

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03108248.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 27/26 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 100350248C

[22] 申请日 2003.3.21 [21] 申请号 03108248.3

[30] 优先权

[32] 2002.3.21 [33] US [31] 10/105,050

[73] 专利权人 生命扫描有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 A·霍奇斯 R·查特利尔

[56] 参考文献

US6214205B1 2001.4.10

CN1249815A 2000.4.5

CN1064945A 1992.9.30

WO0208763A2 2002.1.31

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 章社果

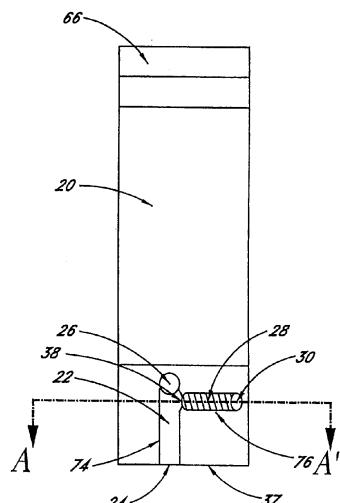
权利要求书 4 页 说明书 26 页 附图 4 页

[54] 发明名称

一种直接的免疫传感器和测定方法

[57] 摘要

本发明公开了一种便宜的可作定量分析的一次性的免疫传感器，不需要洗涤步骤，因此不会产生废液。而且，在这种传感器的优选实施例中，用户无需进行定时操作，且这种传感器可以很容易地应用于广泛的动力学范围内的抗原-抗体相互作用。



1. 一种用来检测液体试样中目标抗原的一次性使用的器件，所述器件包括：

具有第一高度的反应腔；

固定在所述反应腔中的固定抗体；

包含探针和报道复合抗原的报道复合物，其中，所述探针与所述报道复合抗原联接，所述报道复合抗原与所述固定抗体结合，而且所述报道复合抗原与所述固定抗体的结合不如所述目标抗原与所述固定抗体的结合牢固；

检测腔，具有比反应腔的第一高度小的第二高度并且包括通气孔；

所述反应腔的试样入口，和

在所述反应腔和所述检测腔之间的试样通道，其中当通气孔打开时，所述器件适于通过毛细管作用使试样在所述反应腔和所述检测腔之间移动。

2. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述报道复合抗原可以从目标抗原、假抗原或修饰抗原中选出。

3. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述探针可以从放射性同位素、发色团、荧光团或酶中选出。

4. 根据权利要求 3 所述的器件，其特征在于，所述酶包括葡萄糖脱氢酶。

5. 根据权利要求 3 所述的器件，其特征在于，所述器件还包括一种酶作用物。

6. 根据权利要求 5 所述的器件，其特征在于，所述酶作用物是一种氧化酶作用物。

7. 根据权利要求 6 所述的器件，其特征在于，所述酶作用物包含葡萄糖。

8. 根据权利要求 5 所述的器件，其特征在于，所述器件还包括一种介质。

9. 根据权利要求 8 所述的器件，其特征在于，所述介质可以从二氯酚靛酚、过渡金属与含氮杂原子组分的络合物、或铁氰化物中选出。

10. 根据权利要求 3 所述的器件，其特征在于，所述试样具有 pH 值，且所述器件还包括用来调整所述试样 pH 值的缓冲剂。

11. 根据权利要求 10 所述的器件，其特征在于，所述缓冲剂包括磷酸盐或苯六甲酸盐。

12. 根据权利要求 3 所述的器件，其特征在于，所述器件还包含一种稳定剂，所述稳定剂可以稳定所述目标抗原、所述报道复合抗原、所述酶、以及所述固定抗体其中的至少一种。

13. 根据权利要求 6 所述的器件，其特征在于，所述酶作用物是支持于检测腔内表面上。

14. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述固定抗体支持于反应腔内表面上。

15. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述器件还包括一种支持材料。

16. 根据权利要求 15 所述的器件，其特征在于，所述支持材料包含在所述检测腔中，从酶作用物、介质或缓冲剂中选出的第一物质支持于所述支持材料上或是包含在所述支持材料中。

17. 根据权利要求 15 所述的器件，其特征在于，所述支持材料包含在所述反应腔中，从所述固定抗体、所述报道复合物、或能防止蛋白质与反应腔内表面非特定结合的试剂中选出的第二物质支持于所述支持材料上或是包含在所述支持材料中。

18. 根据权利要求 16 或 17 所述的器件，其特征在于，所述支持材料可以从网状材料、纤维填充材料、多孔材料、烧结粉末、大孔隙薄膜或珠粒中选择。

19. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述检测腔中包含第一电极和第二电极。

20. 根据权利要求 19 所述的器件，其特征在于，所述第一电极和所述第二电极中至少一个的材料可以从铝、铜、镍、铬、钢、不锈钢、钯、铂、金、铱、石墨、用粘结剂混合的石墨、氧化铟、氧化锡、导电聚合物或其混合物中进行选择。

21. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，检测腔壁对于

由所述探针发出或吸收的射线是可穿透的，且所述射线表示所述检测腔中是否存在报道复合物。

22. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述器件还包括可探测所述反应腔是否处于充满状态的探测器。

23. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述目标抗原包括人体丙种反应蛋白。

24. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述报道复合抗原可以从单体丙种反应蛋白、从非人类物种得到的丙种反应蛋白或经化学修饰的丙种反应蛋白中选出，其中所述经化学修饰的丙种反应蛋白与所述抗体的亲合力小于所述人类丙种反应蛋白与所述抗体的亲合力。

25. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述检测腔的壁或所述反应腔的壁还包含一种填充物。

26. 根据权利要求 25 所述的器件，其特征在于，所述填充物是一种填充材料，可以从二氧化钛、石墨、硅石、玻璃或其混合物中选择。

27. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述探针包含一种酶辅因子。

28. 根据权利要求 27 所述的器件，其特征在于，所述酶辅因子可以从黄素单核苷酸、黄素腺嘌呤二核苷酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸或吡咯并喹啉苯醌中选出。

29. 根据权利要求 27 所述的器件，其特征在于，所述酶辅因子通过挠性间隔层与所述报道复合抗原联接。

30. 根据权利要求 27 所述的器件，其特征在于，所述器件还包含一种酶作用物。

31. 根据权利要求 27 所述的器件，其特征在于，所述器件还包含一种脱辅基酶。

32. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述探针中包

含一种酶活性调节剂。

33. 根据权利要求 32 所述的器件，其特征在于，所述酶活性调节剂包含激酶或磷酸化酶。

34. 根据权利要求 32 所述的器件，其特征在于，所述器件还包含一种酶作用物。

35. 根据权利要求 32 所述的器件，其特征在于，所述器件还包含一种酶。

36. 根据权利要求 1 所述的器件，其特征在于，所述探针包含一种属于多亚基酶的蛋白质亚基。

一种直接的免疫传感器和测定方法

技术领域

本发明涉及一种进行免疫测定的器件和方法。该器件由一次性使用的免疫传感器构成。

背景技术

生物医学上的传感器用来报告各种被分析物的存在和/或其浓度。如果被分析物是一种蛋白质，那么所使用的传感元件通常是一种抗体，因为抗体与蛋白质（抗原）的相互作用非常特异。这种免疫测定技术通常分成两类：一类是可通过简单的目视检测进行的得到是或否的答案，另一类是通过定量方法来确定抗原的浓度。大多数定量方法需要使用昂贵的设备，如闪烁计数器（用来监测放射性）、分光光度计、荧光分光计（可见美国专利 U.S. 5,156,972）、表面细胞质基因谐振仪（可见美国专利 U.S. 5,965,456）等仪器。因此需要研制出一种既便宜又简单适合于在家庭或现场使用的定量的免疫测定技术。这种免疫传感器不需要进行离心、稀释、移液、冲洗或定时等操作步骤，而且产生最少的废物。

传统的免疫测定技术分为两类：竞争测定和夹层测定。在竞争测定中，试样中的抗原与抗原-探针复合物（通常称作报道复合物）进行混合，然后，混合物中的抗原通过竞争与抗体结合。探针可以是放射性同位素、酶、荧光团或发色团。在夹层免疫测定技术中，试样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，通常需要有一个或多个冲洗步骤。冲洗步骤使测定过程复杂化并会产生对生物有害的废液。因此需要研制出一种无需任何冲洗步骤即可进行免疫测定的器件，而且还应

适合于作为用后即弃的一次性器件。

发明内容

本发明提供了一种便宜的可作定量分析的一次性的免疫传感器，不需要进行洗涤步骤，因此不会产生废液。对于某些实施例的免疫传感器，使用者无需进行定时操作，而且这种传感器可以很容易地应用于广泛的动力学范围的抗原-抗体相互作用。优选实施例中的传感器具有许多潜在的优点。这种传感器很简单便于制造，因为可以在单个步骤中沉积试剂，和/或试剂只沉积在反应腔的一部分上，或沉积在反应腔中的支持上。

这种传感器可以使用假抗原-探针复合物、修饰抗原-探针复合物、或抗原-探针复合物。在此使用的术语“假抗原”是广义的术语，应按照其原本的意义来使用，其包括但不限于，除了要检测的抗原以外的所有能与固定抗体结合的抗原，但这种结合不如要检测的抗原与固定抗体的结合牢固。在此使用的术语“修饰抗原”是广义的术语，并按照其原本的意义来使用，它包括但不限于，已经用化学方法或其它方法修饰的抗原，因此这种修饰抗原可与固定抗体结合，但其结合不如要检测的抗原与固定抗体的结合牢固。抗原-探针复合物中的抗原可与要检测的的抗原相同或不同，这种抗原借助与探针结合而可以与固定抗体结合，但却不如处于未结合状态的要检测的的抗原与固定抗体将进行的结合那么牢固。虽然优选实施例中主要讨论假抗原，但是应当知道可以用抗原-探针复合物或修饰抗原代替假抗原。

与现有技术的方法一般通过控制试剂的沉积速率和表面密度来获得正确的比率相比，本发明比较容易确保反应腔中抗体与抗原-探针、修饰抗原-探针或假抗原-探针的比率正确，因为这在传感器工作过程中抗原-探针、修饰抗原-探针或假抗原-探针于和抗体结合时基本上可以自动实现。优选实施例中的传感器还非常适用于较慢的免

疫反应动力学，其中的结合过程可能很慢。在制造传感器时使用非人类的假抗原可以减少当传感器接触病人手指上血滴时传染免疫疾病的可能性。

在第一实施例中，提供了一种用来检测液体试样中目标抗原的一次性使用的器件，该器件包括：具有第一高度的反应腔，固定在反应腔中的固定抗体，包含探针和报道复合抗原的报道复合物，其中探针与报道复合抗原联接，报道复合抗原可与固定抗体结合，而且报道复合抗原与固定抗体的结合不如目标抗原与固定抗体的结合牢固；检测腔，具有比反应腔的第一高度小的第二高度并且包括通气孔；反应腔的试样入口，和反应腔与检测腔之间的试样通道，其中当通气孔打开时，所述器件适于通过毛细管作用使试样在所述反应腔和所述检测腔之间移动。

在第一实施例的一个特征中，报道复合抗原可以是目标抗原、假抗原或修饰抗原。探针可以包括放射性同位素、发色团或荧光团。

在第一实施例的一个特征中，探针可以包括酶，如葡萄糖脱氢酶。当探针是一种酶时，检测腔中还可以包括一种酶作用物，例如氧化酶作用物，如葡萄糖。检测腔中还可以包括一种介质，如二氯酚靛酚、或过渡金属与含氮杂原子物组分的络合物、或铁氰化物。该器件中还可以包含用来调节试样 pH 值的缓冲剂，如磷酸盐或苯六甲酸盐。该器件中还可以包含稳定剂，用来稳定目标抗原、报道复合抗原、酶、固定抗体中的一种或多种。酶作用物可以支持于检测腔内表面上。

在第一实施例的一个特征中，固定抗体可以支持于反应腔内表面上。

在第一实施例的一个特征中，该器件中还包含一种支持材料。支持材料可以包含在检测腔中，而且支持材料可以包含第一物质，如酶作用物、介质或缓冲剂，其中第一物质可以支持在支持材料上或包含在支持材料中。支持材料可以包含在反应腔中，而且支持材料可以包含第二物质，如固定抗体、报道复合物或能够防止蛋白质与反应腔内表面非特定结合的试剂，其中第二物质可以支持于支持材料上或包含在支持材料中。支持材料可以包括网状材料，例如聚

合物如聚烯烃、聚酯、尼龙、纤维素、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚砜或其混合物的网状材料。支持材料可以包括纤维填充材料，例如聚合物如聚烯烃、聚酯、尼龙、纤维素、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚砜或其混合物的纤维填充材料。支持材料可以包括多孔材料，如粉末烧结，或大孔隙薄膜，比如聚合物材料如聚砜、聚乙二烯二氟化物、尼龙、醋酸纤维素、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯或其混合物的大孔隙薄膜。支持材料可以包括珠粒。

在第一实施例的一个特征中，检测腔中包含第一电极和第二电极。第一电极和第二电极中至少一个包括铝、铜、镍、铬、钢、不锈钢、钯、铂、金、铱、石墨、粘结剂混合石墨、氧化镧、氧化锡、导电聚合物或其混合物等材料。

在第一实施例的一个特征中，检测腔壁对于探针发出或吸收的辐射线是可穿透的，且辐射线表示检测腔中是否有报道复合物存在。

在第一实施例的一个特征中，该器件包括可探测到反应腔是否基本上处于充满状态的探测器。

在第一实施例的一个特征中，该器件包括可在检测腔的远端形成检测腔气孔的穿刺件。该器件还可以在反应腔的远端形成反应腔气孔。

在第一实施例的一个特征中，目标抗原包括人类丙种反应蛋白。报道复合抗原可以包括单体丙种反应蛋白。或者，报道复合抗原可以包括从非人类物种得到的丙种反应蛋白或经化学修饰的丙种反应蛋白，其中经化学修饰的丙种反应蛋白与抗体的亲合力小于人类丙种反应蛋白与抗体的亲合力。

在第一实施例的一个特征中，检测腔壁或反应腔壁可具有聚酯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚烯烃、聚对苯二甲酸乙二醇酯或其混合物等材料。检测腔壁或反应腔壁还可以包括填充剂如二氧化钛、石墨、硅石、玻璃及其混合物。

在第一实施例的一个特征中，探针包括酶辅因子，如黄素单核

甙酸、黄素腺嘌呤二核苷酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸或吡咯并喹啉苯醌。酶辅因子可以通过挠性间隔层与报道复合抗原联接。检测腔中还可以包含酶作用物，或主酶。

在第一实施例的一个特征中，探针中包含酶活性调节剂如激酶，或磷酸化酶。检测腔中还可以包括酶作用物，或酶。

在第一实施例的一个特征中，探针中包含属于多亚基酶的蛋白质亚基。

在第二实施例中，提供了一种用来测定液体试样中目标抗原数量的方法，该方法包括以下步骤：将液体试样放置到含有固定抗体和报道复合物的反应腔中，其中报道复合物包含与报道复合抗原联接的探针，抗体固定在反应腔中，报道复合抗原与固定抗体结合，而且报道复合抗原与固定抗体的结合不如目标抗原与固定抗体的结合牢固；将报道复合抗原的一部分从固定抗体上分离到液体试样中；使目标抗原的一部分与固定抗体结合；将液体试样输送到检测腔中，有电极定位检测腔内；然后以电化反应来确定液体试样中的报道复合物数量，其中报道复合物的数量表示最初在液体试样中的目标抗原数量。

在第二实施例的一个特征中，将液体试样输送到检测腔中的步骤包括将液体试样输送到带有第一电极和第二电极的电化学电池中。确定液体试样中报道复合物数量的步骤还可以包括：在电化学电池中的第一电极和第二电极之间施加电压；然后测量电流，电流表示在液体试样中存在的报道复合物数量，而报道复合物的数量表示目标抗原的数量。

在第二实施例的一个特征中，将液体试样输送到检测腔的步骤包括将液体试样输送到带有电磁辐射透射部分的检测腔中。确定液体试样中报道复合物数量的步骤还可以包括：将电磁辐射透射部分暴露于电磁辐射线中，电磁辐射线穿过液体试样或从液体试样上反射；然后在电磁辐射线穿过液体试样或从液体试样上反射后监测电磁辐射线的特性，该特性表示在液体试样中存在的报道复合物数量，

而报道复合物的数量表示目标抗原的数量。

附图说明

图 1 显示采用了电化学电池的第一优选实施例的免疫传感器的顶视图（不按比例）；

图 2 显示沿图 1 中免疫传感器实施例 A-A' 剖面的横断面视图（不按比例）；

图 3 显示采用了电化学电池的另一个优选实施例的免疫传感器的顶视图（不按比例）；

图 4 显示沿图 3 中免疫传感器实施例 B-B' 剖面的横断面视图（不按比例）。

具体实施方式

以下说明和实例详细介绍了本发明的优选实施例。所属领域的技术人员应当认识到在本发明的范围之内可以作出很多修改和变化。因此，对于优选实施例的说明不应该被认为是用来限制本发明范围。

本发明提供的传感器条包含两个腔室：反应腔和检测腔。试样容纳到反应腔中，试样成分在其中进行免疫反应。在检测腔中检测免疫反应的一种或多种生成物以测定试样中存在的抗原数量。反应腔和检测腔设置成可使试样从反应腔流入检测腔。

当反应腔进行免疫反应之后，至少一些已反应的试样被输送到检测腔，在那里对探针的存在进行检测和分析以得到最后结果。最好输足够的试样，使得检测腔充分装满，即，有足够的试样输送到检测腔，使得能够通过所用的检测方法对探针的存在进行检测和分析。

反应腔中包含要检测的抗原的抗体，抗体在反应腔中固定不动。抗体可以固定在腔室壁上。或者抗体可以固定在反应腔中的支持上。

适当的支持包括但不限于，纤维状材料、大孔隙材料、粉末材料，或者在更为优选的实施例中，可以用本技术领域中众所周知的珠粒材料来支持抗体。

在优选实施例中，固定抗体与被称作“假抗原”的抗原结合在一起，其中“假抗原”与探针联接。假抗原-探针与固定的抗体结合起来，但不如要检测的抗原结合的那么牢固。举例来说，如果要检测的抗原是一种人体蛋白，那么适当的假抗原-探针可以包括相同的动物蛋白质，比如与探针联接的狗蛋白质或猪蛋白质。在这一实例中，人体蛋白质的抗体固定在反应腔中，而与适当探针联接的动物蛋白质则与固定抗体结合，形成抗体-假抗原-探针复合物。

当试样充满反应腔时，假抗原-探针的一小部分分离到溶液中，因为其与抗体的结合相对较弱。在结合的假抗原-探针与自由的假抗原-探针之间将存在一种动态平衡，而留下一些自由的抗体结合位置。如果溶液中有抗原，其将优先于假抗原-探针牢固地结合到自由的抗体结合位置，因而使假抗原-探针留在溶液中。这一过程将持续进行，直至试样中的抗原基本上全部与抗体结合，而在溶液中有等量的自由假抗原-探针。因此与固定抗体结合的每个抗原都将一个假抗原-探针置换到溶液中。

当试样中所有或预定的一部分抗原与固定抗体结合时，溶液中假抗原-探针的浓度反映了试样中抗原的初始浓度。在优选实施例中，自由的和已结合的假抗原-探针之间必须达到平衡以确保溶液中的抗原可以优先于假抗原-探针与抗体结合。因此，要使用与抗体的结合力比目标抗原更弱的假抗原-探针，但是不必像某些现有技术的方法那样在引入试样之前用物理方法使假抗原-探针与抗体分离。

当进行完免疫反应之后，包含任何从抗体上释放的假抗原-探针的液体试样输送到检测腔中。在检测腔中，对试样中存在的假抗原-探针的浓度进行测量并得到结果。

即使在试样中没有抗原的情况下，少量的假抗原-探针也会由于

结合的和自由的假抗原-探针在溶液中达到平衡而分离到溶液中。如果是这样，那么在检测腔中因这些自由假抗原-探针而产生的信号被当作本底信号，应作为分析过程的一部分从抗原浓度结果中减去。

在 2000 年 7 月 14 日中提交的共同未决申请 No.09/616,433 中介绍了一种带有相连的免疫反应和检测腔的免疫测定条，本文引用参考其内容。与本文介绍的具有起初就与固定在反应腔内表面上的抗体复合的假抗原-探针的传感器不同的是，在申请 No.09/616,433 的传感器中，在将试样引入反应腔之前，抗体固定在反应腔的一个表面上，而抗原-探针固定在反应腔的另一个表面上。当试样进入反应腔时，抗原-探针溶解到溶液中并与试样中的抗原竞争与抗体结合的位置。申请 No.09/616,433 中传感器的使用方法主要依靠动力学因素以确保抗原优先于抗原-探针与抗体结合（通过先到达）。因此，需要在空间上将抗原-探针与反应腔中的抗体分离，而且这种传感器在抗原和抗原-探针与抗体的结合强度相等时可以工作。

在优选实施例中的传感器是一种单步骤无冲洗的免疫传感器。这种传感器是一种用后即弃的一次性器件，带有反应腔和检测腔。任何适当的检测方法都可以利用。适当的检测方法包括如目视检测或光谱检测，其中目视检测可观察颜色的变化，而在光谱检测中反射或透射光线被用来测量吸光率的变化。在优选实施例中的检测方法是电化学方法，其中测量与免疫反应生成物有关的电流或电压。

2000 年 7 月 14 日提交的共同未决美国专利申请 No.09/616,556 中还介绍了对液体试样进行电化学测量的方法和器件，在本文中引用参考其内容。

各试验阶段即反应阶段和检测阶段的定时可手动进行。或者，可根据反应腔和/或检测腔被充满时所产生的触发信号来自动定时。

适用于电化学检测的传感器实施例在图 1、2 以及图 3 和 4 中显示。图 1 是传感器条第一实施例的顶视图；而图 2 是横断面视图，示出了反应腔和检测腔的细节。图 3 是传感器条第二实施例的顶视

图；而图 4 是横断面视图，显示了反应腔和检测腔的细节。

传感器

本发明的免疫传感器可以用已知的薄层器件制造技术来制造，如制造电化学葡萄糖传感器所采用的技术（参见美国专利 5,942,102，本文引用参考其内容）。这种技术经过某些改进之后还可以用来制造使用非电化学检测方法的免疫传感器。

在图 1、2 以及图 3 和 4 所示的免疫传感器优选实施例中，检测腔中包含电化学电池。按照本技术领域中已知的薄层传感器制造方法，通过将各种适当形状的薄层材料装配起来就可以制成免疫传感器。一般来说，制造过程包括将一个或多个间隔层夹在顶层和底层中间。

在优选实施例中，传感器 20 是一种将酶，如葡萄糖氧化酶或葡萄糖脱氢酶，用作探针的电化学电池 28，在图 1 所示的这种传感器 20 的顶视图，在图 2 中示出了这种传感器沿 A-A' 剖面的横断面视图。反应腔 22 和检测腔 28 是通过使一小孔从电阻材料片 36 中穿过而形成的。小孔的形状设计成可构成反应腔 22 和检测腔 28 的侧壁以及两个腔 22 和 28 之间的试样通道 38。通过将小孔从反应腔 22 的近端 24 延伸到薄片 37 的边缘还可以形成试样入口 24。在一个实施例中，薄片 36 的厚度构成反应腔 22 和检测腔 28 的整个高度，其中反应腔 22 和检测腔 28 的高度相同。在另一个实施例中，反应腔 22 的高度大于检测腔 28 的高度。反应腔 22 的高度大于检测腔 28 的高度是通过将多个薄片 32、34 和 36 层叠而形成的。如上面所介绍的那样，中间薄片层 36 带有构成反应腔 22 和检测腔 28 的侧壁 74 和 76 的小孔。该中间层 36 夹在两个或更多个其他层 32 和 34 中间，其他层 32 和 34 中的小孔只构成反应腔 22 的侧壁 74，因此层 32 和 34 构成检测腔 28 的端壁 60 和 62。在本实施例中，检测腔的端壁 60 和 62 包括电极 52 和 54，它们可以按上述方法制成。

如图 2 所示，抗体 44 被固定在反应腔 22 的底部 40 上。假抗原-

探针 50 与抗体 44 复合。抗体可以固定在反应腔中任何适当的表面上，比如固定在反应腔 22 的壁上或是固定在反应腔 22 中支持的表面上。

第一薄层电极 52 固定或设置在电阻材料片 36 的一侧 70 上，并在构成检测腔 28 的小孔中延伸而形成端壁 60。层 52 比如可以用粘合剂粘接到薄片 36 上。适当的粘合剂包括，如热激活粘合剂、压敏粘合剂、热固性粘合剂、化学固化粘合剂、热熔性粘合剂、热流动粘合剂等类似的粘合剂。

电极层 52 可以采用适当的材料，如铝、铜、镍、铬、钢、不锈钢、铂、钯、石墨、粘结剂混合的石墨、氧化铟、氧化锡、混合氧化铟/锡、金、银、铱及其混合物、导电聚合物、如聚吡咯或聚乙炔等（用 WO97/18464 中所披露的溅射镀膜方法、用丝网印刷方法或用其它任何适当的方法）对电阻材料片 32 进行涂复而制成。如果电极 52 在电化学电池中用作阴极，那么适当的材料包括，如铝、铜、镍、铬、钢、不锈钢、铂、钯、石墨、粘结剂混合的石墨、氧化铟、氧化锡、混合氧化铟/锡、金、银、铱、及其混合物、聚吡咯或聚乙炔等导电聚合物，和类似材料。如果电极 52 在电化学电池中用作阳极或是在传感器的制造或贮存过程中要与氧化物质接触，那么适当的材料包括，比如铂、钯、石墨、用粘结剂混合的石墨、氧化铟、氧化锡、混合氧化铟/锡、金、银、铱、及其混合物、如聚吡咯或聚乙炔等导电聚合物、和类似材料。适合于用作电极 52 和 54 的材料要与传感器 20 存在的试剂相容，即，在所选择的电压下或在传感器的制造和贮存过程中不与试剂起化学反应。

第二薄层电极 54 固定在电阻材料 36 的另一侧 72 上，也在构成检测腔 28 的小孔中延伸而形成第二端壁 62。在本实施例中，惰性的电绝缘层 36 将电极承载基片 32 和 34 隔开。绝缘层 36 最好使层 32 和 34 保持预定的间距。如果这一间距足够小，比如小于或等于大约 500 微米，那么在相对所用检测时间适当短的时间之后，在电极 52

和 54 之间流动的电流将与还原介质的浓度成正比。在本实施例中，电流上升的速率直接与酶反应的速率有关，因此与酶的数量有关。

在某些实施例中，电极布置形式除了相对形式以外还可以优先选用并列的形式或平行但有偏移的形式。两个电极的大小可以是相同的或基本上相似，或者也可以是大小不同和/或形状不同。两个电极可以由相同的导电材料或不同的材料构成。所属领域的技术人员应当知道可以对电极布置形式、间距、以及结构或制造方法作出其它改进。

在优选实施例中，电极层 52 和 54 以平行的相对关系布置，其间距小于或等于 500、450、400、350、300、250 或 200 微米，而且最好是从大约 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 微米至大约 75、100、125、150 或 175 微米。然而，在某些实施例中，也许最好使电极间距大于 500 微米如 600、700、800、900 或 1000 微米，乃至大于 1、2、3、4 或 5 毫米。

检测腔或反应腔的体积通常为大约 0.3 微升或以下至大约 100 微升或以上，最好大约为 0.5、0.6、0.7、0.8 或 0.9 微升至大约 20、30、40、50、60、70、80 或 90 微升，在大约 1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 或 5 微升至大约 6、7、8、9、10、12、14、16 或 18 微升就更好。然而，在某些实施例中，对于反应腔和检测腔或其中之一可以选用更大或更小的体积。

可以使检测腔 28 中的电极 54 和 52 通过连接端 66 与仪表（未示出）电连接。连接件（未示出）通过导电线路（未示出）与检测腔 28 中的电极 54 和 56 电连接。在图 1 所示的优选实施例中，导电迹线由覆盖在层 32 和 34 内表面上的薄膜导体 52 和 54 的延伸部分构成。与连接区 66 相连的仪表能够在检测腔 28 中的电极 52 和 54 之间施加电压，分析所产生的电信号，显示响应值，还可以将响应值存储在存储器中，或者可以将所存储的响应值发送给外部设备如打印机或电脑。

在使用电化学检测的其它实施例中，一般要用到检测腔一个或两个内表面上的导电材料条，其中至少有两个电极，即传感电极和平衡/参考电极。作为一种选择，还可以设置用作独立参考电极的第三电极。

当使用电位测量的检测方法时，仪表可以测量传感电极和参考电极之间的电位差，但不需要能够在电极之间施加电压。

在使用目视检测或反射光谱法作为检测方法的实施例中，层 32 和 46 及/或层 34 和 42 对于所要观察的辐射波长是可穿透的。在目视检测的情况下，在检测腔 28 中可观察到简单的颜色变化。在使用反射光谱法的情况下，使检测辐射线透过层 32 和 46 及/或层 34 和 42，然后分析从检测腔 28 溶液反射的辐射线。在使用透射光谱法作为检测方法的情况下，层 32、46、34 和 42 对于所选择波长的辐射线是可穿透的。使辐射线透过检测腔 28 中的试样并测量射束的衰减。

在优选实施例中，层 36 包括基片，基片的上表面 70 和下表面 72 上涂有一层粘合剂（未示出）。适于用作层 36 基片的材料包括聚酯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚烯烃，最好是聚对苯二甲酸乙二醇酯。这些材料可以是原始的或加有适当的填充剂以提供所需要的光学或机械性能。适合于用作填充剂的材料包括但并不限于，二氧化钛、石墨、硅石和玻璃。适当的粘合剂包括压敏粘合剂、热固性粘合剂、化学固化粘合剂、热熔性粘合剂和热流动粘合剂。或者，间隔层本身可以由适当的粘合剂构成。

如果在制造过程早期尚未制成试样入口 24，那么可以在与反应腔 22 相交的器件 20 边缘 37 中形成切口（未示出）来制成。

图 1 中的虚线圆表示穿透了层 32、34 和 36 但未穿透层 42 和 46 的小孔 30，层 34 中的小孔通到检测腔 28 中。由于层 42 和 46 起初未被穿透，所以检测腔 28 与大气相通的唯一出口是通到反应腔 22 中的试样通道 38。因此，当反应腔 22 中充满试样时，至检测腔 28 的试样通道 38 被阻塞。这样便将空气封闭在检测腔 28 中并可基本

上防止试样进入检测腔 28 内。在试样最初接触通向检测腔 28 的开口 38 和试样接触到开口 38 远侧的期间，少量的试样将会进入检测腔 28 中。不过，一旦试样已经完全沾湿通向检测腔 28 的开口 38 之后，就不会再有试样填充到检测腔 28 中。反应腔 22 的体积通常选为至少等于且最好大于检测腔 28 的体积。通过使孔口 30 与大气相通，可以将试样输送到检测腔 28 中。孔口可以利用与仪表中螺线管相连的针状物来打开。

如图 3 所示的另一个实施例中的免疫传感器 100 可按以下方法制造。第一成形间隔层 112 和具有类似厚度的第二成形间隔层 114 分别设置在底层 116 的上面。第一间隔层 112 是矩形的，并位于底层 116 的近边 118 处。第二间隔层 114 也是矩形的，并位于底层 116 上离开第一间隔层 112 一定距离的位置。第一间隔层 112 的远边 120 和第二间隔层 114 的近边 122 构成反应腔 124 的侧壁部分 120、122。底层 116 构成反应腔 124 的底壁 126。抗体 164 固定在反应腔 124 的底部 126。抗原-探针或假抗原-探针 162 与固定的抗体 164 结合。

形状与第一成形间隔层 112 类似的第三成形间隔层 128 位于第一成形间隔层 112 的上面。第四间隔层 130 带有狭缝 132，狭缝 132 朝着间隔层 130 的中心方向从间隔层 130 的近端 134 中穿过延伸。第四间隔层 130 位于第二成形间隔层 114 的上面，近端 122、134 相互对齐。第四间隔层中的狭缝 132 构成检测腔 132 的侧壁（未示出）。第二间隔层被第四间隔层 130 中狭缝 132 暴露出来的部分 138 构成检测腔 132 的底部 138。狭缝 132 的近端 140 构成反应腔 124 与检测腔 132 之间的通道 140。第四间隔层 130 的近端 134 构成反应腔 124 的侧壁部分 134。

形状与第一成形间隔层 112 及第三成形间隔层 128 类似的第五成形间隔层 142 位于第三间隔层 128 的上面。形状与第二成形间隔层 114 类似的第六成形间隔层 144 位于第四成形间隔层 130 的上面，近端 146、122 相互对齐。第六间隔层被第四间隔层 130 的狭缝 132

暴露出来的部分 170 构成检测腔的顶部 170。小孔 148 从第六成形间隔层 144 中穿过延伸。小孔 148 的远端 150 与狭缝 132 的远端 152 对齐。小孔 148 构成孔口 154 的侧壁部分 150，使得检测腔 132 中充满试样时能够将空气排出。顶层 156 设置在第五间隔层 142 和第六间隔层 144 上。顶层 156 中也带有大小和形状与第六成形间隔层 144 中小孔 148 类似并相互对准的小孔 158。

在某些实施例中，最好将检测腔 132 中充填试样推迟到反应腔 124 中已装入试样后一段时间，使得反应腔 124 中能够有时间进行免疫反应。在这些实施例中，这是通过在免疫反应完成之后在层 116 和/或 156 中形成通气孔 158 来实现的。当反应腔 124 装满试样时，空气被封闭在检测腔 132 中，这样可以防止试样进入检测腔 132 中。在试样已经装入反应腔 124 之后的适当时间，可以用合适的器具如针状物或刀片在通气孔 148 上面或在通气孔 154 下面刺穿顶层 156 和底层 116 中至少一个。当这么做时，检测腔 132 中的空气可以通过小孔 148 或 154 从层 116 和/或 156 中形成的孔 148 或孔 154 中排出，因此能够通过毛细管作用使试样从反应腔 124 被吸入检测腔 132 中，而取代的空气则排出。

检测腔 132 的高度一般选择为小于反应腔 124 的高度，这样在腔室 132 和 124 表面的表面能作用下，检测腔 132 中的毛细管作用力将大于反应腔 124 中的毛细管作用力。检测腔 132 中较强的毛细管作用力用来将试样抽入检测腔 132 中并清空反应腔 124。这种利用毛细管作用力的差别来填充腔室的方法在 2000 年 3 月 27 日提交的共同未决申请 No.09/536,234 中作了详细介绍。

在优选实施例中，反应腔的高度通常大于检测腔的高度。检测腔的高度通常为大约 500 微米或以下，最好为大约 450、400、350、300、250 微米或以下，在大约 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 微米至大约 75、100、125、150、175 或 200 微米就更好。这些检测腔高度尤其非常适合于检测腔的顶壁和底壁包括电极层的情

况。然而，在采用电化学检测的某些实施例中，可以优先选用大于约 500 微米的腔室高度。这些检测腔高度也适用当采用除电化学检测以外的检测方法时。当采用另一种检测方法如光学检测方法时，优先选用不同的腔室高度。在这种实施例中，可以优先选用的腔室高度为大约 600、700、800 或 900 微米或以上，乃至大约 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 毫米或以上。反应腔的高度通常大于检测腔的高度。然而，在某些实施例中最好使用与检测腔具有相同或类似高度的反应腔，甚至使用高度比检测腔小的反应腔。检测腔高度通常是从大约 5 微米或以下至大约 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 毫米或以上，更好是大约 900、800、700、600、500 微米或以下，大约 450、400、350、300、250 微米或以下就更好，而最好是从大约 5、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50 微米至大约 75、100、125、150、175、200 或 250 微米。

当免疫传感器 100 是电化学传感器 100 时，通过第四间隔层 130 中的狭缝 132 暴露出来的第二间隔层 138 的顶面和第六间隔层 144 的底面 160 可以局部或完全由导电材料覆盖。或者，层 114 和 144 本身可以用导电材料制成。两个导电层之间的电连接（未示出）和仪表（未示出）使得能够在检测腔中进行电化学测量。

制造方法

为了便于说明，将参考图 3 和 4 中所示的传感器来详细介绍优选实施例中传感器的制造方法。传感器条 100 通常是由层压在一起的各层材料构成的。一个或多个间隔层 128、130 将层 112 和 114 与层 142 和 144 隔开。间隔层带有粘合面使得层 112、128 和 142 以及层 114、130 和 144 能够结合在一起。另一种方法是，间隔层本身可以由粘合剂构成，或是包括可通过层压方法中的加热和/或加压而粘接到相邻层上的材料。

检测腔 132 是毛细管空间，其中层 114 和 144 构成该空间的端壁，且层 128、130 的厚度则形成了该空间的高度。层 114 和 144 还

可以充当构成电化学电池电极的电极涂层（未示出）的基片，或者通过用导电材料制成而充当电极本身。在制造时，检测腔 132 一般是通过冲压或其它可将层 130 的一部分除去的方法形成。层 130 中除去的部分还可以用来形成电化学电池的电极区。

反应腔 124 可以用冲压或其它可将间隔层的一部分除去的方法来形成，通过将这一区域除去可使反应腔与检测腔 132 交迭，从而使检测腔 132 连通反应腔 124。然后可以将层 116 和 156 分别层压到层 112、114 和层 142、144 的外表面上以形成反应腔 124 的端壁 126、174。在将层 116 和 156 分别层压到层 112、114 和层 142、144 上之前或之后，可以将免疫化学物质 164 和 162 涂敷到层 116 和/或 156 的内表面上 126 和/或 174 上。通过位于层 112、114 和层 142、144 外表面上的粘合层，或者通过位于层 116 和 156 内表面上的粘合层，可以分别将层 112、114 和层 142、144 粘接到层 116 和 156 上。

通气孔 148 和/或 154 最好通过冲压穿过层 114、130 和 144 的孔来形成。为了简化传感器条的制造过程，最好在进行切去反应腔 124 和/或检测腔 132 一部分的同时形成通气孔 148 和/或 154，因为这样更容易实现腔室和通气孔之间具有重复性的空间关系，而且还可以减少工序步骤。

在另一个实施例中，通气孔 148、154、158 可以通过在层 114、116、130、144 和 156 上冲孔而形成，然后将另外的带层（未示出）层压在这样形成的孔两端。这样做的优点在于，使得能够分别对层 116 和 156 以及通气孔覆盖带层（未示出）的性能进行优化。或者，在层压层 116 或 156 之前，通气孔 148、154、158 分别可以通过在层 114、130、144 和 116 或 156 上冲孔而形成。这样使得只在传感器条 100 的一个表面上有开口 158，因而只需要使用一个覆盖带。

在另一个实施例中，可以先形成层 116 和 156 然后层压到层 114 和 144 上，这样层 116 和 156 不会延伸覆盖通气孔 158 的区域。只是需穿过层 114、130 和 144 以形成通气孔 148、154、158，然后将

另外的带层（未示出）层压在这样形成的孔两端。

可以用任何适当的方法，如压敏粘合剂、可固化粘合剂、热熔性粘合剂，将各层相互粘接在一起。通过加热和/或加压、机械紧固件等类似的方法进行层压。

所属领域的技术人员应当认识到，上述用于免疫传感器的结构形式只是许多种可能结构形式中的两种。比如，通气孔可以设在传感器条的顶部、底部、同时在顶部和底部、或者设在传感器条的一个或多个侧面。通气孔可以具有任何适当的结构形式，并且可以直接延伸到检测腔的一部分，或者可以沿曲折路径延伸到检测腔中。检测腔可以有任何适当的形状，如矩形、方形、圆形或不规则形。检测腔可以紧靠反应腔，或者可以在反应腔和检测腔之间设置一个独立的试样通道。可以使试样从传感器条的每一侧进入反应腔，如图 4 和 3 中的传感器，或者使试样只从传感器条的一侧进入，而另一侧用间隔层封闭，如图 1 和 2 中的传感器。检测腔可以是任何适当的形状，如矩形、方形、圆形或不规则形。检测腔可以被包容在传感器条的主体中，而到达检测腔的通路可以由设在传感器条顶部、底部或侧面的一个或多个试样入口来提供。一般来说，应选择一种具体的结构形式使制造方法得到简化，比如可以通过进行较少的工序或使用较少的部件。

电化学检测

当所述传感器是电化学电池时，电极层，如图 1 和 2 中传感器的层 52 和 54，中设有电接头，使得传感器 20 能够被安置在测量电路中。电池 28 的电极 52 或 54 中至少一个是传感电极，即至少有一个电极对试样中被分析物的氧化或还原形式的数量敏感。在传感电极 52 或 54 的电位表示被分析物水平的电位测量传感器 20 的情况下，还设有有充当参考电极的第二电极 54 或 52 来提供参考电位。在传感电极电流表示试样中被分析物水平的电流测量传感器 20 的情况下，至少还设置另一个电极 54 或 52 起到平衡电极的作用以形成电

路。该第二电极 54 或 52 还可以起到参考电极的作用。或者，设置独立的电极（未示出）来执行参考电极的功能。

如果免疫传感器 20 是作为电化学电池 28 来工作的，那么带有构成反应腔 22 和/或检测腔 28 的小孔的薄片 36 是用电阻材料制成。在优选实施例中，薄片 32 和 34 也是由电阻材料构成。适当的电阻材料包括如聚酯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚烯烃及其混合物等材料。优先选用的聚酯是聚对苯二甲酸乙二醇酯。在图 1 和 2 所示的传感器中，层 32 和 34 是覆盖着导电材料 52 和 54 的基片。导电材料 52 或 54 覆盖在面对检测腔 28 的表面 60 或 62 上，而粘合剂层（未示出）覆盖在面对层 42 或 46 的表面 33 或 35 上。

在图 3 和 4 所示的实施例中，检测腔 132 在层 138 和 170 的内表面上带有导电涂层（未示出），该导电涂层适合于用作电化学传感器电池中的电极。检测腔 132 中还包括由探针酶作用物组成的干试剂层 172，如果必要的话还可以包括一种能使酶在其氧化和还原形式之间循环的氧化还原物质，这种氧化还原物质能够在电池电极上被氧化或还原。还可以有缓冲剂以控制检测腔 132 中的 pH 值。当使用免疫传感器时，电极通过外部连接件（未示出），如本技术领域中所共知的舌片状插头，连接到外部仪表装置（未示出）上。在 1999 年 9 月 20 日提交的共同未决申请 No.09/399,512 和 2002 年 1 月 4 日提交的共同未决申请 No.60/345,743 中公开了适当的连接件。

如果免疫传感器 20、100 是用除电化学检测方法外的检测方法来工作的，那么构成传感器的材料不必是电阻性的。然而，上述聚合物材料在制作优选实施例中的免疫传感器时应被优先选用，因为其易加工、成本低、且与试剂和试样没有反应。

光学检测

在另一个可供选择的实施例中，使用的是光学检测系统而不是电化学检测系统。根据这一可供选择的实施例，不需要有电极，而是使用外部光源和光电管来分析检测腔中溶液透射或反射的光线。

在一个实施例中，最好使光线从传感器的顶面射入然后穿过试样，光线在传感器底层反射回来并穿过试样和顶层，并在顶层处检测。在另一个实施例中，光线通过检测腔的侧面进来并在检测腔的端面之间完全内部反射直至光线通过检测腔的另一个侧面离去，并在那里进行检测。在这些实施例中，检测腔上面的、侧面的和/或下面的层对于这些层的分析光线来说基本上都是可穿透的。在 1999 年 9 月 23 日提交的共同未决的申请 No.09/404,119 中介绍的技术可以用于采用光学检测系统的免疫传感器优选实施例。或者，在某些实施例中最好采用电化学检测与光学检测的组合方法，这也在申请 No.09/404,119 中作了介绍。

免疫传感器中的试剂和其它材料

在反应腔中使用的试剂如固定抗体、假抗原-探针、缓冲剂、介质等类似的物质可以支持在反应腔壁或检测腔壁上、支持在腔室中的独立支持上、保持在基体中、或者可以是自支持的。当试剂支持在腔壁或电极上时，可以利用所属技术领域中众所周知的印刷技术如喷墨印刷、丝网印刷、空隙涂复、平版印刷等类似的方法来涂复化学物质。在一优选实施例中，将含有试剂的溶液涂复到腔室内表面上并进行干燥。

除了使试剂或其它化学物质在反应腔或检测腔的表面上固定或干燥之外，更好的方法是使试剂支持在一个或多个独立支持上或者包括在一个或多个独立支持中，然后将支持放入腔室中。适当的独立支持包括但并不限于，网状材料、无纺薄片材料、纤维充填材料、大孔隙薄膜、粉末烧结、胶凝体、或珠粒。独立支持的优点包括可提高表面面积，因此如果需要的话可以使更多的抗体和假抗原-探针包括在反应腔中。在这样的一个实施例中，与假抗原-探针结合的抗体在多孔材料上干燥，然后放入反应腔中。而且在制造过程中，将未结合的蛋白质从独立支持上洗去也比从反应腔表面上洗去更加容易。

在更为优选的实施例中，与假抗原-探针结合的抗体支持在珠粒上。这种珠粒可以由聚合物材料如乳胶或琼脂糖构成，还可以选择包住磁性材料（如 γ 相三氧化二铁和四氧化三铁）。可挑选珠粒材料以提供对抗体的适当支持。适用的珠粒可以包括市场销售的如挪威奥斯陆 Dynal Biotech 公司所生产 DYNABEADS® 牌。作为选择，在仪表中可以包括磁铁以使磁性珠粒保持在反应腔中并阻止其移动到检测腔。

在还有一个实施例中，反应腔壁是多孔的，与这些孔隙结合的假抗原-探针与抗体固定。在此实施例中，液体试样通过毛细作用能被吸入多孔壁中，但不会渗到限定区域的外面。这是通过使用大孔隙薄膜来形成反应腔壁并将薄膜压紧到反应腔周围以防止试样从所要求的区域渗出来，如授予 Hedges 等人的美国专利 No.5,980,709 中所介绍的。

适用的独立支持如珠粒、网状材料、无纺薄片材料和纤维填充材料使用了聚烯烃、聚酯、尼龙、纤维素、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚砜及其混合物等类似的材料。适用的大孔隙薄膜可以用聚合物材料来制造，这些聚合物材料包括聚砜、聚乙二烯二氟化物、尼龙、纤维素醋酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、及其混合物等材料。

与假抗原-探针结合的抗体可以包括在如聚醋酸乙烯酯基体中。通过改变试样中基体的溶解度特性，可以实现将蛋白质或抗体可控制地释放到试样中。

如图 2 所示，干燥的试剂 64 可以选择性地布置在检测腔 28 中。这些试剂可以包括酶作用物（用作探针）和介质，它们可与假抗原-酶探针 50 中的酶部分起反应以产生可检测信号。酶作用物和介质如果存在的话，应该有足够的数量，使得任何与酶作用物 64 放在一起的酶的反应速度是由酶的数量来决定的。举例来说，如果酶是葡萄糖氧化酶或葡萄糖脱氢酶，就应将适当的酶介质 64 和葡萄糖（如果在试样中不存在）放置到检测腔 28 中。

在使用电化学检测系统的实施例中，铁氟化物是一种适当的介质。其它适当的介质包括二氯酚靛酚和过渡金属与含氮杂原子组分的络合物。如果必要的话，还可以含有缓冲剂以调整检测腔 28 中试样的 pH 值。葡萄糖、介质和缓冲试剂 64 应该有足够的数量，使得酶与酶作用物 64 的反应速度是由酶的浓度来决定的。

构成反应腔 22 底部的基片 42 内表面 40 上涂有与抗体 44 结合的假抗原-探针 50，其中抗体 44 可与试样中要检测的抗原起反应。抗体 44 吸附在或者用其它方法固定在基片 42 的表面 40 上，使得抗体 44 在试验过程中不会从基片 42 上移动。作为选择，在将抗体 44 涂敷到基片 42 内表面 40 上的时候或在此之后，可涂敷用来防止蛋白质与该表面非特定结合的试剂（未示出）。本技术领域中众所周知的这种试剂是牛血清白蛋白（BSA）。非离子表面活性剂也可以用作这种试剂，比如由宾夕法尼亚州费城的 Rohm 和 Haas 公司制造的 TRITON® X100 表面活性剂，或者由特拉华州威尔明顿市的卜内门化学工业美洲(ICI Americas)公司制造的 TWEEN® 表面活性剂。所选择的非离子表面活性剂应该不会使蛋白质变性。当准备好用于试验中时，基片 42 内表面 40 上的涂层 44 处于干燥状态。

在使用电化学检测的优选实施例中，酶可以被用作探针。适当的酶实例包括但并不限于，辣根过氧化酶、葡糖氧化酶和葡糖脱氢酶如 PQQ 非独立葡糖脱氢酶或 NAD 非独立葡糖脱氢酶。

探针还可以是一种酶辅因子。适当的酶辅因子包括但并不限于，黄素单核苷酸、黄素腺嘌呤二核苷酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和吡咯并喹啉苯醌。酶辅因子最好通过挠性间隔层与抗原联接，使得酶辅因子能够与主酶结合。当探针是一种酶辅因子时，主酶可以选择性地与反应腔中的酶作用物及介质一起干燥。

探针还可以是一种酶活性的调节剂。适当的酶调节剂包括，但并不限于，激酶或磷酸化酶。通过改变酶的磷酸化、甲基化、腺苷酸化、尿苷酸化或二磷酸腺苷核糖基化状态，酶调节剂可以改变酶

的活性。酶调节剂还可以通过将缩氨酸从酶中分解出来改变酶的活性。当探针是一种酶调节剂时，酶可以与反应腔中的酶作用物及介质一起干燥。

探针可以是属于多亚基复合体的一种蛋白质亚基。这种蛋白质亚基的一个实例是多亚基酶细胞色素氧化酶中的一种亚基。

抗体和假抗原-探针在反应腔中被干燥之前可以复合在一起。应选择复合条件使自由（未复合的）假抗原-探针的数量减到最小，因为这种物质会增大测定时的本底信号。还应当使自由抗体的数量减到最小，因为这种物质会固定抗原并阻止抗原取代假抗原-探针，从而降低测定灵敏度。例如，通过用惰性高分子如聚乙二醇“占据”溶液可以优化假抗原-探针与抗体的复合作用，因为这样能排除蛋白质周围的体积，从而提高蛋白质的热力学活性并增强它们相互结合的亲合力。参见 Minton 的《生物高聚物》第 20 卷，1981 年，2093 至 2120 页。

抗体在与假抗原-探针复合之前最好固定到珠粒上。这样可以通过暴露于高浓度假抗原-探针使所有抗体位置都被占据。于是通过离心作用和冲洗珠粒很容易将过量的假抗原-探针除去。

免疫传感器对大约 1nM （纳摩尔）至大约 10\mu m （微摩尔）的抗原浓度最敏感。对于相对摩尔量为 100,000 的抗原来说，该浓度对应于大约 0.1\mu g/mL （微克/毫升）至大约 1000\mu g/mL （微克/毫升）。不过，可以改进传感器（比如通过改变电极之间的距离或通过施加不同形式的电压脉冲）以测定浓度在 0.1nM 或以下至 0.1mM 或以上范围内的抗原。

这种测定方法的检测极限是由反应腔中假抗原-探针/抗体的浓度决定的。因此将这摩尔浓度设置到对应于所关心试样中一般会遇到的抗原摩尔浓度的预期范围内。例如，在一般的病理实验室中所遇到的丙种反应蛋白的浓度是从大约 10nM （纳摩尔）至大约 10\mu m （微摩尔）。

可以测定的抗原实例包括，但并不限于，甲胎蛋白、癌胚抗原、丙种反应蛋白、心肌钙蛋白 I、心肌钙蛋白 T、地高辛、铁蛋白、 γ -谷氨酰转移酶、Glycated 血色素、glycated 蛋白质、甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、绒毛膜促性腺激素、人类免疫缺陷性病毒、胰岛素、血清淀粉状蛋白 A、thromblastin、前列腺特殊抗原、凝血素、甲状腺素、肿瘤抗原 CA125、肿瘤抗原 CA15-3、肿瘤抗原 CA27/29、肿瘤抗原 CA19-9 和肿瘤抗原 NMP22。

优选实施例中的传感器并不限于测定人体抗原，而是还可以应用于兽医行业和畜牧业中。而且，如果抗原太小而不能产生免疫性，那么可以将其附加到作为半抗原的载体上，而抗体也可以用这种方法提升到抗原处。因此本发明并不限于蛋白质抗原或大分子的测定，而是同样也可应用于小的抗原。

适用于优选实施例中传感器的抗体包括，但并不限于，天然抗体如免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M 和免疫球蛋白 A。适当的抗体还可以由天然抗体的片段如 $F(ab)_2$ 或 Fab 构成。抗体可以由天然抗体的遗传工程片段或人造片段如 scFv (单链可变片段) 物质制成。

抗体可以与天然抗原探针或“假抗原”探针复合。假抗原的实例包括来自其它物种的抗原。例如，如果要测定人的丙种反应蛋白，那么假抗原可以包括狗、猫、马、牛、羊、猪或鸟的丙种反应蛋白。假抗原还可以通过对天然抗原的修饰来制造。例如，如果要测定人的丙种反应蛋白，那么假抗原可以包括天然五聚物的单体形式或丙种反应蛋白，其氨基、羧基、羟基、硫醇基或二硫基已作了化学修饰。

用传感器来确定抗原是否存在

可以按以下方法用传感器来确定抗原是否存在。参见图 3 和 4，传感器条 100 中包括反应腔 124 和检测腔 132。试样通过入口 166 或 168 进入反应腔 124 中。层 116 和 156 之间的间距以及其内表面的表面能使得试样可以通过毛细管作用吸入到反应腔 124 中。反应腔 124

其中包括固定到反应腔 124 内表面 126 上抗体 164。假抗原-探针复合物 162 与抗体 164 结合起来，使得基本上所有对抗原的抗体识别部位都被假抗原-探针 162 挡住。在本实施例中，探针是一种酶。

在图 4 中示出抗体只是覆盖在反应腔 124 的一个表面 126 上，但是抗体最好覆盖在反应腔 124 中多于一个表面 126 上或是覆盖在包括于反应腔 124 中的独立支持（未示出）上。不过，为了便于制造，一般来说建议抗体 164 只是覆盖在反应腔 124 的一部分上或是覆盖在单个支持材料上。当使用独立支持来固定抗体 164 时，应使支持在试验时不会进入检测腔 132 中。这可以通过以下方法来实现，比如使支持粘附到反应腔 124 的至少一个表面 126 上，或是通过选择支持的大小或形状使得支持不能通过试样通道 134 进入检测腔 132 中，或是通过选择具有足够密度的支持使得当试样被输送到检测腔 132 中时支持还保持在反应腔 124 的底面 126 上。

当试样填充到反应腔 124 中时，与抗体 164 结合的假抗原-酶探针 162 接触到试样，使假抗原-探针的一小部分与抗体 164 分离而进入试样中。然后要有足够的时间使已结合和未结合假抗原-酶探针 162 之间达到动态平衡。如果在试样中存在抗原，那么比假抗原-酶探针 162 能更牢固地与抗体 164 结合的抗原将最终置换出假抗原-酶探针 162。因此与固定抗体 164 结合的每个抗原都会将一个假抗原-酶探针 162 置换到溶液中。

反应在试样进入反应腔 124 之后的预定时间结束。该预定时间是这样设置的，使得有足够的时间使试样中基本上全部抗原都能取代假抗原-酶探针 162 而与抗体 164 结合。或者，该预定时间可以这样设置，使得抗原中的已知部分能够取代假抗原-探针 162 而与抗体 164 结合。

试样进入反应腔 124 的时间可以由用户通过压下与传感器 100 相连的仪表（未示出）上的按钮来表示。这一动作用来起动定时装置（未示出）。在目视检测的情况下，不需要有仪表。在这种实施

例中，用户对反应周期手动定时。

在使用电化学检测来检测免疫反应结果的情况下，可以自动发出试样已经进入反应腔 124 中的指示。如上面所介绍的那样，当试样充满反应腔 124 时，检测腔 132 在其通到反应腔 124 的开口 140 处一小部分将被试样湿润。如果使用电化学检测，那么在检测腔 132 中至少有两个电极（未示出）。如果这些电极（未示出）布置在检测腔的近端 134，那么在试样填充到反应腔 124 中的时候，每个电极（未示出）至少有一部分会与试样接触，试样将接通电极（未示出）而产生可用来起动定时装置的电信号。

在定时装置起动后的预定时间，由用户来确定或自动确定免疫反应阶段已经完成。当试验的免疫反应阶段完成时，将与大气连通的通气孔 158 打开。例如，可以用仪表中由螺线管驱动的针状物刺穿层 156 和/或层 116，或者再刺穿层 114 和 144，使检测腔 132 的远端 152 与大气连通。可以如上述实例中那样由仪表自动进行穿刺，或者在不使用仪表的目视检测情况下可由用户手动刺穿，例如，用户将针状物穿过层 156、116、114 和/或 144 至检测腔中，从而形成通气孔 158。

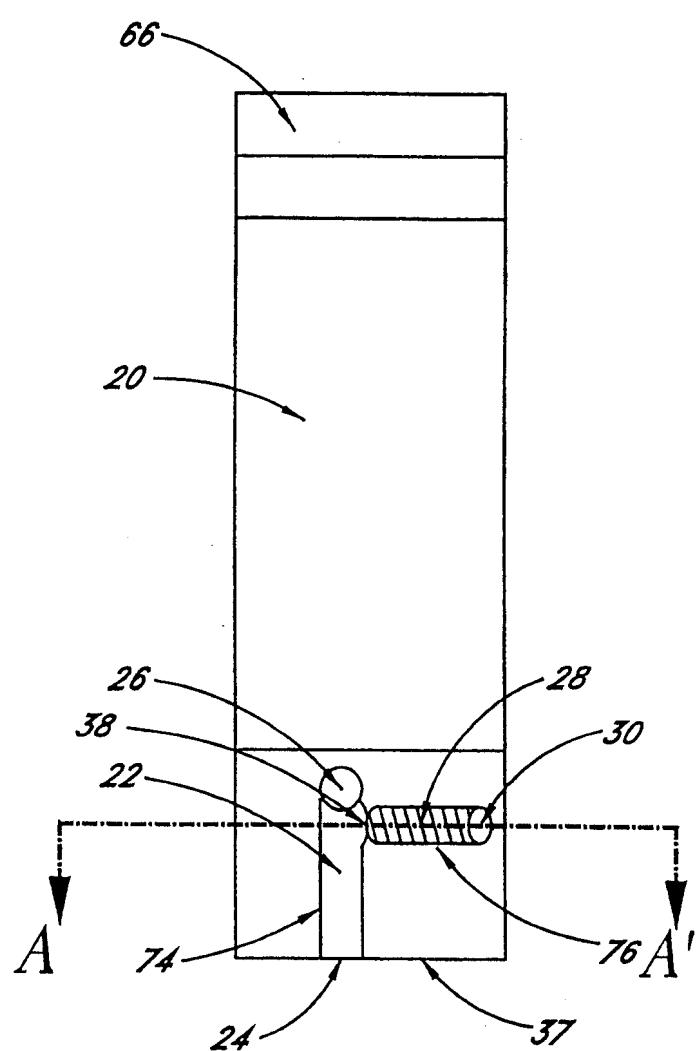
通气孔 158 与大气的连通使得封闭在检测腔 132 中的空气能够逸出，从而使检测腔 132 能够被来自反应腔 124 的已反应试样填充。由于检测腔 132 中的毛细管作用力与反应腔 124 中的毛细管作用力相比增大，所以已反应的试样会被吸入检测腔 132 中。在一优选实施例中，增大的毛细管作用力是通过适当地涂覆检测腔 132 的表面 138 和 160 来提供的，更好的是通过选择检测腔 132 的毛细管距离使其小于反应腔 124 的毛细管距离来实现。在此实施例中，毛细管距离确定为等于腔室的最小尺寸。

当检测腔 132 充满时，试剂 172 溶解到试样中。试剂层 172 中酶组分与酶作用物及介质起反应而产生还原介质。该还原介质在检测腔 134 中被充当阳极的电极（未示出）用电化学方法氧化而产生

电流。在一个实施例中，电流随时间的变化率被用作已反应试样中有酶存在及酶数量的指示。如果电流的变化率小于预定阈值（考虑到有一些假抗原-酶探针 162 由于自由和结合假抗原-酶探针 162 之间建立的动态平衡而释放到溶液中），那么这就表示已反应试样中没有大量的假抗原-酶探针 162，也就表示原始试样中没有抗原。如果电流的变化速率大于阈值速率，那就表示已反应试样中存在的假抗原-酶探针 162 数量大于阈值，因此最初在试样中也有抗原存在。在一个实施例中，电流的变化速率被用来测量试样中最初存在的抗原数量。

上述说明公开了本发明的几种方法和材料。很容易在这些方法和材料方面对本发明作出修改，而且还可以改变本发明的制造方法和设备。通过研究在此公开的本发明说明或实施例，这些修改对于本领域的专业人员来说将变得更加明显。因此，本发明并不限于在此公开的具体实施例，而是包括在本发明的真正范围和精神之内的所有修改和变化，本发明的范围和精神在所附权利要求中加以概括。在此引用的所有专利、申请书和其它参考文献都是以其整体内容作为参考根据。

图 1



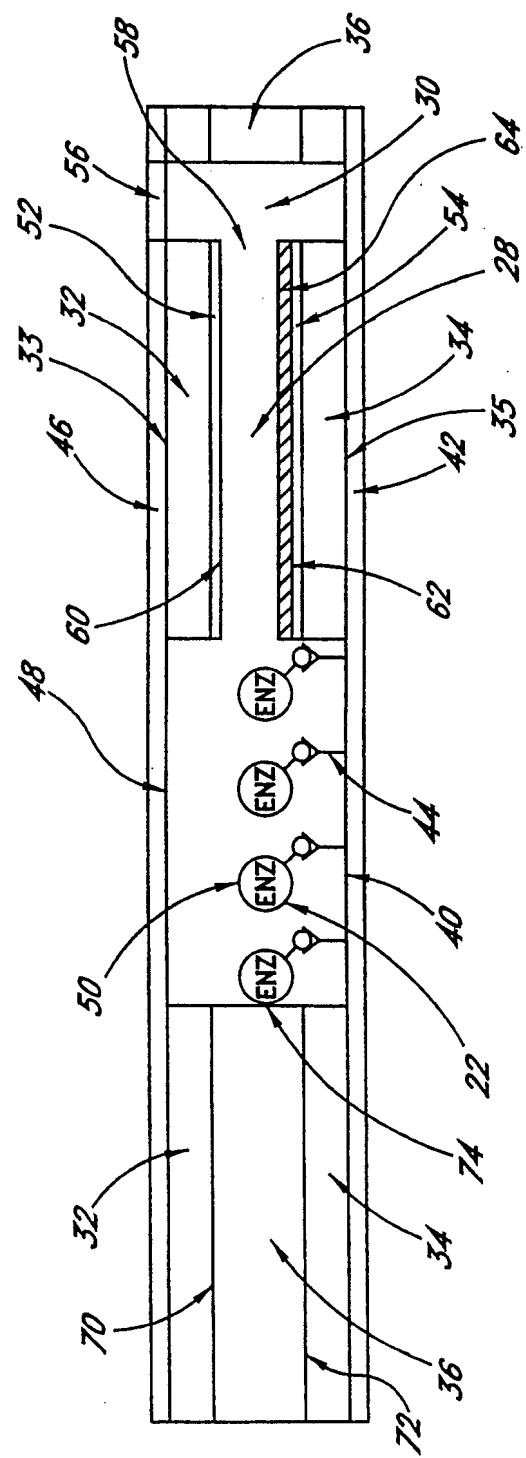


图 2

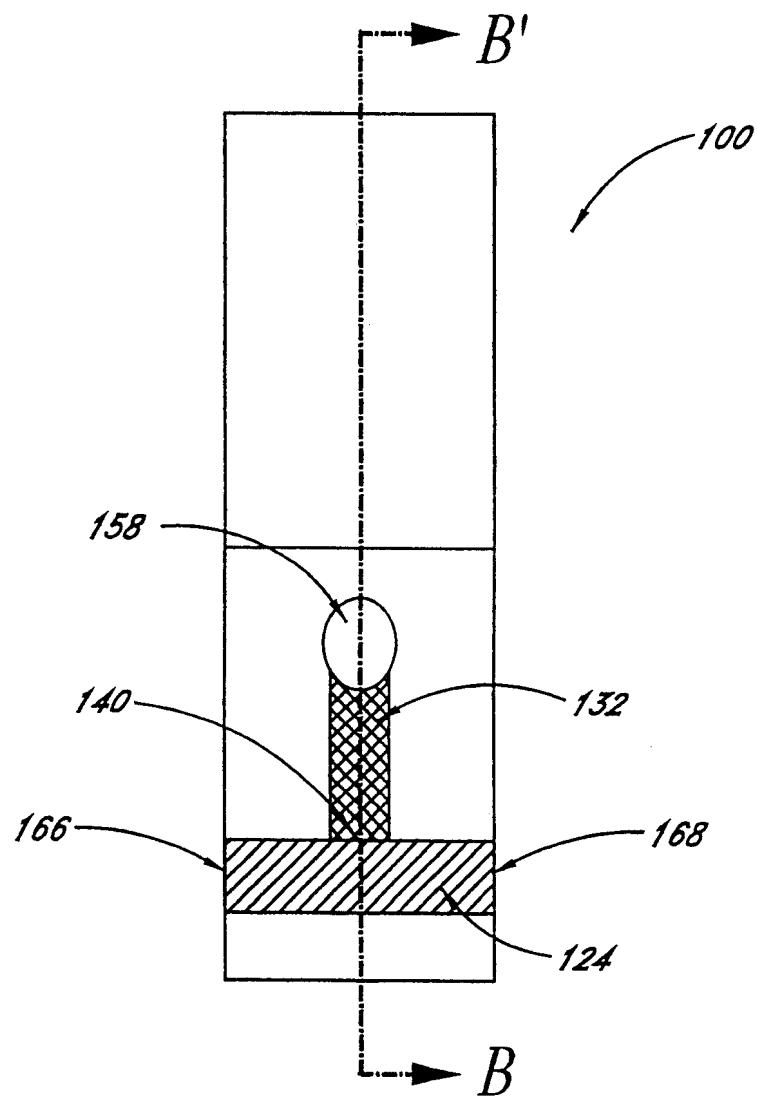


图 3

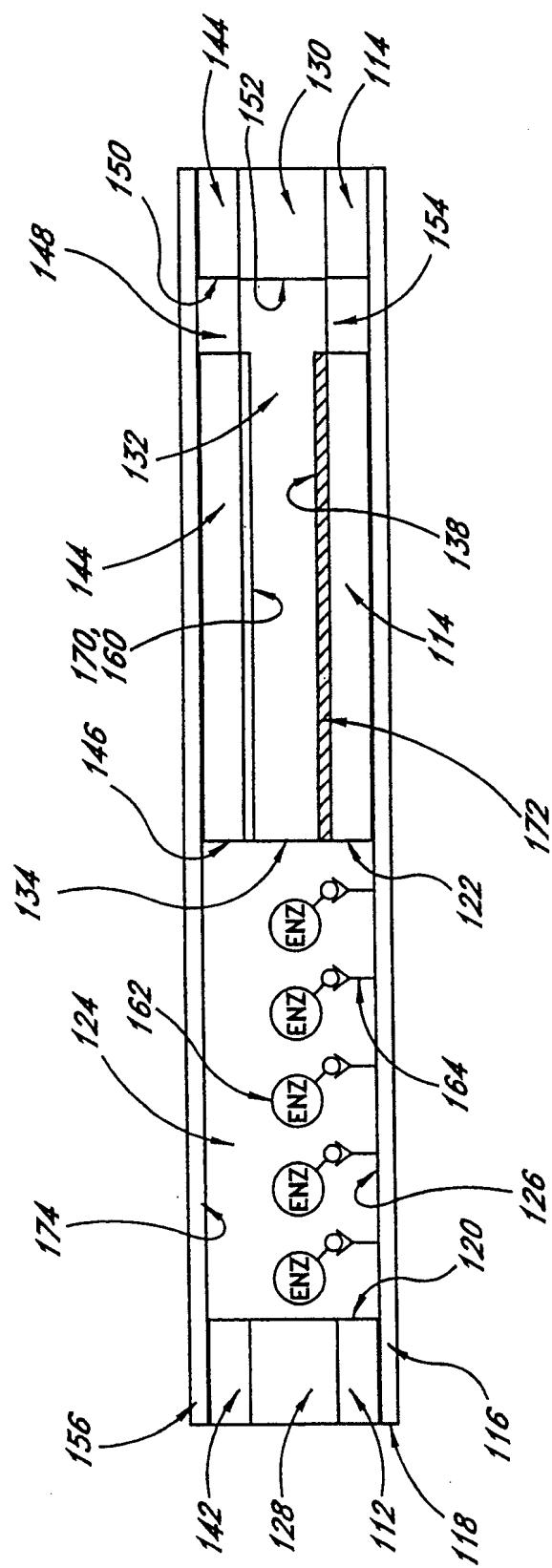


图 4

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种直接的免疫传感器和测定方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN100350248C | 公开(公告)日 | 2007-11-21 |
| 申请号 | CN03108248.3 | 申请日 | 2003-03-21 |
| [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 | A·霍奇斯 R·查特利尔 | | |
| 发明人 | A·霍奇斯 R·查特利尔 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68 G01N27/26 C12Q1/68 C12Q1/00 G01N27/327 G01N27/333 G01N27/416 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/001 G01N33/5438 | | |
| 优先权 | 10/105050 2002-03-21 US | | |
| 其他公开文献 | CN1447117A | | |
| 外部链接 | Espacenet Sipo | | |

摘要(译)

本发明公开了一种便宜的可作定量分析的一次性的免疫传感器，不需要洗涤步骤，因此不会产生废液。而且，在这种传感器的优选实施例中，用户无需进行定时操作，且这种传感器可以很容易地应用于广泛的动力学范围内的抗原-抗体相互作用。

