[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 21/65 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810082366.2

[43] 公开日 2008 年 8 月 13 日

[11] 公开号 CN 101241078A

[22] 申请日 2003.7.11
[21] 申请号 200810082366.2
分案原申请号 03816607.0
[30] 优先权
[32] 2002.7.12 [33] GB [31] 0216197.4
[71] 申请人 斯特拉斯克莱德大学
地址 英国格拉斯哥市
[72] 发明人 W·E·史密斯 D·格雷厄姆
P·科马克 A·麦凯布
[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 程金山
权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 6 页

[54] 发明名称

SERRS 活性微粒

[57] 摘要

本发明涉及提供 SERRS 活性聚合物珠子和它们用于检测靶分子的生产方法，以及检测靶分子的方法。 本发明的检测样品中靶分子的方法包括以下步骤：a) 提供 SERRS 活性珠子，其中 SERRS 活性珠含有包封在聚合物壳中的聚集的金属胶体和至少一种 SERRS 活性染料，且其中已经生产所述珠子使得具有特异可识别的 SERRS 信号并且其表面已经被修饰以便其上已经附着能够结合所述靶分子的部分；b) 提供磁珠，其上附着能够结合所述靶分子的部分；c) 将所述 SERRS 活性珠子和磁珠与样品接触，以便使样品中的任何所述靶分子与所述珠结合；和 d) 通过检测从与所述靶分子结合的 SERRS 活性珠子获得的特异可识别的 SERRS 信号来检测所述靶分子。

1. 检测样品中靶分子的方法，该方法包括以下步骤：

a）提供 SERRS 活性珠子，其中 SERRS 活性珠含有包封在聚合物壳中的聚集的金属胶体和至少一种 SERRS 活性染料，且其中已经生产所述珠子使得具有特异可识别的 SERRS 信号并且其表面已经被修饰以便其上已经附着能够结合所述靶分子的部分；

b）提供磁珠，其上附着能够结合所述靶分子的部分；

c）将所述 SERRS 活性珠子和磁珠与样品接触，以便使样品中的任何所述靶分子与所述珠结合；和

d)通过检测从与所述靶分子结合的 SERRS 活性珠子获得的特异可识别的 SERRS 信号来检测所述靶分子。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中步骤 c）进一步包括通过离心或磁场从溶液中去除所述珠子的步骤。

3. SERRS 活性珠子作为三明治测定法中的标记的应用，其中 SERRS 活性珠含有包封在聚合物壳中的聚集的金属胶体和至少一种 SERRS 活性染料。

4. 根据权利要求 2 的应用，其中待检测的抗原被固定在表面上的抗体和包被在所述 SERRS 活性珠子上的抗体所捕获。

5. 根据权利要求 4 的应用，其中表面在磁珠上。

6. 通过 SERRS 活性珠子捕获的抗原，其中所述 SERRS 活性珠含有包封在聚合物壳中的聚集的金属胶体和至少一种 SERRS 活性染料；和磁珠。

SERRS 活性微粒

本发明涉及提供 SERRS 活性聚合物珠子和它们用于检测靶分子的生产方法，以及检测靶分子的方法。

现代分子生物学中最近的发展突出了对同时原位识别大量生物分析物的需要。有该需求的领域包括 DNA 检测、蛋白质组学、细胞和抗体识别，和药物发现。

包括微粒和使用不同于 SERRS 的检测技术的相关技术包括使用“量子点（quantum dot）”和使用表面等离子体共振的变化，表面等离子体共振可通过结合金颗粒实现。量子点由硫化/硒化镉的纳米级微粒组成，硫化/硒化镉是一种熟知的颜料，其可以被修饰从而可以附着生物分析物。该技术的优点是与单个分子相比单个微粒给出强烈发射，并且这些微粒的性质使得通过改变硫化物与硒化物的比例实现宽范围发射频率。

在表面等离子体共振方法中，如在 Storhoff, J. J. , Elghanian, R. , Mucic, R. C., Mirkin, C. A. , Letsinger, R. L., J. Am. Chem. Soc 1998, 120,1959-1964 中描述的，使用用特定寡核苷酸在表面修饰的两种金纳米微粒（nanoparticle）。两种微粒都识别并杂交 DNA 的特定链，其是生物分析物。这使得金微粒紧密接近，并检测表面等离子体共振的频率变化。然而，这种技术不提供所期望的组合多用、稳定性和简单性。

SERRS 可独特地提供选择性标记化学以开发所需要的新类型测定法。其具有与荧光相等或更好的灵敏性，但是主要优点是用作标记的每种 SERRS 染料给出独特的指纹，其可以在染料混合物中被识别而不用分离染料混合物。现在有约 50 种为 SERRS 特别设计的染料，每种染料给出唯一光谱。尽管控制该潜力的有效方法是已知的，但是其开发受到两个问题的限制。首先，染料包被的银微粒和它们标记的分析试剂或其他试剂之间有反应的可能性，其次，为了得到稳定的强 SERRS，优选保持和复制银微粒间特定程度的聚集—该步骤在分析过

程中容易被扰乱。

本发明目的之一是消除和/或减轻至少一种上面提到的缺点。

一般说来，本发明基于本发明人的观察，即 SERRS 活性染料可被包封在聚合物涂层中，赋予染料的稳定性，保护 SERRS 活性染料免受环境的影响并允许一种以上的染料被包封从而可以检测一种以上的 SERRS 信号。

从而，第一方面，本发明提供了用于鉴定靶分子的 SERRS 活性珠子，其中 SERRS 活性珠子含有聚集的金属胶体和至少一种 SERRS 活性染料，其被包被在聚合物壳中。

SERRS 指表面增强共振拉曼散射(surface enhanced resonance Raman scattering)。SERRS 以前已经被描述过，见例如 Rodger, C. H. , Smith, W. E., Dent, G. , Edmonson, M. , J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1996, 5, 791 和其中的参考文献，读者通过这些参考文献可得到背景信息。令人惊奇地，在银表面有一种普遍的荧光淬灭机制。这意味着几乎所有染料都给出 SERRS，使得能够使用比通过荧光可能得到的更广泛和更简单的衍生化学(derivatisation chemistry)。此外，SERRS 活性微粒提供的染料的特异增强对于允许从一般从含有靶分析物的生物和工业样品观察到的背景信号鉴定染料绰绰有余。这消除了成功地鉴定分析物前许多技术所需要的复杂而费时的分离步骤。

应该明白此处所用的术语 SERRS 不应被理解为限制性的并且本发明也可以应用于表面增强拉曼散射(SERS)，但是优选 SERRS。

令人惊奇地，已经发现将 SERRS 活性金属纳米微粒和 SERRS 活性染料包封在聚合物涂层中不会妨碍 SERRS 信号被容易地检测。此外，可以在某些情况下距离珠子高达 10 米地方检测 SERRS 信号。

聚合物壳可以从各种单体和交联剂形成，这些单体通过链增长机制和逐步增长机制聚合，这些机制能够形成包封聚合胶体和 SERRS 活性染料的珠子。可以理解一部分聚集的胶体也可以附着和/或包埋在珠子的表面。聚合物壳可以含有不止一层。例如，可以形成在表面上含有一些聚集的胶体的珠子。然后可以将这些珠子返回到珠子生产步骤，加入金属胶体。这样产生额外的聚合物盖或层，其在珠子表面

上不含有金属胶体微粒。不过，在某些情况中，可能希望珠子的表面上有金属并且这可以使用金属胶体或者通过金属涂层或者平版沉积金属于珠子表面来实现。在它们的表面上含有金属的珠子的另一个优点是 SERRS 感测也可以在被另外内部标记的珠子的表面进行。

单体和特定单体的优选种类包括，但不限于，下面的种类和其衍生物：丙烯酸和衍生物(例如，2-溴丙烯酸、丙烯酰氯、N-丙烯酰酪氨酸、N-丙烯酰吡咯烷酮（pyrrolidinone）)、丙烯酸酯类(例如，丙烯酸烷基酯、丙烯酸烯丙酯、丙烯酸羟丙酯)、甲基丙烯酸和衍生物(例如，衣康酸、2-(三氟甲基)丙烯酸)、甲基丙烯酸酯(例如，甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸羟乙酯、3-硫代丙基甲基丙烯酸钠盐)、苯乙烯类(例如，(2,3 和 4)-氨基苯乙烯、苯乙烯-4-磺酸、3-硝基苯乙烯)、乙烯基类(例如，氯甲酸乙烯基酯、4-乙烯基苄酸、4-乙烯基苯甲醛、乙酰基咪唑、4-乙烯基苯酚、4-乙烯胺、丙烯醛)、乙烯基吡啶类(例如，(2,3 和 4)-乙烯基吡啶、3-丁烯 1,2-二醇)、硼酸(例如，4-乙烯基硼酸)、磺酸(例如，4-乙烯基磺酸)、金属螯合剂(例如，苯乙烯亚氨基二乙酸)、丙烯酰胺和衍生物(例如，N-甲基丙烯酰胺)、甲基丙烯酰胺和衍生物(例如，N,N-二甲基丙烯酰胺、N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺)、烯烃(例如，4-戊烯酸、3-氯-1-苯基-1-丙烯)(甲)丙烯酸酐和衍生物(例如，甲基丙烯酸酐)、含硅单体(例如，(3-甲基丙烯氧丙基)三甲氧基硅烷、四甲基二硅氧烷)、多烯(例如，异戊二烯、3-羟基-3,7,11-三甲基-1,6,10-十二碳三烯)、叠氮化物(例如，4-叠氮-2,3,5,6-四氟苄酸)、硫醇(例如，烯丙硫醇)。丙烯酸封尾（terminated）的或者其他不饱和尿烷、碳酸盐和环氧化物也可以用于本发明中，如基于硅的单体可以用于本发明中。使主题聚合化合物具有刚性的交联剂是本领域技术人员公知的，并且包括，但不限于，二-、三-、四-和五-官能的丙烯酸盐(酯)、甲基丙烯酸盐(酯)、丙烯酰胺、乙烯树脂、烯丙基树脂和苯乙烯。

银、金或铜胶体表面，特别是银，尤其优选用于本发明中。然而，也可以使用金属合金。

表面可以是裸露的金属或者可以在金属表面上含有金属氧化层。其可包括有机涂层如柠檬酸或适当的聚合物，如聚赖氨酸或多酚的涂

层，以增加其吸附容量。其可包括共价连接到聚合物的染料。

胶体微粒优选地以受控方式聚集以便是统一和期望的大小和形状并且尽可能稳定以抵抗自聚集。制备这些不聚集的胶体的方法已经是公知的。它们包括，例如，用还原剂如柠檬酸盐还原金属盐(例如，硝酸银)，以形成稳定的微晶悬浮液(见 P. C. Lee & D. Meisel, *J. Phys, Chem. (1982), 86, p. 3. 391*)该“储备”悬浮液然后在刚使用前聚集。适当的聚集剂包括酸(例如 HNO_3 或抗坏血酸)、聚胺(例如，聚赖氨酸、精胺、亚精胺、1,4-二氨基哌嗪、二亚乙基三胺、氨基乙基-1,3-丙烷二胺、三亚乙基四胺和四亚乙基五胺)和无机活化离子如 Cl^-、I^-、Na^+ 或 Mg^{2+}。为了增加对该过程的控制，所用的所有设备应该被严格清洁，并且试剂应该是高级别的。

胶体微粒可以是任何大小，只要它们产生 SERRS 效果—通常它们的横截面为约 4-50nm，优选 25-36nm，尽管这将依赖于金属的类型。

本发明的珠子特别小，典型地直径小于 1μm。优选地，珠子的横截面为约 10nm 到 1 mm，更优选地横截面约 10nm 到 1μm，但是显然不小于它们所包封的染料涂布的胶体微粒。

本发明的珠子可含有许多 SERRS 活性纳米微粒(含有聚集的金属胶体和吸附的一种或多种 SERR 活性染料)，它们的每一种可以被相同标记或者不同标记以便增加多用（multiplexing）能力。即，单个珠子可含有一种或多种 SERRS 活性染料。如果不止一种染料被掺入珠子中，获得的 SERRS 信号将是从各种所用的染料得到的 SERRS 信号的组合，并且通过改变珠子中染料和/或染料的相对水平，可以形成具有可辨别的 SERRS 信号的珠子“文库”。

珠子形成中银纳米微粒与聚合物的作用是减小珠子的大小。这提供了对珠子化学的额外控制并意味着可以形成宽范围的大小。从而，一旦聚合物形成，SERRS 珠子排列被锁定在适当位置从而所选聚集的状态被保存。此外，聚合物保护银纳米微粒免受环境的影响。

这些珠子中所用的聚合物还可含有官能团(例如，羧酸、羧酸的活性酯、醇、胺、环氧衍生物、氯甲基苯乙烯基基团、乙烯基基团、硫醇基团、马来酰亚胺和琥珀酰亚胺)或者可通过一种或多种连接基团

进一步衍生化，从而靶分子可以反应并结合到微粒的表面。这些基团的优点是它们可以作为与共价或非共价连接的点以提供特异捕获或分析。术语连接基团指促进一个或多个靶分子和一个或多个 SERRS 活性微粒间粘附的基团。粘附可包括任何类型的键，包括但不限于共价、离子、氢键、范德华力或机械结合。

另一方面，本发明提供了制备 SERRS 活性珠子的方法，包括步骤：

1)形成聚集的金属胶体，其含有被其吸收的 SERRS 活性染料；

2)在适当的溶剂中将聚集的金属胶体与单体混合；和

3)实现单体的聚合从而形成包封聚集的金属胶体的聚合物珠子。

备选地，可以首先制备珠子，其不含有吸附到其中的 SERRS 活性染料的聚集胶体。然后可以加热珠子(例如到 80℃)以便使得它们多孔并能够吸收所述含有被吸收到其中的 SERRS 活性染料的聚集的胶体。冷却珠子捕获珠子中的胶体微粒。通过升高温度并将珠子浸泡在适当的缓冲液中除去染料/胶体。

聚合物珠子还可以进一步反应以将官能团或连接基团加到珠子的外表面从而允许分子粘附的该珠子。

适当的靶分子的实例包括，核酸、蛋白质如抗体、醛、硫醇、胺、炸药、滥用药物、治疗剂、代谢物和环境污染物。然而，珠子，由于它们的极小的尺寸，还可以仅仅应用，例如作为安全标记物。因此珠子可通过包含在例如气溶胶喷雾、颜料、墨水等中而应用于表面。珠子通常对于裸眼是不可见的，但是将负荷特定 SERRS 活性染料或者染料组合从而可以检测特定 SERRS 信号。这尤其可用于防止/最小化假冒。

将适当的物质如 DNA 序列附着到聚合物表面进行分析/或标记步骤。这样，分析过程和 SERRS 过程是分开的并且两者都可优化。

本发明的珠子可以作为标记技术而具有更广泛的应用。它们可以用于例如蛋白质和抗体检测。对于蛋白质，最简单的实例是将一对蛋白质之一附着到 SERRS 活性表面并将荧光标记附着到另一个蛋白质。当这一对复合时，珠子将显示出荧光和拉曼散射，当该对分开时，

将仅仅在珠子上检测到拉曼光谱。存在一种分光光度计，其可适于同时提供荧光和拉曼散射。

此外，这些珠子可以进一步改良以例如在使用时帮助它们的分离。通过将珠子的表面用例如识别靶并且含有生物素基团的 DNA 分子衍生，可以将珠子特异地附着到表面，并且珠子可以在链霉抗生物素蛋白表面上除下。备选地/额外地，例如通过在通过加入材料增重的珠子的里面和/或表面上掺入磁性物质可以磁化珠子，所加入的材料将使得微粒基于它们的重量分离。然后通过使用小磁体将磁性珠子分离以例如，在分光光度计的光线中浓缩微粒。

适当的磁性物质可以是掺入到珠子中的磁性纳米微粒的形式。这些磁性纳米微粒可以包括任何铁磁材料纳米微粒形式，包括铁、磁铁矿、铁酸盐和其他金属如镍和钴的化合物。

通过将含有所述磁性纳米微粒的溶液与胶体/染料混合物组合并且之后形成 SERRS 活性珠子而实现磁性纳米微粒的掺入。所形成的珠子其后可以官能化，如前述。

对于抗体，可以开发一种非常简单的测定法，其消除了竞争性和替换测定法中的某些不确定性，因为用荧光团标记的抗原可被加到固定在 SERRS 活性珠子上的抗体。当珠子通过离心或磁场从溶液除去时，可以考察具有荧光团的那些珠子并且读出拉曼码以确定那些标记已经被替换。备选地，珠子可以用作三明治测定法中的特异标记，在该测定法中抗原被捕获在表面(如板或者磁珠)上的抗体，并且 SERRS 标记的抗体包被的微粒将通过附着到被捕获的抗原而粘附到该表面上。抗原还可以最初由标记微粒上的抗体捕获。通过将珠子附着到两种蛋白质的每一种或者通过将珠子附着到一种蛋白质和将另一种标记如荧光团附着到另一种蛋白质类似的探测蛋白质识别。

在本发明的另一个实施方案中，分子印记方法可用于通过模板方法(见例如 WO 00/41723)将特异分子识别性质赋予聚合物壳。该一般性方法原则上可应用于将亲和性赋予各种分析物的聚合物壳，这些分析物包括临床、饮食、法医和环境相关的分析物。

得到 SERRS 光谱的方法可以是常规的。然而，可以将下面的方

法应用于光谱测量:

典型地，本发明的方法将使用激光的入射光进行，该入射光具有可见光谱的频率，即 380nm-780nm，尤其为 400nm-650nm(所选的确切频率将通常依赖于每种情况所用的染料-可见光谱红色区中的频率总体上倾向于产生更好的表面增强效果)。然而，可以展望以下情形，其中可以使用其他频率，例如紫外(即 200nm-400nm)或近红外范围(700nm-1100nm)的频率。从而可以在约 200nm 到 1100nm 进行 SERRS 检测。

具有适当频率和功率的适当光源的选择和（如果必要）调节将是本领域普通技术人员的能力之内的，尤其是参考可得到的 SERRS 文献之后。为了实现高灵敏检测，使用 SERRS，需要频率为或者接近染料的吸收最大值的相干光源。如果需要较低灵敏性，光源可以不必是相干的或者高强度，因此可以将灯与单色器光栅或棱镜组合使用以选择适当的激发频率。

一些设备适于收集 SERRS 信号，包括波长选择镜、用于散射光检测的全息光学元件和纤维-光学导波管。可以使用例如电荷耦合器件(CCD)、硅光电二极管或者单个或者串连排列的用于信号的级联放大的光电倍增管测量 SERRS 信号的强度。光子计数电子仪器可用于灵敏度检测。检测器的选择将很大程度上依赖于进行具体测定法所需要的检测灵敏性。

注意到本发明的方法可以包括得到横跨一定波长范围的完整 SERRS 光谱，或者选择峰值并仅仅在该峰的波长扫描(即，拉曼“成像”)。还可以仅仅使用用以除去反射光、Raleigh 散射等的滤光器和检测器如光电二极管检测所有拉曼散射。

用于得到和/或分析 SERRS 光谱的仪器将几乎确定地包括一些形式的数据处理器如计算机。

拉曼信号由一系列不定强度的离散光谱线组成。这些线的频率和相对强度对于所检测的 SERRS 活性染料是特异的，因此拉曼信号是该染料的“指纹”。如果 SERRS 分析器被选择性用于检测染料混合物，那么为了鉴定必须检测“指纹”光谱。

一旦 SERRS 信号已经被适当的检测器捕获，其频率和强度数据通常将被传递给计算机用于分析。指纹拉曼光谱将与参照光谱比较以鉴定所检测的拉曼活性化合物或者所测量频率的信号强度将被用于计算所检测的拉曼活性化合物的量。

总之，描述了用于分析物的多重标记的含有 SERRS 活性微粒的聚合物微粒的开发。胶体微粒被染料标记，预聚集并被锁定到聚合物中从而 SEERS 效果被永久接通并且通过例如将所要检测的分子共价连接到聚合物表面单独地进行分析事件。主要优点是这些微粒给出非常强烈、稳定的 SERRS。对于特定微粒的简单、灵敏的鉴定，悬浮液中有巨大的多重标记能力，其是任何其他技术不可匹敌的，并且 SERRS 活性纳米聚集物受到保护而不受环境的影响。反过来，这使得可以原位鉴定和定量复杂混合物中超低浓度的特异靶分析物如 DNA 序列或肽。

另一方面，本发明提供了检测样品中靶分子的方法，该方法包括步骤：

a）提供根据本发明的一种或几种 SERRS 活性珠子，其中该珠子已经被产生从而具有特异的可识别的 SERRS 信号并且珠子的表面已经被修饰从而使能够结合所述靶分子的部分附着其上；

b)将所述一种或几种珠子与样品接触以允许样品中的所述任何靶分子结合所述一种或几种珠子；和

c)通过检测从结合所述靶分子的一种或几种珠子得到的可特异识别的 SERRS 信号来检测所述靶分子。

典型地，靶分子可以是抗体或抗原，在这种情况下 SERRS 活性珠被修饰以分别具有粘附到珠子表面的相应抗原或抗体。可以使用常规三明治测定法，其中第一抗体附着到表面，用于结合样品中可能存在的的特异蛋白。珠子可以被衍生以包括第二抗体，其也对所述蛋白质特异。如果该蛋白质存在于样品中，那么其有效地成为两种抗体间的三明治并且这可通过在附着到第二抗体的珠子上进行的 SERRS 检测。也可以检测天然结合的其他分子如受体/配体复合体，所述复合体之一固定在珠子表面上。

在一个优选的实施方案中，该方法用于检测样品中特定核酸序列。在该情况下，珠子可被修饰以具有能够特异杂交含有特定核酸序列的分子，该分子附着到珠子的表面。能够特异杂交的该分子可以有足够长度而可以发生简单杂交和随后的检测。备选地，能够特异杂交靶核酸分子的分子可以是相对短的分子，比如少于 50 个核苷酸，例如，长度少于 25 个核苷酸，该分子被设计作为引物以允许与所述核酸分子的杂交和从该核酸分子的链延伸。这样，附着到珠子表面的分子将通常通过其 5'末端粘附从而 3'末端能够结合并引发链延伸。典型地，也可以利用另一种引物，其被设计以在距离结合珠子的引物例如 100 个核苷酸到 2000 个核苷酸的地方结合靶核酸分子。这可允许使用适当的 DNA 聚合酶和必需的 dNTPs(脱氧核苷酸三磷酸)产生双链分子，其掺入靶核酸序列，这是本领域技术人员熟知的。

实际上可以进行扩增反应(例如 PCR)以便有效增加将要检测的靶核酸的量。另一引物也可以通过适当的方法修饰以包含能够结合特定表面的部分。例如，该引物在其 5'末端可含有生物素分子以便使任何扩增的产物都能够结合涂有链霉抗生物素蛋白的表面。如此产生扩增产物，其可通过扩增产物的一端结合表面，而游离末端掺入可容易被检测的 SERRS 活性珠。

由于能够产生具有特异不同 SERRS 信号的 SERRS 活性珠，可以使用许多不同标记的珠子进行本领域中所谓的多重反应，这些珠子每一种都具有不同的固定结合部分，例如寡核苷酸。对于寡核苷酸，可以设计每种寡核苷酸以鉴定例如核酸分子中的特定多态性，该设计可通过在 3'末端插入特定序列来实现，当 3'末端发生互补结合时该特定序列将仅允许发生链延伸。即，当 3'末端的核苷酸不与靶杂交时，其不能发生链延伸。通过使用被设计以产生扩增产物的另一种引物进行扩增反应，可能容易地检测靶核酸分子中存在哪种多态性。

如果进行扩增反应，染料，如 Sybr Green 可用作最初指示剂，指示已经得到扩增产物。该产物之后可通过进行 SERRS 检测鉴定。可使用该优选步骤从而仅仅被鉴定为产生扩增产物的反应之后被通过 SERRS 检测进行分析。

总之，本发明的关键优点是

1）灵敏性：每个珠子是一个单独的敏感元件（sensing unit），能够容纳数百万 SERRS 活性染料标记物。整个可利用的银表面可紧密地用染料标记物充满。分子内淬灭机制防止具有例如荧光的两个标记物紧密接近，但是该机制不适用于 SERRS。从而，对于一个珠子，该信号非常强并且可容易且快速地在低浓度检测到。

2）稳定性：聚集过程在珠子的形成过程中进行，该聚集过程对于从 SERRS 得到最大信号是必需的。从而，其是预置的并且受到聚合物的保护而不受环境影响，使得信号持续、恒定并且不受任何生物学事件的影响。此外，用于发现特定分析物的传感物质共价附着到聚合物表面。

3）多重检测：可以生产珠子使得其含有许多“写”的编码，这可通过在许多胶体悬浮液的每一种中使用不同染料混合物并通过将来自一种以上的悬浮液的聚集胶体和染料加到特定珠子而实现。然后 SERRS 峰的尖锐性质使得可以识别没有任何分离的珠子混合物中的每种珠子类型。由于可以使用强烈粘附到 SERRS 活性表面的所有生色团，比用荧光更简单且更广泛的染料化学是可能的。例如，来自染料如偶氮的 SERRS 信号的模式对生色团周围的替换非常敏感，使得比用荧光产生多个标记容易地多。这极大地增加了使用相对简单的染料的编码潜能。

此外，因为珠子含有金属，所以为珠子提供了显著的质量。该重量也可用于使用这些珠子的检测和/或分离技术。例如，如在图 2 中识别的 DNA 条带可以被捕获在石英微量天平的链霉抗生物素蛋白包被的板的表面上并检测质量变化。珠子的沉重性质将使得该质量改变易于检测，与 DNA 条带的常规捕获相比增加了石英天平的灵敏性。检测重量改变后，可以通过重量变化检测导致该变化的特定微粒。

本发明现在将通过实施例和参考下面的图进一步描述，这些图显示了：

图 1 显示了根据本发明的 SERRS 活性珠子的示意性表示。

图 2 示意性显示了根据本发明的 SERRS 活性珠的潜在用途。

图 3 显示了实施例 2 中对照珠子的拉曼光谱和空白珠子的 SERRS。

图 4 显示了染料包被的珠子样品中染料的 SERRS。

图 5 显示了染料包被的珠子的 SEM 图像，测量条长度为 10μm，所示珠子的平均直径约为 0.8μm。

图 6 显示了 ABT DMOPA、8HQPK 和两种染料的 1：10 比例混合的 SERRS 光谱。

图 7 显示了 8HQPK、苯并三唑罗丹明 B 和两种染料的 3：1 混合物的 SERRS 光谱。

图 8 显示了使用扩增反应，根据本发明的 SERRS 活性珠如何用于鉴定特定核酸序列的示意性表示。

实施例部分

实施例 1

胶体制备

根据 Lee 和 Meisel (Rodger, C. , Smith, W. E., Dent, G. , Edmonson, M. , J. Chem. Soc, Dalton Trans., 1996,5, 716; Munro, C. H. , Smith, W. E. , Garner, M., Clarkson, J. 和 White, P. C., Languir, 1995,11, 3712)的方法制备柠檬酸还原的胶体。所有玻璃器具使用王水(3：1 HCl:HNO_3)彻底清洁然后用水然后用蒸馏水彻底冲洗。硝酸银(90mg)溶于 40℃蒸馏水(500ml)中。然后使用本生灯将溶液快速加热到 98℃的温度。此时加入 10 ml 1%柠檬酸三钠溶液。然后小心控制温度，保持温度恒定在 98℃ 90 分钟。恒温期间后，将胶体悬浮液冷却并测量其紫外吸收光谱。最大紫外吸收在 403-410 nm 范围内的胶体用于下面详述的实验中。

通过将 12 管含有 12 ml 柠檬酸还原的胶体(λ_{max}为 406nm)以 3000 r.p.m 离心 20 分钟制备用于聚合中的银沉淀。除去每管的上清液并将剩余的银浓缩到 1 个管中。然后使用超声破碎将浓缩的沉淀重悬于乙腈中，然后将其在 3000 r.p.m 离心 40 分钟。再次除去上清液，使用超声破碎将所得沉淀重悬于乙腈(5ml)中并将悬浮液掺入到聚合中。

用和上面完全相同的方法制备负荷染料的样品，但是在含有柠檬酸盐还原的胶体的12支管中加入150μl ABTDMOPA [4 (5'-偶氮苯并三唑基)-3,5-二甲氧基苯胺]的1×10^{-6}M溶液。

珠子合成

下面的对照聚合物不含有胶体而空白聚合物含有胶体但无染料。负荷染料的聚合物含有胶体和染料。

在3个单独的50ml厚壁玻璃管中进行聚合(对照、空白和负荷染料的)。对照聚合物的反应容器装有乙腈(25ml)、二乙烯基苯80(0.5g)和偶氮二异丁腈(AIBN)(0.005g)，空白聚合物的反应容器装有乙腈(20ml)、溶于乙腈的胶体的无染料悬浮液(5ml)、二乙烯基苯80(0.5g)和AIBN(0.005 g)，负荷染料的聚合物的反应容器装有乙腈(20ml)、溶于乙腈的负荷染料的胶体的悬浮液(5ml)、二乙烯基苯80(0.5g)和AIBN(0.005 g)。摇动反应容器以溶解单体和AIBN，在冰水浴上冷却10 分钟然后用无氧氮气喷射以除去溶解的氧。然后将管包封并通过在低侧面滚筒（low-profile roller）上以60℃加热24小时实现聚合。聚合后，通过在薄膜滤器(0.2μm)上过滤分离聚合物珠子，用几体积新鲜乙腈洗涤然后40℃真空干燥。

珠子修饰

将25 ml 0.1M MES缓冲液(pH 4.5)中的1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)(500 mg)加到聚合物珠子并在25℃孵育2小时以形成胺表面活性物质。图1显示了如上描述制备的珠子(1)的简图。珠子(1)由包封聚集胶体的聚合物壳(3)和SERRS活性染料珠子(5)形成。聚合物壳(3)的表面已经被官能化从而具有氨基表面活性物质(7)，其能够与DNA反应。将25ml磷酸钠缓冲液(pH 7.2)中的3μg oligo/g珠子加入活化的珠子并在 25℃过夜反应。通过离心从溶液除去珠子并重悬于磷酸缓冲液(pH7.2)中备用。

在如上描述制备的珠子(1)的用途的一个简单实例(见图 2)中，寡核苷酸(12)被设计以识别DNA的特异序列。当靶序列(14)存在于DNA

提取物中时，其将与寡核苷酸(12)杂交从而被珠子(10)捕获。含有例如生物素基团(18)的第二寡核苷酸(16)也被杂交并且该系统被带到链霉抗生物素蛋白的板或珠子(20)上。该测定法特异识别靶序列(14)，其与微粒(10)和生物素化的序列(16)都杂交。备选地，如果磁性微粒被加到珠子，其和杂交的靶可被带到适当的表面上而无生物素步骤。在两种方法中，可使用各种方法除去未掺入的探针。在第一种方法中，如果额外的生物素被加到链霉抗生物素蛋白板，没有标记物提供，因此，其是不必严格除去的干扰物。然而，用标记物产生的复合物的大小使得容易分离并且在任一方法中未掺入探针的除去可使用流式细胞系统或者短层析步骤实现。备选地，使用磁性包被的链霉抗生物素蛋白珠子从溶液吸引复合物可以实现磁性分离。

实施例 2

然后使用 12 个离心管制备另一组银沉淀。每管空白珠子含有 9.6ml 胶体和 2.4ml 水。每管染料包被的珠子含有 2.4ml 染料(1×10^{-6}M)和 9.6ml 胶体。

所有管在加入染料后放置过夜并离心 40 分钟。沉淀重悬于 10ml 乙腈中并再次离心 40 分钟(无超声破碎)。

沉淀然后重悬于另一 5ml 乙腈中并超声破碎 2 分钟后加入聚合物反应混合物中。

然后将 0.5g 二乙苯和 0.005g AIBN 溶于总体积 25ml 的乙腈(包括 5ml 胶体)中。样品用 N_2 脱气 10 分钟。然后将样品置于 37℃滚柱（roller）上，加热到 60℃并聚合 24 小时。

然后样品经 0.2mm 孔大小的滤纸过滤，用乙腈洗涤并在真空烘箱中干燥。

然后将少量珠子(即对照、空白和含有染料的珠子)重悬于约 1ml 乙腈中，超声破碎，滴在显微镜载波片上干燥。图 3 和 4 中显示的光谱记录在系统 100 Renishaw 微探针拉曼分光计上，20 倍物镜，100%功率约 8mW)ls,la。

图 3 显示了被鉴定为(a)的对照珠子的拉曼和被鉴定为(b)的空白珠

子的 SERRS。

图 4 显示了含有染料的珠子样品中染料的 SERRS。

SEM 图像

然后使用超声破碎将少量珠子悬浮于 PVA 溶液中。然后将珠子干燥到小玻璃盘中，在真空中干燥并保存后分析。图 5 中的 SEM 图像然后记录在 Cameca SX100 电子微探针微分析器上，使用 5kV 电子束。大珠子为约 1.5μm，小珠子为约 0.5μm。

PVA 中的染料混合物

图 6 和 7 是 PVA 稳定感光底层中的两种混合物的两个样品的拉曼光谱。

图 6 显示了(a) ABT DMOPA (GM19)、(b)8HQPK 和两种染料的 1：10 比例混合物的 SERRS 光谱。在 Renishaw 显微镜系统，514, 5s, la, 100%功率 (约 3mW), X5 物镜上记录光谱。

图 6 中，两种染料(a) ABT DMOPA 和(b) 8HQPK 的每一种的主峰可以在混合物(c)中的光谱中清楚地鉴定。标记的峰(i-v)、(vii) 和(viii)都来自 8HQPK 染料(即 1-[4-(-羟基-喹啉-5-基偶氮)-苯基]-乙酮)，而标记峰(ix)来自 ABT DMOPA 染料。混合物光谱(c)中约 1360cm-1 处的峰是在该位置来自两种染料的峰的组合。该峰的强度相对于光谱中的其他峰增加了。

图 7 显示了(a) 8HQPK、(b)苯并三唑罗丹明 B 和(c)两种染料的 3：1 混合物的 SERRS 光谱。其在 Renishaw 显微镜系统上，以 514nm，5s，3a，100%功率(约 3mW)，5 倍物镜收集。图 7 中，两种染料(a) 8HQPK 和 (b) BTRB 的每一种的主峰可在混合物(c)的光谱中清楚的鉴定。标记峰(i-viii)都来自 8HQPK 染料(即苯并三唑罗丹明 B — 9-{4-[苯并三唑-5-基氨磺酰]-2-甲基-苯基}-6-二乙基氨基-呫吨-3-亚基)-二乙基-铵)，而标记峰(ix)来自 BTRB 染料。

实施例 3-磁珠的用途

珠子制备

将 50ml 磁性纳米微粒溶液加入 50ml 用如实施例 1 中的染料混合物处理的银胶体中。然后离心纳米微粒混合物并如实施例 1 中进行珠子处理。然后如实施例 1 用寡核苷酸官能化珠子。

方法(a)

该方法结合使用微粒的磁性性质的分离和纯化。

使用意欲用于实施例 2 中的测定法的 PCR 产物样品，其中生物素带和一个珠子已经杂交到靶 DNA，将电磁铁的小平头电极放入含有 PCR 产物的微量滴定板的孔中。接通磁铁并收集所有磁珠。然后从溶液除去磁铁，浸入第二孔中并将其洗涤然后进入第三个孔中，该孔具有如实施例 2 中链霉抗生物素蛋白包被的区域。在第三孔切断电磁铁并释放珠子。让珠子在 2 分钟内附着到链霉抗生物素蛋白区，之后再次接通磁铁。这除去了所有未附着的珠子。

这样，所有未掺入的生物素引物保留在第一孔中，所有未附着到靶带的珠子在第一步中除去，未附着到靶带的生物素标记的 DNA 在第二步中除去。如实施例 2 研究第二步后保留在孔底的珠子，SERRS 码用于鉴定珠子和靶 DNA。

方法(b)

该方法阐明了使用仅含有磁性微粒而无标记的银微粒的衍生珠子的选择性优点。也可以使用商业化衍生珠子。

如实施例 1 所描述的制备一批珠子，但是不加入银纳米微粒并使用识别特异靶 DNA 的特异寡核苷酸序列衍生化。还掺入 PCR 混合物中的是具有掺入的珠子中的银标记和珠子和无磁性微粒。它们含有另一寡核苷酸序列，其被设计用以识别相同靶 DNA 的不同区。PCR 后，将电磁铁加入孔中并接通。仅具有磁珠的样品被吸引到电极。然后在拉曼微探针下研究电极。仅观察到含有被标记珠子的电极。该方法是有效的，因为其将所有珠子浓缩于显微镜研究体积中。这增加了灵敏性。该方法是可靠且具有选择性的，因为其包括双杂交事件。

方法(c)

该方法阐明了拉曼和荧光与磁珠的组合使用。

使用来自实施例 4 的 PCR 混合物，其中 Sybr green 被加入 DNA，将电磁铁滴入 PCR 混合物。接通电磁铁并除去磁珠。直接在拉曼显微镜下研究混合物。选择频率使得荧光和拉曼信号在 CCD 监测器的分开部分中检测。该方法是有效的，因为通过在小区域收集珠子用于即刻检测所产生的灵敏性。来自 Sybr green 的荧光甚至在常规 PCR 仪上也检测到杂交从而可以从一个阵列选择单个孔用于快速一步鉴定分析。

实施例 4 SERRS 珠子用于 DNA 检测

在该实施例中，SERRS 珠子可用作检测特异 DNA 序列的标记。该形式基于 PCR 测定法以阐明 SERRS 珠子的高灵敏性和关于多用增加的能力。最初荧光屏可指示已经产生反应的管或孔。这些“热”孔可通过 SERRS 检查并确定已经杂交的一个或多个实际的 DNA 序列。

可根据实施例 1 制备修饰的珠子，其中珠子的外表面已经被修饰以允许寡核苷酸的固定，该寡核苷酸的 3’末端被指向远离珠子的外表面。这可通过例如在寡核苷酸合成过程中将基团附着到其 5’末端并修饰珠子的表面从而 5’末端的基团附着到珠子的表面而容易地实现。

图 8a 显示了这种珠子 50 的示意性表示，该珠子由于珠子 50 内发现的染料标记的胶体微粒 52 而具有特异 SERRS 特征，许多鉴定的寡核苷酸 54 附着到珠子 50 的表面。

靶的 PCR 扩增

PCR 用于从样品扩增特定种类的双链 DNA。这通过使用用于基因分型（genetyping）的等位基因特异寡核苷酸的 PCR 现有的特异性。最初，可选择引物序列检测特定疾病中发现的最通常突变的突变状态。为了分析样品 DNA 的基因型，两种前导引物可以与一种反向引物一起用于多重扩增阻抗突变系统(ARMS)中。正向引物通过 5’-末端接头固定于不同 SERRS 珠子上，这些珠子作为特异引物的标记。反向引物的 5’末端用生物素标记。

随着 PCR 的进行，产物将在 SERRS 珠子上积累，生物素掺入远离 SERRS 珠子的扩增子的末端。备选地，当在 SERRS 珠子上进行 PCR 存在问题时，可以进行靶的常规 PCR，然后导入 SERRS 珠子。

对于例如 5 重反应，5 种不同的引物可以固定于五种不同 SERRS 珠子上并且用与样品混合的所有珠子进行 PCR 反应。

图 8b 示意性显示了标记的产物 60，其在 PCR 反应后得到。使用附着到 SERRS 珠子的引物(见图 8a)和生物素化引物 62 的扩增导致生物素化产物的产生，其也掺入 SERRS 活性珠。

PCR 的初始筛选[任选的]

可通过由于双链 DNA 量的增加例如 Sybr Green(64，见图 8c)荧光的增加测量 PCR 的成功。使用 PCR 结束时的解离曲线将证实 PCR 产物而不是引物二聚体的存在。从而，如果存在扩增，那么荧光将显示该扩增。可能使用 QPCR 仪器测量 PCR 过程中荧光的增加，然后 PCR 后也可使用常规板读出器快速分析试管。认为合适时可以使用无模板对照物的对照管和具有无义 DNA 的珠子。

SERRS 珠子在表面的固定

一旦荧光增加的管已经被任选地鉴定为含有 PCR 产物，其内含物可以点到链霉抗生物素蛋白包被的载波片(66，见图 8d)上。这将具有 SERRS 珠子的生物素化 PCR 产物固定到载波片的表面。生物素化引物也将被固定(但是将不具有特异地可检测的 SERRS 信号)但是任何其他可以在一系列洗涤中洗掉。(这将包括添入的 Sybr Green，其可以发荧光并干扰 SERRS 信号)。从从而，一系列 SERRS 珠子现在将被固定在载波片的表面等待通过 SERRS 研究。

固定化珠子的 SERRS 分析

从被固定的 SERRS 珠子可以得到 SERRS 光谱以鉴定已经被用于产生 PCR 产物的实际的引物序列。SERRS 鉴定没有分离的混合物组分的能力可以用于可能通过眼从多重，例如五重的特定管中鉴定 SERRS 珠子，尽

管也可以使用统计学为非专业人员证实这一点，目的是增加复合程度。

通常，全部设置将消耗不超过标准 QPCR 实验的时间，即如果使用解离曲线为约 150 分钟，或者如果在标准 PCR 循环仪中使用较少循环为约 60 分钟。PCR 设置可以以这种方式安排：珠子上引物的有效浓度和终体积将进入总分析表（spread sheet）并且所有其他值自动显示。这使得设置 PCR 非常简单并减少了计算中的系统误差。PCR 完成后，可能需要将条带管的内含物吸移到微滴定板用于平板读数或者与机器人处理协调。备选地，任选直接吸移到链霉抗生物素蛋白板上。

可能使用与扩增相反的线性延伸将 SERRS 珠子掺入一个长双链 DNA 中。荧光检测不可能检测该部分但是 SERRS 珠子将在酶促延伸时报道是否有一个 DNA 或者上百万。

实施例 5 SERRS 珠子 DNA 结合测定法，利用生物素-链霉抗生物素蛋白结合亲和性

在这里给出了 SERRS 珠子结合测定法的一个实例。在该实例中分析了突变的膀胱纤维症基因的 110 个碱基长的序列。

SERRS 珠子的活性表面(用偶氮染料标记)用短寡核苷酸探针衍生化，该探针与突变膀胱纤维状基因上发现的 DNA 序列互补。突变 CF 链与互补探针合成处相反的序列末端的生物素基团连接。SERRS-DNA 探针被杂交到 CF-生物素序列并固定在链霉抗生物素蛋白板上。

方法

使用前面概述的方法用二乙烯基苯 80 和甲基丙烯酸合成 SERRS 珠子。珠子的表面被许多羧酸基团覆盖。这些活性酸性基团用于将寡核苷酸和其他分子附着到珠子的表面。

DNA 序列

使用快速 DNA 合成仪合成两种序列。

序列 A 含有胺接头 X。

序列 A

-X-GTATCTATATTCATCATAGGAAACACCATT

序列 B 含有生物素，B

序列 B

-B-GACTTCACTTCTAATGATGATTATGGGAGA

(X = 氨基环己烷（aminohexamethylene）并被加到 5'-末端以产生寡核苷酸，该寡核苷酸在固相合成和纯化后在碳链末端具有伯胺基团)。

纯化序列 A(400μl, 0.6mg/ml)并使用 0.1M PBS(750μl)缓冲液中的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC, 37mg)和 N-羟基琥珀酰亚胺(24mg)和乙腈(100μl)将序列 A 偶联到 SERRS 活性珠(70mg)。

将序列 B(0.5μM)与其 CF 互补引物和反向引物用于 PCR 扩增反应中。产物被纯化并加入到具有另外的序列 B 的 oligo 衍生的珠子并加入到 95℃ 10 分钟。

之后将 100μl 分散的溶液点到链霉抗生物素蛋白板上并在湿室中静置 3 小时。DNA 衍生的珠子用作对照。将板用 1% SDS 溶液、水和乙腈洗涤。干燥珠子并通过拉曼分光光度计（photospectroscopy）检查。

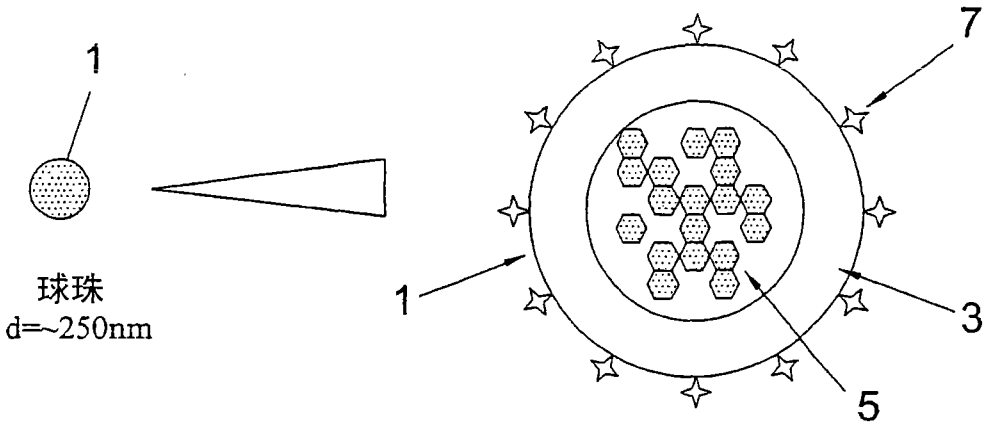

图 1

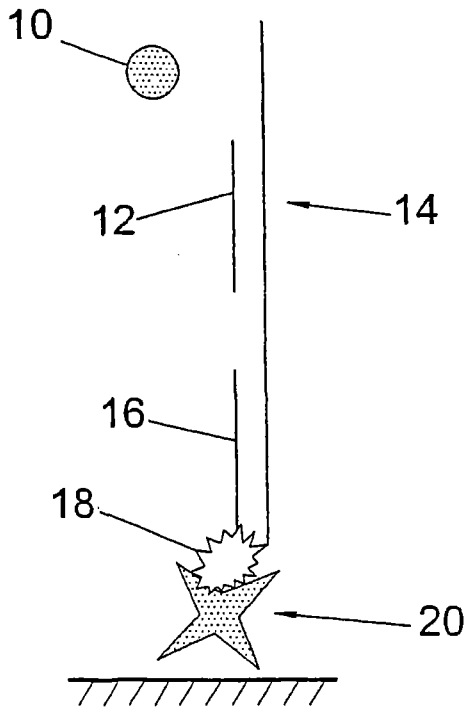

图 2

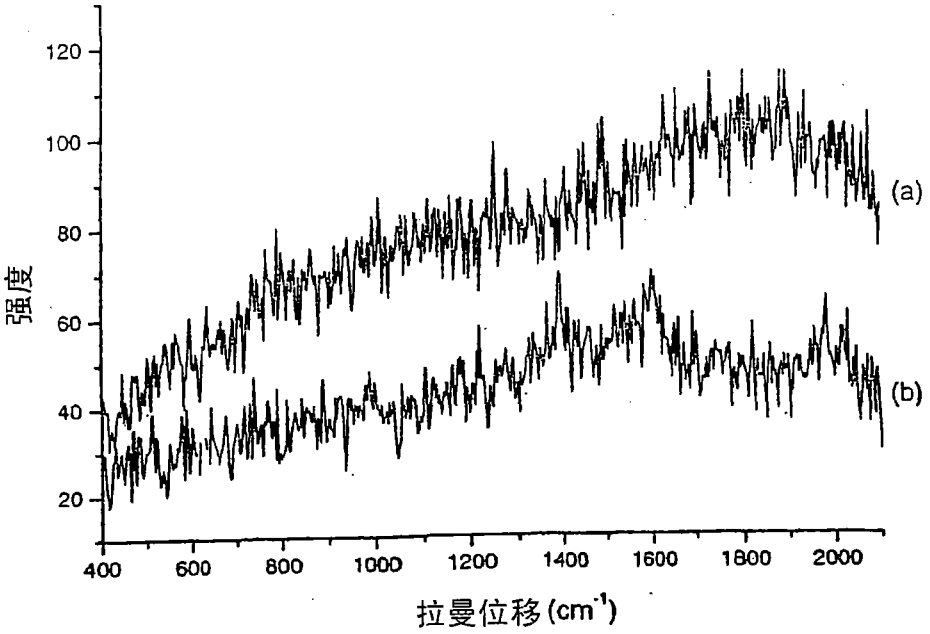
120
100
80
60
40
20
强度
(a)
(b)
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
拉曼位移(cm-1)

图 3

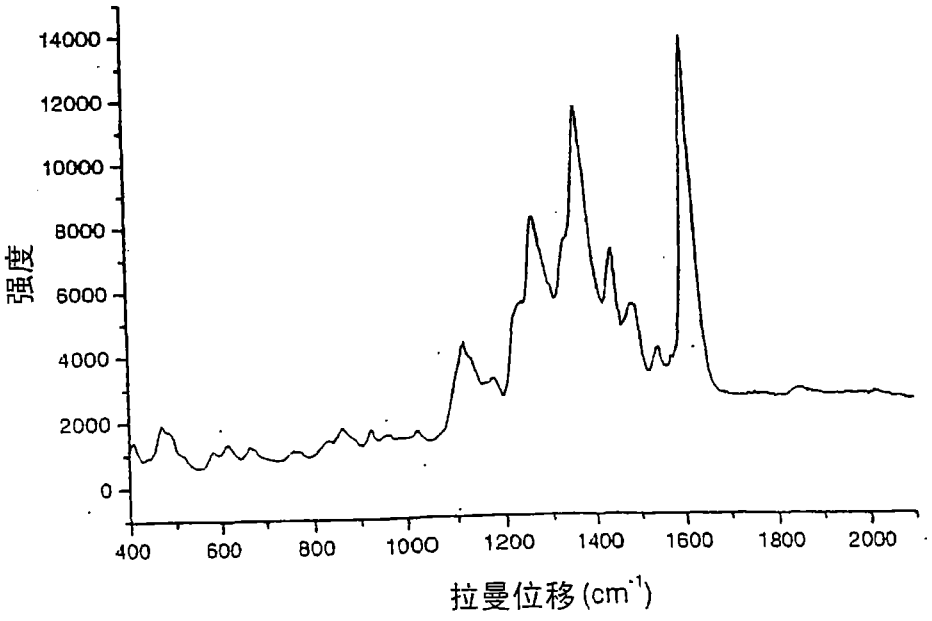
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
强度
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
拉曼位移(cm-1)

图 4

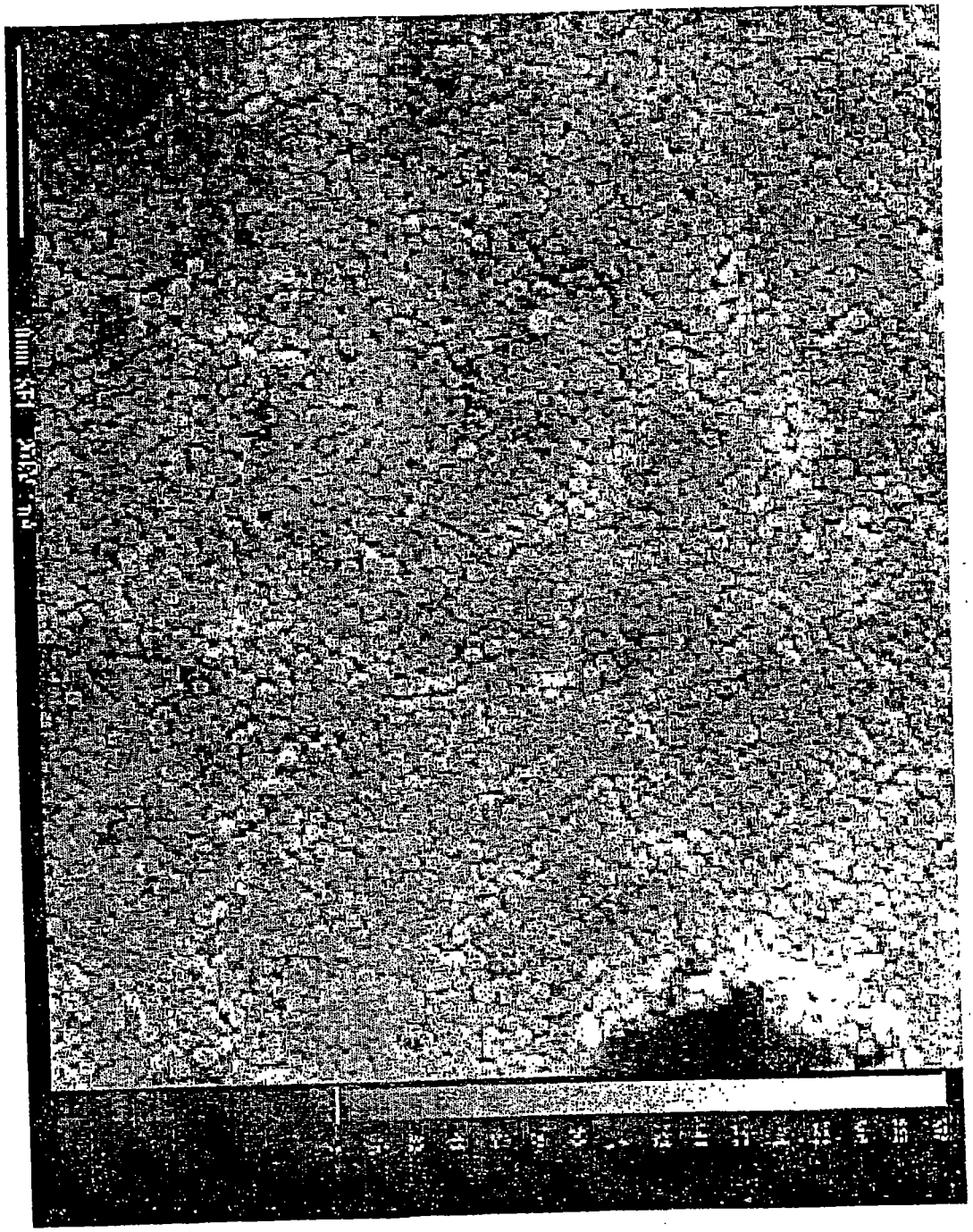

图 5

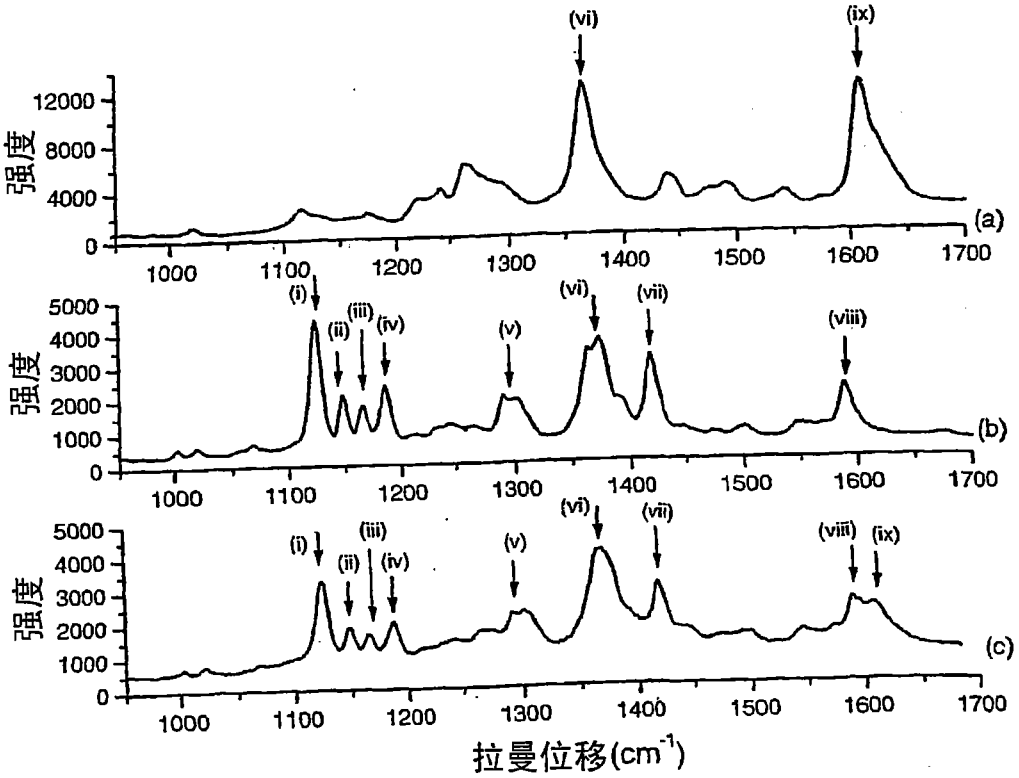
(vi)
(ix)
12000
8000
4000
0
强度
1000
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
(a)
(i)
(ii)
(iii)
(iv)
(v)
(vi)
(vii)
(viii)
5000
4000
3000
2000
1000
0
强度
(b)
(i)
(ii)
(iii)
(iv)
(v)
(vi)
(vii)
(viii)
(ix)
5000
4000
3000
2000
1000
0
强度
(c)
拉曼位移(cm-1)

图 6

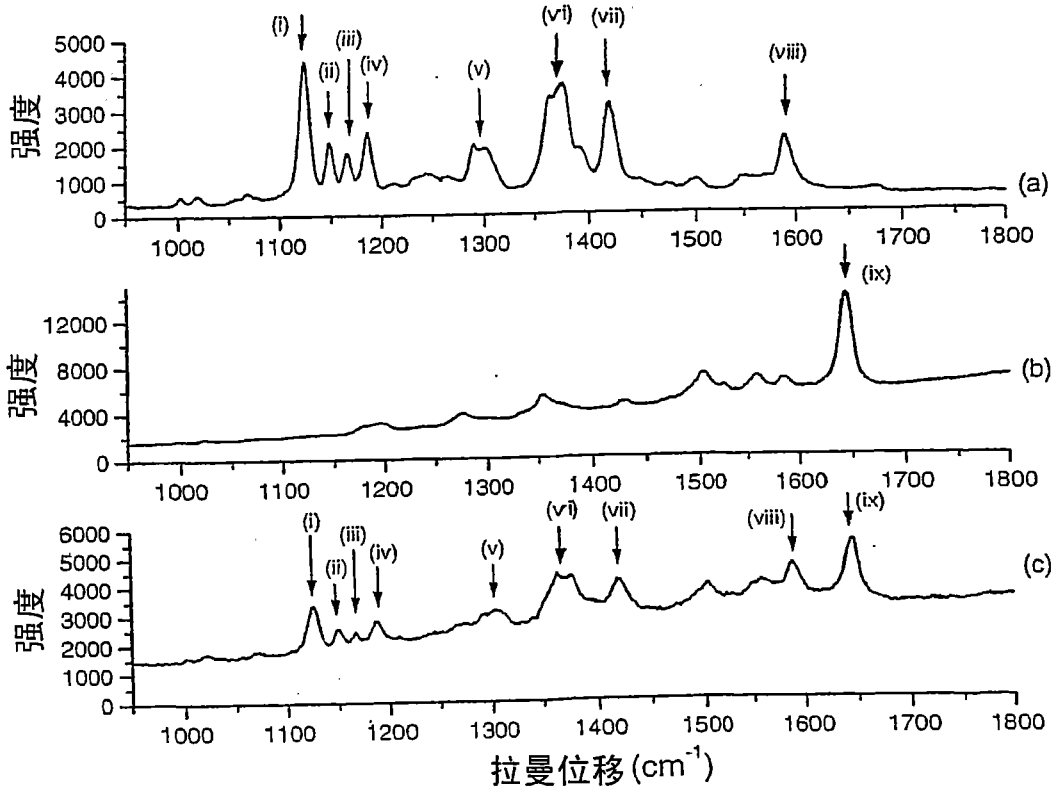

图 7

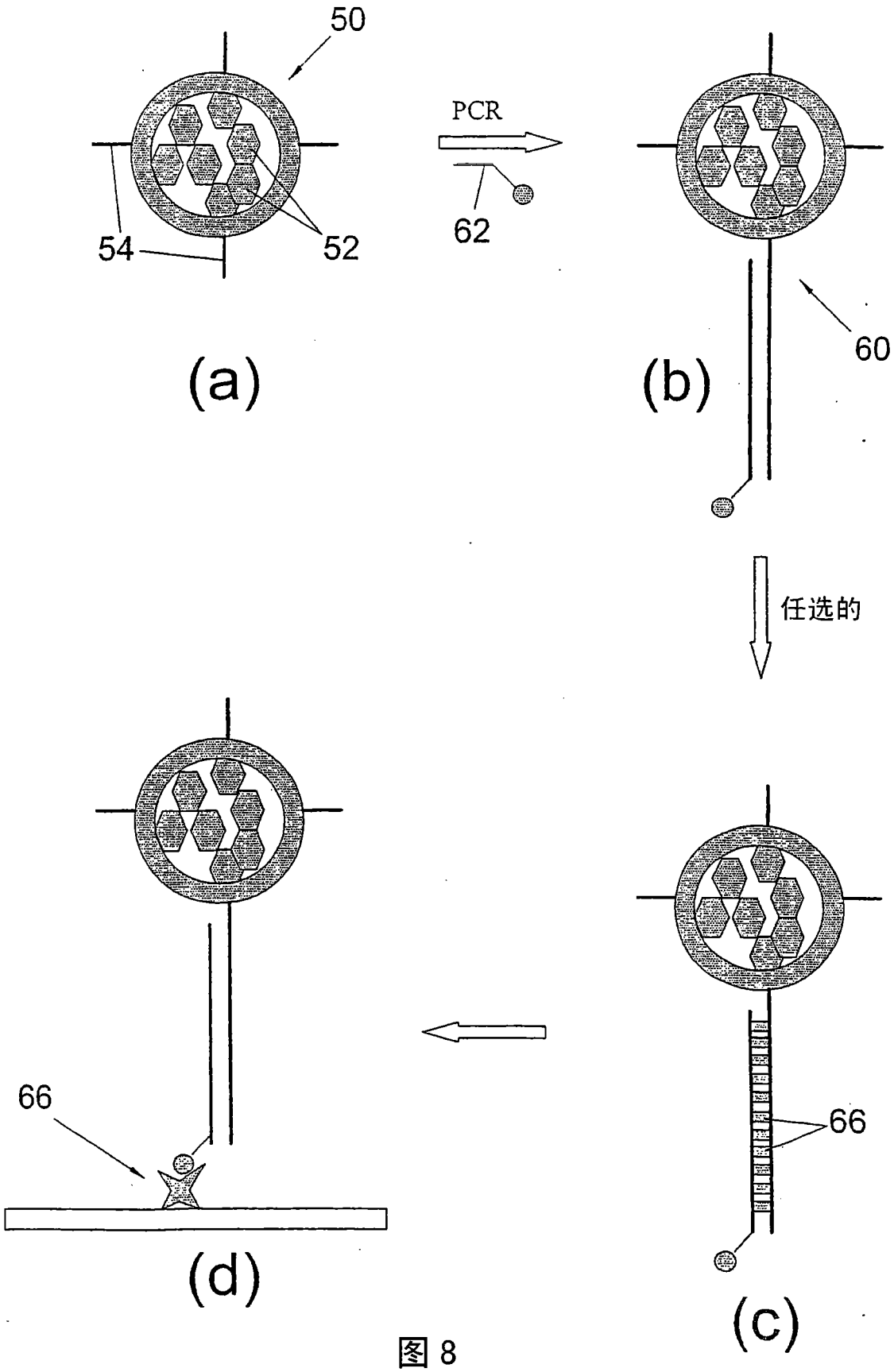

图 8