(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109313155 B
(45)授权公告日 2022.02.25

(21)申请号 201780035872.3
(22)申请日 2017.04.12
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109313155 A
(43)申请公布日 2019.02.05
(30)优先权数据
62/322,093 2016.04.13 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.12.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/027180 2017.04.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/180725 EN 2017.10.19

(73)专利权人 聚合物工艺系统有限公司
地址 美国印第安纳州
(72)发明人 盖瑞·L·休斯
(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司 11332
代理人 刘明海 胡彬

(51)Int.Cl.
G01N 27/26(2006.01)
G01N 27/27(2006.01)
审查员 刘畅

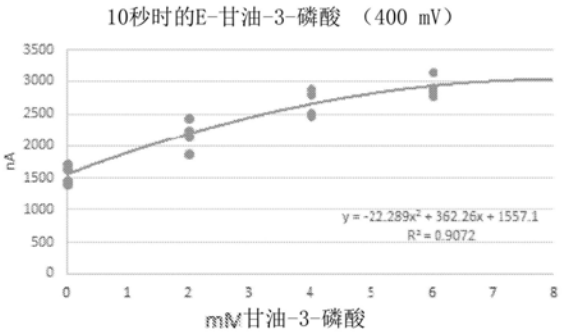
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

用于电化学甘油三酯测定的系统和方法

(57)摘要

用于电化学检测甘油三酯水平的系统包括测试条,所述测试条包括电极和反电极,所述电极和反电极位于样品接收区附近;以及电极和反电极之一上的涂层,所述涂层包括用于甘油三酯的试剂涂层。



CN 109313155 B

1.一种用于电化学检测甘油三酯水平的系统,其特征在于,所述系统包括:

测试条,所述测试条包括电极和反电极,所述电极和反电极位于样品接收区附近;以及

电极和反电极之一上的涂层,所述涂层包括用于检测甘油三酯的试剂涂层,所述试剂涂层包括:表面活性剂;脂蛋白脂肪酶;甘油激酶;三磷酸腺苷;甘油-3-磷酸脱氢酶;NAD;和能够被氧化或还原形成产物的氧化还原剂;以及

分析仪,所述分析仪用于接收测试条并且包括存储在非暂时性介质上的指令,用于向测试条施加电流或电压并响应地确定甘油三酯的量,其中所述氧化还原剂是铁氰化物和酶,其中所述酶是心肌黄酶,以催化氧化还原反应。

2.一种检测甘油三酯的方法,其特征在于,所述方法包括:

提供电化学测试条,所述测试条包括电极和反电极,所述电极和反电极位于样品接收区域中;以及电极和反电极之一上的涂层,所述涂层包括用于检测甘油三酯的试剂涂层,所述试剂涂层包括:表面活性剂;脂蛋白脂肪酶;甘油激酶;三磷酸腺苷;甘油-3-磷酸脱氢酶;NAD;和能够被氧化或还原形成产物的氧化还原剂;

将电化学测试条放入分析仪中;

将血液样品放在电化学测试条上;

测量所提供的通过血液样品和电化学测试条的电流;和

根据电流用分析仪计算甘油三酯的水平,其中所述氧化还原剂是铁氰化物和酶,其中所述酶是心肌黄酶,以催化氧化还原反应。

用于电化学甘油三酯测定的系统和方法

背景技术

[0001] 血液和其他体液中的某些分析物的水平可以预测疾病或其风险。例如，血液中胆固醇和甘油三酯的量是冠心病(“CHD”)风险的重要指标。血浆中甘油三酯过量被称为“高甘油三酯血症”，在一些人中甘油三酯过量与动脉粥样硬化和冠心病的发生有关。甘油三酯升高可能是其他疾病的结果，例如未治疗的糖尿病。与胆固醇一样，甘油三酯水平的增加可通过血浆测量来检测。

[0002] 甘油三酯的分析可以根据多种技术进行。通常使用实验室测试；然而，这种测试通常需要采一小瓶血液，结果可能需要大量的时间来处理。另外，可以使用基于电化学和反射率(reflectance)的测试条(strip)，其提供在即时检测(point-of-care)设置中的测试。

发明内容

[0003] 在一个实施方案中，用于电化学甘油三酯传感器的试剂混合物包括表面活性剂和甘油三酯水解试剂。试剂混合物还包括甘油激酶和甘油-3-磷酸脱氢酶。试剂混合物还包括辅酶和能够被氧化或还原以形成产物的氧化还原剂。在一个替代方案中，甘油三酯水解试剂是脂蛋白脂肪酶。在另一个替代方案中，辅酶是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)。任选地，表面活性剂包括胆汁酸衍生物。或者，表面活性剂包括胆汁酸衍生物的盐。在一个替代方案中，胆汁酸衍生物选自胆汁酸列表，该列表包括：5-胆酸-3β-醇；5α-胆酸-3α-醇-6-酮3-乙酸甲酯；5β-胆酸3,7-二酮甲酯；5β-胆酸；5β-胆酸-3α,12α-二醇3-乙酸甲酯；鹅脱氧胆酸(Chenodeoxycholic acid)；胆酸；脱氧胆酸；甘氨熊脱氧胆酸(Glycoursodeoxycholic acid)；猪脱氧胆酸甲酯(Hyodeoxycholic acid methyl ester)；猪脱氧胆酸；石胆酸(Lithocholic acid)；胆酸钠水合物；脱氧胆酸钠；甘氨鹅脱氧胆酸钠(Sodium glycochenodeoxycholate)；牛磺鹅脱氧胆酸钠(Sodium taurochenodeoxycholate)；牛磺胆酸钠水合物(Sodium taurocholate hydrate)；牛磺胆酸钠盐水合物；和熊脱氧胆酸(Ursodeoxycholic acid)。或者，试剂混合物还包括心肌黄酶(Diaphorase)。

[0004] 在一个实施方案中，用于电化学检测甘油三酯水平的系统包括测试条，所述测试条包括电极和反电极，所述电极和反电极位于样品接收区附近；以及电极和反电极之一上的涂层，所述涂层包括用于甘油三酯的试剂涂层。在一个替代方案中，涂层包括表面活性剂和甘油三酯水解试剂。涂层还包括甘油激酶和甘油-3-磷酸脱氢酶。涂层还包括辅酶和能够被氧化或还原以形成产物的氧化还原剂。在一种配置中，甘油三酯水解试剂是脂蛋白脂肪酶。任选地，辅酶是NAD。或者，表面活性剂包括胆汁酸衍生物。在一种配置中，表面活性剂包括胆汁酸衍生物的盐。

[0005] 在另一个实施方案中，用于电化学甘油三酯传感器的试剂混合物包括甘油三酯水解试剂。试剂混合物还包括甘油激酶和甘油-3-磷酸脱氢酶。试剂混合物还包括辅酶和能够被氧化或还原以形成产物的氧化还原剂。在一个替代方案中，试剂混合物还包括表面活性剂。或者，甘油三酯水解试剂是脂蛋白脂肪酶。任选地，辅酶是NAD。或者，表面活性剂包括胆汁酸衍生物。任选地，表面活性剂包括胆汁酸衍生物的盐。

[0006] 在一个实施方案中，用于电化学检测甘油三酯水平的系统包括测试条，所述测试条包括电极和反电极，所述电极和反电极位于样品接收区附近。所述系统还包括电极和反电极之一上的涂层，所述涂层包括用于甘油三酯的试剂涂层。所述系统还包括用于接收测试条的分析仪，所述分析仪包括存储在非暂时性介质上的指令，用于向测试条施加电流或电压并响应地确定甘油三酯的量。任选地，所述涂层包括：表面活性剂；甘油三酯水解试剂；甘油激酶；甘油-3-磷酸脱氢酶；辅酶；和能够被氧化或还原以形成产物的氧化还原剂。或者，甘油三酯水解试剂是脂蛋白脂肪酶。任选地，辅酶是NAD。在一种配置中，表面活性剂包括胆汁酸衍生物。在另一种配置中，表面活性剂包括胆汁酸衍生物的盐。

[0007] 在一个实施方案中，检测甘油三酯的方法包括提供电化学测试条并将电化学测试条放置在分析仪中。所述方法还包括将血液样品放置在电化学测试条上；测量所提供的通过血液样品和电化学测试条的电流；并根据电流用分析仪计算甘油三酯的水平。可选地，所述测试条包括电极和反电极，所述电极和反电极位于样品接收区域中；以及电极和反电极之一上的涂层，所述涂层包括用于甘油三酯的试剂涂层。或者，所述涂层包括表面活性剂；甘油三酯水解试剂；甘油激酶；甘油-3-磷酸脱氢酶；辅酶；和能够被氧化或还原以形成产物的氧化还原剂。任选地，甘油三酯水解试剂是脂蛋白脂肪酶。或者，辅酶是NAD。任选地，表面活性剂包括胆汁酸衍生物。在一种配置中，表面活性剂包括胆汁酸衍生物的盐。

附图说明

[0008] 图1示出了产生的概念证明(proof-of-concept)图；和

[0009] 图2示出了条设计的一个实施方案。

具体实施方式

[0010] 这里仅为了方便而使用了某些术语，而不是将其视为电化学甘油三酯测定的系统和方法的实施方案的限制。在附图部分，在几个附图中使用相同的参考字母来指定相同元件。

[0011] 在许多实施方案中，预期用途可以是测试全血。与光学测定相比，电化学甘油三酯测定提供了许多优点。与许多光学测定相反，通过安培法甘油三酯测定，不需要膜。许多目前的光学测定依赖于不同的膜制造商，他们自行决定不再生产膜。

[0012] 用电化学测试可以更容易地校准分析仪。测量电流(nA)是标准化过程，而标准化反射率更难。

[0013] 由于试剂更少、原材料(膜、条载体等)更少和该方法的自动化，电化学测试甘油三酯可以导致每个测试条的成本更低。由于自动化和使用的试剂量少，电化学测试条通常制造成本低廉。所提出的电化学甘油三酯测定不依赖于氧，因此可以测试静脉血液和毛细血管血液。

[0014] 在许多配置中，通过电化学测试甘油三酯可以导致比光学测试更好的精确度。

[0015] 在许多实施方案中，电化学甘油三酯测定的测试范围可以大于反射率测定。反射率测试在高浓度下受到可产生的颜色量的限制。然而，电化学测定能够测量更高的浓度。这对于甘油三酯测定是有益的，因为我们收到了用甘油三酯范围为1000mg/dL或更高的动物进行的那些试验的需求。

[0016] 在一些实施方案中，样品大小将是小的：～1.2μL，而不是如在光学系统中使用的15μL。在许多实施方案中，不需要移液管将血液施加到条上，因为血液样品很简单地被芯吸到采样端口中。

[0017] 血液中的甘油三酯浓度是医疗保健提供者要测试的重要分析物。高血压、肥胖、心脏病和糖尿病都与高甘油三酯水平相关。此外，与总胆固醇和HDL一起测试甘油三酯将允许计算LDL。通过进行电化学甘油三酯测定，为创建完整电化学脂类板(lipid panel)奠定了基础。

[0018] 以下反应是用于创建电化学甘油三酯测试的反应的一个实施方案。我们已经证明了反应3和4的概念证明。反应1和2目前在PTS反射率测试条中实施，并且当从最后一个等式开始完全优化后将基于这些结果起作用。

[0019] 1：甘油三酯 $+3H_2O$ $\xrightarrow{\text{脂蛋白脂肪酶}}$ 甘油 +3 脂肪酸

[0020] 2：甘油 +ATP $\xrightarrow{\text{甘油激酶/Mg++}}$ 甘油-3-磷酸 +ADP

[0021] 3：甘油-3-P + NAD $\xrightarrow{\text{甘油-3-磷酸脱氢酶}}$ 磷酸二羟丙酮 + NADH + H^+

[0022] 4：NADH +铁氰化物 $\xrightarrow{\text{心肌黄酶}}$ NAD^+ +亚铁氰化物 使用心肌黄酶的替代方案可以结合Dojindo的1-甲氧基PMS介体(mediator)。此外，可以使用更有利于碱性条件的其他介体代替铁氰化钾。

[0023] 用于甘油三酯的电化学测试条的实施方案的一个关键方面是使用甘油-3-磷酸脱氢酶。在许多实施方案中，酶甘油-3-磷酸脱氢酶已显示测定具有可能性。进一步优化pH、反应物浓度，使用介体进行实验等，将为甘油三酯测定产生更好的精确度、更大的斜率和更低的截距。本文提供了电化学甘油三酯测定的概念证明。

[0024] 图1示出了电化学条的概念证明，其用于测试甘氨酸缓冲液pH 9中的甘油-3-磷酸溶液。进一步优化应该允许更低的截距、更好的斜率和更好的精确度。

[0025] 除了安培法甘油三酯传感器之外，在一些实施方案中，可以使用通用电化学测试条结合先前的发明并提供含甘油三酯测试的多项测试。在测试甘油三酯的同时，检查其他重要的分析物如葡萄糖、胆固醇、HDL等可能会有所帮助。

[0026] 图2示出了包括甘油三酯检测器的条设计的一个实施方案。示出了四个条10。从左到右，条10具有4个、3个、2个和1个样品接收端口20。每个样品接收端口20均可以具有电极30、反电极40和参考电极50。参考电极50可以提供填充指示，因为当样品到达电极50时它才会通电压。还可见触点70、80，其与电极互连并在插入时与分析仪中的触点连接。条的大小不会根据测定的数量而改变。另外，电极放置不会根据测定类型而改变。根据测试方案的要求，为一个、两个、三个或四个分析物打印薄板。本发明公开内容的精神不是将组的大小限制为仅四种分析物，而是提供受保护的概念，无论测试一种或十种分析物。而且，电极并不需要都位于条的一侧。优异的技术可能能够在条的两侧放置电极，从而允许小型化。

[0027] 在一些实施方案中，单分析物测试条被设计为具有与至少四个相关电极相同的位置。显示为“h”的电极60用于分析仪的条检测。剩下的测定将具有至少三个电极——一个用于样品填充检测，另外两个用作反电极和工作电极。这些测定不限于设定数量的电极，因为在一些实施方案中可以预见，为了确定和校正血细胞比容或其他干扰物质，可以添加更多

电极。

[0028] 在多种配置中，可以在电极上涂覆试剂。或者，可以印刷、涂覆、浸涂或以其他方式施加试剂，这在本领域中是显而易见的。也可以使用各种类型的电极，包括由碳、金、铂、铜或其他导电材料制成的电极，这对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0029] 图2示出了用于每项测定的单独的血液采样端口。一些实施方案可以包括单独的采样端口，特别是如果试剂之间可能存在“串扰”的情况下。总之，已经提出了用于电化学甘油三酯测定的新颖构思的实施方案。已经证明，与甘油-3-磷酸和介体的电化学反应是可行的测试技术。电化学甘油三酯测定将具有更小的样品大小、更短的测试时间、更好的精确度，并且制造起来更便宜。

[0030] 许多动物试验实验室要求测试值为约1000mg/dL的甘油三酯的能力。虽然这种范围对于反射率测试是困难的，但是电化学测试可以容易地测试高浓度。当采血量很关键时，该测试对于大鼠、小鼠、兔等测试来说可能是有利的。

[0031] 提供了电化学甘油三酯测定的多个实施方案。用于检查甘油三酯水平的条是方便的即时检测(POC)测定，但是当与胆固醇和HDL测试结合以形成脂类板时是最好的。我们已经证明了电化学脂类板的第一个构成部分。建立电化学脂类板将压倒POC市场的竞争。电化学脂类板具有较小的样品尺寸、较短的测试时间、更好的精确度，并且制造起来更便宜。

[0032] 尽管在前面的具体实施方式中详细描述了具体实施方案并且在附图中进行了解释，但是本领域技术人员将认识到，根据本公开的总教导及其广泛的发明构思，可以开发针对这些详细描述的各种修改和替代方案。因此，应该理解的是，本公开的范围不限于在此公开的特定实施方案和实现方法，而是旨在涵盖如所附权利要求及其任意和所有等同物所限定的精神和范围内的修改。注意，尽管示出了特定实施方案，但是每个附件的特征可以在实施方案之间互换。

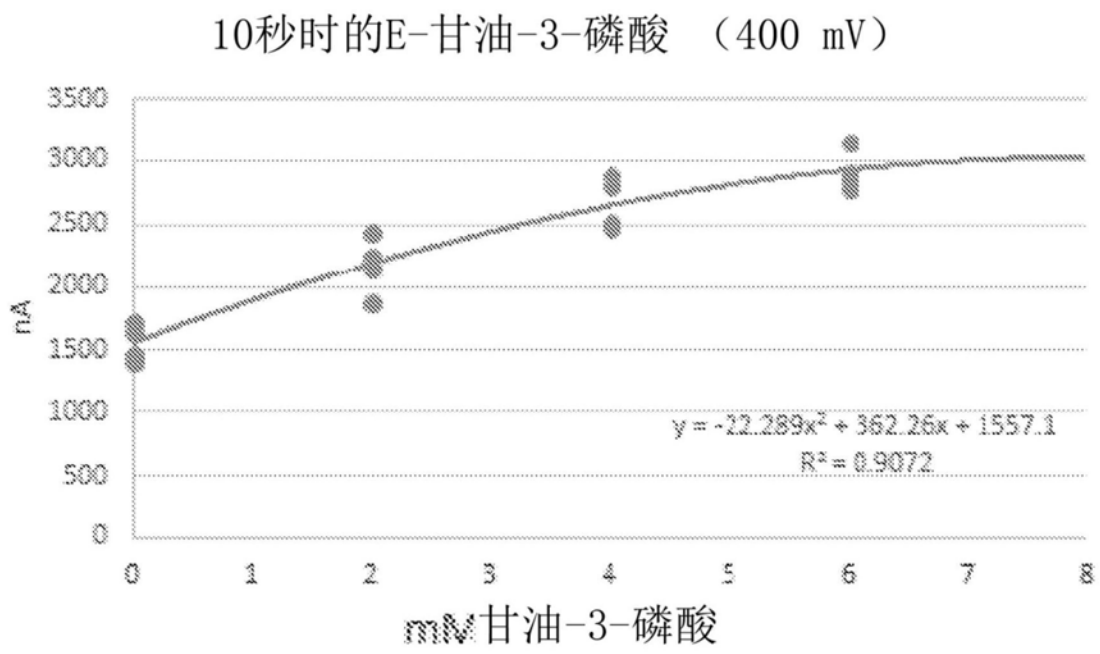

10秒时的E-甘油-3-磷酸 （400 mV）
nA
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
y = -22.289x² + 362.26x + 1557.1
R² = 0.9072
mM甘油-3-磷酸

图1

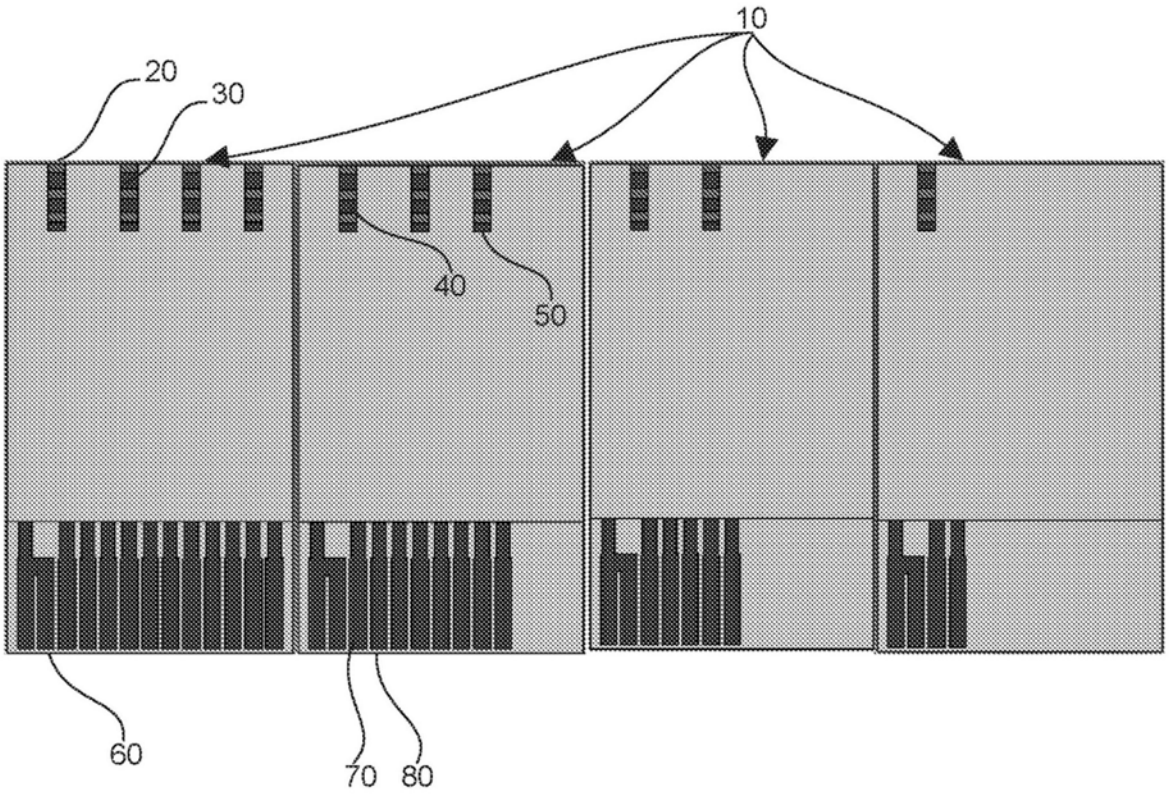

10
20
30
40
50
60
70
80

图2