



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107110851 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201580072490.9

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(22)申请日 2015.11.05

代理人 郑霞

(30)优先权数据

62/075,785 2014.11.05 US

62/192,672 2015.07.15 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.07.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/059321 2015.11.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/073778 EN 2016.05.12

(71)申请人 尼尔米达斯生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 约书亚·T·罗宾逊 唐梅杰

赵苏 戴宏杰

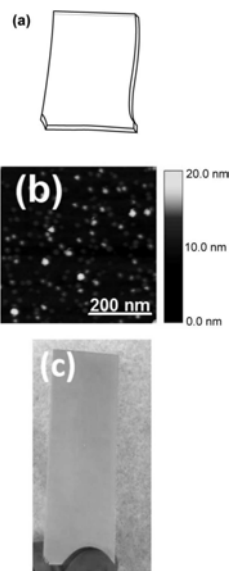
权利要求书8页 说明书36页 附图11页

(54)发明名称

用于增强成像的金属复合物

(57)摘要

本文公开了可用于基于增强荧光的成像技术和测定的组合物和系统。本公开内容的组合物和系统可为在可见光和近红外光中,例如,跨越约400nm至约2100nm具有激发和发射的荧光分子提供提高的荧光。本文还提供了通过使用本公开内容的组合物和系统的基于荧光检测的方法。



1. 一种在基底上包含凸起的纳米结构的薄膜,其中:
所述薄膜的纳米结构包含银包金纳米颗粒;
所述纳米结构彼此被间隙隔开;并且
相对于在不存在所述薄膜的情况下从邻近于所述基底的荧光团获得的荧光信号,来自邻近于所述薄膜的荧光团的荧光信号的强度增强。
2. 如权利要求1所述的薄膜,其中所述间隙具有5nm至50nm的宽度和5nm至1000nm的长度。
3. 如权利要求1所述的薄膜,其中所述纳米结构具有50nm至500nm的平均宽度和平均长度。
4. 如权利要求3所述的薄膜,其中所述纳米结构具有100nm至200nm的平均宽度和平均长度。
5. 如权利要求1所述的薄膜,其中所述薄膜具有 1000nm^2 至 $250,000\text{nm}^2$ 的纳米片大小。
6. 如权利要求1所述的薄膜,其中所述薄膜包含不规则特征和异质结构。
7. 如权利要求1所述的薄膜,其中所述薄膜的高度为5nm至500nm。
8. 如权利要求1所述的薄膜,其中根据电子显微镜成像和导电性,所述薄膜通过渗流路径和导电是半连续的。
9. 如权利要求1所述的薄膜,其中根据电子显微镜成像和导电性,所述薄膜是不连续的。
10. 如权利要求1所述的薄膜,其中荧光信号在400nm至2100nm的范围内。
11. 如权利要求1所述的薄膜,其中所述薄膜产生约400nm至约2100nm的等离子体。
12. 如权利要求1所述的薄膜,其中对于在所述薄膜表面1000nm内的荧光团,荧光信号得到增强。
13. 如权利要求1所述的薄膜,其中所述荧光团为具有约700nm至约800nm的发射的近红外荧光团,并且所述荧光信号的强度增强至少30倍。
14. 如权利要求13所述的薄膜,其中所述荧光信号的强度增强至少100倍。
15. 如权利要求13所述的薄膜,其中所述近红外荧光团为IR680或IR800。
16. 如权利要求1所述的薄膜,其中所述荧光团为具有约400nm至约700nm的发射的可见光染料,并且所述荧光信号的强度增强至少3倍。
17. 如权利要求16所述的薄膜,其中所述荧光信号的强度增强至少30倍。
18. 如权利要求16所述的薄膜,其中所述可见光染料为DAPI、Alexa488、Cy3或Cy5。
19. 如权利要求1所述的薄膜,其中所述基底包含选自下组的一种或多种材料:玻璃、聚苯乙烯、石英、硅石、尼龙、硝酸纤维素、聚氯乙烯、聚多巴胺、聚二甲基硅氧烷、聚偏二氟乙烯、硅、二氧化硅、聚合物、氧化铁和塑料。
20. 如权利要求1所述的薄膜,其中所述基底包含平坦表面、弯曲表面、球形表面、多孔板中的孔或三维多孔膜。
21. 如权利要求1所述的薄膜,其中所述基底为具有或不具有磁芯的珠子。
22. 如权利要求21所述的薄膜,其中所述珠子的直径为0.05微米至200微米。
23. 如权利要求21所述的薄膜,其中所述珠子在容器中,如96孔板或384孔板的孔中。
24. 如权利要求1所述的薄膜,其进一步包含在所述薄膜上的结合元件阵列,其中所述

结合元件与分析物结合。

25. 如权利要求24所述的薄膜,其中所述结合元件阵列包含多个不同的结合元件,其每一个均结合不同的分析物。

26. 如权利要求24所述的薄膜,其中所述结合元件选自蛋白质、抗体、抗原结合抗体片段、细胞、适体、肽、多核苷酸、外来体和组织切片。

27. 如权利要求24所述的薄膜,其中所述结合元件为用于检测样品中的抗体的抗原。

28. 如权利要求27所述的薄膜,其中所述抗原结合选自下组的一种或多种抗体:总人IgG、IgM、IgA和IgE;抗HLA抗体;抗dsDNA抗体;抗Smith抗体;系统性红斑狼疮(SLE)的诊断抗体,如抗核小体、抗U1RNP和抗P0抗体;心血管疾病的诊断抗体;弓形体病、风疹、狂犬病、登革热、疟疾、莱姆病、非洲锥虫病、霍乱、隐孢子虫病、登革、流感、日本脑炎、利什曼病、麻疹、脑膜炎、盘尾丝虫病、肺炎、结核病、伤寒或黄热病的诊断抗体;CMV、HSV-1/2、HBA、HBV、HCV、HDV、HIV、HPV、埃博拉病毒、轮状病毒、人白细胞抗原、甲状腺刺激激素受体(TSHR)、甲状腺过氧化物、甲状腺球蛋白、组织转谷氨酰胺酶(tTG)、肌内膜、脱酰胺麦醇溶蛋白肽的特异性抗体;以及选自p53、NY-ESO-1、MAGE A4、HuD、CAGE、GBU4-5和SOX2的肿瘤相关抗原的特异性抗体。

29. 如权利要求24所述的薄膜,其中所述分析物为蛋白质、抗体、肽、核酸、酶、细胞、外来体、无细胞DNA或组织。

30. 如权利要求24所述的薄膜,其中所述分析物为受试者状况的生物标志物。

31. 如权利要求30所述的薄膜,其中所述分析物为炎症细胞因子、心血管疾病的生物标志物、传染病的生物标志物、炎症肠病的生物标志物或癌症的生物标志物。

32. 如权利要求31所述的薄膜,其中(a)所述分析物为心血管疾病的生物标志物,选自肌钙蛋白I、c反应蛋白(CRP)、NT-ProBNP,以及针对膜联蛋白A5、SDHA、ATP1A3、肌联蛋白、肌球蛋白、ADBRK、EDNRA、EDNRB、AGTR1、CHRM2或HSPD的抗体;(b)所述分析物为传染病的生物标志物,选自乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原、HBV表面抗原、登革热NS1抗原,以及针对鼠弓形体、风疹、CMV、HCV、HIV、梅毒和HSV中一种或多种的抗体;或(c)所述分析物为癌症的生物标志物,选自前列腺特异性抗原(PSA)、癌胚抗原(CEA)、癌抗原-125(CA125)、AFP、SCC、CA19-9、CA242、NSE、Cyfa21-1、CA15-3和总T-PSA。

33. 如权利要求27所述的薄膜,其中所述抗原包括(a)一种或多种鼠弓形体抗原、一种或多种风疹抗原、一种或多种CMV抗原以及一种或多种HSV抗原;以及可选的(b)一种或多种梅毒抗原和一种或多种HIV抗原。

34. 一种制备如权利要求1所述的薄膜的方法,所述方法包括:

将金(Au)纳米颗粒种子吸附在基底上,或使Au纳米颗粒种子在基底上的溶液相或蒸气相中生长;以及

使银纳米结构围绕所述金纳米颗粒种子生长。

35. 一种检测分析物的方法,所述方法包括:

提供在基底上包含凸起的纳米结构的薄膜,其中所述薄膜的纳米结构包含银包金纳米颗粒,并且所述纳米结构彼此被间隙隔开;

将分析物和针对该分析物的标记物施加至所述薄膜,其中所述标记物包含荧光团;以及

通过检测所述荧光团的荧光信号来检测所述分析物,其中相对于在不存在所述薄膜的情况下所述荧光团的荧光信号,所述荧光信号的强度增强。

36. 如权利要求35所述的方法,其中所述薄膜具有一种或多种以下特性:

所述间隙具有5nm至50nm的宽度和5nm至200nm的长度;

所述纳米结构具有50nm至500nm的平均宽度和平均长度;

所述薄膜具有1000nm²至250,000nm²的纳米片大小;

所述薄膜的高度为5nm至500nm;

所述薄膜包含不规则特征和异质结构;

所述薄膜提供约400nm至约2100nm的等离子体;

所述基底包含平坦表面、弯曲表面、球形表面或三维多孔膜;以及

所述基底为珠子。

37. 如权利要求35所述的方法,其中荧光信号在400nm至2100nm的范围内。

38. 如权利要求35所述的方法,其中对于在所述薄膜表面1000nm内的荧光团,荧光信号得到增强。

39. 如权利要求35所述的方法,其中所述荧光团为具有约700nm至约800nm的发射的近红外荧光团,并且所述荧光信号的强度增强至少30倍。

40. 如权利要求35所述的方法,其中所述荧光团为具有约400nm至约700nm的发射的可见光染料,并且所述荧光信号的强度提高至少3倍。

41. 如权利要求35所述的方法,其进一步包括根据检测所述荧光信号而确定所述分析物的浓度、身份或位置。

42. 如权利要求35所述的方法,其中 (i) 所述分析物与所述标记物结合, (ii) 所述分析物在表面上,并且 (iii) 步骤 (b) 包括将所述薄膜施加于所述表面上的分析物。

43. 如权利要求42所述的方法,其中所述分析物通过缀合至所述表面的结合元件而结合至所述表面。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述表面为DNA微阵列、RNA微阵列、miRNA微阵列、肽微阵列、抗原微阵列、蛋白质微阵列或抗体微阵列。

45. 如权利要求42所述的方法,其中所述分析物为炎性细胞因子、心血管疾病的生物标志物、传染病的生物标志物或癌症的生物标志物。

46. 如权利要求45所述的方法,其中 (a) 所述分析物为心血管疾病的生物标志物,选自肌钙蛋白I、c反应蛋白(CRP)、NT-ProBNP,以及针对膜联蛋白A5、SDHA、ATP1A3、肌联蛋白、肌球蛋白、ADBRK、EDNRA、EDNRB、AGTR1、CHRM2或HSPD的抗体; (b) 所述分析物为传染病的生物标志物,选自乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原、HBV表面抗原、登革热NS1抗原,以及针对鼠弓形体、风疹、HCV、HSV、HIV、梅毒和CMV中一种或多种的抗体;或 (c) 所述分析物为癌症的生物标志物,选自前列腺特异性抗原(PSA)、癌胚抗原(CEA)、癌抗原-125(CA125)、AFP、SCC、CA19-9、CA242、NSE、Cyfa21-1、CA15-3和总T-PSA。

47. 如权利要求42所述的方法,其中步骤(c)包括通过显微镜或扫描仪进行成像。

48. 如权利要求35所述的方法,其中所述薄膜进一步包含在所述薄膜上的结合元件阵列,其中所述结合元件与所述分析物结合。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述结合元件选自蛋白质、抗体、抗原结合抗体片

段、细胞、外来体、无细胞DNA、适体和多核苷酸。

50. 如权利要求48所述的方法,其中所述结合元件为用于检测样品中的抗体的抗原。

51. 如权利要求48所述的方法,其中所述分析物为蛋白质、抗体、肽、核酸、酶、细胞、外来体、无细胞DNA或组织。

52. 如权利要求48所述的方法,其中所述分析物为受试者状况的生物标志物。

53. 如权利要求35所述的方法,其中将多种不同的分析物和相应的多种不同的标记物施加至所述薄膜,并在单次测定中检测所述不同标记物中的每一种。

54. 如权利要求35所述的方法,其中所述分析物来自受试者的样品。

55. 如权利要求54所述的方法,其进一步包括根据检测所述荧光信号而鉴别所述样品中细胞的表型。

56. 如权利要求55所述的方法,其中所述表型为癌症。

57. 如权利要求48所述的方法,其中所述阵列包含在已知位置缀合至所述薄膜的多个不同结合元件,该结合元件中的每一个结合不同的分析物;并且所述方法进一步包括基于所检测到的荧光信号的位置来鉴别分析物。

58. 如权利要求48所述的方法,其中所述结合元件为缀合至所述薄膜的寡核苷酸,所述基底为珠子,并且所述分析物为经由序列互补性与所述寡核苷酸杂交的靶多核苷酸,或其扩增产物。

59. 如权利要求58所述的方法,其中所述寡核苷酸为引物,并且检测包括扩增所述靶多核苷酸以产生可检测的扩增产物。

60. 如权利要求35所述的方法,其中所述检测包括单分子成像及示踪,或单纳米颗粒成像及示踪。

61. 如权利要求35所述的方法,其中所述荧光团为荧光共振能量转移(FRET)对的成员,并且该对的一个或两个成员的荧光信号被所述薄膜增强。

62. 如权利要求35所述的方法,其中所述标记物为荧光原位杂交(FISH)探针。

63. 一种对多核苷酸进行测序的方法,所述方法包括:

(a) 提供在基底上包含凸起的纳米结构的薄膜,其中所述薄膜的纳米结构包含银包金纳米颗粒或金包金纳米颗粒,并且所述纳米结构彼此被间隙隔开;

(b) 使寡核苷酸与靶多核苷酸杂交;

(c) 在延伸方向上用与所述靶多核苷酸上的对应位置互补的一个或多个碱基来延伸所述寡核苷酸;以及

(d) 通过检测一个或多个荧光团的荧光信号来鉴别在步骤(c)中添加的所述一个或多个碱基;

其中相对于在不存在所述薄膜的情况下所述荧光团的荧光信号,所述荧光信号的强度被所述薄膜增强。

64. 如权利要求63所述的方法,其中不同的荧光团与四种碱基中的每一种相关联。

65. 如权利要求63所述的方法,其中步骤(c)包括通过聚合酶延伸。

66. 如权利要求63所述的方法,其中步骤(c)包括通过连接酶延伸。

67. 如权利要求63所述的方法,其中所述薄膜在多个珠子上。

68. 如权利要求63所述的方法,其中所述珠子流动通过流通池,或缀合至流通池。

69. 一种包含分布在多孔基底之中或之上的珠子的组合物,其中:

所述珠子具有珠子表面,并且包含凸起的纳米结构的薄膜在所述珠子表面上;

所述纳米结构包含银包金纳米颗粒,或金包金纳米颗粒;

所述纳米结构彼此被间隙隔开;并且

相对于在不存在所述薄膜的情况下从邻近于所述基底的荧光团获得的荧光信号,来自邻近于所述薄膜的荧光团的荧光信号的强度增强。

70. 如权利要求69所述的组合物,其中:

(a) 所述珠子具有磁芯;

(b) 所述珠子的直径为0.05微米至200微米;

(c) 所述多孔基底为多孔膜材料;并且/或者

(d) 所述薄膜包含在所述薄膜上的多个结合元件。

71. 如权利要求69所述的组合物,其中所述多孔基底为包括硝酸纤维素、玻璃纤维、尼龙或乙酸纤维素在内的多孔膜材料。

72. 如权利要求69所述的组合物,其中所述薄膜包含在所述薄膜上的多个结合元件,并且所述结合元件选自蛋白质、抗体、抗原结合抗体片段、细胞、适体和多核苷酸。

73. 一种其上有包含凸起纳米结构的薄膜的珠子,其中:

所述纳米结构包含银包金纳米颗粒,或金包金纳米颗粒;

所述纳米结构彼此被间隙隔开;

多个荧光团缀合至所述珠子或所述薄膜;并且

相对于在不存在所述薄膜的情况下从所述珠子上的荧光团获得的荧光信号,来自所述荧光团的荧光信号的强度增强。

74. 如权利要求73所述的珠子,其进一步包含缀合至所述珠子或所述薄膜的结合元件。

75. 一种用于标记靶标的方法,其包括使所述靶标与多个如权利要求74所述的珠子接触,其中结合元件与所述靶标结合。

76. 一种其上有包含凸起纳米结构的薄膜的珠子,其中:

所述纳米结构包含银包金纳米颗粒,或金包金纳米颗粒;

所述纳米结构彼此被间隙隔开;

多个结合元件缀合至所述珠子或所述薄膜;并且

相对于在不存在所述薄膜的情况下从与所述珠子复合的荧光团获得的荧光信号,来自与所述珠子复合的荧光团的荧光信号的强度增强。

77. 如权利要求73或76中任一项所述的珠子,其中所述珠子具有一种或多种以下特性:

(a) 所述珠子的大小为0.01-10微米;

(b) 所述珠子包含在所述薄膜下方的磁性涂层,任选地其中所述磁性涂层包含氧化铁;

(c) 多个结合元件与所述珠子复合,其中所述结合元件结合分析物,任选地其中所述分析物为外来体、蛋白质、抗体、多核苷酸、无细胞多核苷酸、DNA或RNA;以及

(d) 所述珠子包含聚合物芯或二氧化硅芯。

78. 如权利要求73、74或76所述的珠子,其中所述薄膜具有一种或多种以下特性:

所述纳米结构包含银包金纳米颗粒;

所述间隙具有5nm至50nm的宽度和5nm至200nm的长度;

所述纳米结构具有50nm至500nm的平均宽度和平均长度；

所述薄膜具有1000nm²至250,000nm²的纳米片大小；

所述薄膜的高度为5nm至500nm；

所述薄膜包含不规则特征和异质结构；以及

所述薄膜提供约400nm至约2100nm的等离子体。

79. 一种检测分析物的方法，所述方法包括：

(a) 将多个如权利要求76-78中任一项所述的珠子与包含所述分析物的样品混合，其中所述分析物与所述结合元件结合；

(b) 用结合所述分析物的标记物来标记所结合的分析物，其中所述标记物包含荧光团；以及

(c) 通过检测来自所述荧光团的荧光信号来检测所结合的分析物；其中相对于在不存在所述薄膜的情况下所述荧光团的荧光信号，所述荧光信号的强度增强。

80. 如权利要求79所述的方法，其中：(a) 所述分析物为外来体并且所述标记物为结合所述外来体的表面抗原的抗体；或 (b) 所述分析物为无细胞DNA并且所述标记物为嵌入染料。

81. 一种包含在薄膜基底上的薄膜以及分析物器皿的装置，其中：

(a) 所述薄膜包含凸起的纳米结构，其中所述凸起的纳米结构 (i) 包含银包金纳米颗粒或金包金纳米颗粒，并且 (ii) 彼此被间隙隔开；

(b) 所述分析物器皿被配置用于保持分析物与所述分析物器皿的第一表面相接触；

(c) 所述薄膜具有薄膜表面，该薄膜表面与所述分析物器皿的第二表面接触或与所述分析物器皿的第一表面的间隔在1000nm以内，其中所述第二表面与所述第一表面相对地定位；并且

(d) 相对于在不存在所述薄膜的情况下从所述荧光团获得的荧光信号，来自与所述分析物关联的荧光团的荧光信号的强度增强。

82. 一种包含在薄膜基底上的薄膜以及分析物器皿的装置，其中：

(a) 所述薄膜包含凸起的纳米结构，其中所述凸起的纳米结构 (i) 包含银包金纳米颗粒或金包金纳米颗粒，并且 (ii) 彼此被间隙隔开；

(b) 所述薄膜基底为在所述分析物器皿中的珠子；

(c) 所述分析物器皿被配置用于保持分析物和所述珠子；并且/或者

(d) 相对于在不存在所述薄膜的情况下从邻近于所述基底的荧光团获得的荧光信号，来自邻近于所述薄膜的荧光团的荧光信号的强度增强。

83. 如权利要求82所述的装置，其中：

(a) 所述珠子具有磁芯；

(b) 所述珠子的直径为0.05微米至200微米；

(c) 所述薄膜包含在所述薄膜上的多个结合元件；并且/或者

(d) 所述分析物器皿为多孔板的孔。

84. 如权利要求81或82所述的装置，其中所述薄膜具有一种或多种以下特性：

所述间隙具有5nm至50nm的宽度和5nm至200nm的长度；

所述纳米结构具有50nm至500nm的平均宽度和平均长度；

所述薄膜具有 1000nm^2 至 $250,000\text{nm}^2$ 的纳米片大小；
所述薄膜的高度为 5nm 至 500nm ；
所述薄膜包含不规则特征和异质结构；以及
所述薄膜提供约 400nm 至约 2100nm 的等离子体。

85. 一种检测分析物的方法，其包括：(a) 提供如权利要求81或82所述的装置；(b) 将分析物及针对该分析物的标记物施加至所述分析物器皿，其中所述标记物包含荧光团；以及
(c) 通过检测所述荧光团的荧光信号来检测所述分析物，其中相对于在不存在所述薄膜的情况下所述荧光团的荧光信号，所述荧光信号的强度增强。

86. 一种检测样品中的一种或多种抗体的方法，所述方法包括：

(a) 提供在基底上包含凸起的纳米结构的薄膜，其中 (i) 所述薄膜的纳米结构包含银包金纳米颗粒或金包金纳米颗粒，(ii) 所述纳米结构彼此被间隙隔开；以及 (iii) 多种抗原与所述薄膜的表面复合；

(b) 使所述多种抗原与样品以及用于检测与所述多种抗原中的抗原结合的一种或多种抗体的一种或多种标记物接触；以及

(c) 通过检测所述荧光团的荧光信号来检测所述一种或多种结合的抗体，其中相对于在不存在所述薄膜的情况下所述荧光团的荧光信号，所述荧光信号的强度增强；

其中所述多种抗原包括 (i) 一种或多种鼠弓形体抗原、一种或多种风疹抗原、一种或多种CMV抗原以及一种或多种HSV抗原；以及可选的 (ii) 一种或多种梅毒抗原和一种或多种HIV抗原。

87. 如权利要求86所述的方法，其中所述一种或多种抗体为IgG抗体，并且所述一种或多种标记物为抗IgG抗体。

88. 如权利要求86所述的方法，其中 (i) 所述一种或多种抗体包括选自IgG、IgM、IgA和IgE的一种或多种抗体亚型；(ii) 所述一种或多种标记物包括选自抗IgG抗体、抗IgM抗体、抗IgA抗体和抗IgE抗体的多种对应的标记物抗体；(iii) 对应于一种亚型的标记物抗体的荧光团与对应于任意其他亚型的荧光团是不同的，并且 (iv) 所述方法进一步包括基于所述荧光信号鉴别或定量所述不同的亚型。

89. 如权利要求88所述的方法，其中所述荧光团选自Cy3、Cy5、IR680和IR800。

90. 如权利要求86所述的方法，其中所述多种抗原排列在阵列中的已知位置，并且所述方法进一步包括基于所述荧光信号在所述阵列中的位置来鉴别所述一种或多种结合的抗体。

91. 如权利要求86-90中任一项所述的方法，其中所述薄膜包含银包金纳米颗粒。

92. 如权利要求86-90中任一项所述的方法，其中所述薄膜具有一种或多种以下特性：

所述间隙具有 5nm 至 50nm 的宽度和 5nm 至 200nm 的长度；

所述纳米结构具有 50nm 至 500nm 的平均宽度和平均长度；

所述薄膜具有 1000nm^2 至 $250,000\text{nm}^2$ 的纳米片大小；

所述薄膜的高度为 5nm 至 500nm ；

所述薄膜包含不规则特征和异质结构；

所述薄膜提供约 400nm 至约 2100nm 的等离子体；

所述基底包含平坦表面、弯曲表面、球形表面或三维多孔膜；以及

所述基底为珠子。

93. 如权利要求86-90中任一项所述的方法,其中所述荧光团为具有约700nm至约800nm的发射的近红外荧光团,并且所述荧光信号的强度增强至少30倍。

94. 如权利要求86-90中任一项所述的方法,其中所述荧光团为具有约400nm至约700nm的发射的可见光染料,并且所述荧光信号的强度提高至少3倍。

95. 如权利要求86-90中任一项所述的方法,其进一步包括根据检测所述荧光信号而确定所述分析物的浓度、量、身份和/或位置。

96. 如权利要求86-90中任一项所述的方法,其中所述样品为具有1-100 μ L体积的全血、血浆、血清、唾液或尿液样品。

97. 如权利要求86-90中任一项所述的方法,其中所述样品为具有1-10 μ L体积的全血样品,其任选地在稀释剂溶液中稀释至100 μ L或更小的总体积。

用于增强成像的金属复合物

交叉引用

[0001] 本申请要求提交于2014年11月5日的第62/075,785号美国临时申请以及提交于2015年7月15日的第62/192,672号美国临时申请的权益,所述申请中的每一个均通过引用而全文并入本文。

背景技术

[0002] 在极低浓度下特异性地快速检测化学物质和生物物质的能力正变得越来越重要,尤其是在环境、法医和医疗领域中。因为病原性物质即使在低浓度下存在也可能带来严重的病理学后果,所以对低水平的病原性物质如造成生物威胁的物质的检测例如可提供这类物质对环境污染的关键性测量。因此,灵敏的检测装置使得能够在这类病原体造成重大危害之前将其消除。在许多生物医学应用以及医疗和食品产业中,也越来越需要生物物质的快速和定量检测。

[0003] 根据分子和应用,可使用广泛不同的一组技术来检测生物分子,诸如核酸、蛋白质、抗体、亚细胞囊泡、细胞和组织。基于荧光的检测已经成为生物医学、生物学以及相关科学领域中的主要感测技术之一,例如,流式细胞术、基因测序、免疫分析、免疫组织化学成像(IHC)和免疫荧光成像、单分子成像以及荧光原位杂交(FISH)。然而,对于高灵敏度、高速度、高信噪比应用而言,此类技术常常遭遇荧光信号不足的问题。

[0004] 由于生物材料往往在可见光波长区域具有高背景荧光信号(该背景荧光信号在近红外区域降低),因此根据所使用的方法,对所需生物分子的检测可能受到与生物分子结合的探查荧光分子的荧光输出强度的限制。例如,对于免疫测定技术,如酶联免疫吸附测定(ELISA)——一种用于传染病和自身免疫病的临床诊断测量的常用技术,对蛋白质和抗体的检测限约为1纳克/ml (ng/ml),并且ELISA的动态范围仅跨越<3个数量级。鉴于在早期疾病阶段,包括全血、血浆、血清和唾液在内的生物流体中的生物标志物如细胞因子和抗体(包括用于早期癌症诊断的前列腺特异性抗原(PSA)和用于心血管疾病的肌钙蛋白I(cTnI))的临床相关水平可能远低于1ng/ml,因此这是次优的。

发明内容

[0005] 鉴于上述情况,对提高基于荧光的检测方案的能力以实现更高的信号背景比的检测方法存在需求。本文所述的方法、系统和组合物满足了这一需求,并提供了额外的优势。

[0006] 本公开内容提供了用于以高灵敏度、速度和信噪比检测荧光信号的方法和组合物。本文提供的方法和组合物可用于多种生物医学成像和测定应用,其在可见光和近红外区中的荧光增强跨越大约400纳米(nm)至约2100nm的宽范围。

[0007] 在一方面,本公开内容提供了在基底上包含凸起的纳米结构的薄膜。在一个实施方案中,所述薄膜的纳米结构包含银包金(silver on gold)纳米颗粒;所述纳米结构彼此被间隙隔开;相对于在不存在所述薄膜的情况下从邻近于所述基底的荧光团获得的荧光信号,来自邻近于所述薄膜的荧光团的荧光信号的强度增强。在一些实施方案中,所述间隙具

有5nm至50nm的宽度和5nm至1000nm的长度。在一些实施方案中,所述纳米结构具有50nm至500nm,如100nm至200nm的平均宽度和平均长度。在一些实施方案中,所述薄膜具有1000nm²至250,000nm²的纳米片(nanoplate)大小。所述薄膜可包含不规则特征和异质结构。在一些实施方案中,所述薄膜的高度为5nm至500nm。根据电子显微镜成像和导电性,所述薄膜通过渗流路径和导电可以是半连续的,或者根据电子显微镜成像和导电性,其可以是不连续的。增强的荧光信号可在400nm至2100nm的范围内。在一些实施方案中,对于在所述薄膜表面1000nm内的荧光团,荧光信号增强。在一些实施方案中,所述荧光团为具有约700nm至约800nm的发射的近红外荧光团(例如,IR680或IR800),并且所述荧光信号的强度增强至少30倍(例如,至少100倍)。在一些实施方案中,所述荧光团为具有约400nm至约700nm的发射的可见光染料(例如,DAPI、Alexa488、Cy3或Cy5),并且所述荧光信号的强度增强至少3倍(例如,至少30倍)。所述基底可包含选自下组的一种或多种材料:玻璃、聚苯乙烯、石英、硅石(silica)、尼龙、硝酸纤维素、聚氯乙烯、聚二甲基硅氧烷、聚偏二氟乙烯、聚多巴胺、硅、二氧化硅(silicon dioxide)、聚合物、氧化铁和塑料。所述基底可包含平坦表面、弯曲表面、球形表面或三维多孔膜。在一些情况下,所述基底为珠子,如直径为0.05微米至200微米的珠子。所述珠子可具有或不具有磁芯或顺磁芯。所述珠子可在容器,如多孔板(例如,96孔或384孔板)的孔中。在一些情况下,所述基底本身为孔板的内部,如多孔板(例如,96孔或384孔板)中的孔。

[0008] 本公开内容的薄膜可进一步包含在所述薄膜上的结合元件阵列,其中所述结合元件与分析物结合。所述阵列可包含多个不同的结合元件,其每一个结合不同的分析物。在一些实施方案中,所述结合元件选自:蛋白质、抗体、抗原结合抗体片段、细胞、适体、肽、多核苷酸、外来体和组织切片。所述结合元件可为用于检测样品中的抗体的抗原。被所述抗原结合的抗体可以是选自下组的一种或多种:总人IgG、IgM、IgA和IgE;抗HLA(人白细胞抗原)抗体;抗dsDNA抗体;抗Smith抗体;系统性红斑狼疮(SLE)的诊断抗体,如抗核小体、抗U1RNP和抗P0抗体;心血管疾病(例如,扩张性心肌病)、弓形体病、风疹、狂犬病、疟疾、莱姆病、非洲锥虫病、霍乱、隐孢子虫病、登革热、流感、日本脑炎、利什曼病、麻疹、脑膜炎、盘尾丝虫病、肺炎、结核病、伤寒或黄热病的诊断抗体;CMV、HSV-1/2、HBA、HBV、HCV、HDV、HIV、HPV、埃博拉病毒、轮状病毒、人白细胞抗原、甲状腺刺激激素受体(TSHR)、甲状腺过氧化物、甲状腺球蛋白、组织转谷氨酰胺酶(tTG)、肌内膜、脱酰胺麦醇溶蛋白肽的特异性抗体;以及选自p53、NY-ESO-1、MAGE A4、HuD、CAGE、GBU4-5和SOX2的肿瘤相关抗原的特异性抗体。所述分析物可为蛋白质、抗体、肽、核酸、酶、细胞、外来体、无细胞DNA或组织。所述分析物可为受试者状况的生物标志物。分析物的实例包括炎性细胞因子、心血管疾病的生物标志物(例如,肌钙蛋白I(cTnI)、c反应蛋白(CRP)、NT-ProBNP,或针对膜联蛋白A5、SDHA、ATP1A3、肌联蛋白、肌球蛋白、ADBRK、EDNRA、EDNRB、AGTR1、CHRM2或HSPD的抗体)、传染病的生物标志物(例如,乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原、HBV表面抗原、登革热NS1抗原,或针对鼠弓形体(*Toxoplasmosis gondii*)、风疹、HCV、HIV、梅毒或HSV的抗体)、炎性肠病的生物标志物,或癌症的生物标志物(例如,前列腺特异性抗原(PSA)、癌胚抗原(CEA)、癌抗原-125(CA125)、AFP、SCC、CA19-9、CA242、NSE、Cyfa21-1、CA15-3和总T-PSA)。在一些实施方案中,所述抗原包括一种或多种鼠弓形体抗原、一种或多种风疹抗原、一种或多种CMV抗原以及一种或多种HSV抗原。

[0009] 在一方面,本公开内容提供了用于制备本公开内容的薄膜,如包含含有银包金纳

米颗粒的凸起纳米结构的薄膜的方法。在一些实施方案中,所述方法包括将金(Au)纳米颗粒种子吸附在基底上,或使Au纳米颗粒种子在基底上的溶液相或蒸气相中生长;以及使银纳米结构例如于溶液相中围绕所述金纳米颗粒种子生长。所述薄膜可具有本文公开的薄膜特性的任意组合。

[0010] 在一方面,本公开内容提供了检测分析物的方法。在一个实施方案中,所述方法包括提供在基底上包含凸起的纳米结构的薄膜,其中所述薄膜的纳米结构包含银包金纳米颗粒,并且所述纳米结构彼此被间隙隔开;向所述薄膜施加分析物和针对该分析物的标记物,其中所述标记物包含荧光团;以及通过检测该荧光团的荧光信号而检测所述分析物,其中相对于在不存在所述薄膜的情况下所述荧光团的荧光信号,所述荧光信号的强度增强。所述薄膜可具有一个或多个以下特性:所述间隙具有5nm至50nm的宽度和5nm至200nm的长度;所述纳米结构具有50nm至500nm的平均宽度和平均长度;所述薄膜具有1000nm²至250,000nm²的纳米片大小;所述薄膜的高度为5nm至500nm;所述薄膜包含不规则特征和异质结构;所述薄膜提供约400nm至约2100nm的等离激元(plasmon);所述基底包含平坦表面、弯曲表面、球形表面或三维多孔膜;以及所述基底为珠子。增强的荧光信号可在400nm至2100nm的范围内。在一些实施方案中,对于在所述薄膜表面1000nm内的荧光团,荧光信号得到增强。在一些实施方案中,所述荧光团为具有约700nm至约800nm的发射的近红外荧光团(例如,IR680或IR800),并且所述荧光信号的强度增强至少30倍(例如,至少100倍)。在一些实施方案中,所述荧光团为具有约400nm至约700nm的发射的可见光染料(例如,DAPI、Alexa488、Cy3或Cy5),并且所述荧光信号的强度增强至少3倍(例如,至少30倍)。所述方法可进一步包括根据检测所述荧光信号而确定所述分析物的浓度、身份或位置。在一些实施方案中,(i)所述分析物与所述标记物结合,(ii)所述分析物在表面上(例如,通过缀合至所述表面的结合元件而结合至所述表面),以及(iii)步骤(b)包括将所述薄膜施加于所述表面上的分析物。所述表面可为DNA微阵列、RNA微阵列、miRNA微阵列、肽微阵列、蛋白质微阵列、抗原微阵列或抗体微阵列。成像可包括通过显微镜或扫描仪进行成像。所述薄膜可进一步包含在所述薄膜上的结合元件阵列,其中所述结合元件与所述分析物结合。结合元件可包括选自下组的任一种或多种:蛋白质、抗体、抗原结合抗体片段、细胞、外来体、无细胞DNA、适体和核酸。在一些情况下,所述结合元件为用于检测样品中的抗体的抗原。所述分析物可为蛋白质、抗体、肽、核酸、酶、细胞或组织。所述分析物可为受试者状况的生物标志物。在一些情况下,所述分析物为炎性细胞因子、心血管疾病的生物标志物(例如,肌钙蛋白I(cTnI)、c反应蛋白(CRP)、NT-ProBNP,或针对膜联蛋白A5、SDHA、ATP1A3、肌联蛋白、肌球蛋白、ADBRK、EDNRA、EDNRB、AGTR1、CHRM2或HSPD的抗体)、传染病的生物标志物(例如,乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原、HBV表面抗原、登革热NS1抗原,以及针对鼠弓形体、风疹、HCV、HSV、HIV、梅毒和CMV中一种或多种的抗体),或癌症的生物标志物(例如,前列腺特异性抗原(PSA)、癌胚抗原(CEA)、癌抗原-125(CA125)、AFP、SCC、CA19-9、CA242、NSE、Cyfa21-1、CA15-3或总T-PSA)。所述阵列可包含在已知位置缀合至所述薄膜的多个不同结合元件,该结合元件中的每一个结合不同的分析物;并且所述方法进一步包括基于所检测到的荧光信号的位置来鉴别分析物。在一些实施方案中,所述结合元件为缀合至所述薄膜的寡核苷酸,所述基底为珠子,并且所述分析物为经由序列互补性与所述寡核苷酸杂交的靶多核苷酸,或其扩增产物。当所述结合元件为寡核苷酸时,该寡核苷酸可为引物,并且检测可包括扩增所述靶

多核苷酸,以产生可检测的扩增产物。在一些实施方案中,将多种不同的分析物和相应的多种不同的标记物施加至所述薄膜,并在单次测定中检测所述不同标记物中的每一种。在一些实施方案中,所述分析物来自受试者的样品。所述方法可进一步包括根据检测所述荧光信号(例如,通过免疫组织化学(IHC)染色)而鉴别所述样品中细胞的表型(例如,癌症)。检测可包括单分子成像及示踪(tracking),或单纳米颗粒成像及示踪。所述荧光团可为荧光共振能量转移(FRET)对的成员,并且该对的一个或两个成员的荧光信号可被所述薄膜增强。在一些实施方案中,所述标记物为荧光原位杂交(FISH)探针。检测一种或多种分析物的方法可进一步包括将受试者诊断为具有与所述一种或多种分析物的存在、不存在或水平相关的状况,如本文所述的状况。方法可进一步包括基于一种或多种分析物的检测和/或所得的诊断而采取医疗行为。

[0011] 在一方面,本公开内容提供了对多核苷酸进行测序的方法。在一些实施方案中,所述方法包括(a)提供在基底上包含凸起的纳米结构的薄膜,其中所述薄膜的纳米结构包含银包金纳米颗粒或金包金纳米颗粒,并且所述纳米结构彼此被间隙隔开;(b)使寡核苷酸与靶多核苷酸杂交;(c)在延伸方向上用与所述靶多核苷酸上的对应位置互补的一个或多个碱基来延伸所述寡核苷酸;以及(d)通过检测一个或多个荧光团的荧光信号来鉴别在步骤(c)中添加的所述一个或多个碱基;其中相对于在不存在所述薄膜的情况下所述荧光团的荧光信号,所述荧光信号的强度被所述薄膜增强。不同的荧光团可与四种碱基中的每一种相关联。步骤(c)中的延伸可包括通过聚合酶的延伸,或通过连接酶的延伸。所述薄膜可在多个珠子上,所述多个珠子可任选地流动通过流通池,或缀合至流通池。所述薄膜可具有任一种或多种本文所述的薄膜特性。

[0012] 在一方面,本公开内容提供了一种组合物,其包含分布在多孔基底之中或之上的珠子。在一些实施方案中,所述珠子具有珠子表面,并且包含凸起的纳米结构的薄膜在所述珠子表面上;所述纳米结构包含银包金纳米颗粒或金包金纳米颗粒;所述纳米结构彼此被间隙隔开;相对于在不存在所述薄膜的情况下从邻近于所述基底的荧光团获得的荧光信号,来自邻近于所述薄膜的荧光团的荧光信号的强度增强。所述组合物的特征可进一步在于以下的任一种或多种:(a)所述珠子具有磁芯;(b)所述珠子的直径为0.05微米至200微米;(c)所述多孔基底为多孔膜材料;以及/或者(d)所述薄膜包含在所述薄膜上的多个结合元件。所述多孔基底可为包括硝酸纤维素、玻璃纤维、尼龙或乙酸钠纤维素在内的多孔膜材料。所述薄膜可包含在所述薄膜上的多个结合元件,并且所述结合元件选自蛋白质、抗体、抗原结合抗体片段、细胞、适配体和核酸。所述薄膜可具有任一种或多种本文所述的薄膜特性。

[0013] 在一方面,本公开内容提供了一种珠子,其上具有包含凸起的纳米结构的薄膜。在一些实施方案中,所述纳米结构包含银包金纳米颗粒,或金包金纳米颗粒;所述纳米结构彼此被间隙隔开;多个荧光团缀合至所述珠子或薄膜;并且相对于在不存在所述薄膜的情况下从所述珠子上的荧光团获得的荧光信号,来自所述荧光团的荧光信号的强度增强。所述珠子可进一步包含缀合至所述珠子或薄膜的一个或多个结合元件。在用于标记靶标的方法中可采用多个这样的珠子。所述方法可包括使所述靶标与多个所述珠子接触,其中所述结合元件与所述靶标结合。所述薄膜可具有任一种或多种本文所述的薄膜特性。在一些实施方案中,所述珠子具有一种或多种(例如,全部)以下特性:(a)所述珠子的大小为0.01-10微

米；(b) 所述珠子包含在所述薄膜下方的磁性涂层，任选地，其中所述磁性涂层包含氧化铁；(c) 多个结合元件与所述珠子相复合，其中所述结合元件结合分析物，任选地，其中所述分析物为外来体、蛋白质、抗体、多核苷酸（例如，DNA或RNA）或无细胞多核苷酸（例如，DNA或RNA）；以及(d) 所述珠子包含聚合物芯或二氧化硅芯。

[0014] 在一方面，本公开内容提供了一种珠子，其上具有包含凸起的纳米结构的薄膜。在一些实施方案中，所述纳米结构包含银包金纳米颗粒，或金包金纳米颗粒；所述纳米结构彼此被间隙隔开；多个结合元件缀合至所述珠子或薄膜；并且相对于在不存在所述薄膜的情况下从与所述珠子复合的荧光团获得的荧光信号，来自与所述珠子复合的荧光团的荧光信号的强度增强。在一些实施方案中，所述珠子具有一种或多种（例如，全部）以下特性：(a) 所述珠子的大小为0.01-10微米；(b) 所述珠子包含在所述薄膜下方的磁性涂层，任选地，其中所述磁性涂层包含氧化铁；(c) 多个结合元件与所述珠子相复合，其中所述结合元件结合分析物，任选地，其中所述分析物为外来体、蛋白质、抗体、多核苷酸（例如，DNA或RNA）或无细胞多核苷酸（例如，DNA或RNA）；以及(d) 所述珠子包含聚合物芯或二氧化硅芯。所述薄膜可具有任一种或多种本文所述的薄膜特性。在一些实施方案中，所述薄膜具有一种或多种以下特性：所述间隙具有5nm至50nm的宽度和5nm至200nm的长度；所述纳米结构具有50nm至500nm的平均宽度和平均长度；所述薄膜具有1000nm²至250,000nm²的纳米片大小；所述薄膜的高度为5nm至500nm；所述薄膜包含不规则特征和异质结构；以及所述薄膜提供约400nm至约2100nm的等离子体。在检测分析物如外来体或多核苷酸（例如，无细胞DNA）的方法中可采用多个这样的珠子。在一些实施方案中，所述方法包括(a) 将所述珠子与包含所述分析物的样品混合，其中所述分析物与所述结合元件结合；(b) 用结合所述分析物的标记物标记所结合的分析物，其中所述标记物包含荧光团；以及(c) 通过检测来自所述荧光团的荧光信号来检测所结合的分析物；其中相对于在不存在所述薄膜的情况下所述荧光团的荧光信号，所述荧光信号的强度增强。在一些实施方案中，(a) 所述分析物为外来体并且所述标记物为结合所述外来体的表面抗原的抗体；或(b) 所述分析物为无细胞DNA并且所述标记物为嵌入染料。

[0015] 在一方面，本公开内容提供了包含在薄膜基底上的薄膜以及分析物器皿(receptacle)的装置。在一些实施方案中，(a) 所述薄膜包含凸起的纳米结构，其中所述凸起的纳米结构(i) 包含银包金纳米颗粒，或金包金纳米颗粒，并且(ii) 彼此被间隙隔开；(b) 所述分析物器皿被配置用于保持分析物与所述分析物器皿的第一表面相接触；(c) 所述薄膜具有薄膜表面，该薄膜表面与所述分析物器皿的第二表面接触或与所述分析物器皿的第一表面的间隔在1000nm以内，其中所述第二表面与所述第一表面相对地定位；并且(d) 相对于在不存在所述薄膜的情况下从所述荧光团获得的荧光信号，来自与所述分析物关联的荧光团的荧光信号的强度增强。在一些实施方案中，(a) 所述薄膜包含凸起的纳米结构，其中所述凸起的纳米结构(i) 包含银包金纳米颗粒，或金包金纳米颗粒，并且(ii) 彼此被间隙隔开；(b) 所述薄膜基底为在所述分析物器皿中的珠子；(c) 所述分析物器皿被配置用于保持分析物和所述珠子；并且(d) 相对于在不存在所述薄膜的情况下从邻近于所述基底的荧光团获得的荧光信号，来自邻近于所述薄膜的荧光团的荧光信号的强度增强。当所述装置包含珠子时，所述装置的特征可进一步在于：(a) 所述珠子具有磁芯；(b) 所述珠子的直径为0.05微米至200微米；(c) 所述薄膜包含在所述薄膜上的多个结合元件；并且/或者(d) 所述

分析物器皿为多孔板的孔。所述薄膜可具有以下特性中的任一种或多种：所述间隙具有5nm至50nm的宽度和5nm至200nm的长度；所述纳米结构具有50nm至500nm的平均宽度和平均长度；所述薄膜具有1000nm²至250,000nm²的纳米片大小；所述薄膜的高度为5nm至500nm；所述薄膜包含不规则特征和异质结构；以及所述薄膜提供约400nm至约2100nm的等离子体。可提供所述装置以用于检测分析物的方法，该方法可进一步包括将分析物及针对该分析物的标记物施加至所述分析物器皿，其中所述标记物包含荧光团；以及通过检测所述荧光团的荧光信号来检测所述分析物，其中相对于在不存在所述薄膜的情况下所述荧光团的荧光信号，所述荧光信号的强度增强。所述薄膜可具有任一种或多种本文所述的薄膜特性。

[0016] 在一方面，本公开内容提供了检测样品中的一种或多种抗体的方法。在一些实施方案中，所述方法包括：(a) 提供在基底上包含凸起的纳米结构的薄膜，其中(i) 所述薄膜的纳米结构包含银包金纳米颗粒或金包金纳米颗粒，(ii) 所述纳米结构彼此被间隙隔开，并且(iii) 将多种抗原与所述薄膜的表面复合；(b) 使所述多种抗原与样品以及用于检测与所述多种抗原中的抗原结合的一种或多种抗体的一种或多种标记物相接触，其中每种标记物包含荧光团，以及(c) 通过检测所述荧光团的荧光信号来检测一种或多种结合的抗体，其中相对于在不存在所述薄膜的情况下所述荧光团的荧光信号，所述荧光信号的强度增强；其中所述多种抗原包括一种或多种鼠弓形体抗原、一种或多种风疹抗原、一种或多种CMV抗原以及一种或多种HSV抗原。在一些实施方案中，所述多种抗原进一步包括一种或多种HIV抗原和/或一种或多种梅毒抗原。在一些实施方案中，所述一种或多种抗体为IgG抗体，并且所述一种或多种标记物为抗IgG抗体。在一些实施方案中，(i) 所述一种或多种抗体包括选自IgG、IgM、IgA和IgE的一种或多种抗体亚型；(ii) 所述一种或多种标记物包括选自抗IgG抗体、抗IgM抗体、抗IgA抗体和抗IgE抗体(以及任选包括其全部)的多种对应的标记物抗体；(iii) 对应于一种亚型的标记物抗体的荧光团与对应于任意其他亚型的荧光团(例如，选自Cy3、Cy5、IR680和IR800)是不同的，并且(iv) 所述方法进一步包括基于所述荧光信号鉴别或定量所述不同的亚型。在一些实施方案中，所述多种抗原排列在阵列中的已知位置，并且所述方法进一步包括基于所述荧光信号在所述阵列中的位置来鉴别一种或多种结合的抗体。所述薄膜和基底可为本文所述的任一种。在一些实施方案中，所述薄膜包含银包金纳米颗粒。在一些实施方案中，所述薄膜具有一种或多种以下特性：所述间隙具有5nm至50nm的宽度和5nm至200nm的长度；所述纳米结构具有50nm至500nm的平均宽度和平均长度；所述薄膜具有1000nm²至250,000nm²的纳米片大小；所述薄膜的高度为5nm至500nm；所述薄膜包含不规则特征和异质结构；所述薄膜提供约400nm至约2100nm的等离子体；所述基底包含平坦表面、弯曲表面、球形表面或三维多孔膜；以及所述基底为珠子。在一些实施方案中，所述荧光团为具有约700nm至约800nm的发射的近红外荧光团，并且所述荧光信号的强度增强至少30倍。在一些实施方案中，所述荧光团为具有约400nm至约700nm的发射的可见光染料，并且所述荧光信号的强度提高至少3倍。在一些实施方案中，所述方法进一步包括根据检测所述荧光信号而确定所述分析物的浓度、身份和/或位置。在一些实施方案中，所述样品为具有1-100μL体积的全血、血浆、血清、唾液或尿液样品。在一些实施方案中，所述样品为具有1-10μL体积的全血样品，其任选地在稀释剂溶液中稀释至100μL或更小的总体积。

[0017] 根据仅示出并描述了本公开内容的说明性实施方案的以下详细描述，本公开内容的其他方面和优势对本领域技术人员将变得显而易见。将会认识到，本公开内容能够具有

其他不同的实施方案,并且能够在多个明显的方面对其若干个细节进行修改,而均不脱离本公开内容。因此,附图和说明书应被认为在本质上是说明性而非限制性的。

援引并入

[0018] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用并入本文,其程度如同具体且单独地指出,每个单独的出版物、专利或专利申请均通过引用而并入。

附图说明

[0019] 本发明的新颖特征在所附权利要求中具体阐述。通过参考以下对其中利用到本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述和附图,将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解,附图中:

[0020] 图1在插图(a)-(e)中示出了一系列示例图像,显示根据实施方案,银包金薄膜(Ag/Au)在玻璃上的形成。

[0021] 图2在插图(a)-(c)中示出了根据实施方案,采用不同起始HAuCl₄浓度,沉积在SiO₂上的Au⁰种子的示例原子力显微术形貌图像。

[0022] 图3在插图(a)-(c)中示出了一系列示例图像,采用来自Agilent的genepix扫描仪上的Cy5通道,显示相比于玻璃基底,在示例cAg/Au基底和Au/Au基底上TOTO-3(一种在640nm处激发并在660nm处发射的荧光团)的信号增强。

[0023] 图4在插图(a)-(d)中示出了一系列示例图像,显示根据实施方案,(cAg/Au)薄膜作为细胞因子夹心测定的基底的表现。

[0024] 图5在插图(a)-(c)中示出了一系列示例图像,显示根据实施方案,(cAg/Au)薄膜作为反相蛋白质测定的基底的表现。

[0025] 图6示出了采用根据实施方案的Ag/Au薄膜,通过流式细胞术测定对生物标志物的增强检测的结果。在两幅图中,x轴为从10⁻³至10⁶的对数标度,而y轴为10¹至10⁷的对数标度。

[0026] 图7示出了相比于染色试验结果(A),在等离子体载玻片上的示例Toxo IgG先导试验(B)。

[0027] 图8示出了相比于ELISA结果(A),在等离子体载玻片上的示例Toxo IgM先导试验(B)。在视图(A)中,八个最高的柱条对应于阳性血清,而其他的对应于阴性血清。在视图(B)中,所有柱条都对应于匹配的结果。

[0028] 图9示出了根据实施方案,在等离子体载玻片上的ToRCH先导试验的示例结果。抗原、所检测到的抗体和标记用抗体在(A)中示出。(C)中提供了检测结果的荧光图像。(B)中提供了表明荧光图像的斑点中所打印的抗原的身份的示意布局图,其表明,斑点A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K和L分别对应于被弓形体病IgG(BioCheck)、弓形体病IgG(Meridian)、弓形体病IgG(Montoya Lab)、风疹IgG(Meridian)、弓形体病IgG(Biocheck)、CMV IgG(Meridian)、CMV IgG(Biocheck)、CMV IgM(Biocheck)、重组HSV1(Meridian)、重组HSV2(Meridian)、HSV1(Meridian)和HSV2(Meridian)结合的抗原。

[0029] 图10示出了根据实施方案,在等离子体载玻片上的唾液和全血中的示例IgD检测。

具体实施方案

[0030] 如本文所用的,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包

括复数个指示物。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0031] 术语“多核苷酸”、“核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换使用。它们是指任何长度的聚合形式的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸),或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构,并且可行使已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段的编码区或非编码区、从连锁分析定义的基因座(多个基因座)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、分离的任何序列的DNA、分离的任何序列的RNA、核酸探针以及引物。多核苷酸可包含一个或多个修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在对核苷酸结构的修饰,则其可在聚合物装配之前或之后赋予。核苷酸的序列可被非核苷酸组分中断。可在聚合后进一步修饰多核苷酸,如通过与标记组分缀合。核苷酸类似物可为在一级核碱基(A、C、G、T和U)、脱氧核糖/核糖结构、一级核苷酸的磷酸基团或其任何组合上具有修饰的一级核苷酸的类似物或模拟物。例如,核苷酸类似物可具有天然存在的或人造的经修饰的碱基。修饰的碱基的实例包括但不限于甲基化核碱基、修饰的嘌呤碱基(例如,次黄嘌呤、黄嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、isodG)、修饰的嘧啶碱基(例如,5,6-二氢尿嘧啶和5-甲基胞嘧啶、isodC)、通用碱基(例如,3-硝基吡咯和5-硝基吡咯)、非结合碱基模拟物(例如,4-甲基苯并咪唑和2,4-二氟甲苯或苯)以及无碱基(核苷酸类似物没有碱基的无碱基核苷酸)。具有修饰的脱氧核糖(例如,双脱氧核苷,如双脱氧鸟苷、双脱氧腺苷、双脱氧胸苷和双脱氧胞苷)和/或磷酸结构(一起被称为骨架结构)的核苷酸类似物的实例包括但不限于乙二醇核苷酸、吗啉代核苷酸和锁定核苷酸。

[0032] 如本文所用的,术语“荧光”是指其中分子通过发射光子从激发态弛豫至其基态的过程。如本文所用的,荧光还可以包括磷光。对于荧光,通常通过吸收紫外线、可见光或近红外辐射将分子提升至电子激发态。激发的分子然后通过发光而衰减回到基态或处于较低的激发电子态。

[0033] 如本文所用的,涉及材料的术语“等离子体活性”是指支持等离子体(例如,表面等离子体)从而表现出等离子体性质的材料。表面等离子体可用于增强包括荧光、拉曼散射和二次谐波产生在内的若干种光谱测量的表面灵敏度。

[0034] 如本文所用的,术语“等离子体性质”是指由表面等离子体表现出的性质,或指金属表面上的电荷的集体振荡。在这个意义上,等离子体性质是指可测量的性质,如Nagao等人,“Plasmons in nanoscale and atomic-scale systems,”*Sci. Technol. Adv. Mater.* 11 (2010) 054506 (12pp) 中描述的性质,其描述等离子体传感器,如用于表面增强IR吸收光谱分析(SEIRA)、表面增强拉曼散射(SERS)的等离子体传感器。另一种等离子体性质为等离子体增强的荧光,其在例如Sensors and Actuators B107 (2005) 148-153中描述。

[0035] 如本文所用的,术语“连续的”是指等离子体金属薄膜中的纳米结构的互连,该互连产生导电路径,任选地在未处于该导电路径中的一些纳米结构之间存在间隙。

[0036] 如本文所用的,术语“不连续的”是指在等离子体金属薄膜中存在一个或多个隔离的纳米结构,其中该纳米结构彼此分离且不互连。

[0037] 如本文所用的,术语“邻近”是指荧光分子与等离子体金属薄膜中的纳米结构之间的距离,在该距离内,荧光分子的荧光强度提高例如指定的增加倍数。在一些情况下,邻近可以以埃(例如,在1-1000埃内)、以纳米(例如,在1-1000nm内)或毫米(例如,在1-10mm内)

来衡量。在一些情况下,对于在薄膜表面约1000nm内的荧光团,荧光强度增强。

组合物和系统

[0038] 在多个方面的一些中,本文提供了能够放大或增强荧光信号,如跨越约400nm至约2100nm的信号的组合、系统和方法。该组合和系统可以能够促进具有提高的检测限、灵敏度、速度、特异性和信噪比的荧光检测,从而应用于依赖于荧光作为检测方法的广泛应用中。

[0039] 在一方面,本公开内容提供了在基底上包含凸起的纳米结构的薄膜。该薄膜的特征可进一步在于:该纳米结构包含银包金纳米颗粒;该纳米结构彼此被间隙隔开;相对于在不存在薄膜的情况下从邻近于基底的荧光团获得的荧光信号,来自邻近于薄膜的荧光团的荧光信号的强度增强。该薄膜可直接或间接施加于基底。对于某些应用,该纳米结构包含在第二金属的纳米颗粒上的第一金属,其中第一和第二金属可以是相同或不同的(例如,金包金,或银包金)。该纳米结构可由至少一种类型的贵金属例如钌(Ru)、铑(Rh)、钯(Pd)、银(Ag)、锇(Os)、铱(Ir)、铂(Pt)和金(Au)形成。该纳米结构可采取各种形状,例如,球形、立方体形、长方体形、圆锥体形、圆柱体形、棱柱体形、金字塔形、管状、板状、盘状、棒状,或任何规则或不规则的形状。在一些情况下,该纳米结构包括纳米颗粒。在纳米结构中超过一种类型的金属的情况下,该金属可形成层状或芯/壳结构,例如银包金纳米颗粒。在一些情况下,每种纳米结构均具有相同的形状。在一些情况下,具有不同形状(或异质)的纳米结构可能是优选的。

[0040] 纳米结构的尺寸(例如,长度、宽度、高度等)可根据纳米结构所用于的应用而变化。例如,具有比用于荧光激发和发射的光的波长小得多的纳米结构可能是优选的。在一些情况下,纳米结构可具有小于或等于约1毫米(mm),如小于或等于约750微米(μm)、500 μm 、250 μm 、100 μm 、75 μm 、50 μm 、25 μm 、10 μm 、5 μm 、1 μm 、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm、100nm、90nm、80nm、70nm、60nm、50nm、40nm、30nm、20nm、10nm、9nm、8nm、7nm、6nm、5nm、4nm、3nm、2nm、1nm、800皮米(pm)、600pm、400pm、200pm、100pm、75pm、50pm、25pm或10pm的宽度、长度和/或高度。在一些情况下,纳米结构的宽度、长度和/或高度可大于或等于约1pm、5pm、10pm、25pm、50pm、75pm、100pm、250pm、500pm、750pm、1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、15nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1 μm 、5 μm 、10 μm 、30 μm 、50 μm 、70 μm 、90 μm 、110 μm 、130 μm 、150 μm 、200 μm 、400 μm 、600 μm 、800 μm 或1mm。在一些情况下,纳米结构的宽度、长度和/或高度可在任意两个本文所述的值之间,例如,纳米结构可具有约50nm至约500nm或约100nm至约200nm的平均宽度和平均长度。作为进一步的实例,所述薄膜的高度可为5nm至500nm。

[0041] 纳米结构的横截面积可为至少约0.001 nm^2 、0.005 nm^2 、0.01 nm^2 、0.05 nm^2 、0.075 nm^2 、0.1 nm^2 、0.5 nm^2 、0.75 nm^2 、1 nm^2 、10 nm^2 、20 nm^2 、40 nm^2 、60 nm^2 、80 nm^2 、100 nm^2 、250 nm^2 、500 nm^2 、750 nm^2 、1,000 nm^2 、2,500 nm^2 、5,000 nm^2 、7,500 nm^2 、10,000 nm^2 、25,000 nm^2 、50,000 nm^2 、75,000 nm^2 、100,000 nm^2 、200,000 nm^2 、300,000 nm^2 、400,000 nm^2 、500,000 nm^2 、600,000 nm^2 、700,000 nm^2 、800,000 nm^2 、900,000 nm^2 、1,000,000 nm^2 、2,500,000 nm^2 、5,000,000 nm^2 、7,500,000 nm^2 或10,000,000 nm^2 。在一些情况下,纳米结构的横截面积可小于或等于约25,000,000 nm^2 、10,000,000 nm^2 、8,000,000 nm^2 、6,000,000 nm^2 、4,000,000 nm^2 、2,000,000 nm^2 、1,000,

000nm²、800,000nm²、600,000nm²、500,000nm²、450,000nm²、400,000nm²、350,000nm²、300,000nm²、250,000nm²、200,000nm²、150,000nm²、100,000nm²、80,000nm²、60,000nm²、50,000nm²、40,000nm²、30,000nm²、20,000nm²、10,000nm²、8,000nm²、6,000nm²、4,000nm²、2,000nm²、1,800nm²、1,600nm²、1,400nm²、1,200nm²、1,000nm²、900nm²、800nm²、700nm²、600nm²、500nm²、400nm²、300nm²、200nm²、100nm²、90nm²、80nm²、70nm²、60nm²、50nm²、40nm²、30nm²、20nm²、10nm²、8nm²、6nm²、4nm²、2nm²、1nm²、0.75nm²、0.5nm²、0.25nm²、0.1nm²、0.075nm²、0.05nm²、0.025nm²、0.01nm²、0.0075nm²、0.005nm²、0.0025nm²、0.001nm²、0.0005nm²或0.0001nm²。在一些情况下,纳米结构的横截面积可落在任意两个本文所述的值之间,例如,在约100nm²至约250,000nm²或约1,000nm²至约250,000nm²之间。

[0042] 在一些情况下,包含在薄膜中的每一种纳米结构可具有相同的形状、结构和/或大小。在一些情况下,纳米结构可具有不同的大小、形状和/或结构。根据应用,一定百分比的纳米结构具有相同或不同的大小、形状和/或结构可能是优选的,例如,约1%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的纳米结构可具有相同或不同的大小、形状和/或结构。

[0043] 纳米结构可以是或可以不是彼此隔开的。在纳米结构彼此隔开的情况下,它们可被间隙隔开。纳米结构之间的距离——间隙距离可以变化。在一些情况下,可产生大的间隙距离。在其他情况下,可采用小的间隙距离。可在同一薄膜内的不同位置处构建大和小的间隙。在一些情况下,间隙距离或平均间隙距离可小于或等于约1mm,如小于或等于约750μm、500μm、250μm、100μm、75μm、50μm、25μm、10μm、7.5μm、5μm、2.5μm、1μm、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm、100nm、90nm、80nm、70nm、60nm、50nm、40nm、30nm、20nm、10nm、9nm、8nm、7nm、6nm、5nm、4nm、3nm、2nm、1nm、0.75nm、0.5nm、0.25nm、0.1nm、0.075nm、0.05nm、0.025nm、0.01nm、0.0075nm、0.005nm、0.0025nm或0.001nm。在一些情况下,间隙距离可为至少约0.0001nm、0.0005nm、0.001nm、0.005nm、0.01nm、0.05nm、0.1nm、0.5nm、1nm、5nm、7.5nm、10nm、20nm、40nm、60nm、80nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1μm、2μm、3μm、4μm、5μm、6μm、7μm、8μm、9μm、10μm、25μm、50μm、75μm、100μm、500μm和750μm。在一些情况下,间隙距离可在任意两个本文所述的值之间,例如,在约1nm至约1,000nm之间。

[0044] 间隙可具有不同的宽度和/或长度。例如,间隙的宽度和/或长度可小于或等于约5,000nm、4,000nm、3,000nm、2,000nm、1,000nm、800nm、600nm、400nm、200nm、100nm、80nm、60nm、40nm、20nm、10nm、7.5nm、5nm、1nm、0.75nm、0.5nm、0.25nm、0.1nm、0.05nm、0.01nm、0.005nm或0.001nm。在一些情况下,间隙的宽度和/或长度可大于或等于约0.005nm、0.0075nm、0.01nm、0.05nm、0.075nm、0.1nm、0.5nm、0.75nm、1nm、2.5nm、5nm、7.5nm、10nm、30nm、50nm、70nm、90nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、750nm、1,000nm、2,500nm或5,000nm。在一些情况下,间隙的宽度和/或长度可落在任意两个本文所述的值之间的范围内,例如,间隙可具有约5nm至约50nm的宽度,以及约5nm至约200nm的长度。

[0045] 如本文提供的,根据包含在薄膜中的纳米结构的互连,该薄膜可以是连续的、半连续的或不连续的。例如,薄膜可为连续薄膜,使得其包含相互连接的凸起纳米结构,从而产生导电路径,其在未处于该导电路径中的一些纳米结构之间存在间隙。另外,薄膜可以是不

连续的,使得薄膜的至少一些部分(例如,至少10%、25%、50%、75%、90%或更多)由未被导电路径所连接的纳米结构组成。

[0046] 本公开内容中提供的薄膜的特征(例如,包含在薄膜中的纳米结构的大小、尺寸和/或结构)和特性(例如,纳米结构的粗糙度、厚度、连续性、导电性和/或互连)可通过各种技术来确定和表征,诸如,例如,导电性测量,和/或显微技术,包括标准光学显微术、透射电子显微术(TEM)、共聚焦激光扫描显微术、扫描电子显微术(SEM)和原子力显微术(AFM)。例如,可根据电子显微镜成像和/或导电性来确定通过渗透路径和导电为半连续的薄膜。在一些实例中,可根据电子显微镜成像和导电性来表征不连续膜。

[0047] 如本文所提供的,可使用各种材料来制造基底。例如,这些材料可以有机的或无机的、合成的或天然的、固体的或半固体的。可用于形成基底的材料的非限制性实例可包括玻璃、石英、塑料、硝酸纤维素、硅基材料(例如,硅、二氧化硅)、聚合物(例如,聚苯乙烯、尼龙、聚多巴胺(PDA)、聚氯乙烯(PVC)、聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)、聚偏二氟乙烯等)、生物测定或它们的组合。

[0048] 基底可具有不同的形状,例如,3维或2维的、规则或不规则的、均质或异质的。在一些情况下,基底的侧面形状可以是圆形、正方形、矩形、多边形、椭圆形、细长条、多边形,或任何其他规则或不规则的形状,或它们的组合。例如,在某些情况下,基底为珠子或条形码。基底可为可有利于后续分离和检测过程的磁珠(例如,包含磁芯或顺磁芯的珠子)。基底还可包含平坦表面、弯曲表面、球形表面或三维多孔膜。在一些情况下,基底可为多孔板的孔的内部,在一些情况下,由聚苯乙烯组成。在一些情况下,基底可为多孔板的所有孔。

[0049] 在一些情况下,基底为珠子。珠子可由多种材料(例如,本文所述的基底材料)中的任何材料制成,并且一些品种是可商购的。在一些实施方案中,珠子的平均直径为至少约0.001微米(例如,0.005微米、0.01微米、0.05微米、0.1微米、1微米、10微米、50微米、100微米、250微米、500微米或更大);小于约500微米(例如,400微米、200微米、100微米、50微米、25微米、10微米、1微米或更小);或在任意这些值之间(例如,约0.01微米至约10微米、约0.05微米至约500微米、约0.1微米至200微米,或约0.1微米至约8微米)。珠子可提供于容器中,如管或多孔板的孔中。与本文所述的任何其他基底一样,珠子和/或珠子上的薄膜可缀合一个或多个结合元件,如多个拷贝的单种结合元件,或多个不同的结合元件。在一些情况下,珠子可进一步安设的支持物如多孔基底材料之中或之上。多种多孔基底是可用的,其选择可取决于具体应用、珠子的大小等。用作珠子支持物的多孔膜的非限制性实例包括硝酸纤维素、水凝胶、3D聚合物、玻璃纤维、尼龙或乙酸钠纤维素。

[0050] 利用本公开内容的薄膜,相对于在不存在该薄膜的情况下获得的荧光信号,来自邻近于该薄膜的荧光分子(例如,荧光团)的荧光信号的强度可以增强。荧光信号的这种增强可通过增强因子来表征或定量,该增强因子被定义为在存在薄膜的情况下获得的荧光信号与在不存在该薄膜的情况下获得的相同信号之比。例如,如果在存在和不存在薄膜的情况下,荧光信号分别为410和15,则增强因子约为27。在本文提供的薄膜的帮助下,在400nm至2100nm范围内的荧光信号可以以不同的增强因子得到增强,该增强因子取决于例如荧光信号的波长、薄膜的特征和特性,等等。例如,通过使用本公开内容的薄膜,具有约700nm至约800nm的发射的近红外荧光信号的强度可增强约30倍或更多(例如,至少50倍、100倍、250倍、500倍或更多倍)。在一些实例中,具有约400nm至约700nm的发射的可见光染料的荧光信

号的强度可增强约3倍或更多倍(例如,至少5倍、至少10倍、至少25倍、至少50倍、至少100倍或更多倍)。在一些情况下,薄膜对荧光信号的荧光增强可达约1,000倍、800倍、700倍、600倍、500倍、400倍、300倍、200倍、100倍、90倍、80倍、70倍、60倍、50倍、40倍、30倍、20倍、10倍、9倍、8倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍或2倍。在一些情况下,通过采用本公开内容的薄膜,荧光信号的强度可增强至少约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍或1,000倍。在一些情况下,增强因子可在任意两个本文所述的值之间,例如,约10倍至30倍,或约100倍至200倍。在一些情况下,对于具有至少300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1000nm、1200nm、1400nm、1600nm、1800nm、2000nm或更大的波长;小于2200nm、2000nm、1800nm、1600nm、1400nm、1200nm、1000nm、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm或更小的波长;或在任意这些值之间的波长范围内,如300nm至2200nm、400nm至800nm、500nm至900nm或800nm至1400nm之间的波长的荧光信号,获得了增强。

[0051] 本公开内容可采用许多种荧光分子,例如,荧光团、小分子、染料、荧光蛋白质和量子点。荧光分子的非限制性实例可包括:荧光原位杂交(FISH)探针,1,5IAEDANS;1,8-ANS;4-甲基伞形酮;5-羧基-2,7-二氯荧光素;5-羧基荧光素(5-FAM);5-羧基萘并荧光素;5-羧基四甲基罗丹明(5-TAMRA);5-FAM(5-羧基荧光素);5-HAT(羟基色胺);5-羟基色胺(HAT);5-ROX(羧基-X-罗丹明);5-TAMRA(5-羧基四甲基罗丹明);6-羧基罗丹明6G;6-CR 6G;6-JOE;7-氨基-4-甲基香豆素;7-氨基放线菌素D(7-AAD);7-羟基-4-甲基香豆素;9-氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶;ABQ;酸性品红;ACMA(9-氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶);吡啶橙;吡啶红;吡啶黄;吡啶黄素(Acriflavin);Acriflavin Feulgen SITSa;水母素(光蛋白);AFP—自发荧光蛋白—(Quantum Biotechnologies);Alexa Fluor 350TM;Alexa Fluor 430TM;Alexa Fluor 488TM;Alexa Fluor 532TM;Alexa Fluor 546TM;Alexa Fluor 568TM;Alexa Fluor 594TM;Alexa Fluor 633TM;Alexa Fluor 647TM;Alexa Fluor 660TM;Alexa Fluor 680TM;茜素络合物;茜素红;别藻蓝素(APC);AMC,AMCA-S;AMCA(氨基甲基香豆素);AMCA-X;氨基放线菌素D;氨基香豆素;氨基甲基香豆素(AMCA);苯胺蓝;Anthrocyl stearate;APC(别藻蓝素);APC-Cy7;APTRA-BTC;APTS;Astrazon艳红4G;Astrazon橙R;Astrazon红6B;Astrazon黄7GLL;阿的平(Atabrine);ATTO-TAGTM CBQCA;ATTO-TAGTM FQ;金胺;Auorophosphine G;Auorophosphine;BAO 9(双氨基苯基噁二唑);BCECF(高pH);BCECF(低pH);硫酸小檗碱; β -内酰胺酶;Bimane;二苯甲酰胺;二苯酰亚胺(Hoechst);双BTC;Blancophor FFG;Blancophor SV;BOBOTM-1;BOBOTM-3;氟硼荧(Bodipy) 492/515;氟硼荧493/503;氟硼荧500/510;氟硼荧505/515;氟硼荧530/550;氟硼荧542/563;氟硼荧558/568;氟硼荧564/570;氟硼荧576/589;氟硼荧581/591;氟硼荧630/650-X;氟硼荧650/665-X;氟硼荧665/676;氟硼荧FI;氟硼荧FL ATP;氟硼荧FI-神经酰胺;氟硼荧R6G SE;氟硼荧TMR;氟硼荧TMR-X缀合物;氟硼荧TMR-X,SE;氟硼荧TR;氟硼荧TR ATP;氟硼荧TR-X SE;BO-PROTM-1;BO-PROTM-3;Brilliant Sulphoflavin FF;BTC;BTC-SN;钙黄绿素(Calcein);钙黄绿素蓝;Calcium CrimsonTM;Calcium Green;Calcium Green-1 Ca²⁺染料;Calcium Green-2 Ca²⁺;Calcium Green-SN Ca²⁺;Calcium Green-C18 Ca²⁺;Calcium Orange;植物细胞壁钙荧光白(Calcofluor White);羧基-X-罗丹明(5-ROX);Cascade BlueTM;Cascade Yellow;儿茶酚胺;CCF2

(GeneBlazer);CFDA;叶绿素;色霉素A;色霉素A;CL-NERF;CMFDA;香豆素鬼笔环肽;C-藻青蛋白;CPM甲基香豆素;CTC;CTC甲腈;Cy2TM;Cy3.1 8;Cy3.5TM;Cy3TM;Cy5.1 8;Cy5.5TM;Cy5TM;Cy7TM;环AMP Fluorosensor (FiCRhR);Dabcyl;丹磺酰 (Dansyl);丹磺酰胺;丹磺酰尸胺;丹磺酰氯;丹磺酰DHPE;丹磺酰氟;DAPI;Dapoxyl;Dapoxyl 2;Dapoxyl 3' DCFDA;DCFH (二氯二氢荧光素二乙酸酯);DDAO;DHR (二氢罗丹明123);二-4-ANEPPS;二-8-ANEPPS (非比例);DiA (4-二-16-ASP);二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH);DiD—亲脂性示踪剂;DiD (DiIC18 (5));DIDS;二氢罗丹明123 (DHR);DiI (DiIC18 (3));二硝基苯酚;DiO (DiOC18 (3));DiR;DiR (DiIC18 (7));DM-NERF (高pH);DNP;多巴胺;DTAF;DY-630-NHS;DY-635-NHS;ELF 97;曙红;赤藓红;赤藓红ITC;溴化乙锭;乙锭同型二聚体-1 (EthD-1);Euchrysin;EukoLight;氯化铊 (III);EYFP;固蓝;FDA;Feulgen (碱性副品红);FIF (甲醛诱导的荧光);FITC;Flazo橙;Fluo-3;Fluo-4;荧光素 (FITC);荧光素二乙酸酯;Fluoro-Emerald;Fluoro-Gold (羟基司替巴脘);Fluor-Ruby;Fluor X;FM 1-43TM;FM 4-46;Fura RedTM (高pH);Fura RedTM/Fluo-3;Fura-2;Fura-2/BCECF;Genacryl艳红B;Genacryl艳黄10GF;Genacryl粉3G;Genacryl黄5GF;GeneBlazer (CCF2);Gloxalic Acid;粒蓝;血卟啉;Hoechst 33258;Hoechst 33342;Hoechst 34580;HPTS;羟基香豆素;羟基司替巴脘 (FluoroGold);羟基色胺;高钙Indo-1;低钙Indo-1;吡啶二碳菁 (DiD);吡啶三碳菁 (DiR);Intrawhite Cf;JC-1;J0-J0-1;J0-PRO-1;LaserPro;Laurodan;LDS 751 (DNA);LDS 751 (RNA);Leucophor PAF;Leucophor SF;Leucophor WS;丽丝胺罗丹明;丽丝胺罗丹明B;钙黄绿素/乙锭同型二聚体;LOLO-1;LO-PRO-1;荧光黄;Lyso Tracker Blue;Lyso Tracker Blue-White;Lyso Tracker Green;Lyso Tracker Red;Lyso Tracker Yellow;LysoSensor Blue;LysoSensor Green;LysoSensor Yellow/Blue;Mag Green;马格达拉红 (Phloxin B);Mag-Fura Red;Mag-Fura-2;Mag-Fura-5;Mag-Indo-1;镁绿;镁橙;孔雀石绿;Marina Blue;Maxilon艳黄素10GFF;Maxilon艳黄素8GFF;部花青;甲氧基香豆素;Mitotracker Green FM;Mitotracker Orange;Mitotracker Red;光辉霉素;单溴二胺;单溴二胺 (mBBr-GSH);单氯二胺;MPS (Methyl Green Pyronine Stilbene);NBD;NBD胺;尼罗红;Nitrobenzoxadidole;去甲肾上腺素;核固红;核黄;Nylosan艳黄素E8G;Oregon Green;Oregon Green 488-X;Oregon GreenTM;Oregon GreenTM 488;Oregon GreenTM 500;Oregon GreenTM 514;Pacific Blue;碱性副品红 (Feulgen);PBF1;PE-Cy5;PE-Cy7;PerCP;PerCP-Cy5.5;PE-TexasRed [Red 613];Phloxin B (马格达拉红);Phorwite AR;Phorwite BKL;Phorwite Rev;Phorwite RPA;磷3R;光刻胶;藻红蛋白B [PE];藻红蛋白R [PE];PKH26 (Sigma);PKH67;PMIA;Pontochrome Blue Black;POPO-1;POPO-3;PO-PRO-1;PO-PRO-3;樱草灵;普施安黄;Propidium Iodide (PI);PyMPO;芪;派罗宁;派罗宁B;Pyrozal艳黄素7GF;QSY7;奎纳克林氮芥;Red 613 [PE-TexasRed];试卤灵;RH 414;Rhod-2;罗丹明;罗丹明110;罗丹明123;罗丹明5GLD;罗丹明6G;罗丹明B;罗丹明B 200;罗丹明B extra;罗丹明BB;罗丹明BG;罗丹明Green;罗丹明Phallicidine;罗丹明鬼笔环肽;罗丹明Red;罗丹明WT;玫瑰红;R-藻蓝蛋白;R-藻红蛋白 (PE);S65A;S65C;S65L;S65T;SBFI;血清素;Sevron艳红2B;Sevron艳红4G;Sevron艳红B;Sevron橙;Sevron黄L;SITS;SITS (Primuline);SITS (二苯乙烯异硫代磺酸);SNAFL钙黄绿素;SNAFL-1;SNAFL-2;SNARF钙黄绿素;SNARF1;Sodium Green;SpectrumAqua;SpectrumGreen;SpectrumOrange;Spectrum Red;SPQ (6-甲氧基-N-(3-磺丙基)喹啉鎓);二

苯乙烯;磺基罗丹明B can C;磺基罗丹明Extra;SYTO 11;SYTO 12;SYTO 13;SYTO 14;SYTO 15;SYTO 16;SYTO 17;SYTO 18;SYTO 20;SYTO 21;SYTO 22;SYTO 23;SYTO 24;SYTO 25;SYTO 40;SYTO 41;SYTO 42;SYTO 43;SYTO 44;SYTO 45;SYTO 59;SYTO 60;SYTO 61;SYTO 62;SYTO 63;SYTO 64;SYTO 80;SYTO 81;SYTO 82;SYTO 83;SYTO 84;SYTO 85;SYTOX蓝;IR680;IR880;IR-26;IR-1051;IR-1061;SYTOX绿;SYTOX橙;四环素;四甲基罗丹明 (TRITC);Texas Red™;Texas Red-X™缀合物;噻二碳菁 (DiSC3);噻嗪红R;噻嗪橙;硫黄素5;硫黄素S;硫黄素TCN;Thiolyte;噻唑橙;Tinopol CBS (Calcofluor White);TMR;T0-PRO-1;T0-PRO-3;T0-PRO-5;T0T0-1;T0T0-3;TriColor (PE-Cy5);TRITC四甲基若丹明异硫氰酸盐;True Blue;TruRed;Ultralite;Uranine B;Uvitex SFC;WW 781;X-罗丹明;XTRITC;二甲苯橙;Y66F;Y66H;Y66W;Y0-PRO-1;Y0-PRO-3;Y0Y0-1;Y0Y0-3;Sybr绿、噻唑橙 (嵌入染料);Alexa Fluor染料系列 (如Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700和750);Cy染料荧光团系列 (如Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7);Oyster染料荧光团 (如Oyster-500, -550, -556, 645, 650, 656);DY标记物系列 (如DY-415, -495, -505, -547, -548, -549, -550, -554, -555, -556, -560, -590, -610, -615, -630, -631, -632, -633, -634, -635, -636, -647, -648, -649, -650, -651, -652, -675, -676, -677, -680, -681, -682, -700, -701, -730, -731, -732, -734, -750, -751, -752, -776, -780, -781, -782, -831, -480XL, -481XL, -485XL, -510XL, -520XL, -521XL);ATTO荧光标记物 (如ATTO 390, 425, 465, 488, 495, 520, 532, 550, 565, 590, 594, 610, 611X, 620, 633, 635, 637, 647, 647N, 655, 680, 700, 725, 740);CAL Fluor和Quasar染料 (如CAL Fluor Gold 540, CAL Fluor Orange 560, Quasar 570, CAL Fluor Red 590, CAL Fluor Red 610, CAL Fluor Red 635, Quasar 670);EviTag或Qdot系列的量子点 (如Qdot 525, Qdot565, Qdot585, Qdot605, Qdot655, Qdot705, Qdot 800);荧光素、罗丹明、藻红蛋白,或它们的组合。

[0052] 在一些实例中,荧光分子为近红外荧光团,如IR680或IR880。通常,术语“近红外”(NIR)用于指代电磁谱的近红外区域 (例如,0.6至2.1 μm)。NIR荧光团的其他实例包括均可从GE Healthcare获得的Cy5、Cy5.5和Cy7;均可从VisEn Medical获得的VivoTag-680、VivoTag-S680、VivoTag-S750;均可从Invitrogen获得的AlexaFluor660、AlexaFluor680、AlexaFluor700、AlexaFluor750和Alexa Fluor790;均可从Dyomics获得的Dy677、Dy676、Dy682、Dy752、Dy780;可从Thermo Scientific获得的DyLight 677;均可从AnaSpec获得的HiLyte Fluor 647、HiLyte Fluor 680和HiLyte Fluor 750;均可从Li-Cor获得的IRDye 800、IRDye800CW、IRDye 800RS、IRDye680CW和IRDye 700DX;以及均可从American Dye Source获得的ADS780WS、ADS830WS和ADS832WS。此外,CdSe、PbS、CuInS₂、稀土纳米颗粒、碳纳米管的量子点属于在700-2100nm范围内发射的NIR荧光剂。可通过NIR荧光增强(NIR-FE)来增强NIR标记物,凭此本公开内容的纳米结构有利地改进了荧光团的光谱性质并减轻了一些它们的较经典的光物理学限制。

[0053] 在一些实例中,荧光分子为可见光染料,如Alexa 488、Cy3或Cy5。通常,术语“可见光染料”和“可见光标记物”用于指代具有在电磁谱的可见光区域 (例如,300nm至650nm)中的荧光发射波长的标记物。可见光染料的其他实例包括可从GE Healthcare获得的Cy3;可从Pierce获得的FITC;可从VisEn Medical获得的VivoTag-645;均可从Invitrogen获得的

AlexaFluor350、AlexaFluor405、AlexaFluor430、AlexaFluor488、AlexaFluor514、AlexaFluor532、AlexaFluor546、AlexaFluor555、AlexaFluor594、AlexaFluor610、AlexaFluor633和Alexa Fluor647；均可从Dyomics获得的Dy405、Dy415、Dy430、Dy490、Dy495、Dy505、Dy530、Dy547、Dy560、Dy590、Dy605、Dy610、Dy615、Dy630和Dy647；均可从Thermo Scientific获得的DyLight547和DyLight647；以及均可从AnaSpec获得的HiLyte Fluor 405、HiLyte Fluor 488、HiLyte Fluor 532、HiLyte Fluor 555和HiLyte Fluor 594。可通过荧光增强 (FE) 来增强可见光标记物，凭此银包金纳米结构有利地改进了荧光团的光谱性质并减轻了一些它们的较经典的光物理学限制。

[0054] 在一些情况下，荧光分子可为荧光共振能量转移 (FRET) 对的成员，并且利用FRET产生与结合元件和分析物的结合相关的信号。FRET源自于某些荧光团的性质。在如本文提供的薄膜的存在下，该对的一个或两个成员的这样产生的信号可得到增强。可用于FRET的分子可包括上述荧光团，并且可包括荧光素、5-羧基荧光素 (FAM)、2'7'-二甲氧基-4'5'-二氯-6-羧基荧光素 (JOE)、罗丹明、6-羧基罗丹明 (R6G)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明 (TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明 (ROX)、4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮) 苯甲酸 (DABCYL) 以及5-(2'-氨基乙基) 氨基萘-1-磺酸 (EDANS)。

[0055] 在一些情况下，FRET对的接受体用于将供体的荧光猝灭。在一些情况下，该接受体没有或几乎没有荧光。可用于猝灭的FRET接受体被称为猝灭剂。在本发明的方法中有用的猝灭剂包括但不限于，黑洞猝灭染料 (Biosearch Technologies)，如BHQ-0、BHQ-1、BHQ-2、BHQ-3、BHQ-10；QSY染料荧光猝灭剂 (来自Molecular Probes/Invitrogen)，如QSY7、QSY9、QSY21、QSY35，以及其他猝灭剂，如Dabcyl和Dabsyl；Cy5Q和Cy7Q以及深花青染料 (GE Healthcare)，其可例如与供体荧光团如Cy3B、Cy3或Cy5结合使用；DY猝灭剂 (Dyomics)，如DYQ-660和DYQ-661；以及ATTO荧光猝灭剂 (ATTO-TEC GmbH)，如ATTO 540Q、580Q、612Q。

结合元件和分析物

[0056] 本公开内容的薄膜可进一步包含多个结合元件。该多个结合元件可为结合元件阵列。该结合元件阵列可为微阵列。在一些实施方案中，该多个结合元件直接或间接地与薄膜接触，如通过直接附接或间接地与附接至该薄膜的中间体附接的方式。结合元件可在薄膜的上方。结合元件可在薄膜的下方。在一些情况下，结合元件可附接至基底并间接地接触薄膜。例如，基底可包含处于薄膜与结合元件之间的抗生物素蛋白或链霉亲和素。结合元件可经由连接分子 (或连接体) 附接至基底。该连接体可为能够将结合元件与基底相连接的任意类型的分子 (例如，化学或生物分子)。在一些情况下，该连接体为化学键。例如，结合元件可共价附接至基底的表面。

[0057] 可将许多不同的化学表面改性剂添加至基底，以将结合元件附接至基底。化学表面改性剂的实例可包括但不限于，N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 基团、胺、醛、环氧化物、羧基基团、羟基基团、酰肼、疏水基团、膜、马来酰亚胺、生物素、链霉亲和素、巯基基团、镍螯合物、光反应性基团、硼基团、硫酯、半胱氨酸、二硫化物基团、烷基和酰基卤基团、谷胱甘肽、麦芽糖、叠氮化物、磷酸酯、膦及其组合。在一种情况下，可采用对胺具有反应性的基底表面。这类表面的实例可包括NHS-酯、醛、环氧化物、酰基卤和硫酯。具有游离氨基的分子 (例如，蛋白质、肽、糖肽) 可与这类表面反应，从而与该表面形成共价键。还可合成 (例如，从IDT或操纵子) 具有内部或末端胺基团的核酸探针，并采用类似的化学法将其 (例如，共价或非共价

地)结合至表面。

[0058] 在一些情况下,可经由额外的层,例如,薄膜上的自组装单层,将捕获剂或结合元件的阵列附接至薄膜。在一些实例中,将亲水性聚合物(例如,聚乙二醇(PEG))或葡聚糖连接至薄膜上的自组装单层,其中结合元件(例如,生物分子)与该亲水性聚合物或葡聚糖连接。

[0059] 如本文提供的,本公开内容的系统可进一步包括包含待检测或待鉴别的分析物的样品阵列。该阵列可为微阵列。样品阵列可安设成与本公开内容的薄膜相接触。

[0060] 任何物质均可作为样品的来源。样品可为流体,例如,生物流体。流体样品可包括但不限于,血液或血液组分(例如,全血、血浆)、脐带血、唾液、尿液、汗液、血清、精液、阴道液、胃液及消化液、脊髓液、胎盘液、腔液、眼液、血清、母乳、淋巴液或其组合。可检测样品中低浓度的分析物,或可检测小体积样品中的分析物。例如,样品体积可小于1000 μ L、750 μ L、500 μ L、250 μ L、100 μ L、50 μ L、25 μ L、10 μ L或更小。在一些实施方案中,该流体样品在1-100 μ L或1-10 μ L之间。可将流体样品在稀释剂溶液(例如,胎牛血清、非交叉反应动物血清,或PBST中的BSA溶液)中稀释,如稀释至可达500 μ L、250 μ L、100 μ L或更小的总体积。样品可为固体,例如,生物组织。样品可包括正常健康组织。该组织可与各种类型的器官有关。器官的非限制性实例可包括脑、乳腺、肝、肺、肾、前列腺、卵巢、脾、淋巴结(包括扁桃体)、甲状腺、胰腺、心脏、骨骼肌、肠、喉、食管、胃或其组合。样品可为环境样品(例如,来自农田、湖泊、河流、水库、通风口、墙壁、屋顶、土壤样品、植物或游泳池的样品),或工业样品(例如,来自清洁室、医院、食品加工区、食品生产区、食品、医学实验室、药店或药物复合中心的样品)。

[0061] 样品可包括肿瘤。肿瘤可以是良性(非癌症)或恶性的(癌症)。肿瘤的非限制性实例包括:纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、胃肠系统癌、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、泌尿生殖系统癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯肿瘤、宫颈癌、内分泌系统癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤或其组合。肿瘤可与各种类型的器官有关。器官的非限制性实例可包括脑、乳腺、肝、肺、肾、前列腺、卵巢、脾、淋巴结(包括扁桃体)、甲状腺、胰腺、心脏、骨骼肌、肠、喉、食管、胃或其组合。

[0062] 样品可包括正常健康组织或肿瘤组织的混合物。组织可与各种类型的器官有关。器官的非限制性实例包括脑、乳腺、肝、肺、肾、前列腺、卵巢、脾、淋巴结(包括扁桃体)、甲状腺、胰腺、心脏、骨骼肌、肠、喉、食管、胃或其组合。

[0063] 在一些情况下,样品包含多种细胞,包括但不限于:真核细胞、原核细胞、真菌细胞、心脏细胞、肺细胞、肾细胞、肝细胞、胰腺细胞、生殖细胞、干细胞、诱导多能干细胞、胃肠细胞、血细胞、癌细胞、细菌细胞、从人微生物组样品中分离的细菌细胞,以及人血液中的循环细胞,所述细胞中的一种或多种可为采用本公开内容的薄膜的检测方法的受试物。在一些情况下,样品包含细胞的内容物,诸如,例如,单个细胞的内容物或多个细胞的内容物。

[0064] 根据具体应用,如本文提供的结合元件可被设计或选择用于以比其与样品中所含

其他物质结合的亲和力更高的亲和力与一种或多种特定分析物结合。结合元件与分析物之间的结合可通过多种类型的分析识别机制,例如杂交来进行。结合的强度可被称为“亲和力”。生物样品之间的亲和力可受非共价分子间相互作用的影响,该相互作用包括,例如,氢键键合、疏水相互作用、静电相互作用和范德华力。在一些情况下,例如,对于多重分析,涉及多种分析物和结合元件。例如,实验可涉及对多种不同核酸分子之间或不同蛋白质之间的结合进行测试。在这类实验中,分析物可优选与对其具有更高亲和力的结合元件相结合。在一些情况下,可将多个结合元件配置用于在不同的已知位置处缀合至薄膜,并且每一个结合元件与不同的分析物结合。例如,阵列可包含至少2个(例如,至少10、25、50、100、1000、5000、10000个或更多个)不同的结合元件,每一个结合元件均对不同的分析物(例如,不同的多核苷酸序列,或不同的蛋白质)具有结合特异性。基于检测到的荧光信号的位置,可鉴别该分析物。

[0065] 例如,所述结合可为受体-配体相互作用、酶-底物相互作用、抗体-抗原相互作用,或核酸杂交相互作用。结合元件/分析物结合对可为核酸与核酸,例如,DNA/DNA、DNA/RNA、RNA/DNA、RNA/RNA、RNA。结合元件/分析物结合对可为多肽与核酸,例如,多肽/DNA和多肽/RNA,如序列特异性DNA结合蛋白质。结合元件/分析物结合对可为任意核酸,包括能够进行序列特异性DNA或RNA识别的合成DNA/RNA结合配体(如聚酰胺)。结合元件/分析物结合对可包括天然结合化合物如天然酶和抗体,以及合成结合化合物。结合元件/分析物结合可包括适体,该适体是已通常通过反复轮次的体外选择或等效的SELEX(通过指数富集的配体系统进化)而工程化为具有特异性结合性质的核酸或多肽物质。

[0066] 如本文提供的结合元件和/或分析物可以是任何类型的有机或无机的分子或化合物,例如,生物分子。在一些情况下,结合元件和/或分析物包括蛋白质、肽、抗体、抗原结合抗体片段、多糖、酶、适体、核酸、抗原、细胞或组织。在一些情况下,蛋白质可来源于细胞或组织裂解物、体液或其他样品来源,如在反相蛋白质阵列分析情况下。例如,结合元件和/或分析物可为用于检测样品中的抗体的抗原。抗体的非限制性实例包括总人IgG、IgM、IgA和IgE;抗HLA(人白细胞抗原)抗体;抗dsDNA抗体;抗Smith抗体;系统性红斑狼疮(SLE)、弓形体病、风疹、狂犬病、疟疾、莱姆病、非洲锥虫病、霍乱、隐孢子虫病、登革热、流感、日本脑炎、利什曼病、麻疹、脑膜炎、盘尾丝虫病、肺炎、结核病、伤寒或黄热病的诊断抗体;巨细胞病毒(CMV)、鼠弓形体、风疹病毒、1型和2型单纯疱疹病毒(HSV-1/2)、抗血红蛋白 α (HBA)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒(HDV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、人乳头状瘤病毒(HPV)、埃博拉病毒、轮状病毒、人白细胞抗原、甲状腺刺激激素受体(TSHR)、甲状腺过氧化物、甲状腺球蛋白、组织转谷氨酰胺酶(tTG)、肌内膜、脱酰胺麦醇溶蛋白肽的特异性抗体;以及选自p53、NY-ESO-1、MAGE A4、HuD、CAGE、GBU4-5和SOX2的肿瘤相关抗原的特异性抗体,或它们的组合。可在单次测定中评估多种诊断抗体,如在TORCH测定的情况下评估如针对鼠弓形体、风疹、巨细胞病毒(CMV)和单纯疱疹病毒(HSV)的抗体。TORCH感染是一组先天获得性感染,其在新生儿中引起显著的发病率和死亡率。这些感染是由母亲获得的,并且经过胎盘或在出生过程中传递。尽管每种感染是不同的,但是这些感染如何存在有很多相似之处。当新生儿出现宫内发育迟缓(IUGR)、小头、颅内钙化、结膜炎、听力损失、皮疹、肝脾肿大或血小板减少症时,考虑TORCH感染是重要的。虽然上文提及了五种经典的感染,但还可评估(例如,在相同的结合反应中)其他类别的感染,如人类免疫缺陷病毒(HIV)、水痘

带状疱疹病毒 (VZV)、疱疹、梅毒、细小病毒B19、肠道病毒等。TORCH测定的抗体的实例可包括但不限于,鼠弓形体抗体,免疫球蛋白G (IgG);风疹抗体, IgG;1型和/或2型单纯疱疹病毒抗体, IgG;巨细胞病毒抗体, IgG;鼠弓形体IgM抗体,免疫球蛋白M (IgM);风疹抗体, IgM;1型和/或2型单纯疱疹病毒抗体, IgM;以及巨细胞病毒抗体, IgM。在典型的TORCH测定中,结合元件为抗原(例如,一种或多种鼠弓形体抗原、一种或多种风疹抗原、一种或多种CMV抗原以及一种或多种HSV抗原),并且分析物为针对一种或多种抗原的抗体。

[0067] 通常,给定状况的诊断抗体是结合与该状况相关的分子的抗体。在感染的情况下,该抗体可为与感染原的蛋白质如病毒衣壳蛋白或细菌细胞表面蛋白结合的抗体。在一些情况下,抗原为感染原或其组分。当疾病为自身免疫病时,抗体可为自身抗体,而抗原为人蛋白质或其部分。

[0068] 在一些情况下,分析物可包含生物标志物。该生物标志物可与生物体如受试者的生物状态或状况有关。这样的生物状态或状况的实例包括但不限于疾病、病症、非疾病状况、健康状况,或对不同药物治疗及其他疗法的治疗反应。例如,该分析物可为炎性细胞因子、心血管疾病的生物标志物、传染病的生物标志物、炎性疾病(例如,炎性肠病)的生物标志物,或癌症的生物标志物。生物标志物的限制性实例包括糖化蛋白质、糖化血红蛋白(HbA1c)、HbA-Glyc、HbA-SNO、糖化白蛋白(GA)、葡萄糖(例如,空腹血浆葡萄糖)、人血清白蛋白(HSA)、HSA-Cys、HSA-Glyc、载脂蛋白A-I (apoA-I)、apoA-I MetO、GA、糖化载脂蛋白A-1 (GapoA-I)、甲胎蛋白(AFP)、费城染色体(BCR-ABL)、1型乳腺癌易感性蛋白(BRCA1)、2型乳腺癌易感性蛋白(BRCA2)、v-Raf鼠肉瘤病毒癌基因同源物B (BRAF V600E)、癌抗原125 (CA-125)、碳水化合物抗原19-9 (CA19.9)、Zn- α 2糖蛋白(ZAG)、癌胚抗原(CEA)、表皮生长因子受体(EGFR)、受体酪氨酸-蛋白激酶erbB-2 (HER-2)、肥大细胞/干细胞生长因子受体(KIT)、前列腺特异性抗原(PSA)、S-100蛋白质(S100)、总tau (T-tau)、超磷酸化tau (P-tau)、淀粉样蛋白 β 的42个氨基酸的同种型(AB42)、细胞因子(例如,白介素(IL)-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-1 β 、IL-1Ra、TNF- α 、单核细胞化学吸引蛋白-1 (MCP-1)等)、可溶性CD40配体、血清淀粉样蛋白A (SAA)、选择素(例如,E选择素、P选择素)、髓过氧化物酶(MPO)、基质金属蛋白酶(MMP)、细胞粘附分子(例如,细胞粘附分子1 (ICAM-1)、血管粘附分子1 (VCAM-1))、胎盘生长因子(PlGF)、A2磷脂酶、高敏感性C反应性蛋白(hs-CRP)、金属蛋白酶(MMP-9, MMP-11)、妊娠相关血浆蛋白A (PAPP-A)、组织蛋白酶S、趋化分子(MCP-1、CCR1、CCR2)、髓过氧化物酶、新蝶呤、生长分化因子-15、胎盘生长因子、纤维化标志物(例如,半乳凝素-3)、胎球蛋白A、血管钙化(osteoprogenitorin)、骨髓相关蛋白8/14 (MRP8/14)、五聚环蛋白3 (PTX3)、骨保护素、von Willebrand因子(vWF)、组织因子(TF)、可溶性CD40配体(sCD40L)、凝血酶原片段1.2 (F1.2)、血栓前体蛋白(TpP)、D二聚体、Lp-PLA2团、氧化氨基酸、氧化载脂蛋白A1 (apoA1)、不对称二甲基精氨酸(ADMA)、分泌型磷脂酶、高敏感性心肌肌钙蛋白、丙二醛修饰的低密度脂蛋白、心脏型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)、B型利尿钠肽(BNP)、N-末端pro b型利尿钠肽(NT-proBNP)、和肽素、中区前肾上腺髓质素、尾加压素-1、精氨酸加压素(AVP)、内皮素-1、半乳凝素-3、ST-2、半胱氨酸C、嗜中性粒细胞明胶酶相关的脂质运载蛋白(NGAL)、KIM、脂连素、瘦素、抵抗素、c-肽、磷脂脂肪酸(EPA和DHA)、载脂蛋白E (ApoE)、胆固醇酯转移蛋白(CETP)、S100钙结合蛋白B (S100 β)、神经元特异性烯醇化酶(NSE),以及它们的部分、衍生物或组合。在一些实施方案中,生物标志物为炎性肠病的生物标志物,其非限制性实例包括C

反应蛋白 (CRP)、 α_1 酸性糖蛋白 (血清类粘蛋白)、核周抗中性粒细胞质抗体 (pANCA)、抗酿酒酵母抗体 (ASCA)、粪便钙防卫蛋白、含核苷酸结合寡聚结构域的蛋白 2 (NOD2)、抗外膜蛋白 C (抗OmpC)、胰自身抗体 (PAB)、抗昆布二糖苷碳水化合物抗体 (ALCA)、抗壳二糖苷碳水化合物抗体 (ACCA)、抗甘露二糖苷碳水化合物抗体 (AMCA)、抗昆布多糖 (抗L)、抗Cbir1鞭毛蛋白、抗I2抗体、抗壳多糖 (抗C) 抗体、针对杯形细胞 (GAB) 的抗体, 以及针对细菌鞭毛蛋白 Cbir1 (抗CBir1) 的抗体。生物标志物的组可在单次反应中测定, 并且可包括针对多种状况的生物标志物和/或针对一种或多种状况中的每一种的多种生物标志物。

[0069] 在一些情况下, 生物标志物为与心血管疾病 (CVD) 有关的生物标志物。术语“心血管疾病” (CVD) 通常是指影响心脏和循环系统的一些疾病, 包括动脉瘤; 心绞痛; 心律不齐; 动脉粥样硬化; 心肌病; 脑血管意外 (中风); 脑血管疾病; 先天性心脏病; 充血性心力衰竭; 冠心病 (CHD), 也称为冠状动脉疾病 (CAD)、缺血性心脏病或动脉粥样硬化性心脏病; 扩张性心肌病; 舒张功能障碍; 心内膜炎; 心力衰竭; 高血压 (血压高); 肥厚性心肌病; 二尖瓣脱垂; 心肌梗死 (心脏病发作); 心肌炎; 周围血管疾病; 风湿性心脏病; 瓣膜疾病; 以及静脉血栓栓塞。如本文所用的, 术语“心血管疾病”还包括提及缺血; 由于物理损伤 (动脉内膜切除术 (endarterectomy)、球囊血管成形术) 或慢性损伤 (包括动脉粥样硬化) 引起的动脉损伤 (对内皮谱系的损伤); 心肌损伤 (心肌坏死); 以及肌坏死。通常, 引起新生血管生成反应的任何生理学或病理生理学状况都被包括在如本文所用的术语“心血管疾病”中。当生物标志物的水平高于未罹患CVD的受试者或受试者群体中相同生物标志物的水平时, 该生物标志物可被视为与CVD有关。与心血管疾病有关的生物标志物的实例包括但不限于肌钙蛋白、肌钙蛋白 I (cTnI)、肌酐激酶MB亚组分、ADORA1、ADORA2A、ADORA2B、ADORA3、AGTRL1 (APLNR)、AMPH、APLN、CCBE1、CDC42、CGNL1、CREBBP、CRIP1、CRIP2、CRIP3、CYB5B、DLL4、DUSP5、EEA1、egr-1、ELK1、ELK3、ELK4 (SAP1)、EP300、ERG1 (KCNH2)、ETS1、ETS2、EXOC3L、FGD1、FGD2、FGD3、FGD4、FGD5、FLT1、FST、GATA6、GRRP1、HO-1 (HMOX1)、HO-2 (HMOX2)、IFNG、IL1A、IL1B、LAMA4、Lamb1-1、LGMN、MMP3、Nos2、PAI1、PHD1、PLVAP、RAB5a、RIN3、ROCK2、SOX18、SOX7、SRF、STAB1、STAB2、STUB1、TFEC、THBS1、THBS2、THBS3、THBS4、THBS5、THSD1、TNFAIP8以及XLKD1 (LYVE1)。在一些实施方案中, 该标志物为选自下组的基因中的一种或多种 (例如, 2、3、4、5、10、15、20、25、30种或全部): ADORA2A、AGTRL1 (APLNR)、APLN、CCBE1、CGNL1、CRIP2、CYB5B、DLL4、DUSP5、ELK3、ERG1 (KCNH2)、ETS1、ETS2、EXOC3L、FGD5、GRRP1、HO-1 (HMOX1)、HO-2 (HMOX2)、LAMA4、Lamb1-1、LGMN、PLVAP、RIN3、ROCK2、SOX7、SOX18、STAB1、STAB2、STUB1、TFEC、THSD1、TNFAIP8以及XLKD1 (LYVE1)。在一些实施方案中, CVD生物标志物为自身抗体, 如针对膜联蛋白A5、SDHA、ATP1A3、肌联蛋白、肌球蛋白、ADBRK、EDNRA、EDNRB、AGTR1、CHRM2、HSPD的抗体。可在多核苷酸水平 (例如, 基因组水平、无细胞DNA中或mRNA表达水平) 或蛋白质水平上检测生物标志物。采用这类生物标志物的方法可包括选自以下的一个或多个步骤: 从受试者获得样品, 检测来自受试者的样品中的分析物, 将患者诊断为患有CVD或存在发展出CVD的风险, 以及根据分析物检测来采取医疗行为。

[0070] 在一些情况下, 生物标志物为与癌症有关的生物标志物。通常, 术语“癌症”广泛地指任何肿瘤性疾病 (无论是侵袭性还是转移性的), 其特征在于引起恶性生长或肿瘤的异常且不受控制的细胞分裂 (例如, 不受调控的细胞生长)。癌症的非限制性实例包括棘皮瘤、腺泡细胞癌、听神经瘤、肢端雀斑样痣黑素瘤、顶端螺旋瘤、急性嗜酸性粒细胞白血病、急性淋

巴母细胞白血病、急性巨核母细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性髓母细胞性白血病伴成熟、急性髓样树突状细胞白血病、急性髓样白血病、急性早幼粒细胞白血病、釉质瘤、腺癌、腺样囊性癌、腺瘤、牙源性腺瘤样瘤、肾上腺皮质癌、成人T细胞白血病、侵袭性NK细胞白血病、AIDS相关癌症、AIDS相关淋巴瘤、软组织腺泡状肉瘤、成釉细胞纤维瘤、肛门癌、间变性大细胞淋巴瘤、间变性甲状腺癌、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、血管肌脂瘤、血管肉瘤、阑尾癌、星形细胞瘤、非典型畸胎样杆状瘤、基底细胞癌、基底细胞样癌、B细胞白血病、B细胞淋巴瘤、比里尼导管癌、胆道癌、膀胱癌、母细胞瘤、骨癌、骨肿瘤、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤、乳腺癌、Brenner瘤、支气管肿瘤、细支气管肺泡癌、棕色瘤、伯基特淋巴瘤、原发部位不明的癌症、类癌瘤、癌、原位癌、阴茎癌、原发部位不明癌、癌肉瘤、卡斯尔曼 (Castleman) 病、中枢神经系统胚胎瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤、宫颈癌、胆管上皮癌、软骨瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、绒毛膜癌、脉络膜丛乳头状瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性单核细胞白血病、慢性髓性白血病、慢性脊髓增生性疾病、慢性嗜中性白细胞白血病、透明细胞肿瘤、结肠癌、结直肠癌、颅咽管瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、Degos病、隆凸性皮肤纤维肉瘤、皮样囊肿、结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、胚胎发育不良性神经上皮瘤、胚胎性癌、内胚窦瘤、子宫内膜癌、子宫内膜子宫癌、子宫内膜样肿瘤、肠病伴随T-细胞淋巴瘤、室管膜母细胞瘤、室管膜瘤、上皮样肉瘤、红白血病、食管癌、成感觉神经细胞瘤、尤因家族的肿瘤、尤因家族肉瘤、尤因肉瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、乳腺外佩吉特病、输卵管癌、胎中胎、纤维瘤、纤维肉瘤、滤泡淋巴瘤、滤泡状甲状腺癌、胆囊癌、胆囊癌、神经节神经胶质瘤、神经节瘤、胃癌、胃淋巴瘤、胃肠癌、胃肠道类肿瘤、胃肠道间质瘤、胃肠道间质肿瘤、胚细胞瘤、生殖细胞瘤、妊娠性绒毛膜癌、妊娠滋养细胞肿瘤、骨巨细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、大脑神经胶质瘤病、血管球瘤、胰高血糖素瘤、性腺母细胞瘤、粒层细胞瘤、多毛细胞白血病、毛细胞白血病、头及颈部癌症、头颈癌、心脏癌、血管母细胞瘤、血管外皮细胞瘤、血管肉瘤、骨髓恶性肿瘤、肝细胞癌、肝脾T细胞淋巴瘤、遗传性乳腺—卵巢癌综合征、霍奇金淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、下咽癌、下丘脑胶质瘤、炎性乳腺癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞瘤、幼年型粒单核细胞白血病、卡波西肉瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、Klatskin瘤、Krukenberg瘤、喉癌、喉部癌、恶性雀斑样黑色素瘤、白血病、白血病、唇与口腔癌、脂肪肉瘤、肺癌、黄体瘤、淋巴管瘤、淋巴管肉瘤、淋巴上皮瘤、淋巴样白血病、淋巴瘤、巨球蛋白血症、恶性纤维组织细胞瘤、恶化纤维组织细胞瘤、骨恶性纤维组织细胞瘤、恶性神经胶质瘤、恶性间皮瘤、恶性周边神经鞘瘤、恶性杆状瘤、恶性蝶螈瘤、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、肥大细胞白血病、纵膈生殖细胞肿瘤、纵膈肿瘤、甲状腺髓样癌、髓母细胞瘤、成髓细胞瘤、髓上皮瘤、黑素瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、Merkel细胞癌、间皮瘤、间皮瘤、隐匿原发性转移性鳞状颈癌、转移性尿路上皮癌、混合型Mullerian肿瘤、单核细胞性白血病、口腔癌、粘液性瘤、多发性内分泌肿瘤综合征、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤、蕈样肉芽肿病、蕈样真菌病、骨髓增生异常疾病、骨髓增生异常综合征、髓样白血病、髓样肉瘤、骨髓增殖性疾病、粘液瘤、鼻腔癌、鼻咽癌、鼻咽部癌、肿瘤、神经鞘瘤、神经母细胞瘤、成神经细胞瘤、神经纤维瘤、神经瘤、结节性黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、眼肿瘤、少突星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、嗜酸粒细胞腺瘤、视神经鞘膜瘤、口癌、口癌、口咽癌、骨肉瘤、骨肉瘤、卵巢癌、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低度潜在恶性肿瘤、乳房的佩吉特病、肺上沟瘤、胰腺癌、胰腺癌、乳

头状甲状腺癌、乳头状瘤病、副神经节瘤、鼻旁窦癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、血管周上皮样细胞瘤、咽癌、嗜铬细胞瘤、中间分化的松果体实质肿瘤、松果体母细胞瘤、垂体细胞瘤、垂体腺瘤、垂体瘤、浆细胞肿瘤、胸膜肺母细胞瘤、多胚瘤、前体T淋巴母细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、原发性肝细胞癌、原发性肝癌、原发性腹膜癌、原发性神经外胚层瘤、前列腺癌、腹膜假粘液瘤、直肠癌、肾细胞癌、涉及染色体15上的NUT基因的呼吸道癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌瘤、横纹肌肉瘤、Richter转化、骶尾部畸胎瘤、涎腺癌、肉瘤、施万瘤病、皮脂腺癌、继发性肿瘤、精原细胞瘤、浆液性肿瘤、Sertoli-Leydig细胞瘤、性索间质瘤、Sézary综合征、印戒细胞癌、皮肤癌、小蓝圆细胞瘤、小细胞癌、小细胞肺癌、小细胞淋巴瘤、小肠癌、软组织肉瘤、生长抑素瘤、煤烟疣、脊髓瘤、脊柱瘤、脾边缘带淋巴瘤、鳞状细胞癌、胃癌、浅表扩散性黑素瘤、幕上原始神经外胚层瘤、表面上皮间质瘤、滑膜肉瘤、T细胞急性淋巴母细胞性白血病、T细胞大颗粒淋巴细胞白血病、T细胞白血病、T细胞淋巴瘤、T细胞性幼淋巴细胞白血病、畸胎瘤、终末淋巴癌、睾丸癌、泡膜细胞瘤、喉癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、移行细胞癌、脐尿管癌、尿道癌、泌尿生殖系肿瘤、子宫肉瘤、葡萄膜黑素瘤、阴道癌、Verner Morrison综合征、疣状癌、视通路神经胶质瘤、外阴癌、瓦尔登斯特伦(Waldenström)巨球蛋白血症、Warthin肿瘤以及维尔姆斯肿瘤。当标志物在患有这类癌症的受试者中的水平高于在未患有这类癌症的受试者中的水平,或在癌组织中表达的水平高于在同一类型的正常组织中的水平时,可将该标志物视为与特定癌症有关。特异性关联的实例包括但不限于急性淋巴母细胞白血病(etv6、am11、亲环蛋白b)、B细胞淋巴瘤(Ig-独特型)、神经胶质瘤(E-钙粘蛋白、 α -连环蛋白、 β -连环蛋白、 γ -连环蛋白、p120ctn)、膀胱癌(p21ras)、胆道癌(p21ras)、乳腺癌(MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、宫颈癌(p53、p21ras)、结肠癌(p21ras、HER2/neu、c-erbB-2、MUC家族)、结肠直肠癌(结肠直肠癌相关抗原(CRC)-CO17-1A/GA733、APC)、绒毛膜癌(CEA)、上皮细胞癌(亲环蛋白b)、胃癌(HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肝细胞癌(甲胎蛋白)、霍奇金淋巴瘤(Imp-1、EBNA-1)、肺癌(CEA、MAGE-3、NY-ESO-1)、淋巴细胞衍生白血病(亲环蛋白b)、黑素瘤(p5蛋白、gp75、癌胚抗原、GM2和GD2神经节苷脂、Melan-A/MART-1、cdc27、MAGE-3、p21ras、gp100^{Pmel117})、骨髓瘤(MUC家族、p21ras)、非小细胞肺癌(HER2/neu、c-erbB-2)、鼻咽癌(Imp-1、EBNA-1)、卵巢癌(MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、前列腺癌(前列腺特异性抗原(PSA)及其抗原表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、PSMA、HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肾癌(HER2/neu、c-erbB-2)、子宫颈和食道的鳞状细胞癌(病毒产物,如人乳头瘤病毒蛋白)、睾丸癌(NY-ESO-1)以及T细胞白血病(HTLV-1表位)。采用这类癌症生物标志物的方法可包括选自以下的一个或多个步骤:从受试者获得样品,检测来自受试者的样品中的分析物,将患者诊断为患有癌症或存在发展出癌症的风险,以及基于分析物检测来采取医疗行动。

[0071] 在一些情况下,生物标志物为自身免疫病的生物标志物,如自身抗体。自身免疫病的实例包括但不限于炎症、抗磷脂综合征、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、自身免疫性血管炎、乳糜泻、自身免疫性甲状腺炎、输血后免疫、母-胎不相容、输血反应、免疫缺陷如IgA缺乏、普通可变量免疫缺陷、药物性狼疮、糖尿病、I型糖尿病、II型糖尿病、青少年型糖尿病、幼年型类风湿性关节炎、银屑病关节炎、多发性硬化、免疫缺陷、变态反应、哮喘、银屑病、特应性皮炎、变应性接触性皮炎、慢性皮肤病、肌萎缩侧索硬化、化疗引起的损伤、移植物抗宿主病、骨髓移植排斥反应、强直性脊柱炎、特应性湿疹、天疱疮、贝切特病、慢性疲劳

综合征纤维肌痛、化疗引起的损伤、重症肌无力、肾小球肾炎、变应性视网膜炎、系统性硬化病、亚急性皮肤红斑狼疮、包括冻疮样红斑狼疮在内的皮肤红斑狼疮、舍格伦综合征、自身免疫性肾炎、自身免疫性血管炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性心肌炎、自身免疫性脑炎、自身免疫介导的血液病、lc-SSc (硬皮病的局限皮肤形式)、dc-SSc (硬皮病的扩散皮肤形式)、自身免疫性甲状腺炎(AT)、格雷夫斯氏病(GD)、重症肌无力、多发性硬化(MS)、强直性脊柱炎、移植排斥反应、免疫性衰老、风湿/自身免疫性疾病、混合性结缔组织病、脊柱关节病、银屑病、银屑病关节炎、肌炎、硬皮病、皮炎、自身免疫性血管炎、混合性结缔组织病、特发性血小板减少性紫癜、克罗恩病、人类佐剂病、骨关节炎、幼年型慢性关节炎、脊柱关节病、特发性炎症性肌病、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少症、甲状腺炎、免疫介导的肾脏疾病、中枢或周围神经系统的脱髓鞘疾病、特发性脱髓鞘性多发性神经病、格林-巴利综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、肝胆疾病、感染性或自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉芽肿性肝炎、硬化性胆管炎、炎性肠病(包括克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC))、谷蛋白敏感性肠病、Whipple病、自身免疫或免疫介导的皮肤病、大疱性皮肤病、多形性红斑、变应性鼻炎、特应性皮炎、食物超敏反应、荨麻疹、肺的免疫性疾病、嗜酸性粒细胞性肺炎、特发性肺纤维化、过敏性肺炎、移植相关疾病、移植排斥反应或移植物抗宿主病、银屑病关节炎、银屑病、皮炎、多肌炎/皮肌炎、中毒性表皮坏死松解症、系统性硬皮病和硬化症、与炎性肠病相关的反应、克罗恩病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、结肠炎、肾小球肾炎、变应性状况、湿疹、哮喘、涉及T细胞浸润和慢性炎症应答的状况、动脉粥样硬化、自身免疫性心肌炎、白细胞粘附缺陷、变应性脑脊髓炎、与由细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫应答、结核病、结节病、包括韦格纳肉芽肿病在内的肉芽肿病、粒细胞缺乏、血管炎(包括ANCA)、再生障碍性贫血、Diamond-Blackfan贫血、包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA)在内的免疫性溶血性贫血、恶性贫血、纯红细胞再生障碍(PRCA)、因子VIII缺乏、A型血友病、自身免疫性中性粒细胞减少、全血细胞减少、白细胞减少、涉及白细胞渗出的疾病、中枢神经系统(CNS)炎症性疾病、多器官损伤综合征、重症肌无力、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜病、抗磷脂抗体综合征、变应性神经炎、Behcet病、卡斯尔曼(Castleman)综合征、古德帕斯丘综合征、Lambert-Eaton肌无力综合征、雷诺综合征、舍格伦综合征、Stevens-Johnson综合征、大疱性类天疱疮、天疱疮、自身免疫性多内分泌腺疾病、赖特尔病、僵人综合征、巨细胞动脉炎、免疫复合物肾炎、IgA肾病、IgM多发性神经病或IgM介导的神经病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、自身免疫性血小板减少症、包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎在内的睾丸和卵巢的自身免疫性疾病、原发性甲状腺机能减退、包括自身免疫性甲状腺炎在内的自身免疫性内分泌疾病、慢性甲状腺炎(桥本甲状腺炎)、亚急性甲状腺炎、特发性甲状腺机能减退、Addison病、格雷夫斯氏病、自身免疫多腺体综合征(或多腺内分泌病综合征)、席汉氏综合征、自身免疫性肝炎、淋巴样间质性肺炎(HIV)、闭塞性细支气管炎(非移植)与NSIP、格林-巴利综合征、大血管血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞(Takayasu)动脉炎)、中血管血管炎(包括川崎病和结节性多动脉炎)、强直性脊柱炎、Berger病(IgA肾病)、急进性肾小球肾炎、原发性胆汁性肝硬变、口炎性腹泻(谷蛋白肠病)、冷球蛋白血症以及肌萎缩侧索硬化(ALS)。在一些情况下,该自身免疫病为SLE、类风湿性关节炎和乳糜泻。自身免疫病的生物标志物的实

例包括US20070141625、US20090226440、US20090263474、US20100075891、US20100104579、US20100105086、US20100131286、US20100144055、US20100151471、US20090176217、US20090202469、US20020119118、US20080213280、US20090023166、US20080221016、US20080194474、US20070224638、US20070135335、US20070128189、US20070122413、US20090130683、US20090110667和US20090023166中描述的那些,其在此通过引用而并入本文。

[0072] 如本公开内容中提供的,任何结合元件和/或分析物均可用一个或多个报告分子(或标记物)标记。该标记物可包含荧光分子。结合元件与包含荧光分子的分析物的结合可产生可被本公开内容的薄膜增强的荧光信号。在一些情况下,结合元件和/或分析物可用第一抗体标记,该第一抗体可被包含至少一个荧光分子的第二抗体结合。然后,结合元件与分析物之间结合事件的出现可产生可通过薄膜的存在而增强的荧光信号。

[0073] 在一些情况下,所述结合元件为抗体,其可用于捕获、标记或以其他方式检测分析物。“抗体”为免疫球蛋白分子,其能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点与诸如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等靶标特异性结合。如本文所用的,该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白(如结构域抗体),以及包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰的构型。抗体包括任何类别的抗体,如IgG、IgA或IgM(或其亚类),并且抗体不需要属于任何特定的类别。根据其重链恒定域的抗体氨基酸序列,免疫球蛋白可被分成不同的类别。存在五大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且其中几个可被进一步分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定域分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0074] 抗体可为单克隆抗体。如本文所用的,“单克隆抗体”是指从基本同源的抗体群体中获得的抗体,即除了可能少量存在的天然存在的突变之外,组成该群体的个体抗体均是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,其针对单个抗原位点。此外,与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相比,每种单克隆抗体均针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”表示抗体的特征是从基本同源的抗体群体获得的,不应被解释为需要通过任何特定方法产生该抗体。例如,单克隆抗体可通过最先由Kohler和Milstein,1975, Nature, 256:495描述的杂交瘤方法来制备,或者可通过如第4,816,567号美国专利中所述的重组DNA方法制备。也可以从例如采用McCafferty等人,1990, Nature, 348:552-554中描述的技术生成的噬菌体文库中分离单克隆抗体。

薄膜制造

[0075] 在一方面,本公开内容提供了用于制备本文所述的薄膜的方法。在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:(a)将纳米颗粒种子如金纳米颗粒种子吸附在基底上,或使纳米颗粒种子在基底上的溶液相或蒸气相中生长;以及(b)使纳米结构如银纳米结构围绕该纳米颗粒种子生长。纳米颗粒种子和围绕该纳米颗粒种子生长的纳米结构可由各种类型的材料,如小分子、化学化合物、聚合物或金属制成。在接种过程之前,可对基底进行或不进行处理或修饰。用于制备本公开内容的薄膜的示例方法可包括:(a)向基底施加含有金属离子的第一溶液;(b)采用碱性溶液使金属离子从溶液中沉淀至基底上;(c)将于步骤(b)中沉淀在基底上的该金属离子还原,以在基底上产生种子颗粒;以及(d)将包含金属离子的第二溶液

添加至来自步骤(c)的种子颗粒,以在薄膜中生长出隔离区域。如本文其他各处讨论的,该薄膜可以是连续的、半连续的或不连续的。一旦制备出薄膜后,在一些情况下,可将可与一种或多种分析物特异性结合的用作捕获剂或结合元件的生物分子或化学分子的阵列施加至该薄膜。该分子阵列可作为不同的分子种类安设在薄膜上的非连续位置并偶联至该薄膜,凭此由结合元件与分析物之间的捕获事件产生的荧光信号可被该薄膜增强。应当理解,该第一和第二金属离子溶液可包含相同类型的金属,或包含不同类型的金属以形成金属复合物。例如,在一些情况下,第一溶液包含多个Au离子,因此在基底上产生Au(0)种子颗粒。所提供的第二溶液可包含Au或Ag离子,该离子可围绕Au(0)种子生长出Au或Ag纳米结构。根据所产生的纳米结构的互连,可以制造连续、不连续或半连续的Ag/Au或Au/Au薄膜。

[0076] 薄膜的高度或厚度可以变化。在一些情况下,薄膜的高度小于或等于约5,000nm、4,000nm、3,000nm、2,000nm、1,000nm、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm、100nm、90nm、80nm、70nm、60nm、50nm、40nm、30nm、20nm、10nm、9nm、8nm、7nm、6nm、5nm、4nm、3nm、2nm、1nm、0.5nm、0.1nm、0.05nm、0.01nm、0.005nm或0.001nm。在一些情况下,薄膜的高度可大约或等于约0.0001nm、0.00025nm、0.0005nm、0.00075nm、0.001nm、0.0025nm、0.005nm、0.0075nm、0.01nm、0.025nm、0.05nm、0.075nm、0.1nm、0.25nm、0.5nm、0.75nm、1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、15nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1,000nm、1,500nm、2,000nm、2,500nm或3,000nm。在一些情况下,薄膜的高度可在任意两个本文所述的值之间,例如,在约5nm至约500nm之间。

[0077] 利用本公开内容的薄膜,在薄膜表面的一定距离内产生的荧光信号可增强,其中增强因子随着包括这类距离在内的许多因素而变化。荧光信号可在约400nm至约2100nm的范围内。可影响荧光信号的增强因子的因素的其他非限制性实例可包括薄膜特性和/或特征(薄膜厚度、间隙大小、凸起纳米结构的大小、基底的类型、基底的形状、薄膜表面的粗糙度、基底表面的粗糙度)、荧光分子的类型、光源,或它们的组合。例如,给定某个薄膜时,对于在该薄膜表面的1,000nm内的荧光团,荧光信号可增强。在一些实例中,荧光团为具有约700nm至约800nm的发射的近红外荧光团,并且荧光信号的强度增强至少30倍。在一些实例中,荧光团为具有约400nm至约700nm的发射的可见光染料,并且荧光信号的强度增强至少约3倍。

[0078] 在通过从金属离子溶液中沉淀而制备种子颗粒的情况下,可通过调整该溶液的初始浓度和/或pH值来改变接种密度。该接种密度进而可决定薄膜密度和形态(例如,间隙大小、颗粒间距、纳米颗粒大小等)。在一些情况下,可能需要高接种密度。在一些情况下,低接种密度可能是优选的。在一些情况下,接种密度可小于或等于约 1×10^9 个种子/ mm^2 、 5×10^8 个种子/ mm^2 、 1×10^8 个种子/ mm^2 、 5×10^7 个种子/ mm^2 、 2.5×10^7 个种子/ mm^2 、 1×10^7 个种子/ mm^2 、 5×10^6 个种子/ mm^2 、 1×10^6 个种子/ mm^2 、 5×10^5 个种子/ mm^2 、 1×10^5 个种子/ mm^2 、 5×10^4 个种子/ mm^2 或 1×10^4 个种子/ mm^2 。在一些情况下,接种密度可大于或等于约 1×10^4 个种子/ mm^2 、 5×10^4 个种子/ mm^2 、 1×10^5 个种子/ mm^2 、 5×10^5 个种子/ mm^2 、 1×10^6 个种子/ mm^2 、 5×10^6 个种子/ mm^2 、 1×10^7 个种子/ mm^2 、 5×10^7 个种子/ mm^2 、 1×10^8 个种子/ mm^2 、 5×10^8 个种子/ mm^2 、 1×10^9 个种子/ mm^2 或 5×10^9 个种子/ mm^2 。在一些情况下,接种密度可在任意两个本文所述的值之间,例如,约 4.3×10^7 个种子/ mm^2 。

[0079] 在一些实施方案中,所述方法和材料在方法中采用等离子体不连续银包金 (dAg/Au) 薄膜和连续银包金 (cAg/Au) 薄膜的溶液相生长,该方法开始于通过 Au^{3+} 离子向未修饰表面上沉积/沉淀来快速原位“接种”金纳米颗粒,随后将该离子溶液相还原成 Au^0 。对于Ag/Au结构,在还原步骤之后,通过 Ag^{1+} 的葡萄糖还原使金种子生长至薄膜中,并将所得的具有不同生长程度的薄膜称为连续银包金 (cAg/Au) 或不连续银包金 (dAg/Au) 薄膜。在一些实施方案中,这涉及本纳米级cAg/Au和dAg/Au薄膜制备中的一个三步过程:

(1) 通过从 Au^{3+} 离子溶液中沉淀而将金接种在基底上。通过用含氮碱如 NH_4OH 、尿素等提高溶液的pH而使离子从 HAuCl_4 中沉淀;

(2) 通过还原剂如肼、 NaBH_4 、加热、 H_2 或光还原,将步骤(1)中沉淀的离子还原成基底上的 Au^0 簇;以及

(3) 通过选择性地向初始种子添加银,经由第二溶液中的 Ag^{1+} 卤化物的还原使来自步骤(2)的种子生长,以形成纳米片和凸起结构。这可通过还原剂如光还原剂、D-葡萄糖或在富氢气氛中的超声处理来实现。通常,步骤(3)中的银仅附接于先前沉积的种子,从而产生所谓的“cAg/Au”和“dAg/Au”构造。

[0080] 可通过将基底浸没在金离子溶液中而在多种基底上进行初始接种(沉淀)步骤。该基底无须预处理,但可以以任何方式对其进行预处理以增加金粘附。可选择金盐的离子浓度以控制“种子”的大小和间隔。不希望受理论束缚,据信,纳米片的大小和之间的距离影响基底的荧光增强性质,并可对其进行优化以使可见光和近红外区域中的荧光增强最大化。如下文描述的,通过控制cAg/Au纳米颗粒大小在数百纳米数量级并间隔几纳米至数十纳米的间隙,使来自红外荧光团 (IRDye800) 的近红外荧光提高10-200倍。如下文描述的,通过控制cAg/Au凸起纳米结构大小具有5nm至100nm的平均特征宽度以及1-20nm的间隙宽度,使来自可见光荧光团 (Cy5) 和近红外荧光团 (IRDye800) 的可见荧光相对于空白玻璃基底提高2-100倍。

[0081] 由于可以容易调整如本文所述的薄膜的均一性和形态,因此采用该薄膜来捕获或检测荧光信号的测定或方法可以是高度多重化的。可将不同类型的捕获剂(或结合元件)沉积在薄膜的不同位置,其中每个位置可具有不同的形态或性质(例如,纳米结构的大小、形状和密度、间隙大小、薄膜表面的粗糙度等)。可以使得能够以显著更低的检测限(例如,低至约0.01pg/mL (~1-10fM) 的最低可检测浓度)、更高的灵敏度、特异性和信噪比进行多达数百或数千种分析物(例如,细胞因子或其他蛋白质)的多重检测。可在同一测定中使用具有不重叠的发射波长的不同荧光分子,以标记不同类别的分析物(例如,蛋白质或抗体),从而实现分析物亚型如IgG、IgM、IgA在同一测定中的多色区分。例如,利用报告最低丰度的分子的最大增强荧光团,可以利用薄膜构建能够测量人血清中低丰度和高丰度的不同抗体亚型的多色微阵列。

[0082] 如本文提供的,信噪比(例如,它们的振幅之比)可以是任何适当较高的值(即,适当地高以达到一定精度)。例如,信噪比可为至少约2至1、约3至1、约4至1、约5至1、约6至1、约7至1、约8至1、约9至1、约10至1、约100至1、约1,000至1、约10,000至1或更高。

[0083] 第一溶液和/或第二溶液中所含的离子的还原可通过各种方法实现,例如,经由热诱导还原或光诱导还原,或借助化学试剂如还原剂。还原剂的非限制性实例可包括抗坏血酸、肼、羟胺、铵或硼氢化钠、甲酸、D-葡萄糖、氢气气氛、氢化铝锂(LiAlH_4)、初生态(原子)

氢、钠汞齐、二硼烷、硼氢化钠 (NaBH₄)、含有Sn²⁺离子的化合物如氯化锡(II)、亚硫酸盐化合物、肼(Wolff-Kishner还原)、锌-汞齐(Zn(Hg))(Clemmensen还原)、二异丁基氢化铝(DIBAL-H)、Lindlar催化剂、草酸(C₂H₂O₄)、亚磷酸盐、次磷酸盐和亚磷酸、在生化实验室中使用以避免S-S键的二硫苏糖醇(DTT)、含有Fe²⁺离子的化合物如硫酸铁(II)、一氧化碳(CO)、碳(C)、三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP),或它们的组合。

应用

[0084] 本公开内容的系统和组合物可应用于许多种应用。任何采用荧光检测的方法或技术均可能落入如本文提供的应用的范围内。应用的实例包括但不限于,在进行或不进行多重化的情况下用于经由直接和间接荧光抗体技术检测的蛋白质、核酸和抗体的微阵列,基因测序,体外诊断,包括荧光原位杂交(FISH)、免疫组织化学染色(IHC)、用于IHC染色和FISH的外来体捕获、无细胞DNA捕获和定量测定、化学成像(例如,中红外化学成像、近红外化学成像、拉曼化学成像、荧光成像(紫外线、可见光和近红外区域))、荧光强度衰变形状显微术(FIDSAM)、荧光各向异性、荧光相关光谱(FCS)、荧光图像引导的手术(FIGS)、光漂白荧光损失(FLIP)、栅格光层显微术、免疫荧光测定(IFA)、单分子宽场成像、超分辨率成像技术如受激发射损耗(STED)和单分子定位(PALM/STORM)、通过宽场共聚焦扫描仪和激光扫描细胞计数仪器的细胞和组织成像、酶联免疫斑点(ELISPOT)、荧光(Förster)共振能量转移(FRET)成像、基于光漂白后荧光恢复(FRAP)的成像、用于循环肿瘤细胞(CTC)的成像基底、用于单分子和单纳米颗粒成像的成像基底,以及用于抗原、抗体、肽、DNA、RNA、适体、组织、细胞的基于荧光的微阵列的以及反相微阵列的成像基底,或它们的组合。

[0085] 本公开内容的一些方面提供了检测一种或多种分析物的方法。该方法可包括:(a)提供如本文所述的薄膜;(b)将分析物及针对该分析物的标记物施加至薄膜,其中该标记物可包含荧光分子(例如,荧光团)并且分析物可以与或不与该标记物结合;以及(c)通过检测该荧光分子的荧光信号来检测分析物,其中相对于在不存在薄膜的情况下的荧光信号,该荧光信号的强度可得到增强。可使用多种方法和技术来检测荧光信号,例如,荧光光谱法(或荧光测定法、荧光分光光度法)、荧光显微镜、荧光扫描仪和流式细胞仪。在一些实例中,荧光信号的检测可包括通过显微术进行成像。通常,检测一种或多种分析物的方法可进一步包括将受试者诊断为具有与所述一种或多种分析物的存在、不存在或水平相关的状况。例如,在针对来自受试者的样品中的感染原的存在对生物标志物进行检测后,可接着将该受试者诊断为感染该感染原或其携带者。类似地,根据所分析的一种或多种生物标志物,在检测一种或多种癌症相关生物标志物后可接着癌症的诊断,等等。本文提供了这类生物标志物的多个实例。在一些情况下,方法可进一步包括基于一种或多种分析物的检测和/或所得的诊断而采取医疗行动。医疗行动可包括治疗干预,以及进一步的测试。检测可包括对来自包含结合元件、与该结合元件结合的分析物以及荧光标记物的复合物的荧光信号进行检测,所述各项全都可与薄膜复合。薄膜、结合元件、分析物和荧光标记物可以是本文所述的任一种。

[0086] 方法可采用任何本文所述的薄膜。作为示例,可在该方法中使用的薄膜可具有一种或多种特性,该特性包括,例如,(a)间隙具有约5nm至约50nm的宽度和约5nm至约200nm的长度;(b)纳米结构具有约50nm至约500nm的平均宽度和平均长度;(c)薄膜具有约1000nm²至约250,000nm²的纳米片大小;(d)薄膜的高度为约5nm至约500nm;(e)薄膜包含不规则特

征和异质结构；(f) 薄膜提供约400nm至约2100nm的等离子体；(g) 基底包含平坦表面、弯曲表面、球形表面或三维多孔膜；以及(h) 基底为珠子。该薄膜可包含银包金纳米颗粒。

[0087] 在一些情况下,该方法可进一步包括基于检测到的荧光信号确定分析物的浓度、身份(例如,细胞的表型或样品来源)和/或位置,或样品或样品来源的其他特性。特性的实例包括样品来源的身份(例如,个体受试者或位置)、污染的存在或不存、疾病或状况的存在或不存、蛋白质的类型、核苷酸序列,或其他识别特性。在一些情况下,该方法包括鉴别样品的疾病或状况,或鉴别样品来源(例如,受试者)。这些的实例在上文提供,并且包括的疾病或状况为心血管疾病或状况,肾脏相关疾病或状况,产前或妊娠相关疾病或状况,神经学或神经精神学疾病或状况,自身免疫或免疫相关疾病或状况,癌症,传染性疾病或状况,儿科疾病、病症或状况,线粒体病症,呼吸-胃肠道疾病或状况,生殖疾病或状况,眼科疾病或状况,肌肉骨骼疾病或状况,或皮肤疾病或状况。可鉴别其他疾病,如通过鉴别一种或多种生物标志物的存在或与关于该状况的生物特征(biosignature)相匹配的程度。本文提供了生物标志物的实例。

[0088] 用于经由荧光检测分析物的多种布置是可用的。例如,可诸如通过将样品液体添加至内表面涂覆有薄膜的孔,直接将包含分析物的样品施加至薄膜的表面。可在首先使样品与样品表面如载玻片相接触后,使样品与薄膜直接接触,这可导致分析物夹在样品表面与薄膜之间。在更进一步的实例中,使含有分析物的样品与样品基底接触,该样品基底具有与该样品接触的第一表面(如孔的内表面、载玻片的上表面或微流体装置内的通道)和与该样品接触的第二表面(如孔或载玻片的底面),并且与该分析物相关的荧光信号的检测包括使第二表面靠近薄膜(例如,接触,或处于1000nm以内)。可在检测邻近于薄膜的分析物之前的任意点用荧光标记物来标记该分析物。当薄膜在珠子表面上时,通过将样品与珠子接触而使薄膜靠近待检测的分析物。然后,可在如样品容器中(例如,如在多孔板的孔中)检测荧光。在一些情况下,通过流式细胞术、荧光成像显微镜或扫描仪来分析已接触样品的薄膜包覆的珠子。

[0089] 在一些情况下,分析物可在表面上。分析物可直接或间接地附接至表面。分析物可经由结合元件结合至表面。结合元件可以是相同或不同的,并且可以是多种结合元件中的任一种,其实例在本文中提供。微阵列可包括DNA微阵列、RNA微阵列、miRNA微阵列、肽微阵列、蛋白质微阵列、抗体微阵列,或任意类型的生物或化学分子的微阵列。在分析物结合至表面的情况下,本公开内容的薄膜可施加于表面上的分析物。如上文及本文其他各处所讨论的,薄膜可包含多个结合元件或捕获剂(例如,结合元件的阵列)。每一结合元件均可被配置用于与相同或不同类型的分析物结合。在采用包含多种异质且不规则的纳米结构的非均一薄膜的情况下,该薄膜可包含多个非连续且隔离的位置。所述多个位置可以是可独立寻址的,并且每个位置均可包含能够与某种分析物结合的特定类型的结合元件。每一对结合元件与分析物的结合均可产生可被薄膜增强并可被检测器捕获的荧光信号。基于所检测到的信号的位置,可确定或鉴别该分析物。在一些实例中,结合元件为与施加至基底(例如,珠子)的薄膜缀合的寡核苷酸(例如,引物),并且分析物为可经由序列互补而与该寡核苷酸杂交的靶多核苷酸,或其扩增产物。一旦靶多核苷酸成功与寡核苷酸杂交,则可开始扩增反应,以产生可检测的扩增产物(或扩增子)。由于薄膜可被制造成包含多个隔离且可独立寻址的位置并且每个位置可仅含单个分析物,因此该检测可进一步包括单分子分析,例如,单

分子成像及示踪,或单纳米颗粒示踪及成像。

[0090] 在一些情况下,结合元件的阵列为蛋白质阵列。蛋白质微阵列可以以许多方式制备,如通过将所需的蛋白质点样到薄膜或样品基底上。用于制备蛋白质阵列的示例性方法在例如US 2003/0013130、US2003/0108726和US 2009/0088329中描述。在一些情况下,结合元件的阵列为多核苷酸阵列,如薄膜或样品基底上的寡核苷酸探针的阵列。用于制备多核苷酸阵列的示例性方法包括在载玻片上使用细尖针、使用预制掩模的光刻法、使用动态显微镜装置的光刻法、喷墨印刷或电化学法。示例性的方法在例如Fodor等人,1991,Science 251:767-773;Pease等人,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.91:5022-5026;Lockhart等人,1996,Nature Biotechnology 14:1675;第5,578,832号;第5,556,752号;以及第5,510,270号美国专利中描述。

[0091] 可通过使用根据本公开内容的薄膜来增强采用荧光作为用于检测分析物的手段的多种结合测定中的任一种。在一些实施方案中,该测定为基于受体的测定。通常,基于受体的测定包括检测两个结合配偶体——分析物受体(也被称为结合元件)与分析物之间的相互作用。通常,根据哪个是已知的(分析物受体),哪个是待检测的(分析物),来区分给定结合配偶体对中的分析物受体和分析物。如此,本文所述的示例性分析物受体可在其他实施方案中作为分析物加以检测,而如本文所述的示例性分析物可在其他实施方案中用于检测相应结合配偶体的分析物受体。在一些实施方案中,分析物受体、分析物或二者均包括蛋白质。分析物受体包括但不限于:天然或合成蛋白质、细胞受体蛋白质、抗体、酶、多肽、多核苷酸(例如,核酸探针、引物和适体)、脂质、有机或无机小分子、抗原(例如,用于抗体检测)、金属结合配体,以及对靶分析物具有结合亲和性的任何其他天然或合成的分子。在一些实施方案中,分析物受体对分析物的结合亲和力为小于约 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $1 \times 10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $1 \times 10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $1 \times 10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $1 \times 10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $1 \times 10^{-10}M$ 、 5×10^{-11} 、 1×10^{-11} 或更小的 K_D 。可使用多种分析物和分析物受体,以及采用它们的测定。参见,例如,US8435738。在阵列包含多个不同的结合元件的一些情况下,可在单次反应中检测相应的多种不同的分析物。通常,通过提高来自与分析物的存在或不存在相关的标记物的荧光信号,提供了对该分析物进行检测的灵敏度,使得可在背景水平之上检测到比在不存在本公开内容的薄膜的情况下可能检测到的更少量的分析物。

[0092] 体外诊断成像可包括将细胞和细胞囊泡粘附至基底(通常是表面修饰的玻璃),以及采用与荧光染料缀合的互补抗体或抗原检测某些细胞膜分子。在该方法中,来自细胞的自发荧光和染料的光漂白都是关注的。细胞的内源性自发荧光在350-500nm的可见光区域中最高,接近近红外线区时减少。通过结合本公开内容的薄膜进行细胞成像,可以以最小的自发荧光放大所选标记物的荧光信号(例如,对于具有680nm至800nm区域的峰值激发波长的荧光团)。通过在该区域将荧光放大10-200倍,可使用较低强度的激发,从而减少光漂白。

[0093] 在一些实施方案中,检测测定包括检测一种或多种靶多核苷酸的扩增。扩增方法可包括例如聚合酶链反应(PCR)、链置换扩增(SDA)和基于核酸序列的扩增(NASBA)以及滚环扩增(RCA)。该扩增方法可以是温度循环的或等温的。该扩增方法可以是指数或线性的。对于具有温度循环的扩增,温度循环通常可对应于扩增循环。在某些情况下,等温扩增可具有扩增循环,如变性循环,而在其他情况下,等温扩增反应将单调进行,其中没有任何特定的扩增循环。该扩增方法可用于扩增核酸分子(例如,DNA,RNA)的特定区域(即,靶区域)或

核苷酸序列。例如,该区域可以是单个基因、基因的一部分或非编码序列。

[0094] 如本文所述,薄膜可包覆在基底上,其中该基底为珠子。在该实施方案的一个具体实施方案中,珠子进一步包覆有作为结合元件的多核苷酸探针。可提供多个珠子,并且每个珠均可包覆有多个拷贝的相同多核苷酸或多个不同的多核苷酸。该探针可包含与特定靶序列互补的序列,或者可包含用于检测多个不同靶序列的随机或部分随机序列。如在携带荧光标记物的靶多核苷酸与珠子杂交并检测到荧光的情况下,检测可以仅通过杂交进行。或者,如在结合至珠子的探针沿着用作扩增反应中的模板的靶多核苷酸延伸的扩增反应中,检测可包括另外的操作步骤。可在扩增过程中和/或扩增完成后检测扩增产物。多种用于检测扩增产物的标记物都是可用的,诸如溴化乙锭、SYBR绿、SYBR蓝、DAPI、吡啶黄素、氟香豆素、玫瑰树碱、道诺霉素、氯喹、偏端霉素D、色霉素、碘化丙锭、Hoeste、SYBR金、吡啶、原黄素、吡啶橙、homidium、光辉霉素、钆多吡啶、氨基霉素及其他合适的试剂。

[0095] 作为用于确定溶液中核酸、抗体或蛋白质浓度的方法,经由ELISA的免疫测定检测既用于临床诊断又用作生命科学研究工具。实践中,将捕获抗体或抗原以给定浓度涂覆在载玻片或96孔板的表面上,以便与溶液中的靶分子结合。结合后,将检测抗体或抗原温育,并通常采用校准曲线作为参考,使用经由吸收或荧光光谱法所得的发光来确定溶液中靶分析物的浓度。在不存在本公开内容的薄膜的情况下进行的ELISA通常局限于<3log的动态范围,以及~1纳克分析物/毫升溶液的检测和定量的下限。许多生物分子,如指示早期疾病状态的细胞因子和蛋白质,具有低于1ng/ml的临床相关浓度,以及跨越6个或更多个log的动态范围。通过用靠近本公开内容的薄膜的标记物执行检测步骤,检测的动态范围和基线可扩展,以检测处于甚至低于这类范围的分析物。例如,动态范围可跨越至少3、4、5、6、7个或更多个log。

[0096] 在一些实施方案中,如本文所述的薄膜可与多种显微技术中的任何技术结合使用,该显微技术的实例在本文中描述。所选择的标记物将取决于靶分析物和检测技术。在一些情况下,检测方法为荧光原位杂交(FISH)。在该技术的典型实施中,与感兴趣序列互补的标记的多核苷酸(FISH探针)与固定的染色体制品退火,并且通过显微术检测感兴趣序列的存在以及染色体位置。可通过将感兴趣的核酸固定在包括但不限于玻璃、硅或纤维的基底上而进行FISH。FISH还可定量地使用(Q-FISH),以检测重复序列如端粒的存在和长度。这可以通过确定所发射的荧光的强度(如通过显微术测量的)而实现。可进行采用受试荧光化合物的FISH测定,以用于检测DNA分子或染色体的特定区段。这些特征可在遗传咨询(例如,产前筛查)、药物和物种鉴定中使用。该测定可直接在薄膜上进行,或在其下设置有薄膜以增强荧光以供检测的基底(例如,载玻片)上进行。

[0097] 本文还提供了通过使用本公开内容的系统和组合物对核酸分子进行测序的方法。在一个实施方案中,该方法可包括:(a)提供如本文提供的薄膜(例如,银包金纳米颗粒或金包金纳米颗粒);(b)使寡核苷酸与靶多核苷酸杂交;(c)在延伸方向上用与靶序列上的对应位置互补的一个或多个碱基延伸该寡核苷酸;以及(d)通过检测一个或多个荧光分子(例如,荧光团)的荧光信号来鉴别在步骤(c)中添加的所述一个或多个碱基;其中相对于在不存在薄膜的情况下荧光团的荧光信号,所述荧光信号的强度增强。可通过聚合酶或连接酶延伸该寡核苷酸。用于延伸的四种碱基可包含相同或不同类型的荧光分子。在一些情况下,这四种碱基中的每一种可与不同的荧光分子相关联,使得每种类型的碱基的掺入产生可区

分的可检测信号。通过检测荧光信号,可确定核酸分子的序列。在一些情况下,薄膜在多个珠子上,该多个珠子可流动通过流通池,或缀合至流通池。可通过包括新一代测序(NGS)平台在内的多种测序方法中的任一种进行测序。NGS技术可包括以大规模平行方式对克隆扩增的DNA模板或单个DNA分子的测序(例如,如Volkerding等人,Clin Chem 55:641-658 [2009];Metzker M Nature Rev 11:31-46 [2010]中描述的)。新一代测序平台可以是可商购的平台。可商购的平台包括,例如,用于合成测序、离子半导体测序、焦磷酸测序、可逆染料终止子测序、连接测序、单分子测序、杂交测序和纳米孔测序的平台。用于合成测序的平台可从例如Illumina、454Life Sciences、Helicos Biosciences和Qiagen获得。Illumina平台可包括例如Illumina的Solexa平台、Illumina的Genome Analyzer,并且在Gudmundsson等人(Nat.Genet.2009 41:1122-6)、Out等人(Hum.Mutat.2009 30:1703-12)和Turner(Nat.Methods 20096:315-6)、美国专利申请公开第US20080160580号和第US20080286795号、第6,306,597号、第7,115,400号和第7232656号美国专利中描述。454Life Science平台包括例如GS Flex和GS Junior,并且在第7,323,305号美国专利中描述。来自Helicos Biosciences的平台包括真正单分子测序平台(True Single Molecule Sequencing platform)。用于离子半导体测序的平台包括例如Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) 并且在第7,948,015号美国专利中描述。用于焦磷酸测序的平台包括GS Flex 454系统并且在第7,211,390号、第7,244,559号、第7264929号美国专利中描述。用于连接测序的平台和方法包括例如SOLiD测序平台,并且在第5,750,341号美国专利中描述。用于单分子测序的平台包括来自Pacific Bioscience的SMRT系统,以及Helicos真正单分子测序平台。

[0098] 样品(例如,体液、细胞、组织培养基或从它们衍生出的样品)中的外来体可通过固定的外来体特异性结合元件如抗体(例如,抗CD63、抗CD81和抗CD9)而被捕获在包覆有荧光增强薄膜的表面(例如,载玻片或珠子)上,并进一步经受基于荧光的标记测定。在一些实施方案中,该标记测定用于鉴别和定量蛋白质生物标志物或包括DNA和RNA在内的核酸,或用于评估该样品所来自的受试者的信号传导途径或疾病状态。

[0099] 外来体可从生物样品中分离,该生物样品可包括例如细胞培养基、组织、流体或可含有外来体的任何样品。生物样品的非限制性实例包括外周血、血清、血浆、腹水、尿液、脑脊髓液(CSF)、痰液、唾液、骨髓、滑液、房水、羊水、耳垢、母乳、支气管肺泡灌洗液、精液(包括前列腺液)、Cowper流体或射精前液体、女性射出液、汗液、粪便物、毛发、眼泪、囊肿液、胸膜和腹膜液、心包液、淋巴液、食糜、乳糜、胆汁、间质液、月经、脓、皮脂、呕吐物、阴道分泌物、粘膜分泌物、粪便水、胰液、窦腔灌洗液、支气管肺吸出物或其他灌洗液。生物样品还可包括来自可源自于胎儿或母体的囊胚腔(blastocyl cavity)、脐带血或母体循环的样品。在一些情况下,生物样品为组织样品或活检物,从其可获得外来体。例如,如果样品为固体样品,则可培养来自该样品的细胞以诱导外来体产物。在一些情况下,样品是来自受试者的腹水,例如,来自患有卵巢癌的人受试者的腹水;来自人原代黑素瘤细胞系的细胞培养基上清液;来自人原代结肠癌细胞系的细胞培养基上清液;或鼠巨噬细胞,例如,感染结核病的鼠巨噬细胞。

[0100] 在一些情况下,外来体为癌症外来体。癌症外来体可包括从诸如以下癌细胞和/或肿瘤细胞(原代或细胞培养物)获得或衍生的外来体:乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠癌、增生性

息肉、腺瘤、结肠直肠癌(如CRC Dukes B或Dukes CD)、高度发育不良、低度发育不良、前列腺增生、前列腺癌、黑色素瘤、胰腺癌、脑癌(如胶质母细胞瘤)、血液恶性肿瘤(如B细胞慢性淋巴细胞性白血病、B细胞淋巴瘤-DLBCL、生发中心样B细胞淋巴瘤-DLBCL、活化B细胞样B细胞淋巴瘤-DLBCL以及伯基特淋巴瘤)、肝细胞癌、宫颈癌、子宫内膜癌、头颈癌、食管癌、胃肠道间质瘤(GIST)、肾细胞癌(RCC)或胃癌。癌症外来体还可来自恶化前状况,例如,但不限于巴雷特食管(Barrett's Esophagus)。

[0101] 来自样品(例如,体液)的无细胞多核苷酸(例如,无细胞DNA或cfDNA)可通过固定的DNA特异性抗体(例如,抗dsDNA、抗ssDNA和抗DNA/RNA复合物)或互补多核苷酸而被捕获在包覆有荧光增强薄膜的表面(例如,载玻片或珠子)上,并进一步经受用于鉴别和定量cfDNA的基于荧光的标记测定,以评估该样品所来自的受试者的生物状态或疾病状态。通常,无细胞多核苷酸是存在于样品(例如,细胞已被去除的样品、未经受裂解步骤的样品,或经处理以将细胞多核苷酸与细胞外多核苷酸分离的样品)中的细胞外多核苷酸。例如,无细胞多核苷酸包括细胞死亡时释放至循环中的多核苷酸,并且作为无细胞多核苷酸从血液样品的血浆组分中分离。

[0102] 无细胞多核苷酸可来自多种来源,包括人类、哺乳动物、非人类哺乳动物、猿、猴、黑猩猩、爬行动物、两栖动物或禽类来源。此外,样品可提取自含有无细胞序列的多种动物流体,包括但不限于血液、血清、血浆、玻璃体、痰液、尿液、泪液、汗液、唾液、精液、粘膜分泌物、粘液、脊髓液、羊水、淋巴液等。无细胞多核苷酸可来源于胎儿(经由从怀孕受试者获取的流体),或者可衍生自受试者自身的组织。可采用多种技术通过体液收集来进行无细胞多核苷酸的分离和提取。在一些情况下,收集可包括采用注射器从受试者抽吸体液。在一些情况下,收集可包括将流体移液至或直接收集至收集器皿中。

[0103] 在收集体液后,可采用多种技术分离和提取无细胞多核苷酸。在一些情况下,可采用可商购的试剂盒如Qiagen Qiamper[®]循环核酸试剂盒方案来分离、提取和制备无细胞多核苷酸。在一些实例中,可采用Qiagen Qubit[™] dsDNA HS测定试剂盒方案、Agilent[™] DNA 1000试剂盒或TruSeq[™]测序文库制剂;低通量(LT)方案。

[0104] 通常,通过分区步骤从体液中提取和分离无细胞多核苷酸,在该分区步骤中,在溶液中发现的无细胞DNA与细胞以及体液的其他不溶性组分分离。分区可包括但不限于诸如离心或过滤等技术。在一些情况下,并未先将细胞与无细胞DNA分区,而是将其裂解。在该实例中,通过选择性沉淀将完整细胞的基因组DNA分区。包括DNA在内的无细胞多核苷酸可保持可溶并可与不溶性基因组DNA相分离,且可将其提取。通常,在缓冲液添加以及不同试剂盒特有的其他洗涤步骤之后,可采用异丙醇沉淀来沉淀DNA。可采用进一步的清洁步骤如基于二氧化硅的柱子来去除污染物或盐。可针对特定应用对一般步骤进行优化。例如,可在整个反应中添加非特异性的大量载体多核苷酸,以优化该程序的某些方面,如产率。

[0105] 在一些实施方案中,例如通过使用一个或多个自动化设备,使检测荧光信号的方法中的一个或多个或全部步骤自动化。通常,自动化设备是能够在没有人类指引的情况下运行的设备—自动化系统可在人已经完成采取任何动作以促进功能(例如,通过向计算机输入指令)后的一段时间内执行该功能,之后该自动化设备在没有进一步的人为操作的情况下执行一个或多个步骤。包含实现本文公开的任何方法的代码的软件和程序可存储在一些类型的数据存储介质如CD-ROM、DVD-ROM、磁带、闪存驱动器或磁盘上,或其他适当的计算

机可读介质上,它们可由诸如可为计算机系统的一部分的一个或多个处理器来执行。本发明的各个实施方案还可专门以硬件,或软件与硬件的组合来实现。例如,在一个实施方案中,使用可编程逻辑控制器(PLC),而不是常规的个人计算机。PLC常用于无须购置通用计算机的多种过程控制应用中。PLC可被配置用于执行一种或多种控制程序,并且能够以类似于个人计算机的方式从用户或另一设备接收输入并且/或者向用户或另一设备提供输出。自动化系统可包括液体处理器。液体处理器的实例包括来自Perkin-Elmer、Beckman Coulter、Caliper Life Sciences、Tecan、Eppendorf的液体处理器。

实施例

[0106] 以下实施例是出于说明根据本公开内容的各个实施方案的目的而给出的,并不意味着以任何方式来限制本发明。本实施例以及本文描述的方法是当前优选实施方案的代表,是示例性的,并不旨在限制本发明的范围。本领域技术人员将会想到由权利要求的范围所限定的本发明的精神内所包括的其变化和其他用途。

实施例1:银包金薄膜制备的溶液相方法

[0107] 本实施例描述了银包金薄膜的制备。本实施例中所用的材料包括购自Fisher Scientific的玻璃载玻片和石英载玻片,在使用前用丙酮、IPA和甲醇对其进行冲洗。具有天然氧化层的硅晶片购自斯坦福大学综合系统中心。聚(氯乙烯)盖玻片购自Ted Pella, Inc.。Sylgard 184购自Dow Corning并通过标准程序固化。氯金酸三水合物、盐酸羟胺、硼氢化钠和葡萄糖购自Sigma-Aldrich。氢氧化铵(30%氨)购自Fisher Chemicals。玻璃基底上的cAg/Au薄膜的等离子体共振通过Cary 300分光光度计经由UV-vis-NIR吸收光谱法测量,对任何的玻璃贡献进行了背景校正。在 $\sim 0.25\text{cm}^2\text{SiO}_2$ 基底上于如下所述的不同HAuCl₄浓度下制备了接种的金基底。还原后,将该基底干燥,并通过带有Nanoscope 5软件的Nanoscope III多模AFM(Veeco)在轻敲模式下直接成像以供高度分析。由于高表面粗糙度不适用于AFM,因此经由扫描电子显微术对玻璃和SiO₂上生长的cAg/Au薄膜进行了成像。在5kV加速电压下在具有FEG源的FEI XL30 Sirion SEM上获得了图像。

[0108] 最初将选择的基底浸没在添加有氢氧化铵的氯金酸溶液中。在接种溶液中温育后,通过在水浴中浸泡来洗涤基底。在洗涤步骤后,立即将Au³⁺接种的基底浸没在室温下的0.1mM至100mM硼氢化钠溶液(于线性摇床上或手动搅拌)中。还原几乎立即发生,并导致在致密接种的基底表面上形成淡粉色,并伴随着发展出525nm处的等离子体吸收,表明纳米颗粒形成。AFM确认了纳米级球体的存在,其高度为5-10nm(图1的视图(b)和图2的视图(a))。使还原进行1-5分钟,随后将该基底在水浴中浸泡两次。将该基底加热至高温(>80°C)也导致在不需还原剂的情况下还原成Au⁰,这可能是由于含Au簇的分解。将Au纳米颗粒接种的基底直接从洗涤水浴中移动至处于还原条件下、其中具有Ag¹⁺的溶液中。生长进行直到薄膜停止明显的发展,在约15秒至20分钟之间。图1的视图(a)至(e)中视觉捕获了玻璃载玻片上银包金生长的过程。

[0109] 通过原位Au接种步骤控制首先沉积在基底上的种子的初始密度(种子/mm²)和大小。向碱性pH的氯金酸中添加氢氧化铵可导致围绕Au³⁺中心的氯与氨(或氨基)配体的配体交换,具有通式Au(NH₃)₂(H₂O)_{2-x}(OH)_x^{(3-x)+}。所得的胺-金复合物不在碱性溶液中快速水解,其聚集成簇。在适度碱性的pH下,该低溶解性阳离子簇随后沉积至带负电荷的基底表面上。所沉积的金沉淀物随后被水溶液中的硼氢化钠还原成Au⁰纳米颗粒(上文的步骤(2))。此处

提出的Au纳米颗粒接种方法可广泛适用于多种基底。

[0110] 可改变金簇接种密度以获得产生均一且致密的种子分布的条件。接种密度随 Au^{3+} 浓度提高而增加(图2的视图(a)-(c)),进而影响薄膜密度和形态。还发现阳离子Au簇的接种与pH有关,在pH 8-10下形成均一的种子层。

[0111] 在最终cAg/Au薄膜的生长前,用 NaBH_4 还原所沉积的金阳离子小簇,如果没有该还原,则观察到极少的银生长并且所发生的生长是整体不均匀的。在种子还原后,利用AFM来确认高度5-10nm的纳米级球体的存在(图1的视图(b))。

[0112] cAg/Au薄膜的生长通过卤化银还原至金种子上而实现。对于 Ag^{1+} 还原的速率,表面结合的 Ag^{1+} 离子远大于溶液中的那些离子,因此 Ag^0 形成是种子层所特有的。在还原后的洗涤步骤后,将所接种的基底浸泡在处于还原条件下的受控pH和温度的水溶液中。向该溶液添加卤化银溶液,产生1mM至100mM的银离子浓度。该溶液保持在生长条件下15秒至20分钟的时间,随后进行连续的水洗涤、干燥并于 -20°C 下真空储存。

[0113] 化学地控制金和银纳米颗粒纳米片大小以及颗粒间间隔的能力允许针对可见光和近红外荧光应用对所得薄膜的整体表面等离子体进行优化。由沉淀/沉积期间 HAuCl_4 的浓度控制的金纳米颗粒种子密度以及由种子密度、生长时间以及薄膜生长步骤期间存在的 Au^{3+} 或 Ag^{1+} 离子浓度控制的最终纳米片大小允许相对精确地控制纳米片间隔的间隔。邻近等离子体纳米颗粒纳米片的偶联可用作确定由薄膜所提供的整体等离子体共振的能量以及局部电场增强的量级(因而,金属增强的荧光效果)的参数。类似地,cAg/Au和dAg/Au薄膜的金种子与银外包覆层之间的界面处的相互作用也可以是促进比单金属薄膜更广泛的等离子体增强和更广泛的荧光增强的参数。

[0114] 可系统地改变合成条件以提供等离子体基底文库。可通过初始氯金酸的浓度来改变Au种子的密度。第二生长步骤期间的 Ag^{1+} 离子浓度决定凸起纳米结构之间的纳米间隙距离,该距离在隔离的小纳米片与纳米片之间的5-50nm间隙到连续粗糙薄膜的1-10nm窄间隙之间的范围内。这样的溶液相合成方法产生了荧光增强等离子体(可见光-NIR)cAg/Au和dAg/Au基底的文库,其具有约5-50nm纳米间隙间隔,以及可用于在400-2100nm的宽可见光-NIR范围中的荧光增强的在450-1000nm范围内的等离子体峰。

实施例2:向未修饰的基底上接种金前体

[0115] Ag/Au薄膜的制备包括三个步骤:金前体的接种,还原为 Au^0 簇,以及通过 Ag^{1+} 还原的选择性生长(图1的视图(a)-(e))。通过向含有所选基底的氯金酸溶液中添加氢氧化铵来实现接种。在氢氧化铵添加后,透明的黄色酸性 HAuCl_4 溶液立即变得浑浊,呈橙黄色,pH约9。发现 Au^{3+} 物质于基底上的沉积速率较快。将暴露时间从一分钟增加至20分钟并未显著影响固定在该基底上的金种子的密度或大小。

[0116] Au种子的接种密度取决于在用氢氧化铵沉淀之前基底所浸入的 HAuCl_4 的初始浓度。对于无机基底,如玻璃和 SiO_2 , HAuCl_4 从0.5mM增加至5mM导致Au NP前体种子的密度和均一性的显著提高(图2的视图(a)-(c))。聚合物基底如聚(氯乙烯)(PVC)和聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)需要略高的10mM Au^{3+} 浓度,以便获得高密度的接种。

实施例3:金沉淀物前体的溶液相还原

[0117] 在通过沉淀至所选基底上的Au种子沉积后,将该基底浸没在0.1mM至100mM的硼氢化钠溶液中,这导致 Au^0 纳米颗粒的快速形成,其由基底的淡粉-紫色变化所证实。原子力显

微术揭示了直径为5-10nm的Au NP的形成(图1的视图(b)),并且UV/Vis吸收光谱法揭示了在该大小范围内的Au NP所典型的525nm处的弱表面等离子体共振。

实施例4:Ag¹⁺向前体Au种子上的选择性还原

[0118] 将接种的基底浸没在处于还原条件下的银离子水溶液中启动了Ag¹⁺向种子层上的选择性还原,因此Au前体种子生长成银包金等离子体纳米结构(图1的视图(d))。银还原导致从粉红色至蓝紫色的基底颜色变化,并且最终在薄膜变厚时,在基底上观察到高度反射性的银色(图1的视图(c))。SEM成像揭示,该基底上形成的Ag纳米结构被隔开约1-100nm间隙间隔,这是局部电场增强所期望的形态。

实施例5:TOTO-3荧光信号的增强

[0119] TOTO-3是一种DNA染色染料,其激发(642nm)和发射(660nm)与Cy5类似。将TOTO-3溶液移液至玻璃、Au/Au和cAg/Au基底上并干燥,以便初始评估基底的荧光增强。相比于玻璃,采用Agilent GenePix扫描仪的Cy5通道,在减去背景后,Au/Au呈现出超过10倍的信号提高。cAg/Au导致了减去背景后超过25倍的更大信号提高(图3)。Au/Au和cAg/Au都表现出与玻璃基底相比高得多的针对TOTO-3荧光的信噪比。这可用于在等离子体薄膜上的高灵敏度无细胞DNA测定。

实施例6:用于细胞因子测定的定量分析

[0120] 用于可见光和NIR荧光增强应用的Ag/Au薄膜基底的均一性足以为细胞因子测定提供具有超过6个数量级的动态范围的定量分析(图4)。除了提供在低浓度下的生物标志物定量外,高通量筛选方法还可从由多重微阵列Ag/Au测定提供的扩展动态范围中获益,其中分析物的浓度以及结合常数可跨越显著且未知的范围。基于Ag/Au薄膜的当前近红外荧光增强还可发现作为体外成像工具的其他应用。例如,结合至活细胞的膜的荧光剂已被Ag/Au薄膜增强。

实施例7:用于反向蛋白质阵列测定的定量分析

[0121] 用于可见光和NIR荧光增强应用的cAg/Au薄膜底物对于反向蛋白质阵列(RPPA)应用得到证实,其提供了采用来自至少25个细胞的裂解物对细胞系或生物组织中的人表皮生长因子受体2(HER2)的表达的定量分析。HER2被标记有可见光染料AlexaFluor647,IRDye800的抗HER2所标记,并利用LI-COR Odyssey扫描仪进行成像。相比于可商购的环氧化物包覆的载玻片(来自Schott的NEXTERION),cAg/Au薄膜基底展现出高出约9倍的荧光信号以及明显更高的信号:背景比。

实施例8:

[0122] 用本公开内容的Ag/Au薄膜包覆微小珠子,并将其用于心肌梗死的标志物——肌钙蛋白I的基于流式细胞术的检测。图6中提供了在一系列标志物浓度上的中等荧光强度(MFI)的结果。背景(BKGD)由虚线表示。珠子可以是磁性或非磁性的。

实施例9:

[0123] 在没有本公开内容的薄膜(在本实施例中称为“染色试验”)以及使用本公开内容的薄膜(在本实施例称为“等离子体载玻片试验”)的情况下采用标准IgG染料测定方法对来自56名患者(编号为131-186)的血清样品的弓形体抗体进行了检测。比较的结果在图7的视图(A)-(B)和图8的视图(A)-(B)中示出。

[0124] 将包含本公开内容的薄膜的载玻片(称为“等离子体载玻片”)装载至微阵列打印

机器人 (GESIM Nanoplotter) 中。在该支持物 (holder) 中, 针对每种抗原, 在每个孔 (每个载玻片总共16个孔) 中以一式三份的方式打印斑点。打印该载玻片以检测IgG和IgM。将抗原在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中稀释, 并在25℃下打印, 产生约300微米的微阵列特征直径。将打印的载玻片于真空下密封并储存在-80℃下直至使用。

[0125] 为运行样品, 最初用含有1x PBS、1mM Tris和5%牛血清白蛋白 (BSA) 的缓冲溶液封闭该打印的载玻片。封闭后, 在自动化载玻片洗涤器上用PBS+Tween 20溶液 (PBST) 洗涤该载玻片。将样品 (人血清或全血) 在胎牛血清 (FBS) 溶液中稀释 (1:100), 并将100微升的溶液施加至具有打印的抗原的给定孔。将单独的孔与在FBS中1:200稀释的阳性对照溶液一起温育。也可将对照溶液施加至每个孔。将该溶液在室温下温育1小时, 随后采用自动化载玻片洗涤器以PBST进行洗涤。然后在室温和黑暗中, 将该阵列在FBS中的4nM IRDye800缀合的山羊抗人IgM和4nM IRDye680缀合的山羊抗人IgG中温育30分钟。然后采用自动化载玻片洗涤器在PBST中洗涤该等离子体载玻片, 随后浸入去离子水中, 之后用载玻片离心机进行干燥。

[0126] 之后, 用MidaScan在800nm通道中扫描每个载玻片。记录了反映血清/全血/唾液中的适当抗体的荧光信号强度。

[0127] 图7示出了Toxo IgG效价水平, 其基于染色试验方法 (A) 以及采用相对于对照样品归一化的等离子体载玻片测定信号的荧光强度水平 (B)。图8示出了Toxo IgM效价, 其基于ELISA方法 (A) 以及采用相对于对照样品归一化的等离子体载玻片上的荧光强度水平 (B)。如图中所示, 基于等离子体测定的试验结果与染色试验的结果是高度一致的。

实施例10:

[0128] 在等离子体载玻片上进行了ToRCH先导试验, 并将试验结果与来自商用测定的结果进行比较。将如实施例9中的等离子体载玻片装载至微阵列打印机器人 (GESIM Nanoplotter) 中。在该支持物 (holder) 中, 针对每种抗原, 在每个孔 (总共16个孔/载玻片) 中以一式三份的方式打印斑点。该载玻片打印有被IgG抗体识别的风疹抗原、被IgG抗体识别的CMV抗原、被IgM抗体识别的CMV抗原以及四种HSV抗原。所述抗原、识别该抗原的抗体以及抗体标记物在图9的视图 (A) 中列出。将抗原在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中稀释, 并在25℃下打印, 产生约300微米的微阵列特征直径。将打印的载玻片于真空下密封并储存在-80℃下直至使用。

[0129] 为运行样品, 最初用含有1x PBS、1mM Tris和5%牛血清白蛋白 (BSA) 的缓冲溶液封闭该打印的载玻片。封闭后, 在自动化载玻片洗涤器上用PBS+Tween 20溶液 (PBST) 洗涤该载玻片。将样品 (人血清或全血) 在胎牛血清 (FBS) 溶液中稀释 (1:100), 并将100微升的溶液施加至具有打印的抗原的给定孔。将单独的孔与在FBS中1:200稀释的阳性对照溶液一起温育。也可将该对照溶液施加至每个孔。将该溶液在室温下温育1小时, 随后采用自动化载玻片洗涤器以PBST进行洗涤。然后在室温和黑暗中, 将该阵列在FBS中的4nM IRDye800缀合的山羊抗人IgM和4nM IRDye680缀合的山羊抗人IgG中温育30分钟。然后通过自动化载玻片洗涤器在PBST中洗涤等离子体载玻片, 随后浸入去离子水中, 之后用载玻片离心机进行干燥。

[0130] 之后, 用MidaScan在800nm通道中扫描每个载玻片。记录了反映血清/全血/唾液中的适当抗体的荧光信号强度。

[0131] 图9的视图(A)显示了针对ToRCH组抗体的ELISA试验与初步等离子体载玻片ToRCH测定之间的相关性。在该初始测试中,使用若干种不同的打印的抗原检测同一HSV抗体,以便确定由不同供应商制造的抗原的相对有效性。柱条%代表等离子体载玻片测定与以下试验的相关性:用Architect ABBOTT (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany) 测试的针对风疹的抗体;用Evolis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 测试的针对CMV和HSV的IgG和IgM。商用试验依照厂商说明进行。截止值代表该信号相对于阳性对照样品的归一化强度。图9的视图(B)示意性地示出了打印的微阵列载玻片的布局图(斑点间隔为1mm),以及患者的扫描图像(在图9的视图(C)中示出来)。图右侧的解释说明了与示意图中的那些对应的打印的抗原。

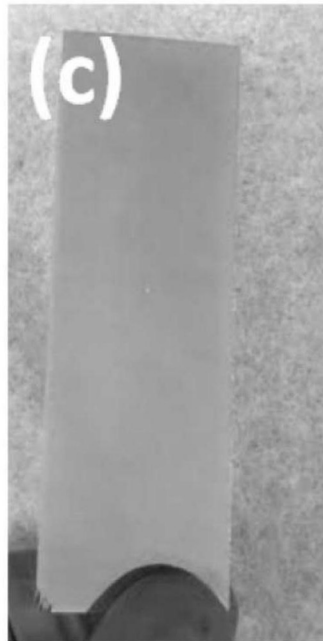
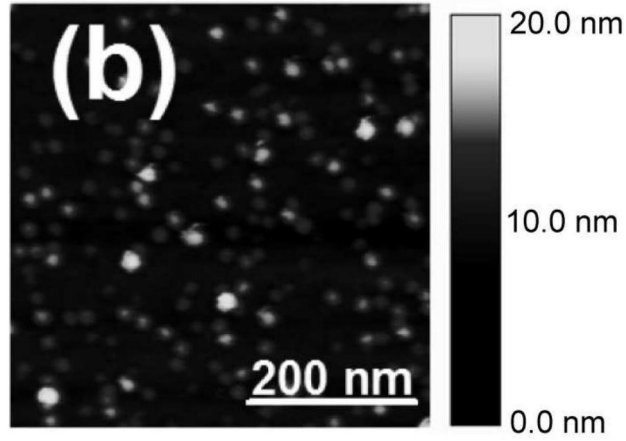
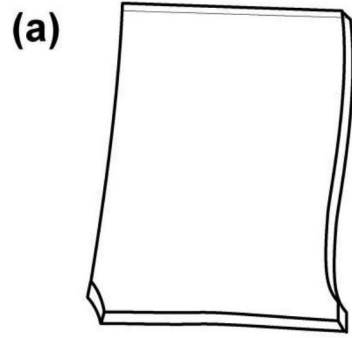
实施例11:

[0132] 使用等离子体载玻片测定来检测唾液和全血样品中的弓形体病IgG。对于唾液测定,方案与用于全血样品的方案基本相同。通过吐入Eppendorf管中而从人取得唾液,并将样品离心以去除任何颗粒。然后接着将与上文实施例9和实施例10中所述相同方案用于进行该测定。图10图示了在等离子体载玻片上检测的,两个人的唾液和全血样品中抗弓形体病IgG的测定结果。这些结果显示唾液样品中弓形体病抗体IgG的成功检测,与采用血清和血液获得的数据相匹配。

实施例12:

[0133] 用根据本公开内容的包含含有银包金纳米颗粒的纳米结构的薄膜包覆大小在0.01至10微米范围内的珠子(在本实施例中称为“等离子体珠子”)。该珠子可具有或不具有磁性氧化铁芯。该珠子具有用捕获外来体或无细胞DNA的结合元件来功能化的表面。该珠子可被赋予磁性性质,以有利于外来体或无细胞DNA的捕获和洗涤。采用荧光显微镜、荧光计或流式细胞术,在捕获的外来体或无细胞DNA在等离子体珠子上时对其进行分析。对于外来体,检测包括将抗原特异性的荧光标记的检测抗体附接至外来体上。对于无细胞DNA,检测包括用嵌入染料标记该无细胞DNA。

[0134] 虽然本文已经示出并描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员显而易见的是,此类实施方案仅通过举例的方式提供。在不偏离本发明的情况下,本领域技术人员现将想到众多更改、改变和替换。应当理解,在实施本发明的过程中可采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。旨在由以下权利要求限定本发明的范围,从而涵盖这些权利要求的范围内的方法和结构及其等同项。



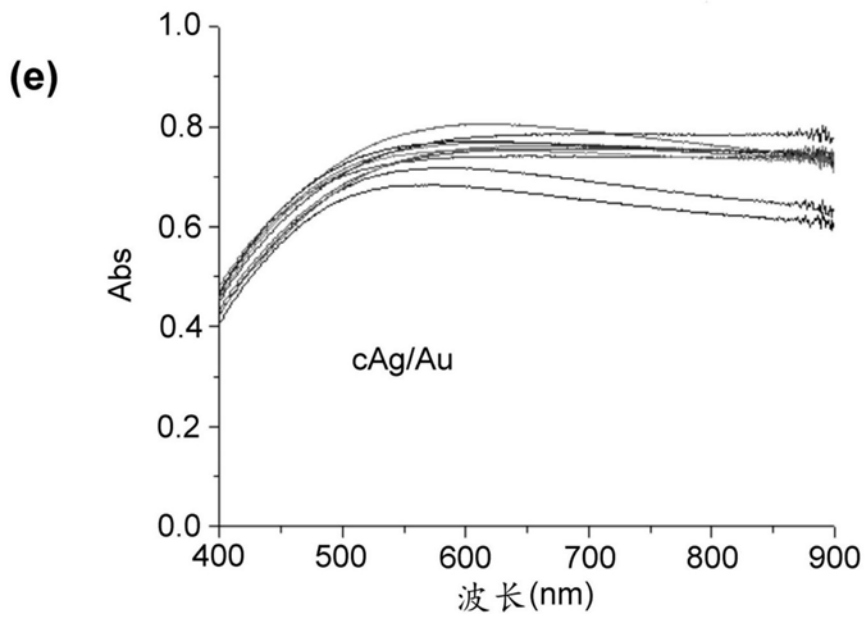
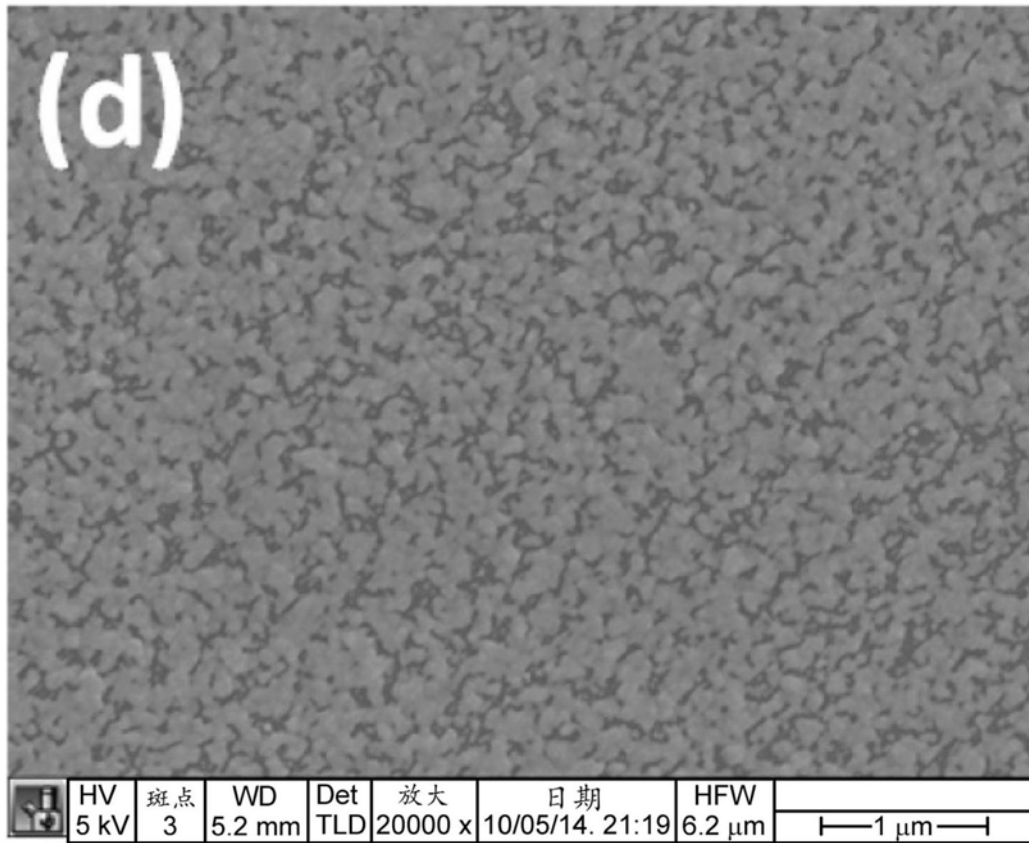


图1

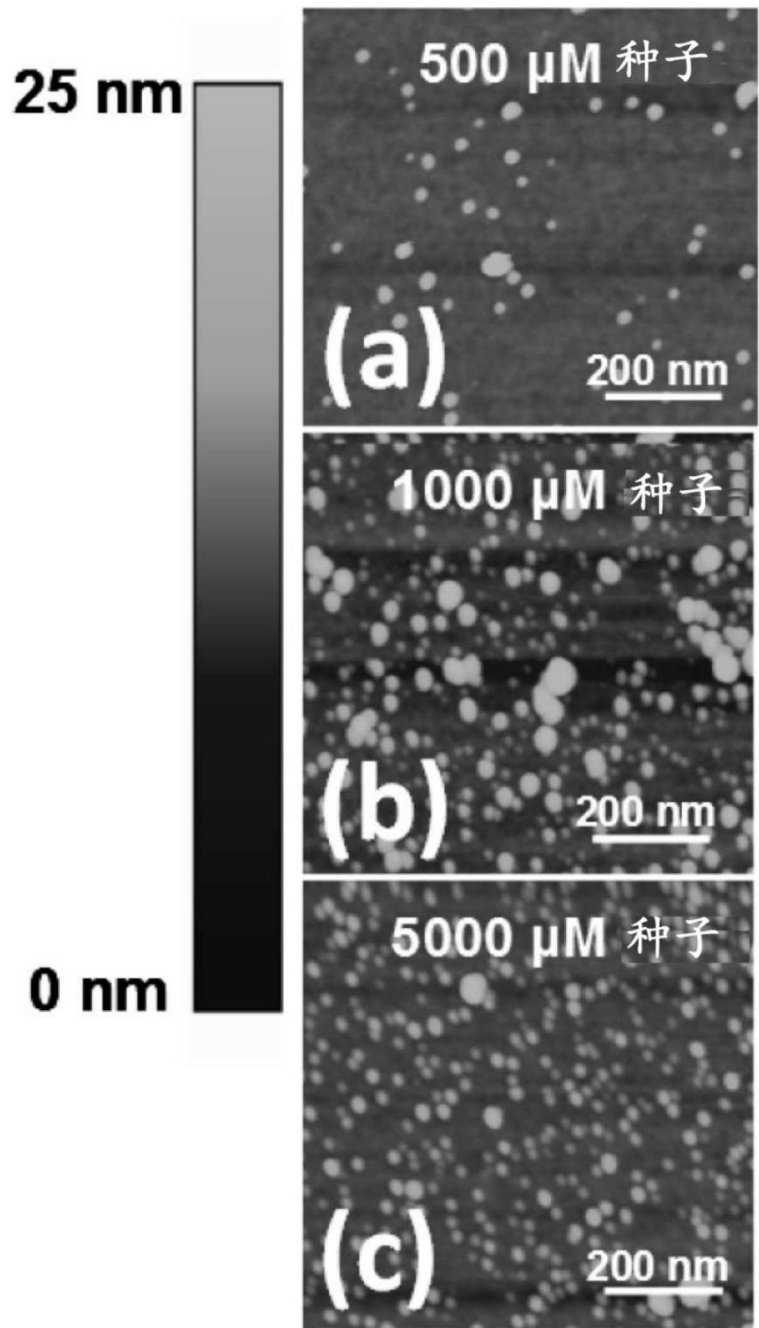
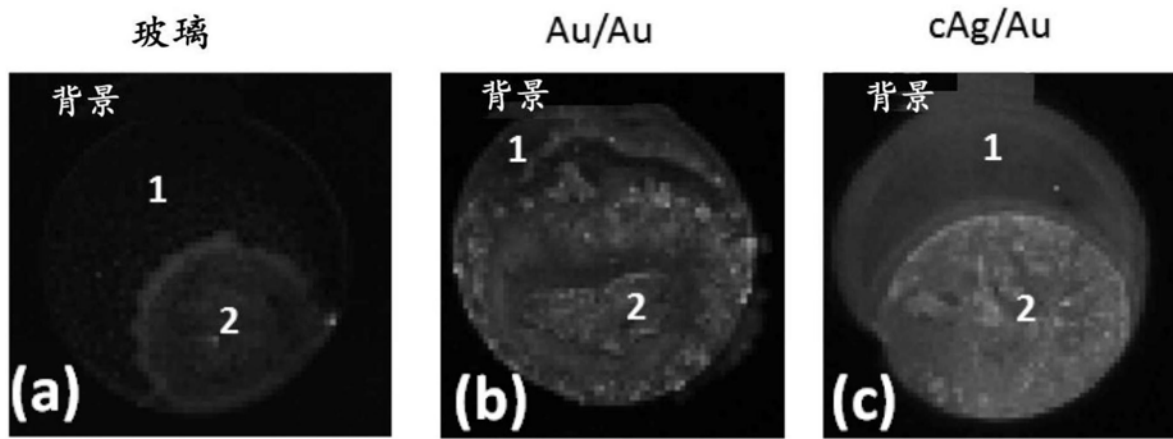


图2



基底	信号: 背景	信号: 区域 1	信号: 区域 2
玻璃	33	48	154
Au/Au	43	247	445
cAg/Au	87	497	899

图3

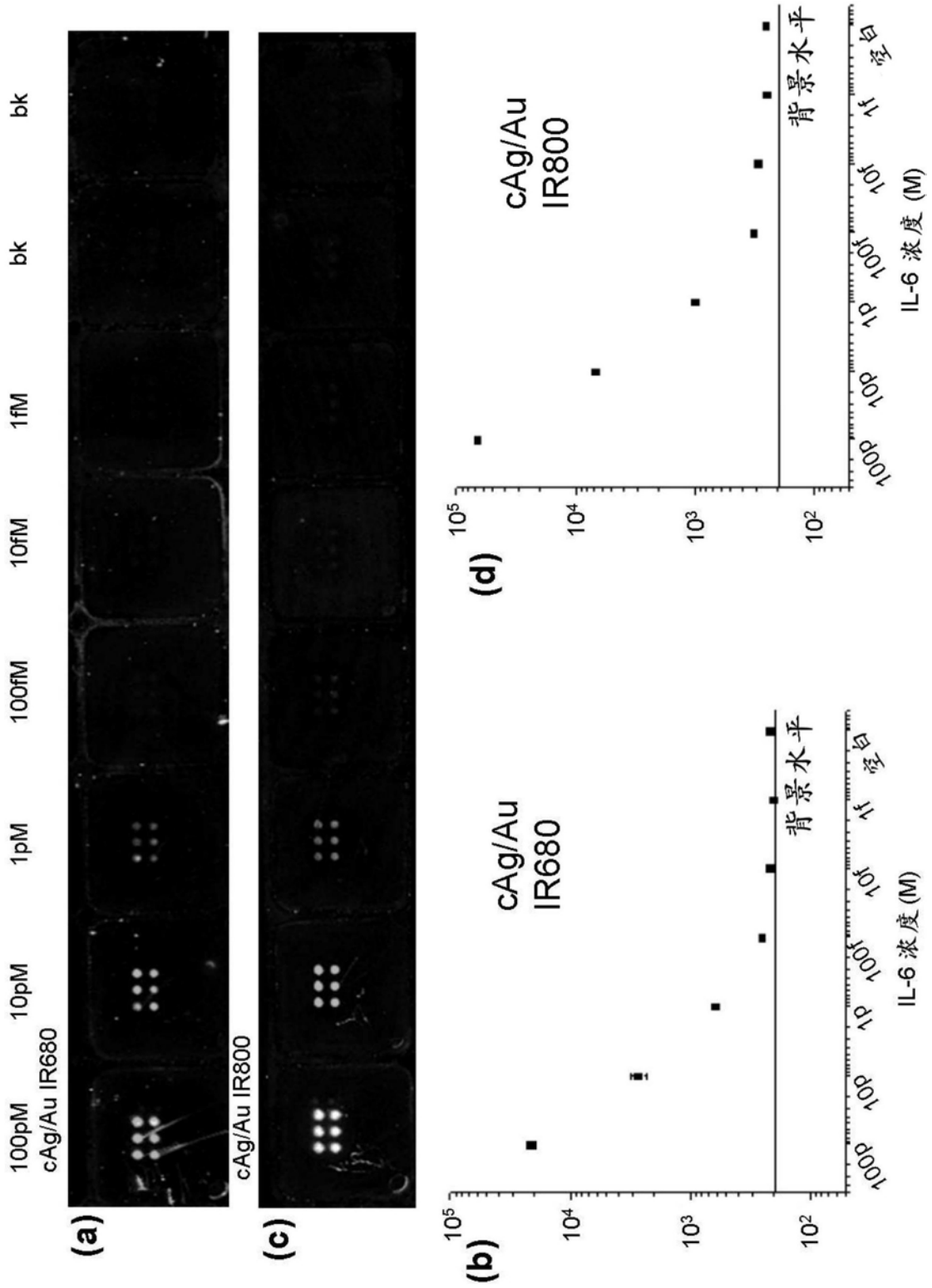


图4

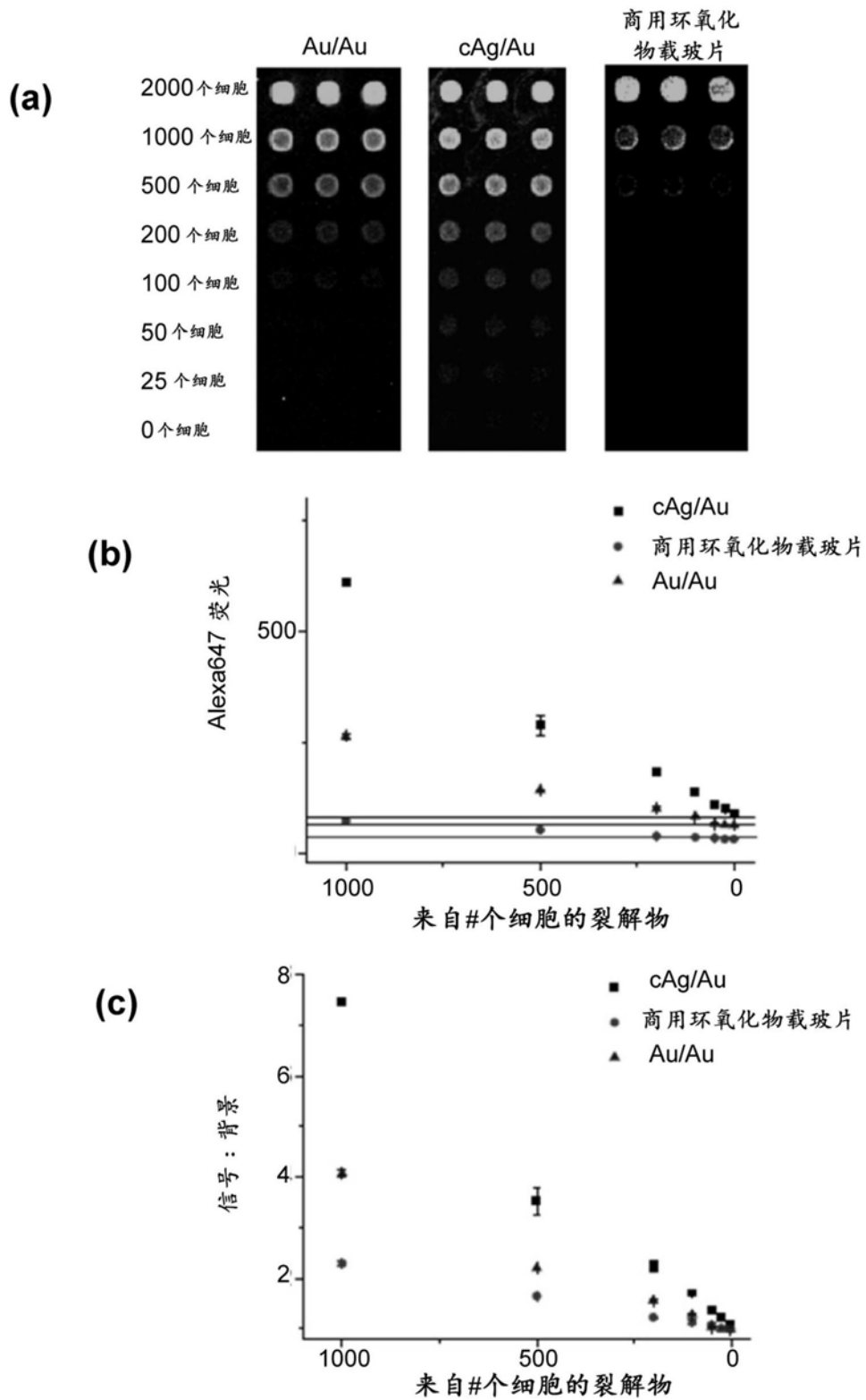


图5

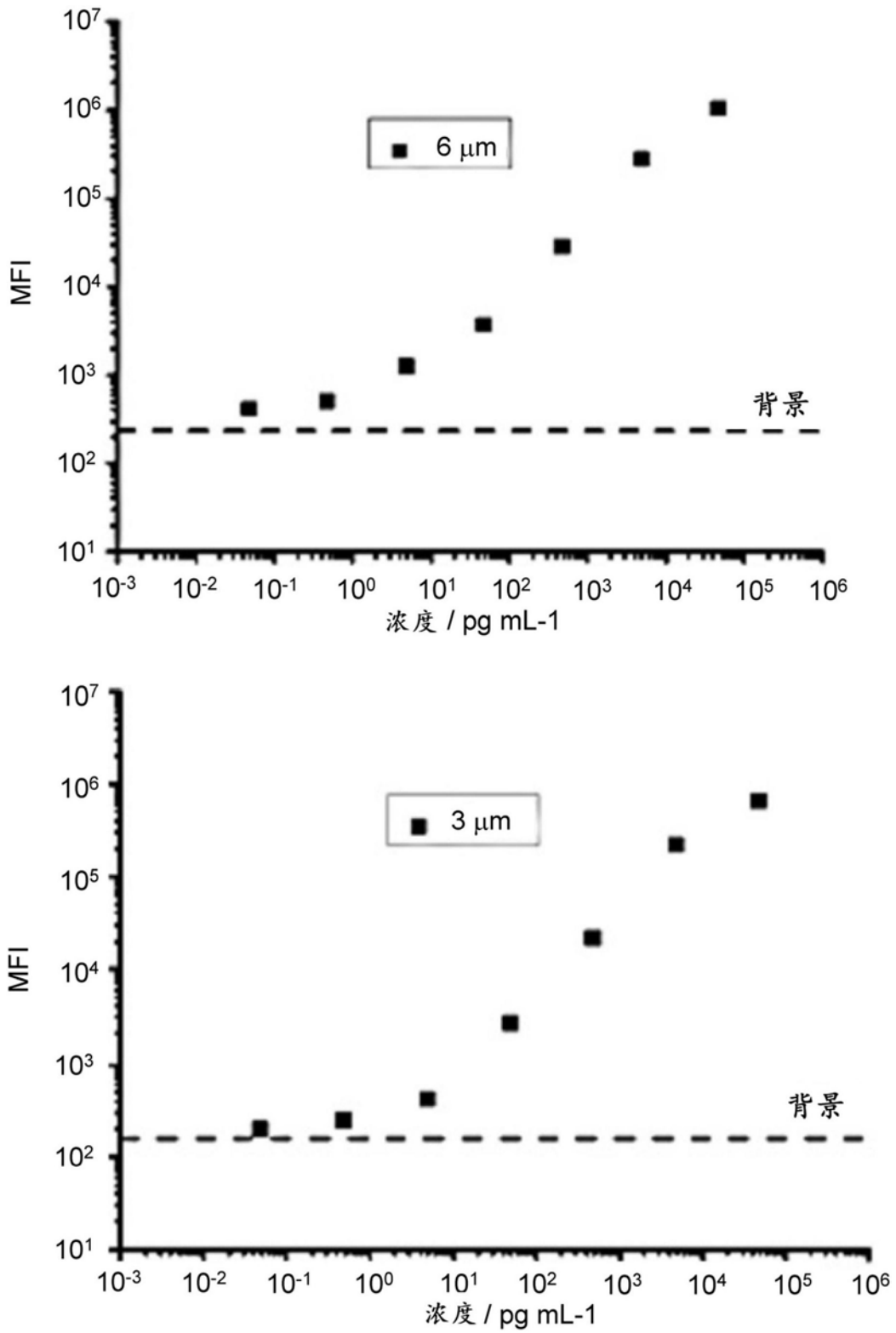


图6

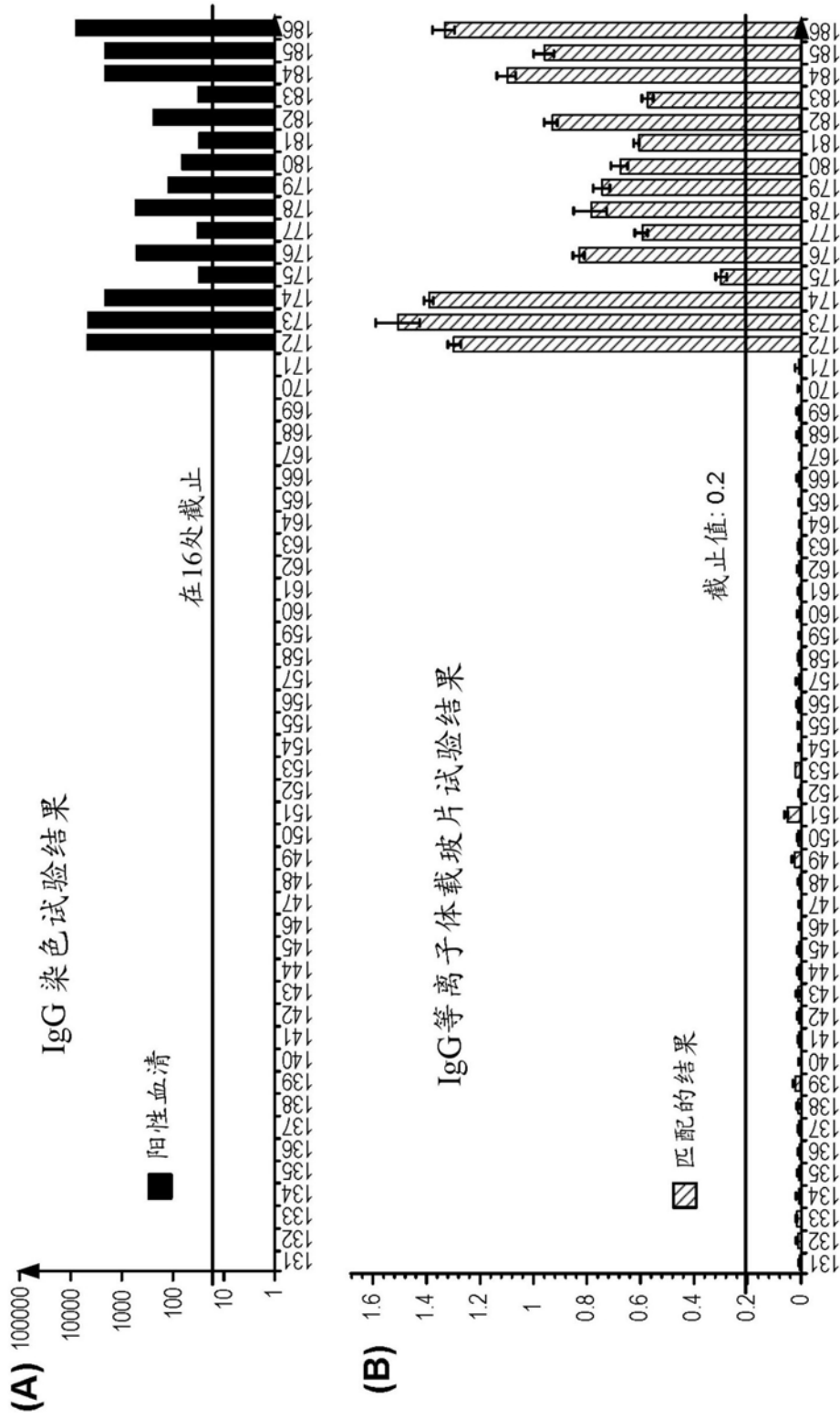


图7

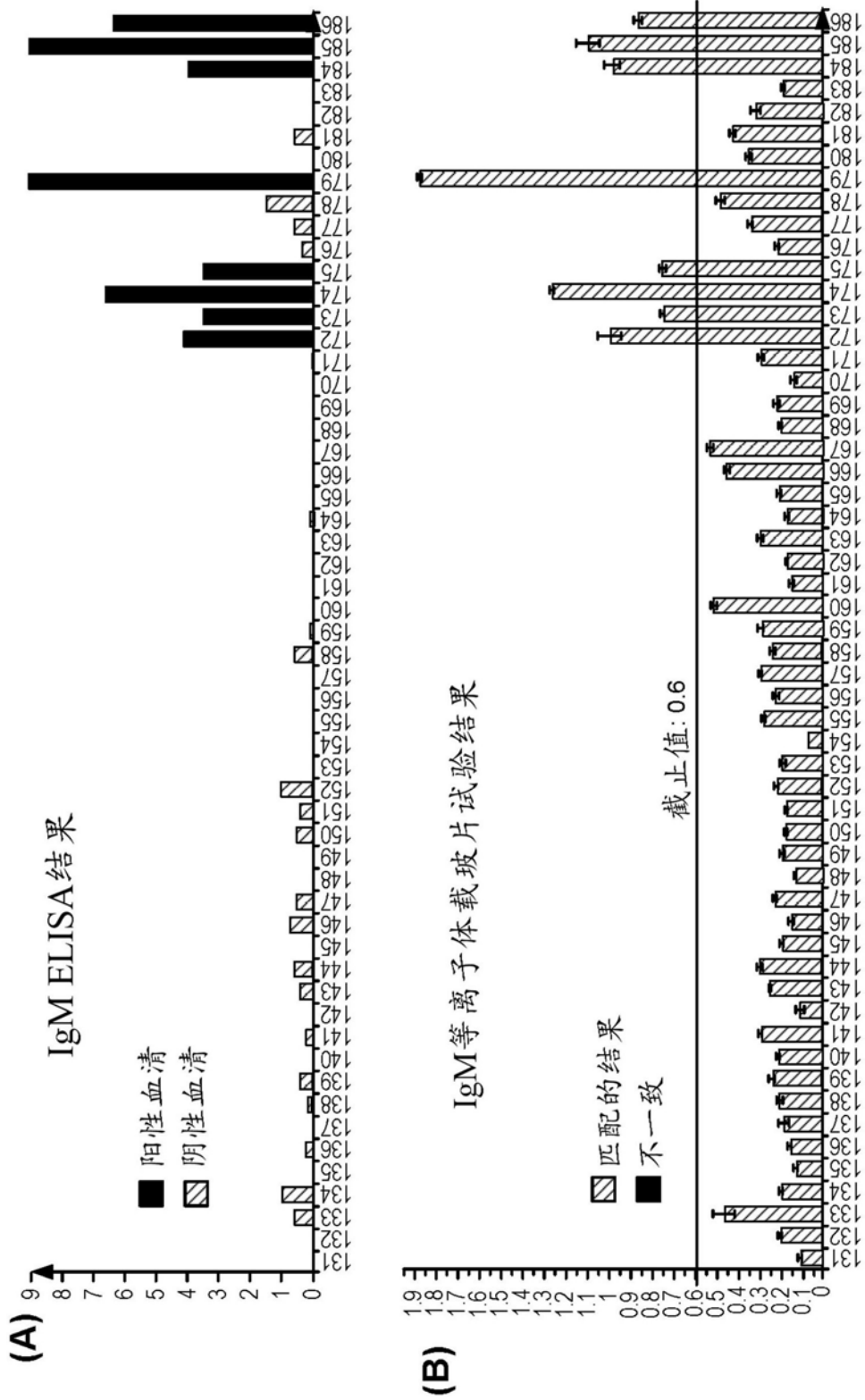
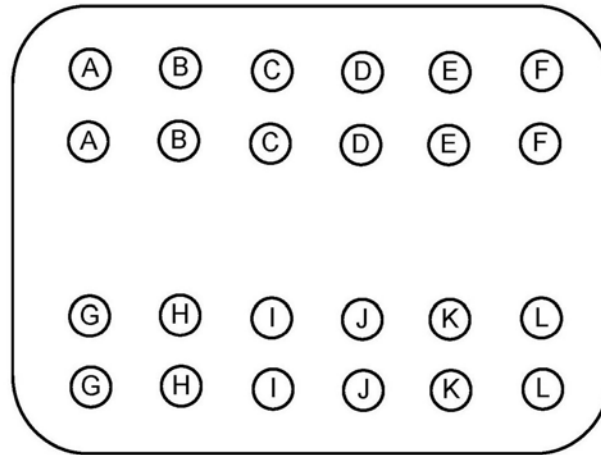


图8

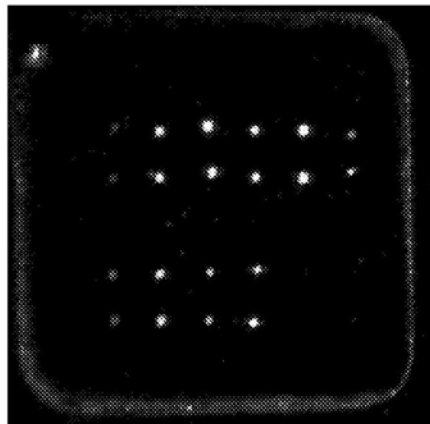
(A)

抗原	抗体	抗体	%	截止值
风疹	IgG-IR680	风疹 IgG	100	0.16
CMV IgG	IgG-IR680	CMV IgG	94.7	0.44
CMV IgM	IgG-IR800	CMV IgM	98.6	1.25
HSV1	IgG-IR680	HSV 1 IgG	96.9	.25
HSV 1	IgG-IR800	HSV 1 IgM		.159
HSV 2	IgG-IR680	HSV 2 IgG		.233
HSV 2	IgG-IR800	HSV 2 IgM		.868

(B)



(C)



- A= 弓形体病 IgG (BioCheck)
- B= 弓形体病 IgG (Meridian)
- C= 弓形体病 IgG (Montoya Lab)
- D= 风疹 IgG (Meridian)
- E= 弓形体病 IgM (BioCheck)
- F= CMV IgG (Meridian)
- G= CMV IgG (BioCheck)
- H= CMV IgM (BioCheck)
- I= 重组 HSV 1 (Meridian)
- J= 重组 HSV 2 (Meridian)
- K= HSV 1 (Meridian)
- L= HSV 2 (Meridian)

图9

在等离子体载玻片上唾液和全血中的IgG检测

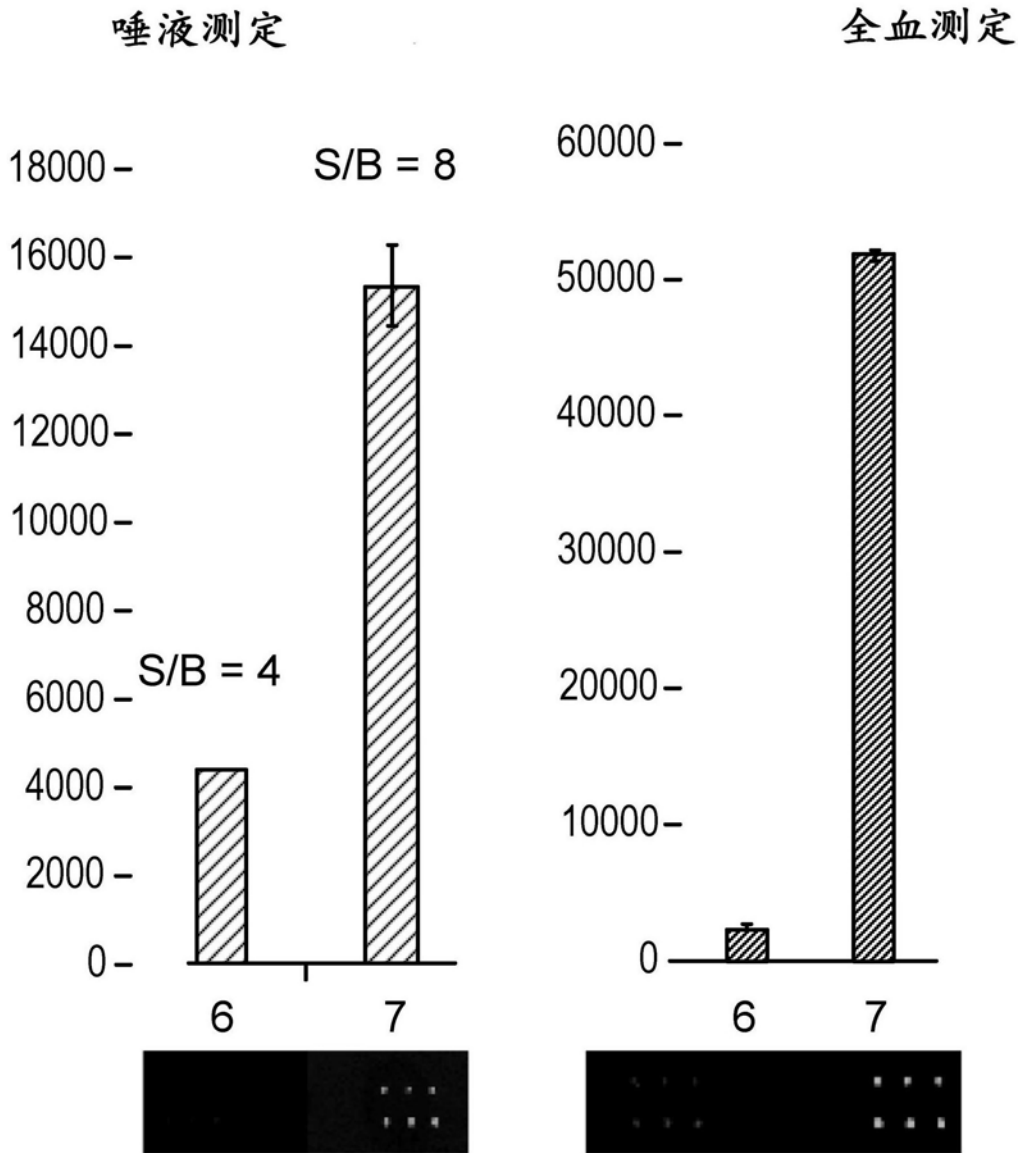


图10

专利名称(译)	用于增强成像的金属复合物		
公开(公告)号	CN107110851A	公开(公告)日	2017-08-29
申请号	CN201580072490.9	申请日	2015-11-05
[标]发明人	约书亚·T·罗宾逊 唐梅杰 赵苏 戴宏杰		
发明人	约书亚·T·罗宾逊 唐梅杰 赵苏 戴宏杰		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	C12Q1/6834 G01N21/648 G01N33/54346 G01N33/582 G01N33/6854 Y02A50/52 Y02A50/53 Y02A50/55 Y02A50/57 Y02A50/58 Y02A50/59 Y02A50/60 C12Q2563/107 C12Q2563/116 C12Q2563/143 C12Q2565/601 C12Q2563/149		
代理人(译)	郑霞		
优先权	62/075785 2014-11-05 US 62/192672 2015-07-15 US		
其他公开文献	CN107110851B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本文公开了可用于基于增强荧光的成像技术和测定的组合物和系统。本公开内容的组合物和系统可为在可见光和近红外光中，例如，跨越约400nm至约2100nm具有激发和发射的荧光分子提供提高的荧光。本文还提供了通过使用本公开内容的组合物和系统的基于荧光检测的方法。

