

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680021312.4

[43] 公开日 2008 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 101198870A

[22] 申请日 2006.6.12

[21] 申请号 200680021312.4

[30] 优先权

[32] 2005.6.17 [33] EP [31] 05105361.9

[86] 国际申请 PCT/IB2006/051866 2006.6.12

[87] 国际公布 WO2006/134546 英 2006.12.21

[85] 进入国家阶段日期 2007.12.14

[71] 申请人 皇家飞利浦电子股份有限公司

地址 荷兰艾恩德霍芬

[72] 发明人 M·W·J·普林斯

A·H·J·伊明克

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 王 英

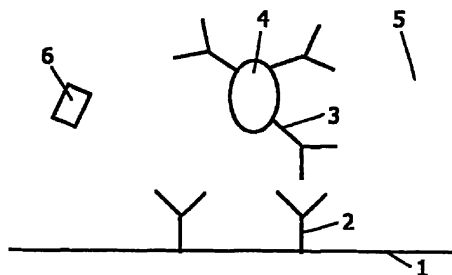
权利要求书 4 页 说明书 18 页 附图 4 页

[54] 发明名称

精密磁性生物传感器

[57] 摘要

本发明提供了用于确定含有至少一种可极化或者极化磁性标记的流体中的至少一种目标的浓度的方法、设备和系统，感测表面包括能够特异性附着到与磁性标记连接的至少一种生物实体的至少一种结合位点，感测设备还包括至少一种磁性传感元件，感测设备还包括用于时间解析地区分特异性附着到结合位点的磁性标记和非特异性附着的标记的分辨装置。根据本发明的方法和设备可被用于生物分子诊断。



1. 一种用于确定流体（5）中的至少一种目标（6）的浓度的感测设备（10），所述流体（5）含有至少一种可极化或者极化磁性标记（4），

所述感测设备（10）包括至少一个感测表面（1），

所述感测表面（1）至少部分包括至少一种结合位点（2），其能够特异性附着到与所述磁性标记（4）连接的至少一种生物实体（3），

所述感测设备（10）还包括至少一种磁性传感器元件（11），

所述感测设备（10）还包括分辨装置（12），用于时间解析地区分特异性附着到所述结合位点（2）的磁性标记（4）对未附着到所述结合位点（2）的标记（4）的暴露率。

2. 根据权利要求1所述的感测设备（10），其中，未结合到所述结合位点（2）的标记的所述暴露率由所述结合位点（2）附近的流体中的未结合标记（4）的浓度来确定。

3. 根据权利要求1所述的感测设备（10），其中，所述分辨装置（12）包括用于产生磁场（130）的磁场产生装置（13）。

4. 根据权利要求1所述的感测设备（10），其中，所述分辨装置（12）包括定位在一个磁场传感器元件（11）每侧的两个磁场产生装置（131、132）。

5. 根据权利要求3所述的感测设备（10），其中，所述磁场产生装置是定位在所述感测设备（10）上的二维导线结构。

6. 根据权利要求3所述的感测设备（10），其中，所述磁场产生装置（13）产生旋转磁场（130）。

7. 根据权利要求3所述的感测设备(10), 其中, 所述磁场产生装置(13)产生单向磁场(130)。

8. 根据权利要求1所述的感测设备(10), 其中, 所述分辨装置(12)包括在第一水平高度的第一表面区域(141)和在第二水平高度的第二表面区域(142), 其中, 所述磁性传感器元件(11)被定位在所述第一和第二表面区域(141、142)之间的过渡区域(143)并面向所述表面区域(141、142)中的至少一个。

9. 根据权利要求8所述的感测设备(10), 其中, 从基本垂直的投影观察, 所述磁性传感器元件(11)以所述过渡区域(143)为中心。

10. 根据权利要求3所述的感测设备(10), 其中, 所述分辨装置(12)包括电容传感器装置。

11. 根据权利要求1所述的感测设备(10), 其中, 所述磁性传感器元件(11)是磁致电阻传感器元件, 优选为AMR、GMR、或者TMR传感器元件。

12. 根据权利要求1所述的感测设备(10), 其中, 所述磁性标记(4)作为磁珠被提供。

13. 一种用于确定含有至少一种可极化或者极化磁性标记(4)的流体(5)中的至少一种目标(6)的浓度的系统(35), 该系统(35)包括根据权利要求1所述的磁致电阻感测设备(10)。

14. 根据权利要求13所述的系统(35), 还包括用于检测磁性传感器元件(11)的磁致电阻变化的电子电路(30), 所述电子电路(30)存在于衬底(20)中或者衬底(20)之外。

15. 根据权利要求 13 所述的系统 (35), 还包括用于产生磁场的外部磁场产生装置 (40)。

16. 一种使用权利要求 1 所述的感测设备 (10) 确定流体 (5) 中的至少一种目标 (6) 的浓度的方法, 所述流体含有至少一种可极化或者极化磁性标记 (4), 所述方法包括下列步骤:

-将包含至少一种磁性标记 (4) 的流体 (5) 提供到所述感测表面 (1) 的上方,

-施加磁场 (130),

-时间解析地区分特异性附着到结合位点 (2) 的磁性标记和非特异性附着的标记 (4)。

17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中, 所述目标 (6) 的浓度通过计算特异性附着的标记 (4) 的浓度对未附着的标记 (4) 的浓度的比值来确定。

18. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中, 所述目标 (6) 的浓度通过计算所测量的至少一种标记 (4) 到所述结合位点 (2) 的特异性结合率对所测量的标记 (4) 对所述结合位点 (2) 的暴露率的比值来确定, 从而优选通过测量所述结合位点 (2) 附近的流体中的未结合标记 (4) 的浓度来确定所述暴露率。

19. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中, 在特异性附着到所述结合位点 (2) 的磁性标记 (4) 对非特异性附着的标记 (4) 之间的时间解析区分, 利用特异性附着的标记 (4) 对非特异性附着的标记 (4) 的旋转和/或平移迁移率的差异来进行。

20. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中, 在特异性附着到所述结合位点 (2) 的磁性标记 (4) 对非特异性附着的标记 (4) 之间的

时间解析区分，使用至少一种调制磁场（130）来进行。

21. 根据权利要求 16 所述的方法，其中，所述目标（4）到所述结合位点（2）的特异性附着通过抑制形式的测定来得到。

22. 根据权利要求 16 所述的方法，其中，所述目标（4）到所述结合位点（2）的特异性附着通过竞争形式的测定来得到。

23. 根据权利要求 16 所述的方法，其中，所述目标（4）到所述结合位点（2）的特异性附着通过夹心形式的测定来得到。

24. 根据权利要求 16 所述的方法，其中，所述目标（4）到所述结合位点（2）的特异性附着通过抗-复合物形式的测定来得到。

25. 根据权利要求 16 所述的方法，其中，所述目标（4）到所述结合位点（2）的特异性附着通过阻断剂形式的测定来得到。

精密磁性生物传感器

本发明涉及用于确定流体中至少一种目标的浓度的感测设备和系统，所述流体中含有可极化或者极化磁性标记中的至少一种，所述系统包括感测设备。本发明进一步涉及使用该感测设备来确定流体中至少一种可极化或极化磁性标记的浓度的方法。

在诊断领域尤其是生物医学诊断（诸如用于体内和体外应用两者的医学和食物诊断，以及用于动物的诊断、健康和疾病的诊断或者质量控制）领域，生物传感器或者生物芯片的使用是公知的。这些生物传感器或者生物芯片通常以生物芯片的微阵列形式被使用，该生物芯片能够分析如 DNA（脱氧核糖核酸）、RNA（核糖核酸）、蛋白质或者小分子（例如激素或药物）的生物实体。当前，存在许多种用于分析少量生物实体或者生物分子或生物实体的片段的测定方法，诸如结合测定、竞争性测定、位移测定、夹心测定或者扩散测定。生物测试的挑战在于流体样品中待测目标分子的浓度很低（例如 pmol.l^{-1} 甚至更低），而变化的背景物质的浓度很高（例如 mmol.l^{-1} ）。目标可以是生物实体，例如多肽、代谢产物、激素、蛋白质、核酸、类固醇、酶、抗原、半抗原、药物、细胞成分或者组织成分。背景物质或基质可以是尿液、血液、血清、唾液或者其他来源或者非人源液体或提取物。附着在目标上的标志改善了目标的检测限制。标记的例子是光学标记、彩珠（coloured bead）、荧光化学基团、酶、光学条形码或者磁性标记。

生物传感器通常采用具有装配了捕获分子的特异性结合位点 2 的感测表面 1。这些捕获分子可特异性地结合流体中的其他分子或者分子复合物。其他捕获分子 3 和标记 4 有助于检测。这在图 1 中示出，其显示了生物传感器感测表面 1，捕获分子与其偶联为其他生物实体（例如目标分子 6 或目标 6）提供结合位点 2。在溶液 5 中，存在另

外的捕获分子 3 与其偶联的目标 6 和标记 4。

目标 6 和标记 4 被允许与生物传感器感测表面 1 的结合位点 2 以后称为“特异性附着”的特定方式结合。但是，其它结合配置也是可能的，此后称为“非特异性附着”。在图 2a、2b、2c、3.1a、3.1b、3.2a、3.2b、3.2c、3.3 中，标记 4 与生物传感器感测表面 1 的一些可能的结合配置的例子被示出。图 2a 和 2b 代表了实现所需的生物附着的所谓的 1 型结合配置。在图 2a 中显示了所需的生物附着，其中目标分子 6 被夹在生物传感器感测表面 1 上的结合位点 2 和标记 4 上存在的捕获分子 3 之间（夹心测定）。在图 2b 中，显示了竞争性测定的生物传感器的情况，其中感测表面 1 上提供的结合位点 2 能够附着到标记 4（通过将结合位点 2 与装配有标记 4 的捕获分子 3 附着）和目标 6 上。目标 6 具有至少部分地与结合位点 2 有关的类似于捕获分子 3 的形式和/或行为，使捕获分子 3（即标记 4）和目标 6 之间的结合位点 2 存在竞争。在图 2c 中，显示了抑制测定生物传感器的情况，其中结合位点 2 在生物学方面类似于目标 6，并且标记 4 与既可结合目标 6 又可结合到结合位点 2 的捕获分子 3（或者一般的生物实体）结合。理想地，结合（经捕获分子 3）到标记 4 的目标 6 可不再与结合表面 2 结合。

在附图中，生物活性实体（例如捕获分子 3 或者结合位点 2）被设计为直接偶联到固相载体（例如传感器表面 1 或者标记 4）。如同本领域已知的那样，所述生物活性层一般经中间实体（例如缓冲液层或者间隔分子）与固相载体连接。所述中间实体被增加以实现表面上分子的高密度和高生物活性。为清楚和简明起见，中间实体在附图中被省去。

与到这些感测表面 1 的生物附着不同，标记 4 还可以非特异性或者非生物方式附着到感测表面 1，即不需要特异性目标分子 6 的媒介而与表面 1 结合。图 3.1a、3.1b、3.2a、3.2b、3.2c、3.3 显示了这种非生物附着，其中图 3.1a 和 3.1b 显示了所谓的 2 型结合配置的例子，其中在与标记 4 偶联的捕获分子 3 和生物传感器感测表面 1 之间，和/或在与标记 4 偶联的捕获分子 3 和偶联到生物传感器感测表面 1 的

结合位点 2 之间存在单一非特异性结合。正常地,这种仅仅通过一个单一非特异性结合的 2 型结合仅仅是微弱的,并可通过诸如洗涤或者磁力的紧迫程序(stringency procedure)被移除。如图 3.2a、3.2b 和 3.2c 所示,所谓的与感测表面 1 和/或结合位点 2 的 3 型结合配置也可能经由穿过在一方面标记 4 (或者与标记 4 偶联的捕获分子 3) 和另一方面生物传感器感测表面 1 和/或结合位点 2 之间的更大区域的众多非特异性结合。3 型配置通常提供比 1 型结合更强的结合力。图 3.3 显示了 1 型的退化方案,其中标记 4 通过特异性和非特异性结合与生物传感器感测表面 1 结合。

在现场测试中,例如唾液中滥用药物的路旁经窗(through-the-window)测试,例如为了交通安全,必须提供在每日被使用的情况下足够强健的测试装备并提供产生足够迅速和精确的结果的测试方法。所述测试可以各种形式被执行,例如竞争或者抑制测定形式。在图 4 中,显示了用于两种不同的测试样品的目标依赖性传感器信号 S1 和 S2 随时间的发展,其中信号 S1 对应于高目标 6 浓度,信号 S2 对应低目标 6 浓度。S1 与 S2 之间存在差值是由于:测试样品中目标分子浓度越低,与捕获分子 3 附着的标记 4 与感测表面 1 的结合位点 2 结合的可能性越高的事实。

在国际专利申请 WO03/054566A1 中,公开了用于确定流体中磁性粒子浓度的磁致电阻感测设备。磁致电阻感测设备或者生物芯片具有带支撑流体的层结构的衬底。层结构具有第一水平高度中的第一表面区域和第二水平高度中的第二表面区域以及用于检测流体中至少一种磁性粒子的磁场的磁致电阻感测元件。磁致电阻元件被定位在第一和第二表面区域之间的过渡区域附近并朝向至少一个表面区域。使用这种设备,能够确定流体中标记 4 的浓度。

本发明的目的在于提供一种感测设备、系统和方法,其能够以足够迅速和精确的方式确定流体中至少一种目标的浓度,该流体含有至少一种可极化或极化磁性标记,特别是通过使用流体中至少一种可极化或者极化磁性标记的浓度,以及特别是通过精确测量感测表面对磁性标记的暴露率(exposure rate)以及特异性地结合在感测表面上的磁

性标记的浓度。

上述目的通过根据本发明的感测设备、系统和方法来实现。

在本发明的第一方面，提供了用于确定含有至少一种可极化或者极化磁性标记的流体中至少一种目标的浓度的感测设备。感测设备包括至少一个感测表面，感测表面包括至少一种能够特异性附着到至少一种与磁性标记连接的生物实体的结合位点。感测设备进一步包括至少一个磁性传感器元件，该感测设备进一步包括用于以时间解析方式区分特异性附着到结合位点的磁性标记和非特异性附着的标记的分辨装置。

根据本发明的设备的优点在于其允许比现有技术更精确更快速地确定测定中磁性传感器上目标分子的浓度。使用根据本发明的感测设备，通过精确确定直接位于传感器表面之上的标记浓度和在感测表面上发生结合过程的时间段，总地来说令人惊异并且使本领域技术人员预料不到的是其能够改善检测限制和特异性。

我们将讨论本发明用于不同测定范围。在第一个例子中，本发明被讨论用于抑制测定的情形。具有目标 6 的样品被暴露给具有标记 4 的反应物。标记 4 被提供有捕获分子 3。在这种情况下，这些捕获分子 3 可被认为是生物捕获分子 3，诸如可特异性结合到目标 6 的抗目标抗体 (anti-target antibody)。由于它们的快速动力学，目标 6 经捕获分子 3 结合到标记 4。基于目标浓度和捕获分子 3 的结合特性（例如缔合和解离常数），标记 4 表面上的捕获分子 3 更大范围或者更小范围地与目标 6 结合。捕获分子 3 的覆盖分数由参数 ϵ 表示。在这种测定中，我们称这种参数为抑制分数，其范围在 0% 到 100% 之间。万一测定被调整成目标受限的，即当测定处于灵敏状态，参数 ϵ 可与样品中目标的浓度成比例。现在传感器表面 1 包覆有结合位点 2，在这种情况下为目标状分子，例如药物结合物。具有标记 4 的流体与传感器表面 1 接触。可在溶液中自由运动的磁性标记 4 具有到达传感器表面的第一机会，与传感器表面生物接触的第二机会和与传感器表面 1 上的结合位点 2 结合的第三机会。标记 4 到达并接触传感器表面的比率被成为暴露率。暴露率不依赖或者几乎不依赖流体中目标的浓

度。这与结合率形成强烈对照，后者强烈依赖流体中目标的浓度，例如经参数 ε 。暴露率总是高于结合率，而且一般远高于结合率。

标记 4 与传感器表面的暴露率和结合率取决于许多参数。一些参数在测试时间之前可以很容易控制或者校准，而另一些参数强烈依赖于测试条件和样品流体的特性而变化。例如，传感器的面积 A 在制造过程中被非常精确地设定，例如，由于芯片的掩模和光刻加工。而且，在设备的生物制造工艺之前或之后，结合位点 2 和捕获分子 3 的生物特性（例如表面密度以及诸如缔合和解离特性的生物活性）可被预先控制和/或校准。但是，传感器表面 1 对标记 4 的暴露率难以控制或者校准，因为它取决于许多参数诸如与样品接触带来的反应物中标记的数量，反应物在样品中的溶解率（注意反应物可以流体或者干燥形式供应），样品的粘度，样品温度，流体中标记混合和/或致动的有效性（例如通过热扩散、沉淀、磁力、声学力、机械致动器、剪切力、旋转激发）。

在上述抑制形式中，目标 6 与标记 4 的结合部分或者全部抑制标记 4 与目标状结合位点 2 的结合。标记 4 与传感器表面 1 上的结合位点 2 的特异性结合率 dN/dt 大约由下式给出（单位 s^{-1} ）：

$$\frac{dN}{dt} = Ak_{on}[Cap][L](1-\varepsilon) \Leftrightarrow \varepsilon = 1 - \frac{dN/dt}{Ak_{on}[Cap][L]} \quad (1)$$

其中 A 为传感器表面的面积（单位 m^2 ）， k_{on} 为分子结合过程的缔合常数（单位 m^3/s ）， $[Cap]$ 为传感器表面上的结合位点浓度（单位 m^{-2} ）， $[L]$ 为在传感器附近的流体中，特别是溶液中标记 4 的浓度（单位 m^{-3} ），并且 ε 为抑制分数，其取决于样品中的目标浓度。缔合常数 k_{on} 取决于生物物质和其他动力学条件（例如温度，或者在结合过程中施加到标记上的力，例如磁力），其在设备的生物制造过程中或其后可被控制和/或校准，甚至仅仅在检测之前使用校准流体控制和/或校准（为了简明和清楚的目的，我们在方程中忽略了解离过程 k_{off} ）。

测试的目的是精确测量原始样品中的目标浓度，其具有与参数 ε 的良好定义的关系。于是我们需要高度精确（即以低 $\Delta \varepsilon / \varepsilon$ ）地确定参数 ε 。考虑到上述方程，重要地是高度精确地确定所有的参数，

即 dN/dt , A , k_{on} , $[Cap]$ 和 $[L]$ 。在小目标浓度的情况下这尤其是一种挑战：在这种情况下， ϵ 很小并且不确定，所有其他参数强烈降低了 ϵ 的精确性。

因此需要在流体中，传感器表面对标记 4 的暴露率精确已知。在本发明中，计划经由对起磁标记作用的磁性离子的体积密度的测量高度精确地测定暴露率。根据本发明，磁性标记或者磁珠的体积密度理想地在测试发生的同时直接在传感器上确定并被测量。但是，体积密度还可在一些稍微不同的位置或时间被测量，只要测量能代表高于结合位点附近的实际体积密度。因此，感测表面 1 在本发明的上下文中被理解为特异性附着的标记 4 的测量，即结合位点 2 的测量被定位和用于暴露率确定的磁性标记 4（即非特异性附着的标记 4）的体积密度测量发生的地方。此外，关于暴露率的测量，即非特异性附着的磁性标记 4 的体积密度的测量，术语“时间解辨”测量被理解为不需要在传感器信号（即指示特异性附着到感测表面的磁性标记的信号）采样的时间间隔期间重复测量标记的体积密度。

现在我们给出生物测定的第二个例子，即竞争性测定。竞争性测定的成分在图 2b 中描述。标记 4 与传感器表面 1 上的结合位点 2 的特异性结合率 dN/dt 由方程（1）近似给出，但现在 ϵ 是结合位点 2 由目标 6 占据的分数。如同在第一个例子中那样，目标 6 在流体中的浓度的精确和迅速的数据可通过测量感测表面对磁性标记的暴露率以及感测表面上的特异性结合磁性标记的浓度而提取。

在第三个例子中，我们提供了夹心测定。如图 1 中所示，带有捕获分子 3 的标记 4 与含有目标 6 的样品接触，并且这些物质与结合位点 2 接触。特异性结合的所需类型在图 2a 中显示。注意，捕获分子 3 和结合位点 2 一般是抗体；通常它们不是相同的分子，因为它们与目标 6 的不同部分结合。图 2a 的结合类型可以不同顺序发生，例如，目标 6 可首先结合标记 4 然后结合结合位点 2，或者反过来。为了本发明的描述清楚起见，我们在这里假定目标 6 首先与标记 4 结合。基于目标浓度和捕获分子 3 的结合特性（例如缔合和解离常数），标记 4 表面上的捕获分子 3 更大或者更小程度地与目标 6 结合。捕获分子

3 由目标 6 的覆盖分数由参数 ε 表示。在这种测定中，我们称该参数为包覆分数 (coating fraction)。标记 4 与传感器表面 1 上的结合位点 2 的结合率 dN/dt 由方程 (2) 近似给出 (单位 s^{-1})：

$$\frac{dN}{dt} = Ak_{on}[Cap][L]\varepsilon \Leftrightarrow \varepsilon = \frac{dN/dt}{Ak_{on}[Cap][L]} \quad (2)$$

其中 A 为传感器表面的面积 (单位 m^2)， k_{on} 为分子结合过程的缔合常数 (单位 m^3/s)， $[Cap]$ 为传感器表面上的结合位点的浓度 (单位 m^{-2})， $[L]$ 为传感器附近流体 (尤其是溶液) 中标记 4 的浓度 (单位 m^{-3})， ε 为包覆分数，其取决于样品中的目标浓度 [注意与方程 (1) 的不同，方程 1 具有项 $(1-\varepsilon)$]。在测试过程中缔合常数 k_{on} 取决于生物物质和其它动力学条件 (例如温度、磁力)，在生物制造工艺过程中或者仅仅在测试之前其可被控制和/或校准。

在上述例子中，参数 ε 是标记 4 上的包覆分数。在进行顺序测定的情况下，即首先将目标 6 与结合位点 2 接触，然后将传感器表面 1 与标记 4 接触，参数 ε 对应于由目标 6 占据的结合位点 2 的分数。

可被使用的测定的第四个例子是抗-复合物(anti-complex)测定。这种测定使用图 1 的成分，并且利用结合位点 2 被选择以结合在目标 6 中存在的捕获分子 3 但不单独结合捕获分子 3 的空间特性。这种形式适于小分子检测，其特征在于结合的标记 4 的量随着目标 6 的数量增加。在该测定的灵敏状态下，方程 (2) 可被应用。

解释本发明在测定中的使用的第五个例子是使用选择性阻断剂的测定。该测定形式此后也被成为阻断剂测定。在该测定中，除图 1 中的成分以外，还使用了阻断剂。阻断剂例如可以是与更大的实体偶联的目标状分子。在目标 6 不存在的情况下，阻断剂将附着到捕获分子 3，从而阻断标记 4 与结合位点 2 的结合。当目标存在时，它们将部分或者全部包覆捕获分子 3。现在标记 4 可与结合位点 2 结合。该结合可以包括与目标 6 的结合 (如图 2a 所示)，但是这不是必需的。假定当阻断剂与捕获分子 3 结合时这种结合不会发生，这种结合也可以对于部分捕获分子 3 发生。。

结合标记 4 的量随着目标 6 在流体样品中的浓度而增加。在测定

的灵敏状态下，方程（2）可被应用。这种形式适于大分子以及小分子。小分子例如可以是滥用的药物。

在生物测定中，反应物可立即被放置在一起（例如在微滴定板的孔(well)中）或者及时顺序接触（例如在孔中使用顺序移液步骤，或者在侧流设备中）。例如，人们可首先将目标 6 与捕获分子 3 接触，然后将物质与阻断剂接触。为了加快速度，物质可立即接触。后者的缺点可能是在目标 6 可与捕获分子 3 结合之前阻断剂就与捕获分子 3 结合，从而降低了包覆分数 ϵ 。这将降低标记 4 与结合位点 2 的结合率。但是，在快速分子动力学中，目标 6 可代替与捕获分子 3 结合的阻断剂，使包覆分数几乎不受影响。

上述测定的例子证明，测得的标记 4 与感测表面 1 的结合率取决于流体中目标 6 的浓度。本发明要求保护通过另外测量标记 4 与结合位点 2 的暴露率，至少一种目标 6 的浓度可以被更精确、因而也更快速地由测得的标记 4 与结合位点 2 的特异性结合率推导得出。

这由涉及分数参数 ϵ 的动力学方程来说明，该参数 ϵ 涉及目标 6 的浓度。

在优选实施方式中，暴露率通过测量表面 1 附近的标记 4 的浓度来确定。

在优选方法中，目标 6 的浓度通过计算结合率对暴露率之比来确定。更优选地，目标 6 的浓度通过计算所测量的特异性结合率对所测量的结合位点 2 附近的标记 4 的浓度之比来确定。

一般说来，感测设备将对特异性附着到感测表面（对比上述 1 型结合）的标记和非特异性附着但仍在感测表面附近的标记敏感。该第二种备选方案可通过以 2 型的方式结合到感测表面的标记或者通过不附着到感测表面但定位在表面附近的标记来实现。

根据本发明，这些不同磁性标记浓度被独立测定。根据本发明的一种实施方式，例如，通过特异性附着的标记对非特异性附着的标记对没有附着的标记的旋转和/或平移迁移率(mobility)的不同，能够将特异性附着的磁性标记与其它标记区分开。例如，能够施加磁场并确定迁移率相关信号。所述磁场还可被调制，例如通过电流导线或者磁

体，将磁性标记吸引到感测表面上，或者将磁性标记排斥离开感测表面，或者在感测表面上方移动磁性标记。对于不同位置的磁性标记来说，磁性传感器元件的信号比较允许确定存在于待测溶液中的感测表面附近的运动磁性标记的数目。

在本发明的优选实施方式中，分辨装置包括用于产生磁场的磁场产生装置。磁场产生装置可被定位在传感器设备上，并且例如可以是电流导线或者二维导线结构。磁场产生装置可产生旋转磁场。在另一种实施方式中，磁场产生装置可产生单向或者一维磁场，例如脉冲单向磁场或者正弦调制磁场。在这种情况下，不同结合到感测表面的磁性标记的不同运动或者旋转自由可与沿着某一方向通过流体（例如液体或者气体）的磁性标记的第一组的不同平移速度有关，或者可与这样的一组磁性标记的不同旋转速度有关。在该方式中，不同组磁性标记可通过本发明的感测设备区别或区分。

在本发明进一步的优选实施方式中，感测设备的分辨装置包括定位在一个磁性传感器元件的每侧，即左侧和右侧或者上和下的两个磁场产生装置。或者，传感器元件定位在两根电流线之间，例如平行电流片之间。本发明的这种实施方式的优点在于，假定在传感器元件的位置处两个磁场彼此补偿到一定程度，磁性传感器元件对两个磁场产生装置的磁场部分或者完全不敏感。因此，磁性传感器元件实质上由于感测表面上或者感测表面附近磁性标记的存在而感受到磁场。通过将磁性传感器元件放置在净磁场被两个磁场产生装置补偿的容积中，避免了传感器元件的可能饱和，传感器元件对所述净磁场敏感。在传感器的敏感方向上这尤其重要，即对于磁场的平面中部件来说尤其重要。

在本发明的进一步优选实施方式中，磁场产生装置是定位在感测设备上的二维导线结构。

如前所述，感测设备将对特异性附着到感测表面的标记（1型结合）以及没有特异性附着但仍在表面附近的标记（例如2型标记结合）或者没有附着到感测表面但在感测表面附近的标记敏感。根据本发明，这些不同磁性标记的浓度被独立测量。根据本发明的进一步实施

方式，感测设备包括具有处于第一水平高度的第一表面区域和处于第二水平高度的第二表面区域的分辨装置，其中磁性传感器元件被定位在第一和第二表面区域之间的过渡区域附近并面对至少一个表面区域。在感测设备的该实施方式中，优选地，从基本垂直的投影观察，磁性传感器元件以第一和第二水平高度之间的过渡区域为中心。

根据本发明的第二种实施方式的感测设备的优点是感测表面附近的磁性标记的浓度仅仅通过改变感测表面的几何形状就可获得，因而不需要使用永久或者被调制的磁场。通过这样，结合到感测表面的标记的进一步参数更容易获得或者所述测量的时间分辨率被增强。

在本发明的进一步优选实施方式中，感测设备的分辨装置包括电容传感器装置。根据本发明测量[L]的一种优选方式是通过电容检测（即测量阻抗谱）和通过获取对溶液中标记的浓度敏感的信号进行。对于这种目的，分辨装置包括电容感测部装置。电容感测装置可通过两个电极来提供，例如感测表面上或上方或者感测表面附近的电容器板或者导线。电容器板可作为感测表面上或附近的金属化区域来提供。电容器板可被布置成大体上平行于感测设备的基板。或者，电容器板可以以诸如硅、多晶硅或任何其他合适的材料的半导体材料的区域的形式来提供。电容器板可以被布置为大体上平行于感测设备的衬底的平面。电容器板可被定位在大体上沿着垂直于衬底平面的方向彼此相对。这具有的优点是，对于[L]的电容测量而言重要样品体积被覆盖或者被考虑在内。或者，电容器板可被定位在大体上沿着平行于衬底平面的方向彼此相对。这具有的优点是，电容器板可被制造成大体上在与感测表面 1 相同的平面中，降低了感测设备的制造工艺的复杂程度。

在本发明再一优选实施方式中，本发明的前述实施方式还可被组合，其中分辨装置包括用于产生磁场的磁场产生装置以及处于第一水平高度的第一表面区域和处于第二水平高度的第二表面区域，其中磁性传感器元件被定位在第一和第二表面区域之间的过渡区域附近并面向第一和第二表面区域中的至少一个。

根据本发明的第三种实施方式的优点在于，感测表面附近的磁性

标记的浓度甚至更好获得，因为它能够将本发明的第一和第二种实施方式的不同测定原理组合在一起，以便增加感测设备的时间分辨率和/或精确性。

对于感测设备的所有实施方式来说，磁性传感器元件可以是 AMR、GMR 或者 TMR 传感器元件的一种。当然，根据本发明，基于其它原理的诸如霍尔传感器元件或者 SQUID 的磁性传感器元件也是可能的。

下面，将主要参照磁性标记（也被成为磁珠或者小珠）对本发明进行描述。磁性标记不需要是球形形状，而是可以是任何合适的形状，例如球体，圆柱体或者杆，立方体，卵形等等形式，或者可以不具有确定或者恒定形状。通过术语“磁性标记”可以理解的是，标记包括任何合适形式的一种磁性粒子或者多种磁性粒子，例如磁性、反磁性、顺磁性、超顺磁性、铁磁性等，其可以是在磁场中永久或暂时产生磁偶极子的任何形式的磁体。为了执行本发明，在磁性标记的形状方面没有限制，但球形标记是现有最容易以可靠方式生产并且最便宜的。磁性标记的尺寸本身不是本发明的限制因素。但是，为了检测生物传感器上的相互作用，小尺寸磁性标记是有利的。当微米级尺寸的磁珠被用于磁性标记时，它们限制了降尺度（downscaling），因为每个标记占据了至少 $1\ \mu\text{m}^2$ 的面积。此外，小的磁性标记具有更好的扩散特性并且一般显示了比大磁珠更低的沉淀趋势。根据本发明，所使用的磁性标记的尺寸在 1 到 3000nm 之间，更优选在 5 到 500nm 之间。

在本发明的说明书和权利要求书中，术语“生物实体”应当被广义解释。它包括生物活性分子，诸如蛋白质、多肽、RNA、DNA、脂类、磷脂、例如糖的碳水化合物，或者类似物质。术语“生物实体”还包括细胞碎片，诸如一部分细胞膜，特别是可包含受体的细胞膜部分。术语生物实体还涉及可能结合到生物实体的小化合物。例子包括激素、药物、配体、拮抗剂、抑制剂和调节剂（modulator）。生物实体可以是被分离的或者被合成的分子。合成分子可包括非天然产生的化合物，诸如改性氨基酸或者核苷酸。生物实体还可在培养基或者流体中产生，所述流体诸如血液或血清或者唾液或者其它体液或分泌

物、或提取物、或者组织样品或者来自细胞培养物的样品，或者任何其它包括生物实体(诸如食物、饲料、水样品或者其它)的样品。

本发明还包括用于确定含有至少一种可极化或者极化磁性标记的流体中至少一种目标的浓度的系统，所述系统包括根据前述任何一种实施方式的磁致电阻感测设备。该系统包括感测设备以及合适的机械环境，例如用于样品获取、样品预处理、感测表面的湿润等的封装、小室、通道、管和类似物。该系统还包括感测设备和合适的电和/或电子环境，例如电源、数据采集和分析装置、输出装置。

本发明还包括使用根据感测设备的前述任一种实施方式的感测设备确定含有至少一种可极化和极化磁性标记的流体中的至少一种目标的浓度的方法，所述方法包括下列步骤：

将包含磁性标记的流体提供到感测表面上。

施加磁场，

在特异性附着到结合位点上的磁性标记对没有附着和/或非特异性附着的标记之间进行时间解析区分。

根据本发明，特别优选通过计算特异性附着的标记的浓度对没有附着的标记的浓度的比值，即结合率（由传感器表面上的磁性标记浓度来表示）对暴露率（由液体体积中磁性标记的浓度来表示）的比值来确定目标的浓度。根据本发明的目标浓度与参数 ϵ 成比例，该参数表示根据测定的类型而变化的、存在于标记 4 上或者传感器表面 1 上的结合部分（binding moieties）的占有分数。该参数以取决于测定的方式与流体中目标浓度相关。

本发明的中心思想是通过如下的两个测量值来测量目标的浓度，即（i）标记对结合位点的特异性结合率和（ii）标记对结合位点的暴露率。暴露率优选经传感器表面附近的未结合标记浓度（即[L]）来测量。[L]的测量存在不同的方式。[L]的一种测量方式是通过测量专用于具有高迁移率的标记的信号。[L]的另一种测量方式是通过比较用于两种不同情况的传感器信号来进行，即当未结合标记处于传感器的敏感区域时的情况和当标记被从传感器的敏感区域除去，例如通过磁力除去，通过热扩散除去，通过流体流动或者通过其它运输机制除

去时的情况。

通过结合仅仅作为例子示出本发明原理的附图的下列详细描述，本发明的这些和其它特征、特性和优点将是显而易见的。描述仅仅作为示例的原因而给出，而不是限制本发明的范围。下面引用的参考标号指的是附图。

图 1 示出了第一捕获分子在包括目标和标记的溶液中被偶联到其上的生物传感器，第二捕获分子与所述标记偶联；

图 2a、2b、2c、3.1a、3.1b、3.2a、3.2b、3.2c、3.3 示出了标记 4 对生物传感器表面的可能结合配置的一些例子；

图 4 示出了用于高目标浓度和低目标浓度的两种不同测试样品的传感器信号随时间的发展；

图 5 示出了根据本发明的系统和感测设备的示意性图示；

图 6 示出了根据本发明的第一种实施方式的设备的示意性图示；

图 7 示出了根据本发明的第二种实施方式的设备的示意性图示；

图 8 示出了根据本发明的第三种实施方式的设备的示意性图示。

将参照特定实施方式并参照一些附图对本发明进行描述，但本发明并不限于它们，而是仅仅由权利要求限定。所描述的附图仅仅是示意性的而非限制性的。在附图中，出于解释的目的，一些元件的尺寸可被夸大而不是按比例绘出。

当涉及单数名词例如“一”、“一个”、“该”时其中不定冠词和定冠词被使用，除非特别指明的一些情况，这包括该名词的复数。

此外，说明书和权利要求书中的术语第一、第二、第三等被用于区别类似的元件并且不用于描述顺序或者时间顺序。应当理解的是，如此使用的术语在合适情况下可互换并且在本文中描述的本发明的实施方式能够以与这里示出的描述不同的顺序操作。

此外，说明书和权利要求书中的术语顶部、底部、上方、下方等用于描述的目的，而对于描述相对位置来说并不是必须的。应当理解的是，如此使用的术语在合适情况下可互换并且在本文中描述的本发明的实施方式能够以与这里描述的或说明的不同的定向操作。

应当注意的是，在说明书和权利要求书中使用的术语“包括”不

应当被解释为限制其后所列举的装置；它不排除其它元件或步骤。因此，“包括装置 A 和 B 的设备”表达的范围不应当被限制成仅仅由部件 A 和 B 构成的设备。它意味着关于本发明，仅仅设备的相关部件是 A 和 B。

图 1 到 3 已经在说明书的介绍性部分描述。

在图 4 中，显示了用于两种不同测试样品的目标相关传感器信号 S_1 和 S_2 的随时间的发展。信号强度以取决于测定类型的方式依赖于目标浓度。例如在夹心测定中，信号 S_1 对应于低目标浓度并且信号 S_2 对应于高目标浓度。在抑制和竞争性测定的例子中相反应用（即信号 S_1 对应于比 S_2 高的目标浓度）。经过与测量时间对应的时间间隔 t_m 能够以足够的精确性测定目标浓度。图 4 中若干小圆圈表示感测设备实际进行的测量。时间间隔 t_m 对应于感测设备得出结果（time-to-result）的时间。在测量开始时，时间间隔是流体尤其是液体到达感测表面上方的时间 t_w 。注意，该图给出了信号对时间或多或少的线性行为的例子。在一些情况下信号可以更复杂，例如像更高次的多项式，由于例如生物层的激活时间或者小珠向着传感器表面的扩散时间或漂移时间。

磁性生物传感器一般被制成对特异性结合到传感器表面的小珠尽可能敏感。但是，特异性结合到表面的小珠（标记）的浓度测量可受到未结合或者非特异性结合的小珠（或标记）的存在的干扰。因此，通过标记浓度测定目标浓度的可靠数据点优选当未结合和/或非特异性结合的小珠被从表面除去时获取。

因此，可以以一次或者重复的方式应用下列顺序或者循环：

- 向着表面拉动小珠；从而可发生结合
- 然后小珠可远离传感器表面运动或者运动到其旁边，从而区分对表面的特异性结合和非特异性结合或者未结合小珠；
- 在该位移步骤之后人们可测量特异性结合的小珠的实际信号。

图 9 图示了对结合到表面的标记敏感并且还对传感器表面附近的未结合小珠在一定程度上敏感的传感器信号。信号被图示为时间的函数，并且描述了表面结合曲线的斜率如何被导出。在本发明的上下

文中，表面敏感信号也被称为目标相关传感器信号 S （或者图 4 中示出的 S_1 、 S_2 ）的原始信号。上述顺序或者循环被用于确定由虚线表示的表面敏感信号的斜率。由虚线表示的信号与目标相关性传感器信号 S 相同。因此，所测量的该信号的斜率导致流体样品中目标浓度的确定。上述顺序或者循环也在图 9 中被表示，其中参考标号 210 表示允许标记在表面附近或者将标记拉到表面的步骤，并且其中参考标号 220 表示移除标记或者从表面拉标记的步骤。参考标号 230 以图 4 中的小圆圈方式表示单个采样间隔或者“一元测量”事件。在测量时间 t_m 期间（参见图 4），一定量的所述采样间隔对收集是必需的。

在由参考标号 210 表示的步骤过程中信号由结合到传感器表面的小珠以及传感器表面附近未结合的小珠引起。在由参考标号 210 和 220 表示的步骤过程中使用信号，该表面结合信号以及由于未结合小珠导致的信号可被导出。结果，溶液中标记的浓度以及结合到传感器表面的标记的浓度可被导出。根据本发明，这两种测量导致可以非常精确地确定流体中目标的浓度。

曲线的斜率与标记对传感器表面的结合率成比例。测量时间 t_m 期间信号的平均斜率 dS/dt 由信号 S （在 t_m 结束时）除以测量时间 t_m 给出。目标浓度以取决于测定的方式与结合率有关。当信号以高信噪比被记录时，目标浓度可以非常精确地被确定。在由磁致电阻传感器检测的情况下，高信噪比可通过使用高电流来实现。高电流可引起加热或者生物物质的不可逆变化。但是，当信号在测定的终点被测量时，生物物质的加热和变化是不重要的。换言之，终点信号（即溶液中结合位点附近的特异性结合标记和/或未结合标记）可以以非常高的信噪比被测量，这增加了目标浓度确定的精确性。

在图 5 中，显示了系统 35 和感测设备 10。本发明提供了特别适用于生物传感器阵列的感测设备 10，诸如例如生物传感器或者生物芯片，即设置在单个衬底材料上的多个生物传感器。感测设备 10 是根据本发明的系统 35 的一部分。在本发明的感测设备 10 的优选应用中，感测设备 10 在用于交通安全的唾液中滥用药物的路旁经窗测试的检测试剂盒中使用。作为例子，该设备被装备用于竞争性测定（参

见图 2b)。感测设备 10 包括结合位点 2 被定位于其上的感测表面 1。结合位点 2 被提供为特异性结合到捕获分子 3 和目标 6。目标 6 是生物实体（例如滥用的药物），而捕获分子 3 是已经偶联到标记 4 的目标状分子。实体 3 和 6 都可结合到位点 2，因此这被称为竞争性测定形式。设备还可被装备用于抑制测定（参见图 2c），但出于简化的原因，在本段中仅仅解释了竞争性测定的情况。感测设备 10 包括衬底 20。优选但非强制的是，感测设备 10 包括磁场产生装置 13。至少如果没有磁场产生装置 13 在感测设备 10 的衬底 20 中设置，感测设备 10 外部的磁场产生设备 40 常常与本发明的系统 35 一起存在。系统 35 还包括至少形成通道或者小室 22 等的外壳 21，以便提供足够的用于流体 5、特别是用于含有附着到标记 4 的目标状捕获分子 3 的液体的空间。此外，流体 5 包含目标 6。

在另一种优选实施方式中，图 5 的设备被装备用于抑制测定形式（参见图 2c）。在该情况下，结合位点 2 是与传感器表面 1 偶联的目标状分子。目标 6 是生物实体，诸如滥用的药物等，并且捕获分子 3 是可特异性结合目标 6 和目标状结合位点 2 的生物实体（例如抗目标抗体）。这被称为抑制测定形式，因为目标 6 与标记 4 的结合部分或者全部抑制了标记 4 对目标结合位点 2 的结合。

通过上面两个例子显而易见的是，该设备可被装备用于不同测定形式的范围，例如竞争性、抑制、位移、夹心测定。如同本领域公知的那样，生物化学和化学物种（例如目标、目标状分子，标记、结合位点）可立即或者顺序混合在一起。为了提高速度，有利地是将反应物立即混合在一起。在后一种情况下，该过程的动力学和结合过程的实际顺序例如取决于扩散和结合速度。

注意，传感器或者芯片衬底可以是任何合适的有机或无机材料的机械载体，例如玻璃、塑料、硅或者这些的组合。在感测设备 10 的优选实施方式中，电子电路 30 被设置在衬底 20 上。电子电路 30 被设置以采集由定位在衬底 20 中的磁性传感器元件 11 采集或测定的信号或者数据。在本发明的替代实施方式中，电子电路 30 还可被定位在衬底 20 之外。

在图 6 中,显示了感测元件 10 的第一种实施方式的示意性表示。在衬底 20 中定位感测表面 1 和磁性传感器元件 11。此外,磁场产生装置 13 定位在感测元件 10 的衬底 20 中。磁场产生装置 13 生成磁场 130。如果存在外部磁场产生装置 40 (参见图 5),前述磁场 130 将成为由磁场产生装置 30 与外部磁场产生装置 40 一起生成的磁场分量。

磁场产生装置 13 例如可以是磁性物质(旋转或者非旋转)和/或导体,例如诸如电流导线 13。在所描述的实施方式中,磁场产生装置 13 优选由电流导线产生。标记 4 的旋转和/或平移运动的检测可优选磁性地进行。在本发明的第一以及下列实施方式中,磁性检测可优选通过使用集成磁性传感器元件 11 来进行。各种类型的传感器元件 11 可被使用,例如诸如霍尔传感器、磁阻抗、SQUID,或者任何一种合适的磁性传感器。磁性传感器元件 11 优选作为磁致电阻元件被提供,例如 GMR 或者 TMR 或者 AMR 传感器元件 11。旋转磁场产生装置可通过电流导线以及集成在感测设备 10 的衬底 20 中的电流产生装置来提供。磁性传感器元件 11 可具有例如细长(长而且窄)的条带几何形状。因此,旋转磁场通过在集成电流导线中流动的电流而施加到磁性标记 4。优选地,电流导线可以以这种方式定位:它们在磁性标记 4 存在于其中的体积中产生磁场。

在图 7 中,显示了传感元件 10 的第二种实施方式的示意性图示。在衬底 20 中被定位了传感器表面 1 和磁性传感器元件 11。感测表面 1 包括由参考标号 14 共同表示的第一和第二表面区域作为分辨装置。独立地,第一和第二表面区域分别由参考标号 141 和 142 表示。

在图 8 中,显示了感测元件 10 的第三种实施方式的示意性表示。在衬底 20 中定位感测表面 1 和磁性传感器元件 11。此外,第一磁场产生装置 131 和第二磁场产生装置 132 被定位在感测元件 10 的衬底 20 中,从而一起生成磁场 130。另外,感测表面 1 包括由参考标记 14 共同表示的作为分辨装置的另一部分的第一和第二表面区域。在图 8 中可以看出,在磁性传感器元件 11 的位置处,由第一和第二磁场产生装置 131、132 形成的磁场的分量至少关于得到的磁场分量而补偿,磁性传感器元件 11 对该分量敏感。

施加的磁场 130 使其在标记 4 上产生扭矩。在这种方式中，标记 4 使用磁场 130 相对于另一主体（例如另一标记 4，感测表面 1 等）旋转。如前所述，标记 4 含有本领域公知的磁性物质。标记 4 例如可以是磁珠、磁性粒子、磁杆、非磁性矩阵(non-magnetic matrix)内部的磁性粒子或者磁性物质串。有关标记 4 的旋转或者运动自由的参数可通过感测设备 10 检测。根据本发明的方法允许高频运动自由或者旋转自由(motional freedom)测量。通过这种类型的测量，特异性附着与非特异性附着的生物实体 3 之间的区分是可能的，并且由此可以检测以不同方式结合到感测表面 1 的标记 4 的不同浓度。

确定特异性附着与非特异性附着的生物实体 3 的不同浓度的另一种可能性是提供与至少第一和第二表面区域协同的感测表面 1 的梯度计状配置。通过在感测表面 1 中提供这种结构，能够导出与磁性标记 4 的表面浓度有关的附加信息。这在国际专利申请 WO 03/054566 中更详细地被解释，其有关下列事项的内容通过引用而包含在本申请中：

- 根据第一、第二和第三实施方式，一种具有至少第一表面区域和第二表面区域的感测表面 1 的结构，为了确定磁性标记 4 的体积密度和/或磁性标记 4 的面密度。

- 测量磁性标记 4 的体积密度和面密度的方法。

在本发明中，重点放在本发明在免疫测定中的应用上。对本领域技术人员来说显而易见的是，还有具有其他目标和其它结合实体的测定可被使用，例如核酸和杂交实体的测定。

我们注意到，上述发明可与传感器多路技术（multiplexing）和/或标记多路技术结合。在传感器多路技术中，传感器被用于不同类型的结合位点 2。同样，标记 4 上的捕获分子 3 可以是不同类型的。在标记多路技术中，使用不同类型的标记 4，例如具有不同尺寸或者不同磁性特征的标记。

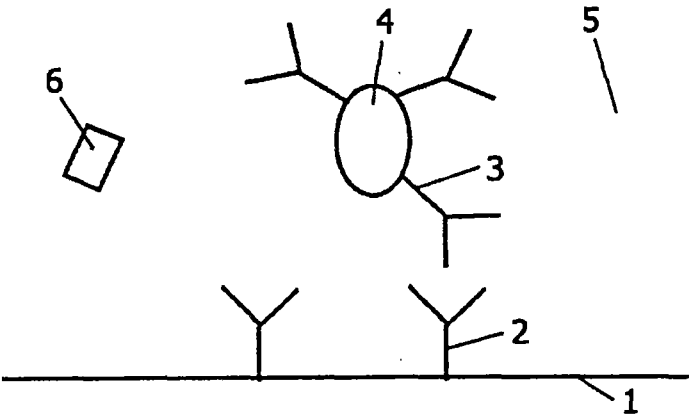


图1

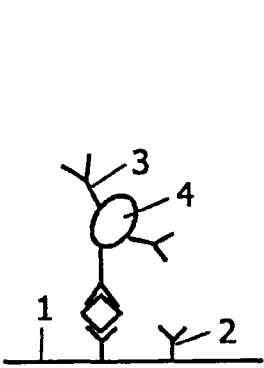


图2a

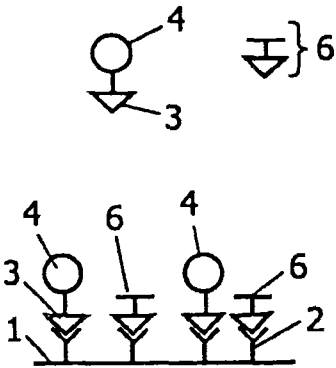


图2b

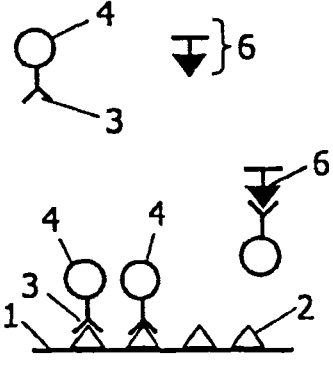


图2c

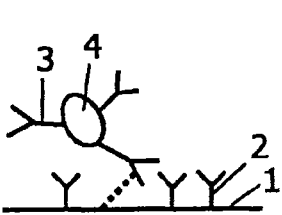


图3.1a

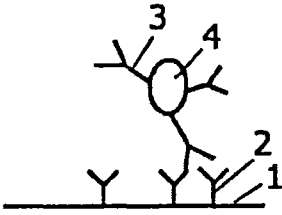


图3.1b

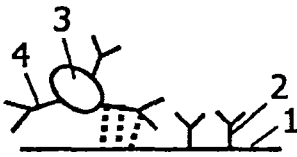


图3.2a

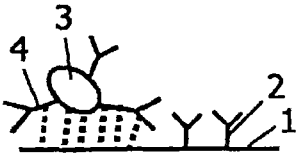


图3.2b

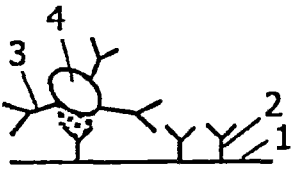


图3.2c

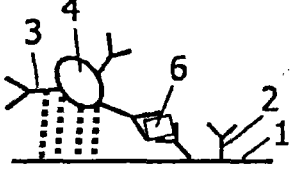


图3.3

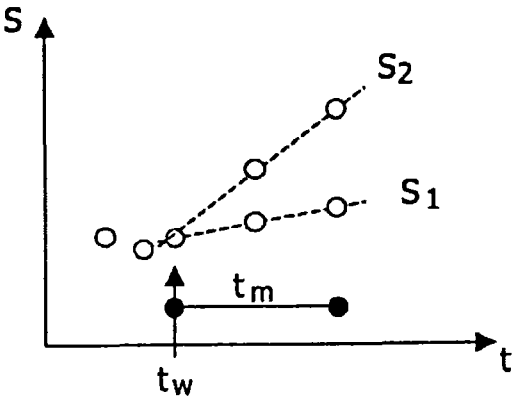


图4

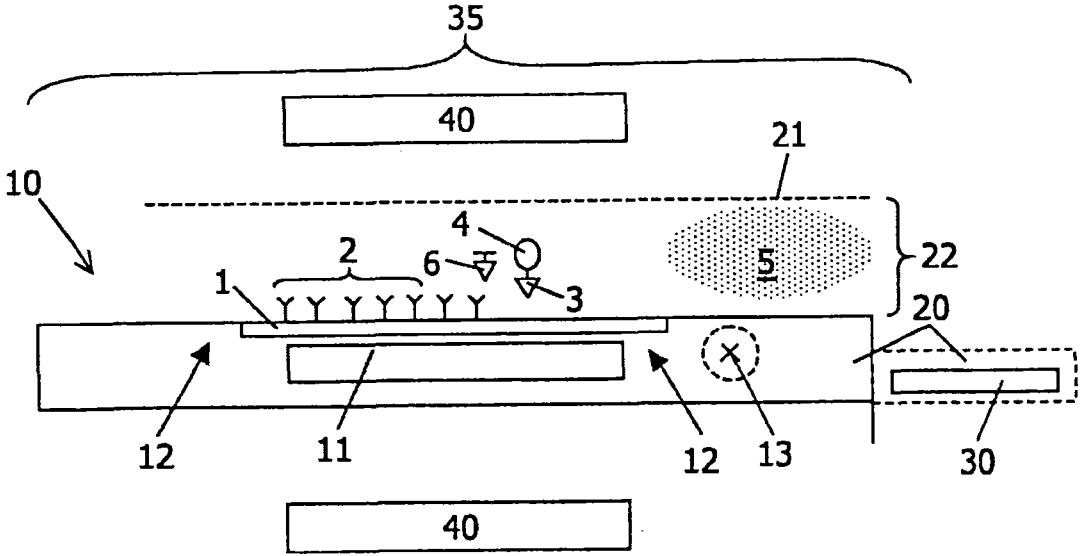
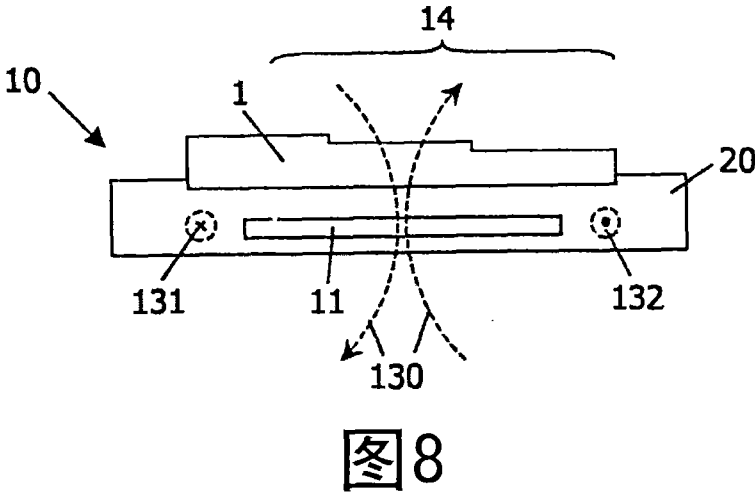
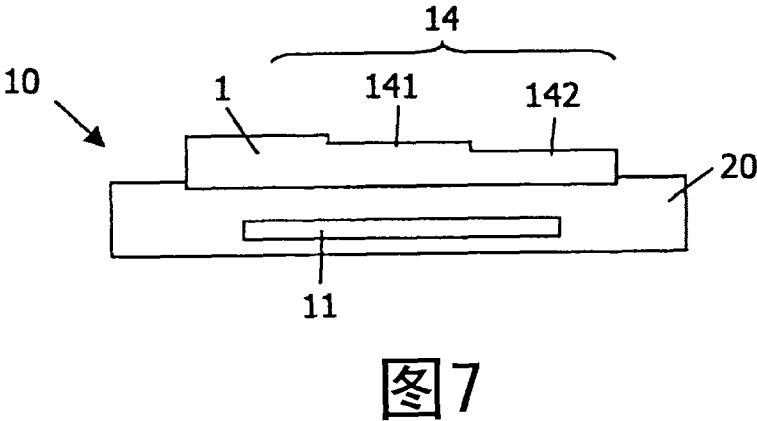
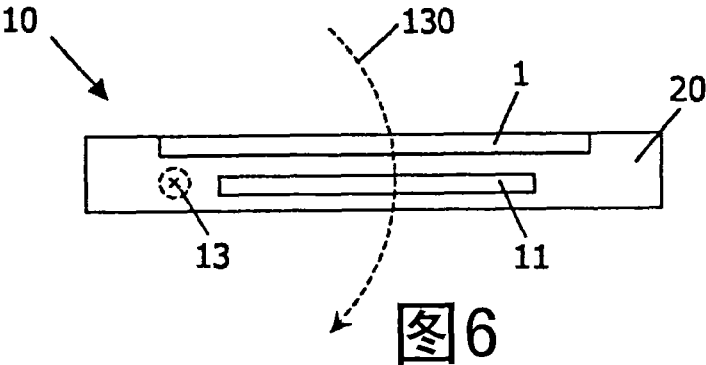


图5



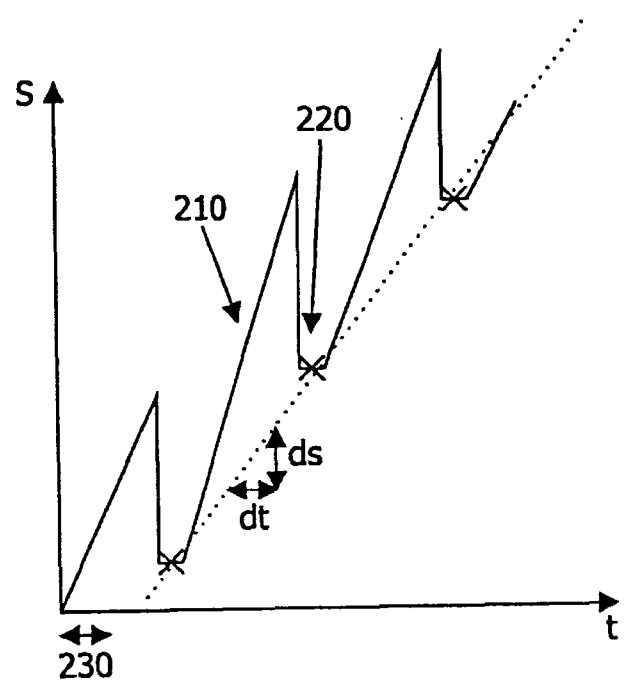


图9