



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101784897 A

(43) 申请公布日 2010.07.21

(21) 申请号 200880019672.X

G01N 33/533 (2006.01)

(22) 申请日 2008.05.23

G01N 33/543 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/58 (2006.01)

60/924,640 2007.05.23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.12.10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/064643 2008.05.23

(87) PCT申请的公布数据

W02008/147949 EN 2008.12.04

(71) 申请人 应用生物系统有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 R·R·卓 J·C·沃伊塔

B·爱德华兹

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 唐晓峰

(51) Int. Cl.

G01N 33/542 (2006.01)

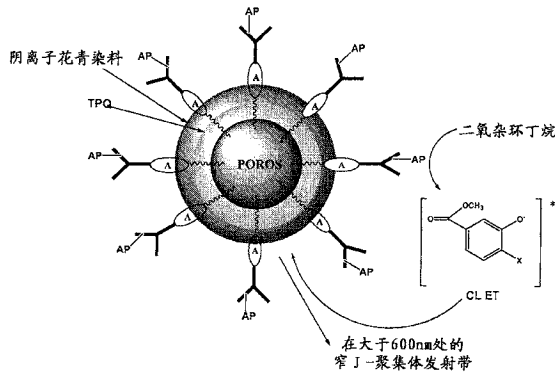
权利要求书 6 页 说明书 20 页 附图 7 页

(54) 发明名称

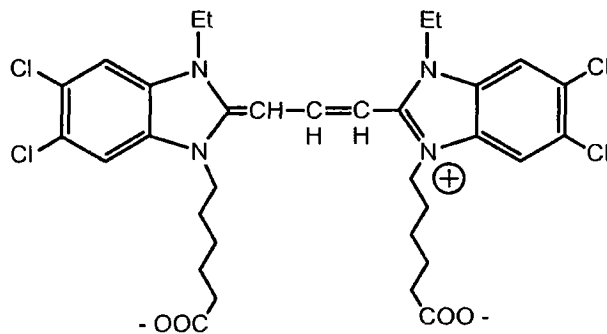
通过从活化的化学发光的基质将能量转移至能量受体染料来检测生物分子的试剂、试剂盒和方法

(57) 摘要

本发明描述了通过从活化的化学发光的基质将能量转移至能量受体染料比如 J-聚集的染料来检测生物分子的试剂、试剂盒和方法。



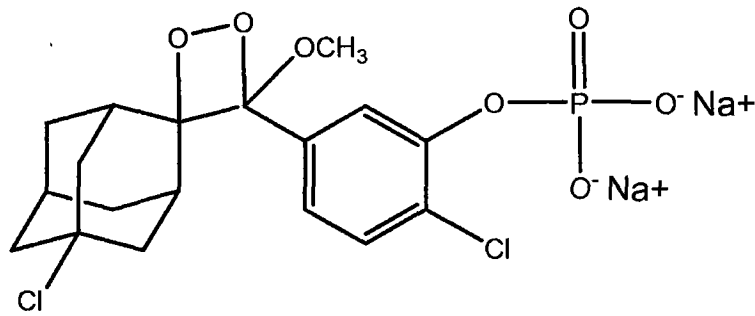
1. 一种制品,其包括:  
包 括表面的载体;  
所述载体表面上的化学发光的增强物质;  
所述载体表面上的能量受体染料;和  
所述载体表面上的一种或多种生物分子探针。
2. 权利要求 1 的制品,其中所述能量受体染料为 J- 聚集的染料。
3. 权利要求 1 的制品,其中所述化学发光的增强物质是包括带正电荷的鎘基的阳离子均聚物或共聚物。
4. 权利要求 3 的制品,其中所述化学发光的增强物质包括聚(乙烯基苄基二甲基苄基氯化铵)(BDMQ)、聚(乙烯基苄基三甲基氯化铵)(TMQ)、聚(乙烯基苄基三丁基氯化铵)(TBQ)、聚(乙烯基苄基三(正戊基)氯化铵)(TPQ)、聚(乙烯基苄基三丁基氯化鎘)(TB)、聚(乙烯基苄基三辛基氯化鎘)(TO)、两种或多种任意的前述物质或包括一种或多种前述物质的共聚物。
5. 权利要求 1 的制品,其中所述载体为颗粒。
6. 权利要求 1 的制品,其中所述载体包括胶乳、聚苯乙烯、尼龙、聚丙烯酰胺或聚(苯乙烯二乙烯基苯)珠粒。
7. 权利要求 2 的制品,其中所述 J- 聚集的染料为花青染料。
8. 权利要求 1 的制品,其中所述一种或多种生物分子探针包括抗体、多核苷酸、寡核苷酸、多肽、蛋白质、受体、凝集素或适体。
9. 权利要求 2 的制品,其中所述载体具有阴离子表面,所述化学发光的增强物质为在所述载体表面上的阳离子均聚物或共聚物,且所述 J- 聚集的染料为在所述阳离子均聚物或共聚物上的阴离子染料。
10. 权利要求 9 的制品,其中所述阴离子染料为具有如下给出的结构的阴离子花青染料:



11. 一种用于检测样品中分析物的试剂盒,其包括:  
权利要求 1 的制品,其中所述一种或多种表面 - 结合生物分子探针包括能够结合分析物的探针,或者当存在分析物时,结合分析物的探针;  
化学发光的基质;和  
任选地,酶标记的生物分子或酶标记的分析物。
12. 权利要求 11 的试剂盒,其中所述化学发光的基质为二氧杂环丁烷、吡啶鎘酯、吡啶鎘磺酰亚胺、9,10- 二氢吡啶、9,10- 二氢吡啶烯醇磷酸酯、荧光素或鲁米诺。

13. 权利要求 12 的试剂盒,其中所述化学发光的基质为 1,2- 二氧杂环丁烷基质。

14. 权利要求 13 的试剂盒,其中所述化学发光的基质具有如下给出的结构:



15. 权利要求 11 的试剂盒,其中所述酶标记是水解酶。

16. 权利要求 11 的试剂盒,其中所述酶标记选自碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡糖醛酸糖苷酶和神经氨酸苷酶。

17. 权利要求 11 的试剂盒,其中所述表面-结合生物分子探针为抗体,所述分析物为抗体的抗原,并且其中所述试剂盒包括当所述分析物结合所述表面-结合生物分子探针时其能够结合分析物的酶-标记的抗体。

18. 权利要求 14 的试剂盒,其中所述试剂盒包括酶-标记的生物分子或酶-标记的分析物,并且其中所述酶标记为碱性磷酸酶。

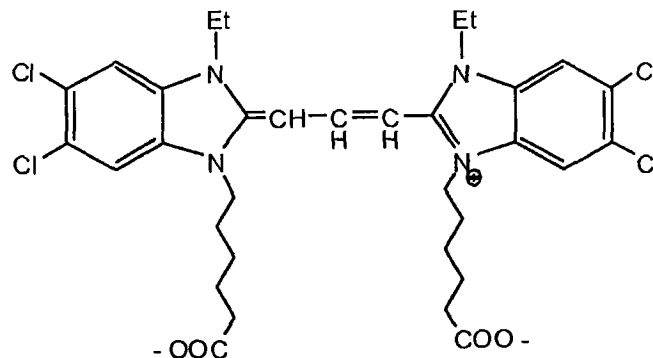
19. 一种用于检测样品中分析物的试剂盒,其包括:

权利要求 9 的制品,其中所述一种或多种表面-结合生物分子探针包括能够结合分析物的探针,或者当存在分析物时,结合分析物的探针;

化学发光的基质,其中所述活化的化学发光的基质激发能量受体染料引起从其中发射;和

任选地,酶标记的生物分子或酶标记的分析物。

20. 权利要求 19 的试剂盒,其中所述阴离子花青染料具有如下列出的结构:



21. 一种用于检测样品中分析物的方法,其包括:

用权利要求 1 的制品接触所述样品,其中所述一种或多种生物分子探针包括结合分析物的探针;

使样品中的分析物结合表面结合探针;其中:(a) 所述分析物为酶;(b) 用酶标记所述分析物;(c) 用酶标记的生物分子接触所述载体表面,所述生物分子结合所述分析物;或(d) 所述分析物为未标记,和将酶标记的分析物加入到样品中以使样品中的酶-标记的分析物与未标记的分析物竞争结合所述表面结合探针;

用酶活化的化学发光的基质接触所述载体表面,其中所述活化的化学发光的基质激发

能量受体染料,引起从其中发射;和

检测来自能量受体染料的发射。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述能量受体染料为 J- 聚集的染料。

23. 权利要求 21 的方法,其中所述酶或酶标记是水解酶。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述酶或酶标记选自碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖醛酸糖苷酶和神经氨酸苷酶。

25. 权利要求 21 的方法,其中所述酶或酶标记是氧化酶。

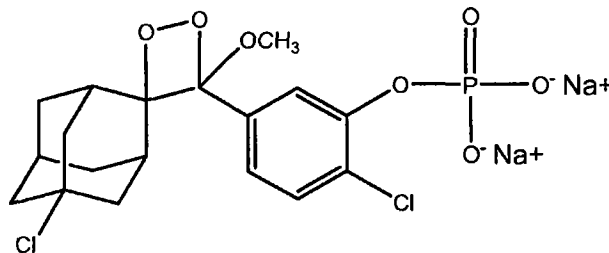
26. 权利要求 21 的方法,其中所述表面-结合探针为抗体和所述分析物为抗体的抗原,或者所述表面结合探针为抗体的抗原和所述分析物为抗原的抗体。

27. 权利要求 26 的方法,其中在使样品中的分析物结合载体结合探针之后,用酶标记的生物分子接触所述载体表面,其中当所述分析物结合所述载体-结合探针时,所述酶标记的生物分子为结合分析物的抗体。

28. 权利要求 21 的方法,其中所述化学发光的基质为二氧杂环丁烷、吡啶鎓酯、吡啶鎓磺酰亚胺、9,10-二氢吡啶、9,10-二氢吡啶烯醇磷酸酯、荧光素或鲁米诺。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述化学发光的基质为 1,2-氧杂环丁烷。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述化学发光的基质具有如下列出的结构:



31. 权利要求 30 的方法,其中所述酶或酶标记是碱性磷酸酶。

32. 一种用于检测样品中分析物的方法,其包括:

用权利要求 9 的制品接触样品,其中所述一种或多种生物分子探针包括结合分析物的探针;

使样品中的分析物结合表面结合探针;其中:(a) 所述分析物为酶;(b) 用酶标记所述分析物;(c) 用酶标记的生物分子接触所述载体表面,所述生物分子结合所述分析物;或(d) 所述分析物为未标记,和将酶标记的分析物加入到样品中以使样品中的酶-标记的分析物与未标记的分析物竞争结合所述表面结合探针;

用酶活化的化学发光的基质接触所述支持表面,其中所述活化的化学发光的基质激发能量受体染料,引起从其中发射;和

检测来自能量受体染料的发射。

33. 权利要求 32 的方法,其中所述酶或酶标记是水解酶。

34. 权利要求 33 的方法,其中所述酶或酶标记选自碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖醛酸糖苷酶和神经氨酸苷酶。

35. 权利要求 32 的方法,其中所述表面-结合探针为抗体和所述分析物为抗体的抗原,或者所述表面结合探针为抗体的抗原和所述分析物为抗原的抗体。

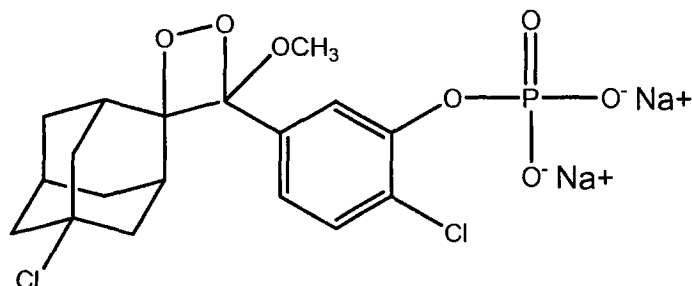
36. 权利要求 35 的方法,其中在使样品中的分析物结合表面结合探针之后,用酶标记

的生物分子接触所述载体表面,其中当所述分析物结合所述载体-结合探针时,所述酶标记的生物分子为结合分析物的抗体。

37. 权利要求 32 的方法,其中所述化学发光的基质为二氧杂环丁烷、吡啶鎓酯、吡啶鎓磺酰亚胺、9,10-二氢化吡啶、9,10-二氢化吡啶烯醇磷酸酯、荧光素或鲁米诺。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述化学发光的基质为 1,2-二氧杂环丁烷。

39. 权利要求 38 的方法,其中所述化学发光的基质具有如下列出的结构:



40. 权利要求 35 的方法,其中所述酶或酶标记是碱性磷酸酶。

41. 一种用于检测样品中分析物的试剂盒,其包括:

制品,其包括具有表面的载体,所述载体表面上的能量受体染料,和所述载体表面上的一种或多种生物分子探针,其中所述一种或多种生物分子探针能够结合分析物,或者当存在分析物时,其结合分析物;

化学发光的基质;和

任选地,酶标记的生物分子或酶标记的分析物。

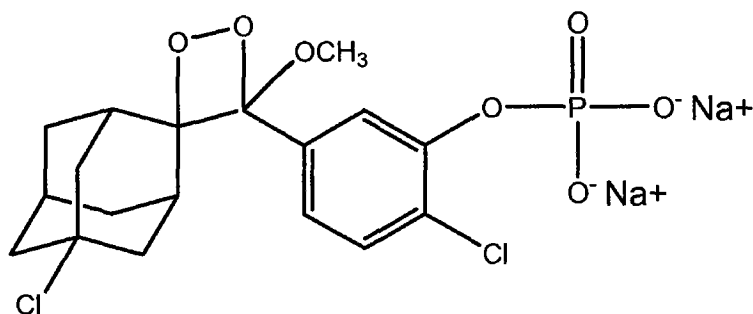
42. 权利要求 41 的试剂盒,其中所述能量受体染料为 J-聚集的染料。

43. 权利要求 41 的试剂盒,其进一步包括所述载体表面上的化学发光的增强物质。

44. 权利要求 41 的试剂盒,其中所述化学发光的基质为二氧杂环丁烷、吡啶鎓酯、吡啶鎓磺酰亚胺、9,10-二氢化吡啶、9,10-二氢化吡啶烯醇磷酸酯、荧光素或鲁米诺。

45. 权利要求 44 的试剂盒,其中所述化学发光的基质为 1,2-二氧杂环丁烷基质。

46. 权利要求 45 的试剂盒,其中所述化学发光的基质具有如下列出的结构:



47. 权利要求 41 的试剂盒,其中所述试剂盒包括酶标记的生物分子或酶标记的分析物。

48. 权利要求 47 的试剂盒,其中所述酶标记是水解酶。

49. 权利要求 48 的试剂盒,其中所述酶标记选自碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖醛酸糖苷酶和神经氨酸苷酶。

50. 权利要求 47 的试剂盒,其中所述表面-结合探针为抗体和所述分析物为抗体的抗原,或者所述表面结合探针为抗体的抗原和所述分析物为抗原的抗体。

51. 权利要求 46 的试剂盒,其中所述试剂盒包括当分析物结合所述载体表面上的探针时其结合所述分析物的酶标记的生物分子,或者与样品中未标记的分析物竞争结合所述载体结合探针的酶标记的分析物,并且其中所述酶标记为碱性磷酸酶标记。

52. 一种用于检测样品中多种分析物的方法,其包括:

用第一制品接触样品,所述制品包括:具有表面的载体;所述载体表面上的第一化学发光的增强物质;所述载体表面上的第一能量受体染料;和所述载体表面上的第一生物分子探针,其中所述第一生物分子探针能够结合第一分析物;

用第二制品接触样品,所述制品包括:具有表面的载体;所述载体表面上的第二化学发光的增强物质;所述载体表面上的第二能量受体染料;和所述载体表面上的第二生物分子探针,其中所述第二生物分子探针能够结合第二分析物;

使样品中的第一分析物结合第一探针,其中:(a) 第一分析物为第一酶,(b) 用第一酶标记第一分析物,(c) 用第一酶标记的和结合所述载体表面上的第一分析物的生物分子接触第一制品的载体表面;或(d) 第一分析物为未标记,和将第一酶标记的第一分析物加入到样品中以使样品中的酶-标记的第一分析物与未标记的第一分析物竞争结合第一制品的第一生物分子探针;

使样品中的第二分析物结合第二探针,其中:(a) 第二分析物为第二酶,(b) 用第二酶标记第二分析物,(c) 用第二酶标记的和结合载体表面上的第二分析物的生物分子接触第二制品的第二载体表面;或(d) 第二分析物为未标记,和将第二酶标记的第二分析物加入到样品中以使样品中的酶-标记的第二分析物与未标记的第二分析物竞争结合第二制品的第二生物分子探针;

用第一酶活化的第一化学发光的基质接触第一制品,其中所述活化的第一化学发光的基质激发第一能量受体染料,引起从其中发射,和用第二酶活化的第二化学发光的基质接触第二制品,其中所述活化的第二化学发光的基质激发第二能量受体染料,引起从发射;和

检测来自第一能量受体染料的发射和检测来自第二能量受体染料的发射,其中来自第一能量受体染料的发射与来自第二能量受体染料的发射是可区别的。

53. 权利要求 52 的方法,其中所述第一和第二化学发光的基质相同或不同。

54. 权利要求 52 的方法,其中所述第一和第二化学发光的增强物质相同或不同。

55. 权利要求 52 的方法,其中同时或顺次用样品接触所述第一和第二制品。

56. 权利要求 52 的方法,其中同时或顺次用第一和第二化学发光的基质接触所述第一和第二制品。

57. 权利要求 52 的方法,其中同时或顺次检测来自第一能量受体染料的发射和检测来自第二能量受体染料的发射。

58. 一种用于检测样品中多种分析物的试剂盒,其包括:

第一制品,其包括:具有表面的第一载体;所述载体表面上的第一化学发光的增强物质;所述载体表面上的第一能量受体染料;和所述载体表面上的第一生物分子探针,其中所述第一生物分子探针包括能够结合第一分析物的第一探针,或者当存在第一分析物时,其结合第一分析物的第一探针;

第二制品,其包括:具有表面的载体;所述载体表面上的第二化学发光的增强物质;所述载体表面上的第二能量受体染料;和所述载体表面上的第二生物分子探针,其中所述第

二生物分子探针包括能够结合第二分析物的第一探针,或者当存在第二分析物时,其结合第二分析物的第一探针;

第一化学发光的基质,其中所述活化的第一化学发光的基质激发第一能量受体染料,引起从其中发射;

第二化学发光的基质,其中所述活化的第二化学发光的基质激发第二能量受体染料,引起从其中发射,其中来自第一能量受体染料的发射与来自第二能量受体染料的发射是可区别的;

任选地,第一酶-标记的生物分子或被第一酶标记的第一分析物;

任选地,第二酶-标记的生物分子或被第二酶标记的第二分析物。

59. 权利要求 58 的试剂盒,其中所述第一和第二化学发光的基质相同或不同。

60. 权利要求 58 的试剂盒,其中所述第一和第二化学发光的增强物质相同或不同。

61. 权利要求 1 的制品,其中所述能量受体染料为荧光染料。

62. 权利要求 1 的制品,其中所述能量受体染料为选自下述的芳族化合物:萘类、蒽类、芘类、联苯类、吡啶、香豆素类、咕吨类、酞菁类、1,2-二苯乙烯类、呋喃类、噁唑类、噁二唑类和苯并噻唑类。

63. 权利要求 1 的制品,其进一步包括所述载体表面上的分子过滤器,其中所述分子过滤器屏蔽或淬灭了干扰检测来自能量受体染料的发光发射的光发射。

64. 权利要求 63 的制品,其中所述分子过滤器为血红蛋白或淬灭染料。

65. 权利要求 11 的试剂盒,其进一步包括:分子过滤器,其中所述分子过滤器屏蔽或淬灭了干扰检测来自能量受体染料的发光发射的光发射。

66. 权利要求 65 的试剂盒,其中当活化时,所述化学发光的基质激发所述能量受体染料,引起从其中发光发射,并且其中所述分子过滤器屏蔽或淬灭了干扰检测来自能量受体染料的发光发射的发光发射。

67. 权利要求 21 的方法,其中在检测来自所述能量受体染料的发射时,分子过滤器在所述载体表面上,其中所述分子过滤器屏蔽或淬灭了干扰检测来自能量受体染料的发光发射的光发射。

## 通过从活化的化学发光的基质将能量转移至能量受体染料 来检测生物分子的试剂、试剂盒和方法

[0001] 本申请要求 2007 年 5 月 23 日申请的序列号为 No. 60/924, 640 的美国临时专利申请的利益, 将其全部内容引入本文作为参考。

[0002] 本文使用的段落标题仅仅用于组织的目的, 不应理解为以任何方式限制本文描述的主题。

### 发明领域

[0003] 本申请通常涉及用于检测样品中的生物分子的试剂、试剂盒和方法。

### [0004] 引言

[0005] 生物测定用户逐渐采用均相测定法方式代替非均相测定法, 优选更简单、步骤更少 (例如, 没有分离步骤) 的测定法, 其意味着获得结果需要更少的劳动和更快的时间。

[0006] 如本文描述的, 灵敏的均相生物测定可以在载体表面上进行, 其中定位酶翻转产生受体染色层 (例如 J- 聚集的染料) 在所述载体上的定位化学激发, 其与附近俘获的分析物检测相关。可以使用载体组装作为用于芯片方式的化学发光的均相酶标记的生物测定和溶液测定的灵敏的生物测定载体。该测定设计也可以适合不同的载体组装的混合, 提供以均相测定方式的多重测定。波长转移发光信号远离自身荧光带和引发来自化学激发的信号的能力可以提供更低的背景、增加信噪比、增加动态范围、增加检测灵敏度和显著地简化仪器读出信号。

### [0007] 发明概述

[0008] 提供一种制品, 其包括:

[0009] 具有表面的载体;

[0010] 所述载体表面上的化学发光的增强物质;

[0011] 所述载体表面上的能量受体染料; 和

[0012] 所述载体表面上的一种或多种生物分子探针。

[0013] 还提供一种用于检测样品中分析物的试剂盒, 其包括:

[0014] 如上述的制品, 其中所述一种或多种生物分子探针包括能够结合分析物的探针, 或者当分析物存在时, 其结合分析物的探针;

[0015] 化学发光的基质; 和

[0016] 任选地, 酶标记的生物分子或酶标记的分析物。当分析物结合表面结合探针时, 所述酶标记的生物分子可以结合所述分析物。所述酶标记的分析物可以与样品中未标记的分析物竞争结合表面结合探针。

[0017] 还提供一种用于检测样品中分析物的方法, 其包括:

[0018] 用如上所述制品接触样品, 其中所述一种或多种生物分子探针包括能够结合分析物的探针;

[0019] 使样品中的分析物结合所述探针; 其中 (a) 所述分析物是一种酶; (b) 用酶标记所述分析物; (c) 用结合分析物的酶标记的生物分子接触所述载体表面; 或 (d) 所述分析物是

未标记的,并且将酶标记的分析物加入样品中,以使样品中酶标记的分析物与未标记的分析物竞争结合所述探针;

[0020] 用所述酶活化的化学发光的基质接触所述载体表面,其中所述活化的化学发光的基质激发能量受体染料,引起从其中发射;和

[0021] 检测来自所述能量受体染料的发射。

[0022] 还提供一种用于检测样品中分析物的试剂盒,其包括:

[0023] 制品,其包括具有表面的载体,所述载体表面上的能量受体染料,和所述载体表面上的一种或多种生物分子探针,其中所述一种或多种生物分子探针包括能够结合分析物的探针,或者当存在分析物时,其结合所述分析物的探针;

[0024] 化学发光的基质;和

[0025] 任选地,酶标记的生物分子或酶-标记分析物。当分析物结合表面结合探针时,所述酶标记的生物分子可以结合所述分析物。所述酶标记的分析物可以与样品中未标记的分析物竞争结合所述表面结合探针。

[0026] 还提供一种用于检测样品中多种分析物的方法,其包括:

[0027] 用第一制品接触样品,所述制品包括:具有表面的载体;所述载体表面上的第一化学发光的增强物质;所述载体表面上的第一能量受体染料;和所述载体表面上的第一生物分子探针,其中所述第一生物分子探针能够结合第一分析物;

[0028] 用第二制品接触样品,所述制品包括:具有表面的载体;所述载体表面上的第二化学发光的增强物质;所述载体表面上的第二能量受体染料;和所述载体表面上的第二生物分子探针,其中所述第二生物分子探针能够结合第二分析物;

[0029] 使样品中的第一分析物结合第一生物分子探针,其中:(a) 第一分析物为第一酶,(b) 用第一酶标记第一分析物,(c) 用第一酶标记的和结合第一分析物的生物分子接触第一制品的载体表面;或(d) 第一分析物为未标记,和将第一酶标记的第一分析物加入到样品中以使样品中的酶-标记的第一分析物与未标记的第一分析物竞争结合第一生物分子探针;

[0030] 使样品中的第二分析物结合第二生物分子探针,其中:(a) 第二分析物为第二酶,(b) 用第二酶标记第二分析物,(c) 用第二酶标记的和结合第二分析物的生物分子接触第二制品的载体表面;或(d) 第二分析物为未标记,和将第二酶标记的第二分析物加入到样品中以使样品中的酶-标记的第二分析物与未标记的第二分析物竞争结合第二生物分子探针;

[0031] 用第一酶活化的第一化学发光的基质接触第一制品,其中所述活化的第一化学发光的基质激发第一能量受体染料,引起其发射,和用第二酶活化的第二化学发光的基质接触第二制品,其中所述活化的第二化学发光的基质激发第二能量受体染料,引起从其中发射;和

[0032] 检测来自第一能量受体染料的发射和检测来自第二能量受体染料的发射,其中来自第一能量受体染料的发射与来自第二能量受体染料的那些是可区别的。

[0033] 还提供一种用于检测样品中多种分析物的试剂盒,其包括:

[0034] 第一制品,其包括:具有表面的第一载体;所述载体表面上的第一化学发光的增强物质;所述载体表面上的第一能量受体染料;和所述载体表面上的第一生物分子探针,

其中所述第一生物分子探针能够结合第一分析物,或者当存在第一分析物时,其结合第一分析物;

[0035] 第二制品,其包括:具有表面的载体;所述载体表面上的第二化学发光的增强物质;所述载体表面上的第二能量受体染料;和所述载体表面上的第二生物分子探针,其中所述第二生物分子探针能够结合第二分析物,或者当存在第二分析物时,其结合第二分析物;

[0036] 第一化学发光的基质,其中所述活化的第一化学发光的基质激发第一能量受体染料,引起从其中发射;

[0037] 第二化学发光的基质,其中所述活化的第二化学发光的基质激发第二能量受体染料,引起从其中发射,其中来自第一能量受体染料的发射与来自第二能量受体染料的那些是可区别的;

[0038] 任选地,第一酶标记的生物分子或第一酶标记的第一分析物;

[0039] 任选地,第二酶标记的生物分子或第二酶标记的第二分析物。

[0040] 本文中给出了本发明教导的这些及其它特征。

#### 附图说明

[0041] 本领域技术人员应理解如下所述的附图仅仅是用于阐述的目的。所述附图并不意味着以任何方式限制本发明教导的范围。

[0042] 图 1 为图解用于碱性磷酸酶标记的 IgG 抗体的测定的示意图,其中 **POROS®**-A 载体,其包括化学发光的增强剂(即 TPQ)、阴离子花青染料和生物分子探针(即蛋白质-A)和具有结合所述探针的碱性磷酸酶标记的 IgG 抗体,产生化学发光的基质的化学激发,引起所述载体上的 J- 聚集的花青染料的窄带发射。

[0043] 图 2 为具有 **POROS®**-A 载体的构建物的示意图,所述载体包括化学发光的增强剂(即, TPQ)、J- 聚集的染料和生物分子探针(即,蛋白质 A),且具有结合所述探针的兔子 cAMP 抗体。

[0044] 图 3 为图解使用图 2 的构建物的竞争测定法的示意图,其中将加入到样品中的碱性磷酸酶标记的 cAMP 与样品中的 cAMP 竞争结合兔子 cAMP 抗体,所述兔子 cAMP 抗体已结合在所述载体表面上的 A 蛋白生物分子探针。

[0045] 图 4 为显示在图 3 中描述的均相 cAMP 测定的标准曲线图,所述测定使用在 **POROS®** 构建物上的 40  $\mu$ l cAMP 抗体和 1 : 50 稀释度的 cAMP- 碱性磷酸酶结合物。

[0046] 图 5 为使用图 2 的构建物的均相 cAMP-AP 测定的能量转移(ET)谱图。

[0047] 图 6 为图解夹心测定的示意图,其使用的载体包括表面、化学发光的增强剂(即 TPQ)、阴离子花青染料(例如, J- 聚集的染料)、用于俘获样品中分析物的生物分子探针(即,俘获抗体)和能够结合结合分析物的载体的酶标记的抗体。如图 6 中图解的,二氧杂环丁烷基质的酶的翻转产生活化的化学发光的基质,其分裂产生光,该光经由能量转移(ET)引起花青染料产生荧光。

[0048] 图 7 为描述多路复用、均相测定的示意图。

[0049] 多种实施方案的说明

[0050] 为了解释本说明书的目的,将使用下述定义,只要适当时,以单数应用的术语也将

包括其复数形式,反之亦然。为了解释本说明书及其相关权利要求的目的,下述给出的任何定于与在任何其它文件,包括引入本文作为参考的任何文件中术语的用法相抵触时,将总是以下列定义为准,除非明确指出相反的含义(例如,在揭示最初使用该术语的文件时)。除非另有说明或当使用“和/或”明显不合适的情况下,本文使用的“或”指“和/或”。除非另有说明或当使用“一个(种)或多个(种)”明显不合适的情况下,本文使用的“一个(种)”指“一个(种)或多个(种)”。使用的“包括”、“包含”、“含有”、“包括”、“包括”、“包括”和“包括”可互换地使用,而不意味着限制。而且,当在一个或多个实施方案的描述中使用术语“包括”时,本领域技术人员应当理解,在某些具体实例中,该实施方案或多个实施方案可以作为替代地使用措辞“基本上由...组成”和/或“由...组成”来描述。

[0051] 如本文使用的能量受体染料为能够接受经由来自供体(例如,化学激发的供体)的能量转移(ET)和将该能量转化成辐射(例如发光)的分子。一类示例性的受体染料为J-聚集的染料。

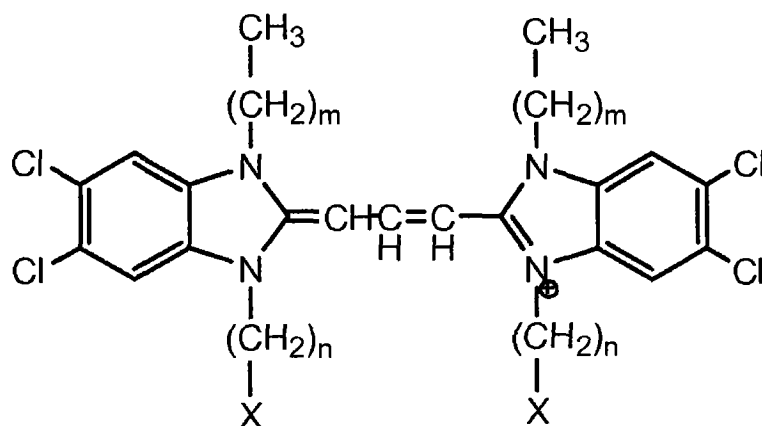
[0052] 如本文使用的化学激发的供体为可以被活化(例如,酶活化)以使其初始基能状态处于(populate)激发态片段的分子。所述片段能够将其激发态能量转移至受体分子,同时其退回至基态能水平。

[0053] 如本文使用的分子过滤器为干扰被检测信号的屏蔽(或淬灭)光发射的分子。分子过滤器的非限制性实例为血红蛋白,其屏蔽<600纳米的光发射和淬灭染料。干扰信号的光发射的一个实例是自身荧光(例如,来自生物试样的高能、蓝色背景发射)。

[0054] 如本文使用的J-聚集的染料是一种其中分子结合形成聚集体的染料,该聚集体具有红移的和比单体染料种类更窄的发射带宽的荧光发射。例如,一些花青染料J-聚集可以显著地红移荧光发射(即,从单体的530-550nm红移至J-聚集体的590-620nm),并且可以使发射带宽缩窄至约15nm(半宽度)。J-聚集的染料公开于:T.Kobayashi(ed.), "J-Aggregates", World Scientific Publishing Co., 1996;Whitten et al., "Stabilization of the Aggregation of Cyanine Dyes at the Molecular and Nanoscopic Level", "Langmuir", 2000, 16, 9042-9048; Mishra et al., "Cyanines During the 1990s: A Review", Chem. Rev. 2000, 100, 1973-2011;以及 von Berlepsch et al., "Effect of alcohols on J-aggregation of a carbocyanine dye", "Langmuir" 2002, 18, 7699-7705。

[0055] 如下给出J-聚集的花青染料的通式结构:

[0056]



[0057] 其中  $\times = \text{COO}^-$  或  $\text{SO}_3^-$ ,  $m$  为 0-9 的整数,  $n$  为 1-9 的整数。这些染料已经描述在文献中, 并且是市售可获得的 (例如, FEW Chemicals, Wolfen, Germany)。

[0058] 如本文使用的供体和受体部分之间的能量转移可以通过任何能量转移 (ET) 过程出现, 比如通过能量转移装置的接近相关部分的碰撞或通过非辐射过程比如能量共振转移 (RET)。应当理解, 在本申请中任何提及的能量转移都包括所有这些机械化不同的 (mechanistically-distinct) 现象。应当理解能量转移也可以通过没有描述的或仍然没有充分理解的机制出现。也应当理解能量转移可以同时和 / 或顺次通过超过一种能量转移过程出现, 并且可检测信号可以是测量两种或多种能量转移过程的活性。因此, 能量转移的机制不限于本发明中的。

[0059] 通常, 能量转移将通过单个供体部分和单个受体部分的作用出现, 但本发明不限于此。所述供体和受体部分可以作用, 使得一种或多种受体部分接受从一种或多种供体部分转移的能量。应当理解一旦化学激发的能量已经转移到第一个受体, 则该能量可以转移到第二个受体, 从而通过能量的级联从随后的供体到受体, 其中每个能量受体是下一个能量转移事件中的能量供体。

[0060] 如本文使用的“载体”可以与术语比如“固体载体”、“固相”、“表面”、“膜”或“树脂”可互换地使用。所有的“载体”都包括至少一个表面。表面可以使平面的、基本上平面的或者非平面的。

[0061] 载体可以由有机聚合物组成, 比如聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚氟乙烯、聚乙烯氧化物和聚丙烯酰胺, 以及任意前述物质的共聚物和接枝物。其它示例性的载体物质包括, 但不限于胶乳、聚苯乙烯、聚四氟乙烯 (PTFE)、聚偏氟乙烯 (PVDF)、尼龙、聚丙烯酰胺或聚(苯乙烯二乙烯基苯) (例如 **POROS**<sup>®</sup>) 珠粒。载体也可以是无机物, 比如玻璃、二氧化硅或孔径可控玻璃 (CPG)。载体的构型可以是珠粒、球形、微粒、颗粒、凝胶或膜的形式。合适载体的某些非限制性实例包括, 但不限于微粒、纳米颗粒、层析载体、膜或微孔 (microwell) 表面。载体可以是多孔的或无孔的, 并且可以具有膨胀或非膨胀特征。载体可以是刚性的, 或者可以是柔性的。载体可以装配成井状、凹陷或其它容器、器皿、部件 (feature) 或位置的形式。多个载体可以以阵列的形式被装配在不同位置, 所述位置对于自动递送试剂或通过检测方法和 / 或仪器是可寻址的。

[0062] 所述载体可以具有带电的、中性的、疏水性的或亲水性的表面。根据某些实施方案, 带电荷的载体表面可以起用于聚电解质多层 (PEM) 涂层、制备 (例如通过连续装配或带相反电荷的有机分子) 的载体的作用。聚电解质多层涂层公开在 Decher 等人编著的 "Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials", Wiley-VCH, (2003); Harris 等人的 "Synthesis of Passivating, Nylon-Like Coatings Through Cross-Linking of Ultrathin Polyelectrolyte Films," J. Am. Chem. Soc., 1999, 121:1978-1979; 和美国专利申请公布 No. 2002-053514A1 中。例如, 可以使用疏水性吸附作用“涂层”聚苯乙烯珠粒。也可以使用电荷相互作用、疏水性相互作用或这些作用的组合涂层载体。所述载体本身可以是化学发光的增强剂 (例如尼龙)。在某些情况下, 为了形成能够增强化学发光的构建物, 所述载体表面可以是直接衍生化的。例如, 可以通过部分季铵化 Merrifield 树脂 (即, 基于苯乙烯和与二乙烯基苯交联的氯甲基苯的共聚物的聚苯乙烯树脂) 中的氯甲基制备用于增强化学发光的衍生化载体。

[0063] 如本文使用的“结合载体”指共价连接载体表面的化合物或非常接近地保留在载体表面的化合物。所述化合物可以非常接近地保留在所述载体表面,例如:1) 通过与表面或其上放置的化合物的静电相互作用;2) 通过与表面或其上放置的化合物的疏水性相互作用;或3) 通过其组合。所述化合物可以通过包埋在覆盖所述载体表面的聚合物层(例如涂层)非常接近地保留在所述载体表面(例如美国专利 No. 5, 071, 909)。非常接近指:1) 在某些实施方案中,在表面的约**200Å**之内;2) 在某些实施方案中,在表面的约**150Å**之内;3) 在某些实施方案中,在表面的约**75Å**之内;或4) 在某些实施方案中,在表面的约**50Å**之内。

[0064] 根据某些实施方案,如上所述化学发光的增强物质、能量受体染料和一种或多种生物分子探针在所述载体的“表面上”。“表面上”指这些组分与所述载体的表面物理地接触或者与所述载体的表面保持非常接近。非常接近意味着:1) 在某些实施方案中,在表面的约**200Å**之内;2) 在某些实施方案中,在表面的约**150Å**之内;3) 在某些实施方案中,在表面的约**75Å**之内;或4) 在某些实施方案中,在表面的约**50Å**之内。在某些实施方案中,比如当用能量受体染料和/或化学发光的增强物质涂层所述载体的表面时,“表面”指用于确定组分是否与所述表面保持非常接近的目的的涂层和本体溶液定义的界面。在某些实施方案中,“表面”指用于确定组分是否与所述表面保持非常接近的目的的载体的表面。

[0065] 在某些实施方案中,所述组分可以直接地或间接地附着(例如,通过覆盖表面的插入层附着)于所述载体表面。所述附着可以是化学的(例如,离子或共价附着)或物理的或其某些组合。例如,可以将化学发光的增强物质涂层在载体表面上,并且可以用能量受体染料涂层得到的构建物。可选地,可以将能量受体染料涂层在载体表面上,并且可以接着用化学发光的增强物质涂层得到的构建物。

[0066] 在某些实施方案中,组分可以非常接近地保留在表面上(这是物理保持的一个实例)。例如,可以将组分包埋在薄的聚合物网络中,使得它们与其它化合物反应,但是不能自由地脱选出本体溶液(参见美国专利 No. 5, 071, 909)。

[0067] 如上所述,本发明提供灵敏的载体上的均相生物测定,其中定位酶翻转产生受体的定位化学激发,其可能与分析物俘获有关(即,确定分析物的存在和/或定量)。得到增强、波长-移位的发光信号容易与本体溶液中非特异性、未增强的、未移位的信号区别。

[0068] 本文描述的测定提供了更一般化的和简单化的测定平台。载体与其中出现分析物俘获的表面的尺寸的结合目的是提供一个微环境,该环境提供与本体溶液中非特异性发光信号不同的发光检测信号。具有受体染料的载体、发光增强剂和分析物俘获剂的组合能够产生发光检测信号,其可能与分析物俘获相关(用于鉴定和/或定量),并且与非特异性发光是可区别的。该测定是灵敏的,因为可以使用酶标记来提供信号放大。当标记的分析物俘获在表面上(以与酶标记的分析物竞争的形式,或者以与酶标记的检测剂夹心的形式)时,接近所述载体表面的化学发光的基质的酶活化引发能量转移(ET)信号产生,其与分析物俘获有关。接近进入本体溶液俘获事件的酶活化化学发光的基质的任何损失都会引起与ET信号不同的非特异性信号。因为来自与包含测定组件的载体上俘获事件相关的酶标记出现的发射,与来自本体溶液中未结合的、非特异性酶活性出现的发射之间的量子产量不同,因而不需要从载体中分离或洗涤过量的、非复合的酶标记的试剂。为了进一步减少非特异性光发射,可以在本体溶液中或固体载体上使用分子过滤器比如血红蛋白或淬灭染料。所

述波长-移位的、增强的信号可能与分析物俘获事件成比例。用更复杂的仪器设计(例如,内含波长特异性过滤器)完全消除可能出现的非复合酶活性的高能信号是可能的。然而,实际上,这通常将是非必需的。

[0069] 载体上的受体染色层、化学发光的增强剂层和俘获剂的组合不仅促进产生均相形式的微分信号,而且能够实现多路复用均相测定设计。例如,在均相形式中,所述测定可以包括:1)载体A,涂层有受体染料A、化学发光的增强剂和俘获试剂A;2)载体B,涂层有受体染料B、化学发光的增强剂和俘获剂B;和3)载体C,涂层有受体染料C、化学发光的增强剂和俘获剂C,等。一种多路复用、均相测定法描述在图7中。在多路复用、均相测定形式中,每种化学发光的增强剂和/或化学发光的基质可以相同或不同,取决于最佳的酶-基质-增强剂组合。受体染料A的发光将与受体染料B的发光是可区别的,两者都与受体染料C的是可区别的,依次类推。因为来自受体染料的信号是可测量的,在所述多路复用测定中使用的化学发光的增强剂和/或化学发光的基质是否相同或不同没有关系。

[0070] 在某些实施方案中,在载体上实施的均相测定可以包括J-聚集的花青染料、聚合的鎘化学发光的增强剂、水解酶标记和化学发光的二氧杂环丁烷基质的受体染色层。在载体上俘获的酶标记的分析物引起J-聚集的染色层的定位化学激发。

[0071] 该化学发光的均相测定具有一些优点。例如,化学激发引发的J-聚集的染料发光降低了噪音,不需要外部激发光源,并且可以提供超出任何二氧杂环丁烷分解引起的显著地红移的信号和典型的与生物学和细胞物质有关的自身荧光频宽。使用J-聚集的染料作为能量转移(ET)受体提供了显著地红移检测信号。因此,电流比率计数据收集不是必需的。另外,与溶液中可能出现的未增强的、非特异性二氧杂环丁烷分解相比,在分析物俘获的位点,载体上ET信号的优先增强进一步减少了电流比率计测量的需要。为了进一步减少非特异性光发射,可以在本体溶液或固体载体上使用分子过滤器比如血红蛋白或淬灭染料。作为基于市售光度计的所有光测量的信号检测测定避免了在早期ET-基生物测定中描述的基于常规双重光倍增管(PMT)光度计的繁琐电流比率计测量。{参见,例如,Patel等人,“Chemiluminescence Energy Transfer: A New Technique Applicable to the Study of Ligand-Ligand Interactions in Living Systems”, *Analyt. Biochem.* 129: 162-169(1983); patel等人,“Homogeneous Immunoassay Based On Chemiluminescence Energy Transfer”, *Clin. Chem.* 29/9, 1604-1608(1983); Williams等人,“A Homogeneous Assay For Biotin Based On Chemiluminescence Energy Transfer”, *Analyt. Biochem.*, 155: 249-255(1986)}。也可以使用酶标记代替定向化学发光的基质标记来扩增检测信号,以增加检测灵敏度范围。本文中描述的测定,例如可以证实3个数量级的动态范围,并且最佳化测定可以进一步增加一般ET均相测定设计中的分析物检测敏感度(参见,图4和实施例B)。

[0072] 本文描述的测定系统能够通过将活化的化学发光的基质(即,化学激发态供体)能量转移(ET)到染料受体(例如,荧光受体染料和/或J-聚集的染料)来检测载体表面上存在的(例如俘获的)分析物。染料受体的波长-移位发射特性使设计的生物测定系统提供来自典型生物分子的或细胞的背景荧光红移的非连续检测信号。一个具体实例是使用J-聚集的染料,其提供快速的、窄的、非连续的、显著地从自身荧光红移的检测信号。

[0073] 一般的测定法设计可以提供任一种化学发光的酶底物(例如,二氧杂环丁烷、吡

啶鎓酯 (acridinium ester)、吡啶鎓磺酰亚胺 (acridinium sulfonimide)、9,10-二氢化吡啶、9,10-二氢吡啶烯醇磷酸酯、荧光素或鲁米诺) 和化学发光的表面信号增强剂, 该酶底物和表面信号增强剂能适应载体表面的带电环境, 以使分析物信号的产生和鉴别最佳化。例如, 所述测定系统可以包括用化学发光的增强聚合物和染料涂层的载体, 其中所述载体包括一种或多种适于俘获分析物的表面结合生物分子探针。当俘获分析物时, 可以通过化学发光的信号, 例如来自自由酶标记或酶分析物引起化学激发的二氧杂环丁烷片段来检测该事件。俘获的分析物引起的化学发光信号容易与非特异性信号区别, 因此, 期望的信号是波长-移位的和增强的, 以及由所述载体“表面上”的受体染料发射的。这与由本体溶液发射的非波长移位的和未增强的非特异性信号形成比较。该测定可用于鉴定和 / 或定量俘获的分析物。

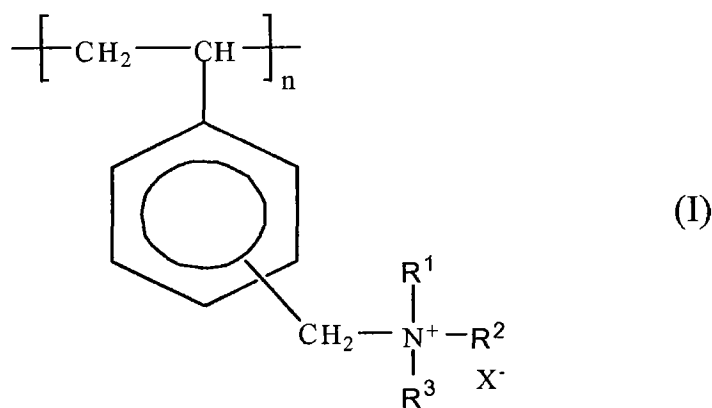
[0074] 该生物测定系统可以使用波长为约 460nm 至 590nm 的化学激发, 其以能量转移的模式引起受体染料的发射红移。波长为约 460nm 的化学激发引起 J-聚集的染料以约 610nm 的波长发射的一个实例引起约 150nm 的 Stokes 移位。该大的 Stokes 移位能够简化信号检测和定量, 其中信号定量可以作为基于市售可获得的光度计的所有光测量, 而不需要基于常规光度计的对偶滤波器读数或双重光倍增管 (PMT) 读数, 并且不需要转化为电流比率计数数据。通过优先增强对应于表面-结合 (即俘获的) 分析物的信号, 可进一步有助于作为所有光阅读的简化的数据收集。

[0075] 所述化学发光的增强物质可以是水相容性合成的或天然存在的物质, 对于由酶活化极性介质 (即, 由作为溶剂的水或水及其它大量或全部极性物质组成的介质, 所述极性物质比如甲醇、乙腈、二甲亚砜、二甲基甲酰胺等) 中化学发光的基质引起的发光片段, 该物质可以提供降低质子性 (protonicity) 的疏水性微环境。根据微环境的精确性质, 在所述化学发光的增强物质的存在下, 化学发光的信号和 / 或化学发光的信号噪音比可以较高, 因为所述化学发光的增强物质可以防止环境淬灭来自发光片段的化学发光发射。另外, 所述信号可以比单独的基本水性环境中更容易空间分解的 (spatially resolved), 因为化学发光的增强物质的存在可以最小化发光片段的扩散, 该扩散由酶活化来自所述位点的化学发光的基质引起, 酶反应存在于所述位点。

[0076] 所述化学发光的增强物质可以是具有疏水性区域的高分子球状蛋白质。所述球状蛋白质可以具有约 1,000 至约 800,000 道尔顿, 优选 40,000 至约 100,000 道尔顿的分子量, 根据十二烷基硫酸钠 (SDS) 凝胶电泳测定。示例性的球状蛋白质包括, 但不限于哺乳动物血清白蛋白, 比如牛血清白蛋白 (BSA) 和人血清白蛋白 (HAS), 以及哺乳动物免疫球蛋白 (IgG)、免疫球蛋白 E (IgE)、A 蛋白和抗生物素蛋白。

[0077] 所述化学发光的增强物质可以是合成大分子物质 (例如, 寡聚或聚合的化学发光的增强物质)。示例性的合成高分子化学发光的增强物质包括水溶性的或水相容的、溶剂可溶性聚合鎓盐。在现有技术中, 已经使用多种这类聚合物作为扩散转移照相系统中的媒染剂 (mordents) 或图像-接受层。所述鎓功能基可以位于聚合物 (紫罗烯) 的主链中, 或主链侧接的基团上。带正电荷的鎓功能基通常是基于氮、磷或硫; 然而, 可以使用任一种带正电荷的基团。可以使用任一种这些聚合物作为高分子化学发光增强物质。该大类物质的示例为具有下式的聚 (乙烯基苄基季铵盐):

[0078]



[0079] 在该式中,每个基团  $R^1$ 、 $R^2$  和  $R^3$  各自独立地代表:

[0080] 具有 1 至 20 个 (包括端点值) 碳原子的直链或支链未取代的烷基或链烯基 (例如,甲基、乙基、正丁基、叔丁基、鲸蜡基等);

[0081] 具有 1 至 20 个 (包括端点值) 碳原子的直链或支链烷基,其被一个或多个下述基团取代:羟基、烷氧基 (例如甲氧基、乙氧基、苄氧基或聚乙烯氧基)、芳氧基 (例如苯氧基)、氨基或取代的氨基 (例如乙酰氨基或胆甾醇基氧基羰基酰氨基) 或卤素或氟代烷或氟代芳基 (例如七氟丁基);

[0082] 具有 3 至 12 个环碳原子 (包括端值) 的未取代的单环烷基 (例如环己基或环辛基);

[0083] 具有 3 至 12 个环碳原子 (包括端值) 的取代的单环烷基,其被一个或多个下述基团取代:烷基、烷氧基、卤烷基或稠合的苯并基团 (例如二甲基环己基或四氢萘基);

[0084] 具有两个或多个稠环的多环烷基,每个环具有 5 至 12 个碳原子 (包括端值),其是未取代的或被一个或多个烷基、烷氧基或芳基取代的 (例如 1- 金刚烷基或 3- 苯基 -1- 金刚烷基);

[0085] 具有至少一个环和总共 6 至 20 个碳原子的芳基、烷芳基或芳烷基,其是未取代的或被一个或多个下述基团取代:烷基、芳基、卤素、氟代烷基或氟代芳基 (例如苯基、萘基、五氟苯基、乙基苯基、苄基、氯 - 或氟苄基或苯基苄基);

[0086] 至少两个上述 R 基团 (即  $R^1$ 、 $R^2$  或  $R^3$  基团) 与它们键合的四价原子一起形成具有 3 至 5 个碳原子 (包括端值) 和 1 至 3 个杂原子 (包括端值) 的饱和的或不饱和的、未取代的或取代的含氮、氮和含氧、或氮和含硫环,其可以是苯并环的,例如 1- 吡啶鎓、1-(3- 烷基或芳烷基) 咪唑鎓、吗啉鎓、烷基或丙烯基哌啶鎓、苯并噁唑鎓、苯并噻唑鎓、或苯并咪唑鎓基团。

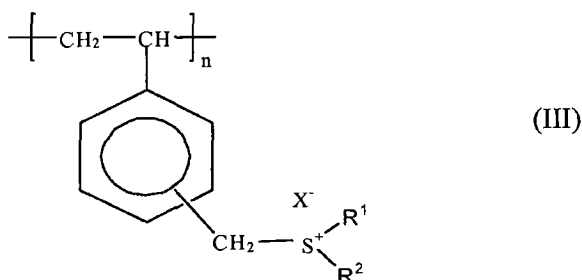
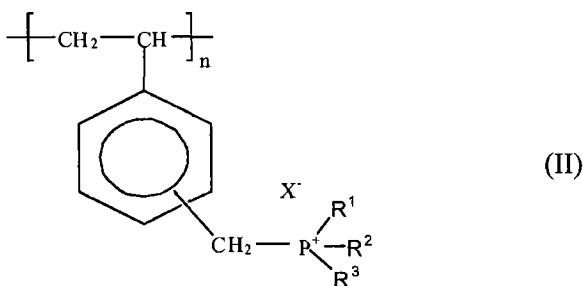
[0087] 所述符号  $X^-$  代表阴离子平衡离子,其可以包括单独的或组合的部分比如卤酸根 (例如,氯酸根或溴酸根)、硫酸根、烷基磺酸根 (例如甲磺酸根)、三氟甲磺酸根、芳基磺酸根 (例如对 - 甲苯磺酸根)、高氯酸根、烷羧酸根 (例如乙酸根)、芳基羧酸根、或荧光平衡离子 (例如荧光素或荧光素衍生物)、9,10- 二苯基蒽硫酸根、或罗丹明磺酸根 (sulforhodamine) 衍生物。

[0088] 所述符号 n 可以代表使聚 (乙烯基苄基) 季铵盐的分子量为约 8,000 至 1,000,000 或以上的数字,所述分子量根据低角度激光散射 (LALLS) 技术测定。

[0089] 可用作化学发光的增强物质的其它示例性的聚合鎓盐包括下式中描述的磷鎓或

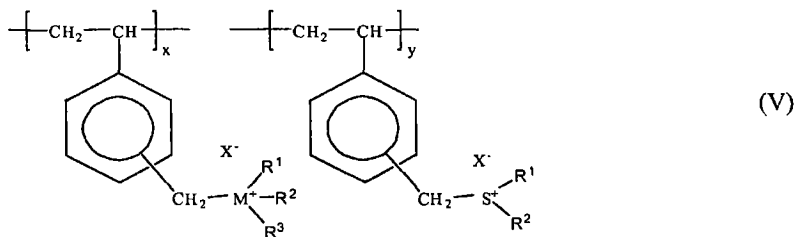
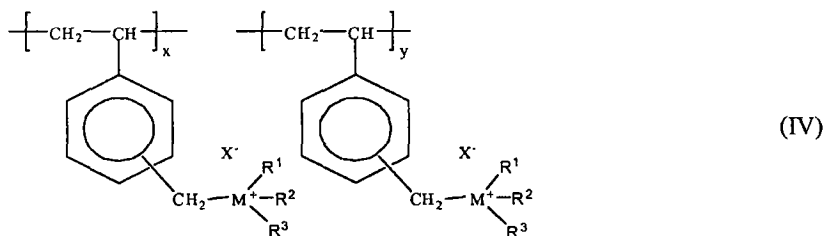
铈鎘聚合物,其中基团 R、X<sup>-</sup> 和 n 的定义为上述给出的。

[0090]



[0091] 而且,包含两个或多个不同的侧链鎘基的共聚物也可用作化学发光的增强物质。这些可以是无规共聚物或嵌段共聚物,其可以使用本领域公认的方法合成。这些共聚物可以包括下述式 IV 或式 V 中显示的重复单元的组合:

[0092]

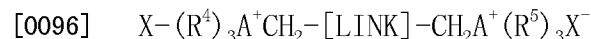


[0093] 在上式中, M 可以是氮或磷。各个 R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 基团或各个 X<sup>-</sup> 为如上定义的。在式 IV 中, 在一个侧链鎘部分中的一个或多个 M、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 或 R<sup>3</sup> 取代基与在其它侧链鎘部分中的相应取代基不同。所述符号 x 和 y 代表所述共聚物包括的独立单体的摩尔分数。因此, 所述符号 x 和 y 可以各自不同, 为 0.01 至 0.99, x 和 y 的总和等于 1。

[0094] 其中一个单体为烯类不饱和鎘单体而其它 (或其它的) 为电荷 - 中性的共聚物或嵌段共聚物也可以用作化学发光的增强物质。这些及能够提供增强来自化学发光的种类比如酶 - 活化的 1,2- 二氧杂环丁烷的光发射的其它高分子可以在美国专利 Nos. 5, 145, 772

和 5,827,650 中找到。将这两篇专利的全部内容都引入本文作为参考。

[0095] 也可以使用二阳离子表面活性剂作为化学发光的增强物质。这些二阳离子表面活性剂可以是下式代表的：



[0097] 其中：各个 A 独立地选自磷和氮原子；

[0098]  $X^-$  为阴离子平衡离子；

[0099] 各个  $R^4$  和  $R^5$  独立地选自未取代的和取代的包含 1 至 20 个碳原子的烷基和芳烷基，因此  $R^4$  和  $R^5$  可以相同或不同；和

[0100] [LINK] 为选自下述的碳链：包含 4 至 20 个碳原子的二亚烷基芳基、芳基、亚烷基、亚烯基和亚炔基。可以用作化学发光的增强剂的二阳离子表面活性剂描述在美国专利 No. 5,451,347 中，将其全部内容引入本文作为参考。

[0101] 除了前述聚合物之外或代替其，可以用作增强剂物质的其它水溶性的寡聚、均聚和共聚物质包括：

[0102] 聚-N-乙烯基噁唑烷酮；

[0103] 聚乙烯氨基甲酸酯（例如聚乙烯丙烯基氨基甲酸酯）；

[0104] 聚羟基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯 [例如，聚（ $\beta$ -羟乙基）甲基丙烯酸酯和聚乙二醇单甲基丙烯酸酯]；

[0105] 用烷基化或芳基烷基化试剂季铵化的含胺低聚物（例如 Jeffamines）；

[0106] 合成多肽（例如聚赖氨酸或苯丙氨酸）；

[0107] 聚乙烯烷基醚（例如聚乙烯甲醚）；

[0108] 多元酸及其盐 [例如聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚乙烯基苯甲酸、聚乙烯基磺酸、聚丙烯酸氨基甲基丙烷磺酸、聚马来酸和聚（N-乙烯基琥珀酰胺酸）]；

[0109] 来源于氨或环状和非环状伯胺或仲胺的聚丙烯酰胺和聚甲基丙烯酰胺；

[0110] 聚乙烯醇和聚乙烯醇与乙酸乙烯酯、乙烯等的共聚物；

[0111] 聚 2-、3- 或 4- 乙烯基吡啶鎓盐，其中杂环氮原子键合如对于上述式 I 中的  $R^1$ 、 $R^2$  和  $R^3$  定义的基团；

[0112] 聚乙烯烷基吡咯烷酮（例如聚乙烯甲基吡咯烷酮）；

[0113] 聚乙烯烷基噁唑烷酮（例如聚乙烯甲基噁唑烷酮）；

[0114] 支链聚乙烯亚胺、酰化的支链聚乙烯亚胺或进一步用烷基或芳烷基季铵化的酰化的支链聚乙烯亚胺；

[0115] 来源于氨或环状和非环状伯胺或仲胺的聚 N- 乙烯胺、及其季铵盐；

[0116] 聚乙烯哌啶；或

[0117] 聚丙烯酰基、聚甲基丙烯酰基或 4- 乙烯基苯甲酰基胺化酰亚胺或聚乙烯苄基胺化酰亚胺，其中带正电荷氮原子上的其它取代基可以是上式 I 中定义的  $R^1$ 、 $R^2$  和  $R^3$  基团中的一个。

[0118] 上述寡聚或聚合化学发光的增强物质可以具有上述对于式 I 的聚（乙烯基苄基季铵盐）给出的范围内的分子量。

[0119] 带正电荷水溶性或水相容性溶剂可溶性小分子鎓盐也可以用作化学发光的增强物质，以增强载体上的化学发光信号。所述小分子鎓盐可以具有在氮、磷或硫上带正电荷的

鎊基,或者包括结构中任何其它带正电荷基团。所述平衡离子可以包括单独或组合的部分,比如卤酸根(例如,氯酸根或溴酸根)、硫酸根、烷基磺酸根(例如甲磺酸根)、三氟甲磺酸根、芳基磺酸根(例如对-甲苯磺酸根)、高氯酸根、烷羧酸根(例如乙酸根)、芳基羧酸根或荧光平衡离子。

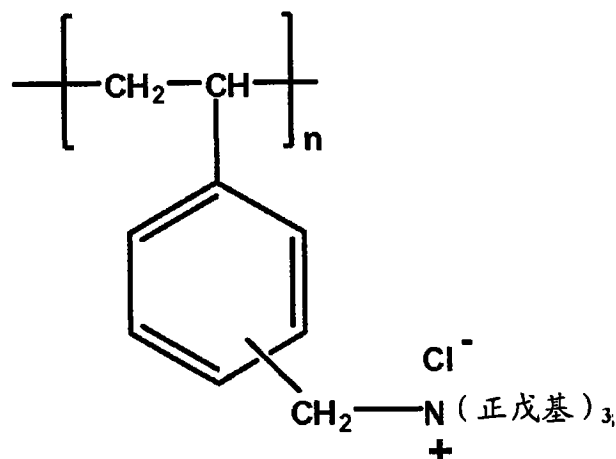
[0120] 可以通过使用如在美国专利 No. 5, 547, 836 中描述的化学发光的增强添加剂调节如上所述聚合物的化学发光的增强作用。可以在将所述化学发光的增强物质应用于表面之前或之后,将所述化学发光的增强添加剂应用于载体表面。可选地,可以将所述化学发光的增强添加剂与化学发光的增强物质混合,并将得到的混合物应用于载体表面。

[0121] 所述化学发光的增强添加剂可以改善化学发光的增强物质形成疏水性区域的能力,在疏水性区域中,在不存在水下,可以分离二氧杂环丁烷氧离子和得到的放射体,使其分解和化学发光,因而减少了其引起的光淬灭反应。所述增强添加剂可以从多种化合物中任一种得到。示例性的增强添加剂包括表面活性剂(例如洗涤剂)、带负电的盐和溶剂。表面活性剂可以改善化学发光的增强物质形成相对稳定的疏水性区域的能力。表面活性剂可以是阳离子的、阴离子的、两性离子的或中性的。当加入到溶液中时,其似乎改善增强物质分离活性二氧杂环丁烷种类,和在任何情况下引起化学发光信号进一步增强的另一类型的增强添加剂包括带负电的盐。在极低浓度下也有活性的第三类型的增强添加剂为疏水性溶剂,包括,但不限于醇类。

[0122] 第四个有效类型的增强添加剂为非四价水溶性聚合物,比如聚(2-乙基-2-噁唑啉(PolyO<sub>x</sub>))。虽然这些聚合物自身可以引起化学发光信号的有限增强,而没有增加背景噪声,但是使用非-四价水溶性聚合物与聚合四价鎊盐的组合可以改善载体比如微点阵上的化学发光信号。可以通过独立地混合一种或多种增强物质(例如球状蛋白质、合成鎊或非鎊聚合物或共聚物)和一种或多种增强添加剂获得化学发光信号和信号噪声比(S/N)的进一步完善。

[0123] 所述化学发光的增强聚合物可以是 TPQ 聚合物,其具有如下列出的结构。

[0124]



[0125] 其它示例性化学发光的增强聚合物包括,但不限于

[0126] 聚(乙烯基苄基二甲基苄基氯化铵)(BDMQ),

[0127] 聚(乙烯基苄基三甲基氯化铵)(TMQ),

[0128] 聚(乙烯基苄基三丁基氯化铵)(TBQ),

[0129] 聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷鎓)(TB),

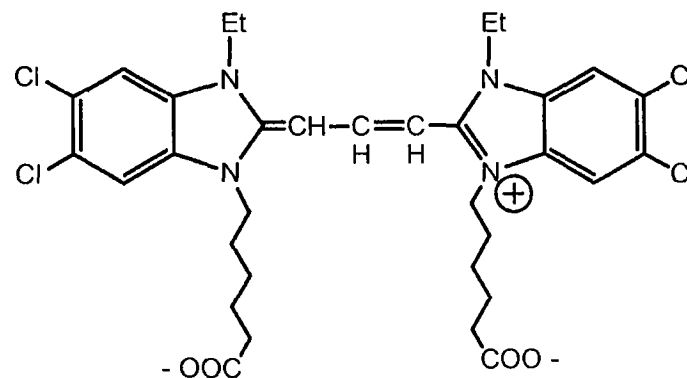
[0130] 聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷鎓)(TO)及其共聚物。

[0131] 所述受体染料可以选自具有其单峰激发态比化学发光的基质的激发态更低能量的任一种荧光化合物。从化学发光的基质至受体染料能量共振转移引起红移发射。受体染料的实例包括,但不限于:荧光染料、芳香化合物包括萘类、蒽类、芘类、联苯类;吡啶;香豆素类;咕吨类;酞菁类;1,2-二苯乙烯类;呋喃类、噁唑类、噁二唑类;和苯并噻唑类。可以用作能量受体染料的示例性的染料也公开在 U. S. 专利 Nos. 6, 028, 190 ;6, 335, 440B1 ; 6, 849, 745B2 ;和 7, 169, 939B2 中。

[0132] 所述染料可以选自能够在载体表面上形成 J-聚集体的染料(例如花青类)。所述染料在载体表面上形成 J-聚集体的能力使其可用于均相化学发光的试验设计。J-聚集的染料显示出非常特征性窄带(例如 15-20nm fwhm),和来自单体染料发射(例如约 530nm)、二氧杂环丁烷发射(例如约 460nm 至 590nm)和生物分子或细胞的背景发光(例如约 350nm)的显著地发射红移(例如约 80-250nm)。

[0133] 所述花青染料可以是阴离子花青染料。所述阴离子花青染料可以具有如下列出的结构:

[0134]



[0135] 所述载体可以具有用阳离子化学发光的增强物质(例如具有带正电荷的鎓基的阳离子均聚物或共聚物)涂层的带负电的表面。如果所述载体具有带负电的表面,则可以用阳离子化学发光的增强物质涂层该带负电的表面。然后,可以用阴离子受体染料涂层得到的构建物。可选地,如果所述载体具有带正电荷的表面,则可以用阴离子受体染料涂层该表面,接着用阳离子化学发光的增强物质涂层。为了获得载体表面上染料和增强剂的有效多层涂层,在载体上涂层染料和增强剂层的顺序,和染料和增强剂的物理性质(即带电荷和/或疏水性)可以变化。

[0136] 在某些实施方案中,可以将受体染料和化学发光的增强剂混合在单层中,或者将其与载体结合成一体。包括化学发光的增强剂和染料的示例性制剂公开在美国专利 No. 5, 145, 772 中。在某些实施方案中,所述受体染料和/或化学发光的增强剂可以被俘获聚合物网络中。当所述化学发光的增强剂为聚合物时,可以配制所述增强剂形成表面上的薄涂层,并且包埋所述受体染料或改良形式的受体染料。例如,可以将受体染料标记的肽包埋在包括聚合化学发光的增强剂的层中。包埋肽的方法公开在美国专利 No. 5, 071, 909 中。例如,染料可以连接多肽,可以使用在美国专利 No. 5, 071, 909 中公开的方法包埋得到的构建物。

[0137] 所述分子过滤器可以是屏蔽或淬灭干扰要检测的信号的光发射的任何分子。分子过滤器的实例包括,但不限于血红蛋白和淬灭染料,比如 dabcy1、DPX(Invitrogen#X1525)和 DNP C2 胺 (Anaspec#81821)。可以使用屏蔽或淬灭干扰要检测的信号的光发射的任何分子。

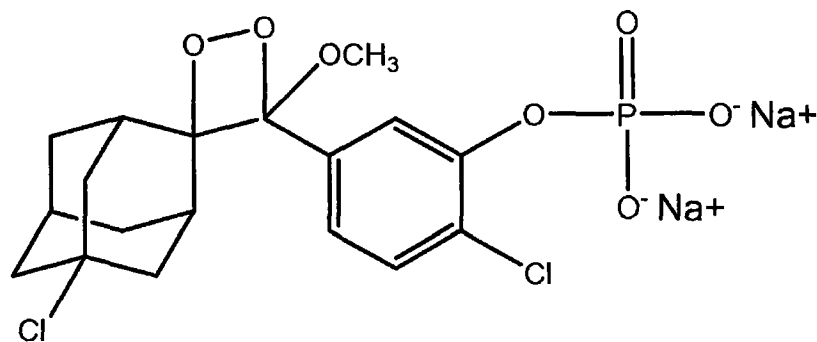
[0138] 所述生物分子探针可以是或者可以包括包括抗体、多核苷酸、寡核苷酸、多肽、蛋白质、受体、凝集素和 / 或适体。在某些实施方案中,所述生物分子探针包括一种探针,其中该探针为抗体、多核苷酸、寡核苷酸、多肽、蛋白质、受体、凝集素和 / 或适体。

[0139] 所述酶分析物或酶标记可以是能够活化化学发光的基质的任何酶。实例为氧化酶,比如辣根过氧化酶,和水解酶,包括但不限于碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡糖醛酸糖苷酶和神经氨酸酶。在免疫测定的情况下,当俘获分析物时,可以用以夹心测定形式附着于检测器抗体或附着于俘获分析物的水解酶标记来检测该俘获事件。

[0140] 当使用二氧杂环丁烷作为化学发光的基质时,裂解可能是由水解酶活化引发。利用该事件,所述化学发光的基质的势能(例如,二氧杂环丁烷基质的四元过氧化物环的势能)被释放,以激发芳基酯片段至单峰激发态。该单峰激发态片段弛豫至基态转移能量至载体表面上的近侧受体染料(例如 J-聚集的染料),然后,其可发光。如果所述能量受体为 J-聚集体,则发射缩窄并红移。

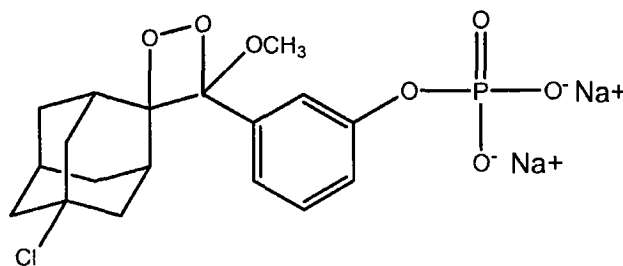
[0141] 如上所述,所述化学发光的基质可以为 1,2-二氧杂环丁烷基质。例如,1,2-二氧杂环丁烷化学发光的基质可以为 CDP-**Star**<sup>®</sup>,可从 Applied Biosystems 获得。CDP-**Star**<sup>®</sup>具有化学名称 2-氯-5-(4-甲氧基螺环{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯代)-三环[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]癸烷}-4-基)-1-苯基磷酸二钠,其结构如下:

[0142]



[0143] 1,2-二氧杂环丁烷化学发光的基质可以是 **CSPD**<sup>®</sup>,其也可以从 Applied Biosystems 获得。**CSPD**<sup>®</sup>具有化学名称 3-(4-甲氧基螺环{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯代)-三环[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]癸烷}-4-基)-1-苯基磷酸二钠,其结构如下:

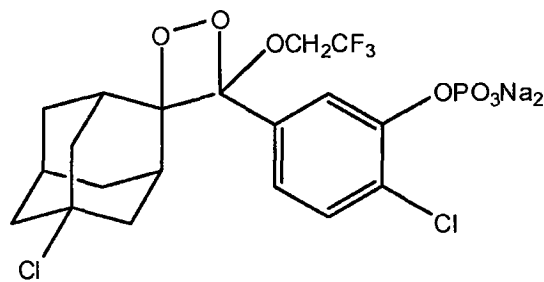
[0144]



[0145] 1,2-二氧杂环丁烷化学发光的基质可以为 TFE-CDP-**Star**<sup>®</sup>,其也可以从 Applied

Biosystems 获得,其具有如下所述化学结构:

[0146]



[0147] 前述的 1,2- 二氧杂环丁烷化学发光的基质仅仅为示例性的,可以使用其它 1,2- 二氧杂环丁烷基质。

[0148] 测定中的分析物可以是任何感兴趣的分析物,所述测定中存在已知所述分析物特异性结合的化合物(即探针或生物分子探针)。例如,所述分析物可以是酶。可选地,所述分析物可以是酶标记的化合物,或者当分析物结合载体上的探针时,其结合分析物的酶标记的生物分子。在某些实施方案中,所述分析物可以是未标记的,并且可以与已经加入到样品中的酶标记的分析物竞争结合载体表面上的生物分子探针。

[0149] 所述酶标记可以是碱性磷酸酶。所述化学发光的基质可以是 **CSPD<sup>®</sup>** 或 **CDP-Star<sup>®</sup>**,所述酶标记可以是碱性磷酸酶。

[0150] 还提供一种用于检测样品中多种分析物的方法。所述方法包括用第一制品接触样品,所述制品包括:具有表面的载体;所述载体表面上的第一化学发光的增强物质;所述载体表面上的第一能量受体染料;包括能够结合第一分析物的第一探针的载体-结合的第一生物分子探针。根据该方法,当存在于样品中时,第一探针结合第一分析物。

[0151] 所述方法还包括用第二制品接触样品,所述制品包括:具有表面的载体;所述载体表面上的第二化学发光的增强物质;所述载体表面上的第二能量受体染料;包括能够结合第二分析物的第二探针的载体-结合的第二生物分子探针。根据该方法,当存在于样品中时,第二探针结合第二分析物。

[0152] 然后,样品中的第一和第二分析物分别结合第一和第二探针。

[0153] 对于使用酶扩增的测定,可以应用下述条件之一:(a) 第一分析物为第一酶,(b) 用第一酶标记第一分析物,(c) 用第一酶标记的生物分子(并且当第一分析物结合在载体表面上的第一探针时,其能够结合第一分析物)接触第一制品的载体表面;或(d) 第一分析物为未标记,和将第一酶标记的第一分析物加入到样品中,以使样品中的酶-标记的第一分析物与未标记的第一分析物竞争结合第一制品的第一探针。对于第二分析物、第二酶、第二探针和第二制品,可以应用相应的条件。

[0154] 在样品中的第一和第二分析物分别结合第一和第二探针之后,用第一酶活化的第一化学发光的基质接触第一制品。活化的第一化学发光的基质激发第一能量受体染料,引起其发射。类似地,用第二酶活化的第二化学发光的基质接触第二制品。活化的第二化学发光的基质激发第二能量受体染料,引起从其中发射。

[0155] 然后,检测来自第一能量受体染料的发射和来自第二能量受体染料的发射。来自第一能量受体染料的发射可以与来自第二能量受体染料的发射区别。

[0156] 在所述多路复用测定中,第一和第二化学发光的基质可以相同或不同。第一和第

二化学发光的增强物质也可以相同或不同。另外,可以同时或顺次用样品接触所述第一和第二制品。也可以同时或顺次用第一和第二化学发光的基质接触所述第一和第二制品。也可以同时或顺次检测来自第一能量受体染料的发射和来自第二能量受体染料的发射。

[0157] 虽然如上描述了酶扩增,但是也可以使用化学发光的标记。特别地,可以用化学发光的标记来标记分析物。可选地,可以用化学发光的标记来标记的生物分子接触载体表面,当分析物结合载体上的探针时,所述生物分子结合所述分析物。作为进一步的选择,分析物可以是未标记的,并且可以将用化学发光的标记来标记的分析物加入到样品中,之后使样品中的分析物结合探针,从而与未标记的分析物竞争结合所述探针。然后,可以活化化学发光的标记。来自活化化学发光的标记的能量转移至载体上的能量受体染料引起发光,该发光可以被检测,并且可以使用其测定样品中分析物的存在和 / 或含量。

## 实施例

[0158] 根据下述实施例可以进一步理解本发明教导的方面,其不应被理解为以任何方式限制本发明教导的范围。

[0159] A. IgG-AP 测定

[0160] 因为一些原因,使用**POROS**<sup>®</sup>-A 作为载体,用于模型生物测定研究。A 蛋白-涂层的**POROS**<sup>®</sup>显示出整体弱的负表面电荷,其使得用阳离子聚合化学发光的增强剂比如 TPQ 涂层,接着用阴离子花青染料涂层(例如,形成**POROS**<sup>®</sup>/TPQ/花青染料构建物,比如图 1 中图解的一种)。基于容易在**POROS**<sup>®</sup>-HS 上引起 J- 聚集,其也具有整体负电荷,预期在**POROS**<sup>®</sup>-A 上涂层的阴离子花青染料也在载体表面上形成 J- 聚集集体。

[0161] 可以通过简单地一起培养 A 蛋白和 IgG,形成非常紧密地复合物 ( $K_a = 10^9 M$ ) 来进行 A 蛋白和 IgG 抗体结合 (Akerstrom 等人, " A Physicochemical Study of Protein G, a Molecule with Unique Immunoglobulin G-Binding Properties, " J. Biol. Chem., 1986, 261:10240-10247)。如果将用碱性磷酸酶标记的 IgG 抗体引入包含**POROS**<sup>®</sup>-A/TPQ/J- 聚集集体构建物的溶液中,则分析物(碱性磷酸酶)将被俘获在用 J- 聚集的花青和 TPQ 增强剂涂层的**POROS**<sup>®</sup>表面上。然后,基于在 J- 聚集的染料表面附近或之上出现的信号产生(例如,化学激发由激发态二氧杂环丁烷片段涂层的 J- 聚集的染料)的接近程度,进行分析物检测。为了获得有效地能量转移至 J- 聚集的花青涂层,所述化学激发的二氧杂环丁烷片段可以从 J- 聚集的组装距离 0 至 100 埃(即,0-10nm)范围内 (Lakowicz, " Principles of Fluorescence Spectroscopy", 第二版, Kluwer Academic/Plenum Press, 第 388 页)。

[0162] 如图 1 所示,由表面-俘获的碱性磷酸酶引起的二氧杂环丁烷 CDP-**Star**<sup>®</sup>的蓝色 460nm 能态经受表面 TPQ 增强和能量转移,产生在约 600nm 具有窄发射带宽的 J- 聚集集体发射。尽管可以观察到集中在 460nm 的某些蓝化学发光信号,但这被最小化,因为在水相中缺少聚合增强。对于均相测定,对于分析物检测和定量,仅仅可以测定红色荧光信号(590-620nm)。该信号可能与在**POROS**<sup>®</sup>-A 表面上发生的事件有关。

[0163] 在碱性磷酸酶作为分析物的均相测定中,使用**POROS**<sup>®</sup>-A/TPQ/J- 聚集的构建物。在将用碱性磷酸酶标记的 IgG 抗体引入包含**POROS**<sup>®</sup>-A/TPQ/J- 聚集集体的构建物的溶液中时,用 J- 聚集的花青和 TPQ 增强剂涂层的**POROS**<sup>®</sup>表面上的 A 蛋白俘获分析物(碱性磷酸

酶)。基于在 J- 聚集体的涂层表面附近或之上出现的信号产生（例如，化学激发由激发态二氧杂环丁烷片段涂层的 J- 聚集体）的接近程度，检测分析物。由表面 - 俘获的碱性磷酸酶引起的蓝色 460nm 二氧杂环丁烷 CDP-**Star**<sup>®</sup> 激发经受表面 TPQ 增强和能量转移，产生在约 600nm 具有窄发射带宽的 J- 聚集体发射。从低效率能量转移引起的任何蓝色化学发光信号（最大 460nm）被最小化，因为在水相中缺少聚合增强。对于均相测定，仅仅可以测定红色荧光信号（590-620nm）用于分析物检测和定量的测量。J- 聚集的染料在 **POROS**<sup>®</sup>-A 表面上产生的信号与 **POROS**<sup>®</sup>- 表面上发生的事件有关。

[0164] 在 Carey Eclipse 荧光计上，从 96- 微量滴定板测量从 CDP-**Star**<sup>®</sup> 到俘获在 **POROS**<sup>®</sup>-20A 表面上的花青 J- 聚集体的能量转移效率，作为红色 / 蓝色信号强度的比率。每个孔包含 10  $\mu$  l 的一系列 **POROS**<sup>®</sup>-20A/IgG-AP/TPQ 染料构建物在 BSA/PBS 中的 1 : 2 稀释液和 90  $\mu$  l 在 pH9.5 的 AMP 缓冲液中的 0.4mM CDP-**Star**<sup>®</sup> 的混合物。光谱和数据概括在下表中。

[0165]

POROS <sup>®</sup> -20A/IgG-AP/TPQ 染料构建物稀释液		1/2	1/32	1/64
Carey 检测器 (PMT)		700	1000	1000
CDP- <b>Star</b> <sup>®</sup>	$\lambda_{\max}$ (nm)	442	443	447
	强度 (a. u. )	8.5	62	55
J-聚集体	$\lambda_{\max}$ (nm)	615	597	598
	强度 (a. u. )	393	878	662
J-聚集体/CDP- <b>Star</b> <sup>®</sup> 强度的比率(红色/蓝色)		46	14	12

[0166] 强度比为来自 **POROS**<sup>®</sup> 20A/IgG-AP/TPQ/ 染料稀释液和 CDP-**Star**<sup>®</sup> 的。

[0167] 如在 597-615nm 存在主要的 J- 聚集体发射所显示的，能量转移效率良好。仅仅在较低稀释试验中在 442-447 纳米处检测到残留二氧杂环丁烷发射，但是强度比仍然很高（甚至在受体的 1/64 稀释液中，红色 / 蓝色强度比 = 12）。

[0168] 也进行了一系列试验，来确定在 **POROS**<sup>®</sup>-20A 构建物表面上分析物俘获 (IgG-alkPhos) 的相对检测曲线。通过用在 BSA/PBS 中的 **POROS**<sup>®</sup> 20A/TPQ/ 阴离子花青染料组装和在 pH 9.5 的 AMP-CI 缓冲液中的 0.4mM CDP-**Star**<sup>®</sup> 的标准混合物培养在 AMP 缓冲液中的一系列兔子抗小鼠 IgG-AP 稀释液来测定碱性磷酸酶的检出限。在有和没有 600nm 宽带滤波器的 Turner 光度计上，由所有化学发光信号生成检测曲线。

[0169] IgG-AP 检测测定的试验设计

[0170] **POROS**<sup>®</sup> 构建物的制备

[0171] 1. 移液 0.15ml (~ 25mg) 的 **POROS**<sup>®</sup>-20A 浆液，将其悬浮在 0.85ml 的 H<sub>2</sub>O 中。

[0172] 2. 离心并弃去上清液。

[0173] 3. 在 1ml 的 H<sub>2</sub>O 中洗涤珠粒 3 次。

- [0174] 4. 将珠粒悬浮在 1ml 的 TPQ 储备溶液 (2mg/ml H<sub>2</sub>O) 中。
- [0175] 5. 在板式搅拌器上培养 60 分钟。
- [0176] 6. 弃去上清液,并连续在 1ml 的水中洗涤珠粒两次,再在 1ml 的 40% MeOH/H<sub>2</sub>O 中洗涤 1 次。
- [0177] 7. 将珠粒悬浮在 40% 的 MeOH/H<sub>2</sub>O 中,并加入 20 μl 的染料储备溶液 (100mg/2ml MeOH)。
- [0178] 8. 包装在铝箔中,并在板搅拌器上培养 60 分钟。
- [0179] 9. 弃去橙色上清液,其在水溶液中形成粉红色乳剂。
- [0180] 10. 连续在 1ml 的水中和在 1ml 的 BSA/PBS 中洗涤粉红色珠粒 3 次。
- [0181] 11. 将最终珠粒悬浮在 1ml 的 BSA/PBS 中,并储存在冰箱中暗处。
- [0182] IgG-AP 结合测定
- [0183] 1. 制备一系列 1 : 10 的 IgG-AP 稀释液。
- [0184] 2. 将 10 μl 的 **POROS**<sup>®</sup> 构建物放置在试管中。
- [0185] 3. 将 10 μl 的 IgG-AP 稀释液加至试管中。
- [0186] 4. 在室温下,培养该混合物 10 分钟。
- [0187] 5. 加入 80 μl 的 0.4mM CDP-**Star**<sup>®</sup>。
- [0188] 6. 在室温下,轻轻地振摇该混合物 30 或 60 分钟。
- [0189] 7. 将试管放置在 37°C 的 Turner 光度计中,立即收集信号 10 分钟。
- [0190] 检出限 :1 : 100 百万稀释的 IgG-AP 得到 S/N > 2 (60 分钟的 0.4mM CDP-**Star**<sup>®</sup> 培养 ;没有过滤器读数 (no filters for readout))
- [0191] 当 CDP-**Star**<sup>®</sup> 的两次培养时间达到 60 分钟时,检出限 (S/N > 2) 改善了 10 倍,从 IgG-AP 的 1 : 10 百万稀释达到了 1 : 100 百万稀释。
- [0192] B. 竞争性 cAMP 测定
- [0193] 使用 J- 聚集体载体构建物提供用于 cAMP 的竞争性均相测定的载体。将 cAMP 抗体层压在 **POROS**<sup>®</sup>-A/TPQ/J- 聚集体构建物上,如图 2 所示。用 TPQ 增强剂和 J- 聚集的花青染料涂层所述 **POROS**<sup>®</sup>-A 表面。cAMP 抗体竞争俘获加入到样品中的分析物 (cAMP) 和 cAMP- 碱性磷酸酶结合物,如图 3 所示。基于在 J- 聚集体涂层表面附近或之上出现的信号产生 (例如,化学激发由激发态二氧杂环丁烷片段涂层的 J- 聚集体) 的接近程度,检测与 cAMP 分析物竞争的 cAMP- 碱性磷酸酶。
- [0194] 如从图 3 中可以看出,由表面俘获的碱性磷酸酶引起的蓝色 460nm 二氧杂环丁烷 CDP-**Star**<sup>®</sup> 激发经受表面 TPQ 增强和能量转移,产生在约 600nm 具有窄发射带宽的 J- 聚集体发射。从低效率能量转移引起的任何蓝色化学发光信号 (最大 460nm) 被最小化,因为在水相中缺少聚合增强。如图 4 所示,经过从 0.1-100 皮摩尔 / 孔的 3 个数量级检测 cAMP 分析物,所述图 4 为显示使用 40 μl 在 **POROS**<sup>®</sup> 构建物上的 cAMP 抗体和 1 : 50 稀释的 cAMP- 碱性磷酸酶结合物的均相 cAMP 测定标准曲线图。
- [0195] 图 5 为使用图 2 的构建物进行均相 cAMP-AP 测定的能量转移 (ET) 光谱。将所述 **POROS**<sup>®</sup>-A/cAMP 抗体 /TPQ/J- 聚集体构建物悬浮在 240 μl 包含 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液中,在室温下,用 10 μl 的 cAMP-AP 结合物 (过量) 培养 60 分钟。将 20 μl 得到的浆液放

置在 96-孔微量培养板中,并用 80  $\mu$ l 在 pH 9.5 的 AMP 缓冲液中的 0.4mM CDP-**Star**<sup>®</sup> 溶液处理。在 37°C 培养 30 分钟之后,用 SpectraMax M2 (MolecularDevices Corp.) 测量光谱。如可以从图 5 可见,发射峰高度的比率(红色在 600nm : 蓝色在 460nm) 大于 56 : 1。

[0196] 均相 cAMP 竞争性测定的试验设计

[0197] A. cAMP 构建物的制备

- [0198] 1. 移液 0.3ml (~ 50mg) 的 **POROS**<sup>®</sup>-20A 浆液,将其悬浮在 0.7ml 的 PBS 中。
- [0199] 2. 离心并弃去上清液。
- [0200] 3. 在 1ml 的 PBS 中洗涤珠粒 4 次。
- [0201] 4. 将珠粒悬浮在 1ml 的 PBS 中,并加入 40  $\mu$ l 的兔子 cAMP 抗体。
- [0202] 5. 在板式搅拌器上培养 60 分钟。
- [0203] 6. 弃去上清液,并连续在 1ml 的 PBS 中洗涤 5 次,再在 1ml 的 H<sub>2</sub>O 中洗涤 1 次。
- [0204] 7. 将珠粒悬浮在 1ml 的 TPQ 储备溶液 (2mg/ml H<sub>2</sub>O) 中。
- [0205] 8. 在板式搅拌器上培养 60 分钟。
- [0206] 9. 弃去上清液,并连续在每次 1ml 的水和在 20% 的 MeOH/H<sub>2</sub>O 中洗涤珠粒。
- [0207] 10. 将珠粒悬浮在 20% 的 MeOH/H<sub>2</sub>O 中,并加入 30  $\mu$ l 的染料储备溶液 (100mg/2ml MeOH)。
- [0208] 11. 包装在铝箔中,并在板式搅拌器上培养 60 分钟。
- [0209] 12. 弃去橙色上清液,其在水溶液中形成粉红色乳剂。
- [0210] 13. 连续在 1ml 的 H<sub>2</sub>O 中洗涤粉红色珠粒、在 1ml 的 BSA/PBS 中洗涤 3 次和在 1ml 的 Tris 缓冲液 (pH = 7.0) 中洗涤两次。
- [0211] 14. 将最终珠粒悬浮在 1ml 的 Tris 缓冲液中,并储存在冰箱中暗处。

[0212] B. cAMP 竞争性测定

- [0213] 1. 将 50  $\mu$ l/孔的一系列 cAMP 标准溶液的 1 : 10 稀释液和 25  $\mu$ l/孔的稀释 cAMP-AP 结合物加入到 96-微量滴定板的孔中,并在板式搅拌器上混合 10 分钟。搅拌器
- [0214] 2. 加入 5  $\mu$ l/孔的 **POROS**<sup>®</sup> cAMP 构建物。
- [0215] 3. 在板式搅拌器上培养 60 分钟。
- [0216] 4. 加入 60  $\mu$ l 的 0.4mM CDP-**Star**<sup>®</sup>,并在板式搅拌器上混合 10 分钟。
- [0217] 5. 将板放置在 29°C 的光度计 TR 717 中,在 20 和 50 分钟之后测量信号。

[0218] 图 6 为图解使用载体的夹心测定的示意图,所述载体包括表面、化学发光的增强剂(即 TPQ)、阴离子花青染料(例如 J-聚集体染料)、用于俘获样品中分析物的生物分子探针(即俘获抗体)和能够结合所述载体结合分析物的酶标记的抗体。如图 6 图解的,二氧杂环丁烷基质的酶的翻转产生活化的化学发光的基质,其分解产生光,该光通过能量转移(ET),使花青染料产生荧光。

[0219] 图 7 为描述一种多路复用、均相夹心测定的示意图。如图 7 所示,经由俘获的第一分析物(分析物 1)结合第一载体的第一酶(酶 1)活化化学发光的供体产生化学激发的供体,其通过能量转移使第一载体表面上的第一染料(染料 1)产生荧光。还如图 7 所示,经由俘获的第二分析物(分析物 2)结合第二载体的第二酶(酶 2)活化化学发光的供体产生化学激发的供体,其通过能量转移使第二载体表面上的第二染料(染料 2)产生荧光。来自第二染料的荧光发射可以与来自第一染料的发射不同。因此,可以同时或顺次检测样品中

的多种分析物。

[0220] 虽然前述说明书教导了本发明的原理,以及提供了用于说明目的的实施例,本领域技术人员应当理解,通过阅读本发明公开的内容,在没有背离本发明的真实范围之内,可以进行形式和细节的各种改变。

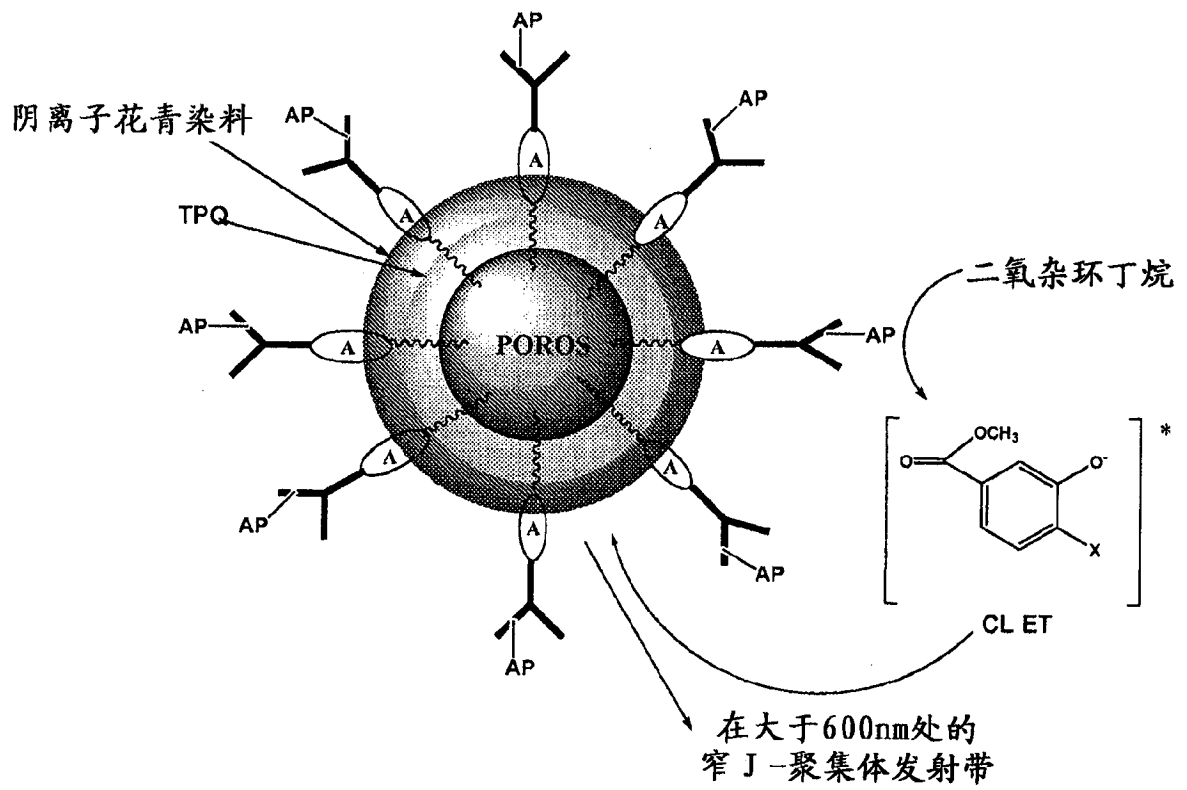


图 1

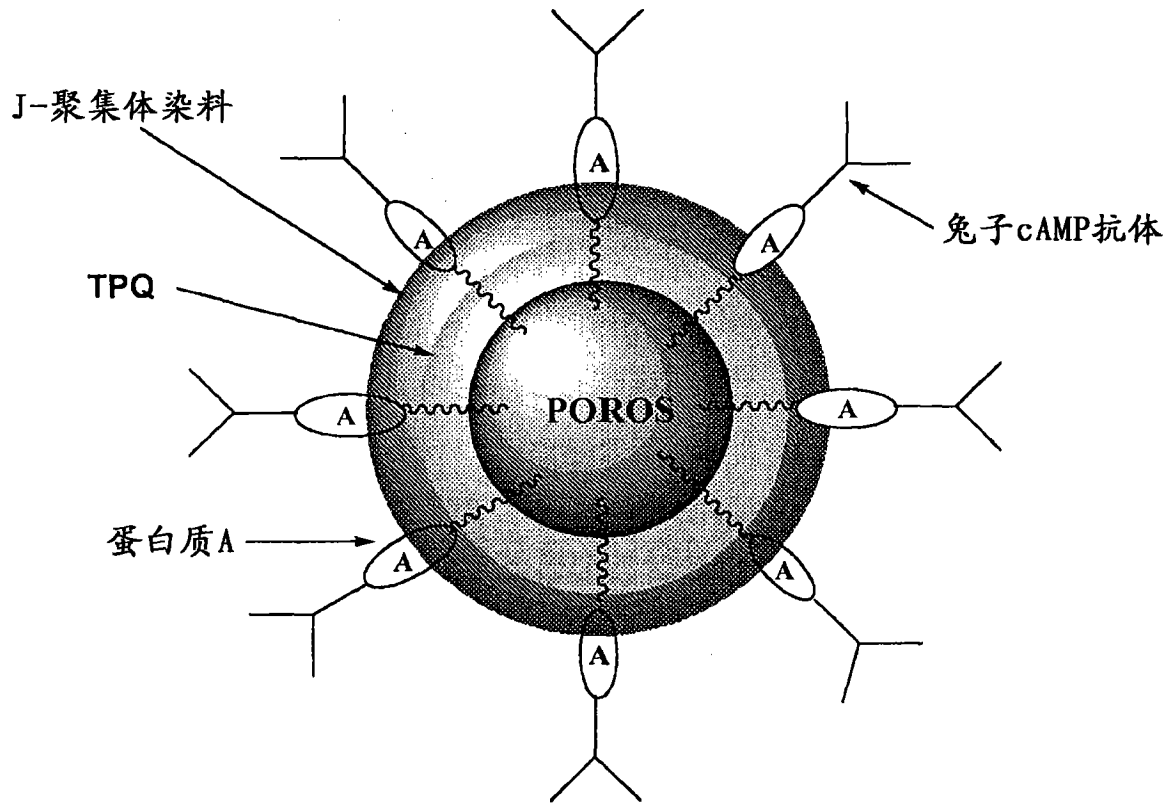


图 2

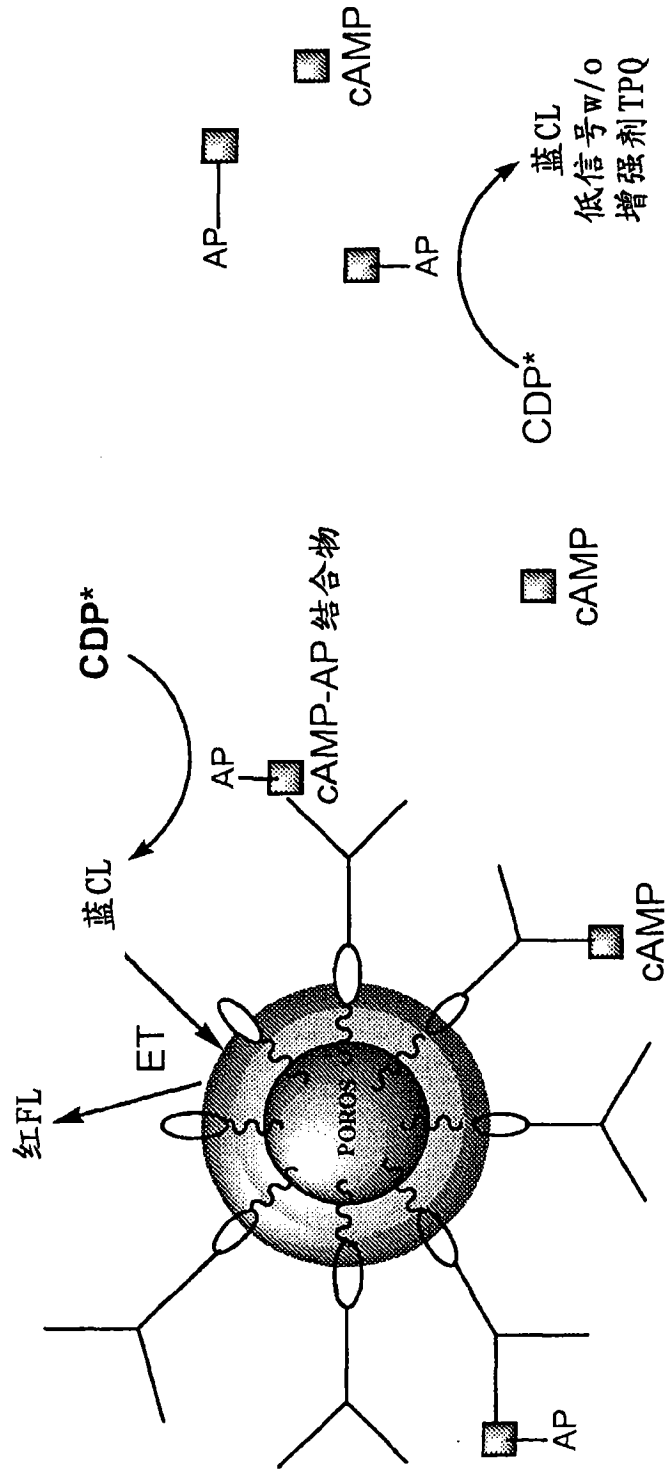


图 3

均相cAMP测定的标准曲线: 在POROS构建物上的  
40  $\mu$ l cAMP抗体和1: 50稀释度的cAMP-AP结合物

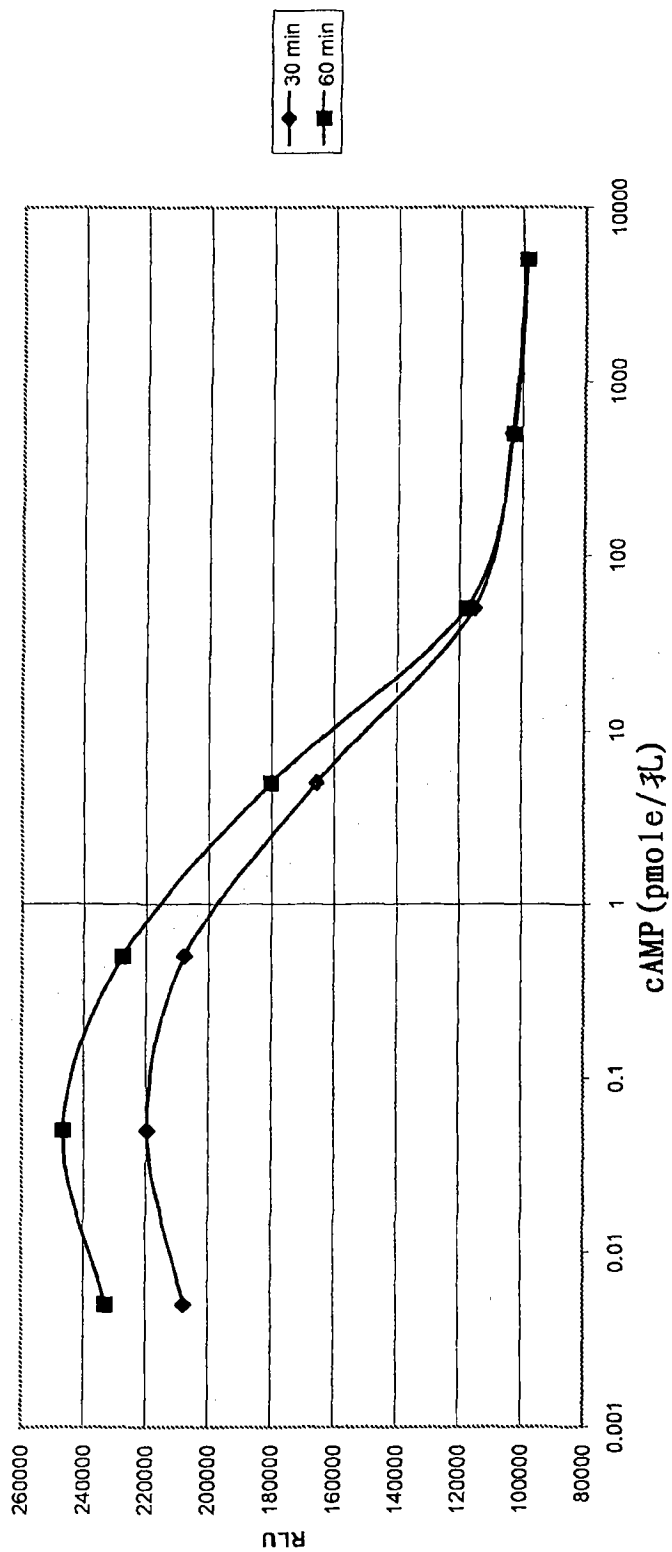


图 4

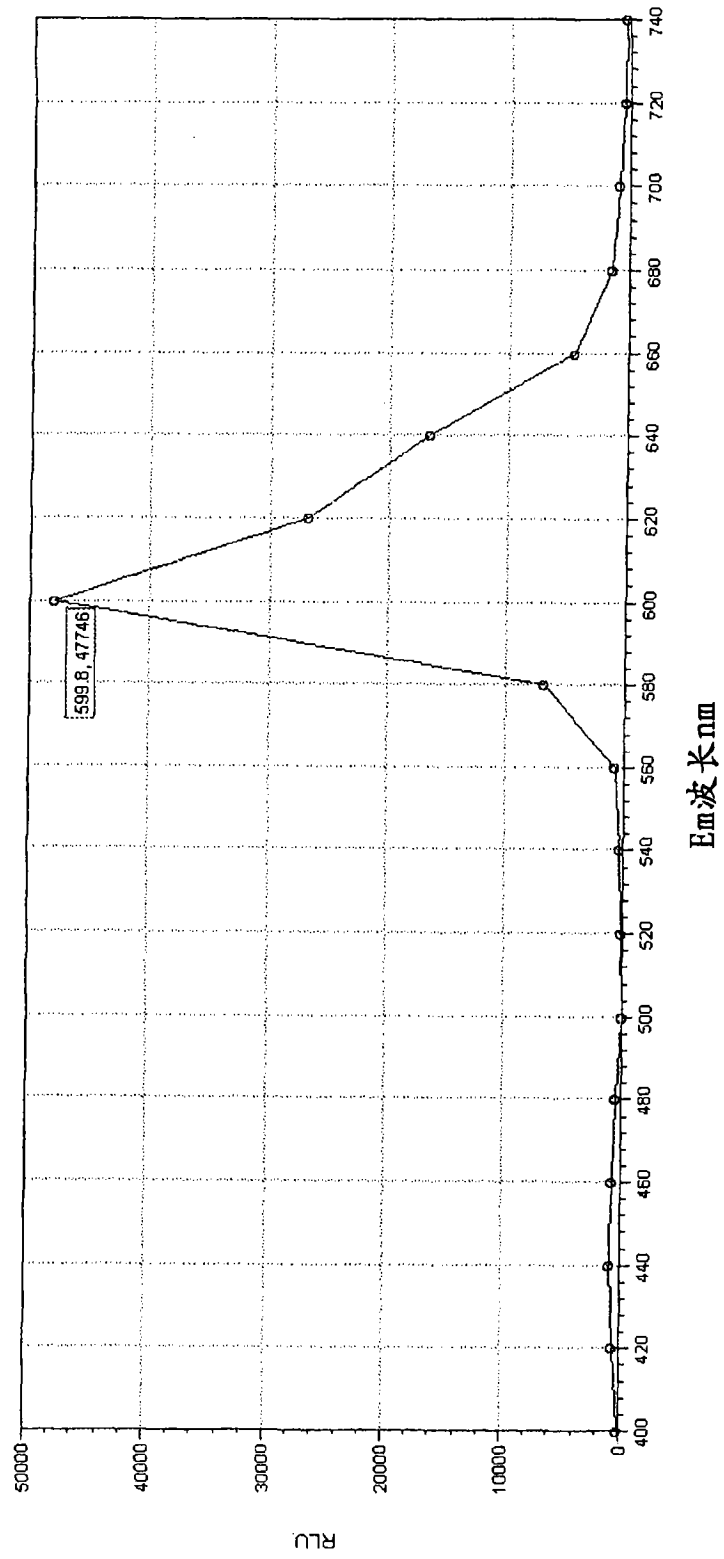


图 5

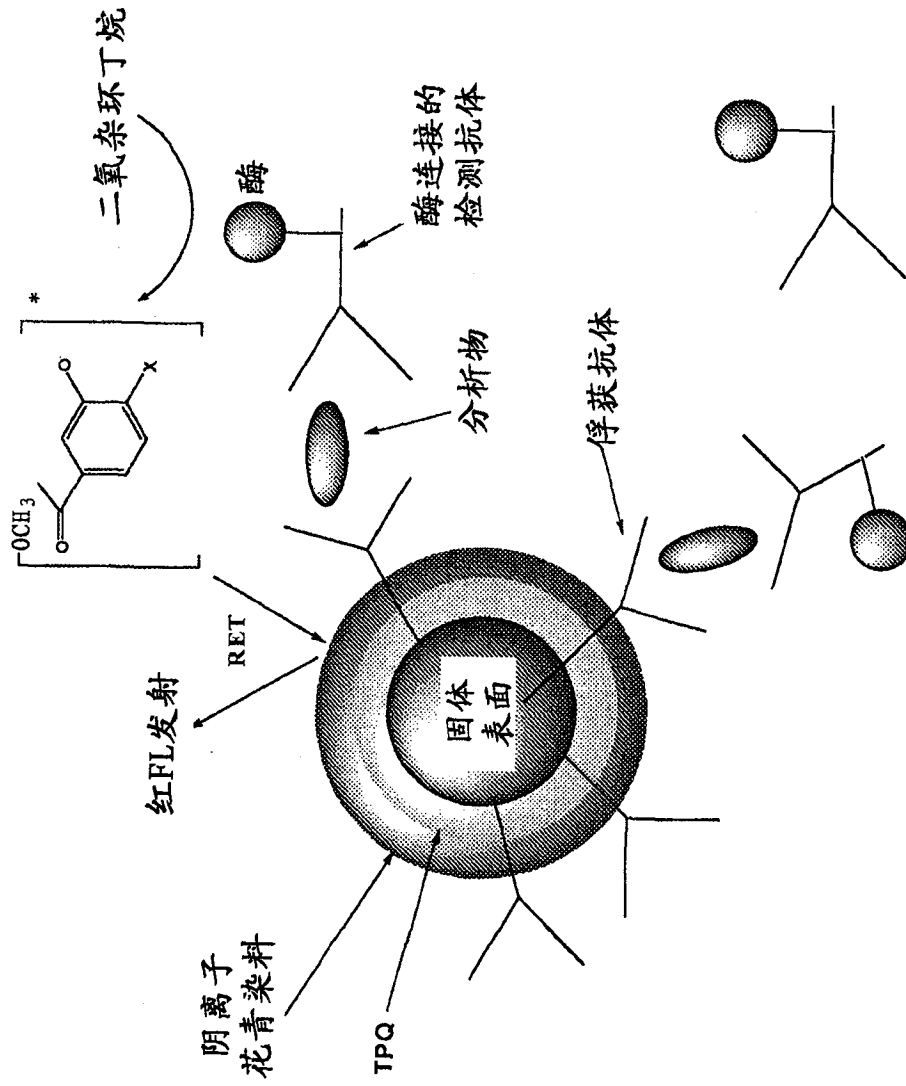


图 6

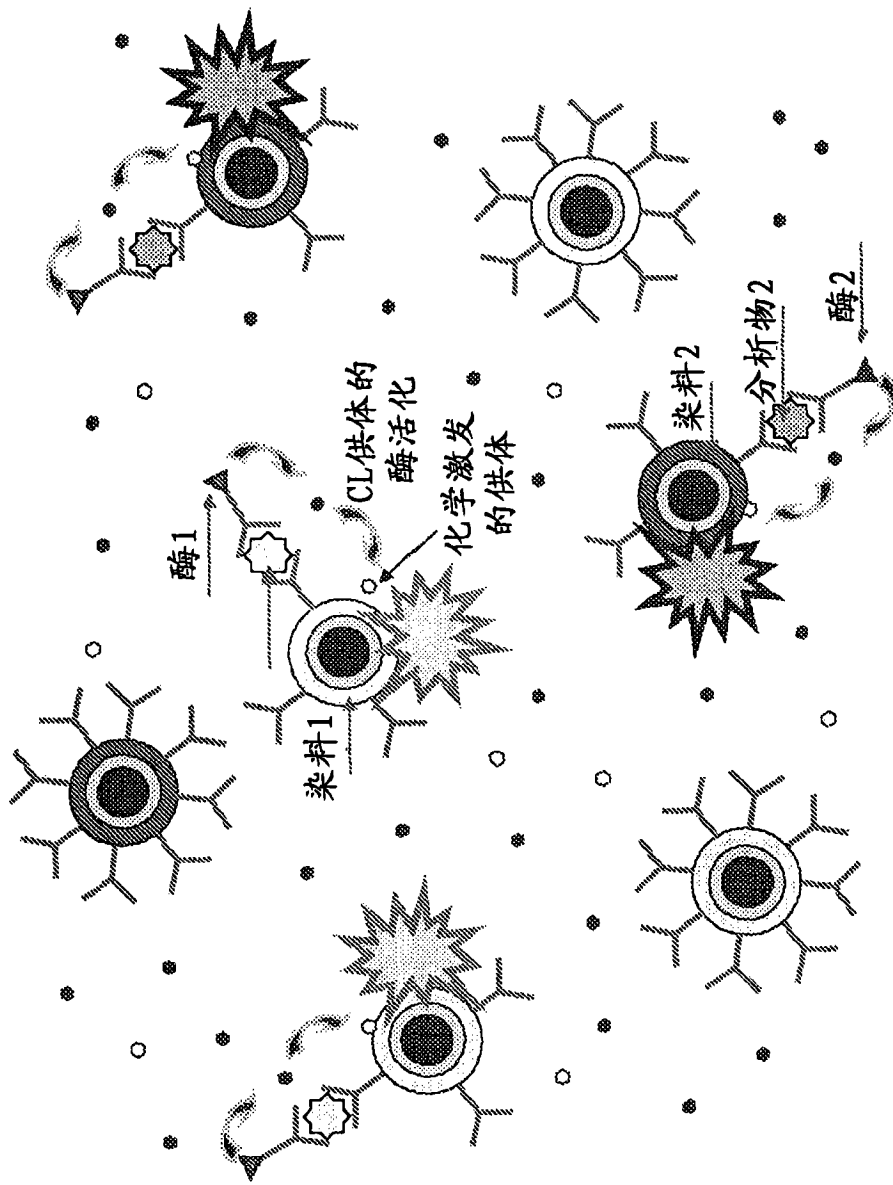


图7

专利名称(译)	通过从活化的化学发光的基质将能量转移至能量受体染料来检测生物分子的试剂、试剂盒和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101784897A</a>	公开(公告)日	2010-07-21
申请号	CN200880019672.X	申请日	2008-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	应用生物系统有限公司		
申请(专利权)人(译)	应用生物系统有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	应用生物系统有限公司		
[标]发明人	R R卓 JC沃伊塔 B爱德华兹		
发明人	R-R·卓 J·C·沃伊塔 B·爱德华兹		
IPC分类号	G01N33/542 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/581 G01N33/533 G01N33/542 G01N33/54313 G01N33/543 G01N33/573 G01N2333/916		
代理人(译)	唐晓峰		
优先权	60/924640 2007-05-23 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明描述了通过从活化的化学发光的基质将能量转移至能量受体染料比如J-聚集的染料来检测生物分子的试剂、试剂盒和方法。

