

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 21/43 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99803956. X

[45] 授权公告日 2006 年 1 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1237338C

[22] 申请日 1999. 11. 12 [21] 申请号 99803956. X

[30] 优先权

[32] 1998. 11. 13 [33] US [31] 60/108414

[32] 1999. 7. 2 [33] US [31] 60/142207

[86] 国际申请 PCT/US1999/026981 1999. 11. 12

[87] 国际公布 WO2000/029830 英 2000. 5. 25

[85] 进入国家阶段日期 2000. 9. 13

[71] 专利权人 莱卡微系统公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 T·E·赖安 M·J·拜尼

审查员 宋海峰

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 杨丽琴

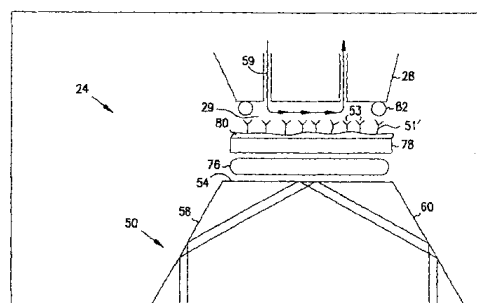
权利要求书 8 页 说明书 26 页 附图 27 页

[54] 发明名称

折射计和用于定性及定量测量的方法

[57] 摘要

公开了一种传感器设备和相关的方法，用于检测和监视分析物和固定的粘合层的特定粘合。该设备最好包括自动临界角折射率计(22)，它具有线性扫描阵列和用于照射一部分线性扫描阵列的光学系统，这种照射取决于淀积在透光元件上的粘合层的折射率。该设备进一步包括流动室(28)，用于使分析物和粘合层(51)接触。本发明的优选检测方法一般来说包括：提供临界角折射计以产生击中固定的粘合层的光，使粘合层与接触相(59)接触，测量全反射的临界角，这个测量值表示在分析物和粘合层之间的相互作用是否存在。



1、一种利用临界角折射测量原理检测在粘合层上是否存在分析物的方法，该方法包括：

提供第一透光元件和第二透光元件，该第一透光元件的折射率大于第二透光元件的折射率，该第二透光元件上具有粘合层；

提供接触相；

使接触相与第二透光元件上的粘合层接触；

让光穿过第一和第二透光元件，使光击中第二透光元件和粘合层之间的界面上；和

探测在检测元件上的亮区和暗区之间的边界的位置，该边界的位置表示在粘合层上是否存在配位体。

2、权利要求1的方法，进一步包括：提供接触层，它将第一透光元件耦合到第二透光元件。

3、权利要求1的方法，进一步包括：提供测试设备，该测试设备的设计使其可以容纳第二透光元件和接触粘合层的接触相，安置该测试设备，以使光可以击中第二透光材料和粘合层之间的界面。

4、权利要求1的方法，其中所述接触相是液体。

5、权利要求1的方法，其中所述第二透光元件选自玻璃和塑料。

6、权利要求1的方法，其中所述粘合层选自羧甲基葡聚糖、醛激活葡聚糖、酰肼激活葡聚糖、硅烷表面、硅烷化表面、硅烷、抗生物素蛋白、链亲和素、中性抗生物素蛋白、生物素基、双官能间隔基的臂、自动成型的单层和类脂。

7、权利要求1的方法，其中提供包含分析物的接触相，包括从下述中选择分析物：抗原、蛋白质、糖蛋白、维生素、微生物、包括细菌和细菌碎片的微生物块、病毒、病毒物质块、类脂、碳水化合物、毒素、DNA、RNA、DNA和RNA的类似物、致病的有机分子、抗细菌和抗病毒的有机分子以及它们的类似物、治疗用的试剂和药品。

8、一种利用临界角折射测量原理检测第一透明材料上的粘合层是否存在分析物的方法，该方法包括：

提供第一透光材料，该第一透光材料的光密度大于粘合层的光

密度;

用接触相接触粘合层;

让光沿光路穿过第一透光材料,以使光击中粘合层和第一透光材料之间的界面上;

检测在沿光路设置的检测元件上的亮区和暗区之间的边界的位置; 和

利用边界的位置确定在粘合层上是否存在分析物。

9、权利要求 8 的方法,其中所述透光材料选自玻璃和塑料。

10、权利要求 8 的方法,其中所述分析物选自抗原、蛋白质、糖蛋白、维生素、微生物、包括细菌和细菌碎片的微生物块、病毒、病毒物质块、类脂、碳水化合物、毒素、DNA、RNA、DNA 和 RNA 的类似物、致病的有机分子、抗细菌和抗病毒的有机分子以及它们的类似物、治疗用的试剂和药品。

11、权利要求 8 的方法,其中所述亮区是由从界面反射的并且照射到检测元件的光的第一部分形成,所述暗区是由进入接触相中并未照射检测元件的光的第二部分形成的。

12、一种检测在粘合层上是否存在分析物的方法,该方法包括:

在粘合层和透光元件之间提供界面,该界面沿光路定位,该粘合层和透光元件具有不同的光密度,足够全内反射击中所述界面的光;

用接触相接触粘合层;

用沿光路传播的光照射界面,使得从界面全内反射的一部分光从界面传播到沿光路设置的检测元件,并且照射检测元件以便在检测元件上形成亮区; 和

检测在检测元件上的亮区和暗区之间的边界的位置,该边界的位置表示在粘合层上是否存在分析物。

13、权利要求 12 的方法,进一步包括:让光先通过透光元件再照射界面。

14、权利要求 13 的方法,进一步包括:让光先通过透光材料再通过透光元件。

15、权利要求 12 的方法,其中所述分析物通过粘合到在粘合层

中固定的配位体而改变光学密度。

16、权利要求 12 的方法，其中所述粘合层选自羧甲基葡聚糖、醛激活葡聚糖、酰肼激活葡聚糖、硅烷表面、硅烷化表面、硅烷、抗生物素蛋白、链亲和素、中性抗生物素蛋白、生物素基、双官能间隔基的臂、自动成型的单层和类脂。

17、权利要求 12 的方法，其中所述在界面和检测元件之间传播的部分光包括从界面反射的光。

18、权利要求 12 的方法，其中所述在界面和检测元件之间传播的部分光包括穿过界面的光。

19、一种检测在粘合层上是否存在分析物的方法，该方法包括：

在第一介质和第二介质之间提供第一界面，在第二介质和第三介质之间提供第二界面，在第三介质和粘合层之间提供第三界面，第一、第二、第三介质和粘合层具有的光密度足以使光可通过第一、第二、和第三界面传播，在第三界面上产生全内反射并向传感器传播；

用接触相接触粘合层；

让光穿过第一界面和第二界面，以使光击中第三界面；和

探测在检测元件上的亮区和暗区之间的边界的位置，该边界的位置表示在粘合层上是否存在配位体。

20、权利要求 19 的方法，其中所述提供第一、第二、第三界面包括提供第一介质、第二介质、第三介质、和粘合层，它们的光密度从第一介质到粘合层依次递减。

21、权利要求 19 的方法，其中所述第二介质是液体。

22、权利要求 19 的方法，其中所述第三介质选自玻璃和塑料。

23、一种检测在粘合层上是否存在分析物的方法，该方法包括：提供由光源产生的光束；

在粘合层和透光元件之间提供界面，该粘合层和透光元件具有的光密度足以使击中这个界面的光全内反射；

用接触相接触粘合层；

照射界面，使光束以预定的入射角击中界面；

提供传感器，该传感器定位在可使传感器检测到在界面上的全

内反射光的位置；和

通过传感器检测光是否存在，光存在与否表示在粘合层上是否存在分析物。

24、权利要求 23 的方法，进一步包括：先让光束穿过透光元件，然后再照射界面。

25、权利要求 23 的方法，进一步包括：改变预定的入射角，以使传感器能够检测到检测光和非检测光之间的变化。

26、权利要求 25 的方法，进一步包括：通过移动或转动光源改变预定的入射角。

27、权利要求 25 的方法，进一步包括：通过移动或转动透光元件改变预定的入射角。

28、权利要求 24 的方法，进一步包括：提供多个光源，以便能够通过用来自不同光源的光束照射界面实现入射角的改变。

29、权利要求 24 的方法，其中所述传感器包括多个检测元件。

30、权利要求 28 的方法，其中所述传感器包括多个检测元件。

31、一种检测在粘合层上的分析物的方法，该方法包括：

提供透光元件，该透光元件的光密度不同于粘合层的光密度，透光元件包括位于粘合层和透光元件之间的界面；

提供光源，该光源产生沿光路传播的准直光束，该光路包括光源、界面和检测元件；

用接触相接触粘合层；

向界面引导光束，使光束以预定的入射角击中界面；和

检测在检测元件上的光是否存在，以便确定在接触相中分析物的不存在。

32、权利要求 31 的方法，其中所述光源是 LED。

33、权利要求 31 的方法，其中由在界面上反射的一部分光形成在检测元件上检测的光。

34、权利要求 31 的方法，其中由透过界面发射的一部分光形成在检测元件上检测的光。

35、一种利用临界角折射测量原理确定在粘合层上是否存在分析物的方法，所说的粘合层淀积在透光元件上，该方法包括：

提供界定光路的临界角折射计;

沿光路将光引导到粘合层和透光元件之间的界面处;

使分析物接触粘合层; 和

按折射测量原理检测粘合层的光密度变化, 并且使该光密度变化和在粘合层上是否存在分析物相关联。

36、权利要求 35 的方法, 进一步包括; 重复进行粘合层光密度变化的折射方式检测, 以便监视随时间的分析物和粘合层之间的相互作用。

37、权利要求 35 的方法, 其中所述使分析物与粘合层的接触包括使粘合层与包含分析物的接触相接触。

38、权利要求 37 的方法, 其中所述接触相是液体。

39、权利要求 35 的方法, 其中所述透光元件选自玻璃和塑料。

40、权利要求 35 的方法, 其特征在于: 粘合层选自羧甲基葡聚糖、醛激活葡聚糖、酰肼激活葡聚糖、硅烷表面、硅烷化表面、硅烷、抗生物素蛋白、链亲和素、中性抗生物素蛋白、生物素基、双官能间隔基的臂、自动成型的单层和类脂。

41、权利要求 35 的方法, 其中所述光密度的变化是由分析物和粘合层之间的相互作用引起的。

42、权利要求 35 的方法, 其中所述分析物选自抗原、蛋白质、糖蛋白、维生素、微生物、包括细菌和细菌碎片的微生物块、病毒、病毒物质块、类脂、碳水化合物、毒素、DNA、RNA、DNA 和 RNA 的类似物、致病的有机分子、抗细菌和抗病毒的有机分子以及它们的类似物、治疗用的试剂和药品。

43、一种利用临界角折射测量原理检测在粘合层上是否存在分析物的设备, 该分析物对于粘合层有亲合力, 该设备包括:

第一透光元件和第二透光元件, 该第一透光元件的折射率大于第二透光元件的折射率,

淀积在第二透光元件上的粘合层, 该粘合层的折射率小于第二透光元件的折射率;

接触粘合层的接触相;

穿过第一和第二透光元件的光束, 使光击中第二透光元件和粘

合层之间的界面；和

传感器，检测在传感器上的亮区和暗区之间的边界的位置，传感器设置在能检测传播自界面的光的位置；

第一透光元件支撑第二透光元件。

44、权利要求 43 的设备，其中所述接触相包含与粘合层相互作用的分析物。

45、权利要求 43 的设备，其中所述亮区是由向传感器的反射自界面的光束形成，所述暗区是由折射进入粘合层内的光形成的。

46、权利要求 43 的设备，进一步包括透光层，该透光层设在第一透光元件和第二透光元件之间。

47、权利要求 43 的设备，其中所述粘合层选自羧甲基葡聚糖、醛激活葡聚糖、酰肼激活葡聚糖、硅烷表面、硅烷化表面、硅烷、抗生物素蛋白、链亲和素、中性抗生物素蛋白、生物素基、双官能间隔基的臂、自动成型的单层和类脂。

48、权利要求 43 的设备，进一步包括支撑结构，以容纳第二透光元件和包含粘合层的接触相，所说的支撑结构的位置使光束能够击中第二透光材料和粘合层之间的界面。

49、权利要求 43 的设备，其中所述接触相是液体。

50、权利要求 43 的设备，其中所述第二透光元件选自玻璃和塑料。

51、权利要求 43 的设备，其中所述分析物选自抗原、蛋白质、糖蛋白、维生素、微生物、包括细菌和细菌碎片的微生物块、病毒、病毒物质块、类脂、碳水化合物、毒素、DNA、RNA、DNA 和 RNA 的类似物、致病的有机分子、抗细菌和抗病毒的有机分子以及它们的类似物、治疗用的试剂和药品。

52、一种用于确定接触相中是否存在分析物的系统，该系统包括：

临界角折射计，以界定击中透光元件和粘合层之间的界面的光束的光路，所述粘合层设在透光元件上，并且对分析物有亲合力；

接触粘合层的接触相；和

检测传感器上的亮区和暗区之间的边界的传感器。

53、权利要求 52 的系统，进一步包括测试设备，用于容纳透光元件。

54、权利要求 53 的系统，其中所述测试设备包括使接触相接触粘合层的装置。

55、权利要求 52 的系统，其中所述接触相包含与粘合层相互作用的分析物。

56、权利要求 52 的系统，其中所述粘合层选自羧甲基葡聚糖、醛激活葡聚糖、酰肼激活葡聚糖、硅烷表面、硅烷化表面、硅烷、抗生物素蛋白、链亲和素、中性抗生物素蛋白、生物素基、双官能间隔基的臂、自动成型的单层和类脂。

57、权利要求 52 的系统，其特征在于：临界角折射计包括外壳，所述传感器设在外壳内。

58、一种用于检测接触相中是否存在分析物的系统，该系统包括：

透光元件，其上设有粘合层，该粘合层对于分析物有亲合力；

临界角折射计，以界定击中透光元件和粘合层之间的界面的准直光束的光路；

接触粘合层的接触相；和

沿光路设置的传感器，以便通过检测沿光路行进的光来检测粘合层的光密度变化。

59、权利要求 58 的系统，进一步包括测试设备，用来使接触相接触粘合层。

60、权利要求 58 的系统，其中所述透光元件是易处置的载玻片。

61、权利要求 58 的系统，其中所述接触相是生物流体。

62、权利要求 58 的系统，其中所述临界角折射计包括沿光路设置的透光材料，以使光束可以穿过这种材料然后击中粘合层和透光元件之间的界面。

63、权利要求 58 的系统，其中所述临界角折射计包括光学系统，用于将光束引向所说的界面。

64、权利要求 58 的系统，其中所述光束以预定的入射角击中界

面。

65、权利要求 58 的系统，进一步包括：产生光束的光源。

66、权利要求 65 的系统，其中所述光束可以以各种角度引向界面。

67、权利要求 58 的系统，进一步包括多个光源，其每个光源都能以预定的入射角将光束引向界面。

68、权利要求 58 的系统，其中所述传感器包括多个检测元件。

折射计和用于定性及定量测量的方法

5

相关申请的交叉参考

本申请要求于1998年11月3日提交的美国临时专利申请60/108414和1999年7月2日提交的美国临时专利申请60/142207领域的优先权。

发明的领域

10 本发明一般来说涉及基于折射率的检测器件领域。具体来说，本发明涉及一种临界角折射计和用于检测和监视分析物和粘合层之间的相互作用的方法。

发明的背景

15 在各种类型的粘合层和分析物之间的相互作用的定性和定量分析对于范围宽大的科学和工业应用来说是很重要的。因此，已经开发出一些传感器，它们可以监测一个样品分析物具体粘合到固定在检测表面上的特定类型配位体的情况。这里的术语“配位体”意指一种类型的分子，这种分子对于另一种类型的分子表现出特定的粘合亲合力。这里的术语“固定的粘合层”、“粘合层”、或“检测层”意指由固定在一个检测表面上的配位体形成的一个层。术语“检测表面”意指20 在两种介质之间的界面，其中的一种介质就是粘合层。这里的术语“接触相”意指与粘合层接触的流体相。这里的术语“分析物”或“样品分析物”意指包含在接触相中的配位体。接触相中的分析物可能有、或可能没有对于特定粘合层的粘合亲合力。

25 例如，基于表面等离子体共振（SPR）现象的传感器是已知的，用来检测和测量包含检测层的样品分析物的折射率变化。SPR传感器经常用在下面的应用场合：表面和界面效应的研究、光谱学、差分反射率、免疫测定。SPR传感器基于如以下所述的原理：当用入射光束照射薄的金属层时，在某些情况下，光束能量可能激发金属膜的受照射表面上的自由电子。具体来说，光束将与表面电子共振，这种共振将30 导致产生大约在200纳米范围内延伸的电场。这种共振只在入射光束的一定入射角下发生，并且取决于定位在由所产生的电场影响的范围内的物质的折射率。分析物的粘合或离解、以及在传感器表面的固定

的粘合层将改变表面的局部折射率，并且产生共振入射角的移动，这个移动与粘合到固定的粘合层上的配位体的浓度（最大浓度为一个预定的限制浓度）成一定的比例关系。通过使用 SPR 对于检测表面的折射率变化进行电-光监测，有可能定性检测配位体以及各种粘合动力学和平衡状态的定量特征。

在图 1 中示意地表示 SPR 生物传感器的例子。SPR 生物传感器 2 包括棱镜 4，棱镜 4 有测试表面，表面上涂有薄的金属膜 6。将第一种类型的配位体 8 固定到金属膜 6 上，并且将分析物 10 引入在测试表面上方的接触相中。具有预定波长的光源 12 将入射光束 14 引向金属膜 6，并且安排光敏检测器 16 以监测反射光束 14' 的强度。在入射光束 14 的一定入射角 α 下，金属膜 6 内的电子（表面等离子体）的共振激发导致入射光束 14 的吸收，因此导致反射光束 14' 的能量损耗，这种情况可以在实验上观察到，如图 2 所示的，在由检测器 16 接收的光强中展现出一个尖锐的最小值。

虽然 SPR 传感器对于折射率变化表现出高的灵敏度，这使它们成为一个很有用的研究工具，但在一个金属层上固定一个粘合层却很困难并且受到限制。之所以困难是因为：固定技术必须把天然构象中的有均匀反应性和可利用取向的配位体结合到不允许有明显量的非特异性结合的金属表面上。在本领域中已经描述了一系列各种各样的固定技术，技术的选择取决于所涉及的特定的配位体。由于这些困难以及和 SPR 传感器的制造有关的其它困难，使这种传感器很昂贵。因此，期望提供一种能够测量由各种配位体之间的相互作用引起的折射率变化的较便宜的器件。

用于与折射率变化有关的灵敏定性测量的一种适宜的器件的一个例子是临界角折射计。临界角折射计的操作基于下面的原理。当光入射到分开两种介质的表面上时，光在两种介质之间的界面上折射，服从斯涅耳（Snell）定律：

$$n \sin I = n' \sin I'$$

其中： n 和 n' 是两种介质的折射率， I 和 I' 分别是入射角和折射角。光可能总是从一种折射率较低的介质传送到折射率较高的介质，因为在这种情况下角度 I' 小于角度 I 。然而，在光束从光密介质（具有较高的折射率 n ）传送到光疏介质（具有较低的折射率 n' ）时，折射角 I' 总

是大于入射角 I 。随着入射角 I 的增加, 折射角 I' 以较快的速率增加。
当 $\sin I = n' / n$ 时, $\sin I' = 1.0$, 折射角 $I' = 90$ 度。这样的入射角叫作临界角。当满足临界角条件时, 没有任何一点光会传播到光疏介质中。
当入射角大于临界角时, 光反射回到光密介质中, 这种现象称之为全
5 内反射 (T.I.R)。如果两种介质的分开的边界是光滑的和干净的, 则
100% 的入射光反射回去。可以使用这种临界角现象测量各种流体或固
体材料的折射率。

图 3a 描述了一种临界角折射计, 它由标号 22 总体表示之。所示的
折射率计 22 包括外壳 32, 所说的外壳 32 有倾斜的上表面部分 34 和与
10 其邻接的水平上表面部分 36, 所示的折射率计 22 还包括位于倾斜的
上表面部分 34 的 LCD 显示器 38 和键盘输入 40。测试装置 24 定位在
水平的上表面部分 36 上。折射率计 22 类似于可以从 Leica Microsystems
Inc 得到的 Leica AR600 自动折射率计。Leica AR600 自动折射率计大
体上是按照公有的美国专利 No.4640616 (1987 年 2 月 3 日, 题目为“自
15 动折射率计”) 的公开内容制造的。这里参照引用了美国专利 No. 4640616
的全部公开内容。

图 4 的示意图表示的是折射率计 22 的光电测量系统, 它是基于上
述的临界角折射计的原理。这个系统包括光敏线性扫描阵列 (LSA) 44,
用于提供随入射在它上面的光的数量和位置而变化的输出信号。线性
20 扫描阵列 44 包括多个相互靠的很近的并且相互排齐的光电管 46。这个
测量系统包括光学系统, 用于把光引向线性扫描阵列 44, 其中的照射
LSA 的光的数量和位置取决于测试样品 51 的折射率。如图 4 所示, 光
学系统包括光源 48 和棱镜 50, 以接受从光源 48 沿光路 57 来的光。棱
镜 50 包括用于接纳测试样品 51 的上表面 54 和与上表面 54 平行的下
25 表面 56, 通过下表面 54 光可以进、出棱镜, 并且包括一对内反射侧表
面 58 和 60, 所说的侧表面 58 和 60 与所说的下表面 56 一起界定了锐
角的夹角。在上表面 54 上设有温度传感器 52 以读出样品温度, 用于
温度补偿目的。

来自于光源 48 的光依次经过漫射体 62、偏振片 64、和准直透镜 66。
30 离开准直透镜 66 的平行光进入干涉滤光片 68, 干涉滤光片 68 发出波
长为 589nm 的基本上的单色光。安排会聚透镜 70, 以接收干涉滤光片
68 发出的光并且将光集中在反光镜 72 的方向。反光镜 72 的取向应使

反射光通过棱镜 50 的下表面 56。所说的光再经侧表面 58 全内反射，以击中上表面 54。以小于临界角的角度入射在上表面 54 上的光的第一部分（未示出）被折射进样品 51 内。以大于临界角的角度入射在上表面 54 上的光的第二部分 55 从上表面 54 全内反射。光的第二部分 55 然后通过侧表面 60 内反射，并经下表面 56 离开棱镜 50。光的第二部分 55 在通过透镜 73 后，经反光镜 74 改变方向，沿线性扫描阵列 44 的方向前进。因此，在 LSA44 上光的分布由照射区 47 和非照射区 47a 组成，其中所说的照射区 47 是由光的第二部分 55 形成的。在两个区 47 和 47a 之间的边界称之为阴影线，它在线性扫描阵列 44 上的位置取决于测试样品 51 的折射率。

在 Leica AR600 自动折射率计中，LSA 包含接近 2600 个单个的电荷耦合器件（CCD）元件，每个元件是一个 $11\text{ }\mu\text{m}^2$ 的正方形。每个 CCD（每个像素）都能够把击中它的光的强度转换成电压，随后再通过支持电路将此电压转换成在 0 和 255 之间的一个数字的数。每个 CCD 都产生一个数字强度数值，以此作为输出读数。在图 5a 中表示的是一个典型的曲线，说明来自裸棱镜的照射强度（空气的基准读数）随单元号的变化。通过按压键盘输入 40 的“启动”键，可以得到图 5a 中的空气的基准读数，从而得到基准曲线 100，它相当于在没有样品放在棱镜 50 的上表面 54 上的条件下线性扫描阵列 44 的照射分布。当把样品放在棱镜上时，通过样品发出的光的第一部分，光的第二部分 55 被反射到 LSA，照射它的一部分，于是在 LSA 上形成一个阴影线，如以上参照附图 4 所述的。通过存储在折射率计 22 的可编程存储器中的软件程序来确定阴影线位置，将这个位置表示为交叉单元号。在一次读数期间，按基准曲线 100 的 94% 制图，制图的结果由图 5b 中基准曲线 100 下边的虚线曲线表示，从而形成经过标度的基准曲线 120。标度的参数并非一定是 94%，它是可以改变的（例如，80%、85%），其目的是在连续的读数期间可实现最佳的精度。然后通过程序寻找交叉单元号，这个程序应能识别样品曲线 110 与标度的基准曲线 120 相交的单元或单元的一部分。然后，根据已知折射率的一种物质的校准读数把交叉单元号转换成折射率值。

尽管临界角反射现象过去是已知的，但使临界角折射计作为传感器进入分析领域使之能够检测和监视分析物和对于分析物具有特殊亲

合力的粘合层之间的粘合的努力一直都没有成功过。由于和市场上销售的 SPA 传感器相比, 临界角折射计(例如上述的 Leica AR600 自动折射率计)是很便宜的, 因此期望使用临界角折射计来检测和监视粘合现象。因此, 需要提供一种利用临界角折射测量原理的方法和器件, 以便能够通过测量由于分析物特殊地粘合到在检测表面上固定的粘合层上而产生的折射率变化来检测和监视特定分析物的存在和量。

发明的概述

因此, 本发明的一个目的是提供一种利用临界角折射测量方法检测和监视在样品分析物和粘合层之间的粘合相互作用的检测器件和方法。

本发明的另一个目的是提供一种检测器件, 它不用通过利用表面等离子体共振现象测量折射率变化, 因此不再需要将粘合层固定在薄金属层上的严格的实验步骤。本发明的相关的目的是避免和金属层的氧化有关的一些问题, 以及避免在传统的 SPR 传感器中必须提供在金属层和玻璃表面之间的中间层。

本发明的下一个目的是提供一种基于临界角的传感器器件, 这种器件能被制造并且操作简单。

本发明的下一个目的是提供一种临界角折射测量方法和设备, 用于测量在检测层处的折射率变化, 它是让光穿过透光的设计, 使光在检测层发生全内反射。

本发明的下一个目的是提供一种通过测量光在检测层处全反射的临界角、利用临界角折射测量原理检测在接触相中是否存在样品分析物的方法和器件。

本发明的下一个目的是提供一种临界角折射计和方法, 用于测量在粘合层和样品分析物之间的粘合反应的速率。

鉴于这些目的和其它目的, 通过使用临界角折射计提供一种用于检测接触相中分析物的存在和数量的设备和方法, 以检测在样品分析物和固定的粘合层之间的相互作用随着时间的进展发生的检测层的折射率变化。按照本发明的一个实施方案, 该设备包括: 自动临界角折射计, 用于获得样品分析物的折射率数据, 所说样品分析物按可操作方式与折射率计的一个光电测量系统相关联; 和计算机, 对所说计算机进行连接, 以便可以与折射率计进行数据通信, 用于处理数据和报

告折射率随时间的变化而发生的变化。

5 折射率计测量系统包括由光电管组成的线性扫描阵列和用于引导光朝向 LSA 的光学系统。击中 LSA 的光形成一个阴影线，将 LSA 分成照射部分和暗的非照射部分。阴影线的位置取决于固定在检测表面上的粘合层的折射率。阴影线的位置根据样品分析物是否已经与粘合层粘合而变。因此可以建立阴影线的位置和随折射率的变化而变化的值（样品分析物在接触相中的浓度）之间的相互关系。这个相互关系是通过存储在折射率计的可编程存储器中的软件程序实现的。

10 按照本发明，提供一种使用临界角折射率计检测和监视分析物和粘合层之间的相互作用的方法。光学系统引导光通过一个或多个透光元件，击中粘合层和透光元件之一之间的界面。在样品分析物和粘合层之间的粘合存在与否将改变粘合层的折射率。粘合层的折射率又影响全反射的临界角。从界面以特定角度反射的光击中 LSA，形成阴影线，阴影线的位置可能和粘合到固定的粘合层分析物的量相关联。相同的原理使本发明的方法和设备能够检测和监视折射率变化的速率，
15 折射率变化速率与接触相中分析物的浓度以及分析物和粘合层之间亲合的强度有比例关系。

本发明还提供一种用于通过测量在粘合层的折射率变化检测对于粘合层有特定亲合力的特定分析物是否存在的设备和方法。这样的检测可以在实验室测试中和家用测试箱中实施。该方法包括以特定的入射角引导准直光束穿过一个或多个透光元件，击中粘合层和透光元件之一之间的界面。根据是否存在对于粘合层有特定亲合力的特定分析物，光的入射角将满足或不满足全内反射的条件。如果满足全内反射条件，则反射光将击中沿反射光的光路设置的 LSA 或其它能够检测光的检测器。因此，根据检测器是否由全内反射的光照射，就可确定分析物的存在与否。还设想，可设置 LSA，以便可以根据是否满足全内反射条件检测照射到 LSA 的透射光。实施上述方法的一种设备包括以特定的入射角在界面上引导一个准直光束。为了检测全反射的临界角，提供能够移动和改变入射角的单个光源。在该设备的一个可替换实施方案中，利用在界面上以不同的角度引导光束的多个光源检测分析物的存在与否。根据在分析物和固定的粘合层之间是否已经发生粘合，
25 来自于光源之一的光在界面上发生全内反射，因而照射光传感器并指
30

示分析物存在与否。

在本发明的实施方案之一中，一种专用的测试设备允许在接触相中的分析物和固定的粘合层之间按可操作方式发生关联。在优选实施方案中，该设备包括薄的透光元件，在其上表面上固定所选类型的配位体，形成粘合层。在透光元件上方封闭地安排一个流动室，用于提供包含样品分析物的接触相的缓冲流动，该样品分析物与固定的粘合层有特定粘合相互作用。确定安排在盘的上表面的 O 形圈或垫的大小，以便在该元件的上表面的粘合层和流体室之间提供不透流体的周边密封。在透光元件的下表面和折射率计棱镜的上表面之间提供高折射率耦合液体。透光元件，例如盘，最好由玻璃、聚苯乙烯、聚碳酸酯、或其它具有合适的折射率的透光材料形成。特定的固定技术通常部分取决于形成盘所用的材料。例如，可以将一种抗体，例如抗-链亲合素抗体固定在透光盘的上表面，并且在缓冲流中引入它的抗原链亲合素，以便分析粘合相互作用。另一个例子是关于 DNA 粘合蛋白质 / DNA 配位体相互作用，OccR 蛋白质可以固定在透光盘的上表面，它的寡核苷酸靶在接触相中引入，以便分析粘合相互作用。

本发明还可包括一种在涉及分析物的特定反应期间监测特定粘合的方法，该方法包括：在透光元件上固定一粘合层；使透明元件按可操作方式与一个自动临界角折射率计的光电测量系统发生关联，引入包含分析物的接触相以接触粘合层，使用临界角折射率计产生测量数据，其中包括的数据是以规律的时间间隔的粘合层折射率的函数，并且处理测量数据以便可以分析所说的分析物粘合到粘合层的进展情况。

附图的简要说明

在下面结合附图的各个实施方案的详细描述中将要更加全面地描述本发明的操作方式和本质。

图 1 是 SPR 检测器的示意图；

图 2 是 SPR 检测器的强度随入射角变化的曲线；

图 3a 是临界角折射计示意图；

图 3b 是按照本发明的传感器设备的透视图，其中包括自动临界角折射计；

图 4 是图 3a 所示的自动折射率计的光电测量系统的示意图；

图 5a 是表示在空气中启动的折射计的基准曲线的曲线图；

- 图 5b 是表示照射强度随阵列单元数变化的曲线；
- 图 6 是表示本发明的校准曲线的示意图；
- 图 7 是本发明的优选测试装置的分解示意图；
- 图 7a 是本发明的一个实施方案的基座和平板的透视图；
- 5 图 7b 是基座和带有滑块的平板的透视图；
- 图 7c 是流动室盖的透视图；
- 图 7d 是装配好的流动室 / 滑块和透视图；
- 图 7e 是图 7a-7d 中所示的实施方案的分解图；
- 图 8 是表示加入蔗糖对于折射率的影响的曲线图；
- 10 图 9 是表示加入牛血清清蛋白对折射率的影响的曲线图；
- 图 10a 是表示通过测量临界角检测到的折射率随里间的变化曲线图，这种变化来自于固定在 Xenobind 玻璃滑块上的兔的抗羊抗体和接触溶液中羊的 IgG 抗原之间的粘合；
- 图 10b 是包含和图 10a 对应的拟合数据的一系列曲线；
- 15 图 11a 是表示通过测量临界角检测到的折射率随里间的变化的曲线图，这种变化来自于固定在 Xenobind 玻璃滑块上的山羊的抗鼠抗体和接触溶液中鼠的 IgG 抗原之间的粘合；
- 图 11b 是包含和图 11a 对应的拟合数据的一系列曲线；
- 图 12 是表示生物素化玻璃和中性抗生物素蛋白结合的山羊的抗鼠
- 20 抗体之间的粘合对于折射率的影响的曲线图；
- 图 13a 是表示非粘合的和粘合的配位体对于折射率的影响；
- 图 13b 是包含和图 13a 对应的拟合数据的一系列曲线；
- 图 14 是用来限制在支撑固定的反应物的透明圆盘只有一侧产生化学激活的一种安排的剖面图；
- 25 图 15a 是本发明的一个实施方案的光学系统的示意图；
- 图 15b 是本发明的另一个实施方案的光学系统的示意图；
- 图 15c 是本发明的另一个实施方案的光学系统的示意图；
- 图 16a 是表示通过测量临界角检测到的折射率随里间的变化的曲线图，这种变化来自于生物素化玻璃和中性抗生物素蛋白结合的山羊的
- 30 抗鼠 IgG 抗体之间的粘合对于折射率的影响的曲线图；
- 图 16b 是表示和图 16a 对应的试验中光强度变化的曲线图；
- 图 16c 是表示和图 16a 对应的试验中阴影线变化的曲线图；

图 16d 是表示和图 16a 对应的试验在开始时的阴影线位置的曲线图;

图 17a 是本发明的载玻片的透视顶视图;

图 17b 是图 17a 所示的载玻片的透视底视图;

5 图 17c 是载玻片的底视图;

图 17d 是载玻片的顶视图;

图 17e 是图 17a - d 所示的载玻片的剖面图。

发明的详细描述

在下面的对于本发明的详细描述中, 参照构成本发明的一部分的附图, 在附图中, 借助于图示表示出实施本发明的优选实施方案。对于
10 这些实施方案的描述足够细致, 以使本领域的普遍技术人员能够实施本发明, 并且可以理解, 还可以利用其它的实施方案, 并且在不偏离本发明的构思和范围的条件下, 还可以进行其它的逻辑上的、机械的、化学的、和电学的变化。因此, 下面的描述不是限制性的, 本发
15 明的范围仅由所附的权利要求书确定。

为了实现本发明的目的和原理, 使用自动临界角折射计检测光检测器 (如, LSA) 上的阴影线, 并因此分辨接触相的全反射临界角, 所说的接触相设置在透光元件上, 且该透光元件具有粘合层。粘合层, 其包括对接触相中的分析物有特殊的亲合力的配位体。(在本说明书
20 中, 术语“样品”和“接触相”可互换使用)。当分析物粘合到粘合层上, 粘合层的光学密度发生了变化。在下面描述的几个实验性的试验中, 使用临界角折射计检测粘合层的光学密度由于粘合现象引起的变化。下面描述的实验结果表明, 使用当前有的 Leica AR600 自动折射率计的光电配置, 能够检测到由于粘合层和样品分析物之间的粘合引
25 起的很小折射率变化, 所说的这种自动折射率计能够在相当宽的折射率范围进行折射率测量。试验结果证实, 使用临界角折射测量方法检测和监视粘合层的光学密度变化是成功的, 粘合层的光学密度变化是由分析物和粘合层之间的粘合相互作用引起的。

图 7 表示一个测试装置 24, 用于完成本发明的优选实施方案的折射测量。在图 7 所示的测试装置中, 细节处略微分解。测试装置 24 包括高折射率耦合液体 76, 它直接引入到临界角折射计 22 (未示出) 的棱镜 50 的上表面 54, 还包括带有粘合层 51' 的透光元件, 例如盘 78,

粘合层 51'淀积在盘 78 和粘合层之间的界面 80 上, 在流动室 28 和界面 80 之间插入密封 O 形圈 82。在此实施方案中, 棱镜 50 是折射率约为 1.7 的蓝宝石棱镜。

5 粘合层 51'包括固定在界面 80 上的配位体 53。配位体 53 对于包含在接触相 59 中的样品分析物可以有或者可以没有特殊的亲合力。在本发明的优选实施方案中, 接触相 59 是通过流动室 28 传递到接触粘合层 51'的液相。接触之后, 接触相 59 中的样品分析物接触配位体 53, 并且, 如果分析物和配位体相互之间具有特殊的亲合力, 则所说的样品分析物粘合到配位体 53 上, 允许粘合现象发生。粘合层 51'的一个例子是固定在界面 80 上的一种抗体基质。接触相 59 例如是用于与粘
10 合层 51'的抗体基质相互作用的一种抗原溶液, 通过流动室 28 传递这种接触相 59, 并且借助于临界角折射计监视这种相互作用。

流动室 28 可以是一个常规的流动室。在本发明的一个实施方案中, 能够提供约为 1ml/分钟流速的流动室, 例如可从 Leica Microsystem Inc. 得到的 Catalog No. 10610 型流动室覆盖界面 80 的绝大部分。适当的
15 耦合液体是高折射率油, 最好是折射率为 1.63 的油。透明盘 78 可以由对于入射光是透明的材料构成, 例如玻璃、塑料、或其它折射率适宜的透光材料构成。在所述的实施方案中, 入射光的波长是 589 nm。在优选实施方案中, 盘 78 在 20℃的折射率大于 1.52。这种材料例如是
20 玻璃、聚苯乙烯、聚碳酸酯。试验中所用的适宜的盘厚度为 0.17 nm。

在图 7a-7e 中表示出流动室/透明盘试验装置的另一个实施方案。在该实施方案中, 流动室的基座 200 放置在平板 202 上, 平板 202 有一个开口 204, 可以露出棱镜 50 (棱镜未示出) 的上表面 54, 如图 7a 所示的。可以通过任何常规方式将基座 200 附着到平板 202 上, 其中
25 包括简单地将基座放在平板上, 或使用螺丝或其它等效方式穿过开口 206 将基座紧固到平板上, 如图 7a 所示。一滴耦合液体 76 (如图 7 所示) 滴到上表面 54, 或者是手动地滴上, 或者是先通过将耦合液体 76 滴入第一板开口 208 再使其带到上表面 54。这溶液流过和板开口 208 相连的第一管 210, 并到达上表面 54。如果有过多的耦合液体 76 流到
30 上表面 54, 则第二管 212 从上表面 54 向第二板开口 214 排放过多的耦合液体, 如图 7e 所示。

图 7b 示出基座 200 和平板 202, 在板 202 上放置透光的载玻片 218

(类似于上述的透光盘 78)。载玻片 218 设在棱镜的上表面 54 的上方, 并且设在适于容纳载玻片的位于基座 200 内的框架 207 内。框架 207 界定了载玻片 218 相对于棱镜的上表面 54 的位置。在图 7b 中, 框架 207 是长方形形状, 可以容纳长方形的载玻片 218 并且部分地包围载玻片 218。如图 7e 所示, 在一个实施方案中, 载玻片 218 包括一个透光区 236 和一个磨砂区 237, 透光区 236 上固定粘合层, 磨砂区 237 用于俘获和漫射照射区域 237 的光。可以对区 237 进行蚀刻, 或用机械方法使其磨薄, 以产生磨砂效果。

图 7c 表示流动室的盖 240, 具有管 226 和 228 用于通过流动室循环接触相。盖 240 包括具有孔 222 的盖框架 230。从基座 200 伸出的一个或多个带有螺纹的短柱 216 穿过盖框架 230 中的孔 222, 然后最好通过滚花螺母 234 固定就位, 如图 7d 所示。管 226 和 228 经过装配到盖框架 230 中的上部 232 耦合到流动室, 如图 7c、7d、7e 所示。上部 232 附着到盖框架 230 上的方式可以是永久性的, 或者是可拆卸的。管 226 和 228 向载玻片 218 传递接触相 59 (如图 7 所示)。接触相通过管 226 或 228 之一进入流动室, 流过载玻片并且通过另一个管离开流动室。期望是, 上部 232 可以包括温度传感器或用于测量在流动室中循环的流体的各种性质的任何其它传感器。这样一种传感器可以放置在上部 232 的表面上, 在折射计操作期间通常与接触相接触。

现在参照附图 17a-17e 更加详细地描述参照附图 7a-7e 描述的流动室装置中使用的载玻片 218 的特定几何形状和设计。所示的载玻片 218 有上表面 250, 上表面 250 有第一抬高部分 252 (图 17a)。上表面 250 有磨砂面层, 用于漫射或俘获不期望出现的光, 防止不期望出现的光进入检测系统被光检测器检测到。磨砂面层可以通过化学的或机械的蚀刻或任何其它的以特定应用所设想的方法实现。第一抬高部分 252 不经蚀刻, 保持透光状态。在图 17e 中表示出载玻片 218 的侧视剖面图, 表示出抬高部分 252, 抬高部分 252 有附着粘合层 51' 的检测表面 253。在图 17a-d 所示的实施方案之一中, 第一抬高部分 252 的形状类似于椭圆形, 有长轴 X。在图 7b 中表示的垫圈 220 通常放在第一抬高部分 252 上, 以便密封测量期间接触相的循环区。图 7b 中的垫圈 220 也作成椭圆形的, 以便和图 17a 的第一抬高部分 252 的形状平行。

图 17b 中的载玻片 218 的下表面 254 类似于上表面 250, 下表面 253

的磨砂面层可以防止不期望的光进入折射计的检测系统。第二抬高部分 256 不蚀刻，保持透光。在一个实施方案中的第二抬高部分呈泪珠形状，其长轴 Y 垂直于轴 X。第三抬高部分也是透光的，并且包括垫环 258，当将载玻片放在平板上时，垫环 258 接触平板 202（如图 7a 所示）。传递到垫环 258 的上表面 54 的耦合液体 76 接触第二抬高部分 256，并且把载玻片 218 耦合到上表面 54，如图 7a 所示。

如图 17c-17d 所示，由抬高部分 252 和 256 界定的透明重叠区 260 将是穿过载玻片 218 和照射表面 253 的光发生反射或透射的区域，表示出在粘合层 51' 和接触相中的分析物之间的粘合相互作用是否存在。

如图 17d 所示，椭圆形部分 252 从第一端 262 到第二端 264 的延伸部分超过了重叠区 260。流动室中的接触相首先接触载玻片 218 的第一端 262 或第二端 264。在接触相从第一端 262 或第二端 264 流到重叠区 260 时，接触相中的任何涡流都将减小，接触相的流动变为层流，从而改善了在检测表面上的粘合反应的测量精度。

如图 17a 和 17d 所示，本发明的企图是使载玻片 218 的表面 250 包括代码区 270，代码区 270 包含标记或嵌入的芯片。包含在代码区 270 中的标记可以是可读的光学图案，可以按任何期望的方式提供有关附着到载玻片的特定粘合层、载玻片材料的折射率、或者特定的载玻片的信息。标记还可以用来辨认载玻片是否在测量阶段开始之前正确地插入流动室。如果代码区 270 包含芯片，则这个芯片可能会以不同的代码信号响应于某种能量（如射频能量）。响应于不同的代码信号，该芯片将提供有关特定载玻片、固定到检测表面的粘合层、载玻片的取向的信息或其它期望的信息。代码区 270 可以定位在载玻片的任何表面上或者定位在载玻片的里面，这取决于载玻片、流动室、和折射计的特定设计。

应该注意的是，在不偏离本发明的权利要求书的范围的条件下，还可以使用在上边具有粘合层的载玻片 218 的其它几何形状和设计。

需要说明的是，使用盘 78 支撑粘合层是优选的作法，但不是在实施本发明的所有的方案中必须的。之所以如此，是因为例如粘合层 51' 可在没有盘 78 的情况下直接固定在棱镜 50 上。在这种情况下，接触相 59 中的样品分析物接触直接固定在棱镜 50 上的配位体 53。在这种设计中，以及在其它可能的设计中，只要满足全内反射的条件，就可

以实现粘合现象的折射测量。

的确，可以使用各种设计以在界面 80 满足全内反射条件从而确定临界角。例如，可以定位光检测器，以检测在界面全内反射的光部分（如在本发明的优选实施方案中那样），或者检测透过界面进入粘5 合层中的光部分。在这两种情况下，在传感器上的阴影线的位置都代表粘合层的折射率，因此，代表在粘合层中发生的粘合现象。此外，界面 80 或者可由透射光照射，或者可由反射光照射。当通过任何光学系统（不一定是包括用于引导光进入界面的棱镜的光学系统）照射界面时，也可以满足全内反射条件。在本发明中成功地使用了这样的光学10 系统，例如将光引向界面的透镜或反光镜的设计。只要在界面 80 上入射的光以满足全内反射的角度照射界面，就可以进行粘合现象的折射测量。

例如（但并非限制），适合于和本发明的临界角折射计一道使用的各种粘合层可以包括固定在透明盘上的下述配位体。第一个例子是15 涂有羧基葡聚糖的玻璃盘。在这个例子中，首先将一层葡聚糖化学结合到透明的玻璃盘 78 的表面上。在将葡聚糖固定在盘 78 上后，用包含羧基作为葡聚糖分子的端基的几种不同的化学试剂之一使葡聚糖改性。这个改性的步骤提供了羧甲基，通过众所周知的 EDC / NHS 化学方法，使用羧甲基去结合这种如蛋白质的配位体。在这个改性步骤使用的化学试剂的例子包括：氯乙酸、溴乙酸、6-溴己酸。在葡聚糖改20 性后，可以实现如蛋白质的粘合层到羧基的直接固定，可进行葡聚糖的进一步的改性，以便可以使用公知的 EDC（1-乙基-3-（3-二甲胺丙基）碳二亚胺）化学方法将一个端胺基固定到这个葡聚糖上。

粘合层的另一个例子包括硅烷分子，硅烷分子共价结合到由硅石25 制成的盘 78 的表面的-Si-OH 基上。根据定位在结合的硅烷分子的端基处的官能团，可以实现蛋白质的直接固定。按另一种方式，进一步地表面改性，即将分子附着到硅烷分子上，可以得到用于蛋白质（配位体）固定的另一些官能基。在市场上可以得到的硅烷分子的例子是： γ -环氧丙氧丙基三乙氧基硅烷，和 3-氨基丙基三乙氧基硅烷。这些硅30 烷分子的端基处（粘合层固定发生的端基处）的官能团分别是羟基和胺基。按另一种方式，可以向硅烷附着双官能团，例如戊二醛，然后将配位体附着到这个官能团上。双官能团用作间隔基的臂，可以使位

阻效应最小并提供至配位体的活性位置的通路。

5 为了获得涂有抗生物素蛋白/链亲和素的玻璃盘，使用类似于在硅烷化过程中描述的化学方法，将抗生物素蛋白和链亲和素结合到盘 78 的玻璃表面上。一旦硅烷结合到玻璃表面上，抗生物素蛋白/链亲和素就固定到双官能间隔基的臂上。由于生物素 - 抗生物素蛋白相互作用的特征是可以得到最高的亲合力，具有已附着的抗生物素蛋白/链亲和素的表面对于生物素具有极高的亲合力。只通过使生物素化蛋白质与抗生物素蛋白接触，就能够很容易地把生物素化蛋白质结合到涂敷的玻璃上。

10 在粘合化学方法的另一个例子中，生物素分子结合到由玻璃制成的盘 78 的表面上，从而产生初始的生物素化玻璃表面。通过使用类似于在硅烷化过程中描述的化学方法可以实现粘合，产生生物素化玻璃。然后，在生物素化玻璃表面上有选择地吸收抗生物素蛋白/链亲和素分子，于是产生了对于生物素分子有高亲合力的表面，这个表面类似于涂有抗生物素蛋白的表面。然后将生物素化蛋白质附着到这个表面上。在此例中，在不破坏初始的生物素化玻璃表面的条件下再生这个表面。按另一种方式，可以将抗生物素蛋白/链亲和素 / 中性抗生物素蛋白结合的蛋白质直接耦合到生物素化玻璃上。

20 当透明盘 78 由塑料制成时，可以利用好几种化学技术将各种配位体固定到塑料表面上。其中的一种技术是在不改性或激活蛋白质的条件下，被动吸收蛋白质到一种疏水的塑料材料上。优选的疏水材料是聚苯乙烯。在这种技术中，静电吸引使得在蛋白质上的正电荷“粘接到带负电的塑料上。通过控制诸如 pH、离子强度、和培育周期之类的参数，可实现配位体（蛋白质）的粘合。这里的培育周期是让包含蛋白质的溶液与盘表面接触的时间长度。

25 另一种可以利用的技术在其初始步骤涉及到粘合戊二醛到塑料表面上，使醛基留在末端。然后利用醛基去固定蛋白质。这样一种技术通常导致所固定的蛋白质的数量的增加。涉及塑料表面的其它技术是利用光激活的交联剂。在这种技术中，固定的酶与交联剂分子结合，30 然后，通过紫外光曝光将其结合到塑料表面上。

本发明还设想，利用在透明玻璃或塑料表面上的自动成型的类脂单层来固定膜结合的蛋白质或对于疏水表面有亲合力的其它配位体。

总括起来,适宜的粘合层可以是;羧甲基化葡聚糖、醛激活葡聚糖、酰肼激活葡聚糖、硅烷表面、硅烷化表面、硅烷、抗生物素蛋白、链亲和素、中性抗生物素蛋白、生物素基、双官能间隔基的臂、自动成型的单层、类脂、和无改变的或非涂敷的玻璃或塑料表面。适宜的分析物可以是抗原、蛋白质、糖蛋白、维生素、微生物、包括细菌和细菌碎片的微生物块、病毒、病毒物质块、类脂、碳水化合物、毒素、DNA、RNA、DNA和RNA的类似物、致病的有机分子、抗细菌和抗病毒的有机分子以及它们的类似物、治疗用的试剂和药品。

在下面详细描述的实验性试验中,在图3b所示的实验设备中使用折射计22。图3b中所示的是按照本发明形成的实验设备,用标号20泛指这个设备。设备20一般说来包括:具有试验装置24用于测量折射率的自动折射率计22、用于存贮流体接触相的贮罐26、界定靠近试验装置24的一个井29(见图7)的流动室28、用于传递接触相从贮罐26到流动室28的泵25和软管27、为与折射计22进行串行通信而进行连接的个人计算机30,用于控制折射计的测量功能,并且用于处理和存储从折射计接收的测量数据。

折射计22进一步包括一个RS-232串行端口(未示出),用于借助于标准串接电缆42和外围设备进行数据连接,大部分通用的个人计算机30都有它自己的串行通信端口(COM1或COM2)。可以通过在计算机上运行的任何终端通信软件程序控制折射计22和计算机30之间的通信。然而,随Microsoft Windows3.11的终端程序以及随Microsoft Windows95的超级终端程序都是公知的,能够在折射计22和计算机30之间进行数据通信以便按照本发明的方法提取实时测量数据。对于终端程序推荐的通信端口设备是:波特率-19200,数据位-8,停止位-1,奇偶校验-无,流动控制-XON/XOFF。在菜单下,选项5“设置”,然后,选项“文本传送”,应该选择“标准流量控制”。保留这些选项以备将来使用是有益的。如通过参照Leica AR600自动折射率计的用户手册和支持文件可以更加全面理解地那样,通过用户输入和发送各种控制码,可以从计算机30遥控折射计。虽然这里概述的本发明的设备包括链接到个人计算机30的自动折射率计22,当然还有可能在折射计22本身内部提供可编程软件和存储器,这将使仪器在各种检测应用中能够连续操作并在选定的规则间隔记录读数。

重要的是要记住，在市场上可以得到的 Leica AR600 自动折射率计中，LSA 的 # 100 单元的交叉点对应于在 20℃ 约为 1.3 的折射率，LSA 的 # 2450 单元的交叉点对应于在同一温度下约为 1.52 的折射率。由于大部分粘合现象引起的折射率变化范围从约 1.3 到约 1.4，所以可以成功地使用 Leica AR600 自动折射率计结构的折射率测量的这个宽的变化范围。

总结起来，这里描述的 7 个实验涉及到两个大的阶段：第一，制备支撑表面，并且在支撑表面上固定粘合层；第二，通过临界角折射测量方法连续测量玻璃和粘合层之间的界面的折射率变化。在向接触相添加非粘合溶液后并且在样品分析物和粘合层之间发生粘合反应期间进行这种测量。

在试验 1 和 2 中，通过添加蔗糖和牛血清清蛋白来改变流动的接触相的质量。添加的目的是为了确定在耦合到 Leica AR600 临界角折射率计上的玻璃载玻片的表面上测量折射率变化的实际可行性。

在试验 3 和 4 中，通过共价结合到硅烷化玻璃盘上固定抗体，它包含终止在醛基中的专用的间隔基的臂。在每个试验中，对于随时间添加的抗原的 5 个连续增加的浓度进行测量。

在试验 5 中，在一个生物素化玻璃表面上吸附中性抗生物素蛋白结合的羊抗鼠 IgG 抗体。在试验 6 和 7 中，实验包括固定的羊抗鼠 IgG 抗体与羊 IgG 的反应，所说的羊 IgG 是一种控制溶液和特殊粘合的抗原鼠 IgG。在相应的附图中给出从试验 1 - 7 记录的测量数据。

透明盘 78 的制备涉及到硅烷化和随后盘的高碘酸盐氧化。虽然在市场上可以得到硅烷化的盘并且可以用来实施本发明，但是完成折射率合适的平 - 平玻璃板（该板的折射率大于接触相的期望折射率）的硅烷化是为了保证在试验 1 和 2 中有高的质量。在试验中使用的透明盘 78 通过相继浸入浓硫酸、蒸馏水、乙醇、和丙酮中进行初始的清洁和羟基化。从 Sigma-Aldrich Chemicals 公司获得 500 克硫酸，产品型号为 S - 126，ACS 试剂级，纯度为 95.7%。将透明盘 78 浸入硫酸中一次，10 分钟，然后浸入蒸馏水中 3 次，每次 10 分钟。从 Sigma-Aldrich Chemicals 公司获得乙醇，产品型号为 27074 - 1，试剂、变性、HPLC 级。将透明盘 78 浸入乙醇两次，每次浸入 10 分钟。。从 Sigma-Aldrich Chemicals 公司获得丙酮，纯度为 99.9%，ACS 试剂级。将透明盘 78

浸入丙酮中两次，每次 10 分钟的周期。将透明盘 78 支撑在由单股铜线形成的线支撑钩上，就可实现各个浸入。从横跨一个试剂室顶部的杆架吊下几个这样的钩，每个钩上都通过在盘周围弯曲线的方式安装一个透明盘。作为单个浸入钩的替换，为了进行浸入，可以专门加工一个或多个支架，支架上有一排按规则的间隔分开的用于保持透明盘 78 和空间。

一旦透明盘 78 已经清洁，必须用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷（以下称 APTS）激活这些透明盘。一个 APTS 分子包含一个硅烷原子，硅烷原子经一个氧原子结合到 3 个乙基上（三乙氧基硅烷）。在涉及界面 80 上的羟基的凝聚反应期间，分子的这个部分直接接合到透明盘 78 的界面 80 上，在水环境中的自由质子亦是如此。为了完成一批 20 个盘的该反应，将 2.5 ml 的 APTS 与 25ml 的蒸馏水混合，产生 10 % wt/vol 的新鲜的 APTS 水溶液。使用冰醋酸（从 Sigma-Aldrich Chemicals 公司获得，产品号为 A-0808）和一台电子 pH 测量仪将这种溶液滴定成 5.0 的 pH 值。透明盘 78 与耦合试剂 APTS 的反应控制在 80℃，历时 3 个小时。

图 14 表示用来限制化学活化仅在每个透明盘 78 的一侧的一种设计。透明盘 78 放在一个窄的坚固的表面上，如一个透明载玻片 84 的表面上，要活化的样品表面向上，如图所示。在透明盘 78 的顶部放置一个橡胶的 O 形环 86，环 86 的内径为 8-9 mm。对于这个 O 形环 86 的大小进行选择，使其和实际折射读数期间放在流动室 28 和透明盘 78 之间的 O 形圈 86 的大小相同，或者略大一点，以保证在折射测量期间暴露到样品分析物的所有样品表面被活化。在 O 形环 86 的顶部放置一段管 88，管 88 的内径对应于 O 形环的内径，管 88 的高度不大于 25 mm。可以理解，O 形环 86 将在透明盘 78 和管 88 之间产生流体密封。管 88 在其升高的部分包括一对直径方向相对的通孔，用于接纳一个结实的插杆 90，插杆 90 有露出端 90a 和 90b。用一根连续的绕在插杆 90 的一个外露端 90a 或 90b 上的然后经过载玻片 84 的下方绕在插杆 90 的另一个外露端上的弹性松紧带 92 按可拆卸方式将组装部分保持在一起。

在 APTS 溶液与透明盘 78 的样品表面 80 的反应完成后，拆开图 14 所示的装置，将透明圆盘 78 在 120℃下加热 2 小时，随后再冷却到室

温。让冷却的透明盘 78 在 5 % wt/vol 戊二醛溶液和磷酸盐缓冲剂中浸渍。磷酸盐缓冲剂的 pH 值是 6.8。对于一批 20 - 30 个透明盘，将 10 克戊二醛与 200 ml 的磷酸盐缓冲剂混合起来，就可提供足够数量的溶液。透明盘 78 在室温（22℃）下的浸渍 90 分钟，接下来两次浸入蒸馏水中，每次 10 分钟。水浸后，重新装配图 14 所示的单侧活化设备，并向管内空间吸移少量抗体，并且使其在 40℃反应 24 小时，以测试涂敷效率。在抗体反应后，用磷酸盐缓冲剂清洗透明盘 78，并且将透明盘 78 在 4℃下存放在等渗压硅烷中。硅烷化方法是众所周知的，可以参照出版物“固定的亲合配位体技术”，Greg T. Hermanson, A, Krishna Mallia, Paul K. Smith, 科学出版社，1992 年，12 - 14 页。

为了实现高碘酸盐氧化步骤，提取 600 微升的至少 1 mg/ml 抗体溶液，并将其放入一个标记管形瓶中，在 10 ml 蒸馏水中溶解 0.06 克偏高碘酸钠。然后，通过在标记管形瓶中混合 300 微升高碘酸溶液与抗体溶液，并且使这种混合物在黑暗中反应 30 分钟以便从碳水化合物产生醛基，从而使高碘酸溶液与抗体溶液结合。上述出版物“固定的亲合配位体技术”在其第 75 页上给出一种支撑基质的高碘酸盐氧化的草案。下一个步骤是耦合抗体到硅烷化盘 78 的界面 80。在“固定的亲合配位体技术”中从第 223 页开始可以找到对于这一步骤的草案。

在标准的折射测量过程，在空气中启动折射计 22，在棱镜 50 上部什么都没有。在这种情况下，棱镜和空气之间的界面上入射的所有的

光都被反射，因为棱镜的折射率通常比空气的折射率大得多。因此，当在空气中启动折射计时，传感器检测到所有的光，因此在传感器上不会形成任何阴影线。因而，折射计产生的读数看起来像是图 5 和 6 中的基准曲线 100。还有，在标准操作情况下，样品通常放在棱镜的顶部，在棱镜的顶部没有固定任何配位体。由于样品放在棱镜的顶部，满足临界角条件，在界面上入射的光变为部分反射和部分透射，在传感器上形成阴影线。因此，折射计产生的读数看起来像是图 5 中的样品曲线 110。

由于在本发明的优选实施方案中，使用折射计检测和监视随透明盘 78 放在棱镜上的各种配位体和

在盘上固定的粘合层 51'之间的相互作用，所以不期望在空气中启动折射计。因此，在本发明的优选实施方案中，不是在空气中完成启动过程，而是在水中完成启动过程。为

了在水中启动折射计，在棱镜 50 的顶部沉积一滴耦合液体，如油，然后在棱镜的顶部放置透明盘。水流流过盘，使折射计可以在水中启动，从而产生读数，如图 6 中所示的水的基准曲线 130。应该注意的是，还可能通过在盘上流过低浓度的 PBS（生理缓冲盐水）来代替流过水，
5 以便启动在棱镜上有盘的折射计。合适的 PBS 的 pH 约为 7.4，并且包括例如 0.14 摩尔的 NaCl，其中含有 0.01 摩尔或 0.1 摩尔的 pH 约为 7.4 磷酸盐缓冲剂。

如果如以上所述的用水或稀释的 PBS 启动折射计，那么，折射计的校准过程不可能用水完成。在这种情况下，要使用一个标准的 PBS
10 流动来校准仪器，产生一个读数，看起来像是图 6 中的 PBS 校准曲线 140。折射计一旦按以上所述的过程启动并校准，这个折射计就为操作作好了准备。

在试验的准备阶段，从 Fisher Scientific 购买标准硅石玻璃显微镜载玻片。从 Xenobind X 公司，NJ, USA 购买 Xenobind 玻璃载玻片。
15 Xenobind 载玻片由硅烷化玻璃制成，它的一个专用的间隔基的臂共价结合到玻璃上，并且一个醛基位于末端。按照 Swaisgood 等人在 1997 年的方法制备生物素化玻璃载玻片：在 1:4v/v 硝酸（可从 Sigma, St. Louis, Missouri 公司得到）中并在 95℃ 下清洁玻璃载玻片 1 个小时，接下来，用蒸馏水清洗。然后，把载玻片浸入 10% v/v 3-氨基丙基三乙氧基硅烷-HCl (pH4.0) 中，在 70℃ 培育 3 个小时，并在 110℃ 干燥过夜，
20 在 4℃ 下浸入含 5 mg/ml NHS-LC-生物素（磺基琥珀基亚酰 6-（生物素胺）己酸酯（可从 Pierce, Rocord, IL 得到））的 50 mm 碳酸氢钠 (pH8.5) 中 2 小时，清洗，并在包含 0.02% NaN₃ 的 50 mm 磷酸钠缓冲剂 (pH6.0) 中存放。在开始试验之前，将载玻片切成 100 mm² 的方块。在上述所
25 有的试验中为了进行校准用作控制溶液的 PBS 包含 10 mm 磷酸钠，0.138 m 氯化钠，2.7 mm 氯化钾，和 0.02% 特威恩-20（去污剂）。加入去污剂的目的是将非特定粘合减至最小。

然后，将兔抗羊抗体和羊抗鼠抗体中的每一种抗体按以下所述都固定到 Xenobind 载玻片上：用 400 ml 的 0.15M（摩尔）的 NaCl、0.1M
30 碳酸氢钠（pH9.1）稀释 40 ml 的 1 mg/ml 抗体。在 Xenobind 载玻片的表面上分布稀释的抗体。然后，把具有已固定的抗体的载玻片放在一个密封潮气的容器内，在黑暗中放置过夜。在此之后，用蒸馏水冲洗

载玻片，在氮气流下干燥，并且立即用于实验。

对于用中性抗生物素蛋白结合的抗体的试验，按以下所述将抗体固定在一个生物素化玻璃载玻片上：用 400 ml 的含有 0.02% 特威恩的 PBS 稀释 40ml 的 1mg/ml 抗体。载玻片上涂抹稀释的抗体，然后放在一个密封潮气的容器内在室温下保温 3 小时。在此之后，用蒸馏水冲洗载玻片，在氮气流下干燥，并且立即用于实验。按另一种方式，通过在试验期间向流动相添加抗体将中性抗生物素蛋白结合的抗体将其固定在玻璃载玻片上。

所有的试验都是按照以下的优选过程进行的，其中参照图 7 所示的试验设备。在棱镜 50 的顶部放置一小滴折射率为 1.63 的耦合油（对应于图 7 中的耦合液体 76）。将玻璃载玻片（对应于图 7 中的标号 78）仔细地放在这滴油的上部，避免在载玻片和棱镜 50 之间产生气泡。要特别当心，保证油不会接触到与粘合层 51' 交界的界面 80，粘合层 51' 包含有固定的抗体（图 7 中的配位体 53）。流动室装置按图 7 所述完成。然后在这个载玻片上以 1-2 ml/分钟的速度循环包含特威恩的 PBS 共计 30 分钟，然后再开始每个试验。在载玻片上流动去离子蒸馏水 3 分钟后再启动 Leica AR600 折射率计。用去离子蒸馏水启动折射率计可以给出线性扫描阵列的一个基准线。这个基准线以后可由软件利用，以便确定代表全反射临界角的阴影线。然后，将这个溶液接通到带有特威恩的 PBS 历时 5 分钟，以校准这个折射计。一旦校准，折射计就可以在一系列预先设定的间隔读出折射率。对于下面描述的试验，对于每个读数，线性扫描阵列扫描 124 次。

一般来说，PBS 在载玻片表面上流动，直到出现一个稳定的基准线时为止。然后，将包含控制蛋白质或抗原作为样品分析物的接触相 59 加到贮罐（图 3b 中的标号 26），并且监视粘合层 51' 的折射率约 10-30 分钟。然后操作控制溶液，以区分非特定粘合与真正的抗原/抗体粘合相互作用。此外，增加贮罐中抗原浓度，将能提供有关粘合相互作用的速率依赖于流速和抗原浓度的关联性的信息。

进行第一个试验是为了表明：如图 7 所示的具有优选的测试设备的临界角折射计能够检测与玻璃载玻片 78 接触的本体溶液的折射率变化，所说的玻璃载玻片 78 上没有粘合层 51'。在试验开始时，用去离

子蒸馏水启动折射计，并且用 PBS 校准，如以上所述。在第一试验期间，向重复循环的 PBS 缓冲剂相继添加蔗糖，借此监测折射率随时间的变化。观察到的如图 8 所示的折射率变化是从蔗糖浓度和折射率之间的众所周知的关系期望产生的变化。还应该注意的是，折射率变化是立即产生的，这也是期望的观察结果，这是因为接触相流速高(>1.0ml/分钟)而流动室的体积小(<30ml)因而稀释效果最小造成的。

第二试验类似于第一试验，只是使用大质量的添加的蛋白质牛血清清蛋白(BSA)来观察折射率变化。和第一试验类似，如图 9 所示的折射率变化是立即得到的，并且对于所添加的 BSA 的质量得到了期望的大小。BSA 试验还证实，粘合到粘合层的非特定粘合的效果是最小的。

第一和第二试验证实，AR600 折射计的所述的结构能够检测流过玻璃载玻片的接触相中的折射率变化，所说的玻璃载玻片是通过高折射率油耦合到 AR600 的棱镜上的。

进行下面的 4 个试验(第三到第七试验)的目的是为了表明：临界角折射计的相同结构能够检测淀积在载玻片上的粘合层的折射率变化，所说的粘合层与接触相的样品分析物接触。在这些试验中，粘合层中的配位体是固定的抗体，接触相是 PBS，样品分析物是和抗体有特定亲合力的抗原。也使用包含具有非特定抗原或蛋白质的 PBS 的控制溶液，如 BSA，以保证随后观察到的折射率变化是由于特定的抗原/抗体粘合相互作用引起的，而不是由于非特定的抗原/抗体粘合相互作用引起的。

在第三试验期间取得的如图 10a 的所示的测量值代表固定在 Xenobind 玻璃载玻片上的兔的抗羊抗体的粘合层的折射率变化。如图 10a 所示，当建立了稳定的基准线时，将鼠 IgG 作为控制溶液加到贮器上，在此之后，监测折射率 45 分钟。和第一及第二试验的观察结果类似，添加非粘合鼠 IgG 控制溶液将导致折射率的立即变化，这是由于在包含鼠 IgG 的缓冲剂中的高盐浓度引起的。在折射率的立即变化后，折射率保持几乎不变历时 45 分钟。每 45 分钟向贮器相继添加对于抗体有特定亲合力的一定体积的 50g/ml 羊的 IgG 抗原。没有观察到折射率的立即阶跃，这是因为包含羊 IgG 抗原的缓冲剂等同于循环的接触溶液的缘故引起的。如图 10a 所示，一旦一定量的抗原加到接触相，

就可检测到折射率的一个逐渐的变化，这表明抗原和固定的抗体之间的一种特定的粘合。通过使用线性回归拟合的图 10b 所示的数据还表明，折射率变化的速率随着抗原浓度的增加而增加。

在第四试验中，如以上所述，在一个 Xenobind 玻璃载玻片上固定羊的抗鼠 IgG 抗体。和第三实施例的结果类似，每当添加一定量的抗原时，折射计检测折射率变化。如图 11a 所示，在建立基准线后，将 50 g/ml 的非粘合的羊 IgG 作为控制溶液加到贮器中。在添加了非抗原性的非粘合的羊 IgG 分子的情况下，没有观察到折射率的任何变化。还有，在大量添加牛血清清蛋白的情况下（没有表示出 BSA 数据）也没有观察到折射率的任何变化。然后，以大约 25 分钟的时间间隔并按 10g/ml 的增量向贮器添加鼠 IgG 抗原，所说的鼠 IgG 抗原对于抗鼠 IgG 抗体具有特定的亲合力。如图 11a 所示，折射率变化是相当大的并且是逐渐发生的，这和质量添加到接触相引起的折射率的立即变化的情况相反。和图 10b 中的数据类似，图 11b 中的用线性回归拟合的数据代表在基准线、控制溶液、和抗原添加物的测量期间由折射计检测到的折射率变化。就第三试验中羊 IgG 抗原的添加而论，在图 11b 中的折射率变化的速率随鼠 IgG 抗原的浓度的增加而增加。显然，这种逐渐增加是由粘合引起的，而不是由质量添加到接触相引起的。这种增加的幅度比由质量添加产生的增加幅度大得多。因此，图 14a 和 14b 中所示的由折射计检测到的折射率变化是由抗原 / 抗体粘合相互作用引起的。

进行第五试验的目的是为了证实折射计检测和监视中性抗生物素蛋白结合的羊抗鼠抗体对于生物素化玻璃载玻片的粘合的能力。如图 12 所示，在基准线建立后，将 15g/ml 的中性抗生物素蛋白结合的羊抗鼠抗体加到贮器。在约 40 分钟并且折射率变化了 0.002 以后，折射率停止改变，这表明抗原 / 抗体粘合反应的饱和。由于折射率变化 0.001 对应于约 1 ng/mm^2 的固定的抗体，所以结合到载玻片表面的总的抗原 / 抗体是 2 ng/mm^2 或 200 ng/cm^2 。这样的结果完全在对于这种类型的实验所期望的范围之内。

在第六试验中，在一个生物素化玻璃载玻片上固定中性抗生物素蛋白结合的羊抗鼠抗体。其固定步骤以在载玻片的表面上涂抹稀释的抗体溶液并且培育 3 个小时，然后再将载玻片安装到折射计内而进行，

从而可以防止中性抗生物素蛋白结合的羊抗鼠抗体非特定粘合到管道和贮器内。（当整个流动室设备未预先暴露到中性抗生物素蛋白结合的抗体时，随后的有关抗原的试验更加容易再现重复）。图 13a 表示的是在这个试验期间固定在载玻片上的中性抗生物素蛋白结合的羊抗鼠抗体的粘合层上的折射率变化。和以前的试验类似，使 PBS 基准线稳定，并且过量添加非粘合羊 IgG 控制溶液。如图 13a 所示，两次添加 10g/ml 的羊 IgG 控制溶液并没有使折射率产生任何变化。按另一种方式，添加一种 BSA 控制溶液（没有表示出 BSA 数据）。使控制溶液循环以保证随后观察到的折射率变化都是由于特定的抗原 / 抗体粘合相互作用引起的，而不是由于非特定的抗原 / 抗体粘合相互作用引起的。在 IgG 或 BSA 或两者组合的控制溶液存在的情况下，向贮器添加鼠 IgG 抗原。在 PBS 中还存在 0.02 % 特威恩 - 20 去污剂以便将非特定粘合减至最小。如图 13a 所示，在接触相中存在控制溶液与否，对于折射率几乎没有或根本没有影响。仅在先向贮器添加 10 g/ml 而后添加 20 g/ml 鼠 IgG 抗原时，折射率只发生逐渐的变化。由折射计检测和监视的这些变化再一次归因于特定的抗原 / 抗体粘合。图 13b 给出了代表折射率变化的拟合数据，它们对应于向贮器添加羊 IgG 控制溶液和两次添加抗原。再一次地，观察到的变化是由于抗原 / 抗体粘合相互作用引起的。

20 第七试验的结果表示在图 16a-16d 中，第七试验与第六试验相同，只是 100 g/ml 鼠 IgG 抗原添加到溶液以诱发响应。图 16a 表示在添加抗原之后接触相的折射率的变化。图 16b 说明第七试验期间强度随时间的变化。如图 16b 所示，阴影线的位置相对于仪器启地期间的阴影线位置（在图 16b 中分别为“G”和“B”）有所改变。图 16c 表示：25 在试验期间，响应于鼠 IgG 的添加，不仅阴影线的位置发生了改变，而且响应的强度也发生了改变。图 16d 表示出阴影线在试验开始时的位置（B）和在试验结束时的位置（G）。这些曲线表示：阴影线的位置和强度随鼠 IgG 向接触相的添加是如何变化的，以及在鼠 IgG 和固定在载玻片上的粘合层之间的粘合反应期间是如何变化的。

30 上述的试验表明，通过测量粘合层的折射率变化，就可以成功地使用临界角折射测量原理来检测和监视样品分析物和粘合层之间的粘合相互作用。下面根据这些试验结果，借助于例子描述本发明的方法

和设备的几个实施例，这些例子不是对本发明的限制。我们的意图是，利用检测和监视各种配位体之间的粘合相互作用的临界角折射测量原理实施的其它实施方案都落在本发明的范围和构思之中。

如以上所述，在自动折射率计 Leica AR600 的光学测量系统的示意图中（图 4），来自光源 48 和光沿光路 57 行进，并以各种入射角照射棱镜 50 的上表面 54。以大于临界角的角度入射在表面 54 上的光的一部分被反射回去，并且由 LSA44 检测。入射在表面 54 上的小于临界角的光的部分传送进样品 51 内并逸出 LSA。可以使用相同的原理检测该设备的不同实施方案中的粘合相互作用，在所说的设备中光源 48 产生准直光束，这个准直光束以一个预定的入射角 α 入射在棱镜 50 的上表面 54 或其它任何检测表面上。例如，如果粘合层是直接淀积在棱镜 50 的表面 54 上，那么界面 80 将是表面 54 和粘合层之间的界面。按另一种方式，如果粘合层 51' 是淀积在透明盘 78 上，则界面 80 将是这个盘和粘合层之间的分界面。

例如，在图 15a 中示意表示的是由光源 48 产生的光束 92，光束 92 以角度 $\beta 1$ 入射到界面 80 上。在该实施方案中光源 48 和传感器 98 的位置是预先确定的。如果在接触相 59 中存在对于粘合层 51' 具有特定亲合力的特定分析物，则要发生粘合，粘合层的折射率 n_2 将要增加，而 n_1 保持不变。由于 n_2 增加，按照斯涅耳定律，全反射的临界角将增加。由于在所述的实施方案中入射角 $\beta 1$ 是固定的，选择入射角 $\beta 1$ 使其大于或等于在没有分析物结合到粘合层时的临界角，但小于当有分析物结合到粘合层时的临界角，这种选择将使光束 92 在无分析物结合的界面 80 上全反射，但在有分析物结合到这个粘合层时将使光束 92 穿过接触相透射出去。因此，当无分析物结合时，反射光束 94 将照射传感器 98。一旦分析物结合到粘合层上，传感器 98 将检测不到反射光束 94。如果实施方案的特定的方法和设计要求检测透射光，则可以定位另一个传感器（在图 15a 中用虚线表示）来检测透射光束 96。通过用传感器 98 检测反射光束的存在，或者通过用其位置适合于检测透射光束的传感器（在图 15a 中用虚线表示）检测透射光束的存在，可以确定在粘合层和接触相中的分析物之间粘合相互作用存在与否。如果该实施方案使用了一个传感器，则在检测到光和检测不到光之间的过渡状态表示粘合。传感器 98 可以是一个简单的光检测器件，表示光束

94（或光束 96）是否照射到这个检测器件，传感器 98 或者可以是一个 LSA，或者是任何其它的能够检测光的传感器。在本发明的这个实施方案中，在检测设备中用检测粘合相互作用来探测样品中是否存在特定物质。这种设备的一个例子是一种“是/否”测试设备，它能够指示在样品中是否存在特定类型的配位体（蛋白质、抗原、等）。例如，通过使用上述的测试设备实施方案，在家里的用户或实验室的工作人可分析血和尿的样品，看其中是否存在特殊物质。

在图 15b 中描述的本发明的另一个实施方案中，允许单个光源 48 移动，或者转动或者平动（在图 15b 中用箭头表示），从而改变了入射的准直光束 92 的轨迹，或者变为光束 92a 或者变为光束 92b，借此改变了准直光束 92 的入射角（在图 15b 中用虚线表示）。和在图 15a 中描述的基础理论类似，当在分析物和粘合层 51'之间的粘合发生时， n_2 增加，增加了全反射的临界角。如果初始的入射角大于或等于当没有分析物结合到粘合层时的全反射的临界角，则传感器 98 检测到反射光束 94。当接触相 59 包含与粘合层反应的分析物时，则当粘合发生时，入射角不再满足全反射条件。通过移动或转动光源 48，选择大于临界角的不同角度（如 β_1 ），因而传感器 98 检测到反射光束 94b。在这个实施方案中，传感器可以是 LSA，但这不是必须的。像在图 15a 中所示的实施方案那样，或者检测反射光束 94，或者检测透射光束 96，都可以检测到粘合。光源可以是 LED。

按另一种方式，代替移动或转动一个光源（图 15a 中的光源 48），可使用多个固定的或可移动的光源 49（图 15c）引导光束以不同的入射角入射在界面 80 上。当由于分析物和粘合层 51'之间的粘合使临界角增加时，可以引导来自于不同的光源 48'的光束以较大的入射角 β_1 入射到界面 80 上。如果入射角 β_1 大于当分析物结合到粘合层时的全反射临界角，传感器 98 将通过检测反射光束 94'来检测粘合。传感器 98 可以包括一个传感器，如 LSA，或者包括多个传感器，如图 15c 中虚线所示的。

还有一个设想是，当准直光束照射界面 80 时，如图 18b 和 18c 所示，代替移动或转动光源，可通过移动或转动其上固定有粘合层的透光元件来改变入射角以满足全内反射条件。

可以理解，本发明包括用于检测和监视在各个配位体之间的粘合

相互作用的设备和方法，为此要观察由于粘合引起的折射率随时间的变化。通过利用阴影线分析测量粘合层的全反射临界角的变化，可以观测到折射率变化。因此，使用非金属的透光元件来固定粘合层，借此可明显简化固定过程。况且，可以用相当低成本的仪器代替成本昂贵得多的 SPR 生物检测设备。因而，本发明可以节省技术人员的时间和设备投资。

期望使用本发明来检测和监视各种各样的粘合相互作用，其中包括（但不限于）；抗原 / 抗体、药物 / 受体、多核苷酸单链 / 互补的多核苷酸单链、抗生物素蛋白 / 生物素、免疫球蛋白 / 蛋白质 A、酶 / 培养基、特定的碳水化合物 / 外源凝聚素等相互作用。测量输出可以是一个 GO / NO GO 报告的形式，例如通过 LCD 显示器 38 输出，这种测量输出在测试大肠杆菌或食物中含有的其它病原体的存在方面可能是有益的。本发明还可以提供诊断信息，诊断信息是通过酶连接的免疫吸附测定（ELISA）和放射免疫测定实时获得的。本发明的方法和设备可以在各种大小的设备中实施，其范围可以从手持式传感器到较大的工业用传感器系统。本发明的方法和设备的应用还包括检测和监视环境污染、农药、和代谢物，水质控制，药物的发现、研究、和制造，诊断化学物质的滥用，食品和饮料的加工。

虽然这里已经说明并描述了特定的实施方案，但本领域的普遍技术人员应该理解，打算实现相同目的的任何设计都可以代替这里所示的特定实施方案。本申请旨在覆盖对于本发明的任何修改或变化。因此，明确表示希望：本发明只由下述的权利要求书限制。

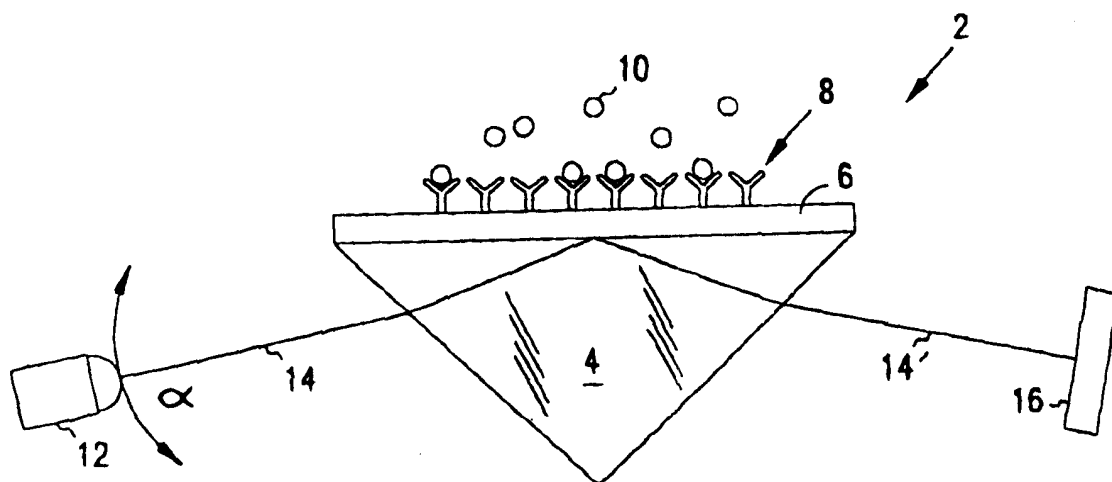


图 1 (现有技术)

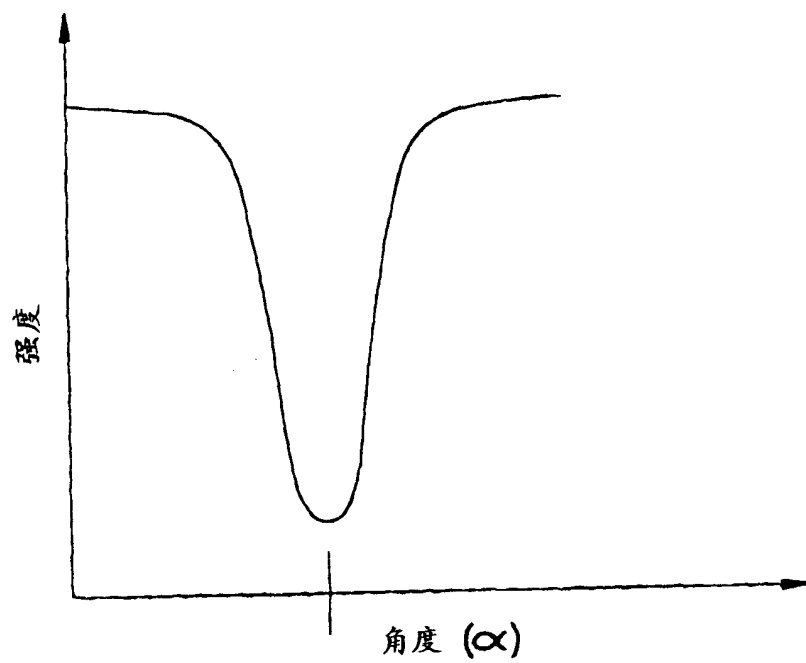


图 2 (现有技术)

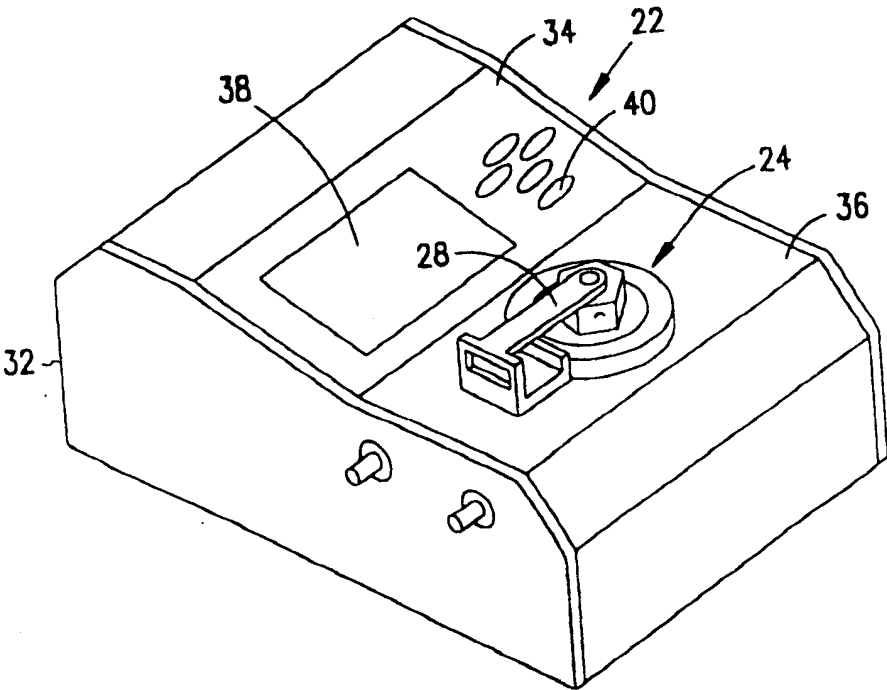


图 3a (现有技术)

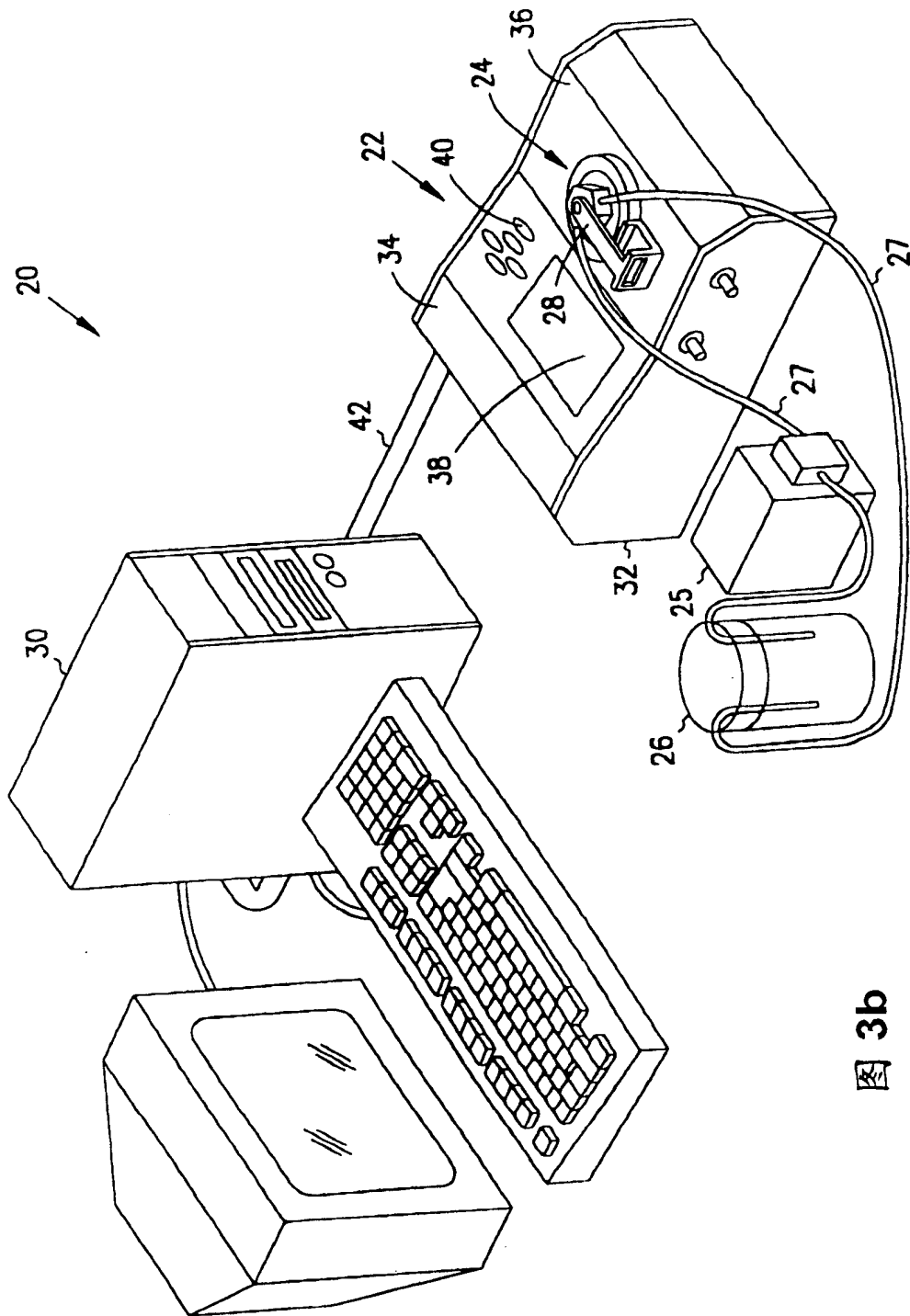


图 3b

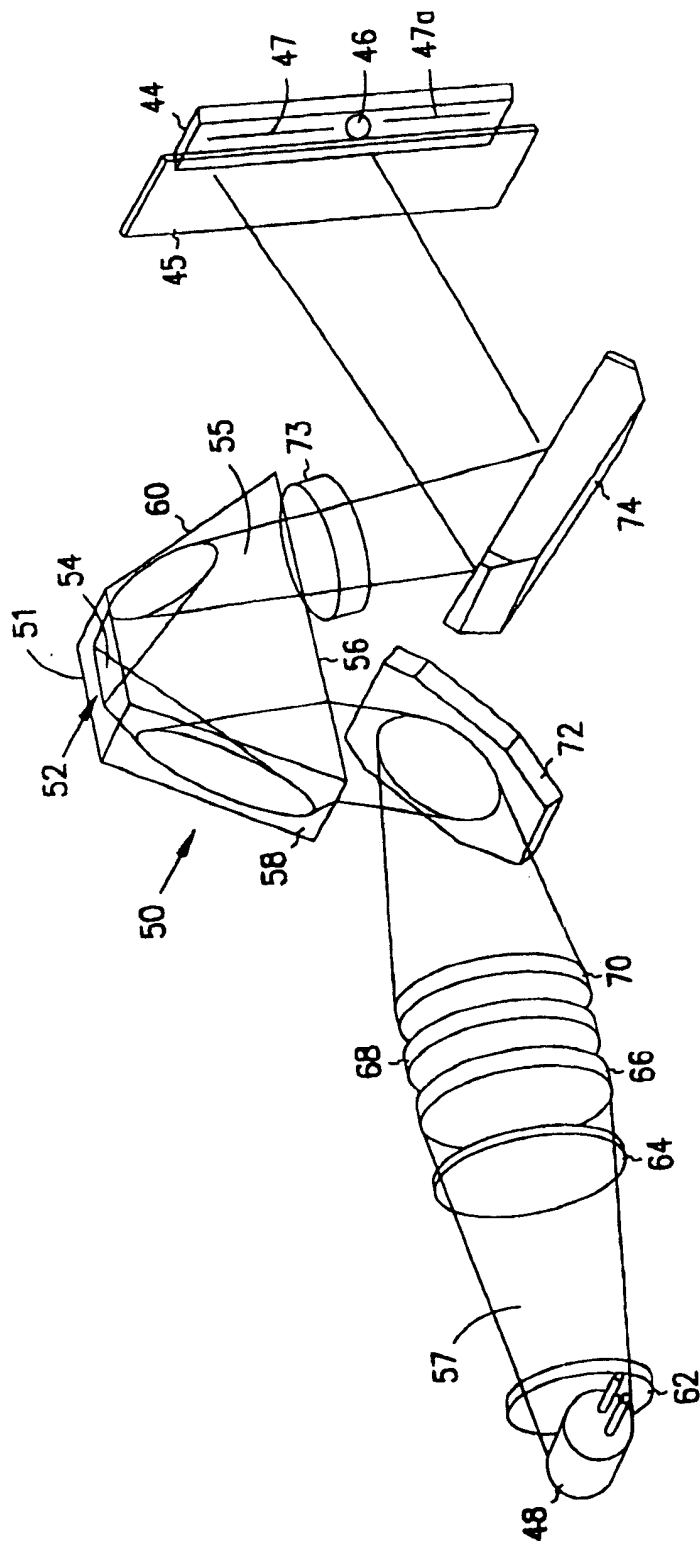


图 4 (现有技术)

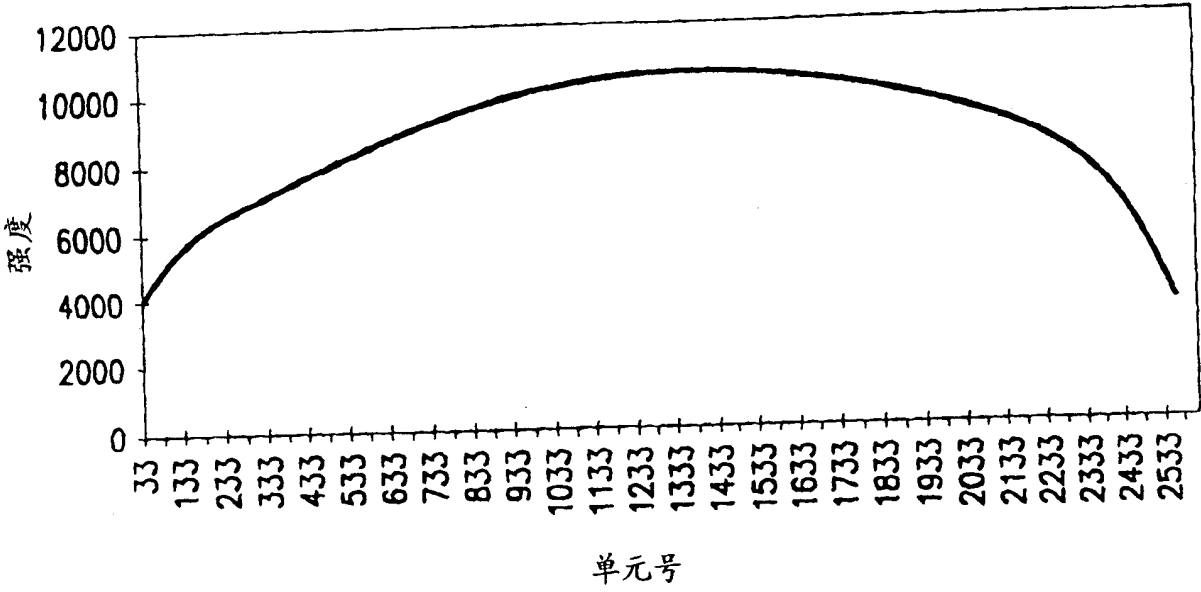


图 5a (现有技术)

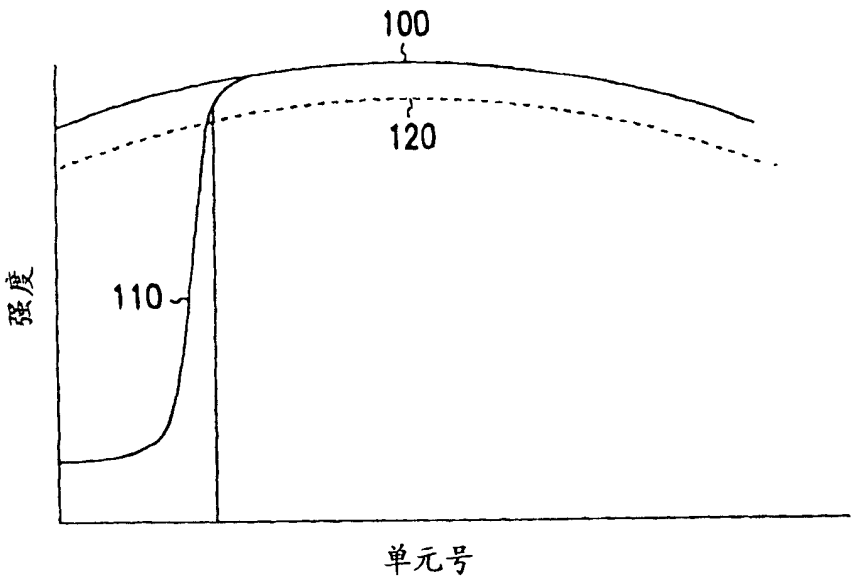


图 5b (现有技术)

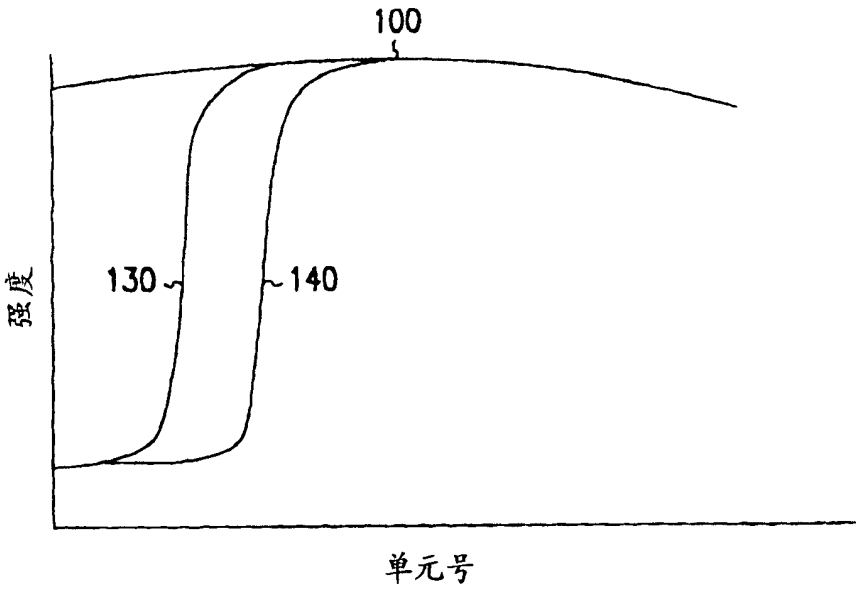


图 6

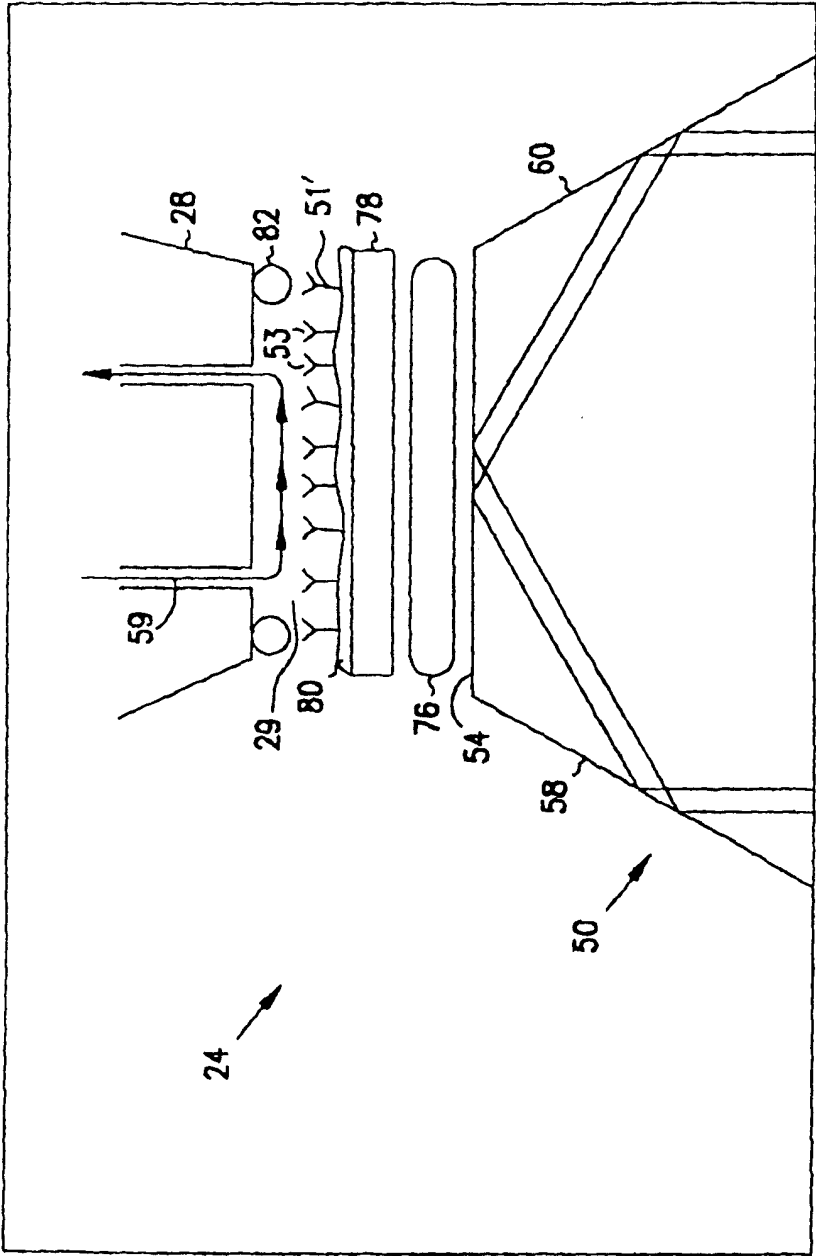


图 7

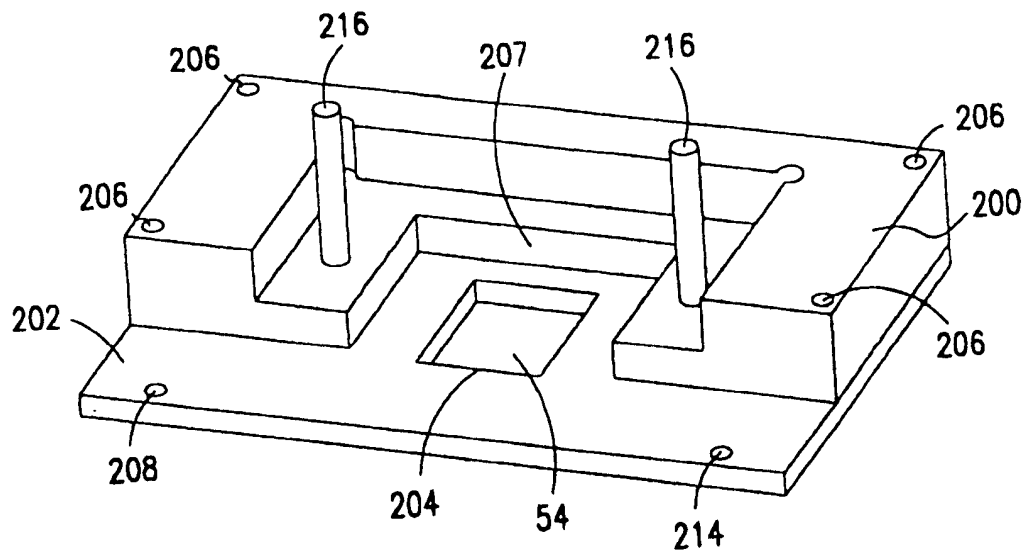


图 7a

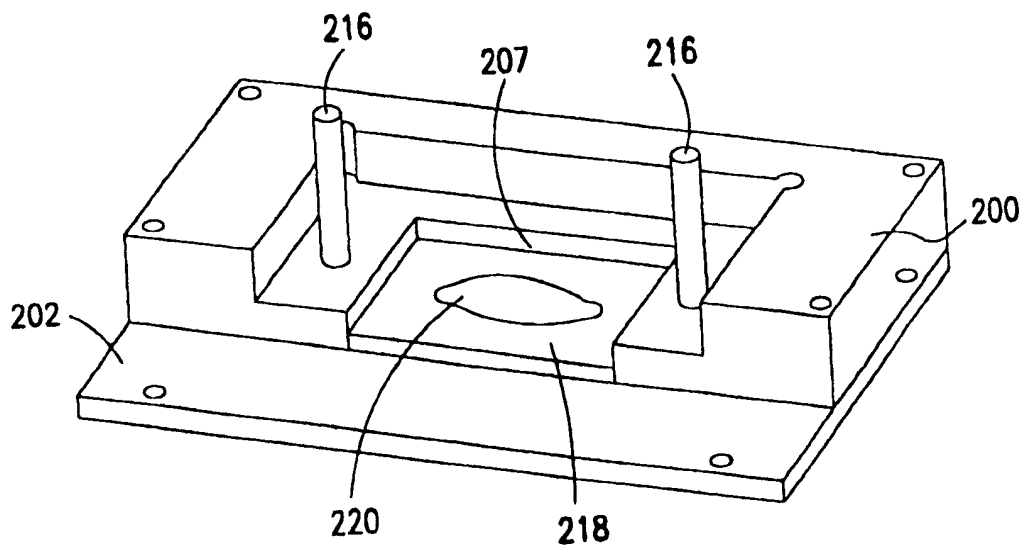


图 7b

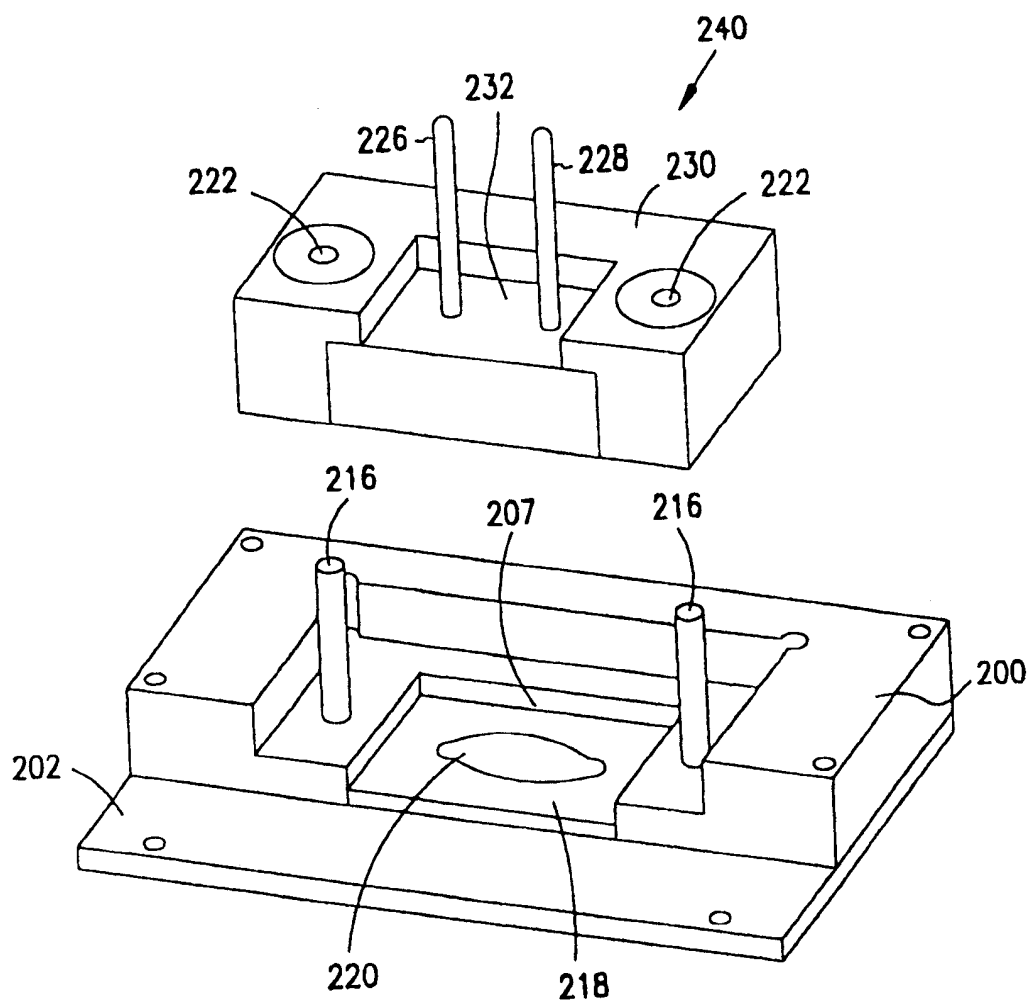


图 7c

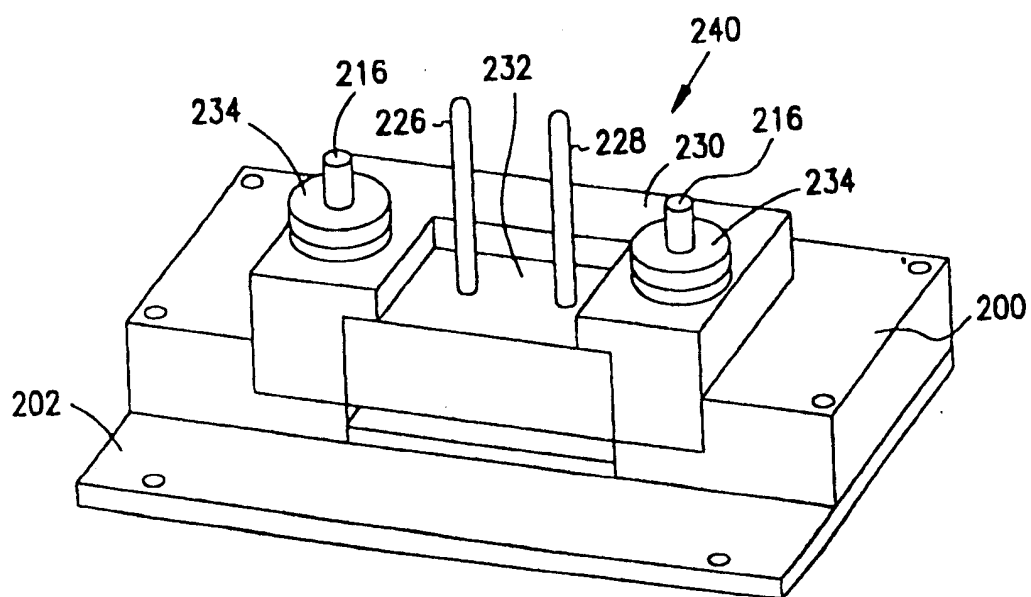
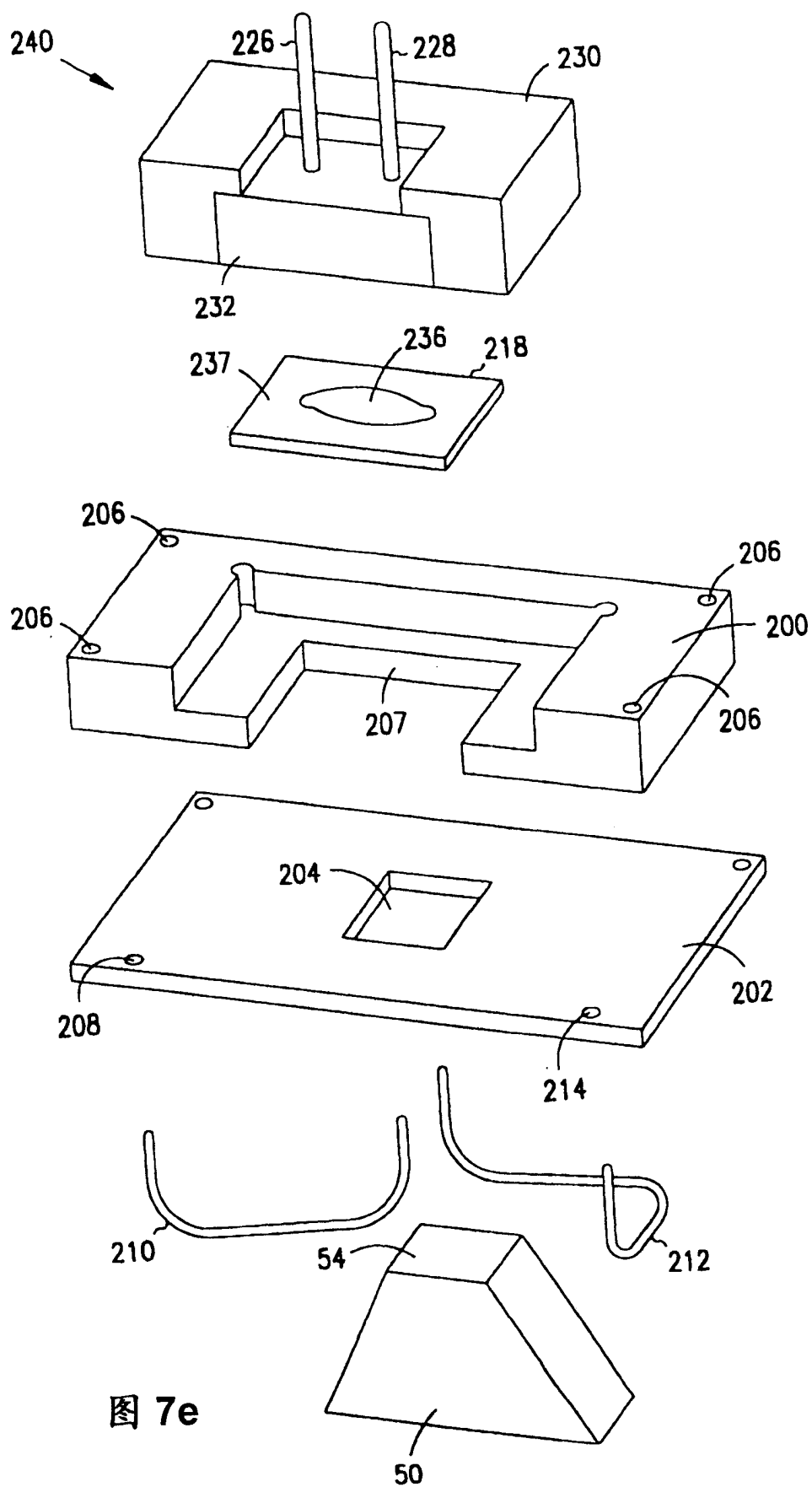


图 7d



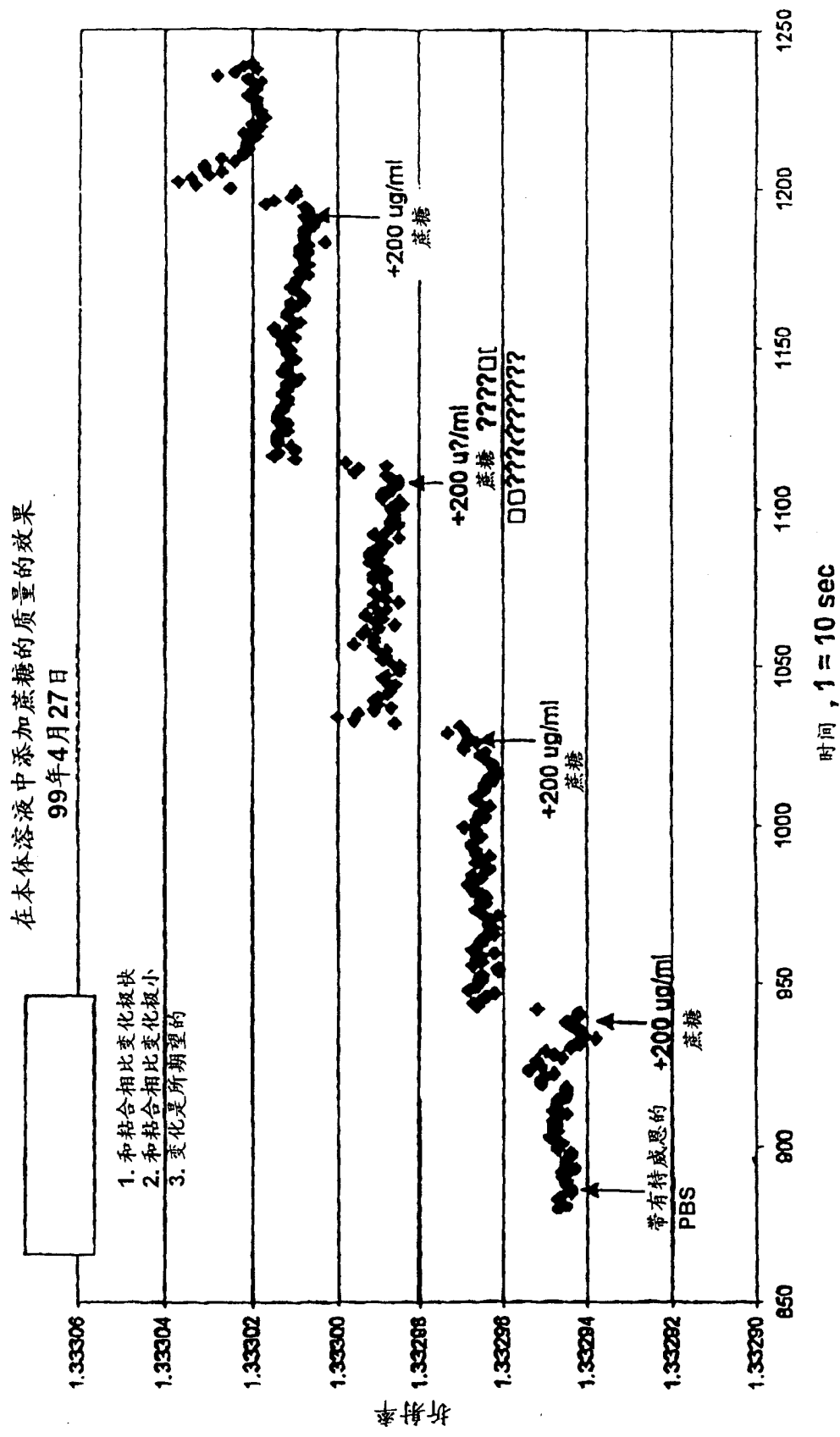


图 8

在本体溶液中添加牛血清蛋白的质量的效果

99年4月27日

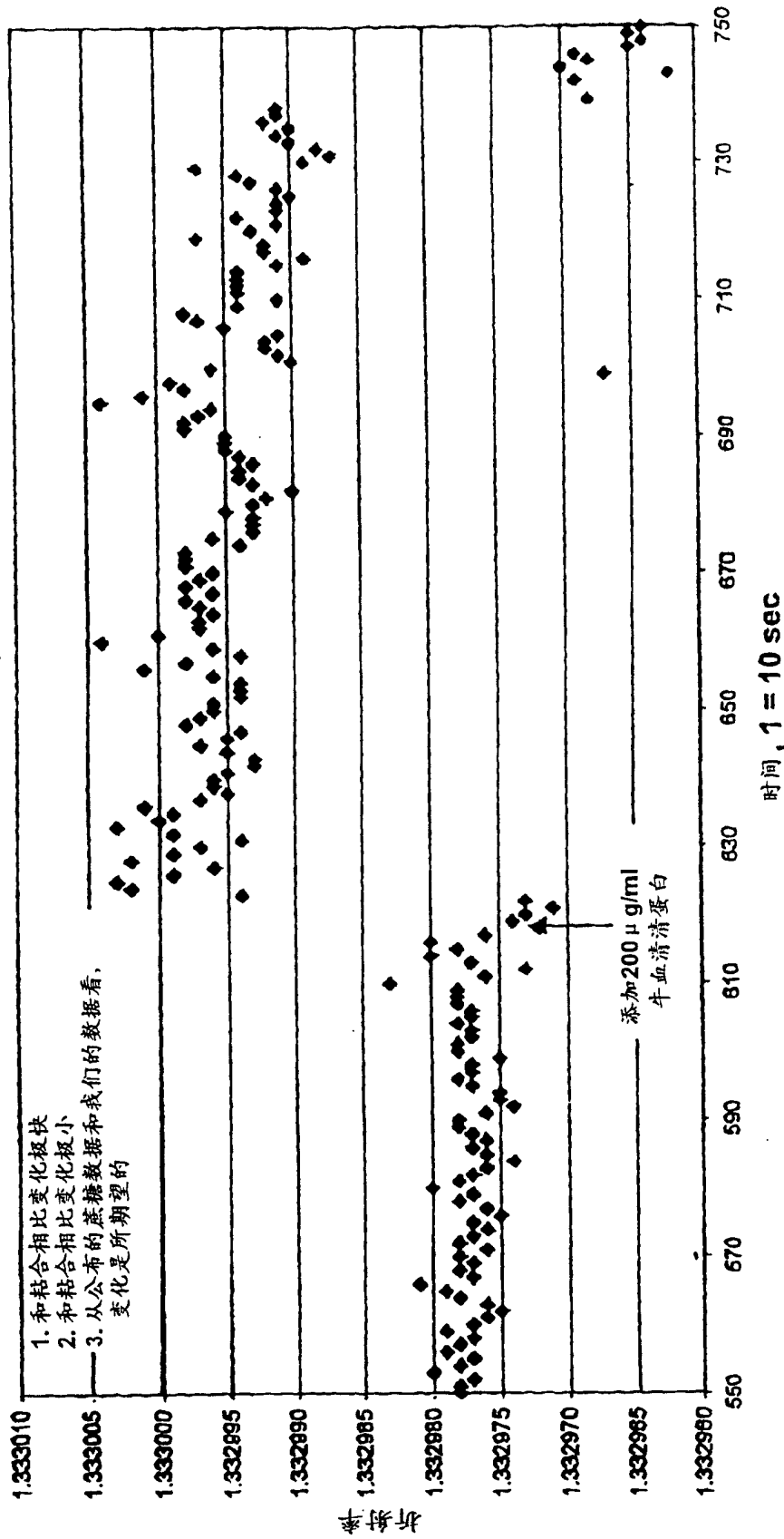


图 9

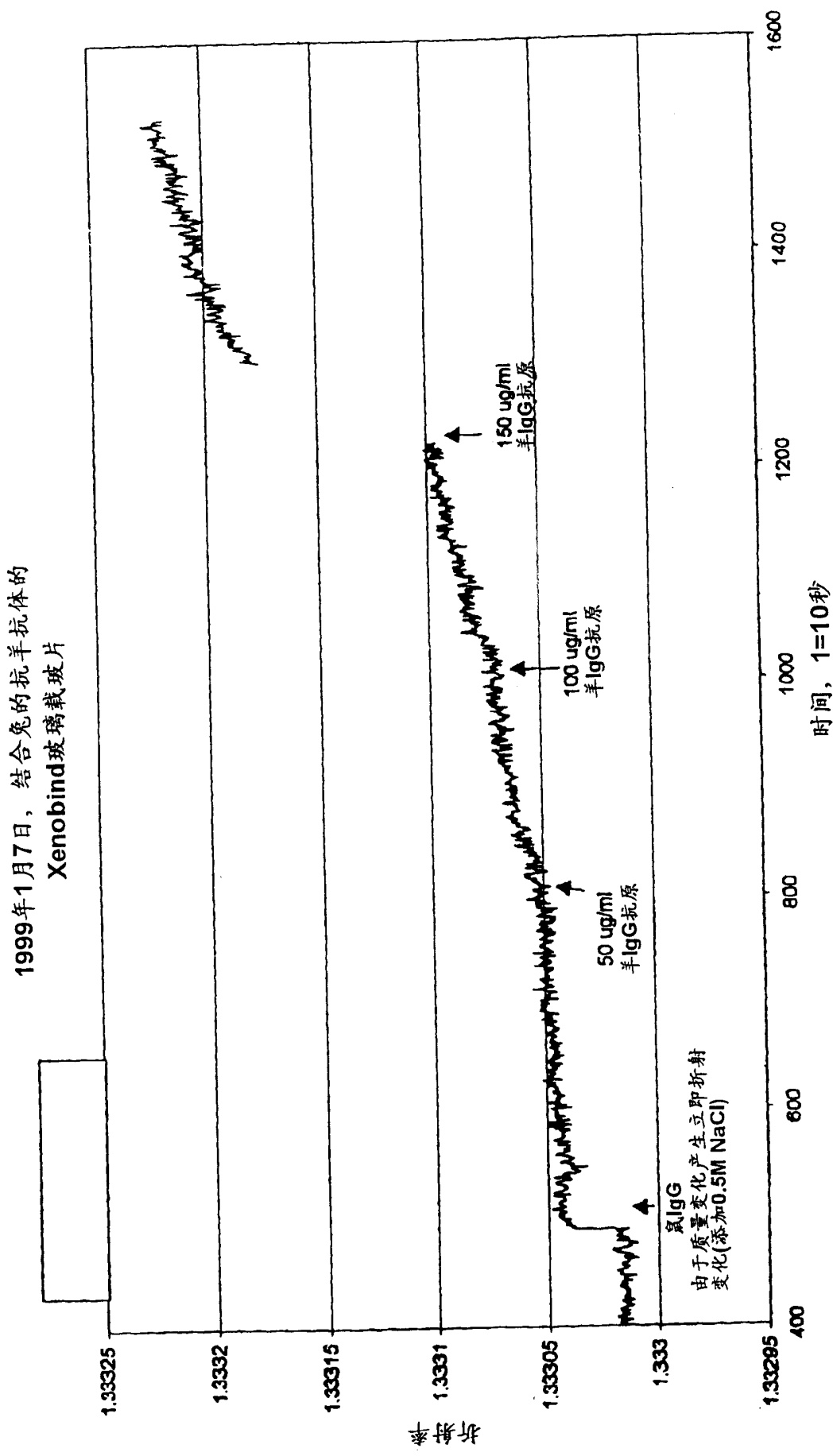


图 10a

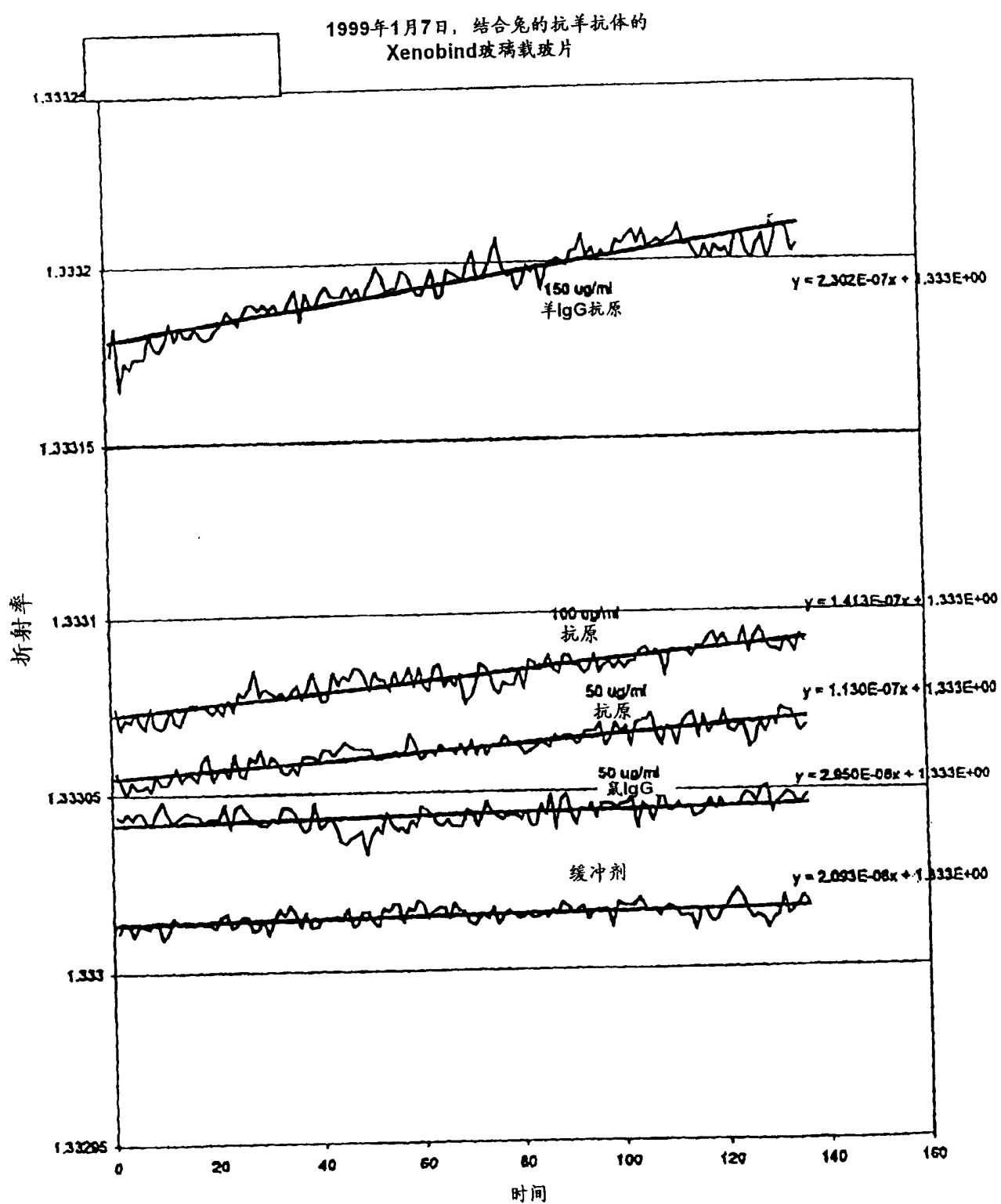


图 10b

Xenobind载玻片, 羊抗鼠, 1999年3月20日

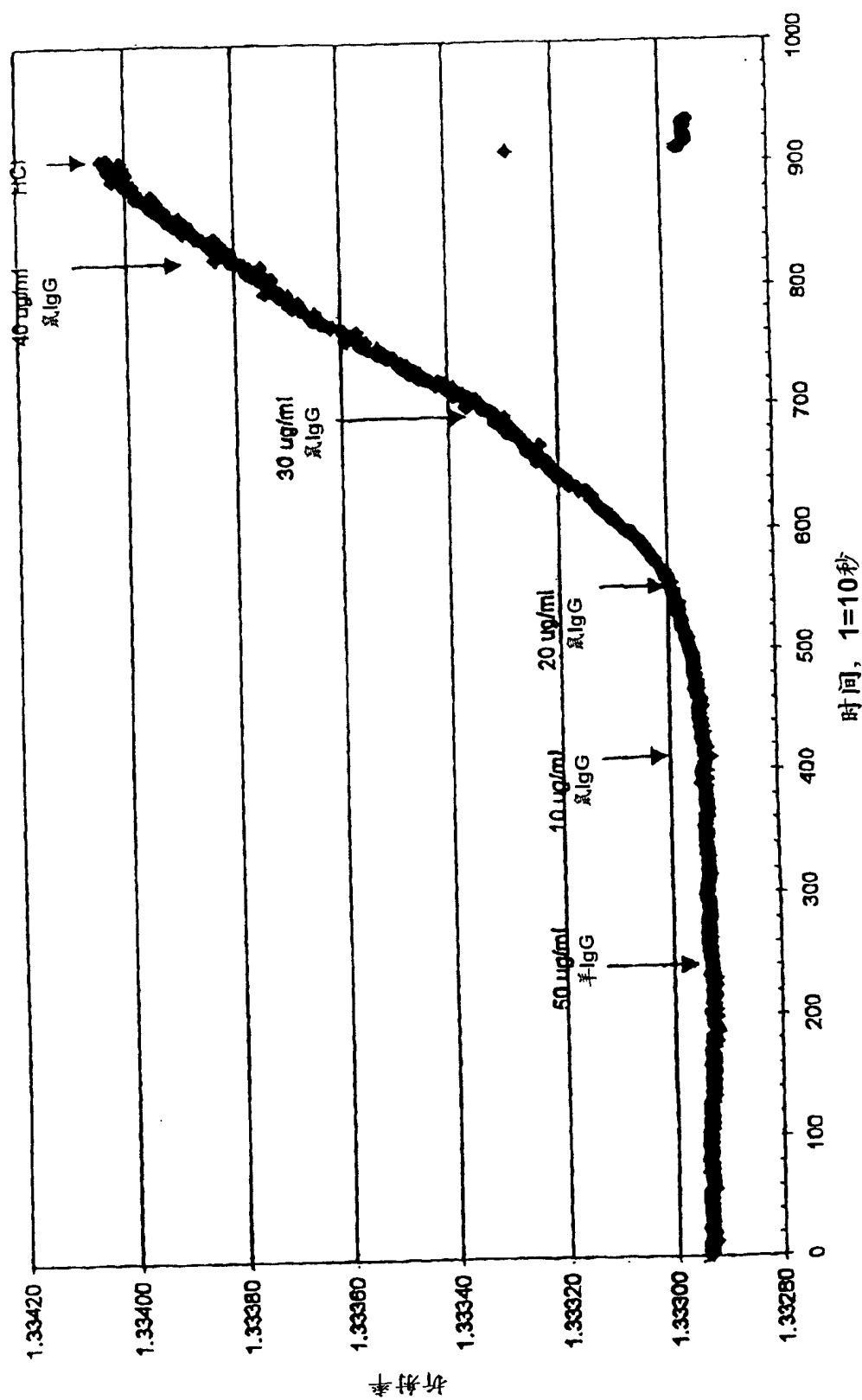


图 11a

Xenobind载玻片, 羊抗鼠, 1999年3月20日

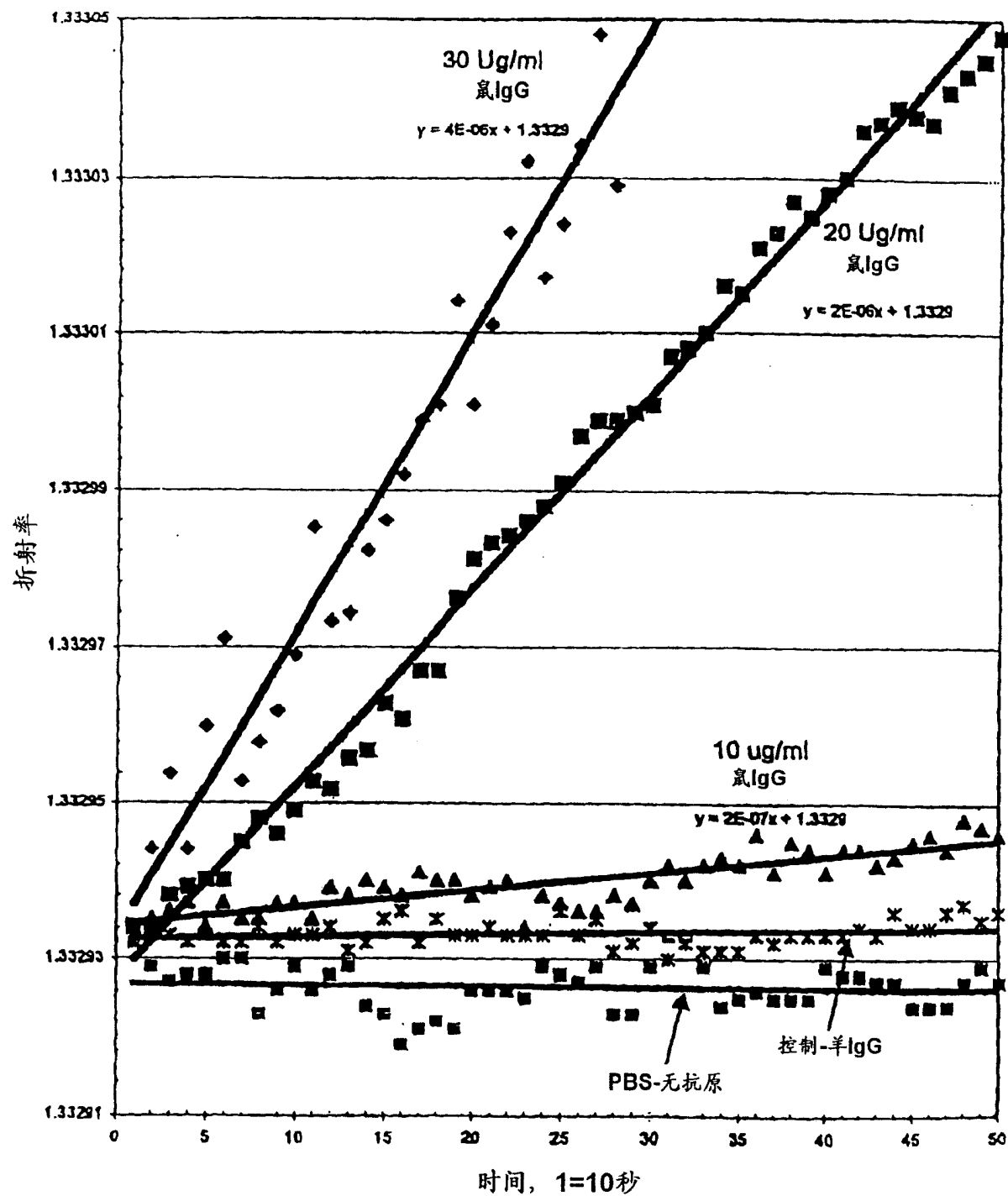


图 11b

1999年3月22日
生物素化玻璃, NAC羊抗鼠粘合

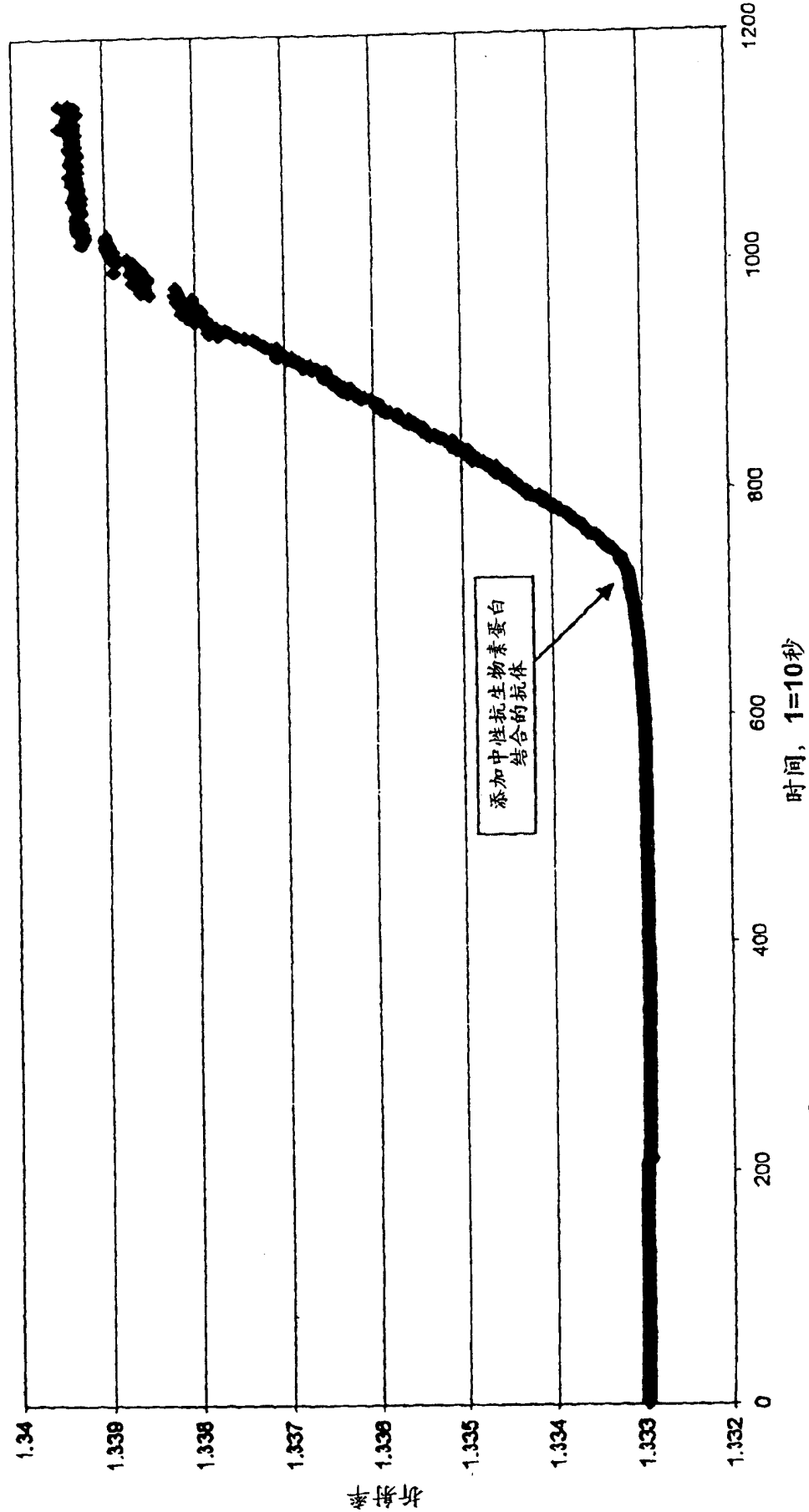


图 12

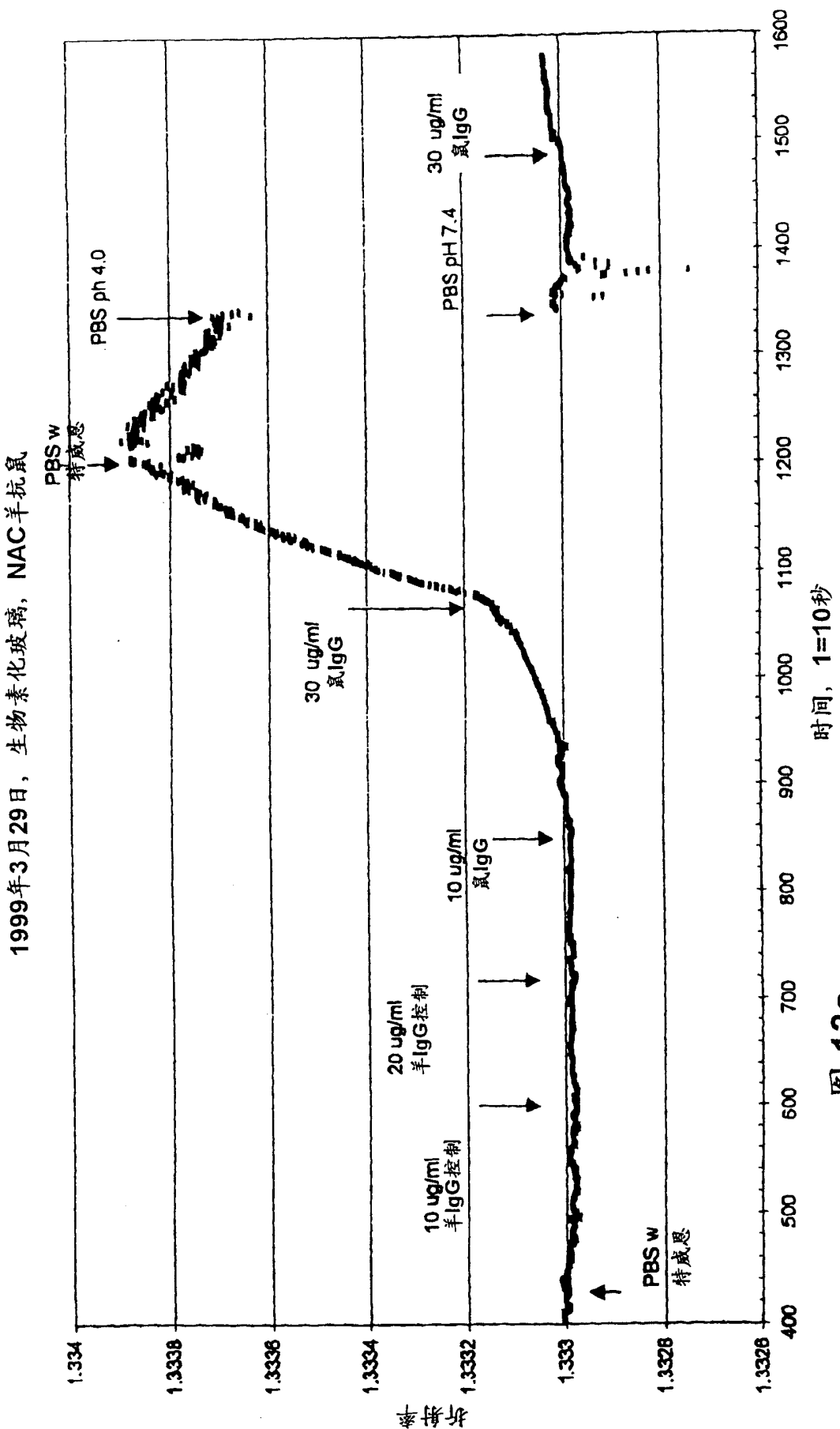


图 13a

1999年3月29日，生物素化玻璃，NAC羊抗鼠

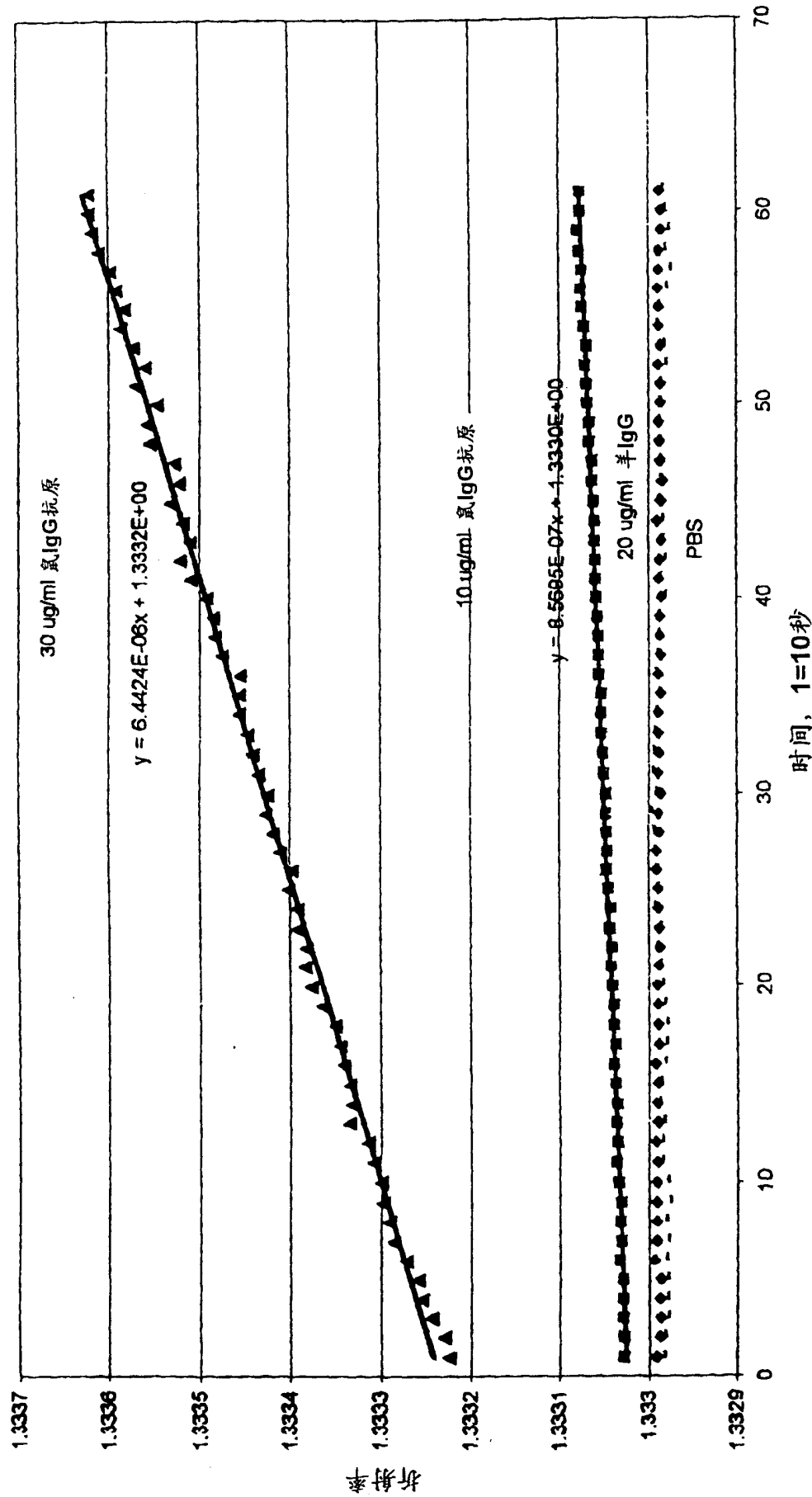


图 13b

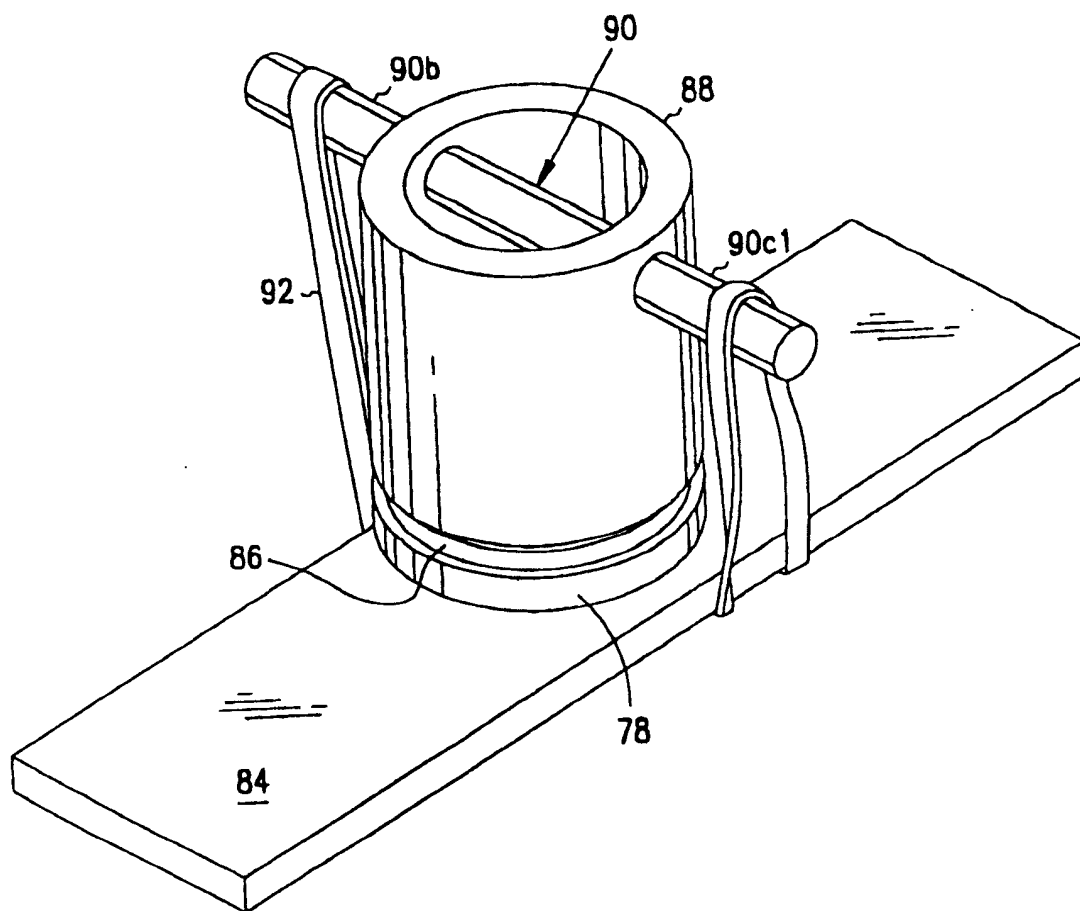


图 14

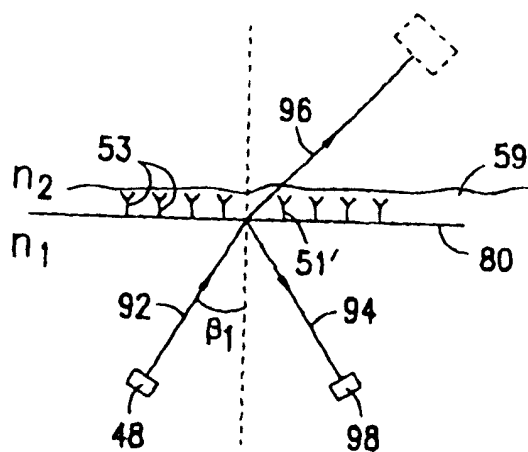


图 15a

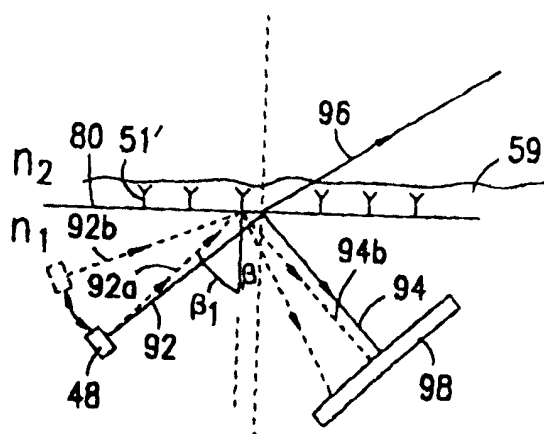


图 15b

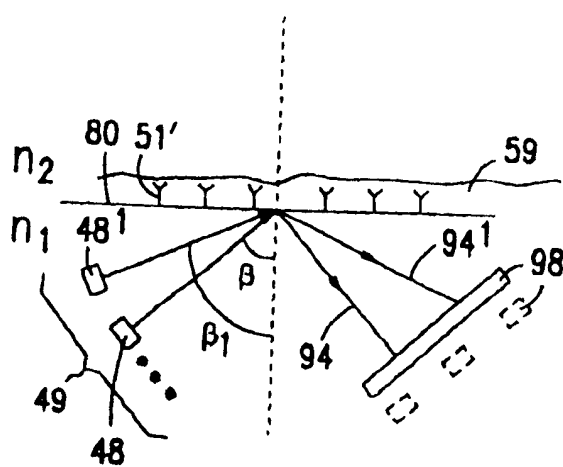


图 15c

试验7, 用中性抗生物素蛋白结合的羊抗鼠预先
培育的生物素化载玻片

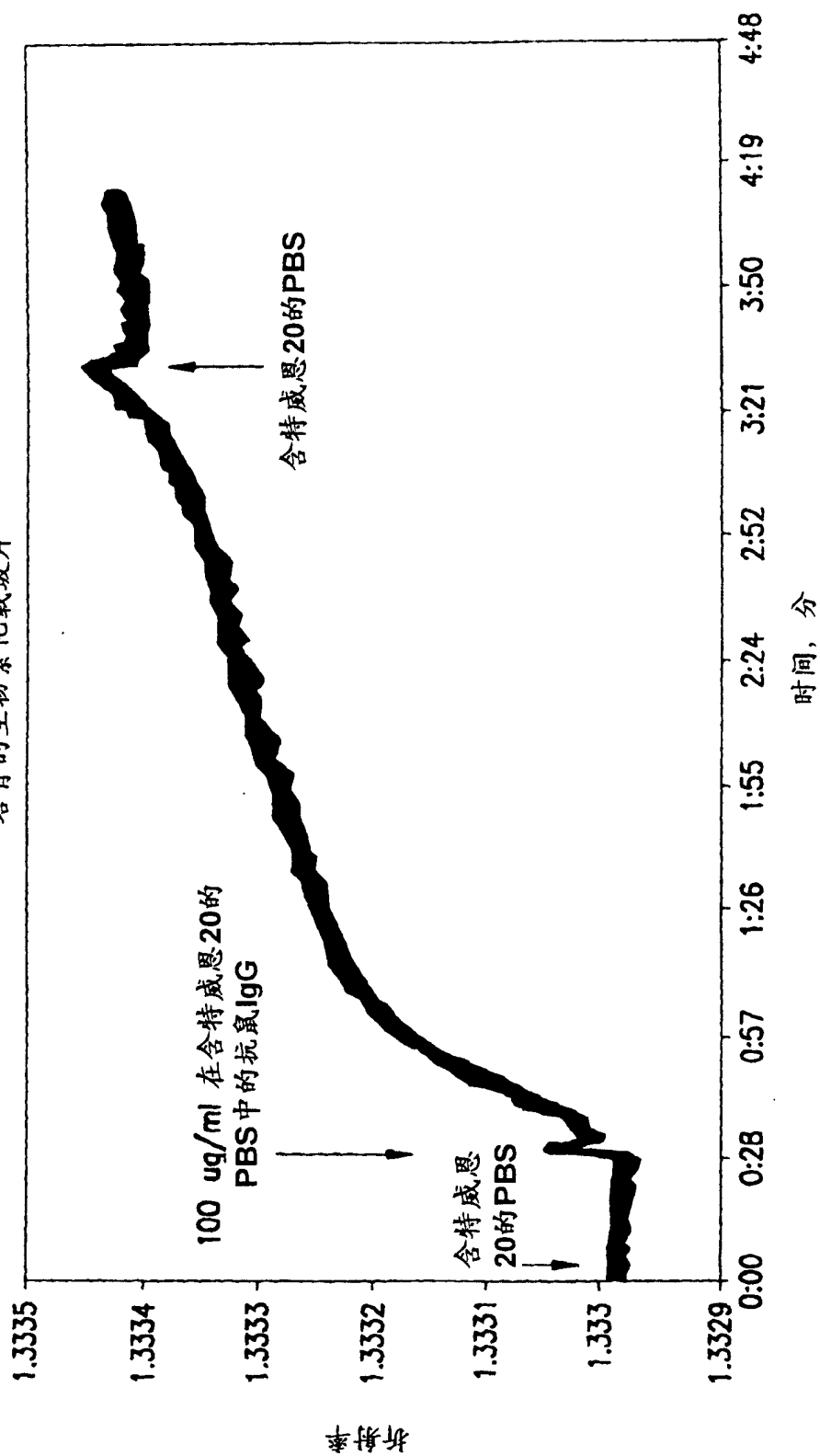
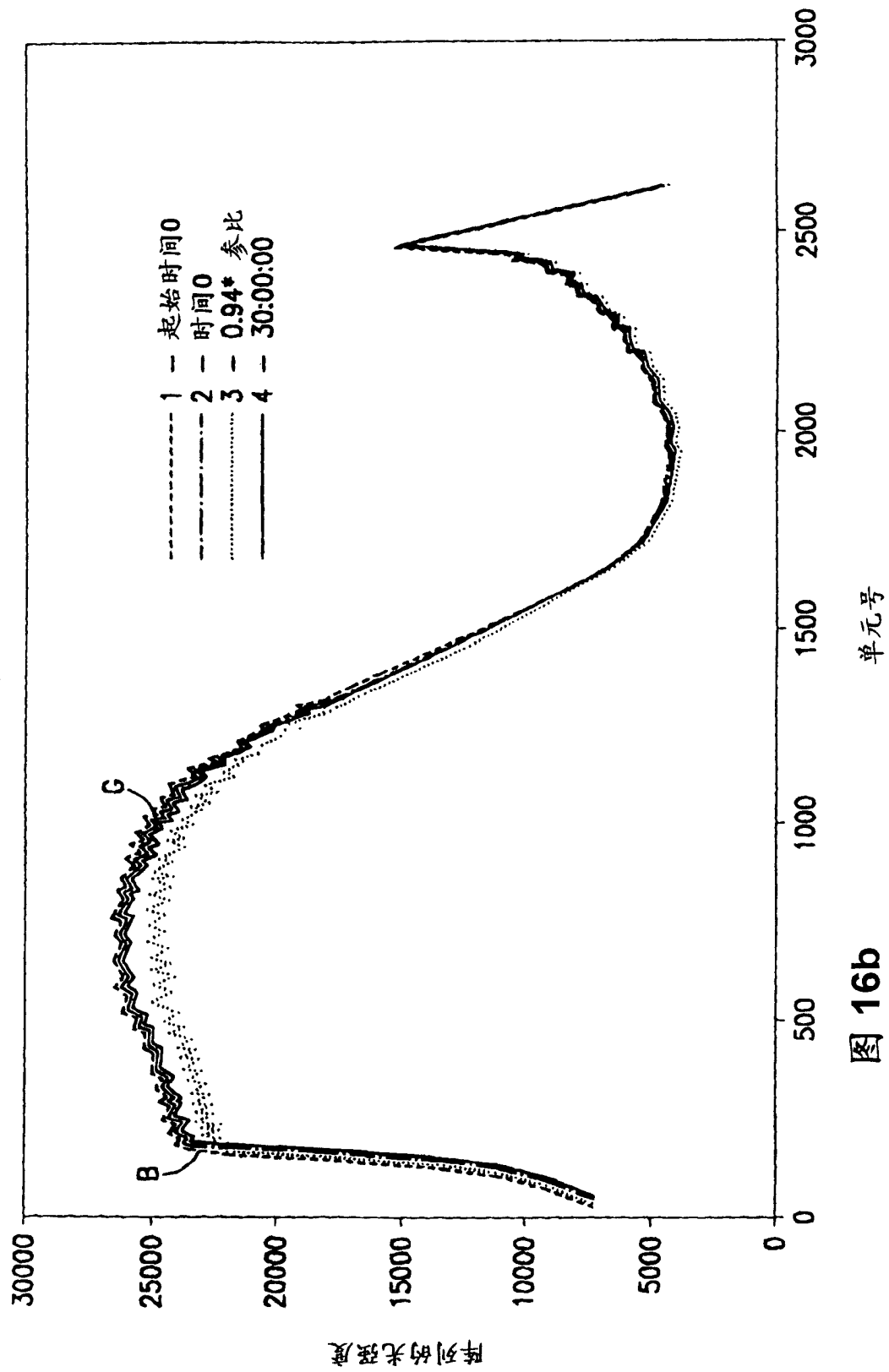


图 16a

试验7, 在生物素化玻璃上的中性抗生物素蛋白
结合的羊抗鼠



试验7, 在生物素化玻璃上的中性抗生物素蛋白
结合的羊抗鼠

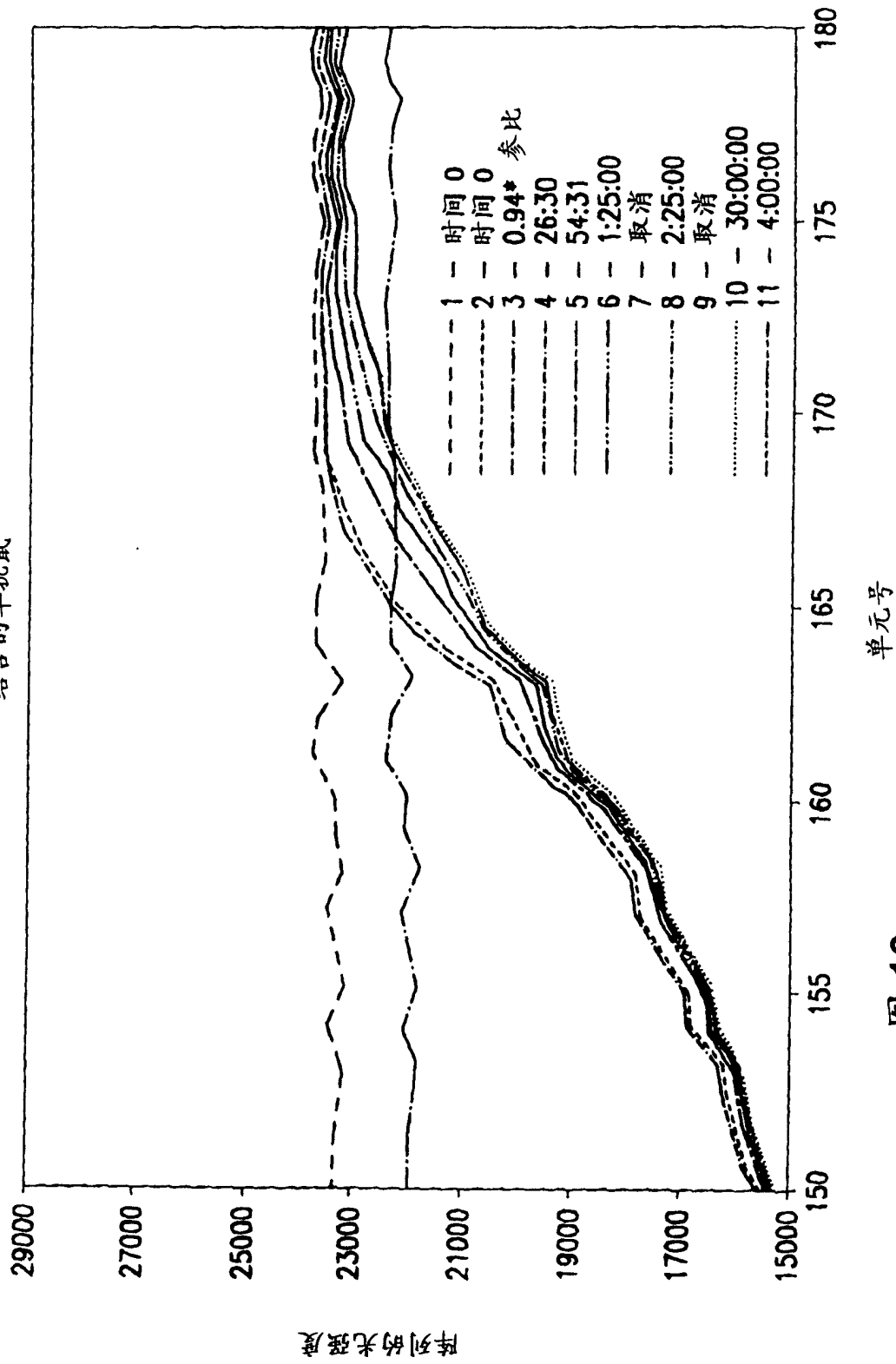


图 16c

试验7, 在生物素化玻璃上的中性抗生物素蛋白
结合的羊抗鼠

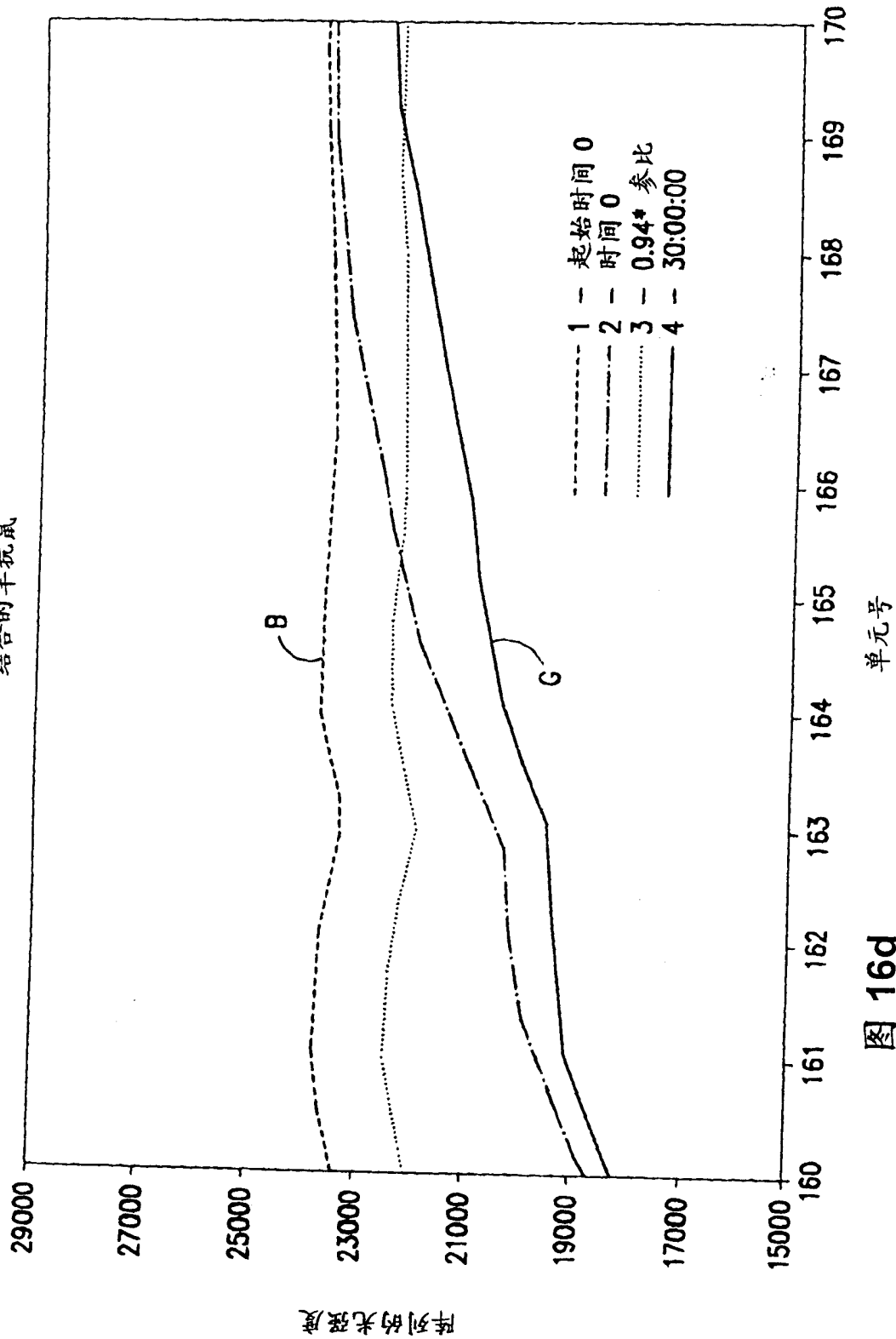


图 16d

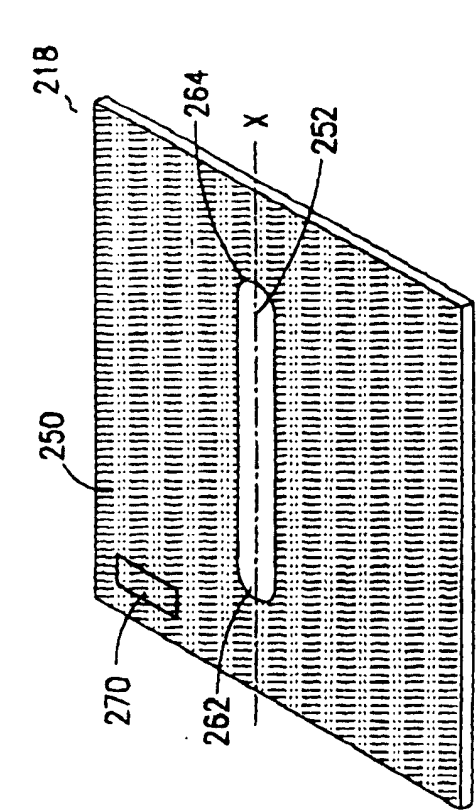


图 17a

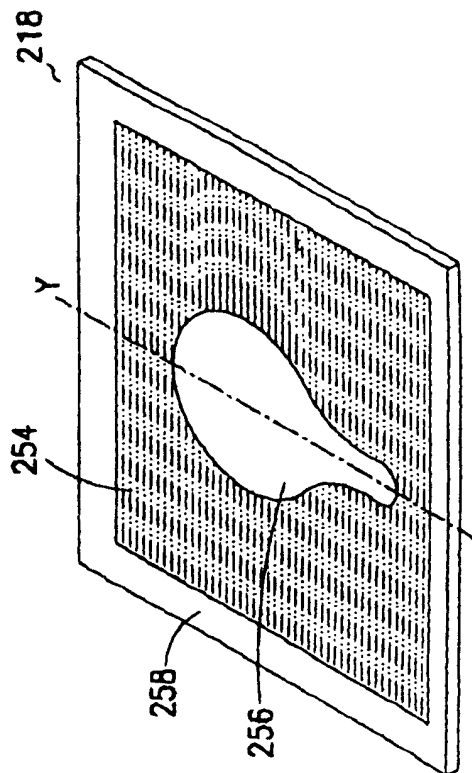


图 17b

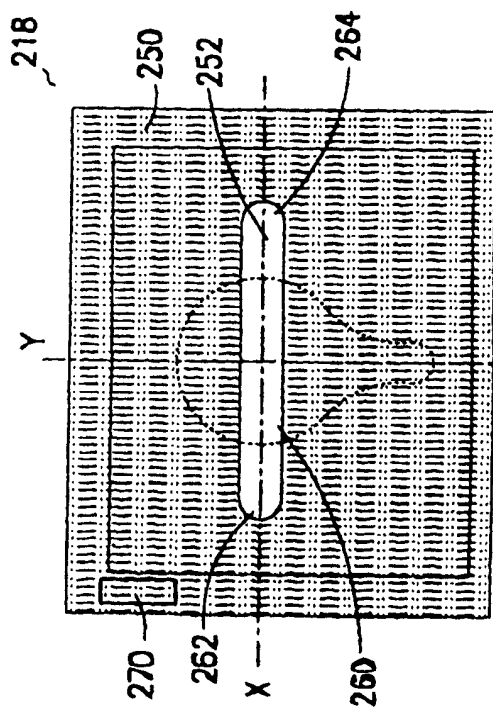


图 17d

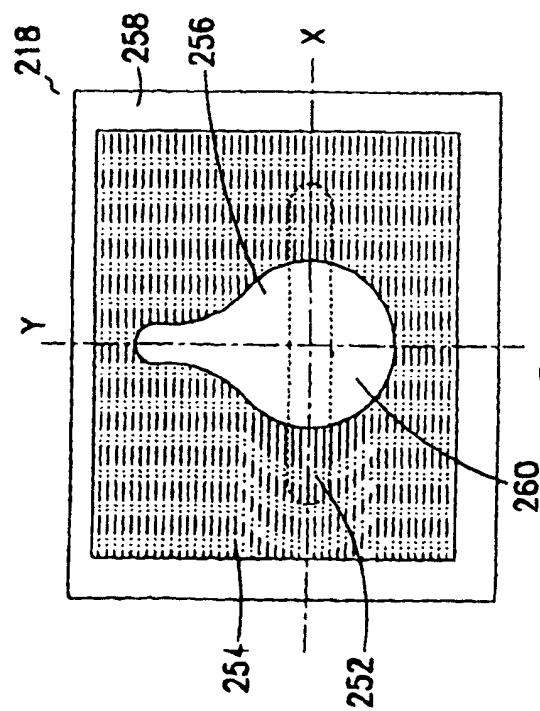


图 17c

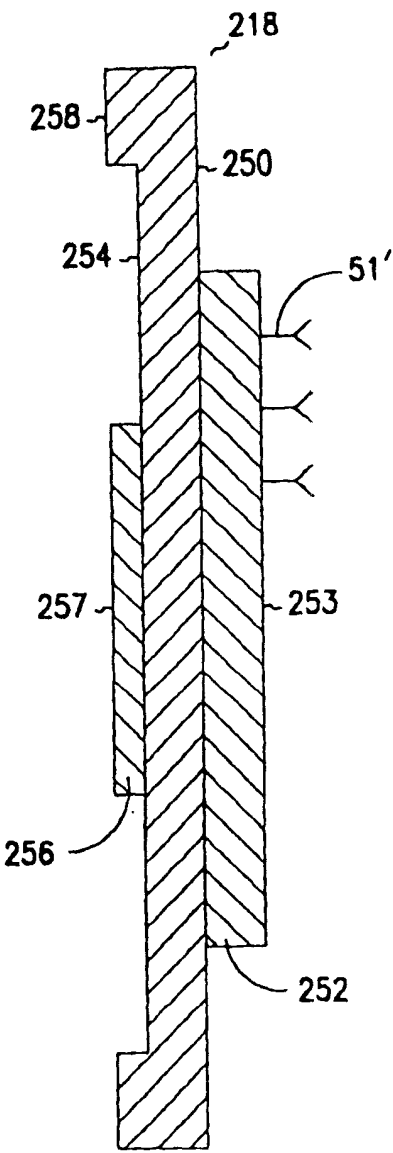


图 17e