

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>



[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 96193840.4

C12M 1/00

C12M 1/40 C12Q 1/00

C12Q 1/68 G01N 21/76

G01N 33/53 G01N 33/543

G01N 33/567

[43]公开日 1998年7月1日

[11]公开号 CN 1186513A

[22]申请日 96.3.6

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

[30]优先权

代理人 钟守期 王景朝

[32]95.3.10 [33]US[31]08 / 402,076

[32]95.3.10 [33]US[31]08 / 402,277

[86]国际申请 PCT / US96 / 03190 96.3.6

[87]国际公布 WO96 / 28538 英 96.9.19

[85]进入国家阶段日期 97.11.10

[71]申请人 梅索磅秤技术有限公司

地址 美国特拉华州

[72]发明人 J·沃尔斯塔德特尔 J·维尔布尔  
G·思加尔 M·马尔丁 L·H·古奥  
A·弗斯彻尔 J·勒兰德

权利要求书 30 页 说明书 88.0 页 附图页数26页

[54]发明名称 多阵列、多特异性的电化学发光检验

[57]摘要

提供了用于产生图案的、多阵列、多特异性表面的材料和方法，所述表面可用电子激发而用于基于电化学发光的检验。提供了用于化学和/或物理控制导电区域及试剂沉积的材料和方法，所述化学和/或物理控制导电区域及试剂沉积用于平板显示器以及多特异性检验方法。

## 权 利 要 求 书

1. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个电极和一个反电极，所述电极或反电极在其表面上固定了预定量的一种试剂，这种试剂能结合一种电化学发光标记的物质或一种电化学发光标记的物质的一种结合配对。  
5
2. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个电极或一个反电极，所述电极或反电极在其表面上固定了预定量的一种试剂，这种试剂能直接或间接地结合一种电化学发光标记的物质。
3. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个电极，所述电极在其表面上固定了预定量的一种试剂，这种试剂能结合一种结合电化学发光测定的一种组份。  
10
4. 如权利要求3所述的一种装置，其特征在于所述电极是工作电极。
5. 如权利要求3所述的一种装置，其特征是所述电极是反电极。
6. 如权利要求3所述的一种装置，其特征是上述固定了的试剂和电  
15 极的复合物基本上允许电子在所述电极和电化学发光标记物之间传递。
7. 如权利要求3所述的一种装置，其特征是所述电极由多孔材料构成。
8. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个  
20 多孔电极和一个反电极。
9. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个工作电极和一个反电极，所述工作电极在其表面上固定了预定量的一种试剂并与这种试剂电化学接触，这种试剂能结合一种结合电化学发光测定的一种组份。
10. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个  
25 工作电极和一个反电极，所述反电极在其表面上固定了预定量的一种试剂并与这种试剂电化学接触，这种试剂能结合一种结合电化学发光测定的一种组份。
11. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个电极、一个反电极和一种多孔基质，这种多孔基质与所述电极电化  
30 学接触，所述多孔基质在其表面上含有预定量的一种试剂，这种试剂能结合一种结合电化学发光测定的组份。

12. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个电极和许多离散的结合区域，所述结合区域能结合一种结合电化学发光测定的一种组份。

5 13. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个工作电极和许多离散的结合区域，该结合区域的每一个都含有预定量的一种试剂，这种试剂能结合一种结合电化学发光测定的一种组份。

14. 如权利要求 13 所述的一种装置，其特征是这种装置还包括一个反电极。

10 15. 如权利要求 13 所述的一种装置，这种装置还包括一个反电极、样品发送装置和光检测装置。

16. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括：

( a ) 一个电极，

15 ( b ) 许多离散的结合区域，该结合区域的每一个都含有预定量的一种试剂，这种试剂能结合一种结合电化学发光测定的一种组份，

( c ) 一个反电极，

( d ) 用于给所述那些结合区域发送样品的装置，

( e ) 用于引发电化学发光的装置，以及

( f ) 用于电化学发光检测的装置。

17. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括：

20 ( a ) 一个电极，

( b ) 一个载体，这个载体上固定了许多离散的结合区域，该结合区域的每一个都含有预定量的一种试剂，这种试剂能结合一种结合电化学发光测定的一种组份，

( c ) 一个反电极，

25 ( d ) 用于给所述那些结合区域发送样品的装置，

( e ) 用于引发电化学发光的装置，以及

( f ) 用于电化学发光检测的装置。

18. 如权利要求 17 所述的一种装置，其特征是所述许多区域与所述电极电化学接触。

30 19. 如权利要求 17 所述的一种装置，其特征是所述电极是多孔的。

20. 如权利要求 19 所述的一种装置，其特征是所述电极由一种含碳的材料构成。

21. 如权利要求 17 所述的一种装置，其特征是所述电极由原纤维构成。
22. 如权利要求 17 所述的一种装置，其特征是所述电化学发光检测装置检测来自所述那些离散的结合区域的一个或多个的电化学发光。
- 5 23. 如权利要求 17 所述的一种装置，其特征是所述载体是多孔基质。
24. 如权利要求 17 所述的一种装置，其特征是所述载体是多孔基质，而所述电极是多孔的。
25. 如权利要求 17 所述的一种装置，其特征是所述载体是多孔基质，所述基质定位在所述电极和反电极之间。
- 10 26. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括：  
( a ) 一个电极，  
( b ) 许多离散的结合区域，该结合区域的每一个都含有预定量的一种试剂，这种试剂能结合一种结合电化学发光测定的一种组份，  
( c ) 一个反电极，  
15 ( d ) 用于给所述那些结合区域发送样品的装置，  
( e ) 用于引发电化学发光的装置，以及  
( f ) 许多用于电化学发光检测的装置。
27. 如权利要求 26 所述的一种装置，其特征是所述许多用于电化学发光检测的装置被用来使一个或多个所述的那些结合区域成像。
20. 28. 如权利要求 27 所述的一种装置，其特征是所述的许多检测装置中的至少一个检测来自一个结合区域的电化学发光。
29. 如权利要求 27 所述的一种装置，其特征是所述许多用于电化学发光检测的装置是 CCD 阵列或二极管阵列。
- 25 30. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个电极，这个电极的表面上固定了许多离散的结合区域，所述这些结合区域能结合一种结合电化学发光测定的一种组份。
31. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个电极，这个电极的表面上固定了许多离散的结合区域，该结合区域的每一个都含有预定量的一种试剂，这种试剂能结合一种结合电化学测定的一种组份。
- 30 32. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括

一个电极，这个电极的表面上固定了许多离散的结合区域，所述结合区域含有电化学发光标记物。

33. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个电极以及一个反电极，这个电极的表面固定了许多离散的结合区域，所述结合区域能产生许多电化学发光信号。

34. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个载体，这个载体在其表面上固定了许多离散的区域，所述区域的每一个都含有预定量的一种试剂，这种试剂能够结合一种结合电化学发光测定的一种组份。

35. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个电极和一个载体，载体的表面上固定了许多离散的结合区域，结合区域的每一个都含有预定量的一种试剂，这种试剂能结合一种结合电化学发光测定的一种组份，所述电极和所述结合区域电化学接触。

36. 如权利要求 35 所述的一种装置，其特征是所述电极是工作电极。

37. 如权利要求 35 所述的一种装置，其特征是上述电极是反电极。

38. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括：

- (a) 一个电化学电池，
- (b) 一个含有一个电极的第一表面，

39. 一种用于通过电化学发光检测被分析物的装置，这种装置包括一个第二表面，这个第二表面上固定了许多结合区域，结合区域的每一个都含有一种结合试剂，这种结合试剂能结合一种结合电化学测定的一种组份，所述第一和第二表面在空间上对准，以便使电子能在所述电极和一种电化学发光标记物之间传递，这种电化学发光标记物直接或间接地连接到所述结合试剂上。

40. 一种用于进行许多电化学发光测定的方法，这种方法包括下述步骤：

- (a) 在测定条件下，使许多离散的结合区域与含有一种或许多种所感兴趣的被分析物的样品接触；

- ( b ) 使所述许多区域的一个或多个电化学发光；以及
- ( c ) 检测在许多所述结合区域处的电化学发光。

41. 一种用于对许多不同的所感兴趣的被分析物进行许多电化学发光测定的方法，这种方法包括下述步骤：

- 5 ( a ) 在测定条件下，使许多离散的结合区域与含有许多所感兴趣的被分析物的样品接触；
- ( b ) 使所述许多离散的结合区域同时电化学发光；以及
- ( c ) 同时检测来自所述那些离散的结合区域的每一个的电化学发光。

10 42. 一种在一个载体上含有许多离散的结合区域的制品，所述那些结合区域互相之间具有空间构型，并在电化学发光测定中对于结合许多不同的所感兴趣的被分析物具有不同的结合特异性。

15 43. 一种在一个载体上含有许多离散的结合区域的制品，所述那些区域的每一个互相之间具有空间构型，而且每个所述区域在电化学发光测定中对所感兴趣的一种被分析物具有不同的结合特异性，每个区域含有与不同的所感兴趣的被分析物结合的、一种不同的结合组份。

20 44. 一种在一个载体上含有许多离散的结合区域的制品，所述那些区域互相之间具有空间构型，而且每个所述区域在电化学发光测定中对所感兴趣的一种被分析物具有不同的结合特异性，每个区域直接或间接地结合一种不同的所感兴趣的被分析物、并结合一种能电化学发光的组成成份。

25 45. 一种在一个载体上含有许多离散的结合区域的制品，这个载体包括一种多孔材料，所述那些区域的每一个互相之间具有空间构型，而且每个所述区域在电化学发光测定中对所感兴趣的一种被分析物具有不同的结合特异性，每个区域含有与不同的所感兴趣的被分析物结合的、一种不同的结合组分。

46. 如权利要求 45 所述的一种制品，其特征是所述多孔材料包括碳。

30 47. 如权利要求 45 所述的一种制品，其特征是所述多孔材料包括原纤维。

48. 一种在一个载体上含有许多离散的结合区域的制品，这个载体

包括官能化的原纤维，所述那些区域互相之间具有空间构型，而且每个所述区域在电化学发光测定中对所感兴趣的一种被分析物具有不同的结合特异性，每个区域直接或间接地结合一种不同的所感兴趣的被分析物、并结合一种能电化学发光的组成成份。

5 49. 一种在一个载体上含有许多离散的结合区域的制品，这个载体包括一种或多种聚合物基质，所述那些区域互相之间具有空间构型，而且每个所述区域在电化学发光测定中对所感兴趣的一种被分析物具有不同的结合特异性，每个区域直接或间接地结合一种不同的所感兴趣的被分析物、并结合一种能电化学发光的组成成份。

10 50. 一种用于通过电化学发光检测样品中的被分析物的盒，这种盒包括：

- ( a ) 在一个载体上的许多离散的结合区域；以及
- ( b ) 一个或多个电极和反电极对。

15 51. 一种用于通过电化学发光检测样品中的被分析物的盒，这种盒包括：

- ( a ) 在一个载体上的许多离散的结合区域；
- ( b ) 一个或多个在空间上与所述那些离散的结合区域对准的电极和反电极的对；以及
- ( c ) 用于把样品送到所述许多离散的结合区域上的装置。

20 52. 如权利要求 49 所述的一种盒，其特征是所述许多离散的结合区域至少形成一个表面，这个表面能结合一种结合电化学发光测定的一种组份。

25 53. 如权利要求 50 所述的一种盒，其特征是所述许多结合区域包括一些具有不同结合特异性的结合区域，以便同时结合存在于样品中的许多不同的所感兴趣的被分析物。

54. 一种用于检测或测量电化学发光的盒，这种盒包括：

- ( a ) 一个第一载体，这个第一载体上具有许多离散的结合区域；
- ( b ) 许多电极和反电极的对，所述许多离散的结合区域的每一个与所述许多电极和反电极的对中的一个靠近对准，所述离散的结合区域以及电极和反电极的对构成许多用于检测电化学发光或进行电化学发光测量的电池，所述电极/反电极对可由一个电能源以电压波形的形式访问，该电压波形能有效地引发电化学发光；以及

(c) 用于把样品送到所述许多离散的结合区域上的装置。

55. 如权利要求 53 所述的一种盒，其特征在所述许多结合区域包括一些具有不同结合特异性的结合区域，以便同时结合存在于样品中的许多所感兴趣的不同的被分析物。

5 56. 一种用于检测或测量样品中的所感兴趣的被分析物的盒，这种盒包括：

10 (a) 一个第一载体，第一载体表面上有许多离散的结合区域，所述那些离散的结合区域中的至少一个与其它结合区域的结合特异性不同，所述许多离散的结合区域的每一个是亲水性的并由一些疏水性区域围绕；

(b) 一个第二载体，第二载体具有许多亲水性区域，亲水性区域包含适于在其上进行化学测定的反应介质；以及

15 (c) 用于使所述许多离散的结合区域与所述许多反应介质接触的装置，从而使存在于每个结合区域上的要被分析的样品与反应介质接触。

57. 如权利要求 50 所述的一种盒，其特征是所述离散的结合区域还包括内部对照物。

58. 一种用于在一个载体上制备许多离散的结合区域的方法，这个载体含有结合试剂，这些结合试剂能结合所感兴趣的被分析物，包括下 20 述这些步骤：

(a) 在一个载体上形成一个自组装 (self assembled) 的单层，所述单层包括在该单层不与上述载体邻接的表面上的连接基团 A，所述第一连接基团 A 能特异性地结合一个连接基团 B；以及

25 (b) 使所述第一连接基团 A 接触一种能结合所感兴趣的被分析物的结合试剂，所述结合试剂结合所述连接基团 B，从而使所述结合试剂通过 A:B 键与所述单层连接，以形成一个结合表面，所述结合表面构造 30 成许多离散的结合区域。

59. 如权利要求 57 所述的一种方法，其特征是使许多不同的结合试剂结合许多离散的结合区域，并且其中，通过把许多流体样品从许多流体导管发送到所述单层上来进行所述接触步骤，每一种流体样品包含一种不同的结合试剂。

60. 一种用于在电化学发光结合测定中检测或测量被分析物的方法，包括下述步骤：

(a) 使固定在一个或多个载体的表面上的许多离散的结合区域与一种样品接触，这种样品含有许多被分析物和与一种电化学发光标记物连接的所述测定的一种组份；

(b) 在存在有适于进行电化学发光测定的反应介质的情况下，施加能有效地在一个或多个所述区域处引发电化学发光的一个电压波形；以及

(c) 检测或测量来自所述许多区域的电化学发光。

10 61. 一种用于对于许多所感兴趣的被分析物进行许多电化学发光测定的试剂盒，包括：

(a) 一种在一个载体上包含许多离散的结合区域的制品，所述结合区域互相之间具有空间构型，且在电化学发光测定中对于所感兴趣的许多不同的被分析物具有不同的结合特异性；以及

15 (b) 一个含有对于进行所述测定必需的一种试剂的容器。

62. 如权利要求 60 所述的一种试剂盒，这种试剂盒还包括一种用于进行所述测定的装置。

63. 一种用于对于许多所感兴趣的被分析物进行许多电化学发光测定的试剂盒，包括：

20 一个容器，含有用于许多电化学发光测定中的、对许多不同的被分析物特异性的一些结合组份。

64. 如权利要求 62 所述的一种试剂盒，这种试剂盒还包括一个或多个含有对于许多电化学测定不结合的一些组份的容器。

65. 如权利要求 62 所述的一种试剂盒，还包括一种制品，这种制品包括在一个载体上的许多离散的结合区域，所述结合区域互相之间具有空间构型、并在电化学发光测定中对所感兴趣的许多不同的被分析物具有不同的结合特异性。

66. 一种盒，这种盒包括：

(a) 在一个载体上的许多离散的结合区域，形成至少一个结合表面；

(b) 许多电极和反电极的对，其中，所述那些离散的结合区域与所述许多电极和反电极的对在空间上对准；以及

(c) 用于给所述许多离散的结合区域送样品的装置。

67. 一种盒，这种盒包括：

(a) 在一个载体上的许多离散的结合区域，形成至少一个结合表面；和

5 (b) 许多电极和反电极的对，其中，所述离散的结合区域与所述许多电极和反电极的对在空间上对准，并能邻近该许多电极和反电极的对，其中所述结合区域相对于载体的表面是亲水性的或疏水性的。

68. 一种盒，这种盒包括：

10 (a) 在一个载体上的许多离散的结合区域，形成至少一个结合表面；

(b) 许多电极和反电极的对，其中，所述离散的结合区域与所述许多电极和反电极的对在空间上对准，所述许多电极在所述结合表面上，每个电极邻接一个结合区域，而所述反电极在一个第二载体上；以及

15 (c) 一个用于把样品发送到所述许多离散的结合区域上的装置。

69. 如权利要求 68 所述的盒，其特征是所述结合区域相对于载体的表面是亲水性的或疏水性的。

70. 如权利要求 66 所述的一种盒，其特征是所述载体含有 2 到 500 个结合区域。

20 71. 如权利要求 66 所述的一种盒，其特征是所述许多结合区域包括一些具有不同结合特异性的结合区域，以同时结合存在于样品中的所感兴趣的多种不同的被分析物。

72. 一种用于检测或测量电化学发光的盒，这种盒包括：

(a) 一个第一载体，这个第一载体上面具有许多离散的结合区域；

25 (b) 许多电极和反电极的对，所述许多离散的结合区域对准并邻近所述许多电极和反电极的对，所述离散的结合区域以及电极和反电极的对形成许多用于检测电化学发光或进行电化学发光测量的元件，可通过一个能有效地触发电化学发光的电压波形形式的电能源访问所述电极/反电极的对；以及

30 (c) 一个用于把样品发送到所述许多离散的结合区域上的装置。

73. 如权利要求 72 所述的盒，该盒还包括能够置于邻接所述第一载

体的一个第二载体，以便在这两个载体之间提供含有样品的装置，其特征是所述许多电极和反电极的对固定在所述第二载体上。

74. 如权利要求 72 所述的盒，其特征是所述许多电极和反电极的对固定到所述第一载体上。

5 75. 如权利要求 72 所述的盒，该盒还包括能够邻接所述第一载体放置的一个第二载体，以便在这两个载体之间提供含有样品的装置，其特征是许多电极定位在所述第一载体上，而许多反电极定位在所述第二载体上，从而使所述许多电极和反电极能彼此邻近定位。

10 76. 如权利要求 72 所述的盒，其特征是所述许多离散的结合区域含有 5 到 1000 个结合区域。

77. 如权利要求 72 所述的盒，其特征是所述许多离散的结合区域含有至少这样一个结合区域，这个结合区域含有一些结合试剂，这些结合试剂彼此等同并且与容纳在其它结合区域中的结合试剂的特异性不同，以便结合所感兴趣的多种不同的被分析物。

15 78. 如权利要求 72 所述的盒，其特征是所述许多离散的结合区域包括至少这样一个结合区域，这个结合区域含有一些结合特异性不同的结合试剂。

79. 如权利要求 78 所述的盒，该盒还包括一个邻接所述第一或所述第二载体的反射表面。

20 80. 如权利要求 78 所述的盒，其特征是所述第一和第二载体、上述许多离散的结合区域以及上述许多电极和反电极的对基本上是透明的。

81. 如权利要求 72 所述的盒，其特征是所述电极和反电极的对的尺寸范围为：直径或宽度从 0.001mm 到 10mm。

25 82. 如权利要求 80 所述的盒，其特征是所述结合区域的尺寸范围为：直径或宽度从 0.001mm 到 10mm。

83. 如权利要求 72 所述的盒，其特征是所述电极和反电极的对的每一个可由至少一个电源单独访问。

84. 如权利要求 72 所述的盒，其特征是所述结合区域是亲水性的，并且由一个疏水性表面围绕。

30 85. 如权利要求 72 所述的盒，其特征是所述结合区域是疏水性的，并由一个亲水性的表面围绕。

86. 如权利要求 72 所述的盒，其特征是所述结合表面包括一个成图案的、自组装的单层。
87. 如权利要求 86 所述的盒，其特征是所述成图案的、自组装的单层包括链烷硫醇。
- 5 88. 如权利要求 87 所述的盒，其特征是所述结合区域能结合选自下述的被分析物：蛋白质、核酸、碳水化合物部分、抗体、抗原、细胞、有机化合物以及金属有机化合物。
- 10 89. 如权利要求 72 所述的盒，其特征是所述结合区域含有一些测定中的功能性试剂，所述这些测定选自临床化学测定、化学发光测定、免 疫测定以及核酸探针测定。
90. 如权利要求 73 所述的盒，还包括一个插在所述第二载体和所述离散的结合区域之间的可去除的电极保护屏障，在触发所述电化学发光之前可去除所述电极保护屏障。
- 15 91. 如权利要求 72 所述的盒，还包括在所述电极对的许多电极上的或邻接所述电极对的许多电极的导电材料，导电材料定位成能使电位延伸远离电极表面而进入测定介质。
92. 一种用于测量样品的电化学发光的装置，这种装置包括：
- ( a ) 许多用于保留至少一种样品的元件，所述许多元件由许多电极和反电极的对以及含有许多离散的结合区域的一个第一载体构成，所述许多离散的结合区域对准并邻近上述许多电极和反电极的对，所述电极和反电极的对可被单独访问，所述元件适于进行电化学发光测量，
- 20 ( b ) 适于给所述许多电极和反电极的对施加可控制的电压波形的电压控制装置，所述电压波形能有效地触发在所述许多元件中的电化学发光，以及
- 25 ( c ) 用于检测来自所述样品的电化学发光的光检测器装置。
93. 一种适于测量电化学发光的试剂盒，这种试剂盒在一个或多个容器中包括：
- ( a ) 在一个载体上的许多离散的结合区域，形成至少一个结合表面；和
- 30 ( b ) 许多电极和反电极的对，这些电极和反电极的对与所述许多离散的结合区域在空间上对准，并能被使得邻近所述许多离散的结合区域。

94. 如权利要求 93 所述的试剂盒，还包括至少一个第二载体，第二载体能邻接所述结合表面载体放置，以便提供含有样品的装置。

5 95. 如权利要求 94 所述的试剂盒，其特征是所述第二载体载有所述许多电极和反电极的对，所述许多电极和反电极的对能与所述许多离散的结合区域对准，并被使得邻近所述许多离散的结合区域。

96. 如权利要求 93 所述的试剂盒，这种试剂盒还包括适于进行电化学发光测定的一些试剂以及预定量的一种提纯过的所感兴趣的被分析物。

97. 一种用于检测或测量样品中的被分析物的盒，这种盒包括：

10 (a) 一个第一载体，这个第一载体的表面上有许多离散的结合区域以便形成至少一个结合表面，至少某些所述的离散的结合区域与其它结合区域的结合特异性不同，所述许多离散的结合区域的每一个都是亲水性的并由一些疏水性区域围绕，以及

15 (b) 一个第二载体，这个第二载体有许多亲水性区域，亲水性区域包含一些适于在其上进行化学测定的反应介质，以便形成测定表面，

能使所述许多离散的结合区域和所述许多反应介质接触，从而使存  
在于每个结合区域上的要被分析的样品与一种反应介质接触，以便检测  
或测量所感兴趣的被分析物。

98. 如权利要求 72 所述的盒，该盒还包括温度控制装置。

20 99. 一种用于进行所感兴趣的反应的盒，这种盒包括：

(a) 一个第一载体，在此载体的表面上有许多离散的区域，每一个所述区域是亲水性的并且由在所述第一载体表面上的一个疏水性区域围绕；以及

25 (b) 一个第二载体，在这个第二载体的表面上有许多离散的区域，每一个所述区域 (i) 是亲水性的并由在所述第二载体表面上的一个疏水性区域围绕，(ii) 包括一些适于进行所感兴趣的一种反应的反应介质，以及 (iii) 在空间上与在所述第一载体表面上的上述区域对准，从而使所述第二载体定位成使在所述第二载体表面上的每个所述区域与在所述第一载体表面上的一个对准的区域接触。

30 100. 如权利要求 66 所述的盒，其特征是所述那些离散的结合区域还包括一种内部对照物。

101. 如权利要求 92 所述的装置，其特征是所述许多离散的结合区域包括至少两个相同的结合区域。

102. 一种结合表面，这种结合表面是下述过程的产物：

(a) 在一个载体上形成一个自组装的单层，所述单层在该单层不邻接上述载体的表面上包括一个第一连接基团 A，所述第一连接基团 A 能与一个第二连接基团 B 特异性地结合，所述单层被施加到在所述载体上的至少一个区域；以及

10 (b) 使所述第一连接基团 A 接触一种结合试剂，所述结合试剂能结合一种所感兴趣的被分析物，使所述结合试剂连接所述连接基团 B，从而使所述结合试剂通过一种 A : B 键而与所述单层连接，形成一个结合表面，

所述结合表面被构造为许多离散的结合区域，离散的结合区域含有能结合一种所感兴趣的被分析物的所述结合试剂。

103. 一种装置，这种装置包括权利要求 22 的结合表面。

104. 如权利要求 66 所述的盒，其特征是所述载体包括一种弹性材料。

105. 一种用于在一个载体上制备许多离散的结合区域的方法，这种方法包括下述这些步骤：

(a) 在一个载体上形成一个自组装的单层，所述单层包括一个在所述单层不邻接上述载体的第一连接基团 A，所述第一连接基团 A 能特异性地结合一个第二连接基团 B，把所述单层施加到所述载体上的至少一个结合区域；以及

25 (b) 使所述第一连接基团 A 与一种结合试剂接触，所述结合试剂能结合所感兴趣的被分析物，使所述结合试剂与所述连接基团 B 连接，从而使所述结合试剂通过一种 A : B 键而连接到所述单层，形成一个结合表面，

把所述结合表面构造为许多离散的结合区域，离散的结合区域含有能结合所感兴趣的被分析物的结合试剂。

106. 如权利要求 105 所述的方法，其特征是在步骤 (a) 中，通过选自下述的一种方法，使所述单层制成为在所述载体上的图案：显微蚀刻、微记录头沉积 ( micro - pen deposition ) 以及微观压印 ( microstamping )。

107. 如权利要求 105 所述的方法，其特征是所述结合试剂选自蛋白质及其片段和其衍生物、以及核酸及其片段和其衍生物。

108. 如权利要求 105 所述的方法，其特征是所述结合试剂选自抗体及其结合片段、抗原、抗原决定部位、细胞及细胞组份、酶、酶底物、  
5 外源凝集素、蛋白质 A、蛋白质 B、有机化合物、金属有机化合物以及碳水化合物组成成份。

109. 如权利要求 105 所述的方法，其特征是所述结合试剂包括许多不同的结合试剂，并且通过从一个多阵列的流体导管发送许多流体样品到所述单层上进行所述接触步骤，每种流体样品包括一种不同的结合试剂，从而使所述单层上的结合表面的离散的结合区域具有与其连接的一些不同的结合试剂。

110. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

( a ) 使位于一个或多个载体的表面上的许多离散的结合区域与含有连接到电化学发光标记物的分子的样品接触；

15 ( b ) 在许多电极和反电极的对的每一个处施加能有效地触发电化学发光的电压波形，所述许多电极和反电极的对与所述许多离散的结合区域在空间上对准并邻近所述许多离散的结合区域，以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

111. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是所述许多离散的结合区域的范围为 5 至 1000 个结合区域。  
20

112. 如权利要求 110 所述的方法，其特征在于所述许多离散的结合区域包括至少这样一个结合区域，所述结合区域含有一些结合试剂，这些结合试剂彼此相同并且与容纳在其它结合区域中的结合试剂的特异性不同，以便结合多种不同的所感兴趣的被分析物。

25 113. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是所述载体包括一个反射表面。

114. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是所述载体、结合表面以及电极和反电极的对基本上是透明的。

30 115. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是所述那些结合区域的尺寸范围为：直径或宽度从 0.001mm 到 10mm。

116. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是所述电极和反电极的对可由至少一个电能源单独访问。

117. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是所述结合区域是亲水性的并由一个疏水性表面围绕。
118. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是所述结合区域是疏水性的并由一个亲水性的表面围绕。
- 5 119. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是所述结合区域为成图案状、自组装的单层。
120. 如权利要求 119 所述的方法，其特征是所述结合区域能特异性地结合选自下述的一种被分析物：蛋白质、核酸、碳水化合物组成成份、抗体、抗原、细胞及细胞组份、有机化合物以及金属有机化合物。
- 10 121. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是所述方法还包括使所述结合区域与适于进行选自下述的一种测定的反应介质接触：临床化学测定、免疫测定以及核酸探针测定。
122. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是所述一个或多个载体是许多叠置定位的载体，并且所述载体的至少一部分对于电化学发光所产生的光基本上是透明的，使所述许多载体的每一个邻接所述那些载体的另一个定位。
- 15 123. 一种用于检测或测量样品中的电化学发光的方法，这种方法包括：
- ( a ) 使许多离散的结合区域中的一个或多个与含有连接到电化学发光标记物的分子的样品接触，所述许多结合区域位于一个或多个载体的表面上，其特征是许多电极和反电极的对与所述许多离散的结合区域在空间上对准，其中，所述许多电极和反电极的对存在于第二载体的表面上，
- ( b ) 把所述第二载体表面放置得邻近所述结合表面，从而使每个所述电极和反电极的对邻近一个不同的结合区域，
- 20 ( c ) 在所述许多电极和反电极的对的每一个处施加一个能有效地触发电化学发光的电压波形，以及
- ( d ) 检测或测量所述电化学发光。
124. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是在步骤 ( a ) 期间，通过一个可去除的电极保护屏障保护所述许多电极和反电极的对免于接触上述样品，而且所述方法还包括在施加所述电压波形之前去除所述屏障。

125. 一种用于检测或测量样品中所感兴趣的被分析物的方法，这种方法包括：

(a) 把含有要被检测或测量的被分析物的样品的液滴放置在载体表面上的许多离散的结合区域上，所述许多离散的结合区域包括至少一个结合区域，这个结合区域含有一些结合试剂，这些结合试剂彼此相同并且与容纳在其它结合区域中的结合试剂的特异性不同，所述离散的结合区域的每一个的特征为疏水性的或亲水性的，条件是围绕每个所述结合区域的所述载体表面的区域是 (i) 疏水性的，如果所述结合区域是亲水性的，以及 (ii) 亲水性的，如果所述结合区域是疏水性的，以便使得上述样品中的所述一种或多种所感兴趣的被分析物能与所述结合区域结合，以及

(b) 使在所述第一载体上的所述液滴与具有许多离散的亲水性区域的一个第二载体的一个表面接触，所述许多离散的亲水性区域上面包括一些适于进行化学测定的反应介质，以及

(c) 确定与所述结合区域结合的所感兴趣的所述被分析物的存在。

126. 一种用于检测或测量样品中所感兴趣的被分析物的方法，这种方法包括：

(a) 把含有要被检测或测量的被分析物的样品的液滴放置在载体表面上的许多离散的结合区域上，所述许多离散的结合区域包括至少一个结合区域，结合区域含有一些结合试剂，这些结合试剂彼此相同并且与容纳在其它结合区域中的结合试剂的特异性不同，所述离散的结合区域的每一个的特征为疏水性的或亲水性的，条件是围绕每个所述结合区域的所述载体表面的区域是 (i) 疏水性的，如果所述结合区域是亲水性的，以及 (ii) 亲水性的，如果所述结合区域是疏水性的，以便使上述样品中的所述一种或多种所感兴趣的被分析物能与所述那些结合区域结合，以及

(b) 把一种反应介质的液滴放在所述样品的液滴上；以及

(c) 确定与所述结合区域结合的所感兴趣的所述被分析物的存在。

127. 一种用于检测或测量样品中电化学发光的方法，这种方法包括按所述顺序进行的下述这些步骤：

(a) 使样品与一个载体的表面接触，所述表面含有许多离散的结

合区域，所述结合区域与许多电极和反电极的对在空间上对准，并能被使得邻近许多电极和反电极的对；

( b ) 使所述结合区域邻近所述许多电极和反电极的对；

( c ) 施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

5 ( d ) 检测或测量电化学发光。

128. 一种用于检测或测量样品中电化学发光的方法，这种方法包括：

( a ) 使样品与一个载体的表面接触，所述表面含有许多离散的结合区域；

10 ( b ) 邻近所述结合区域、在所述载体的上述表面上方、扫描一个电极和反电极的对，且同时施加一个能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( c ) 检测或测量电化学发光。

129. 如权利要求 109 所述的方法，其特征是每个所述结合区域 制备成能使它与许多电极和反电极的对在空间上对准并邻近所述许多电极和反电极的对。

130. 一种检测或测量样品中一种所感兴趣的被分析物的方法，这种方法包括：

20 ( a ) 使样品与一个载体的表面接触，所述表面含有许多离散的结合区域，所述那些结合区域与许多电极和反电极的对在空间上对准并能被使得邻近所述许多电极和反电极的对，所述那些结合区域 ( i ) 含有电化学发光标记物，以及 ( ii ) 能结合一种所感兴趣的被分析物，其中，所述接触是在这样一些条件下，这些条件是使得能出现上述样品中的任何被分析物与所述那些结合区域的结合；

25 ( b ) 使所述结合区域邻近所述许多电极和反电极的对；

( c ) 施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

30 ( d ) 检测或测量电化学发光，其中，相对于在未进行所述接触步骤或在上述样品中没有任何所感兴趣的被分析物的情况下进行时所观察到的电化学发光，电化学发光的减弱表明了上述样品中存在所述被分析物或表明了上述样品中所述被分析物的量。

131. 一种检测或测量样品中的一种所感兴趣的被分析物的方法，这种方法包括：

( a ) 使样品与一个载体的表面接触，所述表面含有许多离散的结合区域，所述结合区域与许多电极和反电极 对在空间上对准并能被使得邻近所述许多电极和反电极的对，所述结合区域能结合一种所感兴趣的被分析物，其中，所述接触是在这样一种条件下，这些条件是使得能出现上述样品中的任何被分析物与所述结合区域的结合，而且其中所述样品含有连接到一种电化学发光标记物的分子；

( b ) 使所述结合区域邻近所述许多电极和反电极的对；

( c ) 施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

10 ( d ) 检测或测量电化学发光，其中，在背景水平上的电化学发光的增强表明上述样品中所述被分析物的存在或该被分析物的量。

132. 一种检测或测量样品中一种所感兴趣的被分析物的方法，这种方法包括：

15 ( a ) 使样品与一个载体的表面接触，所述表面含有许多离散的结合区域，所述结合区域与许多电极和反电极的对在空间上对准并能被使得邻近所述许多电极和反电极的对，所述结合区域能结合一种所感兴趣的被分析物，其中，所述接触是在这样一些条件下，这些条件是使得能出现上述样品中的任何被分析物与所述结合区域的结合；

( b ) 使所述结合区域与上述所感兴趣的被分析物的一种结合配对接触，其中，所述结合配对与一种电化学发光标记物连接；

20 ( c ) 使所述结合区域邻近所述许多电极和反电极的对；

( d ) 施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( e ) 检测或测量电化学发光，其中，在背景水平上的电化学发光的增强表明上述样品中所述被分析物的存在或该被分析物的量。

133. 如权利要求 131 所述的方法，其特征是同时进行步骤 ( a ) 和  
25 ( b )。

134. 如权利要求 131 所述的方法，其特征是在步骤 ( b ) 之前进行步骤 ( a )；而且，在步骤 ( a ) 之后、在步骤 ( b ) 之前清洗上述结合区域，以便去除未结合的被分析物。

135. 一种检测或测量样品中的所感兴趣的被分析物的方法，这种方法包括：

( a ) 使一种第一样品与一个载体的表面接触，所述表面含有许多

离散的结合区域，所述结合区域与许多电极和反电极的对在空间上对准并能被使得邻近所述许多电极和反电极的对，其中，所述样品含有与一种电化学发光标记物连接的一种所感兴趣的被分析物，其中，所述接触是在这样一些条件下，这些条件是使得能出现上述样品中的所述被分析物与所述结合区域结合；

( b ) 使一种第二样品与所述结合区域接触，此接触是在这样一些条件下，这些条件使得能出现在所述第二样品中的任何被分析物与所述结合区域的结合，其中，一种电化学发光标记物并不与在所述第二样品中的任何被分析物连接；

10 ( c ) 使所述结合区域邻近所述许多电极和反电极的对；

( d ) 施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( e ) 检测或测量电化学发光，其中，相对于当省略步骤 ( b ) 时、或相对于当在上述第二样品中没有被分析物时所观察到的电化学发光，电化学发光的减弱表明上述样品中所述被分析物的存在或该被分析物的量。

136. 如权利要求 131 所述的方法，其特征是上述样品由哺乳动物衍生出，而且其中，所述方法用于确定或证实所述哺乳动物的本性。

137. 如权利要求 131 所述的方法，其特征在上述样品含有来自哺乳动物的细胞，而所述方法用于测定所述样品中的细胞数目。

138. 一种用于进行所感兴趣的反应的方法，这种方法包括：

( a ) 把一种样品施加到在一个第一载体的表面上的许多离散的区域的每一个区域上，每一个所述区域是亲水性的并且由在所述第一载体表面上的一个疏水性区域围绕；以及

( b ) 定位一个第二载体，这个第二载体的表面上具有许多离散的区域，每一个所述区域 ( i ) 是亲水性的并且由在所述第二载体表面上的一个疏水性区域围绕； ( ii ) 包括适于进行一种所感兴趣的反应的反应介质，以及 ( iii ) 与在所述第一载体表面上的上述区域在空间上对准，以便使在所述第二载体表面上的每个所述区域与在所述第一载体表面上的一个对准的区域接触，从而使所述样品与所述反应介质接触。

139. 如权利要求 109 所述的方法，其特征是把所述许多流体样品同时发送到所述单层。

140. 如权利要求 110 所述的方法，其特征是所述载体包括一种弹性材料。

141. 如权利要求 119 所述的方法，其特征是所述成图案的自组装的单层包括链烷硫醇。

5 142. 一种用于检测或测量一种所感兴趣的被分析物的方法，这种方法包括：

( a ) 使许多离散的结合区域的一个或多个进行接触，所述许多结合区域位于一个或多个载体的表面上，其中，所述接触是与一种样品接触，这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子，其特征是  
10 在所述接触步骤期间，所述样品并不接触任何电极或反电极；

( b ) 使一个电极邻近所述许多结合区域的一个或多个区域；

( c ) 在所述许多结合区域的一个或多个区域处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( d ) 检测或测量电化学发光。

15 143. 一种用于检测或测量一种所感兴趣的被分析物的方法，这种方法包括：

( a ) 使许多离散的结合区域的一个或多个进行接触，所述许多结合区域 ( i ) 位于一个或多个载体的表面上，以及 ( ii ) 在空间上对准并邻近许多电极和反电极的对，其中，所述接触是与一种样品接触，这  
20 种样品含有与一种电化学发光标记物连接的分子；

( b ) 使一个电极和反电极邻近所述许多结合区域的一个或多个区域；

( c ) 在所述许多结合区域的一个或多个区域处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

25 ( d ) 检测或测量电化学发光。

144. 一种盒，这种盒包括：

( a ) 一个电极，这个电极在其表面上含有一种预定量的材料，这种材料包括构造成一个或多个离散的结合区域的结合试剂，所述结合试剂能特异性地结合一种电化学发光标记的分子或一种电化学发光标记的分子的一种结合配对，而且，所述材料 ( i ) 允许电子在所述电极和在  
30 所述电化学发光标记的分子中的电化学发光标记物之间传递，所述电化

学发光标记的分子与所述结合试剂结合、或者当所述结合配对与所述结合试剂结合时与所述结合配对结合，或者，(ii)使得所述电极能从所述电化学发光标记物产生光子；以及

(b) 一个反电极。

5 145. 一种盒，这种盒包括一个电极，这个电极在其表面上含有一种预定量的材料，这种材料包括一些构造成一个或多个离散的结合区域的结合试剂，所述结合试剂被电化学发光标记，而且，所述材料允许电子在所述电极和所述电化学发光标记物之间传递。

146. 如权利要求 143 所述的盒，其特征在所述电极是多孔的。

10 147. 如权利要求 144 所述的盒，其特征是所述电极是多孔的。

148. 一种盒，这种盒包括：

(a) 一个具有一个或多个离散的结合区域的载体，该结合区域含有一些结合试剂；

15 (b) 一种能透过离子的多孔基质，所述结合区域与所述多孔基质连接；

(c) 一个与所述结合区域电化学接触的电极；以及

(d) 一个反电极。

149. 如权利要求 147 所述的盒，其特征是所述结合试剂被电化学发光标记。

20 150. 一种盒，这种盒包括：

(a) 一个含有结合试剂的结合区域；以及

(b) 一个多孔载体，所述结合区域与所述多孔载体连接，所述多孔载体是一个与所述结合区域电化学接触的电极。

151. 如权利要求 149 所述的盒，这种盒还包括一个反电极。

25 152. 如权利要求 150 所述的盒，其特征是所述结合试剂与所述电极共价结合。

153. 一种盒，这种盒包括：

(a) 一个具有一个第一表面的第一载体，这个第一表面含有一个电极；以及

30 (b) 一个具有一个第二表面的第二载体，这个第二表面含有一个结合区域，所述第一和第二表面在空间上对准，以达到电化学接触。

154. 一种试剂盒，这种试剂盒包括：

( a ) 一个具有一个第一表面的第一载体，这个第一表面含有一个电极；

5 ( b ) 一个具有一个第二表面的第二载体，这个第二表面含有一个结合区域，所述结合区域含有一些预定量的试剂，所述第一和第二表面在空间上对准，以达到电化学接触；以及

( c ) 一个含有电化学发光标记的物质的小瓶。

155. 一种盒，这种盒包括：

10 ( a ) 一个具有一个第一表面的第一载体，这个第一表面含有一个电极；以及

( b ) 一个具有一个第二表面的第二载体，这个第二表面含有一个或多个离散的结合区域，所述第一和第二表面在空间上对准，以便使得电子能在与上述结合区域结合的一种电化学发光标记物和上述电极之间传递。

15 156. 如权利要求 154 所述的盒，其特征是上述第二表面是一种多孔材料，而且所述盒还包括一个反电极。

157. 一种盒，这种盒包括：

( a ) 一个具有一个第一表面的电极；

( b ) 一个具有一个第二表面的反电极；

20 ( c ) 一种在所述第一和第二表面之间的多孔材料，所述多孔材料含有一些能结合一种电化学发光标记的分子的结合试剂，所述多孔材料和所述第一表面在空间上对准，以便允许电子在一种分子上的 一种电化学发光标记物和所述第一表面之间传递，所述分子与一种或多种所述结合试剂结合。

25 158. 一种盒，这种盒包括

( a ) 一种多孔材料；

( b ) 一个反电极；

30 ( c ) 一个载体，这个载体上面有许多离散的结合区域，所述结合区域在空间上对准，以便使得电子能在一种电化学发光标记的物质和所述多孔电极之间传递，所述电化学发光标记的物质与上述结合区域连接。

159. 一种盒，这种盒包括：

( a ) 一个多孔电极；以及

5 ( b ) 一个反电极；所述多孔电极在其表面上含有一种材料，这种材料包括一些结合试剂，所述材料允许电子在所述电极和一种电化学发光标记物之间传递，这种电化学发光标记物与一种或多种所述结合试剂结合。

160. 一种盒，这种盒包括：

( a ) 一个载体，这个载体上面有许多离散的结合区域；

( b ) 一个用于朝向和远离所述结合区域运输流体的隔室；以及

10 ( c ) 一个电极和一个在空间上对准的反电极，以便从与所述许多离散的结合区域结合的一种电化学发光标记物产生电化学发光信号。

161. 一种盒，这种盒包括：

( a ) 一个电极，这个电极在其表面上含有许多离散的结合区域；  
以及

15 ( b ) 一个反电极。

162. 一种盒，这种盒包括：

( a ) 在一个载体上的许多离散的结合区域；

( b ) 一个电极；以及

20 ( c ) 一个反电极，所述电极能从与所述许多离散的结合区域连接的许多电化学发光标记物产生许多电化学发光信号。

163. 如权利要求 161 所述的盒，其特征是所述许多离散的结合区域含有一种电化学发光标记物，而且，所述盒还包括用于把样品发送到所述许多离散的结合区域上的装置。

25 164. 如权利要求 161 所述的盒，该盒还包括用于把样品发送到所述许多离散的结合区域上的装置。

165. 如权利要求 160 所述的盒，其特征是所述电极能从一种电化学发光标记物产生一种电化学发光信号，所述电化学发光标记物与所述结合区域中的至少一个结合。

166. 一种盒，这种盒包括：

30 ( a ) 一个载体，这个载体上面具有许多离散的结合区域；以及  
( b ) 一个或多个电极和反电极的对。

167. 如权利要求 165 所述的盒，该盒还包括用于把样品发送到所述许多离散的结合区域上的装置。

168. 一种试剂盒，这种试剂盒包括：

( a ) 一个电极，这个电极在其表面上含有构造成图案的一些离散  
5 的结合区域；

( b ) 一个用于朝向和离开所述那些结合区域运输流体的隔室；

( c ) 一个反电极；以及

( d ) 一个含有一些电化学发光标记的分子的小瓶。

169. 一种盒，这种盒包括：

10 ( a ) 与一个电极连接的许多离散的结合区域，所述电极邻近一种能透过离子的多孔基质；以及

( b ) 一个反电极。

170. 一种盒，这种盒包括：

15 ( a ) 许多离散的结合区域，所述结合区域与一种能透过离子的多孔基质连接；

( b ) 一个邻近所述能透过离子的多孔基质的电极；以及

( c ) 一个反电极。

171. 一种盒，这种盒包括：

20 ( a ) 许多离散的结合区域，所述结合区域与一种能透过离子的多孔基质连接；以及

( b ) 一个与许多所述结合区域电化学接触的电极。

172. 如权利要求 170 所述的盒，该盒还包括一个反电极。

173. 一种盒，这种盒包括：

25 ( a ) 许多离散的结合区域，所述许多结合区域与一种多孔载体连接；以及

( b ) 一个与许多所述结合区域电化学接触的电极。

174. 一种盒，这种盒包括：

( a ) 一个包括一个电极、一个反电极以及一种与所述电极接触的离子溶液的电化学电池；以及

30 ( b ) 一个载体，这个载体上有许多离散的结合区域，所述许多结合区域与所述电极电化学接触。

175. 如权利要求 143、144 或 160 所述的盒，其特征是上述电极包括碳原纤维。

176. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

( a ) 使在权利要求 143 的盒中的那些结合试剂与一种样品接触，

5 这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子；

( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

177. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

10 ( a ) 使在权利要求 144 的盒中的那些结合试剂与一种样品接触，这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子；

( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

15 178. 如权利要求 175 所述的方法，其特征是所述电极是多孔的。

179. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

( a ) 使权利要求 147 的盒中的那些结合试剂与一种样品接触，这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子；

20 ( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

180. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

( a ) 使权利要求 150 的盒中的那些结合试剂与一种样品接触，这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子；

25 ( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

181. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

30 ( a ) 使容纳在一个第一表面上的结合区域与一种样品接触，这种样品包括与一种电化学发光标记物连接的分子，所述第一表面与含有一个电极的第二表面对准，使所述第一和第二表面在空间上对准，以达到

电化学接触;

( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形; 以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

5 182. 如权利要求 180 所述的方法, 其特征是上述第一表面是一种多孔材料。

183. 一种用于检测或测量电化学发光的方法, 这种方法包括:

( a ) 使权利要求 156 的盒中的那些结合试剂与一种样品接触, 这种样品含有与一种电化学发光标记物连接的分子;

10 ( b ) 在所述第一表面和所述第二表面处施加能有效触发电化学发光的电压波形; 以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

184. 一种用于检测或测量电化学发光的方法, 这种方法包括:

( a ) 使权利要求 157 的盒中的那些结合区域与一种样品接触, 这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子;

( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形; 以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

185. 一种用于检测或测量电化学发光的方法, 这种方法包括:

20 ( a ) 使权利要求 158 的盒中的那些结合试剂与一种样品接触, 这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子;

( b ) 在所述电极表面和反电极表面处施加能有效地触发电化学发光的电压波形; 以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

25 186. 一种用于检测或测量电化学发光的方法, 这种方法包括:

( a ) 使权利要求 159 的盒中的那些结合区域与一种样品接触, 这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子;

( b ) 在所述电极表面和反电极表面处施加能有效地触发电化学发光的电压波形; 以及

30 ( c ) 检测或测量所述电化学发光。

187. 一种用于检测或测量电化学发光的方法, 这种方法包括:

( a ) 使权利要求 160 的盒中的那些结合区域与一种样品接触，这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子；

( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

5 ( c ) 检测或测量所述电化学发光。

188. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

( a ) 使权利要求 161 的盒中的那些结合区域与一种样品接触，这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子；

10 ( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

189. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

15 ( a ) 使在一个载体上的许多离散的结合区域与一种包括连接到一种电化学发光标记物的一些分子的样品接触，这种接触是通过把含有所述那些分子的样品发送到所述那些结合区域上来进行的，所述样品能够调节电化学发光信号，其中所述调节可与上述样品中的所感兴趣的被分析物的浓度关联；

20 ( b ) 在一个电极和反电极处施加能有效地触发来自一种电化学发光标记物的电化学发光的电压波形，所述这种电化学发光标记物与一种分子连接，这种分子与所述那些结合区域中的至少一个结合；

( c ) 测量所述电化学发光；以及

( d ) 确定上述所感兴趣的被分析物的所述浓度。

190. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

25 ( a ) 使权利要求 143 的盒中的那些结合试剂与一种样品接触，这种样品包括第一种分子和与一种电化学发光标记物连接的第二种分子，其中第二种分子是上述第一种分子的一种特异性结合配对；

( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

30 191. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

( a ) 使权利要求 165 的盒中的那些结合区域与一种样品接触，这

种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子；

( b ) 在所述电极和反电极对中的至少一个处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

5 192. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

( a ) 使权利要求 168 的盒中的那些结合区域与一种样品接触，这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子；

( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

10 ( c ) 检测或测量所述电化学发光。

193. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

( a ) 使权利要求 169 的盒中的那些结合区域与一种样品接触，这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子；

15 ( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

194. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

( a ) 使权利要求 171 的盒中的那些结合区域与一种样品接触，这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子；

20 ( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

195. 一种用于检测或测量电化学发光的方法，这种方法包括：

25 ( a ) 使权利要求 173 的盒中的那些结合区域与一种样品接触，这种样品包括一些与一种电化学发光标记物连接的分子；

( b ) 在所述电极和反电极处施加能有效地触发电化学发光的电压波形；以及

( c ) 检测或测量所述电化学发光。

196. 如权利要求 175、188 或 189 所述的方法，其特征是上述电极 30 包括碳原纤维。

197. 一种用于进行许多电化学发光测定的方法，这种方法包括下述

这些步骤:

( a ) 使许多离散的聚合物基质与含有一种或许多种所感兴趣的被分析物的一种样品接触, 每个聚合物基质包括一个或多个结合区域;

( b ) 使所述许多区域的一个或多个电化学发光;

5 ( c ) 检测电化学发光。

198. 如权利要求 197 所述的一种方法, 其特征是用照相底片检测电化学发光。

199. 一种用于进行许多电化学发光测定的方法, 这种方法包括下述这些步骤:

10 ( a ) 使包括一些寡核酸的许多结合区域与含有一种或许多种所感兴趣的被分析物的一种样品接触;

( b ) 使所述许多区域的一个或多个区域电化学发光; 以及

( c ) 在许多所述结合区域处检测电化学发光。

200. 如权利要求 199 所述的一种方法, 其特征是所述许多结合区域包括与一些电化学发光标记物连接的一些寡核酸。

201. 如权利要求 199 所述的一种方法, 其特征是所述许多结合区域含有与一些电化学发光标记物连接的一些寡核酸以及一种或多种所述被分析物, 当与所述寡核酸结合时, 引起调制来自一个或多个结合区域的电化学发光信号。

202. 一种用于进行许多电化学发光测定的方法, 这种方法包括检测存在于一种多组份样品中的浓度低于约  $10^{-3}$  的许多被分析物, 这种方法包括下述这些步骤:

( a ) 使许多离散的结合区域与含有一种或许多种所感兴趣的被分析物的一种样品接触;

( b ) 使所述许多区域的一个或多个电化学发光; 以及

( c ) 在许多所述结合区域处检测电化学发光。

203. 一种用于进行许多电化学发光测定的系统, 包括:

( a ) 许多结合区域, 它们对许多不同的被分析物特异性;

( b ) 一个电压波形信号发生器; 以及

30 ( c ) 一个光子检测器装置。

204. 一种用于进行许多电化学发光测定的系统，包括：
- ( a ) 一个电极；
  - ( b ) 一个反电极；
  - ( c ) 许多结合区域，这许多结合区域对许多不同的被分析物特异  
5 性；
  - ( d ) 用于触发电化学发光的装置；以及
  - ( e ) 用于电化学发光检测的装置。

# 说 明 书

## 多阵列、多特异性的 电化学发光检验

5 本发明是申请号为 08/402,076、申请日为 1995 年 3 月 10 日的共同未决的申请以及申请号为 08/402,277、申请日为 1995 年 3 月 10 日的共同未决的申请的部分后续申请，这里结合这两个申请的每一个的全部内容作为参考。

### 1. 介绍

10 本发明提供了一种用于基于电化学发光的检验的、成图案的（patterned）多阵列、多特异性的表面（PMAMS），以及制造和使用 PMAMS 的方法。

### 2. 发明背景

#### 2.1. 诊断测定

15 从经济上考虑，强烈地需要快速、灵敏的诊断技术。诊断技术在各种各样的经济市场上都是重要的，这些经济市场包括健康保健、研究、农业、兽医和工业市场。在灵敏度、所需的时间、易于使用性、耐用性或成本方面的改进可以开辟尚无可满足市场需要的技术的全新的诊断市场。某些诊断技术可具有高灵敏度，但太贵而不能满足市场需要。其  
20 它一些技术可能是成本效益高，但对于各种市场来说，不足以耐用。在诊断行业中，能够综合这些特性的全新诊断技术是一个显著的进步和机会。

有大量不同的分析技术用于诊断用途。这些技术包括放射性标记、酶联免疫测定、化学比色测定、荧光标记、化学发光标记和电化学发光标记。这些技术的每一种都独特地综合了灵敏度水平、易于使用性、耐用性、速度和成本这几个因素，这几个因素确定和限制了它们在不同的诊断市场的应用。这些差别部分源自每种技术所固有的物理约束。例如，放射性标记本来就不耐用，这是因为标记本身衰变，并且对于许多应用来说，所产生的放射性废物的处理还导致经济、安全和环境方面的开支。

目前所用的许多灵敏的诊断技术都受到市场的制约，这主要是因为需要熟练的技术人员来进行检验。例如，目前所用的电化学发光方法不

仅需要熟练的技术人员，而且还需要反复的清洗和准备步骤。这既增加了成本，又进一步需要处理废物。既简化检验步骤又降低每次检验的成本的全新诊断法，对于开辟新市场及改善现有市场的操作都是极为重要和有用的。

5      2.2. 电化学发光测定

电化学发光（“ECL”）是这样一种现象，其中，电激发的物质发射光子（例如，见 Leland 和 Powell, 1990 年，电化学学会杂志（J. Electrochem. Soc.）137 (10): 3127-3131）。这样的物质叫作 ECL 标记物，而这里也叫作 TAG（标记物）。通常所用的 ECL 标记物包括金属有机化合物，其中，金属例如选自第 VIII 族的贵金属，所述金属有机化合物包括含有钌的和含有锇的金属有机化合物，例如，钌(2, 2'-双吡啶)<sup>3+</sup>部分（也叫作“Rubpy”），例如，为 Bard 等人所公开（美国专利 US 5,238,808）。ECL 标记物所产生的光可在诊断方法中用作信息信号（reporter signal）（Bard 等人的美国专利 US 5,221,605）。例如，ECL 标记物可以与诸如抗体或核酸探针那样的结合试剂共价结合。ECL 标记物/结合试剂复合物可用来测定各种物质（Bard 等人的美国专利 US 5,238,808）。对于基于 ECL 的检测系统来说，极为重要的是需要电势来激发 ECL 标记物发射光子。电势波形横跨一个电极表面（典型的是一个金属表面）和一个反电极施加到一种 ECL 测定溶液（例如，见美国专利 US 5,068,088; US 5,093,268; US 5,061,445; US 5,238,808; US 5,147,806; US 5,247,243; US 5,296,191; US 5,310,687; US 5,221,605）中。

本领域有各种周知的装置可用来进行和检测 ECL 反应。例如，Zhang 等人（美国专利 US 5,324,457 公开了用来进行 ECL 的用于电化学电池的示例电极。Levantis 等人（美国专利 US 5,093,268）公开了用于进行 ECL 反应的电化学电池。Kamin 等人（美国专利 US 5,147,806）公开了用于进行和检测 ECL 反应的装置，包括电压控制装置。Zoski 等人（美国专利 US 5,061,445）公开了用于进行和检测 ECL 反应的装置，该装置包括用于引发 ECL 反应的电势波形图、数字/模拟转换器、控制装置、检测装置，并公开了用于检测 ECL 反应在工作电极处所产生的电流的方法，以便给电子控制装置提供反馈信息。

例如，美国专利 US 5,093,268 详细评论了 ECL 技术。简而言之，ECL 技术是一种检测在样品中以较小的浓度存在于该样品中的所感兴趣的被分析物的方法。

在上面作为参考的被授权的专利中称作 TAG 的 ECL 部分可以与被分析物结合，也可以不与被分析物结合，但对每种情况，由于从工作电极所接收的电能所触发的一系列化学反应，该 ECL 部分被促进到一种激发态。有益地提供了一种促进 TAG 的 ECL 的分子，例如，草酸盐，或更优选的是三丙胺（见美国专利 US 5,310,687）。

### 2.3. 商用 ECL 测定

迄今为止，所有的商用 ECL 反应都是在厘米级的电极表面进行。厘米级电极在源自较大电极的 ECL 信号的强度增强和对每种测定所需的总样品量减少的希望之间达到统一。不过，即或厘米级的电极也不能获得许多测定所要求的灵敏度。为解决这个问题，所有的商用 ECL 系统还利用带涂层的磁珠来捕获 ECL 被分析物或试剂以提高灵敏度。然后，使所述珠靠近工作电极以提高灵敏度。

不过，采用磁珠有许多限制。珠本身涂覆有随时间推移而剥落和降解的蛋白质，引起信号变化。由于在处理和格式化基于珠的测定时的复杂性，商用 ECL 诊断要求对于每个用给定的样品进行的测定有一套复杂、顺序进行的程序，这对于每个要进行的检验来说，增加了时间和成本。5 微米大小的珠防止了绝大多数的珠结合的 ECL TAG 到达邻近工作电极的薄膜，这导致低效率地激发 ECL TAG。

Leventis 等人（美国专利 US 5,093,268）提出了一种同时测定一种以上的不同的被分析物的方法，这种方法是对每种被分析物采用不同的 ECL 标记物，在一次单独的测定中，每种 ECL 标记物对于每种不同的被分析物以不同波长发射光子。不过，这种技术还是有局限性，例如，不能利用充足数量的以不同波长辐射的有效的 ECL 标记物，还需要优化每种 ECL 标记物的化学条件。这些实际的限制已防止了这样的多波长、多被分析物的 ECL 检测系统的商品化。

提高 ECL 灵敏度的另一种方法是改进电极技术。Zhang 等人（美国专利 US 5,324,457）已将 ECL 物质膜直接沉积在各种金属和半导体表面上。Zhang 和 Bard 利用电极表面的整体饱和的技术导致了（如作者所述的那样）不适用于高灵敏度测定的不均匀的不规则沉积。

前述那些用于进行 ECL 测定的方法还要求必须用众多的方法中的任何一种来对包括电极在内的测定元件进行清洗，所述众多的方法包括使用稀酸、稀碱、洗涤溶液等，例如，如美国专利 US 5,147,806 所公开的那样。

5 因此，本发明的一个目的是提供一种新的、成本效率高的测定，用于顺序或同时进行许多 ECL 反应，而且，在一个优选的实施方案中，提供了安装在内部的对照标准物以改进精度。

本发明还有一个目的是提供包含一个或多个载体的盒，该载体适于进行许多同时或顺序进行的 ECL 反应，所述盒还是易于处理的。

10 本发明的一个进一步的相关的目的是减少对于在生物样品中的所感兴趣的被分析物进行单独测定的时间和成本。

本发明还有一个进一步的相关的目的是提供对于在单个生物样品中的所感兴趣的许多被分析物同时进行许多测定的方法和装置。

### 3. 发明概述

15 本发明涉及一种用于进行 ECL 反应和测定的盒，该盒包括许多固定在载体上的离散的结合区域，这些离散的结合区域与一个或多个电极和一个或多个反电极的对在空间位置上对准。所述盒优选地包括一个第一载体，这个第一载体具有许多固定在表面上的离散的结合区域。所述盒可具有一个或多个电极和一个或多个反电极的对。可通过能有效地触发电化学发光的电压波形形式的电能源来单独可访问（addressable）电极和反电极的对。所述盒还可包括一个能够邻接第一载体放置的第二载体，以便于在它们两者之间提供含有样品的装置和/或用作电极。把结合区域在载体表面上构成图案并进行制备，以便结合所感兴趣的被分析物或试剂。

25 本发明还涉及一种用于测量样品的电化学发光的装置，这种装置提供有载体或盒处理装置、适于施加能有效地触发电化学发光的控制电压波形的电压控制装置、用于检测来自样品的电化学发光的光子检测器装置以及样品处理装置。

30 本发明还涉及使用这些用于测量样品的电化学发光的盒的方法：使一个盒的许多结合区域与含有许多所感兴趣的被分析物的样品在 ECL 测定条件下接触，然后在上述许多电极和反电极的对的每一个对处施加能有效地触发电化学发光的电压波形，并且检测或测量所触发的电化学

发光。广而言之，本发明提供 ECL 测定方法，其中，样品并不与电极接触。此外，作为使用电极和反电极的对的一种可供选择的替换方法，本发明提供了在整个结合区域上方扫描电极和反电极。

本发明还提供了包括一些组件的试剂盒，这些组件包括适于同时测量许多电化学发光反应的一些盒、上面固定有许多区域的载体表面以及用于实施化学反应的 ECL 测定的测定介质。

本发明还提供由石墨纳米管（graphitic nanotube）制备的电极。

#### 4. 附图说明

图 1 说明形成本发明盒的两个载体，其中，在载体 10 上有许多结合区域 14，而在载体 12 上有许多对应的电极 16，这样两个载体靠近时在每个结合区域附近放置一反电极对。

图 1A 说明形成本发明盒的两个载体，其中，在载体 10 上有许多结合区域 14，而在载体 12 上有许多对应的电极 16，这样两个载体靠近时在每个结合区域附近放置一反电极对。

图 2 说明形成本发明盒的两个载体，其中，在载体 26 上的许多结合区域 30 邻接单个电极 32 中的一个，从而使得载体 26 和 28 靠近时，在每个结合区域 30 附件都放置一个反电极 38。

图 3 说明形成本发明盒的两个载体，其中，许多结合区域 48 都具有与其邻接的、在载体 44 上的电极和反电极的对 50。载体 46 可任选邻接载体 44 放置，这样载体 46 提供邻接结合区域 48 和电极 50 的含有样品的装置。

图 4 说明形成本发明盒的两个载体，其中，在载体 60 上的许多结合区域 64 与被认为含有被分析物的样品接触。载体 62 具有区域 66，区域 66 含有用于检测或测量所感兴趣的被分析物或者用于进行所需要的反应的反应介质，这样载体 60 和载体 62 靠近时就使结合区域 64 和区域 66 彼此接触。

图 5A 显示用于多阵列、多特异性结合表面的成图案的结合区域的俯视图。几何形状、三角形、正方形和圆形代表了对不同的被分析物特异性的结合区域。这些结合区域可以是疏水性的或是亲水性的。周围的表面可具有与这些结合区域相反的性质（亲水性的或疏水性的），以使结合试剂或被分析物从这些结合区域散布开的程度最小。

图 5B 显示用于把结合试剂和/或被分析物送到那些离散的结合区域的微观流体导管的俯视图。每个点显示了一个微观流体导管（例如，毛细管）的剖面。

图 5C 显示一种微观流体导管的侧视图，显示对齐或对准的微观流体导管靠近时，给成图案的结合区域的一个多阵列输送结合试剂和/或被分析物的情况。每个微观流体导管可以给一个离散的结合区域运送一种不同的结合试剂。

图 6A 显示多阵列电极与具有成图案的多阵列、多特异性结合区域的表面靠近对齐的情况。在所述电极阵列和结合表面阵列之间示出有一个可拆卸的电极保护屏障。整个装置包括一个用于进行多种 ECL 反应的盒。

图 6B 显示对齐的或对准的可寻址的工作阵列和反电极靠近的情况。电极的形状可以与结合区域互补，或是其它形状（例如，交错对插的）。

图 7 显示了对齐或对准的可寻址的工作和反电极以及互补的结合表面靠近时一个阵列的侧视图，其中，导电聚合物从电极表面生长出来横跨电极阵列和结合区域之间的缝隙，以便围绕样品的 ECL 标记物延伸电势场，从而提高 ECL 反应的效率。

图 8 显示了对齐或对准的可寻址的工作和反电极以及互补的结合表面靠近时一个阵列的侧视图，两个组件之间散布有一些导电粒子，以便延伸电势场。通过围绕样品的 ECL 标记物延伸电位场，ECL 反应的效率提高。上述那些导电粒子可以是磁性的，以便于控制。

图 9 显示了对齐或对准的可寻址的工作和反电极以及互补的结合表面靠近时一个阵列的侧视图，其中，电极具有延伸进电极表面和结合区域之间的缝隙的细的突出部分，这是为了围绕样品的 ECL 标记物延伸电势场，以便提高 ECL 反应的效率。

图 10 显示了对齐或对准的可寻址的工作和反电极以及互补的结合表面在靠近时一个阵列的侧视图，其中，表面并不平行，而是以互补的方式彼此相适合。

图 11 显示了一个载体的侧视图，其上有一个金属层，以便以一个盒的形式提供一个单独的电极和结合表面组合件。在金属层上成图案地设置自组装的单层的阵列（“SAMs”）。

图 12 显示了一个载体的侧视图，其上有一个金属层，以便以一个盒的形式提供一个单独的电极和结合表面组合件。把一个 SAMs 阵列成图案设在上述金属层上，而且，导电微粒散布在成图案的 SAMs 中间，以便围绕样品的 ECL 标记物延伸电势场，从而提高 ECL 反应的效率。

5 图 13 显示了一个载体的侧视图，这个载体的上面有一个金属层，以便以一个盒的形式提供一个单独的电极和结合表面组合件。把自组装的单层即 SAM 的阵列成图案设在上述金属层上，并且示出一种导电聚合物和/或纤维从 ECL 标记物生长出来，以便围绕样品的 ECL 标记物延伸电势场，从而提高 ECL 反应的效率。

10 图 14 是一个载体的图，这个载体具有一个由计算机控制的电极对阵列。

图 15 是具有电极对阵列的一个载体的图。

图 16 是一个具有电极对阵列的载体和用于控制激发每个电极对过程的计算机系统的图。

15 图 17 是具有电极对阵列的载体和计算机系统的图，计算机系统具有多个电压源和用于控制激发每个电极对过程的多路转换器。

图 18 是具有电极对阵列的载体和计算机系统的一张图，计算机系统具有许多用于控制激发每个电极对过程的换向电压源。

20 图 19(a)至 19(e)是关于几种可供选择的电极 - 反电极对的组合的平面图。

图 20 显示带完整的夹层测定的载体。

图 21 显示了在载体上的两个相对的 PMAMS 表面。

图 22A 显示了微观流体导管 (2201) 阵列和原纤维垫 (2200)。

图 22B 显示结合区域 (2202)。

25 图 23A 显示通过真空过滤形成原纤维垫的装置。

图 23B 显示在过滤物膜 (2303) 上的原纤维垫 (2304)。

图 24 显示了利用滚筒来生产原纤维垫。

图 25 显示多层原纤维垫的示意图，其中，上层有用于测定的结合区域。

30 图 26 显示用增强非特异结合的部分衍生的原纤维的示意图，且有几种生物的和非生物的物质结合到表面。

图 27 显示用增强非特异结合的部分衍生的原纤维的示意图，而且，有几种物质结合到所衍生的原纤维上，而还有某些物质结合到配体上。

5 图 28 显示了共价接合到原纤维上的几种物质，而还有一些物质结合到另外的实体上。

图 29 显示利用多层原纤维垫作为滤光器，取决于光源的位置在所述垫上或在所述垫内，所述多层原纤维垫可以使光通过和/或可以吸收和/或散射光。

10 图 30A 显示由碳原纤维垫电极上的电化学测量所得到的周期性的伏安记录。

图 30B 显示由金箔电极上的电化学测量所得到的周期性的伏安记录。

图 31 比较了原纤维垫的电化学性质随垫的厚度和扫描速率变化的情况。

15 图 32 说明随着蛋白质溶液中原纤维浓度增加，在原纤维上的非特异结合一般来说增加。

图 33 说明利用表面活性剂可减弱 ECL - TAG1 - 所标记的蛋白质和碳原纤维之间的非特异结合。

20 图 34 显示用于测量原纤维垫电极上的电化学性质和 ECL 的实验元件的俯视图。

图 35 显示用原纤维垫作为电极以及在溶液中的 1000pM 的 TAG1 (实线) 所得到的 ECL 信号和来自测定缓冲剂 (无 TAG1 ) 的信号 (虚线)。

25 图 36 显示了两个表面 PMAMS 装置的示意图，其中，通过成图案的介电层分开所支承的两个电极阵列。

图 37 显示一个装置，这个装置在载体上有许多结合区域 (3702)，而在另一个载体上有电极和反电极。

图 38 示出了一个盒，其中，结合区域设在支承在反电极上的不同物体的表面上。

30 图 39 示出了与工作和反电极接触的凝胶。

图 40 示出 ECL 强度和从与工作和反电极接触的为 ECL 标记的凝胶所得到的周期性伏安记录。

图 41 示出 ECL 强度和从与工作和反电极接触的非 ECL 标记的凝胶所得到的周期性伏安记录。

图 42 示出了用于 ECL 的一个两表面盒的示意图。

图 43 说明原纤维垫可用作一个电极，用于被吸收到该垫上的抗体 5 - TAG1 的 ECL。

图 44A 示出固定在电极上的 TAG1 所标记的蛋白质的 ECL 强度。

图 44B 示出涂层电极的周期性伏安记录。

图 45A 显示源自固定的 ECL TAG1 标记的蛋白质的 ECL 信号的准可逆的重复产生。

10 图 45B 示出局部保留涂层的涂层电极的周期性伏安记录。

图 46A 示出源自固定的 ECL TAG1 所标记的蛋白质的 ECL 信号的不可逆产生。

图 46B 示出基本上损失了涂层的涂层电极的周期性伏安记录。

15 图 47 显示多阵列 ECL 装置以及一个含有用于产生和分析 ECL 信号的控制器装置的微处理器。

### 5. 本发明的详细说明

因此，本发明从广义上来说包括一些用于进行多种电化学测定的盒。这些盒由一些载体构成，这些载体上有许多能特异性地结合一种或多种所感兴趣的被分析物的结合区域。这些结合区域制成在所述载体上的成图案的多阵列多特异性表面（“PMAMS”）。PMAMS 通过例如大大增加可进行的测定的密度，并通过使得能快速且同时进行多种不同的测定，为先前已知的 ECL 测定方法提供了显著的改进。所述盒可包括许多电极，这些电极能选择性地结合到结合区域的 ECL 所标记的试剂触发光的 ECL 发射。图 47 示出多阵列 ECL 装置，这个装置具有电极 20 4700、4704、带有结合区域 4706 的基质 4702、以及含有控制器装置 4720 的一个微处理器，控制器装置 4720 用于产生和分析经由导线 4710 至 4716 所连通的 ECL 信号。

在图 1 所示的本发明的实施方案中，盒包括两个载体 10、12，其中，在第一载体 10 的表面上有许多结合区域 14，而在第二载体 12 的表面上有许多电极/反电极对 16。所述结合区域和电极/反电极对对准，从而使得当第一和第二载体 10、12 靠在一起时，所述许多电极/反电极对 16 的每一对邻接上述许多结合区域 14 中的不同的一个放置。在结 30

合区域 14 的下面的第一载体 10 优选地是具有金膜表面和透明结合区域的 PMAMS。第二载体 12 优选地是其上具有透明的电极/反电极对 16 的透明扁平塑料片。结合区域 14 优选通过在载体表面上微观压印一种有机的自组装的单层（由各种单独的单体构成）图案来制备，其中，所述单体具有生物素或连接部分。然后，使抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白结合到暴露的生物素上（例如，参见美国专利 US 5,093,268）。之后，通过施加诸如生物素标记的抗体那样的离散量的合适的生物标记的结合试剂到已压印了单层的载体表面上的一些位置来施加结合试剂，这些结合试剂能选择性地结合所感兴趣的被分析物。图 1A 说明了包含装 10 在一个外壳（11）中的盒（图 1）的系统。

在本发明的某些实施方案中，希望把指定量或预定量的一种或者多种试剂可再现地固定在一个表面上。固定广泛地用于任何方法，用这些方法把试剂附着到表面，这些方法包括但不限于：共价化学结合、非特异性吸收、在一个表面上干燥试剂、静电相互作用、疏水性和/或亲水性相互作用、封闭或夹杂在液体或者凝胶中、生物特异性结合（例如，配体/受体相互作用或寡核苷酸的夹杂）、金属/配体结合、鳌合作用和/或缠结在聚合物中。

可以以几种方式预先确定固定在表面上的试剂量。例如，可通过一个或多个内部存有试剂的容器元件和/或表面元件来规定在表面上的试剂量。还可通过固定在表面上的试剂的各单一分子的数目来指定试剂量。可根据在一给定区域中某一特定试剂的密度来指定试剂量。可以把试剂量规定为带有某一特定试剂的表面占该表面的总面积的百分比、或相对于在该表面上的其它试剂的量的百分比。还可把试剂量定义为在某特定的表面上给出足够的 ECL 强度所必须有的试剂的量，以便使测定达到所需的特异性。在一个特定的例子中， $1\text{cm}^2$  的金表面面积可涂覆有链烷硫醇的一个单层。

还可把试剂可重复地固定在有涂层的表面上。涂层可用来增强某些试剂的固定作用和/或减弱或者抑制其它试剂的固定作用。表面可全部涂层，或可给表面局部涂层（即成图案涂层）。涂层的成份可以一致，或可含有不同组成的元素。在一个特定的例子中，可把涂层设成图案状的单层膜，该膜在某些区域通过共价化学键固定免疫球蛋白 G，并防止它固定在其它区域。

涂层还可用来预先确定在后续步骤或过程中固定在表面上的一种或多种试剂的量。也可通过限制沉积的试剂量来控制某一特定试剂的量。

表面上有以定量、可重复的方式固定的试剂（或涂层），这样就能够可重复且可定量地测量来自样品的 ECL 信号，这样，就使得能校正。

优选地，电极/反电极对 16 是亚厘米（sub-centimeter）尺寸的，并且，可通过众所周知的、用于制作液晶显示器和电化色显示屏的方法，与电极引线 20（例如，用透明金属膜）一起制作。通过电连接线 19 把电极引线 20 连接到定形信号发生器 18。有益的是，在计算机控制下，电极/反电极对是可单个寻址的，从而可以选择性地给那些离散的结合区域施加电位。配置光检测器装置 22 和数字计算机装置 24，以便在结合到结合区域的一种合适的标记物已经激发了 ECL 发光时记录和分析结果。

图 1A 显示了包括如图 1 所示装在外壳（11）中的一个盒、一些电引线、定形信号发生器、光检测装置和数字计算机的一个装置。所述盒通过开口（15）插入上述外壳。

在另一个实施方案中，一个工作电极用来在多个结合区域同时产生 ECL 信号。在这个实施方案中，通过使用光成像设备来鉴别来自每个结合区域的 ECL 信号。

概括地说，利用本发明的盒所进行的测定的好处是利用了许多离散的结合区域的。例如，使用这样的盒使得能快速和/或同时检测或者测量各种各样的所感兴趣的被分析物。在一个优选的实施方案中，本发明的测定还是这样一些测定，这些测定得益于利用 ECL 所标记的试剂、被分析物或结合表面。本发明的 ECL 测定包括使许多结合区域与被猜测含有所感兴趣的被分析物的样品接触，并触发来自结合 ECL 标记物的 ECL 发光，其中，ECL 标记物是在被分析物或该被分析物的竞争物上、在与该被分析物结合的试剂上或者在许多结合区域上。

本发明还提供用于检测或测定所感兴趣的被分析物的 ECL 测定方法，包括：（a）接触许多离散的结合区域中的一个或多个，所述许多结合区域固定在一个或多个载体的表面上，其中所述接触是指与包括有结合到电化学发光标记物的分子的样品接触，其中，所述样品在所述接触步骤期间并不与任何电极或反电极接触；（b）使一个电极接近所述

许多结合区域中的一个或多个；(c)在所述许多结合区域中的一个或多个处施加能有效地触发 ECL 的电压波形；并且检测或测量 ECL。

在另一个实施方案中，本发明提供了 ECL 测定方法，这方法是：  
5 (a) 接触许多离散的结合区域中的一个或多个，所述许多结合区域  
(i) 固定在一个或多个载体的表面上，以及 (ii) 与许多电极和反电  
极对在空间位置上对准并处于该电极和反电极对的附近，其中，所述接  
触是指与包括有结合到电化学发光标记物的分子的样品接触；(b)使  
电极和反电极接近所述许多结合区域中的一个或多个；(c)在所述许  
10 多结合区域中的一个或多个处施加能有效地触发电化学发光的电压波  
形；以及 (d) 检测或测量电化学发光。

在载体上的所述许多结合区域能与要被测定的样品相互作用。  
PMAMS 可以进一步与含有完成测定所必需的试剂的溶液接触。然后，  
使结合表面与一个互补的电极（优选的是一个干净的、未用过的电极）  
15 的表面接触（例如，压在一起），然后，用所述电极施加电位，以便激  
发 ECL。

在利用图 1 的装置进行测定的一种优选的方法中，把被猜测含有所  
感兴趣的被分析物的样品与适于检测该被分析物的 ECL 标记的试剂一  
起，施加到许多结合区域 14。之后，把载体 11 和载体 12 弄到一起，  
从而使许多结合区域 14 中的每一个处于许多电极/反电极对 16 的不同  
20 对的电极和反电极之间，而样品含在其间。应该注意，不需要使电极和  
反电极对与结合区域机械接触，这是为了当合适的电位施加到电极和反  
电极对之间时激发 ECL。通过电连接线 19，从波形信号发生器 18，  
把适于触发 ECL 发光的电位波形施加到许多电极/反电极对 16 上。在许  
25 多结合区域 14 上的 ECL 标记物所发射的任何信号用光检测装置 22 检  
测，并用数字计算机装置 24 记录分析。

本发明提供检测在一定体积的多组份液体样品中多种所感兴趣的  
被分析物的方法，多种所感兴趣的被分析物可以以各种浓度存在于所述  
样品中。

概括地说，从多组份的样品中可检测低于  $10^{-3}$  摩尔浓度的多种被分  
30 析物。优选地，可以从多组份的样品中检测低于  $10^{-12}$  摩尔浓度的多种  
被分析物。

本发明提供了从多组份的样品进行检测的方法，这种方法可以多相检测方式进行和均相检测方式进行，多相检测也就是说是这样的检测，其中，许多未结合的标记过的试剂在许多结合了的标记过的试剂处于电化学能量试验条件下之前就与这许多结合了的标记过的试剂分离，而均相检测也就是说是这样的检测，其中，许多未结合的标记了的试剂与结合了的标记过的试剂一起处于电化学能量试验条件下。

在本发明的测定中，用来检测某一具体被分析物的电磁辐射是可以与相对于其它被分析物的电磁辐射区分开的，这是通过鉴别它的作为一个图案的一个或多个特征的位置和/或定位来做到的，所述图案对应于在 PMAMS 中的结合区域的图案。

在本发明的均相检测中，由结合了的标记过的试剂所发射的电磁辐射与未结合的试剂相比，由结合了的标记过的试剂所发射的电磁辐射量或者为增加形式或为减少形式，或者，通过检测在空间上对应于一个图案的一个或多个特征的源所发射的电磁辐射，这个图案对应于在 PMAMS 中的结合区域的图案。

在图 20 所示的本发明的方法的一个特定实例中，在载体（5）上进行夹层测定，夹层（5）在其表面上具有许多结合区域（BD），这些区域对于结合某一特定的被分析物（An）是特异性的。当把被猜测含有被分析物的样品施加到上述结合区域时，该被分析物就结合到所述结合区域上。然后，把适于选择性地结合被分析物（An）并已用 ECL 部分（TAG）标记形成 Ab—TAG 的抗体（Ab）施加给到在结合区域上的所述被分析物。在过量后，把未结合的 Ab - TAG 从结合区域清洗掉，通过电极（未示出）把适于触发电化学发光的一个电位波形施加到所述 TAG，以便从在所述结合区域上的任何 TAG 触发 ECL 发光。ECL 信号用光检测装置检测，并由数字计算机装置记录（例如，图 1 中 22 和 24 所示）。

下面提供本发明的进一步的实施例、特征和一些变型。

### 5.1. 结合表面的制备

为了更好地理解本发明、提供了关于制备在载体上的结合区域的更详细的说明。在一个表面上的、对于许多被分析物是特异的结合区域的一个图案阵列在这里叫作一个成图案的、多阵列、多特异性的表面或 PMAMS。例如，通过形成自组装的单层（“SAMs”）图案制备在载

体上的 PMAMS (参见 Ferguson 等, 1993 年, *Macromolecules*, 26 (22): 5870-5875; Prime 等, 1991 年, *Science*, 252: 1164-1167; Laibinis 等, 1989 年, *Science*, 245: 845-847; Kumar 等, 1984 年, *Langmuir*, 10 (5): 1498-1511; Bain 等, 1989 年, *Angew. Chem.*, 101: 522-528)。形成表面图案的方法还包括利用物理刻蚀 (例如, 微切削加工) (Abbott 等, 1992 年, *Science*, 257: 1380-1382; Abbott, 1994 年, *Chem. Mater.* 6 (5): 596-602)、微平板印刷术 (Laibinis 等人, 1989 年, *Science*, 245: 845-847)、通过利用可光激活的化学现象把化学基团附着到表面 (Sundberg 等, 1995 年, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (49): 12050-12057)、以及微观压印技术 (Kumar 等, 1994 年, *Langmuir*, 10(5): 1498-1511; Kumar 等, 1993 年, *Appl. Phys. Lett.*, 63 (14): 2002-2004)。其它形成表面图案的方法包括空间控制散布流体或粒子的方法 (例如, Micropattern deposition (例如, 用微流体导管, 采用 X-Y 平移送到表面上))、微毛细管填充 (Kim 等, 1995 年, *Nature*, 376: 581)、喷墨技术、或注射器撒布器。可以用这些技术的组合来得到复杂的表面图案。在图 5A 中, 显示了载体 600 具有形状独立的结合区域, 仅为了说明的目的, 这结合区域表示为几何形状 602, 以便表明在一个单独的载体上可存在不同的结合特异性。结合区域之间的表面 604 可为疏水性的或亲水性的, 以便约束结合试剂的沉积, 形成结合区域。结合区域和/或在结合区域之间的表面可为易于和抗拒非特异性结合的, 和/或它们可以易于或抗拒结合试剂通过共价或者非共价相互作用的附着。对于通过疏水性相互作用的非特异性结合并不是所想要的用于把结合化学物质附着到表面的方法的情况, 可加入洗涤剂, 以防止出现偶然的非特异性结合。

概括地说, 结合区域的宽度或直径或最宽尺寸是从  $0.1\mu\text{m}$  到 25 1mm, 这取决于该区域的几何形状。把表面选择性地衍生为具有例如对于 ECL 测定溶液特异性结合的组份。此外, 在结合区域处的非特异性相互作用减弱, 而同时通过把诸如聚乙二醇那样的部分结合到离散的结合区域的暴露表面上来保持一种特异性结合部分 (Prime 等, 1993 年, *J. Chem. Soc.* 115: 10714-10721; Prime 等, 1991 年, *Science*, 252: 1164-30 1167; Pale-Grosdemange 等, 1991 年, *J. Am. Chem. Soc.* 113: 12-20)。

概括地说, PMAMS 可含有从 2 到  $10^8$  个结合区域。优选的结合区域数目是从 50 到 500。而在其它一些实施例中, 结合区域的数目是 25

至 100 。

载体可以是各种材料，包括但并不限于玻璃、塑料、聚合物、弹性材料、金属、陶瓷、合金、复合材料箔、半导体、绝缘体、硅和/或层状材料等。例如， Ferguson 等（1993 年， *Macromolecules*，26: 5 5870-5875）、Ferguson 等（1991 年， *Science*, 253: 776-778）、Chaudhury 等（1992 年， *Science*, 255: 1230-1232）所说明的那样，可以制备衍生化的弹性载体。

上面制备有 PMAMS 的载体表面可含有各种材料，例如，网状物、毛毡、纤维材料、凝胶、固体（例如，由金属构成）弹性体等。载体表面可具有各种结构、化学和/或光学性质。例如，上述表面可以是刚性的或柔性的，扁平的或变形的，透明的、半透明的、部分或全反射的、或者是不透明的，并且可以具有一些复合物性质、具有不同性质的一些区域，而且可以是一种以上的材料的复合物。上述表面可以具有成图案的表面结合区域和/或在一个或更多个表面上可按本发明出现催化反应的成图案的区域，和/或在一个或多个表面上的可寻址的电极阵列。可以把上述载体的表面做成任何合适的形状，这形状包括平面、球状、立方体形状和圆柱形状。在一个特定的实施方案中，载有 PMAMS 的载体是一探针。在另一个实施方案中，载有 PMAMS 的载体含有碳，例如石墨、玻璃碳或碳黑。

在一个实施方案中，载有 PMAMS 的载体含有一种或多种碳纤维。这些纤维可以是非晶碳或石墨碳。它们还可以是碳纳米管、buckeytube 或者富勒氏笼形碳分子族（fullerene family）的部分。

在一个优选的实施方案中，载有 PMAMS 的载体含有一种或多种碳原纤维（土卫七原纤维™）（美国专利 US 4,663,230）。单根的碳原纤维（如美国专利 US 4,663,230；US 5,165,909 和 US 5,171,560 中所公开的）的直径可在约 3.5nm 到 70nm 的范围内，而长度大于该直径的  $10^2$  倍，并且具有有序碳原子的多个基本连续层的外层区域和一个明显的内芯区域。仅为说明起见，碳原纤维的典型直径可在约 7nm 到 25nm 之间，而典型的长度范围可在 1 $\mu\text{m}$  到 10 $\mu\text{m}$  之间。

可把碳材料制成为聚集体。如在美国专利 US 5,110,693 及其参考文献中所公开的那样，两种或更多种单独的碳原纤维可构成缠结的原纤维的微观聚集体。这些聚集体的尺寸可从 5nm 到几厘米。仅为说明起见，

一种类型的微观聚集体（“棉花糖或 CC”）类似于纺锤或缠结纤维棒，其直径可从 5nm 到 20μm，长度可从 0.1μm 到 1000μm。亦为了说明的目的，另一种类型的原纤维的微观聚集体（“鸟巢，或 BN”）可近似为球形，其直径可从 0.1μm 到 1000μm。可构成每种类型的（CC 和/

5 或 BN）的更大的聚集体或每种类型的混合体。

可用于载体中的原纤维包括但并不限于单独的原纤维，一种或多种原纤维的聚集体、一种或多种原纤维的悬浮液、原纤维的分散体、原纤维和其它材料（例如，油、石腊、蜡、聚合物、凝胶、塑料、粘合剂、环氧树脂、聚四氟乙烯、金属、有机液体、有机固体、无机固体、酸、碱、陶瓷、玻璃、橡胶、弹性体、生物分子和介质等）的混合物、还有它们的组合物。

在某些情况下原纤维可以是磁性的，而在另外一些情况下是非磁性的。把原纤维可制成磁性或非磁性的程度由催化剂的量来控制，所述催化剂因原纤维生产过程处于原纤维中，美国专利 US 4,663,230; US 10 5,165,909 和 US 5,171,560 中公开了这样的过程。PMAMS 可位于上述 15 载体上，上述载体中、或上述载体附近。

可由不同类型的表面结合基团生成 PMAMS。可用来在它们所要结合的表面上形成单层的自组装单层包括但并不限于链烷硫醇类（它结合金和其它金属）、烷基三氯硅烷、（例如，它结合硅酮/二氧化硅）、链烷羧酸（例如，它结合氧化铝）以及它们的组合。可首先形成单层，然后连接用来附着结合试剂的化学物质。自组装后的衍生过程产生更完美的在载体表面上的单层的二维晶体包皮，具有较少的针孔或缺陷。可在自组装之前或之后用结合试剂对单层衍生化。在单层中的规则的缺陷可以是希望的，并且可通过在自组装前的单层或载体表面衍生化而得到。如果在结合试剂上所衍生的基团（例如，暴露的结合基团）所占空间大，它可在暴露端产生密合（close-packed）的表面，但在金属表面处具有一些规则的缝隙。这有利于加料通过这些规则的缝隙流到 ECL 20 标记的部分，这 ECL 标记的部分结合到与样品溶液接触的部分。

本领域中已知不完整单层的制备。用于制备不完整单层的其它方法 30 包括但不限于：用结合试剂的稀溶液形成单层、在完成前终结形成单层的反应、用辐射损坏更多的完整的单层（例如，离子粒子）、光或化学试剂。在一个实施方案中，重复的压印而不给印记重新涂墨可以给出有

缺陷的单层的范围 ( Wilbur 等, 1995 年, Langmuir, 11: 825 ) 。

可在基质的表面上生成 PMAMS 。基质可以是高度导电的, 例如, 金属电极或导电聚合物膜; 或者, 基质可以是绝缘体; 或者, 基质可以是半导电的和/或具有中等导电率。基质材料可以是离子导体或多孔材料。这样的多孔材料可用作载体材料和/或导电材料和/或过滤材料和/或沟流材料 ( channelling material ) (例如, 使流体、离子物质等通过)。

多孔材料可与另外的一些材料组合。例如, 可用另外的多孔材料、导电材料、半导体材料、沟道结构和/或溶液 (例如, 离子流体) 来制作多孔材料的复合结构。这样的复合结构可以是层状结构、夹层结构和/或散布的复合物。可以采用支承在金属电极上的多孔材料的固体基质。也可把多孔材料夹在导电材料、半导体材料或半导体材料与导电材料的组合材料之间。一个或多个结合区域可含在多孔材料的连续板上和/或可位于在载体上的许多离散的物体上, 每个物体具有一个或多个结合区域。多孔材料 (例如凝胶) 表面可以是扁平的, 半球形的或者为任何规则或不规则的形状, 和/或可具有各种物理性质 (例如, 弹性、刚性、低密度、高密度、密度梯度、干、湿等) 和/或光学性质 (例如, 透明、半透明、不透明、反射、折射等) 和/或电学性质 (例如, 导电、半导电、绝缘可变导电性、例如湿与干的比较等) 。

可在基质中形成沟流的图案。多孔材料层的厚度可从 5 微米到 2000 微米。多孔材料层的厚度还可以大于 2mm 。

孔可以局部和/或完全延伸穿过材料, 或者可以是孔的网络的一部分。这些孔的尺寸范围可宽至从 50 埃到  $10000\mu\text{m}$  。在一个优选的实施方案中, 所述材料有一些尺寸范围从 200 埃到 500 埃的孔和一些尺寸范围从  $0.5\mu\text{m}$  到  $100\mu\text{m}$  的孔。

材料的孔隙可以连续贯穿整个材料, 或者, 可以随材料中的不同位置变化而增加或减少。所述材料可以有以打乱和/或随机方式分布的各种各样的不同尺寸的孔。

多孔材料可以是多于一种的材料的复合材料。

例如, 上述材料中, 某些孔可大到足以通过像生物细胞那样大的物体, 某些孔可通过像蛋白质或抗体那样大的生物介质, 某些孔可只能通过小的 ( $<1000$  的分子量) 有机分子, 和/或上述所有那些种孔的组合。

上述材料的孔隙可以使得一种或多种分子、液体、固体、乳液、悬  
浮液、气体、凝胶和/或分散体能扩散进该材料、处于该材料内和/或穿  
过该材料。所述材料的孔隙使得生物介质可以扩散（主动或被动地）或  
用某些装置强迫进入该材料，处于该材料内和/或穿过该材料。生物介  
质的例子包括但不限于全血、部分血、血浆、血清、尿、蛋白质溶液、  
抗体或其片段、细胞、亚细胞粒子、病毒、核酸、抗原、脂蛋白、脂糖  
类、脂类、糖蛋白、碳水化合物、肽、激素或药剂。多孔材料可有一层  
或多层不同孔隙度的层，这使得生物介质可穿过一个或多个层，但不穿  
过其它层。

- 10 多孔材料能够承载由于离子物质的流动产生的电流。在进一步的细  
致改进中，多孔材料是多孔水溶胀的凝胶，例如，聚丙烯酰胺或琼脂。  
已有各种其它凝胶组合物（例如，参见 Soane, D. S., 于生物技术中的聚  
合物应用； Soane, D. S., Ed.; Simon & Schuster: Englewood Cliffs, NJ,  
1992, 或在医学和药学中的水凝胶, 第 I - III 卷; Peppas, N. A. Ed.; CRC  
15 出版社: Boca, Raton, FL, 1987）。结合区域可通过共价和非共价键附着到  
基质上。（已经撰写了关于这个主题的许多评论和书籍；一些例子是  
Tampion J. 和 Tampion M. D., 固定的细胞：原理和应用，剑桥大学出版  
社： NY, 1987; 固相生物化学：分析和合成方面，Scouten, W. H. Ed.,  
John Wiley and Sons: NY, 1983; 酶学中的方法，固定的酶和细胞，Pt. B  
20 Mosbach, K. Ed., Elsevier Applied Science: London, 1988; 酶学中的方  
法，固定的酶和细胞，Pt. C Mosbach, K. Ed., Elsevier Applied Science:  
London, 1987; 酶学中的方法，固定的酶和细胞，Pt. C Mosbach, K. Ed.,  
Elsevier Applied Science: London, 1987; 还可参见上述的“在医学和药学  
25 中的水凝胶”）。例如，可通过用蛋白质溶液处理来把蛋白质附着到聚  
丙烯酰胺和 N - 丙烯酰琥珀酰亚胺的交联共聚物上。还可以在聚合或  
形成凝胶之前把结合区域并入多孔基质。在一个实施方案中，可采用各  
种耦联化学物质把结合区域附着到未交联的聚合物上。然后，可以使聚  
合物交联（例如，利用包括酰胺键、二硫化物、对环氧化合物的亲核进  
攻 等在内的化学方法）（例如，参见 Pollack 等, 1980, J. Am. Chem.  
30 Soc. 102(20): 6324-36）。结合区域可附着在单体物质上，然后再在聚  
合期间结合入聚合物链中（参见 Adalsteinsson, O., 1979, J. Mol. Catal.  
6(3): 199-225）。而在另一个实施方案中，可通过在聚合反应/形成凝胶

期间把结合区域捕集在孔中，或者通过结合区域渗透进多孔基质和/或膜中，而把结合区域结合进凝胶。此外，结合区域可通过由疏水和/或离子相互作用所导致的非特异吸收被吸附在多孔基质（例如，聚合物凝胶和膜）的表面上。可以有益地把生物素用作交联或结合试剂。抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或其它生物素结合试剂可被结合进结合区域。  
5

可在具有不同孔尺寸和溶剂含量的多孔材料（例如，凝胶）上生成 PMAMS。例如，孔尺寸变化的聚丙烯酰胺凝胶可通过改变丙烯酰胺的浓度和交联程度来做到。

10 在孔尺寸小于被分析物的这样的 PMAMS 上，结合反应基本上在凝胶的表面上进行。在这种情况下，可用穿过凝胶的过滤作用和/或电泳现象来浓缩在凝胶表面处的被分析物并调节结合反应的反应动力学特性（例如，增加速率）。较快的反应动力学特性在快速测定中是有益的（例如，短时间得到结果），并且可在较短的时间内产生高灵敏度。

15 在孔尺寸大于被分析物的 PMAMS 上，结合反应可在凝胶表面上及在其本体中进行。在这种情况下，可用过滤作用和/或可用电泳现象来提高结合的反应动力学特性并从表面上去除未结合的物质。

20 在凝胶上形成的 PMAMS 可以湿储存和/或可以在干燥状态下储存，并在测定期间重组。可在储存前把 ECL 测定所必需的试剂结合进凝胶（通过渗透进凝胶，或通过在形成凝胶期间加入）和/或可在测定期间加入上述试剂。

25 可通过以液体形式把在基质中含有每个结合区域的液滴或微液滴施加到基片上来生成 PMAMS 的成图案的结合区域。然后，用各种众所周知的技术（聚合、交联、冷却至凝胶化相变温度以下、加热）来引起液体的固化和/或凝胶化。导致固化或形成凝胶的试剂可包含在上述液滴中，从而使得在散布后的某个时候所述液滴固化和/或形成凝胶。可用后续的处理（例如，暴露于光、辐射和/或氧化还原电位）来引起固化和/或形成凝胶。在其它一些实施方案中，这样的液滴或微液滴也可以是浆液、预聚合混合物、颗粒团和/或基本上是固体滴。此外，可利用气相沉积。  
30

还可以通过形成基质的分层结构，而每一层含有一个或多个结合区域来形成图案。例如，可把连接到抗体（用标准化学方法）的琼脂糖倒

进一个容器，并通过冷却来使之形成凝胶。然后，可把后面的含有其它抗体的层接着倒在第一层上并使之成为凝胶。这种分层结构的剖面给出了具有许多不同的结合区域的连续表面。可以叠置这样的剖面，并可切开另一个剖面，以产生具有甚至更大密度的结合区域的 PMAMS 表面。

- 5 也可彼此相邻地辅置下含有给定结合元素的基质的线条和/或叠置这些线条。还可以沿剖面切开这样的结构，并用作 PMAMS 表面。

还可利用某些基质能分离的能力来形成图案。例如，可通过在一个产生有许多不同结合区域的表面的聚丙烯酰胺片中的电泳来分离核酸探针的混合物。

- 10 还可用微观流体导管在载体上制备 PMAMS 结合区域。微观流体导管的部分清单包括中空的毛细管、用基质制作的和/或填充了基质（例如，多孔或被溶剂溶胀了的介质）的毛细管、可载有薄膜或液滴的固体载体。毛细管可以是固体，而试剂沿毛细管的外表面流动，可使试剂流体容器可暴露于与 PMAMS 表面接触的多孔基质尖端。例如，可以连续  
15 不断或周期性地补充试剂容器，从而使所给定的多孔基质的尖端可重复地沉积试剂（例如，链烷硫醇，以形成单层；和/或结合试剂等）多次。此外，改变上述尖端的孔隙度可控制试剂流到表面的过程。不同的或相同的结合试剂可存在于许多毛细管中，和/或多种不同的结合试剂可存  
20 在于一个给定的毛细管中。使毛细管与 PMAMS（例如，成图案的 SAM）的表面接触，从而使某些区域受到结合试剂的作用，产生离散的结合区域。不同的结合试剂中，每一种均存在于不同的微观流体导管中，同时按需要从流体导管阵列送到金属表面、SAM 等上面。微观流体导管还可在施加到载体表面前用于用所需的分子涂上微观印记。例如，单独的  
25 微观流体导管可用来施加连接到促进载体表面吸附（例如，在碳氢连接物上的自由硫醇，它促进金吸附）的部分上的不同结合试剂，以形成 PMAMS。这样，例如，用微观流体导管用加入了带自由硫醇的连接物的不同特异性的抗体涂抹的微观印记，可用来在金表面上的所需区域中施加这样的抗体，以形成 PMAMS 的离散的结合区域。

- 成图案的流体发送的另一种方法涉及采用缩微印刷装置，它通过穿  
30 过一个小孔注射滴状流体来发送流体微滴（例如，喷墨印刷机）。可通过不同的机制导致在这些装置中注射滴状流体，所述机制包括加热、带上静电和/或从压包装置施以压力。可通过采用多个孔和/或一个孔并装

上合适的阀来形成多于一种液体的图案。

在一种制备 PMAMS 的方法中，用微观流体导管直接（优选的是同时）把含有所需结合试剂的液滴发送到在一个表面上的离散的区域上，以形成离散的结合区域。结合试剂可含有功能性的化学基团，该功能性化学基团与在其要所施加的表面上的一种化学基团形成键。在另一种变型中，在液滴中的结合试剂非特异性地吸附或结合到表面上（例如，在所述表面上干燥）。

可以选择地，沉积在表面上的液滴含有可形成基质的试剂。这种基质可以是固体、聚合物或凝胶。可以通过蒸发溶剂来形成基质。它可通过单体物质聚合而成。它可以通过预制的聚合物的交联而成。它可以通过调节温度（例如，冷却和/或加热）而成。它可以通过其它一些方法而成。例如，可通过冷却或通过添加导致凝胶化的试剂来冷却聚合物质。可通过在电极处（包括基片）产生反应性物质、通过光（或其它辐射）、通过添加诱导固化或凝胶化的试剂、通过冷却或加热，诱导形成固体基质。此外，所述表面可含有能够引发形成基质（例如，凝胶化或聚合）的催化剂。

在一种优选的技术中，可采用成图案的亲水性/疏水性区域，以防止所施加的流体或凝胶的散布。这样的流体或凝胶可含有待连接到载体表面上的结合试剂，以形成 PMAMS 的结合区域。在这种情况下，采用这样的亲水性/疏水性边界有助于把所产生的结合区域限制在离散的区域处。可以选择地，流体含有可在表面上形成基质的试剂，而结合试剂当沉积在表面上时含在一个确定的区域内。例如，可利用亲水性/疏水性边界助剂可把液滴限制在一个确定的区域。此外，亲水性或疏水性区域可给出可结合（例如，共价或非共价结合）进基质的基团，使得该基质能更稳定地粘合到基片上（Itaya 和 Bard, 1978, Anal. Chem. 50(11): 1487-1489）。在另一种技术中，所施加的流体或凝胶是含有感兴趣的被分析物的样品，样品施加到制备好的 PMAMS 上。在一个优选的实施例中，可用含有疏水性溶液的毛细管把一种溶液沉积在离散的区域上，产生由疏水性区域围绕的亲水性区域。可以选择地，亲水性区域围绕的疏水性结合区域可与含有结合试剂或被分析物的疏水性流体一起使用。疏水性和亲水性是相对于彼此和/或相对于所施加的样品的相对性术语，也就是说，这使得能控制施加到结合区域的流体或凝胶样品的

散布或润湿。进而，可用物理表面特性（例如，在表面上的井(well)或沟流）来完成来自微观流体阵列的受控制的溶液沉积。微观流体导管可包括在一个盒中，或更优选地，用来在使用之前给载体施加一些特定的试剂。

5 可把一种以上的连接化学物质施加到同一载体表面和/或可用多种  
10 印记产生带亲水性和疏水性结合区域的表面。例如，可如下制备这样一个区域，在这个区域中，想要亲水性结合区域在位置 1 处，并想要疏水性结合区域在位置 2 处。制作一个第一亲水性印记，这亲水性印记在位  
15 置 1 处有一个圆盘，而在位置 2 处有一个更大的环。制作第二疏水性印  
20 记，它的盘在位置 2 处，这盘适配于在由印记 1 所留下的环形单层内。  
最后，由单层组份的疏水性溶液清洗表面。

具体地说，用微观接触印刷（也就是说压印）来产生 PMAMS。这样施加的单层由例如用于金表面的表面结合基团构成，优选具有链烷烃（例如， $(CH_2)_n$ ）间隔基的硫醇类基团。有一个间隔基团连接（优选地共价结合）到连接基团 A。“A”例如可以是抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或生物素或者任何具有可资利用的互补结合对“B”的其它合适的结合试剂。A:B 连接可以是共价的或非共价的，而且，Bard 等人公开了本领域中已知的可以使用的某些连接化学物质（美国专利 US 5,221,605 和 US 5,310,687）。 “B”进一步连接到结合试剂，例如，抗体、抗原、核酸、药物或其它适于形成结合区域的物质，该结合区域能结合在要被检验的样品中的一种或多种所感兴趣的被分析物。B 还可以连接到 ECL TAG 或标记物。可借助于毛细管或微观流体导管阵列（图 5A 至图 5C）给 SAM 发送连接基团 B，该毛细管或微观流体导管阵列能在单层“A”连接键上放置许多具有不同结合表面特异性的  
25 “B”试剂。A 和 B 还可以在附着到所述单层之前或先于附着到单层就被连接。如所说明的那样，在图 5A 中，为说明简单起见，形状独立的结合区域表示为几何形状 602，以便表明在单个载体 600 上可存在有不同的结合特异性。图 5B 提供了微观流体导管（例如，毛细管）阵列 606 的俯视图。圆点 610 是所述导管的剖面。图 5C 提供了微观流体导管阵列 608 的侧视图。从顶部和底部伸出的线条是单独的微观流体导管  
30 610。在下面的几何图形 612 代表一旦从每个单独的毛细管发送结合试剂时所形成的特异性结合区域。

作为举例，在上述第一次压印后，裸表面（例如，金）区域可与第二种链烷硫醇反应，该链烷硫醇并没有连接化学物质 A，而且具有与上述第一单层相反的疏水性/亲水性。特异性连接区域就以这种方式在表面上制备。

5 可对每个结合区域采用特异的或用于所感兴趣的被分析物的结合试剂，或者，可采用特异地结合于多种所感兴趣的被分析物的结合试剂。

而在另一种变型中，如上述图 5A 所示，可用具有不同连接化学物质和/或结合部分的一些材料（例如，结合试剂、ECL 标记物、SAMs）  
10 压印载体表面多次。

成图案的结合试剂可以是稳定的和/或坚固的化学基团（例如，经受得住它们所遇到的情况），化学基团然后再连接到比较不那么稳定或耐用的结合基团。可利用多种连接键，以便使在制备 PMAMS 表面时的  
15 每一步的条件最佳和/或简化 PMAMS 表面的制备。例如，可以用普通方式制备第一 PMAMS 表面，然后，进行改性，产生不同的 PMAMS 表面。在另一个实施例中，普通的 PMAMS 表面可以与一些结合试剂的溶液混合物反应，这些结合试剂本身含有把它们引导到该 PMAMS 表面上的一些特定区域（例如，结合区域）的一些结合区域。例如，每一个均给出一种不同的寡（核苷酸）序列的结合区域的图案被连接到表面上。  
20 然后，用含有一些辅助结合试剂混合物的溶液处理表面，所述这些辅助结合试剂的每一种都连接到互补于在上述表面上的一个序列的寡（核苷酸）序列。以这种方式就可达到形成这些辅助结合部分的图案的目的。优选地，寡（核苷酸）序列是 DNA 的 6 至 30 链节。6 至 30 链节的某些组可含有基本上类似的序列互补性，从而使对于杂交的近似结合恒量  
25 在某一给定的组内是类似的，并且可识别地不同于较少互补性的序列。在另一个实施例中，上述辅助结合部分是蛋白质（例如，抗体）。

还可以把用来如下面 5, 13 节中所述的那样抑制施加到一个表面上的试剂或样品的浸湿或散布的所述方法用于制备 PMAMS（和/或施加样品）。可以用所施加的电位（例如，从电极/反电极对）进一步控制  
30 试剂和/或样品的沉积和/或散布（例如，参见 Abbott 等，1994 年，Langmuir, 10(5): 1493-1497）。

PMAMS 结合试剂可位于含有碳的材料上。它们还可以位于单独的碳原纤维上，或者， PMAMS 结合试剂可以位于一种或多种原纤维的聚集体上。在许多实施方案中， PMAMS 结合试剂可以位于一种或多种原纤维悬浮液、原纤维分散体、原纤维与其它材料的混合物（如上述例子 5 中所述）以及它们的混合物等之上。

PMAMS 结合试剂可位于许多单根的原纤维和/或原纤维的聚集体上，该原纤维和/或原纤维的聚集体位于载体之上、之中或附近。在一个例子中，结合试剂位于分散的单根的原纤维或原纤维的聚集体上。这些原纤维或原纤维的聚集体可在载体上的一些不同的结合区域内占据 10 位置，并可构成本申请所述的结合区域。

在另一个例子中，单独的这样一些结合区域或许多这样的结合区域位于载体的隔开的不同区域中。借助非限定性的例子，单独的这样一些结合区域或结合区域的集合体可位于载体中的凹处、坑和/或孔洞里。而在另一个例子中，单独的一致结合区域或许多结合区域可位于水滴、 15 凝胶、弹性体、塑料、油等物质里，这些物质定位在载体的表面上。在另外又一个例子中，单独的一些结合区域可通过一个涂层（可成图案）而定位在载体上，这个涂层对于不同的结合试剂和/或结合试剂/原纤维的集合体具有不同的结合亲合力。

借助于一种或多种微观流体导管（例如，毛细管）使结合区域理想 20 地位于许多单独的原纤维上和/或把原纤维的聚集体制备在载体上。不同的或等同的一些结合试剂可存在于许多微观流体导管中或许多微观流体导管上，和/或多种不同的结合剂可存在于某一给定的微观流体导管中或某一给定的微观流体导管上。可以使毛细管与载体接触（点样），和/或毛细管可发送试剂，这时微观流体导管和/或表面被扫描或相对另 25 一个平移（也就是说，书写的类似钢笔的方法）。微观流体导管可把位于原纤维上的结合试剂发送到载体上，从而使该载体的某些区域暴露于原纤维—结合试剂复合物，以产生离散的结合区域。在一种优选的情况下，不同的结合试剂每种存在于一个不同的微观流体导管中，它们同时从导管阵列发送到载体上。在一个例子中，结合试剂和/或它们所定位 30 的原纤维用与载体表面成键（例如，共价或非共价相互作用）的一种化学官能团衍生化。在某些实施例中，结合试剂和原纤维非特异性地结合或吸附到表面上。而对于另一种情况，可把定位在原纤维上的结合试剂

发送到在载体的表面中的凹处、坑和/或洞里。在另一个例子中，结合试剂发送到涂有一种材料的表面，这种材料对于某些结合试剂或结合试剂/原纤维集合体具有更强的或更弱的结合亲合力，而这样就产生了所述试剂的一些区域，这些区域占据的空间位置不同于其它那些结合试剂。

结合试剂定位在一种或多种磁性的单独的原纤维或原纤维的聚集体上。在这样一种情况下，磁性载体可把定位在磁性原纤维上的结合试剂吸引到该载体上。

载体可含有几种不同的区域，这几种不同的区域是磁性的且被一些非磁性的区域围绕。定位在磁性原纤维上的结合试剂可定位在上述载体的磁性区域上。在一个例子中，载体可含有一种或更多种不同的区域，这不同的区域是磁性的且被一些非磁性的区域围绕，而且，可以调节或改变上述磁性区域中的磁场强度。在这方面，采用这样的可调节或可改变的磁场有助于把定位在原纤维上的结合试剂附着在载体表面或从该载体表面释放，而这样就可用来搅动或混合所述那些区域。

结合区域的数目范围大致为 2 至  $10^8$  个，而优选的是 25 至 500 个区域。

结合区域可位于工作电极和/或反电极上。

此处所述的对于不同类型的 PMAMS、载体以及电极及其结构的不同实施方案也可以互相结合实施。

可以保存（例如，通过保护性表面涂层、干燥表面、处于真空或惰性气氛下的耐用包装、冷冻及有关方法）PMAMS 载体以备将来所用。

## 5.2、结合试剂

本发明的结合区域制备成含有特异地与至少一种所感兴趣的被分析物（配体）结合的结合试剂。在离散的结合区域中选择结合试剂从而使结合区域具有所想要的结合特异性。可从本领域中已知的能够或被推定能够特异地结合某种所感兴趣的被分析物的任何分子中选取结合试剂。可从下述 5.10 节“可以进行的 ECL 测定”中所述的那些被分析物中选取所感兴趣的被分析物。这样，结合试剂就包括但并不限于受体、用于受体的配体、抗体或其结合部分（例如， $\text{Fab}, (\text{Fab})'_2$ ）、蛋白质或其片段、核酸、寡核苷酸、糖蛋白、多糖、抗原、抗原决定部位、细胞和细胞的组成部分、亚细胞粒子、碳水化合物部分、酶、酶底物、外源

凝集素、蛋白质 A，蛋白质 G、有机化合物、金属有机化合物、病毒、锯鹱、类病毒、类脂物、脂肪酸、脂多糖、肽、细胞代谢物、激素、药剂、镇静剂、巴比妥盐、生物碱、类固醇、维生素、氨基酸、糖、非生物聚合物、生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、诸如聚合树脂  
5 那样的有机连接化合物、脂蛋白、胞质分裂素、淋巴细胞活素、激素、合成聚合物、有机和无机分子等。核酸及寡核苷酸可以指包括但并不限于下述这些物质的 DNA、RNA 和/或寡核苷酸的类似物：含改性的碱基或改性的糖的寡核苷酸、含有不是磷酸二酯键的骨架化学物质的寡核苷酸（例如，参见 Nielsen, P. E., 1995 年, Annu Rev. Biophys. Biomol. Street. 24 167-183）和/或已经被合成或被改性给出可用来形成与其它分子的键（共价或非共价）的化学基团（这里，我们定义核酸或寡（核苷酸）含有两个或多个核酸碱基和/或核酸碱基的衍生物）的寡核苷酸。  
10

本发明的 PMAMS 可具有许多的离散的结合区域，这些离散的结合区域至少包括一个含有一些结合试剂的结合区域，这些结合试剂彼此相同，且与含在其它结合区域中的那些结合试剂特异性不同，以便用不同的结合区域为所感兴趣的不同的被分析物提供结合。作为例子，这样的一种 PMAMS 包括一个含有对于甲状腺刺激激素（TSH）的抗体的结合区域、一个含有杂交肝炎 C 病毒（HCV）的寡核苷酸的结合区域、一个含有杂交 HIV 的寡核苷酸的结合区域、一个含有对于 HIV 蛋白质或糖蛋白的抗体的结合区域、一个含有对于前列腺特异抗原（PSA）的抗体的结合区域、以及一个含有对于肝炎 B 病毒（HBV）的抗体的结合区域，或包括前述那些结合区域的子区域。  
15  
20

PMAMS 可具有许多离散的结合区域，这些离散的结合区域至少包括一个结合区域，这个结合区域在其内含有一些结合试剂，这些结合试剂结合特异性不同，从而使一个单独的结合区域能结合多种所感兴趣的被分析物。作为例子，这样的一种 PMAMS 包括一个结合区域，这个结合区域含有对于 T 细胞抗原受体的抗体以及对于诸如 CD4 那样的 T 细胞表面抗原的抗体。  
25

PMAMS 可具有许多离散的结合区域，这些离散的结合区域包括  
30 (i) 至少一个结合区域，这个结合区域含有一些结合试剂，这些结合试剂彼此相同而与含在其它结合区域中的那些结合试剂中的至少一种的特异性不同；以及 (ii) 至少一个结合区域，这个结合区域在其内含

有一些结合试剂，这些结合试剂的结合特异性不同。作为例子，把 PMAMS 制作成具有（a）至少一个结合区域，这个结合区域含有单一特性的结合试剂（例如，对于 T 细胞抗原受体的抗体，例如， $\alpha$ 、 $\beta$  T 细胞抗原受体或者 $\gamma$ 、 $\delta$  T 细胞抗原受体），这样，使得这至少一个结合区域结合所有表达这种 T 细胞抗原受体的细胞；以及（b）至少一个结合区域，这个结合区域含有两种不同的结合试剂，例如，对于 T 细胞抗原受体的抗体和对于 CD4 的抗体，这样，使得这种至少一个结合区域结合表达那种 T 细胞抗原受体的  $CD4^+T$  淋巴细胞（也就是说，T 淋巴细胞的亚种群）。

在另一个实施例中，至少一个结合区域含有一些结合试剂，这些结合试剂是不同的分子，但具有相同的结合特异性（例如，诸如表皮生长因子和对于表皮生长因子受体的抗体那样的一些结合试剂）。

可选择许多种结合试剂，从而使得尽管这些结合试剂不同且具有不同的结合特异性，但它们识别相同的被分析物（在一个可供选择的实施例中，识别不同的被分析物）。例如，对于被分析物是一种具有众多结合部分的被分析物的情况（例如，一种具有不同细胞表面抗原的细胞），与不同的结合部分结合的不同的结合试剂会识别相同的被分析物。作为另一个例子，对于在一个单个细胞上的不同的细胞表面抗原的抗体会识别相同的细胞。而作为又一个例子，对于一个单独抗原的不同的抗原决定部位的抗体可用作识别该抗原的结合试剂。

在另外又一个实施例中，只有特异地结合一种单独的所感兴趣的被分析物的结合试剂存在于一个或多个结合区域中。可以选择地，特异地结合多于一种所感兴趣的被分析物的结合试剂存在于一个或多个结合区域中（例如，交叉反应抗体）。在一种特殊的方案中，可采用结合一类例如具有类似特性的被分析物的结合试剂。

还可把结合区域装入含有一些结合试剂的 PMAMS，这些结合试剂对于所需的标准被分析物是特异性的并被用作一种内部标准（例如，一个可与含有确定量的被分析物的样品接触的结合区域，而结合试剂与该被分析物结合）。还可把含有对于相同的被分析物特异性的结合试剂的多种结合区域装入 PMAMS，以便使得能取分析结果的统计平均。上述那些结合试剂不仅对相同的被分析物特异性，而且可以是等同的，从识别所述被分析物上的相同结合部分。于是，可制备与相同的结合部分特

异性结合的许多结合区域（例如，在2个到 $10^8$ 个的范围内），从而可对ECL量测记录取统计平均，以便控制变化并提高精度。在PMAMS上的许多结合区域可以对在一单独载体上的一种对照用被分析物或一种所感兴趣的被分析物或者这两种被分析物特异性。

5 作为另一个例子，可制备具有已知的ECL标记物初始浓度数的一个或多个离散的结合区域。装在内部的ECL层用作对照物，以便监控例如标记降解和温度效应。

10 可采用这样一种结合试剂，这种结合试剂是一种对于底物（所述底物是所感兴趣的被分析物）特异性的酶，其中在所述底物上的酶反应产物是一种信息试剂（reporter agent）（一种可检测的试剂），例如，是一种触发ECL反应的产物、一种荧光分子、一种一旦与合适的酶接触就变色的物质（例如，用于辣根过氧化酶的生色底物）等等。在这样一种实施方案的一个例子中，用作结合试剂的酶是用来检测或测量样品中的葡萄糖的葡萄糖脱氢酶（GDH）。ECL标记物位于含有GDH的  
15 结合区域内或位于该区域附近。通过酶在葡萄糖上的反应产生NADH，NADH能与ECL标记物反应，促进ECL（Martin等，1993年，Anal. Chim. Acta 281: 475）。

20 可用含有增强背景结合作用的（也就是说，与存在于所感兴趣的被分析物上以及在样品中的其它被分析物上的结合成份结合的）的结合试剂的结合区域提高在检测和测量电化学发光期间的信噪比。作为例子，这里所感兴趣的被分析物是特异细胞亚种群（例如，CD4<sup>+</sup>细胞）而样品是含有病人细胞的流体样品（例如，血），于是对于唾液酸的抗体可用作结合试剂，以增强对样品中的几乎所有细胞的背景结合（由于唾液酸是几乎所有细胞表面糖蛋白的一个组成部分），然后，对于特异于细胞亚种群的细胞表面抗原的抗体（例如，对于CD4的抗体）可用作结合试剂（在与含有对于唾液酸的抗体的结合区域相同或不同的结合区域中）。

### 5.3、电压波形

30 施加在多个ECL单元的电极和反电极对上的电压波形（电位/时间变化）必须足以触发ECL反应。电压波形通常是均匀电压变化形式，从第一电压开始，稳定移动到第二电压，移动回第一电压再到第三电压，然后再回到所述第一电压。例如，波形可从-0.5伏到0.5伏范围

内第一电压开始，直升到 1 伏到 2.5 伏范围的第二电压，移动回到第一电压再到 0.0 伏到 -1 伏范围的第三电压。作为另一个例子，在较简单的波中，可把电压修改为从 0.0 到 +3.5 到 0.0。电压波形可带有线性斜坡、阶梯函数和/或其它函数。当电压保持固定在一个电位时，电压波形可具有时间周期。可相对于一个或多个参考电极控制所施加的电位，或者，没有参考电极可资利用。此外，可用负电位。这样，用来诱导来自本发明的盒的 ECL 发光的电压，对于最佳 ECL 信号强度以及对于 ECL 标记物和测定介质的特异性，是易于选取的。

在某些应用中，当测量发自结合区域的光时，优选改变电压。这对于确定导致结合区域发光的电场的阈值特别重要。在这种情况下，在所述结合区域处施加的电位从被认为是低于发光所需阈值的一个值开始，并第一次测量所发射的光。如果没有测量到光，或者，光处于预定阈值以下，就在计算机的控制下，例如，通过计算机控制的电压源，提高施加在电极对上的电位，并再一次测量。可重复这个过程，直至接收到预定的适量的光。以这种方式，所施加的电压就可用作测定信号。

可从施加到电极对上的交流电压产生 ECL 信号。

例如，如美国专利 US 5,324,457 和 US 5,068,088 所公开的那样，熟悉电压和电流设定的普通技术人员能易于选取用于触发 ECL 发光的最佳电压和电压扫描。

如果工作电极是半导体或含有响应于光而产生电流的另一种组成成分，则通过光照射该工作电极表面，可产生用于产生 ECL 的所需的电位。

#### 5.4. 可寻址的电极和使用该电极的方法

可用众多方法来对许多电极/反电极对寻址。图 14 至 18 中示出了几种示意性的这样的技术。这些图中作为例子所示出的是四个电极/反电极对 101、102、103、104、以及一个波形信号发生器，波形信号发生器一般是一个数字计算机，而且，优选地与用于处理由检测装置所检测的 ECL 的计算机是同一计算机。

在图 14 中，每个电极/反电极对 101 至 104 单独由一对连接到波形信号发生器的线路寻址。作为例子，线路 105、106 访问 (access) 电极/反电极对 101。可用波形信号发生器在任何给定的时间给连接到各个电极/反电极对的任何一对或多对线路施加合适的波形。

为减少反电极对寻址所需的连接件的数目，可以提供图 14 直接连接方案的替代方案。例如，图 15 中示出了行和列的访问方案，用于电激发一些或所有的电极。在这种方案中，在许多电极/反电极对的每一列中的电极 201、202 中的一个连接到在载体 200 上的共用电导体 205，而在所述多个电极/反电极对的每一行中的每个反电极连接到载体 200 上的导体 207、208。导体 205、206 在载体 200 的边缘处分别连接到连接件 C1、C2，而导体 207、208 分别连接到连接件 R1、R2。然后，用单独的线路把这些连接件的每一个连接到波形信号发生器。结果，在图 15 的结构中，所需的连接件的数目和来自波形信号发生器的信号线的数目已经从 8 减少到 4。

要使得能快速和顺序地激发每个电极对，采用计算机控制的开关装置是有益的。图 16 的结构显示了连接到一个第一多路转换器 310 的许多电极。许多反电极连接到第二多路转换器 320。第一多路转换器还连接到电压源 330 的第一个极，电压源 330 典型地提供下述随时间变化的电位。第二多路转换器还连接到电压源的第二个极。利用电连接到每个多路转换器并连接到寄存器 340 的寻址线 A0 - A3，计算机处理器 350 可引导所述多路转换器选择性地把任何或所有第一电极连接到电压源的第一个极，并把任何或所有的第二电极连接到电压源的第二个极。

如图 17 所示，许多电压源通过一些单独的多路转换器组连接到每个电极。如果要求在一特定的电极对处有一个第一电位或电位范围，就通过计算机处理器 350 对与提供那个电位的电压源 430 结合在一起的多路转换器 410、420，典型地是通过寄存器 340 来寻址，由此使那个特定的电压源与所述的电极对连接。如果对另一个电极对要求不同的电位或电位范围，就通过计算机处理器来对与不同的电压源 460 结合在一起的多路转换器 440、450 寻址，由此，通过所结合的多路转换器 440、450 使那个电压源与所述电极对连接。

如图 14 或图 15 所示，如果这个实施例中的电极阵列中至少有一部分电极对是可以独立激励的，例如，一个电极对可由一个电压源激励，而另一个电极对同时由另一个电压源激励。可以选择地，可用一个与两组并联在一起的多路转换器都连接的单个电压源来替代图 17 的两个电压源，这使得能用同一电压源来激励两个电极对。

如图 18 所示，可配置许多电压源 520、530，而不是如图 17 所示的那样对每个电压源配置一组两个多路转换器。这些电压源可通过计算机控制的电开关 510 或一些开关连接到一组单个的多路转换器 310、320。如图 18 所示，所述计算机会指示开关 510 把某一特定的电压源与多路转换器连接，并且还会指示该多路转换器（通过它们的访问线路 A0 - A3 发信号）把所选择的电压源与所希望的特定的电极对连接。

可以选择地，在任何一个实施例中施加给每个电极对的电位可以变化。当使用具有许多不同结合区域的盒时这一点特别有益。这样的盒可要求在不同的结合区域处施加不同范围的电位。考虑过几个不同的实施方案，这几个不同的实施例能改变施加给每个电极的电位。

可有益地使用计算机控制的电压源。计算机控制的电压源是一个可被计算机访问的电压源，以选择提供特定的电位。可以选择地，可给所述计算编程，以便在一段预定的时间范围顺序施加某一特定范围的电位。在这样一个系统中，与计算机和电压源电连接的访问线使得计算机能给电压源编好程序，以便产生特定的电位，施加给待施以电压的那个电极对。

还可采用用于访问许多电极对的另外一些方法。例如，可邻近许多电极和反电极对的每一个放置许多参考电极，以便感知施加到其上的电压。以这种方法可以维持对电压波形的附加控制。

图 36 显示了本发明的另一个实施方案；电极阵列（3600，3601）支承在由在绝缘体 3604（例如，一张穿有孔 3605 的塑料片）中的一些缝隙的图案分开的两个表面（3602，3603）的每一个上。每个电极通过许多缝隙。如果电位施加在每一表面上的一个电极上，电流就只能通过与这两个电极接触的缝隙，这样，就限制了任何可能发生的电化学或 ECL 的位置。在该图所示的优选实施方案中，电极（3600，3601）是在载体上的线路阵列。使在上述两个表面上的两组电极互相垂直取向。在上述绝缘片中的缝隙只位于每个表面的电极的相交部分。

这个实施方案优于那些被单独访问的电极对的优点是只需更少的电引线。

在一个可供选择的实施方案中，省略了绝缘体 3604，而把上述那些表面紧靠着放置，从而使得只有一个狭缝隙存在于上述两个表面之间。在这个实施方案中，施加在每一表面的电极之间的电位会优先地使

电流通过电极的相交部分处（也就是说，在该处，两个电极之间的距离最小），这样就限制了任何可能发生的电化学或 ECL 的位置。

### 5.5. 光检测

用合适的光检测器或邻接本发明的装置放置的检测器检测由被触发的 ECL 发光所产生的光。光检测器例如可以是薄膜、光电倍增管、光电二极管、雪崩光电二极管、电荷耦合器件（“CCD”）、或其它光检测器或者摄像机。光检测器可以是单个的检测器，以检测顺序发光，或者可以是许多检测器，以检测并在空间上分辨在所发射的光的一个单独波长或多个波长处同时发射的光。所发射和被检测的光可以是可见光，或者可作为诸如红外或紫外辐射那样的不可见辐射而被发射。上述检测器可以是静止的，或者是可以移动的。可借助于透镜、反射镜以及光导纤维光导管或光导管（单个的、多个的、固定的或可移动的）使所发射的光或其它辐射导向上述检测器，所述透镜、反射镜以及光导纤维光导管或光导管定位在盒的结合表面上，或邻近该盒的结合表面，或者，上述检测器可直接接收光。此外，载体、PMAMS 以及电极表面本身可用来引导光或透过光。

PMAMS 可在光检测器阵列的表面上形成，从而使每个检测器只接收来自一个结合区域的光。所述光检测阵列可以是 CCD 片，而结合区域可以（用标准的连接化学物质）附着到半导体器件表面。

沉积在结合区域上的液滴或沉积在一个附近的第二表面上的液滴可用作微透镜，以引导或控制所发射的光。可以选择地，光检测器可以在盒的前面直接定向，而且，可采用诸如抛物面反射器或透镜那样的各种聚光装置，而不是采用光导管，来把发自许多结合区域的任何一个的光引导到所述检测器。可同时或顺序测量发自至少两个离散的结合区域的光。

可用在光测量装置和被测量的结合区域之间的“遮光器”（chopper）装置来控制由于热漂移、装置的老化或光检测器中所固有的电噪声所产生的误差。所述遮光器可以是本领域普通技术人员众所周知的那些普通机械遮光器中的任何一种，例如，具有能使光通过的狭缝或开口的旋转圆盘。可以选择地，可用 LCD 光阑、LCD 光阑阵列、固体光阀或者诸如此类的东西来遮断光。可以选择地，可采用诸如光学计算领域中已知的那样的 LCD 遮光器的一个平面阵列或固体光阀。这些

装置优选地位于盒的平面和光导管或聚光装置之间，光导管或聚光装置把光从结合区域引向光检测器。在一个实施方案中，遮光器位于每个结合区域上方。当使用 LCD 遮光器和光阀时，可在不同频率处调制遮光器，以便为不同的发光结合区域同时提供不同的遮光速率。利用这种技术，可用一个单独的光检测器重叠和同时测量许多不同的光信号。然后可用与光检测器电连接的电子带通滤波器把单个的电信号分成几个电分量，每个电分量对应于许多单独的光分量中的一个。通过如上述那样遮断光，或者通过采用本领域中众所周知的其它机制，产生使得 DC 噪声成分能被电滤波掉的 AC 光波形。

同样可通过把先前确定的结果与标准试剂比较来校准 ECL 信号，以便针对试剂耗尽作信号调制。

### 5.6. ECL 信号分析

由一个给定的结合区域所产生的信号可具有一个范围的值，而这些值与定量测量值相关，提供“模拟”信号。在另一种技术中，从每个区域得到“数字”信号，表明被分析物存在与否。

统计分析用于上述两种技术，而且对于转化许多数字信号特别有用以提供定量的结果。不过，某些被分析物要求表明阈值浓度有/没有的数字信号。可单独或组合利用‘模拟’和/或‘数字’格式。其它一些统计方法可用于 PMAMS。例如，可在表面上产生 PMAMS 的浓度梯度（Chaudhury 等，1992 年，科学，256: 1539-1541）。这种技术用来通过对于整个浓度梯度上的结合情况的统计分析来确定浓度。可用多种不同的特异性结合试剂产生具有浓度梯度的 PMAMS 的多个线性阵列。浓度梯度可由给出所述那些不同浓度结合试剂的一些离散的结合区域构成。

在盒的结合表面上有对照测定系统也是重要的，以确保每次分析的一致性，从而控制信号变化（例如，由于降解、盒及其它组件的波动、老化、热漂移、电子线路中的噪声，以及光检测装置中的噪声等产生的变化）。例如，可利用对相同的被分析物的多个多余的结合区域（含有对于所述相同的被分析物特异性的同样的一些结合试剂或一些不同的结合试剂）。在另一个例子中，利用浓度已知的被分析物，或者，PMAMS 的对照区域共价地连接到已知量的 ECL 标记物，或者使用溶液中的已知量的 ECL 标记物。

按照本发明所进行的测定会快速且有效地收集大量的数据，这些数据例如可以以数据库的形式被储存，由临床或研究资料的汇集构成。所收集的数据还可用于快速法医或个人鉴定。例如，采用许多受到人类DNA样品影响的核酸探针就可用于DNA指纹，可易于用来鉴定临床或研究样品。

### 5.7. 多电极阵列的制备

电极的宽度或直径可大致为0.001mm至10mm。一个优选范围的电极对的尺寸（宽度或直径或最宽尺寸，这取决于该电极对的几何形状）是0.01mm到1mm。

10 优选地，用合适的导电材料制作电极，例如透明金属膜或半导体（例如，分别为金或氧化铟锡），这在本领域中是众所周知的，例如，用于制作液晶显示器等。在组装好状态的盒中，在第一和第二载体之间留下足够的空间，以便容纳例如薄膜或润湿表面形式的分析样品。

15 可用含有碳、碳纤维、碳的纳米管（nanotube）和/或上述这些材料的聚集体的材料制作电极。

可用碳原纤维制作电极。可加工一种或多种单独的原纤维和/或一种或多种原纤维的聚集体来形成更大的聚集体（美国专利US5,124,075）。

20 这个更大的聚集体是一个垫或网状物（以后叫作“原纤维垫”），其中，原纤维可缠结在一起或交织在一起。原纤维垫一般具有 $50M^2/g$ 到 $400M^2/g$ 的表面积。

作为例子，可把原纤维垫用作分析和/或制备电化学中的工作电极、反电极或参考电极。在一个例子中，原纤维垫用作用于电化学发光（ECL）的电极。

25 可用原纤维垫承载PMAMS的结合区域。本发明的PMAMS有许多离散的结合区域，其中两个或更多个离散的结合区域可以彼此等同，或可以不同。原纤维垫承载一种或多种结合区域。

可用一个或多个微观流体导管在原纤维垫上制备许多结合区域。不同的或等同的一些结合试剂可存在于许多微观流体导管中，和/或多种不同的结合试剂可存在于一个微观流体导管中。

在图22A和图22B中，用优选为一个阵列形式的许多微观流体导管优选地同时发送含有所需要的那些结合试剂的液滴到原纤维垫2200

的一些区域上，以形成一些离散的结合区域 2202。所述那些结合试剂与存在于上述原纤维垫的部分成键。所述那些结合试剂可非特异性地吸收到上述垫上，或在表面上干燥。

5 把所需要的结合试剂发送到原纤维垫上，而同时对该垫施加抽吸过滤。在这种情况下，抽吸过滤没抽到，或抽到一些或所有的结合试剂进入或穿过上述垫，而这样做时，减少了在形成图案过程期间结合试剂在上述垫的表面上侧向散布的量。

10 把碳原纤维的悬浮液压在基片上，制备原纤维垫，该悬浮液的液体能穿过所述基片（例如，一种过滤物）。可用来形成原纤维垫的过滤物的例子包括滤纸、由聚合物（例如，尼龙）膜形成的过滤物、金属微孔筛、陶瓷滤器、玻璃滤器、弹性体过滤器、玻璃纤维过滤物和/或两种或多种这样的过滤材料的组合。过滤领域中的普通技术人员会认识到这些材料只是适于过滤固体悬浮液的许多可能的材料的一些例子。

15 图 23A 和图 23B 显示一种实施方案，其中，可通过抽吸过滤制作原纤维垫。用过滤物 2300 过滤碳原纤维 2301 的分散液和/或悬浮液，过滤物 2300 可选择地配备有过滤膜 2303 和/或过滤物载体 2302。利用抽吸过滤悬浮液，而抽吸作用例如是通过一个滤瓶 2306 由真空源 2305 施加给上述过滤器的。原纤维垫 2304 聚集在过滤膜 2303 和/或过滤物载体 2302 上。可从上述过滤物上去除带或不带过滤膜 2302 的原纤维垫 20 2304。

25 在另一个实施例中，用压力强迫原纤维的悬浮液穿过过滤器。在一个例子中，通过用活塞把一个受约束的空气层和/或液体层压在上述悬浮液上面，从而把压力施加在受约束的原纤维的悬浮液上。在一个特定的例子中，原纤维过滤器限制在注射器上，所述活塞是注射器柱塞，而上述过滤器是一次性注射器过滤器（本领域普通技术人员众所周知许多这样的过滤器）。

通过毛细管作用迫使原纤维的悬浮液穿过过滤器，或者，通过把所述悬浮液芯吸进或穿过过滤器来过滤所述原纤维的悬浮液。

30 在另一个例子中，使单根的原纤维或原纤维的聚集体共价交联成垫，用光照射用光敏部分所衍生的原纤维，光敏部分当受到光作用时就聚合。

可用过滤物把原纤维俘获在它的孔中，从而构成一个复合物的垫，其中，过滤物起到一个载体的作用。在图 24 中，可通过使由源 2402 所发送的原纤维 2401 的稀浆通过两个大滚筒 2403 之间来制备原纤维垫 2400。在这个过程中，类似于在制备纸片或聚合物片的过程中所见到的那样，滚筒压迫悬浮液的液体，并且生产大的、连续的原纤维垫，可从这个大的、连续的原纤维垫上切下较小的垫。

· 原纤维垫可以是独立的或可被支承。

可改变过滤速率，以获得所需要的垫性能。例如，可改变的那些性能包括结构的均匀性或不均匀性、原纤维或原纤维聚集体的缠结程度、厚度、垫的孔隙度和/或它们的组合。

碳原纤维的悬浮液受到约束，并去除悬浮原纤维的液体。在一个例子中，使其中悬浮原纤维的液体蒸发。在另一个例子中，通过加热去除液体。在另外又一个例子中，悬浮液受到离心作用，并去除所得到的液体（例如，上清液）。在另一个例子中，通过抽气去除液体。

可把悬浮液置于一个或多个上述过滤物上，并通过蒸发使悬浮液干燥。可通过加热或在一个炉子中烘烤来弄干悬浮液，或者，通过冷冻和萃取液体来去除液体。在另外又一个例子中，通过用泵抽气来去除液体。本领域普通技术人员众所周知的许多其它方法都可用来从悬浮液中去除液体。

可通过使一种或多种碳原纤维分散在合适的液体、准固体或凝胶中形成适于通过过滤形成原纤维垫的原纤维悬浮液。合适的液体的例子包括但并限于水、乙醇、甲醇、己烷、二氯甲烷、缓冲过的溶液、表面活性剂、有机溶剂、含有生物介质（例如，蛋白质、抗体或其片段、细胞、亚细胞粒子、病毒、核酸、抗原、脂蛋白、脂糖、类脂物、糖蛋白、碳水化合物、肽、激素或药剂、小分子的溶液、聚合物前体、酸或碱的溶液、油和/或它们的组合）的溶液。

可通过借助声处理把碳原纤维分散在含水溶液中来制备原纤维的悬浮液。在另一个实施例中，可加入表面活性剂或洗涤剂。

原纤维垫的厚度可大体为  $0.01\mu\text{m}$  到  $10,000\mu\text{m}$ 。

在一些优选的实施例中，原纤维垫的厚度在  $1\mu\text{m}$  到  $100\mu\text{m}$  之间。在一些特别优选的实施例中，原纤维垫的宽度或直径范围为  $10\text{mm}$  到  $200\text{mm}$ 。

可重复冲洗并重新过滤原纤维垫，以去除悬浮液残留的残余材料。

加热经过滤或蒸发所制备的原纤维垫（例如，在炉子中），以去除未被过滤去除的悬浮液残留液体。

可用连续的过滤步骤形成由一个或多个不同的层所构成的原纤维的垫，该一个或多个不同的层或者接触一个或多个其它的层，或者紧密邻近一个或多个其它的层。可通过几种性质来区分这些层，这些性质包括但并不限于孔隙度的差别、密度、厚度、单根原纤维和/或原纤维的微观聚集体的尺寸分布、类型、原纤维聚集体的数量和/或尺寸、原纤维的化学衍生性（参看下文）和/或有其它物质附着在原纤维上。

图 25，通过连续的过滤步骤制备多层原纤维垫 2500。一个  $0.5\mu\text{m}$  到  $100\mu\text{m}$  厚的平原纤维层 2501 构成第一层；一个  $0.5\mu\text{m}$  到  $10\mu\text{m}$  厚的原纤维层 2502 构成第二层，原纤维层 2502 带有诸如阻止吸收蛋白质和其它分子的聚（乙二醇）那样的部分；一个  $0.5\mu\text{m}$  到  $5\mu\text{m}$  厚的带有一个或多个结合区域（参看上文）的层 2503 构成第三层。所述结合区域含有一种或多种可结合被分析物 2505 的抗体 2504。抗体/被分析物的复合物可结合一种被标记的抗体 2506。标记物可以是 ECL 标记物。在另外一些实施例中，上述标记物可以是在本申请的其它地方所述的许多标记物的一种或多种。这样的一种多层垫可以是独立的，或者可支承在上述许多可能的载体的一种上面。

可形成有多层组合的多层垫，其中，某些或所有的层可以是不同的。

可以给用来构成原纤维垫的过滤物、原纤维和/或原纤维垫涂层。在一些特定的实施例中，涂层是金属。可以把这些涂层弄成图案，从而使某些部分被涂层，而另外一些部分不涂层。在一个例子中，用电沉积来施加涂层。在另一个例子中，用化学镀层来施加涂层。

给过滤物涂覆金属，并用与所述金属成键的化学官能团对原纤维衍生化。所述过滤物是金属网或金属片。

原纤维垫可以是扁平的或可以变形、规则的或不规则的、圆的、卵形的、矩形的、或许多形状中的一种形状、刚性的或柔软的、透明的、半透明的、局部或整个不透明，并且可具有复合性能或者一些不同的的单独或复合性能的区域。

上述垫可以是一个圆盘或取自一张板的一小块。

优选地同时制作许多原纤维垫，且优选地制作成阵列形式。在一个例子中，微观流体导管的阵列在上述载体上构成许多原纤维垫。在另一个过滤物阵列中，或一个成图案的过滤物（例如，具有不同孔隙度的一些区域）用来制备原纤维垫的阵列。

5 用具有一些孔洞阵列的掩模（例如，筛网）来覆盖过滤物或载体的某些部分，并通过过滤和/或蒸发同时制作许多离散的纤维垫。

原纤维垫的密度从 0.1 到  $3.0\text{g}/\text{cm}^2$ 。该垫可具有可变的密度。例如，可不时地给所述垫施加机械力或压力，以便增加或减少密度。

10 原纤维垫可有一些孔。这些孔可局部和/或完全穿过该垫延伸，或者可以是一个网络或一些孔的一部分。这些孔的尺寸范围大致从 50 埃到  $1000\mu\text{m}$ 。在一个优选的实施例中，原纤维垫具有一些尺寸范围从 200 埃到 500 埃的孔。所述垫的孔隙度在诸多因素中主要取决于该垫的密度。

15 上述垫的孔隙度始终贯穿整个垫，或者，可随在垫中位置的变化而增加或减少。原纤维垫可具有杂乱和/或随机方式分布的、不同尺寸的各种各样的孔。

原纤维垫可含有不同孔隙度的一些不同区域。例如，原纤维垫可具有一层或多层，每层有不同的孔隙度。原纤维垫可有一些贯穿该垫的不同孔隙度的柱。

20 可通过包含不同数量的碳原纤维聚集体来改变上述垫的孔隙度，这些聚集体具有不同的尺寸、形状、成分或组合。在一个具体的例子中，从单独的原纤维，CC 原纤维（如上述）和 BN 原纤维（下述）或一些不同的组合制备垫。例如，原纤维垫中，某些孔可大到足以通过象生物细胞那样大的物体、某些孔可通过象蛋白质或抗体那样大的生物介质、25 某些孔可只通过小（分子量 $<1000$ ）的有机分子和/或有这些孔的组合。

上述垫的孔隙度使得一种或多种分子，液体、固体、乳浊液、悬浮液、气体、凝胶和/或分散液能扩散进该垫、位于该垫内和/或穿过该垫。原纤维垫的孔隙度使得生物介质能扩散（主动或被动）或用某些装置强迫进入该垫、位于该垫内和/或穿过该垫。生物介质的例子包括但不限于全血、分成各部分的血、血浆、血清、尿、蛋白质溶液、抗体或其片段、细胞、亚细胞粒子、病毒、核酸、抗原、脂蛋白、脂糖类、类脂物、糖蛋白、碳水化合物、肽、激素或药剂。原纤维垫可具有一个或多个不

同孔隙度的层，从而使材料可穿过一层或多层，但不穿过其它那些层。

原纤维垫用另一种材料承载或支承在另一种材料上。作为例子，支承材料可以是金属、塑料、聚合物、弹性体、凝胶、纸、陶瓷、玻璃、液体、蜡、油、石腊、有机固体、碳或者上述两种或多种物质的混合物。

5 所述材料可以是固体的或液体的。如果它是固体的，它可含有一个或多孔洞或孔。在一个特定的例子中，上述载体可以是金属筛网、尼龙过滤膜或滤纸。所述载体可以是导体、半导体和/或绝缘体。

在美国专利 US 5,304,326 和 US 5,098,771 所公开的一个实施例中，原纤维可分散在另一种材料中。例如，原纤维可分散在油、蜡、石腊、  
10 塑料（例如，ABS、聚苯乙烯、聚乙烯、丙烯腈等）、陶瓷、聚四氟乙烯、聚合物、弹性体、凝胶和/或它们的组合中。原纤维在其它材料中的分散液是导电性的。可以模塑、压制、成型、铸造、纺制、编织和/或喷射原纤维在其它材料中的分散体，以形成所需形状和/或形式的物体。原纤维垫可带有另外的材料，例如，细纤维、碎片或金属球，以便  
15 提高所述垫的电导率。在另一个例子中，原纤维垫可带有尺寸、形状及密度可变的其它碳纤维、玻璃纤维和/或金属纤维，以产生仅用原纤维所不能获得的孔隙度。在另一方面，上述垫可带有磁珠（例如，DYNAL 珠）。在后一个例子中，所述珠可用来改变上述垫的孔隙度，或者，所述珠本身可用作载体，用来固定结合区域。

20 其它一些碳纤维（例如，碳的纳米结构、碳纳米管、buckminster 富勒氏笼形碳分子、bucky 管、富勒氏笼形碳分子或它们的组合）可用来替代碳原纤维。

25 碳原纤维制备时可同时有共价连接到它们的表面上的化学官能团。如在国际专利 WO 90/14221 中所述的那样，这些化学官能团包括但并不限于 COOH、OH、NH<sub>2</sub>、N-羟基丁二酰亚胺（NHS）-酯、聚-（乙二醇）、硫羟、烷基（(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>）基团和/或它们的组合。这些和其它化学官能团可用来把其它材料附着到原纤维的表面上。

30 某些化学官能团（例如，COOH、NH<sub>2</sub>、SH、NHS-酯）可用来把其他小分子偶连到原纤维上。这样的化学官能团和小分子的组合有许多种可能。

在许多实施例中，NHS-酯基团用来连接带有亲核化学官能团（例如，胺）的其它分子或材料。在一个优选的实施例中，亲核化学官

能团存在于生物分子上和/或生物分子中，该生物分子是天然的和/或是化学衍生的。合适的生物分子的例子包括但并不限于氨基酸、蛋白质及其功能性片段、抗体、抗体的结合片段、酶、核酸以及它们的组合。这是许多这样的可能的技术之一，而且一般可用于这里所给出的那些例子  
5 和许多其它类似的材料和/或生物分子。在一个优选的实施例中，可用于 ECL 的试剂可通过 NHS—基团附着到原纤维上。

可用于 ECL 测定的抗体可通过共价键（例如，与 NHS—酯基团反应）、可通过与合适的连接物（参见上文）反应、通过非特异性结合和/或可通过这些方法的结合，而附着到一种或多种原纤维或者一种原纤  
10 维垫上。核酸和/或细胞通过共价连接到附着在原纤维上的 NHS—酯上可附着到该原纤维或纤维垫上。

可能希望控制材料与原纤维和/或原纤维垫非特异性结合的程度。  
只是作为非限定性的例子，可能希望减少或防止下述这些物质的非特异  
15 性吸收，这些物质是蛋白质、抗体、抗体片段、细胞、亚细胞粒子、病  
毒、血清和/或其中的一种或多种成分、ECL 标记物（例如， $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3$  和  $\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bpy})_3$  衍生物）、草酸盐、三烷基胺、抗原、被分析物和/或这些物质的组合。在另一个例子中，可能希望增强生物分子的结合。

一种或多种减少或防止非特异性结合的化学组成部分可存在于下述物质之中，之上或附近，这些物质是一种或多种原纤维、一种或多种原纤维聚集体和/或原纤维垫。通过使 PEG 组成成分共价连接到一种或多种原纤维和/或原纤维垫上，控制非特异性结合。带电荷的残余物（例如，磷酸盐、铵离子）可共价地附着到一种或多种原纤维或原纤维垫上。  
20

用于载体、电极和/或结合区域的材料可以用表面活性剂处理，以减少非特异性结合。例如，可以用本领域普通技术人员众所周知的表面活性剂和/或洗涤剂（例如，吐温系列，Triton, span, Brij）处理原纤维或原纤维垫。用表面活性剂和/或洗涤剂的溶液清洗、浸湿、保温、声  
25 处理和/或与这些方法的组合一起处理原纤维或原纤维垫。可采用 PEGs 的溶液和/或行为方式类似于 PEG 的分子（例如，寡糖或多糖、其它亲水性低聚物或聚合物）（“聚乙二醇化学：生物技术和生物医学应用”，  
30 Harris, J. M. 编辑，1992，Plenum 出版社）表面活性剂和/或洗涤剂，和/或一起使用。

可通过竞争性非特异吸收阻断诸如上面所列出的那些物质那样的

某些物质的所不希望的非特异吸收。这种竞争性结合物质可以是牛血清白蛋白（BSA）免疫球蛋白G（IgG）。

可通过 TAG 的化学改性减少 ECL - TAG 的非特异性结合。例如，可以改性 TAG，以提高它的亲水性（例如，通过给在 Ru(bpy)<sub>3</sub> 中的二吡啶基配体加入亲水的极性氢键和/或带电荷的官能团），而这样就减少了 TAG 与其它表面的非特异性结合。  
5

可能希望使生物分子或其它介质固定到原纤维或原纤维垫上。可以附着抗体、抗体片段、蛋白质、酶、酶底物、抑制剂、辅因子、抗原、不全抗原、脂蛋白、脂糖、细胞、亚细胞组分、细胞受体、病毒、核酸、  
10 抗原、类脂物、糖蛋白、碳水化合物、肽、氨基酸、激素、蛋白质结合的配体、药剂和/或它们的组合。

还可能希望附着非生物物质于原纤维上，例如，但并不限于聚合物、弹性体、凝胶、涂层、ECL 标记物、氧化还原活性物质（例如，三丙胺、草酸盐）、无机材料、螯合剂、连接物等。

15 一种或多种或者许多物质可变为非特异性结合（例如吸收）到原纤维或原纤维垫的表面。

可通过非特异性吸收使生物分子或其它介质附着到原纤维或原纤维垫上。对于任何给定的原纤维、原纤维垫和/或生物分子，非特异性吸收的程度由所述每种物质的某些性质确定。存在于原纤维上的某些化学官能团或生物组成成分可减弱或增强非特异性结合。在蛋白质的表面上存在有疏水性和/或亲水性斑点（patch）可增强或减弱蛋白质与原纤维或原纤维垫的非特异性结合。用亲水性和/或疏水性斑点来控制在所控制区域中的非特异性结合。  
20

可用烷基链（CH<sub>2</sub>）和/或羧酸基团对原纤维衍生化，以增强生物分子或介质或者其它材料的非特异性结合。  
25

图 26 示意性地说明对于单独的原纤维情况时的实施例。用烷基链 2601 衍生化原纤维 2600。生物分子 2602、2603 和 2604 与该烷基链非特异性地结合。聚合物/弹性体 2605 也被结合。

30 未衍生化的原纤维、原纤维聚集体和/或原纤维垫用来通过非特异性结合固定生物分子、生物介质和其它材料。

ECL TAG 含有带电荷的残余物。使 ECL TAG 选择性地吸引到载体和/或电极上。例如，具有净负电荷的衍生化的 ECL TAG 对于处于更大

还原电位的电极具有较低的亲合性，然而，对于电极电位变得更加氧化性时的电极具有较高的亲合性。调节 ECL tag 和/或结合试剂对于电极的亲合性（例如，在结合和/或清洗步骤期间减少亲合性，而在 ECL 量测记录期间增加 ECL TAG 和/或结合试剂的亲合性，以提高由 ECL TAG 所感受的有效电位）。

在图 28 中，可借助共价键使分子（生物的和非生物的）附着于原纤维上。载有 NHS—酯化学官能团的原纤维 2800 可形成与生物分子或生物介质 2802、2803 的共价键 2801。这些生物介质可使用氨基，以便通过与 NHS—酯基团反应形成共价键。固定聚合物 2800。本领域普通技术人员会认识到 NHS—酯基团作为对于分子的偶联剂的通用性，并且能选择合适的生物分子和合适的反应条件，以实现固定。

一对组成成分和/或分子“M1”和“S1”中，其中的一种或多种附着于原纤维上，且显示相互亲合性或结合能力。M1/S1 可以是抗体/抗原、抗体/不全抗原、酶/底物、酶/辅因子、酶/抑制剂、外源凝集素/碳水化合物、受体/激素、受体/效应物、核酸/核酸、蛋白质/核酸、病毒/配体、细胞/细胞受体等。“结合对” M1/S1 有许多种组合，且能选择一些适于获得所需要的结合的组合。M1 或 S1 或者 M1 和 S1 两者都可以附着到一种或多种原纤维上。

图 27 和图 28 说明可能用于这个实施例的多种可能的结构中的某些结构。在图 27 中，用烷基链 2701 所衍生的原纤维 2700 非特异性地结合了分子 2702，分子 2702 对于另一种分子 2703 具有相互亲合性或结合能力。分子 2703 还附着于另一种分子 2704。阻断分子 2705 可非特异性地吸收到原纤维上。阻断聚合物 2706 和/或具有配体（2708）的聚合物 2707 被非特异性地吸收，其中配体（2708）对于分子 2709 具有亲合性。

在图 28 中，原纤维 2800 通过 2801 共价连接生物分子 2802 和 2803 以及接头分子（linker group）2804。接头分子 2804 对于另一种生物分子 2805 具有相互亲合性或结合能力。生物分子 2803 对另一接头分子 2806 具有相互亲合性或结合能力，其中接头分子 2806 与 2807 共价连接。具有对于结合对 2809 特异性的配体 2812 的聚合物 2808 与原纤维共价连接。阻断分子（例如，BSA）2811 和阻断聚合物 2810 共价连接。

可以用生物素和/或生物素酰化（ biotinylated ）的接头物衍生原纤维，而抗生物素蛋白和/或链霉抗生物素蛋白可以与这接头物结合。抗生物素蛋白和/或链霉抗生物素蛋白可以与原纤维结合，而生物素酰化的抗体和/或蛋白质可以结合。通过非特异性结合、共价键、另外的或相同的偶联对或者它们的组合，可使抗生物素蛋白和/或链霉抗生物素蛋白固定在原纤维上。采用（链霉）抗生物素蛋白以及生物素作为“结合对”是把生物分子或生物介质附着于其它材料上的广泛采用的方法，而且对于本领域普通技术人员来说是众所周知的（ Spinke 等， 1993 年， Langmuir , 9 : 1821 ）。

一个结合对可以是一种单克隆抗体和一种与该抗体结合的抗原。

可以构成多重结合对（例如， M1 / S1 / M2 ）。 M1 是单克隆抗体， S1 是对于 M1 的抗原，而 M2 是与 S1 结合的抗体。这种复合物可构成一种抗体/抗原/抗体“夹层”复合物（这样的抗体可以被单克隆，或可以不被单克隆）。 M2 可以是一种用 ECL 活性的标记物标记的抗体（参看上文）、一种萤光标记物、一种放射性标记物、一种酶标记物和/或它们的组合。

M1 可以是能与金属、金属离子或金属有机化合物络合的一种组成成份（一种“螯合剂”），而 S1 是与 M1 形成一种络合物的一种金属、金属离子或金属有机化合物（一种“螯合剂”），而 M2 是一种生物分子上的组成成份，这种生物分子与 M1 / S1 络合物结合（ Gershon 和 Khilko ， 1995 年，免疫方法杂志， 7371 ）。

用本领域中众所周知的方法进行金属电极图案和把电流分布于在表面上的这样的电极的导电元件的制作（例如，参见美国专利 US 5,189,549 ）。在透明表面上制备金属膜，以产生液晶显示器，并且很适于制备本发明的电极。参见： Haneko ， 1987 年，液晶电视显示器，液晶显示器的原理和应用， KTK 科学出版社，东京， D. Reidel Publishing 。例如，还可按照 DiMilla 等人的方法（ J. Am. Chem. Soc. 116 (5): 2225 - 2226 ）制备透明电极表面。使 0.5nm 的钛和 5nm 的金沉积在透明基片（玻璃或塑料）上。可采用通过上述 DiMilla 的方法所制备薄金层来制备用上述 Kumar 的方法所制备的透明电极结构。最好改进这种方法，以增加导电层的厚度，改进运载电流的能力，而同时最好保持透明性，而这一点

对普通技术人员来说是显而易见的。可用这样的技术制备与 PMA MS 的离散的结合区域对准或邻接的电极表面。

此外，膜和/或单层可由这样一些组成成份构成，其中这些组成成份便于从电极表面给 ECL 标记物传递电位，而不是如 Zhang 和 Bard 所教导的那样，采用一些绝缘组成成份（例如，烷基链）。例如，可采用广泛的共轭系统中的 Pi 轨道重叠用于电子传递。由聚吡咯或其它共轭的环或双键结构提供这样的 Pi 轨道电子传递。

可用寡核苷酸来调节电子传递。例如，可采用在双链 DNA 中重叠 Pi 键，以提高电子传递速率。结合至电极表面的低聚核苷酸可用作结合区域的结合试剂。一旦结合了互补的寡核苷酸序列，就形成具有组织好的重叠的 Pi 键的双链。在一个特定的实施例中，一种最初或原始固定了的（例如，共价地与一个载体结合）寡核苷酸是 ECL 标记的。在另一个实施例中，一种辅助的互补的寡核苷酸或对上述原始的寡核苷酸的局部互补序列的寡核苷酸是 ECL 标记的。与上述辅助的寡核苷酸互补或局部互补的叔寡核苷酸被标记（例如，一种夹层测定）。还可利用分枝了的寡核苷酸链。可利用各种各样的寡核苷酸和/或寡核苷酸的仿制品（例如，具有改性的碱基和/或具有例如含有氮和/或硫的改性的骨架的寡核苷酸）。可进行有关差异的研究。可通过调节电子传递来监控在寡核苷酸和/或寡核苷酸的复合物中的 Pi 重叠的可变化的稳定性。可以对照来自更无序的单链寡核苷酸的信号和/或所期望的信号，关联由 Pi 键稳定的 ECL 标记的双螺旋寡核苷酸对所产生的信号（例如，ECL 光产生的和/或阻抗测量）。对于在完全互补的 ECL 标记的双链寡核苷酸和局部互补的 ECL 标记的双链寡核苷酸之间的 ECL 信号的变化可以相关。此外，可利用多种寡核苷酸的寡核苷酸复合物。例如，可采用三重螺旋。

可用 ECL 检测以及电子装置测量电子传递速率的调节。ECL 标记物可以共价地连接到寡核苷酸的一些链上和/或被非特异性地结合（例如，被插入）。可以不用接头物（例如，5' 硫醇化的 DNA 在金上的吸收），或者用短的（< 10 个原子）接头物，使 DNA 与电极结合，以保证对于从 DNA 到电极的电子传递的低电阻。可使用能有效地从电极到 DNA 链（例如，一个聚乙炔链）传送电子的连接链。

可使用一种混合的单层和/或膜，其中，该单层或膜的至少一种构成

部分根据具体情况便于传递电位。可以选择地，使便于电位传递的一种分子或粒子吸附到上述单层或膜上。如前述例子那样，可使用 Pi 共轭的单层和/或吸附支和/或邻近于电极表面的导电微观粒子。在单层或膜中产生生成图案的规则缝隙。通过利用受控制的一些缝隙图案，而这些缝隙图案在一种有序的实质上是垂直的 SAM 中，其中 SAM 由长链链烷硫醇构成（也就是说，是绝缘的），ECL 标记物已顺序地附着在该长链链烷硫醇上，这样就能控制加在上述 ECL 标记物上的有效电位。例如，图 11 显示了一个盒 1200，盒 1200 由具有一个金属层 1204、一个 SAM 图案 1206 以及在 SAM 图案之间的缝隙 1208 的单独的载体构成。

ECL 标记的蛋白质可以非共价地连接到单层表面。ECL 标记的蛋白质可以吸附到以甲基为终端的链烷硫醇所衍生的金表面的表面上。金表面起到工作电极或反电极的作用。如图 11 至图 13 所示，许多结合区域可结合在一个单独的载体上。在一个优选的实施例中，结合区域包含标记过的和/或未标记过的蛋白质和/或核酸和/或细胞和/或化学物质。

可以选择地，可以改变单层的那些组成部分的长度（例如，在链烷硫醇单层中的烷基链的长度），以控制所述单层的暴露的表面处的有效电位。

概括地说，链烷硫醇可以具有长度在 1 个碳和 100 个碳之间的碳链。在一个优选的实施例中，链烷硫醇的碳长度含有 2 到 24 个碳。链烷硫醇的碳链长度是在 2 到 18 个碳之间。碳链长度是在 7 到 11 个碳之间。这样的链烷硫醇可具有暴露于测定介质的各种的首基，包括甲基、羟基、胺、羧酸、低聚（乙二醇）、磷酸基、磷酰基、生物素、次氨基三乙酸、谷胱甘肽、环氧氧化物、二硝基苯基和/或 NHS 酯。其它一些首基包括通常用于提纯和固定重组融合蛋白标记物的配体（例如，Sassenfeld，1990 年，TIBTECH，8：88—93）。结合区域可以衍生到不同程度，以获得结合试剂的各种密度。例如，可采用不同密度的可活化的化学物质，和/或使衍生进行到不同程度。可利用混合的化学物质产生所需的结合密度。可利用混合的单层控制可活化的基团和/或结合试剂的密度。控制结合基团的密度，以使 ECL 的信噪比最佳。控制结合区域内结合位点的总数，以使 ECL 光信号的强度相对于来自其它结合区域的其他 ECL 光信号最佳，不管这样的 ECL 光信号是被顺序检测或是被同时检测，和/或用

光检测装置检测。

可施加电压波形，以便一次或多次激发在 PMA MS 内与结合区域结合在一起 ECL 标记物。可以多次给相同链烷硫醇衍生的具有所结合的 ECL 标记物的表面施加足以激发 ECL 发光的电位，以多次产生 ECL 光信号。充分施加电位以可逆地产生 ECL。施加电位，以便准可逆地产生 ECL。在电压波形的一个准可逆序列中，可以化学和/或物理地改变里面带有（例如，结合）ECL 标记物的结合区域。所施加的电压波形序列可以不可逆地导致 ECL 发光。

进一步，可施加足以释放单层的组份的电位。希望释放这样的一些单层组份，其中，在电极表面上的体积小（例如，位于电极表面的另一个载体或板）。这样，由于单层被破坏，甚至某些未有效激发的 ECL 标记物也可以被电极表面激发，产生电化学发光的信号，而 ECL 标记物被限制在一个小体积内，限制从电极扩散。可利用各种单层组成控制对于某一给定电位的单层的破坏程度。其中各组份间有强的亲合力的单层更能阻止单层的破坏。较长链的链烷硫醇比较短链的链烷硫醇更有效地阻止破坏。通过改变链的长度，可获得所需的稳定性。

修饰 PMAMS 内的结合区域可用于调节 ECL 信号。施加一系列电压波形以产生许多 ECL 信号。可利用所述许多 ECL 信号获得额外的和/或更好的结果。可以使 ECL 信号的调节速率的统计分析与一个或多个结合区域的整体质量关联。此外，例如可通过过滤一个序列中的某些 ECL 信号来利用所述许多 ECL 信号提高信噪比。进而可利用多个电位波形脉冲，以减少由于非特异性结合造成的所不想要的信号调节。可施加电位以便防止某些带电物质的非特异性结合。另外，可施加电位以促进所感兴趣的被分析物或化学物质在结合区域附近定位。所施加的电压波形提供了大的过电位（Over - Potential）（例如，比所需更高的电位，以产生 ECL）。可用过电位调节在一个电压波形序列中或在一个单独的电压波脉冲中的 ECL 信号。此外，可用过电位调节 ECL 反应动力学特性和/或化学和/或物理地调节结合电位。进一步，可用一个或多个电压波形和/或其它本领域普通技术人员已知的电子探针来评估和/或关联和/或外推关于电极的质量和/或电子性质的数据。

优选地，可通过延伸工作电极表面积提高 ECL 反应的效率，这是通

过提供另外的与该电极接触的导电装置做到的。可利用从导电材料或导电粒子的电极（例如，导线或金属须）的突出部分或延伸部分提高电极表面积，从而使电场更接近 ECL 标记物。可以选择地，电极结构中的凹槽或井可用于同样目的。

5 具体地说，导电粒子可填充在电极表面上的缝隙和/或覆盖载体或单层，提高围绕 ECL 标记物的电场的绝对值，如图 12 所示。这些导电粒子延伸电极表面积，并因此而提高 ECL 反应的效率。图 12 显示盒 1300，具有在金属层 1304 上载有成图案的 SAM 1306 的载体 1302，并指明导电微观粒子填充在缝隙（例如，图 11 中的 1208）中并延伸到金属表面上方，在两个 SAM 图案之间。对于磁性导电粒子，可用磁铁或磁场把该粒子吸到表面。还可以如上所述的那样，用导电粒子延伸在电极表面和具有两个靠近的载体的 PMAMS 的结合区域之间的电位。在图 8 中，盒 900 由具有多阵列电极的一个第一载体 902 和具有 PMAMS 的一个第二载体 904 构成。导电微观粒子 906 定位在两个相对的表面之间，以朝向在结合区域（未示出）上的 ECL 标记物延伸电位。

10 可以选择地，从在电极表面上暴露的缝隙生长导电聚合物，如图 13 所示的那样，以便于围绕样品的 ECL 标记物延伸电位。图 13 显示了具有一个载体 1402 的盒 1400，载体 1402 载有在成图案的 SAM 表面 1406 上的一个金属层 1404。遍布 SAM 表面上生长导电聚合物 1408，以便扩展由多阵列电极（未示出）提供给在该 SAM 表面上的结合区域（未示出）的电场。还可以如上所述的那样，如图 7 所示，用导电聚合物扩展在电极表面和两个靠近的载体的 PMAMS 的结合区域之间的电位。在图 7 中，盒 800 由靠近的载体 802 和 804 构成。在两个相对的表面之间生长导电聚合物 806，以便于朝向在结合区域（未示出）上的 ECL 标记物扩展电位。

15 图 9 显示了一个盒 1000，盒 1000 由具有多电极阵列的一个第一载体 1002 及具有 PMAMS 结合表面的一个第二载体 1004 构成，其中，工作电极的导电突出部分（1006）（例如，细导线或其它突出物）围绕在 PMAMS 结合区域中的 ECL 标记物扩展电场。

20 30 可以把电极对做成各种结构。在本说明书的附图中所画出的最简单的结构是由施加在不导电的平面表面上的金属和/或金属氧化物膜和/或

半导体膜制作而成。这些电极对的电极优选地确定了在它们之间的一个宽度比较恒定的区域，由此提供了比较恒定的电场。

提供了电极的其它一些结构。图 19 ( a ) 至图 19 ( e ) 中示出了几种这样的结构的平面图。图 19 ( a ) 示出了一个交错对插的、类似于梳子的电极对。在这种结构中，每个电极具有从做成为梳子形状的导体延伸出来的许多指。电极和反电极对可邻接结合区域定位，或者，结合区域可定位在电极和反电极之间。图 19 ( b ) 示出了一对同心电极，一个圆形的，而一个是半圆形的。图 19 ( c ) 显示了两个半圆形的电极，这两个半圆形的电极的直边彼此相向。图 19 ( d ) 显示了一对矩形电极。图 19 ( e ) 显示了一对交错对插的电极，电极具有一些互补的相对的、弯曲的表面，以便连它们之间形成弯曲的缝隙。

为了对齐的目的，还可以使电极/反电极对形成为与在 PMAMS 结合表面上的形状互补的特定的形状。图 6B 中示出了示例的形状。显示了载有电极对 714 - 720 的载体 712 。电极对例如可以是圆形的 714 、交错对插的 716 、三角交错对插的 718 或多个电极交错对插的 720 。

在上述图 14 至图 19 所示的那些实施例中，电极对位于一个单独的载体上。可以选择地，如图 2 所示，电极对位于第一和第二相对的载体上。

#### 5.8 、 盒

盒含有一个或多个本发明的载体。盒可以包括许多结合区域以及一个或多个工作电极。

图 2 示出了一个盒，其中，在载体 26 上的许多结合区域 30 的每一个都与许多电极 32 中的不同的一个邻接。反电极 38 在一个第二载体 28 上形成。如前所述，通过把一个样品放在结合区域 30 上，然后使载体 26 和 28 移到一起，从而使反电极 38 的每一个邻接每一个结合区域 30 ，这样进行 ECL 测定，并且，可如上所述，通过波形信号发生器装置 39 、经由引线 34 来触发 ECL 反应，而且，通过光检测装置 40 、导线 41 及数字计算机装置 42 检测和记录 ECL 信号。

图 3 显示了一个盒，其中，许多结合区域 48 的每一个均具有在载体 44 上与其邻接的、许多电极/反电极对 50 中的不同的一对。可以任选把载体 46 邻接载体 44 放置，从而使载体 46 构成邻接许多结合区域 48 及

许多电极 50 的含有样品的装置。这样，通过波形信号发生器装置 54，经由电连接装置 52，可以触发 ECL 反应，而且，用光检测装置 56 检测 ECL 信号，并用数字计算机装置 58 记录和分析 ECL 信号。

如图 21 所示，提供了含有一对或多对载体的盒，定位每对载体，从而使含有结合区域的一个第一载体 1501 的表面面向第二载体含有结合区域的表面，其中，每个表面含有电极 1504 和结合区域 1506；这使得在第一载体上的每个结合区域面向并对准第二载体上的一个电极，而在第二载体上的每个结合区域面向且对准第一载体上的一个电极。

图 4 显示了一个盒，其中，ECL 电极是任选的。载体 64 上的结合区域 64 与被猜想含有某种被分析物的样品接触。载体 62 上的区域 66 含有反应介质，用于检测或测量所感兴趣的被分析物，或用于进行所需要的反应。使载体 60 和载体 62 靠到一起，从而使结合区域 64 和区域 66 接触，并且，通过一个指示器系统，例如，通过比色化学发光或可用光电检测器装置 68 检测并可用数字计算机装置 70 记录和分析的萤光信号，确定被分析物或反应产物的存在。

在一个优选的实施例中，本发明的盒或装置包括一个用于把样品发送到许多离散的结合区域上的装置（例如，参见美国专利 US 5,147,806 的图 1 的部件 1；美国专利 US 5,068,088 的图 1 的部件 1；把这两篇美国专利的全部内容作为参考）。所述用于发送样品的装置可以是静止的或可移动的，并且可以是任何本领域中已知的发送样品的装置，该装置包括但并不限于一个或多个入口、孔洞、孔、通道、管道、微观流体导管（例如，毛细管）、管、套管等。可用各种各样的公知的方法使流体穿过上述系统移动，例如用泵、吸移管、注射器、引力流动、毛细管作用、芯吸、电泳、压力、真空等。用于流体移动的装置可位于盒上或位于一个单独的单元上。可把样品一起放在所有的结合区域上。可以选择地，可用毛细管流体输送装置把样品放在一些特定的结合区域上。可以选择地，可通过用于把流体样品直接发送到在载体上的 PMAMS 上、或者发送进盒或盒的保持器的储存器中便于以后直接给结合表面发送用的自吸移管，把样品放在载体上。

可用多种材料制备载体，这些材料包括但并不限于玻璃、塑料、陶瓷、聚合物材料、弹性材料、金属、碳或含有碳材料、合金、复合物箔、

硅和/或分层材料。载体可有各种结构、化学和/或光学性质。它们可以是刚性的或柔软的、扁平的或变形的、透明的、半透明的、局部或全部全反射或不透明的，并且可具有复合性质、具有不同性质的区域，而且可以是多于一种材料的复合物。

- 5 用于进行测定的试剂可存储在盒和/或单独的容器中。可以以干和/或湿的状态存储试剂。在一个实施例中，通过加入检验样品使在盒中的干试剂再水合。在一个不同的实施例中，试剂存储在“泡形罩包装”里的溶液中，由于来自可移动的滚子或活塞的压力，使该“泡形罩包装”爆裂敞开。盒可以含有废物室或海绵，用于在完成测定后存储液体废物。
- 10 在一个实施例中，盒包括一个用于制备要被检验的生物样品的装置。可含有过滤器，用于去除血中的细胞。在另一个例子中，盒可包括诸如用于计量样品的精确的毛细管那样的装置。

- 一般通过机械装置，例如，通过用导柱、定位销、合叶（在每个载体之间）或导边，使在载体上的许多结合区域和许多电极/反电极放置得彼此邻近对准。可用光学制导装置定位载体和采用在该载体上确定的光学制导标记的电子装置。也可利用其它采用电或磁对准装置的系统。

把盒的载体的结构做成直到需要触发 ECL 反应时才使电极对与样品接触。例如，可用各种机械装置，例如，用可去除的电极保护装置，使电极保持与结合区域表面分开，直到需要电极与样品接触为止。

- 20 本发明的盒或装置包括参考电极，例如，Ag / AgCl 或饱和甘汞电极（SCE）。

可用夹具、粘合剂、铆钉、销针或任何其它合适的机械连接装置使载体保持在一起。还可通过液体样品的表面张力，或通过可拆卸地放置在两个载体的相对侧上的压紧装置，使上述那些载体保持在一起。

- 25 盒还可包括两个以上的载体，例如，具有结合区域和电极的交替层，或者有多个载体，在单个载体上包括结合表面和电极表面。这将形成 ECL 分析元件的三维阵列。任选除了在两个结合区域之间的某些区域外，上述盒的所有的前述组件都是透明的。例如，可以叠置多个透明的结合表面、电极表面和载体。

- 30 第一和第二载体可以是扁平的，并使它们相对，以便在它们两者之间确定保持样品的容积。可以选择地，假若两个载体以及它们的任何其

它组件形状相符合，可把第一和第二载体层的结构做成其它一些合适的形状，包括球形、立方形、圆柱形。例如，图 10 显示了由两个相邻的非平面载体 1102 和 1104 构成的一个盒 1100。每个载体有一个与其它载体形态互补的表面。每个载体可具有一个 PMAMPS 表面或多电极阵列或同时具有这两者。载体之一或两个载体可以是弹性的，以便符合另一个载体的形状。还可以以预切割形态制备载体或盒，或者从一个滚筒发放器发放合适长度的载体或盒。盒还可包括样品容纳装置，例如，样品保持容积、以及样品分散槽、通道、凹处等等。

图 37 显示了一个盒，其中，在基质（3703）中和/或上的结合区域（3702）存在于表面（3701）上。放置有承载工作电极（3704）和反电极（3705）的第二表面，从而使结合区域紧密靠近工作电极。在导致从与结合区域结合的 ECL 标记物产生光的条件下，可通过一个或两个表面检测光。采用光检测器阵列（3706，例如，CCD 阵列、增强的 CCD 阵列或雪崩光电二极管阵列）同时测量来自上述那些结合区域的许多光信号。光检测器阵列使从结合区域产生的光成像。透镜、反射器和/或光波导管可用来加强成像。在另外一些例子中，使从光检测器区段或区域检测到的光（例如，光检测像素）与结合区域关联。可用图像分析辅助所检测到的光与结合区域的关联。在一个优选的实施例中，表面是弹性的或柔顺的，因此，能使得与电极表面紧密接触。使结合区域与一些聚合物连接，其中这些聚合物能够从反电极携带离子流到工作电极。在一个更优选的实施例中，物体是可水溶胀的一些聚合物，它们能够从反电极携带离子流到工作电极。

图 38 显示了一个盒，其中，结合区域（3805，3806，3807）置于不同的物体（3808，3809，3810）的表面上，物体（3808，3809，3810）承载在反电极（3800）上。工作电极（3801）靠近那些物体的表面放置。在导致与结合区域结合的标记物标记的基团的 ECL 的情况下，可通过一个电极或两个电极（如果所述的每一个电极或两个电极是透明的或半透明的）和/或从侧面检测光。用光检测器（3802）阵列同时测量来自每个结合区域的许多光信号。上述那些物体可以是弹性的和/或柔顺的，因而能与工作电极形成紧密的接触。所述那些物体可以是能够从反电极携带离子流到工作电极的聚合物。所述那些物体可以是能够

从反电极携带离子流到工作电极的可水溶胀聚合物。

使含有一个或多个结合区域的透明载体与原纤维垫电极接触。可使试剂在载体/结合区域和原纤维垫之间流动，或穿过所述垫到达结合区域。光可从结合区域通过，穿过透明载体到达检测器。

5 在另一个优选的实施例中，给电极涂覆半透光或透光的碳原纤维层，以增加该电极的有效表面积。

10 可有益地把本发明的 PMAMS 载体和/或盒包装成试剂盒。试剂盒包括一个或多个按照本发明制备的 PMAMS 载体，用于进行包括测定、对照等在内的 ECL 反应。试剂可任选包含在试剂盒中，包括对照试剂、ECL 测定和校准试剂等等。可包括试剂混合物，它含有多种对于多种不同的被分析物特异性的结合试剂。

### 5.9、进行 ECL 的装置

#### 反应

15 在一个实施例中，载体上的 PMAMS 和含有该载体的盒设计成能插入一个装置，这个装置含有用于把一个或多个检验样品施加到 PMAMS 结合区域上并引发多种 ECL 反应的装置。这样的装置可从通常的装置按本发明做适当的改进而成，以进行许多基于载体或盒的 ECL 测定。本发明提供适于用上述各章节中所述的 PMAMS 的每一个特定的实施例进行 ECL 测定的各种装置。Zoski 等人公开了一种用于进行 ECL 反应的装置  
20 (美国专利 US 5,061,445)。所需的改进包括提供载体和/或盒的操作、多个样品的发送、用电压波形源访问多个电极以及多个 ECL 信号的获得和处理。

图 6A 示出了本发明的说明性装置的一些部件。这样的装置 700 包括上和下载体 702、704 以及一个电极防护板 710。上载体载有许多电极/反电极对（未示出）。下载体载有结合区域 706。上述装置能够从盒中去除电极防护板并把电极/反电极定位成接触结合区域上结合的被分析物。试剂或流体流动空间 708 邻接载有结合区域的载体。上述装置还能同时或顺序地给许多电极/反电极对的每一个发送等同的或单独的确定的电压波，以引发盒中的 ECL 反应，然后，用光子检测器，例如，光检测器装置测量所发射的 ECL 辐射。上述装置还可包括温度控制装置，用于保持载体和/或盒的温度、或其上的环境温度，并按照需要调节温度，

以便使 ECL 反应条件最佳。温度控制装置优选地是加热和冷却装置，例如，电阻加热元件、冷风扇、冷冻装置以及任何其它合适的加热或冷却源。温度控制装置还包括温度传感器，例如，恒温器或热电偶装置，并包括响应所检测到的温度变化、启动或关掉加热或冷却装置的装置。

5 上述装置还提供用于保持、移动和操纵一个或多个载体或盒的装置，以进行 ECL 反应。上述装置还包括静止的或可移动的样品发送装置，就像对于上述那些盒所述的那样，用于把样品放在 PMAMS 结合区域上。

10 上述装置还包括一个电极接触装置，它能够使盒的可单独访问的电极连接装置阵列与一个电子波形信号发生器装置（例如，稳压器）电连接（例如，参见美国专利 US 5,068,088 的图 5）。波形信号发生器装置顺序或同时发送信号，以便独立地触发在盒中的多种 ECL 反应。

15 在 ECL 测定期间，在工作电极和反电极之间的离子流可穿过能传导离子的液体（例如，含有离子盐的水）、穿过这种液体的薄膜和/或穿过能传导离子的固体基质流动。

这样，用于测量样品中电化学发光的装置可包括许多用于保持至少一种样品的小室，其中，一个小室可由一个或多个电极和一个或多个反电极以及一个包含许多离散的结合区域的第一载体构成。电极和反电极可配置在第一载体的表面上，或配置在第二载体的表面上，其中，第二载体紧密靠近在第一载体上的结合区域。电极和反电极可成对出现。上述小室还可包括许多传感电极，以感应邻近工作电极的电压。盒还可包括含有参考电极的小室。

25 上述装置还包括光检测装置，该光检测装置例如可通过一个或多个检测器装置检测在盒中所进行的 ECL 反应。只是作为例子，这样的检测器装置包括光纤通道阵列，这个光纤通道阵列与电极阵列对齐并且邻接该电极阵列定位，连接到光检测器装置阵列、或连接到能扫描所发射的 ECL 信号阵列的一个单独的光检测器装置。

上述装置可任选地包括数字计算机或微处理器，以控制所述装置的各种组件的工作。

30 上述装置还包括信号处理装置。仅作为例子，在一个实施例中，信号处理装置包括用于传送、记录、分析和/或显示每个 ECL 测定的结果的

数字计算机。

可以选择地，上述装置包括电极平移装置，以便例如使一个或多个电极/反电极对在结合表面上扫描，从而顺序触发 ECL。

可在 PMAMS 的并联阵列中使用选择尺寸的过滤物。

### 5 5.10、可以进行的 ECL 测定

可从本领域中已知的那些 ECL 标记物（参见上面 2.2 节以及美国专利 US. 5, 310, 687）中选择本发明所用的 ECL 标记物。ECL 标记物例如可包括含金属的有机化合物，其中，所述金属选自钌、锇、铼、铱、铑、铂、钯、钼、锝和钨。用于制备 ECL TAG 试剂的合适的连接化学物质是众所周知的，例如，已由 Bard 等人公开（美国专利 US 5, 310, 687 和 US 5, 221, 605）。使 ECL 标记物与结合试剂结合的方法可以是共价和/或非共价的。ECL 标记物可非共价地与结合试剂结合（例如，通过疏水效应或离子相互作用）。在非共价连接的另一个例子中，ECL 标记物（共价或非共价地）与一种复合物结合，这种复合物又非共价地与一种结合试剂连接。一个更具体的例子是 Ru(bpy)<sub>3</sub> 通过接头物共价地连到 Ni(II) - 三次氨基三乙酸复合物上。这种分子将附着到一些结合试剂上，这些结合试剂包括含有许多组氨酸的肽序列。可以类似方式使用的其它一些受体配体对在本领域中是已知的（Sassenfeld, 1990 年, TIBTECH 8: 88 - 93）。此外，可使用含有多种金属有机化合物（例如，含有 Ru）的 ECL 标记物，该金属有机化合物的结构为带分枝的网络（例如，通过一种碳氢化合物接头物的网络）。这样的含有许多种能够 ECL 的金属有机化合物部分的带分枝的网络可以在一处或多处连接在一种要被 ECL 标记的分子上。在另一个实施例中，含有许多种金属有机化合物的 ECL 标记物是一种线形高聚物，金属有机基团沿着聚合物链（例如，线形的、带分枝的或环状聚合物）的许多位置处连接。

本领域众所周知的其他各种 ECL 测定中可使用多种结合区域。在定量测定中，使用已知量的 ECL 标记的试剂，并使所测量的 ECL 的量与已知的标准关联，以便计算所存在的被分析物量。可用本领域普通技术人员众所周知的方法进行向前、反向、竞争性和夹层测定。例如，在竞争性测定中，如下进行定量确定多组份液体样品中所感兴趣的被分析物的量的方法。使结合表面同时接触（a）已知量的 ECL 标记的配体，此配

体在与存在于结合区域上的某种结合试剂结合时能与所感兴趣的被分析物竞争，以及（b）被猜想含有所感兴趣的被分析物的样品；所述接触在适当的条件下实现，从而使上述所感兴趣的被分析物和配体竞争性地与上述结合试剂结合。在样品中存在被分析物时，会减少与结合区域结合的竞争 ECL 标记的配体的量，这样，就减少（相对于样品中没有被分析物时）所得到的 ECL 量。引发在所得到的结合区域中的 ECL，并定量确定所发射的光量，由此，定量确定存在于样品中的所感兴趣的被分析物的量。可以选择地，可使样品在接触具有 ECL 标记的配体的结合表面之前接触结合表面；然后，该 ECL 标记的配体与来自在 PMAMS 表面上的样品的先前所结合的被分析物竞争，并替换某些所述先前所结合的被分析物。在一个可供选择的实施例中，可处理样品使之含有 ECL 标记的物质/分子，并可使标准量的未标记的所感兴趣的被分析物在与带有样品的结合表面接触之前或同时，接触结合表面，以便进行竞争性测定。

在夹层测定中，ECL 标记的配体是一个结合配对，这个结合配对与在所感兴趣的被分析物上的一种第二结合部分特异性地结合。这样，当在样品中有特异性地与在 PMAMS 的结合区域中的结合试剂结合的被分析物时，就这样形成了一种“夹层”，这种夹层由在结合区域上的、与来自上述样品的被分析物结合的、与 ECL 标记的结合配对结合的结合试剂构成。在另一种竞争性夹层测定中，使被分析物本身的复制品在暴露给样品之前附着到多阵列结合表面的结合区域上。然后，使样品与结合表面接触。一种 ECL 标记的结合配对（它可与被分析物特异性地结合）在测定溶液中没有自由被分析物（来自样品）的情况下会结合被分析物，但在该测定溶液中有自由被分析物（来自样品）的情况下被竞争性地抑制。

在一个可供选择的实施例中，进行顺序标记。例如，在夹层测定的一个特定实施例中，使与结合区域结合的被分析物顺序与多种 ECL 标记的、被分析物的结合配对接触。在两次与每个不同的结合配对接触之间进行 ECL 测量和任选的清洗步骤。以这种方式，可以进行被分析物的多种不同的结合部分的 ECL 测量（例如，CD8<sup>+</sup>、a、b T 细胞抗原受体阳性 T 细胞）。此外，可以使每一种都以不同的波长发光的多种 ECL 标记物的每一种都连接到一种对于在被分析物上的一种不同的组成成份特

异的不同的结合试剂。进而，例如可使用许多不同的报道方法（例如，ECL 标记物、萤光标记物和酶连接的标记物），每一种标记物都附着到对被分析物的不同结合部分特异的不同结合试剂上，例如，以区分 CD4<sup>+</sup>、α、β T 细胞抗原受体 - 阳性细胞与 CD8<sup>+</sup>、α、β T 细胞抗原受体 - 阳性细胞。

在一些优选的实施例中，结合区域含有被标记的蛋白质和/或核酸和/或细胞和/或化学物质。在制作期间、在测定开始之前、在测定期间和/或在测定结束时，可给结合区域加入这样的一些被标记的组份（例如，ECL 标记物）。例如，可在任意时间加入多种被标记的组分，并可顺序取得测量记录。这样的测量记录可提供累积的信息。在另一个实施例中，PMAMS 的结合区域可重复使用许多次。在完成了给定的测定后，在恢复 PMAMS 表面的一个或多个结合区域的活性的条件下清洗所述表面。作为例子，可通过改变反应溶液的离子强度使某些结合反应反向。可以选择地，可加热分解结合复合物。某些结合区域本身就可以自我更新。含有催化（例如，酶促）官能性的结合区域可使用一次以上。结合区域可连续使用，而这样就可用于生物传感器方面的用途。

此外，可使测定格式化，从而附着到多阵列多特异性的成图案的表面上的结合试剂被 ECL 标记。一旦与样品中的某些所感兴趣的被分析物结合，ECL 信号就会定量调节。例如，附着到表面上的 ECL 标记的结合试剂可以对细胞表面上的被分析物特异性，例如，诸如 α 和 β T 细胞抗原受体抗原或 CD4 或 CD8 抗原那样的抗原。一旦暴露于细胞的混合物，与上述表面结合的细胞在所述电极表面靠近多阵列多特异性的表面时，就会在空间上妨碍电极表面激发 ECL 标记的结合试剂的能力，从而调弱 ECL 信号。

可进行均相的测定和多相的测定。在多相测定中，在结合的或未结合的标记的试剂暴露于电位之前，未结合的标记的试剂与结合的标记的试剂分开（例如，通过清洗步骤）。在均相测定中，未结合的标记的试剂和结合的标记的试剂一起暴露于电位作用。在均相测定中，结合的标记的试剂发射的信号的强度或光谱特性大于或小于未结合的标记的试剂发射的信号的强度。可通过测量强度差别确定各个结合的和未结合的组份的存在与否。

一旦完成结合试剂与被分析物其竞争物以及对于该被分析物的任何竞争配对接触的所需步骤，即确保 ECL 标记物处于导致 ECL 的环境。本领域中已知合适的 ECL 测定介质。这样的测定介质有益地包括促进 ECL 标记物的 ECL 的分子，包括但并不限于草酸盐、NADH，而最优先三丙  
5 胺。可自由地在溶液中提供这样的“促进剂”分子，或可通过预先的连接到下列位置或可通过在下列位置处产生（例如，作为化学反应产物）而提供：PMAMS、所述表面上的单层、结合区域、电极表面、结合试剂和/或 ECL 标记物等。如果与接触步骤所得到的结合区域结合的 ECL 标记物周围的介质导致 ECL，就无需改变所述介质。可以选择地，可调  
10 整或替换介质，以便提供导致 ECL 的介质。电极和反电极已经邻近结合区域，或者，已被使得在该结合区域附近，或者被使得与该结合区域接触，施加电压波形，并检测或测量 ECL。

在本发明的一个优选实施例中，在没有电极和反电极的情况下，进行使结合试剂与被分析物或该被分析物的竞争物以及对于该被分析物的任何竞争配对接触的上述步骤，也就是说，从而使样品并不接触电极或反电极。接着这些步骤，使电极和反电极充分靠近与结合区域结合的 ECL 标记物，以引发 ECL 反应。  
15

可用具有 PMAMS 的载体对核酸链排序。例如，用已知的核苷酸序列的不同的寡核苷酸探针作为不同结合区域中的结合试剂制备具有许多结合区域的 PMAMS。也就是说，不同的结合区域会包含不同的已知核苷酸序列的结合试剂。然后，使要排序的核苷酸链或核苷酸链或片段与 PMAMS 结合区域结合（杂化）。要被排序的核酸被 ECL 标记。在 PMAMS 上进行结合测定，并且用来自 PMAMS 上的离散的结合区域的 ECL 信号分布给寡核苷酸链排序。  
20

上述方法基于短的核苷酸与在另一核酸分子中它们的互补序列或基本上互补的序列杂化的能力（例如，参见 Strezoska 等人，1991，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88：1089 - 1093；Bains，1992 年，Bio/Technology 10：757 - 58，此处以这篇文献作参考）。可选择一些条件，从而使所需序列互补性程度对于成功的杂化是必需的。未知序列的 DNA  
30 分子与预定序列的探针的杂化检测 DNA 分子中的互补序列的存在。优选实施该方法，从而使得用与结合区域和在溶液中的样品 DNA 结合的寡核

昔酸探针进行杂化反应。

PMAMS 还可用来分离、筛选和/或选择所需功能的（例如，结合或催化）新的分子或复合物。PMAMS 可用来分离化合物和/或导向化合物，用于治疗目的。可利用本发明的方法制备含有许多肽、核酸、病毒载体或用各种各样的组合化学物质合成的聚合物的 PMAMS。可用各种各样的诸如 PMAMS 处理过的载体快速筛选例如与 ECL 标记的细胞受体结合情况。在一种方法中，使用具有高分散性的不相关的肽序列的第一 PMAMS，以分离前导结合肽序列。然后，使用具有相关序列的肽的 PMAMS，该相关序列是与显示了与在第一 PMAMS 上的所感兴趣的分子（例如，一种细胞受体）结合的序列相关。重复此过程，直到找到具有所需结合特性的肽。

所感兴趣的被分析物例如可以是存在于样品中的全细胞、亚细胞粒子、病毒、朊病毒、类病毒、核酸、蛋白质、抗原、脂蛋白、脂多糖、类脂物、糖蛋白、碳水化合物部分、纤维素衍生物、抗体或其片段、肽、激素、药剂、细胞或细胞的组成部分、有机化合物、非生物聚合物、合成有机分子、金属有机化合物或无机分子。

例如，样品可从固体、乳浊液、悬浮液、液体或气体中衍生出。进而，样品例如可从体液或组织、水、食物、血、血清、血浆、尿、粪便、组织、唾液、油、有机溶剂或空气中衍生出。样品可包括还原剂或氧化剂。

采用本发明，通过使对下述物质特异性的结合试剂结合进本发明的结合表面的结合区域，可以进行检测或测量所述这些物质的测定，所述物质是：白蛋白、碱性磷酸盐、alt/SGPT、氨、液化酶、AST/SGOT、全蛋红素、血液使用的氮、钙、二氧化碳、氯化物、全胆固醇、肌酸酐、GGT、葡萄糖、HDL 胆固醇、铁、LDH、镁、磷、钾、全蛋白质、钠、甘油三脂、尿酸、滥用的药物、激素、心血管系统调节剂、肿瘤标记物、传染病抗原、诱发变态反应的抗原、免疫蛋白质、细胞活素贫血/代谢标记物、氯甲酰苯草、地高辛、庆大霉素、锂、苯巴比妥、苯妥英、普鲁卡因酰胺、奎尼丁、茶碱、妥布霉素、丙戊酸、盐酸万古霉素、苯异丙胺、抗抑郁药、巴比土酸盐、苯并二氮草类、大麻素、可卡因、LSD、美散痛、安眠酮、鸦片制剂、phenylindine、phropoxy - phene、乙醇、

水杨酸盐、扑热息痛、雌二醇、孕酮、睾酮、hcG/bhCG、刺激淋巴小结的激素、黄体化激素、催乳素、诸如刺激甲状腺激素那样的甲状腺激素、T4、TUP、全T3、自由T4、自由T3、皮质醇、肌酸酐激酶-MB、全肌酸酐激酶、PT、APTT/PTT、LD ISOs、肌酸酐激酶ISOs、  
5 肌红蛋白、肌的轻链、肌钙蛋白I、肌钙蛋白T、衣原体、淋病病毒、疱疹病毒、莱姆病病毒、Epstein Barr病毒、IgE、风疹G病毒、风疹M病毒、CMV-G、CMV-M、毒素-G、毒素-M、HBsAg(B型肝炎病毒表面抗原)、HIV1、HIV2、抗HBc、抗HBs、HCV、抗HAV IgM、抗HBC IgM、抗HAV、HBeAg、抗HBeAg、TB、前列腺特异性抗原、CEA、AFP、PAP、CA125、CA15-3、CA19-9、  
10 b2微球蛋白、血红蛋白、红血细胞、HBcAb、HTLV、ALT、STS梅毒、ABO血型抗原和其它血型抗原、巨细胞病毒、铁蛋白、B-12、叶酸盐、烯糖化的血红蛋白、苯异丙胺、抗抑郁药、以及其它一些对精神有影响的药物。

15 可顺序或同时在一些不同的结合区域测量ECL。

使对作为细胞表面蛋白质的所感兴趣的被分析物特异的PMAMS首先暴露于含有细胞的样品，其中，想要计数样品中的细胞。在一个优选的实施例中，使已知的样品体积和/或稀释的样品暴露于PMAMS，PMAMS具有许多对于至少一种细胞表面抗原特异性的结合区域。然后，  
20 通过附着与ECL标记物连接的辅助结合基团来对结合细胞定量。这是一种能与很宽范围的细胞类型相互作用的基团，例如，一种连接到能插入细胞膜的疏水性基团或连接到对着细胞表面糖指向的外源凝集素的ECL标记物。ECL标记物连接到对着细胞表面抗体指向的一种辅助抗体。在一个更具体的实施例中，可通过使用多种ECL标记物标记的辅助抗体区分与相同区域结合的几种细胞类型。优选确保对在细胞表面上的给定被分析物特异性的离散的结合区域的数目超过存在于样品中将结合的细胞平均数目。然后，可用统计技术确定单位样品体积中的细胞数目。还可  
25 用这种技术例如计数诸如病毒那样的其它粒子，其中，结合试剂识别病毒上的抗原。上述区域与细胞的尺寸相比可以较小，从而使只有一个细胞能结合每个区域，这样，就对每个区域导致数字信号，然后，用统计方法，可对所述那些区域的总和分析上述数字信号。上述区域与细胞的

尺寸相比可以较大，从而使多种细胞能与一个区域结合。在这种情况下，可校正来自每个区域的信号，以便给出单位体积样品中的细胞数目。可采用利用光检测器阵列（例如，CCD 摄像机或雪崩光电二极管阵列）进行图像分析，计数细胞并确定细胞的形态。

5 本发明优选地还提供用于进行 ECL 反应的方法，例如，以在 5 分钟到 15 分钟的范围内 1000 个 ECL 反应的速率进行测定的方法。

### 5.11、与其它分析方法和/或 ECL 一起使用的 PMAMS

上述用于基于 ECL 检测的技术可与其它测定技术一起例如用作可能发生催化剂和其它化学反应的区域。本发明的离散的结合区域可用于其它测定技术中，例如，临床化学物质测定，比如电解质测定、临床酶测定、血液蛋白质测定、葡萄糖、尿素和肌酸酐的测定等等。可以与 ECL 测定结合和/或单独与本发明的 PMAMS 一起使用的其它测定技术包括基于化学发光的标记物、基于萤光的测定、酶连接的测定系统、电化学测定（例如，参见 Hickman，1991 年，科学，252：688 – 691）和/或共振检测（例如，表面细胞质基因组和声学技术）测定系统。

可利用具有液滴的 PMAMS 载体，其中，在液滴阵列中有许多不同的化学物质。每个液滴可含有不同的结合试剂和/或不同的化学测定物（也就是说，对同一测定反应介质）。例如，液滴可以是亲水性的、位于由疏水性表面区域围绕的亲水性表面结合区域上。用覆盖表面的疏水性溶液保护液滴。使要被测定的亲水性溶液沉积在具有由疏水性区域围绕的亲水性结合区域的第二 PMAMS 上。使两个表面对准靠近，以便使在相对表面上的亲水性区域接触，并进行光谱分析，以便检测化学测定的反应产物。

可把原纤维垫弄成图案，从而使得有许多由亲水性和/或疏水性区域围绕的离散的疏水性和/或亲水性区域。含有结合试剂的含水溶液的液滴可位于亲水性区域上，并由周围的疏水性区域限定。这些液滴例如可含有原纤维、原纤维的聚集体、结合试剂、ECL 试剂、用于测定的试剂、表面活性剂、PEGs、洗涤剂、上述作为例子所提到的许多生物分子和/或它们的组合。

30 可控制地去除覆盖第一 PMAMS 的疏水性溶液（例如，蒸发、芯吸），以便只使在顶部的一部分液滴暴露于环境。然后，使要被测定光化学反

应的亲水性溶液暴露于 PMAMS 表面 - 进行亲水性微液滴和要被测定的溶液的混合和分析（例如，光谱分析）。

还可把 PMAMS 结合区域用作预过滤物或过滤物。例如，细胞特异的 PMAMS 在某些情况下可单独用作对某些细胞类型的过滤物，以及与一个筛选大小的过滤器一起使用。然后，使所得到的被分析物溶液暴露于对亚细胞颗粒物质（例如，病毒）特异性的 PMAMS。使用颗粒亚细胞 PMAMS 和/或筛选大小的过滤器，以产生小分子（例如，蛋白质、小的化学实体）被分析物溶液。通过使用串联的 PMAMS 测定系统，可顺序提纯被分析物溶液以为减少非特异性被分析物的相互作用。

可以改变用于载体、电极和/或结合区域的材料的不透光性，以便获得所需的性能。这样的材料可以是半透明的、透明的或基本上不透明的，这取决于该材料的厚度、组成和/或光学密度。

原纤维垫的不透光性随着该垫的厚度而增加。极薄的垫是半透光的。较厚的垫基本上是不透明的。在某些例子中，厚度范围为  $0.01\mu\text{m}$  到  $0.5\mu\text{m}$  的垫基本上是半透明的。在另外一些例子中，厚度大于  $20\mu\text{m}$  的垫基本上是不透明的。厚度在  $0.5\mu\text{m}$  到  $20\mu\text{m}$  之间的垫具有中等的不透明性，这种中等不透明性随着原纤维垫的厚度增加而增加。特定厚度的垫的不透光性取决于组成、密度、衍生情况、层的数目、分散在该垫中的那些材料的类型和量、和/或它们的组合情况。它还取决于所用光的波长。

如果材料在给定的厚度基本上是半透明的，而对于另一厚度基本上是不透明的，则由上述材料的某一深度处所发出的光可穿出该材料，而由另一深度（例如，更深）所发出的光可基本上被所述材料吸收或散射。在一个例子中，材料的可变的不透明性使得该材料可用作滤光器。

从原纤维垫中的某一深度发出的光可基本上穿出该垫，并可用放在该原纤维垫的表面上或附近的检测器观察。从另一深度发出的光基本上可被所述垫吸收和/或散射，并且不能为在上述原纤维垫的表面上或附近的检测器所观察到。原纤维垫（和/或光学上类似的材料）的这种性质可用来区分在 ECL 测定中结合的和未结合的试剂。

某些试剂可扩散（主动或被动），被拉（例如，通过抽吸过滤和/或毛细管作用）、被芯吸、或通过压力被推到多孔材料中足够的深度，从而使这些试剂发射的光基本上或全部被垫吸收或散射。在一个例子中，

原纤维垫起到物理过滤器或滤光器的作用，某些试剂穿过该原纤维垫，某些试剂被夹带，和/或某些试剂在所述垫表面处或附近与一个极薄的层结合。防止与一个或多个结合区域结合的试剂和/或结合到一个或多个结合区域（这些区域位于原纤维垫的表面上或在 PMAMS 上的所述垫的表面附近的一个极薄的层中）的物质扩散或被拉入或穿过所述垫。使试剂和/或其它溶液流动或悬浮在原纤维垫的表面上和/或遍布于该原纤维垫的表面，从而使试剂只与在所述垫的表面上的一个极薄的层结合。可在 5 一个或多个方向上清洗试剂一次或多次穿过所述垫。试剂可与原纤维垫、一个或多个结合区域、结合到一个或多个结合区域的其它或相同的试剂结合，被夹带在所述垫中，穿过该垫，或者，将这些情况组合起来。  
10

用于载体和/或电极的多孔材料可多于一层，其中，上层具有结合区域，而在垫中的其它层没有结合区域。在一个例子中，原纤维垫（图 29 中示意性地示出）、上层 2900 的厚度足以防止光通过，此光来源于这层下面的所述垫的层 2901、2902。可用位于垫的表面上或附近处的检测器 15 2906 检测来源于与这上层结合的源 2904、2905 的光。来源于下层 2901、2902 中的源 2907、2908、2909 的光可被所有的层中的任何一个或所有的层吸收或散射，而且不能用检测器 2906、2910 检测到。

可用预过滤步骤在制作垫之前选择原纤维和/或原纤维的聚集体的特定的尺寸、类型、衍生物。用来过滤原纤维悬浮液的过滤媒介物是一定或多种孔隙度的原纤维垫。  
20

多孔材料（例如，原纤维垫）可作为用于结合区域的载体、可用于 ECL 或其它电化学用途的电极、可用来控制试剂发送的过滤器和/或可以各种程度传递、吸收和/或散射光的滤光器。

### 5.12、电化色 ECL 显示器板

本发明还提供了生产用于平板显示器的隔离开的电化学像素的方法。已建议将平板印刷术用于基于电化色和电化学发光的平板显示器，以产生像素，这些像素当受到电子访问时对邻近的像素具有有限的影响（也就是说，有限的串扰）（参见美国专利 5,189,549）。用于减少这样的串扰的平板印刷术的局限性在于当电解材料曝光时必须能改变它的电导率。本发明的特征是减少各像素之间的串扰而无需采用能够光诱发电导率调制的材料，由此，使得能采用很广泛的不同溶液、凝胶或膜。  
25  
30

在夹层结构中，作为像素的活性区域的两个电极表面是在两个彼此面向的表面上。电极表面例如涂覆有互补的电化色材料。要减少串扰，把导电电解膜放在电极表面之间，而在不同的电极对之间（也就是说，在像素元之间）是不导电区域。如果有涂层的电极表面是亲水性的，那么，就使围绕电极的表面区域是疏水性的（例如，借助于压印或穿过掩模沉积），并把亲水性导电小液滴放在第一表面的电极上（例如，借助于射流阵列），然后，用机器对准第二表面，并使该第二表面与第一表面接触，从而使电极对准。这样，可使电解小液滴限制在处于一个像素内的区域，而在像素之间无导电材料。像素的电极对在同一表面上并排紧密靠近。如果有涂层的电极对是亲水性的，就使围绕两个电极的区域是亲水性的，而使一个疏水性环围绕亲水性电极区域（例如，借助于压印或穿过掩模沉积）。用疏水性溶液使上面两个实施例中所述的小液滴稳定。可提高所述溶液的粘度，以提高小液滴阵列的稳定性。可使亲水性和疏水性反过来。在另外一些实施例中，小液滴可含有能聚合的溶液，以提高在电极对之间或在电极对上面的膜的稳定性和/或电导率（例如，导电聚合物）。此外，可利用结构特性来限制在像素之间的串扰。例如，可采用具有能并排环绕表面上的电极像素对的环形压印突出物特征的弹性印记（例如，聚（二甲基硅氧烷）），以便隔离像素之间的电解液、凝胶或膜。可以选择地，可把并排的电极像素对按照类似于井的电绝缘结构放在表面上，电解液、凝胶或膜放在在电极上面的井中，并覆盖或涂覆整个表面，以便隔离并包含每个像素的那些电解成份。

### 5.13、用于其它化学反应的 PMAMS

本发明的 PMAMS 还可用来进行并不与 ECL 结合的那些化学反应。例如，可采用上面 5.11 节中所述的所有的技术和非 ECL 测定。

提供了一种盒，用于检测或测量样品中的所感兴趣的被分析物，这种盒包括：（a）一个表面上具有许多离散的结合区域的第一载体，以便至少形成一个结合表面，至少某些离散的结合区域与其它结合区域具有不同的结合特异性，所述许多离散的结合区域的每一个是亲水性的并由疏水性区域围绕，以及（b）具有许多亲水性区域的一个第二载体，该亲水性区域包括适于在其上进行化学测定的一些反应介质，以便形成一个测定表面，其中，所述许多离散的结合区域和许多反应介质能够达

到接触，从而使存在于每个结合区域上的要被分析的样品与反应介质接触，以检测或测量所感兴趣的被分析物。可以选择地，结合区域可以是疏水性的，而第二载体具有许多含有反应介质的疏水性区域。

本发明还提供一种用于检测或测量样品中所感兴趣的被分析物的方法，这种方法包括：(a) 把含有要被检测或测量的被分析物的样品液滴放在载体表面上的许多离散的结合区域上，其中，该许多离散的结合区域至少包括一个结合区域，这个结合区域含有一些彼此相同的结合试剂，这些结合试剂的特异性与容纳在其它结合区域中的那些结合试剂不同，上述那些离散的结合区域的每一个的特征为疏水性的或亲水性的，但条件是围绕每个结合区域的载体表面的区域是(i) 疏水性的，如果该结合区域是亲水性的话，以及(ii) 亲水性的，如果该结合区域是疏水性的话，以便于上述样品中的一种或多种所感兴趣的被分析物能与所述那些结合区域结合，以及(b) 使在第一载体上的液滴与具有许多离散的亲水性区域的第二载体表面接触，该许多离散的亲水性区域包括适于在其上进行化学测定的反应介质，以及(c) 确定与上述结合区域结合的所感兴趣的被分析物的存在。

还提供一种用于检测或测量样品中所感兴趣的被分析物的方法，这种方法包括(a) 把含有要被检测或测量的被分析物的样品的液滴放在载体表面上的许多离散的结合区域上，其中，所述许多离散的结合区域至少包括一个结合区域，这个结合区域含有一些试剂，这些试剂彼此等同并且与容纳在其它那些结合区域中的结合试剂的特异性不同，所述离散的结合区域的每一个的特征为疏水性的或亲水性的，但条件是围绕上述那些结合区域的每一个的载体表面的区域是(i) 疏水性的，如果结合区域是亲水性的话，以及(ii) 亲水性的，如果结合区域是疏水性的话，以便使得上述样品中的一种或多种所感兴趣的被分析物能与上述那些结合区域结合，以及(b) 把反应介质的液滴放在样品的液滴上；以及(c) 确定与上述结合区域结合的所感兴趣的被分析物的存在。

在本发明的这方面的一个特定的例子中，一些结合区域的每一个均已结合有用在化学反应中的顺序的中间物作为底物的一种不同的酶，这些结合区域位于PMAMS表面上，从而使作为一种后来的酶的反应物的一种给定的酶促反应的产物流动到在反应通路中的下一种酶。本发明还

用上述方法使酶整体固定在自组装的单层上，例如，用于工业用途。

例如，在一侧或两侧上具有这样固定的酶的一些片可叠置，以便获得表面积对溶液体积的高比值。可以选择地，这样固定的酶可以附着到多孔材料上。此外，这样固定的酶可以在探针上、在搅拌剂上、在管或  
5 毛细管的壁上、或者，在诸如温育室那样的容器的壁上。

在本发明的一种可供选择的情况下，可以在 PMAMS 的类似物进行  
10 而如上述那样的非 ECL 测定，所述 PMAMS 的类似物与上述 PMAMS 的  
不同之处在于该 PMAMS 类似物含有一些用于进行非 ECL 反应的离散的  
区域，所述这些离散的区域并非必须已带有结合试剂，因此并非必须是  
15 结合区域。这样的 PMAMS 类似物具有用于进行反应的离散的区域，并  
被制备成能抑制施加到上述那些离散的区域的流体的散布和/或扩散。在一个实施例中，上述那些区域相对于载体表面上的那些周围的区域是疏  
水性的或者是亲水性的，以帮助把反应介质和/或样品局限于上述那些离  
散的区域中。可利用采用井的方法、使反应介质或样品沉积在毡垫或多  
20 孔材料上的方法、在凝胶、膜等物上沉积和干燥反应介质或样品的方法  
来抑制散布或扩散。这样的离散的区域的每一个的直径或宽度小于  
1mm，优选在 50nm 到 1mm 的范围内，最优先的是在 1 微米到 1 毫米的  
范围内。在施加样品前，可把同样的或不同的反应介质沉积在上述离散  
25 的结合区域的每一个上，或施加样品可先于沉积反应介质。

在利用 PMAMS 的类似物进行非 ECL 测定的一种优选的情况下，把  
30 反应介质的液滴放在许多离散的区域上，优选地同时从微观流体导管阵  
列发送，然后，任选提高稳定性和/或保护上述液滴，把更粘的溶液（例  
如，油）放在反应介质的顶部上，或者，可以选择地，放在两个离散的  
区域之间；然后，把含有要被检测或测量的被分析物的样品施加给每个  
区域，或者是离散地施加给每个离散的区域，或者是成块地使含有所述  
那些区域的 PMAMS 类似物的整个表面暴露于流体样品。使在上述那些  
结合区域中暴露于所得到的反应进行，并通过采用从本领域中已知的  
那些指示器和检测系统中选出的一种指示器和检测系统来观测结果。

还在下述这些例子中进一步说明本发明，绝非打算使所述这些例子  
30 限制本发明的范围。

## 6. 例子

### 6.1、用微观压印制备 MAB PMAMS 表面

按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且影响了的光刻胶底板制备成方形阵列图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 (可从 Dow Corning 得到的聚(二甲基硅氧烷)) 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10 : 1 混合物倒到底板上并加以固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。通过暴露于亲水性的、在乙醇溶液 (1 至 10mM) 中的、以 OH 为末端的链烷硫醇、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , 给所得到的弹性印记“涂墨”，用机器使该所得到的弹性印记与一个对齐的金表面用销钉对准接触，并去除该所得到的弹性印记。然后，用疏水性的以  $\text{CH}_3$  为末端的链烷硫醇、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$  (在乙醇中 1 至 10mM) 的溶液清洗基片几秒钟 (例如，2 秒到 10 秒) ( Kumar 等人，上述和 Prime 等人，科学，252: 1164 - 7 )。然后，用氮气流温和地干燥所得到的表面。之后，用机器使含有亲水性溶液的毛细管阵列与上述对齐的表面用销钉对准接触，所述对齐的表面使毛细管与  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$  区域对准。毛细管阵列中的每个毛细管含有单克隆抗体 (MABs)，对所感兴趣的被分析物特异性，能通过酰胺键与亲水性区域上的活性 OH 基团共价结合。

### 6.2、用微观压印制备 MAB 和核酸 PMAMS 表面

按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影了的光刻胶底板制备成方形阵列图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂 10:1 的混合物倒到底板上并加以固化。从硅底板上小心地去除聚合了的 SYLGARD 184。通过暴露于亲水性的、在乙醇溶液 (1 至 10mM) 中的、以 OH 为末端的链烷硫醇、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ ，给所得到的弹性印记“涂墨”，用机器使该所得到的弹性印记与一个对齐的金表面用销钉对准接触，并去除该所得到的弹性印记。然后，用疏水性的以  $\text{CH}_3$  为末端的链烷硫醇、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$  (在乙醇中 1 至 10mM) 的溶液清洗基片几秒钟 (例如，2 秒到 10 秒) ( Kumar 等人，上述和 Prime 等人，科学，252: 1164 - 7 )。然后，用氮气流慢慢地干燥所得到的表面。之后，用机器使含有亲水性溶液的毛细管阵列与上述对齐的表面用销钉对准接触，所述对齐的表面使毛细管与  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$  区域对准。毛细管阵列中的每个毛细管含有抗

体或改性的核酸，对所感兴趣的被分析物特异性，能通过酰胺键与在亲水性区域上的活性 OH 基团共价结合。

### 6.3、通过刻蚀制备 PMAMS 表面

使清洁的金表面暴露于在乙醇溶液（1 - 10mM）中的亲水性的、以 OH 为末端的链烷硫醇、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ （Prime 等人，科学，252：1164 - 1167）。用机器使成细尖的刻蚀器具的直线阵列光学对准接触一个对齐的金表面，并用该直线阵列对所述表面的 X 和 Y 两个方向进行刻蚀，从而产生  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$  区域的一个两维格栅阵列。然后，用疏水性的  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ （在乙醇中 1 至 10mM）的溶液清洗底片几秒钟（例如，2 至 10 秒钟）。然后，用氮气流慢慢地干燥所得到的表面。之后，用机器使含有亲水性溶液的毛细管阵列与上述表面用销钉对准接触，所述表面使毛细管与  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$  区域对准接触。毛细管阵列中的每个毛细管含有抗体或核酸，对所感兴趣的被分析物特异性，能与在亲水性区域上的活性 OH 基团共价结合。

### 6.4、在 PMAMS 表面上的夹层测定

如上所述制备透明的 PMAMS 表面，它基本上是透明的且具有与表面连接的初级抗体（primary antibody）的成图案多特异性阵列。选用透明的载体、电极阵列、单层表面。然后，使 PMAMS 表面暴露于被猜想含有要被测定的所感兴趣的被分析物的溶液样品。之后，清洗掉所述样品，在表面上留下结合了抗体的被分析物。然后，使 PMAMS 表面暴露于含次级的 ECL 标记的对在该表面上所结合的被分析物特异性的抗体的溶液。之后，从 PMAMS 表面上清洗掉这种溶液，留下与存在有被分析物的区域结合的 ECL 标记的次级抗体。

用可拆除的屏障保护电极检测，以便防止样品与电极表面的过早接触，避免污染影响。之后，拆除所述屏障，并使用测定缓冲剂浸湿了的电极阵列与 PMAMS 表面对齐接触。使电极阵列与电子波形信号发生器连接，并把电位施加给工作电极/反电极对。然后，CCD 判读所发射的光，而信号被送至微处理器，把此信号转化为所想要的测量结果输出形式。

把测量结果输出与利用已知量的所感兴趣的被分析物作对照所得到

的测量结果输出作比较，以便计算被分析物的实际量。

### 6.5、在第一和第二 PMAMS 表面上的测定

如上所述制备透明的 PMAMS 表面，其中成图案的多特异性的初级抗体阵列连至表面。然后，使 PMAMS 表面暴露于被猜想含有要被测定的所感兴趣的被分析物的溶液样品。之后，清洗掉所述样品，在表面上留下结合了抗体的被分析物。  
5

给在保护性覆盖物下的第二 PMAMS 配置交替的疏水性/亲水性图案，在图案上有成图案的用 ECL 标记物标记的许多次级抗体的微液滴。

去除保护与第一 PMAMS 对齐的第二 PMAMS 的屏障，并使微液滴与第一 PMAMS 上的初级抗体结合区域对准。升离第二 PMAMS，并使电极阵列与第一 PMAMS 表面对齐接触。使电极阵列与电位波形信号发生器连接，并给工作电极/反电极对施加电位。然后，光电倍增管判读所发射的光，而信号被送至微处理器，把所述信号转化为所想要的测量结果输出形式。  
10

15 把测量结果输出与利用已知量的所感兴趣的被分析物作对照所得到的测量结果输出作比较，以便计算被分析物的实际量。

### 6.6、在 PMAMS 表面上的核酸测定

如上所述制作透明的 PMAMS 表面，其中单链的核酸探针的成图案的多特异性阵列与表面连接。所述探针与所感兴趣的核酸被分析物的 5' 区域互补。然后，使 PMAMS 表面暴露于被猜想含有要被测定的所感兴趣的可杂化的核酸被分析物的溶液样品，已预先使该样品变性，即被处理，以便使所感兴趣的被分析物成为单链。然后，清洗掉所述样品，在上述表面上留下杂化了的被分析物。之后，使 PMAMS 表面暴露于溶液，这种溶液含有对结合在表面上的核酸被分析物的 3' 末端特异性的次级 ECL 标记的核酸探针。然后，从 PMAMS 表面上清洗掉这种溶液，留下与存在有被分析物的区域结合的 ECL 标记的核酸探针。  
20  
25

去除保护与第一 PMAMS 对准的第二 PMAMS 的屏障，并使微液滴对准第一 PMAMS 上的初级抗体结合区域。升离第二 PMAMS，并使电极阵列与第一 PMAMS 表面对准接触。

30 使电极阵列连接一个电位波形信号发生器，并给工作电极/反电极对施加电位。然后，CCD 判读所发射的光，而信号被送至一个微处理器，

把该信号转化为所想要的测量结果输出形式。

把测量结果输出与利用已知量的所感兴趣的被分析物作对照所得到的测量结果输出作比较，以便计算被分析物的实际量。

#### 6.7、用光电倍增器检测器的在 PMAMS 表面上的竞争性测定

5 如上所述制备透明的 PMAMS 表面，这表面具有连接到该表面的、对所感兴趣的被分析物特异性的初级抗体的成图案的多特异性阵列。然后，使 PMAMS 表面暴露于要测定的溶液样品，溶液样品是被猜想含有所感兴趣的被分析物的样品和已知量的 ECL 标记的分子的混合物，已知量的 ECL 标记的分子与用于结合抗体的所感兴趣的被分析物竞争。之后，清洗掉所述样品，在上述表面上留下结合抗体的被分析物和/或被标记了的竞争性结合物。

10 用可去除的屏障保护电极阵列，以便防止样品与电极表面接触，避免污染影响。然后，去除所述屏障，并使得用测定缓冲剂浸湿的电极阵列与 PMAMS 表面接触对准。使电极阵列连接电位波形信号发生器，并给工作电极/反电极对施加电位。之后，用光电倍增管判读所发射的光，而信号送至一个微处理器，把该信号转化为所想要的测量结果输出形式。

15 把测量结果输出与利用已知量的所感兴趣的被分析物作对照所得到的测量结果输出作比较，以便计算被分析物的实际量。

#### 6.8、用 CCD 检测器在 PMAMS 表面上的竞争性测定

20 如上所述制备透明的 PMAMS 表面，这表面具有连接到该表面的、初级抗体的成图案的多特异性阵列。然后，使 PMAMS 表面暴露于被猜想含有要被测定的所感兴趣的被分析物的溶液样品。之后，清洗掉所述样品，在上述表面上留下结合抗体的被分析物。

25 给在保护性覆盖物下面的第二 PMAMS 配置交替的疏水性/亲水性图案，在此图案上有与所感兴趣的被分析物竞争的许多已知量的 ECL 标记的分子的成图案的微液滴。

30 去除保护与第一 PMAMS 对准的第二 PMAMS 的屏障，并使微液滴对准在第一 PMAMS 上的初级抗体结合区域。升离第二 PMAMS，并使电极阵列对准接触 PMAMS 表面。使电极阵列连接电位波形信号发生器，并给工作电极/反电极对施加电位。然后，用 CCD 判读所发射的光，

而信号送至一个微处理器，把该信号转化为所想要的测量结果输出形式。

把测量结果输出与利用已知量的所感兴趣的被分析物作对照所得到的测量结果输出作比较，以便计算被分析物的实际量。

5 6.9、通过用  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$  链烷硫醇进行微观压印制备 MAB PMAMS 表面

按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影的光刻胶底板制备成方形阵列图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184（可从 Dow Corning 得到的聚（二甲基硅氮烷））和相应的 SYLGARD 184 固化剂的 10 : 1 的混合物倒到底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。通过暴露于亲水性的、在乙醇溶液（1 至 10mM）中的、以 OH 为末端的链烷硫醇、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$ ，给所得到的弹性印记“涂墨”，用机器使该所得到的弹性印记与对齐的金表面用销钉对准接触，并去除该所得到的弹性印记。然后，用疏水性的以  $\text{CH}_3$  为末端的链烷硫醇、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ （在乙醇中 1 至 10mM）的溶液清洗底片几秒钟（例如，2 秒到 10 秒）（Kumar 等人的上述的文章）。然后，用氮气流慢慢地干燥所得到的表面。之后，用机器使含有亲水性溶液的毛细管阵列与上述对齐的表面用销钉对准接触，所述对齐的表面使毛细管与  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$  区域对准，以便在每个区域放置特异性抗体。毛细管阵列中的每个毛细管含有单克隆抗体，这些单克隆抗体对所感兴趣的被分析物特异性，能与在亲水性区域上的活性 OH 基团共价结合。

6.10、通过用  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$  链烷硫醇进行微观压印制备 MAB 和核酸 PMAMS 表面

按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影的光刻胶底板制备成方形阵列图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10 : 1 的混合物倒到硅底板上并加以固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。通过暴露于亲水性的、在乙醇溶液（1 至 10mM）中的、以 OH 为末端的链烷硫醇、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$ ，给所得到的弹性印记“涂墨”，用机器使该所得到的弹性印记与一个对齐的金表面用销钉对准接触，并去除该所得到的弹性印记。然后，用疏水性的以  $\text{CH}_3$  为末端的链烷硫醇、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ （在乙

醇中 1 至 10mM ) 的溶液清洗底片几秒钟( 例如, 2 秒到 10 秒) ( Kumar 等人的上述文章)。然后, 用氮气流慢慢地干燥所得到的表面。之后, 用机器使含有亲水性溶液的毛细管阵列与上述对齐的表面用销钉对准接触, 所述对齐的表面使毛细管与一些  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$  区域对准, 以便在每个区域上放置一些特异性抗体和/或可杂化的核酸。毛细管阵列中的每个毛细管含有一些单克隆抗体或改性的核酸, 这些单克隆抗体或改性的核酸对所感兴趣的被分析物特异性, 能通过酰胺键与在亲水性区域上的活性 OH 基团共价结合。

### 6. 11、用链霉抗生物素蛋白 - 生物素接头物制备 PMAMS 表面

按照众所周知的方法把 1 毫米至 2 毫米厚的已曝光且显影的光刻胶底板制备成方形阵列图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10 : 1 的混合物倒到硅底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。通过暴露于巯基十一醇和 12 - 巍基 ( 8 - 生物素酰胺 - 3, 6 - 二氧杂辛基 ) 十二酰胺的混合物, 给所得到的弹性印记 “涂墨”, 这里, 生物素化了的硫醇的摩尔分数为 0.1 ( 参见 Spinke 等人, 1993 年, Langmuir, 9: 1821 - 5, 和 Spinke 等人, 1993 年, J. Chem. Phys. 99 (9): 7012 - 9 )。然后, 用疏水性的以  $\text{CH}_3$  为末端的链烷硫醇、  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$  链烷硫醇 ( 在乙醇中 1 至 10mM ) 的溶液清洗底片几秒 ( 例如, 2 秒到 10 秒 ) ( 参见 Kumar 等人, 如上, Biebuyck, Whitesides )。然后, 用氮气流慢慢地干燥所得到的表面。之后用机器使在每个毛细管中含有链霉抗生物素蛋白溶液的毛细管阵列与上述对齐的表面用销钉对准接触。使毛细管阵列中的每个毛细管对准并接触生物素化的区域, 而且去除该毛细管阵列, 清洗所述表面。然后, 用机器使含有许多生物素化的抗体和生物素化的核酸溶液的第二毛细管阵列与上述对齐的表面用销钉对准接触, 以便在每个区域上放置一些特异性抗体和核酸。

### 6. 12、MAB 单独的表面的制备

用本领域中已知的方法制作在硅表面上的金上的交错对插工作电极和反电极对的电极阵列 ( 例如, 参见上文的 Kumar 等人的文章 )。在这个例子中, 电极阵列和离散的结合区域阵列存在于载体的同一表面上。按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影的光刻胶底板

制备成方形阵列图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184( 可从 Dow Corning 得到的聚 ( 二甲基硅氧烷 ( PDMS ) ) 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10 : 1 的混合物倒到硅底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184 。通过暴露于亲水性的、在乙醇溶液 ( 1 至 10mM ) 中的、以 OH 为末端的链烷硫醇、  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$  , 给所得到的弹性印记 “ 涂墨 ” , 用机器使该所得到的弹性印记与在金电极阵列表面上的对齐的工作电极用销钉对准接触, 之后去除该所得到的弹性印记。然后, 通过使毛细管与在电极阵列表面上的  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$  区域对准, 用机器使含有亲水性溶液的毛细管阵列用销钉对准接触, 以便把一些特异性抗体放在每个区域上。毛细管阵列中的每个毛细管含有一些单克隆抗体, 这些单克隆抗体对所感兴趣的被分析物特异性, 可通过酰胺键与在亲水性区域上的活性 OH 基团共价结合。

### 6. 13 、 在 MAB 单独的表面上进行测定

制作上文 6.12 节所述的载体。如前所述, 从成环形图案的光刻胶底板制作 PDMS 印记, 这些环的每一个独立地限定了一个工作电极 / 反电极对的范围。之后, 使电极阵列表面暴露于要被分析的样品, 该电极阵列表面用 ECL 标记的次级抗体的混合物清洗, 然后用含有三丙胺的测定缓冲剂溶液清洗。然后, 对齐 PDMS 印记, 并使该 PDMS 印记对准接触, 对齐 PDMS 印记的环, 以便把测定缓冲剂的单独的体积限定并确定在每个电极对上面。把过电位施加给电极对, 以便从表面上释放单层, 使工作电极暴露于 ECL 标记的次级抗体。然后, 光电倍增管判读穿过透明的 PDMS 所发射的光, 而信号送至一个微处理器, 把该信号转化为所想要的测量结果输出形式。

把测量结果输出与利用已知量的所感兴趣的被分析物作对照所得到的测量结果输出作比较, 以便计算被分析物的实际量。

### 6. 14 、 制备具有工作电极和反电极的单独的表面

用本领域中已知的方法, 制作在硅载体的金上的两个交错对插电极之间具有金结合区域的、交错对插工作金电极和金反电极对的电极阵列 ( 例如, 参见上文的 Kumar 等人的文章 ) 。在这个例子中, 电极阵列和离散的结合区域阵列存在于同一表面上。按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影的光刻胶底板制备成结合区域的图案, 这些

结合区域处于交错对插电极对之间。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 (可从 Dow Corning 得到的聚(二甲基硅氧烷( PDMS )) ) 和相应的 SYLGARD 184 固化剂的 10:1 混合物倒到硅底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合的 SYLGARD 184。通过暴露于亲水性的、在乙醇溶液 (1 至 10mM) 中的、以 OH 为末端的链烷硫醇、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , 给所得到的弹性印记“涂墨”, 用机器使该所得到的弹性印记与在电极阵列表面上的对齐的金结合区域用销钉对准接触, 之后, 去除该所得到的弹性印记。然后, 用机器使含有亲水性溶液的毛细管阵列用销钉对准接触, 使毛细管与在电极阵列表面上的  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$  区域对准, 以便把一些特异性抗体放在每个区域上。毛细管阵列中的每个毛细管含有一些单克隆抗体, 这些单克隆抗体对所感兴趣的被分析物特异性, 可通过酰胺键与在亲水性区域上的活性 OH 基团共价结合。

#### 6.15、在具有工作电极和反电极的单独的表面上进行测定

用上述方法制作上文 6.14 节所述的载体表面。使所制备的表面暴露于要分析的样品, 所制备的表面用 ECL 标记的次级抗体的混合物清洗, 然后, 再用含有三丙胺的测定缓冲剂溶液清洗。使电极阵列连接电位波形信号发生器, 并给工作电极/反电极对施加电位。然后, 光电倍增管判读所发射的光, 而信号送至一个微处理器, 把该信号转化为所想要的测量结果输出形式。

把测量结果输出与利用已知量的所感兴趣的被分析物作对照所得到的测量结果输出作比较, 以便计算被分析物的实际量。

#### 6.16、制备具有反电极的表面

按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影的光刻胶底板制备成方形阵列图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10:1 混合物倒到硅底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。通过暴露于亲水性的、在乙醇溶液 (1 至 10mM) 的、以 OH 为末端的链烷硫醇、 $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , 给所得到的弹性印记“涂墨”, 用机器使该所得到的弹性印记与在金表面上的对齐的成图案的反电极和方形结合区域用销钉对准接触, 并去除该所得到的弹性印记。成图案的金表面由一些可访问

的环形反电极构成，这些可访问的环形反电极限定了已压印有  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$  的一些结合区域的范围。在每个金反电极和每个用于每个单层结合区域的方形金底片之间有一个缝隙或分开的空间。  
5 之后，用机器使含有亲水性溶液的毛细管阵列与上述对齐的表面用销钉对准接触，所述对齐的表面使毛细管与一些  $\text{SH}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$  区域对准，以使在每个区域上放置一些特异性抗体和核酸。毛细管阵列中的每个毛细管含有一些抗体或核酸，这些抗体或核酸对所感兴趣的被分析物特异性，能与在亲水性区域上的活性 OH 基团共价结合。

#### 6.17、工作电极和反电极处于不同表面上的在单独表面上进行的测定

10 使上面 6.16 节的例子中所述的载体表面暴露于要分析的样品溶液。然后，该载体表面被清洗并暴露于含有许多不同特异性的 ECL 标记的单克隆抗体或 ECL 标记的核酸的溶液，之后，用含有三丙胺的测定缓冲剂清洗。制作透明的可访问的工作电极阵列，使该阵列中的每个工作电极对应于如上述 6.16 节中所述的载体上的一个离散的结合区域/反电极区域。  
15 两个载体用测定缓冲剂弄湿，并用机器对准排齐形状相适应地接触。使电极阵列与一个电位波形信号发生器连接，并给对准了的工作电极/反电极对施加电位，工作电极/反电极对在上述两上载体之间产生电位场。之后，CCD 判读穿过透明工作电极所发射的光，而信号送至一个微处理器，使该信号转化为所想要的测量结果输出形式。

20 把测量结果输出与利用已知量的所感兴趣的被分析物作对照所得到的测量结果输出作比较，以便计算被分析物的实际量。

#### 6.18、用真空过滤作用制作 CC (分散了的) 原纤维垫

25 通过混合 0.1 % w/w 的 CC 原纤维/去离子水，制备每毫升溶液 1 毫克原纤维的 CC 原纤维的含水浆液。通过使 400 瓦的声处理装置 (Sonication horn) 浸入所述浆液 10 分钟到 1 小时之间来在浆液中分散 CC 原纤维（较大的、微米尺度的聚集体被分散成小的聚集体或单根的纤维）。用光学显微镜监控分散的程度。

30 把尼龙过滤膜（孔尺寸为  $0.47\mu\text{m}$ ，直径 25mm）放在直径 25mm 的烧结玻璃过滤物上。通过用抽吸过滤的膜/过滤物装置过滤分散的原纤维浆液（图 23A）。用 20ml 的去离子水稀释浆液（5ml）的等分试样，之后，通过上述膜/过滤器装置过滤该浆液的等分试样。对于大约 0.25 至

0.33g/cc 的普通的垫来说，大约 100 $\mu\text{m}$  的垫需要 6 个等分试样。

继续进行抽吸过滤，直到从垫中去除所有来自分散物的水（通过目视检查）。直接从过滤膜上剥离（用手）上述垫。

使垫在 60 °C 炉子中干燥大约 10 分钟至 15 分钟。所述垫被切割、打孔或以其他方式切开备用。

#### 6. 19、通过蒸发在金属网状载体上制作原纤维垫

通过混合 0.1 % w/w 的 CC 原纤维/去离子水，制备每毫升溶液 1 毫克原纤维的 CC 原纤维的含水浆液。通过使 400 瓦声处理装置浸入浆液 10 分钟到 1 小时之间，分散 CC 原纤维（较大的、微米尺度的聚集体被分散成小的聚集体或单独的纤维）。用光学显微镜监控分散的程度。

把一块 1cm<sup>2</sup> 的不锈钢网状物（400 支）放在直径 25mm 的滤纸上。把 5ml 的浆液等分试样吸移到筛网/滤纸的整体的表面上。使浆液中的水蒸发，蒸发在室温和压力下或在一个加热炉中进行。

一旦原纤维干燥，加入另外的等分试样。把原纤维和筛网作为一个单独的单元从滤纸上剥离。

上述垫被切割、打孔或以其他方式切开，以备使用。

#### 6. 20、生物素固定在载有 NHS - 酯官能团的原纤维上

使得用 COOH 衍生的原纤维（由 Hyperion Catalysts 公司提供）悬浮在 ~ 10mg/ml 的无水的二恶烷中，并不停地搅动。加入超过 20 倍摩尔数的 N - 羟基琥珀酰亚胺，并使之溶解。其次，加入超过 20 倍摩尔数的乙基 - 二氨基 - 丙基 - 碳二亚胺（EDAC），并在室温搅动混合物 2 小时。

在搅动后，抽吸上清液，并用无水的二恶烷清洗固体三次，用无水甲醇清洗一次，并在 0.45 $\mu\text{m}$  的聚砜膜上过滤。用另外的甲醇清洗滤液，并把该滤液放在真空的玻璃小瓶中，直到不再观察到重量的减少。

用 PBS - 1 (~ 70mM 的磷酸盐、150mM 的 NaCl) 清洗 10.4mg NHS - 酯原纤维（ORIGEN 试剂 402 - 130 - 01, pH 7.8, IGEN 公司）。使清洗过的原纤维悬浮在 2.3ml 的抗生物素蛋白溶液中（8.3mg 抗生物素蛋白/每 ml PBS - 1）。

使悬浮液处于室温 1.5 小时，不停地转动烧瓶，以便搅动。

1.5 小时后，在 4 °C 储存悬浮液 16 小时，然后，使该悬浮液处于室温，并用 PBS - 1 清洗，而且使此悬浮液作为在 PBS - 1 中的悬浮液储存。

### 6.21、单克隆抗体（抗 AFP）固定在碳原纤维上

如 6.20 节的例子所述的那样，制备用 NHS 酯官能化的碳原纤维。  
使 14mg 原纤维 - NHS 酯与 500ml PBS - 1 缓冲剂混合。声处理  
该混合物 20 分钟，直到它变为粘滞的浆液。加入另外 500ml PBS - 1  
5 缓冲剂。

把在 80ml 的 PBS - 1 中的抗 AFP ( $\alpha$ -胎蛋白质) 抗体加到上述  
浆液中。使反应能在室温进行 2.5 小时。

加入 6ml 的 PBS - 1 缓冲剂，并在 4 °C 离心反应混合物 5 分钟。用  
吸移管去除上清液。重复这个步骤 9 次。

10 在最后的清洗之后，去除上清液，并在 4 °C 储存原纤维 - 抗 AFP 产  
物。

### 6.22、原纤维垫的周期性的伏安记录：原纤维垫与金箔电极的比较

测量在 0.5M 的  $K_2SO_4$  中的 6mM  $Fe^{3+/2+}(CN)_6$  的周期性伏安记录。  
在图 30A 中，在 0.10mA/cm、在 10、25 和 50mV/秒处测量 CC (分散  
15 了的) 的平原纤维的垫 CV。如 6.18 节的例子所述制作垫。在图 30B 中，  
在 0.05mA/cm、在 10、25 和 50mV/秒处测量对于金箔电极的 CV。所  
有的电位以对 Ag/AgCl 的伏特计。

### 6.23、原纤维垫电极的电化学性质：阳极峰电流与所述垫的厚度的比较

对于相同几何面积 (0.20cm<sup>2</sup>) 但不同厚度的原纤维垫，测量在 0.5M  
20 的  $K_2SO_4$  中的 6mM  $Fe^{3+/2+}(CN)_6$  的周期性的伏安记录。对于在 24μm 到  
42.5μm 范围内的厚度，阳极峰电流 (图 31) 随垫的厚度增加而增加。  
对每一厚度，阳极峰电流还随扫描速率 (例如，速率在 10mV/秒到 150mV/  
秒的范围内) 的增加而增加。作为厚度的函数，阳极峰电流增加的速率  
还随厚度增加而增加。厚度为 24μm 的原纤维垫工作情况与金箔电极不  
25 相上下。

### 6.24、蛋白质与原纤维的非特异性结合

如下测量蛋白质与碳原纤维 (CC) 的非特异性结合： i ) 使  
Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (“TAG 1”) 标记的蛋白质溶液暴露于已知量的碳原纤维，  
直到达到平衡； ii ) 使所标记的蛋白质/原纤维溶液离心，并收集上清液，  
30 以及 iii ) 用电化学发光 (ECL) 测定留在所述上清液中所标记的蛋白  
质的量。

为产生图 32 所示的曲线，给在 0.1M pH 值为 7 的磷酸钾缓冲液中的 CC (平的) 原纤维的系列稀释液加入 3 $\mu$ g/ml 的附着到衍生化的 TAG 1 上的抗 CEA 抗体 (对于附着到一种衍生化的 TAG 1 ECL 标记物上的癌胚抗原的抗体)。在旋转 20 分钟后，用离心法去除原纤维。在 ORIGEN 5 1.5 ( IGEN 公司) 的分析器中，对用 ORIGEN 测定缓冲剂稀释了 5 倍的反应混合物上清液等分试样进行 ECL 测定，测出留在上清液中的蛋白质 (未结合的) 量。当存在较高浓度的碳原纤维时，用衍生的 TAG 1 标记的蛋白质的结合增加时，导致 ECL 信号的减弱 (相对于未暴露于原纤维的反应混合物的对象的 ECL 信号)。

10 6.25、蛋白质与具有洗涤剂/表面活性剂的原纤维的非特异性结合的减弱

用 6.24 节的例子中所述的方法分析上清液对与原纤维结合的蛋白质的影响。给附着到衍生化的 TAG 1/原纤维的混合物上的抗 CEA 加入曲通 X - 100，温育溶液 20 分钟，使试管离心，并用 ECL 分析用 ORIGEN 测定缓冲剂稀释了 5 倍的上清液等分试样。下面的表和图 33 中示出了结 15 果。

| 试管号 | [T - X100], ppm | 峰强度  | 蛋白质 - TAG 1 $\mu$ g/ml | [GF], ppm |
|-----|-----------------|------|------------------------|-----------|
| 19  | 1674            | 1611 | 2.65                   | 52        |
| 18  | 837             | 1634 | 2.65                   | 52        |
| 17  | 418             | 1697 | 2.65                   | 52        |
| 16  | 209             | 1583 | 2.65                   | 52        |
| 15  | 105             | 1772 | 2.65                   | 52        |
| 14  | 52              | 1463 | 2.65                   | 52        |
| 13  | 26              | 627  | 2.65                   | 52        |
| 12  | 13              | 23   | 2.65                   | 52        |

图 33 中示出通过在溶液中用衍生化的 TAG 1 标记的蛋白质的 ECL 强度对曲通 X - 100 的浓度作图所得到的曲线。较强的 ECL 信号对应于在上清液中更多的衍生化的 - TAG 1 标记的蛋白质，这又对应于更少的衍生化的 - TAG 1 标记的、与原纤维结合的蛋白质。范围从 10 ppm 到 100ppm 的曲通 X - 100 的浓度减弱了结合的程度，把所述浓度从 100ppm 增加

到 200ppm 并不进一步减弱结合的程度。

### 6. 26、采用原纤维垫电极的溶液中的自由 TAG 的 ECL

把如 6. 18 节的例子中所制备的原纤维垫安置在图 34 所示的“Fibril Cell”夹具的工作电极的电极夹 3401 的安装区域 3403 中。使电极夹 3401  
5 塞进电化学元件室 3400 底部。把 3M Ag/AgCl 参考电极 (Cyprus # EE008) 穿过参考元件的孔 3402 装入电化学元件室。上述元件填充有测定缓冲剂 (IGEN # 402 - 005 - 01 批号 # 5298)，并附着在 PMT 夹具 3404 上。用 EG & G PARC 175 型万能程序设计器和 EG & G 175 型  
10 稳压器/恒流器，使电位以在 100mV/秒对 Ag/AgCl 从 0 伏扫到 3 伏。用 Hamamatsu R5600U - 01 测量 ECL，用 Pacific Instruments 126 型光  
度计在 900V 给所述 Hamamatsu R5600U - 01 供电。通过由 HEM Snap  
- Master 驱动的 CIO - DAS - 1601 A/D 板在 10Hz 时使模拟数据数字化。  
15 排干 Fibril Cell，并用 1000 pM 的 TAG 1 (IGEN # 402 - 004 - C 批号 # 4297) 冲洗，且填充 1000 pM 的 TAG 1。就像用测定缓冲剂时那样扫过电位。图 35 中示出了对于测定缓冲剂 3501 和 1000 pM TAG1  
3502 的 ECL 记录线 (在 24.0 ± 0.2 °C 时测量)。校正过暗区的 ECL 峰区域对于测定缓冲剂为 22.10 nAs，而对于 1000 pM 的 TAG 1 为 46.40 nAs。

### 6. 27、用原纤维垫电极所吸收的被标记的抗体的 ECL

以 6. 18 节的例子中所述的方式从平的 CC 分散的原纤维制作厚度  
20 0.0035 英寸的原纤维垫。之后，弄干的垫被冲压成 3mm 的圆盘，并装到载体上。由 0.030 英寸的聚酯板制作用于这个实验中的载体，通过丝网印刷的导电金墨使所述聚酯板形成图案。导电金墨形成反电极、参考电极，并提供了用于工作电极和其它电极的引线。用含有双侧碳的导电带 (Aahesives Research) 把两个原纤维垫的圆盘装到每个成图案的载体  
25 上。安装后，用 0.5μl 的附着到去离子水中的衍生的 TAG 1 上的 10μg/ml 的抗 TSH 抗体 (Ru - TSH mono 1:2 26JUN95, IGEN 公司) 或 0.5μl 的在去离子水中的 10μg/ml 的抗 TSH 未用 TAG 1 标记的俘获抗体，给上述那些圆盘涂上班点，并使之干燥。干燥后，用 IGEN 测定缓冲剂充满上述那些垫。把载体上的充满了的那些垫放到以 IGEN Origin 1.5 为基础的仪器上，并用从 0 mV 到 4500 mV 的 500 mV/秒的扫描速率判读 ECL。图 43 比较来自含有 TAG 1 - 抗体垫 4301 和来自含有未用 TAG1

标记的俘获抗体垫 4302 的信号。

### 6.28、用于夹层测定的采用原纤维垫电极的 ECL

如上所述，把抗 AFP 俘获抗体固定在原纤维上。使抗 AFP 原纤维洗入去离子水 (DI)，并重新悬浮成密度为 1mg/ml。采用如 6.18 节的例子中所述的真空过滤生产四层原纤维垫。把 2mg 的抗 AFP 原纤维加到 3mg 的平滑的、CC 分散了的原纤维中，并使混合物在去离子水中稀释成 20ml 的总体积。在 0.45μm 的尼龙过滤物上过滤稀释了的混合物。之后，在这个初始的垫层后面还有两个芯层，每个芯层由 5mg 的平滑的、CC 分散了的原纤维组成。然后，用一个等同于上述初始层的混合了的原纤维层盖上所述垫芯。这导致这样一种原纤维垫，约 40% 的抗 AFP 原纤维在上表面和下表面，而约 100% 的平滑的原纤维在芯里。使这个混合而成的垫在真空中风干，并将这个混合而成的垫冲压成 3mm 的圆盘。然后，如 6.27 节的例子中所述，把这些圆盘装到载体上。干的、被承载的、抗 AFP 的垫用 AFP 校准物 A、C 和 F (IGEN 公司) 充满，并且在试验台顶上在室温被温育 15 分钟。温育后，所承载的电极用去离子水流冲洗 10 秒钟，之后，用无纤维屑的拭子吸干。然后，原纤维垫用附着到用衍生的 TAG 1 (IGEN 公司) 标记的抗体上的抗 AFP 抗体充满，并在试验台顶上在室温被温育 15 分钟。温育后，所承载的电极用去离子水冲洗，并用拭子弄干。之后，原纤维垫用 IGEN 测定缓冲剂充满，并如 6.27 节的例子中所述的那样被判读。

### 6.29、在聚丙烯酰胺表面上的 TAG 1 标记的抗生物素蛋白的 ECL 检测

用众所周知的条件 (用过硫酸铵和 TEMED 引发)，通过共聚合丙烯酰胺、双 - 丙烯酰胺和 N - 丙烯酰 - N' - 生物素基 - 3,6 - 二氧杂辛烷 - 1,9 - 二胺 (生物素通过三(乙二醇)接头物与丙烯酰胺部分连接)，制备含有共价结合的生物素的交联聚丙烯酰胺凝胶。在这个实验中，三种单体物质的浓度分别为 2.6M、0.065M 和 0.023M (报道过丙烯酰胺和双 - 丙烯酰胺的这些浓度会导致孔尺寸小于绝大多数蛋白质的凝胶)。在保持分开大约 0.7mm 的距离的两个玻璃板之间含有上述那些单体的溶液的聚合导致形成具有同样厚度的厚片凝胶。在完成聚合反应后，使凝胶在更换四次的 PBS 中浸湿，清洗掉未结合的生物素。通过使凝胶在含有处于 PBS 中的浓度为 50μg/mL 的蛋白质的溶液中浸湿 20 分

钟，使得用衍生的 TAG 1 标记的抗生物素蛋白（这里，抗生物素蛋白是指 NeutrAvidin，用于这个实验中的是设计用来展示还原了的 NSB 的一种改性抗生物素蛋白）结合到所述凝胶的表面。之后，通过使凝胶在更换四次的 ECL 测定缓冲剂（200mM 的磷酸钠、100mM 的三丙胺、  
5 0.02% ( w/v ) 吐温 20，pH 值 7.2）中浸湿，清洗掉过量的、TAG 1 标记的抗生物素蛋白。如图 39 所示，然后把凝胶（3900）放置得与在一个玻璃载体（3903）上成图案的金工作电极（3901）和反电极（3902）接触。使在两个电极之间的电压以 500mV/秒的速率从 0.0V 到 3.0V 呈直线上升并再回到 0.0V，这导致 ECL 光信号，从放在凝胶上面的一个 PMT（3904）测量该 ECL 光信号（图 40）。不包括含有丙烯酰胺衍生物的生物素而制备的凝胶没有 ECL 信号（图 41）。含有生物素的聚合物所得到的信号表明，几乎是一个完全的蛋白质的单层存在于凝胶的表面上。  
10

### 6.30、在聚丙烯酰胺表面上的 ECL 夹层免疫测定

15 如 6.29 节的例子中所述的那样制备含有共价结合的生物素的、交联聚丙烯酰胺凝胶。链霉抗生物素蛋白吸收到凝胶的表面上，以便形成能俘获生物素标记的物质。用一种溶液处理上述表面，这种溶液含有三丙胺、未知浓度的被分析物、抵抗所述被分析物的生物素标记的抗体以及抵抗所述被分析物的一种不同的 ECL TAG 1 标记的抗体。存在有上述被分析物导致形成一种被分析物和上述两种抗体的复合物，这两种抗体然后被俘获在链霉抗生物素蛋白表面上。如 6.29 节的例子中所述的那样测量与存在于上述表面上的次级抗体结合了的 ECL 标记物。  
20

### 6.31、在承载于电极上的聚丙烯酰胺表面上的多 ECL 夹层免疫测定

25 按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影的光刻胶底板制备成安置成阵列的圆形凹陷的图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10 : 1 的混合物倒到底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。所得到的弹性印记通过暴露于含有以羟基为末端的在乙醇中的硫醇  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{-OH}$  (1 至 10mM) 的溶液而被“涂墨”，并被使得与一个对准的金底片接触，而后被去除。用含有硫醇  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_3$  (在乙醇中 1 至 10mM) 的溶液清洗上述底片几秒钟。之后，所得到的表面用乙醇清洗并用氮气  
30

流干燥。用含有在二噁烷中的烯丙酰氯和三乙胺的溶液处理表面导致以羟基为末端的区域用丙烯酸基团官能化。之后，使含有丙烯酰胺、双丙烯酰胺、N-丙烯酰琥珀酰亚胺、偶氮-双-氟基戊酸以及有氨基的抗体的混合物的毛细管阵列与对准的表面接触，该对准的表面使毛细管与以丙烯酸为末端的一些区域对准，以便把含有特异性抗体的预聚物溶液放在每个区域处。上述毛细管阵列中的每个毛细管含有对所感兴趣的一种不同的被分析物特异性的抗体。使成图案的预聚物液滴暴露于紫外光照射，导致在上述底片上形成交联的凝胶，每块交联的凝胶在表面上给出一个结合区域。通过用一些被分析物的混合物处理上述底片进行测定，所述这些被分析物能在一种缓冲过的溶液中结合在存在于上述凝胶表面上的一个或多个结合区域处，这种缓冲过的溶液含有三丙胺和 ECL-TAG 1 标记的次级抗体。然后，用图 42A 至图 42B 所示，把结合区域（4200, 4201, 4202）（在处于金电极（4232）上的聚丙烯酰胺液滴（4203）上）放置得紧靠 ITO 工作电极（4204）。从上述那些结合区域的每一个所发射的光用 CCD 摄像机（4205）定量，并与用包含在样品溶液中的内部标准的结合区域比较。

#### 6.32、在承载于电极上的聚丙烯酰胺表面上的多 ECL 竞争性免疫测定

按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影了的光刻胶底板制备成安置成阵列的圆形凹陷的图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10:1 的混合物倒到底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。所得到的弹性印记通过暴露于含有以羟基为末端的在乙醇中的硫醇 HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH (1 至 10mM) 的溶液而被“涂墨”，并被使得与一个对准的金底片接触，而后被去除。用含有硫醇 HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>3</sub> (在乙醇中 1 至 10mM) 的溶液清洗上述底片几秒钟。之后，所得到的表面用乙醇清洗并用氮气流干燥。用含有在二噁烷中的烯丙酰氯和三乙胺的溶液处理表面导致以羟基为末端的区域用丙烯酸基团官能化。之后，使含有丙烯酰胺、双丙烯酰胺、N-丙烯酰琥珀酰亚胺、偶氮-双-氟基戊酸以及抗体混合物的毛细管阵列与对准的表面接触，这对准的表面使毛细管与以丙烯酸为末端的一些区域对准，以便把含有特异性抗体的预聚物溶液放在每个区域处。上述毛细管阵列中的那些毛细管含有对所感兴趣

的不同被分析物特异性的抗体。使成图案的预聚物液滴暴露于紫外光照射，导致在上述底片上形成交联的凝胶，每块交联的凝胶在表面上给出一个结合区域。通过用一些被分析物的混合物处理上述底片进行测定，所述这些被分析物能在一种缓冲过的溶液中结合在存在于上述凝胶表面上的一个或多个结合区域处，这种缓冲过的溶液含有三丙胺和 ECL - TAG 1 标记的上述被分析物的类似物（也就是说，确立 ECL - TAG 1 标记的和未标记的被分析物对于与上述那些结合区域结合的竞争）。然后，如图 42 所示，把结合区域（4200，4201 和 4202）（在处于金电极（4232）上的聚丙烯酰胺液滴（4203）上）放置得紧靠 ITO 工作电极（4204）。从上述那些结合区域的每一个所发射的光用一个 CCD 摄像机（4205）定量，并与用于包含在样品溶液中的内部标准样的结合区域比较。

### 6.33、用于结合在承载于电极上的聚丙烯酰胺表面上的细胞的多 ECL 测定

按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影了的光刻胶底板制备成安置成阵列的圆形凹陷的图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10 : 1 的混合物倒到底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。所得到的弹性印记通过暴露于含有以羟基为末端的在乙醇中的硫醇  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{-OH}$  (1 至 10mM) 的溶液而被“涂墨”，并被使得与一个对准的金底片接触，而后被去除。用含有硫醇  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_3$  (在乙醇中 1 至 10mM) 的溶液清洗上述底片几秒钟。之后，所得到的表面用乙醇清洗并用氮气流干燥。用含有在二噁烷中的烯丙酰氯和三乙胺的溶液处理表面导致以羟基为末端的区域用丙烯酸基团官能化。之后，使含有丙烯酰胺、双丙烯酰胺、N - 丙烯酰琥珀酰亚胺、偶氮 - 双 - 氰基戊酸、以及针对细胞表面的抗体的混合物的毛细管阵列与对准的表面接触，这对准的表面使毛细管与以丙烯酸为末端的一些区域对准，以便把预聚物溶液放在每个区域处。使成图案的预聚物液滴受到紫外光照射，导致在上述底片上形成交联的凝胶，每块交联的凝胶在表面上给出一个结合区域。通过首先用细胞的悬浮液处理结合区域，之后用一些结合试剂的混合物处理所述结合区域来进行测定，所述那些结合试剂能结合在一种缓

冲过的溶液中与凝胶表面结合的一种或多种细胞，所述这种缓冲过的溶液含有三丙胺和 ECL - TAG 1 标记的次级抗体和/或对被分析物特异性的其它结合试剂。然后，如图 42 所示，把结合区域（4200，4201，和 4202）（在处于金电极（4232）上的聚丙烯酰胺液滴（4203）上）放置得紧靠 ITO 工作电极（4204）。从上述那些结合区域的每一个所发射的光用一个 CCD 摄像机（4205）定量，并与从用于包含在样品溶液中的内部标准样的发射的光比较。

#### 6.34、用于将被分析物结合到在承载于电极上的聚丙烯酰胺表面上的细胞的多 ECL 测定

按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影了的光刻胶底板制备成安置成阵列的圆形凹陷的图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10:1 的混合物倒到底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。所得到的弹性印记通过暴露于含有以羟基为末端的在乙醇中的硫醇  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{-OH}$  (1 至 10mM) 的溶液而被“涂墨”，并被使得与一个对准的金底片接触，而后被去除。用含有硫醇  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_3$  (在乙醇中 1 至 10mM) 的溶液清洗上述底片几秒钟。之后，所得到的表面用乙醇清洗并用氮气流干燥。用含有在二𫫇烷中的烯丙酰氯和三乙胺的溶液处理表面导致以羟基为末端的区域用丙烯酸基团官能化。之后，使含有丙烯酰胺、双丙烯酰胺、N - 丙烯酰琥珀酰亚胺、偶氮 - 双 - 氯基戊酸以及细胞的混合物的毛细管阵列与对准的表面接触，这对准的表面使毛细管与以丙烯酸为末端的一些区域对准，以便把含有特异细胞类型的预聚物溶液放在每个区域处。使成图案的预聚物液滴受紫外光照射，导致在上述底片上形成交联的凝胶，每块交联的凝胶在表面上给出一个结合区域。通过用含有被分析物混合物的样品处理凝胶进行测定，所述这些被分析物能在一种缓冲过的溶液中结合到存在于上述凝胶表面上的一个或多个结合区域处，这种缓冲过的溶液含有三丙胺和 ECL - TAG 1 标记的抗体和/或对上述被分析物特异性的其它结合试剂。然后，如图 42 所示，把结合区域（4200，4201，和 4202）（在处于金电极（4232）上的聚丙烯酰胺液滴（4203）上）放置得紧靠 ITO 工作电极（4204）。从上述那些结合区域的每一个所发射的光用 CCD 摄像机（4205）定量，

并与从用于包含在样品溶液中的内部标准样的结合区域发射的光比较。

### 6.35、在承载于电极上的聚丙烯酰胺表面上的多 ECL 竞争性杂交测定

按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影了的光刻胶底板制备成安置成阵列的圆形凹陷的图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体

5 184 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10 : 1 的混合物倒到底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。所得到的弹性印

记通过暴露于含有以羟基为末端的在乙醇中的硫醇 HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH (1 至 10mM) 的溶液而被“涂墨”，并被使得与一个

对准的金底片接触，而后被去除。用含有硫醇 HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>3</sub> (在乙醇中 1 至 10mM) 的溶液清洗上述底片几秒钟。之后，所得到的表面用乙

10 醇清洗并用氮气流干燥。用含有在二噁烷中的烯丙酰氯和三乙胺的溶液处理表面导致以羟基为末端的区域用丙烯酸基团官能化。之后，使含有

丙烯酰胺、双丙烯酰胺、N - 丙烯酰琥珀酰亚胺、偶氮 - 双 - 氰基戊酸、以及用氨基官能化了的核酸探针的混合物的毛细管阵列与对准的表面接

15 触，这对准的表面使毛细管与以丙烯酸为末端的一些区域对准，以便把含有特异性探针的预聚物溶液放在每个区域处。上述毛细管阵列中的毛

细管含有对所感兴趣的核酸序列特异的探针。使成图案的预聚物液滴受到紫外光照射，导致在上述底片上形成交联的凝胶，每块交联的凝胶在表

20 面上给出一个结合区域。通过用样品混合物处理上述底片来进行测定，该样品混合物可含有能在一种缓冲过的溶液中结合在存在于上述凝

胶表面上的一个或多个结合区域处的一些序列，所述这种缓冲过的溶液含有三丙胺和可与用于结合到上述表面上的所感兴趣的被分析物竞争的

ECL - TAG 1 标记的一些序列。然后，如图 42 所示，把结合区域 (4200, 4201, 和 4202) (在处于金电极 (4232) 上的聚丙烯酰胺液滴 (4203) 上) 放置得紧靠 ITO 工作电极 (4204)。从上述那些结合区域的每一个所发射的光用 CCD 摄像机 (4205) 定量，并与从用于包含在样品溶液中的内部标准样的结合区域发射的光比较。

25 6.36、在承载于电极上的聚丙烯酰胺表面上的多 ECL 杂交夹层测定

按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影了的光刻胶底板制备成安置成阵列的圆形凹陷的图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体

184 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10 : 1 的混合物倒到底板上并固

化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。所得到的弹性印记通过暴露于含有以羟基为末端的在乙醇中的硫醇  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{-OH}$  (1 至 10mM) 的溶液而被“涂墨”，并被使得与一个对准的金底片接触，而后被去除。用含有硫醇  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_3$  (在乙醇中 1 至 10mM) 的溶液清洗上述底片几秒钟。之后，所得到的表面用乙醇清洗并用氮气流干燥。用含有在二恶烷中的烯丙酰氯和三乙胺的溶液处理表面导致以羟基为末端的区域用丙烯酸基团官能化。之后，使含有丙烯酰胺、双丙烯酰胺、N - 丙烯酰琥珀酰亚胺、偶氮 - 双 - 氟基戊酸以及用氨基官能化的核酸探针的混合物的毛细管阵列与对准的表面接触，这对准的表面使毛细管与以丙烯酸为末端的一些区域对准，以便把含有特异性探针的预聚物溶液放在每个区域处。上述毛细管阵列的毛细管含有对所感兴趣的核酸序列特异的探针。使成图案的预聚物液滴受到紫外光照射，导致在上述底片上形成交联的凝胶，每块交联的凝胶在表面上给出一个结合区域。通过用样品混合物处理上述底片来进行测定，该样品混合物可含有能在一种缓冲过的溶液中结合在存在于上述凝胶表面上的一个或多个结合区域的一些序列，所述这种缓冲过的溶液含有三丙胺以及一些 ECL - TAG 1 标记的序列，这些 ECL - TAG 1 标记的序列可结合在一些序列处的被分析物，这些序列并不互补于结合于表面的那些探针。然后，如图 22 所示，把结合区域 (4200, 4201, 和 4202) (在处于金电极 (4232) 上的聚丙烯酰胺液滴 (4203) 上) 放置得紧靠 ITO 工作电极 (4204)。从上述那些结合区域的每一个所发射的光用 CCD 摄像机 (4205) 定量，并与从用于包含在样品溶液中的内部标准样的结合区域发射的光比较。

#### 6.37、在承载于电极上的聚丙烯酰胺表面上的不同类型的多种测定

按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影了的光刻胶底板制备成安置成阵列的圆形凹陷的图案。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 和相应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10 : 1 的混合物倒到底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。所得到的弹性印记通过暴露于含有以羟基为末端的在乙醇中的硫醇  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{-OH}$  (1 至 10mM) 的溶液而被“涂墨”，并被使得与一个对准的金底片接触，而后被去除。用含有硫醇  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_3$  (在乙醇

中 1 至 10mM ) 的溶液清洗上述底片几秒钟。之后，所得到的表面用乙醇清洗并用氮气流干燥。用含有在二噁烷中的烯丙酰氯和三乙胺的溶液处理表面导致以羟基为末端的区域用丙烯酸基团官能化。之后，使含有丙烯酰胺、双丙烯酰胺、 N - 丙烯酰琥珀酰亚胺、偶氮 - 双 - 氧基戊酸、  
5 以及在 6.31 节至 6.36 节的那些例子中所述的任何结合试剂的混合物的毛细管阵列与对准的表面接触，这对准的表面使毛细管与以丙烯酸为末端的一些区域对准，以便把含有特异性探针的预聚物溶液放在每个区域处。上述毛细管阵列的每个毛细管含有对所感兴趣的被分析物特异的一些结合区域。使成图案的预聚物液滴受到紫外光照射，导致在上述底片  
10 上形成交联的凝胶，每块交联的凝胶在表面上给出一个结合区域。通过用样品混合物处理上述底片来进行测定，该样品混合物可含有能在一种缓冲过的溶液中结合在存在于上述凝胶表面上的一个或多个结合区域处的被分析物，所述这种缓冲过的溶液含有三丙胺以及与用于结合到上述结合区域的被分析物竞争的 ECL - TAG 1 标记的被分析物的类似物和/  
15 或对于所感兴趣的被分析物的 ECL - TAG 1 标记的辅助的结合试剂。然后，如图 22 所示，把结合区域（ 4200 ， 4201 ，和 4202 ）（在处于金电极（ 4232 ）上的聚烯酰胺液滴（ 4203 ）上）放置得紧靠 ITO 工作电极（ 4204 ）。从上述那些结合区域的每一个所发射的光用 CCD 摄像机（ 4205 ）定量，并与从用于包含在样品溶液中的内部标准样的结合区域  
20 发射的光比较。

### 6.38. 高度可逆的 ECL

用  $0.5\mu\text{m}$  和  $0.03\mu\text{m}$  的刚玉软膏用手顺序抛光，随后通过用 1 : 3 的  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  化学刻蚀以及在  $\text{H}_2\text{SO}_4$  的稀释液中在对于  $\text{Ag}/\text{AgCl} - 0.2\text{V}$  和  $1.7\text{V}$  之间的电化学循环，来清洁多晶金电极（由 Bio - Analytical Services 可得到，  $2\text{mm}^2$  ）。之后，使清洁的电极浸没在溶解在乙醇中的辛基硫醇（  $\text{C}_8\text{SH}$  ）的稀释溶液中过夜。通过用  $20\mu\text{l}$  溶解在磷酸盐缓冲盐水（ PBS ，  $0.15\text{M}$   $\text{NaCl}/0.1\text{M}$   $\text{NaPi}$  ， pH 值 7.2 ）中的 TAG 1 标记的牛血清蛋白质（ BSA ）覆盖  $\text{C}_8\text{SH}$  改性的电极，并在温育 10 分钟后用同样的缓冲剂彻底清洗表面，进行蛋白质的吸收。  
25

在具有  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  参考电极、白金线反电极、和 EG & G 283 稳压器的三电极的元件中进行 ECL 。用放在电化学元件的底部处的 Pacific Instruments 的光度计和 Hamamatsu 光电倍增管测量光强。使吸附了蛋白  
30

质的电极浸没在 0.1M 的 TPA 和 0.2M 的磷酸盐、 pH 值为 7.2 的溶液中。如图 44A 所示，当电位在 0.0V 和 1.2V 之间周期性变化时，观察到高度可逆的 ECL 响应（基本上类似于向前和向后扫描的强度，这表明了 ECL 过程的可逆性和在电极上的硫醇和蛋白质层的稳定性。

5 在与用于 ECL 相同的仪器上进行周期性的伏安测量实验，但不用 PMT 和光度计。在此实验中，把一个 C<sub>8</sub>SH 覆盖的电极（无蛋白质）放在 1mM 的铁氟化钾（在 PBS 中）的溶液中，并从 +0.5V 到 1.2V 来回扫过所述电极，随后接着另一个在 +0.5V 和 -0.3V 之间的循环。结果表明单层仍就是未受触动，并且在 1.2V 时不吸收，这是由于在 +0.5V 和 -0.3V 10 之间的伏安记录中只有电容性电流而没有铁氟化物的感应电流（图 44B）。

### 6.39、准可逆的 ECL

如上述同样的方式进行电极改性和蛋白质吸收。在 ECL 实验中，电位在 0.0V 和 1.5V 之间扫描，并记录相应的光强。如图 45A 所示，在同一周期的向前和向后的扫描之间有一些 ECL 的损失，在不同的两个周期之间也有一些 ECL 的损失。在 1.5V 时氧化后，在铁氟化物中的硫醇/金的周期性伏安记录表明了显著的感应电流的量，这表明在 1.5V 时硫醇单层的至少是局部的吸收（图 45B）。

### 6.40、不可逆的 ECL

20 在这些实验中，以和 6.38 节的例子中相同的方式进行电极改性和蛋白质吸收。为测量 ECL，使电位从头到尾扫描一直到 2.0V 并返回到 0.0V。对向前的扫描观察到强光（比在 6.38 节的例子中的可逆情况下观察到更多的光），但如图 46A 所示，它降落到逆向扫描的背景上。在 2.0V 时氧化后，在铁氟化物中的改性的电极的周期性的伏安记录表明绝大多数的硫醇单层解除吸附。

### 6.41、利用固定在成图案的金电极上的初级抗体的 ECL 夹层免疫测定

在这个例子中，把对衰竭特异性抗原（PSA）的抗体固定在成图案的金电极上，用于对 PSA 的免疫测定。

30 按照众所周知的方法把 1 微米至 2 微米厚的已曝光且显影了的光刻胶底板制备成在一个硅载体上的一层光刻胶，这个硅载体具有一个去除了光刻胶的、 1mm × 1mm 的补片。把 SYLGARD 硅酮弹性体 184 和相

应的 SYLGARD 184 的固化剂的 10 : 1 的混合物倒到底板上并固化。小心地从硅底板上去除聚合了的 SYLGARD 184。所得到的弹性“印记”通过使其暴露于含有在乙醇中的、以羟基为末端的  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{-OH}$  和以次氨基三乙酸 (NTA) 为末端的硫醇  $\text{HS-(CH}_2\text{)}_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OC(O)NH(CH}_2\text{)}_4\text{CH(CO}_2\text{H)N(CH}_2\text{CO}_2\text{H)}_2$  的溶液而被“涂墨”。使“涂墨的”5 印记接触金底片并被去除，以便形成  $1\text{mm} \times 1\text{mm}$  的 SAM。用只含有在乙醇中的以羟基为末端的硫醇的溶液清洗上述底片几秒钟，以防止蛋白质与在带有印记的特征外边的区域非特异性地结合。之后，用乙醇清洗所得到的表面并用氮气流干燥。用  $\text{NiCl}_2$  的溶液处理上述表面，随后再用10 含有给出抗 PSA 老鼠单克隆和肽  $(\text{His})_6$  的结合部位的融合蛋白标记物的溶液处理该表面，这导致上述融合蛋白标记物以一种可控制的方式固定在所述表面上。这个过程产生了可再现的和预定量的固定在上述表面上的蛋白质。通过把  $(\text{His})_6$  序列定位在上述融合蛋白标记物的原始结构上，控制蛋白质在所述表面上的取向。通过以 NEA 为末端的硫醇与在带有15 印记的 SAM 中的以羟基为末端的硫醇的比例，并通过带有印记的特征的表面积，控制固定了的蛋白质的绝对量。通过制备含有在血清中的已知浓度的 PSA (浓度范围为  $1\text{fM}$  到  $1\mu\text{M}$ ) 的溶液，确定对于 PSA 的校准曲线。如上所述制备的大量的表面用 PSA 校准标准样处理，然后用含有最佳浓度的抗 PSA (用标记物 1 的衍生物标记的) 次级抗体的溶液处20 理。通过使上述那些表面浸没在含有  $0.1\text{M}$  的 TPA 和  $0.2\text{M}$  的磷酸盐的溶液 ( $\text{pH}$  值为 7.2) 中，并当在金表面处的电位在  $0.0\text{V}$  和  $2.0\text{V}$  之间以  $0.5\text{V}/\text{秒}$  的扫描速率周期性变化时测量所发射的光的峰值强度，这样来确定校准曲线。用同样的步骤，只是通过参考上述校准曲线从峰值 ECL 信号来计算 PSA 的浓度，进行确定样品中的血清里的未知浓度的 PSA 的工作。25

## 7、结合参考文献

本发明并不限定于此处所述的那些特定的实施例所确定的范围。的确，由上述说明和附图，除了此处所述的那些改进之外的本发明的各种改进对本领域普通技术人员来说会变得显而易见。打算使这样的一些改进处于权利要求书的范围内。此处所引用的各种出版物所公开的内容整30 个作为参考而被引用。

## 说 明 书 附 图

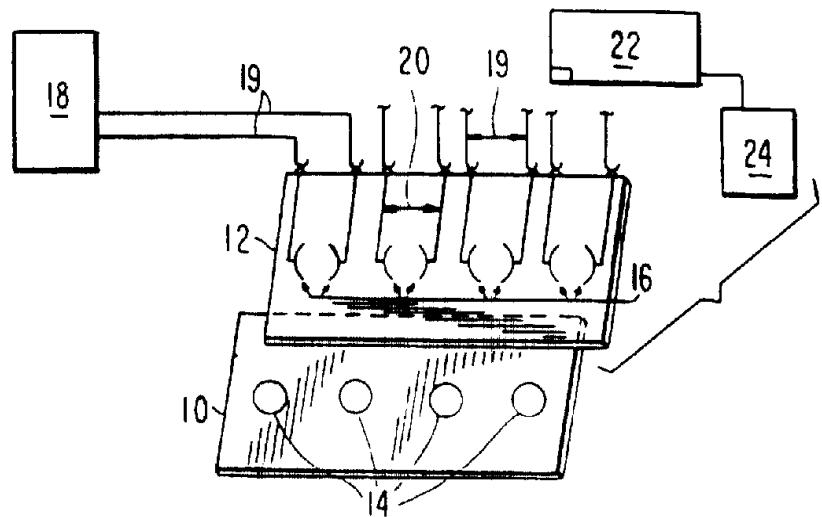


图 1

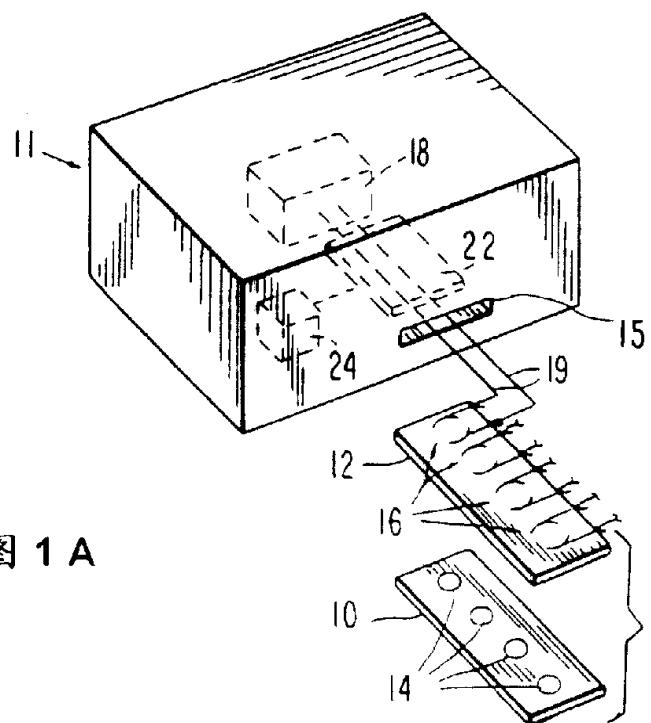


图 1A

图 2

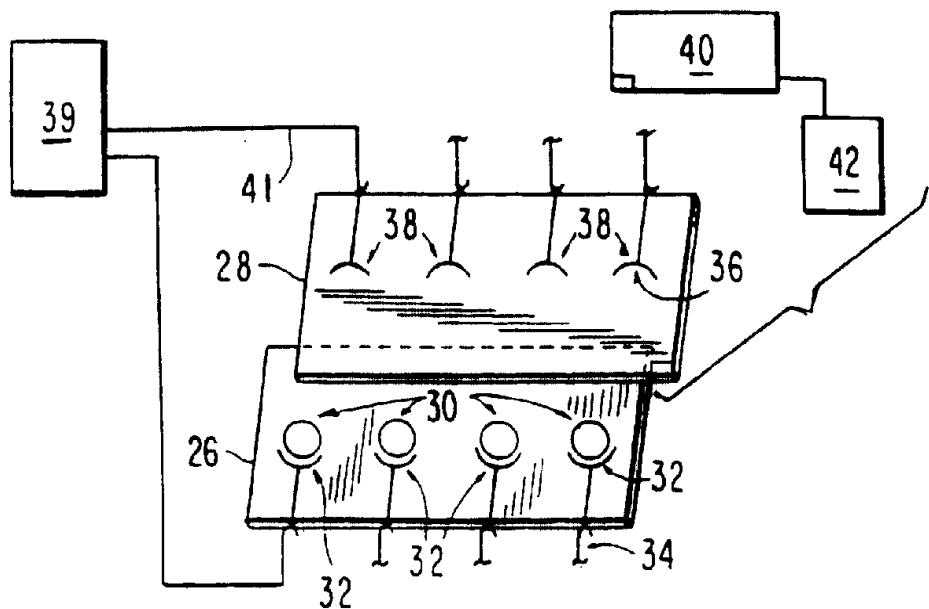


图 3

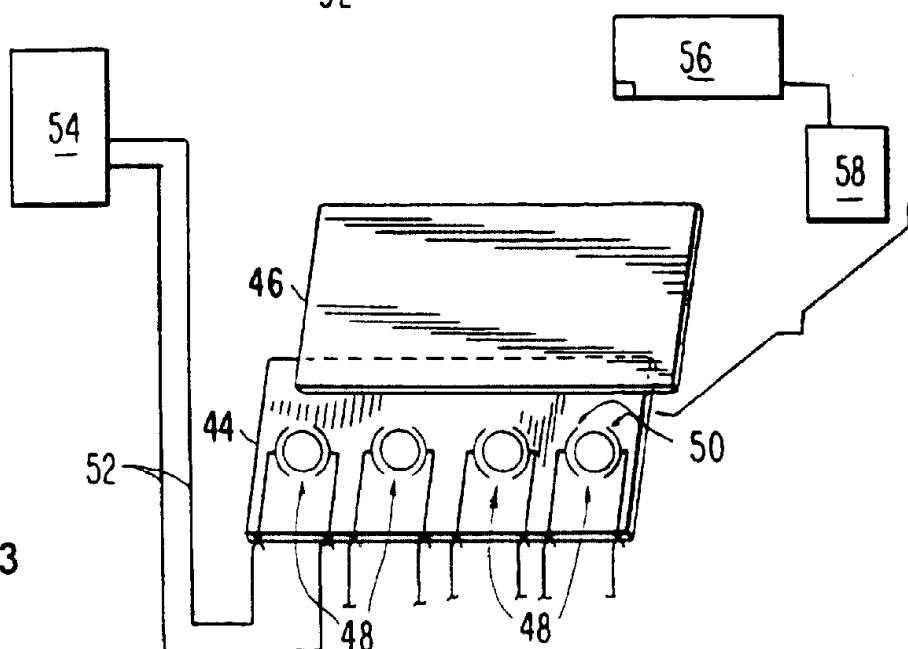
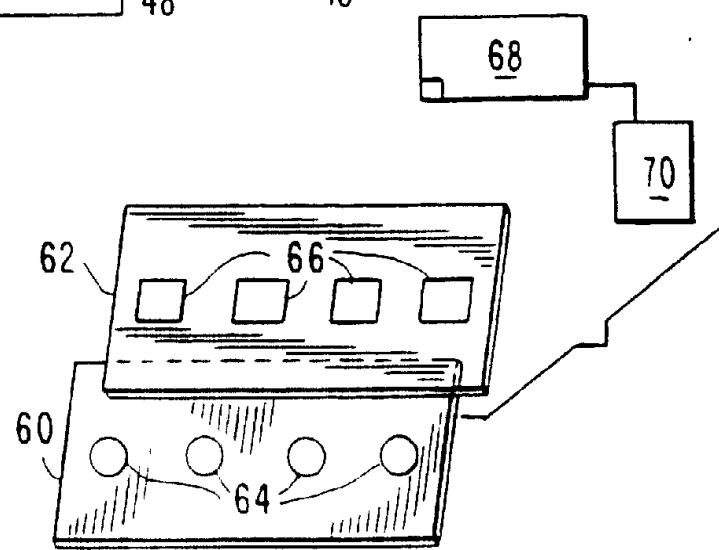


图 4



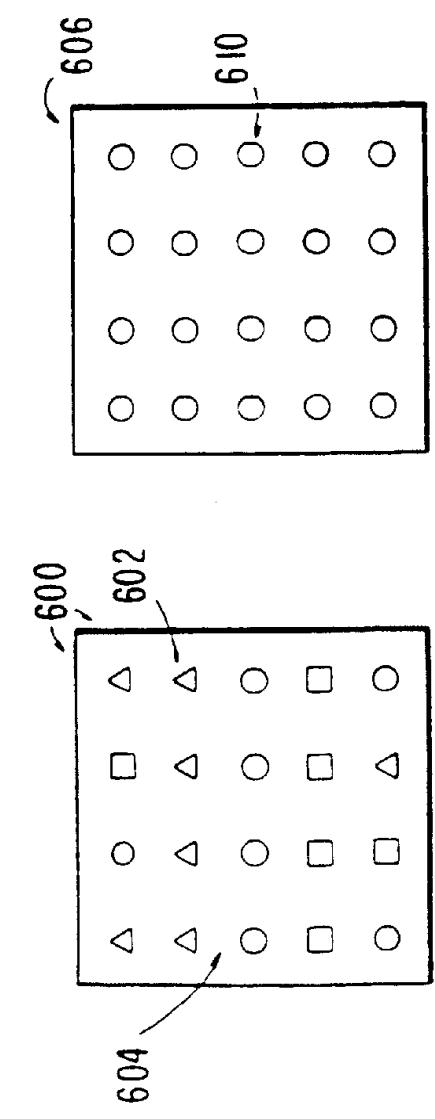


图 5 A

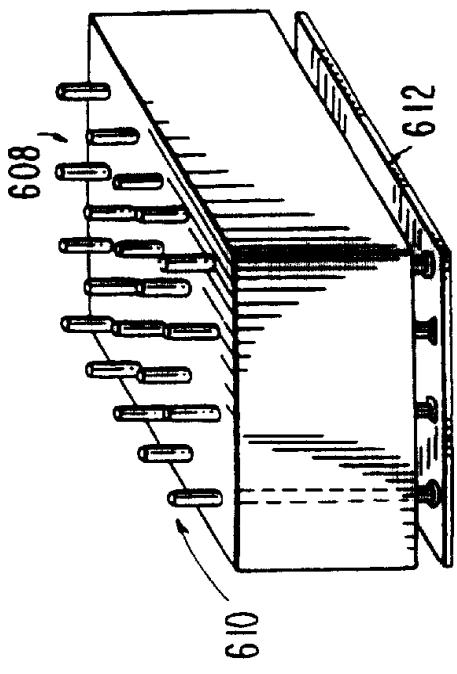
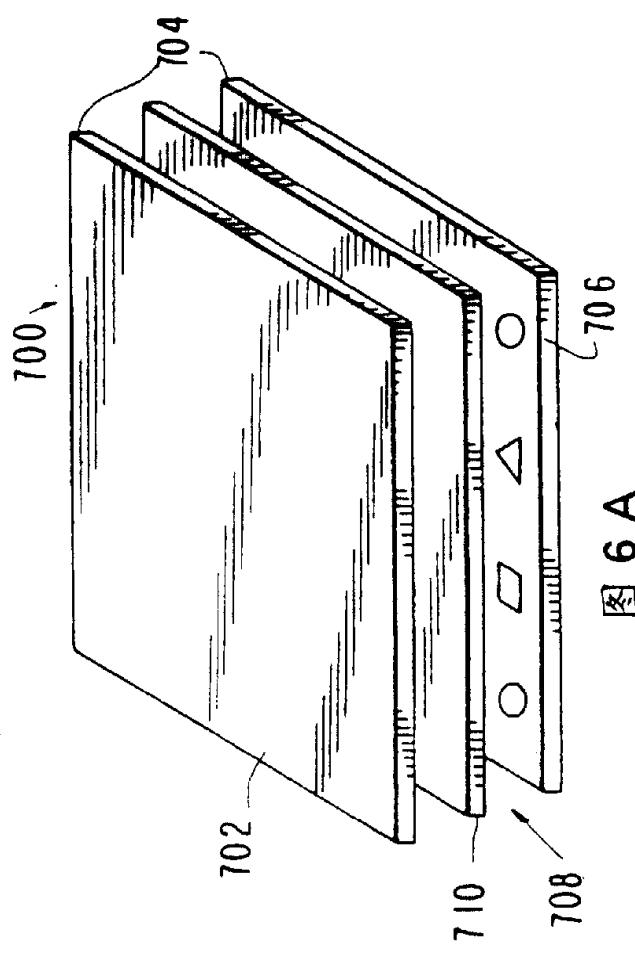


图 5 B



31

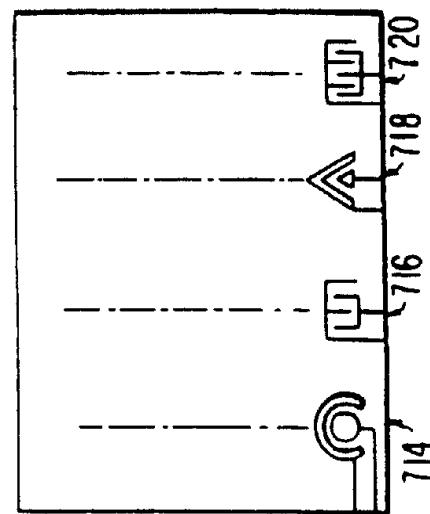


图 6 A



图 6 B

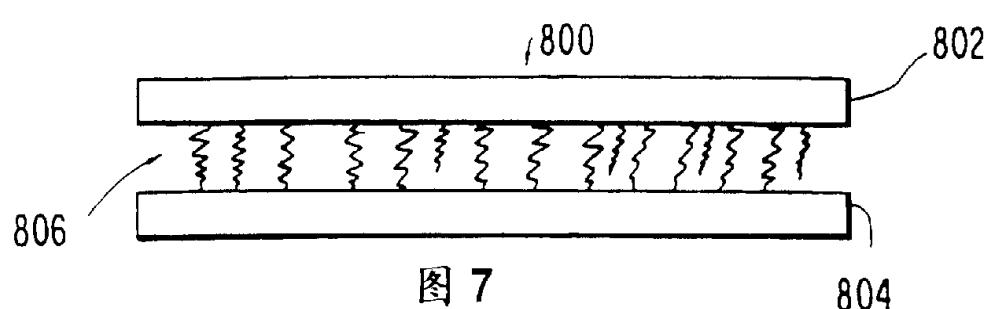


图 7

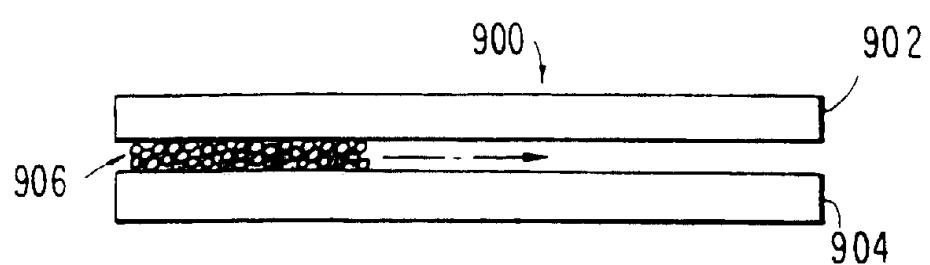


图 8

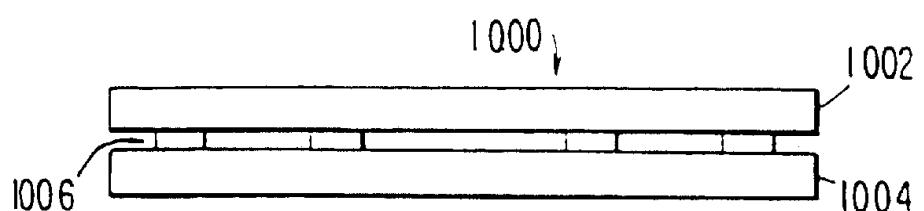


图 9

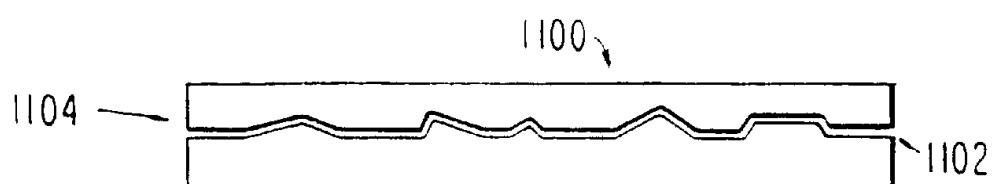


图 10

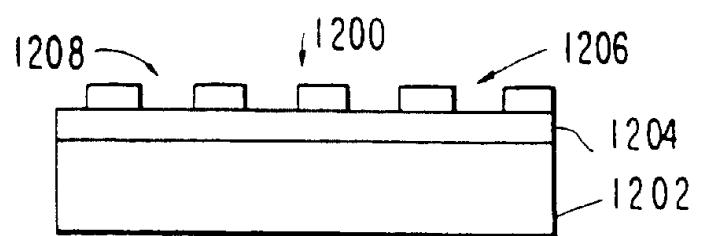


图 11

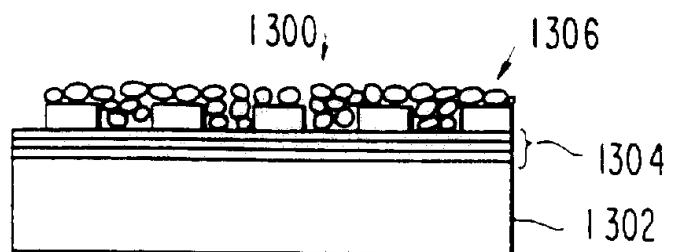


图 12

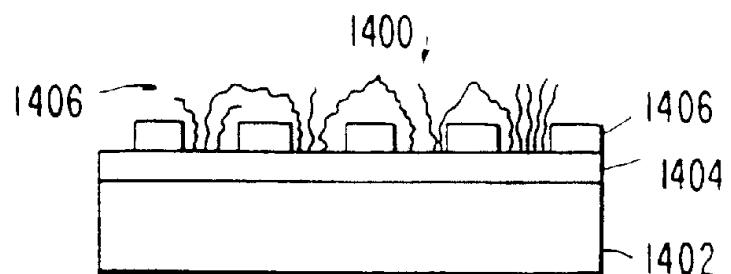


图 13

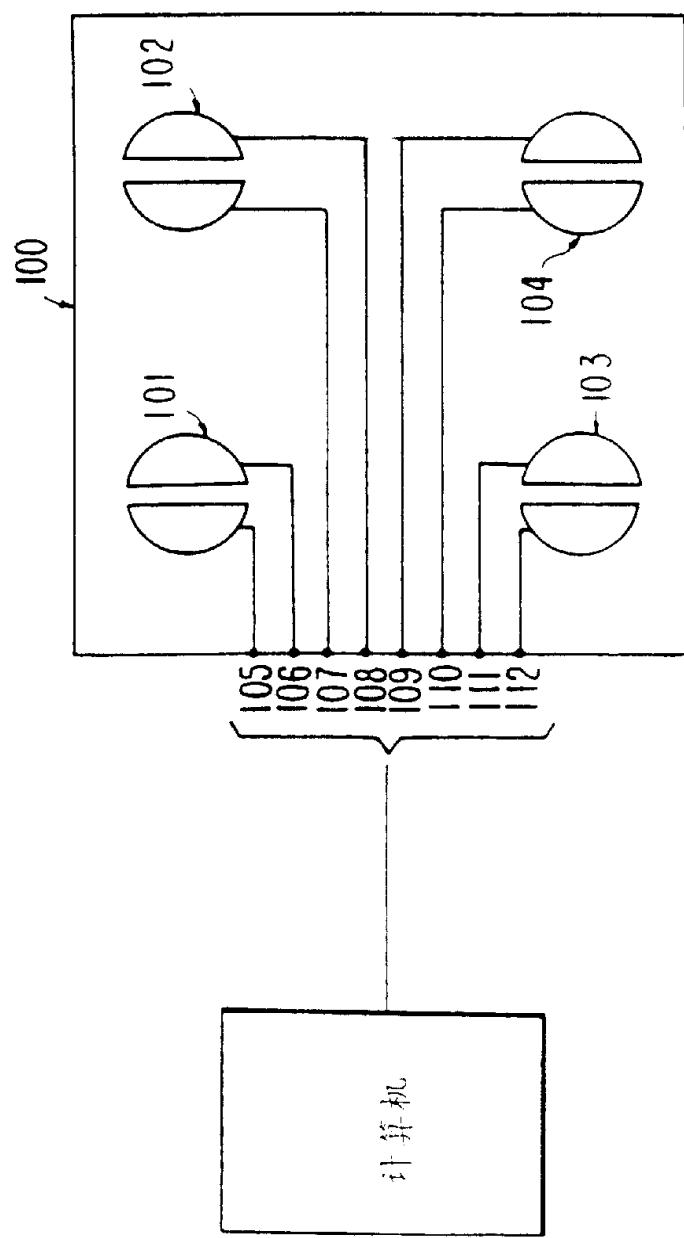
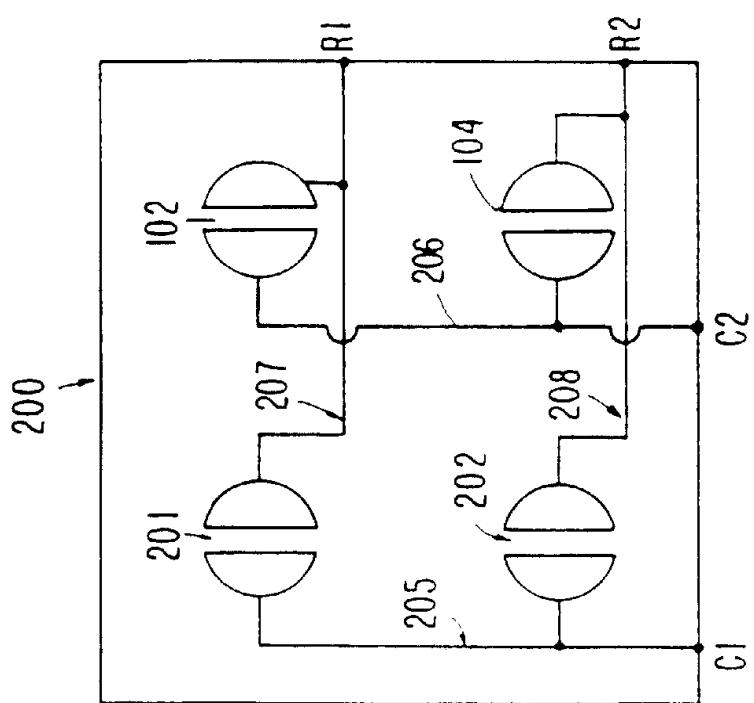


图 14

图 15



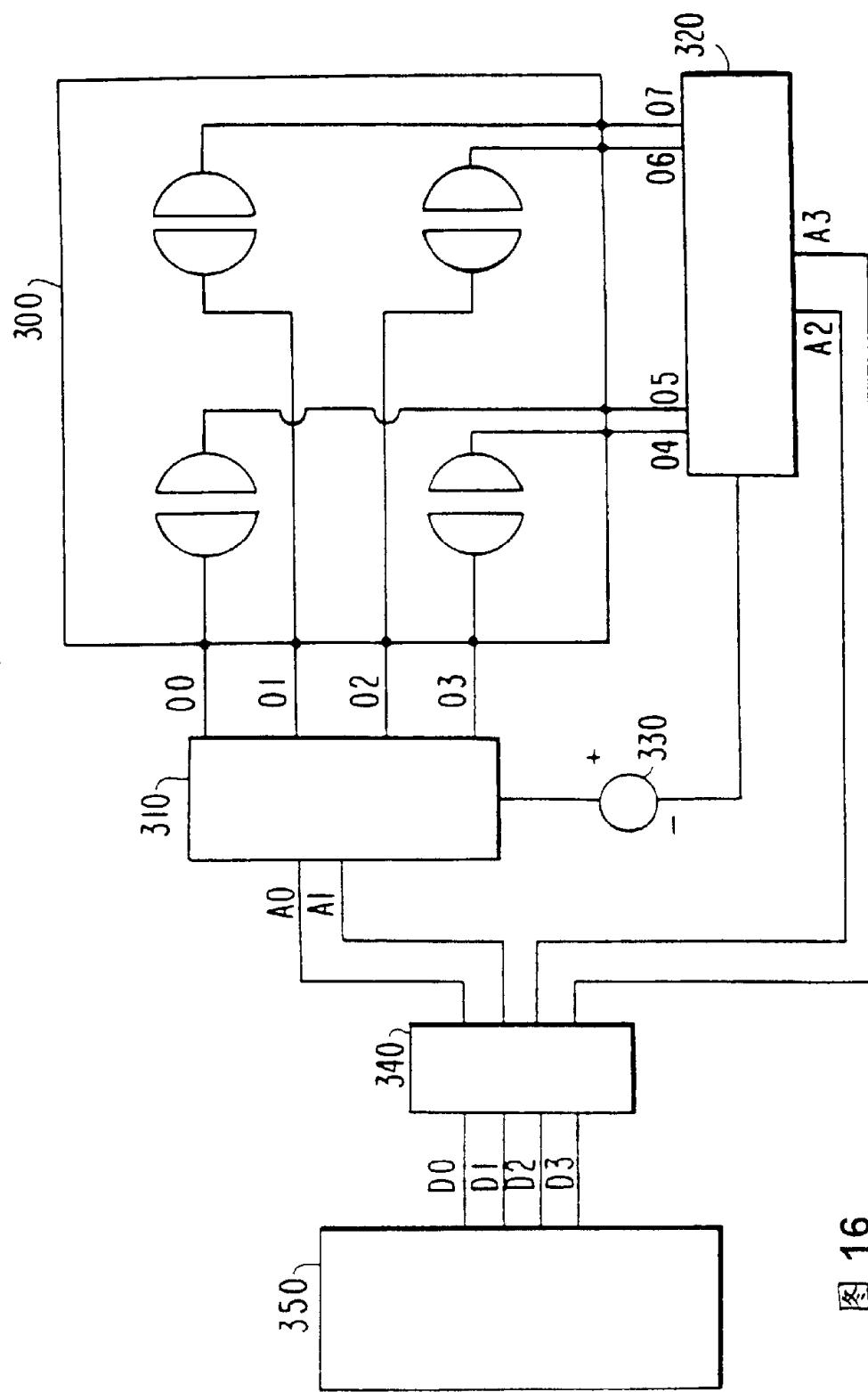


图 16

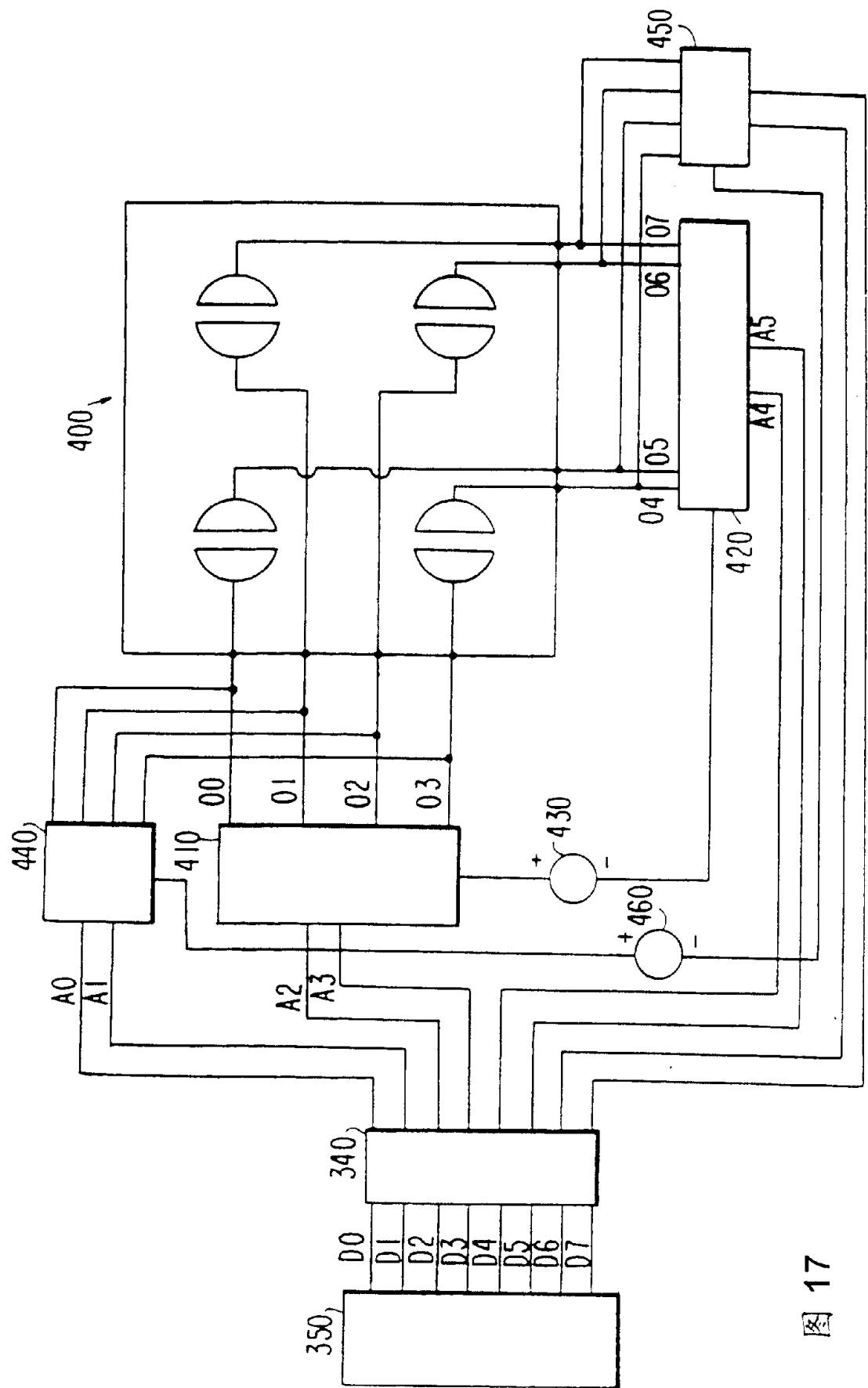


图 17

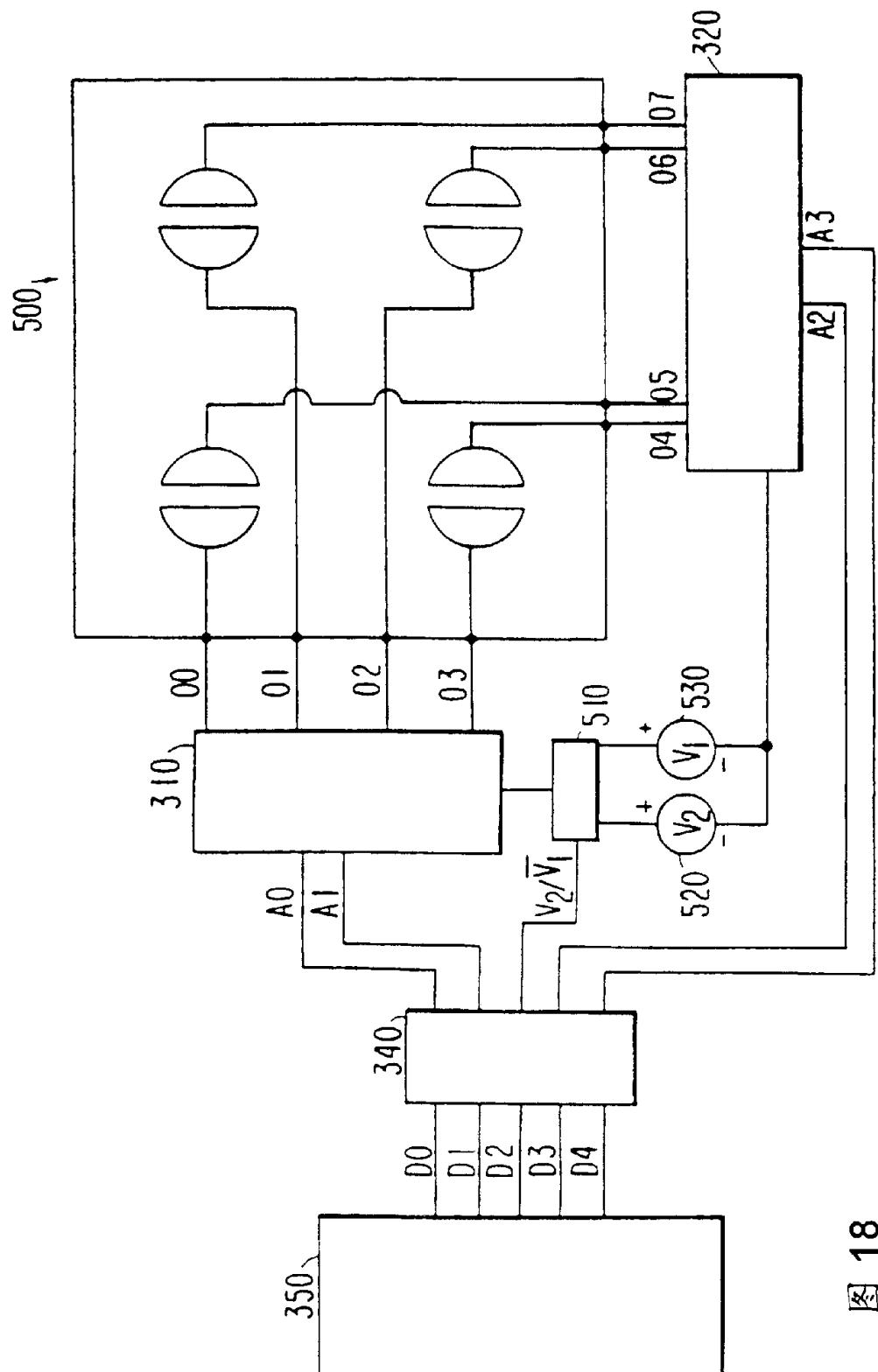


图 18



图 19 a



图 19 b



图 19 c



图 19 d

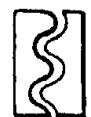


图 19 e

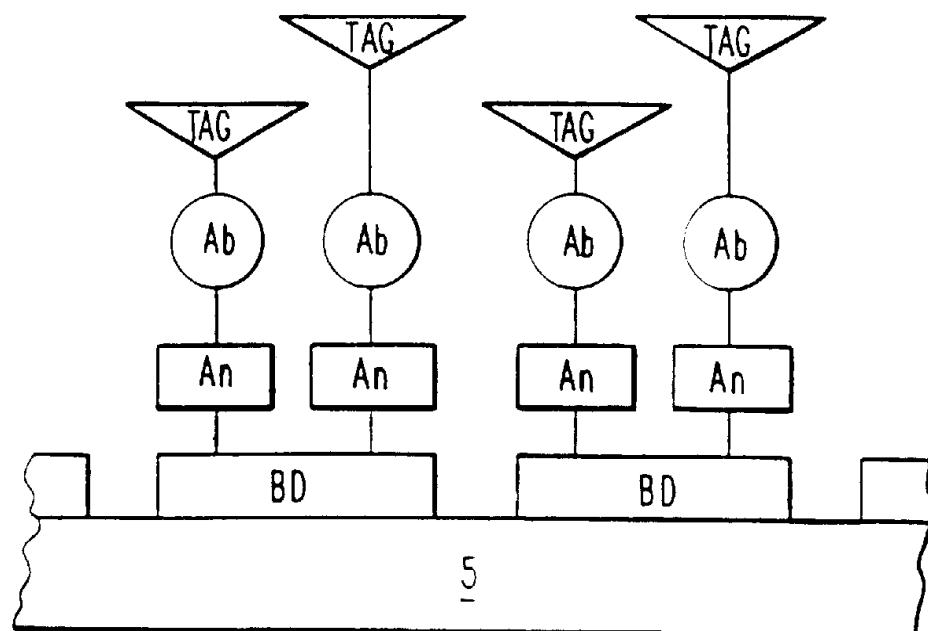


图 20

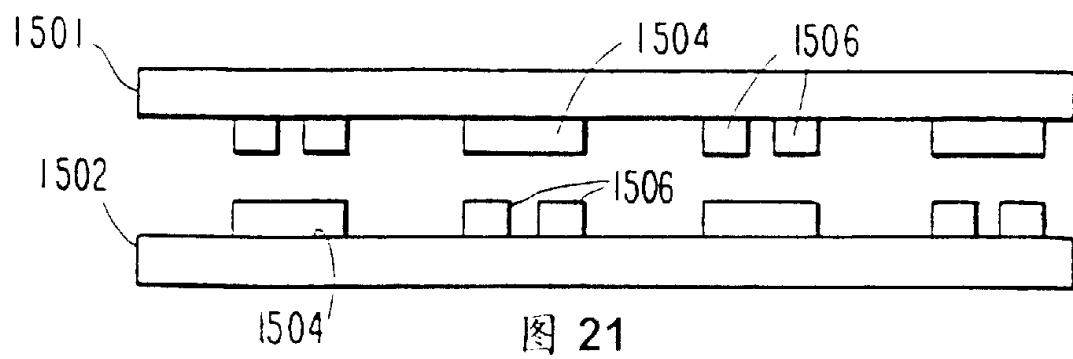


图 21

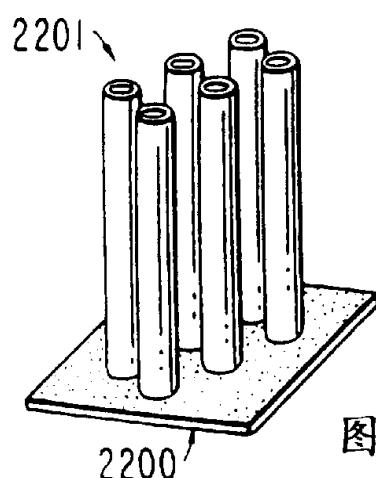


图 22 A

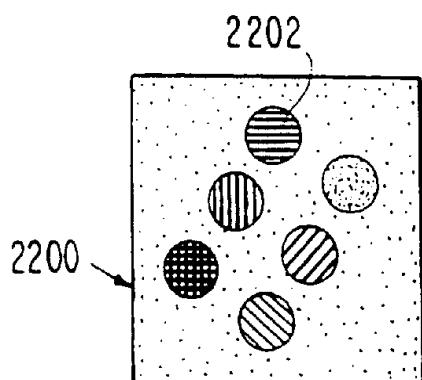


图 22 B

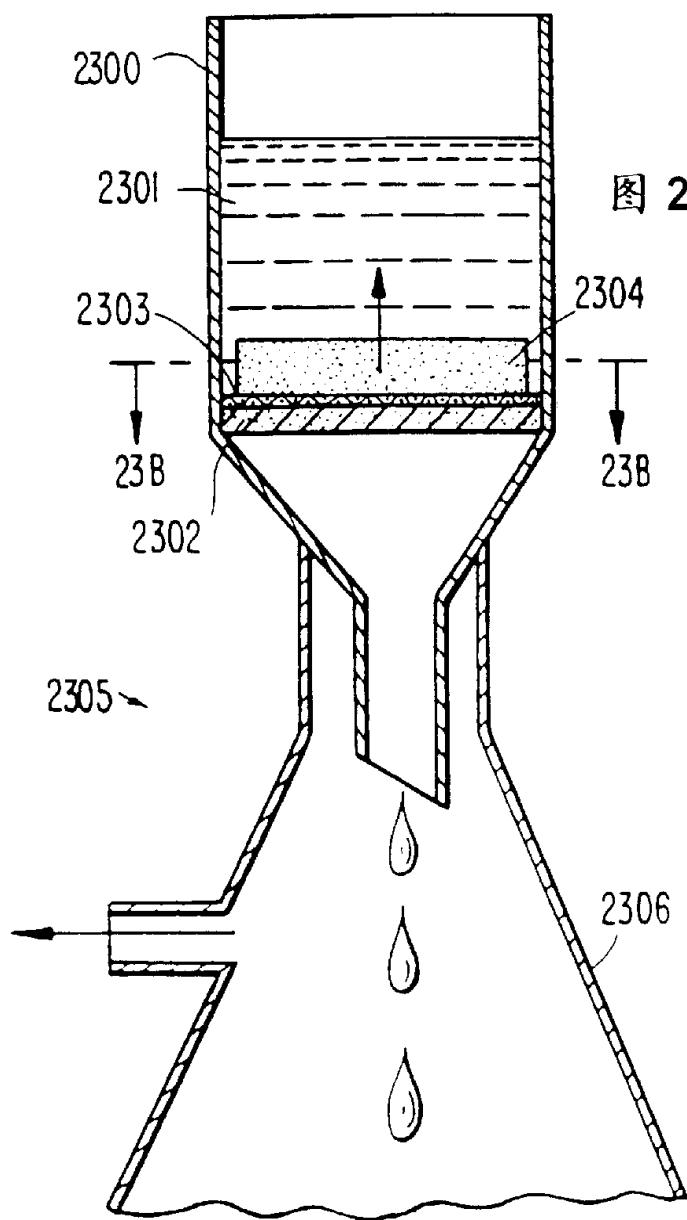


图 23 A

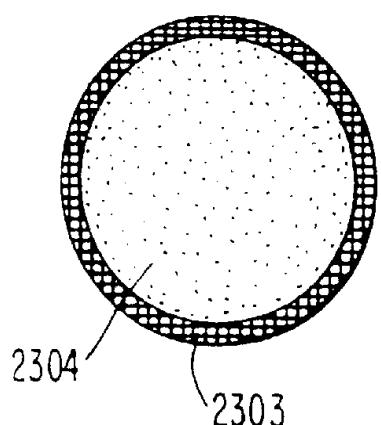


图 23 B

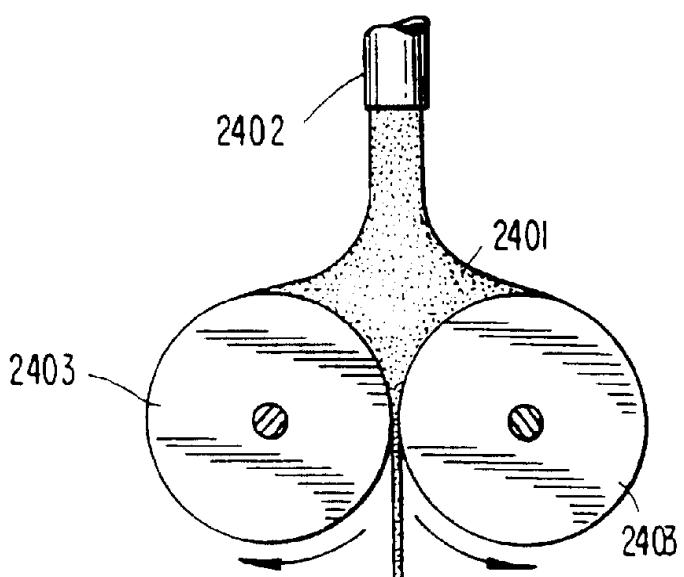


图 24

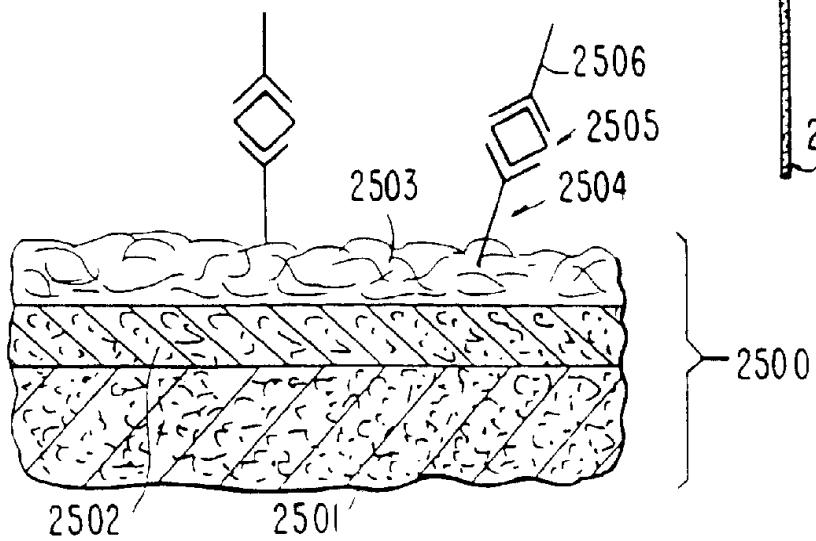


图 25

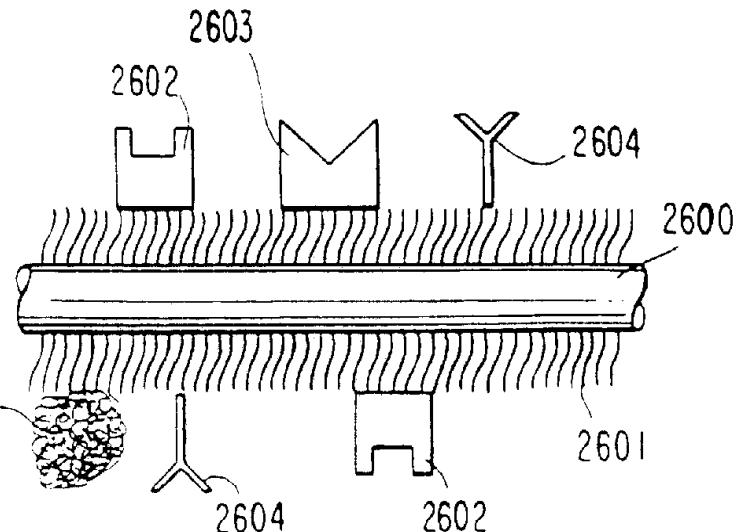
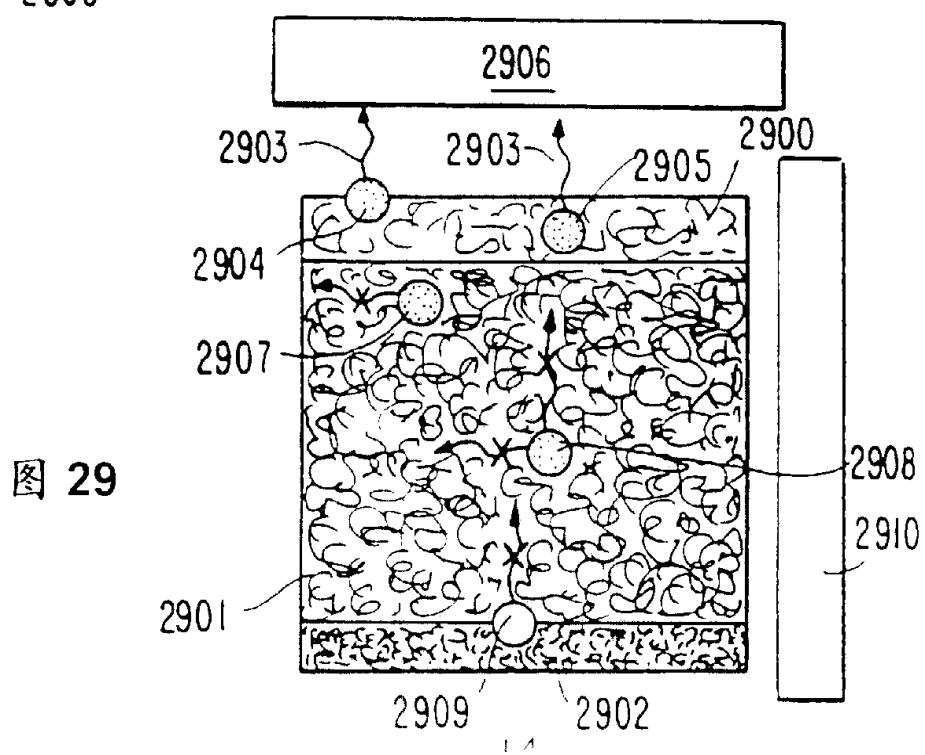
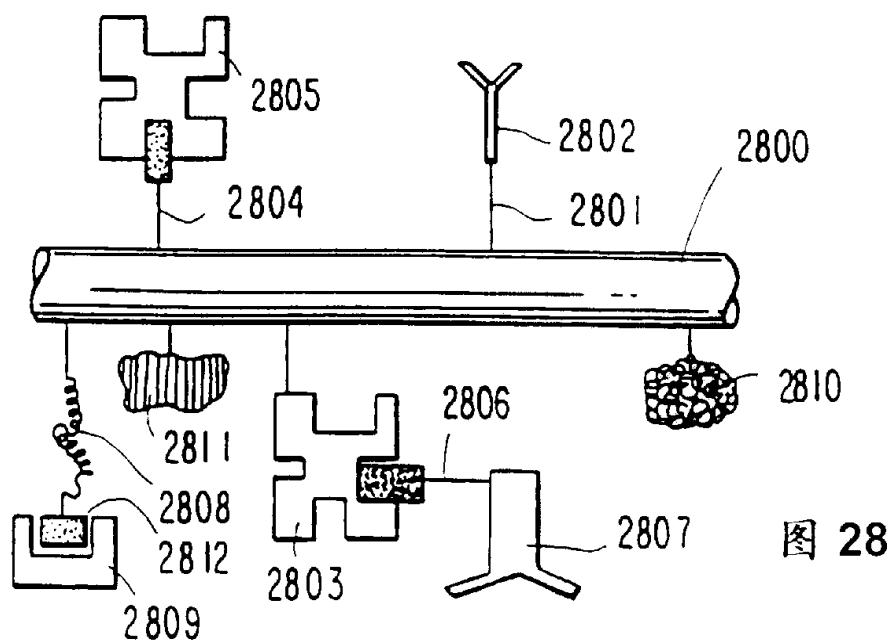
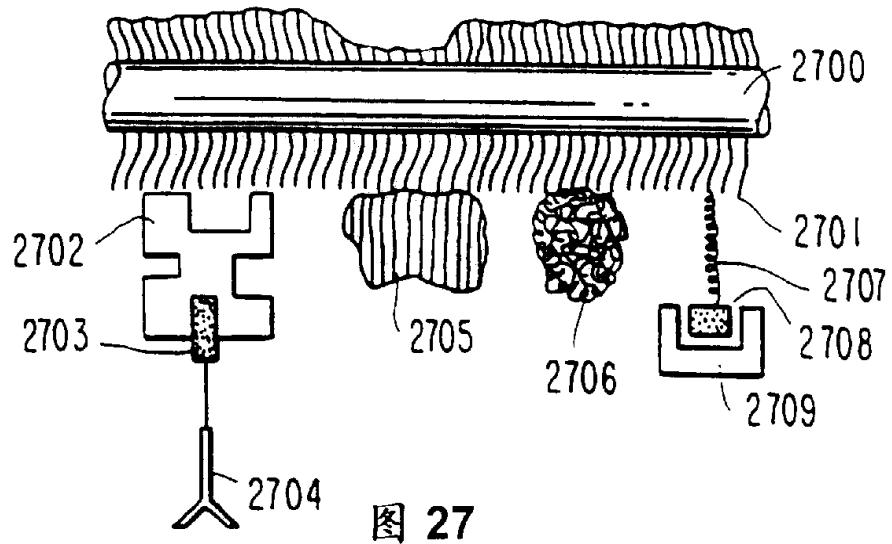
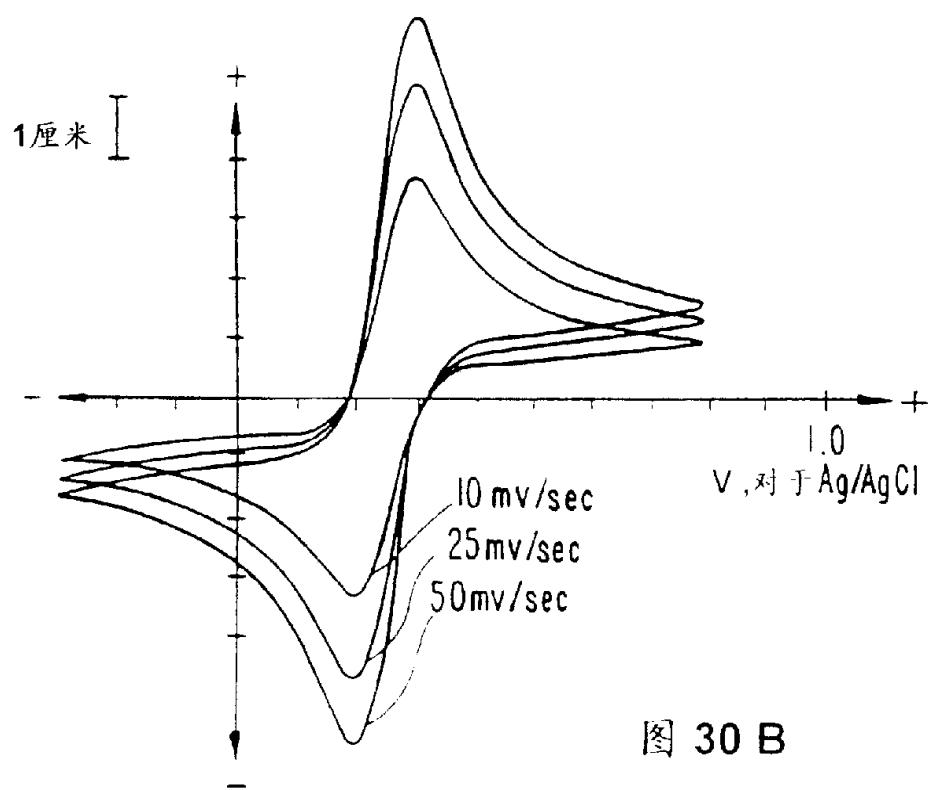
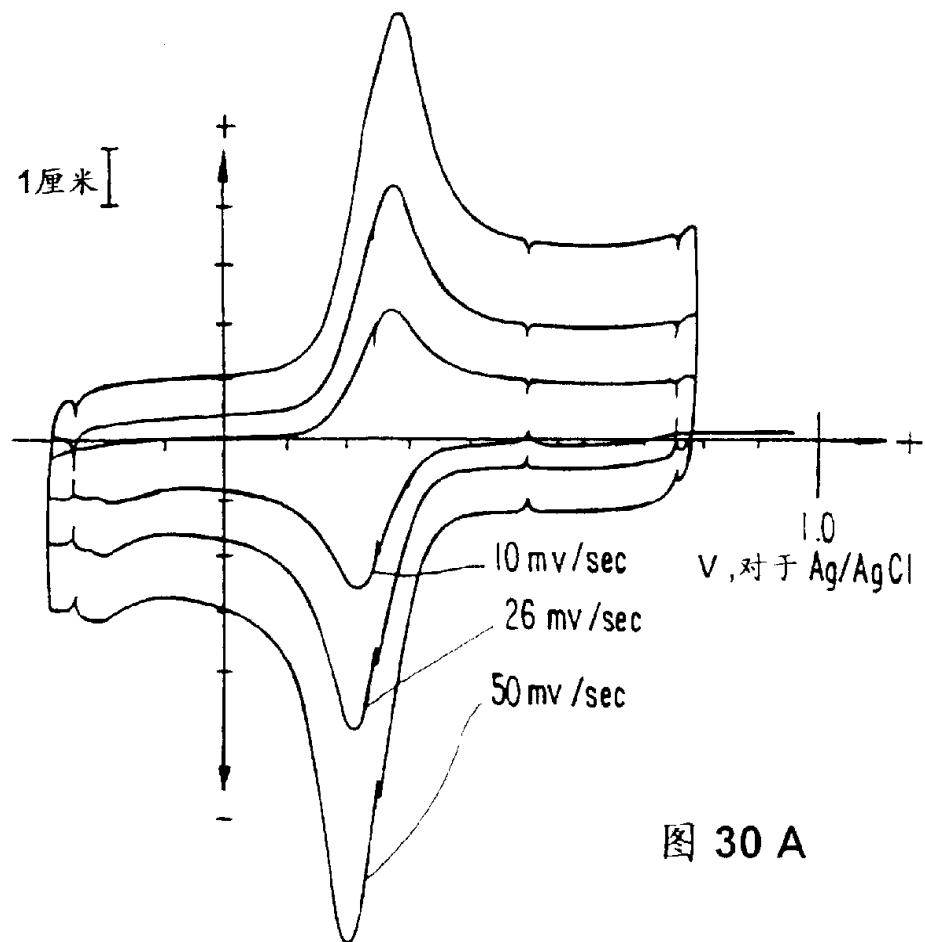


图 26





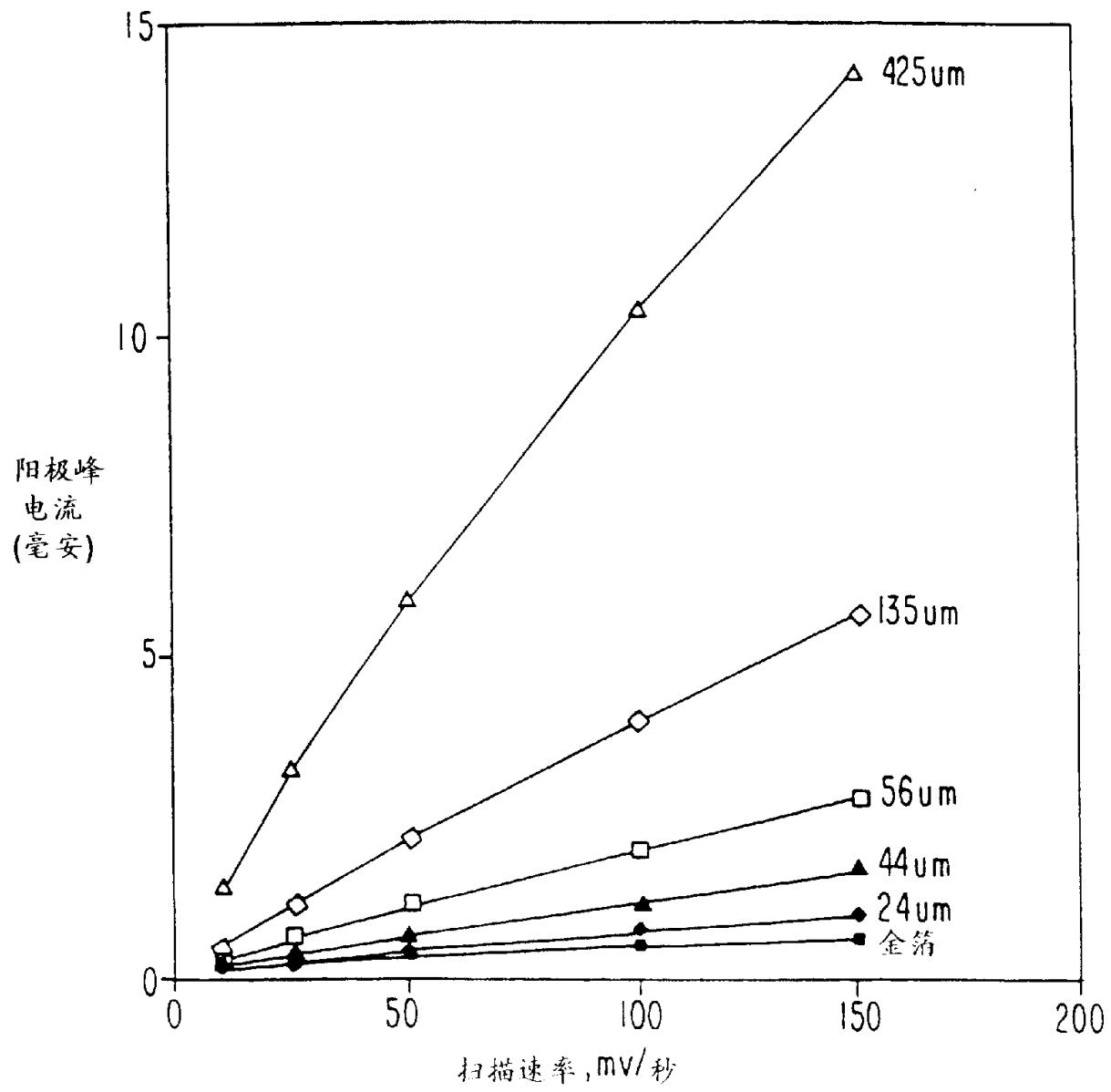


图 31

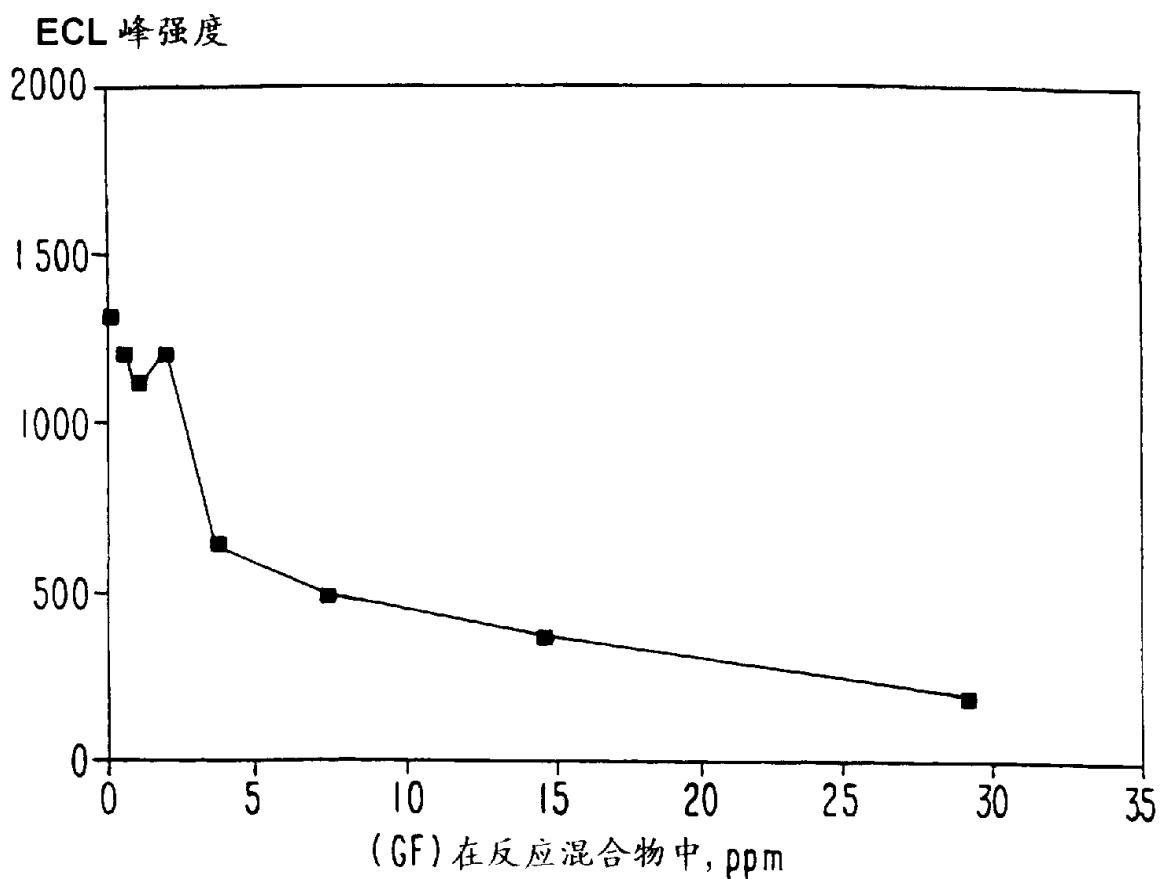


图 32

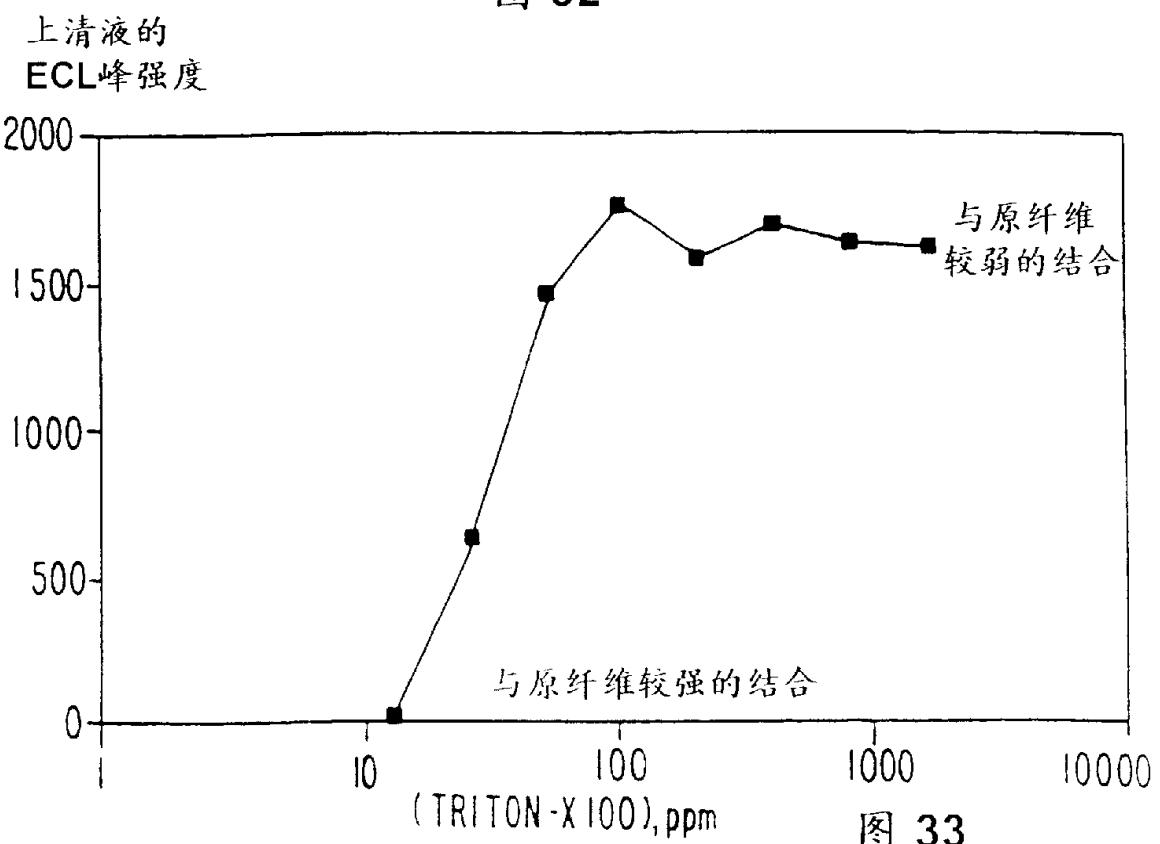


图 33

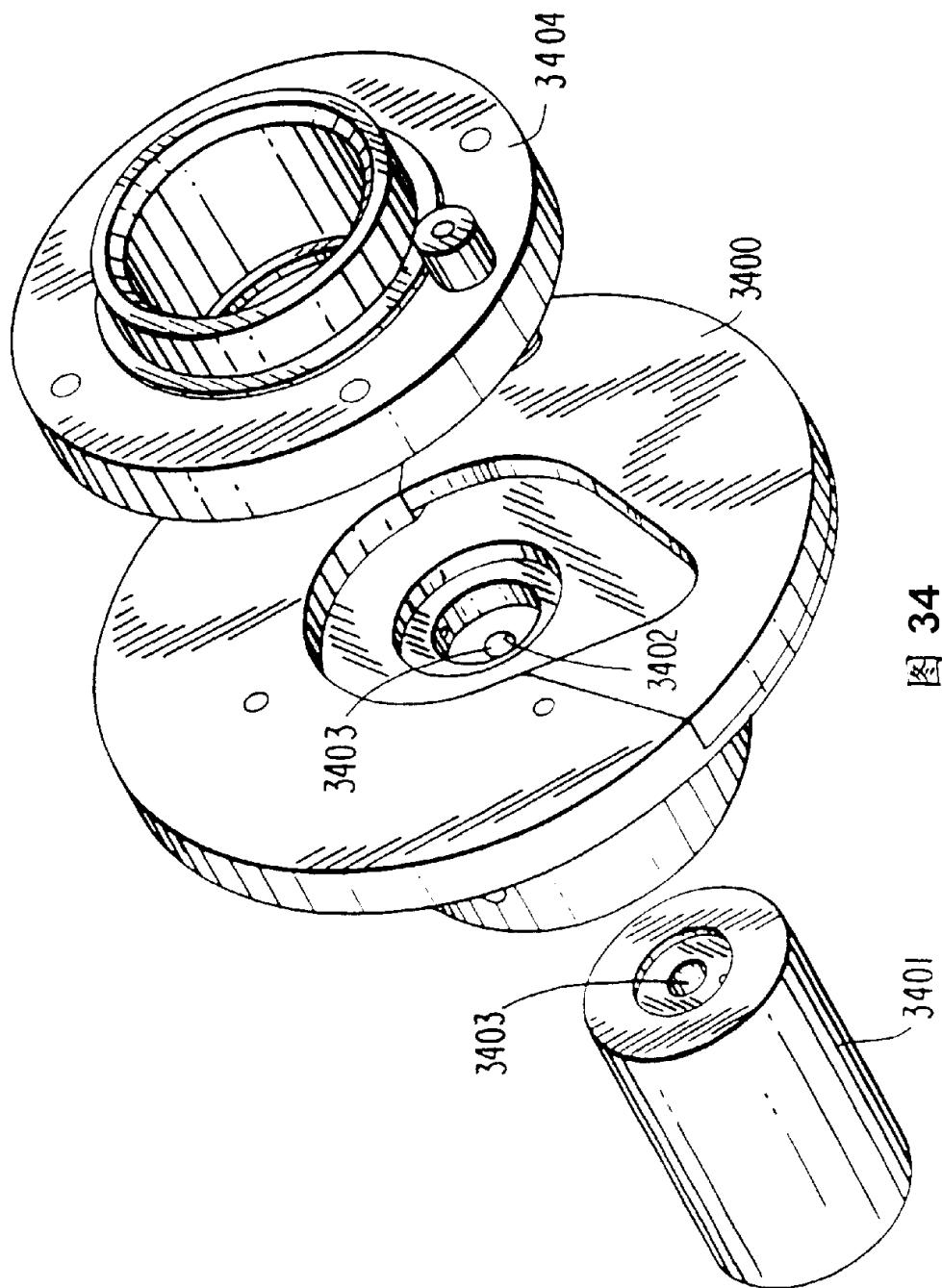
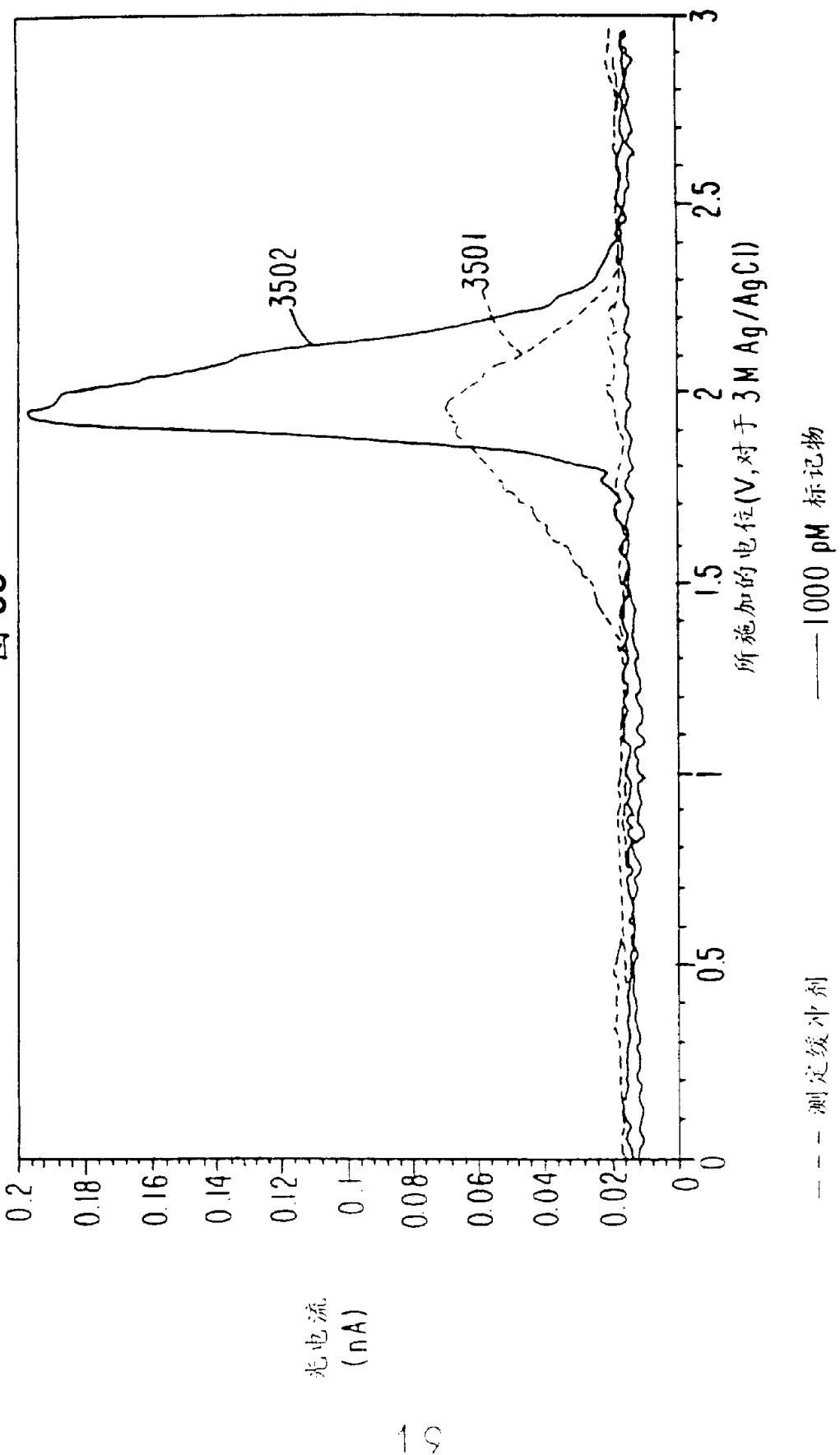
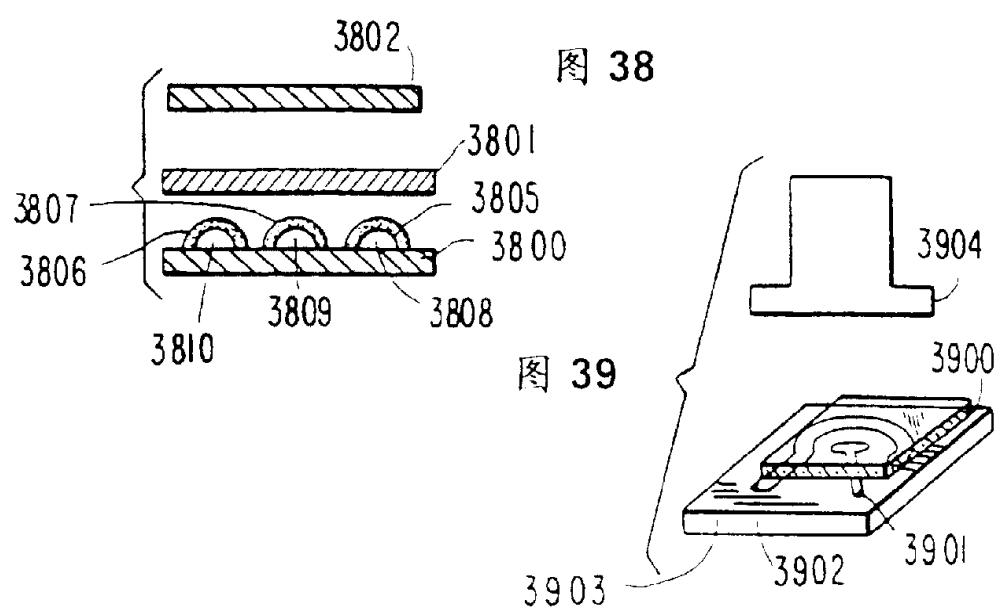
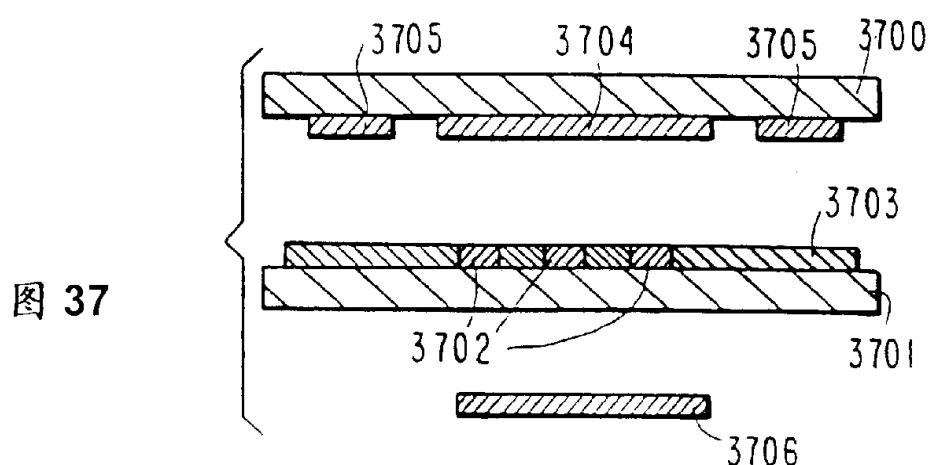
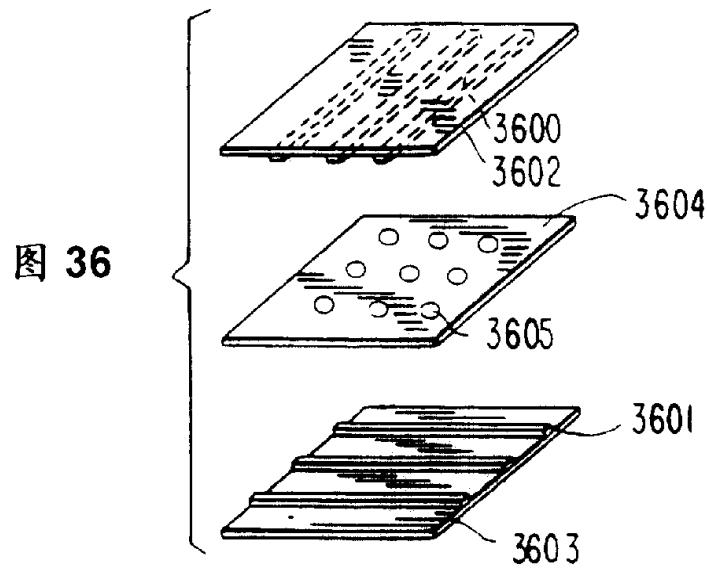


图 34

图 35





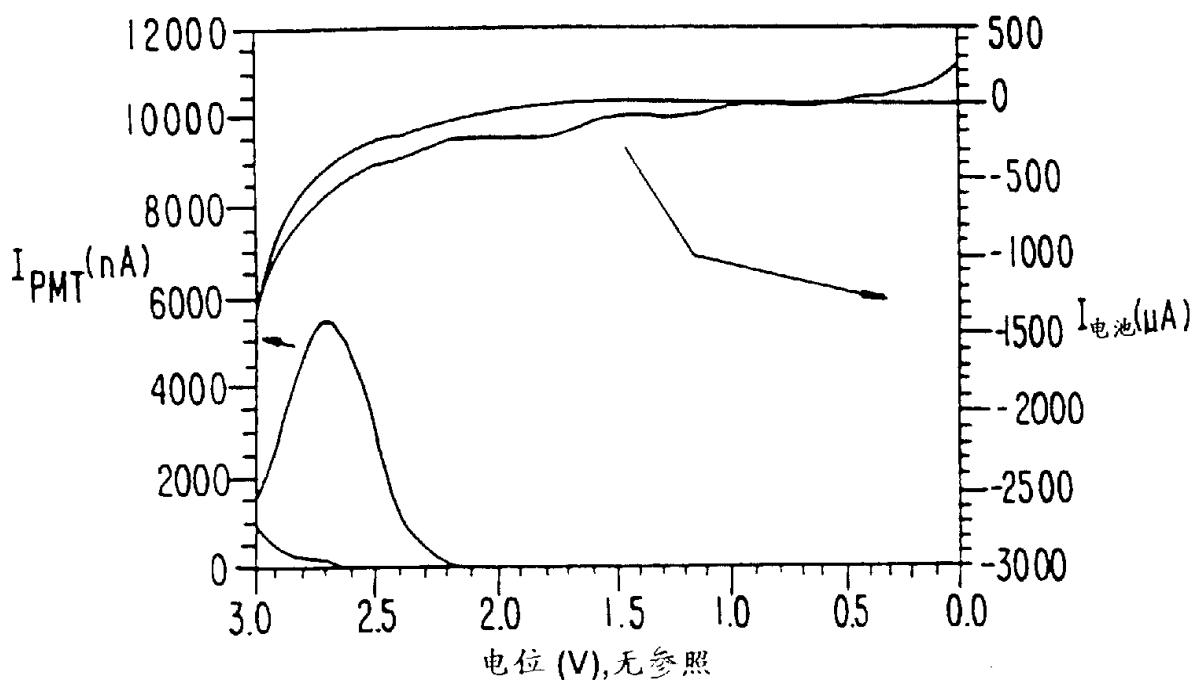


图 40

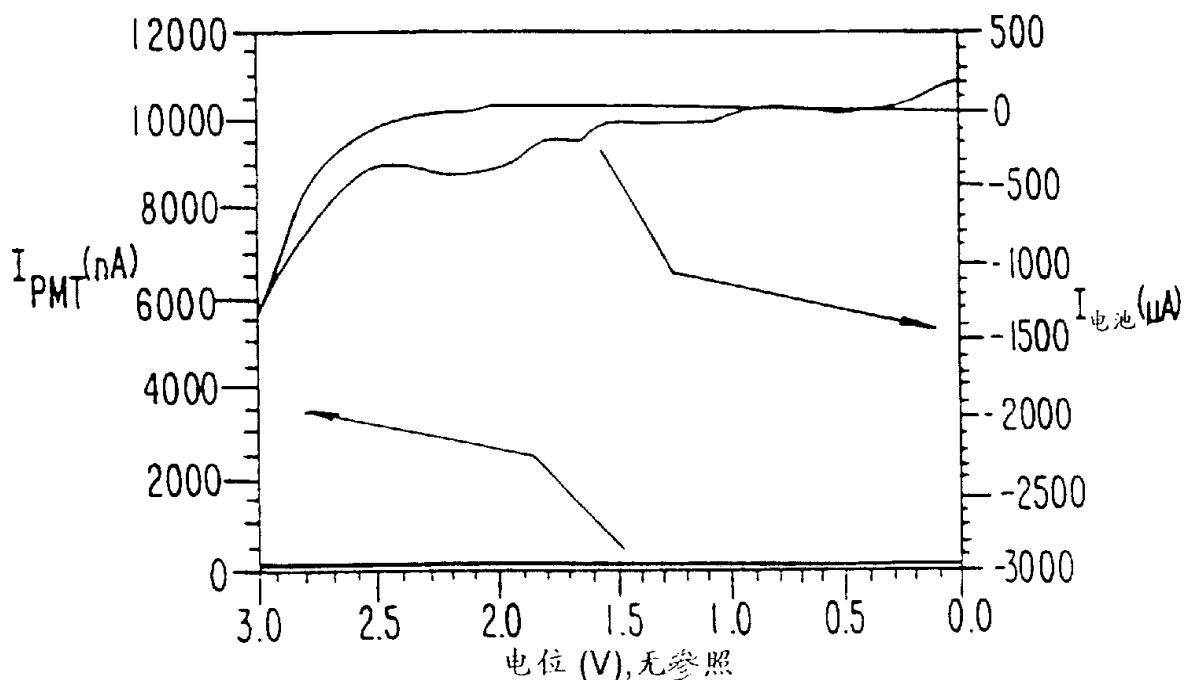


图 41

图 42 A

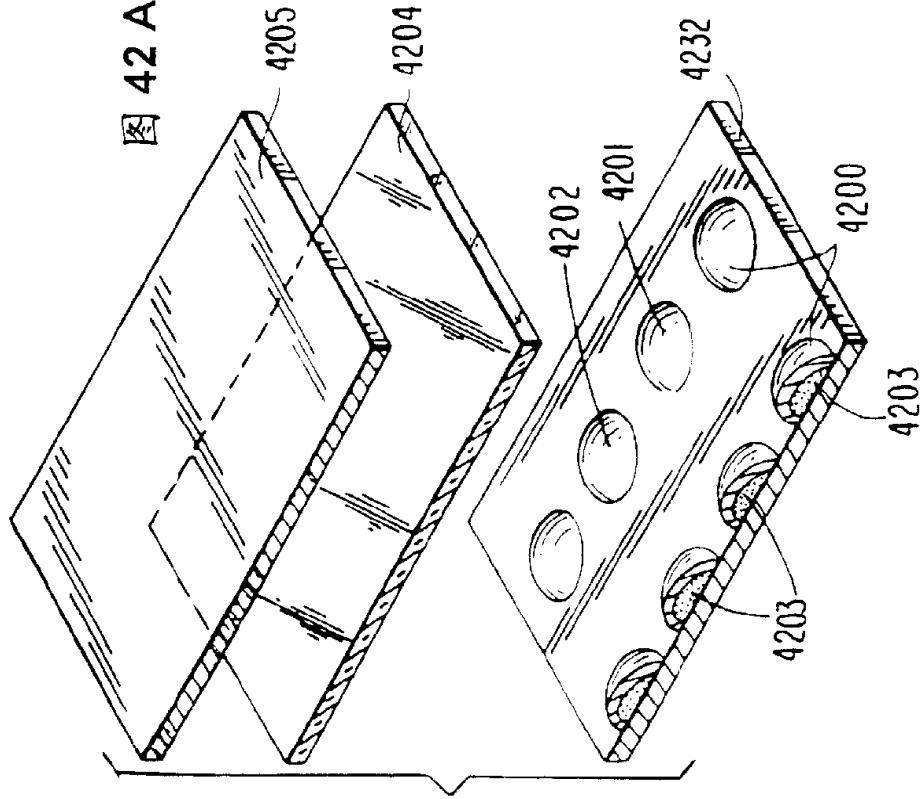


图 42 B

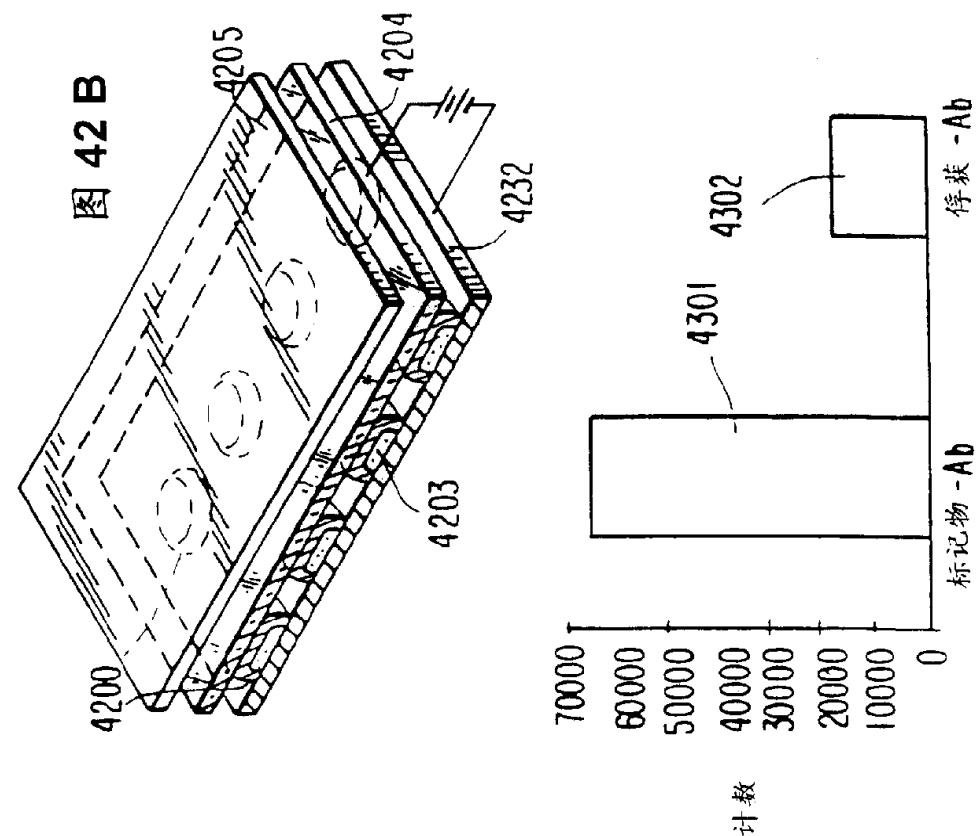


图 43

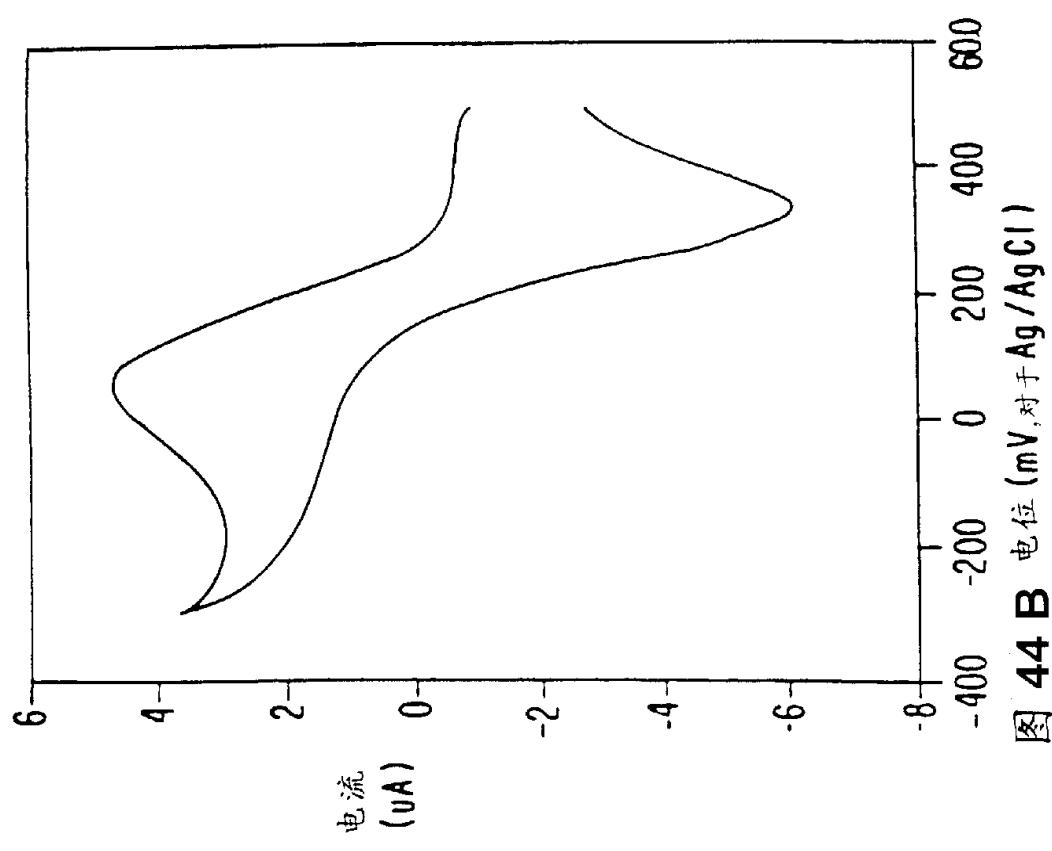


图 44 B 电位 (mV, 对于  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ )

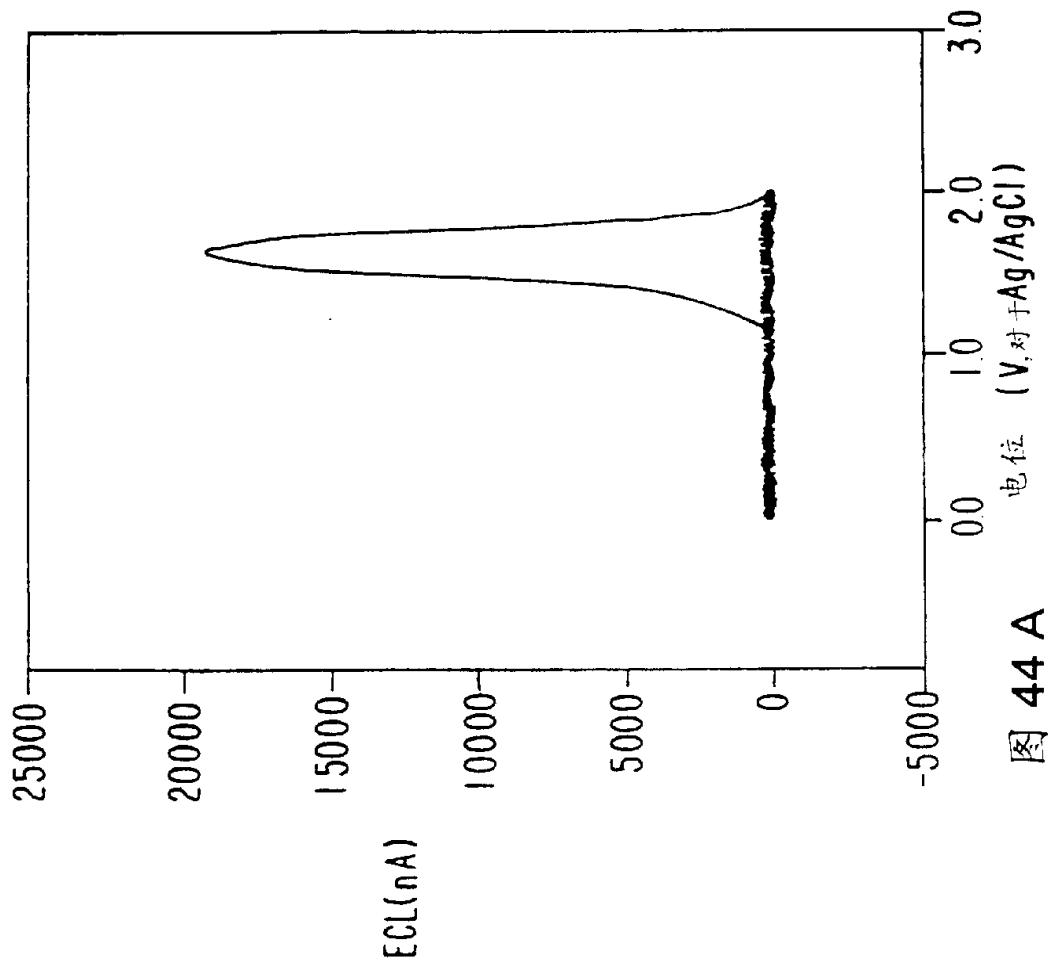


图 44 A 电位 (V, 对于  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ )

图 45 A

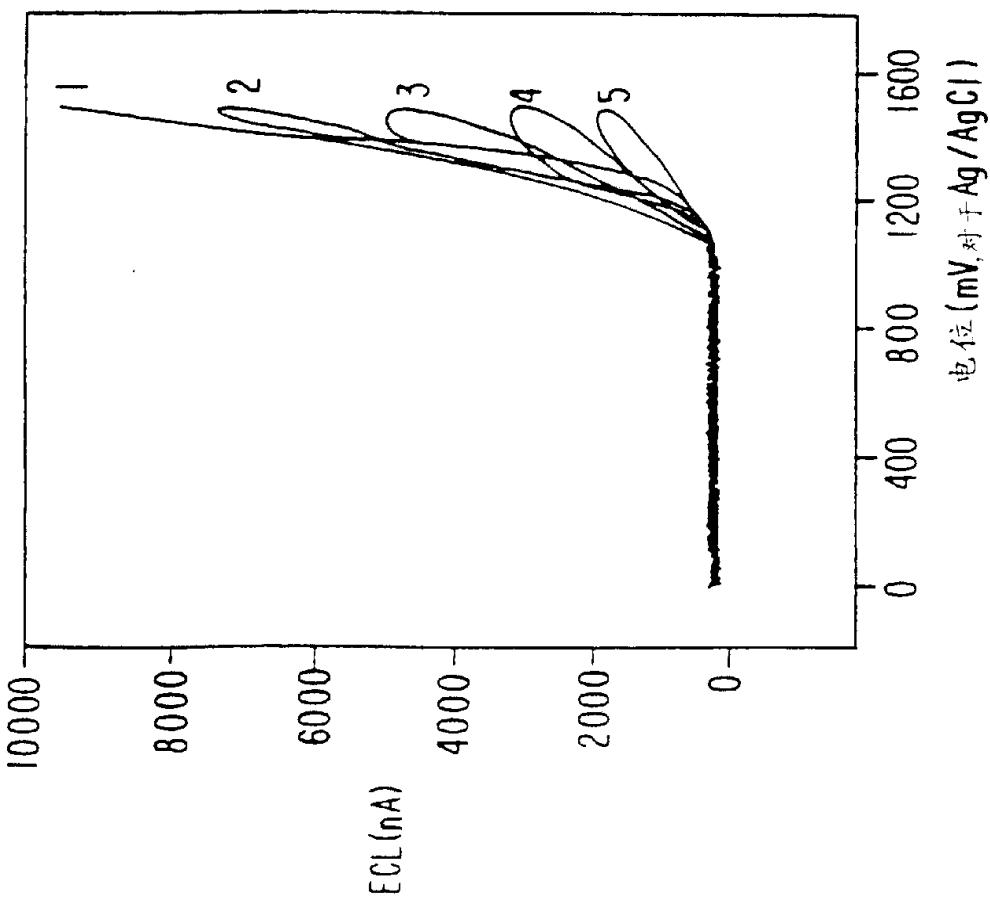


图 45 B

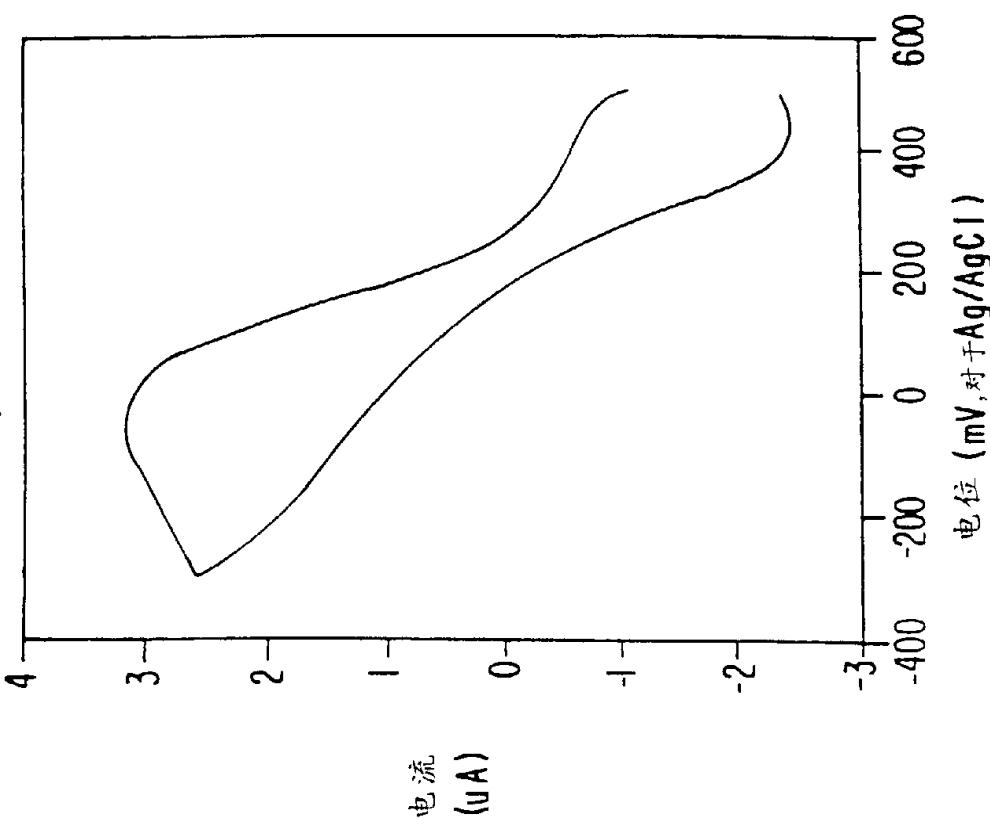


图 46 A

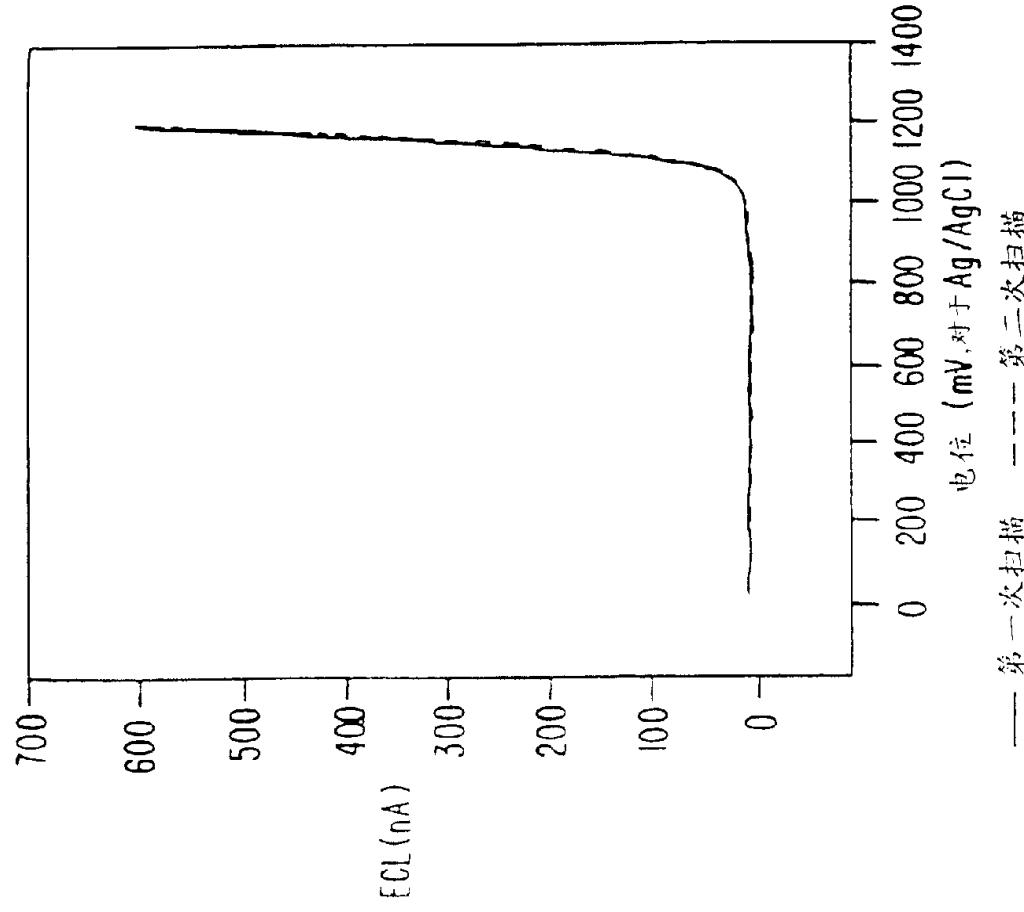
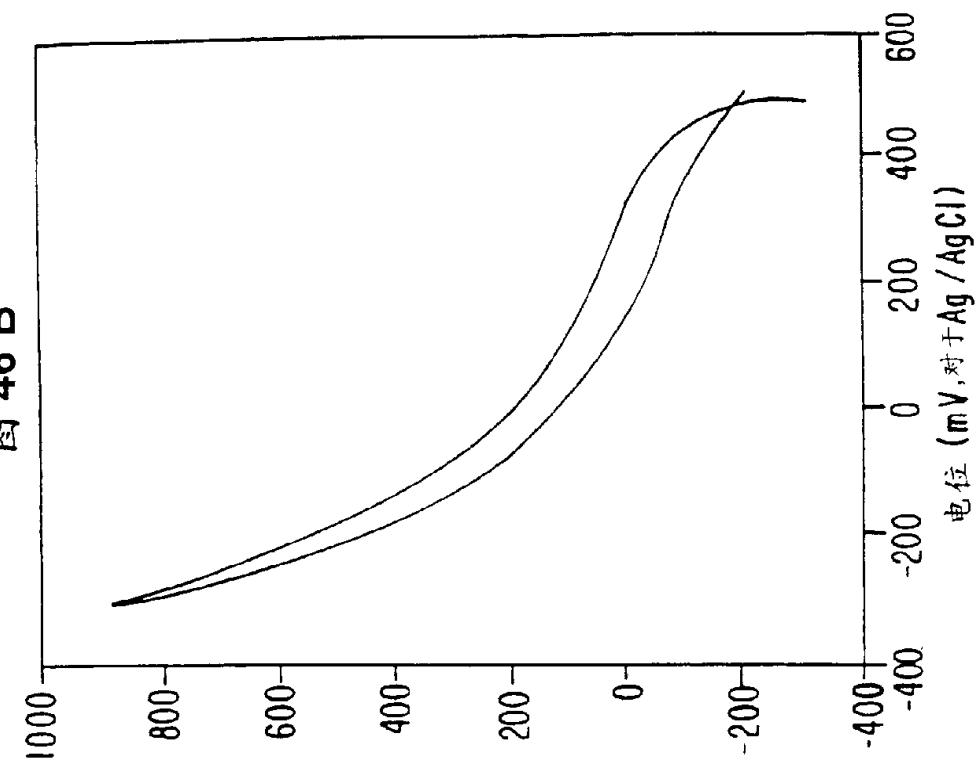


图 46 B



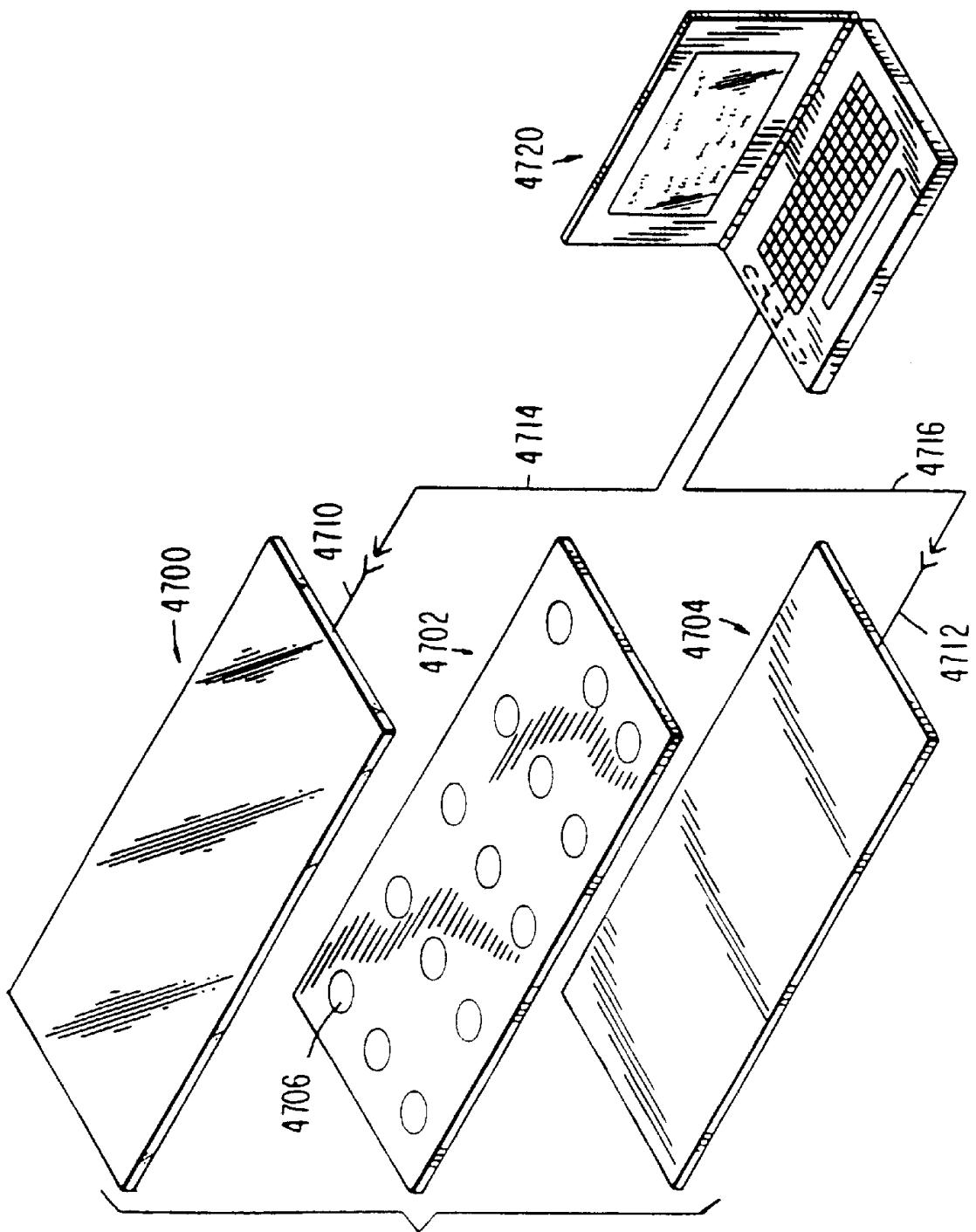


图 47