



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106442961 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201610575436.2

(22)申请日 2008.07.24

(30)优先权数据

60/952099 2007.07.26 US

(62)分案原申请数据

200880108191.6 2008.07.24

(71)申请人 埃葛梅崔克斯股份有限公司

地址 美国新罕布什尔州

(72)发明人 I.哈丁 S.尹加 R.威廉斯

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 权陆军 林森

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

C12Q 1/04(2006.01)

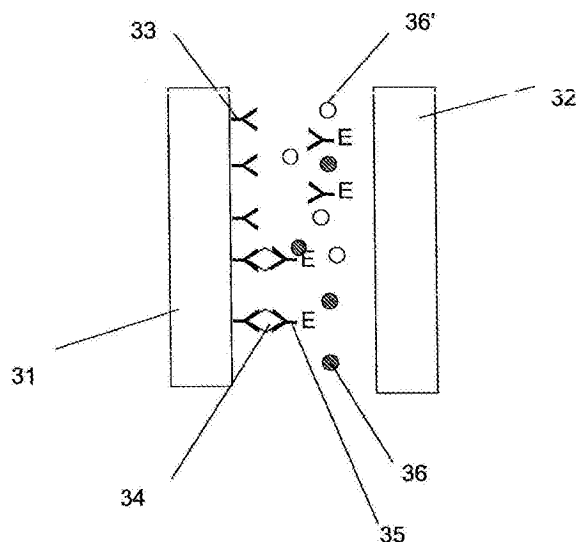
权利要求书2页 说明书9页 附图13页

(54)发明名称

电化学分析物检测装置和方法

(57)摘要

本发明涉及电化学分析物检测装置和方法。一种用于样品中分析物的电化学检测的方法和装置利用了结合相互作用并依靠这种发现,当含有氧化还原酶的试剂被固定在一个电极的表面时发生的、在两个电极之间的氧化还原酶的不对称分布可以作为来自氧化的或还原的氧化还原底物的分布的不对称性的化学势梯度来检测。这种化学势梯度可以通过观察开路中电极之间的电势差来电势测定地检测,或通过观察当电路闭合时电极之间的电流来电流测定地检测。在两种情况下,不对称性的观察可以在不对电极施加外部电势或电流的情况下进行。



1. 一种独立于第二电极上存在的酶的数量测定一个电极上存在的酶的数量方法,包括步骤:

(a) 向测试槽中导入样品,所述测试槽包含第一和第二电极、包含氧化还原酶部分的移动的测试试剂、和与所述移动的测试试剂和/或所述分析物相互作用的试剂,从而所述移动的测试试剂在分析物存在于样品中时具有相对于所述电极的第一分布、在分析物不存在于样品中时具有相对于所述电极的第二分布,所述第一和第二分布之一对于所述电极之间的线是不对称的,所述第一和第二分布的另一个对于所述电极之间的线是对称的或较低不对称的,

(b) 在所述测试槽中提供所述氧化还原酶的氧化还原底物,所述氧化还原底物被所述氧化还原酶作用来产生第一和第二电极之间的化学势梯度,其中所述化学势梯度的量值被所述移动的测试试剂的分布和因而分析物的存在决定,

(c) 检测所述第一和第二电极之间的化学势梯度 I_0 来测定在两个电极上存在的酶活性比例,其中所述化学势梯度的形成和检测在不应用外部电势或电流的情况下进行,

(d) 在所述第一和第二电极之间施加电势并测量所得电流 I_{300} ,和

(e) 计算在一个电极上存在的酶的数量 E_1 。

2. 权利要求1的方法,其中

所述测试槽包含在所述第一电极的表面上设置的固定的测试试剂作为与所述分析物相互作用的试剂之一,所述固定的测试试剂包含分析物结合部分,并且

所述移动的测试试剂包含分析物结合部分和所述氧化还原酶部分,

由此如果分析物存在于测试槽中的样品中,至少部分所述移动的测试试剂变为固定在所述第一电极上,从而当分析物存在时在所述第一和第二电极之间产生氧化还原酶浓度的不对称分布。

3. 权利要求2的方法,其中所述固定的测试试剂的分析物结合部分和所述分析物是抗体-抗原对或抗体/半抗原对。

4. 权利要求3的方法,其中所述氧化还原酶和所述氧化还原底物包含葡萄糖和介质化合物。

5. 权利要求2的方法,其中所述固定的测试试剂的分析物结合部分是药物受体。

6. 权利要求5的方法,其中所述氧化还原酶和所述氧化还原底物包含葡萄糖和介质化合物。

7. 权利要求2的方法,其中所述固定的测试试剂的分析物结合部分是激素受体。

8. 权利要求7的方法,其中所述氧化还原酶和所述氧化还原底物包含葡萄糖和介质化合物。

9. 权利要求1的方法,其中所述固定的测试试剂的分析物结合部分和所述分析物是抗体-抗原对或抗体/半抗原对。

10. 权利要求9的方法,其中所述氧化还原酶和所述氧化还原底物包含葡萄糖和介质化合物。

11. 权利要求1的方法,其中所述固定的测试试剂的分析物结合部分是药物受体。

12. 权利要求11的方法,其中所述氧化还原酶和所述氧化还原底物包含葡萄糖和介质化合物。

13. 权利要求1的方法,其中所述固定的测试试剂的分析物结合部分是激素受体。

14. 权利要求13的方法,其中所述氧化还原酶和所述氧化还原底物包含葡萄糖和介质化合物。

15. 权利要求1的方法,其中 $E_1 = (R \times E_t) / (1+R)$,其中R是在两个电极上存在的酶活性比例, E_t 是总酶活性。

电化学分析物检测装置和方法

[0001] 本申请是国际申请日为2008年7月24日的国际申请PCT/US2008/071073进入中国、申请号为200880108191.6的题为“电化学分析物检测装置和方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2007年7月26日提交的美国临时申请NO.60/952,099的权益,为了所有的目的将该申请通过引用合并在此。

[0003] 技术领域和背景技术

[0004] 本申请涉及用于样品中分析物的电化学检测的装置和方法。本发明利用了分析物和装置中所提供的至少一种试剂之间的特异性结合关系作为检测所述分析物的手段。

[0005] 分析物与试剂之间的特异性结合构成分析基础的分析方法是已知的。例如,在酶联免疫分析(EIA或ELISA)操作中,当分析物存在时,通过分析物与抗体成分的相互作用,在固定的抗体和移动的酶-抗体试剂之间形成夹心物。这引起了酶的固定化。因而固定化酶的随后的检出是测试溶液中存在分析物的指示。(参见美国专利No.3,654,090,4,169,012和4,642,285)。类似的夹心分析在层析免疫分析中使用,其中移动试剂上的有色的标签(例如,有色的乳胶珠子)被诱捕到规定位置处的底物上,来产生指示样品中分析物的存在的图案。(参见美国专利NO.4,943,522、5,656,503、5,712,172和5,766,961)。取决于分析物和试剂之间的特异性结合的分析方法也可以采用竞争性分析的形式,其中包含标记的试剂的复合物的形成在存在分析物时以分析物浓度依赖性的方式被抑制(参见,美国专利NO.4,868,131、5,981,298和5,989,921),或采用置换分析的形式,其中包含标记的试剂的预先存在的复合物在存在分析物时以分析物浓度依赖性的方式被破坏。(参见美国专利NO.4,746,631和6,020,209)。

[0006] 分析物的检测取决于电化学测量的免疫分析也是已知的。美国专利No.5,149,630公开了一种分析,其中与底物反应相关的、酶底物和电极之间电子转移的程度被复合物的形成、或被任何配体复合物相对于未结合的酶标记的成分的置换所扰乱。这种测定在存在施加的电势的情况下进行。在美国专利NO.5,198,367、5,427,912中公开的分析设备中,施加的电势还用于测量电流,美国专利No.5,494,831公开了电流的应用和测量产生结合的阻抗改变。

发明内容

[0007] 本发明提供了利用结合相互作用用于样品中分析物的电化学检测的新的方法和装置。本发明依靠这样的发现,当含有氧化还原酶的试剂被固定在一个电极的表面时所发生的、在两个电极之间氧化还原酶的不对称分布可以作为化学势梯度来检测,所述化学势梯度来自被氧化或还原的氧化还原底物的分布方面的不对称性。这种化学势梯度可以通过观察开路中电极之间的电势差来电势测定地检测,或通过观察当电路闭合时电极之间的电流来电流测定地检测。在两种情况下,不对称性的观察可以在不对电极施加外部电势或电流的情况下进行。

[0008] 在本发明的第一个实施方式中,使用了夹心式分析。在这个实施方式中,要测试分

析物的样品在存在移动的测试试剂的情况下被导入测试槽。测试槽包含第一和第二电极。第一电极在其表面固定了固定的测试试剂。移动的测试试剂包含分析物结合部分和氧化还原酶部分,固定的测试试剂包含分析物结合部分。如果分析物存在于测试槽中的样品中,至少部分所述移动的测试试剂变为固定在所述第一电极上,从而当分析物存在时在所述第一和第二电极之间产生氧化还原酶浓度方面的不对称性。还提供了测试槽中氧化还原酶的氧化还原底物。氧化还原底物被所述氧化还原酶作用(氧化或还原)。如果在所述第一和第二电极之间的氧化还原酶浓度方面存在不对称性(即,当分析物存在于样品中时),这导致所述第一和第二电极之间的化学势梯度。检测这种化学势梯度来测定样品中的分析物。在这个实施方式中,不对称性和产生的势梯度越大,样品中分析物的数量越大。

[0009] 在本发明的第二实施方式中,使用了竞争或置换型的分析。在这种分析中,氧化还原酶连接到可以结合共同的固定的测试试剂的分析物或分析物的类似物。任选地,提供已经通过固定的测试试剂结合到电极的氧化还原酶。当添加样品时,所述样品中存在的分析物将与氧化还原酶竞争固定的测试试剂所提供的结合位点,引起不对称性的量的降低,如果所有结合位点被氧化还原酶占据这将发生。

附图说明

[0010] 附图1A和B显示了当氧化还原酶分布不对称(附图1A)或对称(附图1B)时,在两个电极之间还原的介质分布的示意图。附图2A和B说明了利用电流计测定两个电极处不对称的酶分布。

[0011] 附图3显示了在本发明中有用的的夹心分析形式。

[0012] 附图4和5显示了在本发明中有用的的竞争/置换分析形式。

[0013] 附图6A-C显示了具有相面对的电极的测试槽的构建。

[0014] 附图7A-C显示了并排电极结构的实例。

[0015] 附图8显示了根据本发明的计量器的外视图。

[0016] 附图9显示了在本发明的计量器中可用的电路。

[0017] 附图10:在两个电极处酶活性比例对电势测定信号的影响,显示了在开路中两个电极之间酶分布不对称性的不同水平下作为时间的函数的电势差。

[0018] 附图11:在两个电极处酶活性比例对电流测定信号的影响,显示了在短路中两个电极之间酶分布不对称性的不同水平下作为时间的函数的电流。

[0019] 附图12:峰电势差与电极酶活性的比例相关,显示了峰电势差与电极酶活性比例的相关性。

[0020] 附图13:峰电流与电极酶活性的比例相关,显示了峰电流与电极酶活性比例的相关性。

[0021] 附图14显示了x轴上已知的总酶 E_t 和y轴上测量的 I_{300} 的示意性的标绘图。

[0022] 附图15显示了x轴上已知的 E_t 和y轴上测量的 I_0 的示意性的标绘图。

[0023] 附图16显示了 $\log(R)$ 如何影响 I_0 对比 E_t 的斜率的标绘图,其用于得出参数a和b。

[0024] 附图17显示了 $\log(R)$ 影响 I_0 对比 E_t 的截距的标绘图,其用于得出参数参数c和d。

[0025] 附图18显示了如根据本发明测定的,酶的实际数量与酶的估计数量之间的相关性。

具体实施方式

[0026] I. 定义

[0027] 如在本申请的说明书和权利要求中使用的,应当采用以下定义:

[0028] (a) “分析物”是指可能在样品中存在的感兴趣的材料。在本发明中可检测的分析物是可在特异性结合相互作用中与至少一种其他试剂缔合的那些,它们可以参与此处描述的夹心、竞争或置换分析结构。分析物的实例包括抗原或半抗原,例如肽(例如激素)、蛋白质(例如酶)、药物、杀虫剂、微生物、抗体和可以与互补序列参与序列特异性杂文反应的核酸。

[0029] (b) “分析物特异性酶成分”或试剂是指包含分析物结合部分和氧化还原酶部分两者的试剂。分析物特异性酶成分被适当地用作移动试剂。

[0030] (c) “分析物的测定”是指用于评估样品的定性的、半定量的和定量的过程。在定性评估中,结果表明分析物是否在样品中检出。在半定量的评估中,结果表明是否存在超过某一预定阈值的分析物。在定量评估中结果是存在的分析物的数量的数字性指示。

[0031] (d) 术语“氧化还原酶”是指氧化或还原底物的酶。这样的酶一般可以称为氧化酶、过氧化物酶、还原酶或脱氢酶。例如葡萄糖氧化酶和各种过氧化物酶的酶通常在分析设备中使用,因而稳定形式的这些酶的制备是公知的。

[0032] (e) 术语“氧化还原底物”是指与氧化还原酶相互作用来生产化学势梯度的化合物或化合物的组合。在某些情况下,酶底物可以直接产生足够创造化学势梯度的氧化还原活性物种。在其它情况中,二级化合物可能是需要的。例如,对葡萄糖氧化酶来说,与葡萄糖的相互作用产生葡糖酸内酯和还原的酶,当还原的酶被介质化合物氧化时产生化学势梯度,所述介质化合物是化学势梯度中实际的氧化还原活性物种。因而,在这种情况下,“氧化还原底物”是底物化合物葡萄糖和介质化合物的组合。

[0033] (f) 术语“化学势梯度”是指氧化还原活性物种的浓度梯度。将理解的是,更为严格地,势梯度来自电极之间还原的物种与氧化的物种的比例方面的梯度,然而,一种物种的浓度梯度的思想更容易被体现,因而在此处使用。当在两个电极之间存在这样的梯度时,如果电路是开放的,可以检测电势差,当电路闭合时,电流将流动直到梯度消失。将理解的是,在本发明的设备中化学势梯度是短暂的,当停止产生新的氧化还原活性物种时,氧化还原活性物种的分布将随着时间的过去而平均。在此使用的术语“化学势梯度”仅仅指来自氧化还原酶分布的不对称性的这种短暂的梯度,而不是指来自电极之间电势差或电流的施加的任何电势梯度。

[0034] (g) 用语“检测第一和第二电极之间的化学势梯度”是指使用电势或电流的测量手段检测开路或闭路中的化学势梯度。

[0035] (h) 术语“酶活性”和“酶浓度”在此作为等价的术语使用,尽管将理解的是在正常使用中它们具有不同的含义。酶的活性提供了酶的催化能力的定量度量。这不仅取决于容积中存在的酶的物理数量(即,浓度),还取决于影响酶的催化效率的条件。本发明实际上测量酶活性的不对称性,因为无活性的酶的存在将不会产生氧化还原底物的不对称性。然而,由于期望的是控制酶的质量和条件,这实际上也是酶浓度方面的不对称性的度量。

[0036] (i) 术语“固定在第一电极上”是指直接或间接地固定在电极的表面上,条件是所

固定的材料变为固定在与所述第一电极相关的容积中,并且相比第二电极更接近第一电极。例如,对于电极-抗体-分析物-抗体-酶夹心物的形成来说,酶被认为“固定”在电极上,虽然在夹心物中存在着几个插入的部分。

[0037] (j) 术语“固定的测试试剂”是指当进行本发明的分析时、与电极缔合的夹心物或竞争/置换反应的成分。固定可以通过固定的测试试剂和电极的表面之间化学键(共价的或非共价的)的形成,或可以是物理的缔合,如通过在在电极的表面上设置的凝胶或膜内固定的测试试剂的放置。固定的测试试剂包含结合部分,当分析物存在于样品中时,其与分析物相互作用来产生氧化还原酶分布方面的改变(作为分析物结合酶成分的部分)。在某些实施方式中,固定的试剂将在试验装置的开始制造期间被固定。在其他实施方式中,固定将在添加样品之后原位发生。因而,术语固定的测试试剂是指任何状况,其中获得具有分析物的结合位点的电极-(接头) n -试剂的结构,其中 n 是0或1或更大的整数。后一选择容许产生一组通用的设备,其中连接试剂不是分析物特异性的,添加了结合接头和分析物的试剂用于任何给定的分析物特异性测试。这种另外的试剂可以在制造时添加到测试条上,或在应用于试验设备之前添加到样品中。

[0038] II. 本发明的原理

[0039] 为了方便起见,将在葡萄糖氧化酶作为氧化还原酶、葡萄糖和介质的组合作为氧化还原底物的情境下讨论本发明的理论基础。然而,该讨论中的任何事物不应被当作将本发明限制为使用这些材料的指示。

[0040] 在通常的葡萄糖测量系统中,样品槽中存在的酶将葡萄糖氧化为葡糖酸内酯的酶被还原。氧化的介质(例如铁氰化物)与还原的酶作用来再生酶的氧化形式,并产生还原的介质。这个过程继续,直到葡萄糖或氧化的介质被耗尽。如果酶在样品槽中不对称地分布,则还原的介质的产生也是不对称的,在还原的介质的分布方面产生的不对称性即使在有限的试剂耗尽后也持续一段时间(由扩散参数决定)。

[0041] 当还原的介质存在于两个电极之间的溶液中时,两个电极之间的电势差由能斯特方程(Nemst equation)得出

$$[0042] \quad E = \frac{RT}{F} X \log \left(\frac{[med_{\text{还原}}]_{\text{电极1}}}{[med_{\text{氧化}}]_{\text{电极1}}} X \frac{[med_{\text{氧化}}]_{\text{电极2}}}{[med_{\text{还原}}]_{\text{电极2}}} \right)$$

[0043] 其中 E 是电极1和2之间的电势差, R 是气体常数, T 是绝对温度, F 是法拉第常数。当由于没有不对称性,两个电极处还原的介质的浓度方面没有差异时(即,没有化学势梯度),介质项减为1, $\log 1 = 0$,因而电势差是0。随着不对称性提高,电势差提高。此外,如果系统被设计为在测量时氧化的介质浓度比还原的介质的数量大(由于开始氧化的介质的数量过量或测量的快速进行,或两者),则两个电极处氧化的介质的浓度是基本上相等的,方程式可以简化为:

$$[0044] \quad E = \frac{RT}{F} X \log \left(\frac{[med_{\text{还原}}]_{\text{电极1}}}{[med_{\text{还原}}]_{\text{电极2}}} \right)$$

[0045] 附图1A和B显示了当氧化还原酶分布不对称(附图1A)或对称(附图1B)时,在两个电极(1,2)之间还原的介质分布的示意图。上述方程式可以用于利用电势测定法测定两个电极1和2处酶的浓度比例。两个电极在开放电路中连接,测量它们之间的电势差。如果酶3

在一个电极比另一个电极处是更为有活性或浓缩的(即,它具有如附图1A所示的不对称分布),还原的介质的浓度将在该电极处比另一个高,产生电极之间的电势差。如果在两个电极处存在着酶的相等的活性或浓度(即,它具有如附图1B所示的对称分布),在每个电极处还原的介质的浓度将是相等的,电极将是等电势的,测量的电势差将是0。

[0046] 如果,不使用电势测定法,电极在短路中连接,酶活性的不对称分布将产生还原的介质的不对称分布,其可以在通过闭合电极之间的电路使电极之间的电势差趋向零时通过跟踪(follow)电流来观察到。如果还原的介质通过酶活性产生并且扩散到电极,电流将流动,足够的介质将被再氧化,从而还原的介质浓度在两个电极处相等。电流将与还原的介质向两个电极的流动的差异成比例。

[0047] 附图2A和B说明了这些原则用来利用电流测定法定量两个电极处的酶的浓度比的用途。两个电极在短路中连接,测量它们之间的电流。随着电极之间的电势差被限制为零,当必需在每个电极处维持等量的化学势时,介质将在电极处被还原或氧化。当还原的介质在一个电极被氧化时,电流将流动,等量的氧化的介质将在另一个电极处被还原。如果在每个电极处的酶活性是相等的,将不必需要电子传递来保持化学势平衡,从而将没有电流流动。如果在一个电极处存在比另一个电极处更高的酶活性,还原的介质在该电极处将被消耗,在另一个电极处产生以维持平衡的化学势,电流将流动。

[0048] III. 实际应用

[0049] 本发明的原理适合于测定样品中的分析物的实际应用。这可以在各种结合形式下进行。一般地,使用两个分析物特异性的化学成分,选择它们以相应于要测定的分析物。一般地,希望的是有至少一个成分(一般是分析物-受体)高度特异于该分析物,而另一个成分在它的结合方面可以是较低特异性的。各种非限制性的组合在表1中阐述。

[0050]

分析物	分析物受体	分析物特异性酶的结合成分
疾病特异性抗体, 例如, 针对引起流感疾病的生物体的抗体	疾病相关的抗原, 例如在感兴趣的流感上发现的肽表位, 适体	识别人类抗体的抗体, 适体
扩增的核酸序列, 包括怀疑的目标和已知的引物	与怀疑的目标互补的核酸	与已知的引物互补的核酸序列
激素	激素受体、适体或抗体	激素受体、适体或抗体
药物	药物受体、适体或抗体	激素受体、适体或抗体
杀虫剂	杀虫剂结合蛋白、适体、针对杀虫剂的抗体	杀虫剂结合蛋白、适体、识别针对杀虫剂的抗体的抗体。

[0051] 要理解的是,在本领域中,设备中包含的“抗体”可以是完整抗体,例如免疫球蛋白

白,或它可以是抗体的工程化的结合部分,例如单链抗体(scFv)或结构域抗体(dAb),如在www.domantis.com中描述的。药物的免疫分析在美国专利NO.7,220,842、5,677,132和5,618,926中描述了。杀虫剂和杀虫剂降解产物的免疫分析在美国专利NO.6,635,434中描述了。药物和激素受体可以是天然的激素受体,或者它们可以是本领域已知的具有类似结合性质的工程化的物种。(参见美国专利Nos.7,214,511和6,806,359,Rasmussen et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 7, 4717-4723, February 16, 2001)。美国专利公开20050130203公开了可卡因特异性适体,其可以用作分析物特异性酶成分的结合部分,或用作固定的测试试剂。其他适体在Ellington研究小组在<http://aptamer.icmb.utexas.edu/>的数据库上列出。Mir et al. "Different Strategies To Develop an Electrochemical Thrombin Aptasensor." *Electrochemical Communication* 8 (2006): 505-511已经描述了酶-适体偶联。

[0052] 反应的成分按照这样的方式组合,从而它们取决于样品中分析物的存在或不存在。在氧化还原酶的分布对称性方面引起差异。多种设备形式可以实现这种结果。

[0053] A. 夹心形式

[0054] 附图3显示了两个电极31和32。电极31具有固定在其内表面上的分析物特异性受体33。分析物34与分析物特异性受体33缔合。还存在的是分析物特异性酶试剂35以及氧化还原底物36、36',所述分析物特异性酶试剂35与分析物以这样的方式缔合,从而在结合和未结合状态下酶的活性被维持。当存在分析物34时,由于受体33-分析物34-分析物特异性酶物种35夹心物的形成,分析物特异性酶试剂35的捕获在电极31的表面发生。酶的活性引起接近电极31处一种形式的氧化还原底物(对于附图3来说,36的形式)的浓度提高,由此其量值与分析物的数量相关的、可检测的化学势梯度产生。当不存在分析物时,夹心物不形成,因而不产生可检测的化学势梯度。

[0055] B. 竞争/置换形式

[0056] 附图4和5显示了根据本发明的分析设备的竞争形式。样品槽被两个电极41、42限制。电极41具有配置在上面的分析物受体43。氧化还原酶45包含与分析物或分析物模拟物连接的酶。在不存在分析物时,如附图4中所示,氧化还原酶45连接到分析物受体43,引起氧化还原酶的分布方面的不对称性。取决于氧化还原酶、分析物受体的数量以及分析物受体与氧化还原酶的亲和力,另外的氧化还原酶45'可以存在于批量的样品中。如附图5中所示,当存在分析物44时,它与氧化还原酶45竞争分析物受体43,引起至少某些氧化还原酶45从分析物受体43上的置换,产生氧化还原酶的较低不对称的分布,因而能够测定样品中的分析物。

[0057] C. 设备构建-具查相面对的电极的样品槽

[0058] 附图6A-C显示了使用相面对的电极构建的、根据本发明的设备的样品槽。该设备由各自具有面向设备内部的导电表面(61', 62')的顶层61和底层62和绝缘分隔层63组成。接点64和65从顶层61和底层62伸出,以容许接触导电表面用于电势或电流测量。如在附图6B中所示,导电层63在其中具有开口,其与相面对的导电表面61'和62'一起限定了样品槽。这个样品槽是向外部开放的用于导入样品,例如,通过在附图6C中所示的最后的设备上的开口66。例如,用于形成具有多个开口和/或排气孔的这种类型的槽的各种结构是本领域已知的,因为槽的特定设计对于本发明的实践不是关键的。类似地,连接器的其他设计是已

知的,这对于本发明的实践也不是关键的。

[0059] 在本发明的设备的一个实施方式中,导电表面(61'或62')之一具有放置在上面的分析物受体(固定的测试试剂)。用于分析物测定的试剂的其余部分可以作为干燥的试剂层67配置在样品槽内,或可以在导入样品槽之前添加到样品中。

[0060] 附图6A-C所示的样品槽部分一般作为单一用途的、一次性的部件来构建。

[0061] D. 设备构建-并排的电极

[0062] 除了上文讨论的相面对的电极之外,第一和电极可以放置在样品槽内的同一表面上。这种结构在此称为并排的电极。附图7A-C显示了可以用于并排结构的结构的非限制性实例,包括平行的条(附图7A)、交错的条(7B)和同心环(附图7C)。在每种情况下,在电极71和另一个电极72之间的氧化还原酶分布的不对称性引起两个电极之间可测量的化学势梯度。

[0063] 附图7A-C所示的样品槽部分一般作为单一用途的、一次性的部件来构建。

[0064] E. 设备构建-结果的传达

[0065] 除了样品槽之外,本发明的设备具有以指示分析物的测定的有意义的方式向用户传达观察到的电势或电流的工具。这可以从简单的定性结果(分析物存在或不存在)到分析物数量的具体数值。传达方式的技巧相应地变化。

[0066] 在本发明的一个实施方式中,为了提供定性的结果,设备可以在可见的位置具有材料的斑点,其响应于超过阈值水平的不对称性所产生的电流通过或电势差的施加而改变颜色。在这种情况下,设备不需要独立的计量器部分,可以仅仅是具有外侧的指示物斑点的一次性的测试条。

[0067] 更通常地,样品槽将被包含在一次性的测试条内,所述测试条被插入可再次使用的的计量器中。所述计量器含有在样品或测试条导入之后规定的时间测量电势差或电流的电子元件,以及用于将测量的值转变成显示的值的电子元件。这种转变可以利用查询表(look-up table),所述查询表根据特定的设备几何结构和分析物的校准值将电流或电势的特定值转变成分析物的值。

[0068] 附图8显示了根据本发明的计量器的外视图。如所示,计量器具有带有显示器82的外壳81,和一个或多个控制接口83(例如,开关按钮或滚轮等等)。外壳具有狭槽84用于接受测试设备。在外壳81的内部是电路,用于当施加样品时向测试设备的电极施加电势或电流。这可以在来自用户的启动信号之后、或在测试设备插入和样品施加的自动检测之后进行。

[0069] 在本发明的计量器中可用的适合的电路是本领域已知的,例如,来自美国专利公布NO. US 2005-0265094 A1,通过引用将其合并在此。在附图9中显示了一个这样的电路。在附图9中,提供了理想的电压计942,其可以测量跨越电极941、938的电势。提供了开关944,当要测量电势时它是开放的,测量电流时是闭合的。当开放时,槽939对于它的电极的至少一个是“漂浮的”,允许不受放大器935处的信号影响的电压测量。开关944可以是机械开关(例如,继电器)或FET(场效应晶体管)开关或固态开关。在简单的实例中,所述开关对开路开放;更一般地,它可以对非常高的电阻开放。

[0070] 这个电路可以用于测量电势差或电流差。本领域的技术人员将理解的是,其他电路,包括更简单得多的或更复杂的电路可以用于实现电势差或电流之一或两者的应用。

[0071] 附图9的电路也可以用于向本发明的测试设备施加电势差。虽然,如以上讨论的,电势的这种施加不是进行本发明的测量所必需的,在测量之前施加电势(特别是在相面对的电极结构的测试设备中)可以通过利用本质上为电泳的手段有效地驱动分析物和/或分析物结合酶成分接近具有固定试剂的电极来产生更为快速的测量,只要所述分析物或分析物结合酶成分在测试设备内的条件下(特别是pH值)是带电的。从负到正的电势差的阶梯函数或正弦波也可以起到某种类似于试验设备内的原位洗涤的作用。

[0072] VI. 本发明的优点

[0073] 本发明提供了进行结合分析、用于使用电化学的检测来检测分析物的能力,而不需要施加外部的电势或电流,不需要通常在夹心免疫分析操作中采用的洗涤步骤。因此,用于进行该分析的装置可以更为简单、易于使用和更便宜。此外,电化学分析中的设备部件与例如在光学测量中使用的那些相比是更为有效的,便于供一次性测试设备使用的低成本可再次使用的计量器的制造。

[0074] 本发明可以使用小样本的血液、泪液、唾液或汗液,具有对受试者的最小的侵入性(样品少于10 μ l,优选的少于1 μ l是血液测试特别希望的)。进一步的,本发明可以提供非常快速的测试时间。通常的免疫分析操作花费一小时或更久。本发明的测试设备的小体积以及测试对酶的分布方面小的差异的敏感性意味着,取决于要测量的分析物的浓度以及所述分析物与移动和固定试剂的结合成分的结合动力学,更短的时间是可能的(例如,低于30分钟,更优选的低于10分钟,最优选的低于1分钟)。

[0075] 取决于样品和氧化还原底物的性质,可能的是使用来自样品的材料作为反应系统的部分。例如,当样品是血液样品时,可以使用内源的葡萄糖作为基于葡萄糖氧化酶的系统氧化还原底物的成分。

[0076] 实施例

[0077] 在以下实施例中,使用模型系统展现本发明的实用性和可操作性,其中酶被包被在电极对的两个电极之一的表面上。这种模型不需要酶的捕获,因而对于使用有限量的变量对捕获后的行为建模是有用的,然而它不能提供实际测试系统的结合动力学的完整图形。在其他的酶夹心、竞争和置换分析等等中利用试剂捕获酶是公知的。

[0078] 实施例1

[0079] 使用通过引用合并在此的美国专利公开NO.US-2005-0258035-A1中描述的方法,构建了包含由两侧的粘结层分隔的两个金电极的电化学槽测试条。总数100nL的酶溶液(100mM柠檬酸钠缓冲液pH 4.1中27mg/mL葡萄糖氧化酶)分配到两个电极上并容许干燥。通过将100nL的酶溶液分摊在两个电极之间,用水进行平衡,制备具有不同比例的电极酶活性的测试条。例如,为了制备在电极1上具有75%酶活性、在电极2上具有25%酶活性的条,3份酶溶液与1份水的混合物100nL分配到电极1上,1份酶溶液与3份水的混合物100nL分配到电极2上。100mM β -D-葡萄糖和100mM铁氰化钾的水溶液添加到电化学槽中。记录开路中的电势差(附图10)或短路中的电流(附图11)。注意的是,在不同的不对称性水平下达到信号方面清楚的差异所需的时间是短的(低于15秒),因而使得本发明适合于快速测量。

[0080] 附图12显示了获得的峰电势差与每个电极上分配的酶活性的比例相关。附图13显示了获得的峰电流与每个电极上分配的酶活性的比例相关。

[0081] 实施例2

[0082] 通过将每个电极上分配的酶活性的比例的测定(如实施例1)与总酶活性的测定相组合,一个电极上存在的酶的数量(E1)可以独立于另一个电极上存在的数量(E2)而被测定。

[0083] 不同数量的酶可以分配到如实施例1中描述的夹心结构中充当电极的2个表面上。两个电极上存在的酶活性的比例($R=E1/E2$)通过短路结构中电流的测量来确定。而总酶活性($E_t=E1+E2$)通过使用施加的电势差测量电流来测定。然后根据R和 E_t 的测定的值计算E1和E2。

[0084] 制备含有0.25微克到1微克范围内的葡萄糖氧化酶的测试条,具有在两个电极之间分布的酶从而R在1.5和1.9之间。这些条通过将0.25微克到1微克葡萄糖氧化酶的100nL 100mM柠檬酸钠缓冲液pH4.1溶液分配到电极1上,将0到0.4微克葡萄糖氧化酶的100nL 100mM柠檬酸钠缓冲液pH 4.1溶液分配到电极2上,然后容许分配的溶液干燥来制备。

[0085] 100mM β -D-葡萄糖和100mM铁氰化钾的水溶液添加到电化学槽中,记录短路中的电流5秒。在这之后,施加300mV 10秒。5s前一刻的电流被平均来得到 I_0 ,15秒前一刻的电流被平均来得到 I_{300} (即,在5秒时测量的I是 I_0 ,在15秒时测量的I指定为 I_{300})。

[0086] 对于每个具有改变比例R的 E_t 的提高了的数量所测量的I(I_0 和 I_{300})被记录和标绘。

[0087] 附图14显示了x轴上已知的总酶 E_t 和y轴上测量的 I_{300} 的示意性图。 E_t 和 I_{300} 之间的关系可以从这个曲线来建立,例如数据可以通过以下方程式呈现

$$[0088] \quad I_{300}=m \times E_t+n$$

[0089] 其中m和n是线的斜率和截距。

[0090] 附图15显示了x轴上已知的 E_t 和y轴上测量的 I_0 的示意性的标绘图。如所示,产生了线族,每一条对应每个比例R的值。根据附图15, I_0 电流vs E_t 的线性关系取决于R,即, $I_0=f(E_t, \log R)$ 。

[0091] 为了进一步建立这种函数,我们对附图15中所示的每条线标绘了已知的 $\log(R)$ vs 斜率(附图16)。此外,如附图17中所示,我们标绘了在附图15中每条线的已知的 $\log(R)$ 和截距。

[0092] 因而这个函数f可以进一步定义为关系式

$$[0093] \quad I_0=(a \log R+b) \times E_t+(c \log R+d)$$

[0094] 参数a和b可以根据附图16的曲线计算,参数c和d可以根据附图17计算。一旦已经确定了参数a、b、c、d、m和n,E1可以如下计算

[0095] 1. 从 I_{300} 计算 E_t

$$[0096] \quad E_t=(I_{300}-n) \div m$$

[0097] 2. 从 I_0 和 E_t 计算R

$$[0098] \quad \log R=(I_0-b \times E_t-d) \div (a \times E_t+c)$$

$$[0099] \quad R=10^{\log R}$$

[0100] 3. 从 E_t 和R计算E1

$$[0101] \quad E_1=(R \times E_t) \div (1+R)$$

[0102] 附图18显示了对于在两个电极上具有改变数量的酶的条,E1的计算值对比E1的实际值。附图18表明,我们对在一个电极上分配的酶的估计值与分配的实际数量良好地相关,并且与另一个电极上分配的酶的数量无关。

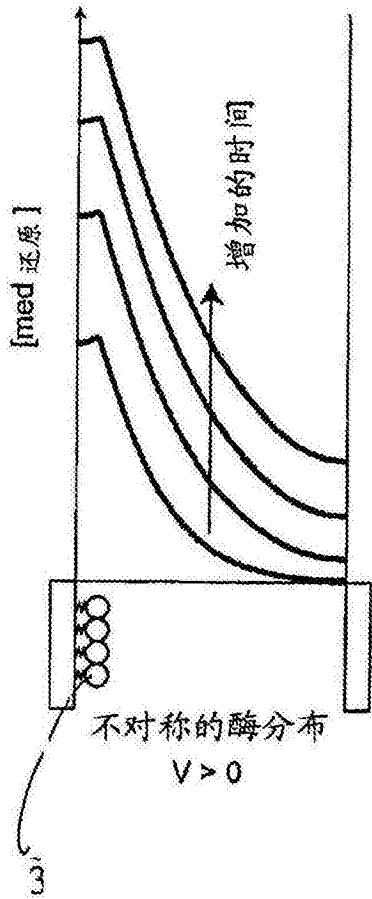


图1A

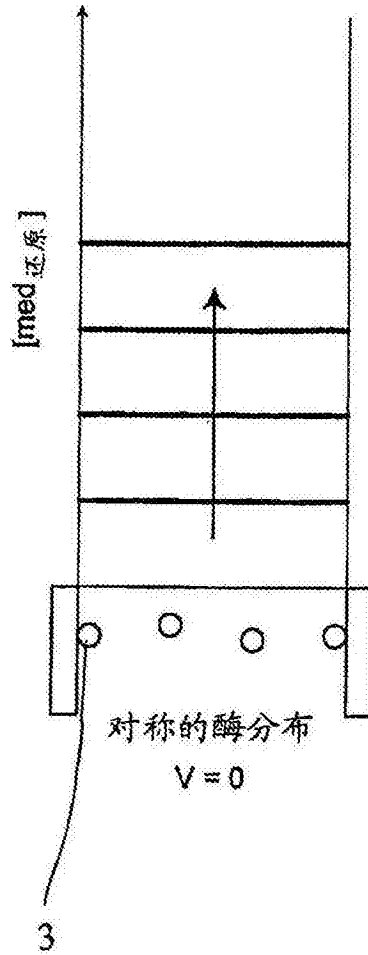


图1B

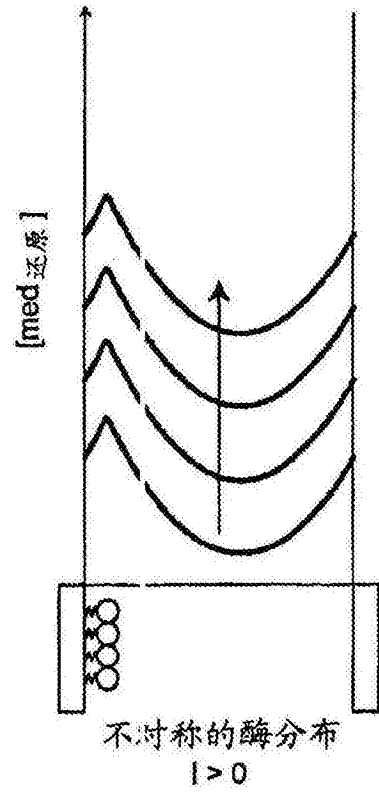


图2A

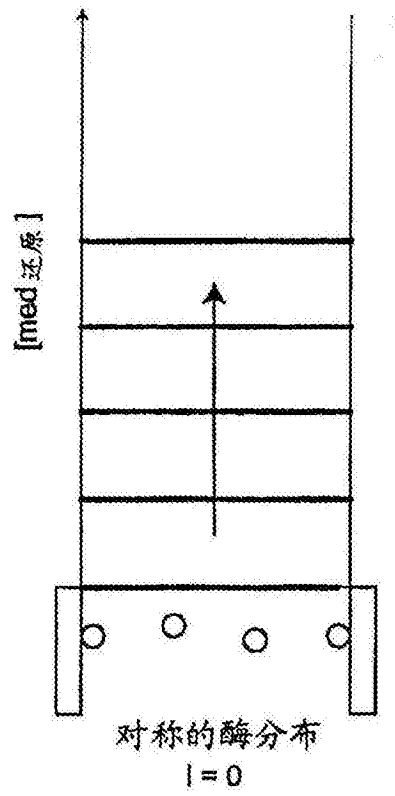


图2B

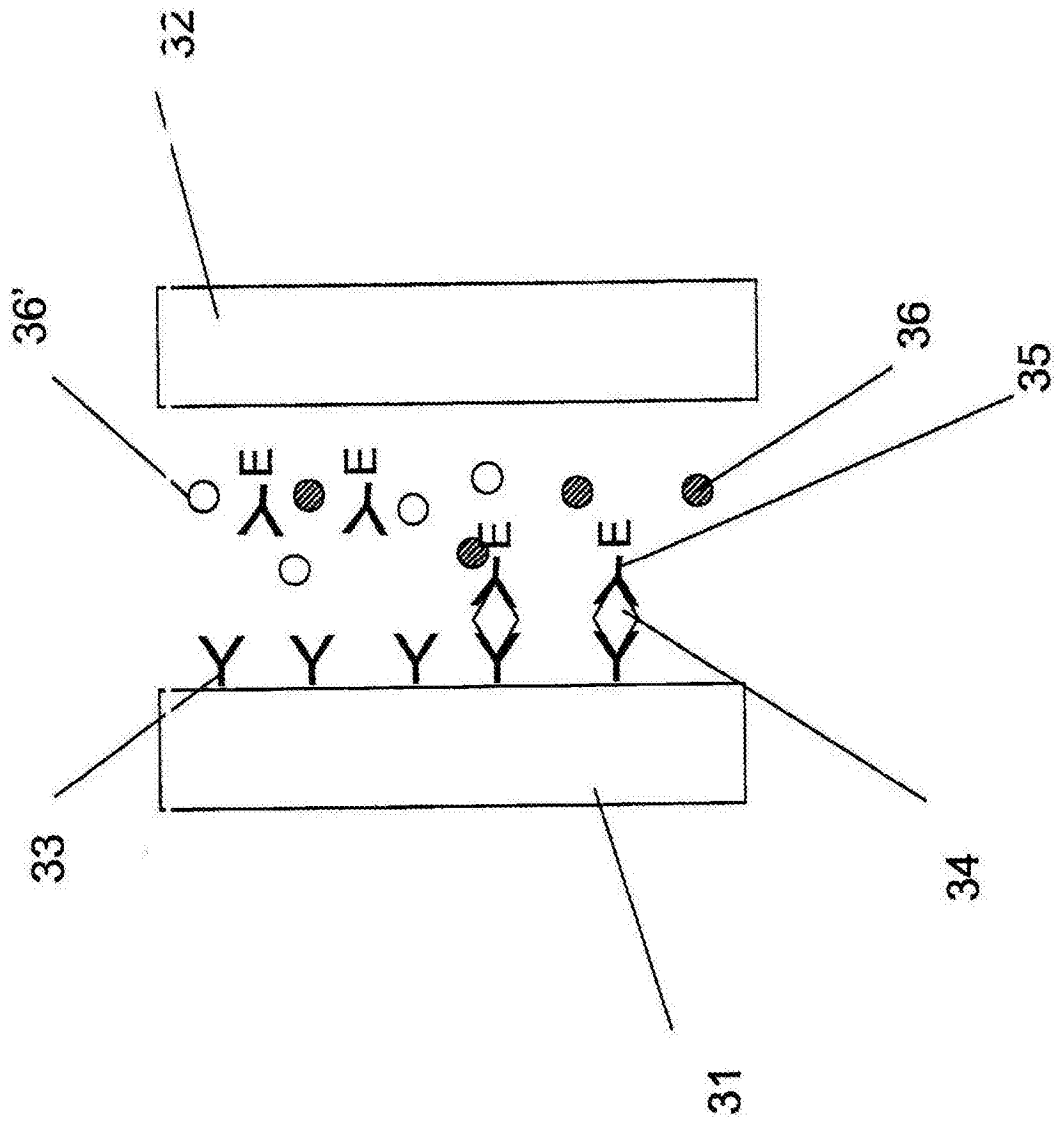


图3

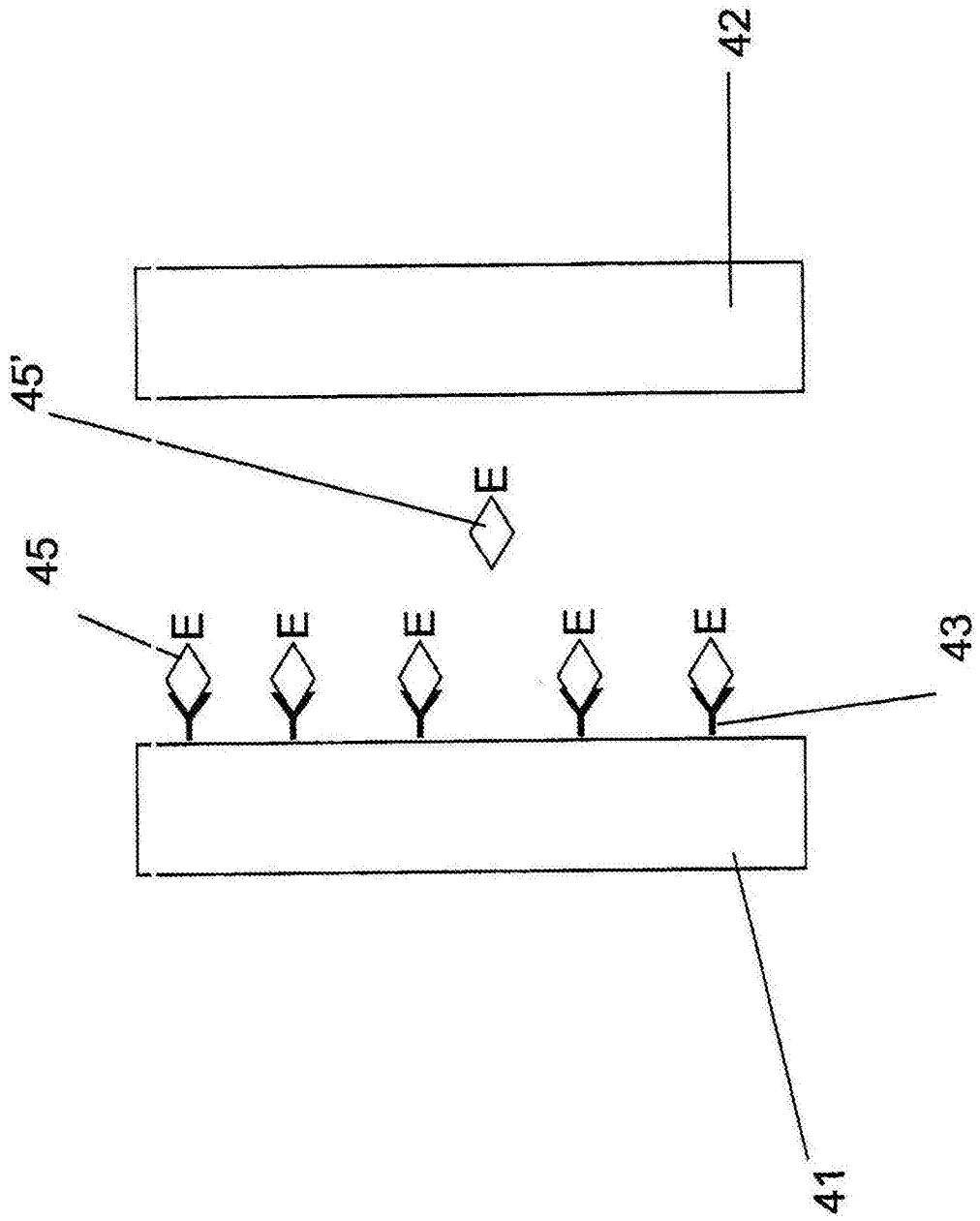


图4

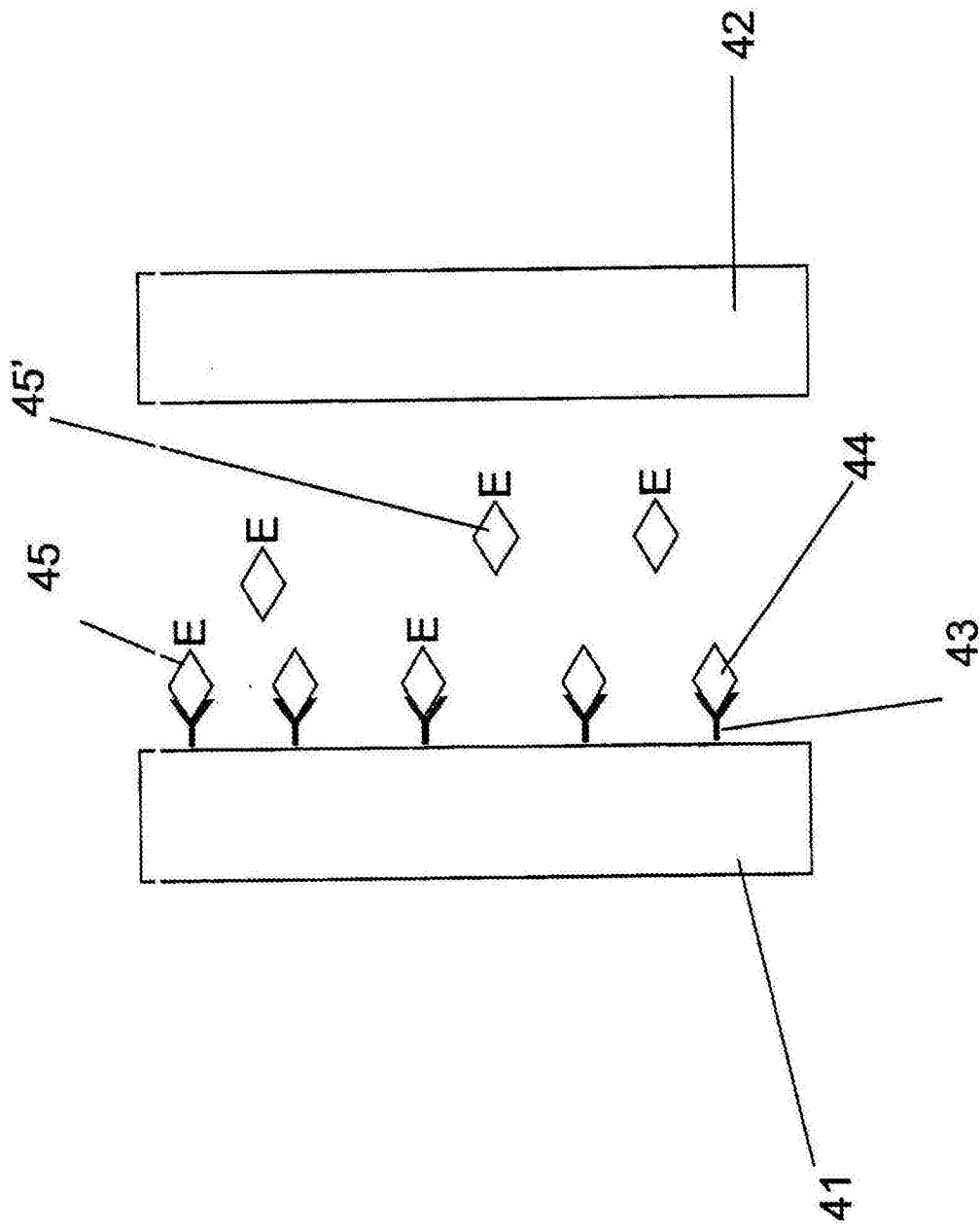


图5

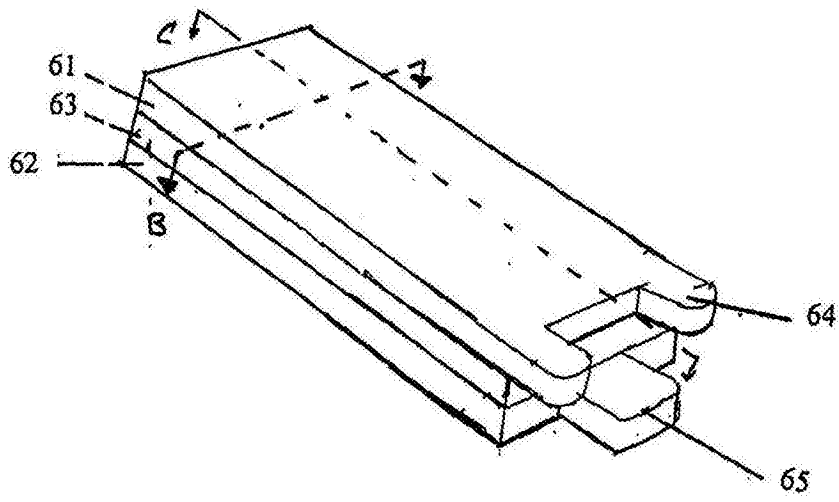


图6A

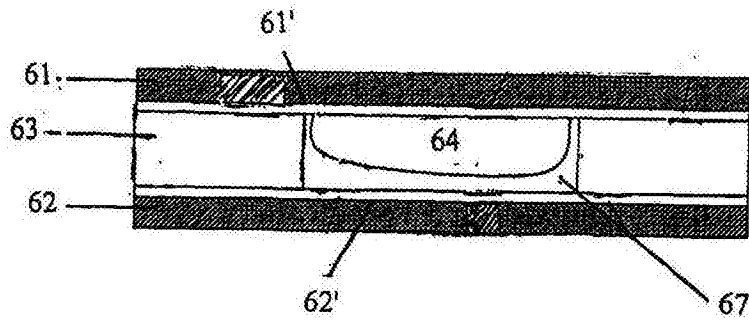


图6B

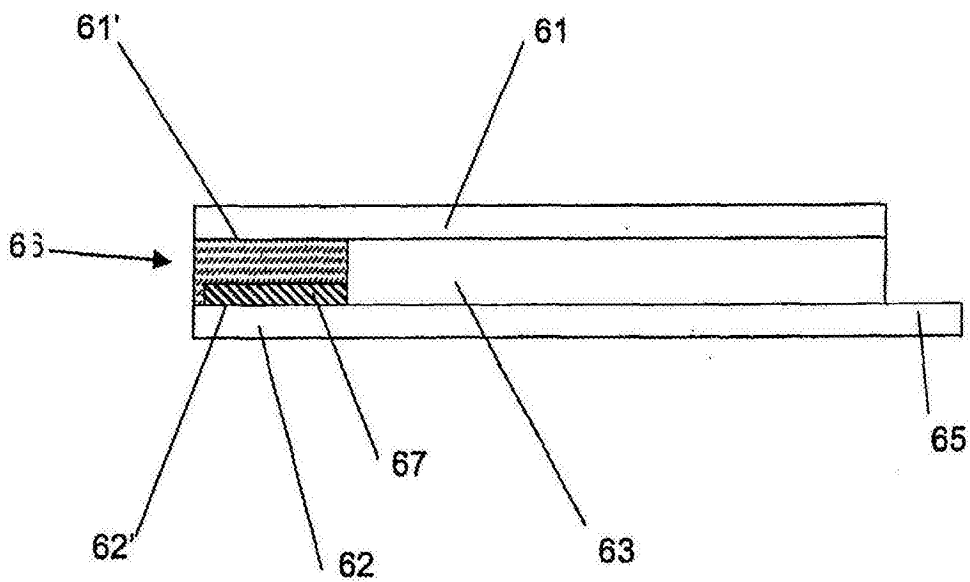


图6C

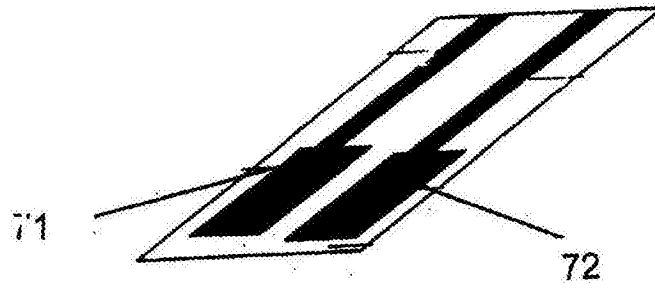


图7A

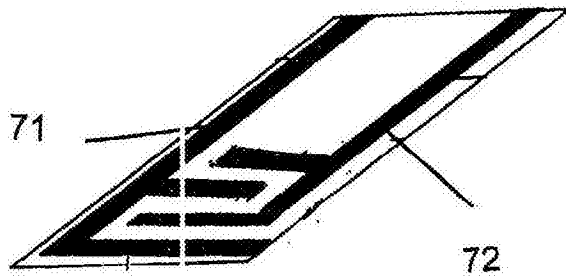


图7B

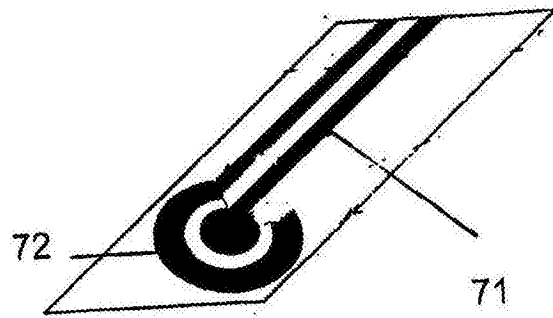


图7C

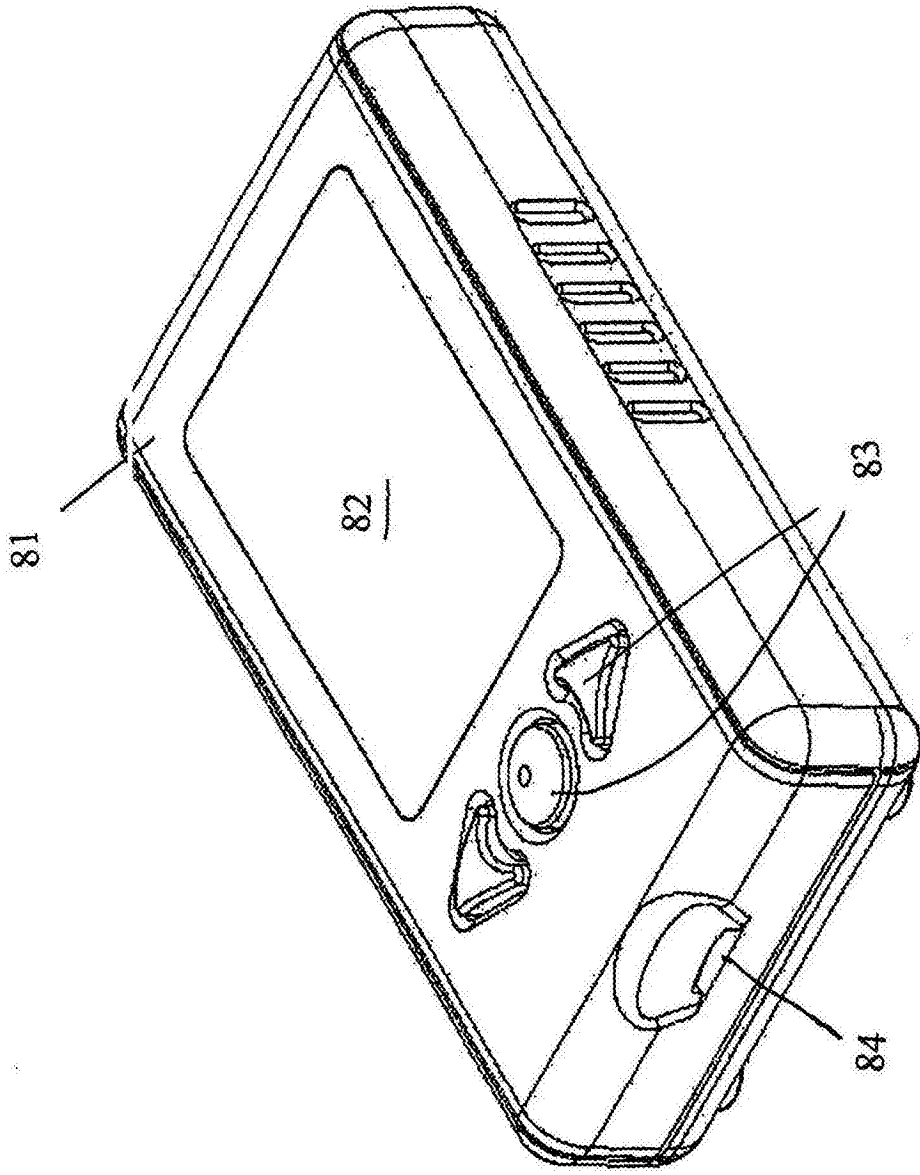


图8

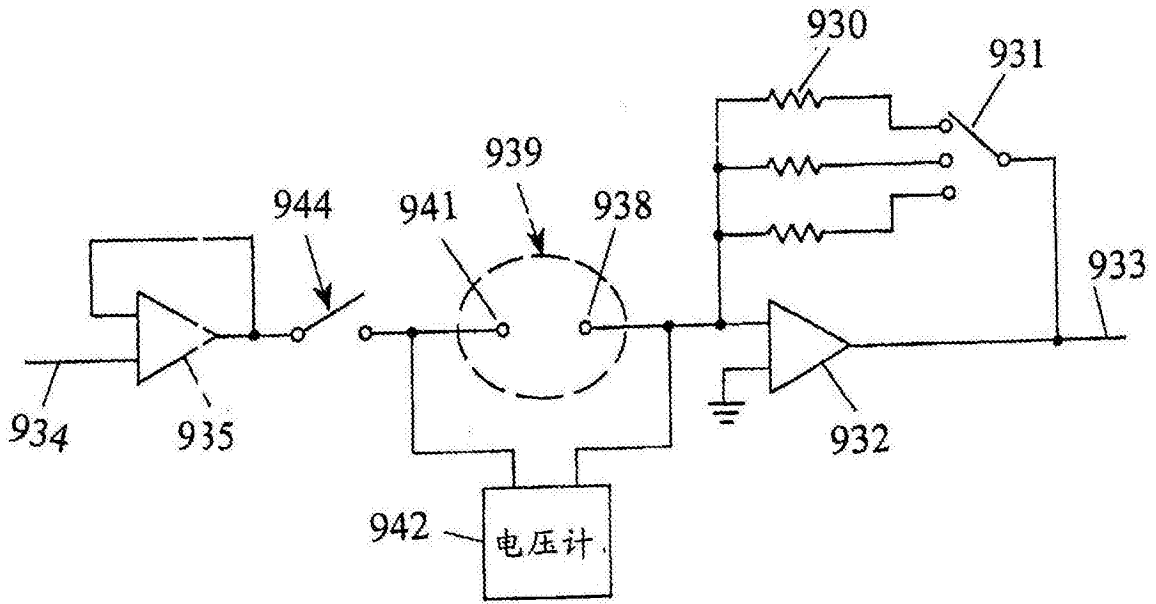


图9

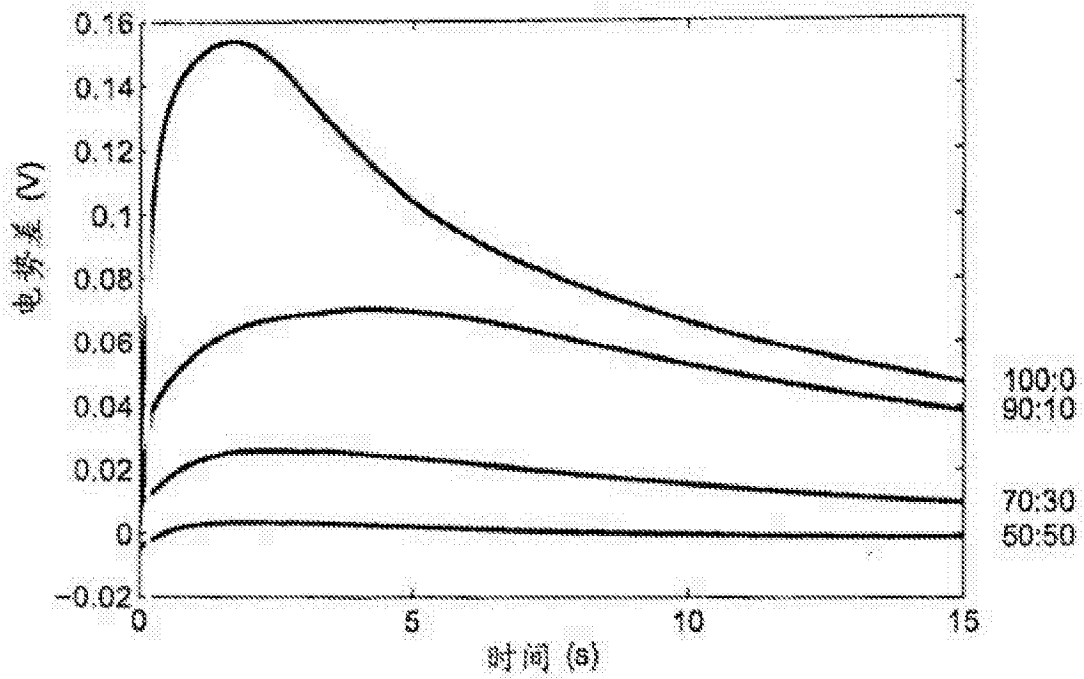


图10

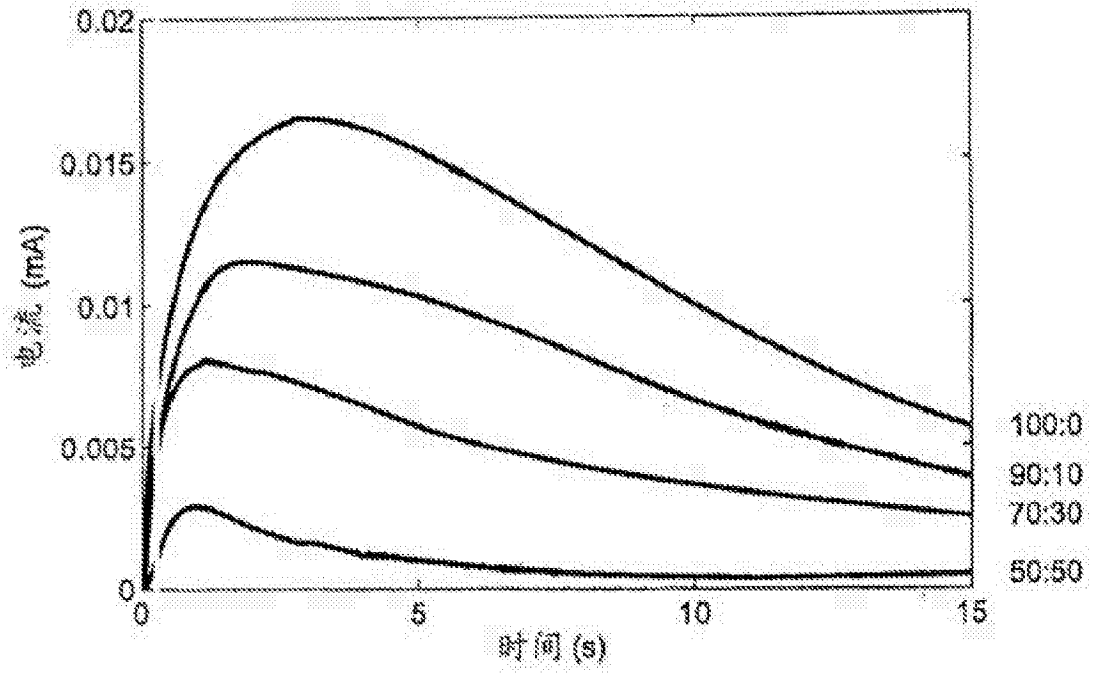


图11

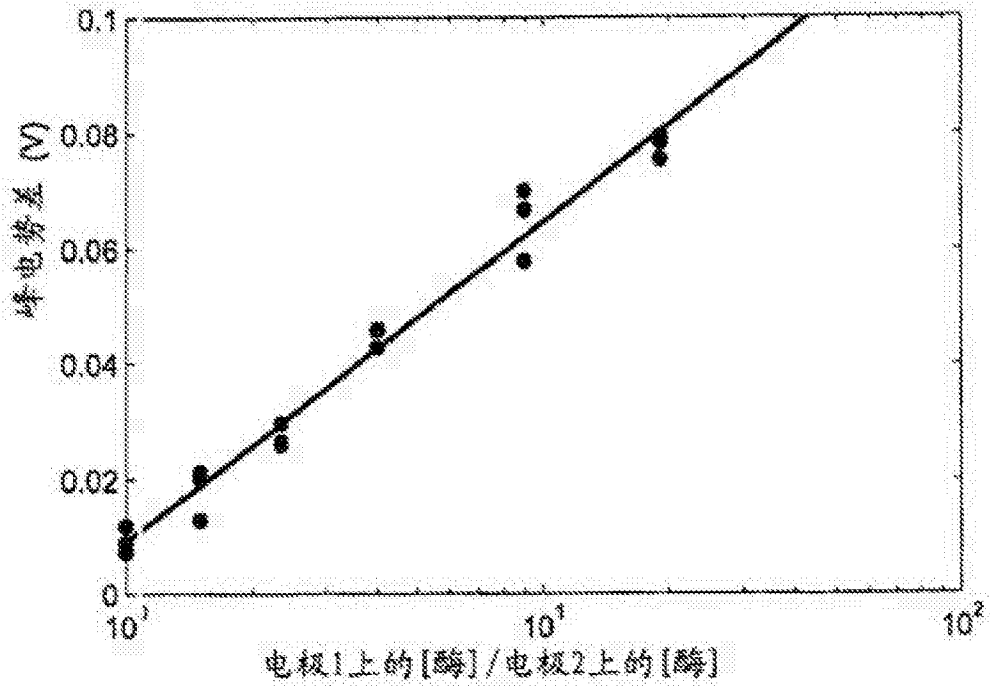


图12

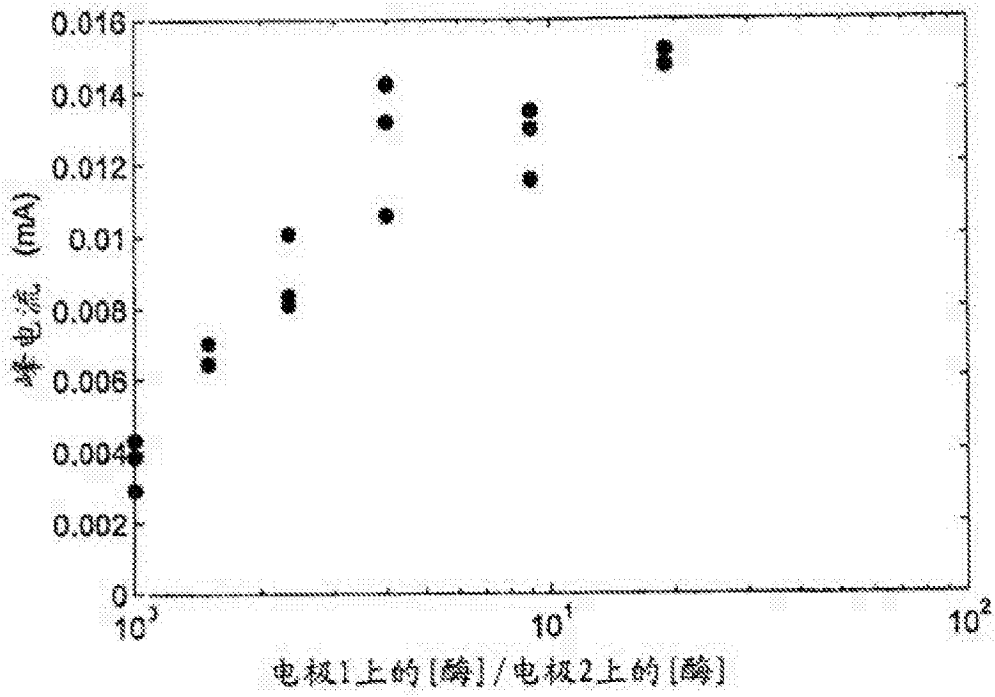


图13

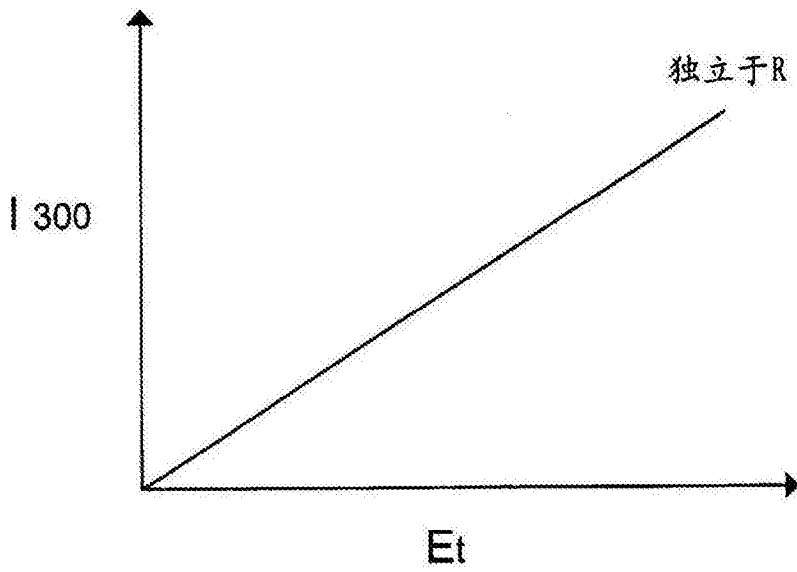


图14

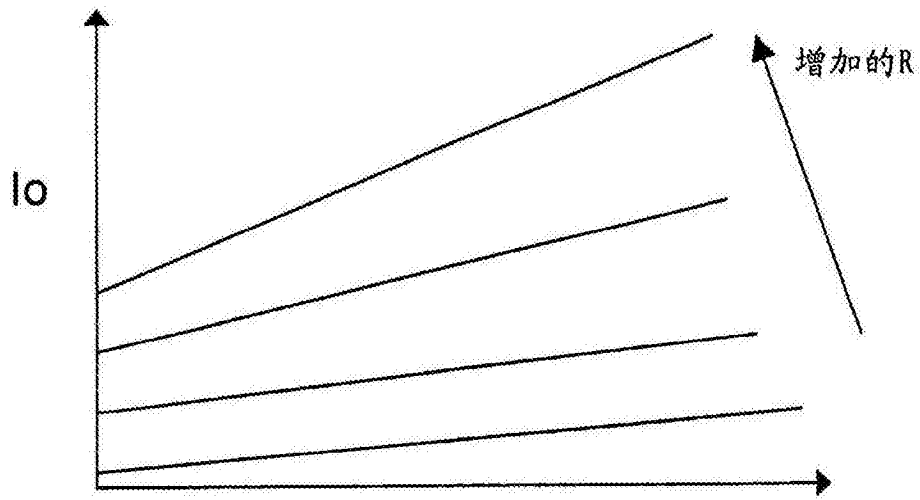


图15

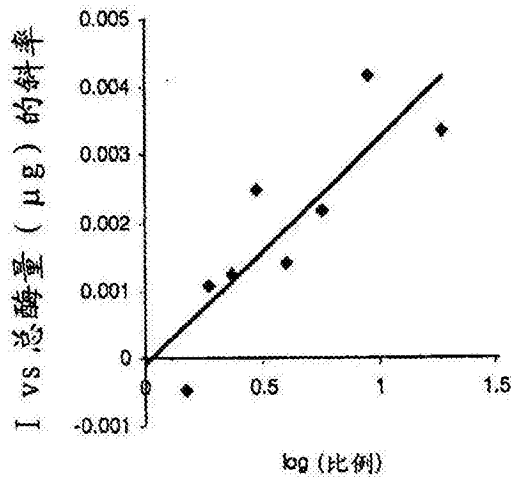


图16

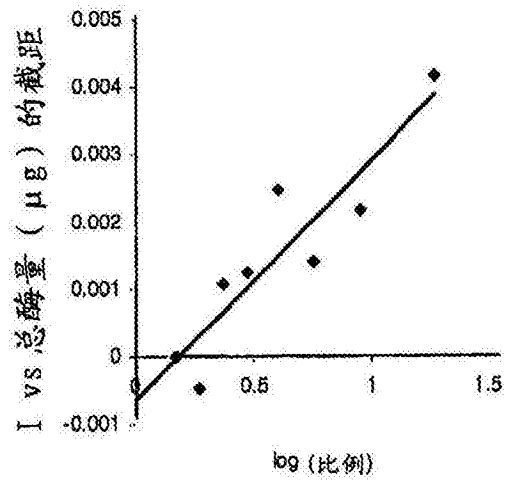


图17

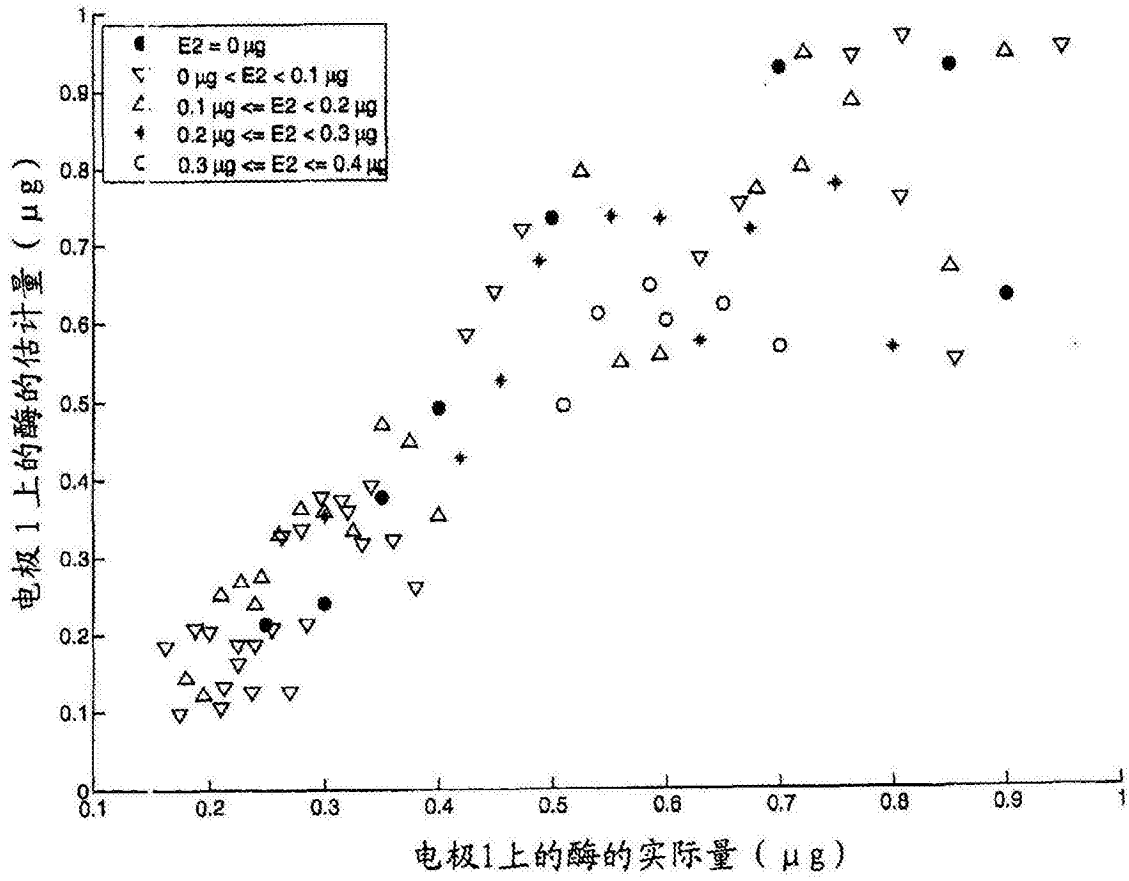


图18