



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110892250 A

(43)申请公布日 2020.03.17

(21)申请号 201880022558.6

(22)申请日 2018.01.30

(30)优先权数据

62/451,932 2017.01.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/015981 2018.01.30

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/140953 EN 2018.08.02

(71)申请人 爱贝斯股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 V·蒋 S·A·安塞尔

R·K·梅赫拉 K·P·阿伦

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

G01N 21/62(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

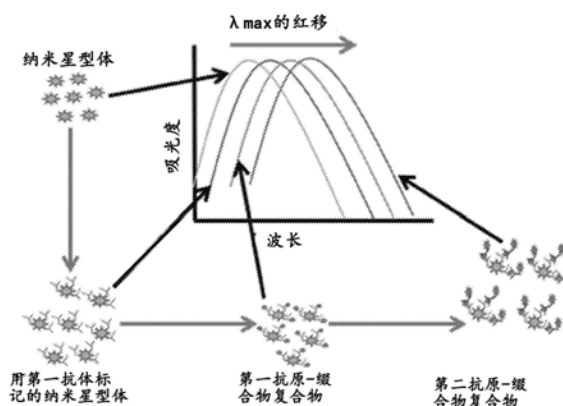
权利要求书4页 说明书25页 附图32页

(54)发明名称

基于溶液的等离子体振子特异性结合配偶体测定和金属纳米结构

(57)摘要

本发明涉及纳米结构-结合配偶体缀合物,以及反应混合物、分析物检测装置以及制备和使用所述缀合物的方法。特别地,本发明提供了检测样品中的靶标分析物的方法,其包括将所述样品与第一检测缀合物和第二检测缀合物在溶液中混合,其中所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物包含偶联到结合配偶体的金属纳米结构,所述靶标分析物如果存在于所述样品中,则所述结合配偶体能够特异性地结合所述靶标分析物以形成所述第一检测缀合物、所述分析物和所述第二检测缀合物之间的复合物,其中复合物形成时光信号的变化指示所述样品中所述靶标分析物的存在。



1. 一种检测样品中的靶标分析物的方法,其包括:

(a) 将所述样品与第一检测缀合物和第二检测缀合物在溶液中混合,其中所述第一检测缀合物和第二检测缀合物包括与结合配偶体偶联的纳米结构,所述靶标分析物如果存在于所述样品中,则所述结合配偶体能够特异性地结合所述靶标分析物以形成所述第一检测缀合物、所述分析物和所述第二检测缀合物之间的复合物,其中所述纳米结构包括多个突起,并且其中所述纳米结构的平均尖端到尖端直径为至少约50nm;

(b) 将所述复合物暴露在紫外-可见-红外光谱的波长范围内的光源下;以及

(c) 测量来自所述复合物的光信号,其中所述光信号的变化指示所述样品中所述靶标分析物的存在。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述纳米结构的平均直径为约70nm。

3. 根据权利要求1的方法,其中所述纳米结构的平均直径为约90nm。

4. 根据权利要求1的方法,其中在3-((3-胆酰胺丙基)二甲氨基)-1-丙磺酸盐(CHAPS)的存在下进行步骤(a)的混合。

5. 根据权利要求4的方法,其中所述CHAPS以约0.1%w/v至约0.5%w/v的浓度存在。

6. 根据权利要求4的方法,其中所述CHAPS以约0.2%w/v的浓度存在于所述溶液中。

7. 根据权利要求1的方法,其中步骤(a)的混合在选自聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、纤维素或其组合的聚合物材料的存在下进行。

8. 根据权利要求7的方法,其中所述聚合物材料选自甲基纤维素、葡聚糖、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇和聚天冬氨酸。

9. 根据权利要求7的方法,其中所述聚合物材料是PEG,并且其中所述PEG以约0.1%至约5%w/v的浓度存在。

10. 根据权利要求1的方法,其中所述溶液还包含粘度增强剂。

11. 根据权利要求10的方法,其中所述粘度增强剂选自海藻糖、麦芽糖糊精、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)、环糊精、甲基纤维素、葡聚糖和聚蔗糖。

12. 根据权利要求1的方法,其中所述溶液还包含选自MgCl<sub>2</sub>和NaSCN的盐。

13. 根据权利要求12的方法,其中所述MgCl<sub>2</sub>或NaSCN以约10mM至约250mM的浓度存在于所述溶液中。

14. 根据权利要求12的方法,其中所述MgCl<sub>2</sub>或NaSCN以约100mM的浓度存在于所述溶液中。

15. 根据权利要求1的方法,其中所述溶液还包含乙二胺四乙酸(EDTA)或乙二醇-双(β-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)。

16. 根据权利要求15的方法,其中,所述EDTA或EGTA以约5mM至约100mM的浓度存在于所述溶液中。

17. 根据权利要求1的方法,其中所述溶液还包含Biolipidure®试剂。

18. 根据权利要求17的方法,其中所述Biolipidure®试剂选自Biolipidure®试剂205、206、1002、1201和1202。

19. 根据权利要求1的方法,其中所述光信号是反射率、吸收光谱、散射光谱或发射光

谱。

20. 根据权利要求1的方法,其中所述光信号的变化包括光谱峰波长移位和/或总光谱轮廓移位。

21. 根据权利要求20的方法,其中所述总光谱轮廓移位是差异光谱。

22. 根据权利要求1的方法,其中检测到纳克量的所述靶标分析物的存在。

23. 根据权利要求1的方法,其中检测到皮克量的所述靶标分析物的存在。

24. 根据权利要求1的方法,其中检测到飞克量的所述靶标分析物的存在。

25. 根据权利要求1的方法,其中在分光光度计比色皿、分析转子、微孔板、临床分析仪、流动室中,在光纤尖端上,或者在透明凝胶中进行步骤(a)。

26. 根据权利要求1的方法,其中所述金属纳米结构是金金属纳米结构。

27. 根据权利要求1的方法,其中所述结合配偶体是生物大分子。

28. 根据权利要求27的方法,其中所述生物大分子选自抗体或其片段、抗原、受体、配体、多核苷酸、适体、多肽、多糖、脂多糖、糖肽、脂蛋白或核蛋白。

29. 根据权利要求27的方法,其中所述生物大分子是抗体。

30. 根据权利要求27的方法,其中所述生物大分子是抗原。

31. 根据权利要求1的方法,其中所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物包含结合配偶体,所述结合配偶体是抗体。

32. 根据权利要求31的方法,其中所述抗体结合所述靶标分析物上的不同表位。

33. 根据权利要求1的方法,其中所述靶标分析物选自蛋白质、酶、抗原、抗体、肽、核酸、激素、糖蛋白、多糖、毒素、病毒、病毒粒子、药物分子、半抗原和化学品。

34. 根据权利要求1的方法,其中所述靶标分析物是病原性抗原或者是病原性抗原的抗体。

35. 根据权利要求34的方法,其中所述病原性抗原是病毒抗原。

36. 根据权利要求35的方法,其中所述病毒抗原来自选自以下的病毒:猫白血病病毒、犬细小病毒、口蹄疫病毒、流感病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、HIV病毒、人乳头瘤病毒、EB病毒和狂犬病病毒。

37. 根据权利要求34的方法,其中所述病原性抗原是细菌抗原。

38. 根据权利要求37的方法,其中所述细菌抗原选自埃立克体属(*Ehrlichia*)、疏螺旋体属(*Borrelia*)、无形体属(*Anaplasma*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和立克次体属(*Rickettsia*)。

39. 根据权利要求37的方法,其中所述细菌抗原选自犬埃立克体(*Ehrlichia canis*)、查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*)、伊氏埃立克体(*Ehrlichia ewingii*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、扁平无形体(*Anaplasma platys*)、嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)和立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)。

40. 根据权利要求34的方法,其中所述病原性抗原是真菌抗原或寄生虫抗原。

41. 根据权利要求40的方法,其中所述真菌抗原或寄生虫抗原选自犬心丝虫、蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、恶性疟原虫(*plasmodium falciparum*)、非洲锥虫病和布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)。

42. 根据权利要求1的方法,其中在封闭剂的存在下进行步骤(a)的混合。
43. 根据权利要求42的方法,其中所述封闭剂选自牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、明胶、卵清蛋白和 $\gamma$ -球蛋白。
44. 根据权利要求43的方法,其中所述封闭剂是以约1%至约5%w/v浓度存在的BSA。
45. 一种检测样品中的靶标分析物的方法,其包括:
- (a) 将所述样品与第一检测缀合物、第二检测缀合物、CHAPS、牛血清白蛋白(BSA)、一种或多种聚合物材料、一种或多种粘度增强剂、盐以及任选螯合剂在溶液中混合,其中所述第一检测缀合物和第二检测缀合物包括与结合配偶体偶联的纳米结构,所述靶标分析物如果存在于所述样品中,则所述结合配偶体能够特异性地结合所述靶标分析物以形成第一检测缀合物、所述分析物和第二检测缀合物之间的复合物;
- (b) 将所述复合物暴露在紫外-可见-红外光谱的波长范围内的光源下;以及
- (c) 测量来自所述复合物的光信号,其中所述光信号的变化指示所述样品中所述靶标分析物的存在。
46. 根据权利要求45的方法,其中所述聚合物材料选自PEG、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、甲基纤维素、葡聚糖、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇和聚天冬氨酸。
47. 根据权利要求45的方法,其中所述粘度增强剂选自海藻糖、麦芽糖糊精、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)、环糊精、甲基纤维素、葡聚糖和聚蔗糖。
48. 根据权利要求45的方法,其中所述盐选自NaCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>和NaSCN。
49. 根据权利要求45的方法,其中所述螯合剂选自乙二胺四乙酸(EDTA)和乙二醇-双( $\beta$ -氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)。
50. 根据权利要求45的方法,其中步骤(a)的溶液还包含Biolipidure®试剂。
51. 根据权利要求45的方法,其中所述纳米结构选自球形纳米粒子和包括多个突起的纳米粒子。
52. 一种包含至少一种结合配偶体-纳米结构缀合物和两性离子洗涤剂的反应混合物,其中所述纳米结构包括多个突起,并且其中所述纳米结构的平均直径为至少约50nm。
53. 根据权利要求52的反应混合物,其中所述两性离子洗涤剂选自3-((3-胆酰胺丙基)二甲氨基)-1-丙磺酸盐(CHAPS)和磺基甜菜碱洗涤剂。
54. 根据权利要求53的反应混合物,其中所述CHAPS以约0.1%至约1%的浓度存在。
55. 根据权利要求54的反应混合物,其中所述CHAPS以约0.5%的浓度存在。
56. 根据权利要求52的反应混合物,其中所述纳米结构的平均直径为约70nm。
57. 根据权利要求52的反应混合物,其中所述纳米结构的平均直径为约90nm。
58. 根据权利要求52的反应混合物,其还包含含有靶标分析物的样品。
59. 根据权利要求58的反应混合物,其中所述靶标分析物选自蛋白质、酶、抗原、抗体、肽、核酸、激素、糖蛋白、多糖、毒素、病毒、病毒粒子、药物分子、半抗原和化学品。
60. 根据权利要求52的反应混合物,其中所述结合配偶体是生物大分子。
61. 根据权利要求60的反应混合物,其中所述生物大分子选自抗体或其片段、抗原、受体、配体、多核苷酸、适体、多肽、多糖、脂多糖、糖肽、脂蛋白或核蛋白。
62. 根据权利要求60的反应混合物,其中所述生物大分子是抗体。

63. 根据权利要求52的反应混合物,其中所述金属纳米结构是金金属纳米结构。

64. 根据权利要求52的反应混合物,其中所述反应混合物包含第一检测缀合物和第二检测缀合物,其中所述第一检测缀合物和第二检测缀合物包含作为第一抗体和第二抗体的结合配偶体。

65. 根据权利要求64的反应混合物,其中所述第一抗体和第二抗体结合所述靶标分析物上的不同且不重叠的表位。

66. 一种用于制备包含结合配偶体和金属纳米结构的缀合物的方法,其适合于基于靶标分析物的存在来检测光信号的变化,其中所述金属纳米结构包括多个突起,并且其中所述金属纳米结构的直径为至少约50nm,所述方法包括:

(a) 将包含所述金属纳米结构的溶液与包含所述结合配偶体的溶液混合以形成结合配偶体-纳米结构缀合物;

(b) 用BSA、PEG、**Biolipidure**<sup>®</sup>试剂或其组合封闭所述缀合物;

(c) 离心所述缀合物;以及

(d) 将所述缀合物重悬于稀释剂中,所述稀释剂包含选自PBS、TBS和硼酸盐的缓冲液;选自BSA、PEG、**Biolipidure**<sup>®</sup>试剂或其组合的封闭剂;和CHAPS。

67. 根据权利要求66的方法,其中所述结合配偶体是抗体。

68. 根据权利要求67的方法,其中所述抗体是含有疏水区的抗体。

69. 根据权利要求66的方法,其中所述溶液包含选自海藻糖、麦芽糖糊精、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)、环糊精、甲基纤维素、葡聚糖和聚蔗糖的粘度增强剂。

70. 根据权利要求66的方法,其中步骤(c)包括在约2,000g或更高下离心。

71. 根据权利要求66的方法,其中所述纳米结构的平均直径为约70nm。

72. 根据权利要求66的方法,其中所述纳米结构的平均直径为约90nm。

73. 根据权利要求66的方法,其中所述方法还包括步骤(d)后的冻干步骤。

74. 根据权利要求73的方法,其中所述冻干步骤包括将所述缀合物分配在液氮中,使用真空和温度循环进行冷冻干燥。

75. 根据权利要求66的方法,其中所述溶液还包含EDTA或EGTA。

76. 根据权利要求66的方法,其中所述溶液还包含MgCl<sub>2</sub>或NaSCN。

77. 根据权利要求66的方法,其中所述溶液还包含EDTA和MgCl<sub>2</sub>。

## 基于溶液的等离子体振子特异性结合配偶体测定和金属纳米结构

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年1月30日提交的美国临时申请号62/451,932的权益,其全部内容特此通过引用以其整体并入。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于检测样品中的靶标分析物的系统和方法。特别地,本发明提供了一种能够检测样品中的微量靶标分析物的基于局域表面等离子体共振的分析物检测系统。

### 背景技术

[0004] 目前的免疫测定和生物分子结合测定典型需要多个步骤和复杂的设备来进行测定。缺乏灵敏度和执行此类异质测定所涉及的复杂性源于将标记的特异性结合配偶体与未标记的特异性结合配偶体分离的特定需要。

[0005] 已尝试开发基于贵金属纳米粒子的局部表面等离子体共振(LSPR)特性的测定(Tokel等人,Chem Rev.,卷114:5728-5752,2014)。LSPR是入射光诱导的纳米尺寸结构中电子的集体振荡。金属纳米粒子对其紧邻处的折射率变化具有强烈的电磁响应,因此可以测量所述纳米粒子的共振频移作为分子结合到纳米粒子表面的指示剂。虽然金属纳米粒子、特别是金纳米粒子已被用于诊断测定以检测结合事件,但是这种测定通常具有低灵敏度并且不能用于定量监测顺序结合事件的动力学。

[0006] 因此,需要采用同质形式同时提供增加灵敏度的改善的测定方法。还期望利用标准实验室技术(诸如光谱学)的测定。

### 发明内容

[0007] 本申请描述了局部表面等离子体共振(LSPR)技术用于进行涉及特异性结合配偶体的测定的用途,所述特异性结合配偶体包括但不限于配体、受体、转录因子、DNA结合元件、抗原和抗体。更具体地,本申请涉及使用纳米结构结合配偶体缀合物在此类测定中实现显著扩增的工艺和材料。在一些方面,本公开文本提供了使用LSPR技术实现分子的灵敏检测并最小化所提供的测定中的非特异性结合(NSB)水平的组合物和方法。

[0008] 在本文所述的各种实施方案中,本申请涉及纳米结构-结合配偶体缀合物,其中所述纳米结构是包含多个尖峰的金属纳米结构。在一些实施方案中,所述纳米结构是平均直径为至少50nm的金属纳米结构。在进一步的实施方案中,所述纳米结构是平均直径为约50nm至约120nm的金属纳米结构。在一些实施方案中,本公开文本提供了这种金属纳米结构-结合配偶体缀合物在溶液中以定性或定量方式确定特异性结合配偶体的结合的用途。在一些实施方案中,本公开文本提供了用于产生本文所述的缀合物的方法。

[0009] 在一个方面,本公开文本提供了用于检测样品中的靶标分析物的方法和组合物,所述方法包括将所述样品与第一检测缀合物和第二检测缀合物在溶液中混合,其中所述第

一检测缀合物和第二检测缀合物包括偶联到结合配偶体的纳米结构,所述靶标分析物如果存在于样品中,则所述结合配偶体能够特异性地结合所述靶标分析物以形成所述第一检测缀合物、所述分析物和所述第二检测缀合物之间的复合物。在一些实施方案中,所述纳米结构是在球形核上包含多个突起的各向异性纳米结构,并且其中所述纳米结构的平均尖端到尖端直径为至少约50nm。在进一步的实施方案中,所述纳米结构的平均直径为约70nm或约90nm。在一些实施方案中,所述纳米结构是球形纳米结构。在进一步的实施方案中,所述方法还包括将所述复合物暴露于紫外-可见-红外光谱的波长范围内的光源。在更进一步的实施方案中,所述方法包括测量来自所述复合物的光信号,其中所述光信号的变化指示所述样品中所述靶标分析物的存在。

[0010] 在一些实施方案中,使用多于两种检测缀合物。例如,添加第三种、第四种、第五种或更多种检测缀合物。在一些实施方案中,每种所述检测缀合物能够结合相同的靶标分析物以形成复合物。在一些实施方案中,每种所述检测缀合物结合所述靶标分析物上的不重叠表位。在一些实施方案中,所述缀合物中的一些或所有是各向异性的。

[0011] 在一些实施方案中,所述混合步骤在3-(3-胆酰胺丙基)二甲氨基-1-丙磺酸盐(CHAPS)的存在下进行。在一些实施方案中,所述CHAPS以约0.1%w/v至约0.5%w/v的浓度存在。在进一步的实施方案中,所述CHAPS以约0.2%w/v的浓度存在。因此,在一些实施方案中,本文提供的溶液包含CHAPS。

[0012] 在一些实施方案中,所述混合步骤在聚合物材料的存在下进行,所述聚合物材料选自聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、葡聚糖、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚谷氨酸、聚乙烯醇和聚天冬氨酸。因此,在一些实施方案中,本文提供的溶液包含PEG、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、葡聚糖、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚谷氨酸、聚乙烯醇和/或聚天冬氨酸中的一种或多种。在一些实施方案中,所述聚合物材料是PEG。在一些实施方案中,PEG以约0.05%至约5%w/v或约0.1%至约3%的浓度存在。在一些实施方案中,所述PEG具有1,000至300,000、或2,000至250,000、或3,000至200,000的分子量。

[0013] 在一些实施方案中,所述混合步骤在粘度增强剂的存在下进行。因此,在一些实施方案中,本文提供的溶液包含粘度增强剂。在进一步的实施方案中,所述粘度增强剂选自海藻糖、麦芽糖糊精、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)、环糊精、随机烷基化环糊精、甲基纤维素、海藻糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇和聚蔗糖(ficoll)、葡聚糖、或其任何组合。在特定的实施方案中,所述混合步骤在浓度为约0.05%至约5%的葡聚糖的存在下进行,所述浓度取决于分子量。例如,在一些实施方案中,葡聚糖以约0.05%、约0.1%、约0.5%、约1%、约1.5%、约2%、约2.5%、约3%、约3.5%、约4%、约4.5%或约5%的浓度存在。

[0014] 在一些实施方案中,所述混合步骤在明胶的存在下进行。因此,在一些实施方案中,本文提供的溶液包含明胶。在一些实施方案中,所述明胶以约0.1%至约3%之间的浓度存在,

[0015] 在一些实施方案中,本文提供的溶液和反应混合物包含至少一种结合配偶体-纳米结构缀合物、CHAPS缓冲液、PEG、一种或多种霍夫梅斯特系列盐(Hofmeister series salts)、EDTA、基于聚合物的封闭试剂(诸如 **Biolipidure®**)、BSA、明胶、或其任何组合。在

一些实施方案中,所述霍夫梅斯特系列盐是氯化镁。在其他实施方案中,所述霍夫梅斯特系列盐是氯化钙。在一些实施方案中,所述反应混合物包含诸如霍夫梅斯特系列盐的多种盐。在一些实施方案中,本文提供的溶液和反应混合物包含浓度为约10mM至约250mM或浓度为约100mM的MgCl<sub>2</sub>或NaSCN。在一些实施方案中,本文提供的溶液和反应混合物包含二价阳离子的柠檬酸盐,例如Mg<sup>2+</sup>的柠檬酸盐或Ca<sup>2+</sup>的柠檬酸盐。在一些实施方案中,所述溶液和反应混合物包含硫氰酸盐、锰、钴、镍、乙二胺四乙酸(EDTA)和/或乙二醇-双(β-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)。在一些实施方案中,所述EDTA和/或EGTA以约5mM至约100mM的浓度存在于所述溶液中。

[0016] 在一些实施方案中,本文提供的方法和组合物中使用的所述纳米结构包含多个突起,其中所述纳米结构的平均尖端到尖端直径为约50nm、约60nm、约70nm、约80nm、约90nm、约100nm、约110nm或约120nm。在一些实施方案中,所述纳米结构是金属纳米结构。在一些实施方案中,所述纳米结构是金金属纳米结构。在一些实施方案中,本文提供的纳米结构是球形纳米结构。在一些实施方案中,所述球形纳米结构的平均直径为约50nm、约60nm、约70nm、约80nm、约90nm、约100nm、约110nm或约120nm。

[0017] 在一些实施方案中,本公开文本提供了检测样品中的靶标分析物的方法,其包括:(a)将所述样品与第一检测缀合物、第二检测缀合物、CHAPS、牛血清白蛋白(BSA)、一种或多种聚合物材料、一种或多种粘度增强剂、盐以及任选地螯合剂在溶液中混合,其中所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物包括与结合配偶体偶联的纳米结构,所述靶标分析物如果存在于所述样品中,则所述结合配偶体能够特异性地结合所述靶标分析物以形成所述第一检测缀合物、所述分析物和所述第二检测缀合物之间的复合物;(b)将所述复合物暴露在紫外-可见-红外光谱波长范围内的光源下;(c)测量来自所述复合物的光信号,其中所述光信号的变化指示所述样品中所述靶标分析物的存在。

[0018] 在一些实施方案中,所述聚合物材料选自PEG、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、甲基纤维素、葡聚糖、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇和聚天冬氨酸。在一些实施方案中,所述粘度增强剂选自海藻糖、麦芽糖糊精、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)、环糊精、甲基纤维素、葡聚糖和聚蔗糖。在一些实施方案中,所述盐选自NaCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>和NaSCN。在一些实施方案中,所述螯合剂选自乙二胺四乙酸(EDTA)和乙二醇-双(β-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)。

[0019] 在一些实施方案中,本文提供的溶液和反应混合物包含Biolipidure®试剂。在一些实施方案中,所述Biolipidure®试剂是Biolipidure® 205、206、1002、1201、1202或其组合。在一些实施方案中,所述纳米结构选自球形纳米粒子和包含多个突起的纳米粒子。因此,在一些实施方案中,本公开文本提供了方法、溶液和反应混合物,所述反应混合物包含第一检测缀合物、第二检测缀合物、CHAPS、BSA、明胶、PEG、EDTA、MgCl<sub>2</sub>、Biolipidure®试剂或其任何组合。

[0020] 在一些实施方案中,所述光信号是反射率、吸收光谱、散射光谱或发射光谱。在一些实施例中,所述光信号的变化包括光谱峰波长移位和/或总光谱轮廓移位。在一些实施例中,所述总光谱轮廓移位是差异光谱。在一些实施方案中,本文提供的方法提供对纳克量、皮克量或飞克量的所述靶标分析物的检测。

[0021] 在一些实施方案中,在分光光度计比色皿、分析转子、微孔板、临床分析仪、流动室中,在光纤尖端上,或者在透明凝胶中进行本文提供的方法。

[0022] 在一个方面,本公开文本提供了包含至少一种结合配偶体-纳米结构缀合物的反应混合物,其中所述纳米结构包括多个突起,并且其中所述纳米结构的平均直径为至少约50nm、或至少约70nm、或至少约90nm或至少约120nm。在另一个方面,公开文本提供了包含至少一种结合配偶体-纳米结构缀合物的反应混合物,其中所述纳米结构是球形纳米结构。在实施方案中,所述反应混合物还包含两性离子洗涤剂。在一些实施方案中,所述两性离子洗涤剂选自3-((3-胆酰胺丙基)二甲氨基)-1-丙磺酸盐(CHAPS)和磺基甜菜碱洗涤剂。在一些实施方案中,所述CHAPS以约0.1%至约1%的浓度存在。在进一步的实施方案中,所述CHAPS以约0.5%的浓度存在。

[0023] 在一些实施方案中,所述结合配偶体是生物大分子。在进一步的实施方案中,所述生物大分子选自抗体或其片段、抗原、受体、配体、多核苷酸、适体、多肽、多糖、脂多糖、糖肽、脂蛋白或核蛋白。在一些实施方案中,本文提供的方法和组合物包含第一检测缀合物和第二检测缀合物,其中所述检测缀合物的结合配偶体之一是抗体。在进一步的实施方案中,所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物均包含作为抗体的结合配偶体。在一些实施方案中,与所述第一缀合物和所述第二缀合物缀合的抗体结合相同靶标分析物上的不同表位。在一些实施方案中,所述第一抗体和所述第二抗体或所述第一缀合物和所述第二缀合物结合所述靶标分析物上的两个不同的不重叠表位。在其他实施方案中,所述第一抗体和所述第二抗体或所述第一缀合物和所述第二缀合物结合两种不同的抗原。在一些实施方案中,所述两种不同的抗原是两种相互作用分子。在一些实施方案中,所述相互作用分子是两种大分子,包括但不限于受体及其配体(例如,蛋白质激素及其结合受体),DNA结合转录因子和另一种转录因子和/或DNA等。

[0024] 在一些实施方案中,所述靶标分析物选自蛋白质、酶、抗原、抗体、肽、核酸、激素、糖蛋白、多糖、毒素、病毒、病毒粒子、药物分子、半抗原和化学品。在进一步的实施方案中,所述靶标分析物是病原性抗原或者是病原性抗原的抗体。在一些实施方案中,所述病原性抗原是病毒抗原。在进一步的实施方案中,所述病毒抗原来自选自以下的病毒:猫白血病病毒、犬细小病毒、口蹄疫病毒、流感病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、HIV病毒、人乳头瘤病毒、EB病毒(Epstein Barr virus)和狂犬病病毒。在其他实施方案中,所述病原性抗原是细菌抗原。在进一步的实施方案中,所述细菌抗原选自埃立克体属(*Ehrlichia*)、疏螺旋体属(*Borrelia*)、无形体属(*Anaplasma*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和立克次体属(*Rickettsia*)。在更进一步的实施方案中,所述细菌抗原选自犬埃立克体(*Ehrlichia canis*)、查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*)、伊氏埃立克体(*Ehrlichia ewingii*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、扁平无形体(*Anaplasma platys*)、嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)和立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)。

[0025] 在其他实施方案中,所述病原性抗原是真菌抗原或寄生虫抗原。在进一步的实施方案中,所述真菌抗原或寄生虫抗原选自犬心丝虫、蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、恶性疟原虫(*plasmodium falciparum*)、非洲锥虫病和布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)。

[0026] 在一些实施方案中,本文提供的所述样品与所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物的混合物在封闭剂的存在下进行。在进一步的实施方案中,所述封闭剂选自牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、明胶、卵清蛋白和 $\gamma$ -球蛋白。在一些实施方案中,所述封闭剂是以约1%至约5%w/v浓度存在的BSA。

[0027] 在一个方面,本公开文本提供了用于制备包含结合配偶体和各向异性金属纳米结构的缀合物的方法,其适合于基于靶标分析物的存在来检测光信号的变化,其中所述各向异性金属纳米结构包括多个突起(尖峰)并且其中所述金属纳米结构的直径为至少约50nm。在其他实施方案中,本公开文本提供了用于制备包含结合配偶体和金属纳米结构的缀合物的方法,其适合于基于靶标分析物的存在来检测光信号的变化,其中所述金属纳米结构是球形纳米结构。在实施方案中,所述方法包括将包括所述金属纳米结构的溶液与包含所述结合配偶体的溶液混合以形成结合配偶体-纳米结构缀合物;在存在或不存在粘度增强剂和/或一种或多种霍夫梅斯特系列盐和/或EDTA和/或EGTA时,用本文提供的封闭试剂(例如,BSA和/或明胶和/或PEG和/或Biolipidure®试剂)封闭所述缀合物;(c)离心所述缀合物;(d)将所述缀合物重悬于稀释剂中,所述稀释剂包含诸如磷酸盐缓冲液(PBS)或Tris缓冲液(TBS)或硼酸盐缓冲液等的缓冲液、本文提供的封闭剂(诸如BSA和/或明胶和/或PEG)和CHAPS。在一些实施方案中,所述结合配偶体是抗体。在进一步的实施方案中,所述抗体是含有疏水区的抗体。

[0028] 在一些实施方案中,所述金属纳米结构和/或包含所述结合配偶体的溶液还包含粘度增强剂。在一些实施方案中,所述粘度增强剂选自海藻糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和聚乙烯醇(PVA)。在一些实施方案中,所述粘度增强剂是葡聚糖。在一些实施方案中,所述粘度增强剂是甲基纤维素。

[0029] 在一些实施方案中,本文提供的用于制备缀合物的方法的离心步骤包括在约2000g或更高下离心。在进一步的实施方案中,所述方法包括在约5000g或更高下离心。在进一步的实施方案中,所述方法包括在约10,000g或更高下离心。在进一步的实施方案中,所述方法包括在约50,000g或更高下离心。在进一步的实施方案中,所述方法包括在约75,000g或更高下离心。在进一步的实施方案中,所述方法包括在约100,000g或更高下离心。

[0030] 在一些实施方案中,本公开文本提供了重悬所述缀合物后的冻干步骤。在进一步的实施方案中,所述冻干步骤包括将所述缀合物分配在液氮中,使用真空和温度循环进行冷冻干燥。

## 附图说明

[0031] 图1. 示出本文所述的LSPR免疫测定的原理。本身包括多个尖峰的金属纳米粒子展现了光谱。由于第一次初级结合和随后的次级结合,所述纳米粒子表面的轻微变化引起与所述纳米粒子结合配偶体缀合物相互作用的光的特征的渐进变化。这些变化可以通过合适的光谱仪记录,并提供定性和定量信息。

[0032] 图2. 显示将抗TSH抗体C1滴定到包括多个突起的纳米结构中,以形成抗体-纳米结构缀合物。

[0033] 图3. 显示将抗TSH抗体C6滴定到包括多个突起的纳米结构中,以形成抗体-纳米结构缀合物。

[0034] 图4.显示将抗体C1和C6大规模(100ml纳米结构)滴定到包括多个突起的纳米结构中,以形成C1抗体-或C6抗体-纳米结构缀合物。插图显示用蛋白质A条纹化的条带,所述条带已经浸入进行或未进行BSA封闭的缀合物溶液中。

[0035] 图5.显示未缀合的纳米结构(573.8nm)和C1纳米结构(移位至585.3nm)或C6纳米结构(移位至585.9nm)的峰移。

[0036] 图6.显示未缀合的纳米结构、C1抗体-纳米结构和C6抗体-纳米结构以及BSA封闭后C1抗体-纳米结构和C6抗体-纳米结构的峰移。

[0037] 图7.显示用蛋白质A(0.5mg/mL)条纹化的侧向流条带,所述侧向流条带浸入含有如下的溶液中:使用吸收方案产生的缀合纳米结构,或者使用吸收方案产生并用BSA封闭的缀合纳米结构。

[0038] 图8.显示使用巯基介导的缀合方案产生的纳米结构缀合物的谱移,所述纳米结构缀合物为:(i)缀合前的50nm纳米结构;(ii)与C1抗体缀合的50nm纳米结构;(iii)与C6抗体缀合的50nm纳米结构;(iv)用BSA封闭后的缀合C1的纳米结构;和(v)用BSA封闭后的缀合C6的纳米结构。

[0039] 图9.显示用蛋白质A(0.5mg/mL)条纹化的侧向流条带浸入含有使用巯基介导的方案产生的缀合纳米结构或使用巯基介导的方案产生并用BSA封闭的缀合纳米结构的溶液中。

[0040] 图10A.显示使用50nm纳米结构和吸附方案产生的C1和C6缀合物的复合 $\lambda_{\max}$ 的变化。

[0041] 图10B.显示使用50nm纳米结构和巯基介导的缀合方案产生的C1和C6缀合物的复合 $\lambda_{\max}$ 的变化。

[0042] 图11.显示促进剂的存在对由吸附方案(左图;0.25%PEG)和巯基介导的方案(右图;1%PEG)制备的缀合物的谱移的影响。

[0043] 图12.显示在增加量的抗原(TSH)的存在下,使用在0.1%PEG和0.5%甲基纤维素的存在下共价连接的缀合物,随时间的剂量-响应曲线和动力学。

[0044] 图13.显示在不存在(0ng)或存在0.25ng hTSH的情况下获得的针对所述缀合物中不同比例的C1和C6抗体(0份C1/40份C6,左上图;40份C1/0份C6,右上图;30份C1/10份C6,左中图;20份C1/20份C6,右中图;10份C1/30份C6,下图)的反应曲线。

[0045] 图14A.显示在增加量的TSH和0.5%PEG的存在下所述缀合物的峰移。

[0046] 图14B.显示在增加量的TSH和1.0%PEG的存在下所述缀合物的峰移。

[0047] 图15A.(上图)显示抗hTSH抗体C1和C6与70nm和90nm纳米结构的缀合以及它们随蛋白质A侧向流条带的再活化。

[0048] 图15B.(下图)显示在用BSA封闭之前和之后,硝酸纤维素上的蛋白质A线路如预期反应。

[0049] 图16.显示包括约70nm直径纳米结构的缀合物的谱移。

[0050] 图17.显示包括约90nm直径纳米结构的缀合物的谱移。

[0051] 图18.显示通过包括多个突起对比纳米棒的50nm纳米结构的峰移测量的TSH的检测。

[0052] 图19.显示CHAPS处理的缀合物的净峰移,所述缀合物包括在pH 6.0下与抗体缀合

的具有多个突起的纳米结构。

[0053] 图20显示具有极性带电头基的 **Biolipidure**<sup>®</sup> 聚合物基材的图片, 以及具有疏水性、阴离子、阳离子和/或氢键供给基团的不同特性的尾部。该图片来自NOF公司的网站, **Biolipidure**<sup>®</sup> 试剂可从该网站购得。

[0054] 图21显示用一系列 **Biolipidure**<sup>®</sup> 试剂和BSA封闭的抗TSH包被纳米粒子相对于时间的波长移位。与标准BSA缀合物相比, 用1002、1201、1202、205和206封闭均在10分钟内增强了所述缀合物的灵敏度。

[0055] 图22A和22B显示用 **Biolipidure**<sup>®</sup> 试剂1002、1003、1201、1202、205、206和BSA封闭的缀合物的非特异性吸附(图22A)。由于来自1003的较大波长移位, 图22B显示仅1002、1201、1202、205、206和BSA的非特异性吸附。

[0056] 图23显示用BSA封闭试剂与4种 **Biolipidure**<sup>®</sup> 封闭试剂得到的纳米粒子缀合物在犬血清中的波长移位, 所述BSA封闭试剂和 **Biolipidure**<sup>®</sup> 封闭试剂对改善灵敏度和减少血清中的非特异性波长移位显示出最大的影响。

[0057] 图24显示响应于1ng/mL (将其在TBS BSA缓冲液中以1/20稀释至50pg/mL cTSH抗原的终浓度) 的波长移位的改善。该图比较了用BSA与 **Biolipidure**<sup>®</sup> 1002封闭的80nm球体和用BSA与 **Biolipidure**<sup>®</sup> 1002封闭的90nm海胆状纳米结构(nanourchin) 的阳性响应。在这两种情况下, 所述 **Biolipidure**<sup>®</sup> 封闭试剂改善了对抗原的响应的波长移位。图24中提供的结果的测定条件包括以下: 50mM Tris, 150mM NaCl, 1%BSA, pH为7.7

[0058] 图25提供了霍夫梅斯特系列盐的示意图(Zhang Y, Cremer PS, "Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series" Curr Opin Chem Biol. 2006Dec; 10(6): 658-63)。

[0059] 图26显示了在使用纳米球cTSH缀合物的测定中MgCl<sub>2</sub>的存在对非特异性结合水平的影响。Kilo和Mister是两种不同的正常犬血清样品。

[0060] 图27显示了MgCl<sub>2</sub>、NaCl或NaSCN的存在对非特异性结合的影响。

[0061] 图28显示了在测试MgCl<sub>2</sub>、NaCl或NaSCN存在的研究5分钟后的LSPR峰移结果

[0062] 图29显示了在LSPR测定中Mg的存在对非特异性结合的影响。

[0063] 图30显示了在LSPR测定中EDTA的存在对非特异性结合的影响。

## 具体实施方式

[0064] 本发明部分基于以下发现: 利用各向异性金属纳米结构标记的结合配偶体可以实现基于LSPR的测定中的显著扩增。因此, 本发明提供了利用多种检测缀合物的分析物检测方法, 所述检测缀合物包括与生物分子偶联的各向异性金属纳米结构。在一些实施方案中, 本文提供的金属纳米结构是多支链各向异性纳米粒子, 所述纳米粒子表面上包括多个突起。如本文所提供的在表面上包含多个突起的所述纳米结构的直径也为至少约50nm。在一些实施方案中, 本文提供的金属纳米结构是球形或非球形金属纳米结构。

[0065] 本发明克服了当前免疫测定、配体-受体结合测定、核酸-蛋白质结合测定或其他特异性结合配偶体测定通常需要多个步骤和复杂的设备来进行这些步骤的问题。缺乏灵敏

度和执行此类异质测定所涉及的复杂性源于将标记的与未标记的特异性结合配偶体分离的特定需要。本发明通过以均质形式进行测定中涉及的所有步骤克服了这些限制,其中反应和未反应的测定组分的分离是不必要的,因为结合事件改变了通过光谱学领域的普通技术人员所用的任何光谱技术实时测量的LSPR特征。本发明的无分离、一锅法测定使用折射率传感、等离子体振子耦合(plasmon coupling)和相关效应来提供最终LSPR调制信号的放大。而且,所提供的方法和金属纳米结构能够改善检测。令人惊讶的是,所提供的方法和金属纳米结构能够改善检测并使非特异性结合最小化(在本文中称为“NSB”)。本公开文本提供各向异性纳米结构-抗体缀合物及其制备方法,其提供出乎意料的高分析物检测灵敏度。本公开文本提供了各向异性纳米结构-抗体缀合物及其制备方法,其提供了意想不到的高分析物检测灵敏度,同时提供了意想不到的低水平NSB。在一个方面,所述纳米结构包括多个突起。在一些实施方案中,用这种星形纳米结构实现的灵敏检测是出乎意料的,因为在本技术领域内众所周知的是,与圆形、球形或其他纳米结构相比,棒形金属纳米粒子是折射率更好的传感器。此外,考虑到文献报道表明对纳米棒而不是本文所述的星形结构具有更好的灵敏度,本文提供的具有球形核和多尖峰的各向异性纳米结构的优异效果是令人惊讶的。在其他实施方案中,所述纳米结构是星形或球形的,并且本文提供的NSB的灵敏度和低水平通过本文提供的缀合方法实现。

[0066] 对于本领域普通技术人员显而易见的是,本发明可以应用于检测多种抗原分析物,诸如与人和动物中的传染病相关的抗原性分析物,例如与传染病相关的抗原和响应于此产生的抗体。除了检测抗原和抗体之外,本文所述的技术还可用于进行涉及诸如配体和受体的特异性结合配偶体和转录因子及其相关DNA结合元件的测定。此外,可以使用具有特异性结合配偶体的各向异性金属纳米粒子的适当缀合物来检测RNA-RNA、RNA-DNA、DNA-DNA或蛋白质-核酸相互作用。

[0067] 如本文所提供的,本发明描述了使用金属纳米粒子在溶液中(与通过化学或物理沉积附着于表面相反)以定性或定量方式确定特异性结合配偶体的结合。可以测量与含有附着于金属纳米粒子的未结合和结合配偶体的区域相互作用的光的特征的变化,从而允许通过合适的检测器确定所述特异性结合配偶体之间的定性和定量相互作用。

[0068] 在第一方面,本申请提供了检测样品中靶标分析物的方法。在一些实施方案中,所述方法包括将所述样品与多种检测缀合物混合,所述检测缀合物包括与结合配偶体偶联的各向异性金属纳米结构。在一些实施例中,所述纳米结构包括多个突起或尖峰。在一些实施方案中,所述纳米结构的直径为至少50nm,包括突起。在其他实施方案中,所述纳米结构是球形的。在一些实施方案中,所述纳米结构是金纳米结构。在一个实施方案中,所述方法包括第一检测缀合物和第二检测缀合物,其中所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物包含与结合配偶体偶联的金属纳米结构,所述靶标分析物如果存在于所述样品中,则所述结合配偶体能够特异性地结合所述靶标分析物以形成所述第一检测缀合物、所述分析物和所述第二检测缀合物之间的复合物。例如,所述缀合物包含第一结合配偶体和第二结合配偶体,它们各自结合相同靶标分析物上的不同表位。在进一步的实施方案中,所述方法包括将所述复合物暴露在紫外-可见-红外光谱波长范围内的光源下;并测量来自所述复合物的光信号,其中所述光信号的变化指示所述样品中所述靶标分析物的存在。在示例性实施方案中,所述第一检测缀合物和/或所述第二检测缀合物中的金属纳米结构是金金属纳米结构。

在另一个示例性实施方案中,所述混合步骤在聚合物材料的存在下进行,所述聚合物材料选自聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇、聚谷氨酸和聚天冬氨酸。在优选的实施方案中,所述聚合物材料是PEG。在又一个示例性实施方案中,所述混合步骤在多糖或其他粘度增强剂的存在下进行。在一些实施方案中,所述粘度增强剂选自海藻糖、麦芽糖糊精、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或聚乙烯醇(PVA)。在一些实施方案中,所述多糖选自麦芽糖糊精、海藻糖、蔗糖、玉米糖浆和多聚葡萄糖。在优选的实施方案中,所述多糖是麦芽糖糊精或海藻糖。在又一个示例性实施方案中,所述混合步骤在封闭剂的存在下进行。在一些实施方案中,所述封闭剂选自牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、明胶、卵清蛋白和 $\gamma$ -球蛋白。在优选的实施方案中,所述封闭剂是BSA。

[0069] 在一些实施方案中,本公开文本提供了方法和组合物,所述组合物包括先前已用于诸如侧向流测定的测定中但之前未使用或预期用于LSPR测定的封闭剂。例如,在一些实施方案中,本公开文本提供了用于本文所述的LSPR测定的方法和组合物,其中一种或多种 **Biolipidure®** 试剂用作封闭剂。令人惊讶的是,尽管基于在非LSPR测定(诸如侧向流测定等)中使用这些试剂无法预测LSPR测定中对波长移位的影响,本发明人发现 **Biolipidure®** 试剂在本文提供的LSPR测定中提供优异的效果。**Biolipidure®** 试剂是展现出以下一个或多个特征的聚合物试剂:提高灵敏度和检测准确度;抑制非特异性吸附;稳定抗体和酶;并消除批次之间的差异。**Biolipidure®** 试剂不需要生物危害处理,并且在一些实施方案中,通过制备具有 **Biolipidure®** 的缓冲溶液(例如,约0.1wt%、约0.25wt%、约0.5wt%、约0.75wt%、约1wt%、约1.25wt%、约1.5wt%、约2wt%、约5wt%或更多)来使用,并将待测样品溶解在缓冲液中。在特定的实施方案中, **Biolipidure®** 试剂以1wt%的浓度使用。

[0070] 在本文所述的各种实施方案中,本发明的方法可以以夹心测定形式、直接测定形式、间接测定形式以及竞争性和次级标记形式配置。

[0071] 在一些实施方案中,所述检测方法是夹心测定。在此类实施方案中,所述检测缀合物包含本文提供的各向异性金属纳米结构,其与结合配偶体偶联,所述靶标分析物如果存在于样品中,则所述结合配偶体能够特异性地结合所述靶标分析物。例如,在一个实施方案中,夹心测定形式的方法包括第一检测缀合物和第二检测缀合物,其中所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物包括球形金属纳米结构和/或具有多个突起的金属纳米结构,其中所述纳米结构与结合配偶体偶联,所述靶标分析物如果存在于所述样品中,则所述结合配偶体能够特异性结合所述靶标分析物以形成第一检测缀合物、所述分析物和第二检测缀合物之间的复合物。在示例性实施方案中,所述第一检测缀合物和/或所述第二检测缀合物中的金属纳米结构是各向异性金金属纳米结构。将所述复合物暴露在光源下,并测量光信号,其中所述光信号的变化指示所述样品中分析物的存在。作为示例,当含有所述靶标分析物的样品与所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物混合时,所述靶标分析物与所述检测缀合物中的结合配偶体结合以在所述第一检测缀合物、所述分析物和所述第二检测缀合物之间形成复合物。这种复合物的形成使所述检测缀合物中的金属纳米结构彼此非常接近,即等离子体振子-等离子体振子耦合。所述金属纳米结构吸收、散射或透射的光量受到

所述复合物中金属纳米结构的接近度的影响,从而产生峰吸收波长的增强的移位,这指示在所述样品中靶标分析物的存在。

[0072] 在其他实施方案中,所述检测方法是竞争性测定。在此类实施方案中,所述第一检测缀合物包括与感兴趣的靶标分析物偶联的金属纳米结构。如在所述夹心测定方法中,所述第二检测缀合物能够特异性结合所述靶标分析物。在这种类型的测定中,所述第一检测缀合物最初将与所述第二检测缀合物结合。如果含有靶标分析物的样品与这些初始复合物混合,则所述样品中未标记或游离的靶标分析物将与所述第一检测缀合物竞争结合所述第二检测缀合物。在这种类型的测定中,光信号的变化将由所述金属纳米结构从所述第一检测缀合物到所述第二检测缀合物的位移产生,所述光信号的变化将成比例地减小峰吸收波长中的波长移位。

[0073] 如上所述,本发明的方法可以使用多种检测缀合物。检测缀合物包括球形金属纳米结构或具有多个突起并且与结合配偶体偶联的金属纳米结构,所述结合配偶体能够根据测定构型特异性结合靶标分析物或另一种检测缀合物。例如,在其中所述方法以夹心测定形式配置的实施方案中,所述检测缀合物包括与能够特异性结合靶标分析物的结合配偶体偶联或缀合的金属纳米结构。在其中所述方法以直接竞争测定形式配置的其他实施方案中,至少一种检测缀合物包括与靶标分析物偶联或缀合的金属纳米结构。

[0074] 在一些实施方案中,所述检测缀合物包含能够特异性结合靶标分析物的结合配偶体。如本文所用,“特异性结合”是指以高亲和力结合靶标分子,例如至少 $10^{-6}$ M的亲和力。在一些实施方案中,所述结合配偶体是半抗原和其他小分子,药物,激素,包括但不限于抗体或其片段(例如,Fv、Fab、(Fab)<sub>2</sub>、单链、CDR等)、抗原、受体、配体、多核苷酸、适体、多肽、多糖、脂多糖、糖肽、脂蛋白或核蛋白的生物大分子。在某些实施方案中,所述结合配偶体是抗体。在其他实施方案中,所述结合配偶体是抗原。

[0075] 在一些实施方案中,所述检测缀合物,例如第一检测缀合物和第二检测缀合物,包含作为相同类型分子的结合配偶体,但优选在不同于另一个的位置处与靶标分析物结合。举例来说,第一检测缀合物和第二检测缀合物都可以是识别靶标分析物的抗体,但所述第一检测缀合物与靶标分析物结合的表位与所述第二种检测缀合物结合靶标分析物的表位分开并且理想地不与该表位重叠。因此,在某些实施方案中,所述第一检测缀合物包含识别靶标分析物的第一表位的抗体,所述第二检测缀合物包含识别靶标分析物的第二表位的不同抗体。在本文所述的各种实施方案中,所述第一检测缀合物可包含识别靶标分析物的第一表位的单克隆抗体。在进一步的实施方案中,所述第二检测缀合物可以包含识别靶标分析物的第二表位的单克隆抗体,所述靶标分析物与所述第一检测缀合物识别的表位分开并且理想地不重叠。可替代地,所述第一检测缀合物和/或所述第二检测缀合物可包含多克隆抗体。例如,所述第一检测缀合物可包含多克隆抗体,而所述第二检测缀合物包含单克隆抗体。在一些实施方案中,所述第一检测缀合物包含多克隆抗体,而所述第二检测缀合物包含多克隆抗体。

[0076] 所述检测缀合物中的金属纳米结构可以由贵金属或其复合物组成。在一些实施方案中,所述检测缀合物中的金属纳米结构可以由过渡金属或其复合物组成。在一些实施方案中,所述检测缀合物中的金属纳米结构可包含碱金属或镧系元素与贵金属或过渡金属的组合。在某些实施方案中,所述检测缀合物中的金属纳米结构包含选自金、银、铜、铂、钯、



效地产生缀合物。此外,CHAPS的存在允许在离心后容易地重悬所述抗体缀合物。特别地,包含离心后不能再悬浮的疏水性抗体的缀合物在CHAPS的存在下容易重悬浮。此外,CHAPS洗涤剂的存在有助于防止导致聚集的非特异性尺寸/形状变化。诸如本文提供的具有多个尖峰的纳米结构的颗粒可以脱离溶液。本发明人惊奇地发现,即使所述颗粒完全脱离溶液,也可以通过添加CHAPS来拯救所述颗粒。在一些实施方案中,所述反应混合物包含结合配偶体-纳米结构缀合物,其中所述混合物包含一种或多种选自磺基甜菜碱系列、Triton系列(x-100)洗涤剂、Tween系列(Tween 20)洗涤剂、诸如CTAB的阳离子洗涤剂系列和诸如SDS的阴离子洗涤剂的封端剂或两性离子洗涤剂。

[0080] 还提供了将分子与本文公开的金属纳米结构缀合的方法。这些方法包括诸如涉及1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)、磺基-NHS偶联、疏水结合或硫醚化学的那些缀合化学。在一些实施方案中,所述结合配偶体或靶标分析物可通过各种化学官能团与所述金属纳米结构偶联,所述化学官能团包括巯基、胺、二巯基、丙烯酰亚磷酰胺、叠氮化物或炔烃。在一些实施方案中,所述分子可以通过较大的载体分子或蛋白质间接偶联至所述金属纳米结构。当诸如激素、药物和小于10kD的其他小分子等分子很小时,这种间接偶联特别有用。优选地,所述载体蛋白不能与所述靶标分析物发生特异性相互作用。在一些实施方案中,蛋白质A或蛋白质G或蛋白质A/G可以缀合或偶联至所述纳米粒子。

[0081] 在一些实施方案中,用于将分子缀合至本文提供的金属纳米结构的方法包括将包括所述金属纳米结构的溶液与包含所述结合配偶体的溶液混合以形成结合配偶体-纳米结构缀合物;用BSA封闭所述缀合物;(c)离心所述缀合物;以及(d)将所述缀合物重悬于稀释剂中,所述稀释剂包含诸如PBS的缓冲液、诸如BSA和CHAPS的封闭剂。在一些实施方案中,所述结合配偶体是抗体。在进一步的实施方案中,所述抗体是含有疏水区的抗体。在一些实施方案中,在将所述抗体滴定到所述纳米结构中之前,将所述金属纳米结构调节至碱性pH。例如,在一些实施方案中,将所述纳米结构pH调节至约8、约8.5、约8.8或约9.2的pH。然而,在一些实施方案中,本发明人惊奇地发现,包括所述纳米结构的溶液的pH可以调节至中性或酸性pH(例如,约5.5、约6、约6.5或约7)并成功形成能够进行敏感的抗原检测的缀合物。在一些实施方案中,中性或酸性pH形成难以重悬于包含BSA和磷酸盐缓冲液的标准缀合物稀释剂中的缀合物。令人惊讶的是,这种不溶性缀合物在含有CHAPS的缓冲液中迅速溶解。

[0082] 在一些实施方案中,第一检测缀合物中使用的一种或多种金属可以与制造第二种检测缀合物中的所述金属纳米结构的一种或多种金属相同。例如,在一个实施方案中,所述第一检测缀合物包括金纳米结构,所述第二检测缀合物包括金纳米结构。在其他实施方案中,所述第一检测缀合物中使用的金属不同于用在所述第二检测缀合物中产生所述金属纳米结构的一种或多种金属。

[0083] 在一些实施方案中,可以用合适的缓冲液、离子强度和其他促进剂调节所述反应环境。在一个优选的实施方案中,所述反应环境包括聚乙二醇(PEG),如本文所述,该PEG可以增强LSPR信号的强度和信号发展的速率。也可以使用其他类似的聚合物材料,所述聚合物材料包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇和聚天冬氨酸。

[0084] 本发明还提供了分析物检测装置,其用于利用本文所述的方法检测样品中的靶标分析物。合适的分析物检测装置可包括但不限于分光光度计比色皿、分析转子、微孔板或流

动室。如本领域技术人员将理解的,光纤的尖端或透明凝胶也可用于实施本文公开的检测方法。

[0085] 在某些实施方案中,本文所述的分析物检测装置的所有组成部分都包含在离心转子或盘中。例如,转子或盘可包括一个或多个反应室,多个检测缀合物位于所述反应室中。在一些实施方案中,所述检测缀合物以诸如冻干珠粒或丸粒的冻干组合物的形式存在。在一些实施方案中,所述分析物检测装置包括具有一个或多个反应室的转子或盘,其中每个反应室包含多个检测缀合物(例如,第一检测缀合物和第二检测缀合物),其中所述检测缀合物是偶联至金属纳米粒子的第一特异性结合配偶体和第二特异性结合配偶体。这种装置提供一步分析物检测测定,由此使测试样品与所述转子或盘接触,并且将离心力施加到所述转子或盘上,从而将所述测试样品递送到所述反应室,在所述反应室中,所述样品与所述第一次检测缀合物和所述第二检测缀合物混合。在所述转子或盘包括多于一个反应室的实施方案中,可以选择所述检测缀合物,使得可以在每个反应室中检测不同的分析物。如果转子包括多个反应室,则这些转子形式检测装置可以以夹心测定形式、直接竞争形式或两者配置。

[0086] 在一些实施方案中,直接竞争测定或夹心测定可以在诸如美国专利号5,061,381、美国专利号5,122,284、美国专利号5,186,844、美国专利号5,304,348、美国专利号5,457,053和美国专利号5,693,233中描述的离心转子中进行。在一些实施方案中,本公开文本提供了多重测定,其中能够进行多重分析的盘或转子允许通过例如多个比色皿进行单独检测。

[0087] 在一些实施方案中,两种配对单克隆抗体的纳米粒子缀合物或结合多于一个表位的多克隆抗体混合物作为冻干珠粒添加。溶液相LSPR测定适用于单克隆和多克隆抗体。在一些实施方案中,本公开文本提供了允许在LSPR测定中高度灵敏检测的抗体对。例如,在一些实施方案中,所述抗体对是抗TSH抗体克隆C1和C6,二者各自结合TSH的不同表位。在其他实施方案中,所述抗体对是抗TSH抗体克隆C1和5409。在一些实施方案中,使用由抗-T抗BCMASH抗体克隆5405和5409制备的金缀合物获得最佳信噪比。

[0088] 本发明还包括包含本文公开的本发明的分析物检测装置的试剂盒。在一个实施方案中,所述试剂盒包含多种检测缀合物(例如,第一检测缀合物和第二检测缀合物),其中所述检测缀合物是与本文提供的金属纳米结构连接的特异性结合配偶体。在一些实施方案中,可以将一种或多种所述检测缀合物冻干,例如,以丸粒或珠粒的形式。在一个实施方案中,将所有检测缀合物冻干。在进一步的实施方案中,所述试剂盒可包括一种或多种另外的试剂。在一些实施方案中,一种或多种另外的试剂以冻干形式提供。在一些实施方案中,所述试剂盒可包含封闭剂、糖、聚合促进剂材料、氯化钠和/或其组合。“封闭剂”是防止样品中存在的蛋白质与可检测的试剂和/或分析物结合的试剂。封闭剂典型地是蛋白质本身,可包括但不限于牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、明胶、卵清蛋白、 $\gamma$ -球蛋白和来自未免疫动物的IgG。在一些实施方案中,所述糖是多糖。在一个实施方案中,所述多糖选自麦芽糖糊精、玉米糖浆和多聚葡萄糖。在优选的实施方案中,所述多糖是麦芽糖糊精。在另一个实施方案中,所述糖是海藻糖。在一些实施方案中,所述试剂盒可包含麦芽糖糊精和海藻糖。在一些实施方案中,所述聚合促进剂材料是PEG。

[0089] 本发明的试剂盒还可包括使用所述装置检测测试样品中的分析物的指令,用于收

集生物样品的装置或工具,和/或用于从固体材料(诸如土壤、食物和生物组织)获得样品的提取缓冲液。

[0090] 如本文所述,测试样品可以是任何类型的液体样品,包括从环境或食物样品制备的生物样品或提取物。在一个特定的实施方案中,所述测试样品是生物样品。生物样品包括但不限于全血、血浆、血清、唾液、尿液、胸腔积液、汗液、胆汁、脑脊髓液、粪便物质、阴道液、精子、晶状体液、粘液、滑液、腹膜液、羊水、活检组织、唾液和细胞裂解物。所述生物样品可以从怀疑患有诸如癌症、传染病(例如,病毒感染、细菌感染、寄生虫感染或真菌感染)、心血管疾病、代谢疾病、自身免疫疾病等疾病的人类受试者或动物受试者获得。所述生物样品也可以从进行常规体检的健康受试者(例如人或动物)获得。

[0091] 在该方法的一些实施方案中,将所述测试样品与第一检测缀合物混合,随后使所述混合物与所述第二检测缀合物接触。在某些实施方案中,使所述样品、所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物同时接触。例如,所述样品与两种试剂同时接触可以在本文所述的转子形式检测装置中进行。

[0092] 如上所述,在一些实施方案中,本申请涉及与结合配偶体缀合的金属纳米结构的用途,其中所述纳米结构具有诸如尖峰或锥形突起的多个突起,并且其中所述纳米结构的平均直径为约50nm或更多。本发明人惊奇地发现,即使由于纳米棒是更好的折射率变化传感器,其预期将提供优异的性能,与使用纳米棒(具有光滑的棒形表面)相比,基于溶液的测定的灵敏度通过含有突起的纳米结构显著增强。事实上,本发明人惊奇地发现,在本文公开的基于溶液的测定中,包括具有多个突起的纳米结构的所述金属纳米结构缀合物展现出稳健的抗原检测,而纳米棒缀合物不能进行稳健的抗原检测。本发明人进一步发现,相对于具有相同突起特征的较小纳米结构,包括突起的较大纳米结构展现出更好的检测灵敏度。例如,在一些实施方案中,当测定中使用的纳米结构的平均直径从约50nm增加至约70nm时,检测灵敏度增加。在进一步的实施方案中,当测定中使用的纳米结构的平均直径从约70nm增加至约90nm时,检测灵敏度甚至更高。

[0093] 在一个实施方案中,所述溶液包含终浓度为约2%至约20%wt/vol的多糖。在另一个实施方案中,所述溶液包含终浓度为约4%至约15%wt/vol的多糖。在又一个实施方案中,所述溶液包含终浓度为约5%至约10%wt/vol的多糖。在一个示例性实施方案中,所述溶液包含终浓度为约5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或更多(包括其间的所有值)的多糖。在某些实施方案中,海藻糖可用于防止分析转子中检测缀合物的沉降。在某些实施方案中,所述海藻糖浓度为约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或更多(包括其间的所有值)。在本文所述的各种实施方案中,与在包含替代糖(例如蔗糖、海藻糖、麦芽糖糊精、山梨糖醇、甘露糖醇或聚蔗糖)的溶液中进行的测定相比,当向所述溶液中添加多糖时,可以提高测定的灵敏度。在一个示例性实施方案中,所述多糖是麦芽糖糊精。在另一个示例性实施方案中,所述多糖是海藻糖。在又一个示例性实施方案中,所述多糖是葡聚糖。

[0094] 在一个实施方案中,所述溶液包含终浓度为约0.1%至约20%wt/vol的封闭剂。在另一个实施方案中,所述溶液包含终浓度为约0.5%至约10%wt/vol的封闭剂。在又一个实施方案中,所述溶液包含终浓度为约1%至约5%wt/vol的封闭剂。在一个示例性实施方案中,所述溶液包含终浓度为约1%、2%、3%、4%或5%(包括其间的所有值)的封闭剂。在本

文所述的各种实施方案中,与在不存在封闭剂的情况下进行的测定相比,当将封闭剂添加到所述溶液中时,可以提高测定的灵敏度。在一些实施方案中,所述封闭剂选自牛血清白蛋白、酪蛋白、明胶、卵清蛋白和 $\gamma$ -球蛋白。在一个示例性实施方案中,所述封闭剂是牛血清白蛋白(BSA)。

[0095] 在一些实施方案中,所述溶液包含麦芽糖糊精、海藻糖、PEG、封闭剂(例如BSA)和/或氯化钠中的一种或多种。在示例性实施方案中,可以提供一种或多种溶液组分,例如麦芽糖糊精,作为冻干珠粒或丸粒,所述冻干珠粒或丸粒在添加液体(例如水、盐水溶液或液体生物样品)时悬浮。例如,可以在分光光度计比色皿或分析转子的反应室中提供一种或多种溶液组分,作为在添加液体后悬浮在溶液中的珠粒。

[0096] 在另外的实施方案中,通过在选自聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇和聚天冬氨酸的聚合促进剂材料的存在下将所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物与所述分析物混合,可以实质上增加LSPR信号。在一个示例性实施方案中,所述聚合物材料是聚乙二醇(PEG)。在一个实施方案中,所述反应混合物包含终浓度为约0.1mg/mL至约200mg/mL的聚合物材料,例如PEG。在另一个实施方案中,所述反应混合物包含终浓度为约0.2mg/mL至约100mg/mL的聚合物材料,例如PEG。在又一个实施方案中,所述反应混合物包含终浓度为约0.5mg/mL至约10mg/mL的聚合物材料,例如PEG。在又一个实施方案中,所述反应混合物包含终浓度为约2mg/mL至约8mg/mL的聚合物材料,例如PEG。在一个示例性实施方案中,所述反应混合物包含终浓度为约2、3、4、5、6、7或8mg/mL(包括其间的所有值)的聚合物材料,例如PEG。在一些实施方案中,可以使用不同分子量的PEG,例如,较少量的较高分子量PEG可以用于实质效果。在一些实施方案中,测定增强所需的PEG浓度随聚合物的分子量而变化。

[0097] 本发明的检测方法可用于确定靶标分析物的定性或定量的量。这些方法对于确定样品中靶标分析物的近似量特别有用,其尤其可用于诊断某些医学病症或评估药物治疗的功效。在一个实施方案中,靶标分析物的量可通过如下来确定:对于具有已知量的靶标分析物的样品,通过测量来自如本文所述的金属纳米粒子的光信号的变化来建立特定分析物的标准曲线;确定测试样品的光信号变化;并将测试样品的光信号变化与标准曲线获得的值进行比较。在一些实施方案中,确定第一试剂与第二试剂之间的复合物的量包括将来自测试样品的吸光度比和/或反应速率与来自具有已知量的复合物的一个样品的吸光度比和/或反应速率进行比较,从而确定测试样品中所述复合物的量。可以将来自测试样品获得的定量值与预定阈值进行比较,其中所述预定阈值指示所述靶标分析物的异常或正常水平。

[0098] 本发明的检测方法提供了用于检测样品中的微量靶标分析物的高度灵敏技术。在一些实施方案中,可以使用金纳米结构缀合物实现基于表面等离子体共振的信号扩增效应,使得可以在样品中检测纳克量的靶标分析物。因此,在所述方法的一个实施方案中,检测纳克量的靶标分析物的存在。在一些实施方案中,可以使用复合金属纳米结构检测缀合物来扩增来自包含金纳米粒子的检测缀合物的基于等离子体共振的信号。使用与分析物特异性抗体缀合的金包被的银纳米结构可以检测皮克量的所述靶标分析物。因此,在所述方法的一些实施方案中,检测皮克量的所述靶标分析物的存在。在所述方法的其他实施方案中,检测飞克量的所述靶标分析物的存在。通过改变复合金属纳米结构的组成和/或形状可以获得更高的灵敏度。

[0099] 当将入射光施加到金属纳米结构时,金属中的导带电子以与入射电磁波相同的频率共同振荡。由于这些共振振荡,所述纳米结构在特定波长范围内强烈吸收和散射光。对于包含贵金属或过渡金属的金属纳米结构,该波长范围在取决于纳米结构的特定组成的紫外-可见-红外光谱中。因此,用于施加适用于本发明方法的电磁能的光源可包括可应用紫外-可见光谱或紫外-可见-红外光谱内的波长范围的任何光源,包括弧光灯和激光。在一些实施例中,光源可以配备有单色仪,以便可以施加特定波长的光。

[0100] 所述金属纳米结构的光学特性取决于它们的尺寸、形状和组成。例如,固体金纳米粒子具有取决于粒径的约515nm至约560nm的吸收峰波长( $\lambda_{\max}$ )。具有30nm直径的金球形纳米粒子在约520nm处吸收最大,随着颗粒直径的增加, $\lambda_{\max}$ 移位到更长的波长。银和铜颗粒在紫外/蓝色或红色区域(例如,约350nm至约500nm)具有 $\lambda_{\max}$ ,其中粒径增加导致 $\lambda_{\max}$ 向更长波长的移位。金属纳米棒具有横向 $\lambda_{\max 1}$ 和纵向 $\lambda_{\max 2}$ 。不同金属的合金典型地在所包含的金属的吸收峰之间的中间范围内显示出吸收峰。例如,包含金和银的50/50合金的纳米结构展现出约480nm的 $\lambda_{\max}$ ,其中金的量增加导致吸收峰向更长波长的移位。可以通过改变所述纳米结构的形状或几何形状来改良LSPR信号对局部中等折射率变化的灵敏度。例如,与球体相比,非球形颗粒(例如,纳米棱柱、纳米棒、纳米壳等)对折射率的变化具有增加的LSPR敏感性。在一些实施方案中,通过改变所述检测缀合物中使用的金属纳米结构的尺寸、形状或组成,使光学特性(例如,在特定波长下的吸收/散射)适合特定应用。

[0101] 所述入射光与金属纳米结构之间的相互作用可以作为反射光或透射光来监测。被吸收或散射的入射光的量可以被测量为反射模式中的吸收光谱或透射模式中的吸收光谱。在一些实施方案中,从所述金属纳米结构测量的光信号可以是光学反射、吸收光谱、散射光谱和/或发射光谱。

[0102] 由所述结合配偶体和靶标分析物之间的复合物形成产生的检测缀合物中的金属纳米结构之间的等离子体振子耦合产生金属纳米结构的局部表面等离子体共振谱的变化。例如,这些变化可以包括增加的光学消光、增加的光学反射和/或增加的散射和/或发射信号。在一些实施方案中,指示所述样品中靶标分析物的存在的光信号的变化包括光散射的移位、增加或降低或这些特征的组合。在某些实施方案中,指示所述样品中靶标分析物的存在的光信号的变化是谱峰波长移位。在某些其他实施方案中,指示所述样品中靶标分析物的存在的光信号的变化是在除峰之外的位置处的波长移位。例如,指示所述样品中靶标分析物的存在的光信号的变化可以是中点光谱波长移位、波长基底处的光谱波长移位或者诸如差异光谱等的总光谱波长移位。在一个实施方案中,所述光谱峰中的波长移位可以是200nm至1200nm光谱窗内的红移(例如,移位到较长波长)。在另一个实施方案中,所述光谱峰中的波长移位可以是200nm至1200nm光谱窗内的蓝移(例如,移位到较短波长)。可以在设定的反应时段之后的特定时间点测量光信号的变化。另外或可替代地,可以测量反应周期内光信号的变化(例如,速率确定)。两种类型的测量均可用于靶标分析物的定性或定量分析。

[0103] 用于测量不同波长的光信号并获得消光、散射或发射光谱的各种装置在本领域中是已知的。任何分光光度计或光度计仪器都适用于所公开的方法。一些非限制性实例包括平板读取器、Cobas Fara分析仪和Piccolo xpress<sup>®</sup>和Vetscan分析仪(加州联合市Abaxis公司)、光纤读取器(例如,LightPath<sup>™</sup> S4(加州门洛帕克LamdaGen))、SPR仪器(例如,GE

Healthcare提供的Biacore仪器)、Olympus和Hitachi等的离心分析仪。

[0104] 本发明还包括测定复合物,所述测定复合物包含(i)第一检测缀合物,所述第一检测缀合物包括本文提供的金属纳米结构,所述金属纳米结构具有多个突起并偶联至结合配偶体,(ii)靶标分析物,和(iii)第二检测缀合物,所述第二检测缀合物包括根据本公开文本的金属纳米结构,所述金属纳米结构与结合配偶体偶联,其中第一检测缀合物中的结合配偶体与靶标分析物上的第一表位结合,并且第二检测缀合物中的结合配偶体与靶标分析物上的第二表位结合,从而形成包含第一检测缀合物、靶标分析物和第二检测缀合物的复合物。在一些实施方案中,所述测定复合物包含在适配为与离心转子一起使用的比色皿中。在其他实施方案中,所述测定复合物包含在离心转子或盘中的反应室内。

[0105] 可以使用本发明的方法、装置和测定复合物检测任何类型的靶标分析物,特别是那些在疾病诊断中重要的靶标分析物。靶标分析物可包括但不限于蛋白质、酶、抗原、抗体、肽、核酸(RNA,DNA,mRNA,miRNA)、激素、糖蛋白、多糖、毒素、病毒、病毒粒子、药物分子、半抗原或化学品。在一些实施方案中,所述靶标分析物是与人和/或动物中的传染病相关的标记物或抗原。在其他实施方案中,所述靶标分析物是与特定生理状态或病理状况相关的标记物或抗原。

[0106] 在某些实施方案中,所述靶标分析物是病原性抗原或者是病原性抗原的抗体。例如,所述病原性抗原可以是病毒抗原(例如猫白血病毒、犬细小病毒、口蹄疫病毒、流感病毒、甲乙丙型肝炎病毒、HIV病毒、人乳头瘤病毒、EB病毒和狂犬病病毒等)、细菌抗原(例如,埃立克体属(*Ehrlichia*)、疏螺旋体属(*Borrelia*)、无形体属(*Anaplasma*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和立克次体属(*Rickettsia*)等)、真菌抗原或寄生虫抗原(例如,犬心丝虫、蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、恶性疟原虫(*plasmodium falciparum*)、非洲锥虫病和布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)等)。在具体的实施方案中,所述细菌抗原可以来自犬埃立克体(*Ehrlichia canis*)、查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*)、伊氏埃立克体(*Ehrlichia ewingii*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、扁平无形体(*Anaplasma platys*)、嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)和立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)。在其他实施方案中,所述靶标分析物是疾病相关抗原或者是疾病相关抗原的抗体。疾病相关抗原包括但不限于癌症相关抗原或标志物(例如,PSA、AFP、CA125、CA15-3、CA19-9、CEA、NY-ESO-1、MUC1、GM3、GD2、ERBB2等)、心血管疾病相关抗原或标志物(例如肌钙蛋白、C-反应蛋白、脑利钠肽、CKMB、脂肪酸结合蛋白等)、代谢相关抗原或标志物(如甲状腺刺激素、甲状腺素、瘦素、胰岛素)或自身免疫疾病相关抗原或标记物(例如,自身抗体)。在某些实施方案中,所述靶标分析物是炎性抗原或标记物(例如,C-反应蛋白、MRP14、MRP8、25F9等)。在其他实施方案中,所述靶标分析物是妊娠相关抗原或标记物(例如胚胎抗原、人绒毛膜促性腺激素)。

[0107] 在一些实施方案中,本公开文本提供用于合成本文提供的纳米结构的方法。在某些实施方案中,通过连续添加预定量的以下试剂并充分混合,在单个容器中合成银/金纳米粒子:(1)表面活性剂(例如,离子型[阴离子、阳离子或两性离子]或非离子型)或封端剂诸如3-((3-胆酰胺丙基)二甲氨基)-1-丙磺酸盐(CHAPS)、SDS、Tween、Triton或任何磺基甜菜碱洗涤剂,(2)氯化金,(3)水,(4)硝酸银,(5)柠檬酸三钠,并且最后添加(6)抗坏血酸以引

发纳米粒子的形成。在其他实施方案中,通过以下列顺序添加预定量的下列物质在单个容器中合成所述纳米粒子:(1)表面活性剂或封端剂诸如CHAPS、SDS、Tween、Triton、CTAB或任何磺基甜菜碱洗涤剂,(2)氯化金,(3)硝酸银,(4)柠檬酸三钠,(5)水和(6)还原剂。在一些实施方案中,所述还原剂由CHAPS、抗坏血酸、柠檬酸三钠和水组成。在进一步的实施方案中,所述还原剂由约200mg CHAPS、约4g抗坏血酸、约117.6mg柠檬酸三钠和约15.68g水组成。在一些实施方案中,将约1mL的1% (wt/wt) CHAPS依次与约0.25mL的0.1M氯化金、约0.5mL的0.02M硝酸银、约0.05mL的1M柠檬酸三钠、约6.2mL的水和约2mL的还原剂混合。改变各种活性成分(诸如金属盐、封端剂、还原剂)的浓度和溶液的pH导致不同的颗粒类型(例如,纳米球、纳米星型体或纳米棒)和纳米粒子的不同组成。

[0108] 在一些实施方案中,通过依次混合水、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、氯化金,抗坏血酸和预形成的金纳米球种子来形成纳米星型体。在进一步的实施方案中,依次混合约0.825mL水、约0.1mL 20%CTAB、约0.025mL 0.1M氯化金、约0.05mL 1M抗坏血酸和约0.05mL金纳米球种子。所述种子的年龄和种子与金属离子的比例影响几何结构,从而影响纳米粒子的光谱。通过使用由约200mg CHAPS,约4g抗坏血酸,约117.6mg柠檬酸三钠和约15.68g水组成的还原剂还原氯化金来制造仅含金的纳米星型体。形成的纳米星型体的大小取决于氯化金的浓度。通过该方法制备的金纳米星型体可以通过离心纯化并储存在2°C-8°C的水中。

[0109] 使用本文提供的方法形成纳米材料基本上在几分钟内完成,但可以过夜达到平衡。纳米粒子的合成可以通过光谱监测并通过扫描或透射电子显微镜确认。

[0110] 在一些实施方案中,可通过改变表面活性剂或封端剂、抗坏血酸、柠檬酸三钠、氯化金和/或硝酸银的浓度来改变尺寸并因此改变光学特性。合成的纳米星型体的尺寸随着银含量的增加而增加到一定程度然后降低。这些变化反映在合成的纳米星型体的LSPR峰中,因为峰在银/金比率增加时发生红移,但然后在金:银::5:2的摩尔比下开始蓝移。所选择的洗涤剂在反应混合物中的终浓度可以从0.05%-5%变化,较小的颗粒在较高浓度的洗涤剂中占优势。增加抗坏血酸的浓度产生较小的纳米星型体,抗坏血酸的终浓度在0.05至0.2M之间变化。类似地,将柠檬酸三钠的浓度从10mM增加到100mM会降低纳米星型体的尺寸。

[0111] 在一些实施方案中,金-银纳米合金可以在碱性还原条件下通过将CTAB(例如,溶解在醇中的CTAB)与氯化金和硝酸银混合来合成。在一些实施方案中,可以通过依次混合水、CTAB、氯化金(0.5mM至5mM)、硝酸银(20%至80%的金)、抗坏血酸(10mM至200mM)或含有抗坏血酸、柠檬酸三钠和CHAPS的还原剂,和NaOH(50%至200%的抗坏血酸)来诱导纳米合金的形成。在进一步的实施方案中,通过混合约0.825mL水、约0.1mL在异丙醇中制备的20%CTAB、约0.025mL 0.1M氯化金、约0.005-0.025mL 0.1M硝酸银、约0.05mL 1M抗坏血酸和约0.05mL 1M NaOH来形成纳米合金。CTAB的浓度可以在0.05M至0.2M之间变化,较低的浓度有利于合成的更高含量的纳米星型体。酸性pH有利于纳米棒的形成,并且在降低的pH下获得更高的纵横比。

[0112] 通过以下不应解释为限制的附加实施例进一步说明本发明。根据本公开文本,本领域技术人员将理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所公开的具体实施方案进行许多改变并仍然获得相同或相似的结果。

[0113] 贯穿本公开文本的所有专利和非专利文献均出于所有目的通过引用以其整体并

入本文。

[0114] 实施例

[0115] 实施例1.用于缀合到纳米结构的抗体克隆的滴定

[0116] 进行研究以鉴定用于将具有多个尖峰的纳米结构缀合至示例性抗体的方案。首先,进行滴定实验以将抗TSH克隆C1滴定到纳米结构中,以确定最佳缀合所需的抗体量。

[0117] 将所述反应物设置于1ml比色皿中,所述比色皿置于Lambda950分光光度计中。在用10微升0.5M硼酸盐(pH 9.2)将pH调节至9.2后,将1ml所述纳米结构置于所述比色皿中。记录光谱,其显示 $\lambda_{\max}$ 为573.8nm。通过观察连续添加2 $\mu$ g抗体时的峰移来确定抗体C1的结合。达到每OD单位约6-8微克抗体的等当点。最后添加10微升20%BSA以阻断非特异性结合事件。这导致 $\lambda_{\max}$ 额外的2nm移位。结果在图2中给出。

[0118] 类似地,进行滴定实验以确定缀合C6(对TSH的不同表位具有特异性)抗体所需的抗体量。对于C1抗体,将反应物设置于1ml比色皿中,所述比色皿置于Lambda950分光光度计中。在用10微升0.5M硼酸盐(pH9.2)将pH调节至9.2后,将1ml具有多个尖峰的所述纳米结构置于所述比色皿中。记录光谱,其显示 $L_{\max}$ ( $\lambda_{\max}$ )为573.7nm。通过观察连续添加2 $\mu$ g所述抗体后的峰移来确定抗体C6的结合。达到每OD单位约6微克抗体的等当点。最后,添加10微升20%BSA。这导致 $\lambda_{\max}$ 额外的1.4nm移位。结果在图3中给出。

[0119] 接下来,为了确定缀合的可扩展性,进行C1和C6抗体与所述纳米结构的大规模(100ml)缀合。结果在图4中给出。在该制备中,将约0.5mg的C1和C6分别添加到两个容器中,每个容器含有在快速搅拌下预调节至pH 9.2的100ml的纳米结构溶液。在用BSA封闭之前和之后,测试如此产生的缀合物溶液的抗体结合。将用0.5mg/ml蛋白质A条纹化的条带浸入用磷酸盐缓冲BSA和Tween溶液稀释的缀合物溶液中。得到的线路(1和6)指示C1或C6与纳米结构结合,并且所述抗体在BSA封闭后保持结合(1B和6B)。

[0120] 通过离心回收C1和C6缀合物,用缀合物稀释剂洗涤一次并再次离心。含有缀合物的沉淀物易于溶解在含有PBS/BSA/CHAPS的缀合物储存溶液中。在水中制备最终缀合物的稀释液并进行比较。原始未缀合的纳米结构在573.8nm处具有峰,所述峰在封闭的缀合物中红移至585-586nm。在图5中示出移位。可在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C储存最终的缀合物溶液直至使用。

[0121] 实施例2.通过吸附缀合方案将纳米结构与抗体缀合

[0122] 为了产生纳米结构缀合物,将具有多个突起和平均直径为50nm的纳米结构( $\lambda_{\max}$ 在575nm-1.00D/mL)用0.1M硼酸盐调节至pH 8.8。滴定C1或C6抗体(每个OD纳米结构约33皮摩尔)并充分混合15分钟。添加2mg BSA/ml并再混合15分钟。将纳米结构/C1或/C6混合物15,000g下离心10分钟;去除上清液;将所述缀合物重悬于包含PBS/BSA和CHAPS的缀合物稀释剂CG-1P中。CHAPS对于重悬C6抗体特别重要,所述C6抗体是疏水的。此外,所述CHAPS洗涤剂有助于防止非特异性尺寸/形状变化导致聚集。

[0123] 图6显示使用吸附方案产生的缀合物的谱移,所述缀合物为:(i)缀合前的50nm纳米结构;(ii)与C1抗体缀合的50nm纳米结构;(iii)与C6抗体缀合的50nm纳米结构;(iv)用BSA封闭后的缀合C1的纳米结构;和(v)用BSA封闭后的缀合C6的纳米结构。该研究表明抗体结合导致4-5nm红移,并且在用BSA封闭缀合物时诱导1nm的额外移位。

[0124] 为了证实所述抗体分子与所述纳米结构结合,将用蛋白质A(0.5mg/mL)条纹化的侧向流条带浸入含有所述缀合纳米结构或者用BSA封闭的缀合纳米结构的溶液中。图7显示

形成所述缀合物并且BSA封闭不破坏所述缀合物

[0125] 实施例3.通过巯基介导的缀合方案将纳米结构与抗体缀合

[0126] 为了使用巯基介导的缀合方案产生纳米结构缀合物,将具有多个突起和平均直径为50nm的纳米结构( $\lambda_{\max}$ 在575nm-1.00D/mL)用0.1M硼酸盐调节至pH 8.8。滴定TCEP还原的C1或C6抗体(每个OD纳米结构约33皮摩尔)并充分混合15分钟。添加2mg BSA/ml并再混合15分钟。将纳米结构/C1或/C6混合物15,000g下离心10分钟;去除上清液;将所述缀合物重悬于包含PBS/BSA和CHAPS的缀合物稀释剂CG-1P中。CHAPS对于重悬C6抗体特别重要,所述C6抗体是疏水的。此外,所述CHAPS洗涤剂有助于防止非特异性尺寸/形状变化导致聚集。

[0127] 图8显示了使用巯基介导的缀合方案产生的缀合物的谱移,所述缀合物为:(i) 缀合前的50nm纳米结构;(ii) 与C1抗体缀合的50nm纳米结构;(iii) 与C6抗体缀合的50nm纳米结构;(iv) 用BSA封闭后的缀合C1的纳米结构;和(v) 用BSA封闭后的缀合C6的纳米结构。该研究表明抗体结合导致4-5nm红移,并且在用BSA封闭缀合物时诱导1nm的额外移位。

[0128] 为了证实所述抗体分子与所述纳米结构结合,将用蛋白质A(0.5mg/mL)条纹化的侧向流条带浸入含有所述缀合纳米结构或者用BSA封闭的缀合纳米结构的溶液中。图9显示形成缀合物并且BSA封闭不破坏缀合物。

[0129] 实施例4.使用抗体缀合的纳米结构进行灵敏抗原检测。

[0130] 测试了所述缀合物检测抗体存在的能力。在不存在和存在TSH的情况下,C1和C6吸附缀合物的复合 $\lambda_{\max}$ 的变化。抗TSH克隆C1和C6购自Arista Biologicals。这些抗体靶向TSH的 $\beta$ 片段。将缀合至50nm纳米结构的克隆C1和C6在PBS/BSA缓冲液中混合在一起,并扫描 $\lambda_{\max}$ 的变化250秒,以在Nicoya™ lifesciences的OpenSPR分光光度计上获得基线。然后添加TSH至5ng/ml并监测 $\lambda_{\max}$ 额外450秒。图10A显示使用50nm纳米结构和吸附方案产生的C1和C6缀合物的复合 $\lambda_{\max}$ 的变化。图10B显示使用50nm纳米结构和巯基介导的缀合方案产生的C1和C6缀合物的复合 $\lambda_{\max}$ 的变化。

[0131] 接下来,评估了促进剂的存在对由吸附和巯基介导的方案制备的缀合物的谱移的影响。该研究的结果显示,不同浓度的促进剂在吸附方案缀合物中提供与巯基介导的共价连接的缀合物不同的响应。例如,较低分子量和较低浓度的PEG产生的来自吸附缀合物的响应与共价连接的缀合物相似(图11)。

[0132] 图12.显示在增加量的抗原(TSH)的存在下,使用在0.1%PEG和0.5%甲基纤维素的存在下共价连接的缀合物,随时间的剂量-响应曲线和动力学。图12显示在0.1%聚乙二醇和0.5%甲基纤维素的存在下抗TSH C1和C6的共价连接的缀合物的峰移剂量响应。

[0133] 接下来,进行研究以确定对所用缀合物(例如,C1纳米结构和C6纳米结构)的比率的影响。图13显示从单独的C1或C6或者从各种比例的所述两种抗体获得的结果。在不存在(0ng)或存在0.25ng hTSH的情况下获得反应曲线。在该特定测定中,所述克隆C1本身基本上是非反应性的,但是一旦引入C6就作出显著贡献。不希望受理论束缚,在一些实施方案中,测定取决于3D纳米粒子集合体的形成;并且离子强度、pH和洗涤剂的适当变化可以提供灵敏度的额外增强。

[0134] 在另一项研究中,将两种缀合物(15 $\mu$ l的C1和25 $\mu$ l的C6)与含有0-2ng TSH的PBS/BSA/PEG 8K溶液混合。所述反应混合物中PEG的终浓度为0.5%(图14A)或1.0%(图14B)。将所述反应混合物的组分(0.8ml)置于一次性比色皿中以记录使用Nicoya的OpenSPR™光谱仪

测量的 $\lambda_{\max}$ 的变化。然后使用回归分析拟合在这些实验中获得的曲线。如图14A和14B所示，从回归分析计算10分钟的 $\lambda_{\max}$ 变化并绘图以产生曲线。PEG浓度从0.5% (图14A) 增加到1% (图14B) 使灵敏度增加到几乎2倍。

[0135] 实施例5. 具有多个尖峰并且平均直径为70或90nm的较大的纳米结构

[0136] 使用具有多个尖峰并且平均直径为70或90nm (包括尖峰) 的纳米结构测试了缀合和检测。图15A (上图) 显示抗hTSH抗体C1和C6与70nm和90nm纳米结构的缀合以及它们在蛋白质A侧向流条带上的反应性。图15B (下图) 显示在用BSA封闭之前和之后，硝酸纤维素上的蛋白质A线路如预期反应。未缀合的70和90nm纳米结构分别显示 $\lambda_{\max}$ 为609.5和641.9。C1和C6的附接及随后用BSA封闭导致 $\lambda_{\max}$ 中高达8nm的移位。下表显示了图15A中的量化数据。

[0137] 表1. 在存在或不存在BSA封闭的情况下70和90nm C1和C6缀合物的 $\lambda_{\max}$

	nm	光标
[0138] 70 nm未缀合的	609.5	1.034
70-C1 缀合物	614.3	1.05
70 nm未缀合的	609.6	1.034
70-C6 缀合物	615.1	1.057
90 nm未缀合的	641.9	1.063
90-C1 缀合物	647.3	1.055
90 nm未缀合的	641.9	1.041
90-C6 缀合物	647.6	1.068
70-C1-BSA	617	1.074
70-C6-BSA	617.7	1.089
90-C1-BSA	650.2	1.131
[0139] 90-C6-BSA	650.1	1.107

[0140] 比较了不同直径的纳米结构之间的灵敏度。与直径为约90nm的缀合物相比，包括约70nm直径纳米结构的缀合物的谱移得到改善。引人注目的是，因为直径增加至90nm产生的纳米结构-缀合物能够产生大于15nm的净谱移，进一步将所述纳米结构的直径增加至约90nm导致灵敏度进一步提高 (图16和图17)。总之，研究表明，具有多个尖峰的所述纳米结构的直径的增加导致检测灵敏度增加。此外，观察到增加PEG提高了灵敏度，一直到某一PEG浓度，而非常高的浓度会适得其反。

[0141] 实施例6. 在基于溶液的测定中具有多个突起对比纳米棒的纳米结构的活性

[0142] 进行研究以比较本文提供的包括多个突起的纳米结构缀合物与包含相同抗体的纳米棒缀合物的检测灵敏度。

[0143] 从Nanocomposix获得纳米棒 (长度为 $45.5 \pm 6.3$ nm, 宽度为 $17.4 \pm 1.2$ nm), 并通过

吸附缀合方案与抗体克隆1和6缀合。如上所述,还在硼酸盐缓冲液中使用pH 9.2的被动吸附,将包括多个突起的50nm纳米结构与抗体克隆1和6缀合。研究结果在图18中给出。在包含PBS、BSA和1%PEG 20000的缓冲液中,在添加或不添加10ng TSH的情况下测试纳米棒缀合物检测TSH的能力。图18显示 $\lambda_{\max}$ 没有净变化,这是通过从不用TSH的值中减去用TSH获得的值来计算的;使用Nicoya Lifesciences的OpenSPR™记录 $\lambda_{\max}$ 变化。类似地测试具有多个突起的纳米结构,但TSH的量为0.5ng,因为TSH浓度为10ng/ml时速率太快。引人注目的是,通过峰移分析测量,包含多个突起的纳米结构展现出稳健的TSH检测,而纳米棒未能检测到TSH。该结果是出乎意料的,至少是因为纳米棒被认为是折射率变化的优异传感器。然而,在基于溶液的本测定中,具有多个突起而非纳米棒的纳米结构展现出优异的效果。

[0144] 实施例7. 低pH缀合方案产生展现出灵敏检测的缀合物

[0145] 进行研究以评估使用纳米结构形成的缀合物的能力,所述纳米结构包括在较低pH下与抗体缀合的多个突起。

[0146] 将抗TSH抗体克隆C1和C6缀合至通过单个容器无种子方法制备的金纳米星型体。用蒸馏水将所述纳米星型体稀释至OD=1。所述pH为大约6.0。将克隆1和6分别添加至所述纳米星型体溶液中,以获得每OD纳米星型体溶液5 $\mu$ g所述抗体。孵育15分钟后,用每毫升缀合物2mg BSA封闭所述缀合物。然后通过25000g离心15分钟将所述缀合物与反应物分离。如果通过添加10mM磷酸盐缓冲的BSA(1%)使所述粒料松散,则可以重复离心。将最终沉淀物溶于含有以下CHAPS的缓冲液中:PBS(1x)、BSA(1%)和CHAPS(2%)。通过超声处理可以帮助溶解达30秒。

[0147] 通过用PBS/BSA(PBS中的1%BSA)稀释最终的C1(3份)和C6(1份)缀合物至OD为约0.5,并在OpenSPR™光谱仪上记录存在或不存在1ng/ml TSH的随时间的峰移,测试这些缀合物检测TSH的能力。结果显示在图19中,其显示净移位(通过从1ng/ml TSH引起的移位中减去在没有任何TSH的情况下看到的移位来计算所述净移位),相对于反应时间作图。该研究显示所述缀合物展现出稳健的检测活性。

[0148] 实施例8. 血清蛋白的非特异性吸附的同时降低和免疫测定灵敏度的增加

[0149] **Biolipidure®**试剂是合成聚合物试剂,所述合成聚合物试剂含有磷酸胆碱(PC)极性基团,以及含有疏水性、阴离子、阳离子和/或氢键供给基团的聚合物尾部(图20)。这些试剂也称为2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱聚合物(MPC),由于其抵抗非特异性蛋白质吸附、细胞粘附和血液凝固的特性,所述试剂已被掺入到聚合物生物材料中。这些试剂的一些特征包括提高灵敏度和准确度,抑制非特异性吸附,稳定抗体和酶,减少批次之间的差异而没有生物危害处理的麻烦。

[0150] 对于许多应用,将**Biolipidure®**试剂添加到最终工作溶液中,以实现所需的产品结果。为了防止免疫测定中的非特异性吸附,**Biolipidure®**试剂可以通过包被微孔板、包被磁珠和添加到溶液中存在的抗体来施用。在一些实施方案中,可以通过制备具有1wt% **Biolipidure®**试剂的缓冲溶液来使用**Biolipidure®**试剂;将样品(例如,粘膜)溶解在缓冲液中,并将稀释的样品加载到免疫层析仪的样品垫上。

[0151] 令人惊讶的是,当在被动IgG吸附的封闭阶段添加到金纳米粒子的表面时,**Biolipidure®**试剂可以减少血清蛋白的非特异性吸附,并增强测定的灵敏度。简而言之,

用小鼠IgG包被金纳米球15分钟,随后用Biolipidure®封闭剂205、206、1002、1003、1201、1202或BSA之一包被15分钟。将所述抗体-金缀合物洗涤3次并悬浮在缀合物稀释剂中用于储存,之后进行测试。为了测试与BSA缀合物相比,Biolipidure®缀合物对抗原的敏感度,在10分钟过程中,在缓冲液、tris缓冲盐水/牛血清白蛋白(TBS BSA)中用500pg/mL抗原测试所述缀合物。令人惊讶的是,5/6Biolipidure®封闭的缀合物显示出超出标准BSA封闭的缀合物2-3倍的增强。结果在图21中示出。

[0152] 更令人惊讶的是,当测试血清样品中的非特异性蛋白质吸附时,与标准BSA缀合物相比,Biolipidure®封闭具有降低NSB的能力。所有Biolipidure®缀合物均使用经验证具有低/正常TSH水平的相同犬血清样品进行测试。将所述血清样品在TBS/BSA中稀释1/20,并且监测它们相对于时间的波长变化。如图22A所示,Biolipidure试剂1003响应于向所述纳米粒子缀合物中添加血清而显示出大的10nm波长移位。该移位比所有其他缀合物大约3-4倍,因此将该移位移除以清楚地观察其他缀合物的波长移位(图22B)。响应于添加犬血清,BSA封闭的IgG缀合物在10分钟过程中的波长移位为约3.5nm。Biolipidure®缀合物1202显示出与BSA封闭的缀合物相似的波长移位。在犬血清的存在下,用205、206、1002和1201封闭的缀合物均显示波长移位的降低。

[0153] 由于Biolipidure®试剂的不同特性,它们对犬血清具有不同的响应,并增强了夹心免疫测定的灵敏度。Biolipidure®试剂205、206、1002和1201均显示出能够减少犬血清的波长移位,并且在均相夹心免疫测定中改善响应抗原的LSPR移位的能力。Biolipidure®试剂1202能够改善对抗原的响应,而响应于向样品中添加犬血清的波长移位等同于所述BSA缀合物的波长移位。

[0154] 抗原检测的灵敏度的增加和犬血清的非特异性波长移位的降低不限于球形纳米粒子。当将Biolipidure试剂添加到所述IgG缀合物的表面时,所述抗体缀合物对抗原的敏感度增加,并且与BSA封闭的缀合物相比,响应于添加血清的波长移位显著降低(图23)。Biolipidure®试剂1002封闭的90nm海胆状纳米结构(即表面上包括多个突起的各向异性纳米粒子)缀合物的响应显著增加,对于1ng/ml的抗原(稀释20倍至50pg/ml的犬抗原),响应增加2倍(图24)。这些缀合物也比用Biolipidure®1002封闭的球形金缀合物灵敏得多。

[0155] 该研究的结果提供了一种令人惊讶的用于增加测定中的灵敏度同时降低非特异性结合的方法。在金纳米粒子-抗体被动缀合过程中,从BSA到一些Biolipidure®试剂改变所述封闭剂导致在缓冲条件下对抗原的波长移位显著增加,并且响应于向所述缀合物添加血清而波长移位降低,指示来自血清组分的非特异性吸附可能降低。

[0156] 实施例9. 盐组合和EDTA减少非特异性结合

[0157] 进行研究以确定LSPR测定中非特异性结合的原因和减少非特异性结合的途径。非特异性结合可能是由于金缀合物与大血清蛋白之间的静电或疏水相互作用。最初的研究集中在NaCl。基于Hofmeister理论,进行实验以确定MgCl<sub>2</sub>或NaSCN是否可有益于防止蛋白质聚集。此外,离液盐可能对金缀合物胶体稳定性产生影响。在图25中给出霍夫梅斯特系列系列盐的示意图。

[0158] 使用离液盐MgCl<sub>2</sub>的初步研究显示有希望的结果。没有盐的情况下,正常的犬血清

样品产生显著的非特异性结合。具有50-100mM MgCl<sub>2</sub>的情况下,非特异性结合信号急剧减少(图26)。5分钟后的LSPR峰移结果如下表2所示。MgCl<sub>2</sub>的存在不成比例地降低了非特异性结合和5ng/ml LSPR信号。

[0159] 表2. 在存在或不存在MgCl<sub>2</sub>的情况下的LSPR峰移

[0160]	缓冲液	2.5ng/ml	5ng/ml	Kilo	Mister
	PBS-BSA	.	0.980	3.888	.
	PBS-BSA100mM MgCL2	.	0.552	0.285	.
	PBS-BSA50mM MgCL2	0.448	0.875	0.334	0.322
	PBS-BSAREP2	.	1.035	3.070	.

[0161] 在另一项研究中,评估了其他离液盐对80nm纳米球cTSH缀合物的影响。测试MgCl<sub>2</sub>、NaCl和NaSCN。MgCl<sub>2</sub>和NaSCN均展现出非特异性结合的减少(图27)。在图28和下面的表3中提供5分钟后的LSPR峰移结果。

[0162] 表3. 在NaCl、MgCl<sub>2</sub>或NaSCN存在下的LSPR峰移

浓度mM	NaCl			MgCL2			NaSCN		
	5ng/ml	Kilo	S/B	5ng/ml	Kilo	S/B	5ng/ml	Kilo	S/B
[0163] 0	0.940	4.085		0.940	4.085		0.940	4.085	
50	0.975	1.561	0.625	0.566	0.190	2.981	0.726	0.263	2.755
100	0.674	0.454	1.486	0.303	0.199	1.525	0.404	0.184	2.196
200	0.599	0.304	1.970	0.117	-0.010		0.172	0.168	1.021

[0164] 在另一项研究中,使用非常低的混合样品(在TBS缓冲液中<100pg/ml cTSH)和高样品(在TBS缓冲液中10ng/ml)来证实Mg(II)的存在在基于LSPR的犬TSH测定中对非特异性结合的有益效果。在0mM MgCl<sub>2</sub>的存在下,极低和高cTSH样品的波长移位是相同的(图29,左上图)。在渐增浓度的MgCl<sub>2</sub>(1mM、10mM或100mM,分别在图29的右上图,左下图和右下图中)的情况下,极低样品中的波长移位减小。因此,该研究证实,当以100mM存在时,Mg(II)实质上减少了非特异性结合(图29)。为了理解Mg(II)对LSPR信号的影响的机理,进行了第二个实验,其中使用EDTA(螯合剂)。令人惊讶的是,EDTA显示出与Mg(II)类似的效果(图30)。更令人惊讶的是,EDTA和Mg(II)一起似乎没有相互抵消。尤其令人惊讶至少是因为预计EDTA会螯合Mg(II)并导致Mg(II)失去其作用。因此,该研究表明,Mg(II)任选地与其他霍夫梅斯特系列盐以及EDTA或乙二醇-双(β-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)的组合完全控制基于LSPR的测定中的非特异性结合。在使用球形纳米结构或在表面上包含多个突起的纳米粒子的研究中实现了这些令人惊讶的结果。

[0165] 应当理解,所公开的发明不限于所描述的特定方法、方案和材料,因为这些可以变化。还应理解,本文所用术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且并非旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求书限制。

[0166] 本领域的技术人员仅使用常规实验就将认识到或能够确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等同方案。此类等同物旨在被以下权利要求书涵盖。

[0167] 除非另外定义,否则本文中的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然在本发明的实践或测试中可以使用与本文所述的那些方法和材料类似或等效的任何方法和材料,但本文描述了优选方法和材料。引用的所有出版物、专利和专利出版物出于所有目的通过引用以其整体并入本文。

[0168] 提供本文所讨论的出版物仅仅是因为它们公开的公开在本申请的提交日期之前。本文中的任何内容都不应视为承认本发明因在先发明而无权早于此类出版物。

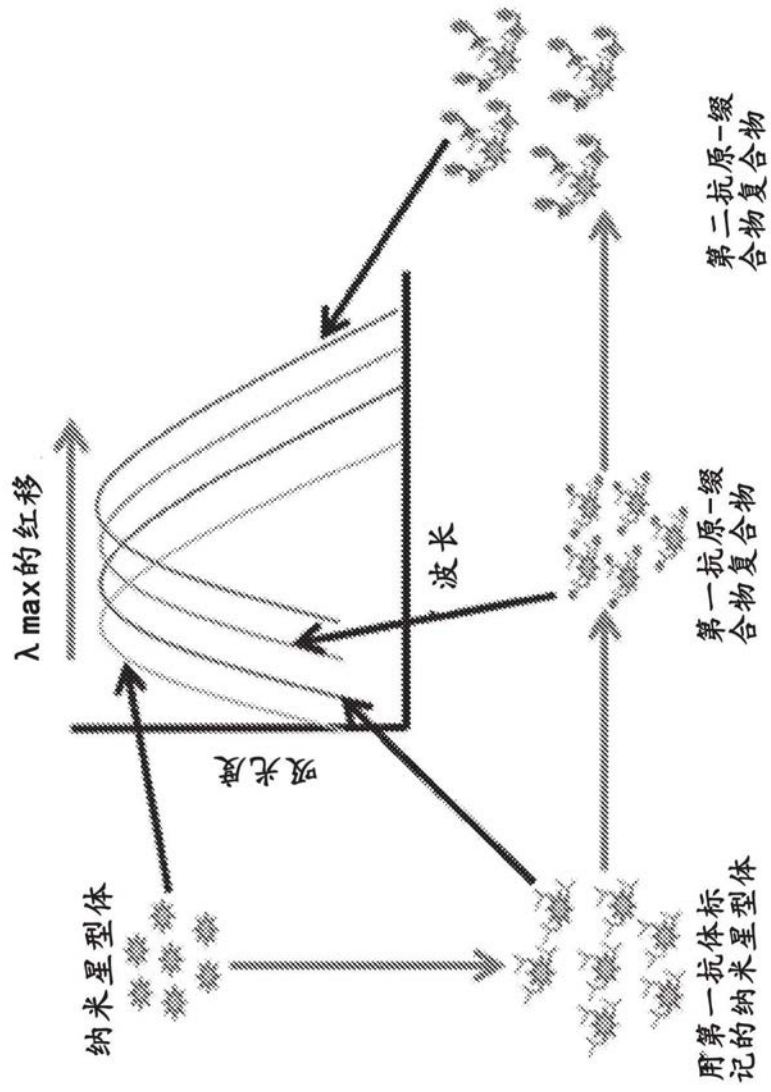
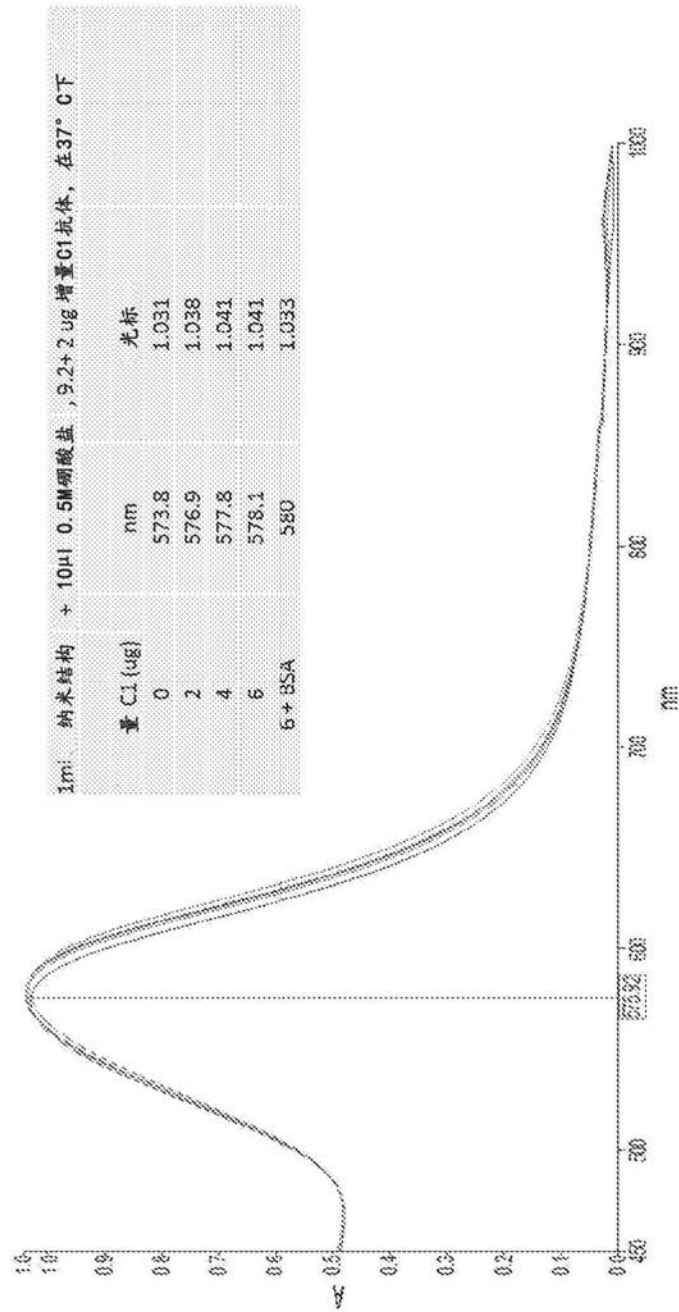


图1

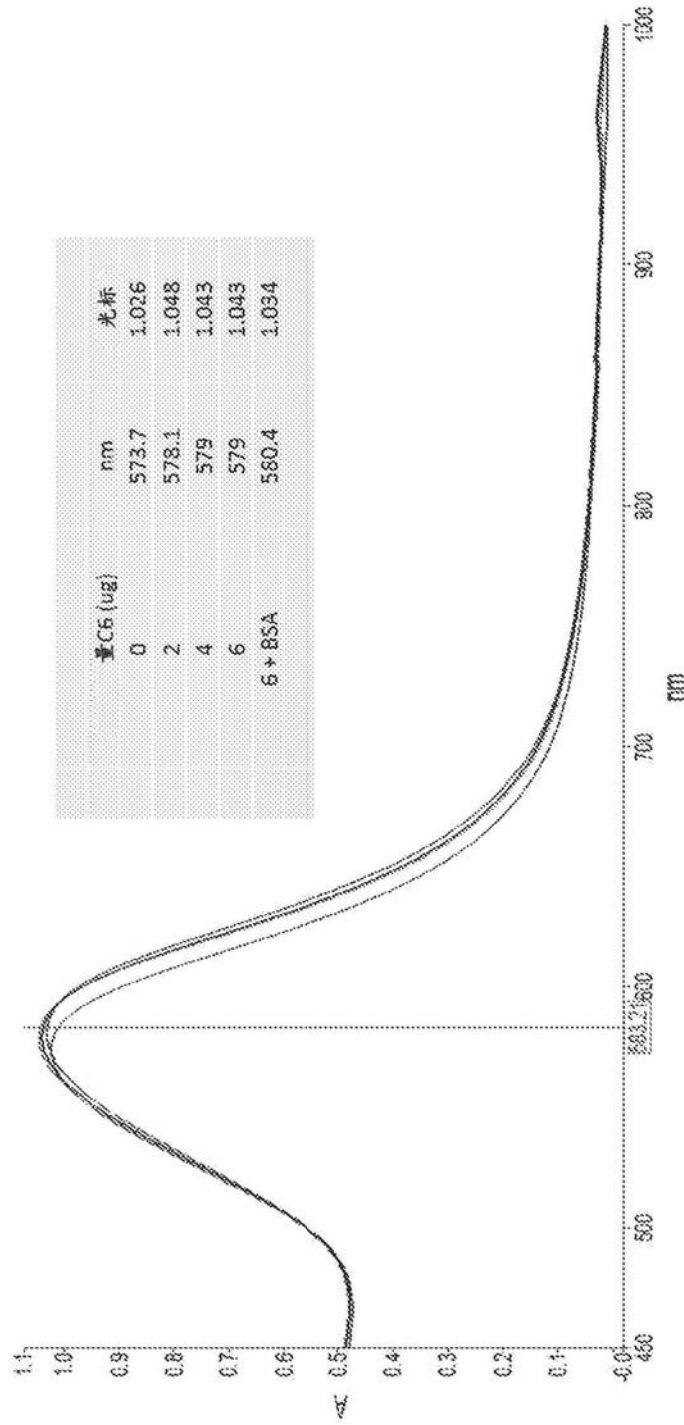
### 将C1滴定到纳米结构中



4-6  $\mu$ g 抗体/OD

图2

将C6滴定到纳米结构中



4-6 μg 抗体/OD

图3

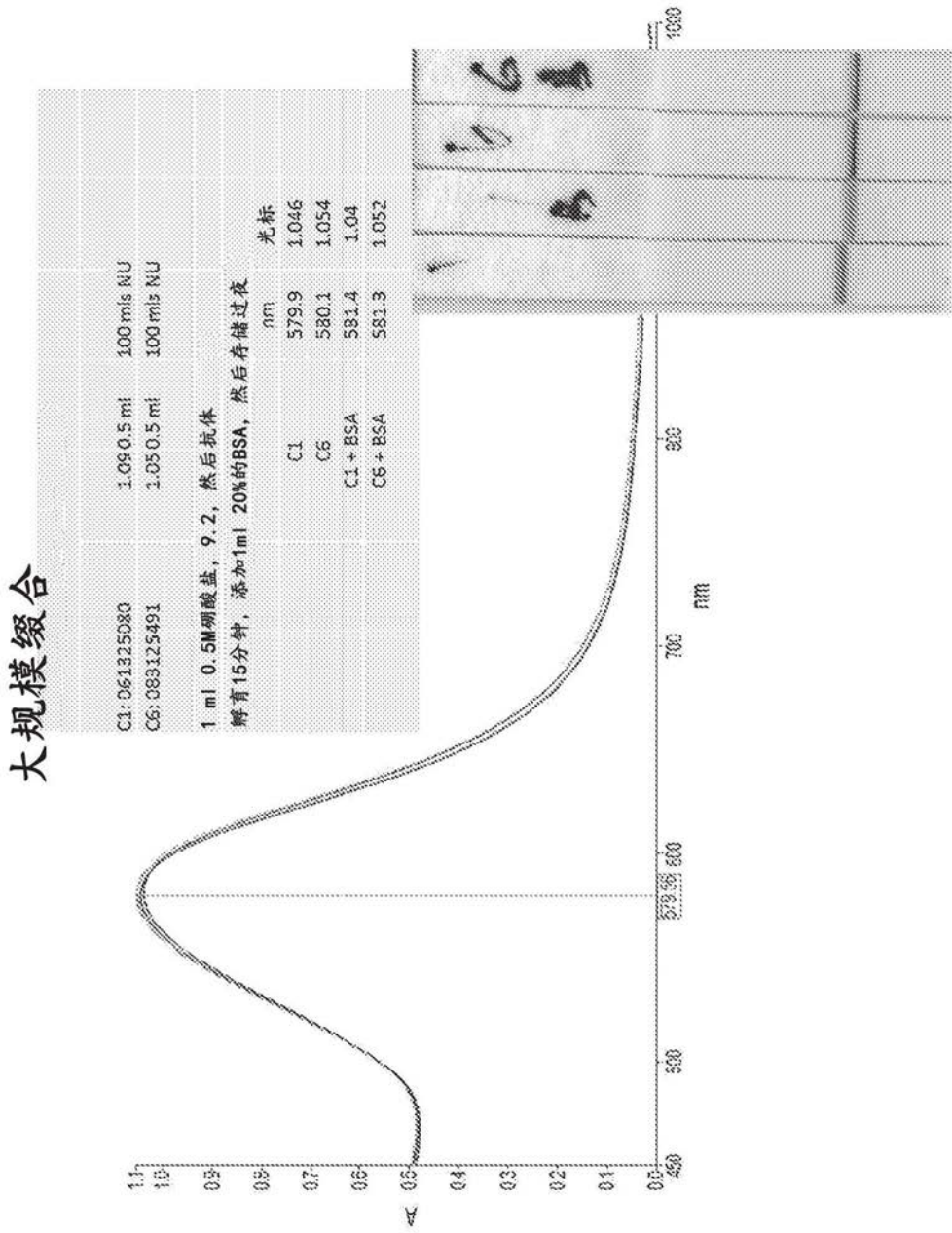


图4

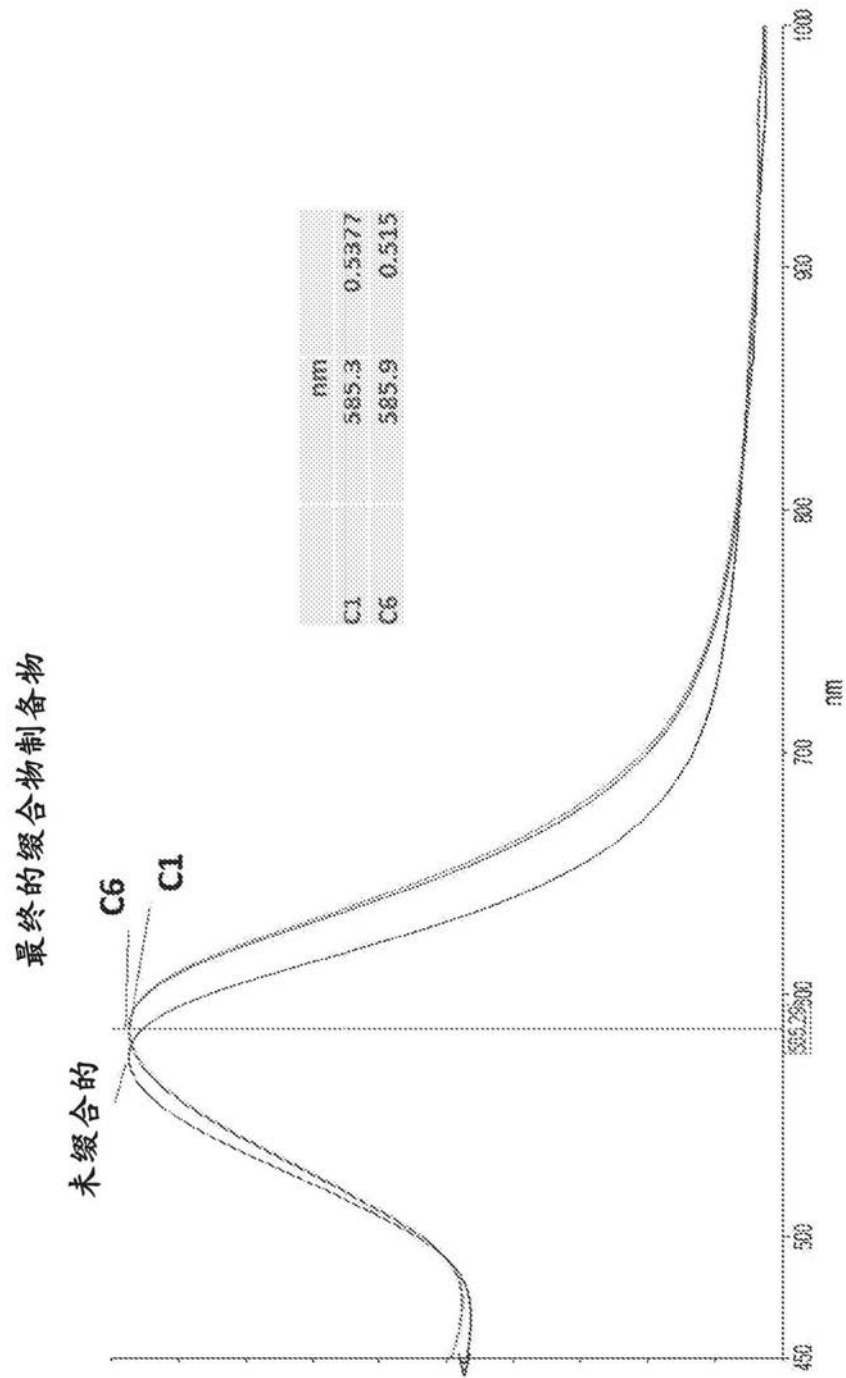


图5

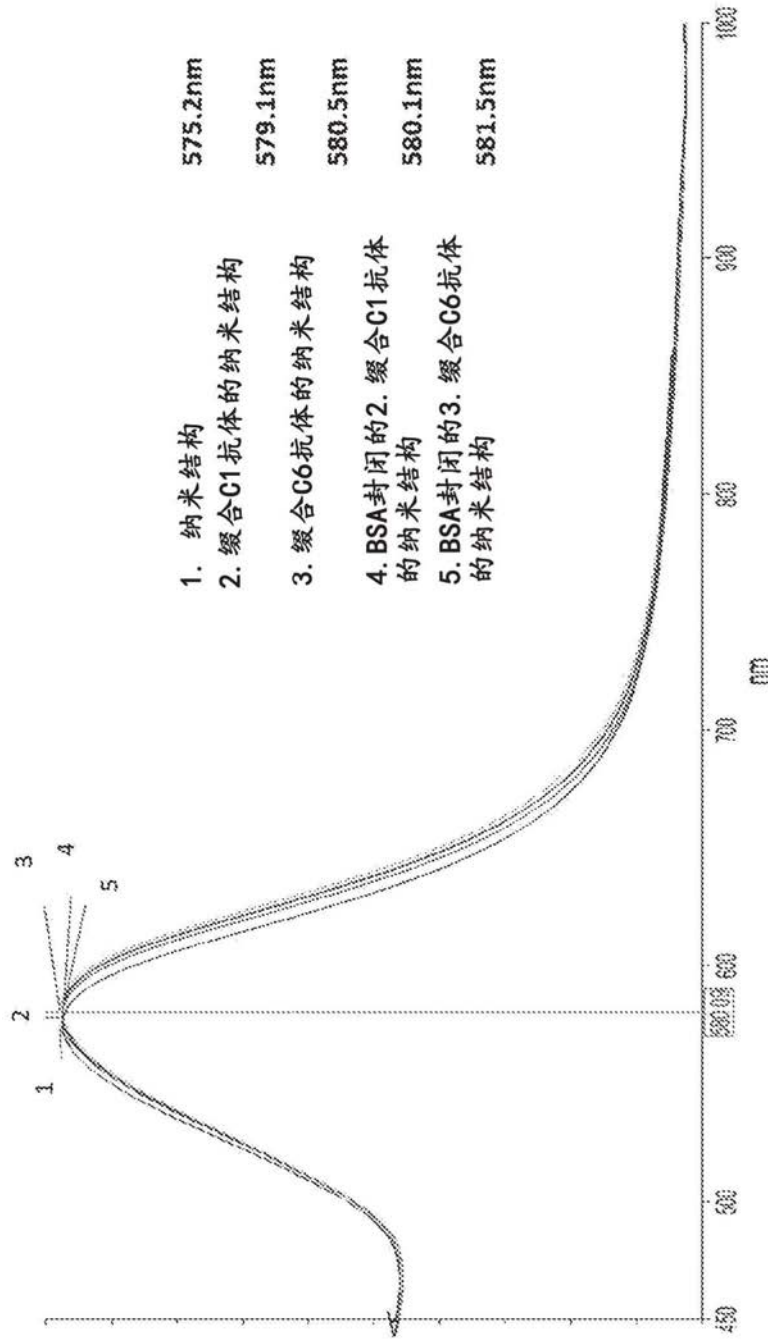
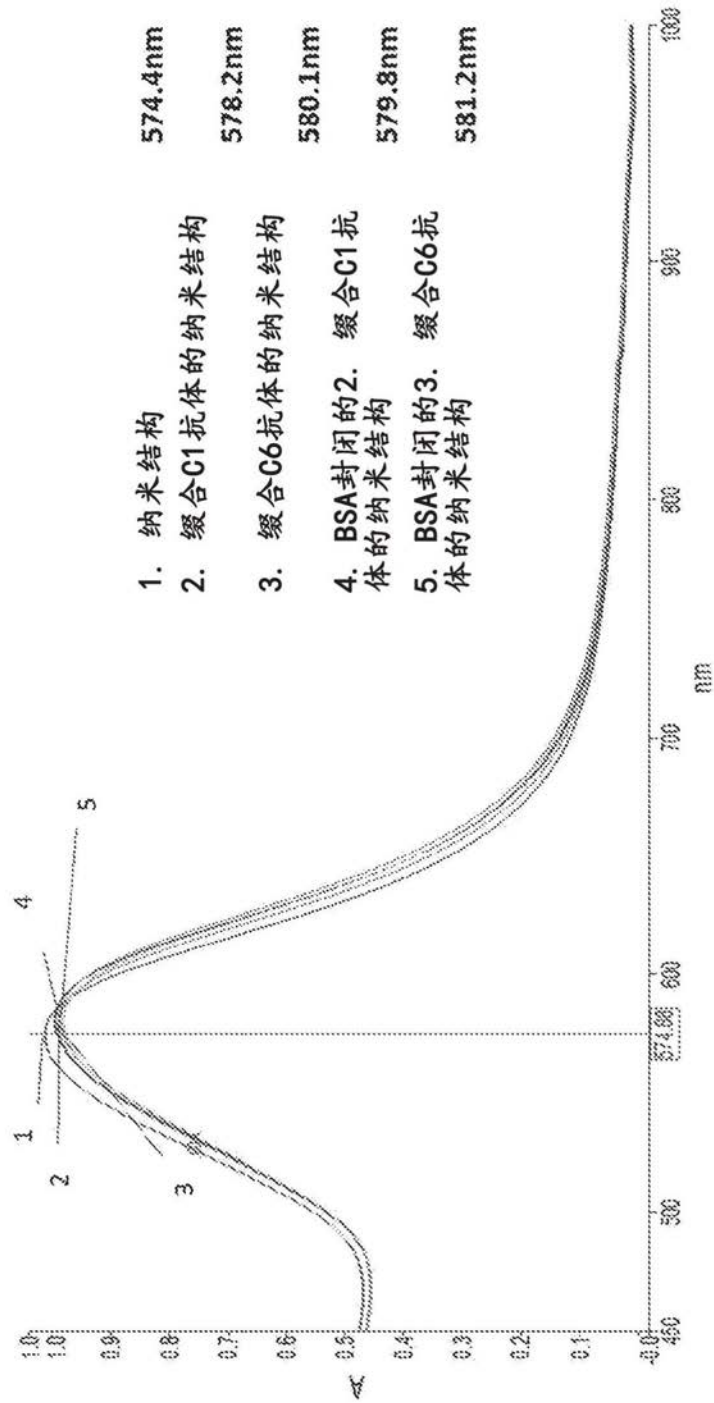


图6



图7



- 1. 纳米结构
- 2. 缀合C1抗体的纳米结构
- 3. 缀合C6抗体的纳米结构
- 4. BSA封闭的2. 缀合C1抗体的纳米结构
- 5. BSA封闭的3. 缀合C6抗体的纳米结构

图8



图9

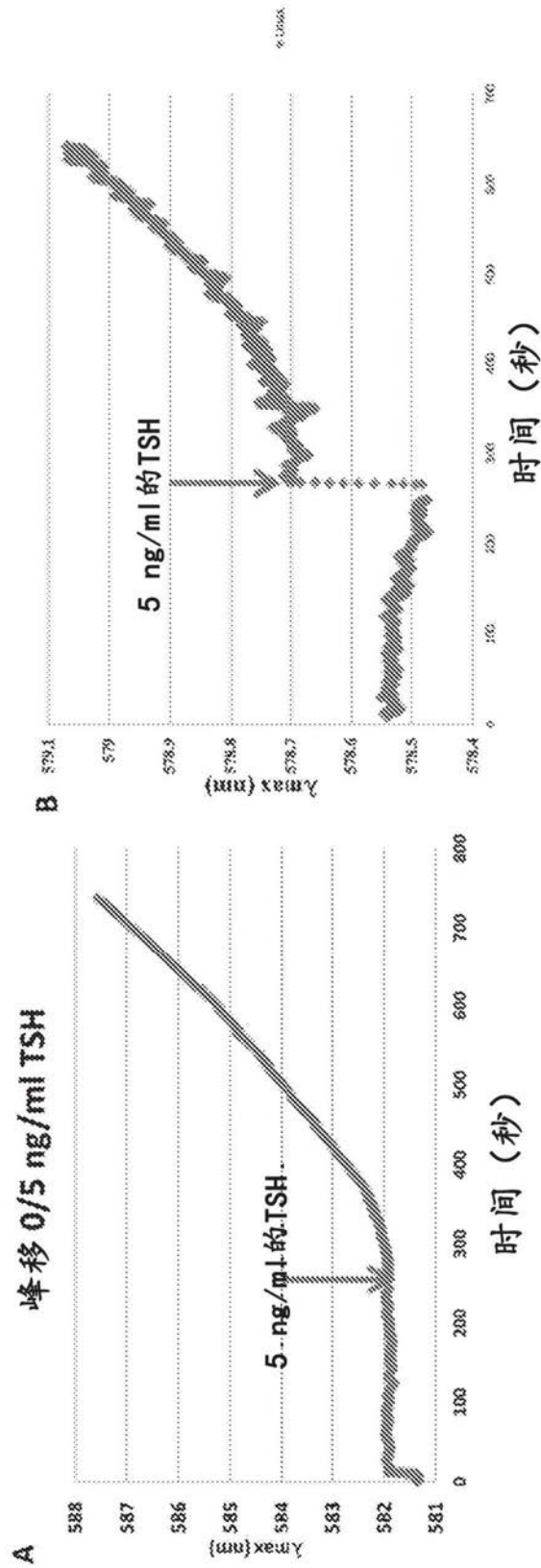


图10A和10B

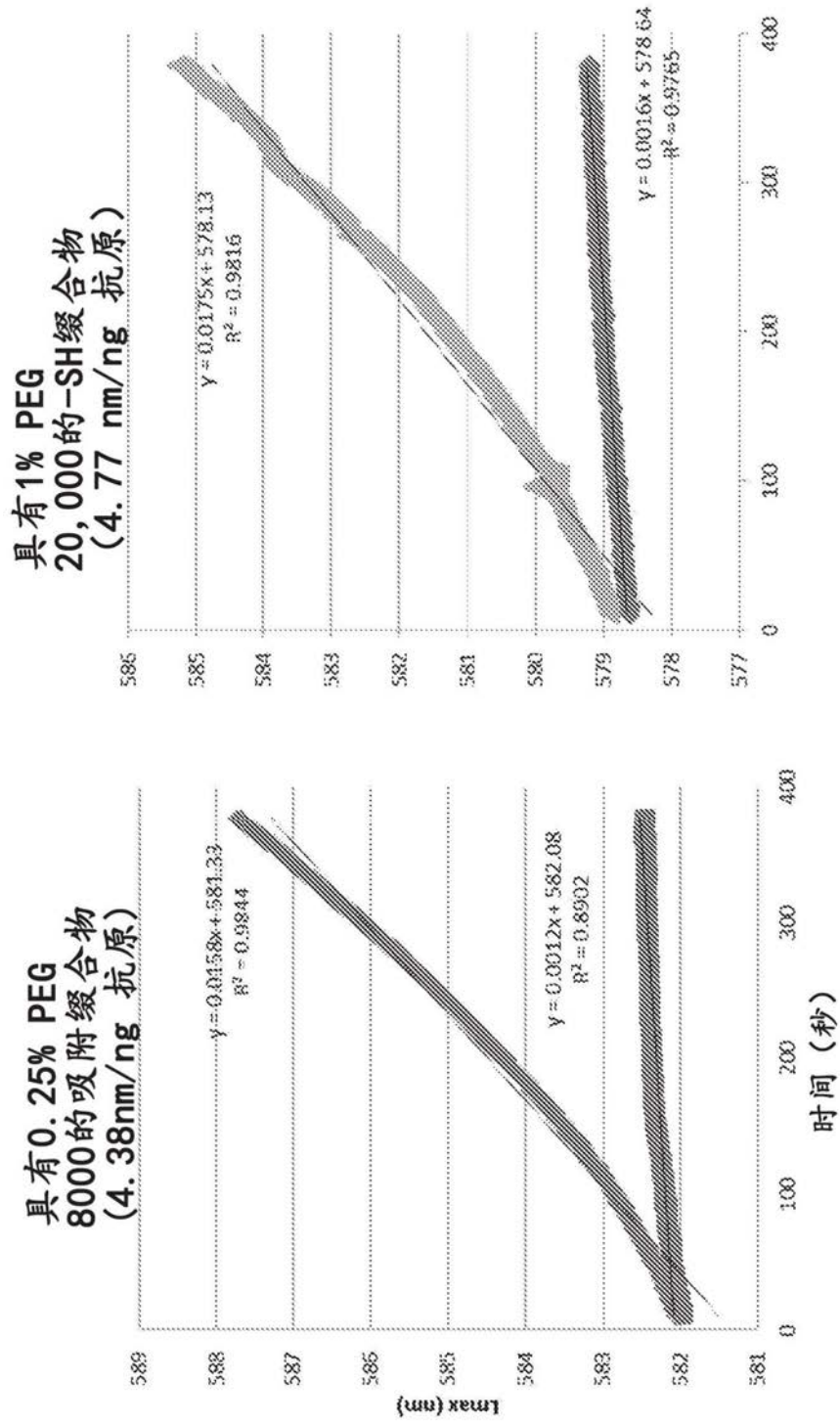


图11

共价连接的海胆状纳米结构缀合物的剂量-响应/动力学

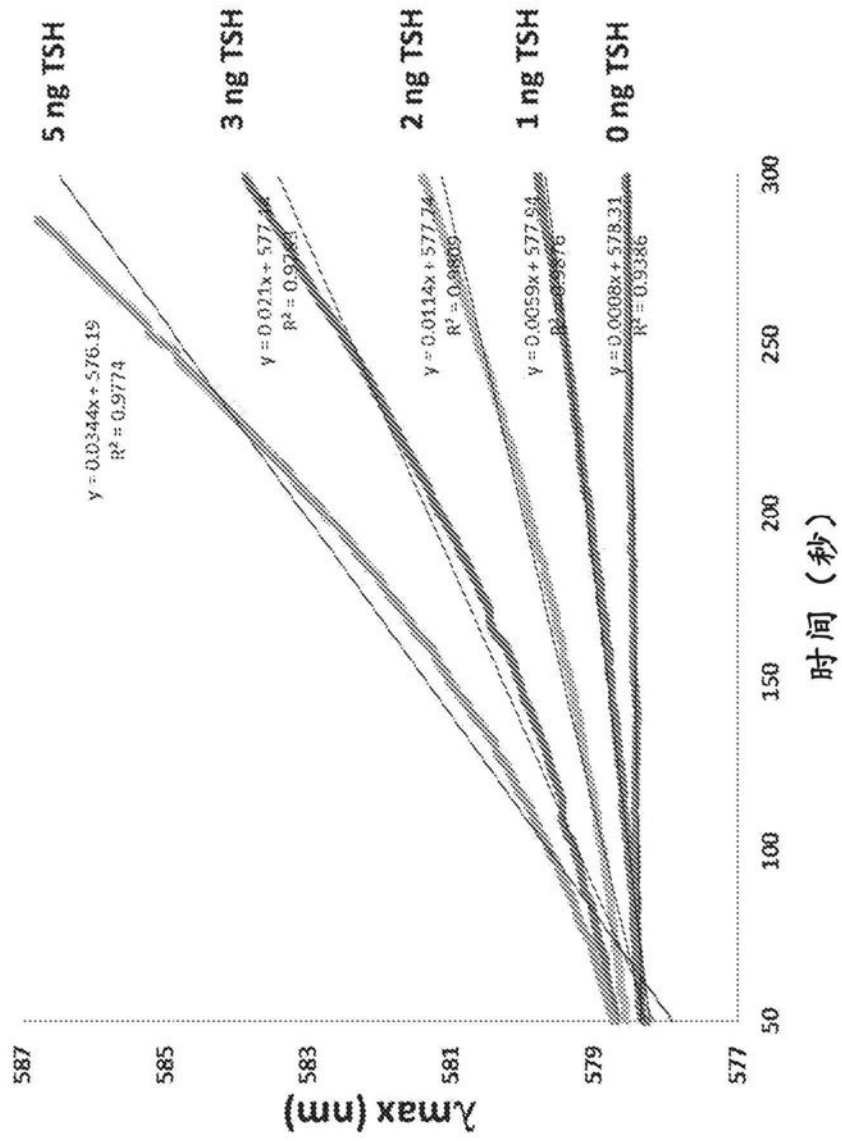


图12

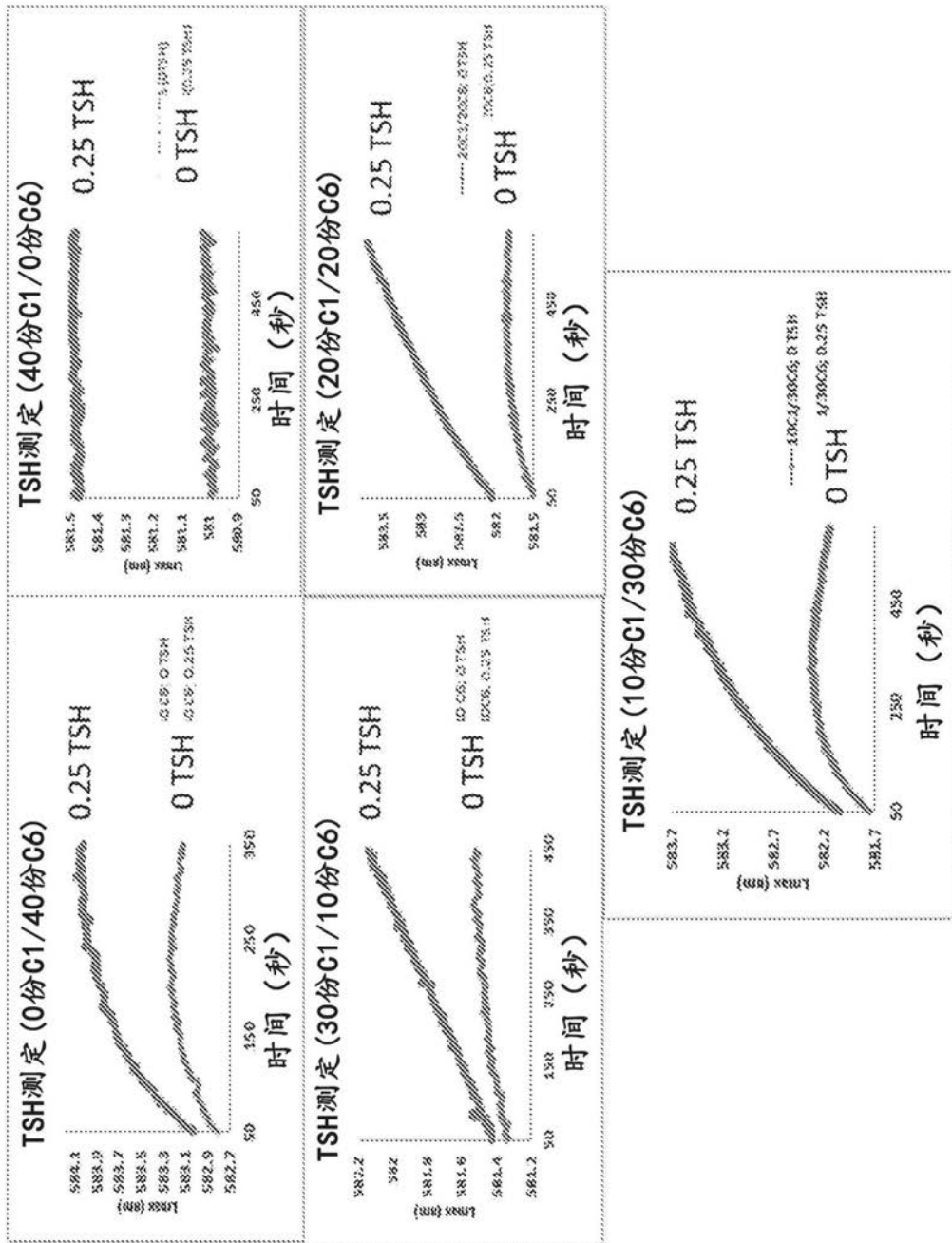


图13

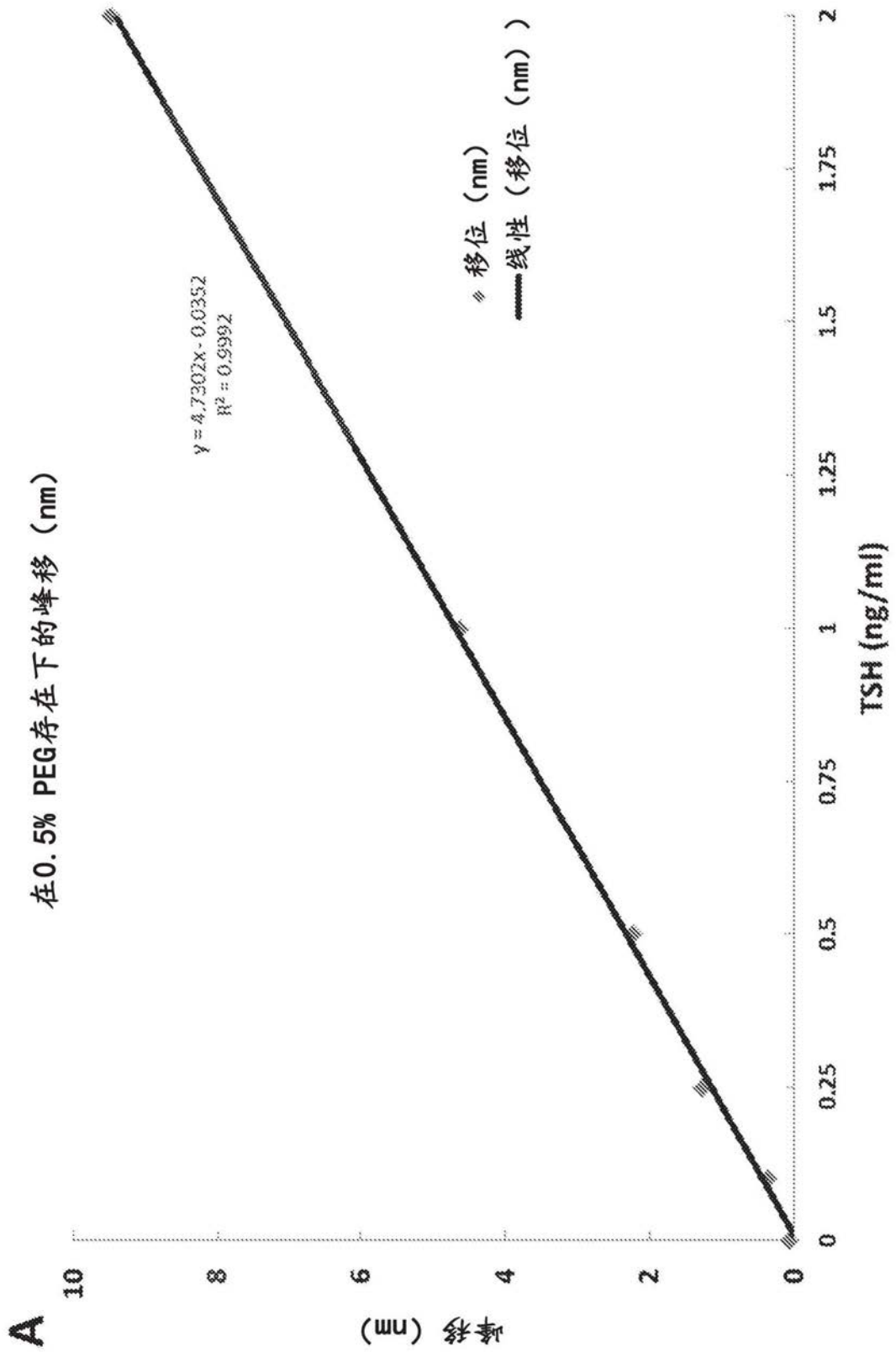


图14A

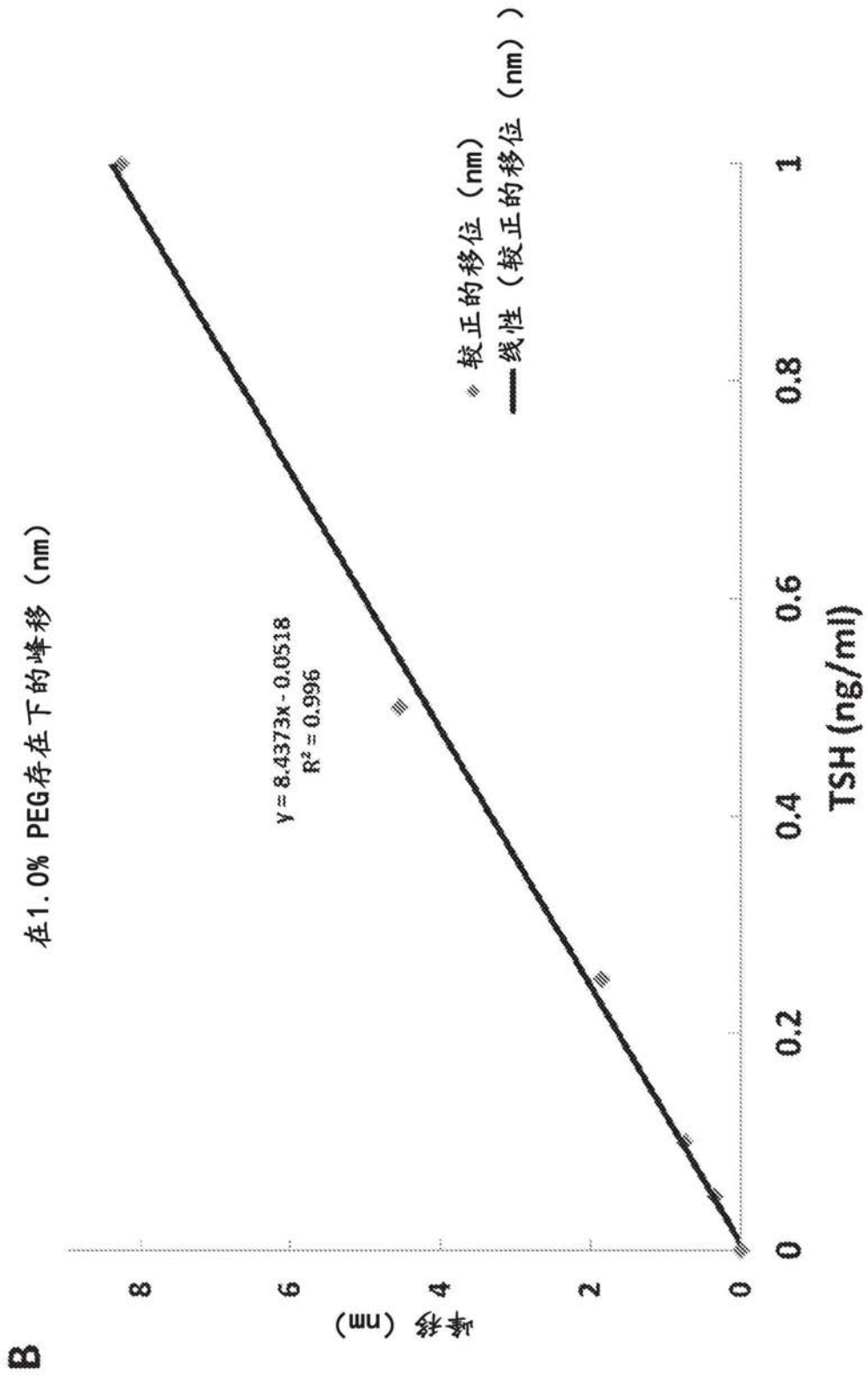


图14B

70 nm和90 nm纳米结构

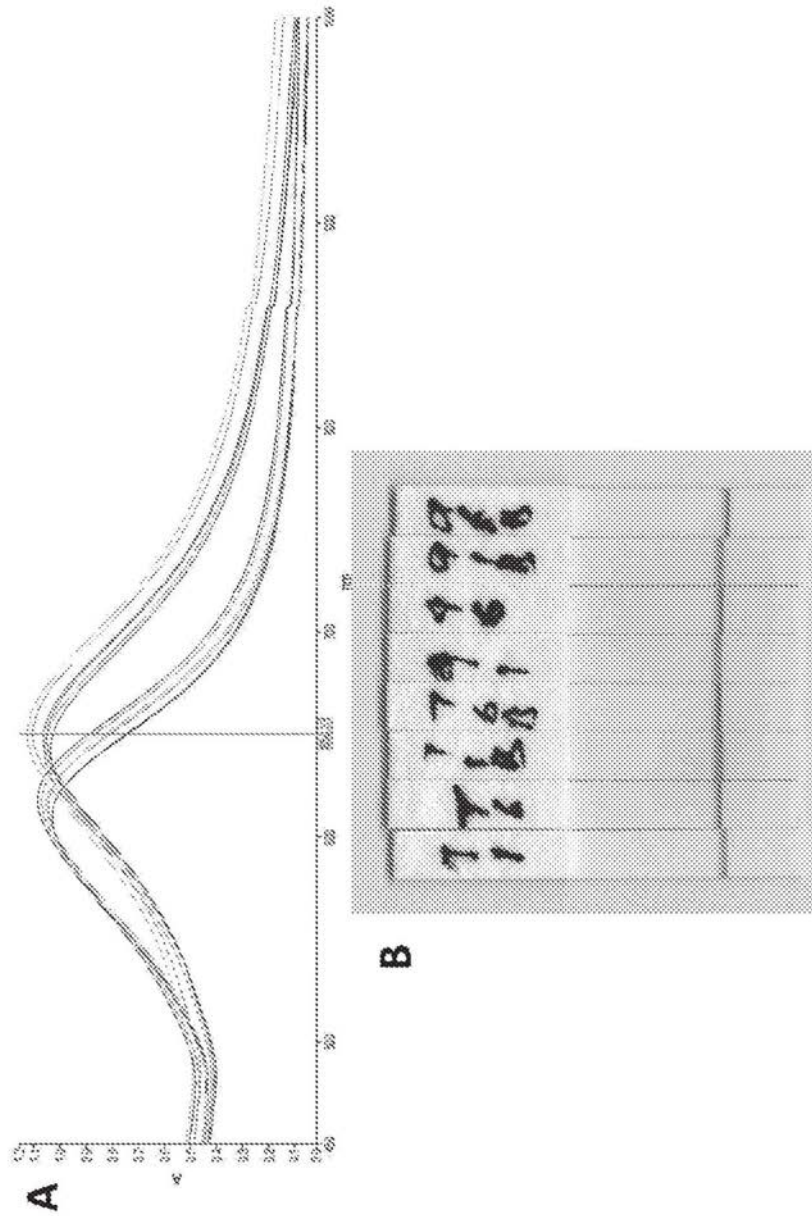


图15A和15B

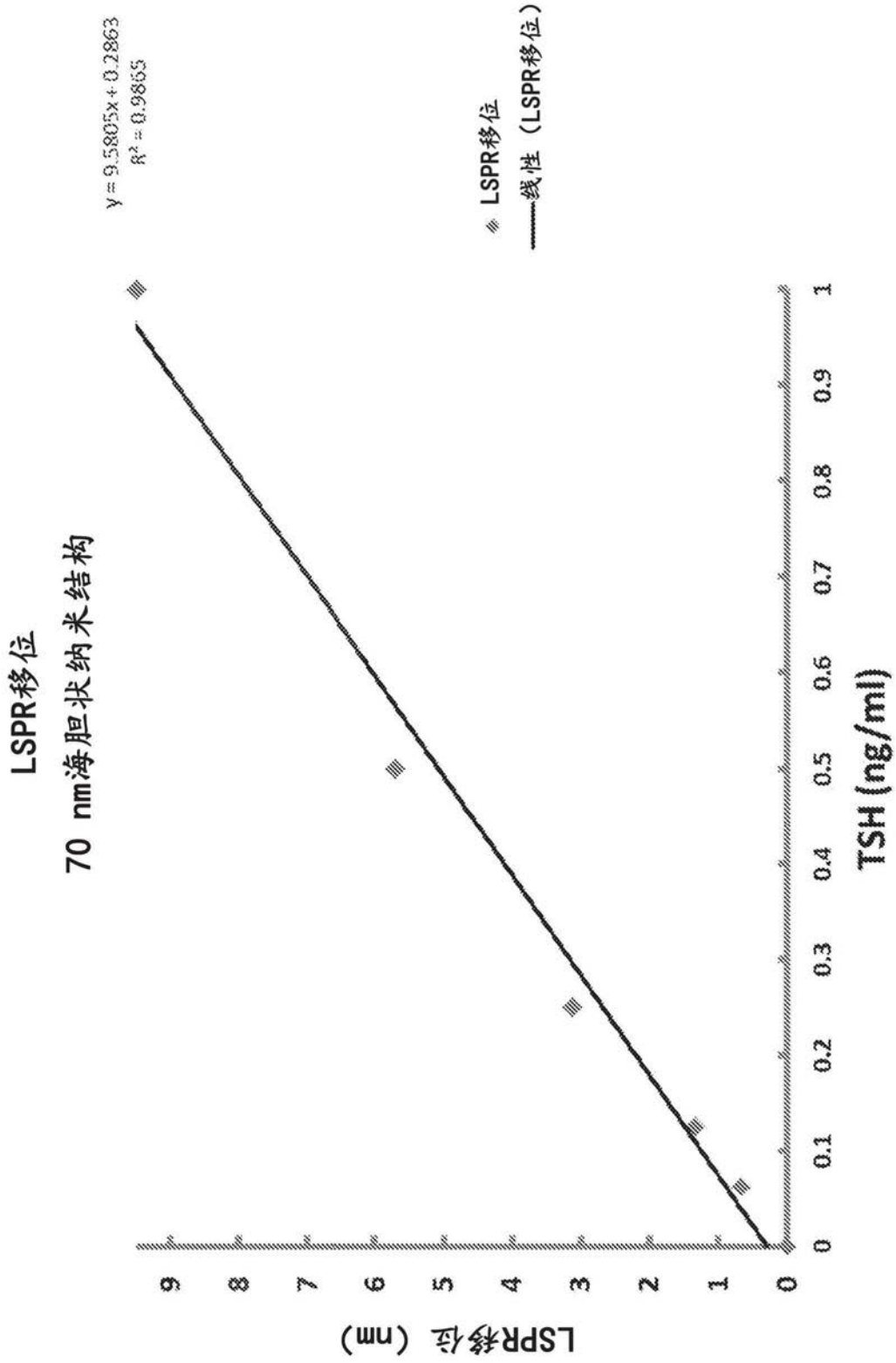


图16

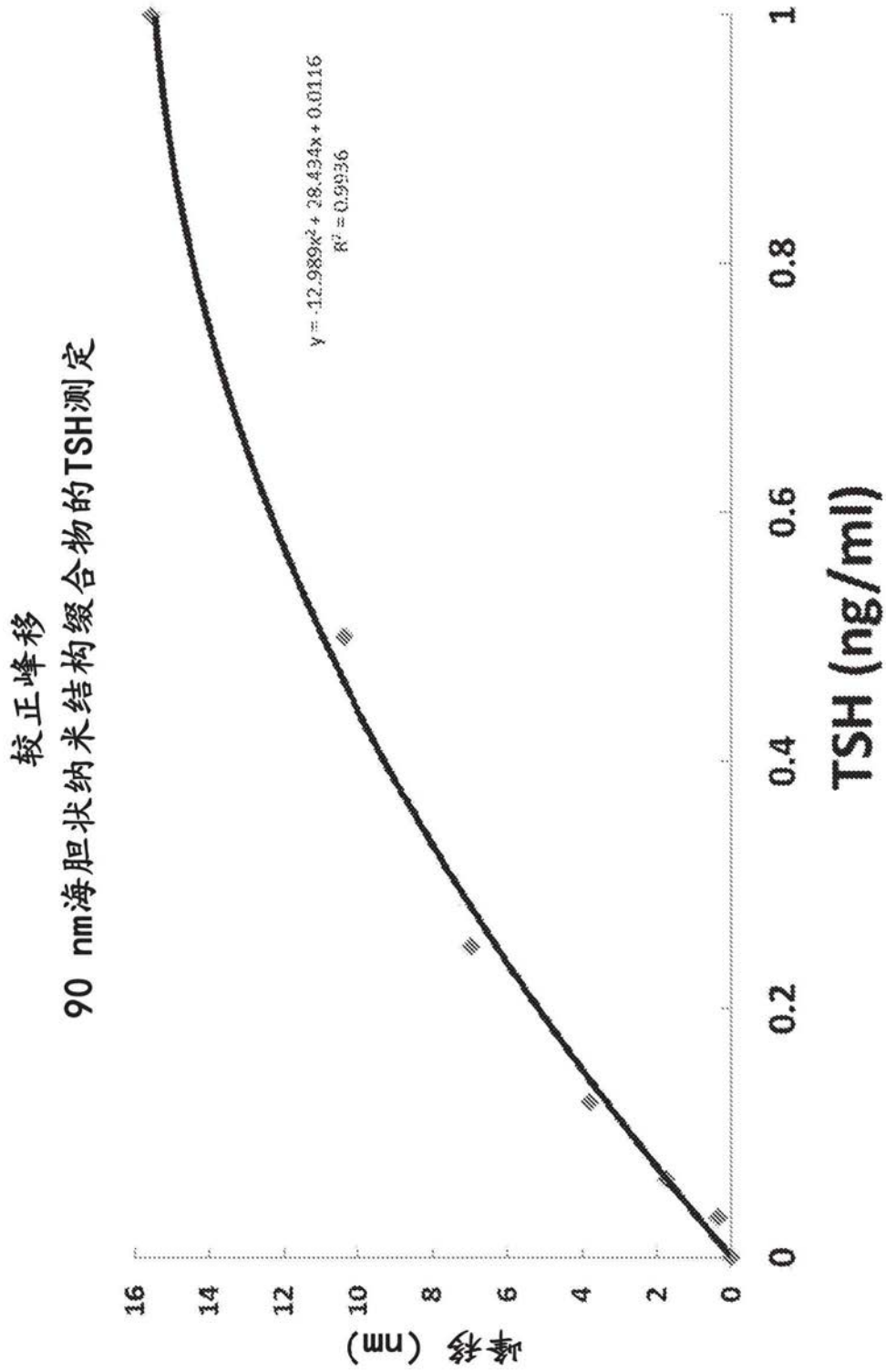


图17

通过峰位移分析进行的TSH检测

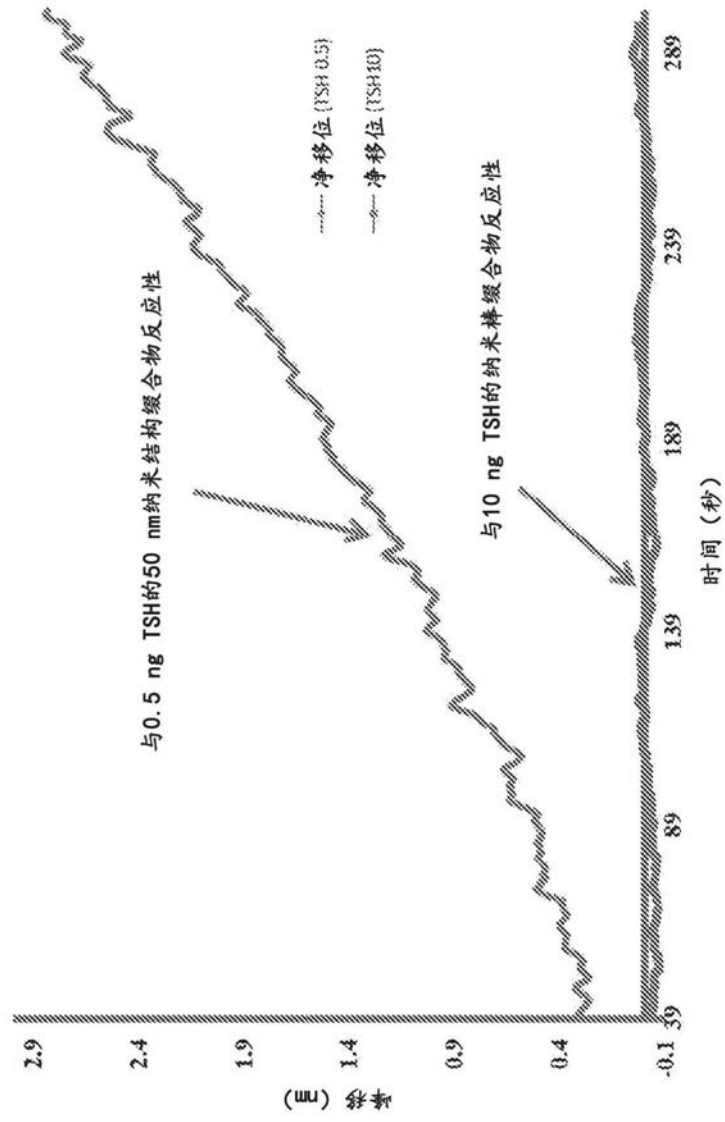


图18

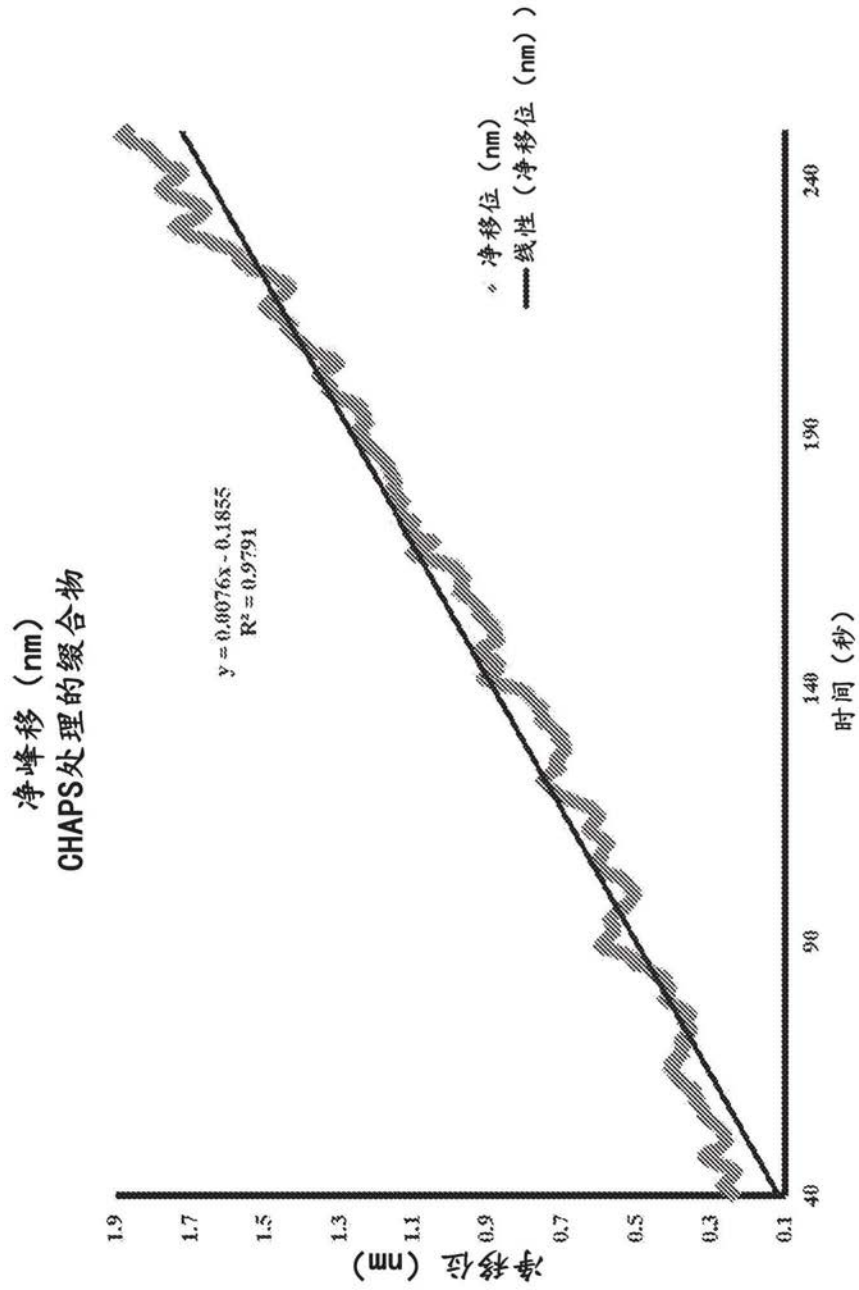


图19

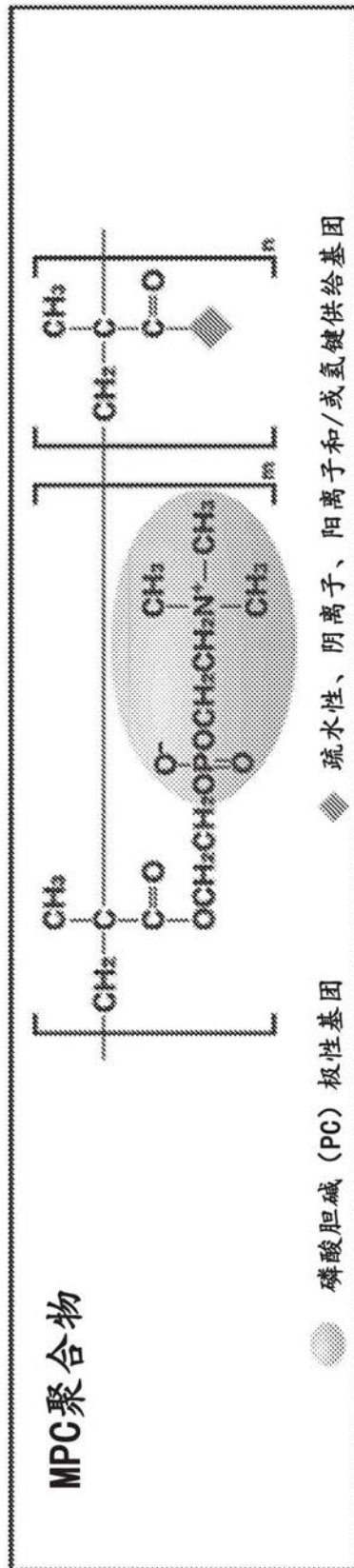


图20

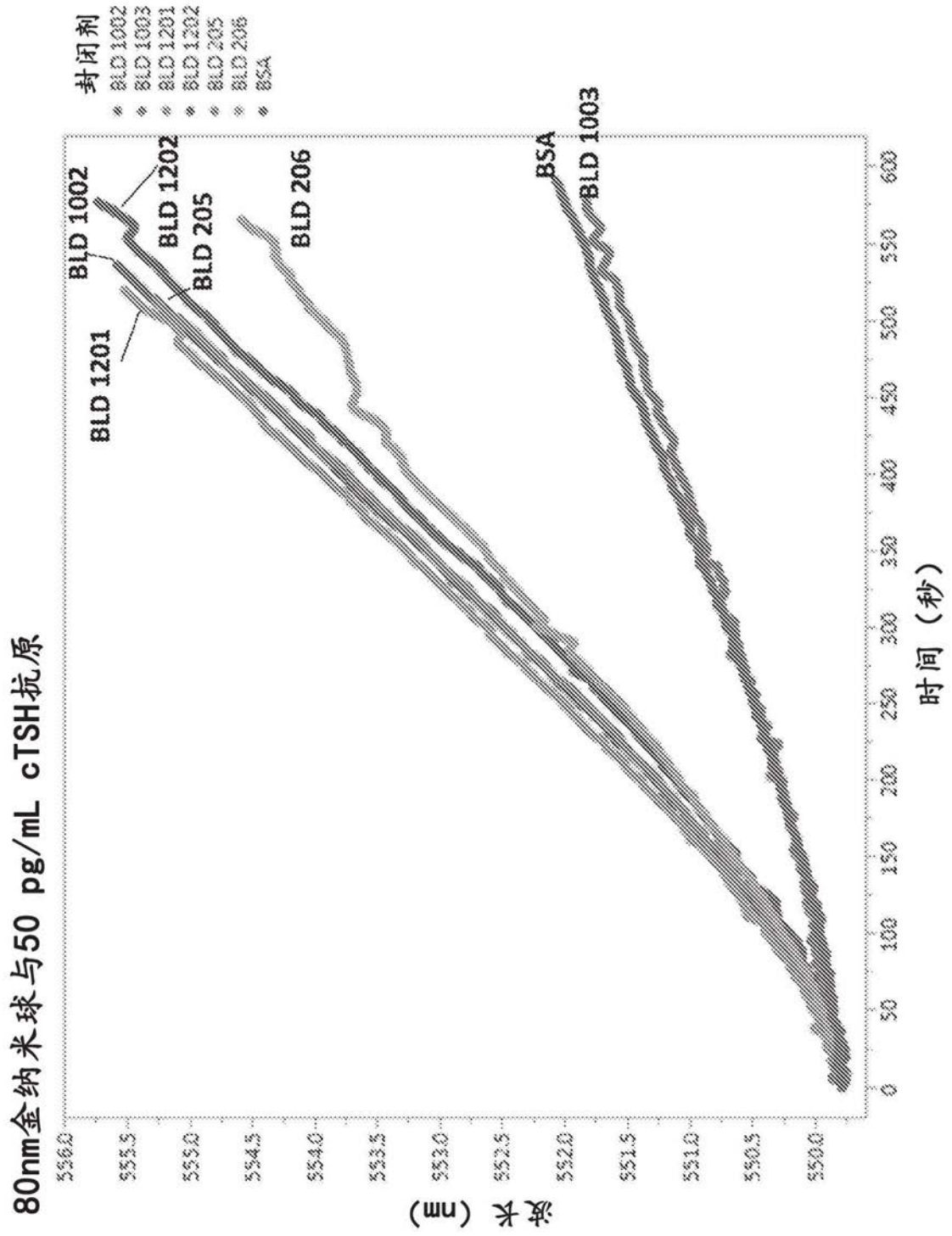


图21

用Biolipidure试剂封闭的具有5405/5409的80 nm金纳米球

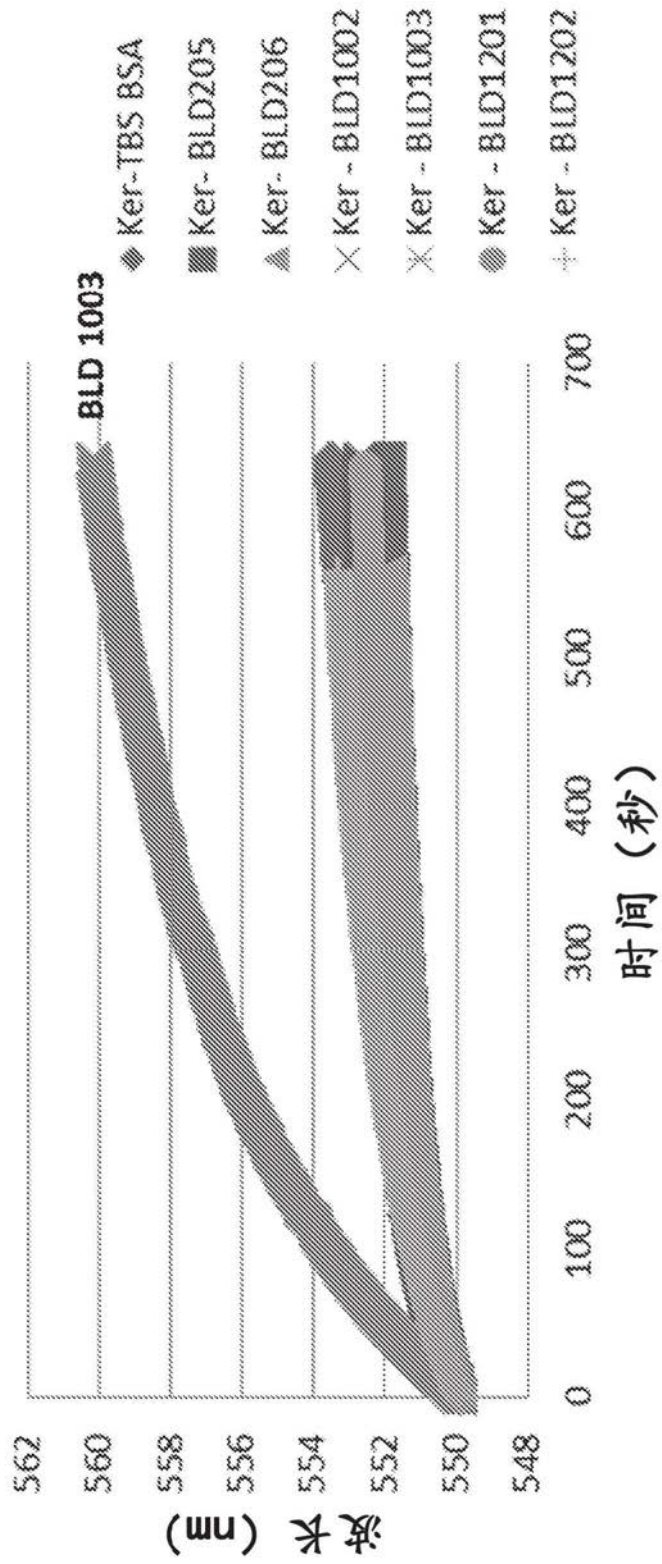


图22A

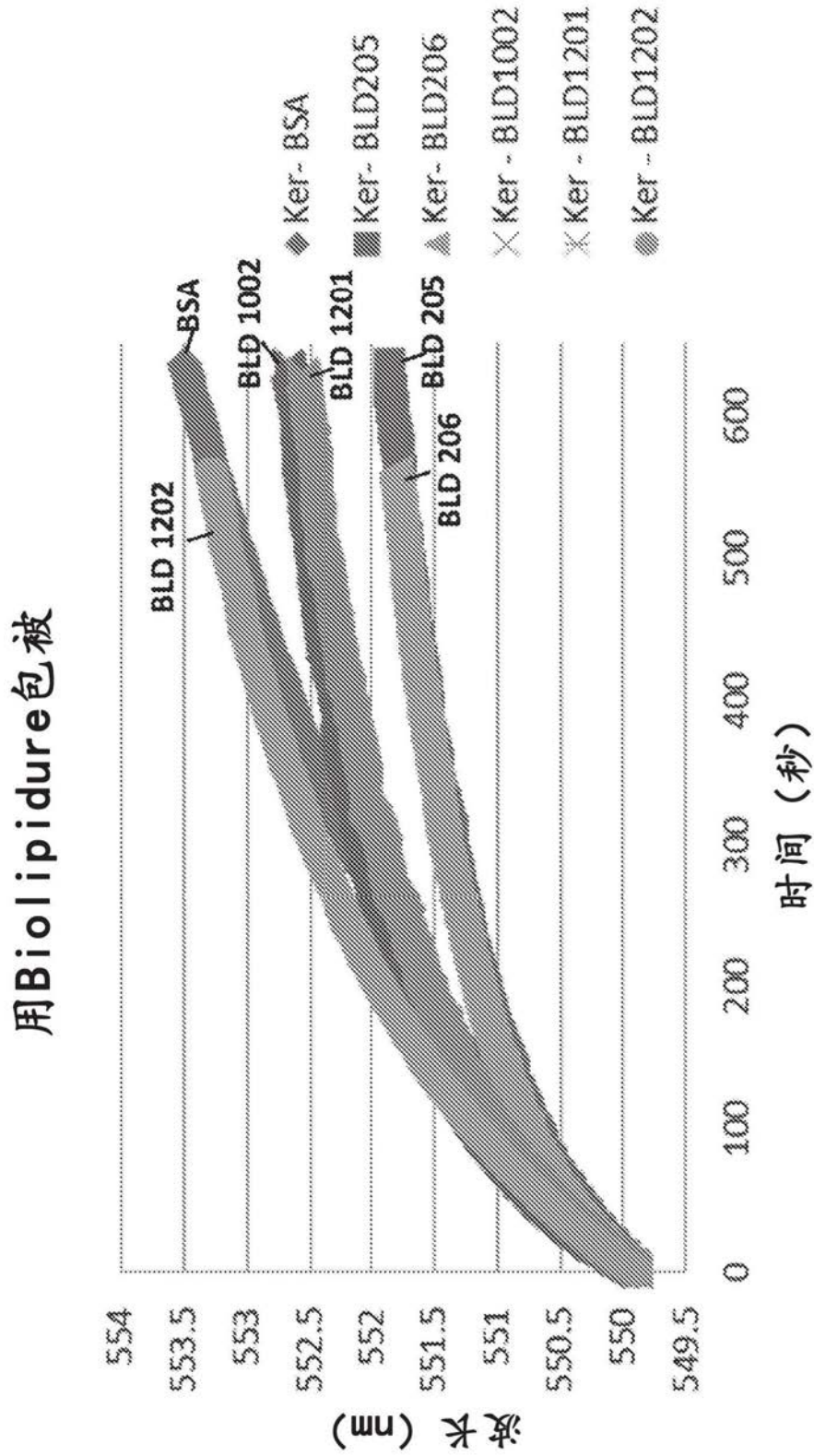


图22B

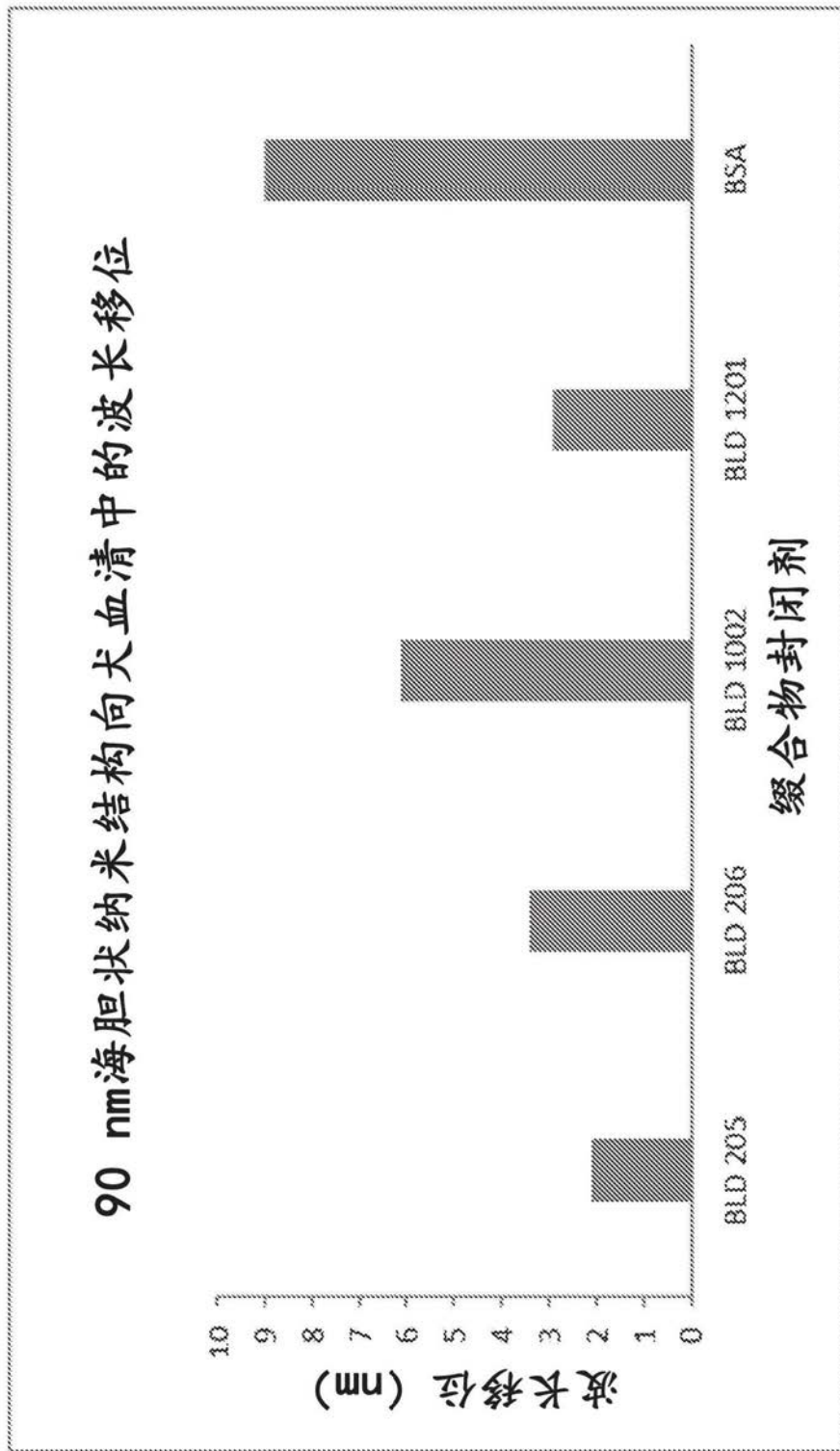


图23

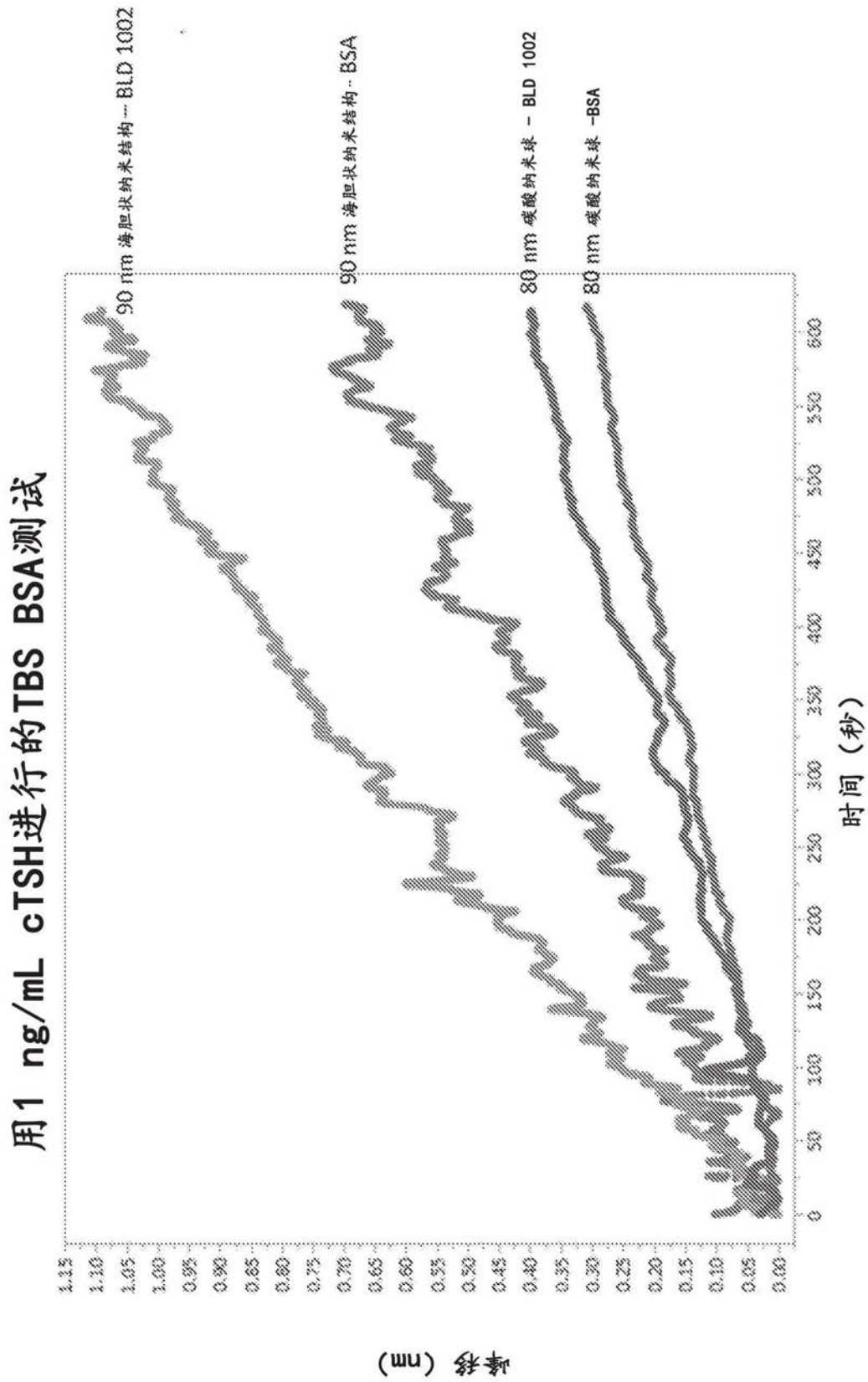


图24

霍夫梅斯特系列

阳离子

$NH_4^+$   $K^+$   $Na^+$   $Li^+$   $Mg^{2+}$   $Ca^{2+}$  胍盐<sup>+</sup>



$SO_4^{2-}$   $HPO_4^{2-}$  醋酸根 柠檬酸根  $Cl^-$   $NO_3^-$   $ClO_3^-$   $I^-$   $ClO_4^-$   $SCN^-$

↑ 表面张力

难造空腔

↓ 可溶性碳氢化合物

盐析 (聚合)

↓ 蛋白质变性

↑ 蛋白质稳定性

阴离子

↓ 表面张力

易造空腔

↑ 可溶性碳氢化合物

盐溶 (溶解)

↑ 蛋白质变性

↓ 蛋白质稳定性



图25

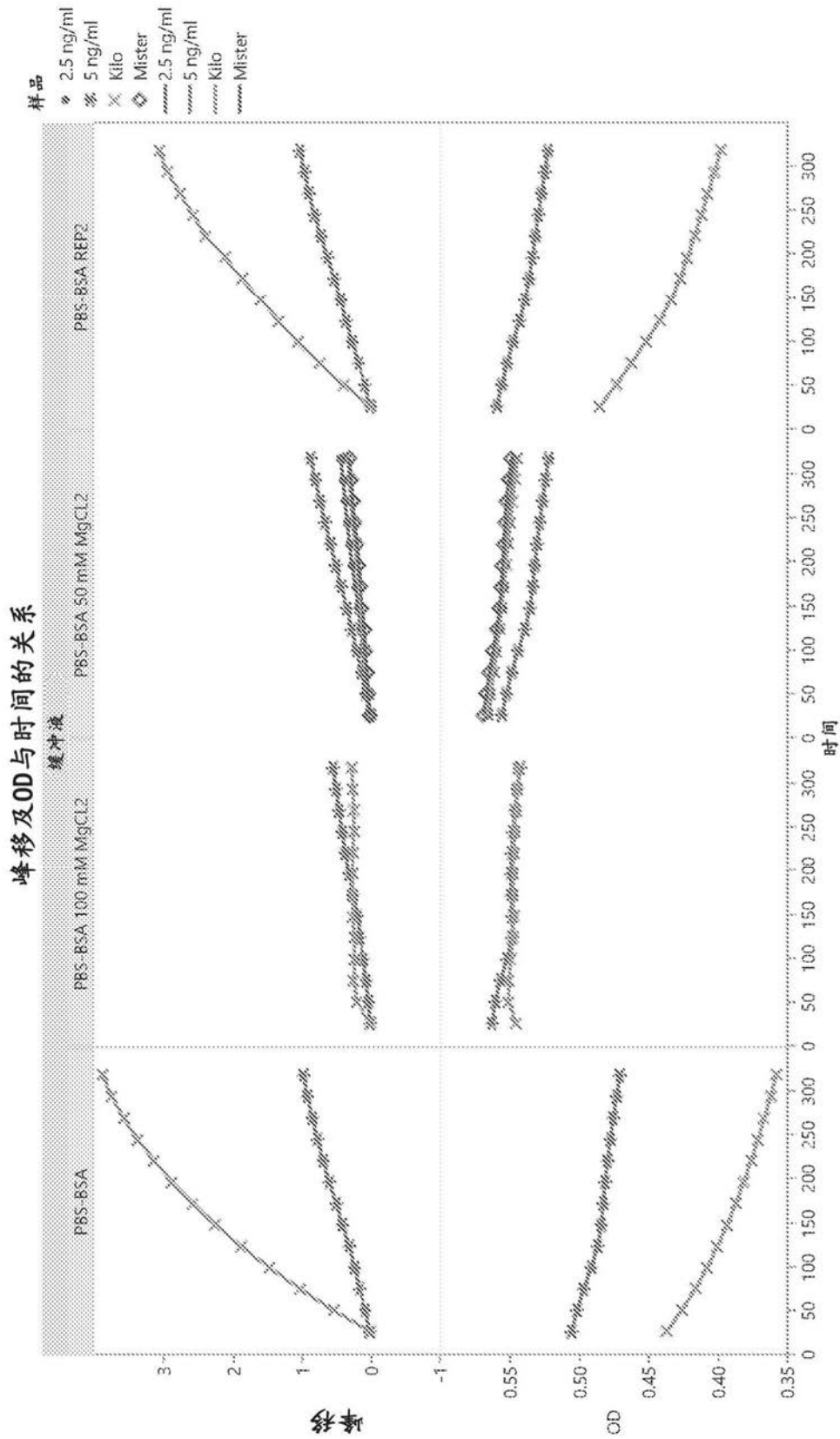


图26

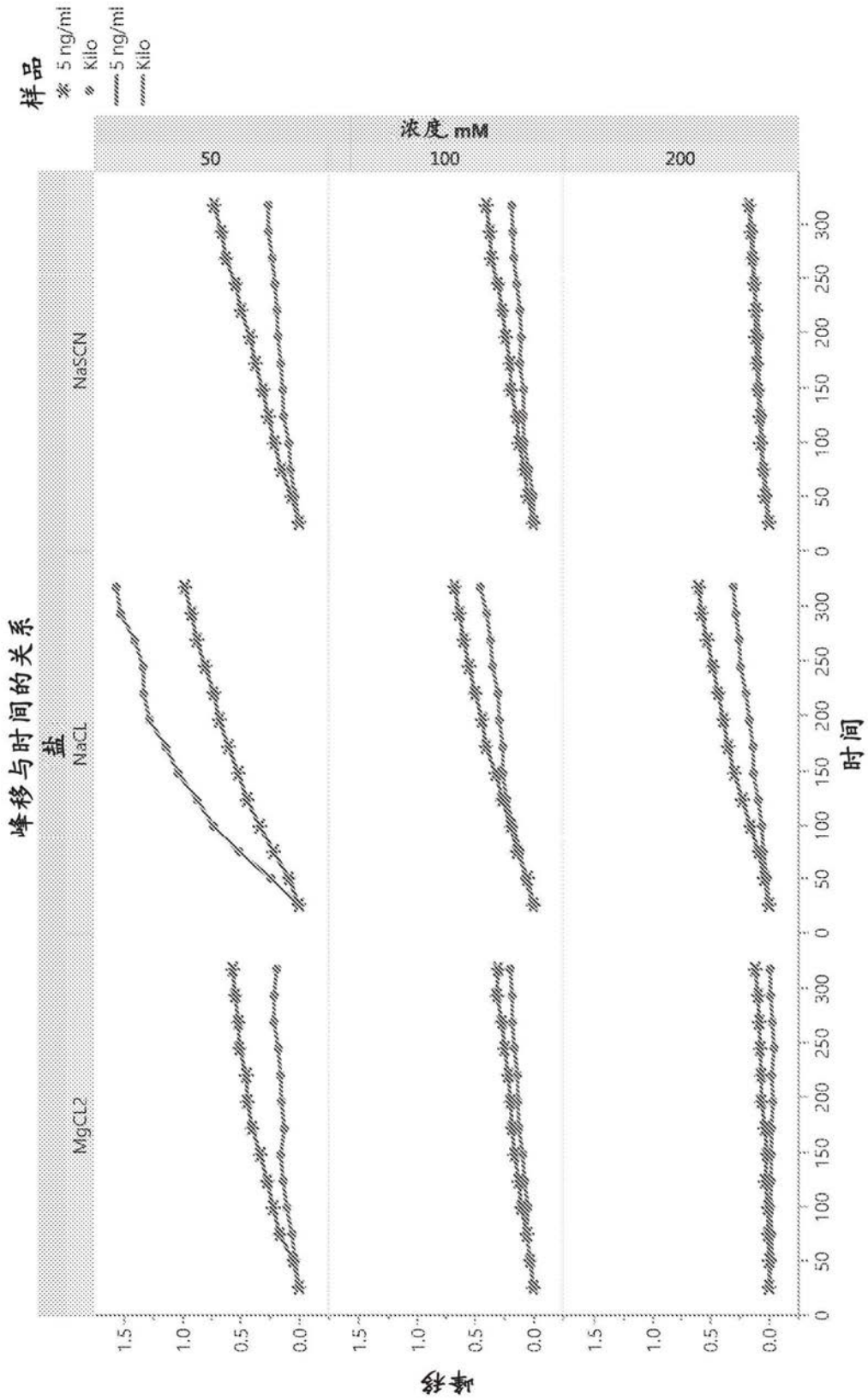


图27

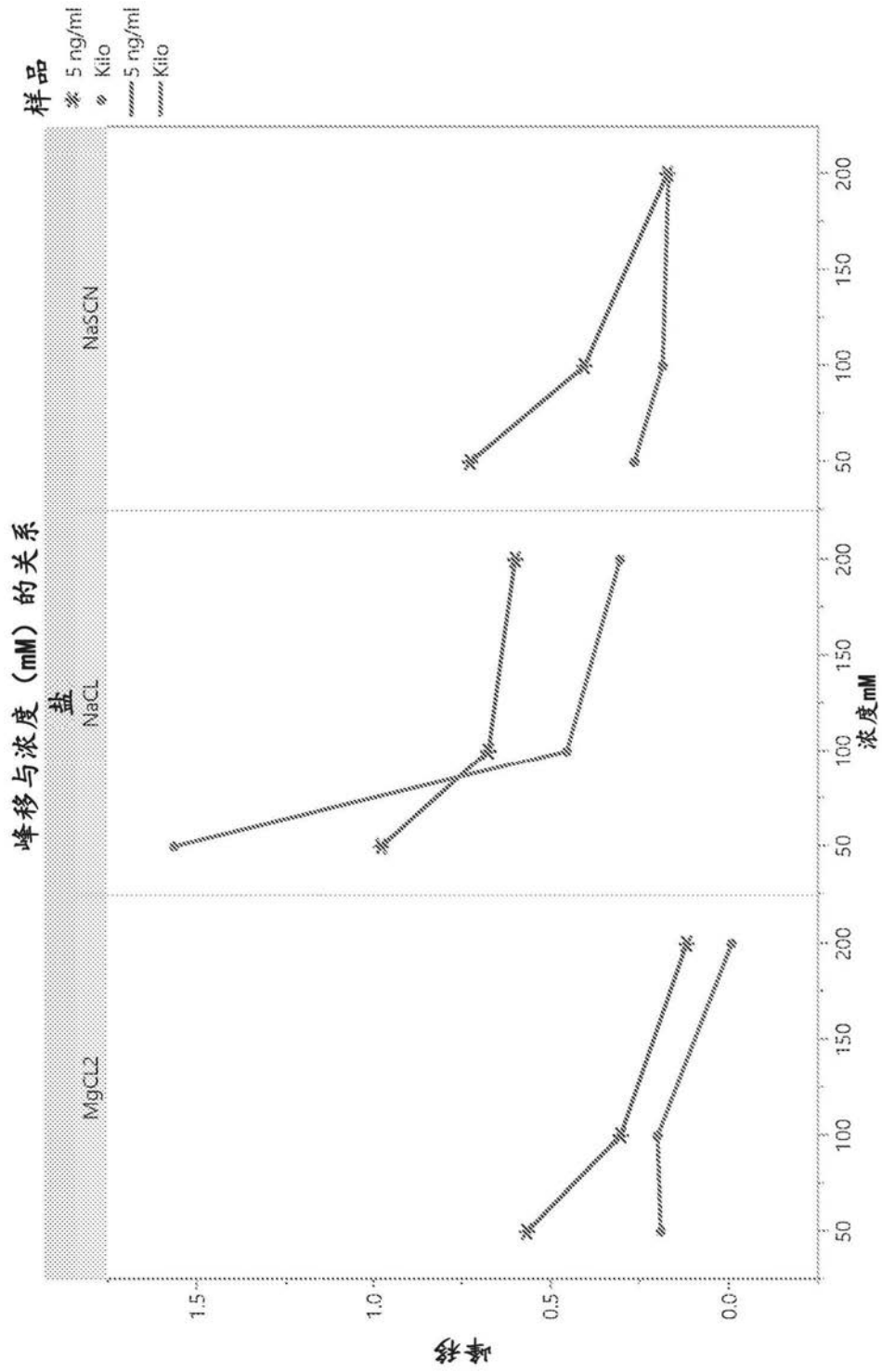


图28

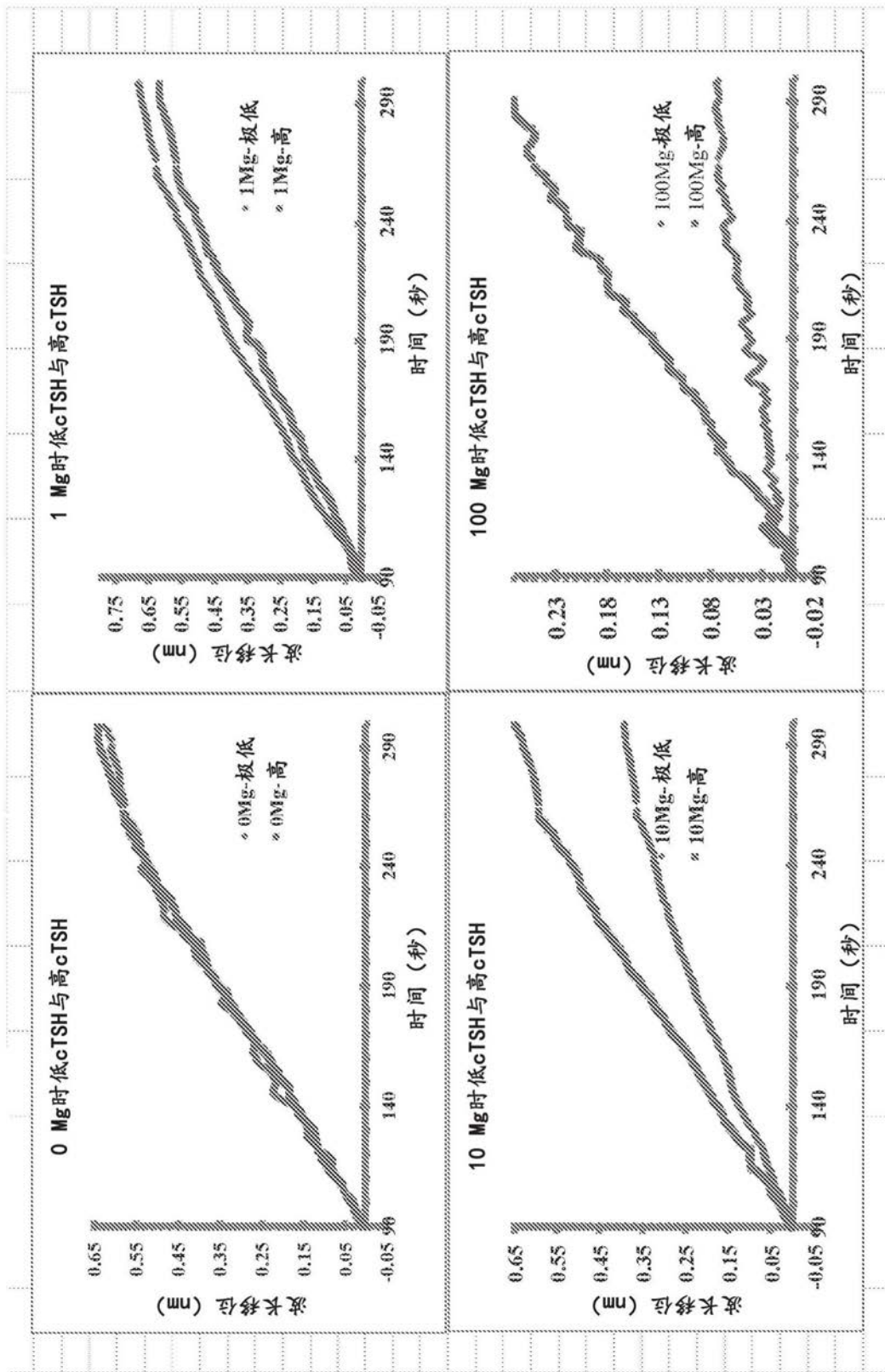


图29

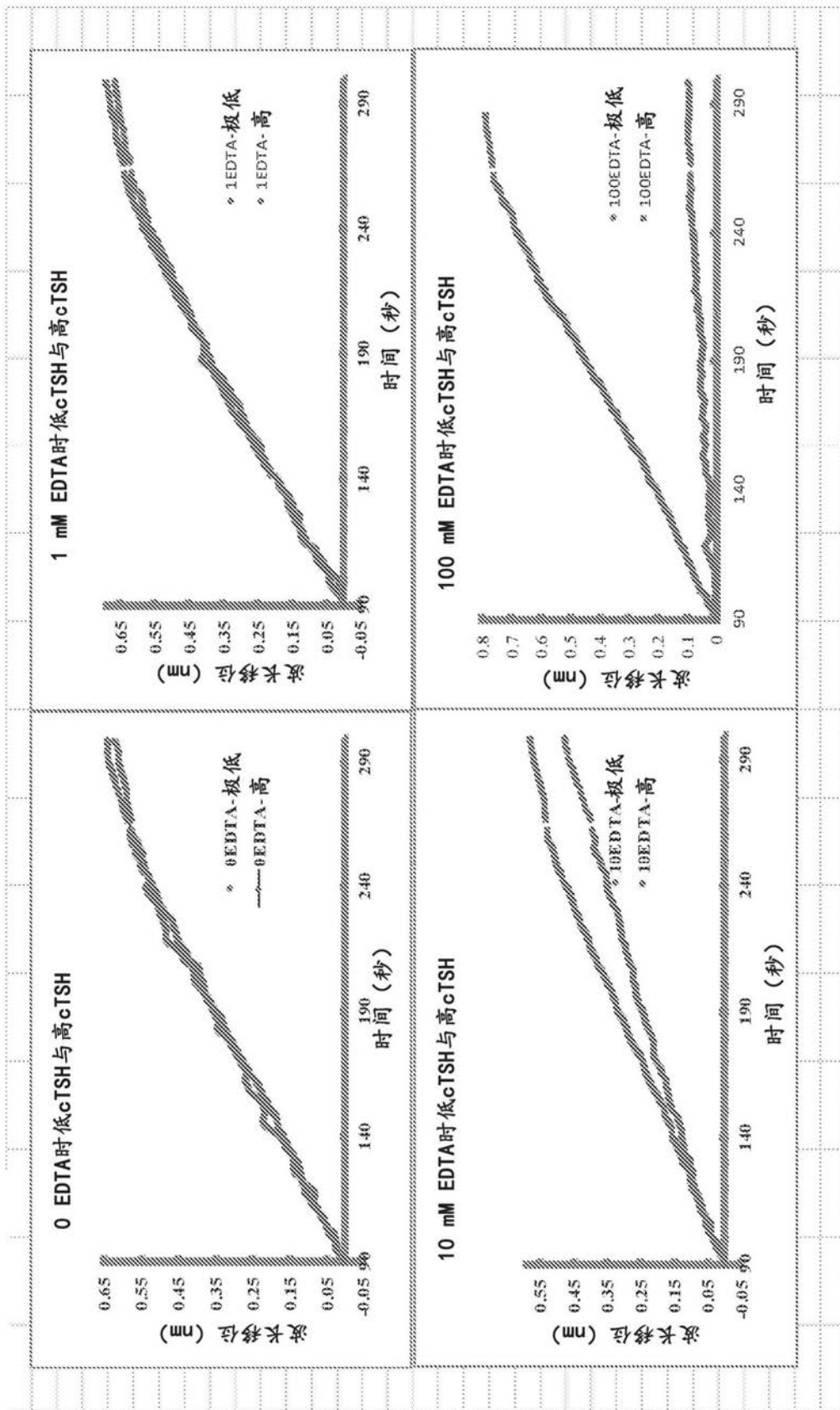


图30

专利名称(译)	基于溶液的等离子体振子特异性结合配偶体测定和金属纳米结构		
公开(公告)号	<a href="#">CN110892250A</a>	公开(公告)日	2020-03-17
申请号	CN201880022558.6	申请日	2018-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	爱贝斯股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	爱贝斯股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	爱贝斯股份有限公司		
[标]发明人	V 蒋 KP阿伦		
发明人	V·蒋 S·A·安塞尔 R·K·梅赫拉 K·P·阿伦		
IPC分类号	G01N21/62 G01N33/53 G01N33/532		
CPC分类号	G01N21/554 G01N33/54346 Y02A50/57 Y02A50/58		
优先权	62/451932 2017-01-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及纳米结构-结合配偶体缀合物，以及反应混合物、分析物检测装置以及制备和使用所述缀合物的方法。特别地，本发明提供了检测样品中的靶标分析物的方法，其包括将所述样品与第一检测缀合物和第二检测缀合物在溶液中混合，其中所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物包含偶联到结合配偶体的金属纳米结构，所述靶标分析物如果存在于所述样品中，则所述结合配偶体能够特异性地结合所述靶标分析物以形成所述第一检测缀合物、所述分析物和所述第二检测缀合物之间的复合物，其中复合物形成时光信号的变化指示所述样品中所述靶标分析物的存在。

