

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/68

G01N 33/52



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98115107.8

[45] 授权公告日 2003 年 8 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1119656C

[22] 申请日 1998.5.6 [21] 申请号 98115107.8

[30] 优先权

[32] 1997. 5. 6 [33] US [31] 045754

[71] 专利权人 奥索临床诊断有限公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 T·阿特 J·R·谢弗

D·B·拉塔特 R·C·苏顿

J·C·毛克 W·W·维贝二世

R·F·温特科恩

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 温宏艳

权利要求书 4 页 说明书 17 页

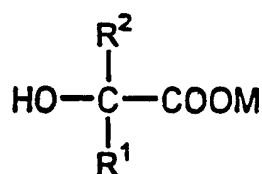
[54] 发明名称 用于蛋白质检测的干燥分析单元

[57] 摘要

公开了一种干燥分析单元，该单元能用于灵敏快速地检测及定量分析蛋白质。使用一种染料进行化验，该染料与蛋白质及钼酸盐离子反应引起该染料光谱吸收的可测量的变化。也公开了稳定和提高化验准确度的聚合物，和减少重碳酸盐干扰的化合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1、用于蛋白质检测的干燥分析单元，所述单元含有：
 - (A) 一个多孔扩散层；
 - 5 (B) 一或多个附加层，包括：
 - (i) 一种染料，能与蛋白质及钼酸盐离子反应使所述染料的光谱吸收或反射强度发生变化；
 - (ii) 一种钼酸盐；和
 - (iii) 一种含有丙烯酰胺的聚合物，
- 10 其中所述染料、所述钼酸盐和所述含有丙烯酰胺的聚合物可以共同存在于所述单元的同层中或者任意组合或单独存在于所述单元的各层中；
 - (C) 一层载体，其中一个或多个附加层 (B) 位于层 (A) 与 (C) 之间，并且各层处于流体接触状态。
- 2、权利要求 1 的干燥分析单元，其中所述染料选自由邻苯二酚紫、焦棕
- 15 酚红、溴焦棕酚红和倍因组成的组。
- 3、权利要求 2 的干燥分析单元，其中所述染料为邻苯二酚紫。
- 4、权利要求 1 的干燥分析单元，其中所述钼酸盐为钼酸铵。
- 5、权利要求 1 的干燥分析单元，其中所述含有丙烯酰胺的聚合物选自由聚丙烯酰胺，聚合物聚丙烯酰胺-共-N-乙烯基-2-吡咯烷酮，聚合物聚（丙烯酰
- 20 胺-共-丙烯酸）和聚合物聚（丙烯酰胺-共-N-(3-乙酰乙酰氨基丙基)甲基丙烯酰胺）组成的组。
- 6、权利要求 5 的干燥分析单元，其中所述聚合物为聚丙烯酰胺，其分子量范围为 100000 至 150000 道尔顿。
- 7、权利要求 1 的干燥分析单元，其中所述染料为邻苯二酚紫，所述钼酸
- 25 盐为钼酸铵，所述含有丙烯酰胺的聚合物为聚丙烯酰胺，所述聚丙烯酰胺分子量范围为 100000 至 150000 道尔顿。
- 8、一种蛋白质的测量方法，该方法包括：
 - (A) 使怀疑含有蛋白质的流体与一种具有通式结构的羟基羧酸结合：



5

其中 R^1 与 R^2 独立为 H 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{OH}$ ， M 为 H 、或者是带正电金属或非金属的相反离子；

(B) 使所述含有所述羟基羧酸及怀疑含有的蛋白质的流体与一种干燥分析单元接触，所述单元含有：

10

(a) 一个多孔扩散层；

(b) 一或多个附加层，含有：

(i) 一种染料，该染料能与蛋白质及钼酸盐离子反应使所述染料的光谱吸收或反射强度发生变化；

(ii) 一种钼酸盐；

15

(iii) 一种含有丙烯酰胺的聚合物，

其中所述染料，所述钼酸盐和所述含丙烯酰胺的聚合物可以共同存在于所述单元的同层中或者任意组合或单独存在于所述单元各层中；

(c) 一层载体，其中一个或多个附加层 (b) 位于层 (a) 与 (c) 之间，并且各层处于流体接触状态；和

20

(C) 测量该染料的光谱吸收或反射强度的变化作为蛋白质浓度的量度。

9、一种用于蛋白质检测的干燥分析单元，所述单元含有：

(A) 一个多孔扩散层；

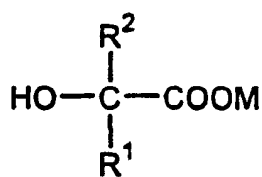
(B) 一或多个附加层，含有：

(i) 一种染料，该染料能与蛋白质及钼酸盐离子反应使所述染料的光谱
25 吸收或反射强度发生变化；

(ii) 一种钼酸盐；

(iii) 一种含有丙烯酰胺的聚合物；

(iv) 一种具有通式结构的羟基羧酸；



5

其中 R^1 与 R^2 独立为 H、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{OH}$, M 为 H、或者是带正电的金属或非金属的相反离子;

其中所述染料、所述钼酸盐、所述含有丙烯酰胺的聚合物和所述羟基羧酸可以共同存在于所述单元的同层中或者任意组合或单独存在于所述单元各层

10 中; 和

(C) 一层载体, 其中一个或多个附加层 (B) 位于层 (A) 与 (C) 之间, 并且各层处于流体接触状态。

10、一种蛋白质的测量方法, 该方法包括:

15 含有:

(a) 一个多孔扩散层;

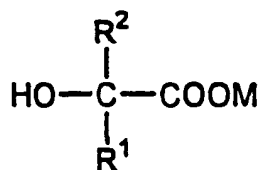
(b) 一或多个在流体中与所述多孔扩散层接触的附加层, 含有:

(i) 一种染料, 该染料能与蛋白质及钼酸盐离子反应使所述染料的光谱吸收或反射强度发生变化;

20 (ii) 一种钼酸盐;

(iii) 一种含有丙烯酰胺的聚合物;

(iv) 一种具有通式结构的羟基羧酸;



25

其中 R^1 与 R^2 独立为 H、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{OH}$, M 为 H、或者是带正电的金属或非金属的相反离子;

其中所述染料、所述钼酸盐、所述含有丙烯酰胺的聚合物和所述羟基羧酸可以共同存在于所述单元的同层中或者任意组合或单独存在于所述单元各层中;

30

(c) 一层载体，其中一个或多个附加层 (b) 位于层 (a) 与 (c) 之间，并且各层处于流体接触状态；和

(B) 测量该染料光谱吸收或反射强度的变化作为蛋白质浓度的量度。

用于蛋白质检测的干燥分析单元

5 本发明涉及干燥分析单元以及使用该分析单元定量分析液体样本中的蛋白质的方法。更确切地说，本发明涉及将特定的染料、钼酸盐离子以及含有丙烯酰胺和羟基羧酸的聚合物用于该分析单元。

在医疗实践及研究、分析及诊断过程中一直需要快速准确检测各种液体、如生物体液中存在的化学及生物物质的方法。例如，在对多种人类疾病进行有
10 效的研究、诊断和治疗时必须快速准确地测定蛋白质的有无和多少。

为了进行物质检测，近几十年来人们研究了各种各样的分析方法。这些方法已非常可靠，在某些情况下，适用于自动检测，以及适用于试剂盒的形式。

蛋白质化验一般在溶液中进行，或者在实验装置中进行，在该装置中液体以某种方式从参与到化验中的试剂中除去。尽管溶解工艺已为本领域广泛接
15 受，不过通常仍然需要分析设备经常具有错综复杂的溶液处理和转运能力。而且这种化验中所用的分析设备可能涉及复杂的液体处理，也许需要技术人员来进行操作和严格的清洗，清洗是用来避免样本之间的污染。

作为溶液化学的替代选择是使用干燥的分析单元。应当明确的一点是由于涂层剂的干扰，不是所有的以溶液为基础的分析化验都能适用干燥分析单元，
20 涂层剂可以是例如粘合剂、表示活性剂、及其他提高或促进物质沉降、样本湿润、保持该分析单元结构完整所需的试剂。而且干燥分析单元必须在使用时分格，以分开不相容的成分。这一点与溶液化学的情况不同，后者可以将液体分开贮存、连续加入。

有大量出版物描述了干燥分析单元及其用途，包括美国专利 4132528 号、
25 美国专利 4786605 号、美国专利 3992158 号，Pierce 等人的美国专利 4258001 号，Fricker 等人的美国专利 4670381 号，WO82/2601（1982、8、5 公开）、欧洲专利申请 051183 号（1982、5、12 公开）、欧洲专利申请 066648 号（1982、12、15 公开）。所引用的全部内容结合在此作为参考。

判定和监测病人肾功能的实用指标是尿液中存在的总蛋白质浓度。依据特
30 定的疾病状态，存在于尿液中的蛋白质性质和数量是不同的，该疾病状态导致

了肾防止蛋白质通过进入尿液的功能衰竭。

尿液中可能发现的蛋白质实例包括但不限于白蛋白、完整的免疫球蛋白、 κ 游离链、 λ 游离链、视黄醇结合蛋白质、 α -1-微球蛋白和 β -1-微球蛋白。这些蛋白质的氨基酸组成和分子量大不相同。临床医师在使用尿总蛋白筛分化验时所感兴趣的信息是单位体积尿样中的蛋白质总量。诊断化验的结果，也就是理论上测得的信号，应当与可能存在的蛋白质的性质或类型无关。例如，50mg/dL 白蛋白应当与 50mg/dL 其它蛋白质所产生的信号相同。人尿液中正常蛋白质范围约为 5 至 100mg/dL。

已有各种方法用于检测生物物质中的总蛋白浓度。在很多分析化验中都测量光学信号，如在光谱可见或紫外区的吸收，该光学信号与样本中蛋白质浓度成比例。不过该信号一般也是样本中蛋白质性质的函数，且并不仅仅与蛋白质的含量有关，这并非人们所希望的。这些方法通常依靠下列方法之一，产生可检测的光学信号：

1、蛋白质与 Cu(II) 的配合物，缩二脲反应，引起光谱可见区可检测的但是微小的吸收。

2、测量由蛋白质的芳族氨基酸产生的光谱紫外区的吸收。

3、通过将特殊的氨基酸用含有发色团的分子进行衍生作用可以检测蛋白质含量，该发色团借助其特征吸收或荧光可被定量分析。

4、可以使用染料检测样本中蛋白质的有无或多少，该染料能与蛋白质以非共价键方式结合生成染料-蛋白质配合物，该配合物可对染料的吸收光谱产生微扰。一些染料需要金属离子的存在，如钼或钨，在这种情况下，染料、金属离子与蛋白质的非共价配合物的生成可对染料的吸收光谱产生微扰，后者可用于检测样本中蛋白质的有无或多少。

5、蛋白质与染料竞争与 Cu(II) 的配位作用，产生一个与蛋白质浓度成比例的吸收信号（ Cu(II) /染料配位化合物具有与游离染料、即不与 Cu(II) 配位化合物染料不同的吸收光谱）。

美国专利 4132528 涉及基于缩二脲反应的蛋白质化验法。'528 专利的干燥化验单元含有一种 Cu(II) 的缩二脲试剂和一种 Cu(II) 的螯合剂，如 CuSO_4 ，以及酒石酸，或二者的配合物，一种能提供 PH 大于 12 条件的缓冲系。当含水液体、如血清或脑脊髓液（CSF）中的蛋白质在 PH 大于 12 的条件下与缩二脲

试剂相互作用时，发生二价形式的铜与蛋白质之间的反应产生紫色。颜色强度直接与血清蛋白质含量成比例，通过已知的比色分析技术可测得蛋白质浓度。不幸的是，该专利的干燥滑动单元敏感度比所需程度低，也就是说不能检测浓度小于等于 200mg/dL 的蛋白质。

- 5 美国专利 4786605 描述了用于蛋白质定量分析的干燥分析单元的组成，它用预先生成的 Cu(II)/吡啶偶氮染料配位化合物代替缩二脲试剂，所得分析单元的灵敏度比'528 专利的分析单元高。向化验单元中加入含水蛋白质后，二价铜离子被蛋白质从配合物中取代，Cu(II)/染料配合物的吸收曲线移至未配位染料的吸收曲线。因此加入蛋白质后，Cu(II)/染料配合物的吸收峰与蛋白质加入
- 10 量成比例地降低，用含有已知浓度蛋白质的样本进行适当校正后，就能用比色法检测液体样本中未知浓度的蛋白质了。按该专利的教导，这些分析单元具有非常好的动态范围，其灵敏度也比基于缩二脲反应的分析单元高达约 30 倍。

不过，4786605 号专利技术在尿样蛋白质定量的用途始终表现出与作为参考标准的用考马斯蓝溶液法化验蛋白质浓度所得到的值相比，有约 10 至 20% 的尿样呈不可接受的随机阳性偏差，也就是说，某些病人尿样的预计蛋白质浓度（约占样本人群的 10 至 20%）用'605 专利技术测得的结果大于用考马斯蓝

15 化验法测得的结果。据推断，某些尿样中的该随机阳性偏差是由还原剂的存在而引起的，如抗坏血酸，它能引发 Cu(II)与染料上可还原基团、如硝基的还原反应。人们需要一种对上述化验工艺的缺陷不敏感的干燥分析单元。

- 20 溶液中在酸性条件下特定指示剂染料与蛋白质及金属离子的配位反应发生可测量的颜色变化是已知的。如上所述，溶液中奏效的分析化验方法未必很容易适合于干燥分析单元，原因已有引证。

人们迫切需要的是不同的蛋白质同样与一种染料反应产生光学信号，该信号与样本中含有的蛋白质量有关，而与蛋白质的性质无关。尿中含有含量不等的碳酸氢盐（多至约 200mM）。尿样中高浓度的碳酸氢盐如果不稀释或经样本预处理除去之（如分子筛分离工艺），由于染料-金属离子-蛋白质要在低 PH 条件（1.5 至 3.5）下发生相互反应，足够多的碳酸氢盐被引入化验中产生强碱性条件，而使化验结果不可靠或毫无用处，和/或碳酸氢盐另外会干扰金属离子的配位作用。人们需要提供这样一种用于蛋白质检测的干燥分析单元，该分

25 析单元对还原剂或碳酸氢盐的存在不敏感，该分析单元所产生的信号量度基本

30

上与蛋白质的含量相对应，也就是说，基本上与蛋白质的性质无关（这里“基本上”指的是对于具体的蛋白质测量应用来说是适合的或可接受的，如尿样中总蛋白质的测量），该分析单元可用于在约 5 至 300mg/dL 范围内对蛋白质进行定量分析，而无需预先稀释、预先浓缩、或进行样本预处理以除去所述干扰剂。

我们意外地发现，在钼酸盐离子以及含有丙烯酰胺的聚合物、羧基羧酸化合物的存在下，可以制备得到含有指示剂染料的干燥分析单元，适用于检测生物体液中蛋白质的有无或多少。

在本发明的干燥分析单元中，在钼酸盐离子以及丙烯酰胺聚合物与羧基羧酸化合物的存在下，使用指示剂染料已解决在先技术中干燥分析单元在检测蛋白质浓度时遇到的问题。对本发明的实施方式来说，钼酸盐离子是优选的金属离子。不过本发明的实施方式并不仅限于钼酸盐离子。其他适当的金属离子，如钨酸盐离子，也被认为是在本发明的范围之内。

如上所述，人们迫切需要的是不同的蛋白质同样地与染料反应产生光学信号，该光学信号与样本中蛋白质含量有关，而与蛋白质性质无关。我们意外地发现，用于将各种试剂涂在干燥单元上的聚合物赋形剂影响了指示剂染料系统与不同蛋白质之间的表观反应性。因此所测得的光学信号数值依赖于所含有的蛋白质的性质或类型；不过当含有丙烯酰胺的聚合物存在于干燥分析单元中时，这种对蛋白质类型的依赖程度显著降低了。

本发明公开了用于样本中总蛋白质定量的干燥分析单元，该定量方法是在钼酸铵的存在下生成指示剂染料与蛋白质的配合物的基础上，在适当波长下测量反射强度变化。本发明的干燥单元用于检测任何液体样本、尤其是生物体液中的蛋白质含量。

更具体地说，在一种实施方式中，本发明涉及一种用于检测及定量蛋白质的干燥分析单元，该分析单元包括：

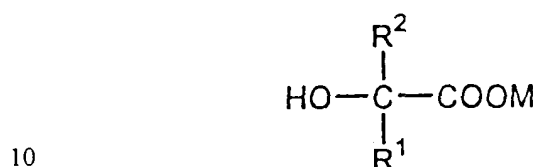
- (i) 多孔的扩散层，
- (ii) 一或多个附加层，它们在流体中与该多孔的扩散层接触，和
- (iii) 载体，

其中该分析单元在至少一层中含有一种含有丙烯酰胺的聚合物、指示剂染料和钼酸盐离子，在所述分析单元与怀疑含有蛋白质的液体接触的基础上，这些物

质反应发生可测量的染料光谱吸收或反射强度变化，其中所述染料、所述钼酸盐和所述含有丙烯酰胺的聚合物可以共同存在于所述分析单元的同层中，或者任意组合或单独存在于所述分析单元的各层中。

本发明提供了在检测及定量蛋白质中使用上述干燥分析单元的方法，该方法包括：

(A) 向怀疑含有蛋白质的液体样本中加入下式的羟基羧酸，



其中 R^1 与 R^2 独立为 H、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{OH}$ ，M 为 H、或者是荷正电的金属或非金属的相反离子；

(B) 使含有该羟基羧酸的液体样本与所述分析单元接触；然后

(C) 测量染料光谱吸收或反射强度的变化，作为蛋白质有无及多少的量度。

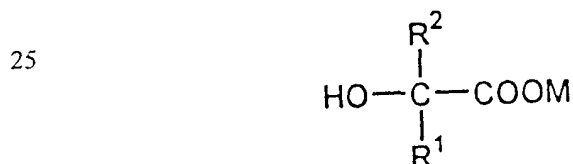
在一种优选的实施方式中，本发明涉及一种用于检测及定量蛋白质的分析单元，该分析单元包括：

(i) 多孔的扩散层，

(ii) 一或多个附加层，它们在流体中与该多孔的扩散层接触，和

(iii) 载体，

其中所述分析单元在至少一层中含有一种含有丙烯酰胺的聚合物、其中所述分析单元包含一种具有下式结构的羟基羧酸，



其中 R^1 与 R^2 独立为 H、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{OH}$ ，M 为 H、或者是荷正电的金属或非金属的相反离子；该分析单元进一步含有指示剂染料和钼酸盐离

子, 在所述分析单元与怀疑含有蛋白质的液体接触的基础上, 这些物质反应发生可测量的染料光谱吸收或反射强度的变化, 其中所述染料、所述钼酸盐、所述含有丙烯酰胺的聚合物和所述羟基羧酸可以共同存在于所述分析单元的同层中或者以任意组合或单独存在于所述分析单元的各层中。

- 5 本发明提供了一种在检测及定量蛋白质中使用上述优选的干燥分析单元的方法, 该方法包括:

(A) 使怀疑含有蛋白质的液体样本与所述分析单元接触;

(B) 测量光谱吸收或反射强度的变化, 作为蛋白质有无及多少的量度。

- 10 本发明有利地用于检测各种含水液体中蛋白质的存在和/或浓度, 如人及动物的生物体液、食物、工业或市政废水、及其他通常以这种方式化验的液体。能被化验的生物体液包括但不限于全血、血清、血浆、尿、脊柱液、泪液、滑液、淋巴液、组织或空斑悬液、牙龈液、鞘液、脑液及其他对本领域技术人员来说是显而易见的液体。

- 15 可被检测的蛋白质包括但不限于肽类、多肽、蛋白质(如酶、抗体、脂蛋白和糖蛋白)、以及含有肽类、多肽和/或蛋白质或与之结合(共价或非共价方式)的化合物。本发明尤其用于检测尿中的蛋白质。

- 20 本发明在实施中用到一种分析单元, 该分析单元含有一个通常是经涂层处理过的多孔扩散层, 该扩散层孔度适中, 以适应稀释或未经稀释的供化验的样本(例如 1 至 50 μL)。本发明的分析单元用本领域所熟知的技术组装而成。优选地, 多孔扩展层的孔是各向同性的, 该性质是由层中颗粒, 纤维或其它物理成分之间的空间相互连接所赋予的。各向同性的孔指的是流体沿层均一地扩散。该层材料可用水不溶性的, 且在化验过程中保持其结构的完整性。常用的分析单元组装用材料及方法例如描述在 Przybylowicz 等的美国专利 3992158 号, Pierce 等的美国专利 4258001 号, Kitazima 等的美国专利 4292272 号和 Koyama 等的美国专利 4430436 号中, 全部内容结合在此作为参考。优选的多孔扩散层是在 ESTANE(热塑性聚酯和聚醚聚氨基甲酸酯弹性体)中从硫酸钡制得的, 如美国专利 3992158 号、Przybylowicz 等所述。

- 30 分析单元中有一或多个附加层, 所有附加层在流体中与多孔扩散层接触。这里, “在流体中接触”应被理解为用来说明流体能够很容易地从一层移动到另一层。这些附加层优选涂在聚合物层上, 包括亚层, 试剂层和辐射保持层,

它们由一或多种本领域已知的亲水性粘合剂材料、如明胶；与乙烯吡咯烷酮聚合物组合。一些附加层可以是水不溶性的，而另一些附加层可以是水溶性的。

本发明分析单元的各层可以是自我承载的（self-supporting），不过优选的是这些层配有一个适当的尺寸稳定的化学惰性的载体，优选地，该载体是非孔性的，和电磁辐射可穿透的。载体的选择应当与检测方式相适应（如传导或反射光谱分析法）。可用的载体材料包括但不限于纸、金属箔、聚苯乙烯、聚酯、聚碳酸酯和纤维素酯。

本发明分析单元的至少一层中有一种染料，该染料能特异性地与蛋白质和钼酸盐离子反应。

这里所用的“与蛋白质和钼酸盐离子反应的染料”指的是任何这样的染料化合物，在钼酸盐离子与蛋白质的存在下，染料的光谱或光吸收性质区别于在没有蛋白质存在的条件下，染料与钼酸盐离子的光谱或光吸收性质。具有上述特点的染料包括那些含有开放的芳族结构和三环状芳族结构、且具有官能团的染料化合物（例如但不限于位于一个芳环上的两个邻羟基），该官能团能与钼酸盐离子发生配位作用。这样的染料包括但不限于邻苯二酚紫、四溴苯酚酞乙基酯、三碘苯酚磺酞、四溴焦赭酚红和焦赭酚红。

在本发明的一个优选实施方式中，提供了用于检测蛋白质有无和/或多少的多层分析单元。具体来说，该多层单元含有一个非孔性载体，该载体在流体中接触其上的：

- （i）第一试剂层或缓冲层，含有与蛋白质及钼酸盐离子反应的染料、钼酸盐、含有丙烯酰胺的聚合物；
- （ii）亚层，和
- （iii）多孔扩散层。

本发明的分析单元可在适宜的层中包含多种本领域已知的添加剂，有助于制备、流体的扩散、和对所不需要的辐射的吸收。

本发明分析单元的制备可采用在先技术描述过的常规涂层方法及设备（包括凹板涂层、幕涂、如料斗涂层及其它涂层技术）。该分析单元可被确定为多种形式，包括任意所需宽度的长带、板、滑片或片状。而且，借助适当的分析及方法，本发明的方法可以手动或自动操作。一般来说，本发明方法包括在多孔扩散层上点样（如1至50 μL ）使其与分析单元中的试剂接触。流体

在分析单元中的移动有效地使用于发生反应的试剂混合。

点样后,使分析单元接受任何加快或促进蛋白质-染料-钼酸盐配合物生成所需的条件的作用,如恒温、加热或其它过程。

如上所述,用在本发明中的与蛋白质及钼酸盐离子反应的染料包括但不限于
5 于那些含有开放的芳族结构和三环状芳族结构、且具有官能团的染料化合物
(例如但不限于位于一个芳环上的两个邻羟基),该官能团能与钼酸盐离子发生配位作用。这样的染料包括但不限于邻苯二酚紫、四溴苯酚酞乙基酯、三碘苯酚磺酞、四溴焦赭酚红和焦赭酚红。

上面确认的染料化合物在商业上能从已知的化学品供应商处得到,如
10 Eastman 有机化学品公司、Aldrich 化学品公司、Sigma 化学品公司等,或者可以使用本领域技术人员所熟知的常规原料及方法进行制备。

制备分别含有下列指示剂染料的干燥分析单元:邻苯二酚紫(邻苯二酚,
4, 4'-(3H-2; 1-benzoxathiol-3-ylidene)-二-S, S-二氧化物)、焦赭酚红
(2-(4,5,6-三羟基-3-氧-3H-咕吨-9-基)苯磺酸)、溴焦赭酚红(螺[3H-2,1-
15 苯并噻硫醇(benzoxathiol)-3',9'-[9H]-咕吨-3',4',5',6'-四酚-2, 7-二溴-I, I-
二氧化物])、赭因(3',4',5',6'-四羟基螺[异苯并呋喃-1(3H), 9'-[9H]咕
吨]-3-酮)。干燥分析单元的一般特征描述在Przybylowicz等的美国专利3992158
以及Frank与Pierce的美国专利4258001。所有这些染料均对物理化学环境的变化敏感。

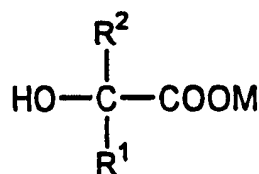
20 我们已发现,借助干燥分析单元中的上述染料结合钼酸盐离子可进行尿蛋白的定量分析。含有邻苯二酚紫以及钼酸盐离子的干燥分析单元对于含有人白蛋白的制备溶液提供了最佳分析检测灵敏度(也就是说,在所需的高至300mg/dL的蛋白质浓度范围内,产生最佳的反射强度Dr的变化)和重复精度。

我们已经意外地发现,用于将干燥单元各种试剂涂层的聚合物赋形剂影响
25 指示剂染料系统与不同蛋白质的表观反应性,于是存在光学信号的测量值对蛋白质类型的依赖。适用于本发明的聚合物的作用在于校正光学信号,也就是说,聚合物能减少等量的不同蛋白质之间所测得的反射强度信号中的差异。这一点是十分必要的,因为在不同的样本中占大多数的是不同的蛋白质类型,而所要测量的是单位体积样本中含有的蛋白质总量(总蛋白质)。理论上总蛋白
30 质的化验应当以相等的灵敏度对全部蛋白质进行定量。本发明的聚合物包括但

不限于水溶性均聚物、共聚物及三元共聚物，它们主要含有（大于 40 重量百分比）丙烯酰胺。如果本发明的聚合物含有能与钼酸盐离子配位化合的官能团，其含量必须满足不会干扰到蛋白质的检测。一个优选的聚合物是丙烯酰胺的均聚物，即重均分子量约在 20000 与 250000 道尔顿之间的聚丙烯酰胺（以下称为聚 A）。最优选的范围是在约 100000 与 150000 道尔顿之间。

另外我们还非常意外地发现，向多层分析单元中加入乙醇酸（优选为预先涂在分析单元中）基本上减少了由碳酸氢盐所带来的干扰。另一些具有通式结构的羟基羧酸：

10



其中 R^1 与 R^2 独立为 H、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{OH}$ ，M 为 H、或者是带正电的金属或非金属的相反离子，该羟基羧酸具有相似的作用，也适用于本发明。具有上式结构的代表性羟基羧酸包括 2-羟基丙酸、及其盐、2-甲基-2-羟基丙酸及其盐。

使用含有指示剂染料和钼酸盐离子以及所述的丙烯酰胺聚合物与羟基羧酸的干燥分析单元进行尿蛋白的定量分析能获得令人满意的结果。邻苯二酚紫及钼酸盐离子与一种聚丙烯酰胺聚合物及乙醇酸的组合是一种优选的干燥分析单元，所述聚丙烯酰胺聚合物的分子量约在 20000 与 250000 道尔顿之间，该分析单元对高至 300mg/dL 的蛋白质浓度能进行较为灵敏的测量，重复精度也非常好。最优选的干燥单元含有涂在试剂/缓冲层中的聚 A（平均分子量在 100000 与 150000 道尔顿之间）作为聚合物赋形剂，还含有预涂层的乙醇酸。

聚丙烯酰胺的作用在于校正指示剂染料邻苯二酚紫/钼酸盐离子与不同蛋白质之间的反应性。在干燥单元中使用优选的聚合物可显著减少相等浓度而不同类型的蛋白质检测中反射强度信号的差异。使用邻苯二酚紫与钼酸盐时聚合物的作用在使用其他类型的指示剂染料与金属离子时也观察到了。由本发明可以制备用于浓度约为 5 至 300mg/dL 的尿中总蛋白定量分析的干燥单元。该干燥单元对不同蛋白质的灵敏度几乎是相等的，使所得结果准确，适用于其预期

用途,而且好于在先技术基于溶液及干燥单元的化验方法。通过在应用了邻苯二酚-钼酸盐化学的干燥单元中加入乙醇酸,已经克服了由尿样中广泛存在不同浓度的碳酸氢盐而带来的最主要的干扰。其它羟基羧酸、例如上述,具有相似的作用,无论是将其结合在分析单元中还是加入到样本中。这两项不同的意外发现提供了灵敏耐用的干燥化验单元,尤其适用于液体样本中总蛋白质的定量分析。

给出下列实施例用来说明本发明的范围。因为给出这些实施例的目的仅在于解释说明,其中所体现的本发明不应当限于这些。除非另有说明,全部试剂和设备均从商业来源得到。

10 下列实施例 1-4 描述了含有不同指示剂染料的单元的分析检测灵敏度与重复精度比较试验的结果。

例 1

邻苯二酚紫

将邻苯二酚紫以 0.12g/m^2 涂在试剂层上,试剂层另外含有 12g/m^2 的具有下列组成的丙烯酰胺聚合物(聚(丙烯酰胺-共-N-乙基-2-吡咯烷酮, 50 : 50 重量比))、以下称为聚合物 AVP, 和表面活性剂 Zonyl FSN(0.36g/m^2)与 5.9g/m^2 的琥珀酸 (PH2.5) 作为缓冲剂, 钼酸铵 (0.18g/m^2) 和 0.15g/m^2 的草酸钾。使用一种颗粒扩散层(组成如下所述以及如美国专利 4258001 所述)。在扩散层与试剂层之间是聚(N-乙基-2-吡咯烷酮)亚层。将分析单元边缘切成 1 厘米见方, 装入滑片。使用 Johnson & Johnson 临床诊断分析仪将含有蛋白质的溶液点在滑片单元上, 使滑片恒温, 读取反射强度 Dr。这种评价单元的方法使专业人员能够对多种单元进行试验, 还能很方便地重复测量。其它任何点样、恒温及测量光学信号的方法也适合评价干燥单元。单元结构如下所示:

25 邻苯二酚紫单元

扩散层	共聚(乙基甲基丙烯酸) $30\ \mu\text{m}$ 颗粒
亚层	聚(N-乙基-2-吡咯烷酮) 共聚(丙烯酰胺-共-N-乙基-2-吡咯烷酮) (50 : 50) wt 邻苯二酚紫
30 试剂层	琥珀酸

钼酸铵
草酸钾
Zonyl FSN

载体

5 在 670nm 下测量偏离系数。下表 1 列出使用上述邻苯二酚紫单元所得的结果。含有蛋白质的流体的制备方法是将向已知体积的 0.15M 氯化钠水溶液中加入已知重量的人血清白蛋白，得到具有表 1 所示白蛋白浓度的流体。将含白蛋白流体的等分试样（10 μL）点在单元扩散层上。点样后的单元在 37℃下恒温 5 分钟。然后测量反射强度。所测得的反射强度（<Dr>）是 6 次重复测量
10 （n=6）结果的平均值。%CV 为平均 Dr 的偏移系数：

表 1

HSA（mg/dL）	<Dr>	%CV
10	1.022	4.8
50	1.209	1.0
100	1.370	2.3
150	1.489	1.9
300	1.732	4.7

在 10 至 300mg/dL 白蛋白内测量的反射强度的变化（ΔDr=0.710）说明邻苯二酚紫单元的检测灵敏度是非常好。%CV 相对较小，说明重复精度好。

例 2

15 焦栲酚红

将焦栲酚红以 0.18g/m² 涂在如美国专利 3992158 所述的硫酸钡扩散层上。将表面活性剂 TRITON X-100（0.001g/m²）、酒石酸（6.0g/m²，PH2.5）和草酸 2g/m² 涂在试剂层上，试剂层用丙烯酰胺的均聚物聚 A（平均分子量为 100000 道尔顿）以 10g/m² 涂覆。钼酸铵以 0.9g/m² 涂在硫酸钡扩散层上。在扩
20 散层与试剂层之间涂以聚（N-异丙基丙烯酰胺）的亚层。单元结构如下所示：

焦栲酚单元

扩散层 硫酸钡
 焦栲酚红
 钼酸铵

亚层	聚（ N-异丙基丙烯酰胺）
	聚丙烯酰胺（聚 A ）
试剂层	酒石酸
	草酸
	TRITON X100

酯载体

涂上若干 PH2.5 的缓冲液，不过若是酒石酸，在所化验的蛋白质浓度范围内提供了最大线性响应（在 540nm ）。实验方案与邻苯二酚紫单元所述的相同，只是在 540nm 下测量 Dr 。结果（ n=6 ）见表 2 。

表 2

HSA （ mg/dL ）	<Dr>	%CV
100	0.281	5.0
50	0.327	4.9
150	0.363	7.1
300	0.382	4.4

5 在用焦梣酚红单元化验的白蛋白浓度范围内， Dr 的变化为 0.101 ，因此检测灵敏度小于邻苯二酚紫单元。 %CV 较小，不过还是稍大于用邻苯二酚紫单元所观察到的值。

例 3

10 溴焦梣酚红单元

将溴焦梣酚红以 0.24g/m² 涂在试剂层上，试剂层中含有 12g/m² 的聚丙烯酰胺赋形剂，下文称之为聚合物 AAM ，它是聚（丙烯酰胺-共-N-（ 3-乙酰乙酰氨基丙基）甲基丙烯酰胺）、 95： 5 重量比。表面活性剂 TRITON X-165 （ 0.20g/m² ）、丙二酸（ 8.0g/m²， PH2.5 ）和钼酸铵（ 0.4g/m² ）也涂在 AAM 层上。硫酸钡扩散层涂在聚（ N-异丙基丙烯酰胺）亚层上。含有硫酸钡扩散层的单元结构如下所示。

溴焦梣酚红单元

扩散层	硫酸钡
亚层	聚（ N-异丙基丙烯酰胺）

试剂层

聚（丙烯酸胺-共-N（3-乙酰乙酰氨基丙基）甲基丙
烯酰胺）95：5wt
溴焦梣酚红
丙二酸
钼酸铵
草酸钾
双乙烯基磺酰甲基醚（BVSME）

酯基

溴焦梣酚单元的评价方法如上所述，与含有邻苯二酚、焦梣酚红指示剂染料
的单元相同。溴焦梣酚单元的评价数据（n=6）见表3。

表 3

HSA（mg/dL）	<Dr>	%CV
10	1.482	86.1
50	1.487	20.6
100	1.547	11.3
300	1.660	2.6

白蛋白浓度范围内 Dr 的变化为 0.178，因此说明检测灵敏度小于邻苯二
5 酚紫单元。%CV 较大，说明明显没有重复精度。

例 4
梣因

将梣因以 0.12g/m²涂在硫酸钡扩散层上。表面活性剂 TRITON X-165
（0.2g/m²）、丙二酸（8.0g/m²，PH2.5）和草酸（2.5g/m²）涂在 10.0g/m²
10 的共聚物中形成缓冲层，共聚物在下文称作聚合物 AVP，分子组成为聚（丙
烯酰胺-共-N-乙烯基-2-吡咯烷酮）（50：50）wt。除了染料以外，钼酸铵
（0.90g/m²）和表面活性剂 TRITON X-100（1g/m²）涂在硫酸钡扩散层中。
单元结构如下所示。

梣因单元

扩散层

硫酸钡
梣因
钼酸铵

	TRITON X-100
亚层	聚（ N-异丙基丙烯酰胺） 聚（丙烯酰胺-共-N-乙烯基-2-吡咯烷酮）（ 50 : 50 ） wt
缓冲层	丙二酸 TRITON X-165 草酸
酯载体	

按如上所述其它单元的方法评价桔因单元（ n=6 ），在 550nm 下测量 Dr 。
结果见表 4：

表 4

HSA （ mg/dL ）	<Dr>	%CV
10	0.541	85.7
50	0.569	20.3
100	0.565	93.1
300	0.580	19.5

白蛋白浓度范围内 Dr 的变化为 0.039 ， 与邻苯二酚紫单元相比，检测灵
5 敏度显著降低。 %CV 相当大，说明明显没有重复精度。

例 5

本例试验了使用含有优选染料邻苯二酚紫和钼酸铵的干燥分析单元时不
同的试剂层聚合物赋形剂检测不同蛋白质类型的效果。本试验中所比较的聚合
物是聚 A （质均分子量约为 120000 道尔顿）、聚（丙烯酰胺-共-N-乙烯基-2-
10 吡咯烷酮）（ 50/50 重量比）（聚合物 AVP ）和分子组成为聚（丙烯酰胺-共-
丙烯酸）（ 90/10 重量比）的聚合物，以下称之为聚合物 PAA 。全部扩散层均
为如上述美国专利 3992156 所述的硫酸钡。聚合物涂成相等的干燥涂层
（ 12g/m² ）。向已知体积的含 0.15M 氯化钠的水溶液中加入已知重量的供研
究的纯净人蛋白质，包括 IgG 、视黄醇结合蛋白和 R 轻链，制得含蛋白质的溶
15 液。如上所述，将单元制成滑片。使用含纯净人白蛋白溶液进行化验校正（以
下称之为校正液）。每种含 100mg/dL 供试蛋白质的溶液的 10 μ L 等分试样分
别在单独的干燥分析（滑片）单元上点样。滑片在 37 ℃下恒温 5 分钟后，在

670 纳米下测量反射强度。由所测得的反射强度和用上述校正液的化验校正值计算样本中总蛋白浓度。结果见表 5。

表 5
聚合物类型对蛋白质反应性的作用

聚合物	白蛋白	K 轻链	λ 轻链	IgG	视黄醇结合蛋白	α-1-微球旦白
	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
AVP	100	33	33	64	62	44
聚 A	100	44	52	73	73	66
PAA	100	N.D.**	34	59	N.D.	N.D.

5 ** 未作试验

表 5 中的数据表明，聚合物影响了邻苯二酚及钼酸盐与蛋白质之间的相互作用。尤其是聚 A 能减少不同蛋白质类型之间所观察到的 Dr 值的差异，因此对所要评价的蛋白质浓度要参照用含有人白蛋白的校正液的校正进行检测。这使蛋白质浓度评价接近于预期的 100mg/dL，以校正液中蛋白质的加入量计。

10 显然，聚 A 提供了最佳试验效果，也就是测量信号相对于供试蛋白质类型的依赖程度最小。

例 6

本例评价了乙醇酸对碳酸氢盐干扰的作用。乙醇酸预先涂在试剂层中，试剂层也含有 12g/m² 的聚 A。乙醇酸在试剂层中的涂层浓度如表 6 所示。向汇集起来的人尿样本中加入碳酸氢钠得到最终碳酸氢盐浓度为 100mM 或 200mM（两种情况下最终汇集尿样的 PH=8.5）。PH 不是调至最终的观测值，而是加入碳酸氢盐后所得。未处理过的对照尿样中总蛋白浓度为 18mg/dL（使用用于总蛋白测量的 BIOTROL™ 试剂盒检测，这是一种结合了焦樟酚红/钼酸铵染料的基于溶液的化验方法，该试剂盒购自 Merck Biofrol Diagnosfics, Exfon, PA 19341;目录第 A01217U）。如上例 5 测量反射强度，如例 5 用含有人白蛋白的校正液对化验单元校正之后测量 Dr，用 Dr 评价总蛋白浓度。从来自碳酸氢盐处理过的尿样的蛋白质评价值中减去来自对照尿样的蛋白质评价值。数据如表 6 所示。

表 6

乙醇酸对碳酸氢盐干扰的作用

碳酸氢盐处理过的样本与不含碳酸氢盐的对照样本之间的蛋白质浓度差异

乙醇酸	碳酸氢盐	
g/m ²	100mM	200mM
0	35	110
0.125	22	77
0.25	13	54
0.375	8	30
0.5	4	20
0.75	N.D.	13
1.0	N.D.	-2

(N.D.=未作检测)

5 碳酸氢盐能产生模拟蛋白质的光学信号。例如，在没有乙醇酸存在的条件下，含有 200mM 碳酸氢盐的尿样的测量蛋白质浓度要比实际水平高约 110mg/dL 。如表 6 所示，乙醇酸戏剧性地降低了碳酸氢盐的干扰作用。乙醇酸（或其它适宜的羟基羧酸，如前文所述）可以有如例 6 直接加入到干燥分析单元中，或者还可以在干燥分析单元与样本接触之前加入到样本中。涂在单元

10 中的乙醇酸的适用浓度范围约为 0.125 至 2.0g/m²。优选的范围为 0.125 至 1.5g/m²，更优选的范围为 0.25 至 1.25g/m²。优选的干燥分析单元结构如下所示:

扩散层	硫酸钡
亚层	聚（ N-异丙基丙烯酰胺）
	聚丙烯酰胺（聚 A ）
	乙醇酸
	邻苯二酚紫染料
试剂/缓冲层	钼酸铵
	草酸钾
	Zonyl-FSN 表面活性剂
	丙二酸缓冲液， PH2.5
	载体

给出上述试验和实施例的目的在于说明本发明的范围和精神。通过对这些实施方式和实施例的说明，本领域的技术人员也很容易获知其它实施方式和实施例。其它实施方式和实施例也在本发明预期的范围内；因此本发明不应仅限于权利要求书。