

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/32

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02139981.6

[43] 公开日 2003 年 7 月 2 日

[11] 公开号 CN 1427082A

[22] 申请日 2002.11.19 [21] 申请号 02139981.6

[30] 优先权

[32] 2001.11.20 [33] US [31] 09/988812

[71] 申请人 生命扫描有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 T·欧阳 P·黄

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 徐雁漪

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 4 页

[54] 发明名称 稳定的四唑鎓试剂组合物及其使用方法

[57] 摘要

用于测定在提供的样品中的分析物的稳定的四唑鎓染料试剂组合物和方法。本试剂组合物包括一种四唑鎓染料成分,例如水溶性的四唑鎓盐,和有效量的亚硝酸盐稳定剂,例如亚硝酸盐。在许多实施方案中,本试剂组合物包括附加的分析物氧化信号生成系统组分,如:分析物氧化酶,例如分析物脱氢酶或分析物氧化酶;电子传递试剂;和酶辅助因子。还提供了包括本试剂组合物的测试条,以及与本测试条结合的系统 and 试剂盒。发现本试剂组合物、测试条、系统和试剂盒可用来测量样品中的多种分析物,上述样品如生理样品,例如,血液或其级分,或组织液(组织液)。

I S S N 1 0 0 0 - 4 2 7 4

1. 一种试剂组合物，其中包含：
一种四唑鎓染料；和
5 有效量的亚硝酸盐稳定剂。
2. 根据权利要求 1 的组合物，其中所述的四唑鎓染料是水溶性四唑鎓盐。
3. 根据权利要求 1 或 2 的组合物，其中所述的亚硝酸盐稳定剂是亚硝酸盐。
- 10 4. 根据权利要求 1,2 或 3 的组合物，其中所述的试剂组合物包含一种分析物氧化信号生成系统。
5. 根据权利要求 1 至 4 的任一组合物，其中所述的组合物是流体组合物。
6. 根据权利要求 1 至 4 的任一组合物，其中所述的组合物是干组合物。
7. 一种试剂测试条，其中包含：
15 一种基材；和
根据权利要求 1 至 6 任一的试剂组合物。
8. 一种分析物检测或测量系统，其中包含：
(a) 权利要求 7 的试剂测试条；和
(b) 一种自动的仪器。
- 20 9. 一种在样品中检测分析物的存在或测定其浓度的方法，所述方法包含：
(a) 施用所述生理样品于根据权利要求 7 的测试条试剂，由此在所述试验片上产生一个点；
(b) 检测所述点；和
(c) 通过检测所述点确定在所述生理样品中所述分析物的存在和浓度。
- 25 10. 一种用来确定在生理样品中分析物浓度的试剂盒，它包括：
(a) 根据权利要求 7 的测试条试剂；
(b) 至少下述之一；
(i) 获得所述生理样品的装置和
(ii) 一种分析物标准物。

稳定的四唑鎓试剂组合物及其使用方法

5 本发明的领域

本发明的领域是分析物测定。

本发明背景技术

在当今社会中，生理液体，例如血液或血液衍生的产品中的分析物的测定越来越重要。分析物的检测在多种应用领域，包括临床实验室测定，家用测定
10 等中找到了用途，上述测定的结果在多种病症的诊断和治疗中起到了重要的作用。感兴趣的分析物包括醇、甲醛、葡萄糖、谷氨酸、甘油、 β -羟基丁酸盐、L-乳酸盐、亮氨酸、苹果酸、丙酮酸、类固醇等。相应于分析物测定的重要性的提高，临床和家用的各种分析物测定的方案和设备已经被开发和应用。

目前已经开发了使用信号生成系统去鉴别在如血液生理样品中存在的感兴
15 趣的分析物的多种方案和设备。

目前已经开发了多种上述的信号生成系统用来测定多种不同的分析物，而且还需要进一步开发上述系统。

相关文献

相关的专利文献包括：US 6,200,773; US 5,902,731; EP0 908 453
20 A1; WO94/01578 和 WO94/01544。

本发明概述

稳定的四唑鎓染料试剂组合物包括提供的四唑鎓染料试剂，例如水溶性四唑鎓盐，和四唑鎓亚硝酸盐染料稳定试剂，例如亚硝酸盐。在许多方案中，试剂组合物包括分析物氧化信号生成系统的成分，其中四唑鎓染料是其中的一种
25 成分，上述系统包括一或多种下述附加成分：氧化分析物的酶（analyte oxidizing enzyme），例如分析物脱氢酶或分析物氧化酶；电子传递试剂；和酶辅助因子。还提供了其中包括所述的试剂组合物的测试条（test strip），以及包含有本测试条的系统 and 试剂盒。发现本试剂组合物、测试条、系统和试剂盒可用来测量样品中的多种分析物，上述样品如生理样品，例如，血液或其级分，或 ISF(组织
30 液)。

图表的简要说明

图1提供了没有 NaNO_2 的 WST-5 的水溶液的紫外可见光谱，在光照或黑暗下 24 小时。

图2提供了存在 NaNO_2 的 WST-5 的水溶液的紫外可见光谱，在光照或黑暗下 24 小时。

图3提供了没有 NaNO_2 的 WST-5 在膜上的反射谱，在光照或黑暗下 7 小时。

图4提供了含有 0.3M NaNO_2 的 WST-5 在膜上的反射谱，在光照或黑暗下 7 小时。

具体实施方案的说明

本发明提供了在样品中测量分析物的稳定的四唑鎓染料试剂组合物及其使用方法。本试剂组合物包括四唑鎓染料成分，例如水溶性四唑鎓盐，和有效量的亚硝酸盐稳定剂，例如亚硝酸盐。在一些实施方案中，本试剂组合物包括附加成分分析物氧化信号生成系统，如：分析物氧化酶，例如分析物脱氢酶或分析物氧化酶；电子传递试剂；和酶辅助因子。还提供了包括本试剂组合物的测试条，以及包括了本测试条的系统 and 试剂盒。发现本试剂组合物、测试条、系统和试剂盒可用来检测样品中的多种分析物，样品如生理样品，例如血液或其级分，或 ISF(组织液)。

在对本发明进一步说明之前，应理解的是本发明并不仅限于下述本发明具体的实施方案，可以对具体的实施方案进行改变，且这些改变仍落在随附的权利要求的范围内。还应理解的是，使用术语的目的是为了说明具体的实施方案，而不是为了限制本发明。而且，本发明的范围将通过附加的权利要求而确立。

在本说明书和附加权利要求中，除非在本文中清楚的指明，单数形式的冠词“a”，“an”和“the”包括复数的含义。除非另外定义，在本文中使用的所有的技术和科技术语为本发明所属领域普通技术人员理解的一般含义。

当提供数值范围时，应理解的是除非在文本中清楚的指明，在其范围的上限和下限之间，每个中间值都是下限单位的十分之一，以及在指定范围内任何其它指定或中间值都包括在本发明中。上述较小范围的上限和下限可以独立地被包括在较小范围内，而且还被包括在本发明中，并服从于在指定范围内任何具体的排除限定。当指定的范围包括一或两个端值时，被排除一个或两个端值

的范围仍包含在本发明中。

除非另外定义，在本文中使用的所有的技术和科技术语具有本发明所属领域普通技术人员理解的一般含义。尽管在本发明实践和试验中可以使用与本文中描述相似或相同的任何方法、设备和材料，但在此说明的是优选的方法、设备和材料。

在本文参见提及的所有出版物都是以说明本发明为目的的，且在出版物中说明和公开的成分可在说明本发明时结合使用。

综上，本发明提供了稳定的四唑鎓染料组合物及其使用方法，以及试剂测试条、系统和试剂盒。在对本发明的进一步说明中，下述更详细地讨论了上述每一个具有创造性的特征。

试剂组合物

综上，本发明提供了稳定的四唑鎓染料试剂组合物，已发现上述组合物可用于检测样品中的多种分析物。本发明的四唑鎓染料试剂组合物特征在于至少包括一种四唑鎓染料试剂和一种有效量亚硝酸盐稳定试剂。

四唑鎓染料试剂是一种四唑鎓化合物(染料前体)，其在接受转移的氢化物后形成着色的甲臌产物。在许多实施方案中，四唑鎓染料试剂是水溶性四唑鎓盐，它能够接受氢化物生成水溶性、有色的甲臌产物。令人关注的水溶性四唑鎓盐在 EP 0 908 453 中已经说明，其中公开的内容由于提及而成为本文的一部分。一类令人关注的水溶性四唑鎓盐包括 EP 0 908 453，第2页，35—48行式2所述的盐。其它类令人关注的水溶性四唑鎓盐包括 EP 0 908 453，第3页，10—25行式1所述的盐。

特别令人关注的具体的水溶性四唑鎓化合物或盐非限定性地包括：2-(2'苯并噻唑基)-5-苯乙烯基-3-(4'-邻苯二甲酰肼基)四唑鎓(BSPT)，2-苯并噻唑基-(2)-3,5-二苯基四唑鎓(BTDP)，2,3-二(4-硝基苯基)四唑鎓(DNP)，2,5-二苯基-3-(4-苯乙烯基苯基)四唑鎓(DPSP)，二苯乙烯基硝基蓝四唑鎓(DS-NBT)，3,3'-[3,3'-二甲氧基-(1,1'-联苯)-4,4'-二基]-二[2-(4-硝基苯基)-5-苯基]-2H 四唑鎓(NBT)，3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H 四唑鎓(MTT)，2-苯基-3-(4-羧苯基)-5-甲基四唑鎓(PCPM)，四唑鎓蓝(TB)，硫代氨基甲酰基硝基蓝四唑鎓(TCNBT)，四硝基蓝四唑鎓(TNBT)，四唑鎓紫(TV)，2-苯并噻唑基-3-(4-羧基-2-甲氧基苯基)-5-[4-(2-磺乙基氨基甲酰基)苯基]-2H-四唑鎓(WST-4)，和2,2'-二苯并噻唑基-5,5'-二[4-

二(2-磺乙基)氨基甲酰基苯基]-3,3'-(3,3'-二甲氧基-4,4'-亚联苯基)二四唑鎓二钠盐(WST-5)。在一些实施方案中,染料化合物选自下组: 2,2'-二苯并噻唑基-5,5'-二[4-二(2-磺乙基)氨基甲酰基苯基]-3,3'-(3,3'-二甲氧基-4,4'-亚联苯基)二四唑鎓二钠盐(WST-5); 2-苯并噻唑-3-(4-羧基-2-甲氧基苯基)-5-[4-(2-磺乙基氨基甲酰基)苯基]-2H-四唑鎓(WST-4)等。在许多实施方案中 WST-5 是优选的,因为其容易溶于水介质,它与所有的生物样本都是相容的。而且,所得的甲腈化合物在紫-蓝区域存在强的光谱吸收,这使校正血红层白背景信号的要求降低。同时四唑鎓染料试剂的用量可根据试剂组合物的性质变化,例如,无论是干试剂还是湿试剂,在许多实施方案中染料试剂的浓度范围为大约 1.5mM—大约 50mM,通常为大约 3mM—大约 40mM 且优选为大约 3.5mM—大约 28mM。

除了上述四唑鎓染料化合物,本试剂组合物还包括有效量的亚硝酸盐稳定剂。有效量意为稳定四唑鎓化合物足够的量使其不会受到暴露在光线下的有害的威胁或影响,例如:改变。换言之,使用的亚硝酸盐稳定剂的量为提供足够稳定的四唑鎓化合物,该化合物无论暴露在特征的光照或黑暗下都会提供基本上相同的信号特征。如下述实施例 1 中所述,我们认为存在于液体试剂组合物中的四唑鎓染料化合物对于本发明的目的来讲是相对稳定的,即如果其产生的任何信号的性质暴露在光下比不暴露在光下观察的信号的性质不超过大约 2 倍,通常大约 2.5 倍,则可决定用其作为评价的方案。如下述实施例 2 中所述,我们认为存在于干燥试剂组合物中的四唑鎓染料化合物对于本发明的目的来讲是相对稳定的,即如果其产生的任何信号的性质暴露在光下比不暴露在光下观察的信号性质不超过大约 2 倍,通常大约 2.3 倍,则可决定用其作为评价的方案。在组合物中亚硝酸盐稳定成分与四唑鎓染料的比例的一般范围为大约 2—大约 500,通常大约 7—大约 200。如上所述,在许多实施方案中,在组合物中亚硝酸盐稳定试剂的浓度为大约 0.1M—大约 0.8M,通常为大约 0.2M—0.6M。同时可使用任何适合的亚硝酸盐稳定试剂,特别例如:亚硝酸钠、亚硝酸钾和它的衍生物,在本发明的许多实施方案中,亚硝酸钠是最优选的。存在亚硝酸盐稳定剂可以使四唑鎓染料染料暴露在光照下至少 3 小时,有时至少 5 小时且一些情况下至少 10, 15, 20, 24,, 48, 72 小时或更多。

如上所述,本试剂组合物典型地还包括分析物氧化信号生成系统的附加成分。信号生成系统是将其混合时它们能够产生一致作用的二种或多种化合物或

分子的集合，它能产生检测信号表示出给定样品中存在一定量的特定的分析物。术语信号生成系统被广泛地应用，其既包括信号生成系统的各种试剂成分的混合物，也包括这样的系统，在该系统中一种或多种试剂成与其余的试剂成分独立存在，例如试剂盒中的存在方式。

- 5 如上述，本组合物的信号生成系统是一种分析物氧化信号生成系统。分析物氧化剂通常是一种酶，它能够从人们感兴趣的分析物上移走氢化物生成分析物的氧化形式。感兴趣的氧化分析物的酶包括分析物氧化酶和分析物脱氢酶。令人关注的分析物氧化酶非限定性地包括：葡萄糖氧化酶(其中分析物是葡萄糖)、胆固醇氧化酶(其中分析物是胆固醇)、醇氧化酶(其中分析物是醇)、胆
- 10 红素氧化酶(其中分析物是胆红素)、胆碱氧化酶(其中分析物是胆碱)、甲醛氧化酶(其中分析物是甲醛)、谷氨酸盐氧化酶(其中分析物是谷氨酸盐)、甘油氧化酶(其中分析物是甘油)、半乳糖氧化酶(其中分析物是半乳糖糖)、L-抗坏血酸氧化酶(其中分析物是 L-抗坏血酸)、乳糖氧化酶(其中分析物是乳糖)、亮氨酸氧化酶(其中分析物是亮氨酸)、苹果酸氧化酶(其中分析物是苹果酸)、
- 15 丙酮酸氧化酶(其中分析物是丙酮酸)、尿酸氧化酶(其中分析物是尿酸); 等。

所关注的检测物脱氢酶非限定性地包括：检测醇的醇脱氢酶、检测甲醛的甲醛脱氢酶、检测葡萄糖的葡萄糖脱氢酶、检测葡萄糖-6-磷酸盐的葡萄糖-6-磷酸盐脱氢酶、检测谷氨酸的谷氨酸盐脱氢酶、检测甘油的甘油脱氢酶、检测 β -羟基丁酸的 β -羟基丁酸盐脱氢酶、检测类固醇的羟基类固醇脱氢

20 酶、检测 L-乳酸盐的乳酸盐脱氢酶、检测亮氨酸的亮氨酸脱氢酶、检测苹果酸的苹果酸盐脱氢酶和检测丙酮酸的丙酮酸盐脱氢酶。

在许多实施方案中，本信号生成系统还包括酶辅助因子，酶辅助因子能够以一定的方式与氧化剂反应，即所关注的分析物被氧化剂氧化，氧化剂同时还还原酶辅助因子。所关注的辅助因子非限定性地包括：例如 β -烟酰胺腺嘌呤二

25 核苷酸(β -NAD); β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(β -NADP); 硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; 硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸; 烟酰胺 1, N6-亚乙烯基腺嘌呤二核苷酸; 烟酰胺 1, N6-亚乙烯基腺嘌呤二核苷酸磷酸; 和吡咯-喹啉醌(PQQ); 和黄素化合物，如 FAD 和 FMN。在本信号生成系统中包括的应特别令人关注的酶辅助因子包括：NADH 或 NAD(P)H 和 PQQH₂。

30 除了分析物氧化剂，本信号生成系统典型地包括电子传递剂。电子传递剂

意为可以以氢化物离子的形式，从还原酶辅助因子到水溶性四唑鎓产物转移电子的一种化合物或分子。有价值的电子传递剂包括低和高分子量的电子传递剂。在本说明书中，低分子量意为分子量不超过大约 2000 道尔顿，通常大约 1000 道尔顿且在许多情况下大约 500 道尔顿。高分子量意为分子量至少大约 5000 道尔顿，且在许多实施方案中 10,000 或 20,000 道尔顿或更高。高分子量电子传递剂的分子量一般不超过大约 100,000 道尔顿。在许多实施方案中，低分子量电子传递剂是非蛋白质化合物，同时高分子量的电子传递剂是蛋白质化合物。蛋白质意为多肽或其聚合模拟物。

多种低分子量非蛋白质电子传递剂是有价值的。上述转移剂包括：黄素如核黄素(RBF)、咯嗪(ALL)和二甲基异咯嗪；吩嗪如吩嗪、吩嗪甲硫酸盐(PMS)、吩嗪乙硫酸盐、甲氧基吩嗪甲硫酸盐和藏红；甲基-1,4-萘酚(甲萘酯)。吩噻嗪如 PT 及其阳离子基团 PT^+ ，硫堇(TH)、天青 A(AA)、天青 B(AB)、天青 C(AC)、亚甲基蓝(MB)、亚甲基绿(MG)和甲苯胺蓝 O(TOL)；吩嗪如吩嗪(POA)、碱性蓝 3 (BBS)、和亮甲酚蓝 ALD (BCBA)、苯并- α -吩噻嗪鎓氯化物 (phenazoxonium) (Medola's blue); 靛酚如 2,6-二氯苯酚靛酚(DCIP)；和吲达胺如 Bindschedler's green 和吲达胺；等。在许多实施方案中特别有价值的吩嗪化合物，例如：PMS，吩嗪乙硫酸盐、甲氧基吩嗪甲硫酸盐和藏红，在许多实施方案中 PMS 是低分子量，非蛋白质电子传递剂。

在许多实施方案中，高分子量蛋白质电子传递剂是能够氧化还原的辅助因子的酶，例如 NAD(P)H，和伴随还原四唑鎓盐的信号生成系统。在许多实施方案中，这种电子传递酶是心肌黄酶，如硫辛酸脱氢酶、铁氧化还原蛋白-NADP 还原酶，硫辛酰胺脱氢酶、NADPH 脱氢酶等。可以获得多种心肌黄酶并应用，其中在本信号生成系统中存在的代表性的市售心肌黄酶包括杆菌心肌黄酶、梭状芽孢杆菌心肌黄酶、弧菌心肌黄酶、猪心肌黄酶等。

如上所述，本组合物可以湿或干组合物形式存在。湿组合物意为流体组合物，典型地是含水组合物。发现上述组合物可用在多种生测结构中，如试管结构，这在现有技术中是已知的。干组合物意为组合物不是流体，即干燥形式，如基本上不含有未化合的水的组合物。上述组合物典型地存在于测试条试剂中，本文在下述会进一步说明。

试剂测试条

在本发明许多实施方案中特别令人关注的测试条试剂包括上述干试剂组合物，其可以用来测量在样品中分析物是否存在和浓度。具体的，本发明提供了测定全血中特定分析物的干测试条，例如： β -羟基丁酸盐，葡萄糖等。广义上，测试条试剂包括固体支持物和存在于其上的干试剂组合物，其中干试剂组合物是由对存在的令人关注的分析物生成检测信号所需的所有的试剂化合物制备的。在本发明所有的实施方案中，出现在本测试条上的干试剂组合物包括下述组分：一种分析物氧化酶、一种酶辅助因子、一种电子传递试剂、一种水溶性四唑鎓盐、和亚硝酸盐稳定剂，其中上述的各种成分已经在上面作较详细的说明。

在许多实施方案中，本测试条包括一层试验垫膜，它固定在固体支持物上。支持物可以是塑料——例如：聚苯乙烯、尼龙或聚酯——或金属片或现有技术中任何其它适合的材料。试剂组合物与测试条的结合例如是通过涂覆在测试条上、结合到测试条上等。测试条还可以以较复杂的排列构型，例如，其中试验垫放置在支持物和表面层之间，在样品处理中使用的一种或多种试剂可以出现在表面层上。另外，如现有技术中已知的，在测试条上还可以有液流路径和通路。在许多有价值的实施方案中的测试条的构型公开于 US 5,902,731，上述公开物由于提及而引入本文。

在本测试条中，干试剂组合物与载体材料或基材以例如存在于其上或其中的方式结合。基材可以是吸湿的或不吸湿的。吸湿意为一种材料其对一种或多种出现的成分存在优先的保持力，例如：在材料中能够吸收或“吸取”一种或多种成分，就象在色谱分离中出现的情况。吸湿材料的实施例非限定性地包括：尼龙、未处理的纸、硝基纤维素等，它们能够对液体中包含的并通过该材料的成分进行色谱分离。

可选择的，基材也可以是不吸湿的。不吸湿的基材包括惰性的多孔材料，它对本文中所述信号生成系统的多种成分提供支持，并可以带有正电荷。上述基材通常构型以提供施用生理样品，例如血液的固定场所，并检测通过信号生成系统的染料产生的发色产物。这样，典型地，基材能让液流从中流过并提供足够的空旷空间使信号生成系统发生化学反应。已经开发了几种不同的多孔基材用于多种分析物测量的生物测定，这些基材在材料、孔径、尺寸等方面是不同的，其中代表性的基材包括在 US 55,932,431; 5,874,099; 5,871,767; 5,869,077;

5,866,322; 5,834,001; 5,800,829; 5,800,828; 5,798,113; 5,670,381; 5,663,054; 5,459,080; 5,459,078; 5,441,849 和 5,212,061 中说明的基材; 本文中结合其中公开的内容。测试条的尺寸和孔率可以变化很大, 其中基材可带有或没有孔率梯度, 例如, 在样品施用区域或附近是较大的孔且在检测区域是较小的孔。在许多实施方案中, 基材的构型成试验垫膜并固定在固体支持物上, 其中支持物可以是塑料(例如: 聚苯乙烯、尼龙或聚酯)或金属片或现有技术中已知的任何其它材料。在许多实施方案中有价值的测试条构型公开于 US 5,972,294; 5,968,836; 5,968,760; 5,902,731; 5,846,486; 5,843,692; 5,843,691; 5,789,255; 5,780,304; 5,753,452; 5,753,429; 5,736,103; 5,719,034; 5,714,123; 383,550; 381,591; 5,620,863; 5,605,837; 5,563,042; 5,526,120; 5,515,170; 367,109; 5,453,360; 5,426,032; 5,418,142; 5,306,623; 5,304,468; 5,179,005; 5,059,394; 5,049,487; 4,935,346; 4,900,666 和 4,734,360 中, 本文中结合其中公开的内容。

代表性测试条构型的适合的实施例在 US 6,200,733 和 5,902,731 中提供, 本文中结合其中公开的内容。

15 本测试条可以使用任何适合的方案制造。一个适合的方案是至少测试条的试验垫部分与水性组合物接触, 水性组合物包括所有试剂组合物的成分并在最后试剂测试条与试验垫相联接。适合的, 试验垫可以浸渍在水性组合物中, 在其中保持足够的一段时间然后干燥, 由此, 生成与试剂组合物相联系的试剂测试条的试验垫。如上所述, 水性组合物将包括与试剂测试条的试验垫相联系的多种试剂组合物, 其中以足够量存在的多种组分提供了制备试验垫试剂组合物中所需量的成分。如上, 其中电子传递剂是非蛋白质, 在液体组合物存在的电子传递剂的浓度典型地在大约 10—50,000, 通常大约 50—10,000 且优选大约 100—5,000 μM 范围内。在其它的实施方案中, 其中电子传递剂是蛋白质, 在水性组合物存在的电子传递剂的浓度典型地在大约 10—10,000, 通常大约 50—5,000 且优选大约 100—3,000U/ml 范围内。四唑鎓染料的浓度, 例如在液体组合物存在的四唑鎓盐的浓度范围是大约 3mM 至 36mM, 通常是大约 6mM 至 24mM。当存在酶辅助因子其浓度范围大约 1.5mM 至 28mM, 通常是大约 3.5mM 至 14mM。类似的, 存在的分析物氧化酶试剂的浓度范围大约 100U 至 5000U, 通常大约 200U 至 3000U。亚硝酸盐稳定剂的量, 例如亚硝酸盐如亚硝酸钠, 典型的范围是大约 0.1M 至大约 0.8M, 通常是大约 0.2M 至大约 0.6M。参见实

施例部分, 其中更详细地说明了制备本试剂测试条的代表性的方法。

分析物测量的方法

发现上述信号生成系统、试剂组合物和测试条可用于检测方法中, 检测样品中的分析物存在的量, 即浓度。应用本方法可以检测多种不同的分析物, 其中代表性的分析物包括上述说明的, 例如醇、甲醛、葡萄糖、谷氨酸、甘油、 β -羟基丁酸盐、L-乳酸、亮氨酸、苹果酸、丙酮酸、类固醇等。原则上, 本方法可用于测定多种不同的生理样品中分析物的存在, 以及浓度, 生理样品如尿、眼泪、口水等, 本方法特别适用于测定在血液或血液级分, 例如血液衍生的样品, 且更具体地在全血、组织液(ISF)中分析物的浓度。

10 在本方法中, 将样品和信号生成系统与反应混合物结合, 使反应进行足够长的时间产生在样品中存在(且有时定量)分析物的信号指示, 并测定所得的信号以及在样品中(且有时定量)存在的分析物。上述步骤可以在适合容积的容器, 例如试管中进行, 其中试剂组合物是流体组合物。在许多实施方案中, 上述步骤在本文上述的试剂测试条上进行。

15 在一些实施方案中, 本方法的特征是检测信号由测试条基材表面形成的不会被冲洗的点组成。不会被冲洗的点由水溶性甲臍产物组成, 其紧密地结合在基材表面, 基材表面使其在常规冲洗条件下不会很容易地从其表面除去。常规的冲洗条件意为在分析物生测的基材表面上所经历的未束缚的成分从表面除去的条件。常规冲洗条件的实例为本领域技术人员使用的核苷酸杂化基本排列生测的条件。上述条件是本领域技术人员已知的, 如上所述, 本方法的特征是在带正电荷基材的表面生成不会被冲洗的点, 其中不会被冲洗的点是由水溶性的甲臍产物组成。

25 在本方法的许多实施方案的实践中, 第一步是在测试条上施用一定量的生理样品, 其中测试条如本文中上述。施用到测试条上的生理样品例如血液的量通常在大约 $2\ \mu\text{L}$ — $40\ \mu\text{L}$, 优选在大约 $5\ \mu\text{L}$ — $20\ \mu\text{L}$ 的范围内变化。由于本测试条的性质, 施用到测试条上的血液样品的体积相对很小, 体积范围是例如大约 $2\ \mu\text{L}$ — $40\ \mu\text{L}$, 通常在大约 $5\ \mu\text{L}$ — $20\ \mu\text{L}$ 。当生理样品是血液时, 用本方法可以测定血液样品的多种不同的血细胞比容, 其中血细胞比容在大约 20%—65%, 通常在大约 25%—60% 的范围内。

30 将样品施用到测试条后, 使样品与信号生成系统的成分反应产生可测定的

产品，例如不会被冲洗的点，可测定产品的存在量与样品中存在的令人感兴趣的分析物的最初量成比例。然后测定可检测产物，即，以不会被冲洗的点的形式出现的信号产生系统产生的信号，并与起始样品中的被分析物的量相联系。在一些实施方案中，使用自动的设备进行上述测定和相关步骤。对上述反应、
5 检测和相关步骤、以及进行上述步骤的设备在下述专利中进一步进行了说明：US 4,734,360；4,900,666；4,935,346；5,059,394；5,304,468；5,306,623；5,418,142；5,426,032；5,515,170；5,526,120；5,563,042；5,620,863；5,753,429；5,573,452；5,780,304；5,789,255；5,843,691；5,846,486；5,902,731；5,968,836 和 5,972,294，本文中结合其中公开的内容在相关。步骤中，通过例如校准仪器，而将竞争性反
10 应对于观测到的信号的恒定性的影响（constant contribution）纳入考虑，确定推导出的分析物浓度。

试剂盒

本发明还提供了在实践中使用本方法的试剂盒。本发明的试剂盒至少包括一种如上所述的信号生成系统，其中信号生成系统的成分可以与单一的试剂组
15 合物结合，或分别存在例如于分离的容器中。在一些实施方案中，信号生成系统将以试剂测试条的形式存在于试剂盒中。本试剂盒还进一步包括获得生理样品的方法。例如，其中生理样品是血液时，本试剂盒还包括获得血液样品的方法，如用针刺手指的柳叶刀，柳叶刀针刺装置等。另外，本试剂盒还包括对照溶液或标准，例如：含有标准浓度分析物的分析物对照溶液。在一些实施方案
20 中，试剂盒还包括如上所述的自动设备，来检测样品施用后在测试条上生成的产品的量将与被检测产品与在样品中分析物的量相联系。

除了上述成分，本试剂盒典型地还包括应用本设备实践本方法的试剂盒中使用的成分的说明书。实践本方法的说明书通常被记录在适当的记录介质上。例如，说明书被打印在如纸或塑料等的基材上。同样的，这些说明书将被插入
25 包装品而存在于试剂盒中，在试剂盒或其成分(例如：与包装或小包装相关联)的容器的标签中等。在其它实施方案中，说明书存在于适合的计算机可读储藏介质例如 CD-ROM、磁盘等电子储藏数据文件中。在其它的实施方案中，实际的说明书没有存在于试剂盒中，但可以通过远程的手段例如通过互联网获得提供的说明书。这种实施方案的实例是一种试剂盒，它包括一个网址从中可以
30 浏览说明书和/或从中可以下载说明书。对于说明书，获得说明书的方法被记录

在适当的基材上。

本发明以例示和非限定的方式提供了下述实施例。

试验

实施例 1, 含水形式

5 0.1M MES, pH6.5, WST-5 6.75mM, NaNO₂(0 或 0.3M)

将上述溶液单独放置在光照或黑暗下 24 小时。通过紫外可见光谱测定 10 倍稀释的溶液。所得结果示于图 1&2。图 1 表示了将溶液分别放置在黑暗和光照下不含 NaNO₂ 的溶液的结果。图 2 表示了将溶液分别放置在黑暗和光照下含 NaNO₂ 的溶液的结果。

10 实施例 2, 干燥形式

表 1. 干燥形式的成分表

成分	含量
水	100ml
(N-[2-羟基乙基]哌嗪-N'-N[4-丁磺酸,钠盐]) (HEPES, FM 260.3 Sigma St.Louis, MO, USA)	1.3gm
硼十水合物(FW 381.4, Sigma St.Louis, MO, USA)	3.0gm
Gantrez* 6%	20ml
Pluronic L-64 (BASF 公司, Moun Olive, New Jersey, USA)	1.5gm
Robose(MW182, Sigma St.Louis, MO, USA)	5gm
亚硝酸钠(MW69, Aldirch Chemicals, Milwaukee,WI. USA)	0 或 2gm
WTS-5(MW 1331.37, Dojindo)	0.9gm
加入 NaOH 调节 pH 至 6.0	
葡萄糖氧化酶(GO.TOYOBO)	100KU

* Gantrez AN-139(聚甲基乙基醚—alt—马来酸酐, MW 1,080,000, Cat #41632—0, Aldirch Chemicals, Milwaukee,WI. USA)制备 6%Gantrez 水溶液, 在 95℃ 加热不超过 45 分钟, 得到 6%Gantrez 的现用溶液。

15 将从 Pall Corporation(East Hills,NY)获得的 0.8μm 的尼龙膜浸入表 1 的试剂中, 直到饱和。用玻璃棒小心地刮掉过量试剂。将所得膜在 56℃、的烤箱中悬挂干燥 10 分钟。

将涂覆或没有涂覆亚硝酸钠的膜单独放置在光照或黑暗下 7 小时。通过

Macbath 测定膜的反射比。所得结果示于图 3&4。图 3 表示将膜分别放置在黑暗和光照下不含 NaNO_2 的膜的结果。图 4 表示将膜分别放置在黑暗和光照下含 NaNO_2 的膜的结果。

上述结果和讨论证明本发明提供了改进的四唑鎓染料组合物，因为组合物
5 本发明提供了便利的方式稳定其中的染料成分，使得其暴露在光照下对染料不会产生有害作用。同样的，本发明对现有技术具有明显的贡献。

正如本文中每个单独的出版物或专利都在本文中被具体地和单独地指明由于提及而结合，在本说明书中引证的所有的出版物和专利都由于提及而结合在本文中。引证的所有出版物都在申请日之前公开，不得解释为认可本发明由于
10 先有发明的存在而没有资格先于这些公开物。

由于为了清楚地理解本发明，本文中通过例示和实施例的方式详细地说明了本发明，因此对本领域普通技术人员来讲，受本发明启示所作的一些改变和改进是很显而易见的，但这些改变并不偏离本申请随附权利要求的精神和范围的。

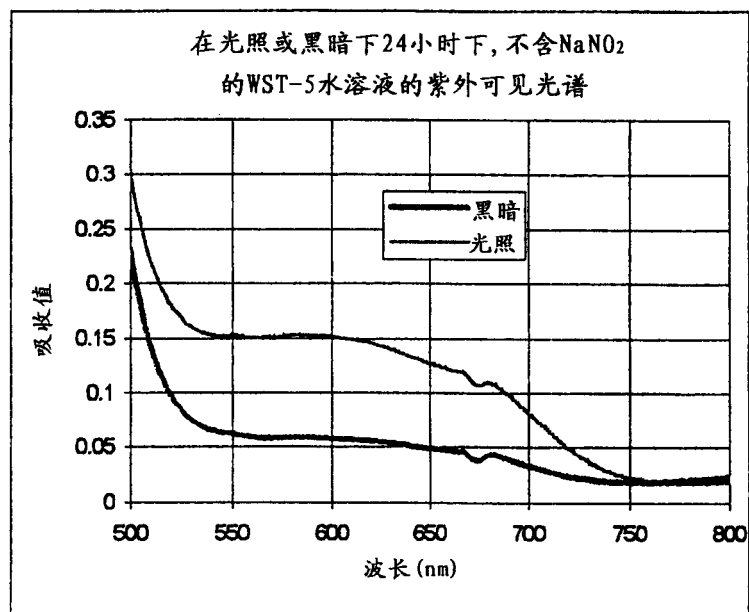


图 1

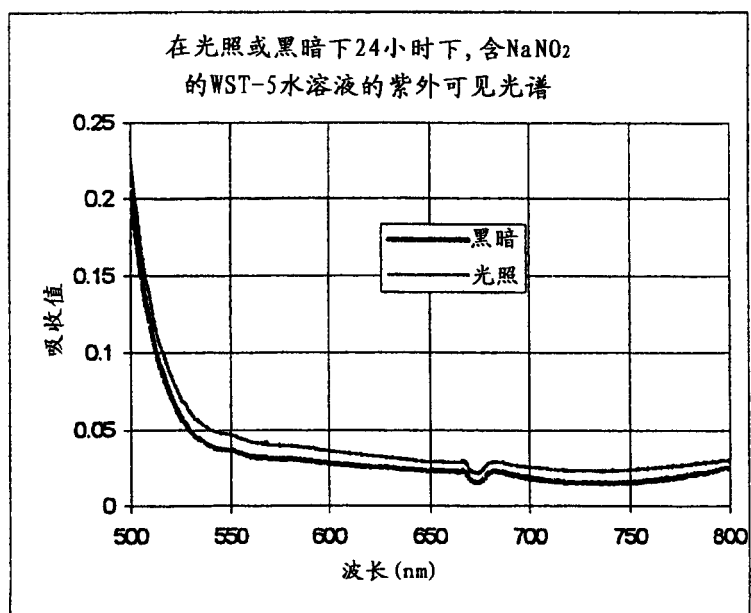


图 2

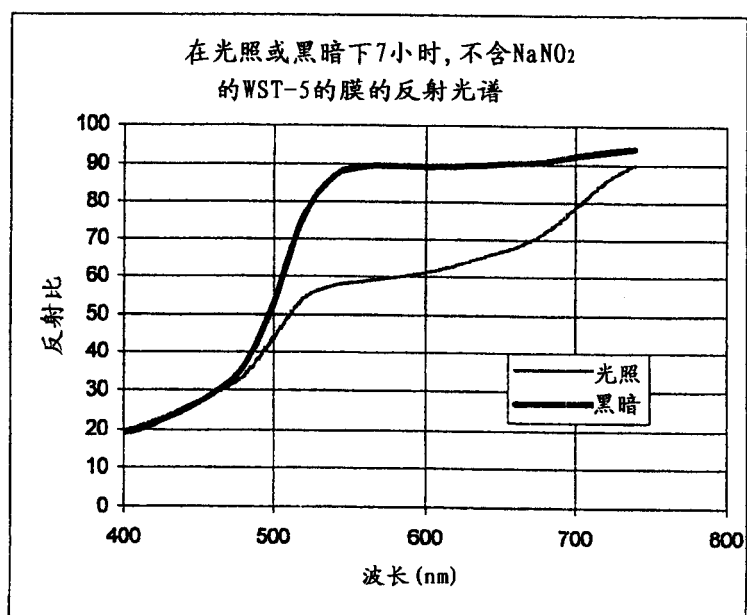


图 3

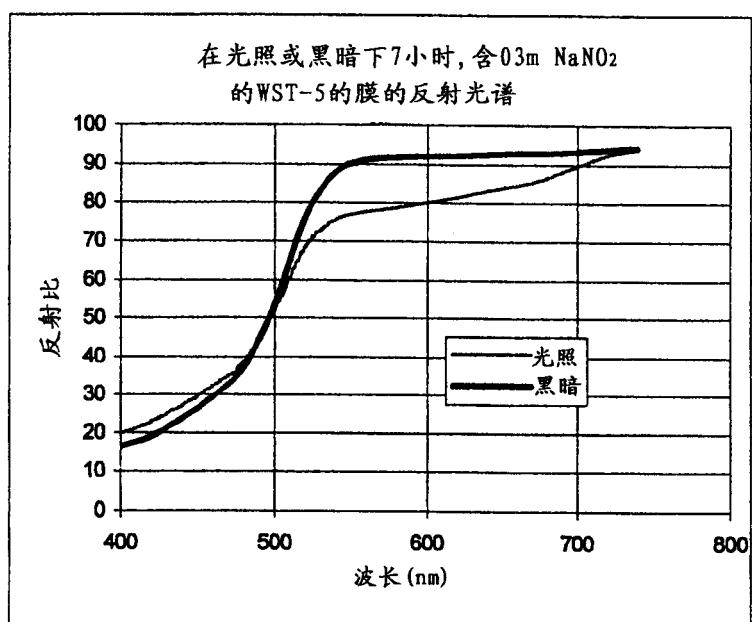


图 4

专利名称(译)	稳定的四唑鎓试剂组合物及其使用方法		
公开(公告)号	CN1427082A	公开(公告)日	2003-07-02
申请号	CN02139981.6	申请日	2002-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	生命扫描有限公司		
申请(专利权)人(译)	生命扫描有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生命扫描有限公司		
[标]发明人	T欧阳 P黄		
发明人	T· 欧阳 P· 黄		
IPC分类号	G01N33/50 C12Q1/26 G01N21/78 G01N31/22 G01N33/52 C12Q1/32 G01N33/531		
CPC分类号	C12Q1/26 G01N33/52		
优先权	10/988812 2001-11-20 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

用于测定在提供的样品中的分析物的稳定的四唑鎓染料试剂组合物和方法。本试剂组合物包括一种四唑鎓染料成分，例如水溶性的四唑鎓盐，和有效量的亚硝酸盐稳定剂，例如亚硝酸盐。在许多实施方案中，本试剂组合物包括附加的分析物氧化信号生成系统组分，如：分析物氧化酶，例如分析物脱氢酶或分析物氧化酶；电子传递试剂；和酶辅助因子。还提供了包括本试剂组合物的测试条，以及与本测试条结合的系统 and 试剂盒。发现本试剂组合物、测试条、系统和试剂盒可用来测量样品中的多种分析物，上述样品如生理样品，例如，血液或其级分，或组织液(组织液)。

