(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101558306 B
(45)授权公告日 2014.05.14

(21)申请号 200780045901.0

(22)申请日 2007.09.28

(30)优先权数据
11/640,458 2006.12.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2009.06.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2007/053960 2007.09.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2008/075214 EN 2008.06.26

(73)专利权人 金伯利-克拉克环球有限公司
地址 美国威斯康星州

(72)发明人 宋旭东

(74)专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280
代理人 王勇 徐丁峰

(51)Int.Cl.
G01N 33/558(2006.01)
C12Q 1/37(2006.01)
G01N 33/573(2006.01)

(56)对比文件
US 2006/0003394 A1,2006.01.05, 说明书第4-6,15,16,18-24,30,38,42-44,49,55-59段.
CN 1756834 A,2006.04.05, 摘要,权利要求1-19,说明书第2页第30行至第8页第27行,实施例1-4,图1A-7.
US 2003/0119073 A1,2003.06.26, 全文.

审查员 胡晓佳

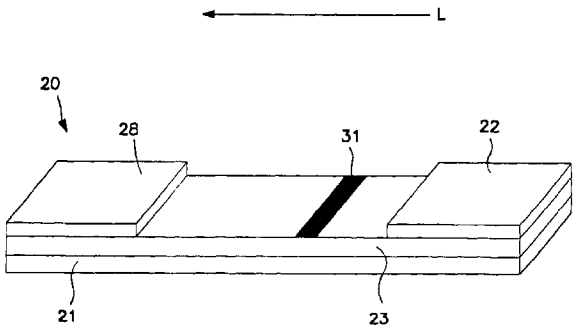
权利要求书2页 说明书16页 附图6页

(54)发明名称

酶检测技术

(57)摘要

本发明提供一种用于检测酶或酶抑制剂的存在或量的侧流测定装置。该侧流测定装置使用分子底物以便于通过检测该底物和/或在该底物的酶催化反应中形成的产物来检测酶或酶抑制剂。在一个实施方案中,例如,当接触分子底物时,酶催化与分子底物的反应并且形成产物。该侧流测定装置还包括可以产生检测信号以用于确定在测试样品中的酶的存在或量的可检测物质。例如,可检测物质可以直接或者间接附着于对产物具有亲合力的特异结合成员。在酶催化反应之后,产物可以结合可检测物质,这可以接着产生可检测信号。由该物质展示的信号然后被用于指示在测试样品中的酶或酶抑制剂的存在或量。



CN 101558306 B

1. 一种用于检测测试样品中的酶或其抑制剂的存在或量的侧流测定装置，所述侧流测定装置包括限定施用区、施用区下游的缀合区、第一检测区以及第二检测区的层析介质，所述侧流测定装置包括能够经历催化反应以形成产物的分子底物，在所述施用区中所述分子底物被可扩散地固定，从而在所述施用区中所述测试样品与所述分子底物接触，所述侧流测定装置还包括能够产生第一检测信号的第一可检测物质，在所述缀合区中所述第一可检测物质被可扩散地固定，所述第一可检测物质直接或间接地与所述产物结合以产生第一检测信号，所述侧流测定装置包括直接或间接地与分子底物结合以产生第二检测信号的第二可检测物质，其中酶或其抑制剂的存在或量可从所述第一检测区中的所述第一检测信号和所述第二检测区中的所述第二检测信号来确定。

2. 根据权利要求 1 的侧流测定装置，其中所述分子底物包括第一特异结合成员，并且其中所述产物包括第二特异结合成员。

3. 根据权利要求 2 的侧流测定装置，其中所述第一可检测物质直接或者间接地与第三特异结合成员结合。

4. 根据权利要求 3 的侧流测定装置，其中所述第三特异结合成员具有对于所述第二特异结合成员的亲合力。

5. 根据权利要求 3 的侧流测定装置，其中所述第三特异结合成员与所述第二特异结合成员相同或者是所述第二特异结合成员的类似物。

6. 根据权利要求 1-5 之任一项的侧流测定装置，其中第一接受材料固定在所述第一检测区中，所述第一接受材料与所述产物结合。

7. 根据权利要求 1-5 之任一项的侧流测定装置，其中所述酶是水解酶。

8. 根据权利要求 7 的侧流测定装置，其中所述水解酶是蛋白酶或者肽酶。

9. 根据权利要求 1-5 之任一项的侧流测定装置，其中所述分子底物是酪蛋白、白蛋白、血红蛋白、肌红蛋白、角蛋白、明胶、胰岛素、蛋白聚糖、纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白、或其衍生物。

10. 一种用于确定测试样品中的酶或其抑制剂的存在或量的方法，所述方法包括 ：

提供侧流测定装置，所述侧流测定装置包括限定施用区、施用区下游的缀合区、第一检测区以及第二检测区的层析介质，所述侧流测定装置包括可扩散地固定在施用区中的分子底物和可扩散地固定在缀合区中的第一可检测物质，所述第一可检测物质能够产生第一检测信号，所述分子底物、所述第一可检测物质以及能够产生第二检测信号的第二可检测物质与所述层析介质流体联通，其中所述分子底物能够经历催化反应以形成产物，所述第一可检测物质直接或间接地与所述产物结合以产生第一检测信号，所述第二可检测物质直接或间接地与分子底物结合以产生第二检测信号 ；

使所述层析介质的施用区与测试样品接触 ；

确定所述第一检测区中的所述第一检测信号的存在或强度 ；

确定所述第二检测区中的所述第二检测信号的存在或强度。

11. 根据权利要求 10 的方法，其中所述分子底物包括第一特异结合成员，并且其中所述产物包括第二特异结合成员。

12. 根据权利要求 11 的方法，其中所述第一可检测物质直接或者间接地与第三特异结合成员结合，所述方法还包括使所述第二特异结合成员与所述第三特异结合成员结合。

13. 根据权利要求 10-12 之任一项的方法，其中所述测试样品中的酶的量与所述第一检测信号的强度成正比。

14. 根据权利要求 10-12 之任一项的方法，其中所述测试样品中的酶的量与所述第一检测信号的强度间接地成比例。

15. 根据权利要求 10-12 之任一项的方法，其中所述酶是水解酶。

16. 根据权利要求 15 的方法，其中所述水解酶是蛋白酶或者肽酶。

17. 根据权利要求 10-12 之任一项的方法，其中所述分子底物是蛋白质、糖蛋白、肽、核酸、碳水化合物、脂质、酯、或其衍生物。

18. 根据权利要求 17 的方法，其中所述分子底物是酪蛋白、白蛋白、血红蛋白、肌红蛋白、角蛋白、明胶、胰岛素、蛋白聚糖、纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白、或其衍生物。

酶检测技术

背景技术

[0001] 通常需要确定测试样品中的特定酶的存在或者量。在一些情况下，仅酶的存在例如可以指示组织或者器官损伤的存在。同样地，异常的酶浓度也可以指示其它病症，例如细菌或者病毒感染。例如，认为蛋白酶（例如天冬氨酸蛋白酶）和金属肽酶增加了白色念珠菌 (Candida albicans) 的致病性，白色念珠菌是可以引起念珠菌阴道炎（“酵母感染”）的微生物。测试样品中的酶的存在或者浓度还可以作为对于某些类型的癌症或者其它病症的诊断标记物。例如，前列腺特异性抗原 (PSA) 是前列腺癌的公知的标记物。诊断标记物的其它实例包括组织蛋白酶 A（癌症）、组织蛋白酶 G（肺气肿、类风湿性关节炎、炎症）、纤溶酶原激活物（血栓形成、慢性炎症、癌症）和尿激酶（癌症）。

[0002] 用于检测酶的存在的一个常规技术在授予 Braach-Maksvytis 等的美国专利 6348319 中被描述。Braach-Maksvytis 等通过检测酶对底物的消化来发挥作用。例如，Braach-Maksvytis 等的图 1 例示了包括第一区 11 和第二区 12 的装置 10。第一区 11 被提供有通过肽接头 15 与链霉抗生物素蛋白 14（探针）连接的聚合物珠 13（载体），可通过蛋白酶 16 裂解肽接头。当添加蛋白酶 16 时，链霉抗生物素蛋白 14 释放并且传递到第二区 12，第二区包括通过膜的阻抗变化来检测链霉抗生物素蛋白存在的生物感受器膜 17。（第 5 栏 25-30 行）。然而，遗憾的是，技术例如 Braach-Maksvytis 等描述的技术对于某些类型的应用例如需要患者进行相对快速的诊断（自我诊断或者医护人员的帮助）的那些应用是极其复杂且成本抑制的。

[0003] 因而，当前需要一种简单且廉价的技术用于精确地检测测试样品中的酶的存在。

发明内容

[0004] 根据一个实施方案，公开了一种用于检测测试样品中的酶或者其抑制剂的侧流测定装置。该装置包括限定检测区的层析介质，分子底物，和能够产生检测信号的可检测物质。例如，检测信号可以能够在检测区中产生以确定酶或者其抑制剂的存在或者量。在一个实施方案中，接受材料可以固定在检测区中，其能够与酶反应产物或者其复合物结合。在一个实施方案中，层析介质还可以限定第二检测区，在第二检测区中能够产生第二检测信号。例如，第二接受材料可以固定在第二检测区中，其能够与分子底物或其复合物结合。

[0005] 根据另一个实施方案，公开了一种用于检测测试样品中的酶或其抑制剂的方法。该方法包括提供侧流检测装置，该侧流检测装置包括限定检测区的层析介质。该侧流装置包括能够经历催化反应以形成产物的分子底物，和用于直接或者间接产生检测信号的可检测物质。该方法包括使层析介质与测试样品接触和确定检测区中的检测信号的存在或者强度。在一些实施方案中，层析介质能够限定附加区。例如，层析介质可以限定施用区，在施用区中测试样品可以接触层析介质。在一个实施方案中，层析介质可以限定施用区的下游缀合区，在缀合区中可检测物质可以被可扩散地固定。可以使用竞争或者夹心免疫测定法来检测测试样品中的酶的存在或者浓度。

[0006] 下面将更加详细地讨论本发明公开内容的其它特征和方面。

附图说明

[0007] 针对本领域的技术人员，在说明书的余下部分中参考附图更加具体地介绍包括其最佳方式在内的本发明的充分公开，在附图中：

[0008] 图 1 是在侧流测定装置中可使用的测定装置的一个实施方案的透视图；

[0009] 图 2 是在侧流测定装置中可使用的测定装置的另一个实施方案的透视图；

[0010] 图 3 是在侧流测定装置中可使用的测定装置的另一个实施方案的透视图；

[0011] 图 4 是在一个实施方案中可使用的一种测定技术的示意例示；

[0012] 图 5 是在一个实施方案中可使用的另一种测定技术的示意例示；

[0013] 图 6 是在一个实施方案中可使用的另一种测定技术的示意例示；以及

[0014] 图 7 示意地例示了从本文描述的测定装置的一个实施方案获得的结果。

[0015] 在本发明的说明书和附图中重复使用附图标记意图表示相同或者类似特征或元件。

具体实施方式

[0016] 定义

[0017] 如在本文使用的，术语“测试样品”通常指怀疑包含酶和 / 或酶抑制剂的材料。例如，可以从生物源获得或者衍生出测试样品，所述生物源例如生理液体，包括血液、间质液、唾液、眼晶状体液、脑髓液、汗液、尿液、乳液、腹水液、粘液、滑液、腹腔液、阴道分泌物、羊水等。除了生理液体之外，还可以使用其它液体样品，例如水、食品等用于执行环境或者食品生产测定。另外，可以使用固体材料作为测试样品。测试样品可以以从源获得的那样直接使用，或者可以在预处理以改变样品的特征后使用。例如，这种预处理可以包括从血液、稀释粘液等制备浆液。预处理的方法还可以包括过滤、沉淀、稀释、蒸馏、混合、浓缩、干扰组分的灭活、试剂的加入等。而且，其还有益于改变固体测试样品以形成液体介质，以释放酶和 / 或酶抑制剂等。

[0018] 如在本文使用的，术语“分子底物”通常指分子化合物，其可以经历酶催化反应以形成产物。在一个实施方案中，分子底物可以是小于大约 3000 道尔顿（即，原子质量单位，1 道尔顿等于碳最多的同位素碳 12C 的原子质量的十二分之一）。在某些实施方案中，分子底物可以是更小，例如小于大约 2000 道尔顿，小于大约 1000 道尔顿，或者小于大约 500 道尔顿。在一个实施方案中，分子底物可以不含（即，不结合或者附着于）可能空间上、化学上或者以任何其它方式干扰分子底物和酶之间的反应的第二化合物、结构或者材料。例如，在一个实施方案中，分子底物可以不含任何报告物、珠、颗粒、标记等。

[0019] 如在本文使用的，术语“底物缀合物”通常指结合或附着第二材料，例如探针、颗粒、珠等的分子底物。

[0020] 详细描述

[0021] 现在详细地参考本发明的多种实施方案，下面阐述一个或者多个实施例。每一个实施例都是以解释而不是限制的方式提供。实际上，本领域的技术人员清楚，在不偏离本发明的范围或者精神的前提下可以对本发明公开的内容进行多种修改和改变。例如，作为一个实施方案的一部分被阐述或描述的特征可以被用在其它实施方案中以产生另一个实施

方案。因此，本发明的公开内容覆盖了在权利要求书及其等价物的范围内的修改和变化。

[0022] 本发明的公开内容通常涉及用于检测酶或者酶抑制剂的存在或量的侧流测定装置。该测定装置使用分子底物，例如肽、蛋白质、或者糖蛋白底物，以便于酶或者酶抑制剂的检测。分子底物提供酶例如蛋白水解酶的目标。具体而言，当接触分子底物时，蛋白水解酶裂解分子底物并且释放酶反应产物。该测定装置还使用在酶与分子底物反应时可以产生检测信号的可检测物质。然后由可检测物质产生的信号可以用于指示测试样品中的酶或者酶抑制剂的存在或者量。

[0023] 根据本发明的公开内容可以检测多种类型的酶。例如，可以检测转移酶、水解酶、裂解酶等。在一些实施方案中，感兴趣的酶是“水解酶”，其指催化水解反应的酶。这些水解酶的实例包括但不限于蛋白酶、肽酶、脂肪酶、核酸酶、均寡糖酶或杂寡糖酶、均多糖酶或杂多糖酶、磷酸酶、硫酸酯酶、神经氨酸酶和酯酶。在一个实施方案中，例如，可以检测肽酶。“肽酶”是水解酶，其裂解在较短肽中存在的肽键。肽酶的实例包括但不限于金属肽酶、二肽基肽酶 I、II 或者 IV 等等。在另一个实施方案中，可以检测蛋白酶。“蛋白酶”是水解酶，其裂解在较长肽和蛋白质中存在的肽键。可以检测的蛋白酶的实例包括但不限于丝氨酸蛋白酶（例如，胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶、PSA 等）、天冬氨酸蛋白酶（例如胃蛋白酶）、巯基蛋白酶（例如，激素原巯基蛋白酶）、金属蛋白酶、酸性蛋白酶、和碱性蛋白酶。其它酶在 Bronstein 等的美国专利 6243980 和 Yue 等的美国专利 20040081971 中被描述，这些文献通过参考全部引入本文。

[0024] 除了裂解分子底物的酶例如上述的那些酶之外，该测定装置还可以可选择地用于检测催化分子底物上的键形成的酶的存在和催化在分子底物中构象变化的酶的存在。例如，可以检测将功能团转移到底物的转移酶、使第二分子共价地结合底物的连接酶、聚合酶、或者异构酶。可以检测的实例性转移酶包括激酶和甲基化酶。例如，通过检测底物的磷酸化，可以检测包括蛋白激酶、肌酸激酶、己糖激酶等等的激酶。可以通过将一个或者多个甲基基团加到该底物上来检测甲基化酶，例如甲基化酶 II。

[0025] 同样地，根据本发明的公开内容还可以检测多种已知酶抑制剂的任一种。例如，水解酶的已知抑制剂包括但不限于蛋白酶、肽酶、脂肪酶、核酸酶、均寡糖酶或杂寡糖酶、均多糖酶或杂多糖酶、磷酸酶、硫酸酯酶、神经氨酸酶和酯酶的抑制剂。蛋白酶抑制剂可以包括例如天冬氨酸蛋白酶抑制剂、丝氨酸蛋白酶抑制剂、巯基蛋白酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、酸性或者碱性蛋白酶抑制剂等等。蛋白酶抑制剂的一些具体实例包括苯甲脒(benzamideine)、吲哚、胃蛋白酶抑制剂、卵巨球蛋白、氟哌啶醇、过渡态模拟物等等。转移酶抑制剂的一些具体实例包括抑制谷胱苷肽 S- 转移酶的利尿酸和苯并环庚吡啶基法呢基转移酶抑制剂 (FTI) **sarasar®**。

[0026] 如上所述，分子底物可以用于检测酶或者酶抑制剂的存在或者量。分子底物可以天然存在或是合成的。水解酶的一些合适的分子底物包括例如酯、酰胺、肽、醚、或者其它具有酶促水解键的化学化合物。酶催化的水解反应例如可以产生作为一种产物的羟基或者胺化合物，和作为第二种产物的游离磷酸盐、醋酸盐等。分子底物的具体类型可以包括例如蛋白质或者糖蛋白、肽、核酸（例如，DNA 和 RNA），碳水化合物、脂质、酯、及其衍生物等等。例如，肽酶和 / 或蛋白酶的一些适合分子底物可以包括肽、蛋白质、和 / 或糖蛋白，例如酪蛋白（例如，β - 酪蛋白、偶氮酪蛋白等），白蛋白（例如，牛血清白蛋白）、血红蛋白、肌红蛋白、

角蛋白、明胶、胰岛素、蛋白聚糖、纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白等等。其它适合的分子底物在 Simonsson 等的美国专利 4748116、Diamond 等的美国专利 5786137、Rao 等的美国专利 6197537、Henderson 等的美国专利 6235464、Nemori 等的美国专利 6485926 中有描述，这些文献通过参考全部引入本文。

[0027] 在分子底物与酶接触之后，可以形成酶反应产物。然后分子底物或者酶反应产物可以与可检测物质相互作用以直接或者间接地产生可检测信号。适合的可检测物质可以包括例如色原；发光化合物（例如荧光化合物、磷光化合物等）；放射性化合物；可视性化合物（例如，胶乳或者金属颗粒，例如金）；脂质体或者含有信号产生物质的其它泡囊；酶和 / 或底物等等。例如，适合用作可检测物质的一些酶在 Litman 等的美国专利 4275149 中有描述，该文献通过参考全部引入本文。酶 / 底物系统的一个实例是酶碱性磷酸酶和底物氮蓝四唑 -5- 溴 -4- 氯 -3- 吲哚基磷酸盐、或其衍生物或类似物，或者底物 4- 甲基伞形酮磷酸盐 (4-methylumbelliferyl-phosphate)。其它合适的可检测物质可以是在 Jou 等的美国专利 5670381 和 Tarcha 等的美国专利 5252459 中描述的那些物质，这些文献通过参考全部引入本文。

[0028] 在一些实施方案中，该可检测物质可以包含产生光学可检测信号的发光化合物。所述发光化合物可以是分子、聚合物、树枝状聚合物、颗粒等等。例如，适合的发光分子可以包括但不限于荧光素、铕螯合剂、藻胆蛋白、罗丹明、和它们的衍生物和类似物。其它适合的发光化合物是半导体纳米晶体，其通常被称为“量子点”。例如，这些纳米晶体可以包含式 CdX 的核，其中 X 是 Se、Te、S 等等。纳米晶体也可以被式 YZ 的覆盖壳钝化，其中 Y 是 Cd 或者 Zn，而 Z 是 S 或者 Se。合适的半导体纳米晶体的其它实例还可以被公开在 Barbera-Guillem 等的美国专利 6261779 和 Dapprich 的美国专利 6585939 中，这些文献通过参考全部引入本文。

[0029] 另外，适合的磷光性化合物可以包括一个或者多个金属的金属配合物，所述金属例如钌、锇、铼、铱、铑、铂、铪、钯、钼、钨、铜、铁、铬、钨、锌等等。特别优选的是钌、铼、锇、铂和钯。金属配合物可以包含一个或者多个配体，其有利于配合物在水环境或者非水环境中的可溶性。例如，配体的一些合适实例包括但是不限于吡啶、吡嗪、异烟酰胺、咪唑、二吡啶、三吡啶、菲咯啉、二吡啶吩嗪、卟啉、卟吩、以其衍生物。这些配体可以例如被烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、取代芳烷基、羧酸酯、醛、甲酰胺、氰基、氨基、羟基、亚氨基、羟基羰基、氨基羰基、脒基、胍基、酰脲、含硫基团、含磷基团以及 N- 羟基 - 琥珀酰亚胺的羧酸酯所取代。

[0030] 卟啉和卟吩金属配合物具有与亚甲基桥偶联在一起的吡咯基团以形成具有金属螯合内腔的环状结构。这些分子中的许多在室温下在适合溶剂（例如水）和无氧环境中显示了强的磷光特性。能够显示磷光特性的一些适合的卟啉配合物包括但是不限于铂 (II) 粪卟啉 -I 和 III、铂 (II) 粪卟啉、钌粪卟啉、锌 (II) 粪卟啉 -I、及其衍生物等等。类似地，能够显示磷光特性的一些适合的卟吩配合物包括但不限于铂 (II) 四 - 中 - 氟苯基卟吩和钯 (II) 四 - 中 - 氟苯基卟吩。其它适合的卟啉和 / 或卟吩配合物在 Schmidt 等的美国专利 4614723、Hendrix 的美国专利 5464741、Soini 的美国专利 5518883、Ewart 等的美国专利 5922537、Sagner 等的美国专利 6004530、和 Ponomarev 等的美国专利 6582930 中有描述，这些文献通过参考全文引入本文。

[0031] 二吡啶金属配合物还可以被用作磷光性化合物。适合的二吡啶配合物的一些实例包括但是不限于双[(4,4′-甲酯基)-2,2′-二吡啶]2-[3-(4-甲基-2,2′-二吡啶-4-基)丙基]-1,3-二氧戊环钌(II);双(2,2′二吡啶)[4-(丁烷-1-醛)-4′-甲基-2,2′-二-吡啶]钌(II);双(2,2′-二吡啶)[4-(4′-甲基-2,2′-二吡啶-4′-基)-丁酸]钌(II);三(2,2′二吡啶)钌(II);(2,2′-二吡啶)[双-双(1,2-二苯基膦基)乙烯基]2-[3-(4-甲基-2,2′-二吡啶-4′-基)丙基]-1,3-二氧戊环锇(II);双(2,2′-二吡啶)[4-(4′-甲基-2,2′-二吡啶)-丁基胺]钌(II);双(2,2′-二吡啶)[1-溴4(4′-甲基-2,2′-二吡啶-4-基)丁烷]钌(II);双(2,2′-二吡啶)马来酰亚氨基己酸,4-甲基-2,2′-二吡啶-4′-丁基酰胺钌(II)等等。可以显示磷光特性的其它适合的金属配合物可以被公开在Richter等的美国专利6613583、Massey等的美国专利6468741、Meade等的美国专利6444423、Massey等的美国专利6362011、Bard等的美国专利5731147、和Massey等的美国专利5591581中,这些文献通过参考全文引入本文。

[0032] 在一些情况下,使用“时间分辨”发光检测技术。时间分辨检测涉及使用一个或多个短的光脉冲激发发光化合物,然后在激发之后并且在测量余下的发光信号之前典型地等待一定的时间(例如在大约1到100微秒)。以这样的方式,消除了任何短暂的磷光或者荧光背景信号和散射的激发辐射。这一消除多数的背景信号的能力可以产生大于常规荧光或者磷光为2-4个数量级的灵敏度。因此,设计时间分辨检测以利用某些发光材料的特性来减少来自发射源或散射处理(由激发辐射的散射引起)的背景信号。

[0033] 为了有效地发挥功能,时间分辨技术通常需要对于发光化合物来说相对长的发射寿命。这被期望以使得化合物在任何短暂的背景信号消耗掉之后很久发射其信号。而且,长发光寿命使得使用时间门控测量方法的低成本回路成为可能。例如,可检测化合物可以具有大于大约1微秒的发光寿命,在一些实施方案中大于大约10微秒、在一些实施方案中大于大约50微秒,而在一些实施方案中从大约100微秒到大约1000微秒。另外,所述化合物也可以具有相对大的“斯托克司位移”。术语“斯托克司位移”通常被定义为发光辐射的光谱线或带向发射波长的位移比激发线或带向发射波长的位移更长。相对大的斯托克司位移允许发光化合物的激发波长保持远离其发射波长并且是期望的,因为在激发和发射波长之间的大的差异使得更容易消除来自发射信号的反射激发辐射。进一步,大的斯托克司位移还将来自样品中的发光分子的干涉最小化和/或将由于蛋白质或者胶体引起的光散射最小化,该蛋白质或者胶体与一些体液(例如血液)一起存在。另外,大的斯托克司位移还使得关于昂贵的、高精度的滤波器以消除背景干涉的需求最小化。例如,在一些实施方案中,发光化合物具有大于大约50纳米的斯托克司位移,在一些实施方案中大于大约100纳米,在一些实施方案中从大约100到大约350纳米。

[0034] 例如,在时间分辨检测技术中使用的一种适合类型的荧光化合物包括钐(Sm(III))、镝(Dy(III))、铕(Eu(III))和铽(Tb(III))的镧系元素螯合物。以实质上更短波长激发这样的螯合物之后,该螯合物可以显示很强的红移的窄带的长时间发射。典型地,由于在分子中发色团靠近镧系元素,所以螯合物具有很强的紫外线激发带。在通过发光团进行激发之后,激发能量可以从激发的发光团传递到镧系元素。之后是镧系元素的荧光发射特性。例如与对于荧光素只有大约28纳米相比,铕螯合物具有是大约250到大约350纳

米的非常大的斯托克司位移。而且，与其它荧光化合物的大约 1 到大约 100 纳秒相比，铕螯合物的荧光是长寿的，其寿命是大约 100 到大约 1000 微秒。另外，这些螯合物具有窄的发射光谱，典型地具有在大约 50％的发射率的小于大约 10 纳米的带宽。一种适合的铕螯合物是 N-（对异硫氰基苄基）- 二亚乙基三胺四乙酸 -Eu^{+3}。

[0035] 另外，镧系元素螯合物在水溶液或者悬浮液中是惰性的、稳定的、和具有固有的荧光性，其还可以用于取消对胶束形成试剂的需要，该胶束形成试剂经常用于保护螯合物在水溶液或者悬浮液中具有有限可溶性和淬灭问题。这样的螯合物的一个实例是 4-[2-(4- 异硫氰基苯基）乙炔基]-2,6- 双（[N,N- 双（羧甲基）氨基] 甲基）- 吡啶 [参考 :Lovgren T. 等 ;Clin.Chem.42,1196-1201(1996)]。多个镧系元素螯合物还显示出极其高的信噪比。例如，一种这样的螯合物是四配位基 β - 二酮 - 铕螯合物 [参考 :Yuan,J. 和 Matsumoto,K. ;Anal.Chem.70,596-601(1998)]。除了上述荧光化合物，适合使用的其它化合物可以被公开在 Mullinax 等的美国专利 6030840、Davidson 等的美国专利 5585279、Singer 等的美国专利 5573909、Wieder 等的美国专利 6242268、和 Hemmila 等的美国专利 5637509 中，这些文献通过参考全文引入本文。

[0036] 如所述，酶催化反应的分子底物或者产物可以与可检测物质相互作用以产生可检测信号。例如，酶反应产物可以特异地与化合物结合，其接着可以与可检测物质结合。例如，在一些实施方案中，酶反应产物可以是特异结合对的一个成员，所述特异结合对即两个不同分子，其中一个分子化学地和 / 或物理地与第二个分子结合。免疫反应的特异结合成员可以包括抗原、半抗原、抗体（第一或者第二），和其复合物，包括通过重组体 DNA 方法或者肽合成来形成的那些。抗体可以是单克隆或者多克隆抗体、重组体蛋白质或其混合物或片段，以及抗体和其它特异结合成员的混合物。这些抗体的制备和它们作为特异结合成员使用的适合性的细节对于本领域的技术人员是公知的。其它公共的特异结合成员包括但是不限于生物素和抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性链亲和素、captavidin、或者抗生物素抗体 ;蛋白 A 和 G ;碳水化合物和凝集素，互补核苷酸序列（包括在 DNA 杂交测定中使用的以检测目标核酸序列的探针和捕获核酸序列）;互补肽序列，包括通过重组方法形成的那些 ;效应物和受体分子 ;激素和激素结合蛋白 ;酶辅助因子和酶，酶抑制剂和酶 ;及其衍生物等等。而且，特异结合对可以包括多个成员，其是原特异结合成员的类似物、衍生物、和 / 或片段。当用于间接产生信号时，是特异结合对的一个成员的酶反应产物可以被放置成与特异结合对的另一成员缀合的可检测物质相接触。因此，酶反应产物通过特异结合对间接地与可检测物质结合。然后使用本领域的技术人员公知的技术，该信号可以很容易地被（直接或者间接地）检测。

[0037] 不管酶反应产物或未反应的分子底物是否直接或者间接地与可检测物质结合，可检测物质可以与颗粒结合或者包含颗粒（有时称为“珠”或“微珠”）。特别地，如下面将要进一步说明的，颗粒增强了可检测物质通过层析介质并且在检测区中变成固定的能力。例如，可以使用天然存在的颗粒，例如核、支原体、质粒、质体、哺乳动物细胞（例如红细胞影）、单细胞微生物（例如，细菌）、多糖（例如琼脂糖）等。进一步，也可以使用合成颗粒。例如，在一个实施方案中，用荧光或者有色染料来标记胶乳颗粒。尽管可以使用任何的乳胶颗粒，但乳胶颗粒通常形成于聚苯乙烯、丁二烯苯乙烯、苯乙烯丙烯酸 - 乙烯基三聚物、聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸乙酯、苯乙烯 - 马来酸酐共聚物、聚乙酸乙烯酯、聚乙

烯基吡啶、聚二乙烯基苯、聚对苯二甲酸丁二醇酯、丙烯腈、氯乙烯丙烯酸酯等、或者其醛、羧基、氨基、羟基或酰肼衍生物。其它适合的颗粒可以被公开在 Jou 等的美国专利 5670381 和 Tarcha 等的美国专利 5252459 中。商业上可获得的合适的荧光颗粒的实例包括俄勒冈州的尤金的 MolecularProbes 公司销售的商业名称为“FluoSphere”(Red 580/605) 和“TransfluoSphere”(543/620) 的荧光羧基化微球，以及也被 MolecularProbes 公司销售的“Texas Red”和 5- 和 6- 羧基四甲基罗丹明。另外，商业上可获得的合适的有色胶乳微粒的实例包括印第安纳州的费舍尔的 Bangs Laboratories 公司销售的羧基化胶乳珠。

[0038] 当被使用时，颗粒的形状通常可以变化。在一个具体的实施方案中，例如，颗粒是球形形状。然而，应理解，本发明还考虑其它形状，例如板、棒、圆盘、条、管、不规则形状等。另外，颗粒的大小也可以改变。例如，颗粒的平均大小（例如直径）可以从大约 0.1 纳米到大约 1000 微米的范围，在一些实施方案中，从大约 0.1 纳米到大约 100 微米的范围，在一些实施方案中，从大约 1 纳米到大约 10 微米的范围。例如，“微刻度”颗粒通常是希望的。当使用时，这样的“微刻度”颗粒可以具有的平均大小在从大约 1 微米到大约 1000 微米的范围，在一些实施方案中，从大约 1 微米到大约 100 微米的范围，在一些实施方案中，从大约 1 微米到大约 10 微米的范围。同样地，“纳刻度”颗粒也可以被使用。这样的“纳刻度”颗粒可以具有的平均大小在从大约 0.1 到大约 10 纳米的范围，在一些实施方案中，从大约 0.1 到大约 5 纳米的范围，在一些实施方案中，从大约 1 到大约 5 纳米的范围。

[0039] 在使用中，使用者可以允许测试样品与分子底物接触一定的时间周期。例如，本领域的技术人员很容易地认识到，在反应物之间以保证酶催化反应的接触时间取决于感兴趣的酶的活性，其又取决于温度、pH、底物浓度、抑制剂的存在（竞争（与酶结合），无竞争（与酶 - 底物复合物结合），或者非竞争（与酶和 / 或酶 - 底物复合物结合））等等。根据需要可选择地控制这些因素来增加或者减少接触时间。例如，接触时间可以大于大约 1 分钟，在一些实施方案中，从大约 5 分钟到大约 50 分钟，在一些实施方案中，从大约 10 分钟到大约 25 分钟。类似地，pH 可以被选择性地控制以利于酶的活性。例如，在测试样品中的高水平的基础物质（例如胺类）可以产生对于一些酶的最佳活性来说太高的 pH，例如大于 8。具体而言，酶在从大约 3 到大约 8 的 pH 水平时可以具有最佳活性，在一些实施方案中，从大约 4 到大约 7。因此，如果需要，可以使用缓冲剂或者其它 pH 改变化合物来保持期望的 pH。类似地，可以使用加热或者冷却系统来选择性地控制温度以利于酶活性。

[0040] 在接触之后，任何存在于测试样品中的酶通常将与底物分子的至少一部分相互反应。结果，可以形成多种类物质，包括酶反应产物、部分裂解的复合物（例如，酶底物复合物）、未反应底物分子以及酶催化反应的次级反应物和产物。例如，在水解酶的情况下，在混合物中将包括在底物分子的酶催化裂解期间形成的至少两种产物（它们可以是相同的或者不同的）。当考虑到在底物上形成新键的酶催化反应时，在混合物中包含的物质可以包括参与反应的其它反应物（例如，ATP、甲基供给反应物、单体例如氨基酸、和通过聚合酶或连接酶等加到底物上的核苷酸等）以及在酶催化反应中形成的次级产物（例如，ADP）。

[0041] 更长的接触时间和更大的酶浓度可以在所得到的混合中产生更大浓度的酶反应产物，例如在多级酶反应的情况下，更长接触时间可以允许多级反应以进一步继续到完成。相应地，一些实施方案包括一种用于选择性地控制处理的各组分的接触时间的方法。例如，与分子底物接触后，测试样品可以包含在根据任何流动控制方法（例如，通过装置的物理

设计的流动限制、装置的材料选择等等）的装置的区域中以便选择性地控制各种组分的接触时间。

[0042] 在与分子底物接触的时间期间和/或之后，测试样品可以与可产生可检测信号的可检测物质接触。例如，可检测物质可以直接或者间接地结合酶反应产物，如它形成的那样。总的来说，当在测试样品中酶浓度开始增加时，在混合物中将形成更多的酶反应产物。因此，酶浓度与混合物的酶反应产物的量相关。如果酶反应产物能够直接与可检测物质结合以产生检测信号（例如发光化合物、有色染料等），则检测信号的存在或者强度可以被相对简易地定性地、定量地、或者半定量地确定。例如，在一个实施方案中，酶的量与与可检测物质结合的酶产物的信号强度成正比。如果需要，可以绘制信号强度比已知酶浓度的范围的酶浓度的图形以产生强度曲线。为了确定在未知的测试样品中的酶的量，然后可以根据强度曲线将信号强度转换成酶的浓度。

[0043] 在一些情况下，可以优选在测试样品与分子底物和任何其它期望反应物例如缓冲剂等相互反应的一段时间之后，将测试样品与可检测物质接触。例如，可以期望使用不是酶反应产物的组分来确定检测信号的存在或者强度。在一个实施方案中，可检测物质可以直接或者间接地与混合物的分子底物结合。因此，在测试样品中的酶可以与分子底物反应的接触期间之后，可以将测试样品与可检测物质接触。在该实施方案中，酶的量可以间接地与与可检测物质结合的底物的信号强度成比例。

[0044] 在任何情况下，本发明公开的检测方法可以提供双放大酶检测方法。具体而言，一种方法可以包括第一酶反应放大，随后是第二信号放大。两级放大方法可以提高检测的灵敏度和/或者精确度。而且，本发明公开的方法可以给酶反应放大提供有效反应时间和样品体积控制方案。另外，本发明公开的方法可以区分常规测定方法中的酶的活性形式和非活性形式，而不需要多种以前已知的酶测定中所要求的灭活步骤。

[0045] 在这点上，现在将更加详细地描述可以任选地使用以利于检测的测定装置的多种实施方案。参考图 1，例如，显示测定装置 20 的一个实施方案，其包含通过载体 21 承载的层析介质 23。该层析介质 23 可以由液体能够通过的多种材料的任一种制造，例如，流体通道、多孔膜等。例如，层析介质 23 可以是由这样的材料形成的多孔膜，所述材料例如但不限于自然的、合成的、或者合成修改的自然材料，例如多糖（例如纤维素材料如纸以及纤维素衍生物如醋酸纤维素和硝化纤维素）；聚醚砜；聚乙烯；尼龙；聚偏二氟乙烯 (PVDF)；聚酯；聚丙烯；硅；无机材料，例如灭活的氧化铝、硅藻土、$MgSO_4$、或者其它用聚合体均匀分散在多孔聚合物基质中的无机微细材料，该聚合物例如氯乙烯、氯乙烯－丙烯共聚物和氯乙烯－醋酸乙烯共聚物；布料，所述布料为自然的（例如棉）以及合成的（例如尼龙或人造纤维）；有孔凝胶，例如硅胶、琼脂糖、葡聚糖和明胶；多聚膜，例如聚丙烯酰胺；等等。在一个具体的实施方案中，所述层析介质由硝化纤维素和/或聚醚砜材料形成。应该理解，术语“硝化纤维素”指纤维素的硝酸酯，其可以是单独的硝化纤维素，或者硝酸和其它酸的混合酯，所述其它酸例如是具有 1-7 个碳原子的脂族羧酸。尽管没有要求，但是使用层析介质 23 用于化学分离可以提供比其它常规分离技术例如离心分离更高的益处。例如，对于很多消费领域，包括期望一次性试剂盒的那些领域，层析介质 23 可以简化并且减少所得的侧流测定装置的成本。

[0046] 载体 21 可以由能够承载层析介质 23 的任何材料形成。尽管没有要求，但是载体

21 可以是透明的，使得光线容易地通过。另外，还通常希望载体 21 是液体不能渗透的，以使得流过该介质的液体不渗漏过载体 21。用于该载体的适合的材料的实例包括但是不限于玻璃；聚合材料，例如聚苯乙烯、聚丙烯、聚酯（例如**Mylar®**膜）、聚丁二烯、聚氯乙烯、聚酰胺、聚碳酸酯、环氧化物、甲基丙烯酸酯和聚三聚氰胺（polymelamine）；等等。正如本领域公知的，层析介质 23 可以被浇铸到载体 21 上，其中得到的叠层可以被冲切至期望的尺寸和形状。可选择地，可以例如使用粘接剂简单地将层析介质 23 层叠到载体 21 上。在一些实施方案中，将硝化纤维素或者尼龙多孔膜粘接到**Mylar®**膜。使用粘接剂使多孔膜结合到**Mylar®**膜，例如压敏粘接剂。在商业上从马萨诸塞州的贝德福德的 Millipore 公司可获得这种类型的叠层结构物。合适的叠层结构物的其它实例被公开在 Durley，III 等的美国专利 5075077 中，该文献通过参考全部引入本文。

[0047] 测定装置 20 也可以使用吸收材料 28。该吸收材料 28 通常接收迁移通过整个层析介质 23 的液体。正如本领域公知的，吸收材料 28 可以辅助提升毛细管作用和液体流动通过该介质 23。

[0048] 在图 1 所示的实施方案中，将测试样品直接施用在缀合垫 22 上。提供的反应剂可以包括一个或者多个分子底物、辅助因子、缓冲剂、抑制剂或者有助于提高酶反应的其它反应剂。例如，对于测定有利地需要稀释剂的测试样品，提供的反应剂可以包括预定量的稀释剂，以及其它反应剂。可以将测试样品添加到稀释剂中以启动酶反应。提供的反应剂可以根据需要被一起提供或者单独提供。例如，一种稀释剂可以与其它反应剂物理上分开。在将测试样品添加到例如于装置上形成的混合孔中的稀释剂中之后，混合物可以与添加反应剂接触。在所示实施方案中，在测试样品与在缀合垫处提供的反应剂组合期间和之后进行接触。

[0049] 缀合垫 22 与多孔膜 23 流体联通，混合物在图 1 中的箭头“L”所示的方向上行进通过多孔膜 23。可以用于形成缀合垫 22 的一些适合的材料包括但是不限于硝化纤维素、纤维素、多孔聚乙烯垫、和玻璃纤维滤纸。该缀合垫 22 可以包括可扩散地固定到其的可检测物质，混合物的组分可以优先地与可检测物质结合（直接或者间接）。例如，缀合垫 22 可以包括用可检测物质标记的可扩散地固定的探针，该探针额外包括用于酶反应产物、分子底物、或混合物的其它组分的特定粘合剂。因此，包括可检测物质和混合物的组分的缀合探针可以被形成。以如上所述的方式，使用多种公知技术的任一种，例如通过共价键合和 / 或物理吸收，混合物的组分例如酶反应产物可以与探针缀合。在一个特定的实施方案中，探针的羧基基团被活化并且与酶反应产物的氨基基团反应以形成酰胺键。如果需要，缀合垫 22 也可以包含可扩散地或者不可扩散地固定到其的一个或者多个测定反应剂，例如缓冲剂、抑制剂等。

[0050] 不管如何，层析介质 23 限定了检测区 31，在检测区中缀合探针可以被捕获并被检测。缀合探针被捕获的方式可以取决于探针的性质。例如，在一些实施方案中，生物接受材料可以被固定在检测区 31 中以用于捕获生物组分。这样的生物接受材料是本领域公知的，并且可以包括但是不限于抗体、抗原、半抗原、生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性链亲和素、captavidin、蛋白 A、蛋白 G、碳水化合物、凝集素、核苷酸序列、肽序列、效应物和受体分子、激素和激素结合蛋白、酶辅助因子和酶、酶抑制剂和酶，及其衍生物。

[0051] 当然，用于捕获和检测缀合探针的任何其它适合的技术也可以被使用。例如，在一

些实施方案中，可以将非生物接受材料固定在检测区 31 中以用于捕获探针。例如，在一个实施方案中，该接受材料是聚电解质。聚电解质可以具有净正或负电荷，以及通常是中性的净电荷。具有净正电荷的聚电解质的一些适合实例包括但是不限于聚赖氨酸（从密苏里州的圣路易斯的 Sigma-Aldrich Chemical 公司可商业获得）、聚乙撑亚胺；表氯醇 - 功能化聚胺和 / 或聚酰胺型胺，例如聚（二甲胺 - 共 - 表氯醇）；聚二烯丙基二甲基 - 氯化铵；阳离子纤维素衍生物，例如用季铵水溶性单体接枝的纤维素共聚物或纤维素衍生物；等等。在一个具体的实施方案中，可以使用 **CelQuat®** SC-230M 或 H-100（从 National Starch&Chemical 公司可获得），其是包含季铵水溶性单体的纤维素衍生物。另外，具有净负电荷的聚电解质的一些适合实例包括但是不限于聚丙烯酸，例如聚（乙烯 - 共 - 甲基丙烯酸钠盐）等。还应理解，其它的聚电解质也可以使用在本发明公开的方法中，例如两亲聚电解质（即，具有极性部分和非极性部分）。例如，适合的两亲聚电解质的一些实例包括但是不限于聚（苯乙烯基 -b-N- 甲基 2- 乙烯基碘化吡啶鎓和聚（苯乙烯基 -b- 丙烯酸），这两个都可以从加拿大的多尔瓦尔的 PolymerSource 公司获得。聚电解质的其它实例被更详细地描述在 Song 等的美国专利申请公开 20030124739 中，该文献通过参考全部引入本文。

[0052] 尽管通常可以使用任何聚电解质，但是对于具体应用所选择的聚电解质可以根据缀合探针的性质而变化。特别地，聚电解质的分布电荷允许其结合到具有相反电荷的物质。因此，例如具有净正电荷的聚电解质通常更好地配备以与带负电荷的缀合探针（例如染料颗粒）相结合，而具有净负电荷的聚电解质通常更好地配备以与带正电荷的缀合探针相结合。因此，在这样的实例中，在这些分子之间的离子相互作用允许在检测区 31 中发生期望的结合。然而，尽管离子相互作用被主要使用以获得期望的结合，已经发现，聚电解质可以与具有相似电荷的探针相结合。

[0053] 根据一个实施方案，与包括可检测物质的探针相缀合的酶反应产物可以具有对于在检测区 31 中的接受材料的亲合力。在该实例中，结合探针可以通过在酶反应产物和接受材料之间的特异结合固定在检测区 31 中，使得可以检测可检测物质产生的信号。例如，酶反应产物可以通过第一特异结合位点与探针结合，并且酶反应产物可以包含显示对于接受材料具有特异亲合力的第二特异结合位点。

[0054] 检测区 31 通常可以提供许多的不同检测区域，使得使用者可以更好地确定在测试样品中的酶的浓度。当被利用时，每个区域可以包含相同或不同的接受材料。例如，检测区 31 可以包括两个或者多个不同的检测区域（例如线、点等）。两个或者多个不同的检测区域的使用可以提供某些益处，例如由于反应复合物或者其它材料的消耗过度而利于半定量和 / 或禁止可能的假阳性。检测区域可以以线的形式在基本垂直于测试样品流过层析介质 23 的方向上布置。同样地，在一些实施方案中，检测区可以以线的形式在基本平行于测试样品流过介质 23 的方向上布置。

[0055] 对于图 1 中示出的实施方案，当在测试样品中的酶浓度增加时，更多的缀合探针被形成并且在检测区 31 中变为固定。可检测的酶反应产物在检测区 31 中的增加量导致信号强度的增加。根据该信号强度的这一增加，酶的存在或浓度可以容易地被确定。例如，在一个实施方案中，在检测区 31 中酶的量与信号强度 I_1 成正比。如果需要，可以绘制该信号强度 I_1 比已知酶浓度范围中的酶浓度以产生强度曲线。为了确定在未知测试样品中的酶量，然后根据强度曲线可以将信号强度转换成酶浓度。

[0056] 可以理解，检测区 31 的一个或者多个不同的区域可以展示信号强度和酶浓度之间的上述关系；然而，不需要每一个不同区都展示这样的关系。例如，在一些实施方案中，多个不同区域中的仅一个可以展示与酶浓度成正比的信号强度。其它不同区域的信号强度（例如减少假阳性所使用的那些）可以另外地保持恒定，或者展示信号强度的增加和 / 或降低。只要检测区 31 的至少一个不同区域满足直接关系，则认为检测区 31 展示的信号强度与酶浓度成正比。

[0057] 本发明的某些实施方案可以使用在测定装置上的样品施用区。因此，测试样品可以被直接施用到缀合垫 22 的上游装置。在这一点上，现在将详细地描述将测试样品施用到包括样品施用区的装置的不同实施方案。参考图 2，例如显示了测定装置 120，其包括位于载体 121 上的层析介质 123、吸收材料 128、和样品施用垫 124。可以将测试样品直接施用到样品施用垫 124。样品施用垫 124 可以包含一个或者多个可扩散地或者不可扩散地固定到其的测定预处理反应物。例如，样品施用垫 124 可以包含一个或者多个分子底物、辅助因子、缓冲剂、抑制剂、或者促进酶反应所使用的其它试剂。底物和酶可以彼此接触并且被允许在将测试样品施用到样品施用垫 124 时形成的混合物中相互反应。因此，样品施用垫 124 实际上可以有效限定装置上的反应区。在一些实施方案中，通过使用样品施用垫 124 来更具体地控制接触时间 / 反应时间。例如，可以控制样品施用垫 124 的孔隙率来控制混合物从样品施用垫 124 到装置 120 的相邻部分的流速。在另一个实施方案中，样品施用垫 124 可以通过屏障临时地与装置 120 的相邻区分离开。例如，样品施用垫可以限定一个孔，在该孔中可以形成并保持混合物。在期望的接触期间之后，可以移除临时的屏障，例如门，并且混合物可以通过多孔性膜、流体通道或类似物流动到缀合垫 122。

[0058] 能够产生可检测信号的探针可以可扩散地固定到缀合垫 122，该缀合垫 122 被配置成与混合物的组分结合。例如，探针可以包含可检测物质，例如以上所述的那些。探针也可以包含被可检测物质标记或施用的颗粒。在一些实例中，期望以某种方式修改探针。例如，用特异结合成员修改探针以形成具有对酶反应产物、分子底物、或混合物的其它组分具有特异亲合力的探针。以如上所述的方式，使用多种已知技术的任一种，例如通过共价键合和 / 或物理吸附，通常可以将特异结合成员施用到探针上。在一个特定实施方案中，探针表面上的羧基基团被激活并且与特异结合成员的氨基基团反应以形成酰胺键。

[0059] 不管其特定结构，测定装置 120 典型地包括检测区 131，在该检测区中混合物的组分，例如酶反应产物可以被捕获并被检测。使用多种测定方式，可以在该检测区 131 中检测酶反应产物。在一个实施方案中，例如，“夹心”测定方式被使用，其中探针的特异结合成员被选择为具有对酶反应产物的亲合力。例如抗体、抗原等的酶反应产物典型地具有两个或者多个结合位点（例如表位）。这些结合位点之一被探针的特异结合成员占据以形成缀合探针。然而，酶反应产物的游离结合位点可以随后与在第一检测区 131 中固定的接受材料结合以形成新的三重夹心复合物。可选择地，使用直接或间接的“竞争性”测定方式，可以检测酶反应产物。在这样的实例中，探针的特异结合成员可以与酶反应产物相同或是酶反应产物的类似物。因此，当到达检测区 131 时，检测探针和酶反应产物竞争固定的接受材料的可利用结合位点。当然，任何其它测定方式对于使用也是适合的。

[0060] 在图 2 所示的实施方案中，当开始增加测试样品中的酶浓度时，更多的酶产物反应在混合物中形成。因此，如果使用夹心测定方式，更多的酶反应产物与可检测探针结合，

形成缀合探针，使得酶的量与在检测区 131 处的信号强度成正比。另一方面，如果使用竞争性的测定方式，酶的量与检测区 131 处的信号强度成间接比例。如果需要，可以绘制信号强度比已知酶浓度的范围内的酶浓度以产生强度曲线。为了确定在未知的测试样品中的酶的量，然后可以根据强度曲线将信号强度转换成酶浓度。

[0061] 如本文公开的测定装置可以包括在该装置上的附加区。例如，参考图 3，测定装置 120 被图示为与图 2 的测定装置 120 相同，只是它还包含定位在检测区 131 的下游的第二检测区 135。第二检测区 135 可以提供一个或者多个不同的区域（例如线、点等），并且可以被定位在相对于混合物的流动的任何方向上。第二接受材料被固定在第二检测区 135 中的介质 123 上。第二接受材料可以用作对于没有在第一检测区 131 中结合的任何可检测物质的固定结合位点。在一个实施方案中，例如其中使用“直接”竞争性测定的实施方案中，第一接受材料包含具有对于酶反应产物和探针（即，该探针具有结合到其的特异结合成员，该成员与酶反应产物相同或者是其类似物）的特异结合亲合力的抗体。第二接受材料包含具有对于探针的特异结合亲合力的聚电解质。当存在时，混合物的酶反应产物与探针竞争第一接受材料的可利用结合位点。任何剩下的、未结合的探针行进通过第一检测区 131 到达第二检测区 135。因为探针具有对于第二接受材料的特异亲合力，它们在第二检测区 135 中变成为固定。

[0062] 同样地，在使用“间接”竞争性测定的另一实施方案中，酶反应产物可以包含特异结合成员（例如生物素）并且探针可以是与互补结合成员（例如链霉抗生物素蛋白）结合的染色颗粒，该互补结合成员具有对于酶反应产物的亲合力。第一接受材料包含与酶反应产物相同或是其类似物的特异结合成员，由此具有对探针的亲合力。第二接受材料包含也具有对探针的结合亲合力的聚电解质。当存在时，酶反应产物与探针结合以形成缀合探针，由此减少了可用于对于与第一接受材料结合的探针的量。相反，与酶反应产物复合的那些缀合探针行进通过第一检测区 131 到达第二检测区 135。因为探针具有对于所选择的聚电解质的特异亲合力，因此它们在第二检测区 135 中变成固定。

[0063] 在参考上述的竞争性测定实施方案中，当酶的浓度提高时，由于在混合物中的酶反应产物的存在，在第二检测区 135 处的信号强度 I_2 也开始提高。根据信号强度的提高，可以容易地确定酶的存在或者浓度。例如，在一个实施方案中，酶的量与在第二检测区 135 处的信号强度 I_2 成正比。如果需要，可以绘制信号强度 I_2 比对于已知酶浓度的范围内的酶浓度以产生强度曲线。为了确定在未知测试样品中的酶的量，然后根据强度曲线可以将信号强度转换成酶浓度。应该理解，正如关于第一检测区 31 和 / 或 131 的上述讨论的那样，只要第二检测区 135 的一个不同的区域满足直接关系，则认为通过第二检测区 135 展示的信号强度与酶浓度成正比。

[0064] 同样地，在参考上述的实施方案中，在检测区 131 处的信号强度 (I_1) 和第二检测区 135 处的信号强度 (I_2) 之间可以存在相反关系。例如，因为存在预定量的探针，在第二检测区 135 处捕获的量与在检测区 131 处捕获的量成反比例。作为相反关系的结果，通过比较这两个检测区处的信号强度，酶的浓度在某些情况下可以在扩展的范围内被更有效地测量。例如，在一个实施方案中，酶的量与信号强度“I_2”与信号强度“I_1”的比率成正比。基于该比率所落在的范围，可以确定对于酶的一般浓度范围。如果需要，可以绘制 I_2 与 I_1 的比率比已知酶浓度的范围内的酶浓度以产生强度曲线。为了确定在未知测试样品中的酶的

量，然后根据强度曲线可以将信号强度比率转换成酶浓度。应该注意，可以绘制在 I_2 与 I_1 之间的可选的数学关系比酶浓度以产生强度曲线。例如，在一个实施方案中，可以绘制 $I_2/(I_2+I_1)$ 的值比酶浓度以产生强度曲线。

[0065] 一种装置可以包括附加检测区。例如，一种装置可以包括检测区，在该检测区中可以检测混合物的第二组分。接受材料可以被固定在该第二检测区中，其是对于混合物的第二组分的特异结合成员。例如，在第一检测区中可以结合并检测酶反应产物，以及在第二检测区中可以结合并检测分子底物。装置上可以包括的其它区可以包括例如用于确认该装置正确工作的对照区、一个或者多个用于提供对该装置的内部校准能力的校准区等等。

[0066] 如上所述，可以定性地、定量地、和 / 或半定量地确定信号强度。在定量的结果被期望的实施方案中，可以使用本领域已知的多种技术之一来确定信号强度。例如，在一些实施方案中，使用荧光检测技术。

[0067] 上述检测技术在酶的情况下被具体描述。然而，如所描述的，本发明公开的装置同样地适用于检测测试样品中的酶抑制剂的存在或者量。为了检测测试样品中的酶抑制剂的存在，可以将预定量的对应的酶与测试样品混合并且允许温育。在存在一定量的酶抑制剂时，酶催化反应不以可检测速率进行。因此，在酶抑制剂浓度和信号强度之间的关系将与酶浓度和信号强度之间的关系相反。例如，使用图 1 作为图解说明，在存在一定量的抑制剂下将不发生酶催化反应。因此，将无酶反应产物形成并且检测区 31 将不产生可检测信号。在另一方面，当酶抑制剂的量减少时，酶引起酶反应以如上所述那样地形成。由于酶反应产物的存在的对应增加，在检测区 31 处产生的信号强度因此开始增加。相应地，在该具体实施方案中，在测试样品中的酶抑制剂的量与在检测区 31 处的信号强度成反比例。

[0068] 参考图 4，现在将更加具体地描述使用荧光检测蛋白酶的存在的方法的一个实施方案。初始，将包含蛋白酶 P 的测试样品施加到样品施用垫 124，在这里其接触分子底物 47（例如蛋白质或糖蛋白）。允许分子底物 47 与蛋白酶 P 接触并且形成包含多肽 42 和 43 的混合物，该多肽 42 和 43 是在分子底物 47 和蛋白酶 P 之间的酶催化反应的酶反应产物。该混合物还包括未反应的分子底物 47，和蛋白酶 P。该混合物流动到缀合垫 122，正如方向箭头所指示的那样。

[0069] 探针 44 可扩散固定到缀合垫 122，该探针 44 包括可检测物质和对于酶反应产物 43 的特异结合成员。当混合物在缀合垫 122 处与探针 44 相互反应时，酶反应产物 43 特异地与探针 44 结合以形成缀合探针 45。当探针 44 可扩散地固定到缀合垫 122 时，接着包括该缀合垫 45 的混合物行进到检测区 131。接受材料 90 被固定在检测区 131 中，该接受材料 90 对于通过酶催化反应所产生的酶反应产物 43 的第二结合位点是特异的。因此，在检测区 131 中的可利用结合位点可以被缀合探针 45 所结合。

[0070] 一旦被捕获，可以在检测区 131 处测量缀合探针 45 的信号强度。荧光检测通常使用波长滤波以便将发射光子与激发光子分离，并且使用检测器，该检测器记录发射光子并且产生可记录的输出，通常作为电信号或者摄影影像。使用的一个适合的荧光检测器是 FluoroLog III 分光荧光计，其由新泽西州的埃迪逊的 SPEX 工业公司所销售。适合的荧光检测器的另一个实例在 Song 等的美国专利申请公开 2004/0043502 中被描述，该文献通过参考全部引入本文。尽管在该具体实施方案中使用了荧光，但是应该理解，也可以使用任何其它公知的检测技术。例如，其它适合的光学检测技术可以包括但是不限于磷光、衍射、反

射比、透射比等等。光学读取器可以能够发射光并且还能够记录检测信号（例如透射或者反射光，发射荧光或磷光等等）。例如，在一个实施方案中，可以使用反射比分光光度计或者读取器以检测报告物的存在，该报告物展示可视颜色（例如染色的胶乳微粒）。一个合适的反射比读取器例如在 Kaylor 等的美国专利申请公开 2003/0119202 中有描述，该文献通过参考全部引用本文。

[0071] 不管用于测量信号强度的技术，通过在检测区 131 处的信号强度可以确定蛋白酶 P 的存在或者量。

[0072] 参考图 5，现在将更加详细地描述通过竞争性类型测定使用荧光来检测转移酶的存在的方法的实施方案。初始，将包含转移酶 T 的测试样品施用到包含分子底物 67（例如多肽）的样品施用垫 124。允许分子底物 67 与转移酶 T 接触一段充分的时间以形成包含可以提供由转移酶靶定的部分（例如磷）的组分 64（例如 ATP）。在接触时间段（该接触时间段可以简单的是从样品施用垫 124 流到缀合垫 122 的时间段）之后，混合物可以包括未反应的分子底物 67、转移酶 T、和通过酶催化反应产生的产物 68（例如磷酸化的多肽）。混合物流动到缀合垫 122，如方向箭头所指示的那样。可检测探针 70 可扩散地固定到缀合垫 122 上或其内，该可检测探针 70 包括酶催化反应的产物或者其类似物。当混合物从样品施用垫 124 行进到检测区 131 时，可检测探针 70 被聚集并且随该混合物一起行进。接受材料 91 固定在检测区 131 中，该接受材料对于通过酶催化反应所产生的产物 68 是特异性的。因此，在混合物中形成的产物 68 和可检测探针 70 竞争在检测区 131 中的可利用结合位点。一旦被捕获，如对本文描述的其它实施方案所描述的那样，可以测量和分析信号强度。具体地，在该实施方案中，当可检测探针 70 占据检测区 31 中的更多可利用结合位点时，较大的信号将指示在测试样品中的较低浓度的转移酶 T。

[0073] 图 6 图解说明了包括对照区 136 的测试装置的另一实施方案。根据该实施方案，包括酶 E 的测试样品可以在样品施用垫 124 处被施用到该装置。样品施用垫 124 包括对于酶催化反应的反应剂，其包括分子底物 147。该测试样品与样品施用垫 124 的反应剂组合以形成混合物，在该混合物中可以发生酶催化反应以形成至少一种酶反应产物 143。测试样品可以在样品施用垫 124 处保持如上面讨论的一段时间或者可以直接行进到缀合垫 122。包含可检测物质和对于分子底物 147 的特异结合成员的探针 144 可扩散地固定在缀合垫 122 处。当在缀合垫 122 处测试样品与探针 144 相互反应时，在混合物中剩下的未反应分子底物 147 特异地与探针 144 结合以形成底物缀合物 145。当探针 144 可扩散地固定到缀合垫 122，包括任何底物缀合物 145 的混合物然后行进到检测区 131。接受材料 190 固定在检测区 131 中，该接受材料 190 对于分子底物 147 的第二结合位点是特异的。因此，底物缀合物 145 可以与检测区 131 中的可利用结合位点结合。一旦被捕获，底物缀合物的信号强度在检测区 131 中可以被测量。例如，大信号强度可以指示在混合物中的高浓度的未反应分子底物 147，相应地，指示测试样品中几乎没有或没有酶存在。图 6 的实施方案还包括对照区 136，其将信号给使用者，测定正确地执行。例如，对照区 136 包含在对照区 136 中的固定的聚电解质接受材料 170，用于捕获能够包含底物缀合物探针 145 和探针 144 的探针。

[0074] 在一个例示性应用中，可以使用测定装置以用于确定在 RAS 蛋白激活周期中涉及的转移酶的存在。RAS 蛋白对于宽的各种信号通道起到重要的分子开关作用。这些通道控制包括细胞骨架完整性、细胞粘着和迁移、和细胞凋亡的过程。RAS 蛋白在激活形式

(RAS-GTP) 和未激活形式 (RAS-GDP) 之间循环。

[0075] RAS 蛋白通常在癌症中不受控制，导致侵袭和转移增加以及细胞凋亡减少。相应地，可以使用该测定装置以用于确定 GTPase 激活蛋白 (GAP) 的存在，GTPase 激活蛋白提高 GTP 水解率，将 RAS-GTP 返回到其未激活 RAS-GDP 形式。例如，可以将包含 GAP 的测试样品与 RAS-GTP 分子底物相混合。允许分子底物与测试样品接触充分的时间段以形成混合物，该混合物可以包括未反应的分子底物 (RAS-GTP)、GAP 和通过酶催化反应产生的产物 (RAS-GDP)。允许混合物流动到缀合垫，该缀合垫包含被分子底物 (RAS-GTP) 或者酶催化反应的产物 (RAS-GDP) 的特异结合剂标记的可检测探针。例如，探针可以被在某些新陈代谢通路中的 RAS-GTP 激活的 MAP 激酶所标记。当组合时，未反应分子底物可以特异性地与标记 MAP 激酶的探针结合以形成底物缀合物，如上所述，然后混合物行进到检测区。第二接受材料固定在检测区中，该第二接受材料对于 RAS-GTP 是特异的，例如第二 MAP 激酶。因此，在检测区中的可利用结合位点可以被在包括未反应底物的缀合垫中形成的底物缀合物占据。因此，与可检测探针结合的荧光颗粒也将结合在检测区中。一旦被捕获，如本文描述的其它实施方案所描述的那样，信号强度可以被测量和分析以确定测试样品中的 GAP 的存在。

[0076] 在另一个实施方案中，可以使用侧流测定装置以确定 RAS 激活蛋白的存在。例如，可以使用侧流测定装置以确定 G 交换因子 (GEF)（例如 CDC25、SOS1、SOS2) 的存在，G 交换因子催化 RAS-GDP 到其激活形式 RAS-GTP 的反应。根据该实施方案，分子底物可以是蛋白的非激活形式 RAS-GDP。当分子底物与包含激活 GEF 的测试样品接触时，可以激活 RAS-GDP 到 RAS-GTP 形式。在该情况下，产物 (RAS-GTP) 可以与缀合垫处的可检测物质缀合，并且然后被固定在检测区中的特异结合剂例如 MAP 激酶捕获，以确定在测试样品中的 GEF 的存在或者量。

[0077] 侧流测定装置的其它例示性应用可以是确定测试样品中的血管紧张素转化酶 (ACE) 的存在。ACE 是催化血管紧张素 I 转化成血管紧张素 II 的外肽酶。尽管看起来血管紧张素 I 主要是作为血管紧张素 II 的前体存在，但是血管紧张素 II 是有效的血管收缩剂并且被认为在例如高血压、心脏病和糖尿病性肾病的病症中起作用。根据该具体实施方案，侧流测定装置可以包括分子底物例如血管紧张素 I。当分子底物与包含 ACE 的测试样品接触时，血管紧张素 I 可以被转化成血管紧张素 II。例如，侧流测定装置的检测区可以包含其中固定的接受材料，该接受材料对于血管紧张素 II 是特异的，诸如 AT_1 或者 AT_2 受体。在检测区中的可检测探针（例如在缀合垫处形成的血管紧张素 II 缀合探针）的结合和检测可以指示在测试样品中的 ACE 的存在。

[0078] 如本文描述的侧流测定装置可以提供相对简单且成本低的方法来快速执行酶或其抑制剂的原位检测。该装置可以提供测试结果，该结果是可视的以使得其很容易被执行该测试的人以迅速的方式并且在有助于高可靠且一致的测试结果的测试条件下观察到。如果需要，侧流测定装置也可以是一次性的，在测试完成时可以将该装置丢弃。

[0079] 本发明公开的内容可以参考下面的实施例而被更好地理解。

[0080] 实施例 1

[0081] 准备底物，使用从 Pierce biotechnology 获得的 EX-LC 生物素在硼酸盐缓冲剂中将血红蛋白生物素化。生物素化的血红蛋白通过透析被纯化。

[0082] 如下制备侧流装置：

[0083] 为了形成样品垫，用溶解在包含蔗糖 / 吐温 -20 的 PBS 缓冲液中的纯化的生物素化血红蛋白浸泡玻璃纤维垫。然后将该玻璃纤维垫在 37℃下干燥。

[0084] 为了形成缀合垫，用包含标记有从Bangs Laboratories公司获得的链霉抗生物素蛋白的蓝色颗粒、蔗糖和吐温 -20 的溶液浸泡第二玻璃纤维垫。然后对该第二玻璃纤维垫进行干燥。

[0085] 硝酸纤维素膜卡片被抗生物素抗体成条带以形成检测区并且还被聚赖氨酸成条带以形成对照区。在施用材料之后，对该硝酸纤维膜卡片进行干燥。

[0086] 然后将缀合垫和纤维素垫层叠在其间具有检测区和对照区的硝酸纤维膜卡片的任一端处。将无反应剂的玻璃纤维垫和载有血红蛋白的玻璃纤维样品垫也层叠到硝酸纤维膜卡片。具体地，在缀合垫和载有血红蛋白的样品垫之间层叠无反应剂的玻璃纤维垫以调解酶反应时间。然后将装配的卡片切割成多个装置，每一个装置近似有 4mm 的宽度。

[0087] 用形成的装置进行测定。将来自灰色链霉菌 (S.Griseus) 的蛋白酶以不同浓度稀释在 PBS 缓冲液中并且直接施用到载有血红蛋白的样品垫上。由此形成的混合物从样品垫流动到无反应剂的玻璃纤维垫并且分别流动到缀合垫、检测区和对照区上。

[0088] 典型运行的结果被示意性例示在图 7 中。分别以 30μg/mL、0.3μg/mL、0.03μg/mL 浓度的蛋白酶和 0.0μg/mL 的对照处理所示测定装置的泳道 1-4。在施用之后的大约二十分钟，在检测区处的泳道 3 和 4 中观察到两个深蓝色带，几乎不含或不含蛋白酶的样品被施用到泳道 3 和 4。相反，在检测区处的泳道 1 和 2 中仅观察到弱带或者根本没有带，这些样品包括高浓度的蛋白酶。在对照区中所有的泳道显示深蓝带。

[0089] 尽管已经相对于具体实施方案详细地描述了本发明，但是应理解，本领域的技术人员，在理解上述内容之后，可以容易地想象出这些实施方案的替换、变化和等效物。相应地，应该以权利要求书和其任何等效物的范围来确定本发明的公开内容的范围。

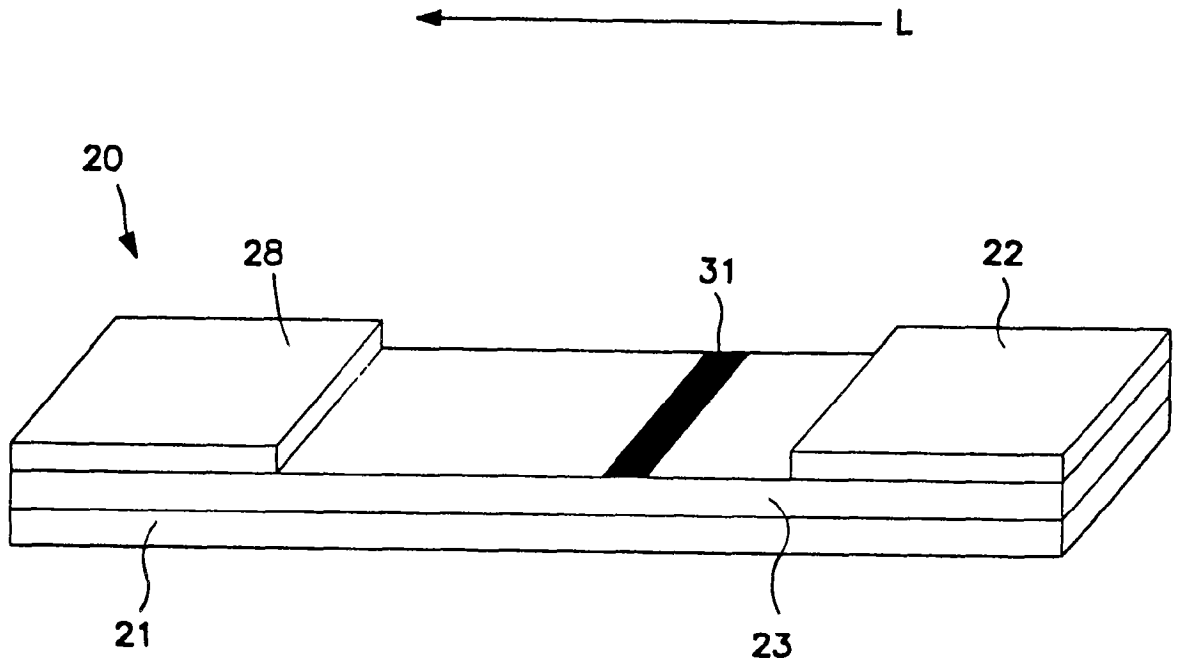


图 1

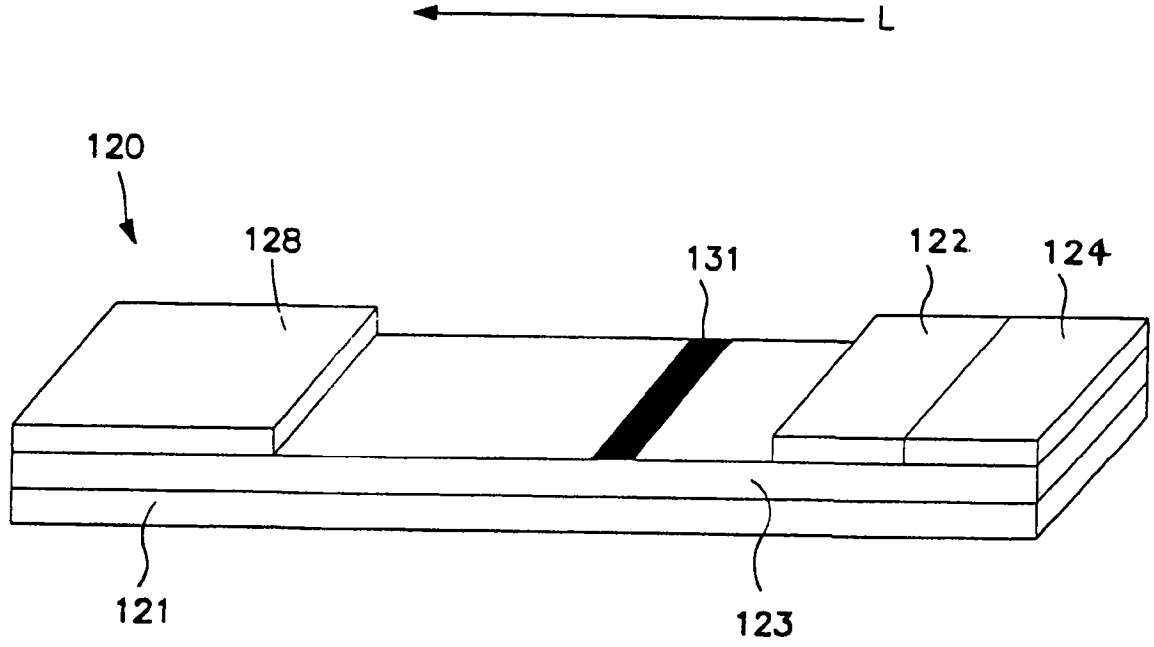


图 2

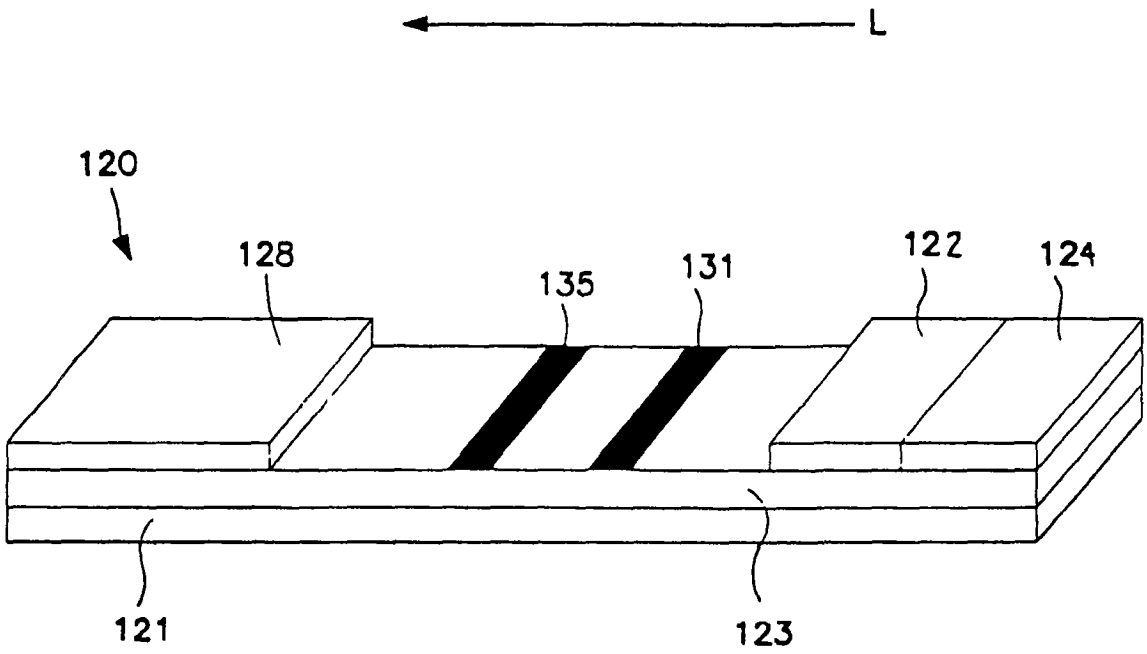


图 3

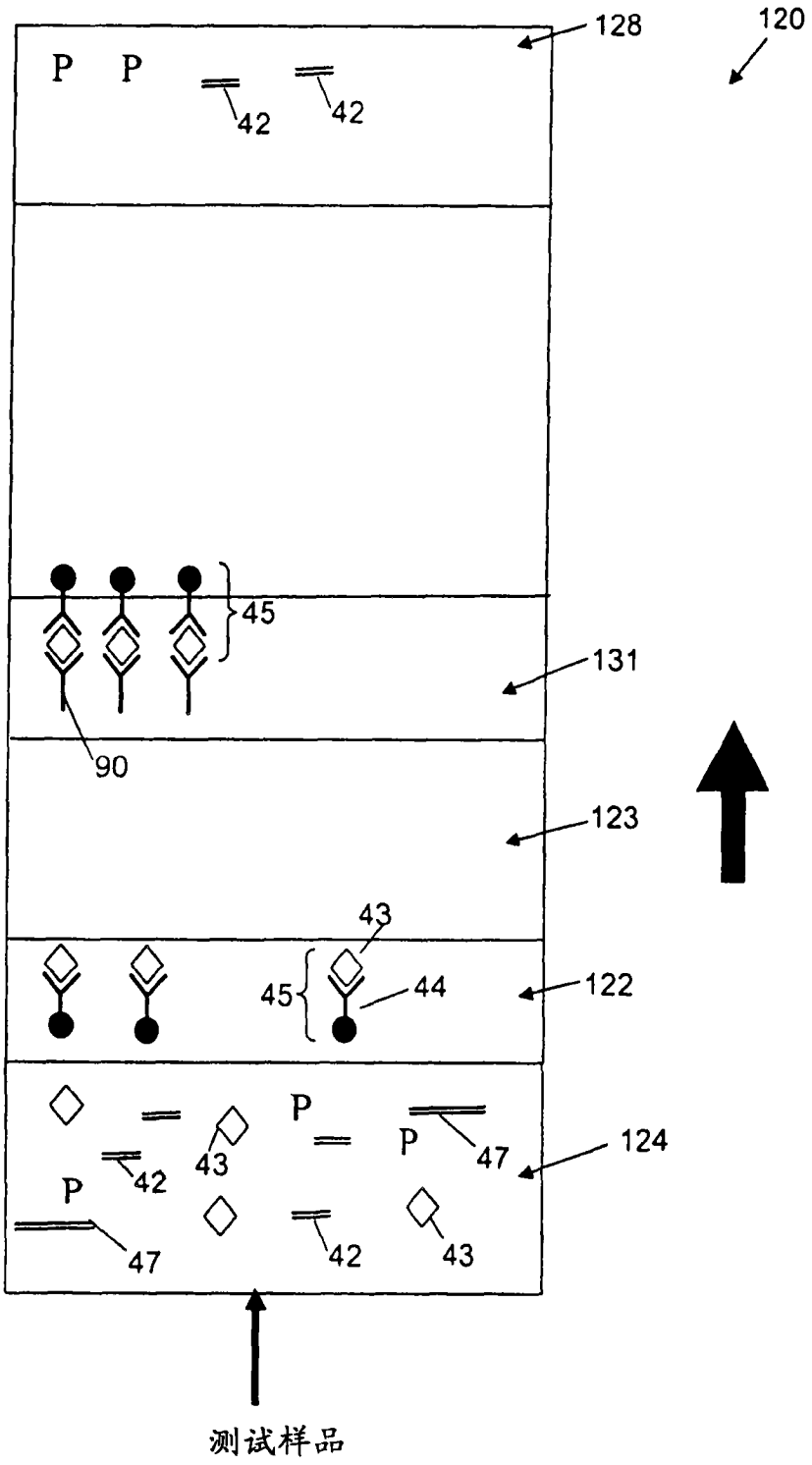

128
120
P P
42
42
45
131
90
123
43
45
44
122
P
P
47
124
P
42
43
47
42
43
测试样品

图 4

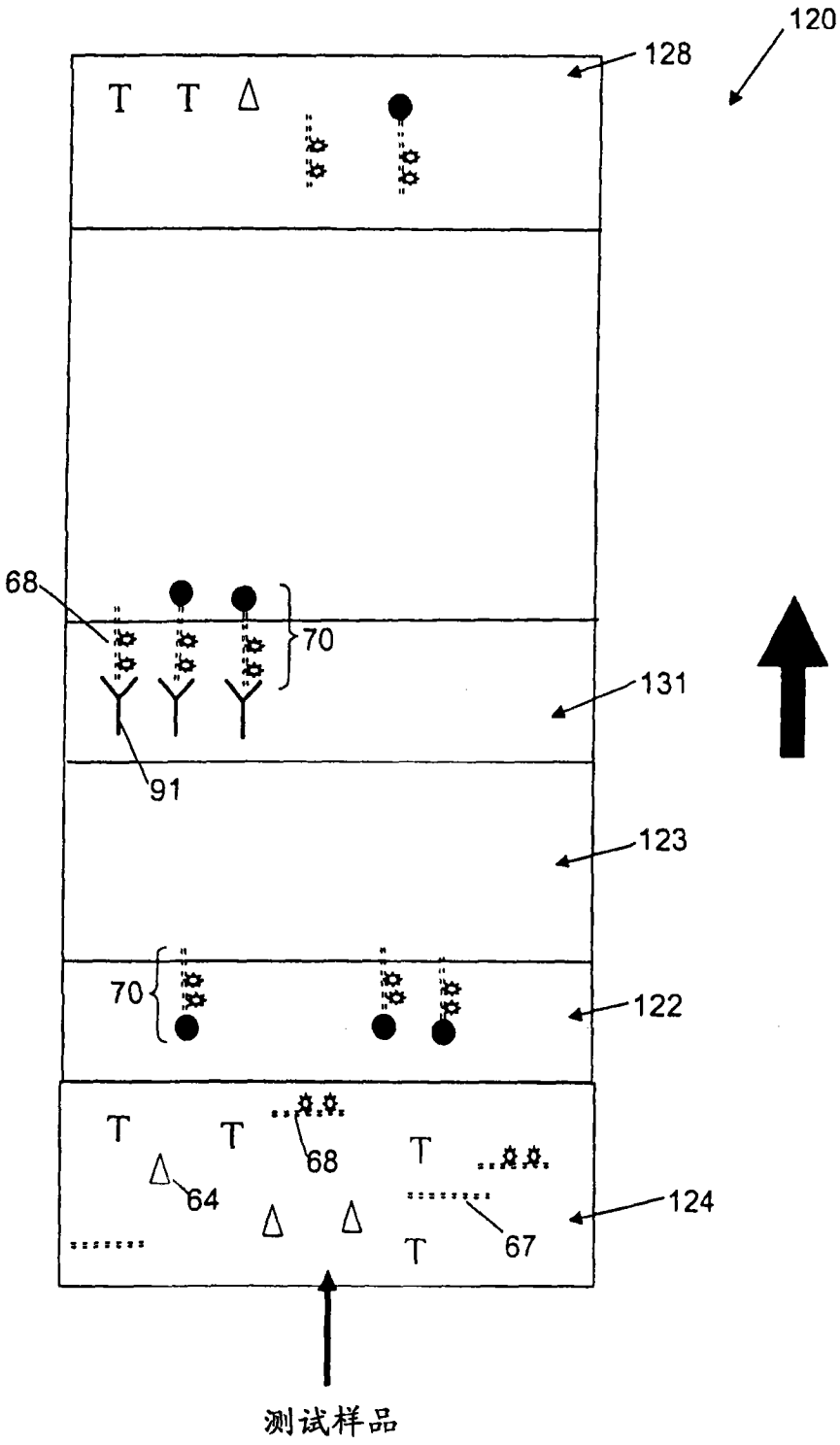


图 5

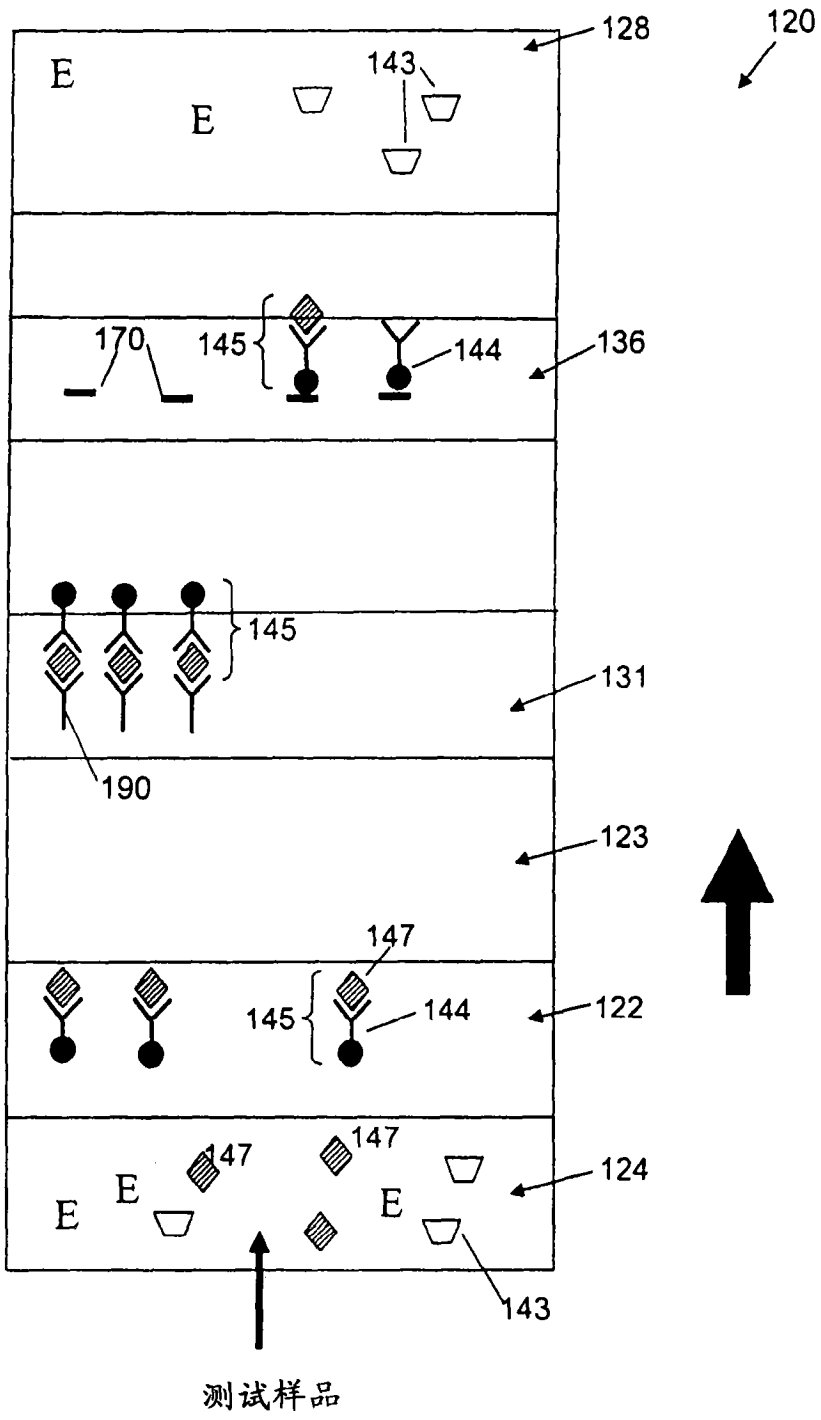

120
128
E
E
143
170
145
144
136
145
131
190
123
147
145
144
122
147
147
E
E
E
124
143
测试样品

图 6

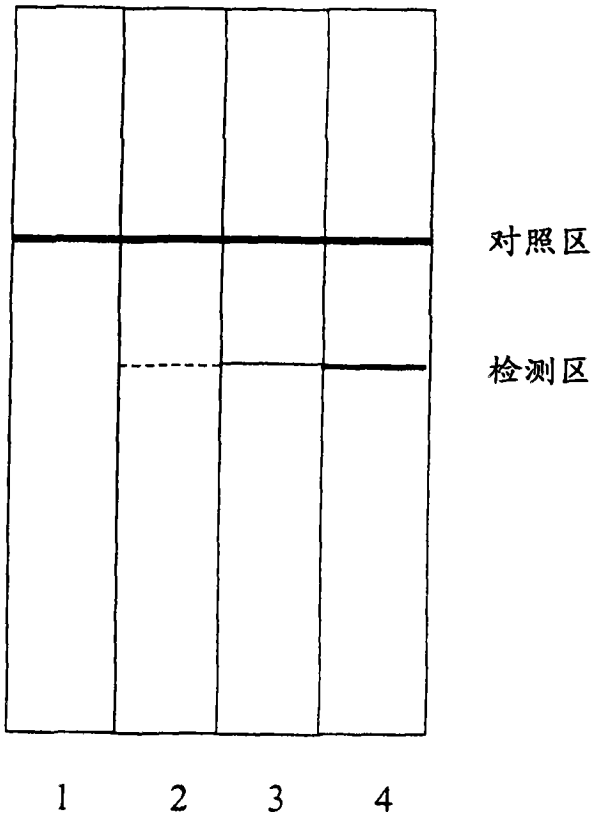


图 7