



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101208599 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 10

(21) 申请号 200680023014. 9

G01N 35/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 04. 22

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

0735/05 2005. 04. 26 CH

JP 平 1-115450 A, 1989. 05. 08, 说明书实施例 2、图 1.

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日

2007. 12. 26

JP 平 1-115450 A, 1989. 05. 08, 说明书实施例 2、图 1.

(86) PCT 国际申请的申请数据

PCT/EP2006/003726 2006. 04. 22

WO 03/050517 A1, 2003. 06. 19, 说明书第 12 页第 3 段.

(87) PCT 国际申请的公布数据

W02006/114249 DE 2006. 11. 02

WO 2004099430 A2, 2004. 11. 18, 说明书第 20 页第 23 至 30 行.

(73) 专利权人 拜耳知识产权有限责任公司

地址 德国蒙海姆

EP 0614055 B1, 1997. 08. 06, 说明书第 2 栏第 35 行至第 4 栏第 42 行、图 1.

(72) 发明人 E·希克 D·尤廷杰 C·卡朗德

JP 平 3-296460 A, 1991. 12. 27, 说明书第 2 页实施例部分、图 1, 3.

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

EP 0486393 A1, 1992. 05. 20, 说明书第 6 页第 50 行至第 7 页第 19 行、图 1.

代理人 温宏艳 林森

JP 特开平 6-134367 A, 1994. 05. 17, 说明书第 [0008] 至 [0014] 段、图 1.

审查员 刘红彦

(51) Int. Cl.

G01N 33/00 (2006. 01)

B05B 17/06 (2006. 01)

B05D 1/02 (2006. 01)

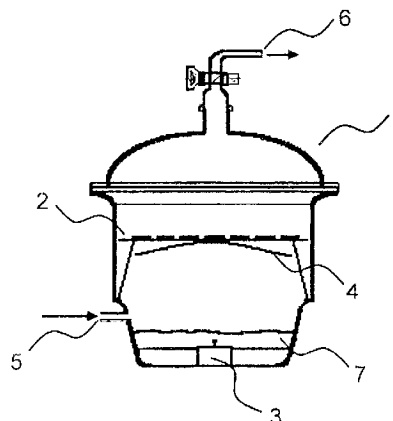
权利要求书3页 说明书19页 附图5页

(54) 发明名称

用于涂覆通过亲和力-测定法用于被分析物检测的底物基质的新的设备和方法

(57) 摘要

本发明的主题涉及各种实施方案通过亲和力-测定法用于检测一个或多个被分析物的底物基质的涂覆设备,其包括:-用于接收被雾化液体的容器(“液体容器”),其中具有在至少一个所述底物基质的表面沉积的物质(化合物)以及形成于液体之上的在操作期间产生的喷雾体积;-用于诱导雾化工序的促动器,和-用于在涂覆工艺期间接收和储存底物基质的支持物,其特征在于,底物基质与被雾化液体表面不接触。本发明还包括各种实施方案,通过亲和力-测定法用于检测一个或多个被分析物的、具有粘合促进-和/或钝化层的底物基质的涂覆方法。



1. 用于涂覆用于通过亲和力 - 测定法检测一个或多个被分析物的底物基质的设备, 其包括:

- 封闭的容器, 除了用于气体的入口和用于气体和 / 或雾的出口之外, 其具有用于接收具有小于 3cP 的粘度的待雾化液体的液体体积, 其含有在至少一个所述底物基质表面所沉积的物质以及在液体之上在操作期间形成的雾体积;

- 用于诱导雾化工序的浸入待雾化液体内的用作液体雾化促动器的超声喷雾器, 和

- 在涂覆工艺期间接收和储存底物基质的支持物, 其中所述支持物在容器内,

- 被结合到支持物的下侧的作为液滴沉降器的拱顶玻璃杯,

- 其中所述底物基质与待雾化液体的表面不接触, 并且所述超声喷雾器位于支持物的下面,

- 其中所述底物基质是实质上平坦的, 而且基本上水平地储存在支持物上, 其中所述支持物用于相对于待雾化液体的表面水平储存底物基质。

2. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 液滴沉降器不能渗透水蒸气和雾。

3. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 液滴沉降器渗透液滴直到所限定的大小。

4. 如权利要求 2 所述的设备, 其特征在于, 液滴沉降器具有凹透镜形状。

5. 如权利要求 3 所述的设备, 其特征在于, 液滴沉降器包括一个细小网孔的网, 后者的网目尺寸决定允许通过液滴的最大尺寸。

6. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 其另外包括用于形成在所述底物基质的环境中所产生的并欲沉降在底物基质上的雾的均匀分布的设备。

7. 如权利要求 6 所述的设备, 其特征在于, 所述的用于形成在所述底物基质的环境中所产生的并欲沉降在底物基质上的雾的均匀分布的设备包括一个通风机。

8. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 它还另外包括用于控制和 / 或调节待雾化液体和 / 或液体容器的单个或全部器壁的温度的装置。

9. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 所述支持物是恒温的。

10. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 它还另外包括在涂覆工艺期间用于控制和 / 或调节液体容器内部压力的装置。

11. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 它还另外包括用于旋转轴向垂直于支持物平面的底物基质的装置。

12. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 它还另外包括用于收集和用于返回 / 回收沉降在液体容器壁上的被雾化的液体的装置。

13. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 它还另外包括用于便利液体容器的清洗的装置。

14. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 它还另外包括用于控制调节和 / 或改变待雾化液体表面与待涂覆的底物基质表面之间距离的装置。

15. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 待雾化液体是水溶液。

16. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 待雾化液体是有机溶液。

17. 如权利要求 16 所述的设备, 其特征在于, 待雾化液体是醇溶液。

18. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 待涂覆的底物基质是实质上平坦的。

19. 如权利要求 1 所述的设备, 其特征在于, 待涂覆的底物基质由一个或多个层组成。

20. 用于涂覆用于通过亲和力 - 测定法检测一个或多个被分析物的底物基质的方法, 其特征在于

- 所述待涂覆的底物基质位于如权利要求 1-19 任一项所述的涂覆设备的支持物上, 其中作为液滴沉降器的拱顶玻璃杯被结合到支持物的下侧,

- 所述涂覆设备包含封闭的容器, 除了用于气体的入口和用于气体和 / 或雾的额外的出口之外, 所述容器具有液体体积和雾体积,

- 存在于所述液体体积中的具有小于 3cP 的粘度的液体被雾化, 并且所述雾体积在液体之上通过浸入待雾化液体且位于支持物的下面的用作液体雾化促动器的超声喷雾器产生,

- 经过气体入口, 气体进入到容器内, 而且与形成的雾混合, 并且

- 在被雾化液体中存在的物质从所形成的雾中沉淀在待涂覆的底物基质上,

- 其中所述底物基质与待雾化液体的表面不接触。

21. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 所述涂覆设备的液滴沉降器不渗透蒸汽和雾。

22. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 所述涂覆设备的液滴沉降器能够渗透直到限定大小的液滴。

23. 如权利要求 21 所述的方法, 其特征在于, 所述涂覆设备的液滴沉降器具有凹透镜的形状。

24. 如权利要求 22 所述的方法, 其特征在于, 所述涂覆设备的液滴沉降器包括一个其网目尺寸决定允许通过液滴的最大尺寸的细小网孔的网。

25. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 涂覆设备另外包括用于形成在所述底物基质环境中所产生并欲沉降在底物基质上的雾的均匀分布的装置。

26. 如权利要求 25 所述的方法, 其特征在于, 在所述底物基质环境中所形成并欲沉降在底物基质上的雾的均匀分布是借助通风机形成的。

27. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 涂覆设备另外包括用于控制和 / 或调节待雾化液体和 / 或液体容器的单个或全部器壁的温度的装置, 并且待雾化液体和 / 或液体容器的单个或全部器壁的温度在涂覆工艺期间进行控制和 / 或改变。

28. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 用于接收和 / 或储存底物基质的涂覆设备的支持物在涂覆工艺期间是恒温的。

29. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 涂覆设备另外包括在涂覆工艺期间用于控制和 / 或调节液体容器内部压力的装置并且压力在涂覆工艺期间进行控制和 / 或改变。

30. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 在涂覆工艺期间底物基质在垂直于支持物平面的轴上旋转。

31. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 沉降在液体容器壁上的液体被收集并再返回待雾化液体中。

32. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 涂覆设备额外包括用于控制调节和 / 或改变待雾化液体表面与待涂覆的底物基质表面之间的距离的装置, 从而在涂层工艺的期间在所述液体和待涂覆的液体表面之间设定一个很好定义的距离。

33. 如权利要求 20 所述的方法, 其特征在于, 涂覆设备的底物基质基本上水平地储存

在支持物上。

34. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,待雾化液体是水溶液。

35. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,待雾化液体是有机溶液。

36. 如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,待雾化液体是醇溶液。

37. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,底物基质的涂层是使用应用于待涂覆底物基质的障板以几何学结构的方式进行的。

38. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,待涂覆的底物基质是实质上平坦的。

39. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,待涂覆的底物基质由一个或多个层组成。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其特征在于,待涂覆底物基质的至少一层是在入射的激发光或测定光的传播方向实质上光学透明的。

41. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,待涂覆的底物基质通过依靠一个或多个激发冷光现象的检测的亲和力-测定法的方式使得一个或多个被分析物得以检测。

42. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,在底物基质上的沉积的层是一种粘附-促进层。

43. 如权利要求 42 所述的方法,其特征在于,所述的粘附-促进层具有小于 200nm 的厚度。

44. 如权利要求 42 所述的方法,其特征在于,所述的粘附-促进层包括一种化学化合物,其选自硅烷,功能化的硅烷,环氧化物,功能化的,带电荷的或极性聚合物,硫醇,磷酸烷基酯和磷酸烷基酯,多功能的嵌段共聚物。

45. 如权利要求 44 所述的方法,其特征在于,所述多功能的嵌段共聚物是聚-L-赖氨酸/聚乙二醇。

46. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述待涂覆的底物基质包含一个或多个应用于所述底物基质表面的特定结合配偶体,并且所述特定结合配偶体被固定在具有任意几何形状的离散测定区域中,其中所述单个测定区域可能含有相同或不同的特定结合配偶体,而且其中相对于所述被分析物和/或相对于所述特定结合配偶体来说是化学中性的化合物使用所述方法应用于所述离散测定区域之间或在所述测定区域内未被占据的部分区域中作为钝化层。

47. 如权利要求 46 所述的方法,其特征在于,所述钝化层包含化合物,所述化合物选自自由白蛋白,酪蛋白,非特异性的多克隆或单克隆异源抗体或经验用于检测被分析物和它们的结合配偶体的非特异性抗体,洗涤剂,未用待分析多核苷酸杂交的片段的天然或合成 DNA,或者无电荷的但亲水的聚合物组成的化合物。

48. 底物基质,其用于通过亲和力-测定法检测一个或多个被分析物,所述底物基质包括一个粘附-促进层,其特征在于,所述的粘附促进层通过权利要求 20-47 任一项所述的涂覆方法制得。

49. 底物基质,其用于通过亲和力-测定法检测一种或多种被分析物,所述底物基质包括涂覆底物基质的至少部分区域的钝化层,所述钝化层在空间分开的测定区域之间或在所述测定区域内部未被占据的部分区域中,其特征在于,所述的钝化层通过权利要求 20-47 任一项所述的涂覆方法制得。

用于涂覆通过亲和力 - 测定法用于被分析物检测的底物基质的新的设备和方法

技术领域

背景技术

[0001] 许多应用领域需要测定可能的复杂组成以及本质的样品中被分析物的多样性,例如,在用于测定个体健康状态的诊断方法中或在通过提供生物学活性化合物测定生物体以及其复杂活体功能方式影响的药物研发中。

[0002] 已知的分析分离方法通常最佳化,用于根据预先确定的理化参数,例如分子量或分子电荷和质量的商,在尽可能短的时间内分离存在于给定样品中的大量化合物。生物亲合 - 检测法是基于使用一种在各种情况下的尽可能较高特异性的生物的或生化的或合成的识别元素,下文中也叫做“结合配偶体”或“特异性结合配偶体”,用于以一种高度选择的方式识别并结合复杂组成样品中的相应(各个)被分析物。多种各种各样化合物的检测需要使用相应数量的各种特异性识别元素。

[0003] 一种基于生物亲合反应的检测方法可以在均相溶液中以及固体载体(“底物基质(Trägersubstrat)”)表面发生。取决于方法的特定设计,后者要求,在将被分析物结合到相应的识别元素后,任选进一步检测底物,并同样任选在不同方法步骤之间,在各情形中洗涤步骤以分离生成的所述识别元素和检测分析物的配合体,并任选,进一步检测剩余样品物质和任选使用的其他试剂。

[0004] 为了测定被分析物的多样性或研究样品的多样性,包含在所述微量滴定盘中在离散样品容器中或这些盘的“井”中的不同被分析物的测定方法是普遍的,特别是在工业分析实验室中。此处最普遍的是在通常约 8cm×12cm 的面积内具有 8×12 个井的栅格的盘,其中每一个井要求用数百个微升的体积填充。然而,在许多申请中使用尽可能小的样品体积同时测定单一样品容器中大量被分析物是期望的。

[0005] WO 84/01031, US-P 5807755, US-P 5837, 551 和 US-P 5432, 099 倡议以一种作为离散测定区域的小“点”,其中一些显著低于 1mm² 面积,的形式固定被分析物特异性识别元素,在共用底物基质上为了能够确定被分析物的浓度通过以一种只取决于诱导时间,不存在连续流动,实质上与绝对样品体积无关的方式只结合一小部分存在的被分析物分子。许多这样的作为测定区域的“点”以二维排列的方式在共用底物基质上形成一个所谓的“微排”。

[0006] 通过固定在离散的空间分开的测定区域中的底物基质上作为识别元素的相应互补核酸来同时检测一个样品中许多不同核酸的方法现在是比较普遍的。例如,已经公开了作为识别元素的低聚核苷酸系列,以普通玻璃或显微镜载玻片作为底物基质,具有非常高的特征密度(公用固相载体上的测定区域的密度)。US 专利号 5, 445, 934(Affymax 技术),例如,描述并主张了每平方厘米具有超过 1000 特征密度的低聚核苷酸系列。

[0007] 近来,诸如此类系列和检测方法的描述随即执行用于同时测定许多蛋白质,例如,在 US 专利号 6, 365, 418 B1 中已经变得更加频繁。

[0008] 固定用于被分析物检测的结合配偶体的最简单的形式包括物理吸附,例如,归因于结合配偶体和底物基质之间的疏水性相互作用。然而,由于媒介的组成及其理化性质,例如,举例来说极性和离子强度,这些交互作用的程度可以做较大变动。在被完全吸附固定在表面之后结合配偶体的粘附力通常不够充分,特别在多步试验中如果连续加入各种试剂时。

[0009] 因此,通常优选将结合配偶体固定在应用于底物基质上的粘附-促进层。已知许多原料适用于制备所述的粘附-促进层,例如,非功能化的或功能化的硅烷,环氧化物,功能化的,带电荷的或极性聚合物以及“自组被动的或功能化的单一或多层”,磷酸烷基酯和膦酸烷基酯,多功能嵌段共聚物,例如,举例来说聚(L)赖氨酸/聚乙二醇。

[0010] 例如,WO 00/65352 描述了用于医学应用作为具有移植共聚物(“接枝共聚物”)作为粘附-促进层的底物基质的生物测定传感器平台或植入管的涂层,具有一个聚离子主链(电子静态),例如,到一个底物基质上和“非交互式”(吸附-抵抗)侧链。

[0011] 为了最小化被分析物或它们的检测物质或其他结合配偶体的非特异性结合,特别是在用于被分析物检测的测定区域(点)之间的(未覆盖)区域,通过局部定址应用产生的,优选通常在该区域形成“钝化”膜。为了该目的,相对于被分析物或相对于它们的检测物质或其他的结合配偶体,“化学中性”,也就是未结合的物质,被应用于空间分开测定区域之间的底物基质化合物上。

[0012] 所述相对于被分析物或它们的检测物质或其他的结合配偶体,“化学中性”物质,也就是说,这些未结合的,组分(在下文也被称为“钝化化合物”),已知可以选自白蛋白,特别是牛血清白蛋白或人血清白蛋白,酪蛋白,非特异性的多克隆或者单克隆异源抗体或组经验用于检测被分析物的非特异性抗体(特别是用于免疫测定),洗涤剂-例如,举例来说,吐温 20-,未用待分析的多核苷酸杂交的片段的、天然或合成 DNA,例如,举例来说,青鱼或鲑鱼精液的提取物(特别是应用于多核苷酸-杂交试验),或者还为无电荷但是亲水的聚合物,例如,举例来说,聚乙二醇或右旋糖酐。

[0013] 为了能够从结合信号产生可能可量化的数据,例如通过荧光检测微排的多个测定区域(点),有必要确保表面密度的一致和测定区域内固定的结合配偶体的结合活性,以便使彼此可以匹配。满足这一需求的实质前提是在其上形成离散测定区域(点)的粘附-促进层的高空间均一性。相应的也要求应用钝化层存在空间均一性以确保指定的测定区域(点)之间的统一的尽可能低的信号背景。

[0014] 可以使用各种方法将粘附-促进层施加到底物基质上,取决于形成的粘附-促进层部件的分子性质和被涂层底物基质的热及化学稳定性。可以实行硅烷化,例如,在气液二相中,例如,通过浸渍方法。当涂覆方法在气相中时,在非常大的反应容器中(与待涂覆的底物基质的尺寸相比),通常会导致沉积层比较好的均一性,从液相沉积的层通常会具有较大的空间多相性,举例来说,在实行浸渍法之后跟踪。

[0015] 由于来自于气相中的沉淀通常要求提高工艺温度,所以进行应用于钝化层的步骤通常发生于液相中,在用于多数场合下不耐热的被分析物检测的识别元素应用后。钝化步骤一般利用一种浸渍方法。这包括将底物基质滴入到装满相对于被分析物或他们的检测物或其他结合配偶体,“化学中性”即没有结合的化合物的溶液(“钝化溶液”)的容器中,以便尽可能快地并同时用钝化溶液弄湿底物基质的全部表面。随后,将底物基质在钝化溶液

中保留（“培养”）一段时间，以可以将用于表面钝化的化合物吸附到底物表面。

[0016] 该常规方法的优点在于可以在没有任何其他帮助的情况下进行而且对试验员的能力没有任何特殊要求。

[0017] 然而，该方法的缺点是通过钝化溶液流经底物表面，当底物基质浸渍时的瞬间相对较高的斑点“污染”的风险。在该方法中，从离散的测定区域解吸出的并被冲走的原料（固定的特定结合配偶体）可以在没被钝化化合物完全覆盖的区域里在相对钝化溶液流动方向（基于底物表面）的方向再一次在周围区域中被吸附。

[0018] 斑点的“污染”程度取决于其中离散测定区域中被固定的特定结合配偶体的表面密度和钝化溶液的组成，尤其是在所述钝化溶液中特定结合配偶体的溶解性。就高特征密度来说，即在临近斑点之间短距离的情况下，“污染”效果可能大大削弱或甚至排斥来自于系列测定区域的试验信号的定量分析，这是由于来自于所述离散测定区域之间区域的背景信号不均匀分布的结果。这种不期望的效果可能会导致试验信号的有意义分析是不再可能的，特别是如果被固定的原料从一个斑点输送到临近的斑点。

[0019] 该方法的另一个缺点是对于相对较大体积的钝化溶液和于此相结合的较高的成本的内在需求。

[0020] 已知所述的“污染”效果可通过使用喷雾法，例如，通过喷雾器得以预防。这包括将钝化溶液以微小液滴的形式应用到底物表面上直到在所述表面形成连续不断的液膜。然后在液体蒸汽的饱和大气压中（即，在 100% 大气湿度在含水的钝化溶液的情况下）在预先确定的一段时间内形成底物表面，又以便从此使应用于表面钝化的化合物吸附到底物表面。流动痕迹可通过在所述钝化过程中底物基质水平地（相对于涂层的底物基质表面）储藏得以避免。

[0021] 斑点实质上可通过适当实施该方法得以避免。另一个优点是需要的钝化溶液的量，一般通过相对上述浸渍法的因子 10 得以降低。

[0022] 然而，该方法的内在难处是所要求的均一润湿和应用的液体量的精确计量，需要在底物表面形成均质液体膜，从而增加了对操作员的要求。例如，如果过度应用钝化溶液则斑点的“污染”会再次发生。国际专利申请 WO 01/57254，例如，描述了基于制备具有核酸，蛋白质或其他化学或生物学化合物作为固定在离散测定区域的特定结合配偶体的用于制备微排的涂层方法的模块化系统。

[0023] 尽管比起浸渍法来说具有明显的优势，喷雾法的结果同样并不理想。由于液滴是通过喷管或喷雾器排出，所述液滴在其击打在所涂覆表面的瞬间具有集中在表面的或多或少强的动量。这与当击打在表面产生甚至更小的液滴时所述液滴飞溅的风险率有关，因此形成的测定区域（斑点）的边缘通常不是以一种明确的方式产生的。况且，喷雾法通常会引起具有较大液滴尺寸变异的较大的液滴。

[0024] 发明目的

[0025] 因此，需要发展一种来自液相的涂覆法以及用于进行所述涂覆法的设备，可实现如从气相中沉淀的形成层的类似高度均一性并要求使用尽可能少的液体量。此外将相应的新涂覆法和为此使用的涂层设备二者适当的应用于粘附促进层和钝化层来是合乎需要的。低于经济可行性方面，溶液应当尽可能成本合算，也就是说，设备的复杂性应该保持尽可能低。相应的新涂层设备应当易于操作且随即实施的涂覆法应当易于自动化。

[0026] 发明概述

[0027] 令人惊异地发现,根据下述本发明方法满足所述必要条件,以含有被应用于底物基质的化合物的雾化溶液为基准,并且不要求任何来自于雾沉积到所述底物基质方向的底物基质上的液滴的实质冲量。根据本发明的涂层设备,已经发展用以进行所述方法,其特征在于结构简单可以使用便宜的市场上可买到的组分,并能够减轻操作。

[0028] 本发明使用的方法,利用根据如下所述的一个实施方案的本发明涂层设备,适于将粘附-促进层和钝化层应用于任何,但是优选平坦的,用于检测亲和力-测定法中的被分析物的底物基质。

[0029] 本发明的方法是上述喷雾法的发展,对于本发明的方法在一个优选实施方案中通过超声处理而产生非常细小的液滴。应用于所述方法的涂层设备包括,在一个优选实施方案中,具有一个用于水平储存底物基质的支持物(相对于待雾化液体的表面)和一个位于其下的超声发生荡器的封闭容器,该容器陷于待雾化液体中。本发明方法的特征在于,所产生的液滴实质上小于喷雾法的情况。在操作情况中,在待雾化液体上方产生了非常密集的雾,在一个优选实施方案中雾通过在一个微弱的额外使用的氮流的帮助下引起的湍流均匀分布在容器中,其中容器优选封闭的没有进气口和出气口。由于相对于待涂覆的底物基质表面涂层溶液没有流动,斑点的“污染”,如浸渍法所描述的,在本发明的方法中是可以避免的。因此,由于钝化溶液和本方法关于先前操作步骤中使用的用于固定离散测定区域的特异性结合配偶体的“斑点溶液”组成的选择,以及用于特异性结合配偶体的该溶液的浓度,以及因此在所述测定区域固定的特异性结合配偶体的表面密度的结果,这里几乎没有任何限制。由于在表面钝化步骤中沿底物基质表面没有流动,无论临近斑点之间怎样“污染”没有特别的风险,并且,因此,在一系列测定区域形成的它们的密度仅受计量器和用于形成离散测定区域所用仪器(“斑点”)的位置准确度的限制。此外本发明方法的特征在于可在一个共用的适当尺寸的容器中同时涂覆多个底物基质并且易于自动化,并可很容易由未经训练的人员进行操作。所要求的和用于涂覆底物基质的液体体积在喷雾法的情况下具有相似的数量级。

[0030] 附图简要说明

[0031] 图1图解说明了本发明的涂层装置。

[0032] 图2描绘了在一个二维阵列(“微排”(Mikroarray))中具有12种不同应用样品的测定区域的几何排列和在一个共用底物基质上6种排列的线性排列。

[0033] 图3A-图3C描绘了微排的荧光信号,其中相应底物基质的自由表面通过不同的涂覆方法被钝化,在各种情况下通过下列放大的图象细节得以显示(A:浸渍法;B:喷雾法,C:本发明的雾化法)。

[0034] 图4A描绘了在各种情况中微排的所有斑点之间测定的背景信号强度的平均值和标准偏差,其中相应底物基质的自由表面通过不同的涂覆方法被钝化(A:浸渍法;B:喷雾法,C:本发明的雾化法)。

[0035] 图4B描绘了微排的所有参照斑点(至于术语参见示范的具体实施例)荧光强度的平均值和标准偏差,其中相应底物基质的自由表面通过不同的涂覆方法被钝化(A:浸渍法;B:喷雾法,C:本发明的雾化法)。

[0036] 图5A描绘了用于分析物检测的微排测定区域的荧光信号的平均强度和标准偏

差,其中相应底物基质的自由表面通过不同的涂覆方法被钝化(A:浸渍法;B:喷雾法,C:本发明的雾化法)并且微排随后用抗体A1(抗-p53)的溶液培养然后在各种情况下通过用Alexa 647 氟抗-兔子Fab片段诱导的荧光检测进行检测。

[0037] 图5B描绘了用于分析物检测的微排测定区域的荧光信号的平均强度和标准偏差,其中相应底物基质的自由表面通过不同的涂覆方法被钝化(A:浸渍法;B:喷雾法,C:本发明的雾化法)并且微排随后用抗体A2(抗磷酸-p53)的溶液培养然后在各种情况下通过用Alexa 647 氟抗-兔子Fab片段诱导的荧光检测进行检测。

[0038] 发明详述

[0039] 本发明的主题首先涉及用于涂覆通过亲和力-测定法检测一个或多个被分析物的底物基质的设备,包括:

[0040] - 用于接收待雾化液体的容器(“液体容器”),其含有在至少一个所述底物基质表面上待沉积的物质(化合物)以及形成于操作期间液体之上的雾体积;

[0041] - 用于诱导雾化工序的促动器和

[0042] - 在涂层期间接收和储存底物基质的支持物,其特征在于底物基质与待雾化的液体表面不接触。

[0043] 术语“待雾化液体”此处是指本发明涂层设备内部液体的总量,其上促动器的推动力用于液体雾化,结果部分所述液体转化为雾。

[0044] 优选待雾化液体上雾的形成在所述液体内部超声波的作用下形成。相应地,优选所述的促动器用来产生超声波。

[0045] 形成超声波的各种工艺工程是已知的,例如,通过压电晶体,振荡薄膜等。优选所述的促动器包括超声波发生器的振荡片(Membran)。

[0046] 更优选所述促动器在操作期间沉浸在待雾化液体内部。优选所述促动器完全在被待雾化液体内部。

[0047] 如果作用在待雾化液体上的超声波的强度和频率可以调节和/或可以通过适当的方式测量是有利的。

[0048] 如新涂覆方法的需要中提到的,形成层的一致性和高度均一性是非常重要的。为了确保这一点,待沉淀的雾的尽可能小的液滴的尽可能窄的粒径分布是合乎需要的。就特别应用于Terraristik的简单商业喷雾器来说,待雾化液体中大液滴甚至飞溅的出现是必须考虑的。

[0049] 优选本发明的涂层设备包括液滴沉降器。所述的液滴沉降器分布在待雾化液体表面之间的空间体积和支持物上,并且在其上待涂覆底物基质在涂层期间被储存。

[0050] 不同的实施方案的液滴沉降器是适合的。原则上,使用的液滴沉降器是不能渗透蒸汽和雾(如果所述液滴沉降器是,例如,封闭的固体)。如果液滴沉降器具有凹透镜的几何形状是有利的。一个使用的液滴沉降器的实例是拱顶玻璃杯(具有一凹面)。

[0051] 使用的液滴沉降器也可以渗透液滴直到所限定的大小,例如具有小于200 μm 的直径。这可以从技术上通过所述的包含其有网目尺寸决定允许通过液滴最大尺寸的细小网孔的网的液滴沉降器来实现。

[0052] 优选底物基质,当储存在支持物上时,在涂层期间在其避开待雾化液体表面的侧面/表面进行涂层,其中不一定排除在其他表面的涂层。

[0053] 可以在待涂覆底物基质上应用障板 (Masken),也是可以可能的,通过在本发明的涂覆方法中使用本发明的涂层设备通过任选连续雾化一个或多个任选的不同液体形成几何学结构的涂层。在几何形状可以再生的底物基质上形成涂层区域的前提,各种情况下在不被涂覆的底物基质的区域的液体封闭入口通过相应的适当障板遮盖,使得雾液滴不能到达不待涂覆的区域。

[0054] 为了可以满足形成底物基质的非常一致和均匀涂层这样的主要目的,如果本发明的涂层设备进一步包含用于在所述底物基质的环境中形成所产生并沉淀在底物基质上的雾的均匀分布的设备是更加有利的。

[0055] 为此,例如有利的是,如果气体进入设备的容器中(即,进入空气空间或气体空间或雾空间),在此气体与形成的雾混合和/或与其形成湍流。

[0056] 因此如果涂层设备还包括至少一个气体入口是有利的。设备还可以额外包括一个或多个用于排放气体和/或雾的出口。

[0057] 另外还有利的是,如果所述用于形成在底物基质环境中所产生并沉淀在底物基质上的雾的均匀分布设备包括一个通风机,并且,由其所产生的雾和任选另外进入到该设备的容器中的气体湍流,以便实现更好的混合并从而消除雾分配的不均匀性。

[0058] 为了确保在涂覆工艺过程中的恒定和良好定义的条件,如果本发明的涂层设备进一步包含用于控制和/或调节待雾化液体和/或液体容器的单个或所有器壁的温度的设备是更加有利的。并且优选在涂覆工艺期间用于接收和/或储存底物基质的涂层设备的支持物是恒温的。

[0059] 为了同样的原因,如果涂层设备另外包括用于在涂覆工艺期间控制和/或调节液体容器内部压力的设备也可以是有利的。

[0060] 为了确保底物基质的涂层的一致性和均一性,特别是在本发明设备的容器中消除任何所形成的雾的多相性的影响,尽管有适当的预防措施,但该多相性仍可能存在,如果涂层设备另外包括在垂直于支持物平面的轴上旋转底物基质的设备是更加有利的。

[0061] 由于本发明方法的固有性质,也就是实质空间非定向性沉淀,液滴的形成,以及因此所含有的化合物施用于表面涂层,不仅在底物基质的自由表面发生,也在,例如,在本发明涂层设备的液体容器的器壁上发生。因为施用到底物基质上的化合物可以是非常特别的高纯形式的物质,因而可以相对贵的,优选的是,本发明涂层装置另外包括用于收集和用于返回/回收在液体容器壁上沉淀的雾化液化的装置。

[0062] 如果本发明的涂层设备还含有用于液体容器的便利清洗装置将会更加有利。例如,所述的装置可以包括所述容器壁表面的憎水涂层,用于沿着液体容器内壁回收并进入到返回待雾化液体内的液体中并且用于便利的清洗。这样的设备同时还涉及几何形状,例如,通过避免或至少磨圆在其中液体容易储存并且很难除去的角。

[0063] 优选待涂覆底物基质在涂层设备的支持物上实质水平的储存。术语“实质水平”此处包括至多 $\pm 10^\circ$ 水平储存的偏差。

[0064] 如果涂层设备还包括在待雾化液体表面与待涂覆底物基质表面之间距离的控制调节和/或改变的装置将会更加有利。

[0065] 液体容器优选封闭的,没有选择性的气体入口和选择性额外的气体 and / 或雾的出口。

[0066] 待雾化液体优选粘度小于 3cP 的低粘度液体。特别是水溶液。然而,该待雾化液体也可以是有机的,特别是醇溶液。

[0067] 而且,优选的待涂覆底物基质是实质上平坦的。此处术语“实质上平坦的”意为所述底物基质包括含有待涂覆表面的平面,其不含可能存在的三维结构(例如,举例来说,在底物基质表面上提供的样品容器的侧壁),以及一个又包含对应底物基质所用表面的实质上平行的两个平面,此处属于“实质上平行的”包括至多 $\pm 10^\circ$ 平行性偏差。“实质上平坦的”意为底物基质含有待涂覆的平滑和粗糙的表面。

[0068] 待涂覆的底物基质可以包含一个单独(自我支持)层,例如,举例来说,载玻片,或其他多层。

[0069] 优选至少一个待涂覆的底物基质的层在入射激发光或测量光的传播方向实质上光学透明。

[0070] 此处原料或底物基质的“光学透明度”是指在所述原料或在所述底物基质中传送的光的传播路径长度或在作为光波导管形成的底物基质的如下(高折射率)波导层中传导的光的传播路径长度,在可见光谱的至少一部分区域(在 400nm 和 750nm 之间)中大于 2mm,如果所述传播长度路径不被改变所述光传播方向的结构限制。例如,可见光的传播路径长度,即所述光在对应原料中在路径上,直到当所述光进入所述原料时光强度降低到初始强度的 $1/e$ 值的距离,可以按从若干厘米(例如,在薄膜波导中,见下文)直到米或千米(在用于光信号传送的光控制的情况下)的数量级中。在以薄膜波导为基准的光栅-波导结构的情况下,波导层内部传导的光的传播矢量的长度可能受一些依据外部耦合衍射光栅(作为波导层形成)的测微计的限制。然而,该传播路径长度的限制是取决于结构而不是结构的材料性质。根据本发明,这样的光栅-波导-结构被称为“光学透明的”。在本发明的范围内,“实质上光学透明”也指这些底物基质或层,其中光透射所述底物基质或层的强度的减弱小于 50%。

[0071] 待涂覆底物基质的至少一个层,在入射激发光或测量光传播方向实质上光学透明的,可以包含,例如,选自包括硅酸盐,例如玻璃或石英,透明热塑形式的、注塑的或可轧的塑料,例如聚碳酸酯,聚酰亚胺,丙烯酸酯,特别是聚甲基丙烯酸甲酯,聚苯乙烯,环烯烃聚合物和环烯烃共聚物组的一种材料。

[0072] 在本发明涂层设备的一个具体实施方案中,待涂覆底物基质包括一个薄金属层,优选由金或银制得,任选在下方的中间层上,具有一个优选小于 1.5 的折射率,其中选择所述金属层和可能的中间层的厚度以便表层等离子体在关联激发光的波长和/或产生的冷光的波长下能够被激发。所述金属层的厚度优选在 10nm-1000nm 之间,特别优选 30nm-200nm。

[0073] 用于产生表层等离子体激元和联合冷光测定以及波导结构的条件已经在文献中多次描述。

[0074] 在本申请中术语“冷光”是指在光学或非光学,例如,电学或化学或生化或热量,激发后,在紫外线到红外线范围内光量子的自发发射。术语“冷光”包括,例如,化学发光,生物发光,场致发光和特别是荧光和磷光。荧光和磷光是特别优选的冷光形式。

[0075] 优选的待涂覆底物基质是包括一层或多层的光波导。所述底物基质可以被连续地作为光波导形成或可以包括离散的波导区域。

[0076] “连续波导区域”意为相应的波导区域,其实质上延伸横穿用于分析物检测的底物基质表面部分的全部区域,不中断的高折射率、波导层。

[0077] 光波导管特别适于用作亲合测定法中的被分析物检测的底物基质,因为所述波导与高折射率波导层到下降折射率的临近层(也可能是空气)边界的“渐逝”场的形成有关。渐逝场到环境的穿透深度小于指示光波长(例如,200nm到400nm)范围的限制,因此被分析物分子或检测物分子或检测物分子部分(例如,举例来说,荧光性标记的)的交互作用可以被激发并在波导表面以空间高度选择的方式被该渐逝场观测到,并且来自远端场,例如,来自样品媒介深处的干扰信号可以基本上被淘汰。

[0078] 因此通常优选包括所述待涂覆底物基质表面的待涂覆底物基质的连续或离散的波导区域。

[0079] 特别优选的待涂覆底物基质包括具有实质上光学透明的波导层(a)的平面光学薄膜波导管,波导层(a)在第二个具有比该层(a)降低的折射率的同样实质光学透明层(b)上,并且任选同样实质光学透明中间层(b)在层(a)和具有同样的比层(a)降低的折射率的层(b)之间。

[0080] 给定层(a)的原料并给定折射率,则灵敏度随着层厚度降低而增加,直到所述层厚度的下限。所述下限取决于当降低到指示光的波长数值之下时的光导停止以及在非常薄层中由于进一步降低的层厚度观测到的传播损耗的增加。优选产品的层(a)厚度和其折射指数来自于十分之一到十,优选三分之一到三分之二,的耦合入层(a)的激发光或测定光的波长。

[0081] 用于耦合激发光或测定光到光学波导管的各种方法是已知的。在相对厚的波导层以至自承的波导管的情况下,可能将光以所述指示光通过利用适当数值孔径的透镜经过全内反射这样的方式聚焦在波导管的端面。在波导管具有比其波导层厚度更大横向宽度的情况下,优选使用柱面透镜。所述透镜可以是空间远离波导管排列并与此直接连接。在降低波导管层厚度的情况下,不适合形成端面耦合。在该情况下最好通过附属于波导管的,优选没有缺口或通过折射率-校准液体连接到波导管上的棱镜进行耦合。也可以通过连接到光波导管的光学纤维提供激发光,并通过端面耦合所述的激发光,在不同的波导管中通过将两个波导管彼此接近使得它们的渐逝场重叠,从而可以启动传递的能量来耦合已经耦合的光。

[0082] 因此优选在使用所述底物基质的亲和力-测定法的检测步骤期间,待涂覆底物基质的离散或连续波导区域可以与用于耦合一个或多个光源的激发光或测定光的一个或多个光耦合元素以光学相互作用彼此接触,其中所述的光耦合元素选自灯棱镜耦合器,用光波导彼此接触并具有重叠渐逝场的迅衰耦合器,具有聚焦透镜,优选柱面透镜的端面耦合器,排列在底物基质的波导层端侧面前,以及光栅耦合器。

[0083] 特别优选待涂覆底物基质的离散或连续波导区与一个或多个可以耦合到所述底物基质波导层中的激发光或测定光的光栅结构(c)彼此接触,和/或与一个或多个不耦合所述底物基质波导层的激发光或测定光的光栅结构(c')彼此接触,其中底物基质上同时存在的光栅结构(c)和(c')可以具有一致或不同的光栅周期。

[0084] 所述的光栅结构优选具有任何纵剖面(Profile)的离隙光栅,例如长方形,三角形,锯齿形,半圆形或正弦形的纵剖面,或在实质平坦层(a)具有折射率周期调节的相位光栅

或体积光栅。光栅结构(c)优选为表面离隙光栅。

[0085] 光栅结构(c)和/或(c')可以是单一或多相衍射并可以具有2nm-100nm,优选10nm-30nm的深度,以及200nm-1000nm,优选300nm-700nm的周期。光栅支配的条板的宽度对光栅周期的比率可以在0.01-0.99之间,其中优选0.2-0.8之间的比率。

[0086] 第一个光学透明层(a)的折射率优选大于1.8,同时优选第一个光学透明层(a)包括选自氮化硅, TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 , 和 ZrO_2 , 特别优选包括 TiO_2 , Ta_2O_5 或 Nb_2O_5 的材料。

[0087] 此外待涂覆底物基质的第二个光学透明层(b)优选包括选自硅酸盐,例如玻璃或石英,透明热塑形式的,注塑的或可轧的塑料,例如聚碳酸酯,聚酰亚胺,丙烯酸酯,特别是聚甲基丙烯酸甲酯,聚苯乙烯,环烯烃聚合物和环烯烃共聚物的一种材料。

[0088] 适于用作底物基质的平坦光学薄膜波导管的各种具体实施方式的描述,例如,在国际专利申请WO 95/33197, WO 95/33198, WO 96/35940, WO 98/09156, WO 01/79821, WO 01/88511, WO 01/55691 和 WO 02/79765 中。在上述专利申请中描述的特定底物基质的具体实施方式和通常认为的传感器平台,以及与此实施分析物检测的方法,以及这些申请文件在此全文引入做参考作为本发明的一部分。

[0089] 本发明涂层设备的一组优选实施方案特征在于待涂覆底物基质通过亲和力测定法依靠检测一个或多个被激发的冷光现象使得一个或多个被分析物能够被检测。

[0090] 另一组实施方案的特征在于待涂覆的底物基质通过亲和力测定法依靠在所述底物基质表面临近场(消逝场)的有效折射率的变化检测来检测一个或多个被分析物。

[0091] 本发明的主题进一步涉及用于通过亲和力测定法检测一个或多个被分析物的涂覆底物基质的方法,其特征在于:

[0092] - 所述待涂覆底物基质位于根据所述的任何实施方案的本发明的涂层设备的支持物上,

[0093] - 所述涂层设备的液体容器中含有的液体是被雾化并且

[0094] - 在雾化的液体中存在的物质(化合物)从形成的雾中沉积在待涂覆的底物基质上,

[0095] 其中底物基质与待雾化的液体表面不接触。

[0096] 优选在所述液体内部超声波的作用下在待雾化液体上形成雾。相应的,优选所述的促动器用来形成超声波。

[0097] 用于形成超声波的各种技术方法是已知的,例如,通过压电晶体,振荡薄膜等。优选所述的促动器包括超声发生器的振动片并且液体通过其中形成的超声波喷成雾状。

[0098] 更优选在操作期间所述的促动器陷于待雾化液体中。优选,所述的促动器完全在待雾化液体内部。

[0099] 如果作用在待雾化液体上的超声波的强度和频率可以调节和/或可以通过适当的方式测定将会更加有利的。

[0100] 更优选涂层设备包括一个液滴沉降器,其预防待雾化液体的飞溅和大液滴与待涂覆底物基质互相接触。大液滴意为直径大于200 μm 的液滴。液滴沉降器不能渗透气体和雾。例如,液滴沉降器可能是封闭的固体。如果液滴沉降器具有凹透镜的几何形状可能有利。例如可以使用的液滴沉降器是拱顶玻璃杯(具有一凹面)。

[0101] 使用的液滴沉降器也可以渗透液滴至所定义的大小。这可以从技术上通过所述的包含其有网目尺寸决定允许通过液滴最大尺寸的细小网孔的网的液滴沉降器来实现。

[0102] 为了满足形成底物基质的尽可能一致和均匀涂层这样的主要目的,如果本发明的涂层设备进一步包含用于在所述底物基质的环境中形成所形成并沉淀在底物基质上的雾的均匀分布的设备是更加有利的。

[0103] 为此,可能有利的是例如,如果涂层设备另外含有至少一个可让气体进入液体容器的气体进口,在该容器中气体与形成的雾混合。设备可能还另外含有一个或多个用于排放气体和 / 或雾的出口。

[0104] 如果在通风机的帮助下在所述的底物基质环境中发生的形成并沉降在底物基质上的雾均一分布,这对于涂层的一致性和均一性也可能是有利的。

[0105] 为了确保涂覆工艺期间恒定和良好定义的条件,如果本发明的涂层设备还包括用于控制和 / 或调节待雾化液体和 / 或液体容器单独或全部器壁的温度设备并且待雾化液体和 / 或液体容器单独或全部器壁的温度在涂覆工艺期间进行控制并改变可能会更加有利。也优选在涂覆工艺期间用于接收和 / 或储存底物基质的涂层设备的支持物是恒温的。

[0106] 为了同样的原因,如果涂层设备还含有在涂覆工艺期间用于控制和 / 或调节液体容器内的压力的设备并且在涂覆工艺期间控制和 / 或改变压力可能也是有利的。

[0107] 为了确保底物基质的涂层的一致性和均一性,特别是消除本发明设备的容器中形成的雾的多相性的任何影响,尽管有适当的预防措施多项性仍可能存在,如果在涂覆工艺期间底物基质沿垂直于支持物平面的轴旋转将会更加有利。

[0108] 优选在涂覆工艺期间储存在支持物上时,底物基质涂覆在其避开待雾化液体表面的侧面 / 表面,其中在其其他表面的涂层并不必须排除。

[0109] 本发明方法特定变体的特征在于在本发明的涂覆法中利用本发明的涂层设备通过任选连续雾化一种或多种任选不同的液体并且利用被应用于待涂覆底物基质上的障板形成几何学结构的涂层。在其几何形状可以重复的被涂覆区域在底物基质上形成的前提是,通过相应的适当障板遮盖在各种情况下不被涂覆的各底物基质区域的液体封闭入口,所以没有雾滴会通过未被涂覆的区域。

[0110] 优选在涂覆工艺期间待涂覆的底物基质实质上水平储存在涂层没有的支持物上。

[0111] 如果涂层设备还含有用于控制调节和 / 或改变待雾化液体表面与待涂覆的底物基质表面之间的距离的装置,从而在涂层操作期间设定良好定义的所述液体和待涂覆液体表面之间的距离。

[0112] 为了降低待雾化液体的消耗量,也优选收集沉降在液体容器壁上的液体并将液体回收至待雾化液体中。

[0113] 涂层设备的液体容器优选封闭的,不含任选的气体入口和任选额外的气体 and / 或雾出口。

[0114] 待雾化液体优选粘度小于 3cP 的低粘度液体。它们可能特别是水溶液。然而,待雾化的液体也可以是有机的,特别是醇溶液。

[0115] 更优选待涂覆底物基质是实质上平坦的。

[0116] 待涂覆底物基质可能由单一(自承的)层组成,例如,举例来说,载玻片或多倍层。

[0117] 优选待涂覆底物基质的至少一层在入射的激发光或测定光传播方向是实质光学

透明的。

[0118] 待涂覆底物基质的至少一层在入射激发光或测定光传播方向实质光学头透明层，可以包括，例如选自硅酸盐，例如玻璃或石英，透明热塑形式的，注塑的或可轧的塑料，例如聚碳酸酯，聚酰亚胺，丙烯酸酯，特别是聚甲基丙烯酸甲酯，聚苯乙烯，环烯烃聚合物和环烯烃共聚物组成的材料。

[0119] 在本发明涂层设备的一个具体实施方案中，待涂覆的底物基质包括一个薄金属层，优选由金或银制得，其任选在下方的中间层上，具有优选小于 1.5 的折射率，其中所述金属层以及可能中间层的厚度被选择使得表面的等离子体激元在入射激发光的波长和 / 或在产生的冷光的波长下能够被激发。

[0120] 优选待涂覆的底物基质包括含有一个或多个层的光波导管。所述的底物基质可以贯穿作为光波导管或可以包括离散的波导区域。

[0121] 此处待涂覆底物基质的连续或离散的波导区域通常优选包括所述底物基质待涂覆的表面。

[0122] 优选待涂覆的底物基质包括具有实质上光学透明的波导层 (a) 的平坦的光学薄膜波导管，波导层 (a) 在第二个，具有比层 (a) 低的折射率的同样实质光学透明层 (b) 以及，任选同样实质光学透明中间层 (b') 在层 (a) 和同样的比层 (a) 低的折射率的层 (b) 之间。

[0123] 此处优选待涂覆底物基质的离散或连续波导区域在亲和力 - 测定法的检测步骤期间与所述底物基质在光的交互作用下与用于耦合一个或多个光源的激发光或测定光的一个或多个光耦合元件光学彼此接触，其中所述的光耦合元件选自灯棱镜耦合器，用光波导彼此接触并具有重叠渐逝场的迅衰耦合器，具有聚焦透镜的端面，优选柱面透镜的耦合器，排列在底物基质的波导层端侧面前，以及光栅耦合器。

[0124] 特别优选待涂覆底物基质的离散或连续波导区与一个或多个启动耦合到所述底物基质波导层中的激发光或测定光的光栅结构 (c) 彼此接触，和 / 或与一个或多个启动不耦合所述底物基质波导层中的激发光或测定光的光栅结构 (c') 彼此接触，其中底物基质上同时存在的光栅结构 (c) 和 (c') 可以具有相同或不同的光栅周期。

[0125] 优选第一个光学透明层 (a) 的折射率大于 1.8。优选第一个光学透明层 (a) 包括选自氮化硅， TiO_2 ， ZnO ， Nb_2O_5 ， Ta_2O_5 ， HfO_2 ，和 ZrO_2 ，特别优选 TiO_2 ， Ta_2O_5 或 Nb_2O_5 的材料。

[0126] 而且待涂覆底物基质的第二个光学透明层 (b) 优选包括选自硅酸盐，例如玻璃或石英，透明热塑形式的，注塑的或可轧的塑料，例如聚碳酸酯，聚酰亚胺，丙烯酸酯，特别是聚甲基丙烯酸甲酯，聚苯乙烯，环烯烃聚合物和环烯烃共聚物的材料。

[0127] 优选的本发明涂覆方法的实施方案的特征在于待涂覆底物基质在亲和力测定法中通过一个或多个激发冷光现象的检测来检测一个或多个被分析物。

[0128] 另一组实施方案的特征在于待涂覆底物基质在亲和力测定法中通过所述底物基质表面临近场（渐逝场）的有效折射率改变的检测来检测一个或多个被分析物。

[0129] 本发明方法的一个实施方案的特征在于沉积在底物基质上的层是粘附 - 促进层。

[0130] 优选所述的粘附 - 促进层具有小于 200nm 的厚度，特别优选小于 20nm。

[0131] 多种化合物适用于制备本发明涂覆法中的粘附 - 促进层。例如，所述的粘附 - 促进层可以含有一种化学化合物，其选自硅烷，功能化的硅烷，环氧化物，功能化，带电荷或极

性聚合物和“自组织的被动或功能化单-或多倍层”、硫醇,磷酸烷基酯和膦酸烷基酯,多功能的嵌段共聚物,例如,举例来说,聚(L)赖氨酸/聚乙二醇。

[0132] 本发明方法的特征在于通过亲和力测定法(通过结合来自供给溶液的结合配偶体到固定的结合配偶体上)检测一个或多个被分析物的一个或多个特定的结合配偶体被固定在底物基质的表面。

[0133] 这些特定结合配偶体可通过本发明的涂覆法应用到粘附-促进层或直接应用到未涂层的底物基质的表面,其中优选在根据本发明的随后的涂层步骤中,提供钝化层给没有特定结合配偶体的表面区域(见下文)。

[0134] 在本发明方法的概括应用实施方案中,固定在所述底物基质表面上的特定的结合配偶体是用于特异性识别存在一个所提供样品中的一个或多个被分析物的生物学或生化或合成的识别元素。

[0135] 在这里,这种不同的特定识别元素在各种情况下在不同离散测定区域尽可能高纯度形式存在,. 这样通常样品中不同的被分析物与含有不同识别元素的测定区域结合。这种测定区域阵列也被称为“截获阵列”。

[0136] 由于不同识别元素的理化性质(例如,其极性)或多或少极大地有所不同,用于最佳固定所述识别元素的条件,例如在任选应用于粘附-促进层的共用固体载体的离散测定区域内通过吸附或共价键结合,具有相应的差异。因此,被选择用于固定许多不同识别元素的固定条件(例如,举例来说,粘附-促进层的类型),很难最佳的同时用于所有识别元素,但是在各种识别元素的固定性质之间可能会存在一种折中方案。

[0137] 这种检测的另一缺点是多种不同样品中被分析物的检测通常要求在共用或离散载体上提供相应数量的识别元素离散阵列,对识别元素提供不同的样品。这就意味着为了研究许多不同的样品需要许多制备相对麻烦的高数量的离散阵列。

[0138] 国际专利申请 PCT/EP 03/09561 和 PCT/EP 03/09562,其内容在此全部引入做为本发明的一部分,倡议一种新的检测方案,其能够使共用载体上系列中的许多样品同时用于存在于所述样品的被分析物。为了该目的,被研究的样品本身,而不是不同的特定识别元素,未被处理或经过尽可能少的处理步骤后被应用于系列离散测定区域中的底物基质上。两份所述申请文件提到这样的检测方案称为“转化检测体系”。

[0139] 因此本发明方法的其他概括应用实施方案的特征在于固定在所述底物基质表面的特定结合配偶体是一个或多个被分析物本身,它们通过嵌入天然样品基质或被一个或多个冲洗步骤修饰形式的样品基质被固定。

[0140] 所述结合配偶体,即自我固定检测或在提供样品中被检测的被分析物和/或它们固定的或应用于提供的检测试剂的生物的或生化的或合成的识别元素,可以选自蛋白质,例如,单-或多克隆抗体和抗体片段,肽,酶,糖肽,低聚糖,植物凝血素,用于抗体的抗原,用其他结合位点功能化的蛋白质(“标记-蛋白质”例如,举例来说,“组氨酸-标记-蛋白质”)和核酸(例如 DNA, RNA, 低聚核苷酸)和核酸类似物(例如 PNA),寡核苷酸配基,膜-结合和离析的受体以及它们的配体,由化学合成产生的用于接受摩尔印记的孔穴,天然和人工聚合物等。

[0141] 在这里,所述的应用于底物基质的表面的特定结合配偶体可以在具有任何几何形状,例如圆形,椭圆形,三角形,长方形,多边形等,的离散测定区域(斑点)内固定,其中单

独的测定区域可以含有相同或不同的特定结合配偶体。

[0142] 优选通过所述底物基质的特定结合配偶体的空间选择性应用形成离散测定区域，优选通过使用一种或多种选自包括“墨水喷射定位”，机械定位，“微触打印”，用于在压力差或电学或电磁位能的作用下将固定的化合物应用于平行或交叉的微通道形成测定区域的流体接触区域的方法，以及光化学和照相平版印刷的固定方法。

[0143] 如上所述，在底物基质表面没有固定的特定结合配偶体的区域为了最小化被分析物分子或它们的测定试剂的非特异性结合，优选相对于被分析物和 / 或相对于其结合配偶体来说是“化学中性”的化合物被应用于空间离散测定区域之间或所述测定区域内未被占据的部分区域中。优选，这些相对于被分析物和 / 或相对于它们的结合配偶体来说是“化学中性”的化合物，例如选自白蛋白，特别牛血清白蛋白或人血清白蛋白，酪蛋白，不特异性多克隆或单克隆异源抗体或被经验的用于检测被分析物和它们的结合配偶体的非特异性抗体（特别是用于免疫测定），洗涤剂 - 例如，举例来说，吐温 20-，没用待分析的多核苷酸杂交的片段的天然或合成 DNA，例如，举例来说，青鱼或鲑鱼精液提取物（特别是用于多核苷酸杂交试验），或者无电荷的但亲水的聚合物，例如，举例来说，聚乙二醇或右旋糖酐。

[0144] 本发明的主题因此涉及一种根据提到的具体实施方案的本发明的方法，该方法的特征在于沉积在底物基质上的层是钝化层，其应用于空间分开的测定区域之间或在所述测定区域内部未被占据的部分区域中，相对于被分析物和 / 或相对于它们的结合配偶体来说是“化学中性”的化合物，在所述的测定区域形成后，优选包括的化合物例如，选自由白蛋白，特别牛血清白蛋白或人血清白蛋白，酪蛋白，非特异性的多克隆或单克隆异源抗体或经验用于检测待检测的被分析物和它们的结合配偶体的非特异性抗体（特别是用于免疫测定），洗涤剂 - 例如，举例来说，吐温 20-，没用待分析的多核苷酸杂交的片段的天然或合成 DNA，例如，举例来说，青鱼或鲑鱼精液提取物（特别是用于多核苷酸杂交试验），或者无电荷的但亲水的聚合物，例如，举例来说，聚乙二醇或右旋糖酐。

[0145] 本发明的主题也涉及一种用于通过亲和力 - 测定法检测一种或多种被分析物的底物基质，其包括一粘附 - 促进层，其特征在于，所述的粘附 - 促进层通过根据提到的任何实施方案的本发明的涂覆方法来制备。

[0146] 本发明的主题还涉及一种用于通过亲和力 - 测定法检测一种或多种被分析物的底物基质，其包括涂覆底物基质的至少部分区域的钝化层，其特征在于，所述的钝化层通过根据提到的任何实施方案的本发明的涂覆方法来制备。

[0147] 本发明的主题进一步涉及根据提到的任何实施方案应用于人和 / 或动物诊断的底物基质。

[0148] 本发明以下通过示范的实施例详细阐明。

具体实施方式

[0149] 实施例

[0150] 1. 本发明的涂层设备和涂覆方法

[0151] 图 1 描绘了本发明涂层设备的示意图。在本实施例中用本发明的涂层设备“钝化”制备的用于亲和力检测法的底物基质的特异性结合配偶体未被占据的区域，即在该区域中应用“钝化层”。本发明的设备包括在该示范的实施方案中的一个约 21 体积的作为用于

待雾化液体和在液体上形成的雾体积的容器的干燥器 (1), 用于接收待涂覆底物基质的支持物 (2), 一个用作液体雾化促动器 (3) 的超声喷雾器 (“Lucky Reptile Mini-Nebler”, Reptilica, D-90431 纽伦堡, 德国), 一个用作液滴沉降器 (4) 的拱顶玻璃杯以及用于气体和 / 或产生的雾的玻璃入口 (5) 和出口 (6)。

[0152] 在操作期间超声波发生器陷于待雾化液体 (7) 中。为了最小化所要求的液体体积, 本实施例的实施方案包括嵌入超声波发生器, 固定到干燥器的底部, 在聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 中堆加到声音 - 产生震荡薄膜之下, 这样只要求应用待雾化液体的薄层。

[0153] 通过超声被作用形成非常细小的液滴, 在液体的水平线之上, 并借助于弱氮流通过入口 (5) 引入到容器内部额外产生湍流, 以便在所有容器中形成尽可能均匀分布的所得雾。

[0154] 作为底物基质的平坦光学薄膜波导管, 被涂覆并具有 14mm 宽 $\times$ 57mm 长 $\times$ 0.7mm 厚的外部尺寸 (其他详细描述, 参见下文), 在涂层操作期间, 水平 (相对于液体表面) 储存在距液面上约 8cm 的支持物 (2) 中。在本实施例中, 支持物作为具有孔穴的载体而由塑料制得, 这样从雾中沉降的过量的液体可以通过该孔穴排除。在本示范的实施方案中, 支持物可承受十个作为底物基质的具有所述尺寸的薄膜波导管。

[0155] 在本实施例中, 作为液滴沉降器的拱顶玻璃杯被结合到支持物 (2) 的下侧, 并保护待涂覆底物基质免受雾化溶液 (涂层溶液) 的飞溅。

[0156] 在本实施例中, 所形成的非常均匀分布的雾以非常细小的液滴的形式沉降排列在顶侧 (相对于涂层设备的储存) 具有高折射率波导层 (a) 上的底物基质上, 并且在这些底物基质的顶侧甚至在 5-10 分钟内形成薄的, 连续的液体薄膜。在总共 30 分钟的保温时间后, 底物基质从涂层设备中移除, 用高纯度的流水 (微孔) 漂洗, 并随后在氮流中干燥。

[0157] 在本实施例中, 作为底物基质的所述尺寸的薄膜波导管需要约 2ml 体积的钝化溶液 (待雾化液体)。

[0158] 2. 实施传统的涂覆方法

[0159] 2.1. 底物基质

[0160] 本实施例中 (在 1. 中也已经提到) 用于亲和力测定法的底物基质随即被转移到平坦的光学薄膜波导管中, 该波导管在各种情况下具有 14mm 宽 $\times$ 57mm 长 $\times$ 0.7mm 厚的外部尺寸。所述底物基质包括所有情况下的玻璃底物 (AF 45) 和另外应用的一 (150nm) 薄的, 高折射率的由五氧化二钽制得的层。在玻璃底物中, 两个表面离隙光栅 (光栅周期 318nm, 光栅深度: (12 ± 2) nm) 在 9mm 的距离纵向水平调节, 用作耦合光至高折射率层的衍射光栅。

[0161] 通过自发的自组 (“自组装”) 形成的单层的单 - 十二烷基磷酸酯 (DDP), 被作为粘附 - 促进层应用于所述底物基质的金属氧化层表面。具有所述粘附 - 促进层的底物基质的表面以高疏水性而著称。在各种情况下 144 个离散测定区域 (斑点) 的 6 种同样的微排以各自 16 列以及 9 栏的方式排列并通过使用喷墨定位仪 (模型 NP1.2, GeSiM, Grosserkmannsdorf, 德国) 应用于具有憎水粘附 - 促进层的底物基质上。各斑点通过将单个的约为 350pL 体积的液滴应用于碎片表面而形成。

[0162] 2.2 试剂和底物基质上测定区域系列的形成

[0163] 本实施例意欲在随后的亲和力测定法中将被检测的被分析物本身固定在制备的

底物基质上,被分析物嵌入到天然的样品基质中或通过少许样品制备步骤已经制得形式的样品基质(细胞溶解产物)中。此处这些样品形式以下还被称为“天然-相同样品”。在进一步提供检测试剂后进行检测步骤。

[0164] 在“天然-相同”样品中生物学相应蛋白质分析物的检测利用人直肠癌细胞株(HT29)。这些粘附细胞于 37 °C 在由塑料制得的常规细胞培养瓶(Greiner Bio-One, St Gallen, 瑞士, 催化剂编号 No. 658170) 中在修饰的 McCoy's 5A 介质中培养。各种细胞培养瓶中的同类细胞培养物然后用紫外灯照射 10 分钟或用 10 μ M 的多柔比星处理。另一份同样的细胞培养物不经处理并充当这些处理的细胞培养物的对照样品,在分析检测法中用作阴性对照。

[0165] 处理后,不同的细胞培养物在各种条件下用 10ml 的 PBS(磷酸盐缓冲盐水溶液,冷却的到 4 °C) 洗涤。

[0166] 然后将细胞通过添加含有 7M 尿素, 2M 硫脲和完全(complete)(蛋白酶抑制剂, Roche AG, 1 片/50ml) 的溶胞缓冲液从细胞培养瓶的底部分离开并同时完全溶胞化。其中所有的含蛋白质细胞组分自发的变性并溶解。因此所获得的细胞溶解产物在一个离心装置(Eppendorf, Hamburg, 德国) 中以 13000xg 离心 5 分钟以移除不溶的细胞组分(例如 DNA 和细胞膜碎片)。将上清液移除并用作以下测定其中总的蛋白质浓度通常为 5mg/ml 和 10mg/ml 之间。

[0167] 所述的导致 DNA 损坏的 HT29 细胞培养物的处理,即是,在紫外线照射的情况下,尤其由于链的破坏和由于胸腺嘧啶二聚体的形成,以及在添加多柔比星的情况下,由于 DNA 临近碱基之间相互渗透。以致被损害细胞内部特定信号通道被激活或去活化,这可能会导致,例如,细胞程序死亡(细胞凋亡)。担负激活或去活化信号通道的是特定键蛋白质(所谓的“标记蛋白质”),其可以通过磷酸化在一个或多个不同的位点调节一个或多个信号通道。

[0168] 一个通过标记蛋白调节信号通道的例子是肿瘤抑制蛋白 p53,其通过其磷酸化程度控制细胞分裂,细胞程序死亡以及用于修复损坏 DNA 的某些机制。在癌细胞中,所述信号通道在其调节中由于一个或多个标记蛋白的突变或缺失通常在一个特定或多个位点被破坏,这最终会引起不受控制的增殖。

[0169] p53 和 P-p53(p53 的磷酸化形式) 的相对含量通过高度特异性的结合到这些蛋白质上的抗体进行检测和测定,这些蛋白质被作为已经得到和进一步处理的细胞溶解产物中的被分析物固定在底物基质上(优选在应用如上所述的粘附-促进层后)。

[0170] 得到的细胞溶解产物通过稀释 10-20 倍而达到约 0.4mg/ml 的总蛋白质浓度,并随后应用于离散测定区域以在作为底物基质的已经具有粘附-促进层的薄膜波导管的金属氧化物表面上形成一系列测定区域。除了含有应用的细胞溶解产物的测定区域外,各微排进一步包括含有固定其中的 Cy5- 荧光标记的牛血清白蛋白(Cy5-BSA) 的测定区域用作测定期间的局部差异和/或激发光强度随时间变化的参考(“参考-斑点”)。Cy5-BSA 以在 7M 尿素, 2M 硫脲(标记率:约为每 BSA 分子 3 个 Cy5 分子) 中 0.5nM 的浓度应用。

[0171] 图 2 描绘了底物基质上 6 个(相同)阵列的二维阵列和直线排列中测定区域排列的几何形状。间隔(轴间距)300 μ m 的斑点的直径为大约 120 μ m。用于该实施例的测定区域阵列在各种情况下包括一个含有应用于 4 个副本的 12 种不同的样品的测定区域的

排列,其中 4 个相同的测定区域在各种情况下排列在垂直于在检测步骤期间这些底物基质的波导层中的光的传播方向的共用圆柱上。在各种情况下,4 个相同的测定区域用于帮助测量测定区域阵列内部测量信号的重复再现性。包括应用于其中的 Cy5-BSA(仅供参考目的)的测定区域的圆柱(Spalten)在各种情况下排列在含有被应用于其中的被分析样品的测定区域的圆柱(Spalten)之间或与其紧挨着。在该实施例中本发明的分析平台包括 6 个相同的如图 2 所描绘的这种测定区域的阵列。

[0172] 2.3 测定区域之间以及内部的自由区域的钝化

[0173] 在应用“天然-相同”的样品和 Cy5-BSA 后,将底物基质在无尘氛围中干燥,之后在进一步的步骤中用牛血清白蛋白(BSA)将底物基质自由的未被覆盖的疏水表面区域饱和(钝化),以便最小化不希望有的检测试剂的非特异性结合,在这种情况下抗体和/或荧光标记的分子。

[0174] 上述已经在 1. 之下描述的本发明的表面钝化方法与两个其他方法(2.3.1. 浸渍法和 2.3.2. 喷雾法)相比较,其中在所有场合使用新鲜的过滤了的钝化溶液(50mM 咪唑,100mM NaCl,3% BSA(w/v),pH 7.4)。在通过 1. 之下以及下列描述的方法钝化自由表面之后,分别将底物基质于 4℃ 保存在封闭的聚苯乙烯管中直到随后进行亲和力测定法的测定。

[0175] 2.3.1. 浸渍法

[0176] 作为底物基质的平坦光学薄膜波导管垂直浸入装满钝化液体的容器(聚苯乙烯管)中,以便尽可能同时并迅速润湿所述底物基质的所有表面。在室温下培养 1 小时后,底物基质小心地由高纯度的流水(微孔)下冲洗以及然后在氮气流(等级 50)下干燥。作为底物基质的所述尺寸每个薄膜波导管要求约 25ml 体积的钝化溶液。

[0177] 2.3.2. 喷雾法

[0178] 钝化溶液此处通过色谱喷雾器(Glas Keller Cat.No.12.159.603,巴塞尔,瑞士)和约 3.5bar 的压力下喷雾在底物基质上,直到在其待涂覆表面形成连续的液体薄膜。喷雾器的喷嘴和底物基质表面的距离在此约为 30cm。然后如此处理的底物基质在封闭的容器中在室温下在 100% 的湿度下培养 1 小时,然后小心在高纯度的流水(微孔)下冲洗以及最后在氮气流(等级 50)下干燥。在这些实施例中的所述的具体实施方案中的每个底物基质要求约 3ml 体积的钝化溶液。

[0179] 3. 亲和力-测定法

[0180] 3.1. 测定设计

[0181] 应用于离散测定区域的固定细胞溶解产物中一般特定蛋白质(即,例如,有或没有磷酸化)或尤其是激活形式的(例如,磷酸化)特定蛋白质的检测通过顺序添加相应的检测试剂来执行,然后测量所得荧光信号:为第一实验步骤准备,多克隆分析-特定兔子抗体(抗体 A1(#9282):抗-p53;抗体 A2(#9284):抗-磷酸-p53(Ser15);两种抗体基于细胞信号技术,INC.,Beverly,MA,USA 获得)在实验缓冲液(50mM 咪唑,100mM NaCl,5% BSA,0.1% pH 7.4 的吐温 20)中以 1:500 的比率稀释。在各种情况下,30 μ l 的这些不同抗体的溶液被应用于 6 个相同的测定区域系列的一个,然后在室温下培养过夜(第一实验步骤)。额外的,非特异性结合抗体通过用实验缓冲液(2 $\times$ 200 μ l)洗涤每个系列来移除。

[0182] 为了检测在离散测定区域中、在此处包含于固定的细胞溶解产物中的结合的分析-特定抗体,使用结合到上述抗体 A1 和 A2 的、Alexa 氟 647-标识抗-兔子 Fab 片段(分

子探针, Kat. Nr. Z-25308, 莱登, 荷兰) 来进行第二实验步骤。该荧光标记的 Fab 片段应用于该系列 (各 $30 \mu\text{l}$) 上的实验缓冲液的 1 : 500 的稀释液中, 从市场上可买到的储备溶液开始, 然后在室温下在黑暗中培育 1 小时。该系列然后用实验缓冲液 (在各情况下用 $200 \mu\text{l}$ 两次) 洗涤, 以便除去不特异性的结合荧光标记的 Fab 片段。以这种方式制备的分析平台然后进行储存直到通过激发和检测所产生的荧光信号在 ZeptoREADER™ (见下文) 中的检测步骤。

[0183] 3.2. 来自测定区域系列的荧光信号的测定

[0184] 来自各种测定区系列的荧光信号利用 ZeptoREADER™ (Zeptosens AG, CH-4108 Witterswil, 瑞士) 顺序自动测量。作为底物基质 (根据 2.1.) 的用于各测定区域系列的平坦光学薄膜波导管进行调节以满足用于光耦合经过光栅结构 (c) 进入波导五氧化二钽层内部的共振条件并用于最佳化在所述测定区域范围内的有效的激发光。随后, 各系列产生可被用户选择数量的来自所研究系列的荧光信号的图像, 其中可选择不同的暴露时间。用于实施例的测定时的激发波长是 635nm, 使用在激发波长排除散射光的干涉滤波器 (传输 $(675 \pm 20)\text{nm}$) 在 Cy5 的荧光波长使用冷照相机检测荧光, 过滤器位于照相机的镜头前。所形成的荧光图像自动储存在控制计算机的储存盘上。光学系统 (Zepto READER™) 更加详细的资料描述于国际专利申请 PCT/EP 01/10012 中, 其在此全文引入作为本申请的一部分。

[0185] 3.3. 评定和参此

[0186] 来自测定区域 (斑点) 的平均信号强度通过图像分析软件 (ZeptoVIEW™, Zeptosens AG, CH-4108 Witterswil) 进行测定, 其能够半自动的评价许多测定区域系列的的荧光图像。

[0187] 相机单个像素的原始数据组成数字化测定值的一个二维矩阵, 测定的强度作为传感器平台上相应于其投影面积的单个像素的测定值。数据的评价首先通过人工在图像点 (像素值) 上铺设一个二维 (坐标) 的光栅, 据此各斑点的部分图像落在该个体二维光栅元件内部。在该光栅元件内部, 各斑点被指定一个可环形的尽可能好地调控的具有被用户定义半径 (通常 $120 \mu\text{m}$) 的“评价区域” (利害区域, AOI)。图像分析软件决定了各个 AOIs 个体的定位作为各个像素的信号强度的函数进行测定。开始时被用户定义的 AOIs 的半径, 被保存。各斑点的平均总体信号强度通过所选定评价区域内部的像素值 (信号强度) 的算数平均来测定。

[0188] 背景信号由斑点之间的测定信号强度决定。为了该目的, 每个斑点有四个另外的圆形区域 (通常具有与斑点的评价区域一致的联合半径) 被定义为用于背景信号测定的评价区域, 优选排列在临近斑点之间的中间。被测定的这四个圆形区域的平均背景信号强度, 例如, 作为用于此的所选择的 AOIs 内部的像素值 (信号强度) 的算术平均值。来源于测定区域 (斑点) 的平均净信号强度接下来作为以各个斑点的局部平均总信号强度与局部平均背景信号强度的差来计算。

[0189] 所有斑点净信号强度的参比通过在各种情况下借助各测定区域系列的参照斑点 (Cy5-BSA) 进行。为了该目的, 各斑点的净信号强度除以同排 (平行于渐近场 - 传感器平台内部光导传播方向排列) 的邻近参考斑点的净信号强度的平均值。所述参此补偿垂直于各微排内部以及不同微排之间光传播方向的可利用激发光强度的局部差异。

[0190] 3.4. 结果

[0191] 图 3A 描绘了在用于检测 p53 的分析之后微排的荧光信号的典型图像,其中测量区域之间的自由区域通过使用浸渍法(根据 2.3.1.)被钝化。信号强度在各个体参考斑点内部以及不同参考斑点(Cy5-BSA)之间均匀和均一地分布,并且相对于背景几乎理想的圆形斑点的边缘非常清晰明显(参见图像细节)。相反,具有痕迹-类似“污点”特征的被固定的细胞溶解产物的测定区域用高信号强度尤为清晰可见。这些“污点”是,如上所述,在具有斑点的底物基质浸渍入钝化溶液时产生的,并通过没有被完全吸附的并被所述的钝化溶液从测定区域溶解的,并沿浸渍的相反流动方向被吸附到在自由的尚未被钝化的底物基质表面上的紧邻这样的测定区域的部分样品,甚至在其可以被钝化溶液中含有的 BSA 钝化之前。由于已经从测定区域分开并被重吸附在附近区域的这部分样品始终含有一定量的被检测的被分析物,所以在读数期间,对应的荧光信号显示在所述的位点。

[0192] 图 3B 描绘了在用于检测 p53 的分析之后微排的荧光信号的典型图像,其中斑点之间的自由区域通过喷雾法(根据 2.3.2.)钝化。来自参考斑点的信号与那些在使用浸渍法后的微排相比较,均涉及它们形状的一致性 or 均一性以及它们的强度。来自含有固定的细胞溶解产物的测定区域的信号是,关于它们的强度,同样与来自经过浸渍法的微排的相应测定信号相比较。由于在喷雾法中,与浸渍法相反,钝化溶液在底物基质表面的流动可以被忽视,细胞溶解产物斑点并不具备上述的“污点”,然而,只有较低荧光强度的较小的“副产物”,其非常明显的大约随机排列在所述斑点周围。所述副产物很可能由局部分离以及没有紧密结合在测定区域边缘的细胞溶解产物的流动所引起,由于此处着陆的钝化溶液的小喷雾液滴在着陆在该表面时具有垂直于被涂覆表面微不足道的动量,这可能会产生飞溅。

[0193] 图 3C 描绘了在用于检测 p53 的分析之后微排的荧光信号的典型图像,其中测定区域之间的自由区域通过本发明方法通过如 1. 下所述的钝化溶液雾化来钝化。同被其他所述方法钝化的微排相比较,参照斑点和细胞溶解产物的斑点的具有可比较的良好的均一性和形状的高质量在此处非常显著。细胞溶解产物斑点的“污点”和“副产物”在此处可以避免,由于远离引力效应,基本上无向和动量施用以非常细小雾液滴形式的钝化溶液,其大小显然低于通过喷雾形成的液滴。

[0194] 没有来自固定样品部件的钝化效果的表面,即通过钝化溶液中含有的 BSA 抑制非特异性结合程度,可以半定量的从斑点-自由区域测定的信号强度(斑点之间,“背景信号”)来测定。因此,用 BSA 不完全覆盖的表面比起连续用 BSA 涂覆的表面具有较高的信号,由于在没有 BSA 的表面上在实验中所用的荧光标记检测试剂(Alexa 647 抗-兔子 Fab)至少部分发生的非特异性结合。

[0195] 图 4A 描绘了背景信号强度的平均和标准偏差,其通过于此上所形成的微排的自由底物基质表面的所有斑点之间测定,其该表面已经通过三种不同的方法钝化。字母 A, B 和 C 涉及,如它们在图 4B,图 5A 和图 5B 中所示,通过浸渍法(A),喷雾法(B)或通过雾化钝化溶液(C)的方法的钝化。通过测量的(较低的)背景信号强度,令人惊异地证明用喷雾法和本发明的雾化法处理后的钝化效率明显高于应用用于表面钝化的浸渍法后。况且,背景信号强度的标准偏差在应用喷雾法或本发明的雾化法后是 11-12%,在各种情况下明显低于使用用于表面钝化的浸渍法后,后者会导致背景信号强度的标准偏差为 34%。这会导致涂层的一致性 or 均一性在应用喷雾法或雾化法后也高于使用浸渍法后的结果。

[0196] 图 4B 描绘了微排的所有参照斑点的平均荧光强度,其中对应底物基质的自由表

面再次用三种不同的涂覆方法处理。令人惊奇地证实了,对此可知,信号强度的增加在应用喷雾法后是轻微的且在应用雾化法后是显著的(也就是约 60%),与应用浸渍法后的信号相比。这些差异归于应用的钝化溶液的体积减少,其可能部分分开用于参照的所施用的 Cy5-BSA 化合物,以及雾化方法情况中应用的钝化溶液的几乎无动量。

[0197] 图 5A 描绘了微排中,来自用于被分析物检测的测定区域的荧光信号的平均强度和标准偏差,其底物基质表面各自用不同的钝化方法处理,然后用抗体 A1(抗-p53)(图 5A,顶部)和 A2(抗-磷酸-p53)(图 5A,底部)的溶液培育,并然后在各种情况下通过具有 Alexa 647 氟抗-兔子 F_{ab} 片断的荧光检测用于检测。所测定的荧光信号强度与各种情况下细胞溶解产物中所含的被分析物的相对含量相关联(相当于细胞溶解产物的浓度:较高的信号与较高的被分析物浓度相当,其中所述相关显然是非线性的)。

[0198] 与没有预处理的对照样品相比(在各种情况下图 5A 和图 5B 中表示为“对照”),用紫外线灯(在各种情况下图 5A 和图 5B 中表示为“+UV”)和特别是那些用多柔比星处理的 HT29 细胞培养物的溶解产物(各种情况下在图 5A 和图 5B 中表示为“+Dx”),显示了在相关细胞中由于蛋白质表达的增加所引起的 p53 含量的显著增加。

[0199] 相反,图 5B 显示了用紫外线-处理的样品中磷酸-p53 的含量比起对照样品同样显著增加,而用多柔比星处理的样品中磷酸-p53 的含量仅略微超过(0.2mg/ml-0.4mg/ml 的溶解产物浓度情况下)甚至低于(0.1mg/ml 的溶解产物浓度情况下)对照样品的,尽管大大提高了 p53 的总浓度。这显示了由 DNA 损伤诱导的信号通道,其中磷酸-p53 作为关键调节蛋白质,在细胞系中对紫外线处理很明显但显然对用多柔比星处理仅非常微弱。

[0200] 实质上,考虑到用于钝化自由底物基质表面所用的不同方法的影响,用于被分析物检测的来自测定区域的测定信号强度没有统计学上显著的不同,考虑到归因于试验的变化(误差线),也就是说,它们与用于表面钝化的所进行的涂覆方法无关。这就意味着,与用于参此 Cy5-BSA 化合物上的影响明显相反,考虑到吸附在底物基质上的细胞溶解产物的影响,不同的钝化方法没有区别。

[0201] 总之,这些结果表明,通过雾化将钝化溶液应用到底物基质表面的本发明的方法具有非常明显的优点,与传统浸渍法甚至喷雾法相反,并完全能够满足所提出的要求。对于熟练技术人员而言很明显的是,在上述示范的实施例中举例说明的用于表面钝化的底物基质涂层方法直接适用于具有适当粘附-促进层的涂层并且可以以这样的方式概括。

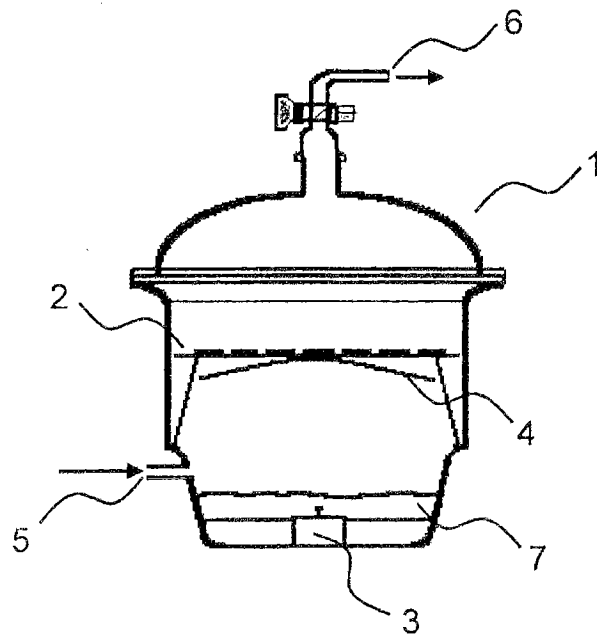


图 1

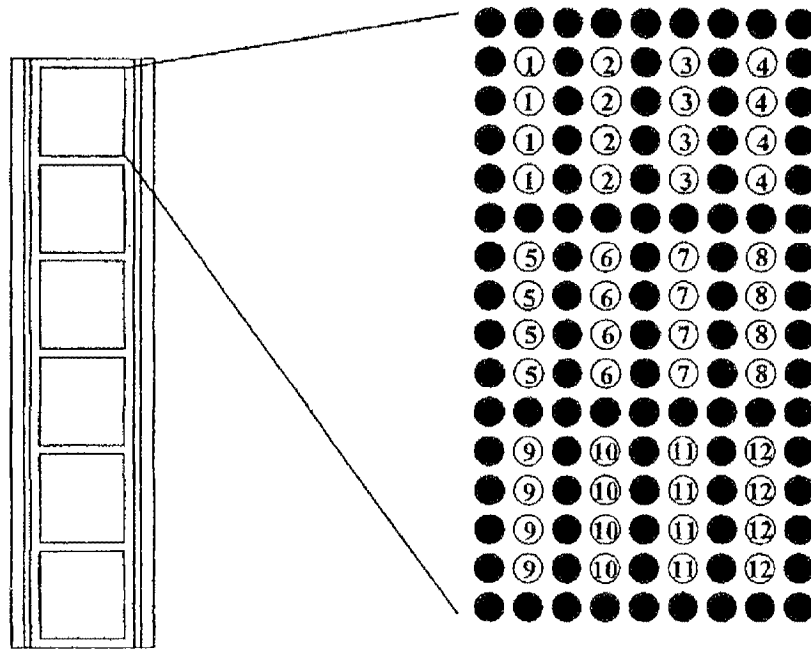


图 2

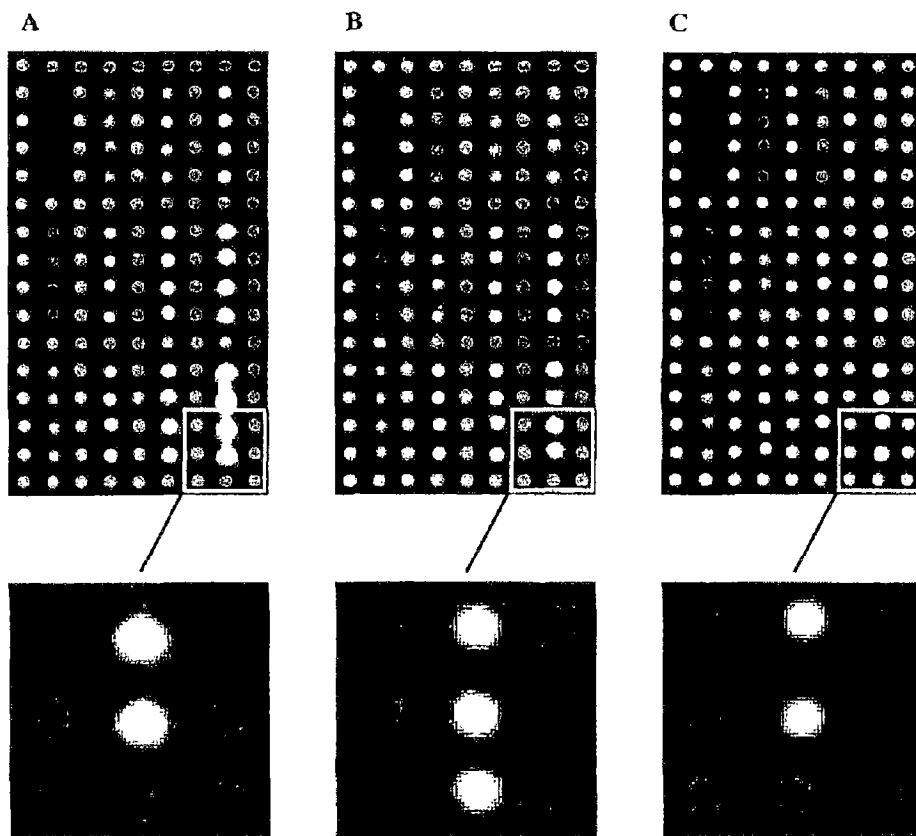


图 3

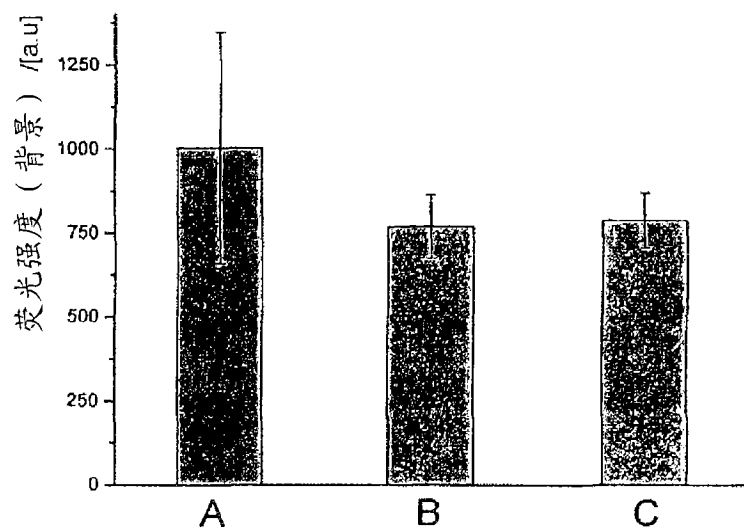


图 4A

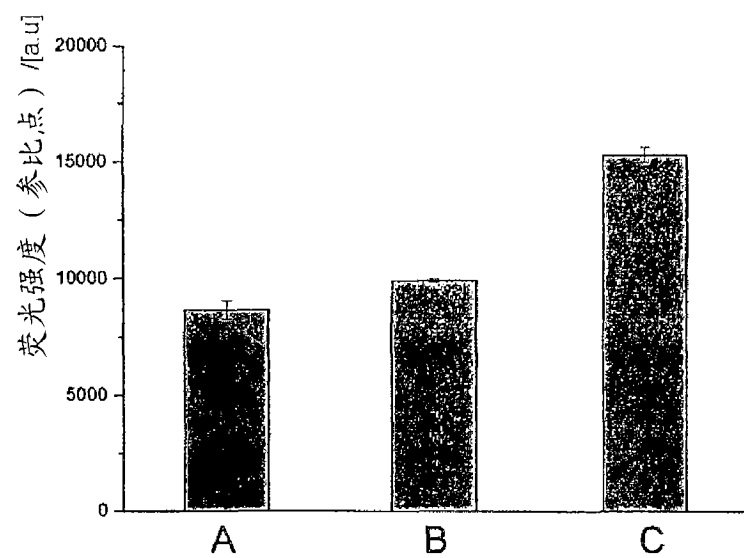


图 4B

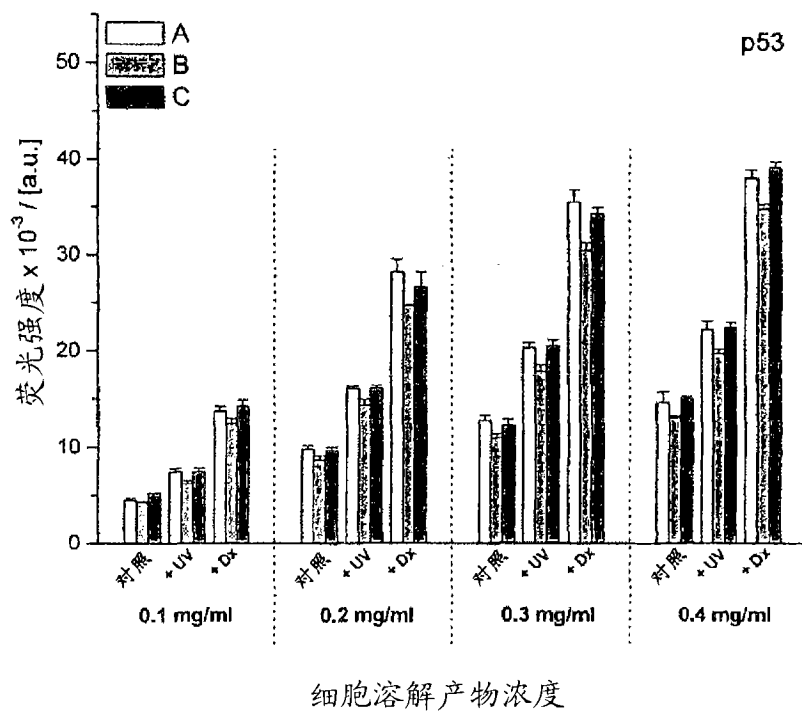


图 5A

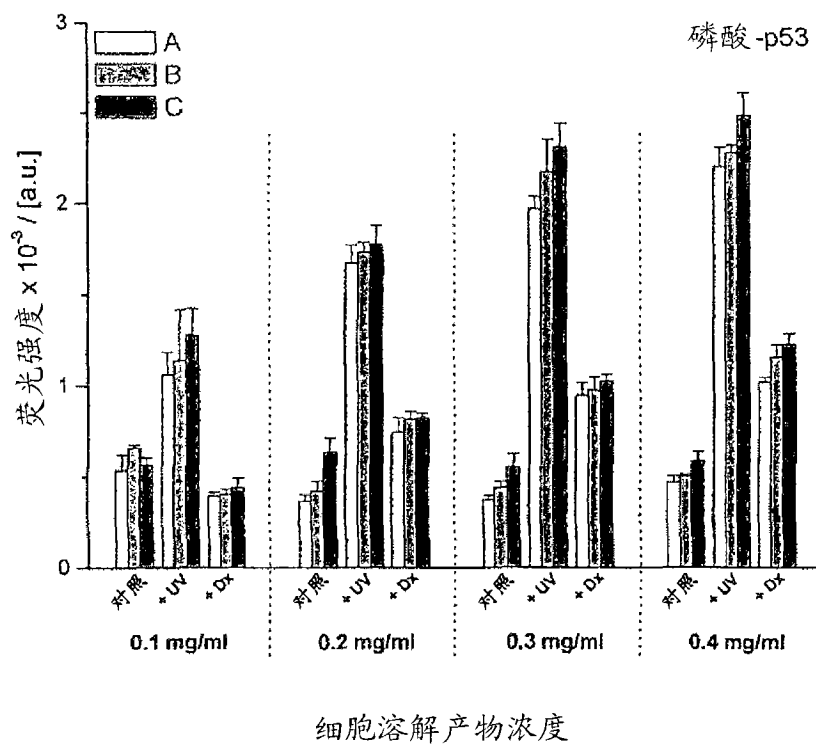


图 5B