

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610149310.5

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 27/26 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月6日

[11] 公开号 CN 1975421A

[22] 申请日 2006.11.21

[21] 申请号 200610149310.5

[30] 优先权

[32] 2005.11.21 [33] US [31] 11/284097

[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 D·赖拉特 A·霍奇斯
R·沙特利耶

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李波 梁谋

权利要求书2页 说明书19页 附图4页

[54] 发明名称

生物传感器设备及使用方法

[57] 摘要

此处公开了用于检测目的分析物的存在的方法和装置。生物传感器可以包含反应室和电化学检测室。反应室可以包含至少一个固定的结合位点和适于结合靶分析物和固定的结合位点中至少一个的探针缀合物，而检测室可以包含用于检测电化学反应的电极。如果存在靶分析物，流体样品中的靶分析物导致反应室中结合的探针缀合物的量增加，这可以在反应室中进行电化学检测。

1. 用于检测流体样品中的靶分析物的生物传感器，该装置包含：
包含固定的结合位点和探针缀合物的反应室，其中探针缀合物包含适于结合于固定的结合位点的结合配偶体；
包含电极的检测室，该电极用于对检测室中的电化学反应进行检测；和
反应室和检测室之间的流体通道，
其中，流体样品中靶分析物的存在或不存在导致反应室中结合的探针缀合物的量改变，该改变可以用检测室中的电化学反应进行检测。
2. 权利要求1的生物传感器，其中固定的结合位点是抗原，并且结合配偶体是抗体。
3. 权利要求1的生物传感器，其中固定的结合位点是抗体，并且结合配偶体是抗原。
4. 权利要求1的生物传感器，进一步包含适于通过毛细作用进行填充的填充室。
5. 权利要求4的生物传感器，其中反应室的毛细作用尺寸小于填充室的毛细作用尺寸。
6. 权利要求1的生物传感器，其中检测室包含通气孔。
7. 权利要求6的生物传感器，其中可以通过刺穿装置的外层而打开通气孔。
8. 权利要求6的生物传感器，其中可以通过去除装置外层的一部分而打开通气孔。
9. 权利要求6的生物传感器，其中可以通过沿着穿孔撕开而打开通气孔。
10. 权利要求1的生物传感器，其中反应室包含通向大气的开口。
11. 权利要求1的生物传感器，其中固定的免疫结合位点和探针缀合物位于反应室内的不同表面上。
12. 权利要求1的生物传感器，其中固定的结合位点位于至少一个磁珠上。
13. 权利要求12的生物传感器，其中至少一个磁珠干燥在反应室

的内表面上。

14. 权利要求 12 的生物传感器，进一步包含磁铁。

15. 权利要求 14 的生物传感器，其中磁铁的放置使得在将流体样品导入反应室后所述至少一个磁珠移动，以便与探针缀合物紧密接触。

16. 权利要求 1 的生物传感器，其中探针缀合物包括酶。

17. 权利要求 16 的生物传感器，进一步包括介质和酶底物。

18. 用于检测流体样品中的靶抗原的生物传感器，该装置包含：
包含包括抗体的至少一个固定的结合位点和探针缀合物的反应室，所述探针缀合物包括适于结合于结合的靶抗原的抗体；
包含电极的检测室，该电极用于对检测室中的电化学反应进行检测；和

反应室和检测室之间的流体通道，

其中，流体样品中靶抗原的存在导致反应室中结合的探针缀合物的量减少，该减少可以用检测室中的电化学反应进行检测。

19. 检测流体样品中的靶分析物的方法，该方法包括以下步骤：
将样品送递到包含反应室和检测室的生物传感器中；
使反应在反应室中固定的结合位点和探针缀合物之间进行；
使样品移动到检测室中，对探针缀合物的水平进行电化学检测，其中样品中靶分析物的存在导致反应室中检测到的探针缀合物的量增加或减少。

20. 权利要求 19 的方法，其中固定的结合位点包括靶抗原，并且探针缀合物包括适于结合靶抗原的抗体。

21. 权利要求 19 的方法，其中探针缀合物包括酶。

22. 权利要求 19 的方法，其中样品通过毛细作用从反应室移动到检测室。

23. 权利要求 19 的方法，其中移动样品的步骤包括打开通气孔。

24. 权利要求 19 的方法，进一步包括基于从检测室接受的电信号对样品中靶抗原的量进行定量的步骤。

生物传感器设备及使用方法

相关申请

本申请作为部分继续申请要求 2002 年 3 月 21 日提交的名称为“直接免疫传感器测定”的美国申请系列号 10/105,050 和 2004 年 4 月 22 日提交的名称为“免疫传感器”的 10/830,841 的优先权，在此全文引入这两篇文献作为参考。

发明背景

已经采用了常规生化传感器，包括基于免疫测定的系统来报道多种分析物的存在和/或浓度。免疫测定通常分为两类：竞争测定和夹心测定。在竞争测定中，将测试样品中的抗原与抗原-探针复合物（通常称作报道复合物）混合，然后混合物竞争与抗体的结合。探针可以是放射性同位素、荧光团、或发色团。在夹心免疫测定中，测试样品中的抗原与抗体结合，然后第二抗体-探针复合物与抗原结合。在这些现有技术的测定方法中，通常需要一个或多个洗涤步骤。洗涤步骤在测定程序中导入了复杂性，并且会产生生物危险的液体废物。

免疫测定通常给用户提供了最常通过简单目测（如颜色改变）获得的定性结果（如“是/否答案”），或诸如抗原浓度的定量结果。大多数定量方法涉及昂贵的设备组，如闪烁计数器（用于监测放射性）、分光光度计、分光荧光计（参见，例如美国专利 No.5,156,972）、表面等离子共振仪（参见，例如美国专利 No. 5,965,456），等等。因此，开发便宜和简单的、足够适用于家庭或野外使用的免疫测定是有利的。所述生物传感器优选不需要离心、稀释、移液、洗涤或定时步骤，并且将产生很少的废物。

发明概述

此处公开了用于检测目的分析物和/或对目的分析物进行定量的生物传感器装置和方法。在一种实施方案中，提供了一次性的测定装置，用于检测流体样品中的靶分析物，该装置包含反应室，其中放置了固定的结合靶和探针缀合物（conjugate）。当将样品导入反应室中时，

在固定的结合靶、探针缀合物和/或靶分析物（如果存在）之间发生结合反应。在一种示例的实施方案中，如果存在靶分析物，其导致与固定的结合位点结合的探针缀合物的量改变。可以在检测室中检测这种改变。

固定的结合靶、探针缀合物和靶分析物可以包括多种公知的配体。例如，本领域技术人员可以理解，固定的结合靶、探针缀合物和靶分析物可以包括抗原或抗体、激素或神经递质和受体、底物或变构效应物和酶、凝集素和糖、DNA 或 RNA 结构，如适体和它们的结合种类（包括其它 DNA 或 RNA 种类或结合蛋白）、蛋白、生物素和亲和素或链亲和素系统、酶和它们的底物和抑制剂、脂质结合系统，及其组合。为了促进对此处描述的装置和方法的理解，将在下文描述免疫配体，装置将被称作免疫传感器或生物传感器。

一方面，上文提到的检测室包括电极和电化学反应试剂。例如，检测室中的电化学反应可以用于确定反应室中结合的探针缀合物的量是否由于靶抗原的存在而增加或减少。电化学反应也可以用于基于检测室中的探针缀合物的浓度而确定分析物（如靶抗原）浓度。

在一种实施方案中，固定的结合位点包括适于结合于靶抗原的抗体，探针缀合物包括适于结合于结合的靶抗原的抗体。如果靶抗原存在于流体样品中，固定的结合位点可以结合于靶抗原上的一个位点，探针缀合物可以结合于靶抗原上的另一个位点。因此，流体样品中靶抗原的存在导致了反应室中结合的探针的量增加和检测室中探针缀合物的量减少。

在另一种实施方案中，固定的结合位点包括靶抗原，探针缀合物包括适于结合于靶抗原的抗体。当将样品导入反应室时，如果存在靶抗原，它将与探针缀合物结合。结果，流体样品中靶抗原的存在导致反应室中与固定的结合位点结合的探针缀合物的量减少，可以移动到检测室的未结合的探针缀合物的量增加。可以通过检测室中的电化学反应检测结合的探针缀合物的减少和/或对结合的探针缀合物的减少进行定量。相反，固定的结合位点可以包括抗体，探针缀合物可以包括靶抗原。流体样品中靶抗原的存在将相似地导致反应室中结合的探针缀合物的量减少。

一方面，固定的结合位点和探针缀合物在反应室中混合。或者，

固定的结合位点和探针缀合物分开放置。例如，固定的结合位点可以位于干燥在反应室表面的磁珠上。当将液体样品导入反应室中时，可以用磁场保持磁珠和固定的结合位点不移动到检测室中。

在此处公开的另一种实施方案中，提供了检测流体样品中的靶抗原的方法。该方法可以包括将样品送递到包括反应室和检测室的生物传感器装置的步骤。使样品与固定的结合位点和位于反应室中的探针缀合物反应。然后将样品转移到检测室，该方法进一步包括对检测室中的探针缀合物进行电化学检测的步骤。检测步骤使得用户能够基于在检测室中检测的探针缀合物水平确定样品中是否存在靶抗原。该方法也可以包括基于从检测室接受的电信号对样品中的靶抗原进行定量的步骤。

附图简述

从以下详细说明，结合附图，可以更全面理解本发明，在附图中：

图 1 是此处公开的生物传感器的一个实施方案的顶视图；

图 2 是图 1 的生物传感器沿着线 A-A' 的剖视图；

图 3 是此处公开的生物传感器的另一个实施方案的顶视图；

图 4A 是图 3 的生物传感器沿着线 A-A' 的剖视图；

图 4B 是图 3 的生物传感器沿着线 B-B' 的剖视图；

图 4C 是图 3 的生物传感器沿着线 C-C' 的剖视图；以及

图 4D 是图 3 的生物传感器沿着线 D-D' 的剖视图。

发明详述

此处描述了生物传感器装置和使用方法。在一种实施方案中，传感器包括反应室和检测室。结合于目的分析物或与目的分析物相关的种类的固定的结合位点位于反应室内。该室中还有可以在检测室中检测的探针种类，其可以与能够结合于固定的结合位点的种类缀合，或可以结合于与固定的结合位点结合的种类。这在下文中称作探针缀合物。探针缀合物和固定的结合位点使得样品中目的分析物的存在改变了探针缀合物和固定的结合位点之间的相互作用。例如，当存在时，分析物可以阻断探针缀合物与固定的结合位点的结合。或者，分析物可以提供探针缀合物的结合位点，从而增加结合的探针缀合物的量。

在任意一种实施方案中，分析物的存在改变了反应室中结合的探针缀合物的量。

反应室的排列可以是这样的，其使得探针缀合物结合反应发生到需要的程度后，将来自反应室的液体转移到检测室，与它一起转移游离的探针缀合物，留下结合的探针缀合物。在检测室中，可以检测游离探针缀合物的量。例如，可以用检测室中的电极对检测室中探针缀合物的水平进行电化学检测。如果靶分析物存在/不存在，可以确定电化学反应，和/或基于检测室中探针缀合物的量确定靶分析物的浓度。

图 1 和 2 中举例说明的生物传感器 20 的第一种实施方案包括检测室 28 和反应室 22，检测室 28 包含电化学电池，反应室 22 包含固定的结合位点和探针缀合物。可以通过形成延伸通过电阻间隔材料 36 的片材的孔而制备检测室 28 和反应室 22。可以对孔成形，使得它限定反应室 22 和检测室 28 以及样品室 22、28 之间的样品通道 38 的侧壁。通过将孔从反应室 22 的近端 24 延伸到传感器 20 的边缘 37，也形成的样品入口 25。在一种实施方案中，片材 36 的厚度限定了反应室 22 和检测室 28 的高度，并且室可以具有相等的高度。根据该实施方案，检测室中的毛细作用力必须高于反应室中的毛细作用力。这可以通过修饰反应室和/或检测室的表面或通过给检测室添加诸如此处公开的填充材料而实现。

在另一种实施方案中，反应室 22 的高度大于检测室 28 的高度。例如，可以通过将多个内部片材 32、34、36 和/或外部密封片材 42、46 层叠在一起而制备高度大于检测室 28 的反应室 22。例如，在图 2 中，传感器 20 的中间片材 36 具有限定上述反应室 22 和检测室 28 的侧壁的孔。中间片材 36 夹在一个或多个额外的层 32、34 之间，额外的层 32 和 34 具有仅仅相应于反应室 22 的孔。至于检测室 28，层 32 和 34 限定室的端壁 60、62（即，顶面和底面）。在该实施方案中，检测室的端壁 60 和 62 包含可以通过连接工具进行电连接的电极 54 和 52，以测量电路。电极在下文中更详细地描述。

一方面，可以通过连接端 66 使电极 52 和 54 与仪表（未示出）连接。连接端使仪表（未示出）通过导电轨（未示出）与检测室 28 中的电极 52 和 54 电连通。与连接区 66 连接的仪表能够在检测室 28 中的电极 52 和 54 之间施加电位，并且检测电化学反应过程中产生的电信号。

在使用中，用户首先通过样品入口 25 将样品导入传感器的第一个室，即反应室 22。可以在毛细作用或芯吸作用的影响下将样品牵引到反应室中。反应室可以包括一个开放到大气中的通气孔 26，使得由样品排出的气体可以逃逸。样品将被牵引到第一个室中，直到填充到达反应室通气孔 26，在此将停止填充。选择反应室 22 的体积，以便至少等于，优选大于检测室 28 的体积。

图 1 中有阴影线的圆表示刺穿层 32、34 和/或 36，但不刺穿层 42 和 46 的孔 30。由于最初不刺穿层 42 和 46，检测室 28 的通向大气的唯一开口是通过开放到反应室 22 的通道 38。因此，当反应室 22 填充了样品时，空气截留在反应室 28 中，其基本上阻止填充样品。在样品首先接触检测室 28 的开口 38 和其接触开口 38 的远侧之间的时间中，少量样品可以进入检测室 28。但是，一旦样品将开口 38 到达检测室 28 之间完全润湿，不再发生检测室 28 的填充。

通气孔 56 到大气的开口使得截留在检测室 28 中的空气可以逃逸，从而使得检测室 28 可以用来自反应室 22 的反应的样品填充。可以以多种方式打开通气孔 56，例如，通过刺穿装置的外层，通过去除装置外层的一部分，和/或通过撕去装置的一部分。

当打开通气孔时，由于与存在于反应室 22 中的毛细作用力相比，检测室 28 中的毛细作用力增加，反应的样品将被牵引进入检测室 28。在一种实施方案中，通过合适地涂布检测室 28 的表面，或更优选地通过选择检测室 28 的毛细作用距离，使其小于反应室 22 的该距离，提供增加的毛细作用力。在这种实施方案中，毛细作用距离定义为室的最小尺寸。本领域技术人员可以理解，反应和/或检测室中的毛细作用力可以通过改变多种因素而产生。薄室中的毛细作用力讨论于例如名称为“防止毛细作用或芯吸作用填充装置的取样不足的方法”的美国专利.: 6,823,750，在此全文引入该文献作为参考。

图 3-4D 举例说明了生物传感器 120 的第二个示例的实施方案，其包括三个室。该免疫传感器除了反应室 122 和检测室 128 外，还包括填充室 107。传感器 120 可以由上文所述的多层形成，包括，例如，密封层 142、下层 134、间隔层 136，和上层 132。一方面，每层包含绝缘材料，而上层和下层 132、134 额外包括如下文更详细讨论的导电膜。通过去除传感器中不同点的层的部分，形成填充室 107、反应室 122 和

检测室 128。此外，暴露上层和下层 132、134 上的部分导电膜，提供了用于进行电化学反应的电极 152、154，并且提供了用于将传感器与仪表电连接的电接触区 101、102、103。

填充室 107 从患者或用户接受样品，并且提供了用于填充其它两个室的样品储存器。反应室 122 和检测室 128 与填充室 107 处于流体连通。为了辅助流体在各室间移动，检测室 128 可以包括最初关闭的通气孔 130。样品在反应室中反应后，打开通气孔 130，这样检测室 128 中的空气可以通过通气孔出去，使得来自反应室 122 的液体进入检测室。如上文针对通气孔 56 的讨论，通气孔 130 可以以多种方式打开，包括刺穿装置、去除外层和/或撕下装置的一部分（即，沿着穿孔撕开）。

传感器可以包括使得与下电极 152 电连接的电连接点 101 和使得与上电极 154 电连接的电连接点 102、103。虚线 106 表示限定上层 132 上的上电极 154 的导电膜中的断开处。该断开处是通过在铺展导电膜时对其定型，或通过在生产过程中建立断开处而制成。该断开处可以通过对膜进行刮擦，将膜的部分刮掉，对膜进行化学蚀刻，对膜进行激光消融，或其它公知方法制成。导电膜中断开处 106 的部分作用是通过使检测室中的导电涂层与反应室中的该涂层电绝缘而限定条带的活性电极区。这是有利的，因为它可以防止原本在反应室中的导电膜上流动的电信号影响测试结果。

传感器 120 也可以包括接触点 103，其使得用户能够电连接与反应室 122 接触的导电膜的一部分。当反应室 122 填充样品时，监测接触点 103，使得能够检测到信号，该信号指示给仪表，条带成功填充并且可以开始测试顺序。为了采用图 3-4D 中示出的本发明的实施方案实现该目的，可以在接触点 101 与下导电膜进行电连接，在接触点 103 与反应室中的上导电膜进行电连接。然后可以在两个连接点（101，103）之间施加电位，并且监测电流、电压和/或电阻，以便确定样品何时进入反应室。该电位可以是直流电位或可以是随时间改变的电位，如交流电位或具有交替极性的方波电位脉冲。通过监测由于电位的施加而流动的电流，或需要通过预定电流的电压，我们可以获得反应室中的导电膜何时开始变湿的指示。

用于电接触带有下导电膜的下层 134 的连接区 101 可以通过将下层 134 延伸通过间隔层 136 和上层 132 而形成。接触区 102 是通过去除

层 134 和 136 的部分以暴露上层 132 的一部分而形成。接触区 103 是通过如图 4D 中所示去除下层 134 和间隔层 136 的一部分而类似地形成（图 3 中的 D-D' 剖视）。

填充室 107 可以通过去除下层 134 和间隔层 136 的部分，但使上层 132 和密封层 142 保持完整而形成。密封层 142 可以粘附于层 134 的外表面，并且与层 134 和 136 以及层 132 中的切断部分的侧面一起形成能够通过毛细作用将样品牵引到其中的毛细管道。图 4A 中举例说明了该管道（图 3 中的 A-A' 剖视）。

反应室 122 是通过除去间隔层 136 的一部分，但使层 134 和 132 保持完整而形成的。这形成了毛细间隙，其中毛细间隙的高度小于填充室 122 的高度。这使得毛细作用力能够通过毛细作用将液体从填充室 122 牵引到反应室 128 中。反应室的小高度可以允许在反应室中相对迅速地混合各成分。一方面，反应室 122 在条带的侧缘打开，使得能够通气，而液体填充反应室。

检测室是以与反应室 122 相似的方式形成的，是通过去除间隔层 136 的一部分同时使层 134 和 132 保持完整而形成的。最初，检测室 128 在一端开口到反应室 122，但没有其它开口。

通过去除上层 132（或下层 134）的部分或将其刺穿，将通气孔 130 引入检测室 128。图 4B 示出的层 146（图 3 中的 B-B' 剖视）可以层压到条带的上表面，以便拆开开口。或者，如果去除上层 134 的一部分，可以刺穿/去除密封层 142，以打开通气孔 130。

当液体样品填充反应室 122（作为填充过程的一部分）时，它将渡过检测室 128 的开口。因此，当液体填充反应室 122，使得它流过检测室 128 的开口时，空气截留在检测室 128 中，防止进一步的液体进入。这使得液体能够保留在反应室 122 中，而结合反应能够进行。预定的时间后，当反应室 122 中可能存在的任何结合反应进行到需要的程度时，通过刺穿工具刺穿（或去除/撕下）层 142 或 146，使得空气逃逸出检测室 128，这样液体从反应室 122 转移到检测室 128。检测室的横断尺寸使得毛细作用能够填充反应室。

本领域技术人员将理解，此处描述的免疫传感器可以具有多种可选择的构型，例如，传感器的形状、室的数目、电极构型和/或电接触点的放置。例如，说明多种可选择的传感器实施方案的其它传感器装

置公开于与本申请一起提交的名称为“用于电化学分析的方法和设备”的美国申请中，在此全文引入该美国申请作为参考。此外，本领域技术人员将理解，尽管举例说明的传感器采用通气孔来控制室间的液体流动，也考虑其它的液体引导实施方案。例如，可以去除或打开反应室和检测室之间的物理屏障，使流体能够在室之间流动。此处描述的传感器也可以包括泵元件，使流体通过装置运动。

本发明的免疫传感器包括上文描述的电极 52、152 和 4、154。在某些实施方案中，可以使用除附图中举例说明的相对关系之外的电极构型，例如，并列关系或错位关系。电极的大小可以是相同或基本相似的，或可以是不同的大小和/或不同的形状。电极可以包含相同的导电材料或不同的材料。电极构型、间隔和构造或制作的其它变化对本领域技术人员是显而易见的。

在一种实施方案中，电极以平行相对的关系安装，距离小于或等于 500、450、400、350、300、250 或 200 微米，更优选是大约 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 微米 - 大约 75、100、125、150 或 175 微米。但是，在某些实施方案中，可能优选的是电极间隔大于 500 微米，例如，600、700、800、900 或 1000 微米，或甚至大于 1、2、3、4 或 5 毫米。

至少一个电极可以是传感电极，即，在抗氧化情况下对还原的氧化还原剂的量敏感的电极，或在氧化剂情况下对氧化的氧化还原剂的量敏感。在电位测量传感器的情况下（其中传感电极的电位指示存在的分析物水平），存在作为参比电极的第二电极，其提供参比电位。在电流测量传感器的情况下（其中传感电极的电流指示样品中的分析物水平），存在至少一个其它的电极，其作为对电极使电路完整。第二电极也可以作为参比电极。或者，额外的电极（未示出）可以行使参比电极的功能。

一方面，限定电极 52、152、54、154 的导电膜可以通过粘合剂粘附于免疫传感器的表面。合适的粘合剂包括，例如，热活化的粘合剂、压力敏感的粘合剂、热固性的粘合剂、化学固性的粘合剂、热融性粘合剂、热流粘合剂等。在替代的方面，通过将用合适的导电材料涂布（如通过溅射涂布或丝网印刷）一片电阻材料而制备导电膜，所述导电材料例如铂、钯、碳、氧化铟；氧化锡、混合的氧化铟/氧化锡、金、

银、铍，其混合物等。适于用作电极的材料应当与传感器 20、120 中存在的试剂相容。合适的电阻材料包括，例如，聚酯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚烯烃，其混合物等。

用于免疫传感器中的试剂，如固定的抗体/抗原、探针连接的抗原/抗体、缓冲液、介质、酶底物等可以支持在反应室 22、122 的壁上，或在包含在室内的独立支持物上、在基质内，或可以是自我支持的。如果试剂支持在室壁或电极上，可以通过采用本领域公知的印刷技术，如喷墨印刷、丝网印刷、平版印刷等施加化学物质。在替代的实施方案中，将含有试剂的溶液施加到室内的表面上，并且干燥。

在此处描述的免疫传感器的另一种实施方案中，免疫种类和/或电化学试剂可以支持在一种或多种置于传感器中的独立支持物上，和/或包含在其中。合适的独立支持物包括，但不限于，网孔材料、非编织的片材、纤维填料、大孔膜、烧结粉末，和/或珠子。独立支持物的优点包括表面积增加，这使得更多的固定的结合位点和探针缀合物包含在反应室 22、122 中。在一种实施方案中，将固定的抗体和/或探针缀合物干燥到支持材料上，然后将支持材料置于反应室中。或者，将固定的结合位点或探针缀合物掺入支持材料上，将其它成分支持在反应室壁上。在另一种实施方案中，反应室壁是多孔的，其中掺入了固定的结合位点和/或探针缀合物。这是通过以下方式实现的，即采用大孔膜形成反应室壁，并且将膜敷在反应室周围以防止样品渗漏到需要的区域外。

合适的独立支持物包括诸如网孔材料、非编织片材和包括聚烯烃、聚酯、尼龙、纤维素、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚砒、其混合物等的纤维填充材料的材料。合适的大孔膜可以由包括聚砒、聚偏二氟乙烯、尼龙、乙酸纤维素、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、其混合物等的聚合物材料制备。

在一种实施方案中，固定的结合位点和/或探针缀合物支持在珠子上。所述珠子可以包含聚合物材料，如琼脂、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯，任选包裹了磁性材料（如 $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ 和 Fe_3O_4 ）。选择珠子的材料，以便给抗体提供合适的支持。合适的珠子可以包括挪威的 Dynal Biotech of Oslo 以商标 DYNABEADS® 出售的那些。任选地，可以包含磁铁，以便将磁珠保持在反应室中，防止它们移动到检

测室中。例如，固定的结合位点可以位于反应室内的磁珠上。

用传感器确定抗原存在与否

如上文的讨论，传感器 20、120 可以包括固定的结合位点和探针缀合物。尽管以下说明是参照图 2 的传感器作出的，它明显地也适用于传感器 120。

在一种实施方案中，固定的结合位点 44 是要检测的抗原的抗体，并且探针缀合物 50 是连接于要检测的抗原的酶或要检测的抗原的假抗原。

抗体 44 可以吸附或以其它方式固定在其上，使得它们在测试过程中不离开反应室。任选地，在将抗体 44 施加在反应室的内表面上之后，可以施加设计用于防止蛋白与该表面的非特异性结合的试剂（未示出）。本领域公知的所述试剂的实例是牛血清白蛋白（BSA）。也可以将非离子型表面活性剂用作所述试剂，如 Rohm & Haas of Philadelphia, Pa.生产的 TRITON X100 或 ICI Americas of Wilmington, Del 生产的 TWEEN。优选地，选择的非离子型表面活性剂不使蛋白变性。

与抗体间隔开的是探针缀合物 50（酶连接的抗原）。用于探针缀合物 50 的合适的酶包括但不限于葡萄糖氧化酶和葡萄糖脱氢酶。酶连接的抗原 50 可以沉积在反应室内，沉积的方式是当被样品润湿后它可以释放到样品中。例如，酶连接的抗原 50 可以在反应室的表面上干燥，使得酶连接的抗原 50 和反应室之间仅仅存在弱键。一方面，选择酶连接的抗原 50 的溶解速度，使得在样品填充反应室的时间中探针缀合物溶解在样品中。以此方式，酶连接的抗原 50 可以在填充后均匀分布在反应室的区域中。

一方面，可以选择酶连接的抗原 50 和抗体 44 的相对量，使得抗体 44 相对于酶连接的抗原 50 是过量的。一方面，过量限定为当与样品中要检测的抗原分子的数目相比时，过量是小的。

这样，当样品填充反应室时，酶连接的抗原 50 与样品混合。然后使酶连接的抗原 50 与抗体 44 接触足够的时间。由于存在过量的抗体 44，如果样品中不存在抗原，那么基本上所有的，或大部分酶连接的抗原 50 将结合于抗体 44，因此有效固定。如果样品中存在靶抗原，靶

抗原将接触并结合抗体 44，阻断至少一些酶连接的抗原 50 与抗体 44 的结合。因此，当样品中存在靶抗原时，在反应步骤末，酶连接的抗原 50（或至少其可测量的部分）将在样品中保持可移动，并且可以移动到检测室中。相反，如果样品中不存在靶抗原，则酶连接的抗原 50 将固定在 48 反应室中（或样品中保持可移动的量的至少可测量的减少）。本领域技术人员可以理解，过量的抗体 44 不是必须的，或者，酶连接的抗原 50 和抗体 44 的相对量是相同的，或可以存在过量的酶连接的抗原 50。

在第二种实施方案中，固定的结合位点 44 是可以结合于靶抗原上的位点的抗体，探针缀合物 50 包括与能够结合于结合的靶抗原的抗体偶联的酶。采用固定的结合位点和探针缀合物的抗体的优点是，靶结合试剂可以在制造条带的过程中紧密混合并一起干燥。结合靶必须扩散的距离可以更短，其可能缩短进行测定所需要的时间。

当样品进入反应室时，反应室中固定的结合位点可以结合于目的分析物上的一个位点。探针缀合物可以包括第二抗体，其与连接于固定的结合位点的靶抗原上的第二位点结合。当含有目的分析物的样品填充反应室时，探针缀合物和固定的结合位点与样品混合，目的分析物在一个位点与探针缀合物结合，在第二个位点与固定的结合位点结合。因此，分析物形成固定一部分探针缀合物的连接物，其中固定的部分可以用于检测样品中分析物的存在和/或对其浓度进行定量。例如，可以通过观察转移到检测室中的游离探针缀合物的量的减少而对固定的探针缀合物的量进行定量。

在另一实施方案中，固定的结合位点 44 可以是靶抗原，探针缀合物 50 可以包括与能够结合目的分析物的抗体偶联的酶。优选地，固定的结合位点和探针缀合物在反应室中是分开放置的，以防止或减少在导入样品前的任何反应。

当含有靶抗原的样品填充反应室时，样品中的靶抗原可以结合探针缀合物（抗体），减少结合于固定的结合位点（抗原）的探针缀合物的量。因此，靶抗原的存在与否改变反应室中探针缀合物的量。固定的部分可以用于检测样品中分析物的存在和/或对其浓度进行定量。例如，可以通过观察转移到检测室中的游离探针缀合物的量的减少而对固定的探针缀合物的量进行定量。

一方面，固定的结合位点和/或探针缀合物结合于珠子。例如，固定的结合位点（抗原）可以位于干燥在反应室的一个表面上的珠子上，并且探针缀合物（抗体）可以干燥在反应室的另一个表面上。珠子可以是磁珠，以便通过磁场防止离开反应室。当样品填充反应室时，样品中的抗原结合探针缀合物的抗体，并且防止固定的结合位点（抗原）结合探针缀合物，从而使探针缀合物保持游离，以便转移到检测室中。

如上文所述，珠子可以具有使得当样品转移到检测室时它们将保留在反应室中的特征。例如，顺磁珠可以沿施加的磁场的场力线排列，使它们被磁场维持，由此防止随样品转移到检测室。可以通过诸如电磁铁的任何合适的装置施加磁场，或者，在替代的实施方案中，当需要使电力消耗最少时，可以通过永磁铁施加磁场。在一种实施方案中，可以以特定方式放置磁铁，使它们与反应室中探针缀合物的位置和反应室中顺磁珠的位置更近。采用这种排列，珠子在磁场的影响下将倾向于向探针缀合物移动，并且与其混合。一旦珠子移动到探针缀合物并与其混合，施加的磁场将倾向于防止珠子移动到具有更低浓度的磁场线的位置，因此，珠子将通过磁场固定在反应室中。

无论固定的结合位点和探针缀合物的构型如何，样品在反应室内反应后，反应的样品将移动到检测室。这可以在样品导入反应室后在预定的时间发生。例如，可以设定预定的时间，使得存在足够的时间使基本上所有的探针缀合物发生结合。一方面，可以由用户手工计算样品在反应室中的存留时间。或者，可以通过与传感器电接触的仪表进行电子计算。

在一种实施方案中，通过电极监测样品在反应室中的存留时间。例如，在图 1 和 2 的传感器中，当样品填充反应室 22 时，样品将润湿检测室 28 的一小部分，即通向反应室 22 的开口 38 处。电极 52 和 54 可以置于检测室 28 中，使得在填充反应室 22 的过程中电极 52 和 54 的每一个的至少一部分被样品接触，使得样品的存在将联通电极 52 和 54，并且产生可以用于引发定时装置的电信号。在另一种实施方案中，如图 3 和 4 的传感器所示，与下电极和接触区 101 一起使用的分开的电接触（接触点 103）可以检测反应室中样品的存在。

在样品进入反应室后的预定时间，认为完成了测试的免疫反应阶段。然后，可以将通气孔 30、120 开放到大气。例如，可以用仪表中

的螺线管活化的针头刺穿覆盖通气孔的层。刺穿可以由仪表自动进行或由用户手工进行，例如，用户将针头插入通过覆盖通气孔的层。

任选放置于检测室 28、128 中的是干燥的试剂 64，其包含酶底物和介质，能够与探针缀合物的酶部分反应，产生可检测的信号。如果存在酶底物和介质，它们可以是足够的量，以便通过存在的酶量确定与酶底物一起存在的任何酶的反应速度。例如，如果酶是葡萄糖氧化酶或葡萄糖脱氢酶，则将合适的酶介质和酶底物，如葡萄糖（如果没有存在于样品中）置于反应室 28、128 中。在一种替代的实施方案中，将足量的葡萄糖置于检测室 28、128 中，使得进入的样品中葡萄糖水平的任何改变都不会显著改变酶反应速度。也可以引入缓冲液，以辅助调节检测室 28、128 中样品的 pH。在一种实施方案中，铁氰化物是合适的介质。其它合适的介质包括二氯靛酚和过渡金属与含氮杂芳种类之间的复合物。此外，可以加入促进电子更有效从酶转移到铁氰化物种类的第二介质，如 phenazine ethosulphate 和/或 2,3-二甲氧基-5-甲基-p-苯醌。酶底物、介质、第二介质和缓冲试剂 64 可以足量存在，使得酶与酶底物的反应速度受到存在的酶浓度的限制。

当填充检测室 28、128 时，将试剂 64 溶解于样品中。探针缀合物的酶成分与酶底物和介质反应，产生还原的介质。该还原的介质在检测室 28、128 中作为阳极的电极上电化学氧化，产生电流。在一种实施方案中，该电流随时间改变的速度用作反应的样品中酶的存在和存在的酶量的指示物。如果电流的改变速度小于（或大于）预定的阈值，则表明反应的样品中不存在显著量（或存在显著量）的探针缀合物 50，表明存在（或不存在）原始样品中存在的抗原。相反，大于（或小于）预定阈值的电流改变速度可以用于表明样品中缺乏（或存在）抗原。在一种实施方案中，电流的改变速度用于得出最初存在于样品中的抗原的相对量的测量值。例如，电流的改变速度可以用于确定探针缀合物浓度，其可以与样品中抗原的浓度相关联。

用蜂毒肽作为探针

在一种实施方案中，可以将包含抗原-蜂毒肽复合物的探针连接的抗原干燥在上文所述的反应室壁上。检测室可以包含介质，该介质包括脂质体或脂质泡中的铁氰化物。如果抗原-蜂毒肽复合物到达脂

质体，它们将爆裂，并且释放铁氰化物。这导致信号的迅速放大，即，小量的游离抗原与抗原-蜂毒肽复合物竞争抗体上的结合位点，并且导致高浓度的铁氰化物。

将辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶用于电化学测定中

常规 ELISAs 用辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(AP)作为量热测定中的酶。但是，开发了使这两种酶都能用于电化学测定的底物。在该实施方案中，Ap 可以与磷酸对氨基苯酯一起使用，HRP 可以与四硫富瓦烯一起使用。

以下非限定性的实施例说明了本发明的原则和实施。本发明范围和精神内的许多其它实施方案对本领域技术人员将是显而易见的。

实施例

进行了对全血中的人 C 反应蛋白的示例的免疫传感器测定，其中采用包被了人 C 反应蛋白的磁珠。

将 C 反应蛋白 (CRP) 与 1.5 微米的羧化 BioMag 磁珠(Cat no BM570; Bangs Laboratories, Indianapolis In, USA)共价结合。用 pH 5.2 的 50mM MES (吗啉代乙磺酸(Sigma-Aldrich, St Louis, MO USA))缓冲液将 21.9 mg 珠子(1 ml)洗涤 4 次，这是通过用该缓冲液温育，并且用磁铁将珠子聚集在试管侧面，2 分钟后用转移液管除去缓冲液。第 4 次洗涤后，将珠子悬浮在终体积 0.34 ml 的 50mM MES 中。加入 40 ul 100 mg/ml EDAC (Sigma, St Louis, MO USA)，5 分钟后，加入溶于磷酸缓冲液 (Hyttest, Turku Finland)中的 450 ug CRP。在室温下将珠子再温育 30 分钟。按照上文所述用磁铁聚集珠子，以除去未结合的 CRP。然后通过含有 20mM Tris (2-氨基-2-羟甲基)-1,3 丙二醇)、0.15 M 氯化钠 pH 7.4 (TBS) 和 1mg/ml 牛血清白蛋白(BSA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO USA) 的缓冲液中温育 30 分钟而封闭珠子，然后通过磁聚集在相同的缓冲液中洗涤 4 次。将珠子储存在含 0.05% 叠氮化钠 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO USA)的 TBS/BSA 中。

葡萄糖脱氢酶/抗体缀合物

根据 O Sullivan 等(Anal. Biochem. 100 100-108 1979)描述的方

法，用试剂 MBS (M-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯)完成葡萄糖脱氢酶(重组大肠杆菌酶；Kiikoman Corporation, Chiba, Japan) GDH 和单克隆抗体 4C28 克隆 C2 (Hyttest, Turku Finland)的缀合。

在该实施例中，MBS 与 GDH 上的氨基反应，并且纯化 MBS-GDH 中间体。然后使 SMCC-GDH 复合物上的马来酰亚胺基团与抗体的铰链区上的游离巯基反应，所述游离巯基是通过与还原剂盐酸半胱胺反应而导入的。

1. IgG 铰链区二硫化物的还原

37℃下用 1ml 溶液与 6mg 盐酸半胱胺(Sigma-Adrich, St Louis, MO USA)一起温育 90 分钟，所述溶液含有溶于缓冲液中的 2 mg/ml Mab C2，所述缓冲液含有 0.1M 磷酸钠 pH 7.4；0.15 M NaCl 和 2.5 mM EDTA (反应缓冲液)。通过将混合物施加到在反应缓冲液中平衡的脱盐柱(PD-TO; Amersham)，并且在相同的缓冲液中继续洗脱而终止反应。收集 0.5 毫升的级分，将含有大多数蛋白的三个级分合并。在合并后使该材料立即与马来酰亚胺活化的酶反应。假定 1mg/ml 抗体 C2 的溶液在 280nm 的吸光度是 1.35，从而确定蛋白浓度。

2. 酶的马来酰亚胺活化

在将 2mg GDH 溶于 1.0ml 反应缓冲液的同时，加入 50ul 含有溶于 DMSO 的 7.6 mg/ml MBS (Pierce Rockford III USA)的溶液，并且 37℃下温育 30 分钟。通过将混合物施加到在反应缓冲液中平衡的脱盐柱 (PD-TO; Amersham)，并且在相同的缓冲液中继续洗脱而终止反应。收集 0.5 毫升的级分，将含有大多数蛋白的三个级分合并。

3. 抗体与酶的缀合

以 1 mg Ab 比 0.9 mg GDH 的比例将还原的 IgG 和马来酰亚胺反应的 GDH 混合在一起，4℃下温育过夜。通过以下步骤终止反应：加入 6mg 盐酸半胱胺并且在室温下再温育 15 分钟，然后将 1.5 ml 等分物施加到分开的、用含有 20 mM Tris 和 0.15 M 氯化钠 pH 7.4 (TBS)的缓冲液平衡的脱盐柱，并且在相同的缓冲液中继续洗脱。合并每个柱的含

有最高浓度蛋白的三个 0.5ml 的级分。加入氯化钙到 1mM 的终浓度，叠氮化钠到 0.1%的终浓度，PQQ 到 0.05 mg/ml 的终浓度。使用前在 4℃ 储存缀合物。

C 反应蛋白的常规免疫测定

也通过常规酶免疫测定确定样品中的 CRP 水平。所有温育都是在室温下进行。

用溶于 TBS 缓冲液中的 50 ul 10 ug/ml 多克隆抗体 C2 包被 Immulon 11 微量滴定板的孔，在室温下持续 60 分钟。通过倒置和轻敲板子而除去未结合的抗体，然后用含有 0.1% TWEFN 20 (聚氧乙烯山梨聚糖一月桂酯; Sigma-Adrich, St Louis, MO USA)的 200 ul TBS 缓冲液洗涤孔 4 次。

然后将 50 ul 已知的标准物或通常在 TBS/TWEEN 中稀释 100 - 1000 倍的含有未知量 CRP 的样品加入每个孔，再温育 1 小时。然后通过上文描述的洗涤过程除去未结合的抗原。随后加入溶于 TBS/TWEEN 的 50 ul 220 ng/ml 的生物素化的 C6 抗体溶液，再温育 60 分钟。洗去未结合的第二抗体后，加入 50ul neutravidin-辣根过氧化物酶的 1/1000 稀释液(Pierce Rockford III USA)，使反应继续进行 15 分钟。最后，洗涤除去未结合的酶后，通过加入 ABTS 底物 (Pierce Rockford III USA) 检测结合的酶。

通过以下方法进行抗体 C6 的生物素化。将 2 毫克单克隆抗体 C6 (Hytest, Turku Finland) 溶于 1ml 50 mM 重碳酸钙，与 29ul 溶于二甲亚砷(Sigma)的生物素 N 羧基琥珀酰亚胺酯(Pierce)的 1mg/ml 溶液反应。在偶然振荡的条件下使反应进行 30 分钟。通过将混合物施加到在含有 20mM Tris (2-氨基-2-羟甲基)-1,3 丙二醇)、0.15 M 氯化钠 pH 7.4 (TBS)的缓冲液中平衡的脱盐柱(PD-10; Amersham)，并且在相同的缓冲液中继续洗脱而终止反应。收集 0.5 毫升的级分，将含有大多数蛋白的三个级分合并。将材料在 4℃ 储存。假定 1mg/ml C6 溶液在 280nm 的吸光度是 1.2，从而通过吸光度确定蛋白浓度。

传感器条带

按照如下构建传感器条带：

1) 电极由 178 μm 厚的 Melinex 组成，其上溅射涂布了一层金。金涂层的表面电阻是 8-12 ohms/sq。

2) 用 0.3 mM 2-巯基乙磺酸的溶液涂布电极 20 秒，然后通过喷气干燥。该程序使电极保持亲水，并且减少空气携带的烃和其它污染物导致的污垢。

3) 用箔材处理将化学物质（如上文描述的试剂）的条带干燥到电极上。将箔材转移通过固定的刀片，该刀片在工作电极的表面产生刻痕，并且辅助限定工作电极的区域。然后将该箔材转移通过连接于注射泵的两个钝尖的不锈钢移液针头，使以下物质沉积：

- 电化学试剂（铁氰化物、葡萄糖等），使其覆盖刻痕，和
- 位于刻痕另一侧的抗体 - 酶缀合物，距离电化学试剂大约 1 - 2mm。

4) 用红外线干燥器和热空气在 50 摄氏度干燥化学物质条带。

5) 用旋转压切工具在间隔物中压切出反应室和检测室形状。

6) 将间隔物层压到电极上，层压的方式使得抗体 - 酶缀合物位于反应室中，电化学试剂位于检测室中。

7) 用凸/凹模具组将填充室冲压到双层中。

8) 将结合于顺磁珠的抗原梳刷到分开的电极膜上。

9) 然后将具有顺磁珠的电极键合到来自步骤(6)的双层，其方式使得抗原 - 珠条带与反应室中的抗体 - 酶缀合物相对。

10) 用凸/凹模具组将每个传感器中的通风孔冲压到三层中。

11) 用“魔力胶带”（3M）覆盖通风孔和填充室的开口侧。

12) 使三层的箔材一体化(singulated)，以产生工作电极。

GDH 的电化学检测

溶液中含有溶于缓冲液中的 5 mg/ml 2,3 二甲氧基-5-甲基 1,4-苯醌 (Adrich, WI USA)、326mg/ml 铁氰化钾、400mM 葡萄糖，所述缓冲液含有 0.26mg/ml 柠康酸(Sigma)和 13.3mg/ml 柠康酸二钾。

缀合物

含有 400 $\mu\text{g/ml}$ GDH 的溶液在含有 1mM 氯化钙、10mg/ml BSA、0.26mg/ml 柠康酸、13.3mg/ml 柠康酸二钾和 10 mg/ml 蔗糖的溶液中稀

释到 100ug/ml。

磁珠

溶液中含有 5mg/ml CRP 包被的珠子、100mg/ml 蔗糖、1mM 氯化钙、0.26mg/ml 柠檬酸(Sigma)和 13.3mg/ml 柠檬酸二钾。

样品制备

将血细胞比容为 42%，血浆浓度为 1ug/ml CRP 的正常肝素化全血用于以下实验。（CRP 血液）。在 100ul 全血中加入 10ul 溶于磷酸缓冲液中的 2.5 mg/ml CRP 溶液。在另一个 100ul 样品中加入 10ul 磷酸缓冲液作为对照。

测试程序

在填充室（图 3 的 107）中加入大约 5ul 血液。使血液流入填充室 107 和反应室 122，在接近检测室 128 的入口时停止。血液使来自反应室 122 壁的缀合物溶解并且与磁珠相互作用，所述磁珠由于反应室 122 下的磁铁的存在被牵引到反应室底部。没有添加 CRP 时，大多数缀合物将能够结合磁珠。

温育 40 秒后，刺穿图 3 中的通气孔 130。这使血液与未结合的 GDH 缀合物一起流过刻痕线（106）进入检测室，在此开始了在检测室中电极间流动的电流的测量。在接下来的 45 秒中测量由检测室中 GDH 的存在产生的电流。下面的结果是对照血液或含有 250ug/ml CRP 的血液的六次重复样品。它们显示了填充检测室 128 后 5 秒和 45 秒时以 μA 表示的电流。5 秒和 45 秒的电流差异用作样品中 CRP 浓度的量度。

对样品				加入 250 ug/ml CRP			
	5 秒	45 秒	差异	5 秒	45 秒	差异	
	19.01	27.72	8.71	24.26	40.8	16.54	
	16.99	26.45	9.46	20.32	37.25	16.93	
	20.05	28.41	8.36	26.39	47.25	20.86	
	18.81	31.1	12.29	25.12	50.44	25.32	
	16.75	24.0	7.05	20.41	39.09	18.68	
	22.94	34.22	11.28	17.93	35.77	17.84	
平均值			9.525			19.36	
标准差			1.77			1.55	

如上表中所示，在对照样品和加入了 250 ug/ ml CRP 的样品之间存在电流改变速度的显著差异。这样，免疫传感器就能够检测样品中 CRP 的存在。

基于上文描述的实施方案，本领域技术人员可以理解本发明的其它特征和优点。因此，本发明不限于具体显示和描述的内容，而是由所附权利要求指出。在此特意全文引入在此引用的所有公开文献和参考文献作为参考。

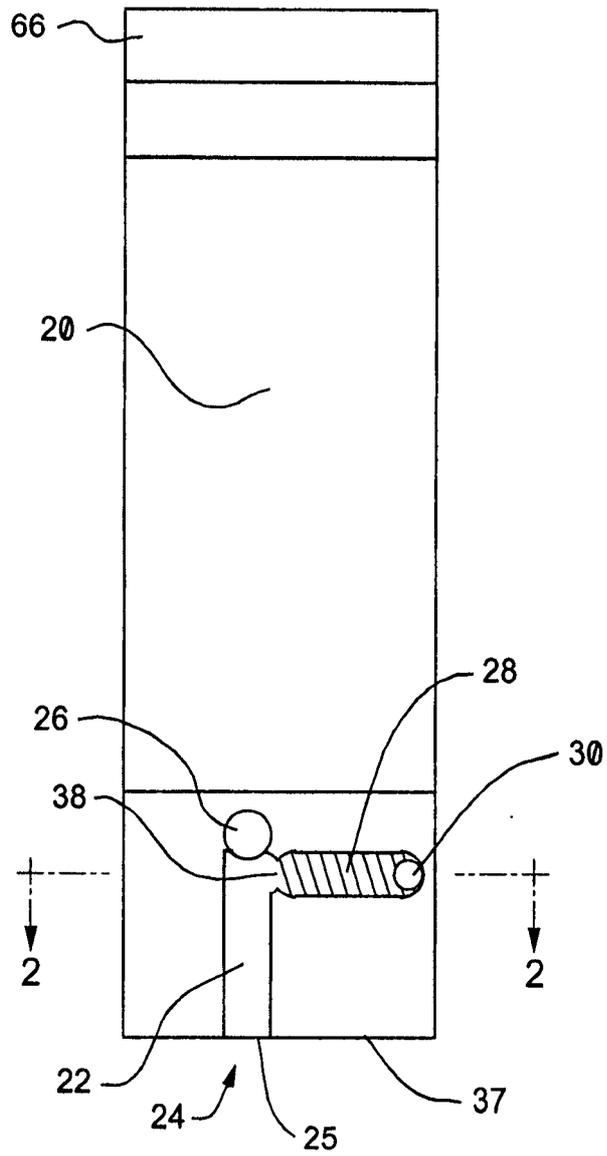


图 1

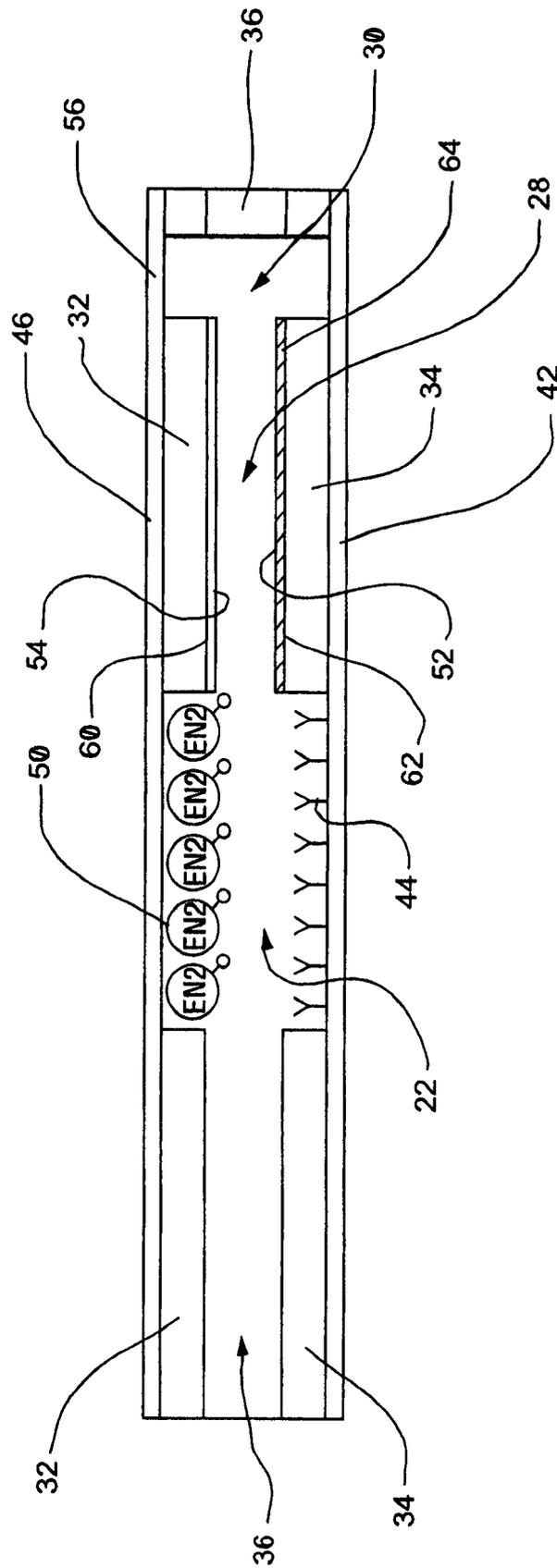


图 2

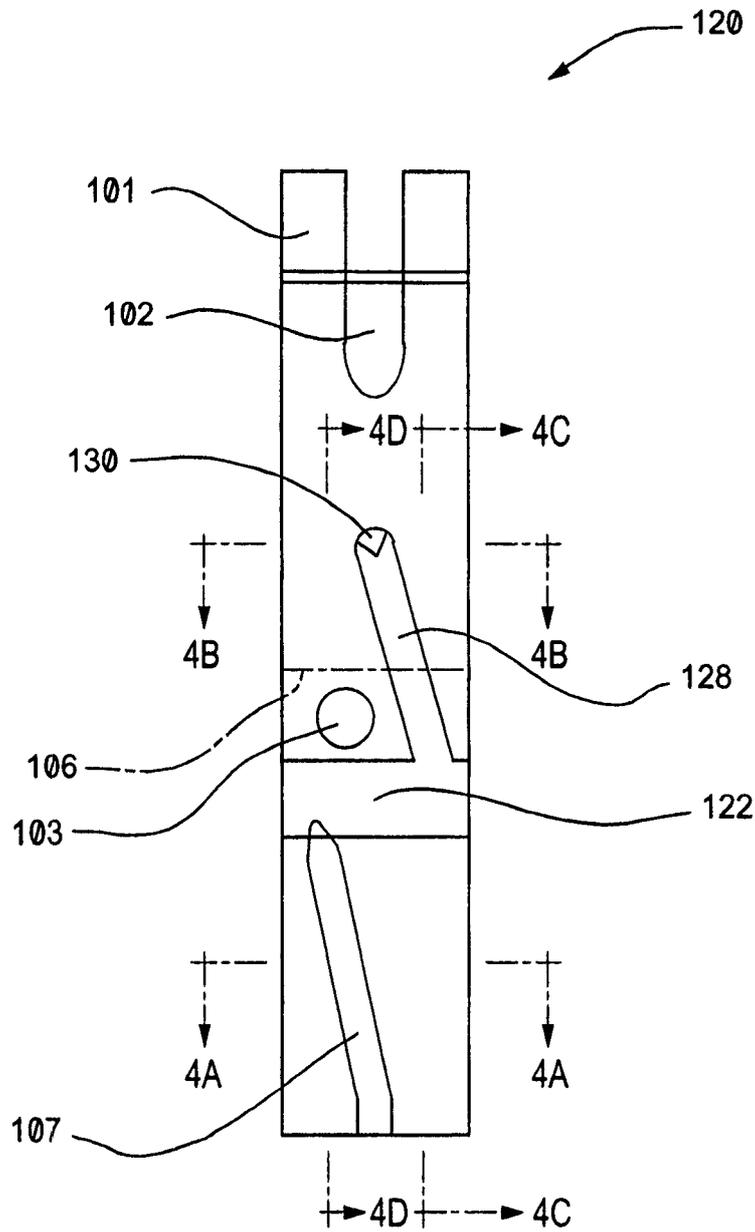


图 3

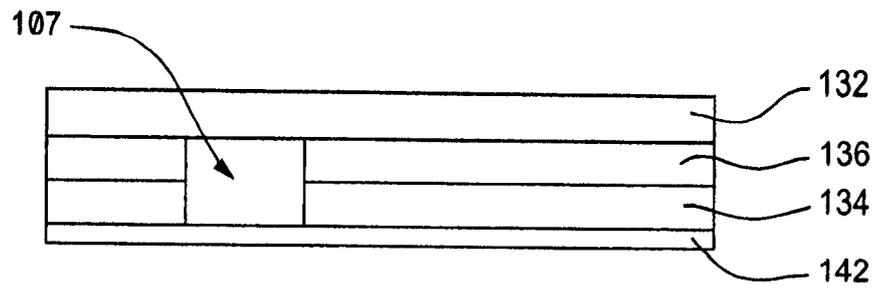


图 4A

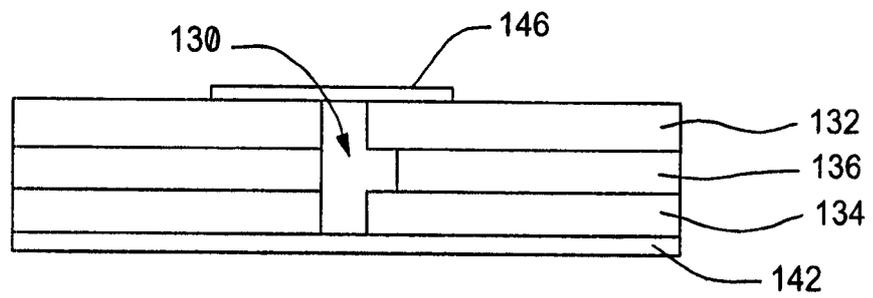


图 4B

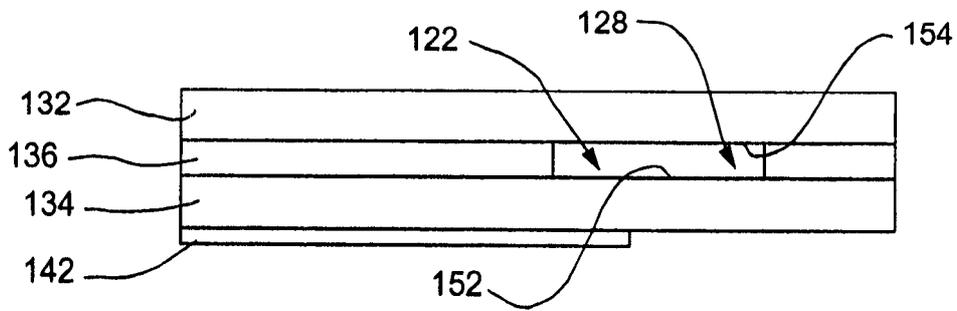


图 4C

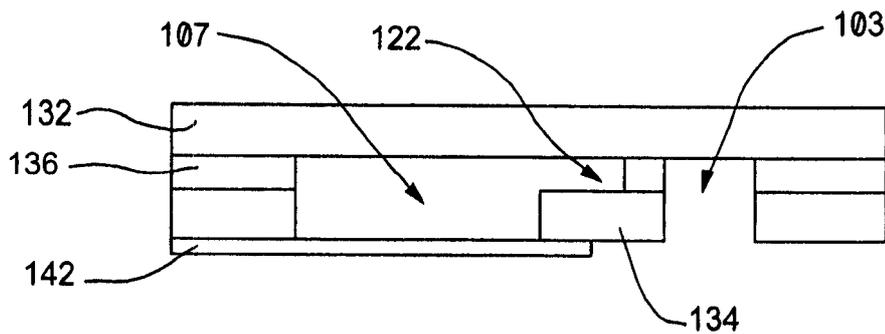


图 4D

专利名称(译)	生物传感器设备及使用方法		
公开(公告)号	CN1975421A	公开(公告)日	2007-06-06
申请号	CN200610149310.5	申请日	2006-11-21
[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	D赖拉特 A霍奇斯 R沙特利耶		
发明人	D·赖拉特 A·霍奇斯 R·沙特利耶		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/26		
CPC分类号	G01N33/54326 Y10T29/49124 G01N33/5438 G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	李波 梁谋		
优先权	11/284097 2005-11-21 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

此处公开了用于检测目的分析物的存在的方法和装置。生物传感器可以包含反应室和电化学检测室。反应室可以包含至少一个固定的结合位点和适于结合靶分析物和固定的结合位点中至少一个的探针缀合物，而检测室可以包含用于检测电化学反应的电极。如果存在靶分析物，流体样品中的靶分析物导致反应室中结合的探针缀合物的量增加，这可以在反应室中进行电化学检测。