

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101036046 B

(45) 授权公告日 2012. 02. 22

(21) 申请号 200580033961. 1

G01N 21/77(2006. 01)

(22) 申请日 2005. 08. 19

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/602, 684 2004. 08. 19 US

60/674, 393 2005. 04. 22 US

US 5326531 A, 1994. 07. 05, 全文.

EP 1122535 A2, 2001. 08. 08, 说明书 0018 段到第 0061 段、附图 4-5, 9, 11.

US 5408999 A, 1995. 04. 25, 全文.

CN 1284170 A, 2001. 02. 14, 全文.

Zhong Xu 等. A novel

fiber-optic pH sensor incorporating carboxySNAFL-2 and fluorescent wavelength-ratiometric detection. Journal of Biomedical Materials Research Part A 39 1. 1998, 39(1), 9-11.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2007. 04. 05

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2005/029559 2005. 08. 19

(87) PCT 申请的公布数据

W02006/023725 EN 2006. 03. 02

(73) 专利权人 血细胞保存公司

地址 美国华盛顿

审查员 胡婉约

(72) 发明人 M·W·里德 S·J·吉尔胡德

P·C·哈里斯 R·D·法尔兹格拉夫

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李华英

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006. 01)

A61B 5/00(2006. 01)

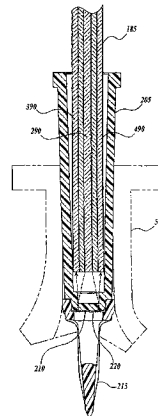
权利要求书 3 页 说明书 24 页 附图 22 页

(54) 发明名称

荧光 pH 检测器系统和相关方法

(57) 摘要

一种荧光 pH 检测器和使用荧光 pH 检测器测量 pH 的方法。用于测定样品性质, 如 pH 或二氧化碳浓度的方法和系统使用探测器, 所述探测器输送激励光并在至少两个波长处接收来自固定于基质上的荧光物质的发射光。所述探测器例如通过窗口与基质上的荧光物质物理分离。在第一和第二波长处接收到的光被用于测定样品的性质。此外, 可以在基质上提供尖端, 使得可以允许分析物例如经由半透膜与所述基质接触。



1. 一种用于测量样品的 pH 的方法,包括:
 - (a) 用从探测器发射的激励光照射固定在膜上的荧光物质,该探测器与固定在膜上的荧光物质物理隔离,
其中固定在膜上的荧光物质与样品液体持续连通,
其中激励光具有足以使荧光从荧光物质发射的波长,
其中荧光物质在第一发射波长具有第一发射强度,在第二发射波长具有第二发射强度,第一和第二发射强度的比率取决于 pH;以及
 - (b) 测量第一和第二发射强度以确定样品的 pH。
2. 根据权利要求 1 的方法,其中所述膜是微孔膜。
3. 根据权利要求 1 的方法,其中所述膜是选自硝化纤维膜、硝化纤维和醋酸纤维素的混合酯膜、聚对苯二甲酸乙二醇酯膜、聚碳酸酯膜、聚偏二氟乙烯膜和聚酰亚胺膜的微孔膜。
4. 根据权利要求 1 的方法,其中探测器通过窗口与固定在膜上的荧光物质物理隔离,该窗口对激励光和荧光发射透明。
5. 根据权利要求 1 的方法,其中探测器包括一个或多个光纤。
6. 根据权利要求 1 的方法,其中荧光物质选自萘并荧光素化合物和半萘并罗丹明化合物。
7. 根据权利要求 1 的方法,其中萘并荧光素化合物选自半萘并荧光素化合物和羧基萘并荧光素化合物。
8. 根据权利要求 1 的方法,其中荧光物质是半萘并荧光素化合物,该半萘并荧光素化合物选自 5' (和 6')-羧基-3,10-二羟基-螺[7H-苯并(c)氧杂蒽-7,1'(3'H)-异苯并呋喃]-3'-酮和 2-(2-氯代-3-羟基-9-羧乙基-10-氧代-10H-苯并(c)氧杂蒽-7-基)苯甲酸。
9. 根据权利要求 1 的方法,其中固定在膜上的荧光物质包括荧光物质和大分子的共轭物。
10. 根据权利要求 9 的方法,其中大分子是白蛋白。
11. 根据权利要求 1 的方法,其中固定在膜上的荧光物质包括半萘并荧光素/人体血清白蛋白共轭物。
12. 根据权利要求 1 的方法,其中样品包括血液和血液制品。
13. 根据权利要求 1 的方法,其中样品包含在密封容器内。
14. 一种用于测量 pH 的系统,包括:
 - (a) 用于激励荧光物质的光源,其中荧光物质在第一发射波长具有第一发射强度,在第二发射波长具有第二发射强度;
 - (b) 用于测量第一发射强度的第一发射检测器;
 - (c) 用于测量第二发射强度的第二发射检测器;
 - (d) 用于将激励光从光源传送到荧光物质的激励光导装置,其中光导装置包括靠近光源的第一终点和远离光源的第二终点;
 - (e) 用于将发射从荧光物质传送到第一发射检测器的第一发射光导装置,其中光导装置包括靠近检测器的第一终点和远离检测器的第二终点;

(f) 用于将发射从荧光物质传送到第二发射检测器的第二发射光导装置,其中光导装置包括靠近检测器的第一终点和远离检测器的第二终点;

(g) 容纳激励光导装置、第一发射光导装置和第二发射光导装置的远端终点的探测器;以及

(h) 用于接收探测器的组件,该组件包括:

(i) 用于接收探测器的壳体,其中该壳体适合用于在第一端接收探测器并在第二端终止于窗口,该窗口对激励和发射光透明,

(ii) 可反向连接到壳体的第二端的尖端部件,其中尖端部件适合接收来自待测量样品的液体,以及

(iii) 尖端部件和窗口之间的膜上固定的荧光物质,其中固定在膜上的荧光物质与样品液体持续连通,并且其中窗口将探测器部件与固定在膜上的荧光物质物理隔离。

15. 根据权利要求 14 的系统,其中所述膜是微孔膜。

16. 根据权利要求 14 的系统,其中所述膜是选自硝化纤维膜、硝化纤维和醋酸纤维素的混合酯膜、聚对苯二甲酸乙二醇酯膜、聚碳酸酯膜、聚偏二氟乙烯膜和聚酰亚胺膜的微孔膜。

17. 根据权利要求 14 的系统,其中光源是发光二极管。

18. 根据权利要求 14 的系统,其中第一和第二检测器是光电二极管。

19. 根据权利要求 14 的系统,其中激励光导装置、第一发射光导装置和第二发射光导装置是光纤。

20. 根据权利要求 14 的系统,其中壳体包括终止于窗口的锥形管。

21. 根据权利要求 14 的系统,其中荧光物质包括半萘并荧光素 / 人体血清白蛋白共轭物。

22. 根据权利要求 14 的系统,其中尖端部件包括用于刺穿密封容器的刺突。

23. 一种用于测量在液体样品中的二氧化碳水平的方法,包括:

(a) 用从探测器发射的激励光照射固定在膜上的荧光物质,该探测器与固定在膜上的荧光物质物理隔离,其中固定在膜上的荧光物质与对处于液体样品中的二氧化碳具有 pH 响应性的溶液液体持续连通,其中具有对二氧化碳有 pH 响应性的溶液通过选择性可渗透膜与液体样品连通,其中激励光具有足以使荧光从荧光物质发射的波长,其中荧光物质在第一发射波长具有第一发射强度,在第二发射波长具有第二发射强度,第一和第二发射强度的比率取决于 pH;

(b) 测量第一和第二发射强度以确定具有 pH 响应性的溶液的 pH;以及;

(c) 使具有 pH 响应性的溶液的 pH 对样品中二氧化碳水平相关。

24. 根据权利要求 23 的方法,其中探测器通过窗口与固定在膜上的荧光物质物理隔离,该窗口对激励光和荧光发射透明。

25. 根据权利要求 23 的方法,其中探测器包括一个或多个光纤。

26. 根据权利要求 23 的方法,其中荧光物质包括半萘并荧光素 / 人体血清白蛋白共轭物。

27. 根据权利要求 23 的方法,其中半萘并荧光素化合物选自 5' (和 6')-羧基-3,10-二羟基-螺 [7H- 苯并 (c) 氧杂蒽 -7,1' (3' H)- 异苯并呋喃]-3' - 酮和 2-(2- 氯代 -3- 羟

基-9-羧乙基-10-氧代-10H-苯并(c)氧杂蒽-7-基)苯甲酸。

28. 根据权利要求 23 的方法,其中样品包括血液或血液制品。

29. 根据权利要求 23 的方法,其中样品包含在密封容器内。

30. 一种用于测量在液体样品中二氧化碳水平的系统,包括:

(a) 用于激励荧光物质的光源,其中荧光物质在第一发射波长具有第一发射强度,在第二发射波长具有第二发射强度;

(b) 用于测量第一发射强度的第一发射检测器;

(c) 用于测量第二发射强度的第二发射检测器;

(d) 用于将激励光从光源传送到荧光物质的激励光导装置,其中光导装置包括靠近光源的第一终点和远离光源的第二终点;

(e) 用于将发射从荧光物质传送到第一发射检测器的第一发射光导装置,其中光导装置包括靠近检测器的第一终点和远离检测器的第二终点;

(f) 用于将发射从荧光物质传送到第二发射检测器的第二发射光导装置,其中光导装置包括靠近检测器的第一终点和远离检测器的第二终点;

(g) 容纳激励光导装置、第一发射光导装置和第二发射光导装置的远端终点的探测器;以及

(h) 用于接收探测器的组件,该组件包括:

(i) 用于接收探测器的壳体,其中该壳体适合用于在第一端接收探测器并在第二端终止于窗口,该窗口对激励和发射光透明,

(ii) 可反向连接到壳体的第二端的尖端部件,其中尖端部件包括用于接收具有对存在于液体样品中的二氧化碳的 pH 响应性的溶液的腔体,其中具有对二氧化碳有 pH 响应性的溶液通过选择性可渗透膜与液体样品液体连通,以及

(iii) 在尖端部件和窗口之间的膜上固定的荧光物质,其中固定在膜上的荧光物质与具有对二氧化碳有 pH 响应性的溶液液体持续连通,以及

其中窗口将探测器部件与固定在膜上的荧光物质物理隔离。

31. 根据权利要求 30 的系统,其中光源是发光二极管。

32. 根据权利要求 30 的系统,其中第一和第二检测器是光电二极管。

33. 根据权利要求 30 的系统,其中激励光导装置、第一发射光导装置和第二发射光导装置是光纤。

34. 根据权利要求 30 的系统,其中壳体包括终止于窗口的锥形管。

35. 根据权利要求 30 的系统,其中选择性可渗透膜可透过二氧化碳。

36. 根据权利要求 30 的系统,其中荧光物质包括半萘并荧光素 / 人体血清白蛋白共轭物。

37. 根据权利要求 30 的系统,其中尖端部件包括用于刺穿密封容器的刺突。

荧光 pH 检测器系统和相关方法

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光 pH 检测器和使用荧光 pH 检测器测量 pH 的方法。

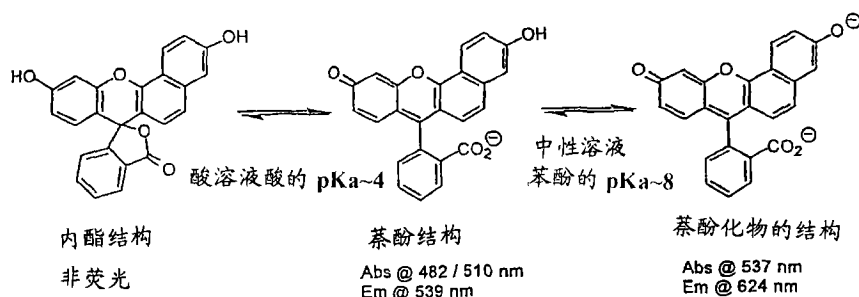
背景技术

[0002] 用于测量 pH 的光传感器（光子管）是公知的。某些芳香有机化合物（例如，酚酞）的颜色随 pH 改变，并可以被固定在固态载体上形成“pH 试纸”。这些可视指示器易用，但不能提供定量读数。颜色变化难以被准确分辨，并可以被有色彩的分析物掩盖。荧光指示器已被用作光学传感器。pH 敏感荧光染料可以被固定在固态载体上，并且通常比简单变色（基于吸光度或反射率）指示器更灵敏。提高灵敏度的荧光指示器可以使固态载体小型化，这种小型化已经被有利地用于研发测量血液中 pH、CO₂ 和 O₂ 参数的光纤传感器设备中。

[0003] 在医疗行业中特别需要血液的准确 pH 测量。血液或其它体液（胸腔积液）的 pH 可以与某些有关病理学的生理反应有关。血气分析是常用的关键护理手段。基于储存条件，分离血液成分（血浆、血小板）的 pH 可以快速改变，这是由于所溶解的 CO₂ 由从献血者收集的富含 CO₂ 的静脉血中挥发。血小板尤其是新陈代谢活性的，其在以 20–22°C 储存期间产生乳酸。对由“棕黄层法”制备的血小板的欧洲质量标准要求所储存的血小板的 pH 为在 37°C 时 pH6.8–7.4（在 22°C 时为 7.0–7.6）。

[0004] 半萘并荧光素 (SNAFL) 化合物和有关的半萘并罗丹明荧光素 (seminaphthorhodaflyuor) (SNARF) 化合物是可商业购买的比率计荧光 (Molecular Probes 有限公司, Eugene, OR, 参见例如, 美国专利 No. 4, 945, 171) 并且它们的合成和光谱性质已经被描述。这些化合物具有包括可以由 LED 光源有效激励的长波长吸光度的优势。下面示出了有关的酸 / 碱平衡和有关的光谱性质。

[0005]



[0006] SNAFL 染料的萘酚结构的去质子化使萘酚化物分子具有较长波长的荧光发射。pKa 是两个分子种类以相同量形成的 pH 值。具有可以使其结合其它感兴趣分子的反应连接基团的 SNAFL 化合物也可以商业购买。

[0007] 已使用各种方法将“比率计”染料固定到用于光纤 pH 检测器的固态载体。羧基萘并荧光素 (CNF) 已经被结合到氨基乙基纤维素并且这种材料被粘合到聚酯 (Mylar) 膜以制造用于光子管的感应膜。这种材料的 pKa 为 7.41, 略低于游离 CNF (pKa 7.62)。使用四乙氧基硅烷以在玻璃覆盖片上形成的溶胶玻璃中捕获 CNF 也已经被报道。这种材料的 pKa 为 7.46。9-氯取代的 SNAFL 类似物 (SNAFL-2) 已经与聚乙烯胺反应并且残留的氨基基团与光

致交联剂交联以在丙烯酸纤维上形成凝胶状涂层。这种纤维 - 光传感器的 pKa 为 7.14, 明显低于所公开的游离 SNAFL 化合物的 pKa (pKa ~ 7.7)。这表明固定染料周围的分子环境和连接结构可以改变 pH 检测器的性能。

[0008] 尽管上述的在 pH 检测中已有一些进步,但仍需要用于测量 pH 的改进的方法和设备。本发明希望实现这种需要并且还提供相关的优点

发明内容

[0009] 在一个方面,本发明提供了一种用于测量样品的 pH 的方法。该方法用于测量血液和血液制品的 pH。在一个实施方案中,该方法用于测量在密封容器中的血液或血液制品的 pH。在一个实施方案中,该方法包括如下步骤:

[0010] (a) 用从探测器发射的激励光照射固定在基质上的荧光物质,该探测器与固定在基质上的荧光物质物理隔离,其中固定在基质上的荧光物质与样品液体连通,其中激励光具有足以使荧光从荧光物质发射的波长,其中荧光物质在第一发射波长具有第一发射强度,在第二发射波长具有第二发射强度,第一和第二发射强度的比率取决于 pH;以及

[0011] (b) 测量第一和第二发射强度以确定样品的 pH。

[0012] 在该方法中,探测器与固定在基质上的荧光物质物理隔离。作为在此使用,术语“物理隔离”是指探测器从被检测样品物理隔离。提供激励光和接收发射光的探测器接触被检测样品。在本发明方法中,样品与基质固定的荧光物质接触(即,液体连通)。探测器与样品隔离并且不与其物理接触。图 3 和 5 示例了将探测器从样品隔离。在一个实施方案中,探测器由对激励光和荧光发射透明的窗口与荧光物质隔离。

[0013] 在一个实施方案中,探测器包括一个或多个光纤。

[0014] 在该方法中,荧光物质是定量荧光物质。在一个实施方案中,荧光物质选自萘并荧光素化合物和半萘并罗丹明化合物。在一个实施方案中,萘并荧光素化合物选自半萘并荧光素化合物和羧基萘并荧光素化合物。在一个实施方案中,半萘并荧光素化合物选自 5' (和 6')-羧基-3,10-二羟基-螺[7H-苯并(c)氧杂蒽-7,1' (3'H)-异苯并呋喃]-3'-酮(在此也称为“SNAFL-1”,见图 7A) 和 2-(2-氯代-3-羟基-9-羧乙基-10-氧代-10H-苯并(c)氧杂蒽-7-基)苯甲酸(在此也称为“EBIO-3”,见图 7E)。

[0015] 在一个实施方案中,固定在基质上的荧光物质包括荧光物质和大分子的共轭物。在一个实施方案中,大分子是白蛋白。在一个实施方案中,大分子是血清白蛋白。在一个实施方案中,大分子是人体血清白蛋白。在一个实施方案中,大分子是重组人体血清白蛋白。在一个实施方案中,固定在基质上的荧光物质包括萘并荧光素/血清白蛋白共轭物。在一个实施方案中,固定在基质上的荧光物质包括半萘并荧光素/人体血清白蛋白共轭物。

[0016] 如上所述,该方法适用于测量密封在容器中的血液或血液制品的 pH。在一个实施方案中,固定在基质上的荧光物质通过保持容器密封的手段导入到密封容器中。

[0017] 在本发明的另一方面,提供一种用于测量 pH 的系统。在一个实施方案中,该系统包括:

[0018] (a) 用于激励荧光物质的光源,其中荧光物质在第一发射波长具有第一发射强度,在第二发射波长具有第二发射强度;

[0019] (b) 用于测量第一发射强度的第一发射检测器;

- [0020] (c) 用于测量第二发射强度的第二发射检测器；
- [0021] (d) 用于将激励光从光源传送到荧光物质的激励光导装置，其中光导装置包括靠近光源的第一终点和远离光源的第二终点；
- [0022] (e) 用于将发射从荧光物质传送到第一发射检测器的第一发射光导装置，其中光导装置包括靠近检测器的第一终点和远离检测器的第二终点；
- [0023] (f) 用于将发射从荧光物质传送到第二发射检测器的第一发射光导装置，其中光导装置包括靠近检测器的第一终点和远离检测器的第二终点；
- [0024] (g) 容纳激励光导装置、第一发射光导装置和第二发射光导装置的远端终点的探测器；以及
- [0025] (h) 用于接收探测器的组件，该组件包括：
- [0026] (i) 用于接收探测器的壳体，其中该壳体适合用于在第一端接收探测器并在第二端终止于窗口，该窗口对激励和发射光透明，
- [0027] (ii) 可反向连接到壳体的第二端的尖端部件，其中尖端部件适合接收来自待测量样品的液体，以及
- [0028] (iii) 尖端部件和窗口之间的基质上固定的荧光物质，其中固定在基质上的荧光物质在测量期间与样品液体连通，并且其中窗口将探测器部件与固定在基质上的荧光物质物理隔离。
- [0029] 在一个实施方案中，光源是发光二极管。
- [0030] 在一个实施方案中，第一和第二检测器是光电二极管。
- [0031] 在一个实施方案中，激励光导装置、第一发射光导装置和第二发射光导装置是光纤。
- [0032] 在一个实施方案中，壳体包括终止于窗口的锥形管。
- [0033] 在一个实施方案中，尖端部件包括用于刺穿密封容器的刺突。
- [0034] 用于该系统中的荧光物质包括关于该方法描述的和下面进一步具体描述的那些荧光物质。在一个实施方案中，荧光物质包括半萘并荧光素 / 人体血清白蛋白共轭物。
- [0035] 在另一方面，本发明提供一种用于将固定在基质上的荧光物质导入样品中的组件。该组件尤其用于将固定在基质上的荧光物质导入密封在容器内的样品中。在一个实施方案中，该组件包括：
- [0036] (a) 具有第一开放端和第二封闭端的壳体，其中封闭端包括对可见光透明的窗口；
- [0037] (b) 可反向连接到壳体封闭端的尖端部件，其中尖端部件适合使壳体窗口露出；以及
- [0038] (c) 在壳体窗口和尖端部件中间的基质上固定的荧光物质。
- [0039] 尖端部分适合将壳体窗口露出。通过将壳体窗口暴露在尖端部件外部的环境中，固定在壳体窗口和尖端部件之间的基质上的荧光物质与待测量的样品液体连通。
- [0040] 在一个实施方案中，壳体是锥形的。在一个实施方案中，尖端部件包括用于刺穿密封容器的刺突。用于该组件中的荧光物质包括关于该方法描述的和下面进一步具体描述的那些荧光物质。在一个实施方案中，荧光物质包括半萘并荧光素 / 人体血清白蛋白共轭物。
- [0041] 在另一方面，本发明提供了一种包括上述组件的血液袋或血液制品袋。

[0042] 在本发明的另一方面中,提供环境敏感性荧光团蛋白共轭物。在一个实施方案中,共轭物包括共价连接到白蛋白的环境敏感性荧光团。在一个实施方案中,环境敏感性荧光团是 pH 敏感性荧光团、氧敏感性荧光团、核酸敏感性荧光团、离子敏感性荧光团、葡萄糖敏感性荧光团、油脂敏感性荧光团或酶敏感性荧光团。

[0043] 在一个实施方案中,环境敏感性荧光团是选自萘并荧光素化合物和半萘并罗丹明化合物的 pH 敏感性荧光团。在一个实施方案中,萘并荧光素化合物是半萘并荧光素化合物和羧基萘并荧光素化合物。在一个实施方案中,半萘并荧光素化合物是 5' (和 6')-羧基-3,10-二羟基-螺[7H-苯并(c)氧杂蒽-7,1'(3'H)-异苯并呋喃]-3'-酮或 2-(2-氯代-3-羟基-9-羧乙基-10-氧代-10H-苯并(c)氧杂蒽-7-基)苯甲酸。

[0044] 在一个实施方案中,白蛋白是血清白蛋白。在一个实施方案中,白蛋白是人体血清白蛋白。在一个实施方案中,白蛋白是重组人体血清白蛋白。

[0045] 在一个实施方案中,环境敏感性荧光团是 2-(2-氯代-3-羟基-9-羧乙基-10-氧代-10H-苯并(c)氧杂蒽-7-基)苯甲酸,并且白蛋白是人体血清白蛋白。

[0046] 应当理解,上述的本发明方法和系统可以改变以包括特定的环境敏感性荧光团,从而提供对由特定荧光团提供用途特异的方法和系统。

[0047] 在另一方面,本发明提供了一种基质固定的荧光物质。在一个实施方案中,基质固定的荧光物质是膜固定的荧光物质。在一个实施方案中,膜固定的荧光物质是粘着到膜上的萘并荧光素化合物和白蛋白共轭物。在一个实施方案中,膜是微孔膜。在一个实施方案中,膜是硝化纤维膜、硝化纤维和醋酸纤维素的混合酯膜、聚对苯二甲酸乙二醇酯膜、聚碳酸酯膜和聚酰亚胺膜。

[0048] 在一个实施方案中,萘并荧光素化合物是半萘并荧光素化合物和羧基萘并荧光素化合物。在一个实施方案中,萘并荧光素化合物是 5' (和 6')-羧基-3,10-二羟基-螺[7H-苯并(c)氧杂蒽-7,1'(3'H)-异苯并呋喃]-3'-酮和 2-(2-氯代-3-羟基-9-羧乙基-10-氧代-10H-苯并(c)氧杂蒽-7-基)苯甲酸。

[0049] 在一个实施方案中,白蛋白是血清白蛋白。在一个实施方案中,白蛋白是人体血清白蛋白。在一个实施方案中,重组人体血清白蛋白。

[0050] 在本发明的另一方面,提供一种用于测量二氧化碳的方法。在一个实施方案中,该方法包括如下步骤:

[0051] (a) 用从探测器发射的激励光照射固定在基质上的荧光物质,该探测器与固定在基质上的荧光物质物理隔离,其中固定在基质上的荧光物质与对存在于液体样品中的二氧化碳具有 pH 响应性的溶液液体连通,其中具有对二氧化碳有 pH 响应性的溶液通过选择性可渗透膜与液体样品连通,其中激励光具有足以使荧光从荧光物质发射的波长,其中荧光物质在第一发射波长具有第一发射强度,在第二发射波长具有第二发射强度,第一和第二发射强度的比率取决于 pH;

[0052] (b) 测量第一和第二发射强度以确定具有 pH 响应性的溶液的 pH;以及

[0053] (c) 使具有 pH 响应性的溶液的 pH 对样品中二氧化碳水平相关。

[0054] 在一个实施方案中,探测器通过窗口与固定在基质上的荧光物质物理隔离,该窗口对激励光和荧光发射透明。在一个实施方案中,探测器包括一个或多个光纤。

[0055] 在一个实施方案中,样品包括血液或血液制品。在一个实施方案中,样品包含在密

封容器中。在一个实施方案中,固定在基质上的荧光物质通过保持容器密封的手段被导入密封容器中。

[0056] 用于该方法的荧光物质包括关于用于测量 pH 的该方法描述的和下面进一步具体描述的那些荧光物质。在一个实施方案中,荧光物质包括半萘并荧光素 / 人体血清白蛋白共轭物。

[0057] 在另一方面,本发明提供了一种用于测量二氧化碳的系统。该系统用于测量在液体样品中的二氧化碳水平。在一个实施方案中,该系统包括:

[0058] (a) 用于激励荧光物质的光源,其中荧光物质在第一发射波长具有第一发射强度,在第二发射波长具有第二发射强度;

[0059] (b) 用于测量第一发射强度的第一发射检测器;

[0060] (c) 用于测量第二发射强度的第二发射检测器;

[0061] (d) 用于将激励光从光源传送到荧光物质的激励光导装置,其中光导装置包括靠近光源的第一终点和远离光源的第二终点;

[0062] (e) 用于将发射从荧光物质传送到第一发射检测器的第一发射光导装置,其中光导装置包括靠近检测器的第一终点和远离检测器的第二终点;

[0063] (f) 用于将发射从荧光物质传送到第二发射检测器的第二发射光导装置,其中光导装置包括靠近检测器的第一终点和远离检测器的第二终点;

[0064] (g) 容纳激励光导装置、第一发射光导装置和第二发射光导装置的远端终点的探测器;以及

[0065] (h) 用于接收探测器的组件,该组件包括:

[0066] (i) 用于接收探测器的壳体,其中该壳体适合用于在第一端接收探测器并在第二端终止于窗口,该窗口对激励和发射光透明,

[0067] (ii) 可反向连接到壳体的第二端的尖端部件,其中尖端部件包括用于接收具有对存在于液体样品中的二氧化碳有 pH 响应性的溶液的腔体,其中具有对二氧化碳有 pH 响应性的溶液通过选择性可渗透膜与液体样品液体连通,以及

[0068] (iii) 在尖端部件和窗口之间的基质上固定的荧光物质,其中固定在基质上的荧光物质在测量期间与具有对二氧化碳有 pH 响应性的溶液液体连通,以及其中窗口将探测器部件与固定在基质上的荧光物质物理隔离。

[0069] 在一个实施方案中,光源是发光二极管。

[0070] 在一个实施方案中,第一和第二检测器是光电二极管。

[0071] 在一个实施方案中,激励光导装置、第一发射光导装置和第二发射光导装置是光纤。

[0072] 在一个实施方案中,壳体包括终止于窗口的锥形管。

[0073] 在一个实施方案中,选择性可渗透膜可透过二氧化碳。

[0074] 在一个实施方案中,尖端部件包括用于刺穿密封容器的刺突。

[0075] 用于该方法的荧光物质包括关于用于测量 pH 的方法描述的和下面进一步具体描述的那些荧光物质。在一个实施方案中,荧光物质包括半萘并荧光素 / 人体血清白蛋白共轭物。

附图说明

[0076] 当结合附图时,通过参考下面的详细描述将更容易理解本发明,因此本发明的前述方面和许多附加的优点将更容易理解。

[0077] 图 1A 是用于测量 pH 的本发明的典型系统的示意图;

[0078] 图 1B 是用于测量 pH 的本发明系统中使用的光学平台的示意图;

[0079] 图 2 是本发明系统中使用的用于激励和发射光导装置的典型壳体的示意图;

[0080] 图 3 示出了激励 / 发射光纤壳体 and 密封容器端口之间的关系;

[0081] 图 4A-4C 示出了用于将基质固定的荧光物质导入密封容器中的典型端口组件,图 4A 示出了组装的端口,图 4B 是端口组件的分解图,图 4C 是尖端的平面图;

[0082] 图 5A 和 5B 示出了结合基质固定的荧光物质的典型密封容器,图 5A 显示了其中基质通过穿刺和重新密封过程被导入的密封容器,图 5B 显示了在容器制造期间结合基质的密封容器;

[0083] 图 6 是在密封容器的制造中使用的典型端口组件;

[0084] 图 7A-E 示出了在本发明方法和系统中使用的典型半萘并荧光素化合物的结构;

[0085] 图 8 示出了作为用于本发明方法和系统的典型荧光物质 (SNAFL-1) 的 pH 的函数的发射光谱;

[0086] 图 9 示出了作为用于本发明方法和系统的典型荧光物质 (EBIO-3) 的 pH 的函数的发射光谱;

[0087] 图 10 是制备用于本发明方法和系统的典型荧光团 - 蛋白 (EBIO-3/HSA) 共轭物的示意图;

[0088] 图 11 示出了作为用于本发明方法和系统的典型荧光团 - 蛋白共轭物 (SNAFL-1/HSA) 的 pH 的函数的发射光谱;

[0089] 图 12 示出了作为用于本发明方法和系统的典型荧光团 - 蛋白共轭物 (EBIO-3/HSA) 的 pH 的函数的发射光谱;

[0090] 图 13 示出了作为 pH(Oxyphen) 的函数的典型固定荧光团 - 蛋白共轭物 (SNAFL-1/HSA) 的基质的发射光谱;

[0091] 图 14 示出了作为 pH(硝化纤维) 函数的典型固定荧光团 - 蛋白共轭物 (SNAFL-1/HSA) 的基质的发射光谱;

[0092] 图 15 示出了作为 pH(硝化纤维) 的函数的典型固定荧光团 - 蛋白共轭物 (EBIO-3/HSA) 的基质的发射光谱;

[0093] 图 16 示出了在用于测量 pH 的本发明方法中使用的数据;

[0094] 图 17 示出了用于富血小板血浆的本发明方法的结果;

[0095] 图 18 示出了用于由本发明方法和系统获得的富血小板血浆的 pH 结果的相关性;

[0096] 图 19 示出了本发明的典型的固定荧光团共轭物的基质的稳定性;

[0097] 图 20 示出了用于测量密封容器中二氧化碳的本发明的典型设备;

[0098] 图 21 示出了根据本发明在测量 pH 中探测器位置对荧光强度的作用;

[0099] 图 22 示出了根据本发明在测量 pH 中膜孔径对荧光强度的作用。

[0100] 发明详述

[0101] 本发明提供一种用于测量 pH 的方法和用于测量 pH 的系统。所述的方法和系统适

用于测量容纳在密封容器中的样品的 pH。

[0102] 在本发明的一个方面,提供一种用于测量 pH 的方法。在该方法中,通过将来自具有 pH 依赖性荧光发射的单个荧光物质的荧光发射强度进行比较来确定 pH。具有 pH 依赖性荧光发射的荧光物质在第一波长具有第一发射强度,在第二波长具有第二发射强度,第一和第二发射强度是在荧光物质的环境中的 pH 特征。第一和第二发射强度的比率提供了 pH 测量。第一和第二发射强度的校准提供了基于强度的参考(比率信息),其被用于确定荧光物质的环境的 pH。

[0103] 本发明方法是荧光波长定比率方法。作为在此使用,术语“荧光波长定比率”是指将在第一和第二发射波长测量的第一和第二荧光发射强度分别对比以提供 pH 信息的方法。

[0104] 在该方法中,具有 pH 依赖性荧光发射的荧光物质被固定在接触样品的基质上以使得荧光物质接触样品。与样品接触的固定荧光物质位于样品中使得荧光物质可以被检测。荧光测量通过以足以引起荧光发射的波长照射荧光物质,然后进行测量产生。由于荧光物质的发射分布(即,分别在第一和第二发射波长测量第一和第二荧光发射强度)的 pH 依赖性的性质,荧光发射分布的测量产生荧光物质的环境的 pH(即,样品 pH)。

[0105] 在本发明方法的一个实施方案中,待确定 pH 的样品被容纳在密封容器中。这种方法适用于测量在常规血液储存容器中密封的血液和血液制品的 pH。

[0106] 在另一实施方案中,待确定 pH 的样品被容纳在开放容器中。作为在此使用,术语“开放容器”是指未密封的容器。这种方法适用于避免被测量样品的污染的情况。在这种方法中,探测器被清洁和/或消毒并被一次性使用。这种方法适用于测量在食物、药物或生物研究中所用材料的 pH,其中容纳材料的容器是未密封的(即,开放的)。这种“实验室用”系统包括在探测器上布置的尖端(参见下面的描述)。通过将尖端浸入样品并测量 pH 来进行 pH 测量。尖端从样品中取出,从探测器取出,并被丢弃。

[0107] 在测量所包含样品的 pH 的方法中,在将样品放置在容器中之前或之后将基质固定的荧光物质导入容器中。作为在此使用,术语“密封容器”是指防止其内含物暴露到容器外的环境中的容器。密封容器防止容器的内含物接触例如容器外的液体或气体。密封容器还防止容器的内含物从容器中溢出。

[0108] 容器可以被制造成包括作为容器的组件的基质固定的荧光物质。在该实施方案中,荧光物质在制造期间被结合到容器中以提供样品可以在随后被导入并测量其 pH 的容器。在实施例 1 中描述了结合基质固定的荧光物质的容器的制造。

[0109] 可选地,基质固定的荧光物质可以在样品已经被导入容器后导入容器中。在该实施方案中,基质固定的荧光物质通过一个工艺被导入容器中,在该工艺中,容器首先被刺破(或扎破)以导入基质固定的荧光物质,然后被重新密封以提供密封容器,该密封容器现在包括接触基质固定的荧光物质的样品。在实施例 2 中描述了将基质固定的荧光物质导入密封容器中的工艺。

[0110] 如上所述,在检测之前、之中和之后,将包括接触样品的基质固定的荧光物质的容器密封。荧光物质的检测需要以足以从荧光物质产生荧光发射并测量该荧光发射的波长激励所述物质。在本发明方法中,检测通过在密封容器中的窗口实现。荧光物质由通过窗口的照射被激励,来自荧光物质的发射通过窗口从荧光物质收集。窗口是密封容器的组件并

可以允许接触样品的荧光物质的检测。窗口对于激励和发射波长足够透明以允许由该方法检测。基质固定的荧光物质被靠近窗口定位以足以进行检测；靠近得足以有效激励荧光物质并足以有效从荧光物质收集发射。应当理解，对于外荧光应用，使用一个窗口。然而，本发明的其它方法和设备可以包括其它光路，例如直通或直角光路，其中可使用一个以上的窗口。

[0111] 本发明方法包括以足以从荧光物质产生发射并足以测量发射的波长照射基质固定的荧光物质，该物质在一个实施方案中与样品一起容纳在密封容器中。激励光和荧光发射穿过密封容器的窗口。在一个实施方案中，密封容器还包括用于接收保持激励光导装置和发射光导装置的壳体的端口。在一个实施方案中，激励光导装置包括一个或多个将来自光源的激励光传送到荧光物质的光纤。在一个实施方案中，发射光导装置包括一个或多个将来自荧光物质的发射光传送到光检测器的光纤。接收壳体的端口靠近窗口定位以足以进行检测；靠近得足以有效激励荧光物质并足以有效从荧光物质收集发射。

[0112] 如同所有光学荧光方法一样，本发明方法包括用于激励荧光物质的光源和用于测量荧光物质的发射的检测器。基于在方法中使用的荧光物质的吸光度和发射分布选择光源、波长选择滤波器和检测器。

[0113] 合适的光源提供以足以从荧光物质产生荧光发射的波长和强度的激励能量。光源可以提供相对宽的波带激励（例如，紫外线或白光光源）或相对窄的波带激励（例如，激光器或发光二极管）。为了提高激励效果和发射测量，可以从光源中选择相对宽的波带激励光并通过使用衍射光栅、单色仪或滤波器使波带激励光变窄以适合荧光物质。合适的光源包括钨丝灯、卤素灯、氙气灯、弧光灯、LED、空心阴极灯和激光器。

[0114] 合适的检测器在荧光物质的发射波带上检测荧光发射的强度。为了改善发射测量，可以从荧光物质源选择荧光发射并通过使用衍射光栅、单色仪或滤波器使荧光发射变窄以适合荧光物质。合适的检测器包括对应荧光物质的波长发射带的光电倍增管和固态检测器，例如光电二极管。其它合适的检测器是光电池、PIN 二极管和雪崩光电二极管。

[0115] 通过使用滤波器，反射离开目标的所有激励光在到达检测器之前被滤除。这可以通过在激励和发射光路都使用滤波器来实现。在某些例子中，到达检测器的反射的激励光（其可以比发射光强度多出许多数量级）可以湮没特殊信号。通常， $10E5$ (10^5) 或更大的带外排斥适用于滤波器组的每一个装置。也可以通过使用有角度的窗口减少激励光使得反射光被引导远离发射检测器。然而，这种光路不如滤波器组装置有效。

[0116] 来自光源的激励光可以通过使用光导装置，例如一个或多个光纤被导向到荧光物质。类似地，来自荧光物质的发射可以通过使用光导装置，例如一个或多个光纤被导向到检测器。

[0117] 图 1A 示意性示出了用于执行本发明方法的典型系统。参考图 1A，系统 100 包括控制和操作系统组件的控制器 110。系统组件包括用于输入包括系统命令的信息的键区 120；用于确定系统状态和观察 pH 确定结果的显示器 130；用于将信息输入到系统的条形码读出器 140，该信息包括待由系统确定 pH 的样品的识别；用于打印系统状态和 pH 确定结果的打印机 150；用于驱动系统的电池（或插头和电力适配器）160；用于储存检测结果和校准数据的存储设备 165；用于指令光学平台组件和处理来自光学平台的信号的信号处理电子设备 170；以及包括激励源、发射检测器、光导装置和相关透镜和滤波器的光学平台 180。光

学平台包括容纳一个或多个激励光导装置和两个或两个以上发射光导装置的探测器部件 185。图 1A 还示出了包括用于接收探测器部件 185 的端口 205 的密封容器 500。

[0118] 图 1B 是用于测量 pH 的本发明系统中使用的光学平台的示意图。参考图 1B, 光学平台 180 包括激励光学器件 280、第一发射光学器件 380 和第二发射光学器件 480。激励光学器件 280 包括光源 282、准直透镜 284、滤波器 286、聚焦透镜 288 和激励光波导 290。第一激励光学器件 380 包括检测器 382、聚焦透镜 384、滤波器 386、准直透镜 388 和第一发射光波导 390。第二发射光学器件 480 包括检测器 482、聚焦透镜 484、滤波器 486、准直透镜 488 和第二发射光波导 490。激励光导装置 290、第一发射光波导 390 和第二发射光波导 490 装在探测器部件 185 中。

[0119] 系统的光源有效激励荧光物质。合适的光源包括发光二极管、激光器、钨灯、卤素灯、氙气灯、弧光灯和空心阴极灯。在一个实施方案中, 光源是 500–560nm 范围发光的发光二极管。可用于本发明系统中的典型发光二极管是可从 Marktech, Latham NY 购买的绿色超亮 Cotco 503 系列 LED。

[0120] 准直透镜将光(例如, 来自光源的激励光或来自发射光波导的第一和第二发射光)导向到带通滤波器。合适的准直透镜包括双凸玻璃透镜和平凸玻璃透镜。可用于本发明系统中的典型的准直透镜是可从 Edmund Optics, Barrington, NJ 购买的 Tech Spec PCX 透镜。激励准直透镜为 12×36(单位为 mm 的有效聚焦长度乘以直径), 第一和第二发射准直透镜为 12×18。

[0121] 聚焦透镜将光线从带通滤波器聚焦到激励光导装置或从带通滤波器聚焦到检测器。合适的聚焦透镜包括双凸玻璃透镜和平凸玻璃透镜。可用于本发明系统中的典型的聚焦透镜是可从 Edmund Optics, Barrington, NJ 购买的 Tech Spec PCX 透镜。激励聚焦透镜为 12×18, 第一和第二发射聚焦透镜为 12×15。

[0122] 在光学平台中使用滤波器以使传送光的带宽变窄。

[0123] 合适的激励滤波器包括带通滤波器, 短通滤波器、长通滤波器或短通和长通滤波器的组合。在一个实施方案中, 系统使用通过在约 370nm–540nm 范围的光的短通滤波器。可用于本发明系统中的典型激励短通滤波器是可从 Omega Optical, Brattleboro, VT 购买的 540ASP。

[0124] 合适的第一发射滤波器包括带通、短通、长通或短通和长通滤波器的组合。在一个实施方案中, 带通滤波器通过光的范围为约 595–605nm, 并在 10nm 的半高度具有全宽的光。可用于本发明系统中的典型的第一发射带通滤波器是可从 Omega Optical, Brattleboro, VT 购买的 600DF10。

[0125] 合适的第二发射滤波器包括带通、短通、长通或短通和长通滤波器的组合。在一个实施方案中, 带通滤波器通过范围为约 562–573nm, 并在 10nm 的半高度具有全宽的光。可用于本发明系统中的典型的第一发射带通滤波器是可从 Omega Optical, Brattleboro, VT 购买的 568DF10。

[0126] 激励光波导将来自光源的激励光通过探测器部件传送到荧光物质。在一个实施方案中, 激励光波导包括一个或多个光纤。在一个实施方案中, 激励波导是单个光纤。可用于本发明系统中的典型纤维光学器件是可从 Edmund Optics, Barrington, NJ 购买的 R02–534。

[0127] 第一和第二发射光波导分别将来自荧光物质的荧光发射通过探测器部件传送到第一和第二发射检测器。

[0128] 在一个实施方案中,第一发射光导装置包括一个或多个光纤。在一个实施方案中,第一发射光导装置包括多个光纤。在一个实施方案中,第一发射光导装置包括4个光纤。可用于本发明系统中的典型纤维光学器件是可从Edmund Optics, Barrington, NJ购买的R02-533。

[0129] 在一个实施方案中,第二发射光导装置包括一个或多个光纤。在一个实施方案中,第二发射光导装置包括多个光纤。在一个实施方案中,第二发射光导装置包括4个光纤。可用于本发明系统中的典型纤维光学器件是可从Edmund Optics, Barrington, NJ购买的R02-533。

[0130] 可用于本发明系统中的合适的光纤包括直径0.2-2mm的玻璃或塑料光纤。

[0131] 系统的第一和第二发射检测器有效测量来自荧光物质的第一和第二荧光发射。合适的检测器包括光电二极管、PIN二极管和光电倍增管。在一个实施方案中,第一和第二发射检测器是对400-800nm范围有反应的光电二极管。可用于本发明系统中的典型的光电二极管包括可从Vishay Intertechnology, Malven, PA购买的BPW34。

[0132] 图2示意性示出了可用于本发明系统中的包罩激励和发射光导装置的典型的检测器部件。如图2所示,光导装置为光纤。参考图2,探测器部件185包罩激励光导装置290、多个第一发射光导装置390和多个第二发射光导装置490。在图2所示的典型检测器部件中,具有4个第一发射光导装置390和4个第二发射光导装置490。4个第一发射光导装置可以被认为是第一通道(例如,测量来自荧光物质的第一荧光发射),4个第二发射光导装置可以被认为是第二通道(例如,测量来自荧光物质的第二荧光发射)。在所示的典型检测器部件中,来自两组纤维的每组的纤维围绕中央纤维(290)交替布置(即,纤维390和490交替布置)。这种构造提供均匀离开“热点”,使得由第一组光纤收集的光与由第二组光纤收集的光类似。

[0133] 图3示意性示出了包罩激励/发射光导装置的探测器部件和密封容器端口的关系。参考图3,探测器部件185由端口205接收。端口205包括窗口210,其对于在荧光测量中使用的激励和发射波长是透明的。从光导装置290发出的激励光穿过窗口210并检测荧光物质固定于其上的基质220,该基质在本发明方法的操作中接触容纳在密封容器200中的样品。基质220的照射导致基质固定的荧光物质的激励和来自荧光物质的荧光发射。从荧光物质的发射分别由光导装置390和490接收并传送到检测器382和482(见图1B)。如上所述,荧光物质的第一发射强度和第二发射强度将取决于样品的pH。

[0134] 图4A和4B示出了将基质固定的荧光物质导入到密封容器中的典型端口组件。图4A示出了组装的端口,图4B是端口组件的分解图。

[0135] 参考图4A和4B,端口组件202包括端口205和尖端215。端口205是以窗口210终止并具有用于接收探测器部件185(未示出)的开口212的圆柱体。在一个实施方案中,端口205从开口212至窗口210逐渐变细,使得探测器部件185插入到端口205中的深度由探测器直径预定。在一个实施方案中,探测器部件185在组件202中的行程深度由突出物(未示出)限制。在一个实施方案中,探测器和膜之间的最佳距离被确定为2mm或更小。图21示出了测量为探测器和膜之间距离的函数的荧光强度。当插入到端口中时,探测器185

的面和窗口 210 基本平行。端口 205 和尖端 215 配合成使得端口和尖端可反向连接。在一个实施方案中,端口 205 包括环形插入物 214,而尖端 215 包括由用于接收插入物 214 的环形唇缘 218 限定的开口 216。在该实施方案中,插入物 214 的直径小于开口 216。应当理解,端口和尖端之间的连接关系可以颠倒(即,端口具有用于接收具有插入物的尖端的环形唇缘)。唇缘 218 限定了用于接收基质 220 的基底 222,其在端口 205 连接到尖端 215 时被固定在端口组件 202 中。尖端 215 包括在基底 222 中的孔 224。孔 224 提供基质 220 与容纳在密封容器中的液体样品的接触,端口组件被导入到该密封容器中。尖端 215 终止于顶点 226,该顶点便于将端口组件 202 通过穿刺导入到密封容器中。图 4C 是尖端 215 的平面图,示出了基底 222 和孔 224。在一个实施方案中,组件由可从 GE Polymerland, Pittsfield, MA 购买的 Lexan HPS11125 制造。

[0136] 图 5A 和 5B 示出了结合基质固定的荧光物质的典型的密封容器。图 5A 示出了其中通过穿刺插入端口组件的密封容器。图 5B 示出了被制造成包括端口组件的密封容器。

[0137] 参考图 5A,密封容器 500 包括多个容器端口 510。端口组件 202(包括端口 205、膜 220 和尖端 215) 在插入后位于容器端口 510A 中。容器 500 在插入端口组件 202 后保持密封。容器端口 510A 密封到端口 205。

[0138] 参考 5B,密封容器 500 包括多个容器端口 510。端口组件 232(包括端口 205、膜 220 和尖端 215) 在容器制造后位于容器端口 510A 中。实施例 1 中描述了用于制造结合端口组件的典型密封容器的工艺。

[0139] 图 6 示出了在制造期间用于结合到密封容器的典型端口组件。用于在容器制造期间结合的端口组件基本与图 4 所示的用于导入到密封容器的端口组件相同,除了用于容器制造的组件不需要包括,并且优选不包括用于穿刺容器的特征。参考图 6,端口组件 232 包括端口 205 和尖端 235。端口 205 是终止于窗口 210 并具有用于接收探测器部件 185(未示出)的开口 212 的圆柱体。在一个实施方案中,端口 205 从开口 212 至窗口 210 逐渐变细,使得探测器部件 185 插入到端口 205 中的深度由探测器的直径预定。当插入到端口中时,探测器部件 185 的面和窗口 210 基本平行。端口 205 和尖端 235 被配合成使得端口和尖端可反向连接。在一个实施方案中,端口 205 包括环形插入物 214,尖端 235 包括由用于接收插入物 214 的环形唇缘 218 限定的开口 216。在该实施方案中,插入物 214 的直径小于开口 216。应当理解,端口和尖端之间的连接关系可以颠倒(即,端口具有用于接收具有插入物的尖端的环形唇缘)。唇缘 218 限定了用于接收基质 220 的基底 222,其在端口 205 连接到尖端 235 时被固定在端口组件 202 中。尖端 235 包括在基底 222 中的孔 224。孔 224 提供基质 220 与容纳在密封容器中的液体样品的接触。

[0140] 具有 pH 依赖性发射的荧光物质。用于测量 pH 的本发明方法和系统使用具有 pH 依赖性的荧光发射的荧光物质。荧光物质在第一波长具有第一发射强度,在第二波长具有第二发射强度,第一和第二发射强度是在荧光物质的环境中的 pH 的特征。第一和第二发射强度的比率提供了 pH 测量。应当理解,荧光发射作为具有具有最大波段的波带发生,最大波段在此是指发射波长。

[0141] 在一个实施方案中,第一波长和第二波长之间的间隔至少约 40nm。在一个实施方案中第一波长和第二波长之间的间隔至少约 30nm。在一个实施方案中第一波长和第二波长之间的间隔至少约 20nm。使用 10nm HBW 滤波器时,间隔至少约 30nm。优选地,本发明系统

通过去除任何 10E5 或其以上的发射带重叠实现荧光信号分离。

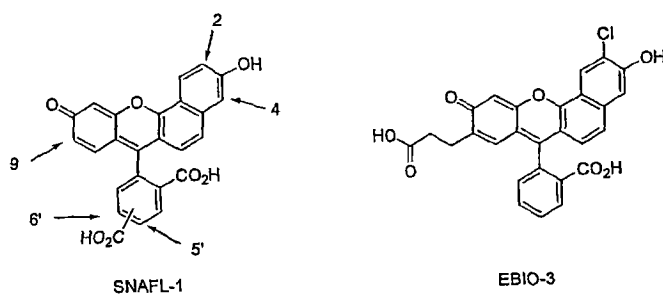
[0142] 用于测量 pH 的本发明方法和系统不限于任何特别的荧光物质, 或任何特别的 pH 范围。本发明方法和系统可与任何具有 pH 依赖性性质的荧光物质一起操作, 该 pH 依赖性性质可以被激励并且其发射可以被测量。可由本发明方法和系统测量的 pH 范围可以被选择并由荧光物质的 pH 依赖性性质确定。

[0143] 除了它们上述的 pH 依赖性性质, 合适的荧光物质包括那些可以基本上不可逆地固定在基质上的物质。荧光物质可以共价连接或非共价连接基质。

[0144] 合适的 pH 依赖性荧光物质包括现有技术已知的那些物质。具有合适的 pH 依赖性性质的典型荧光物质包括荧光衍生物, 其包括萘并荧光素化合物、半萘并荧光素化合物 (例如, SNAFL 化合物) 和半萘并罗丹明荧光素化合物 (例如, SNARF 化合物)。这些化合物具有与它们的长波长发射相关的优点, 这可以较少受到在血液中可能的光吸收物质的干扰。这些化合物还具有相对长波长吸光度, 使它们尤其适合由可购买的 LED 光源激励。具有合适的 pH 依赖性性质的另一化合物是 HPST, 8-羟基-1,3,6-萘三磺酸。虽然化合物具有理想的定比率 pH 性质, 在短波长 (403nm) 的激励是最佳的, 在这种情况下中强 LED 光源不可商业购买。在美国专利 No. 4, 945, 171 中描述了可用于本发明方法和系统的典型 SNAFL 和 SNARF 化合物。Molecular Probes (现在是 Invitrogen, Eugene, OR) 出售具有可共轭羧基连接子的 CNF、SNAFL、SNARF 染料, 参见例如, 由 R. P. Haugland 所作的 Molecular Probes Handbook (第九版), 第 21 章“pH 指示器”第 829-847 页。Epoch Biosciences (现在为 Nanogen, Bothell, WA) 出售具有丙酮酸连接子的 EBIO-3。Whitaker 等人 (Ana l. Biochem. (1991) 194, 330-344) 显示了多种 SNAFL 化合物的合成。Wolfbeis 等人 (MikrochimActa (1992) 108, 133-141) 描述了 CNF 和氨基纤维素共轭物的使用。SNAFL 族化合物最早的参考见 Whitaker 等人 (1998) Biophys. J. 53, 197a。在 CNF 族中的有关染料是 VITABLU, 具有 7.56pKa 的萘并荧光素衍生物 (Lee 等人 (1989) Cytometry 10, 151-164)。在每个邻近苯酚的碳位置具有溴取代基的 CNF 类似物 (pKa 7.45) 的 pKa 比他们测量的 CNF 的 pKa (pKa 7.99) 低 0.54pKa 单位。Lee 等人指出难以以为这些化合物确定“真”pKa 值。在实施例 3 中描述了用于 pKa 确定的方法。SNAFL-1 (文献中 pKa ~ 7.8) 游离酸在基于荧光的分析中具有 7.6pKa。

[0145] 下面示出了用于本发明方法和系统的半萘并荧光素化合物 (SNAFL-1 和 EBIO-3) 的结构。

[0146]



[0147] 编码制描述了连接分子的连接位置。如下所述, 这些化合物具有适合共轭到载体蛋白的羧化物连接基团。为了共轭, 可以使用 SNAFL-1 的活性 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯 (可从 Molecule Probes 公司, Eugene, OR 购买)。在人体血清白蛋白 (HSA) 中的赖氨酸残

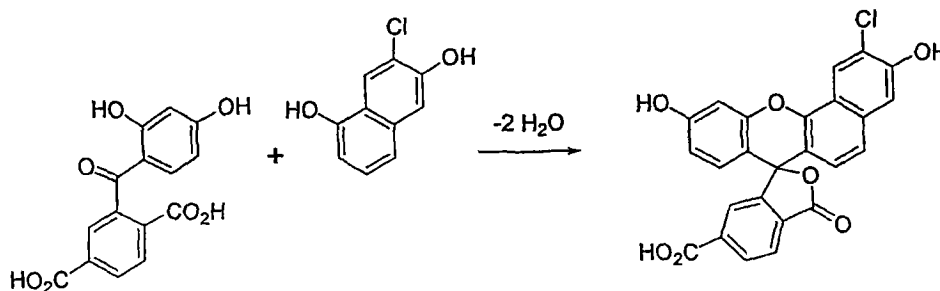
基上的共轭提供了所需的 SNAFL/HSA 共轭物。EBIO-3 的碳化二亚胺活性提供了活性中间体,该中间体能有效共轭到人体血清白蛋白。

[0148] 图 7 示出了可用于本发明方法和系统的典型萘并荧光素和半萘并荧光素化合物。

[0149] SNAFL 化合物可从 Molecular Probes 公司, Eugene, OR 购买。根据已经公开的通用方法(参见例如,美国专利 No. 4, 945, 717)可以容易地合成 SNAFL 化合物。

[0150] 下面显示了典型 2-氯取代的 SNAFL 化合物的制备。

[0151]



[0152] 可以在存在脱水酸或 Lewis 酸催化剂,例如氯化锌的情况下,通过 1,6-二羟基萘与二酸取代的 4-酰基间苯二酚缩聚制备所述化合物。

[0153] 在美国专利申请号 No. 11/022, 039 中描述了具有丙酸连接子的 SNAFL 化合物的制备,该专利的全部内容在此引用作为参考。可从 Nanogen, Bothell WA 购买典型的具有丙酸连接子的 SNAFL 化合物, EBIO-3。

[0154] 图 8 和 9 分别示出了可用于本发明方法和系统的作为典型荧光物质(即, SNAFL-1 和 EBIO-1)的 pH 的函数的发射光谱。图 8 示出了作为 pH(pH6.0-10.0)的函数的在 50mM 磷酸钾缓冲液中的 SNAFL 的发射光谱(在 540nm 激励)。参考图 8,在 pH6-7 的响应相对较差($pK_a = 7.6$)。图 9 示出了作为 pH(pH6.0-10.0)的函数的在 50mM 磷酸钾缓冲液中的 EBIO-3 的发射光谱(在 545nm 激励)。现在参考图 9,在 pH6-7 的响应相对较好($pK_a = 6.6$)。表 1 中概括了图 7A-7E 中示出的 SNAFL 类似物的光谱性质和 pK_a 数据。

[0155] 表 1 SNAFL 类似物 pH 敏感性吸光度和发射

[0156]

化合物	吸光度 λ_{max} (酸)	吸光度 λ_{max} (碱)	发射 λ_{iso}	发射 λ_{max} (碱)	pK_a
SNAFL-1	482, 510nm	540nm	585nm	620nm	7.6
SNAFL-2	485, 514	547	590	630	7.6
EBIO-1	496, 519	545	560	620	6.5
EBIO-2	506, 538	572	590	645	7.8
EBIO-3	480, 509	534	560	610	6.6

[0157] 参考表 1, 获得 $10 \mu M$ SNAFL 类似物的吸光度和发射光谱。在 pH6、8 和 10 确定吸光度:酸(pH6)给出两个类似吸光度谱带;pH10 给出单个 λ_{max} (碱)。通过在吸光度 λ_{max} (碱)处的激励测定发射光谱。发射光谱交叉的波长表示为 λ_{iso} 。发射 λ_{max} 在

pH10 时测量。pKa 由荧光发射光谱确定。EBIO-1 和 EBIO-3 在 pH ~ 6.5 时变化更灵敏。其它类似物在 pH ~ 8 敏感。

[0158] 用于基质固定的荧光物质的共轭物。在用于本发明方法和系统时,荧光物质被固定在基质上,使得荧光物质与待测量其 pH 的样品接触。荧光物质可以通过使用具有与基质的强结合相互作用的材料(例如大分子间隔基材料)被固定在基质上。间隔基材料可以允许荧光物质的共价结合并提供为有效非共价固定到基质表面所需的大表面积。在一个实施方案中,间隔基材料是人体血清白蛋白(HSA),其具有~44 赖氨酸残基可用于共价结合。HSA 的密集带电分子结构在吸附到生物材料上时具有钝化效应。其它优点包括减少荧光素猝灭,使共轭荧光团环境均匀和重组形式(来自酵母)可利用性,使得不会发生感染(与来自献血者的 HAS 相比而言)。HSA 共轭物可通过超滤方法容易地提纯并形成稳定溶液,该溶液易于通过吸光度和荧光分析来表征,以确定每个蛋白的荧光团数目。

[0159] 在一个实施方案中,荧光物质通过使用蛋白或蛋白片段固定在基质上。合适的蛋白包括那些可以基本不可逆地固定在基质上的蛋白。蛋白可以共价连接到基质或非共价连接到基质。合适的蛋白包括荧光物质可以基本不可逆地固定的蛋白。荧光物质可以共价或非共价连接蛋白。

[0160] 合适的蛋白包括人体血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、vonWillebrand 因子、激肽原、纤维蛋白原和血色素(不含铁)。合适的蛋白包括具有可利用赖氨酸残基(用于共轭到荧光团)并且分子量足以允许有效固定到印迹膜的蛋白。在蛋白(像半胱氨酸)中的其它官能团可以被假定用于共价连接到合适的反应性固体载体。

[0161] 在一个实施方案中,荧光物质通过使用多糖固定在基质上。合适的多糖包括那些可以基本不可逆地固定在基质上的多糖。多糖可以共价连接到基质或非共价连接基质。合适的多糖包括荧光物质可以基本不可逆地固定于其上的蛋白质。荧光物质可以共价或非共价连接多糖。

[0162] 合适的多糖包括葡聚糖、氨基葡聚糖、肝素和凝集素。

[0163] 在另一实施方案中,荧光物质通过使用树突状结构固定在基质上。合适的树突状结构包括那些可以基本不可逆地固定在基质上的树突状结构。树突状结构可以共价连接到基质或非共价连接到基质。PAMAM 树状物可商业购买,还可使用其他结构类型和尺寸的树突状结构。

[0164] 在一个实施方案中,荧光物质共价连接到蛋白以提供可固定到基质的荧光团-蛋白共轭物。在一个实施方案中,荧光团-多糖共轭物非共价连接基质。

[0165] 在一个实施方案中,荧光团-蛋白质共轭物被固定在基质上。在一个实施方案中,荧光物质是半萘并荧光素,蛋白是人体血清白蛋白。在一个实施方案中,半萘并荧光素是 SNAFL-1。实施例 4 中描述了 SNAFL-1/HSA 共轭物的制备。实施例 5 中描述了 SNAFL-1/HSA 共轭物的荧光性质。在一个实施方案中,半萘并荧光素是 EBIO-3。在实施例 6 中描述了 EBIO-3/HSA 的制备。在图 10 中示出了 EBIO-3 偶连到 HSA 的示意性示例。在实施例 7 中描述了 EBIO-3/HSA 共轭物的荧光性质。

[0166] 图 11 示出了用于本发明方法和系统的作为典型荧光团-蛋白质共轭物(SNAFL-1/HSA,每个 HSA1.6 荧光团)的 pH(6.0-10.0)的函数的荧光发射光谱。

[0167] 图 12 示出了用于本发明方法和系统的作为典型荧光团-蛋白质共轭物(EBIO-3/

HSA, 每个 HSA1.92 荧光团) 的 pH(6.0-10.0) 的函数的荧光发射光谱。

[0168] 对于荧光团-蛋白质共轭物, 最佳荧光团荷载将基于特定荧光团变化。

[0169] 对于 SNAFL-1/HSA 共轭物, 荧光团荷载可以从约 0.01 到约 40SNAFL-1/HSA 之间变化。在 0.01 信号较小, 在 40 荧光团/HSA 荧光猝灭。在一个实施方案中, SNAFL-1 共轭物包括约 2SNAFL-1/HSA。

[0170] 对于 EBIO-3/HSA 共轭物, 荧光团荷载可以在约 0.01 到约 40EBIO-3/HSA 之间变化。在一个实施方案中, EBIO-3 共轭物包括约 2EBIO-3/HSA。

[0171] 用于荧光物质固定的基质。在本发明方法和系统中, 荧光物质被固定在基质上。如上所述, 荧光物质可以共价或非共价连接地直接固定到基质上, 或可选地, 通过使用可以由共价或非共价连接固定在基质上的材料(例如, 荧光团-蛋白共轭物) 固定在基质上。

[0172] 合适的基质基本不可逆地固定荧光物质。在本发明方法中, 合适的基质还不会抑制液体样品与荧光物质的接触, 并且不会削弱或改变 pH 测量。

[0173] 典型的基质包括膜, 例如由硝化纤维制造的微孔膜、硝化纤维和醋酸纤维素的混合酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯、聚偏二氟乙烯和聚酰亚胺。这些材料可从 Whatman S&S, Florham Park, NJ 和 Millipore, Billerica MA 购买。合适的膜包括其中多孔结构由离子束穿刺产生的膜, 例如可从 Oxyphen GmbH, Dresden, Germany 以品牌 OXYPHEN 购买的膜。也可以使用带电尼龙表面(Nytran)。合适的膜包括塑料膜, 其中通过将微孔注模到塑料中, 例如由 **Amic**, Stockholm, Sweden 采用的工艺产生微孔结构。图 22 显示了在各种孔径硝化纤维醋酸纤维素混合酯膜上固定的 SNAFL-1/HSA 在 pH7 的发射强度。

[0174] 实施例 8 和 10 描述了典型荧光团蛋白共轭物在膜上的固定。实施例 8 描述了 SNAFL-1/HSA 共轭物的固定。实施例 9 描述了固定的 SNAFL-1/HSA 共轭物的荧光性质。实施例 10 描述了 EBIO-3/HSA 共轭物的固定。实施例 11 描述了固定的 EBIO-3/HSA 共轭物的荧光性质。

[0175] 图 13 和 14 分别示出了由实施例 9 描述的微孔试验测量的, 作为 pH(pH 响应) 的函数的 Oxyphen 和硝化纤维上固定的典型荧光团-蛋白共轭物(SNAFL-1/HSA, 3.6 : 1) 的发射光谱。

[0176] 图 15 示出了由实施例 11 描述的伸缩管插入分析测量的, 作为 pH(6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 和 10.0) 的函数的在实施例 8 中描述的在硝化纤维上固定的典型荧光团-蛋白共轭物(EBIO-3/HSA, 2.0 : 1) 的发射光谱。对 pH6-8 范围在 600nm 的发射的广泛传播表明了对 pH 响应的良好的荧光性。

[0177] 定比率 pH 方法和系统。本发明方法是荧光波长-定比率方法。在该方法中, 分别将在第一和第二发射波长测量的荧光物质的第一和第二荧光发射强度进行比较以提供 pH 信息。第一发射波长随 pH 变化, 而第二发射波长不随 pH 变化并给出对于荧光强度的内部对照。在一个实施方案中, 使用查找表格查找所测量比率、第一和第二发射波长的组合并确定其对应的 pH。在一个实施方案中, 使用比率、第一和第二发射波长的数学函数计算最终 pH。

[0178] 图 16 示出了在用于测量 pH 的本发明方法中使用的的数据。显示了由伸缩管插入分析测量的, 在硝化纤维上固定的典型荧光团-蛋白共轭物(EBIO-3/HSA, 2 : 1) 在 pH7.0 的发射光谱。在这种装置中, 激励带通滤波器不能完全去除在发射区域中的激励光, 如所示的

在空白硝化纤维盘上测量的背景信号。将校正背景的全光谱乘以在每个波长的第一和第二假定滤波器的透射率,并且计算在最终曲线下的面积以给出第一和第二波长的信号。选择假定滤波器的中央波长和带宽,使得共轭物的定比率性质与感兴趣区域中的 pH 有最强关系。

[0179] 图 17 示出了由在实施例 11 描述的伸缩管插入分析测量的磷酸缓冲盐 (PBS)、贫血小板血浆 (PPP) 和富血小板血浆 (PRP) 的本发明方法的结果。三条曲线表示了对于三种不同液体在所测量 pH 和比率之间的最适关系。

[0180] 图 18 示出了由实施例 11 描述的注模插入 PVC 管分析测量的,由本发明方法和系统获得的三种不同血浆样品的 pH 结果的相关性。荧光信号和 pH 之间的关系具有约 0.1pH 单位的准确度。

[0181] 图 19 示出了在由浸渍方法制备的并由实施例 10 描述的沥滤试验测量的硝化纤维和醋酸纤维素混合酯上的本发明典型的基质的固定荧光共轭物 (EB10-3/HSA, 2 : 1) 的稳定性。沥滤的低水平远低于任何化合物的毒性水平。

[0182] 二氧化碳测量。在另一方面,本发明提供了用于在液体样品中测量二氧化碳浓度的设备和方法。二氧化碳测量方法利用了上述的 pH 测量方法和系统。在二氧化碳测量方法和设备中,将上述的基质固定的荧光物质接触溶液,溶液的 pH 响应二氧化碳水平。除了接触基质固定的荧光物质之外,将具有响应二氧化碳水平的 pH 的溶液接触待测量二氧化碳水平的液体样品。通过选择性可渗透膜将具有响应二氧化碳水平的 pH 的溶液从待测量二氧化碳水平的液体样品中分离。该膜可透过气体(例如,二氧化碳)并且不可透过其它材料(例如,液体)。通过使用上述测量 pH 的方法,接触基质固定的荧光物质的响应二氧化碳浓度的溶液的 pH 被测量并由接触该溶液的样品的二氧化碳水平相关。

[0183] 具有响应二氧化碳水平的 pH 的溶液是水溶液,该水溶液包括对二氧化碳反应并响应二氧化碳浓度改变溶液的 pH 的试剂。对二氧化碳反应并改变其所溶溶液的 pH 的合适的试剂包括重碳酸盐,例如碳酸氢钠。

[0184] 选择性可渗透膜将具有响应二氧化碳水平的 pH 的溶液从含有二氧化碳的液体样品中分离。该膜可透过二氧化碳并且不可透过液体和其它溶质。在该方法中,来自液体样品的二氧化碳从液体样品穿过膜并进入水溶液,从而与二氧化碳试剂反应以改变水溶液的 pH。合适的选择性可渗透膜包括由硅和 PTFE 制造的膜。

[0185] 图 20 示出了用于测量在密封容器中的二氧化碳的本发明的典型设备。参考图 20,设备 600 包括端口组件 610,其包括端口 620 和尖端 630。端口 620 是终止于窗口 622 并具有用于接收探测器部件 185 的开口 624 的圆柱体。当插入端口时,探测器部件 185 的面和窗口 622 基本平行。端口 620 和尖端 630 被配合成使得端口和尖端可反向连接。包括固定的荧光物质的基质 640 被固定在端口 620 和尖端 630 内。尖端 630 包括用于接收具有对二氧化碳有 pH 响应性的溶液的腔 645。腔 645 由窗口 622、尖端 630 和选择性可渗透膜 650 限定。腔 645 包括基质 640,该基质由探测器部件 185 检测。

[0186] 将用于测量二氧化碳的设备如上所述与包含固定的 EB10-3/rHSA 共轭物 (rHSA 是重组 HSA) 的膜组装。将 PARAFILM M 层,烯烴型材料的混合物在膜朝向尖端情况下加入。将膜与 5 μ l 的 35mM 碳酸盐缓冲液 (pH7.4) 水合,该膜由 PARAFILM M 密封在组件中并在整个试验中保持水合。通过用管和“Y”适配器连接到气源以放出压力而将组件充入 100%的二

氧化碳气体。组件经受二氧化碳预定时期,使其适应环境空气条件,并重复进行。在以 525nm 激励后在每个阶段测量在 568nm 和 600nm 的荧光。在下面的表 2 中概括了结果,并且反映出由于二氧化碳浓度的变化导致荧光的改变,这证实了本发明的荧光比率方法也可用于计算二氧化碳浓度。用于血小板储存的 PVC 储存袋可稍透过气体,二氧化碳直接相关于 pH 的测量。

[0187] 表 2 二氧化碳检测结果

[0188]

环境条件	在 568nm 的发射	在 600nm 的发射	比率 (600/568)
在环境 CO ₂ 中 15 分钟	753	2184	2.9
在 100% CO ₂ 中 5 分钟	1179	2234	1.894
在环境 CO ₂ 中 15 分钟	833	2175	2.611
在 100% CO ₂ 中 8 分钟	1161	1930	1.662
在环境 CO ₂ 中 60 分钟	765	2184	2.854

[0189] 本发明提供了基于荧光的 pH 指示器,该指示器可以容易地插入到所设计的血液储存袋的采样端口中并使用基于光纤的 LED 光源和光电二极管测量系统检测。这种固态系统使用了“定比率”校准方法,该方法解决了由于在血液中的可以干扰照射指示器染料的激励光量的干扰物质,在荧光信号强度中的可变性。在两个波长测量荧光强度的比率,一个波长检测染料的酸(质子化)异构体,一个波长检测碱(去质子化)异构体。

[0190] 为了研发用于富血小板血浆的准确 pH 检测器,具有 pKa ~ 6.6 的化合物是合适的,例如, SNAFL 化合物的 2-氯取代基将苯酚的 pKa 从 7.6 降低到 ~ 6.6。这些化合物的共轭物可以被固定到各种固态载体以提供感应 pH 膜。

[0191] 本发明提供了成本低,易于制造的 pH 感应膜,该膜提供了在 pH6.5-7.5 的血小板储存袋中的准确 pH 测量。在一个实施方案中,本发明使用 2-氯取代的定比率荧光素化合物的蛋白共轭物(人体血清白蛋白)。当固定到硝化纤维印迹膜时,荧光团:HSA 的比率对性能最优。当在膜上干燥后,荧光团:HSA 共轭物具有非常低的沥滤率。这种材料的盘容易组装到用于插入到血小板储存袋的采样端口的保持器中。在使用基于绿色 LED 的荧光计时,荧光膜材料表现出良好的 pH 响应。在该方法中,用适当滤波的光电二极管测量用于定比率 pH 检测的两个发射波长,在所需的 6.5 的低 pH 阈值具有 ~ 0.1 单位的准确度。

[0192] 荧光探测器分子可以被设计成对各种环境敏感。本发明方法和系统描述了 pH 敏感性荧光团的用途。然而,通过改变本发明方法和系统以包括环境敏感性荧光团而不是 pH 敏感性荧光团,可以检测其它环境。随分子环境变化而荧光性质变化的各种荧光探测器可商业购买。参见例如,由 R. P. Haugland 编写的 Molecular Probes Handbook(第九版)。探测器可以连接到白蛋白或其它蛋白,并且用于制备基质,该基质用于如本文所述的检测,或使用其它基于荧光的方法。环境敏感性荧光团、系统和方法的例子包括如下。

[0193] 核酸检测:核酸结合染料在存在 DNA 或 RNA 时改变荧光性质。

[0194] 酶基质：蛋白或肽可以用荧光染料和荧光猝灭分子标记，使得在存在特定酶，例如蛋白酶时产生荧光信号（FRET 检测）。

[0195] 用于脂质的探测器：亲脂性染料可以在存在细胞膜或其它富含脂质分析物时改变荧光性质。

[0196] 用于氧的探测器：除了 pH 检测和二氧化碳检测之外，某些荧光分子对氧浓度的变化敏感，例如，三（2,2'-二吡啶基）钌（II）二氯化物（RTDP）。

[0197] 用于金属离子的指示器：结合金属的荧光染料可以根据与其一起结合钙、镁、锌、钠、钾等等时改变荧光性质。

[0198] 葡萄糖检测：诸如 ConA 结合葡萄糖的某些凝集素，和适当标记的凝集素可以制备成葡萄糖探测器。

[0199] 提供下面的实施例以示例，但不限制本发明。

具体实施方案

[0200] 实施例 1

[0201] 结合典型基质固定的荧光物质的容器的制造

[0202] 参考图 5B，密封容器 500 由 PVC 制造。PVC 材料与多种添加剂，例如增塑剂、稳定剂和润滑剂复合。配方用于制造袋子和管。复合 PVC 被挤压通过模具，用于将可塑材料转换成薄片形式。在切割后，挤压的薄片被切割成所需的尺寸并被传送到焊接部件。通过类似的 PVC 复合物的挤压制造供体和传送管。然后，管被切割成适当长度并传送到焊接部件。诸如注入口、针盖和夹子的组件由注模方式制造。组件被超声清洁并在烘干炉中烘干。

[0203] 焊接。血液袋由高频焊接技术制造。将有尺寸的 PVC 薄片放置在电极之间，施加高压高频。PVC 非常快速地变热并在电极之间产生密封。注入口和供体和传送管与袋保持适当位置并焊接以形成血液袋系统的整体部分。为了制造结合典型基质固定的荧光物质的容器（图 5B），焊接开口管以提供端口 510A。该管可以有带颜色的 PVC 制造以为固定的荧光物质提供光保护。将焊接的袋子修整。端口组件 232（图 6）由注模的 Lexan 部分（205 和 235）和具有固定的荧光物质（220）的 3.53mm（9/64 英寸）直径的硝化纤维盘制造。端口组件由摩擦配合保持在一起或可以被粘合在适当位置。端口组件被插入到端口 510A 的开口管。端口组件由摩擦配合保持在端口中或可以被粘合在适当位置。组装的袋子和端口被消毒和标记，用于血小板浓缩品的最终储存。

[0204] 实施例 2

[0205] 将典型基质固定的荧光物质结合到密封容器中

[0206] 参考图 5A，密封容器 500 包括多个容器端口 510。端口组件 202 在插入后位于容器端口 510A 中。端口组件 202（图 4A-4C）由注模的 Lexan 部分（205 和 215）和具有固定的荧光物质（220）的 3.53mm（9/64 英寸）直径的硝化纤维盘制造。端口组件由摩擦配合保持在一起或可以被粘合在适当位置。端口组件通过使用刺突尖端刺穿密封而经由隔膜密封被插入端口 510A 内。可选地，密封可以用单独的穿刺工具预先刺穿。可以在空的或填充血小板的袋子上执行端口组件的插入，但是在任何情况中，应当使用无菌方法以避免袋子内含物的可能的污染。端口组件由摩擦配合保持在端口中或可以被粘合在适当位置。容器 500 在端口组件 202 插入端口 510A 后保持密封（不漏）。

[0207] 实施例 3

[0208] 典型 SNAFL 类似物的荧光和 pH 性质 :pKa 确定仪器。使用 Ocean Optics USB2000 光纤分光计和钨卤素光源 (零件号 HL-2000FHSA) 比较随各种 SNAFL 游离酸的 pH 变化的荧光。光源装备有线性可变滤波器,该滤波器可以调节激励波束的波长和形状。通过使用空试管得到荧光团的最大调节激励波长 (见表 1)。试管保持器 (零件号 CUV-FL-DA) 直接连接到光源和将发射光引导到分光计的纤维光导电缆。为每个荧光光谱记录激励条件 (在指定波长下 3000msec 照射)。使用 Ocean Optics 软件在个人计算机上收集光谱数据,并捕获不同光谱的覆盖图。

[0209] 样品制备。从 Molecular Probes 购买在 1mg 小瓶中的 SNAFL-1 作为游离羧酸。加入 0.3mL 异丙醇和 0.7mL 水得到 1mg/mL 溶液。使用 SNAFL-1 的 426 的分子量 (MW) 计算摩尔浓度 (SNAFL-1 = 2.35mM)。将 4.25 μ L 的这种溶液用各种 50mM 的磷酸缓冲液稀释到 1mL 以得到 pH 为 6-10 的 10 微摩尔溶液。以类似方式制备 10 微摩尔 SNAFL-2 (MW = 460) 的溶液。从 Epoch Biosciences 获得 EBIO-1 (MW = 523), EBIO-2 (MW = 627) 和 EBIO-3 (MW = 489) 作为散装化合物。仔细称出 1.6mg 的每种固体粉末并溶于 3.2mL 的 40% 异丙醇中以得到 0.5mg/mL 溶液。在 pH6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、8.0 和 10.0 获得各种 SNAFL 和 EBIO 化合物的发射光谱。图 8 (SNAFL-1) 和图 9 (EBIO-3) 示出了覆盖的荧光发射光谱的实施例。所有光谱显示了所有发射光谱重叠的等吸收波长 (见图 1)。这是理想的定比率性能特征,除了上述所示的那些 (内酯、萘酚、萘酚盐) 之外没有竞争荧光结构。

[0210] pKa 计算。两个分子物质 (互变异构体) 相同表示的 pH 被定义为 pKa。存在许多可以影响 pKa 的变量,并且由于结构具有重叠吸光度,因此难以实施测量方法。因此,由文献进行的直接比较可以变化较小。在此包含的计算基于在 pH10 的情况下仅存在三阴离子萘酸盐结构的假设。将在发射最大的荧光强度除以 2,通过在最近的 2 条曲线之间插值计算交叉 pH 曲线的 pH。如表 1 所示,2- 氯取代的 EBIO 化合物的 pKa 明显低于其它类似物。

[0211] 实施例 4

[0212] 典型荧光团 - 蛋白共轭物 :SNAFL-1/HSA 的制备

[0213] 从 Sigma 购买人体血清白蛋白 (HSA) (产品目录 #A-8763), 为 100mg 的冻干粉末。从 Molecular Probes 购买 SNAFL-1NHS 酯, 为 5 和 6 异构体的混合物。制备在 1mL 的 pH8.56 的碳酸氢钠 (0.1M) 中的 10mg (0.15 微摩尔) HSA 的溶液。制备在 0.1mL 的二甲亚砷中的 1mL (1.91 微摩尔) 的 NHS 酯溶液。将 0.3mL 等分试样的 HSA 溶液转移到 1.6mL 的 Eppendorf f 管中, 并加入各种提供比率的 NHS 酯溶液 : 管 1, 11.8 微升 (5 当量); 管 2, 23.6 微升 (10 当量), 管 3, 47.1 微升 (20 当量)。搅动深红溶液并允许静置在暗处至少 1 小时。将管 1 的 5 : 1 共轭物通过凝胶过滤层析法在填充 Sephadex G-15 和 pH7.4 的磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 的 0.5 \times 20cm 柱上提纯。共轭物在 PBS 中作为快速移动红 / 橙色带被分离并使用 PBS 稀释成 0.75mL, 以得到 4mg/mL 的蛋白共轭物溶液。大部分颜色随共轭物洗脱, 但是一些小分子量 (橙色) 杂质保留在柱的顶部。将柱清洗以足以再次用于 10 : 1 和 20 : 1 共轭物的提纯。每个共轭物在 PBS 中被洗脱并被稀释到 0.75mL 以得到 ~ 4mg/mL 溶液 (基于 HSA 成分 60 微摩尔)。将红色溶液冷藏、避光储存。制备 1 微摩尔的每种 SNAFL-1/HSA 共轭物的溶液并使用 Beckman DU640B 分光计通过 UV-vis 光谱分析。每个光谱显示在 pH7 于 490 和 521nm 具有吸光度最大值, 正如从 SNAFL-1 共轭物的酸性形式所希望的。相对吸光

度显示了随着不同的 SNAFL : HSA 提供比率在吸光度中希望的变化。将在 pH7 的 SNAFL-1 酸 (从 Molecular Probes 获得) 的 10 微摩尔溶液用作标准以更准确确定每次 HSA 共轭物制备的 SNAFL-1 的平均荷载。使用这种分析, 5 : 1 的共轭物具有 4.1 的荧光 /HSA, 10 : 1 的共轭物具有 6.4 的荧光 /HSA, 20 : 1 的共轭物具有 11.2 的荧光 /HSA。

[0214] 实施例 5

[0215] 典型荧光团 - 蛋白共轭物 :SNAFL-1/HSA 的荧光性质

[0216] 使用 Ocean Optics USB2000 光纤分光计和钨卤素光源 (零件号 HL-2000FHSA) 比较各种 SNAFL-1/HSA 共轭物和 SNAFL-1 游离酸的相对荧光。光源装备有线性可变滤波器, 该滤波器可以调节激励波束的波长和形状。试管保持器 (零件号 CUV-FL-DA) 直接连接到光源并且纤维光导电缆将发射光引导到分光计。报告每个荧光光谱的激励条件 (在指定波长 3000msec 照射)。使用 Ocean Optics 软件收集光谱数据于个人计算机上, 并捕获不同光谱的覆盖图。各种荷载水平的 SNAFL-1/HSA 的比较表明 4.1-1.6SNAFL-1 分子提供大约相同的荧光信号。较高荷载或较低荷载共轭物提供较少信号。

[0217] 获得磷酸钾缓冲液中的 10 微摩尔溶液的发射光谱。在 540nm 进行激励。对于 SNAFL-1 的碱形式 (pH10) 观察到在 620nm 时具有发射最大值。如所料的, 当 pH 减小时, 620nm 荧光的强度减小。观察到等吸收点在 585nm, 在那里荧光在所有 pH 保持恒定。响应在约 pH8 时良好, 在 pH6-7 之间较差。

[0218] 从 2.5 微摩尔的典型 SNAFL-1/HSA 共轭物 (1.6SNAFL-1/HSA) 溶液获得的光谱表明对 pH6-7 改善了 pH 响应 (见图 11)。OceanOptics 的卤素光源装备有 532nm 干涉滤波器 (Edmund Optics, Barrington, NJ.), 使得可检测到 pH6-7 之间在 572nm 的荧光等吸收点。对 SNAFL-1 的碱性形式 (参见 pH10 曲线) 观察到在 620nm 的发射最大值。如所料的, 当 pH 减小时, 620nm 荧光的强度减小。与游离 SNAFL-1 羧酸 (见图 8) 相比, 观察到对 HSA 共轭物于 pH6-7 的响应改善。观察到来自等吸收波长的 pH8 和 10 曲线的红移, 表明包括荧光物质的其它竞争分子结构。通过在荧光染料和 HSA 间隔基之间采用较长连接结构或更亲水的连接结构可以消除这种不理想表现。

[0219] 实施例 6

[0220] 典型荧光团 - 蛋白共轭物 :EBIO-3/HSA 的制备

[0221] 方法 A. 通过将 6.2mg 的 EDC 溶解于 0.2mL 的 DMF 和 0.123mL 的 50mM 磷酸缓冲液 (pH5.8) 中制备 0.1M 的 EDC 储液 (Sigma/AldrichChemical 公司, St. Louis MO)。将 1.0mg 的 EBIO-3 酸 (Nanogen, Bothell, WA) 溶于 0.102mL 的 DMF 得到 20mM 溶液。将 3.0mg (0.045 微摩尔) 的 HSA (Sigma/Aldrich Chemical 公司, St. Louis MO) 在两个 1.7mL 的 Eppendorf 试管的每个中溶于 0.3mL 的 pH8.5 碳酸氢钠溶液中。将 0.1M EDC (0.045mL) 加入到在单独 Eppendorf 试管中的 20mM EBIO-3 (0.045mL, 0.9 微摩尔) 中, 并将该溶液加入到 HSA 试管的一个中以得到提供 20 : 1 比率的 EBIO-3 : HSA。通过加入 0.0225mL 的 EDC (0.1mM) 和 0.0225mL 的 EBIO-3 (20mM) 的预混合溶液将提供的 5 : 1 比率用于其它 HSA 试管。均匀的暗红 HSA 共轭物溶液在暗处室温下培育。在 21 小时后, 将每个 HSA 共轭物在如上所述用于 SNAFL 共轭物 (实施例 4) 的 G15 Sephadex 柱上提纯。一些未反应的 EBIO-3 酸保留在柱的顶部 (特别是 20 : 1 提供比率), 但是从所需蛋白共轭物中彻底分离, 该蛋白共轭物首先洗脱为在 ~ 0.5mL 的 pH7.4 缓冲液中的粉红部分。使用 pH7.4 的 PBS 将每种提纯的共

轭物稀释到 0.75mL 以提供 4mg/mL 溶液 (0.06mM)。将红色溶液冷藏、避光储存。在 pH7.4 制备 1 微摩尔的每个 EBIO-3/HSA 共轭物并使用 BeckmanDU640B 分光计通过 UV-vis 光谱分析。游离 EBIO-3 酸 (10 微摩尔) 光谱在 534nm 具有吸光度最大值, 20 : 1 共轭物在 538nm 具有吸光度, 5 : 1 共轭物在 545nm 具有最大值。光谱显示了吸光度随着 EBIO-3 : HSA 提供比率提高产生希望的增加。使用这种 EBIO-3 作为标准, 20 : 1 共轭物具有 5.07 的 EBIO-3 : HSA, 5 : 1 提供的具有 1.92EBIO-3 : HSA。联合效率稍低于实施例 4 的 SNAFL/HSA 共轭物 (20 : 1 共轭物具有 11.2 荧光 /HSA, 5 : 1 提供的具有 4.1 荧光 /HSA)。EDC 联合方法具有合适的效率并且可再现。

[0222] 方法 B. 通过将 6.0mg 的 EDC 溶于 0.194mL 的 DMF 和 0.118mL 的 50mM 的 PBS (pH 7.4) 中制备 0.1M 的 EDC (Sigma/Aldrich Chemical 公司, St. Louis MO) 溶液。将 3.0mg 的 EBIO-3 酸 (Nanogen, Bothell, WA) 溶于 0.306mL 的 DMF 以得到 20mM 的溶液。两种溶液在 EBIO-3 溶液容器中组合并在室温下在暗处培育 1 小时。将来自酵母 (Delta Biotechnology 有限公司, Nottingham, UK) 的 75.0mg (1 微摩尔) 的液体重组 HSA (rHSA) 与 7.5mL 的 pH8.5 的碳酸氢钠在 15mL 锥形试管中混合。将整个容量的 EBIO-3/EDC 溶液与 rHSA 溶液组合并在室温下于暗处培育 15-20 小时。使用 Amicon 搅拌超滤细胞系统和 YM10 膜 (Millipore, Bedford, MA) 将 rHSA/EBIO-3 共轭物提纯。将 50mM 的 PBS (pH7.4) 用作洗涤溶液。在提纯后, 使用 BCA™ Protein Assay (Pierce, Rockford, IL) 测量共轭物的蛋白浓度。将等分试样的共轭物根据其 BCA 确定的蛋白浓度用 50mM 的 PBS (pH7.4) 稀释到 1mg/ml。通过采用 Bio-Tek's Synergy HT 平板读出器的吸光度扫描分析 1mg/ml 等分试样的共轭物、PBS 流出液的最后 1 毫升、50mM 的 PBS (pH7.4) 的等分试样和 EB3 Standard (在 DMF 和 50mM 的 PBS (pH7.4) 中的 15mM EBIO-3 的溶液) 的等分试样。在黑色、96 孔、干净、平地板上对 300 微升的上述样品的每个进行扫描, 扫描从 450nm 到 650nm 进行。记录它们的最大峰值并用于确定共轭物的纯度和质量。

[0223] 实施例 7

[0224] 典型荧光团 - 蛋白共轭物 : EBIO-3/HSA 的荧光性质

[0225] 获得如在实施例 6 (方法 A) 所述的方法制备的两种 EBIO-3/HSA 共轭物的 2.5 微摩尔溶液的荧光光谱。共轭物显示对 pH6-7 改善的 pH 响应 (参见图 12 对于 1.92 : EBIO-3/HSA 共轭物的重叠光谱)。Ocean Optics 的卤素光源装备有 532nm 带通滤波器 (Edmund Optics, Barrington, NJ.), 这允许对 pH6-7 在 ~ 565nm 的荧光等吸收点被检测。对 SNAFL-1 的碱性形式 (红色轨迹, pH10) 观察在 605nm 的发射最大值。如所料的, 随 pH 减小, 605nm 荧光的强度减小。与 SNAFL-1/HSA 共轭物 (见图 11) 比较, 观察到对于 EBIO-3/HSA 共轭物对 pH6-7 的响应的改善。观察到来自等吸收波长的 pH8 和 10 的红移, 表明包括荧光物质的其它竞争分子结构, 但是与 SNAFL-1/HSA 共轭物相比量级较小。

[0226] 实施例 8

[0227] 典型荧光团 - 蛋白共轭物 : SNAFL-1/HSA 的固定

[0228] 使用下面的一般方法将荧光团 - 蛋白共轭物和荧光团 - 碳水化合物共轭物固定在硝化纤维或毛细孔膜上。从 Molecular Probes 获得具有“可固定”赖氨酸残基的荧光标记右旋糖苷。这些右旋糖苷具有约 10,000 的分子量, 每个共轭物具有 1.8 荧光团, 并且每个共轭物具有 2.2 个赖氨酸, 以商品名“Fluoro-Emerald”出售。同样从 Molecular Probes 获

得荧光素标记的牛血清白蛋白 (BSA), 每个共轭物具有 4.5 个荧光团。如实施例 4 所述制备各种 SNAFL-1/HSA 共轭物。从 Schleicher 和 Schuell 以商品名 PROTRAN 获得硝化纤维膜。孔径据称为 0.2 微米。由聚酯制造的毛细孔膜从 Oxyphen 获得, 具有各种孔径。0.1 微米和 1.0 微米孔径膜成功用于固定荧光右旋糖酐。荧光素 / 右旋糖酐、荧光素 / BSA 和 SNAFL-1/HSA 共轭物都被成功固定, 并且 SNAFL-1/HSA 共轭物的荧光性质如下所述全部表征。

[0229] 一般固定方法。 SNAFL-1/HSA (2.5 SNAFL-1/HSA) 在 0.1 微米孔直径 Oxyphen Membrane Discs 上。如实施例 4 所述制备具有 2.5 : 1 SNAFL-1 : HSA 提供比率的荧光 HSA 共轭物, 并且将该共轭物稀释以在磷酸缓盐溶液 (PBS) (pH7.4) 中提供 0.05、0.2、1.0 和 4mg/mL 的浓度。通过 20 微升移液管将 5 微升液滴添加到预冲压多孔盘 (1/4 英寸直径) 的中心, 该盘位于工作台顶部。带液点的盘可以风干 (约 30 分钟), 然后放置在单独的干燥器中过夜。干燥的盘在单独的 Eppendorf 试管中用 2×1mL 的 PBS 洗涤并可以浸泡在 1mL 的 PBS 中过夜。洗涤的盘在 PBS 溶液中稳定 (在 30 天后未出现降解)。可选地, 该盘可以在干燥器中再次干燥并干燥储存。湿储存或干燥储存的盘具有类似的荧光性质。盘具有荧光信号, 该信号与施加到如实施例 9 所述的荧光试验所测量的每个上的标记大分子的浓度成比例。

[0230] 实施例 9

[0231] 典型固定的荧光团 - 蛋白共轭物; SNAFL-1/HSA 的荧光性质

[0232] 使用光纤分光计对多孔膜盘上的荧光大分子共轭物进行的微孔分析。 使用在实施例 5 中所述的 Ocean Optics 光纤分光计检测如实施例 8 所述制备的荧光盘的荧光性质。在光源上的试管由纤维光学反射率探测器代替, 该探测器具有围绕拾取来自样品的发射光并将其传送到分光计的单个光纤盘绕的 6 个激励光纤。反射率探测器穿过在前面具有盖子的 12×12×18 英寸黑盒子中的孔。探测器被夹在 1cm 正方形开口的下部内, 该开口可以使探测器的尖端被定位在 96 孔微孔板 (清洁底部黑色板) 的下面。探测器被倾斜 30 度角以减少进入探测器尖端的反射光。感兴趣的荧光盘被放置在孔的底部并以用 300 微升的感兴趣分析物溶液覆盖。激励光源被调谐得足够长以将感兴趣盘定位在反射率探测器的尖端上, 然后关闭百叶窗并且该板被覆盖另一盒子以使盘避免外界光。除非另外提到, Ocean Optics 软件被设置成采集具有 3000msec 积分时间和 3 个平均值的数据。在关闭百叶窗的情况下捕捉暗光谱, 并将该暗光谱用于在试验期间所有减去背景的读数。然后打开百叶窗并开始盘的荧光读数。在计算机屏幕上的图形显示提出了在每个 3000msec 积分时间后的实时光谱。在获得所需的 3 个光谱 (约 10 秒) 后, 图示仅显示出微小变化。在这点上, 捕捉所显示的光谱的快照并储存到盘中用于将来的处理。关闭百叶窗, 设置下一次微孔试验。通过互换在微孔中的分析物溶液, 相同的盘可以被测量多次。可选地, 在不同孔中的不同的盘可以通过将微孔板在反射率探测器上再次定位来测量。

[0233] 在 Oxyphen 盘上固定的 SNAFL-1/HSA 的荧光荷载。 上述的微孔试验用于比较在 Oxyphen 盘上 SNAFL-1/HSA 的相对荧光。在卤素光源中的激励滤波器被设置成 532nm 波长和“敞开”带通位置以使试验灵敏度最大化。激励波束回到探测器光纤中的反射率显著, 滤波器的波长位置被调节成在 620nm 提供“最小值”, 在 620nm 处, 来自碱性形式的 SNAFL-1/HSA 的荧光最强。在如上所述的 pH7 的磷酸钾缓冲液 (50mM) 中, 在单独微孔中检测实施例 8 所述的 SNAFL-1/HSA 的各种浓度。光谱显示了区分在 pH7 的 4、1、0.2 和 0.05mg/mL 膜的

相对荧光强度的能力。所有情况都具有大于背景的信号。

[0234] 在 pH7 于多孔 Oxyphen 盘上固定的各种剂量的 SNAFL-1/HSA (2.5 : 1) 的相对荧光强度。在荧光团的碱性形式的荧光最大值的 620nm 处测量荧光强度。使用在卤素灯上的敞开设置来进行激励,这可有效激励酸碱形式的 SNAFL-1。来自光源(未调节盘)的反射光具有最低强度光谱。0.05mg/mL 盘的光谱给出了在荧光强度上的小增加。0.2mg/mL 盘、1mg/mL 盘和 4mg/mL 盘显示荧光强度逐步增加。来自不同批的膜的两个 30 天 PBS 浸泡样品(1mg/mL)的荧光光谱基本相同并显示出膜荷载可以成批再现,并且 SNAFL-1/HSA 共轭物在 PBS 溶液中不会从盘表面显著脱离。

[0235] 固定在 Oxyphen 盘上的 SNAFL-1/HSA 的 pH 依赖性的荧光。在微孔试验中检测上述的 1mg/mL 的 SNAFL-1/HSA 盘的 pH 依赖性的响应。在 pH4、5、6、7、8、9 和 10 的磷酸钾缓冲液中检测单个盘。数据显示这些膜盘具有宽动态范围的 pH 测量,但是在 pH > 6 时具有更灵敏的响应。在缓冲液互换之间的时间为 5 分钟,在另外的平衡稳定时间后在光谱方面无明显变化。这表明在固定的 SNAFL ~ 1/HSA 共轭物的 pH 环境中的即使剧烈变化的响应时间也很短。

[0236] 使用 SNAFL-1/HSA Oxyphen 盘对 pH 的荧光测量的“交叉分析”。上述微孔试验用于检测盘的荧光等吸收性。为了这个试验,在 OceanOptics 卤素光源(零件号 HL-2000FHSA)中的百叶窗组件被去除,使用专门的适配器将两个 532nm 带通滤波器(Edmund Scientific)插入到腔中。这显著减少了在感兴趣光谱区域(> 550nm)中的反射背景。所显示的数据用于由 SNAFL : HSA (5 : 1) 共轭物制备的 4mg/mL 荷载盘。固定的蛋白共轭物显示出与溶液相数据相比不同寻常的 pH 比荧光性质。与在 575nm 的荧光等吸收点不同,在 pH 增大时荧光强度逐步增加。pH10 的光谱在 620nm 显示希望的最大值,并跨过在 pH4、6、7 和 8 的缓冲液中获得的覆盖光谱曲线。这些“交叉点”被用作灵敏试验的基础以确定膜环境的 pH。通过在三个不同日子使用这种试验形式检测三个不同的膜盘。交叉点在 2nm 内可再现。

[0237] 4mg/mL 盘 (3.6 : 1SNAFL : HSA) 显示在 pH10 “交叉”的逐步增加。对于 pH4,交叉是在 579nm。三个盘 / 三个不同日子得到相同结果 ± 2 nm。交叉点在 592nm(pH6)、600nm(pH7a, b) 和 611nm(pH8)。在 pH10 的荧光最大值是在 620nm,与溶液相性质相同。

[0238] 实施例 10

[0239] 典型荧光团 - 蛋白共轭物 :EBIO-3/HSA 的固定

[0240] 斑点固定方法。如实施例 6 所述以 2 : 1 的比率制备 EBIO-3/HSA 共轭物。从 Schleicher 和 Schuell 以商品名 PROTRAN 获得硝化纤维膜。使用 4mg/ml 的 EBIO-3/HSA 溶液以和实施例 5 所述的一般固定方法相同的方式处理盘。

[0241] 浸泡固定方法。如实施例 6 所述以 2 : 1 的比率制备 EBIO-3/HSA 共轭物。从 Millipore 以产品系列 TF 获得混合酯硝化纤维和醋酸纤维素膜。EBIO-3/HSA 共轭物被稀释到 0.2mg/ml 并且 45ml 被加入到膜的 9cm 盘。在室温并使其避光下搅动盘过夜。未结合的共轭物被去除,该盘用两个 1 小时洗涤和一个过夜洗涤进行洗涤,并全程伴随搅动。然后将盘干燥并干燥储存。较小的盘由 9cm 盘冲压用于研究。

[0242] 实施例 11

[0243] 典型的固定的荧光团 - 蛋白共轭物 :EBIO-3/HSA 的荧光性质

[0244] 使用光纤分光计在多孔膜盘上的荧光大分子共轭物的伸缩管插入分析。使用具有双 532nm 滤波 (Edmund Scientific) 的卤素光源 (零件号 HL-2000FHSA) 的如实施例 9 中所述的 Ocean Optics 光纤分光计检测如实施例 10 所述制备的荧光盘, 以将荧光性质与液相 pH 相联系。用于 5/32 英寸膜盘的保持器由 4mm 外径和 5mm 外径的聚苯乙烯伸缩管和有角度的 0.015 英寸厚度聚苯乙烯窗口制作。有角度窗口被布置成使得它将膜盘相对管轴保持在 60 度角。这可以使光纤探测器布置在管的一端并且检测在接触某个 pH 的液体的窗口的另一侧上的盘。已知 pH 值的缓冲液被放置成接触伸缩管插入物和由实施例 10 中斑点固定方法制造的盘, 并且用 Ocean Optics 软件记录荧光发射, 该软件设置成以 1000msec 积分时间和 3 个平均值收集数据。

[0245] 对于未知 pH 值的液体, 包含 5 个伸缩管插入物的搅动和光保护的容器和由实施例 10 中的浸泡固定方法制造的盘、50mL 的缓冲液或血浆和校准 pH 电极 (ROSS 电极 /Orion 720a 仪表) 被用于研究荧光盘的 pH 和荧光响应。加入 1N HCL 或 1M NaOH 液滴以产生所研究液体的 pH 范围。通过设置成用于以 1000ms ec 积分时间和三个平均值读取的在 Excel 中的 Ocean Optics 宏指令 (macro) 收集荧光光谱。使用模型带通滤波器和在 Excel 中的定比率方法分析光谱以获得 PBS、贫血小板血浆和富血小板血浆的校准曲线。

[0246] 使用常规优化荧光的 pH 依赖性检测器对多孔膜盘上的荧光大分子共轭物的注模插入 PVC 管分析。将注模的聚碳酸酯部分成形以将荧光盘固定到如图 4 所示的荧光 pH 检测器探头上。膜由实施例 10 中的浸泡固定方法制备并被组装到塑料插入物中。将长度为 1 英寸, 内径 3/16 英寸的 PVC 管布置在插入物的尖端上, 使得 250 μ l 液体被放置在试管中并由石蜡膜覆盖以减缓二氧化碳解吸作用。进行第一和第二波长的荧光测量, 然后用血液气体分析仪 (Bayer 348) 读出 pH。如在伸缩管插入分析中一样通过酸和碱的加入产生 pH 数据范围, 以调节血浆样品的 pH。

[0247] 虽然已经示例和描述了本发明的优选实施方案, 应当理解, 在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以在此作出各种变化。

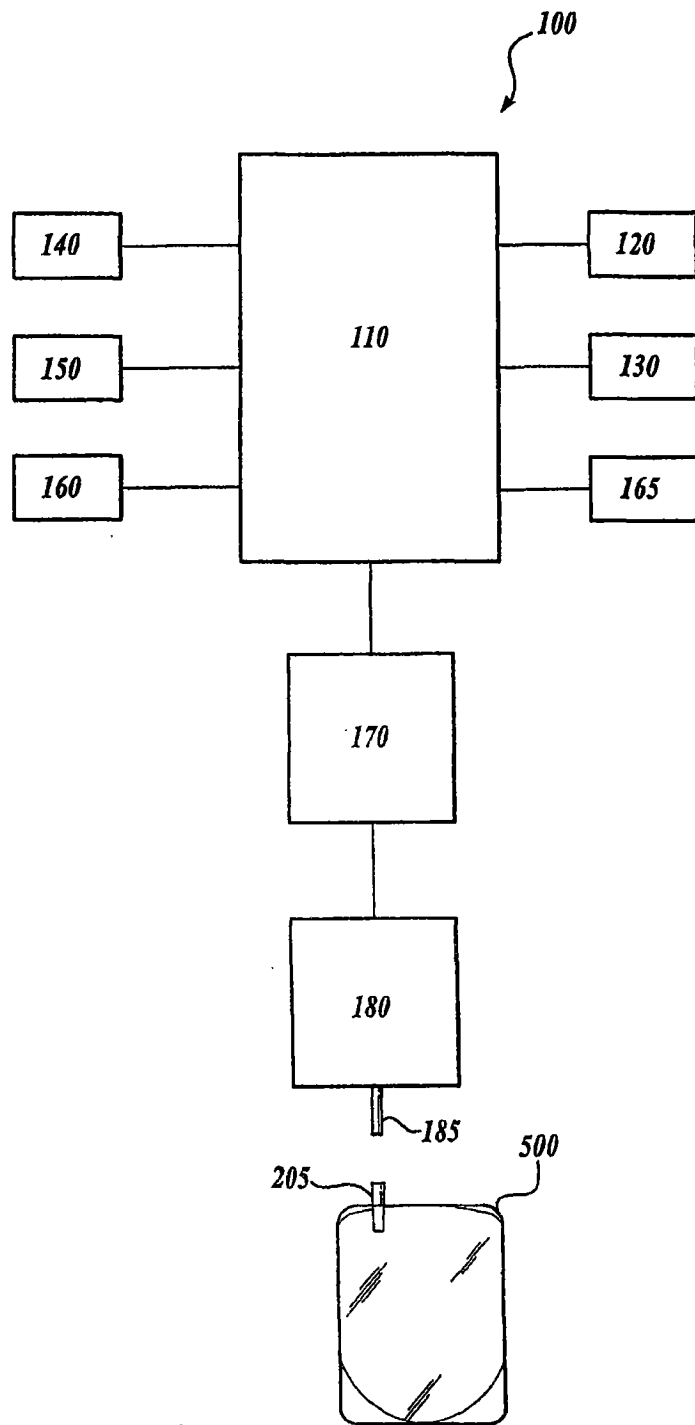


图 1A

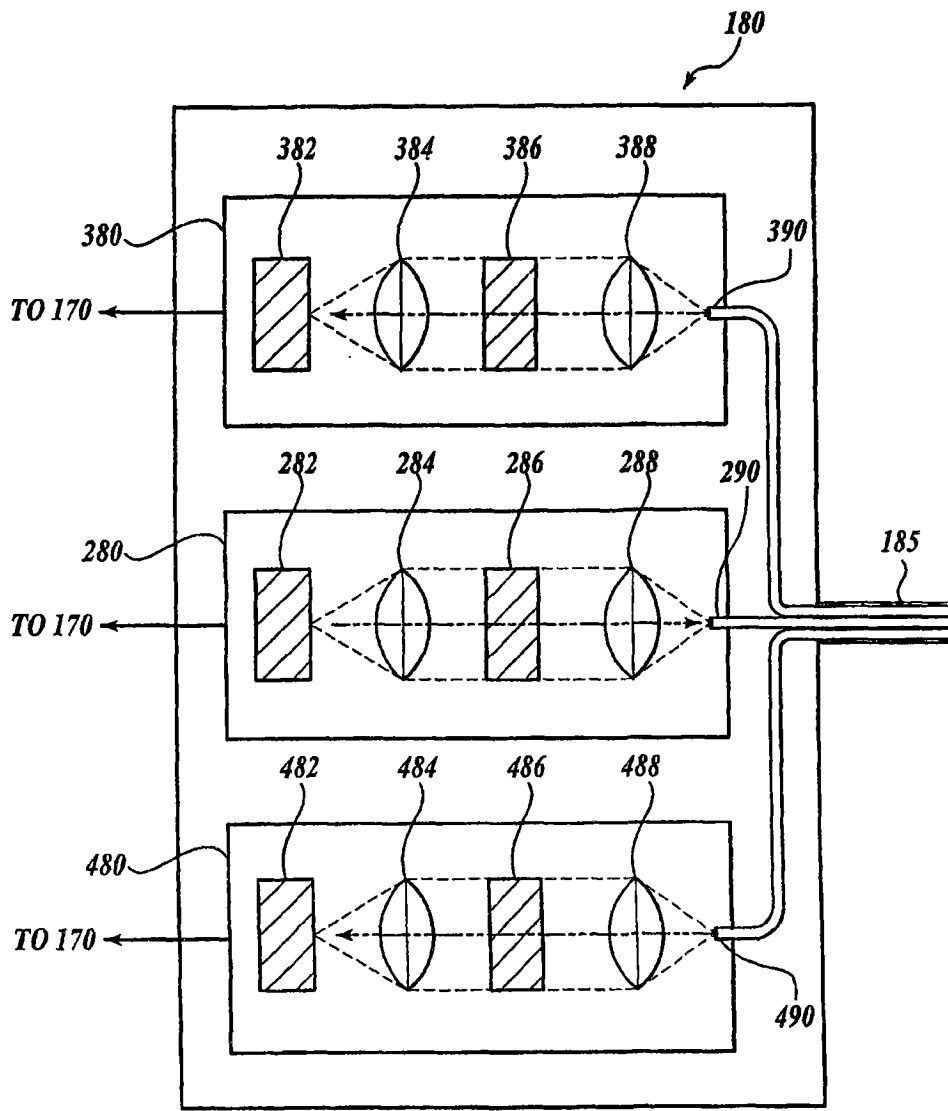


图 1B

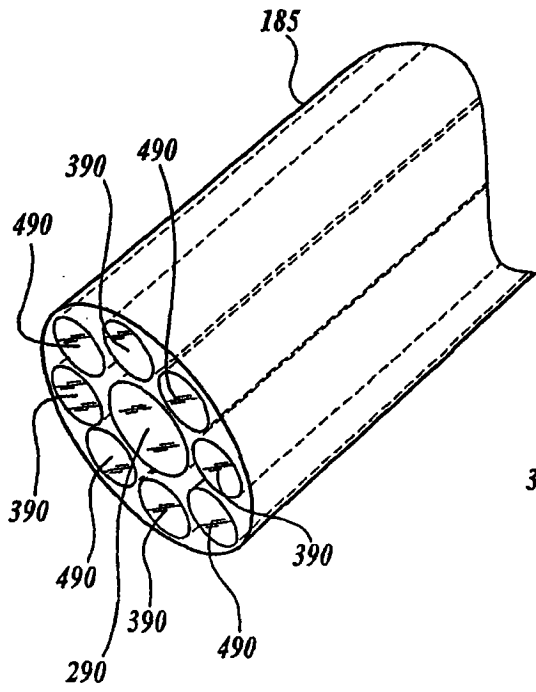


图 2

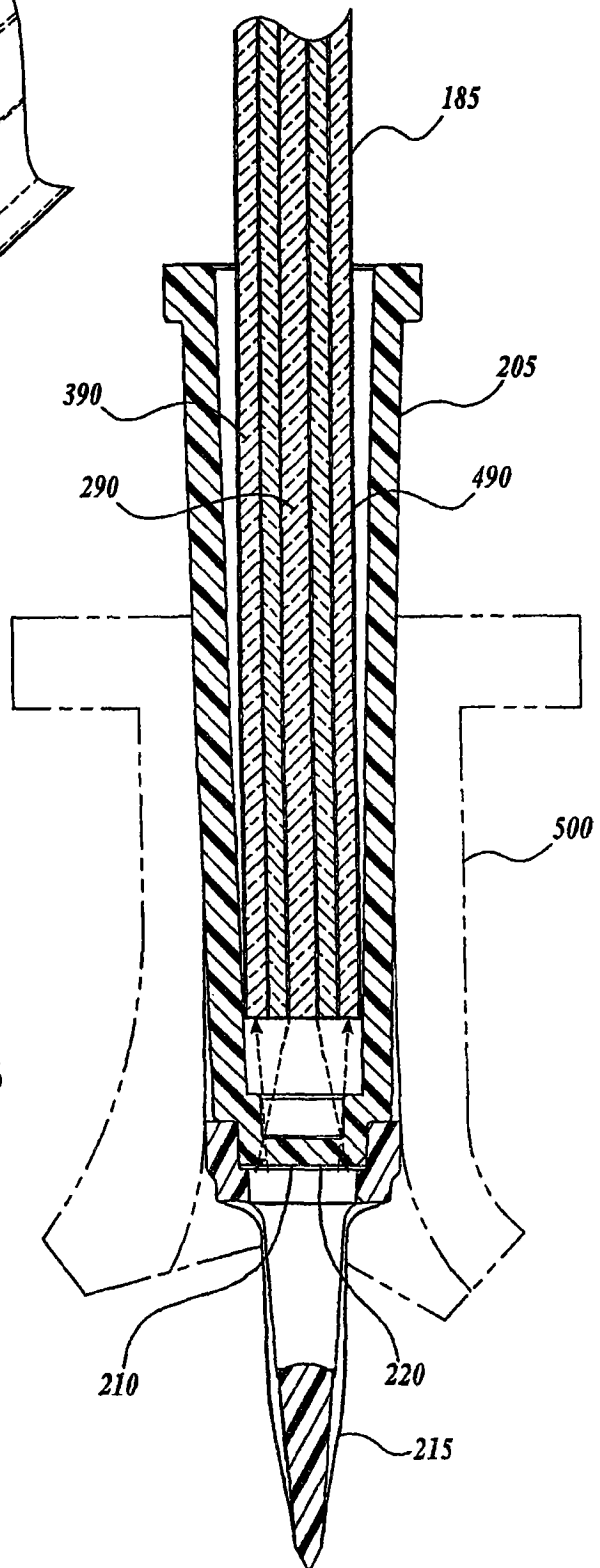


图 3

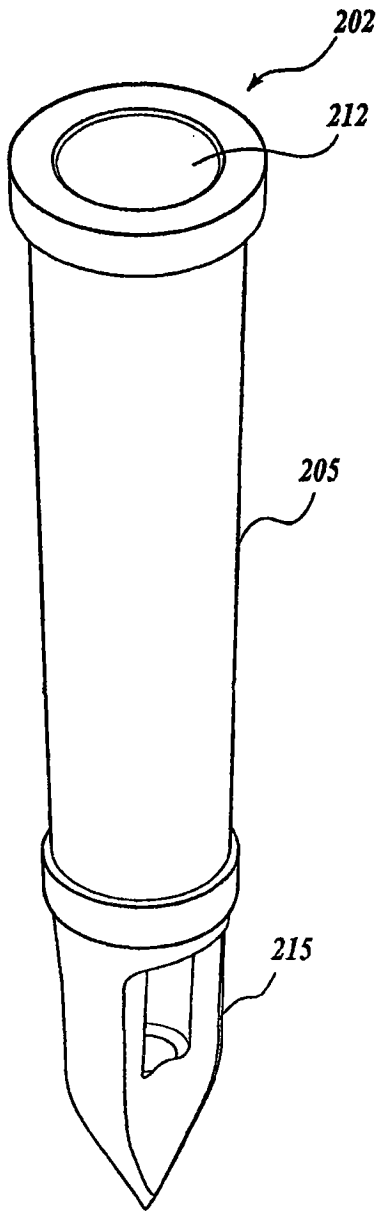


图 4A

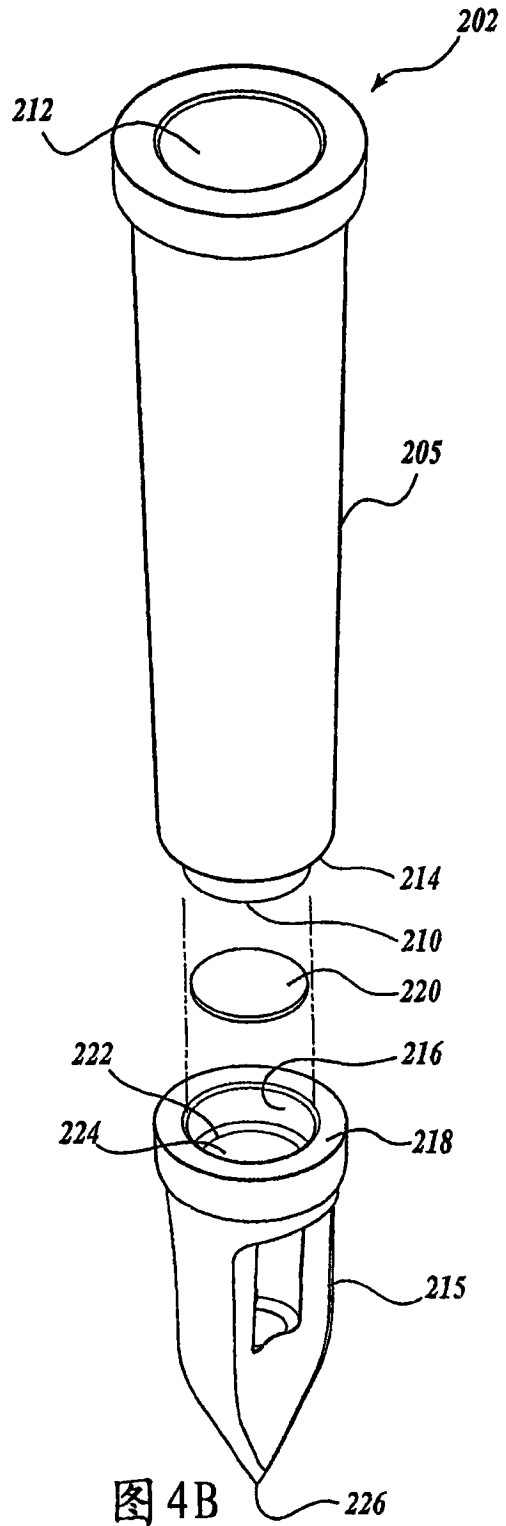


图 4B

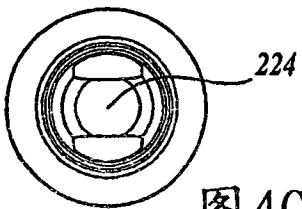


图 4C

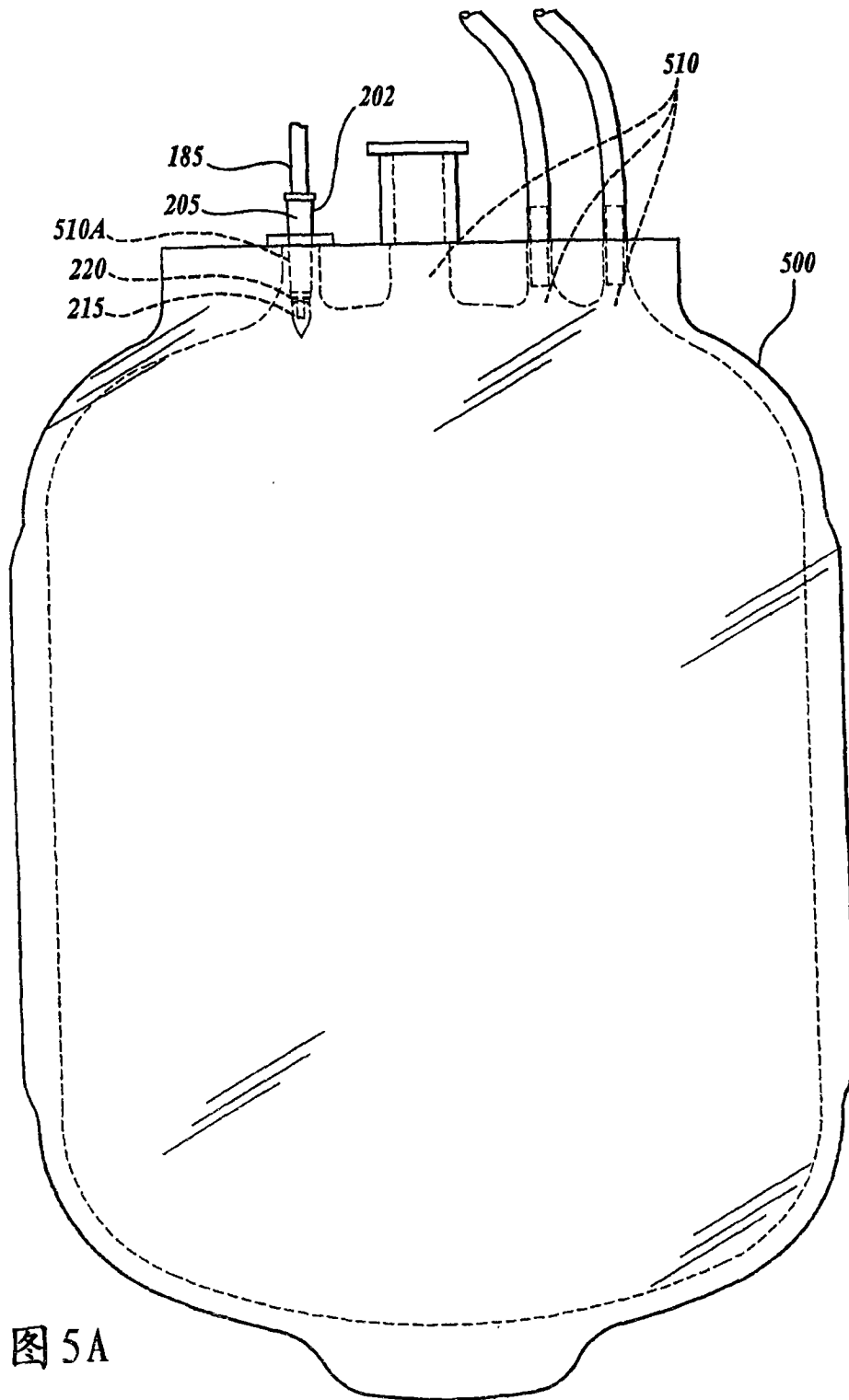


图 5A

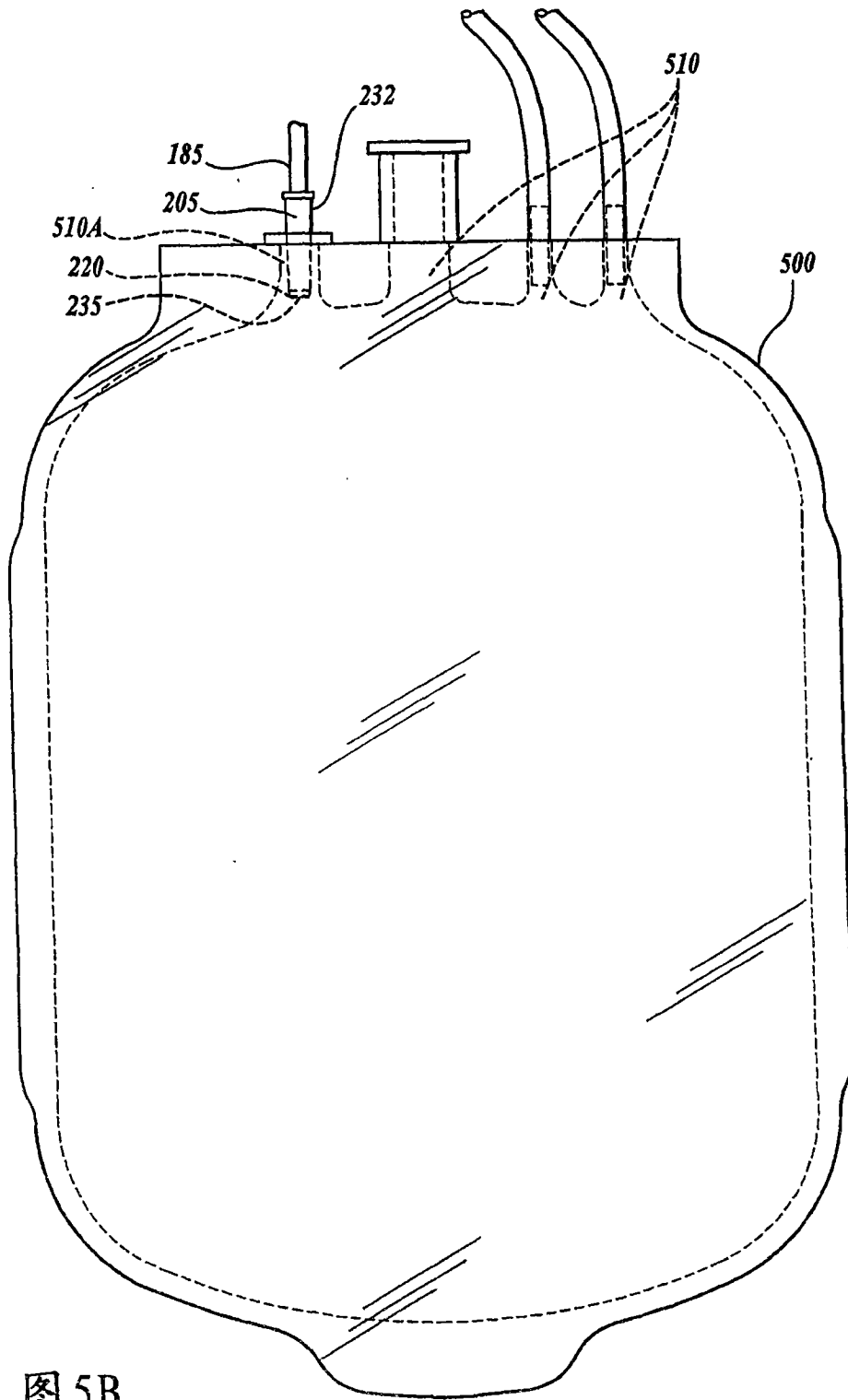


图 5B

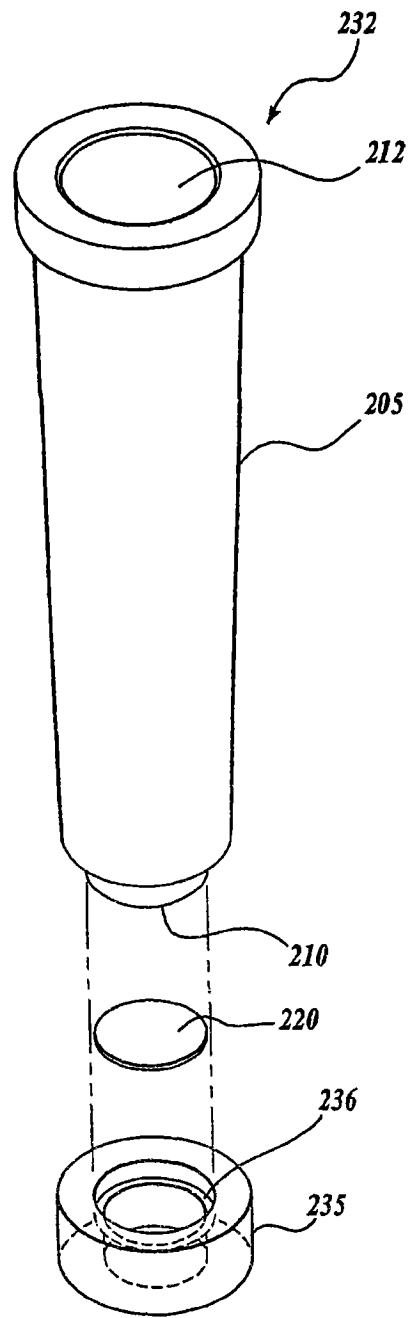


图 6

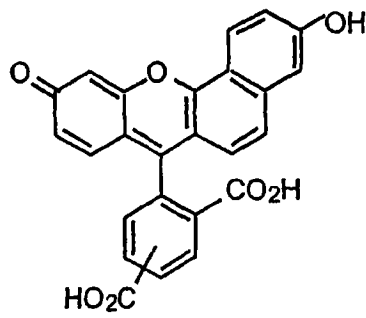


图 7A SNAFL-1

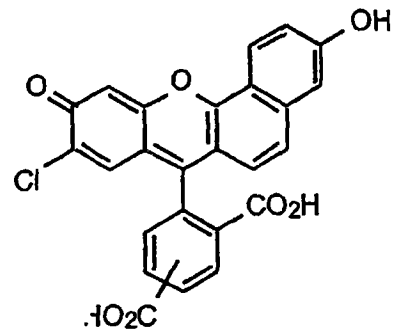


图 7B SNAFL-2

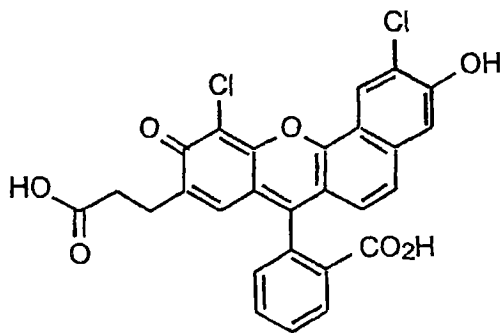


图 7C EBIO-1

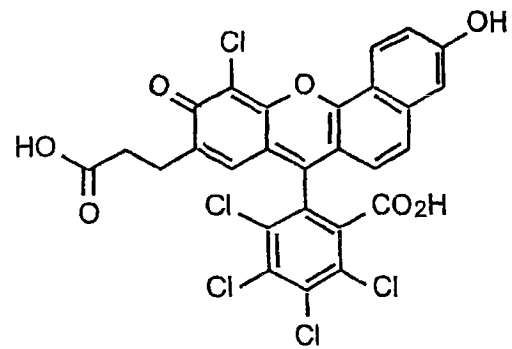


图 7D

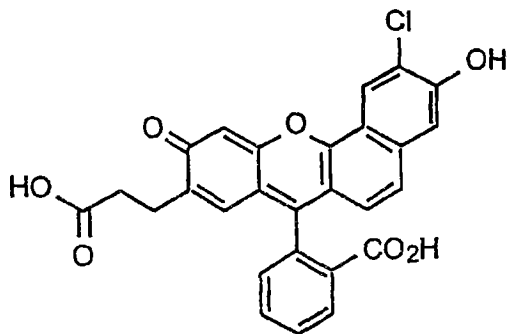


图 7E

EBIO-3

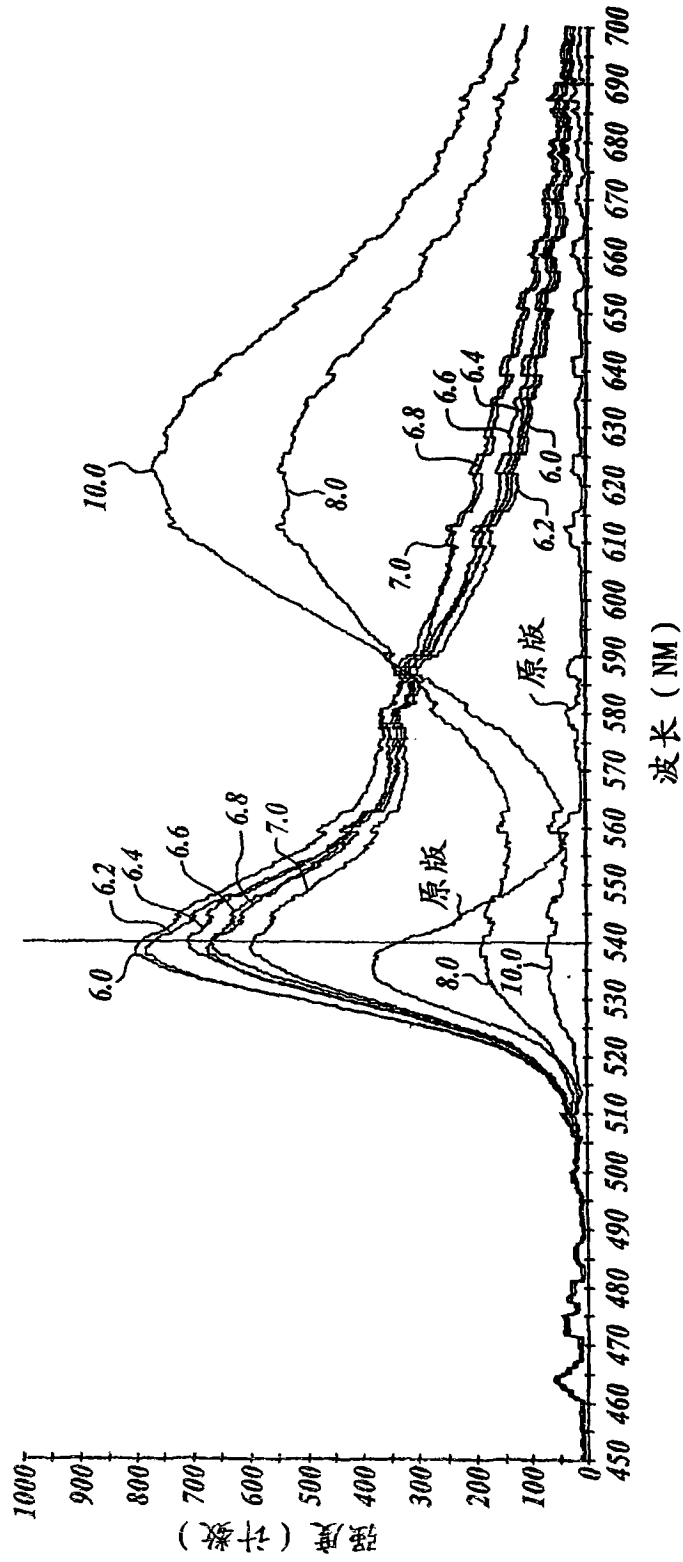


图8

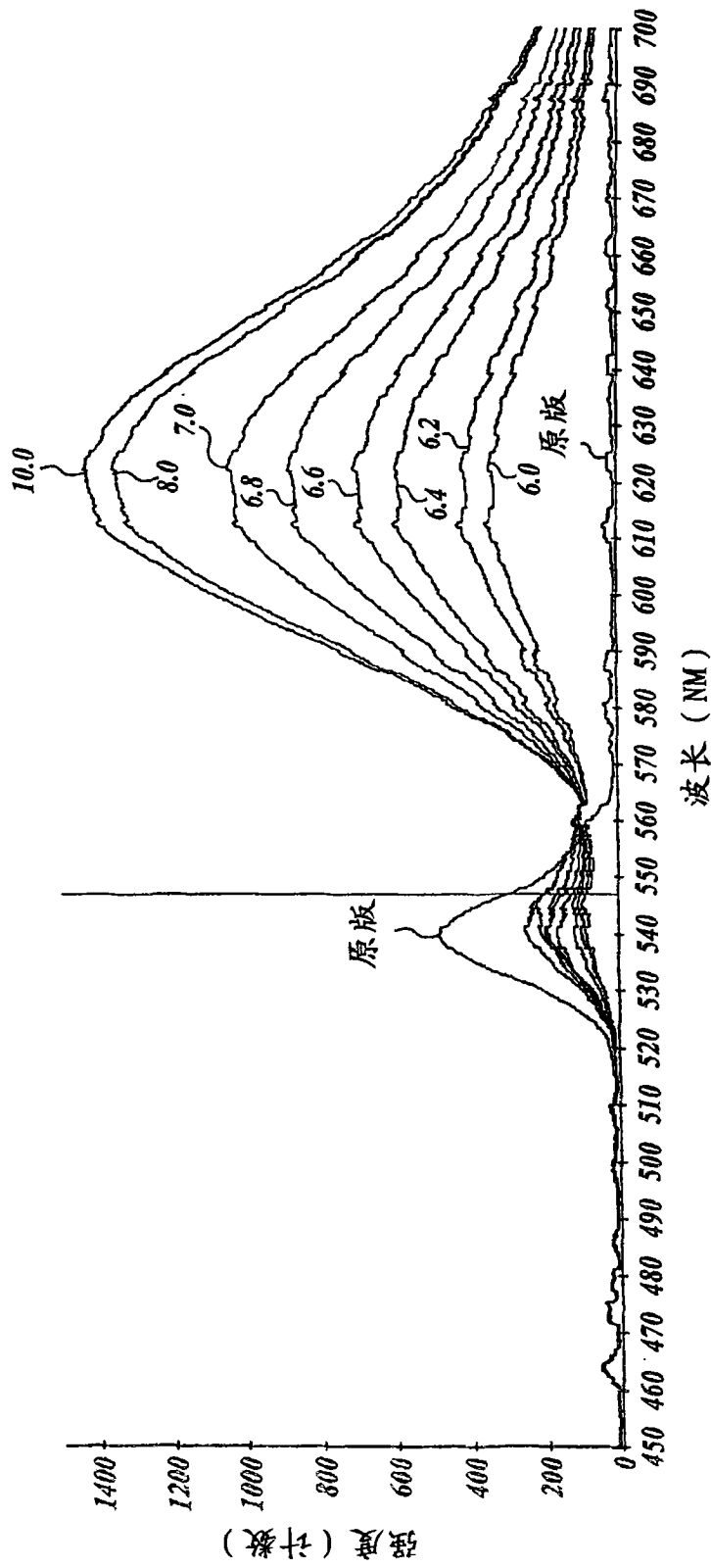


图9

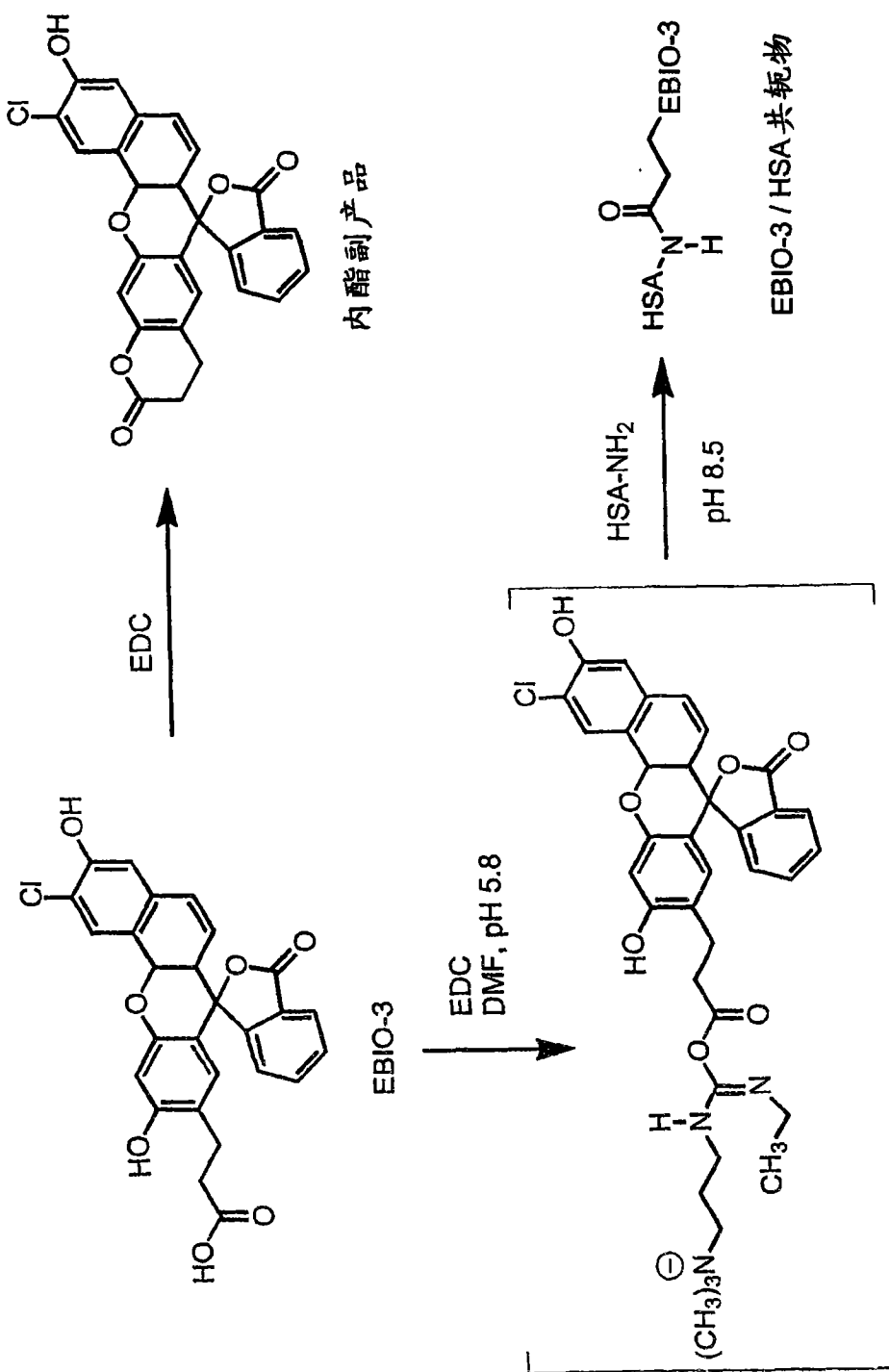


图 10

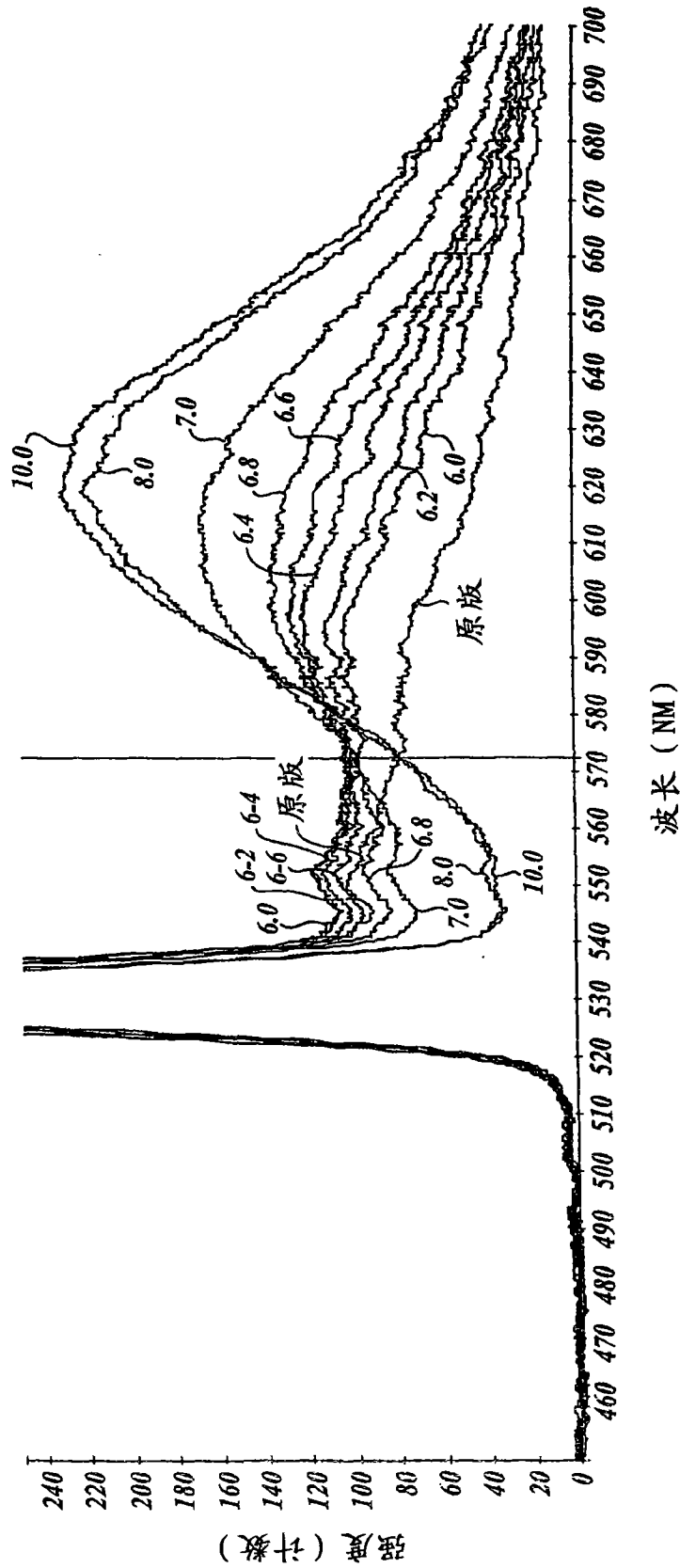
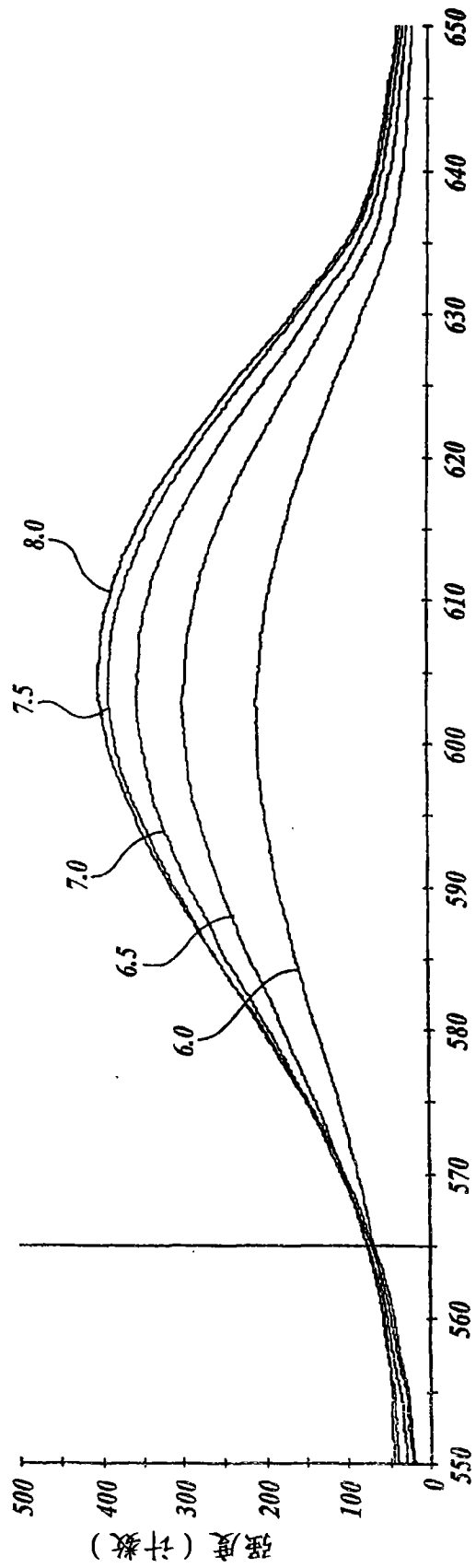


图11



波长 (nm)

图12

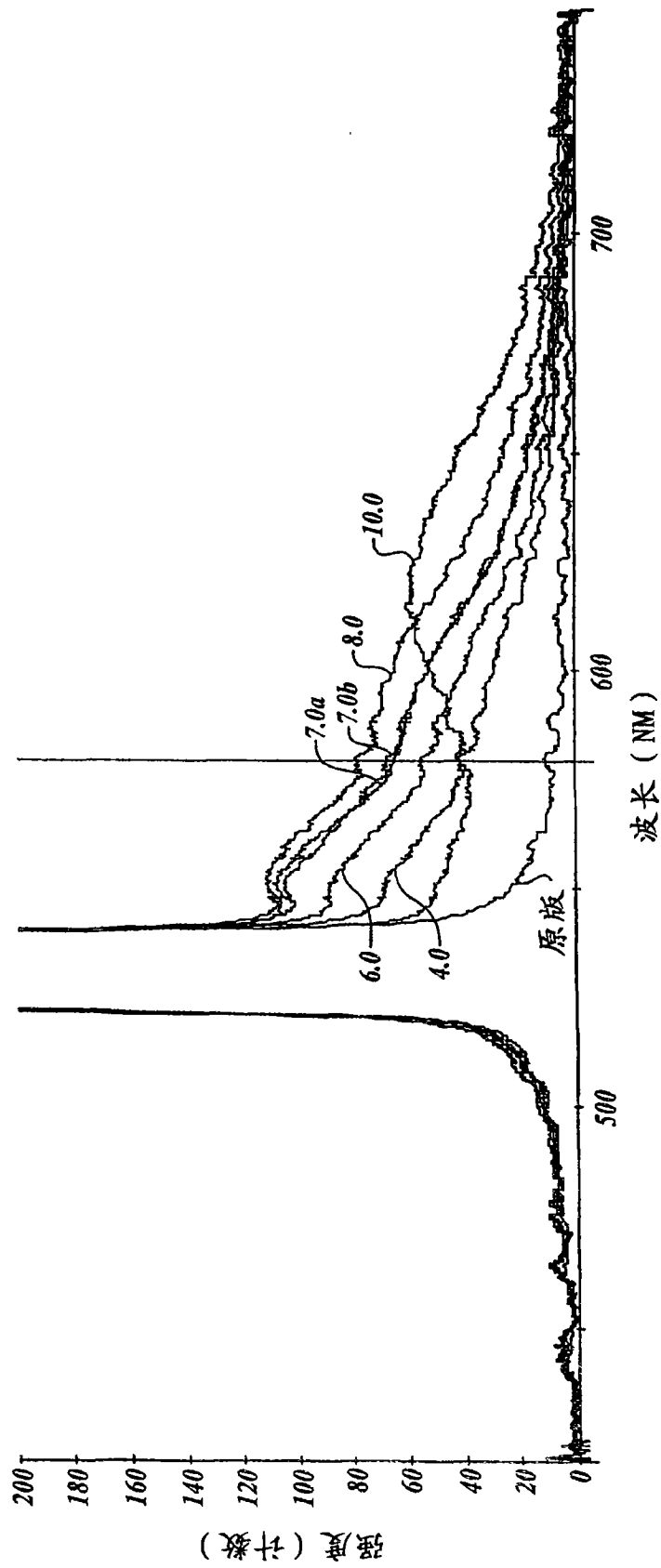


图13

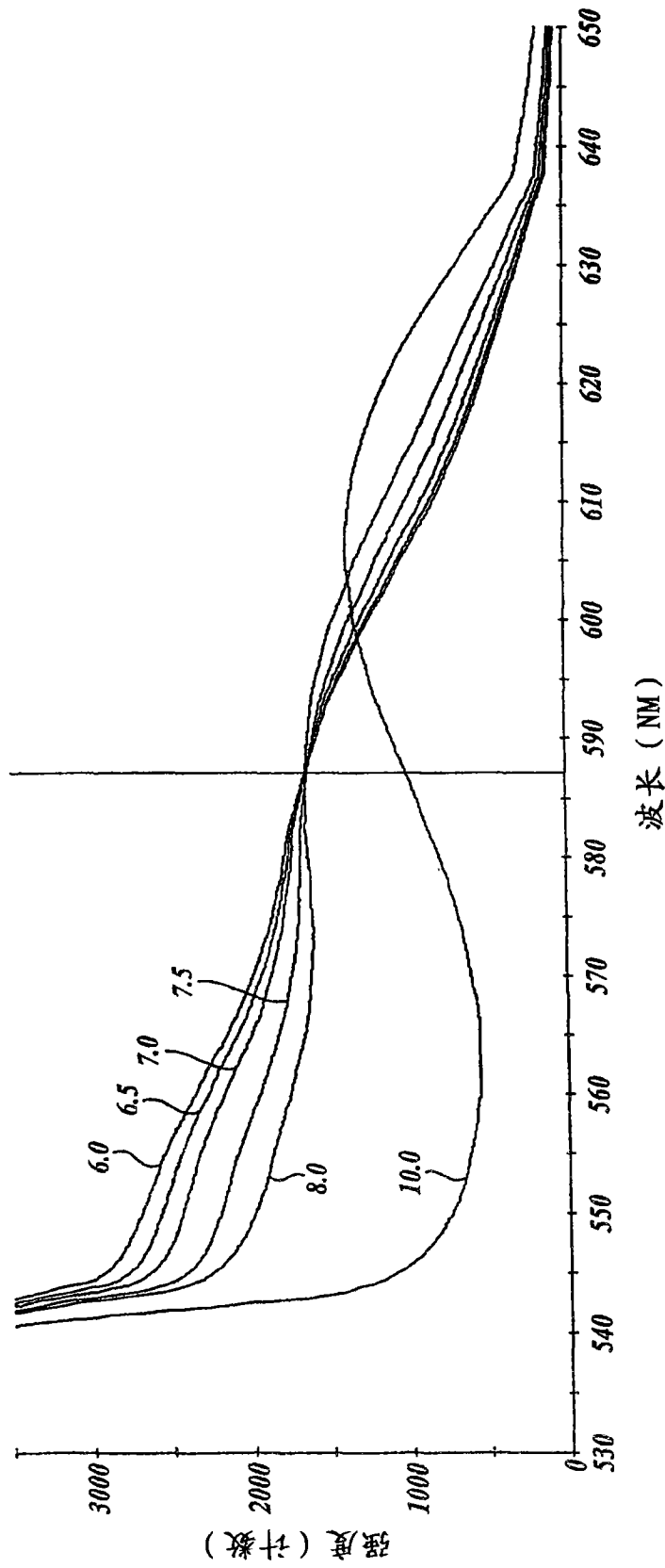


图14

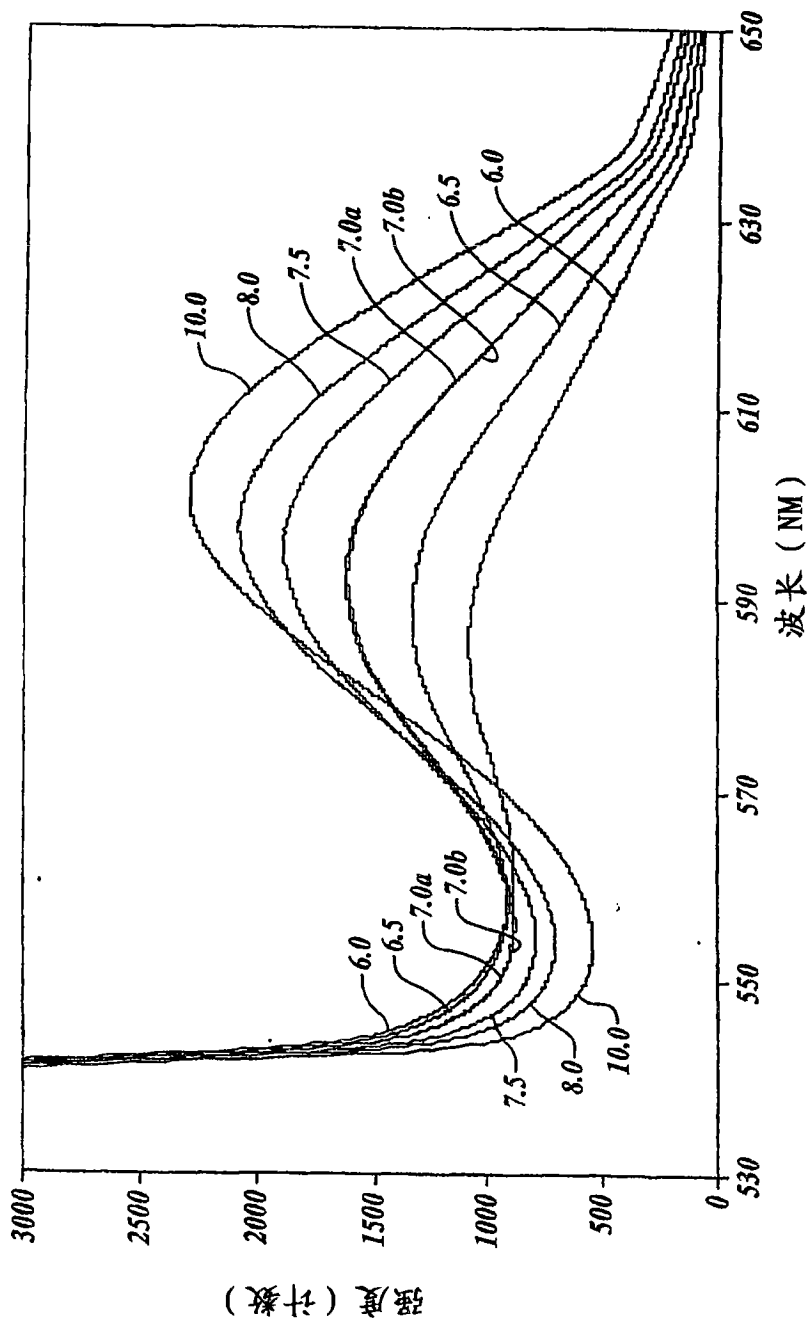


图15

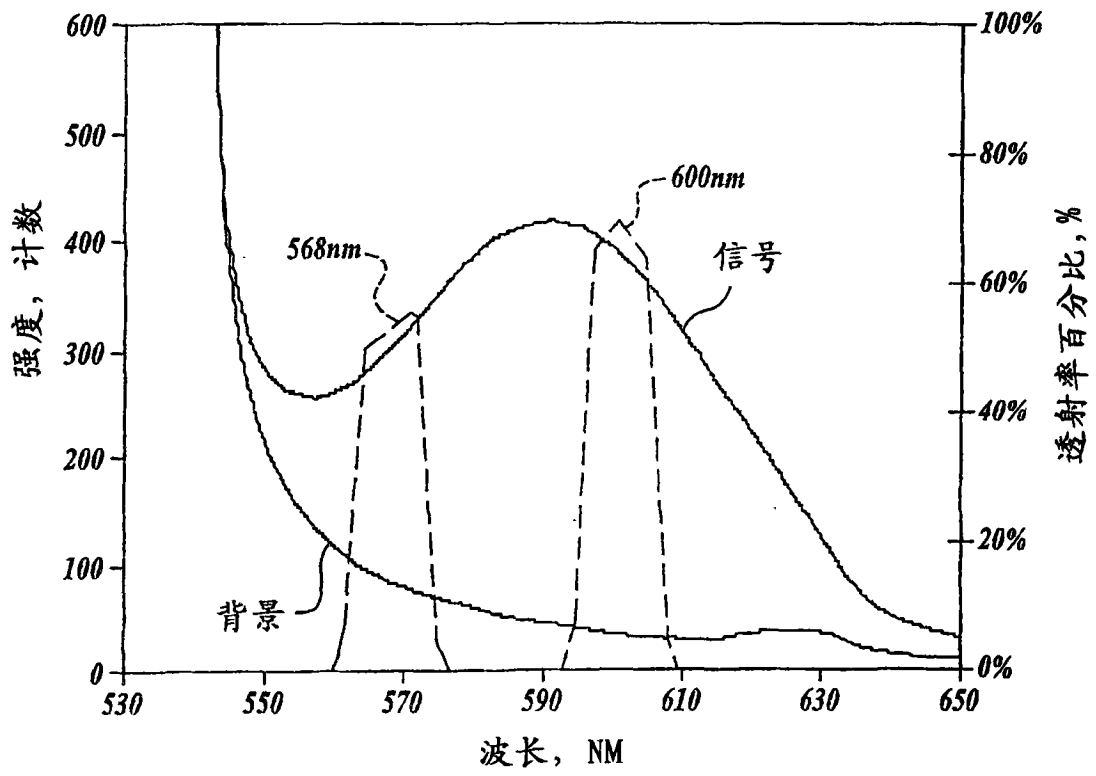


图16

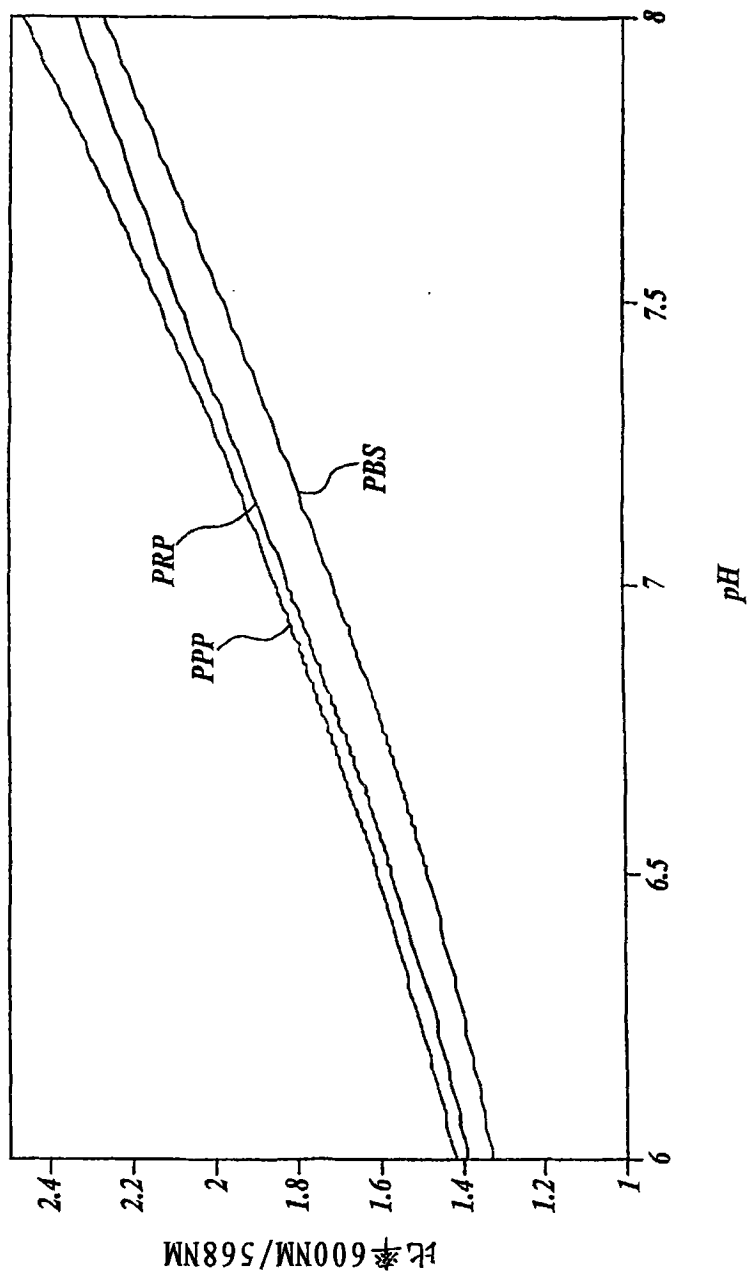


图17

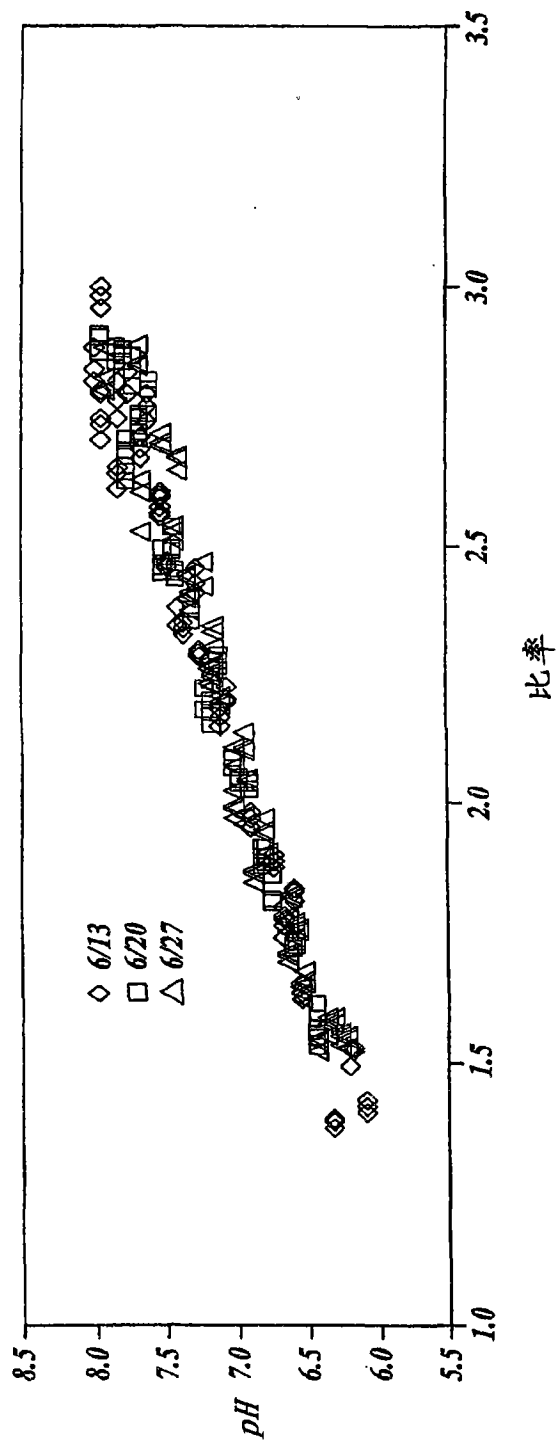


图18

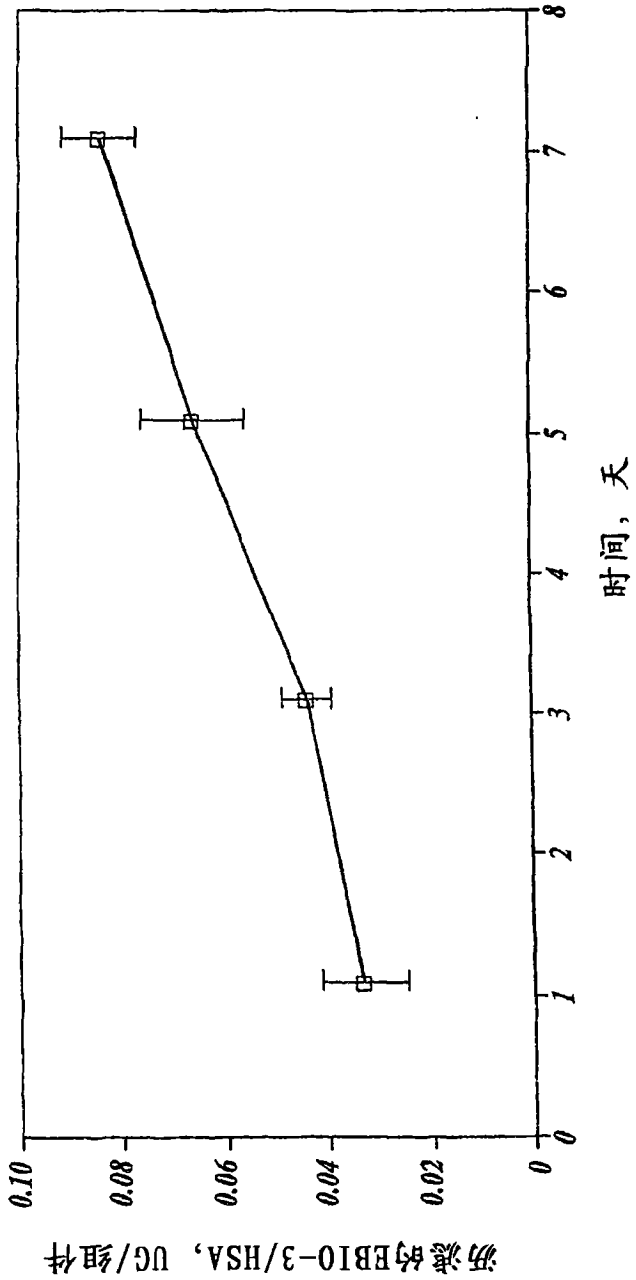


图19

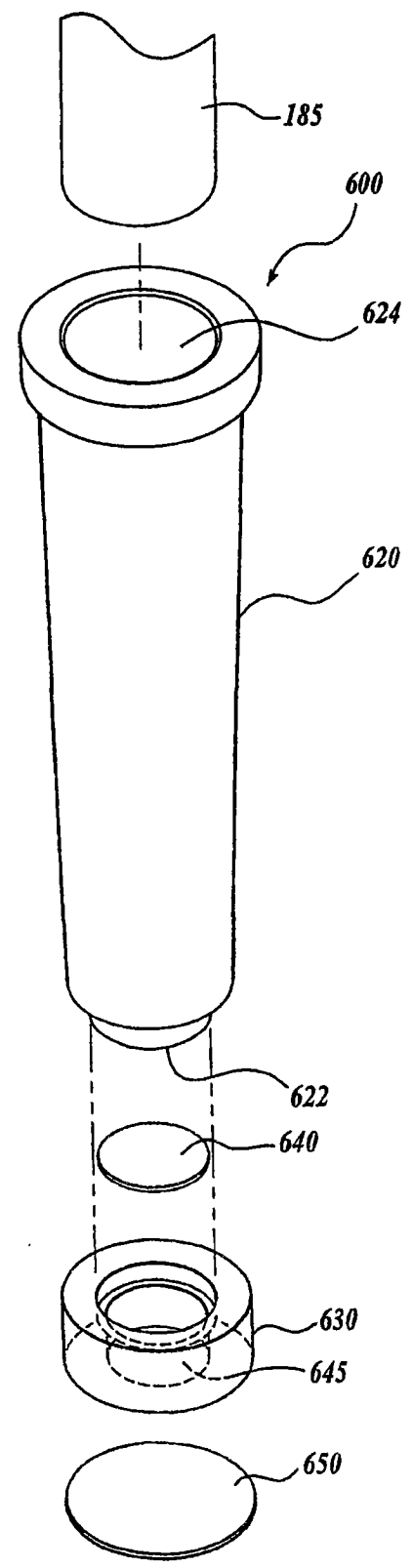


图 20

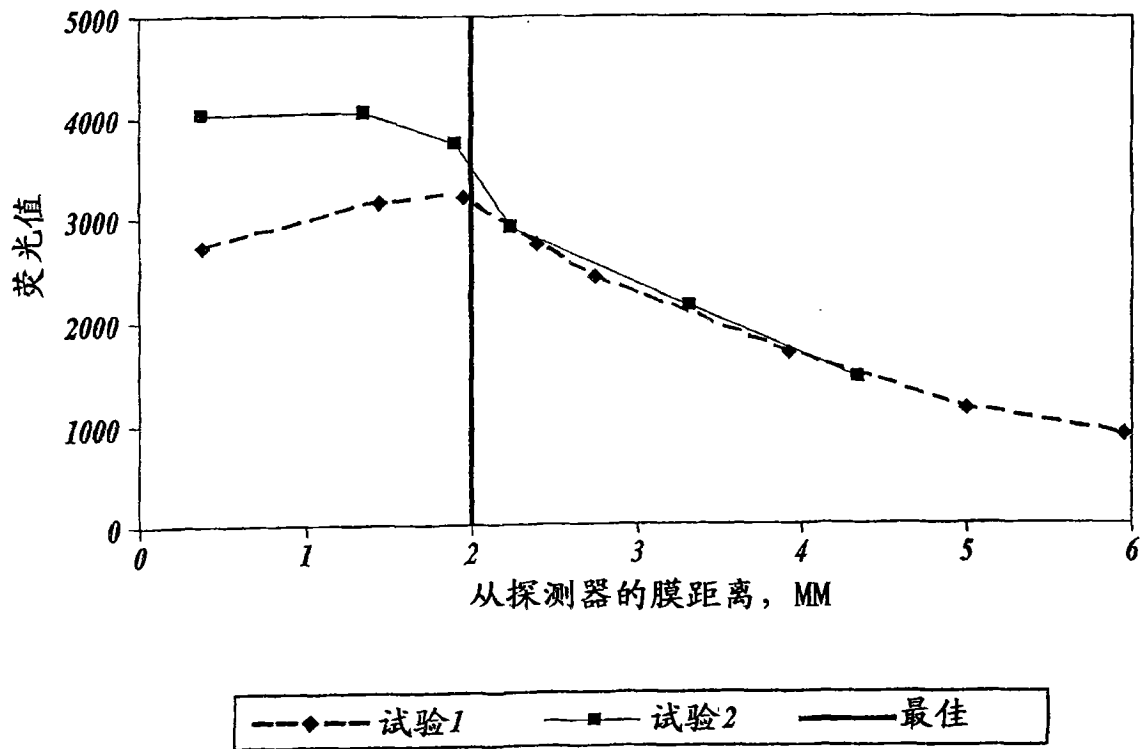


图21

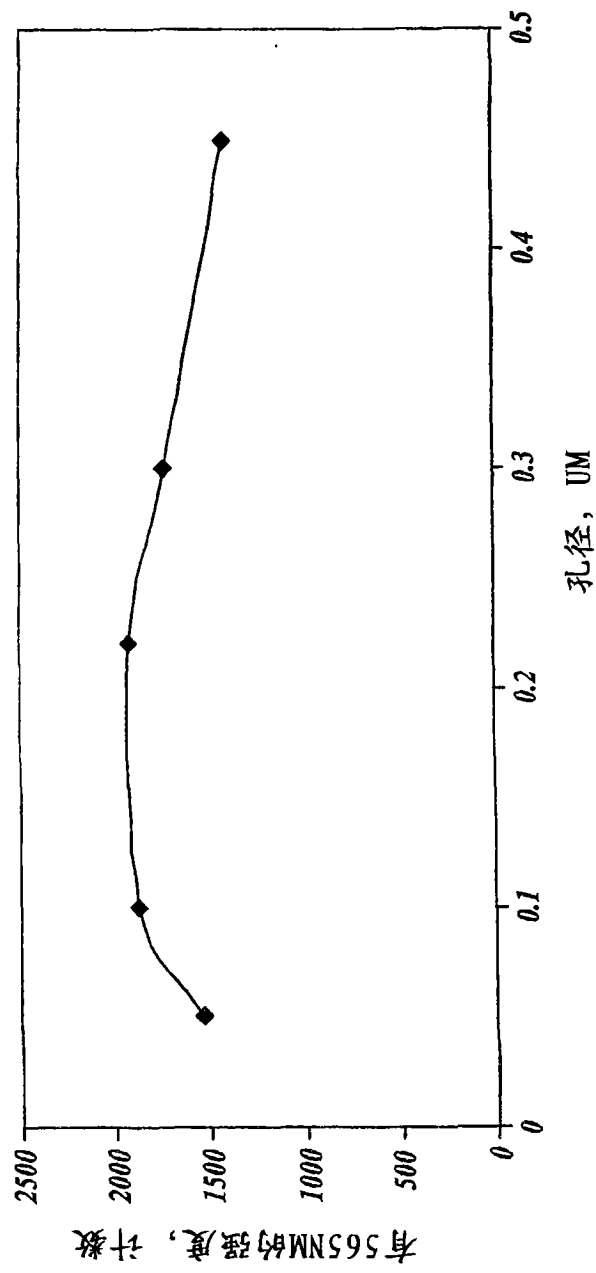


图22