

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/543

G01N 27/26

C12Q 1/68



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01104109.9

[45] 授权公告日 2005 年 11 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1228635C

[22] 申请日 2001.2.20 [21] 申请号 01104109.9

[71] 专利权人 刘 忠

地址 天津市塘沽东沽石油新村 5 区 5 幢 101 号

[72] 发明人 刘 忠

审查员 倪晓红

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

代理人 黄韧敏

权利要求书 5 页 说明书 24 页 附图 4 页

[54] 发明名称 一种生物传感器及运用该传感器的 有广泛的应用前景。
量化检测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种利用电化学方法定量检测和实时测定液体样品中蛋白质和核酸的生物传感器及运用该生物传感器对液体样品中的蛋白质和核酸进行量化检测的方法。该装置包括一个基底传感器，上有涂附在塑料基底上的一个工作电极、一个参比电极和至少一个第三电极，所述工作电极上固定有可与分析物结合的第二个结合物，所述基底传感器的各电极与可读仪表相连，进行电化学测量；一个毛细膜，设置于所述基底传感器上方，用于检测中样品的水平方向传输；它还进一步包括一个复合垫，所述复合垫中包含有可与分析物特异结合的第三结合物。本发明成功地提供了一种简单、快速和可靠的方法，利用免疫测试、分子杂交和电化学检测相结合的方式直接定量检测存在于液态样本中的分析物，在医疗诊断、农业和环境监测领域具

知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274

1、 一种用于液体样品中定量检测分析物的生物传感器，其特征在于，所述的传感器至少包括

一个基底传感器，上有涂附在塑料基底上的一个工作电极、一个参
5 比电极和至少一个第三电极，所述工作电极上固定有可与分析物结合
的第一结合物，所述基底传感器的各电极与可读仪表相连，进行电化
学测量；

一个毛细膜，设置于所述基底传感器上方，用于检测中样品的水平
方向传输；

10 一个复合垫，所述复合垫中包含有可与分析物特异结合的第二结合
物。

2、 根据权利要求1所述的生物传感器，其特征在于在所述基底
传感器上布置有：

一采样区（14'），其上方设置所述复合垫（20），用于采集液样；
15 一检测区（16'），采集的液样在此与所述的所有电极发生接触反应；
所述毛细膜将所述采样区与检测区连接起来。

3、 根据权利要求2所述的生物传感器，其特征在于它还包括一个
废液吸收垫（18），用于接收检测的液体样本。

4、 根据权利要求2所述的生物传感器，其特征在于，所述工作
20 电极上固定的第一结合物为可与分析物特异结合的核酸、蛋白质。

5、 根据权利要求4所述的生物传感器，其特征在于所述工作电
极上固定的第一结合物为具有免疫活性的抗体或抗体片段。

6、 根据权利要求5所述的生物传感器，其特征在于所述工作电
极上固定的第一结合物为单克隆抗体。

25 7、 根据权利要求4所述的生物传感器，其特征在于所述工作电

极上固定的第一结合物为 DNA。

8、 根据权利要求 1 所述的生物传感器，其特征在于，所述第三电极为一校正电极，用于校正检测系统的误差。

9、 根据权利要求 1 所述的生物传感器，其特征在于，所述第三
5 电极为一第二工作电极，用于所述工作电极的空白对照。

10、 根据权利要求 1 所述的生物传感器，其特征在于所述第二结合物被预先沉积或固化于所述复合垫中。

11、 根据权利要求 10 所述的生物传感器，其特征在于所述第二结合物为经标记物标记的可与分析物特异结合的核酸、蛋白质。

10 12、 根据权利要求 11 所述的生物传感器，其特征在于所述的标记物为能与底物和电子传输介质产生电化学检测信号的酶。

13、 根据权利要求 12 所述的生物传感器，其特征在于所述的酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

14、 根据权利要求 11 所述的生物传感器，其特征在于所述蛋白
15 质为抗体或抗体片段。

15、 根据权利要求 11 所述的生物传感器，其特征在于所述的核酸为 DNA。

16、 根据权利要求 12 所述的生物传感器，其特征在于所述的底物为含过氧化氢的底物溶液；所述电子传输介质为生铁或生铁的一种
20 衍生物、苯醌、抗坏血酸或 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺。

17、 根据权利 1 所述的生物传感器，其特征在于所述毛细膜为生物薄膜。

18、 根据权利要求 1 所述的生物传感器，其特征在于在所述复合垫上设置一滤过装置，用于过滤液体样品。

25 19、 根据权利要求 2 所述的生物传感器，其特征在于，它还包括

一传感器封盖(12)，其上对应于所述样本采集区还检测区分别设置一液体样本采集孔(14)和一检测孔(16)，用于加样和观察反应进程；以及一吸收槽，该槽在液体流动通道的末端与毛细膜局部相连，用于吸收检测区的过剩液体。

5 20、 根据权利要求1所述的生物传感器，其特征在于，所述的工作电极及/或辅助电极包括一个通过丝网印刷印制的碳导体，第三电极包括一个通过丝网印刷印制的银或银/氯化银导体。

21、 根据权利要求1所述的生物传感器，其中还包括：

10 a) 能与分析物发生特异反应的第一结合物通过经缓冲处理的脂肪醇溶液固化在所述工作电极表面；

b) 在固化了第一结合物的工作电极表面包被一层能够增加稳定性的稳定剂以使被固化的第一结合物进一步稳定。

22、 根据权利要求21所述的生物传感器，其中所述的脂肪醇为异丙醇；所述的稳定剂含有糖。

15 23、 一种对液体样本中分析物进行量化检测的方法，包括以下步骤：

a) 将样本与含有经标记物标记的能与分析物特异结合的第二结合物的溶液接触以形成一种检验混合物；

20 b) 在所述的生物传感器对上述检验混合物进行孵育，经过一段充足的时间，使分析物夹在所述第二结合物和固化于传感器工作电极表面的第一结合物之间；

c) 在所述生物传感器表面加入含有底物和电子传输介质的检测溶液，以促进电子传输反应。

25 d) 通过测定由带有标记物的分析物催化的电子传输介质所产生的电流感应，来进一步测定样品的分析物含量。

24、 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述经标记物标记的能与分析物特异结合的第二结合物被预先沉积或固化于所述复合垫中，步骤 a)在所述生物传感器的复合垫上进行。

25、 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述步骤 d)通过可读的
5 电流计装置测定。

26、 根据权利要求 23 所述的方法，其中在步骤 b)后将所述传感器的第二工作电极作为参比电极，通过测定工作电极与第二工作电极之间的电流差，进而测定样品中的分析物含量。

27、 根据权利要求 23 所述的方法，其中在步骤 b)后还包括用缓
10 冲液冲洗传感器表面。

28、 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述第一结合物为核酸、蛋白质。

29、 根据权利要求 28 所述的方法，其中所述核酸为 DNA。

30、 根据权利要求 28 所述的方法，其中所述蛋白质为抗体或抗
15 体片段。

31、 根据权利要求 30 所述的方法，其中所述抗体为单克隆抗体。

32、 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述第二结合物为核酸、蛋白质。

33、 根据权利要求 32 所述的方法，其中所述蛋白质为抗体或抗
20 体片段。

34、 根据权利要求 32 所述的方法，其中所述核酸为 DNA。

35、 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述的液体样本为体液。

36、 根据权利要求 35 所述的方法，其中所述的体液为血液、血清、血浆、尿液或前列腺液。

25 37、 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述的分析物为甲胎蛋

白、前列腺类抗原、心脏肌钙蛋白、碳活性蛋白、人绒毛膜促性腺激素或核酸。

- 38、 根据权利要求 23 所述的方法，其中步骤 c)中所述的电子传输介质是生铁或生铁的一种衍生物、苯醌、抗坏血酸或 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺。

39、 根据权利要求 23 所述的方法，其中步骤 c)中所述的底物为含过氧化氢的底物溶液。

一种生物传感器及运用该传感器的量化检测方法

5 技术领域

本发明涉及一种可对存在于液体样品中的蛋白质和核酸进行定量检测的传感器装置，具体地说涉及一种利用电化学方法定量检测和实时测定液体样品中蛋白质和核酸的生物传感器。

本发明还涉及运用该生物传感器对液体样品中的蛋白质和核酸进行
10 量化检测的方法。

背景技术

随着现代医学的发展，对于用于疾病诊断的现代医学检验技术的要求也越来越高，快速、高效、高精确度的医学检验能为疾病的早期发现和
15 诊断提供有力的支持和帮助。对于医生和病人来说，医学检验的理想模式应是随时、随地、检测样品无需转送的、全自动化的检验方式。人们越来越意识到，在进行疾病诊断时，能确定人体体液例如血液、精液等的各种成份的含量，而为非专业人员设计的能够迅速检测量化结果的检测装置的重要性。在各种用于疾病诊断的检测指标中，体液中蛋白质和
20 核酸的检测是各种心血管疾病、前列腺疾病、癌症、遗传疾病和各种疾病的预防性筛查的重要指标。

免疫分析已被广泛用于检测抗原和抗体。常用就是酶免疫测定（EIAs）。EIAs特别适用于临床分析、医学诊断、药品分析、环境监测、食品质量控制及生物过程分析。其重要性在于高灵敏性和精确性，它可

以检测来源于多种样本基质的各种检验成分。按照样品的处理方法，EIAs通常被分为非均相酶免疫测定（需将游离抗原自那些与抗体结合的抗原中分离开来），和均相酶免疫测定（无需分离或清洗步骤）。按照抗体结合位点的存在条件，EIAs也可分为竞争性或非竞争性的。通常，对于大量样本的常规分析来说，EIAs是简便的并适于各种检测物的分析。然而，在分析过程中，这些方法需要多次的清洗和孵育步骤方能完成。而且对于大多数的情况而言，这些方法必须借助于复杂而且价格昂贵的分析设备来实现。此外，多次清洗和孵育步骤也限制了适用于分散的普通医疗点的便携式检测分析设备的研制与开发。

近些年来，通过人们的努力，已经可以克服非均相EIAs的局限，并且找到了均相的、快速的和无需分离清洗步骤的免疫测试方法，该方法便于在一般医疗点使用。并已开发出一种简单、快速的EIAs检测，能够通过可视的颜色变化进行单个分析物检测。基于将抗原或抗体固化在固相物体上的技术，通过使用一些如测液计、试管以及渗透膜测试盒这些常规化验器具便可快速地得到临床所需的简单定性的分析结果。这种膜式检测方法将抗原、抗体固化在固相物体上，通过使用一些常规的液体转移器具，便可快速地进行简单的定性分析。这种方法不但广泛在家庭测试中得到应用，而且正愈来愈多地被医生和医院的实验室所采用。例如用于怀孕、咽喉链锁状球菌感染、细菌以及排卵预测的检查。有关这类检测在美国专利 Pat. Nos.5, 622, 871, 4703, 017, 5, 468, 647 和5, 798, 273.中有记载。

上述方法克服了常规检测方法中需分离、清洗步骤的难题，为临床检测提供了快速、简便的新途径。但是，这种快速检测方法的缺陷在于，它并不具备高灵敏度和定量的检测性能。因而，一些需要有针对性的定量检测的医疗诊断只能在拥有该类复杂的免疫测试分析仪器的专门的实

实验室中进行。近年来，快速免疫检测方法的一个主要倾向就是朝定量检测方向发展。人们已经提出一种膜式免疫检测方法作为定量测试的方案，具体实例见美国专利第5753517号，其中记载了利用抗体结合物、参照物以及膜式液体传输方法进行定量免疫-色谱分析。但是，这种方法对在普通医疗点的诊断检测中还存在一定的困难，原因在于这种方法还不能达到无需分离样品、一步进行检测的目的。或许使用膜式免疫检测方法所存在的突出问题在于对于膜的要求方面存在矛盾。例如，在检测中蛋白质的固化要求所使用的膜具有很强的蛋白质粘合特性，但是在传送分析物方面又要求膜不能黏着蛋白质。而且，通常用于提高这种膜式检测方法的灵敏性的各要素之间却具有排它性。例如，钝化剂在降低非特异性反应信号的同时也降低了特异性反应信号的量。由于在膜式免疫检测方法的开发过程中常常遇到对膜需求的矛盾性，常规膜式检测系统在定量免疫检测方法中的使用受到了极大的限制。

因此，这就要求能够开发出一种改良的可以提供快速、准确、量化检测结果的免疫检测装置和方法。电化学检测的高灵敏性，加之抗体-抗原反应所固有的特性使一项先进的技术----电化学免疫检测得以实现。该项技术除了具备电化学检测的简洁、灵敏的优点外，其突出之处在于可以测定未经处理的有其它干扰物质存在的样本。在液体样本的分析测定方面采用安培表电化学检测的免疫检测技术已得到应用。美国专利第No.5,830,680号记述了一项采用安培表检测的免疫检测装置进行体液分析诊断检查的专利。该装置包括一个进行无需分离的夹心型免疫检测方法的电化学检测系统，其中的蛋白质分析物，如HCG,被夹在固化于多孔膜金金属电极上的吸附抗体和一种碱性磷酸盐类抗体之间。虽然，这类装置具有无需分离样本的优点，但是在处理和孵育样本时却需花费较长的时间上，这就限制了这种检测方法在快速诊断测试中的应用。

美国专利第No.5756362号对一种在免疫检测中采用脂质体进行信号产生和电化学检测的方法进行了描述。在这种方法中，将包裹入电敏感物的脂质体与分析物复合。首先将含有分析物的样本放入一测试装置进行孵育，该样本同时含有一种能与分析物及分析物—脂质体复合物特异结合的材料。经孵育后，这种混合溶液经吸附条传输至一电化学测量部分，在这里脂质体被细胞溶解剂溶解并释放出电敏感物。电敏感物释放量可用电化学方法检测出来，并且其量的多少与样品中分析物的含量有对应关系。

在美国专利第No.5391272号中记述了用生物活性物在胶体金属上包被，然后在传感器上包被的方法。分析物的检测是通过测量固化在传感器上的电敏感类物质所产生的电流来实现的，这类物质是分析物/酶催化反应一部分。虽然这种方法适用于检测一些分析物（如荷尔蒙或除草剂），但它需要经过较复杂的分离过程和孵育过程方能达到理想的灵敏度。

其它应用电化学检测方法进行免疫检测的方法都需依赖一些在非均相免疫检测中的常规方法，比如，需要长时间的孵育和多次的清洗步骤，才能将自由抗原和检测反应物自被固化的抗原和反应物中分离出来。虽然已有几个研究团体发布了关于应用无分离电流计进行免疫检测方法的实验报道，但至今仍未有一种简单、快捷、样本无需分离步骤的电流计免疫测试的成功报道。

基因诊断技术在二十世纪末得到迅速发展，采用基因诊断技术有可能在各种疾病的最早期发现疾病发生和发展的趋势。基因诊断技术的发展经历了传统的分子杂交技术、基因的PCR扩增技术以及综合上述技术并向微观和集成发展的基因芯片技术。DNA芯片是将已知的基因序列通过打印或原位合成而固化于介质的表面，后者通过分子杂交，可以将样品中基因成分精确地分析出来。基因芯片技术虽然可望在二十一世纪得

到巨大的发展，但最终市场化尚有一些关键问题亟待解决。其中很重要的问题便是基因芯片检测设备的自动化和普及化。目前，DNA芯片的检测结果一般都是采用扫描仪扫描芯片，这种设备价格昂贵，需要专门的设备和专业技术人员操作，大大限制了基因芯片技术在临床诊断上的应用。

因此，一种能够提供简单、定量和实时诊断测量的检测仪器和方法的技术仍是当务之急。

发明内容

针对现有技术的缺陷，本发明的目的在于提供一种利用电化学方法直接、快速、定量检测样品中的蛋白质和核酸的生物传感器装置。

本发明的另一目的是提供利用该生物传感器定量检测样品中蛋白质和DNA的方法。

本项发明在此领域解决了诸多技术问题，成功地提供了一种简单、快速和可靠的方法，利用免疫测试、分子杂交和电化学检测相结合的方式直接定量检测存在于液态样本中的分析物。

本发明使用了组合式电化学生物传感器(即传感器膜片)。此传感器膜片包含一个基底传感器，它是将导体材料通过丝网印刷印制在一相应的基体上加工而成的。将一种对应于分析物的特异性反应物(第一结合物)固化在工作电极表面，这种反应物可以是对应于目标分析物的特异性抗体、核酸，也可以是目标分析物本身。

本发明的传感器装置由一个采样区和一个检测区组成。其中，检测区包括用于固化特异性反应物的电极表面区域。而采样区则包括一个复合垫，其中包含有预先固定的可与分析物特异结合的第二结合物。该第二结合物可以是一种经标记物标记的可与分析物特异结合的核酸、蛋白

质或高分子类物质，当与底物（或检测物）发生反应时，它可以产生一种电化学检测信号。

本发明的传感器装置还可以包含一条毛细膜，通过它将采样区和检测区连接起来。该毛细膜作为一种载体通过毛细作用将含有分析物和检测反应物的液体样本送至检测区，使其通过抗体抗原反应或核酸之间的分子杂交被固化在电极表面。可用作毛细膜的材料包括但不限于尼龙、纤维素、纸及类似的材料。优选的膜是网状结构膜。网状结构膜的优点是它的平面结构适合于液体样本自采样区向检测区平面流动，进而与固化于电极表面的特异性反应物直接接触。

10 本发明的传感器装置附带的复合垫，用来吸收以及有目的地控制标记的检测反应物的释放，也可同时/或是附带一个分离过滤装置，用来将血浆从血液中分离出来，使血浆与复合垫上的第二结合物结合。

本发明的传感器装置还设置一个废液吸收垫，这种吸收垫应有足够的空隙和容量来接收用于检测的液体样本。

15 本发明还进一步介绍了应用本发明的生物传感器定量检测一分析物中蛋白质和核酸含量的方法。应用本生物传感器进行酶免疫检测或核酸检测时，将含有目标分析物的样本放入采样区。该样本将沿着安装在传感器膜片上的毛细膜流动，与标记的第二结合物发生反应，进而与固化在传感器表面的第一结合物（抗体或核酸）发生反应。在采用夹心式免疫检测方法时，被分析物将被夹于在传感器上固化的抗体和标记的第二结合物之间。液态样本中分析物的含量与在此过程中通过抗体抗原相互作用而固化在传感器表面分析物的量存在着一定的比例关系，并且分析物的含量可以通过被固定在传感器表面的抗体-酶复合物测得。分析物的量就可以根据目标分析物的标准曲线予以确定。通过分析物与固化于电极上的检测反应物之间的特异性结合，利用标记在特异性反应物上的标

20

25

记物作为指示剂进行定量检测。

本发明的方法结合了免疫反应（分子杂交）与电化学反应的原理和方法，利用能与分析物发生特异性反应的标记物作为指示剂进行检测。在一定的条件下由传感器装置产生的电流与分析物在液态样本中的浓度
5 成比例关系，并且该电流可以由电流表测量出来。无论是用本发明的竞争式还是夹心式生物传感器都可以完成缓冲液和体液样本中分析物的检测。

当本发明生物传感器与一个电化学装置，如一种手持式探测器，相连接后可进行电化学检测，直接将待测样品滴在一次性传感器膜片上进行
10 行电化学检测，可迅速得到检测结果。即使再普通医疗点中非专业人员也能在短时间（数十秒至30分钟）之内取得灵敏度高的定量测试结果。另外，本发明的方法几乎可以通用于任何液体样本中的免疫活性类物质和核酸的定量检测，因此，它在医疗诊断、农业和环境监测领域具有广泛的应用前景。

15 此外，本发明的生物传感器装置还可设计为盒装样式，适于家庭、诊所及普通医疗点使用。

附图说明

下面结合附图，通过对本发明较佳实施例的描述，详细说明但不限
20 制本发明。

图1A为本发明传感器的俯视简图。

图1B为本发明传感器中基传感器的俯视简图。

图2为电子免疫传感器的分解图。

图3表示前列腺类抗原在缓冲液（-■-）及血清（-▲-）样本的含量与
25 电子免疫传感器检测区中所产生的电流反应的对应关系。

图4表示液体样本中AFP的含量,与使用传感器膜片形式在检测区的电流反应的对应关系。

图5表示由电子免疫传感器测出的液体样本中心脏肌钙蛋白I的电化学反应。

5

具体实施方式

本发明的生物传感器装置包括一个基底传感器和膜,共同组成一个传感器装置(即传感器膜片),例见图1和图2。

如图1B所示,基底传感器4,其上有通过丝网印刷涂附在塑料基底上的一个工作电极2、一个参比电极8和至少一个第三电极10,基底传感器有多种制作方法,例如通过一种导电涂液(如碳素涂液)隔膜印制在一个合适的基底上,例如一张Mylar®塑料PVC等等。然后可将基底裁开制作多个基底传感器膜片。工作电极和第三电极都可用碳素涂液印制,参比电极则最好用银质涂液印制。要想使工作电极和第三电极有更好的导电性,可选择在碳质涂层的下面先涂上一层银质涂液。亦可以在与样本采集区相应的位置在导电涂层的上面再涂一层绝缘材料。用上述方法制作的基底传感器在固化吸附第一结合物时无需进一步的处理。第三电极可以为一校正电极,用于校正检测系统的误差,也可以是一个第二工作电极,用于作为工作电极2的空白对照。

对应于分析物的第一结合物,可以为蛋白质或核酸,例如夹心式免疫检测中,将第一抗体通过适当的方式固化在电极表面,可用喷涂或滴涂的方式。该第一结合物可以是对应于目标分析物的一种特异性抗体、核酸或目标分析物本身,优选的固化抗体应是单克隆抗体,其浓度应达到或超过 10^9 升/摩尔。

在基底传感器4上分别布置有:一采样区14',其上方设置一复合垫

20, 用于采集液样; 一检测区 16', 采集的液样在此与所述电极发生接触反应; 以及一废液吸收垫 18; 采样区与检测区通过一毛细膜 22 连接, 液样自采样区传送到检测区, 分析物即被夹在预先固化或沉积在复合垫中的第二结合物和被固化在电极表面的第一结合物之间。

5 图1A所示为传感器膜片12的封盖。该封盖12有两个开口14及16。将此封盖12装在传感器膜片4上时, 开口14及16分别对应于传感器膜片上的采样区14' 及检测区16', 并将它们暴露在工作电极表面。

图1B所示的三个电极提供本发明的传感器膜片与一个电位测量仪之间的连接, 对工作电极表面可用电化学方法检测到的物质进行电流测量。
10 当检测区16' 有液体样本时, 该生物传感器就如同一个电化学电池, 因此当工作电极与第三电极之间产生连续的电位差, 在它们之间就形成了电流。电路中的电流的大小直接与通过吸附抗体固化在工作电极表面的检测反应物的量成正比, 详尽描述如下。市售的与本发明配套的电位测量仪包括 (West Lafayette, IN), Cypress System Electrochemical
15 Analyser (Laurence, KS), and AndCare Electrochemical Monitor (Durham, NC)。

本发明的传感器装置还可根据需要在复合垫位置装上一个分离过滤器, 液体垂直方向通过时, 该分离过滤器可将血浆从血液中分离出来。

如图2的分解图所示, 本发明的传感器装置也设计了反应物水平方向
20 流动 (自左向右) 的装置, 在本发明中, 吸收垫18与毛细膜22末端相连, 复合垫20与毛细膜22的另一端相连, 这样, 吸收垫18、毛细膜22及复合垫20覆盖了采样区14' 和检测区16'。第二结合物, 例如标识有 (与之复合的) 能与底物和电子传输介质反应产生电化学检测信号的酶的抗体, 被固化在复合垫20上, 复合垫20用作复合物的吸收和有效地控制释放。
25 毛细膜22连接下面的采样区14' 和电极表面的检测区16', 在这里分析

物将被输送到在电极表面的检测区上。

更具体地说，当由开口14将含有分析物的样本加入传感器装置之后，该样本首先流经复合垫20，在复合垫中，样本的接触引起沉积在或预先固化在复合垫上的抗体-酶复合物(或核酸)的释放，然后，该样本和被释放的抗体-复合反应物(或核酸)通过毛细作用经毛细膜22被带到传感器表面的检测区16'，在这里分析物被吸附于电极表面固化的第一抗体(或核酸)和含有标记物的第二抗体(或核酸)复合物所形成的夹层中。

电化学酶免疫检测 (EEIA)

与多数其它方法比较，EEIA结合了电化学测试的灵敏性与免疫测试的选择性和特异性，可进行灵敏度极高的检测，并且能扩大检测的范围，电化学检测方法特别适用于电极表面的有抗原-抗体反应的免疫传感器，也可用于电极表面进行核酸分子杂交的核酸传感器。(Ngo. T. T. Ed. *Electrochemical Sensors in Immunological Analysis* Plenum Press. New York, 1987;和Monroe, D. *Amperometric Immunoassays in Critical Reviews in clinical Laboratory Sciences* 23(1):1-18, 1990)最常用的进行EEIA检测的酶标识包括碱性磷酸酶(AP)和辣根过氧化物酶(HRP)。通常一种理想的酶应该能够高效催化该酶底物中相应介质的电子转移反应。

在本发明的一个实施方案中，使用了一种夹心式的免疫检测方式，将辣根过氧化物酶(HSRP)与形成夹心式所用的第二抗体进行复合。可与工作电极上的固化的抗体发生特异性反应的分析物的量决定了电极表面酶抗体复合物的量(也因此决定了检测中电化学反应产生的电流)，因而可以进一步测出目标分析物的量。另外，一种竞争型的免疫检测可用于辣根过氧化物酶(HRP)与分析物相复合的情况。分析物与分析物HRP复合物

在固化抗体的电极表面竞争有限数量的结合位点。由于检测方法的竞争本质，电极表面的分析物-酶复合物数量（也即检测中电化学反应产生的电流）与样品中分析物的浓度成反比。

酶的活性是由电子传输介质的电化学还原性质所决定。本发明中可能用到的电子传输介质包括二茂铁及其衍生物、苯醌、如抗坏血酸或 3, 3' , 5, 5' -四甲基联苯胺(TMB)。进行 HRP 活性安培计检测的首选介质是 TMB, ELISA 曾报道过 TMB 适合在分光光度计测量中使用, 并且已被作为一种电化学介质用于以 HRP 为酶的免疫检测中 (G. Volpe et al, Analyst 123:1303-130T7, 1998)。在夹心式检验方法的测试中发现 TMB 是对低含量 HRP 进行电化学检测的良好底物。

因此, 在本发明方法中, 加入首选介质TMB和过氧化氢以探测电极表面的HRP复合物。实验中要有充裕的TMB和过氧化氢的浓度以确保有效的酶促反应。由于有与HRP复合物反应的过氧化氢的存在, TMB被氧化, 然后在相对低电势下被底物还原。由于使用低电势, 例如0mv-200mv (vs. Ag/AgCl), 许多通常会干扰电化学检测的生物过程都不会产生干扰信号。所使用的电子传输介质及底物的浓度通常保持在比酶促反应所需的要高一些。在此条件下, 电极表面TMB的循环所产生的稳定电流是对应于HRP的量。由于夹心层所依附的固相也可用来测量电流, 如可通过电极连接检测仪器, 在加入底物溶液几秒钟之内便可产生稳定电流。如此产生的电流与通过分析物被固化在电极表面的HRP复合物的量成正比。底物溶液可在检测时手工加入检测区 (图1), 也可将底物溶液密封在储存器, 如 alumna pouch中, 预先装在传感器上。后一种方式中, 在检测时可以用挤压的方法或用机械方法撕开包装以让溶液流出。

在使用一次性免疫传感器进行酶免疫检测时, 将含有目标分析物的样本置于采样区。第二结合物, 如酶-抗体复合物, 与样本接触时被释放

出来。样本与第二结合物随后渗过安装在传感器膜片上的毛细膜与被固化在传感器上的抗体结合在一起。如果要安装一个滤过装置，例如用作血液分离，该装置则应安装在复合垫之上，将血浆从血液中分离出来。任何从毛细膜渗出的过剩的液体样本都会被吸收垫吸收。在夹心式免疫检测方法中，分析物被夹于固化在传感器表面的抗体和抗体复合物之间。从液体样本中分离的分析物的数量与经抗原-抗体相互作用而固定于传感器电极表面的分析物数量成正比，并可由经分析物被固化在传感器表面的抗体-酶复合物检测出来。

免疫检测也可用一种基底传感器来进行，将吸附抗体（第一抗体）固化在工作电极上。在这种检测方法中，先将一种含有目标分析物的样本与抗体-酶复合物相混合，再将混合物加入传感器并进行短时间的孵育，孵育时间应足以使样本中的分析物和抗体-酶复合物相结合并被吸附抗体吸附，孵育时间约为5至30分钟。孵育完成后，用缓冲溶液清洗传感器以洗去未吸附的分析物及复合物。然后加入含有酶底物和电子传输介质的检测溶液测出被吸附的分析物的量。由酶催化的电化学反应产生的电极上稳定电流可用常规的电流可读仪表测出。电流的大小与液样中分析物数量成正比。

在本发明的另一个实施方案中，用上述方法，在孵育完成后，无需使用缓冲液清洗传感器，而是用第二工作电极作为参比电极直接通过电流计测定工作电极与第二工作电极之间的电流量差，该电流量差与样本中分析物的量成正比。

在本发明的又一个实施方案中，可以使用成套检测仪器来进行量化免疫检测，例如使用本发明的生物（免疫）传感器。该免疫传感器包括至少含一个检测区的一次性传感器膜片，其工作电极表面固化有第一结合物。该免疫传感器还可包括其它组件，如手持监视器，分析物的标准

对照，缓冲溶液等等。

本发明可适用于几乎任何可产生生物反应的分析物，尤其适用于任何可产生抗原-抗体反应的分析物。这里“分析物”一词广泛地指任何可引起免疫原性反应的样品或任何可进行核酸分子杂交的样品。有代表性的分析物包括但不限于：麻醉剂、激素、蛋白质、细菌、病毒、癌标
5 识物等等。利用本发明生物传感器及其方法可以检测到的分析物包括但不限于：前列腺癌检测中的前列腺类抗原检测；以甲胎蛋白（AFP）、人绒毛膜促性腺激素（HCG）、游离雌三醇（estriol）为标识的出生前遗传学筛查；以心肌钙蛋白I作为标识的急性心肌梗塞等诸如此类的检测；
10 以及以DNA为标识的分子遗传学检测。分析物可以因各种液态样本的不同而有所差别，它们包括但不限于：各种体液，例如血清、尿液、唾液等和各种生物液体中的分析物等。

这里之所以将抗原-抗体反应作为本发明的生物传感器的一个具体实例，是因为它们很具代表性并便于理解，但是本发明生物传感器及其
15 量化检测方法所用的与分析物发生特异性反应的试剂却不只限于蛋白质类，还可以包括其它天然合成或人工合成高分子类，如人工合成受体，碳水化合物/蛋白质的合成类、核酸及非蛋白质类，直至那些能通过复合或交叉反应生成目标化合物的物质。

本发明的一个突出的优点在于非专业人员就可以进行这样的定量检
20 验，而且只需完成加入样本溶液或检测剂这样简单的步骤。检测中无须长时间的样本孵育和分离过程，整个检测过程在几分钟至几十分钟之内便可以完成，真正实现了一步法和无需分离样品的现代医学检验的要求。

下面，我们将通过以下实施例对本发明进行更详细的描述，使本发明的优点和效果显而易见。

准备工作:印制传感器

图1中所示的基底传感器可从市场购买,也可通过丝网印刷将导电材料印制/涂附在一个相应的基底,例如塑料上来自制。试验中所用传感器是使用聚酯膜以及涂液材料制造商所推荐的方法印制的。涂液材料包括银导体和碳导体(Polymer Thick film Compositions, 5000 and 7102, DuPont, Research Triangle Park, NC),基底采用Mylar®(聚酯薄膜)塑料。工作电极和第三电极都是由碳质涂液印制而成的,参比电极是由银质涂液印制而成的。要想使工作电极和非工作电极获得更好的导电性,可以选择在碳质涂层的下面先涂上一层银质涂层。也可在导线上涂上一层绝缘膜以形成绝缘层。以此方法制作的传感器在吸附抗体的固化方面无须作进一步的处理。

实施例2

在通过丝网印刷法印制的传感器上的抗体固化

此例描述使用脂肪醇溶液将抗体固化在丝网印刷印制的传感器上的方法。脂肪醇溶液有助于润湿电极表面、减少静电、加速溶液中蛋白质的分解,使其更容易附着在电极表面。

通过使用一种含有脂肪醇的缓冲抗体溶液(如PBS)可以将抗体直接固化在碳质传感器表面。优选的脂肪醇为异丙醇。要将抗体固化在丝网印刷印制的传感器上,需要在工作电极区滴上一层混合入 $3\mu\text{l}$ 的吸附抗体溶液的含有异丙醇的磷酸盐溶液。该脂肪醇溶液室温下在空气中挥发,沉积一层附着在电极表面的抗体。

加入传感器的抗体的量需根据每一吸附抗体来确定。一般来说,在传感器中加入足够量的抗体以便在传感器表面形成单层抗体层,可以得到最佳的传感器响应。通过这种方法固化在传感器表面的抗体通常可以在短期内保留自身的生物活性。

为进一步稳定被固化在传感器上的抗体，以备长期使用，可将有抗体附着的传感器表面浸在含有25%的StabilCoat®(SurModics, Inc., Eden Prairie MN) 和0.01%的Tween20的溶液中室温下保温十分钟。十分钟后溶液挥发，传感器完全变干，然后将其放入有干燥剂的密封容器中。

5 固化溶液中醇的含量也影响着传感器响应的灵敏度. 我们作了许多试验来对比抗体固化溶液中的异丙醇含量对其所产生的影响。使用上节中所描述的方法，一个在含有各种不同异丙醇（v/v%）的PBS缓冲器中的单克隆抗-甲胎蛋白抗体被固化在了传感器上。将该固化好的传感器放入含有200ng/ml甲胎蛋白(AFP)及AFP-HRP复合物的混合溶液中室温下孵育
10 15分钟，然后用pH7.4/0.5% Tween 20 的PBS溶液冲洗。每个传感器上固化的AFP-HRP所产生的即时电流通过使用实施例3中所描述的方法来测量。下表1说明传感器对应于抗体固化溶液中异丙醇的含量所获得的信号值。结果显示PBS溶液中25%含量是普遍适用的，因此它是目前固化大多数吸附抗体最理想的用液比例。

15

表1

异丙醇的百分比 (%)	对应即时信号值 信号百分比 (%)
0	47.7
5	51.5
10	58.4
20	70.1
25	100
30	64.5

实验证明，甲醇、乙醇和乙烷醋酸盐都是将抗体固化在电极上的理想溶剂，但是固化测试的结果显示，随时间推移，用乙醇溶液固化抗体的传感器的稳定性的下降速度比用异丙醇溶液固化抗体的传感器的稳定性的下降速度要快得多。

固化抗体也可使用除滴覆涂层以外的技术来实现，例如，抗体的固化也可使用将抗体溶液喷雾在电极表面然后让该溶液蒸发的方法。使用喷雾的方法沉积在传感器上抗体的均匀度可以通过对溶剂和喷雾条件的选择来控制。而且，这种喷雾涂层技术亦适用于抗体固化传感器的批量生产。

实施例3

HRP复合物的电化学检测

通过第二抗体与一种酶作用物的复合将目标分析物与固化抗体粘和在一起的方式可以形成一种夹心结构，这种结构通过酶的复合使目标分析物的量化测定得以实现。

酶的活性是由电子传输介质的电化学还原性质所决定。本发明中可能用到的电子传输介质包括dimethylaminomethyl ferrocene、抗坏血酸、苯醌、3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)。进行HRP活性安培计检测的首选介质是TMB。ELISA曾报道过TMB适合在分光光度计测量的中使用，并且已被作为一种电化学介质用于以HRP为酶的免疫检测中(G. Volpe et al, *supra*)。在夹心式检验方式的测试中发现TMB是对低含量HRP进行电化学检测的良好底物。

由含 40 μ M 的 TMB、及 5%-10%二甲亚砷的 0.1M, PH6.0 醋酸钠溶液，和 0.01%的过氧化氢混合而成的一种优选的共同底物以利 HRP 酶促反应。或者，也可购买含 TMB、缓冲溶液和过氧化氢的底物溶液成品。这类成品溶液包括 K-Blue Substrate^R Ready-to-use (TMB) 和 1-StepTM Turbo TMB(Pierce, Rockford, IL)。

固定于传感器上 HRP 的酶活性由 Petite Ampere 分析器 (Bioanalytical Systems, Inc, West Lafayette, IN) 测出。在向与监视器相连的传感器中加入 HRP 底物溶液后，再施加-50mV 的电势。加入

底物溶液 5 秒钟后，即可测出固定于传感器上的 HRP 产生的电流。

实施例 4

膜的选择

通过几种不同类型膜对缓冲液毛细流速的比较，可以确定不同材料的毛细膜的特性。这里将几家厂商（Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts）提供的多微孔膜与具有不同网孔尺寸的尼龙网过滤器进行比较。膜被切割为 4.5cm 长，4mm 宽的条状。每个膜片由一个透明细带将其一端固定在塑料基底上。将缓冲溶液（磷酸缓冲盐 PBS/0.5%酪蛋白，pH7.4）加在膜片的固定端。记录下液体流过 4cm 待检测膜片所需的时间。如表 2 所示，多微孔膜的流速通常低于网状结构膜的流速。而且，在所测的网孔尺寸范围内，缓冲溶液的流速直接与网孔开口的大小成正比。尽管测试的实际速度取决于所用膜的材料，但这些测试的结果表明任何一种被测的膜都可以用来提供快速检测。另外，所有被测膜都表现出稳定的流动性。

表 2

膜的类型	微孔尺寸	缓冲液流过 4cm 膜的时间
Durapore, SV 型	4 μm	3' 26' '
Durapore, SV 型	1 μm	3' 45' '
Satorius, 硝酸纤维	8 μm	2' 32' '
Satorius, 醋酸纤维	8 μm	2' 59' '
Whatman, 硝酸纤维	5 μm	3' 47' '
Whatman, 硝酸纤维	3 μm	3' 42' '
尼龙网过滤器	网孔开口尺寸	
细孔, 尼龙网	11 μm	1' 33'
细孔, 尼龙网	50 μm	1' 05' '
细孔, 尼龙网	60 μm	49' '

细孔，尼龙网	80 μm	40' ,
--------	------------------	-------

被测膜传感器反应性能的对比是通过将每一种膜用于同一种传感器装置来进行对比的。抗甲胎蛋白（AFP）抗体依前面例 2 所述的步骤被固定的于传感器上。作为夹心式检测的第二抗体，抗 AFP-HRP 复合物被沉积并干燥于一个复合垫上。复合垫和各种被测传感器膜片的准备依照后面例 7 所述的步骤进行。本例中所用的膜都是未经阻滞剂处理的膜。

对每个传感器膜片加入 100 μl pH7.4 的溶于 PBS/0.5%酪蛋白的 300ng/mlAFP 溶液。该样本流过组装于传感器膜片上的受测试膜，并与固定在传感器表面的抗体以及 HRP 抗体复合物进行反应。使用 TMB/H₂O₂底物溶液测出电化学信号。并通过向没有分析物的传感器膜片加入缓冲液的方法来对比非特异性信号引起的背景反应及分析物的反应。表 3 显示此项试验的结果。

表 3

薄膜类型	微孔尺寸	信号强度 μA	背景 μA
Durapore, SV 型	4 μm	4.01	2.51
Satorius, 硝酸纤维	8 μm	2.00	1.12
Satorius, 醋酸纤维	8 μm	1.83	0.99
Whatman, 硝酸纤维	5 μm	4.36	2.44
Whatman, 硝酸纤维	3 μm	0.97	0.55
细孔，尼龙网	50 μm	3.03	0.47

试验结果表明多微孔结构膜所产生的背景信号一般大于网状结构膜。另一方面，尽管测试溶液在网状结构膜中的流速远远高于多微孔结构的膜(见表 2)，但仍能产生较强的信号，显示出更高效的抗体-抗原复合条件。这些数据显示出，与多微孔膜相比，网状结构膜具有最低的背景信号和最高的信噪比，证明网状结构的膜目前更适合于本生物传感器及其方法。

虽然网状结构膜如尼龙网更适合于用做本生物传感器的材料，但也应

看到另外一些具有类似结构的材料，即便是多微孔结构的材料，在经过优化以消减其非特异性信号响应以后仍可用以得到类似的效果。

实施例 5

选择膜阻滞剂以降低非特异性信号

5 通过阻滞传感器片中的膜片可以进一步提高生物传感器的反应性能。膜的阻滞基于如下目的：1)降低抗体复合物或分析物与膜表面的非特异性结合。2)提高成品设备的再吸水和储存特性。通常可以通过加蛋白质(如酪蛋白，或牛血清蛋白)，表面活性剂(如 Tween 20，或 Triton X-100)，或高分子聚合物(如聚乙烯醇)进行阻滞以减低膜上的非特异性
10 附着。

本发明中优选的阻滞剂是一种具有憎水性中端和亲水性末端的聚合物，其结构为 PEG-PPG-PEG，其中 PEG 为聚乙二醇，PPG 为聚丙二醇。这类聚合物有 Pluronic™ 和 Poloxamer™ 等。憎水性的中端可吸附于憎水性的表面上，未吸附于其表面的亲水性末端则可象海藻般地自由浮动。憎
15 水性中端的覆盖和亲水性末端浮动可共同有效地阻滞膜表面，并形成不吸收蛋白质的表层。

为检验阻滞剂对非特异性信号所产生的效果，在与生物传感器检测类似的条件下，进行了一些实验，以确定残留于被阻滞膜上的 HRP 抗体复合物的数量。所使用的阻滞试剂包括(a)一种 PEG-PPG-PEG 聚合物(平均 M_n 8,400)，(b)Triton X-100，(c)PVA(M_w 13,000-23,000)，(d)Tween
20 20。以上试剂都由 Aldrich Chemical Company, Inc, Milwaukee, WI 提供。先将干燥的膜(尼龙网，30 μ m 网孔，Millipore)浸润于含 1%阻滞剂的溶液中，然后在 4C° 的温度下隔夜存放，使其在无振动条件下自然均匀扩散。接下来再将膜在室温下晾干，然后切割为 0.5cm 宽 2cm 长的膜
25 片，并组装于由心肌钙蛋白 I 的吸附抗体固化的基传感器上，其它装置

还有一个吸收垫和一个含有 30ng/pad 预干燥的抗心肌钙蛋白 I HRP 复合物的复合物垫。加 150 μ l 的 PBS pH7.4/0.5%酪蛋白缓冲溶液于采集区并使其流动。5 分钟后再加 3 滴含有 TMB/H₂O₂ 的底物溶液于检测区。每个传感器膜片的电流信号由例 3 中所述的电化学方法测得。

实验结果表明，相对于未阻滞的膜而言，由于膜上 HRP 复合物的附着作用，所有的阻滞试剂都具备一定的降低非特异性信号的效果。阻滞的效果依次为：PEG-PPG-PEG>>PVA>Triton X-100>Tween 20。同时也发现阻滞试剂的用量一样影响到非特异性信号的数量。通常，阻滞试剂的用量的增加会引起非特异性信号的减弱。

10 实施例 6

抗体-HRP 复合物

许多抗体-HRP 复合物市场有售。做为选择, 也可使用 Pierce's EZ-Link™ Plus 活化过氧化物酶试剂盒(Pierce Chemical, Rockford, IL) 经以下步骤得到:

1. 将约 1mg 的 IgG 用 0.5-1.0ml 的磷酸缓冲盐溶液溶解。
2. 重组 1mg 冻干的 EZ-Link Plus™ 活化过氧化物酶于 100 μl 水并加入 IgG 溶液中。
3. 立即加入 10 μl 氰基氢化硼钠溶液，其组成为 5M NaCNBH3 比 1M NaOH。
4. 在室温下将该溶液孵育 1 小时。
5. 加入 20 μl 含 3M 胺基乙醇，pH9.0 的解缓冲，并在室温下反应 15 分钟。
6. 透析 PBS 溶液中的复合物。使用 DispoDialyzer 析去谱中的分子量 100,000 (MWCO)，以将游离的 HRP 从复合物溶液中除去。
7. 将 Pierce' s SuperFreeze™ 过氧化物酶复合物稳定剂加入到复合物溶液，并将该溶液长期贮存于冰箱中。

实施例 7

复合物释放条件

本发明生物传感器检测中复合垫的制作材料是多种多样的，例如由聚丙烯酸乙烯粘合的硼硅酸盐纤维，或聚脂基体材料。制作复合垫的材料应具备低的蛋白质复合、稳定的流动性、稳定的复合物释放等性质。
5 Loprosorb (KK0141 Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) 是一种比较理想的复合物释放材料。

在以下介绍的检测中，将抗体复合物在复合垫上干燥，可用喷雾瓶将复合物溶液喷洒于复合垫上，也可用微吸管将复合溶液手工滴在复合物释放材料上。本例中的抗体--HRP 复合物溶液由 20% 的蔗糖缓冲液稀释。
10 复合垫在接触样本采集区的毛细膜前应保持干燥。当液体样本加入采集区域后，复合物被再水化并渗过薄膜。

实施例 8

探测前列腺类抗原的一次性传感器装置。

15 图 2 中所示的基底传感器可单独进行各种液体中的分析物检测，将含有目标分析物的样本直接加入有固化抗体的检测区。在本例中，这样的基底传感器通过使用以上例 2 所述的方法将单克隆抗-PSA 抗体固化于该传感器膜片，以进行前列腺类抗原 (PSA) 检测。将 PBS PH7.4/0.5% 的酪蛋白溶液中的 PSA 和血清样本与第二单克隆抗-PSA 抗体-HRP 复合物同时
20 孵育，结果在基底传感器表面形成复合物吸附。经过室温下十分钟的孵育后，将传感器膜片用 PBS 0.05% Tween 20, PH7.4 的溶液洗净，然后再滴入含有过氧化氢和 TMB 的底物溶液。用电极将传感器与一个可读仪器 (Petite ampere, Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN) 连接，产生的电流在添加底物溶液后五秒钟测得。如图 4 所示，电流感
25 应的大小与测试样本中的 PSA 含量成正比。由此方法测出的分析物包括，

但不仅限于，人绒毛膜促性腺激素(HCG)，心肌钙蛋白(CRP)和甲胎蛋白(AFP)。

实施例 9

使用一次性传感器的夹心式检测

5 使用本发明中的一次性膜传感器也可对甲胎蛋白(AFP)进行夹心式免疫检测。

本例中，据 Boorsman, D.M. et. al (J.Histochem. Cytochem. 23:200-207, 1976) 的方法经净化处理的 3ul 比重为 15ug/ml 的抗-AFP-HRP 复合物沉积在一个低蛋白结合复合垫上(Gelman Sciences 生产(Loprosorb, KK0141))。该复合垫在室温下晾 20 分钟，然后在可控湿度的室内存放一夜方被安装到传感器膜片上，然后将 30ng/sensor 的单克隆抗-AFP 固定在传感器上，这样传感器装置就安装完毕。

使用一次性生物传感器进行酶免疫测试时，在样本采样区加入 200ul PH 值为 7.4 的 PBS /0.5%酪蛋白的 AFP 样本溶液。样本流过传感器膜片上的毛细膜与固化在传感器表面的抗体及抗体酶复合物发生反应。几分钟后，在传感器检测区加入含有 TMB/H₂O₂ 的 100ul/sensor 底物溶液。五秒钟后，用与传感器膜片相连的可读仪表(Petite Ampere Bioanalytical Systems, Lafayette, IN) 测出电流。如图 5 所示，检测区内的信号随液样中分析物聚集不断加强。

20 原理相似，本发明的生物传感器也可用于检测心脏标记物心肌钙蛋白(TnI)，用于心脏损伤病症的检测。这个用所描述的方法装配的生物传感器由一个基底传感器，一个复合垫，一个尼龙网状膜(30um Millipore) 组合装配而成。每个传感器都在其工作电极表面固定了约 45 ng 的单克隆抗体；复合垫含有 30ng 抗与 HRP 相复合的 TnI 的第二抗体。此例中所用的膜经 2%的 PEG-PPG-PEG(nm8400)溶液预先阻滞，检测中在采样区加

25

入 150ul 含有 TnI 样本液体，五分钟后，在检测区加入 K-Blue 底物成品 TMB(Neogen Corporation, Lexington, KY)。五秒钟后，用与传感器膜片相连的可读仪表（Petite Ampere Bioanalytical Systems, Lafayette, IN）测出电流。如图 5 所示检测结果说明用这种生物传感器
5 在临床范围内，可对液体样本中 TnI 的量进行量化测定。

实施例 10

本实施例说明以 DNA 为特异性反应物和检测反应物的 DNA 传感器的准备和检测。

将已知稀释度的大肠杆菌加入标准的多聚酶链反应 (PCR) 混合物中，
10 根据操作指南制备 (Amplitaq Kit, Perkin Elmer Cetus, Emeryville, Calif.)。两个用于反应的寡聚核苷酸引物（每个 5μl）是 18mers，其与细菌中代表四环素抗性基因的 DNA 的每个 1kb 片段的末端同源。该反应在以下条件进行：94℃1 分钟、54℃1 分钟、以及 74℃1 分钟，重复上述三个步骤 30 个循环。

15 在该 PCR 反应的终末，向混合物中加入两个新的引物，每个 5 μ l，接着进行 10 个循环的 PCR。该新的引物与位于被第一组引物结合的区域中的四环素抗性基因上的区域同源。与这些第二引物的一个的 5' 末端共价结合的是一个生物素—HRP 复合物标记物，而与另一引物的 5' 端共价结合的是一个“一般的结合位点”，它由 10 个碱基序列组成，该序列代
20 表对应于一个双链 DNA 结合蛋白 (dsDNA BP) 的一个特定的位点。

在第二次 PCR 后，取 10 μ l 反应混合物液体在 0.7%琼脂糖凝胶、120V 电泳 30 分钟，溴化乙锭染色，于紫外光下进行观察。

然后将 5μl 反应混合物与等体积甲醇混合，置于一个膜电极的复合垫上，在 37℃湿润的箱中孵育 30 分钟，测量特异结合的电流强度，由读
25 数计读出电流强度。所述的膜电极先用 10μl 的 100μg/ml dsDNA BP 溶液

在 37℃湿润的孵箱中包被 1 小时，接着在 PH7.4 的磷酸盐缓冲液中短暂漂洗，并在 6×SSC 中的 0.25% BLOTTO (Maniatis, 1990) 在 37℃封闭 15 分钟。

溴化乙锭染色的凝胶显示在正确的分子量范围内有一条单一的带，
5 表明用本发明的技术从少至单个细菌中成功地扩增出了靶 DNA。使用放射标记的 dsDNA BP 显示该蛋白与 PVDF 和玻璃有良好的结合。含有对应于 dsDNA BP 结合位点的扩增的 DNA 成功地与固定化蛋白结合，对于这种反应最佳条件的研究尚在进行中。

如上所述，用本发明技术从单个细菌中成功地对靶 DNA 的扩增已在
10 溴化乙锭染色的凝胶中得以证明，通过电流计读数已证明该扩增的、修饰的靶 DNA 可通过 dsDNA BP 结合到传感器的表面。因此，对于本发明所需的两个步骤——靶 DNA 的特异扩增以及修饰后的和扩增的靶 DNA 通过一个双链 DNA-结合蛋白结合到传感器表面，均已具备。

以上对本发明的详尽描述和实施例说明，并不限制本发明，本领域
15 技术人员可以根据本发明作出各种修改和变化，只要不超出本发明基本精神，均应属于本发明的范围。

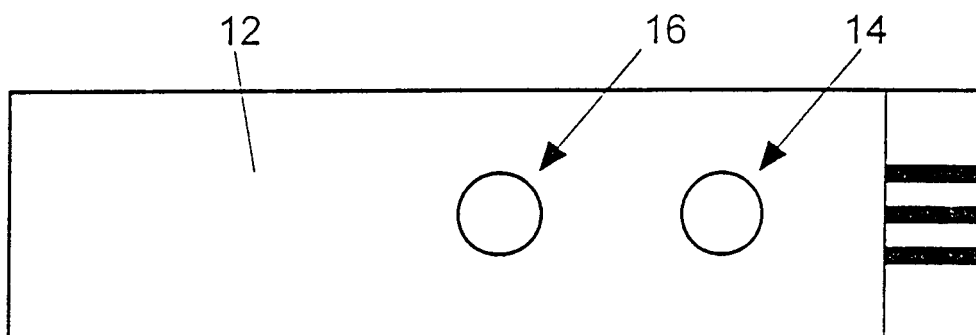


图 1A

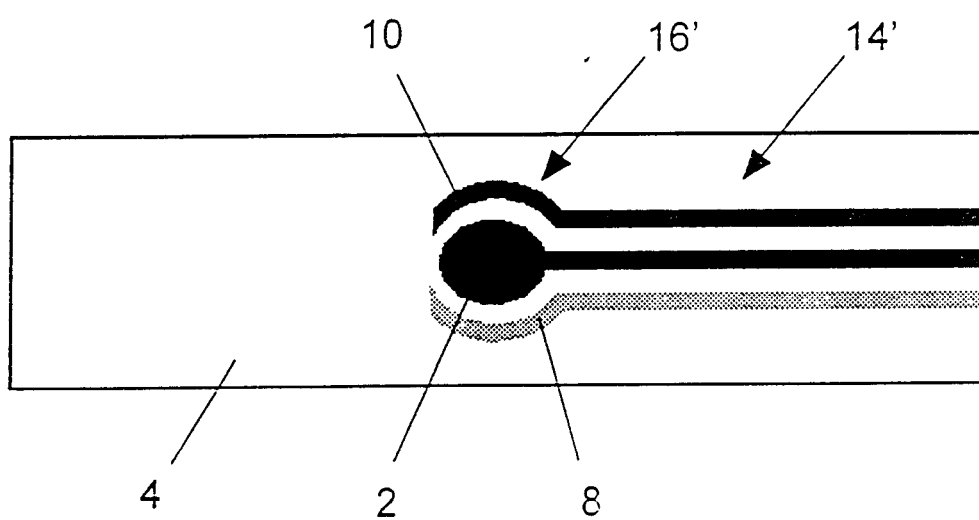


图 1B

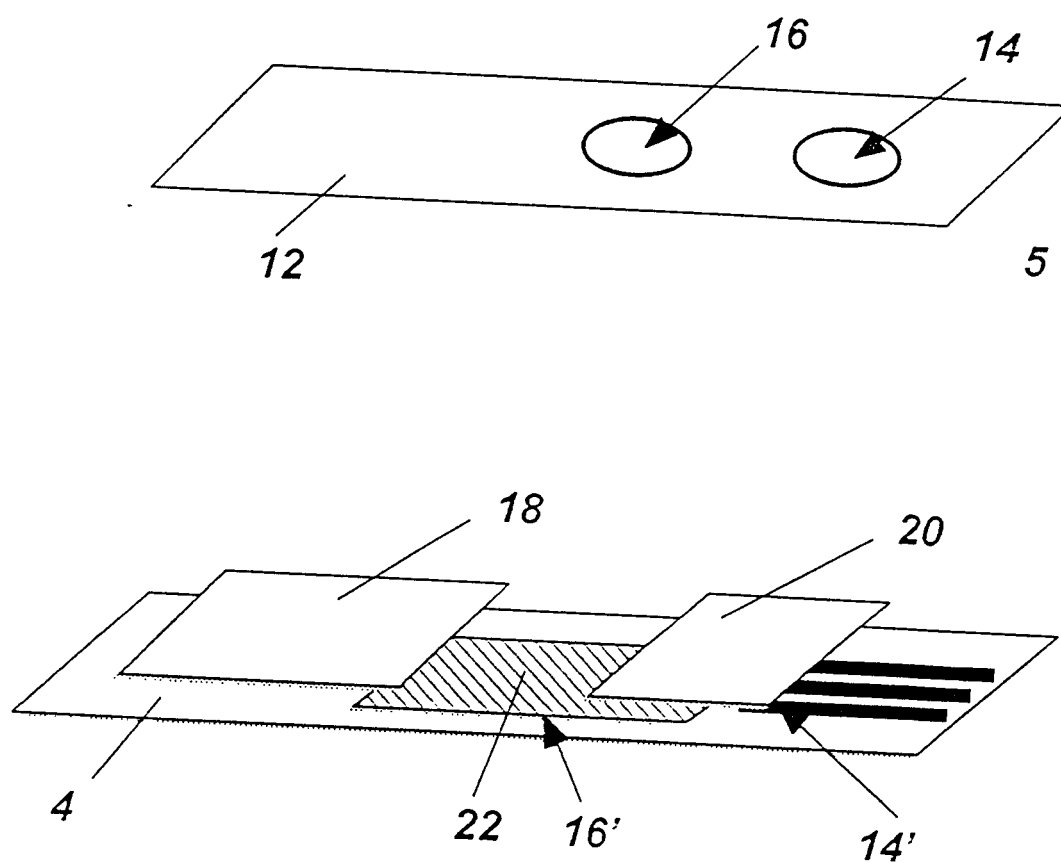


图 2

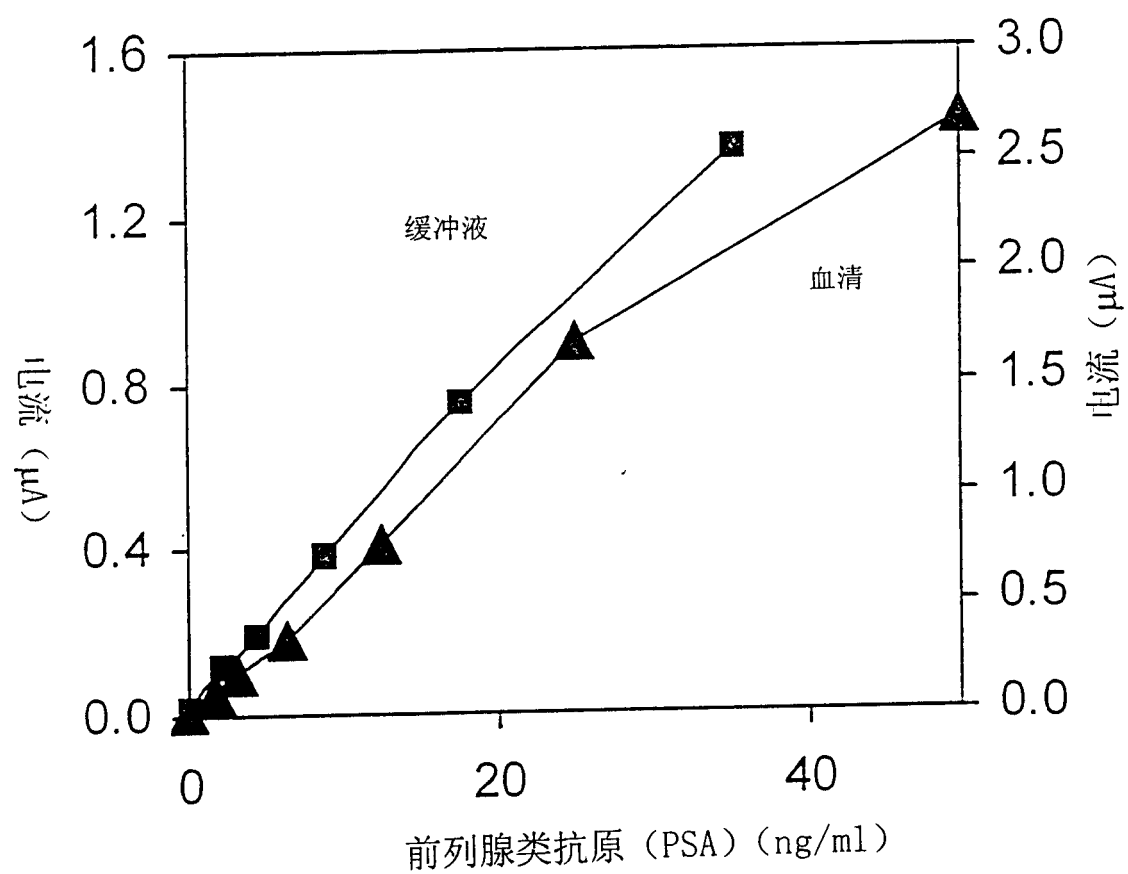


图 3

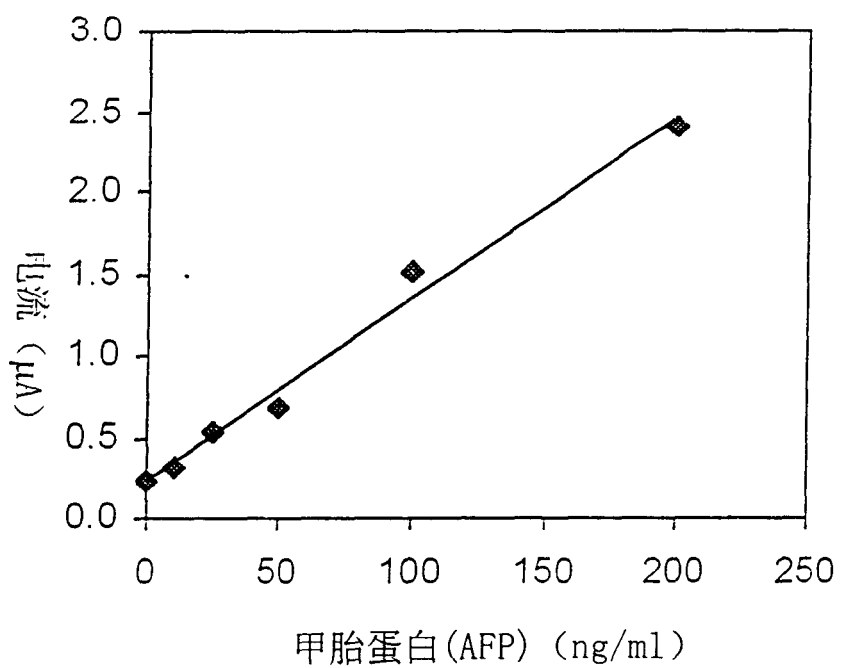


图 4

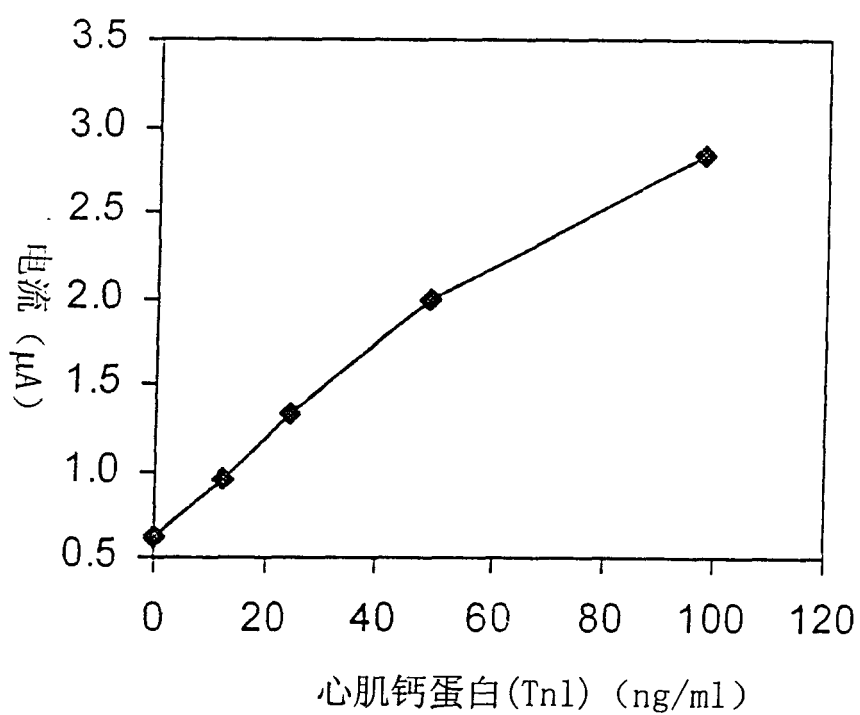


图 5

专利名称(译)	一种生物传感器及运用该传感器的量化检测方法		
公开(公告)号	CN1228635C	公开(公告)日	2005-11-23
申请号	CN01104109.9	申请日	2001-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	刘开颜		
申请(专利权)人(译)	刘开颜		
当前申请(专利权)人(译)	刘忠		
[标]发明人	刘忠		
发明人	刘忠		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N27/26 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/558		
其他公开文献	CN1370993A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种利用电化学方法定量检测和实时测定液体样品中蛋白质和核酸的生物传感器及运用该生物传感器对液体样品中的蛋白质和核酸进行量化检测的方法。该装置包括一个基底传感器，上有涂附在塑料基底上的一个工作电极、一个参比电极和至少一个第三电极，所述工作电极上固定有可与分析物结合的第二个结合物，所述基底传感器的各电极与可读仪表相连，进行电化学测量；一个毛细膜，设置于所述基底传感器上方，用于检测中样品的水平方向传输；它还进一步包括一个复合垫，所述复合垫中包含有可与分析物特异结合的第二结合物。本发明成功地提供了一种简单、快速和可靠的方法，利用免疫测试、分子杂交和电化学检测相结合的方式直接定量检测存在于液态样本中的分析物，在医疗诊断、农业和环境监测领域具有广泛的应用前景。

