



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1910444 B

(45) 授权公告日 2010.04.14

(21) 申请号 200580001999.0 第 18-20 行, 第 4 栏第 64 行 - 第 7 栏第 11 行、附图 5, 6.
(22) 申请日 2005.01.07 US 6131580 A, 2000.10.17, 全文.
(30) 优先权数据 Petra Turkewitsch et al. Fluorescent functional recognition sites through molecular imprinting - a polymer-based fluorescent chemosensor for aqueous cAMP. Analytical Chemistry 70. 1998, 702025-2029.
60/534, 735 2004.01.07 US
(85) PCT 申请进入国家阶段日 2006.07.06
(86) PCT 申请的申请数据 PCT/US2005/000632 2005.01.07
(87) PCT 申请的公布数据 W02005/068980 EN 2005.07.28
(73) 专利权人 纽约州立大学研究基金会
地址 美国纽约州
(72) 发明人 F·V·布莱特
(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 范征
(51) Int. Cl. G01N 21/64 (2006.01)
(56) 对比文件 US 6582971 B1, 2003.06.24, 说明书第 2 栏

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 10 页

(54) 发明名称

分子印迹聚合物、其制备方法和检测分析物存在的方法

(57) 摘要

本发明提供了整合有发射位点的蛋白质或多肽印记聚合物 (PIPIES), 用于检测包含对分析物特异的模板位点的蛋白质或多肽分析物的存在。在模板位点上或其附近是选择性地放有报道分子。也公开了 PIPES 的制备方法及其在检测分析物中的应用。

1. 一种用于检测选自蛋白质或肽的分析物存在的含有聚合物基质的分子印记聚合物, 所述聚合物基质包含:

多个模板位点, 各模板位点对分析物特异; 和

一个或多个报道分子, 其选择性连接在模板位点上, 其中至少 90% 报道物存在于模板位点上, 特定多肽或蛋白质结合于模板位点后, 观察到报道物的吸光度和 / 或发射改变。

2. 如权利要求 1 所述的分子印记聚合物, 其特征在于, 所述聚合物是干凝胶或气凝胶。

3. 如权利要求 1 所述的分子印记聚合物, 其特征在于, 所述报道物选自发光团或生色团。

4. 如权利要求 3 所述的分子印记聚合物, 其特征在于, 所述发光团选自荧光素、BODIPY、罗丹明、三(4,7-二苯基-1,10-菲咯啉)钌(II) ($[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$) 和量子点。

5. 如权利要求 3 所述的分子印记聚合物, 其特征在于, 所述生色团选自 4-硝基苯胺、2,6-二苯基-4-(2,4,6-三苯基-1-吡啶并)酚盐、2,6-二氯-4-(2,4,6-三苯基-1-吡啶并)酚盐和 N,N-二二乙基-4-硝基苯胺。

6. 如权利要求 1 所述的分子印记聚合物, 其特征在于, 所述模板位点对角质形成细胞生长因子、卵清蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白及其组合特异。

7. 如权利要求 1 所述的分子印记聚合物, 其特征在于, 所述报道分子通过化学链连接在模板位点上。

8. 一种选择性检测选自蛋白质和多肽的分析物的分子印记聚合物的制备方法, 所述方法包括以下步骤:

a) 使未聚合的聚合物组分在所述分析物分子存在下聚合形成具有模板位点的聚合物基质, 其中各模板位点上结合有所述分析物分子;

b) 从所述模板位点释放所述分析物分子, 从而形成对分析物特异的模板位点;

c) 单独制备分析物-可活化报道物复合物, 其中可活化化学残基共价连接于报道分子;

d) 使所述模板位点与所述分析物-可活化报道物复合物相接触;

e) 激活所述分析物-可活化报道物复合物, 形成分析物-活化的报道物复合物, 从而实现分析物-活化的报道物复合物的报道物部分与模板位点的结合; 和

f) 从所述分析物-活化的报道物复合物释放分析物分子, 从而提供具有模板位点和结合在所述模板位点上的报道分子的分子印记聚合物, 其中所述模板位点对分析物特异。

9. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述聚合物是干凝胶或气凝胶。

10. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述制备分析物-可活化报道物复合物的步骤包括将报道分子共价连接于可活化的化学残基以形成可活化报道物和使一个或多个可活化报道物结合于分析物分子形成分析物-可活化报道物复合物的步骤, 其中分析物-可活化报道物复合物含有一个或多个报道分子。

11. 如权利要求 10 所述的方法, 其特征在于, 所述报道分子通过化学链共价连接于可活化的化学残基。

12. 如权利要求 10 所述的方法, 其特征在于, 所述可活化的化学残基是可光敏化的化学残基。

13. 如权利要求 12 所述的方法, 其特征在于, 所述可光敏化的化学残基选自芳基叠氮、

氟化芳基叠氮和二苯甲酮衍生物。

14. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述可活化的化学残基选自异硫氰酸酯、琥珀酰亚胺基酯、羧酸酯、四氟苯基酯、羰基叠氮化物、磺酰氯、芳基化剂、醛、碘代乙酰胺、马来酰亚胺、烷基卤、二硫化物、二氯三嗪、N-甲基靛红酸酐、氨基苯基硼酸、酰基脒、肼、羟胺、胺、碳二亚胺、酯化剂、重氮烷、烷基卤、三氟甲烷磺酸酯、和由酰基叠氮制备的异氰酸酯。

15. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述链选自亚甲基链、醚链、聚二甲基硅氧烷链、聚苯乙烯链、氨基酸链和有机或无机低聚物。

16. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述报道物是发光团或生色团。

17. 如权利要求 16 所述的分子印记聚合物,其特征在于,所述发光团选自荧光素、BODIPY、罗丹明、三(4,7-二苯基-1,10-菲咯啉)钌(II) ($[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$) 和量子点。

18. 如权利要求 16 所述的分子印记聚合物,其特征在于,所述生色团选自 4-硝基苯胺、2,6-二苯基-4-(2,4,6-三苯基-1-吡啶并)酚盐、2,6-二氯-4-(2,4,6-三苯基-1-吡啶并)酚盐和 N,N-二乙基-4-硝基苯胺。

19. 一种在测试样品中检测分析物存在的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 使测试样品与如权利要求 1 所述的分子印记聚合物接触;和

b) 在接触测试样品后检测报道分子的吸光度或发射改变,

其中报道分子的吸光度或发射改变表明测试样品中存在所述分析物。

分子印迹聚合物、其制备方法和检测分析物存在的方法

[0001] 本申请要求 2004 年 1 月 7 日提交的美国临时申请号 60/534,735 的优先权,将其内容纳入本文作为参考。

[0002] 此工作由国家自然科学基金会资助号 CHE-0078101 和 CHE-0315129 的资助。政府享有本发明的某些权利。

发明领域

[0003] 本发明总地涉及分析物检测领域,更具体地涉及在样品中检测蛋白质。

[0004] 发明背景

[0005] 美国人在检测和定量化学物质上每年花费数十亿美元。这些测定大部分在装备精良的实验室中进行,需要技术人员、大量昂贵试剂和长分析时间。用于临床点护理测试或野外应用时也需要小的整合分析平台。许多这些需要有助于激发化学传感器的开发 [1]。类似地,对同时测量样品中的“每种物质”的日益增长的需求 [2] 促进了依赖于化学和生化传感器阵列策略 [4-10] 的人造“鼻”和“舌”的开发 [3]。

[0006] 目前,需要开发克服现有装置和方法的缺点的新装置。在样品中同时定量多种分析物的检测方法是构建和操作更便宜且更简单的,它们精确、准确且可信,和 / 或提供足够的检出限和选择性,这或许是分析物检测领域中受欢迎的进展。

[0007] 试图用于检测的一种通用装置是“生物传感器”。在普通生物传感器中,固定的生物识别元件(如抗体、适配体、DNA 寡核苷酸、酶、凝集素、信号蛋白、转运蛋白)用于选择性识别靶分析物,结合或转化(如果分析物是底物)事件导致与样品中的分析物浓度相关的光学、质量、热和 / 或电化学反应。

[0008] 虽然生物传感器开发看起来好像简单,但是有许多基础问题与开发分析上有用的生物传感器有关。例如,传统方案取决于鉴定合适的可选择性识别靶分析物的生物识别元件。采用合适的检测 / 转导方法,固定生物识别元件 [11-13],以使它保持其天然活性 / 亲和性和选择性。生物识别元件 - 传统设计中的生物传感器的心脏 - 需要随时间保持稳定,靶分析物需要进入生物识别元件,在每次测量后需要分析物 - 生物识别元件结合 / 相互作用是可逆的,或至少容易解离 / 复位。上述缺点限制了生物传感器在分析物检测中的应用。

[0009] 在过去十年中,通过模板 - 导向的功能性单体的交联在合成聚合物内引入特定结合域引起了很大关注 [14,15]。分子印记包括将可聚合功能性单体排列在模板(假靶分析物或实际靶分析物)周围,然后聚合和去除模板。该排列一般通过以下作用来实现:(i) 非共价相互作用(如 H 键、离子对相互作用)或(ii) 可逆共价相互作用。去除模板后,这些分子印记的聚合物(MIP)可识别和结合特定化学物质(即模板或模板类似物)。

[0010] 基于 MIP 的材料潜在优点包括:与生物识别元件相当的特异性;在极端化学和物理条件下的坚固性和稳定性;以及为缺少合适的生物识别元件的分析物设计识别位点的能力。开发了用于(非穷举列表)蛋白质、氨基酸衍生物,糖及其衍生物、维生素、核苷酸碱基、杀虫剂、药品和聚环芳香烃的 MIP。然而,根据 Lam[16],开发基于 MIP 的生物模拟传感器中主要问题之一是信号转导。

[0011] 有几则报道利用发光作为转导形式的基于MIP的传感器。例如, Powell小组 [17a] 用反式 4-[对-(N,N-二甲基氨基)苯乙烯基]-N-乙烯基苄基氯化嘧啶(荧光团)、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯、2-羟乙基甲基丙烯酸酯和引发剂 2,2'-偶氮二异丁酸腈(AIBN)形成 cAMP 印记的有机聚合物。这些 MIP 在 1 毫摩尔 cAMP 的存在下荧光改变 20%, 它们对于 cAMP 的选择性超过 cGMP。Murray 小组 [17b] 用 $\text{Eu}(\text{R})_3(\text{NO}_3)_3$ (R = 频哪基甲基磷酸酯或二乙烯基甲基苯甲酸酯)(荧光团)、苯乙烯和 AIBN 制备索曼印记的有机聚合物。

[0012] 这些 MIP 能够检测低至每 1×10^{15} 份之 750 份的索曼且来自有机磷农药的干扰最小。传感器反应时间是 8 分钟。Takeuchi 小组 [17c] 报道了基于荧光的 MIP 传感器, 用于检测 9-乙基腺嘌呤(9-EA)。此传感器基于用 5,10,15-三(4-异丙基苯基)-20-(4-甲基丙烯酰基氧苯基)卟啉锌(II)(荧光团)和甲基丙烯酸模板 9-EA。在 CH_2Cl_2 中, 这些聚合物对 9-EA 的结合亲和力为 $7.5 \times 10^5 \text{M}^{-1}$, 对腺嘌呤、4-氨基吡啶和 2-氨基吡啶有选择性, 在 250 微摩尔 9-EA 的存在下产生的荧光改变为 40%。Wang 小组 [17d] 报道了基于荧光的 MIP 传感器, 用于用丹磺酰化的二甲基丙烯酸单体(荧光团)、乙二醇二甲基丙烯酸酯和 AIBN 检测 L-色氨酸。在操作中, 作者将移动淬灭剂 4-硝基苯甲醛(4-NB)加入 MIP, 使丹磺酰发射淬灭。加入 L-色氨酸后, 释放/阻断一些 4-NB 进入丹磺酰残基, 丹磺酰荧光增加。加入 10 毫摩尔 L-色氨酸后荧光改变为 45%。等量 D-色氨酸、L-苯丙氨酸和 L-丙氨酸的存在引起 32%、27% 和 < 9% 荧光改变。Lam 小组 [16] 用光诱导的电子转移(PET)方案形成基于荧光的 MIP, 用于检测模板的溶胶凝胶衍生的干凝胶内的 2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)。在此项工作中, 作者用 2,4-D 作为模板使 3-[N,N-双(9-苄基甲基)氨基]丙基三乙氧基硅烷(荧光团)与四乙氧基硅烷(TEOS)和苯基三甲氧基硅烷(PTMOS)共聚合。如此形成的 MIP 随 pH(表观 pKa 在 7.2 附近)显示荧光改变, 它在 750 微摩尔 2,4-D 的存在下产生 15% 荧光降低。用苯甲酸和乙酸进行的测试在相似浓度时不引起显著干扰。

[0013] 近来, Edmiston 和同事 [17e] 报道了用于以牺牲间隔(SS)方案检测杀虫剂 1,1-双(4-氯代苯基)-2,2,2-三氯乙烷(DDT)的基于荧光的干凝胶 MIP 的制作方法 [18], 其中他们将 3-异氰基丙基三乙氧基硅烷与 4,4'-亚乙基双酚反应, 形成 SS。然后他们通过将 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)与荧光团 4-氯-7-硝基苯并咪唑(NBD)反应(将 NBD 连接于 APTES 胺, NBD-APTES)制备荧光单体。然后通过混合 NBD-APTES、SS 和双(三甲氧基甲硅烷基)苯, 然后经一般的酸水解方法形成印记干凝胶。一旦干凝胶形成, 作者用稀释的 LiAlH_4 切割 SS 氨基甲酸酯键, 在模板位点内形成胺残基, 从干凝胶中释放 SS。传感器对 DDT 起反应(NBD 荧光改变 3%), 模板干凝胶对 DDT 提供的选择性超过可能的干扰物(如苄(A)、2,2-双(4-氯代苯基)-1,1-二氯乙烯(p,p-DDE)、1-(2-氯代苯基)-1-(4-氯代苯基)-2,2-二氯乙烷(o,p-DDD)、2,2-双(4-氯代苯基)-1,1-二氯乙烷(p,p-DDD)、二苯基甲烷(DPM)、4,4'-二溴联苯基(DBBP)、4,4'-双(氯甲基)-1,1'-联苯基(BCP))。DDT 检出限在每十亿水平单位数部分。

[0014] 然而, 在所有以前有关基于发光的 MIP 传感器的工作中, 没有开发出保证在分析物结合发生时发光报道分子实际上紧挨着分析物的方案。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明提供分子印记聚合物及其用于选择性检测蛋白质和多肽的方法。制备分子印记聚合物的方法包括制备整合有发射位点的蛋白质或多肽模板的聚合物(PIPIES), 这意

味着报道分子选择性植入模板位点中或其附近。为了检测测试样品中存在的蛋白质或多肽,使测试样品接触 PIPIES,以使靶蛋白或多肽(如果存在)与 PIPIES 结合/反应。传感器反应可用任何光子检测装置如光电倍增管、电荷转移装置(CTD)或互补型金属氧化物半导体(CMOS)来检测。

[0017] 通过首先在靶蛋白周围形成聚合物平台产生本发明 PIPIES。然后从聚合物平台上去除蛋白质分子,产生模板位点。然后用一个或多个报道分子选择性标记模板位点,如下所述。报道分子共价连接于可活化的化学残基,形成可活化报道物。报道分子可直接或通过插入化学部分链(tether)基团和/或接头基团连接于可活化的化学残基。报道分子和可活化的化学残基与或不与链基团和/或接头基团的组合称为可活化报道物(AR)。

[0018] 然后,使可活化报道物结合于靶蛋白(或多肽)分子,形成非共价键合的靶蛋白-AR 复合物。这些复合物可有 1 个以上报道分子。本领域通常已知报道分子通过非共价结合包括疏水键和氢键结合于蛋白质和多肽。靶蛋白分子用作递送蛋白,将报道分子递送到模板位点。然后,聚合物基质内的模板位点接触靶蛋白-AR 复合物。AR 活化后,如在可光敏化的化学残基的情况下被光子活化后,在聚合物基质内的 AR 和模板位点上的可活化残基之间发生化学反应,在 AR 和模板位点上的可活化残基之间形成一个或多个共价键。这将一个或多个报道分子安置在模板位点上或其附近。

[0019] 虽然不希望受限于任何具体理论,但考虑到围绕报道分子的直接微环境(本文中称为报道物的群聚区(cybotactic region))的物理化学特性(如介电常数、折射率、动力学等)的改变会引起报道分子的吸光度、激发光谱和发射光谱,以及激发态发光寿命和/或发光极化的改变。结果是,预计当报道分子和模板位点共享一些或所有报道分子的群聚区时,报道者吸光度/发光特性(即分析信号)的改变较大。因此,当分析物分子结合于模板位点,从而改变模板位点的物理化学特性时,报道分子在模板位点上同时感受到结合。

[0020] AR 与模板位点连接后,用洗涤步骤去除递送蛋白(或多肽)。虽然用水溶液最方便,但也可使用其它溶剂如有机溶剂或混合物。报道者安置在模板位点上或其附近的聚合物平台在本文中称为 PIPIES。当聚合物是干凝胶时,本发明材料是整合有发射位点的蛋白质印记干凝胶或 PIXIES。

[0021] 虽然术语蛋白质在整个申请中用于描述本发明,它也表示包括多肽。PIPIES 可用于通过使 PIPIES 接触样品检测样品中靶蛋白的存在。如果靶蛋白存在于样品中,它能选择性结合于模板位点。靶蛋白(即分析物)与模板位点的结合使围绕报道分子的群聚区产生改变。报道分子的局部微环境的这种改变可引起报道分子的吸光度、激发光谱和发射光谱,以及激发态寿命和/或极化的改变,通过测量这种改变能确定结合蛋白的存在。

[0022] 本发明提供了将报道分子选择性安置在蛋白质结合位点附近而不阻塞位点的方法。因此,在聚合物基质中,大多数(> 50%)报道分子存在于报道位点上或其附近。在一个实施方式中,基本上所有报道分子存在于模板位点上或其附近。术语“基本上所有”指至少约 90%报道物,优选至少约 95%,更优选至少约 98%或 99%报道物存在于模板位点上或其附近。换言之,在此实施方式中,少于 10%,优选少于 5%,更优选少于 2%或 1%报道物存在于聚合物基质中且不与模板位点结合。因此,不像其他方法,本发明的大多数聚合物平台(即聚合物的非模板区)基本不含报道物。因此,最大程度降低或消除了随机分布在聚合物平台中且距模板位点相对远的报道物背景信号。

[0023] 因此,本发明克服了开发用于检测蛋白质的基于 MIP 传感器的两个挑战。首先,形成基于蛋白质选择性聚合物的 MIP。其次,将报道分子安置在模板位点上或其附近,以转导后续的蛋白质模板位点结合事件。我们称我们的新传感器材料为整合有发射位点的蛋白质印记聚合物 (PIPIES)。本发明方法见图 1-3。

[0024] 附图简要说明

[0025] 图 1 代表产生 PIPIES 的整个过程。

[0026] 图 2 代表产生随后可光敏化的可活化报道 (AR) 分子。

[0027] 图 3 代表用于制备整合有发射位点的蛋白质印记干凝胶 (PIXIES) 的反应顺序。

[0028] 图 4 代表卵清蛋白选择性 PIXIES 的校正曲线。

[0029] 图 5 代表从离散传感器元件 (左) 到成套冗余传感器组 (中) 到多样化、多形式的传感器阵列方案 (右) 的进展。

[0030] 图 6 代表设计用于角质形成细胞生长因子 (KGF) 的五个 (5) 重复的基于 PIXIES 的传感器元件 (直径 100 微米) 的反应。也显示了这些响应于天然和变性 KGF 的 KGF- 反应性 PIXIES 的分析校正曲线。

[0031] 图 7 代表衍生自不同干凝胶前体配方 (Fx) 的五个 (5) 不同的基于 PIXIES 的传感器元件的反应结果 (蛋白质浓度 = 0.1 微摩尔),各自是卵清蛋白、人血清白蛋白 (HSA) 或牛血清白蛋白 (BSA) 的模板。

[0032] 图 8 代表设计用于完整蓖麻毒蛋白 (A 和 B 链) 的基于 PIXIES 的多样化传感器阵列的一部分。显示了衍生自不同干凝胶前体配方 (Fx) 的五个 (5) 不同的 (行) 基于 PIXIES 的传感器元件的五个 (5) 重复 (列) 反应。

[0033] 图 9 代表与四种 (4) 具有 10、100、512 和 1024 个元件的基于 PIXIES 的多样化传感器阵列相比,标准酶联免疫吸附测定 (ELISA) 提供的选择性,各传感器元件衍生自不同干凝胶前体配方。

[0034] 图 10 代表设计用于检测 25 种不同蛋白质的基于 PIXIES 的传感器元件的 5×5 阵列的一部分。

[0035] 发明详述

[0036] 本发明提供了针对给定靶蛋白分子印记聚合物,然后在模板位点上或其附近位点选择性安置一个或多个报道分子用于检测蛋白质的方法和组合物 (图 1)。也提供了用基于 PIPIES 的传感器检测和定量蛋白质的方法。虽然参考文献通常将蛋白质的检测用于说明性目的,但它包括蛋白质和多肽。通常认为多肽由约 50-500 个氨基酸组成,蛋白质由 500 个以上的氨基酸组成。用本发明方法,可开发用于未知多肽或蛋白质的传感器,即使没有生物识别元件可用。

[0037] 可用基于有机和 / 或无机前体的分子印记领域已知的任何方法形成 MIP。许多不同类型的聚合物系统可用于本发明方法。一个说明性例子是,可采用溶胶凝胶衍生的干凝胶。然而,可容易地使该方法适合于基于气凝胶或者天然或合成聚合物系统的其它 MIP。然而,溶胶凝胶衍生的干凝胶和气凝胶尤其有用,因为这些材料的物理化学特性可通过前体的选择、前体的摩尔比和加工方法调整 [参见参考文献 18 和 19]。

[0038] 通常,用于本发明方法的聚合物应该使靶蛋白 - 可活化报道物复合物可结合或在聚合前与至少一些其组分单体化学相互作用。这种聚合物是本领域熟知的。合适的聚合前

体的例子包括但不限于： $(\text{EtO})_3\text{-Si-R}'\text{-Si-(EtO)}_3$ 和 $(\text{EtO})_3\text{-Si-R}''$ 基团，如图 3 所示。

[0039] 根据本发明方法，靶蛋白与一种或多种可聚合前体（如有机单体、引发剂、四烷氧基硅烷、有机修饰的硅烷、催化剂（如酸或碱））混合。任选地，添加剂（如有机、无机聚合物，生物聚合物，表面活性剂）可用于还原蛋白质或防止蛋白质变性。进行聚合，以将蛋白质封在基质内，印记该基质。然后使掺入蛋白质的混合物形成一整块（一般认为厚度大于 1mm）或将其沉积在基材上成为薄膜（一般认为厚度等于或小于 1mm）。然后从模板基质中去除蛋白质（用含水缓冲液洗涤）。下一步，将报道分子共价连接在模板位点内。用可活化报道物完成该步骤。可活化报道物包含 (a) 报道物，(b) 可活化化学残基，和任选的 (c) 报道物和可活化化学残基之间的链 / 接头。

[0040] 有用的聚合物前体包括醇盐和有机修饰的硅烷（图 3 中具有 R 或 R' 基团的物质）。它们与一种或多种四烷氧基硅烷（四甲基正硅烷 TMOS 或四乙基正硅烷 TEOS）、乙醇或其它合适的共溶剂，以及酸或碱催化剂（如 HCl、NaOH）混合。R 和 R' 基团一般包括：R = 正烷基、 $-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$ 、- 苯基、- 苯基 -NH_2 、 $-(\text{CH}_2)_2\text{-}$ 吡啶基、- 环氨基丙基、 $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ 苯基、 $-(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{C}_2\text{H}_4\text{-OH})_2(\text{CH}_2)_3\text{-N}^+(\text{R}'')_3$ 、二氢咪唑、脲基丙基和 EDTA；R' = $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-}(\text{CH}_2)_3\text{-}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-C}_2\text{H}_4\text{-NH}(\text{CH}_2)_3\text{-}$ 、- 苯基 - 和 - 联苯基 -。这些前体、前体形式、催化剂和添加剂的准确摩尔比取决于正在形成的所需干凝胶。

[0041] 报道物通常是发光基团或生色团，它们吸收或发出紫外线、可见光或红外线。可用于本发明方法的报道物的非限制性例子包括发光的有机或无机物质如荧光素、BODIPY、罗丹明、有机金属络合物如三（4,7-二苯基-1,10-菲咯啉）钌(II) ($[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$) 和发光纳米微粒（即量子点）。对它们的理化环境起反应的非发光染料分子也可用作报道分子（如 4-硝基苯胺和 2,6-二苯基-4-(2,4,6-三苯基-1-吡啶并)酚盐 (Reichardt 染料 30)、2,6-二氯-4-(2,4,6-三苯基-1-吡啶并)酚盐 (Reichardt 染料 33) 和 N,N-二乙基-4-硝基苯胺)。

[0042] 报道分子和可活化残基的组合（有或没有链）是可活化报道物 (AR)。可活化残基是可随后与聚合物碱或其它共价键进行插入反应而活化的化学基团。可采用可通过吸收光子活化的基团，如光照（通常在 $< 360\text{nm}$ 处）后产生可与亲核基团形成键的活性中间体的芳基叠氮；UV 光解后产生活性氮宾，从而比简单的芳基叠氮产生更多 C-H 插入产物的氟化芳基叠氮，或可用 $< 360\text{nm}$ 处的电磁辐射重复地激发直到它们产生共价加合物而不损失反应活性的二苯甲酮衍生物。化学活性官能团的其它例子包括：(a) 胺类：异硫氰酸酯、琥珀酰亚胺基酯、羧酸酯、四氟苯基酯、羰基叠氮、磺酰氯、芳基化剂和醛；(b) 硫醇类：碘代乙酰胺、马来酰亚胺、烷基卤、芳基化剂和二硫化物；(c) 醇类：二氯三嗪，N-甲基靛红酸酐，氨基苯基硼酸，由酰基叠氮制备的异氰酸酯，和酰基脒；以及 (d) 羧酸类：肼、羟胺、胺、碳二亚胺、酯化剂、重氮烷、烷基卤和三氟甲烷磺酸酯。这些基团也可用作接头基团。

[0043] 连接部分（本文中也称为链或化学链）可以在化学科学中用于使残基互相间隔开的任何可能的天然或合成基团之一。连接部分的一般例子是亚甲基链、醚链、聚二甲硅氧烷链、聚苯乙烯链、氨基酸链和任何其它有机 / 无机低聚物。可用于在特定类型的报道分子和可活化残基之间形成连接的化学基团的特定例子包括但不限于：连接胺残基可以用异硫氰酸酯、琥珀酰亚胺基酯、羧酸酯、四氟苯基酯、羰基叠氮、磺酰氯、芳基化剂和醛；连接硫醇残基可以用碘代乙酰胺、马来酰亚胺、烷基卤、芳基化剂和二硫化物；连接醇残基可以用

二氯三嗪、N-甲基脒红酸酐、氨基苯基硼酸、由酰基叠氮制备的异氰酸酯、和酰基脒；连接羧酸可以用脒、羟胺、胺、碳二亚胺、酯化剂、重氮烷、烷基卤和三氟甲烷磺酸酯。

[0044] 为将报道物位点选择性安置在蛋白质模板位点上或其附近，将蛋白质与 AR 混合（图 1）。蛋白质和可活化报道物在溶液中形成复合物 - 本文中称为蛋白质-AR 复合物。

[0045] 使以蛋白质为模板的聚合物材料接触蛋白质-AR 报道物复合物，用复合物填充可及的模板蛋白质位点。在这个步骤中，靶蛋白选择性递送 AR 分子或 AR 分子使模板位点在报道分子群聚区内。然后，蛋白质-AR 加载的 MIP 通过合适方法（如用 UV 光照射）活化。结果是，一个或多个报道分子共价连接在模板位点上或其附近。在通过插入反应建立与聚合物平台连接的光敏化残基的情况下，用适当波长的电磁辐射照射模板聚合物，以产生例如，经受高效 C-H 插入模板位点中的氮宾。其它插入 / 键形成反应在合成化学领域技术人员的范围内。非限制性例子包括光照后产生活性中间体的芳基叠氮、UV 光解后产生活性氮宾的氟化芳基叠氮、可用电磁辐射连续激发 / 照射直到它们产生共价加合物的二苯甲酮衍生物、具有巯基的马来酰亚胺、具有胺 / 羧酸酯的碳二亚胺、具有胺的 NHS 酯、具有糖（氧化）的酰脒、具有胺的 PFP 酯、具有胺的羟基甲基脒、具有胸腺嘧啶的补骨脂素（光敏嵌入剂）、具有胺的亚氨酸酯、具有巯基的吡啶基二硫化物、具有羟基的异氰酸酯（非水性）和具有巯基、胺或羟基的乙烯基砜。

[0046] 然后，用溶液（如含水缓冲液）冲洗以蛋白质为模板的材料，以释放任何蛋白和未反应的报道物。洗涤也去除 AR 可与其反应的任何蛋白。留下的聚合物平台是整合有发射位点的蛋白质印记的聚合材料。

[0047] 该方案可应用于任何基于 MIP 的蛋白质检测方法。PIXIES 方法详见本文所述，但本领域技术人员知道，可应用于其它印记材料。

[0048] 在另一实施方式中，本发明提供用于检测蛋白质或多肽分析物的存在的分子印记聚合物，该聚合物包含至少一个接触活性基团的模板位点支座，以使该位点能够选择性结合所述蛋白质或多肽分析物，其中报道分子连接在模板位点上或其附近。在模板位点上或其附近指模板位点在报道物群聚区内，以使当蛋白质结合于模板位点时报道分子的吸光度、激发光谱和发射光谱，激发态发光寿命和 / 或发光极化的改变受到影响。

[0049] 通过将报道分子选择性放置在模板位点上或其附近，与当报道分子仅随机分布在整个聚合物基质中时观察到的相比降低背景噪音。在本发明中，虽然报道分子可随机分布，如果在模板位点上也位点选择性地放置报道分子，将看到信号背景比提高。在一个实施方式中，大多数（> 50%）报道分子存在于模板位点上或其附近。在进一步优选的实施方式中，至少 60%、70%、80%、90%、95%、98% 和 99% 报道分子存在于模板位点上或其附近。

[0050] 在又一实施方式中，本发明提供了检测蛋白质的方法。该方法包括提供以蛋白质为模板的聚合物，根据上述实施方式，它可选择性结合蛋白质。如果不知道以蛋白质为模板的聚合物的吸收 / 发射，那么可测量。然后，将此 PIXIES 接触测试样品或未知样品。再次测量模板聚合物的吸收 / 发射。以蛋白质为模板的聚合物的吸收 / 发射的改变与样品中蛋白质的水平相符合。用合适的校正曲线确定样品中的蛋白质浓度。

[0051] 本发明的 PIXIES 可重复使用。分析物（例如来自测试样品的分析物）的结合是可逆的，可通过溶剂（水性溶剂或有机溶剂或混合物）洗涤去除分析物。然后，PIXIES 可再次用于检测分析物。

[0052] 在本发明的一个实施方式中,可为各个靶蛋白设计和开发多个可调传感器。此方案避免了与一种分析物/一个传感器方案相关的基本问题。这里,可同时筛选 PIXIES 文库(比较表 1),以优化 PIXIES 分析性能和鉴定 PIXIES 组,其中对于给定分析物而言组内的反应特征多样性最大。

[0053] 在又一实施方式中,可在 LED、其它合适光源或基材的表面上形成多个基于 PIXIES 的传感器元件,以形成传感器阵列。美国专利号 6,492,182、6,582,966 和 6,589,438(纳入本文作为参考)中描述了在 LED 表面上形成传感器和检测分析物。各传感器元件可用作具体靶蛋白的单独的基于 PIXIES 的传感器。

[0054] 此外,可构建多样化、多形式传感器元件阵列,其中为各个靶蛋白开发多种传感器。在操作中,LED 用作光源,以同时激发 LED 表面上传感器元件内的报道分子,可用阵列检测器(如 CTD 或 CMOS)检测所有传感器元件的靶分析物依赖性发射。合适的校正步骤后,各 PIXIES 元件的发射与样品中具体分析物的分析物浓度相关。

[0055] 为了检测单个 PIXIES 传感器元件的吸光度/发射,可采用 PMT、光电二极管或其它合适的光子检测器。对于多个 PIXIES 传感器元件可采用成像装置如电荷耦合器件(CCD)或基于 CMOS 的图像检测器。用阵列检测器可同时评价多个基于 PIXIES 的传感器元件。

[0056] 在另一实施方式中,针印法或其它阵列制作方案可用于开发用于同时检测多种分析物的传感器阵列。这允许将多个光子传感器元件印记在光源或合适基材的表面上。

[0057] 以下叙述提供本发明的特定实施方式。本领域技术人员将认识到,可对这些实施方式作常规修改,这些修改应该在本发明范围内。

[0058] 实施例 1

[0059] 本实施例(图 1)描述了普通 PIPIES 的制备。反应 1 说明从报道分子(RM)与接头基团(LG)、任选的链基团与接头基团(LG'、LG'')和可活化基团(AG)与接头基团(LG''')形成可活化报道(AR)分子的过程。反应 2 说明形成蛋白质模板(PT,靶分析物)-AR 复合物(PT-(AR)_n)的过程。AR-PT 化学计量是 n-1,其中 n 可以是整数。在一个实施方式中,n 在 1 和 10 之间。反应 3 说明从前体(PR)、任选的添加剂(ADD)和蛋白质模板(PT)形成蛋白质印记聚合物(PIP)的过程。反应 4 说明用蛋白质模板(PT,靶分析物)-AR 复合物(PT-(AR)_n)将 PIP 转变为 PIPIES 的过程。

[0060] 实施例 2

[0061] 本实施例描述了对卵清蛋白特异的 PIXIES 的制备。AR 的制备如图 2 所示。制备具有通过链连接的可活化芳基叠氮基团的报道分子(RM)。在暗处,连接于氟化芳基叠氮的胺-反应性琥珀酰亚胺基酯与含胺发光团(BODIPY 505/515)反应形成发光团标记的芳基叠氮(化合物 1)。化合物 1 是 AR,它用于将一个或多个报道分子安置在干凝胶中的蛋白质模板位点内,如下所述。

[0062] 通过将 1 当量靶蛋白(卵清蛋白)与 250-1000 当量醇盐混合形成以蛋白质为模板的干凝胶(图 3)。使溶胶在密封小瓶中水解后,将薄膜(500-800nm,经表面光度测定法测定)旋转浇铸在熔融硅基材上,形成干凝胶(48 小时,暗处,室温)。用水性缓冲液洗剂(磷酸盐缓冲盐水,pH 7.0,0.01M,15mM NaCl)从模板干凝胶中去除卵清蛋白。

[0063] 为了将发光报道分子安置在干凝胶内的卵清蛋白模板位点,在磷酸盐缓冲盐水(pH 7.0,0.01M,15mM NaCl)中制备卵清蛋白(微摩尔蛋白质)和化合物 1 的 1:1 混合

物。在这些条件下,稳态的荧光各向异性测定显示 > 98% 的化合物 1 是与卵清蛋白结合的。卵清蛋白和 1 之间的相互作用不是独特的;有大量文献关于有机或无机“配体”与蛋白质的结合。因此,靶蛋白(卵清蛋白)主要用于将报道分子(图 1 和 2 中的 RM)选择性递送到模板位点中。然后,我们将以卵清蛋白为模板的干凝胶膜浸没在卵清蛋白-1 溶液中,填满所有可及的卵清蛋白模板位点。15 分钟后,从卵清蛋白-1 溶液中取出膜。用 1000W 氙弧灯的滤光输出($\lambda < 360\text{nm}$)照射膜。虽然不受限于任何具体理论,但考虑到光照射产生经受高效 C-H 插入干凝胶超结构中的芳基叠氮。照射 10 分钟后,用水性缓冲液(磷酸盐缓冲盐水, pH 7.0, 0.01M, 15mMNaCl)冲洗以卵清蛋白为模板的干凝胶膜,从模板干凝胶中释放任何卵清蛋白和未反应的 1。洗涤步骤也去除 1 可与其反应的任何卵清蛋白。

[0064] 实施例 3

[0065] 本实施例描述了用如实施例 2 所述制备的 PIXIES 检测卵清蛋白。图 4 概括了一系列 ($n = 10$) 以卵清蛋白为模板的 PIXIES 膜的反应曲线。这些具体的基于 PIXIES 的膜的摩尔组成是 55% 四乙基正硅烷 (TEOS)、2% 氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES)、3% 辛基三甲氧基硅烷 (OTS) 和 40% 双(2-羟基-乙基)氨基丙基三乙氧基硅烷 (HAPTS)。卵清蛋白:醇盐 Si 的摩尔比是 1 : 750, BODIPY 505/515 用作发光报道分子(图 2 中的 RM)。如图 4 所示,当卵清蛋白加入这些以卵清蛋白为模板的 PIXIES 中时,发光增加。

[0066] 实施例 4

[0067] 本实施例描述了 PIXIES 对卵清蛋白的选择性。在以卵清蛋白为模板的 PIXIES 对卵清蛋白的选择性的初始测试中,15 微摩尔卵清蛋白的溶液与 15 倍摩尔过量的苯基-8O₂Cl 反应,以阻断所有卵清蛋白表面上可及的伯胺。然后再测定 PIXIES 对卵清蛋白磺酰胺的反应。在测试的浓度范围(高达 2.5mM)中没有观察到反应(图 4)。

[0068] 在第二个实验中,我们用人血清白蛋白(HSA)作为替代干扰物测试了以卵清蛋白为模板的 PIXIES 的选择性。这些实验的结果也显示(图 4)以卵清蛋白为模板的 PIXIES,对卵清蛋白的选择性超过 HSA(也比较表 1)。

[0069] 在第三个实验中,我们取一系列相同的以卵清蛋白为模板的 PIXIES,在卵清蛋白、卵清蛋白磺酰胺和 HAS 的混合物中孵育它们,我们观察到的反应仅等于样品的卵清蛋白含量。

[0070] 在第四个实验中,我们通过注射卵清蛋白栓,然后注射纯缓冲液用以卵清蛋白为模板的 PIXIES 传感器进行了一系列连续流动实验。这些 $625 \pm 10\text{nm}$ 厚 PIXIES 膜的反应时间(达到 90% 最大信号改变的时间)大约 45 秒,反应 8% 可逆(25 个循环)。

[0071] 实施例 5

[0072] 本实施例描述了对用不同前体和干凝胶组成制备的一系列基于 PIXIES 的传感器膜进行 Scatchard 分析 [20]。这些实验的结果总结在表 1 中。这些实验的结果说明不同干凝胶组成可用于调节 PIXIES 反应和选择性。

[0073] 表 1. 三种基于不同前体组成的以卵清蛋白(O)为模板的 PIXIES 的反应和结合亲和力和。

	PIXIES 组成	K_d (nM) ^a			
		O 反应 ^b	O	O 磺酰胺	HSA
[0074]	A	102	8/35	-	3000
	B	167	2/19	79	352
	C	65	18/125	56/289	650

[0075] (a) 当有两个通路时,这反映了两种恢复的结合亲和力。(b) 对 $50 \mu\text{M}$ O 的反应 (%)。[A] 与图 4 所用组成相同。[B] 15% TEOS、5% OTS 和 75% HAPTS。[C] 8% TEOS 14% APTES、7% OTS 和 71% HAPTS。

[0076] 表 1 所列的平衡结合数据证明可检测一种分析物与另一种分析物的反应中的基本差异,因此可为各个分析物设计可调传感器。进一步描述如下。

[0077] 实施例 6

[0078] 本实施例(图 5)描述了从离散传感器元件(左)至成套冗余传感器(中)至多样化、多形式传感器阵列方案(右)的基于 PIXIES 的传感平台的进展。各阵列的校正曲线见下。不同的圆圈代表基于不同 PR、ADD、AR、T 和 PT 的不同传感器元件(图 1-3)。该方案可用于设计和开发定制的基于 PIXIES 的传感器平台,可用于相对于其它蛋白提高对一种蛋白的选择性或用于同时在单个样品中检测和定量多种蛋白。下面更详细地讨论本发明的这个方面。

[0079] 实施例 7

[0080] 在本实施例中,证明了 PIXIES 方案在阵列形式中用于检测角质形成细胞生长因子(KGF)的实用性。这里,在 KGF 的阵列形式中制备了五个(5)相同的基于 PIXIES 的传感器元件。结果总结在图 6 中。图 6 的左手部分显示了印记在 LED 表面的 100 微米直径基于 PIXIES 的传感器元件的一系列 CCD 图像,用 CCD 作为加入的 KGF 的函数检测。PIXIES 发射随 KGF 浓度增加而增加。也列出了用高浓度 BSA(1 微摩尔)或化学变性的 KGF(即用 2M 尿素处理的 KGF)进行的对照实验。该信号等价于空白实验。图 6 的右手侧列出在天然 KGF 和化学变性的 KGF 存在下以 KGF 为模板的 PIXIES 的校正曲线。选择性很明显,这就是 PIXIES 的检测潜力。

[0081] 实施例 8

[0082] 在本实施例中,是为卵清蛋白、HAS 和 BSA 设计的一系列五个(5)重复的基于 PIXIES 的传感器元件的反应,其中各 PIXIES 基于不同干凝胶配方。结果见图 7。具体说,配方 F1 是 15% TEOS、5% OTS 和 75% HAPTS;配方 F2 是 8% TEOS、14% APTES、7% OTS 和 71% HAPTS;配方 F3 是 8% TEOS、14% APTES、7% OTS 和 71% 掺入 3 重量% PEG(2000)的 HAPTS;配方 F4 是 28% TEOS、4% APTES、7% OTS 和 61% HAPTS;配方 F5 是 8% TEOS、14% APTES、7% OTS 和 71% 含有 1.5 摩尔%甘油的 HAPTS。一起采用这种多个传感器,给定蛋白的总的检测精确性、准确性和动态范围可提高数倍。用多个可调传感器和冗余检测方案也更容易地检测到假阳性和阴性。

[0083] 实施例 9

[0084] 在本实施例中,证明了本方法在检测不同蛋白中的实用性。制备一系列以蛋白质为模板的干凝胶,如实施例 1 和 2 所述检测蛋白质。

[0085] 结果总结在表 2 中。

[0086] 表 2. 以 KGF-、白介素 -1 α (IL-1 α)、白介素 -1 β (IL-1 β)、转化生长因子 - α (TGF- α) 和转化生长因子 - β (TGF- β) 为模板的 PIXIES 的检出限和选择性因数。

	模板	检出限(pM)	选择性因数 ^a
	IL-1 α	12	47 ^b
[0087]	IL-1 β	13	36 ^c
	KGF	6	210 ^d
	TGF- α	9	150 ^e
	TGF- β	8	123 ^f

[0088] (a) 在 5x 检出限下靶蛋白信号除以相同浓度的干扰蛋白的信号。

[0089] (b) IL-1 β 是干扰蛋白。

[0090] (c) IL-1 α 是干扰蛋白。

[0091] (d) 化学变性的 KGF (2M 尿素) 是干扰蛋白。

[0092] (e) TGF- α 是干扰蛋白。

[0093] (f) TGF- β 是干扰蛋白。

[0094] 这些结果表明, PIXIES 方案能够产生离散的传感器元件,它具有低至皮摩尔级 (pM) 的检出限并且当待检测蛋白高度同源时对一种蛋白的选择性超过另一种蛋白。例如,表 2 的结果列出了为白介素 -1 α (IL-1 α) 和白介素 -1 β (IL-1 β) 以及转化生长因子 - α (TGF- α) 和转化生长因子 - β (TGF- β) 设计的 PIXIES 的结果。各传感器的选择性因数至少为 36 倍。

[0095] 实施例 10

[0096] 在本实施例中,说明了用于检测蓖麻毒蛋白的基于 PIXIES 的多样化传感器阵列的开发。来自落射荧光显微镜的未经处理的假彩色 CCD 图像显示了设计用于完整蓖麻毒蛋白的基于 PIXIES 的传感器元件的 5 \times 5 阵列 (图 8)。各列由五个 (5) 重复的基于给定干凝胶配方化学 (Fx) 的传感器元件组成。在这种情况下 AR 见图 2, RM = 丹磺酰基;链是 -(CH₂)₃-。配方 Fa 是 15% TMOS、75% OTS 和 5% HAPTS;配方 Fb 是 18% TEOS、3% APTES、8% OTS 和 71% HAPTS;配方 Fc 是 8% TMOS、14% APTES、7% OTS 和 71% 掺入 12 重量% PEG (2000) 的 HAPTS;配方 Fd 是 25% TMOS、7% APTES、18% OTS 和 50% HAPTS;配方 Fe 是 20% TEOS、10% APTES、45% OTS 和 25% 含有 3 摩尔% 丙二醇的 HAPTS。一起采用这种多个传感器,蓖麻毒蛋白的总的检测精确性、准确性和动态范围提高了一个数量级以上,动态范围显著延伸。

[0097] 实施例 11

[0098] 在本实施例中,将标准酶联免疫吸附测定 (ELISA) 对完整蓖麻毒蛋白的选择性与各自由 10、100、512 和 1024 传感器元件组成的四个 (4) 基于 PIXIES 的多样化传感器阵列的选择性作比较 (图 9)。各传感器元件衍生自不同干凝胶配方 (参见图 3 和实施例 3-10)。选择性因数代表来自 ELISA 或所示传感器阵列与 10pg/mL 完整蓖麻毒蛋白 (A 和 B 链) 的总反应比除以用 10pg/mL 所示蛋白 (仅蓖麻毒蛋白 A、仅蓖麻毒蛋白 B、HSA 和 BSA) 刺激时观察到的 ELISA 或相同阵列的总反应。显而易见的是,与 ELISA 相比,具有许多传感器元件的基于 PIXIES 的平台中观察到选择性大大增加 (超过两个数量级)。

[0099] 实施例 12

[0100] 在本实施例中,证明了 PIXIES 方案在多形式同时检测不同蛋白质中的实用性。这

里,各基于 PIXIES 的传感器元件设计用于不同蛋白靶的基于 PIXIES 的传感器元件的 5×5 阵列(图 10)用三种不同的蛋白质混合物刺激。在图 10A 中,显示了来自含有 HSA、BSA、卵清蛋白、KGF、IL-1 和 TGF 的混合物的反应。在图 10B 中,显示了来自 KGF、钙调蛋白、猪血清白蛋白、RANTES 和 EGF 的混合物的反应。在图 10C 中,显示了来自 HSA、RANTES、EGF、IL-1 和 TGF 的混合物的反应。这些结果证明在样品中可同时检测多种蛋白。

[0101] 虽然本说明书中列出了具体实施方式,但本领域技术人员将认识到,本领域技术人员可作出常规修改,而不背离本发明范围。

[0102] 参考文献:

[0103] 1. 《市售生物传感器,在临床、生物工艺和环境样品中的应用》(Commercial Biosensors. Applications to Clinical, Bioprocess, and Environmental Samples); Ramsay, G. 编; John Wiley & Sons; New York, NY, 1998。

[0104] 2. Haris, T. D., Anal. Chem. 2000, 72, 669A。

[0105] 3. Gopel, W., Sens. Actuators B 2000, B65, 70-72。

[0106] 4. Alberr, K. J.; Lewis, N. S.; Schauer, CL.; Sotzing, G. A.; Stitzel, S. E.; Vaid, T. P.; Walt, D. R., Chem. Rev. 2000, 100, 2595-626。

[0107] 5. Britton, C. L.; Jones, R. L.; Oden, P. I.; Hu, Z.; Warmack, R. J.; Smith, S. F.; Bryan, W. L.; Rochelle, J. M., Ultramicroscopy 2000, 82, 17-21。

[0108] 6. Bailey, R. A.; Persaud, K. C. 刊于《聚合物传感器和致动器》(Polymer Sensors and Actuators); Osada, Y.; DeRossi, D. F. 编; Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2000; 第 149-81 页。

[0109] 7. Stefan, R.-I.; Van Staden, J. F.; Aboul-Enein, H. Y., Crit. Rev. Anal. Chem. 1999, 29, 133-53。

[0110] 8. Walt, D. R., Cur. Opin. Chem. Biol. 2002, 6, 689-95。

[0111] 9. (a) Barko, G.; Abonyi, J.; Ulavay, J., Anal. Chim. Acta 1999, 398, 219-26. (b) Wachter, E. A.; Thundat, T., Rev. Sci. Instrum. 1995, 66, 3662-7。

[0112] 10. (a) Grate, J. W., Chem. Rev. 2000, 100, 2627-47. (b) Park, J.; Groves, W. A.; Zellers, E. T., Anal. Chem. 1999, 71, 3877-86. (c) Ricco, A. J.; Crooks, R. M.; Osbourn, G. C., Acc. Chem. Res. 1998, 31, 289-96。

[0113] 11. 《酶学方法》(Methods in Enzymology), Mosbach, K 编, 第 135 和 136 卷, Academic Press; Orlando, FL, 1987。

[0114] 12. 《蛋白质固定化:基础和应用》(Protein Immobilization: Fundamentals and Applications), Taylor, R. F., Marcel Dekker, Inc.; New York, NY, 1991; 第 8 章。

[0115] 13. Weetall, H. H. 《固定化的酶、抗原、抗体和肽:制备和表征》(Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and peptides: preparation and Characterization), Marcel Dekker, Inc.; New York, NY, 1975; 第 6 章和第 8 章。

[0116] 14. (a) Piletsky, S. A.; Alcock, S.; Turner, A. P. F., TrBC 2001, 19, 9-12. (b) Katz, A.; Davis, M. E., Nature 2000, 403, 286-9. (c) Dickert, F. L.; Hayden, O., “化学传感中的分子印记”(Molecular imprinting in chemical sensing), TrAC 1999, 18, 192-9. (d) Kriz, D.; Ramstrom, O.; Mosbach, K., Anal. Chem. 1997, 69, 345A-9A. (e) Ensing, K.;

De Boer, T., TrAC 1999,18,138-45. (f)Wulff, G., ” Ang. Chem., Int. Ed. Engl. 1995,34, 1812-32. (g)Mayes, A. G. ;Mosbach, K., TrAC 1997,16,321-32. (h)Mosbach, K., TrBS1994, 19,9-14. (i)Mallik, S. ;Plunkett, S. D. ;Dhal, P. K. ;Johnson, R. D. ;Pack, D. ;Shuck, D. ; Arnold, F. H., New. J. Chem. 1994,18,299-304。

[0117] 15. (a)Burow, M. ;Minoura, N., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1996,227,419-22. (b)Sellergren, B., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2000,39,1031-7. (c)Mosbach, K., Anal. Chim. Acta 2001,435,3-8. (d)Piletsky, S. A. ;Piletska, E. V. ;Bossi, A. ;Karim, K. ; Lowe, Tumer, A. P. F., Biosen. &Bioelec. 2001,16,701-7. (e)Bossi, A. ;Piletsky, S. A. ; Piletska, E. V. ;Righetti, P. G. ;Tumer, A. P. F., Anal. Chem. 2001,73,5281-6。

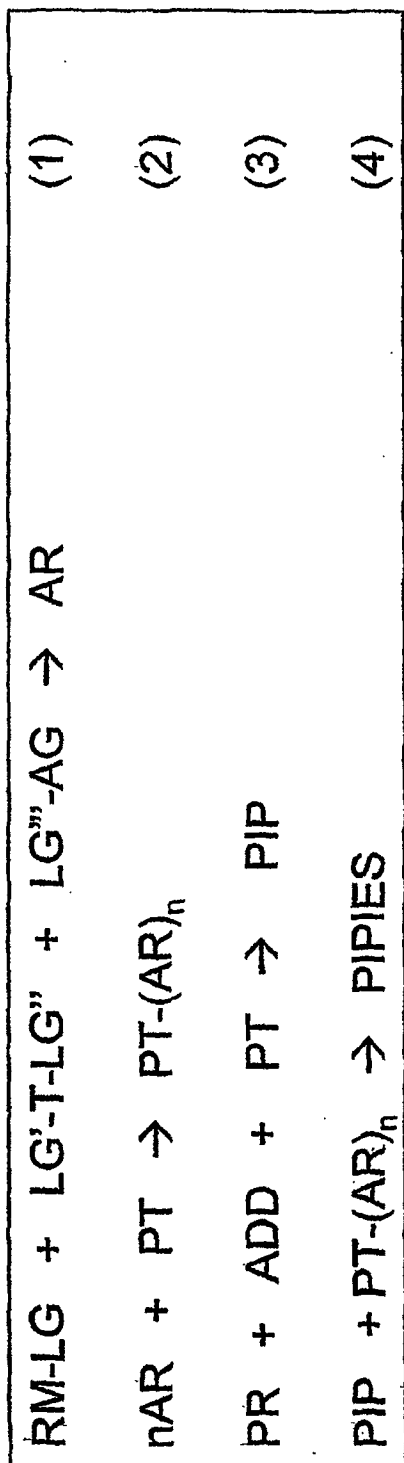
[0118] 16. Leung, M. K. -P ;Chow, C. -F. ;Lam, M. H. -W., J. Mater. Chem. 2001,11,2985-91。

[0119] 17. (a)Turkewitsch, P. ;Wandelt, B. ;Darling, G. D. ;Powell, W. S., Anal. Chem. 1998,70,2025-30. (b)Jenkins, AL., Uy, O. M. ;Murray, G. M., Anal. Chem. 1999,71, 373-8. (c)Matsui, J. ;Higashi, M. ;Takeuchi, T., J. Am. Chem. Soc. 2000,122,5218-9. (d) Liao, Y. ;Wang, W. ;Wang, B., Bioorg. Chem. 1999,27,463-76. (e)Graham, A. L. ;Carison, CA. ;Edmiston, P. L., Anal. Chem. 2002,74,458-67。

[0120] 18. 《高级材料的化学加工》(Chemical Processing of Advanced Materials) ; Hench, L. L. ;West J. K. 编 ;Wiley ;New York, NY,1992。

[0121] 19. Jin, W. ;Brennan, J. D., Anal Chim. Acta 2002,461,1-36。

[0122] 20. Lulka, M. F. ;Iqbal, S. S. ;Chambers, J. P. ;Valdes, E. R. ;Thompson, R. G. ; Goode, M. T. ;Valdes, J. J., Mater. Sci. Engr. 2000, C11,101-5。



RM - 报道分子
LG, LG', LG'', LG''' - 接头基团
T - 链基团
AG - 可活化基团
AR - 可活化报道物
PT - 蛋白质模板
PT-(AR)_n - 蛋白质模板/可活化报道物复合物
PR - 前体(有机/无机/杂合)
ADD - 添加剂
PIP - 蛋白质印记聚合物
PIPIES - 整合有发射位点的蛋白质印记聚合物

图 1

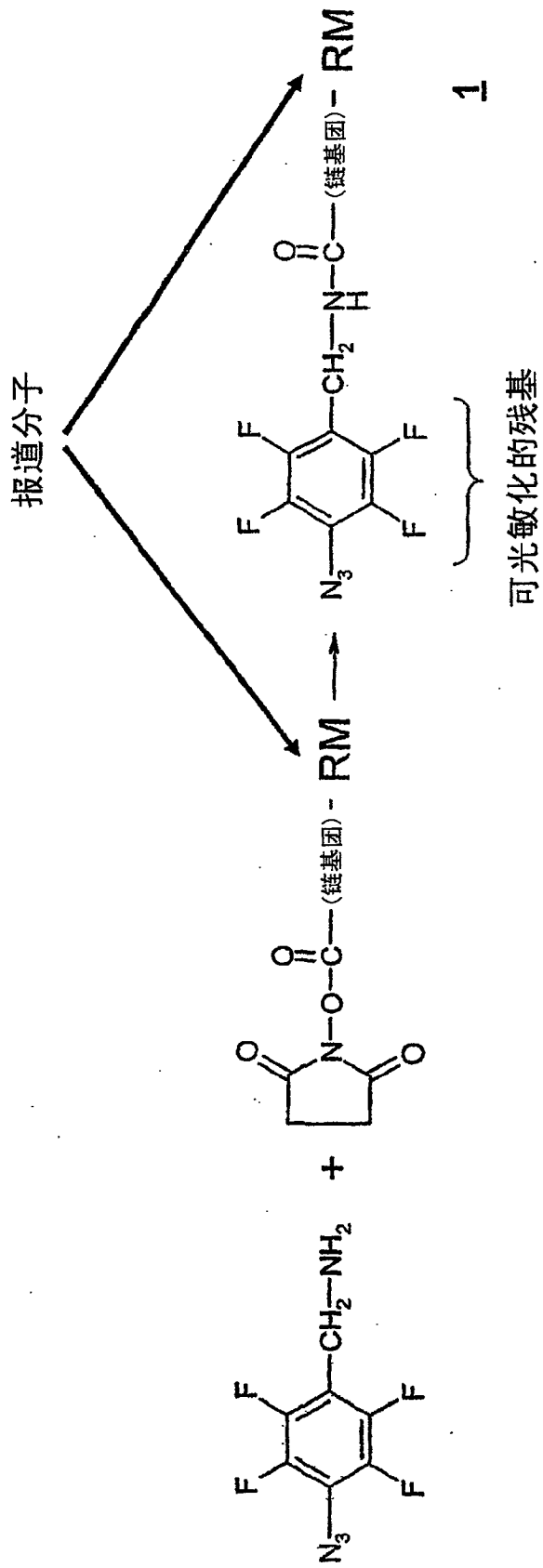


图 2

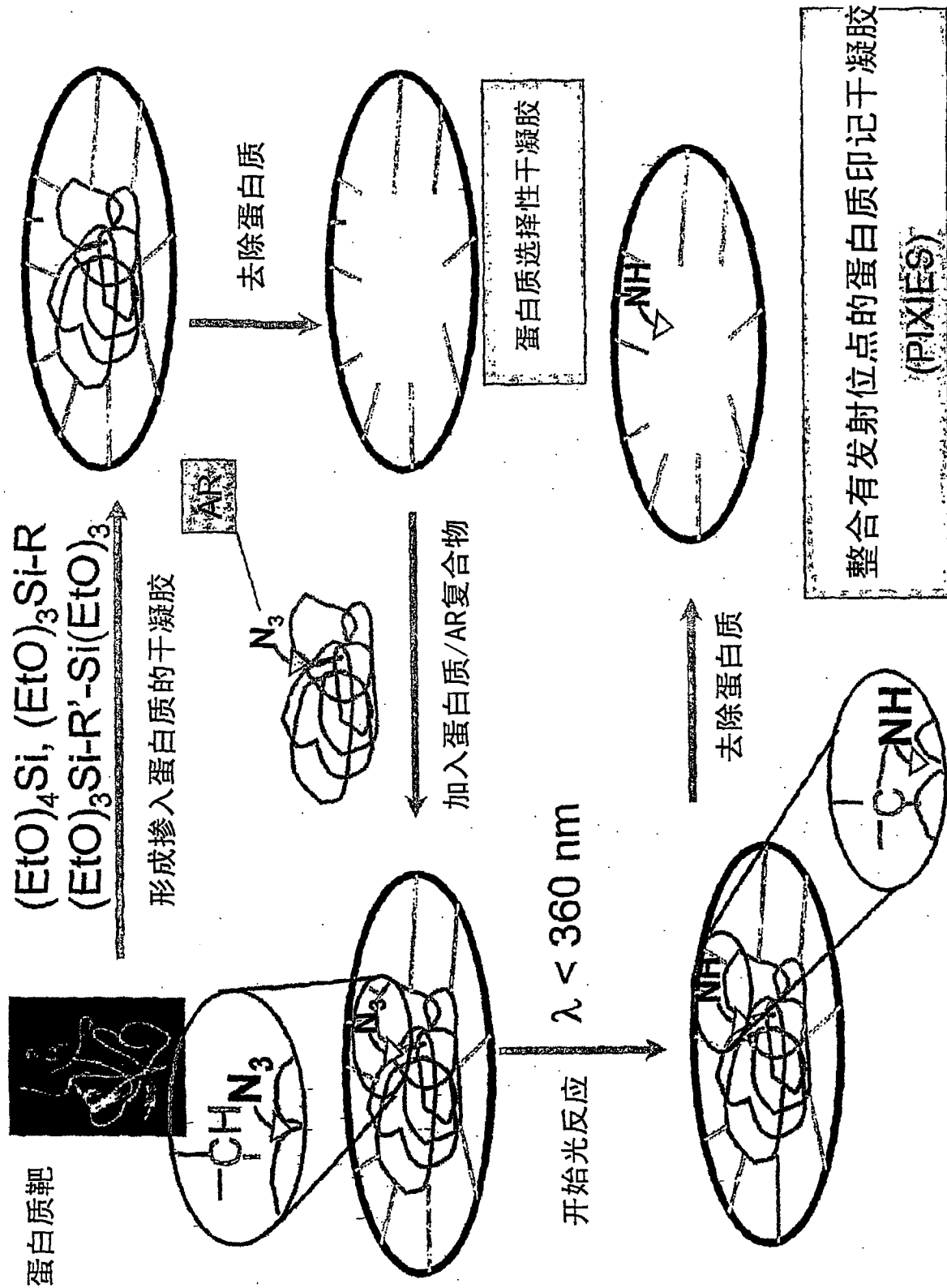


图 3

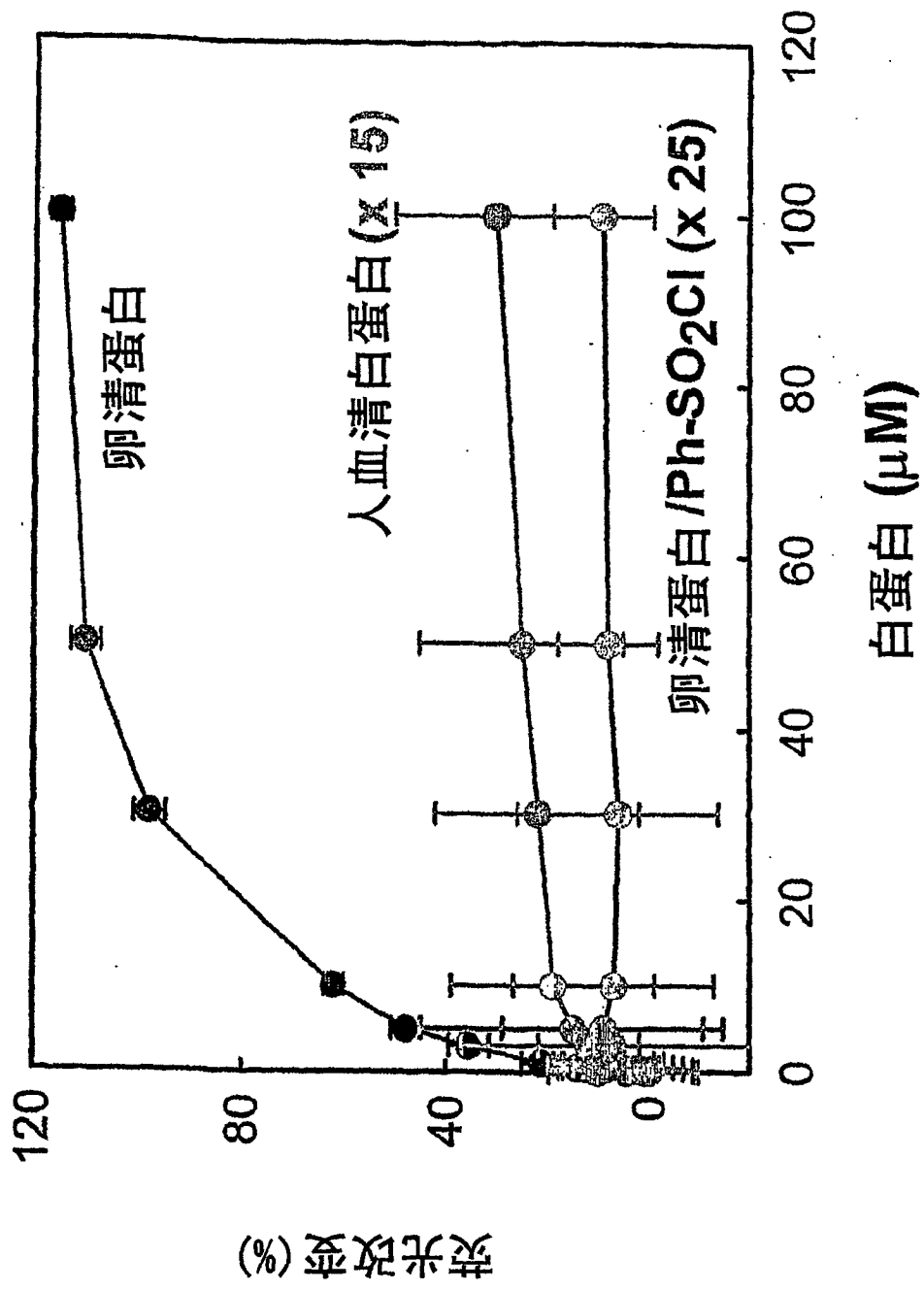


图 4

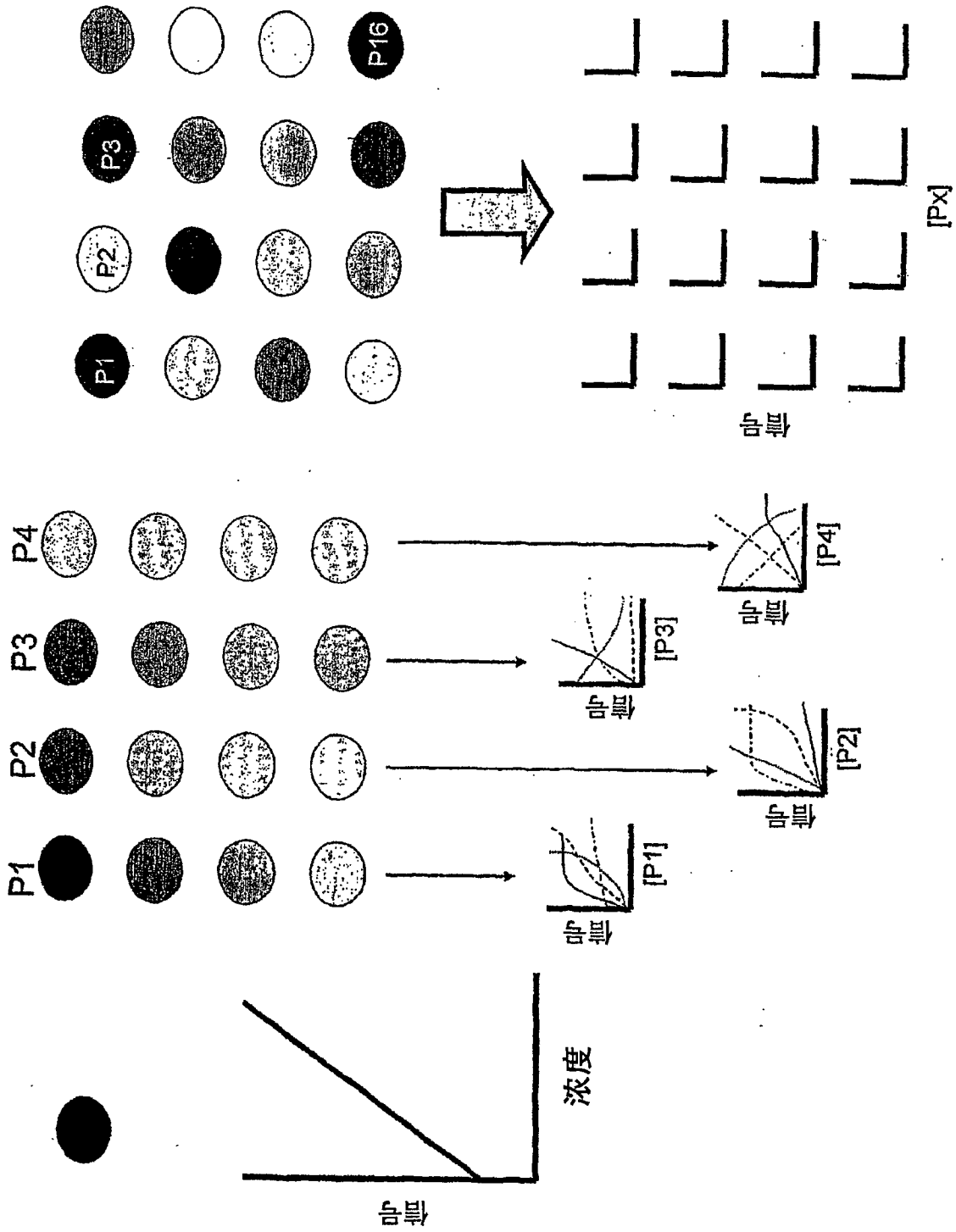


图 5

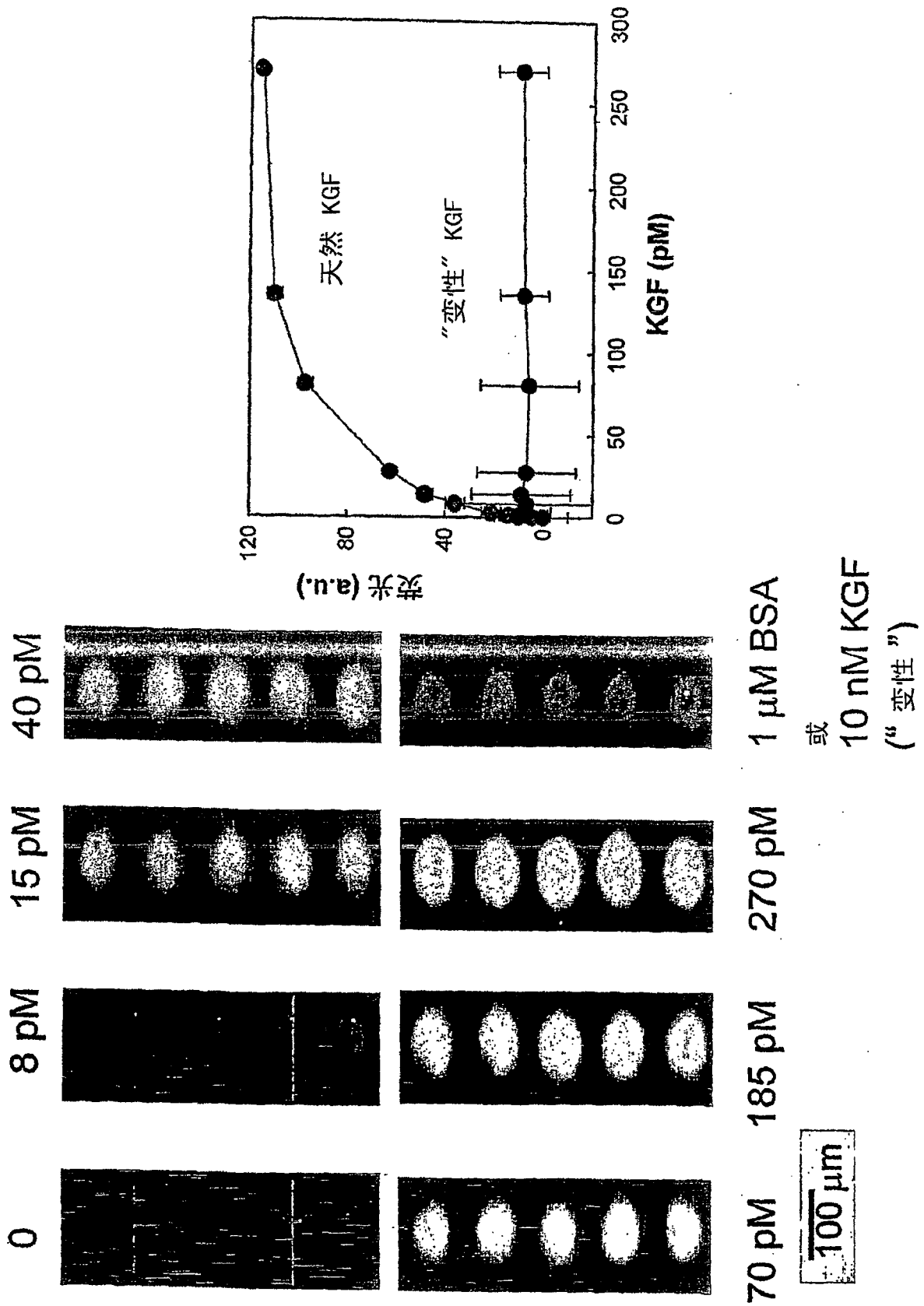


图 6

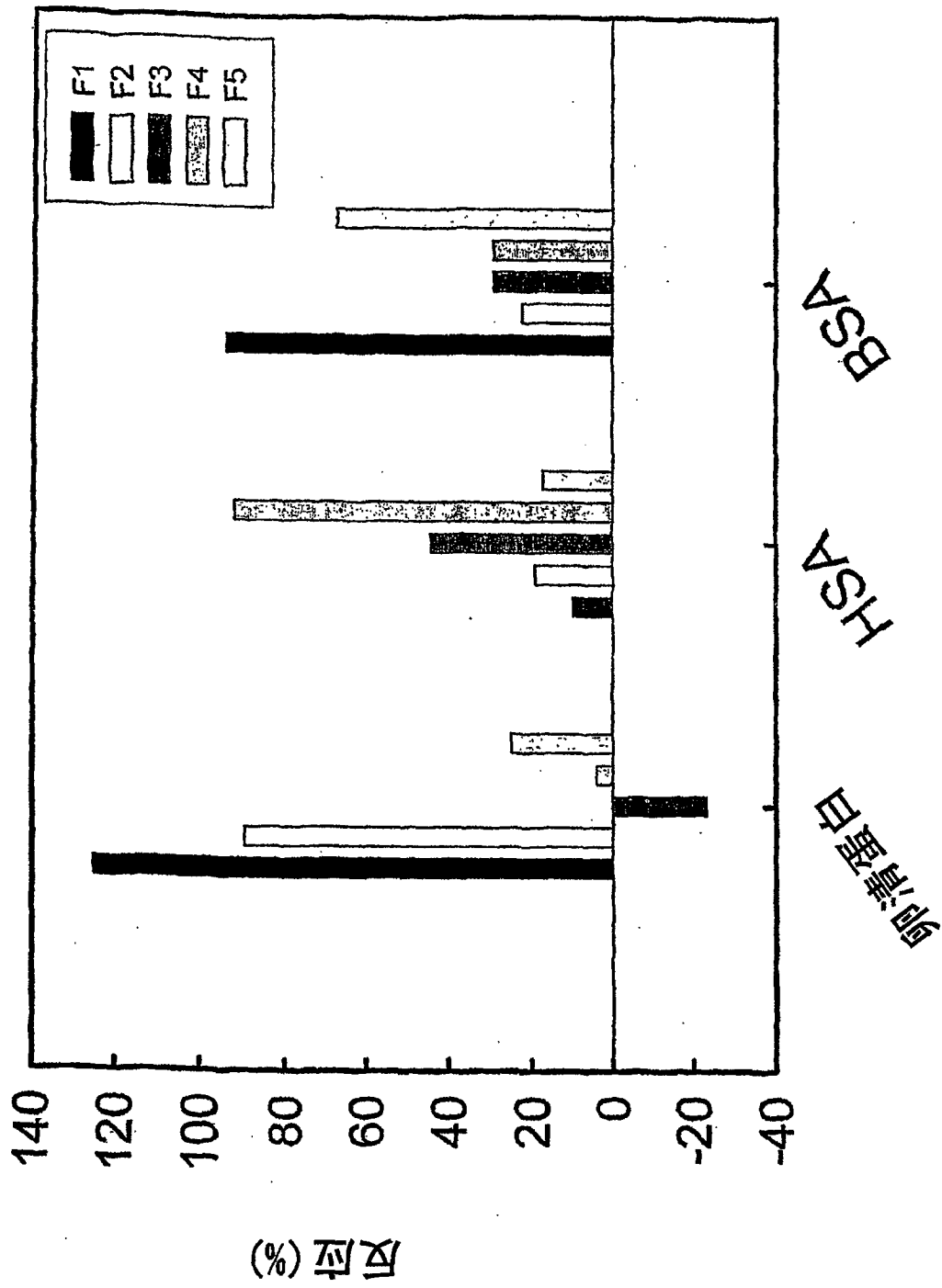


图 7

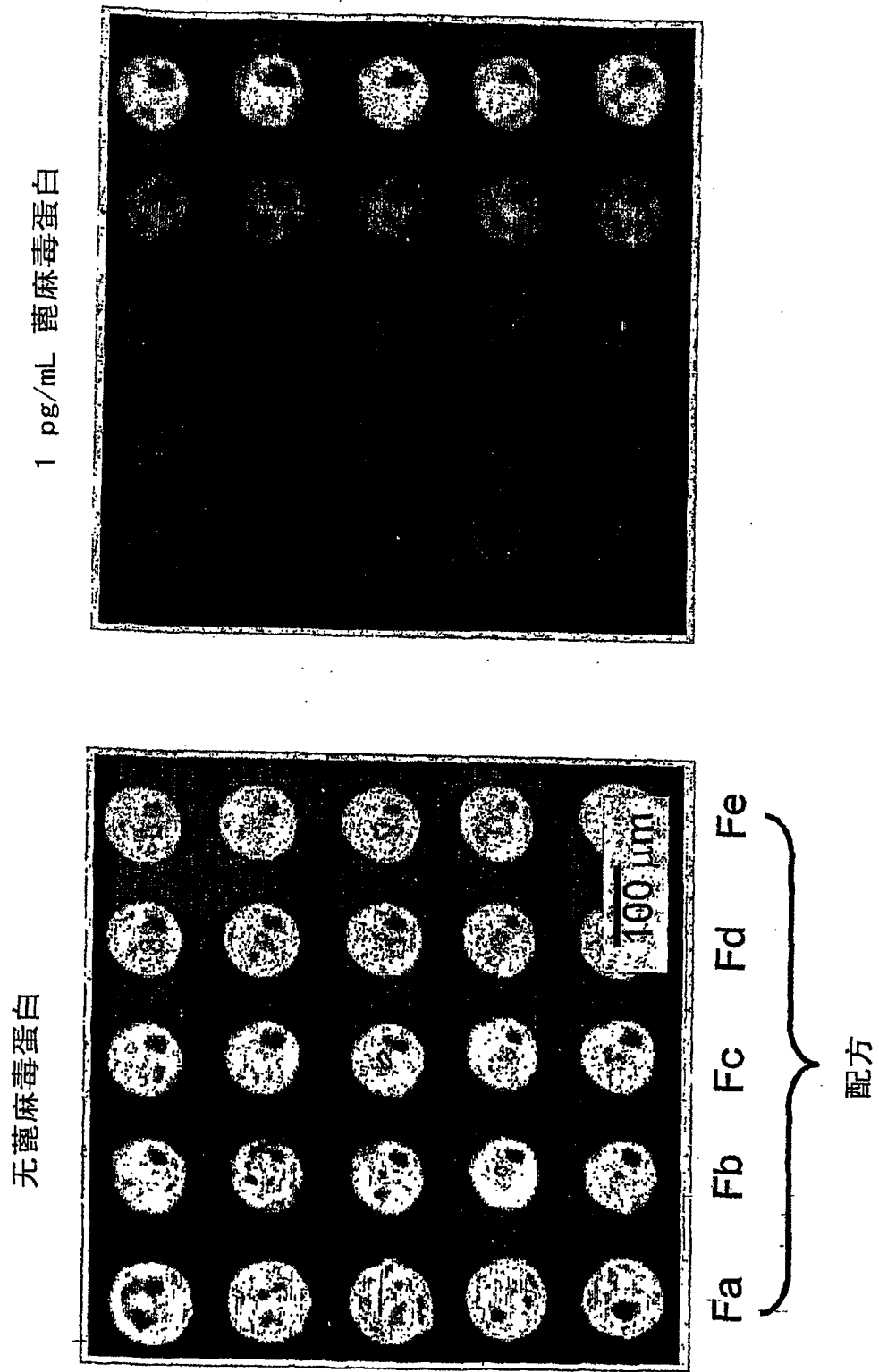


图 8

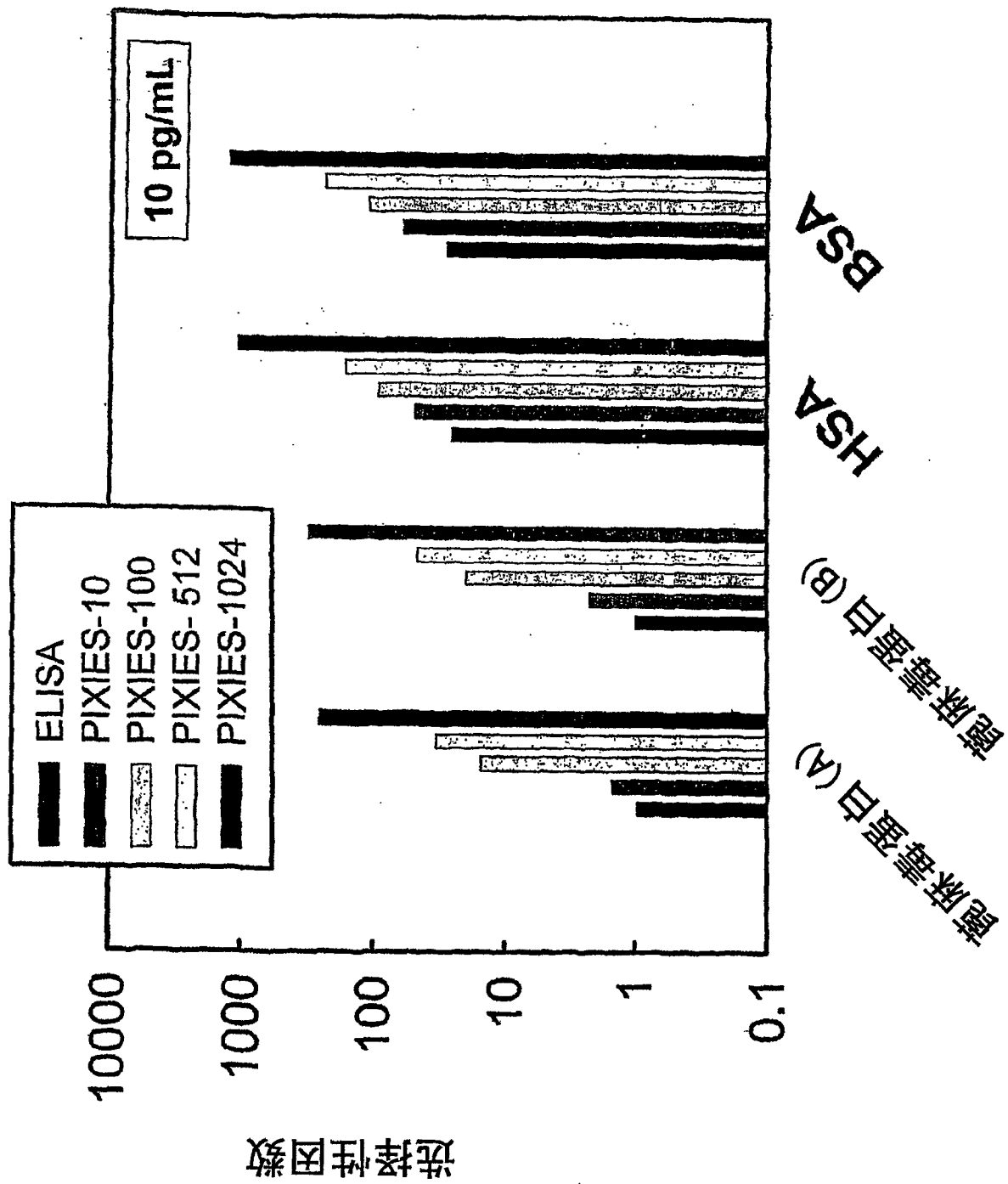


图 9

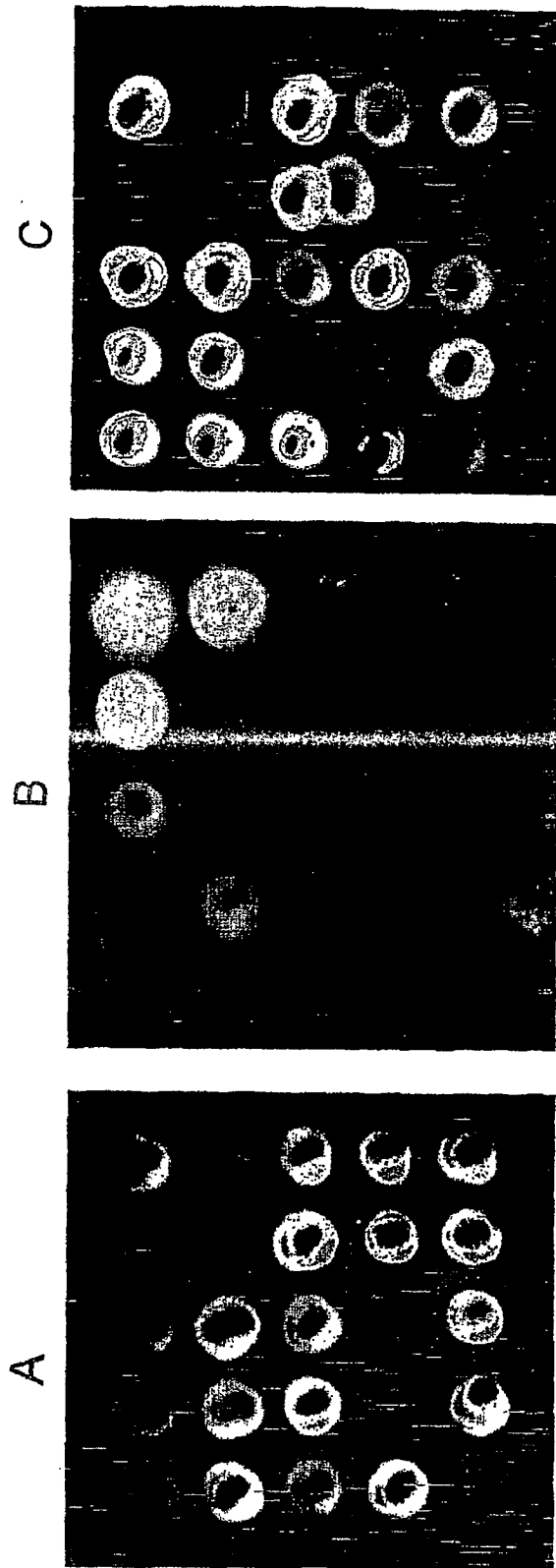


图 10

专利名称(译)	分子印迹聚合物、其制备方法和检测分析物存在的方法		
公开(公告)号	CN1910444B	公开(公告)日	2010-04-14
申请号	CN200580001999.0	申请日	2005-01-07
申请(专利权)人(译)	纽约州立大学研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	纽约州立大学研究基金会		
[标]发明人	FV布莱特		
发明人	F·V·布莱特		
IPC分类号	G01N21/64 C08F283/00 C08F289/00 C08F291/00 C08L51/00 C08L51/02 C09B69/10 G01N33/00 G01N33/53 G01N33/542		
CPC分类号	B82Y10/00 G01N2600/00 G01N21/6428 B01J20/268 C08L51/02 B82Y5/00 C09B69/103 C08F283/00 C08L51/003 C08F291/00 G01N33/542 C09B69/109 B82Y20/00 C08F289/00 Y10T436/143333		
代理人(译)	范征		
审查员(译)	高望		
优先权	60/534735 2004-01-07 US		
其他公开文献	CN1910444A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了整合有发射位点的蛋白质或多肽印记聚合物(PIPIES),用于检测包含对分析物特异的模板位点的蛋白质或多肽分析物的存在。在模板位点上或其附近是选择性地放有报道分子。也公开了PIPIES的制备方法及其在检测分析物中的应用。

PIXIES 组成	K_d (nM) ^a			
	O 反应 ^b	O	O 磷酸胺	HSA
A	102	8/35	-	3000
B	167	2/19	79	352
C	65	18/125	56/289	650