



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113272647 A

(43) 申请公布日 2021.08.17

(21) 申请号 201980081642.X

(22) 申请日 2019.10.24

(30) 优先权数据

62/750,260 2018.10.25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.06.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2019/051150 2019.10.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/084620 EN 2020.04.30

(71) 申请人 以色列国农业和农村发展部农业研

究组织 (ARO) (佛卡尼中心)

地址 以色列里雄莱锡安市

(72) 发明人 埃尔兹托夫·叶夫根尼

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

代理人 肖华

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

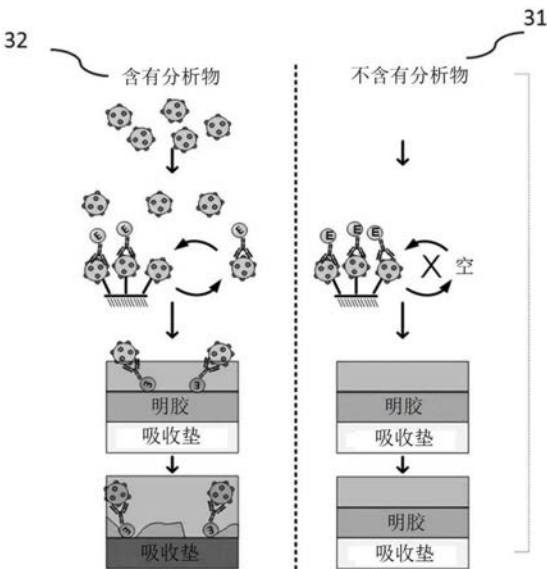
权利要求书4页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

用于液体样品的即时检测分析的装置和方法

(57) 摘要

一种用于快速、现场识别分析物的传感器，其特征在于：(a) 样品层；(b) 至少一个反应层，其与所述样品层互连；(c) 至少一个报告物层，其与所述反应层互连；(d) 至少一个阻止层，其与所述报告物层互连；以及 (e) 吸收垫，其与所述阻止层互连；这些层被布置为信号通道。所述传感器利用分析物-效应物复合物，其中，所述效应物影响所述阻止层，使得报告物化合物能够穿越所述阻止层。



1. 一种用于快速、现场识别分析物的传感器,其特征在于:
 - a. 样品层;
 - b. 至少一个反应层,与所述样品层互连;
 - c. 至少一个报告物层,与所述反应层互连;
 - d. 至少一个阻止层,与所述报告物层互连;以及
 - e. 吸收垫,与所述阻止层互连;其中,上述层从a至e排列,并且作为特定分析物信号通道可操作地排列。
2. 一种用于快速、现场识别分析物的传感器,其特征在于,以样品层为特征;
 - a. 至少一个报告物层,与所述样品层互连;
 - b. 至少一个反应层,与所述报告物层互连;
 - c. 至少一个阻止层,与所述反应层互连;以及
 - d. 吸收层,与所述阻止层互连;其中,上述层从a至e排列,并且作为特定分析物信号通道可操作地排列。
3. 根据权利要求1或2所述的传感器,其特征在于,所述样品层由多孔的、吸收性的以及非反应性的膜构成。
4. 根据权利要求3的所述的传感器,其特征在于,所述膜选自群组,所述群组包括醋酸纤维素膜、硝化纤维素膜、纤维素酯膜、聚砜(PS)膜、聚醚砜(PES)膜、聚丙烯腈(PAN)膜、聚酰胺膜、聚酰亚胺膜、聚乙烯和聚丙烯(PE和PP)膜、聚四氟乙烯(PTFE)膜、聚偏氟乙烯(PVDF)膜、聚氯乙烯(PVC)膜及玻璃纤维纸膜。
5. 根据权利要求1或2所述的传感器,其特征在于,所述反应垫包含至少一种固定的分析物-效应物复合物。
6. 根据权利要求5所述的传感器,其特征在于,所述分析物-效应物复合物包括:
 - a. 至少一个分析物;以及
 - b. 至少一个效应物,所述效应物对所述阻止垫的组分是特定的;其中,所述分析物和效应物可逆地或不可逆地连接。
7. 根据权利要求6所述的传感器,其特征在于,所述效应物是酶。
8. 根据权利要求6所述的传感器,其特征在于,所述固定的分析物-效应物复合物另外包含至少一个报告物化合物。
9. 根据权利要求5的传感器,其特征在于,所述固定的分析物-效应物复合物可逆地与特定抗分析物抗体相结合,所述抗体对所述分析物是特定的。
10. 根据权利要求9所述的传感器,其特征在于,通过将来自所述样品的所述游离分析物与所述抗体进行特定的竞争性或非竞争性的结合,将所述分析物-效应物复合物从所述抗体中释放出来,并固定到所述反应层。
11. 根据权利要求7所述的传感器,其特征在于,所述抗分析物抗体不可逆地结合到所述反应垫。
12. 根据权利要求1或2所述的传感器,其特征在于,所述报告物层装载有结合或未结合的报告物化合物。
13. 根据权利要求8或12所述的传感器,其特征在于,所述报告物化合物:
 - a. 不能穿越不受影响的阻止层;

b.能穿越受影响的阻止层;以及
对所述吸收垫或所述检测器是特定的。

14.根据权利要求13所述的传感器,其特征在于,所述报告物化合物选自化合物群组,所述化合物群组由染料、颜料、电化学活性化合物、酶、荧光团、化学发光分子和放射性核素组成。

15.根据权利要求13所述的传感器,其特征在于,由于尺寸、电荷或磁性、疏水性或疏脂性,所述报告物化合物被阻止穿过未受影响的所述阻止层。

16.根据权利要求1或2所述的传感器,其特征在于,所述阻止层由受所述效应物影响的至少一个化合物组成。

17.根据权利要求16所述的传感器,其特征在于,所述阻止层包括可被酶分解的至少一个材料,所述材料选自群组或有机化合物,所述群组由糖、水凝胶、肽、脂质和聚合物组成。

18.根据权利要求1或2所述的传感器,其特征在于,所述吸收垫可选择地或不可选择地与所述报告物化合物反应或结合,以产生信号。

19.根据权利要求18所述的传感器,其特征在于,所述信号通过视觉识别或由所述检测器测量。

20.根据权利要求19所述的传感器,其特征在于,所述检测器基于光谱、光化学、生物化学、酶促、免疫化学、电、射线照相和光学方法。

21.根据权利要求19所述的传感器,其特征在于,所述检测器将结果传送到计算机系统或网络。

22.一种用于快速、现场识别分析物的传感器,其特征在于,包括:

- a.至少一个可逆固定的分析物-效应物复合物;
- b.至少一个报告物化合物;
- c.至少一个阻止层;以及
- d.至少一个吸收层;

其中,所述报告物化合物中的至少一个和所述分析物彼此不结合;并且所述阻止层位于所述分析物、所述报告物以及所述吸收层之间,并且被配置为特定的分析物信号通道。

23.根据权利要求22所述的传感器,其特征在于,所述分析物与所述效应物结合,以产生分析物-效应物复合物。

24.根据权利要求23所述的传感器,其特征在于,所述分析物-效应物复合物包括:

- a.至少一个分析物;以及
- b.至少一个效应物,所述效应物对所述阻止垫的组分是特定的;

其中,所述分析物和所述效应物可逆地或不可逆地连接。

25.根据权利要求23所述的传感器,其特征在于,所述效应物是酶。

26.根据权利要求23所述的传感器,其特征在于,所述分析物-效应物复合物通过与抗分析物抗体可逆地结合而被固定,所述抗分析物抗体对所述分析物是特定的。

27.根据权利要求26所述的传感器,其特征在于,通过来自所述样品的所述游离分析物与所述抗体进行特定的竞争性或非竞争性的结合,将所述分析物-效应物复合物从所述抗体中释放出来,并固定到所述反应层。

28.根据权利要求22所述的传感器,其特征在于,所述报告物化合物:

a.不能穿越不受影响的阻止层;以及

b.能穿越受影响的阻止层;以及

对于所述吸收垫或所述检测器是特定的。

29.根据权利要求28所述的传感器,其特征在于,所述报告物化合物选自化合物群组,所述化合物群组由颜料、染料、电化学活性化合物、酶、荧光团、化学发光分子和放射性核素组成。

30.根据权利要求22所述的传感器,其特征在于,所述阻止垫由至少一个化合物组成,所述化合物可通过与所述效应物相互作用而改变。

31.根据权利要求30所述的传感器,其特征在于,所述阻止层由可被酶分解的材料组成,所述材料选自群组,所述群组由糖、水凝胶、肽、脂质和聚合物组成。

32.根据权利要求22所述的传感器,其特征在于,所述吸收垫选择性地或非选择性地与所述报告物化合物反应和/或结合,以产生信号。

33.根据权利要求32所述的传感器,其特征在于,所述信号通过视觉识别或由所述检测器测量。

34.根据权利要求31所述的传感器,其特征在于,所述检测器基于光谱、光化学、生物化学、酶促、免疫化学、电、射线照相和光学方法。

35.根据权利要求31所述的传感器,其特征在于,所述检测器将结果传送到计算机系统或网络。

36.一种用于分析样品的方法,其特征在于,包括以下步骤:

a.获取溶液形式的样品;

b.获得传感器,所述传感器包括:

i.至少一个可逆固定的分析物-效应物复合物;

ii.至少一个报告物化合物;

iii.至少一个阻止层;以及

iv.至少一个吸收层;

其中,至少所述报告物化合物和所述分析物彼此不结合;其中,所述阻止层位于所述分析物与所述报告物之间和所述吸收之间;

c.装载样品溶液;以及

d.读取分析结果。

37.根据权利要求36所述的方法,其特征在于,所述样品层由多孔的、吸收性的以及非反应性的膜构成。

38.根据权利要求37所述的传感器,其特征在于,所述膜选自群组,所述群组包括醋酸纤维素膜、硝化纤维素膜、纤维素酯膜、聚砜(PS)膜、聚醚砜(PES)膜、聚丙烯腈(PAN)膜、聚酰胺膜、聚酰亚胺膜、聚乙烯和聚丙烯(PE和PP)膜、聚四氟乙烯(PTFE)膜、聚偏氟乙烯(PVDF)膜、聚氯乙烯(PVC)膜和玻璃纤维纸膜。

39.根据权利要求36所述的方法,其特征在于,所述反应垫含有至少一种固定的分析物-效应物复合物。

40.根据权利要求39所述的传感器,其特征在于,通过来自所述样品的所述分析物与所述抗体进行特定的竞争性或非竞争性的结合,将所述分析物-效应物复合物从所述抗体中

释放出来,并固定到所述反应层。

41. 根据权利要求36所述的方法,其特征在于,所述报告物化合物:

- a. 不能穿越不受影响的阻止层;以及
- b. 能穿越受影响的阻止层;以及
- c. 对于所述吸收垫或所述检测器是特定的。

42. 根据权利要求41所述的方法,其特征在于,所述报告物化合物选自化合物群组,所述化合物群组由颜料、染料、电化学活性化合物、酶、荧光团、化学发光分子和放射性核素组成。

43. 根据权利要求36所述的方法,其特征在于,所述阻止垫由至少一个化合物组成,所述化合物可以通过与所述效应物相互作用而改变。

44. 根据权利要求43所述的方法,其特征在于,所述阻止层由可被酶分解的材料组成,所述材料选自群组,所述群组由糖、水凝胶、肽、脂质和聚合物组成。

45. 根据权利要求36所述的方法,其特征在于,所述吸收垫选择性地或非选择性地与所述报告物化合物反应和/或结合,以产生信号。

46. 根据权利要求45所述的方法,其特征在于,所述信号通过视觉识别或由所述检测器测量。

47. 根据权利要求46所述的方法,其特征在于,所述检测器基于光谱、光化学、生物化学、酶促、免疫化学、电、射线照相和光学方法。

48. 根据权利要求46所述的方法,其特征在于,所述检测器将结果传送到计算机系统或网络。

用于液体样品的即时检测分析的装置和方法

技术领域

[0001] 本发明的领域是用于样品的即时检测 (point-of-care) 分析的系统。

背景技术

[0002] 水或食物中的病原体、污染物或毒素的侵染或污染是世界范围内的疾病和病痛的主要原因。这在缺乏用于跟踪水源和食物链污染的技术和预算的发展中国家中是严重的问题。WHO估计每年有150万人死于水源性疾病,其中超过一半归因于供水安全、环境卫生和个人卫生 (WHO:疾病负担和成本效益估计,2014),而在2010年食源性疾病导致420,000人死亡 (全球食源性疾病负担的WHO估计,2015)。

[0003] 当前的技术,例如GS-MS、质谱分析仪或HPLC都是昂贵的、不可移动的并且需要训练有素的操作者。

[0004] 本发明提出了一种即时检测传感器,其提供了简单、便携和成本效益高的解决方案,并为传染病的爆发提供了标记、病原体、污染、毒素或载体的快速和本地化分析。除全细胞外,生物标记还可以表征为蛋白质、代谢物、抗体、肽、激素、脂质等。可选择地,分析物可以是通过对分裂、降解、退化、衰变等产生的原始生物标记的片段。

[0005] 识别病原体污染或毒素的方法有很多,例如细胞板培养、免疫测定和核酸相关检测。但这些方法存在各种缺点,例如灵敏度低、价格高、检测复杂、需要实验室环境等。使这些方法适用于现场使用已经被证明是具有挑战性的。

[0006] 有两种类型的设备已经达到了使消费者能够广泛使用的必要要求。一种是基于生物传感器的血糖仪,另一种是妊娠试验。

[0007] 侧流免疫测定 (LFA) 是目前最有可能满足挑战的技术。

[0008] 已经在开发基于侧流技术的成本效益和快速细菌测试方面取得了一些进展,其中包括开发了用于大肠杆菌、李斯特菌、沙门氏菌和链球菌的传感器。然而,对靶标分析物的低灵敏度和低特异性限制了它们的使用。基于ELISA的技术 (例如化学发光、电化学和比色法) 提供了较高的灵敏度和特异性,但它们更为复杂和耗时。

[0009] W0201897796描述了一种确定或定量样品中感兴趣的分析物分子、病毒或细胞的存在设备。然而,`796包含准备共轭分析物报告物分子的附加步骤。

[0010] US7300802B2描述了一种用于即时检测测试 (POCT) 的生物传感器,通过将用于免疫反应和酶促反应的连续交叉流程程序引入到膜带色谱分析系统中来提高其检测灵敏度。然而,由于使用了多个系统,所以在`802中描述的生物传感器必须由熟练的技术人员操作。

[0011] 因此,对于快速、现场、简单和低成本的用于检测被污染的+食物和水源+的系统来说,还存在未满足的需求。

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供一种用于快速、现场识别分析物的传感器,其中:

[0013] 样品层;

- [0014] 至少一个反应层,其与所述样品层互连;
- [0015] 至少一个报告物层,其与所述反应层互连;
- [0016] 至少一个阻止层,其与所述报告物层互连;以及
- [0017] 吸收垫,其与所述阻止层互连;
- [0018] 其中,前述的层从a至e排列,并且作为特定分析物的信号通道可操作地排列。
- [0019] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,包括:
- [0020] 样品层;
- [0021] 至少一个报告物层,其与所述样品层互连;
- [0022] 至少一个反应层,其与所述报告物层互连;
- [0023] 至少一个阻止层,其与所述反应层互连;以及
- [0024] 吸收层,与所述阻止层互连;
- [0025] 其中,前述的层从a至e排列,并且作为特定分析物信号通道可操作地排列。
- [0026] 本发明的另一个目的是提供前述的传感器,其中,前述样品层由多孔的、吸收性的和非反应性的膜构成。
- [0027] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,所述膜选自群组,所述群组包括醋酸纤维素膜、硝化纤维素膜、纤维素酯膜、聚砜(PS)膜、聚醚砜(PES)膜、聚丙烯腈(PAN)膜、聚酰胺膜、聚酰亚胺膜、聚乙烯和聚丙烯(PE和PP)膜、聚四氟乙烯(PTFE)膜、聚偏氟乙烯(PVDF)膜、聚氯乙烯(PVC)膜及玻璃纤维纸膜。
- [0028] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,反应垫含有至少一种固定的分析物-效应物复合物。
- [0029] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,前述效应物分析物-效应物复合物包含:
- [0030] 至少一个分析物;以及
- [0031] 至少一个效应物,所述效应物对阻止垫的组分是特定的;
- [0032] 其中,所述分析物和效应物可逆地或不可逆地连接。
- [0033] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,固定分析物-效应物复合物可逆地与特定抗分析物抗体相结合,该抗体对分析物是特定的。
- [0034] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,通过将样品中的游离分析物与抗体进行特定的竞争性或非竞争性的结合,将分析物-效应物复合物从抗体释中放出来,并固定到反应层。
- [0035] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,固定的分析物-效应物复合物还包括至少一个报告物化合物。
- [0036] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,抗分析物抗体不可逆地结合到反应垫上。
- [0037] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,报告物层装载有结合的或未结合的报告物化合物。
- [0038] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,前述报告物化合物的特性在于:
- [0039] 不能穿越未分解的、完整的阻止层;
- [0040] 能够穿越阻止层中产生的孔;以及

[0041] 吸收垫或检测器的特性。

[0042] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,报告物化合物选自化合物群组,所述化合物群组由染料、颜料、电化学活性化合物、酶、荧光团、化学发光分子和放射性核素组成。

[0043] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,由于尺寸、电荷或磁性、疏水性或疏脂性,报告物化合物被阻止穿越未受影响的阻止层。

[0044] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,阻止层包括至少一种受效应物影响的化合物。

[0045] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,所述阻止层包括可被酶分解的材料,所述材料选自一个群组,该群组由糖、水凝胶、肽、脂质和聚合物组成。

[0046] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,吸收垫可选择地或不可选择地与报告物化合物反应或结合,以产生信号。

[0047] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,所述信号通过视觉识别或由检测器测量。

[0048] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,前述检测器基于光谱、光化学、生化、酶、免疫化学、电学、射线照相和光学方法。

[0049] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,前述检测器将结果传送到计算机系统或网络。

[0050] 本发明的目的是提供一种用于快速、现场识别分析物的传感器,包括:

[0051] 至少一个可逆的固定分析物-效应物复合物;

[0052] 至少一个报告物化合物;

[0053] 至少一个阻止层;以及

[0054] 至少一个吸收层;

[0055] 其中,前述报告物化合物和前述分析物彼此不结合;其中,所述阻止层位于所述分析层、所述报告物层以及所述吸收层之间,并且被配置为特定的分析物信号通道。

[0056] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,分析物与效应物结合以产生分析物-效应物复合物。

[0057] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,前述效应物是酶。

[0058] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,前述分析物-效应物复合物通过可逆地结合至抗分析物抗体而被固定,抗分析物抗体对所述分析物是特定的。

[0059] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,,通过将样品中的游离分析物与抗体进行特定的竞争性或非竞争性的结合,将分析物-效应物复合物从抗体中释放出来,并固定到反应层。

[0060] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,前述报告物化合物的特征包括:

[0061] 不能流过/横穿/通过/穿越不受影响的阻止层;以及

[0062] 可流过/横穿/通过/穿越受影响的阻止层。

[0063] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中前述报告物化合物选自以下一组化合物:颜料、染料、电化学活性化合物、酶、荧光团、化学发光分子和放射性核素。

[0064] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,阻止垫包括至少一种化合物,所述

化合物可以通过与效应物相互作用而改变。

[0065] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,前述阻止层由可被酶分解的材料组成,所述材料选自有机化合物群组,所述有机化合物组由糖、水凝胶、肽、脂质和聚合物组成。

[0066] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,吸收垫可选择地或不可选择地与报告物化合物反应和/或结合以产生信号。

[0067] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中所述信号通过视觉识别或由检测器测量。

[0068] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,检测器基于光谱、光化学、生化、酶、免疫化学、电学、射线照相和光学方法。

[0069] 本发明的另一个目的是提供前述传感器,其中,检测器将结果传送到计算机系统或网络。

[0070] 本发明的目的是提供用于分析样品的方法,包括以下步骤:

[0071] 获取溶液形式的样品;

[0072] 获取传感器,所述传感器包括:

[0073] 至少一个可逆固定的分析物-效应物复合物;

[0074] 至少一个报告物化合物;

[0075] 至少一个阻止层;以及

[0076] 至少一个吸收垫;

[0077] 其中,前述报告物化合物和前述分析物彼此不结合;其中,前述阻止层位于前述分析物、前述报告物和前述检测器之间;其中,前述阻止层位于前述分析层、前述报告物层和前述吸收层之间;

[0078] 装载样品液;以及

[0079] 读取分析结果。

[0080] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中前述样品层由多孔的、吸收性和无反应性的膜构成。

[0081] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中,前述膜选自群组,所述群组包括:醋酸纤维素膜、硝化纤维素膜、纤维素酯膜、聚砜(PS)膜、聚醚砜(PES)膜、聚丙烯腈(PAN)膜、聚酰胺膜、聚酰亚胺膜、聚乙烯和聚丙烯(PE和PP)膜、聚四氟乙烯(PTFE)膜、聚偏氟乙烯(PVDF)膜、聚氯乙烯(PVC)膜及玻璃纤维纸膜。

[0082] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中前述反应垫含有至少一种固定分析物-效应物复合物。

[0083] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中,通过来自样品的游离分析物与抗体进行特定的竞争性或非竞争性的结合,将分析物-效应物复合物从抗体中释放出来,并固定到反应层。

[0084] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中,报告物化合物的特性在于:

[0085] 不能穿越不受影响的阻止层;以及

[0086] 能穿越受影响的阻止层;以及

[0087] 吸收垫或检测器的特性。

[0088] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中,前述报告物化合物选自化合物群组,所述化合物群组由颜料、染料、电化学活性化合物、酶、荧光团、化学发光分子和放射性核素组成。

[0089] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中,阻止垫包括至少一种化合物,前述化合物可以通过与效应物相互作用而改变。

[0090] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中,前述阻止层包括至少一种可被酶分解的材料,前述材料选自群组,该群组由糖、水凝胶、肽、脂质和聚合物组成。

[0091] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中,吸收垫可选择地或不可选择地与报告物化合物反应和/或结合以产生信号。

[0092] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中,前述信号通过视觉识别或由检测器测量。

[0093] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中,前述检测器基于光谱、光化学、生化、酶、免疫化学、电、射线照相和光学方法。

[0094] 本发明的另一个目的是提供前述方法,其中,前述检测器将结果传送到计算机系统或网络。

附图说明

[0095] 图1-示出了传感器的示意性结构。

[0096] 图2-示出了传感器的示意性活动。

[0097] 图3-示出了传感器的示意性活动。

[0098] 图4-示出了沉积过程对明胶层的均匀性的影响。

[0099] 图5-示出了明胶浓度对溶液阻止性能的影响。

[0100] 图6-示出了明胶浓度的增加降低了溶液中的酶穿越阻止层而扩散的能力。

[0101] 图7-示出了本发明概念的证据。

具体实施方式

[0102] 在本申请中,本文所用的术语“分析物”或“感兴趣的分析物”是指可能存在于液体样品中的待检测物质。分析物可以是存在至少一个天然存在的或合成的特定结合配偶体的任何物质。分析物可以包括蛋白质或蛋白质片段,多肽或肽片段,氨基酸,DNA片段,RNA片段,小分子,细菌,天然配体,病毒颗粒(病毒体),病毒或上述任何物质的代谢物、抗体或仿生物质。分析物可以是有毒的或可以用作杀虫剂或毒素。在一些配置中,所识别的分析物可以仅仅是原始分析物的片段,所述片段由分裂、降解、退化、衰变、氧化等造成。分裂可能是由于暴露在环境中或作为样品预处理过程的一部分而引起的。

[0103] 在本申请中,术语“抗分析物抗体”是指由基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编辑的一个或多个多肽组成的蛋白质。该术语涵盖多克隆抗体、单克隆抗体及其片段,以及由免疫球蛋白基因序列改造而来的分子。抗分析物抗体对感兴趣的分析物是特定的。术语“抗分析物捕获抗体”是捕获感兴趣分析物的抗分析物抗体。此类抗体可方便地附着到固相上,例如反应层的膜上。

[0104] 在本申请中,本文所用的术语“报告物化合物”或“报告物分子”(或简称“报告物”)

是指归因于报告物化合物与吸收层和/或检测器之间的相互作用而对检测分析物的存在、密度或数量有用的分子。分子可以通过光谱、光化学、生物化学、酶促、免疫化学、电、射线照相和光学方法检测。光学上可检测的分子可以在紫外、可视或红外光谱中被检测到,包括诸如染料或荧光标记的化合物。

[0105] 可用于本发明的“报告物化合物”还包括任何合适的分子,其可以与分析物分子缀合而不损害待检测的报告物分子或待结合至抗体的分析物的能力。

[0106] 在优选的实施例中,报告物选自群组,该群组由染料、放射性核素、酶及其组合组成。

[0107] 染料可以是“小分子”染料/荧光剂,或大分子染料/荧光剂(例如绿色荧光蛋白及其所有变体)。染料可以是串联荧光团缀合物。在各种实施例中,染料可以是荧光半导体纳米晶体颗粒、量子点、电活性分子/染料或上转换纳米晶体。

[0108] 在一个优选的实施例中,报告物化合物被加载到“报告物层”或“报告物膜”上。报告物层可以通过以选择性或非选择性方式结合报告物而形成。在一个优选的配置中,通过用报告物化合物溶液使膜饱和,随后干燥所装载的膜,以非选择性方式将报告物结合到膜上,从而来装载膜。在这种配置中,当样品溶液使层再水合时,报告物与液体/溶液相互作用,并与流体一起迁移到“阻止层”。或者,可以将报告物分子装载到阻止层上游的另一层上。

[0109] 术语“阻止层”、“阻止垫”或“阻止膜”是指经处理的多孔或半多孔膜或固体层,其由不允许报告物分子通过的材料构成,除非其通过与效应物相互作用而改变。由于报告物化合物和阻止层的化学或物理性质,阻止层阻碍了报告物化合物的通过。在一个优选的配置中,阻止层是可以被酶(糖、水凝胶、肽、蛋白质、脂肪、塑料聚合物等)分解的任何生物或化学物质,如明胶。

[0110] 术语“效应物”(或者“效应物化合物”或“效应物分子”)是指可与分析物结合而不影响其活性的化合物。效应物具有与阻止层相互作用的能力,从而以使报告物化合物通过的方式来改变其物理或化学性质。效应物可以是酶、大分子或小分子。效应物的组成可以是有机的、无机的或有机金属的。在一个优选的实施例中,效应物是能够分解阻止层,开放足够大的孔以供报告物化合物通过的酶。

[0111] 如本文所用,术语“膜”是指天然或合成/人造膜。术语“合成膜”或“人造膜”是指由有机材料,如聚合物和液体以及无机材料生产的人造膜。各种各样的合成膜在本领域中是众所周知的。在各种实施例中,样品层、至少一个共轭层、至少一个阻止层和吸收层的膜独立地选自群组,该群组由醋酸纤维素膜、硝化纤维素膜、纤维素酯膜、聚砜(PS)膜、聚醚砜(PES)膜、聚丙烯腈(PAN)膜、聚酰胺膜、聚酰亚胺膜、聚乙烯和聚丙烯(PE和PP)膜、聚四氟乙烯(PTFE)膜、聚偏氟乙烯(PVDF)膜、聚氯乙烯(PVC)膜和玻璃纤维纸膜组成。

[0112] 术语“吸收膜”、“吸收层”或“吸收垫”是指经处理的膜,所述膜特定或非特定地与报告物化合物结合或反应。在各种实施例中,吸收层还包含至少一个用于报告物分子(或简称为报告物)的基底。本文所用的报告物基底旨在包括能够与报告物相互作用的任何基底。优选地,报告物和报告物基底之间的相互作用产生定性或定量效果。本文所用的“报告物基底”是可以促进基底消失的测量或与催化反应有关的产物出现的测量的基底(或多个基底)。报告物基底可以在溶液中游离或结合(或“束缚”)到例如表面或另一分子。报告物基底

可以通过多种手段中的任一种来标记,所述手段包括例如荧光团(具有或不具有一个或多个另外的组分,例如猝灭剂)、放射性标记、生物素(例如生物素化)或化学发光标记。在报告物是辣根过氧化物酶的情况下,基底优选鲁米诺。

[0113] 在一些配置中,吸收层是检测器的一部分。在这种配置中,吸收垫促进了报告物化合物和检测器之间的相互作用。在一个配置中,这是通过包含报告物基底或通过捕获游离的报告物化合物来进行的。

[0114] 术语“检测器”是指能够测量到达吸收层或与报告物基底相互作用的报告物化合物的装置。所述测量可以是化合物本身或与基底相互作用的测量。这种相互作用可以通过光谱、光化学、生物化学、酶促、免疫化学、电学、射线照相或光学手段来测量。检测器被配置为利用化学计量学来分析由报告物-吸收相互作用产生的信号(或多个信号),以检测和测量样品中存在的分析物的量。

[0115] 本发明的目的是用于现场、实时、快速和简单的分析物检测的传感器。

[0116] 参考图1,图中描述了本发明的一个非限制性实施例,液体样品被收集并装载在样品层上(11)。样品溶液使各层水合,并且样品溶液流动至反应层(12)。样品中的分析物与抗分析物抗体结合,使结合的分析物-效应物复合物错位。分析物-效应物复合物通过报告物层到达阻止层(13)。效应物与阻止层相互作用(13),影响阻止层的物理和/或化学性质。这种变化使得报告物化合物能够穿越阻止层并到达吸收层(14)。

[0117] 参考图2,图中描述了本发明的一个非限制性实施例,液体样品收集并装载在样品层上21。样品溶液使各层水合,并且样品溶液流动至反应层22。如果样品溶液含有分析物,则样品中的分析物与抗分析物抗体结合,使结合的分析物-效应物复合物错位。然后,分析物-效应物复合物通过报告物层到达阻止层23。效应物与阻止层相互作用23,影响阻止层的物理和/或化学特性。这种变化使得报告物化合物能够穿越阻止层24并到达吸收层25。然后,传感器将返回阳性结果26。

[0118] 如果样品不含分析物,则分析物-效应物复合物保持结合27,并且不会影响阻止层的物理和/或化学性质28。报告物化合物将不能穿越阻止层29,并且传感器将返回阴性结果30。

[0119] 参考图3,图中通过两个实例描述了本发明:

[0120] o31含有分析物的样品->其中阻止层与效应物相互作用->使得报告物化合物能够到达吸收层。

[0121] o32不包含分析物的样品->阻止层不受影响。

[0122] 穿越阻止层的报告物化合物与吸收层相互作用以产生信号。这种相互作用可以是特定的,例如结合到基底,或非特定的,例如染料的累积。这种相互作用产生信号,例如归因于染料的累积而产生颜色。在一些配置中,该信号然后由检测器来检测。传感器可配置为通过使用装载有多个抗分析物捕获抗体的一个反应层或通过使用多个反应层(每一层对应于不同的抗分析物捕获抗体)来检测单个样品中多于一个的分析物的存在。检测器和吸收层可以被配置为检测多于一个的报告物化合物的存在,从而使得系统能够检测到单个样品中多个分析物的存在。在这种配置中,由每个报告物产生的信号必须是不同的,并且必须不妨碍检测器检测由其它报告物化合物产生的信号的能力。在这种配置中,检测器可以使用化学计量学来检测样品中各种分析物的水平。

[0123] 在本发明的另一个非限制性实施例中,传感器由多个层构成,每个层彼此叠放以提供液流。

[0124] 在本发明的另一个非限制性实施例中,传感器被构造为单个条带。在本实施例中,层是端对端排列的,并且是一个条带形的区域。

[0125] 在这种方法中,吸收纤维素膜充当了固体垫层支撑物,不同的测定成分被固定在其上的各个层上。

[0126] 示例1

[0127] 本示例描述了一种用于检测食物中的过敏原的传感器。在本示例中,膜是纸(纤维素),阻止层由明胶构成,报告物化合物是染料,效应物是胃蛋白酶。在第一步中,收集液体样品并将其沉积在采样垫上。样品穿越采样垫,直到它到达反应垫。反应垫含有与过敏原抗体相结合的固定的过敏原-胃蛋白酶复合物(抗分析物-酶复合物)。样品中的游离过敏原与抗分析物抗体捕获复合物相结合,释放分析物-胃蛋白酶复合物。复合物通过并再水合颜料层,并到达明胶阻止层。胃蛋白酶分解明胶,形成孔(每个游离复合物一个孔)。染料分子通过明胶中的孔并到达吸收垫,使吸收层着色。

[0128] 在该配置中,颜色指示食物中存在的过敏原,提醒可能的健康危害。

[0129] 示例2

[0130] 本示例描述了一种用于检测水源性病原体的传感器。在本示例中,膜是纸(纤维素),阻止层由明胶构成,报告物层含有红色染料,效应物是胃蛋白酶。在该配置中,传感器包含7个反应层,每个反应层针对不同的病原体:

[0131] 隐孢子虫属

[0132] 贾第虫属

[0133] 志贺氏菌属

[0134] 大肠杆菌0157:H7

[0135] 军团菌属

[0136] 弯曲菌

[0137] 沙门菌属

[0138] 每个反应层均含有与病原体抗体结合的特定的固定病原体-胃蛋白酶复合物(抗分析物-酶复合物)。每个病原体-胃蛋白酶复合物还与另外的报告物化合物同步,从而形成病原体-胃蛋白酶-报告物复合物。每个另外的报告物化合物是不同的荧光化合物,每个荧光化合物发射不同光谱的光。

[0139] 第一步,收集液体样品并将其沉积在采样垫上。样品穿越采样垫,直到到达特定的反应垫。特定反应垫含有与病原体抗体相结合的病原体-胃蛋白酶-报告物复合物。样品中的游离病原体与抗分析物抗体捕获复合物相结合,释放病原体-胃蛋白酶-报告物复合物。复合物通过以及再水合颜料层,并到达明胶阻止层。然后胃蛋白酶分解明胶,形成孔(每个游离复合物有一个孔)。染料分子通过明胶中的孔并到达吸收垫,使吸收垫着色。然后将吸收层加载到光谱检测器中,然后可用于识别样品中的特定病原体。

[0140] 在这种配置中,着色层警告可能的污染,并且使用检测器检测存在于水源中的特定病原体。

[0141] 示例3

[0142] 本示例描述了一种用于代替反应器来验证清洁的方法。在本示例中，膜是纸(纤维素)，阻止层由明胶构成，报告物化合物是染料，效应物是胃蛋白酶。在本示例中，将所报告的化合物溶解在样品收集溶液中。

[0143] 在第一步骤中，将一定剂量的样品收集溶液沉积在反应器的表面上。样品收集溶液包含合适的溶剂和染料(所报告的化合物)。将样品层浸入反应器表面上的溶液中。样品穿越采样垫，直到到达反应垫。反应垫包含与抗分析物抗体相结合的固定的分析物-胃蛋白酶复合物(抗分析物-酶复合物)。样品中的游离分析物与抗分析物抗体捕获复合物相结合，释放分析物-胃蛋白酶复合物。复合物到达明胶阻止层。胃蛋白酶分解明胶，产生孔(每个游离复合物一个孔)。染料分子通过明胶中的孔并到达吸收垫，使吸收层着色。

[0144] 在这种配置中，颜色表示反应器没有被充分清洁。

[0145] 示例4

[0146] 本示例示出了该方法的生物物理效果。

[0147] 参考图4，其示出了沉积过程对明胶层的均匀性的影响，以便确定假定均匀的明胶层的恒定扩散时间。为了确定干燥方案对明胶层形成的均匀性的影响，测试了两种不同的干燥模式：

[0148] 第一种(图4A)中，将250 μ l的5% (w/v) 明胶溶液放置在4x4cm Kim擦拭纸上方，并在室温下在平坦表面上干燥。

[0149] 第二种中，将4x4cm Kim擦拭纸浸入1mL 5% (w/v) 明胶溶液中，挤压(以除去过量的液体)并在空气中干燥。

[0150] 明胶层的均匀性是传感器开发过程中的关键问题，因为均匀的层不仅允许确定通过传感器中的该停止层的恒定的时间，而且在评价过程中被相同的酶浓度分解。

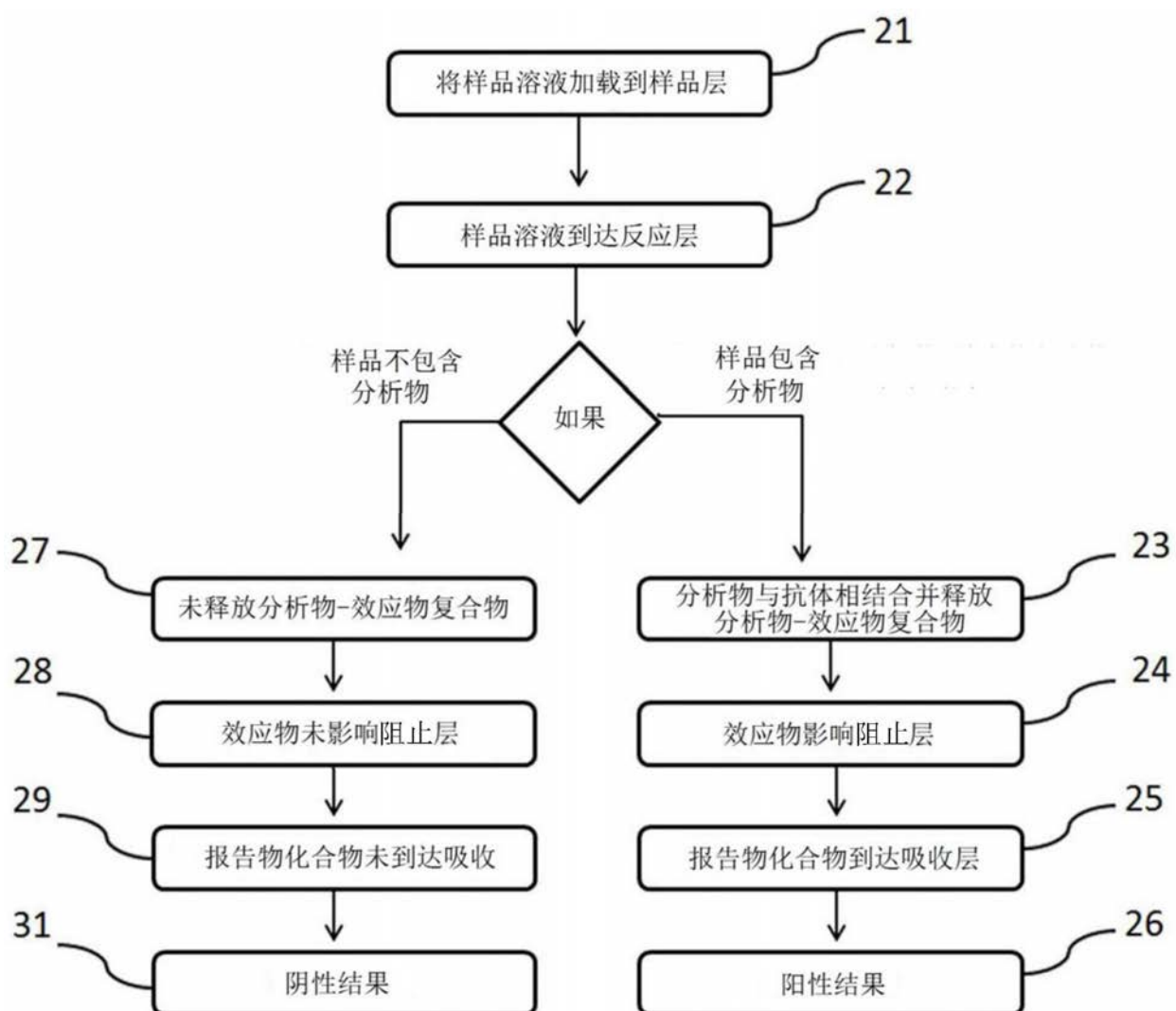
[0151] 参考图5，其示出了明胶浓度对阻止层阻止/终止/调节溶液通过的能力的影响。如前一节所示(图4)，创建了具有不同明胶浓度的阻止层。然后将阻止层置于吸收层上方，并将25 μ l的具有(+)和不具有(-)酶菠萝蛋白酶(250单位/mL)的有色溶液置于其上方。菠萝蛋白酶是来自菠萝的降解明胶的酶，因此测试了明胶层(具有清澈溶液)的终止能力，并且还确定了各种明胶浓度对阳性(+)溶液(含有该酶的溶液)的酶促反应的影响。图5示出了所有含有菠萝蛋白酶的溶液都扩散通过阻止层，而与明胶浓度无关。这示出了菠萝蛋白酶在任何使用的明胶浓度下穿透阻止层的能力。在酶阴性样品(用清水测试)中，只有含5%明胶(w/v)和更多明胶的层显示出停止溶液的能力。这指示扩散/降解机制的特性，其中具有包含至少5% (w/v) 明胶的阻止层的系统将允许含有酶的溶液通过，同时终止阴性样品并将通过溶液。

[0152] 参考图6，其示出了明胶浓度对其阻止阻止/终止性质的确定效果。对于该步骤，将如图4所示的明胶浓度为5% (w/v) 的阻止层放置在吸收垫上方。为了测试酶通过能力，在有色溶液中制备不同的菠萝蛋白酶浓度并置于阻止层之上。随着酶降解阻止层中的明胶，有色溶液通过吸收层并将其着色。该步骤不会显示可以通过终止层的最低酶浓度和明胶浓度对这些通过能力的影响。

[0153] 图6示出，阻止层中明胶浓度的增加降低了溶液中菠萝蛋白酶使有色溶液能够通过阻止层扩散的能力。尽管两种测试浓度均防止假阴性结果，但含有12.5 μ g/mL明胶的阻止层足以防止含有两个活性单元的溶液扩散或通过阻止层。阴性样品显示含有5% (w/v) 明胶

的阻止层可以防止阴性溶液(不含酶)通过它扩散,因为阳性溶液(含有菠萝蛋白酶)可以分解阻止层并使得具有尽可能低浓度的酶溶液能够通过。

[0154] 图7进一步示出了当存在含有菠萝蛋白酶(+)的溶液时,本发明产生阳性结果的潜力。



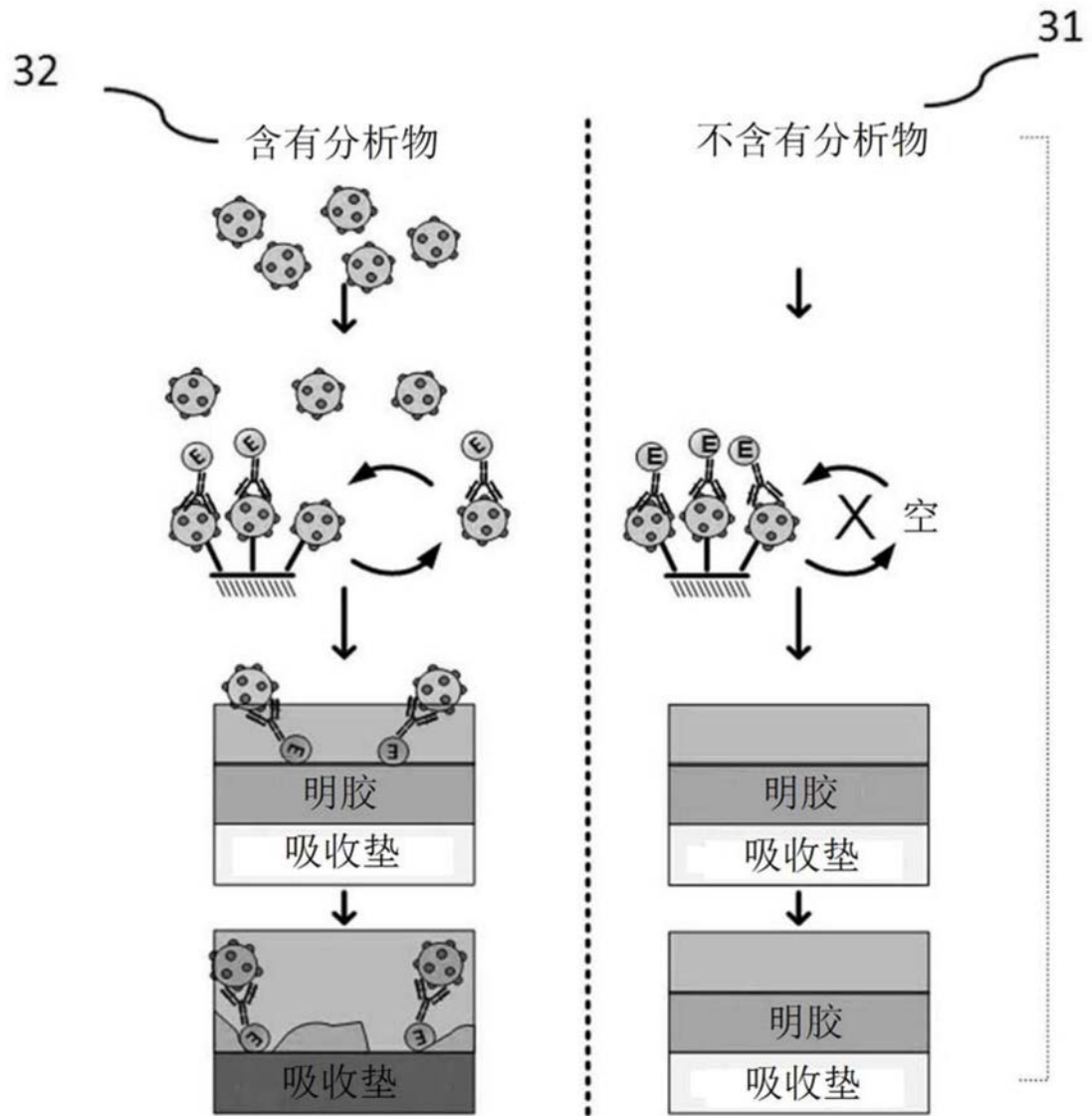


图3

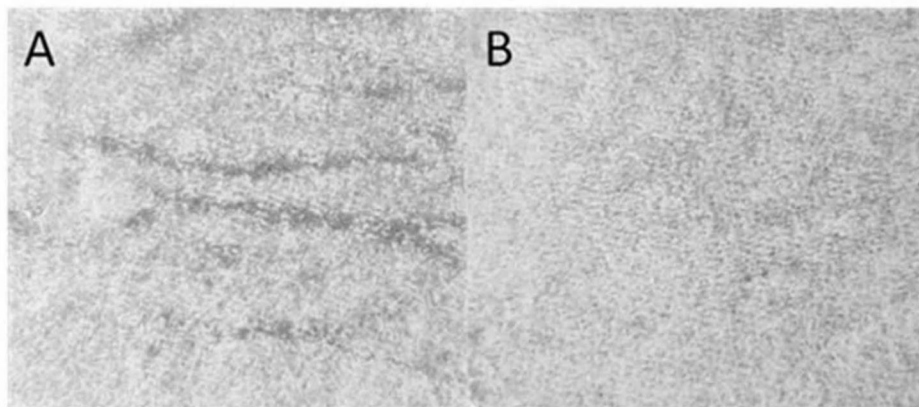


图4

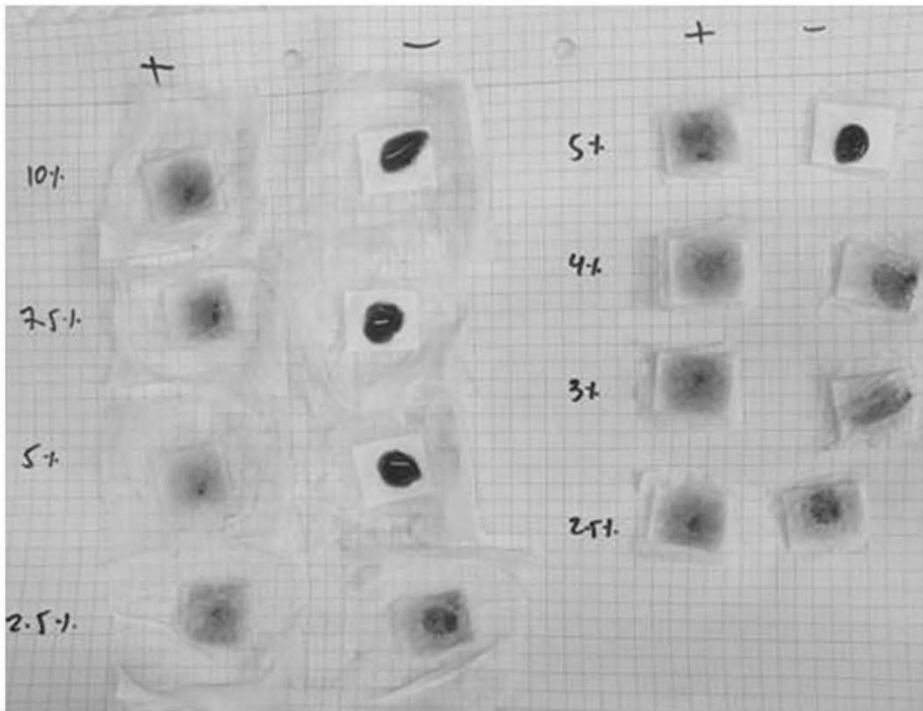


图5

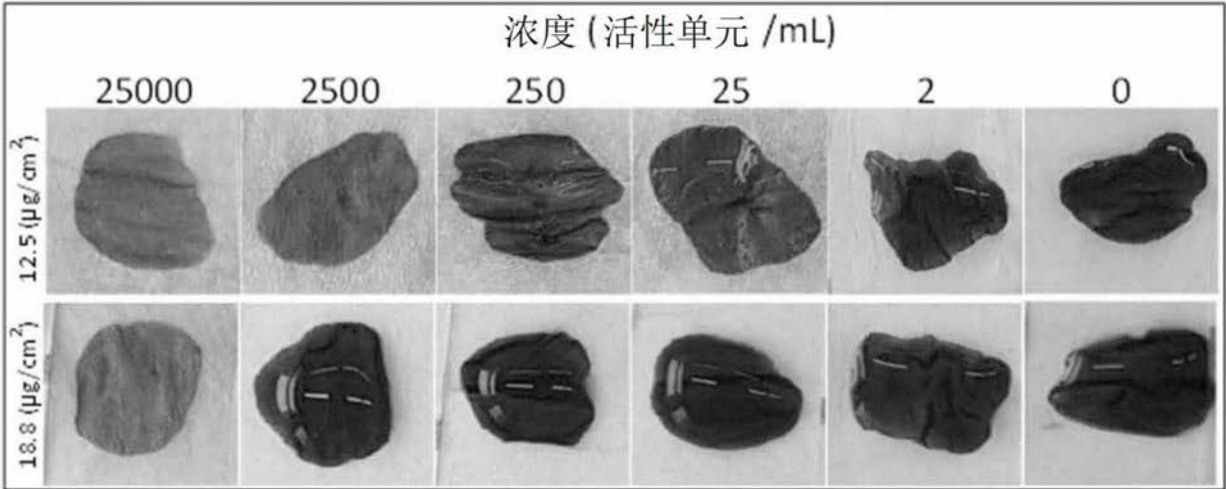


图6

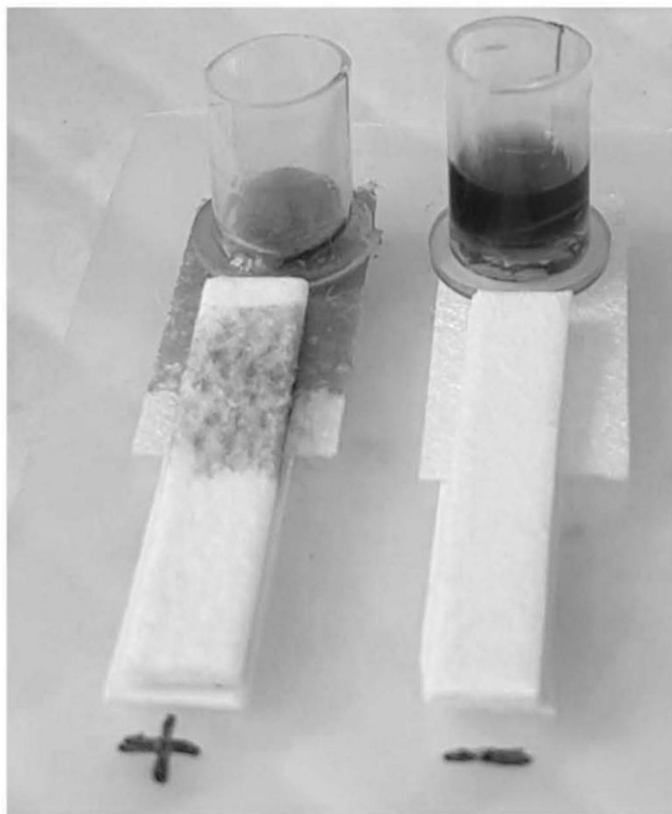


图7