

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480011159.8

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 5 月 31 日

[11] 公开号 CN 1781022A

[22] 申请日 2004.4.21

[21] 申请号 200480011159.8

[30] 优先权

[32] 2003.4.25 [33] KR [31] 10-2003-0026227

[86] 国际申请 PCT/KR2004/000914 2004.4.21

[87] 国际公布 WO2004/097419 英 2004.11.11

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.25

[71] 申请人 拜奥迪吉特实验室技术公司

地址 韩国首尔

[72] 发明人 白世焕 赵贞焕 金奭厦

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

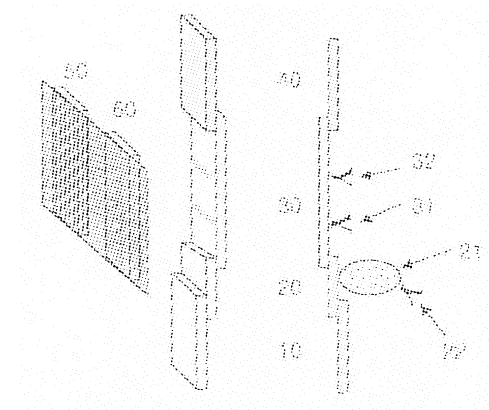
权利要求书 4 页 说明书 25 页 附图 12 页

[54] 发明名称

用于进行现场测试的膜条生物传感器系统

[57] 摘要

本发明涉及一种用于现场测试(POCT)的生物传感器,通过将一种用于免疫反应和酶反应的连续交叉流动步骤引入到膜条色谱检测系统中显著地提高了检测灵敏度。本发明涉及一种膜条生物传感器系统,它包括:(a)用于加样的膜垫片(10), (b)用于释放检测结合成分的膜垫片(20),其中膜垫片(20)含有干燥状态的用于检测的与标记物相连接的结合成分, (c)具有用于捕获的固定的结合成分的信号生成膜垫片(30), (d)用于吸收纵向流动介质的膜垫片(40), (e)用于给酶供应底物溶液的膜垫片(50), (f)用于吸收横向流动介质的膜垫片(60)以及(g)底物溶液。



1. 一种膜条生物传感器系统，其包括
 - (a) 用于加样的膜垫片 (10)，
 - (b) 用于释放检测结合成分的膜垫片 (20)，其中所述膜垫片 (20) 含有干燥状态的用于检测的与标记物相连接的结合成分，
 - (c) 具有用于捕获的固定的结合成分的信号生成膜垫片 (30)，
 - (d) 用于吸收纵向流动介质的膜垫片 (40)，
 - (e) 用于给酶供应底物溶液的膜垫片 (50)，
 - (f) 用于吸收横向流动介质的膜垫片 (60) 以及
 - (g) 底物溶液，其中所述系统具有两组交叉排列的膜垫片，
 - (I) 一组纵向排列的垫片，其中垫片 (10) 在长度方向上被部分地叠加于垫片 (20) 的末端并固定，且垫片 (20) 和垫片 (40) 在长度方向上分别被部分叠加于信号生成膜垫片 (30) 的两个末端并固定；和
 - (II) 另一组横向排列的垫片，其中垫片 (50) 和垫片 (60) 在信号生成时分别被部分叠加于信号生成膜垫片 (30) 的两个侧边并固定。
2. 权利要求 1 的膜条生物传感器系统，其中横向排列的垫片 (50) 和 (60)
 - (i) 固定在属于纵向排列的垫片的信号生成膜垫片 (30) 的两个侧边；或是
 - (ii) 最初保持分离状态，然后在完成纵向流动反应之后固定到信号生成垫片上。
3. 权利要求 1 的膜条生物传感器系统，其中与横向排列的垫片分开制备纵向排列的垫片，并通过将任何一个板移到另一个板上而将固定在

分开的板上的两组垫片以交叉的位置相结合成十字形。

4. 权利要求 1 的膜条生物传感器系统，其中为进行电化学测定，将一电极直接安放在信号生成膜 (30) 上或是分开制造并在进行信号检测时与垫片结合。

5. 权利要求 1 的膜条生物传感器系统，其中或是在用于促进酶反应时的底物溶液供应的膜垫片 (50) 上方的预定位置上所放置的容器中制备底物溶液或是在与分析系统分开的容器中制备底物溶液。

6. 权利要求 1 的膜条生物传感器系统，其中用于加样的膜垫片 (10)、用于释放检测结合成分的膜垫片 (20)、和用于供应底物溶液的膜垫片 (50) 是玻璃纤维膜，信号生成膜垫片 (30) 是硝化纤维素膜，而用于吸附的膜垫片 (40) 和 (60) 是纤维素膜。

7. 权利要求 1 的膜条生物传感器系统，其中用于检测的与标记物相连接的结合成分包括

- i) 示踪剂与用于检测的结合成分的缀合物，或
- ii) 用于检测的结合成分和示踪剂与第二结合成分的缀合物，所述第二结合成分特异于用于检测的结合成分。

8. 权利要求 7 的膜条生物传感器系统，其中用于检测的结合成分是与分析物特异性反应的抗体、酶、受体或 DNA。

9. 权利要求 7 的膜条生物传感器系统，其中示踪剂是辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、或 *Arthromyces ramosus* 过氧化物酶，且底物溶液包括特异于酶的显色底物成分，以及在信号生成时，将酶-底

物反应的信号显示为肉眼可检测到的颜色变化。

10. 权利要求 7 的膜条生物传感器系统，其中示踪剂是胶体金，且底物溶液包括银化合物，以及在信号生成时，将化学催化反应的信号显示为肉眼可检测到的颜色变化。

11. 权利要求 7 的膜条生物传感器系统，其中示踪剂是辣根过氧化物酶或 *Arthromyces ramosus* 过氧化物酶，且底物溶液包括鲁米诺或其它特异于酶的发光底物成分，以及在信号生成时，测定光信号作为酶-底物反应的信号。

12. 权利要求 7 的膜条生物传感器系统，其中示踪剂是 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、或其化合物，且底物溶液包括鲁米诺或其它发光底物成分，以及在信号生成时，测定光信号作为化学催化反应的信号。

13. 权利要求 7 的膜条生物传感器系统，其中示踪剂是葡萄糖氧化酶、尿素酶、青霉素氧化酶、或胆固醇氧化酶，且底物溶液包括特异于酶的电化学信号生成成分，以及在信号生成时，测定传导性变化、电流变化或电压变化作为酶-底物反应的信号。

14. 权利要求 1 的膜条生物传感器系统，其中用于捕获的结合成分是与分析物特异性反应或与结合成分和分析物之间所形成的复合物中的另一部分特异性反应的抗体、酶、受体或 DNA。

15. 权利要求 1 的膜条生物传感器系统，其中系统按照如下排列而构建：纵向排列的垫片 (10)、(20)、(30) 和 (40) 被固定在系统的容器的底部 (72) 内侧，所述系统的容器具有信号检测窗 (78) 和底物溶液容器穿

透针头 (75)，横向排列的垫片 (50) 和 (60) 被固定于横向排列的垫片固定支架 (74) 上，所述支架 (74) 位于具有加样孔的容器的顶部 (71) 内侧，其中支架 (74) 与位于顶部 (71) 外侧的流动转换按钮 (73) 相连接，且含有底物溶液的底物溶液容器 (76) 被置于膜垫片 (50) 上以供应底物溶液。

16. 权利要求 15 的膜条生物传感器系统，其中当在完成纵向流动反应之后通过自动地或手动地操纵流动转换按钮 (73) 将横向排列的垫片以交叉的位置固定于纵向排列的垫片上时，立即用安置于容器的底部 (72) 的底物溶液容器穿透针头 (75) 穿透底物溶液容器 (76)，由此自动进行横向流动反应。

用于进行现场测试的膜条生物传感器系统

技术领域

本发明涉及一种用于进行现场测试 (Point-of-care Testing, POCT) 的生物传感器, 通过将一种用于信号生成的免疫反应和其它反应的连续交叉流动步骤 (successive cross-flow procedure) 引入到膜条色谱法检测系统中可显著地提高所述生物传感器的分析性能。

技术背景

对体液中低浓度的疾病标记物 (代谢物、蛋白、细胞等) 的测定通常是通过采用生物学反应例如酶反应和抗原-抗体结合而实现的。因为酶和抗体具有非常高的选择性识别它们的反应配体的反应特异性以及具有高的反应效率, 所以测定复杂介质中的分析物成为可能。寻求发展基于这些反应特性的诊断系统以便对疾病进行早期诊断和在疾病早期对疾病进行充分治疗是非常重要的。但是, 因为绝大多数的诊断系统都需要操纵试剂和设备, 所以它们的应用被限定于实验室, 并且需要具有更多的专业知识才能进行测定。

最近, 作为一种免疫检测法, 对在家里的自我诊断以及在现场例如医生办公室或急诊室测定可以代表疾病的症状和进展的标记物例如激素、蛋白和微生物的需求正在快速地增长 (参考文献: C. P. Price 等, Principles and Practice of Immunoassay, 1997, page 579-603, Macmillan Reference Ltd., London)。为此, 发展不需要任何专业知识和复杂步骤, 并且使用简单以及提供快速应答的免疫检测系统是必需的。可以通过采用用于固定结合蛋白 (例如抗原或抗体) 的微孔膜的免疫色谱法完成这样的诊断操作 (参考文献: R. Chen 等, 1987, Clin. Chem. Vol. 33, Page

1521-1525; M. P. A. Laitinen, 1996, Biosens, Bioelectron., Vol. 11. 1207-1214; S. C. Lou 等, 1993, Clin. Chem., Vol.39, 619-624; S. H. Paek 等, 1999, Anal. Lett., Vol. 32. 335-360)。在这种分析形式中, 当从膜条的底部末端吸收含分析物的标本时, 通过毛细管作用经膜孔将分析物转运到固定有结合蛋白的层。在固体的表面发生抗原和抗体之间的结合反应, 接着通过介质流动分离未结合的分子。因为介质的侧向流动 (lateral flow) 加速了试剂的转运, 所以基于上述原理的膜条免疫色谱法提供了对分析物的快速分析以及一步检测的便利, 其中在单次加样后就可以完成分析。

受孕和排卵的诊断试剂盒市场的快速增长已经很好地反映了对这些一步诊断系统的需求, 并且由于预计不久可能建立的基于因特网的电话诊断和处方系统, 因此就要求将对例如要求定期检查的成人疾病的疾病家庭监测系统作为卫生保健的关键环节。但是, 现有的家庭版的诊断试剂几乎都是处于实施简单的免疫色谱检测和用肉眼识别颜色信号的定性结果的水平, 因此它们不适用于分析需要测定其浓度的指示剂物质 (蛋白标记物等)。作为能被用于定量分析的传统方法, 利用传统的光度测定转换方法可将作为示踪剂的胶体金中生成的颜色信号转化为吸光度 (参考文献: M. P. A. Laitinen, 1996, Biosens. Bioelectron., Vol. 11, 1207-1214), 它仍有缺点, 即与在实验室中所广泛使用的酶联免疫吸附检测法的检测敏感度比较, 它的检测敏感度低。

通过使用具有高敏感度的信号生成剂例如荧光物质或放射性同位素可以克服现场测试设备的低敏感度的缺点。事实上, 已经发展出免疫检测系统, 其中用荧光物质标记的检测抗体进行免疫色谱检测以及用荧光检测仪测定检测结果 (参考文献: 美国专利 5753517)。因为这个技术提供了高敏感度以及无有害作用, 它最近已经被应用于可在急诊室使用的现场免疫诊断设备中 (参考文献: 美国专利 6271040 B1)。但是, 因为荧光检测仪是相当昂贵的并且它难以被缩小到可携带的尺寸, 所以这个系

统被限制地用于医院的临床实验室或研究实验室，以及当与实验室版的酶联免疫吸附检测法比较时，除了快速检测之外，它不具有其它的特殊优点。

另一方面，实验室版的酶联免疫吸附检测法基本上都需要用于在相应的免疫检测过程中分离免疫复合物和未反应物的洗涤步骤，并且还要分开进行用于信号生成的酶反应。因此，对于现场测试，使用这些复杂的、多步骤的方法显然是困难的。

本发明的目的是提供一种膜条生物传感器技术，通过将具有相当廉价的高敏感度优点的实验室版的酶联免疫吸附检测法的原理应用到现场测试中，它不仅使得能够进行现场测试所需的快速和简单的检测，还满足了对标本中的分析物的高敏感度测定的临床需要。

发明内容

本发明涉及一种膜条生物传感器系统，包括：

(a) 用于加样的膜垫片 (10)，

(b) 用于释放检测结合成分的膜垫片 (20)，其中膜垫片 (20) 含有干燥状态的用于检测的与标记物相连接的结合成分，

(c) 具有用于捕获的固定的结合成分的信号生成膜垫片 (30)，

(d) 用于吸收纵向流动介质的膜垫片 (40)，

(e) 用于给酶供应底物溶液的膜垫片 (50)，

(f) 用于吸收横向流动介质的膜垫片 (60) 以及

(g) 底物溶液，

其中所述系统具有两组交叉排列的膜垫片，

(I) 一组纵向排列的垫片，其中垫片 (10) 在长度方向上被部分地叠加于垫片 (20) 的末端并固定，而垫片 (20) 和垫片 (40) 在长度方向上分别被部分叠加于信号生成膜垫片 (30) 的两个末端并固定；和

(II) 另一组横向排列的垫片，其中垫片 (50) 和垫片 (60) 在信号生

成时分别被部分叠加于信号生成膜垫片 (30) 的两个侧边并固定。

上述的纵向排列的膜垫片通常是在传统的免疫色谱法中所使用的膜垫片，附加的横向排列的膜垫片是唯一不同的。这样排列的膜垫片使得我们能在膜条生物传感器系统中连续进行利用纵向流动的反应例如免疫反应和利用横向流动的其它反应例如酶反应。

在本发明的膜条生物传感器系统中，横向排列的垫片 (50) 和 (60) 或是在一开始就固定到组合有纵向排列的垫片的信号生成膜垫片 (30) 上或是最初保持分离状态并在完成纵向流动反应 (例如免疫反应) 之后再固定到信号生成垫片上，它们被用于进行横向流动反应 (例如酶反应)。

如上述的，对于分别制备纵向排列的垫片和横向排列的垫片的情况，通过将纵向排列的垫片 (10)、(20)、(30) 和 (40) 固定到一单个板上以及将横向排列的垫片 (50) 和 (60) 固定到另一个板上，然后将任何一个板移动到另一个板上使之成为十字形，就可以进行两组垫片的连接。

具体地，可以以如下的形式制备本发明的膜条生物传感器系统：将纵向排列的垫片 (10)、(20)、(30) 和 (40) 固定在具有信号检测窗 (78) 和底物溶液容器穿透针头 (75) 的系统的容器 (holder) (例如塑料容器) 的底部 (72) 内侧，以及将横向排列的垫片 (50) 和 (60) 固定于安置在具有加样孔的容器的顶部内侧的横向排列的垫片固定支架 (74) 上，其中支架 (74) 与顶部外面的流动转换按钮 (73) 和含有底物溶液并最终将底物加到底物供应膜垫片 (50) 上的底物溶液容器 (76) 相连接 (图 7)。

所述的膜垫片生物传感器系统的操纵原理如下：

当在完成纵向流动反应之后通过自动地或手动地操纵流动转换按钮 (73) 将横向排列的垫片以交叉的位置连接到纵向排列的垫片上时，用置于容器底部 (72) 的底物溶液容器穿透针头 (75) 穿透底物溶液容器 (76)，这样就自动进行横向流动反应。

更具体地，所述的膜条生物传感器系统的操纵步骤如下：

首先，当经加样孔 (77) 加入含有分析物的标本时，在该位点通过经

纵向排列的垫片的毛细管孔的侧向流动用固定的捕获抗体进行免疫反应，同时经流动转换按钮 (73) 被固定于顶部的横向排列的垫片保持不与纵向排列的垫片接触的状态 (图 7C)。在免疫反应之后，当自动地或手动地操纵流动转换按钮 (73) 时，横向排列的垫片固定部分 (74) 垂直下降，据此横向排列的垫片 (50) 和 (60) 分别被固定于纵向排列的垫片中的信号生成膜垫片 (30) 的左侧和右侧，同时底物溶液容器穿透针头 (75) 在底物溶液容器 (76) 的底物打了个孔，自动地将酶的底物供应给垫片 (50) (图 7D)。然后底物形成横向流动并扮演了洗涤未反应成分以及使得生成来自与捕获抗体所形成免疫复合物中所含的酶的颜色信号的作用。可以通过信号检测窗 (78) 用肉眼观察和用基于比色法或其它检测方法例如发光法和电化学法的检测设备定量检测酶反应所生成的信号。

可以以用于电化学测定的模式构建本发明的膜条生物传感器系统，此外，一个电极可以被直接地安装于信号生成膜垫片 (30) 上或分别制造并在信号检测时将其与垫片结合。

在膜条生物传感器系统中，为了有助于在酶反应时自动地将底物供应到膜垫片 (50) 上，在固定于系统的容器顶部的预定位置上的容器中制备底物溶液。对于底物溶液的手工供应，也可以在不同于分析系统的容器中制备底物溶液。

对于所述垫片的可用材料，任何人都可以使用，只要它适用于每种垫片的目的。作为一个经典的实例，玻璃纤维膜可被用作为用于加样的膜垫片 (10)、用于缀合物释放的膜垫片 (20) (在本发明中“缀合物”被用作为同义于“标记的结合成分”) 和用于底物溶液供应的膜垫片 (50)；硝化纤维素膜可被用作为信号生成膜垫片 (30)；以及纤维素膜可被用作为吸收膜垫片 (40) 和 (60)。

如上述的，用于缀合物释放的膜垫片 (20) 至少包括一种用于检测的结合成分以及一种用于信号生成的标记 (这表示“信号生成剂”或“示踪剂”，例如酶、荧光素和放射性同位素)。

膜垫片 (20) 中所含有的干燥状态的用于检测的与标记物相连接的结合成分包括

- (i) 标记物与用于检测的结合成分的缀合物, 或
- (ii) 用于检测的结合成分和标记物与第二结合成分的缀合物, 所述第二结合成分特异于用于检测的结合成分。

用于检测的结合成分是一种与分析物例如抗体、酶、受体、DNA 等特异性反应的物质。另外, 用于捕获的结合成分是一种与分析物和抗体、酶、受体或 DNA 等特异性反应的物质, 可被列举作为成分。因此, 本发明的分析原理以及基于此的生物传感器系统可以被用于构建采用酶的信号生成的免疫传感器、酶传感器和 DNA 传感器。

作为信号生成剂, 可举出酶, 如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或 *Arthromyces ramosus* 过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、尿素酶、青霉素氧化酶、或胆固醇氧化酶; 胶体金颗粒; 金属离子, 例如 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、或它们的化合物。所述底物溶液包括显色成分、光生成成分、电化学信号生成成分、或银化合物; 并进行产生以颜色、颜色改变、光发射、传导性改变、电流改变、或电压改变作为信号的作用。

如下可以解释根据选择信号生成剂和底物溶液应用本发明的膜条生物传感器系统。

对于颜色检测型光度测定生物传感器, 可以将辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或 *Arthromyces ramosus* 过氧化物酶作为信号生成剂, 以及底物溶液包括一种特异于相应的酶的显色底物成分, 并且酶-底物反应生成了可被肉眼所检测到的信号例如颜色或颜色变化。另外, 作为一种对酶-底物反应的替代, 可以采用化学反应, 作为一个经典的实例, 通过用胶体金作为示踪剂和银化合物例如乙酸银作为底物溶液, 金和银中间的催化反应可生成如上面所提及的信号。

对于光检测型光度测定生物传感器, 可以将辣根过氧化物酶或 *Arthromyces ramosus* 过氧化物酶作为示踪剂, 以及底物溶液包括特异于

相应的酶的光生成底物成分例如鲁米诺，并且在信号生成时，酶-底物反应生成了可被肉眼所检测到的光信号。另外，作为一种对上述提及的酶的替代示踪剂，可以使用金属离子例如 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、或它们的化合物。

对于电化学的生物传感器，可以将葡萄糖氧化酶、尿素酶、青霉素氧化酶、或胆固醇氧化酶用作为信号生成剂，以及底物溶液包括特异于酶的电化学信号生成底物成分，并且酶-底物反应生成了作为信号的传导性变化、电流变化或电压变化。

如下可以更详细地解释本发明的膜条生物传感器系统的免疫检测。结合图 1 中所示的实施例，基于介质的连续交叉流动的膜条生物传感器系统是由左侧的分别以横向方向排列的功能性膜垫片和右侧的四个在纵向方向彼此连接的不同的膜垫片构成。在纵向排列中，在底部放置了用于加样的玻璃纤维膜垫片 (10)，在更上方的位置，放置了干燥状态的含有检测抗体 (22)-酶 (21) 缀合物的玻璃纤维膜垫片 (20)。当以干燥状态存在时，缀合物具有固定性，但是一旦与水性介质接触后，它马上被溶解并参与液相中的抗原-抗体反应。在更上方的位置，安置了其中捕获抗体 (31) 和特异于检测抗体的第二抗体 (32) 分别被固定于预定位点上的硝化纤维素膜垫片 (30)，最终在相应的位点上分别生成与分析物浓度成比例的信号以及作为对照的与分析物浓度无关的恒定信号。在顶部位置上，放置了作为吸收物的纤维素膜垫片 (40) 以保持经上面所罗列的膜垫片中的微孔的毛细管作用所造成的侧向流动。每个膜垫片都是彼此部分叠加的，排列在塑料薄膜上，并用双面带固定以制备功能性免疫条。另外，与免疫条分开的是，制备将最终定位于硝化纤维素膜垫片 (30) 左侧的用于给作为示踪剂的酶供应底物或供应用于信号扩增的水性介质的玻璃纤维膜垫片 (50) 以及将位于其右侧的用于吸收底物溶液以保持经毛细管作用的底物溶液流动的纤维素膜垫片 (60)。这些横向排列的垫片最初不与免疫条的主体接触，因此免疫反应首先通过免疫条沿纵向方向单

独进行，以及随后的左侧和右侧垫片的连接将容许在横向方向单独进行酶反应。

膜条生物传感器系统的分析概念

在图 2 中显示了如上所述的用膜条生物传感器系统所进行的由四个步骤所构成的分析过程。首先，当免疫条的底部末端被浸泡于含分析物的标本（例如血清、血浆、全血）时，标本通过加样垫片被吸收到系统内，并且经毛细管作用在纵向方向沿着条转移介质（图 2A）。当介质到达蓄积有干燥状态的抗体缀合物的玻璃膜垫片时，缀合物即刻被溶解并且经抗原（即分析物）-抗体反应形成了液态的第一免疫复合物。当该免疫复合物被转移到更上方位置上的信号生成垫片时，通过与固定的捕获抗体的反应将其捕获于固体表面形成三明治型的免疫复合物，用介质流动分离未结合物。其次，将免疫条与横向排列的垫片连接（图 2B）。通过利用垫片固定支架移动纵向排列的垫片或横向排列的垫片可以实现这一点。第三步，将酶底物溶液自动地或手动地加入到底物溶液供应垫片上，并启动横向流动，该流动容许溶液经信号生成垫片被吸附到底物溶液吸附垫片上（图 2C）。第四步，将底物供应给在与固定于硝化纤维素膜上的捕获抗体所形成的三明治免疫复合物中所含的酶（示踪剂），因此通过催化反应分别生成与分析物浓度成比例的信号和对照信号（图 2D）。根据所选择的信号生成剂的类型，用合适的检测仪（例如颜色检测仪、光检测仪或电化学检测仪）定量信号以测定分析物浓度。

本发明所设计的“基于纵向-横向交叉流动的膜条生物传感器系统”的主要目的是结合利用催化剂例如酶作为示踪剂的信号生成技术和免疫色谱检测法例如可以高敏感度实施的现场测试。在一个利用微孔作为固体介质的普通的酶联免疫吸附检测中，在抗原-抗体反应之后从免疫复合物中分离未反应的成分，然后加入复合物中所含的酶标记的底物进行催化反应以生成信号。但是，在传统的仅依赖于纵向流动的免疫色谱检测

系统中，难以实现这样的免疫复合物的分离与信号生成。如果在完全分离免疫复合物之前提前存在或加入酶底物，那么就生成了与分析物浓度无关的非特异信号。因此，这两个操作即免疫复合物的分离和信号生成应当是被一步一步地、完全连续地实施的。通过引入在本发明中所发展出的交叉流动概念满足了这样的需要，这种使得能够进行紧接着的在免疫条上纵向流动单独所不可能完成的底物供应是创造性的。在这个新的检测形式中，检测过程的自动化是可能的，这样可以去除单独的洗涤步骤或试剂操作，并且可以在加样后的短期内（例如 15 分钟）完成分析，还可以得到精确的检测结果，因为它使用了作为敏感的信号生成剂的酶。

在图 3 中显示了各种用于供应酶底物溶液的流动途径。除了通过免疫条上的信号生成垫片的横向流动以外（图 3A），通过底物溶液供应垫片和吸收垫片的适当排列也可以诱导出横向的、对角流动（图 3B）。另外，在进行免疫反应并去除了除信号生成垫片以外的免疫条的成分之后，沿长度方向排列底物溶液供应垫片和吸收垫片，据此可以以各种纵向流动（图 3C、D 和 E）供应底物溶液。在这些不同的流动途径中，在设计新的分析系统时要考虑到多个信号生成和效率，通过横向流动供应酶底物溶液是优选的。

与其它传统的系统相比较，本发明所发展的用于现场测试的膜条生物传感器系统的优点如下。首先，当酶示踪剂与其它的比色信号生成剂例如胶体金和乳胶颗粒比较时，酶通过催化反应生成信号，因此提供了扩增效应。所以，采用新的生物传感器对分析物的检测与利用荧光物质作为信号生成剂的生物传感器是同样高度敏感的。其次，如果采用了合适的酶-底物反应，与荧光检测仪比较，用于测定反应所生成的信号的检测仪是相当便宜的并且可以被缩小到可携带的尺寸。第三，在分析中可将各种酶作为示踪剂，因此如上面所解释的，可以生成不同的信号例如在颜色、光度、电流、电压和传导度上的变化。这就提供了灵活性，即根据可获得的信号检测设备和技術可以选择作为示踪剂的酶。

颜色检测型光度测定生物传感器

作为相同的分析概念的应用，如上所解释的膜条生物传感器系统可被用于构建颜色信号检测型光度测定生物传感器。和使用微孔作为用于蛋白固定的固体介质的酶联免疫吸附检测 (ELISA) 一样，这样的生物传感器可以在膜条上独立地完成用于信号生成的酶反应，据此提供了可以从两种检测系统中所能得到的优点，即 ELISA 中的高敏感度和普通免疫色谱检测中的快速应答。在颜色检测型传感器中，根据反射光度可以测定出与标本中的分析物浓度成比例的膜上所生成的可感知到的颜色信号的强度。因此，当与定量所常用到的荧光检测型系统比较时，保持有可与之相比的分析性能的颜色检测型传感器是相当廉价的并使用小尺寸的信号检测仪，因此可被用于现场测试。

在图 4 中详细地描述了颜色检测型生物传感器的分析原理。当如上面所解释的经纵向流动从免疫条的底物末端吸收含分析物的标本 (例如血液) 时，分析物与检测抗体-酶缀合物反应，固定于信号垫片上的捕获抗体捕获第一免疫复合物，然后用介质流动分离未反应成分 (图 4A)。所捕获的检测抗体-酶缀合物的量与分析物浓度成正比，因此最终生成了与之成比例的信号。在相同的条的上方区域中所固定的第二抗体捕获了纵向流动所分离的过量的缀合物。不论分析物的浓度如何，在该位点上的信号保持恒定，并且它可被用作为对照信号。对于来自酶缀合物的信号生成，如上述的通过横向流动供应酶底物，然后去除了固定抗体所捕获的免疫复合物以外的其它所有成分，同时在所捕获的免疫复合物中所包含的酶生成了信号 (图 4B)。利用分光光度计 (例如，光电二极管、电荷耦合器件等) 通过供给具有恒定波长的光并测定其的减少与颜色强度成比例的反射光测定出膜条上所生成的颜色信号的强度 (图 4C)。

作为可用于生成颜色信号的酶，可以列举在 ELISA 中广泛使用的辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶和 *Arthromyces ramosus*

过氧化物酶 (ARP)。作为催化反应的结果, 这些酶生成颜色信号, 对于这样的目的, 可被用作为每种酶的底物是不同的。例如, 对于使用 HRP 的情况, 四甲基联苯胺 (TMB)、二氨基联苯 (DAB) 和 4-氯-1-萘酚 (4C1N) 可被用作为在存在有过氧化氢时的可溶性的显色底物。相应的底物要求不同的光反应条件, 因此通过考虑它的分析特征和生物传感器的要求可以选择出合适的底物。

作为酶的标记方法, 除了如上面所提及的用检测抗体直接缀合酶的方法外, 可以列举使用特异于检测抗体的第二抗体的间接方法。在该情况中, 在免疫条的缀合物垫片上的不同空间分别蓄积检测抗体和第二抗体-酶缀合物以构建检测系统。在检测时, 酶缀合物特异地与检测抗体与分析物之间的第一免疫复合物反应, 然后被固定于信号生成垫片的指定位置上的捕获抗体所捕获。这个方法可以解决对于不同的分析物每次都需要进行检测抗体和酶之间的缀合的不便。另外, 也可以通过与胶体金的缀合使用检测抗体, 因此可以在免疫条的缀合垫片上的不同位置上蓄积检测抗体-金缀合物和第二抗体-酶缀合物。对于应用该方法到膜条生物传感器系统的情况, 在检测后从胶体金生成了与随后在纵向流动期间通过结合于固定抗体而被捕获的分析物和金缀合物之间的第一免疫复合物的浓度成比例的红色信号, 因此, 可以肉眼随访检测的进展。另外, 对于一个或多个检测抗体分子被结合于胶体金表面的情况, 可以结合与检测抗体分子成比例的第二抗体-酶缀合物, 因此提供了信号扩增效应。

作为另一种用于信号生成的方法, 可以采用抗生物素链菌素和生物素之间的结合反应, 并且抗生物素链菌素通常被缀合于检测抗体以及生物素被结合于酶。因为抗生物素链菌素和生物素之间的反应具有至今为止所有已知的生物学反应中的最高的亲和力, 所以与使用第二抗体的方法比较, 它提供了一个优点即信号扩增效应。当构建检测系统时, 根据检测系统的需要例如分析物的更低的检测限度、动态范围、分析时间和费用选择上面所提及的信号生成方法。

在颜色检测型生物传感器的另一个形式中, 对于信号生成, 可以采用化学反应例如金和银之间的催化反应作为对酶反应的一种取代, 并且可以列举胶体金和乙酸银作为常用的试剂 (参考文献: Patel N 等, 1992, Ann. Clin. Biochem. Vol. 29, Page 282-286, Rocks. BF 等, 1991, Ann. Clin. Biochem. Vol. 28, Page 155-159)。在传统的免疫色谱法中, 通过用检测抗体-胶体金缀合物作为信号生成剂制备免疫条, 以及通过第一纵向流动从金中生成与分析物浓度成比例的颜色信号。当根据交叉流动概念通过第二横向流动提供乙酸银时, 经催化反应将银蓄积到结合于捕获抗体位点的胶体金的表面上, 因此显著地扩增了颜色信号。这样的结果是等同于使用酶作为信号生成剂的检测系统的结果, 通过之后供应基于交叉流动方法的不使用酶、生物学材料就能扩增金颜色信号的化学物质例如乙酸银可以容易地构建具有高敏感度的检测系统。这样一种方法的引入提供了显著的优点即对痕量浓度的分析物的测定成为可能, 而用对金颜色的肉眼识别的方法不能达到这一点。和使用酶的情况一样, 用反射光测法可以测定所扩增的颜色信号。

光检测型光度测定生物传感器

作为在本发明中所发展的另一种膜条生物传感器系统的形式, 它可被用于构建光检测型光度测定生物传感器。当与上面所提及的颜色检测型生物传感器比较时, 这样的传感器采用本身能生成光信号的示踪剂。因此, 这种形式的生物传感器不需要光源, 它使得检测仪更为简单和廉价。检测系统的检测原理和变异性等同于上面所解释的颜色检测型生物传感器, 对合适信号生成剂的选择仍是必要的, 使得可以生成与分析物浓度成比例的光信号。如在图 5 中所特别显示的那样, 可以将一种酶 *Arthromyces ramosus* 过氧化物酶 (ARP) 用作为信号生成剂, 这种酶与鲁米诺的反应生成了可在 427nm 的最大吸光率所测定的光信号 (参考文献: Kim, Pisarev, and Egorov, 1991, Anal. Biochem. Vol. 199, Page 1-6)。

与通常用于颜色生成的HRP比较,光信号的强度在敏感度上比它高约500倍。作为对酶的取代,可以使用金属离子(Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 等),它们是廉价的并比酶生成更敏感的光信号(参考文献: D. Junsack, U. Spohn, 1999, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 14, Page 123-129)。

可以将使用酶或金属离子作为示踪剂的光信号生成方法应用到本发明的交叉流动系统中。在进行用于抗原-抗体反应的纵向流动之后,接着进行用于供应底物溶液的横向流动(图5A)。同时,冲洗除了结合到固定在膜上的抗体的免疫复合物之外的未结合成分,并且同时从包含于所捕获的免疫复合物中的示踪剂生成光信号。对于APR用作为示踪剂的情况,可以采用被调整到最优化酸度的含有鲁米诺和过氧化氢的底物溶液。在噪音最小化的暗条件下,用在邻近信号生成垫片上所带有的检测工具例如光电二极管测定所生成的信号(图5B)。在用光度测定检测仪检测信号并将其转化为电信号之后,根据显示信号变化对分析物浓度的标准曲线测定出标本中的分析物浓度。

对于构建光检测型生物传感器的情况,抗体分子上的示踪剂的标记方法和分析成分的排列都等同于上面所详细解释的用于构建颜色检测型生物传感器。

电化学生物传感器

作为另一种应用,在本发明中所发展的膜条生物传感器系统的概念也可被用于电化学生物传感器的组装。这些生物传感器用酶作为信号生成剂,它经对底物的酶转化诱导了离子浓度、电荷密度或电化能的变化并生成了作为信号的电化学变化(参考文献: M. M Castillo-Ortega 等, 2002, Sensors and Actuators B. Vol 85, page 19-25; Andrea Pizzariello 等, 2001, Talanta, Vol 54, Page 763-772)。对于这些信号的电化学检测仪是使用相当简单的、廉价的和小尺寸的,但是作为额外的需要,用于电化学测定的电极应当被直接地安装到免疫条上或分别制备在信号检测的同

时与免疫条结合 (参考文献: J. H. Kim, S.H. Paek, 2000, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 14, Page 907-915)。检测系统的分析原理等同于上面所解释的光度测定生物传感器, 但是对于生成与分析物浓度成比例的电化学信号, 需要选择合适的信号生成剂。

根据电化学检测的方法, 可作为示踪剂的酶可以不同。例如, 为了诱导作为信号的传导性变化, 可以使用尿素酶。这个酶通过将作为底物的尿素降解为铵离子和碳酸根离子增加了离子浓度, 据此生成了作为信号的与分析物浓度成比例的传导性变化 (图 6)。作为另一个实例, 为了生成作为信号的电流的变化, 可以将氧化或还原它的底物的酶例如葡萄糖氧化酶和胆固醇氧化酶用作为示踪剂, 利用电极测定经酶反应的电子密度的变化作为电流变化。作为另一个实例, 可以生成作为信号的电化学能变化以及它的通常应用是用作为示踪剂的酶 (葡萄糖氧化酶、尿素酶、青霉素氧化酶调控氢离子浓度即酸度) 并用 pH 电极测定酶反应的结果 (参考文献: Andrea Pizzariello 等, 2001, *Talanta*, Vol. 54, page 763-772)。另一方面, 对于使用尿素酶作为示踪剂的情况, 将对于在这个酶反应中尿素的降解所生成的铵离子或碳酸根离子的选择性膜安装于电极表面, 据此可以检测作为电信号的化学能变化。

如图 6 所描述的那样, 电化学生物传感器的分析原理等同于上面所解释的光度测定生物传感器。当将含分析物的标本应用到免疫条的底物末端时, 分析物和从缀合物垫片中所释放出的抗体-酶缀合物形成第一免疫复合物, 然后该复合物与固定在信号生成垫片上的捕获抗体形成三明治型免疫复合物。当用于抗原-抗体反应的纵向流动停止并转换为横向流动时, 去除了除捕获免疫复合物以外的其它成分, 并且同时通过捕获免疫复合物中所存在的酶和它的底物之间的反应生成了电化学信号 (图 6A)。为了检测这些电化学信号, 采用了已经被安置于膜或分别制备的合适的电极 (图 6B) 使得信噪比最大化 (图 6C)。另外, 对于电化学分析, 虽然关于电极的分析条件例如材料、形状和尺寸影响生物传感器的检测

性能，但是为了信噪比应当最优化传感器的物理化学因素。

根据对作为示踪剂的酶的适当选择，如上所述的在本发明中所构想的基于交叉流动的膜条生物传感器系统导致了各种生物传感器的构建。在过去，使用膜条的检测系统无法提供从作为示踪剂的酶的酶反应生成信号所必需的成分，因此构建有效的生物传感器是困难的。通过使用在本发明中所发展的交叉流动概念可以解决这个问题。也就是说，根据酶示踪剂以及酶的底物溶液的便利的、自动的供应，交叉流动方法可以构建出各种生物传感器。因此尽管具有高敏感度但是因为复杂的检测步骤和长的检测时间而不能被普通人所常规操纵的酶联免疫吸附检测(ELISA)可以被在膜条上便利地完成。另外，根据本发明将各种酶用作信号生成剂以取代以往的需要昂贵检测仪的荧光示踪剂是有可能的，据此可采用廉价的和小尺寸的检测仪。

附图说明

图 1 显示了本发明所构想的膜条生物传感器系统的成分和排列。

图 2 显示了膜条生物传感器系统的交叉流动色谱检测方法、本发明的关键点和它的基于此的分析原理。在这个图中，A 描述了介质的纵向流动所诱导的标本的吸收和抗原-抗体反应。B 描述了免疫条与纵向排列的垫片的连接；C 描述了在免疫检测中用作为标记的酶的底物溶液的供应；和 D 描述了酶所生成的信号。

图 3 显示了用于给酶供应底物溶液的各种流动途径，这在基于双流动的色谱法的分析中是有用的。

图 4 显示了基于组合于交叉流动色谱法的酶联免疫吸附检测法的本发明的颜色检测型光度测定生物传感器的分析原理。在此，A 描述了纵向流动的加样和免疫复合物的形成，B 是底物溶液的横向流动的用于信号生成的酶反应，和 C 是基于反射光测法的颜色信号检测。

图 5 显示了本发明的光检测型光度测定生物传感器的分析原理，它

是基于与图 4 中所描述的相同的概念,只是信号生成方式不同。在此,A 描述了横向流动的用于信号生成的酶反应,和 B 是发光信号检测。

图 6 描述了本发明的电化学生物传感器的分析原理,它利用了与图 4 中所描述的相同的原理,只是信号生成方式不同。在此,A 描述了用于信号生成的酶反应,B 是电极附着步骤,C 是电化学信号(例如传导性变化)检测。

图 7 显示了一个用于交叉流动膜条色谱检测的分析成分的容器,它被设计用于以自动或手工模式进行连续操纵,即免疫反应和酶反应。在此,A 和 B 描述了容器的所有构成,C 和 D 描述了具有被组合的容器的顶面和底面的容器的横截面。C 部分描述了在进行用于免疫反应的纵向流动期间的横向和纵向排列的垫片的相对位置,和 D 描述了在进行用于酶反应的横向流动期间的两种排列的垫片的相对位置。

图 8 描述了根据本发明的颜色检测型光度测定生物传感器(实施例 6)对分析物(B 型肝炎病毒表面抗原,HBsAg)浓度的应答。A 显示了用胶体金作为标记的试验结果,B 是用酶 HRP 作为标记的结果,和 C 是吸光度的颜色信号所表达的剂量-应答曲线。

图 9 显示了对标准浓度的分析物肌钙蛋白 I 的金颜色信号和 ARP 光信号的比较。利用在实施例 7 中所制备的光检测型膜条生物传感器测定光信号。

图 10 显示了利用在实施例 9 中所制备的电导分析的膜条生物传感器所测定的对标准浓度的人血清白蛋白的传导性信号的变化,以证实概念在电化学生物传感器中的应用。

图 11 显示了直接酶标法和间接方法所测定的对 HBsAg 的剂量应答的比较。A 和 B 分别是根据直接和间接方法从基于交叉流动概念的膜条生物传感器系统中所生成的颜色信号的结果,和 C 显示了从酶联免疫吸附法(ELISA)生成并在 450nm 的吸光率上所测定的颜色信号的结果。

<附图标记的解释>

- 1: 分析物
- 10: 用于加样的膜垫片
- 20: 用于释放与标记物相连接的检测结合成分的膜垫片
- 21: 信号生成剂 (或示踪剂)
- 22: 检测抗体
- 30: 用于信号生成的膜垫片
- 31: 捕获抗体
- 32: 特异于检测抗体的第二抗体
- 33: 光源
- 34: 光度测定检测仪
- 35: 用于电化学信号检测的电极
- 40: 用于吸收纵向流动介质的膜垫片
- 50: 用于供应底物溶液的膜垫片
- 60: 用于吸收横向流动介质的膜垫片
- 71: 容器的顶部
- 72: 容器的底部
- 73: 流动转换按钮
- 74: 横向排列的垫片固定板
- 75: 底物溶液容器穿透针头
- 76: 底物溶液容器
- 77: 加样孔
- 78: 信号检测窗

实现发明的最佳模式

以下实施例更具体地支持本发明的内容并通过说明具体的应用显示出它的用途,但是它们从不限制本发明的范围。

实施例中所用的材料

实施例中所用的材料和它们的来源如下：B 型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、抗 HBsAg 的多克隆抗体 (兔来源) 和单克隆抗体 (鼠来源)、抗人血清白蛋白的多克隆抗体 (山羊来源) 都购自 Enzyme International (美国)。心脏肌钙蛋白 I (cTnI) 和特异于它的抗体即多克隆抗体 (山羊来源) 和单克隆抗体 (鼠来源) 都购自 Spectral (美国)。胶体金 (直径 40nm, 0.01%)、葡聚糖凝胶、酪蛋白 (钠盐型, 牛奶中提取)、牛血清白蛋白 (BSA, 经热休克法纯化, V 级)、Tween20、Triton X-100、人血清白蛋白 (HAS) 是由 Sigma (美国) 提供。硝化纤维素膜 (孔径 12mm) 和玻璃纤维膜、及纤维素膜 (3MM, 色谱级) 分别购自 Millipore (美国) 和 Whatman (美国)。抗生物素链菌素 (SA)、N-琥珀酰基-3-[2-联硫基吡啶]丙酸酯 (N-succinimidyl-3-[2-pyridyldithio]propionate, SPDP)、琥珀酰 4-[N-马来酰亚胺甲基]环己胺-1-羧酸酯 (succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate, SMCC)、二硫苏糖醇 (DTT)、和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)-LC-LC-生物素都来自 Pierce (美国)。酶即辣根过氧化物酶 (HRP)、*Arthromyces ramosus* 过氧化物酶 (ARP) 和尿素酶都购自 Calbiochem (美国)。每种酶的底物即四甲基联苯胺 (TMB) 和鲁米诺、尿素分别购自 Moss (美国) 和 Sigma (美国)。其它所用的试剂都是分析级的。

实施例 1：抗体-胶体金缀合物的合成

根据标准方案测定了各种反应溶液的酸度和抗体浓度，然后找出在最优化的条件下合成缀合物 (参考文献：S.H. Paek 等, 1999, Anal. Lett., Vol. 32, 335-360)。

简单地，将中性 pH 缓冲液中的透析了的特异于 HBsAg 的抗体溶液 (100mg/ml, 0.8ml) 加入到金溶液 (8ml) 中，调整 pH 为 9.0，并反应 30

分钟。然后，往该溶液中加入 1ml 5% 通过将酪蛋白溶解于 10mM 磷酸缓冲液 (pH 7.4, PB) 所制成的酪蛋白溶液 (酪蛋白-PB) 并反应 30 分钟。在 15,000rpm 离心反应溶液 45 分钟后，去除上清液。往剩下的金沉淀物中加入酪蛋白-PB 并调整缀合物的终体积为 0.2ml，储存于 4℃ 直到使用。

实施例 2 抗体-酶缀合物的合成

通过利用交联剂的化学反应进行特异于分析物的抗体和酶之间的缀合。在抗体与 20 倍过量摩尔浓度的 SMCC 在 4℃ 下反应 4 小时之后，用 Sephadex G-15 凝胶色谱去除过量的 SMCC，然后如下所述用活化的酶直接将抗体缀合化。对于酶的活化，将蛋白溶液在 5mM 含 EDTA 的 PB 中并与 20 倍过量摩尔浓度的 SPDP 在室温下反应 1 小时。为了引入分子上的巯基，将 DTT (终浓度 10mM) 加入到反应混和物中并在 37℃ 再反应 2 小时。在 Sephadex G-15 凝胶柱中去除过量的试剂。将摩尔比为 1:10 的两种活化试剂即抗体和酶混和并在 4℃ 反应过夜。用一填充 Sephadex G-100 凝胶的柱 (1x20cm) 进行这些所合成的抗体-酶缀合物的纯化。将反应混和物 (1ml) 注射到柱中并用 PBS 洗脱。用 Bradford 检测法监测每个洗脱部分中的蛋白，并在非还原条件下最后用 SDS-PAGE (7% 凝胶) 确认缀合物的纯度。

实施例 3 具有固定抗体的信号生成垫片

将针对迁移效率和孔径的硝化纤维素 (NC) 膜的最优化产品用作为信号生成垫片。将 NC 膜 (孔径: 12mm, Millipore) 用于抗体的固定。可以将物理吸附和化学方法用作为固定方法，并根据试验的结果通过考虑方法的便利性和可重复性最终选择出合适的方法。用物理吸附将抗体固定在 NC 膜条 (7x25mm) 的预定位置上。用微分配器将用含有 140mM NaCl 的 PB 所稀释的 1mg/ml 抗体 (1.5ml) 点在膜的一个位置 (距离底部 10mm 处) 上，然后在室温下反应 1 小时。将具有固定抗体的条在溶解于

100mM Tris 缓冲液的 0.5%酪蛋白 (pH 7.6, 酪蛋白-Tris) 中浸泡 1 小时以阻断残余的表面, 随后用含有 0.1% Triton X-100 的 Tris 缓冲液洗涤 3 次, 并在空气中晾干。

实施例 4 信号生成垫片 (具有固定的抗生物素链菌素)

将用于固定取代抗体的抗生物素链菌素 (SA) 的如在实施例 3 中所解释的相同的 NC 膜用作为信号生成垫片。作为固定方法, 因为在预试验中 SA 的物理吸附显示出低的固定产率, 所以采用了化学方法。将 NC 膜 (7x25mm) 浸泡在 0.5%戊二醛溶液中并反应 1 小时, 然后用 PBS 洗涤 3 次。用微分配器将 10mg/ml SA (1mL) 加入到距离底部末端 1cm 的位置上, 在保持 100%湿度的孵育箱中孵育并在室温下反应 1 小时。剩下的步骤与在实施例 3 中所示的抗体固定的步骤一致。

实施例 5 颜色检测型分析系统的构建

5-1. 免疫条的构建

用在实施例 6-1 中所用的检测抗体-胶体金缀合物或与第二抗体-HRP 缀合物 (实施例 6-2 中所用的) 结合的金缀合物作为信号生成剂构建免疫色谱检测系统, 其中用肉眼识别或吸光度检测测定出依赖于分析物 (HBsAg) 浓度的信号。免疫条 (图 1) 包括 (从底部) 用 0.1% (v/v) Triton X100 处理的玻璃纤维膜 (7x20mm)、具有标记缀合物的玻璃纤维膜 (7x5mm)、具有固定抗体的 NC 膜 (7x25mm)、和作为吸附垫片的纤维素膜 (7x15mm)。每个连续的膜垫片都是部分叠加的并用双面带固定于塑料薄膜上。

5-2. 横向排列的垫片的构建

为了在抗体-HRP 缀合物的应用中的从 HRP 生成颜色信号, 为了诱导交叉流动, 利用供应含有过氧化氢和 TMB 的酶底物的玻璃纤维膜 (10x20mm) 和作为吸附垫片的纤维素膜 (15x20mm) 构建横向排列的垫

片。垫片与上面所解释的免疫条是空间分离的，以这样的之后横向垫片被容许分别与 NC 膜的两个侧边接触以诱导酶反应的方式设计分析系统(图 2)。

实施例 6 颜色检测型光度测定生物传感器的剂量应答

6-1. 以胶体金作为示踪剂

用扫描反射光测法测定在实施例 5 中所制备的分析系统的金颜色信号对 HBsAg 标准物的剂量应答。将每个 HBsAg 的标准溶液 (150ml) 放到不同的微孔中，将免疫条以直立位放置到每个微孔中 15 分钟以吸附水溶液到条中。用扫描仪 (HP ScanJet 6100C, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) 扫描在固定抗体区域所显示的信号。通过使用图像分析程序 (Multianalyst version 1.1, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 选择出所捕获图像中的染色区域 (图 8A) 使得可以覆盖所有的染色区域，然后将其转化为与颜色强度成比例的吸光度 (图 8C, 金信号)。

根据结果，所测定的吸光度和用肉眼所验证的颜色强度都与分析物浓度成比例。对于金颜色信号，检测敏感度为约 100ng/ml。

6-2. 以 HRP 作为示踪剂

用与金颜色信号测定相同的方法测定在如实施例 5-1 中所构建的检测系统中的 HRP 信号对 HBsAg 的剂量应答。分析方法基本上等同于生成金信号的方法，除了如所提及的第二抗体-HRP 缀合物的额外应用。对于 HRP 信号生成，横向排列的底物供应垫片和吸附垫片分别位于信号垫片的右侧和左侧，供应 HRP 的底物溶液以容许进行横向流动 3 分钟。去除了被 NC 膜上的捕获抗体所捕获的免疫复合物以外的剩余成分，并同时从所捕获的免疫复合物所包含的 HRP 中生成蓝色信号 (图 8B)。

用与金信号相同的方法将颜色信号定量为吸光度 (图 8C, HRP 信号)。

从所得到的结果发现，作为信号的吸光度与肉眼所验证的颜色强度

成比例以及也与分析物浓度成比例。对于以酶作为示踪剂，检测敏感度为约 1ng/ml，这比金颜色信号约强 100 倍 (图 8C)。

实施例 7 光检测型分析系统的构建

7-1. 免疫条的构建

将急性心肌梗死的特异性标记物肌钙蛋白 I 用作为模型分析物。用捕获抗体-生物素缀合物、检测抗体-胶体金缀合物或检测抗体-ARP 缀合物和具有在实施例 4 中所制备的固定 SA 的膜条制备免疫色谱检测系统。免疫条 (图 1) 包括 (从底部) 用 0.1% (v/v) Triton X100 处理的玻璃纤维膜 (7x20mm)、具有缀合物的玻璃纤维膜 (7x5mm)、具有固定 SA 的 NC 膜 (7x25mm)、和作为吸附垫片的纤维素膜 (7x15mm)。每个连续的膜垫片都是部分叠加的并用双面带固定于塑料薄膜上。

7-2. 横向排列的垫片的构建

为了从条中所有的 ARP 中生成光信号，利用供应含有鲁米诺和过氧化氢的酶底物的玻璃纤维膜 (10x20mm) 和作为吸附垫片的纤维素膜 (15x20mm) 构建横向排列的垫片。在实施例 5-2 中已经提及横向排列的垫片的作用，并且也显示于图 2 中。

实施例 8 光检测型生物传感器的剂量应答

8-1. 以胶体金作为示踪剂

用扫描反射光测法测定在实施例 7 中所制备的分析系统的金颜色信号对 cTnI 标准物的剂量应答。将每个 cTnI 的标准溶液 (150ml) 放到不同的微孔中，将免疫条以直立位放置到每个微孔中。下面的分析方法与在实施例 6-1 对 HBsAg 的方法相同，如所说明的将所生成的颜色信号转化为吸光度 (图 9，金颜色信号)。

根据结果观察到吸光度与用肉眼所验证的颜色强度成比例，也与分析物浓度成比例。对于金颜色信号，检测敏感度为约 1ng/ml。

8-2. 以 ARP 作为示踪剂

从与在实施例 8-1 中所描述的金颜色检测型免疫条相同构建的检测系统中测定出 ARP 光信号对 cTnI 的剂量应答,除了用检测抗体-ARP 取代检测抗体-胶体金缀合物,以及也将交叉流动用作为用于本发明的从酶中生成信号的关键方法。在纵向流动模式中的用于免疫反应的方法是等同于用胶体金作为示踪剂的实施例 8-1 中的方法。在完成纵向流动后,底物供应垫片和横向排列的吸附垫片分别位于信号垫片的右侧和左侧,供应 ARP 的底物溶液 (0.2M 碳酸缓冲液, pH 9.0, 含有过氧化氢和鲁米诺) 以容许进行横向流动 3 分钟。去除除了膜上所捕获的免疫复合物以外的剩余成分并同时从所捕获的免疫复合物中所含有的 ARP 中生成蓝色光信号。用安装于个人计算机中的光电二极管 (Hamamatsu, 日本) 和模拟数字转换设备 (ADCM 板, 韩国制造) 定量光信号。

根据结果观察到从光信号所转化的点信号 (电压) 与分析物浓度成比例 (图 9, ARP 光信号)。检测敏感度为约 0.1ng/ml, 这比用胶体金作为示踪剂的敏感度高出约 10 倍。

实施例 9 电化学检测型分析系统的构建

根据与实施例 5 和 7 中所显示的方法基本相同的方法构建生成针对分析物浓度的电化学信号的免疫色谱检测系统。但是电化学检测系统还需要如图 6 所示的电极以指示电化学测定, 下面解释了传导性检测系统。

9-1. 免疫条的构建

采用用作为糖尿病并发症所引起的肾病的早期诊断的标记物的人血清白蛋白 (HAS) 为模型分析物。用检测抗体-尿素酶缀合物和具有固定捕获抗体的 NC 膜条构建免疫色谱检测系统。用与实施例 5-1 中所描述的相同的方式构建免疫条系统 (图 1)。

9-2. 横向排列的垫片的构建

为了从条中所有的尿素酶中生成传导性信号, 利用供应含有尿素的

酶底物溶液的玻璃纤维膜 (10x20mm) 和作为吸附垫片的纤维素膜 (15x20mm) 构建横向排列的垫片。

实施例 10 电化学检测型生物传感器的剂量应答

用电化学检测设备 (传导性计) 得到在实施例 9 中所制备的检测系统的 HAS 的剂量应答。采用与实施例 6-2 中所描述的相同的分析方法。在应用横向流动 3 分钟后, 去除了膜上所捕获的免疫复合物以外的剩余成分, 并同时在免疫复合物中所含有的尿素酶将尿素降解为铵离子和碳鎓离子。因此, 与分析物浓度成比例的传导性的变化作为信号 (图 10)。然后用数字万用表 (HITASI, 日本) 测定在具有固定捕获抗体的区域上所生成的电流所表达的传导性信号。

根据结果证实传导性依赖性电流与分析物浓度成比例, 以及检测敏感度符合约 1ng/ml。

实施例 11 酶标记方法

在酶联免疫吸附检测法 (ELISA) 中有两种标记方法, 即直接法, 其中通过将酶直接连接到与分析物特异反应的检测抗体上生成信号, 和间接法, 其中完全用检测抗体结合分析物以及将酶连接到特异性识别检测抗体的第二抗体上用于信号生成。

通过使用采用了将如 ELISA 中的基于酶的信号扩增技术引入到膜条分析系统中的交叉流动系统, 比较了两种标记方法。通过将 HRP 直接连接到检测抗体上应用直接标记法, 检测抗体为从鼠中生成的特异于 HBsAg (分析物) 的单克隆抗体, 以及通过将 HRP 连接到第二抗体上测定间接标记法, 第二抗体为从山羊中生成的识别特异于分析物的检测抗体的多克隆抗体。基本上, 直接法可能要求酶标记应当倍连接到不同的分析物的每种检测抗体上。另一方面, 间接法在便利性和信号扩增上是有优势的, 即甚至可以使用不同分析物的酶缀合物, 因为使用附加抗体可

以实现信号扩增。在这个实施例中，用两种方法比较了它们的分析性能。

与实施例 6-2 中的方法一样进行采用间接标记法的分析，如实施例 6-1 所描述的那样实行利用直接法的检测除了用 HRP 取代金连接到特异于 HBsAg 的检测抗体上。如上面所解释的，用扫描光度测定法测定膜条检测系统所生成的颜色信号对 HBsAg 的剂量应答 (图 11A 和 B)。

分别从直接和间接法的结果中证实间接法的检测敏感度比直接法高出约 10 倍。从 ELISA 中也得到了相同的比较结果 (图 11C)。但是，根据分析的目的和要求，优选的方法可以是不同的。

工业实用性

本发明提供了一种膜条生物传感器技术，它不仅能进行现场测试所需的快速和简单的检测，还满足了对标本中的分析物的高度敏感的检测的临床需要。通过将实验室版酶联免疫吸附检测法的原理应用到现场测试的设备上实现了这一点，它具有廉价和对分析物的敏感定量的优点。

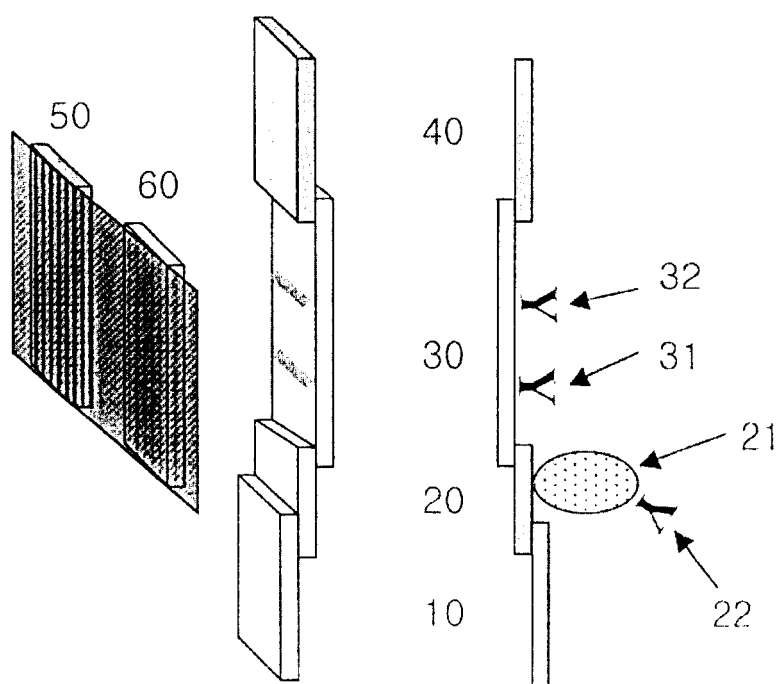
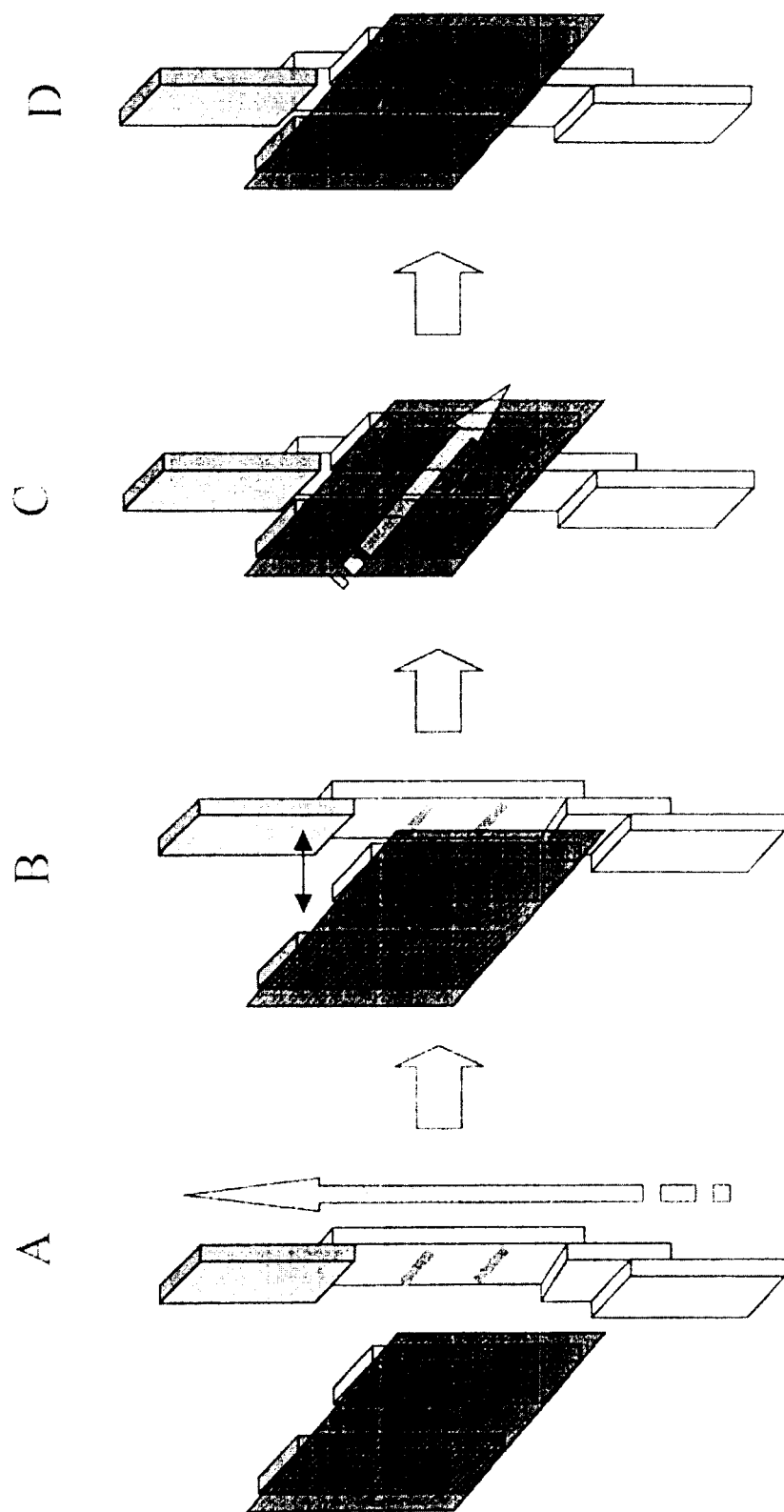
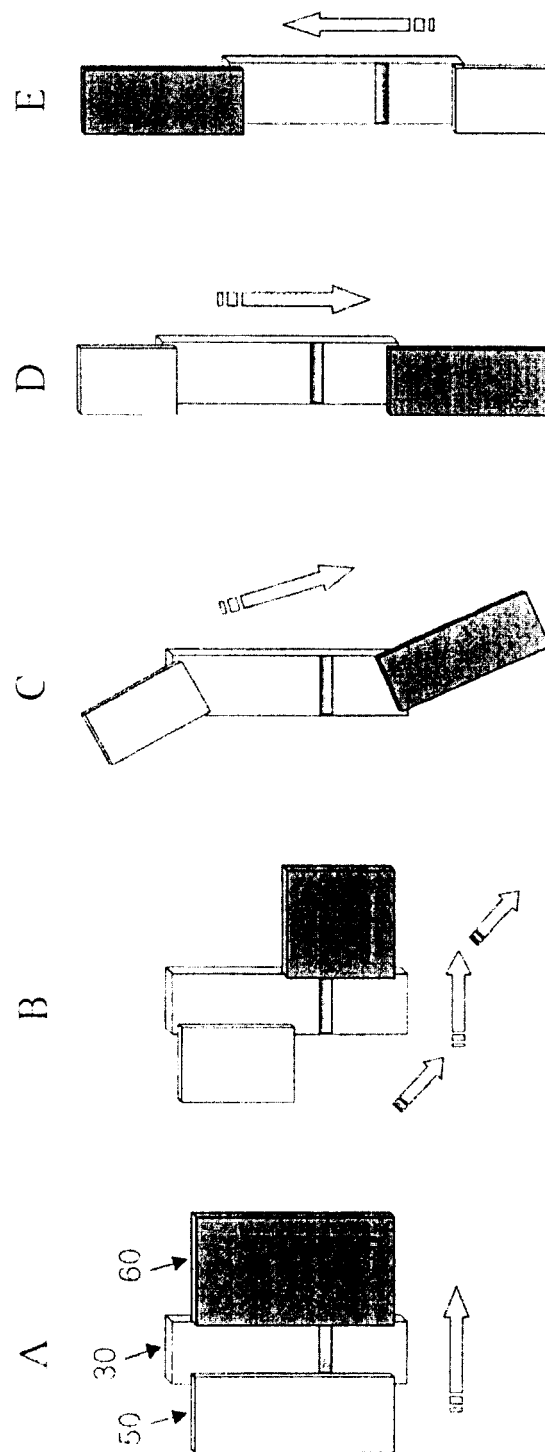
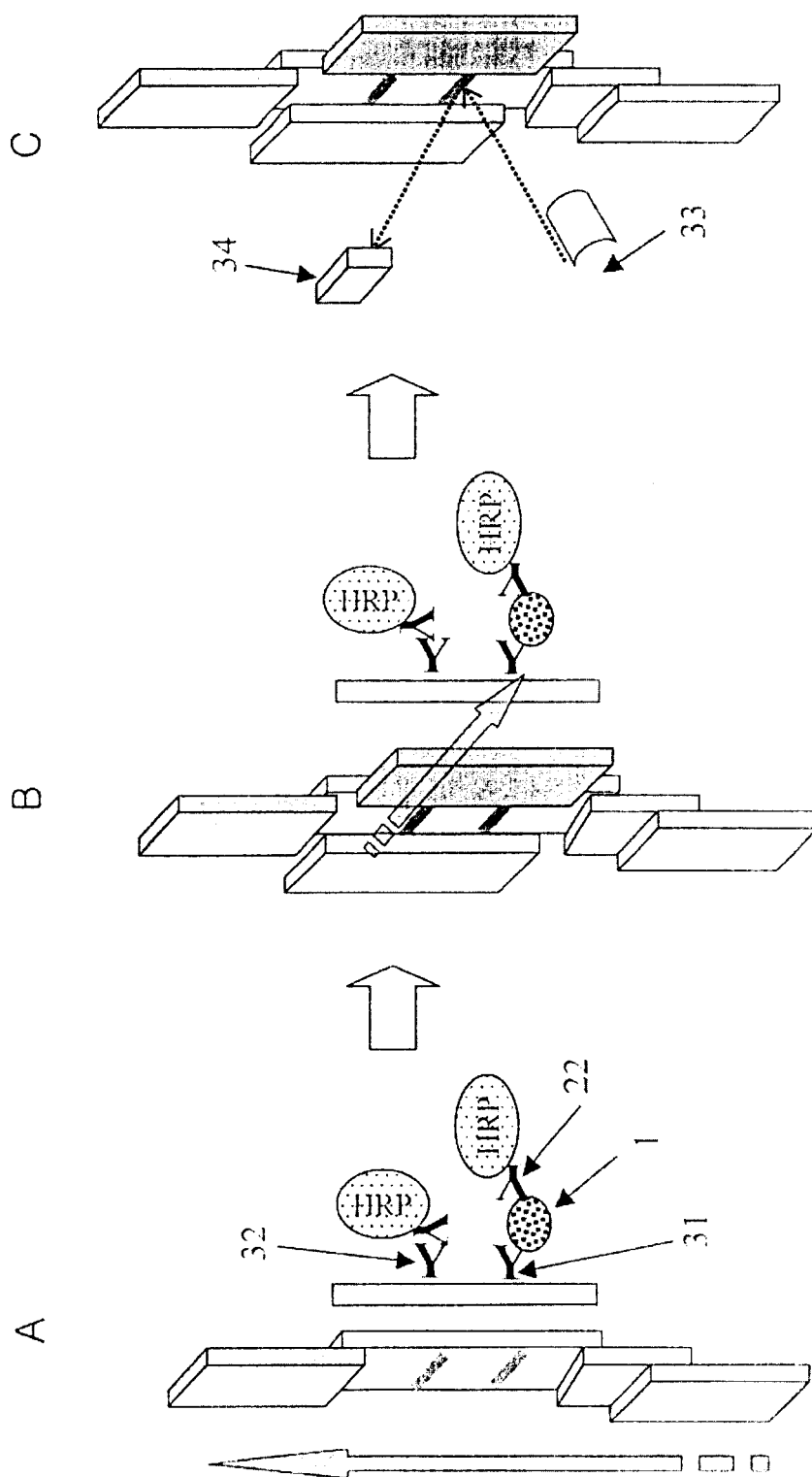
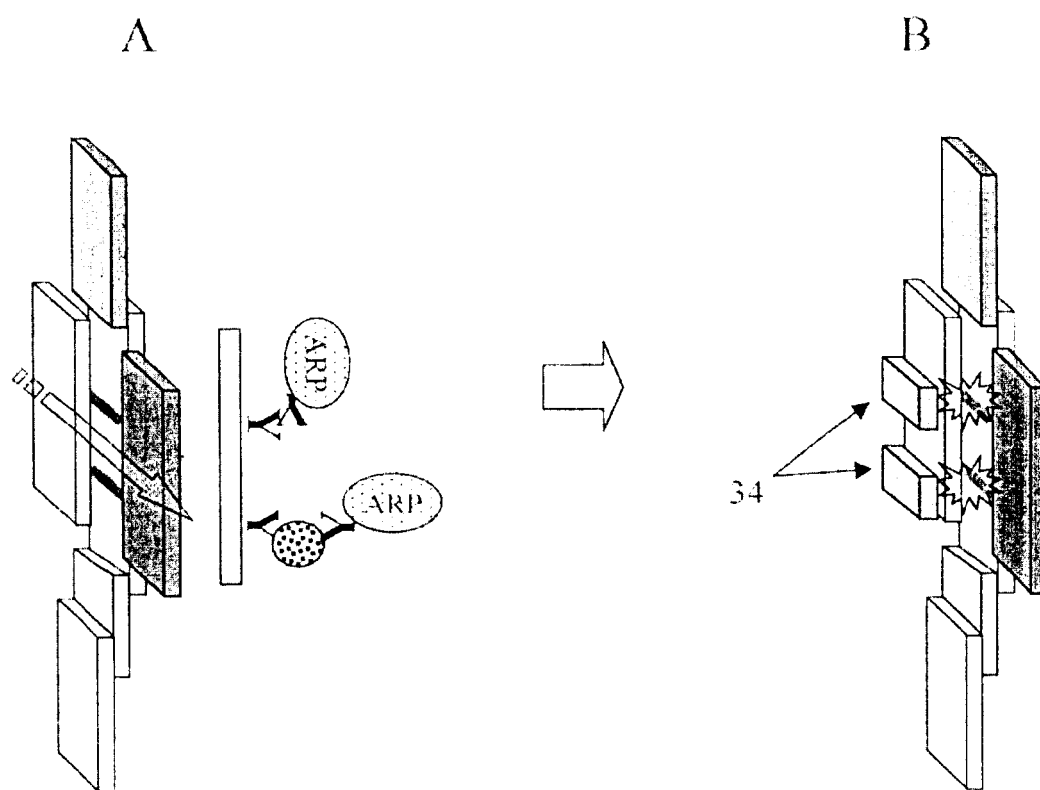


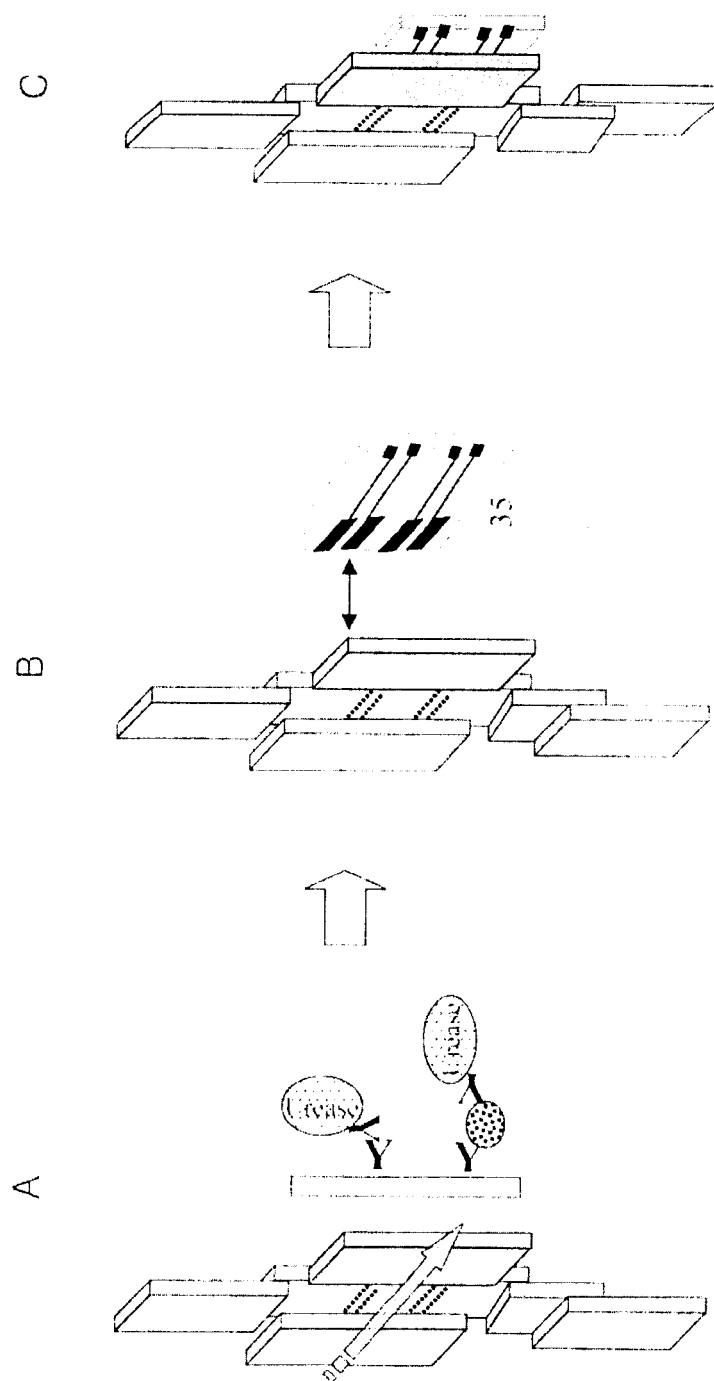
图 1

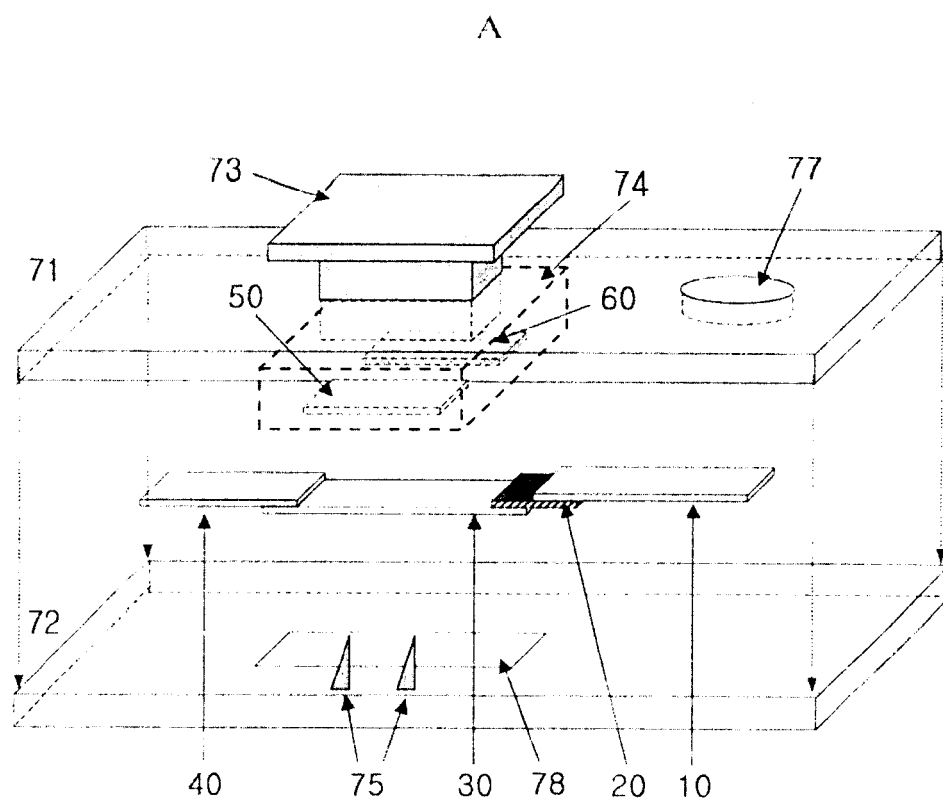
**图 2**

**图 3**

**图 4**

**图 5**

**图 6**

**图 7**

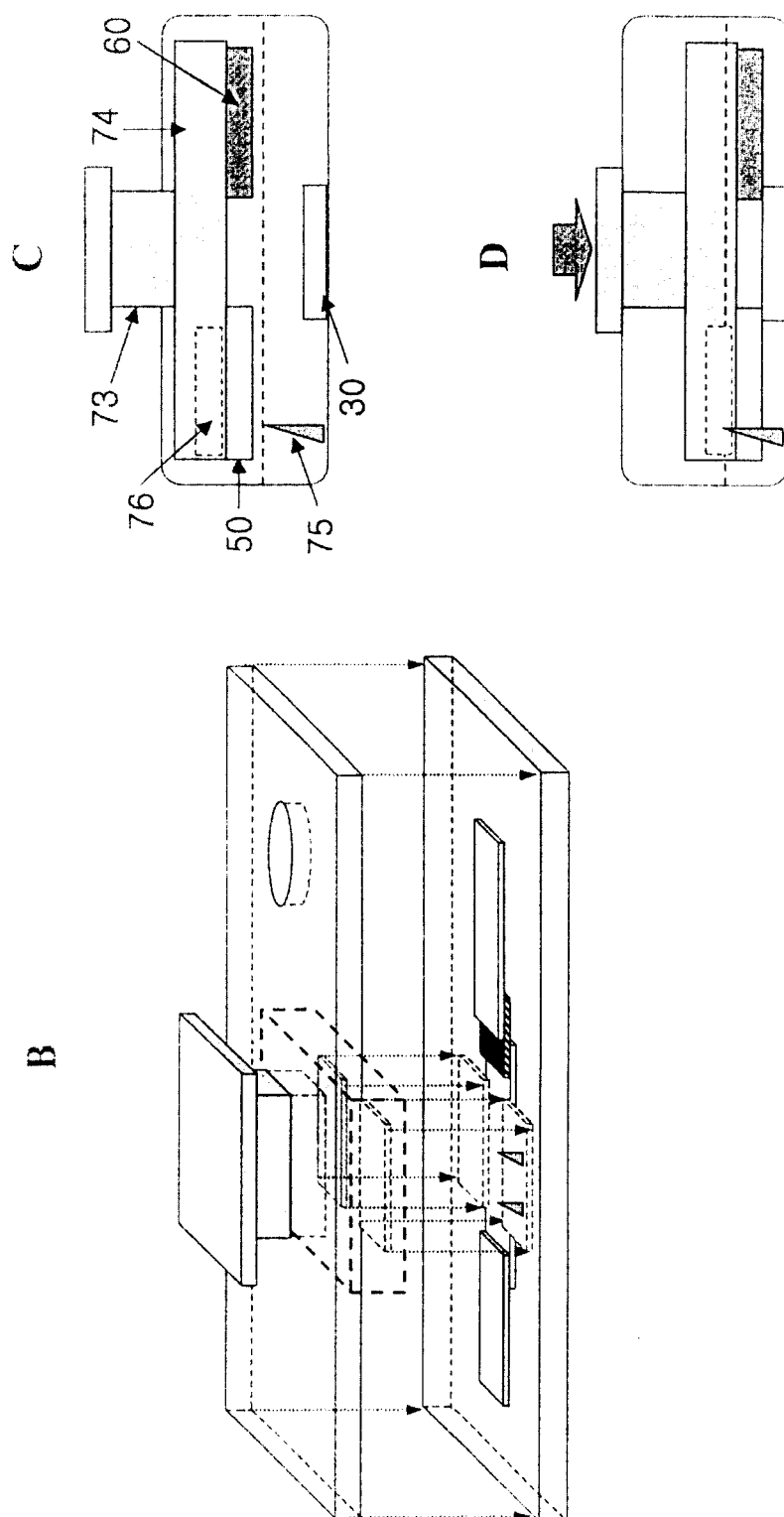


图 7 (续)

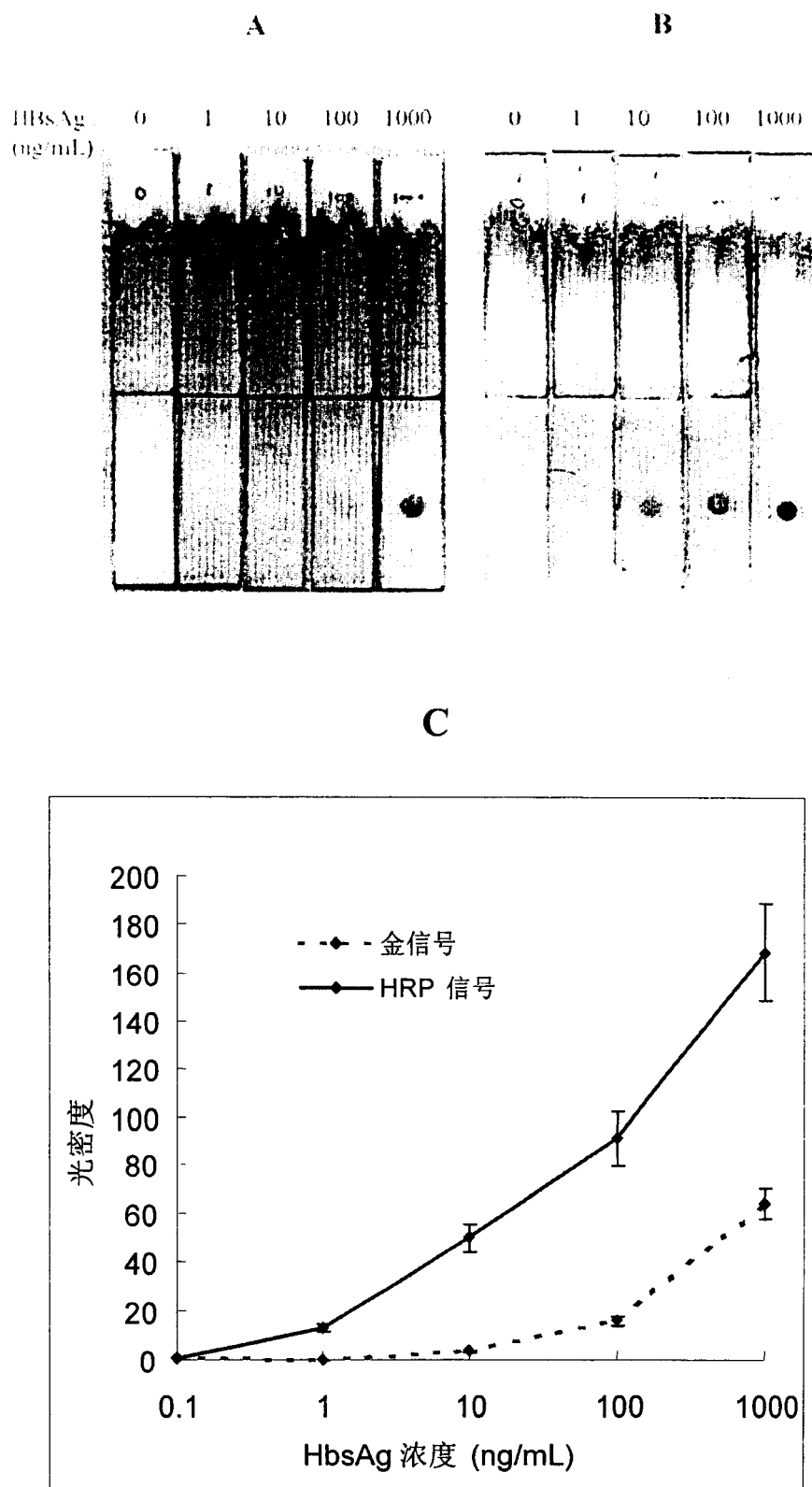


图 8

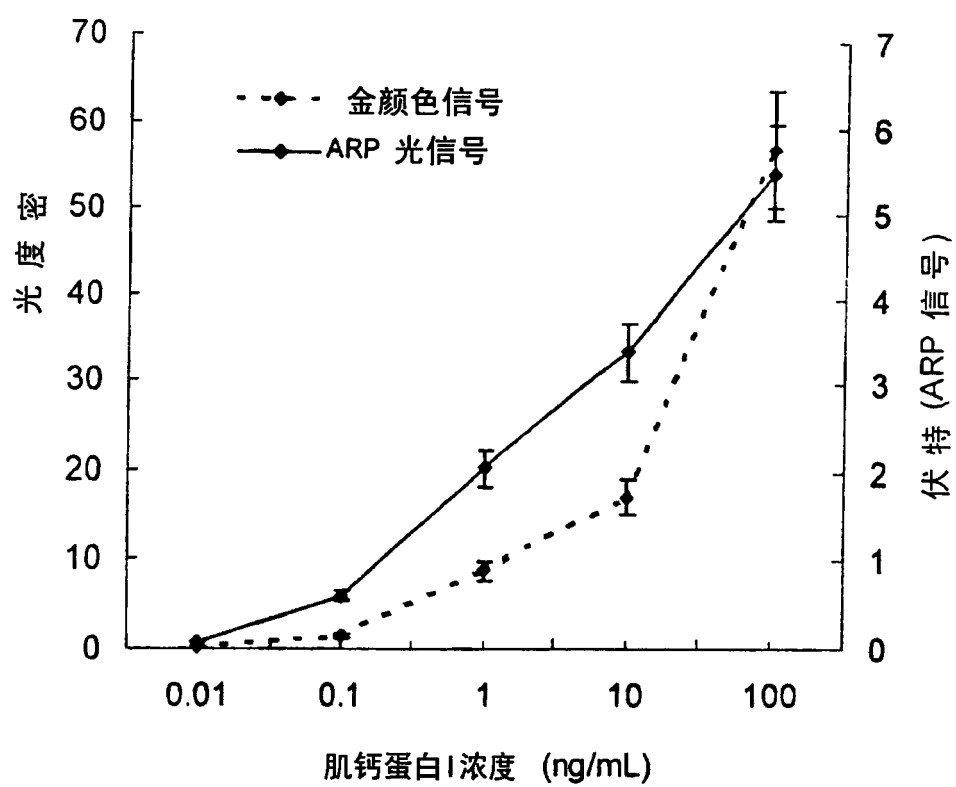


图 9

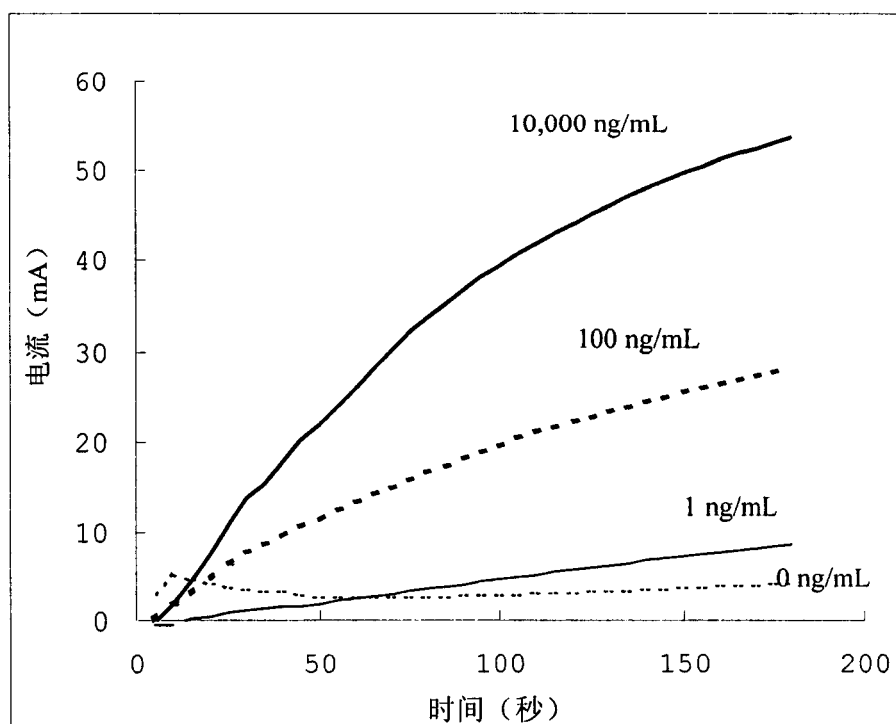
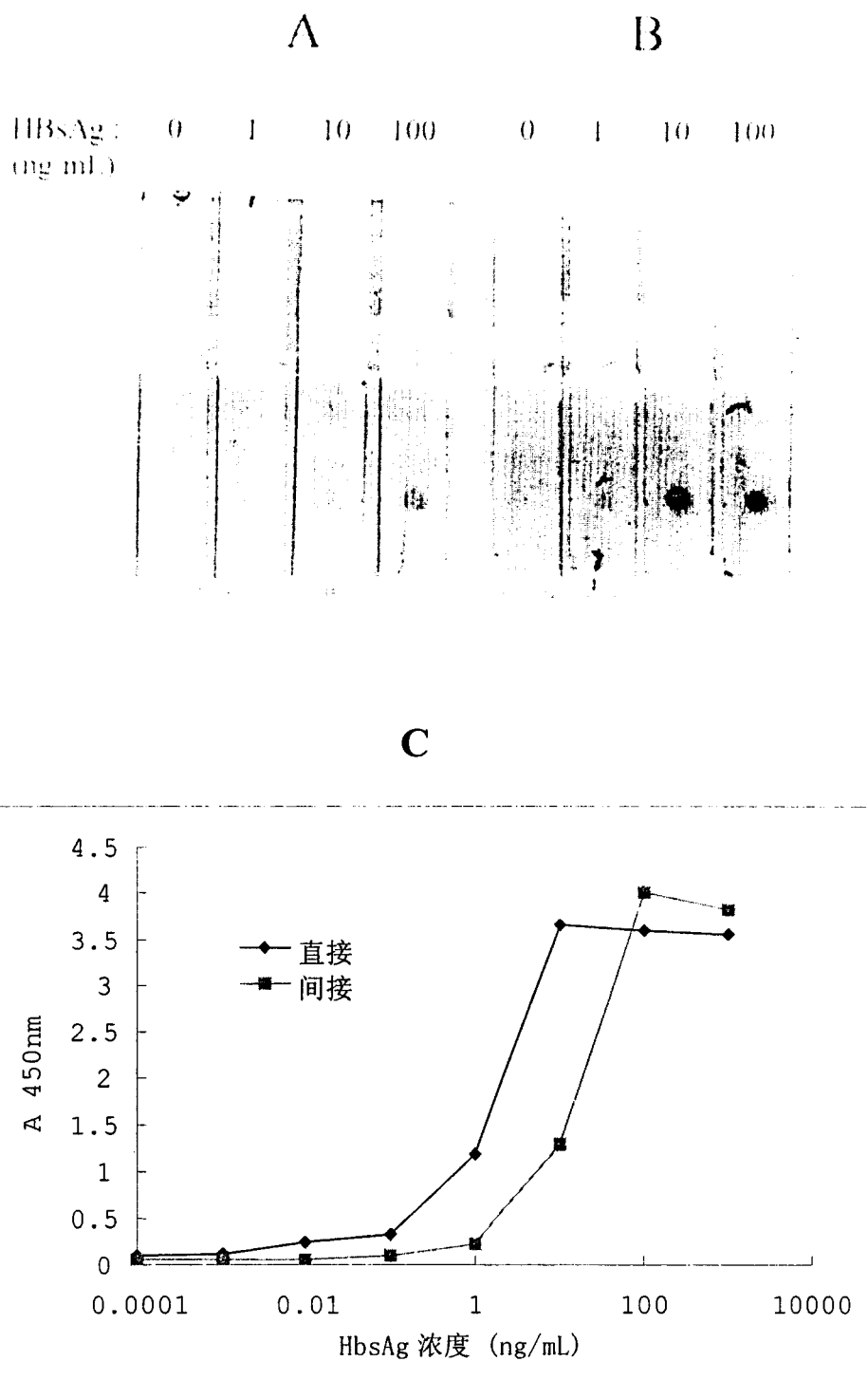


图 10

**图 11**

专利名称(译)	用于进行现场测试的膜条生物传感器系统		
公开(公告)号	CN1781022A	公开(公告)日	2006-05-31
申请号	CN200480011159.8	申请日	2004-04-21
[标]发明人	白世焕 赵贞焕 金奭廈		
发明人	白世焕 赵贞焕 金奭廈		
IPC分类号	G01N33/538 G01N33/543 C12N9/02 C12Q1/00 G01N33/53 G01N33/537 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/558 C12Q1/001 Y10S436/808 Y10S436/81 Y10S436/823		
代理人(译)	林晓红		
优先权	1020030026227 2003-04-25 KR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于现场测试(POCT)的生物传感器，通过将一种用于免疫反应和酶反应的连续交叉流动步骤引入到膜条色谱检测系统中显著地提高了检测灵敏度。本发明涉及一种膜条生物传感器系统，它包括：(a)用于加样的膜垫片(10)，(b)用于释放检测结合成分的膜垫片(20)，其中膜垫片(20)含有干燥状态的用于检测的与标记物相连接的结合成分，(c)具有用于捕获的固定的结合成分的信号生成膜垫片(30)，(d)用于吸收纵向流动介质的膜垫片(40)，(e)用于给酶供应底物溶液的膜垫片(50)，(f)用于吸收横向流动介质的膜垫片(60)以及(g)底物溶液。

