



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104854456 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201380065952. 5

代理人 张英 宫传芝

(22) 申请日 2013. 10. 16

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

1218555. 9 2012. 10. 16 GB

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/58(2006. 01)

G01N 27/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 06. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/071590 2013. 10. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/060454 EN 2014. 04. 24

(71) 申请人 模式诊断有限公司

地址 英国斯特拉思克莱德区

(72) 发明人 约翰·迪尔林 路易斯·格雷

保罗·赫尼

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

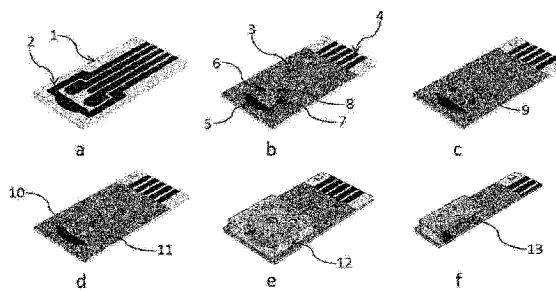
权利要求书3页 说明书14页 附图11页

(54) 发明名称

利用电化学检测的免疫测定

(57) 摘要

本发明涉及利用电化学传感器检测样品中的分析物,该电化学传感器包括对照传感元件、检测传感元件和磁体,相对于对照传感元件,该磁体将磁珠选择性地吸引到检测传感元件。传感元件产生信号,其指示在传感元件处酶标记的量。在暴露于传感元件的样品中存在分析物的情况下,形成免疫复合物,其包含分析物、酶标记和磁珠。通过磁体,免疫复合物被吸引到检测传感元件。相对于对照传感元件,在检测传感元件处酶标记的量的增加指示在样品中分析物的存在或量。提供了方法、传感器、装置和试剂盒。



1. 一种用于检测在样品中的分析物的方法,包括:

a) 提供电化学传感器,包括:

对照传感元件,

检测传感元件,以及

磁体,相对于所述对照传感元件,所述磁体将磁珠选择性地吸引到所述检测传感元件,

其中,在暴露于检测溶液之后,每个传感元件产生信号,所述信号指示在所述检测溶液中且在所述传感元件处存在的酶标记的量,

b) 将所述传感元件暴露于检测溶液,

其中,所述检测溶液包含:

i) 待测试分析物的存在的样品,

ii) 与所述分析物反应的检测抗体,所述检测抗体附接于所述酶标记,以及

iii) 与所述分析物反应的分离抗体,所述分离抗体附接于磁珠,

使得在所述样品中存在分析物的情况下,在所述检测溶液中形成免疫复合物,所述免疫复合物包含所述分析物、所述检测抗体和分离抗体、所述酶标记和所述磁珠,以及

c) 测量由所述检测传感元件和对照传感元件产生的信号,以及

d) 由所述信号确定在所述检测溶液中且在所述检测传感元件和所述对照传感元件处的酶标记的量,

其中相对于所述对照传感元件,在所述检测传感元件处酶标记的量的增加指示在所述样品中分析物的存在或量。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述磁体将磁珠吸引到所述检测传感元件而不将磁珠吸引到所述对照传感元件。

3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法,其中,所述磁体位于所述检测传感元件处。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中,

每个所述传感元件包括工作电极、对电极和可选的参比电极,

每个工作电极具有保持第一试剂和 / 或第二试剂的导电基质,所述第二试剂是用于所述第一试剂的氧化剂或其前体;

其中,所述导电基质是导电含碳或含石墨基质或者导电多孔基质,并且所述第一试剂和所述氧化剂之间的反应是通过酶标记可催化的,从而提供在所述工作电极处的可检测信号。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中,通过保持在所述检测传感元件和对照传感元件中在所述工作电极与所述对电极和 / 或当存在时的所述参比电极之间的电势,以及测量在所述检测传感元件和对照传感元件中在所述测试工作电极和对照工作电极与所述对电极和 / 或当存在时的参比电极之间通过的电流,测量由所述检测传感元件和对照传感元件产生的信号。

6. 根据权利要求 4 或权利要求 5 所述的方法,其中,相对于在所述对照传感元件中在所述对照工作电极与所述对电极和 / 或当存在时的参比电极之间通过的电流的量,在所述检测传感元件中在所述工作电极与所述对电极和 / 或当存在时的参比电极之间通过的电流的量的增加指示在所述样品中分析物的存在或量。

7. 根据权利要求 4 至 6 中任一项所述的方法,其中,所述导电基质是碳糊。
8. 根据权利要求 4 至 7 中任一项所述的方法,其中,所述第一试剂是四甲基联苯胺。
9. 根据权利要求 4 至 8 中任一项所述的方法,其中,所述第二试剂是过硼酸盐。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述传感器包括容纳所述检测溶液的检测室。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述检测抗体共价连接于所述酶标记。
12. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法,其中,所述检测抗体非共价连接于所述酶标记。
13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中,所述检测抗体通过二抗连接于所述酶标记。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述分离抗体共价连接于所述磁珠。
15. 根据权利要求 1 至 14 中任一项所述的方法,其中,所述分离抗体非共价连接于所述磁珠。
16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中,所述分离抗体通过二抗连接于所述磁珠。
17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述酶标记是过氧化物酶,例如辣根过氧化物酶 (HRP)。
18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述检测溶液通过以下产生:在测定溶液中混合所述样品、附接于所述酶标记的所述检测抗体和附接于磁珠的所述分离抗体,以及改变所述测定溶液以产生所述检测溶液。
19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中,在所述测定溶液中且在 pH 7 至 8 温育样品、附接于所述酶标记的所述检测抗体和附接于所述磁珠的所述分离抗体 2-5 分钟。
20. 根据权利要求 18 或权利要求 19 所述的方法,其中,通过降低 pH 改变所述测定溶液以产生所述检测溶液。
21. 一种用于检测在溶液中的分析物的电化学传感器,包括:
对照传感元件,
检测传感元件,以及
磁体,相对于所述对照传感元件,所述磁体将在所述溶液中的磁珠选择性地吸引到所述检测传感元件,
使得在暴露于溶液之后,每个所述传感元件产生信号,所述信号指示在所述溶液中且在所述传感元件处存在的酶标记的量。
22. 根据权利要求 21 所述的传感器,其中,所述磁体将磁珠吸引到所述检测传感元件而不将磁珠吸引到所述对照传感元件。
23. 根据权利要求 21 或权利要求 22 所述的传感器,其中,所述磁体位于所述检测传感元件处。
24. 根据权利要求 21 至 23 中任一项所述的传感器,其中,
每个所述传感元件包括工作电极、对电极和可选的参比电极,
每个工作电极具有保持第一试剂和 / 或第二试剂的导电基质,所述第二试剂是用于所述第一试剂的氧化剂或其前体;

其中,所述导电基质是导电含碳或含石墨基质或者导电多孔基质,以及所述第一试剂和所述氧化剂之间的反应是通过酶标记可催化的,从而提供在所述工作电极处的可检测信号。

25. 一种传感装置,包括:

根据权利要求 1 至 24 中任一项所述的电化学传感器,

采样器,用于容纳来自个体的样品以及将所述样品引入所述电化学传感器,

电子阅读器,用于依据由所述电化学传感器的所述传感元件产生的信号确定在所述样品中分析物的量并提供指示所述量的输出。

26. 一种用于检测分析物的试剂盒,包括:

根据权利要求 21 至 24 中任一项所述的电化学传感器或根据权利要求 25 所述的传感装置,

与所述分析物反应的检测抗体,所述检测抗体附接或可附接于酶标记;

与所述分析物反应的分离抗体,所述分离抗体附接或可附接于磁珠;以及可选的一种或多种缓冲剂或其它试剂。

27. 根据权利要求 21 至 24 中任一项所述的电化学传感器、根据权利要求 25 所述的传感装置或根据权利要求 26 所述的试剂盒在用于检测分析物的方法中的用途。

28. 根据权利要求 27 所述的用途,其中,所述方法是根据权利要求 1 至 20 中任一项所述的方法。

利用电化学检测的免疫测定

技术领域

[0001] 本发明涉及用于检测样品中的分析物的免疫测定,并且尤其是涉及电化学传感器的免疫测定。

背景技术

[0002] 夹心 (sandwich) 测定形式因在样品中的分析物的免疫学检测而众所周知。在夹心测定中,分析物被夹在固定在固相上的捕获抗体和游离在溶液中的标记的检测抗体之间。夹心测定通常需要,在检测步骤以前洗掉多余的标记的检测抗体,以使待检测的信号产生自抗体-分析物复合物而不是未结合试剂。

[0003] 减少为进行免疫测定所需要的步骤的数目(包括洗涤步骤)对于许多应用将是所期望的。

发明内容

[0004] 本发明涉及以下免疫测定,在存在未结合试剂的情况下,其使用电化学传感器来检测在样品中的分析物。

[0005] 本发明的第一方面提供了用于检测在样品中的分析物的方法,包括:

[0006] a) 提供电化学传感器,包括:

[0007] 对照传感元件,

[0008] 检测传感元件以及

[0009] 磁体,相对于对照传感元件,其选择性地吸引磁珠到检测传感元件,

[0010] 其中在暴露于检测溶液之后,每个传感元件产生信号,其指示在检测溶液中并在传感元件处存在的酶标记的量,

[0011] b) 将电化学传感器暴露于检测溶液,

[0012] 其中检测溶液包含:

[0013] i) 待测试分析物的存在的样品,

[0014] ii) 检测抗体,附接于酶标记的该检测抗体与所述分析物反应,以及

[0015] iii) 分离抗体,附接于磁珠的该分离抗体与所述分析物反应,

[0016] 使得在样品中存在分析物的情况下,在检测溶液中形成免疫复合物,其包含分析物、检测和分离抗体、酶标记以及磁珠,以及

[0017] c) 测量由检测和对照传感元件产生的信号,以及

[0018] d) 由所述信号确定在检测溶液中并在检测传感元件和对照传感元件处酶标记的量,

[0019] 其中相对于对照传感元件,在检测传感元件处酶标记的量的增加指示在样品中分析物的存在或量。

[0020] 本发明的第二方面提供了用于检测在样品中的分析物的方法,包括:

[0021] (i) 提供电化学传感器,其包括对照和检测传感元件以及磁体,相对于对照传感元

件,磁体选择性地吸引磁珠到检测传感元件,

[0022] 每个传感元件包括工作电极、对电极(反电极, counter electrode)、和可选的参比电极,

[0023] 每个工作电极具有保持第一试剂和/或第二试剂的导电基质,上述第二试剂是用于第一试剂的氧化剂或其前体;

[0024] 其中导电基质是导电含碳或含石墨基质或导电多孔基质以及在第一试剂和氧化剂之间的反应是通过酶标记可催化的,从而提供在工作电极处的可检测信号;

[0025] (ii) 将对照和检测传感元件暴露于检测溶液,其包含:

[0026] a) 用于测试分析物的存在的样品,

[0027] b) 检测抗体,附接于酶标记的该检测抗体与所述分析物反应,以及

[0028] c) 分离抗体,附接于磁珠的该分离抗体与所述分析物反应,

[0029] 使得在样品中存在分析物的情况下,在检测溶液中形成免疫复合物,其包含分析物、检测和分离抗体、酶标记、以及磁珠;以及

[0030] (iii) 保持在检测和对照传感元件中在工作电极与对电极和/或参比电极(当存在时)之间的电势;以及

[0031] (iv) 测量在检测和对照传感元件中在测试和对照工作电极与对电极和/或参比电极(当存在时)之间通过的电流,

[0032] 相对于在对照传感元件中在对照工作电极与对电极和/或参比电极(当存在时)之间通过的电流的量,在检测传感元件中在工作电极与对电极和/或参比电极(当存在时)之间通过的电流的量的增加指示在样品中分析物的存在或量。

[0033] 本发明的第三方面提供了用于检测在溶液中的分析物的电化学传感器,包括:

[0034] 对照传感元件,

[0035] 检测传感元件以及

[0036] 磁体,相对于对照传感元件,其选择性地吸引在溶液中的磁珠到检测传感元件,

[0037] 使得在暴露于溶液之后,每个所述传感元件产生信号,其指示在溶液中并在传感元件处存在的酶标记的量。

[0038] 本发明的第四方面提供了如上所述的电化学传感器在用于检测分析物的方法中的用途。

[0039] 本发明的第五方面提供了传感装置,包括:

[0040] 根据第三方面的电化学传感器,

[0041] 采样器,用于容纳来自个体的样品,以及可选地,将所述样品引入电化学传感器,

[0042] 电子阅读器,用于依据由电化学传感器的传感元件产生的信号来确定在样品中分析物的量并提供指示所述量的输出。

[0043] 本发明的第六方面提供了用于检测分析物的试剂盒,包括:

[0044] 根据第三方面的电化学传感器或根据第四方面的传感装置,

[0045] 检测抗体,附接或可附接于酶标记的该检测抗体与所述分析物反应,

[0046] 分离抗体,附接或可附接于磁珠的该分离抗体与所述分析物反应;以及

[0047] 可选的一种或多种缓冲剂或其它试剂。

附图说明

[0048] 图 1 是根据本发明的一些实施方式的检测的示意图。

[0049] 图 2 是如本文描述的传感元件的示意图。

[0050] 图 3 示出在缓冲液中辣根过氧化物酶 (HRP) 标记磁珠的检测。WE1 是具有磁体的传感元件以及电极 2 是没有磁体的传感元件 (如图 1 所示)。

[0051] 图 4 示出借助于检测抗体在缓冲液中 HRP 标记磁珠的检测。WE1 是具有磁体的传感元件以及电极 2 是没有磁体的传感元件 (如图 1 所示)。

[0052] 图 5 示出借助于比色检测的 C 反应蛋白 (CRP) 珠测定的结果。

[0053] 图 6 示出借助于洗涤和电化学检测,对于 $0.0 \mu\text{g/mL}$ CRP 珠测定的电流对时间的瞬态。WE1 是具有磁体的传感元件以及 WE2 是没有磁体的传感元件 (如图 1 所示)。

[0054] 图 7 示出借助于洗涤和电化学检测,对于 $0.23 \mu\text{g/mL}$ CRP 珠测定的电流对时间的瞬态。WE1 是具有磁体的传感元件以及 WE2 是没有磁体的传感元件 (如图 1 所示)。

[0055] 图 8 示出借助于洗涤和电化学检测的 CRP 珠测定。WE1 是具有磁体的传感元件以及 WE2 是没有磁体的传感元件 (如图 1 所示)。

[0056] 图 9 示出借助于电化学检测,对于 $0.0 \mu\text{g/mL}$ CRP 珠测定 (没有洗涤) 的电流对时间的瞬态。WE1 是具有磁体的传感元件以及 WE2 是没有磁体的传感元件 (如图 1 所示)。

[0057] 图 10 示出借助于电化学检测对于 $0.23 \mu\text{g/mL}$ CRP 珠测定 (没有洗涤) 的电流对时间的瞬态。WE1 是具有磁体的传感元件以及 WE2 是没有磁体的传感元件 (如图 1 所示)。

[0058] 图 11 示出借助于电化学检测并且没有洗涤的 CRP 珠测定。WE1 是具有磁体的传感元件以及 WE2 是没有磁体的传感元件 (如图 1 所示)。

具体实施方式

[0059] 本发明涉及在免疫测定中电化学传感器用于检测在样品中的分析物的用途。

[0060] 电化学传感器可以用来定性或半定量地确定在配置传感器的环境中存在的分析物的量。例如,可以将电化学传感器暴露于包含生物样品或其部分的检测溶液以检测在样品或部分中分析物的存在和 / 或测量在样品或部分中分析物的量。

[0061] 在一些实施方式中,电化学传感器可以用来确定在样品中分析物的水平是处于生理水平 (即在健康受试者中预期的水平) 还是临床水平 (其是异常水平,或相关于疾病状态的水平)。

[0062] 电化学传感器包括对照传感元件和检测传感元件。用于传感器的适宜的传感元件描述于 W02010/055306,其全部内容以引用方式结合于本文。

[0063] 在暴露于检测溶液之后,每个传感元件产生信号,其指示在检测溶液中并在传感元件处存在的酶标记的量。例如,信号可以指示在由传感元件的电极限定的电解质空间中的检测溶液中存在的酶标记的量。

[0064] 检测传感元件伴随有磁体,相对于对照传感元件,其将在检测溶液中的磁珠选择性地吸引到检测传感元件。换句话说,相比于到对照传感元件,磁体将磁珠更强烈地吸引到检测传感元件。优选地,磁体将在检测溶液中的磁珠吸引到检测传感元件并且并不吸引磁珠到对照传感元件。

[0065] 可以根据电极的几何形状和间隔、电极传感器基板的厚度、和磁珠的尺寸来调节

磁体的强度以优化磁珠到检测传感元件的选择性吸引。在一些实施方式中,适宜的磁体可以具有 150 至 300g 的强度,例如 160、210、250 或 290 g。

[0066] 用于如本文描述的电化学传感器的适宜的磁体可容易获自商业来源(例如 Supermagnete DE) 并且包括镀镍 (Ni-Cu-Ni) 钕 (NdFeB) 磁体。

[0067] 如果分析物存在于样品中,那么此分析物将存在于检测溶液中。在检测溶液中,检测和分离抗体结合于分析物。这种结合引起形成免疫复合物,其包含酶标记、磁珠和分析物。因为它包含磁珠,所以磁体吸引上述免疫复合物到检测传感元件但并不到对照传感元件。因此免疫复合物被选择性地吸引到检测电极,从而在免疫复合物中存在的酶标记有助于由检测传感元件产生的信号而不是由对照传感元件产生的信号。因此,相对于来自对照传感元件的信号,在检测溶液中分析物的存在引起来自检测传感元件的信号增加。

[0068] 相对于传感元件来定位磁体,以相对于对照传感元件,选择性地吸引磁珠到检测传感元件。换句话说,磁体的位置产生在传感器中的磁场,其在检测传感元件处比在对照传感元件处更强,使得相比于对照传感元件,磁珠被更强烈地吸引到检测传感元件。优选地,定位磁体以在传感器中在检测传感元件处但不在对照传感元件处产生磁场,使得磁珠被吸引到检测传感元件但不被吸引到对照传感元件。

[0069] 例如,可以将磁体定位在检测传感元件处,例如在检测传感元件之中、之上或之下,使得吸引到磁体的磁珠到达检测传感元件;或可以接近、相邻或靠近于检测传感元件来定位磁体,例如在传感元件的 5mm 内,以达到同样的效果。

[0070] 在传感器中分开对照传感元件和检测传感元件,使得两种传感元件均不能检测在其它传感元件处的酶标记,即来自检测传感元件的信号独立于来自对照传感元件的信号。

[0071] 可以充分分开传感元件,以在分析期间防止电产生的化学物质在传感元件之间的扩散。技术人员可以容易地确定用于任何特定分析的传感元件的适当间隔。在一些实施方式中,对于分析的每分钟,传感元件可以被分开至少 1mm。通常,传感元件可以被分开至少 1mm、2mm、3mm、4mm、或 5mm。

[0072] 电化学传感器可以进一步包括容纳检测溶液的检测室。可以将传感元件定位在检测室中,以使将它们暴露于容纳在检测室中的检测溶液。

[0073] 在一些实施方式中,可以将传感元件定位在单独的检测室中。例如,电化学传感器可以包括第一和第二检测室。第一和第二检测室可以容纳部分的检测溶液。可以将检测传感元件定位在第一检测室中,以使将它暴露于在第一检测室中的检测溶液,以及可以将对照传感元件定位在第二检测室中,以使将它暴露于在第二检测室中的检测溶液。

[0074] 对照传感元件和/或检测传感元件可以固定或可固定于固体支持物。固体支持物可以将传感元件保留在适当的位置,例如在反应室中并保持它们的分开。在一些实施方式中,固体支持物可以限定或部分地限定检测室的内表面。

[0075] 每个传感元件可以包括工作电极、对电极和可选的参比电极。在一些实施方式中,可以使用组合的参比/对电极,例如用于可预测样品的定性测量、半定量测量或定量测量。电极可连接于电源。适宜的电极描述于 W02010/055306,其全部内容结合于本文。

[0076] 工作电极、对电极和可选的参比电极限定电解质空间。在使用中,电极与在电解质空间中的检测溶液电接触并确定在由传感元件的电极限定的电解质空间中存在的酶标记的量。

[0077] 工作电极可以包含一种或多种试剂,其通过连接于检测抗体的酶标记可催化,从而提供在工作电极处的可检测信号。可以将试剂保持在导电基质中的工作电极处。例如,工作电极可以具有保持第一试剂和 / 或第二试剂的导电基质,上述第二试剂是用于第一试剂的氧化剂或其前体;其中在第一试剂和氧化剂之间的反应是通过酶标记可催化的,从而提供在工作电极处的可检测信号。

[0078] 适宜的导电基质包括导电含碳或含石墨基质或导电多孔基质,例如碳糊 (carbon paste)。

[0079] 第一和第二试剂的选择可以取决于所采用的酶标记。在存在酶标记的情况下,第一试剂可以与第二试剂反应。

[0080] 适宜的第一试剂可以是或可以包含以下化合物,其选自四甲基联苯胺、 α 愈创木酯酸、2, 2'-连氨基-二(3-乙基苯并噻唑烷-6-磺酸)、氢醌、苯二胺、邻联茴香胺、邻联甲苯胺(二甲基联苯胺)、6-甲氧基喹啉、和 3, 3'-二氨基联苯胺、3-氨基-9-乙基咪唑,优选四甲基联苯胺。优选地,第一试剂保持在导电基质中。例如,第一试剂可以以 1 至 15 wt%, 优选 2-9 wt% 或约 5 wt%, 存在于导电基质中。

[0081] 第二试剂可以是氧化剂或其前体。在存在酶标记的情况下,它可以与第一试剂反应。第二试剂可以保持在导电基质中。

[0082] 用于检测过氧化物酶酶标记的适宜的第二试剂可以包括氢过氧化物或其前体。例如,第二试剂可以是或可以包括过氧化脲或过硼酸钠,优选过硼酸钠。优选地,第二剂是氢过氧化物。因此,第一试剂优选是在存在过氧化物酶酶标记的情况下与氢过氧化物反应的化合物。

[0083] 用于检测葡萄糖氧化酶酶标记的适宜的第二试剂可以包括葡萄糖或其前体。

[0084] 在一些优选的实施方式中,在传感元件中用于检测过氧化物酶酶标记的工作电极可以包括保持四甲基联苯胺(TMB)和过硼酸盐(PER)的碳糊(CP)基质。

[0085] 在一些实施方式中,工作电极的导电基质可以保持单一试剂(即仅第一试剂)。在试剂和酶标记之间的反应提供在工作电极处的可检测信号而不需要第二试剂。这可以用于,例如,检测碱性磷酸酶酶标记。用于检测碱性磷酸酶的适宜的试剂包括 1-萘基-磷酸酯;5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯(BCIP);氢醌二磷酸酯;酚酞磷酸酯;4-氨基苯基磷酸酯;3-羟基吲哚磷酸酯(3-idoxyl phosphate)和苯基磷酸酯。

[0086] 用于在传感元件中的工作电极的其它优选形式描述于 W02010/055306。

[0087] 除第一试剂和 / 或第二试剂之外,在传感元件中的工作电极还可以可选地包含一种或多种另外的添加剂。例如,工作电极可以进一步包含润湿添加剂,其可以可选地保持在导电基质中。适宜的润湿添加剂可以包括聚乙烯吡咯烷酮、Triton X、和 / 或吐温。润湿添加剂可以以 0.005-0.25 wt% 存在于导电基质中。

[0088] 其它适宜的工作电极添加剂描述于 W02010/055306。

[0089] 在一些实施方式中,在传感元件中的工作电极可以在至少部分的它们的表面上被完全或部分地涂布。在电极上的涂层优选可溶于检测溶液并在暴露于检测溶液之后通过溶解从工作电极除去。适宜的涂料包括水溶性聚合物,如聚亚烷基二醇,例如聚乙二醇;纤维素聚合物,例如羟烷基纤维素,包括羟乙基纤维素和羟丙基甲基纤维素;蔗糖或其它多糖,例如壳聚糖;以及乙烯基聚合物,例如聚(乙烯吡咯烷酮)和聚(乙烯吡咯烷酮)-(乙酸乙

烯酯) 共聚物。

[0090] 电化学传感器包括对电极。对电极可以具有足够的尺寸以承载来自工作电极的电流并且通常可以具有以下有效电活性面积, 其为至少 1x 在传感器元件中的其它电极的组合面积, 从而确保流自两个工作电极的电流并不受到限制。对电极可连接于电源。优选地, 当对电极用作参比电极时, 将对电极连接于电源。

[0091] 对于可以用于本发明的电化学传感器的对电极的类型并未特别限定, 并且用于传感元件(如本文描述的)的适宜的对电极在本领域中是众所周知的。优选的电极材料包括碳、钢和铂。由于它们的相对较低的成本, 钢和碳是用于一次性传感器和装置的最优选的电极材料。例如, 适宜的对电极可以是碳。

[0092] 在一些实施方式中, 在本发明的电极装置中可以包括参比电极。参比电极可以是标准银/氯化银电极。参比电极可以是假参比电极(pseudo reference electrode), 在存在包含适当离子的适当缓冲液的情况下, 其可操作为参比电极。在一种实施方式中, 假参比电极可以是基于银的电极, 其获自或可获自经约 1% 的 FeCl_3 水性溶液处理的银电极。可以在处理之前和/或之后洗涤电极。假参比电极也可以是, 例如, 丝网(screen)印刷的。Ag/AgCl 参比电极的丝网印刷是在本技术领域良好建立的(例如用于葡萄糖生物传感器)。

[0093] 在一些实施方式中, 可以采用组合的对电极和参比电极。

[0094] 三电极形式可以用于, 例如, 对低端检测(low end detection) 提供更大的准确度和精度, 而两电极形式可以优选用于高端(high end) 和定性分析。

[0095] 可以利用标准技术来产生用于传感元件(如本文描述的)的电极。例如, 电极可以丝网印刷到在绝缘固体(例如聚酯固体)上的碳触点上, 或可以直接丝网印刷到绝缘固体上。

[0096] 两种传感元件可以适应用于电连接于电源电压, 如恒电势器(稳压器, potentiostat)。在一些实施方式中, 在传感器中的传感元件可以电连接于连接器, 如端口、插头或插座, 在电子阅读器中, 其可连接于电压源(电源, voltage supply)(如下文描述的)。

[0097] 电化学传感器确定在它所暴露的检测溶液中存在的分析物的存在或量。

[0098] 检测溶液可以包含:

[0099] 待测试分析物的存在的样品,

[0100] 检测抗体, 附接于酶标记的该检测抗体与分析物反应;

[0101] 分离抗体, 附接于磁珠的该分离抗体与分析物反应; 以及

[0102] 可选的一种或多种缓冲剂或其它试剂。

[0103] 分析物可以是其在样品中的存在或量需要检测或测量的任何分子、复合物、聚集体或细胞。适宜的分析物包括两个或更多抗原表位, 其允许分析物同时被两种抗体所结合(即, 如本文描述的检测抗体和分离抗体)。

[0104] 分析物可以是蛋白质、核酸、碳水化合物、或脂质或它们的组合, 细胞或有机分子, 如细菌、病毒以及天然或合成的化学分子。

[0105] 适宜的分析物包括 C 反应蛋白、血红蛋白、钙防卫蛋白、衣原体属、乳铁传递蛋白、弹性蛋白酶、大肠杆菌、幽门螺杆菌、前列腺特异性抗原、 β - 联蛋白、人绒毛膜促性腺激素、胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 以及抗穆勒激素。

[0106] 待测试分析物的生物样品可以是其中分析物待检测或测量的任何生物流体。例如,生物流体可以是血液、血清、血浆、粪便、尿液、腔液 (lumen)、消化酶、伤口液、精液、肠液、淋巴液、唾液、汗液、脑脊液、或眼泪。

[0107] 在暴露于电化学传感器以前,可以加工、分级分离、纯化和 / 或部分纯化生物样品。例如,如果并不检测或量化红细胞或血红蛋白,则可以利用血浆分离膜从全血样品除去红细胞。

[0108] 检测抗体是特异性地结合于分析物的抗体。

[0109] 用于任何感兴趣的分析物的适宜的抗体在本领域中是容易获得的并且可以通过常规技术来产生或获自商业供应商。

[0110] 检测抗体可以连接或可连接于酶标记。

[0111] 酶标记催化保持在工作电极处的试剂的氧化以产生可检测信号。例如,工作电极可以在电极导电基质(如上所述)中保持第一和可选地第二试剂,并且酶标记可以催化第一试剂的氧化(可选地通过第二试剂)。然后在电极处可以还原第一试剂的氧化形式以提供在电极处的可检测信号。上文更详细地描述了在工作电极中用来检测每种酶标记的适宜试剂。

[0112] 适宜的酶标记在本领域中是众所周知的并且包括过氧化物酶、葡糖氧化酶和碱性磷酸酶。优选地,标记是过氧化物酶,如辣根过氧化物酶(HRP)。

[0113] 酶标记可以利用标准重组技术来产生或获自商业供应商(例如 Acris Antibodies ;Santa Cruz ;Abcam Ltd, UK ;R&D Systems ;DAKO ;Invitrogen, USA)。

[0114] 可以直接地或通过接头(linker)分子间接地将检测抗体连接于酶标记。接头分子可以共价结合于检测抗体和酶标记,或可以非共价结合于检测抗体和酶标记的一种或两者。例如,酶标记可以结合于二抗(第二抗体,secondary antibody),该二抗结合于检测抗体。二抗的结合使酶标记连接于检测抗体。

[0115] 用于将检测抗体或二抗连接或结合于酶标记的适宜方法在本领域中是众所周知的。

[0116] 分离抗体是特异性地结合于分析物的抗体。分离抗体结合于与检测抗体不同的抗原表位并且不与检测抗体竞争结合于分析物。换句话说,检测和分离抗体可以同时结合于分析物以形成包含分析物、检测抗体和分离抗体的复合物。

[0117] 如上所述,用于感兴趣的任何分析物的抗体在本领域中是容易获得的,并且可以通过常规技术来产生或获自商业供应商(Acris Antibodies ;Santa Cruz ;Abcam Ltd, UK ;R&D Systems ;DAKO ;Invitrogen, USA)。

[0118] 分离抗体连接于磁珠。

[0119] 磁珠是铁磁性颗粒,其容易结合于生物分子。适宜的珠可以具有约 0.1 至 10 μm 的直径,优选 1 μm 。磁珠的应用在本领域中是众所周知的并且适宜的珠可获自商业供应商(例如 Life Technologies, USA ;Chemcell GmbH, DE)。适宜的珠可以,例如,包含围绕磁赤铁矿核的非多孔二氧化硅基质。

[0120] 可以直接地或通过接头分子间接地将分离抗体连接于磁珠。接头分子可以共价结合于分离抗体和磁珠,或可以非共价结合于分离抗体和磁珠的一种或两者。例如,磁珠可以结合于二抗,该二抗结合于分离抗体。二抗的结合将磁珠连接于分离抗体。

[0121] 用于将抗体连接于磁珠的适宜方法在本领域中是众所周知的。

[0122] 特别选择用于目标分析物的检测和分离抗体。抗体被配对以确保靶向在分析物上的不同表位,以使两种抗体均可以结合以产生包含抗体和分析物的免疫复合物。

[0123] 优选地,检测和分离抗体是单克隆抗体,但在一些应用中适当匹配的多克隆抗体可以是有用的。优选地,分离和/或纯化抗体(例如至 >95%)以便于标记。

[0124] 其它免疫测定试剂包括细胞裂解剂,如皂角苷(皂苷, saponin)。在必要时,可以使用其它标准免疫测定试剂。

[0125] 电化学传感器检测在检测溶液中包含分析物、标记和磁珠的免疫复合物的存在或量。

[0126] 可以通过任何合适的技术或方法来产生检测溶液。

[0127] 在一些实施方式中,可以在初始测定溶液中混合样品和免疫测定试剂,以使在测定溶液中形成包含分析物、标记和磁珠的免疫复合物(如果分析物存在于样品中)。然后可以例如通过降低 pH 来处理测定溶液以产生检测溶液。

[0128] 借助于混合(根据需要),可以将样品与检测和单独的抗体以及其它免疫测定试剂混合,以产生测定溶液。可以同时或依次地将免疫测定试剂与样品混合。例如,可以将样品与检测抗体混合,接着与分离抗体混合,反之亦然。

[0129] 可以在促进抗体与在样品中的分析物的结合的条件下温育测定溶液。

[0130] 可以在约 37°C 的温度温育测定溶液。可替换地,样品可以是在室温。例如,可以在 5 至 45°C、10 至 30°C、或优选 18 至 25°C 的温度温育测定溶液。可以调节测定溶液的温度以使其达到优选的温度。例如,可以冷却或允许冷却测定溶液:从生理温度至室温。

[0131] 在一些实施方式中,可以在 pH 7.4 和环境温度温育测定溶液 1-10 分钟。典型的实验室测定温育时间包括约 2 小时温育,然而这可以减少到 1-10 分钟,例如用于快速家用测试。

[0132] 在存在分析物的情况下,在包含标记和磁珠的复合物形成之后,可以进一步处理测定溶液以产生检测溶液。例如,测定溶液的 pH 可以减小到 3 至 7 的 pH,优选 4 至 5,优选约 5。这可以通过将合适的缓冲剂加入测定溶液来实现。可替换地,这可以以筒的形式并通过在特定区域中干燥试剂以控制缓冲液例如柠檬酸的 pH 来实现。

[0133] 在检测溶液中在传感元件处酶标记的存在引起传感元件产生信号。诱发信号的酶标记可以是包含分析物的免疫复合物的一部分,或可以存在为未结合的检测抗体结合物的一部分。然后依据由传感元件产生的信号来确定在检测溶液中并在检测传感元件和对照传感元件处存在的酶标记的量。

[0134] 在样品中分析物的存在致使在包含分析物、磁珠和酶标记的检测溶液中存在免疫复合物。通过磁体,这些免疫复合物被吸引到检测传感元件,但并不被吸引到对照传感元件。这引起相对于在对照电极处的量,在检测溶液并在检测传感元件处酶标记的量的增加。因此在检测溶液中并在检测传感元件和对照传感元件处酶标记的相对量指示在样品中分析物的存在或量。

[0135] 相对于对照传感元件,在检测传感元件处增加的酶标记的量可以指示在样品中分析物的存在。相对于对照传感元件,在检测传感元件处酶标记的量的差异可以指示在样品中分析物的量。

[0136] 传感元件可以产生电信号,其指示在检测溶液中并在传感元件处酶标记的量。信号可以是安培或电位信号。例如,信号可以是在恒定或零电流下在工作电极和对电极和/或参比电极(当存在时)之间的势差,或更优选地,信号可以是在恒定电势下在工作电极和对电极和/或参比电极(当存在时)之间通过的电流。

[0137] 在一些优选的实施方式中,在传感元件处酶标记的量的确定可以通过:

[0138] (iii) 保持工作电极与对电极和/或参比电极(当存在时)之间的电势;以及

[0139] (iv) 测量在测试和对照工作电极与对电极和/或参比电极(当存在时)之间通过的电流。

[0140] 在工作电极与对电极和/或参比电极(当存在时)之间通过的电流的量指示在测定溶液中并在传感元件处的酶标记的量。

[0141] 相对于在对照传感元件处在工作电极与对电极和/或参比电极(当存在时)之间通过的电流的量,在检测传感元件处在工作电极与对电极和/或参比电极(当存在时)之间通过的电流的量的增加指示在样品中分析物的存在。相对于对照传感元件,在检测传感元件处电流的量的差异可以指示在样品中分析物的量。

[0142] 可以将电化学传感器包含在外壳或筒中。

[0143] 外壳或筒可以是一次性的。

[0144] 外壳或筒可以包括一个或多个试剂储器、测定室和液体转移系统或导管以促进样品与免疫测定试剂的混合、检测溶液的生产和样品至检测室(用于暴露于电化学传感器)的输送。

[0145] 优选地,设置试剂储器、测定室和液体转移系统或导管,以使通过重力流将流体转移到电化学传感器。

[0146] 在一些实施方式中,可以将传感器的传感元件保留在筒中的腔内。可以将涂层材料装入腔中,从而至少部分覆盖在腔内的传感元件。在通过检测溶液的水合之后,涂层材料可以溶解以将传感元件的电极暴露于检测溶液。

[0147] 筒可以包括一个或多个流体转移导管以将样品或其部分从采样器传送到传感器的检测室。在一些实施方式中,筒可以进一步包括测定室,其中在检测室中的检测以前,用免疫测定试剂来混合和温育样品。例如,可以通过第一流体转移导管将样品从采样器运送到测定室,其中它与免疫测定试剂混合以形成测定溶液。可以在测定室中温育测定溶液并通过第二流体转移导管运送到检测室,用于暴露于传感器。可以处理测定溶液以在测定室、流体转移导管或检测室中产生检测溶液。

[0148] 筒可以包含一种或多种免疫测定试剂。例如,筒可以包含检测抗体、分离抗体和一种或多种缓冲剂或其它免疫测定试剂。

[0149] 在筒中的免疫测定试剂可以包括测定缓冲液,用于混合免疫测定试剂和/或样品以产生测定溶液。

[0150] 在筒中的免疫测定试剂还可以包括检测缓冲液,用于与测定溶液混合以产生检测溶液。检测缓冲液可以,例如,降低pH,以使检测溶液具有比测定溶液更低的pH并且与通过电化学传感器来检测酶标记相容。优选地,检测缓冲液包含足够浓度的氯离子,以使在传感元件中的假参比电极近似真参比电极的行为。

[0151] 可以在使用前将在筒中的免疫测定试剂存储在筒内的储器中,或可以以冻干形式

加以存储,并且可以在将样品引入筒中之后溶解以产生测定或检测溶液。

[0152] 在接触样品或检测或测定溶液之后,在筒中的试剂储器可以释放试剂。储器材料可以,至少部分地,是可溶的并且优选在水合之后是可溶的,从而将试剂释放进入样品。储器优选由水溶性聚合物构成。适宜的水溶性聚合物是本文描述的用作电极的涂层材料的那些聚合物。

[0153] 储器的位置可以紧邻传感元件,并且可以例如相邻于检测和 / 或对照传感元件的电解质空间。因此,在电化学分析之前和期间,包含在储器内的试剂可以用于测定溶液或检测溶液。可替换地,储器的位置可以紧邻于测定和 / 或检测室。

[0154] 筒可以进一步包括加热元件和 / 或混合器,以促进在测定室、检测室和 / 或流体转移导管中在一种或多种免疫测定试剂和样品之间的相互作用和混合。

[0155] 可以改变筒以连接于或接合于电子阅读器。

[0156] 筒可以包括连接器,如插头 / 插座或端口,其提供与电子阅读器的电连接。连接器允许电化学传感器与电子阅读器的电连接,使得可以将功率提供给传感器并且来自传感器的信号可以被分析、加工和 / 或记录在阅读器中。可以通过包括在筒中的布线或其它电路,将连接器连接于传感元件。

[0157] 电化学传感器或包括电化学传感器的筒可以是传感装置的一部分。

[0158] 传感装置可以包括:

[0159] 如上所述的电化学传感器,

[0160] 适合于存储和 / 或采集来自受试者的生物样品的采样器,以及

[0161] 电子阅读器,其用于依据由电化学传感器的传感元件产生的信号来确定在样品中分析物的量以及提供指示所述量的输出。

[0162] 可以将电化学传感器包括在用于传感装置的筒内。

[0163] 可以使传感装置适合于分析来自受试者的样品。传感装置可以是手持式装置并且可以改变以由不是临床医生或合格的技术人员的使用者来使用。可以将传感装置提供给私人个体使用,作为家庭测试试剂盒的一部分。

[0164] 并不限制传感装置的形状、尺寸或结构。优选地,使传感装置适合用于生物样品,并使适合用于上述样品的电化学分析。在一种实施方式中,传感装置具有适合手持的本体的形式。

[0165] 采样器可以适合于从来自个体的生物流体除去样品和 / 或容纳生物流体的样品。

[0166] 采样器的形式取决于样品和将要进行的测试。例如,采样器可以包括用于尿液或其它体液样品的芯(吸液芯,wick),用于血液或其它体液样品的毛细管填充室,粪便采样器,皮肤细胞刮刀,或用于来自颈、宫颈内膜、尿道、口、舌或鼻的样品的拭子。

[0167] 采样器可以包括便于从个体提取生物流体样品的元件。例如,采样器可以包括柳叶刀,其使得个体能够轻刺他们的皮肤(例如在指、耳等处),或者包括尿液收集装置,其排出尿液的第一流,例如排除最初的 10 ml。

[0168] 在一些实施方式中,采样器可以包括用于容纳生物流体的样品的样品室。优选地,采样器是一次性的。

[0169] 采样器与筒可连接,以使容纳在采样器中的样品被递送到筒。

[0170] 采样器可以包括一个或多个处理元件,其允许样品的分离、纯化和 / 或分级分离

(fractionation)。例如,采样器可以包括用于全血分析的血浆分离膜。

[0171] 在一些实施方式中,一种或多种免疫测定试剂可以包含在采样器中。例如,可以以冻干形式将检测抗体固定在采样器内。样品到采样器的引入可以溶解检测抗体。

[0172] 采样器可以与传感装置是一体的并且可以是可从其移除的。因此,提供了用于采样和分析样品的单件设备。

[0173] 电子阅读器可以包括电子显示器,例如液晶显示器 (LCD),其能够提供关于分析结果的视觉指示。指示符可以是单词和 / 或符号。电子显示器提供了关于所显示结果的更大的确定性,并且显示不易受主观解释的影响。对于其中阳性结果表示为颜色变化的测试,这样的解释是特别不利的。上述变化可能难以可视化,并且可能不是均匀的,从而对使用者提供非决定性的或不确定的结果。例如,电子显示器可以提供可视化结果,例如数值,其指示在样品中分析物的量。

[0174] 电子阅读器可以进一步包括电压源 (或电源) 以控制在传感器中的传感元件。电压源优选适合于在检测和对照传感元件的工作电极与对电极或参比电极 (当存在时) 之间供给恒定偏压。优选地,相对于在工作电极和参比或对电极之间的丝网印刷 Ag/AgCl 参比电极,电压源适合于供给 -1 至 +1 伏的恒定偏压,优选 -0.4 至 +0.4 伏,更优选 +0.03 伏。

[0175] 电子阅读器可以进一步包括处理器以依据由电化学传感器产生的信号来确定在样品中分析物的量。电子阅读器可以进一步包括存储器,其用于记录和存储来自电化学传感器和 / 或计数器的数据,以指示已进行的测试的数目和 / 或剩余测试的数目。

[0176] 电子阅读器可以包括连接器,例如插头或插座,用于连接于在筒上的连接器。

[0177] 电子阅读器可以进一步提供有报警器,其向使用者指示,何时应对新样品进行进一步的测试。报警器可以是视觉或听觉报警器或两者。

[0178] 数据可以可下载自电子阅读器,例如通过可连接于阅读器的筒端口或单独的端口如 USB 端口的附加集线器 (add-on hubs),或通过无线连接,如蓝牙或无线局域网 (wi-fi)。

[0179] 通过一系列的测试,传感装置可以用来指示分析物的存在。重复实验会最小化假阳性结果的机会。传感装置可以适合于一系列的重复实验。因此,传感装置可以具有可以使用两次或更多次的电化学传感器。可替换地,上述装置可以提供有两个或更多电化学传感器,其中每个传感器用于上述系列实验之一。

[0180] 传感装置可以提供为试剂盒的一部分,其可以进一步包括免疫测定试剂、稀释剂或缓冲剂 (如本文描述的),或适合于生成稀释剂的混合物,例如通过添加水。

[0181] 在试剂盒中,免疫测定试剂、稀释剂和缓冲剂可以提供为固体或凝胶,用于制成液体形式,例如通过添加水。

[0182] 试剂盒可以进一步包括其它部件,用于利用电化学传感器获得和分析样品,如柳叶刀装置、尿液收集容器、粪便收集装置 (例如厕所吊带 (toilet sling) 或平台)、附加插入元件以允许与电子阅读器的连通性 (例如 usb、蓝牙、无线局域网) 和 / 或卫生垃圾袋。

[0183] 试剂盒可以包括操作说明组。说明可以涉及传感装置的使用,存储和 / 或采样器的使用,和传感装置结果的解释。操作说明可以是纸张的形式、在电子载体上或可获自或可下载自万维网站 (提供了其地址)。

[0184] 本发明的其它方面和实施方式提供了其中用术语“由...组成”代替术语“包含”的上述方面和实施方式,以及其中用术语“基本上由...组成”代替术语“包含”的上述方面和

实施方式。

[0185] 对于技术人员而言,在阅读本公开内容之后,这些实施方式的改进、进一步的实施方式以及其改进将是显而易见的,因此它们在本发明的范围内。

[0186] 应当理解的是,除非上下文另有要求,否则本申请披露了上述任何方面和实施方式彼此间的所有组合。类似地,除非上下文另有要求,可以单独地或连同任何其它方面一起结合优选的和/或可选的特点。

[0187] 对于本领域技术人员而言,鉴于本公开内容,本发明的各种另外的方面和实施方式将是显而易见的。

[0188] 在本说明书中提及的所有文件和数据库条目的全部内容以引用方式结合于本文。

[0189] 在本文中使用的情况下,“和/或”被视为具体披露了两种指定特征或成分的每一种并且有或没有另一种。例如“A和/或B”被视为具体披露了:(i)A、(ii)B以及(iii)A和B中的每一种,就如同在本文中单独地陈述了每一种。

[0190] 除非上下文另外指示,否则上文所述的特征的描述和定义并不限于本发明的任何特定方面或实施方式,而是同样适用于所描述的本发明的所有方面和实施方式。因此,以所有的组合和排列披露上文所述的特征用于本发明。

[0191] 现将通过实施例的方式并参照本文描述的图表来说明本发明的某些方面和实施方式。

[0192] 实施例

[0193] 提供了以下实施例,其仅用于说明的目的,并不旨在限制本发明的范围(如本文描述的)。

[0194] 1. 测定概念

[0195] 本文描述的电化学传感器区分起因于分析物的实际信号和起因于仍然在溶液中的未结合检测抗体的背景信号。在实施例中,过氧化物酶 HRP 已被选择作为通过传感器加以检测的酶标记。为了 HRP 与电极化学物质反应,它必须非常靠近传感器。在没有外力的情况下,反应将是扩散依赖的。这将产生缓慢响应,并具有直接相关于分析物浓度的低幅度信号。在磁性微珠上进行上述测定以使得抗体-分析物复合物能够利用磁场力被带到电极。该系统使用两个相同的功能电极:电极 1 具有在它后面的磁体以及电极 2 没有磁体。在磁场中,珠被运送到电极 1。电极 2 用来记录由未结合检测抗体所引起的背景信号。在两种信号之间的差异可以用来计算溶液中分析物的浓度。此构想说明于图 1。

[0196] 在图 1 中,分析物(CRP)被夹在在磁珠上的捕获抗体和标记有 HRP 的检测抗体之间。磁场用来将磁珠带到对 HRP 敏感的功能化电极。第二电极用来检测在测试溶液中存在的起因于游离在溶液中的未结合的 HRP 标记的检测抗体的背景信号。两个电极是相同的,不同之处在于,在电极 1 的后面添加了磁体。

[0197] 2. 方法

[0198] 2.1 电化学传感器

[0199] 对于以下实验,传感装置被分成两部分:反应室和传感元件。

[0200] 在反应室中完成测定。96 孔板的孔用作每个测试的反应室。然后将测定溶液转移至在传感电极上的孔。通过恒电势器来供电和控制传感电极并利用数据采集装置来收集数据。每个传感元件由以下组成:标准电极电化学电池,其是两个电极(工作和对电极)

或三电极（工作、参比和对电极）形式，这取决于样品的可预测性或复杂性（例如粪便是不可预测的并且因样品而异）。将电极丝网印刷在 350 微米的聚酯膜(Kemafoil®, mts1 w, Coveme, UK) 上, 如图 2 所示。对电极是丝网印刷碳。参比电极是在丝网印刷碳触点上的丝网印刷 Ag/AgCl。工作电极是放置在丝网印刷碳触点上的 CP/TMB/PER 共混物。检测传感元件（在图 1 中的电极 1）具有在它后面的磁体，而对照传感元件（在图 1 中的电极 2）则没有磁体。14 mm 直径孔被限定在传感元件的表面上以保持测试溶液，时间为电化学测试的持续时间，其中借助于 250 微米双面粘接性聚酯带。

[0201] 2.2 缓冲液和试剂

[0202] 测定缓冲液：

[0203] -PBS 缓冲液（产品代码：P5368, Sigma, UK）

[0204] 电化学缓冲液：

[0205] -1x 缓冲液 A (pH 5.0) (自制)

[0206] -在缓冲液中氯离子的浓度对于假参比电极近似真参比电极的行为来说是足够的。

[0207] -缓冲强度足以确保 pH 值接近 5.0 (测定溶液的 pH 是 7.4)。

[0208] 测定稀释：

[0209] 在 107.7 μ L 测定缓冲液中进行测定，然后用 300 μ L 电化学缓冲液稀释，以产生 407.7 μ L 测试溶液 (pH 5)。

[0210] 3. 检测概念的测试

[0211] 直接用 HRP 来标记磁性微珠。借助于电化学传感器来测试一系列浓度的这些珠。首先，在标准电化学缓冲液中测试珠（图 3）。其次，在包含 HRP 标记的检测抗体的电化学缓冲液中并在和在全测定中使用的相同浓度下测试珠，以模拟当测试全测定时将存在的背景信号（图 4）。来自这些测试的数据表明，检测概念进行得非常好。在两种测试中，源自 HRP 标记珠的信号给出线性趋势。

[0212] 4. 珠测定

[0213] CRP 测定被设计和测试为用来说明上述技术的方法。上述测定被设计有磁性微珠作为固相。比色检测用来发展和证实上述测定。

[0214] 在反应室（96 孔板的孔）中用标记有 HRP 的检测抗体来温育分析物 1 小时。然后将与捕获抗体结合的磁珠加入反应室并温育溶液另外一小时。洗涤珠 3 次，然后再悬浮于溶液。然后将珠溶液从反应室转移到清洁检测室。从测试溶液分离珠并添加比色溶液，然后温育 10 分钟。添加终止溶液并除去 96 孔板和珠（因为珠的颜色引起在 450 nm 的背景信号）。利用吸光度板读取器在 450 nm 读取孔板。

[0215] 结果（图 5）表明，测定是正常工作的并且观测到对于增加浓度的 CRP 的线性趋势。

[0216] 5. 借助于洗涤，CRP 珠测定的电化学检测

[0217] 借助于电化学检测来测试 CRP 珠测定。遵循用于比色测定的方法，其中仅用电化学检测方法来替代比色检测方法。

[0218] 在反应室中，用标记有 HRP 的检测抗体来温育分析物 1 小时。然后将与捕获抗体结合的磁珠加入反应室并温育溶液另外一小时。洗涤磁珠三次。然后用电化学缓冲液稀释

测试溶液并用移液管移到在电极传感器上的孔上并在 30 mV 与 Ag/AgCl REF 下进行测量 30 秒。

[0219] 对于其中在电化学检测以前洗涤珠的测定,对于 0 μ g/mL 和 0.23 μ g/mL CRP 的原始数据的实例的电流对时间的曲线图分别示于图 6 和图 7。测定的给出为充电对 CRP 浓度的完整结果示于图 11。结果表明,可以成功地结合珠测定和电化学检测。

[0220] 6. 没有洗涤的 CRP 珠测定的电化学检测

[0221] 然后在没有洗涤步骤的情况下进行实验。在反应室中,用 HRP 标记的检测抗体来温育分析物 1 小时。然后将与捕获抗体结合的磁珠加入反应室并温育溶液另外一小时。从反应室除去溶液并用电化学缓冲液稀释。将测试溶液用移液管移到在电极传感器上的孔上,然后在 30 mV 与 Ag/AgCl REF 下进行测量 30 秒。

[0222] 对于 0 μ g/mL 和 0.23 μ g/mL CRP 的原始数据的实例的电流对时间的曲线图分别示于图 9 和图 10。测定的给出为充电对 CRP 浓度的完整结果示于图 11。利用用于 20-30 秒的测量期间的矩形规则来计算充电。结果表明,可以成功地结合珠测定和电化学检测而不需要洗涤。

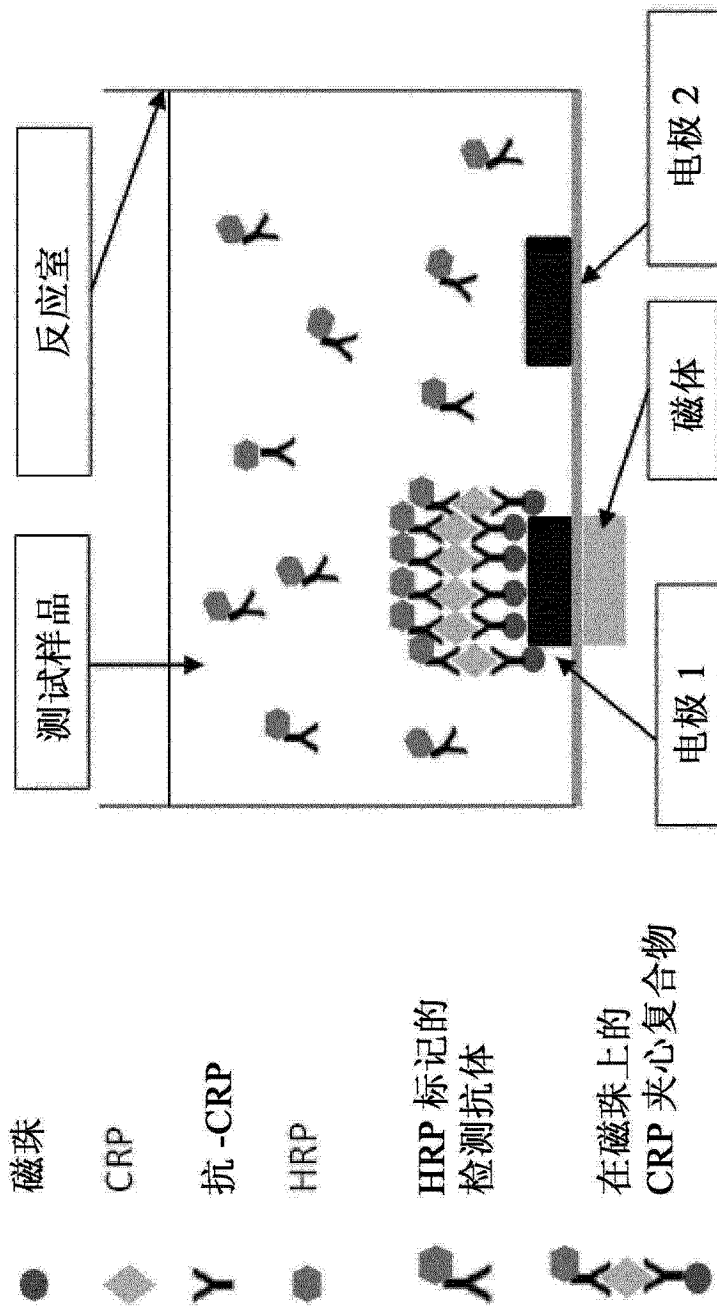


图 1

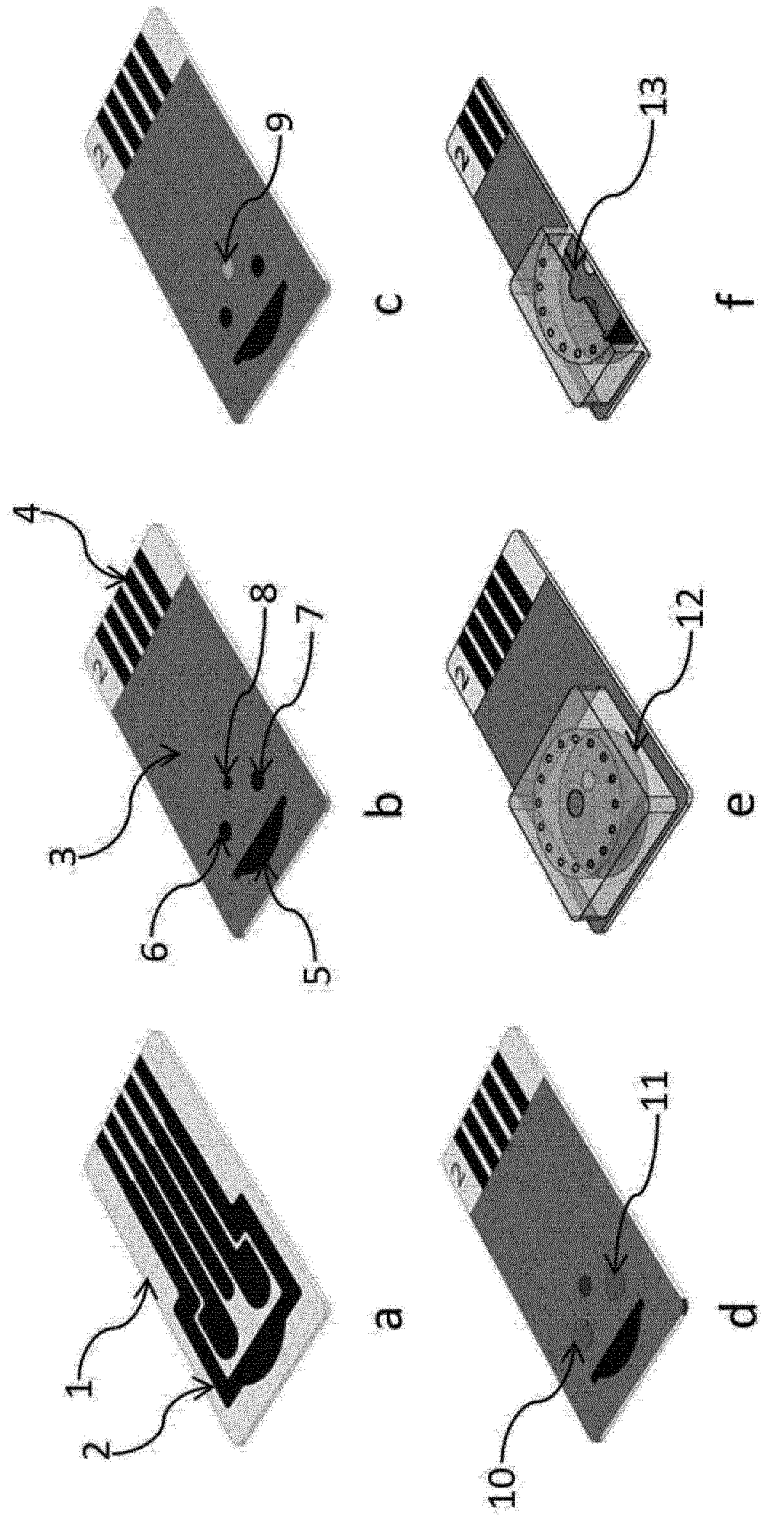


图 2

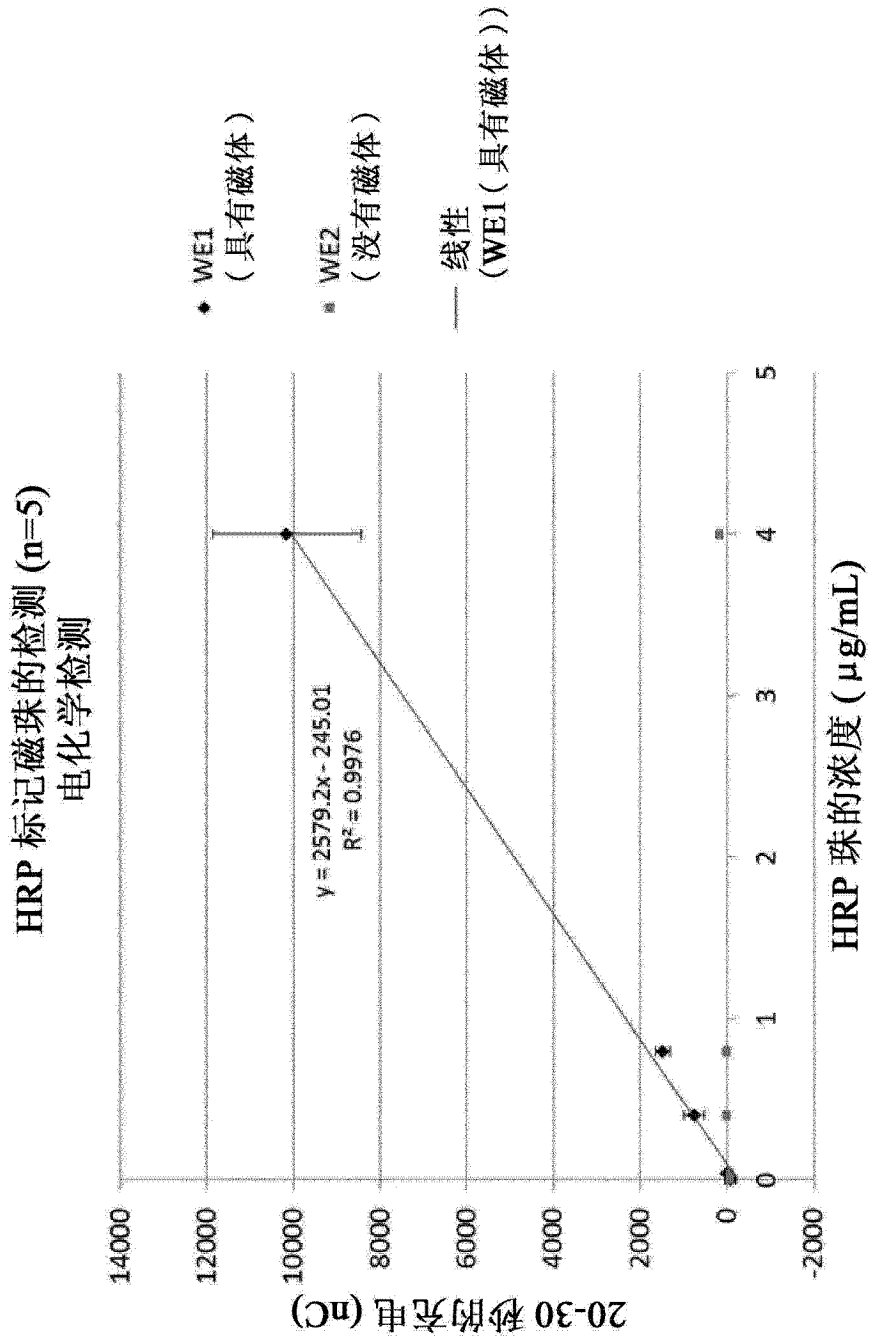


图 3

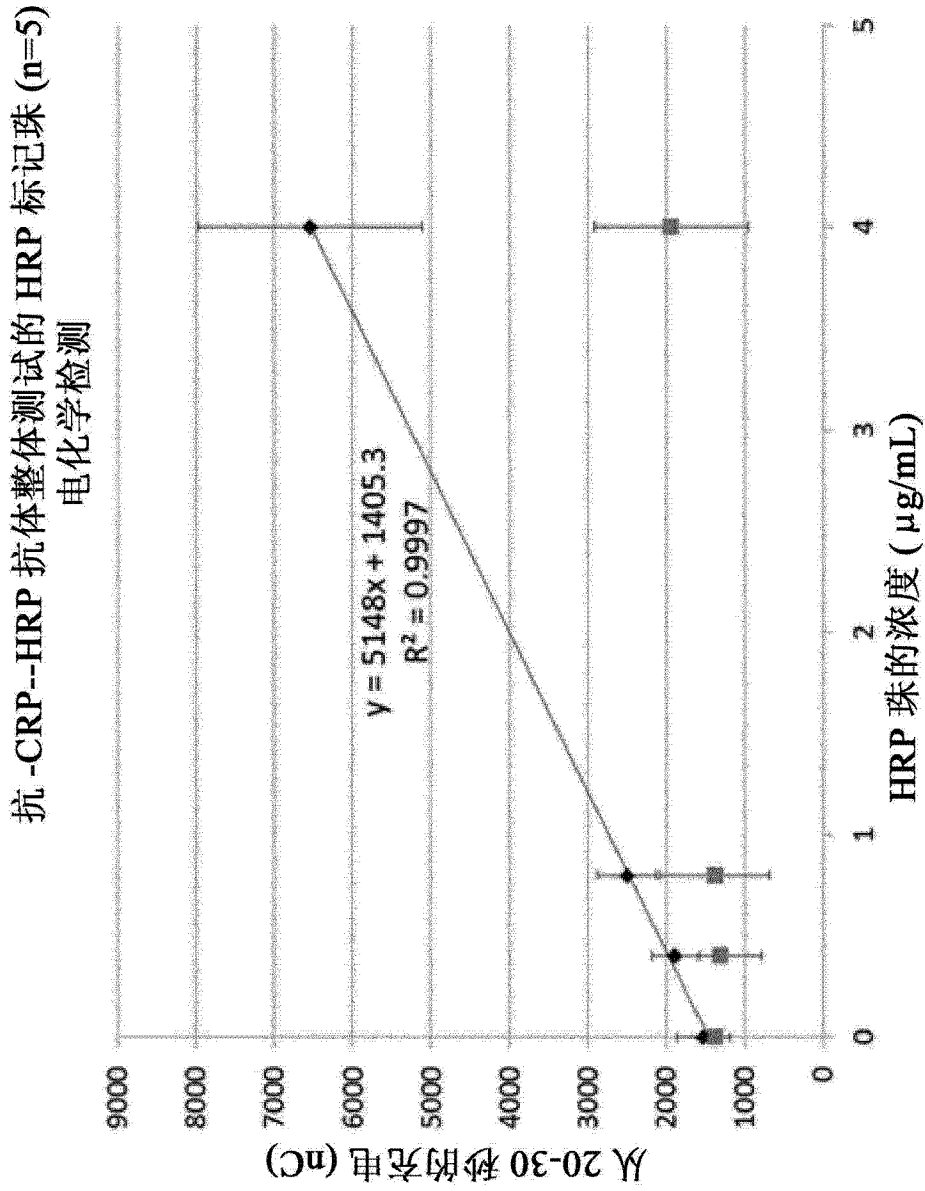


图 4

CRP 珠测定 - 比色检测 (n=3)

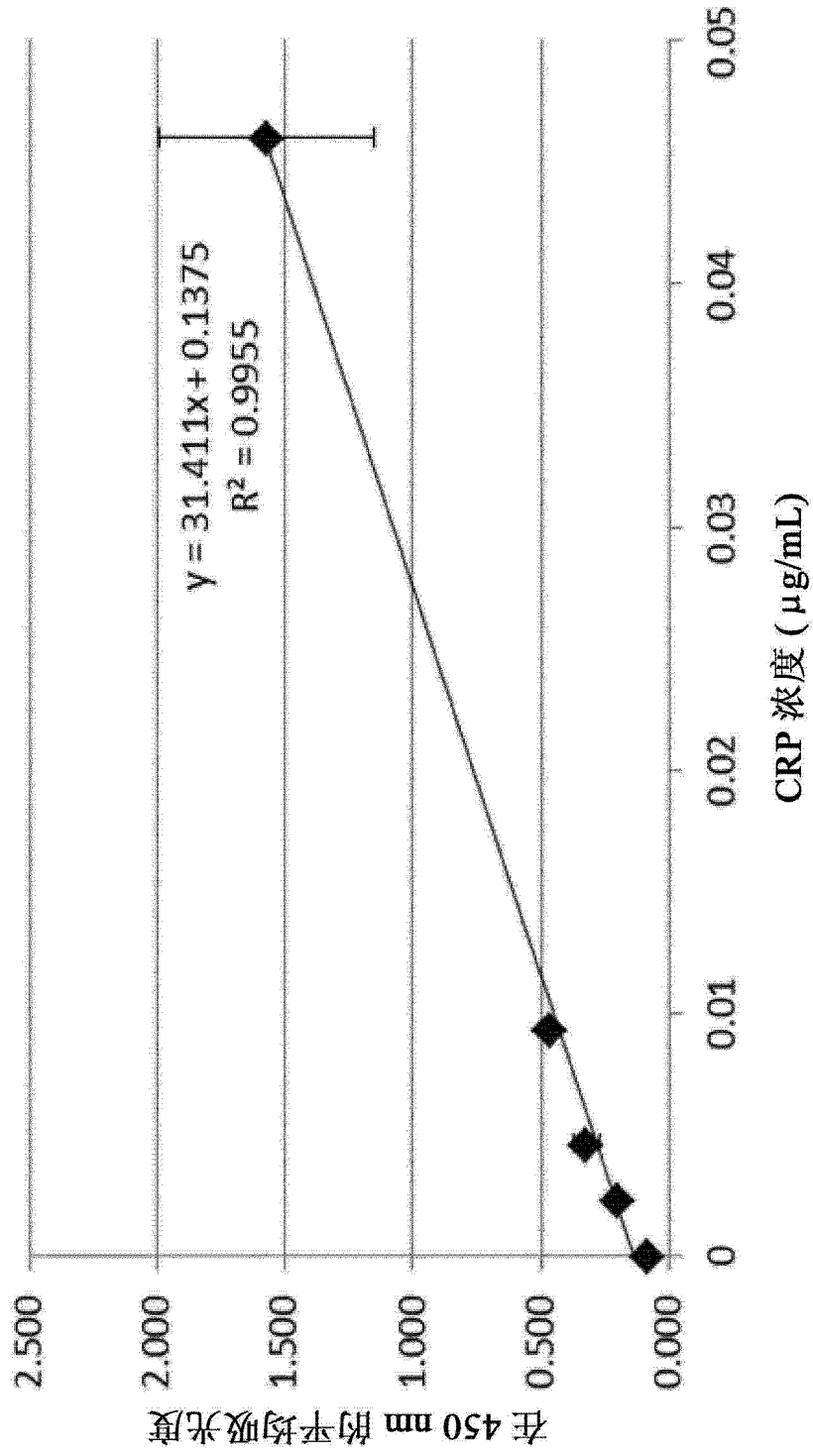
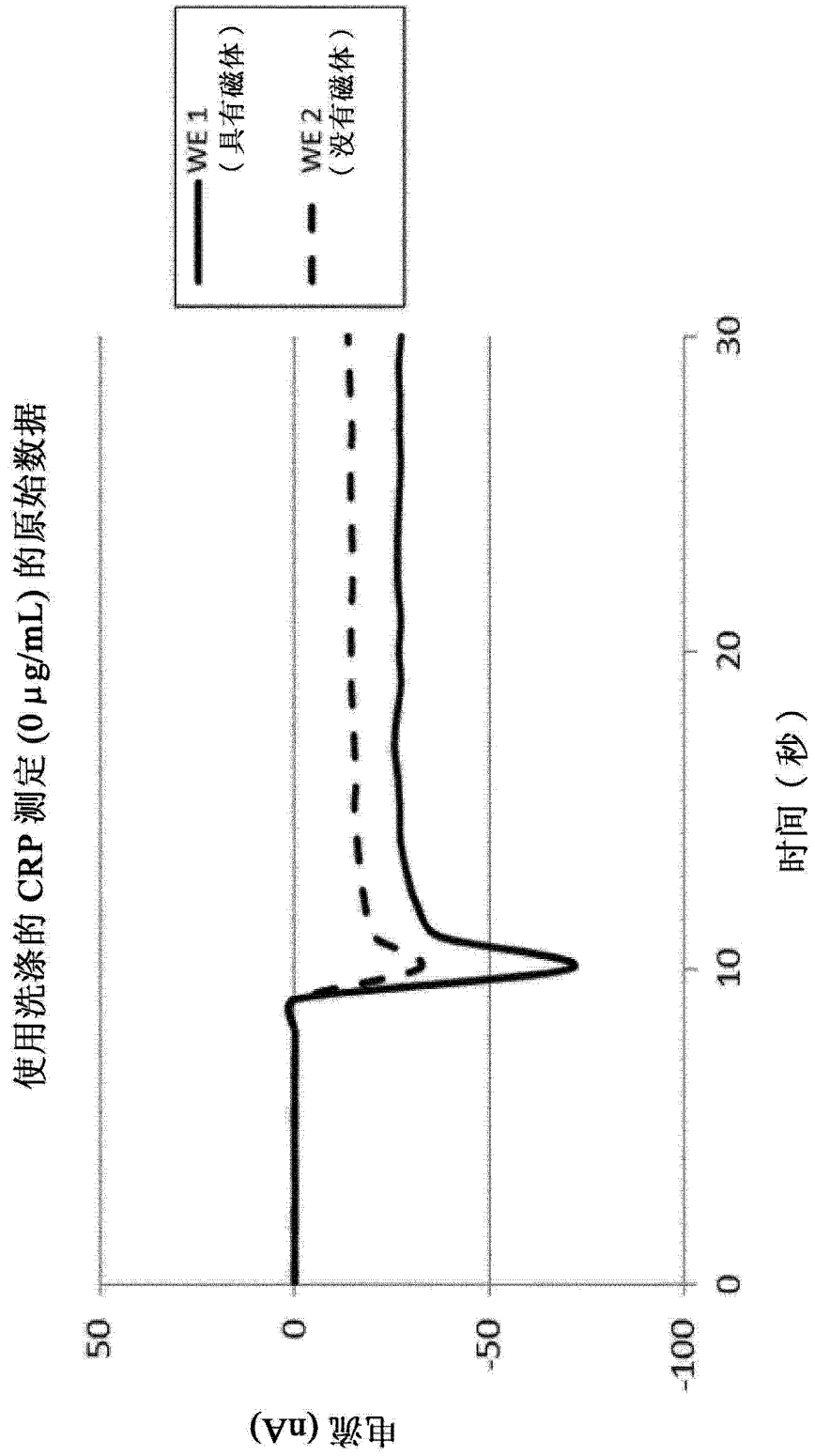


图 5



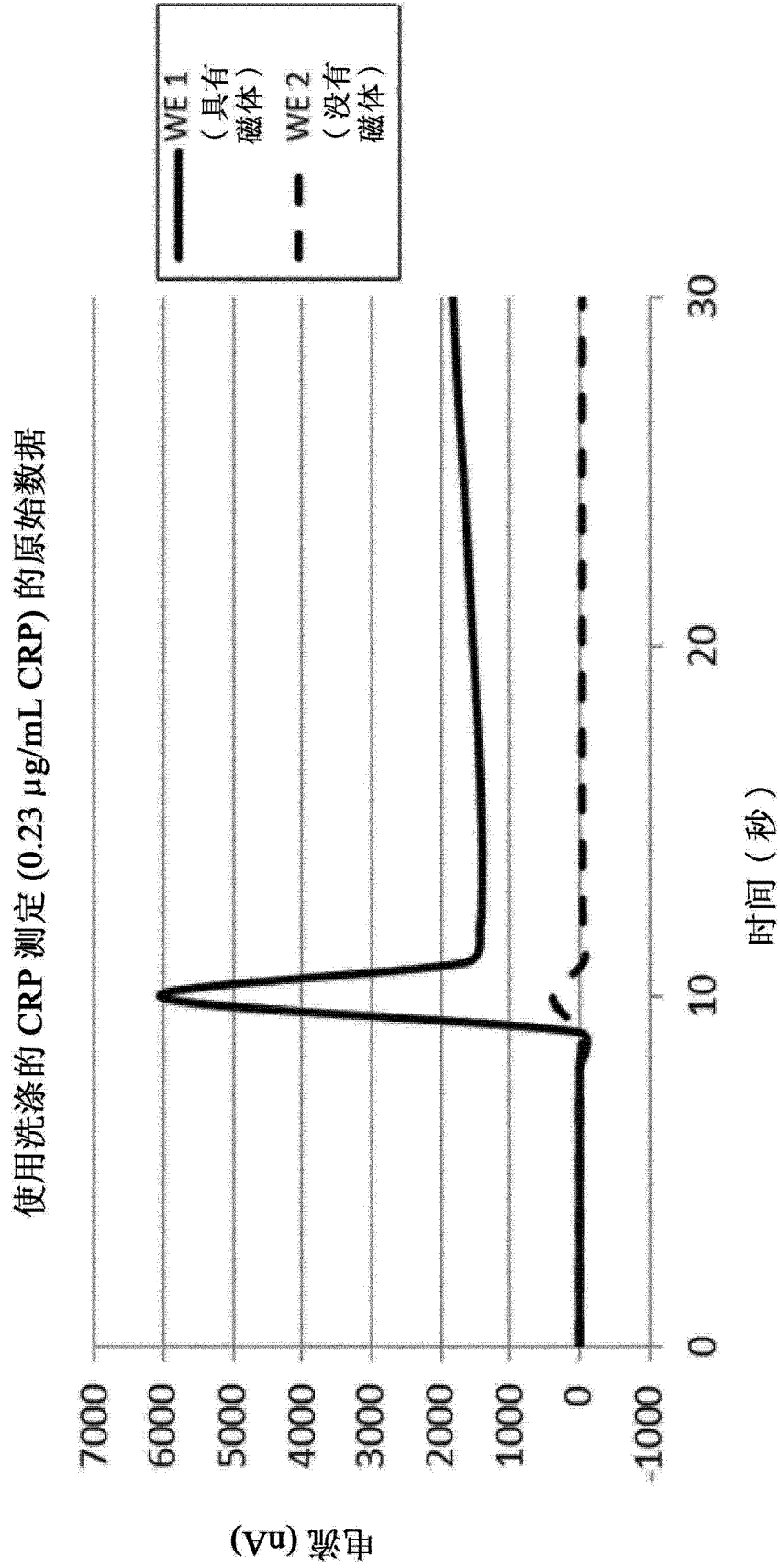


图 7

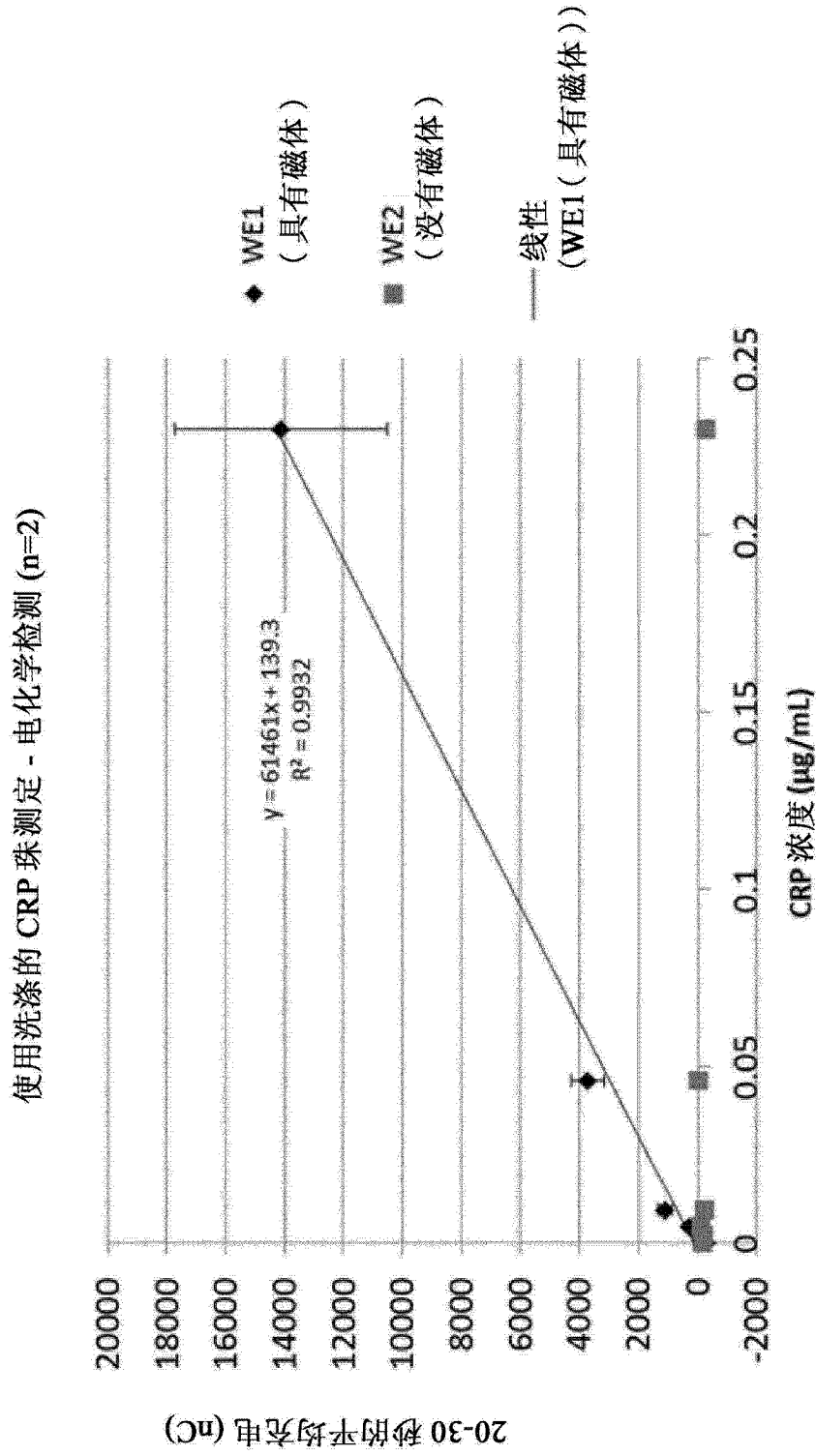


图 8

没有使用洗涤剂 (0.0 $\mu\text{g/mL}$ CRP) 的 CRP 测定的原始数据

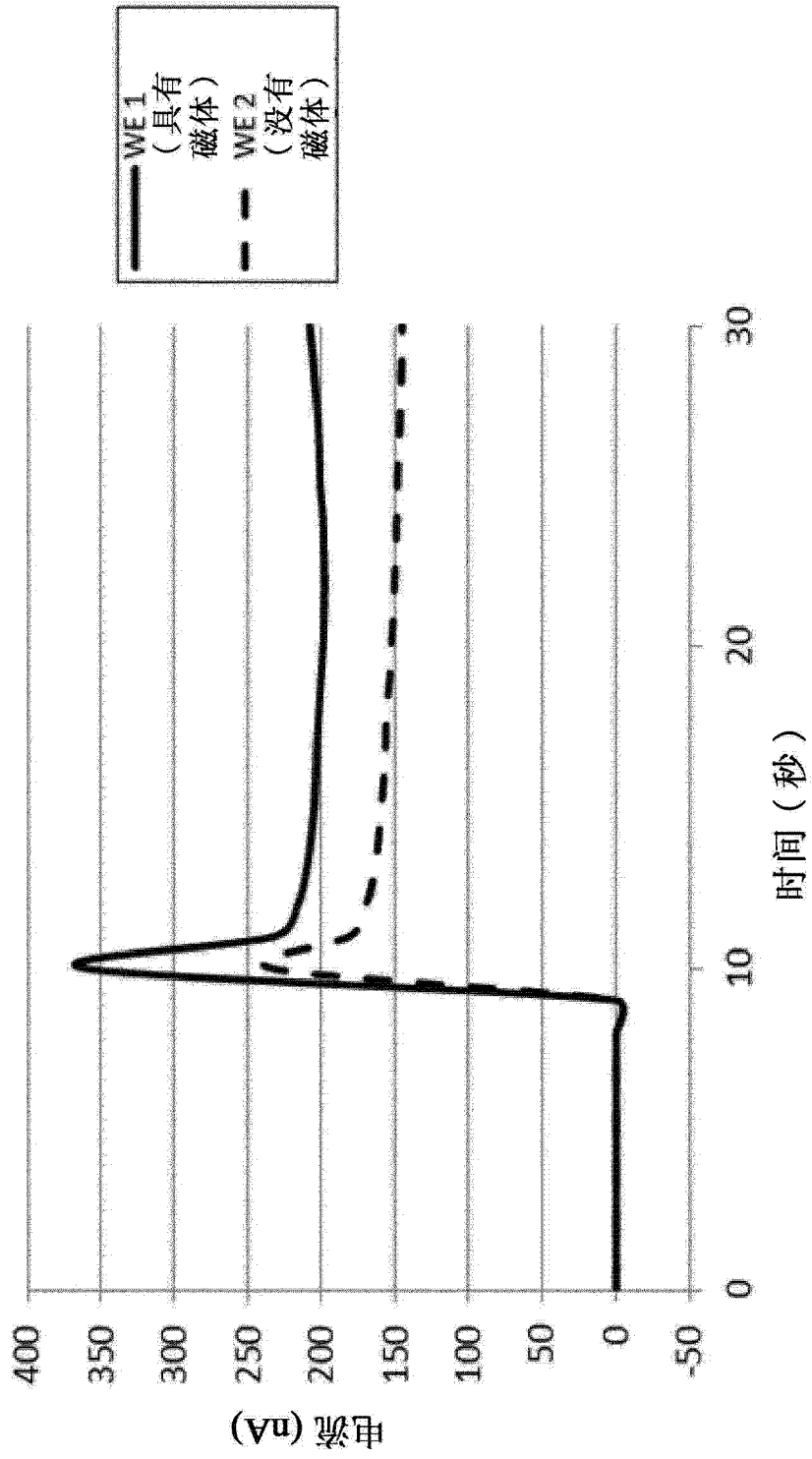


图 9

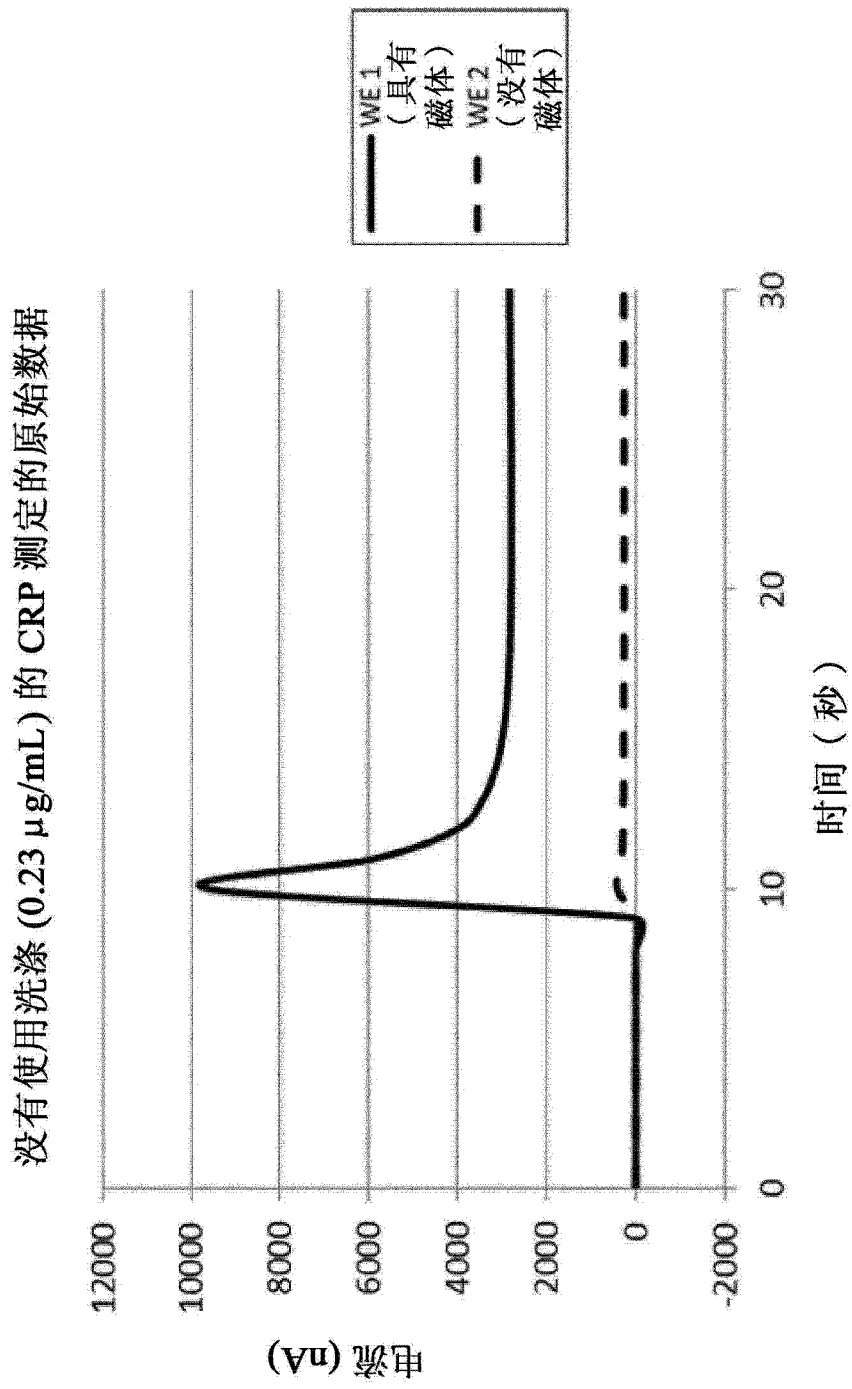


图 10

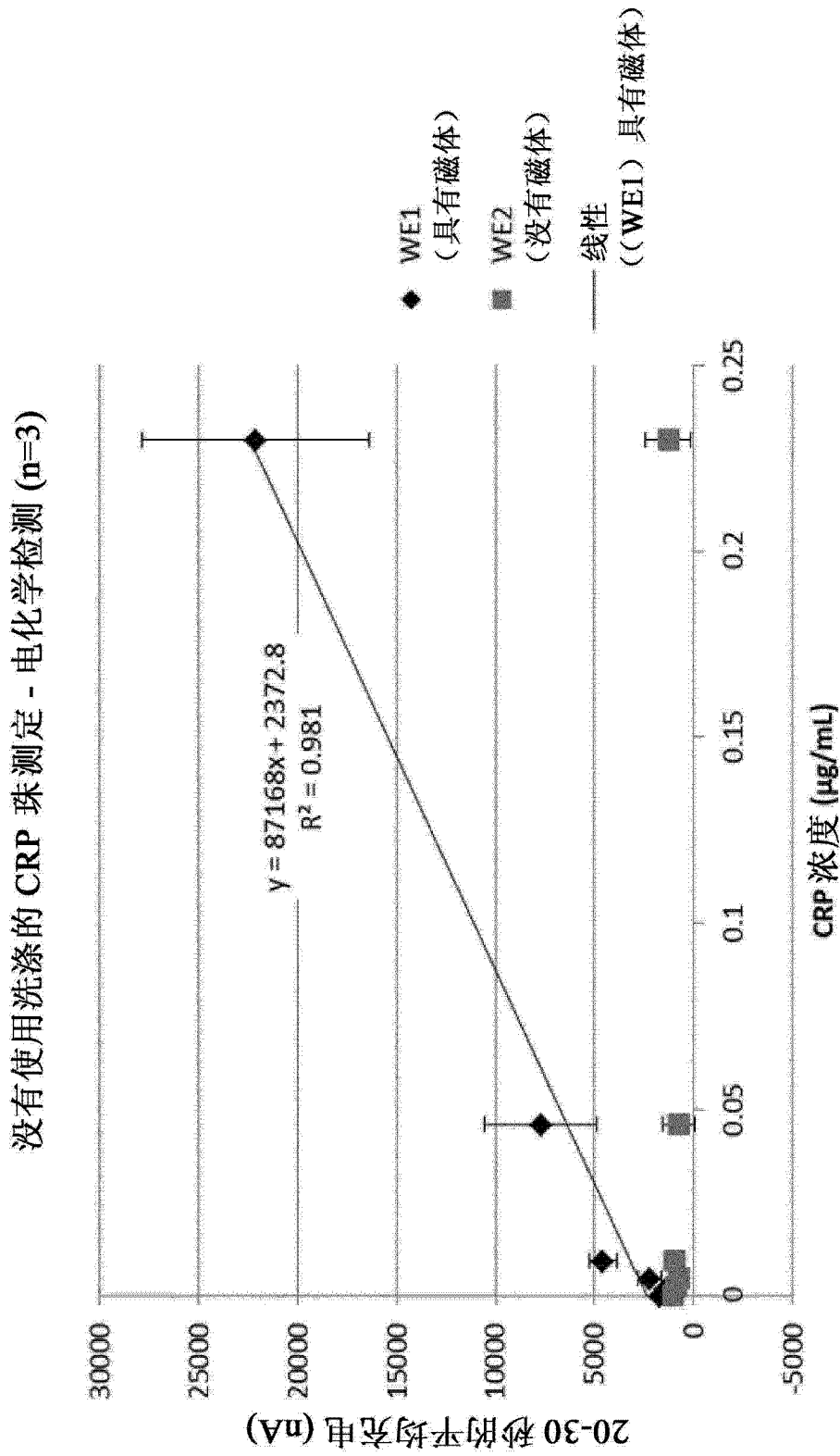


图 11