



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03819837.1

[43] 公开日 2005 年 9 月 28 日

[11] 公开号 CN 1675549A

[22] 申请日 2003. 6. 18 [21] 申请号 03819837. 1

[30] 优先权

[32] 2002. 6. 19 [33] SE [31] 0201874 - 5

[32] 2002. 6. 19 [33] US [31] 60/389,497

[86] 国际申请 PCT/SE2003/001037 2003. 6. 18

[87] 国际公布 WO2004/001417 英 2003. 12. 31

[85] 进入国家阶段日期 2005. 2. 21

[71] 申请人 瑞典生物传感器应用股份公司

地址 瑞典松德比贝里

[72] 发明人 P·曼松 B·利德贝里

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 11 页

[54] 发明名称 用于置换反应的固体载体上的涂覆的金属表面

[57] 摘要

本发明涉及一种固体载体上的涂覆的金属表面，其中涂层由经疏基端与金属表面牢固粘附的寡聚(乙二醇)封端的包含酰胺基团的烷基硫醇的自组装单层(SAM)和经由酰胺基与形成 SAM 的 OEG 分子结合的低分子量抗原组成，其中烷基部分包含 1~20 个亚甲基，其中寡聚(乙二醇)部分包含 1~15 个乙烯氧单位，其中抗原(例如包爆炸物和麻醉药)与特异性针对抗原的抗体任选地可逆性结合。固体载体上的涂覆的金属表面可作为分析装置，例如压电晶体微量天平装置或表面等离子体共振生物传感器的部分而被用在检测分析物抗原的方法中，通过监测抗体自涂层的置换在水溶液中检测对抗体的亲和力高于涂层的抗原的分析物抗原。



1. 一种固体载体上的涂覆的金属表面，其中涂层由经由巯基端与金属表面牢固粘附的寡聚（乙二醇）封端的包含酰胺基团的烷基硫醇的自组装单层（SAM）和经由酰胺基与形成SAM的OEG分子结合的低分子量抗原组成，其中烷基部分包含1~20个亚甲基，其中寡聚（乙二醇）部分包含1~15个乙烯氧单位，其中抗原与特异性针对抗原的抗体任选地可逆性结合。
2. 根据权利要求1的固体载体上的涂覆的金属表面，其中金属选自金、银、铝、铬和钛。
3. 根据权利要求1或2的固体载体上的涂覆的金属表面，其中抗原是相同或不同的，在固体载体上的片中与同一单层结合或与不同单层结合，且选自任选地衍生化的爆炸物和麻醉药。
4. 根据权利要求3的固体载体上的涂覆的金属表面，其中爆炸物选自三硝基甲苯（TNT）、二硝基甲苯（DNT）、六氢-1,3,5-三硝基-1,3,5-三嗪（RDX）、八氢-1,3,5,7-四硝基-1,3,5,7-四嗪（HMX）、季戊四醇四硝酸酯（PETN），和硝化甘油（NG）。
5. 根据权利要求3的固体载体上的涂覆的金属表面，其中麻醉药选自可卡因、海洛因、苯异丙胺、脱氧麻黄碱、大麻酚、四氢大麻酚（THC）和亚甲二氧基-N-甲基苯异丙胺（Ecstasy）。
6. 根据权利要求1~5任一项的固体载体上的涂覆的金属表面，其中固体载体是压电晶体电极或玻璃平板或棱柱。
7. 根据权利要求1-6任一项的固体载体上的涂覆的金属表面，其中寡聚（乙二醇）含有4~6个乙烯氧单位而烷基含有15个亚甲基单位。
8. 根据权利要求1-7任一项的固体载体上的涂覆的金属表面作为分析装置的部分通过监测抗体自涂层的置换而用于在水溶液中检测对抗体的亲和力高于涂层的抗原的分析物抗原的用途。
9. 一种检测水溶液中分析物抗原的方法，包括通过在水溶液中将抗原特异性抗体与涂覆的金属表面接触而活化，如果需要，缺少结合的抗体的根据权利要求1-7任一项的固体载体上的涂覆的金属表面，使抗体与涂层的抗原结合，除去过剩的抗体，将可能包含对抗体的亲和力高于涂层的抗原的分析物抗原的水溶液与可逆性结合于涂层的抗

体接触，使抗体解离并与分析物抗原反应，和通过分析装置的方法检测涂覆的金属表面上质量的损失。

10. 根据权利要求 9 的方法，其中分析装置选自压电石英晶体微量天平装置和表面等离子体共振生物传感器。

5 11. 根据权利要求 9 或 10 的方法，其中分析装置包括流动室，其中放置了根据权利要求 1-7 任一项的固体载体上的涂覆的金属表面。

用于置换反应的固体载体上的涂覆的金属表面

5 本发明涉及固体载体上的涂覆的金属表面，所述金属表面用于置换反应，特别是用于通过特异性针对分析物的可逆性结合的抗体从涂层上置换来检测水溶液中的分析物。置换的检测采用分析装置，例如压电晶体微量天平（PCM）装置或表面等离子体共振（SPR）生物传感器来实施，由此检测水溶液中分析物的存在。

10 发明背景

SPR 生物传感器是一种灵敏的实时技术，其可用于提取关于邻近特定金属表面的分子间相互作用的信息。其为测定浓度、结合和离解速率常数 and 亲合性以及抗原表位绘图和测定相互作用特异性提供了可能性 [B. Liedberg and K. Johansen, Affinity biosensing based on surface plasmon detection in "Methods in Biotechnology, Vol. 15 7: Affinity Biosensors: Techniques and Protocols", K. R. Rogers and A. Muchandani (Eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 31-53]。将参与该研究反应的一种组分在 SPR 实验之前或之后固定在金属表面上。将固定的分子暴露于连续流体中，该流体中可注入相互作用的物质种类。该方法的基础在于光学探测和有意义的信号能够反映表面上介电功能或折射率的变化。表面上的分子间相互作用可导致这些改变。

PCM 技术的基础在于微量天平装置中的振荡压电晶体，其中晶体包括例如石英、氮化铝 (AlN) 或铌酸钠钾 (NKN)。当晶体是石英晶体时，25 该装置被称为 QCM (石英晶体微量天平)。PCM 和 QCM 是重量分析性传感器，故此其对质量改变灵敏。QCM 包括压电石英晶体平板，该平板的两面上均已放置了金属电极。施加在所述晶体板上的交变电势差能产生切变波。在特定的频率（如此厚度是半波长的奇数倍）下，晶体将发生共振 [M. Rodahl, F. Hook, A. Krozer, P. Brzezinski and B. 30 Kasemo, Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments, Review of Scientific Instruments 66 (1995) pp. 3924-3930]。

能量上最适宜的半波长数是一。共振频率依赖于晶体的厚度，但通常在 MHz 范围内。平板表面上的质量改变将导致共振频率的移动。频率移动 0.01 赫兹可被很容易地检测到，这一事实使得 QCM 成为测定质量变化的灵敏传感器。大量专利及其它出版物公开了压电石英晶体 (QCM) 作为基于亲和性的化学传感器/检测器在例如多种免疫测定技术，以及细菌和病毒的检测中的用途。在大多数这些申请中，QCM-装置被用于分析在相互作用对 (interaction pairs) 例如抗体和抗原之间相互作用之后的晶体重量增加。

由于常规免疫传感器的反应慢，即感压晶体的重量变化小，故此采用常规免疫传感器检测小分子具有明显的困难。为了获得小分子的必要检测，必须提高系统的敏感性。为改善小分子的可检测性，应通过小分子和较大分子间的特异性相互作用而将小分子与较大分子反应。例如，小抗原分子与特异性与之结合的抗体反应从而形成更易于检测的抗原-抗体复合物。如果将对抗体的亲和力低于分析物抗原的抗原衍生物固定在表面上，特异性针对这些抗原的抗体可与固定的抗原可逆性结合。然后，当溶液中存在分析物抗原时，抗体将被从固定的抗原上置换下来，而与分析物抗原形成抗原-抗体复合物。在抗体携带标记 (例如荧光标记) 的情况下，可借助该标记来检测形成的复合物。另一方面，若固定的抗原是被固定在对质量改变灵敏的生物传感器的表面上，则抗体从表面上的置换将导致质量的损失。本发明中使用了所述置换反应。

有机硫化合物 (例如烷基硫醇) 可被用于在金基底上形成非常有序的和致密填充的 SAM。硫和金之间的强化学键将分子与表面结合。一经被固定在基底上 (在数秒内发生)，分子即由于烷基链间的范德华力而开始将其自身组装成致密填充的结构。后面的过程是很费时的，在非常有序的 SAM 完成之前要经过数小时或甚至是数天。所使用的分子的长度对获得的 SAM 的特性具有很强的影响。全反式 SAM 是非常有序和致密填充的单层，质量较差的 SAM 具有缺陷如完全或末端不对称 (gauche) (较多或较少通心管样)。由于固定距离和碳链的范德华直径的大小之间不匹配，SAM 中的分子将表现出 $25-40^\circ$ 的链倾斜 [B. Liedberg and J. M. Cooper, Bioanalytical applications of self-assembled monolayers in "Immobilized Biomolecules in

Analysis: A Practical Approach", T. Cass and F. S. Liegler (Eds.), Biosensors, Oxford university press, Oxford, pp. 55-78]。分子的游离端可与所需基团或甚至蛋白质连接。以这一方式，可以设计出具有感兴趣的和有用特性的表面。混和不同的烷基硫醇还能增加多能性。但是，应注意到加载液中硫醇的特定混合并非必然导致相同混合的 SAM。相反，由于在自组装其间的复杂的热力学过程，该情况是很少见的。在现有技术中，尚未将与低分子量抗原结合的 SAM 发展用于置换反应，该置换反应中抗原特异性抗体与固定抗原可逆性结合，然后在水溶液中解离，然后与对抗体的亲和力高于固定抗原的分析物抗原结合。

发明内容

本发明提供了固体载体上的涂覆的金属表面，所述金属表面可用于分析装置中，通过监测与涂层上的抗原可逆性结合的抗体经解离和与分析物抗原的反应而从涂层上置换来检测水溶液中的分析物抗原。

在本说明书和权利要求中，词语抗体意指包括完整抗体和抗体的抗原-结合部分或合成抗原-结合分子。

由此，本发明的一个方面涉及一种固体载体上的涂覆的金属表面，其中涂层由寡聚（乙二醇）封端的包含酰胺基的烷基（OEG）硫醇的自组装单层（SAM）组成。OEG 硫醇包含与金属表面牢固结合的巯基和经由酰胺基引入形成 SAM 的 OEG 硫醇分子的低分子量抗原，其中烷基部分包含 1~20 个亚甲基，OEG 部分包含 1~15 个乙烯氧单位，其中抗原与特异性针对抗原的抗体任选地可逆性结合。

在本发明的一个实施方案中，寡聚（乙二醇）含有 4~6 个乙烯氧单位，烷基含有 15 个亚甲基单位。

在 SAM 形成之前，通过将抗原上的官能团与 OEG 硫醇的封端官能团反应将低分子量抗原合成性地与 OEG 分子结合。这些官能团的类型可以是羧酸、氨基和羟基基团。在抗原缺少用于反应的官能团的情况下，必须在反应前将官能团引入低分子量抗原上。

根据本发明的固体载体上的涂覆的金属表面通常在使用前与抗原-特异性抗体分开存放。然而，当用于置换分析时，固体载体上的涂覆的金属表面包括与涂层的抗原可逆性结合的特异性抗体。

根据本发明的固体载体上的涂覆的金属表面的金属优选选自；例如金、银、铝、铬和钛。本发明优选的金属是金。除了经结合于 SAM 而被固定外，涂层的抗原与分析物抗原相同或是其衍生物。因此涂层的抗原可被衍生化以便将水溶液中结合的抗体的解离最优化。

5 与根据本发明的涂层的 SAM 结合的抗原可以是相同的或不同，即抗原可与相同的特异性抗体结合或者可以是两种或多种与不同的特异性抗体结合的抗原的混合物，从而可以检测水溶液中某些不同分析物抗原的存在。在抗体携带不同标记（例如荧光标记）的情况下，能够检测不同抗体的置换。然而，几种不同抗体的混合物通常被用于对任何靶抗原的样品的筛选（例如任何麻醉药或爆炸物样品的筛选）是充分的情况中。为了避免不同抗原和抗体（彼此间具有不同的亲和力）间的干扰，必须引入带有固体载体上的不同抗原的涂层的离散斑点或点的微阵列。

15 在本发明优选的实施方案中，涂层抗原选自任选衍生化的爆炸物和麻醉药。在所选择的涂层的抗原与特异性抗体的结合太强以至阻碍了抗体在水溶液中的解离的情况下，抗原分子可以是经化学修饰的，例如通过官能团（如酯或氨基）（通过除去，或置换原始基团）的修饰或通过消除抗原分子的部分、或在抗原分子中引入新的官能团或侧链，以便降低其对抗体的亲和力。

20 爆炸物优选自三硝基甲苯（TNT）、二硝基甲苯（DNT）、六氢-1, 3, 5-三硝基-1, 3, 5-三嗪（RDX）、八氢-1, 3, 5, 7-四硝基-1, 3, 5, 7-四嗪（HMX）、季戊四醇四硝酸酯（PETN）、和硝化甘油（NG），而麻醉药品优选自可卡因、海洛因、苯异丙胺、脱氧麻黄碱、大麻酚、四氢大麻酚（THC），和亚甲二氧基-N-甲基苯异丙胺（Ecstasy）。

25 在本发明优选的实施方案中，根据本发明的固体载体上涂覆的金属表面的固体载体是压电晶体电极或玻璃板或棱镜，故此压电晶体电极上的涂覆的金属表面适用于 PCM 装置中，而玻璃板或棱镜上的涂覆的金属表面适用于 SPR 装置中。

30 本发明的另一方面涉及将根据本发明的固体载体上的涂覆的金属表面作为分析装置的部分通过监测抗体自涂层的置换而用于检测水溶液中对特异性抗体的亲和力高于涂层的抗原的分析物抗原的用途。

而本发明的另一方面涉及检测水溶液中分析物抗原的方法，包括

通过在水溶液中将抗原特异性抗体与涂覆的金属表面接触而活化（如果需要）缺少结合的抗体的根据本发明的固体载体上的涂覆的金属表面，使抗体与涂层的抗原结合，除去过剩的抗体，将可能包含对抗体的亲和力高于涂层的抗原的分析物抗原的水溶液与可逆性结合于涂层的抗体接触，使抗体解离并与分析物抗原反应，和通过分析装置的方法检测涂覆的金属表面上质量的损失。

在本发明方法的一个实施方案中，分析装置选自压电晶体微量天平装置和表面等离子体共振生物传感器。

在本发明优选实施方案中分析装置包括流动室，其中放置根据本发明的固体载体上的涂覆的金属表面。

以下将通过若干附图和实验描述来举例说明本发明，但应当理解这并非意在将本发明限制于具体描述的内容。

附图简述

图 1 显示了某些麻醉药品，海洛因、苯异丙胺、Ecstasy、脱氧麻黄碱、大麻酚和四氢大麻酚（THC）的化学式。

图 2 显示了三硝基甲苯（TNT）和 2,4-二硝基甲苯（2,4-DNT）的化学式。

图 3 图示了在固体载体（例如 QCM 电极）的金属表面上发生的置换机制。注意其未按比例表示。实际上，抗体要比 TNT 分子大很多。显示的传感器表面基于自组装（SAM）技术。衍生化的 TNT 分子（TNT 类似物）经 SAM 与金属表面共价结合，首先将特异性针对 TNT 和 TNT 类似物的 ABTNT 抗体可逆性地、松弛地与 TNT 类似物结合，然后暴露于溶液中的 TNT，ABTNT 解离，然后与 TNT 形成复合物。

图 4 显示了 EG₄ 和 EG₆ 的化学结构。

图 5 显示了 ANA1, ANA2 和 ANA3 的化学结构。

图 6 显示了在与 EG₄ 不同的混合比例下，抗体（与 ABTNT（0.02g/L）孵育 30 分钟后）对不同 TNT 类似物的吸收。观测到两种技术（IRAS 和消光椭圆偏振法）之间非常一致。

图 7 显示了通过实时技术 SPR (Biacore2000) 观测的 EG₄ 和 ANA1, 及其混合物的 ABTNT 结合能力。将流速设定为 50 μL/分钟, ABTNT（0.02g/L）的注入体积为 100 μL。显示了 EG₄ 的 SAM 上的低吸收。

图 8 显示了通过实时技术 QCM (V2B)观测的 EG₄ 和 ANA1, 及其混合物的 ABTNT 结合能力。将流速设定为 50 μL/分钟, ABTNT (0.02g/L) 的注入体积为 100μL。显示了 EG₄ 的 SAM 上的低吸收。

图 9 显示 Biacore2000 装置上的实验, 其显示了注入 1、10 和 100μL TNT 用以 EG₄ 和 ANA1, 及其混合物的 SAM 的 SPR 反应。预先通过注入 100μL ABTNT 对表面实施加载。将流速设定为 50 μL/分钟。

图 10 显示了在改变的 V2B 流动室系统上实施的 QCM 检测。将流速设定为 50 μL/分钟, 所有的 TNT 注入体积为 100μL。预先通过注入 100μL ABTNT (0.02g/L) 对表面实施加载。从包含 100%和 50% ANA1 的加载液中组装了 SAM。注入的 TNT 浓度为 1、10 和 100pg/μL, 其为连续制备的, 将表面预先暴露于 TNT 以进行第二次和第三次 TNT 注入。箭头显示注入。

图 11 显示了在改变的 V2B 流动室系统上实施的 QCM 检测。将流速设定为 50 μL/分钟, 所有的 TNT 注入体积为 100μL。预先通过注入 100μL ABTNT (0.02g/L) 对表面实施加载。从包含 10%和 1% ANA1 的加载液中组装 SAM。注入的 TNT 浓度为 1、10 和 100pg/μL, 其为连续制备的, 将表面预先暴露于 TNT 以进行第二次和第三次注入 TNT。箭头显示注入。

20 实验描述

制备包含两类分子的混合的单层, 第一种分子为蛋白质驱除剂而第二种分子为 TNT 类似物, 由此能够获得包含不同量的表现出低水平非特异性结合的类似物的 SAM。

起始步骤是评价由寡聚(乙二醇)(OEG)封端的包含酰胺基的烷基硫醇所构成的 SAM 的蛋白质抗性。为此目的所选择的两种分子是 EG₄ 和 EG₆ (图 4)。已有报道给出这些分子的蛋白质驱除剂 [P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides and P. E. Laibinis, Molecular conformation in oligo (ethyleneglycol)-terminated monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption, Journal of Physical Chemistry B, 102(1998) pp. 426-436]。纯 EG₄ 和 EG₆ 各自的, 以及两者不同的组合的 SAM 已经通过使用某些技术 (即消光椭圆偏振法,

接触角测定法和红外反射吸收光谱学 (IRAS)) 而得以定性。

而且, 以与上述 OEG 组合的适宜的候选物的不同混合, 已分别对均包含 2, 4-二硝基苯末端基团的三种 TNT 类似物分子 (ANA1, ANA2 和 ANA3) (图 5) 进行了检测。然后通过与纯 OEG SAM 相同的技术对这些混合的 SAM 定性。此外, 由 100% 类似物 (1, 2 和 3 分别) 制备的 SAM 用 X 线光子分光镜检查 (XPS) 进行检测。

使用消光椭圆偏振法和 IRAS, 还对所有 TNT 类似物以不同的混合比例检测了结合 ABTNT 的能力。而且, 通过 SPR 和 QCM 方法检测了与暴露于 TNT 反应的 ABTNT 的置换强度。

10

化合物

EG₄ 和 EG₆ 分子获自瑞典 Linkping 大学的物理和检测系的应用物理和化学部, 类似物 ANA1, ANA2 和 ANA3 在瑞典 Linkping 大学的物理和检测系的化学部合成。ABTNT 和 TNT 获自 Biosensor Applications Sweden AB.

15

样品制备

将硅片在 TL2 (MilliQ 水: 25% 过氧化氢: 37% 氯化氢 6: 1: 1 85 °C, 10 分钟) 中清洗, 然后在 MilliQ 水中充分漂洗, 将其在通过电子束蒸发涂覆 25 Å 的钛和 2000 Å 的金之前于氮气中干燥。所使用的设备为 Balzers UMS 500 P 系统。钛和金的蒸发速率分别为 1 Å/s 和 10 Å/s。保持至少 10⁻⁹ 的底压, 在蒸发其间应注意压力在全部时间内均要位于低 10⁻⁷ 刻度。该类表面用于除 SPR 和 QCM 检测外的所有实验中。SPR 表面 (平金) 获自 Biacore AB, Uppsala, Sweden, 而金涂覆的 QCM 晶体获自 Biosensor Applications Sweden。应注意到用于 SPR 检测的表面的表面粗糙度与用于其它实验的表面的相似, 而 QCM 晶体的表面涂层具有更粗糙的特性。

在暴露于硫醇加载液之前, 将样品表面在 TL1 (MilliQ 水: 25% 过氧化氢: 30% 氨水 6: 1: 1 85 °C, 10 分钟) 中清洗, 然后在 MilliQ 水中充分漂洗。以 99.5% 乙醇为基础的加载液中的硫醇的浓度对于纯硫醇溶液以及对于混合硫醇溶液均为 20 μM。在室内条件下, 将表面孵育大约 40 小时。然后将样品在 99.5% 的乙醇中漂洗两次, 然后超声处

25

理 3 分钟（因为 QCM 晶体上的金涂覆不能耐受该步骤，故将其省略），然后再在 99.5% 的乙醇中漂洗两次。若非另有所述，在将表面置于氮气干燥和分析之前，将表面保存于纯 99.5% 乙醇最长 8 小时。用 IRAS 和消光椭圆偏振法检测的大量样品随后也在室内条件下以 0.02g/L 浓度的 ABTNT（在 PBS (pH7.4) 中制备的）孵育 30 分钟，再次检测。所有时间内均用 TL1 清洗的镊子处理样品。

表面等离子体共振 (SPR)

将装备有温控流动室的来自 Biacore AB 的两种不同类型的装置应用于 SPR 实验。在 BiacoreX 装置上以两个流动通道实施一系列的实验。在这些实验中，将流速设定为 10 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ ，通过注入 70 μL 的 ABTNT (0.02g/L) 而对样品表面实施加载。随后，在分开的流体通道中注入浓度为 100pg/ μL 和 10ng/ μL 的 TNT 溶液以导致置换，由此导致 ABTNT 从表面上解离。

所使用的第二个装置为装备了四个流体通道的 Biacore2000。流速为 50 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ ，所有注入体积为 100 μL 。在所有时间内，顺序对四个流体通道运行。如前，注入的 ABTNT 的浓度为 0.02g/L。注入的 TNT 的浓度为 1、10 和 100pg/ μL 。

在所有情况下，运行缓冲液为为 PBS (pH7.4)，ABTNT 和 TNT 溶液均在系统介质中制备。用于 SPR 实验的样品表面为涂覆了大约 400 \AA 金的玻璃板，将流动室温度保持在 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

石英晶体微量天平 (QCM)

在室内条件下，在来自 Biosensor Applications Sweden AB 的轻微改变的流动室系统 V2B 上实施 QCM 检测。使用的 AT-截至的 QCM 晶体是共振频率为 10 MHz 的厚度剪切模式类型。钛和金沉积层的厚度分别为 250~300 \AA 和 400~450 \AA 。用 Biacore2000 设置实验中的全部参数，将流速为 50 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ ，注入体积为 100 μL ，ABTNT 浓度为 0.02g/L，TNT 浓度为 1、10 和 100pg/ μL 和运行缓冲液为 PBS (pH7.4)。应当注意在相同流体通道中一个接一个的实施 TNT 注入，这是指在 TNT-非暴露的表面上仅实施了 1 pg/ μL 的 TNT 注入。

结果

OEG 分子

将 OEG 分子 EG₄ 和 EG₆ 用于在金上产生 SAM。除了纯 EG₄ 和 EG₆ SAMs，还制备了两种包含两种分子的混合 SAM，并进行了检测。后者从包含 5 75% 和 50% EG₄ 和其余 EG₆ 的加载液中组装。将混合的单层命名为 EG₄: EG₆ 3: 1 和 EG₄: EG₆ 1 : 1。

用表 1 所示的消光椭圆偏振法和接触角测定法对 EG₄ 和 EG₆ 的不同组合的 SAM 进行定性。自组装过程显示了良好的可重复性，所得结果与现有发现一致 [R. Valiokas, M. Ostblom, S. Svedhem, S. C. T. 10 Svensson, and B. Liedberg; Temperature-driven phase transitions in oligo (ethylene glycol) -terminated self-assembled monolayers, The Journal of Physical Chemistry B, 104 (32) (2000) pp. 7565-7569, REF.]。接触角测定法得到的小角显示出这些 SAMs 的低疏水性，其是驱除特性的多个前提之一。根据 EG₆ 15 比例增加可以得出厚度的轻微增加。根据经验，疏水表面吸取蛋白质和细胞。此外，滞后的低值提示非常均质的表面。

表 1. 以最大误差给出的 EG₄, EG₆ 和二者混合物的 SAM 的特征描述

加载液	SAM 厚度 (Å)	接触角测定 (°)				
		前进 θ_a		后退 θ_r		
EG ₄	35.7±2.2 ^a	(33.9°)	29±3 ^c	(30°)	24±1 ^c	(28°)
EG ₄ :EG ₆ 3:1	34.4±0.5 ^b		31±1 ^d		27±1 ^d	
EG ₄ :EG ₆ 1:1	37.0±1.5 ^a		33±1 ^c		30±1 ^c	
EG ₆	38.4±0.7 ^b	(38.9°)	28±3 ^d	(28°)	23±1 ^d	(25°)

20 ^a 3 × 5 次对三个表面的检测, ^b 2 × 5 次对两个表面的检测,
^c 对三个表面的三次检测, ^d 对两个表面的两次检测,
^e 参考 Valiokas 等。

TNT-类似物

25 在 TNT-类似物与 EG₄ 混合前, 在分别从包含纯 ANA1, 2 和 3 的加载液中组装的 SAM 中对其分别进行检测。表 2 中总结了椭圆偏振法和

接触角测定法的结果。如预期的，类似物的厚度超出 OEG 分子的厚度。三个类似物之间的微小差别甚至能反映出分子长度的差别（图 5 中显示的其化学式）。此处显示的接触角通常大于 OEG 分子的。前进和后退角之间的滞后也较大，这揭示了更粗糙的表面。考虑到从表面上除去相对大量的二硝基苯端基（其能在制备的 SAM 中引入缺陷），故此其是可以预期的。

表 2. 以最大误差给出的 ANA1, ANA2 和 ANA3 的 SAM 的特征描述

加载液	SAM 厚度 (Å)	接触角测定 (°)	
		前进 θ_a	后退 θ_r
ANA1	47.0±0.9 ^a	66±2 ^b	52±1 ^b
ANA2	48.4±0.7 ^a	53±2 ^b	38±1 ^b
ANA3	49.8±0.5 ^a	51±3 ^b	34±1 ^b

10 ABTNT 的固定

对不同的 TNT 类似物已经以其不同的混合比例评价了其结合 ABTNT 的能力。使用了某些技术，它们之间的一致是惊人的。

如图 6 所示的两个图形以 IRAS 和椭圆偏振检测法为基础，其显示出对于不同类似物和其与 EG₄ 的混合比例的固定的 ABTNT 的量。对于 IRAS 数据，酰胺 I 带的部分用于检测结合的 ABTNT (1710 ~ 1665 cm⁻¹ 之间累积的)。椭圆偏振检测法的数据显示出在与 ABTNT 孵育后，膜厚度的增加。此处，EG₄ 显示出其驱除蛋白质的特性。固定的 ABTNT 的量事实上为零。此外，包含高量类似物的三种 SAM 的抗体的结合非常相似。从 1% 类似物溶液组装的 SAM 通常表现出较低的固定程度。

20

官能度检测

采用两个思考方法已经评估了三种 TNT-类似物以其不同混合比例的官能度。首先，考虑其 ABTNT-结合能力，其次，考虑与 TNT 暴露反应的 ABTNT 的解离。在两种情况下，实施两种实时技术，SPR 和 QCM。对于 SPR 检测，反应单位 (RU) 的增加与表面上结合的 ABTNT 的量相应，二对于 QCM 实验，频率的降低是等效物。所有三种类似物均具有高潜

25

能，但焦点集中在 ANA1 上，因为其表现出的性能比其它的好。对于该节的所有实验，运行缓冲液为 PBS (pH7.4)，在相同基质中制备 ABTNT 和 TNT 溶液。ABTNT 浓度一般为 0.02g/L。

5 ABTNT-结合能力

对于 SPR 实验，使用了来自 Biacore AB 的两类装置（称为 Biacore2000 和 BiacoreX 系统）。对于在 Biacore2000 装置上实施的检测，将流速设定为 50 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ ，通过注入 100 μL 的 ABTNT (0.02g/L) 而对样品表面实施加载。图 7 中给出和 ANA1 及其混合物的 ABTNT-结合能力的图形。纯 EG₄ 的 SAM 所示的非常低的吸收也进一步支持了其驱除蛋白质的特性。在以 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 和 ABTNT 注入体积为 70 μL 运行的 BiacoreX 装置所实施的实验中显示出不同混合比例之间相同的相互关系（数据未给出）。

在轻度改变的流动室系统 V2B (Biosensor Applications Sweden AB 开放) 上实施 QCM 检测。按 Biacore2000 实验设置所有参数，即流速为 50 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ 和 ABTNT 注入体积为 100 μL 。图 8 中显示了曲线，该曲线显示了 EG₄ 和 ANA1 及其化合物的 ABTNT 结合能力。再一次清楚证实了 EG₄ 的 ABTNT 结合能力低。

SPR 和 QCM 实验中 ABTNT 与不同 SAM 的结合相似。包含大多数 TNT-类似物的三种表面均将 ABTNT 非常好地结合到表面，抗体的解离非常慢。由于恒定暴露于新鲜缓冲液，故可以预期 ABTNT 的特定释放，即永远无法达到真实的平衡。

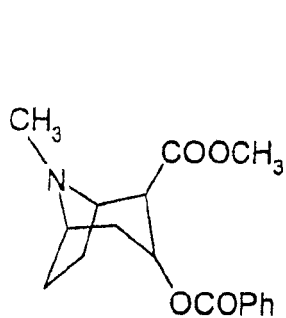
ABTNT 置换

图 9 中显示了 SPR 曲线 (Biacore2000, 流速: 50 $\mu\text{L}/\text{分钟}$)，其显示出在对以 EG₄ 和 ANA1 不同的混合比例注入 1, 10 和 100pg/ μL TNT 反应的中的 ABTNT 脱附。表面已预先通过注入 100 μL ABTNT 而进行加载。

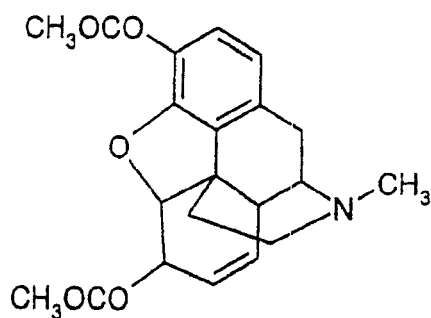
图 9 中曲线的出现提示了 ABTNT 与包含较少 ANA1 的 SAM 的结合较弱，由此促进了置换反应。这可能是抗体二价体和其与表面相互作用的结果。ANA1 含量越高，对于 ABTNT 发现两种 TNT-类似物（每个表位一个）与之结合的机会就越大。在 EG₄ : ANA1 99: 1 的情况下，该事

件发生的可能性更低，简单地因为 ANA1 的丰富度较低。因为抗体的结合力强烈地依赖于是否仅一个或二个表位与抗原结合，该事件具有高度相关性。

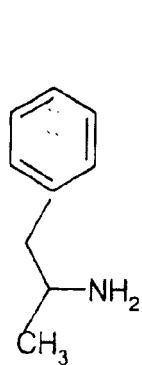
5 图 10 和 11 显示了来自 QCM 检测 (流速: 50 μ L/min, 注入体积为: 100 μ L) 的相应结果。通过共振频率的增加可以看出由注入 TNT 导致的质量损失。还包括频率 df/dt (其与浓度成比例) 的导数, 其通常能给出更清楚的检测信号。



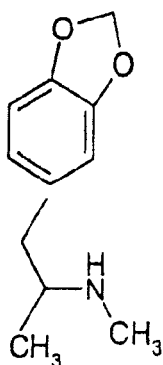
可卡因



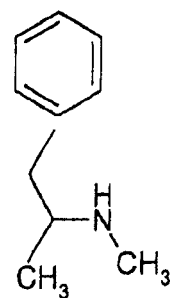
海洛因



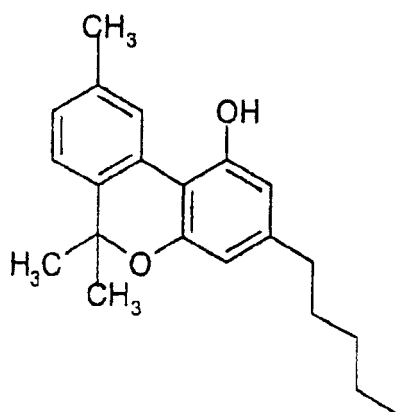
苯异丙胺



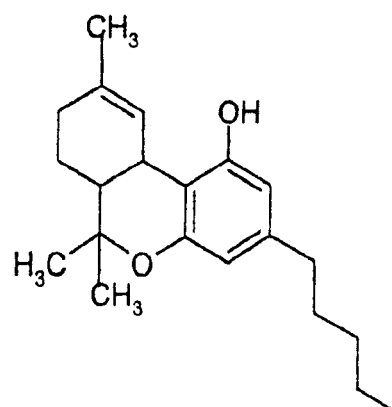
亚甲二氧基-N-甲基
苯异丙胺MDMA或Ecstasy



脱氧麻黄碱

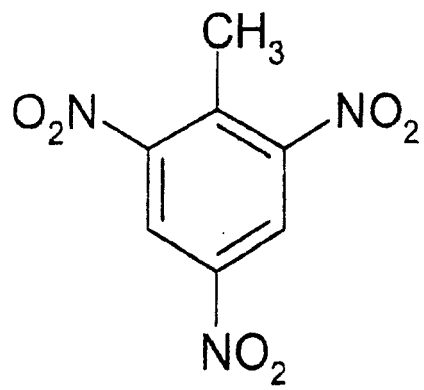


大麻酚

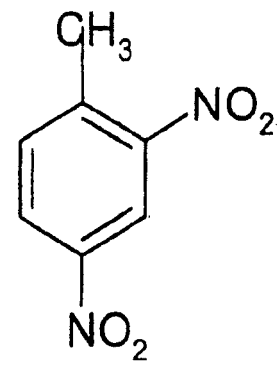


四氢大麻酚 (THC)

图 1



2, 4, 6-三硝基甲苯 (TNT)



2, 4-二硝基甲苯 (2, 4-DNT)

图 2

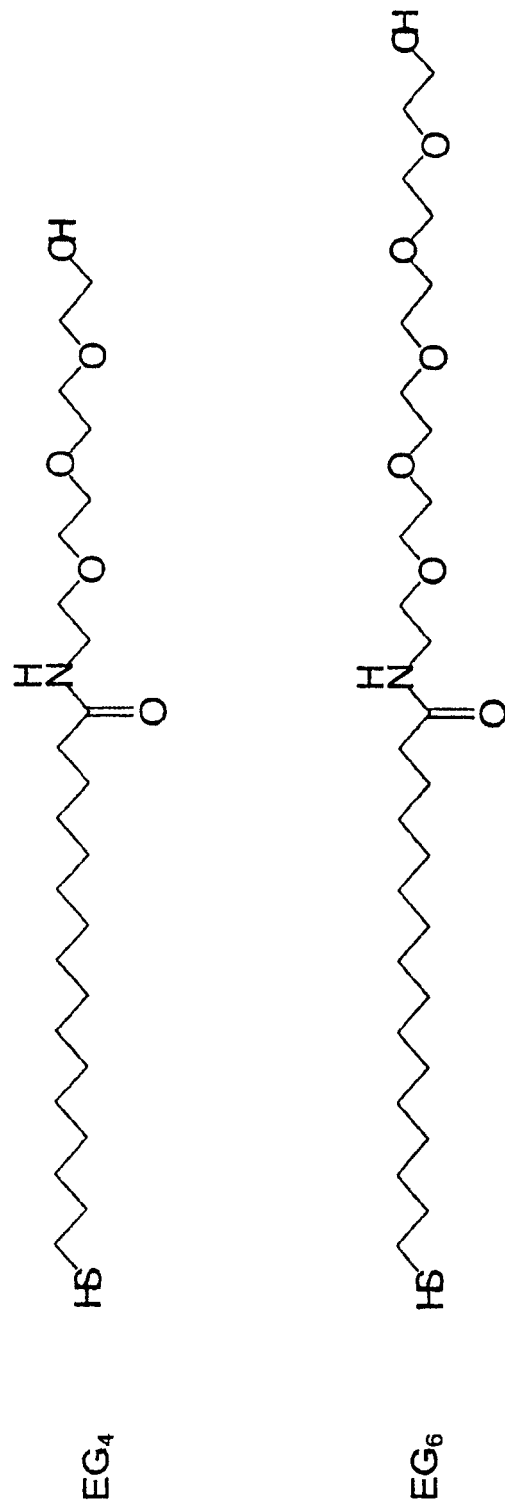


图 4

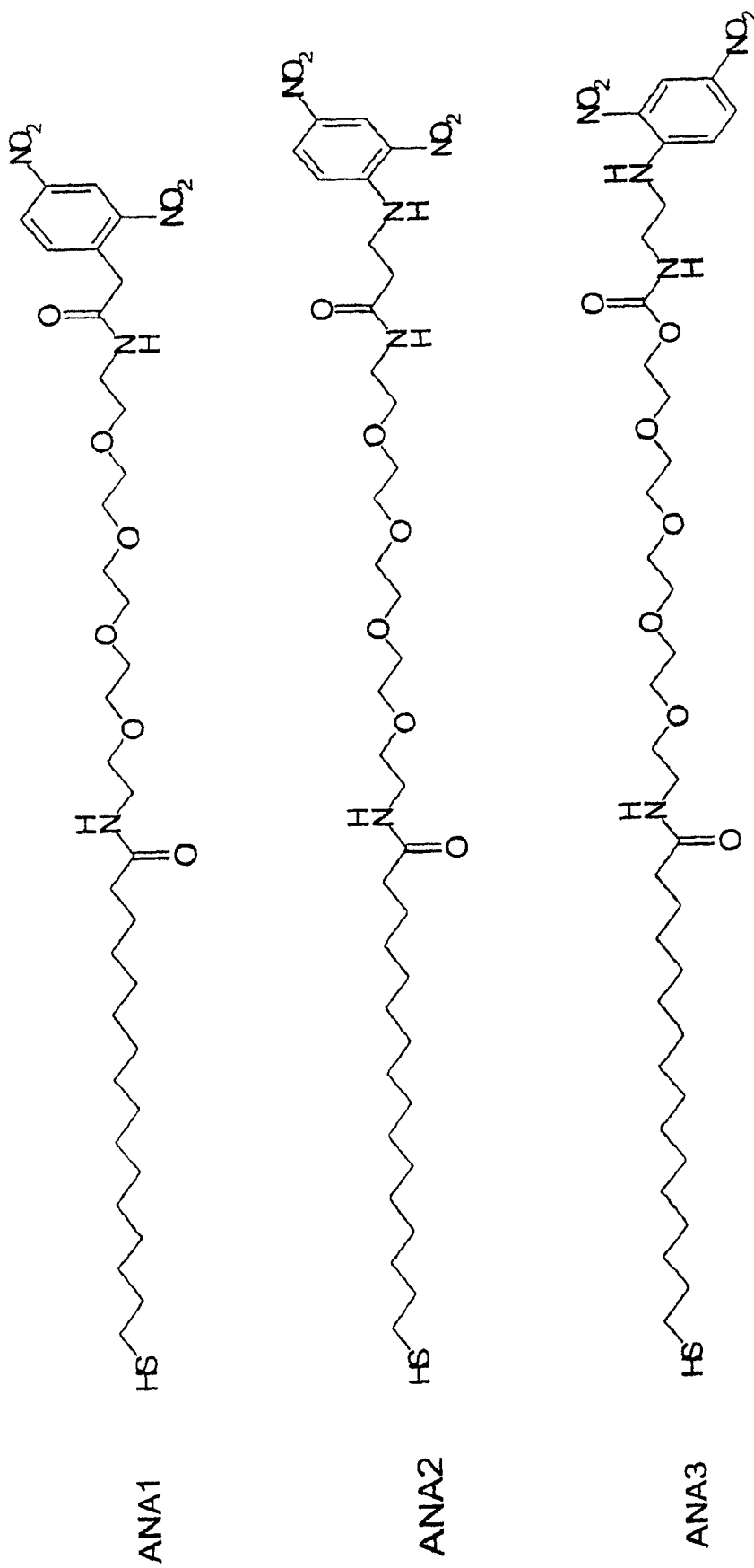


图 5

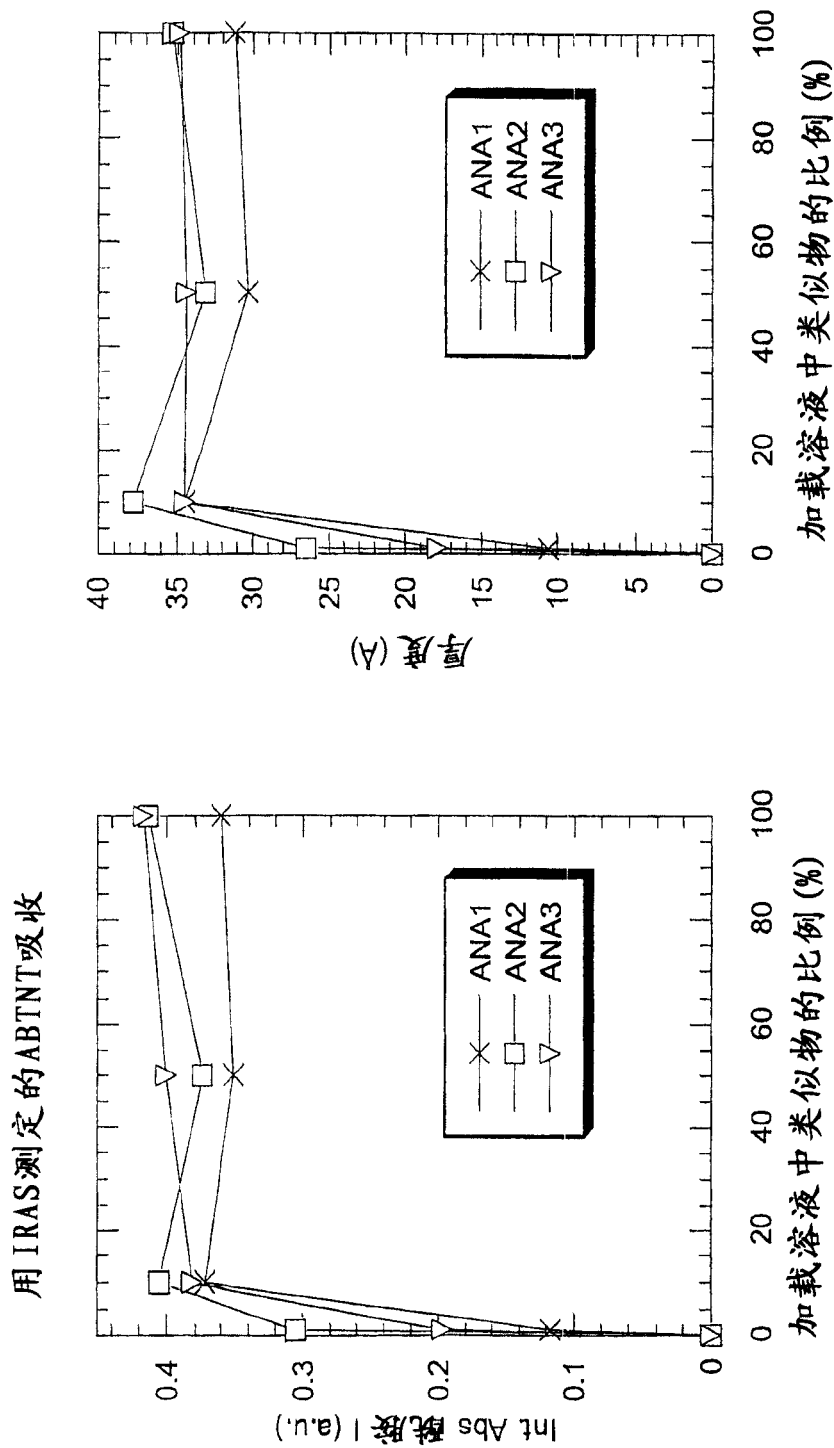


图 6

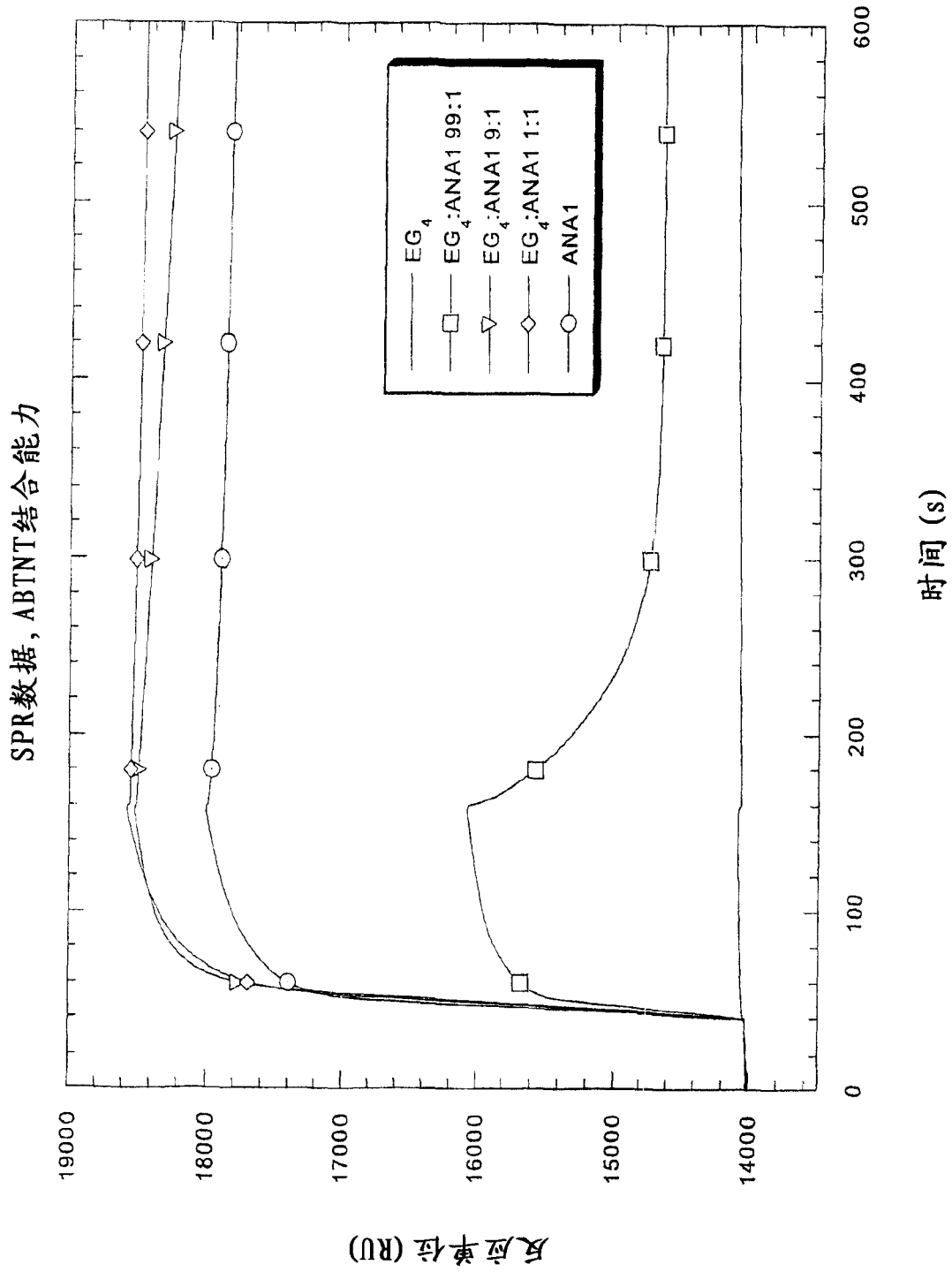


图 7

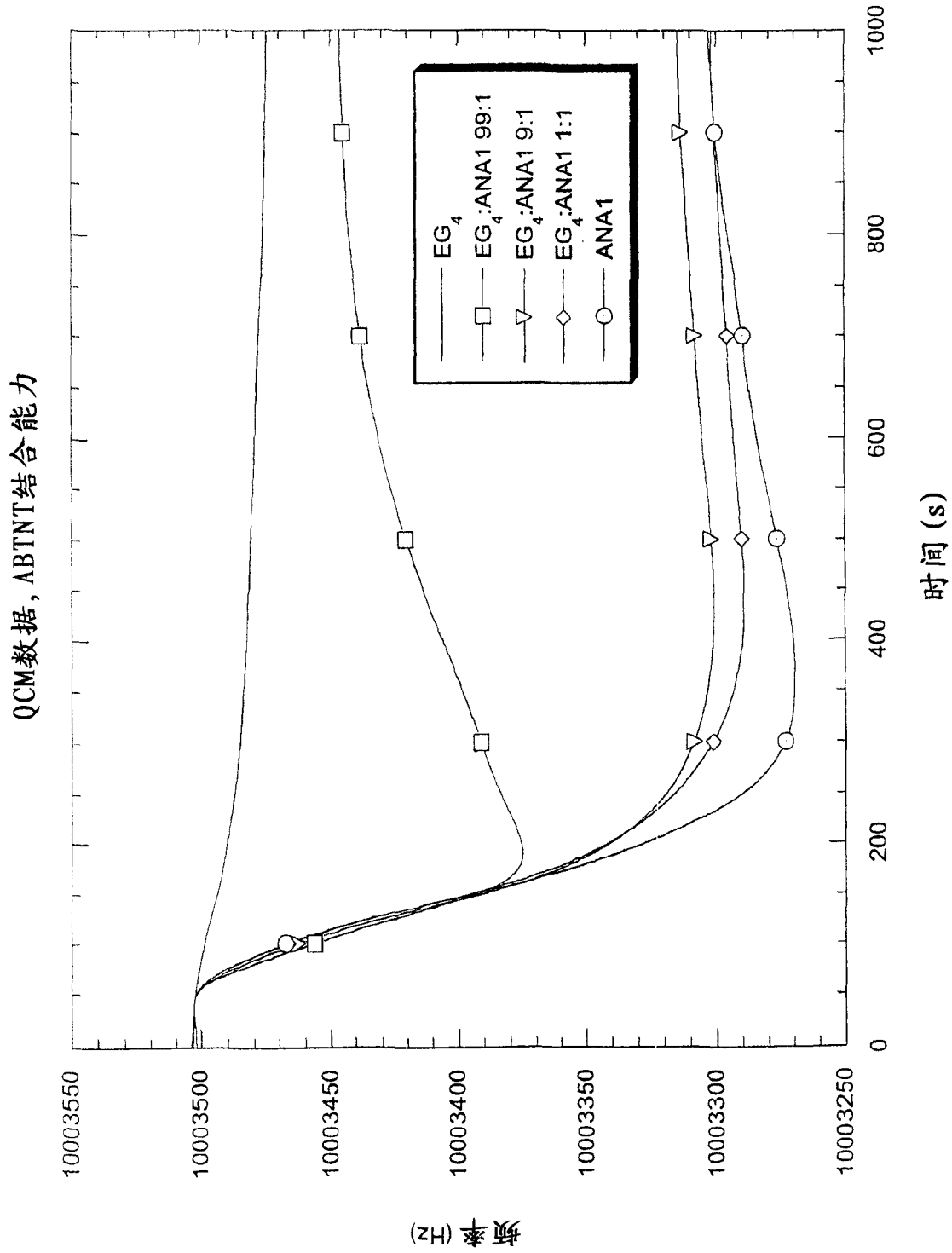


图 8

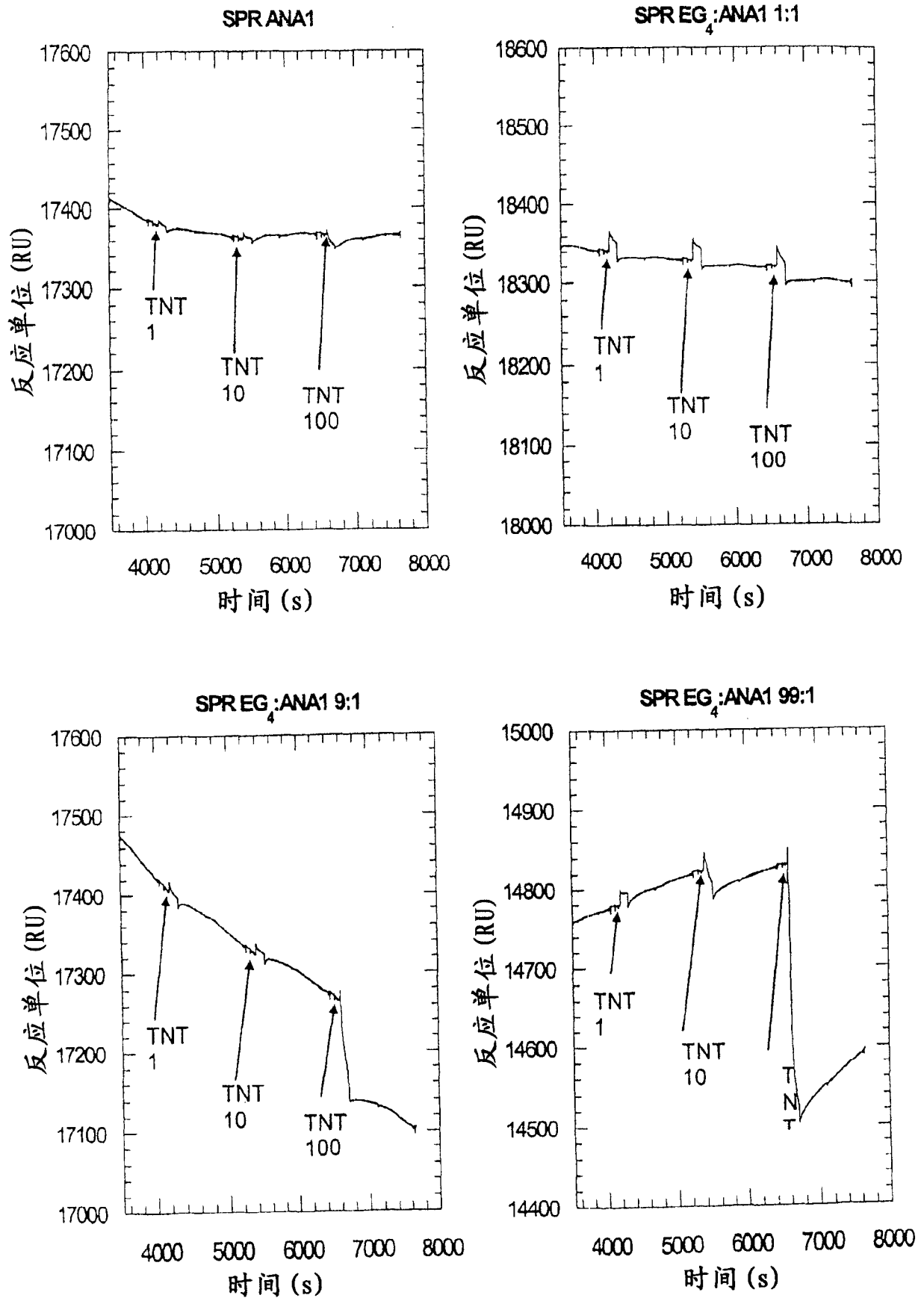


图 9

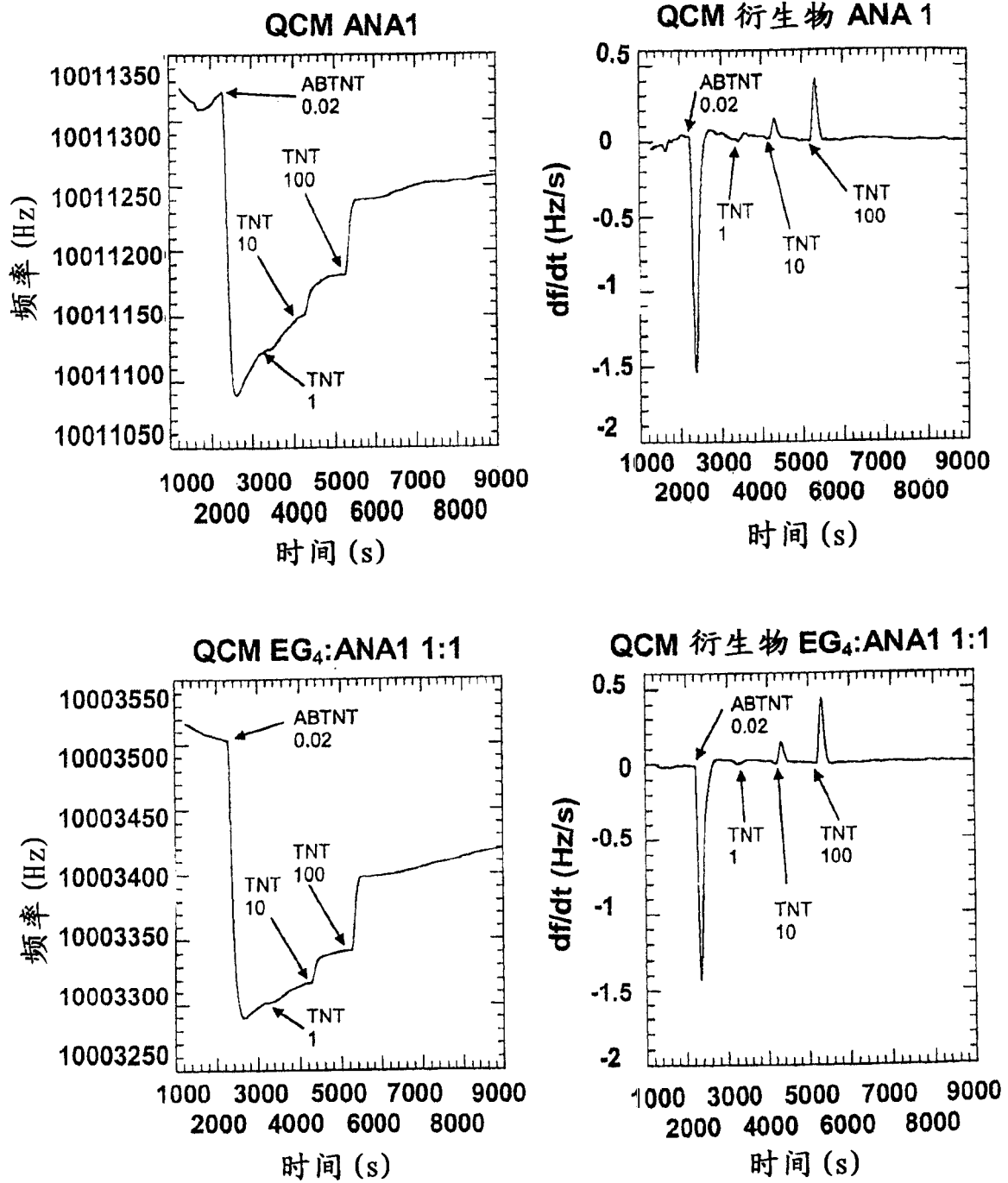


图 10

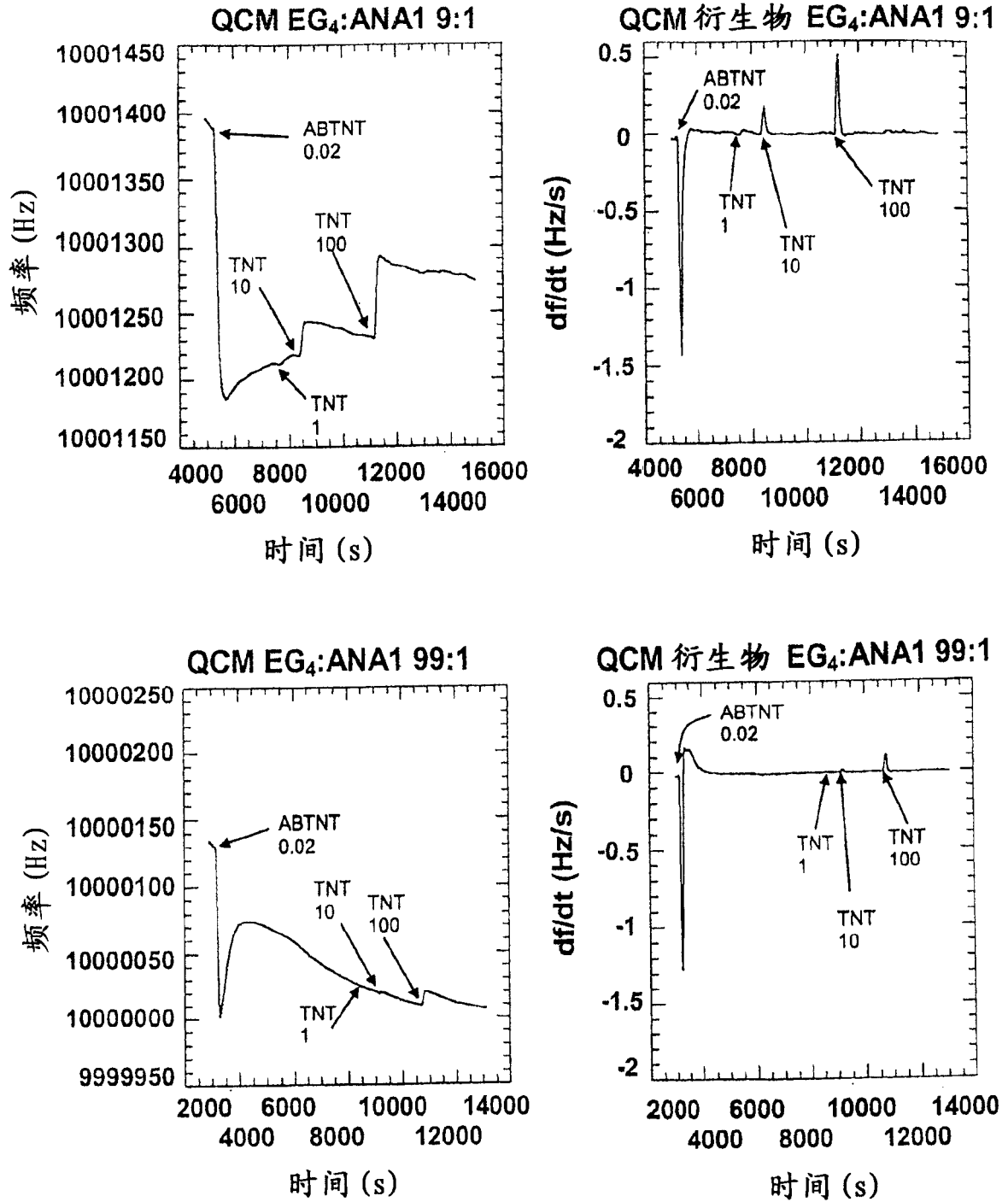


图 11

专利名称(译)	用于置换反应的固体载体上的涂覆的金属表面		
公开(公告)号	CN1675549A	公开(公告)日	2005-09-28
申请号	CN03819837.1	申请日	2003-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	瑞典生物传感器应用股份公司		
申请(专利权)人(译)	瑞典生物传感器应用股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	瑞典生物传感器应用股份公司		
[标]发明人	P曼松 B利德贝里		
发明人	P·曼松 B·利德贝里		
IPC分类号	G01N33/547 G01N5/02 G01N21/27 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/552		
CPC分类号	G01N33/54353 G01N33/54393 G01N2610/00 B82Y30/00 G01N33/553		
代理人(译)	谭明胜		
优先权	0201874 2002-06-19 SE 60/389497 2002-06-19 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种固体载体上的涂覆的金属表面，其中涂层由经巯基端与金属表面牢固粘附的寡聚(乙二醇)封端的包含酰胺基团的烷基硫醇的自组装单层(SAM)和经由酰胺基与形成SAM的OEG分子结合的低分子量抗原组成，其中烷基部分包含1~20个亚甲基，其中寡聚(乙二醇)部分包含1~15个乙烯氧单位，其中抗原(例如包爆炸物和麻醉药)与特异性针对抗原的抗体任选地可逆性结合。固体载体上的涂覆的金属表面可作为分析装置，例如压电晶体微量天平装置或表面等离子体共振生物传感器的部分而被用在检测分析物抗原的方法中，通过监测抗体自涂层的置换在水溶液中检测对抗体的亲和力高于涂层的抗原的分析物抗原。

