



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101111605 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 03

(21) 申请号 200580047362. 5

(22) 申请日 2005. 11. 30

(30) 优先权数据

11/001, 583 2004. 12. 01 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 07. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/043343 2005. 11. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02007/046825 EN 2007. 06. 21

(73) 专利权人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 埃里克·D·施沃贝尔

詹姆斯·D·哈柏

玛莎·S·皮特罗维基

弗朗西丝·E·纳吉 托德·H·瑞德

克里斯汀尼·E·霍根

理查德·H·马修思

约瑟夫·莱西瑞格诺拉

马克·汉尼斯 特瑞那·R·维安

罗斯·M·约瑟夫 雷蒙德·尤塔罗

沙安·柏利省 马克·A·霍利斯

伯纳德特·约翰逊

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

G12Q 1/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 02066683 A2, 2002. 08. 29, 第 2 页, 第 14 页.

审查员 吴立

权利要求书 3 页 说明书 38 页

序列表 5 页 附图 45 页

(54) 发明名称

光电子探测系统

(57) 摘要

本发明提供了一种探测可溶性抗原的方法。特别的,提供了一种探测可溶性蛋白质和化学制剂的方法。此外,本发明还提供了一种探测样品中核酸序列的方法,还描述了一种包含 Fc 受体和发光分子的发光细胞,用以探测样品中的目标颗粒,其中被探测的目标颗粒与一个或一个以上抗体结合。本发明还提供了一种用于探测众多样品中的目标颗粒的光电子传感装置。

1. 活性试剂在制备用于检测样品中可溶性抗原的试剂盒中的应用,其中,所述活性试剂:

a) 包括一种或多种能够交联可溶性抗原的化学化合物,或者所述活性试剂能够通过三氯乙酸(TCA)沉淀、加热沉淀、使用乙醇沉淀,获得交联抗原,

b) 包括一种发光细胞,该发光细胞包括能够与交联抗原结合的抗体,其中,抗体与交联抗原的结合会导致细胞内钙的增加,且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子,

其中,样品中可溶性抗原的检测是通过测量从发光细胞中发射的光子来进行的。

2. 一种体外探测样品中的可溶性抗原的方法,其中,该体外方法不用于基本的诊断和治疗中,该方法包括下述步骤:

a) 使用一种或多种化学化合物交联该可溶性抗原,或者使用三氯乙酸(TCA)沉淀、加热沉淀、使用乙醇沉淀,从而获得交联抗原,

b) 将含有抗体的发光细胞与所述交联抗原结合,其中所述抗体与该交联抗原相结合,并且抗体与交联抗原的结合会导致细胞内钙的增加,且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子,

c) 测量从发光细胞中发射的光子,从而探测样品中的可溶性抗原。

3. 根据权利要求1所述的应用或者权利要求2所述的方法,进一步包括将可溶性抗原与一种固体底物交联,从而获得结合于固体底物的交联可溶性抗原,

4. 根据权利要求3所述的应用或者方法,其中,该固体底物包含一种与可溶性抗原的第一抗原决定簇结合的第一抗体,从而获得一种结合了固体底物的交联可溶性抗原;所述发光细胞包含一种与可溶性抗原的第二抗原决定簇结合的第二抗体,并且该第二抗体与结合了固体底物的交联可溶性抗原的结合会导致细胞内钙的增加,且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子。

5. 根据权利要求1到4中任意一项所述的应用或者方法,其中可溶性抗原是蛋白质。

6. 根据权利要求1到4中任意一项所述的应用或者方法,其中可溶性抗原是化学制剂。

7. 根据权利要求6所述的应用或者方法,进一步包括将化学制剂与肽相结合从而产生化学制剂-肽复合物。

8. 根据权利要求1所述的应用或者权利要求2所述的方法,其中结合交联抗原的抗体选自由嵌合抗体、单链抗体、单克隆抗体和多克隆抗体所组成的组中。

9. 根据权利要求1所述的应用或者权利要求2所述的方法,其中发光分子是一种钙敏感型发光分子或者钙敏感型荧光分子。

10. 根据权利要求9所述的应用或者方法,其中,所述发光分子选自由水母蛋白,奥贝林,thalassicolin,mitrocomin(halistaurin),clytin(phialidin),mnemopsin,berovin,吲哚-1(Indo-1),呋喃-2(Fura-2),喹啉-2(Quin-2),Fluo-3,Rhod-2,calcium green,BAPTA,cameleons所组成的组中。

11. 根据权利要求1所述的应用或者权利要求2所述的方法,其中,所述发光分子是一种细胞,选自由原核细胞、真核细胞、人造细胞和非活细胞。

12. 根据权利要求11所述的应用或者方法,其中所述发光细胞选自由B-细胞、T-细胞、巨噬细胞、肥大细胞和成纤维细胞所组成的组中。

13. 根据权利要求 2 所述的方法,其中固体底物包括一种或多种底物,所述底物选自由多孔板、微离心管、过滤单元、磁珠、带电分子所组成的组中。

14. 活性试剂在制备用于检测样品中可溶性抗原的试剂盒中的应用,其中,所述活性试剂包括:

a) 一种或者一种以上能够与样品中可溶性抗原上两个不同的抗原决定簇结合的抗体;

b) 包含 Fc 受体的发光细胞,所述 Fc 受体与一个或一个以上抗体的结合会导致细胞内钙的增加,并且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子,

其中,样品中可溶性抗原的检测是通过测量从发光细胞中发射的光子来进行的。

15. 一种体外探测样品中的可溶性抗原的方法,其中,该体外检测方法不用于疾病的诊断和治疗,该方法包括下述步骤:

a) 将样品与下述物质结合:i) 一个或一个以上能与可溶性抗原的两个不同抗原决定簇结合的抗体;ii) 包含 Fc 受体的发光细胞,所述 Fc 受体与一个或一个以上抗体的结合会导致细胞内钙的增加,并且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子,

b) 测量从发光细胞中发射的光子,从而探测样品中的目标颗粒。

16. 根据权利要求 14 所述的应用或者权利要求 15 所述的方法,其中可溶性抗原是蛋白质。

17. 根据权利要求 14 所述的应用或者权利要求 15 所述的方法,其中可溶性抗原是化学制剂。

18. 根据权利要求 14 所述的应用或者权利要求 15 所述的方法,其中结合交联抗原的抗体选自由嵌合抗体、单链抗体、单克隆抗体和多克隆抗体所组成的组中。

19. 根据权利要求 14 所述的应用或者权利要求 15 所述的方法,其中发光分子是一种钙敏感型发光分子或者钙敏感型荧光分子。

20. 根据权利要求 19 所述的应用或者方法,其中,所述发光分子选自由水母蛋白,奥贝林,thalassicolin,mitrocomin(halistaurin),clytin(phialidin),mnemopsin,berovin,吲哚-1(Indo-1),呋喃-2(Fura-2),喹啉-2(Quin-2),Fluo-3,Rhod-2,calcium green,BAPTA,cameleons 所组成的组中。

21. 根据权利要求 14 所述的应用或者权利要求 15 所述的方法,其中,所述发光分子是一种细胞,选自由原核细胞、真核细胞、人造细胞和非活细胞。

22. 根据权利要求 21 所述的应用或者方法,其中所述发光细胞选自由 B- 细胞、T- 细胞、巨噬细胞、肥大细胞和成纤维细胞所组成的组中。

23. 活性试剂在制备用于检测样品中化学制剂的试剂盒中的应用,其中,所述活性试剂包括:

a) 一种化学制剂,该化学制剂与肽特异性结合,从而获得该化学制剂-肽的复合体,

b) 含有一个或一个以上抗体的发光细胞,其中所述一个或一个以上抗体与该化学制剂-肽的复合体中的两个不同的抗原决定簇相结合,并且一个或一个以上抗体与化学制剂-肽的复合体的结合会导致细胞内钙的增加,且所述发光细胞进一步包含能发射光子以

应答这种细胞内钙增加的发光分子，

其中，样品中化学试剂的检测是通过测量从发光细胞中发射的光子来进行的。

24. 一种体外探测样品中的化学试剂的方法，其中，该体外检测方法不用于疾病的诊断和治疗，该方法包括下述步骤：

a) 将该化学试剂与特异性结合所述化学试剂的肽混合，从而获得该化学试剂-肽的复合体，

b) 添加含有一个或一个以上抗体的发光细胞，其中所述一个或一个以上抗体与该化学试剂-肽的复合体中的两个不同的抗原决定簇相结合，并且一个或一个以上抗体与化学试剂-肽的复合体的结合会导致细胞内钙的增加，且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子，

c) 测量从发光细胞中发射的光子，从而探测样品中的化学试剂。

25. 根据权利要求 23 所述的应用或者权利要求 24 所述的方法，其中所述肽是一种抗原结合肽，从而获得一种化学试剂-抗原结合肽的复合体。

26. 根据权利要求 25 所述的应用或者方法，其中所述肽是一种抗原结合肽，从而获得一种化学试剂-抗原结合肽的复合体，本方法进一步包括交联该化学试剂-抗原结合肽的复合体，从而获得一种化学试剂-抗原结合肽的交联复合体。

27. 根据权利要求 23 所述的应用或者权利要求 24 所述的方法，其中结合交联抗原的抗体选自嵌合抗体、单链抗体、单克隆抗体和多克隆抗体所组成的组中。

28. 根据权利要求 23 所述的应用或者权利要求 24 所述的方法，其中发光分子是一种钙敏感型发光分子或者钙敏感型荧光分子。

29. 根据权利要求 28 所述的应用或者方法，其中，所述发光分子选自由水母蛋白，奥贝林，thalassicolin, mitrocomin (halistaurin), clytin (phialidin), mnemopsin, berovin, 吲哚 -1 (Indo-1), 呋喃 -2 (Fura-2), 喹啉 -2 (Quin-2), Fluo-3, Rhod-2, calcium green, BAPTA, cameleons 所组成的组中。

30. 根据权利要求 23 所述的应用或者权利要求 24 所述的方法，其中，所述发光分子是一种细胞，选自由原核细胞、真核细胞、人造细胞和非活细胞。

31. 根据权利要求 30 所述的应用或者方法，其中所述发光细胞选自由 B- 细胞、T- 细胞、巨噬细胞、肥大细胞和成纤维细胞所组成的组中。

## 光电子探测系统

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求申请日为 2004 年 12 月 1 日的美国申请 NO. 11001583 的优先权, 该申请是 2004 年 1 月 16 日申请的美国专利申请 NO. 10467242 的部分连续案, 该申请是英语公开的申请日为 2002 年 2 月 6 日的国际申请 NO. PCT/US0203606 的美国国家阶段, 其要求了申请日为 2001 年 2 月 7 日的美国临时申请 NO. 60266977 的权利。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明依靠由美国空军提供的合约号为 F19628-00-C-0002 的政府基金而完成。政府享有本发明的一些权利。

### 背景技术

[0005] “穷人的核武器”这类生物武器、化学武器的增加强调了对于能长期监测环境的小型、快速、敏锐的生物制剂探测器的需求。在战争环境中, 有效的探测器在探测到特异性生物制剂或化学制剂后能快速向士兵发出警报, 使其快速履行抵制手段。

[0006] 这样的探测器在非军事领域中的应用也同样有效。快速探测病人体内的抗抗菌素细菌能够帮助医生选择更加有效的治疗方法。连续检测城市饮用水源供应能提供对潜在病原体的早期预告, 给予公共事业部门更多的时间来抑制潜在的公共健康隐患。除此之外, 将这类探测器应用于对肉类及家禽类的检疫, 是对现行使用的“戳和闻气味”的检疫程序的重要改进。总之, 这种探测器迫切的需要在医药 (例如兽药)、农业、环境保护 (例如用于诊断病态建筑物综合症)、食品加工或标准制订等领域中进行分析 and 诊断上的应用。

[0007] 所有的脊椎动物都是通过产生高度变化的抗体分子, 以在某种程度上获得对外来制剂 (抗原) 的特异性免疫应答。抗体分子以高度特异性与抗原结合, 例如, 它们能够特异性的结合两种高度相关的细菌菌株、病毒、蛋白质、核酸、真菌、原生动物、多细胞寄生虫、朊病毒, 以及这些物质的生成产物或者诱导产物。

[0008] 抗体由免疫系统中的关键成分——B 细胞产生。抗原通过在其表面结合抗体以刺激 B 细胞, 导致细胞内发生生化反应的级联, 使钙离子流入 B 细胞的细胞溶质中。

[0009] 对抗体的结构和功能、B 细胞活性的回顾, 可参见 Paul 编辑的《免疫学基础》, 第 3 版, Raven 出版社, 纽约 (1993)。

[0010] 利用抗体的差异性来探测多重目标颗粒和稀有目标颗粒或抗原的装置已经在美国专利 NO. 6087114 和美国专利 NO. 6248542 中描述。

[0011] 这类装置通常包括一种用于容纳传感细胞 (例如, B 细胞、巨噬细胞或纤维组织原细胞) 的液体介质, 一种光学探测器, 传感细胞也包含这里所说的淡黄色细胞 (CANARY) 或发光细胞。该液体介质用于接收要被探测的目标颗粒。每个传感细胞都拥有受体 (例如, 嵌合抗体或单链抗体), 它们能在细胞表面表达并且对要探测的抗原具有专一性。抗原与受体的结合会引发包括化学变化或生化变化的信号途径 (例如, 钙浓度的增加)。这些传感细胞在其细胞溶质内也包含发光分子 (例如发光蛋白质或吲哚-1(indo-1)), 这些发光分子能发射光子以应答信号途径 (例如增加细胞溶质内钙的浓度)。探测器可以通过一个覆

盖物（例如玻璃）与包含细胞的介质分离开来，所述的覆盖物对于光子来说是透明的。这种覆盖物能用以支撑介质，保护探测器的易碎表面，或起到透镜的作用。这种光学探测器，例如电荷耦合装置（CCD），能够探测出细胞作为对受体介导的信号途径的应答而发射的光子，提示使用者被探测的抗原已经出现。能够应用于该装置的其他光学探测器包括光电倍增管，光电二极管，互补金属氧化物半导体（CMOS）成像器，雪崩光电二极管，和成像增强电荷耦合装置（ICCD）（例如可从 Photek 有限公司获得，东萨西克斯郡，英国）。在一些实施方案中，所述光学探测器能够识别各个单个细胞。

## 发明内容

[0012] 在此描述的本发明是对美国专利 NO. 6087114 和美国专利 NO. 6248542 中描述的装置的修正和改进，以提供一种探测可溶性抗原的方法。特别的，本发明提供了一种探测可溶性蛋白质和化学制剂的方法。除此之外，本发明还提供了一种探测样品中核酸序列的方法。并且，还提供了一种包含 Fc 受体和发光分子的发光细胞，可用以探测样品中的目标颗粒，该被探测到的目标颗粒与一个或一个以上抗体结合。本发明还提供了一种光电子传感装置，该装置可通过使用光子探测器来探测众多样品中的目标颗粒。

[0013] 对于目标颗粒的探测（例如可溶性抗原或者核酸），由目标颗粒与受体的直接结合或间接结合、于发光细胞表面的表达来进行部分介导。直接结合可通过受体，例如能直接的、特异性结合目标颗粒的抗体来完成。目标颗粒的间接结合可以通过 Fc 受体与已连接了（结合了）目标颗粒的抗体间的结合来完成。

[0014] 在本发明的一个实施方案中，提供了一种探测样品中核酸序列的方法，包括下述步骤 a) 在适宜抗原结合的寡核苷酸（即已经结合了抗原的寡核苷酸）与核酸序列杂交的条件下使样品与至少一个抗原结合的寡核苷酸结合，b) 加入发光细胞，其中所述发光细胞包含一个或一个以上受体，这些受体与抗原结合的寡核苷酸的抗原相结合，一个或一个以上受体与抗原的结合导致细胞内钙的增加，能发射光子的发光分子应答这种细胞内钙的增加，c) 测量从发光细胞中发射的光子，从而探测样品中的核酸序列。

[0015] 在本发明的另一个实施方案中，提供了一种探测样品中核酸序列的方法，包括下述步骤 a) 在适宜抗原结合的寡核苷酸与核酸序列杂交的条件下使样品与众多抗原结合的寡核苷酸结合，b) 加入发光细胞，其中所述发光细胞包含一个或一个以上受体，这些受体与抗原结合的寡核苷酸的抗原相结合，一个或一个以上受体与抗原的结合导致细胞内钙的增加，能发射光子的发光分子应答这种细胞内钙的增加，c) 测量从发光细胞中发射的光子，从而探测样品中的核酸序列。

[0016] 在本发明的又一个实施方案中，提供了一种探测样品中核酸序列的方法，包括下述步骤 a) 结合：i) 待测样品，ii) 至少一种与被探测的核酸序列相互补的抗原结合的寡核苷酸，和 iii) 一种固体底物，它含有至少一个结合于其上的、与所述核酸序列互补的寡核苷酸，在适宜抗原结合的寡核苷酸及结合于底物的寡核苷酸与核酸序列杂交的条件下，获得包含杂交了至少一种抗原结合的寡核苷酸的核酸序列的固体底物，b) 向包含杂交了至少一种抗原结合的寡核苷酸的核酸序列的固体底物中添加发光细胞，其中所述发光细胞包含一个或一个以上受体，这些受体与抗原结合的寡核苷酸的抗原相结合，一个或一个以上受体与抗原的结合导致细胞内钙的增加，并且所述的发光细胞进一步包含能发射光子以应答

这种细胞内钙增加的发光分子, c) 测量从发光细胞中发射的光子, 从而探测样品中的核酸序列。

[0017] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了一种探测样品中核酸序列的方法, 包括下述步骤 a) 在适宜抗原结合的寡核苷酸与核酸序列杂交的条件下使样品与至少一种抗原结合的寡核苷酸结合, 以获得一种抗原结合型杂交复合体, b) 添加一个或一个以上与抗原结合型杂交复合体中的抗原具有特异性的抗体; c) 添加包含 Fc 受体的发光细胞, 所述 Fc 受体与一个或一个以上抗体的结合会导致细胞内钙的增加, 并且所述的发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, d) 测量从发光细胞中发射的光子, 从而探测样品中的目标颗粒。

[0018] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了一种探测样品中目标颗粒的方法, 包括下述步骤 a) 将样品与下述物质混合: i) 与目标颗粒具有特异性的抗体; ii) 包含 Fc 受体的发光细胞, 所述 Fc 受体与抗体的结合会导致细胞内钙的增加, 并且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, b) 测量从发光细胞中发射的光子, 从而探测样品中的目标颗粒。

[0019] 在一个进一步的实施方案中, 提供了一种探测样品中可溶性抗原的方法, 包括下述步骤 a) 将样品与下述物质混合: i) 一个或一个以上能与可溶性抗原的两个不同抗原决定簇结合的抗体; ii) 包含 Fc 受体的发光细胞, 所述 Fc 受体与一个或一个以上抗体的结合会导致细胞内钙的增加, 并且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, b) 测量从发光细胞中发射的光子, 从而探测样品中的目标颗粒。

[0020] 本发明还描述了一种利用光子探测器来探测众多样品中的目标颗粒的光电子传感装置, 包括 a) 具有多个位点来承载众多样品的转子, b) 一个或一个以上含有下述混合物的样品: i) 用于探测目标颗粒的样品; 和 ii) 含有能接受目标颗粒的受体的细胞, 其中所述受体与目标颗粒的结合会导致细胞内钙的增加, 并且所述细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, c) 定位于一个位置上的光子探测器, 用以探测在转子转动时置于其上的一个或一个以上样品发射出的光子。

[0021] 在本发明的一个进一步的实施方案中, 提供了一种利用光子探测器来探测一个或一个以上样品中的目标颗粒的光电子传感装置, 包括 a) 具有多个位点来承载众多样品的转子, b) 一个或一个以上含有下述混合物的样品: i) 用于探测目标颗粒的样品; 和 ii) 对目标颗粒具有特异性的抗体; 和 iii) 包含 Fc 受体的发光细胞, 所述 Fc 受体与抗体的结合会导致细胞内钙的增加, 并且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, c) 定位于一个位置上的光子探测器, 用以探测在转子转动时置于其上的一个或一个以上样品发射出的光子。

[0022] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了一种利用光子探测器来一个或一个以上样品中的核酸序列的光电子传感装置, 包括 a) 具有多个位点来承载众多样品的转子, b) 一个或一个以上含有下述混合物的样品: i) 用于探测核酸序列的样品; ii) 至少一个与该核酸序列杂交的抗原结合的寡核苷酸; 和 iii) 包含一个或一个以上受体的发光细胞, 其中所述受体与杂交了核酸序列的抗原结合的寡核苷酸的抗原相结合, 并且所述一个或一个以上受体与抗原的结合会导致细胞内钙的增加, 且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, c) 定位于一个位置上的光子探测器, 用以探测在转子转动时

置于其上的一个或一个以上样品发射出的光子。

[0023] 在一个实施方案中,这种转子包含 16 个位点来承载 16 个样品。

[0024] 进一步的,在本发明的另一个实施方案中,提供了一种探测样品中可溶性抗原的方法,包括 a) 将样品与含有一个或一个以上抗体的发光细胞结合,其中所述一个或一个以上抗体与可溶性抗原的两个不同的抗原决定簇相结合,并且该可溶性抗原与一个或一个以上抗体的结合会导致细胞内钙的增加,并且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, b) 测量从发光细胞中发射的光子,从而探测样品中的可溶性抗原。

[0025] 在本发明的另一个实施方案中,提供了一种探测样品中可溶性抗原的方法,包括下述步骤 a) 交联该可溶性抗原,从而获得交联抗原, b) 将含有抗体的发光细胞与所述交联抗原混合,其中所述抗体与该交联抗原相结合,并且抗体与交联抗原的结合会导致细胞内钙的增加,且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, c) 测量从发光细胞中发射的光子,从而探测样品中的可溶性抗原。

[0026] 在本发明的进一步的实施方案中,提供了一种探测样品中可溶性抗原的方法,包括下述步骤 a) 将可溶性抗原与一种固体底物交联,从而获得结合于固体底物的交联可溶性抗原, b) 向结合了固体底物的交联可溶性抗原中添加发光细胞,其中所述发光细胞包含一个结合了该可溶性抗原的抗原决定簇的抗体,并且该抗体与结合了固体底物的交联可溶性抗原的结合会导致细胞内钙的增加,且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, c) 测量从发光细胞中发射的光子,从而探测样品中的可溶性抗原。

[0027] 在本发明的另一个实施方案中,提供了一种探测样品中可溶性抗原的方法,包括下述步骤 a) 将样品与固体底物结合,该固体底物包含与可溶性抗原的第一抗原决定簇结合的第一抗体,从而获得结合了固体底物的交联可溶性抗原, b) 向结合了固体底物的交联可溶性抗原中添加发光细胞,其中所述发光细胞包含与可溶性抗原的第二抗原决定簇结合的第二抗体,并且该第二抗体与结合了固体底物的交联可溶性抗原的结合会导致细胞内钙的增加,且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, c) 测量从发光细胞中发射的光子,从而探测样品中的可溶性抗原。

[0028] 在本发明的另一个实施方案中,提供了一种探测样品中的化学制剂的方法,包括下述步骤 a) 将该化学制剂与肽混合,从而获得该化学制剂-肽的复合体, b) 添加含有一个或一个以上抗体的发光细胞,其中所述一个或一个以上抗体与该化学制剂-肽的复合体中的两个不同的抗原决定簇相结合,并且一个或一个以上抗体与化学制剂-肽的复合体的结合会导致细胞内钙的增加,且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, c) 测量从发光细胞中发射的光子,从而探测样品中的化学制剂。

[0029] 在本发明的另一进一步的实施方案中,提供了一种探测样品中的化学制剂的方法,包括下述步骤 a) 将该化学制剂与肽结合,从而获得一种化学制剂-肽的复合体, b) 交联该化学制剂-肽的复合体,从而获得化学制剂-肽的交联复合体, c) 将化学制剂-肽的交联复合体与发光细胞混合,所述发光细胞含有一种与该化学制剂-肽交联复合体相结合的抗体,这种抗体与化学制剂-肽交联复合体的结合会导致细胞内钙的增加,且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, d) 测量从发光细胞中发

射的光子,从而探测样品中的化学制剂。

[0030] 在一种另外的实施方案中,提供了一种探测样品中的化学制剂的方法,包括下述步骤 a) 将该化学制剂与一种抗原结合肽结合,从而获得一种化学制剂-抗原结合肽的复合体, b) 添加发光细胞,该发光细胞含有一个或一个以上抗体,这些抗体与该化学制剂-抗原结合肽复合体的两个不同的抗原决定簇相结合,这种一个或一个以上抗体与化学制剂-抗原结合肽复合体的结合会导致细胞内钙的增加,且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, c) 测量从发光细胞中发射的光子,从而探测样品中的化学制剂。

[0031] 在本发明的一个其他的实施方案中,提供了一种探测样品中的化学制剂的方法,包括下述步骤 a) 将该化学制剂与一种抗原结合肽结合,从而获得一种化学制剂-抗原结合肽的复合体, b) 交联该化学制剂-抗原结合肽的复合体,从而获得一种化学制剂-抗原结合肽的交联复合体, c) 添加发光细胞,该发光细胞含有一种抗体,该抗体与该化学制剂-抗原结合肽交联复合体相结合,这种结合会导致细胞内钙的增加,且所述发光细胞进一步包含能发射光子以应答这种细胞内钙增加的发光分子, d) 测量从发光细胞中发射的光子,从而探测样品中的化学制剂。

[0032] 本发明所述的系统在医药(例如兽药)、农业、环境保护(例如用于诊断病态建筑物综合症)、食品加工或标准制订领域中做分析和诊断上的应用是十分有效的。

[0033] 前述的及前述未提及的本发明的其他性质、特征和优点将在下面对优选实施方案的详细描述中明显体现,并且在随后的附图中举例说明。

## 附图说明

[0034] 专利文件或专利申请文件包含至少一幅彩色附图,在提交了请求及支付必要费用的基础上,公开的专利文件或专利申请文件的复印件的彩色附图将由政府部门提供。

[0035] 图 1 是光电子传感细胞概念的示意图

[0036] 图 2 是说明含有对可疑物质进行初步探测的采样器(触发器)的光电子传感器的一般结构体系的示意图

[0037] 图 3 是说明建立用于光电子传感器的细胞系的示意图

[0038] 图 4 是生物学气溶胶告警传感器(BAWS)/光电子传感器集成系统的示意图

[0039] 图 5 表示的是光电子传感器中 B 细胞对口蹄疫病毒的应答

[0040] 图 6 表示的是光电子传感器的干式撞击器模块

[0041] 图 7 是说明定位化核混合的效果的示意图

[0042] 图 8 表示的是利用土拉热氏菌细胞定位化的效果

[0043] 图 9 表示的是光电子传感器的自动化细胞运送模块

[0044] 图 10 表示的是使用光电子传感器时一个土拉热氏菌细胞样品的剂量应答关系

[0045] 图 11 表示的是 B 细胞对化学污染和生物污染的抵抗能力

[0046] 图 12 表示的是光电子传感器的自动离心模块

[0047] 图 13 是空气撞击器/光电子传感器的示意图

[0048] 图 14 是光电子传感器的示意图

[0049] 图 15 表示的是光电子传感器的光学/光电倍增管(PMT)模块

[0050] 图 16 是空气撞击器 / 光电子传感器的示意图

[0051] 图 17 是光电子传感器的多通道离心机的示意图

[0052] 图 18 是光电子传感器的湿法离心机 / 撞击器概念的示意图

[0053] 图 19 是光电子传感器的湿法离心机 / 撞击器概念的示意图

[0054] 图 20 是光电子传感器的专用管 (custom tube) 的示意图

[0055] 图 21 表示的是集成的干式撞击器 / 光电子传感器

[0056] 图 22 表示的是细胞处理对特异于鼠疫杆菌的 B 细胞的应答的影响

[0057] 图 23 表示的是可以收集气溶胶样品的撞击器

[0058] 图 24 是 CANARY 传感器概念的概括示意图。B 细胞被经过修饰,能在细胞内部表达水母发光蛋白,并在细胞表面表达病原体抗体。当病原体出现时,抗体交联在(固定在,聚积在)细胞表面,刺激产生信号级联,导致细胞内钙的增加。水母发光蛋白分子通过氧化水母发光蛋白来应答这种细胞内钙的增加,并发出光子。光子的输出可以由 PMT 监测。

[0059] 图 25 是 DNA 探测的示意图。互补于目标 DNA 序列、并含有末端地高辛配基标记的寡核苷酸与目标 DNA 进行杂交。与目标 DNA 结合的多个地高辛配基标记的寡核苷酸同 CANARY 细胞(发光细胞)表面的地高辛配基抗体的结合,刺激了光子的发射。

[0060] 图 26A-C 是一组曲线图。CANARY 细胞(发光细胞)对针对地高辛配基的抗体的表达可以由地高辛配基标记的 DNA 来刺激。将能表达针对地高辛配基的抗体的发光细胞加入到离心管中,所述离心管中还含有 50 微升指示浓度的地高辛配基标记的 DNA 标准剂。对该管进行短暂离心,迫使细胞聚积在管的底部,离 PMT 距离最近,将光子的发射作为时间记录功能,使用三种不同类型的地高辛配基标记的 DNA 来刺激细胞,每种达到成功的灵敏度都不同。图 26A 中,由地高辛配基密集标记的质粒 DNA(约 4000 个碱基对与 200 个地高辛配基分子相连接)的探测极限是大约 1 纳克 / 毫升(50 匹克绝对含量)。图 26B 中,由地高辛配基稀疏标记的不同长短(81-8576 个碱基对)的 DNA 分子量标准剂的探测极限是 1 微克 / 毫升(50 纳克绝对含量)。图 26C 中,每个端点都使用地高辛配基标记的不同长短(8-587 个碱基对)的 DNA 分子量标准剂(DNA 分子的每个端点都有一个地高辛配基)的探测极限是 100 纳克 / 毫升(5 纳克绝对含量)。

[0061] 图 27A-B 是一组曲线图。对细胞进行离心可能降低其对可溶性抗原的灵敏度。将能表达针对地高辛配基的抗体的发光细胞加入到离心管中,所述离心管中还含有 50 微升指示浓度的地高辛配基标记的质粒 DNA。图 27A 中,对该管进行短暂离心,迫使细胞聚积到管的底部,离 PMT 距离最近,将光子的发射作为时间记录功能。图 27B 中,将细胞与 DNA 进行人工混合,在不经离心的状态下放置于 PMT 前。

[0062] 图 28 是曲线图。在实验环境下,杂交两个互补的地高辛配基标记过的寡核苷酸(3 号寡核苷酸和 NEG3 号寡核苷酸)。用 C02-I 介质以 1:10 的用量稀释样品至总体积达到 100 微升,并加入 20 微升的细胞,测量光子发射。地高辛配基细胞表达地高辛配基抗体,而对照组细胞不进行表达。

[0063] 图 29 是曲线图。快速杂交地高辛配基标记的单链 DNA 寡核苷酸。向 8 微升的杂交溶液(50 毫摩 NaCl,40 毫摩 Tris, PH7.5)加入指示含量的寡核苷酸 NEG3,并在加入 90 微升 C02-I 介质和 20 微升地高辛配基 CANARY 细胞后迅速加入 1 微升的 3 号寡核苷酸(oligo3)。迅速将管内物质混合,并将管迅速置于测光计中监测光子的输出。从第二种寡

核苷酸的加入到将管置于测光计中(x 轴的 0 点)的总的用时约为 15 秒。

[0064] 图 30 是一个曲线图。单链 DNA 从 pBluescript 噬菌体质粒中获得,并与全部 10 个地高辛配基标记的寡核苷酸杂交。杂交以后,反应液在 100 微升 C02-I 介质中被稀释,并加入 20 微升地高辛配基细胞,然后测量光子的发射。图中所示的摩尔比是寡核苷酸与目标单链 DNA 的比。该实验的理想比率在 1.2 到 1.4 之间。

[0065] 图 31 是一个曲线图。对单链 DNA 的序列特异性探测。10 个地高辛配基标记过的寡核苷酸与给定量的单链噬菌体质粒 DNA 进行杂交,其中所述的 10 个地高辛配基标记过的寡核苷酸与噬菌体质粒 pBluescript 的 (+) 链互补。加入能表达针对地高辛配基的抗体的发光细胞,由细胞发出的光被光电倍增管监测。只能探测到噬菌体质粒的 (+) 链,这表明,识别反应是存在序列特异性的。当寡核苷酸探针不存在时,单链 DNA 无法刺激细胞。该实验中的探测极限是 50 纳克。

[0066] 图 32A-B 是一组柱形图。在核酸探测反应中温度带来的影响。在几个不同温度下将单链噬菌体质粒 DNA 与给定浓度的探针进行杂交,出现了最大 RLU。图 32A 中,在 PBS 中,当杂交温度 51℃ 时,出现最大信号,但类似的信号还出现在杂交温度为 47℃ 和 42℃ 的时候。图 32B 中,在 42℃ 条件下进行杂交,比使用低浓度寡核苷酸探针的实验表现出增强的信号,0.16pmoles 的寡核苷酸与 0.63pmoles 的寡核苷酸的作用效果相当。在寡核苷酸浓度为 0.04pmoles 的时候信号加倍。

[0067] 图 33 是 DNA 沉降方法的一个示意图。捕获寡核苷酸连接在沉降颗粒的表面上,这类寡核苷酸不与地高辛配基标记过的寡核苷酸结合相同的区域。目标核酸与捕获寡核苷酸相结合,地高辛配基标记的寡核苷酸与目标颗粒相结合。整个复合物通过离心(或者磁场作用)被沉降,并由表达针对地高辛配基的抗体的发光细胞进行探测。

[0068] 图 34 是一个曲线图。目标 DNA 的沉降能提高灵敏度。使用生物素标记的寡核苷酸饱和与链霉抗生素蛋白结合的珠,通过洗涤除去过量的寡核苷酸。在 47℃ 条件下使用所述的珠培养 pBluescript 单链 DNA(+ 链)5 分钟,然后洗涤。加入地高辛配基标记的探测寡核苷酸,在 47℃ 条件下杂交 20 分钟,通过洗涤除去过量的寡核苷酸。将所述珠重新悬浮于 200 微升 C02-I 介质中,每次试验使用 40 微升。

[0069] 图 35 是一个柱形图。在指示浓度的阻塞剂的存在下,在 47℃ 条件下使用生物素标记的寡核苷酸培养 PBS 噬菌体质粒单链 DNA 20 分钟,其中所述生物素标记的寡核苷酸与链霉抗生素蛋白包被的聚苯乙烯珠相结合,并与地高辛配基标记过的寡核苷酸相结合。在室温下,在 TBS(50 毫摩 Tris,130 毫摩 NaCl)中洗涤与珠结合的、由地高辛配基标记的目标物质 3 次。将珠重新悬浮于 C02-I 介质中,并加入发光细胞,然后离心所述反应液,并使用测光计监测光子的输出。

[0070] 图 36A-C 是一组曲线图。图 36A 中,当使用 IFN  $\gamma$  处理 U937 细胞时,其表现出对 Fc  $\gamma$  RI 表达的增加。用免疫荧光检验法测量使用 IFN  $\gamma$  处理过(200 纳克/毫升,空心的绿色峰值)的 U937 细胞或未经处理(实心紫色峰值)的 U937 细胞对 Fc  $\gamma$  RI 的相关表达。图 36B 中,U937 细胞表达功能性水母发光蛋白。当使用 ionomycin 处理时(50M),经过钙敏感的发光蛋白水母发光分子转染的 U937 细胞会发射光子。图 36C 中,当将 Fc 受体交联到具有稳定表达水母发光蛋白能力的 U937 细胞中后,进行光子的探测。使用 10 微克/毫升的人类免疫球蛋白 G 预培养 U937 细胞,然后进行洗涤并且使用山羊抗人类免疫球蛋白 G 进

行处理 (2' 段)。

[0071] 图 37A-D 是一组曲线图。U937 细胞可以被加工成能够快速应答于几种不同病原体或其类似物。使用 IFN  $\gamma$  (200 纳克 / 毫升) 处理 U937 细胞 24 小时, 以增强其对内源性 Fc  $\gamma$  RI 的表达, 并为 CANARY 试验做好准备。然后, 使用下述抗体对细胞进行培养: 图 37A 中, 鼠类抗炭疽杆菌孢子, 图 37B 中, 兔类多克隆抗炭疽杆菌孢子, 图 37C 中, 鼠类抗土拉热弗朗西丝氏菌, 或者图 37D 中, 鼠类抗枯草杆菌杂交瘤上清液。然后将细胞应用于标准 CANARY 试验, 在试验中, 使用单克隆抗体探测 1000cfu 炭疽杆菌孢子, 使用兔多克隆抗体探测 10000cfu 孢子, 同样还探测到 10000cfu 土拉热弗朗西丝氏菌和 1000cfu 枯草杆菌孢子。

[0072] 图 38A-C 是一组曲线图。经过快速加工的 U937 是具备特异性的, 并且所述特异性取决于抗体。在图 38A 中, 使用鼠类抗土拉热弗朗西丝氏菌抗体培养的 U937 细胞没有对 105cfu 炭疽杆菌孢子产生应答, 但是对 106cfu 土拉热弗朗西丝氏菌产生应答。在图 38B 中, 用鼠类抗炭疽杆菌孢子抗体加载的细胞没有对土拉热弗朗西丝氏菌产生应答, 但是对 106cfu 炭疽杆菌孢子产生应答。在图 38C 中, 当抗土拉热弗朗西丝氏菌抗体不存在时 (106cfu 土拉热弗朗西丝氏菌, 没有 ab), 细胞对 106cfu 土拉热弗朗西丝氏菌没有产生任何应答。

[0073] 图 39 描述了一种 16 通道传感器。这个传感器被设计成能够使用单个的光收集通道同时进行对 16 种样品的测量。所述传感器包括一个能够水平承载 16 根 1.5 毫升管的转子, 这些管平均分布在转子的圆周上, 在可变速马达的驱动下绕垂直轴运动。一个单独固定的光子探测元件 (例如, 一个 PMT) 为定位于转子的平面上, 其位置刚好超过管子旋转时经过的路径。通过这种方式, 每根管子都按顺序的、反复的运动至紧密接近 PMT, 使得管子每次经过时其输出的光子都能被采样。最后, 使用一个由光源 (红外线 LED) 和探测器 (光电晶体管) 组成的光学转换器来控制被探测光子的计数, 并将其重组于 16 个字段中, 每个字段对应一个特定的样品。

[0074] 图 40 是一个曲线图。从 16 通道传感器获得的数据证明, 其 LOD 值与使用单个通道仪器获得的值相同, 只是 16 种样品进行了同时的测量。单独的测量包括下述步骤: 在分别的 1.5 毫升管中准备 16 种样品 (和 / 或对照物), 向每根管中导入等量的发光细胞, 将管子置于放置在暗箱中的转子上, 在高 RCF (约 2000g) 条件下对管进行短暂离心 (5 秒), 从而将发光细胞定位至管子的底部, 在测量的过程中, 将转子的转速降至 60rpm (每根管每秒被采样一次), 为每种样品建立一个光子计数的时间数列, 用于显示和 / 或输入到计算机运算法则程序用于评估。

[0075] 图 41 是一个便携式 16 通道传感器设计的示意图。

[0076] 图 42 是一个集成有气溶胶收集器和发光细胞运送系统的 CANARY 圆盘 (CD)。

[0077] 图 43 是一个被撞击器喷嘴和透明管切掉一部分的气溶胶收集模块的示意图。

[0078] 图 44 是一个带有阀门运送系统的发光细胞运送模块示意图。

[0079] 图 45 是一个 16 通道传感器及其功效的概括图。

[0080] 图 46 是一个毒性探测的概括图。

[0081] 图 47 是一个表达水母发光蛋白的传感细胞和一个普遍的抗体受体的概括图。

[0082] 图 48 是一个探测可溶性单体抗原的方法 1 的示意图。一个单个的发光细胞被加工成能够在同一个单体抗原中表达两种针对不同抗原决定簇的不同抗体。抗原对抗体的交

联,刺激了发光细胞发射光子。

[0083] 图 49 是一个曲线图,描述了分别用炭疽杆菌和鼠疫杆菌处理细胞系所产生的结果,其中所述细胞系能表达针对炭疽杆菌和鼠疫杆菌的抗体。这个单克隆细胞系能够探测到至少 50cfu 的炭疽杆菌或者鼠疫杆菌,这表明:两个抗体上的两个抗原结合位点都被表达并且都是起作用的。

[0084] 图 50 是探测可溶性蛋白的方法的示意图。使用两个抗体来探测包含两个或者更多抗原决定簇的抗原,一个抗体与珠(或者与其他任何与多个抗体分子相结合的支持物)结合,而另一个抗体由发光细胞表达。周抗体包被的珠培养抗原,并在珠的表面用多个抗原进行修饰。然后将珠导入发光细胞。由于抗原与珠进行了交联,所以发光细胞抗体也交联其上并且刺激了光子的发射。

[0085] 图 51 是一个曲线图,描述了交联于 G 蛋白磁性珠的抗体 6E10-10 在 4℃ 下使用不同量的 BoNT/A Hc 培养 3 小时所产生的结果。使用 CO2-I 介质洗涤所述珠三次。加入能表达 6B2-2 抗体的发光细胞,将反应液离心 5 秒,然后使用测光计监测输出的光子。

[0086] 图 52 是一个探测化学制剂的示意图。将一个分离的肽特异性结合到感兴趣的化学制剂上,产生了一个特异性结合于肽-化学制剂复合体的抗体。如果所述肽-化学制剂仅仅形成一个单个的功能性抗原决定簇,可以向所述肽中导入一个额外的抗原决定簇。如图所示,这个抗原决定簇是一个地高辛配基分子,但是其他特异性抗原决定簇也是完全可以的。当化学制剂存在时,该化学制剂-肽的复合体可以包括两个抗体结合位点,并且可以通过与蛋白质毒性探测相类似的方法进行探测。

[0087] 图 53 是一个描述另外一种探测化学制剂的方法的示意图。分离两种肽,并将其串联(按一纵列)结合到感兴趣的化学制剂上。这些肽的结合可以通过下列方式进行探测:形成针对每个肽-化学制剂复合体的抗体;或者使用如图所示的抗体结合位点标记所述的肽。

[0088] 图 54 是另外一种探测化学制剂的方法的示意图。将一种肽与两种感兴趣的化学制剂相结合,从而形成一个化学制剂-肽的二聚物复合体。将一个抗体特异性结合到这种化学制剂-肽的二聚物复合体上。所述化学制剂-肽的二聚物复合体可以含有两个抗体结合位点,足够用来刺激发光细胞,以增加细胞内的钙浓度,因而导致发光细胞发射光子。

## 具体实施方式

[0089] 本发明在此描述了一种探测可溶性抗原的方法。举例说明,这里的可溶性抗原可以是可溶性蛋白质或者化学制剂。在一个实施方案中,该可溶性抗原只包含一个或者两个抗原决定簇。对可溶性抗原的探测需要使用在细胞表面表达的抗体,所述抗体与抗原的结合引发钙浓度的增加,钙浓度的增加刺激了发光分子发射光子来应答这种细胞内钙的增加,这取决于抗原与细胞表面的抗体交联(或聚集,从而将抗体固定于细胞表面)的能力,从而导致细胞内钙的增加。可溶性抗原与在细胞表面表达的抗体的交联能力低,其激活细胞内钙的增加的能力就低。本发明所述的探测可溶性抗原的方法,已经按照方法描述的步骤完成了抗体的交联,即能够激活细胞内钙的增加并导致发光分子发射光子来应答这种钙浓度的增加。

[0090] 希望被探测的可溶性抗原和化学制剂可以是很多种类的制剂。举例说明,但并非

限制,本发明所述的方法可以用于探测蛋白毒素,例如肉毒毒素,血清型 A、B、C、D、E、F、G,葡萄球菌肠毒素-B(SEB)和其他超抗原,蓖麻毒素,志贺氏细菌性痢疾毒素,芋螺毒素,梭菌 *perfringens*  $\epsilon$  毒素,志贺氏细菌状核糖体灭活蛋白,和其他可溶性细菌产品,例如来自鼠疫杆菌的 F1 抗原,保护性抗原,致死因子,来自炭疽杆菌的水肿因子。希望被探测的其他分子包括细菌定数传感分子,例如同型丝氨酸内酯。可用于本发明的方法探测的化学战争制剂或它们水解后的分解产物的例子包括,但并非限制,氰化物(氢氰酸),碳酰氯(二氯化碳),CK(氯化氰),CL(氯气),CX(二氯碳亚胺,羟基),DP(二氯碳酸,三氯甲基酯),GA,Tabun(二甲氨基氰磷酸乙酯),GB,沙林 9-甲基磷酰基氟酸,(1-甲基乙基酯),GD,梭曼(甲基磷酰基氟酸,1,2,2-三甲基丙基酯),GF(甲基磷酰基氟酸,环乙基酯),芥末(1,1'-叔代双 2-氯乙烷),HN-1,氮芥末(2-氯-N-2-氯乙基-N-乙基乙醇胺),HN-2,氮芥末(2-氯-N-2-氯乙基-N-甲基乙醇胺),路易斯毒气(2-氯乙烯亚砷酸二氯化物),PFIB(1,1,3,3,3-五氟-2-三氟甲基-1-丙烯),三光气(碳酸,三氯甲基酯),V-气体(甲基硫代磷酸,S-2-二乙氨基乙基 0-2-甲基丙基酯),VX(甲基硫代磷酸,S-2-二 1-甲基乙基氨基乙基 0-乙酯),VX 的二元组分(0-乙基,0-2 二异丙基氨基乙基甲基磷酸盐和硫),GD 的二元组分(二氟(DF)磷酰甲烷与 2-叔乙基醇和胺的混合物),GB 的二元组分(二氟(DF)磷酰甲烷与异丙醇和异丙胺的混合物。除此之外,可使用本发明所述的方法进行探测的其他生物衍生化学制剂包括,毒枝菌素,特别是单端孢霉烯(T2)毒枝菌素,蛇形菌素异基,蛤蚌毒素,或者其他 *dinoflagellage* 产物,微囊藻素(各种类型),珊瑚虫毒素,沙曲毒素 H,黄曲霉毒素,和河豚毒。

[0091] 其他希望被探测的蛋白质包括,APP(淀粉状前体蛋白),与 CJD 结合的朊病毒蛋白,与 BSE 结合的朊病毒蛋白,与羊痒病结合的朊病毒蛋白,与库鲁病结合的朊病毒蛋白,和 PSA(前列腺特异性抗原)。并且,对适当的可溶性抗原或化学制剂的探测在很多应用领域都是十分有效的,例如在临床应用,举例说明,甲状腺机能,肾上腺机能,骨代谢,可生育性,不可生育性,IVF,妊娠,生长和生长激素缺乏,糖尿病,血液学,心脏机能,癌症,过敏,自体免疫,治疗性药物监测,药物的滥用,研究免疫分析应用,遗传工程蛋白,乳状药物残留,肝功能,抗生素和抗生素合成途径。这些领域中被用来分析的合适的可溶性抗原是本领域技术人员知晓的(例如可参见《免疫分析手册》第 2 版,David Wild 编辑,自然出版集团 2001NY NY)。

[0092] 本发明还提供了探测和识别特异性核酸(NA)序列的方法。在一个实施方案中,使用寡核苷酸探针使抗原与目标核酸接触。这些探针用抗原修饰特异性核酸序列。这种抗原修饰的(也指这里所说的抗原共轭型)寡核苷酸能够刺激发光细胞表达抗体来抑制抗原。游离探针,如果存在的话,是一种单体,因而不会刺激发光细胞。同样的,标记的寡核苷酸与核酸上的非特异位点的背景结合不会显著刺激发光细胞,因为由这种稀有的背景结合而产生的抗原太过分散,以至于不能有效的交联抗体。

[0093] 抗原的选择依赖于很多因素,包括相应抗体的有效性和特性,被探测样品中可交叉反应的抗原的缺乏,及抗原与寡核苷酸共轭物的可溶性、稳定性和成本,这些是本领域技术人员可以理解的。这里所使用的寡核苷酸可以是 DNA, RNA, 肽核酸(PNA), 锁定核酸,或者其他任何种类具有专门的、独特特性的、本领域熟知的修饰核酸替代品。除此之外,向这类探针中添加阳离子氨基酸(以肽或蛋白的形式)能增加杂交率。如果需要,这种阳离子肽或

阳离子蛋白可以提供双倍职能使发光细胞探测出抗原。因此,在本发明的一个实施方案中,基于发光细胞的探测系统含有一个或一个以上抗体在其表面,并且包括一个在抗原受目标核酸刺激时能发射光子的化合物(发光分子)。特别的,光子的发射由细胞内钙浓度的增加来激活。

[0094] 本发明还提供了一种能探测与一个或一个以上抗体相结合的目标颗粒的传感细胞。特别的,这种传感细胞含有一个发光分子和一个与抗体相结合的 Fc 受体,其中该抗体与目标制剂或者目标颗粒相结合。在一个实施方案中,包含 Fc 受体的传感细胞是巨噬细胞,例如人类巨噬细胞系 U937。其他合适的细胞或者细胞系是本领域技术人员知晓的。所述 Fc 受体是一个与抗体或者抗原抗体复合物相结合的膜表达蛋白质家族。它们在例如单核(白)细胞或巨噬细胞这样的几种造血细胞中表达。Fc 受体的几种小类包括 Fc  $\gamma$  受体(Fc  $\gamma$  RI),是一种可溶性抗体的高亲和结合体。Fc  $\gamma$  RI 与免疫球蛋白(IgG)的恒定区域(Fc 段)结合,而将抗体的抗原结合区域留出。抗体结合 Fc 受体与特异性抗原的交联引发信号途径,刺激钙的释放。因此,Fc 受体交联到传感细胞会导致细胞内钙浓度的增加,发光分子从而发射光子来应答这种钙浓度的增加。

[0095] 本发明还在此描述了一种 16 通道传感器。在它的最简单的形式中,发光细胞的试验包括准备一种置于透明管中的样品,向透明管中导入一部分事先准备好的发光细胞,用快速离心螺旋将发光细胞送至透明管底部,用光子计量传感器测量从透明管中输出的光。在实验室里,大多数发光细胞的测定是连续进行的,一次使用一种样品,在自动化 BAWS/CANARY 仪器中,同时测量四种样品,每种样品都有自己单独的光线收集通道。前一个体系需要更多的时间,而后一个体系则需要更加复杂(和昂贵)的硬件。

[0096] 在此描述了一种能减少多种样品的测量时间(且对硬件的需求最小)的特殊方法。传感器被设计成能够通过单一的光线收集通道来同时测量多种样品。这种传感器包含一个能够水平承载 16 只 1.5 毫升管的转子,这些管子平均分布在转子的圆周上,在可变速马达的驱动下绕垂直轴运动(附图 39)。一个单独固定的光子探测元件(例如 PMT)被安置在转子的平面上,其位置刚好超过管子转动时产生的轨道。在这个设计中,每根管子都能按顺序的、反复的紧密接近光子探测元件,以便在每次通过时使其输出的光能被采样。最后,使用一个包含光源(红外线 LED)和探测器(光电晶体管)的光学转换器来控制被探测光子的计数,并将数据重组于 16 个字段中,每个字段对应一个样品。

[0097] 这种 16 通道的设计的另外一种实施方案被称为 TCAN 传感器。这种 TCAN(触发式 CANARY)生物传感器是一种自动化生物传感器,它将气溶胶的收集和发光细胞液体流的运送集成到一个放射状圆盘中。这个 TCAN CANARY 圆盘(CD)(附图 42)上结合了管道,用以将空气流分送至不同的通道。收集的气溶胶(附图 43)使用干法撞击技术,使颗粒顺着气流定位于空塑料管底部。

[0098] 在对气溶胶颗粒进行撞击后,CD 与管道结合以开启位于圆盘上的电子管。圆盘的快速旋转导致发光细胞液体在离心力的作用下依次进入各自的管中(附图 44)。接着利用一个光学探测器,通过发光细胞发出的光子与气溶胶颗粒的相互作用来识别可能存在的生物制剂。气溶胶的收集和发光细胞的运输这一反应可以在一个圆盘中重复多次。这个特性使其可以在不更换 CD 的情况下在几次触发事件下对多个发光细胞进行试验。

[0099] 适用于本发明的这些材料和方法将在后面的细节中描述。

**[0100] 发光细胞**

**[0101]** 这里所述的发光细胞（这里也叫做传感细胞或 CANARY 细胞）可以是任意的具有合适受体、信号途径和信号输出方法的原核细胞或者真核细胞，或者是自然的或经过了遗传工程、化学添加的细胞。这些细胞可以是具有功能受体、信号途径和信号输出方法的人造单元或者无生命的单元。通过与抗原受体的结合，例如与抗体的结合，这些细胞促使钙离子流入细胞溶质中。能有效应用于本发明所述的装置和方法的细胞的一个例子是 B 细胞（即，从冷血动物或者含有多骨颌（bony jaw）热血脊椎动物中分离的 B 细胞），它可以借助基因工程来表达一种或多种表面结合型的单克隆抗体。能有效应用于本发明所述的装置的细胞的另一个例子是巨噬细胞，例如人类巨噬细胞系 U937，可以在细胞表面表达 Fc 受体。可以通过将抗体与目标接触的方式使抗原与抗体结合，之后这种抗原抗体复合物将与细胞上的 Fc 受体结合，刺激信号途径最终导致细胞内钙的增加。

**[0102]** 单克隆抗体可以经由例如下述方法获得：用待测抗原免疫一种动物，从获得免疫的动物中采集 B 细胞。然后，将编码所述单克隆抗体的 DNA 提取分离并插入到一种无限增殖细胞系中，然后筛选出对待测抗原具有特异性的表面单克隆抗体的细胞。B 细胞被有效用于定性分析和定量分析，主要原因不仅仅是 B 细胞发射的信号典型的并不随着暴露于其的另外的目标样品而显著降低，并且还因为它发射的信号是线性的。

**[0103]** 可选择的，这种细胞还可以是纤维原细胞。然而，纤维原细胞不具备将表面抗体的细胞质部分转换成细胞内的钙储备所必需的信号转导机制。为了解决这个问题，可以在该纤维原细胞中表达一种嵌合的表面抗体。这种嵌合表面抗体含有一个衍生自多肽（例如纤维原细胞生长因子受体）的细胞质氨基酸序列，可以将信号从纤维原细胞质膜的内表面转换至细胞内的钙储备。因此，当抗原与嵌合抗体的胞外部分结合并导致表面上的抗体聚积时，钙的迁移也被激活了。使用嵌合抗体的类似的策略也可以被应用于除 B 细胞以外的其他任何细胞类型中，使该细胞可以适用于本发明所述的方法和装置中。

**[0104]** 本发明所述的方法和装置中所使用的细胞是那些被设计成能识别特异性物质的细胞，包括那些在其表面上含有受体使其能特异性结合物质的细胞。虽然优选的受体是抗体或者单链抗体，但是其他适合的受体，包括分裂素（例如脂多糖（LPS）受体），巨噬细胞清除受体，T 细胞受体，细胞黏着分子，DNA 结合蛋白如部分的序列特异性限制酶或者转录因子，单链 RNA 结合蛋白或双链 RNA 结合蛋白，与待识别的 DNA 或者 RNA 序列互补的寡核苷酸，或其他配位体受体（例如甲脒亚磺酸，细胞活素，白细胞介素，或者激素受体，神经递素受体，气味受体，趋化因子受体等等）也能与被识别的物质特异性结合。所述受体可以由跨膜结构域、对受体有结合特异性的膜结合分子（例如结合抗体的 Fc 受体），或者与膜结合分子的共价结合或者非共价结合（例如，生物素-链霉抗生物素蛋白，二硫键等等）来结合到细胞表面上。所述受体还可以是嵌合分子，例如，它可以含有一个胞外功能区，例如抗体，单链抗体，植物凝集素或者其他对待识别物质有特异性结合的区域或肽，和一个胞内功能区，例如来自胰岛素受体，纤维原细胞生长因子，或者其他可以引发第二信使级联的蛋白等等。受体除了直接结合于待识别物质以外，也可以是特异性结合于另外一个分子或者对象，再由后者特异性的结合于待识别的物质，例如第二抗体，标记粒，与抗原结合的寡核苷酸等。

**[0105]** 或者，这些结合步骤中只需要有一个步骤是特异性的。例如，可以用与一种抗原

(或直接与一种粒或在一种基质上)相结合的寡核苷酸探针把含有特异性序列的 DNA 或者 RNA 从溶液中提取出来,然后可以用与目标 DNA/RNA 退火的第二组非特异性抗原结合的寡核苷酸探针来刺激对该第二抗原具有特异性的细胞。此外,以嵌合体形式在细胞表面表达的非特异性核酸结合蛋白(组织蛋白,精蛋白,RNA 结合蛋白)或者这些结合蛋白的抗体也可以在经过特异性序列选择步骤后用来探测核酸的存在。

#### [0106] 抗体

[0107] 无论来源于何种类型的细胞,单克隆抗体的抗原结合可变区都可以从公开的 DNA 序列中获得,或者由一个杂交瘤细胞系通过 RT-PCR(反转录 PCR)克隆得到。RT-PCR 可以利用几组设计为在 5' 端与可变区的前导区或者构架区退火以及在 3' 端与恒定区退火的引物来完成。

[0108] 然后,抗体可变区被克隆成已经包含轻链恒定区和重链恒定区的表达载体。Persic 等人在《基因》(Gene)187:9-18,1997 的著作中描述的轻链表达载体就特别适合于这一目的。Persic 等人描述的 VK 表达含有 EF-1 $\alpha$  启动子,一个引导序列,多个克隆位点,人类 Ig k( $\kappa$ ) 恒定区和聚腺苷酸信号。重链表达载体是从 Invitrogen 的 pDisplay 中获得的。所述载体包含一个巨细胞病毒 (CMV) 启动子,一个引导序列,一个 HA 标记,多个克隆位点,霉菌 (myc) 标记,以及其后的 PDGFR 跨膜结构域和牛生长激素聚腺苷酸信号。

[0109] pDisplay 可以采用如下方法进行改进以用来重链表达。用不含有分泌所需的外显子的小鼠 IgM 恒定区代替 pDisplay 的 PDGFR 跨膜结构域。这样确保了蛋白可以结合在膜上。新霉素抵抗基因可以由下述任意一种抗生素抵抗基因取代,这些抵抗基因包括,但不局限于,潮霉素,博来霉素,嘌呤霉素,卡那霉素,和杀稻瘟菌素基因。重链(或者轻链)可变区可以用一个两步法插入:利用重叠延伸 PCR 除去存在于 pDisplay 的多克隆位点两侧的 HA 标记和 myc 标记。也可以建立一个载体,以允许插入含有融合了约 300 个碱基对的 IgM 恒定区的可变区的重叠延伸产物,从而使克隆只通过一个步骤就完成。

[0110] 下面的例子就是通过上述抗体载体构建步骤来实现的。

[0111] 能特异性结合待测抗原的抗体是一个能结合在抗原或者抗原决定基,但基本不能结合在样品中其他抗原或抗原决定基的分子。所述抗体可以是嵌合的(例如含有非抗体氨基酸序列)或者是单链的(例如抗体的互补性决定区域是由一个连续的多肽序列形成的)。

[0112] 可选择的,可以使用标准技术从动物中获得产生表面抗体的细胞,并且用来制备产生表面抗体的单克隆细胞群体,所述的标准技术可以使用例如 Kohler 等人在《自然》(Nature)256:495-497(1975);Kozbor 等人在《今日免疫》(Immunol Today)472(1983);或者 Cole 等人在《单克隆抗体与肿瘤治疗》(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy) Alan R Liss Inc,77-96(1985)中描述的杂交瘤技术。生产表达单克隆抗体细胞的技术是众所周知的(例如可参见 Coligan 等人编著的《现代免疫学实验》(Current Protocols in Immunology)(1994), John Wiley 和 Sons, Inc,纽约, NY,1994),只是需要选择对表面抗体的改进而不是对分泌抗体的改进。

[0113] 众多的用来融合淋巴细胞和无限增殖细胞系的公知方案中的任意一种都可以应用于生成产生表面单克隆抗体的细胞的目的(例如可参见上述的《现代免疫学实验》(Current Protocols in Immunology), Galfre 等人在《自然》(Nature)266:55052,1977 的文章, Kenneth 在《单克隆抗体》中的题名为“生物分析中的新维度”(Dimension In

Biological Analyses, Plenum 出版社, 纽约, NY, 1980) 的文章, 以及 Lemer 在耶鲁生物医学虚报 54:387-402(1981) 中的文章)。此外, 本领域普通技术人员能够欣喜的发现, 这些方法的许多改良或变形也同样有效。

[0114] 表达抗体的多克隆细胞可以通过用待测抗原免疫适合的动物来制备。产生针对抗原的抗体分子的细胞可以从免疫过的动物身上(例如从血液中)分离出来, 并借助包被有抗原的皮氏培养皿进行淘选等公知技术来进行进一步的纯化。作为制备单克隆细胞的一种替代形式, 可以通过用抗原筛选一个重组组合免疫球蛋白文库(例如抗体噬菌体展示文库)来识别和分离出编码单克隆抗体的核酸, 由此分离出免疫球蛋白文库中那些能结合抗原的成员。用于产生和筛选噬菌体展示文库的试剂盒是可以商业购买的(例如药物重组噬菌体抗体系统, 目录号 NO. 27-9400-01, 以及 Stratagene Surf **ZAP®** 噬菌体展示试剂盒, 目录号 NO. 240612)。此外, 例如可在下述文献中找到特别适用于生成和筛选抗体展示文库的方法和试剂的例子: 美国专利 NO. 5223409, PCT 公开文本 NO. W092/18619, PCT 公开文本 NO. W091/17271, PCT 公开文本 NO. W092/20791, PCT 公开文本 NO. W092/15679, PCT 公开文本 NO. W093/01288, PCT 公开文本 NO. W092/01047, PCT 公开文本 NO. W092/09690, PCT 公开文本 NO. W090/02809, Fuchs 等人在《生物技术》91370-1372(1991) 中的文章, Hay 等人在《人类抗体杂交瘤》381-85(1992) 中的文章, Huse 等人在《科学》2461275-1281(1989) 中的文章, 以及 Griffiths 等人在 EMBO 学报 12725-734(1993) 中的文章。

[0115] 当文库中所希望的成员被识别出后, 特定序列可以被克隆成任何合适的核酸表达子(例如, 载体)并转染到例如纤维原细胞这样的细胞中。表达子同样可以编码可操作连接于抗体序列的氨基酸序列, 以适合于细胞表达抗体。正如上面所讨论的, 纤维原细胞生长因子受体的胞质跨膜序列能被连接到对待测抗原具有特异性的单链抗体上, 使得当与抗原接触时, 细胞能停止住钙的迁移。虽然在纤维原细胞中可以表达分离的重组重链和轻链以形成嵌合体, 但是单链抗体也是同样适用的(例如可参见 Bird 等人在《生物技术动态》(Trends Biotechnol)9. 132-137, 1991 中的文章, 以及 Huston 等人在 IntRev Immunol 10195-217, 1993 中的文章)。

[0116] 光子发射分子

[0117] 希望的物质与细胞表面受体的结合将引发一个细胞内的信号途径。一种优选的信号途径是从 B 细胞、T 细胞、肥大细胞、巨噬细胞和其他免疫细胞中发现的第二信使级联途径, 其中, 细胞表面受体的交联会激活酪氨酸激酶, 这种酪氨酸激酶能使磷脂酶 C 磷酸化, 磷脂酶 C 又能把磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸脂(PIP<sub>2</sub>)裂解成为肌醇 1,4,5-三磷酸酯(IP<sub>3</sub>)和甘油二酯, 然后, IP<sub>3</sub> 打开钙通道, 使例如细胞内质网储存的胞内钙释放或者使细胞外的钙进入细胞, 由此提高细胞内的钙浓度。根据受体的类型, 细胞的类型和所需的信号转导方法, 也可以选择另外的第二信使级联, 例如 G 蛋白腺嘌呤环 c-AMP 蛋白激酶 A 级联。

[0118] 需要提供一种方法, 用以检测细胞对待识别物质的应答时其内部的信号转导。如果内部信号转导包括胞质中钙的增加, 那么优选的探测方法是钙敏感发光分子或者钙敏感荧光分子, 例如水母蛋白, 奥贝林(obelin), thalassicolin, mitrocomin(halistaurin), clytin(phialidin), mnemopsin, berovin, 吲哚-1(Indo-1), 呋喃-2(Fura-2), 喹啉-2(Quin-2), Fluo-3, Rhod-2, calciumgreen, BAPTA, cameleons(参见 A. Miyawaki 等人在 Proc Natl Acad Sci 96, 213540, 1999 上的文章), 或者类似的分子。可以预料, 利用钙敏感

分子产生的相对光强度和传感器细胞的存储特性可能随特定发光分子而改变,激活发光分子的半衰期——在某些情况下具有显著的优势(例如提高的灵敏度、定量探测或者定性探测)。利用光蛋白发光分子的天然辅助因子的结构类似物可能还会导致其他的性能增强。各种能被激活细胞接纳的钙敏感荧光染料可以从商业途径获得,例如分子探针 Inc, Eugene, 例如水母蛋白, 奥贝林, thalassicolin, mitrocomin(halistaurin), clytin(phialidin), mnemopsin, berovin 或者 cameleons 之类的 Oreg 蛋白可以用遗传学方法注入到细胞内,或者由来自 HIV TAT(约 47-57 个氨基酸残基, A. Ho 等人在《肿瘤研究》(Cancer Research) 61, 474-477, 2001 中的文章)的蛋白摄取标记来运送,或者通过其他方式运送。如果需要,这种报告分子可以包括目标信号,使这些分子导向到内质网或者质膜的细胞质表面上、线粒体的内部或者那些局部钙浓度变化可能非常大的位置上。也可以使用探测信号通路中其他位置的活性的光学方法,例如附着在信号途径组分上的荧光基因的荧光共振能量转移(FRET)(参见 S. R. Adams 等人在《自然》349, 694-697, 1991 中的文章)。关于内部信号转导涉及活氧分子(例如超氧阴离子, 羟自由基, 辣根过氧化物酶化合物 I 或 II)的增加的情形,优选的探测方法是活性氧敏感性发光分子或者荧光分子,例如光蛋白 pholasin(一种来自生物发光软体动物 *Pholas dactylus* 的 34-k Da 糖蛋白)或者类似的分子。可选择的,任何荧光素酶的报告基因都可以与经信号途径诱导产生的启动子连接。在例如 T 细胞和肥大细胞这类的细胞中,信号途径将触发出含有诸如粒酶、类胰蛋白酶或者 chymases 等蛋白酶的胞吐(exocytosis)颗粒。这些蛋白酶的胞吐可以采用色度或者荧光度量的方法进行探测(例如,连接在被蛋白酶裂解的肽链上的 p-硝基苯胺(p-nitroaniline)或者 7-氨基-4-三氟甲基香豆素(AFC)上,(可以参见以下文章:S. E. Lavens 等人在《免疫学方法学报》166, 93, 1993 中的文章;D. Masson 等人在 FEBS Letters 208, 84, R&D Systems 中的文章)。同时,用微电极或者其他方法来探测与钙离子流或者其他信号转导离子流相关的电活动也适用于监测细胞中的信号转导应答。

[0119] 适合的发光分子是那种任何能在应答增加的细胞质钙浓度时能够发射光子的分子,包括生物发光分子和荧光分子。在 Button 等人在《细胞钙》(Cell Calcium) 14663-671(1993); Shimomura 等人在《细胞钙》(Cell Calcium) 14373-378(1993), 和 Shimomura 等人在《自然》2271356-1357(1970)中发表的这些文章中,描述了一种发光分子:生物发光水母发光蛋白。这种水母发光蛋白通过氧化一种小化学分子腔肠素(coelenterazine)来产生光子。腔肠素通过细胞膜进行扩散,因此,腔肠素或其类似的分子可以加入到细胞周围的培养介质中。或者,可以将编码能制造腔肠素的酶的基因导入细胞。在另一个实施方案中,可以使用生物发光绿色荧光蛋白(GFP)(可参见 Chalfie,《Photochem Photobiol》62 651-656(1995)中的文章)或者黄色荧光蛋白(YFP)。在此种实施方案中,细胞质中既有 GFP 也有水母发光蛋白。在应答细胞液中钙的增多时,水母发光蛋白以非发光(emissionless)能量转移的形式向 GFP 提供能量。然后,GFP 发射光子。可选择的,所述发光分子也可以是被适合于诱导荧光的波长的光照明下的钙敏感荧光分子(例如吲哚-1(indo-1))。

[0120] 水母发光蛋白或者其他任何的发光分子,可以采用本领域熟知的方法将其导入细胞中。如果所述发光分子是一种蛋白(例如水母发光蛋白的情形),则该细胞可以含有一个编码该蛋白的表达载体(例如,一种被导入细胞后会产生发光分子的核酸或者病毒)。表达

载体可以存在于染色体外部,或者被整合到细胞基因中去。

[0121] 结合抗原 / 结合标记

[0122] 一种或多种抗原或者标记可以被加入(这里也可称为结合)到分子中以提供一种熟知的抗原决定基。例如,一种或多种抗原可以被结合到一个寡核苷酸上以生成一个抗原结合型寡核苷酸,这是一种熟知的抗原决定基。一个抗原结合型分子可以包含一个或一个以上抗原,这些抗原可以是相同的也可以是不同的。举例说明,但不局限与此,与用于探测的分子相结合的抗原或者标记包括小抗原,例如地高辛配基,地高辛,胆碱磷酸,荧光素或者其他 fluorophores,还包括生物素和肽,例如 HIS, VSV-G, FLAG, 和 C(AAKK) 多聚体(例如 Corey 在 J Am Chem Soc(1995)1179373-4 中所描述的)。

[0123] 寡核苷酸

[0124] 除了常规的 DNA 探针和 RNA 探针之外,各种经修饰的核酸被表明可以以一种序列特异性的方式杂交到目标核酸序列中。这些经修饰的核酸包括:肽核酸(PNA)(参见 Nielsen 等人在《科学》254 1497-1500,1991 上发表的文章)、双-PNA(参见 Griffith 等人在《J. Am. Chem. Soc》117 831-832,1995 上发表的文章)、Tail-clamp 肽核酸(参见 Bentin 在《生物化学》(Biochemistry)42 13987-13995,2003 上发表的文章)、PD 环(PD loops)(参见 Bukanov 等人在《肽核酸》95 5516-5520,1998 上的文章)、结合了假互补碱基的肽核酸(参见 Lohse 等人在《肽核酸》96(21)11804-11808,1999 上的文章)或者锁定核酸(参见 Braasch 和 Corey 在《Chem Biol》81-7 上的文章)。已经表明,这些不同种类的修饰核酸在杂交特性、稳定性、亲和性和特异性方面存在差别,可以用以替代常规的 DNA 寡核苷酸(可参见 Beck 和 Nielsen,91-114 页,《人工 DNA 方法和应用》,CRC 出版社,Y E Khudyakov 和 H. A Field eds)。已经表明,与阳离子蛋白质、肽、或者结合了 DNA 的蛋白相结合会提升修饰核酸的杂交动力学特性(参见 Corey 在《J Am Chem Soc》1179373-9374,1995 中的文章;或 Zhang 等人在《Nuc Ac Res》27(17)3332-3338,2000 上的文章)。

[0125] 已经证明,辅助寡核苷酸的加入能够促进寡核苷酸的结合(可参见 O' Meara 等人在《Anal Biochem》225195-203,1998 中的文章;Barken 等人在《生物技术》36 124-132,2004 中的文章)。未标记的发夹竞争探针的加入可以提高其特异性(可参见 Huang 等人在《Nucleic Ac. Res》30(12)e55,2002 上发表的文章)。

[0126] 在与目的物杂交后,除去未结合的寡核苷酸的步骤对于核酸序列探测来说不是必须的,但是是所希望的。那些未结合的标记寡核苷酸可以使用各种常规的色谱技术进行分离,包括分子筛,疏水作用色谱法,或者离子交换,依据使用的特定探针的化学性质来选择。

[0127] 其他的核酸结合分子

[0128] 寡核苷酸不是唯一能识别特异性核酸序列的分子。蛋白质同样具有识别能力,可以在发光细胞的表面进行表达,并且与细胞质功能区重组结合,通过结合来启动钙的应答,这类蛋白质包括例如与抗体的 Fc 部位相结合的结合了核酸的蛋白。结合了核酸的蛋白在发光细胞表面的表达会消除寡核苷酸杂交前的双链核酸的变性,并且,该体系将产生所有必须的组分,不需要添加额外的合成寡核苷酸。可能的序列特异性 DNA 结合蛋白包括(1) DNA 限制酶(优选已经除去了或者灭活了 DNA 切割催化位点的 DNA 限制酶,例如 L F Dornor 和 I Schildkraut 在《Nucl Acids Res》22,1068-1074,1994 中发表的文章);(2) 转录因子或者其他特异性 DNA 结合蛋白或 RNA 结合蛋白,特别是那些能够识别感兴趣的病原体或生

物体中独特的 DNA 序列或者 RNA 序列的蛋白（例如，HIV TAT 转录因子，可参见 C Brigati 等人在《FEMS Microbiology Letters》220, 57-65, 2003 中的文章“痘病毒转录因子”；S SBroyles 在《普通病毒学期刊》84, 2293-2303, 2003 中发表的文章）。具有上述受体的发光细胞可以被设计用来通过一个特异性重复序列或者两个或多个可选择的独特序列来与目标 DNA/RNA 交联。

#### [0129] 捕获寡核苷酸

[0130] 尽管不是探测所必需的，在可沉淀的或固体支持物上捕获目标核酸序列能提高测定的敏感度。单链 DNA 目的物可以通过使用例如生物素标记的、与抗生物素蛋白包被的聚苯乙烯或顺磁性珠相结合的捕获寡核苷酸进行捕获。经捕获的物质可以通过适当的离心或者暴露于磁场中的方法与未结合的物质分离。在寡核苷酸与珠的结合过程中不是必须使用中间结合反应（抗生物素蛋白-生物素），能将寡核苷酸连接到固体支持物上的任何相互作用都是可以使用的，包括直接缀合。另外，用于与捕获寡核苷酸连接的任何固体支持物都应该是足够的。反应可以是二维排列的形式，其中特异性捕获寡核苷酸被置于该排列的特异性位置上。可选择的，目标核酸序列的捕获可以通过非特异性的方式进行（例如，离子交换树脂，沉淀析出，与组蛋白或鱼精蛋白结合）。目标捕获还会浓缩目标核酸序列和 / 或除去测定中的干扰物。

#### [0131] 多价性

[0132] 对发光细胞产生的刺激取决于对其来说似乎是多化合价的抗原。通常的，这可以通过至少两种方式完成。首先，抗原的多倍拷贝体可以连接到一个目标分子上，例如，将多倍结合了抗原的寡核苷酸杂交到目标核酸序列中。其次，每一个都连接了单独抗原的目标核酸序列的几个拷贝体可以彼此结合，或者以彼此高度接近的方式结合（例如连接到珠上）。在这个方法中，单独的目标核酸序列不是多化合价的，但是与目标核酸序列的多倍拷贝体相连接的珠应该存在一个多价抗原。

#### [0133] 反应室

[0134] 适用于本发明的反应室可以是任何基质或者容器，只要发光细胞和待测离子能在其中混合并相互接触即可。在一个实施方案中，反应容器是一个离心管（例如，微量离心管或者 Eppendorf 管）。正如这里所述，为了使待测颗粒或者发光细胞中的一个先聚集成团，然后再把另外一个驱入聚集成团的团中，离心是一种特别合适的方式。为了进一步增强离子和细胞的成团性，可以在管的侧壁涂覆例如牛血清白蛋白之类的非粘性载体蛋白，以防止发光细胞粘到侧壁上，并且可以在管的底部涂覆聚 L- 赖氨酸来帮助确保目标粒子会被粘留在管底。其他能防止或者造成细胞黏着的蛋白或者分子是本领域熟知的，它们同样适用于本发明。

[0135] 具有特制样品孔几何形状的离心管提供了又一种实施方案，它利用离心来增加发光细胞与不易沉淀粒子的相互作用，并降低对特定旋转顺序的要求。在这种实施方案中，含有粒子的待分析的样品被放置在一个样品室最大宽度近似等于发光细胞直径的管子中。使浓缩的发光细胞悬浮于样品的上层，然后用离心来驱使大量密集在一起的发光细胞穿过较小的粒子，同时在几何形状的限制下增大了发光细胞抗体与粒子的相互作用。与细胞相关联的抗体同粒子的结合将捕获不易沉降的粒子，并把它和发光细胞一起快速拉向管底，这时在管底发出的光可以用光电倍增装置观察到。

[0136] 在另一个实施方案中,反应室是一些二维排列的孔,例如,是一个微滴板,或者是一些沿一个带子的点或者孔,如附图所示的那样。这种设计使得可以对多个样品和 / 或多个目标粒子进行多重探测。为了自动运送待测粒子和 / 或发光细胞,反应室或者样品收集器和发光细胞容器可以设定在至少两个方向上。阵列上的孔也可以使用在所述离心管中使用的那些粘性涂层或非粘性涂层处理,使发光细胞与待测粒子的接触更加容易。

#### [0137] 样品收集器

[0138] 可以使用不同的装置从例如空气中收集样品。通常来说,空气采样装置有一个含有液体的收集室,空气或者气体可以从中或者从其边上流过,或者有一个多孔过滤器,当空气或者气体流经该过滤器时粒子(例如目标粒子)能被截获。对于含有液体的收集室,收集的液体可以通过离心或者其他处理以使粒子从液体中分离出来。分离出的粒子然后被沉积在反应室中。对于含有过滤器(例如硝化纤维素)的收集室,过滤器或者过滤器的一部分可以用来当作反应室。可选择的,粒子可以从过滤器中洗出,或者可以使过滤器溶解或用其他方法从粒子中去除。过滤器收集室同样可以用于从流经它的液体(例如水样样品(water supply sample)或者脑脊液)中收集粒子。此外,如前所述,液体样品可以通过离心来去除存在于其中的任何颗粒物质。可用于本发明的各种采样器都是已知的并且可以购买得到的。参见 SKC, Inc, 该公司出售 SKC **BioSampler®** 和其他采样装置。

[0139] 也可以使用其他的空气采样器。例如一种可供选择的装置是 Air-0-Cell 采样盒(SKC, Inc)。在该装置中,空气中的颗粒被加速并与一个粘性片相碰撞,这种粘性片可直接用于各种着色处理和显微检查。

[0140] 气溶胶颗粒可以在一种被称为撞击器的装置中使用惯性分离法收集。把一个含有被收集粒子的气流从感兴趣的环境中吸入到撞击器内,其中该气流被导向一个撞击表面。当撞击器的几何参数和其内的流速适当时,具有足够惯性的粒子将不会随着气流而流动,而是撞击到一个表面上。由于静电作用和 / 或范德瓦耳力的作用,相当一部分撞击表面的粒子会被粘住,进而被收集和浓缩。通过这种方式,利用包括上述装置和方法在内的各种可用的试验技术,含有蛋白(包括毒素)、病毒、细菌(植物型的和孢子型的)、寄生虫、花粉和其他可探测物质的气溶胶颗粒可以被收集以供探测。

[0141] 使用空气撞击器收集生物试验所用的干样品较之传统的空气至液体样品收集具有一些通常的优点,即减少或免除了消耗物和转换机构,从而减少了试验成本,并降低了对自动化的要求。本发明所述的装置和方法的特殊优点在于,使用干式撞击进行收集,从而保证了在添加本发明所述装置和方法的传感细胞之前所有收集到的样品全部定位在一个表面上,无论单个待分析的粒子的大小如何。这样,不论待分析粒子在液体中的沉降系数有多大,它们全部实现了定位化,从而使上述装置和方法的灵敏度最大化并因为免除了耗时的步骤而加速了许多试验进程。

[0142] 能够保留撞击到其上的一定比例的粒子并适用于后续生物测定的任何表面都可以用来做为收集表面。合适的材料包括生物兼容的金属、塑料、玻璃、晶体、气溶胶、水溶胶、纸张等等。这些材料的特别有用的形式包括微量离心管、用于高通量筛选的多孔板、连续带条、过滤器、侧向流动免疫试验中的缀合释放垫等等。可以通过修饰收集表面的方法来增加收集效率,这些方法包括:添加能提升生物颗粒黏着性的涂层(这些涂层在性质上可以是化学的或者生化的,例如聚赖氨酸);增加表面粗糙度来增大收集表面积;特制表面几何

形状,使颗粒沉积在规定的表面区域上。此外,可以通过操控收集表面的静电荷和输入颗粒从而产生附加的吸引力来进一步改善收集效率。

[0143] 对于干式撞击收集器的进一步改进可以这样实现:在收集器上逆流使用空气-空气浓缩器来增加撞击到收集表面上的每个单位空气样品中的颗粒数。这可以大大减少为探测器能提供可靠结果所需的足够数目的气溶胶颗粒的收集时间。

[0144] 在关于这个收集器概念的例子中,附图 23 所示的撞击器被设计成在一个可商业购得的塑料管底部收集气溶胶样品。将喷嘴向下伸入管中,其出口位于管子内表面的曲率半径处。这样的设置增大了颗粒撞击到管子底部的可能性,以使在那里装置的传感细胞最可能与颗粒接触。一旦收集完成,含有装置传感细胞的液滴会被直接加入到含有被收集的气溶胶颗粒的管中,旋转 5 秒钟来加速细胞到管子表面的运输,并使用光子探测器(例如 PMT, CCD, 光二极管等等)测量发出的光。使用这个设备,可以在不到一分钟的时间内从气溶胶颗粒中收集干细菌孢子并直接用光电子装置识别出来。这个方法可用于多个收集样品的管子和能控制后续试验的自动化系统来实现。系统如何能控制至少 10 个相互独立的试验的例子示于图 4、6、9、12 和 15。通过实现一种能在一个管子内(复用的)寻找多种待分析颗粒的方法,单个试验周期内可探测的物质数目可以大于管子的数目。这种方法可以这样实现,生成表达了多个对不同待分析物有亲和性的受体的各个光电子探测装置细胞系,或者在单个管子内组合多个有不同特异性的细胞系。

[0145] 附图 4 是一个完整的生物气溶胶警告传感器(BAWS)/光电子传感器系统示意图。BAWS 触发模块用来初步探测例如具有预定尺寸范围的颗粒的存在。如果探测到了符合规定的颗粒,BAWS 将触发一个空气-空气浓缩器,使具有特定尺寸范围的颗粒通过一个干式撞击器模块被收集和沉积到一个孔内(例如反应室,反应管)。干式撞击器模块进行干样品收集,并与一个用来向反应室(例如管)运送细胞(例如发光细胞)的注射模块相沟通。一个传输模块用来把反应室组件(含有一个或一个以上室或管)转移到一个离心模块,在那里进行样品颗粒与细胞的沉积或者混合。离心模块可以,但不必须与一个用于探测光子发射的光学/PMT 模块相沟通。一个控制器模块用于控制系统的操作。

[0146] 附图 6 所示是一个干式撞击器模块概念的例子。在这个例子中,给出了一个单通道(例如原型系统)和一个多通道装置,包括各自独立的样品管(例如 PCR 管)和管座,它们与负责收集颗粒测试样品的空气-空气浓缩器相沟通。

[0147] 附图 9 所示是一个可自动化运送细胞的粒子。传感细胞(例如发光细胞)通过注射器或者注射器泵组件(其中还可以包含滴管或者其他运送设备)导入到体系中。这种类型的组件使得可以把多种传感细胞同时导向颗粒样品(例如,反应室(如管)中的样品)。

[0148] 附图 12 所示是一个用于旋转颗粒样品或细胞样品的离心模块概念的例子。借助一个装载机构把带有样品管的管座导入一个适合接受该管座的旋转组件上。旋转组件使样品旋转。该旋转组件与收集信号(例如光子发射)的光学模块相沟通,可以用一个编码马达使样品室对准于探测器(例如光学模块)。

[0149] 附图 15 所示是一个光学模块的例子。由于精密的设计,该模块能够进行多个样品(例如在反应室或管内的样品)的同时测定。其中管座和管子导入单元的方式使得它们能与必要时使用的透镜组件(例如,集成的反射镜、透镜)相沟通,并且最终与一个光探测器(例如,一个 PMT)相沟通。PMT 将产生信号,该信号然后被传送给一个处理器进行处理和显示。

[0150] 附图 21 所示是一个集成的干式撞击器 / 光电子传感器。在所述传感器中,上述各种模块被排成一行,其中有一个装有 30 个管座的盒子可放置到一个带式驱动的管座传送模块上。所述传送模块将各个试验管按顺序从收集器运送到细胞运送模块,再送到离心模块,最后在完成了光子探测以后送至确认样品存储模块。这个集成式传感器的总体尺寸约为 54 英寸宽 × 33 英寸高 × 22 英寸深。

[0151] 现实中的样品可能会包含这样一些物质,它们或者会阻止试验实现(结果造成假阴性),或者会在并无特异性抗原的情况下引起应答反应(结果造成假阳性)。在许多情况中,这些样品可以在试验之前经过处理,以出去这类物质。例如,对于清洁剂或者血清因子这类可溶性物质,可以通过一个预离心的步骤除去,试剂将在管底集中,可以用试验培养液(Portal Shield 样品)来置换管内的液体。对于那些难溶的大颗粒物质,可以使用可购买得到的滤孔尺寸为例如 3-5 微米的过滤器把它们从样品中去除,其中滤孔尺寸的选择应当能让试剂通过而挡住污染物质(柴油或者烟垢样品)。利用注入式过滤器可以快速处理样品,仅使总的试验时间增加几分钟。

[0152] 样品定位化

[0153] 作为样品收集器或者反应室的一部分,可以采用除离心以外的不同方法来使发光细胞与待测颗粒的接触更加容易。例如,可以使用电泳、等电位聚焦、双向电泳、磁性标记粒,或者将与其相似的其他生物电子装置集成到本发明所述的体系中。参见例如美国专利 NO. 6017696 和授予 Nanogen Inc 的其他专利;Goater 等人在《寄生虫学》117 S177-189, 1998 中的文章,美国专利 NO. 5512439, NO. 4910148 以及授予 Dynal AS 的其他专利。

[0154] 把含有目标颗粒(这里所说的颗粒可以是能被发光细胞识别的任何颗粒——蛋白质/毒素、病毒、细菌、寄生虫、核酸等等)的液体样品与含有发光细胞的等量的培养液混合,会造成能导致光子发射率暂时增大的颗粒-细胞接触。从混合步骤开始到出现最大发光率的这一段时间取决于特定细胞对刺激的应答特性、发生混合的时间长度(混合时间)、以及混合后颗粒与细胞发生接触的典型时间(扩散时间)。

[0155] 由于即使在目标颗粒不存在的情况下探测光子的背景光子率依然存在(例如背景细胞发光和光子探测器及其电路的热噪声),由单个目标-细胞作用所发射的光子难以与背景区分开。要得到一个有用的信号,必须大大增加相对于背景的探测光子率。对于一个给定的样品,当其混合时间和扩散时间最小的时候,该探测光子率最大。样品中存在的目标颗粒的其他可能的信号包括:增大一定时间内探测光子多于仅有背景时的总数,改变探测光子的统计性质,或者改变探测光子的光谱质量。

[0156] 扩散时间可以通过减小混合颗粒与细胞之间的平均距离来达到最小化。这可以通过在较大的混合体积中使颗粒和/或细胞定位化到一个小体积(通常是一个层)内来实现。然而,定位颗粒和/或细胞所需的时间也许会长于细胞的特征性应答时间。颗粒和细胞在这个较长的定位化时间内的混合可能会因为增大了各次发光之间的平均时间而造成较低的光子发射率从而导致较小的信号。为了避免这样的情况发生,颗粒和细胞两者中的一个或者两个应该在确保它们之间的接触最小化的前提下分离来定位化。这样的定位化也可以缩短混合时间。

[0157] 一般来说,移动细胞或者颗粒有以下几种方法:沉降(通过重力或者离心力);液体流动(强迫的或者对流的);电力(电泳和双向电泳);磁力(使用磁性珠);声波/超声

波（驻波或者行波）。

[0158] 定位化要求一种移动颗粒和 / 或细胞的手段并且结合一个可以收集颗粒和 / 或细胞的屏障,例如一个通道或者容器的固体表面,一个过滤器的表面,或者一个环绕着一个电场极小点的势能屏障。它们的例子包括:沉降(使细胞定位化于一个室的下表面处);空气撞击(被撞击的颗粒黏附于或者驻留于一个收集表面);过滤(颗粒或者细胞被收集于过滤器表面或者进入过滤器内部);亲和力捕获(通过特异性或者非特异性结合作用使颗粒或细胞定位化);磁力捕获(通过定位化磁力使磁性珠停留在一个固体表面、过滤器表面上或者过滤器内部;磁性珠可以具有也可以不具有能促使颗粒或细胞黏附的表面化学活性);电泳(仅适用于带电颗粒,收集于电极表面);和双向电泳(正:把颗粒或者细胞收集于一个电极的表面;负:收集到一个最小电场区域内)。

[0159] 颗粒和细胞的定位化和混合可以使用上述各种方法的结合或者与其他方法的结合来实现。在下面的表格中,给出了各种定位化 / 探测器组合的一些例子。其中某些代表性例子给出了二维的颗粒或者细胞定位化的方法,这使得在使用一个光子探测器阵列(包括 CCD)而不是单个光子探测器(例如一个 PMT)时能够改善灵敏度或者对不同颗粒的甄别能力。

[0160]

| 例子            | 细胞定位化方法        | 颗粒定位化方法     | 混合颗粒或者细胞方法      | 探测器 |
|---------------|----------------|-------------|-----------------|-----|
| 离心            | 离心(短时)         | 离心(长时)      | 细胞 / 沉降(离心)     | 单个  |
| 流动细胞          | 沉降并黏着在表面       | 细胞上方的浅通道    | 颗粒 / 沉降(重力)     | 单个  |
| 流动细胞(多细胞系)    | 沉降并黏着在表面       | 细胞上方的浅通道    | 颗粒 / 沉降(重力)     | 成像  |
| 流动细胞 / 磁性珠    | 沉降并黏着在表面       | 定位化磁性珠捕获    | 颗粒(珠上) / 沉降(重力) | 成像  |
| 流动细胞(电场)      | 沉降并黏着在表面       | 细胞上方的浅通道    | 颗粒 / 电泳         | 单个  |
| 带条 / 吸附芯      | 流动(进入吸附芯)      | 空气撞击(带条)    | 细胞 / 沉降(重力)     | 单个  |
| 空气撞击          | 离心(短时)         | 空气撞击(带条)    | 细胞 / 沉降(离心)     | 单个  |
| Uniprep / 磁性珠 | 沉降于表面          | 过滤器表面上的磁性珠  | 颗粒(珠上) / 沉降(重力) | 单个  |
| 流经细胞          | 过滤器表面上的细胞      |             | 流经细胞            | 单个  |
| 逆向流动          | 离心使细胞附着于过滤器表面上 | 保留在过滤器表面上   | 颗粒 / 逆向离心力流经细胞  | 单个  |
| 离心管双向电泳捕获     | 离心到过滤器表面上      | 由双向电泳力驻留于流体 | 细胞 / 沉降(离心)     | 单个  |
| 行波双向电泳        | 沉降并附着于行波双向电泳   | 行波双向电泳      | 颗粒 / 沉降(重力)     | 单个  |
| 可溶膜管          | 分开容室           | 离心(长时)到可溶膜上 | 细胞或颗粒 / 行波双向电泳  | 单个  |
| 声波 / 超声波      |                |             | 可溶膜和沉降(离心)      |     |

**[0161] 定位化实施例**

**[0162]** 在下述每一个实施例中,除了另有说明外,都做了如下假设:样品是兼容于短期细胞寿命和功能的液态细胞溶液的一个等份,其中可能含有目标颗粒(尽管在下面的说明中假设存在这种颗粒)。液体样品可以从环境、临床、由空气制备成的液体、洗涤的药签或者其他样品中获得。空气样品可以从被驱动的空气流(空气采样器或者表面取样器)、静电捕获、或者制备的空降颗粒等获得。细胞应该被理解为位于兼容于细胞寿命和功能的培养液中的发光细胞。假定颗粒与细胞的接触会导致一个或一个以上光子的发射。样品与细胞在其中混合的室的外部有单个的或者排列的光子探测器阵列,而且在室的外部或者内部还可能用于增强对发射光子的捕获和探测的光学元件(例如反射镜、透镜、光导管等等)。混合室假定是部分的或者整体透明的,或者有其他方式可以让发射的光子到达探测器。

**[0163] 离心**

**[0164]** 样品可以在一个室内被离心足够的时间以使颗粒沉降。细胞可以在不干扰颗粒的情况下被导入室内并被短时间离心使其能沉降到颗粒上。光子探测可以在离心时、或者较典型的在离心后进行。

**[0165] 亲和力捕获(表面捕获)**

**[0166]** 样品可以被导入一个微量离心管、多孔板、过滤器单元或者其他适当的装置内,这些装置的某些与样品接触的部分被处理成能借助特异性或非特异性的结合作用来结合和留住可能存在的颗粒。非特异性结合可以通过静电/离子交换作用、疏水作用、亲水作用等等容易得以实现。特异性结合可以通过使那些结合在基质上的成分停留在颗粒(例如抗体、受体、糖蛋白、蛋白质、肽、碳氢化合物、寡核苷酸等等)的表面上容易得以实现,或者可以通过使被受体结合的那些成分停留在颗粒(小分子、肽、蛋白质、碳氢化合物等等)的表面上。

**[0167] 亲和力捕获(在移动基质上)**

**[0168]** 类似于在表面捕获的亲和力捕获,只是颗粒是结合在可移动的基质上的(例如聚合珠,细胞,带电分子,磁性珠,细菌等等),这种可移动基质利用包括这里所说的方法在内的各种方法提供了移动和/或定位化颗粒或者细胞的额外方式。

**[0169] 流动细胞**

**[0170]** 发光细胞可以被导入一个浅流动池中并附着于底部表面,再一次的流动能去除未附着的细胞。样品的导入使许多细胞培养液移动,于是颗粒可以沉降到附着的细胞上。当颗粒与细胞接触时会发射出光子。

**[0171] 流动细胞(多细胞系)**

**[0172]** 类似于上述流动细胞,但是具有一些敏感于不同目标颗粒的不同的发光细胞区域。图像探测器探测到的光子使得可以判断哪些类细胞被激活了,进而可以判断样品中存在哪些种类的目标颗粒。

**[0173] 流动细胞(磁性珠)**

**[0174]** 类似于上述流动细胞。适合的磁性珠与样品混合,以使目标颗粒附着在珠上。这些装饰了目标颗粒的磁性珠可以被导入到流动池中,在这里一个强的局部磁场(由永久磁铁或者电磁铁产生)将把这些磁性珠捕获在附着了细胞的表面的上方。混合的过程可以通过消除磁力从而把磁性珠沉降在细胞上来实现,或者通过移动磁力以把磁性珠吸引到细胞

所附着的表面上。

[0175] 流动细胞（电场）

[0176] 类似于上面的流动细胞，只是还包含一个供细胞附着的表面和一个平行于该表面的用作分离电极的表面（两个表面之中至少有一个表面是透明的）。样品可以被导入，置换大量的细胞培养液。在电极之间施加适当的直流电压，使颗粒因为电泳作用移动到你附着的细胞处。

[0177] 带条 / 吸附芯

[0178] 使一个可能含有目标颗粒的空气样品撞击一个透明表面，这个表面可以是刚性的或者柔性的（例如一个带条），可以是多孔的或者非多孔的。在撞击区域的周围可以黏着一个吸收材料，或者吸附芯，如果对于多孔表面，在该表面的另一侧黏着吸收材料或者吸附芯。细胞可以被置于撞击区域，由于吸附芯的作用，过量的培养液能够被吸收，从而减小了含有细胞的培养液的体积和深度，使细胞更靠近于颗粒。细胞可以沉降出来到撞击颗粒上，或者，如果是背面含有吸附材料的多孔表面的情况，还可以利用流动使细胞被拉向颗粒。

[0179] 空气撞击

[0180] 使一个可能含有目标颗粒的空气样品撞击进入一个适合于离心的室（被固定的，并且一开始的时候是空的）内。细胞能够在干扰颗粒的情况下被导入到室内，并且经过短暂的离心后沉降到颗粒上。光子探测可以在不经过旋转、旋转之中、或者更典型的在旋转之后进行。

[0181] 过滤装置 / 磁性珠

[0182] 将细胞置入一个经过改进的、含有一个室和一个带有合适的过滤器的活塞的无注射过滤装置中（**Whatman®**, Mini-Uniprep™ 或者类似产品），其中细胞可以附着于室的底部表面上，没有附着的细胞可以被洗脱除去。样品可以和具有适当的表面亲和力的磁性珠一起被导入到室内。在该室内插入一个内部含有一个固定于过滤器背面附近的合适的磁铁的改进型活塞，直到室内的残留空气通过过滤器排除出去。这个组件可以被倒置过来，（在经过可能让磁性珠沉降到过滤器表面的一段时间以后）把该室向下推到活塞上。磁性珠和颗粒可以通过过滤、沉降和磁力吸引而聚积到过滤器的表面。颗粒可以附着在磁性珠上面，或者在磁性珠之间被捕获。通过再次倒转该组件，颗粒将被磁性珠带离细胞，而磁性珠则被活塞内的磁铁吸住。除去磁铁释放磁性珠从而释放颗粒，颗粒经过一段短距离后将沉降到细胞上。

[0183] 流经细胞

[0184] 可以让一层或者几层细胞沉降到位于室底的一个适合的过滤器或者膜的表面上。样品可以被导入到室内细胞的上方并对其施加压力（例如可以使用活塞或者外部的泵）。当样品流经相互间紧密接触的细胞时，颗粒将被导入细胞的密集范围内，并发生接触。

[0185] 逆向流动

[0186] 可以让一层或者多层细胞沉降到位于一个“细胞”室底部的适合的过滤器或者膜的表面上。样品可以放置在一个被分离的“样品”室内，该“样品”室通过某个流动通道与位于过滤器下面某一点上的细胞室相连接。这两个室的相互位置可以设定成使在一个离心管中样品室更靠近于转动轴，并且样品室中的液面高度比细胞室中的液面高度更靠近于转动轴。这样，当离心管旋转的时候，液体将在各室间流动，试图保持一个离转动轴相同的距

离。这样能够迫使一些样品向上穿过支撑细胞的过滤器,并且经过被向外的离心力作用而保持着抵抗流动的细胞。当样品流经相互间紧密接触的细胞时,颗粒将被导入细胞的密集范围内,并发生接触。

#### [0187] 离心管过滤器

[0188] 将样品导入一个被切掉适当大小的一块离心管过滤器的过滤器筐(filterbasket)内。在适当的离心条件下,样品能够被迫使穿过过滤器,并让尺寸大于过滤器被切掉尺寸的颗粒聚积在过滤器的表面上。可以将细胞加入到过滤器筐中并给予一个短时间的离心,以使细胞被带到过滤器的表面上和颗粒上。

#### [0189] 双向电泳捕获

[0190] 类似于上面所说的流动细胞,只是在任一表面上带有合适的电极或者带有伸入到流动细胞中的电极。样品可以通过连续流经电极的方式被导入,这些电极连接于外部电源并受其电驱动。当流速、频率、波形和振幅有一个合适的组合时,由于负双向电泳颗粒可被导向细胞上房的一个最小电场强度区域并在那里被捕获。当停止流动并改变对电极的电驱动(可能包括在一些电极间施加直流电压以产生电泳力)之后,颗粒可以被沉降或是驱逐(通过电泳或者正双向电泳)到附着的细胞上。

#### [0191] 行波双向电泳

[0192] 在一个浅的柱状室中,可以在一个或者两个平行表面上制造一些适当的电极(或许是透明的),包括一个用于收集颗粒的中央平面电极,一个位于外围的电极,以及一组螺旋状电极(可以与中央电极位于同一表面,也可以在与之相反的表面)。样品可以被导入到室内,在外围电极和中央电极之间施加一个直流电压,利用电泳将颗粒吸引到中央电极上。通过液体的交换,将细胞导入到室内。通过使用适当的相移交流电压驱动螺旋状电极,可以借助行波双向电泳把细胞扫(sweep)到中央,然后细胞在那里沉降颗粒。

#### [0193] 可溶膜管

[0194] 可以使用电激励溶解金膜,在离心沉降颗粒使之定位化的时候隔离目标颗粒和发光细胞。或者可以将颗粒沉降到位于细胞上方的膜上(如附图 20 所示),也可以用铺设在另外一个室(或许是插入到室内的)的底部的膜使得细胞离开原来室的底部。不论是哪种情况,当膜在电激励添加下被溶化以后,利用沉降法,或者可以是离心法,使颗粒与细胞混合。

#### [0195] 声波 / 超声波

[0196] 颗粒的浓缩可以使用声波或者超声波来完成。颗粒可以在一个驻波的节点处聚积,或者被一个行波所移动。细胞也可以用这种方式移动,或者用前面所述几种方法的任意一种进行运送。

#### [0197] 毒素探测

[0198] 为了探测单价抗原,有必要使用两种方案中的一种来诱导表面抗体的交联。第一种方案是,在细胞表面表达两个各自独立的结合位点,这样的话两个受体分子能够结合于一个配位体上。另一种方案是,如果配位体以多价的形式表达于细胞,则可以在细胞表面上表达一个结合位点。下面所述是利用抗体-抗原识别模型的一些具体的例子。

[0199] 首先,可以在单个细胞系的表面表达两种抗体,每种特异于一个分子的不同抗原决定簇(抗原决定簇 1 和 2)。单个分子与两种抗体的结合(一个抗体针对抗原决定簇 1,

而另外一个抗体针对抗原决定簇 2) 将导致交联和发光。更具体的说,单个 B 细胞系被调控成表达两种独立的抗体,每个抗体识别单个分子上的一个不同的抗原决定簇。单体抗原的出现将促使两个表面抗体交联,造成细胞内钙的增加和水母发光蛋白的发光。近来我们找到一种表达了能同时抵抗鼠疫杆菌和土拉热弗朗西丝氏菌的功能性抗体(加上表达于基因内的 PC 抗体)(参见实施例)的细胞系。这个细胞系能够独立的识别这两种细菌中的每一种,这表明了这两种抗体都是功能性的,并且证明了发光细胞能够同时表达两种功能性抗体。

[0200] 另一个潜在的问题是,对于不能通过离心力被沉淀的抗原,此种光电子装置和方法的敏感性如何。鼠疫杆菌 F1 抗原作为低分子量聚合物存在于溶液中,因此在我们的测试中是不可能被沉降的。然而,表达抗 F1 抗体的 B 细胞能够探测到 5ng/ml 的可溶性 F1 抗原。这与现今的免疫分析方法相当,因此证明了此种光电子装置对于可溶性制剂而言是相当敏感的。使用缀合了卵清蛋白的磷酸胆碱抗原进行了补充试验。这种小抗原能够刺激抗体在细胞表面进行交联的能力提示我们,这种含有多个拷贝数的 PC 抗原决定簇的小分子量抗原能够有效交联表面抗体并引起钙的内流和光子的发射。

[0201] 第二种方案利用离心的方式能够改善上述对单价抗原的探测限制。这种方法使一种毒素抗体在良性细菌表面表达,而另外一种毒素抗体在 B 细胞表面表达。然后,毒素可以通过离心方式被沉降,接着,加入表达第二抗体的 B 细胞。由于在细菌表面固定了多种抗原,因此对于 B 细胞来说毒素实质上表现为多价,因而引发交联发生和光子的发射。更特别的,抗单体抗原(例如毒素)的抗原决定簇 1 的抗体表达于细菌表面。可溶性毒素与这些抗体结合,用毒素抗原将所述细菌包被。这些被毒素包被的细菌在加入表达抗抗原决定簇 2 的抗体的 B 细胞之前,通过离心方式被沉降。B 细胞抗体的交联导致水母发光蛋白发射光子。这一方案的实验结果证实了对细菌表面抗原进行探测的可行性,并且在加入 B 细胞之前先将细菌沉降可以增加探测的敏感性。相似的方法同样可以被用于任何难以沉降的制剂以提高其对 B 细胞的呈递。

[0202] 交联

[0203] 目标颗粒的交联可以通过任何已知的方法来实现。例如,交联可以通过使用一种或者多种中间制剂或者分子来完成,这些中间制剂或者分子的例子包括:肽、抗体、化合物、抗体、生物素、抗生蛋白链菌素。此外,交联还可以通过共价结合或者非共价结合来完成。交联的方法还可以包括沉淀或者通过配位体、抗体或者化学功能基团等物质结合在固相上,这些都是本领域公知的。

[0204] 多重分析

[0205] 下面将描述 B 细胞混合物是如何能够用于在不增加探测通道(管等)的情况下而提高可探测到的抗原的数量的。探测多个待测物的最简单的方式是在每个探测通道使用单一的发光细胞类型,并通过增加探测通道的数量来增加细胞分析的数量。这种方法对于小数量的分析是可以接受的,但是,随着待测物数量的增多,方法会变得越来越复杂,并且资源紧张。然而,如果需要的话,可以将多个不同 B 细胞系混合在一起,则可能在一个仅仅 5 通道的系统上使用同时的阴性对照来进行多达 31 种测定。

[0206] 举个例子,如果只有一个单一的通道,则最多只能进行一种 B 细胞的探测分析。然而,如果存在两条通道,则可以进行 3 种不同的探测分析,其中每条通道含有等量的 3 种不

同的 B 细胞系种的两种

[0207] 例如,如果有 3 种 B 细胞系 A, B, C

[0208] 并将它们混合放入两条通道,由此

[0209] 通道 1 :A, B 通道 2 :B, C

[0210] 然后会有三种可能的阳性读数

[0211]

| 通道 1 | 通道 2 |                                        |
|------|------|----------------------------------------|
| 是    | 否    | 提示仅存在 A                                |
| 否    | 是    | 提示仅存在 C                                |
| 是    | 是    | 提示仅存在 B<br>(或者可能存在多于一种的制剂,但我们在此认为不太可能) |

[0212] 相似的,如有有 3 条通道,通过将 4 种细胞系混合在一起,则可以进行 7 种各自独立的探测分析(在此简单的表示为,针对各个制剂的细胞系以字母 A 至相应于细胞系数量的字母表示,并记录通道数量以显示哪些通道对于各个制剂进行阳性探测是必需的,记录如下——123. F——表示通道 1、2 和 3 必须均记录阳性才能鉴定制剂 F)

[0213]

| 通道 1       | 通道 2       | 通道 3       |
|------------|------------|------------|
| A, B, G, F | B, C, E, F | C, D, G, F |
| A          | B          | 123F       |
| E          | G          |            |
| D          | 23C        |            |

[0214] 假定所有的分析都按照相等的比例进行混合,则可以通过给定的通道数而得到独立的分析数,简单描述此关系的公式为:

[0215] # 细胞分析 =  $2^n - 1$ , 其中 n 指代通道数,而每个通道中需要混合的细胞分析数是  $2(n-1)$ 。

[0216] 因此,将 16 中不同的 B 细胞系混合在一起,需要 5 个通道以进行 31 种变体的分析。一个 10 通道系统的设计实际上能够用于通过使用同时的阴性对照(5-通道阳性鉴定,5-通道阴性对照)而鉴定 31 种不同的制剂。

[0217] 下面所示的是一个 4-通道系统(15 种不同的分析)的相应的通道混合物和阳性探测

[0218]

| 通道 1                   | 通道 2                   | 通道 3                   | 通道 4                   |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| A, B, G, F, I, K, L, M | B, C, H, I, J, L, M, N | F, C, D, I, J, K, M, O | D, E, G, H, J, K, L, M |
| A                      | C                      | I                      | 1234M                  |
| N                      | H                      | J                      |                        |
| O                      | D                      | K                      |                        |
| E                      | B                      | 124L                   |                        |
|                        | F                      |                        |                        |
|                        | G                      |                        |                        |

[0219] 可以确定,无需过多的努力,本领域技术人员可以基于以上的描述和以下的实施例,将本发明应用至其最大的程度。下面的实施例应当被视为仅仅是举例说明本领域技术人员如何实施本发明,并不构成对说明书其他内容进行的任何的限制。

#### [0220] 实施例

[0221] 附图 1 是一种示意图,表示出本发明的常规的细胞成分。细胞(在此为 B 细胞)含有一种发光分子(在此为水母发光蛋白)且在其表面具有抗体。这些抗体特异于目标颗粒上的抗原,颗粒的例子例如生物武器制剂。目标颗粒与 B 细胞上的抗体的结合将导致两个或者多个抗体在细胞表面聚积,引发的信号转导级联将导致钙从细胞内的储存处释放到细胞质内。这种细胞质内钙浓度的升高导致水母发光蛋白释放光子。然后,光子被一个例如 CCD 的光电倍增装置捕获并且记录。因此,使用具有功能性表面并且含有可应答于钙浓度升高的细胞质发光分子的细胞,可以实现一种细胞生物探测器。

[0222] 这种基于细胞的探测系统提供了对任何目标颗粒上的任何抗原的快速、灵敏、特异性、精确和灵活的探测。在灵活性方面,该系统能够被改良成可以针对任何颗粒或者颗粒群。在一个实施例中,单个的发光细胞可以含有许多种抗体类型,每种类型都特异于目标颗粒的一些非重叠群。于是,这种单个发光细胞可以用来同时识别同一类的不同目标颗粒品种。

[0223] 在第二个实施例中,一个反应室内可含有两种类型的发光细胞。一类发光细胞含有一些特异于一种类型的不同种目标颗粒(例如,细菌)的抗体,并能在应答于与该类中任何一种颗粒相接触时发射一个具有第一波长的光子。第二类发光细胞含有一些仅仅特异于该类中某特定种的颗粒(例如,鼠疫杆菌)的抗体,并能在应答于与该种颗粒的结合时发射一个具有不同于第一波长的第二波长光子。这样的设计通过减小或者排除虚假阳性信号而提供了极高的准确性。仅当第一波长的光子和第二波长的光子都被探测到时,才记录为一个阳性事件。为了进一步减小或者排除虚假阳性信号,必要时,还可以把发光分子具有的特异性扩展到多于两种。

[0224] 附图 2 是本发明的常规结构和使用环境的示意图。

[0225] 附图 3 是本发明的一个实施方案所使用的分子生物学的示意图。在这个实施例中,表达了一种发光分子(例如水母发光蛋白分子)但不表达抗体的通用 B 细胞系被作为用来产生能表达任何特异于任何抗原的抗体的 B 细胞的基础。一种抗体表达载体被导入到一个被选择用于表达该载体并扩展用于本发明系统的普通 B 细胞中。用这个方法,结合以 pDisplay 和 VK 表达(在前面“抗体”一节有所描述),将产生对各种目标具有目标特异性的发光细胞。已经生产了特异于口蹄疫病毒(FMDV)、委内瑞拉马脑髓炎(VEE)病毒、鼠疫杆菌、土拉热弗朗西丝氏菌、布鲁氏菌、霍乱弧菌的 01 和 0139 菌株,和正痘病毒等的发光细胞。在 USDA 获得了 FMDV 抗体可变区域的 cDNA 和序列。NMRC 的研究人员获得了鼠疫杆菌、土拉热弗朗西丝氏菌、布鲁氏菌、霍乱弧菌 01 和 0139 菌株的抗体可变区域 cDNA 和序列。分别在 CDC 和 USAMRIID 获得了由杂交克隆产生的 VEE 和正痘病毒抗体的可变区域。口蹄疫病毒(FMDV)、鼠疫杆菌、土拉热弗朗西丝氏菌、委内瑞拉马脑髓炎病毒(VEEV)分别是口蹄疫、鼠疫、土拉热病、脑髓炎的起因。通过联合使用在一些公开的论文中描述引物自杂交瘤进行克隆。正在制造特异于 *Bacillus globigii* 的发光细胞,因为这种非病原性细菌被一些军事人员用作生物武器物质探测系统现场测试中的测试生物。附图 5 表示出一个说明当

几个特异于 FMDV 的发光分子的克隆与或 FMDV 目标接触时产生的光子发射应答的曲线图。在每种情况中,发光分子都在目标与细胞发生接触后约 20-30 秒内发出光子。附图中也显示出的数据表明:当一个不期望会与发光分子结合的突变 FMDV(在病毒衣壳蛋白中单个氨基酸的变异)与一个发光细胞克隆接触时不会发光。这种阴性对照支持了导入探测系统的高度的特异性。

[0226] 各种构型的离心管和光电倍增管(PMT)的设定情况可用于本发明的系统。该设定包含个能使一个摆动装置的样品微量离心管旋转的转子(马达)和一个位于固定位置的平衡管。所述 PMT 位于底部,在其静止时其向上对着样品管的底部一端。在一个典型的试验中,对于比发光细胞小的目标颗粒,含有颗粒的液体样品被放置在样品管中,并且在足以将大部分颗粒沉降于管底的条件下进行离心(例如,对于土拉热弗朗西丝氏菌为 56xg,60 秒)。然后将发光细胞悬浮液至于管中的样品上层(这样使其不会搅动沉积的颗粒),并且短暂离心,以使细胞与目标颗粒相接触。如果目标颗粒存在于待测颗粒中,细胞将发射特定波长的光子,并且由 PMT 捕获并记录。

[0227] 在特定的实施方案中,PMT 可以是斯坦福 Research systems 的 SR400 双通道选通光子计数器系统相接口的 Hamamatsu(公司)的 HC125-08 光电倍增管。离心机可以是带有一个摆动管构型的 Sapphire(蓝宝石)17 转,18.5AWG,5 安培马达。

[0228] 离心管(反应室)可以根据需要进行改造和升级,以帮助待测颗粒和发光细胞进行接触。在附图 20 所示的一个实施方案中,离心管包含一个位于管底处的、含有预先安装的发光细胞的封闭的间隔(小室)。这个间隔(小室)通过一个可溶性金阳极膜与管子的其余部分隔离。在操作中,一个含有待测颗粒的样品被置入管内,并借助旋转使待测颗粒在膜上聚积。然后将膜溶解,使管子进行短暂的旋转,以使颗粒与发光细胞相接触。这个可溶性膜系统已经由 Langer 及其同事在《Angewandte Chemie International Edition》39: 2396-2407,2000 以及《自然》397:335-338,1999 中描述。

[0229] 离心过程的一些步骤可以是自动化的,或者可以设计成使用者根本无需停止离心。例如,通过适配于 Beckman Instruments 公司购得的制备性离心机(例如,超速离心机)的机构特性,液体和样品的加入和去除可以在不停止转子旋转的情况下完成。此外,有可能希望在向心力仍然存在的情况下来探测光子的发射(例如,对于发光细胞与目标颗粒的接触在不经离心就不稳定的情况下)。为了探测从旋转着的样品管发出的光子,PMT 可以安排在相对于转轴的一个径向位置处。在大多数情况下,这种设定下的 PMT 不需要与样品管一同旋转,取而代之的,PMT 可以是静止不动的,当样品经过 PMT 前方时简单的记录光子的发射。如果发射的信号非常弱,可以把探测器(例如,PMT 或者 CCD 芯片)连结到转子上,与样品管一同旋转。可选择的,可以用设定在转子周围的多个 PMT 来探测光子的发射。

[0230] 如果多个样品在同一个转子上转动,则必要时可以改变 PMT 的位置或者信号处理方式。在一个实施方案中,一个转子上承载了 4 个样品管,每个样品管含有能发射同样波长光子的细胞。为了区分来自每个样品的发射,可以用一个径向对准的 PMT 连续的探测发射情况。然后利用一个来自转子的监视每个样品在各个时刻的位置的时标曲线来分解连续的发光数据,确定每个样品的发光情况。可以理解,本发明还包括了一些其他的变化。

[0231] 例如,附图 17 是转子上承载了 2 个反应管,并且在管子下方有 2 个对准着的 PMT 的示意图。在停顿位置处,转子利用转子位置编码器使每个管子向下对准于相应的 PMT。在

另一个例子中,附图 17 中所示的离心体系可以和一个空气采样收集器集成在一起,构成如附图 18 所示的系统。径向的气溶胶撞击管可以包括任何类型的颗粒监视器,例如在美国专利 NO. 5932795 及其引证文件中描述的监视器。在另外一个例子中,附图 18 所示的系统可以被改成只需要一个相对于转子轴径向对准的 PMT,正如附图 19 所示。如上所述,被 PMT 记录的发射情况可以用轴位编码器分解成每个样品管的发射。

[0232] 返回到附图 17,其中液体成分包括,但不限制,被加工成可以识别特定生物制剂的 B 细胞悬浮液,缓冲溶液,防腐剂,细胞培养介质,它们可以被放置在几个离心管中的每一个,并混合以悬浮着在另一个步骤中预先从气溶胶样品中收集到的样品颗粒的液体,其中颗粒可以包括但不局限于:蛋白质、肽、化学制剂、病毒、以植物形态或者孢子形态存在的细菌、真菌孢子、花粉粒子、原生动物、血液或组织细胞以及它们的碎片,这些颗粒可以是单独的,也可以是与例如灰尘等载体例子相结合的。当马达开始旋转时,离心管被甩出进入径向位置,B 细胞和 / 或样品颗粒将按照颗粒的大小和密度以不同的速率被驱赶到离心管的底部。细胞和含有样品的液体的加入和离心的准确顺序可以根据它们的相对沉降速度,以得到最大信号为目的来设计。一般来说,可以预期能够通过选择使这些样品旋转(预旋转)适当时间,然后加入 B 细胞并使它们一起旋转到互相接触,来使比 B 细胞沉降的慢的颗粒能诱导出最大的光子输出。对于以相似于或者快于 B 细胞的速度沉降的颗粒,对样品与 B 细胞混合物的单次旋转将诱导出系统的最大光子输出。可以利用集成于离心装置的上游的颗粒尺寸分析器(包括但不局限于 BAWS 单元,和液体颗粒分析器)所给出的数据来自自动化确定最优的操作顺序和启动恰当的计算机控制自动样品处理。

[0233] 当“旋转周期”结束,并且在旋转马达和轴位编码器的控制之下转子在一个预定位置上停下来时,摆臂将由于重力作用而下垂,使离心管的底部面对于光电倍增管的光敏面,然后记录任何光信号。在该实施例的一个改良型中,可以把单个光电倍增管放置在转子 / 反应管离心机的最大半径处,以便在各个反应管相继经过光电倍增管的光敏面时收集来自反应管的光子。可以根据轴位编码系统的监视来区分和叠加来自每个反应管的光子输出。

[0234] 返回到附图 18,其中对气溶胶颗粒的收集处理和使气溶胶颗粒与 B 细胞相接触的处理被集成到一起。在这里,离心管被安装在摆臂上,旋转时摆臂将让离心管能盖住径向撞击管的端部,于是,由于作用在旋转着径向撞击管内的空气上的离心力,气溶胶样品将被引导流进离心管的样品入口(如有必要,可辅之以另外的吹气单元)。高速的流动使气溶胶颗粒被捕获到离心管的内表面上或者管内所含液体的表面上,分别造成颗粒被捕获于管子表面或者液体中。当有液体存在时,作用在液体的离心压力将能抵消为让颗粒被捕获于液体所需的高速空气流所产生的力,并防止颗粒被撞击空气吹出。在与管子表面或者液体撞击后,气溶胶颗粒将被留住,对于液体收集的情况,颗粒将被迫沿径向向外流动,结果在最大半径处(离心管底部)产生增大的局部颗粒浓度。在收集步骤之后加入 B 细胞将它们旋转到局部浓缩的颗粒所处的同一区域将造成光子输出。可选择的,也可以时在收集步骤进行时已在液体中加入了 B 细胞,并且单个光电倍增管在旋转时实时监测输出(附图 19)。这一实施例的一种修改是,在入口处加入液体组分(包括但不局限于通过其他手段例如生物气溶胶颗粒收集器所收集的颗粒样品,和已加工 B 细胞的悬浮液)并且离心力使它们分布到管中。

[0235] 当“旋转周期”结束,并且在旋转马达和轴位编码器的控制之下转子在一个预定的

位置上停下来时,摆臂将由于重力作用而下垂,使离心管的底部面对于光电倍增管的光敏面,然后记录任何光信号。在该实施例的一个修改型中,可以把单个的光电倍增管放置在转子/反应管离心机的最大半径处,以便在各个反应管相继经过光电倍增管的光敏面时收集来自反应管的光子。可以根据轴位编码系统的监视来区分和叠加来自每个反应管的光子输出。

[0236] 附图 7 是顺序离心结果的代表性示意图。对于小于发光细胞、但具有与发光细胞相同密度的目标颗粒,首先旋转待测颗粒(例如,以高速)使其成团是有益的。然后,可以加入发光细胞,再在能防止减小所需的细胞应答特性的可能是较为温和的条件下进行旋转(图中最高一行的顺序)。此外,这种离心顺序将迫使几乎所有的待测颗粒和发光细胞进入离心管底部处的一个相对较小的体积内。相反的,如果先混合待测颗粒和发光细胞,然后一次性的使它们旋转将会导致颗粒与发光细胞的分离而不是接触(图中的中间行)。当然,如果根本不作旋转,则将大为减小反应室中颗粒和发光细胞的有效浓度(图中最下一行)。

[0237] 附图 8 给出了一个用实际试验验证了附图 7 的顺序结果的曲线图。在附图 7 所示的三种方法中,都使用了对土拉热弗朗西丝氏菌具有特异性的发光细胞与已经死亡的土拉热弗朗西丝氏菌的混合。正如曲线图中所看到的,顺序旋转方法造成了接触以后的快速而高效的发光。相反的,单次旋转方法的发光曲线在时间上和幅度上都要差的多。无旋转的方法则难得产生几次发光反应。

[0238] 在另外的一个试验中产生了类似的发光曲线,正如附图 8 中的曲线图所示。对这些发光曲线的观察表明:单次旋转方法中的目标特异性发光比两次旋转的方法稍微快了一些。然而,已经发现,这一结果的产生主要是由于两次旋转方法需要较长的旋转时间所造成的,因此,并不能反映出 B 细胞的应答时间在实际上有所改善。事实上,两次旋转方法的初始斜率明显大于单次旋转方法,这说明两次旋转方法导致了健全的发光应答。

[0239] 附图 8 中所示的探测系统的灵敏度可以使用滴定方法计数进入到离心管里的土拉热菌的数目来评估。附图 10 所示的曲线图总结了评估的结果。可以看出,25000 个发光细胞能在应答于约 5300 个土拉热病目标颗粒时发出超过背景的可探测光子。可以期望,对反应条件的进一步优化将提高灵敏度。

[0240] 经过一次冷冻-解冻循环能提高细胞应答(参见附图 22)。在这个试验中,对特异于鼠疫杆菌(YP)的细胞进行管理信、再次悬浮于冷冻剂(含有 10% DMSO 的 RPMI 再加上 10% 的 FBS)、在  $-80^{\circ}\text{C}$  下冷冻,然后转移到液态氮中。细胞在  $37^{\circ}\text{C}$  下进行解冻,把 1ml ( $2 \times 10^6$  个)细胞稀释在 4ml 的 RPMI 中,并在  $37^{\circ}\text{C}$  下培育过夜。第二天,对细胞加载腔肠素等待 2 小时,然后洗入二氧化碳-独立介质( $\text{CO}_2\text{-I}$ ),恢复 24 小时。用  $5 \times 10^5$  个 YP(50ul 深度的  $10^7/\text{ml}$  的 YP)作用于 10000 个细胞。未经处理的细胞表现为 9500 个光子每秒的应答,而经过冷冻解冻的细胞在应答于 YP 时发出了 6 倍的光子。通过仅使细胞暴露于冷冻剂而不进行冻结的手段,这一刺激作用可被大量复制(5 倍刺激)。可以看出,冷冻剂中的刺激因子是 DMSO。当细胞用 2% 的 DMSO 处理时(是指 DMSO 的最终浓度,即让 1ml 位于含有 10% DMSO 的冷冻剂的细胞稀释到 4ml 的普通冷冻剂中),可以探测到类似的刺激水平。DMSO 的作用可以归结到许多因素。已经知道, DMSO 可以实现造血细胞的分化,可能就是通过这个途径刺激细胞。此外,在含甘油的介质中冷冻细胞也显示出相类似的刺激水平。因此,可以看出,该作用还部分的由于 DMSO 所诱导的应激应答,有可能可以利用任何一

些能刺激“热休克”应答的条件来复制这一刺激。

[0241] 细胞可以在充有腔肠素的冷冻状态下储存。先将细胞加载腔肠素,使其恢复 24 小时,然后再冷冻。解冻以后,细胞用 10ml 的 CO<sub>2</sub>-I 介质洗涤,使细胞以  $5 \times 10^5$  个 / 毫升的浓度重新悬浮于 CO<sub>2</sub>-I 介质中。这些细胞能够探测 YP (在解冻后大约 1 小时,但较短的时间也是可能的)。如果在室温 (RT) 下储存,几天以后这些细胞仍然能够探测制剂。在对细胞加载腔肠素和冷冻之前,使用 DMSO 进行预处理能够提高解冻以后细胞对待测制剂的灵敏度。

[0242] 在附图 22 中所示的是经过各种细胞处理以后,细胞对于稀释于 CO<sub>2</sub>-I 中的 50ul 的浓度为 100000000 个 YP / 毫升的 YP 的应答情况。未经处理:细胞在 RPMI 中生长,使用腔肠素加载,洗涤,恢复 24 小时,然后加入 YP。冷冻 / 解冻:细胞在 RPMI 中生长,转移到冷冻介质,并且冷冻。解冻的细胞 (1ml) 被放置于 4ml RPMI 中,在 37℃ 下培育 24 小时,加载腔肠素,洗涤,恢复 24 小时,然后加入 YP。冷冻介质:细胞在 RPMI 中生长,转移到冷冻介质,在室温下 (RT) 培育 10 分钟。细胞 (1ml) 被放置于 4ml RPMI 中,在 37℃ 下培育 24 小时,加载腔肠素,洗涤,恢复 24 小时,然后加入 YP。2% DMSO:细胞在 RPMI 中生长,转移到含有 2% DMSO 的 RPMI 中,在 37℃ 下培育 24 小时,加载腔肠素,洗涤,恢复 24 小时,然后加入 YP。

[0243] 一个成功的生物武器探测系统应当能够抵抗来自战场上一般环境物质的污染。为了评估发光细胞能否在环境压迫或污染下工作,在使发光细胞暴露于强柴油排放环境中 1 小时 (参见附图 11 中左边的线形图) 或者使发光细胞被 107 个大肠杆菌 (作为任何现场细菌的污染替代品) 污染以后 (参见附图 11 中右边的线形图),再让其与目标颗粒混合。其结果正如附图 11 中所示,上述特定的化学污染和生物污染测试并不影响发光分子在应答于目标颗粒时的光子发射能力。

[0244] 附图 13 和附图 14 描述了本发明的一个不同的实施例,其中不需要离心。附图 13 的示意图显示了该实施例中的不同组合。生物气溶胶警告传感器 (BAWS) 探测例如具有预定尺寸范围的颗粒是否出现。Primmerman 在《林肯实验室学报》12:3-32,2000 中的文章描述了 BAWS 的一个例子。如果要探测某些符合一定规定的颗粒,BAWS 将触发一个空气 - 空气收集器 (样品收集器,如美国专利 NO. 5932795 中描述的),使得具有特定尺寸范围的颗粒在第一站处就被收集和储存在一个位于样品带条某一部分上的孔 (反应室) 中,对此,附图 14 给出了不同视角的视图。当待测颗粒储存于所述孔中后,带条将前进到一个位于发光细胞池 (reservoir) 下方、PMT 上方的第二站处。对目标颗粒上的目标抗原具有特异性的发光细胞储存在孔内,从孔中发射的光子可以被很好的监测到。

[0245] 在待测颗粒被 BAWS 探测的过程中,随着带条穿越第一站,各个待测颗粒可以被储存在一些相继的孔中 (附图 14)。在第二站处,多个分别含有不同目标特异性发光分子的发光分子池被安装在一个转盘上,所述转盘可以使某个特定池旋转 to 指定位置上,以便让不同的发光细胞储存到孔中。通过这种方式,便可以探测到含有待测颗粒的不同目标,正如附图 14 中关于孔的顶部视角示意图所示的。当然,如果不同的发光细胞能发射不同波长的光子,则只要位于第二站下方的 PMT 能够区分不同的波长,便有可能将不同的发光细胞储存到同一个含有待测颗粒的孔内。

[0246] 附图 16 是本发明系统的又一个实施例的示意图。在该实施例中,空气颗粒在第一站处被储存在一个二维孔排列的一个含有 6 个孔的行中的每个孔内 (例如,一个带条上含

有 6 个行和几百个栏)。这样,每当孔排列前进一行,使这个行位于第二站处,向该行内的每个孔内储存不同的发光细胞,便可以由设置在第二站下方的一行 PMT 同时探测出全部 6 个反应的光发射。为了帮助颗粒黏着在带条上的孔中,可以在孔中涂覆粘合剂或者液体。

#### [0247] 细胞工程和试验方法实施例

##### [0248] A:细胞加工方法

[0249] 将 M12g3R 细胞在 37℃ 下保持在含有 5% CO<sub>2</sub> 的 RPMI1640 潮湿环境中, RPMI 中还添加了 10% 的胎牛血清、1mM 的丙酮酸钠、2mM 的 L- 谷氨酸盐、100 μM 的非必需氨基酸、50 μM 的 2- 巯基乙醇、50U/ml 的青霉素、和 250ng/ml 的两性霉素 B(Life Technologies 公司)。细胞通过电穿孔 (270V、950 μF) 被转染以 Pcmv AEQ. IRES. NEO, 并在 1mg/ml 的 G418 中选择两周。筛选出能应答于抗 -IgM 的 G418 抵抗克隆。这些在交联于表面 IgM 时能取得光子发射最大增强的克隆被用于随后的转染以产生特异于特定病原体的 B 细胞系。通过 (借助于电穿孔) 与轻、重链以及一种对向嘌呤霉素传递抵抗性的基因编码的链的共同转染, 具有加工获得特异性的抗体的表面表达即可完成。嘌呤霉素抵抗物和克隆是根据它们对抗原的应答来选择的。在人类延长因子 1 α (EF-1 α) 启动子的控制下, 轻链表达载体, VK 表达, 将在多个克隆位点 (MCS) 的下游包含对于人类 κ 基因的恒定区。重链载体是通过改良的 pDisplay (Invitrogen) 来产生的: 保留巨细胞病毒 (CMV) 启动子和引导序列, 但用小鼠 IgM 的结合于膜上的恒定区的基因来取代从血小板衍生的生长因子 (PDGF) 受体跨膜结构域, 并且去除 MCS 任意一侧上的两个标记。使用 PCR 向抗体可变区加上一些合适的限制点, 并在克隆成表达构建体之前确认所有 PCR 产物的序列。用来产生重组抗体的可变区是从以下两条途径克隆的: 从 cDNA 克隆或者由利用随机寡核苷酸引物和 PCR 的逆转录 (RT) 从杂交瘤克隆。根据制造商的推荐, RNA 可以用 Trizol 试剂 (Life Technologies 公司) 提取, 且第一链的合成使用逆转录试剂盒 (Ambion) 进行。PCR 用设计为与轻链或重链 5' 端的引导序列 [S. T. Jones 和 M. M. Bendig 《Bio/Technology》9, 88, 1991] 以及小鼠 κ 或 IgG2 的 3' 端的恒定区退火的几组引物进行。

##### [0250] B:生物发光 B 细胞对 FMDV 的应答

[0251] 用于发光试验的、以 pCMV、AEQ、IRES、NEO 质粒和能识别 FMDV A12 菌株的重组抗体的表达载体稳定的转染的 M12g3R B 细胞用下述方法进行制备: 细胞在第一天进行解冻。解冻后经过 24 小时再制备细胞对于获得最大活性和可靠性是至关重要的。冷冻 / 解冻步骤可以使 B 细胞的应答提高多达 100 倍。在第二天, 在覆盖有箔片的情况下, 在含有 50 μM 腔肠素 (MolecularProbes 公司, Eugene, Oreg) 的试验介质中 [无需 CO<sub>2</sub> 的介质、10% 的 FBS、50 μg/ml 的链霉素、50U/ml 的青霉素、250ng/ml 的两性霉素 B(Life Technologies 公司)] 以室温培育 106 个细胞 2 小时, 洗涤两次, 并且以 5×10<sup>5</sup> 个 / 毫升的最终浓度重新悬浮于试验介质中。在 1.5ml 的微量离心管中在室温下整夜旋转细胞, 待 15-20 小时以后进行试验。在试验中, 用 25 μL 的细胞与抗原混合 (5 μL 浓度为 14×10<sup>8</sup> pfu/ml 的 wtA12pRMC35 菌株, 10 μL 浓度为 7.5×10<sup>7</sup> pfu/ml 的 A12 突变体 B2PD. 3), 并用测光计 (Lumat LB9507, Perkin Elmer) 测量应答。

##### [0252] C:细菌和大病毒的生物发光试验

[0253] 本传感装置和方法可以用于细菌和病毒的快速探测。细胞系被加工成能够应答于土拉热弗朗西丝氏菌——土拉热病的病源。然而, 当采用与 FMD、VEE 病毒相同的方法进

行试验时,信号产生缓慢并且几乎无法与背景分开,这表面 B 细胞与抗原之间的相互作用率很低(0 秒预旋转 /0 秒旋转)。过去用抗原珠刺激剂所做的试验已经证明,通过浓缩抗原和 B 细胞可以提高灵敏度和速度(数据未给出),于是重新设计测光计,使其在光电倍增管(PMT)上方设置一个离心机。当制剂与细胞混合在一起的时候,使用离心机浓缩 5 秒,发现信号改善并且应答加快(0 秒预旋转 /5 秒旋转)。当在加入细胞前预先使较慢沉降的土拉热弗朗西丝氏菌离心时(60 秒预旋转 /5 秒旋转),可以观察到最理想的结果。这一方法保证了在短时间内有大量细胞与抗原发生物理接触,从而在灵敏度和速度方面有显著的提升。在对试验方案进行了额外的优化以后,我们可以在不到三分钟的时间爱你内探测到 60cfu(克隆形成单位)的土拉热弗朗西丝氏菌,其中还包括了预旋转的时间,但是没有看到对灭活的鼠疫杆菌(鼠疫的致病杆菌)的应答。这一探测限制已经由另两个灭活的土拉热弗朗西丝氏菌来源和一个不同菌株的肯定(数据未给出)。而且,本传感器装置还具有宽广的灵敏度范围,可探测的浓度范围达到 7 个数量级。

[0254] B 细胞使用上述方法进行制备。50  $\mu$  L 含有上述数量的鼠疫杆菌或者土拉热弗朗西丝氏菌的试验液以 6500xg 离心 60 秒,然后加入 20  $\mu$  L 的细胞,并且在离心测光计中再旋转 5 秒。使用 Hamamatsu HC-125 光电倍增管探测光子,用 Stanford Research Systems SR400 选通光子计数器监测信号。

[0255] 核酸探测实施例

[0256] 表达地高辛配基抗体的发光细胞的特性

[0257] 将编码针对地高新配基的抗体(Daugherty 等人在《蛋白质工程》11(9):825-832, 1998 中的文章有所描述)的质粒导入发光细胞中,然后使用与地高辛配基化学缀合的蛋白(BSA)(Dig-BSA)筛选这些细胞。12 个各自不同的池(pool)被选出来,意味着 12-24 个各自不同的细胞系。第一个试验测试这些细胞能否探测到交联了 DNA(Dig-DNA)的地高辛配基抗原。测试了三种不同类型的可购买获得的 Dig-DNA,分别让它们与下列物质反应:表达地高辛配基抗体的淡黄色细胞(附图 26A-C)、通过每 20 个碱基对与地高辛配基连接的质粒 DNA(附图 26A)、通过每 200 个碱基与地高辛配基连接的 DNA 分子量标记(附图 26B)、和每端都与一个地高辛配基相连接的 DNA 分子量标记(附图 26C)。每样标准制剂都能不同程度的刺激发光细胞,使用地高辛标记的质粒 DNA 表现出最高灵敏度的应答。平均间隔 20 个碱基的抗原对细胞的刺激比平均间隔 200 个碱基的抗原对细胞的刺激要大 100 多倍(对于每个地高辛配基单位来说,不是对于每微克 DNA 单位来说),这个事实表明,对于想要刺激出一个理想的应答来说,200 个碱基是个太长的距离了。为了刺激导致钙释放的胞内级联和水母发光蛋白光子产生,相邻的抗体必须被固定在与彼此足够近的位置,以便激发细胞内的反应。

[0258] 我们同样注意到,在测量光子输出之前进行离心,这个在使用传统淡黄色细胞探测可溶性抗原和不溶性抗原方法中的反应顺序,事实上能够降低淡黄色细胞对可溶性 Dig-DNA 抗原的灵敏度。在该试验中显示(附图 27A 和 27B),在 DNA 溶液中离心细胞看起来似乎减少探测限制将近 10 倍。这个结果反映出对于 DNA 的探测和对于其他不能沉淀抗原的探测之间的区别。

[0259] 使用发光细胞对杂交型寡核苷酸探针的探测

[0260] 这个试验被设计用来探测地高辛配基标记(Dig-labeled)探针与目标 DNA 的杂

交。所述实验中使用的目标 DNA 来自于噬菌体质粒 pBluescript II。可以将这种 3100 个碱基对长度的环形噬菌体质粒导入以制备双链 DNA(dsDNA) 或者两条单链 DNA(ssDNA) 的任意一条。这两条单链 DNA 链被称为 (+) 链和 (-) 链。10 个特异性结合于 (+) 链的地高辛配基标记的寡核苷酸探针被设计出来：

[0261]

| 寡核苷酸号码 | DNA 序列                     | 噬菌体质粒碱基位置 | 解链温度 |
|--------|----------------------------|-----------|------|
| 1      | GCAACGTTGTTGCCATT( 序列 1)   | 2269-2285 | 56 0 |
| 2      | TACAGGCATCGTGGTGT( 序列 2)   | 2288-2304 | 53 3 |
| 3      | GCTCGTCGTTTGGTATGG( 序列 3)  | 2309-2326 | 57 3 |
| 4      | TCATTTCAGCTCCGGTTC( 序列 4)  | 2328-2344 | 55 0 |
| 5      | ACGATCAAGGCGAGTTAC( 序列 5)  | 2348-2365 | 53 1 |
| 6      | GATCCCCCATGTTGTGC( 序列 6)   | 2368-2384 | 57 7 |
| 7      | AAAGCGGTTAGCTCCTTC( 序列 7)  | 2388-2405 | 54 3 |
| 8      | TCCTCCGATCGTTGTCA( 序列 8)   | 2408-2424 | 56 5 |
| 9      | GTAAGTTGGCCGAGTG( 序列 9)    | 2428-2444 | 55 7 |
| 10     | TCACTCATGGTTATGGCA( 序列 10) | 2448-2465 | 53 5 |
| NEG3   | CCATACCAAACGACGAGC( 序列 11) | 2326-2309 | 57 3 |

[0262] 利用寡核苷酸沿 pBluescript 噬菌体质粒 DNA 上的位置顺序对寡核苷酸进行编号。上述每个显示的是寡核苷酸的 DNA 序列, 该序列在噬菌体质粒上的位置, 和寡核苷酸的解链温度 ( $T_m$ ) (结合吸引力的近似值)。这些寡核苷酸的解链温度上的微小差别表明它们每个都具有相似的结合特性。

[0263] 每一个寡核苷酸都有一个地高辛配基 (Dig) 连接在其第一残基上, 它们之间相似的解链温度 ( $T_m$ ) 反映了它们之间具有相似的结合目标 DNA 的特性。这 10 个地高辛配基标记的寡核苷酸杂交到目标 DNA 的 (+) 链上, 会导致双链 DNA 有 200 个碱基的延长, 其中每 20 个碱基含有一个 Dig 分子。质粒上剩余 2900 个碱基还保持单链状态。这套固定化地高辛配基抗原与发光细胞表面上的地高辛配基抗体交联, 从而刺激光子产生。

[0264] 第 11 号寡核苷酸 (NEG3) 是一个对照物。NEG3 被设计成直接与 3 号寡核苷酸相结合, 产生一个 20 个核苷长的短小的双链 DNA, 每个端点含有一个 Dig。表达地高辛配基抗体的发光细胞能够检测到 80 微摩 (femtomoles) 投入的寡核苷酸 (附图 28)。这个对照证明了, 对于杂交条件的选择, 应当是在解链温度范围内并至少足够使两个寡核苷酸结合。更重要的, 这个对照证明了, 与互补 DNA 有 20 个碱基的结合已经足够有力的交联抗体, 并使发光细胞发出信号。

[0265] 寡核苷酸与寡核苷酸的杂交发生的异常快速 (附图 29)。将寡核苷酸 NEG3 在 3 号寡核苷酸之后加入到杂交溶液中。然后迅速将该溶液稀释于介质中, 加入发光细胞, 然后反应在光度计中发生 (从加入 3 号寡核苷酸开始消耗的时间为 15 秒)。这个简化的杂交方法没有戏剧性的影响试验的灵敏度 (对比附图 29 和 28)。

[0266] 接下来,将多个地高辛配基标记的寡核苷酸杂交到单链 DNA 目标上。检测得到的复合物刺激发光细胞的能力。附图 30 显示出了对于给定数量的单链 DNA 而言,不同浓度的地高辛寡核苷酸探针的杂交情况。在该实验中,产生最优信号的单链 DNA 寡核苷酸探针的比率在 1.2 到 1.4 之间。当探针浓度高时,未结合的地高辛标记寡核苷酸看起来是抑制信号的。在这些实验中,0-63pmoles 的寡核苷酸在很多测试条件下都表现的很好。一个剂量应答曲线给出了单链 DNA 的探测极限:约为 50ng,或者 50 微摩 (fmoles) (附图 31)。很值得注意的是,在任何这些实验中都无法探测到 (-) 链 DNA,这表明地高辛标记寡核苷酸的杂交以及随后的发光细胞发射信号取决于目标 DNA 上的序列。

[0267] 温度和缓冲液的组分影响着地高辛寡核苷酸 (Dig-oligos) 与目标 DNA 的杂交。在 47℃到 51℃之间的温度下,在 PBS (附图 32A) 或者 TBS (附图 32B) 中进行的杂交都产生了最优的应答。高于或者低于该范围温度下的杂交都降低了信号的振幅。缓冲液中组分的变化将明显的影响最理想的杂交温度。

[0268] 目标 DNA 捕获

[0269] 生物素标记的寡核苷酸被结合到有抗生蛋白链菌素涂覆的磁性珠和非磁性珠的表面上。这些“捕获”寡核苷酸被设计成在一个位置孔中与目标 DNA 结合,而不是与地高辛标记的寡核苷酸在同一位置。在加入发光细胞之前将目标 DNA 与一种沉降支撑物结合,能够使 DNA 被更加广泛的洗涤,并且提高试验的灵敏度。一种沉降目标 DNA 的方法如附图 33 所示。在这个示意图中,一个生物素标记的捕获寡核苷酸可以与有抗生蛋白链菌素涂覆的聚苯乙烯或者磁性珠相连接。将地高辛配基标记的寡核苷酸与目标进行杂交,将得到的杂交复合体利用离心或者使用磁性珠进行沉降。然后,将发光细胞重新悬浮并使用磁性珠进行沉降,并将反应管置于光度计中。沉降对探测目标 DNA 的影响如附图 34 所示。在这种情况下,要将 LOD 提高到 108 数量级范围,参照于 DNA 不发生沉降的典型数值。添加可购买获得的阻塞剂 (罗氏应用科学公司, Cat#1 096 176) 能够进一步加强信号。附图 35 表示的是在杂交 / 捕获过程中添加不同浓度的阻塞剂所产生的结果。在这个实验中,添加 1%到 10%的阻塞剂能够在任何目标测试浓度下都能够改善背景比率的信号。

[0270] Fc 受体发光细胞

[0271] Fc 受体是一个能结合抗体或者免疫复合体的膜表达蛋白的家族。它们能在一些例如单核细胞和巨噬细胞这类的造血细胞中表达。一些存在的 Fc 受体的小类包括 Fc  $\gamma$  受体 I (Fc  $\gamma$  RI), 一种可溶性抗体的高亲和性结合剂。Fc  $\gamma$  RI 结合于免疫球蛋白 G (IgG) 的恒定区域 (Fc 部分), 而将抗体的抗原结合区域留出。抗体结合型受体与特定抗原的交联会激发信号途径,从而刺激钙的释放。

[0272] 人类巨噬细胞系 U937 中含有内源性 Fc  $\gamma$  RI。用 IFN  $\gamma$  处理这类细胞能够增强 Fc  $\gamma$  RI 的表达,正如附图 36A 中所示。使用水母发光蛋白表达质粒转染 U937 细胞会产生功能性水母发光蛋白,正如使用钙离子载体 ionomycin 处理细胞所证明的那样。这会引起一个快速的、瞬时的钙的增加,从而刺激水母发光蛋白发射光子,正如附图 36B 中所示。接下来对 U937 进行测试,以确定水母发光蛋白是否会被由 Fc 受体的交联而引发的钙的增加所刺激。在室温下用人类 IgG 培养 U937 细胞 15 分钟。洗涤除去细胞中未结合的 IgG,然后用山羊抗人类 IgG 处理细胞。如附图 36C 中所示,可以观察到钙的快速增加。

[0273] 实验证明, U937 细胞可以被“加工成”能迅速的应答于几种不同的病原体或类似

物。用 IFN(200ng/ml) 处理 U937 细胞 24 小时,能够增加内源性 Fc  $\gamma$  RI 的表达,并为发光细胞试验做好准备。用下述抗体培养细胞:鼠类抗炭疽杆菌孢子(附图 37A),兔多克隆抗炭疽杆菌孢子(附图 37B),鼠类抗土拉热弗朗西丝氏菌(附图 37C),或者鼠类抗枯草杆菌(附图 37D)。然后将细胞应用于标准试验,在试验中,使用单克隆抗体探测 1000cfu 的炭疽杆菌孢子,使用兔多克隆体探测 10000cfu 的炭疽杆菌孢子,同样的方法也应用于探测 10000cfu 的土拉热弗朗西丝氏菌以及 1000cfu 的枯草杆菌孢子。

[0274] 接下来的一组实验证明,测验的特异性取决于使用的抗体。使用鼠类抗土拉热弗朗西丝氏菌对 U937 细胞进行培养,并探测 U937 细胞对 105cfu 的炭疽杆菌孢子的应答。如附图 38A 所示,细胞对炭疽杆菌没有应答,但应答于 106cfu 土拉热弗朗西丝氏菌。相反的,加载了鼠类抗炭疽杆菌孢子抗体的细胞对土拉热弗朗西丝氏菌没有应答,但应答于 106cfu 炭疽杆菌孢子,如附图 38B 中所示。而且,如附图 38C 中所示,在抗土拉热弗朗西丝氏菌抗体缺乏的状态下,细胞丝毫没有表现出对 106cfu 土拉热弗朗西丝氏菌的应答。

[0275] 16 通道传感器实施例

[0276] 已经成功的测试出了一种能减少测量多种样品(同时对硬件的要求最低)的时间的新的途径。一个实验性的传感器被设计成能通过单个的光收集通道来同时测量 16 种样品。所述传感器由一个能水平承载 16 根 1.5ml 的管的转子的构成,这 16 根管平均分布在转子的圆周上,由一个变速马达驱动,延垂直轴向转动(附图 39)。在转子的平面上置有一个单独固定的光子探测元件(在这个例子中,是一个 PMT),元件的位置刚好远于管子转动时经过的路径。通过这种方式,每根管都能按顺序的、重复的运动到密切接近 PMT 的位置,以便在每次经过 PMT 时管内发出的光都能被取样。最后,使用一个光学转换器来控制被探测光子的计数,这个光学转换器由一个光源(一个红外 LED)和一个探测器(一个光电晶体管)构成,并将得到的数据重新组织编入 16 个字段,每个字段对应于一个特定样品。

[0277] 一个测量过程由下列步骤组成:

[0278] 分别在不同的 1.5ml 管中准备 16 种样品(和/或对照物),

[0279] 向每个管中导入等量的发光细胞;

[0280] 将管子放入置于一个暗箱中的转子上,

[0281] 在高 RCF( $\sim 2000g$ ) 情况下短暂离心(5 秒钟),使发光细胞定位于管底,

[0282] 在测量过程中(1-2 分钟)降低转动速度至 60rpm,每个管每秒钟被取样一次,并且

[0283] 为每种样品建立一个光子计数的时间序列,用来显示和/或输入到计算机运算程序中以使用来评估。

[0284] 附图 40 是 16 通道测量数据的一个实施例,与单根管方法的数据相比显示出 LOD。由于这种 16 通道传感器正如它被设计的那样能测量 16 种样品,通过增加通道数以便能够测量更多数量的样品也成为可能,尽管传感器的尺寸和取样的统计学特性最终会限制实际的操作。类似的,可以通过减少放置在传感器上的样品的数量,或者通过减少传感器上通道的数量,使测量较少数量的样品成为可能。附图 41 所示的是一个 16 通道便携式传感器设计的 CAD 图。

[0285] 这种 16 通道传感器设计的另一个实施方案是被称为 TCAN 的传感器。这个 TCAN(Triggered-CANARY) 生物传感器是一种自动化生物传感器,它将气溶胶的收集和 B 细胞的运送整合到一个放射状圆盘形式。所述 TCAN CANARY 圆盘(CD)(附图 42)上接合了一

个管道,该管道能将空气流分配到各个通道中。所述气溶胶收集器(附图 43)利用干式撞击技术将气溶胶颗粒顺着空气流定位至空塑料管的底部。

[0286] 当气溶胶颗粒完成撞击以后,接合了管道的 CD 启动定位于圆盘上的电子管。圆盘快速旋转,这使得发光细胞液体流在离心力的作用下依次被送入不同的管中(附图 44)。然后,根据能够发射光子的发光细胞与气溶胶颗粒之间的相互作用,使用一个光学探测器来识别可能存在的生物制剂。这个气溶胶收集和发光细胞运输的过程可以在一个圆盘中重复多次。这个特性使得:能够在不更换 CD 的情况下,在几次触发事件之下可以完成多个 CANARY 试验。

#### [0287] 毒性探测实施例

[0288] 可以使用多种方法来实现对可溶性蛋白质的探测。例如,在一种方法中,将两种抗体表达在同一个发光细胞中,其中两种抗体分别针对同一个发光细胞的不同抗原决定簇。然后,将抗体与单体抗原交联(附图 48)。应当指出的是,在分泌途径中的抗体的种类在附图 48 的示意中是被理想化了的。在一个实施例中,所述抗体可以是杂和功能的(heterfunctional),例如,一个抗体上可以含有两个不同的功能性抗原结合位点。在另一个实施例中,每个抗体只能含有一个功能性抗原结合位点。这个方法取决于两个因素:(1)多功能抗体在同一个发光细胞中表达,和(2)两组相互连接的抗原决定簇足够来刺激发光细胞(尽管这些组中不止一个可能被需要用来刺激一个给定细胞)。

[0289] 在一个实验中,多功能抗体在同一个发光细胞系中表达(附图 49)。已经产生了抗炭疽杆菌和鼠疫杆菌的单个细胞系表达抗体。这个克隆细胞系对抵抗两种抗原都表现出很好的灵敏度。可以理解,针对同一个可溶性单体的两个抗原决定簇的两种抗体同样可以被有效的表达。并且,两个相互连接的抗原决定簇足够来刺激发光细胞。

[0290] 另一个探测可溶性单体抗原的方法是交联该可溶性抗原,使其对发光细胞表现多价性(附图 50)。这种交联可以通过将蛋白与珠接触来完成,或者如果是重组蛋白的情况下,可以使用标记,又或者利用抗体,如肉毒杆菌毒性 Hc 片段试验中证明的那样。还有其他各种可能的方法,能有效的完成抗原的交联,这些很容易被本领域技术人员所理解,包括使用三氯乙酸(TCA)沉淀抗原,加热或者使用乙醇,以及通过配合体、抗体或化学功能性基团接触所述抗原的方法。然后,可以使用发光细胞表达抗体探测交联单体,所述抗体能够识别交联抗原上仍然可以结合的抗原决定簇。

[0291] 这种方法已经在实践中被证明,使用肉毒杆菌毒性类型 A(BoNT/A Hc)作为可溶性单体目标蛋白(附图 51),使用 Pless 等人在《传染病与免疫学》(2001)570-574 中的文章中所述的抗体。识别一个抗原决定簇的单克隆抗体(6E10-10)被交联到 G 蛋白包被的珠上。将这些珠在 4℃下用 BoNT/A Hc 培养 3 小时,洗涤,然后用其刺激发光细胞表达第二抗体(6B2-2),所述第二抗体能识别一个不同的 BoNT/A Hc 抗原决定簇。被 BoNT/A Hc 修饰过的珠能够有效刺激发光细胞,出现 6ng 的 LOD。表达与帮助 BoNT/A 和珠结合的抗体相同的抗体的发光细胞不能被刺激,这表明发光反应不是由目标蛋白的聚积所引起的。

#### [0292] 化学探测实施例

[0293] 化学探测在军事装置和临床装置上都十分重要。某些化学物质可能含有两个抗原决定簇,可供抗体分别的结合。在这种情形下,化学探测方法应该与前述概括的毒性探测方法一样。然而,在很多情况下,在感兴趣的化学物质上不存在两个各自独立的抗原决定簇。

在这种情形下,有必要对所述化学物质进行修饰,使其可以刺激发光细胞。下述概括了四种不同的修饰方法:

[0294] 将感兴趣的化学物质固定于一个固体支持物上。制备发光细胞表达抗体,该抗体能够识别所述化学物质上仍然可以结合的部位。当所述固定于固体支持物上的化学物质的密度足够高时,发光细胞表面的抗体会被固定的与彼此足够近,以便刺激细胞。这个方法类似于附图 50 中所示的毒性探测的方法。

[0295] 首先,制备能够特异性结合化学物质的肽(肽链)。接着,制备能够特异性结合化学物质-肽复合体的抗体。如果该化学物质-肽复合体有两个或两个以上抗原决定簇,该复合体可以由在毒性探测部分描述过的两种抗体任意之一的技术进行探测。如果该复合体只有一个特异性抗原决定簇,那么,可以使用一个额外的抗原决定簇,例如地高辛配基,与肽合成(附图 52),那么,所述复合体就包含两个抗原结合位点了,分别是(1)由肽-化学物质复合体形成的抗原决定簇,以及(2)地高辛配基抗原决定簇。只有在化学物质存在的情况下两个抗原决定簇才存在。随后,这两个抗原决定簇可以由在毒性探测部分描述过的两种抗体任意之一的技术进行探测。

[0296] 制备两种能特异性结合化学物质的肽(或者是在化学物质的存在下能互相结合的肽)。每种肽都可以被合成标记,只有在化学物质存在的情况下,两个抗原决定簇才能互相结合,因此可以被发光细胞探测到(附图 53)。或者,可以提供能针对肽-化学物质复合体的一种或者多种抗体,然后,使用针对该复合体的抗原的组合,或者一种针对复合体的抗原和一种针对肽标记的抗原的组合,来探测上述化学物质的存在。

[0297] 如上所述,制备能够特异性结合化学物质的肽(肽链),并且制备能特异性结合肽-化学物质复合体的抗体。对所述与化学物质结合的肽进行二聚,如此以来,如果得到的二聚物结合两种化学物质,它就会含有两个抗体结合位点。这个复合体可以由能够表达针对化学物质-肽复合体的抗体的发光细胞来进行探测。

[0298] 将与小分子结合的肽从组合文库中分离出来。这些分子包括卟啉(Nakamura 等人在《生物传感器和生物电子学》2001,16:1095-1100 中的文章所描述)、色氨酸(Sugimoto 等人 1999,677-678 中的文章所描述)和镉(Mejare 等人在《蛋白质工程》1998,11(6).489-494 中的文章所描述)。然而,使用蛋白质代替肽能够获得更高亲和力的结合体。已经建立了文库,在所述文库中对结合位点进行了组合定义,这些被组合定义的结合位点可以被用来分离与小分子结合了的位点。像这样使用 lipocalin 作为起始蛋白的文库可以被用来分离能结合地高辛配基变体的结合体(Schlehuber 和 Skerra 在《生物物理化学》96:213-228,2002 中的文章有所描述)。可以使用许多其他的蛋白作为起始蛋白来实现该方法,但是那些已经对目标化学物质具有某种结合活性的蛋白可能是尤其希望的(例如,乙酰胆碱酯酶,在针对 VX 和沙林病毒的情况下)。

[0299] 本领域技术人员应该理解,虽然本发明仅对优选的实施方案进行了详细的表示和说明,但在不背离本发明主旨的情况下的各种形式上和细节上的改变都应当包含在本发明的范围之内,在从属权利要求中被包括。

[0300] 这里引用的所有文献、专利及专利申请文件的相关教导在此全部结合作为参考。

## 序列表

<110> 麻省理工学院

埃里克·D·施沃贝尔  
詹姆斯·D·哈柏  
玛莎·S·皮特罗维基  
弗朗西丝·E·纳吉  
托德·H·瑞德  
克里斯汀尼·E·霍根  
理查德·H·马修思  
约瑟夫·莱西瑞格诺拉  
马克·汉尼斯  
特瑞那·R·维安  
罗斯·M·约瑟夫  
雷蒙德·尤塔罗  
柏利省·沙安  
伯纳德特·约翰逊  
马克·A·霍利斯

<120> 光电子探测系统

<130>0050.2068014

<150>11/001, 583

<151>2004-12-01

<150>10/467, 242

<151>2004-01-16

<150>PCT/US02/03606

<151>2002-02-06

<150>60/266, 977

<151>2001-02-07

<160>11

<170>FastSEQ for Windows Version 4.0

<210>1

<211>17

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>1

gcaacgttgt tgccatt

17

<210>2

<211>17

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>2

tacaggcatc gtggtgt

17

<210>3

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>3

gctcgtcggtt tggtatgg

18

<210>4

<211>17

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>4

tcattcagct ccggttc

17

<210>5

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>5

acgatcaagg cgagttac

18

<210>6

<211>17

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>6

gatccccat gttgtgc

17

<210>7

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>7

aaagecgtta gctccttc

18

<210>8

<211>17

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>8

tcctccgatac gttgtca

17

<210>9

<211>17

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>9

gtaagttggc cgcagtg

17

<210>10

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>10

tcactcatgg ttatggca

18

<210>11

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>11

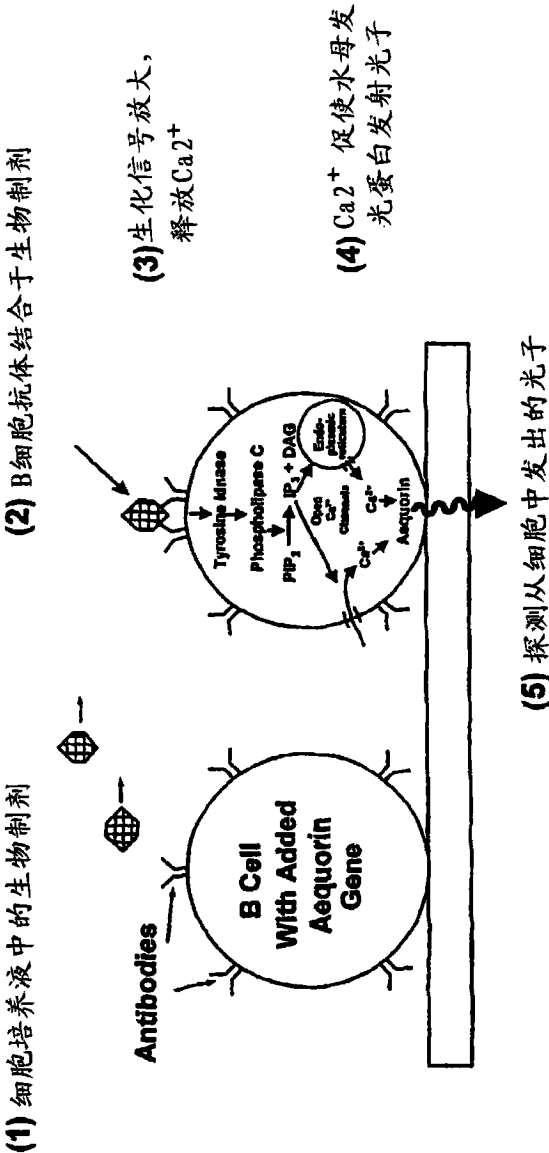
ccataccaaa cgacgagc

18

传感器概念

基于细胞的传感

- 几秒钟内应答
- 高灵敏度
- 不同的B细胞特异于不同的生物制剂

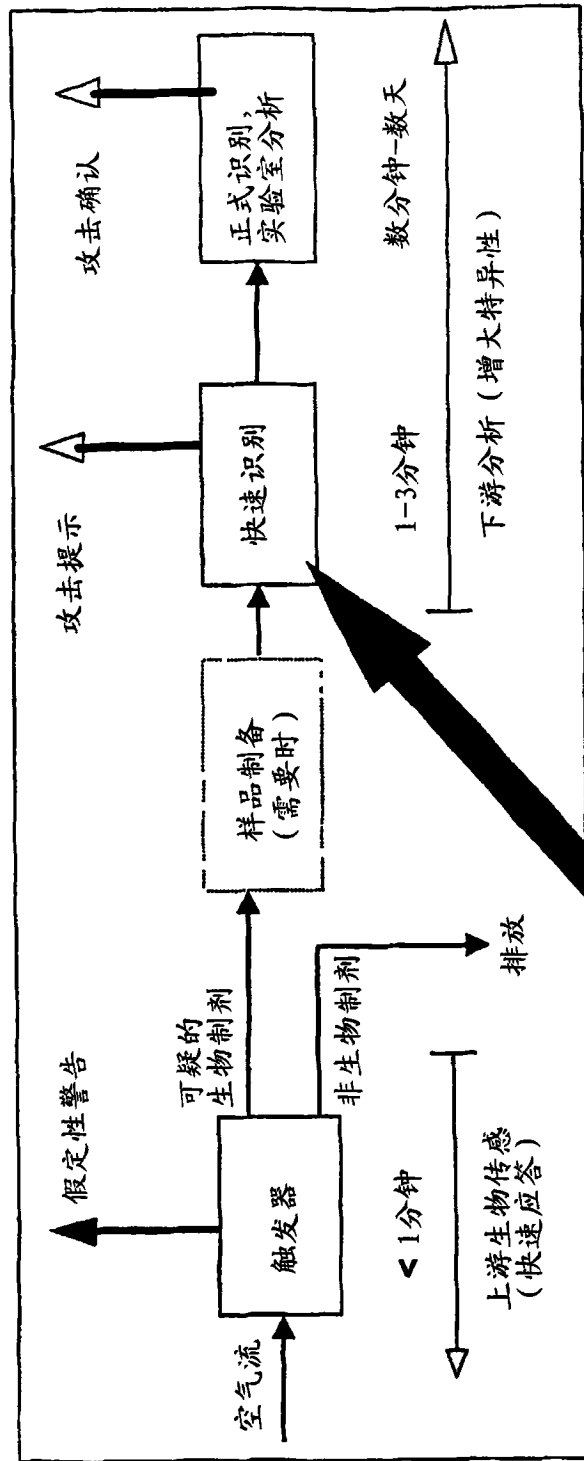


理论依据

- 某些生物制剂能以1-10个颗粒的水平感染
- 为探测存在典型生物背景计数时的低水平攻击所需的快速、灵敏识别传感器

图 1

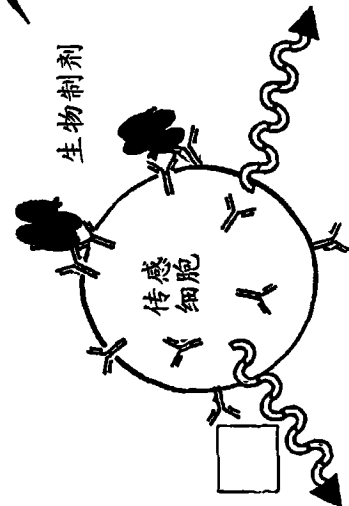
## 一般生物传感器体系



## 设计目标

- 快速、灵敏的识别传感器
- 很强的抗污染能力

图 2



传感细胞系的生成

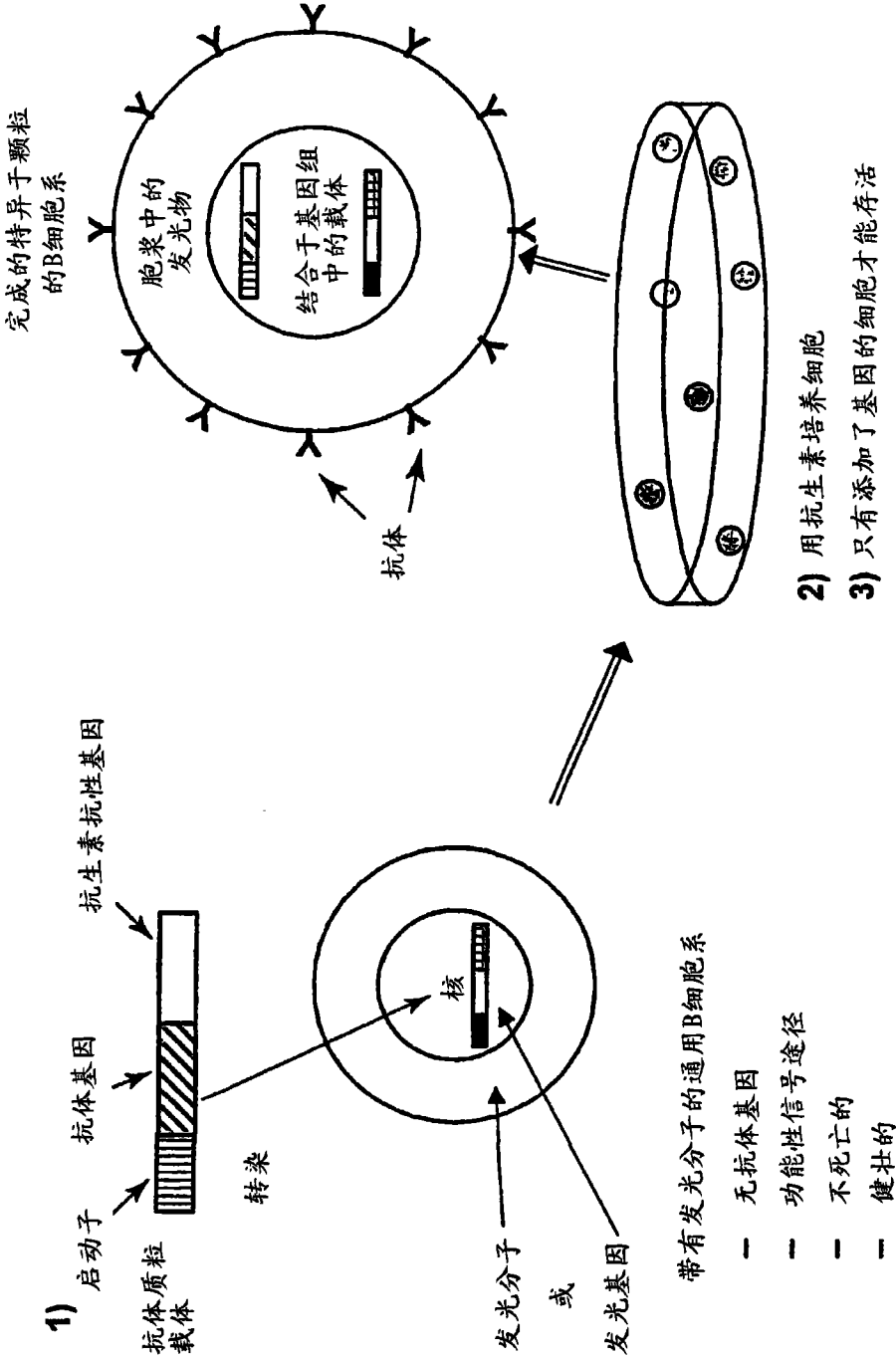


图 3

集成式/传感器概念

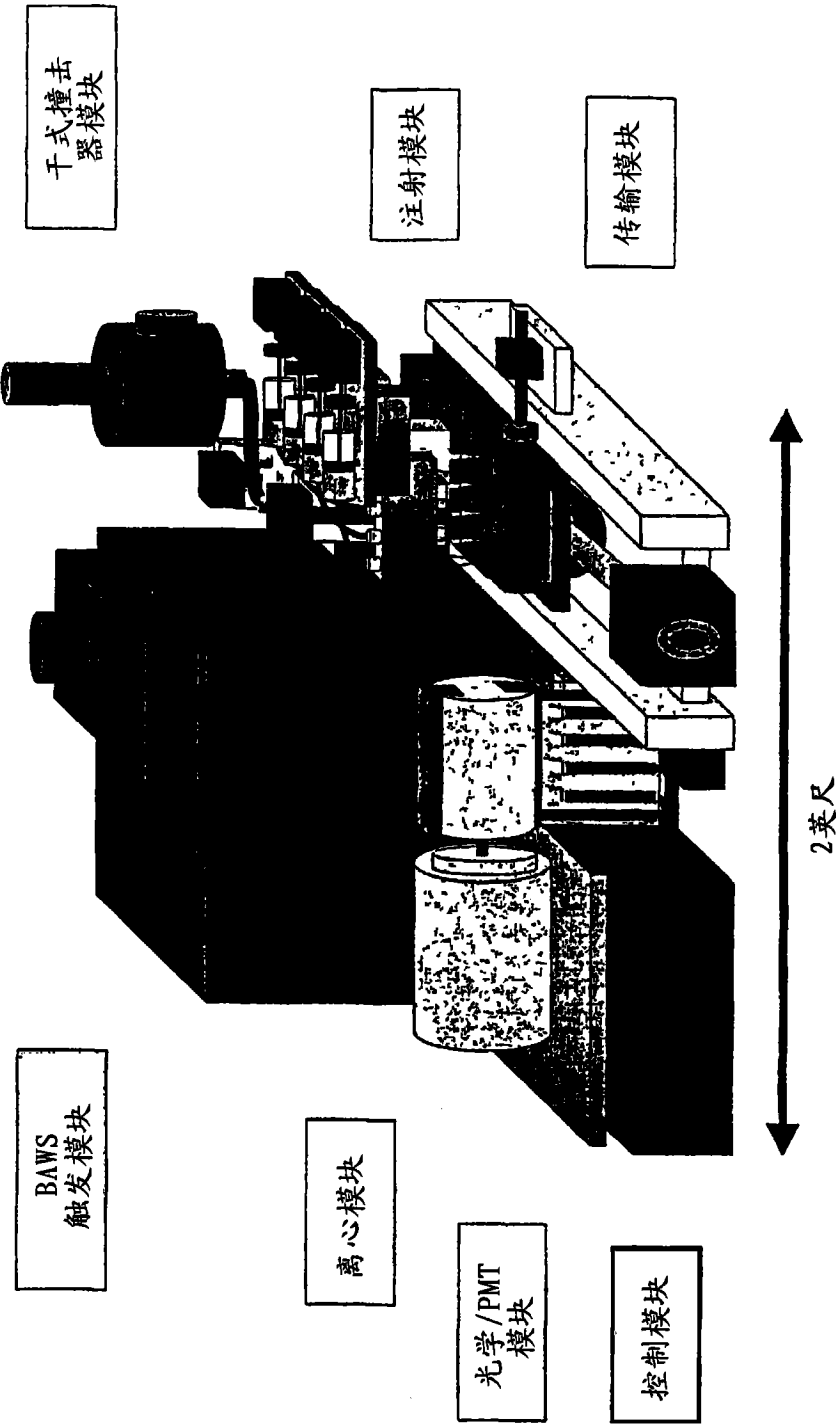
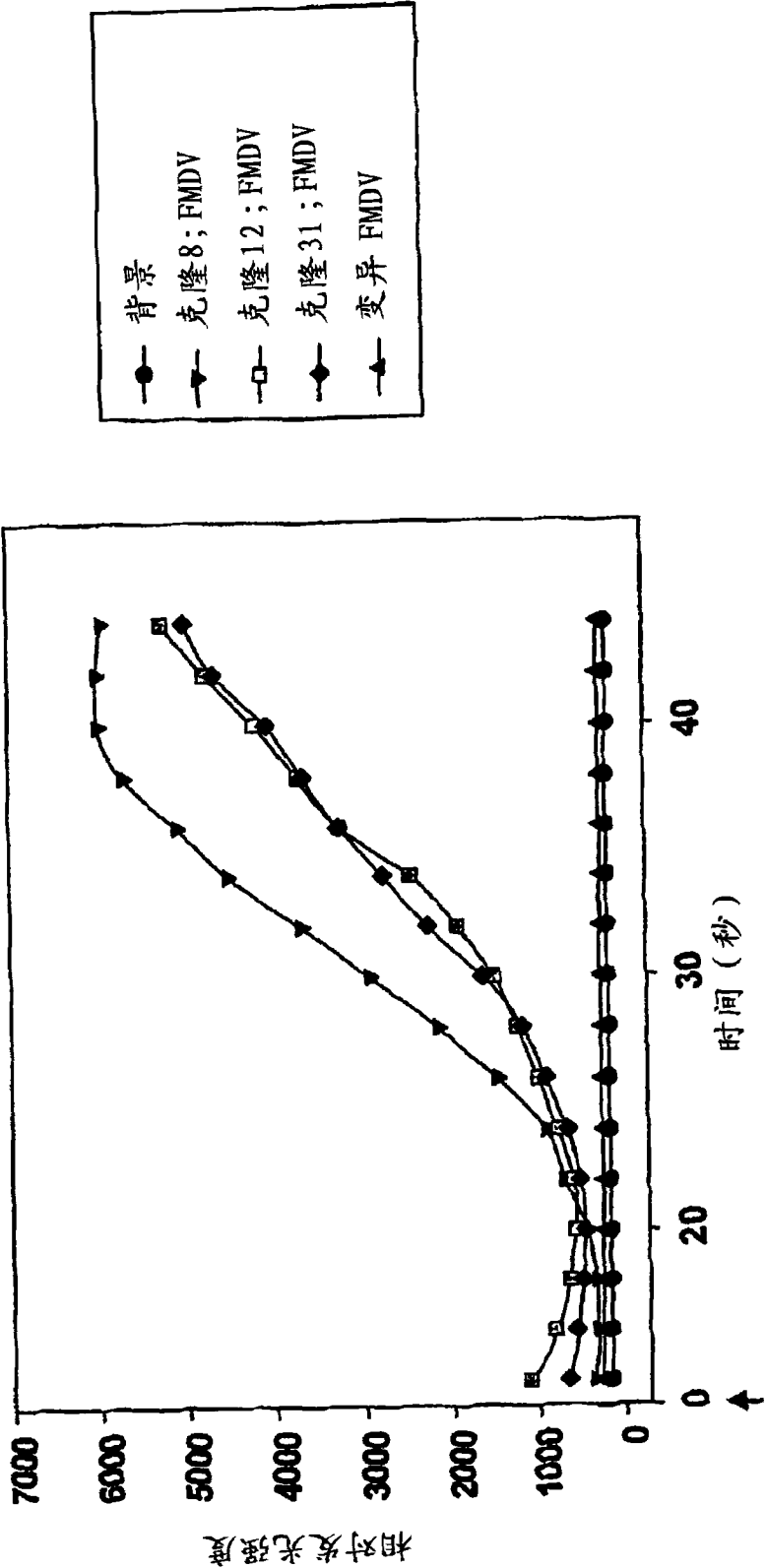


图 4

B细胞对口蹄疫病毒的应答

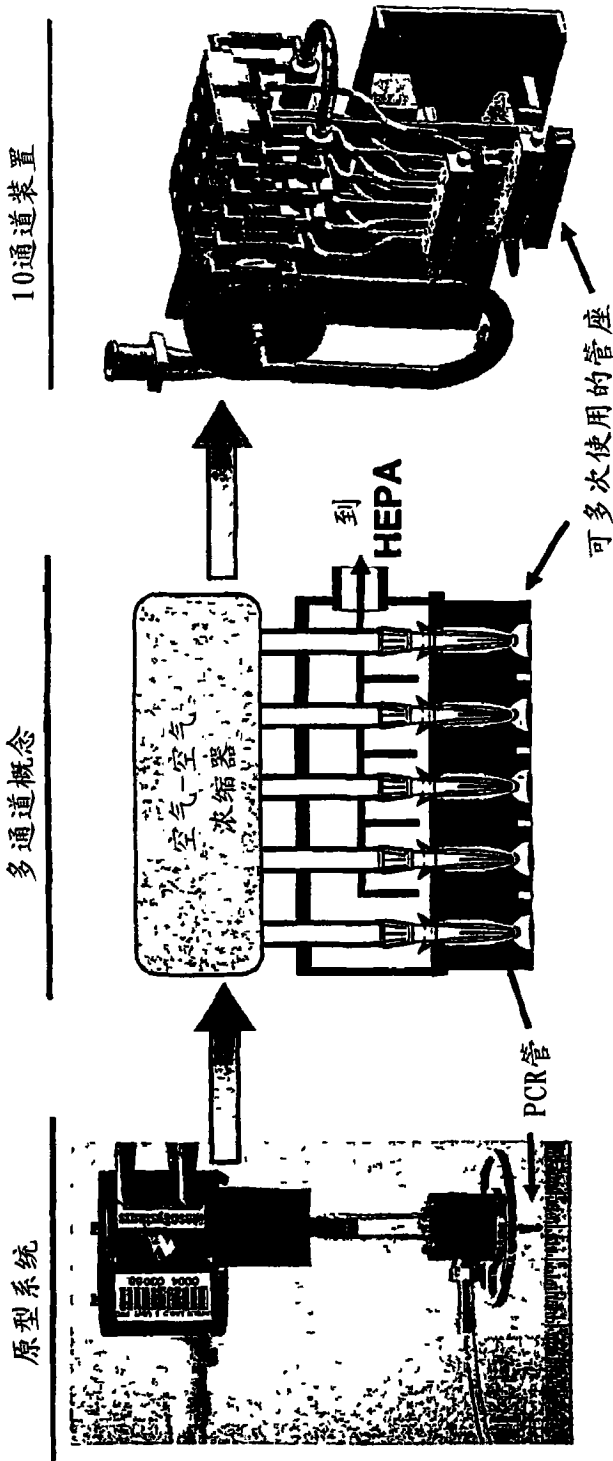
• 试验完成于P1um岛的USDA BL-3设备



导入病毒

图 5

干式撞击器模块概念



- 空气-空气浓缩器把颗粒集中到较小的空气体积中
- 可多次使用的管座承载可直接作用作确认样品的PCR管

图 6

通过离心提供活性抗原

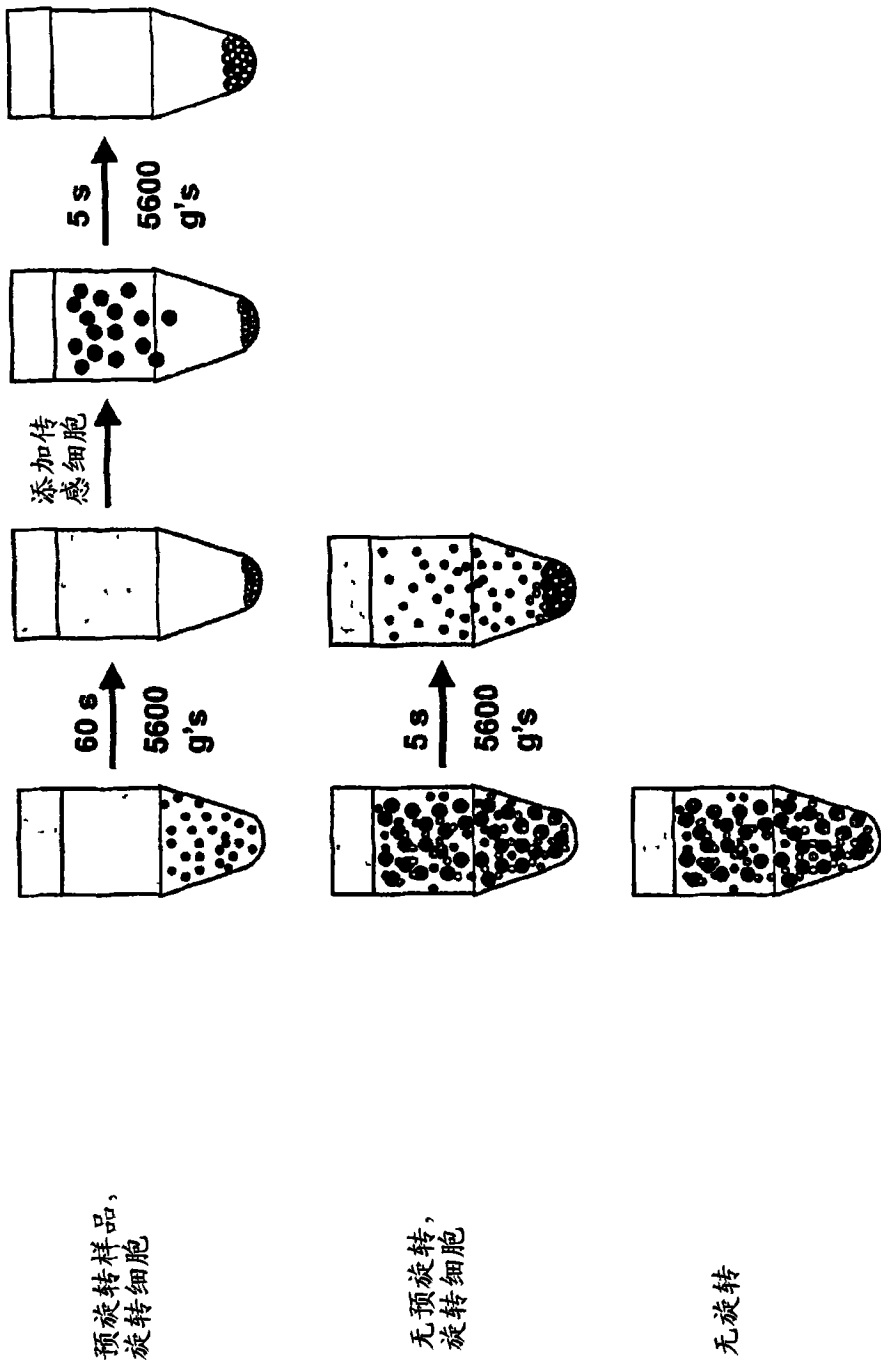
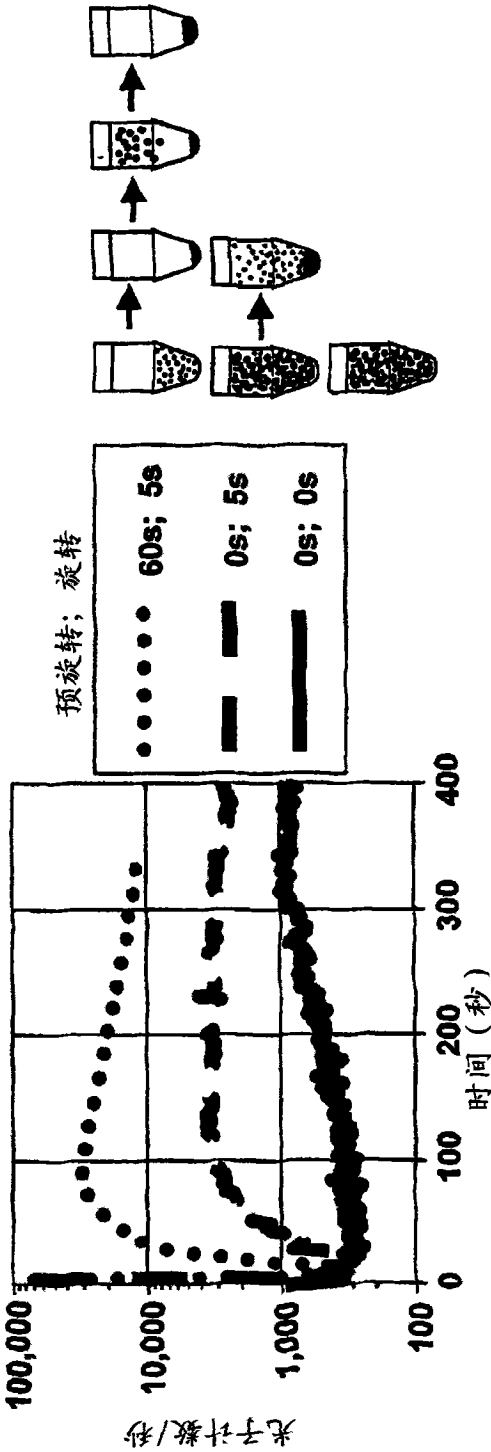


图7

活性抗原呈递信号



- 所示结果为探测 $5.3 \times 10^5$ 个已杀死土拉热病细胞时得到的
- 所用细胞在采用标准测光试验 (等价于无离心) 时曾被判断为阴性应答

图 8

自动细胞运送概念

- 传感细胞可用注射泵、自动滴管等运送
- 不同类型的传感细胞预先装载于各个注射器中
- 需要环境控制以保持B细胞的性能
- 在气溶胶收集之后再加入B细胞，每个测试一滴

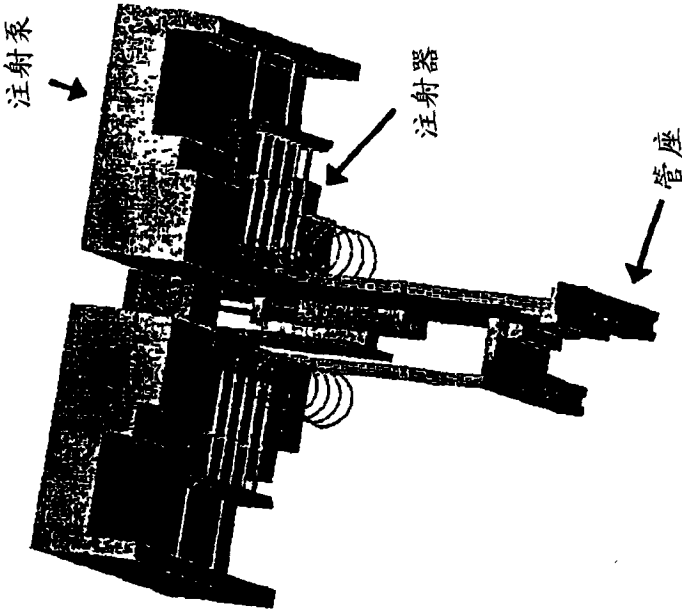


图9

已杀死土拉热病菌的剂量应

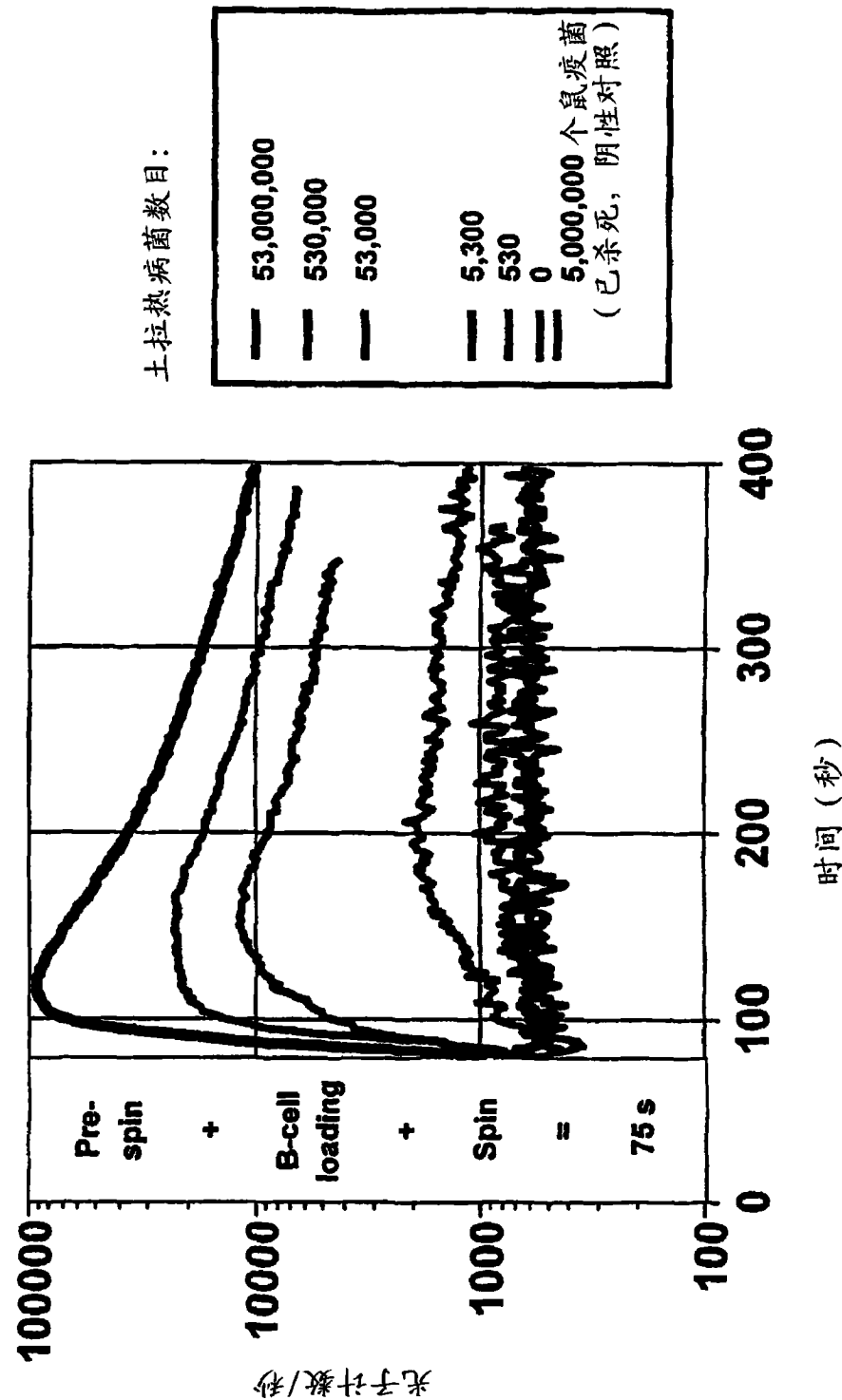
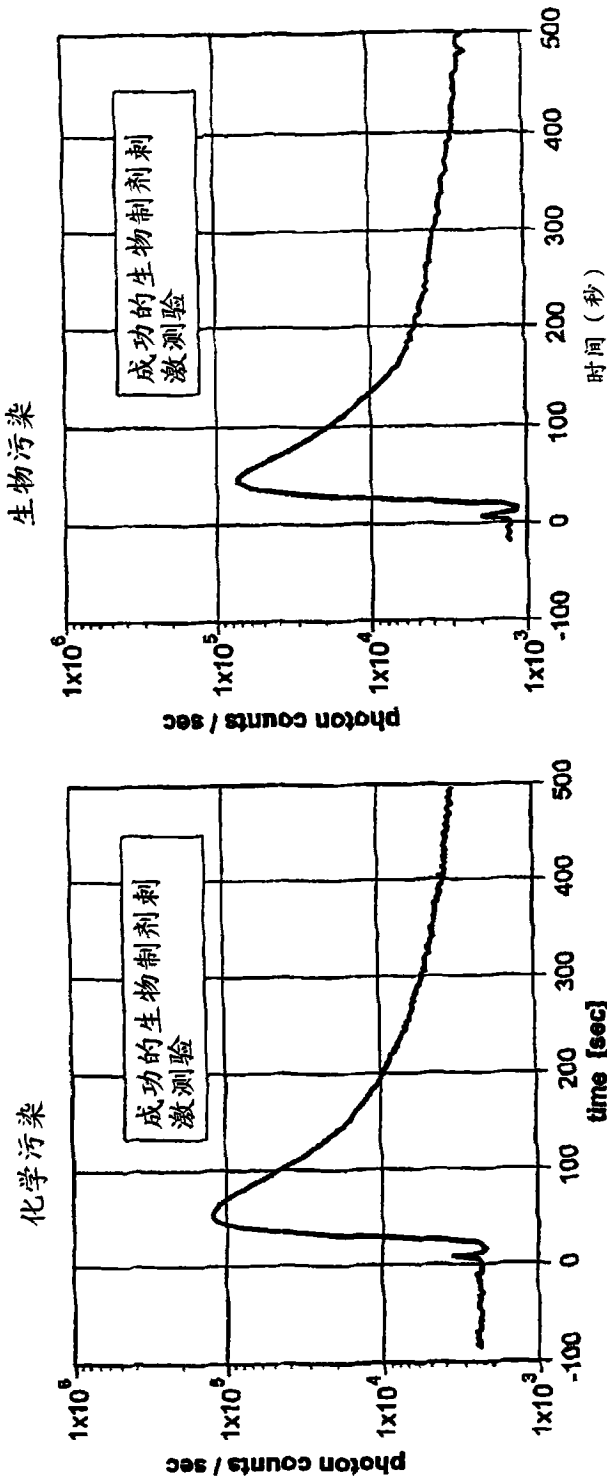


图10

污染抵抗能力

- B细胞能抵抗污染



- 对强柴油排放提取物暴露1个小时
- 被 $10^7$ 个大肠杆菌污染

图 11

自动离心模块概念

- 用5秒钟的离心迫使细胞进入颗粒
- 有定位标记的马达使样品对准于光学模块以进行信号收集
- 线形布局也可以自动化和按比例增加

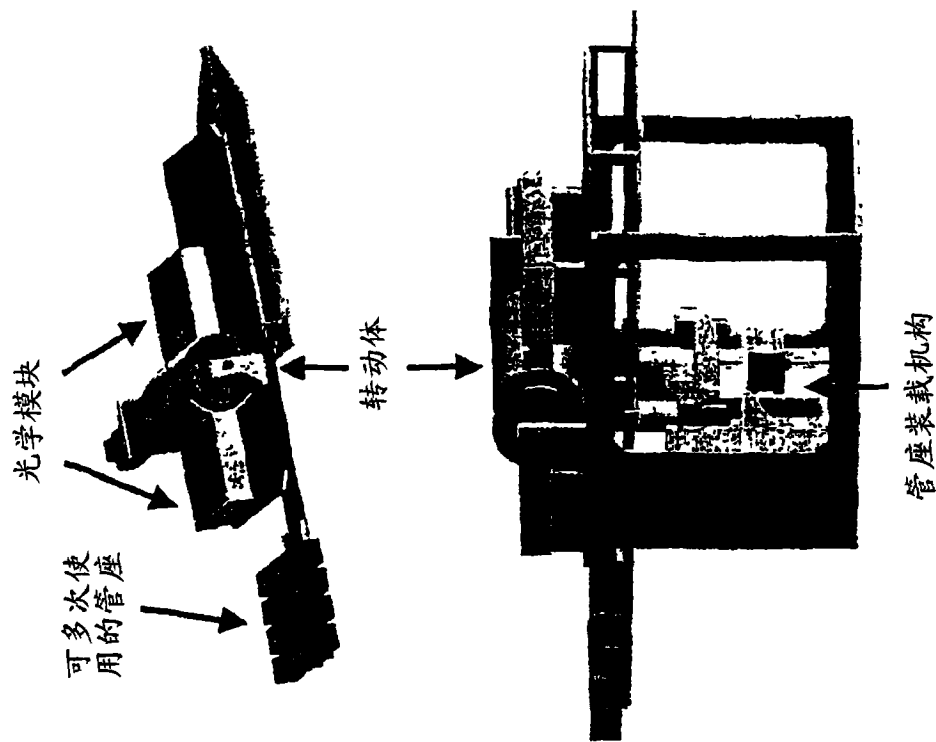
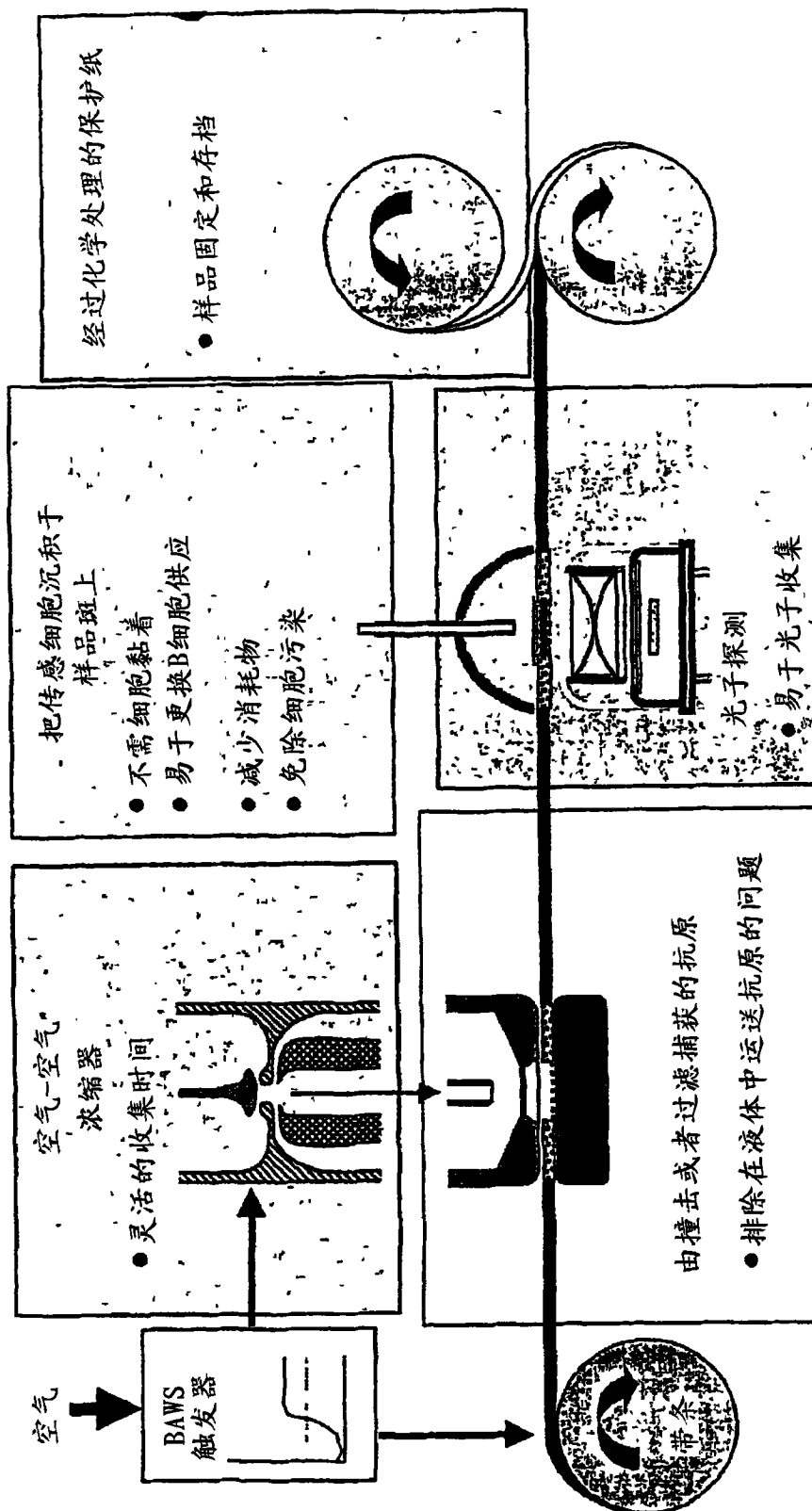


图12

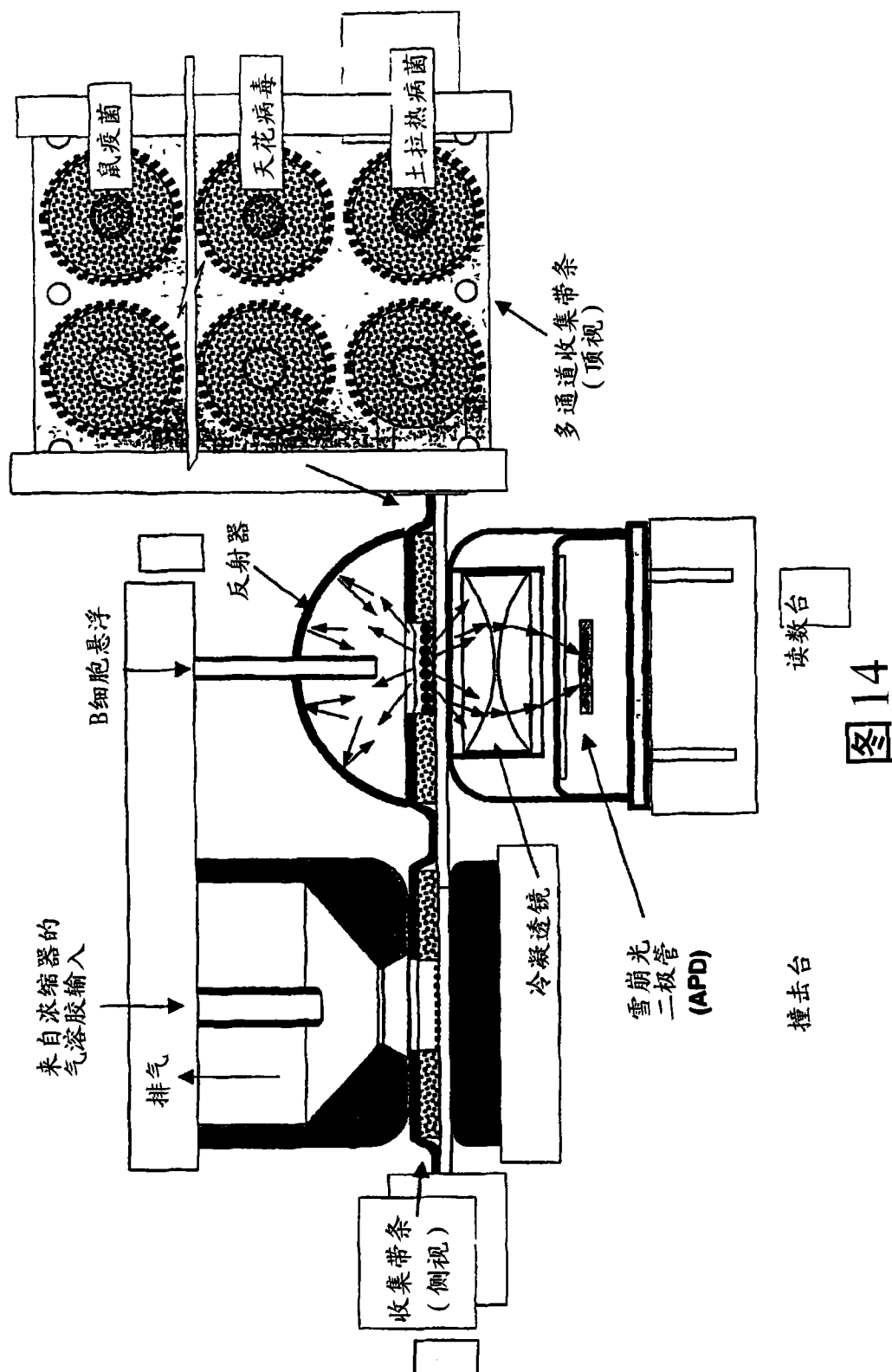
传感器概念：  
直接空气撞击



• 适合于多目标同时探测的设计

图13

## B细胞识别器概念



光学/PMT模块概念

- 互补的形状帮助对准和屏蔽散射光的光学系统
- 集成式反射器与透镜改善光的收集
- 每个转动体用两个这样的模块同时  
进行10个测试
- 干样品收集后不到1分钟即获得信号

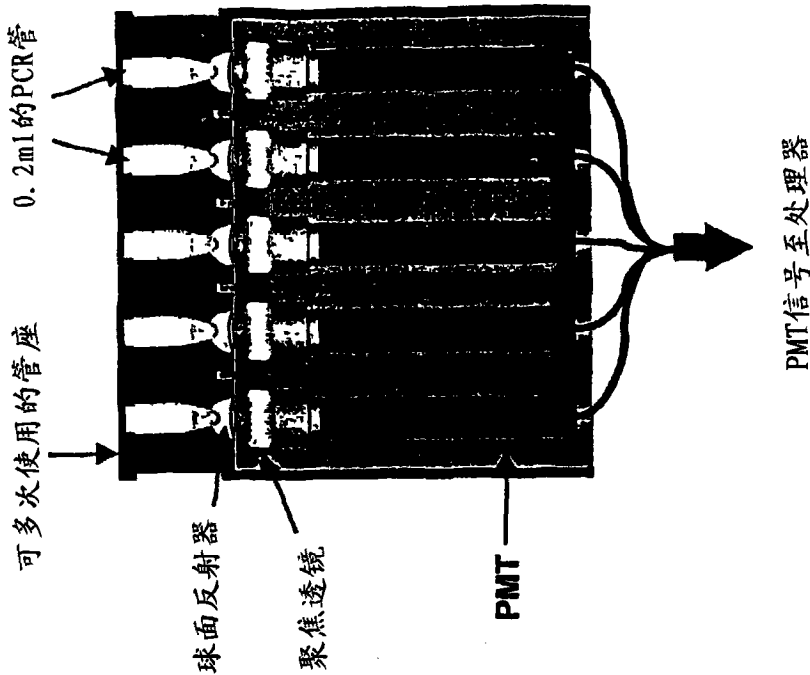


图15

# 用于传感细胞识别传感器的 直接撞击式被测剂运送系统

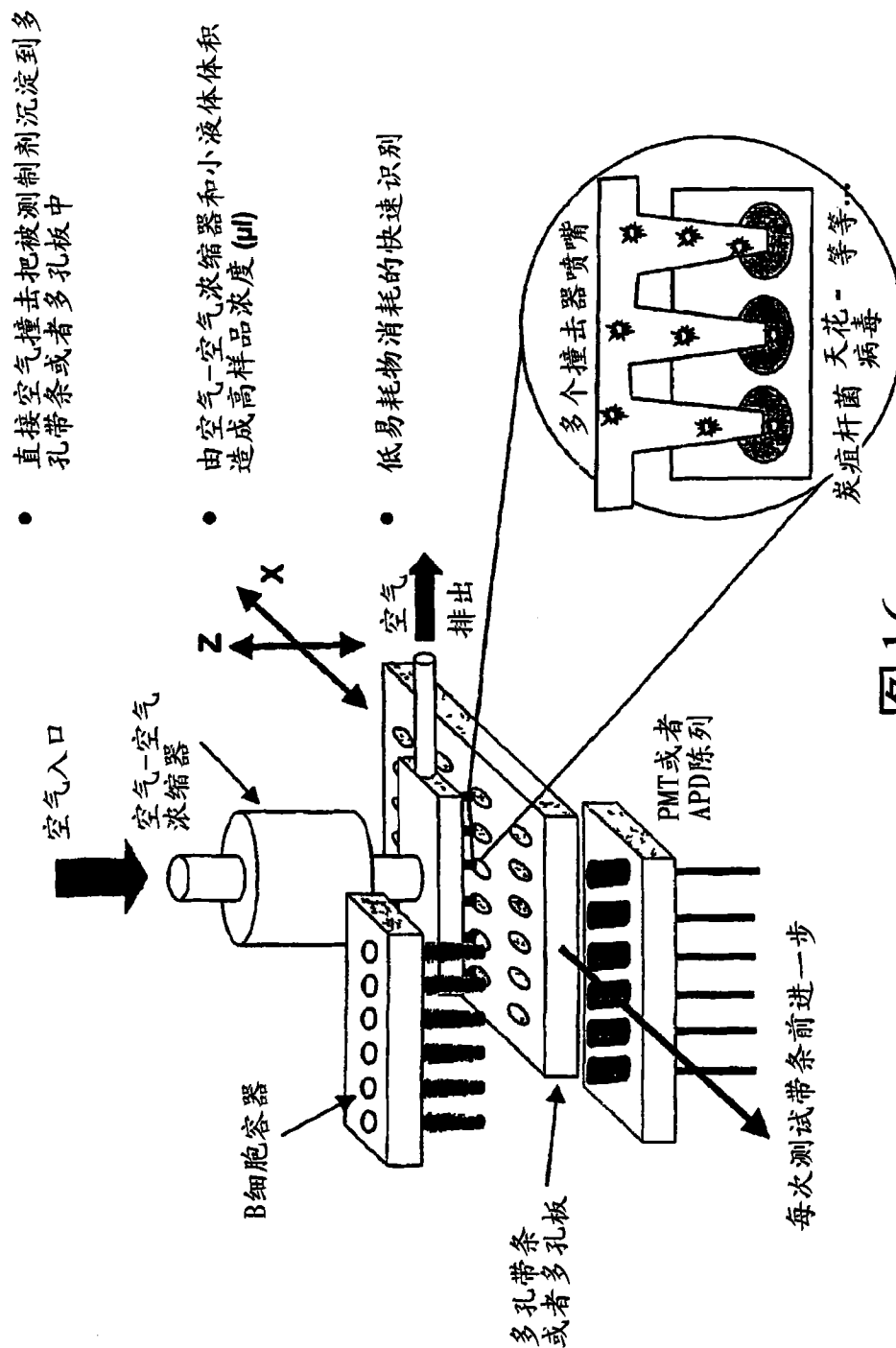


图16

## 简单多通道离心机概念

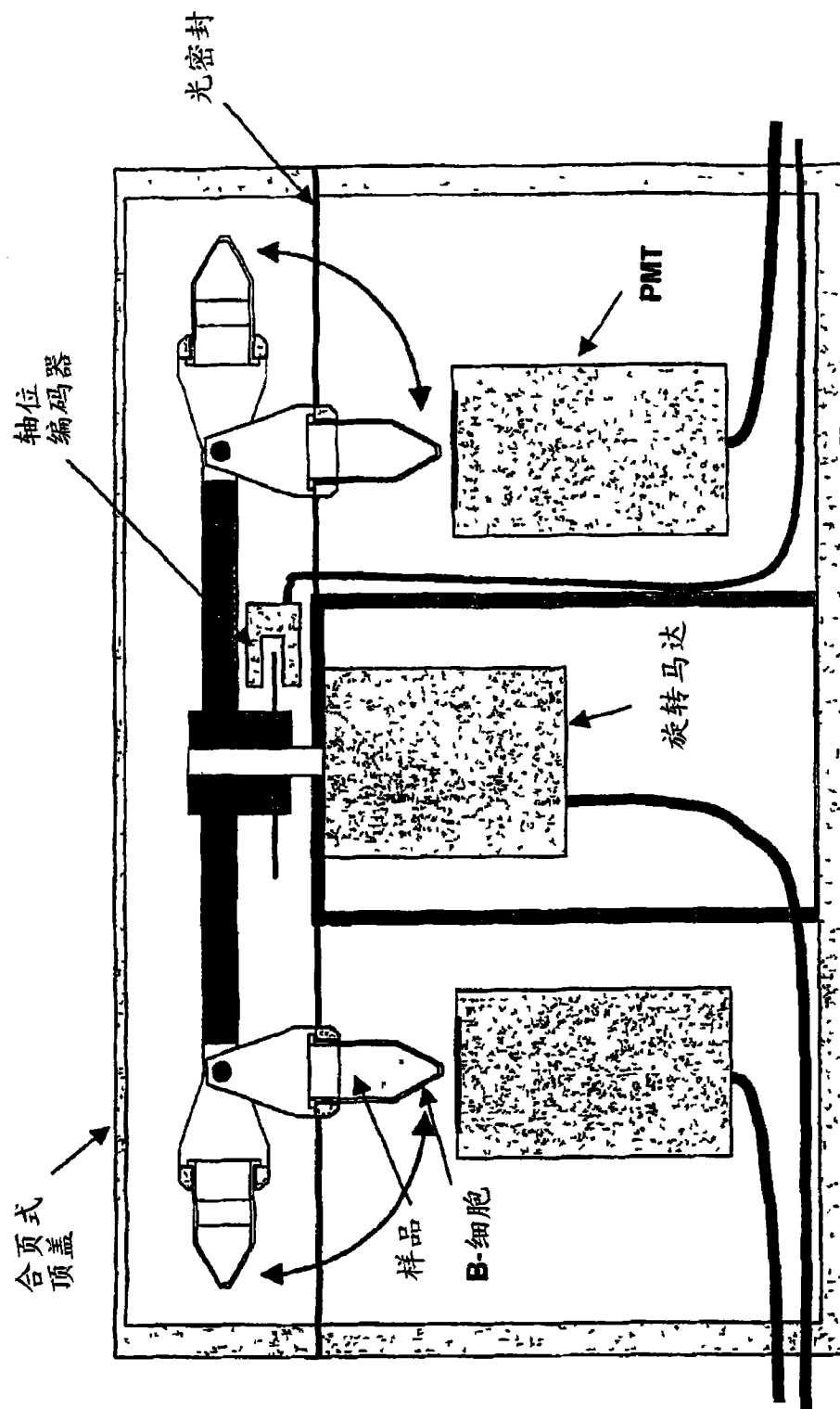


图17



## 湿法离心机/撞击器概念

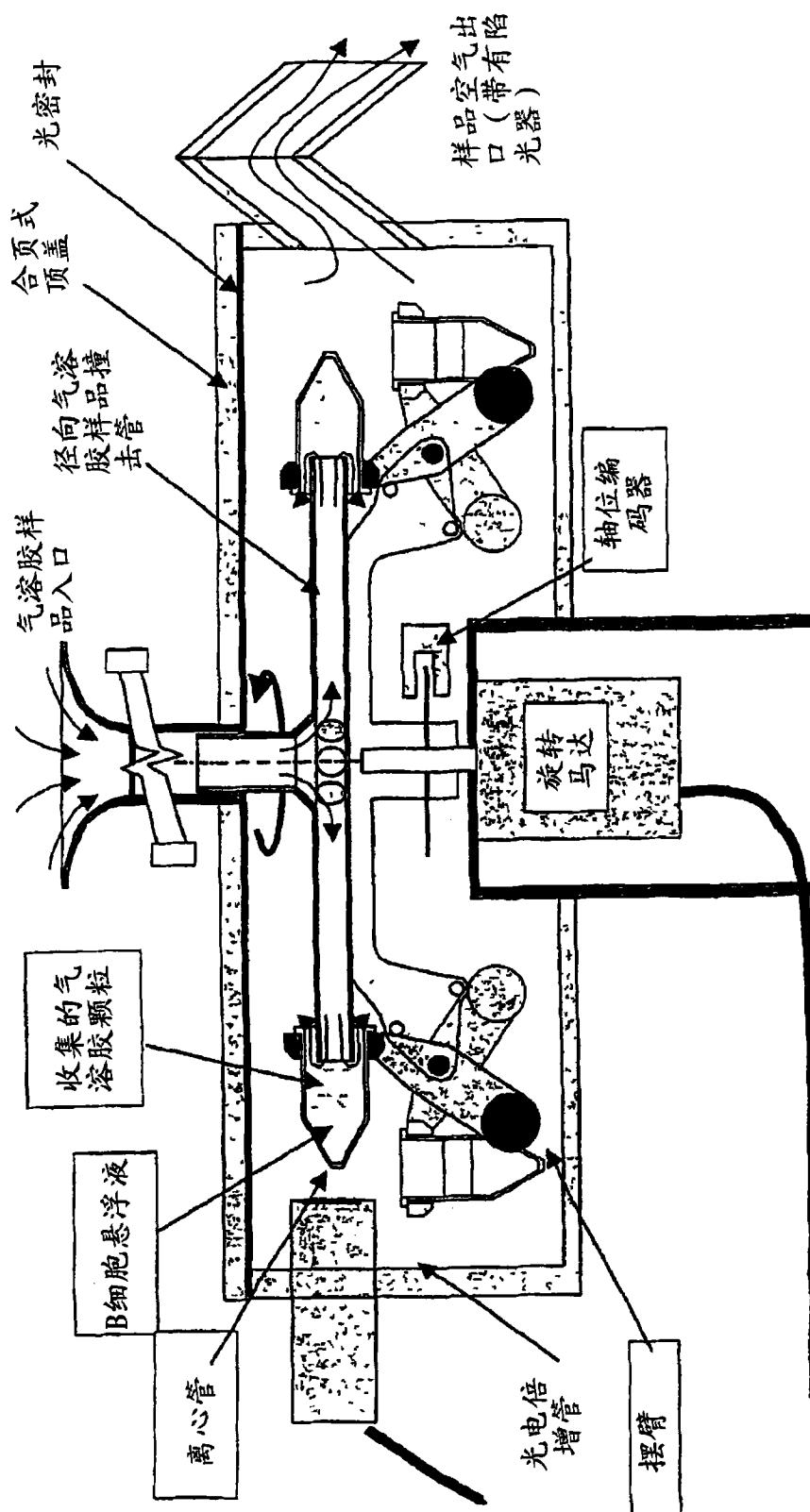
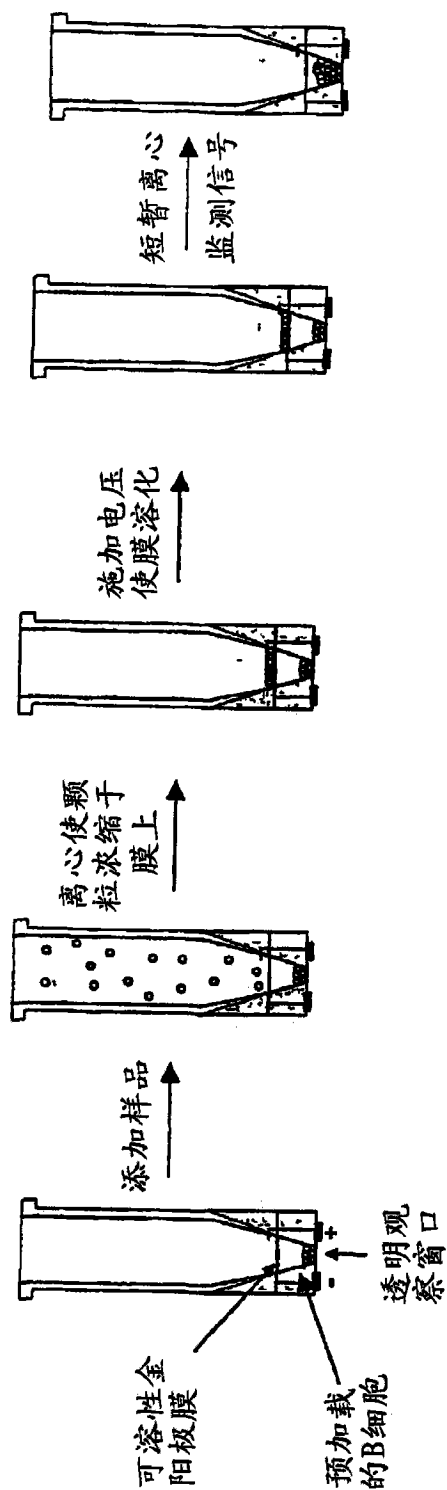


图 19

# 特制管概念



溶化金膜的建模根据了Langer及其同事在Angewandte Chemie International Edition, Volume 39, pp. 2396-2407 (2000) and Nature Vol. 397, pp. 335-338 (1999) 中所描述的药物运送装置。

图20

## 集成式干式撞击器/传感器概念

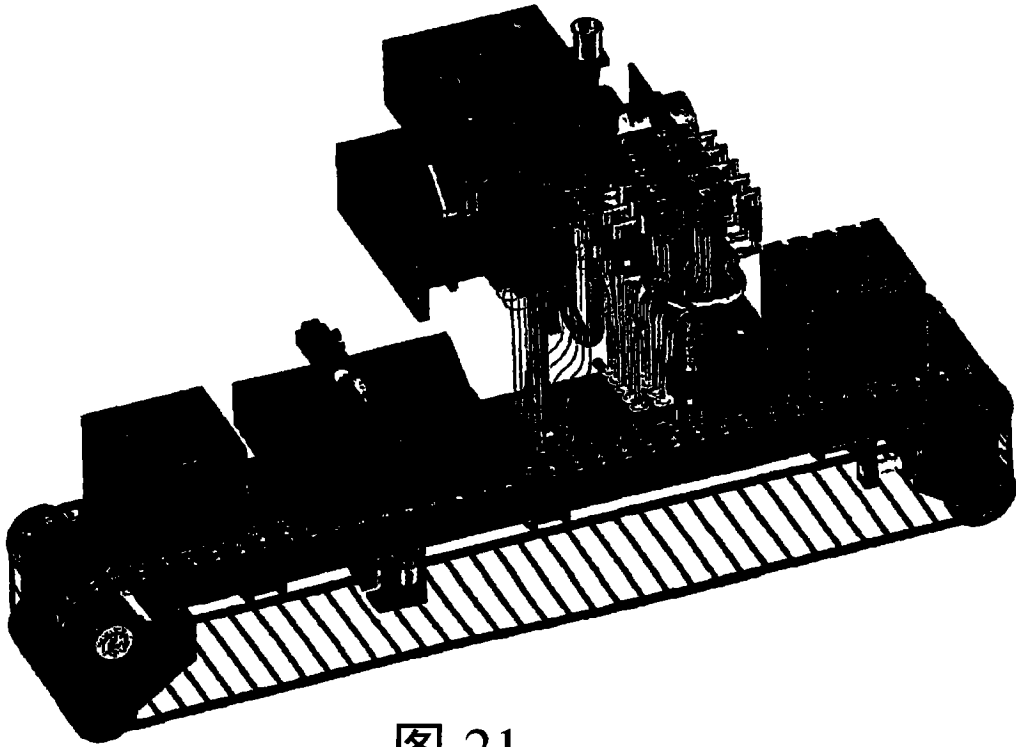


图 21

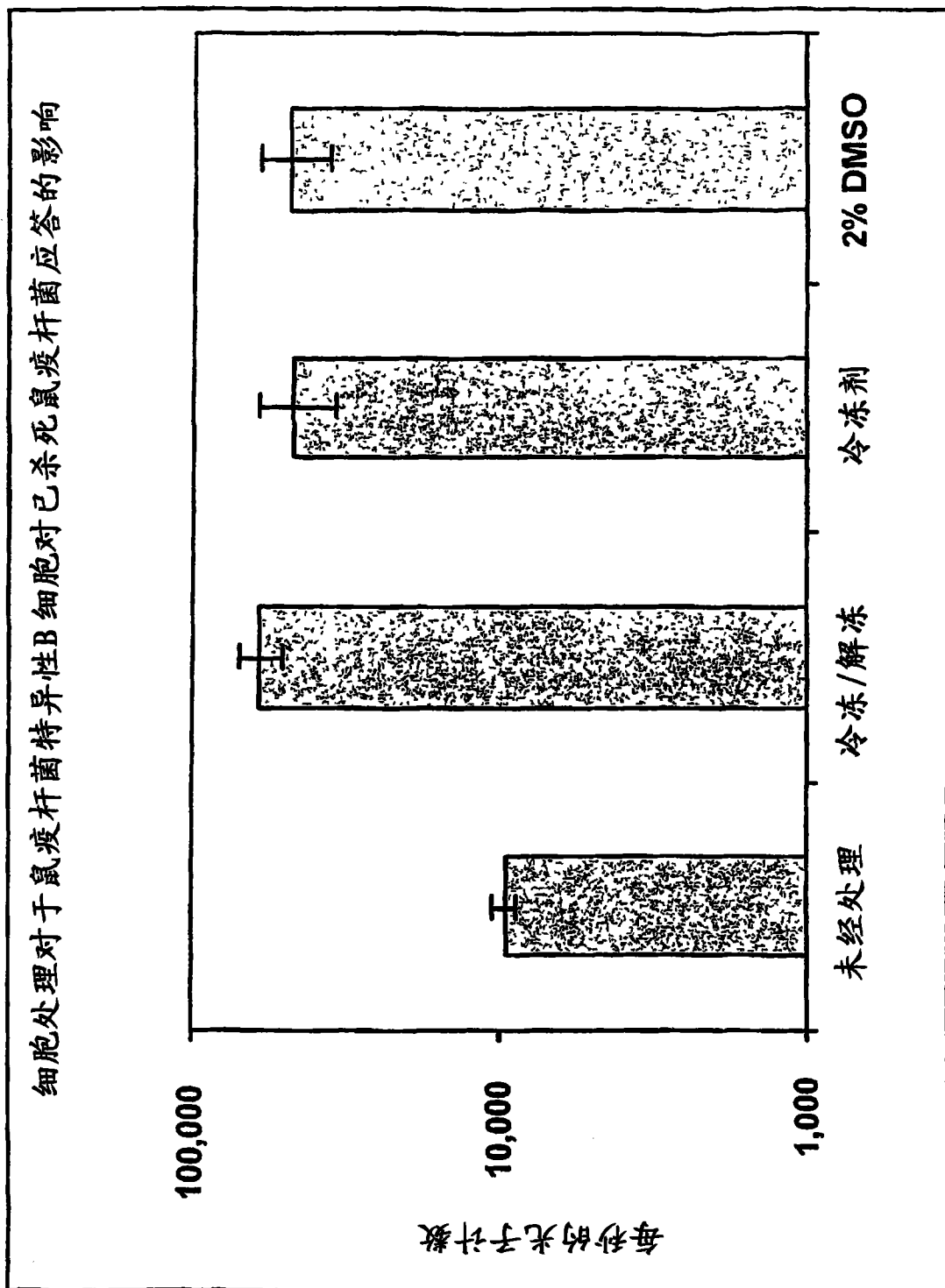
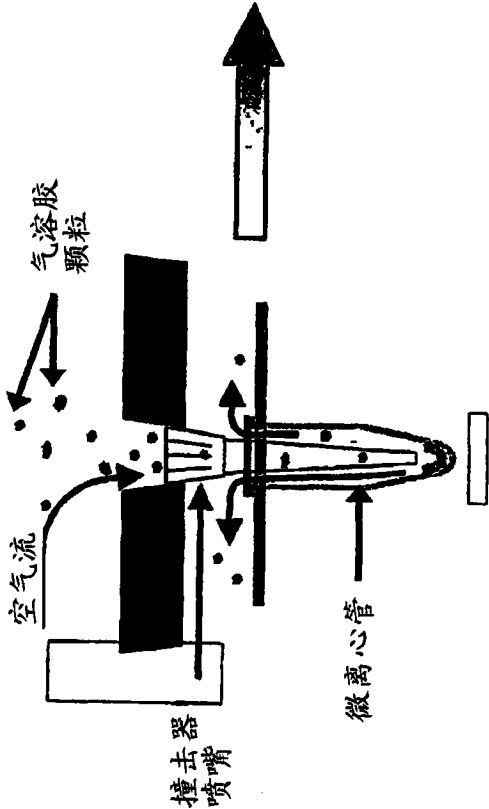


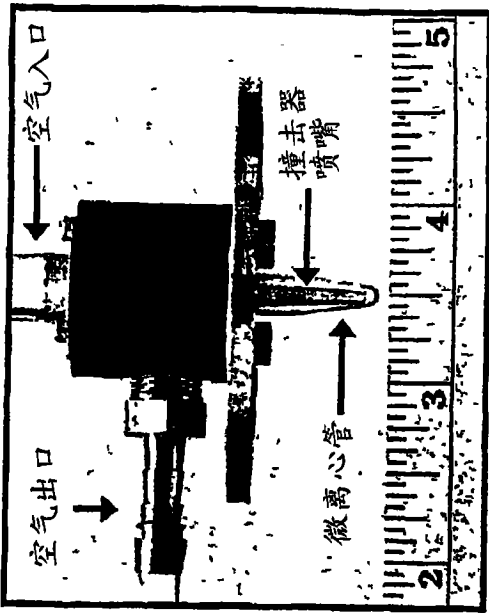
图 22

干气溶胶的收集

概念



干式收集器原型



- 颗粒的动量迫使它们与管表面接触，并驻留于其上
- 免除收集液体使系统简化和改善可靠性
- 微离心管是在考虑到操作成本的情况下而设计的

图 23

## 背景：CANARY传感器方法

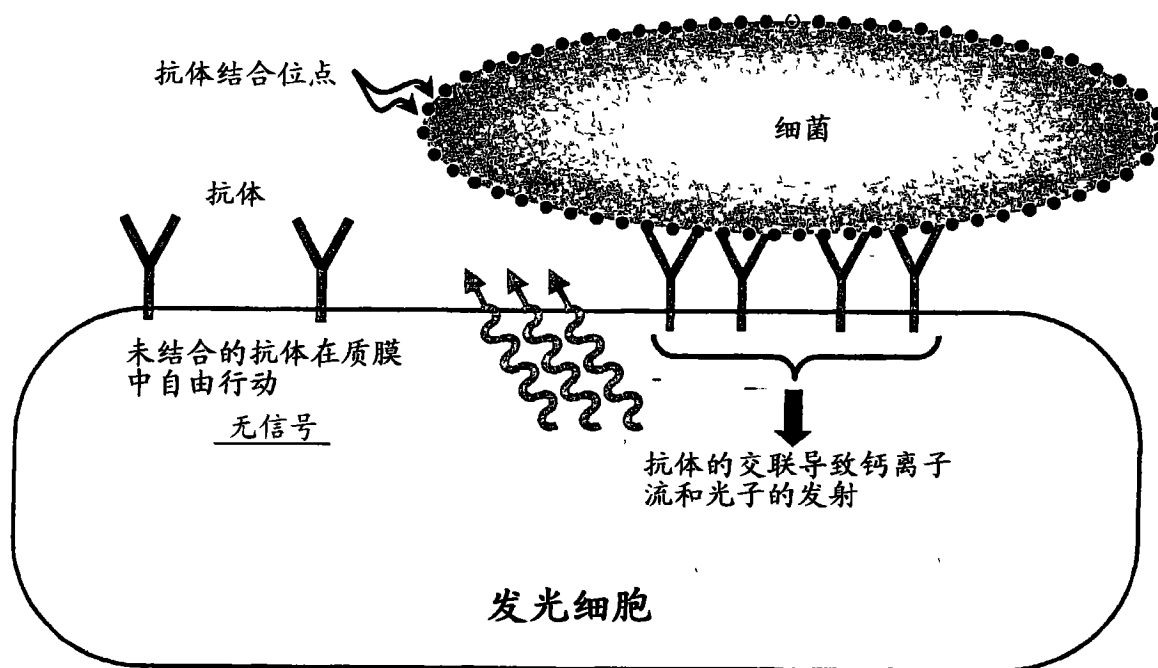
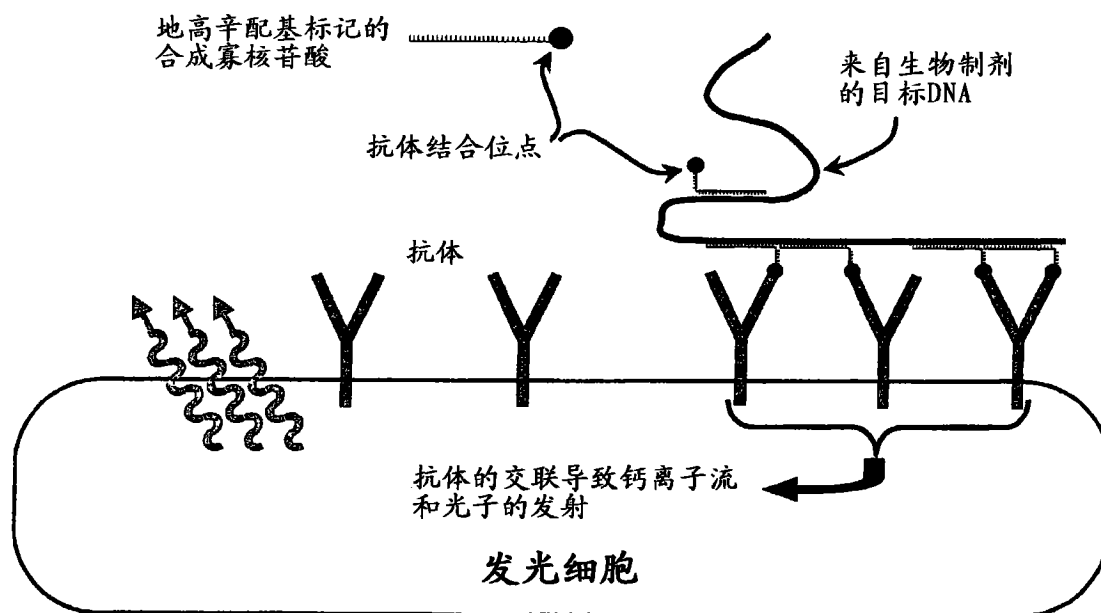


图 24

## 用CANARY探测DNA的方法

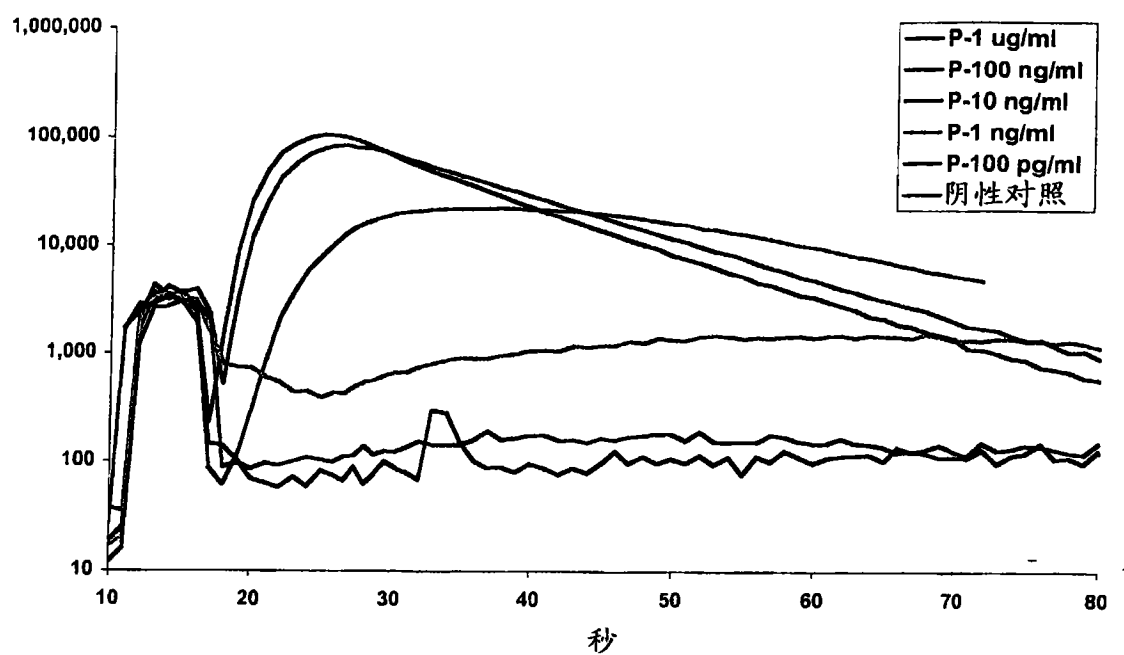


地高辛配基抗体和序列由位于Austin的德克萨斯大学的Georgiou博士友情提供

图 25

图 26A

由地高辛配基标记的质粒DNA (~1 Dig/20 bp)



在内由地高辛配基标记的DNA分子量标记 (~1 Dig /200 bp)

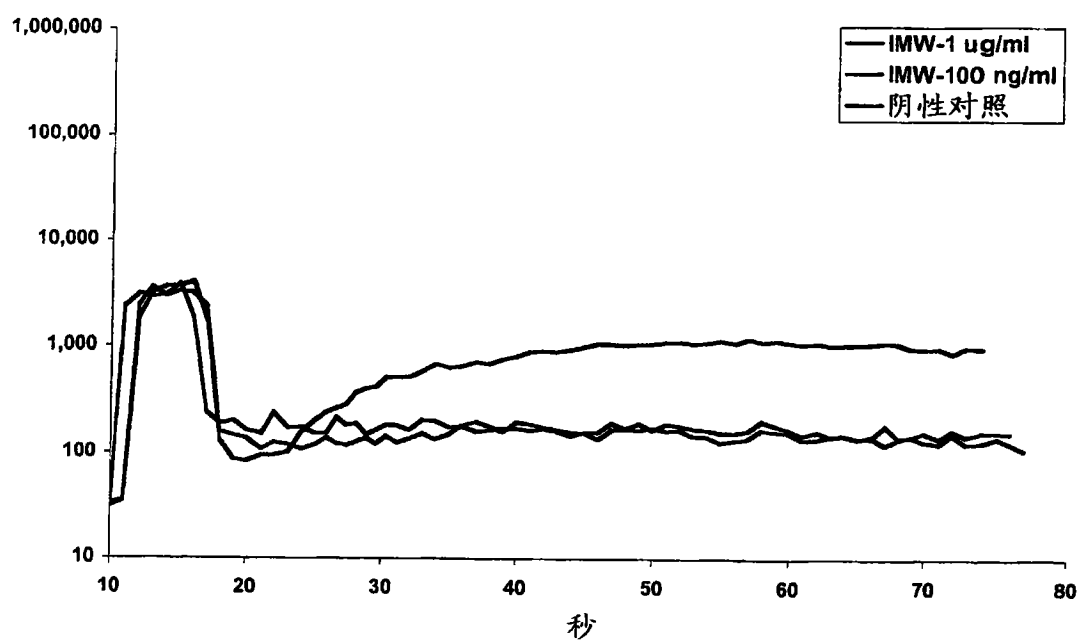


图 26B

在端部由地高辛配基标记的DNA分子量标记

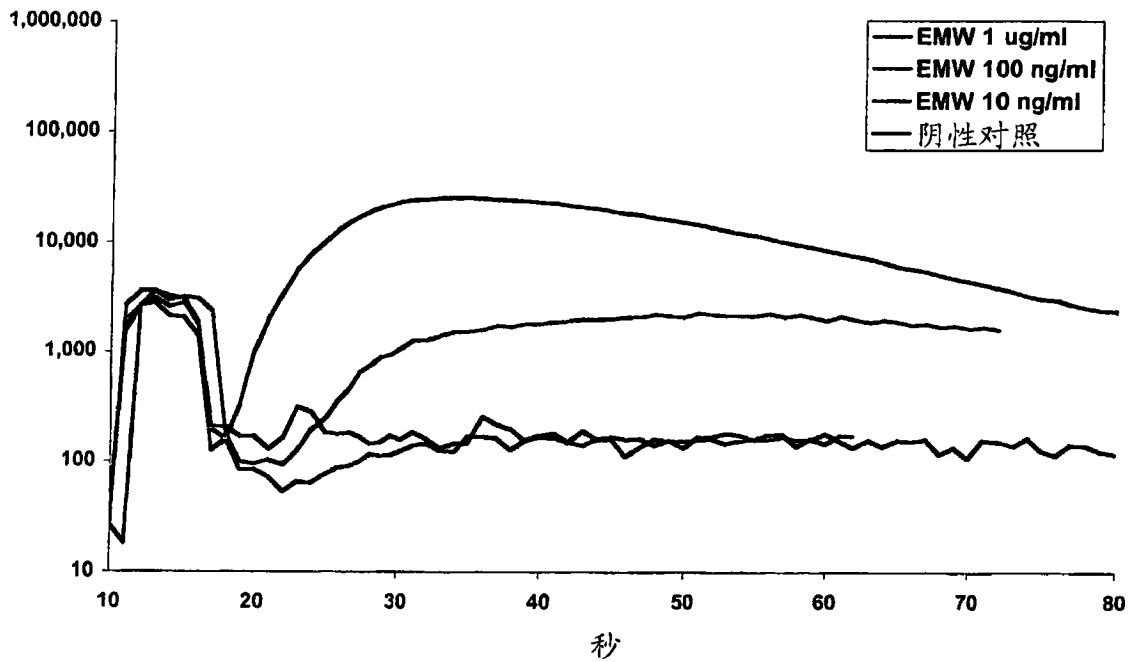
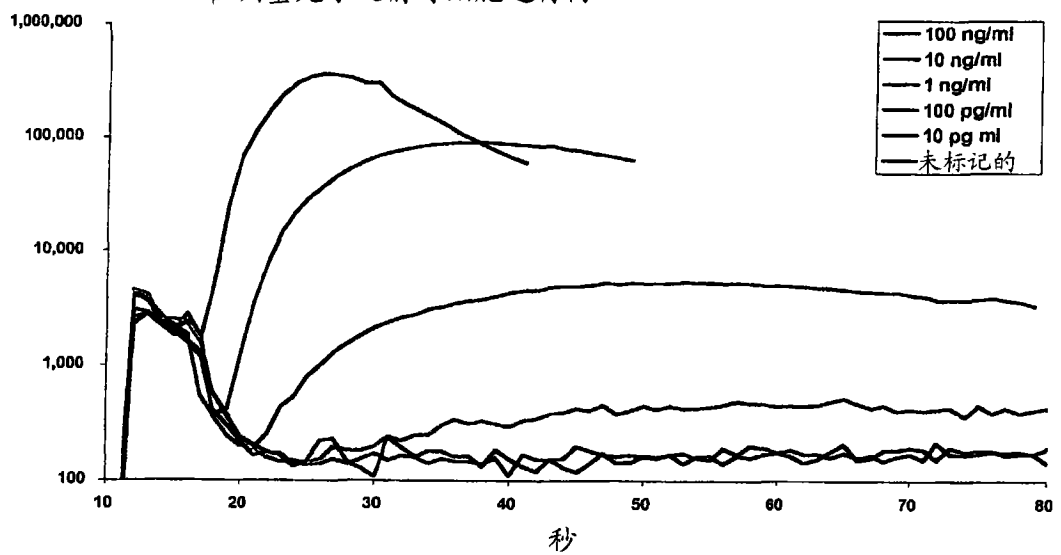


图 26C

图 27A

地高辛标记的质粒DNA的测量  
在测量光子之前对细胞进行离心



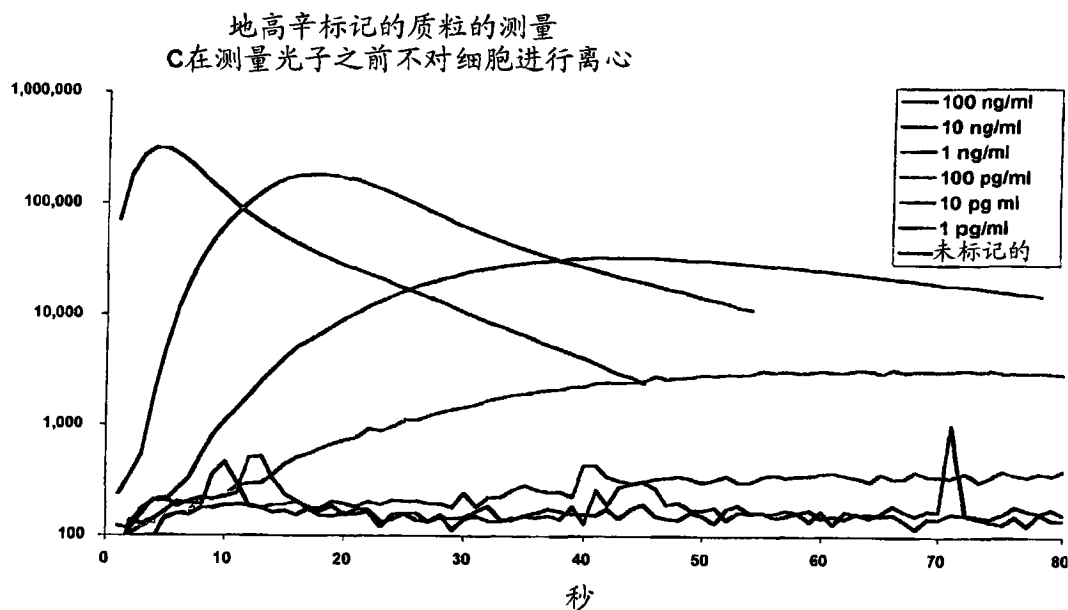


图 27B

两个由地高辛标记的寡核苷酸的杂交

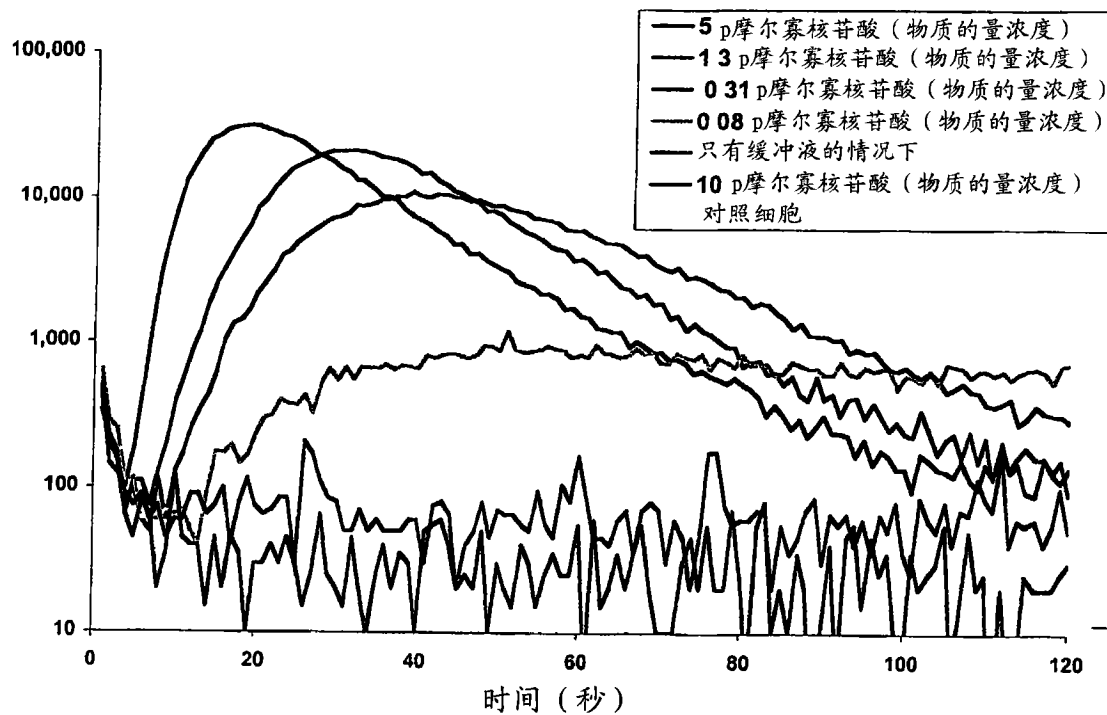


图 28

# 互补寡核苷酸的探测：在杂交时间很短的情况下

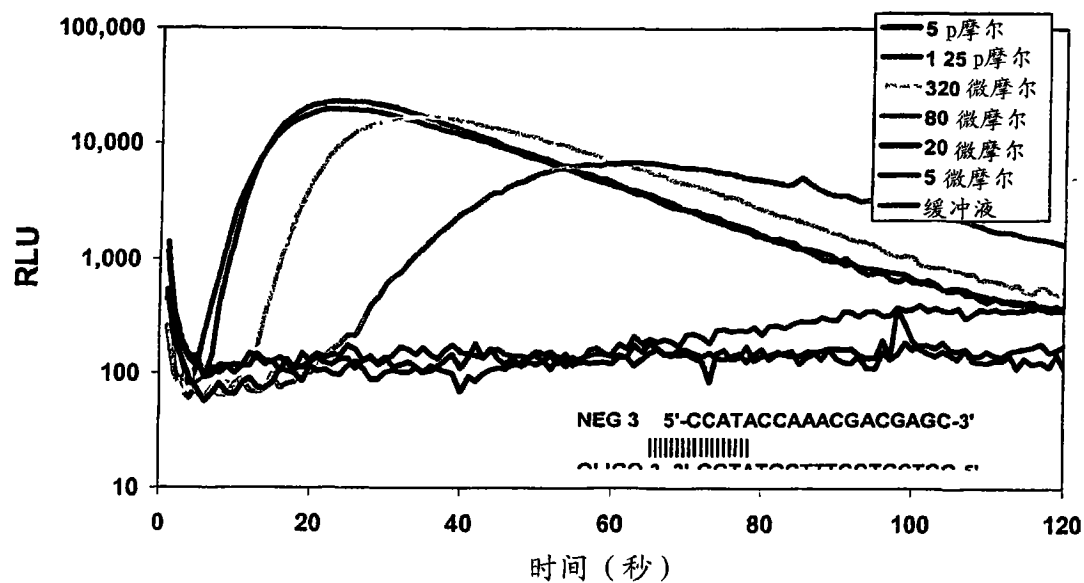


图 29

## 对5微克单链DNA的探测 (5 p摩尔)

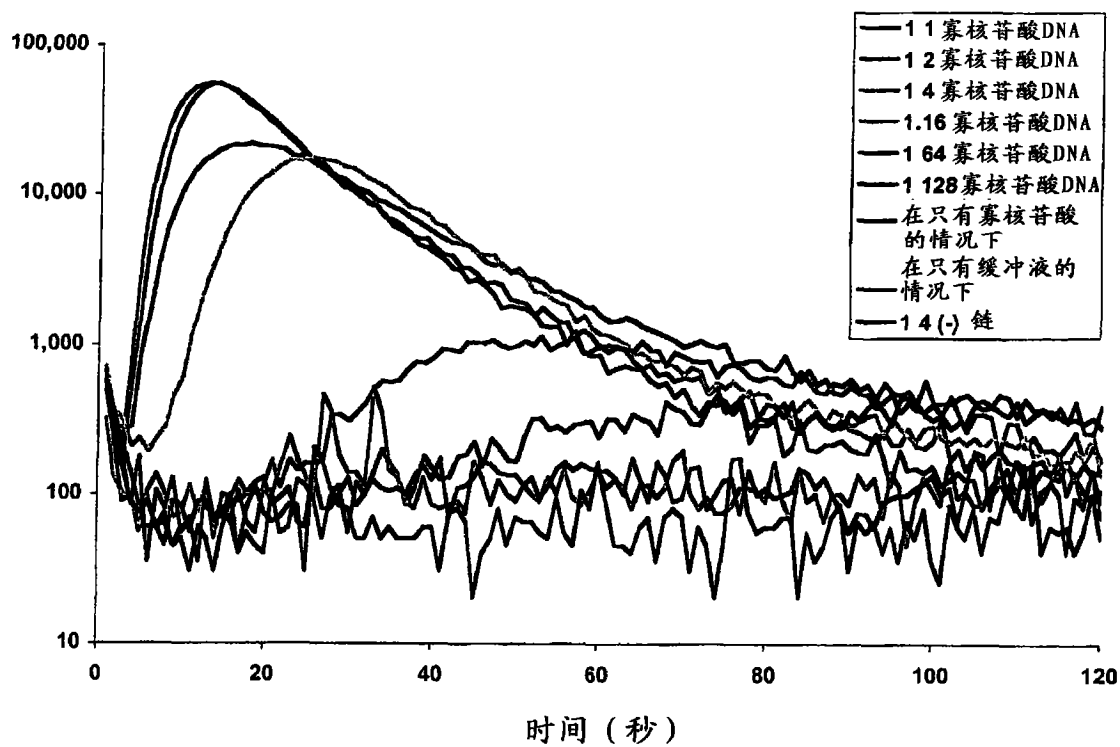


图 30

## 单链DNA的探测

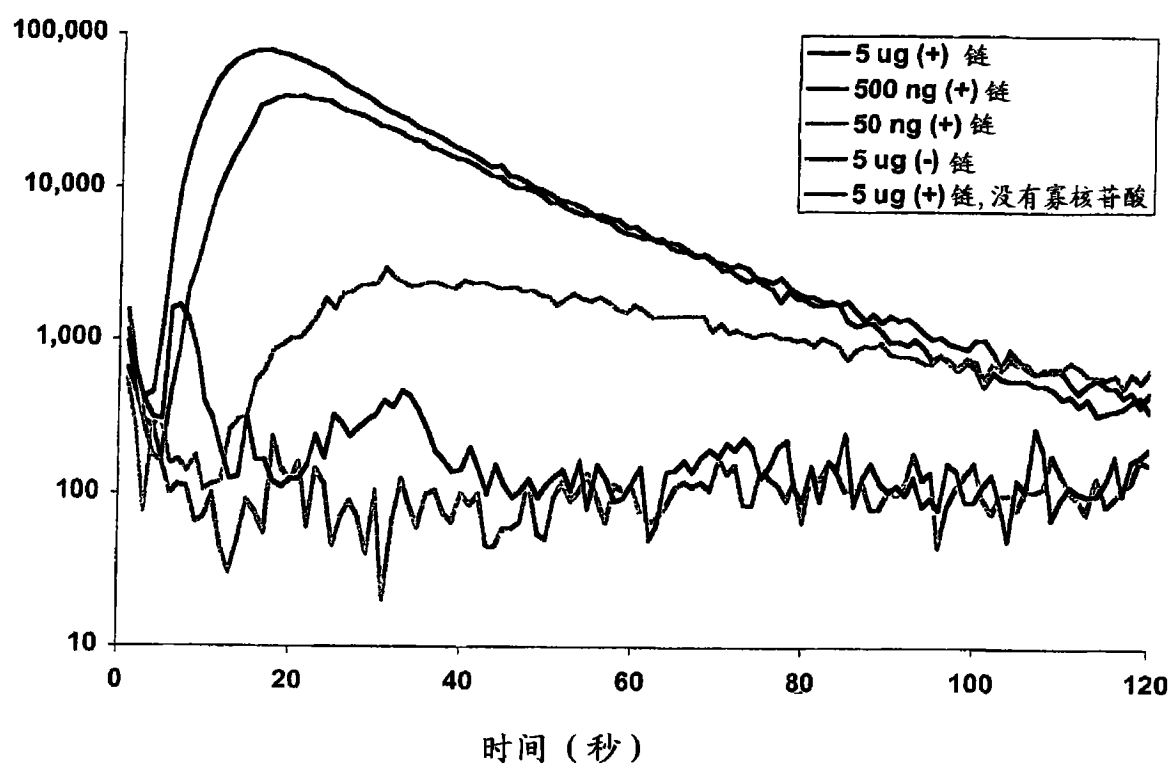


图 31

图 32A

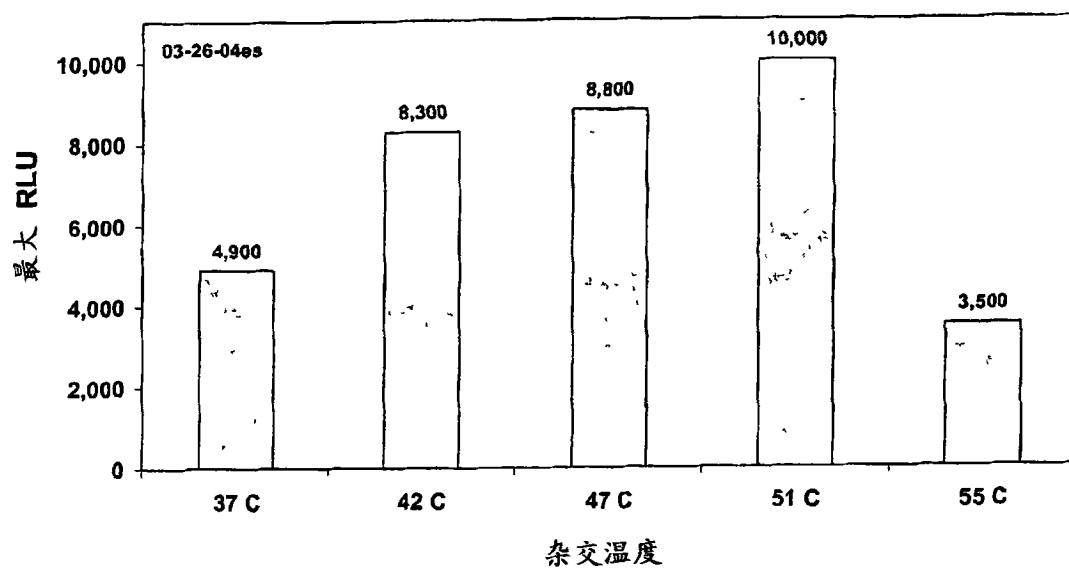
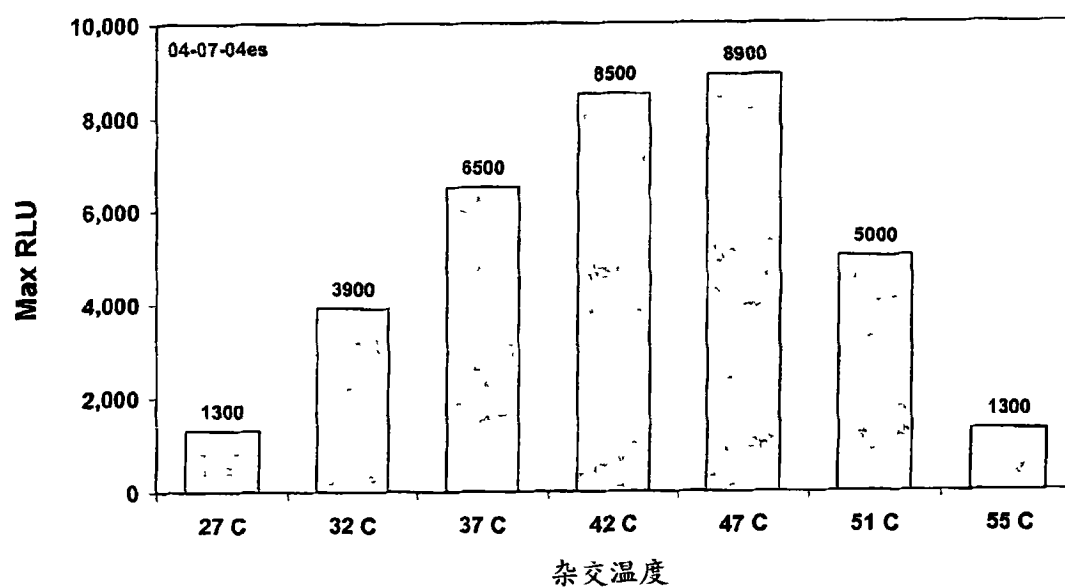
杂交温度对于在PBS中探测  
单链DNA的影响杂交温度对于在NaCl/Tris中探  
测单链DNA的影响

图 32B

## 沉淀DNA的方法

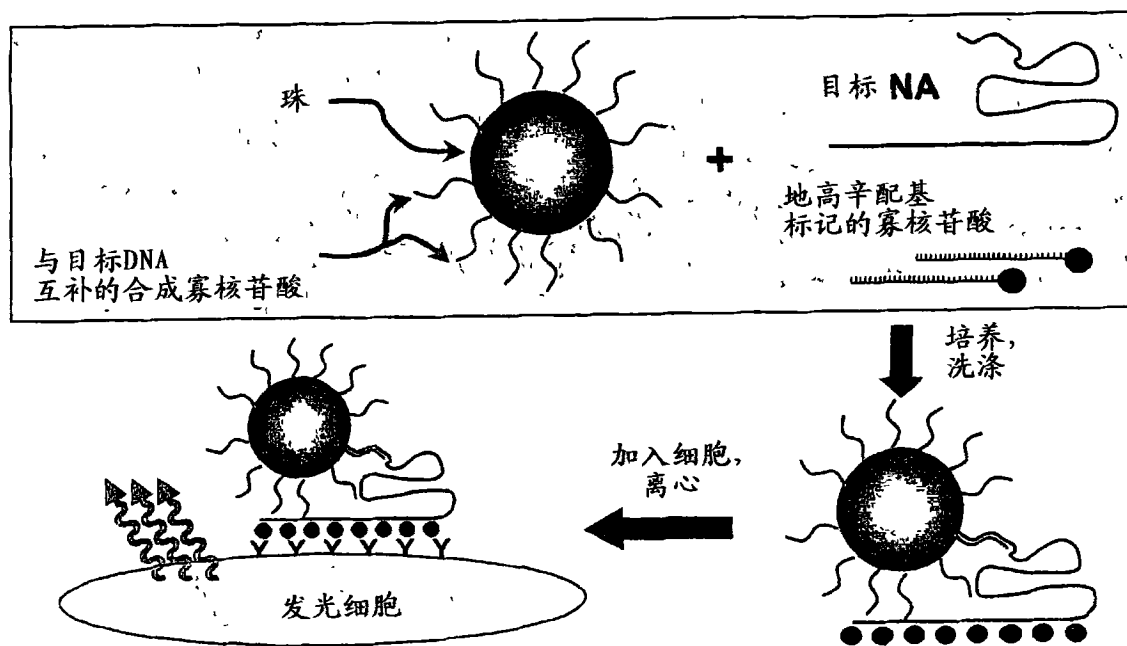


图 33

## 与珠结合的单链DNA的剂量应答

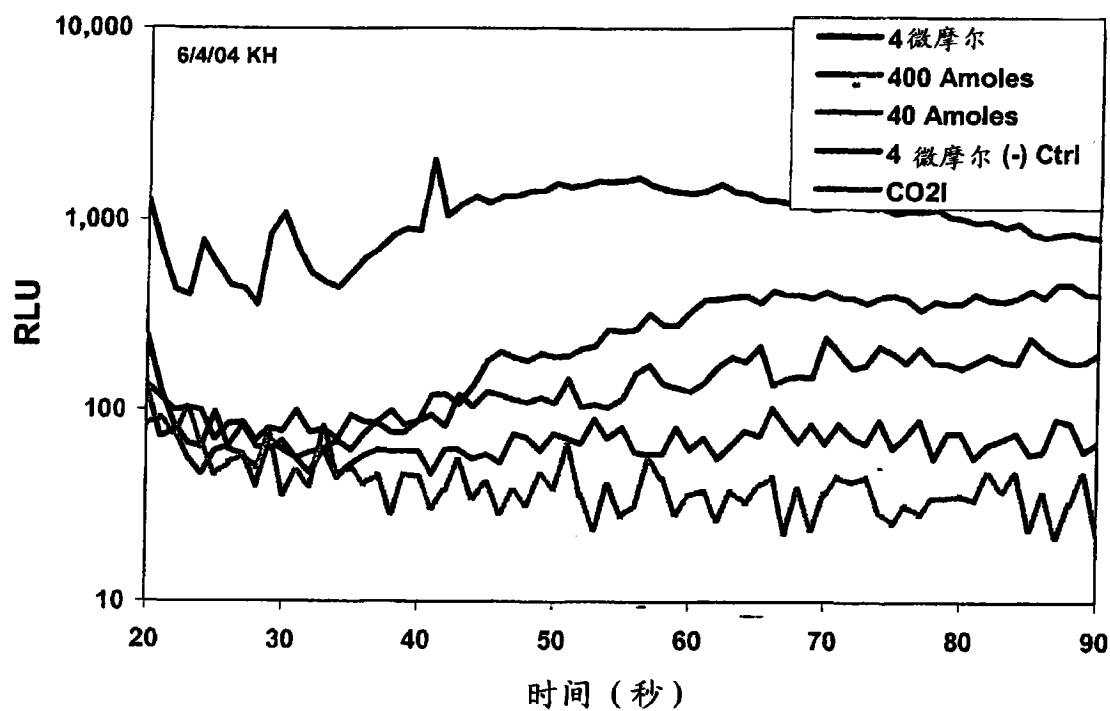


图 34

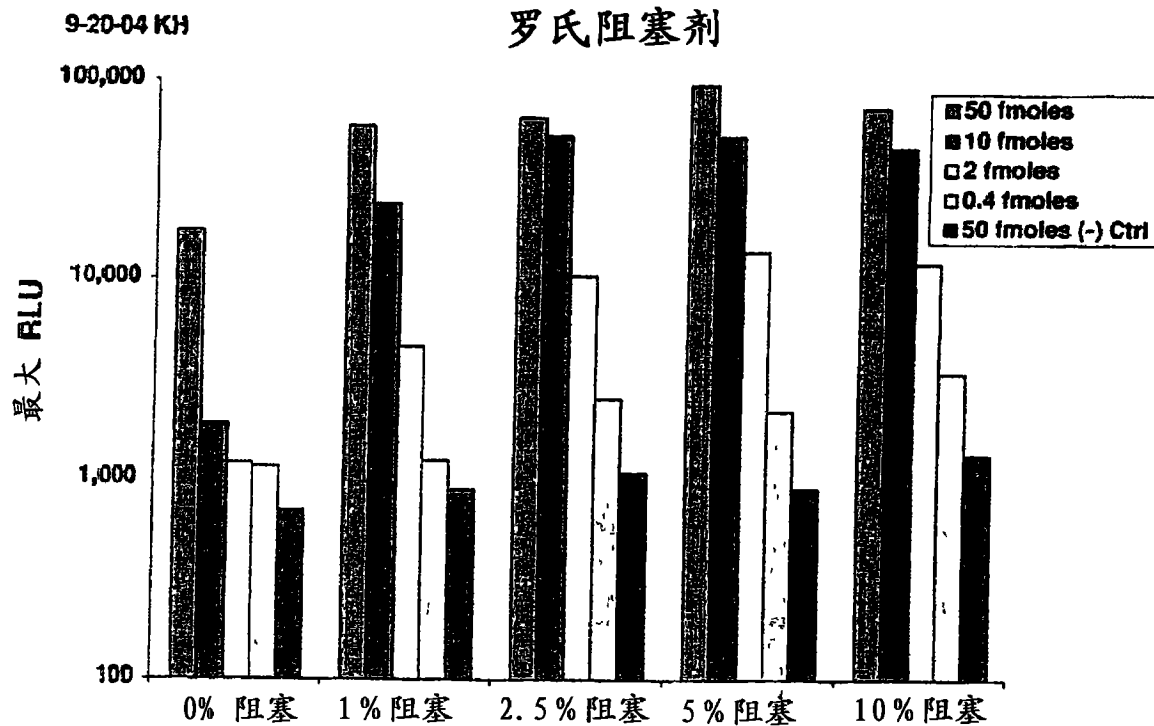


图 35

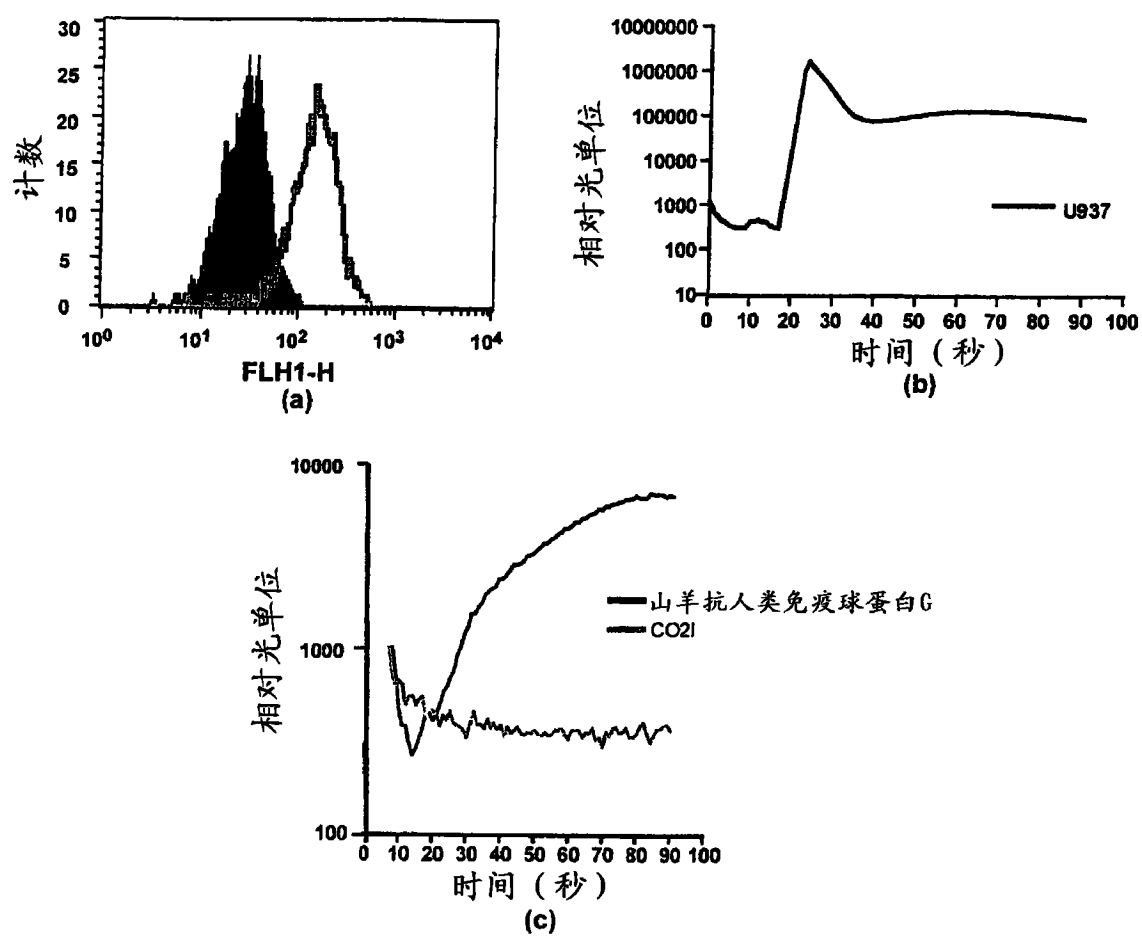


图 36A-C

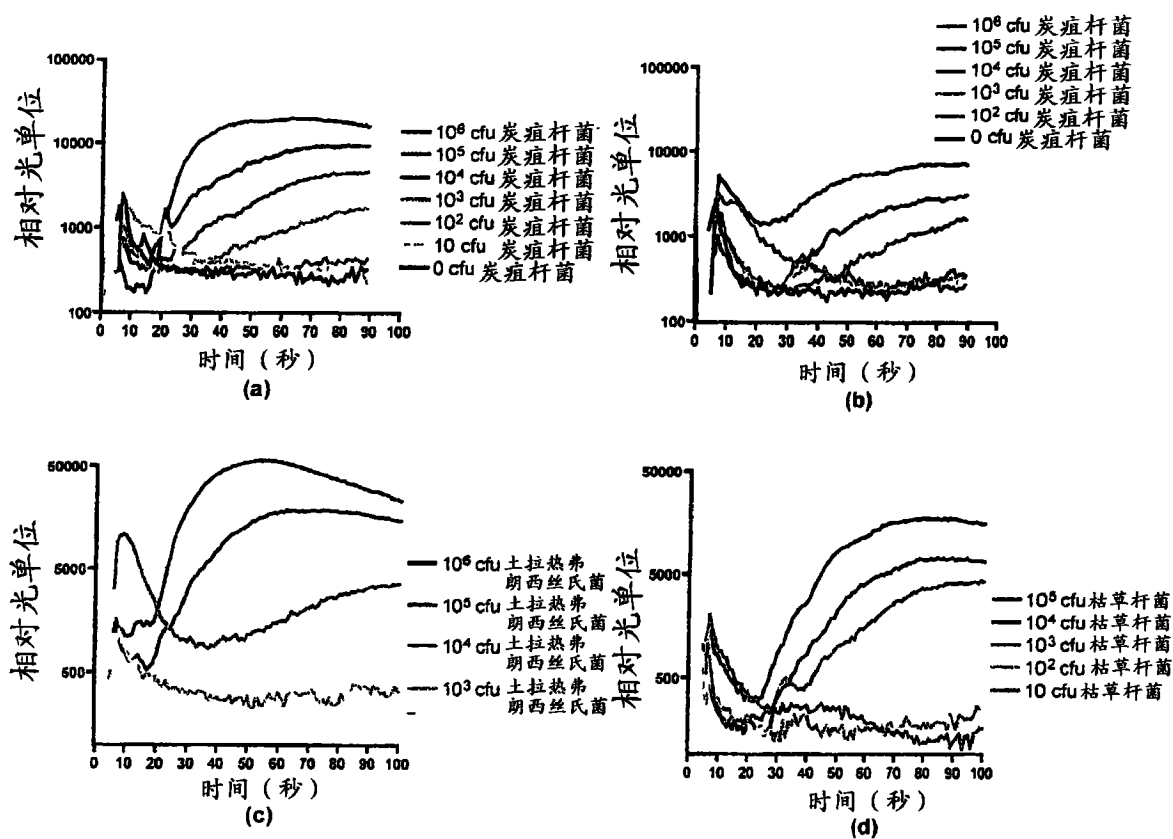


图 37A-D

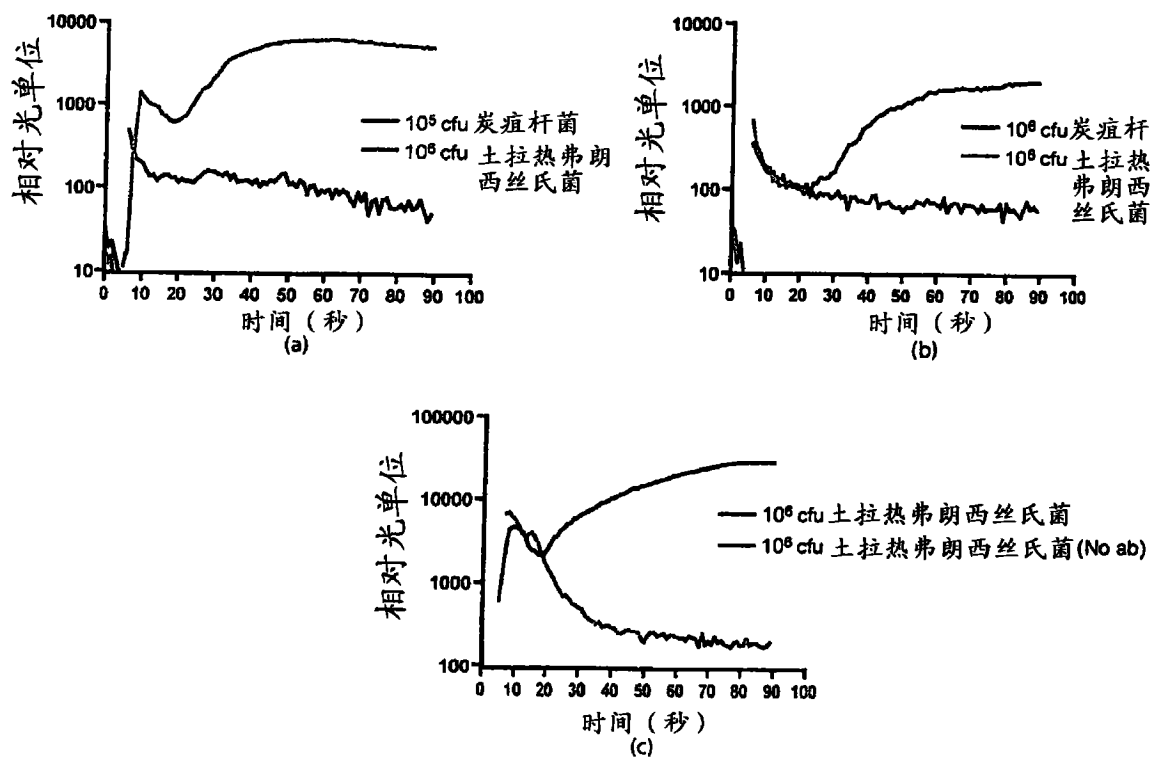


图 38A-C

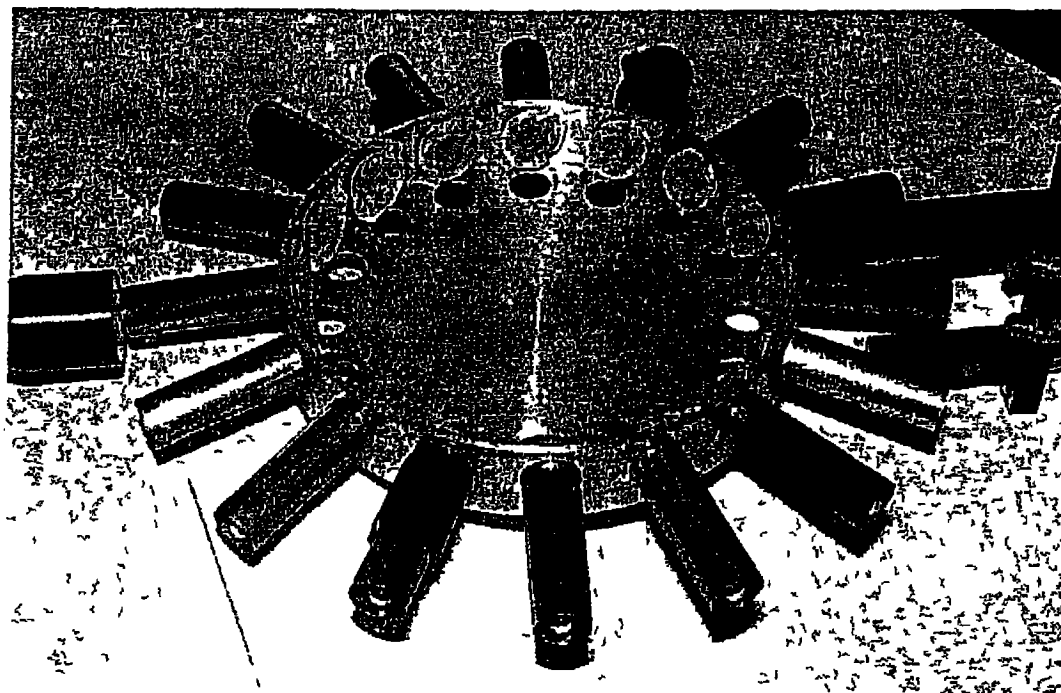


图 39

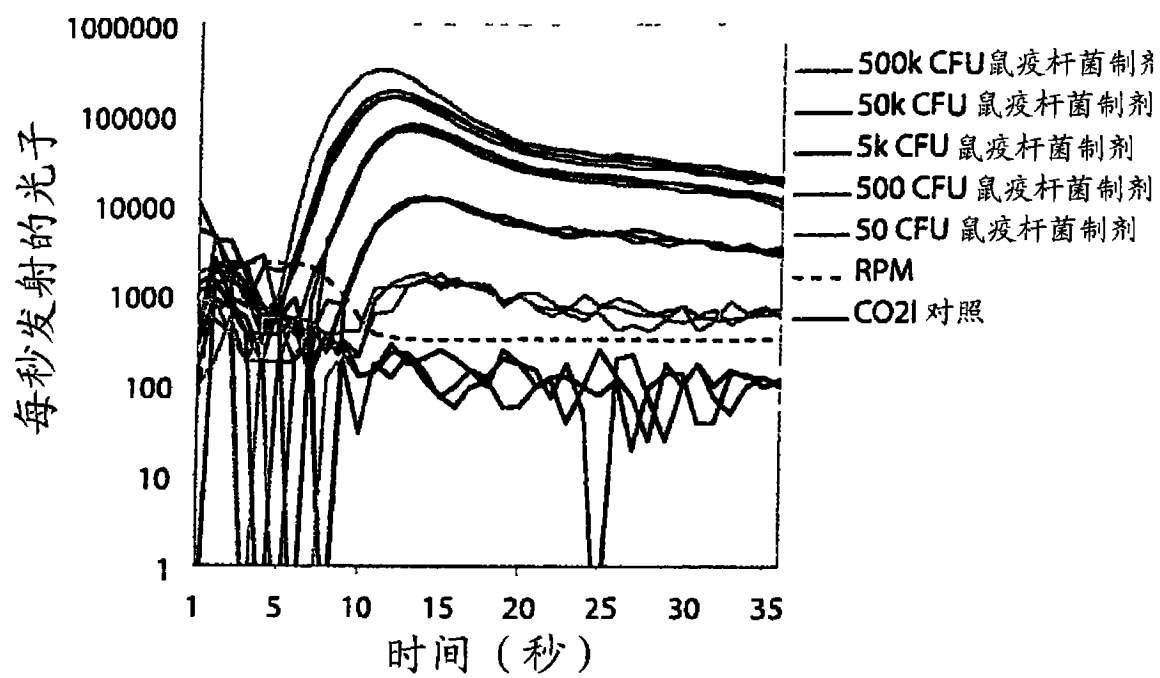


图 40

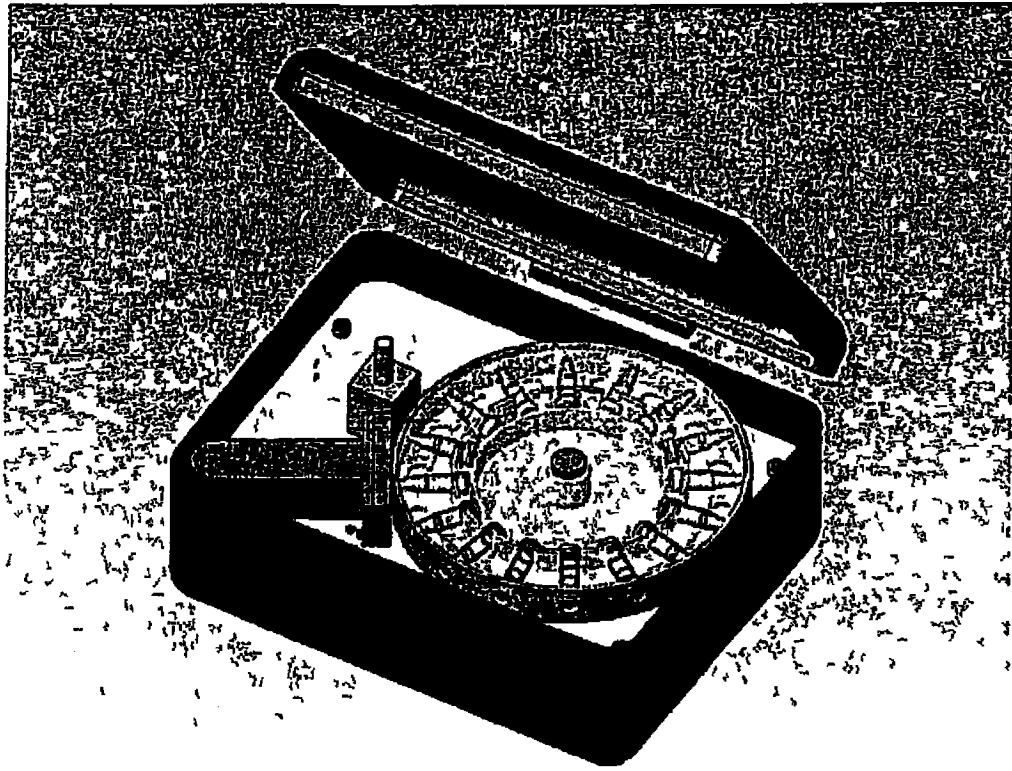


图 41

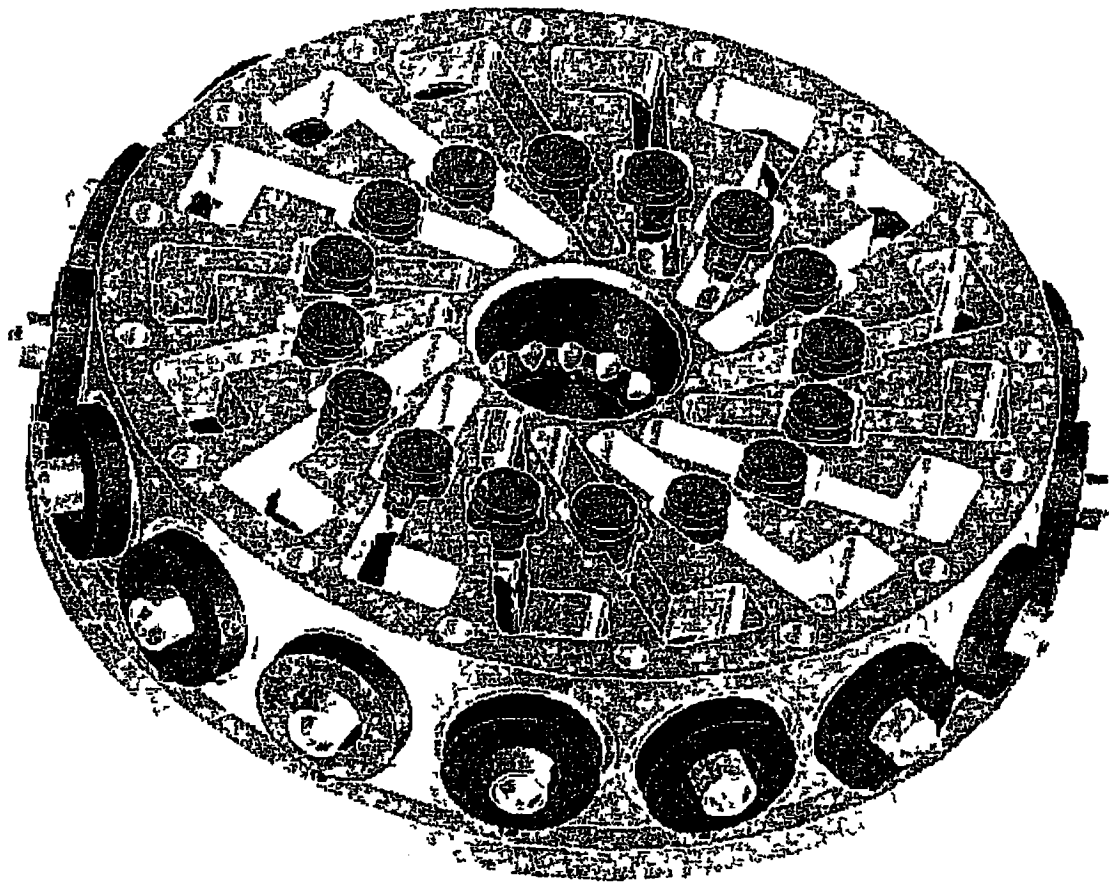


图 42

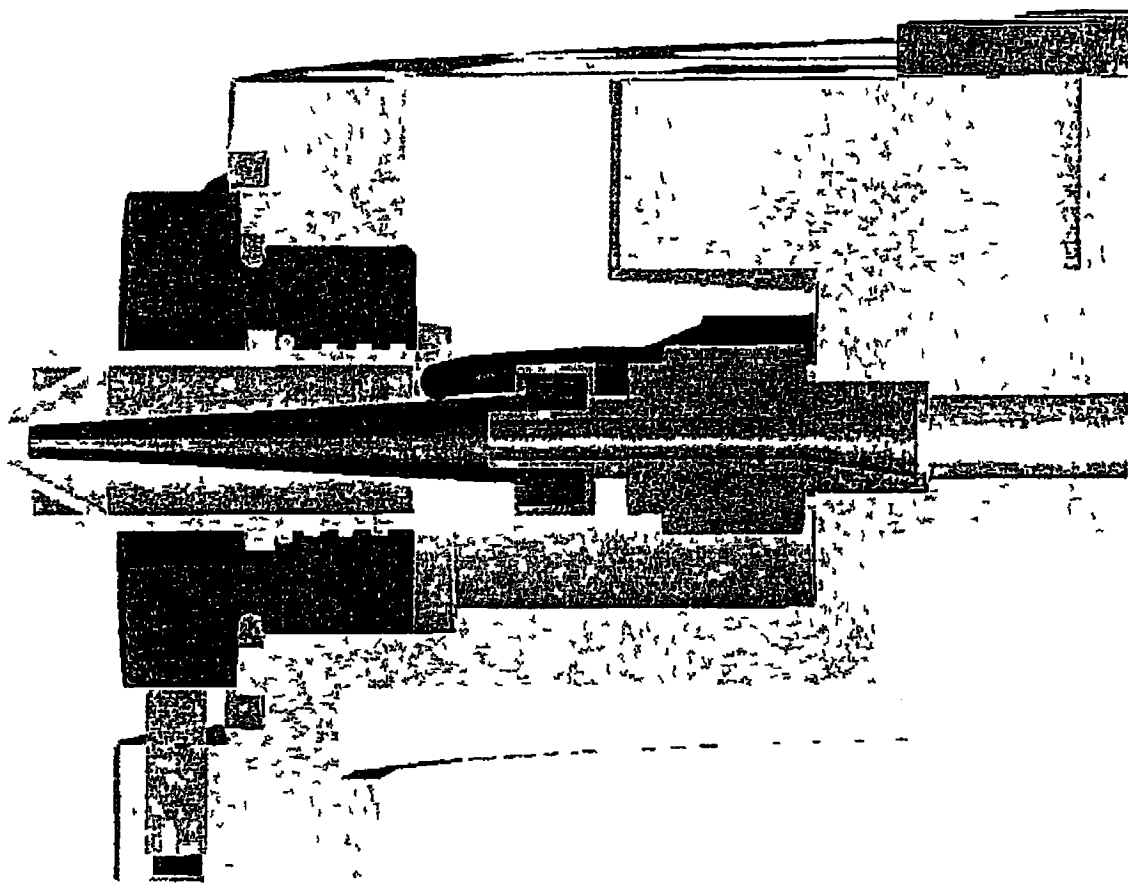


图 43

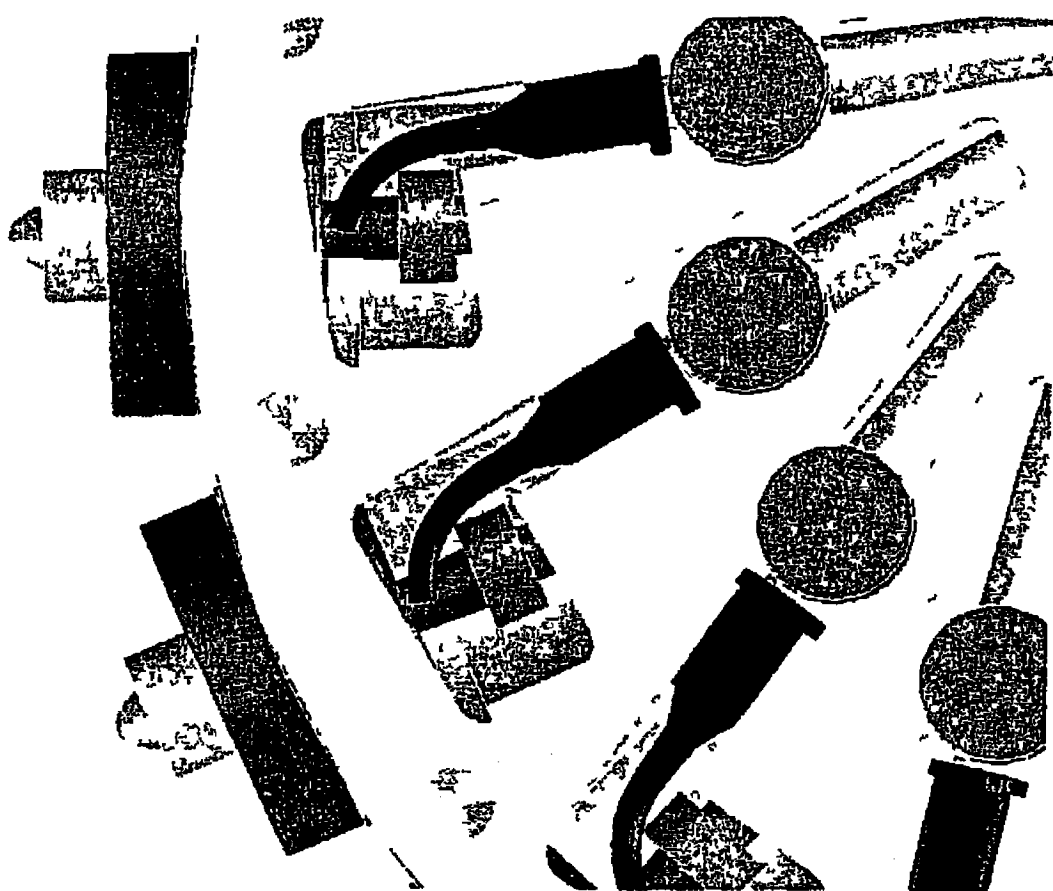
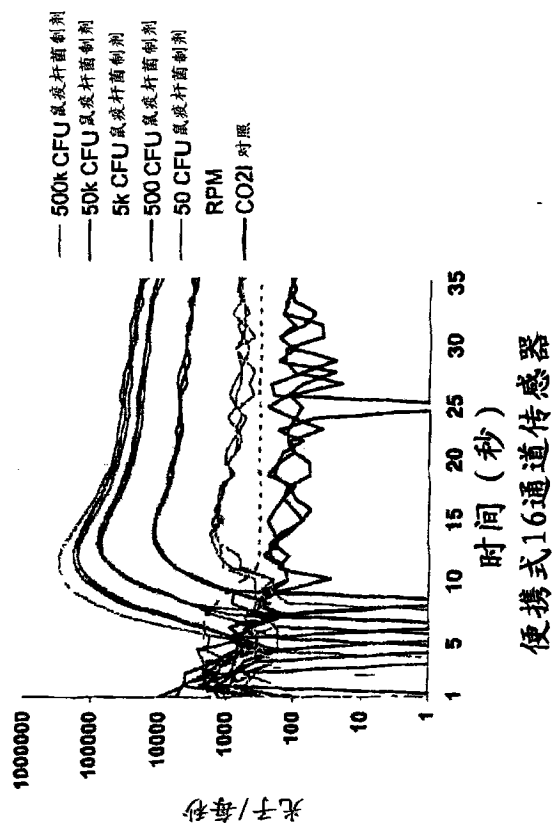


图 44

在16通道传感器原型中对  
16种样品的同时测量



• 探测单毒素类似体的经改进的试验

• 作为范例的加工过的通常细胞与通常细胞所需要的2-63个月相比,仅需要10分钟

• 作为范例的16通道传感器的原型

- 使用一个PMT就能同时读数
- 16个人工加载的样品
- 其灵敏度与单通道传感器相同

便携式16通道传感器



原型

图 45

毒性类似物的CANARY探测

- 用以探测可溶性、单体蛋白的改进的CANARY试验
  - 速度：普遍 > 15分钟
  - 灵敏度：到目前为止为6 纳克 (0.01xLD50)
- 对试验的改进的目的是使速度和灵敏度最优化

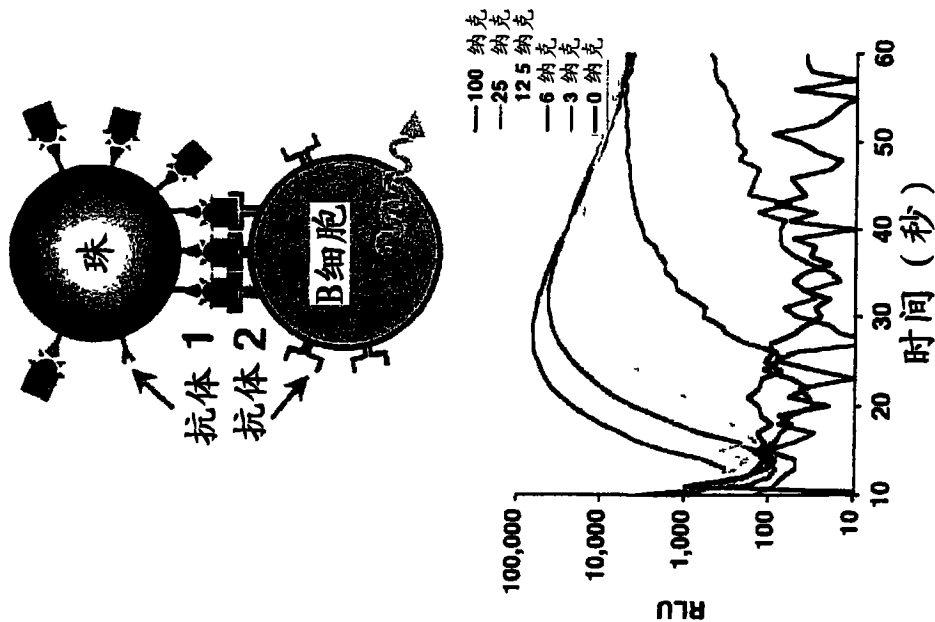
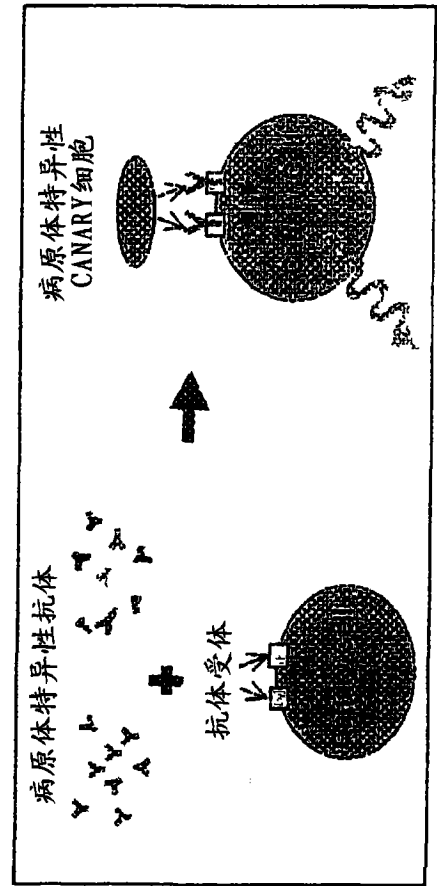


图 46

通常CANARY细胞

目标: 加工一个通常的细胞系, 使其可以被用来在1天内 (相较于原来的2-3个月) 产生新的病原体特异性细胞

方法: 制造一个细胞系, 使其能表达水母发光蛋白和一个综合抗体受体



成就:

- 能快速生成 (<10分钟) 病原体特异性细胞
- 灵活: 能接受单克隆和多克隆抗体
- 特异性探测; 达到最优的灵敏度

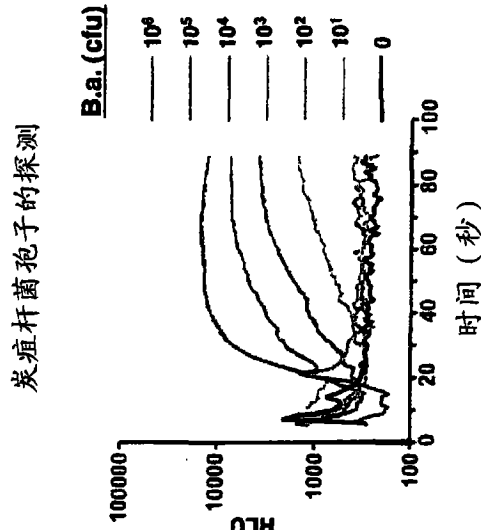


图 47

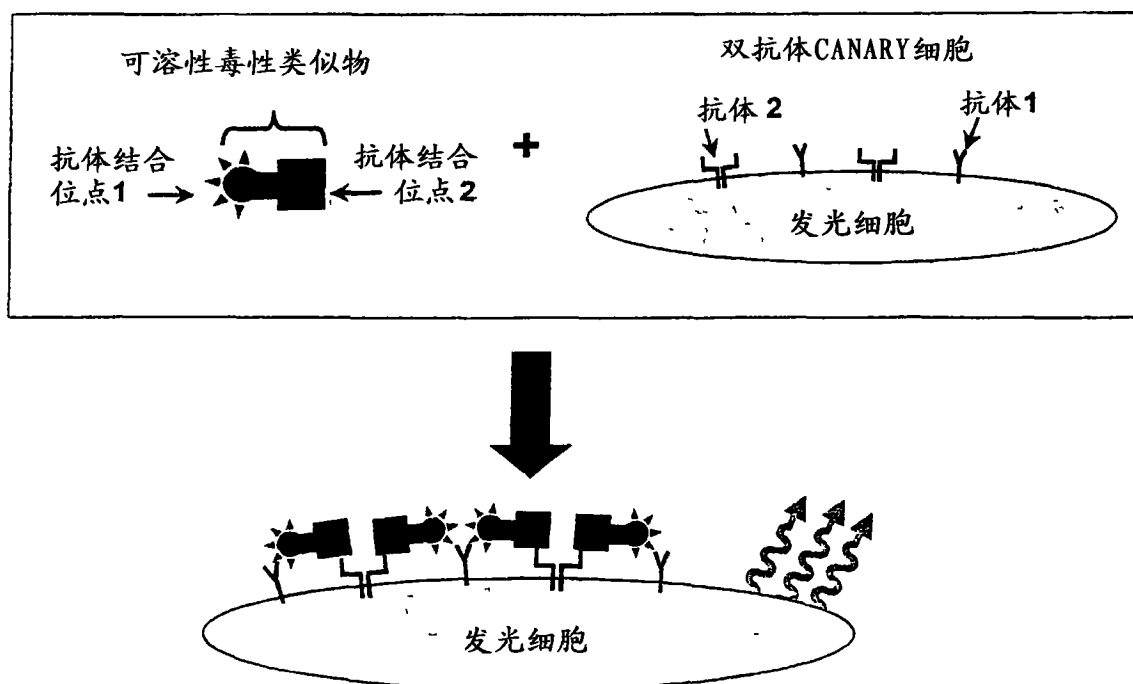


图 48

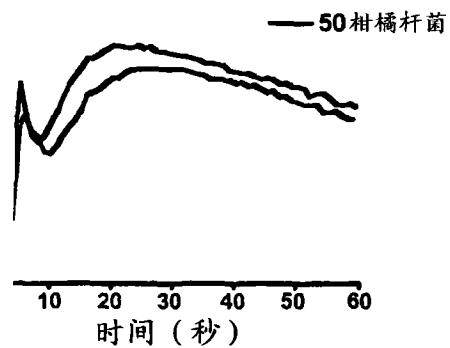


图 49

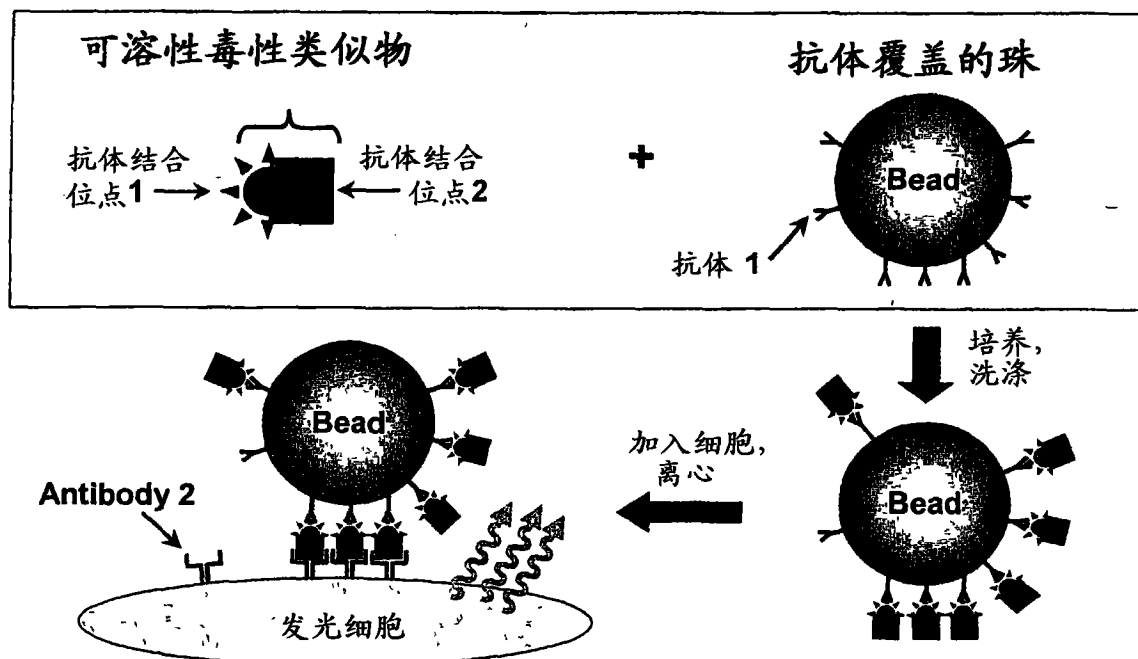


图 50

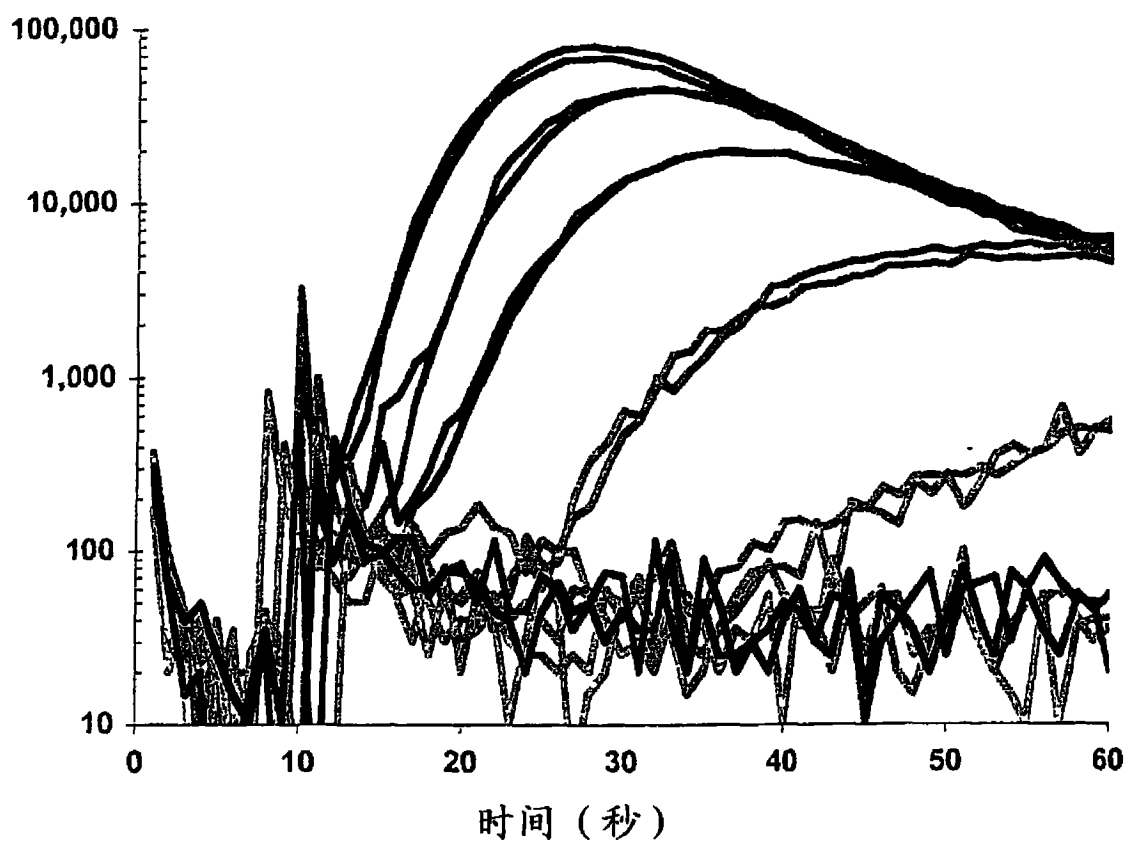


图 51

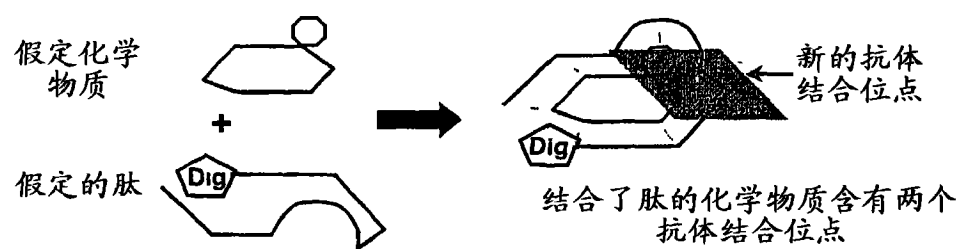


图 52

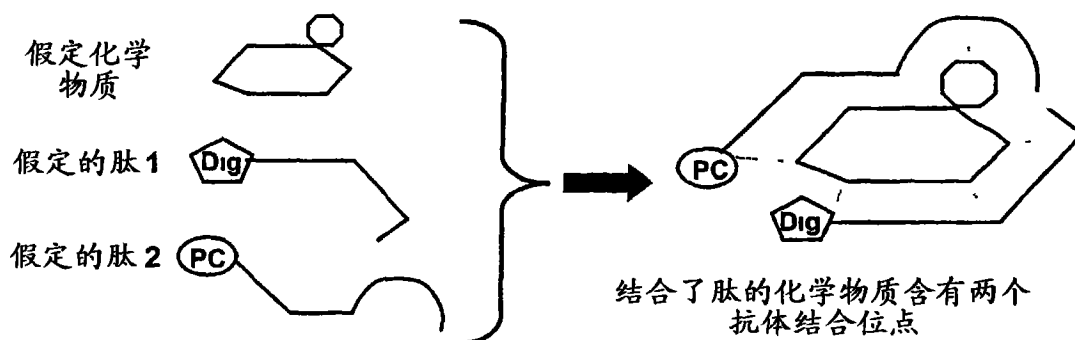


图 53

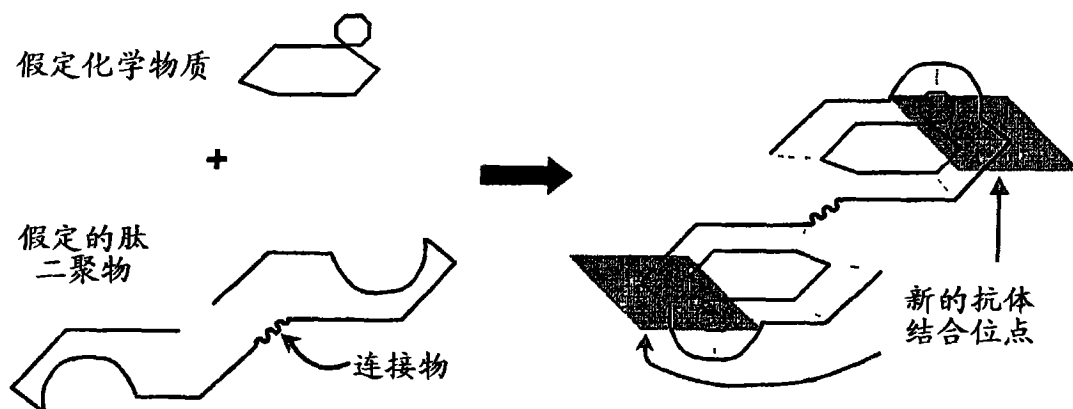


图 54