

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00807224.8

[51] Int. Cl.

G01N 21/00 (2006.01)

G01N 31/22 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/538 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100362335C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/537 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

[22] 申请日 2000.5.5 [21] 申请号 00807224.8

[30] 优先权

[32] 1999.5.5 [33] US [31] 09/305,771

[86] 国际申请 PCT/US2000/012099 2000.5.5

[87] 国际公布 WO2000/070327 英 2000.11.23

[85] 进入国家阶段日期 2001.11.5

[73] 专利权人 英特克科学公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 卢方 陆王农 王凯华

[56] 参考文献

US5753517A 1998.5.19

US5753519A 1998.5.19

US4233144A 1980.11.11

US5789154A 1998.8.4

US5389523A 1995.2.14

US5811236A 1998.9.22

审查员 宋海峰

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 4 页 说明书 18 页 附图 10 页

[54] 发明名称

用于电化学定量分析固相内被分析物的系统

[57] 摘要

本发明的目的是提供对包括生物液体样品在内的待分析物进行固相电化学定量分析的系统, 方法和检测条。一种检测样品被加到样品收集垫。随后测试样品溶液和检测盒的反应试剂相接触并沿液体通路迁移。检测盒反应试剂(例如被标记物)和目标待分析物(例如蛋白, 激素, 或酶, 多糖, 抗体, 核酸, 药物, 毒素, 病毒, 部分细胞壁)或两者相互作用形成复合物, 或者可选择的与另一检测盒反应试剂竞争性相互作用, 导致指示剂富集在固相的界定区域。对界定区域进行电化学分析, 其结果取决于用恒电势和电势定量分析法(如电极析出伏安法)对指示剂或指示剂衍生物的形态的电化学转化的监测结果。指示剂的电化学转化有特征性的电学标志, 它与样品中待分析物的浓度相关。

1. 用于定量至少一个待分析物的亲和色谱检测条，包括：

A) 亲和色谱介质，其包括一个界定区域，其中所述界定区域包括固定结合物质，其中所述固定结合物质专用于捕获/固定被标记物和/或所述被标记物与所述待分析物的复合物，其中所述被标记物包括在电化学分析条件下呈电活性的标记物；

B) 用于在含有所述固定结合物质的界定区域与外部电源之间建立电接触的装置，和

C) 用于在所述亲和色谱介质上除所述界定区域以外的区域与外部电源之间建立参照电接触的装置。

2. 权利要求 1 所述的用于定量一个以上待分析物的亲和色谱检测条，其中所述界定区域包括固定结合物质，其中所述固定结合物质专用于捕获/固定被标记物和/或所述被标记物与所述待分析物的复合物，其中所述每个被标记物包括不同的电活性标记物并且专用于与仅有的一个目的待分析物相互作用/竞争。

3. 权利要求 1 所述的亲和色谱检测条，其中所述亲和色谱介质包括第二界定区域，其中所述第二界定区域包括固定结合物质，其中所述检测条包括(I)用于在第二界定区域与外部电源之间建立电接触的第二装置，和(II)用于在所述亲和色谱介质上除所述第二界定区域以外的区域与外部电源之间建立参照电接触的第二装置。

4. 权利要求 1 所述的亲和色谱检测条，其中所述被标记物被预先设置于所述检测条的样品收集介质上。

5. 权利要求 4 所述的亲和色谱检测条，其中所述预先设置的被标记物为冻干物形式。

15. 用于定量至少一种待分析物的试剂盒，其包括：

- A) 权利要求 1 所述的亲和色谱检测条；和
- B) 从所述捕获/固定被标记物中释放所述标记物的释放试剂。

16. 用于定量至少一种待分析物的试剂盒，其包括：

- A) 权利要求 1 所述的亲和色谱检测条；和
- B) 包括所述标记物的试剂。

17. 定量至少一种待分析物的方法，其包括：

- A) 提供权利要求 1 所述的亲和色谱检测条；
- B) 在含有所述固定结合物质的界定区域与外部电源之间建立电接触，并在所述亲和色谱介质上除所述界定区域以外的区域与外部电源之间建立参照电接触；
- C) 将包括所述待分析物的样品应用于所述检测条，并且选择性应用含有所述被标记物的试剂；
- D) 使得所述被标记物和/或所述被标记物与所述待分析物的复合物被所述固定结合物质捕获/固定，从而在所述界定区域中累积；以及
- E) 进行电化学分析以确定所述界定区域中的被标记物浓度，并且将其与所述待分析物的浓度相关联。

18. 权利要求 17 所述的方法，包括提供权利要求 9 所述的亲和色谱检测条，将所述标记物从所述被标记物中释放出来，并将所述标记物预先富集为在所述工作电极上的沉积物。

19. 权利要求 18 所述的方法，其包括在阳极析出条件下通过氧化在工作电极表面上沉积面将所述沉积物从所述工作电极上析出。

20. 权利要求 17 所述的方法，其中的电化学分析为恒电势分析。

21. 权利要求 17 所述的方法，其中的电化学分析为电势分析。

用于电化学定量分析固相内被分析物的系统

发明背景

1. 发明领域

本发明涉及一个系统、检测方法和检测设备，该系统将亲和色谱分析检测技术和电化学定量技术结合起来用于对检测样品中一个或多个待分析物进行分析。更具体的说，本发明涉及用电化学定量分析系统来测定待分析物（例如蛋白，荷尔蒙或酶，小分子，多糖，抗体，核酸，药物，毒素，病毒或病毒颗粒，部分细胞壁和其它具备可鉴别的特征性或特异性标志物的组分），在固相上（例如检测条）通过测定与待分析物浓度相关的被标记物质上的指示剂来进行检测。分析系统中所使用的检测条包括亲和色谱分析的固相介质，以及与之相应的电化学检测系统，并且在所述的介质中有流体通路。在下文中将对本发明进行详细阐述，实际上本发明适用于任何待分析物的定量分析，待分析物的浓度与电活化物质的电活化粒种相关，电活化粒种在本发明中检测仪器内类似于电化学池的环境下能表现出电响应的变化。

2. 已有技术描述

A. 免疫检测

在固相（检测条）上对待分析物进行免疫化学分析一般包括测定液体样品中待分析物与被标记物质或其他反应组分的相互作用。在已有技术的背景下，“被标记物质”包括：(a)被指示剂标记的待分析物模拟物；(b)能够与目的待分析物进行特异性相互作用的被标记的配体；或(c)由(a)或(b)与其它反应组分相互作用形成的复合物。包含被标记物和待分析物的液体被转移进可渗透的薄膜或渗透膜，液体经膜上的流体通路在扩散作用和毛细作用牵引下移动，与一个或更多个试剂盒的试剂相遇（其中至少有一个被固定在某个特定区域）。被标记物和/或目标待分析物被固定在检测点的检测盒试剂捕获并形成

复合物。如果复合物的浓度足够大的话，就会在当前点产生可辨别的变化。其中的指示剂是色素，例如金属（比如胶体金），或可替换为彩色乳胶颗粒，可辨别的变化通常是指对于肉眼即可观察到的变化。

下面的专利被认为是这种免疫色谱层析检测的代表。这些专利是按照时间顺序排，讨论的顺序与其专利的专利描述与权利要求的可专利性无关。

Campbell et al, US Patent 4,703,017 (受让人为 Becton Dickinson) 描述了一种检测方法，能够用一种“直接”或“微粒”指示剂来检测待分析物，具体的这种指示剂能够用肉眼观测到，所以，这种诊断方法可适用于家庭诊断；或者，作为一种选择，用于缺乏精密分析仪器的临床检测中。可选择的直接指示剂是包含色素或其它有同等作用着色剂的脂质体。所要求权利的检测方法被描述为适于尿液检测（例如怀孕测试）；这样能够检测待分析物含量高浓度水平。因此，这种检测方法被认为能够对待测物进行半定量的检测。因为该检测方法为单一步骤（如将样品加到检测试剂条上），检测被描述为“快速”检测技术。

Rosentein, US Patent 5,591,645 (受让人为 Becton Dickinson) 描述了一种免疫层析检测方法，其原理于上述专利（美国专利号为 4,703,017）中所述原理相同。Rosentein 检测仪器将检测试剂盒中所有的反应试剂合并放入检测条的同一平面上，将待测样品直接加到检测条上使所含的反应物发生反应，从而进行所需要的分析。直接指示剂可以从许多类型的着色剂中选择，其中优选的是可以吸附到结合蛋白（如抗体或抗原）上的胶体金。所要求权利的检测方法被描述为适于尿液检测（例如怀孕测试）；能够检测待分析物含量较高浓度。因此，这种检测方法被认为能够对待测物进行半定量的检测。因为该检测方法为单一步骤（如将样品加到检测试剂条上），检测被描述为“快速”检测技术。

Swanson 等, US Patent 5,073,484 (受让人为 雅培试验室) 描述了一种免疫层析检测方法, 该检测方法利用多检测带, 其中每个带都有着共同的流体通路。当测试样品和测试反应试剂在流体通路迁移时, 目标待分析物(通常与一种直接指示剂结合)可以与分别固定在每一个测试带上的反应试剂结合。每个测试带都预先用标准参照物校准, 所以测试带所呈现的特定颜色反应与样品中待分析物的浓度水平相关。相应的, 样品中待分析物的浓度可以通过测试仪器中流体通路所显现的颜色水平来进行估计。因为该检测方法为单一步骤(如将样品加到检测试剂条上), 该检测被描述为“快速”检测技术。

May 等, US Patent 5,602,040 (受让人为 Unilevel Patent Holdings) 描述了一种免疫层析检测方法, 该检测方法与上文所述的 Campbell 和 Rosenstein 的专利中所描述的检测方法类似。May 等人所发现并提出权利要求的一个与前述所不同的原理是在样品接受处放置冻干的糖和直接指示剂。据报道添加糖对于冻干的指示剂进行有效的重构从而使其与样品中的待分析物进行反应是必要的。

前面所述的快速检测方法对于适应待分析物含量提高的检测有一些限制性的例外, 这些快速检测方法通常不适合对待分析物水平进行精确定量监测, 或不适合在单一测试环境中对超过一个的待测试物的浓度变化进行定量测定。

B. 仪器分析

对液体样品的分析通常还包括用仪器测量给定点或电极的电位和/或电流的变化。典型性的, 电测量方法还要参照第二电极和在给定的时间间隔和/或一系列特定的条件下进行的大量测量。

下面的专利是这种用电化学方法进行分析的代表。这些专利是按照时间顺序编排, 讨论的顺序与其专利的专利描述与权利要求的可专

利性无关。

Wang 等, US Patent 5,292,423 (受让人为 New Mexico State University Technology Transfer Corp.) 描述了一种能够对液体样品(如饮用水, 血液, 尿液等)进行微量金属分析的方法和仪器, 所用的方法为液体样品中的微量金属被网板印刷而成的预先包被上汞的碳(工作)电极所吸附。Wang 的测试平台使用了至少一个附加(参照)电极。通过用阳极溶出伏安法(ASV)或电势测量分析法(PSA)对吸附有微量金属的电极进行分析。据称 Wang 的方法和设备的优势包括他的发明适合于对可能含有污染物的液体样品用一次性的检测设备进行现场检测。

Brooks US Patent 5,753,517 (受让人为 University of British Columbia) 描述了一种定量的免疫色谱层析分析, 使用一种仪器来检测一种特殊的乳胶指示剂, 其相应的检测程序使用了被称为 RAMP™ 的技术。根据 Brooks 等称 RAMP™ 技术使用的乳胶颗粒类似于酶联免疫方法(ELISA)中所使用的酶。以 RAMP™ 的技术为基础的检测, 检测条中包括两种不同的荧光标记指示剂, 将其放入暗盒中并将液体样品加于检测条上。目标待分析物与一种指示剂在检测条上的测试带上发生反应并形成荧光复合物, 同时在检测条上的第二种指示剂保持完整(以提供内部参照)。因此 RAMP™ 技术能够区分荧光复合物和内部参照物的差别从而来对样品中的待分析物进行测定。

Brooks 等更换系统来优化他们的分析方法, 尝试使用了光学检测方法(光散射)来测定电导或电阻的变化。在所提到的替代方法中有一种为: Brooks 等尝试(US 5753,517-col. 7, line 7-9, inclusive)通过电化学测量从与待分析物相关的复合物中释放的电活性的物质(例如铋, 镉或碲原子)对待分析物进行定量测量。根据 Brooks 所称其中的一个替代方法包括使用螯合剂-蛋白复合物作为待分析物的指示剂, 通过附加酸性溶液使金属释放作为后面阳极溶出伏安法定量测定中的标

志原子 (Hayes 等, Anal.Chem.66:1860-1865 (1994))。

下面所发表的技术文献被认为是这种电化学分析的代表。这些论文是按照时间顺序编排, 讨论的顺序与其对于发明的可专利性的重要程度无关。

电化学技术向亲和色谱方法提出了挑战, 因为其稳定而且敏感的信号, 较少程度的检测限制, 简单的操作方法和低成本。Henieman 等所作的开创性研究 (Hayes F.H.等, Anal.Chem.66:1860-1865 (1994)) 表明可以在阳极析出伏安法 (ASV) 中使用金属原子标记物来进行异种免疫检测。这种免疫检测包括螯合剂和蛋白共价结合形成的复合物作为金属标记物的螯合剂。通过抗体的标记蛋白和未标记蛋白竞争性平衡 (固定在聚酯管的表面), 金属标记物被释放并转移到电化学小池中与悬挂的汞滴状电极 (HMDE) 和已除去气泡的液体混合来进行 ASV 检测。相类似的, Wang 等 (Wang J., Anal.Chem., 70, 1682-1685(1998)) 使用了一种抗体包被且网板印刷的感受器, 在一次性检测条的表面完成整个检测步骤, 并使用了高敏感性的电势测量法来测定几微升溶液中所释放的金属原子标记物。作为分散的敏感的检测方法, 这种芯片上完成试验的实验操作与以往以 ASV 为基础的免疫测定相比, 提供了几点优势, 包括简化的试验操作 (如排除了分离和大量的反应试剂, 排除了有毒性的汞滴, 更敏感的析出检测方式)。Wang 的系统对于感受器的预调整 (使用前) 和样品的反应需要较长的孵育时间; 而且需要大量的洗涤的步骤, 这些都使得这种方法繁琐而且不实用。

发明目的

本发明的目的是补救如上面所述或相关的以往技术中的缺陷。

更具体地说, 本发明的主要目的是采用快速亲和色谱的电化学分析方法对待分析物进行定量测定。

本发明的另一个目的是提供一个能在固相检测形式下对待分析物进行电化学定量分析的系统，该系统可容易用于快速免疫层析检测。

本发明的另一个目的是提供一个在固相上对待分析物进行电化学定量分析的系统，该系统包括一个通过在固相上测量恒电压或电势的变化来测定标志物的简化的装置，该电压/电势变化是由检测位点标记物的浓度变化导致。

本发明的另一个目的是提供一个能够同时对某一共同的待测试样品中的多种待分析物在固相检测形式下进行电化学的定量分析，包括用析出伏安法来测定标记物的简化装置。

发明概述

上述以及相关的目的的实现是通过在固相检测环境下使用本发明中的电化学定量分析系统、方法和检测条来测定待分析物的浓度。首先，检测样品溶液和被标记的物质相接触，并在检测条件下于固相检测环境中在流体通路上迁移。不考虑检测形式（竞争性检测，夹心法检测等），被标记物富集于固相中的界定区域中。在本发明中所提到的系统和方法中，一种“被标记物”包括任何适当的电活性的物质，其能够在检测条件下被隔离在在固相的特定界限的区域内，或能够在特定区域内释放电活性成分，（在下文中都被称为电活化粒种）；并且这种电活性粒种会在电化学定量分析中产生电化学转变（例如氧化还原反应）。由观测测量得知：电活化粒种的转变可以与检测样品中待分析物的浓度正相关或负相关（与标准曲线相比较）。

测定待分析物的浓度的两种主要的电学分析方法为电势测定和恒电势的测定。每种测定分析试验都需要/包括两个电极和一种接触性样品（电解）溶液，在检测条上共同组成类似电化学池的环境。电极表面为离子导体（如从水状流体样品、检测试剂等中电解出）和电子导

体结合组成。在检测条中类似于电化学池的环境中，能与待分析物反应的电极（或能够指示待反应物的电活性物质）被定义为“指示”或“工作”电极，电压维持恒定的电极被定义为“参照”电极（它的反应不依赖于样品溶液）。

在本发明的一个实施方案中，固定化的被标记物与释放的反应物接触，使界定区域内固定化的被标记物上标记发生释放/置换。以金属标记为例，发生释放/置换的金属能够与释放反应试剂溶液中的物质相互作用，在固相的界定区域中的工作电极表面形成金属薄膜（或金属表面活性复合物）。所以对亲和色谱检测条上的界定区域使用恒电势测量，通过阳极析出伏安法从工作电极上的金属薄膜(或金属表面活性复合物)析出标记物，这使得标记物经历第二次电化学转化（使标记物从还原态转变成氧化态）。标记物的第二次转化（从还原态转变成氧化态）可以作为用于监测的特征性标志，并且通过与标准曲线相比较，可以直接与样品中待分析物的浓度相关联。

从金属薄膜（或金属表面活性复合物）也相当于从待分析物中析出的标记物能够被定量，这通过用恒电势电化学测定技术来测量界定区域内的变化。这种电化学定量分析的特点包括应用界定区域内的在一系列限定的电位中一个电位，还包括检测每个电位之间的电子转移率（电流）。电位的变化类似于在不同的波长中用一系列光学测量方法对一个颜色指示剂进行测定。电极间的电位变化使得电活性粒种以一个给定的速率得到或失去电子（相应地发生还原或氧化反应），这可以指示这些电活性化学物质的浓度。相应的反应产物的电流不仅反映了电子流经电子/溶液交界面的速率，而且还反映（当与标准相比时）了检测样品中待分析物的浓度。因此这种恒电势测定的技术能够测量有电活性的（例如能在电化学池环境中用于还原或氧化）任何化学物质。

一个优选的对于本发明中所述的电化学定量分析系统起作用的检

测条的设计，必须包含多种的组分和功能区：（a）控制检测条所吸收的样品的体积和速率；（b）适用于样品和一种被标记物与检测条上的界定区域上被固定的结合物质发生可控制的反应；（c）能够有效的从样品的内生性组分中分离被标记物质；（d）被标记物集中于检测条上界定区域内用于电化学处理；（e）通过用电化学方法对待分析物进行定量分析。

在另一个前述的检测条设计的优选实施方案中，样品与被标记物能够被结合到一个吸水垫上（如纤维玻璃），该吸水垫通过流体维持与固相亲和色谱检测介质的联系。样品传递于被标记物之上使之发生重构，反应后的被标记物和/或其与待分析物形成的复合物被送入上述的检测介质中。当上述液体和其组分（如样品，反应试剂和其反应产物）在亲和色谱介质中扩散，被标记物结合于流体通路的界定区域上（也即后面所述的“检测位点”）。典型的，这种界定区域可以被限定为固定在其上的结合物质能够与待分析物、待分析物的类似物或待分析物和/或被标记的配体（如通过结合于待分析物的表位上）形成的复合物相互作用的区域。当待分析物，待分析物的类似物或待分析物和/或被标记的配体变得逐渐富集在检测位点时，可以进行测量并与检测样品中的待分析物相关联。

这种可控制的电势（恒电势）测定技术的优点包括高敏感度，对电活性物质的选择性，较宽的线性范围，易携带性以及低成本的制造仪器和化学物质特性。

为了使多种功能性的组分都位于完整的设备之中，本发明优选的检测条的设计中所有的组分优选被排列或安置于一个共同的支撑或垫层上（典型的为一种惰性的塑料如聚酯薄膜）。检测设备的底层可以预先印制有导电性物质以保证在检测条上亲和色谱检测介质和电化学检测仪之间的电学联系（直接或诱导耦合），并且电化学分析仪器能够测定检测条上界定区域内微小的电变化。如同在后面的附图中所更

多的被描述到的，支撑层有两处或更多处被典型的用导电物质或金属盐印制，形成被后面所述的“电极”。这些电极被排列在支撑层上，在空间上与固相介质的界定区域相一致。与检测位点的界定区域相一致的电极被称为“工作电极”。取决于分析所用的电化学方法，检测条通常需要至少一个附加物（如“参照”电极）来形成电化学池中的挡板。

当被标记物集中于检测位点的界定区域内时，可以通过一系列电化学技术进行测量。如上所述，在进行测量之前最好通过在工作电极上进行预富集来首先从复合物中分离标记。这种“预富集”处理包括标记从复合物中的释放/置换以及标记在还原态被捕获（如金属薄膜（或金属表面活性复合物））于工作电极之上，在电极上标记物变的更加有电化学可用性或活性。在完成预富集过程后，反应后的金属薄膜（或金属表面活性复合物）能够用于通过阳极析出伏安法进行恒电势电化学定量分析。

在优选的这种分析系统的范围中（如通过阳极析出伏安法进行恒电势电化学定量分析），在电化学定量分析条件下，标记物被再度氧化，对标记物的这种电化学转化（从还原态转化为氧化态）进行检测。在这种转化中产生的电流信号（峰电流和区域电流）依赖于大量的系统变量，金属标记物的特征和电极的几何形状。在每个例子中这些变量可以通过经验来调整；而且反应条件被调整与标准曲线相适合，用于校准相应于待分析物浓度的电信号。更具体而言，图 4 描述了一个碳电极上一个铅金属薄膜的电流信号反应相应于对铅从低浓度到高浓度进行阳极析出的分析曲线。相似的，图 5 表明（在电化学分析前）检测了金属铋信号（电流）强度的变化，作为“预富集”间隔期的函数。如图 5 所示表明预富集间隔时间越长（从 1 到 15 分钟），电流强度越大。在分析过程的条件下对于每一种可以选择的标记物都进行了相似的关联/优化并创建了相应的标准曲线，相应的对于一个特定的分析关联了一系列可能的动态范围的条件以及一系列浓度。图 6 表明

在一种含有铟，铅，铜和铋的溶液的同一个检测窗口中多种标记物的反应。用本发明中的多标记物能够对一个样品溶液中的待分析物同时进行定量分析。

附图简述

图 1. 本发明的固相电化学定量分析系统的检测条部分的透视图。（A：一个两电极的系统；B：一个三电极的系统）。

图 2. 图 1 中检测条沿着平面 AA 的截面图。

图 3. 本发明中的检测设备图。

图 4. 图示了在一系列浓度下（预富集的铋金属标记物的浓度范围从 1 纳克/毫升到 50 纳克/毫升）对碳电极上铋/汞合金进行电极析出分析所得的电流信号响应曲线。

图 5. 图示的电流信号响应曲线表明（在电化学分析前）检测了金属铋信号（电流）强度的变化，作为“预富集”间隔期的函数。如图 4 所示表明预富集间隔时间越长（从 1 到 15 分钟），电流强度越大。

图 6. 图示表明在一种含有铟，铅，铜和铋金属标记物的溶液的同一检测窗口内多标记物的电流信号响应曲线。

图 7. 图示对标准肌红蛋白抗体溶液电化学分析得到电流信号响应曲线，这是不同浓度的根据本发明中系统、方法和检测条（图 1 和 2）进行的。

图 8. 图示了用本发明的系统、方法和检测条（图 1 和 2）对血清中的 2.5 纳克/毫升的乙肝抗原进行 6 次重复测量得到的电流信号响应曲线。

图 9. 图示用标记有铅，铜，和铋离子的乙肝抗体对血清中乙肝抗原的测量得到的电流信号响应曲线。

图 10. 图示用本发明中的系统、方法和检测条（图 1 和 2）对血清中的人体绒毛膜促性腺激素（左）、乙肝抗原（右）和对照标记物（中）进行测量得到的电流信号响应曲线。

图 11. 图示竞争性检测人的 NPOR(25 聚体寡核苷酸)得到的电流

信号响应曲线，A（上）空白溶液的（没有人的 NPOR）信号，B（下）含有人的 NPOR 的溶液的信号。

包括优选实施方案在内的发明详述

本发明中的系统、方法和检测条的一个独特的优势是在一个给定的样品中能对多种待分析物同时进行电化学定量分析。因此对给定样品中每一待分析物通过简单的使用不同的标记物可以完成给定样品中滥用药物的组合检测。相应的，可以理解的是下面所讨论的并不意味着将本发明的范围和应用局限于分析单一待分析物；并且容易理解和例证，这种描述仅局限于分析单一待分析物。

如上面概述中所述并一再被强调的那样，本发明中的电化学定量分析系统的基础为：被标记物在固相测试环境的界定区域内初始富集；并随后导致标记物形态的电转化，在被检测的环境内产生可测量的电信号，这种信号和检测样品中的待分析物的数量相关。

在某些例子中，从被标记物中释放/置换标记物是适当的（作为分析流程的中间步骤），并且使其转化或使其与其它物质反应，这在更大程度上可实现电化学定量分析。例如，被标记物上所标记的为金属（例如被标记的配体）情况下，在测试条的界定区域的分离和富集通常需要从其配体组分中的分离和/或置换以及随之的转化或反应以导致/实现其转化为另一种形式（例如氧化或还原状态），这种形式可以更加容易的被用于电化学形态的转化。在本发明的一个优选的实施方案中，被标记的配体包含一个功能团，其能够通过类似螯合剂的作用来与金属标记物耦合。但这种耦合对 PH 值敏感，所以在固相的界定区域富集后，通过简单的与酸性盐溶液接触，金属标记物从复合物中被释放/置换。

可选的，当被标记的配体包含包裹于脂质体中的指示剂时（如金属），如在 Campbell 等的专利中描述的那样，专利号为 US

4,703,017(如前面所讨论过的), 该指示剂依次与一个配体相连接, 脂质体的完整性可以很方便的用许多常见的脂溶剂(如清洁剂)来调整/溶解。因此金属能够从其与被标记配体形成的配体组合物中释放, 由此使得定量分析更容易实现/可用。

电化学定量分析使用的为阳极析出伏安法作为可选择的分析方法, 释放/置换的金属标记物能够与酸性溶液内的汞离子发生反应在固相介质的界定区域内的工作电极上形成汞合金。在随后的电化学定量分析中金属标记物的电化学还原反应发生逆转, 对这种转化的微小电化学变化进行监测并与检测样品中待分析物的存在及其浓度相关联。

为使本发明中的系统和方法更容易使用和携带, 本发明中的定量分析系统使用了亲和色谱检测条, 其上的界定区域被设计成能够富集目标待分析物。图 1 和 2 中的检测设备为检测设备的一个优选实施方案的代表。

如图 1 和 2 所描述的检测设备首先包括一个亲和色谱检测条和一个电化学检测系统。

亲和色谱检测条包括大量不连续区域, 并且优选为包括至少两个(2)和更优选的为三个(3)不连续组分的组合, 这些组分可以通过流体相连接。如图 1 所示, 检测条包括一个样品收集垫(12), 在垫上预先安置有被标记物(14)(如被标记的配体或被标记的待分析物类似物), 或与样品收集垫(14)同时存在或邻接存在, 还包括一个膜, 其上预先包被有物质(18)(如配体或待分析物类似物), 以及一个可以用来使样品溶液迁移的吸收性垫子。在本发明的优选实施方案中, 被标记物为冻干物(保证其在用前的稳定); 并与液体样品接触后发生结构变化。

在本发明中的系统和分析方法的范围内, 一种“被标记物”包括

任何可用的电活性物质，该物质能在检测条件下被隔离在固相的界定区域内，或者在该区域释放电活性组分（也即后文中所提到的“电活性粒种”），并于随后的电化学定量分析中发生电化学转化（如氧化还原反应）。电化学粒种的可观测到的测量结果（转化）与检测样品中的待分析物的浓度直接或间接相关（与标准曲线对比）。

在本发明的优选实施方案中，被标记的检测盒试剂典型的包括一种金属标记物标记的蛋白或配体。当与样品接触时，金属标记的试剂与样品中的待分析物相互作用形成复合物。一种可以用亲和色谱分离/富集待分析物的被标记的物质包括一个蛋白/配体和金属标记物，可优选的按照专利号 US 4,732,974 的专利和 Gary 等的技术文献（Covalent Attachment of Chelating Groups to Macromolecules, Biochem. And Biophys. Res. Comm., Vol.77, No 2(1997) pp581-585）所描述的步骤制备(这里包括其全部的参考文献)。简单的说，金属标记物能够结合到相对待分析物特定的蛋白/配体上，蛋白/配体首先通过对金属标记物有亲和力的“外生性螯合集团”的共价结合被修饰。共价基团对于金属指示剂是特异性的，能够直接共价耦合到结合蛋白/配体或者通过中间介质或连接基团来间接耦合。毫无疑问，耦合位点应远离对待分析物特异性的免疫化学活性位点。金属标记物特别适合于用来合成作为本发明的系统和方法中检测盒内检测试剂的被标记物，包括镁，铝，钙，钪，钛，钒，铬，锰，铁，钴，镍，铜，锌，镓，锗，铷，铈，钼，钨，钽，钇，铉，钐，铊，铅，镧，铋，镅，镆，镎，铀，锡，锑，钡，钍，钶，钷，汞，铟，铂，镱，铌，铍，锆，钘，铯，钺，钹，钫以及它们的同位素。

另一个可以用于待分析物进行亲和色谱分离/富集的被标记物包括结合于脂质体的待分析物的类似物。标记有化学反应试剂的脂质体的制备和它们在亲和色谱检测中的应用是已经被熟知并有技术文献报道 (Roberts, 等, Investigation of Liposome-Based Immunomigration Sensors for the Detection of Polychlorinated Biphenyl, Anal. Chem,

Vol.57, No.5(February 1,1995)pp. 482-491)。

被标记物和/或被标记物与待分析物组成的复合物被扩散/毛细作用所携带，从沿着固相亲和色谱介质（16）的流体通路安置的样品加入垫（18）带至其下游检测位点，并在那里被富集和固定。这可以通过传统的方式完成，例如利用能特定与待分析物/金属复合物相互作用的固定结合蛋白或其它合适的物质作为检测盒试剂。因此当被标记物和/或复合物沿着检测设备中的流体通路迁移/扩散时，其能够与固定的结合物质相遇并被捕获而集中在检测位点。经过一段合适的反应时间，在检测条的界定区域内能够富集对于电化学分析检测和定量分析提供足够量的待分析物/被标记物。

电化学检测系统（26）通过在基质物质上（如聚脂薄膜，塑料或其它相对电绝缘（不传导）物质）印制两个电极（对于两电极系统）或三个电极（对于三电极系统）来制备。采用一个具有双面粘性的支持物（241）将亲和色谱检测条和电化学检测系统结合到一起。支持物上的孔位于电化学检测系统和膜上的测试区（18）之间。

对于样品中待分析物含量的检测和测量是通过能够测量电化学粒种的微小电化学变化来完成的，例如，当电化学粒种从还原态转化为氧化态时会产生电流或电压的变化。实际应用中，通过将本发明中的亲和色谱检测条插入到适合测量的设备中并将检测位点（18）的电极（26）与设备进行电耦合。监测设备与亲和色谱检测条的耦合可以是直接的（物理接触）或者间接的（感应式）同仪器与检测设备上的界定区域/检测位点相耦合。检测设备也与检测条在另一位点（28）电耦合，能为检测位点读取数据的比较提供参照点或内部标准。其后，电位加于检测位点来激活/转化标记物使之改变形态，并监视这种转化。这种转化在很多方面都表现出来，其依赖于加于检测位点的电位的性质和强度，以及其它与预富集和标记物的自身性质相关的系统变量。

对检测设备的另一设计如图 3 所示，亲和色谱检测条和电化学检测系统被放置于一个装置内，该装置包括一个绝缘体（30），一个顶端部分或者盖（32）和一个底端部分或者底（34）；盖与底能够相互配对以保证密封来保护其中的亲和色谱检测条和电化学检测系统，因此提供了一个抗干扰的环境。绝缘体（30）为漏斗状，能够导引检测试剂到达检测位点并通过装置的盖上的洞被加入装置中，并相应的在膜上的检测区（检测位点）内的特定区域打孔以分离膜上的界定区域（体积），与用于预富集指示剂的检测盒试剂的体积相关。

实施例

下面的实例包括进一步详细说明，描述和举例说明大量能够体现本发明的检测试剂盒与电化学方法的优选的实施方案。除非特别指出，这些实例中描述的或用到的用于合成物质的设备和技术都是标准的。除非特别指出，例子按照质量百分比给出组分和百分比。

实施例 1

1. 制备离子标记蛋白（如抗体和抗原）

在轻微加热下二亚乙基三胺五乙酸和三乙胺溶于水。溶液被冻干后产生玻璃状残余物，这种残余物在轻微加热下溶于乙腈。溶液冰浴并加入异丁基氯甲酸酯，不断搅拌直至完全反应。产生的二亚乙基三胺五乙酸酐在室温下与存在于保护溶液中一定摩尔浓度的蛋白发生反应。反应混合物用柠檬酸盐缓冲液透析。过量的标记物溶液被加入经过透析的溶液并于室温孵育。被标记的蛋白用磷酸缓冲液透析。利用上述我们实验室的方法，蛋白（抗乙肝抗原的抗体，抗 HCG 的抗体，抗肌红蛋白的抗体，抗肌钙蛋白 I 的抗体，G-SAG，IgG-Fc，艾滋病毒和丙肝病毒等）都能够很好的被金属离子标记（如铋，铅，铟，铊和铜）。被标记的蛋白能够用于制备亲和色谱检测条。

2. 制备亲和色谱固相检测设备

两个导电性的沉积物或区域（对于两电极系统）对应于检测位点

（碳墨电极）和参照位点（银/氯化银墨电极）被喷墨式地印制于聚酯薄层。每个印制区的大小为 $4 \times 4\text{mm}$ 和约 5/1000 英寸厚。

一个有固定化配体预先放置于检测位点（检测区）的膜被碾压到垫层上来将检测位点和碳墨电极系统相连接。纤维玻璃垫（包括标记物/配体结合物）和过量流体吸收介质被分别放置于薄层的两端，形成组装的检测条。例子中所述的检测设备如图 1、2 和 3 所示。

3. 测量待分析物

利用前述的金属离子标记的配体和亲和色谱固相检测设备来检测 HCG，乙肝抗原，肌红蛋白或多重待分析物过程中，液体样品首先加到样品加样处，随后液体样品在毛细作用下从亲和色谱检测条的一端迁移到另一端。液体在样品垫上迁移，被标记物发生重构，待分析物与被标记的配体形成复合物，并被转移和吸引到亲和色谱检测介质中。当复合物到达检测区（检测位点），复合物中的待分析物与检测区的固定化配体发生反应形成被标记的配体-待分析物-配体复合物，同时没有结合的组分和液体部分继续被吸引并流入设备相反侧的吸收性介质内。检测区复合物的形成被记录并用方波析出伏安法（SWSV）对被标记的金属离子定量。如上所述，析出分析过程包括预富集（或形成表面活性复合物的吸收性积聚）和对金属离子的定量测定。

当待测样品为混浊液如为血液或尿液样品时，对传统的光学检测技术会产生影响，而使用前述分析方法则具备特殊的优势。图 7 表示对于一个标准的不同浓度的肌红蛋白溶液的电化学分析，所用的为本发明的系统，方法和检测设备（图 3）。较少的检测限制和检测试剂的敏感性归因于铅离子相对于抗肌红蛋白抗体的较高的摩尔标记比率和铅在工作电极上预富集的时间间隔较长。图 8 表示用本发明中的系统、方法和检测设备（图 3）对血清样品中 2.5 纳克/毫升的乙肝抗原的重复测量。经过 6 次重复测量观察到重复性较好的测量结果。并且，用本发明中的系统、方法和检测设备可以同步检测样品中的多种待分

析物。图 9 为血清样品中乙肝抗原的响应，所用的抗乙肝抗原抗体分别标记有铅，铜和铋离子，不同的离子可以从响应曲线上观察到，曲线表明复合物(标记着不同金属离子的抗乙肝抗原抗体—乙肝抗原—抗乙肝抗原抗体—抗乙肝抗原抗体复合物)在检测区形成并被检测。图 10 表明用本发明的系统、方法和检测设备（图 3）可以同时检测血清样品中的 HCG（左）和乙肝抗原（右）进行检测，在中间的峰值为表明设备是正常工作的对照检测。

实施例 2

核酸（寡核苷酸，DNA 和 RNA）传感器

1. 制备金属标记寡核苷酸

在轻微加热下二亚乙基三胺五乙酸和三乙胺溶于水。溶液被冻干后产生玻璃状残余物，这种残余物在轻微加热下能够溶于乙腈。溶液冰浴并加入异丁基氯甲酸酯，不断搅拌直至完全反应。产生的二亚乙基三胺五乙酸酐在室温下与存在于保护溶液中一定摩尔浓度的寡核苷酸发生反应。反应混合物用三氨基甲烷盐酸缓冲液透析。过量的标记物溶液被加入经过透析的溶液并于室温保温。被标记的寡核苷酸用三氨基甲烷盐酸缓冲液透析。被标记的寡核苷酸用于制备亲和色谱检测传感器。

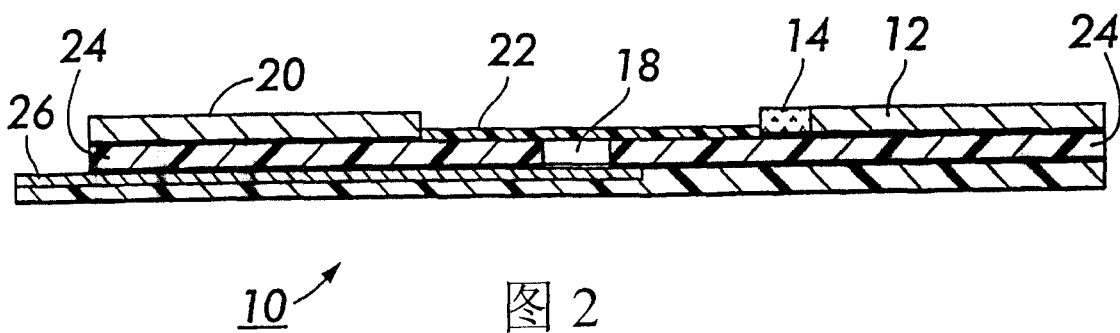
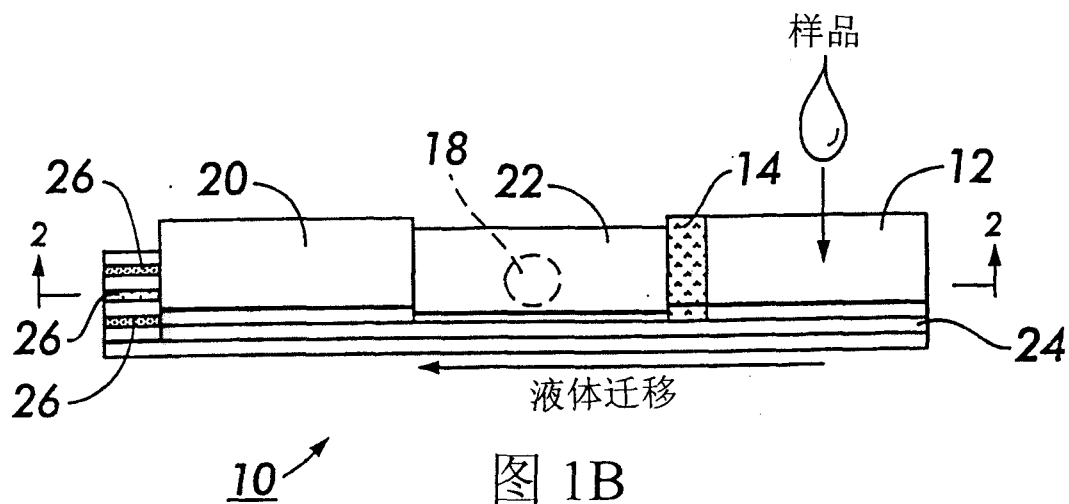
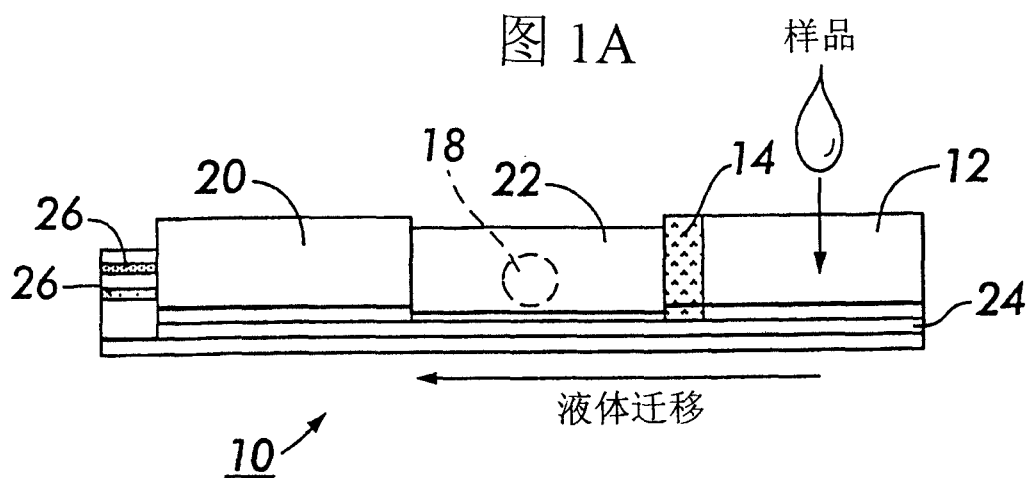
2. 制备亲和色谱固相检测设备

两个导电性的沉积物或区域（对于两电极系统）对应于检测位点（碳墨电极）和参照位点（银/氯化银墨电极）被喷墨的印制于聚酯薄层。每个印制区的大小为 $4 \times 4\text{mm}$ 和约 5/1000 英寸厚。

一个有固定化配体预先放置于检测位点（检测区）的膜被碾压到垫层上来将检测位点和碳墨电极系统相连接。纤维玻璃垫（包括标记物/配体结合物）和过量流体吸收介质被分别放置于薄层的两端，形成集合的检测条。例子中所述的检测设备如图 1、2 和 3 所示。

3. 测量人的 NPOR

利用前述的金属离子标记的配体和亲和色谱固相检测设备来检测人的 NPOR，含有寡核苷酸的液体样品首先加于样品加样处，随后液体样品在毛细作用下从亲和色谱检测条的一端迁移到另一端。液体在样品垫上迁移时，埋入样品垫的被标记的寡核苷酸和包被在检测区的互补寡核苷酸链竞争性地与样品溶液中的目标寡核苷酸链结合，形成被标记的寡核苷酸-互补寡核苷酸链复合物和寡核苷酸-互补寡核苷酸链复合物，同时没有结合的组分和液体部分继续被吸引并流入设备对侧的吸收性介质内。检测区复合物的形成被记录并用方波析出伏安法（SWSV）对被标记的金属离子定量。如上所述，析出分析过程包括预富集（或形成表面活性复合物的吸收性积聚）和对金属离子的定量测定。图 11 表明用本发明中的系统、方法和检测设备（图 3）来竞争性地测定人的 NPOR（25 聚体寡核苷酸）。A（上）为空白溶液(没有人的 NPOR)的信号和 B（下）为带有人 NPOR 溶液的信号。这种结果提供了对 DNA 检测和测序的一种方法。



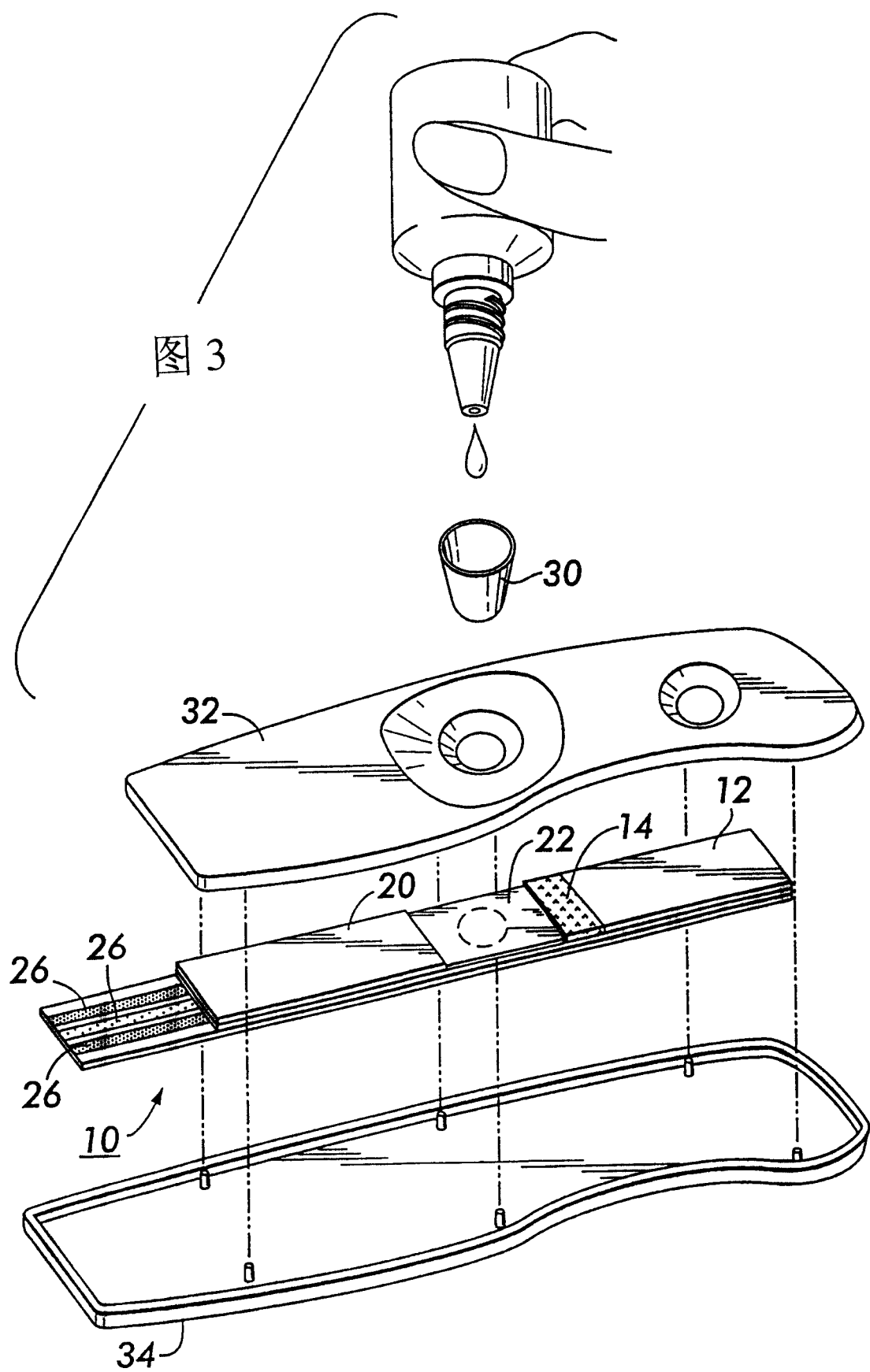


图 4

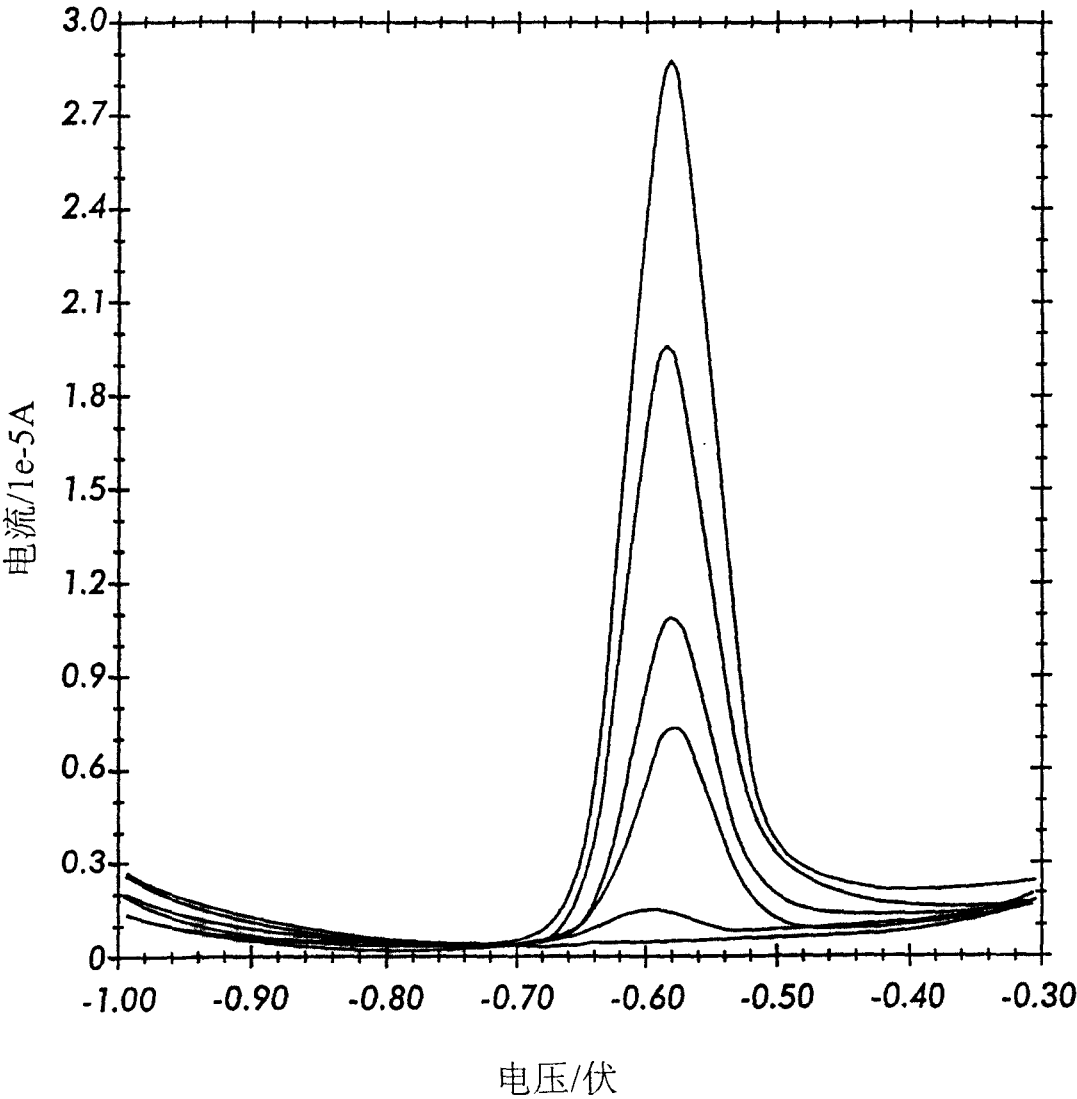


图 5

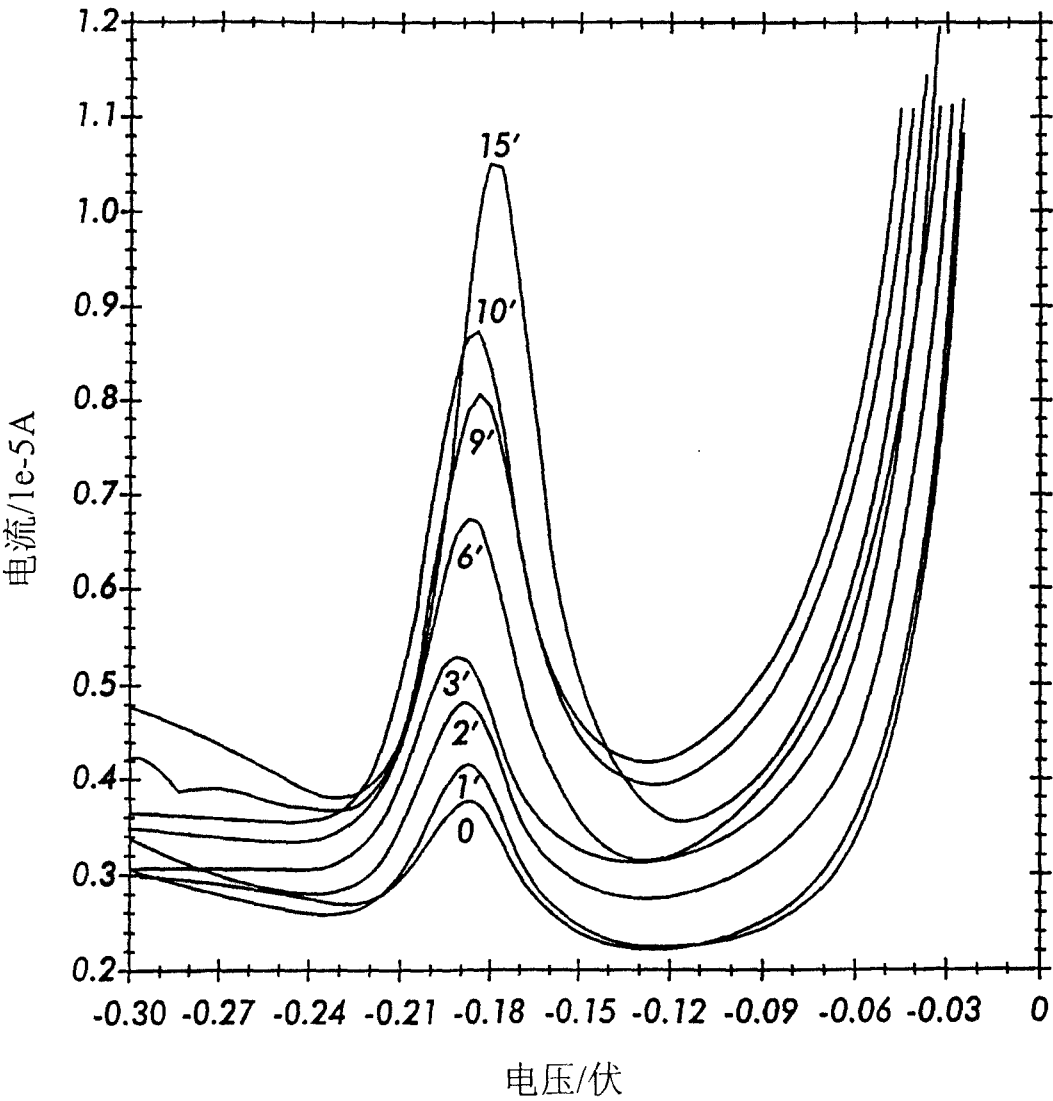


图 6

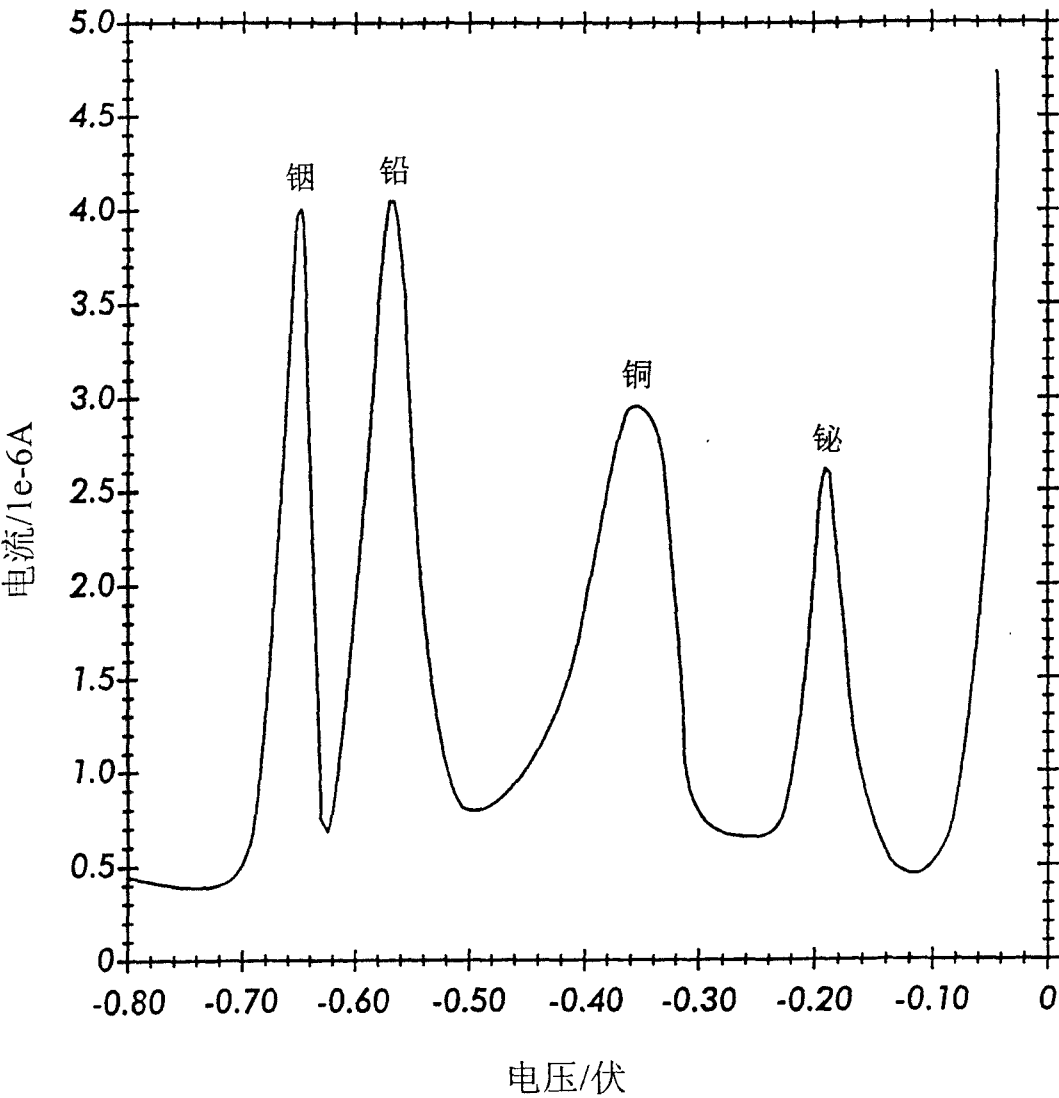


图 7

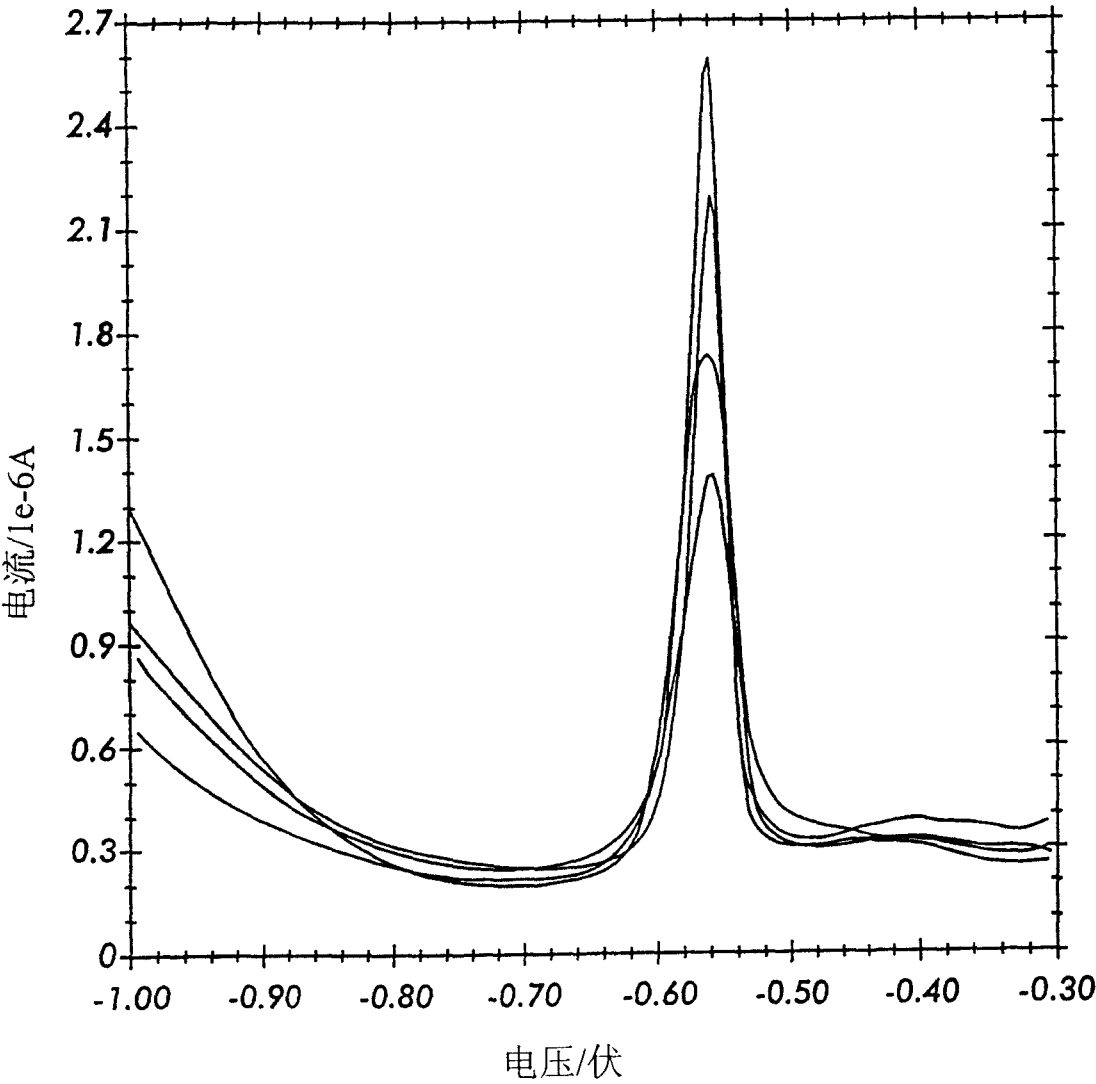


图 8

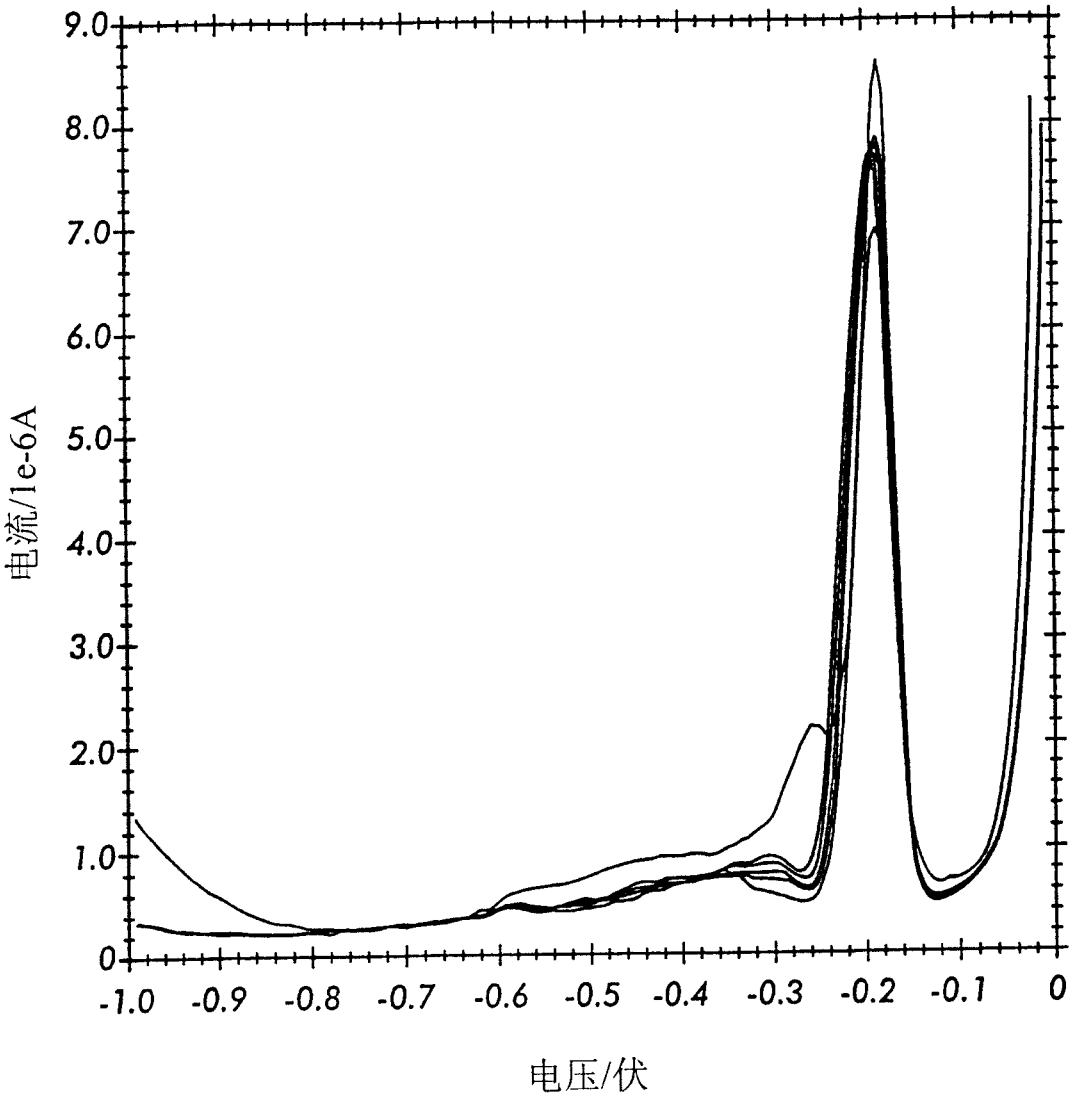


图 9

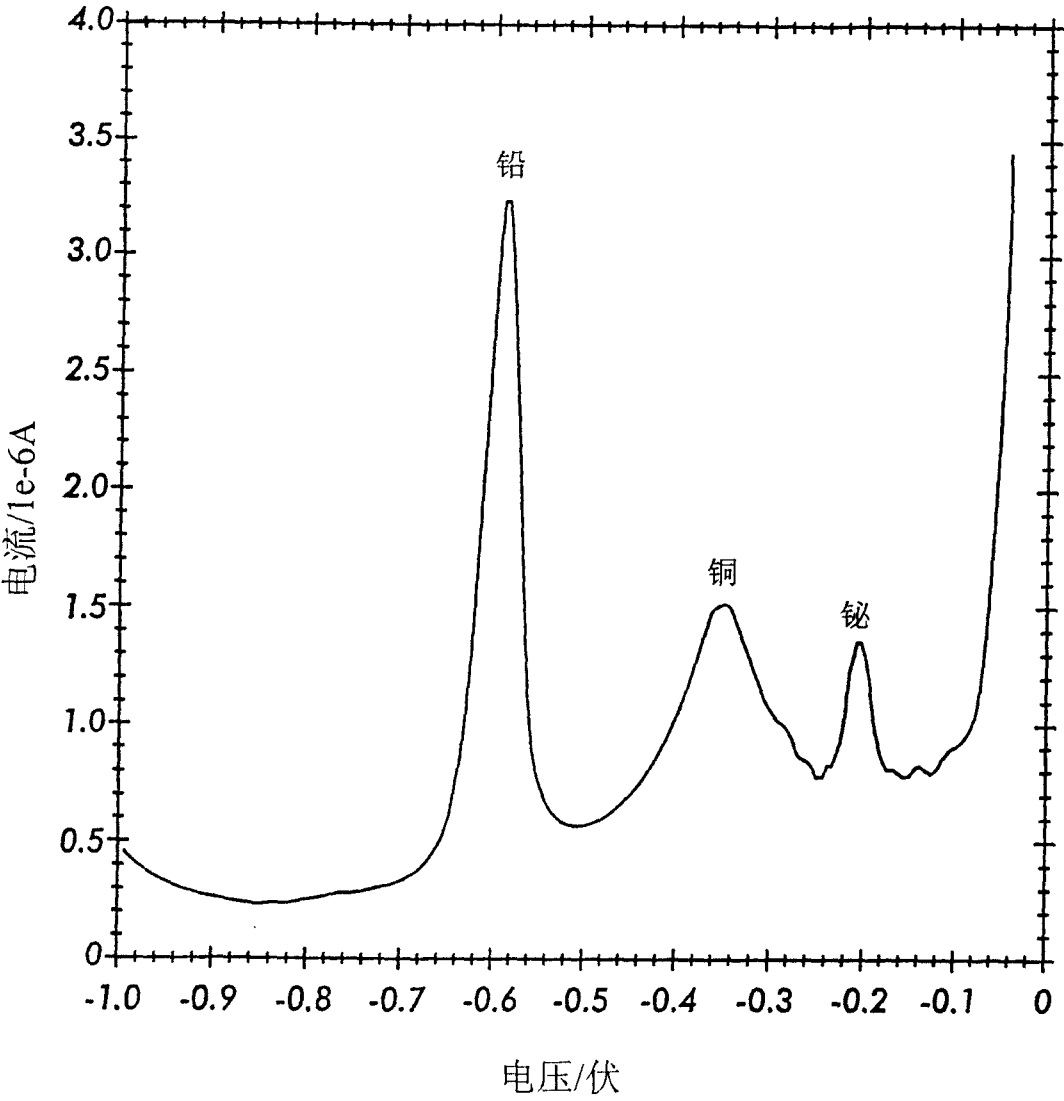


图 10

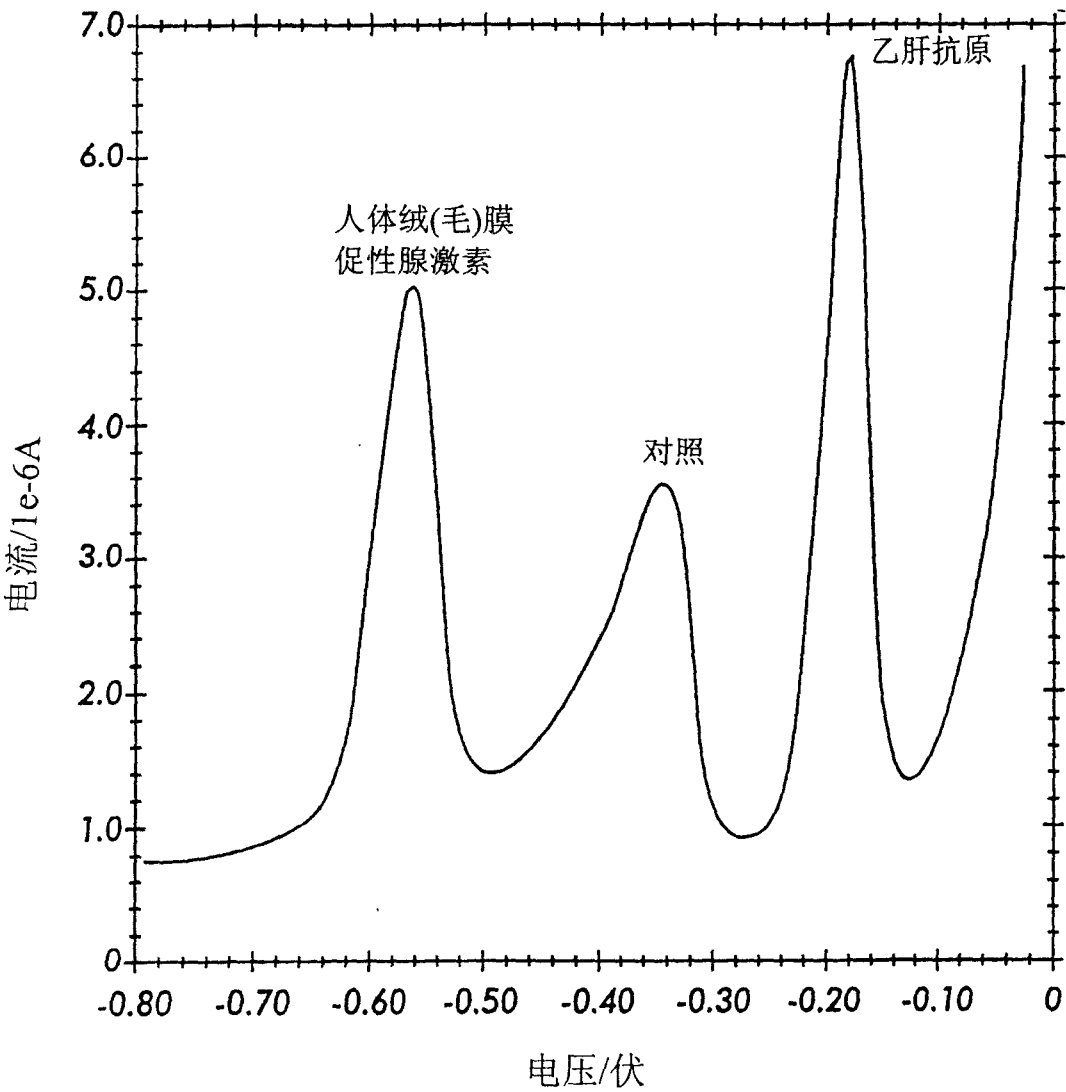


图 11

