



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104246502 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201380015233. 2

(22) 申请日 2013. 03. 19

(30) 优先权数据

1260120 2012. 10. 24 FR

61/612, 564 2012. 03. 19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2013/050588 2013. 03. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/140089 FR 2013. 09. 26

(71) 申请人 米洛万·斯坦科夫

地址 法国普莱斯

(72) 发明人 米洛万·斯坦科夫

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 刘金辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

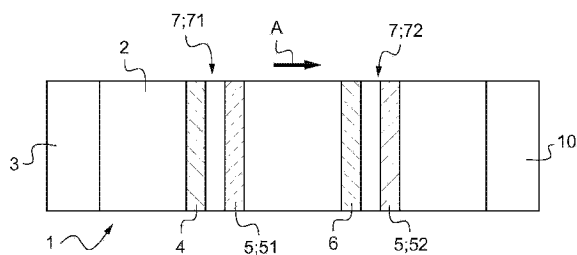
权利要求书2页 说明书23页 附图3页

### (54) 发明名称

用于测定至少一种能够包含在液体样品中的分析物的装置

### (57) 摘要

本发明涉及用于测定至少一种能够包含在液体样品中的分析物的存在和 / 或量的装置, 所述装置包含毛细扩散工具 (2), 在其上实现用于存放液体样品的区 (3)、上游释放区 (4) 和至少两个捕获区 (5)。装置 (1) 也包含位于所述捕获区 (5) 中的至少一个的下游的至少一个下游释放区 (6), 所述下游释放区 (6) 包含与可见的和 / 或可测量的标记物缀合的至少一种检测试剂; 并且释放区 (4, 6) 的检测试剂和 / 或位于所述释放区 (4, 6) 的直接下游的额外的捕获区 (5) 的捕获试剂, 适于特异性结合所述分析物和 / 或彼此特异性结合, 以形成复合物, 所述复合物使得能够在所述 (一个或多个) 额外的捕获区处测定所述液体样品中的所述分析物。



1. 装置,其用于测定至少一种能够包含在液体样品中的分析物的存在和 / 或量,所述装置包含毛细扩散工具 (2),在所述毛细扩散工具 (2) 上所述液体样品意图根据毛细迁移的方向和指向侧向迁移,并且在所述毛细扩散工具 (2) 上,以所述上游至下游毛细迁移指向,至少实现:

- 用于存放液体样品的一个区 (3),

- 一个上游释放区 (4),其包含与可见的和 / 或可测量的标记物缀合的至少一种检测试剂,所述检测试剂能够由于液体样品在所述毛细扩散工具中的迁移而移动,和

- 至少两个捕获区 (5),各包含固定在所述毛细扩散工具上的至少一种捕获试剂。

所述装置特征在于所述装置 (1) 还包含至少一个下游释放区 (6),所述下游释放区 (6) 在所述毛细扩散工具 (2) 上实现并位于所述 (一个或多个) 捕获区 (5) 中的至少一个的下游,

所述下游释放区 (6) 也包含与可见的和 / 或可测量的标记物缀合的至少一种检测试剂,所述检测试剂能够由于液体样品在毛细扩散工具 (2) 中的迁移而移动,和

在于释放区 (4,6) 的检测试剂和 / 或位于所述释放区 (4,6) 的直接下游的 (一个或多个) 互补捕获区 (5) 的捕获试剂,能够特异性结合所述分析物和 / 或特异性彼此结合以在所述 (一个或多个) 互补捕获区 (5) 处形成复合物,允许测定所述液体样品中的所述分析物。

2. 根据权利要求 1 的用于测定的工具,特征在于 (一个或多个) 下游释放区 (6) 各插入到两个捕获区 (5) 之间。

3. 根据权利要求 1 或 2 中任一项的用于测定的装置,特征在于其包含上游区组 (71),所述上游区组包含位于上游释放区 (4) 的直接下游的上游捕获区 (51),所述上游区组 (71) 其本身接一个或多个区组 (72),所述一个或多个区组 (72) 各包含释放区 (6) 和一个或多个互补捕获区 (5)。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项的用于测定的装置,用于测定单种分析物,特征在于释放区 (4,6) 的 (一种或多种) 检测试剂和 / 或捕获区 (5) 的 (一种或多种) 捕获试剂能够特异性结合所述分析物。

5. 根据权利要求 4 的用于测定的装置,其特征在于释放区 (4,6) 包括彼此相同的一种或多种检测试剂,并且在于捕获区 (5) 包括彼此相同的一种或多种检测试剂。

6. 根据权利要求 4 或 5 中任一项的用于测定的装置,其特征在于毛细扩散工具 (2) 包括:

- 上游释放区 (4),

- 一个或两个上游捕获区 (51),与所述上游释放区 (4) 互补,并然后

- 下游释放区 (6),和

- 至少两个第二捕获区 (52),与所述下游释放区 (6) 互补。

7. 根据权利要求 4 或 5 中任一项的用于测定的装置,其特征在于毛细扩散工具 (2) 包括:

- 上游释放区 (4),

- 一个或两个上游捕获区 (51),与所述上游释放区 (4) 互补,并然后

- 至少两个连续的区组 (72),各包含:

- 释放区 (6), 和
- 至少一个捕获区 (52), 与所述相关的释放区 (6) 互补。

8. 根据权利要求 1 至 3 中任一项的用于测定的装置, 用于检测至少两种分析物, 特征在于释放区 (4、6) 的检测试剂和 / 或所述释放区 (4、6) 相邻下游的 (一个或多个) 互补捕获区的检测试剂, 能够特异性结合所述分析物之一。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项的用于测定的装置, 特征在于在毛细扩散工具 (2) 上实现的、每个插入到两个捕获区 (5) 之间的 (一个或多个) 下游释放区 (6) 的数量是从 1 至 4。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项的用于测定的装置, 特征在于在毛细扩散工具 (2) 上实现的、与位于直接上游的释放区 (4、6) 之一互补的 (一个或多个) 捕获区 (5) 的数量为从 1 至 10。

11. 根据权利要求 1 至 10 中任一项的用于测定的装置, 特征在于释放区 (4、6) 的检测试剂和互补捕获区 (5) 的捕获试剂或至少其中之一能够特异性结合分析物或至少分析物之一以构成夹心形态测试。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项的用于测定的装置, 特征在于释放区 (4、6) 中的至少一个的检测试剂和互补捕获区 (5) 的捕获试剂或至少其中之一, 在一种情况下, 是待测定的分析物的类似物, 并且在另一种情况下, 是能够特异性结合所述分析物或分析物的所述类似物的试剂, 以构成竞争形态测试。

13. 用于定量测定存放在根据权利要求 4 至 7 中任一项的用于测定的装置上的液体样品中的分析物的方法, 特征在于所述方法包括以下连续的步骤:

- 测量每个捕获区 (51、52) 处的信号强度的步骤,
- 在每个区组 (7) 中, 将所述测量的强度相加的步骤,
- 计算强度比例的步骤, 所述强度比例对应于一个区组的相加的强度相对于另一个区组的相加的强度, 和
- 从标准曲线将所述计算的强度比例与所述液体样品中的分析物的定量值相关联的步骤, 所述标准曲线对应于在所述液体样品中分析物量的基础上计算的强度比例。

## 用于测定至少一种能够包含在液体样品中的分析物的装置

### 发明领域

[0001] 本发明涉及用于测定至少一种能够包含在液体样品中的分析物的装置。

[0002] 本发明特别涉及通过侧向迁移实施免疫色谱技术的装置。

### 背景技术

[0003] 大多数用于测定（一种或多种）分析物的技术已经逐渐演化为更加容易地使用的装置，允许开发快速和低成本的常规诊断方法。

[0004] 这一改变在医学领域特别显著，随着通过“定点护理”或“家用测试”的诊断的出现，其中在患者床边或在家直接进行诊断，不需要使用分析性的实验室自动化的技术。

[0005] 免疫测定法是用于此类快速诊断的技术的部分。

[0006] 这些免疫测定法涵盖基于特异性结合对成员之间的亲和性结合反应的诊断装置和方法。

[0007] 全局中，这些免疫测定法被分为 2 种公知的主要方法。

[0008] 在所谓的“竞争”方法中，期望的分析物和经标记的检测试剂为特异性结合捕获试剂而竞争。通过在捕获试剂上的可见的（或可测量的）信号的缺乏或存在，分别测量样品中的期望的分析物的存在或缺乏。

[0009] 在所谓的“夹心”方法中，经标记的检测试剂结合期望的分析物，后者经过捕获试剂固定在固体支持物上。通过在捕获试剂上的可见的（或可测量的）信号的存在或缺乏，分别测量液体样品中的分析物的存在或缺乏。

[0010] 在这些免疫测定法中，特别适用于某些分析物的所谓的“免疫色谱”装置是已知的。

[0011] 免疫色谱是固相诊断方法，使用在惰性膜上的干化学和侧向迁移。

[0012] 此类免疫测定法采用条状形式的多孔支持物，其中和 / 或其上插入实施测试所需的干形式的试剂。

[0013] 处理多孔支持物使得特异性结合搭档（通常是抗原 / 抗体）之间的识别反应在捕获区发生并可以在此水平显示。

[0014] 实践中，当待分析的液体样品存放在支持物上时，其通过毛细作用沿膜迁移。期望的分析物通常被固定在膜的给定区上的特异性捕获试剂捕获。

[0015] 根据夹心方法原理，反应是由经标记的特异性检测试剂显示的。

[0016] 也能够使用竞争类型的反应。通常在这种情况下使用是经标记的分析物的检测试剂，其是期望的分析物对于与固定的捕获试剂特异性结合的竞争者。

[0017] 这些免疫色谱装置通常适于单次和家用。事实上，其使用简易并且迅速，仅需要最少量的操作，因为全部试剂插入或包含在装置中。

[0018] 然而，在一些特别的情况中，这些免疫色谱装置可能提供不是完全可靠的结果。

[0019] 在一方面，当通过“夹心”形态测试测定分析物时，对于某些分析物观察到“钩状效应”。

[0020] 钩状效应是免疫学测试中公知的不想要的作用。其在当存在于样品中的分析物处于非常高浓度时发生。

[0021] 钩状效应然后可以导致假阴性,造成异常的结论,即样品中没有分析物或分析物以低浓度存在。

[0022] 在夹心类型免疫测定法中具有钩状效应的分析物生成高斯曲线类型的信号 / 浓度曲线。

[0023] 对于给定的信号,当在确定的时间阅读结果时,对于期望的分析物,两种浓度于是是可能的,一种低而另一种高。

[0024] 竞争测试允许对于不同于待施用的分析物的两种浓度分别获得两种不同的信号。

[0025] 但非常快地,竞争测试也显示了其局限,因为在目标分析物浓度相对低时存在信号消灭。

[0026] 通常用于克服这些夹心和竞争测试的缺点的解决方案是施用来自液体样品的稀释范围的分析物。

[0027] 但是此类稀释范围的使用不适于家用。此外,样品的稀释范围的使用需要额外的操作和单次使用测试装置的增加的消耗因为每个样品在不同的稀释度测试。

[0028] 用于该目的的解决方案例如在 WO 2007/023372 中描述,其涉及用于测定液体样品中的分析物的装置,所述装置包含毛细扩散工具,在所述毛细扩散工具上实现:

[0029] a) 样品存放或接收区;

[0030] b) 上游释放区,包含与可见的和 / 或可测量的标记物缀合的分析物特异性检测试剂,其通过毛细扩散在毛细扩散工具中的湿态中自由迁移;和

[0031] c) 两个下游捕获区,其在毛细扩散方向,连续地包含,在一方面,分析物特异性捕获试剂和,在另一方面,固定的分析物或分析物的类似物。

[0032] 分析物特异性的检测试剂和捕获试剂,允许通过夹心测试测定液体样品中的分析物;然后固定的相同的分析物特异性检测试剂和分析物,或分析物类似物,允许通过竞争测试测定液体样品中的目标分析物。

[0033] 在此类装置中,检测试剂过量地存放在在互补捕获区上游形成的单个释放区中。

[0034] 不管其益处,发明人发现捕获区上游的此过量的检测试剂不是令人满意的,在于通常观察到非特异性反应,强背景和迁移问题。

[0035] 在另一方面,构造某些免疫色谱装置用于同时测定若干种分析物。

[0036] 此类免疫色谱装置,例如, EP-1657550 中描述的,有利地包含毛细扩散工具,在所述毛细扩散工具上实现:

[0037] a) 样品存放或接收区;

[0038] b) 上游释放区,其包含与可见的和 / 或可测量的标记物缀合的检测试剂的混合物,每种对于分析物之一是特异性的,其通过毛细扩散在毛细扩散工具中的湿态中自由迁移;和

[0039] c) 下游捕获区,各包含对于分析物之一特异性的捕获试剂,所述下游捕获区根据迁移的方向连续分布。

[0040] 同样,检测试剂存放在单个释放区处,所述单个释放区是在捕获区的上游实现的,考虑到毛细迁移方向。

[0041] 然而,发明人再次发现不同捕获区上游的此检测试剂的混合物是不令人满意的,因为不同检测试剂之间的交叉反应以及试剂之间的相互比活抑制。

[0042] 包含在多个捕获区上游形成的(一种或多种)检测试剂的释放区的免疫色谱装置因此是不令人满意的。

[0043] 因此,对于用于测定单种分析物和用于测定若干种分析物的新型毛细扩散测定装置有需求,所述测定装置允许减轻特别由于在多个连续捕获区上游报告的(一种或多种)检测试剂的过量和/或混合物导致的问题。

## 发明总结

[0044] 本发明因此涉及用于测定至少一种能够包含在液体样品中的分析物的存在和/或量的装置,所述装置包含毛细扩散工具,在所述毛细扩散工具上所述液体样品意图根据毛细迁移的方向和方式侧向迁移。

[0045] 在此毛细扩散工具上,以所述毛细迁移方向上游到下游,实现多个区,即至少:

[0046] - 用于存放液体样品的一个区,

[0047] - 一个上游释放区,其包含至少一种与可见的和/或可测量的标记物缀合的检测试剂,所述检测试剂能够由于液体样品在所述毛细扩散工具中的迁移而运动,和

[0048] - 至少两个捕获区,其各包含至少一种固定在所述毛细扩散工具上的捕获试剂。

[0049] 此装置还包括至少一个下游释放区,所述下游释放区在所述毛细扩散工具上实现并且位于所述捕获区中至少一个的下游。

[0050] 此下游释放区也包含至少一种与可见的和/或可测量的标记物缀合的检测试剂,所述检测试剂能够由于液体样品在所述毛细扩散工具中的迁移而运动。

[0051] 释放区的检测试剂和/或位于所述释放区直接下游的(一个或多个)互补捕获区的捕获试剂然后能够特异性结合所述分析物和/或特异性彼此结合以在所述(一个或多个)互补捕获区处形成复合物,允许测定所述液体样品中的所述分析物。

[0052] 一般而言,取决于构成位于所述释放区的直接下游的(一个或多个)捕获区的捕获试剂,此类布置具有允许调整释放区的检测试剂的量和/或特异性的特别的益处。

[0053] 可彼此组合或独立利用的其他有利特征在下文显示:

[0054] - 在两个捕获区之间各插入(一个或多个)下游释放区;

[0055] - 上游区组包含位于上游释放区的直接下游的上游捕获区,有利地适用于夹心形态测试,所述上游区组本身接一个或多个区组,各包含释放区和一个或多个互补捕获区;此特征允许根据待测定的(一种或多种)分析物的检测阈值优化(一个或多个)下游区组的浓度和特异性。

[0056] 为了测定单种分析物,释放区的(一种或多种)检测试剂和/或捕获区的(一种或多种)捕获试剂有利地能够特异性结合所述分析物。

[0057] 在这种情况下,释放区优选地包括彼此相同的一种或多种检测试剂,并且捕获区优选地包括彼此相同的一种或多种捕获试剂。

[0058] 还在这种情况下,毛细扩散工具有利地包括:

[0059] - 上游释放区,

[0060] - 与所述上游释放区互补的第一捕获区或两个第一捕获区,和然后

[0061] 或

[0062] - 下游释放区, 和

[0063] - 与所述下游释放区互补的至少两个第二捕获区,

[0064] 或至少两个连续的区偶 (zones of couples), 各包含:

[0065] - 释放区, 和

[0066] - 与所述相关的释放区互补的至少一个捕获区。

[0067] 为了检测至少两种分析物, 释放区的检测试剂和 / 或所述释放区的相邻下游的 (一个或多个) 互补捕获区的捕获试剂, 有利地能够特异性结合所述分析物之一。

[0068] 根据可组合或彼此独立采用的仍然的其他优势特征:

[0069] - 在毛细扩散工具上实现的、各插入两个捕获区之间的下游释放区的数量, 为从 1 至 4 个, 例如, 2 个, 对于 25mm 的标准毛细支持物形态;

[0070] - 在毛细扩散工具上实现的、与位于直接上游的释放区之一互补的捕获区的数量, 为从 1 至 10 个, 优选地 5 个, 对于 25mm 的标准毛细支持物形态;

[0071] - 释放区中的至少之一的检测试剂和互补捕获区的捕获试剂或它们中之一能够特异性结合分析物或分析物中的至少之一以构成夹心形态测试;

[0072] - 释放区中的至少之一的检测试剂和互补捕获区的捕获试剂或它们中至少之一, 在一种情况下, 是待测定的分析物的类似物并且, 在另一种情况下, 是能够特异性结合所述分析物或所述分析物的类似物的试剂, 以构成竞争形态测试;

[0073] - 用于存放液体样品的区 (i) 与上游释放区合并或 (ii) 位于上游释放区的上游。

[0074] 本发明还涉及用于定量测定存放在测定装置上的液体样品中的分析物的方法, 该方法包括以下连续的步骤:

[0075] - 在每个捕获区测量信号强 (强度) 的步骤,

[0076] - 在每个区组中, 将测量的所述强度相加的步骤,

[0077] - 计算强度比例的步骤, 所述强度比例对应于一个区组的相加的强度与另一个区组的相加的强度相比较, 和

[0078] - 将所述计算的强度比例与所述液体样品中的分析物的定量值相关联的步骤, 考虑到对应于基于所述液体样品中的分析物量计算的强度比例的标准曲线。

[0079] 附图

[0080] 本发明将由以下对根据本发明的多种装置的描述连同附图进一步说明, 但无论如何不是对本发明的限制。所述附图其中:

[0081] - 图 1 示意性地描述了根据本发明的用于测定单种分析物的第一装置, 其包含两个区组, 各由释放区和捕获区组成。

[0082] - 图 2 更加示意性地描述了根据本发明的用于测定单种分析物的第二装置, 其包含由释放区和捕获区组成的第一区组, 和由后接若干捕获区的释放区组成的第二区组;

[0083] - 图 3 也示意性地描述了根据本发明的用于测定单种分析物的第三装置, 其包含若干区组, 各由释放区和捕获区组成;

[0084] - 图 4 更加示意性地描述了根据本发明的用于测定两种分析物的第四装置, 其包含两个区组, 各由释放区和捕获区组成, 各用于所述分析物之一。

[0085] - 图 5 仍然示意性地描述了根据本发明的用于测定若干种分析物的第种装置, 其

包含若干区组,各由释放区和两个捕获区组成,各用于分析物之一。

**[0086] 发明详述**

**[0087]** 本发明因此涉及用于测定至少一种能够包含在液体样品中的分析物的装置。

**[0088]** 通过在前述图 1 至 5 中显示的多个实施方式非常示意性地描述根据本发明的此装置的一般结构。

**[0089]** 一般地,当描述多个实施方式时,保留使用的参考号以表示相同或相似的结构元件。

**[0090]** 如图 1 至 5 中所示,每个装置 1 包括毛细扩散工具 2,所述液体样品(未显示)意图存放于所述毛细扩散工具 2 上,并然后以上游至下游毛细迁移方向和指向侧向迁移。

**[0091]** 迁移方向和指向由图 1 中点 A 所表示的箭头示意性地说明。

**[0092]** 一般地,概念“上游”和“下游”指液体样品沿着毛细扩散工具 2 的长度的此迁移方向和指向。

**[0093]** 在此毛细扩散工具 2 上以所述上游至下游毛细迁移指向 A 实现不同的连续区,即至少:

**[0094]** - 一个区 3 用于存放液体样品,

**[0095]** - 一个上游释放区 4,其包含与可见的和/或可测量的标记物缀合的至少一种检测试剂,所述检测试剂由于液体样品在所述毛细扩散工具 2 中的迁移而能够移动,和

**[0096]** - 至少两个捕获区 5,各包含固定在所述毛细扩散工具上的至少一种捕获试剂。

**[0097]** 根据本发明,此装置 1 还包含至少一个额外释放区 6,其在所述毛细扩散工具 2 上实现并且位于所述捕获区 5 中的至少一个的下游。

**[0098]** 此额外的下游释放区 6 还包含与可见的和/或可测量的标记物缀合的至少一种检测试剂,所述检测试剂由于液体样品在毛细扩散工具中的迁移而能够移动。

**[0099]** 毛细扩散基质 2 因此包括若干连续区组 7,其各由至少两个连续区组成:

**[0100]** - 一个释放区 4 或 6,上游,以及

**[0101]** - 一个或多个捕获区 5,称为“互补的”,位于所述相关释放区 4、6 的直接下游。

**[0102]** 选择释放区 4、6 的检测试剂和/或(一个或多个)互补捕获区 5 的捕获试剂以特异性结合所述分析物和/或彼此特异性结合。

**[0103]** 此方法确保在所述互补捕获区 5 形成(一种或多种)复合物,允许测定所述液体样品中的所述分析物。

**[0104]** 特别地,选择每个区组 7 的检测和捕获试剂用于实施夹心形态和/或竞争形态的免疫学测试。

**[0105]** 因此,(一个或多个)额外的释放区 6 的存在允许(一种或多种)检测试剂在每个区组 7 中的最优分布,其然后以相对于不同的相关捕获区 5 的方式排列。

**[0106]** 因此,能够相对于位于直接下游的(一个或多个)互补捕获区 5 调整每个释放区 4、6 中的检测试剂的量和特异性。

**[0107]** 一般而言,根据本发明的装置允许测定液体样品中低浓度和非常高浓度的(一种或多种)分析物而不获得假阳性或假阴性结果。

**[0108]** 此外,可以构建根据本发明的装置用于液体样品中的一种或多种分析物的半定量测定。

[0109] 根据本发明的装置特别适用于具有显著钩状效应的分析物的测定,诸如孕激素(hCG)、前列腺特异性抗原(PSA)和血红蛋白(例如用于粪便中血红蛋白检测,也称为“大便潜血”(FOB))。

[0110] 涉及存在若干释放区的本发明的其他益处包括:

[0111] - 取决于待检测的靶浓度的检测试剂和捕获试剂的优化,

[0112] - 更高水平的准确性。

[0113] 由于上述两点,获得了测定装置的,以及可见的和可测量的信号的解释值的灵敏度和特异性的增加。

[0114] 本发明的不同方面在下文以更多细节显示。

[0115] (一种或多种) 分析物和液体样品

[0116] “分析物”指样品中待检测的任何化学、生物化学或生物学实体。

[0117] 此化学实体有利地是来自生命世界,优选地来自植物或动物世界,更优选地,存在于人类中的实体。

[0118] 在由根据本发明的装置和方法检测到的分析物中,可特别提及蛋白质、肽、抗体、激素、类固醇、源自感染剂或肿瘤细胞的抗原、感染剂诸如细菌、病毒或寄生虫、核酸(DNA或RNA)、治疗性化合物、药物或抗体。

[0119] 分析物尤其选自已知在其由免疫色谱技术检测期间产生钩状效应的那些。

[0120] “钩状效应”特别地意为通过免疫色谱技术获得的假阴性结果,异常地得出样品中没有分析物的结论,当分析物以非常高浓度存在于样品中时出现。

[0121] 一般地,钩状效应导致可见的和可测量的应答信号的弱化,与待测定的分析物浓度的增加相反,导致(i)两种不同浓度的相同信号(具有相同强度),所述两种不同浓度之一低而另一高,和(ii)抑制揭示极高分析物浓度的信号。

[0122] 例如,在hCG激素的大多数免疫色谱测试中,钩状效应在约5000mIU/mL处开始并将继续直到约250000mIU/mL,涉及尤其对于低(25mIU/mL)和高(200000mIU/mL)浓度的相同信号强度。

[0123] 就此而言,分析物因此有利地选自绒毛膜促性腺激素(hCG)、前列腺特异性抗原(PSA)、血红蛋白、大便潜血(FOB)、致癌基因标志物(诸如铁蛋白、 $\alpha$ 胎蛋白(AFP)、CA15-3/CA27.29(乳腺癌)、CA19-9(胰腺癌)、CA-125(卵巢癌))、C反应性蛋白(CRP)、肌钙蛋白I(TNI)、心脏标志物(诸如肌钙蛋白T、CK-MB、肌球蛋白、B型利钠肽(t-BNP))、药物滥用(DOA)、疗法监控生物标志物、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、其他疗法相关的循环的致癌基因生物标志物、其他细胞、细胞内或组织特异性生物标志物等)、黄体化激素(LH)或卵泡刺激素(FSH)。

[0124] 取决于其结构,根据本发明的装置使得能够测定单种分析物(单一分析物)或测定若干种分析物(多(poly-)或多(multi-)或多(pluri-)种分析物)。

[0125] “若干种分析物”意为至少两种分析物,更优选地2、3、4或5种分析物。

[0126] 此多分析物方法对于自身免疫疾病的研究(“自身免疫疾病组”)、过敏的研究(“过敏组”)、药物领域的疗法监控、毒理学、患者对治疗或炎性标记物的应答、对于多重感染的诊断测试(例如人免疫缺陷病毒或HIV/丙型肝炎/乙型肝炎)可能是有兴趣的。

[0127] 例如,根据本发明的装置可适用于测定一种液体样品中的多种抗体,即例如抗

HIV(人免疫缺陷病毒或 HIV)、抗 HCV(丙型肝炎病毒)、抗 HB(慢性病毒性肝炎标记物)、抗 TB(结核)。

[0128] “液体样品”意为其中期望的分析物处于溶液或悬液中的任何样品。

[0129] 此液体样品尤其可以是任何生物学液体或体液。

[0130] 液体样品也可以已经直接或间接地从生物学液体或体液得到。

[0131] 样品也可以是固体样品的液体提取物。

[0132] 通常,液体样品是尿、全血、血浆或血清。

[0133] 在根据本发明的一些方法中,当液体样品是血浆、血清或全血时例如,使用稀释剂。

[0134] 稀释剂与样品一起存放于多孔固体支持物上。备选地,稀释剂在样品之前或之后存放于多孔固体支持物上。

[0135] 此稀释剂在固体支持物中迁移,导致或协助样品与经标记的检测试剂在多孔支持物中迁移。

[0136] 通常,此稀释剂由缓冲的盐溶液组成,并且也可包含去垢剂或反应需要的任何其他组分。

[0137] 根据本发明的装置是令人感兴趣的,在于其可适用于测定至少一种分析物的存在,以及测定其量。

[0138] “检测”或“测定”因而意为液体样品中一种或多种分析物的定性测定(有利地存在或不存在)。

[0139] “检测”或“测定”,也意为测量和定量样品中的一种或多种分析物。

[0140] 事实上,根据本发明的装置和方法的性能也允许用于实施液体样品中的一种分析物或至少两种不同分析物的定量或半定量测量的实施方式。

[0141] 毛细扩散工具

[0142] 根据本发明,“毛细扩散工具 2”意为构成或充当连续毛细扩散单位的任何工具,通过侧向迁移(即垂直于实施毛细扩散的(一种或多种)毛细材料的厚度)。

[0143] 有利地,此毛细扩散工具是允许液体通过简单毛细扩散而迁移的多孔固体支持物。

[0144] 此支持物的多孔性使得样品和/或试剂能够在液体或湿态中毛细扩散(或侧向迁移)。

[0145] 此类毛细扩散工具非常广泛地用于全部免疫色谱技术中,尤其是侧向迁移免疫色谱技术中。

[0146] 此类毛细扩散工具例如是在毛细扩散(侧向迁移)的方向和/或指向上延长的支持物。

[0147] 此毛细扩散工具由以下组成:

[0148] - 单个毛细或多孔材料,

[0149] - 许多不同的毛细或多孔元件或材料,彼此方便地放置(例如通过重合),以获得在毛细扩散方向上从一个元件或材料至另一个的连续毛细流动。

[0150] 此类毛细扩散工具决定了任何液体的毛细扩散方向和指向,所述液体接收或存放于上游端,并且然后向所述工具的下游端移动。

[0151] 根据本发明所考虑的毛细扩散,也称为“侧向迁移免疫色谱”,与免疫过滤技术中实施的不同,所述免疫过滤技术中液体通过(一种或多种)多孔过滤材料的厚度。

[0152] 作为实例,这些毛细扩散工具可以由多种免疫色谱支持物组成,例如,纤维素、尼龙、硝化纤维、聚乙烯或玻璃纤维。

[0153] 毛细扩散工具可以由一个或多个单独的部分组成。支持物的不同部分可以由不同材料组成。当毛细扩散工具由不同部分或不同材料组成时,这些元件以允许毛细扩散工具中的连续毛细流动的方式布置。

[0154] 通常,毛细扩散工具由在毛细扩散方向上延长的多孔固体支持物组成。优选地,根据本发明的装置的毛细扩散工具包含免疫色谱条状物形式的多孔固体支持物。

[0155] 毛细扩散工具例如是由叠加的或重叠的若干条状物组成的免疫色谱条状物形式。

[0156] 根据本发明的装置例如可由与刚性支持物结合的色谱条状物组成。

[0157] 刚性支持物可以由多种材料制成,诸如纸板、增塑的纸板或更优选地,塑料材料。优选地,刚性支持物由聚苯乙烯制成。

[0158] 有利地,毛细扩散工具可以包括在夹紧支持物中。此夹紧支持物使得毛细扩散工具更容易操作并且也能够使其免受潮湿。

[0159] 夹紧支持物可以部分或全部地包住毛细扩散工具。

[0160] 夹紧支持物可以由多种材料制成,诸如纸板、增塑的纸板或更优选地,塑料材料。有利地,夹紧支持物由刚性并且防水的材料制成。

[0161] 这些夹紧支持物或套尤其在专利 WO-2007/023372、EP-0291194、EP-0560411、EP-0560410 和 EP-1091808 中描述。

[0162] 通常,夹紧支持物处于套的形式。

[0163] 有利地,提供的此夹紧支持物具有至少一个观察窗以观看捕获区。

[0164] 有利地布置这些观察窗使得仅提供对待分析至少一种分析物的测定或当合适时,至少两种分析物的测定的捕获区的直接目视。

[0165] 存放区

[0166] 存放区 3 对应于毛细扩散工具 2 的上游的区,在其上提供液体样品。

[0167] 存放区可以与由吸收剂材料制成的集水(catchment)系统合作。

[0168] 此集水系统可以直接与例如尿流接触。

[0169] 如在 WO-00/00288 中所描述的,集水系统可以在两个位置之间移动,一个用于收集液体样品,远离毛细扩散工具,而另一个与毛细扩散工具的存放区相连或毛细接触。

[0170] 在本发明的一个实施方式中,毛细扩散工具可包含用于存放或收集样品的区,所述区从夹紧支持物伸出以接收液体样品。

[0171] 在本发明的另一实施方式中,夹紧支持物或套具有至少一个开口用于存放液体样品。

[0172] 检测试剂和捕获试剂

[0173] 毛细扩散工具 2 在其长度上包括,一方面,分布以实现释放区 4、6 的至少一种检测试剂,和在另一方面,分布以实现捕获区 5 的至少一种捕获试剂。

[0174] 下文更加详细描述“释放区”或“捕获区”意为毛细扩散工具 2 的局部化的和划定界限的部分,在其上分别存放一定量的至少一种检测试剂或至少一种捕获试剂。

[0175] 释放区 4、6 中的每个和捕获区 5 有利地是横线或带（垂直于迁移方向延伸），所述横线或带具有例如范围从 1 至 2mm 的宽度，以及范围从 3 至 5mm<sup>2</sup> 的表面积。

[0176] 一般而言，“检测试剂”或“捕获试剂”是任何化学、生物化学或生物学实体，其能够特异性地结合以形成复合物，允许测定液体样品中的所述分析物。

[0177] 检测试剂和 / 或捕获试剂另外还是称为“结合试剂”的试剂。

[0178] 允许测定液体样品中的一种或多种分析物的此类结合试剂是公知的并且可以就本发明的实施进行选择。

[0179] 这些结合试剂有利地选自能够特异性结合所述分析物和 / 或彼此的那些。

[0180] 根据所实施的测试形态，互补结合试剂意图形成不同的复合物：

[0181] - 结合试剂能够同时结合分析物以形成夹心形态测试，

[0182] - 结合试剂之一（检测或捕获试剂）能够结合分析物以及其他结合试剂（分别地捕获或检测试剂），以形成竞争形态测试。

[0183] 在本文上下文中，结合试剂中的至少一种有利地选自能够特异性结合分析物和 / 或分析物类似物的化学、生物化学或生物学实体。

[0184] “结合”或“结合的”意为任何强结合，例如共价的，以及任何弱结合，例如抗原 / 抗体或分析物 / 抗分析物类型的结合。

[0185] “抗分析物”意为能够特异性结合分析物或与分析物竞争特异性结合捕获试剂的任何化学、生物化学或生物学实体，例如，抗体、抗原或核酸。

[0186] “合适的分析物类似物”有利地意为当适当时，能够与分析物竞争特异性结合捕获试剂或检测试剂的任何化学、生物化学或生物学实体。

[0187] 结合试剂有利地选自抗体、抗原或核酸。

[0188] 分析物和结合试剂因此通常形成能够彼此特异性结合的一对 (couple)，例如，配体 / 抗配体对、抗原 / 抗体对、DNA/RNA 对或 DNA/DNA 对。

[0189] 因此，如果分析物是抗原或半抗原，结合试剂（检测试剂和 / 或捕获试剂）中的至少一种有利地是分析物特异性抗体。

[0190] “分析物特异性抗体”意为在抗原 / 抗体类型结合中能够特异性结合分析物的抗体。

[0191] 其通常是对分析物具有高亲和力的多克隆或单克隆抗体。优选地，其是单克隆抗体。

[0192] 如果分析物是抗体，结合试剂中的至少一种有利地是由抗体识别的抗原。

[0193] 如果分析物是核酸，结合试剂中的至少一种有利地是互补的 DNA 探针。

[0194] （一种或多种）检测试剂有利地与可见的和 / 或可测量的标记物，有利地颗粒标记物缀合。

[0195] “可见的和 / 或可测量的标记物”意为由于捕获区处的信号发射允许用裸眼或使用仪器直接或间接检测的任何标记物。

[0196] 信号例如是荧光、着色、存在同位素或磁性信号。

[0197] 实例包括荧光的或有色的颗粒标记物诸如胶体金、有色的乳胶颗粒、荧光的乳胶颗粒和抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白缀合的颗粒。

[0198] 有色的或荧光的颗粒标记物因此是在水中不可溶的小尺寸颗粒并因此在液相中

形成悬液、分散液或溶液。

[0199] 允许用肉眼直接观察的标记物也包括葡聚糖类型的标记物 (Hansen T.M., IVD Technology 4, 35-40, 2003)。然后结合试剂与含有荧光团的葡聚糖链 (衍生自多糖) 缀合。

[0200] 标记物也可以是酶 (包括碱性磷酸酶或 AP、辣根过氧化物酶或 HRP)、着色剂 (或染料) 或化学发光化合物 (包括异硫氰酸荧光素或 FITC)。

[0201] 为了增加灵敏度, 可以使用通过本领域技术人员知晓的技术标记的抗体 (诸如例如生物素化的抗体), 例如, 用于间接检测, 使得能够通过形成抗生物素蛋白 - 生物素和链酶抗生物素 - 生物素实体间接进行检测。

[0202] 此经标记的和生物素化的抗体也能够直接存放于捕获区中的测试线上以增加灵敏度, 或和特异性检测抗体存放以增加接触时间和另外尤其地, 增加灵敏度, 例如由于结合位点数量。

[0203] 对此部分, 通过本领域技术人员知晓的技术将分析物特异性捕获试剂固定在固体支持物上。

[0204] 此捕获试剂以使得其不能在湿态中移动的方式固定。

[0205] 可以通过例如吸收或共价偶联实施此固定。

[0206] 连续区组的组成

[0207] 毛细扩散工具 2 因此包括一个或多个捕获区 5, 所述捕获区 5 与位于直接上游 (考虑到毛细迁移指向) 的释放区 4、6 互补。

[0208] “直接上游”特别地意为捕获区 5 的上游的第一个释放区 4、6

[0209] “互补的”意为构成区组的释放和捕获区, 选择其组分结合试剂以允许实施用于测定目标分析物的测试, 有利地竞争形态测试和 / 或夹心形态测试。

[0210] 每个区组因此包含释放区, 后接至少一个互补捕获区 (当适当时在新区组的释放区前)。

[0211] 如先前所讨论的, 此布置对于允许将释放区的检测试剂的量和 / 或特异性调整至根据构成直接下游的 (一个或多个) 捕获区的捕获试剂的最接近的程度以及尽可能准确有特别的益处。

[0212] 一般而言, 毛细扩散工具 2 可以包括:

[0213] - 仅这样的区组, 选择所述区组的组分结合试剂以允许实施竞争形态测试; 或

[0214] - 仅这样的区组, 选择所述区组的组分结合试剂以允许实施夹心形态测试; 或

[0215] - 至少一个这样的区组, 选择所述区组的组分结合试剂以允许实施竞争形态测试, 和至少一个这样的区组, 选择所述区组的组分结合试剂以允许实施夹心形态测试; 或

[0216] - 至少一个这样的区组, 选择所述区组的组分结合试剂以允许实施竞争形态和夹心形态测试, 和至少一个这样的区组, 选择所述区组的组分结合试剂以允许实施竞争形态和 / 或夹心形态测试。

[0217] 在每个区组中, 可以混杂释放区和捕获区, 或一系列的第一捕获区。

[0218] 备选地, 捕获区, 或一系列的第一捕获区, 有利地与释放区分开几毫米的距离, 例如范围从 2 至 4mm。

[0219] 另外, 一系列的捕获区有利地彼此分开几毫米的距离, 例如范围从 1 至 4mm。

[0220] 更一般地, 上游释放区可以位于样品存放或接收区中。

[0221] 但是,此上游释放区也可以存放在干态中,在样品存放或接收区的下游,以防止存放样品时由于洗涤效应的任何检测试剂损失。

[0222] 更一般而言地,在毛细扩散工具上实现的、与位于直接上游的释放区互补的捕获区的数量,有利地是从 1 至 10 个,优选地从 2 至 5 个(仍然是选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 的数量)。

[0223] 此类方法特别可用于获得半定量或定量类型结果。

[0224] 事实上,如实施例所示,在连续的捕获区上获得的信号谱可以归因于液体样品中的分析物浓度范围。如实施例所示,在连续的捕获区上获得的信号谱也可以归因于液体样品中的准确的分析物浓度值。

[0225] 实施例部分也还另外显示,惊人地,使用用于实施夹心测试的释放和捕获区的特别的布置,可以显著降低钩状效应。

[0226] 在此方面,显示了令人感兴趣的实施方式包含:

[0227] - 上游区组,其包含释放区 / 捕获区对或两个捕获区,和然后

[0228] - 下游区组,其至少包含新的释放区,后接一系列捕获区。

[0229] 此上游区组有利地基于夹心形态以确保在上游捕获(一种或多种)分析物:

[0230] - (一种或多种)分析物的显著部分,

[0231] - 或对应于检测阈值和诊断值的部分(“诊断值”指在科学上认为是允许医学解释的阈值的任何分析物(或生物标志物)浓度)。

[0232] 特别地,此预定的上游捕获允许液体样品在前进通过随后的(一个或多个)区组的路径中浓度受控。

[0233] 此上游区组的存在将呈现控制(一个或多个)下游区组中的钩状效应的益处。

[0234] 仍然是一般而言地,特别地,对于根据以 ng/mL 或以国际单位 (IU)/mL 表达的浓度命名法的期望的诊断值浓度范围,有利地调整释放区内检测试剂的浓度和互补捕获区内捕获试剂的浓度。

[0235] 此浓度例如是 0.1 和 1ng/ 多孔支持物的线性 cm 之间,取决于结合试剂特异性。

[0236] 此外,释放区的数量,以及因此,对应的区组的数量,是从 1 至 4 个(仍然是选自 1、2、3 或 4 的数字)。优选的范围将是例如毛细支持物长度为 25mm 的两个组。

[0237] 相关区的结合试剂的选择本身是常规的。

[0238] 在竞争测试中,释放区 4、6 和互补捕获区 5 有利地包含:

[0239] (i) 作为分析物本身,或合适的分析物类似物的标记的检测试剂,与可见的和 / 或可测量的标记物缀合,和

[0240] (ii) 固定的捕获试剂,有利地抗体类型抗分析物,能够特异性结合样品中的分析物和前述检测试剂。

[0241] 此实施方式使得能够通过测试检测液体样品分析物,所述测试中竞争发生在(一个或多个)捕获区,在,一方面,样品分析物和,另一方面,经标记的分析物或经标记的分析物类似物之间。

[0242] 备选地,仍然在竞争测试中,释放区 4、6 和互补捕获区 5 有利地包含:

[0243] (i) 作为抗分析物的标记的检测试剂,例如,分析物或分析物特异性抗体,与可见的和 / 或可测量的标记物缀合,和

[0244] (ii) 作为分析物本身,或分析物类似物的捕获试剂,固定在毛细扩散工具 2 的捕获区 5 的至少一个中。

[0245] 此实施方式使得能够通过竞争测试检测液体样品分析物,所述竞争测试中检测试剂能够与样品分析物或捕获试剂竞争结合。

[0246] 在这些不同的竞争测试中,在缺少样品中的目标分析物的情况下,固定的复合物经标记的检测试剂 / 捕获试剂形成。这些固定的复合物因此在缺少分析物的情况下生成诸如以上定义的可见的和 / 或可测量的信号。

[0247] 在存在分析物的情况下,在捕获试剂处没有固定经标记的检测试剂。在捕获区缺少信号因此对应于在样品中存在分析物。

[0248] 在夹心类型测试中,释放区 4、6 和互补捕获区 5 有利地包含:

[0249] (i) 与可见的和 / 或可测量的标记物缀合的作为抗分析物的标记的检测试剂,其特异性结合分析物,和

[0250] (ii) 固定的捕获试剂,其特异性地结合分析物,和有利地抗分析物。

[0251] 根据此夹心形态实施方式的优选的实施方式,区组 7 的释放区 4、6 中的至少一个包含对于分析物或对于至少一种分析物特异性的、与可见的和 / 或可测量的标记物缀合的一种或多种抗体,所述抗体存放于毛细扩散工具中或上的干态中,但通过毛细扩散在湿态中自由迁移。

[0252] 在这种情况下,此区组 7 的(一个或多个)互补捕获区 5 包含通过已知技术固定的一种或多种分析物特异性抗体。这些抗体的固定方式使得它们不能在湿态中移动。

[0253] 释放区 4、6 和(一个或多个)互补捕获区 5 的抗体分别并且特异性地结合分析物,例如,在两个表位位点上,与分析物相同或不同。

[0254] 获得的复合物分析物 / 抗体固定在区组 7 的(一个或多个)捕获区 5 处。这些固定的复合物因此生成可见的和 / 或可测量的信号诸如以上定义的。

[0255] 为了检测单种分析物,释放区的(一种或多种)检测试剂和 / 或捕获区的(一种或多种)捕获试剂有利地能够特异性结合所述分析物。

[0256] 因此连续的区组有利地用于单种分析物。

[0257] 在这种情况下,释放区有利地包括彼此相同的一种或多种检测试剂,并且捕获区包括彼此相同的一种或多种捕获试剂。

[0258] 全部不同的连续区组因此适用于实施具有相同形态的测试,即竞争或夹心。

[0259] 备选地,释放区各有利地包括特异性检测试剂,并且互补捕获区包括互补的捕获试剂。

[0260] 在这种情况下,不同的连续区组可以适用于实施彼此相同或不同的测试,即竞争或夹心。

[0261] 为了检测至少两种分析物,释放区的检测试剂和 / 或所述释放区的紧邻下游并共同形成区组的(一个或多个)互补捕获区的捕获试剂,有利地能够特异性结合待测定的所述分析物之一。

[0262] 在这种情况下,每个区组有利地用于分析物之一。

[0263] 不同的连续区组可以适用于实施彼此相同(竞争或夹心)或不同(竞争和夹心)的测试。

[0264] 根据感兴趣的实施方式,每个区组包含在所述区组的捕获区下游的最终捕获区。

[0265] 此最终捕获区包含固定的试剂,所述试剂能够特异性结合源自所述区组的释放区的经标记的检测试剂。

[0266] 此实施方式可以用作对照区;其也具有允许以这样的方式在此区组的末端捕获经标记的检测试剂的益处,所述方式使得所述经标记的检测试剂达不到位于下游的区组并且为了防止任何干扰现象。

[0267] 更一般而言地,区组 7 的释放区 4、6 和互补捕获区 5 有利地包含:

[0268] (i) 作为抗分析物的标记的检测试剂,例如分析物或分析物类似物特异性抗体,与可见的和/或可测量的标记物缀合,

[0269] (ii) 作为分析物本身、或分析物类似物的捕获试剂,固定在毛细扩散工具 2 的捕获区 5 中的至少一个中,和

[0270] (iii) 固定的捕获试剂,特异性结合分析物,也有利地特异性结合抗分析物,固定在毛细扩散工具 2 的另一个捕获区 5 中。

[0271] 后一实施方式允许在单个区组内同时实施夹心形态测试和竞争形态测试。

[0272] 特别的实施方式

[0273] 根据本发明的第一实施方式在图 1 中显示。

[0274] 此装置适用于定性地测定可能存在于液体样品中的目标分析物。

[0275] 毛细扩散工具 2 包括两个区组 7:

[0276] - 上游组 71,其由彼此互补的上游释放区 4 和上游捕获区 51 组成,和

[0277] - 下游组 72,其由彼此互补的下游释放区 6 和下游捕获区 52 组成。

[0278] 在每个区组 7 中,选择各自的结合试剂用于通过如上所述的竞争测试或夹心测试实施目的分析物的检测。

[0279] 这两个区组 7 因此适用于实施:

[0280] - 单个竞争测试或单个夹心测试,

[0281] - 一个组竞争测试而另一组夹心测试。

[0282] 在任何情况下,每个捕获区 5 上游的释放区 4、6 的存在允许紧密适应释放区/捕获区对中的浓度。

[0283] 通过根据本发明的多种装置还可以实施单种分析物的测定,所述装置具有其特异性的益处。

[0284] 图 2 和 3 显示了此类其他装置,其毛细扩散工具 2 包括上游区组 71,所述上游区组 71 包含:

[0285] - 上游释放区 4,和

[0286] - 第一捕获区 51,与所述上游释放区 4 互补。

[0287] 适当时,两种变异对于直接下游的(一个或多个)区组 72 是可行的。。

[0288] 在根据图 2 的第一种变异中,毛细扩散工具 2 仍然包括下游区组 72,所述下游区组 72 包含:

[0289] - 下游释放区 6,和然后

[0290] - 若干连续的第二捕获区 52,此处三个,与所述下游释放区 6 互补。

[0291] 此实施方式具有提供特别可靠的半定量结果,避免钩状效应的益处。

[0292] 根据此实施方式,对于测定 hCG 激素,可以预期其试剂浓度和特异性进行了调整的上游区组 71 仅检测对应于缺失时期的第一天的 hCG 激素浓度,即约 20mIU/mL。

[0293] 下游释放区 6 含有浓度高于上游释放区 4 处存在的浓度的检测试剂,允许在第二个下游连续捕获区 52 处检测和区分多种分析物浓度。

[0294] 在此形态中,对于对应于缺失时期的第一天的 hCG 激素浓度,如此仅在第一个捕获区 51 处发现可视和可测量的检测信号。

[0295] 对于对应于怀孕的一或多周的 hCG 激素浓度,可视和可测量的信号将连续出现在下游释放区 6 下游的第二捕获区 52 处,提供了测试的样品的 hCG 激素浓度半定量分析。

[0296] 根据相同的实施形态,从适于测定前列腺特异性抗原(或 PSA)的试剂可以检测“诊断值阈值浓度”(4ng/mL)并且与相同分析物的其他更高浓度(多至 200ng/mL)区分,同样允许半定量方法。

[0297] 同样地,根据相同形态,通过适于测定便血(血红蛋白)(FOB 或大便潜血测试)的试剂可以检测“诊断值阈值浓度”(40ng/mL)并且与相同分析物的更高浓度(多至 1000ng/mL 和更多)区分,因而提供了半定量结果。

[0298] 根据图 2 的第一种变异的未陈述的备选方案,上游区组 71 包含第二捕获区,也与上游释放区 4 互补。

[0299] 此第二捕获区位于上游释放区 4 和第一捕获区 51 的下游,但仍在下游区组 72 的上游。

[0300] 在此情况中,毛细扩散工具 2 在上游包括第一区组 7,所述第一区组 7 包含:

[0301] - 上游释放区 4,

[0302] - 两个连续的上游捕获区 51,与所述上游释放区 4 互补,

[0303] 并且然后在下游是第二区组 7,包含:

[0304] - 下游释放区 6,和

[0305] - 若干第二连续捕获区 52,此处为三个,与所述下游释放区 6 互补。

[0306] 在根据图 3 的第二种变异中,扩散工具 2 还包括连续的下游区组 72,此处为三个,各包含:

[0307] - 释放区 6,和

[0308] - 捕获区 52,与所述相关的释放区 6 互补。

[0309] 在测定单种分析物的情况下,此实施方式具有优化连续释放和捕获区中的检测阈值的益处。

[0310] 在此变异中,从上游至下游逐渐增加连续的释放区 4、6 中的检测试剂浓度,同时保持每个捕获区 52 中相同的捕获试剂浓度可能是有兴趣的。

[0311] 此方法在多个浓度值具有诊断值(阈值)的分析物检测(例如 hCG、PSA 或血红蛋白)的环境下有益处。

[0312] 根据本发明的另一种方法,可以对于若干种分析物的测定修改释放区和捕获区。

[0313] 在此方面,根据图 4 描述的实施方式,毛细扩散工具 2 包括许多连续的区域 7,在此情况中为两个,每个由释放区 4、6 和互补捕获区 5 组成。

[0314] 在此情况中,上游区组 71 适用于通过合适的测试(竞争或夹心)测定第一分析物;下游区组 72 适用于通过合适的测试(竞争或夹心)测定第二分析物。

[0315] 此类装置将还包括一个或多个其他额外的区组 7, 每个适用于待测定的一种分析物。

[0316] 备选地, 根据图 5 描述的实施方式, 毛细扩散工具 2 包括区组 7, 此处为三个, 每个由后接若干个捕获区 5 (此处为两个) 的释放区 4、6 组成。

[0317] 同样地, 每个区组 7 适用于通过合适的测试 (竞争和 / 或夹心) 测定分析物中的一种。

[0318] 在每个区组 7 中存在若干个捕获区 5 使得能够获得这些分析物中的每种的半定量值。

[0319] 这些不同的实施方式在任何方面都不是限制性的。多个区组 7 及其各自的组成可以以任何方式调整。

[0320] 对照区

[0321] 在本发明的优选的实施方式中和如图 1 至 5 中所示的, 装置 1 还包括对照区 10, 所述对照区在下游形成并包含对照捕获试剂。

[0322] 此对照区 10 使得能够具有阳性对照以确保液体样品从毛细扩散工具 2 的存放区 3 到捕获区 5 的有效毛细扩散。

[0323] 此对照区 10 由永久固定在毛细扩散工具 2 的下游的捕获试剂组成。

[0324] 其可以是, 例如, 结合构成释放区 4、6 的 (一种或多种) 检测试剂的抗体。在这种情况下, 此对照捕获试剂允许 (一种或多种) 检测试剂迁移通过待检查的捕获区 5。

[0325] 备选地, 此对照捕获试剂独立于分析物并且仅允许液体样品沿着待检查的毛细扩散基质 2 扩散。

[0326] 实施

[0327] 可根据后文定义的使用方法或说明实施此类装置:

[0328] a) 液体样品存放在毛细扩散工具 2 的存放区 3 中,

[0329] b) 允许度过一段时间, 所述时间足以使得液体样品毛细扩散迁移至捕获区 5, 合适时, 至对照区 10,

[0330] c) 在捕获区 5 达到以下程度:

[0331] c. 1) 与分析物复合的检测试剂结合其区组 7 的互补捕获试剂 (夹心形态), 和 / 或

[0332] c. 2) 观测到检测试剂结合其区组 7 的捕获试剂 (竞争形态), 然后

[0333] d) 从获得的结果定性地和 / 或半定量地和 / 或定量地测定 (一种或多种) 分析物。

[0334] 在实践中, 在根据步骤 c) 的毛细迁移过程中, 液体样品连续通过串联形成的区组 7 中的每个。

[0335] 在实施夹心形态测试的每个区组 7 中, 存在的任何分析物与来自其释放区 4 或 6 的检测试剂形成复合物。

[0336] 如此形成的复合物前进至互补捕获区 5, 在这里它们被对应的捕获试剂固定。

[0337] 如此保留的复合物在此捕获区提供可见的和 / 或可测量的信号, 允许检测在所述液体样品中目的分析物的存在。

[0338] 适当时, 信号强度在连续捕获区处增加, 在 (一个或多个) 区组上分布直到逐渐耗

尽经标记的复合物。

[0339] 有利地通过适当的光学扫描仪测量信号强度。此信号强度例如以在全部或部分捕获区 5 上检测到的像素数表示。

[0340] 在此上下文中,当其包括单种分析物的若干连续的捕获区而克服钩状效应和获得半定量结果时,本发明的装置特别有兴趣。

[0341] 在此方面,每个捕获区处的信号强度与其他连续的捕获区的信号强度相比较。

[0342] 释放区的检测试剂和分析物之间形成的复合物的一部分被每个连续的捕获区捕获,直到迁移的液体样品中的分析物逐渐耗尽。

[0343] 每个捕获区处的信号强度因此相对于之前的捕获区增加,直到此强度达到其最大值的捕获区。然后该捕获区后接信号强度降低的捕获区。

[0344] 之前在相同的装置上实施标准溶液从而将液体样品中的分析物半定量结果指定给结果谱。

[0345] 然后能够通过将每个捕获区预先指定给液体样品中的分析物浓度范围将此结果改变为半定量值。

[0346] 在实施竞争形态测试的区组 7 中,存在的任何分析物阻止来自其释放区 4 或 6 的检测试剂和(一个或多个)互补捕获区 5 的捕获试剂之间形成复合物。

[0347] 在缺少分析物的情况下,形成复合物并在对应的捕获区处产生可见的和/或可测量的信号。

[0348] 同样地,当其包括单种分析物的若干连续的捕获区而克服钩状效应并且获得半定量结果时,本发明的装置特别有兴趣。

[0349] 可以相对于分析物浓度半定量地解释结果,诸如例如,低、中等、高和非常高。

[0350] 之前在相同的装置上实施标准溶液以在此再次将液体样品中的分析物半定量结果指定给结果谱。

[0351] 通过对每个捕获区预先指定样品中的分析物浓度范围,然后能够将此结果改变为半定量值。一般而言,测定装置也可以允许定量测量分析物。

[0352] 因此获得的视觉结果可以改变为例如以例如待测定的液体样品中的分析物的 ng/mL 或 mIU/mL 表示的浓度。

[0353] 出于该目的,对测定装置实施标准溶液以能够将液体样品中的分析物定量值指定给强度谱。

[0354] 例如,在每个捕获区处测量信号强度(像素数)。

[0355] 对于每个区组,随后将在这些捕获区上测量的信号强度相加。

[0356] 将不同区组的分别相加的强度改变为这样的比例,所述比例对应于一个区组的相加的强度相对于另一区组的相加的强度。

[0357] 如果需要,对这些比例进行插值,例如线性插值,有利地与每个预先测定的分析物浓度的范围的比例系数相关联,以获得对应于强度比例(横坐标)作为液体样品中分析物浓度(纵坐标)的函数的标准曲线。

[0358] 然后能够将对于经分析的样品获得的强度比例与所述液体样品中的分析物的定量值相关联,考虑到前述标准曲线。

[0359] 在特别的实施方式中,在支持物上应用检测和捕获试剂从而获得:

- [0360] - 上游区组,其包含两个捕获区 T1 和 T2,在第一释放区 L1 之后,和
- [0361] - 下游区组,其包含三个捕获区 T3、T4 和 T5,在第二释放区 L2 之后。
- [0362] 在此情况中,有利地用以下公式 (I) 评价累积强度比例 :
- [0363] 累积强度比例 = ( 三个下游捕获区 T3、T4 和 T5 的强度的总和 ) / ( 两个上游捕获区 T1 和 T2 的强度的总和 )
- [0364] 累积强度比例使得能够构建信号曲线 ( 强度 ) 作为待分析的液体样品中分析物的浓度的函数。
- [0365] 此类定量分析在下文实施例 2 中进一步说明。

## 实施例

- [0366] 实施例 1 :用于测定具有钩状效应的分析物的侧向流动免疫色谱装置
- [0367] 通过用侧向流动免疫色谱的 hCG 半定量浓度值的测定测试实施钩状效应评价。
- [0368] 明确地,为了抵消钩状效应,通常在单个释放区处对测定装置提供过量的经标记的抗体。
- [0369] 过量的抗体意为抗体浓度显著高于测定诊断兴趣阈值所要求的浓度。
- [0370] 从例如由 Fitzgerald 公司提供的“hCG 配对的抗体”(单 / 多克隆抗体) 构建多种装置。
- [0371] 根据标准方法 ( 例如由 Organon Teknika 公司开发的技术 ) 用胶体金 (Aldrich Sigma) 标记抗 hCG 抗体。
- [0372] 根据本文以下详述的不同布置 ( 测试 1 至 5 ) 将抗 hCG 抗体印在 Millipore 公司的硝化纤维膜 (NC) 上。
- [0373] 调整这些存放的抗体的浓度从而获得从 0.5 至 1  $\mu$ g/mL 的浓度。
- [0374] 用在 hCG 阴性的尿中稀释的不同浓度的 hCG 激素 (Sigma) 测试 4mm 的片 ( 或条状物 )。测试的稀释液是 0、25、50、100、1000、5000、50000、100000、250000 和 500000mIU/mL。
- [0375] 这些不同的浓度对应于正常条件下怀孕的每个阶段 ( 分别是怀孕的 0、1、2、3、4、5、6、9 至 12、13 至 16 周 )。
- [0376] 测试方案是在片状存放区上施用 150  $\mu$ L 每种稀释液 ;在 3 至 5 分钟后,在每个片的 ( 一个或多个 ) 捕获区上观察着色强度的存在。
- [0377] 记录结果并遵循一般适用于读取此类型的定性测试的标准解释结果,即 :
- [0378] 0: 没有着色
- [0379]  $\pm$ : 轻微着色,不明确的,边界线,鬼线 (ghost line), 不容易可见
- [0380] +: 淡着色但清晰可见
- [0381] ++: 清晰可见的线
- [0382] +++: 强烈线着色
- [0383] ++++: 非常强烈线着色
- [0384] 测试 1: 具有单个释放区和单个捕获区 ( 测试线 1 ) 的装置
- [0385] 获得的结果在下表 n° 1 中显示。
- [0386] 表 1
- [0387]

|       |                  | 着色强度  |   |   |    |     |      |
|-------|------------------|-------|---|---|----|-----|------|
|       |                  | 测试线 1 |   |   |    |     |      |
| 怀孕周   | 浓度<br>HCG mIU/ml | Ø     | ± | + | ++ | +++ | ++++ |
| 0     | 0                | X     |   |   |    |     |      |
| 1     | 25               | X     |   |   |    |     |      |
| 2     | 50               |       |   | X |    |     |      |
| 3     | 100              |       |   |   | X  |     |      |
| 4     | 1000             |       |   |   |    | X   |      |
| 5     | 5000             |       |   |   |    | X   |      |
| 6     | 50000            |       |   |   | X  |     |      |
| 9-12  | 100000           |       |   | X |    |     |      |
| 13-16 | 250000           | X     |   |   |    |     |      |
|       | 500000           | X     |   |   |    |     |      |

[0388] 使用侧向流动免疫色谱的快速测试显示了 1000 和 5000mIU/ml 的 hCG 之间的剂量 / 应答曲线的线性。

[0389] 由于钩状效应 (“高剂量钩状效应”) 从这个最大浓度开始出现信号强度损失

[0390] 结果是, 此类测试不能区分结果的某些着色强度, hCG 浓度是否是 50mIU/mL 或 100000mIU/mL。

[0391] 测试 2: 具有单个释放区和两个连续的捕获区 (测试线 1 和测试线 2) 的装置

[0392] 生产含有第二捕获线 (测试线 2) 的片并然后用相同 hCG 浓度组进行测试。

[0393] 获得的结果在下表 n° 2 中显示。

[0394] 表 2

[0395]

|                  |  | 着色强度  |   |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |
|------------------|--|-------|---|---|----|-----|------|-------|---|---|----|-----|------|
|                  |  | 测试线 1 |   |   |    |     |      | 测试线 2 |   |   |    |     |      |
| 浓度<br>HCG mIU/ml |  | Ø     | ± | + | ++ | +++ | ++++ | Ø     | ± | + | ++ | +++ | ++++ |
| 0                |  | X     |   |   |    |     |      | X     |   |   |    |     |      |
| 25               |  | X     |   |   |    |     |      | X     |   |   |    |     |      |
| 50               |  |       |   | X |    |     |      | X     |   |   |    |     |      |
| 100              |  |       |   |   | X  |     |      |       |   | X |    |     |      |
| 1000             |  |       |   |   |    | X   |      |       |   |   | X  |     |      |
| 5000             |  |       |   |   |    | X   |      |       |   |   |    | X   |      |
| 50000            |  |       |   |   | X  |     |      |       |   |   |    | X   |      |
| 100000           |  |       |   | X |    |     |      |       |   |   | X  |     |      |
| 250000           |  | X     |   |   |    |     |      |       |   | X |    |     |      |
| 500000           |  | X     |   |   |    |     |      |       |   | X |    |     |      |

[0396] 在更高的浓度报道了钩状效应。事实上, 似乎引入第二捕获线将钩状效应的浓度阈值迁移至更高的浓度区。

[0397] 测试 3 :具有单个释放区和三个连续的捕获区 ( 测试线 1、测试线 2 和测试线 3) 的装置

[0398] 生产含有第三捕获线 ( 测试线 3) 的片并然后用相同 hCG 浓度组进行测试。

[0399] 获得的结果在下表 n° 3 中显示。

[0400] 表 3

[0401]

| 怀孕周   | 浓度<br>HCG mIU/ml | 着色强度  |   |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |       |   |   |    |     |      |
|-------|------------------|-------|---|---|----|-----|------|-------|---|---|----|-----|------|-------|---|---|----|-----|------|
|       |                  | 测试线 1 |   |   |    |     |      | 测试线 2 |   |   |    |     |      | 测试线 3 |   |   |    |     |      |
|       |                  | Ø     | ± | + | ++ | +++ | ++++ | Ø     | ± | + | ++ | +++ | ++++ | Ø     | ± | + | ++ | +++ | ++++ |
| 0     | 0                | X     |   |   |    |     |      | X     |   |   |    |     |      | X     |   |   |    |     |      |
| 1     | 25               |       | X |   |    |     |      | X     |   |   |    |     |      | X     |   |   |    |     |      |
| 2     | 50               |       |   | X |    |     |      |       | X |   |    |     |      | X     |   |   |    |     |      |
| 3     | 100              |       |   |   | X  |     |      |       |   | X |    |     |      |       | X |   |    |     |      |
| 4     | 1000             |       |   |   |    | X   |      |       |   |   | X  |     |      |       |   | X |    |     |      |
| 5     | 5000             |       |   |   |    | X   |      |       |   |   |    | X   |      |       |   |   | X  |     |      |
| 6     | 50000            |       |   |   | X  |     |      |       |   |   |    | X   |      |       |   |   | X  |     |      |
| 9-12  | 100000           |       |   | X |    |     |      |       |   |   | X  |     |      |       |   | X |    |     |      |
| 13-16 | 250000           | X     |   |   |    |     |      |       | X |   |    |     |      |       | X |   |    |     |      |
|       | 500000           | X     |   |   |    |     |      |       | X |   |    |     |      | X     |   |   |    |     |      |

[0402] 第三捕获线 ( 测试线 3) 不再更多地迁移钩状效应。这可能是由于释放区的经标记的抗体耗尽。

[0403] 测试 4 :具有单个释放区和三个连续的捕获区的装置

[0404] 根据测试 n° 3 的结论,我们保持了三个捕获区同时将单个释放区的经标记的抗体浓度加倍。

[0405] 发现这种配置倾向于具有强背景,使得测试不可读并且不可用。

[0406] 测试 5 :具有两个释放区和四个捕获区的装置

[0407] 在第一捕获线 ( 测试线 1) 之后引入第二释放区,后接捕获抗体的 3 个互补线。此配置对应于诸如以上关于图 2 描述的实施方式。

[0408] 用相同 hCG 浓度组测试此新平台。在下表 n° 4 中总结了获得的结果。

[0409] 引入与 3 个连续捕获线互补的第二释放区允许断言在第一捕获线 ( 测试线 1) 中获得的信号在哪个浓度范围并且,因此,宣布浓度范围,半定量地指向怀孕的阶段。

[0410] 此方法提供了对钩状效应问题的解决方案。

[0411]

表 4

|       |                  | 测试区 1 |   |   |    |     |      |  |  |  |   | 测试区 2: |   |    |     |      |       |   |   |    |     |       |   |   |   |    |     |      |
|-------|------------------|-------|---|---|----|-----|------|--|--|--|---|--------|---|----|-----|------|-------|---|---|----|-----|-------|---|---|---|----|-----|------|
|       |                  | 测试线 1 |   |   |    |     |      |  |  |  |   | 测试线 2  |   |    |     |      | 测试线 3 |   |   |    |     | 测试线 4 |   |   |   |    |     |      |
| 怀孕周   | 浓度<br>HCG mIU/ml | Ø     | ± | + | ++ | +++ | ++++ |  |  |  | Ø | ±      | + | ++ | +++ | ++++ | Ø     | ± | + | ++ | +++ | ++++  | Ø | ± | + | ++ | +++ | ++++ |
| 0     | 0                | X     |   |   |    |     |      |  |  |  | X |        |   |    |     |      | X     |   |   |    |     |       | X |   |   |    |     |      |
| 1     | 25               |       | X |   |    |     |      |  |  |  | X |        |   |    |     |      | X     |   |   |    |     |       | X |   |   |    |     |      |
| 2     | 50               |       |   | X |    |     |      |  |  |  |   | X      |   |    |     |      | X     |   |   |    |     |       | X |   |   |    |     |      |
| 3     | 100              |       |   |   | X  |     |      |  |  |  |   |        | X |    |     |      |       | X |   |    |     |       | X |   |   |    |     |      |
| 4     | 1000             |       |   |   |    | X   |      |  |  |  |   |        |   | X  |     |      |       |   | X |    |     |       |   | X |   |    |     |      |
| 5     | 5000             |       |   |   |    |     | X    |  |  |  |   |        |   |    | X   |      |       |   |   | X  |     |       |   |   | X |    |     |      |
| 6     | 50000            |       |   |   | X  |     |      |  |  |  |   |        |   |    |     | X    |       |   |   |    | X   |       |   |   |   | X  |     |      |
| 9-12  | 100000           |       |   | X |    |     |      |  |  |  |   |        |   |    |     |      |       |   |   |    | X   |       |   |   |   |    | X   |      |
| 13-16 | 250000           |       | X |   |    |     |      |  |  |  |   |        | X |    |     |      |       |   |   |    |     | X     |   |   |   |    |     | X    |
|       | 500000           |       | X |   |    |     |      |  |  |  |   | X      |   |    |     |      |       |   |   |    |     |       |   |   |   |    | X   |      |

[0412] 实施例 2 :用于定量测定具有钩状效应的分析物的侧向流动免疫色谱装置

[0413] 材料

[0414] 免疫色谱装置包含作为硝化纤维膜的多孔支持物,优选地,具有 8 至 15 微米之间

的孔大小和 2 至 3cm 之间的宽。

[0415] 样品片、缀合物片和吸收剂片的多孔材料选自多种选择的纤维素和玻璃纤维纸供应商,厚度在 0.2 和 1.0mm 之间取决于应用,孔隙度在 100 和 200 微米之间。

[0416] 从由 BiosPacifc 公司提供的 hCG 配对的抗体(单/多克隆抗体)构建抗体。

[0417] 缓冲溶液 PBS 中的抗 hCG 和抗  $\beta$ -hCG 单克隆和多克隆抗体浓度优选为 1mg/mL。

[0418] 根据标准方法(例如由 Organon Teknika 公司开发的技术)用胶体金(Aldrich Sigma)标记抗 hCG 抗体。

[0419] 抗 hCG 抗体印在 Millipore 公司的硝化纤维膜(NC)上。

[0420] 调整这些存放的抗体的浓度从而获得从 0.5 至 1  $\mu$ g/mL 的浓度。

[0421] 用于制备释放试剂(标志物)的胶体金优选地浓度为从 10 至 150D/mL,颗粒大小为 20 至 60 微米之间。

[0422] 制备并校准(根据国际标准 NIBSC)hCG 对照范围(Sigma)以获得范围从 0mIU/mL 至 1000000mIU/mL 的 hCG 浓度,所述浓度是评估测试的性能和其质量控制所需要的。测试的稀释液是 0、25、250、2500、25000、250000、500000 和 1000000mIU/mL。

[0423] 方法

[0424] 在硝化纤维支持物上应用检测和捕获试剂以获得:

[0425] - 第一释放区 L1,有利地在插入到样品片和印在 PVC 支持物上的膜之间的缀合物片上,

[0426] - 两个上游捕获区 T1 和 T2,在第一释放区 L1 之后,

[0427] - 第二释放区 L2,和

[0428] - 三个下游捕获区 T3、T4 和 T5,在第二释放区 L2 之后。

[0429] 第二释放区 L2 布置在第二上游捕获区 T2 和第一下游捕获区 T3 之间以有利地确保它们之间至少 2 毫米的距离。

[0430] 调整释放区和捕获区试剂的浓度以确保检测给定浓度(0 至 1000000mIU/mL)的期望的 hCG 分析物。

[0431] 在施用试剂后,在编程的温度和湿度条件下干燥硝化纤维支持物(通常 37°C 1h)。

[0432] 干燥后,使用印有试剂的硝化纤维支持物来建造母片形态测试(“bande de testàcouper en bandelette”),包含 PCV 支持物,印刷的硝化纤维膜,缀合物片(第一释放区),样品片和吸收剂片。

[0433] 样品片,缀合物片和吸收剂片是布置在具有印刷的硝化纤维膜的 PVC 支持物上的多孔材料,调整并任选地免疫化学处理以实际接收样品(样品片)、过滤样品、保证其与第一释放区中的试剂反应(缀合物片)、提供在膜上均匀的迁移和最终吸收过量的试剂并终止迁移(吸收剂片)。

[0434] 然后切割母片以获得从 2 至 6mm 宽,优选地,从 4mm 或 5mm 宽的片。

[0435] 然后在长方形状的塑料套中封装片(盒形态装置),准备使用。

[0436] 测试程序

[0437] 制备不同 hCG 浓度以获得跨越从 0 至 1000000mIU/mL 的 hCG 激素的浓度范围的对照范围

[0438] 每个浓度测试两次。

[0439] 一般而言,在不同测试单元上使用每种 hCG 浓度的 100 至 200 微升之间的样品。

[0440] 观察反应最多十分钟。

[0441] 用裸眼评估获得的结果(浓度范围)。

[0442] 然后,用光学阅读工具(仪器或阅读器)记录获得的结果,所述工具允许测量每个捕获线的强度(以像素表示)。

[0443] 由阅读器提供的定量结果(数字结果)是从这样的算法计算的,所述算法的基本计算考虑根据以下式(I)的累积强度比例:

[0444] 累积强度比例(CSR) = (三个下游捕获区 T3、T4 和 T5 的强度的总和)/(两个上游捕获区 T1 和 T2 的强度的总和)

[0445] 式(I)

[0446] 在本实验条件下获得的结果在下表 5 中显示。

[0447] 累积强度比例随液体样品中分析物浓度而增加。

[0448] 通过插值,累计强度比例允许构建信号曲线(强度)作为液体样品中分析物浓度的函数。

[0449] 然后能够在从 0 至 1000000mIU/mL 的范围上测定液体样品中 hCG 浓度,考虑在存在所述液体样品的条件下在所述测定装置上测量的此信号曲线和累积强度比例。

[0450]

表 5

| 以像素计的强度 / 捕获线              |       |        |        |        |        |        |         |       |
|----------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|-------|
| 以 mIU/mL 计的<br>hCG 分析物浓度   | 0     | 25     | 250    | 2500   | 25000  | 500000 | 1000000 |       |
| 捕获线 T1                     | 18886 | 108928 | 234085 | 278087 | 176567 | 29346  | 16915   | 10131 |
| 捕获线 T2                     | 17316 | 81398  | 173706 | 246662 | 146653 | 41915  | 24346   | 10415 |
| 总 2 条线                     | 36202 | 190326 | 407791 | 524749 | 323220 | 71261  | 41261   | 20546 |
|                            |       |        |        |        |        |        |         |       |
| 捕获线 T3                     | 6295  | 33339  | 113129 | 229576 | 142516 | 45046  | 28946   | 13308 |
| 捕获线 T4                     | 1965  | 28398  | 111021 | 164484 | 164342 | 42531  | 34208   | 15331 |
| 捕获线 T5                     | 3502  | 30833  | 61406  | 99659  | 121671 | 36346  | 38123   | 22162 |
| 总 3 条线                     | 11762 | 92570  | 285556 | 493719 | 428529 | 123923 | 101277  | 50801 |
|                            |       |        |        |        |        |        |         |       |
| 总比像素<br>(T3+T4+T5)/(T1+T2) | 0,325 | 0,486  | 0,700  | 0,941  | 1,326  | 1,739  | 2,455   | 2,473 |

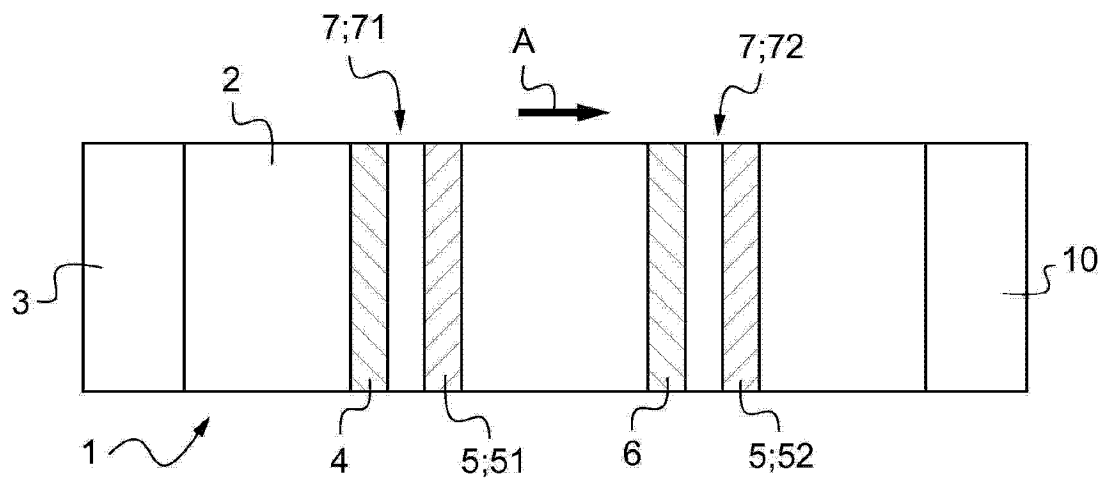


图 1

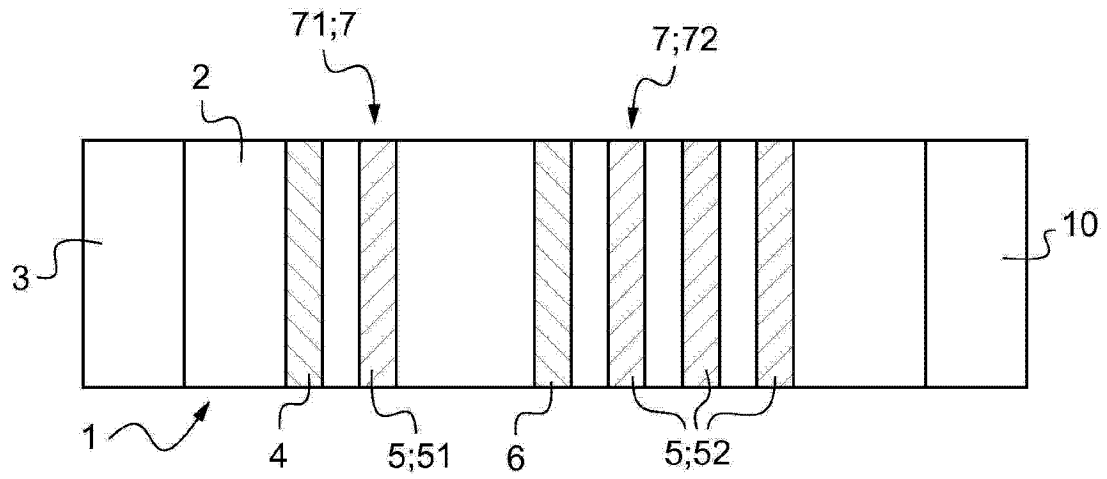


图 2

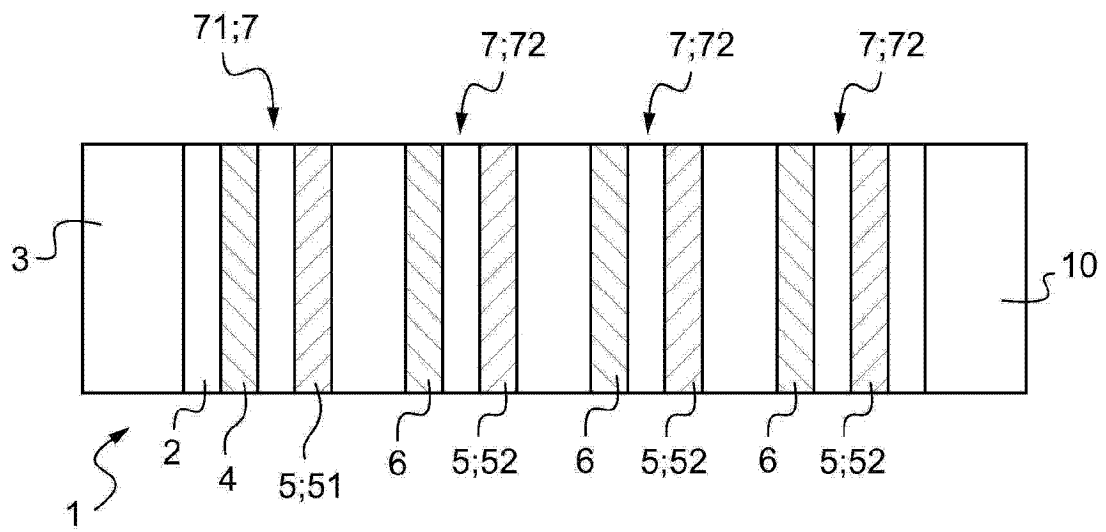


图 3

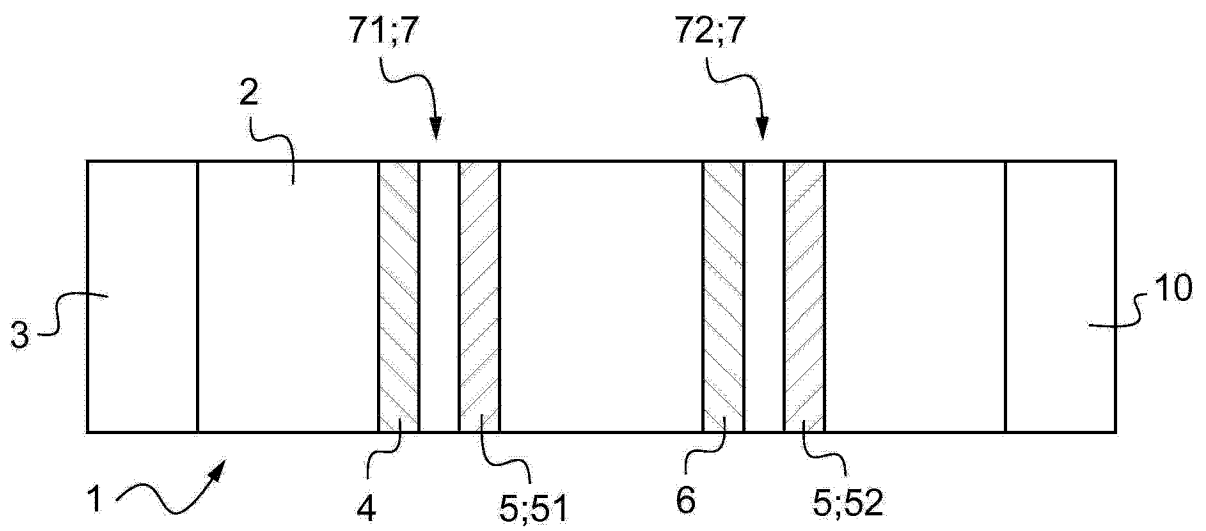


图 4

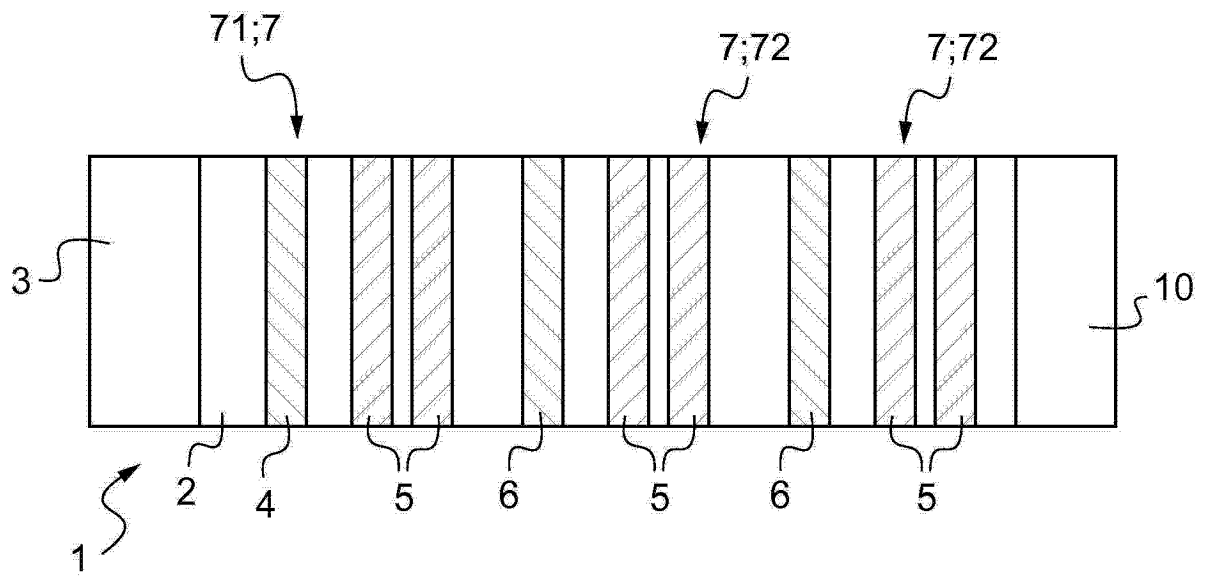


图 5