相通,从而在试验样品被施加至反应膜 21 时增加水压和完全吸收。

E、后置过滤罩

容纳快速检测装置 13 的后置过滤单元 3 的后置过滤罩 15 包含带有处于基底上的内领 34 的外漏斗套筒 29、带有向外延伸手柄 35 的内漏斗套筒 28,以及后置过滤单元 3。漏斗套筒 28,29 和手柄 35 由塑料材料模塑而成。一种优选的塑料材料是聚苯乙烯树脂 (Fouzhou Chimplus 化学品有限公司,中国)。外套筒 29 和内套筒 28 呈圆筒形,外侧直径分别为 15.0mm 和 12.5mm,装配好的罩 15 可完全匹配进入试验筒的储液槽 22。后置过滤罩 15 被设计用来在将试验样品后加入到储液槽 22 中之后连接试验筒 14,并且在多功能缓冲液被添加并浸润过滤罩 15 的后置过滤单元 3 之后立刻移走。在装配好的形式下,后置过滤罩 15 的体积容积为大约 0.5ml。

后置过滤单元 3 的标记区包含一个充满指示剂的过滤层,它将与试验单元 2 的反应区直接流体相通,从而提高胶体金结合抗体与抗原包被的反应膜 21 之间的反应活性。过滤器包含带 OVA 结合子的玻璃微纤维 (Whatman, GF/AVA),该材料是白色的,基本重量为 48g/m²,厚度为 0.303mm,流速为 150s/1.5cm,干张力为 640g/1.5cm,湿张力为 324g/1.5cm 以及孔积率为 3sec/100ml/in²。一旦装配好,冷冻干燥的胶体金结合体可通过用含有 10%糖的 0.1—0.15ml RBS 缓冲液 (0.6—0.7mm 氯化钾、0.03m 氯化钠、2—2.1mm 无水正磷酸氢二钠、0.3—0.4mm 单磷酸钾) 溶液进行处理而再生。将胶体金结合体溶液 (0.1 至 0.15ml) 分配至每个过滤器上,并随后在 37 至 40°C 温度下干燥。过滤层根据如下规格切割:厚度为 790

至 830 微米; 孔积率为 1.6 至 2.0s/100ml/in²; 张力为 14.5N/55mm; 流速为 67s/7.5cm; 吸收率为 76.4%; 孔径尺寸为 4.3 微米; 毛细作用为 1.00min:sec; 直径为 0.42mm。

10.2 检查蛋白质 A (PA)

配方

氯化钠

10%于去离子水中

BSA

1%BSA 于去离子水中, PH5.0 至 9.00 (最佳 PH6.0)

胶体金

如上 PH 步骤中制备。

标记材料的储备液

起始浓度稀释在 DDI 中至终浓度为 0.1—2mg/ml (最佳 0.1mg/ml)

方法

——制备 9 次连续稀释的蛋白质 A (PA)

——在 PA 稀释液中以 1:10 的比例加入已调好 PH 值的胶体金 (即在 0.1ml PA 稀释液中加入 1ml 胶体金)

——温育 10 分钟。

——在每个稀释管中加 8—10%的氯化钠至终浓度为 1% (最佳为 0.9%)。

——温育 5 分钟。

——在每个管中加入 0.07—0.1%的牛血清白蛋白至终浓度为 0.1% (最佳为 0.08%)

——在 520nm 处读取吸收值

——确保蛋白质浓度是能抑制沉淀的最小量。

浓度 (ug)	吸收值 1	吸收值 2	平均值
0	0.313	0.314	0.314
2	0.524	0.524	0.524
3	0.533	0.532	0.533
4	0.533	0.533	0.533
5	0.540	0.540	0.540
6	0.575	0.571	0.573
7	0.580	0.580	0.580
8	0.576	0.583	0.580
9	0.576	0.576	0.576

Hughes D.A.&J.E. Beesley(1998) 在 J.D. Pound 中制备胶体金探针. *Methods In Molecular Biology* vol 80: Immunochemical Protocols, 2nd edition. Human Press Inc., Totowa, NJ

10.3 胶体金结合物的制备

材料

柠檬酸钠 0.3mM 在去离子水中

BSA 1%BSA 在去离子水中, PH5.00 至 9.00

PEG 1%聚乙烯乙二醇(分子量 15,000 至 20,000) 在去离子水中,
PH 调至 6.00

磷酸盐缓冲液 混合 0.04M (去离子水中) 的 NaH_2PO_4 至 0.07M (水中) 的 KH_2PO_4 中, 比例为 1: 4.4, PH 调至 6.00

Hepes 缓冲液中的蛋白 A 蛋白 A 在 Hepes 缓冲液 (0.025M hepes 和 0.25mM 硫汞撒, 在 DDI 水中, PH7.00) 中的终浓度为 1mg/ml。

硼酸盐缓冲液 0.05M 硼酸钠在去离子水中, PH 为 8.50。

再悬浮缓冲液

8mM 无水正磷酸氢二钠

1%牛血清白蛋白

3mM 叠氮化钠

0.02%聚乙烯乙二醇

0.14—0.15M 氯化钠

1.5mM 正磷酸二氢钾

2.7mM 氯化钾

4.3mM 正磷酸三钠

在 1000ml 去离子水中混合上述试剂, PH 为 7.3 至 7.5。

过程

——将 1%的四氯化金酸加入水中至终浓度为 0.01%。

——让溶液达到猛烈沸腾点。

——在回流上以 30 分钟时间加入 15ml 0.3mM 柠檬酸钠

——移动长颈瓶使内容物冷却至 40°C 或更低。

——将 60ml $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 的磷酸盐缓冲液 (0.04M 在 DI 水中) 以 1:44

的比例加入到 0.07M (在水中) KH_2PO_4 中, PH 调至 6.00, 或加入到 50mM 硼酸盐缓冲液中, 如果 PH 太低加入数滴 2mM K_2CO_3 。

——将溶液的一部分除去, 以进行聚集检测, 从而了解配体加入金溶液中的浓度。

——加入蛋白 A 至终浓度为 5—9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +5%(最佳为 6+0.3=6.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

[最终 PA+5%] (mg/l) $\times$ 长颈瓶整体积 (L)

[起始 PA] (mg/ml)

即 总体积=500mlCG 和 dH_2O +15ml 柠檬酸钠+60ml 磷酸盐

缓冲剂—3ml PH 检测本=572ml=0.572L

(6+0.3) mg/L $\times$ 0.572L/1mg/ml=加入 3.60ml 蛋白 A

——溶液持续过程为 15—30 分钟 (最佳 20 分钟)。

——通过加入 10%牛血清白质, PH5.00 至 9.00, 至终浓度为 0.1%, 搅拌 5—15 分钟 (最佳 10 分钟) 而停止配体的吸收。

——以 46500g (20,000rpm), 温度 4—5°C, 50 至 80 分钟离心标记的胶体金。

吸出及再悬浮

在真空长颈瓶的帮助下吸出上层物, 小心不要扰动小球。在再悬浮缓冲液 (or RBS—BSA) 中再悬浮至最终视觉密度为 520nm 处的 1.180 至 4.500 (最佳 2.00)

冻干过程

在达到合适的光学密度后, 溶液以 0.6ml 的整分部分倒入 3ml 玻璃瓶中。将开槽的塞子 (直径 1mm) 中途插入瓶中并转移至冻干架上。维持 -4°C 温度 5 小时。初步干燥是在小于 100m Torr 的真空下且架温度为 -30°C 下进行的, 时间为大约 3 小时, 而冷凝器温度低于 -80°C。随后架上温度为 -10°C 5 小时, 然后架上温度变为 0°C, 真空为 0m Torr 持续 2 小时。

第二步干燥在 +20°C 进行 4 小时。在最后, 瓶子带着开槽的塞子被放在真空中。然后将产品从架上移走并进行功能检测, 以确保产品质量。样品留着供以后参考。

10.4 胶体金结合物的稳定化

过程

——制备在 RBS 溶液中的 1%，2%，5%和 10%的蔗糖，PH7.0—7.5。

——采用 (a) 5 滴 (150ul) ,(b)10 滴 (350ul) 和 (c) 15 滴 (650ul)

有各自蔗糖百分比的溶液再生冻干胶体金结合物。

——加入 5 滴 (150ul) 各再生液至过滤介质。

——空气中完全干燥。

样品	结果			
	1%	2%	5%	10%
对照线	2+	2+	2+	3+
阳性对照	1+	1+	1+	2+/3+
阴性对照	neg	neg	neg	neg

10.5 后置过滤单元的制备

诊断检测的目的之一是开发需要较少步骤的检测装置。因此，通过使指示剂与后置过滤单元 3 的过滤介质联合，可以消除额外的步骤，即在分析期间单独加入试剂至诊断装置中的步骤。

材料

——胶体金结合物，如前所述制备和冻干。

——糖，例如漏芦糖，乳糖，蔗糖，葡萄糖，甘露糖，果糖等。

过程

——采用 0.1—0.15ml 含 10%蔗糖的 PBS 缓冲液 (0.6—0.7Mm 氯化钾，0.03M 氯化钠，2—2.1mM 无水正磷酸氢二钠，0.3—0.4mM 单磷酸钾) 再生冻干了的胶体金。

——在每个过滤器上散布 0.1 至 0.15ml 胶体金溶液。

——让过滤器在 37—40°C 中完全干燥。

10.6 多功能缓冲液的制备

配方

0.01—0.1M EDTA

0.02M 叠氮化钠

0.05—0.1M 氯化钠

6mM 无水正磷酸氢二钠

0.1—0.25mM 乙基汞硫代水杨酸钠

0.05—0.1%Triton X—100

0.02—0.03M 氯化缓血酸胺

0.2—0.3%Tween—20

0.5—2.5%DVP—40

过程

——将所有成分与（0.01—0.1MEDTA，0.02M 叠氮化钠，

0.05—0.1M 氯化钠，6mM 无水正磷酸氢二钠，0.1—0.03M 氯化缓血酸胺，0.2—0.3%Tween—20，0.5—2.5%PVP—40）一起加入。

——用去离子水加满

——调节 PH 至 7.00-10.00

10.6 分析过程

血清或血浆样品

采用清洁的移液管将一滴血清或血浆样品加至反应膜的中心，并且使样品完全吸收通过膜并进入吸收材料垫。

后置过滤罩与试验筒的储液槽相连，以使后置过滤单元与试验单元流体相通。随后将 10 至 15 滴多功能缓冲液加入到后置过滤罩的漏斗中。在大约 1 分钟的温育后，将后置过滤罩从试验筒上移走，而在温育期间再溶解时胶体金结合物流过后置过滤单元。一离散带色线，一条垂直对照线以及一条检测线形成于反应膜中心，以指示试验样品中 *Helicobacter pylori* 的存在。分析结果的显示大约要 3 分钟。

工业应用

这里所介绍的快速诊断装置、分析方法和多功能缓冲液，以及用于生产多功能缓冲液的方法、检测试剂盒和配方，为液体样品中靶分析的测定提供了改进的方式。

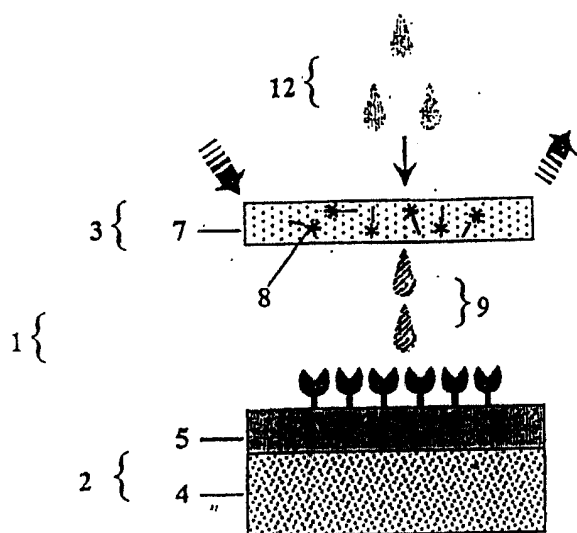


图 1A

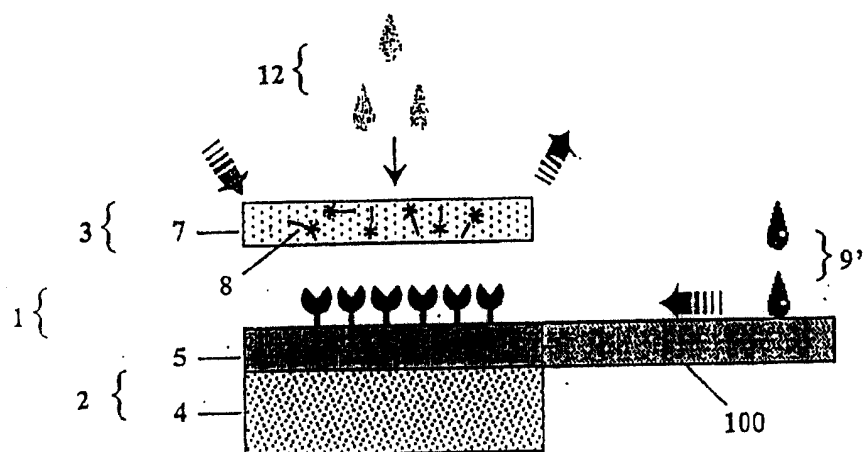


图 1B

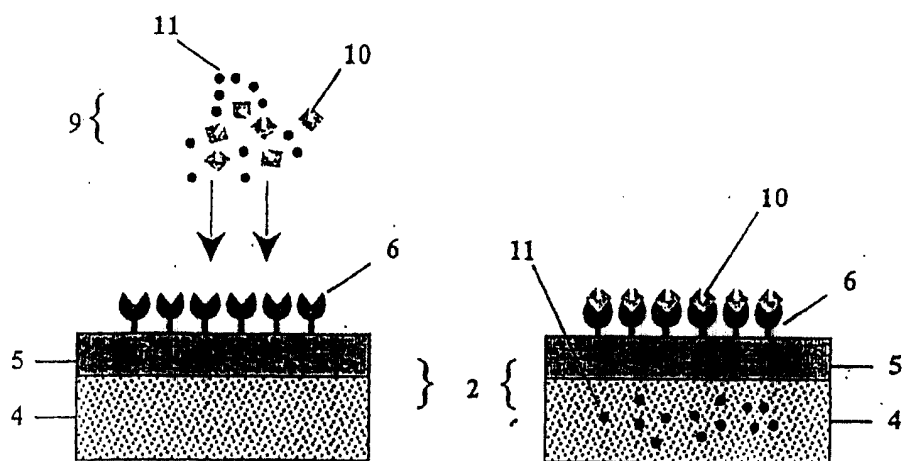


图 2A

图 2B

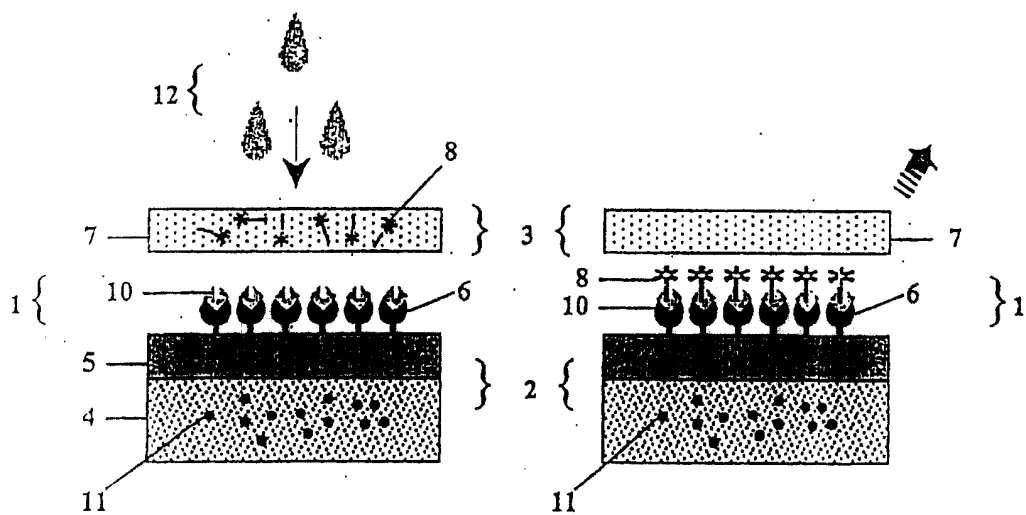


图 2C

图 2D

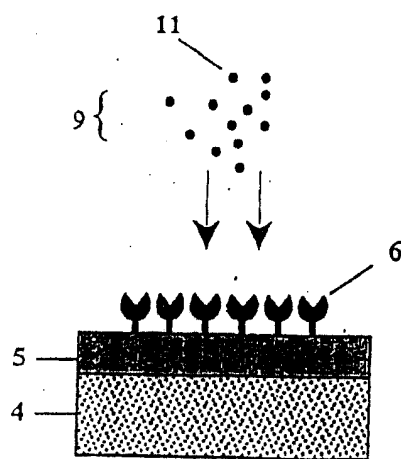


图 3A

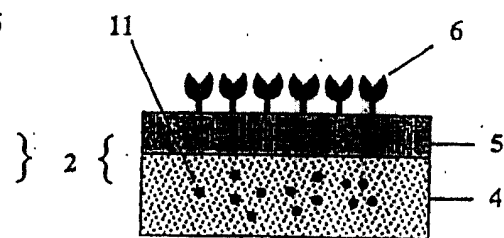


图 3B

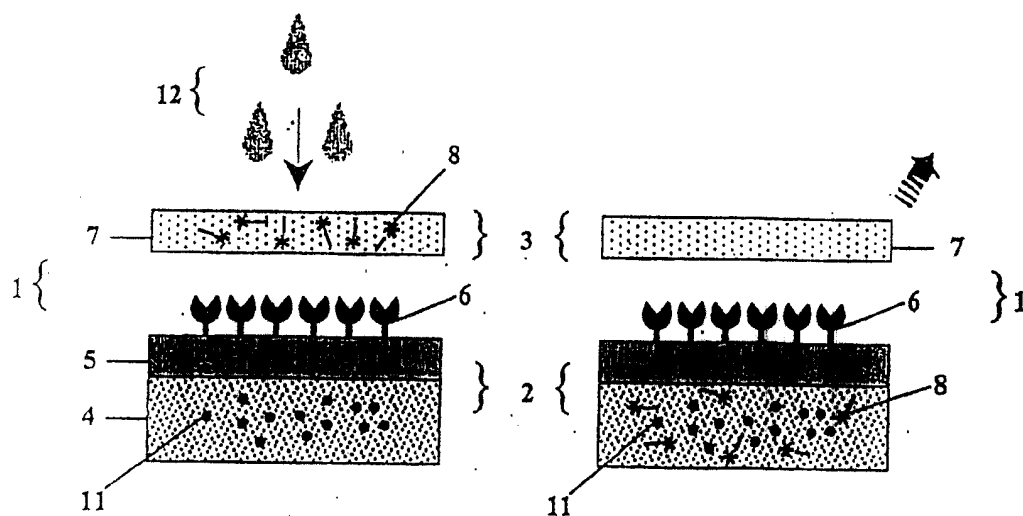


图 3C

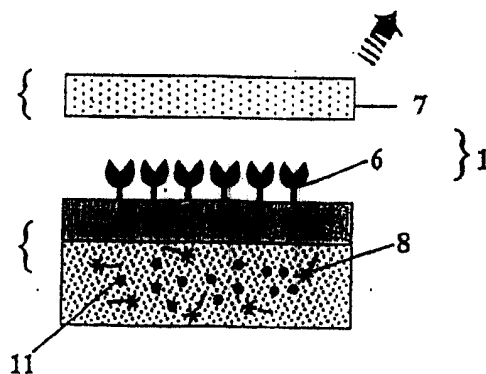


图 3D

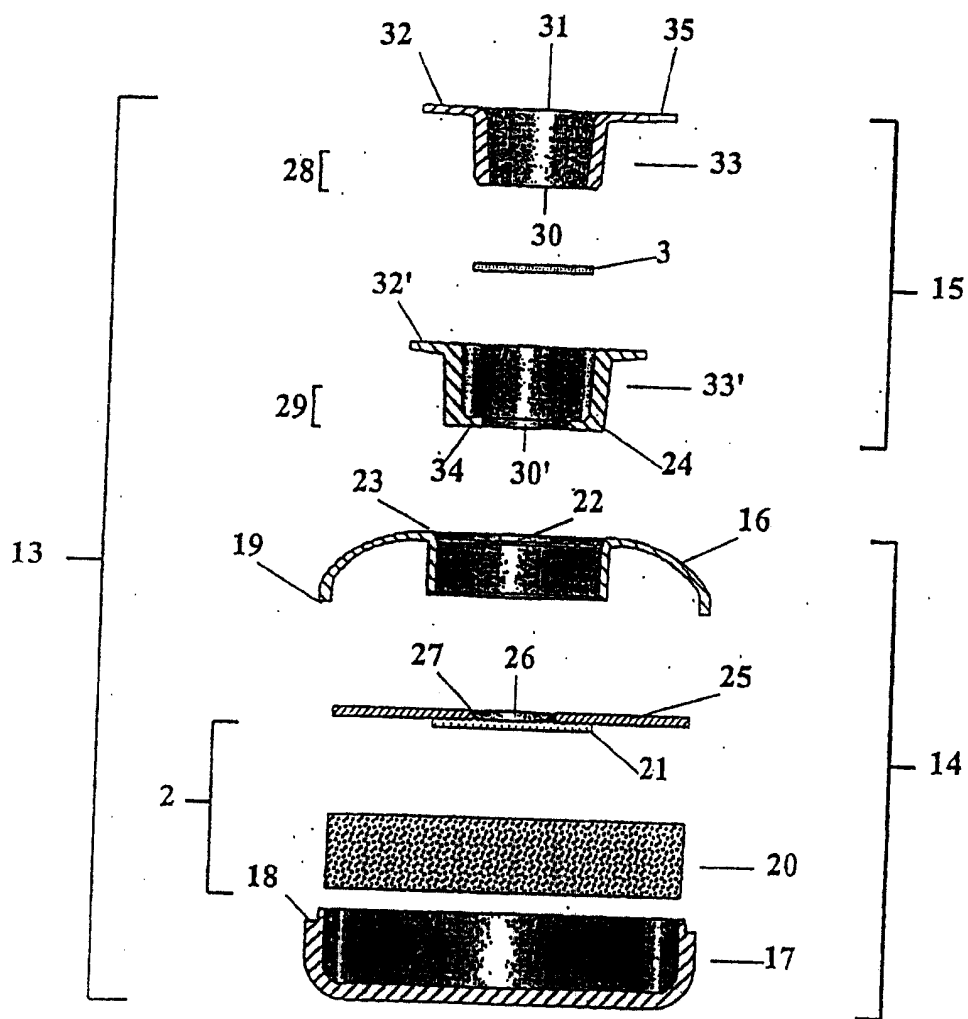


图 4

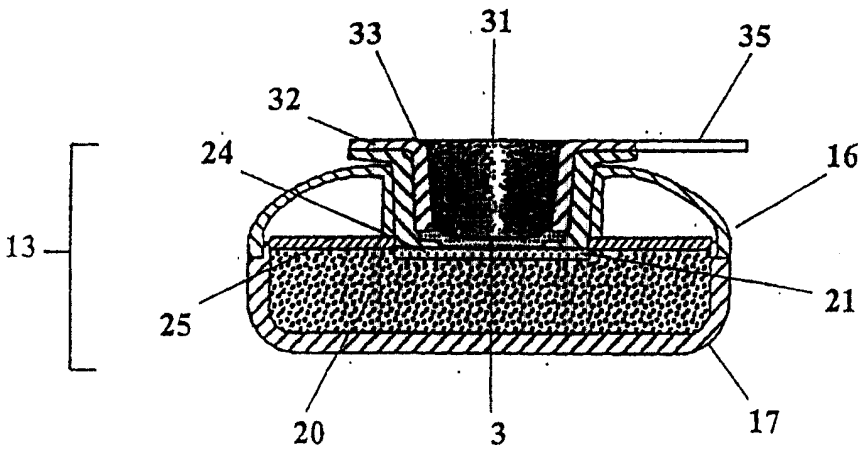


图 5

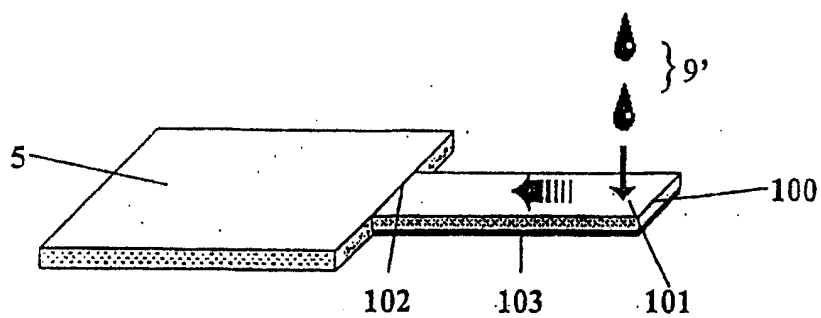


图 6

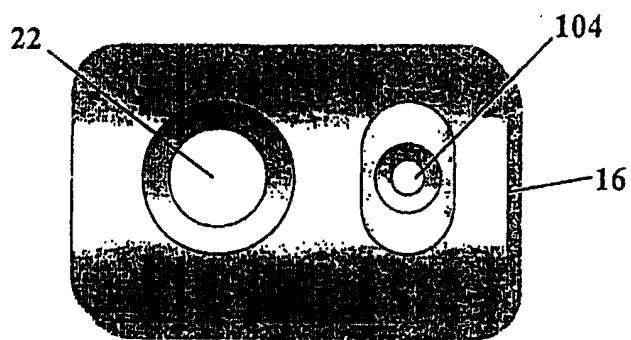


图 7A

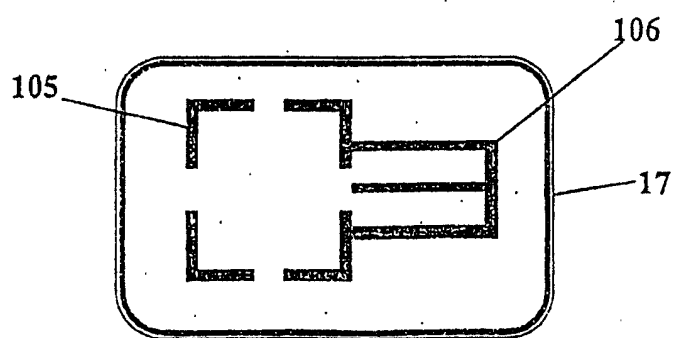


图 7B