

## 用于检测生物样本中的错误折叠蛋白质的装置和方法

### 技术领域

本申请涉及生物检测技术，更具体地，涉及一种用于检测生物样本中错误折叠蛋白质的装置和方法。

### 背景技术

子痫前期是一种妊娠过程相关的疾病，目前对于其发生机制知之甚少，通常指孕前血压正常的孕妇在妊娠 20 周以后出现高血压、蛋白质尿，同时伴随头痛、眼花、恶心、呕吐、上腹不适等症状。

目前，临床上针对子痫前期的诊断主要是依赖其临床特征如高血压以及蛋白质尿进行判定。科研工作者一直致力于研究用于子痫前期诊断的新的标志物及新的方法。美国耶鲁大学的科研人员于孕妇尿液中发现一些错误折叠的蛋白质分子与子痫前期的发生存在明显的相关性，这些错误折叠的蛋白质分子可与刚果红染料选择性的结合，而刚果红染料也可与纤维素结合，并由此开发了一种基于斑点扩散的试验方法用于检测孕妇尿液中的错误折叠蛋白质以用于子痫前期的诊断或预测。

然而，现有技术采用的斑点扩散技术不适合处理弱阳性样本，难以有效区分弱阳性样本与阴性样本，容易引起误判。因此，有必要提供一种改进的检测方法和装置。另外，在本领域中对于能够进行定量和/或具有改进的灵敏度、特异度和准确度的检测方法和装置也存在需求。

### 发明内容

本公开满足了上述需求中的至少一个。本申请的一个目的在于提供一种能够有效检测错误折叠蛋白质的装置和方法。

在本申请的一个方面，提供了一种用于检测生物样本中的错误折叠蛋白或其聚集体的方法，其包括：(a) 提供生物样本；(b) 使所述生物样本与检测试剂混合，所述检测试剂能够与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合；(c) 使与所述检测试剂混合的所述生物样本接触并通过分离基质，所述分离基质被构造以吸附未与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂并允许与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂通过；(d) 以游离液体状态收集从所述分离基质通过的生物样本；以及(e) 检测所收集的呈游离液体状态的生物样本中所述检测试剂的存在，其中所述检测试剂的存在指示所述生物样本中存在所述错误折叠蛋白或其聚集体。在一个实施方案中，在步骤(d)中，在流体收集腔中收集所述生物样本，并且所收集的生物样本在所述流体收集腔中呈游离的液体状态。在进一步的实施方案中，所收集的所述生物样本在所述流体收集腔中能够自由流动。在仍进一步的实施方案中，所述流体收集腔中能够自由流动的液体体积为至少约 50  $\mu$ L、至少约 100  $\mu$ L、至少约 500  $\mu$ L、至少约 50  $\mu$ L、至少约 1 mL、至少约

3 mL、或约 3 mL 至约 5 mL。

在本申请的另一个方面，提供了一种用于检测生物样本中的错误折叠蛋白或其聚集体的装置，该装置包括：壳体，所述壳体限定流体分离腔与流体收集腔；其中，所述流体分离腔用于接收与检测试剂混合的所述生物样本，其中所述检测试剂能够与所述生物样本中的所述错误折叠蛋白或其聚集体结合，所述流体分离腔还用于从所述与检测试剂混合的所述生物样本中分离并保留未与所述生物样本中的所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的所述检测试剂，并允许与所述生物样本中的所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的所述检测试剂流过；以及其中，所述流体收集腔用于收集流过所述流体分离腔的所述生物样本。

在本申请的另一方面，还提供了一种试剂盒，其包括前述方面的用于检测生物样本中的错误折叠蛋白质的装置。

在本申请的又一方面，提供了本公开的装置在制备用于诊断或预测以错误折叠蛋白为特征的疾病的试剂盒中的用途。

在本申请的又一方面，提供了一种预测罹患以错误折叠蛋白为特征的疾病的风险的方法。

在本申请的又一方面，提供了（1）能够与错误折叠蛋白质特异性或其聚集体结合的检测试剂与（2）能够吸附游离状态的所述检测试剂的吸附介质的组合在制备用于诊断或预测以错误折叠蛋白为特征的疾病的装置或试剂盒中的用途。

以上为本申请的概述，可能有简化、概括和省略细节的情况，因此本领域的技术人员应该认识到，该部分仅是示例说明性的，而不旨在以任何方式限定本申请范围。本概述部分既非旨在确定所要求保护主题的关键特征或必要特征，也非旨在用作为确定所要求保护主题的范围的辅助手段。

### **附图说明**

通过下面说明书和所附的权利要求书并与附图结合，将会更加充分地清楚理解本申请内容的上述和其他特征。可以理解，这些附图仅描绘了本申请内容的若干实施方式，因此不应认为是对本申请内容范围的限定。通过采用附图，本申请内容将会得到更加明确和详细地说明。

图 1 示出了根据本申请一个实施例的用于检测生物样本中错误折叠蛋白质的装置 100；

图 2 示出了根据本申请一个实施例的用于检测生物样本中错误折叠蛋白质的装置 200；

图 3a-3b 示出了根据本申请一个实施例的用于检测生物样本中错误折叠蛋白质的装置 300；

图 4a-4c 示出了根据本申请一个实施例的用于检测生物样本中错误折叠蛋白质的装置 400；

图 5 示出了根据本申请一个实施例的用于检测生物样本中错误折叠蛋白质的方法 500。

图 6 示出了模拟样本的检测结果。左侧为模拟阳性样本收集液；右侧为模拟阴性样本收集液。

图 7 示出了氧化铝滤除尿液颜色测试结果。

图 8 示出了氧化铝作为分离材料的检测灵敏度测试。

图 9a-9c 示出了分别采用乙酸纤维素（图 9a）、干蛋白（图 9b）和微晶纤维素（图 9c）作为分离介质检测模拟样本的结果。各图中左侧为模拟阴性样本收集液；右侧为模拟阳性样本收集液。

图 10a-10c 示出了采用本发明的检测装置进行临床检测的过程。

### 具体实施方式

如在本文中使用的术语“基本上”、“约”和类似术语，是用作近似的术语而非程度的术语，且意图其说明本领域普通技术人员所公认的测定值或计算值中的固有偏差。同样，意图本文所述的任何数值范围包括包含在所述范围内的相同数值精度的所有子范围。例如，意图“1.0-10.0”的范围包括介于所述最小值 1.0 和所述最大值 10.0 之间(或包含其)的所有子范围，即，具有大于或等于 1.0 的最小值和小于或等于 10.0 的最大值，例如，2.4-7.6。意图本文所述的任何最大数值限制均包括其中包含的所有较低数值限制，且意图在本说明书中所述的任何最小数值限制均包括其中包含的所有较大数值限制。因此，本发明人保留修改本说明书(包括权利要求书)的权力，以明确描述包含在本文明确描述的范围之内的任何子范围。如本文所用，术语“约”是指在所描述的值之上或之下 10%以内的值。

在下面的详细描述中，参考了构成其一部分的附图。在附图中，类似的符号通常表示类似的组成部分，除非上下文另有说明。详细描述、附图和权利要求书中描述的说明性实施方式并非旨在限定。在不偏离本申请的主题的精神或范围的情况下，可以采用其他实施方式，并且可以做出其他变化。可以理解，可以对本申请中一般性描述的、在附图中图解说明的本申请内容的各个方面进行多种不同构成的配置、替换、组合，设计，而所有这些明确地构成本申请内容的一部分。

研究人员发现患有子痫前期的女性的尿液标本中存在 SERPINA-1 和白蛋白的独特的非随机切割产物。SERPINA-1 片段错误折叠并形成超分子聚集体的这一倾向使得人们考虑通过检测错误折叠蛋白质来早期诊断子痫前期病症。进一步的研究发现在患有子痫前期的女性的尿液中存在的错误折叠蛋白质能够与刚果红染料结合，因此现有技术中采用了加载刚果红染料的检测试纸来检测指示子痫前期的错误折叠蛋白质。例如，中国专利申请 CN108291905A 采用了侧向流层析技术，将刚果红染料以冻干形式内置在样本垫上。加入尿液样本后，尿液与刚果红染料混合后流过捕获器，游离的刚果红染料被捕获器捕获，与尿液中目标蛋白质（即错误折叠蛋白质）结合的刚果红染料则流过捕获器进入展示条区。由此，如果尿液中含有目的蛋白质，则在展示条区显示红色（阳性），如果尿液中没有目标蛋白质，则游离刚果红染料被捕获器捕获，从而在展示条区显示无色（阴性）。类似地，中国专利申请 CN109342737A 在检测试纸上采用了斑点扩散技术，即尿液样本与刚果红染料混合后，通过毛细管将一定量尿液点至滤纸上。对于阴性样本，其中的刚果红染料与滤纸结合会形成一个浓缩的红点，而对于阳性样本，由于刚果红染料与目标蛋白质结合，因

此样本中缺少游离的刚果红染料在滤纸上形成浓缩的红点，而是形成一个均匀扩散的红圈，即斑点扩散。通过判断浓缩红点或扩散斑点，即可进行子痫前期的早期诊断。

然而，本申请的发明人发现现有的用于检测错误折叠蛋白质的检测试纸存在缺陷，其不适合处理弱阳性样本。当用检测试纸检测弱阳性样本时，由于弱阳性样本中含有的错误折叠蛋白质的量相对较少，因此可能有部分刚果红染料不会结合错误折叠蛋白质，这使得检测试纸中仍存在一定量的游离刚果红染料。过多的游离刚果红染料同样会形成浓缩红点，或者在展示条区域显色，从而导致错误诊断结果。此外，对于侧向流层析，最多只能获得半定量结果，并且由于能够添加的样品量受限（ $\mu\text{L}$  级），检测特异度和准确度也并不理想。

为了解决现有技术存在的上述问题的一个或多个，本申请的发明人摒弃了传统的检测试纸或基于毛细作用或吸收垫吸力的侧向流技术，而是创造性地在液体状态下进行错误折叠蛋白质的检测。具体地，发明人利用容器装载混合了生物样本和染料如刚果红染料的溶液，该混合液经过分离基质处理后所收集的溶液的颜色可以被观测以表征生物样本中是否存在错误折叠蛋白质。一般来说，所收集的溶液的颜色越深，说明被分离基质吸附的染料比例越低，而与错误折叠蛋白质结合的染料比例越高。本公开的基于液体的检测方法和装置不仅可以通过目检进行定性或半定量检测，而且允许通过光学检测设备来实现定量检测。重要的是，本申请的发明人还出乎意料地发现，本公开的基于液体的检测方法和装置还获得了显著改进的特异度和准确度。

至少部分基于上述发现，本公开提供了一种基于液体的检测技术。

在一个方面中，提供了一种用于检测生物样本中的错误折叠蛋白或其聚集体的方法，其包括：(a) 提供生物样本；(b) 使所述生物样本与检测试剂混合，所述检测试剂能够与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合；(c) 使与所述检测试剂混合的所述生物样本接触并通过分离基质，所述分离基质被构造以吸附未与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂并允许与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂通过；(d) 以游离液体状态收集从所述分离基质通过的生物样本；以及(e) 检测所收集的呈游离液体状态的生物样本中所述检测试剂的存在，其中所述检测试剂的存在指示所述生物样本中存在所述错误折叠蛋白或其聚集体。在一个实施方案中，在步骤(d)中，在流体收集腔中收集所述生物样本，并且所收集的生物样本在所述流体收集腔中呈游离的液体状态。

在一些实施方案中，以游离液体状态收集的生物样本基本上未附着或吸附或结合于流体收集腔的内壁上，而是能够在流体收集腔中自由流动。这与侧向流层析中样品流基于毛细作用（毛细管床）或吸收垫的吸力从加样端向检测端定向流动不同，其中在检测区中的样品受到毛细作用或吸收垫吸力的束缚或限制。毛细作用或吸收垫吸力的有限性也限制了侧向流层析所允许的样品添加体积。而毛细管床或吸收垫的使用也使得无法通过光学方法进行定量检测。

在一些实施方案中，所收集的生物样本在流体收集腔中能够自由流动。在一些实施方案中，在流体收集腔中能够自由流动的液体体积为至少约 50  $\mu\text{L}$ 、至少约 100  $\mu\text{L}$ 、至少约 500  $\mu\text{L}$ 、至少约 50  $\mu\text{L}$ 、至少约 1 mL、至少约 3 mL、或约 3 mL 至约 5 mL，例如约 0.6 mL、7

mL、0.8 mL、0.9 mL、1 mL、1.1 mL、1.2 mL、1.3 mL、1.4 mL、1.5 mL、1.6 mL、1.7 mL、1.8 mL、1.9 mL、2.0 mL、2.1 mL、2.2 mL、2.3 mL、2.4 mL、2.5 mL、2.6 mL、2.7 mL、2.8 mL、2.9 mL、3.0 mL、3.5 mL、4.0 mL、4.5 mL、5.0 mL、6.0 mL、7.0 mL、8.0 mL、9.0 mL、或 10 mL。

在一些实施方案中，本公开的基于液体的检测技术允许添加具有至少约 50  $\mu$ L、至少约 100  $\mu$ L、至少约 0.5 mL、至少约 1 mL、至少约 3 mL、或约 3 mL 至约 5 mL 的体积的生物样本，例如约 0.6 mL、0.7 mL、0.8 mL、0.9 mL、1 mL、1.1 mL、1.2 mL、1.3 mL、1.4 mL、1.5 mL、1.6 mL、1.7 mL、1.8 mL、1.9 mL、2.0 mL、2.1 mL、2.2 mL、2.3 mL、2.4 mL、2.5 mL、2.6 mL、2.7 mL、2.8 mL、2.9 mL、3.0 mL、3.5 mL、4.0 mL、4.5 mL、5.0 mL、6.0 mL、7.0 mL、8.0 mL、9.0 mL、或 10 mL。

在一些实施方案中，本公开的基于液体检测的技术允许通过光学方法对所收集的液体进行定量检测。在一些实施方案中，流体收集器的至少一部分区域是透明的（例如提供透明观察窗口），以供使用者观察混合溶液的颜色或通过光学方法进行检测。可用于本公开的光学方法是光学分析领域中已知的，包括但不限于分光光度法。可用于本发明的光学方法还可以根据所使用的检测试剂进行选择，例如当检测试剂是荧光染料时，则荧光分析法可被使用。

在一个方面，本公开提供了一种用于检测生物样本中的错误折叠蛋白或其聚集体的装置，其包括：壳体，所述壳体限定流体分离腔与流体收集腔；其中，所述流体分离腔用于接收所述生物样本与检测试剂的混合液，其中所述检测试剂能够与所述生物样本中的错误折叠蛋白或其聚集体结合，所述流体分离腔含有分离基质，用于从所述混合液中吸附未与错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂，并允许与错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂流过；并且所述流体收集腔用于收集流过所述流体分离腔中的分离基质的生物样本。

在一些实施方案中，检测试剂例如刚果红染料可以在检测过程开始之前预先装载在容器中，或者也可以检测过程中加入到容器中（以固态或溶液形式）。在另一些实施方案中，生物样本也可以在同一容器中与检测试剂如刚果红染料混合，或者可以在其他容器中预先与检测试剂如刚果红染料混合。

本申请所使用的“容器”或“壳体”是指可用于容纳液体并以液态形式保存或收集液体如生物样本的元件，其可具有例如类似于量筒、烧杯、瓶子、试管的结构或任何其它可容纳液体的腔室。腔室的构型包括但不限于圆柱形、长方体型、圆锥形、半球型或上述形式的组合。容器或壳体可以包括一个或多个腔室，以分别用于检测过程中的不同处理操作或步骤，其中每个腔室可以用于一种或多种操作或步骤。可以理解，容器或壳体通常可以采用无色透明材料形成，例如采用玻璃、亚克力、塑料、聚酯或其他材料。聚酯可以是例如聚氯乙烯。在一些实施方案中，容器的一部分可以由不透明材料形成，但是至少部分区域是透明的（例如提供一些透明观察窗口），以供使用者观察混合溶液的颜色或通过光学方法进行检测。

容器或壳体可以包括一个或多个腔室，例如包括“流体接收腔”、“流体分离腔”和“流体收集腔”中的一个或多个。至少部分腔室相互流体连通或者可以以其他形式相互转移液体，例如通过倾倒或注入等方式将一个腔室中的液体转移到另一腔室中。根据具体处理的不同，腔室内可以包含物质，也可以不包含物质。在一些实施方案中，腔室内可以含有能够与生物样本中的错误折叠蛋白质或其他目标蛋白质相结合的检测试剂，如染料，或者含有能够捕获或吸附染料的分离基质材料。在一些实施方案中，检测试剂可以是例如染料，例如可见光染料或荧光染料，诸如偶氮染料或其类似物（如刚果红或伊文思蓝）、苯并噻唑类染料或其类似物（如硫黄素 T 和硫黄素 S）、苋菜红、亮黑、尼罗红、或其一种或多种的组合。在一些实施方案中，本申请的装置和方法被用于子痫前期的早期检测，相应地，可以用于结合该病症的错误折叠蛋白质的检测试剂可以是偶氮染料或其类似物，例如刚果红染料（即，4-氨基-3-[4-[4 (1-氨基-4-磺酸基-萘-2-基)偶氮苯基]苯基]偶氮-萘-1-磺酸二钠）。在一些实施方案中，检测试剂可以以固体形式包含在腔室中，或者也可以以溶液形式包含在腔室中。优选地，检测试剂可以以固体形式保存，这样当加入生物样本后，检测试剂与生物样本混合并以液体形式存在，这允许检测试剂与目标蛋白质充分结合。非溶液形式保存的检测试剂具有长期稳定性或较长的保质期。在一个实施方案中，干燥的检测试剂是刚果红，并且可以以例如 0.1  $\mu\text{g}$ -100  $\mu\text{g}$ ，更优选 0.2  $\mu\text{g}$ -50  $\mu\text{g}$ ，甚至更优选 1  $\mu\text{g}$  至 25  $\mu\text{g}$ （例如 2  $\mu\text{g}$ 、5  $\mu\text{g}$ 、10  $\mu\text{g}$ 、15  $\mu\text{g}$  或 20  $\mu\text{g}$ ）的量保存在腔室中，或者保存在密封袋中并在检测开始前或检测期间加入到对应的腔室中。检测试剂的颜色是可检测的，即肉眼可见的，可以通过目测检查和/或机械或电子阅读器检测。

正如前述，部分腔室中可以含有分离基质材料。分离基质材料因其空间结构和/或组成的特殊性，能够与目标蛋白质或某些其他特定蛋白质竞争结合检测试剂。值得注意的是，检测试剂对分离基质材料的亲和力要小于其对目标蛋白质（错误折叠蛋白或其聚集体）的亲和力。也就是说，如果样本中不含目标蛋白质，那么检测试剂就会与分离基质材料结合，从而使得检测试剂不能保留在所收集的生物样本中并使其显色；但是，如果生物样本中存在目标蛋白质，检测试剂就会与目标蛋白质结合，而不与分离基质材料结合，因此目标蛋白质与检测试剂的结合产物就会保留在液体中而流入流体收集腔，从而形成可观察的有色溶液。在一些实施方案中，分离基质材料可以是任何本领域技术人员所熟知能够通过氢键或范德华力等作用与游离检测试剂结合（例如包含自由羟基）的材料或表面具有微孔结构的介质，例如吸附介质或分子筛层析介质。在一些实施方案中，分离基质不吸附目标蛋白质（即，错误折叠蛋白质或其聚集体）或不与其结合。在一些实施方案中，分离基质可以是颗粒（例如粒径分布在约 100-200 目之间的范围，例如约 110 目、约 120 目、约 130 目、约 140 目、约 150 目、约 170 目、约 180 目或约 190 目）、纤维、或半固体（例如凝胶）的形式。

可以基于所使用的检测试剂和目标蛋白的亲和力来选择分离基质。在一些实施方案中，分离基质的材料可包括但不限于：棉花（如棉或棉纤维）、或棉纱布；蚕丝；纤维素，例如硝化纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、或木屑；聚合物类，例如聚酯、聚乙烯、聚砜、

聚乙烯醇、聚乙二醇（例如 PEG2000、PEG3000、PEG4000、PEG5000 或 PEG6000）、或聚丙烯酰胺；玻璃纤维；硅胶、明胶或葡聚糖凝胶；干蛋白或蛋白干粉，例如蛋清蛋白干粉；无机矿土类，例如沸石、陶土、高岭土、羧基磷灰石、蒙脱土；钙盐类，例如氯化钙、碳酸钙或磷酸钙；活性炭；或活性氧化铝；或上述物质的任何组合。在一些实施方案中，分离基质的材料选自活性氧化铝、微晶纤维素、乙酸钠纤维素、干蛋白、或其任何组合。在一些实施方案中，干蛋白或蛋白干粉可具有约 0.5-1 mm 或更大的粒径，和/或可包含嗜刚果红蛋白或具有 $\beta$ 片层结构。在一个实施方案中，活性氧化铝是酸性氧化铝，并可具有约 100-200 目例如约 100-150 目的粒径。

在一些实施方案中，壳体的流体腔室可以相互流体连通。优选地，这些流体腔室之间可以通过具有微孔或其他类似结构的隔离层，例如筛板、隔板或织网相隔。该隔离层可以避免一个流体腔室内填充的固体材料（例如分离基质材料）转移到另一流体腔室中，但是仍然允许液体在流体腔室之间流动。在一些实施方案中，隔离层可以将固体材料固定。在一个实施方案中，本公开的装置还包括隔离层，其设置在所述流体分离腔和所述流体收集腔之间，并分隔所述流体分离腔和所述流体收集腔。隔离层允许生物样本流过且阻止所述分离基质进入所述流体收集腔。隔离层可以是筛板、隔板或织网的形式，并且可以是一层或多层。

在一些实施方案中，隔离层的材料不吸附生物大分子，例如蛋白质。在一些实施方案中，具有微孔的隔离层如筛板、隔板或织网的材料可以包括无机材料（例如无机纤维或无机颗粒），例如陶瓷、玻璃、玻璃纤维、或金属（如不锈钢）；聚合物，包括聚合物纤维或颗粒，例如聚酰胺（如尼龙）、聚乙烯类（如超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）、聚四氟乙烯（PTFE）、聚苯乙烯、或聚氯乙烯（PVC））、聚丙烯酸类（如亚克力）、聚丙烯类、塑料（如多孔塑料）、聚酯、聚氨酯；纤维素如滤纸或木浆纤维素；或其他能够允许生物样本流过且阻止分离基质进入流体收集腔的材料。

在一些实施方案中，隔离层的材料是多孔塑料。多孔塑料又可称为泡沫塑料，是以合成树脂为基体，加入发泡剂及其它添加剂，经发泡作用形成的一种具有细孔海绵状结构的物质。常用的树脂包括聚乙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚氨酯等。

在一些实施方案中，隔离层的材料是亲水性的或疏水性的。疏水性材料可通过亲水剂表面改性或等离子处理而成为亲水性。

在一些实施方案中，隔离层可以是一层或多层。在一些实施方案中，隔离层可具有约 0.1-5 mm 的厚度，例如约 0.5-4 mm、约 1-3 mm、约 1.5-2.5 mm、约 1.2mm、约 1.3mm、约 1.4mm、约 1.5mm、约 1.6mm、约 1.7mm、约 1.8mm、约 1.9mm、约 2.0mm、约 2.3mm、约 3.2mm。

根据所使用的分离基质的尺寸，隔离层材料可以具有例如约 5 $\mu$ m-200 $\mu$ m 的孔径，例如 5 $\mu$ m、10 $\mu$ m、20 $\mu$ m、30 $\mu$ m、40 $\mu$ m、50 $\mu$ m、60 $\mu$ m、70 $\mu$ m、80 $\mu$ m、90 $\mu$ m、100 $\mu$ m、110 $\mu$ m、120 $\mu$ m、130 $\mu$ m、140 $\mu$ m、150 $\mu$ m、160 $\mu$ m、170 $\mu$ m、180 $\mu$ m 或 190 $\mu$ m。隔离层材料的孔径也可以小于 5 $\mu$ m 或大于 200 $\mu$ m，只要能够阻止分离基质进入流体收集腔。

在一个额外的实施方案中，本公开提供了一种多孔隔离元件，其被构造以允许生物样本流过且阻止分离基质进入。在一些实施方案中，多孔隔离元件是筛板。在一些实施方案中，多孔隔离元件通过选自以下的材料制备获得：无机材料（例如无机纤维或无机颗粒），例如陶瓷、玻璃、玻璃纤维、或金属（如不锈钢）；聚合物，包括聚合物纤维或颗粒，例如聚酰胺（如尼龙）、聚乙烯类（如超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）、聚四氟乙烯（PTFE）、聚苯乙烯、或聚氯乙烯（PVC））、聚丙烯酸类（如亚克力）、聚丙烯类、塑料（如多孔塑料）、聚酯、聚氨酯；纤维素如滤纸或木浆纤维素；或其任何组合。在一些实施方案中，多孔隔离元件具有约 0.1-5 mm 的厚度，例如约 0.5-4 mm、约 1-3 mm、约 1.5-2.5 mm、约 1.2mm、约 1.3mm、约 1.4mm、约 1.5mm、约 1.6mm、约 1.7mm、约 1.8mm、约 1.9mm、约 2.0mm、约 2.3mm、约 3.2mm。在一些实施方案中，多孔隔离元件可以具有例如约 5 $\mu$ m-200 $\mu$ m 的孔径，例如 5 $\mu$ m、10 $\mu$ m、20 $\mu$ m、30 $\mu$ m、40 $\mu$ m、50 $\mu$ m、60 $\mu$ m、70 $\mu$ m、80 $\mu$ m、90 $\mu$ m、100 $\mu$ m、110 $\mu$ m、120 $\mu$ m、130 $\mu$ m、140 $\mu$ m、150 $\mu$ m、160 $\mu$ m、170 $\mu$ m、180 $\mu$ m 或 190 $\mu$ m。

在本申请中，生物样本中能够结合检测试剂的目标蛋白质可以是例如错误折叠蛋白质或者其聚集体或超分子蛋白质聚集体，或者前述物质的混合物和每种蛋白质的片段。目标蛋白质可以包含 $\beta$ 片层结构。另外，目标蛋白质可以是嗜刚果红染料的。错误折叠蛋白质可以包括例如 $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶（SerpinA1）、血浆铜蓝蛋白质、重链 IgG、轻链 IgG、干扰素诱导蛋白质 6-16 (IF16-6, G1P3)、白蛋白质、其混合物或其片段或每种蛋白质的片段。然而，错误折叠蛋白质不限于前述蛋白质。例如，错误折叠蛋白质可以是导致或与蛋白质错误折叠病症有关的任意蛋白质，或者蛋白质的组合。

本申请的检测方法和装置可以被用于检测生物样本中错误折叠蛋白质、聚集蛋白质和/或超分子聚集蛋白质，其中生物样本来自于哺乳动物，包括但不限于人、灵长类动物或基因工程化的哺乳动物，并且哺乳动物可以是妊娠的。本文的检测方法、装置和试剂盒可用于指示或预测受试者患有子痫或子痫前期的风险。

生物样本可以是液体，例如尿液、血液、唾液、组织/组织间液、血清、血浆、脑脊液、羊水。在另一些实施方案中，生物样本可以是固体，并且在检测之前被处理为液体。本申请的检测方法可用于来自哺乳动物的生物样本。在人的情况下，所述方法可以用于妊娠（即孕龄）约 8 至 42 周，优选妊娠约 18 至 41 周，更优选约 20 至 41 周或 20 周至分娩的孕妇。但是，本申请的检测方法也可以用于产后哺乳动物。本公开的基于液体的检测装置和方法所检测到的至少一种目标蛋白质可以通过可视化检测从而获得定性或半定量结果或通过光学方法而获得定性结果。例如，经分离基质分离并收集得到的生物样本的颜色越深，则说明其中生物样本中的目标蛋白质含量越高，则受测试的患者患有相关病症的可能性也越大。

本申请的检测装置也可用于检测除子痫及子痫前期（包括重度子痫前期、非典型子痫前期）以外的蛋白质错误折叠病症。例如，所述装置可用于检测以下错误折叠的蛋白质病症或病况中的错误折叠的蛋白质，如阿尔茨海默氏病、脑 $\beta$ -淀粉样血管病、青光眼中的视网膜神经节细胞变性、朊病毒病、帕金森病和其他共核蛋白质病（synucleinopathy）、Tau

蛋白质病、额颞叶变性(FTLD)、FLTD\_FUS、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、亨廷顿病和其他三联症、重复障碍、痴呆(英国和丹麦家族性)、遗传性脑出血伴淀粉样变、CADASIL、亚历山大病(Alexander disease)、各种淀粉样变性、Serinopathies、II型糖尿病、包涵体肌炎/肌病、白内障、视网膜色素变性伴视紫红质突变、甲状腺髓样癌、垂体催乳素瘤、遗传性晶状体角膜营养不良、马洛里氏小体(Mallory body)、肺泡蛋白质沉积症、牙源性肿瘤淀粉样蛋白质变性、囊性纤维化、镰状细胞病和危重病肌病。

在一些实施方案中,本申请的检测装置和方法可以在大约10分钟或更少、在大约5分钟或更少,优选地大约3分钟或更少时间内提供测试结果。

本申请还包括用于检测生物样本中目标蛋白质的试剂盒。该试剂盒可包含用于本公开的用于检测生物样本中的错误折叠蛋白质的装置,和/或其他检测所需的组件。例如,试剂盒还可以包括用于将生物样本加入至壳体中的装置,例如吸液管或滴管以及装置的使用说明等。在一些实施方案中,试剂盒还可以包括具有不同颜色深度的颜色对照表,以便于使用者根据实际检测结果(颜色)对照该表进行判断。该装置不仅可以作为独立的实体使用,还可以以试剂盒的形式使用,这在某些临床或非临床环境中更有利。试剂盒可以包装在箱或聚酯薄膜袋中。试剂盒袋还可以单独包装,也可以多个包装,例如每包装有2、5、10、15、25、50或100个试剂盒。

在一些实施方案中,吸液管或滴管被构造为流体接收腔,其中容纳有检测试剂。检测试剂可以是粉末或颗粒形式。这样,当流体接收腔接收到生物样本后,其中保存的检测试剂可以如期待地混合并溶解到生物样本中,从而能够与生物样本中的目标蛋白充分结合。检测试剂也可以采用其他固体形式。例如,流体接收腔中可以具有基质材料(不同于本文描述的分离基质材料),例如海绵或类似结构,而检测试剂可以分散地附着于基质材料中。当生物样本被加入流体接收腔中时,基质材料上附着的检测试剂能够迅速溶解到生物样本中。替代地,检测试剂也可以采用溶液形式,当流体接收腔接收到生物样本后,检测试剂的溶液也能够迅速地与生物样本充分混合。在一些实施方案中,吸液管或滴管内还可以设置控制线(如阳性对照,例如 $\beta$ 片层)。

本申请的检测方法和装置可以由医务人员、非专业医疗人士或由患者自己(当患者为人类时)在临床实验室(在医院内或在医院外环境)、即时护理环境、医师办公室实验室、急诊室(例如在医院内)使用,或用作患者床旁测试(near-patient testing)装置或即时护理(point-of-care)装置。此外,本申请的检测方法和装置可以与其他诊断测定法(例如免疫测定法,例如检测与子痫前期相关的其他蛋白质(即生物标志物,例如sFlt-1、PLGF、PP-A、PP13、正五聚体蛋白质、抑制素-A、和可溶性内皮因子)的那些免疫测定法)和/或在诊断子痫前期中常用的其它方法或观察法(例如,血压读数、在诊断子痫前期中使用的临床测试,包括血小板计数、血清肌酸酐浓度、血清ALT(丙氨酸氨基转移酶)和AST(天门冬氨酸氨基转移酶),以及其它体征或症状例如体重增加、头晕、头痛、视力模糊等)联合。可以理解,本申请不对检测方法和装置的使用环境进行限制。

接下来,结合具体的实施方案,对本申请的装置和方法进行进一步的说明。

图 1 示出了根据本申请一个实施方案的用于检测生物样本中错误折叠蛋白质的装置 100。

如图 1 所示，装置 100 包括壳体 102，该壳体 102 可以包括一个或多个流体腔室。在图 1 所示的实施方案中，壳体 102 限定了流体接收腔 104、流体分离腔 106 以及流体收集腔 108。这些流体腔室 104、106 和 108 可以相互流体连通，从而允许液体在按照预定的顺序在不同的流体腔室内流动。

具体地，流体接收腔 104 位于壳体 102 的最上端，其通过壳体 102 上相邻的流体入口 110 可操作地与外部连通。在一些实施方案中，流体入口 110 上安装有可移除的密封塞 112，在装置 100 暂时不需要使用而被保存时，将密封塞 112 安装在流体入口 110 上可以保持壳体 102 内部空间的密闭性，避免其内部空间被污染。当需要使用装置 100 来检测生物样本时，密封塞 112 可以被从流体入口 112 移除，从而露出流体接收腔 104 的内部，这样，生物样本或其他液体即可通过该流体入口 110 注入到流体接收腔 104 中。可以理解，在一些实施方案中，也可以通过其他结构来密封流体入口 110。例如，流体入口 110 可以被可刺破或可移除的密封膜密封，在使用装置 100 进行检测前，该密封膜可以被刺破或移除来允许液体注入。

在一些实施方案中，流体接收腔 104 中含有检测试剂。优选地，检测试剂可以是粉末或颗粒形式。这样，当流体接收腔 104 接收到生物样本后，其中保存的检测试剂可以如期待地混合并溶解到生物样本中，从而能够与生物样本中的目标蛋白充分结合。检测试剂也可以采用其他固体形式。例如，流体接收腔 104 中可以具有基质材料，例如海绵或类似结构，而检测试剂可以分散地附着于基质材料（不同于下述的分离基质材料）中。当生物样本被加入流体接收腔 104 中时，基质材料上附着的检测试剂能够迅速溶解到生物样本中。替代地，检测试剂也可以采用溶液形式，当流体接收腔 104 接收到生物样本后，检测试剂的溶液也能够迅速地生物样本充分混合。

经过流体接收腔 104 时，检测试剂与生物样本充分混合以提高检测试剂与生物样本中的目标蛋白的结合程度。在一些实施方案中，流体接收腔可以具有减缓液体流速的构件，例如沙漏或蜿蜒流体通道，以增加生物样本流过流体接收腔 104 的时间。

流体接收腔 104 可以通过流体通道 114 与其下游的流体分离腔 106 相互流体连通，以允许混合了检测试剂的生物样本能够流入流体分离腔 106。在一些实施方案中，流体通道 114 可以由能够水解的薄膜密封（检测试剂采用固体形式），该密封薄膜能够将固体的检测试剂保留在流体接收腔 104 中，避免其在检测开始前不期待地进入流体分离腔 106 中。在另一些实施方案中，流体通道 114 也可以通过密封塞或类似流体密封结构密封（检测试剂可以采用固体形式或液体形式）。

可以理解，流体接收腔 104 主要用于接收并引入生物样本，并使得其与检测试剂充分混合。在一些实施方案中，壳体 102 也可以不具有流体接收腔 104，这时生物样本可以在壳体 102 外部预先与检测试剂混合。这样，经混合的生物样本可以直接经由流体入口 110 注入壳体 102 中，例如直接流入到流体分离腔 106 中。其中，对于混合后的生物样本，如

果其中存在目标蛋白质，那么该目标蛋白质与检测试剂充分结合，并且使得生物样本中游离形式的检测试剂的量显著减少。

仍参考图 1 所示，位于流体接收腔 104 下游的流体分离腔 106 中保存有本文所描述的分离基质材料。当生物样本流过流体分离腔 106 时，分离基质材料能够吸附游离态的检测试剂，避免游离态的检测试剂继续向下游流动，但不影响其它成分流经其继续向下游流动。可以理解，在一些实施方案中，为了增加生物样本在流体分离腔 106 内的停留时间，分离基质材料可以较为紧密地保存在流体分离腔 106 中，以降低流速。在另一些实施方案中，流体分离腔 106 也可以构造有用于减缓流速的构件，例如沙漏。在一些实施方案中，流体分离腔 106 可以具有预定长度（例如 1 厘米、2 厘米、5 厘米、10 厘米或更长）的流体路径，以保证足够的时间处理生物样本。

正如前述，分离基质材料能够与目标蛋白质或某些其他特定蛋白质竞争结合检测试剂，但检测试剂对分离基质材料的亲和力要小于其对目标蛋白质的亲和力。也就是说，已结合目标蛋白质的检测试剂会随着生物样本继续向下游流动，而其他游离态检测试剂则会被分离基质材料固定于流体分离腔 106 中并且不再向下游移动。

仍参考图 1 所示，在流经流体分离腔 106 后，生物样本继续向下游流动。具体地，生物样本经由流体分离腔 106 与流体收集腔 108 之间的流体出口 116 流入流体收集腔 108 中。在一些实施方案中，流体出口 116 可以设置有可移除的密封塞。

流体收集腔 108 用于收集流过流体分离腔 106 的生物样本。当生物样本中存在结合了检测试剂的目标蛋白质时，流体收集腔 108 中收集的生物样本会因检测试剂的存在而显色。流体收集腔 108 的至少一部分是可透光的，以使得其中收集的显色的生物样本能够被目视观察到或进行光学检测。在一些情况下，生物样本的量可能较少，因此流体收集腔 108 收集的液体的高度有限而影响观察效果。相应地，流体收集腔可以被构造为具有大体沿竖直方向向下渐缩的内部截面（例如锥形截面），从而提高腔内液体高度以便于观察。

从图 1 所示的实施方案可以看出，在进行检测时，壳体 102 可以被放置为使得流体接收腔 104、流体分离腔 106 和流体收集腔 108 从高到低排列。这样，生物样本液体本身的重力可以驱动其向下游流动，并且分别流经这些腔室而聚集在流体收集腔 108。可以理解，在一些其他的实施方案中，装置 100 也可以具有其他的流体驱动机构来驱动液体在壳体 102 中按照顺序流动。例如，可以在壳体 102 的最上游流体接收腔 104 上端设置一个可移除的流体泵、活塞或类似机构，当生物样本被加入到壳体 102 中之后，该流体泵或类似机构可以附接到壳体上，并且向壳体 102 内加压以使得生物样本流向流体分离腔 106 和流体收集腔 108。

图 2 示出了根据本申请另一实施方案的用于检测生物样本中错误折叠蛋白质的装置 200。相比于图 1 所示的装置 100，图 2 所示的装置 200 没有在壳体中包括流体接收腔。相应地，可以单独提供检测试剂，并且在壳体外预先混合检测试剂与生物样本。这样，当混合后的生物样本通过壳体 202 的流体入口 210 被注入到装置 200 中时，其可以直接进入流体分离腔 206，进而经流体分离腔 206 处理后再汇集在流体收集腔 208 中。

根据使用方法的不同，本申请的检测装置还可以采用其他适合的结构。图 3a 和图 3b 示出了根据本申请又一实施方案的用于检测生物样本中错误折叠蛋白质的装置 300，并且图 3a 和图 3b 分别是该检测装置 300 处于不同状态或阶段的示意图。

如图 3a 所示，装置 300 包括壳体 302，其中该壳体 302 进一步包括流体分离腔 306、以及与流体分离腔 306 流体连通的流体收集腔 308。取决于检测过程的不同阶段，流体收集腔 308 同时还作为流体接收腔使用，这将在下面详细说明。

具体地，流体收集腔 308 中可以预先装载有检测试剂。参考图 3a，在刚开始进行检测时，将流体收集腔 308 放置于流体分离腔 306 的上方。类似于图 1 所示的流体接收腔 104，生物样本经由流体入口 310 注入流体收集腔 308（此时流体收集腔 308 作为流体接收腔使用），并且与流体收集腔 308 内装载的检测试剂充分混合。之后，受重力作用，混合的生物样本从流体收集腔 308 经流体通道流入流体分离腔 306，并且基本完全地带走流体收集腔 308 中的检测试剂。在流体分离腔 306，其中的分离基质材料结合并吸附生物样本中游离的检测试剂，从而将其保留在其中。

接着，如图 3b 所示，在以图 3a 所示的方向稍微装置 300 放置一段时间（例如 5 秒、10 秒、20 秒、30 秒、2 分钟或更长）后，利用密封塞 312 将流体入口 310 密封，以避免液体流出壳体 302。接着，将装置 300 倒置，使得流体收集腔 308 放置于流体分离腔 306 的下方。这样，受重力作用，生物样本将经由流体通道由流体分离腔 306 重新流回流体收集腔 308，并且在其中汇集。可以理解，由于流体收集腔 308 中原有的检测试剂基本上已全部溶解在生物样本中并被带入流体分离腔 306 中，因此流体收集腔 308 不残留有检测试剂。在一些实施方案中，流体收集腔 308 中容纳的检测试剂的量不超过流体分离腔 306 能够保留（即结合）的检测试剂的量。

在一些实施方案中，检测试剂也可以不预先加载在流体收集腔 308 中，而是在装置 300 外预先与生物样本混合，或者分别或同时与生物样本加入到流体收集腔 308 中。

可以看出，相比于图 1 所示的装置 100，图 3a 和 3b 所示的装置 300 结构更简单，制造和使用成本更低。

图 4a、图 4b 和图 4c 示出了根据本申请再一实施方案的用于检测生物样本中错误折叠蛋白质的装置 400，并且其分别是该检测装置 400 处于不同状态或阶段的示意图。

如图 4a 至图 4c 所示，相比于图 1 至图 3b 所示的一体式结构，装置 400 的壳体 402 采用分体式结构，其包括多个独立构造并且相互分离的腔体。但是，每个腔体均具有开口以允许液体流入和/或流出。接下来，结合实际检测或使用时的顺序，对装置 400 进行进一步地说明。

如图 4a 所示，壳体 402 包括流体接收腔 404。在一些实施方案中，流体接收腔 404 用于接收生物样本，并且将预先或检测时加入的检测试剂与生物样本混合，以便于生物样本中的目标蛋白质能够与检测试剂充分结合。

继续，如图 4b 所示，壳体 402 还包括流体分离腔 406，其中含有分离基质材料。使用者可以将流体接收腔 404 倒置，以将混合的生物样本从流体接收腔 404 倾倒入流体分离腔

406 中。这样，游离态的检测试剂即可被分离基质材料处理而从生物样本中分离，并且吸附结合在分离基质材料中。

如图 4c 所示，壳体 402 还包括流体收集腔 408，其用于收集经分离基质材料处理的生物样本。使用者可以将流体分离腔 406 倒置，以将混合的生物样本从流体分离腔 406 倾倒入流体收集腔 408 中。如果原始的生物样本中含有目标蛋白，那么其就在检测过程中结合检测试剂，并且最终携带检测试剂而被收集在流体收集腔 408 中并在其中显色。可以理解，在一些实施方案中，流体收集腔 408 可以与流体接收腔共用一个腔室，也即一个腔室在检测开始时作用为流体接收腔，而在检测后期作用为流体接收腔。在另一些实施方案中，也可以不提供流体接收腔，而是在装置 400 外部预先混合检测试剂与生物样本。

本申请上述实施方案的用于检测生物样本中的错误折叠蛋白质的装置可以被提供为试剂盒。

图 5 示出了根据本申请一个实施方案的用于检测生物样本中的错误折叠蛋白质的方法 500。如图 5 所示，该方法 500 包括：在步骤 502，提供壳体，所述壳体限定流体分离腔与流体收集腔；在步骤 504，由所述流体分离腔接收与检测试剂混合的生物样本，其中所述检测试剂能够与所述生物样本中的错误折叠蛋白质结合；在步骤 506，由所述流体分离腔从与检测试剂混合的生物样本中分离并保留未与生物样本中的错误折叠蛋白质结合的检测试剂，从而使得与生物样本中的错误折叠蛋白质结合的检测试剂流过；以及在步骤 508，由所述流体收集腔收集流过所述流体分离腔的生物样本。

可以理解，本申请上述实施方案中的装置 100-400 可以用于实施用于检测生物样本中的错误折叠蛋白质的方法。

因此，在一个方面，本方面提供了一种用于检测生物样本中的错误折叠蛋白或其聚集体的方法，所述方法包括：提供壳体，所述壳体限定流体分离腔与流体收集腔；由所述流体分离腔接收与检测试剂混合的生物样本，其中所述检测试剂能够与所述错误折叠蛋白其聚集体结合；由所述流体分离腔从所述与检测试剂混合的所述生物样本中分离并保留未与所述错误折叠蛋白其聚集体结合的检测试剂，从而使得与所述错误折叠蛋白其聚集体结合的检测试剂流过；以及由所述流体收集腔收集流过所述流体分离腔的生物样本。

在一些实施方案中，所述壳体还限定流体接收腔，所述流体分离腔位于所述流体接收腔与所述流体收集腔之间。进一步地，所述方法还包括：在由所述流体分离腔接收与检测试剂混合的生物样本之前，由所述流体接收腔接收与检测试剂混合的生物样本，并且使得所述生物样本经由所述流体接收腔流入所述流体分离腔。

在一些实施方案中，所述壳体还限定流体接收腔，所述流体分离腔位于所述流体接收腔与所述流体收集腔之间，并且所述流体接收腔中容纳有检测试剂。进一步地，所述方法还包括：在用所述流体分离腔接收与检测试剂混合的生物样本之前，由所述流体接收腔接收所述生物样本，并且使得所述生物样本与所述检测试剂混合，从而与检测试剂混合的生物样本经由所述流体接收腔流入所述流体分离腔。

在一些实施方案中，所述方法还包括：在由所述流体分离腔接收与检测试剂混合的生物样本之前，由所述流体收集腔接收与检测试剂混合的生物样本，并且使得所述生物样本经由所述流体收集腔流入所述流体分离腔。

在一些实施方案中，所述流体收集腔中容纳有检测试剂。所述方法还包括：在用所述流体分离腔接收与检测试剂混合的生物样本之前，由所述流体收集腔接收所述生物样本，并且使得所述生物样本与所述检测试剂混合，从而与检测试剂混合的生物样本经由所述流体收集腔流入所述流体分离腔。

在一些实施方案中，所述流体接收腔与所述流体分离腔流体连通。

在一些实施方案中，所收集的所述生物样本在所述流体收集腔中能够自由流动。在一些进一步的实施方案中，所述流体收集腔中能够自由流动的液体体积为至少约 50  $\mu\text{L}$ 、至少约 100  $\mu\text{L}$ 、至少约 500  $\mu\text{L}$ 、至少约 1 mL、至少约 3 mL、或约 3 mL 至约 5 mL。

在一个方面，本公开还提供了一种预测受试者罹患以错误折叠蛋白为特征的疾病的风险的方法，其包括根据本公开的方法或使用本公开的装置检测生物样本中错误折叠蛋白的存在，其中所示错误折叠蛋白的存在指示所示受试者患有或处于罹患以错误折叠蛋白为特征的疾病的风险。

此外，本公开的装置和方法还可用于在患有妊娠高血压病症的患者或可能疑似患有子痫前期的患者中诊断子痫前期或进行区分性诊断的方法，其包括以下步骤：a) 从具有高血压的妊娠患者获得生物样本（如尿液），和 b) 采用本公开的方法或装置检测所述生物样本中错误折叠蛋白的存在，由此提供或支持患者子痫前期的诊断或充当区分性诊断。在一些实施方案中，本公开还包括一种治疗疑似患有子痫前期的妊娠哺乳动物的方法，其包括：a) 采用本公开的方法或装置检测来自哺乳动物的生物样本中错误折叠蛋白的存在，从而确定指示妊娠的哺乳动物患有子痫前期的错误折叠蛋白的存在；和 b) 使妊娠的哺乳动物分娩以治疗子痫前期。

### 实施方案

本公开考虑了包括但不限于以下实施方案，以及以下实施方案中描述的特征的所有组合。

实施方案 1. 一种用于检测生物样本中的错误折叠蛋白或其聚集体的方法，其包括：

- (a) 提供生物样本；
- (b) 使所述生物样本与检测试剂混合，所述检测试剂能够与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合；
- (c) 使与所述检测试剂混合的所述生物样本接触并通过分离基质，所述分离基质被构造以吸附未与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂并允许与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂通过；
- (d) 以游离液体状态收集从所述分离基质通过的生物样本；以及
- (e) 检测所收集的呈游离液体状态的生物样本中所述检测试剂的存在，其中所述检测试剂的存在指示所述生物样本中存在所述错误折叠蛋白或其聚集体。

实施方案 2. 根据实施方案 1 所述的方法, 其中所述错误折叠蛋白或其聚集体选自错误折叠蛋白、蛋白聚集体、超分子蛋白聚集体、错误折叠蛋白片段、蛋白聚集体片段、超分子蛋白聚集体片段和其任何组合。

实施方案 3. 根据实施方案 1 或 2 所述的方法, 其中所述错误折叠蛋白或其聚集体包含 $\beta$ 片层结构。

实施方案 4. 根据实施方案 1-3 中任一项所述的方法, 其中在步骤(b)中, 与所述检测试剂混合的所述生物样本具有至少约 0.5 mL、至少约 1 mL、至少约 3 mL、或约 3 mL 至约 5 mL 的体积。

实施方案 5. 根据实施方案 4 所述的方法, 其中在步骤(d)中, 在流体收集腔中收集所述生物样本, 并且所收集的生物样本在所述流体收集腔中呈游离的液体状态。

实施方案 6. 根据实施方案 5 所述的方法, 其中所收集的所述生物样本在所述流体收集腔中能够自由流动。

实施方案 7. 根据实施方案 6 所述的方法, 其中所述流体收集腔中能够自由流动的液体体积为至少约 50  $\mu$ L、至少约 100  $\mu$ L、至少约 500  $\mu$ L、至少约 1 mL、至少约 3 mL、或约 3 mL 至约 5 mL。

实施方案 8. 根据实施方案 5-7 中任一项所述的方法, 其中所述流体收集腔不提供毛细作用。

实施方案 9. 根据实施方案 5-8 中任一项所述的方法, 其中所收集的呈游离液体状态的生物样本未附着或吸附或结合于所述流体收集腔的内壁上或者基本上未附着或吸附或结合于所述流体收集腔的内壁上。

实施方案 10. 根据实施方案 1-9 中任一项所述的方法, 其中所收集的呈游离液体状态的生物样本允许通过光学方法进行步骤(e)的所述检测。

实施方案 11. 根据实施方案 1-10 中任一项所述的方法, 其中通过视觉法或光学方法进行步骤(e)的所述检测。

实施方案 12. 根据实施方案 1-11 中任一项所述的方法, 其中所述检测试剂能够与错误折叠蛋白质特异性结合。

实施方案 13. 根据实施方案 1-12 中任一项所述的方法, 其中所述检测试剂是染料, 例如可见光染料或荧光染料, 例如偶氮染料或其类似物(例如刚果红或伊文思蓝)、苯并噻唑类染料或其类似物(例如硫黄素 T 和硫黄素 S)、苋菜红、亮黑或尼罗红。

实施方案 14. 根据实施方案 1-13 中任一项所述的方法, 其中所述分离基质包括选自下组的一种或多种的材料: 棉或棉纱布; 蚕丝; 纤维素, 例如硝化纤维素、微晶纤维素、乙酸钠纤维素、或木屑; 聚合物类, 例如聚酯、聚乙烯、聚砜、聚乙烯醇、聚乙二醇(例如 PEG2000、PEG3000、PEG4000、PEG5000 或 PEG6000)、或聚丙烯酰胺; 玻璃纤维; 硅胶、明胶或葡聚糖凝胶; 干蛋白或蛋白干粉, 例如蛋清蛋白干粉; 无机矿土类, 例如沸石、陶土、高岭土、羧基磷灰石、蒙脱土; 钙盐类, 例如氯化钙、碳酸钙或磷酸钙; 活性炭; 或活性氧化铝。

实施方案 15. 根据实施方案 1-14 中任一项所述的方法, 其中所述分离基质包括活性氧化铝, 并且所述染料是刚果红或其类似物。

实施方案 16. 根据实施方案 1-15 中任一项所述的方法, 其中所述生物样本来自疑似患有蛋白质错误折叠病或处于罹患蛋白质错误折叠病的风险的哺乳动物, 例如人类。

实施方案 17. 根据实施方案 16 所述的方法, 其中所述蛋白质错误折叠病选自包括以下的组: 子痫前期、重度子痫前期、非典型子痫前期、子痫、阿尔茨海默氏病、脑 $\beta$ -淀粉样血管病、青光眼中的视网膜神经节细胞变性、朊病毒病、帕金森病和其他共核蛋白病、Tau 蛋白病、额颞叶变性 FTLD、FLTD\_FUS、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿病和其他三联症、重复障碍、痴呆 (英国和丹麦家族性)、遗传性脑出血伴淀粉样变、CADASIL、亚历山大病、各种淀粉样变性、Serinopathies、II 型糖尿病、包涵体肌炎/肌病、白内障、视网膜色素变性伴视紫红质突变、甲状腺髓样癌、垂体催乳素瘤、遗传性晶状体角膜营养不良、马洛里氏小体、肺泡蛋白沉积症、牙源性肿瘤淀粉样蛋白变性、囊性纤维化、镰状细胞病和危重病肌病。

实施方案 18. 一种用于检测生物样本中的错误折叠蛋白或其聚集体的装置, 其特征在于, 所述装置包括:

壳体, 所述壳体限定流体分离腔与流体收集腔;

其中, 所述流体分离腔用于接收所述生物样本与检测试剂的混合液, 其中所述检测试剂能够与所述生物样本中的所述错误折叠蛋白或其聚集体结合, 所述流体分离腔含有分离基质, 用于从所述混合液中吸附未与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂, 并允许与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂流过; 并且

所述流体收集腔用于收集流过所述流体分离腔中所述分离基质的生物样本。

实施方案 19. 根据实施方案 18 所述的装置, 其中所述错误折叠蛋白或其聚集体选自错误折叠蛋白、蛋白聚集体、超分子蛋白聚集体、错误折叠蛋白片段、蛋白聚集体片段、超分子蛋白聚集体片段和其任何组合。

实施方案 20. 根据实施方案 18 或 19 所述的装置, 其中所述错误折叠蛋白或其聚集体包含 $\beta$ 片层结构。

实施方案 21. 根据实施方案 18-20 中任一项所述的装置, 其中所述检测试剂能够与错误折叠蛋白质特异性结合。

实施方案 22. 根据实施方案 18-21 中任一项所述的装置, 其中所述检测试剂是染料, 例如可见光染料或荧光染料, 例如偶氮染料或其类似物 (例如刚果红或伊文思蓝)、苯并噻唑类染料或其类似物 (例如硫黄素 T 和硫黄素 S)、苋菜红、亮黑或尼罗红。

实施方案 23. 根据实施方案 18-22 中任一项所述的装置, 其中所述分离基质包括选自下组的一种或多种材料: 棉或棉纱布; 蚕丝; 纤维素, 例如硝化纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、或木屑; 聚合物类, 例如聚酯、聚乙烯、聚砜、聚乙烯醇、聚乙二醇 (例如 PEG2000、PEG3000、PEG4000、PEG5000 或 PEG6000)、或聚丙烯酰

胺；玻璃纤维；硅胶、明胶或葡聚糖凝胶；干蛋白或蛋白干粉，例如蛋清蛋白干粉；无机矿土类，例如沸石、陶土、高岭土、羧基磷灰石、蒙脱土；钙盐类，例如氯化钙、碳酸钙或磷酸钙；活性炭；或活性氧化铝。

实施方案 24. 根据实施方案 18-23 中任一项所述的装置，其中所述流体收集腔被构造以游离液体状态收集从所述流体分离腔流过的生物样本。

实施方案 25. 根据实施方案 24 所述的装置，其中所收集的所述生物样本在所述流体收集腔中能够自由流动。

实施方案 26. 根据实施方案 25 所述的装置，其中所述流体收集腔中能够自由流动的液体体积为至少约 50  $\mu\text{L}$ 、至少约 100  $\mu\text{L}$ 、至少约 500  $\mu\text{L}$ 、至少约 1 mL、至少约 3 mL、或约 3 mL 至约 5 mL。

实施方案 27. 根据实施方案 18-26 中任一项所述的装置，其中所述流体收集腔不提供毛细作用。

实施方案 28. 根据实施方案 18-27 中任一项所述的装置，其中所收集的生物样本未附着或吸附或结合于所述流体收集腔的内壁上或者基本上未附着或吸附或结合于所述流体收集腔的内壁上。

实施方案 29. 根据实施方案 18-28 中任一项所述的装置，其中所述流体收集腔的至少一部分是可透光的，以使得其中收集的生物样本能够用光学方法检测。

实施方案 30. 根据实施方案 18-29 中任一项所述的装置，其中所述装置还包括隔离层，其设置在所述流体分离腔和所述流体收集腔之间，并分隔所述流体分离腔和所述流体收集腔。

实施方案 31. 根据实施方案 30 所述的装置，其中所述隔离层允许生物样本流过且阻止所述分离基质进入所述流体收集腔。

实施方案 32. 根据实施方案 31 所述的装置，其中所述隔离层的材料包括选自无机材料（例如无机纤维或无机颗粒），例如陶瓷、玻璃、玻璃纤维、或金属（如不锈钢）；聚合物，包括聚合物纤维或颗粒，例如聚酰胺（如尼龙）、聚乙烯类（如超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）、聚四氟乙烯（PTFE）、聚苯乙烯、或聚氯乙烯（PVC））、聚丙烯酸类（如亚克力）、聚丙烯类、塑料（如多孔塑料）、聚酯、聚氨酯；纤维素如滤纸或木浆纤维素，并且任选地，所述材料是亲水性的或经过亲水处理。

实施方案 33. 根据实施方案 30-32 中任一项所述的装置，其中所述隔离层具有 0.1-5 mm 的厚度和/或 5-200  $\mu\text{m}$  的孔径。

实施方案 34. 根据实施方案 18-33 中任一项所述的装置，其中所述生物样本来自疑似患有蛋白质错误折叠病或处于罹患蛋白质错误折叠病的风险的哺乳动物，例如人类，例如选自下组中的一种或多种的样本：尿液、血液、唾液、组织液、组织间液、血清、血浆、脑脊液或羊水。

实施方案 35. 根据实施方案 18-34 中任一项所述的装置，其中所述壳体还限定流体接收腔，所述流体接收腔用于接收所述生物样本。

实施方案 36. 根据实施方案 35 所述的装置, 其中所述流体接收腔中容纳有所述检测试剂, 并且使得所述生物样本与所述检测试剂混合。

实施方案 37. 根据实施方案 35 或 36 所述的装置, 其中所述流体分离腔与所述流体接收腔流体连通或者呈分体式。

实施方案 38. 根据实施方案 35-37 中任一项所述的装置, 其中所述流体接收腔还包括减缓流体流速的构件, 例如沙漏。

实施方案 39. 根据实施方案 35-38 中任一项所述的装置, 其中所述流体接收腔的流体入口处安装有可移除的密封塞。

实施方案 40. 根据实施方案 18-34 中任一项所述的装置, 其中所述流体收集腔中容纳有所述检测试剂, 所述流体收集腔还包括:

样本入口, 所述流体收集腔经由所述样本入口接收所述生物样本并使得所述生物样本与其中容纳的所述检测试剂混合;

流体通道, 所述流体通道位于所述流体收集腔与所述流体分离腔之间, 以允许与所述检测试剂混合的所述生物样本从所述流体收集腔流入所述流体分离腔, 以及允许流过所述流体分离腔的所述生物样本流回所述流体收集腔; 以及

密封塞, 用于可移除地密封所述样本入口;

其中, 所述流体收集腔中容纳的所述检测试剂的量不超过所述流体分离腔能够保留的所述检测试剂的量。

实施方案 41. 根据实施方案 18-34 中任一项所述的装置, 其中所述流体收集腔还包括:

样本入口, 所述流体收集腔经由所述样本入口接收与所述检测试剂混合的所述生物样本;

流体通道, 所述流体通道位于所述流体收集腔与所述流体分离腔之间, 以允许与所述检测试剂混合的所述生物样本从所述流体收集腔流入所述流体分离腔, 以及允许流过所述流体分离腔的所述生物样本流回所述流体收集腔; 以及

密封塞, 用于可移除地密封所述样本入口。

实施方案 42. 根据实施方案 18-41 中任一项所述的装置, 其中所述流体收集腔被构造为具有大体沿竖直方向向下渐缩的内部截面。

实施方案 43. 根据实施方案 18-42 中任一项所述的装置在制备用于诊断或预测以错误折叠蛋白为特征的疾病的试剂盒中的用途。

实施方案 44. 根据实施方案 43 所述的用途, 其中所述疾病选自包括以下的组: 子痫前期、重度子痫前期、非典型子痫前期、子痫、阿尔茨海默氏病、脑 $\beta$ -淀粉样血管病、青光眼中的视网膜神经节细胞变性、朊病毒病、帕金森病和其他共核蛋白病、Tau 蛋白病、额颞叶变性 FTLT、FLTD\_FUS、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿病和其他三联症、重复障碍、痴呆 (英国和丹麦家族性)、遗传性脑出血伴淀粉样变、CADASIL、亚历山大病、各种淀粉样变性、Serinopathies、II 型糖尿病、包涵体肌炎/肌病、白内

障、视网膜色素变性伴视紫红质突变、甲状腺髓样癌、垂体催乳素瘤、遗传性晶状体角膜营养不良、马洛里氏小体、肺泡蛋白沉积症、牙源性肿瘤淀粉样蛋白变性、囊性纤维化、镰状细胞病和危重病肌病。

实施方案 45. 根据实施方案 44 所述的用途，其中所述疾病为子痫前期。

实施方案 46. 根据实施方案 44 所述的用途，其中所述疾病是阿尔茨海默氏病或帕金森病。

实施方案 47. 一种预测罹患以错误折叠蛋白为特征的疾病的风险的方法，其包括根据实施方案 1-17 中任一项所述的方法或使用实施方案 18-42 中任一项所述的装置检测生物样本中错误折叠蛋白的存在。

实施方案 48. (1) 能够与错误折叠蛋白质特异性结合的染料与 (2) 装有能够吸附游离状态的所述染料的吸附材料的分离柱的组合在制备用于诊断或预测以错误折叠蛋白为特征的疾病的试剂盒中的用途。

实施方案 49. 根据实施方案 48 所述的用途，其中所述分离柱位于壳体限定的流体分离腔中，并且所述壳体还限定与所述流体分离腔流体连通的流体收集腔。

应当注意，尽管在上文详细描述中提及了用于检测生物样本中是否存在错误折叠蛋白质的装置和方法的若干步骤或模块，但是这种划分仅仅是示例性的而非强制性的。实际上，根据本申请的实施方案，上文描述的两个或更多模块的特征和功能可以在一个模块中具体化。反之，上文描述的一个模块的特征和功能可以进一步划分为由多个模块来具体化。

## 实施例

### 实施例 1 染料测试

测试了不同类型的染料，包括硫黄素 T、硫黄素 S、刚果红、伊文思蓝、苋菜红、亮黑、尼罗河红。测试结果用“佳”、“好”、“中”、“差”来表示染料的适用性。“佳”表示染料可以与样本中错误折叠蛋白质结合；可以与游离染料分离开；颜色便于观察，试验重复性好。“好”表示染料可以与样本中错误折叠蛋白质结合；可以与游离染料分离；颜色便于观察；试验重复性一般。“中”表示染料可以与样本中错误折叠蛋白质结合；可以与游离染料分离；颜色不便于观察；试验重复性一般。“差”表示不可用。试验结果如下表所示：

| 染料    | 制造商        | 批号        | 结果 |
|-------|------------|-----------|----|
| 硫黄素 S | Sigma      | SLBG6233V | 好  |
| 硫磺素 T | Sigma      | T1892     | 好  |
| 刚果红   | Sigma      | MKBX816J  | 佳  |
| 伊文思蓝  | ALADDIN    | A1309044  | 好  |
| 苋菜红   | Sigma      | MKCF8543  | 好  |
| 亮黑    | 东京化成工业株式会社 | 4QWMK-RB  | 好  |

|     |              |           |   |
|-----|--------------|-----------|---|
| 尼罗红 | 上海源叶生物科技有限公司 | SJ06246AB | 好 |
|-----|--------------|-----------|---|

### 实施例 2 分离材料测试

测试了各种分离材料。测试结果以“佳”、“好”、“中”、“差”来表示材料的适用性。“佳”表示材料可以区分游离及结合态的染料；样本在材料中的流速适宜；材料填装便利；可滤除尿液本底颜色；试验重复性好。“好”表示材料可以区分游离及结合态染料；样本在材料中的流速适宜；试验重复性好；材料填装便利性一般；不能滤除尿液颜色。“中”表示材料可以区分游离及结合态染料；样本在材料中的流速适宜；试验重复性一般；材料填装便利性一般；不能滤除尿液颜色。“差”表示不可用。

| 制造商          | 型号/规格                  | 材料      | 结果 | 用量   |
|--------------|------------------------|---------|----|------|
| 阜达卫生材料厂      | 300g                   | 棉       | 好  | 0.1g |
| 阜达卫生材料厂      | 500g                   | 棉纱布     | 好  | 0.1g |
| 国药集团化学试剂有限公司 | 30153060-250g          | 聚乙烯醇    | 好  | 0.6g |
| Sigma        | 06300-1kg              | 酸性氧化铝   | 佳  | 0.8g |
| 信帆生物 GEMIC   | 40-120 $\mu$ m<br>100g | 葡聚糖凝胶   | 好  | 0.5g |
| 国药集团化学试剂有限公司 | 10006619-500g          | 活性炭     | 好  | 0.2g |
| 国药集团化学试剂有限公司 | 68005761-250g          | 微晶纤维素   | 佳  | 0.3g |
| 国药集团化学试剂有限公司 | 69007260-250g          | 乙酸钠纤维素  | 佳  | 0.3g |
| 国药集团化学试剂有限公司 | 20034361-500g          | 硅胶      | 好  | 0.6g |
| 国药集团化学试剂有限公司 | P8240-500g             | PEG4000 | 好  | 0.8g |
| 爱上它小宠用品店     | 800g                   | 木屑      | 好  | 0.1g |
| 上海强顺化学试剂有限公司 | 40-60 目<br>250g        | 沸石      | 好  | 0.3g |
| 自制           | 自制                     | 干蛋白(鸭蛋) | 佳  | 0.3g |

|                     |                     |                |   |      |
|---------------------|---------------------|----------------|---|------|
|                     |                     | 蛋清蛋白干<br>粉)    |   |      |
| 迪妙屋                 | 500g                | 陶土             | 好 | 1.0g |
| 福晨(天津)化学试剂有限<br>公司  | 500g                | 高岭土            | 好 | 0.9g |
| 天津市致远化学试剂有限<br>公司   | 500g                | 无水氯化钙          | 好 | 0.6g |
| 上海麦克林生化科技有限<br>公司   | 80μm<br>H875582-25g | 羧基磷灰石          | 好 | 0.7g |
| 国药集团化学试剂有限公<br>司    | MW300 万<br>250g     | 聚丙烯酰胺,<br>阴离子型 | 好 | 0.5g |
| Sigma               | G7041-500g          | 明胶             | 好 | 0.4g |
| 上海阿拉丁生化科技股份<br>有限公司 | M109698-50g         | 蒙脱土            | 好 | 0.7g |
| 国药集团化学试剂有限公<br>司    | 10005717-250g       | 碳酸钙            | 好 | 0.6g |

### 实施例 3 隔离材料测试

测试了以下各种隔离材料。测试结果以“佳”、“好”、“中”、“差”来表示材料的适用性。“佳”表示材料可以较好的隔离和承载；样本在材料中的流速适宜；填装便利；试验重复性好。“好”表示材料可以较好的隔离和承载；样本在材料中的流速适宜；试验重复性好；材料填装便利性一般。“中”表示材料隔离和承载效果一般；样本在材料中的流速一般；材料填装便利性一般。“差”表示不可用。

| 名称  | 制造商                   | 货号                                                            | 规格     | 主要材料  | 效果 |
|-----|-----------------------|---------------------------------------------------------------|--------|-------|----|
| 筛板  | 杭州科百特<br>过滤器材有<br>限公司 | PM 100 H<br>0765 NIDR<br>015;<br>PM 100 H<br>0700 NIDR<br>015 | 100 μm | PE 粒子 | 佳  |
| 尼龙网 | 杭州科百特<br>过滤器材有        | 200 目                                                         | 200 目  | 尼龙 6  | 中  |

|       |              |         |                                   |       |   |
|-------|--------------|---------|-----------------------------------|-------|---|
|       | 限公司          |         |                                   |       |   |
| 玻纤过滤纸 | 上海金标生物科技有限公司 | SB08    | 300×<br>200mm                     | 玻璃纤维  | 佳 |
| 滤纸    | 辽宁抚顺市民政滤纸厂   | 11cm 圆形 | 快速：<br>80-120μm<br>中速：<br>30-50μm | 木浆纤维素 | 好 |

#### **实施例 4 刚果红染料测试**

为进一步测试染料刚果红的性能，配制 1mg/mL 人血浆白蛋白 HSA 溶液，90℃条件下加热 30 分钟，作为模拟阳性样本。配制 5mg/mL 刚果红溶液作为染料母液。以 0.2g 氧化铝作为分离材料制作分离柱，取 1mg/mL HSA 溶液 1mL 作为模拟阳性样本，取 1mL 水作为模拟阴性样本，分别加入 5μL 刚果红染料母液。将模拟阴、阳性样本分别过氧化铝分离柱，观察收集液体的染色。结果表明，模拟阳性样本收集液体为红色，模拟阴性样本收集液体为无色，如图 6 所示。

#### **实施例 5 氧化铝滤除尿液颜色测试**

以 0.2 g 氧化铝作为分离材料制作分离柱，取收集的阴性尿液样本及阳性尿液样本各 1mL，分别加入 5mg/mL 刚果红溶液 5μL。将制备的样本分别过氧化铝分离柱，观察收集液的颜色。结果表明，阳性样本收集液为红色，阴性样本收集液无色透明。如图 7 所示。

#### **实施例 6 分离基质材料检测灵敏度测试**

以 0.2 克氧化铝作为分离材料制作分离柱。配制人血清白蛋白 HSA 梯度溶液（1mg/mL、0.75mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.125mg/mL、0.0625mg/mL）。在 90℃加热 30 分钟后，取配制的 HSA 梯度溶液各 1mL，分别加入 5mg/mL 刚果红溶液 5 μL。分别过氧化铝分离柱，观察收集液颜色。结果表明，当样本中 HSA 浓度为 0.25mg/mL 时，肉眼观察可见明显红色，浓度为 0.125mg/mL 时，收集液呈现浅红色，即其检测灵敏度可达至少 0.25mg/mL 或甚至更低。结果如图 8 所示。

以 0.3 g 乙酸钠纤维素、0.3g 干蛋白（鸭蛋蛋清蛋白干粉）、和 0.3g 微晶纤维素分别作为分离材料制作分离柱。配制人血清白蛋白 HSA 溶液（10mg/mL）。在 90℃加热 30 分钟后，取变性的 HSA 稀释至 0.3 mg/mL，共 1ml，加入 5 mg/mL 刚果红溶液 7 μL。分别过分离柱，观察收集液颜色。结果表明，含变性 HSA 时，肉眼观察可见明显红色，而不含 HSA 时，流出液为无色。结果如图 9a-9c 所示。上述结果还表明，所测试的三种分离介质也可实现与活性氧化铝至少相当的检测灵敏度。

**实施例 7 氧化铝对刚果红染料的吸附分离作用**

目的：本发明中所选分离材料氧化铝对于刚果红染料的分离是基于一种吸附机制，为验证此机制，开展此实验。

配制材料：称取 4g 无水硫酸铜（天茂化工，lot：20200315），用去离子水定容至 250mL，所得硫酸铜溶液浓度为 0.1 M。称取 5mg 刚果红（Sigma，lot：MKBX8167V），加去离子水 1mL，摇匀形成均匀溶液，所配制的刚果红溶液浓度为 5mg/mL。为了制备模拟阳性样本，称取 10mg 人血清白蛋白（HSA）（Solarbio，lot：7241052），加去离子水 1mL，配制成 10mg/mL 的 HSA 溶液，于 90℃沸水浴中加热 30min，恢复至室温使用。为了制备分离装置，称取 0.8 g 氧化铝加入自制分离柱中。

检测：模拟阴性样本采用硫酸铜溶液（不含变性蛋白的溶液），硫酸铜溶液本身呈现蓝色，加入刚果红溶液后，溶液变为近黑色。取硫酸铜溶液 1 mL，加入 7μL 刚果红溶液，摇匀后，加入分离柱，经分离柱分离后，收集液颜色为蓝色。将收集液于 490nm（游离刚果红特征性吸收波段）及 800nm（硫酸铜溶液特征性吸收波段）测定吸光值，490nm 吸光值为 0.001，而 800nm 吸光值为 0.021，即收集液中无刚果红，这说明上述混合液中的刚果红仍滞留在氧化铝分离柱中，而硫酸铜则在收集液中。

取模拟阳性样本（变性的 HSA 溶液），稀释至 1 mg/mL，取 1 mL，加 7μL 刚果红溶液，摇匀，混合液颜色为红色，加入分离柱，经分离柱分离后，收集液颜色为浅红色，表明部分刚果红由于与变性蛋白结合而未被氧化铝吸附，过量的游离刚果红则被氧化铝吸附。收集液于 520nm 测定光吸收，吸光值为 0.038，说明收集液中含有结合态刚果红染料。

结论：本发明中所用氧化铝对阴性样本和阳性样本的区分是通过氧化铝将游离和结合态的染料加以分离而实现的。本实验中硫酸铜溶液的蓝色是由铜离子形成，而铜的相对质量远小于染料刚果红，模拟阴性样本经分离柱分离后，如分离机制为分子筛效应，则刚果红应先于铜离子先流出。而本实验中，收集液颜色为蓝色，经 490nm 测定也未见有刚果红形成的特征吸收；而在模拟阳性样本中，收集液为红色，这是由于刚果红染料因与变性蛋白结合，由变性蛋白带入溶液中因而使溶液呈现红色，并在 520nm 形成结合态刚果红染料特征性光吸收。基于此，氧化铝对于游离染料的分离是基于对染料的吸附作用，而非分子筛效应。

**实施例 8 临床研究**

本试验采用考核试剂对受试者尿液样本进行检测，检测结果与金标准判断结果对比并进行统计分析，验证考核试剂的临床使用价值。每组受试者的最小入组人数应满足统计学分析的要求。

临床试验分组

| 编号 | 分类  | 最低研究样本量 |
|----|-----|---------|
| 1  | 阴性组 | 700     |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 2 | 阳性组 | 100 |
|---|-----|-----|

## 1 对比方法

以《中华医学会妊娠期高血压疾病诊治指南（2015）》中子痫前期疾病诊断标准作为金标准。

## 2 研究对象的选择

本研究适用于 18 周岁及以上，孕周 $\geq 20$  周的孕妇。依据研究对象金标准诊断结果进行分组。

### 2.1 阳性组

依据《中华医学会妊娠期高血压疾病诊治指南（2015）》诊断为子痫前期疾病的受试者入组；

### 2.2 阴性组

依据《中华医学会妊娠期高血压疾病诊治指南（2015）》诊断为非子痫前期疾病的受试者入组。

## 3 临床试验机构的选择

根据《体外诊断试剂注册管理办法》、《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》等法规及临床样本量的要求，同时综合流行病学背景等因素和按照国家药品监督管理局认定的国家药物临床试验机构目录，选择 2 个或以上具备临床试验资格的医疗机构作为临床研究单位。

## 4 临床样本的选择

### 4.1 样本类型

尿液；

### 4.2 样本收集、保存和运输

- 1) 根据入选标准，选择符合要求的受试者。
- 2) 产科收集尿液样本。
- 3) 入组受试者取中段尿 5ml，置于收集管中；
- 4) 样本的储存及运输条件应符合说明书要求；
- 5) 冷藏或冷冻样本检测前应缓慢恢复至室温。

### 4.3 临床记录

研究者收集符合入选标准的受试者样本，并记录受试者基本信息、样本收集日期、操作人等。

### 4.4 样本入选标准

- 1) 自愿加入本试验并签署知情同意书；
- 2) 年龄 $\geq 18$  周岁；
- 3) 孕周 $\geq 20$  周；

### 4.5 样本排除标准

- 1) 明显肉眼可见的血尿;
- 2) 无法完成子痫前期金标准诊断的患者。

#### 4.6 样本剔除标准

- 1) 样本溯源信息缺失的样本;
- 2) 未按样本采集要求、采集数量不足的样本应予以剔除;
- 3) 因收集、保存、试验操作失误等原因导致无法检测,且难以重新采集样本的受试者,应予以剔除;
- 4) 任何因素造成的样本污染、腐败、降解等,将增加检测结果的不确定性应予以剔除;
- 5) 同一受试者重复样本应予以剔除;
- 6) 研究者认为不宜继续参加本次临床研究的受试者。

### 5 临床试验的实施

#### 5.1 样本检测

##### 样本准备

将大约 3 至 5mL 中段尿液收集在干净的容器中,以立即使用或在 2-8°C 下储存直至使用。尿液样品在使用前恢复至室温。

##### 检测试剂盒

检测试剂盒的结构显示于图 10a-9c 中,其中使用 0.8g 酸性氧化铝作为分离基质,刚果红作为检测试剂,以及β片层作为阳性对照。

##### 测试步骤

- (1) 使用前将试剂盒和样品恢复至室温。
- (2) 旋开检测试管的盖,将试管直立放置在平坦的表面上(图 10a)。
- (3) 完全挤压移液管的橡胶球,将移液管插入在容器中收集的尿液,并将尿液吸取至刻度线(图 10b)。注意:尿样在移液管中会变成红色。
- (4) 缓慢挤压移液管橡胶球,将尿样装载入检测试管内的分离基质中。重新旋紧盖子,并使试管直立约 3-10 分钟,然后观察检测试管中的洗脱液和移液器中的控制线的颜色(图 10c)。

##### 测试结果

- (1) 阴性结果:检测试管下部为无色流出液。阴性结果表明孕妇在测试时可能没有子痫前期。
- (2) 阳性结果:检测试管下部的流出液呈红色。阳性结果表明孕妇可能患有子痫前期,应进一步咨询医生。
- (3) 无效结果:在一次成功的测试中,图 10c 所示移液管中的控制线变为红色。如果控制线没有变成红色,用另一个移液管和检测试管重复测试。如果流出液呈黄褐色,则该尿液样本不适合进行检测,检测结果无效。

#### 5.2 数据汇总

临床试验完成后汇总临床数据，递交统计人员汇总结果进行统计分析。

6 临床评价方法

对考核试剂检测结果与金标准明确判读结果进行比较，观察试剂的灵敏度、特异度、准确度、阴性预测值和阳性预测值等。

|            |    | 临床结果 |     |     |
|------------|----|------|-----|-----|
|            |    | 阳性   | 阴性  |     |
| 本发明试剂盒检测结果 | 阳性 | 107  | 13  | 120 |
|            | 阴性 | 37   | 780 | 817 |
|            | 总数 | 144  | 793 | 937 |

根据对 937 名受试者的队列研究，本发明的试剂盒实现了 74.3%的灵敏度、98.4%的特异度、94.7%的准确度、89.2%的阳性预测值(PPV)和 95.5%的阴性预测值(NPV)。临床数据表明，本发明的试剂盒在兼顾灵敏度的情况下，实现了非常高的特异度和准确度。

本技术领域的一般技术人员可以通过研究说明书、公开的内容及附图和所附的权利要求书，理解和实施对披露的实施方式的其他改变。在权利要求中，措词“包括”不排除其他的元素和步骤，并且措辞“一”、“一个”不排除复数。在本申请的实际应用中，一个零件可能执行权利要求中所引用的多个技术特征的功能。权利要求中的任何附图标记不应理解为对范围的限制。本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均以引用方式并入本文，其程度就如同每个独立出版物或专利申请被具体地和单独地指示为以引用方式并入一样。

## 权 利 要 求 书

1. 一种用于检测生物样本中的错误折叠蛋白或其聚集体的方法，其包括：
  - (a) 提供生物样本；
  - (b) 使所述生物样本与检测试剂混合，所述检测试剂能够与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合；
  - (c) 使与所述检测试剂混合的所述生物样本接触并通过分离基质，所述分离基质被构造以吸附未与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂并允许与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂通过；
  - (d) 以游离液体状态收集从所述分离基质通过的生物样本；以及
  - (e) 检测所收集的呈游离液体状态的生物样本中所述检测试剂的存在，其中所述检测试剂的存在指示所述生物样本中存在所述错误折叠蛋白或其聚集体。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中在步骤(d)中，在流体收集腔中收集所述生物样本，并且所收集的生物样本在所述流体收集腔中呈游离的液体状态。
3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所收集的所述生物样本在所述流体收集腔中能够自由流动。
4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中所述流体收集腔中能够自由流动的液体体积为至少约 50  $\mu\text{L}$ 、至少约 100  $\mu\text{L}$ 、至少约 500  $\mu\text{L}$ 、至少约 1 mL、至少约 3 mL、或约 3 mL 至约 5 mL。
5. 根据权利要求 2-4 中任一项所述的方法，其中所述流体收集腔不提供毛细作用。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法，其中所述检测试剂是染料，例如可见光染料或荧光染料，例如偶氮染料或其类似物（例如刚果红或伊文思蓝）、苯并噻唑类染料或其类似物（例如硫黄素 T 和硫黄素 S）、苋菜红、亮黑或尼罗红。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法，其中所述分离基质包括选自下组的一种或多种的材料：棉或棉纱布；蚕丝；纤维素，例如硝化纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、或木屑；聚合物类，例如聚酯、聚乙烯、聚砜、聚乙烯醇、聚乙二醇（例如 PEG2000、PEG3000、PEG4000、PEG5000 或 PEG6000）、或聚丙烯酰胺；玻璃纤维；硅胶、明胶或葡聚糖凝胶；干蛋白或蛋白干粉，例如蛋清蛋白干粉；无机矿土类，例如沸石、陶土、高岭土、羧基磷灰石、蒙脱土；钙盐类，例如氯化钙、碳酸钙或磷酸钙；活性炭；或活性氧化铝。
8. 一种用于检测生物样本中的错误折叠蛋白或其聚集体的装置，其特征在于，所

述装置包括：

壳体，所述壳体限定流体分离腔与流体收集腔；

其中，所述流体分离腔用于接收所述生物样本与检测试剂的混合液，其中所述检测试剂能够与所述生物样本中的所述错误折叠蛋白或其聚集体结合，所述流体分离腔含有分离基质，用于从所述混合液中吸附未与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂，并允许与所述错误折叠蛋白或其聚集体结合的检测试剂流过；并且

所述流体收集腔用于收集流过所述流体分离腔中所述分离基质的生物样本。

9、根据权利要求 8 所述的装置，其中所述检测试剂是染料，例如可见光染料或荧光染料，例如偶氮染料或其类似物（例如刚果红或伊文思蓝）、苯并噻唑类染料或其类似物（例如硫黄素 T 和硫黄素 S）、苋菜红、亮黑或尼罗红。

10、根据权利要求 8-9 中任一项所述的装置，其中所述分离基质包括选自下组的一种或多种材料：棉或棉纱布；蚕丝；纤维素，例如硝化纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、或木屑；聚合物类，例如聚酯、聚乙烯、聚砜、聚乙烯醇、聚乙二醇（例如 PEG2000、PEG3000、PEG4000、PEG5000 或 PEG6000）、或聚丙烯酰胺；玻璃纤维；硅胶、明胶或葡聚糖凝胶；干蛋白或蛋白干粉，例如蛋清蛋白干粉；无机矿土类，例如沸石、陶土、高岭土、羧基磷灰石、蒙脱土；钙盐类，例如氯化钙、碳酸钙或磷酸钙；活性炭；或活性氧化铝。

11、根据权利要求 8-10 中任一项所述的装置，其中所述流体收集腔被构造成以游离液体状态收集从所述流体分离腔流过的生物样本。

12. 根据权利要求 11 所述的装置，其中所收集的所述生物样本在所述流体收集腔中能够自由流动。

13. 根据权利要求 12 所述的装置，其中所述流体收集腔中能够自由流动的液体体积为至少约 50  $\mu\text{L}$ 、至少约 100  $\mu\text{L}$ 、至少约 500  $\mu\text{L}$ 、至少约 1 mL、至少约 3 mL、或约 3 mL 至约 5 mL。

14、根据权利要求 8-13 中任一项所述的装置，其中所述流体收集腔不提供毛细作用。

15、根据权利要求 8-14 中任一项所述的装置，其中所述装置还包括隔离层，其设置在所述流体分离腔和所述流体收集腔之间，并分隔所述流体分离腔和所述流体收集腔。

16、根据权利要求 15 所述的装置，其中所述隔离层允许生物样本流过且阻止所述分离基质进入所述流体收集腔。

17、根据权利要求 16 所述的装置，其中所述隔离层的材料包括选自无机材料（例如无机纤维或无机颗粒），例如陶瓷、玻璃、玻璃纤维、或金属（如不锈钢）；聚合物，包括聚合物纤维或颗粒，例如聚酰胺（如尼龙）、聚乙烯类（如超高分子量聚乙烯（UHMW-PE）、聚四氟乙烯（PTFE）、聚苯乙烯、或聚氯乙烯（PVC））、聚丙烯酸类（如亚克力）、聚丙烯类、塑料（如多孔塑料）、聚酯、聚氨酯；纤维素如滤纸或木浆纤维素，并且任选地，所述材料是亲水性的或经过亲水处理。

18、根据权利要求 8-17 中任一项所述的装置，其中所述壳体还限定流体接收腔，所述流体接收腔用于接收所述生物样本。

19、根据权利要求 8-18 中任一项所述的装置在制备用于诊断或预测以错误折叠蛋白为特征的疾病的试剂盒中的用途。