



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103201630 B

(45)授权公告日 2016.08.10

(21)申请号 201180052477.9

(22)申请日 2011.08.26

(30)优先权数据

102010043153.2 2010.10.29 DE (续)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.04.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/064686 2011.08.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/055607 DE 2012.05.03

(73)专利权人 恩德莱斯和豪瑟尔测量及调节技术
分析仪表两合公司

地址 德国盖林根

(72)发明人 迈克尔·汉克 安哥拉·奥比施
阿克塞尔·菲库斯

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 张焕生 谢丽娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

(56)对比文件

EP 1347300 A1,2003.09.24, (续)

审查员 陈伟潘

权利要求书3页 说明书29页 附图6页

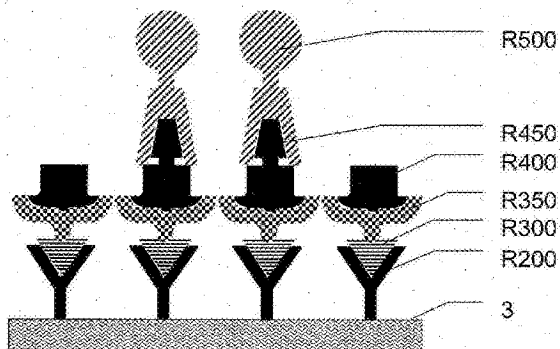
(54)发明名称

利用生物分析仪测定液体样品的被分析物含量的方法

(57)摘要

本发明涉及一种利用生物分析仪自动现场测定液体样品的被分析物含量的方法,所述生物分析仪包含具有至少一个测量导管的微流体系统以及引导一种或多种液体通过所述测量导管的装置,其中所述测量导管具有至少一个基底,所述方法包括用于至少在测量区内执行测量的如下所述的可重复执行的步骤序列:(i)制备具有多个受体的传感器基质,所述受体优选选择性且特异性地、特别是由于亲和相互作用而结合所述被分析物和/或其他靶分子,或引起所述被分析物或所述其他靶分子的化学转化,所述制备包括引导至少第一化学物质的制备溶液通过所述测量导管的步骤,所述第一化学物质包括至少一个结合在所述基底上的官能团以及至少一个其他官能团,其中多个所述第一化学物质经由结合在所述基底上的官能团结合在所述基底上,其中结合在所述基底上的多个所述第一化学物质的其他官能团用作受体或用于随后结合受体;(ii)引导所述液体样品或通过用至少一种试剂处理

所述液体样品而获得的待测量液体通过所述测量导管,其中包含在所述液体样品或所述待测量液体中的被分析物和/或包含在所述液体样品或所述待测量液体中的其他靶分子,优选选择性且特异性地结合在所述受体上,或被所述受体化学转化,并测定与被所述受体结合或转化的靶分子的量或与所述受体结合或转化的被分析物的量相关的测量变量,并从所述测量变量推导出所述液体样品的被分析物含量;以及(iii)再生、特别是清洁所述至少一个基底,其中所述传感器基质以及在给定情况下与所述传感器基质结合的分 子特别是被分析物分子、其他靶分子或其他分 (续)



CN 103201630 B

[接上页]

(30) 优先权数据

102010064392.0 2010.12.30 DE

(56) 对比文件

CN 101446555 A, 2009.06.03,

senkheun choi等. A regenerative biosensing surface in microfluidics using electrochemical desorption of short-chain self-assembled monolayer. 《Microfluid nanofluid》. 2009, 第820、825页, 摘要, 表2.

christie A. Canaria 等. formation and removal of alkythiolate self-assembled monolayers on gold in aqueous solution. 《lab chip》. 2006, 第6卷第293—294页, 摘要.

Seokheun Choi等. Reusable biosensors via in situ electrochemical surface regeneration in microfluidic applications. 《Biosensors and Bioelectronics》. 2009, 第25卷(第2期), 第528—529页, 摘要, 附图1—2.

(57) 摘要

子, 从所述基底释放和/或至少被部分分解。

1. 利用生物分析仪自动现场测定液体样品的被分析物含量的方法, 所述生物分析仪包含具有至少一个测量导管的微流体系统以及引导一种或多种液体通过所述测量导管的装置, 其中所述测量导管具有至少一个第一基底,

所述方法包括用于至少在测量区内做测量的如下所述的重复可执行的步骤序列:

(i) 制备具有多个受体的传感器基质, 所述受体结合所述被分析物和/或其他靶分子, 或引起所述被分析物或所述其他靶分子的化学转化,

所述制备包括引导至少第一化学物质的制备溶液通过所述测量导管的步骤, 所述第一化学物质包括至少一个结合在所述第一基底上的官能团以及至少一个其他官能团, 其中多个所述第一化学物质经由结合在所述第一基底上的官能团结合在所述第一基底上,

其中结合在所述第一基底上的多个所述第一化学物质的其他官能团用于随后结合受体;

其中结合在所述第一基底上的多个第一化学物质形成第一结合层, 并且所述第一化学物质的其他官能团提供用于经由特异性结合在所述其他官能团上随后结合受体的结合位置,

其中所述受体被直接结合或经由一个或多个其他结合层被间接结合在所述第一结合层上;

(ii) 引导所述液体样品或通过用至少一种试剂处理所述液体样品而获得的待测量液体通过所述测量导管, 其中包含在所述液体样品或所述待测量液体中的被分析物和/或包含在所述液体样品或所述待测量液体中的其他靶分子结合在所述受体上或被所述受体化学转化,

并测定与所述受体所结合或转化的靶分子的量相关或与所述受体所结合或转化的被分析物的量相关的测量变量, 并从所述测量变量推导出所述液体样品的被分析物含量; 以及

(iii) 清洁所述第一基底, 其中所述传感器基质以及在给定情况下与所述传感器基质结合的分子, 从所述第一基底释放和至少被部分分解。

2. 如权利要求1所述的方法, 其中结合在所述第一基底上的多个第一化学物质形成第一结合层, 并且所述第一化学物质的其他官能团形成用于随后结合一个或多个其他结合层的结合位置, 其中最上方的结合层提供用于随后结合受体的多个结合位置。

3. 如权利要求1所述的方法, 其中被提供用于随后结合受体的结合位置选自在每种情况下适合于结合多个不同受体的数个结合位置。

4. 如权利要求2或3所述的方法, 其中提供的结合位置包含用于结合生物素的结合位置。

5. 如权利要求2或3所述的方法, 其中提供的结合位置包含免疫球蛋白结合位置。

6. 如权利要求5所述的方法, 其中通过将生物素化的结合免疫球蛋白的分子结合在用于结合生物素的结合位置上提供所述免疫球蛋白结合位置。

7. 如权利要求6所述的方法, 其中用于结合生物素的结合位置是如权利要求5中所述的结合位置。

8. 如权利要求1所述的方法, 其中与所述受体所结合或转化的靶分子的量或者所述受体所结合或转化的被分析物的量相关的测量变量是光学测量变量。

9. 如权利要求1所述的方法,其中用标记物直接或间接标记所述被分析物或所述其他靶分子,所述标记物用于引入用来影响与所述受体所结合或转化的靶分子的量或所述受体所结合或转化的被分析物的量相关的测量变量的特性。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述标记物选自:酶、荧光团和金属或半导电的纳米粒子。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述标记物经由至少一种亲和相互作用被直接或间接地结合在待标记的靶分子上,或者在所述待标记的靶分子结合在所述传感器基质上之后而被结合在所述靶分子上。

12. 如权利要求11所述的方法,其中所述标记物经由至少一种亲和相互作用、利用蛋白质标签而被直接或间接地结合在待标记的靶分子上,或者在所述靶分子结合在所述传感器基质上之后而被结合在所述靶分子上,其中所述蛋白质标签选自在每种情况下可以经由相同的亲和相互作用直接或间接标记的数种标签。

13. 如权利要求12所述的方法,其中所述标签选自高亲和性蛋白质标签。

14. 如权利要求12或13所述的方法,其中所述标签和/或所述待标记的靶分子是重组制造的蛋白质或肽。

15. 如权利要求1所述的方法,其中所述第一基底是导电基底。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述第一基底的清洁,通过在所述第一基底和经由电解质与所述第一基底导电接触的对电极之间产生电流流动来进行,使得清洁所述第一基底。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述对电极实施为第二基底,在该第二基底上结合有结合在所述第一基底上的所述第一化学物质的官能团,并且所述对电极被布置在测量通道中。

18. 如权利要求1所述的方法,其中所述第一基底包含亲硫的导电基底,并且结合在所述第一基底上的所述第一化学物质的官能团包含硫醇或二硫化物基团,其中通过所述硫醇或二硫化物基团的硫原子结合在所述第一基底上来形成所述第一化学物质的层。

19. 如权利要求1所述的方法,其中,当所述受体结合所述被分析物和/或其他靶分子,所述受体选择性且特异性地结合所述被分析物和/或其他靶分子。

20. 如权利要求19所述的方法,其中,所述受体因亲和相互作用而结合所述被分析物和/或其他靶分子。

21. 如权利要求1所述的方法,其中,所述特异性结合特别是至少一个非共价结合。

22. 如权利要求1所述的方法,其中,与所述传感器基质结合的分子是被分析物分子、其他靶分子或其他分子。

23. 如权利要求8所述的方法,其中根据发光测量、反射测量或吸收测量来确定所述光学测量变量。

24. 如权利要求16所述的方法,其中清洁所述第一基底不依赖于所述第一基底的当前占据情况。

25. 如权利要求17所述的方法,其中所述对电极被布置与所述第一基底相对或与所述第一基底共轴放置。

26. 如权利要求11所述的方法,其中所述标记物利用抗体和/或蛋白质标签来结合。

27. 用于执行如权利要求1至26之一所述的方法的生物分析仪,其包含具有至少一个测量导管的微流体系统和用于将液体引导通过所述测量导管的装置,

其中所述测量导管包含至少一个第一基底,在所述第一基底上,至少在测量区内、至少有时布置有具有多个受体的传感器基质,所述受体结合或化学转化液体样品或通过用至少一种试剂处理所述液体样品而获得的待测量液体中存在的靶分子或被分析物,

其中所述生物分析仪包含至少一个信号转换器,该信号转换器根据结合在所述受体上或被所述受体转化的被分析物的量或者根据结合在所述受体上的靶分子的量或被转化的靶分子的量而输出测量信号。

28. 如权利要求27所述的生物分析仪,其中所述第一基底是导电的,对电极被布置在所述微流体系统内并至少在所述清洁期间与所述第一基底导电接触,并且其中所述生物分析仪还包括在所述第一基底与所述对电极之间产生电流流动的装置。

29. 如权利要求28所述的生物分析仪,其中所述对电极被布置在所述测量导管内,与所述第一基底相对放置或与所述第一基底共轴延伸。

30. 把利用亲和生物测定法来测定液体样品的被分析物含量的单次使用的实验室方法适应成在如权利要求27所述的生物分析仪中使用的方法,所述方法包括下列步骤:

(a)选择用于构建一个或多个结合层的适合的结合结构以结合所述亲和生物测定法的受体,并设定所述结合结构的密度;

(b)任选地选择可选的测定方法和/或提供可选的附加靶分子和/或用于直接或间接引入标记的方法;

(c)核查亲和生物测定法的所有组分的相互交叉反应性;

(d)确定所述生物分析仪的适合的方法参数,以使用所述亲和生物测定法来执行测量;

(e)检查并且在给定情况下调整所述生物分析仪的方法参数,以用于执行所述第一基底的再生和相应的清洁;

(f)任选地检查所述液体样品或测量液体的基质效应;以及

(g)产生校准曲线并验证所述方法。

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述亲和生物测定法不用于测定脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。

利用生物分析仪测定液体样品的被分析物含量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用生物分析仪测定液体样品的被分析物含量的方法。

背景技术

[0002] 生物传感器可被细分成基于亲和性的生物传感器和代谢性生物传感器,用于待检测液体样品中包含的预定被分析物的优选选择性和特异性检测各用于浓度测量。在这样的情形中,一大类各式各样的生物传感器包含:受体层,其可以具有固定在表面上的大量受体,所述受体例如抗体、半抗原、DNA、细胞或酶;信号转换器,其输出与结合在所述受体层上的被分析物的量相关的测量信号;以及信号处理系统,其用于放大和/或进一步处理由所述信号转换器输出的测量信号。

[0003] 被分析物可以是液体样品中的待检测物质,所述物质例如为生物化学、生物学或医学系统中待检测的蛋白质、肽、抗体、酶或一些其他物质。然而,被分析物也可以是在环境监测或水质监测的情形中需要检测或测定的细胞、细胞组分或DNA或例如活性成分。

[0004] 在基于亲和性的生物传感器的情形中,在给定情况下,除了被分析物之外,可能还必需使其他物质连接于受体层的受体。优选以高特异性和选择性结合于受体的物质,在这里被统称为靶分子,或者也被称为这样的受体的配体。因此,在给定生物传感器的情况下,被分析物表示受体的靶分子。然而,其他靶分子也可以是不同于真正被分析物的分子,并且,这些分子类似地连接于受体层的受体,并与例如被分析物竞争受体层的结合位置。

[0005] 在代谢性生物传感器的情形中,被分析物和/或其他靶分子在瞬时结合于受体层后发生催化转化,在代谢性生物传感器的情形中所述受体层含有至少一种酶、细胞、细胞组分或其他催化有效的生物分子,它们在给定情况下能够催化转化所述被分析物和另外存在的物质。

[0006] 为了检测液体样品中的被分析物或测定其浓度,将液体样品与受体层进行接触,使得被分析物分子以及在给定情况下存在于液体样品中的其他靶分子连接于受体层或被受体层转化。通过这种方式实现物理和/或化学变化,例如涂层厚度、折射率、光吸收或电荷的变化。可以利用信号转换器来检测和/或定量测定这些变化。用于记录所述变化的适合的信号转换器包括例如光电传感器和测量电流或电压的传感器。也可以用具有例如发光或磁特性的标记物直接或间接标记结合在受体层上的靶分子,或者在靶分子结合到受体层上之后进行直接或间接的后续标记。在这种情况下,光学传感器适合作为用于记录发光的信号转换器,或者磁性传感器适合用于记录磁特性。适合作为标记物的其他物质还包括催化后续化学反应的酶,其中可以用相应的适合的信号转换器来记录所述反应的过程。

[0007] 已知有大量不同的各式各样的生物传感器方法。下面将提及并通过实例简要解释最常用的方法:

[0008] 直接法:被分析物结合在受体层的受体上,并且不存在其他靶分子。在这种方法的改良中,被分析物在结合到受体上之前或之后与一种或多种附加物质(标记物)反应,这一般来说用于直接或间接引入被分析物不具有的物理特性,并因此可以通过测定这种所提

供的物理特性来检测被分析物的结合。因此,在直接法的情形中,被分析物在受体层上的结合被直接检测到,或通过检测与被分析物反应的标记物而被间接检测到。

[0009] 竞争法:一般来说,向待检测被分析物含量的液体样品添加已知浓度或活性的其他靶分子(竞争物),然后将如此获得的待测量液体施加到受体层。在这样的情况下,在被分析物与竞争物之间存在对在受体层的受体上的结合的竞争。一般来说,竞争物具有标记物,这继而直接或间接地向系统中引入可以被检测到的物理特性。因此,在竞争法的情形中,竞争物在受体层上的结合被直接检测到,或通过检测竞争物的标记物而被间接检测到。然后可以从测量信号推导出液体样品的原始被分析物浓度。

[0010] 结合抑制试验:向待检测被分析物含量的液体样品添加已知浓度或活性的与被分析物结合的互补分子。随后,将如此形成的测量液体引导到具有受体的受体层上,所述受体结合游离的互补分子,但不与被分析物结合。可以利用适合的方法直接检测这种结合。可选地,互补分子在结合到受体上之前或之后或与被分析物结合之前或之后,可以与标记物直接或间接反应。因此,在结合抑制试验的情形中,直接检测互补分子在受体上的结合,或者直接或间接检测互补分子上的标记物。然后,可以从测量信号推导出液体样品的被分析物浓度。

[0011] 为了制备受体层,将受体固定在固体载体材料上,即与固体载体材料结合。这可以通过例如受体在载体材料即所谓的基底的表面上的非特异性吸附来进行。然而,受体的共价键合或经由大量其他结合层的结合,也是用于制备受体层的已建立的方法。因此,例如,可以将链霉亲和素共价键合于固体载体表面上,并且为了制备受体层,利用生物素与链霉亲和素之间的亲和相互作用将生物素偶联的抗体连接在链霉亲和素结合层上。一般来说,人们将构建在固体载体材料表面上的整个层系统称为生物传感器的“传感器基质”,其中最后一层是受体层。

[0012] 在许多应用中,将具有受体层的传感器基质施加于被集成在微流体系统中的生物芯片上。一般来说,这些生物芯片是单次使用的产品,其在单次执行被分析物的测定或浓度测量后被丢弃,相应地用新的生物芯片更换。此外,在代谢性生物传感器的情形中,含有传感器基质的芯片或筒盒也必须定期更换。其中的原因是生物受体的稳定性和稳健性一般来说低,并且靶分子与受体结合的亲和性通常高。因此,一般来说,使结合在受体上的靶分子从受体脱离的条件,也伴有受体层或多或少的破坏。从相关技术文献只能了解到很少的特殊情况在其中描述了受体层的这种再生,即在保持受体层的功能性基本上不变的同时几乎完全移除靶分子。然而,根据现有技术状态,这对于绝大多数生物传感器、特别是用于测定蛋白质的生物传感器来说是不可能的。

[0013] 其中使用带有受体层的单次使用芯片的自动或半自动生物分析仪是已知的。因此,例如在欧洲专利EP1343011B1中,描述了一种用于核苷酸序列的电化学检测的装置。这种装置具有用于导入液体样品的可更换的分析盒,优选实施为单次使用的部件。所述盒具有带有受体层的测量电极,核苷酸序列选择性且特异性地结合在所述受体层上。所述分析盒可以经由模拟接口与计算系统相连,其中可以利用所述计算系统来执行核苷酸序列的电化学检测。

[0014] 相反,为了将生物传感器、特别是基于亲和性的生物传感器应用于过程测量技术,例如用于自动监测工业工厂中的生物技术过程或用于自动监测例如水中的药物残留或内

分泌活性物质的含量,希望能够一个接一个地执行多个测量,而不需每个测量都更换或调换芯片或含有传感器基质的其他部件。对于这样的测量任务来说,生物传感器的一种可能应用可以是生物分析仪,待监测的过程介质的液体样品被特别是在线地供应给所述生物分析仪。任选地,可以用执行上面描述的方法的试剂例如用其他靶分子、标记物等,优选自动地对液体样品进行预处理。生物分析仪还包括:受体层,液体样品或通过预处理获得的待测量液体被供应给所述受体层;信号转换器,其输出与结合在受体层上的被分析物或靶分子的数量相关的测量信号;以及信号处理系统,其进一步处理测量信号并输出测量值,特别是从测量信号推导出的测量值。在自动或半自动分析仪中,可以利用泵装置、气动系统或其他液体运输系统来执行样品和在给定情况下的试剂向受体层的供应,以及液体样品或待测量液体在蒸发测量后的排出。为了维持所需试剂量以及蒸发分析后待废弃的液体体积,用于样品和在给定情况下的试剂的小的供应和排出管线应该具有尽可能小的横截面,例如在亚毫米范围内。这样的具有在亚毫米范围内的横截面的液体管线,在后文中也被称为微流体管道。具有这样的微流体管道的生物分析仪模块,也被称为微流体单元。

[0015] 为了将用于这些目的的生物分析仪的维护工作降至最低,或者为了提高自动化程度,对适合于一个接一个地执行多个测量并且其中传感器基质及其相应的受体层可以在现场、以高的可重复性被基本上完全再生或更新的生物传感器,存在着需求。

[0016] 关于如何能够使生物传感器的传感器基质或受体层再生,从文献中已知有不同的方法。在这样的情况下,通常改变溶剂以便引起受体与靶分子之间的结合的解开。为此,通常改变溶液的pH值。此外,也常常进行离子强度或溶剂极性的改变或添加特异性作用物质,以便实现受体层的再生。然而,这些方法的缺点在于,为了能够多次再生受体层,对于每种受体-靶分子相互作用来说,必须在复杂的试验运行中确定最佳再生效率与受体的最小破坏之间的最适折衷。根据这些方法,受体或受体层的更新是不可能的。

[0017] A.T. Tüdös, E.R. Lucas-van-den Bos, E.C.A. Stigter, “脱氧雪腐镰刀菌烯醇的基于表面等离子体共振的快速抑制测定法”(Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(2003), 5843-5848, 描述了这样的一种受体层再生方法,所述受体层使用半抗原作为特别小且稳健的受体。宣称了在499和717个之间的再生循环。对于免疫测定法来说,在受体是蛋白质的情况下,没有已知的受体层可以类似地成功进行多次再生。

[0018] 从EP2189793A1了解到,为了从相应受体层的受体移除靶分子,可以使用选择性分解与受体相连的靶分子的酶。然而,在这样的情况下,必须注意所使用的酶不会同等地攻击受体,这强烈限制了应用这种技术的能力。由于结合的靶分子的这种酶性分解的化学特性,在多次执行方法后维持所述受体的密度显得极为不可能。

[0019] 用于再生生物传感器的受体层的另一种方法包括经由寡核苷酸、因此经由短的DNA或RNA分子来结合受体。为此,将寡核苷酸共价键合到表面,并将形成用于结合受体的相应结合层的受体或分子与互补的寡核苷酸偶联。互补寡核苷酸之间的特异性亲和相互作用导致受体固定在表面上,并由此导致形成受体层。互补寡核苷酸之间的亲和相互作用可以通过化学方法或通过提高温度来移除,以便从表面释放受体。然而,在蛋白质存在下,例如在存在作为受体的抗体的情况下,这种方法一般是不可执行的,这是由于在面对升高至超过40°C的温度时或者在释放所需的试剂存在下,蛋白质一般来说会变性。在这样的情况下,

特别是在蛋白质含量高的情况下、在蛋白质变性的情况下,可能形成难以溶解的蛋白质聚集物,在不使用攻击性化学清洁的情况下,所述蛋白质聚集物只能被不完全地移除,并且,所述蛋白质聚集物通过粘着并积聚到例如液体供应和排出系统的液体管线,可以极为麻烦地影响自动或半自动生物分析仪的功能。当结合在受体层上的分子彼此桥接或交联时,情况也是如此。在这种情况下,也必须使用攻击性化学条件来释放这些桥接或交联的分子。此外,在面对移除蛋白质聚集物所需的攻击性化学条件时,表面键合的寡核苷酸也不再稳定。

[0020] 此外,从文献中了解到第一类用于电化学移除结构简单的生物层的方法。与使用纯化学手段例如通过酸、碱溶液或溶剂来化学移除传感器基质、相应的受体层相比,在电化学移除受体层的情形中,实现了经由带有受体层的基底的电流流动,这导致受体层、相应的传感器基质的氧化或还原释放(解吸附)。

[0021] 因此,例如在Seokheun Choi,Junseok Chae,“微流体应用中经由现场电化学表面再生的可重复使用的生物传感器”(Reusable biosensors via in situ electrochemical surface regeneration in microfluidic applications),*Biosensors and Bioelectronics*25(2009)527-531,Seokheun Choi,Junseok Chae,“微流体装置中使用短链自组装单层的电化学解吸附的再生性生物传感表面”(A regenerative biosensing surface in microfluidics using electrochemical desorption of short-chain self-assembled monolayer),*Microfluidics and Nanofluidics*7(2009)819-827或Christie A.Canaria等,“在水性溶液中烷基硫醇盐自组装单层在金上的形成和移除”(Formation and removal of alkylthiolate self-assembled monolayers on gold in aqueous solutions),*Lab on a Chip*6(2006)289-295几篇文章中,描述了利用烷基硫醇作为结合分子将受体施加在金表面上以便通过这种方式提供受体层的方法。在这些文章中还描述了与如何移除被用作结合分子的烷基硫醇这一问题相关的调查。在这样的情况下,特别是通过已释放的烷基硫醇的重新吸附和由烷基硫醇的电化学分解引起的氢产生而出现了问题。此外,在重复制备和移除层的情形中,观察到存在表面占据情况的连续漂移,这表明移除不完全。在引述的文章中都没有探索在受体层占据情况不同的情况下清洁效力是否相等。然而,这对于在用于过程测量技术的自动生物分析仪中的应用来说是必不可少的,这是由于生物传感器测量一般来说基于一个或多个参比测量来进行,在所述参比测量的情形中受体层的占据一般来说发生得不完全或几乎完全。特别是在SPR测量的情况下,正如文章中所描述的,参比测量的质量对于测量结果的质量起到决定性的重要作用。因此,例如在Seokheun Choi,Junseok Chae,“微流体应用中经由现场电化学表面再生的可重复使用的生物传感器”(Reusable biosensors via in situ electrochemical surface regeneration in microfluidic applications),*Biosensors and Bioelectronics*25(2009)527-531的情形中,不应假定在受体层上结合有大量纤维蛋白原的情况下(图3c)清洁效力与受体层上仅结合有很少纤维蛋白原的情况下相同。

[0022] 对于生物传感器在过程测量技术中的自动或半自动应用来说,重要的是顺序执行的浓度测定能够产生彼此相当的测量结果。因此,需要一种即使在受体层多次再生或更新后,例如在50、100或更多个再生或更新循环后,也能对相等的靶分子浓度产生基本上相等的测量信号、即强度相当的测量信号的系统,特别是在测量信号相对于参比测量而言的情况下。

[0023] 此外,对于自动或半自动工作的生物分析仪来说,希望的是,可以以简单的方式将多个不同受体固定在生物分析仪的信号转换器可接近的测量区中,使得在直接法中检测被分析物或在竞争法或结合抑制试验中检测另一种靶分子。对于这样的生物分析仪的制造来说,为了自动执行多种不同的测定法和相应的分析方法,有利的是提供可以在其中执行多种不同方法的基本上通用的基础结构(例如带有用于使液体样品和试剂通过测量区的某种液体导管结构的微流体单元)。

发明内容

[0024] 因此,本发明的目的是提供适合应用于过程测量技术、利用上述类型的生物分析仪测定液体样品中的被分析物含量的方法,并相应地提供适合用于执行这种方法的生物分析仪。

[0025] 这个目的通过利用生物分析仪自动现场测定液体样品的被分析物含量的方法来实现,所述生物分析仪包含具有至少一个测量导管的微流体系统以及引导一种或多种液体通过所述测量导管的装置,其中所述测量导管具有至少一个基底,

[0026] 所述方法包括用于至少在测量区内执行测量的如下所述的可重复执行的步骤:

[0027] (i)制备具有多个受体的传感器基质,所述受体优选选择性且特异性地、特别是由于亲和相互作用而结合所述被分析物和/或其他靶分子,或引起所述被分析物或所述其他靶分子的化学转化,

[0028] 所述制备包括引导至少第一化学物质的制备溶液通过所述测量导管的步骤,所述第一化学物质包括至少一个结合在所述基底上的官能团以及至少一个其他官能团,其中多个所述第一化学物质经由结合在所述基底上的官能团结合在所述基底上,

[0029] 其中结合在所述基底上的多个所述第一化学物质的其他官能团用作受体或用于随后结合受体;

[0030] (ii)引导所述液体样品或通过用至少一种试剂处理所述液体样品而获得的待测量液体通过所述测量导管,其中包含在所述液体样品或所述待测量液体中的被分析物和/或包含在所述液体样品或所述待测量液体中的其他靶分子,优选选择性且特异性地结合在所述受体上,或被所述受体化学转化,

[0031] 并测定与被所述受体结合或转化的靶分子的量或与被所述受体结合或转化的被分析物的量相关的测量变量,并从所述测量变量推导出所述液体样品的被分析物含量;以及

[0032] (iii)再生并相应地清洁所述至少一个基底。

[0033] 其他有利的发展和实施方式被描述在从属权利要求中。

[0034] 特别是可以将所述至少一个基底再生,其中所述传感器基质以及在给定情况下与所述传感器基质结合的分子特别是被分析物分子、其他靶分子或结合在所述传感器基质上的其他物质,基本上完全从所述基底释放和/或至少被部分分解。通过这种方式,所述至少一个基底可以被完全或基本上完全清洁,即至少被充分清洁,使得留在所述基底上的所述传感器基质的残留组分和可能结合在所述传感器基质上的物质仅有非常少的量,以致在重复所述步骤(i)-(iii)的情况下,即在新制备所述传感器基质、新引导新的液体样品的情况下以及在新再生所述基底的情况下,不产生明显的影响,特别是对测量的准确性不产生明

显影响。

[0035] 步骤(i)-(iii)的序列在下文中也被简称为“测量循环”。由于通过移除传感器基质和可能与所述传感器基质结合的分子,并随后重新制备所述传感器基质来将基底定期再生并相应地重新清洁,因此,出于维护目的而更换基底或伸入到生物分析仪的其他机械装置、特别是伸入到其中执行所描述的方法的测量导管中的其他机械装置,不是必需的。因此,液体样品的分析可以被完全自动地执行,一个接一个地执行大量测量循环。由于基底被完全或基本上完全清洁,因此确保了在顺序测量循环中,传感器基质具有基本上相当的特点,这确保了在不同测量循环中获得的测量结果和相应的分析结果具有非常良好的可比性。

[0036] 至少可以在预定的测量区内执行测量,所述测量特别包括步骤(ii)的引导所述液体样品或所述待测量液体通过所述测量导管,并测定与被所述受体结合或转化的靶分子的数量或与被所述受体结合或转化的被分析物的量相关的测量变量。测量区是测量导管表面的一部分。基底被至少部分布置在测量区中,然而,它也可以延伸到测量导管内或微流体系统的其他液体管道内的测量区之外。

[0037] 使用本发明的方法,其上结合靶分子特别是被分析物的受体,经由第一化学物质而结合在基底上。在这样的情况下,受体可以由第一化学物质的其他官能团形成。在这种情况下,通过将第一化学物质固定在基底上,在单一制备步骤中形成了受体层。于是,传感器基质仅由受体层构成。如果官能团形式的受体不是第一化学物质的直接组分,那么其他官能团可用于结合受体。在这种情况下,第一化学物质结合在基底上形成第一结合层,受体继而可以通过例如特异性结合在其他官能团上,而被直接结合或经由一个或多个其他结合层被结合在所述第一结合层上。在每种情况下,可以通过使含有在每种情况下结合在最上方的结合层上、用于形成附加结合层的其他化学物质的附加制备溶液流过,来顺序形成一个或多个附加结合层。通过这种方式,传感器基质由一个或多个结合层以及结合在最上方的结合层上的最终受体层形成。由第一化学物质形成的最下方结合层和每个其他结合层,优选通过特异性亲和相互作用、例如经由生物素-链霉亲和素结合或抗体与其抗原之间的结合,而被结合在每种情况下形成位于下方的层的化学物质的结合位置上。此外,受体也优选经由特异性亲和相互作用而被结合在最上方的结合层上。施加附加结合层,即经由第二化学物质和可能的其他化学物质将受体间接结合在第一化学物质上,提供了可以如下实施的优点,即在给定的结合层系统上,可以将大量不同的受体制备成受体层,但是其中所有受体相对于它们的结合使用相同的官能团,使得不需要对结合层和受体进行匹配。

[0038] 在步骤(iii)中进行基底再生之前,可以将步骤(ii)重复一次或多次,所述步骤(ii)包括引导并分析所述液体样品或通过用试剂处理例如混合所述液体样品而产生的待测量液体。

[0039] 通过重复执行方法步骤(i)至(iii)的序列,受体层以及相应的传感器基质总是可以现场、即在没有伸入到测量导管中的机械装置的情况下被重新重构在相同基底上,并因此可以以自动方式确定一个接一个供应到生物分析仪的液体样品的被分析物含量。优选情况下,方法步骤(i)至(iii)可以被执行至少50次,优选至少150次,更优选至少300次。

[0040] 术语“官能团”一般是指决定性地确定带有它们的化合物的材料特性和反应行为的原子团。在这里以及下文中,官能团的概念还包括:能够形成与其他化学物质的优选特异

性的结合相互作用的原子团或分子区；以及结合在化学物质上的标记物、特别是分子，例如由分子、肽、蛋白质或蛋白质标签形成的标记物。例如，结合在烷基硫醇上并用作用于受体-靶分子结合的结合配偶体的生物素分子，形成所述烷基硫醇的第一官能团。所述烷基硫醇的硫醇基形成第二官能团。

[0041] 结合在基底上的第一化学物质的官能团优选与基底材料匹配。基底可以是例如金属或者可以包含至少一个金属涂层。

[0042] 在这里，术语“受体”是指如上所定义的官能团，互补分子、也称为靶分子优选选择性且特异性地、特别是由于亲和相互作用而结合在所述受体上，或者其他化学物质被所述受体酶催化转化。在这样的情况下，不一定必须涉及生物学意义上的受体例如抗体。

[0043] 许多不同方法可用于测定液体样品的被分析物含量。例如，可以将被分析物作为靶分子直接结合在受体层上(直接法)。也可以将被分析物和不同于所述被分析物的靶分子结合在受体层上，以便记录与结合在受体层上的靶分子的数量相关的测量变量，并从所述测量变量确定被分析物浓度(竞争法)。还可以将待测量液体在引导通过测量导管之前与预处理溶液混合，其中所述预处理溶液含有已知浓度的被分析物反应配偶体，然后再将混合物引导通过测量导管。在这种情况下，未与被分析物分子结合的剩余反应配偶体用作靶分子，其中从结合在受体表面上的靶分子的数量，可以推导出所测量溶液中被分析物的浓度(结合抑制试验)。

[0044] 术语“测定被分析物含量”是指被分析物的纯定性检测、一定样品体积的待测量液体中被分析物级分的半定量测定、或甚至是待测量液体中被分析物的定量浓度测定或活性测定。

[0045] 优选情况下，根据这里和下文中描述的方法测定被分析物含量，不用于测定脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。

[0046] 在这里以及下文中，术语“化学物质”特别是指分子、复合体、生物分子聚集体或微生物。分子可以包括例如酶、肽、蛋白质或DNA。复合体的实例是蛋白复合体，其也被称为蛋白聚集体。微生物可以包括特别是细胞，例如酵母细胞。

[0047] 在有利实施方式中，基底是导电的。在这样的情况下，它可以是例如测量导管的导电表面区域，其可以实施为例如在测量导管壁上的金属膜。基底可以包含例如具有高亲硫特性的化学上稳定的金属，特别是诸如金或铂的金属。在这种情况下，官能团在基底上的结合可以包括硫原子键合、特别是共价地键合于基底。特别适合于此的是硫醇或二硫化物基团。

[0048] 第一化学物质的实例包括硫醇，特别是烷基硫醇和聚乙二醇硫醇。本领域的技术人员已知这样的分子可以作为生物化学分子、特别是生物传感器的受体的结合分子，即所谓的连接物(比照上面引用的文章)。使用硫醇基结合表面作为基底，烷基硫醇在基底例如金或铂基底与硫醇基的硫原子之间形成共价键，并通常在表面上形成自我组织化的单层，也称为自组装单层或简称SAM。然而，这样的SAM的形成对于构建传感器基质以及相应的受体层来说不是绝对需要的。

[0049] 这里以及下文中描述的方法优选自动进行，其中包含电子数据处理单元例如微型计算机的控制单元控制引导液体通过测量导管和记录测量值。用于引导液体的装置可以包括特别是泵例如注射泵或气动装置。从生物分析仪的适合于记录测量变量的信号转换器输

出的测量信号可以被控制单元转化成数字信号,并可以从所述数字信号形成测量变量的测量值。

[0050] 可以使用纯化学手段来进行基底的再生,例如通过将含有过氧化物的氢氧化钠溶液引导通过测量导管以溶解传感器基质。

[0051] 基底的再生和相应的清洁,也可以通过在基底和经由电解质与基底导电接触的对电极之间产生电流流动来进行,以便特别是基本上不依赖于基底被传感器基质以及在给定情况下与所述传感器基质结合的其他物质的当前占据情况而清洁基底。因此,为了移除传感器基质,在基底与对电极之间产生电流流动,以便实现基底的清洁,这意味着完全或几乎完全移除和/或至少部分分解传感器基质和可能与所述传感器基质结合的物质。

[0052] 如果用于制备所述层的物质之一含有位于其下方的层的物质或形成随后层的物质的大于一个的结合位置,那么在各个层具有高覆盖度的情形中,可以在分子水平上发生共价或非共价键合联结,从而形成交联网络。在这些情况下,通过溶解层结构来移除受体层以及使用纯化学手段例如通过酸、氧化剂或有机溶剂来清洁基底,通常是不完全的,或者只能在损坏基底的情况下实现。然而已发现,通过在基底例如测量导管的导电表面区域的形式基底和经由电解质与基底导电接触的对电极之间产生电流流动来电化学溶解层结构,引起了全部层结构的尽可能完全的释放和基底的清洁。特别是,当在表面上产生的电流流动足以电解产生氧或氢或可选地氧和氢时,可以实现导电表面的尽可能完全的清洁(电化学清洁)。有利的是,对电化学清洁进行优化,使得传感器基质和与所述传感器基质结合分子或其他化学物质的释放,与传感器基质的至少部分分解一起发生。

[0053] 在基底与对电极之间产生电流流动的步骤,可以被特别执行成使得通过电解在基底和/或对电极上形成氢和/或氧。通过这种方式,在每种情况下,由电流流动和产生的氢或氧实现的受体层以及相应的传感器基质的氧化和相应的还原的清洁作用,还被进一步扩大。与此相反,在上面引述的Seokhun Choi等的文章中,在清洁期间,在含有氯化物的溶液例如磷酸盐氯化钠溶液存在下执行层的氧化吸附,这排除了更高电势以及与其相关的传感器基质的氧化分解的应用,因为否则的话,在正电势的情况下由此形成的金氯络合物将引起金表面的破坏。然而,如果避免了氯化物和/或氰化物的存在,则电化学清洁可以在更高以及相应的更低电势下,以氧化以及还原两种方式执行,从而进一步提高清洁效力。特别是可以在基底上建立交替的氧化和还原条件。优选情况下,在电流流动期间,基底与对电极之间的导电接触由电解质引起,所述电解质含有浓度低于150mmol/l、优选低于15mmol/l、更优选低于1.5mmol/l的氰离子和/或卤素离子,特别是当基底包含金膜或铂膜时。

[0054] 因此,在方法实施方式的情形中,在通过电解在基底上形成氢和/或氧的情况下,可以获得非常高的清洁效力,其在超过50个测量循环中保持相等,并且在每种情况下,随后以高的可重复性在现场重新重建传感器基质。在内部调查中显示,在这样的情况下,由层序列烷基硫醇-PEG-生物素-中性亲和素(NeutrAvidin)构成的桥接蛋白质层结构和由层序列烷基硫醇-PEG-生物素-中性亲和素-BSA-生物素-中性亲和素-BSA-生物素-中性亲和素构成的高度交联蛋白质层结构两者能够被重复地并以相等尺度被移除,并且在每种情况下,在移除层结构后随后实施的传感器基质与在比较实验中在新的非再生基底上构建的传感器基质具有相同的特性。

[0055] 对电极可以被布置在位于测量导管内,特别是与基底相对。因此,对电极可以是例

如化学上非常惰性的材料,并优选以膜的形式被施加。这样的惰性电极材料由例如掺杂硼的金刚石样碳层形成。这样的电极被用在例如水处理中,并在那里用于电解产生羟基游离基以分解有机残留物。

[0056] 对电极可以类似地作为另一个基底实施在测量导管中,特别是与基底相对放置,在所述另一个基底上结合有结合在基底上的第一化学物质的官能团。例如,基底以及对电极两者可以包含结合硫醇基或二硫化物基团的导电材料。基底和用作另一个基底的电极可以例如作为金膜或铂膜形成在测量导管的相对放置的壁上。通过这种方式,在步骤(i)的执行中,将具有大量受体的传感器基质形成在基底以及对电极两者上。在步骤(ii)的执行中,液体样品中或待测量液体中包含的被分析物和/或其他靶分子优选选择性且特异性地结合在形成在基底上和附加基底上的传感器基质的受体上,或者被它们化学转化。可以测定与被两个传感器基质的受体结合或转化的被分析物的量或与两个传感器基质的受体结合的靶分子的数量相关的测量变量。这是特别有利的,这是因为由此增大了可有效使用的基底表面,由于测量信号相应增大,这对测量的准确性具有积极影响。步骤(iii)的再生起到清洁两种基底的作用。

[0057] 为了控制传感器基质的电化学氧化和/或还原性移除,在基底与对电极之间产生电流流动期间,可以相对于经由电解质、特别是利用电解质桥与基底电解接触的参比电极的参比电势来设定、特别是控制基底的电势。可以通过生物分析仪的控制单元来进行所述控制。通过使用参比电极来调节或控制基底以及相应的对电极的电势,可以防止在被连接作为工作电极的基底上和/或在电极上出现过大的正或负电势,因为否则的话,基底以及相应的对电极可能受到攻击或甚至损坏。术语“电解接触”是指经由电解质、特别是含有离子的水性溶液而离子传导性接触。优选情况下,包含无隔膜的电质桥。相反,在上面引述的Seokheun Choi等的文章中,利用双电极电路进行受体层的还原性移除。由于不存在参比电极,因此不能检查在两个电极上实际得到的电势。通过这种方式,依赖于微流体系统中起支配作用的条件以及电解质浓度和组成,可能在基底上或对电极上产生过大的正电势或负电势。这些大的电势在重复出现时,能够引起电极功能的破坏。不管怎样,这使本文公开的发明的目的不能实现。

[0058] 参比电极可以实施为与测量导管相连的附加液体导管的导电涂层。作为参比电极,也可以使用金属丝特别是铂丝或金丝形式的无电流操作的假参比电极,其可以被布置在测量导管或与测量导管相连的附加液体导管中。如果在测量循环期间假参比电极被所使用的试剂占据,那么假参比电极同样被再生或清洁。

[0059] 相对于参比电极的参比电势,用作工作电极的基底的电势可以在最小值与最大值之间连续或不连续地、特别是线性地变化,以便通过电化学清洁、特别是使用氧和相应的氢的产生来重新清洁基底。优选情况下,电势在最大值与最小值之间来回、特别是线性地移动多次,特别是在2和1000次之间。类似地,过程持续时间以及清洁持续时间可以在广泛限度内变化,并根据清洁结果进行变化或设定。为此,生物分析仪的控制单元可以为服务人员提供相应的输入设备或用于加载预定过程参数的装置。任选地,在产生电流流动期间或之后或之间,可以记录基底上出现的电流水平,以便获得一个或多个循环伏安图,从图中可以推导出导电表面区段的状态。此外,也可以使用可选分析方法例如光学、电压测量或其他电化学分析方法来评估基底的状态。

[0060] 可选地,在基底与对电极之间产生的电流流动的电流水平,也可以在最小值与最大值之间连续或不连续地变化,以便通过电化学清洁来重新清洁基底。在这样的情况下,在基底与参比电极之间建立的电势差不能低于最小值,也不能超过最大值,以避免损坏基底。

[0061] 如果对电极类似地用作基底,则这里为被连接作为工作电极的基底所给出的所有数据和条件,同样适用于对电极。

[0062] 在基底与对电极之间产生电流流动的步骤之前、期间或之后,可以将一种或多种清洁和/或辅助液体引导通过测量导管。在基底与对电极之间产生电流流动之前或之后被引导通过的清洁液体,主要用于基底的化学清洁。适合作为清洁液体的是例如酸或碱溶液或溶剂。用作辅助液体的是例如电解质溶液,其有利地支持导电基底上的电化学过程(例如 Na_2SO_4 溶液或添加 H_2O_2)。在电流流动期间被引导通过测量导管的辅助或清洁液体,用于支持电化学清洁。在电流流动期间,特别有利的是酸性并且在给定情况下含有增补的过氧化氢的电解质溶液。施加的电解质在电极上所施加的电势下不应分解或反应。在这里,相应的所谓的导电盐是已知的。酸性磷酸盐缓冲液极其适合于使所添加的过氧化物在储存期间的无电流分解最小化。

[0063] 优选情况下,电解质和/或辅助液体在电流流动期间被连续或不连续地引导通过微流体测量导管。通过这种方式,可以防止所需辅助试剂的耗尽或电解产生的反应性物质的富集,这对基底表面的寿命有正面影响。此外,传感器基质的分解产物以及由电解形成的气泡从基底表面的区域被移除,这有助于更快速且安全的清洁。

[0064] 在基底与对电极之间产生电流流动期间,可以将例如酸性磷酸盐缓冲溶液作为辅助液体引导通过测量导管。相对于银/氯化银参比电极的电势,铂基底的电势在 -0.5V 至 -1.25V 范围内的负值(还原,在给定情况下伴有氢的形成)与 $+1.5\text{V}$ 至 $+2.25\text{V}$ 范围内的正值(氧化,在给定条件下伴有氧的形成)之间变化的情况下,这样的辅助液体对支持电化学清洁来说是有利的。

[0065] 在基底再生期间或再生之后,可以检查基底上传感器基质的残留组分,特别是利用电化学测量方法例如循环伏安法或阻抗谱法、光学测量方法例如椭圆偏光法或吸附试验进行检查。特别有利的是,为了评估和/或控制再生以及相应的再生效率,可以将再生期间的电流水平考虑在内。在吸附试验的情况下,将结合在基底上的传感器基质的残留组分上的物质引导通过测量导管,然后确定吸附的物质的量。所述检查也可用于控制再生。

[0066] 辅助液体还可以包括例如光化学或电化学产生的臭氧,臭氧由于其强氧化效果而被考虑用于传感器基质的有效分解。此外,也可以使用有效分解传感器基质的其他化学物质或物理方法。在这种情况下,不需要提供电流流动,因此也不需要基底是导电的。

[0067] 如果选择不导电的、特别是非亲硫的材料作为基底,并且第一化学物质以经由含硫官能团结合之外的其他方式结合在基底上,则可以使用纯化学手段来实现基底的再生以及相应的清洁。例如,基底可以是玻璃,在包含(三烷氧基)甲硅烷基团作为用于结合在玻璃基底上的第一官能团的第一化学物质的协助下,在所述玻璃上制备用于构建传感器基质的第一结合层。在这种情况下,为了再生基底并相应地移除传感器基质,可以使用例如含70体积%硫酸和30体积%过氧化氢溶液(30%的水溶液)的溶液。

[0068] 这里描述的用于清洁基底的所有方法的共同之处在于,不单只存在结合在受体上的被分析物、相应的被分析物分子或可能结合在受体层的受体上的其他靶分子或其他物质

的释放,同样地也不单只存在传感器基质从基底上的释放。相反,优选同时存在传感器基质组分以及在给定情况下被所述传感器基质结合的其他分子的分解。通过这种方式,传感器基质的重复、可靠且有把握的移除可能基本上不依赖于传感器基质的复杂性,特别是在具有蛋白质作为组分的传感器基质的情况下,和/或在存在形成传感器基质的组分和/或与所述传感器基质结合的分子的上述交联的情况下。此外,测量程序所需的所有步骤,包括传感器基质的构建(步骤i)、测定被分析物含量(步骤ii)和传感器基质的再生和相应的移除(步骤iii),都在现场执行,即通过将相应的溶液以预定顺序相继引导通过测量导管而不对测量导管进行其他操作。

[0069] 结合在基底上的多个第一化学物质形成第一结合层,并且所述第一化学物质的其他官能团提供用于随后结合受体的结合位置。

[0070] 第一化学物质的其他官能团可以包括例如生物素。在这种情况下,受体可以被直接结合在第一化学物质的其他官能团上,或经由结合在第一化学物质的其他官能团上并具有至少一个生物素结合位置的结合生物素的第二化学物质而被间接结合在第一化学物质的其他官能团上。

[0071] 结合生物素的第二化学物质可以包括结合生物素的分子,例如亲和素、亲和素衍生物或类似于亲和素的分子,特别是链霉亲和素或中性亲和素。

[0072] 相反,结合生物素的分子例如链霉亲和素、中性亲和素或亲和素、或亲和素衍生物,也可以用作第一化学物质的官能团。然后利用结合在受体上的生物素基团直接结合受体,或经由多种结合物质例如结合分子来结合受体。

[0073] 结合在第一化学物质的其他官能团上的受体,可以经由至少一个非共价键直接或间接结合在第一化学物质上。

[0074] 被提供用于结合受体的最上方的结合层的结合位置可以选自在每种情况下适合于结合多个不同受体的数个结合位置。因此,这些结合位置尽可能普遍地适用。例如,结合位置可以是用于结合生物素的结合位置,并且在这种情况下,包含链霉亲和素或中性亲和素或亲和素样分子。生物素-链霉亲和素的结合可以用作用于结合多个不同受体的通用接口,这是由于使用生物技术中已建立的技术进行生物素化以及相应地将链霉亲和素结合在结合分子上是简单且普遍可行的。特别是,例如,生物素官能化的抗体被广泛用于执行免疫测定。

[0075] 用于构建尽可能通用的结合层的其他适合的结合位置可以是免疫球蛋白结合位置。有利的是,可以通过将生物素化的结合免疫球蛋白的分子结合在如上所述的用于结合生物素的结合位置上,来提供这些免疫球蛋白结合位置。

[0076] 当第一化学物质的其他官能团用作受体时,由结合在基底上的第一化学物质形成的层同时为结合层和受体层。

[0077] 当第一化学物质的其他官能团用于结合受体时,由第一化学物质形成的层形成结合层,在该结合层上可以任选形成一个或多个其他结合层,其中受体层被提供为最终层,该最终层由结合在位于其下方的结合层的结合位置上的受体形成。形成各个层的化学物质,在每种情况下可以通过亲和相互作用、特别是非共价键合,而与形成位于其上方或下方的层的化学物质结合。

[0078] 优选情况下,传感器基质的每一层根据具体情况,相对于在每种情况下位于其下

方的层具有完全的覆盖度,并且无论如何具有至少超过80%的覆盖度。通过这种方式确保了,使用顺序重新制备的传感器基质进行的测量产生彼此相当的测量结果,这是由于在这种情况下,总是存在基本上相同数量的受体结合位置,使得每个重新制备的传感器基质能够结合相当的最大靶分子数量。这确保了生物分析仪的测量信号的高度可重复性,尽管传感器基质是连续重新制备的。

[0079] 与本发明相关的术语传感器基质的“层”不一定被理解为形态学描述。相反,术语“层”是指在相同结合步骤中并以相同方式结合、优选非共价地、更优选经由亲和相互作用结合在位于其下方的层的化学物质上或基底上的多个化学物质。层不必仅仅由多个相同的化学物质例如相同的分子、特别是相同的蛋白质形成,相反,也可以包含大量不同的化学物质。决定性的是在相同的结合步骤中例如在将包含形成所述层的化学物质的制备溶液传送通过的过程中,经由基本上相同的物理相互作用力进行结合。

[0080] 为了获得高的可重复性和小的个体变差,特别有利的是在重复或多次制备传感器基质的情况下,将受体层的受体的平均表面密度以及在有利情况下平均取向尽可能保持恒定。这可以通过在制备传感器基质的情况下使各个层的表面密度尽可能高和/或尽可能接近各自的平衡状态来实现,所述平衡状态各自自由在位于其下方的层的结合位置上形成特定层的物质的结合和释放构成。

[0081] 术语超过80%的覆盖度是指在每种情况下,在用于结合的条件,在表面的覆盖度超过平衡状态下的覆盖度的80%的情况下的表面的覆盖程度,所述用于结合的条件基本上是制备溶液中待结合的物质浓度、流速、结合速率和流体测量导管的几何形状。在测量导管的预定几何形状的情况下,引导相应溶液通过测量导管的流速和持续时间可以以彼此之间匹配并与溶液浓度匹配的方式进行选择,并使得能够获得超过80%的覆盖度。所述参数可以在初步实验中被确定,然后被提供用于执行所描述的用于确定被分析物含量的方法。覆盖度可以通过测量来确定,其中相应物质的覆盖度通过例如椭圆偏光法或利用微米尺度石英而被直接测量到,或通过向相应的层供应与相应物质特异性结合的分子,并通过例如光学方法确定结合的分子的数量而被间接测量到。

[0082] 为了可重复地设定受体层的某一受体密度,在传感器基质的每一层的情况下,在下文中被称为“结合物质”或者也称为结合分子的形成结合层的特定物质可以与另一种化学物质相结合,所述另一种化学物质结合在位于其下方的层的与结合物质相同的结合位置上,但是不具有随后被引导通过测量导管的化学物质可以结合在其上的其他官能团。结合物质的具体表面密度由结合物质的浓度、结合物质与一种或多种其他化学物质的浓度比和尺寸比、以及结合和释放的相应平衡比所决定。类似地,也可以同样地设定受体层的受体密度。因此,例如在传感器基质带有层序列金基底/烷基硫醇-PEG-生物素/中性亲和素/生物素偶联的抗体的情况下,将生物素-聚乙二醇与生物素偶联的抗体混合能够降低受体层的受体的表面密度。在这种情况下,受体与聚乙二醇的层同样也被称为受体层。也可以以同样的方式来设定结合层中结合物质的密度。

[0083] 与被受体结合的靶分子或被受体转化的靶分子的量相关或被受体结合或转化的被分析物的量相关的测量变量,可以是光学测量变量,特别是根据发光测量、反射测量或吸收测量来确定所述光学测量变量。对于适合于生物分析仪的方法来说,由于尤其是由温度和电解质波动所引起的大的扰乱性影响,SPR测量是不太适合的。为了确定光学测量变

量,在例如靶分子上可以结合有或随后结合有具有发光特性即荧光或磷光特性的官能团或转化在后续步骤中供应的底物溶液以产生光(化学发光)或颜色变化的官能团。

[0084] 当测量变量是由靶分子直接或间接产生的化学发光或靶分子的发光标记物的发光时,有利的是,基底以及相应的含有基底的测量区透射至少10%、优选至少50%或甚至至少70%的波长范围在300nm和900nm之间的光。一般来说,对于在生物分析仪中使用光学测量方法来说,有利的是,基底以及相应的含有基底的测量区透射至少10%、优选至少50%或甚至至少70%的测量辐射。例如,基底可以作为具有晶格结构的金属膜被施加在测量导管的壁上。在这种情况下,通过晶格结构的中间空间发生透射。

[0085] 在实施方式中,被分析物可以是肽或蛋白质,其中除了被分析物之外的其他靶分子是不同于被分析物的另一种分子,特别是源自于被分析物并具有标签、优选为蛋白质标签的肽或蛋白质,所述标签用于直接或间接产生测量变量或影响测量变量。不同于被分析物的靶分子可以是例如竞争物,所述竞争物由于亲和相互作用而与被分析物同样结合在受体上(比照竞争法)。可选地,不同于被分析物的靶分子可以是优选选择性且特异性结合在受体层上的分子,特别是与被分析物分子形成复合体的肽或蛋白质,使得结合在受体层上的靶分子数量是被分析物浓度的度量(比照结合抑制试验)。

[0086] 这样的具有蛋白质标签并形成其他靶分子的蛋白质或肽,可以作为包含蛋白质标签的重组蛋白或肽而被产生。在这样的情况下,有利的是随后不必进行蛋白质或肽与蛋白质标签的化学偶联,所述蛋白质标签被用于随后通过标记物进行直接或间接标记。如果具有蛋白质标签的蛋白质或肽包含与被分析物相同的基础蛋白质或基础肽,则还存在另一个优点,即一般来说,被分析物和不同于被分析物的分子与受体的亲和相互作用通常在相同的数量级。

[0087] 为了测定与结合在受体上的被分析物分子或其他靶分子的数量相关的测量变量,可以将标记物直接或间接结合在结合于传感器基质上的被分析物上或结合在另一种靶分子上。标记物用于直接或间接引入影响测量变量的特性。具体地,它可以经由蛋白质标签而被结合在具有蛋白质标签的靶分子上。这可以例如通过将标记物或带有作为官能团的标记物的化学物质的溶液引导通过测量导管来实现,其中所述标记物或带有标记物的化学物质,具有在被分析物、其他靶分子、或靶分子的蛋白质标签上结合的官能团。在后一种情况下,标记物特异性结合在结合于受体层上并具有蛋白质标签的靶分子上,而不结合在同样结合于受体层上的被分析物分子上。可选地,在先前的方法步骤中用标记物标记靶分子,使得已经标记有标记物的靶分子被引导通过测量导管,这也是一种选择方案。与已知的蛋白质分析方法相比,优选作为竞争物的带有蛋白质标签的靶分子的应用,提供了极大优点,即为了测定不同的被分析物,只需要直接或间接结合在靶分子的蛋白质标签上的标记物,或者蛋白质标签本身就是标记物。因此,例如,使用绿色荧光蛋白(GFP)作为起到标记物作用的蛋白质标签,提供了将其荧光作为测量变量引入的优点,利用光学信号转换器可以直接测定所述荧光,和/或通过随后结合针对GFP的抗体例如酶偶联的抗体可以间接测定所述荧光。

[0088] 适合直接结合的标记物除了GFP之外,还包括其他发荧光物质,例如发荧光的纳米粒子。有利情况下,间接结合的标记物可以经由亲和相互作用而被结合在靶分子或被分析物上。在这种情况下,所描述的蛋白质标签特别适合作为通用结合结构,用于随后直接或间接结合标记物。除了例如由于某些荧光或吸收特征而可被检测到的化学物质之外,适合的

标记物还包括在其他化学物质存在下影响特别是可以通过信号转换器而被光学检测到的测量系统的特性的化学物质。它们的实例是进入化学反应并特别是由于化学发光或颜色变化而从所述化学反应产生可检测的光学信号的标记物。这样的标记物的实例是过氧化物酶,其在鲁米诺(luminol)/H₂O₂溶液存在下,实现通过过氧化物酶催化的化学发光。

[0089] 用于执行上述实施方式之一的方法的生物分析仪包含具有至少一个测量导管的微流体系统和用于将液体引导通过测量导管的装置,

[0090] 其中测量导管包括至少一个基底,在所述至少一个基底上,至少在测量区内、至少有时布置有具有多个受体的传感器基质,所述受体优选选择性且特异性地结合或化学转化液体样品或通过用至少一种试剂处理液体样品而获得的待测量液体中存在的靶分子或被分析物,

[0091] 其中生物分析仪包括至少一个信号转换器,所述信号转换器根据结合在受体上或被受体转化的被分析物的量或根据结合在受体上的靶分子或被转化的靶分子的量而输出测量信号。

[0092] 结合的被分析物或结合的靶分子的量,对应于结合在受体上的被分析物分子或靶分子的数量。

[0093] 可以将对电极布置在微流体系统内,所述对电极被特别布置在测量导管内与第一基底相对放置,并优选用作另一个基底。如果对电极用作另一个基底,那么在该另一个基底上也至少有时布置有具有多个受体的传感器基质。传感器基质的制备以及基底和用作另一个基底的对电极的再生,可以如上所述根据自动现场测定液体样品的被分析物含量的方法来进行。

[0094] 基底和对电极可以相对于流过测量导管的电解质的流动方向进行布置,使得由于基底与对电极之间的电流流动而出现在电解质中的气泡被导流,以使所述气泡基本上不影响电流流动。对电极可以实施为微流体系统的导管的导电涂层,相应地作为膜,其特别是可以与测量导管不同,但与它们粘合。它优选可以被布置在测量导管内,例如与基底相对或与其共轴放置。

[0095] 生物分析仪还可以包含被形成在微流体系统内的参比电极,所述参比电极经由电解质桥、特别是无隔膜电解质桥与至少一个基底导电连接。基底、对电极和在给定情况下参比电极,可以实施为它们被布置在其中的微流体系统的导管壁上的可导电连接的膜,特别是金属涂层。

[0096] 微流体系统可以包含第一部件,其具有表面,其中测量导管以及在给定情况下其他导管、特别是与测量导管相连的用于液体运输的导管,实施为凹陷部,

[0097] 其中至少第二部件与所述第一部件相连并覆盖凹陷部,并将它们相对于环境液密封。如此形成的液体管线,在液体可以从其导入到微流体系统中的一个或多个储液器与液体可以从微流体单元转移到其中的废液容器之间延伸。第一和第二部件可以特别由电绝缘的、优选透明的材料例如玻璃或合成材料如塑料构成。

[0098] 基底、对电极以及在给定情况下参比电极,可以作为可导电连接的膜、特别是作为金属涂层形成在第二部件上。

[0099] 在可选实施方式中,微流体系统可以包含第一部件、特别是平面平行的第一板,以及与所述第一部件隔开布置的第二部件、特别是平面平行的第二板,其中所述第一部件和

第二部件经由布置在第一部件与第二部件之间的一个或多个间隔元件、特别是一个或多个中间板而彼此相连,其中所述一个或多个间隔元件具有中间空间和/或穿孔,所述中间空间和/或穿孔形成在所述第一部件与第二部件之间延伸的导管结构,包括所述测量导管以及在给定情况下与所述测量导管相连的用于液体运输的附加导管。第一和第二部件特别是电绝缘的、优选透明的材料,例如玻璃或塑料。所述一个或多个中间板可以是例如柔性的。因此,它们可以实施为例如有机硅垫的形式。所述第一和第二部件可以实施为例如玻璃板的形式。在这里,有利的是使用显微镜载片。在这种实施方式中,基底、对电极以及在给定情况下参比电极,可以是第一和/或第二部件上的可导电连接的膜、特别是金属涂层的形式。

[0100] 在其他实施方式中,可以使用导电的微流体小管作为基底、对电极以及在给定情况下的参比电极。因此,例如,基底可以是小金管,对电极可以是小铂管,参比电极可以是内部衬有氯化银的小银管。在这种类型的实施方式的情形中,优点在于这些小管的简单的电学和微流体连接性。在这样的情况下,一种有利的变化形式由测量导管构成,所述测量导管的测量区由至少内部导电的小管形成,例如小的铂管,在其内部共轴且不与小管直接接触地放置有至少在表面上是导电的丝,例如铂丝。在这样的情况下,小管可以用作基底,丝用作对电极以及在给定情况下用作另一个基底。此外,颠倒的功能性表示另一种选择方案。由于基底与对电极之间的间隔小,基底和对电极的共轴布置允许高的电流密度,这使得即使在电再生以及相应的清洁期间基底和/或对电极的表面被轻度移除的情况下也具有长使用寿命。

[0101] 为了进行光学测量,测量导管优选在测量区的区域中实施为其透过至少10%的波长范围在300nm和900nm之间的光。这种情况发生在例如基底是厚度合计在2和30nm之间的薄的铂层的实施方式中,或者发生在透明材料上施加例如衬结构的或晶格结构的不透明基底的情形中。

[0102] 在优选实施方式中,微流体单元或给定情况下的大量微流体单元,与用于供应试剂、相应的试剂溶液和用于容纳废液的容器一起,被布置在生物分析仪的可更换单元、即所谓的可更换盒中。可更换盒内的容器利用微流体连接系统,与用于将试剂供应到微流体单元中以及用于将用过的液体排入废液容器中的一个或多个微流体单元相连。液体通过微流体单元的运输优选间接地例如气动地进行,以便除了用于递送待分析液体样品的管线之外,不需要将附加的液体输送管线连接到可更换盒。这使得能够进行生物分析仪的简单且用户友好的操作。在将这样的填充有所需试剂和相应的试剂溶液的可更换盒插入到生物分析仪中之后,在初始步骤中,用液体填充流体管线和导管。随后可以现场并直接一个接一个地重复执行步骤i至iii,以在生物分析仪的协助下执行测量。可以利用自动样品获取系统将用于分析的液体样品从待监测的过程介质中取出,并经由可更换盒与样品获取系统的连接进料到可更换盒,并相应地进料到所述可更换盒中包含的微流体单元。通过这种方式,在这种在线生物分析仪的协助下,可以进行全自动测量。在储存的且为测量操作所需的试剂以及相应的试剂溶液消耗后,或者在用于容纳废液的容器完全充满后,将可更换盒更换为新的或复原后的可更换盒。

附图说明

[0103] 现在,将根据附图中示出的实施方式实例更详细地描述本发明,所述附图如下所

示：

- [0104] 图1是a)带有结合的被分析物和靶分子的受体层的第一示意图；
- [0105] b)带有结合的被分析物和靶分子的受体层的第二示意图；
- [0106] 图2是生物分析仪的微流体单元的平面示意图；
- [0107] 图3是图2的微流体单元的示意性纵截面；
- [0108] 图4是a)图2的微流体单元在电化学清洁之前的平面示意图；
- [0109] b)图2的微流体单元在电化学清洁期间的平面示意图；
- [0110] 图5是生物分析仪的微流体单元的第二种实施方式的示意图，所述微流体单元由第一部件、形成导管的有穿孔的中间板和第二部件的复合体构成，其中：
- [0111] a)是第一部件的平面示意图；
- [0112] b)是形成导管的有穿孔的中间板的平面示意图；并且
- [0113] c)是第二部件的平面示意图；
- [0114] 图6是生物分析仪的微流体单元的第三种实施方式的示意图，其中：
- [0115] a)是使用图6b)的切割面C-C获得的示意性纵截面；并且
- [0116] b)是使用图6a)的切割面B-B获得的示意性横截面。

具体实施方式

[0117] 图1a)是生物分析仪的可再生传感器基质的示意图，所述传感器基质带有受体R350和结合在受体R350上的被分析物分子R400以及同样结合在受体R350上的其他靶分子R450。用作传感器基质的基底3的是结合硫醇基的导电表面。这可以是例如金或铂表面，其由例如涂层、膜或固体金属件例如小管形成。铂和金具有高的亲硫特性，并且还具有在化学上稳定以及在面对下面详细描述受体层的电化学溶解和新受体层的制备时在化学上不改变、特别是不氧化的优点。

[0118] 在基底3上布置有第一化学物质的层，所述第一化学物质用作受体R350的结合分子R200。在亲硫表面例如金或铂表面的情况下，用于在基底3上形成结合层的结合分子R200可以是例如具有另一种官能团的烷基硫醇，其中硫醇基与金或铂表面共价键合。结合分子R200的另一个实例是 α -巯基- ω -生物素聚乙二醇(也简称为硫醇PEG生物素)。它可以经由金属硫在基底3上的结合而从水性溶液中被结合。通过任选添加具有仅仅一个在基底3上结合的硫醇基但不具有用于结合受体R350的另一种官能团的巯基聚乙二醇，一方面，可以设定生物素基团的表面密度。另一方面，引入的聚乙二醇防止了随后添加的蛋白质在基底表面上的非特异性吸附。

[0119] 结合分子R200还具有至少一个其他官能团，所述其他官能团用作结合位置，用于经由官能团结合到受体R350的互补分子的特异性结合。在这种实例中，结合分子R200的其他官能团由烷基硫醇的生物素基团形成。如果 α -巯基 ω -生物素聚乙二醇用作结合分子R200，则其生物素基团类似地作用于特异性直接或间接结合受体R350的官能团。在这种实例中，受体R350优选选择性且特异性地结合在结合于结合分子R200上的分子R300上。在这种实例中，分子R300是结合生物素的分子例如链霉亲和素。结合分子R200和分子R300(分子R300优选选择性且特异性地结合在结合分子R200的其他官能团上，并且受体R350经由分子R300而被结合在结合分子R200上)形成了通用接口，用于将大量可选择的受体350结合在

相同结合分子R200上,并由此用于将多个不同受体(间接)结合在基底3上。在这里示出的实例中,用于将受体R350结合在结合分子R200上的生物素-链霉亲和素连接非常适合作为通用接口,这是因为生物素化以及相应地用链霉亲和素标记分子是生物技术中已建立的技术。特别是,生物素官能化的抗体被广泛用于例如执行免疫测定。

[0120] 在图1a)中所示的实例中,结合在受体R350上的是被分析物分子R400和其他靶分子R450,所述其他靶分子R450与被分析物分子R400竞争结合在受体R350上并被生物分析仪用于检测。与被分析物R400类似,其他靶分子R450能够通过亲和相互作用优选选择性且特异性地而结合在受体R350上。被分析物R400可以是例如蛋白质。在每种情况下,蛋白质分子相应地优选选择性且特异性地结合在受体R350上。在这种情况下,其他靶分子R450优选同样是蛋白质分子,其同样优选选择性且特异性地、特别是通过亲和相互作用结合在受体R350上。特别是,其他靶分子R450可以是标记的或可随后标记的蛋白质分子。在本实例中,其他靶分子R450被提供有蛋白质标签。蛋白质标签是结合在实际蛋白质上的氨基酸序列。蛋白质标签在例如亲和层析中用于净化在生物技术方法中制造的靶蛋白,这是通过结合在靶蛋白上的蛋白质标签与层析柱中使用的结合配偶体的特异性相互作用而将靶蛋白从方法的其余产物中分离来实现的。在本实例中,蛋白质标签起到直接或间接结合带有标记物的分子R500的作用。标记物具有物理或化学特性,生物分析仪的信号转换器可以根据这些特性产生与结合在受体R350上的其他靶分子R450的数量相关并与结合在受体R350上的被分析物分子的数量间接相关的测量信号。为此目的,带有标记物的分子R500包含官能团,该官能团由于亲和相互作用而特异性结合在靶分子R450上、优选结合在它们的蛋白质标签上。

[0121] 如果液体样品中存在的被分析物R400是蛋白质Pfs,那么相应的抗体(抗Pfs抗体)可以用作受体R350。在竞争法中,为了测定液体样品的被分析物含量,向液体样品添加用作其他靶分子R450的竞争物,在本情况下,其他靶分子R450例如为重组制造并装备有血凝素标签(HA标签)的Pfs(HA-Pfs),通过这种方式,获得了用于生物分析仪所提供的分析的待测量液体。带有标记物的分子R500可以是例如与过氧化物酶偶联的针对HA标签的抗体。通过添加被标记物过氧化物酶催化的鲁米诺/H₂O₂溶液而实现的化学发光,被特别是包含光电二极管的光学信号转换器转变成电测量信号,其信号强度依赖于化学发光的强度。所述化学发光的强度又依赖于结合在靶分子R450上的带有标记物的分子R500的数量。因此,从利用信号转换器产生的测量信号,可以推导出结合在受体层R450上的靶分子的数量,并可以从该信息得知待测量液体中被分析物分子R400的浓度。可以用生物分析仪的测量电路和/或电子数据处理单元对测量信号进行处理,并可以由此推导出待测量液体以及相应的液体样品中被分析物的浓度。

[0122] 为了证实使用这种由结合分子R200和其上结合在受体R350上的优选选择性且特异性结合的分子R300构造而成的通用结合结构也可以执行完全不同的免疫测定,现在将参考图1a)给出另一个实例,在该实例的情况中对液体样品中的卡马西平进行检测。与前面的实例中相同,用于结合受体的通用接口,经由被结合分子R200固定的大量生物素基团和与其结合的中性亲和素或链霉亲和素分子R300,而被形成在基底3上。针对药剂卡马西平的生物素化抗体R350被结合在所述通用接口上。随后,将从已添加有过氧化物酶偶联的卡马西平衍生物的液体样品形成的待测量液体引导经过如此形成的传感器基质。在这样的情况

下,最初包含在液体样品中的卡马西平作为被分析物R400结合在受体上,并与以已知浓度存在的过氧化物酶偶联的卡马西平分子竞争,所述过氧化物酶偶联的卡马西平分子是较早时制造的偶联物,包含靶分子R450的功能性以及带有标记物的分子R500的功能性两者。可选地,也可以使用与HA标签共价键合的卡马西平作为竞争物。这与使用过氧化物酶偶联的卡马西平衍生物相比,具有的优点是,HA标签具有比过氧化物酶显著更小的分子量,使得被分析物与竞争物之间的尺寸比尽可能小。如果被分析物与竞争物具有非常不同的尺寸,则可能引起被分析物与竞争物的极为不同的结合亲和性,这通常是不合乎需要的。特别是在低分子量被分析物例如卡马西平的情况下,与这样的高分子量被分析物的偶联、例如在酶的情况下与过氧化物酶的偶联,可引起结合亲和性的显著改变,这对检测和测定下限有不利影响,并相应地增加测量误差。

[0123] 用于结合受体R350的另一种通用层结构被显示在图1b)中。在这里,图1a)中示出的基底3、大量结合分子R200的结合层和优选选择性且特异性地结合在结合分子R200的官能团上的分子R300这样的层结构,同样用于结合受体R350。然而,所述层结构增补有另一种结合层,在该另一种结合层上也可以以各种不同方式结合非生物素化的受体R350。在本实例中,该附加的结合层由生物素化的免疫球蛋白结合分子R310例如针对IgG型免疫球蛋白的生物素化抗体(生物素抗IgG抗体)、或生物素化的蛋白A/G构成。随后,可以将过去的免疫学测试方法中已确立的大量不同抗体结合在其上作为受体,而不必改变位于下方的层或其构建方法。

[0124] 图2示出了用于检测液体样品中的被分析物或测定其浓度的生物分析仪的微流体系统100的平面图。微流体系统100包括例如透明合成材料的底板1a,其在底平面上具有开放的导管结构,所述导管结构由底板1a中的凹陷部形成并包括导管区段10、15、20、30、40和接合部12、18。位于底板1a上并将导管区段10、15、20、30、40相对于彼此以及环境密封的,是终端盖板1b,其例如同样由透明合成材料形成。这在图2的切割面A-A上所获取的图3的横截面图中是明显的。底板1a和盖板1b通过形状、力或材料粘合的互锁连接件1c例如胶粘剂粘合或加压接缝而彼此固定地连接。由盖板1b密封的导管区段10、15、20、30、40形成液体管线,待分析的液体样品以及给定情况下的其他试剂被引导通过所述管线用于执行测量。

[0125] 此外,底板1a包括可以与液体供应管相连的连接件110,120和可以与排出管相连的连接件130、140,液体可以通过所述连接件被进料到导管结构或从导管结构排出。供应和排出管线将微流体系统100与被布置在远处的储液器相连,在所述储液器中容纳有用于执行测量以及相应的分析的液体。经由供应和排出管线,可以将待检测的液体样品以及在给定情况下被容纳在储液器中并将被添加到液体样品中的试剂两者供应到微流体系统100。液体通过微流体系统100的导管结构的递送和排出,可以例如利用泵或通过气动方式来进行。

[0126] 可选地,如图2中所示,导管结构也可以被看作微流体系统的基础结构,其不依赖于液体管线的具体实施方式。因此,也可以例如使用微流体软管和/或小管来构造图示的结构。液体管线优选具有在 10^7 和 $1\mu\text{m}^2$ 之间、优选在 10^6 和 $10^2\mu\text{m}^2$ 之间、更优选在 10^5 和 $10^4\mu\text{m}^2$ 之间的横截面。

[0127] 由微流体系统100的导管区段形成的测量导管30包括基底3,所述基底3已经根据图1进行过描述并实施为测量导管的导电表面区域。基底3可以例如实施为被放置在盖板1b

上的金属膜,例如金或铂膜。与在测量导管30中流动的液体发生接触的基底区域用作测量区7,传感器基质被构建在所述测量区中,并且在给定情况下,被引导通过测量导管30的液体样品或待测量液体中包含的被分析物结合在传感器基质上,并利用信号转换器、特别是光学信号转换器进行检测。

[0128] 经由接合部18与测量导管30相连的另一个导管区段40,包含附加的导电的表面区域作为对电极4,其被形成为例如置于盖板上的金属膜。基底3以及对电极4两者经由电连接件(未示出)与恒压或恒流电压源相连。如果电解质流过导管区段30和40,则基底3和对电极4经由电解质进行导电接触。通过在基底3与对电极4之间施加电势差,可以实现通过电解质的电流流动。

[0129] 在这里显示的实例中,在附加的导管区段20中布置有第三导电表面区域,其可以任选用作参比电极2。参比电极2同样实施为金属层,特别是微流体单元100的盖板1b上的银层,用于形成Ag/AgCl参比电极。在这里,电连接件也可以连接到例如恒压或恒流源。

[0130] 现在,将参考图2中示例的微流体系统和图1的带有受体的传感器基质,来描述用于制备传感器基质和用于检测待测量溶液中的被分析物或测定其浓度的方法。

[0131] 首先,在基底3上制备传感器基质。传感器基质包括具有受体R350的受体层,在所述受体上优选选择性且特异性地结合待测定的靶分子R450。为此,在第一步骤中,将具有硫醇基和另一种官能团的结合分子R200例如带有附加官能团的烷基硫醇的第一制备溶液,引导通过测量导管30。结合分子R200经由它们的硫醇基共价键合于基底3,并在理想情况下在基底3上形成单层。将制备溶液以优选恒定的流速引导通过测量导管30,持续预定的第一时间长度,直至产生的结合层的如上所定义的覆盖度安全地达到大于80%。可以在初步实验中确定为此所需的时间长度。该时间长度特别依赖于流速、结合分子R200的类型、制备溶液的浓度、结合速率和其他环境变量例如温度。

[0132] 当已经完成用结合分子R200形成传感器基质的第一结合层时,在一次或多次洗涤、漂洗步骤(在下面不进一步明确陈述)后,在第二步骤中,将第二制备溶液引导通过测量导管30。该第二制备溶液含有实际的受体R350,受体R350被结合在优选选择性且特异性地结合在第一结合层上的官能团R300上。例如,形成第一结合层的结合分子R200可以具有生物素基团,结合在受体R350上的结合生物素的基团R300例如链霉亲和素基团特异性结合在所述生物素基团上。第二制备溶液的进料被执行一段时间长度,该时间长度被选择成使得由结合在结合分子R200上的受体所形成的受体层的覆盖度如上所定义合计为至少80%。为此所需的时间长度可以在初步实验中被确定。

[0133] 在本实例中,传感器基质的制备只需要两个步骤,即将结合分子R200结合在基底3上,以及随后将受体R350经由它们的官能团R300结合在结合分子R200上。然而,另一个选择方案是不将受体R350结合在直接特异性结合在第一结合层上的官能团上,而是首先经由一种或多种其他结合分子、由此经由一个或多个其他结合层而结合在第一结合层上。该一种或多种附加的结合分子,在一个或多个附加步骤中通过引导在每种情况下含有将要结合在最后施加层的官能团上的结合分子的相应制备溶液,而被结合。在这样的情况下,产生了具有一个或多个结合层和最终受体层的传感器基质的层结构。优选情况下,传感器基质的所有层具有至少80的覆盖度,正如上面已经解释的。

[0134] 如果受体R350已被施加在表面上,则传感器基质的制备已经结束,并且可以执行

液体样品中或通过用一种或多种附加试剂处理所述液体样品而获得的待测量液体中被分析物的检测或被分析物浓度的测定。

[0135] 用于测定被分析物浓度的各个方法步骤取决于所执行的检测方法。例如,可以将被分析物结合在受体上,并直接检测该结合或通过附加的受体结合在被固定在第一受体上的被分析物上来检测该结合(夹心试验方法)。正如上面已经描述的,也可以检测竞争性结合在受体上的靶分子来代替被分析物。也可以将含有被分析物的测量溶液在较早时与含有结合在被分析物上的靶分子的附加溶液(试剂)混合,以便形成被分析物与靶分子的复合物。然后将该混合物引导通过测量导管并检测结合在受体层上的剩余游离靶分子(结合抑制试验)。本领域技术人员已知许多通过将靶分子结合在受体层上来检测被分析物或测定其浓度的其他方法,正如开始时简要刻画的。通过将测量溶液或与一种或多种试剂溶液混合的测量溶液相应地引导通过带有微流体单元100或下面描述的实施方案的生物分析仪中的测量导管30,可以重现所有这些方法。

[0136] 在本实例中,执行竞争试验方法。在这样的情况下,将含有被分析物R400的待测量液体与含有浓度已知的作为竞争物的其他靶分子R450的溶液的混合物引导通过测量导管30。靶分子R450与被分析物分子R400竞争结合在受体R350上。正如较早时描述的,靶分子R450是标记有蛋白质标签的蛋白质,并且除了标签之外,与被分析物R400基本相同。

[0137] 在将靶分子以及因此被分析物R400和其他靶分子R450结合在受体层上后,在附加步骤中,将含有带有标记物的分子R500的溶液引导通过测量导管30,所述带有标记物的分子R500特异性结合在靶分子R450的官能团上,在本实例中是结合在靶分子R450的蛋白质标签上。在本实例中,带有标记物的分子是抗HA抗体-过氧化物酶偶联物。可选地,带有标记物的分子也可以被间接结合。因此,例如在第一步骤中,可以在含有蛋白质标签的其他靶分子R450上结合生物素化的抗HA抗体,其上随后结合标记有荧光染料的链霉亲和素作为带有标记物的分子。

[0138] 如果标记物是过氧化物酶,那么在附加步骤中,将含有鲁米诺和 H_2O_2 的溶液引导通过测量导管30,其引起发光辐射的发射。利用光电信号转换器(未示出)例如光电二极管来记录发出的辐射,并将其转变成电测量信号。通过信号转换器将测量信号输出到测量电路,所述测量电路放大并处理测量信号,并将处理过的测量信号输出到数据处理系统例如微型计算机。数据处理系统利用安装的评估程序从测量信号推导出待测量液体中被分析物的浓度,并将该浓度输出到显示系统,和/或经由数据线输出到上级单元。数据处理系统可以是控制单元的部件,所述控制单元控制生物分析仪的功能,处理、储存并输出测量信号,并处理和执行来自于服务人员或来自于上级单元的用于生物分析仪的维护和/或控制的输入命令。

[0139] 取决于用于检测液体样品或待测量液体中的被分析物或测定其浓度的测试方法,可以使用不同的信号转换器来产生与结合在受体层上的靶分子数量相关的测量信号。例如,代替用于检测靶分子的化学发光,也可以激发荧光。在这种情况下,将用于激发荧光的辐射辐照到微流体单元内受体层的区域中,并利用光电信号转换器例如光电二极管记录发射的荧光辐射。此外,还可以执行吸收测量来检测靶分子。在所有这些情况下,有利的是,记录通过微流体单元100的透明底板1a或通过微流体单元100的盖板1b的测量辐射、即例如发光或荧光辐射,并在给定情况下将必需的激发辐射(用于荧光或吸收测量)相应地发送通过

透明底板或盖板,。对于辐射被辐照到盖板1b中或记录通过盖板1b的辐射的情形来说,有利情况下,其上施加有传感器基质的基底3对于施加的波长一般来说位于300nm和900nm之间的辐照来说是透明的。这通过使形成基底3的导电涂层例如金或铂涂层足够地薄来实现。在这里,优选情况下,这意味着涂层厚度小于100nm,优选在10和50nm之间。这种厚度的金或铂层对于使用300至900nm波长范围内的测量辐射进行光学测量来说,足够透明。为了在测量区区域中获得所需光学透明性,可选地,也可以将基底施加为结构化涂层,例如无涂层并因此具有透明的中间空间的衬结构或晶格结构的形式。在使用酶作为标记物和发色酶底物的情形中,另一种变化形式是在实际测量区后、例如在测量导管30的区域中出口130前方带有透明区,以便可以在透明区中测量流过导管的液体的吸收。除了过氧化物酶之外,磷酸酶和其他酶也在生物分析中广泛用作标记物。可用于它们的还有大量不同的酶底物。

[0140] 在结束测量后,为了执行下一个测量,进行受体层的再生。由于被分析物分子R400以及相应的靶分子R450的释放,或者经由结合基团R300结合在结合分子R200上的受体R350的释放不完全能够以足够可重复的方式进行,因此为了重新清洁基底3,释放整个传感器基质,包括其上结合的被分析物分子R400以及相应的靶分子R450,包括结合在其上的所有附加分子。实验显示,结合分子R200和经由结合基团R300结合的受体R350在分子水平上形成互连的共价或非共价键合的网络,该网络通过纯化学清洁即使在升高的温度下也只能艰难地或在长时间后被完全溶解,在所述情况下将清洁液体例如酸、氧化酸、碱溶液或有机溶剂引导通过测量导管30。

[0141] 已发现,为了完全移除传感器基质和结合在其上的分子,电化学清洁方法是有效的,在这种情况下在基底3与对电极4之间放置电势差,同时将电解质液体引导通过测量导管30以及附加导管区段40两者。由施加在基底3与对电极4之间的电势差引起的通过电解质液体的电流流动,导致在给定情况下在分子水平上共价或非共价交联的传感器基质、包括结合在其上的附加分子溶解。

[0142] 在这里描述的基于图2的实施方式中,基底3、对电极4和参比电极2实施为3个电极电路的形式,其中利用恒压电路来设定参比电极2与基底3之间的电势差,并利用对电极4来控制所述电势差。

[0143] 为了清洁基底3,可以将恒定的电势差施加例如预定长度的时间。已发现,当施加在基底3与参比电极之间的电势差通过例如电势的线性扫描而在最大值与最小值之间连续变化,其中所述最大值和最小值优选具有不同符号,使得氧化电势和还原电势交替出现在基底3上时,对形成基底3的金属涂层特别具有保护性。基底3相对于参比电极的电势从起始值向最大值、随后向最小值、然后返回到起始值(或其他轮转方式)的移动、特别是线性移动,被称为“循环”。优选情况下,为了清洁基底3,完成许多循环,例如2至100个或甚至多达1000个循环。

[0144] 为电化学清洁所选择的实际条件,除了其他因素之外,还取决于电解质和传感器基质各自的组成、微流体系统的几何形状、以及基底3和相应的对电极4的布置和材料选择。这些因素一般来说在初步实验中被确定。在这样的情况下,清洁方法将被优化,使得一方面确保完全移除传感器基质,而在另一方面电极不受攻击。在初期实验中发现,一般来说,当基底相对于Ag/AgCl参比电极的电势在-0.5V至-1.25V范围内的负值与+1.5V至+2.25V范围内的正值之间线性变化时,获得特别好的清洁效力,其中在达到最大和最小值后,任选将电

势在每种情况下保持固定数秒的时间长度。通过这种方式,将传感器基质交替暴露于氧化和还原性条件以及产生的氢和相应的氧,使得传感器基质的不同组分氧化性以及相应地还原性地释放、特别是分解。纯氧化性的清洁同样也是可能的;然而已发现,在这种情况下,基底可能受损。在所陈述的电势范围内特别有利的是,在最大值以及相应的最小值时,在水性电解质存在下,分别发生氧和氢的产生。在这种情况下,形成的氧和相应的氢支持性地有助于传感器基质组分的溶解和分解。

[0145] 存在大量不同的可以使用的电势或电流函数,其实例是三角、锯齿、正弦、矩形或不同脉冲和阶梯函数。在这样的情况下,特别优选的函数是其中在每个周期中、因此在每次电势扫描的情形中,电流流动在某段时间、更优选在相对于周期长度的10至95%的时间内合计接近零的函数。

[0146] 在使用铂基底的实验中已发现,对于氧化性清洁来说,基底的电势相对于银/氯化银参比电极的电势,至少有时优选被设定为高于+0.6V,优选高于+1.0V。对于还原性清洁来说,基底的电势相对于银/氯化银参比电极的电势,至少有时优选被设定为低于-0.2V,优选低于-0.4V。由于小的过电压在这些条件下在铂上产生氢,因此为还原性清洁产生了足够的氢。优选情况下,作为电势的循环或周期性移动的结果,发生氧化性和还原性清洁的交替。在特别简单的变化形式中,为了调节电势,使用可设定或可改变的电压源,其输出不参比于地电势。

[0147] 优选情况下,在电势扫描期间以及相应的循环期间出现的最大电流密度,相对于微流体管道内的基底面积、特别是基底的测量区中的面积,为大于 $2\text{mA}/\text{cm}^2$ 、更优选大于 $20\text{mA}/\text{cm}^2$ 。在每种情况下,相对于微流体管道内的基底面积、特别是测量区的面积,优选地,在基底的再生以及相应的清洁期间流过的正电流电荷大于 $+0.2\text{C}/\text{cm}^2$ 、更优选大于 $+2\text{C}/\text{cm}^2$,流过的负电流电荷小于 $-0.2\text{C}/\text{cm}^2$ 、更优选小于 $-2\text{C}/\text{cm}^2$ 。此外,优选情况下,在电解再生以及相应的清洁中流过基底的正电荷和负电荷,具有基本上相等或差别小于25%的量值。

[0148] 在电势进行线性扫描的情况下在基底3上出现的电流,可以任选以循环伏安图的形式被记录和评估。如此测量的循环伏安图尤其可以提供关于传感器基质的残留物是否仍结合在导电基底3上的信息。因此,可以根据记录的循环伏安图来确定清洁阶段的成功结束。此外,其他电压测量分析方法例如方波伏安法或差分脉冲伏安法,也适用于此。

[0149] 现在将根据图4a)和4b)详细描述这种利用微流体系统100清洁基底3的电化学清洁方法的实例。在基底3与对电极4之间施加电势差之前,首先经由连接到液体供应管线的连接件120将3M KCl水溶液引导到导管区段20中,然后经由接合部12进一步引导到测量导管30中,并经由测量导管30与附加导管区段40之间的接合部18引导到其中布置有对电极4的附加导管区段40中。液体通过所述导管区段的供应,通过在输入连接件120与排出连接件130、140之间提供压力差,而在输入连接件110与排出连接件130、140之间没有压力差来进行。

[0150] 一旦为了电化学清洁而将其中布置有参比电极2的导管区段20用KCl溶液填充后,立即将用于电化学清洁的清洁电解质例如100mM Na_2SO_4 溶液经由供应连接件100引导通过测量导管30,并也经由接合部18引导到带有对电极4的导管区段40中。此外,还发现,在给定条件下添加有0.25体积%过氧化氢的磷酸盐含量为100mmol/l的酸性磷酸盐缓冲溶液(pH=2.1),也适合作为清洁电解质。总的来说,清洁溶液的组成应该被选择成使得在基底与对电

极之间的低电势下能够获得尽可能高的电流流动。通过这种方式,能够实现高的清洁效力并且对电极损害很小或没有损害。

[0151] 清洁电解质在该流动通路上的导流,通过在供应连接件110与两个排出连接件130、140之间施加压力差来实现。同时,确保在第二供应连接件120与排出连接件130、140之间不存在压力差,以便防止 Na_2SO_4 溶液在带有参比电极2的导管区段20中流动。因此,在接合部处形成了较早导入的 KCl 溶液与 Na_2SO_4 溶液之间的过渡,经由这种过渡可以发生载荷子交换。通过这种方式,为参比电极形成了无隔膜的电解质桥,所述参比电极的参比电解质 KCl 溶液经由接合部与用作清洁电解质的 Na_2SO_4 溶液导电接触,而不需要多孔隔膜、间隙、烧结玻璃或将参比电解质与清洁电解质物理隔开的其他手段。

[0152] 在测量导管30和带有对电极4的导管区段40完全充满清洁电解质后,在基底3与对电极4之间施加电势差。这可以通过例如向基底3相对于参比电极2施加一定电势来进行。在导管区段10与导管区段20之间的接合部12处,导管区段20中包含的 KCl 电解质与导管区段10、15中容纳的清洁电解质之间的液体接合部形成了无隔膜的电解质桥,参比电极2经由所述无隔膜的电解质桥与基底3相连。使用恒压电路,对基底3与对电极4之间的电流进行设置以获得所需电势。相应地,也在基底3与对电极4之间产生电势差和电流流动。如上所述,相对于参比电极2施加到基底3的电势在最大值与最小值之间例如线性地移动多次。这一过程被证明对形成基底3的金属膜特别具有保护性。

[0153] 在基底3或对电极4的电化学清洁中出现的、在给定情况下由例如一个电极上产生的氢或氧所造成的气泡,以从接合部18经由排出管130、140离开微流体系统的管道系统的电解质液体流动方向(比照图4b)的箭头)排出。同样地,从基底3释放的分子、分子部分或分子聚集体也以该流动方向从测量导管30排出,以便防止重新吸附。

[0154] 生物分析仪的微流体单元的大量可选实施方式是可能的。图5a)至c)示出了微流体单元的优选实施方式。用与前面的实例中所使用的同样的指称符号指称同样的部件。微流体单元包括第一部件1a'(图5a))、第二部件1b'(图5c))和布置在第一部件1a'与第二部件1b'之间的中间板1c'(图5b)),它们都以平面图被示出在图5中。

[0155] 图5a)中示出的第一部件1a'可以是透明材料例如玻璃或塑料。在平面图中可以看见实施为膜的参比电极2和基底3。用作参比电极2的是例如银/氯化银参比电极,其由在给定情况下经由一个或多个中间层、特别是增粘剂而被施加在部件1a'上的银膜形成。通过例如用氯化铁(III)溶液处理,将银膜的表面氯化。基底3同样在给定情况下经由一个或多个中间层被施加为第一部件1a'上的膜。在这样的情况下,例如,它可以是例如通过溅射施加的50至500nm厚的铂层。铂层用作亲疏性基底,利用形成第一结合层的第一化学物质的铂硫结合的形成来结合传感器基质。基底3与参比电极2可以与例如测量电路或电压源例如恒压源或恒流源电连接(经由没有更详细示出的连接件)。

[0156] 部件1a'的区域5和5'未涂覆有导电材料。在给定情况下,可以用化学上稳定和电绝缘的材料例如氮化硅 Si_3N_4 涂覆区域5和5',在给定情况下,这仅仅在与电极相邻的区域中做出。优选情况下,这样的涂层被施加成在电极表面上重叠例如10至100 μm ,因此在基底3的电化学清洁期间能够有效地避免电极的侵蚀,并因此避免例如粘合助剂如二氧化钛的攻击。此外,用110、110'和120标出的是微流体单元的供应连接件,用130和140标出的是微流体单元的排出连接件。它们在图示的实例中作为孔实施,其中在视图中未示出的表面上,可

以例如通过粘附来安装例如常规连接件,用于连接微流体软管线。

[0157] 图5c)在平面图中示出了微流体单元的第二部件1b'。与第一部件1a'相同,第二部件1b'可以由透明材料例如玻璃或塑料形成,其中电极2'、4和4'以及电绝缘区域6、6'以膜的形式,在给定情况下经由中间层、特别是促进粘合的中间层而被提供在第二部件1b'上。参比电极2'实施成与被施加在第一部件1a'上的参比电极2相同。对电极包括第一对电极区4和第二对电极区4'。第一对电极区4由导电的化学惰性物质例如掺杂硼的金刚石或铂形成,以完整膜的形式被施加。在组装的微流体单元中位于弯曲形状测量导管30区域中的区域4'中,对电极以中断的方式实施。在图示的实例中,其是与对电极区4侧面相连的管线结构,例如由宽度为例如10 μm 并以例如20 μm 的相互间隔平行布置的管线构成。同样地,其他尺寸和几何形状例如晶格结构,也适用于这里。在使用非光学透明电极材料的情形中,由此在测量导管的测量区7中、因此也在相应信号转换器的帮助下被用于获得测量信号的区域中,产生了部分光学透明性。因此,在酶标记物的帮助下使用间接方法运行的生物分析仪的微流体单元的优选实施方式中,例如,光学信号转换器被布置在对电极4'的区域或部分的下方,所述信号转换器的记录区由图5c)中用圆形区域标出的测量区7形成。信号转换器可以具有例如光电二极管,其记录由酶标记物催化产生的化学发光的光,并将其转变成成比例的电流信号。对电极4、4'和参比电极2'具有没有更详细示出的用于电接触的连接件。在微流体单元的组装状态下,形成在第一部件1a'上的参比电极2和形成在第二部件1b'上的参比电极2'可以彼此导电连接,和/或通过来自于测量电路例如恒压或恒流电路的共有连接件进行接触。

[0158] 图5b)中示出的有穿孔的中间板1c'包含例如125 μm 厚的聚二甲基硅氧烷(PDMS)弹性垫。为了形成微流体单元,第一部件1a'的在图5a)中面朝观察者的底板表面和第二部件1b'的在图5c)中面朝观察者的底板表面被布置成彼此面对,彼此隔开并彼此相对放置,并且中间板1c'作为两个部件1a'与1b'之间的间隔元件被插入,并与部件1a'和1b'对齐。如果中间板1c'由弹性材料形成,则第一部件1a'和第二部件1b'可以通过将两侧压向布置在其间的中间板1c'来液密性地连接在一起,并由此形成具有相对于环境密封的导管结构的微流体单元。在图示的实例中,导管的宽度为500 μm 。在可选实施方式中,在光刻法中从光敏材料例如从光致抗蚀剂产生形成导管的有穿孔的中间板。在这种情况下,中间板1c'优选与第一和第二部件1a'以及相应的1b'固定相连。

[0159] 现在将在下面描述如此形成的导管结构。构建传感器基质(步骤i)、执行测量(步骤ii)以及再生和相应地清洁基底(步骤iii)所需的试剂和相应的试剂溶液,可以经由连接件110和110'从供应容器或样品进料供应以及给定情况下的混合系统(未示出)被进料。任选地,微流体单元还可以具有其他连接件(未示出)。在优选的变化形式中,将可以彼此相互作用的试剂或试剂溶液经由两个不同的供应管线进料到微流体单元。通过这种方式,防止这样的组分与供应系统中已经存在的另一种组分相互作用,例如一种后续的试剂可能与早先被传送通过供应管线并仍保持吸附在供应系统的壁上的其他试剂相互作用。在本发明的生物分析仪的运行较长的情况下,供应系统中组分和试剂的这种相互作用一方面可以引起较大的合生,另一方面可以引起试剂在移动通过微流体单元、特别是通过测量导管30时初始浓度降低,这特别是在需要低的检测限的情况下,对测量结果的可重复性具有负面影响,并相应地可能增加必须供应试剂的时间长度,并由此强烈地增加试剂消耗。

[0160] 来自于连接件110'的导管区段10'与来自于连接件110的导管区段10在导管接合部12处相汇。在导管接合部11处,可以将液体经由导管区段40引导到与排出连接件140相连的废液容器(未示出)中,这相当于绕过测量区。在这样的情况下,微流体单元的外部电路相应地经由液体驱动装置和阀进行导流。由导管区段40形成的旁路的优点在于,通过这种方式,可以首先引导试剂和相应的试剂溶液通过实际的测量单元,直至最初可能包含的气泡从供应系统中被移除,并且在用第二种得到的试剂和相应的试剂溶液替换第一种试剂和相应的第一种试剂溶液时,直至向第二种试剂和相应的试剂溶液过渡的浓度梯度已通过导管系统或至少通过导管接合部12。通过试剂或试剂溶液的这种预备性导流,可以确保在将试剂或试剂溶液引导通过测量导管30并引导通过测量区的情况下,它们从一开始就以相同浓度和基本上不含气泡的状态通过,因此在使用自动生物分析仪重复执行上述方法步骤i至iii的情况下,对测量结果的可重复性具有正面影响。

[0161] 在本实例中,测量导管30是弯曲的形状,其中优选情况下,微流体单元的所有导管具有相同的横截面。通过这种方式,从外部导入到微流体单元中的气泡以及主要是在基底的电化学再生和相应的清洁情况下产生的气泡,可以非常简单地回移出微流体单元,并且降低了它们在具有更大导管横截面的区域中附着于导管壁的风险。测量导管30在接合部18处与附加导管区段20汇合,用于确保参比电极2和2'的参比电势稳定的试剂例如3M的氯化钾溶液可以经由供应连接件120被进料通过所述导管区段20。被引导通过测量导管30并通过导管区段20的液体流向导管接合部18,然后在受到外部电路和液体驱动系统和阀的控制时,通过导管区段30'和排出连接件130,进入连接在下游的废液容器(未示出)。通过这种方式,有效防止了氯离子穿透到测量导管30的区域中。

[0162] 与在较早描述的实例中相同,参比电极2和相应的2'经由无隔膜的电解质桥与基底3和对电极4以及4'电接触。此外,在基底的电化学再生和相应的清洁期间产生的气泡,当气泡位于紧邻导管接合部18之前的测量导管30的末端处时,仅仅瞬时地中断参比电极2、2'与被连接作为工作电极的基底3和对电极4、4'之间的这种电接触。然而,由于优选至少有时施加的通过测量导管30的体积流量和同样优选至少有时施加的通过导管区段20的体积流量引起的气泡被快速导流到导管区段30'中,因此参比电极与工作电极和相应的对电极之间的电接触的这种中断仅仅持续短时间,并且还可以例如使用电子辅助装置进行检测和补偿。

[0163] 图5a)至c)的微流体单元示出了测量导管、测量区、基底与对电极之间的几何关系。测量导管30是微流体系统中的一个区域,其中,在将用于构建传感器基质所需的试剂引导通过的情形中,生物分析仪的传感器基质以总是相同并可重复的方式被建造在其中布置的基底上。在图5a)至c)的微流体单元中,导管区域30延伸至紧邻导管接合部18之前的基底末端。此外,在导管接合部11与12之间的导管区域中以及在旁路的导管区域40中,试剂和相应的试剂溶液通过这些导管区域的初步流动,引起传感器基质的构建。然而,这可能在其组成和密度上发生变化,或者在气泡通过后可能甚至部分或完全没有功能。在图5中示出的实例中,除了测量导管之外,基底和对电极还另外覆盖导管区10、10'和40以及导管接合部11和12。在这里,其他几何形状也是可能的。对于本发明的微流体单元的操作来说,必需的是基底应该至少部分存在于至少测量区中。然而,含有基底的测量导管还可以另外延伸到被信号转换器记录的区域7之外,所述基底在其上以可重复的方式构建有完整的传感器基质。

这种情况的一个实例是,用例如可以被布置在微流体单元的两侧并在紧邻导管接合部18之前的导管区段30的末端处测定透射率的用于测量透射率的光学装置,代替图5a)至c)中示出的微流体单元的实例中用于记录由酶标记物引起的化学发光信号的光电二极管。在使用发色底物代替化学发光酶底物的情形中,使用导管区段30的被基底覆盖的整个区域作为测量区,而不再只使用光电二极管的记录区域中的区域作为测量区,这是由于在被引导通过测量导管30并在连接在测量导管之后的信号转换器的帮助下进行检查的酶底物溶液的透射率发生变化的情况下,该整个区域被用于获得测量信号。

[0164] 被连接作为工作电极的基底3和对电极4、4'相对于微流体管道进行布置,使得导管区段10、10'、30和40以及导管接合部11和12被它们液密性覆盖。通过这种方式,确保了在这些区域中通过电化学再生和相应的清洁进行基底表面的完全清洁。通过所有导管区域中各处的基底与对电极之间的近似相等的隔开,基底表面的清洁同样在所有导管区域中各处基本上相等,并且流过基底表面的电流密度的分布没有显著差异。这是有利的,因为由此在给定情况下由于再生或清洁条件造成的基底的表面释放,同等地影响所有区域、特别是测量导管中的区域,并因此能够进行频繁的再生并由此利用生物分析仪频繁地现场执行测量,并伴有恒定的高质量测量结果。正如上面已经描述的,对电极4和4'也可以作用于构建传感器基质的另一个基底。在这样的情况下,对电极优选由与基底3相同的材料构成,因此在图示的实例中由铂构成。然后在执行步骤i至iii期间,在该另一个基底上优选进行与在微流体管道中相对放置的基底3的区域上基本上相同的过程。

[0165] 图6示出了微流体单元1000形式的另一种实施方式。在这样的情况下,使用导电的微流体小管和相应的丝作为基底3和对电极4。因此,基底3由例如小的金管构成,对电极4由与基底3共轴布置的金丝构成。这种类型的实施方式的优点在于利用相应的支架1001、1001'可实现这些小管的简单的电和微流体可连接性。在这样的情况下,小管3用作基底,丝4用作对电极并同样作为另一个基底。颠倒的功能性也代表了另一种选择方案。基底3与对电极4的共轴布置允许高电流密度通过基底与对电极之间的小的间隔,这使得使用寿命延长,并且在电再生和相应的清洁的情况下,基底和/或对电极的表面仅仅轻度移除。通过利用微流体软管和小管进行相应的连接,也可以实施更复杂的微流体单元,其不被或仅仅被部分构建为微流体芯片。

[0166] 在基底3的电势在最大值与最小值之间移动的一些循环后,基底3被基本上完全清洁。然后,可以以上述方式形成传感器基质的更新的制备物,以便随后用于重新测量。通过这种方式,在每种情况下可以使用新制备的传感器基质执行至少50个或甚至100至200个测量。

[0167] 由于传感器基质被定期完全重新制备,因此也可以执行各种被分析物的顺序测量,其中在每种情况下,接着制备特别适用于相应的待测定被分析物的具有某种受体的传感器基质。例如,在顺序制备中,在每种情况下对于当前待检测的被分析物或对于相应地用于被分析物检测的靶分子来说,不同的、优选选择性且特异性结合的受体可以被结合在结合分子R200上。

[0168] 在微流体系统的可选和优选构造中,对电极和基底可以被布置在同一个导管中,并放置成彼此相对。在这样的情况下,参比电极被布置在经由接合部与测量导管区段相连的导管中,使得它如图4b中所示,在电化学清洁期间经由无隔膜的电解质桥与基底导电连

接。在上述用于制备传感器基质的方法的情形中,当基底和对电极被布置在测量导管中彼此相对放置时,传感器基质被构建在基底以及对电极两者上,使得可以使用两个传感器基质来产生测量信号。在这样的情况下,基底可以例如对测量辐射透明,使得例如在对电极和基底上产生的发光辐射透射通过基底,并可以作为测量信号被布置在基底后方的光电二极管记录到。

[0169] 对用于在工业过程中监测(定量)被分析物浓度的生物分析仪的重要要求是,在使用连续插入的再生的传感器基质进行顺序测量的情况下,由生物分析仪输出的测量信号的可重复性。尤其是,必须确保生物分析仪在顺序测量的情况下,在被分析物浓度保持相等的情况下,事实上输出相同信号强度的测量信号,其中在所述顺序测量之间,在每种情况下执行传感器基质的新制备。

[0170] 为了使用这里描述的方法确保这一点,传感器基质的制备被执行成使得导电表面区段3上的结合分子R200的层的覆盖度为如上所限定的至少80%。

[0171] 最优情况下,在受体在一个或多个制备步骤中被结合在结合层上的情形中,在第二制备步骤以及在给定情况下附加制备步骤的情况下,第二制备溶液以及在给定情况下其他制备溶液被引导通过测量导管的时间长度也被选择成使得在每种情况下获得如上所限定的80%的覆盖度。

[0172] 如图1a)和b)中所示,传感器基质的层结构以及在给定情况下带有标记物的分子在被分析物上或与被分析物竞争传感器基质的结合位置的靶分子上的直接或间接结合,允许以简单的方式将从实验室应用已知的用于单次使用测定的方法技术转变成可以利用生物分析仪重复自动执行的方法。在这里,作为其实例描述了将用于单次使用的实验室实施的免疫测定法转移到用于过程测量技术的自动工作的生物分析仪:在实验室测定中,通过将针对牛冠状病毒(BCV)的抗体吸附在微量滴定板的疏水基底表面上,来产生受体层。然后,施加需要检查BCV组分的测量样品并随后漂洗,以便移除未结合在受体上的BCV。随后,施加针对BCV的另一个表位的第二抗体,重新漂洗,然后施加辣根过氧化物酶(HRP)偶联的第三抗体的偶联物。该第三抗体结合在第二抗体上,使得第二抗体被HRP间接标记。在重复漂洗后,随后通过添加发色底物2,2'-连氨基双-(3-乙基-苯并噻唑啉)6-磺酸(ABTS)和过氧化氢并对该溶液的吸收进行光度测定的最终步骤,进行测量值的测定。

[0173] 现在将描述用于将利用所描述的单次使用的亲和生物测定法进行的液体样品的BCV含量测定,向利用生物分析仪进行的液体样品的BCV含量的自动且可重复执行的现场测定进行转变的方法。在第一步骤(步骤a)中,选择用于构建传感器基质的结合层的适合的结合结构。由于用作受体R350的针对BCV的抗体(抗BCV抗体)涉及非生物素化的IgG类抗体,因此基于图1b)的层序列硫醇-PEG-生物素-中性亲和素-生物素-抗IgG抗体-抗BCV抗体是非常适合的,其中抗BCV抗体用作受体R350。作为可选测定方法(步骤b),在使用HRP分子作为带有标记物的分子R500的情形中,除了发色ABTS反应以及随后的光度测定之外,还可以使用鲁米诺与过氧化氢之间的化学发光反应。这在自动生物分析仪中具有只需要一个光电检测器例如光电二极管作为信号转换器的优点。

[0174] 在附加步骤中,为自动生物分析仪中所使用的用于液体管线的材料或用于与液体样品或其他使用的试剂发生接触的其他部分的材料选择适合的阻断试剂,以便减少组分的非特异性吸附。

[0175] 在通过这种方式限定了结合层并选择了可选测定方法之后,产生了选自几种通用的标准变化形式并由下列物质形成的传感器基质的结合层序列:

[0176] -亲硫的基底(基底3)

[0177] -硫醇-PEG-生物素(第一结合分子R200,其具有生物素作为官能团,用于经由第二结合分子R310间接结合受体R350)

[0178] -中性亲和素(结合在结合分子R200上的分子R300,并且第二结合分子R310结合在其上)

[0179] -生物素-抗IgG抗体(第二结合分子R310)。

[0180] 为了检测液体样品中的BCV含量,在该结合层序列上随后跟有从实验室方法可知的亲和测定法的层序列:

[0181] -针对BCV的IgG类型的抗体(结合在第二结合分子上的受体R350)

[0182] -BCV(被分析物R400,其中占据密度取决于液体样品中被分析物的浓度)

[0183] -针对BCV的第二抗体(用于间接结合带有标记物的分子R500)

[0184] -针对第二抗体的HRP标记的第三抗体(R500),用于利用鲁米诺/ H_2O_2 进行化学发光检测。

[0185] 在下面的步骤中,所有使用的组分必须检查交叉反应性(步骤c),以便由此排除测量信号的错误。为此,例如,可以在每种情况下省略一个层来连续构造受体层,并且在出现交叉反应性的情况下,测定到的测量信号为明显高于零的值。此外,各个层、优选为主要结合层的密度,将通过共同结合相对于后面的层未官能化或无反应性的其他组分来设定。

[0186] 如果自动生物分析仪具有用于液体运输的微流体管道系统、包括在其中形成传感器基质并执行被分析物检测的测量导管,则还应该确定含有用于形成传感器基质的化学物质的制备溶液的适合的体积流量、浓度以及各种制备溶液和在给定情况下漂洗溶液被引导通过测量导管的时间长度(步骤d)。在这样的情况下,优选选择高的浓度、同样高的制备溶液体积流量和长的时间长度。通过这种方式,确保传感器基质的各种组分在对应于该浓度下的化学平衡的给定条件下形成的层在每种情况下几乎完全覆盖位于其下方的层。在这样的情况下,待检测的每种组分相对于其在制备溶液中的浓度、体积流速和制备溶液被引导通过测量导管的时间长度是可变的。在每种情况下,向在所选的条件下实施出的传感器基质供应被分析物浓度已知的测量溶液,并利用根据生物分析仪的信号转换器所选择的检测方法记录测量信号。从如此获得的测量信号产生矩阵,从所述矩阵可以在每种情况下为传感器基质的每个层确定最适的方法参数、浓度、体积流速和引导通过测量导管的时间长度。因此,例如,可以选择下述组合,即所述组合能够使制备溶液引导通过测量导管的时间尽可能短,并且尽管如此,能够产生在制备溶液引导通过的持续时间明显长得多的情况下的测量信号的95%的测量信号。通过这种系统性程序,可以快速实现所述方法参数与通过系统的微流体流动适应。

[0187] 在附加步骤中,以类似方式确定用于执行基底的再生和相应的清洁的方法参数(步骤e)。为此,首先确定通过化学手段进行清洁、例如通过将清洁溶液引导通过测量导管是否足以基本上完全清洁基底,或者是否应该执行电化学清洁,在执行电化学清洁的情况下,除了将清洁溶液引导通过测量导管之外,还使基底相对于对电极以及相应的参比电极的电势发生变化,使得在给定情况下,在通过清洁溶液的电解形成的氢和相应的氧的支持

下,发生传感器基质和在给定情况下结合在其上的分子的至少部分分解。使用一系列试验,可以改变方法参数、清洁溶液的浓度/组成、基底电势、相应的在基底与对电极之间流动的电流的水平、引导清洁溶液通过测量导管的时间长度、在给定情况下引导辅助液体通过测量导管的时间长度、基底电势的曲线、相应的在基底与对电极之间流动的电流的曲线,并且根据表示基底清洁程度的测量信号可以确定再生的成功。从将清洁成功作为不同过程参数的函数作图而得到的相应的矩阵,可以确定最佳的方法参数。

[0188] 在需要时使用来自于相应应用领域的样品执行测量,以便在给定情况下鉴定(步骤f)从特定测量介质得到的基质效应。如果发生这种情况,可以确定用于特定情况的适合的对策,例如将样品稀释或在随后的方法校准中将测量值的偏差考虑在内。在转变为利用生物分析仪的自动现场测定的亲和测定法已被校准后,进行相应的验证(步骤g)。这包括检查制备溶液和其他使用的试剂的储存稳定性。

[0189] 上述方法的优点在于,在例如生物技术生产厂中用于质量控制、在通常的实验室实践中使用的例如作为单次使用的实验室方法执行的亲和测定法,可以被有效地转移到自动生物分析仪。因此,例如,能够完全自动、重复并在线地分析物质例如蛋白质或如上述实例中所述的疫苗的含量。使用一个或几个标准层系统来结合几乎任何受体和/或使用一种或几种标记物或分子,提供了一种平台或构建试剂盒、溶液,可以通过所描述的方式使用相对少的努力将已知的实验室方法转移到所述平台或构建试剂盒、溶液。

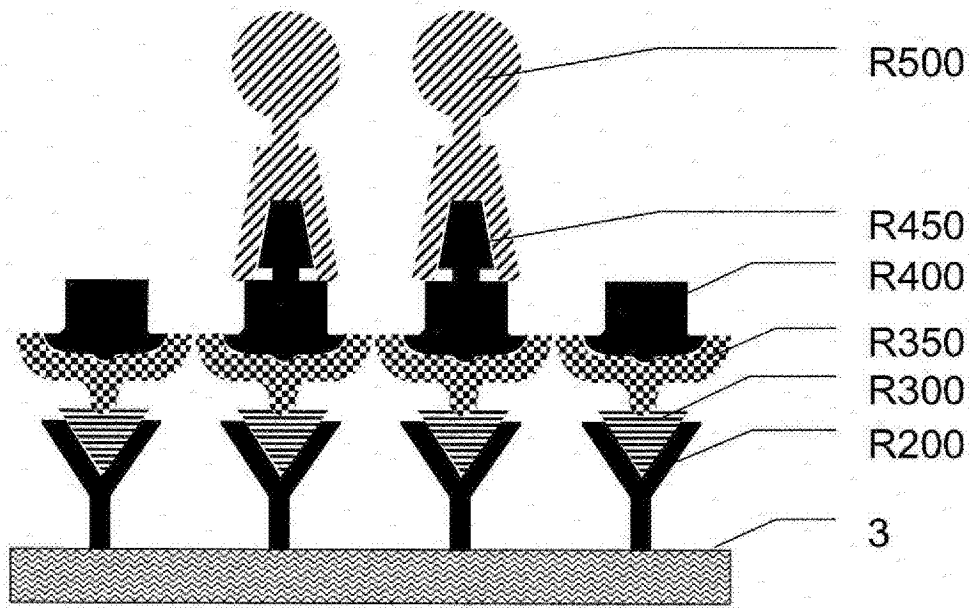


图1a

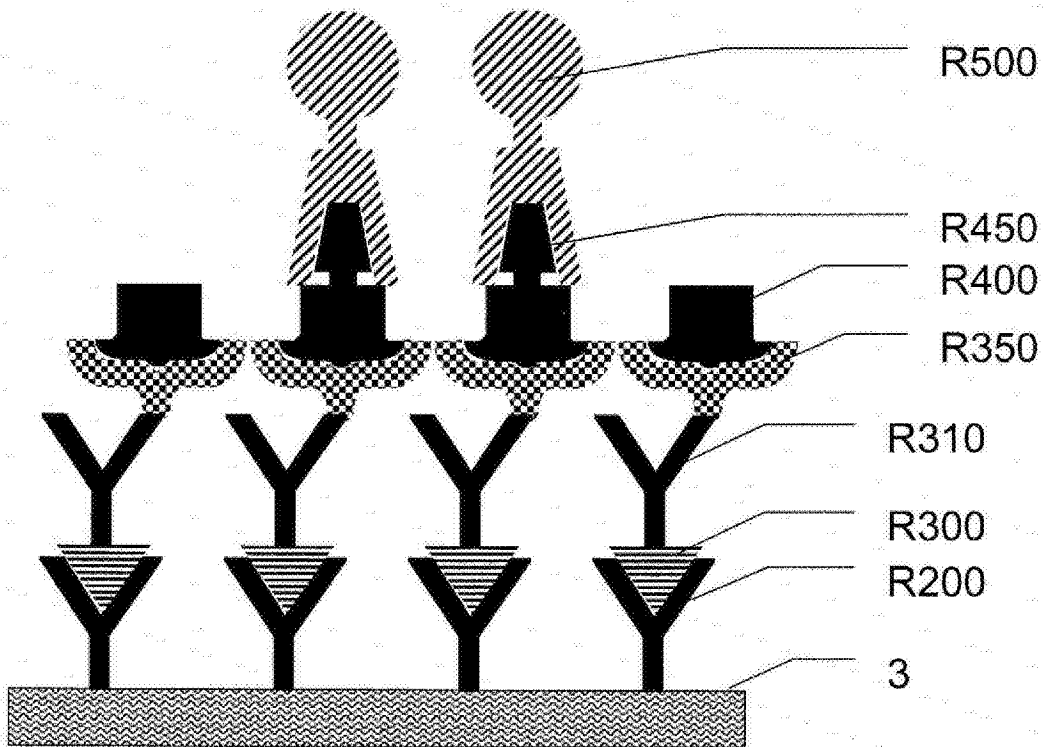


图1b

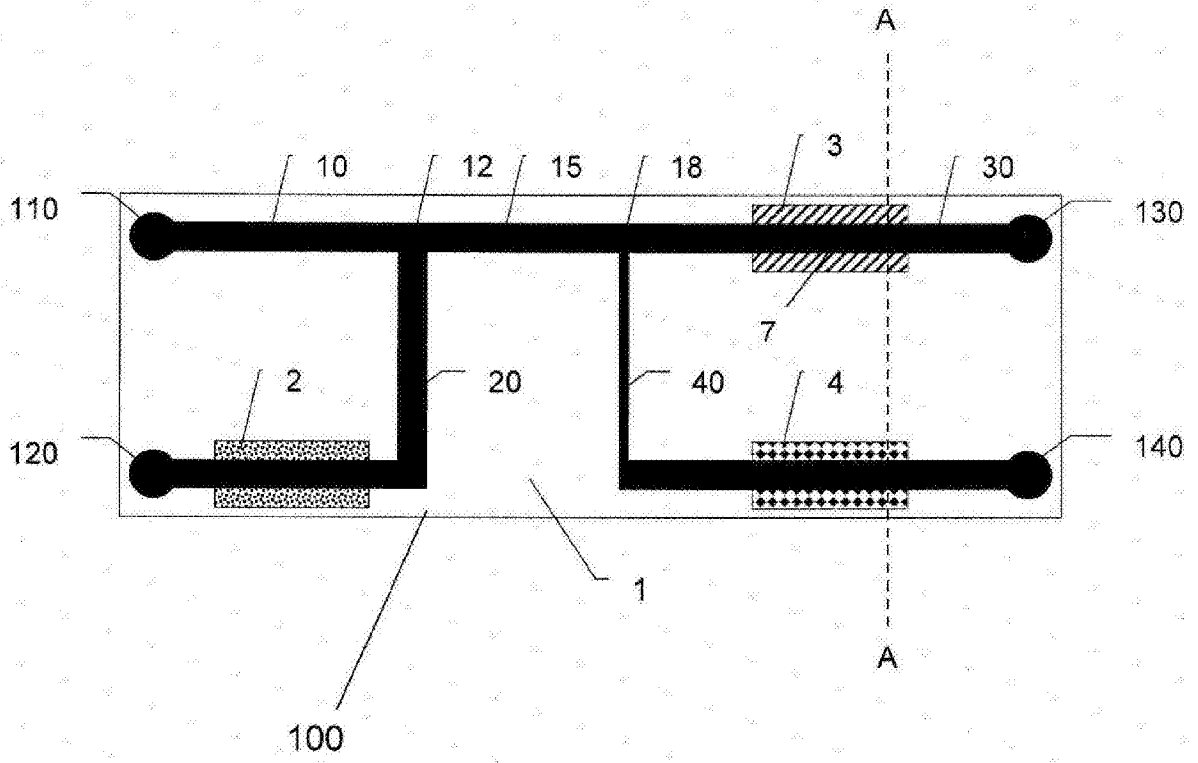
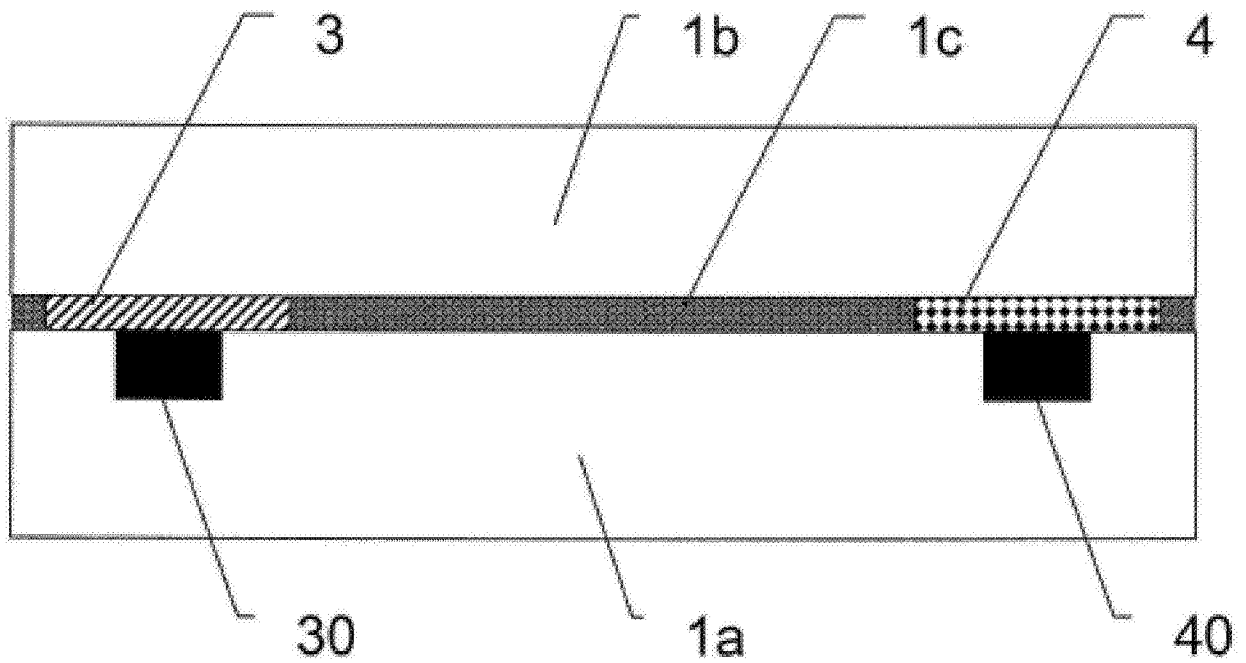


图2



微流体系统（在图2的A-A上的横截面）

图3

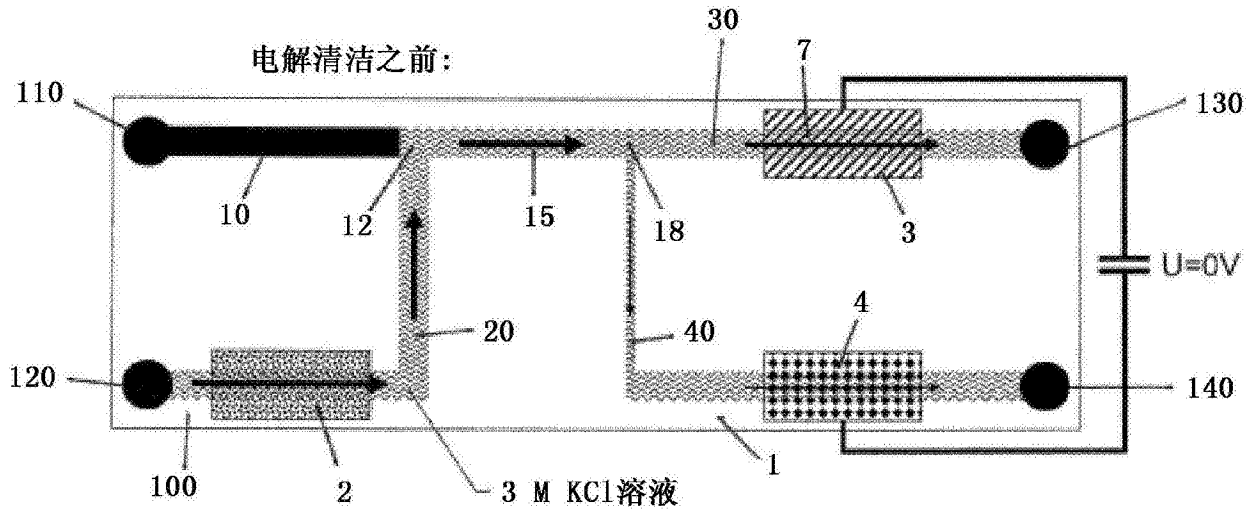


图4a

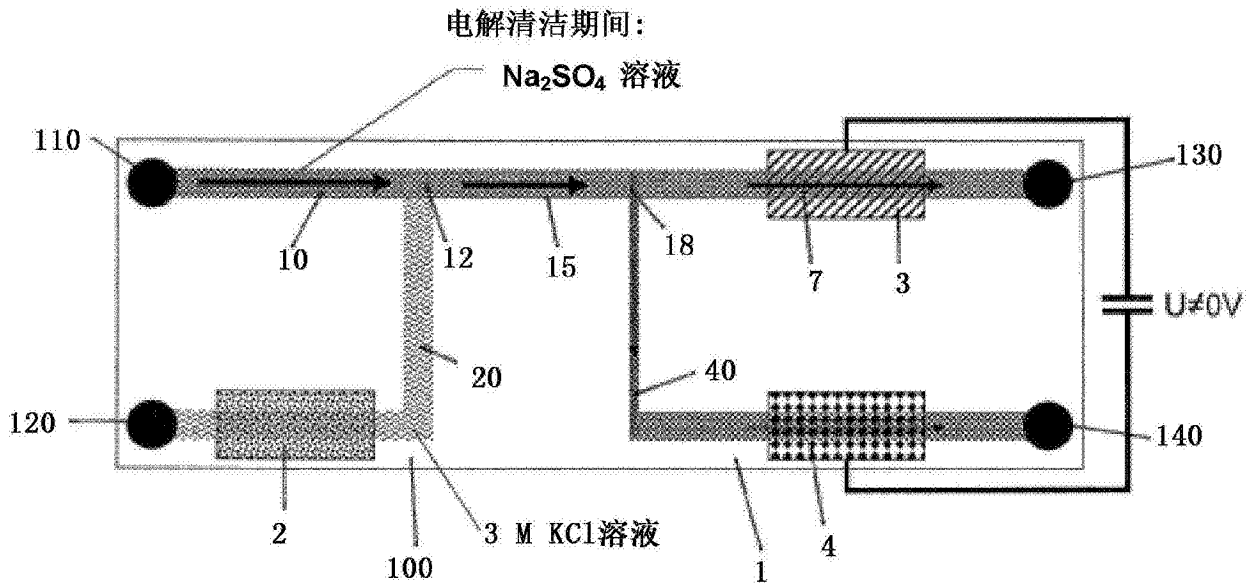


图4b

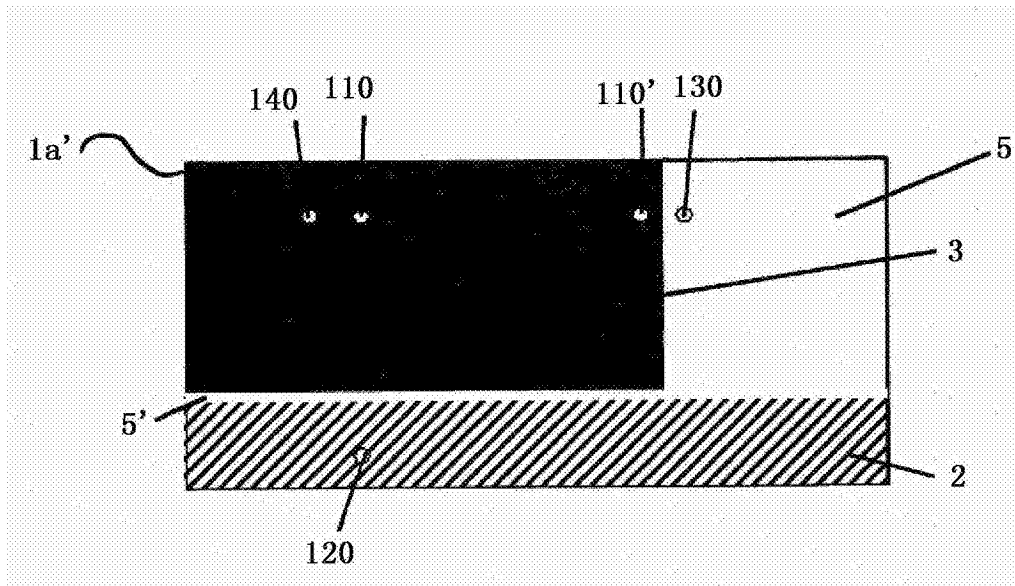


图5a

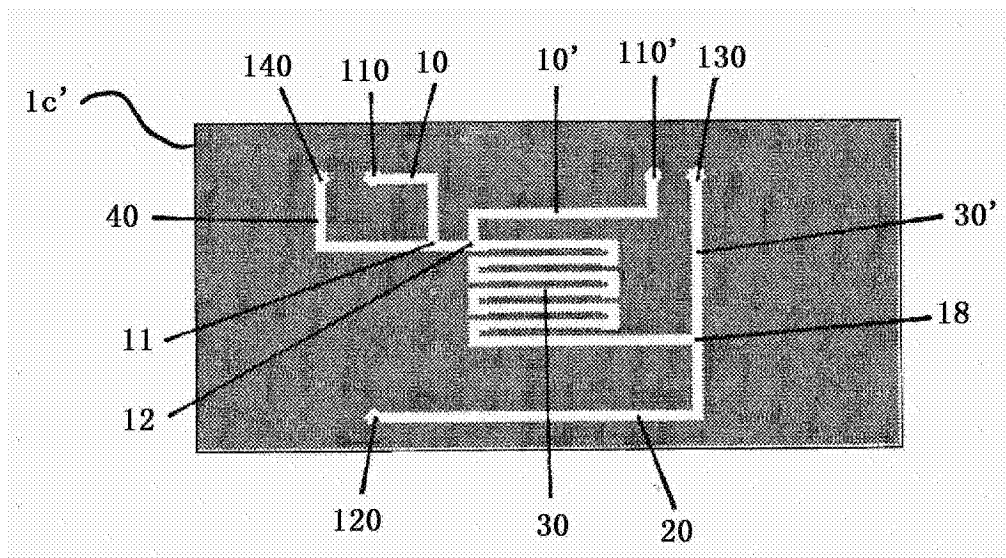


图5b

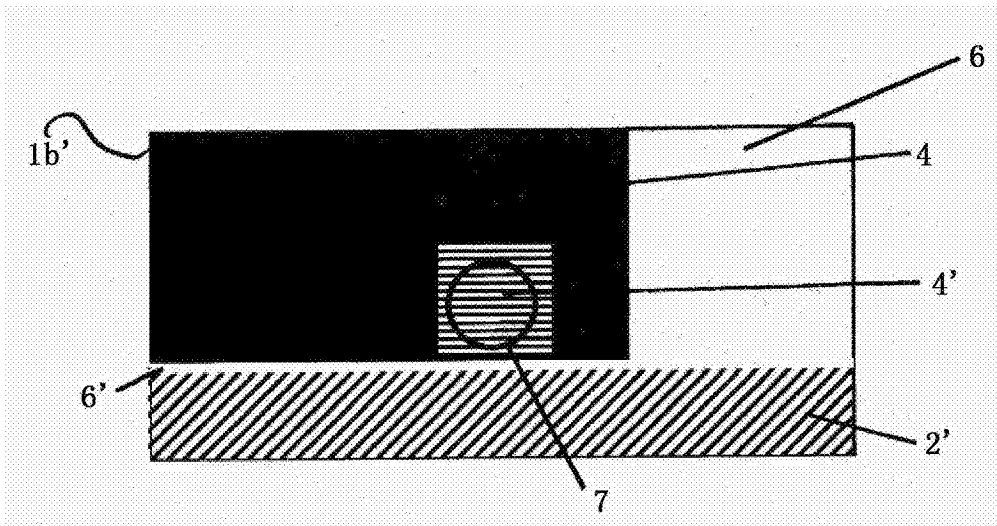


图5c

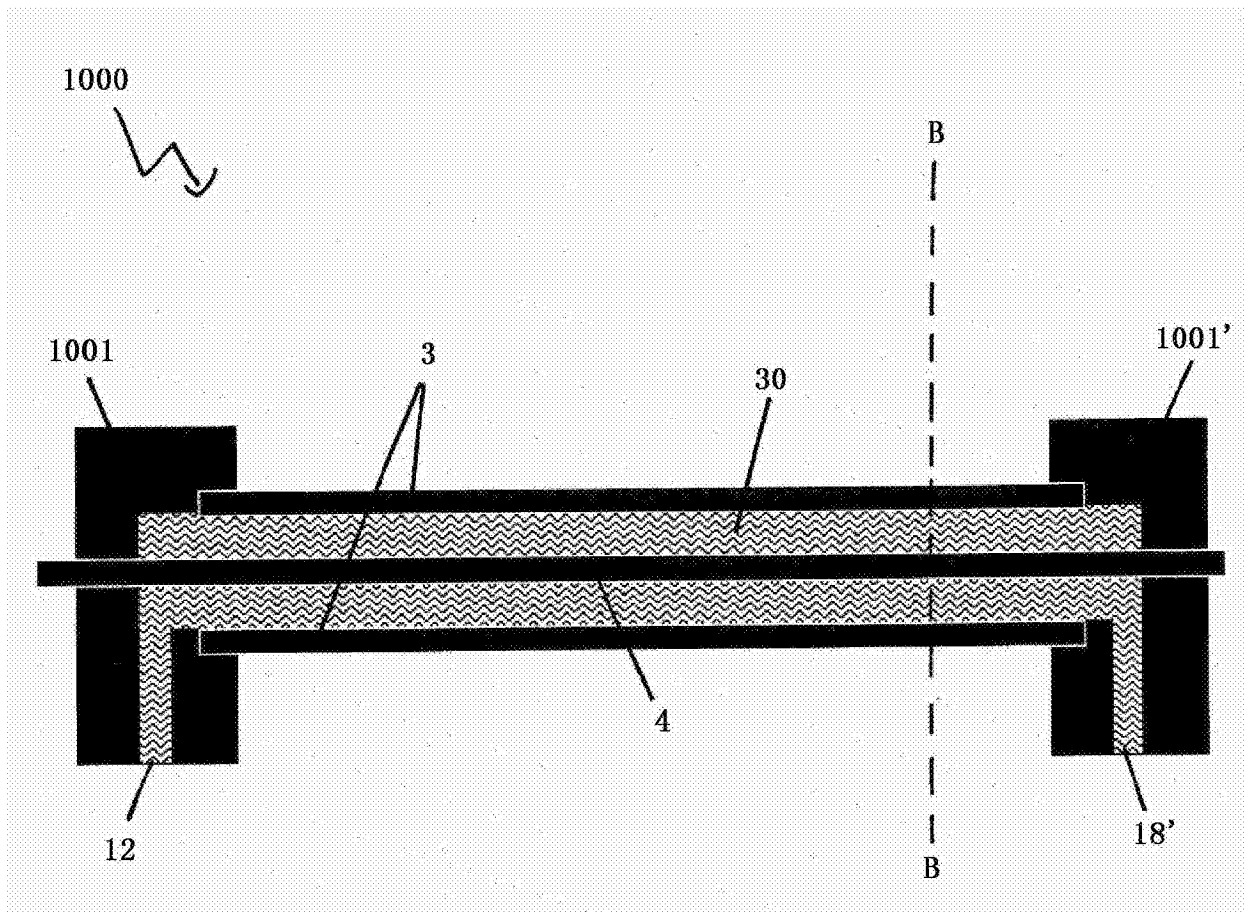


图6a

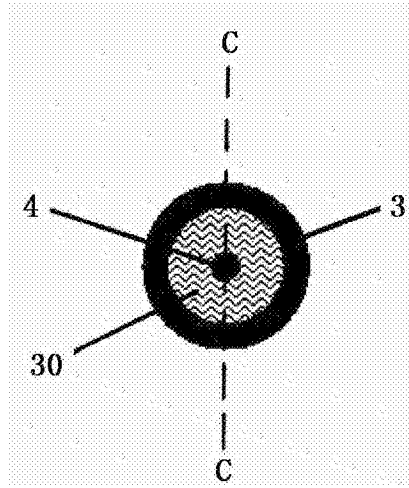


图6b