



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **332532**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 27/333 (2006.01)

G01N 27/416 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20031284	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	2003.03.20	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	2003.03.20	(30)	Prioritet	2002.03.21, US, 105050
(41)	Alm.tilgj	2003.09.22			
(45)	Meddelt	2012.10.15			
(73)	Innehaver	LifeScan Inc, 1000 Gibraltar Drive, MS 3 D, US-CA95035-6312 MILPITAS, USA			
(72)	Oppfinner	Ronald Christopher Chatelier, 13 Apple Grove, Bayswater, Vic 3135, AU-, Australia			
		Alastair Hodges, 15 Jasmine Court, Blackburn South, Vic 3130, AU-, Australia			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for å detektere et målantigen i en fluidprøve samt engangsinnretning egnet for å praktisere nevnte fremgangsmåte			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0208763 A2 EP 0603954 A2 US 6325973 B1 WO 0208762 A1			
(57)	Sammendrag				

Denne oppfinnelsen beskriver en kvantitativ, billig, engangsimmun sensor som ikke krever vasketrinn og som dermed ikke genererer flytende avfall. Videre, i foretrukne utførelsesformer av sensoren kreves det ingen tidstrinn av brukeren, og sensoren kan lett adopteres til antigen-antistoffinteraksjoner over et bredt kinetisk område.

Feltet for oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører fremgangsmåte for å detektere et målantigen i en fluidprøve samt engangsinnretning egnet for å praktisere nevnte fremgangsmåte.

5

Bakgrunn for oppfinnelsen

Biomedisinske sensorer blir anvendt for å rapportere nærværet og/eller konsentrasjonen av en rekke analyserte stoffer. Når det analyserte stoffet er et protein, er det følgende elementet vanligvis et antistoff, fordi interaksjonen av antistoffet med proteinet (antigenet) er veldig spesifikt. Slike immunoassays faller vanligvis i to kategorier: et "ja/nei-svar" blir oppnådd for eksempel ved enkelt visuell deteksjon, eller en konsentrasjon av antigenet bestemmes ved en kvantitativ fremgangsmåte. De fleste kvantitative fremgangsmåtene involverer dyre utstyrsdeler slik som scintillasjonstellere (for å måle radioaktivitet), spektrofotometere, spektrofluorometere (se for eksempel U.S. 5,156,972), overflateplasmonresonansinstrument (se for eksempel U.S. 5,965,456) og lignende. Det ville derfor være en fordel å utvikle et kvantitativt immunoassay som både er billig og enkelt nok til å anvende, slik at det er passende for hjemme- eller feltanvendelse. En slik immunosensor krever ingen sentrifugering, fortynning, pipettering, vasking eller tidstrinn og danner minimalt med avfall.

Konvensjonelle immunoassays er klassifisert i to kategorier: konkurranseanalyser og sandwichanalyser. I en konkurranseanalyse, blir antigenet i testprøven blandet med et antigenprobekompleks (vanligvis referert til som et reporterkompleks), og blandingen konkurrerer så for binding til antistoffet. Proben kan være en radioaktivt isotop, et enzym, en fluorfor eller en kromofor. I en sandwich immunoanalyse binder antigenet i testprøven seg til antistoffet, og så binder et sekundært antistoffprobekompleks seg til antigenet. I disse tidligere analysefremgangsmåtene i feltet, var det vanligvis nødvendig med ett eller flere vasketrinn. Vasketrinnene introduserer kompleksitet til analyseprosedyren, og kan danne biohasardiøs flytende avfall. Det vil derfor være en fordel å utvikle en innretning for å utføre en immunoassay som ikke krever noen vasketrinn, og som er passende for en enkel anvendelse som engangsinnretning.

WO0208763 omtaler en immunsensor anordning for deteksjon av et antigen, hvor anordningen omfatter et reaksjonskammer, et immobilisert antistoff i reaksjonskammeret samt et immobilisert reporterkompleks som omfatter en probe koblet til et reporterkompleksantigen som kan binde det immobiliserte antistoff når

35

tillatt å komme i kontakt med dette. Reporterkompleksantigenet er fysisk adskilt fra det immobiliserte antistoff i reaksjonskammeret før introduksjon av prøve, som inneholder antigen som skal detekteres, i reaksjonskammeret.

- 5 EP0603954 omtaler analytiske elementer og metode for å anvende dem for å detektere kjemiske og biologiske substanser i en prøve og da spesielt substanser som stabiliserer peroksidasemerkede immunoreaktanter i immunoreaksjoner som utføres under tørre betingelser og ikke i nærvær av væsker. Både sandwichanalyser og Konkurransenalyser er nevnt.

10

US6325973 vedrører et apparat for utførelse av bindingsanalyser for en analytt av interesse i en prøve, hvor analysen er basert på måling av elektrokjemiluminisense ved en elektrodeoverflate. Analytten i prøven blir fanget på en partikkel som har en overflatekomponent som er i stand til å binde til analytten som er løst i prøven.

- 15 Partikkel med overflatebundet analytt blir så transportert til en elektrodeoverflate, hvor transporten blir drevet av gravitasjon, sentrifugering eller magnetiske krefter.

WO0208762 vedrører et apparat og en fremgangsmåte for evanescent-lys-fluoranalyser som involverer en "waveguide" i en angengsinnretning for deteksjon og kvantifisering av en analytt in en fluidprøve. Mengden fluorescensmolekyler som er bundet til "waveguide" korrelerer med den til analytt i fluidprøven. Ved å passere lys gjennom "waveguide", dannes et evanescent felt som selektivt eksiterer fluorescens molekyler som er bundet til "waveguide". Lys sendt ut fra fluorescensmolekylet detekteres ved en lys-detekteringsanordning, og mengden analytt i fluidprøven blir bestemt.

25

Oppsummering av oppfinnelsen

Et første aspekt ved oppfinnelsen vedrører en engangsinnretning for bruk ved deteksjon av et målantigen i en fluidprøve, kjennetegnet ved at innretningen omfatter et reaksjonskammer; et immobilisert antistoff festet i reaksjonskammeret; et reporterkompleks som omfatter en probe og et reporterkompleksantigen, hvori reporterkompleksantigenet er et pseudo-antigen eller et modifisert antigen, hvori proben er koblet til reporterkompleksantigenet, hvori reporterkompleksantigenet er bundet til det immobiliserte antistoffet og hvori reporterkompleksantigenet binder svakere enn målantigenet til det immobiliserte antistoffet; et deteksjonskammer; en prøveåpning til reaksjonskammeret og en prøvepassasjevei mellom reaksjonskammeret og deteksjonskammeret.

Uttrykket "pseudoantigen", som det anvendes her, er et vidt uttrykk og blir anvendt på sin vanlige måte, som inkluderer, uten begrensning, antigener som er forskjellige fra antigenet av interesse som binder seg til det immobiliserte antistoffet, men ikke så sterkt
5 som antigenet av interesse.

Uttrykket "modifisert antigen", som det brukes her, er et bredt uttrykk og anvendes på sin vanlige måte, som inkluderer, uten begrensning, antigener som er blitt kjemisk eller på annen måte modifisert slik at det modifiserte antigenet binder seg til det
10 immobiliserte antistoffet, men ikke så sterkt som antigenet av interesse.

I en utførelsesform ifølge oppfinnelsen kan proben inkludere radioaktive isotoper, kromoforer eller fluorforer.

15 I en annen utførelsesform kan proben inkludere et enzym, slik som glycolase dehydrogenase. Når proben er et enzym, kan deteksjonskammeret videre inkludere et enzymsubstrat, for eksempel et oksiderbart substrat slik som glykose. Deteksjonskammeret kan også videre inkludere en formidler, slik som diklorfenolindofenyl, eller komplekser mellom transisjonsmetaller og
20 nitrogeninnholdende heteroatomiske deler eller jerncyanid. Innretningen kan videre inkludere en buffer som justerer pH'en i prøven, slik som en fosfat eller en mellitat. Innretningen kan også inkludere en stabilisator, hvor stabilisatoren stabiliserer ett eller flere av målantigenene, reporterkompleksantigenet, enzymet og det immobiliserte antistoffet. Enzymsubstratet kan være støttet på en indre overflate av
25 deteksjonskammeret.

I en utførelsesform kan det immobiliserte antistoffet være støttet på en indre overflate til et reaksjonskammer.

30 I en utførelsesform inkluderer innretningen også et støttemateriell. Støttemateriellet kan være innen deteksjonskammeret, og kan inkludere en primær substans slik som et enzymsubstrat, en formidler eller en buffer, som kan være støttet på eller finnes innen støttemateriellet. Støttemateriellet kan være innen reaksjonskammeret, og kan inkludere en sekundær substans slik som immobilisert antistoff, reporterkomplekset eller et
35 middel som hindrer ikke spesifikt binding av proteiner til den indre overflaten til et reaksjonskammer, som kan være støttet på eller finnes innen støttematerialer. Støttematerialer kan inkludere et nettmateriale, for eksempel et nettmateriale som

inkluderer en polymer slik som polyolefin, polyester, nylon, cellulose, polystyren, polykarbonat, polysylfon eller blandinger av dem. Støttematerialet kan inkludere et fibrøst fyllmateriale slik som et fibrøst fyllmateriale som inkluderer en polymer slik som polyolefin, polyester, nylon, cellulose, polystyren, polykarbonat, polysylfon eller
5 blandinger av dem. Støttematerialet kan inkludere et porøst materiale, slik som et sintret pulver, eller et makroporøst membran, for eksempel en makroporøs membran som inkluderer polymert materiale slik som polysulfon, polyvinyliden, difluorid, nylon, celluloseacetat, polymetakrylat, polyakrylat eller blandinger av dem. Støttematerialet kan inkludere en kule.

10

I en utførelsesform inkluderer deteksjonskammeret en primær elektrode og en sekundær elektrode. Minst en av den primære elektroden og den sekundære elektroden inkluderer et materiale slik som aluminium, kobber, nikkel, krom, stål, rustfritt stål, palladium, platina, gull, iridium, karbon, karbon blandet med bindemiddel, indiumoksyd, tinnoksyd,
15 en ledende polymer eller blandinger av dem.

20

I en utførelsesform kan en deteksjonskammervegg være transparent fra en avgitt stråling eller absorbert av proben, og strålingen er en indikasjon på en tilstedeværelse eller fravær av reporterkomplekset i deteksjonskammeret.

I en utførelsesform inkluderer innretningen en detektor som detekterer en tilstand hvor reaksjonskammeret er vesentlig fylt.

I en utførelsesform inkluderer innretningen et gjennomhullet middel som danner en
25 deteksjonskammeråpning i en fjærn ende av deteksjonskammeret. Innretningen kan også inkludere en reaksjonskammeråpning ved en fjærn ende av reaksjonskammeret.

I en utførelsesform inkluderer målantigenet et humant C-reaktivt protein. Reporterkompleksantigenet kan inkludere et monomert C-reaktiv protein. Alternativt
30 kan reporterkompleksantigenet inkludere et C-reaktivt protein utlettet fra en ikke-human art eller et kjemiskmodifisert C-reaktivt protein, hvor en affinitet av det kjemisk modifiserte C-reaktive proteinet til antistoffet er mindre enn en affinitet av det humane C-reaktive proteinet til antistoffet.

35 I en utførelsesform inkluderer en vegg i deteksjonskammeret, eller en vegg i reaksjonskammeret, et materiale slik som polyester, polystyren, polykarbonat, polyolefin, polyetylen tereftalat eller blandinger av dem. Veggene i deteksjonskammeret,

eller veggen i reaksjonskammeret, kan også inkludere en fyllmasse, slik som titandioksyd, karbon, kiesel, glass og blandinger av dem.

I en utførelsesform inkluderer proben en enzym kofaktor, slik som flavin
 5 mononukleotid, flavin adenin dinukleotid, nikotinamid adenin dinukleotid eller pyrrolokinolinkinin. Enzym kofaktoren kan være koblet til reporterkompleksantigenet gjennom et fleksibelt avstandsstykke. Deteksjonskammeret kan også inkludere et enzymsubstrat eller et apoenzym.

10 I en utførelsesform inkluderer proben en enzymaktivitetregulator, slik som en kinase eller fosforylase. Deteksjonskammeret kan også inkludere et enzymsubstrat, eller et enzym.

I en utførelsesform inkluderer proben en proteinsubenhet som er del av et
 15 multisubenhetsenzym.

Et andre aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for å bestemme en mengde av et målantigen i en fluidprøve, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter følgende trinn:

20 å plassere fluidprøven i et reaksjonskammer som inneholder et immobilisert antistoff og et reporterkompleks som omfatter en probe koblet til et reporterkompleksantigen, hvori antistoffet er festet i reaksjonskammeret, hvori reporterkompleksantigenet er bundet til det immobiliserte antistoffet, hvori reporterkompleksantigenet er et pseudo-antigen eller et modifisert antigen, og hvori reporterkompleksantigenet binder seg svakere enn
 25 målantigenet til det immobiliserte antistoffet:

å dissosiere en del av reporterkompleksantigenet fra det immobiliserte antistoffet inn i fluidprøven;

å binde en del av målantigenet til det immobiliserte antistoffet;

å overføre fluidprøven til et deteksjonskammer; og

30 å bestemme en mengde av reporterkompleks i fluidprøven, hvori mengde av reporterkompleks er en indikasjon på mengden av målantigen initielt i fluidprøven

I en utførelsesform inkluderer trinnet for å overføre den flytende prøven til et deteksjonskammer og overføre den flytende prøven til en elektrokjemisk celle som har
 35 en primær elektrode og en sekundær elektrode. Trinnet for å bestemme en mengde av reporterkompleks i den flytende prøven kan også inkludere: å gjøre et potensial mellom den primære elektroden og den sekundære elektroden i den elektrokjemiske cellen; og å

måle en strøm, hvor strømmen er en indikasjon på en mengde reporterkompleks tilstede i den flytende prøven, og hvor mengden av reporterkompleks er en indikasjon på mengden av målantigen.

- 5 I en utførelsesform inkluderer trinnet for overføring av den flytende prøven til et deteksjonskammer og overføre den flytende prøven til et deteksjonskammer som inkluderer en elektromagnetisk strålingsoverføringsdel. Trinnet for å bestemme en mengde av reporterkompleks i den flytende prøven kan også inkludere trinnet av: å utsette den elektromagnetiske strålingsoverføringsdelen til elektromagnetisk stråling,
- 10 hvor den elektromagnetiske strålingen passerer gjennom den flytende prøven eller reflekterer fra den flytende prøven; og å måle en egenskap hos den elektromagnetiske strålingen etter at den har passert gjennom den flytende prøven eller reflekterer fra den flytende prøven, hvor egenskapen er en indikasjon på en mengde reporterkompleks tilstede i den flytende prøven, og hvor mengden av reporterkompleks er en indikasjon
- 15 på mengden av målantigen.

Kort beskrivelse av tegningene

- Fig. 1** viser et grunnriss (ikke i skala) av en immunosensor i en første foretrukket utførelsesform som inkorporerer i en elektrokjemisk celle.
- 20

Fig. 2 viser et tverrsnitt (ikke i skala) langs linjen A-A' av en utførelsesform av immunosensoren i figur 1.

- Fig. 3** viser et grunnriss (ikke i skala) av en immunosensor av en foretrukket utførelsesform som inkorporerer en elektrokjemisk celle.
- 25

Fig. 4 viser et tverrsnitt (ikke i skala) langs linjen B-B' av en utførelsesform av immunosensoren i figur 3.

- Detaljert beskrivelse av de foretrukne utførelsesformene**
- 30

- En sensorremse blir tilveiebragt som inneholder to kammerer: et reaksjonskammer og et deteksjonskammer. En prøve blir mottatt i reaksjonskammeret, hvor komponentene til prøven gjennomgår en immunreaksjon. Et eller flere produkter i immunreaksjonen blir
- 35 detektert i deteksjonskammeret for å kvantitere antigenet tilstede i prøven.

Reaksjonskammeret og deteksjonskammeret er arrangert slik at prøven kan strømme fra reaksjonskammeret inn i deteksjonskammeret.

Etter at immunreaksjonen har funnet sted i reaksjonskammeret, blir minst noe av reaksjonsprøven overført til deteksjonskammeret, hvor nærværet av en probe blir detektert og analysert for å skaffe et resultat. Det er foretrukket at tilstrekkelig prøve blir overført slik at deteksjonskammeret blir tilstrekkelig fylt, nemlig at tilstrekkelig prøve
 5 blir overført til deteksjonskammeret slik at nærværet av et probe kan detekteres og analyseres av deteksjonsfremgangsmåten som brukes.

Reaksjonskammeret inneholder antistoffer til antigenet av interesse mobilisert innen kammeret. Antistoffene kan immobiliseres på en vegg til selve kammeret. Alternativt
 10 kan antistoffene immobiliseres på en støtte som finnes innen reaksjonskammeret. Passende støtter inkluderer, men er ikke begrenset til, fibrøse materialer, makroporøse materialer, pudrede materialer eller i bestemte foretrukne utførelsesformer, kuler av et materiale slik som er velkjente innen feltet for å støtte antistoffer.

I de foretrukne utførelsesformene er de immobiliserte antistoffene bundet til det som er referert som et "pseudoantigen" koblet til en probe. Pseudoantigenproben binder seg til det immobiliserte antistoffet, men ikke så sterkt som antigenet av interesse. Hvis for eksempel antigenet som skal detekteres er et humant protein, så kan en passende pseudoantigenprobe inkludere en dyreversjon av det samme proteinet, slik som et
 20 hundeprotein eller et griseprotein, koblet til proben. I dette eksempelet er antistoffer til den humane versjonen av proteinet immobilisert i reaksjonskammeret, og dyreversjonen av proteinet, koblet til en passende probe, er bundet til det immobiliserte antistoffet slik at det danner et antistoff-pseudoantigen-probekompleks.

Når prøven fyller reaksjonskammeret, dissosierer en liten porsjon av pseudoantigenproben inn i løsning, siden den er relativt svakt bundet til antostoffet. En dynamisk likevekt vil eksistere mellom bundet pseudoantigenprobe og fri
 pseudoantigenprobe, og la det være igjen frie antigenbindende seter. Hvis det er antigen i løsningen, så vil det binde seg sterkt til de frie antistoffbindende setene før
 30 pseudoantigenproben og dermed blir pseutoantigenproben i løsningen. Denne prosessen vil fortsette inntil vesentlig alt antigenet i prøven er bundet til antostoffene, og det er en lik mengde pseudoantigenprobefritt i løsningen. Dermed vil hvert antigen som binder seg til et immobilisert antistoff omplassere et pseudoantigen probe til løsning.

Når hele, eller en forhåndsbestemt fraksjon av antigenet i prøven er bundet til de mobiliserte antistoffene, reflekterer konsentrasjonen av pseudoantigenprobe i løsning den opprinnelige konsentrasjonen av antigen i prøven. I de foretrukne

utførelsesformene, avhenger likevekten mellom fri og bundet pseudoantigenprobe av å sikre at antigen i løsning ender opp bundet til antistoffet før pseudoantigenproben.

Følgelig blir en pseudoantigen probe brukt som binder seg svakere til antistoffet enn målantigenet, men det er ikke nødvendig å fysisk fjerne pseudoantigenproben fra

5 antistoffet før introduksjon av prøven kommer slik som i visse tidligere fremgangsmåter.

Etter at immunoreaksjonen har funnet sted, blir den flytende prøven som inneholder enhver pseudoantigen probe som er frigitt fra antistoffene overført til

10 deteksjonskammeret. I deteksjonskammeret blir konsentrasjonen av pseudoantigenprobe tilstede i prøven målt og et resultat ervervet.

En liten mengde av pseudoantigenproben kan dissosiere inn i løsning selv i fraværet av antigen i prøven, som et resultat av den bundne og frie pseudoantigenproben som når

15 likevekt i løsning. Hvis dette finner sted, så skyldes signalet som lages i deteksjonskammeret at denne frie pseudoantigenprobe blir behandlet som et bakgrunnssignal, som blir subtrahert for antigen konsentrasjonsresultatet som del av analyseprosedyren.

20 I det samtidig forestående søknadsnummer 09/616,433 arkivert 14. juli 2000, blir en immunoassaystrimmel med en koblet immunreaksjon og deteksjonskammer beskrevet.

Ulikt sensoren som er beskrevet her, som bruker en pseudoantigenprobe som initielt var kompleksert med et antistoff immobilisert på en overflate innen reaksjonskammeret, er antistoffene i sensoren i søknadsnummer 09/616,433 før introduksjonen av prøven inn i reaksjonskammeret, immobilisert på en overflate og antigenprobe blir immobilisert på en annen overflate i reaksjonskammeret. Når prøven er introdusert inn i

reaksjonskammeret, løses antigenproben opp i løsningen og konkurrerer med antigenet i prøven for antistoffsetene. Fremgangsmåten for å anvende sensoren i søknadsnummer 09/616,433 avhenger primært av kinetiske faktorer for å sikre at antigenet binder seg til antistoffer (ved å komme dit først) i preferanse over antigenproben. Følgelig er det et behov for romlig å fjerne antigenproben fra antistoffet i reaksjonskammeret, og sensoren kan fungere når antigenet og antigenproben bindes med lik styrke til antistoffet.

35 I foretrukne utførelsesformer er sensoren en enkel trinn immunsensor uten vask.

Sensoren er en engangsinnretning som er enkelt å anvende som bruker et reaksjonskammer og et deteksjonskammer. Enhver passende deteksjonsfremgangsmåte

kan brukes. Passende deteksjonsfremgangsmåter inkluderer for eksempel visuell deteksjon hvor utviklingen av en farge observeres, eller spektroskopisk deteksjon hvor reflektert eller transmetert lys anvendes for å måle forandringer i lysabsorbanse. I en foretrukket utførelsesform er deteksjonsfremgangsmåten elektrokjemisk, hvor den elektriske strømmen eller potensialet relatert til produktene fra immunreaksjonene blir målt.

Fremgangsmåter og innretninger for å erverve elektrokjemiske målinger av flytende prøver blir diskutert videre i samtidig pågående USpatent søknadsnummer 09/616,556 arkivert 14. juli 2000.

Tidsinnstillingen av de forskjellige testtrinnene, det vil si reaksjonstrinnet og deteksjonstrinnet, kan gjøres manuelt. Alternativt kan tidsinnstillingen gjøres automatisk som respons på et utløst signal som lages når reaksjonskammeret og/elle deteksjonskammeret fylles.

Utførelsesformer for sensorer som er passende for å anvende med elektrokjemisk deteksjon er illustrert i figur 1 og 2 og i figur 3 og 4. Figur 1 er et grunnriss av en første utførelsesform av en sensorstrimmel, og figur 2 er et tverrsnitt som viser detaljer av reaksjonskammeret og deteksjonskammeret. Figur 3 er et grunnriss av en annen utførelsesform av en sensorstrimmel, og figur 4 er et tverrsnitt som viser detaljer av reaksjonskammeret og deteksjonskammeret.

Sensorer

Immunsensorene i den foreliggende oppfinnelsen kan lages ved å anvende velkjente tynnskikts innretningsfabrikasjonsteknikker som blir anvendt for å lage elektrokjemiske glykosefølende innretninger (se for eksempel U.S. 5,942,102). Slike teknikker, med visse modifikasjoner, kan også anvendes for å lage immunsensorer som bruker ikke-elektrokjemiske deteksjonsfremgangsmåter.

I de foretrukne utførelsesformene av immunsensorene illustrert i figurene 1 og 2 og i figurene 3 og 4, omfatter deteksjonskammeret en elektrokjemisk celle. Immunsensorene kan lages ved å samle sammen forskjellige tynnskikt av passende formede materialer ifølge tynnskiktsensorfabrikeringsfremgangsmåter såvel som de som er kjent i fagfeltet. Typisk involverer fabrikasjonsprosessen å legge oppå hverandre ett eller flere mellomlag mellom et topplag og et bunnlag.

I en foretrukket utførelsesform er sensoren **20** en elektrokjemisk celle **28** som bruker et enzym, for eksempel glykoseoksydase eller glykosedehydrogenase, som proben, som illustrert i figur 1, et grunnriss av en slik sensor **20**, og figur 2, et tverrsnitt av sensoren gjennom linje A-A'. Reaksjonskammeret **22** og deteksjonskammeret **28** ble laget ved å danne en åpning som strekker seg gjennom et lag med elektrokjemisk resisivt materiell **36**. Åpningen blir formet slik at den definerer en sidevei av både reaksjonskammeret **22** og deteksjonskammeret **28**, såvel som prøvepassasjeveien **38** mellom de to kammerne **22** og **28**. Ved å utvide åpningen fra den nærmeste enden **24** av reaksjonskammeret **22** gjennom kanten av arket **37**, blir prøveinngangen **24** også dannet. I en utførelsesform definerer tykkelsen av arket **36** hele høyden av reaksjonskammeret **22** og deteksjonskammeret **28** som er den samme. I en annen utførelsesform er høyden av reaksjonskammeret **22** større enn den til deteksjonskammeret **28**. Et reaksjonskammer **22** med større høyde enn deteksjonskammeret **28** lages ved å legge flere lag **32**, **34** og **36** sammen. Midtarket **36** av laget har en åpning som definerer sideveggene **74** og **76** i både reaksjonskammeret **22** og deteksjonskammeret **28** som beskrevet over. Dette mellomlaget **36** er lagt mellom to eller flere tilleggslag **32** og **34**, tilleggslagene **32** og **34** har en åpning som definerer sideveggen **74** i bare reaksjonskammeret **22**, lagene **32** og **34** definerer dermed endeveggene **60** og **62** i deteksjonskammeret **28**. I denne utførelsesformen omfatter endeveggene **60** og **62** i deteksjonskammeret elektrodene **52** og **54**, som kan lages som beskrevet nedenfor.

Som illustrert i figur 2 blir antistoffene **44** bundet til bunnen **40** i reaksjonskammeret **22**. Pseudiantigenproben **50** er kompleks med antistoffene **44**. Antistoffet kan være bundet til en passende overflate innen reaksjonskammeret, for eksempel bundet til en vegg eller en overflate på en støtte innen reaksjonskammeret **22**.

Et primært tynt elektronlag **52** er festet eller dannet på en side **70** av flaket av det elektriske resistive materiale **36**, forlenget over åpningen til å danne deteksjonskammeret **28** og danner en endevegg **60**. Laget **52** kan være festet til flaten **36**, det vil si med et bindemiddel. Passende bindemidler inkluderer for eksempel varmeaktiverende bindemidler, trykksensitive bindemidler, varmekonserverte bindemidler, kjemisk konserverte bindemidler, varmesmeltede bindemidler, varmestømmende bindemidler og lignende.

Elektrodelaget **52** kan lages ved å overtrekke (for eksempel ved å sprute over dekket slik som utgreiet i WO97/18464 ved "screenprinting", eller ved enhver annen passende fremgangsmåte) en flate av det elektrisk resistive materialet **32** med et passende

materiale, for eksempel aluminium, kobber, nikkel, krom, stål, rustfritt stål, platinum, palladium, karbon, karbon blandet med et bindemiddel, indiumoksyd, tinnoksyd, blandede indium/tinnoksyd, gull, sølv, iridium, blandinger av dem, ledende polymerer slik som polypyrrol eller polyacetylen og lignende. Hvis elektrode **52** skal anvendes som en katode i den elektrokjemiske cellen, så inkluderer passende materialer for eksempel aluminium, kobber, nikkel, krom, stål, rustfritt stål, platinum, palladium, karbon, karbon blandet med et bindestoff, indiumoksyd, tinnoksyd, blandede indium/tinnoksyder, gull, sølv, iridium, blandinger av dem, ledende polymerer slik som polypyrrol eller polyacetylen og lignende. Hvis elektrode **52** skal anvendes som en anode i den elektrokjemiske cellen eller skal komme i kontakt med oksyderende substanser under sensorproduksjonen eller lagring, så inkluderer passende materialer for eksempel platina, palladium, karbon, karbon blandet med et bindemiddel, indiumoksyd, tinnoksyd, blandede indium/tinnoksyder, gull, sølv, iridium, blandinger av dem, ledende polymerer slik som polypyrrol eller polyacetylen og lignende. Materialer som er passende for anvendelse som elektrodene **52** og **54** er compatible med reagensene tilstede i sensoren **20**, det vil si de reagerer ikke kjemisk med reagenser ved det valgte potensiale eller under fabrikasjon og lagring av sensor.

Et andre tynt elektrodelag **54** blir festet på den motsatte siden **72** av det elektriske resistive materiale **36**, som også strekker seg over åpningen som danner deteksjonskammeret **28**, for å danne en andre endevegg **62**. I denne utførelsesformen, separerer det uvirksomme elektrisk ikke-ledende laget **36** de elektrodebærende substratene **32** og **34**. Helst holder det ikke-ledende laget **36** lagene **32** og **34** ved en på forhånd bestemt separasjon. Forutsatt at separasjonen er liten nok, det vil si mindre enn eller lik ca 500 mikroner, vil strømmen som strømmer mellom elektrodene **52** og **54** være direkte proporsjonal til konsentrasjonen av redusert formidler etter en passende kort tir realtvt til deteksjonstiden som brukes. I denne utførelsesformen er hastigheten for strømpoppgang direkte relatert til hastigheten av enzymreaksjonen og derfor mengden av enzym tilstede.

I visse utførelsesformer, kan en elektrodekomplikasjon forskjellig fra et motsatt forhold være å foretrekke, for eksempel et side-til-side-forhold, eller en parallell med forsøvet forhold eller trodene kan være identiske eller vesentlig like i størrelse, eller de kan være av forskjellig størrelse og/eller forskjellige fasonger. Elektrodene kan omfatte det samme ledende materiale, eller forskjellige materialer. Andre variasjoner i elektrodekonfigurasjonen, mellomrom og konstruksjon eller fabrikasjon vil være åpenbare for fagfolk.

I en foretrukket utførelsesform er elektrodelagene **52** og **54** festet i et parallelt motsatt forhold ved en distanse på mindre enn eller lik 500, 450, 400, 350, 300, 250 eller 200 mikrons, og mer ønskelig fra ca 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 eller 50 mikrons til ca 75, 100, 125, 150 eller 175 mikrons. I visse utførelsesformer kan det imidlertid være å foretrekke at elektrodemellomrommet er større enn 500 mikrons, for eksempel 600, 700, 800, 900 eller 1000 mikrons, eller til og med større enn 1, 2, 3, 4 eller 5 millimeter.

Det er typisk at volumet i deteksjonskammeret eller reaksjonskammeret er ca 0.3 mikroliter eller mindre til ca 100 mikroliter eller mer, helst ca 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 eller 0.9 mikroliter til ca 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 eller 90 mikroliter, og aller helst ca 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 eller 5 mikroliter til ca 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16 eller 18 mikroliter. I visse utførelsesformer kan imidlertid større eller mindre volumer være å foretrekke for en eller begge av reaksjonskammere og deteksjonskammere.

Elektrodene **54** og **52** i deteksjonskammeret **28** kan plasseres i elektrisk kontakt med et måleapparat (ikke vist) gjennom koblingsenden **66**. Koblingene (ikke vist) er i elektrisk kobling med elektrodene **54** og **56** i deteksjonskammeret **28** via ledende baner (ikke vist). I den foretrukne utførelsesformen som er illustrert i figur 1, består disse ledende banene av utvidelser av hinnene av leder **52** og **54** overtrukket på de indre overflatene til **32** og **34**. Måleapparatet i forbindelse med forbindelsesområdet **66** er i stand til å bruke et potensial mellom elektrodene **52** og **54** i deteksjonskammeret **28**, analysere de elektriske signalene som dannes, viser en respons, med eller uten å lagre responsen i hukommelse, og med eller uten å overføre lagrede responser til en ekstern innretning slik som en printer eller computer.

I andre utførelsesformer som bruker elektrokjemisk deteksjon, blir strimler av ledende materiale på en eller begge de interne overflatene i deteksjonskammeret stort sett anvendt, med minst to elektroder tilstede, det vil si en følede elektrode og en motsatt/referanseelektrode. Valgfritt kan en tredje elektrode som tjener som en separat referanseelektrode være tilstede.

Når man bruker potensiometriske deteksjonsfremgangsmåter, er måleapparatet i stand til å måle forskjellen i potensiale mellom en følbare elektrode og en reformselektrode, men de trenger ikke å være i stand til å bruke et potensiale mellom elektrodene.

I utførelsesformer hvor visuell deteksjon eller reflektans spektroskopi er deteksjonsfremgangsmåten som anvendes, er lagene **32** og **46** og/eller lagene **34** og **42**

transparente for strålingsbølgelengden som skal observeres. I tilfelle med visuell deteksjon, blir en enkel fargeforandring i deteksjonskammer **28** observert. I tilfelle med reflektansspektroskopi, stråler deteksjonsstråling gjennom lagene **32** og **46** og/eller lagene **34** og **42**, og strålingen som reflekteres fra løsningen i deteksjonskammer **28** blir analysert. I det tilfelle hvor transmisjonsspektroskopi er deteksjonsfremgangsmåten, er lagene **32**, **46**, **34** og **42** transparente for stråling ved den bølgelengden som er valgt. Strålingen stråler gjennom prøven i deteksjonskammer **28** og dempningen av strålen blir målt.

I en foretrukket utførelsesform omfatter lag **36** et substrat med et lag med bindemiddel (ikke vist) som er overtrukket på dets øvre overflate **70** og nedre overflate **72**. Eksempler på materialer som er passende for substratet i lag **36** inkluderer polyester, polystyren, polykarbonat, polyolefiner og helst polyetylen tereftalat. Disse kan være naturlige materialer eller de kan være fylt med passende fyllstoffer for å få passende optiske eller mekaniske egenskaper. Eksempler på materialer som er passende som fyllstoffer inkluderer, men er ikke begrenset til, titandioksyd, karbon, kvarts og glass. Eksempler på passende bindemidler er trykksensitive bindemidler, varme og kjemisk herdede bindemidler og varmesmeltet og varmestømmende bindemidler. Alternativt kan mellomromslagene selv bestå av et passende bindemiddel.

Hvis en prøveinngang **24** ikke allerede er dannet tidligere i fabrikeringsprosessen, så blir en tveiebragt, ved for eksempel å danne et innsnitt (ikke illustrert) i kanten **37** til innretningen **20** som gjennomskjærer reaksjonskammeret **22**.

Den strekede sirkel i figur 1 betegner en åpning **30** som gjennomhuller lagene **32**, **34** og **36**, men ikke lagene **42** og **46**, åpningen i lag **34** åpner inn i deteksjonskammer **28**. Fordi lagene **42** og **46** ikke er gjennomhullet initielt, er den eneste åpningen til atmosfæren i deteksjonskammeret **28** den enkle passasjeveien **38** som åpner inn i reaksjonskammeret **22**. Når reaksjonskammeret **22** fylles med prøve, blir dermed prøvepassasjeveien **38** til deteksjonskammeret **28** blokkert. Dette fanger luft i deteksjonskammeret **28** og hindrer det vesentlig fra å fylles med prøve. En liten mengde av prøve vil gå inn i deteksjonskammer **28** under tiden mellom når prøven først kontakter åpningen **38** til deteksjonskammer **28**, og når prøven kontakter den fjerne siden av åpningen **38**. Med en gang prøven har fuktet fullstendig over åpningen **38** til deteksjonskammeret **28**, vil det imidlertid ikke skje noe mer fylling av deteksjonskammeret **28**. Volumet i reaksjonskammeret **28** blir stort sett valgt slik at det er likt ellers helst større enn volumet i deteksjonskammeret **28**. Ved å åpne ventilen **30** til atmosfæren, blir prøve

overført for å fylle deteksjonskammeret **28**. Ventilen kan være åpnet ved hjelp av en nål som er koblet til en sylinderspole i måleapparatet.

En immunsensor **100** i en annen utførelsesform, som vist i figurene 3 og 4, kan lages som følger. Et første formet lag **112** og et andre formet mellomrom **114** lag av samme tykkelse blir begge plassert på topp av et bunnlag **116**. Det første mellomromslaget **112** er rektangulært i fasong, og er plassert ved den nære enden **118** av bunnlaget **116**. Det andre mellomromslaget **114** er også rektangulært i fasong, og er plassert på bunnlaget **116** med en distanse adskilt fra det første mellomromslaget **112**. Den fjerne kanten **120** av det første mellomromslaget **116** og den nære kanten **122** av det andre mellomromslaget **114** danner delene **120**, **122** av sideveggene i reaksjonskammeret **124**. Bunnlaget **116** danner bunnveggen **126** i reaksjonskammeret **124**. Antistoffene **164** er festet til bunnen **126** i reaksjonskammeret **124**. Antigenproben eller pseudoantigenproben **162** er bundet til de festede antistoffene **164**.

Et tredje formet mellomromslag **128**, lik i fasong som det første formede mellomromslaget **112**, er plassert på topp av det første formede mellomromslaget **112**. Et fjerde mellomromslag **130** har en spalte **132** som utvides gjennom den nære enden **134** av mellomromslaget **130** mot senteret av mellomromslaget **130**. Det fjerde mellomromslaget er **130** plassert på topp av det andre formede mellomromslaget **114** med de nære endene **122**, **134** innregulert. Spalten **132** i det fjerde mellomromslaget danner sideveggene (ikke illustrert) i deteksjonskammeret **132**. Delen **138** av det andre mellomromslaget utsatt av spalten **132** i det fjerde mellomromslaget **130** danner bunnen **138** i deteksjonskammeret **132**. Den nære enden **140** av spalten **132** danner passasjeveien **140** mellom reaksjonskammeret **124** og deteksjonskammeret **132**. Den nære enden **134** av det fjerde mellomromslaget **130** danner en del **134** av sideveggen av reaksjonskammer **124**.

Et femte formet mellomrom **142**, lik i fasong til det første formede mellomromslaget **112** og tredje formede mellomromslaget **128**, er plassert på topp av det tredje mellomromslaget **128**. Et sjette formet mellomromslag **144**, lik i fasong til det andre formede mellomromslaget **114**, er plassert på topp av det fjerde formede mellomromslag **130**, med de nære endene **146**, **122** innregulert. Delen **170** av det sjette mellomromslaget eksponert av spalten **132** i det fjerde mellomromslag **130** danner toppen **170** av deteksjonskammeret **132**. En åpning **148** strekker seg gjennom det sjette formede mellomromslaget **144**. Den fjerne enden **150** av åpningen **148** og den fjerne enden **152** av spalten **132** er innrettet. Åpningen **148** danner en del **150** av en sidevegg

av en ventil **154**, og tillater utskifting av luft fra deteksjonskammeret **132** ettersom det fylles med prøver. Et topplag **156** er tilpasset over det femte mellomromslaget **142** og sjette mellomromslaget **144**. Topplaget **156** inkluderer også en åpning **158** av samme størrelse og fasong, og i oppstilling med åpning **148** i det sjette formede laget **144**.

5

- I visse utførelsesformer kan det være å foretrekke å forsinke fyllingen av deteksjonskammer **132** til en tid etter at prøven har fylt reaksjonskammeret **124**, for å tillate tid for at immunreaksjonene skal skje i reaksjonskammeret **124**. I disse utførelsesformene oppnås dette ved å danne et ventilhull **158** i laget **116** og/eller **156** etter fullføringen av immunreaksjonene. Når reaksjonskammeret **124** fyller seg med prøve, blir luft fanget i deteksjonskammeret **132**, som hindrer det i å bli fylt med prøve. I en passende tid etter at prøven har fulgt reaksjonskammeret **124**, kan minst et av topplaget **154** og bunnlaget **116** punkteres over ventilhullet **148** eller under ventilhullet **154** med en passende innretning, slik som en nål eller et blad. Når dette finner sted, kan luften i deteksjonskammer **132** ventilere gjennom hullet **148** eller hullet **154** dannet i lag **116** og/eller **156** via åpningen **148** eller **154**, og dermed tillate prøven å bli dratt inn i deteksjonskammer **132** fra reaksjonskammeret **124** ved kapilær virkning og den utskiftede luften som skal ventileres.
- Høyden på deteksjonskammeret **132** blir vanligvis valgt slik at den er mindre enn høyden av reaksjonskammer **124** slik at, i kombinasjon med overflateenergier på utsidene av kammerne **132** og **124**, den kapilære kraften i deteksjonskammeret **132** vil være større enn i reaksjonskammeret **124**. Den sterkere kapilære kraften i deteksjonskammeret **132** tjener til å dra prøven inn i deteksjonskammeret **132** mens den tømmer reaksjonskammer **124**. Denne fremgangsmåten ved å anvende forskjeller i kapilær kraft for å fylle et kammer er beskrevet i detalj i den samtidig pågående søknadnummer 09/536,234 arkivert 27. mars 2000.

- I foretrukne utførelsesformer er høyden av reaksjonskammeret vanligvis større enn høyden på deteksjonskammeret. Høyden av deteksjonskammeret er vanligvis ca 500 mikrons eller mindre, helst ca 450, 400, 350, 250 mikrons eller mindre, og mer ønskelig ca 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 eller 50 mikrons til ca 75, 100, 125, 150, 175 eller 200 mikrons. Disse deteksjonskammerhøydene er spesielt godt passende for bruk når topp –og bunnveggene i deteksjonskammeret omfatter elektrodslag. Det kan imidlertid være visse utførelsesformer hvor elektrokjemisk deteksjon brukes hvor cellehøyder større enn ca 500 mikrons kan foretrekkes. Disse deteksjonskammerhøydene kan også være passende når deteksjonsfremgangsmåter forskjellig fra elektrokjemisk deteksjon

35

blir brukt. Når en annen deteksjonsfremgangsmåte blir brukt, for eksempel en optisk deteksjonsfremgangsmåte, kan forskjellige cellehøyder være å foretrekke. I slike utførelsesformer kan en cellehøyde på ca 600, 700, 800 eller 900 mikrons eller mer, eller selv ca 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 eller 5 mm eller mer være å foretrekke. Høyden på reaksjonskammeret er vanligvis større enn den hos deteksjonskammeret. I visse utførelsesformer kan det imidlertid være å foretrekke å bruke et reaksjonskammer som har den samme eller en lignende høyde som deteksjonskammer, og selv mindre høyde enn deteksjonskammeret. Deteksjonskammerhøyden er vanligvis fra ca 5 mikron eller mindre til ca 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 eller 5 mm eller mer, helst ca 900, 800, 700, 600 eller 500 mikrons eller mindre, mer ønskelig ca 450, 400, 350, 300 eller 250 mikrons eller mindre, og mest ønskelig fra ca 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 eller 50 mikrons til ca 75, 100, 125, 150, 175, 200 eller 250 mikrons.

Når immunsensoren **100** er en elektrokjemisk sensor **100**, kan toppoverflaten av det andre mellomromslaget **138** og bunnoverflaten **160** av det sjette mellomromslaget **144** som er utsatt for spalten **132** i det fjerde mellomromslaget **130** være delvis eller fullstendig overtrukket med et ledende materiell. Alternativt kan lagene **114** og **144** selv være laget av elektrisk ledende materialer. Elektrisk forbindelse mellom de to ledende lagene (ikke illustrert) og et måleapparat (ikke illustrert) gjør at elektrokjemiske målinger kan utføres innen deteksjonskammere.

Fabrikeringsfremgangsmåter

Med hensikt å illustrere blir detaljer for fabrikeringen av sensorer i foretrukne utførelsesformer diskutert med referanse til sensoren som er tegnet i figurene 3 og 4. Sensorstrimmelen **100** blir vanligvis konstruert av materialer laminert sammen. Ett eller flere mellomromslag **128**, **130** blir anvendt for å lage et mellomrom mellom lagene **112** og **114** fra lagene **142** og **144**. Mellomromslagene har klebende overflater slik at lagene **112**, **128** og **142** og lagene **114**, **130** og **144** kan holdes sammen. Alternativt kan mellomromslagene selv bestå av et bindemiddel, eller de kan omfatte et materiale som er istand til å klebe til tilstøtende lag ved bruk av varme og/eller trykk i en lamineringsfremgangsmåte.

Deteksjonskammeret **132** er et kapilært område hvor lagene **114** og **144** danner endeveggene av mellomrommet og tykkelsen av lagene **128**, **130** definerer høyden. Lagene **114** og **144** kan også tjene som substrater for elektrodeovertrekkinger (ikke illustrert) som danner elektrodene til en elektrokjemisk celle, eller som kan virke som

elektroder selv ved hjelp av å være konstruert av elektrisk ledende materialer. Under konstruksjonen blir deteksjonskammer **132** vanligvis dannet ved å punktere ut, eller på annen måte fjerne en del av lag **130**. Denne utkuttete delen av lag **130** kan også tjene til å definere elektrodeområde i den elektrokjemiske cellen.

5

Reaksjonskammeret **124** kan dannes ved å punktere eller på annen måte fjerne en del av mellomromslagene, med områdene fjernet slik at reaksjonskammeret overlapper med deteksjonskammeret **132**, for dermed å forårsake at deteksjonskammeret **132** åpnes inn i reaksjonskammeret **124**. Lagene **116** og **156** kan så lamineres til den eksterne overflaten av henholdsvis lagene **112**, **114** og lagene **142**, **144**, slik at endeveggene **126**, **174** av reaksjonskammer **124** dannes. Immunkjemikaliene **164** og **162** kan overtrekkes på en intern overflate **126** og/eller **174** av lagene **116** og/eller **156** før eller etter lamineringen av **116** og **156** på henholdsvis lagene **112**, **114** og lagene **142**, **144**. Lagene **116** og **156** kan klebes til henholdsvis lagene **112**, **114** og lagene **142**, **144**, med et klebende lag på den eksterne overflaten av henholdsvis lagene **112**, **114** og lagene **142**, **144**, eller på den interne overflaten av lagene **116** og **156**.

Ventilen **148** og/eller **154** kan med fordel formes ved å punktere et hull gjennom lagene **114**, **130** og **144**. Sett utifra synspunktet om å forenkle strimmelfabrikasjonsprosessen, er det spesielt fordelaktig å danne ventil **148** og/eller **154** samtidig som "kutt-ut-delen" av reaksjonskammeret **124** og/eller deteksjonskammeret **132** dannes, ettersom dette gjør det lettere å oppnå et reproduserbart romlig forhold mellom kammeret eller kemmerne og ventilen, og også reduserer antall prosessstrinn.

I en annen og forskjellig utførelsesform, kan ventilen **148**, **154**, **158**, dannes ved å punktere gjennom lagene **114**, **116**, **130**, **144** og **156** og i tillegg teipe lagene som er laminert over begge endene av hullet som dermed dannes. Dette har den fordel at det tillater optimalisering av egenskapene til lagene **116** og **156**, og ventilhullet som dekker teiplagene (ikke illustrert) separat. Alternativt kan ventilhull **148**, **154**, **158** dannes ved å punktere gjennom lagene **114**, **130**, **144** og **116** eller **156** før lamineringen av henholdsvis lagene **116** eller **156**. Dette etterlater en åpning av **158** til bare en side av strimmelen **100** og denne bruker bare en dekkingssteip.

I enda en utførelsesform, kan lagene **116** og **156** dannes og lamineres til lagene **114** og **144** slik at lagene **116** og **156** ikke utvider seg til det området hvor ventil **158** dannes. Så er det bare nødvendig å punktere gjennom lagene **114**, **130** og **144** for å danne ventilen

148, 154, 158 og i tillegg teipe lagene (ikke illustrert) som er laminert over begge endene av hullet som dannes.

Lagene kan være klistret til hverandre ved en passende fremgangsmåte, for eksempel trykksensitivt bindemiddel, helbredelige bindemidler, varmesmeltede bindemidler, laminert ved bruk av varme og/eller trykk, mekaniske festere og lignende.

De ovenfor beskrevne konfigurasjonene for sensoren er to av mange mulige konfigurasjoner for sensoren, noe som vil forstås av en fagperson. For eksempel kan ventilen tilveiebringes gjennom toppen av strimmelen, bunnen av strimmelen, både toppen og bunnen av strimmelen eller gjennom en eller flere sider av strimmelen. Ventilen kan være av enhver passende konfigurasjon, og kan strekke seg direkte inn i en del av deteksjonskammeret eller den kan følge en indirekte vei inn i deteksjonskammeret. Deteksjonskammeret kan være av en passende fasong, for eksempel rektangulært, firkantet, sirkulært eller irregulært. Deteksjonskammeret kan støte opp mot reaksjonskammeret, eller så kan en separat prøvepassasjevei mellom reaksjonskammeret og deteksjonskammeret tilveiebringes. Prøver kan få tilgang til reaksjonskammeret på enten siden av strimmelen, som i sensoren i figurene 3 og 4, eller bare gjennom en side av strimmelen med den motsatte siden blokkert av et mellomrom, som i figurene 1 og 2. Deteksjonskammeret kan være av enhver passende fasong, for eksempel rektangulært, kvadratisk, sirkulært eller irregulært. Deteksjonskammeret kan befinne seg innen strimmelkroppen, og tilgang til deteksjonskammeret kan tilveiebringes ved en eller flere prøveinnganger gjennom toppen, bunnen eller siden av strimmelen. Vanligvis blir en bestemt konfigurasjon valgt slik at fabrikasjonsfremgangsmåten kan forenkles, det vi si ved å utføre færre trinn eller ved å anvende færre komponenter.

Elektrokjemisk deteksjon

Når sensoren er en elektrokjemisk celle, blir elektrodelagene, for eksempel lagene **52** og **54** i sensoren i figurene 1 og 2, tilveiebragt med en elektrisk forbinder som tillater sensoren **20** å bli plassert i en målekrets. Minst en av elektrodene **52** eller **54** i cellen **28** er en følende elektrode, det vil si en elektrode som er sensitiv til mengde av oksydert eller redusert form av en analyt i prøven. I tilfelle med en potentiometrisk sensor **20** hvor potensialet av den følende elektroden **52** eller **54** er en indikasjon på nivået av analyt tilstede, er en andre elektrode **54** eller **52** som virker som referanseelektrode tilstede som virker slik at den tilveiebringer et referansepotensiale. I tilfelle med en

amperometisk sensor **20** hvor føleelektrodestrømmen er en indikasjon på nivået av analyt i prøven, er minst en annen elektrode **54** eller **52** tilstede som fungerer som en motsatt elektrode for å komplitere den elektriske kretsen. Denne andre elektrode **54** eller **52** kan også fungere som en referanseelektrode. Alternativt kan en separat elektrode
 5 (ikke vist) utføre funksjonen til en referanseelektrode.

Hvis immunsensoren **20** opereres som en elektrokjemisk celle **28**, så omfatter flaten **36** som inneholder åpningene som definerer reaksjonskammeret **22** og/eller deteksjonskammeret **28** et elektrisk resistivt materiale. I en foretrukket utførelsesform
 10 omfatter også flatene **32** og **34** et elektrisk resistivt materiale. Passende elektriske resisitive materialer inkluderer for eksempel polyestere, polystyrenere, polykarbonater, polyolefiner, blandinger av dem og lignende. Foretrukket polyester er polyetylen tereftalat. I sensoren som er tegnet i figurene 1 og 2, er lagene **32** og **34** substrater overtrukket med elektrisk ledende materiale **52** og **54**. Det elektriske ledende materiale
 15 **52** eller **54** er overtrukket på overflaten **60** eller **62** som vender mot deteksjonskammeret **28** og et klebende lag (ikke vist) blir overtrukket på henholdsvis overflaten **33** eller **35** som vender mot lag **42** eller **46**.

I utførelsesformen som er vist i figurene 3 og 4, har deteksjonskammeret **132** elektrisk
 20 ledende overtrekkinger (ikke illustrert) på den interne overflaten av **138** og **170** som er passende for anvendelse som elektroder i en elektrokjemisk sensorcelle. Det som også befinner seg i deteksjonskammeret **132** er et tørt reagenslag **172** som omfatter et substrat for probeenzyme og, hvis det er nødvendig, en redoksdel som er istand til å cyclere enzymet mellom dets oksyderte og reduserte former, og som er istand til å bli
 25 oksydert eller redusert av celleelektrodene. En buffer kan også være tilstede for å kontrollere pH i deteksjonskammer **132**. Når immunsensoren er i bruk, blir elektrodene forbundet med en ekstern elektron måleinnretning (ikke illustrert) gjennom eksterne forbindere (ikke illustrert), for eksempel tunge plugger, som er kjent i fagfeltet. Passende forbindere blir utgreiet i det samtidig påventende søknadnummer 09/399,512
 30 arkivert 20. september 1999 og samtidig påventende søknadsnummer 60/345,743 arkivert 4. januar 2002.

Hvis immunsensoren **20**, **100** blir operert ved å anvende en deteksjonsfremgangsmåte som er forskjellig fra en elektrokjemisk deteksjonsfremgangsmåte, så trenger ikke
 35 materialene som sensoren lages fra være elektrisk resistivt. Imidlertid er de polymere materialene beskrevet over foretrukket for anvendelse i konstruksjonen av

immunsensorer i foretrukne utførelsesformer på grunn av deres prosesseringsvennlighet, lave kostnader og mangel på reaktivitet mot reagenser og prøver.

Optisk deteksjon

5

I en alternativ utførelsesform, blir et optisk heller enn et elektrokjemisk deteksjonssystem anvendt. Ifølge denne alternative utførelsesformen, er ikke elektroder nødvendig og en ekstern lyskilde og fotocelle blir anvendt for å analysere lys overført gjennom, eller reflektert fra løsningen i deteksjonskammer. I en utførelsesform er det foretrukket å skinne lyset gjennom toppoverflaten av sensoren, deretter gjennom prøven hvor det blir reflektert av det lavere sensolaget og så tilbake opp gjennom prøven og topplaget. Hvor det blir detektert. I en annen utførelsesform skinner lyset inn gjennom siden av deteksjonskammeret, og blir totalt internt reflektert mellom endeoverflatene i deteksjonskammeret inntil det passerer ut gjennom den andre siden av deteksjonskammeret, hvor det blir detektert. I disse utførelsesformene, er lagene over, til siden og/eller under deteksjonskammeret vesentlig transparent til det analyserende lyset som passerer gjennom laget eller lagene. Teknikkene beskrevet i framtidig pågående søknadsnr. 09/404,119 arkivert 23. september 1999 kan adapteres for anvendelse med immunsensorer fra foretrukne utførelsesformer som bruker optiske deteksjonssystemer. Alternativt kan i hvisse utførelsesformer det være foretrukket å anvende en kombinasjon av elektrokjemiske deteksjons- og optiske deteksjonsfremgangsmåter, som også er beskrevet i søknadsnr. 09/404,119.

25

Reagenser og andre materialer tilstede i immunsensoren

Reagenser for anvendelse i reaksjonskammeret, for eksempel immobiliserte antistoff, pseudoantigenprobe, buffer, formidler og lignende, kan støttes på veggene av reaksjonskammeret eller på veggene av deteksjonskammeret, på en uavhengig støtte som finnes innen kammerne, med en matriks eller de kan selv være støttende. Hvis reagensene skal støttes på kammerveggene eller elektrodene, kan kjemikaliene brukes ved å bruke printeteknikker som er velkjent i fagfeltet, for eksempel blekk jet printing, screenprinting, "slot" overtrekning, litografi og lignende. I en foretrukket utførelsesform blir en løsning som inneholder reagenset brukt på en overflate innen et kammer og får lov til å tørke.

35

I stedet for å immobilisere eller tørke reagensene eller andre kjemikalier på overflatene av reaksjonskammeret eller deteksjonskammeret, kan det være fordelaktig å støtte dem

på eller ha dem innen ett eller flere uavhengige støtter, som så blir plassert inn i et kammer. Passende uavhengige støtter inkluderer, men er ikke begrenset til, maskematerialer, ikke ikkevete arkmaterialer, fibrøse fyllematerialer, makroporøse membraner, sintrede pulvere, geler eller kuler. Fordelene med uavhengige støtter inkluderer et øket overflateområde, som dermed tillater at med antistoff eller pseudoantigenprobe inkluderes i reaksjonskammeret hvis det er ønskelig. I en slik utførelsesform blir antistoffet bundet til pseudoantigenprobe, tørket på et stykke porøst materiale, som så plasseres i reaksjonskammeret. Det er også lettere under fabrikkering å vaske ubundet protein fra uavhengige støtter, slik som kuler, sammenlignet med å vaske ubundet protein av overflaten av reaksjonskammeret.

I en bestemt foretrukket utførelsesform er antistoffet bundet til pseudoantigenproben støttet på kuler. Slike kuler kan omfatte et polymert materiale, for eksempel lateks eller agarose, med eller uten å støpe rundt et magnetisk materiale (slik som gamma Fe_2O_4). Kulematerialet er valgt slik at passende støtte for antistoffet blir tilveiebragt. Passende kuler kan inkludere de som markesføres som DYNABEADS® av Dynal Biotech fra Oslo, Norge. Valgfritt så kan magnes inkluderes i måleapparatet for å holde de magnetiske kulene i reaksjonskammeret, og for å stoppe dem fra å bevege seg til deteksjonskammeret.

I enda en annen utførelsesform, er veggene i reaksjonskammeret porøse, med antistoffet bundet til pseudoantigenproben inkorporert i porene. I denne utførelsesformen er den flytende prøven istand til å "wick" inn i den porøse veggen, men ikke lekke ut av det definerte området. Dette oppnås ved å anvende en makroporøs membran til å danne reaksjonskammerveggen og sammentrykke membranen rundt reaksjonskammeret for å hindre lekkasje av prøven ut av det ønskede området, som beskrevet i U.S. patentnr. 5,980,709 til Hodges, et al.

Passende uavhengige støtter slik som kuler, maskematerialer, ikke-vevde arkmaterialer og fibrøse fyllmaterialer inkluderer, polyolefiner, polyestere, nylon, cellulose, polystyren, plykarbonater, polysulfoner, blandinger av dem og lignende. Passende makroporøse membraner kan lages fra polymere materialer inkludert polysulfonyer, polyvinyliden difluorider, nyloner, celluloseacetater, polymetakrylater, polyakrylater, blandinger av dem og lignende.

Antistoffet bundet til pseudoantigenproben kan finnes innen en matriks, for eksempel polyvinylacetat. Ved å variere de løselige karakteristikaene til matriksen i prøven, kan kontrollert frigjøring av proteinene eller antistoff inn i prøven oppnås.

- 5 Som illustrert i figur 2 kan tørkede reagenser **64** valgfritt anbringes i deteksjonskammeret **28**. Disse reagensene kan inkludere en enzymsubstrat (anvendt som en probe) og en formidler, som er istand til å reagere med enzymdelen av pseudoantigenenzymproben **50** for å produsere et detekterbart signal. Enzymsubstratet og formidleren, hvis de er tilstede, må være i tilstrekkelig mengde slik at hastigheten på
- 10 reaksjonen for ethvert enzym som er tilstede med enzymsubstratet **64** blir bestemt ved hjelp av mengden av enzymet som er tilstede. For eksempel hvis enzymet er glykoseoksidase eller glykose dehydrogenase, blir en passende enzymformidler **64** og glykose (hvis det ikke allerede er tilstede i prøven) plassert i deteksjonskammeret **28**.
- 15 I en utførelsesform hvor et elektrokjemisk deteksjonssystem blir anvendt, er ferricyanid en passende formidler. Andre passende formidlere inkluderer diklorfenolindofenol og komplekser mellom transisjonsmetaller og nitrogen-inneholdende heteroatomiske deler. Buffere kan også inkluderes for å justere pH'en i prøven i deteksjonskammeret **28** hvis
- 20 tilstrekkelige mengder slik at hastigheten på reaksjonen til enzymet med enzymsubstratet **64** er begrenset av konsentrasjonen av enzymet som er tilstede.

- Den interne overflaten **40** av substratet **42**, som danner basen av reaksjonskammeret **22**, er overtrukket med pseudoantigenprobe **50** bundet til antistoffene **44** til antigenet som
- 25 skal detekteres i prøven. Antistoffene **44** blir adsorbent eller på annen måte immobilisert på overflaten **40** av substratet **42** slik at de ikke blir fjernet fra substratet **42** under en test. Under eller etter bruk av antistoffene **44** til den interne overflaten **40** i substratet **42**, kan valgfritt et middel laget for å hindre ikke-spesifikk binding av proteiner til denne overflaten anvendes (ikke vist). Et eksempel på et slikt middel som er velkjent i
- 30 fagfeltet er bovint serum (BSA). En ikke-ionisk surfaktant kan også anvendes som et slikt middel, for eksempel TRITON® X100 surfaktant produsert av Rohm & Hass fra Philadelphia, Pennsylvania eller TWEEN® surfaktanter produsert av ICI Americas of Wilmington, Delaware. Den ikke-ioniske surfaktanten som velges denaturerer ikke proteiner. Overtrekkingen **44** på den interne overflaten **40** av substratet **42** er i tørr
- 35 tilstand når den er klar i å anvendes i en test.

I foretrukne utførelsesformer hvor elektrokjemisk deteksjon blir brukt, kan enzymene anvendes som proben. Eksempler på passende enzymer inkluderer, men er ikke begrenset til, pepperrot peroksidase, glykoseoksidase og glykosedehydrogenase, for eksempel PQQ-avhengig glykosedehydrogenase eller NAD-avhengig
 5 glykosedehydrogenase.

Proben kan også være en enzymkofaktor. Eksempler på passende kofaktorer inkluderer, men er ikke begrenset til, flavin mononukleotid, flavinadenin dinukleotid, nikotinamidadenin dinukleotid og pyrrolokinolin kinon. Kofaktoren er helst koblet til
 10 antigenet med et fleksibelt mellomrom for å tillate kofaktoren å binde seg til apoenzymet. Når proben er en kofaktor, kan apoenzymet valgfritt være tørket samtidig med enzymsubstratet og formidleren i reaksjonskammeret.

Proben kan også være en regulator av enzymaktivitet. Eksempler på passende
 15 enzymregulatorer inkluderer, men er ikke begrenset til, kinaser eller fosforylaser. Enzymregulatorer kan forandre aktiviteten av enzymet ved å forandre tilstanden til fosforylering, metylering, adenylering, uridylering eller adenosin difosfat ribosylering av en enzymet. Enzymregulatorer kan også forandre aktiviteten av enzymet ved å kløyve et peptid av enzymet. Når proben er en enzymregulator, blir enzymet tørket
 20 samtidig med enzymsubstratet og formidleren i reaksjonskammeret.

Proben kan være en proteinsubenhet som er del av et multi-subenhetkompleks. Et eksempel på en slik proteinsubenhet er en av subenehtene i multisubenhetsenzymet cytokromoksidase.

25 Antistoff og pseudoantigenproben kan være i kompleks med hverandre før det blir tørket inn i reaksjonskammeret. Komplekseringsbetingelsene blir valgt for å minimalisere mengden av fri (ikke komplisert) pseudo-antigenprobe, ettersom denne delen vil øke bakgrunnssignalet i analysen. Mengden av fritt antistoff blir også
 30 minimalisert ettersom denne delen vil binde antigenet og stoppe det fra å erstatte pseudoantigenproben, og dermed redusere sensitiviteten av analysen. For eksempel er det mulig å optimalisere komplekseringen av pseudoantigenproben med antistoffer ved å lage trengsel i løsningene med uvirksomme makromolekyler, slik som polyetylenglykol, som ekskluderer volum til proteinene og dermed hever deres
 35 termodynamiske aktivitet og øker affiniteten av deres binding til hverandre. Se for eksempel Minton, Biopolymers, Vol. 20, s. 2093-2120 (1981).

Det er en fordel å ha antistoffet immobilisert på kuler før det blir i kompleks med pseudoantigenproben. Dette tillater alle antistoffsetene å være okkupert ved å sette dem for en høy konsentrasjon av pseudoantigenproben. Overskudd av pseudoantigenproben blir så lett fjernet ved sentrifugering og vasking av kulene.

5

Immunsensoren er mest sensitiv for antigenkonsentrasjoner fra ca 1 nM til ca 10 μ M (mikromolar). For et antigen med en relativ molar masse på 100 000, dette korresponderer til ca 0.1 μ g/ml (mikrogram/ml) til ca 1000 μ g/ml (mikrogram/ml). Imidlertid kan sensoren modifiseres (for eksempel ved å forandre separasjonen mellom
10 elektrodene, eller ved å bruke et forskjellig mønster med voltpulser) for å undersøke antigenkonsentrasjoner i området 0.1 nM eller mindre til 0.1 mM eller mer.

Den maksimalt detekterbare grensen i analysen blir bestemt ved konsentrasjonen av pseudoantigenprobe/antistoff i reaksjonskammeret. Denne molare konsentrasjonen blir
15 derfor satt til å korrespondere til det forventede området av molare antigenkonsentrasjoner som vanligvis påtreffes i prøver av interesse. For eksempel er konsentrasjonen av C-reaktiv protein som finnes i et typisk patologilaboratorium fra ca 10 nM til ca 10 μ M (mikromolar).

20 Eksempler på antigener som kan undersøkes inkluderer, men er ikke begrenset til, alfafetoprotein, carcinoembryonisk antigen, C-reaktivt protein, hjertetroponin I, hjertetroponin T, digoksin, ferritin, gammaglutamyl transferase, glycaselert hemoglobin, glykasert protein, hepatitt A, B og C, korion gonadotropin, humant immunodefisientvirus, insulin, serumamyloid A, tromblastin, prostataspesifikt antigen,
25 protrombin, tyroksin, tumorantigen CA125, tumorantigen CA15-3, tumorantigen CA27/29, tumorantigen CA19-9 og tumorantigen NMP22.

Sensorene i foretrukne utførelsesformer er ikke begrenset til analysen av humane antigener, men er også passende for anvendelse innen veterinær- og
30 dyrelandbruksapplikasjoner. Også, hvis et antigen er for lite til å være immunogent, så kan det festes på en bærer som et haptent og antistoffer kan lages mot det på denne måten. Derfor er oppfinnelsen ikke begrenset til analysen av proteinantigener eller til store molekyler, men er også brukbar for små antigener.

35 Antistoffer passende for anvendelse i sensorene i foretrukne utførelsesformer inkluderer, men er ikke begrenset til, de naturlige antistoffene slik som IgG, IgM og IgA. Passende antistoffer kan også lages fra fragmenter fra naturlige antistoffer, slik

som $F(ab)_2$ eller Fab. Antistoffet kan være sammensatt av genetisk konstruerte eller syntetiske fragementer fra naturlige antistoffer slik som scFv (enkeltkjedefragmentvariable) deler.

- 5 Antistoffene kan være i kompleks med native antigenprober eller til "pseudo-antigen"prober. Eksempler på pseudoantigener inkluderer antigener fra andre arter. For eksempel hvis humant C-reaktivt protein skal undersøkes så kan pseudoantigenet inkludere hund, katt, hest, bovin, ovin, gris eller fugle C-reaktiv protein. Pseudoantigener kan også lages ved å modifisere det native antigenet. For eksempel
- 10 hvis humant C-reaktivt protein skal undersøkes, så kan pseudoantigenet inkludere en monomer form av den native pentameren, eller C-reaktivt protein som har fått dets amin, karboksyl, hydroksyl, tiol eller disulfidgrupper kjemisk modifisert.

Å anvende sensoren for å bestemme nærværet eller fraværet av et antigen

- 15 Sensoren kan anvendes for å bestemme nærværet eller fraværet av et antigen i en prøve som følger. Referert til figurene 3 og 4 som inneholder strimmelsensoren **100** et reaksjonskammer **124** og et deteksjonskammer **132**. Prøve blir introdusert i reaksjonskammer **124** via port **166** eller **168**. Separasjonen mellom lagene **116** og **156**
- 20 og overflateenergien av deres interne overflater er slik at prøven vil dras inn i reaksjonskammer **124** ved kapilær virkning. Reaksjonskammer **124** inneholder antistoffer **164** immobilisert på en intern overflate **126** i reaksjonskammeret **124**. Pseudoantigenprobekompleksene **162** er bundet til antistoffene **164** slik at vesentlig alle antistoff gjenkjenningsssetene for antigenet er blokkert av pseudoantigenprobe **162**. I
- 25 denne utførelsesformen er proben et enzym.

- I figur 4 er antistoffet vist som overtrukket kun på en flate **126** i reaksjonskammeret **124**, eller overtrukket på en separat støtte (ikke illustrert) som finnes i reaksjonskammeret **124**. For å lette fabrikasjonen er det imidlertid vanligvis foretrukket
- 30 at antistoffene **164** bare er overtrukket på en del av reaksjonskammeret **124**, eller på et enkelt støttemateriell. Når en separat støtte blir anvendt for å immobilisere antistoffene **164**, er støtten slik at den ikke går inn i deteksjonskammeret **132** under testen. Dette kan oppnås for eksempel ved å feste støtten på minst en overflate **126** i reaksjonskammeret **124**, eller ved å velge størrelsen eller fasongen av støtten slik at den ikke kan gå inn
- 35 gjennom prøvepassasjeveien **134** til deteksjonskammer **132**, eller ved å velge en støtte med tilstrekkelig tetthet slik at den forblir på den laveste flaten **126** i reaksjonskammeret **124** når prøven overføres til deteksjonskammeret **132**.

Når prøvefyllerreaksjonskammer **124**, kommer pseudoantigenenzymproben **162** bundet til antistoff **164** i kontakt med prøven og en liten fraksjon av pseudoantigenproben dissosierer fra antistoffet **164** og inn i prøven. Tilstrekkelig tid tillater så for at den dynamiske likevekten mellom bundet og ubundet pseudoantigenenzymprobe **162** skal etableres. Hvis antigenet er tilstede i prøven, erstatter antigenet som binder seg sterkere til antistoffet **164** enn pseudoantigenenzymproben **162**, til slutt pseudoantigenenzymproben **162**. Hvert antigen som binder seg til et immobilisert antistoff **164** vil dermed erstatte en pseudoantigenenzymprobe **162** i løsning.

Slutten på reaksjonstrinnet er en forhåndsbestemt tid etter at prøven er introdusert inn i reaksjonskammeret **124**. Den forhåndsbestemte tiden blir satt slik at det er tilstrekkelig tid for at vesentlig hele antigenet i prøven skal erstatte pseudoantigenenzymproben **162** og binde seg til antistoffet **164**. Alternativt kan den forhåndsbestemte tiden settes slik at en kjent fraksjon av antigenet erstatter pseudoantigenproben **162** for å binde seg til antistoffet **164**.

Tiden som prøven blir introdusert inn i reaksjonskammer **124** kan indikeres av brukeren, for eksempel ved å presse en knapp på et måleapparat (ikke illustrert) som er koblet til sensoren **100**. Denne handlingen anvendes for å utløse en tidsinnretning (ikke illustrert). I tilfelle med visuell deteksjon er ingen måleapparatinnretning nødvendig. I en slik utførelsesform avslutter brukeren manuelt reaksjonsperioden.

I tilfelle hvor elektrokjemisk deteksjon anvendes for å detektere resultatet fra immunreaksjonene, kan indikasjonen på at prøven er blitt introdusert inn i reaksjonskammeret **124** automatiseres. Som beskrevet over, vil når prøve fyller reaksjonskammer **124**, en liten del av deteksjonskammeret **132** ved dets åpning **140** inni reaksjonskammeret **124** bli fuktet av prøve. Hvis elektrokjemisk deteksjon blir brukt er minst to elektroder (ikke illustrert) tilstede i deteksjonskammer **132**. Hvis disse elektrodene (ikke illustrert) blir plassert i deteksjonskammeret **134** slik at minst en del av hver elektrode (ikke illustrert) er i kontakt med prøven under fyllingen av reaksjonskammer **124**. Hvilket tilstedeværelsen av prøven danner en bro mellom elektrodene (ikke illustrert) og danne et elektrisk signal som kan anvendes for å utløse tidsinnretningen.

En forhåndsbestemt tid etter at tidsinnretningen er blitt utløst, enten av brukeren eller automatisk, så blir immunreaksjonsfasen til testen ansett for å være fullstendig. Når immunreaksjonsfasen i testen er fullstendig, blir ventilen **158** til atmosfæren åpnet. For

eksempel kan en sylinderspoleaktivert nål i måleapparatet anvendes for å gjennomhulle lag **156** og/eller lag **116**, eller i tillegg lagene **114** og **44**, og dermed åpne den fjerne enden **152** til deteksjonskammeret **132** til atmosfæren. Gjennomhullingen kan utføres automatisk av måleapparatet, som i eksempele over, eller manuelt av brukeren i tilfelle
 5 med visuell deteksjon hvor ingen apparat kan anvendes, for eksempel så setter brukeren inn en nål gjennom lagene **156**, **116**, **114** og/eller **144** inn i deteksjonskammeret, og dermed dannes ventilen **158**.

Åpningen av ventilen **158** til atmosfæren tillater at luften som er fanget i
 10 deteksjonskammeret **132** kan forsvinne og dermed tillates deteksjonskammer **132** å fylles med reagert prøve fra reaksjonskammeret **124**. Den reagerte prøven vil trekkes inn i deteksjonskammeret **132** på grunn av øket kapilær kraft i deteksjonskammer **132** sammenlignet med den som er tilstede i reaksjonskammer **124**. I en foretrukket utførelsesform blir den økede kapilære kraften tilveiebragt av passende å overtrekke
 15 overflaten **138** og **160** i deteksjonskammeret **132** eller mer ønskelig, ved å velge den kapilære distansen for deteksjonskammeret **135** slik at den er mindre enn den i reaksjonskammeret **124**. I denne utførelsesformen blir den kapilære distansen definert til å være den minste dimensjonen i kammeret.

20 Når deteksjonskammeret **132** er fylt, løses reagensen **172** inn i prøven. Enzymkomponenten i reagenslaget **172** reagerer med enzymsubstratet og formidleren slik at det produserer redusert formidler. Denne reduserte formidleren er elektrokjemisk oksydert ved en elektrode (ikke illustrert) som virker som en anode i deteksjonskammeret **134** for å produsere en elektrisk strøm. I en utførelsesform blir
 25 hastigheten for å forandre denne strømmen med tid anvendt som en indikator på tilstedeværelsen og mengden av enzymet som er tilstede i den reagerte prøven. Hvis hastigheten for forandring av strøm er mindre enn en forhåndsbestemt grunnlinje verdi (medregnet at noe pseudoantigenenzymprobe **162** blir frigjort inn i løsning som et resultat av den dynamiske likevekten som blir etablert mellom den frie og bundne
 30 pseudoantigenenzymproben **162**), så blir den en indikasjon på at ingen signifikant mengde pseudoantigenenzymprobe **162** er tilstede i den reagerte prøven, noe som indikerer på mangel av antigen tilstede i den opprinnelige prøven. Hvis hastigheten for forandring av strøm er høyere enn grunnlinjehastigheten, indikerer det at pseudoantigenenzymproben **162** er tilstede i den reagerte prøven i en mengde som er
 35 større enn den underlinje verdien, og dermed er antigen også tilstede i den initielle prøven. I en utførelsesform blir hastigheten for forandring av strøm anvendt for å gi et mål på den relative mengden av antigen som initielt var tilstede i prøven.

P a t e n t k r a v

1.

Engangsinnretning for bruk ved deteksjon av et målantigen i en fluidprøve,
 5 k a r a k t e r i s e r t v e d at innretningen omfatter et
 reaksjonskammer; et immobilisert antistoff festet i reaksjonskammeret; et
 reporterkompleks som omfatter en probe og et reporterkompleksantigen, hvori
 reporterkompleksantigenet er et pseudo-antigen eller et modifisert antigen, hvori proben
 er koblet til reporterkompleksantigenet, hvori reporterkompleksantigenet er bundet til
 10 det immobiliserte antistoffet og hvori reporterkompleksantigenet binder svakere enn
 målantigenet til det immobiliserte antistoffet; et deteksjonskammer; en prøveåpning til
 reaksjonskammeret og en prøvepassasjevei mellom reaksjonskammeret og
 deteksjonskammeret.

15 2.

Innretningen ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at proben
 er en radioisotop, kromofor, fluorofoor eller enzym.

3.

20 Innretningen ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
 ytterligere omfatter et enzymsubstrat.

4.

Innretningen ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 25 enzymsubstratet er et oksiderbart substrat.

5.

Innretningen ifølge krav 3 eller 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 enzymsubstratet er støttet på en indre overflate i deteksjonskammeret.

30

6.

Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 2-5, k a r a k t e r i -
 s e r t v e d at enzymet omfatter en glukosedehydrogenase.

35 7.

Innretningen ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 enzymsubstratet omfatter glukose.

8.

Innretningen ifølge krav 3 eller et hvilket som helst krav avhengig av dette, k a r a k t e r i s e r t v e d at innretningen ytterligere omfatter en mediator.

5

9.

Innretningen ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at mediatoren er diklorfenolindofenol, et kompleks mellom et transisjonsmetall og nitrogeninnholdende heteroatom enheter eller ferricyanid.

10

10.

Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-9, k a r a k t e r i s e r t v e d at prøven har en pH, og hvor innretningen ytterligere omfatter en buffer som justerer pH i prøven.

15

11.

Innretningen ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at bufferen omfatter et fosfat eller en mellitat.

20

12.

Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter en stabilisator, hvori stabilisatoren stabiliserer minst en av målantigenet, reporterkompleksantigenet, enzymet eller det immobiliserte antistoffet.

25

13.

Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-12, k a r a k t e r i s e r t v e d at det immobiliserte antistoffet er støttet på en indre overflate i reaksjonskammeret.

30

14.

Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-13, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter et støttemateriale.

35

15.

Innretningen ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at støttematerialet er inneholdt i deteksjonskammeret, og hvori:

enten et enzymsubstrat, en mediator eller en buffer; eller

- 5 det immobiliserte antistoff, reporterkomplekset eller et antigen som hindrer ikke-spesifikk binding av proteiner til den indre overflate av et reaksjonskammer er støttet på eller inneholdt i støttematerialet.

16.

- 10 Innretningen ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at støttematerialet omfatter et maskemateriale, et fibrøst fyllmateriale, et porøst materiale, et sintret pulver, en makroporøs membran eller en kule.

17.

- 15 Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-16, k a r a k t e r i - s e r t v e d at deteksjonskammeret omfatter en første og en andre elektrode.

18.

- 20 Innretningen ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at minst en av den første og andre elektroden omfatter aluminium, kobber, nikkel, krom, stål, rustfritt stål, palladium, platina, gull, iridium, karbon, karbon blandet med bindemiddel, indiumoksid, tinnoksid, en ledene polymer eller en blanding derav.

19.

- 25 Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-19, k a r a k t e r i - s e r t v e d at en deteksjonskammervegg er transparent for en stråle emitert eller absorbert av proben, hvori strålingen er en indikasjon på tilstedeværelse eller fravær av reporterkomplekset i deteksjonskammeret.

30 20.

Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-19, k a r a k t e r i - s e r t v e d at den ytterligere omfatter en detektor som detekterer en tilstand hvor reaksjonskammeret er vesentlig fullt.

35 21.

Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-20, k a r a k t e r i - s e r t v e d at målantigenet omfatter et humant C-reaktivt protein.

22.

Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-21, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at reporterkompleksantigenet er et monomert C-reaktivt protein,
et C-reaktivt protein utledet fra en ikke-human art eller et kjemisk modifisert C-reaktivt
5 protein hvori en affinitet for det kjemisk modifiserte C-reaktive protein overfor
antistoffet er mindre enn affiniteten av det humane C-reaktive proteinet overfor
antistoffet.

23.

10 Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-22, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at en vegg i deteksjonskammeret, eller en vegg i
reaksjonskammeret ytterligere omfatter et fyllstoff.

24.

15 Innretningen ifølge krav 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at
fyllstoffet er titandioksid, karbon, kvarts, glass eller en blanding derav.

25.

Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-24, k a r a k t e r i -
20 s e r t v e d at proben omfatter en enzym kofaktor.

26.

Innretningen ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at
enzym kofaktoren er flavin mononukleotid, flavinadenin dinukleotid,
25 nikotinamidadenin dinukleotid eller pyrrolokinolin kinon.

27.

Innretningen ifølge krav 25 eller krav 26, k a r a k t e r i s e r t
v e d at enzym kofaktoren er koblet til reporterkompleksantigenet gjennom en
30 fleksibel "spacer".

28.

Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 25-27, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at den ytterligere omfatter et apoenzym.

29.

Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-24, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at proben omfatter en enzymaktivitetsregulator.

5 30.

Innretningen ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at
enzymaktivitetsregulatoren omfatter en kinase eller fosforylase.

31.

10 Innretningen ifølge krav 29 eller krav 30, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den ytterligere omfatter et enzym.

32.

15 Innretningen ifølge hvilket som helst av kravene 1-24, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at proben omfatter en proteinsubenhet av et
multisubenhetenzym.

33.

20 Fremgangsmåte for å bestemme en mengde av et målantigen i en fluidprøve,
k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter følgende
trinn:

25 å plassere fluidprøven i et reaksjonskammer som inneholder et immobilisert antistoff og
et reporterkompleks som omfatter en probe koblet til et reporterkompleksantigen, hvori
antistoffet er festet i reaksjonskammeret, hvori reporterkompleksantigenet er bundet til
det immobiliserte antistoffet, hvori reporterkompleksantigenet er et pseudo-antigen eller
et modifisert antigen, og hvori reporterkompleksantigenet binder seg svakere enn
målantigenet til det immobiliserte antistoffet:

30 å dissosiere en del av reporterkompleksantigenet fra det immobiliserte antistoffet inn i
fluidprøven;

å binde en del av målantigenet til det immobiliserte antistoffet;

å overføre fluidprøven til et deteksjonskammer; og

å bestemme en mengde av reporterkompleks i fluidprøven, hvori mengde av
reporterkompleks er en indikasjon på mengden av målantigen initielt i fluidprøven.

34.

Fremgangsmåten ifølge krav 33, k a r a k t e r i s e r t v e d at trinnet med overføring av fluidprøven til et deteksjonskammer omfatter å overføre fluidprøven til en elektrokjemisk celle, hvor den elektrokjemiske cellen omfatter en
5 første elektrode og en andre elektrode.

35.

Fremgangsmåten ifølge krav 34, k a r a k t e r i s e r t v e d at trinnet med å bestemme en mengde av reporterkompleks i fluidprøven omfatter:
10 å påsette et potensiale mellom den første elektroden og den andre elektroden; og
å måle en strøm, hvori strømmen er en indikasjon på mengde reporterkompleks som er tilstede i fluidprøven, og hvori mengden av reporterkompleks er en indikasjon på mengden målantigen initielt i fluidprøven.

36.

Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av kravene 33-35, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at trinnet med overføring av fluidprøven til et deteksjonskammer omfatter å overføre fluidprøven til et deteksjonskammer som omfatter en elektromagnetiskstrålingsoverføringsdel.
20

37.

Fremgangsmåte ifølge krav 36, k a r a k t e r i s e r t v e d at trinnet med å bestemme en mengde reporterkompleks i fluidprøven omfatter følgende trinn:
25 å utsette den elektromagnetiskestrålingsoverførbaredelen for elektromagnetisk stråling, hvor den elektromagnetiskestrålingen passerer gjennom fluidprøven eller reflekteres fra fluidprøven; og
å måle en egenskap til den elektromagnetiskestrålingen etter at den har passert gjennom fluidprøven eller reflekterer fra fluidprøven, hvori egenskapen er en indikasjon på en
30 mengde reporterkompleks tilstede i fluidprøven, og hvori mengden av reporterkompleks er en indikasjon på mengden av målantigen initielt i fluidprøven.

1/4

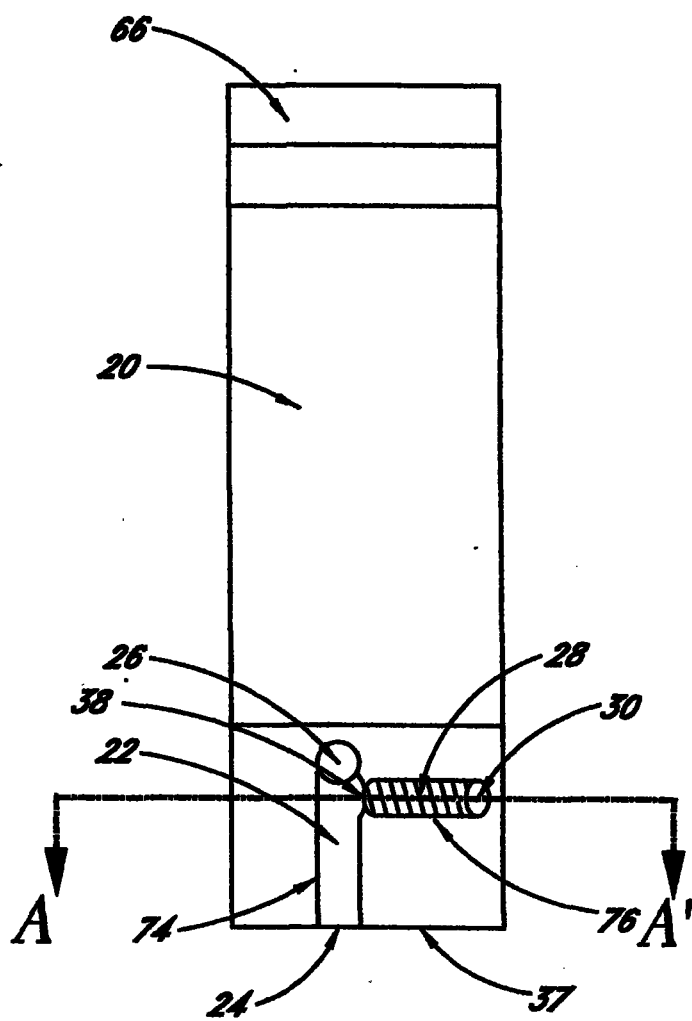


FIG. 1

3/4

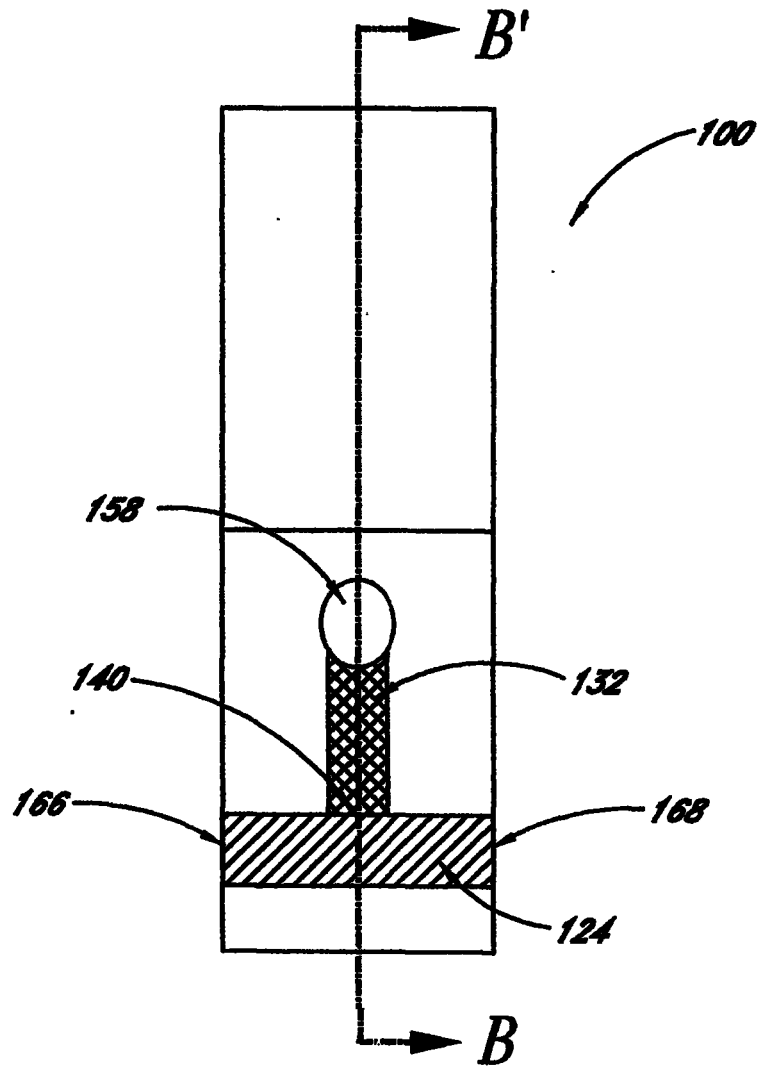


FIG. 3

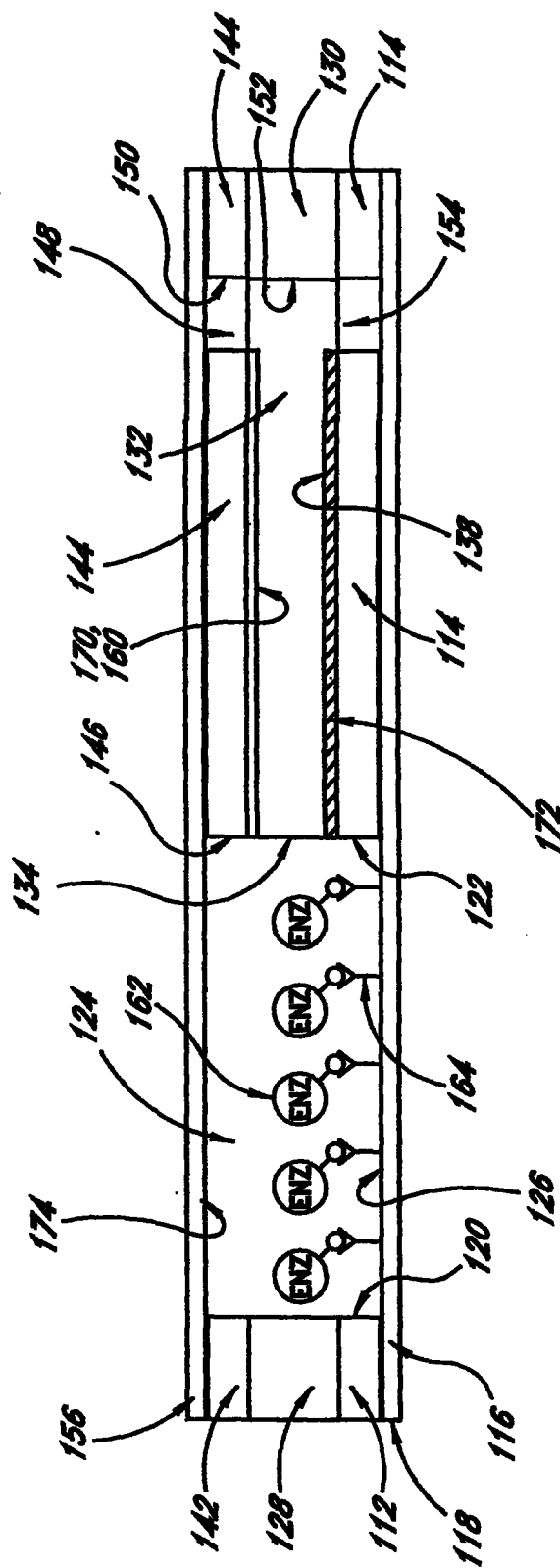


FIG. 4