



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102089441 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 17

(21) 申请号 200980127277. 8

C12M 1/40 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 05. 26

C12Q 1/26 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/34 (2006. 01)

61/071, 921 2008. 05. 27 US

G01N 21/78 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2011. 01. 12

US 4477575 A, 1984. 10. 16,

(86) PCT申请的申请数据

US 4810633 A, 1989. 03. 07,

PCT/CA2009/000684 2009. 05. 26

US 4900666 A, 1990. 02. 13,

(87) PCT申请的公布数据

WO 2007000048 A1, 2007. 01. 04,

W02009/143601 EN 2009. 12. 03

WO 0008466 A2, 2000. 02. 17,

(73) 专利权人 ZBX 公司

WO 03023051 A2, 2003. 03. 20,

地址 加拿大安大略省

US 6372513 B1, 2002. 04. 16,

(72) 发明人 史沁卫

审查员 周洋

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 阴亮

(51) Int. Cl.

C12Q 1/25 (2006. 01)

C12M 1/34 (2006. 01)

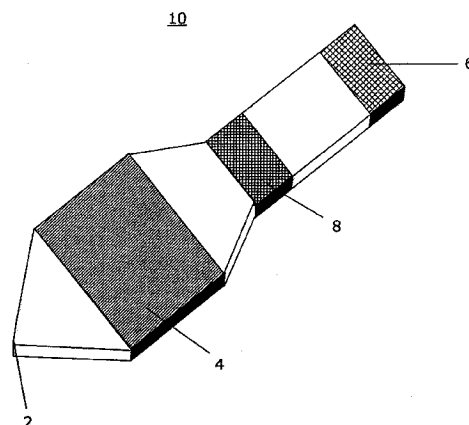
权利要求书3页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

酶分析膜、检测装置和方法

(57) 摘要

本发明涉及新的酶分析膜，侧向流动酶检测方法，和包括所述膜的分析装置。本发明用于快速酶检测小体积样品中一种或多种分析物的存在。本发明提供了用于检测生物样品中一种或多种小分子分析物的存在的酶分析膜，其中所述膜包括接收区；分离区和信号区，至少一个所述区域包括将所述分析物转化为通过与存在于信号区中的显色剂反应进行检测的形式的一种或多种酶，并且其中在接收区，所述膜水平地接收样品，并且所述样品连续通过侧向流动经过接收区、分离区和信号区，其中在所述信号区形成可见的颜色变化表明存在分析物。



1. 用于检测生物样品中小分子分析物的存在的酶分析膜,所述膜包括:
  - 接收区,其在上游端具有尖端,用于接收样品;
  - 信号区,其在所述接收区的下游;
  - 分离区,其位于所述接收区和所述信号区之间,用于从所述样品过滤红细胞,其中所述分离区包含容纳红细胞而基本不溶血的孔径;
  - 酶,其位于至少一个所述区中,用于将所述分析物转化为可检测形式;以及
  - 显色剂,其位于所述信号区中,其在所述分析物的可检测形式的存在下产生颜色以在所述膜中产生可见的颜色改变;
  - 其中设置所述膜,使得所述样品从所述接收区的所述尖端侧向流动到所述信号区,其中在所述膜中存在所述分析物的情况下,在所述信号区内产生可见的颜色改变。
2. 如权利要求 1 所述的膜,其中所述样品选自全血、血清、血浆、尿、唾液、汗液、脊髓液、精液、组织裂解液及其组合。
3. 如权利要求 2 所述的膜,其中所述样品是血液。
4. 如权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的膜,其中所述酶位于所述信号区中。
5. 如权利要求 1 至 4 中任一权利要求所述的膜,其中所述酶位于所述分离区中。
6. 如权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的膜,其包括多种酶。
7. 如权利要求 1 至 6 中任一权利要求所述的膜,其包括多种显色剂。
8. 如权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的膜,其中所述分离区是玻璃纤维。
9. 如权利要求 1 至 8 中任一权利要求所述的膜,其中所述信号区是硝化纤维。
10. 如权利要求 1 至 9 中任一权利要求所述的膜,其中所述可检测形式是所述分析物的氧化产物或还原产物。
11. 如权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的膜,其中所述酶选自芳基酰基酰胺酶、醇氧化酶、醇脱氢酶、水杨酸羟化酶、同型半胱氨酸酶、胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶、尿素酰胺水解酶、甲醛脱氢酶及其组合。
12. 如权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的膜,其中所述显色剂选自邻甲酚、硫酸铜、吩嗪硫酸甲酯、氯化硝基四氮唑蓝、4-氨基苯酚、碘硝基氯化四氮唑蓝、心肌黄酶、NAD<sup>+</sup>及其组合。
13. 如权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的膜,其中所述分析物包括对乙酰氨基酚,所述酶包括芳基酰基酰胺酶,并且所述显色剂包括邻甲酚。
14. 如权利要求 13 所述的膜,其进一步包括硫酸铜。
15. 如权利要求 1 至 14 中任一权利要求所述的膜,其中所述分析物包括甲醇,所述酶包括甲醛脱氢酶,并且所述显色剂包括氯化硝基四氮唑蓝。
16. 如权利要求 15 所述的膜,其进一步包括吩嗪硫酸甲酯。
17. 如权利要求 1 至 16 中任一权利要求所述的膜,其中所述分析物包括水杨酸盐,所述酶包括水杨酸羟化酶,并且所述显色剂包括 4-氨基苯酚。
18. 如权利要求 1 至 17 中任一权利要求所述的膜,其中所述分析物包括乙醇,所述酶包括醇脱氢酶,并且所述显色剂包括碘硝基氯化四氮唑蓝。
19. 如权利要求 18 所述的膜,其进一步包括心肌黄酶。
20. 如权利要求 1 至 19 中任一权利要求所述的膜,其进一步包括对照区。

21. 分析装置,其包括权利要求 1 至 20 中任一权利要求所述的膜。

22. 使用酶分析膜检测生物样品中小分子分析物的存在的方法,所述酶分析膜包括在上游端具有尖端的接收区;在所述接收区下游的信号区;位于所述接收区和所述信号区之间、用于从所述样品过滤红细胞的分离区,其中所述分离区包含容纳红细胞而基本不溶血的孔径;位于至少一个所述接收区和信号区中的,用于将所述分析物转化为可检测形式的酶;以及位于所述信号区中的显色剂;其中所述方法包括:

- 将所述样品涂覆在所述尖端上以使所述样品从所述接收区的所述尖端侧向流动到所述信号区;以及

- 观察所述信号区中的颜色改变,其中颜色改变表明所述样品中存在所述分析物。

23. 如权利要求 22 所述的方法,其中所述样品选自全血、血清、血浆、尿、唾液、汗液、脊髓液、精液、组织裂解液及其组合。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述样品是血液。

25. 如权利要求 22 至 24 中任一权利要求所述的方法,其中所述样品的涂覆体积高达约  $50 \mu\text{l}$ 。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其中所述样品的涂覆体积为约  $10 \mu\text{l}$  至约  $50 \mu\text{l}$ 。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其中所述样品的涂覆体积为约  $10 \mu\text{l}$ 。

28. 如权利要求 22 至 27 中任一权利要求所述的方法,其中在涂覆所述样品之后的约 1 分钟至 10 分钟内发生所述颜色改变。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其中在涂覆所述样品之后的约 5 分钟至 10 分钟内发生所述颜色改变。

30. 如权利要求 22 至 27 中任一权利要求所述的方法,其中在涂覆所述样品之后的少于约 1 分钟内发生所述颜色改变。

31. 如权利要求 22 至 30 中任一权利要求所述的方法,其中所述酶位于所述信号区中。

32. 如权利要求 22 至 31 中任一权利要求所述的方法,其中所述酶位于所述分离区中。

33. 如权利要求 22 至 32 中任一权利要求所述的方法,其包括多种酶。

34. 如权利要求 22 至 33 中任一权利要求所述的方法,其包括多种显色剂。

35. 如权利要求 24 至 34 中任一权利要求所述的方法,其中所述分离区是玻璃纤维。

36. 如权利要求 22 至 35 中任一权利要求所述的方法,其中所述信号区是硝化纤维。

37. 如权利要求 22 至 36 中任一权利要求所述的方法,其中所述可检测形式是所述分析物的氧化产物或还原产物。

38. 如权利要求 22 至 37 中任一权利要求所述的方法,其中所述酶选自芳基酰基酰胺酶、醇氧化酶、醇脱氢酶、水杨酸羟化酶、同型半胱氨酸酶、胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶、尿素酰胺水解酶、甲醛脱氢酶及其组合。

39. 如权利要求 22 至 38 中任一权利要求所述的方法,其中所述显色剂选自邻甲酚、硫酸铜、吩嗪硫酸甲酯、氯化硝基四氮唑蓝、4-氨基苯酚、碘硝基氯化四氮唑蓝、心肌黄酶、 $\text{NAD}^+$  及其组合。

40. 如权利要求 22 至 39 中任一权利要求所述的方法,其中所述分析物包括对乙酰氨基酚,所述酶包括芳基酰基酰胺酶,并且所述显色剂包括邻甲酚。

41. 如权利要求 40 所述的方法,所述膜进一步包括硫酸铜。

42. 如权利要求 22 至 41 中任一权利要求所述的方法,其中所述分析物包括甲醇,所述酶包括甲醛脱氢酶,并且所述显色剂包括氯化硝基四氮唑蓝。

43. 如权利要求 42 所述的方法,所述膜进一步包括吩嗪硫酸甲酯。

44. 如权利要求 22 至 43 中任一权利要求所述的方法,其中所述分析物包括水杨酸盐,所述酶包括水杨酸羟化酶,并且所述显色剂包括 4-氨基苯酚。

45. 如权利要求 22 至 44 中任一权利要求所述的方法,其中所述分析物包括乙醇,所述酶包括醇脱氢酶,并且所述显色剂包括碘硝基氯化四氮唑蓝。

46. 如权利要求 45 所述的方法,所述膜进一步包括心肌黄酶。

47. 如权利要求 22 至 46 中任一权利要求所述的方法,其进一步包括将所述膜的颜色与对照的颜色比较。

48. 如权利要求 47 所述的方法,其中所述对照是所述膜中的区域。

49. 如权利要求 22 至 48 中任一权利要求所述的方法,其进一步包括用分光光度计测量所述颜色改变的强度。

50. 如权利要求 22 至 49 中任一权利要求所述的方法,其中将所述膜置于分析装置中。

51. 用于检测血液样品中一种或多种小分子分析物的存在的酶方法,所述方法包括:

- 将所述血液样品水平地涂覆在权利要求 1 至 21 中任一权利要求所述的酶分析膜上,
- 观察所述信号区域的颜色,
- 其中所述信号区域中的颜色改变表明所述血液样品中存在所述分析物。

## 酶分析膜、检测装置和方法

[0001] 本申请要求 2008 年 5 月 27 日提交的第 61/071921 号美国临时专利申请的优先权，该申请整体以引用的方式并入本文中。

### 发明领域

[0002] 本发明涉及用于检验流体样品中分析物的分析膜、方法和装置。更具体地，本发明涉及新的酶分析膜 (enzymatic analytical membrane)、侧向流动酶检测方法以及包括所述酶分析膜的分析装置。本发明用于快速酶检测小体积样品中一种或多种分析物的存在。

### [0003] 发明背景

[0004] 在本申请中，在括号中引用各种参考文献来更全面地描述本发明相关的技术发展水平。这些参考的公开内容以其整体以引用的方式并入本发明中。

[0005] 若不及时治疗，对乙酰氨基酚 (APAP) 和甲醇 (MeOH) 用药过量能够导致严重的并发症和死亡。对于这些中毒，可进行治疗。出现的症状可以是明显的或不明显的，使得通过实验方法进行快速鉴定变得至关重要。通过气相色谱法 (GC) 来检测甲醇仅在少量的教学医院中可行。据我们所知，在即时检验 (POCT) 时这些检验都不可行。

[0006] 免疫检测装置和步骤目前用于检测生物流体样品中分析物的存在。一般地，包括抗原 / 抗体反应的免疫化学反应发生在诸如细胞膜的干燥有孔载体上，待分析的样品通过毛细管作用流经所述的干燥有孔载体。能够在视觉上或通过使用基于反射系数或荧光的检测体系和仪器来检测样品中分析物的存在。通常，标记是酶标记或粒子直接标记，例如金溶胶标记。

[0007] 在下列美国专利中描述了这种类型的典型的免疫层析装置：4,094,647；4,235,601；4,361,537；4,703,017；4,774,192；4,839,297；4,861,711；4,885,240；4,960,691；5,075,078；5,079,142；5,110,724；5,120,643；5,135,716；5,290,678；5,468,648；5,559,041；5,591,645；5,607,863；5,622,871；5,648,274；5,656,503；5,846,838；5,869,345；5,877,028；5,998,220；6,017,767；6,168,956；6,171,870；6,187,598；6,214,629B1；6,228,660；6,528,321；和 6,534,320。本申请人的 W02004/033101 和 W0 2007/000048 也描述了使用免疫检测法检测样品中分析物的膜阵列和分析装置。

[0008] 然而上述装置通常用于检测样品中的某些分析物，它们需要使用抗体。因此，由于对于诸如甲醇的许多小分子不能产生抗体，所以不能检测到它们。能够使用酶检验形式代替进行这样的小分子的检测，其中使用一种或多种酶将涉及的分子直接或间接地转化为可检测的分子。所得分子的量是正在检测的分子的浓度的函数。这种类型的检验的最常见的形式是中心实验室中最常用的湿化学法，其中用定量仪器分析结果。酶检验的另一形式是干化学法，其中在诸如量油尺的固体基体上干燥酶及其它所需化学品。通过将量油尺在短时间内浸入样品，然后在规定区域观察颜色变化来实现目标分子的检测。由于红细胞的存在掩盖了基体上任何的颜色改变，所以这种类型的产品仅能用于尿或其它非血液样品检测。

[0009] 第 5,294,540 号美国专利公开了用于检测血液中乙醇的干分析酶元件 (dry analytical enzymatic element)。第 6,015,683 号和第 6,783,731 号美国专利公开了用于检测血液中对乙酰氨基酚的干分析酶元件。这些分析元件使用分光光度计来检测颜色改变。尽管有效,但由于不能在患者身边立即检测样品,而是必须将样品送到中心实验室来处理,所以该方法不方便。当对有可能用药过量的患者进行评估时,这种方法浪费了宝贵的时间。例如,这也意味着在 POCT 时护理人员不能使用这些装置,除非在他们的救护车中装备了分光光度计。

[0010] 第 4,810,633 号美国专利描述了用于在诸如血液或尿的水性检测样品中检测乙醇的干分析酶检测装置。在该检测装置中,检验组合物均匀地包括单层载体基体。该装置是用检测混合物浸渍的基体。将浸渍的基体贴在支撑部件上。当检测全血样品时,用血液样品涂覆浸渍的载体基体,并且必须洗去或擦掉过量的样品。

[0011] 第 4,900,666 号美国专利描述了类似于第 4,810,633 号美国专利的装置,然而,其包括了半渗透膜来过滤红细胞。在向衬垫表面涂覆血液样品后,必须将其洗净或擦净以避免混淆颜色变化效果。尽管在上面所列的那些方法中该方法可以是优选的,但是其仍然具有某些内在问题。特别地,从条带上擦去或清去过量的血液的需要增加了医务人员与血液产品意外接触的机会。此外,清洗条带可能会有效地降低样品的浓度,导致分析物将低于检测水平。另外,擦拭的物理过程将损坏条带,由此造成需要第二次检测和延长等待结果。

[0012] 上面所列的全部酶装置的主要问题是它们不能从样品中自动滤除红细胞。这是有问题的,因为精确的检测结果依赖于条带的颜色改变。诸如红细胞的其它有色体的存在能够导致混淆结果。

[0013] 尽管上述装置通常用于检测样品中的分析物,但是期望提供灵敏、快速,并且用于即时环境 (point of care setting) 的酶分析装置。此外,亟需开发用于这样的临床相关小分子的一步式快速血液检测,所述小分子诸如乙醇、乙酰水杨酸、甲醇、对乙酰氨基酚、同型半胱氨酸、胆固醇、尿素及其组合,所述检验提供了快速和灵敏的结果,并且仅使用小体积样品以使污染医护人员的任何风险最小化。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明是用于在小体积的诸如血液的生物样品中快速检测是否存在小分子分析物的高效和高灵敏度的一步式的新的侧向流动酶检验装置和酶分析膜,所述小分子分析物例如乙醇、乙酰水杨酸、甲醇、对乙酰氨基酚、同型半胱氨酸、胆固醇、尿素及其组合。在即时检验 (POCT) 时,所述分析膜和装置是有用的。

[0016] 根据本发明的一个方面,提供了用于检测生物样品中一种或多种小分子分析物的存在的酶分析膜,所述膜依次包括:

[0017] 接收区、分离区和信号区,至少一个所述区包括一种或多种酶,所述酶将所述分析物转化为可通过与存在于所述信号区中的显色剂反应进行检测的形式,

[0018] 其中所述膜在所述接收区侧向接收所述样品,并且所述样品连续通过侧向流动经过所述接收区、分离区和信号区,在所述信号区内形成可见的颜色改变表明存在所述分析物。

[0019] 根据本发明的另一方面,提供了用于检测血液样品中一种或多种小分子分析物的存在的方法,其包括:

- [0020] 将所述血液样品水平地涂覆至酶分析膜上，
- [0021] 观察所述信号区域的颜色，
- [0022] 其中所述信号区内的颜色改变表明所述血液样品中存在的所述分析物达到或高于预定水平。
- [0023] 本发明还提供了利用本发明的膜和方法的酶体系和试剂盒。
- [0024] 根据本发明的另一方面，提供了用于检测生物样品中小分子分析物的存在的酶分析膜，所述膜包括：
- [0025] - 用于接收样品的在上游端具有尖端的接收区；
- [0026] - 接收区下游的信号区；
- [0027] - 位于至少一个所述区中的用于将分析物转化为可检测形式的酶；以及
- [0028] - 位于信号区中的显色剂，其在所述分析物的可检测形式的存在下，产生颜色以在膜中产生可见的颜色改变；
- [0029] - 其中设置所述膜使得所述样品从所述接收区的尖端侧向流动至所述信号区，在膜中存在分析物的情况下，在所述信号区内产生可见的颜色变化。
- [0030] 根据另一方面，提供了使用酶分析膜来检测生物样品中小分子分析物的存在的方法，所述膜包括在上游端具有尖端的接收区；位于接收区下游的信号区；和位于至少一个区中的将分析物转化为可检测的形式的酶；以及位于信号区中的显色剂；其中所述方法包括：
- [0031] - 将所述样品涂覆在所述尖端上以使所述样品从所述接收区的尖端侧向流动到所述信号区；以及
- [0032] - 观察信号区的颜色改变，其中颜色改变表明所述样品中存在所述分析物。
- [0033] 根据另一方面，所述膜进一步包括在接收区和信号区之间的用于过滤样品的分离区。根据另一方面，所述分离区是玻璃纤维。根据另一方面，所述信号区是硝化纤维。
- [0034] 根据另一方面，所述样品选自全血、血清、血浆、尿、唾液、汗液、脊髓液、精液、组织裂解液及其组合。根据另一方面，所述样品是血液。
- [0035] 根据另一方面，所述酶位于所述信号区内。在其它方面，所述酶位于所述分离区内。
- [0036] 根据另一方面，所述膜包括多种酶和 / 或多种显色剂，其能够相互配合来检测单一分析物或能够将其用于多种分析物。
- [0037] 根据另一方面，所述分析物的可检测形式是所述分析物的氧化产物或还原产物。
- [0038] 根据另一方面，所述酶选自芳基酰基酰胺酶、醇氧化酶、醇脱氢酶、水杨酸羟化酶、同型半胱氨酸酶 (homocysteinase)、胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶、尿素酰胺水解酶 (urea amidolyase)、甲醛脱氢酶及其组合。
- [0039] 根据另一方面，所述显色剂选自邻甲酚、硫酸铜、吩嗪硫酸甲酯、氯化硝基四氮唑蓝、4-氨基苯酚、碘硝基氯化四氮唑蓝、心肌黄酶、NAD<sup>+</sup> 及其组合。
- [0040] 根据另一方面，所述分析物包括对乙酰氨基酚，所述酶包括芳基酰基酰胺酶，并且所述显色剂包括邻甲酚。根据另一方面，所述膜进一步包括硫酸铜。
- [0041] 根据另一方面，所述分析物包括甲醇，所述酶包括甲醛脱氢酶，并且所述显色剂包括氯化硝基四氮唑蓝。根据另一方面，所述膜进一步包括吩嗪硫酸甲酯。

[0042] 根据另一方面,所述分析物包括水杨酸盐,所述酶包括水杨酸羟化酶,并且所述显色剂包括 4-氨基苯酚。

[0043] 根据另一方面,所述分析物包括乙醇,所述酶包括醇脱氢酶,并且所述显色剂包括氯化硝基四氮唑蓝。根据另一方面,所述膜进一步包括心肌黄酶。

[0044] 根据另一方面,所述膜进一步包括对照区。

[0045] 根据另一方面,提供了分析装置,其包括本文所述的膜。

[0046] 从下面的详细描述中,本发明的其它特征和优势将变得显而易见。然而,应当理解,详细描述和具体实施例当表明本发明实施方案时,仅以示例性说明的形式给出,因为从所述详细描述中,在本发明精神和范围内的各种变化和修饰对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0047] 附图简述

[0048] 从本文给出的详细描述和附图中将更充分地理解本发明,其中仅以示例性说明的方式给出所述详细描述和附图,其不会限制本发明的计划范围。

[0049] 图 1 是本发明的酶分析膜的顶视平面图;

[0050] 图 2 是图 1 的酶分析膜的透视图;以及

[0051] 图 3 是包括图 1 的酶分析膜的典型分析装置的分解图。

[0052] 优选实施方案详述

[0053] 本发明涉及用于酶检测生物样品中一种或多种小分子分析物的新的酶分析膜、侧向流动酶检测方法和装置。经由将小体积生物样品涂覆在膜上和将分析物用酶转化为可检测形式,本发明第一次提供了快速、灵敏、有效并且准确的酶分析膜和方法。

[0054] 在本发明中,将样品涂覆在膜的尖端上,然后通过膜侧向流动到其中含酶的部分,在该部分中通过位于膜另一端的信号区中的选定的显色剂来将分析物转化为可检测形式。本发明提供了只需要将其涂覆在膜尖端以在那里连续侧向流动样品,并且本发明提供了分析物的连贯、灵敏和快速检测。因为将样品涂覆在膜的一边(水平地),其基本上沿一个方向流动,因此使浪费的样品最小化。在这种方法中仅需要使用小样品体积。相反,因为现有技术将样品涂覆在膜的顶部(垂直地),所以其膜需要较大的样品体积。然后样品散开并且由于重力向下分散,并且其继续沿着任何一个和所有方向侧向分散,因此浪费样品。

[0055] 因为当将血液用作样品时存在内嵌的红细胞过滤,所以本发明也是有利的。本发明还提供了内部体积控制;其允许毛细管取样;并且是本发明是一步式、离开式(walk away)即时检验。与免疫检测膜相反,本发明涉及不同的化学和试剂配制,并且膜条带和外壳设计也是完全不同的。使用侧向流动技术的现有酶检验尚未开发。

[0056] 本发明的酶分析膜由材料以一定方式构成,使得当将样品涂覆在上游端的样品接收区的边缘时,通过毛细管作用样品自动以侧向方式从样品接收区顺流移动到信号区(即将样品水平地涂覆在膜尖端的边缘上,并且其以这种方式沿着或通过膜继续流动)。在使用全血的方面,酶分析膜的信号区比膜其余部分的孔径小,例如,分离区的孔径较大以便防止红细胞进入信号区。以这种方式,红细胞从流体样品中自动分离,并且从不进入或覆盖信号区。相反,现有技术的膜必须被擦拭或清洗以去除遮住信号区的红细胞。

[0057] 现在,参照图 1 和图 2 在本文中描述本发明,图 1 和图 2 显示了通常指定为参考数字 10 的酶分析膜的一个实施方案。由与体液相容的任何类型的有孔膜材料形成酶分析膜



10。酶分析元件 10 也包括至少三个区。一个所述区是接收区 2。接收区 2 位于酶分析膜的上游端。接收区 2 是将样品涂覆到酶分析元件 10 的地方。能够将样品涂覆在接收区 2 的边缘、尖端或尖端的边缘。接收区 2 的下游是分离区 4。在本发明使用全血的方面中,分离区 4 过滤血从而阻碍红细胞的顺流移动。分离区 4 位于酶分析膜 10 的接收区 2 的附近,并且当流体样品侧向顺流移动经过酶分析膜 10 时,分离区 4 通常是流体样品在接收区 2 之后将遇到的第一个区。分离区 4 任选地包括至少一种将感兴趣的分析物转化为显色检验可检测的形式的酶。

[0058] 分离区 4 的下游是信号区 6。信号区 6 位于酶分析元件 10 的下游端附近,并且当流体样品顺流移动经过酶分析元件 10 时,信号区 6 通常是流体样品将遇到的最后一个区。信号区 6 包括与样品中的分析物反应导致可见的颜色改变的显色试剂和 / 或酶。信号区 6 可以任选地包括对照区 8。在这样的方面中,对照区 8 不含有任何特定试剂,并且提供背景对照使得使用者能够将信号区 6 与对照区 8 比较来观察信号区 6 是否有任何显色,或者将信号区 6 中的显色强度与对照区 8 中的显色强度相比。

[0059] 本发明的酶分析膜 10 能够与任何合适的装置一起使用以容纳膜并且使其更易贮藏、运输和使用。在一方面中,能够使膜位于如图 3 所示的一般指定为数字 30 的装置内。这样的适合与本发明的酶分析膜 10 一起使用的分析装置的实例公开在本申请人的 WO 2007/000048 专利申请(其整体以引用的方式并入本文中)中。简言之,分析装置 30 具有相互配合以将酶分析膜 10 装入所述分析装置 30 的上半部 12 和下半部 14。上半部 12 的底面中的凹口形成样品流动槽 16。将流体样品涂覆在样品流动槽 16 上。将酶分析元件 10 定型并放置在分析装置 30 中,以便于样品经过接收区 2 的厚度(即在接收区 2 的边缘或尖端)进入膜分析元件 10。制作装置以具有至少一个观察孔 18 以观察酶分析膜 10 的信号区 6。如果存在对照区 8,装置可以任选地具有第二个观察孔 20 以便观察对照区 8。分析装置 30 可以任选地包括可移动的保护盖(没有示出),其旨在配合分析装置 30 以有助于使用微量吸移管将小体积样品涂覆到酶分析膜 10 上,由此防止使用者污染流体样品。在其它实施方案中,可将分析装置设计为用于浸入含有流体样品的储液器。这样的装置也可以用来容纳本发明的酶分析膜 10。酶分析膜 10 和包括所述膜的分析装置 30 便于制备,并且不需要用于毛细血管血液样品的单独样品采集或转移装置。

[0060] 在本发明一个非限制性的实施方案中,在使用中,用手指采血程序容易获取足量的一滴全血样品(多大约  $50 \mu\text{l}$ , 并且在这样的方面中为约  $10 \mu\text{l}$  至约  $50 \mu\text{l}$  和这之间的任何范围)。通过将血液样品直接涂覆到酶分析元件 10 或涂覆到分析装置 30 的样品流动槽 16 上,在接收区 2 使血液样品与酶分析膜 10 的尖端部分侧向接触。若使用分析装置 30,本领域技术人员将容易地认识到,酶分析膜 10 的毛细力比样品流动槽 16 的毛细力更大,从而确保仅当接收到足量的样品时分析检测开始。通过毛细管作用,样品自动侧向流动通过接收区 2 的厚度进入并且通过分离区 4,其中在分离区 4 内阻滞红细胞,由此将其与血浆分开。分离区 4 不阻碍小分子分析物的流动。在其流动期间,样品中的分析物将遇到将感兴趣的分析物转化为显色检验可检测形式的一种或多种酶和 / 或试剂。

[0061] 应该理解,膜是具有顶面、底面和侧面的三维结构。边缘位于膜的各种面相接的外围上。应当理解,边缘表示两个面的交线。在该方面,通过单外围边缘连接的具有顶面和底面的膜是薄的并且近似于二维。在其他方面,具有两个或多个界定边缘和在外围附近的侧

面的膜是较厚的并且是更接近三维的。本领域技术人员应当理解膜的厚度是不限制的。如图所示,在该方面中,将膜定型使其在上游端形成尖端。应当理解,尖端表示逐渐减小至点或尖端的端。尖端本身形成两个锥形边相交的边缘。将生物样品涂覆在膜的上游端以使其侧向顺流通过膜。更具体地,将生物样品涂覆在膜的尖端上或膜的尖端部分的边缘上。

[0062] 通过毛细管作用产品继续顺流流向遇到显色剂混合物的信号区 6。分析物的可检测形式与显色剂混合物的反应导致在信号区 6 中肉眼可见的颜色改变。信号区 6 下游的任选的对照区 8 将保持其颜色不改变以便能够将其作为背景对照。在本发明的实施方案中,当集中信号并且保持对照区 8 和信号区 6 的距离时,将信号区 6 做成具有宽上游端和窄下游端的形状以便实现样品通过膜部分的快速移动。

[0063] 当流体样品完成其向酶分析元件 10 的下游端的信号区 6 的毛细流动时,样品流动槽 16 基本上空的。将这种布置作为控制以检测和限制检测中使用的样品体积。在一个非限制性的实施方案中,通过约  $10\ \mu\text{l}$  至约  $50\ \mu\text{l}$  的一滴血占用的总吸收体积来检测酶分析元件 10 的总尺寸。

[0064] 基于正常范围和诊断的敏感性和特异性,可以临床测定检测的截止。该截止用于使产物最优化以使颜色变化表明样品中分析物的水平达到或超过截止值。通过改变参数来实现酶检验最优化,所述参数例如但不限于,所用酶的量、缓冲 pH、试剂在膜上的位置和所用色原的量。例如,如果酶检验仅用于提供分析物存在的是-否指示,则能够挑选显色剂和酶的特性和量来提供非常大并且非常快速的颜色变化,唯一的问题是清晰地可检测的分析物依赖的颜色改变终点的发展。如果分析膜不仅用于识别分析物的存在而且用于量化存在的分析物的量,则应该基于所用试剂及其浓度来挑选颜色变化的程度以提供取决于检测样品分析物的水平的可检测差异的颜色变化。在这样的检测中,在适当的颜色变化发展期之后,读取颜色并且根据颜色变化的水平来检测分析物的浓度。

[0065] 本发明还提供了使用上述酶分析膜 10 的用于分析物和流体样品组分的快速分析的侧向流动酶检测法。在这样的方面中,侧向流动酶检测法尤其适合使用一步程序用小体积流体样品进行的全血组分的快速分析。由于仅需要约  $10\ \mu\text{l}$  至约  $50\ \mu\text{l}$  的少量血液以获得没有背景干扰并且有最小溶血的高灵敏度检测,所以用微创进行所述分析。例如,能够通过任何类型的手指采血或针刺手指容易地提供小体积全血。

[0066] 在本发明的实施方案中,可以任选地提供具有用于支撑的垫板,又称为衬板(backing card)(没有示出)的酶分析膜 10。一般地,所述衬板是具有适当粘合剂的聚苯乙烯带,其不会在酶分析膜 10 中移动。例如,合适的聚苯乙烯带是 Super **White**<sup>®</sup> 聚苯乙烯带(G & L Precision Die Cutting, Inc, San Jose, California) 或来自 Ahlstrom(PA, USA) 的聚酯垫 3701。也可以在 2 至 8 区中的一个区或全部区使用透明封带来抑制样品蒸发。适合在本发明中使用的典型的透明封带是 **ARcare**<sup>®</sup> (Adhesives Research, Glenn Rock, Pennsylvania), 其是约  $50\ \mu\text{m}$  厚的聚酯膜。本领域技术人员应当理解可以以多种尺寸和形状制备本发明的酶分析膜 10, 其不限于图 1 至 3 所示的和上述的酶分析膜 10。此外,在其它实施方案中,在对照区 8 的区域中,当样品达到信号区 6 的下游端时,酶分析膜 10 的分离区 4 和信号区 6 上的透明封带的长度变化能够导致样品以可控方式蒸发,显示出容易检测的信号。在该方面中,检测可以是定性的、半定量的或基本定量的。若需要,可以通过读数器或分光光度计来检测颜色强度以便可以获得定量结果。

[0067] 由任何类型的与血液相容并且通常与体液相容的有孔膜材料构成酶分析膜 10。例如但不限于,这样的材料可以选自硝化纤维、PVDF(聚偏二氟乙烯)、诸如 Whatman F87-14 的玻璃纤维,诸如购自 Pall 公司(Long Island, 纽约)的那些合成纤维膜,诸如购自 Spectral Diagnostics(Toronto, 加拿大)的那些聚醚砜膜和吡咯烷酮膜和诸如购自 Porex 公司(Fairburn, GA)的那些聚乙烯膜。本领域技术人员应当理解与本文公开的这样的材料类似的任何类型的材料都适合在本发明使用。

[0068] 在本发明的其它方面中,酶分析元件 10 能够由多于一种的膜制成。根据该实施方案,能够在不同的膜中包括接收区 2、分离区 4 和信号区 6。在非限制性的实施方案中,当提供的酶分析膜 10 具有多于一种的膜时,其保持从酶分析膜 10 上游端的第一层膜到酶分析膜 10 下游端的最后一层膜的孔径递减。

[0069] 在本发明的方面中,分离区 2 的孔径可以选自约  $8\ \mu\text{m}$  至约  $60\ \mu\text{m}$  (和在其间的任何范围)的孔径。这样的范围可包括但不限于约  $8\ \mu\text{m}$  至约  $10\ \mu\text{m}$ 、约  $8\ \mu\text{m}$  至约  $20\ \mu\text{m}$ 、约  $8\ \mu\text{m}$  至约  $30\ \mu\text{m}$ 、约  $8\ \mu\text{m}$  至约  $40\ \mu\text{m}$  和约  $8\ \mu\text{m}$  至约  $50\ \mu\text{m}$ 。其还包括这些范围的子范围。在本发明的优选方面中,选择分离区 4 的孔径以容纳红细胞而基本不溶血。在本发明的一个方面中,这样的孔径约大于高达约  $8\ \mu\text{m}$  左右的红细胞的大小。在本发明的方面中,信号区 6 由本领域技术人员理解的任何有孔膜材料构成,所述材料例如但不限于硝化纤维、PVDF(聚偏二氟乙烯)、尼龙和超高分子量的聚乙烯。在本发明的方面中,将硝化纤维用于信号区 6,并且选择其孔径具有小于分离区 4 的孔径的硝化纤维。

[0070] 选择能够与酶分析元件 10 一起使用的酶以使其与可检测的分析物相容,并且所述酶用于将分析物转化为在显色检验中可检测的形式。在这样的方面中,酶催化氧化还原反应并且将分析物转化为氧化产物或还原产物。例如,芳基酰基酰胺酶可用于将对乙酰氨基酚转化为对氨基苯酚。另外,醇氧化酶可用于将甲醇转化为甲醛。可用于本发明的某些实施方案的酶的其他实例包括醇脱氢酶,水杨酸羟化酶,同型半胱氨酸酶,胆固醇酯酶/胆固醇氧化酶,过氧化物酶,尿素酰胺水解酶等。

[0071] 下列酶的非限制性的实例可以用于将分析物转化为可检测的形式:

[0072]

<u>分析物</u>	<u>酶</u>
对乙酰氨基酚	芳基酰基酰胺酶
乙酰水杨酸	水杨酸羟化酶
乙醇	醇脱氢酶; 和/或醇氧化酶

[0073]

甲醇	醇脱氢酶; 和/或醇氧化酶; 和/或甲醛脱氢酶
胆固醇	胆固醇酯酶; 和/或胆固醇氧化酶
同型半胱氨酸	同型半胱氨酸酶
尿素	尿素酰胺水解酶

[0074] 在这样的方面中,可检测的形式是酶促反应的氧化产物或还原产物。在显色检验中使用技术人员熟知的试剂,这样的产物是容易检测的。在这种方法中,能够在本文所述的分析膜上检测能够由氧化产物 / 还原反应的部分制成的任何分析物。

[0075] 在某些实施方案中,在分离区 4 中包括所选择的酶。如果分离区 4 不含有将感兴趣的分析物转化为显色检验中可检测的形式的至少一种酶,则至少一种这样的转化酶将存在于信号区 6 中。如果反应需要多于一种酶,可将所有所述酶加入到分离区 4 或信号区 6 中。在其他实施方案中,可以在不同区域分别包括所述酶。也可能在酶分析膜 10 中包括另外的区域以包括酶,使得样品中的分析物依次遇到每种酶,导致在显色检验中形成可检测的分析物。

[0076] 如果需要在膜上固定酶,例如在信号区 6 中固定酶,由于已知硝化纤维或相似物质结合蛋白,所以能够使用硝化纤维或相似物质。另一方面,如果需要酶随着样品流动而移动,例如在分离区 4 中,能够将酶放置在玻璃纤维上。

[0077] 能够使用诸如购自 Imagen Technology (Hanover, NH) 的 IsoFlow 的精确液体喷雾器将诸如 NAD 和铜的酶和其它辅助因子,以及诸如在对乙酰氨基酚酶检验中的邻甲酚,和在甲醇检验中的氯化硝基四氮唑蓝的显色剂分散在选定区域上。根据诸如灵敏度、检测时间和样品类型的检验要求来用实验方法测定酶和其它所需试剂的浓度。在对于膜中的酶和其它试剂最优的条件下干燥分散膜。干燥过程的条件可包括诸如温度、湿度和时间的参数。不同的干燥条件可影响检测稳定性、灵敏度和背景。技术人员能够容易地检测这样的条件。在本发明的其他实施方案中,在检测的时候,可以溶液形式提供酶以用样品添加。在这样的实施方案中,能够单独提供或在试剂盒中一起提供分析装置、膜和酶溶液。

[0078] 技术人员可用的任何多种显色剂混合物可以用于本发明的酶分析膜 10。在本文所述的膜中能够使用能检测感兴趣的分析物的任何显色剂。信号区 6 包括显色反应所需的显色剂混合物。例如包括邻甲酚及硫酸铜或吩嗪硫酸甲酯及氯化硝基四氮唑蓝;用于水杨酸盐(阿司匹林)检验的 4-氨基苯酚和用于乙醇检验的在心肌黄酶和 NAD<sup>+</sup> 的存在下的碘硝基氯化四氮唑蓝。本发明的酶分析膜适合用于多种分析物的检测,所述分析物例如但不限于乙醇、乙酰水杨酸、甲醇、对乙酰氨基酚、同型半胱氨酸、胆固醇、尿素及其组合。

[0079] 在本发明的范围内,在流体样品中一次检测一种分析物或甚至多种分析物。因此,本领域技术人员将认识到能够将一种或多种酶和 / 或一种或多种显色剂沉积在本发明的酶分析膜 10 上。能够挑选酶和显色剂以在每个选定分析物的存在下产生明显的颜色变化。或者,能够挑选酶和显色剂以在任何一种选定分析物的存在下产生单一的颜色变化。当检测多于一种分析物时,可能某些颜色产物是不溶的。在检测多余一种分析物的实施方案中,

1) 可将用于一种分析物的试剂放置在用于其它分析物的试剂的上游;2) 可以设计膜以使其允许将样品涂覆在条带中间的一个分离区并且样品将沿两个方向侧向流动,每个方向具有信号区和一组不同的试剂;或者3) 将两个不同的检验背对背地放置在一个外壳中并且将其与一个样品槽连接。技术人员可以考虑并且理解用于同时检测多于一种分析物的其他相似方法。

[0080] 适用于本发明分析膜的生物样品可以包括但不限于全血、血清、血浆、尿、唾液、汗液、脊髓液、精液、组织裂解液及其组合。

[0081] 本发明提供了使用小体积流体样品基于流体样品中存在一种或多种小分子分析物的快速并且准确的诊断。临床检测性检验的敏感度需求。根据正常范围、检测特异性和临床实用性,某些检验需要高截止,其它检验需要较低截止。所述方法允许本领域技术人员操作诸如试剂浓度、配药速率 (dispensing rate)、位置、流速和可替换的酶或试剂的参数以实现所需的灵敏度/截止。检测时间通常为5分钟至15分钟,并且在这样的方面中少于5分钟、4分钟、3分钟、2分钟或1分钟。检测结果一旦显现,其在长时间内是较稳定的。

[0082] 一般地,上述公开内容描述了本发明。通过参照下列具体实施例,能获得更完整的理解。描述这些实施例仅为了示例性说明的目的,并且不旨在限制本发明的范围。因为情况可提示或提供权宜之计,所以考虑改变形式和等价物的替换。尽管本文已使用具体术语,但这样的术语旨在叙述含义而不是为了限制的目的。

## 实施例

[0083] 实施例1:评价用于检测对乙酰氨基酚 (APAP) 和甲醇 (MeOH) 的酶分析膜

[0084] 通过本文所述的酶分析膜分析来自两种不同 MeOH 过度剂量的 12 种血清和通过免疫检测对 APAP 呈阳性的 17 种血清。除了可商购的质量控制样品,也分析分别对 MeOH 和 APAP 呈阴性的 6 种和 10 种血清。用 40mmol、80mmol 和 120mmol 的乙醇来检测对乙醇的交叉反应。检验技术人员忽视初始结果。

[0085] MeOH:根据气相色谱法 (GC) 的结果,十一个 POCT 阳性样品中的九个是阳性的。在两分钟读取所述结果。通过酶分析膜是阳性的而通过 GC 则是阴性的两个样品仅低于 GC 的检测极限,这表明酶分析膜可比 GC 更灵敏。GC 的检测极限为约 2mM。与其余的样品具有一致性。对于酶分析膜甲醇不提供假阳性的结果。

[0086] APAP:所有患者和质量控制样品与初始检测结果一致。检测极限为 200  $\mu\text{mol}$  时,在 7 分钟读取。

[0087] 本实施例证明能够在急诊部顺利地使用甲醇和对乙酰氨基酚的酶分析膜来检测血液中的甲醇和对乙酰氨基酚,并由此来对中毒患者进行鉴别归类。

[0088] 实施例2:对乙酰氨基酚酶分析膜装置

[0089] 根据本发明制备使用一滴全血样品的对乙酰氨基酚检测装置。对于信号区,使用常规的液体喷雾器,用显色试剂浸润规定流速为 180sec/4cm 的硝化纤维 (Millipore)。显色试剂包括 3% 邻甲酚、6.4mM 硫酸铜和 1M 氢氧化钠。在室温下,在低于 20% 的相对湿度下,将浸润的硝化纤维放置 30 分钟。用酶溶液喷洒分离区 (Whatman),然后将该分离区冻干以除去水。酶溶液包括 250U/mL 芳基酰胺酶 (GDS Technology)。通过聚苯乙烯衬带 (G & L Precision Die Cutting, Inc.) 支撑酶分析膜。使用冲切工具获得酶分析膜的

形状。如图 3 所示,在分析装置中放置酶分析膜。使用 40  $\mu$  l 的血液或血清的这种分析装置检测在需要约 10 分钟检测步骤中证明了其优秀的血浆分离和样品流动。该检测达到了 200  $\mu$  M 对乙酰氨基酚的灵敏度。

**[0090] 实施例 3:甲醇酶分析膜装置**

[0091] 根据本发明制备使用一滴全血样品的甲醇检测装置。对于信号区,用显色试剂、18U/mL 甲醛脱氢酶 (Sigma-Aldrich) 和 6mM  $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水合物 ( $\beta$ -NAD) 浸润规定流速为 180sec/4cm 的硝化纤维 (Millipore)。显色试剂包括 0.3mM 吩嗪硫酸甲酯、1.2mM 氯化硝基四氮唑蓝和 0.5% Triton X-100。用 315U/mL 醇氧化酶溶液 (Sigma-Aldrich) 喷洒分离区 (Whatman)。在室温下,在低于 20% 的相对湿度下,将浸润的膜放置 30 分钟。通过聚苯乙烯衬带 (G & L Precision Die Cutting, Inc.) 支撑酶分析膜。使用冲切工具获得酶分析膜的形状。如图 3 所示,在分析装置中放置酶分析膜。使用 40  $\mu$  l 血清的这种分析装置的检测在约 3 分钟检测时间下表明具有 3mM 甲醇的灵敏度。

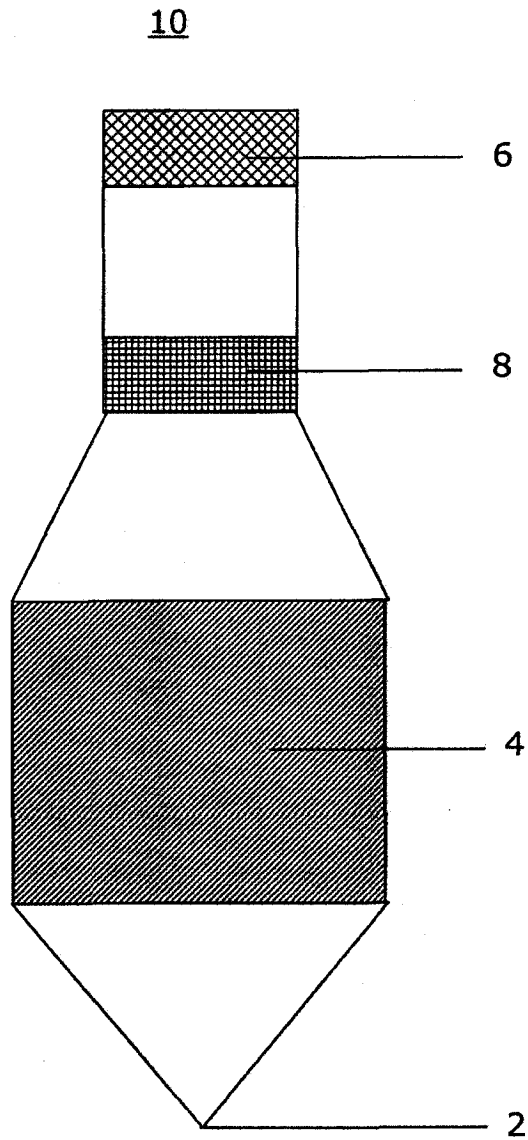


图 1

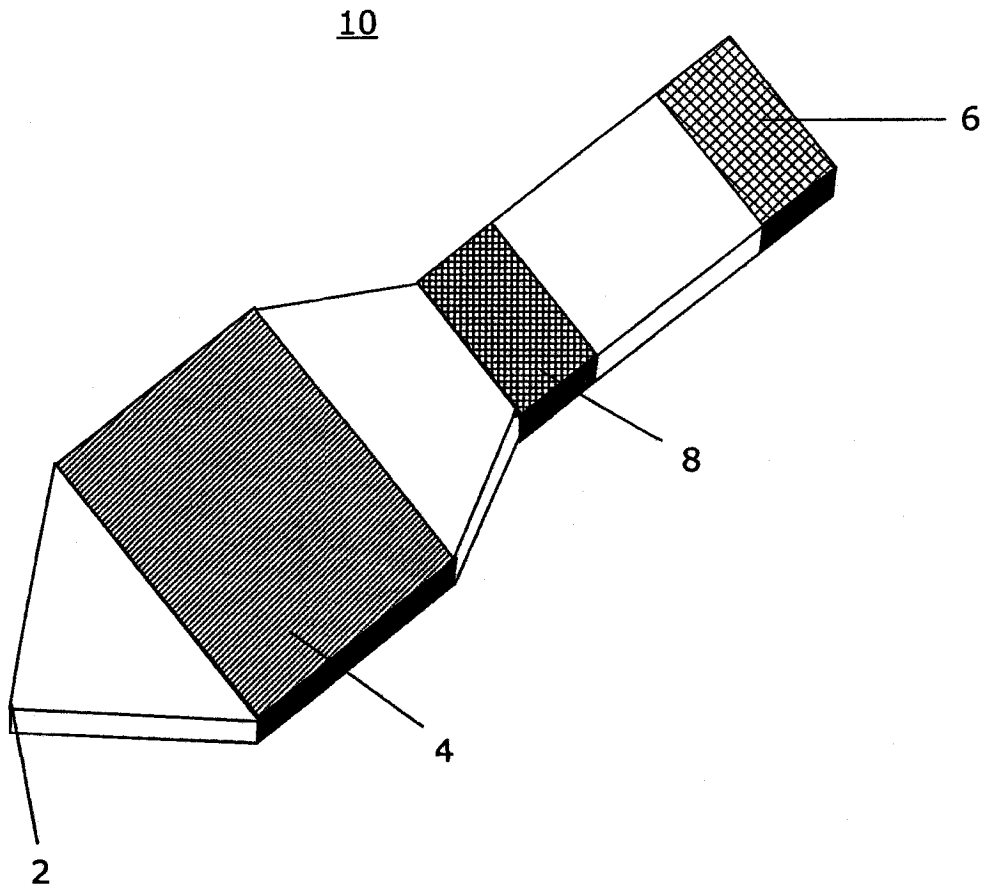


图 2



30

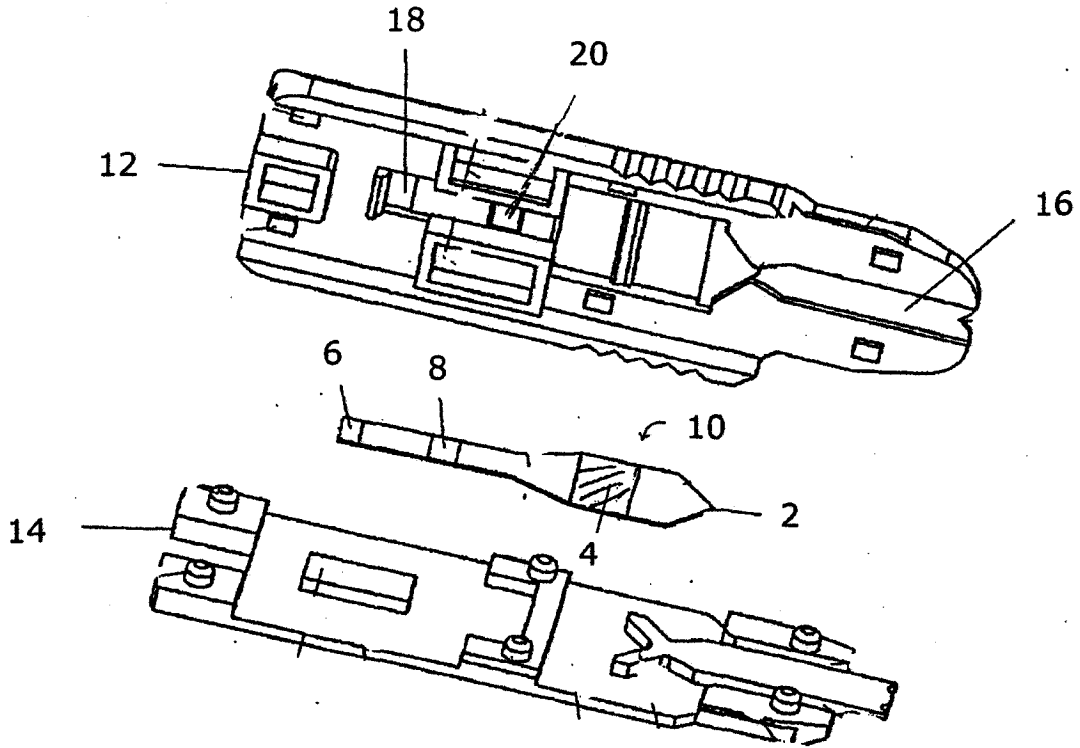


图3