



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112400025 A

(43) 申请公布日 2021.02.23

(21) 申请号 201980046859.7

(22) 申请日 2019.07.10

(30) 优先权数据

62/697,514 2018.07.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/055896 2019.07.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/012391 EN 2020.01.16

(71) 申请人 3M创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 格雷戈里·W·西顿

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 王潜 郭国清

(51) Int.Cl.

C12Q 1/28 (2006.01)

C09B 15/00 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

权利要求书6页 说明书38页

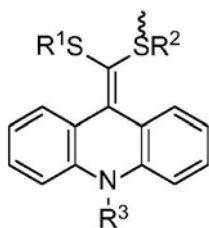
(54) 发明名称

测定

(57) 摘要

本发明公开了一种测定样品中的分析物的方法以及用于执行所述测定的试剂盒。

1. 一种测定样品中的分析物的方法,所述方法包括
形成反应混合物,以及
将触发溶液与所述反应混合物混合;其中
待测定的所述分析物可存在于所述样品中,
所述反应混合物为水性溶液,所述水性溶液包含
化学发光标记的特异性结合配偶体,所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第一特异性结合配偶体的化学发光标记物,所述化学发光标记的特异性结合配偶体能够与所述分析物结合以形成分析物结合的化学发光标记的特异性结合复合物,
活化剂标记的特异性结合配偶体,所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第二特异性结合配偶体的活化剂标记物,和
选择性信号抑制剂;并且
所述触发溶液能够由未结合的化学发光底物产生背景信号,并且
在存在分析物的情况下,触发溶液能够产生与所述样品中所述分析物的量相关的可检测分析物信号;其特征在于
所述反应混合物还包含未结合的化学发光底物。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述触发溶液还包含增强剂。
3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述增强剂选自酚类化合物、芳香胺、苯并噁唑、羟基苯并噁唑、芳基硼酸以及前述物质中的任一些的混合物。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述触发溶液包含氧化剂或还原剂。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述触发溶液包含过氧化物。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述选择性信号抑制剂选自抗坏血酸、异抗坏血酸、6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸、抗坏血酸6-棕榈酸酯、5,6-异亚丙基-抗坏血酸、丁基化羟基甲苯、谷胱甘肽、尿酸、一种或多种生育酚以及儿茶素。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述活化剂标记物为过氧化物酶。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含直接或间接连接到特异性结合配偶体的化学发光标记物,其中所述化学发光标记物具有下式



其中

波浪线表示与所述特异性结合配偶体附接或与将所述化合物连接到所述特异性结合配偶体的连接基附接的位点;

R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自1个至20个碳原子的取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基基团,其中当 R^1 或 R^2 被取代时,其被1个至3个取代基取代,每个取代基独立地选自羰基、羧基、三(C1-C8)烷

基甲硅烷基、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{OSO}_3^{2-}$ 、糖基、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{OPo}_3^{2-}$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、 $\text{C}(0)\text{NHNH}_2$ 、季铵和季磷。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体和所述活化剂标记的特异性结合配偶体各自与所述样品中的所述分析物结合。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含连接到所述分析物的类似物的化学发光标记的化合物, 并且进一步地, 其中所述分析物和所述化学发光标记的特异性结合配偶体竞争以与所述活化剂标记的特异性结合配偶体结合。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述未结合的化学发光底物选自鲁米诺, 异鲁米诺, 洛芬碱, 吡啶酯, 例如光泽精, 和9,10-二氢吡啶, 邻苯二甲酰肼, 例如2,3-二氢-1,4-双酮酞嗪, 荧光素, 和含1,2-二氧杂环丁烷的化合物, 例如二酮、3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMPPD)和3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"- β -D'-吡喃半乳糖基氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMPGD)、3-(4-甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠和1,2-二氧杂环丁烷二酮、金刚烷叉基-金刚烷基-1,2-二氧杂环丁烷, 特别是鲁米诺或异鲁米诺, 并且更特别是鲁米诺。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法还包括检测分析物信号和背景信号。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中检测分析物信号包括从至少一个是具有已知分析物浓度的标准样品的样品中检测至少一个标准分析物信号, 并且还包括从至少一个具有未知分析物浓度的试验样品中检测试验分析物信号。

14. 根据权利要求12或13所述的方法, 其中检测背景信号包括从至少一个是具有已知分析物浓度的标准样品的样品中检测至少一个标准背景信号, 并且还包括从至少一个具有未知分析物浓度的试验样品中检测试验背景信号。

15. 一种用于测定分析物的试剂盒, 所述试剂盒包括

化学发光标记的特异性结合配偶体, 所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第一特异性结合配偶体的化学发光标记物, 所述化学发光标记的特异性结合配偶体能够与所述分析物结合以形成分析物结合的化学发光标记的特异性结合复合物,

活化剂标记的特异性结合配偶体, 所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第二特异性结合配偶体的活化剂标记物, 和

选择性信号抑制剂; 并且其中

触发溶液能够由未结合的化学发光底物产生背景信号; 其中

在存在分析物的情况下, 所述触发溶液能够产生与所述样品中所述分析物的量相关的可检测分析物信号;

其特征在于所述反应混合物还包含未结合的化学发光底物。

16. 根据权利要求14所述的试剂盒, 其中所述触发溶液还包含增强剂, 所述增强剂选自酚类化合物、芳香胺、苯并噻唑、羟基苯并噻唑、芳基硼酸以及前述物质中的任一些的混合物。

17. 根据权利要求14至15中任一项所述的试剂盒, 其中所述未结合的化学发光底物选

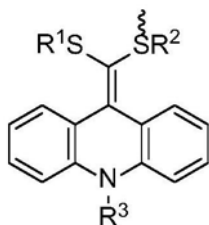
自鲁米诺,异鲁米诺,洛芬碱,吡啶酯,例如光泽精,和9,10-二氢吡啶,邻苯二甲酰肼,例如2,3-二氢-1,4-双酮酞嗪,荧光素,和含1,2-二氧杂环丁烷的化合物,例如二酮-3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMPPD)和3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-β-D'-吡喃半乳糖基氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMPGD)、3-(4-甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠和1,2-二氧杂环丁烷二酮、金刚烷叉基-金刚烷基-1,2-二氧杂环丁烷,特别是鲁米诺或异鲁米诺,并且更特别是鲁米诺。

18. 一种用于样品中的分析物的溶液相测定方法,所述溶液相测定方法包括:

c) 形成水性反应混合物,所述水性反应混合物包含通过以任何顺序或同时添加到水性溶液中的以下组分:

样品,

化学发光标记的特异性结合配偶体,所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含直接或间接连接到第一特异性结合配偶体的化学发光标记化合物,其中所述化学发光标记化合物为下式的化合物



其中

波浪线表示与所述特异性结合配偶体附接或与将所述化合物连接到所述特异性结合配偶体的连接基附接的位点;

R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自1个至20个碳原子的取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基基团,其中当 R^1 或 R^2 被取代时,其被1个至3个取代基取代,每个取代基独立地选自羰基、羧基、三(C1-C8)烷基甲硅烷基、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^{2-}$ 、糖基、 $-PO_3^-$ 、 $-OPO_3^{2-}$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、C(0)NHNH₂、季铵和季磷,

活化剂标记的特异性结合配偶体,所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含具有过氧化物酶活性的直接或间接连接到第二特异性结合配偶体的活化剂标记化合物,和

选择性信号抑制剂,所述选择性信号抑制剂选自L-抗坏血酸、6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸、2-氨基酚、3-氨基-L-酪氨酸、4-氯邻苯二酚、吩噻嗪、2-溴苯并-1,4,-二醇、5,6-异亚丙基抗坏血酸和抗坏血酸6-棕榈酸酯,

其中所有的所述组分均能够溶于所述水性溶液中,并且所述组分均未被固定到固体载体上,并且

其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体和所述活化剂标记的特异性结合配偶体与存在于所述样品中的所述分析物结合以在所述水性溶液中形成结合的复合物;以及

d) 向所述水性反应混合物中添加包含过氧化物化合物的触发溶液,其中所述触发溶液在存在所述选择性信号抑制剂的情况下释放可检测化学发光信号,所述可检测化学发光信号与所述水性反应混合物中的所述分析物结合的化学发光标记的特异性结合配偶体和所

述分析物结合的活化剂标记的特异性结合配偶体的量相关,并且其中所述选择性信号抑制剂导致由所述化学发光标记化合物和所述活化剂标记化合物之间的反应产生的信号的比率,超过当不在此类组合中时来自所述化学发光标记化合物和所述活化剂标记化合物之间的反应的信号的比率;

其特征在于

所述反应混合物还包含未结合的化学发光底物,所述未结合的化学发光底物产生了与所述样品中所述分析物的所述浓度不相关的可检测背景信号。

19. 一种用于检测样品中的分析物的试剂盒,所述试剂盒包括:

用于所述分析物的第一特异性结合配偶体;

缀合至所述第一特异性结合配偶体的化学发光化合物;

用于所述分析物的第二特异性结合配偶体;

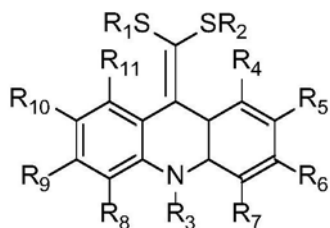
缀合至所述第二特异性结合配偶体的活化剂化合物;

选择性信号抑制剂;和

触发溶液,

其中所述试剂盒的所有前述组分能够溶于水性溶液中,

其中所述化学发光化合物为具有下式的9,10-二氢吡啶乙烯酮二硫缩醛化合物

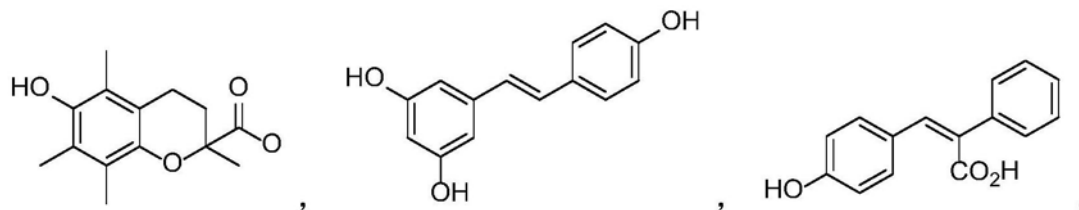


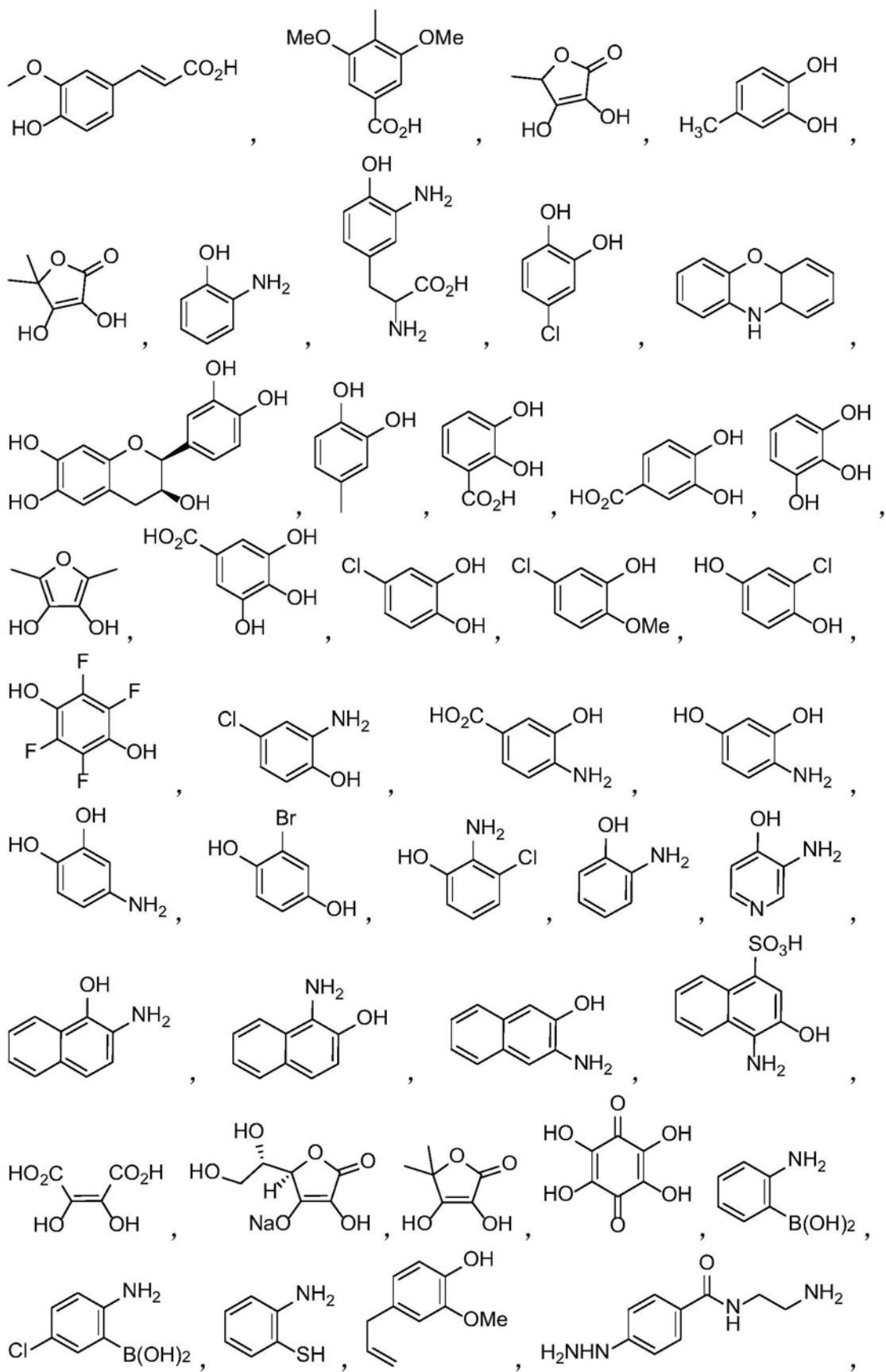
其中R₁和R₂中的每一者选自H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基或取代的芳烷基,当R₁和R₂被取代时,其最常见地被1个至3个基团取代,所述基团选自羰基、羧基、三(烷基)甲硅烷基、糖基、-SO₃⁻、-OSO₃⁻、-PO₃⁻、-OP₃⁻、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵和季磷,

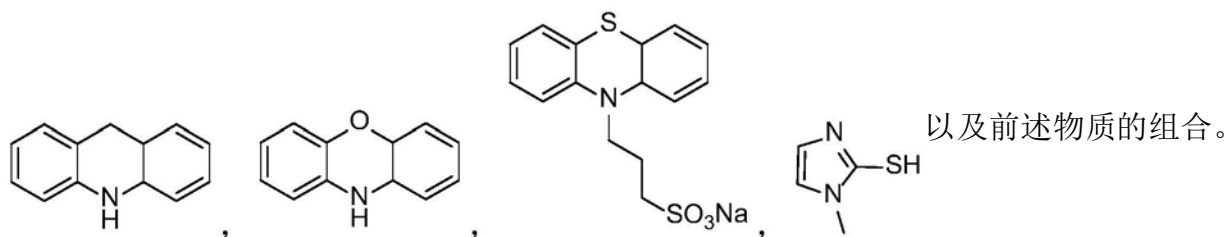
R₃选自H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基或取代的芳烷基,

R₄至R₁₁中的每一者独立地为H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、烷氧基、芳氧基、卤素、氨基、取代的胺、羧基、烷氧羰基、羧基酰胺、氰基或磺酸基,其中成对的邻近的R₄至R₁₁部分可共价结合以形成五元至七元的碳环或杂环,

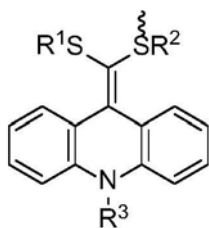
其中所述选择性信号抑制剂选自谷胱甘肽,抗坏血酸,尤其是L-抗坏血酸,抗坏血酸盐,尤其是L-抗坏血酸盐,尿酸,L-抗坏血酸-6-棕榈酸酯,生育酚,5,6-异亚丙基-L-抗坏血酸,异抗坏血酸,包括D-异抗坏血酸、L-异抗坏血酸或两者,亚硫酸钠,二乙基羟胺,BHT,







20. 根据权利要求19所述的试剂盒, 其中所述化学发光标记化合物为下式的化合物



其中

波浪线表示与所述特异性结合配偶体附接或与将所述化合物连接到所述特异性结合配偶体的连接基附接的位点;

R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自1个至20个碳原子的取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基基团, 其中当 R^1 或 R^2 被取代时, 其被1个至3个取代基取代, 每个取代基独立地选自羰基、羧基、三(C1-C8)烷基甲硅烷基、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^{2-}$ 、糖基、 $-PO_3^-$ 、 $-OPO_3^{2-}$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、 $C(=O)NHNH_2$ 、季铵和季磷。

测定

背景技术

[0001] 溶液相发光测定是已知的,例如在W02010099486中。已知的测定基于特异性结合配偶体的特异性识别和结合在一起来检测物质的存在或量。例如,在免疫测定法中,抗体与特定的结合配偶体结合。又如,在核酸结合测定中,核酸链(例如核酸配体)与特异性结合配偶体结合。一些测定使用化学发光来产生信号并使该信号与分析物的量相关。

发明内容

[0002] 测定样品中的分析物的方法可包括形成反应混合物并将触发溶液与所述反应混合物混合。待测定的所述分析物可存在于所述样品中,但所述测定也可显示不存在所述分析物。所述反应混合物为水性溶液,所述水性溶液包含:化学发光标记的特异性结合配偶体,所述特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第一特异性结合配偶体的化学发光标记物,所述化学发光标记的特异性结合配偶体能够与所述分析物结合以形成分析物结合的化学发光标记的特异性结合复合物;活化剂标记的特异性结合配偶体,所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第二特异性结合配偶体的活化剂标记物;和选择性信号抑制剂。

[0003] 所述反应混合物还包含未结合的化学发光底物。

[0004] 所述触发溶液能够由所述未结合的化学发光底物产生背景信号,并且在存在分析物的情况下,触发溶液能够产生与所述样品中所述分析物的量相关的可检测分析物信号。

[0005] 试剂盒可包括进行上述测定所必需的除所述样品之外的组分。

具体实施方式

[0006] 在整个本公开中,为方便起见,常常使用单数形式例如“一种”、“一个”和“该/所述”;然而,除非上下文明确规定或清楚指示仅为单数,否则单数形式意指包括复数。当单独称为单数时,通常使用术语“仅仅一个”。

[0007] 术语例如“共同”、“常见地”、“通常”、“常见”和“一般”用于指制备或实践本文所述发明的共同、典型或常见方式的特征。这些术语不应理解为意指此类特征存在于现有技术中,远少于它们在现有技术中共同、典型或常见的特征。

[0008] 本公开中的一些术语定义如下。其它术语对于本领域的技术人员将是熟悉的,并且应当被赋予本领域的普通技术人员将赋予它们的含义。

[0009] 分析物:待在测定中检测或定量的物质。在测定中通常使用对分析物具有特异性结合亲和力的一种或多种物质(并且尤其是一种或多种特异性结合配偶体)以有利于检测分析物。分析物可以为特异性结合配偶体可结合的蛋白质、肽、核苷酸、核苷、抗体、半抗原、小分子(即,非聚合分子)等。示例性分析物不仅包括药物,例如类固醇、激素、蛋白质、糖蛋白、粘蛋白、核蛋白、磷蛋白、阿片类、维生素、抗菌剂、抗真菌剂、抗病毒药、嘌呤、抗肿瘤剂、苯丙胺、氮杂卓类、前列腺素以及药物代谢物,而且还包括核苷、有机核苷、核苷酸、有机核苷酸、核糖核苷、DNA、DNA链段、RNA、RNA链段、PDNA、PDNA链段、核酸配体、毒素类(例如红血

球毒素、光毒素、神经毒素、氰基毒素、鳍藻毒素、坏死毒素、肌毒素)、霉菌毒素(例如T-2霉菌毒素、黄曲霉素、肉毒毒素、蓖麻毒素、蜂毒)以及其他环境毒素或生物毒素。分析物也可以为细胞、病毒、细菌或真菌。

[0010] 活化剂:引起化学发光化合物的活化使得在存在触发物的情况下化学发光化合物发光的化合物。

[0011] 活化剂标记的特异性结合配偶体:包括用于分析物的特异性结合成员以及直接或间接(例如,通过连接基)结合到特异性结合配偶体的活化剂的反应物。

[0012] 化学发光化合物:例如通过转化成以电子激发态形成的另一种化合物或通过转化成电子激发态然后弛豫到基态而发生导致光发射的反应的化合物。激发态可以为单重激发态或三重激发态。激发态可在弛豫到基态时直接发射光,或者可首先例如通过Forester或Dexter机制将能量转移到继而发射光的能量受体。

[0013] 化学发光标记的特异性结合配偶体:包括用于分析物的特异性结合成员以及直接或间接(例如,通过连接基)结合到特异性结合配偶体的化学发光化合物的反应物。

[0014] 分析物信号:与样品中存在的分析物的量相关的信号,例如来自测定的化学发光输出。

[0015] 背景信号:不与样品中存在的分析物的量相关的信号,例如化学发光输出。

[0016] 不可逆键:使两个部分(通常为特异性结合配偶体和化学发光标记物或特异性结合配偶体和活化剂标记物)相缔合的键,该键在执行本文所述的测定时不会断裂。不可逆键可通过一些其他方式断裂,例如使用化合物或在物理条件例如温度下断裂,该不可逆键在本文所述的测定期间不暴露于其中。可以为不可逆键的典型键包括共价键、离子键等。通过不可逆键连接的两个部分被称为“不可逆地结合”。不可逆键区别于可逆结合相互作用,例如特异性结合配偶体或分析物与特异性结合配偶体的可逆结合。

[0017] 基于现有技术化学发光的测定结合测定(例如US20100267071中所述的免疫测定法)以及其他测定(例如基于核酸配体结合等的那些测定)将具有未知分析物浓度的试验样品的化学发光信号与通过使用具有已知分析物浓度的多个样品生成的标准曲线进行比较。

[0018] 在特异性化学发光测定中,如例如US20100267071中所述,将包含未知浓度分析物的试验样品与包含化学发光标记的特异性结合配偶体、活化剂标记的特异性结合配偶体和选择性信号抑制剂的测定溶液混合以形成反应混合物。然后将触发溶液与反应混合物混合。触发溶液包含氧化剂或还原剂,通常为过氧化物,并且在许多情况下为增强剂。

[0019] 该测定以两种形式中的一种进行。在“竞争性测定”形式中,活化剂标记的特异性结合配偶体与化学发光标记的特异性结合配偶体在可预先形成或可原位形成的复合物中结合。当存在分析物时,分析物和化学发光标记的特异性结合配偶体竞争以结合分析物。在存在触发溶液的情况下,化学发光标记的特异性结合配偶体上的结合到活化剂标记的特异性结合配偶体的化学发光标记物可操作地接近活化剂标记的特异性结合配偶体并因此被活化,从而导致发光。结合到分析物的化学发光标记的特异性结合配偶体并未可操作地接近活化剂标记的特异性结合配偶体,因此其化学发光标记物未被活化并且不发光。在该形式中,分析物信号为发光强度,并且其与分析物浓度负相关。

[0020] 一种另选形式为“夹心测定”形式,由此通常在分析物的不同部分上,活化剂标记的特异性结合配偶体和化学发光标记的特异性结合配偶体均与分析物结合,以使化学发光

标记物与活化剂标记的结合配偶体可操作地接近。所得的“夹心”复合物中的化学发光标记的特异性结合配偶体的化学发光标记物可操作地接近活化剂标记的特异性结合配偶体，因此发光。在不存在分析物的情况下，活化剂标记的结合配偶体并未可操作地接近活化剂标记的特异性结合配偶体，因此不发光。在该形式中，分析物信号为发光强度并且其与分析物浓度正相关。

[0021] 在任一种情况下，在光度计中测量试验样品中的分析物信号的强度，并且将其与通过用具有已知分析物浓度的标准样品进行相同测定而构建的发光强度与浓度的标准曲线进行比较。然后将分析物信号与标准曲线相关提供了分析物的浓度。

[0022] 虽然当被分析的样品仅包含分析物和水时这是可接受的，但化学发光的大多数商业应用也将包含除分析物之外的其他物质。例如，当分析来自食物物质的试验样品中是否存在毒素时，则除该毒素之外，通常还将存在许多化合物，例如来自食物物质的残余化合物。这些其他化合物可干扰分析物信号的产生，通常通过干扰产生化学发光物类的氧化或还原反应。在这种情况下，分析物信号与标准曲线的相关性将不会在试验样品中提供分析物的准确浓度，因为标准曲线将由不包含这些其他干扰化合物的溶液生成。这会导致相关性误差，其中分析物信号与标准曲线的比较不能准确地提供试验样品中的分析物的浓度。例如，可使用的一种选择性信号抑制剂为抗坏血酸，抗坏血酸也天然地或作为添加的抗氧化剂存在于许多食物物质中。如果试验样品中存在显著量的抗坏血酸，则其可进一步抑制来自试验样品的分析物信号的产生，并且通过分析物信号与标准曲线的相关性获得的浓度可能过低。这可能是显著的问题，尤其是当测定有害的食物污染物时，因为该测定可能不正确地表明当食物事实上具有不安全水平的污染物时，食物具有安全水平的污染物。

[0023] 更一般地，可由被分析样品中的其他化合物的干扰引起的分析物浓度误差可为显著的，在一些情况下可高达40%或甚至更大。在分析食物样品的毒素的示例中，一些毒素在低至5ppb或甚至更低的水平下对于动物食用为不安全的。因此，这些误差可能意味着一方面丢弃事实上可安全食用的食物样品，或者另一方面提供毒素以安全水平存在的错误信念而事实上毒素可导致食用其的动物患病或死亡的不安全水平存在，这是有区别的。

[0024] 对于该问题的现有技术解决方案尚不可接受。从试验样品中去除除分析物之外的化合物以防止干扰结合为异常困难的，并且即使不是不可能的，在商业环境中实现也是不切实际的，因为在商业环境中在试验样品中可存在数千、数万、或甚至更多种未知种类的不同化合物。另一种不可接受的现有技术解决方案为将试验样品显著稀释至其中可忽略除分析物之外的化合物干扰的点。该溶液为不可接受的，因为分析物浓度也被稀释，因此分析物的最低检测水平（“LLD”）和最低定量水平（LLQ）降低。如上所述，许多相关分析物的浓度需要被确定为ppb水平，因此LLQ和LLD的降低使得涉及试验样品的大量稀释的解决方案不可接受。

[0025] 不仅可接受的解决方案应避免上述缺点，也就是说，用于商业环境中应当是可行的，并且不需要对试验样品进行显著稀释，但其也应当可与多种粘合剂一起使用，这意味着该技术不应依赖于结合配偶体（例如，抗体、核酸配体等）的性质，使得其可应用于多种不同类型的结合测定。

[0026] 本公开提供了此类技术解决方案。简而言之，下文更详细描述的技术解决方案涉及使用化学发光底物作为背景剂。背景剂在存在触发溶液的情况下提供发光背景信号（通

过导致来自化学发光标记物的分析物信号的相同系列的氧化或还原反应), 但与分析物与化学发光标记的特异性结合配偶体的结合无关。即, 背景剂不需要与任何结合配偶体结合以便产生背景信号。背景剂以相同的已知量存在于用于构建标准曲线的标准物中。它也以相同的浓度与化学发光标记的结合配偶体一起存在于测定溶液中。因此, 在没有化合物干扰分析物信号和背景信号(例如, 分析物为试验样品中唯一溶解的化合物)的氧化或还原反应的情况下, 试验样品中的背景信号将与标准样品中的背景信号相同。然而, 当存在对化合物的干扰时, 则来自试验样品的背景信号将不同于来自标准样品的背景信号。获取来自标准样品的背景信号与来自试验样品的背景信号的比率以提供比例因子。比例因子乘以所观察到的分析物信号提供了已针对干扰化合物的存在进行校正的“经校正的分析物信号”。将经校正的分析物信号而非所观察到的分析物信号与标准曲线相关提供了对试验样品中的分析物浓度的准确指示。

[0027] 特异性结合配偶体

[0028] 采用两个标记的特异性结合配偶体: 一个为活化剂标记的, 并且另一个为化学发光标记的。特异性结合配偶体中的每个特异性结合配偶体为对另一种物质具有特异性亲和力的分子, 一般为生物分子。示例包括DNA、RNA、寡核苷酸、核酸配体、抗原、抗体、抗体-DNA嵌合体、半抗原、蛋白质、肽、凝集素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和生物素。

[0029] 每个特异性结合配偶体通常与其他配偶体不同, 因为两个特异性结合配偶体不竞争分析物上的相同或重叠的结合位点。对于其中活化剂标记的特异性结合配偶体和化学发光标记的特异性结合配偶体两者的特异性结合配偶体部分为抗体的典型情况, 抗体中的每个抗体在分析物上具有不同的非竞争性表位。

[0030] 可组合使用(即, 一个可具有化学发光标记物而另一个可具有活化剂标记物)的特异性结合配偶体的示例包括互补寡核苷酸或多核苷酸(例如DNA、RNA、核酸配体等)、抗生物素蛋白-生物素、链霉抗生物素蛋白-生物素、激素-受体、凝集素-碳水化合物、IG蛋白A-结合蛋白受体、核酸-核酸结合蛋白、核酸配体-核酸配体和核酸-抗核酸抗体。US20100267071中讨论的特异性结合配偶体为合适的。

[0031] 这些方法中的任一者均可适于竞争性测定形式或夹心测定形式。特异性结合配偶体的种类确定了测定的形式, 具体地, 测定是夹心测定还是竞争性测定。在任一种情况下, 选择用于化学发光标记的特异性结合配偶体的特异性结合配偶体以特异性结合分析物。最常见的为使用抗体, 但也可采用上文所讨论的特异性结合配偶体中的任一者。为了适应竞争性测定形式, 将活化剂标记的特异性结合配偶体设计为活化剂-分析物类似物缀合物。在这种情况下, 活化剂直接或通过包含如本文所讨论的辅助物质的连接基缀合至分析物的类似物, 该类似物可以为分析物本身或者为与分析物具有足够结构相似性的化合物, 使得该化合物也以与分析物基本上相同的方式结合到化学发光标记的特异性结合配偶体。

[0032] 为了适应夹心测定形式, 化学发光标记的特异性结合配偶体和活化剂标记的特异性结合配偶体两者特异性地与分析物结合。在这种情况下, 用于活化剂标记的特异性结合配偶体的特异性结合配偶体通常为抗体, 但是它也可以为核酸配体或上述特异性结合配偶体中的任一者。在这种情况下, 化学发光标记的特异性结合配偶体和活化剂标记的特异性结合配偶体两者与分析物结合, 通常与分析物上的不同结合位点结合。

[0033] 竞争性测定和夹心测定两者为本领域已知的, 并且用于完成这些改编的方法为已

知的。关于测定形式和特异性结合配偶体的示例和附加细节可见于US20100267071。

[0034] 化学发光标记的特异性结合配偶体

[0035] 化学发光标记的特异性结合配偶体通常以小于 10^{-4} M、具体地为小于 10^{-6} M、并且具体地为 10^{-11} M至 10^{-7} M的浓度存在于反应混合物中。

[0036] 化学发光标记的特异性结合配偶体包括一般通过不可逆键用化学发光标记物标记的特异性结合配偶体。通常，特异性结合配偶体的每个分子具有不可逆地结合到其上的至少一个化学发光标记物。在一些情况下，可存在结合到每个特异性结合配偶体的多达 10^2 个或甚至更多的化学发光标记物。每个特异性结合配偶体分子不必具有相同数量的化学发光标记物。

[0037] 一个或多个化学发光标记物可以为任何合适的化学发光部分，该化学发光部分可通常通过不可逆键与特异性结合配偶体结合。该键（通常为不可逆键）可以为直接连接或间接连接。在直接连接中，该一个或多个化学发光标记物直接连接到特异性结合配偶体，而在该一个或多个化学发光标记物和特异性结合配偶体之间不使用连接基或辅助物质。直接连接通常通过不可逆键，例如离子键、共价键、疏水相互作用、氢键等，并且最常见的为共价键。

[0038] 当采用间接连接时，连接基（在本领域中有时称为辅助物质）用于连接该一个或多个化学发光标记物和特异性结合配偶体。任何合适的连接基都可使用；合适的连接基将不会阻止该一种或多种化学发光标记物发光，并且通常不会使化学发光标记的特异性结合配偶体不溶于水性介质。示例性连接基包括蛋白质，例如链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、中和亲和素、生物素、阳离子化BSA、fos、jun、钥孔血蓝蛋白、免疫球蛋白（包括其片段或部分）、脂质体、胶束、合成树枝状聚合物例如AMAM、合成聚合物例如聚丙烯酸、天然聚合物例如多糖（例如官能化葡聚糖、多核苷酸、核酸配体和寡核苷酸等）。多糖，尤其是氨基右旋糖酐或羧基右旋糖酐以及自组装蛋白质为最常用的。

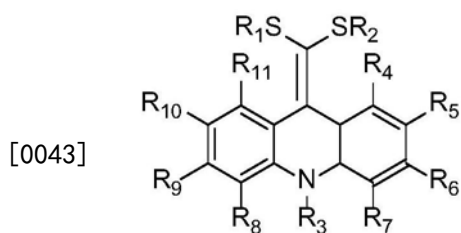
[0039] 化学发光标记物通过使通式CL-L-RG的化合物与特异性结合配偶体反应而形成，其中CL表示化学发光部分，L表示连接基或共价键，并且RG表示反应性基团。一旦反应完成，化学发光部分就会变成化学发光标记的特异性结合配偶体上的化学发光标记物。化学发光标记物与触发溶液中的氧化剂或还原剂或者与活化剂标记的特异性结合配偶体中的活化剂标记物反应以形成活化的化学发光化合物，该化学发光化合物通常为化学发光标记物的激发态。激发态可以为单重激发态亦或三重激发态。激发态既可以随着发光而弛豫，也可以发生能量转移至继而发光的发射能量受体。在特定实施方案中，发光在添加触发溶液后非常快速地发生，更具体地在添加触发溶液后2秒内达到峰值强度。然而，这不是必需的，因为只要在足够的时间段内测量分析物信号，较慢的反应也可给出准确的结果。

[0040] 适于结合到特异性结合配偶体（例如抗体或抗体片段）的多种化学发光化合物为本领域已知的。这些化学发光化合物中的任一者均可用于本文所述的测定中。

[0041] 示例性化学发光部分和化学发光标记物包括芳族环状双酰肼类（例如鲁米诺、异鲁米诺、氨基丁基乙基异鲁米诺、氨基己基乙基异鲁米诺、7-二甲基氨基萘-1,2-二羧酸酰肼、环取代的氨基邻苯二甲酰肼、蒽-2,3-二羧酸酰肼、菲-1,2-二羧酸酰肼、茈二羧酸酰肼、5-羟基邻苯二甲酰肼、6-羟基邻苯二甲酰肼）、咕吨染料（例如荧光素、伊红、罗丹明染料、rhodol染料）、化学发光芳香胺或杂环胺、MCLA、吡啶乙酸、异丁醛、三羟基芳族化合物（例如

连苯三酚、间苯三酚和红倍酚)、以及US5420275和US5324835中公开的双酮酞嗪化合物、9,10-二氢吡啶乙烯酮二硫缩醛化合物以及前述物质的组合。虽然这些标记物中的任一者可与或不与发射能量受体一起使用,但是异丁醛最常与发射能量受体一起使用。

[0042] 一些化学发光标记物可以为式I的标记物:



I

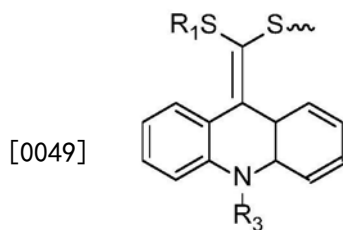
[0044] 在式I的标记物中, R_1 和 R_2 中的每一者独立地为H或含有选自C、N、O、S、P、Si和卤素的1个至50个原子加上足以满足非氢原子化合价的氢原子的有机部分。最常见地, R_1 和 R_2 中的每一者独立地为特异性结合配偶体的连接基、H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基或取代的芳烷基。当 R_1 和 R_2 被取代时,其最常见地被1个至3个基团取代,这些基团选自羰基、羧基、三(烷基)甲硅烷基、糖基、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^-$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-OPo_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵和季磷。

[0045] 在式I的标记物中, R_3 为H或含有选自C、N、O、S、P、Si和卤素的1至50个原子(最常见地为1个至20个原子)加上足以满足非氢原子化合价的氢原子的有机部分。最常见地, R_3 为特异性结合配偶体的连接基、H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基或取代的芳烷基。在这种情况下, R_3 最常具有1个至20个碳原子。在许多情况下, R_3 为具有1个至4个碳原子的烷基、苯基、苄基、取代的苄基、烷氧基烷基、羧基烷基或烷基磺酸。可能的是, R_3 (尤其是当其烷基、取代的烷基、烯基或取代的烯基时,而且在其它情况下)共价结合到 R_7 或 R_8 上以形成环,通常为五元环或六元环。当上述部分中的一个或多个被取代时,其最常见地被1个至3个基团取代,这些基团选自羰基、羧基、三(烷基)甲硅烷基、糖基、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^-$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-OPo_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵和季磷。

[0046] 在式I的标记物中, R_4 至 R_{11} 中的每一者独立地为H或含有选自C、N、O、S、P、Si和卤素的1个至50个原子加上足以满足非氢原子化合价的氢原子的有机部分。最常见地, R_1 和 R_2 中的每一者独立地为特异性结合配偶体的连接基、H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、烷氧基、芳氧基、卤素、氨基、取代的胺、羧基、烷氧羰基、羧基酰胺、氰基或磺酸基。成对的邻近的 R_4 至 R_{11} 部分,例如 R_4 和 R_5 、 R_8 和 R_9 等,可共价结合以形成环。在这种情况下,该环通常为五元环至七元环,并且最通常为五元环或六元环。该环可以为碳环或杂环,并且在后一种情况下可包含杂原子例如N、O或S,并且可以为未取代的或在一个或多个碳原子或一个或多个杂原子上被取代。当上述部分中的一个或多个被取代时,其最常见地被1个至3个基团取代,这些基团选自羰基、羧基、三(烷基)甲硅烷基、糖基、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^-$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-OPo_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵和季磷。

[0047] 最常见地,在式I中, R_4 至 R_{11} 中的每一者为H。

[0048] 最常见地,所采用的式I的标记物为式II的标记物。

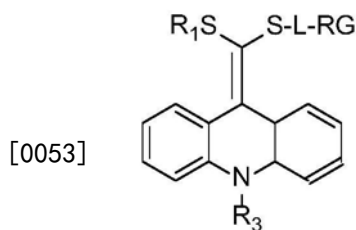


II

[0050] 其中波浪线指示与特异性结合配偶体附接的点。在此类情况下, R_3 通常为H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基或取代的芳烷基。在此类情况下, R_3 最常具有1个至20个碳原子, 尤其是具有1个至4个碳原子的烷基、苄基、苄基、取代的苄基、烷氧基烷基、羧基烷基或烷基磺酸。当上述部分中的一个或多个被取代时, 其最常见地被1个至3个基团取代, 这些基团选自羰基、羧基、三(烷基)甲硅烷基、糖基、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^-$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-OP(=O)_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵和季磷。

[0051] 具体地讲, 在式II的标记物中, 波浪线表示与特异性结合配偶体附接或与将化合物连接到特异性结合配偶体的连接基附接的位点, R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基, 其中当 R^1 或 R^2 被取代时, 其被1个至3个取代基取代, 每个取代基独立地选自羰基、羧基、三烷基甲硅烷基、 $-SO_3$ 、糖基、 $-PO_3$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、C(0) $NHNH_2$ 、季铵和季磷, 并且 R^3 选自取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基, 其中当 R^1 或 R^2 被取代时, 其被1个至3个取代基取代, 每个取代基独立地选自羰基、羧基、三烷基甲硅烷基、 $-SO_3$ 、糖基、 $-PO_3$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、C(0) $NHNH_2$ 、季铵和季磷。

[0052] 式II的标记物通过特异性结合配偶体与式III的化合物的反应结合到特异性结合配偶体。



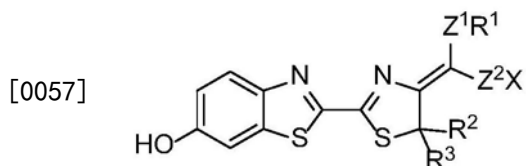
III

[0054] 其中L和RG如上所述。

[0055] 在US20100267071的表8中提供可采用的式III的化合物的示例。一般来讲, 式I的化合物和具体地式III的化合物可根据US20070172878中公开的方法制备。例如, 可商购获得的9,10-二氢吡啶或N-取代的9,10-二氢吡啶可用强碱处理, 之后用二硫化碳处理以形成9,10-二氢吡啶二硫代羧酸酯, 其继而通过常规的酯化方法进行酯化或部分酯化以安装取代基 R_1 。 R_2 可通过剩余巯基与强碱例如丁基锂或氢化钠的去质子化来添加, 然后用适当的亲电体处理以附接 R_2 。取代基 R_1 和 R_2 可发生进一步的反应以操纵其上的官能团, 以便获得期望的式III的化合物。

[0056] 化学发光标记物还可选自芳族环状二醛酰肼 (aromatic cyclic

dialhydrazide)、三羟基芳族化合物、9,10-二氢吡啶乙烯酮二硫缩醛化合物、9,10-二氢吡啶酯、9,10-二氢吡啶硫酯、9,10-二氢吡啶烯醇以及具有下式的化合物



[0058] 其中

[0059] R^1 选自1个至20个碳的烷基、烯基、炔基、芳基和芳烷基基团或被独立地选自羰基、三烷基甲硅烷基、 SO_3^- 、 $-OSO_3^-$ 、糖基、 PO_3^- 、 $-OP(OR')_3$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵或季磷的1个至3个基团部分取代的前述基团中的任一者，X选自具有1个至20个碳原子的C1-C8烷基、芳基、芳烷基、烷基或烷基羰基，三烷基甲硅烷基， SO_3^- ，糖基和 $PO(OR'')(OR')$ ，其中 R' 和 R'' 独立地选自C1-C8烷基、氰基烷基、氰基芳基、氰基芳烷基、三烷基甲硅烷基、碱金属阳离子、碱土金属阳离子、铵阳离子和三烷基磷阳离子， Z^1 和 Z^2 独立地选自O和S原子，并且 R^2 和 R^3 独立地选自H和C1-C8烷基。

[0060] 另外的化学发光标记物公开于US 5497072、US523212、US5593845、US5922588、US60130803、US6696569、US6891057和US20100267071中。可采用这些或其他化学发光标记物中的任一者。尤其合适的化学发光标记物和化学发光标记的特异性结合配偶体包括US20100267071中公开的那些。

[0061] 活化剂标记的特异性结合配偶体

[0062] 活化剂标记的特异性结合配偶体通常以小于 $10^{-4}M$ 、具体地为小于 $10^{-6}M$ 、并且最具体地为 $10^{-11}M$ 至 $10^{-7}M$ 的浓度存在于反应混合物中。

[0063] 活化剂标记的特异性结合配偶体包含通常不可逆地结合到特异性结合配偶体的活化剂标记物。可使用任何合适的活化剂标记物。当化合物满足两个要求时，其可适作为活化剂标记物。首先，它能够从氧化剂或还原剂接受或提供电子，或在一些罕见情况下为多个电子，以形成基团、离子基团，或在一些罕见情况下形成离子。此类基团、离子基团或离子有时被称为活化的活化剂标记物，并且活化的活化剂标记物的形成有时被称为活化活化剂标记物。其次，一旦形成活化的活化剂标记物，它就应当能够活化化学发光标记的特异性结合配偶体上的化学发光标记物，并且如果适用于未结合的化学发光底物，则导致化学发光标记物发光，并且如果适用，则未结合的化学发光底物发光。

[0064] 典型活化剂标记物为过氧化物酶或具有过氧化物酶样活性的化合物。示例包括乳过氧化物酶、微过氧化物酶、髓过氧化物酶、卤代过氧化物酶、钒溴过氧化物酶、辣根过氧化物酶、真菌过氧化物酶、木质素过氧化物酶、Mn依赖性过氧化物酶、大豆过氧化物酶和不是酶但具有过氧化物酶样活性的过氧化物酶模拟化合物例如Mn-TPPS4。

[0065] 活化剂标记的特异性结合配偶体可包括过氧化物酶或具有过氧化物酶样活性的化合物与生物分子的缀合物或复合物。在此类情况下，可采用的典型生物分子包括DNA、RNA、核酸配体、抗体、抗体片段、抗体-DNA嵌合体、抗原、半抗原、蛋白质、肽、凝集素(lectin)、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和生物素。

[0066] 一个或多个活化剂标记物通常通过不可逆键结合到特异性结合配偶体。该键(通常为不可逆键)可以为直接连接或间接连接。在直接连接中，该一个或多个化学发光标记物

直接连接到特异性结合配偶体,而在该一个或多个化学发光标记物和特异性结合配偶体之间不使用连接基或辅助物质。直接连接通常通过不可逆键,例如离子键、共价键、疏水相互作用、氢键等,并且最常见的为共价键。

[0067] 当采用间接连接时,连接基(在本领域中有时称为辅助物质)用于连接该一个或多个化学发光标记物和特异性结合配偶体。任何合适的连接基都可使用;合适的连接基将不会阻止该一种或多种化学发光标记物发光,并且通常不会使化学发光标记的特异性结合配偶体不溶于水性介质。示例性连接基包括蛋白质,例如链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、中和亲和素、生物素、阳离子化BSA、fos、jun、钥孔血蓝蛋白、免疫球蛋白(包括其片段或部分)、脂质体、胶束、合成树枝状聚合物例如AMAM、合成聚合物例如聚丙烯酸、天然聚合物例如多糖(例如官能化葡聚糖、多核苷酸、核酸配体和寡核苷酸等)。多糖,尤其是氨基右旋糖酐或羧基右旋糖酐以及自组装蛋白质为最常用的。

[0068] 合适的活化剂标记的特异性结合配偶体包括US20100267071中公开的那些。

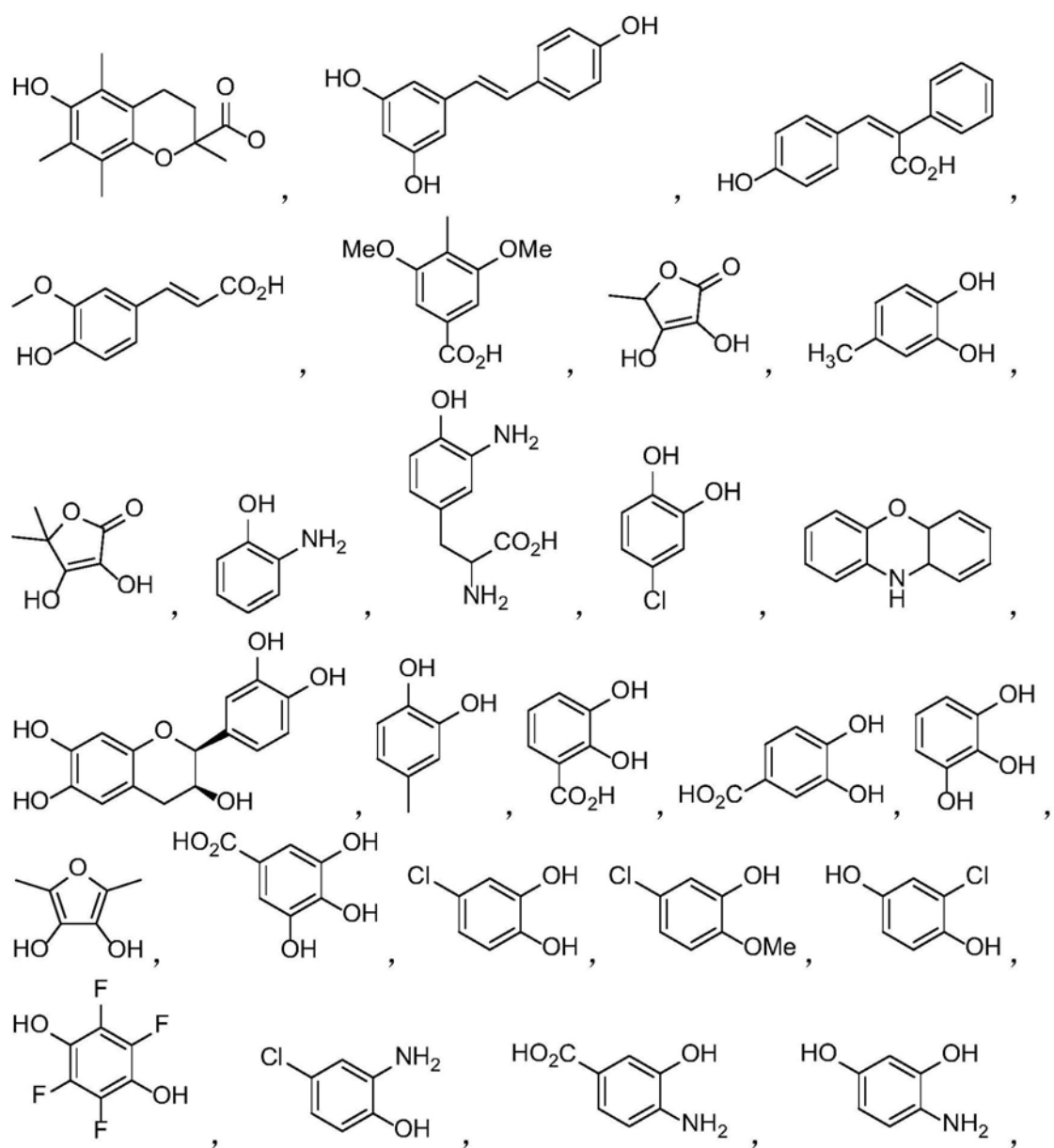
[0069] 选择性信号抑制剂

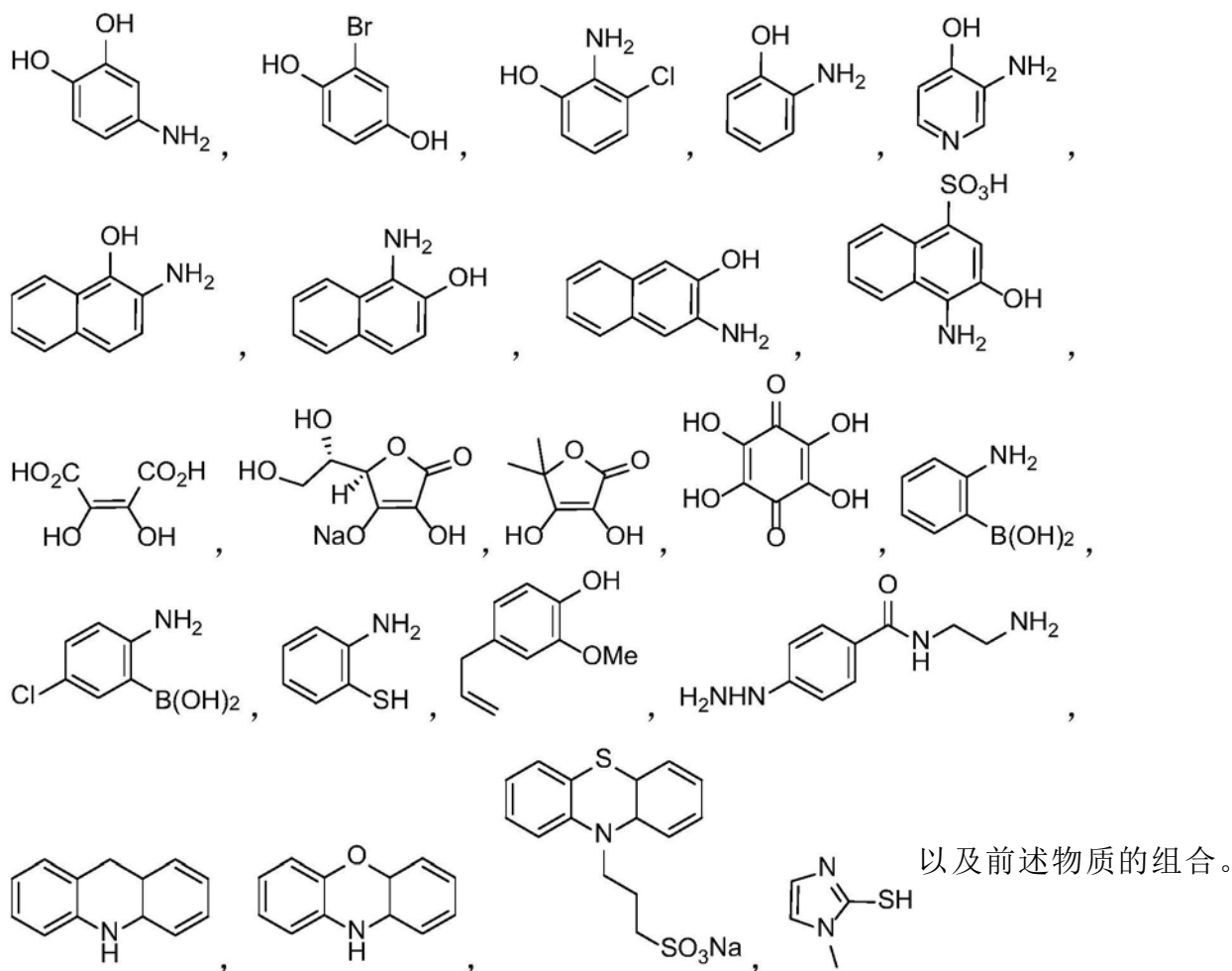
[0070] 选择性信号抑制剂会降低由存在于反应混合物中但不参与本文所述的测定的过量化学发光标记的特异性结合配偶体导致的噪声信号。它们的功能更详细地描述于US20100267071中。

[0071] 通常,一种或多种选择性信号抑制剂以 10^{-6}M 至 10^{-1}M 、最常见 10^{-5}M 至 10^{-4}M 的浓度存在于反应混合物中。具体的浓度包括 $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 至 $5 \times 10^{-4}\text{M}$,并且更具体地为 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 至 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 。

[0072] 适合用作选择性信号抑制剂的化合物包括抗氧化剂,尤其是牺牲型抗氧化剂,以及可与基团、离子基团、或在一些情况下由氧化剂或还原剂与活化剂标记的选择性结合配偶体上的活化剂标记物相互作用而形成的离子(或在一些情况下的氧化剂或还原剂)反应的其他分子。可采用任何抗氧化剂,因为出于本公开的目的,选择性信号抑制剂的各种选项以相同的方式起作用。具体地,与氧化剂或还原剂(一般为过氧化物)或与活化剂标记的特异性结合配偶体上的活化的活化剂标记物反应,以淬灭过氧化物基团或活化的活化剂标记物。

[0073] 可用作选择性信号抑制剂的一些特异性抗氧化剂在US20100267071中有所描述。示例包括谷胱甘肽、抗坏血酸,尤其是L-抗坏血酸,抗坏血酸盐,尤其是L-抗坏血酸盐,尿酸,L-抗坏血酸-6-棕榈酸酯,生育酚,5,6-异亚丙基-L-抗坏血酸,异抗坏血酸,包括D-异抗坏血酸,L-异抗坏血酸或两者,亚硫酸钠,二乙基羟胺,BHT,





最常见地,使用生育酚或抗坏血酸,尤其是抗坏血酸。

[0074] 在使用中,该一种或多种选择性信号抑制剂以任何合适的方式提供。例如,它们可作为触发溶液的组分提供,在这种情况下,当添加触发溶液时会形成反应混合物。它们还可具有化学发光标记的特异性结合配偶体或活化剂标记的特异性结合配偶体中的一者或两者,或者它们可作为固体或作为适当浓度的溶液单独添加。最常见地,该一种或多种选择性信号抑制剂在工作溶液中提供的浓度比反应混合物中提供的浓度高十倍,或在一些情况下甚至高十倍以上,尤其是在添加触发溶液之后。工作溶液通常为水性的,并且在许多情况下可以为水,例如缓冲水,但在一些情况下,其还可含有表面活性剂、乙醇、二醇等,以便提供足够高浓度的该一种或多种选择性信号抑制剂。在任何情况下,将它们以适当的量添加,以在反应混合物中获得合适的浓度。

[0075] 触发溶液

[0076] 触发溶液提供由化学发光标记的特异性结合配偶体以及在一些情况下由背景试剂导致发光所需的一种或多种氧化剂或还原剂。该一种或多种氧化剂或还原剂可通过与化学发光标记物和(如果适用的话)背景剂直接反应来执行该功能,但更常见的是,该一种或多种氧化剂或还原剂与活化剂标记的特异性结合配偶体上的活化剂标记物反应以有利于活化剂标记物与化学发光标记物的作用。

[0077] 该一种或多种氧化剂或还原剂可以为活化活化剂标记的特异性结合配偶体上的活化剂标记物的任何化合物。最常见地,该一种或多种氧化剂或还原剂为与活化剂标记物

相互作用以活化活化剂标记物的一种或多种过氧化物,该活化剂标记物通常为过氧化物酶或具有过氧化物酶样活性的化合物。虽然可使用与过氧化物酶或具有过氧化物酶样活性的化合物反应的任何过氧化物,但常用的过氧化物包括烷基过氧化物(尤其是其中烷基为乙基或甲基)、烷基氢过氧化物(尤其是其中烷基为乙基或甲基)、芳族过氧化物(尤其是苄基过氧化物)、脂质氢过氧化物(尤其是二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸或亚油酸的氢过氧化物)、过氧酸(例如间氯过氧苯甲酸)、过氧化氢、过氧化脲、过氧化氨基甲酸酯和过硼酸盐。过氧化物的浓度可变化,但通常为 10^{-8}M 至 3M ,并且最常见为 10^{-3}M 至 10^{-1}M 。

[0078] 虽然不是必需的,但增强剂通常用作触发溶液的组分。增强剂可以为促进活化剂标记物(通常为过氧化物酶)的反应性、降低测定中的噪声信号或两者的任何化合物。典型增强剂包括酚类化合物、芳香胺、吩噻嗪或吩噻嗪与靛酚或靛苯胺的混合物、取代的羟基苯并噻唑、取代或未取代的芳基硼酸以及它们的酯和酸酐等。一些合适的增强剂公开于US20100267071、US5171668、US5206149和US5512451中。当采用时,增强剂通常以 10^{-5}M 至 10^{-1}M 的浓度存在。

[0079] 如上所讨论的,除氧化剂或还原剂以及(当采用时)增强剂之外,该一种或多种选择性信号抑制剂还可存在于触发溶液中。

[0080] 触发溶液通常包含在水性溶剂中描述的各种溶质。水性溶剂通常为缓冲水。可采用可用于生物系统的任何缓冲液,只要其不干扰化学发光标记物或测定的发光至不能产生足够的分析物信号即可。最有用的缓冲液将pH保持为5至10.5。具体有用的缓冲液使pH保持为6.0至9.0,例如为6.5至8.5,并且最具体地为7.0至8.0

[0081] 可使用的示例性缓冲液公开于US20100267071中。最常见地,缓冲液选自磷酸盐、硼酸盐、乙酸盐、三(羟基甲胺)甲烷、甘氨酸、麦黄酮、2-氨基-2-甲基-1-丙醇、二乙醇胺、MOPS、HEPES、MES等。

[0082] 一种或多种洗涤剂或聚合物表面活性剂可用于增强发光或降低噪声信号。示例包括聚氧乙烯化烷基酚、聚氧乙烯化醇、聚氧乙烯化醚、聚氧乙烯化山梨醇酯、季铵盐(例如CTAB)和季磷盐。具体有用的示例为聚合物阳离子表面活性剂,最具体地为季铵盐和季磷盐。

[0083] 如上所讨论的,该一种或多种选择性信号抑制剂可任选地存在于触发溶液中。

[0084] 例如,触发溶液可包含水性缓冲液、浓度为 10^{-5}M 至 1M 的过氧化物和浓度为 10^{-5}M 至 10^{-1}M 的增强剂。又如,触发溶液可包含水性缓冲液、浓度为 10^{-5}M 至 1M 的过氧化物、浓度为 10^{-5}M 至 10^{-1}M 的增强剂,以及浓度使得一种或多种选择性信号抑制剂在反应混合物中具有 10^{-6}M 至 10^{-1}M 的浓度的该一种或多种选择性信号抑制剂。

[0085] 未结合的化学发光底物

[0086] 未结合的化学发光底物可以为未缀合至或以其它方式不可逆地结合到分析物标记的选择性结合配偶体或化学发光标记的特异性结合配偶体的任何化学发光分子。在大多数情况下,未结合的化学发光底物能够溶于反应混合物中。为了分别测量化学发光标记的特异性结合配偶体和未结合的化学发光底物的发光强度,可方便地选择未结合的化学发光底物,该未结合的化学发光底物具有不同于化学发光标记物的最大发光波长的最大发光波长,但这不是必需的。

[0087] 在测定期间,未结合的化学发光底物可与氧化剂或还原剂反应,最常见的是通过

活化剂标记的特异性结合配偶体上的活化剂标记物间接反应。该反应使化学发光底物进入电子激发态,化学发光底物可从电子激发态发光以产生背景信号。另选地,但不太典型地,未结合的化学发光底物的激发态可发生与继而可发光以产生背景信号的发射能量受体的进一步反应。

[0088] 合适的未结合的化学发光底物包括环状酰肼,例如鲁米诺和异鲁米诺,咪唑化合物,例如洛芬碱,吡啶酯,例如光泽精,和9,10-二氢吡啶,邻苯二甲酰肼,例如2,3-二氢-1,4-双酮酞嗪,荧光素,和含1,2-二氧杂环丁烷的化合物,例如二酮、3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMPPD)和3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-β-D'-吡喃半乳糖基氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMPGD)、3-(4-甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1.3,7]癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠和1,2-二氧杂环丁烷二酮、金刚烷叉基-金刚烷基-1,2-二氧杂环丁烷)。最常见的为鲁米诺和异鲁米诺,并且特别是鲁米诺。

[0089] 在测定中,通过与化学发光标记物相同的光化学机制,即通过与氧化剂或还原剂反应,通常通过活化剂标记物,将未结合的化学发光底物转化成产生通常为发光形式的可检测背景信号的激发态。可检测的背景信号与分析物的浓度不相关。因此,样品中可能干扰分析物信号产生的非分析物组分将类似地干扰背景信号产生。

[0090] 有可能利用这一点来获得校正因子,该校正因子校正非分析物化合物对测定的干扰。为此,制备一组标准样品,每个包含不同已知量的分析物,以及将反应混合物的其他组分(即,化学发光标记的特异性结合配偶体、活化剂标记的特异性结合配偶体和未结合的化学发光底物)暴露于触发物。与标准样品一起使用的反应混合物中的每个反应混合物具有相同量的化学发光标记的特异性结合配偶体、活化剂标记的特异性结合配偶体和未结合的化学发光底物。添加触发溶液,并且测量标准样品中不同分析物浓度下的分析物信号以及背景信号两者,对于所有标准样品,这通常是相同的,因为未结合的化学发光底物的浓度在所有标准样品中均相同。如果对于所有试验样品背景信号不相同,则这表明测定器的部分存在误差,或者分析物与未结合的化学发光底物相互作用。在后一种情况下,可采用不同的未结合的化学发光底物。

[0091] 不同分析物浓度下的分析物信号可用于形成分析物信号与分析物浓度的相关性曲线。

[0092] 来自试验样品的背景信号可用于制作如下比例因子。测定试验样品,并确定分析物信号和背景信号两者。比例因子被计算为由标准样品产生的背景信号与由试验样品产生的背景信号的比率。该比例因子考虑了试验样品中非分析物化合物的影响,并且如果试验样品中不存在干扰测定的非分析物化合物,则比例因子为1。

[0093] 为了确定试验样品中的分析物浓度,将试验样品的分析物信号乘以比例因子以得到经校正的分析物信号。将经校正的分析物信号与由标准样品确定的分析物信号与分析物浓度的相关性曲线进行比较以提供分析物浓度。

[0094] 检测

[0095] 各种信号,例如背景信号和分析物信号,可由本领域已知的任何装置检测。装置的类型可取决于信号的类型。当信号为发光信号时,通常使用光度计或CCD相机。其他可用的检测器包括摄影胶片、X射线胶片、闪烁计数器、光量计、透射率检测器(例如UV/Vis和IR检

测器)等。最常见地,检测在试管中或在光度计中的多孔板中或在CCD相机前面进行。多孔板和CCD相机的使用可为方便的,因为在这种情况下,可同时在多孔板的不同孔中进行多个试验样品和标准样品的测定和检测。可用众多可商购获得的或本领域已知的光度计、CCD相机等中的任一者来执行检测。

[0096] 用途

[0097] 本文所述的测定可用于多种系统中。ELISA系统为一种用途,但也可按照本文的指导和技术人员的知识采用涉及核酸配体结合和其他非免疫原特异性结合配偶体的测定。示例包括溶液杂交测定、DNA印迹检测、RNA印迹检测、DNA或RNA测序、DNA或RND指纹分析、菌落杂交和噬菌斑测定,所有这些测定均为本领域已知的。可分析可制备至少一种特异性结合配偶体的任何分析物。示例包括抗原、毒素、毒液、核酸、核苷酸、多核苷酸、药物、类固醇、半抗原、抗体、肽、肽片段、激素、受体、引物、小分子等。

[0098] 例示性实施方案的列表

[0099] 该实施方案列表旨在帮助理解本发明的特定方面。并非旨在进行限制。

[0100] 1.一种测定样品中的分析物的方法,所述方法包括

[0101] 形成反应混合物,以及

[0102] 将触发溶液与所述反应混合物混合;其中

[0103] 待测定的所述分析物可存在于所述样品中,

[0104] 所述反应混合物为水性溶液,所述水性溶液包含

[0105] 化学发光标记的特异性结合配偶体,所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第一特异性结合配偶体的化学发光标记物,所述化学发光标记的特异性结合配偶体能够与所述分析物结合以形成分析物结合的化学发光标记的特异性结合复合物,

[0106] 活化剂标记的特异性结合配偶体,所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第二特异性结合配偶体的活化剂标记物,和

[0107] 选择性信号抑制剂;并且其中

[0108] 所述反应混合物还包含未结合的化学发光底物,并且

[0109] 所述触发溶液能够由所述未结合的化学发光底物产生背景信号,并且

[0110] 在存在分析物的情况下,触发溶液能够产生与所述样品中所述分析物的量相关的可检测分析物信号。

[0111] 2.根据实施方案1所述的方法,其中所述反应混合物还包含增强剂。

[0112] 3.根据实施方案1所述的方法,其中所述触发溶液还包含增强剂。

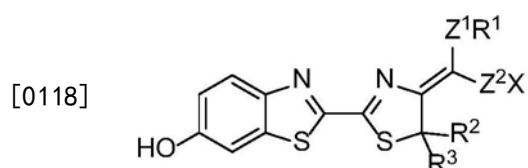
[0113] 4.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述选择性信号抑制剂导致由具有所述分析物的复合物中的所述化学发光标记的特异性结合配偶体和所述活化剂标记的特异性结合配偶体之间的反应产生的信号比率超过当不存在具有所述分析物的复合物时来自所述化学发光标记的特异性结合配偶体和活化剂标记的特异性结合配偶体之间的反应信号比率。

[0114] 5.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述选择性信号抑制剂选自在邻位或对位取向上具有至少两个羟基基团的芳族化合物、具有至少一个羟基基团以及与所述至少一个羟基基团中的一个或多个处于邻位或对位的氨基基团的芳族化合物、具有在烯键式不饱和基团上取代的至少两个羟基基团以及氮杂环基团的化合物。

[0115] 6. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂选自抗坏血酸、异抗坏血酸、6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸、抗坏血酸6-棕榈酸酯、5,6-异亚丙基-抗坏血酸、丁基化羟基甲苯、谷胱甘肽、尿酸、一种或多种生育酚以及儿茶素。

[0116] 7. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂为抗坏血酸。

[0117] 8. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含直接或间接连接到特异性结合对成员的化学发光标记物, 其中所述化学发光标记物选自芳族环状二醛酞肼、三羟基芳族化合物、9,10-二氢吡啶乙烯酮二硫缩醛化合物、9,10-二氢吡啶酯、9,10-二氢吡啶硫酯、9,10-二氢吡啶烯醇以及具有下式的化合物



[0119] 其中

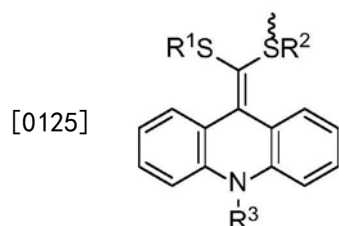
[0120] R^1 选自1个至20个碳的烷基、烯基、炔基、芳基和芳烷基基团或被独立地选自羰基、三烷基甲硅烷基、 SO_3^- 、 $-OSO_3^-$ 、糖基、 PO_3^- 、 $-OPo_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵或季磷的1个至3个基团部分取代的前述基团中的任一者；

[0121] X 选自具有1个至20个碳原子的C1-C8烷基、芳基、芳烷基、烷基或烷基羰基, 三烷基甲硅烷基, SO_3^- , 糖基和 $PO(OR')(OR'')$, 其中 R' 和 R'' 独立地选自C1-C8烷基、氰基烷基、氰基芳基、氰基芳烷基、三烷基甲硅烷基、碱金属阳离子、碱土金属阳离子、铵阳离子和三烷基磷阳离子；

[0122] Z^1 和 Z^2 独立地选自O和S原子；并且

[0123] R^2 和 R^3 独立地选自H和C1-C8烷基。

[0124] 9. 根据实施方案1至7中任一项所述的方法, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含直接或间接连接到特异性结合配偶体的化学发光标记物, 其中所述化学发光标记物具有下式



[0126] 其中

[0127] 波浪线表示与所述特异性结合配偶体附接或与将所述化合物连接到所述特异性结合配偶体的连接基附接的位点；

[0128] R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自1个至20个碳原子的取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基基团, 其中当 R^1 或 R^2 被取代时, 其被1个至3个取代基取代, 每个取代基独立地选自羰基、羧基、三(C1-C8)烷基甲硅烷基、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^{2-}$ 、糖基、 $-PO_3^-$ 、 $-OPo_3^{2-}$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、C(O)NHNH₂、季

铵和季磷。

[0129] 10. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含直接或间接连接到特异性结合对成员的活化剂标记化合物, 其中所述活化剂标记物选自过渡金属盐、过渡金属络合物和酶, 并且其中所述活化剂标记物具有过氧化物酶活性。

[0130] 11. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述活化剂标记物为过氧化物酶。

[0131] 12. 根据实施方案11所述的方法, 其中所述活化剂标记物为辣根过氧化物酶。

[0132] 13. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体和所述活化剂标记的特异性结合配偶体中的至少一者包含辅助物质, 所述辅助物质选自可溶性蛋白质、链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、中和亲和素、生物素、阳离子化BSA、fos、jun、可溶性合成树枝状体、可溶性合成聚合物、多糖、葡聚糖、有机核苷酸、核苷酸、核苷、核酸配体、脂质体和胶束。

[0133] 14. 根据实施方案2至12中任一项所述的方法, 其中所述增强剂为促进具有过氧化物酶活性的活化剂的催化转换的一种或多种化合物。

[0134] 15. 根据实施方案13所述的方法, 其中所述增强剂选自酚类化合物、芳香胺、苯并噁唑、羟基苯并噁唑、芳基硼酸以及前述物质中的任一些的混合物。

[0135] 16. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述触发溶液包含氧化剂或还原剂。

[0136] 17. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述触发溶液包含过氧化物。

[0137] 18. 根据实施方案17所述的方法, 其中所述过氧化物选自烷基过氧化物 (尤其是其中所述烷基为乙基或甲基)、烷基氢过氧化物 (尤其是其中所述烷基为乙基或甲基)、芳族过氧化物 (尤其是苄基过氧化物)、脂质氢过氧化物 (尤其是二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸或亚油酸的氢过氧化物)、过氧酸 (例如间氯过氧苯甲酸)、过氧化氢、过氧化脲、过氧化氨基甲酸酯和过硼酸盐。

[0138] 19. 根据实施方案18所述的方法, 其中所述过氧化物为过氧化氢。

[0139] 20. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述触发溶液包含增强剂, 所述增强剂选自酚类化合物、芳香胺、苯并噁唑、羟基苯并噁唑、芳基硼酸以及前述物质中的任一些的混合物。

[0140] 21. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述触发溶液和所述反应混合物以及所述分析物的所有的所述组分均为水溶性的。

[0141] 22. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述触发溶液、所述测定溶液或所述反应混合物均不包含直接或间接缀合至固相物质的材料。

[0142] 23. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含选自以下的化合物: 在邻位或对位取向上具有至少两个羟基部分的芳族化合物、具有羟基部分和处于邻位或对位取向上的氨基部分的芳族化合物、具有至少两个乙烯基羟基基团和氮杂环的化合物。

[0143] 24. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含抗坏血酸, 并且其中所述抗坏血酸尤其是L-抗坏血酸。

[0144] 25. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸。

[0145] 26. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含2-氨基酚。

[0146] 27. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含3-氨基-酪氨酸, 尤其是3-氨基-L-酪氨酸。

[0147] 28. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含4-氯邻苯二酚。

[0148] 29. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含吩噻嗪。

[0149] 30. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含2-溴苯并-1,4-二醇。

[0150] 31. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含5,6-异亚丙基抗坏血酸。

[0151] 32. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含6-棕榈酸酯。

[0152] 33. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体和所述活化剂标记的特异性结合配偶体各自与所述样品中的所述分析物结合。

[0153] 34. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含连接到所述分析物的类似物的化学发光标记的化合物, 并且进一步地, 其中所述分析物和所述化学发光标记的特异性结合配偶体竞争以与所述活化剂标记的特异性结合配偶体结合。

[0154] 35. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述未结合的化学发光底物选自环状酰肼(例如鲁米诺和异鲁米诺)、咪唑化合物(例如洛芬碱)、吡啶酯(例如光泽精和9,10-二氢吡啶)、邻苯二甲酰肼(例如2,3-二氢-1,4-双酮酞嗪)、荧光素和含1,2-二氧杂环丁烷的化合物(例如二酮、3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMPPD)和3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-β-D'-吡喃半乳糖基氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMPGD)、3-(4-甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠和1,2-二氧杂环丁烷二酮、金刚烷叉基-金刚烷基-1,2-二氧杂环丁烷), 具体地为鲁米诺或异鲁米诺, 并且更具体地为鲁米诺。

[0155] 36. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述未结合的化学发光底物包含鲁米诺。

[0156] 37. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述未结合的化学发光底物的最大发光强度的波长不同于所述化学发光标记物的最大发光强度的波长。

[0157] 38. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述方法还包括检测分析物信号和背景信号。

[0158] 39. 根据实施方案38所述的方法, 其中检测分析物信号包括从至少一个是具有已知分析物浓度的标准样品的样品中检测至少一个标准分析物信号, 并且还包括从至少一个具有未知分析物浓度的试验样品中检测试验分析物信号。

[0159] 40. 根据实施方案38或39所述的方法, 其中检测背景信号包括从至少一个是具有已知分析物浓度的标准样品的样品中检测至少一个标准背景信号, 并且还包括从至少一个具有未知分析物浓度的试验样品中检测试验背景信号。

[0160] 41. 一种用于测定分析物的试剂盒, 所述试剂盒包括

[0161] 化学发光标记的特异性结合配偶体, 所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第一特异性结合配偶体的化学发光标记物, 所述化学发光标记的特异性结合配偶体能够与所述分析物结合以形成分析物结合的化学发光标记的特异性结合复合物,

[0162] 活化剂标记的特异性结合配偶体, 所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第二特异性结合配偶体的活化剂标记物, 和

[0163] 选择性信号抑制剂; 并且其中

[0164] 触发溶液能够由所述未结合的化学发光底物产生背景信号,

[0165] 并且还包括

[0166] 未结合的化学发光底物; 其中

[0167] 在存在分析物的情况下, 所述触发溶液能够产生与所述样品中所述分析物的量相关的可检测分析物信号。

[0168] 42. 根据实施方案41中任一项所述的试剂盒, 其中所述触发溶液还包括增强剂。

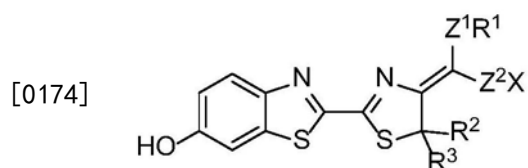
[0169] 43. 根据实施方案41或42中任一项所述的试剂盒, 其中所述选择性信号抑制剂导致由具有所述分析物的复合物中的所述化学发光标记的特异性结合配偶体和所述活化剂标记的特异性结合配偶体之间的反应产生的信号比率超过当不存在具有所述分析物的复合物时来自所述化学发光标记的特异性结合配偶体和活化剂标记的特异性结合配偶体之间的反应的信号比率。

[0170] 44. 根据实施方案41至43中任一项所述的试剂盒, 其中所述选择性信号抑制剂选自在邻位或对位取向上具有至少两个羟基基团的芳族化合物、具有至少一个羟基基团以及与所述至少一个羟基基团中的一个或多个处于邻位或对位的氨基基团的芳族化合物、具有在烯键式不饱和基团上取代的至少两个羟基基团以及氮杂环基团的化合物。

[0171] 45. 根据实施方案41至44中任一项所述的试剂盒, 其中所述选择性信号抑制剂选自抗坏血酸、异抗坏血酸、6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸、抗坏血酸6-棕榈酸酯、5,6-异亚丙基-抗坏血酸、丁基化羟基甲苯、谷胱甘肽、尿酸、一种或多种生育酚以及儿茶素。

[0172] 46. 根据实施方案41至45中任一项所述的试剂盒, 其中所述选择性信号抑制剂为抗坏血酸。

[0173] 47. 根据实施方案41至46中任一项所述的试剂盒, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含直接或间接连接到特异性结合对成员的化学发光标记物, 其中所述化学发光标记物选自芳族环状二醛酰肼、三羟基芳族化合物、9,10-二氢吡啶乙烯酮二硫缩醛化合物、9,10-二氢吡啶酯、9,10-二氢吡啶硫酯、9,10-二氢吡啶烯醇以及具有下式的化合物



[0175] 其中

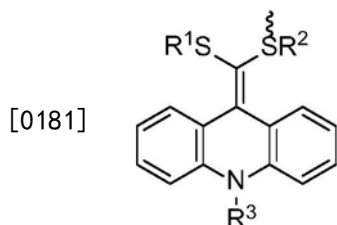
[0176] R^1 选自1个至20个碳的烷基、烯基、炔基、芳基和芳烷基基团或被独立地选自羰基、三烷基甲硅烷基、 SO_3^- 、 $-OSO_3^-$ 、糖基、 PO_3^- 、 $-OP_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵或季磷的1个至3个基团部分取代的前述基团中的任一者；

[0177] X选自具有1个至20个碳原子的C1-C8烷基、芳基、芳烷基、烷基或烷基羰基，三烷基甲硅烷基， SO_3^- 、糖基和PO (OR') (OR'')，其中R'和R''独立地选自C1-C8烷基、氰基烷基、氰基芳基、氰基芳烷基、三烷基甲硅烷基、碱金属阳离子、碱土金属阳离子、铵阳离子和三烷基磷阳离子；

[0178] Z^1 和 Z^2 独立地选自O和S原子；并且

[0179] R^2 和 R^3 独立地选自H和C1-C8烷基。

[0180] 48. 根据实施方案41至46中任一项所述的试剂盒，其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含直接或间接连接到特异性结合配偶体的化学发光标记物，其中所述化学发光标记物具有下式



[0182] 其中

[0183] 波浪线表示与所述特异性结合配偶体附接或与将所述化合物连接到所述特异性结合配偶体的连接基附接的位点；

[0184] R^1 和 R^2 独立地选自取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基，其中当 R^1 或 R^2 被取代时，其被1个至3个取代基取代，每个取代基独立地选自羰基、羧基、三烷基甲硅烷基、 $-SO_3^-$ 、糖基、 $-PO_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、C(O)NHNH₂、季铵和季磷；

[0185] R^3 选自取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基，其中当 R^1 或 R^2 被取代时，其被1个至3个取代基取代，每个取代基独立地选自羰基、羧基、三烷基甲硅烷基、 $-SO_3^-$ 、糖基、 $-PO_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、C(O)NHNH₂、季铵和季磷。

[0186] 49. 根据实施方案41至48中任一项所述的试剂盒，其中所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含直接或间接连接到特异性结合对成员的活化剂标记化合物，其中所述活化剂标记物选自过渡金属盐、过渡金属络合物和酶，并且其中所述活化剂标记物具有过氧化物酶活性。

[0187] 50. 根据实施方案41至49中任一项所述的试剂盒，其中所述活化剂标记物为过氧化物酶。

[0188] 51. 根据实施方案50中任一项所述的试剂盒，其中所述活化剂标记物为辣根过氧化物酶。

[0189] 52. 根据实施方案41至50中任一项所述的试剂盒，其中所述化学发光标记的特异

性结合配偶体和所述活化剂标记的特异性结合配偶体中的至少一者包含辅助物质,所述辅助物质选自可溶性蛋白质、链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、中和亲和素、生物素、阳离子化BSA、fos、jun、可溶性合成树枝状体、可溶性合成聚合物、多糖、葡聚糖、有机核苷酸、核苷酸、核苷、核酸配体、脂质体和胶束。

[0190] 53. 根据实施方案42至52中任一项所述的试剂盒,其中所述增强剂为促进具有过氧化物酶活性的活化剂的催化转换的一种或多种化合物。

[0191] 54. 根据实施方案53中任一项所述的试剂盒,其中所述增强剂选自酚类化合物、芳香胺、苯并噻唑、羟基苯并噻唑、芳基硼酸以及前述物质中的任一些的混合物。

[0192] 55. 根据实施方案41至54中任一项所述的试剂盒,其中所述触发溶液包含氧化剂或还原剂。

[0193] 56. 根据实施方案41至55中任一项所述的试剂盒,其中所述触发溶液包含过氧化物。

[0194] 57. 根据实施方案56中任一项所述的试剂盒,其中所述过氧化物化合物选自烷基过氧化物(尤其是其中所述烷基为乙基或甲基)、烷基氢过氧化物(尤其是其中所述烷基为乙基或甲基)、芳族过氧化物(尤其是苄基过氧化物)、脂质氢过氧化物(尤其是二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸或亚油酸的氢过氧化物)、过氧酸(例如间氯过氧苯甲酸)、过氧化氢、过氧化脲、过氧化氨基甲酸酯和过硼酸盐。

[0195] 58. 根据实施方案57中任一项所述的试剂盒,其中所述过氧化物为过氧化氢。

[0196] 59. 根据实施方案41至58中任一项所述的试剂盒,其中所述触发溶液包含增强剂,所述增强剂选自酚类化合物、芳香胺、苯并噻唑、羟基苯并噻唑、芳基硼酸以及前述物质中的任一些的混合物。

[0197] 60. 根据实施方案41至59中任一项所述的试剂盒,其中所述触发溶液和所述反应混合物以及所述分析物的所有的所述组分均为水溶性的。

[0198] 61. 根据实施方案41至60中任一项所述的试剂盒,其中所述触发溶液、所述测定溶液或所述反应混合物均不包含直接或间接缀合至固相物质的材料。

[0199] 62. 根据实施方案41至61中任一项所述的试剂盒,其中所述选择性信号抑制剂包含选自以下的化合物:在邻位或对位取向上具有至少两个羟基部分的芳族化合物、具有羟基部分和处于邻位或对位取向上的氨基部分的芳族化合物、具有至少两个乙烯基羟基基团和氮杂环的化合物。

[0200] 63. 根据实施方案41至62中任一项所述的试剂盒,其中所述选择性信号抑制剂包含抗坏血酸,并且其中所述抗坏血酸尤其是L-抗坏血酸。

[0201] 64. 根据实施方案41至63中任一项所述的试剂盒,其中所述选择性信号抑制剂包含6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸。

[0202] 65. 根据实施方案41至64中任一项所述的试剂盒,其中所述选择性信号抑制剂包含2-氨基酚。

[0203] 66. 根据实施方案41至65中任一项所述的试剂盒,其中所述选择性信号抑制剂包含3-氨基-酪氨酸,尤其是3-氨基-L-酪氨酸。

[0204] 67. 根据实施方案41至66中任一项所述的试剂盒,其中所述选择性信号抑制剂包含4-氯邻苯二酚。

[0205] 68. 根据实施方案41至67中任一项所述的试剂盒, 其中所述选择性信号抑制剂包含吩噻嗪。

[0206] 69. 根据实施方案41至68中任一项所述的试剂盒, 其中所述选择性信号抑制剂包含2-溴苯并-1,4-二醇。

[0207] 70. 根据实施方案41至69中任一项所述的试剂盒, 其中所述选择性信号抑制剂包含5,6-异亚丙基抗坏血酸。

[0208] 71. 根据实施方案41至70中任一项所述的试剂盒, 其中所述选择性信号抑制剂包含6-棕榈酸酯。

[0209] 72. 根据实施方案41至71中任一项所述的试剂盒, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体和所述活化剂标记的特异性结合配偶体各自适于与所述样品中的所述分析物结合。

[0210] 73. 根据实施方案41至72中任一项所述的试剂盒, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含连接到所述分析物的类似物的化学发光标记的化合物, 并且进一步地, 其中所述分析物和所述化学发光标记的特异性结合配偶体适于竞争以与所述活化剂标记的特异性结合配偶体结合。

[0211] 74. 根据实施方案41至73中任一项所述的试剂盒, 其中所述未结合的化学发光底物选自环状酰肼, 例如鲁米诺和异鲁米诺, 咪唑化合物, 例如洛芬碱, 吡啶酯, 例如光泽精, 和9,10-二氢吡啶, 邻苯二甲酰肼, 例如2,3-二氢-1,4-双酮酞嗪, 荧光素, 和含1,2-二氧杂环丁烷的化合物, 例如二酮-3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷 (AMPPD) 和3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-β-D'-吡喃半乳糖基氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷 (AMPGD)、3-(4-甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠和1,2-二氧杂环丁烷二酮、金刚烷叉基-金刚烷基-1,2-二氧杂环丁烷), 特别是鲁米诺或异鲁米诺, 并且更特别是鲁米诺。

[0212] 75. 根据实施方案41至74中任一项所述的试剂盒, 其中所述未结合的化学发光底物包含鲁米诺。

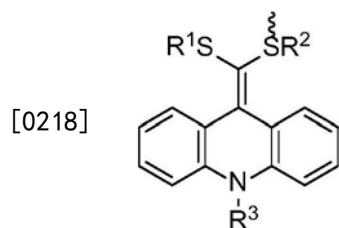
[0213] 76. 根据实施方案41至75中任一项所述的试剂盒, 其中所述未结合的化学发光底物的最大发光强度的波长不同于所述化学发光标记物的最大发光强度的波长。

[0214] 77. 一种用于样品中的分析物的溶液相测定方法, 所述溶液相测定方法包括:

[0215] a) 形成水性反应混合物, 所述水性反应混合物包含通过以任何顺序或同时添加到水性溶液中的以下组分:

[0216] 样品,

[0217] 化学发光标记的特异性结合配偶体, 所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含直接或间接连接到第一特异性结合配偶体的化学发光标记化合物, 其中所述化学发光标记化合物为下式的化合物



[0219] 其中

[0220] 波浪线表示与所述特异性结合配偶体附接或与将所述化合物连接到所述特异性结合配偶体的连接基附接的位点；

[0221] R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自1个至20个碳原子的取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基基团，其中当 R^1 或 R^2 被取代时，其被1个至3个取代基取代，每个取代基独立地选自羰基、羧基、三(C1-C8)烷基甲硅烷基、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^{2-}$ 、糖基、 $-PO_3^-$ 、 $-OP_3^{2-}$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、C(0)NHNH₂、季铵和季磷，

[0222] 活化剂标记的特异性结合配偶体，所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含具有过氧化物酶活性的直接或间接连接到第二特异性结合配偶体的活化剂标记化合物，和

[0223] 选择性信号抑制剂，所述选择性信号抑制剂选自L-抗坏血酸、6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸、2-氨基酚、3-氨基-L-酪氨酸、4-氯邻苯二酚、吩噻嗪、2-溴苯并-1,4,-二醇、5,6-异亚丙基抗坏血酸和抗坏血酸6-棕榈酸酯，

[0224] 其中所有的所述组分均能够溶于所述水性溶液中，并且所述组分均未被固定到固体载体上，并且

[0225] 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体和所述活化剂标记的特异性结合配偶体与存在于所述样品中的所述分析物结合以在所述水性溶液中形成结合的复合物；以及

[0226] b) 向所述水性反应混合物中添加包含过氧化物化合物的触发溶液，其中所述触发溶液在存在所述选择性信号抑制剂的情况下释放可检测化学发光信号，所述可检测化学发光信号与所述水性反应混合物中的所述分析物结合的化学发光标记的特异性结合配偶体和所述分析物结合的活化剂标记的特异性结合配偶体的量相关，并且其中所述选择性信号抑制剂导致由所述化学发光标记化合物和所述活化剂标记化合物之间的反应产生的信号的比率超过当不在此类组合中时来自所述化学发光标记化合物和所述活化剂标记化合物之间的反应的信号的比率；

[0227] 其特征在于

[0228] 所述反应混合物还包含未结合的化学发光底物，所述未结合的化学发光底物产生了与所述样品中所述分析物的所述浓度不相关的可检测背景信号。

[0229] 78. 一种用于检测样品中的分析物的试剂盒，所述试剂盒包括：

[0230] 用于所述分析物的第一特异性结合配偶体；

[0231] 缀合至所述第一特异性结合配偶体的化学发光化合物；

[0232] 用于所述分析物的第二特异性结合配偶体；

[0233] 缀合至所述第二特异性结合配偶体的活化剂化合物；

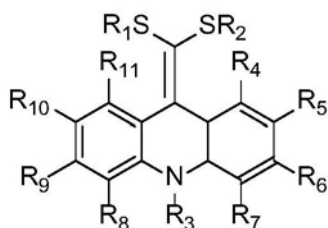
[0234] 选择性信号抑制剂；和

[0235] 触发溶液，

[0236] 其中所述试剂盒的所有前述组分能够溶于水性溶液中，

[0237] 其中所述化学发光化合物为具有下式的9,10-二氢吡啶乙烯酮二硫缩醛化合物

[0238]

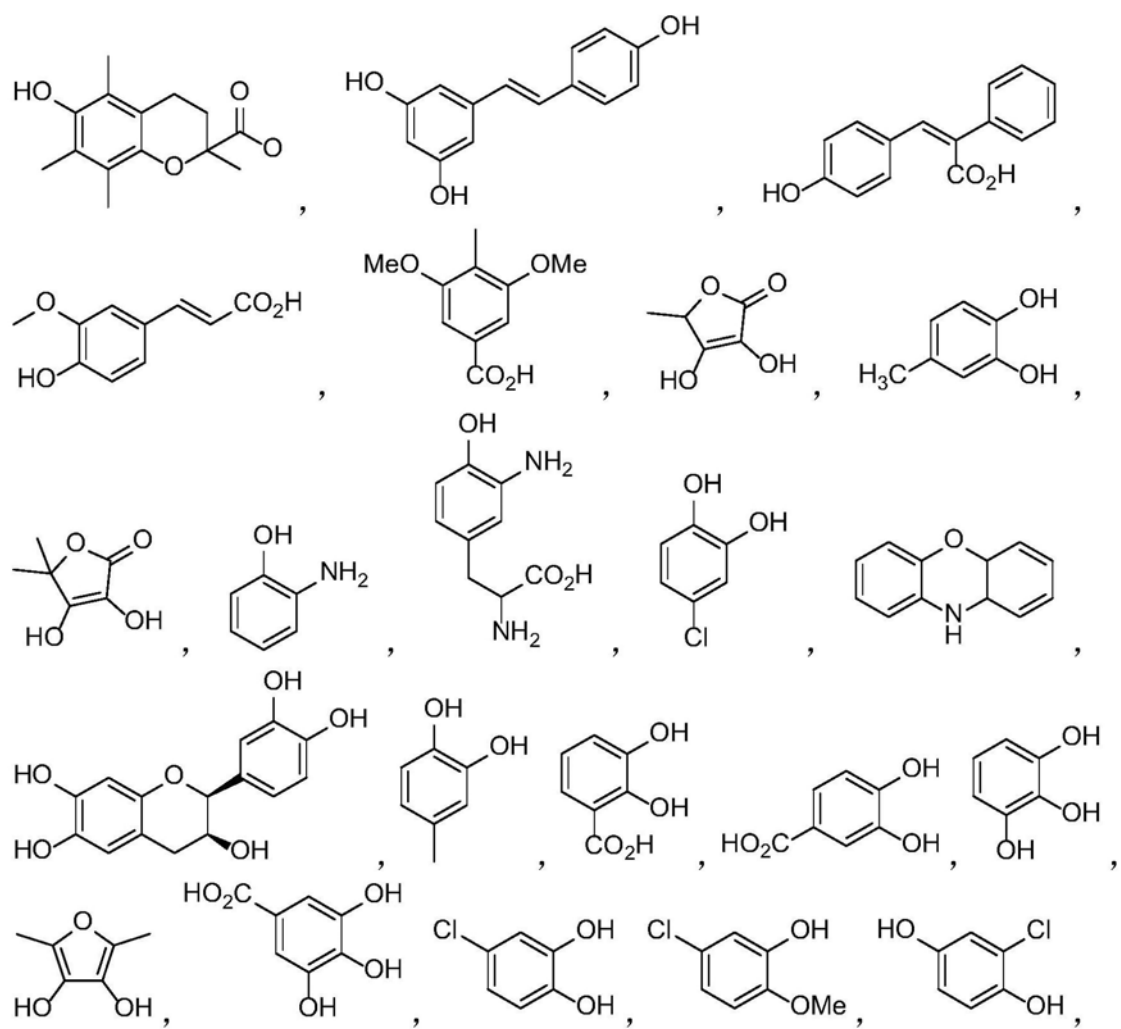


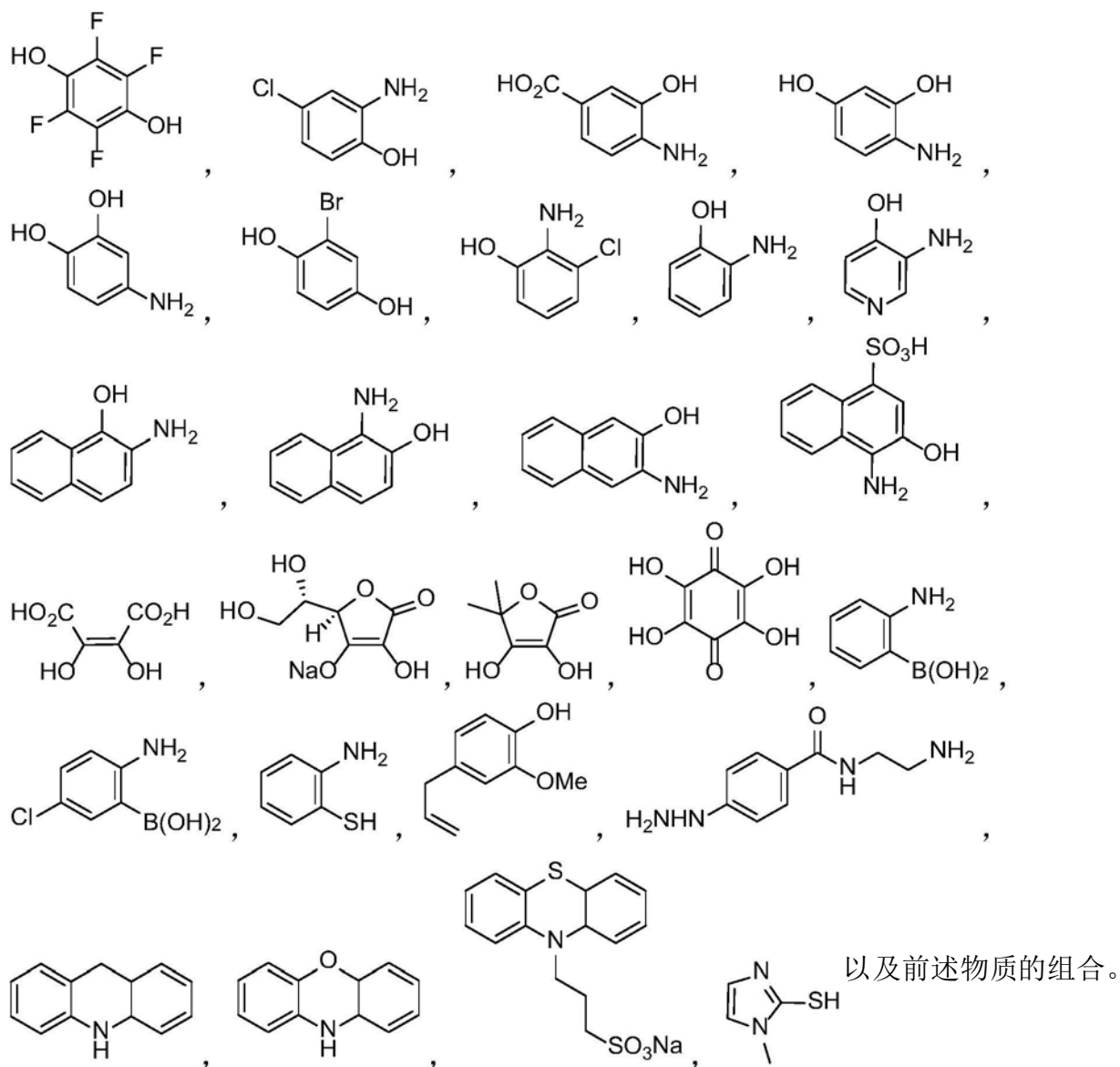
[0239] 其中R₁和R₂中的每一者选自H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基或取代的芳烷基,当R₁和R₂被取代时,其最常见地被1个至3个基团取代,所述基团选自羰基、羧基、三(烷基)甲硅烷基、糖基、-SO₃⁻、-OSO₃⁻、-PO₃⁻、-OPO₃⁻、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵和季磷,

[0240] R₃选自H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基或取代的芳烷基,

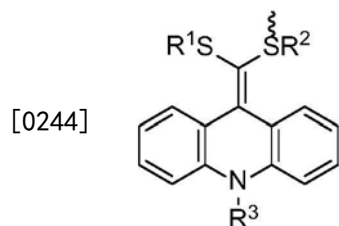
[0241] R₄至R₁₁中的每一者独立地为H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、烷氧基、芳氧基、卤素、氨基、取代的胺、羧基、烷氧羰基、羧基酰胺、氰基或磺酸基,其中成对的邻近的R₄至R₁₁部分可共价结合以形成五元至七元的碳环或杂环,

[0242] 其中所述选择性信号抑制剂选自谷胱甘肽,抗坏血酸,尤其是L-抗坏血酸,抗坏血酸盐,尤其是L-抗坏血酸盐,尿酸,L-抗坏血酸-6-棕榈酸酯,生育酚,5,6-异亚丙基-L-抗坏血酸,异抗坏血酸,包括D-异抗坏血酸、L-异抗坏血酸或两者,亚硫酸钠,二乙基羟胺,BHT,





[0243] 79. 根据实施方案78所述的试剂盒,其中所述化学发光标记化合物为下式的化合物



[0245] 其中

[0246] 波浪线表示与所述特异性结合配偶体附接或与将所述化合物连接到所述特异性结合配偶体的连接基附接的位点;

[0247] R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自1个至20个碳原子的取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基基团,其中当 R^1 或 R^2 被取代时,其被1个至3个取代基取代,每个取代基独立地选自羰基、羧基、三(C1-C8)烷基甲硅烷基、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^{2-}$ 、糖基、 $-PO_3^-$ 、 $-OPO_3^{2-}$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、C(0)NHNH₂、季

铵和季磷。

[0248] 实施例

[0249] 材料

[0250] 乙二胺四乙酸二钾盐(EDTA二钾盐)、对香豆酸、吐温20、Tris碱、Tris盐酸盐、抗坏血酸钠和光泽精购自美国密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO)。

[0251] 过氧化氢(30%, 贝克的分析级)购自美国宾夕法尼亚州拉德诺的VWR国际公司(VWR International, Radnor, PA)。

[0252] 乙醇(200标准)购自美国宾夕法尼亚州普鲁士王市的Decon Labs公司(Decon Labs Incorporated, King of Prussia, PA)。

[0253] PVP360[平均分子量为360,000的聚(乙烯基吡咯烷酮)]和PEG-6000[平均分子量为6000的聚(乙二醇)]购自西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich Corporation)。

[0254] 牛IgG SPARCL测定试剂盒购自美国宾夕法尼亚州西彻斯特的Life Diagnostics公司(Life Diagnostics Incorporated, West Chester, PA)。根据表1中所述的溶液配方在PBS中制备牛IgG标准溶液。

[0255] 通过将20体积份的牛IgG标准溶液(表1)与1体积份的光泽精的饱和溶液在去离子水中混合来制备牛IgG标准+光泽精溶液。

[0256] 根据测定试剂盒说明书制备含有(抗牛IgG)-HRP缀合物的溶液。

[0257] 根据测定试剂盒说明书制备含有9,10-二氢吖啶标记的抗牛IgG的溶液,并另外补充有抗坏血酸钠(200微摩尔)。

[0258] 马血清(16050-130)和磷酸盐缓冲盐水(PBS)购自赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific Incorporated)。在PBS中以1e-1、1e-2、1e-3、1e-4和1e-5(体积/体积)的稀释浓度制备具有马血清的试验样品。

[0259] 表1. 牛IgG标准溶液

组分	PBS 溶液中的浓度
牛 IgG 标准物(来自 SPARCL 测定试剂盒)	50ppb
吐温 20	3 重量%
PVP360	3 重量%
PEG-6000	3 重量%

[0261] 将实施例1的触发溶液制备为表2中所列组分的水性溶液。

[0262] 表2. 触发溶液的组成

组分	触发溶液中的浓度(g/L)
对香豆酸	1.31
EDTA二钾盐	0.40
吐温20	2.00
过氧化氢(30%)	11.33
乙醇(200标准)	32.00
Tris碱	1.33

Tris盐酸盐	2.22
---------	------

[0264] 皮质醇SPARCL测定试剂盒购自Life Diagnostics公司 (Life Diagnostics Incorporated)。

[0265] 使用测定试剂盒中提供的皮质醇原液和稀释剂制备皮质醇标准溶液。

[0266] 通过将来自试剂盒的皮质醇-HRP缀合物 (781微升) 与来自试剂盒的249微升的稀释剂混合来制备含有皮质醇-HRP缀合物的溶液。

[0267] 通过将来自试剂盒的抗皮质醇9,10-二氢吡啶缀合物 (2.5微升) 与来自试剂盒的247.5微升的稀释剂混合来制备含有抗皮质醇9,10-二氢吡啶缀合物的溶液。

[0268] 计算

[0269] 将标准样品的所报告背景信号除以试验样品的所报告背景信号来确定比例因子 (SF)。

[0270] 通过将试验样品的分析物信号乘以比例因子 (SF) 来计算试验样品的经校正的分析物信号。

[0271] 实施例1

[0272] 通过首先将马血清稀释样品 (20微升) 添加到板中的孔来在反射-白色96孔板中制备试验样品。每个孔包含单个试验样品,并且每个试验样品一式三份进行试验。对于包含标准样品的孔,使用20微升的PBS溶液 (3次平行测定)。接下来,将20微升的牛IgG标准溶液+光泽精溶液添加到每个孔中,并且将板以300rpm摇动30秒。将抗牛IgG-HRP缀合物溶液 (20微升) 添加到每个孔中,并且将板以300rpm摇动30秒。然后将9,10-二氢吡啶标记的抗牛IgG缀合物溶液 (20微升) 添加到每个孔中,并且将板以300rpm摇动30秒。使用3M公司的MLS II注射光度计 (购自美国明尼苏达州梅普尔伍德的3M公司 (3M Corporation,Maplewood,MN)) 将30微升的触发溶液添加到每个孔中。将仪器设定为同时对闪光灯发光信号 (试验样品或标准样品的分析物信号) 进行读取并积分持续三秒。在记录闪光灯发光信号 (相对光单位, RLU) 之后,在注入后60秒至70秒的时间段期间 (积分时间为一秒) 记录第二发光信号 (试验样品或标准样品的背景信号)。报告第二信号的RLU值为在10秒时间范围内记录的值的平均值。在表3至表7中,报告了每个平行测定样品的试验样品的背景信号 (RLU)、标准样品的平均背景信号 (RLU)、试验样品的分析物信号 (RLU)、标准样品的平均分析物信号 (RLU)、计算的比例因子和试验样品的经校正的分析物信号 (RLU) 值。关于每个试验样品的经校正的分析物信号是否在对应标准样品的分析物信号的 $\pm 20\%$ 内的确定也记录在表中。

[0273] 对于含有标准样品的三个孔,单个背景信号为643RLU、748RLU和853RLU。使用标准样品 ($n=3$) 的背景信号的748RLU的平均值计算比例因子。标准样品的平均分析物信号 (RLU) 被计算为38015RLU (其中三个单个的标准样品分析物信号为35903RLU、38075RLU和40067RLU)。

[0274] 表3. 具有 $1e-5$ 马血清作为添加的干扰物的试验样品 (IgG) 的经校正的分析物信号的测定

[0275]

	试验样品的平行测定		
	1	2	3
试验样品的背景信号(RLU)	697	1066	1018
标准样品的平均背景信号	748	748	748
比例因子	1.07	0.70	0.73
试验样品的分析物信号(RLU)	38645	59717	48375
标准样品的平均分析物信号(RLU)	38015	38015	38015
试验样品的经校正的分析物信号(RLU)	41350	41802	35314
试验样品的经校正的分析物信号在标准样品的平均分析物信号的 $\pm 20\%$ 内	是	是	是

[0276] 表4. 具有 $1e-4$ 马血清作为添加的干扰物的试验样品(IgG)的经校正的分析物信号的测定

[0277]

	试验样品的平行测定		
	1	2	3
试验样品的背景信号(RLU)	578	1106	881
标准样品的平均背景信号	748	748	748
比例因子	1.29	0.68	0.85
试验样品的分析物信号(RLU)	26397	54250	39458
标准样品的平均分析物信号(RLU)	38015	38015	38015
试验样品的经校正的分析物信号(RLU)	34052	36890	33539
试验样品的经校正的分析物信号在标准样品的平均分析物信号的 $\pm 20\%$ 内	是	是	是

[0278] 表5. 具有 $1e-3$ 马血清作为添加的干扰物的试验样品(IgG)的经校正的分析物信号的测定

[0279]

	试验样品的平行测定		
	1	2	3
试验样品的背景信号(RLU)	547	950	792
标准样品的平均背景信号	748	748	748
比例因子	1.37	0.79	0.94
试验样品的分析物信号(RLU)	25661	51732	38585
标准样品的平均分析物信号(RLU)	38015	38015	38015
试验样品的经校正的分析物信号(RLU)	35156	40868	36270
试验样品的经校正的分析物信号在标准样品的平均分析物信号的 $\pm 20\%$ 内	是	是	是

[0280] 表6. 具有 $1e-2$ 马血清作为添加的干扰物的试验样品(IgG)的经校正的分析物信号的测定

[0281]

	试验样品的平行测定		
	1	2	3
试验样品的背景信号(RLU)	283	790	616
标准样品的平均背景信号	748	748	748
比例因子	2.64	0.95	1.21
试验样品的分析物信号(RLU)	14738	33775	25536
标准样品的平均分析物信号(RLU)	38015	38015	38015
试验样品的经校正的分析物信号(RLU)	39807	32086	30989
试验样品的经校正的分析物信号在标准样品的平均分析物信号的 $\pm 20\%$ 内	是	是	是

[0282] 表7. 具有 $1e-1$ 马血清作为添加的干扰物的试验样品(IgG)的经校正的分析物信号的测定

[0283]

	试验样品的平行测定		
	1	2	3
试验样品的背景信号(RLU)	139	383	327
标准样品的平均背景信号	748	748	748
比例因子	5.38	1.95	2.29
试验样品的分析物信号(RLU)	10707	15478	12754
标准样品的平均分析物信号(RLU)	38015	38015	38015
试验样品的经校正的分析物信号(RLU)	57602	30182	29206
试验样品的经校正的分析物信号在标准样品的平均分析物信号的 $\pm 20\%$ 内	否	否	否

[0284] 比较例A

[0285] 遵循与实施例2中所述相同的过程,不同的是用牛乳IgG标准溶液(20微升)替换牛乳IgG标准溶液+光泽精溶液(20微升)。在表8至表12中,报告每个平行测定样品的试验样品的分析物信号(RLU)和标准样品的平均分析物信号(RLU)值。标准样品的平均分析物信号(RLU)被计算为37694RLU(其中三个单个的标准样品分析物信号为36955RLU、37062RLU和39066RLU)。关于每个试验样品的分析物信号是否在对应标准样品的分析物信号的 $\pm 20\%$ 内的确定也记录在表中。

[0286] 表8. 试验样品的分析物信号和具有 $1e-5$ 马血清作为添加的干扰物的标准样品的分析物信号的比较

[0287]

	试验样品的平行测定		
	1	2	3
试验样品的分析物信号(RLU)	44823	52240	48061
标准样品的平均分析物信号(RLU)	37694	37694	37694
试验样品的经校正的分析物信号在标准样品的平均分析物信号的 $\pm 20\%$ 内	是	否	否

[0288] 表9. 试验样品的分析物信号和具有 $1e-4$ 马血清作为添加的干扰物的标准样品的分析物信号的比较

		试验样品的平行测定		
		1	2	3
[0289]	试验样品的分析物信号(RLU)	30610	47831	39052
	标准样品的平均分析物信号(RLU)	37694	37694	37694
	试验样品的经校正的分析物信号在标准样品的平均分析物信号的 $\pm 20\%$ 内	是	否	是

[0290] 表10. 试验样品的分析物信号和具有 $1e-3$ 马血清作为添加的干扰物的标准样品的分析物信号的比较

		试验样品的平行测定		
		1	2	3
[0291]	试验样品的分析物信号(RLU)	29907	45515	38403
	标准样品的平均分析物信号(RLU)	37694	37694	37694
	试验样品的经校正的分析物信号在标准样品的平均分析物信号的 $\pm 20\%$ 内	否	否	是

[0292] 表11. 试验样品的分析物信号和具有 $1e-2$ 马血清作为添加的干扰物的标准样品的分析物信号的比较

		试验样品的平行测定		
		1	2	3
[0293]	试验样品的分析物信号(RLU)	17124	29716	25446
	标准样品的平均分析物信号(RLU)	37694	37694	37694
	试验样品的经校正的分析物信号在标准样品的平均分析物信号的 $\pm 20\%$ 内	否	否	否

[0294] 表12. 试验样品的分析物信号和具有 $1e-1$ 马血清作为添加的干扰物的标准样品的分析物信号的比较

		试验样品的平行测定		
		1	2	3
[0295]	试验样品的分析物信号(RLU)	12452	13552	12768
	标准样品的平均分析物信号(RLU)	37694	37694	37694
	试验样品的经校正的分析物信号在标准样品的平均分析物信号的 $\pm 20\%$ 内	否	否	否

[0296] 比较例B

[0297] 如上所述制备马血清的试验样品($1e-1$ 至 $1e-5$ 的稀释液)。标准样品为未添加马血清的PBS溶液。使用牛IgG ELISA试剂盒(目录号IGG-11,购自Life Diagnostics公司(Life Diagnostics Incorporated))根据制造商的说明书分析试验样品和标准样品。用Bio Tek POWERWAVE 340读板机(购自美国佛蒙特州威努斯基市的BIO Tek仪器公司(Bio Tek Instruments Incorporated, Winooski, VT))测定每个孔的吸光度值(A450)。每个平行测定(试验和标准样品)的吸光度(A450)值报告于表13中,并且与标准样品计算出的平均A450值进行比较。三次标准样品的平均A450值为0.551。

[0298] 表13.

[0299]

	马血清浓度	吸光度 (A450)	平均标准样品吸光度 (A450) 的计算的百分比	在标准样品的 20%内
标准样品	0	0.555	101	NA
标准样品	0	0.532	97	NA
标准样品	0	0.565	103	NA
试验样品	1e-5	0.600	109	是
试验样品	1e-5	0.584	106	是
试验样品	1e-5	0.567	103	是
试验样品	1e-4	0.523	95	是
试验样品	1e-4	0.589	107	是
试验样品	1e-4	0.606	110	是
试验样品	1e-3	0.501	91	是
试验样品	1e-3	0.626	114	是
试验样品	1e-3	0.589	107	是
试验样品	1e-2	0.490	89	是
试验样品	1e-2	0.501	91	是
试验样品	1e-2	0.490	89	是
试验样品	1e-1	0.180	33	否
试验样品	1e-1	0.186	34	否
试验样品	1e-1	0.196	36	否

[0300] 实施例2

[0301] 干燥进料玉米使用Romer系列II研磨机(奥地利Getzendorf的Romer Labs公司(Romer Labs, Getzendorf, Austria))研磨并通过#20筛。将过筛的玉米(2g)添加到8mL来自皮质醇SPARCL测定试剂盒(购自Life Diagnostics公司(Life Diagnostics Incorporated))的缓冲液。通过反复倒置3分钟来混合所得的浆料。将来自样品的上清液通过0.45微米注射器过滤器(美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技公司(Thermo Fischer Scientific, Waltham MA USA))过滤。使用来自测定试剂盒的缓冲液制备五种系列的滤液。(2x、4x、6x、8x和10x)。对于未稀释的样品和每个稀释液系列,制备八个单个的试验样品。每个试验样品掺杂有不同浓度的皮质醇(25nM、12.5nM、6.25nM、3.13nM、1.56nM、0.78nM、0.39nM或0.20nM)。由皮质醇溶液标准制备对应的一系列标准样品。将光泽精(5微升的10mg/mL水溶液)添加到每个样品(试验样品和标准样品)。

[0302] 就竞争性形式测定而言,通过首先将掺杂皮质醇的样品(50微升)添加到板中的孔中,在试剂盒中提供的96孔板中制备样品。每个孔包含单个试验样品或标准样品。接下来,将25微升的皮质醇-HRP缀合物溶液添加到每个孔中,并且将板以300rpm摇动30秒。然后将抗皮质醇-9,10-二氢吡啶缀合物溶液(25微升)添加到每个孔中,并且将板以300rpm摇动30秒。

[0303] 使用Turner BioSystems TD 20/20n光度计(美国威斯康星州麦迪逊的普洛麦格公司(Promega Corporation, Madison, WI))将30微升的触发溶液(得自测定试剂盒)添加到测定板的每个孔中。将仪器设定为同时对发光信号进行读取并积分持续六十秒(积分时间为0.1秒)。在前20秒期间测量(试验样品或标准样品的)分析物信号并取平均值。在记录闪光灯发光信号之后,在58秒和59秒的时间段期间记录第二发光信号(试验样品或标准样品的背景信号)并取平均值。

[0304] 在表14至表19中,报告了每个样品的试验样品的背景信号(RLU)、标准样品的背景

信号 (RLU)、试验样品的分析物信号 (RLU)、标准样品的分析物信号 (RLU)、计算的比例因子和试验样品的经校正的分析物信号 (RLU) 值。

[0305] 关于每个试验样品的经校正的分析物信号是否在对应标准样品的分析物信号的 $\pm 7.5\%$ 内的确定记录在表26中。

[0306] 表14. 具有10x稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品 (皮质醇) 的经校正的分析物信号 (RLU) 的测定

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的背景信号 (RLU)	553317	658535	543582	490741	578933	328499	338088	271638
标准样品的背景信号	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
比例因子	0.970	0.873	0.970	1.014	0.930	1.254	1.219	1.384
[0307] 试验样品的分析物信号 (RLU)	3236225	3613034	3237134	2671864	2457679	1296061	934213	463894
标准样品的分析物信号 (RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
试验样品的经校正的分析物信号 (RLU)	3140250	3153836	3138441	2707979	2286782	1625496	113880	642086

[0308] 表15. 具有8x稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品 (皮质醇) 的经校正的分析物信号 (RLU) 的测定

[0309]

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的背景信号(RLU)	566466	625861	536361	486262	571577	321871	335035	268353
标准样品的背景信号	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
比例因子	0.948	0.918	0.982	1.023	0.942	1.280	1.230	1.401
试验样品的分析物信号(RLU)	3329442	3318155	3099781	2717973	2343828	1214894	950182	463151
标准样品的分析物信号(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
试验样品的经校正的分析物信号(RLU)	3155821	3047647	3045454	2780087	2208913	1555075	1168820	648902

[0310] 表16. 具有6x稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品(皮质醇)的经校正的分析物信号(RLU)的测定

[0311]

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的背景信号(RLU)	506331	592650	491769	446645	523492	300334	297698	256791
标准样品的背景信号	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
比例因子	1.060	0.970	1.072	1.114	1.029	1.372	1.384	1.464
试验样品的分析物信号(RLU)	2768949	3050402	2815308	2343694	2054745	1131264	787353	431397
标准样品的分析物信号(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
试验样品的经校正的分析物信号(RLU)	2936167	2958729	3016776	2609887	2114342	1551863	1089996	631627

[0312] 表17. 具有4x稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品(皮质醇)的经校正的分析物信号(RLU)的测定

[0313]

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的背景信号(RLU)	515612	504591	478380	408393	464877	281948	263326	216780
标准样品的背景信号	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
比例因子	1.041	1.139	1.102	1.218	1.159	1.461	1.565	1.734
试验样品的分析物信号(RLU)	3178009	2874138	2961188	2337276	1854375	963160	544177	302927
标准样品的分析物信号(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
试验样品的经校正的分析物信号(RLU)	3309268	3274268	3261908	2846526	2148757	1407418	851682	525392

[0314] 表18. 具有2x稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品(皮质醇)的经校正的分析物信号(RLU)的测定

[0315]

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的背景信号(RLU)	444728	405951	389423	314420	370965	206136	191641	149302
标准样品的背景信号	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
比例因子	1.207	1.416	1.353	1.582	1.452	1.999	2.151	2.518
试验样品的分析物信号	2839788	2322543	2305990	1448249	1152668	452434	231905	138338

[0316]

(RLU)								
标准样品的分析物信号	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
(RLU)								
试验样品的经校正的分析物信号	3428397	3288790	3120429	2290953	1673780	90262	498716	348368
(RLU)								

[0317] 表19. 具有未稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品(皮质醇)的经校正的分析物信号(RLU)的测定

[0318]

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的背景信号	289665	329783	280283	223769	246972	166864	141918	99695
(RLU)								
标准样品的背景信号	536908	574839	526961	497374	538676	411997	412127	375979
比例因子	1.854	1.743	1.880	2.223	2.181	2.469	2.904	3.771
试验样品的分析物信号	1765315	1896647	1260152	737566	504160	30913	149433	73662
(RLU)								
标准样品的分析物信号	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372
(RLU)								
试验样品的经校正的分析物信号	3272093	3306015	2369216	1639399	1099636	750382	433949	277801
(RLU)								

[0319] 比较例C

[0320] 遵循与实施例2中所述相同的程序,不同的是不将光泽精添加到试验样品的任一者中。在表20至表25中,报告每个样品的试验样品的分析物信号(RLU)和标准样品的分析物信号(RLU)值。关于每个试验样品的分析物信号是否在对应标准样品的分析物信号的 $\pm 7.5\%$ 内的确定记录在表27中。

[0321] 表20. 具有10x稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品(皮质醇)的分析物信号和标准样品(皮质醇)的分析物信号的比较

[0322]

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的分析物信号(RLU)	2986836	2999758	2985115	2575683	2175063	1546084	1083165	610717
标准样品的分析物信号(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

[0323] 表21. 具有8x稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品(皮质醇)的分析物信号和标准样品(皮质醇)的分析物信号的比较

[0324]

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的分析物信号(RLU)	2961849	2860324	2858265	2609209	2073142	1459492	1096979	609017
标准样品的分析物信号(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

[0325] 表22. 具有6x稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品(皮质醇)的分析物信号和标准样品(皮质醇)的分析物信号的比较

[0326]

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的分析物信号(RLU)	2679541	2700131	2753105	2381779	1929545	1416228	994729	576422
标准样品的分析物信号(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

[0327] 表23. 具有4x稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品(皮质醇)的分析物信号和标准样品(皮质醇)的分析物信号的比较

[0328]

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的分析物信号(RLU)	2618417	2590723	2580944	2252278	1700177	1113602	673883	415710
标准样品的分析物信号(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

[0329] 表24. 具有2x稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品(皮质醇)的分析物信号和标准样品(皮质醇)的分析物信号的比较

[0330]

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的分析物信号(RLU)	2124224	2037724	1933408	1419467	1037069	560278	309003	215848
标准样品的分析物信号(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

[0331] 表25. 具有未稀释的玉米提取物作为干扰物的试验样品(皮质醇)的分析物信号和标准样品(皮质醇)的分析物信号的比较

[0332]

	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
试验样品的分析物信号(RLU)	1459352	1474481	1056669	731171	490437	334670	193541	123899
标准样品的分析物信号(RLU)	3154464	3121706	3106978	2738340	2252914	1583308	1163059	645372

[0333] 表26. 实施例2的结果

[0334]

玉米提取物（添加的干扰物）的稀释水平	实施例 2：试验样品的经校正的分析物信号在标准样品的分析物信号的±7.5%内							
	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
10x	是	是	是	是	是	是	是	是
8x	是	是	是	是	是	是	是	是
6x	是	是	是	是	是	是	是	是
4x	是	是	是	是	是	否	否	否
2x	是	是	是	否	否	否	否	否
未稀释	是	是	否	否	否	否	否	否

[0335] 表27.比较例C的结果

[0336]

玉米提 取物(添 加的干 扰物)的 稀释水 平	比较例 C: 试验样品的分析物信号在标准样品的分析物信号的±7.5%内							
	皮质醇浓度(nM)							
	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25
10x	是	是	是	是	是	是	是	是
8x	是	是	是	是	是	是	是	是
6x	否	否	否	否	否	否	否	否
4x	否	否	否	否	否	否	否	否
2x	否	否	否	否	否	否	否	否
未稀释	否	否	否	否	否	否	否	否

[0337] 实施例3

[0338] 评估光泽精(未结合的化学发光底物)对溶液相发光测定的影响。以竞争性形式使用皮质醇SPARCL测定法(Life Diagnostics公司(Life Diagnostics Incorporated))。制备了四种不同的样品A至D。在样品A中,使用来自测定试剂盒的稀释剂制备皮质醇浓度为25nM的皮质醇标准样品(50微升)。在样品B中,制备不含皮质醇(即仅包含样品A的稀释剂)的对照标准(50微升)。在样品C中,如样品A那样制备50微升的皮质醇标准样品,并补充有5微升的10mg/mL光泽精水性溶液。在样品D中,如样品B那样制备50微升的对照标准样品,并补充有5微升的10mg/mL光泽精水性溶液。根据随测定试剂盒一起提供的制造商的说明书单独分析样品A至D(各50微升)。使用Turner BioSystems TD 20/20n光度计(美国威斯康星州麦迪逊的普洛麦格公司(Promega Corporation, Madison, WI))将触发溶液(100μL)添加到测定板的每个孔中。将仪器设定为在添加触发溶液之后的1秒、2秒、5秒、10秒、15秒、20秒、30秒、40秒和60秒的时间点读取发光信号。将每个报告的发光值(RLU)记录为前十个0.1秒积分的平均值。结果报告于表28中。

[0339] 表28.

[0340]

时间 (秒)	发光信号(RLU)			
	样品 A 不含光泽精的皮 质醇(25nM)	样品 B 不含皮质醇且不含 光泽精	样品 C 含光泽精的皮质 醇(25nM)	样品 D 不含皮质醇且含 光泽精
1	24695	500204	32773	281669
2	21928	325489	33014	195379
5	18750	163249	31739	115147
10	15393	96082	29732	80490
15	13731	69826	28939	65280
20	11968	56769	27976	57212
30	10106	39712	27384	47221
40	9144	31608	25668	43119
50	8163	26621	25408	38848
60	7673	22630	25097	35654