



# (12) 发明专利申请

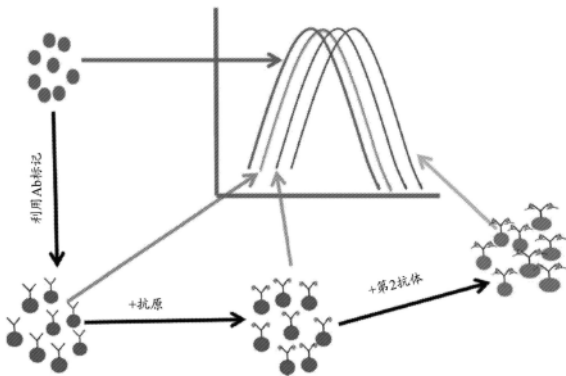
(10) 申请公布号 CN 117434261 A  
(43) 申请公布日 2024. 01. 23

(21) 申请号 202311388153.3  
(22) 申请日 2016.08.04  
(30) 优先权数据  
62/201,051 2015.08.04 US  
(62) 分案原申请数据  
201680045090.3 2016.08.04  
(71) 申请人 硕腾服务有限责任公司  
地址 美国新泽西  
(72) 发明人 J·弗里斯 R·K·梅拉  
K·P·阿伦 V·蒋  
(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
专利代理师 封新琴  
(51) Int.Cl.  
G01N 33/553 (2006.01)  
G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书1页 说明书21页 附图22页

(54) 发明名称  
基于溶液的等离子体特异性结合配偶体测定中的信号放大

(57) 摘要  
本发明涉及分析物检测装置和使用此类装置来检测样品中的极少量目标分析物的方法。具体地,本发明提供一种检测样品中的目标分析物的方法,所述方法包括将所述样品与溶液中的第一检测缀合物和第二检测缀合物混合,其中所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物包括偶合至结合配偶体的金属纳米结构,所述结合配偶体能够特异地结合至所述样品中的所述目标分析物(如果存在)以便在所述第一检测缀合物、所述分析物与所述第二检测缀合物之间形成复合物,其中光学信号在复合物形成后的变化指示所述目标分析物在所述样品中的存在。还描述了制备纳米结构和纳米合金以及缀合至结合配偶体的纳米结构和纳米合金的方法。



1. 一种检测样品中的目标分析物的方法,其包括:

(a) 在含聚乙二醇的溶液中将所述样品与第一检测缀合物和第二检测缀合物混合,其中所述聚乙二醇以0.1mg/mL至200mg/mL的浓度存在;所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物包括偶合至结合配偶体的复合金属纳米结构,所述结合配偶体能够特异性地结合至所述样品中的所述目标分析物(如果存在)以便在所述溶液中,在所述第一检测缀合物、所述分析物与所述第二检测缀合物之间形成复合物;且所述目标分析物是致病抗原或致病抗原的抗体,其中所述致病抗原是病毒或细菌抗原。

(b) 将所述复合物暴露于在紫外光-可见光-红外光光谱内的波长范围下的光源;以及

(c) 测量来自所述复合物的光学信号,其中所述光学信号的变化指示所述目标分析物在所述样品中的存在。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述光学信号是反射、吸收光谱、散射光谱或发射光谱。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述光学信号的所述变化包括光谱峰波长偏移和/或总光谱波长偏移。

4. 如权利要求3所述的方法,其中所述总光谱波长偏移是差异光谱。

5. 如权利要求1所述的方法,其中检测到毫微克数量的所述目标分析物的存在。

6. 如权利要求1所述的方法,其中检测到微微克数量的所述目标分析物的存在。

7. 如权利要求1所述的方法,其中检测到毫微微克数量的所述目标分析物的存在。

8. 如权利要求1所述的方法,其中步骤(a)在分光光度比色杯、分析转子、微孔板、临床分析仪、流室中、在光纤的尖端上或在透明凝胶中执行。

9. 如权利要求1所述的方法,其中所述复合金属纳米结构包括选自金、银、铜、铂、钯、镉、铁、镍以及锌的至少两种金属。

10. 如权利要求1所述的方法,其中所述复合金属纳米结构中的每一个包括第一金属的核心和第二金属的涂层。

## 基于溶液的等离子体特异性结合配偶体测定中的信号放大

[0001] 本申请是申请号为201680045090.3的中国专利申请(申请日:2016年8月4日,发明名称:基于溶液的等离子体特异性结合配偶体测定中的信号放大)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2015年8月4日提交的美国临时申请号62/201,051的优先权权益,所述申请以引用的方式整体并入本文。

### 发明领域

[0004] 本发明涉及用于检测样品中的目标分析物的系统和方法。具体地,本发明提供基于局部化等离子体共振的分析物检测系统,所述分析物检测系统能够检测样品中的极少量目标分析物。

[0005] 发明背景

[0006] 当前免疫测定和生物分子结合测定通常需要多个步骤和复杂设备来执行测定。在执行此类非均相测定中所涉及的灵敏度缺乏和复杂性由将标记的特异性结合配偶体与未标记的特异性结合配偶体分离的特定需要所引起。

[0007] 已经尝试开发基于贵金属纳米颗粒的局部表面等离子体共振(LSPR)性质的测定(Tokel等,Chem Rev.,第114卷:5728-5752,2014)。LSPR是由入射光诱发的在纳米大小的结构中的电子集体振荡。金属纳米颗粒对于紧邻它们的折射率变化具有强电磁反应,因此可测量纳米颗粒的共振频率的偏移来作为结合至纳米颗粒表面的分子的指标。虽然金属纳米颗粒,尤其是金纳米颗粒,在诊断测定中用于检测结合事件,但此类测定通常受到低灵敏度的影响并且不能用于定量地监测连续结合事件的动力学。

[0008] 因此,需要改进的测定方法,所述测定方法在提供增加的灵敏度的同时使用均相格式。利用标准实验室技术(诸如光谱学)的测定将也是合乎需要的。

[0009] 发明概述

[0010] 本申请描述了使用局部化表面等离子体共振技术(LSPR)来执行涉及特异性结合配偶体的测定,所述特异性结合配偶体包括但不限于配体、受体、转录因子、结合DNA元素、抗原和抗体。更具体地,本申请涉及用于使用复合金属纳米材料标记的配偶体实现此类测定中的显著放大的过程 and 材料。

[0011] 在本文所述的各种实施方案中,本申请涉及使用在溶液中的复合纳米材料标记的配偶体来以定性或定量方式确定特异性结合配偶体的结合。

[0012] 在第一方面中,本申请提供检测样品中的目标分析物的方法。在一个实施方案中,所述方法包括将样品与第一检测缀合物和第二检测缀合物混合,其中第一和第二检测缀合物包括偶合至结合配偶体的金属纳米结构,所述结合配偶体能够特异性地结合至样品中的目标分析物(如果存在)以便在第一检测缀合物、分析物与第二检测缀合物之间形成复合物;将复合物暴露于在紫外光-可见光-红外光光谱内的波长范围下的光源;以及测量来自复合物的光学信号,其中光学信号的变化指示目标分析物在样品中的存在。在一个示例性实施方案中,第一检测缀合物和/或第二检测缀合物中的金属纳米结构是复合金属纳米结

构。在另一个示例性实施方案中,混合步骤在选自聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇和聚天冬氨酸的聚合物材料存在的情况下发生。在优选实施方案中,聚合物材料是PEG。在又一个示例性实施方案中,混合步骤在多糖存在的情况下发生。在一些实施方案中,多糖选自麦芽糖糊精、玉米糖浆和多聚葡萄糖。在优选实施方案中,多糖是麦芽糖糊精。在又一个示例性实施方案中,混合步骤在阻断剂存在的情况下发生。在一些实施方案中,阻断剂选自牛血清白蛋白、酪蛋白、明胶、卵白蛋白和丙种球蛋白。在优选实施方案中,阻断剂是牛血清白蛋白。

[0013] 在一些实施方案中,检测缀合物包括能够特异性地结合至目标分析物的结合配偶体。在某些实施方案中,结合配偶体是半抗原和其他小分子、药物、激素、生物大分子,所述生物大分子包括但不限于抗体或其片段(例如,Fv、Fab、(Fab)<sub>2</sub>、单链、CDR等)、抗原、受体、配体、多核苷酸、适体、多肽、多糖、脂多糖、糖肽、脂蛋白或核蛋白。在某些示例性实施方案中,结合配偶体是抗体。在其他示例性实施方案中,结合配偶体是抗原。在一些实施方案中,检测缀合物(例如,第一检测缀合物和第二检测缀合物)包括是相同类型分子的结合配偶体。

[0014] 在一些实施方案中,检测缀合物中的金属纳米结构可由贵金属或其复合物组成。在一些实施方案中,检测缀合物中的金属纳米结构可由过渡金属或其复合物组成。在一些实施方案中,检测缀合物中的金属纳米结构可包括与贵金属或过渡金属组合的碱金属或镧系元素。在某些实施方案中,检测缀合物中的金属纳米结构包括选自金、银、铜、铂、钯、钇、铈、钕、钛、铬、镉、锌、铁、钴、镍和其复合物的金属。在示例性实施方案中,金属纳米结构是金纳米结构。在另一个示例性实施方案中,金属纳米结构是银纳米结构。

[0015] 在优选实施方案中,检测缀合物中的金属纳米结构是包括至少两种贵金属、过渡金属、碱金属或镧系元素的复合金属纳米结构。在一些实施方案中,复合金属纳米结构包括选自金、银、铜、铂、钯、钌、铑、铱、钛、铬、镉、锌、铁、钴及镍的至少两种金属。在其他实施方案中,复合金属纳米结构包括选自金、银、铜、铂、钯、镉、铁、镍及锌的至少两种金属。在示例性实施方案中,复合金属纳米结构包括金和银。

[0016] 在一个示例性实施方案中,第一结合配偶体链接至金或复合纳米颗粒,并且第二结合配偶体链接至另一种复合纳米材料,所述另一种复合纳米材料含有两种金属,所述两种金属选自由金、银、铜、铂、钯、镉和锌组成的组。在另一个示例性实施方案中,第一结合配偶体缀合至含有银和金的纳米颗粒,并且第二结合配偶体缀合至含有金和铜的纳米颗粒。

[0017] 如本文所述, 显著的信号放大可在各种测定中实现。在某些实施方案中, 测定是直接测定、间接测定、夹心测定、竞争性测定和次级标记测定。在某些另外的实施方案中, 这些测定可使用消光测量、散射测量和/或反射测量来监测特异性结合事件。

[0018] 在某些实施方案中,本发明的方法能够检测样品中的毫微微克至毫微克数量的目标分析物。

[0019] 如以上所述,本申请涉及使用在溶液中的纳米材料标记的配偶体(例如缀合至复合金属纳米结构的抗体)以定性或定量方式确定特异性结合配偶体的结合。在一些实施方案中,溶液包括多糖(例如,麦芽糖糊精)、海藻糖、聚合物材料(例如,PEG)、阻断剂(例如,牛血清白蛋白)和/或氯化钠中的一种或多种。在示例性实施方案中,溶液成分中的一种或多种(例如麦芽糖糊精)可呈冻干形式提供,例如,提供为珠粒或球团。例如,溶液成分中的一

种或多种可在分光光度比色杯中或在分析转子的一个或多个反应室中提供为珠粒或球团。珠粒和球团可在添加液体(例如水、盐溶液、液体样品等)后悬浮。在一个实施方案中,溶液包括最终浓度为约2%至约20%重量/体积(wt/vol)的麦芽糖糊精。在另一个实施方案中,溶液包括最终浓度为约4%至约15%wt/vol的麦芽糖糊精。在又一个实施方案中,溶液包括最终浓度为约5%至约10%wt/vol的麦芽糖糊精。在一些实施方案中,与在包括替代糖(例如蔗糖或聚蔗糖)的溶液中执行的测定相比较时,测定的灵敏度在麦芽糖糊精被添加至溶液时得到改进。

[0020] 在另一个方面中,本发明提供用于利用本文所述的方法来检测样品中的目标分析物的分析物检测装置。合适的分析物检测装置可包括但不限于分光光度比色杯、分析转子、微孔板、临床分析仪(例如,Cobas Fara)或流室。也可采用光纤的尖端或透明凝胶来执行本文所公开的检测方法。在示例性实施方案中,分析物检测装置选自分光光度比色杯和分析转子。

[0021] 在优选实施方案中,分析检测装置的部件包括在离心转子或圆盘内。在一些实施方案中,转子或圆盘可包括一个或多个反应室,多种检测缀合物位于所述一个或多个反应室中。在某些实施方案中,检测缀合物呈冻干组合物(诸如冻干珠粒或球团)形式存在。在一些实施方案中,分析物检测装置包括具有一个或多个反应室的转子或圆盘,其中每个反应室包括多种检测缀合物(例如,第一检测缀合物和第二检测缀合物),其中检测缀合物偶合至金属纳米颗粒,例如,复合金属纳米结构。在转子或圆盘包括超过一个反应室的实施方案中,可选择检测缀合物以使得可在每个反应室中检测不同分析物。

[0022] 在又一个方面中,本发明提供包括本发明的分析物检测装置的试剂盒。在一个实施方案中,所述试剂盒包括多种检测缀合物(例如,第一检测缀合物和第二检测缀合物),其中检测缀合物偶合至金属纳米颗粒,例如,复合金属纳米结构。在一些实施方案中,所述检测缀合物中的一种或多种可以是冻干的。在一个实施方案中,全部检测缀合物是冻干的。在示例性实施方案中,第一检测缀合物和/或第二检测缀合物中的金属纳米结构是复合金属纳米结构。

[0023] 在又一个方面中,本发明提供一种用于制备在本文描述的检测装置和方法使用的复合金属纳米结构的方法。在一个实施方案中,所述方法包括:制备包括聚合物与氯金酸的混合物的第一溶液、制备包括银或铜纳米结构的第二溶液,以及将第一溶液与第二溶液孵育一段时间,其中所得混合物包括涂有金的银纳米结构或涂有金的铜纳米结构。在某些实施方案中,将还原剂(诸如抗坏血酸)添加至反应混合物以增加所产生的纳米结构的数量。在一个实施方案中,第一溶液中的聚合物是聚乙烯吡咯烷酮。在另一个实施方案中,第一溶液中的聚合物是聚乙烯醇。在另一个实施方案中,所述方法包括:制备包括净化剂(诸如CHAPS)与氯金酸的混合物的第一溶液和包括银或铜盐的溶液,以及孵育第一溶液与含有还原剂(诸如抗坏血酸)的第二溶液,从而导致形成复合纳米结构。纳米结构的大小和形状可通过改变所使用的金属的比、净化剂的浓度以及最后所使用的抗坏血酸的量来改变。

[0024] 附图简述

[0025] 图1. 示出本文所述的LSPR免疫测定的基本原理。金属纳米颗粒自身展现出取决于金属组成、大小、形状和分散介质的性质的光谱。纳米颗粒的表面处由第一初级结合和后续次级结合引起的轻微变化造成与纳米缀合物相互作用的光的特性的逐渐变化。此类变化可

由合适的分光仪记录并提供定性以及定量信息。

[0026] 图2. 示出受体具有多个配体结合部位的实例。利用纳米颗粒标记的抗体在结合至抗原时造成光谱偏移。

[0027] 图3. 示出当受体具有多个结合部位或受体具有不同结合部位时在不同纳米颗粒类型之间的LSPR耦合效应。

[0028] 图4. 示出聚乙二醇 (PEG) 对LSPR信号的影响。LSPR信号在PEG存在的情况下实质性地增加。这幅图示出在向含有2.5ng心丝虫抗原和抗心丝虫多克隆抗体的反应介质添加PEG后LSPR信号的十倍增强。

[0029] 图5. 示出通过利用蓝色金纳米星所造成的波长偏移的增加。在这幅图中, 与抗体的红色胶体金缀合物相比较时, 缀合至蓝色纳米星的抗体提供波长偏移率的2倍增加。这个实验是使用2.5ng粗心丝虫提取物作为抗原并且然后使其与使用红色胶体金制备的商用缀合物或按照本发明制备的新颖蓝色缀合物反应来设置。在两种类型的缀合物中都使用聚乙二醇。

[0030] 图6. 示出鸡抗蛋白质A的蓝色胶体缀合物与蛋白质A在宽浓度范围内反应并且反应速率在长时间内是线性的。

[0031] 图7A和7B. 示出在溶液相(图7A)而不是固相(图7B)中使用LSPR技术时分析物检测的实质性改进。反应是使用Nicoya芯片在固相中执行或使用Nicoya比色杯组件在液相中执行。在两个实验中使用同一Nicoya分光仪。比色杯测定(溶液相)中的CRP响应比固相中大了大致6倍至8倍。

[0032] 图8A和8B. 示出使用胶体金缀合单克隆抗TSH抗体在溶液相中进行的TSH检测。

[0033] 图9A、9B和9C. 示出在反应介质中不具有PEG(图9A)或具有PEG(图9B)的情况下进行的TSH检测的比较。两种单克隆抗体(C1和C6)用作胶体金缀合物。改变两种缀合物的比并且在30% C1和70% C6时获得最佳信号。图9C示出在反应介质中包括PEG的情况下进行的检测的TSH LSPR峰偏移比较。图9C演示了PEG在500秒时增强TSH测定中的分析物检测。

[0034] 图10. 示出如下合成的金/银合金纳米颗粒的光谱: 在添加硝酸银、然后添加抗坏血酸且最后添加氢氧化钠之前使氯化金与CTAB反应。

[0035] 图11. 示出在纳米合金颗粒中具有增加的含银量的情况下 $\lambda_{\text{最大}}$ 的线性蓝移。

[0036] 图12. 示出具有金和金/银合金纳米颗粒的老鼠IgG缀合物的免疫反应性。缀合物通过老鼠IgG向金或合金颗粒上的被动吸收来合成。利用在横向流硝化纤维条上成条的蛋白质A来测试这些缀合物的反应性。

[0037] 图13. 示出利用CHAPS封端的金/银纳米星的光谱。在添加硝酸银和柠檬酸三钠之前向CHAPS添加氯化金。纳米星的形成通过还原性溶液的添加来诱发, 所述还原性溶液含有抗坏血酸、CHAPS和柠檬酸三钠。 $\lambda_{\text{最大}}$ 发生红移, 一直到某个银浓度, 然后发生蓝移。因此通过改变反应介质中的金与银的比产生不同大小的纳米星。

[0038] 图14. 示出在老鼠IgG结合至在不存在银的情况下产生的仅金纳米颗粒后的峰红移。

[0039] 图15. 示出在老鼠IgG结合至在存在~37.5%银的情况下产生的金/银纳米星后的大得多的峰红移。

[0040] 图16. 示出麦芽糖糊精对LSPR信号的高度积极影响。

[0041] 图17. 示出麦芽糖糊精和BSA如何减少在分析转子中的沉淀并维持高LSPR信号。

[0042] 图18. 示出在BSA、PEG和麦芽糖糊精的各种浓度下进行的TSH的pg/ml检测。

[0043] 发明详述

[0044] 本发明部分地基于以下发现:基于LSPR的测定中的显著放大可利用复合金属纳米结构标记的结合配偶体来实现。因此,本发明提供利用多种检测缀合物的分析物检测方法,所述检测缀合物包括偶合至生物分子的复合金属纳米结构。

[0045] 本发明克服了当前免疫测定、配体-受体结合测定、核酸-蛋白质结合测定或一般需要多个步骤和用于执行此类步骤的复杂设备的其他特异性结合配偶体测定的问题。在执行此类非均相测定中所涉及的灵敏度缺乏和复杂性由将标记的特异性结合配偶体与未标记的特异性结合配偶体分离的特定需要所引起。本发明通过在均相格式中执行测定中所涉及的所有步骤来克服此类限制,其中已反应的测定成分和未反应的测定成分的分离是不必要的,因为结合事件会改变通过光谱学普通技术人员所使用的光谱技术中的任一种实时测量的LSPR特性。本发明的无需分离的一锅法测定使用等离子体偶合和相关效应来提供最终LSPR调制信号的放大。

[0046] 如将对本领域普通技术人员显而易见,本发明可应用于多种抗原分析物的检测,诸如与人和动物的感染性疾病相关联的抗原分析物,例如,与感染性疾病相关联的抗原和响应于所述抗原而生成的抗体。除了抗原和抗体的检测之外,本文所述的技术还可用于执行涉及特异性结合配偶体的测定,所述特异性结合配偶体诸如配体和受体,以及转录因子和其相关联的DNA结合元素。此外,可使用金属纳米颗粒与特异性结合配偶体的适当缀合物来检测RNA-RNA相互作用、RNA-DNA相互作用、DNA-DNA相互作用或蛋白质-核酸相互作用。

[0047] 如本文所提供的,本发明描述了使用在溶液中(而不是通过化学或物理沉积附接至表面)的金属纳米颗粒以定性或定量的方式确定特异性结合配偶体的结合。可以测量与包括附接至金属纳米颗粒的未结合的配偶体和已结合的配偶体的区域相互作用的光的特性的变化,从而允许通过合适的检测器确定特异性结合配偶体之间的定性和定量相互作用。

[0048] 在第一方面中,本申请提供检测样品中的目标分析物的方法。在一些实施方案中,所述方法包括将样品与多种检测缀合物混合,所述检测缀合物包括偶合至结合配偶体的金属纳米结构。在一个实施方案中,所述方法包括:第一检测缀合物和第二检测缀合物,其中第一和第二检测缀合物包括偶合至结合配偶体的金属纳米结构,所述结合配偶体能够特异性地结合至样品中的目标分析物(如果存在)以便在第一检测缀合物、分析物与第二检测缀合物之间形成复合物;将复合物暴露于在紫外光-可见光-红外光光谱内的波长范围下的光源;以及测量来自复合物的光学信号,其中光学信号的变化指示目标分析物在样品中的存在。在一个示例性实施方案中,第一检测缀合物和/或第二检测缀合物中的金属纳米结构是复合金属纳米结构。在另一个示例性实施方案中,混合步骤在选自聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇和聚天冬氨酸的聚合物材料存在的情况下发生。在优选实施方案中,聚合物材料是PEG。在又一个示例性实施方案中,混合步骤在多糖存在的情况下发生。在一些实施方案中,多糖选自麦芽糖糊精、玉米糖浆和多聚葡萄糖。在优选实施方案中,多糖是麦芽糖糊精。在又一个示例性实施方案中,混合步骤在阻断剂存在的情况下发生。在一些实施方案中,阻断剂选自牛血清白蛋白、酪蛋白、明

胶、卵白蛋白和丙种球蛋白。在优选实施方案中,阻断剂是牛血清白蛋白。

[0049] 在本文所述的各种实施方案中,本发明的方法可以夹心测定格式、直接测定格式、间接测定格式以及竞争性格式和次级标记格式来配置。

[0050] 在一些实施方案中,检测方法是夹心测定。在此类实施方案中,检测缀合物包括偶合至结合配偶体的金属纳米结构,所述结合配偶体能够特异性结合至样品中的目标分析物(如果存在)。例如,在一个实施方案中,呈夹心测定格式的方法包括:第一检测缀合物和第二检测缀合物,其中第一检测缀合物和第二检测缀合物包括偶合至结合配偶体的金属纳米结构,所述结合配偶体能够特异性地结合至样品中的目标分析物(如果存在)以便在第一检测缀合物、分析物与第二检测缀合物之间形成复合物。在示例性实施方案中,第一检测缀合物和/或第二检测缀合物中的金属纳米结构是复合金属纳米结构。将复合物暴露于光源并且测量光学信号,其中光学信号的变化指示分析物在样品中的存在。作为例示,当含有目标分析物的样品与第一和第二检测缀合物混合时,目标分析物结合至检测缀合物中的结合配偶体以在第一检测缀合物、分析物与第二检测缀合物之间形成复合物。这种复合物的形成使检测缀合物中的金属纳米结构彼此极为接近,即,等离子体-等离子体偶合。由金属纳米结构吸收、散射或透射的光的量受到复合物中的金属纳米结构的接近性影响,因而产生峰吸收波长的增强偏移,这指示目标分析物在样品中的存在。

[0051] 在其他实施方案中,检测方法是竞争性测定。在此类实施方案中,第一检测缀合物包括偶合至所关注目标分析物的金属纳米结构。如同在夹心测定方法中一样,第二检测缀合物能够特异性地结合至目标分析物。在这种类型的测定中,第一检测缀合物最初将结合至第二检测缀合物。如果含有目标分析物的样品与这些初始复合物混合,则样品中的未标记或游离的目标分析物将与第一检测缀合物竞争以便结合至第二检测缀合物。这种类型的测定中的光学信号的变化将由第一检测缀合物中的金属纳米结构从第二检测缀合物的位移引起,这将成比例地减少峰吸收波长的波长偏移。

[0052] 如以上所述,本发明的方法可利用多种检测缀合物。根据测定配置,检测缀合物包括偶合至能够特异性地结合至目标分析物或另一种检测缀合物的结合配偶体的金属纳米结构。举例而言,在所述方法以夹心测定格式来配置的实施方案中,检测缀合物包括偶合至或缀合至能够特异性地结合目标分析物的结合配偶体的金属纳米结构。在所述方法以直接竞争性测定格式来配置的其他实施方案中,检测缀合物中的至少一种包括偶合至或缀合至目标分析物的金属纳米结构。在示例性实施方案中,第一检测缀合物和/或第二检测缀合物中的金属纳米结构是复合金属纳米结构。

[0053] 在一些实施方案中,检测缀合物包括能够特异性地结合至目标分析物的结合配偶体。如本文所用,“特异性结合”是指以高亲和力(例如,至少 $10^{-6}$ M的亲和力)结合至目标分子。在一些实施方案中,结合配偶体是半抗原和其他小分子、药物、激素、生物大分子,所述生物大分子包括但不限于抗体或其片段(例如,Fv、Fab、(Fab)<sub>2</sub>、单链、CDR等)、抗原、受体、配体、多核苷酸、适体、多肽、多糖、脂多糖、糖肽、脂蛋白或核蛋白。在某些实施方案中,结合配偶体是抗体。在其他实施方案中,结合配偶体是抗原。

[0054] 在一些实施方案中,检测缀合物(例如,第一检测缀合物和第二检测缀合物)包括是相同类型分子的结合配偶体,但优选地在互不相同的位置处结合至目标分析物。举例而言,第一检测缀合物和第二检测缀合物都可以是识别目标分析物的抗体,但第一检测缀合



物结合至目标分析物的表位与第二检测缀合物结合至目标分析物的表位分离并且理想地不与其重叠。因此,在某些实施方案中,第一检测缀合物包括识别目标分析物的第一表位的抗体并且第二检测缀合物包括识别目标分析物的第二表位的不同抗体。在本文所述的各种实施方案中,第一检测缀合物可包括识别目标分析物的第一表位的单克隆抗体。在另外的实施方案中,第二检测缀合物可包括识别目标分析物的第二表位的单克隆抗体,所述第二表位与由第一检测缀合物识别的表位分离并且理想地不与其重叠。可选地,第一检测缀合物和/或第二检测缀合物可包括多克隆抗体。例如,第一检测缀合物可包括多克隆抗体而第二检测缀合物包括单克隆抗体。在一些实施方案中,第一检测缀合物包括多克隆抗体并且第二检测缀合物包括多克隆抗体。

[0055] 检测缀合物中的金属纳米结构可由贵金属或其复合物组成。在一些实施方案中,检测缀合物中的金属纳米结构可由过渡金属或其复合物组成。在一些实施方案中,检测缀合物中的金属纳米结构可包括与贵金属或过渡金属组合的碱金属或镧系元素。在某些实施方案中,检测缀合物中的金属纳米结构包括选自金、银、铜、铂、钯、钇、铈、铉、铊、铋、镉、锌、铁、钴、镍和其复合物的金属。在一个实施方案中,金属纳米结构是金纳米结构。在另一个实施方案中,金属纳米结构是银纳米结构。

[0056] 在优选实施方案中,检测缀合物中的金属纳米结构是复合金属纳米结构。“复合金属纳米结构”是指包括至少两种贵金属、过渡金属、碱金属或镧系元素的纳米结构。两种或更多种金属可混合在一起(如在合金中),或两种或更多种金属可存在于纳米结构的单独部分中。举例而言,一种金属可形成纳米结构的核心,而第二金属形成纳米结构的外壳层或涂层。在一些实施方案中,复合金属纳米结构包括选自金、银、铜、铂、钯、钇、铈、铉、铊、铋、镉、锌、铁、钴及镍的至少两种金属。在其他实施方案中,复合金属纳米结构包括选自金、银、铜、铂、钯、镉、铁、镍及锌的至少两种金属。在一个具体实施方案中,复合金属纳米结构包括金和银。在另一个实施方案中,复合金属纳米结构包括金和铜。在又一个实施方案中,复合金属纳米结构包括银和铜。本发明的方法中使用的复合金属纳米结构可包括许多不同的几何形状,诸如球状纳米颗粒、锥体纳米颗粒、六边形纳米颗粒、纳米管、纳米星、纳米壳层、纳米棒、纳米点、纳米岛、纳米线、纳米盘、纳米立方体或其组合。在示例性实施方案中,复合金属纳米结构选自纳米星和纳米棒。

[0057] 在某些实施方案中,本发明的方法中使用的复合金属纳米结构是第一金属与第二金属的合金。在一些实施方案中,本发明的方法中使用的复合金属纳米结构包括第一金属的核心和第二金属的涂层。在具体实施方案中,复合金属纳米结构包括银核心和金涂层。在其他实施方案中,复合金属纳米结构包括铜核心和金涂层。在另一个实施方案中,核心是银并且涂层是铜。在一些实施方案中,复合金属纳米结构中的每一个包括电介质核心(例如二氧化硅、硫化金、二氧化钛、硅石和聚苯乙烯)、第一金属的第一涂层和第二金属的第二涂层。在检测方法的一个具体实施方案中,核心是硅石,第一涂层(即内涂层)是银涂层,并且第二涂层是金涂层(即外涂层)。在另一个实施方案中,核心是硅石,第一涂层(即内涂层)是铜涂层,并且第二涂层是金涂层(即外涂层)。

[0058] 在一些实施方案中,在利用第二金属进行的涂布过程之后,使包括第一金属的核心溶解以形成由第二金属组成的空心结构。例如,利用金纳米颗粒对银核心进行涂布会在银核心周围生成金壳层,并且随后使银核心溶解或降解,从而导致形成空心纳米金壳层结

构。

[0059] 金属纳米结构包括球状纳米颗粒以及纳米片和纳米壳层。纳米片具有大于其厚度的横向尺寸(例如边缘长度)。纳米片包括纳米盘、纳米多边形、纳米六边形、纳米立方体、纳米环、纳米星以及纳米棱柱体。在一些实施方案中,金属纳米结构(包括复合纳米结构)具有选自以下各项的几何形状;球状纳米颗粒、锥体纳米颗粒、六边形纳米颗粒、纳米管、纳米星、纳米壳层、纳米棒、纳米点、纳米岛、纳米线、纳米盘、纳米立方体或其组合。其他形状也是可能的,包括不规则形状。在某些实施方案中,金属纳米结构的大小和形状是不均匀的——即,金属纳米结构是不同形状和大小的纳米结构的非均匀混合物。在一个示例性实施方案中,金属纳米结构是纳米星。在另一个示例性实施方案中,金属纳米结构是纳米棒。在另一个示例性实施方案中,金属纳米结构是复合纳米球。

[0060] 对于球状纳米颗粒,合适的直径范围包括约5nm至约200nm、约10nm至约100nm和约20nm至约60nm。对于纳米棒,合适的直径范围包括约5nm至约50nm、约8nm至约30nm和约10nm至约25nm。此外,对于纳米棒,合适的长度范围包括约25nm至约150nm、约40nm至约120nm和约50nm至100nm。在一些实施方案中,纳米棒的纵横比(即长度/直径)在2与10之间。对于纳米片,边缘长度可以是约10nm至约800nm、约20nm至约500nm、约50nm至约200nm、约30nm至约100nm或约10nm至约300nm。纳米片的厚度范围可以是约1nm至约100nm、约5nm至约80nm、约10nm至约50nm或约5nm至约20nm。

[0061] 在一些实施方案中,纳米片具有大于2的纵横比。纵横比是边缘长度与厚度的比。优选地,纳米片具有约2至约25、约3至约20、约5至约10、约2至约15或约10至约30的纵横比。

[0062] 将分子缀合至金属纳米结构的方法是本领域技术人员已知的。此类方法包括缀合化学法,诸如涉及1-乙基-3-[3-二甲氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)的化学法、磺基-NHS偶合、疏水性结合或硫醚化学法。在一些实施方案中,结合配偶体或目标分析物可通过各种化学官能团偶合至金属纳米结构,所述化学官能团包括硫醇、胺、二硫醇、丙烯酸亚磷酰胺、叠氮化物或炔烃。在一些实施方案中,分子可通过更大的载体分子或蛋白质间接地偶合至金属纳米结构。当分子较小,诸如是激素、药物和小于10kD的其他小分子时,这种间接偶合尤其适用。优选地,载体蛋白质不能够与目标分析物特异性地相互作用。在一些实施方案中,蛋白质A或蛋白质G或蛋白质A/G可缀合或偶合至纳米颗粒。

[0063] 在一些实施方案中,第一检测缀合物中所使用的一种或多种金属可与制成第二检测缀合物中的金属纳米结构的一种或多种金属相同。例如,在一个实施方案中,第一检测缀合物包括金纳米结构并且第二检测缀合物包括金纳米结构。在其他实施方案中,第一检测缀合物中所使用的金属与用于形成第二检测缀合物中的金属纳米结构的一种或多种金属不同。例如,在一些实施方案中,第一检测缀合物包括银纳米结构并且第二检测缀合物包括金纳米结构。在其他实施方案中,第一检测缀合物包括金纳米结构并且第二检测缀合物包括银纳米结构。在某些实施方案中,第一检测缀合物包括金纳米结构并且第二检测缀合物包括复合纳米结构。在相关实施方案中,复合纳米结构包括涂有金的银纳米结构。在其他具体实施方案中,第一检测缀合物包括金纳米结构并且第二检测缀合物包括复合纳米结构,所述复合纳米结构包括涂有金的铜纳米结构。在又一些其他实施方案中,第一检测缀合物包括金纳米结构并且第二检测缀合物包括复合纳米结构,所述复合纳米结构包括涂有金的磁铁矿纳米结构。在再其他的实施方案中,第一检测缀合物包括金纳米结构并且第二检测

缀合物包括复合纳米结构,所述复合纳米结构包括金和碱金属或镧系元素。

[0064] 在某些实施方案中,用于产生第一检测缀合物的金属纳米结构的大小类似于第二检测缀合物中所使用的金属纳米结构的大小。在此类实施方案中,使两组纳米结构的大小相匹配可提供反射光谱、发射光谱或散射光谱中的最佳波长偏移。

[0065] 在一些实施方案中,反应环境可利用适当的缓冲剂、离子强度和其他促进剂进行调整。在优选实施方案中,反应环境包括聚乙二醇(PEG),如本文所述,聚乙二醇可增强LSPR信号的强度。也可使用其他类似的聚合物材料,包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇和聚天冬氨酸。

[0066] 本发明还提供了用于利用本文所述的方法来检测样品中的目标分析物的分析物检测装置。合适的分析物检测装置可包括但不限于分光光度比色杯、分析转子、微孔板、或流室。如技术人员将理解,也可采用光纤的尖端或透明凝胶来执行本文所公开的检测方法。

[0067] 在某些实施方案中,本文所述的分析检测装置的全部部件包括在离心转子或圆盘内。例如,转子或圆盘可包括一个或多个反应室,多种检测缀合物位于所述一个或多个反应室中。在一些实施方案中,检测缀合物呈冻干组合物(诸如冻干珠粒或球团)形式存在。在一些实施方案中,分析物检测装置包括具有一个或多个反应室的转子或圆盘,其中每个反应室包括多种检测缀合物(例如,第一检测缀合物和第二检测缀合物),其中检测缀合物偶合至金属纳米颗粒。这种装置提供一步式分析物检测方法,它们使测试样品与转子或圆盘接触,并且向转子或圆盘施加离心力会将测试样品递送至反应室,在所述反应室中样品与第一检测缀合物和第二检测缀合物混合。在转子或圆盘包括超过一个反应室的实施方案中,可选择检测缀合物以使得可在每个反应室中检测不同分析物。如果转子包括多个反应室,则这些转子格式检测装置可以夹心测定格式、直接竞争性格式或两者来配置。

[0068] 本文论述的金属纳米结构类型中的任一种可与这些转子格式检测装置一起使用。在一些实施方案中,第一检测缀合物包括金纳米结构并且第二检测缀合物中的金属纳米结构是金纳米结构。在其他实施方案中,第一检测缀合物包括银纳米结构并且第二检测缀合物中的金属纳米结构是金纳米结构。在再其他的实施方案中,第一检测缀合物包括金纳米结构并且第二检测缀合物包括复合纳米结构。例如,在一个实施方案中,复合纳米结构是涂有金的银纳米结构。在另一个实施方案中,复合纳米结构是涂有金的铜纳米结构。

[0069] 本发明还包括试剂盒,所述试剂盒包括如本文所公开的本发明的分析物检测装置。在一个实施方案中,试剂盒包括多种检测缀合物(例如,第一检测缀合物和第二检测缀合物),其中检测缀合物偶合至金属纳米颗粒。在一些实施方案中,检测检测缀合物中的一种或多种可以是冻干的,例如,呈球团或珠粒形式。在一个实施方案中,全部检测缀合物是冻干的。在另外的实施方案中,试剂盒可包括一种或多种附加试剂。在一些实施方案中,附加试剂中的一种或多种呈冻干形式提供。在一些实施方案中,试剂盒可包括阻断剂、糖、聚合物促进剂材料、氯化钠和/或其组合。“阻断剂”是防止存在于样品中的蛋白质与可检测试剂和/或分析物相关联的试剂。阻断剂通常是蛋白质本身并且可包括但不限于牛血清白蛋白、酪蛋白、明胶、卵白蛋白、丙种球蛋白和来自未免疫动物的IgG。在一些实施方案中,糖是多糖。在一个实施方案中,多糖选自麦芽糖糊精、玉米糖浆和多聚葡萄糖。在优选实施方案中,多糖是麦芽糖糊精。在另一个实施方案中,糖是海藻糖。在一些实施方案中,试剂盒可包括麦芽糖糊精和海藻糖。在一些实施方案中,聚合物促进剂材料是PEG。

[0070] 本发明的试剂盒还可包括用于使用装置来检测测试样品中的分析物的说明书、用于收集生物样品的装置或工具,和/或用于从固体材料(诸如土壤、食物和生物组织)中获得样品的提取缓冲剂。

[0071] 如本文所述,测试样品可以是任何类型的液体样品,包括生物样品或从环境或食物样品制备的提取物。在一个具体实施方案中,测试样品是生物样品。生物样品包括但不限于全血、血浆、血清、唾液、尿液、胸膜腔积液、汗液、胆汁、脑脊液、粪便、阴道分泌液、精子、晶状体液、黏液、滑液、腹膜液、羊水、活检组织、唾液以及细胞裂解物。生物样品可从怀疑患有疾病病状,诸如癌症、传染病(例如,病毒感染、细菌感染、寄生虫感染或真菌感染)、心血管疾病、代谢疾病、自身免疫疾病等的人类受试者或动物受试者获得。生物样品也可从经历例行医学检查的健康受试者(例如人或动物)获得。

[0072] 在所述方法的一些实施方案中,将测试样品与第一检测缀合物混合并且随后使混合物与第二检测缀合物接触。在某些实施方案中,使样品、第一检测缀合物与第二检测缀合物同时接触。例如,样品与两种试剂同时接触可在如本文所述的转子格式检测装置中发生。

[0073] 如以上所述,本申请涉及使用在溶液中的复合纳米材料标记的配偶体以定性或定量方式确定特异性结合配偶体的结合。本发明人出人意料地发现,与添加其他糖(诸如蔗糖、海藻糖或聚蔗糖)相比较,基于溶液的测定的灵敏度在多糖(例如麦芽糖糊精)被添加至溶液时得到显著增强。在离心转子格式中,需要低速离心来将样品递送至分析室中。在离心期间和之后,向溶液添加多糖(例如麦芽糖糊精)对防止复合纳米材料标记的配偶体(例如缀合至金-银纳米星的抗体)的聚集和沉淀尤其有效。与其他糖(诸如蔗糖、海藻糖或聚蔗糖)相关的灵敏度改进是无法预料的。凭借减少的聚集和沉淀,实现增加的测定灵敏度。因此,在一些实施方案中,本发明的方法在包括多糖(例如麦芽糖糊精、玉米糖浆或多聚葡萄糖)的溶液中执行。

[0074] 在一个实施方案中,溶液包括最终浓度为约2%至约20%wt/vol的多糖。在一个实施方案中,溶液包括最终浓度为约4%至约15%wt/vol的多糖。在又一个实施方案中,溶液包括最终浓度为约5%至约10%wt/vol的多糖。在示例性实施方案中,溶液包括最终浓度为约5%、6%、7%、8%、9%或10%(包括其间的所有值)的多糖。在本文所述的各种实施方案中,与在包括替代糖(例如蔗糖或聚蔗糖)的溶液中执行的测定相比较,测定的灵敏度在多糖被添加至溶液时得到改进。在示例性实施方案中,多糖是麦芽糖糊精。

[0075] 在一个实施方案中,溶液包括最终浓度为约0.1%至约20%wt/vol的阻断剂。在另一个实施方案中,溶液包括最终浓度为约0.5%至约10%wt/vol的阻断剂。在又一个实施方案中,溶液包括最终浓度为约1%至约5%wt/vol的阻断剂。在示例性实施方案中,溶液包括最终浓度为约1%、2%、3%、4%或5%(包括其间的所有值)的阻断剂。在本文所述的各种实施方案中,与在不存在阻断剂的情况下执行的测定相比较,测定的灵敏度在阻断剂被添加至溶液时得到改进。在一些实施方案中,阻断剂选自牛血清白蛋白、酪蛋白、明胶、卵白蛋白和丙种球蛋白。在示例性实施方案中,阻断剂是牛血清白蛋白。

[0076] 在一些实施方案中,溶液包括麦芽糖糊精、海藻糖、PEG、阻断剂(例如,牛血清白蛋白)和/或氯化钠中的一种或多种。在示例性实施方案中,溶液成分中的一种或多种(例如麦芽糖糊精)可被提供为在添加液体(例如水、盐溶液或液体样品)后悬浮的冻干珠粒或球团。例如,溶液成分中的一种或多种可在分光光度比色杯或分析转子的反应室中被提供为在添

加液体后悬浮在溶液中的珠粒。

[0077] 在附加实施方案中,通过在聚合物促进剂材料存在的情况下将第一和第二检测缀合物与分析物混合,可以实质性地增加LSPR信号,所述聚合物促进剂材料选自聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚烯丙胺、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚丙烯酸、聚乙烯醇和聚天冬氨酸。在示例性实施方案中,聚合物材料是聚乙二醇(PEG)。在一个实施方案中,反应混合物包括最终浓度为约0.1mg/mL至约200mg/mL的聚合物材料,例如PEG。在另一个实施方案中,反应混合物包括最终浓度为约0.2mg/mL至约100mg/mL的聚合物材料,例如PEG。在又一个实施方案中,反应混合物包括最终浓度为约0.5mg/mL至约10mg/mL的聚合物材料,例如PEG。在又一个实施方案中,反应混合物包括最终浓度为约2mg/mL至约8mg/mL的聚合物材料,例如PEG。在示例性实施方案中,反应混合物包括最终浓度为约2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、7mg/mL或8mg/mL(包括其间的所有值)的聚合物材料,例如PEG。

[0078] 本发明的检测方法可用于确定目标分析物的定性或定量的量。此类方法尤其适用于确定样品中的目标分析物的近似量,这尤其可用于诊断某些医学病状或评估药物疗法的功效。在一个实施方案中,可确定目标分析物的数量,方法是:通过如本文中对于具有已知数量的目标分析物的样品所描述地测量由金属纳米颗粒引起的光学信号的变化来建立具体分析物的标准曲线;确定对于测试样品的光学信号变化;并且将对于测试样品的光学信号变化与对于标准曲线获得的值进行比较。在一些实施方案中,确定第一试剂与第二试剂之间的复合物的数量包括将来自测试样品的吸光度比值和/或反应速率与来自具有已知数量的复合物的一个样品的吸光度比值和/或反应速率进行比较,从而确定测试样品中的复合物的数量。可将从测试样品获得的定量值与预定的阈值进行比较,其中所述预定的阈值指示目标分析物的异常或正常水平。

[0079] 本发明的检测方法提供一种用于检测样品中的极少量目标分析物的高度灵敏技术。在一些实施方案中,基于等离子体共振的信号放大可利用金纳米结构缀合物实现,以使得可在样品中检测毫微克数量的目标分析物。因此,在所述方法的一个实施方案中,检测到毫微克数量的目标分析物的存在。在一些实施方案中,来自包括金纳米颗粒的检测缀合物的基于等离子体共振的信号可使用复合金属纳米结构检测缀合物来放大。缀合至分析物特定抗体的涂有金的银纳米结构的使用可实现微微克数量的目标分析物的检测。因此,在所述方法的一些实施方案中,检测到微微克数量的目标分析物的存在。在所述方法的其他实施方案中,检测到毫微微克数量的目标分析物的存在。更大灵敏度可通过更改复合金属纳米结构的组成和/或形状来获得。

[0080] 当入射光施加至金属纳米结构时,金属中的导带电子在入射电磁波的相同频率下共同地振荡。由于这些共振振荡,纳米结构强烈地吸收并散射特定波长范围的光。对于包括贵金属或过渡金属的金属纳米结构,根据纳米结构的具体组成,这个波长范围在紫外光-可见光-红外光光谱中。因此,用于施加适合在本发明的方法中使用的电磁能的光源可包括可施加在紫外光-可见光光谱或紫外光-可见光-红外光光谱内的波长范围的任何来源,包括弧光灯和激光。在一些实施方案中,光源可配备有单色器以便可施加特定波长的光。

[0081] 金属纳米结构的光学性质取决于其大小、形状和组成。例如,根据颗粒大小,固体金纳米颗粒具有约515nm至约560nm的吸收峰波长( $\lambda_{\text{最大}}$ )。具有30nm直径的金球状纳米颗粒在约520nm下最大程度地吸收,而随着颗粒直径增加, $\lambda_{\text{最大}}$ 偏移至更长波长。银和铜颗粒在紫

外光/蓝光或红光区域(例如,约350nm至约500nm)中具有 $\lambda_{\text{最大}}$ ,而增加的颗粒直径导致 $\lambda_{\text{最大}}$ 偏移至更长波长。金属纳米棒具有横向 $\lambda_{\text{最大1}}$ 和纵向 $\lambda_{\text{最大2}}$ 。不同金属的合金通常展现出在构成金属的吸收峰之间的中间范围内的吸收峰。举例而言,包括金与银的50/50合金的纳米结构展现出约480nm的 $\lambda_{\text{最大}}$ ,而金的量逐渐增加导致吸收峰偏移至更长波长。可通过改变纳米结构的形状或几何形状来修改LSPR信号对于局部媒介折射率的变化灵敏度的灵敏度。例如,与球体相比较,非球状颗粒(例如纳米棱柱体、纳米棒、纳米壳层等)具有增加的LSPR灵敏度。在一些实施方案中,通过改变检测缀合物中所使用的金属纳米结构的大小、形状或组成来针对具体应用定制光学性质(例如在具体波长下的吸收/散射)。

[0082] 入射光与金属纳米结构之间的相互作用可作为反射光或透射光加以监测。被吸收或散射的入射光的量可作为反射模式中的吸收光谱或透射模式中的吸收光谱加以测量。在一些实施方案中,从金属纳米结构测量的光学信号可以是光学反射、吸收光谱、散射光谱和/或发射光谱。

[0083] 由结合配偶体与目标分析物之间的复合物形成引起的在检测缀合物中的金属纳米结构之间的等离子体耦合产生了金属纳米结构的局部表面等离子体共振光谱的变化。例如,此类变化可包括增加的光学消光、增加的光学反射和/或增加的散射和/或发射信号。在一些实施方案中,指示目标分析物在样品中的存在的光学信号的变化包括光学散射的偏移、增加或减少或这些特征的组合。在某些实施方案中,指示目标分析物在样品中的存在的光学信号的变化是光谱峰波长偏移。在某些其他实施方案中,指示目标分析物在样品中的存在的光学信号的变化是在除了峰之外的位置处的波长偏移。例如,指示目标分析物在样品中的存在的光学信号的变化可以是中点光谱波长偏移、在波长的基础处的光谱波长偏移或总光谱波长偏移,诸如差异光谱。在一个实施方案中,光谱峰的波长偏移可以是在200nm至1200nm光谱窗内的红移(例如,偏移至更长波长)。在另一个实施方案中,光谱峰的波长偏移可以是在200nm至1200nm光谱窗内的蓝移(例如,偏移至更短波长)。光学信号的变化可在设定反应期之后的具体时间点测量。另外或可选地,可测量在反应期内的光学信号的变化(例如速率确定)。两种类型的测量都可用于目标分析物的定性或定量分析。

[0084] 用于测量不同波长的光学信号并获得消光、散射或发射光谱的各种装置在本领域中是已知的。任何分光光度仪器或光度仪器适合在所公开的方法中使用。一些非限制性实例包括板读出器、Cobas Fara分析器以及Piccolo<sup>®</sup>xpress和Vetscan分析器(Abaxis, Inc., Union City, CA)、光纤读出器(例如,LightPath<sup>™</sup>TS4 (LamdaGen, Menlo Park, CA))、SPR仪器(例如,可自GE Healthcare获得的Biacore仪器)、来自Olympus, Hitachi的离心分析器等。

[0085] 本发明还包括一种测定复合物,所述测定复合物包括(i)包括偶合至结合配偶体的金属纳米结构的第一检测缀合物、(ii)目标分析物和(iii)包括偶合至结合配偶体的金属纳米结构的第二检测缀合物,其中第一检测缀合物中的结合配偶体结合至目标分析物上的第一表位并且第二检测缀合物中的结合配偶体结合至目标分析物上的第二表位,从而形成包括第一检测缀合物、目标分析物和第二检测缀合物的复合物。在一些实施方案中,测定复合物包括在适合与离心转子一起使用的比色杯中。在其他实施方案中,测定复合物包括在离心转子或圆盘中的反应室内。

[0086] 可使用本发明的方法、装置和测定复合物来检测任何类型的目标分析物,尤其是对于疾病诊断有重大意义的目标分析物。目标分析物可包括但是不限于蛋白质、酶、抗原、

抗体、肽、核酸(RNA、DNA、mRNA、miRNA)、激素、糖蛋白、多糖、毒素、病毒、病毒粒子、药物分子、半抗原或化学品。在一些实施方案中,目标分析物是与人和/或动物的传染病相关联的标志物或抗原。在其他实施方案中,目标分析物是与具体生理状态或病理状况相关联的标志物或抗原。

[0087] 在某些实施方案中,目标分析物是致病抗原或致病抗原的抗体。例如,致病抗原可以是病毒抗原(例如,猫白血病毒、犬细小病毒、口蹄疫病毒、流感病毒、a型肝炎病毒、b型肝炎病毒、c型肝炎病毒、HIV病毒、人乳头瘤病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、狂犬病病毒等)、细菌抗原(例如,埃立克体属、疏螺旋体属、无形体属、沙门氏菌、杆菌、立克次氏体属等)、真菌抗原、或寄生虫抗原(例如,犬心丝虫、蓝氏贾第鞭毛虫、恶性疟原虫、非洲锥虫、布氏锥虫等)。在特定实施方案中,细菌抗原可来自犬埃立克体属、恰菲埃立克体属(*Ehrlichia chaffeensis*)、伊氏埃立克体属、包氏疏螺旋体属、扁平无形体属、嗜吞噬细胞无形体属、肠沙门氏菌、炭疽杆菌和立氏立克次氏体。在其他实施方案中,目标分析物是疾病相关抗原或疾病相关抗原的抗体。疾病相关抗原包括但不限于癌症相关抗原或标志物(例如,PSA、AFP、CA125、CA15-3、CA19-9、CEA、NY-ESO-1、MUC1、GM3、GD2、ERBB2等)、心血管疾病相关抗原或标志物(例如,肌钙蛋白、C反应蛋白、脑钠肽、CKMB、脂肪酸结合蛋白等)、代谢相关抗原或标志物(例如,促甲状腺激素、甲状腺素、瘦蛋白、胰岛素)或自身免疫疾病相关抗原或标志物(例如,自身抗体)。在某些实施方案中,目标分析物是炎症抗原或标志物(例如,C反应蛋白、MRP14、MRP8、25F9等)。在其他实施方案中,目标分析物是妊娠相关抗原或标志物(例如,胎儿抗原、人绒毛膜促性腺素)。

[0088] 本发明还提供一种用于制备复合金属纳米结构的方法。在一个实施方案中,所述方法包括:制备包括聚合物与氯金酸的混合物的第一溶液、制备包括银或铜纳米结构的第二溶液,以及将第一溶液与第二溶液一起孵育一段时间,其中所得混合物包括涂有金的银纳米结构或涂有金的铜纳米结构。所得混合物优选地具有约515nm至约670nm或约520nm至约560nm的峰吸光度。在一个实施方案中,所得混合物具有约530nm至约545nm的峰吸光度。在另一个实施方案中,所述方法包括:制备包括净化剂(诸如CHAPS)与氯金酸的混合物的第一溶液和包括银或铜盐的溶液,以及孵育第一溶液与含有还原剂(诸如抗坏血酸)的第二溶液,从而导致形成复合纳米结构。纳米结构的大小和形状可通过改变所使用的金属的比、净化剂的浓度以及最后所使用的抗坏血酸的量来改变。

[0089] 用于制备第一溶液的聚合物可以是以下各项中的任一种:聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚丙烯酸酯、聚乙二醇、聚乙烯亚胺、聚天冬氨酸、聚谷氨酸、各种树胶、明胶或包括前述各项中的任一种的混合聚合物。在一个具体实施方案中,聚合物是聚乙烯吡咯烷酮。不同类型的涂层纳米结构可通过改变聚合物的分子量来获得。聚合物的合适分子量范围包括约5,000道尔顿至约150,000道尔顿、约10,000道尔顿至约100,000道尔顿、约20,000道尔顿至约80,000道尔顿。在一些实施方案中,聚合物具有小于50,000道尔顿的分子量。在其他实施方案中,聚合物具有小于20,000道尔顿的分子量。在某些实施方案中,聚合物具有约10,000道尔顿的分子量。

[0090] 金涂层的特性可通过调整聚合物与氯金酸的浓度比来控制。例如,聚合物与氯金酸的浓度比是约100:1至约1:100、约2:1至约5:1或约5:1至约8:1。在一些实施方案中,聚合物与氯金酸的浓度比是1:1。聚合物的合适浓度包括但不限于水或乙醇中的约0.1%至约



20%wt/wet。氯金酸的合适浓度包括但不限于约0.001M至约1.0M、约0.010M至约0.500M和约0.050M至约0.100M。

[0091] 涂层效率和厚度也可受到涂层溶液(即第一溶液)的pH值和卤化物含量影响。在某些实施方案中,溶液的pH值保持在约3至约14的范围内。在一些实施方案中,溶液的卤化物含量小于150mM。在其他实施方案中,溶液的卤化物含量在约0至约50mM范围内。

[0092] 制备银和铜纳米结构的溶液的方法是本领域技术人员已知的。例如,包括银或铜纳米结构的第二溶液可通过美国专利公布号2012/0101007、美国专利公布号2014/0105982或美国专利公布号2013/0230717中所描述的方法中的任一种来制备,所述专利中的每一项以引用的方式整体并入本文。在一个实施方案中,包括银或铜纳米结构的第二溶液通过将银源或铜源与还原剂混合来制备。合适的银源包括银盐,诸如硝酸银。合适铜源包括硫酸铜(II)、氯化铜(II)、氢氧化铜(II)和硝酸铜(II)、乙酸铜(II)和三氟乙酸铜(II)。可与银源或铜源反应以形成纳米结构的还原剂可包括葡萄糖、抗坏血酸、硼氢化钠以及聚合物(诸如PVP)的碱性溶液(例如pH值大于7.5)。在某些实施方案中,还原剂是抗坏血酸。银纳米结构或铜纳米结构的所需形状和光谱峰可通过调整反应物的比或浓度来实现,如本领域普通技术人员已知的。仅举例而言,高浓度的还原剂可产生五角形纳米结构和双锥体形纳米结构,而低浓度的还原剂可产生细长的纳米线或管。根据纳米结构的具体形状,包括银或铜纳米结构的第二溶液可具有约540nm至约1000nm、约600nm至约700nm、约630nm至约680nm、约750nm至约850nm、约900nm至约940nm、约580nm至约620nm或约550nm至约750nm的峰吸光度。在某些实施方案中,包括银纳米结构的第二溶液具有约600nm(即,595nm(含)至605nm(含))的峰吸光度。在一些实施方案中,包括铜纳米结构的第二溶液具有约585nm(即,580nm(含)至590nm(含))的峰吸光度。在一些实施方案中,与包括类似大小和形状的银纳米结构的溶液的峰吸光度相比,包括铜纳米结构的溶液的峰吸光度更大(即红移)。

[0093] 在一些实施方案中,第一溶液与第二溶液的孵育期是至少12小时。在其他实施方案中,第一溶液与第二溶液的孵育期大于24小时,优选地大于48小时,更优选地至少72小时。可在孵育期期间监测反应混合物的峰吸光度的变化以相应地调整孵育时间。举例而言,峰吸光度偏移至更短波长(例如在520nm至550nm区域内)可指示涂有金的纳米结构已经稳定。在某些实施方案中,所得纳米结构对于氯化钠(例如,0.25-1M)的稳定性用于指示对纳米结构的适当涂布。涂有CTAB的颗粒(诸如纳米棒)耐氯化钠。

[0094] 在某些实施方案中,本发明提供合成具有大于约50/mL的光学密度的纳米结构的方法。在一个实施方案中,所述方法包括将如本文所描述的聚合物与氯金酸混合、将混合物在设定温度下搅拌第一时间段、将抗坏血酸添加至混合物,以及将混合物孵育第二时间段。纳米结构的大小和形状由聚合物与氯金酸的浓度比以及孵育温度和时间决定。聚合物和氯金酸的浓度可在如上所述的范围内。温度可基于所需纳米结构的大小和形状来调整,但可在约4℃至约100℃的范围内。类似地,孵育期(即,第一时间段)可基于纳米结构的所需性质来调整,但可在约15分钟至约一天的范围内。

[0095] 在一些实施方案中,在第一孵育期之后,将约0.1至1份的抗坏血酸(例如约1至5M)添加至混合物。添加抗坏血酸之后的第二孵育期可以是约1至约24小时。不受理论约束,添加抗坏血酸提供了所产生纳米结构的数量的实质性增加。

[0096] 在某些实施方案中,所述方法还包括给混合物添加或掺杂约1至约100份的氯化金



(例如约0.001M至1M)或硝酸银(例如约0.001M至1M)或其他金属(例如贵金属、过渡金属、碱金属或镧系元素)。这个掺杂步骤可进一步增加所得纳米结构的共振强度。在一些实施方案中,在将抗坏血酸添加至反应之前,将氯化金、硝酸银或其他金属添加至混合物。在其他实施方案中,在添加抗坏血酸之后,将氯化金、硝酸银或其他金属添加至混合物。可调整金属和抗坏血酸的添加顺序以将所得纳米结构定制为所需形状和大小。

[0097] 在一些实施方案中,本发明提供用于合成复合纳米颗粒的方法。在某些实施方案中,通过依次添加预定数量的以下试剂并充分混合来在单个容器中合成银/金纳米颗粒:

(1)表面活性剂(例如,离子型[阴离子型、阳离子型或两性离子型]或非离子型)或封端剂,诸如3-(3-胆酰胺丙基)二甲氨基-1-丙磺酸盐(CHAPS)、SDS、Tween、Triton或磺基甜菜碱净化剂中的任一种,(2)氯化金,(3)水,(4)硝酸银,(5)柠檬酸三钠,且最后添加(6)抗坏血酸以开始纳米颗粒的形成。在其他实施方案中,通过按以下顺序添加预定数量的各项来在单个容器中合成纳米颗粒:(1)表面活性剂或封端剂,诸如CHAPS、SDS、Tween、Triton、CTAB或磺基甜菜碱净化剂中的任一种,(2)氯化金,(3)硝酸银,(4)柠檬酸三钠,(5)水,以及(6)还原剂。在一些实施方案中,还原剂由CHAPS、抗坏血酸、柠檬酸三钠和水构成。在另外的实施方案中,还原剂由约200mg CHAPS、约4g抗坏血酸、约117.6mg柠檬酸三钠和约15.68g水构成。在一些实施方案中,将约1mL含水1%(wt/wt)的CHAPS依次与约0.25mL的0.1M氯化金、约0.5mL的0.02M硝酸银、约0.05mL的1M柠檬酸三钠、约6.2mL的水和约2mL的还原剂混合。改变各种活性成分(诸如金属盐、封端剂、还原剂)的浓度和溶液的pH值会产生不同颗粒类型(例如,纳米球、纳米星或纳米棒)和不同组成的纳米颗粒。

[0098] 在一些实施方案中,通过将水、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、氯化金、抗坏血酸和预先形成的金纳米球晶种按顺序混合来形成纳米星。在另一个实施方案中,将约0.825mL的水、约0.1mL的20%CTAB、约0.025mL的0.1M氯化金、约0.05mL的1M抗坏血酸和约0.05mL的金纳米球晶种按所述顺序混合。晶种的阶段和晶种与金属离子的比影响纳米颗粒的几何形状且因此影响纳米颗粒的光谱。

[0099] 使用本文所提供的方法形成纳米材料基本上在数分钟内完成,但可允许它过一夜达到平衡。纳米颗粒的合成可通过光谱学来监测并且通过扫描或透射电子显微术来确认。

[0100] 在一些实施方案中,大小以及因此光学性质可通过更改表面活性剂或封端剂、抗坏血酸、柠檬酸三钠、氯化金和/或硝酸银的浓度来改变。合成的纳米星的大小随着含银量增加而增加,一直到某个点,然后减小。这些变化在合成的纳米星的LSPR峰中反映为:峰在银/金比增加时红移,但然后在金:银的摩尔比为5:2时开始蓝移。反应混合物中的所选净化剂的最终浓度可从0.05%-5%改变,而更小的颗粒在净化剂的浓度更高时占优势。增加抗坏血酸的浓度会产生更小的纳米星,而抗坏血酸的最终浓度从0.05M至0.2M改变。类似地,将柠檬酸三钠的浓度从10mM增加至100mM会减小纳米星大小。

[0101] 在一些实施方案中,金-银纳米合金可在碱性还原情况下通过将CTAB(例如,溶解在乙醇中的CTAB)与氯化金和硝酸银混合来合成。在一些实施方案中,纳米合金的形成可通过将水、CTAB、氯化金(0.5mM至5mM)、硝酸银(20%至80%的金)、抗坏血酸(10mM至200mM)或还原剂以及NaOH(50%至200%的抗坏血酸)按顺序混合来诱发,所述还原剂含有抗坏血酸、柠檬酸三钠和CHAPS。在另外的实施方案中,纳米合金通过将约0.825mL的水、在异丙醇中制备的约0.1mL的20%CTAB、约0.025mL的0.1M氯化金、约0.005mL-0.025mL的0.1M硝酸银、约

0.05ml的1M抗坏血酸以及约0.05ml的1M NaOH混合来形成。CTAB的浓度可从0.05M至0.2M改变,而更低的浓度有助于合成的纳米星的更高含量。酸性pH值有助于纳米棒的形成,并且更高的纵横比在减小的pH值下获得。

[0102] 本发明通过以下附加实施例来进一步示出,所述实施例不应被视为限制性的。根据本公开,本领域技术人员应了解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可对所公开的特定实施方案进行许多改变并且仍获得相似或类似的结果。

[0103] 在本公开全篇中提到的所有专利和非专利文件出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

## 实施例

[0104] 实施例1. 利用LSPR信号放大的直接测定

[0105] 在这个实施例中,通过添加含有抗心丝虫多克隆抗体的胶体缀合物、合适的分散介质(诸如磷酸盐缓冲盐水)和不含心丝虫抗原的样品的溶液来设置空白反应。在一段时间内记录光谱变化。然后通过向以上空白溶液中所使用的反应溶液添加已知数量的心丝虫抗原来设置一组阳性对照。可选地,记录空白反应,并且然后添加已知数量的心丝虫抗原以利用抗原的浓度制备与光谱扫描的偏移相关的校准曲线。然后使用这个校准曲线来计算未知样品中的心丝虫抗原的数量。光谱扫描的偏移意味着(1)  $\lambda_{\text{最大}}$  的变化, (2) 阳性样品与阴性样品之间的差异光谱,或 (3) 导数光谱。

[0106] 实施例2. 利用LSPR信号放大的夹心测定

[0107] 夹心测定在分析物显示至少两个不同的结合部位(抗原的表位),而每个部位结合至特异性结合配偶体的情况下是最合适的。因此,在这个实施例中,指向CRP的一个表位的抗体固定在金和/或银纳米颗粒上,并且指向非重叠表位的第二抗体利用胶体金和/或银来标记。这种设置允许测量CRP抗原的,因为样品中的CRP抗原的量确定光谱变化的程度。在未标记第二抗体但变化是降低几个数量级时,也能看出光谱变化。可改变纳米颗粒的金属组成以优化反应状况。

[0108] 实施例3. 在转子中执行测定

[0109] 直接竞争性测定或夹心测定可在离心转子中执行,诸如在美国专利号5,061,381、5,122,284、5,186,844、5,304,348、5,457,053和5,693,233中所描述的转子。在这种情况下,将两个配对的单克隆抗体或多克隆抗体混合物的结合至超过一个表位的纳米颗粒缀合物作为冻干珠粒添加。溶液相LSPR测定在单克隆抗体和多克隆抗体的情况下都起作用。

[0110] 实施例4. 通过聚乙二醇或类似聚合物增强LSPR信号

[0111] 图4和图9A-9C中呈现的数据示出,LSPR信号在聚乙二醇存在的情况下实质性地增加。具有不同分子量的PEG可在优化浓度下使用以在给定测定中获得所需选择性。可以利用聚乙烯吡咯烷酮或类似聚合物材料替换PEG以针对一组给定的纳米颗粒和/或所述组特异性结合配偶体获得优化反应状况。

[0112] 实施例5. 麦芽糖糊精的添加改进测定灵敏度

[0113] 进行了许多实验来确定各种糖和其他试剂的作用以使沉淀效果最小化并且保持LSPR信号。如图16中所示,麦芽糖糊精出人意料地增强了信号,这通过BSA的存在得到进一步改进。相比之下,在添加海藻糖、山梨醇或环糊精时(数据未示出),LSPR信号的强度并没

有那么强。另外,通过添加麦芽糖糊精和BSA,也解决了沉淀问题(图17)。大致50pg/ml的TSH可利用特定数量的PEG、BSA和麦芽糖糊精来检测(图18)。

[0114] 实施例6.金纳米星和金-银合金颗粒的合成和其使用

[0115] 利用新颖的方法来合成在等离子体测定(诸如本文所述的溶液相等离子体测定)中使用的纳米材料。

[0116] 使用以下方法制备涂有CHAPS的纳米星或涂有CTAB的纳米星。对于涂有CHAPS的纳米星,在合适的容器中制备1ml的含水1% (重量/重量)CHAPS (3-((3-胆酰胺丙基)二甲胺)-1-丙磺酸盐)。将0.25ml的0.1M氯化金、0.5ml的0.02M硝酸银、0.05ml的1M柠檬酸三钠、6.2ml的水以及最后2ml的还原剂(200mg CHAPS、4g抗坏血酸、117.6mg柠檬酸三钠、15.68g水)依次搅拌到容器中并且在至少一个小时内良好混合。在水中稀释为1:20后,读出光谱。在一些实施方案中,大小以及因此光学性质可通过更改CHAPS、抗坏血酸、柠檬酸三钠、氯化金和硝酸银的浓度来改变。

[0117] 对于涂有CTAB的纳米星,将十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)以20% (wt/wt)的浓度溶解在异丙醇中。所有其他试剂含水。纳米星的形成通过按顺序混合以下各项来诱发:0.825ml的水、0.1ml的20% CTAB、0.025ml的0.1M氯化金、0.05ml的1M抗坏血酸以及最后0.05ml的预先形成的金纳米球晶种。在一些实施方案中,大小以及因此光学性质可通过更改成分的浓度来改变。在使用新鲜晶种对纳米棒进行引晶时,30℃的CTAB水溶液产生纳米棒。在异丙醇中制备的CTAB溶液可在室温下使用,但有助于纳米星的合成超过纳米棒的合成。

[0118] 金-银纳米合金在碱性还原情况下通过将溶解在乙醇中的CTAB与氯化金和硝酸银混合来合成。纳米合金的形成通过按顺序混合以下各项来诱发:水(用于构成总共1ml的反应体积)、0.2ml的20% CTAB(在异丙醇中)、0.025ml的0.1M氯化金、0-0.05ml的0.02M硝酸银、0.02ml的还原剂以及最后0.05ml的1M NaOH,所述还原剂含有抗坏血酸、CHAPS和柠檬酸三钠。在一些实施方案中,还原剂含有CHAPS、柠檬酸三钠和抗坏血酸。根据晶种的阶段,酸性pH值有助于纳米星和纳米棒的产生。

[0119] 图10中提供金/银合金纳米颗粒的光谱,所述金/银合金纳米颗粒通过在添加硝酸银、然后添加抗坏血酸以及最后添加氢氧化钠之前使氯化金与CTAB反应来合成。增加纳米合金颗粒中的含银量导致 $\lambda_{\text{最大}}$ 的线性蓝移,并且增加纳米合金颗粒中的含金量导致红移,如图11中所示。

[0120] 为了制备利用CHAPS封端的金/银纳米星,在添加硝酸银和柠檬酸三钠之前将氯化金添加至CHAPS。纳米星的形成通过还原性溶液的添加来诱发,所述还原性溶液含有抗坏血酸、CHAPS和柠檬酸三钠。利用CHAPS封端的金/银纳米星的光谱在图13中示出。 $\lambda_{\text{最大}}$ 发生红移,一直到某个银浓度,然后发生蓝移。因此,通过改变反应介质中的金与银的比产生不同大小的纳米星。

[0121] 使用以下方法将抗体附接至纳米星或纳米合金。以合适的g力使合适体积的纳米星或纳米合金溶液离心。将上清液仔细地去除并利用相等体积的1% CHAPS代替。在 $\lambda_{\text{最大}}$ 处针对光谱和OD读出水中的1:20稀释。在2ml微量离心管中,按所述顺序添加0.5M的硼酸盐(pH值为9.2)、1% CHAPS、来自步骤1的洗涤后纳米星/纳米合金以及所需抗体。调整溶液的数量,以便CHAPS的最终浓度是0.1%,硼酸盐是0.05M至0.1M,颗粒OD是2/ml,并且抗体浓度

是 $1\mu\text{g}/\text{OD}$ - $10\mu\text{g}/\text{OD}$ 。在5分钟-10分钟的孵育后,添加相等体积的缀合物稀释剂CG (3x PBS、1% BSA、2% CHAPS和0.1%叠氮化钠)并良好混合,然后以 $5000g$ 离心10分钟,将上清液去除,并且使缀合物在缀合物稀释剂CG中再悬浮至初始体积。将离心步骤重复一次,并且使最终球团再悬浮在缀合物稀释剂CG的1/5初始体积中。读出1:10稀释的OD光谱。此时,缀合物准备好用于治疗或用于免疫测定中。如在文献中已知,通过将抗体添加到纳米颗粒的稀释溶液来将抗体附接至合成的纳米颗粒。

[0122] 图12示出具有金和金/银 (50%/50%等摩尔) 合金纳米颗粒的老鼠IgG缀合物的免疫反应性。利用在横向流硝化纤维条上成条的蛋白质A来测试通过老鼠IgG向金或合金颗粒上的被动吸收来合成的缀合物的反应性。

[0123] 相对于在不存在银的情况下产生的仅金纳米颗粒,金/银纳米星在结合老鼠IgG后展现出大得多的峰红移。将老鼠IgG结合至仅金纳米颗粒后的峰红移在图14中示出,并且将老鼠IgG结合至在 $\sim 37.5\%$ 银存在的情况下产生的金/银纳米星后的更大的峰红移在图15中示出。

[0124] 在一些实施方案中,离心条件、离子强度、pH值和抗体与纳米材料比可针对每种类型的抗体-纳米材料组合加以优化。使用共价键进行缀合的替代方法是本领域技术人员熟知的。

[0125] 应了解,所公开的发明不限于所描述的具体方法、协议和材料,因为这些可以变化。还应了解,本文所用的术语仅出于描述具体实施方案的目的,且不意图限制本发明的范围,本发明的范围将仅受所附权利要求书的限制。

[0126] 本领域技术人员将认识到,或者仅仅使用常规实验就能够确定,本文所述的发明的特定实施方案的许多等效方案。此类等效方案意图涵盖在以下权利要求中。

[0127] 综上所述,本发明包括但不限于以下项:

[0128] 1.一种检测样品中的目标分析物的方法,其包括:

[0129] (a) 在含聚乙二醇的溶液中将所述样品与第一检测缀合物和第二检测缀合物混合,其中所述聚乙二醇以 $0.1\text{mg}/\text{mL}$ 至 $200\text{mg}/\text{mL}$ 的浓度存在;所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物包括偶合至结合配偶体的复合金属纳米结构,所述结合配偶体能够特异性地结合至所述样品中的所述目标分析物(如果存在)以便在所述溶液中,在所述第一检测缀合物、所述分析物与所述第二检测缀合物之间形成复合物;且所述目标分析物是致病抗原或致病抗原的抗体,其中所述致病抗原是病毒或细菌抗原。

[0130] (b) 将所述复合物暴露于在紫外光-可见光-红外光光谱内的波长范围下的光源;以及

[0131] (c) 测量来自所述复合物的光学信号,其中所述光学信号的变化指示所述目标分析物在所述样品中的存在。

[0132] 2.如项1所述的方法,其中所述光学信号是反射、吸收光谱、散射光谱或发射光谱。

[0133] 3.如项1所述的方法,其中所述光学信号的所述变化包括光谱峰波长偏移和/或总光谱波长偏移。

[0134] 4.如项3所述的方法,其中所述总光谱波长偏移是差异光谱。

[0135] 5.如项1所述的方法,其中检测到毫微克数量的所述目标分析物的存在。

[0136] 6.如项1所述的方法,其中检测到微微克数量的所述目标分析物的存在。

- [0137] 7.如项1所述的方法,其中检测到毫微微克数量的所述目标分析物的存在。
- [0138] 8.如项1所述的方法,其中步骤(a)在分光光度比色杯、分析转子、微孔板、临床分析仪、流室中、在光纤的尖端上或在透明凝胶中执行。
- [0139] 9.如项1所述的方法,其中所述复合金属纳米结构包括选自金、银、铜、铂、钯、镉、铁、镍以及锌的至少两种金属。
- [0140] 10.如项1所述的方法,其中所述复合金属纳米结构中的每一个包括第一金属的核心和第二金属的涂层。
- [0141] 11.如项9所述的方法,其中所述复合金属纳米结构中的每一个包括金涂层和银核心。
- [0142] 12.如项9所述的方法,其中所述复合金属纳米结构中的每一个包括银涂层和金核心。
- [0143] 13.如项1所述的方法,其中所述复合金属纳米结构中的每一个是第一金属与第二金属的合金。
- [0144] 14.如项1所述的方法,其中所述复合金属纳米结构具有选自以下各项的几何形状:球状纳米颗粒、锥体纳米颗粒、六边形纳米颗粒、纳米管、纳米星、纳米壳层、纳米棒、纳米岛、纳米点、纳米线或其组合。
- [0145] 15.如项1所述的方法,其中所述结合配偶体是生物大分子。
- [0146] 16.如项15所述的方法,其中所述生物大分子选自抗体或其片段、抗原、受体、配体、多核苷酸、适体、多肽、多糖、脂多糖、糖肽、脂蛋白或核蛋白。
- [0147] 17.如项16所述的方法,其中所述生物大分子是抗体。
- [0148] 18.如项16所述的方法,其中所述生物大分子是抗原。
- [0149] 19.如项1所述的方法,其中所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物包括结合配偶体,所述结合配偶体是抗体。
- [0150] 20.如项19所述的方法,其中所述抗体结合所述目标分析物上的不同表位。
- [0151] 21.如项1所述的方法,其中所述致病抗原是病毒抗原。
- [0152] 22.如项21所述的方法,其中所述病毒抗原来自选自猫白血病毒、犬细小病毒、口蹄疫病毒、流感病毒、a型肝炎病毒、b型肝炎病毒、c型肝炎病毒、HIV病毒、人乳头瘤病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒和狂犬病病毒的病毒。
- [0153] 23.如项1所述的方法,其中所述致病抗原是细菌抗原。
- [0154] 24.如项24所述的方法,其中所述细菌抗原选自埃立克体属、疏螺旋体属、无形体属、沙门氏菌、杆菌和立克次氏体属。
- [0155] 25.如项24所述的方法,其中所述细菌抗原来自犬埃立克体属、恰菲埃立克体属、伊氏埃立克体属、包氏疏螺旋体属、扁平无形体属、嗜吞噬细胞无形体属、肠沙门氏菌、炭疽杆菌和立氏立克次氏体。
- [0156] 26.如项1所述的方法,其中所述溶液进一步包含氯化钠。
- [0157] 27.如项1所述的方法,其中所述聚乙二醇以约0.2mg/mL至约100mg/mL的浓度存在。
- [0158] 28.如项1所述的方法,其中混合步骤(a)在多糖存在的情况下发生。
- [0159] 29.如项28所述的方法,其中所述多糖选自麦芽糖糊精、玉米糖浆和多聚葡萄糖。

- [0160] 30.如项29所述的方法,其中所述多糖是麦芽糖糊精。
- [0161] 31.如项30所述的方法,其中所述反应混合物中的麦芽糖糊精的最终浓度是约2%至约20%wt/vol。
- [0162] 32.如项31所述的方法,其中所述反应混合物中的麦芽糖糊精的所述最终浓度是约5%至约10%wt/vol。
- [0163] 33.如项1所述的方法,其中混合步骤(a)在阻断剂存在的情况下发生。
- [0164] 34.如项33所述的方法,其中所述阻断剂选自牛血清白蛋白、酪蛋白、明胶、卵白蛋白和丙种球蛋白。
- [0165] 35.如项34所述的方法,其中所述阻断剂是牛血清白蛋白。
- [0166] 36.如项35所述的方法,其中所述反应混合物中的牛血清白蛋白的最终浓度是约1%至约5%wt/vol。
- [0167] 37.如项1所述的方法,其中所述聚乙二醇以2mg/mL至8mg/mL的浓度存在。
- [0168] 38.一种分析物检测装置,其包括:
- [0169] 第一检测缀合物,其中所述第一检测缀合物包括偶合至结合配偶体的金属纳米结构,所述结合配偶体能够特异性地结合至样品中的目标分析物(如果存在);以及
- [0170] 第二检测缀合物,其中所述第二检测缀合物包括偶合至结合配偶体的金属纳米结构,所述结合配偶体能够特异性地结合至所述样品中的所述目标分析物(如果存在),
- [0171] 其中第一检测缀合物和第二检测缀合物在包含聚乙二醇的溶液中,其中所述聚乙二醇以0.1mg/mL至200mg/mL的浓度存在;
- [0172] 所述第一检测缀合物和/或所述第二检测缀合物中的所述金属纳米结构是复合金属纳米结构,且
- [0173] 所述目标分析物是致病抗原或致病抗原的抗体,其中所述致病抗原是病毒或细菌抗原。
- [0174] 39.如项38所述的分析物检测装置,其中所述分析物检测装置是分光光度比色杯、分析转子、微孔板、或流室。
- [0175] 40.如项39所述的分析物检测装置,其中所述分析物检测装置是分析转子。
- [0176] 41.如项40所述的分析物检测装置,其中所述分析转子包括一个或多个反应室,所述第一检测缀合物和所述第二检测缀合物位于所述一个或多个反应室中。
- [0177] 42.如项38所述的分析物检测装置,其中所述第一检测缀合物和/或第二检测缀合物是冻干的。
- [0178] 43.如项38所述的分析物检测装置,其中所述装置被配置来接收测试样品。
- [0179] 44.如项38所述的分析物检测装置,其中所述装置被配置来将所述第一检测缀合物、所述分析物和所述第二检测缀合物的复合物暴露于在紫外光-可见光-红外光光谱内的波长范围下的光源。
- [0180] 45.如项44所述的分析物检测装置,其中所述装置进一步被配置来测量来自所述复合物的光学信号,其中所述光学信号的变化指示所述目标分析物在所述样品中的存在。
- [0181] 46.如项38所述的分析物检测装置,其中所述溶液进一步包含氯化钠。
- [0182] 47.如项38所述的分析物检测装置,其中所述聚乙二醇以约0.2mg/mL至约100mg/mL的浓度存在。

[0183] 48.如项1所述的分析物检测装置,其中所述聚乙二醇以2mg/mL至8mg/mL的浓度存在。

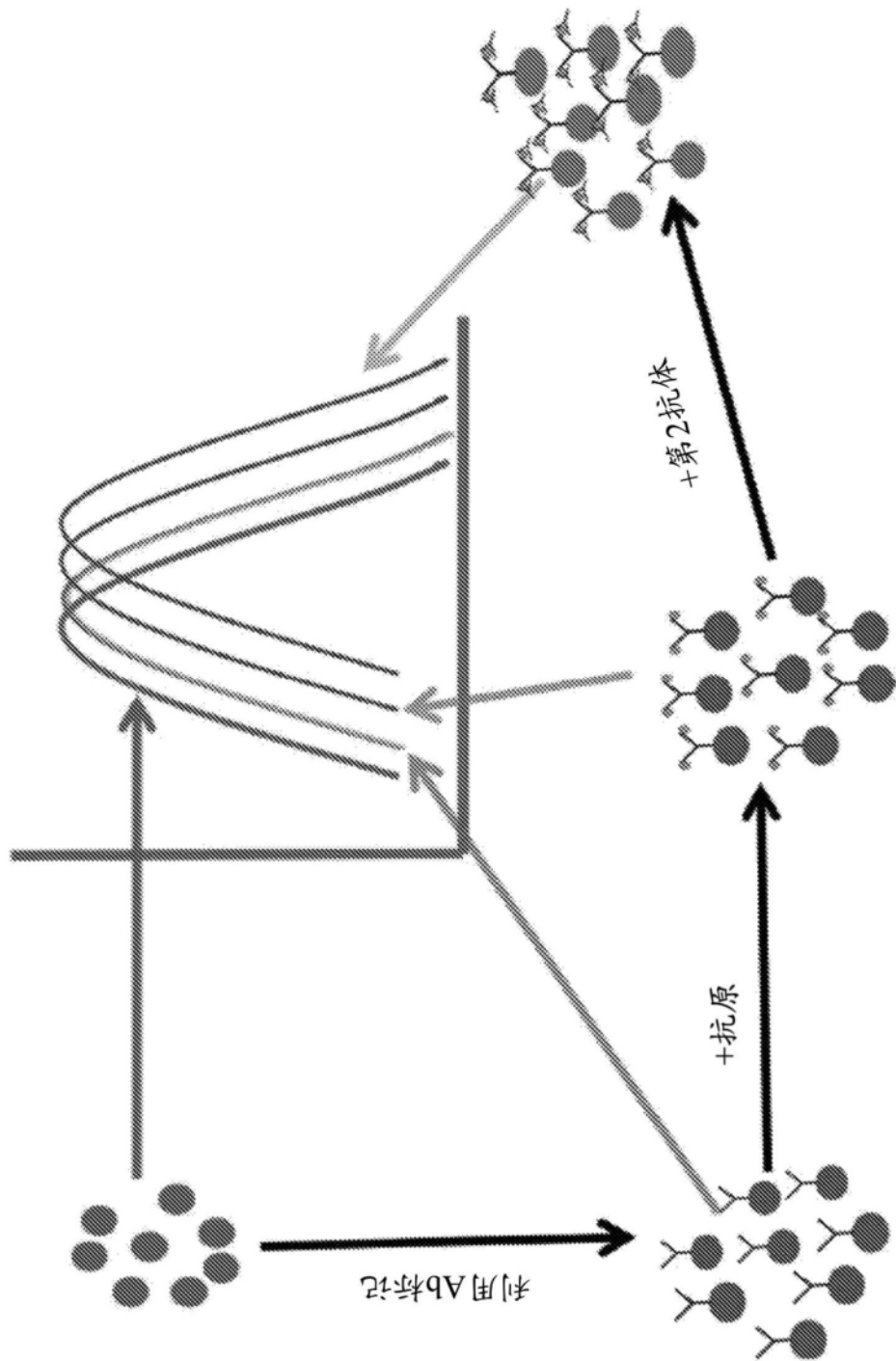


图1



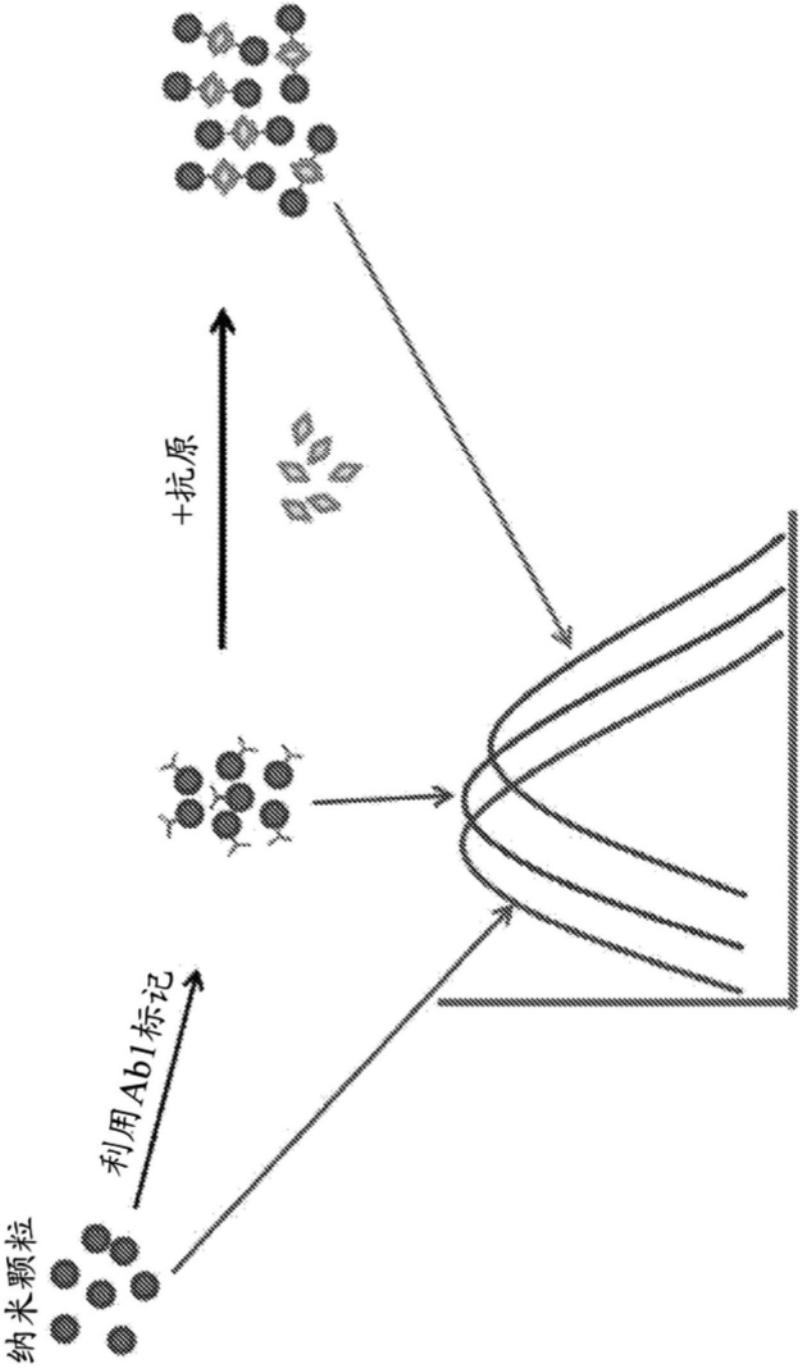


图2

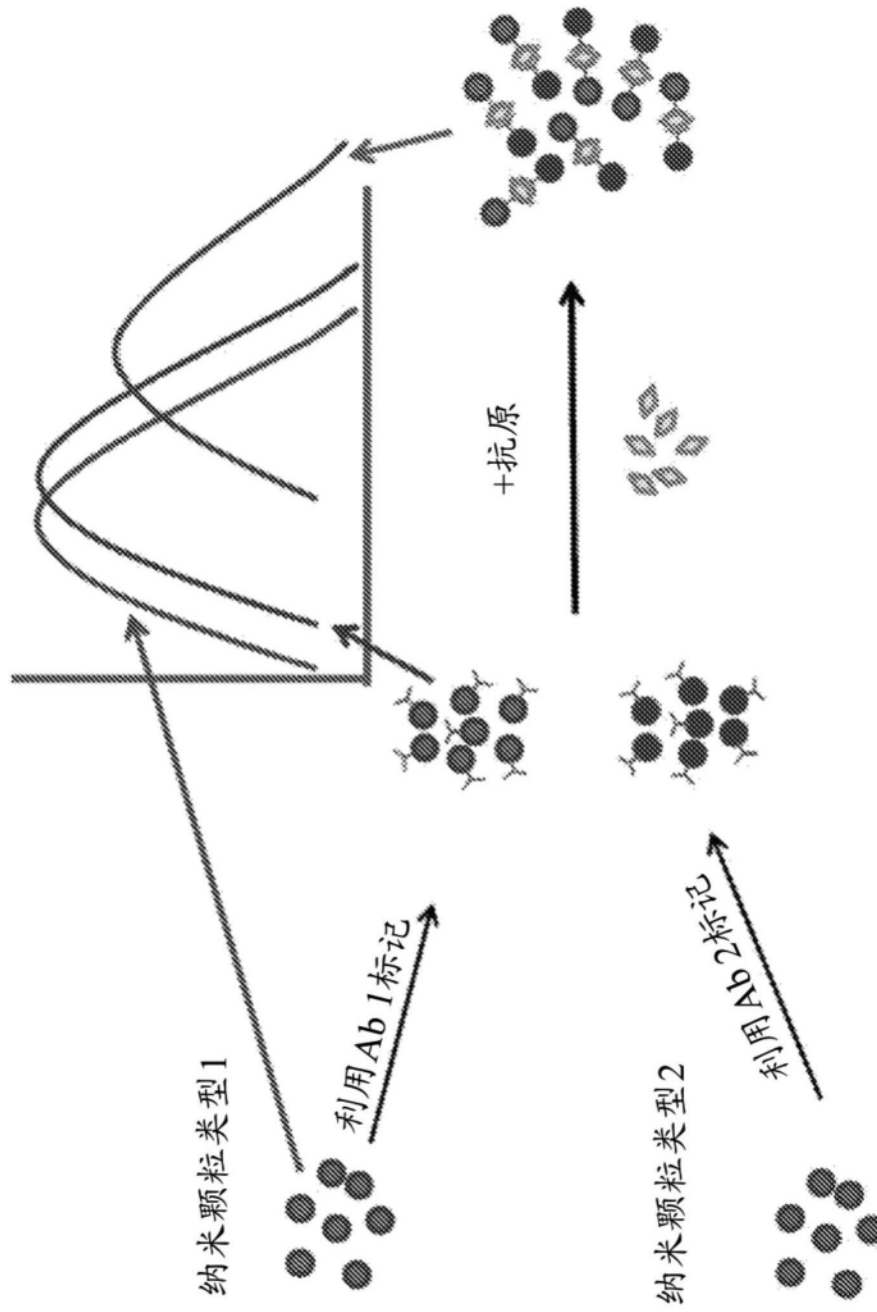


图3

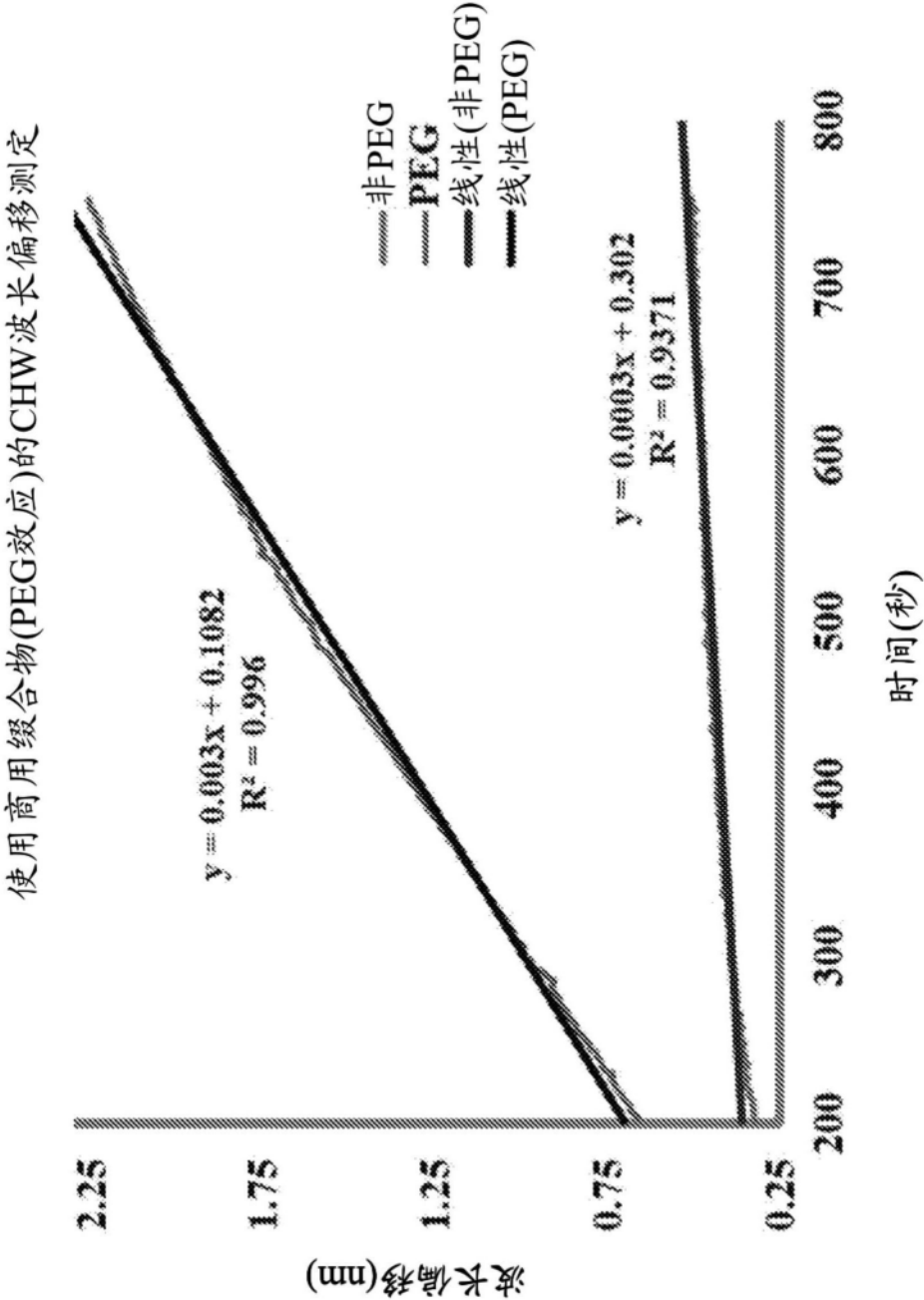


图4

使用仅金且各向异性缀合物(具有PEG)的CHW波长偏移测定

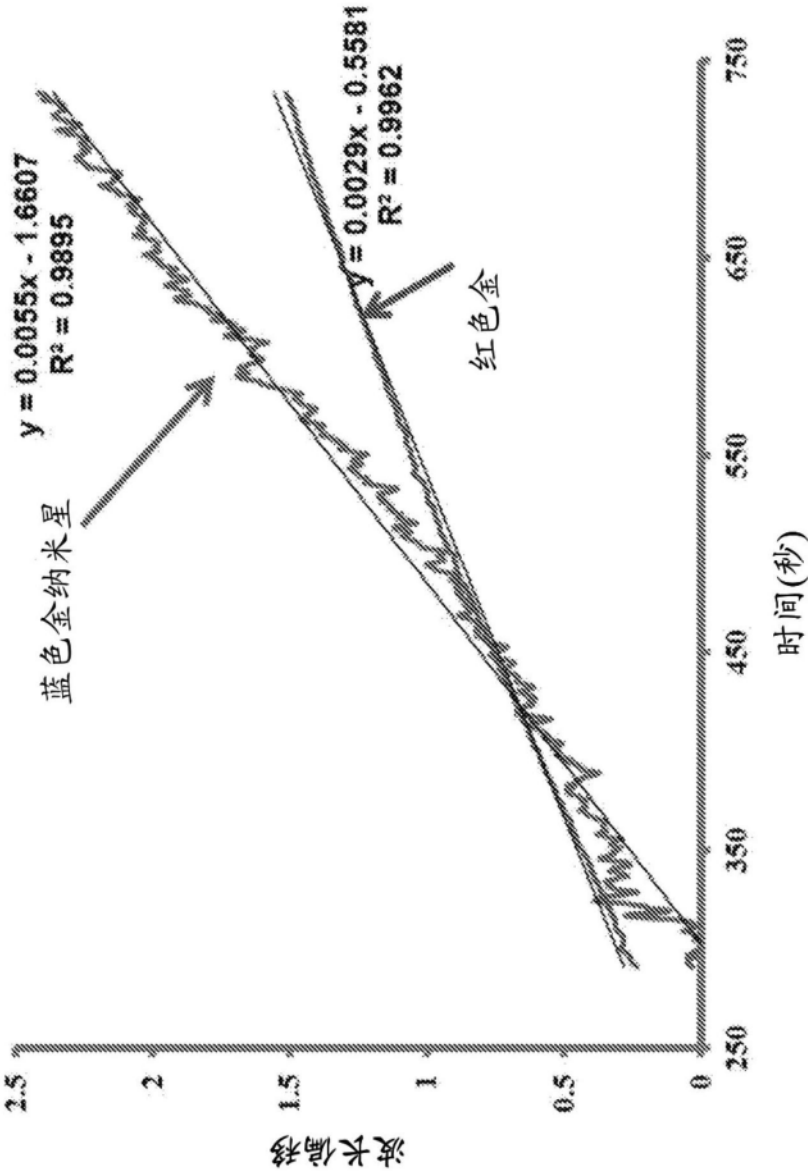


图5

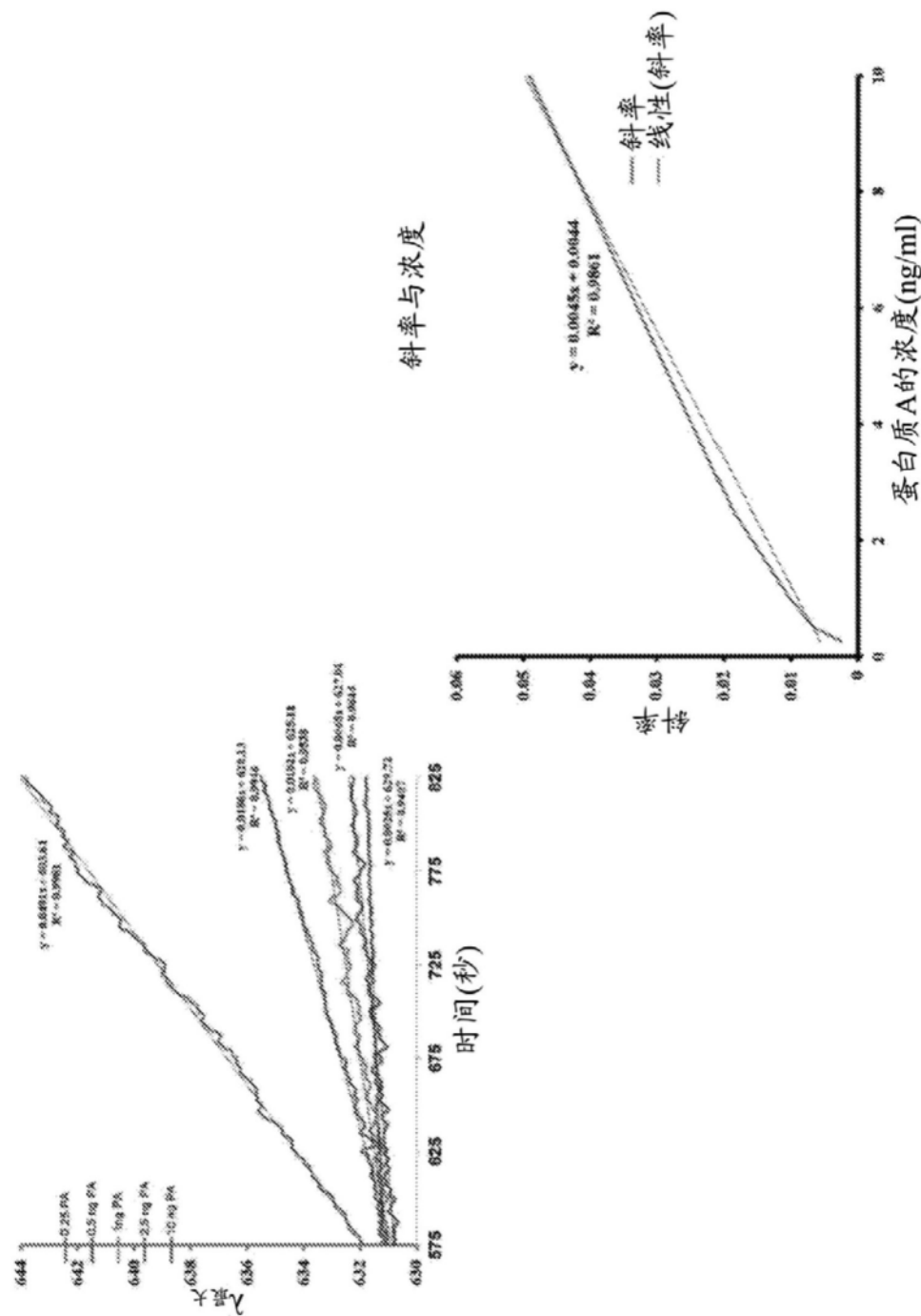


图6

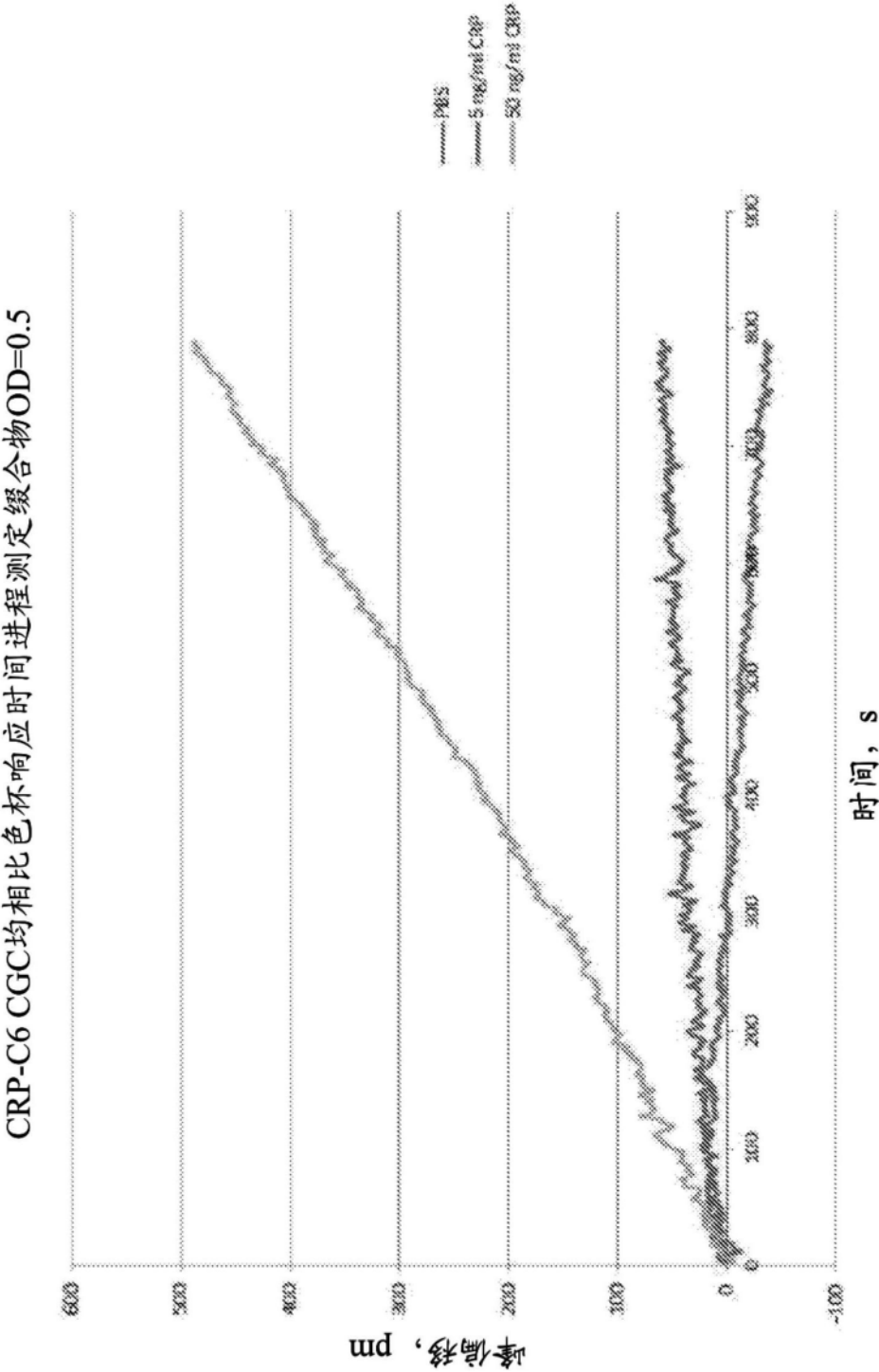


图7A

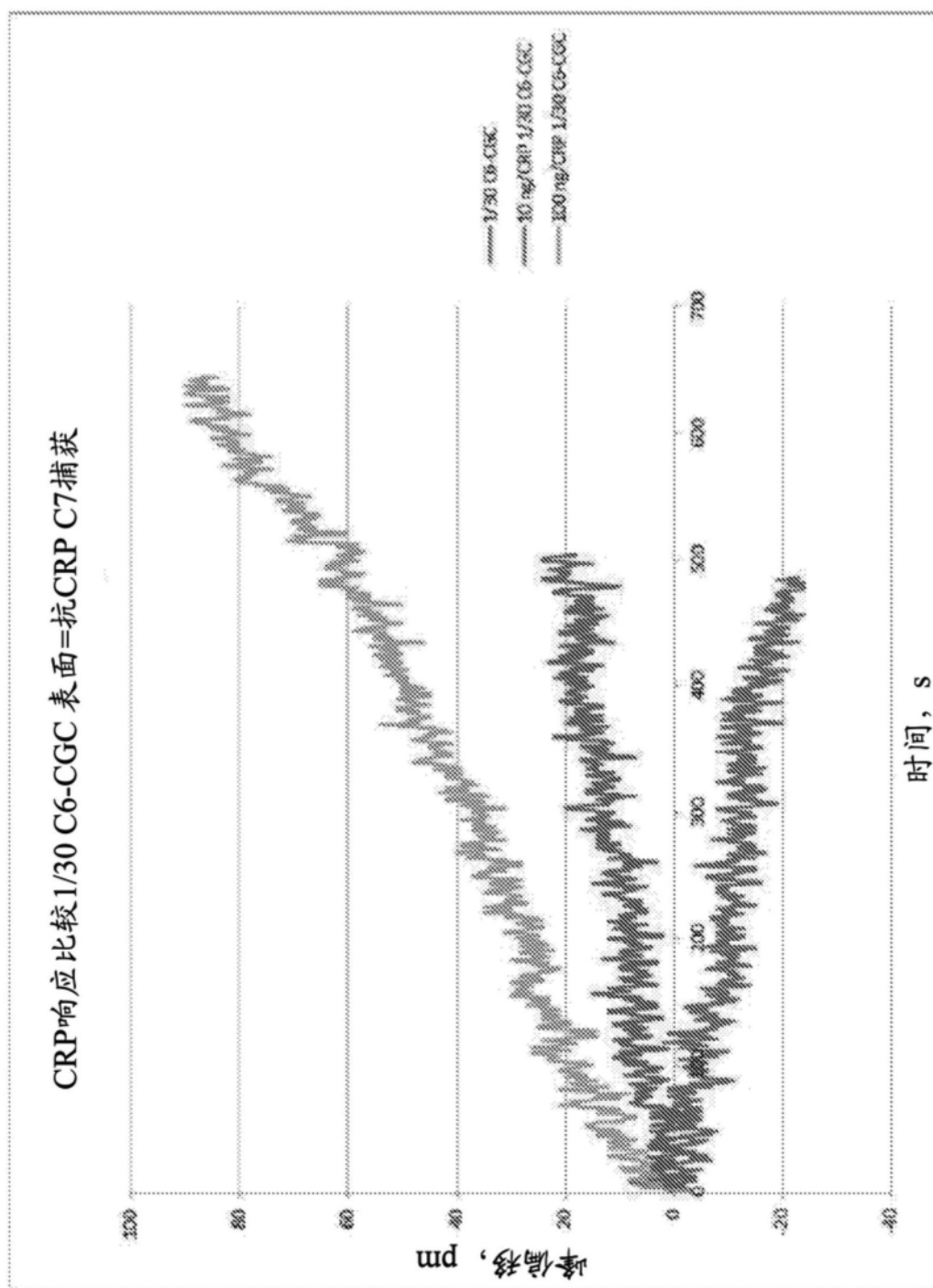


图7B

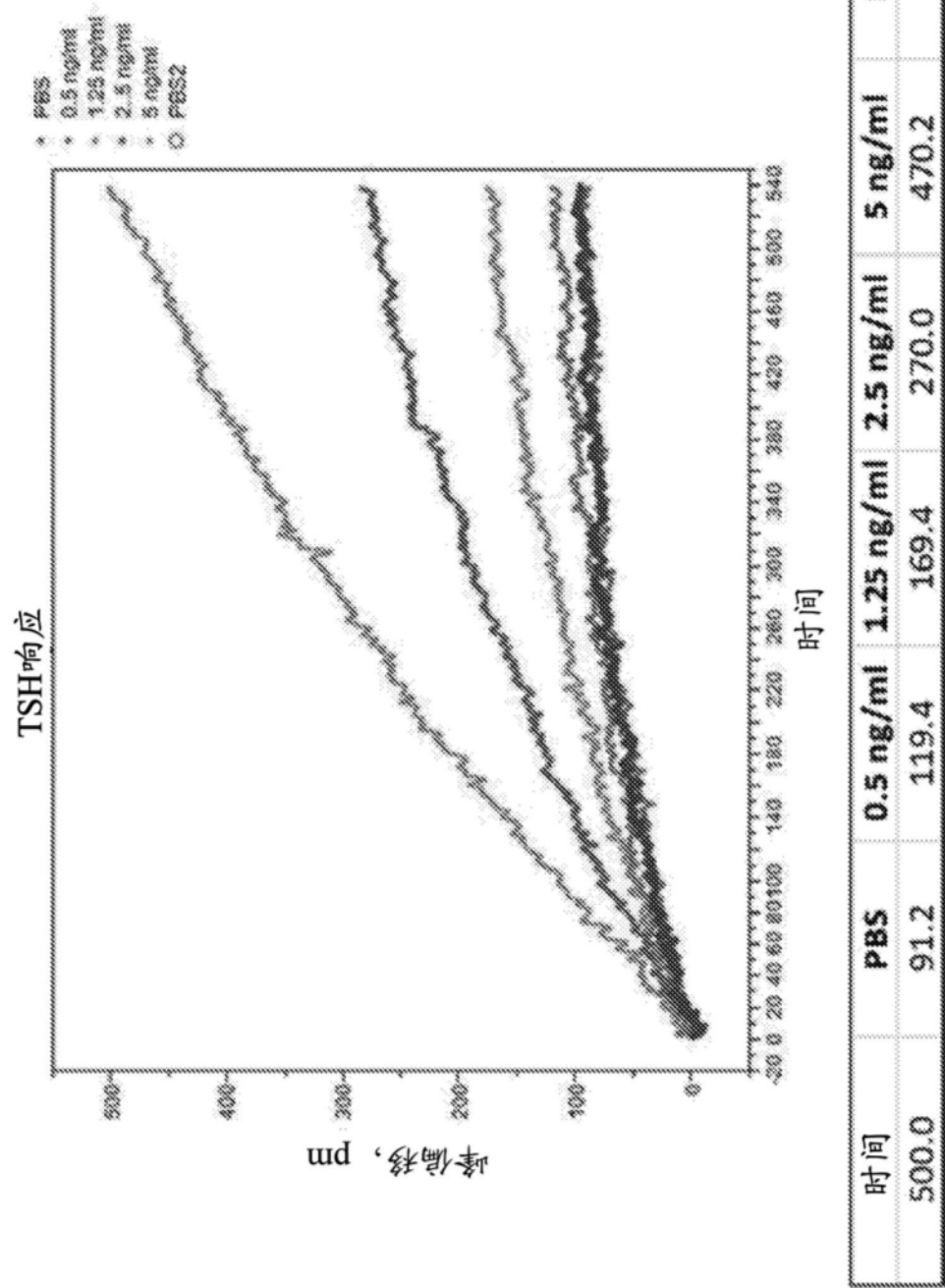


图8A



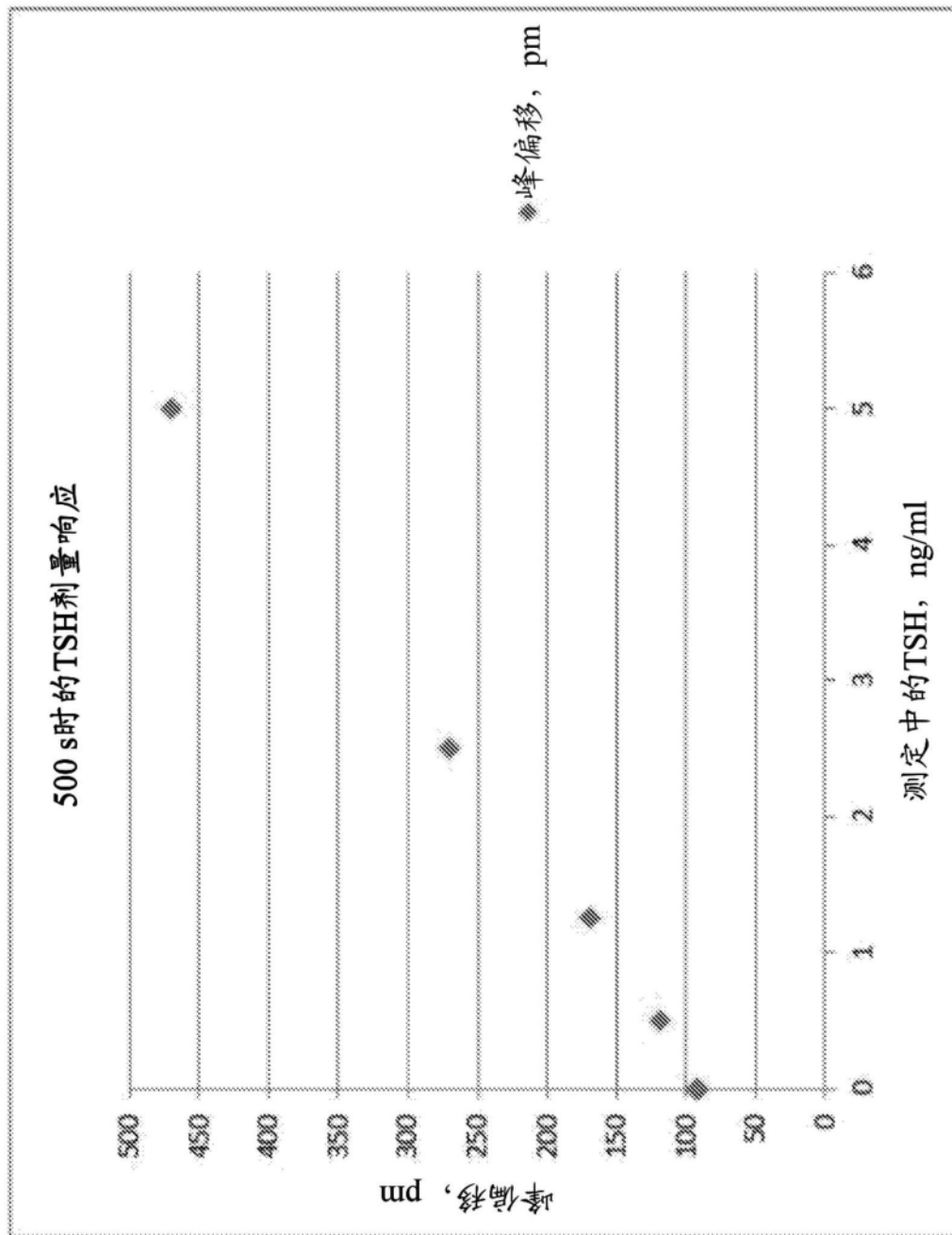


图8B

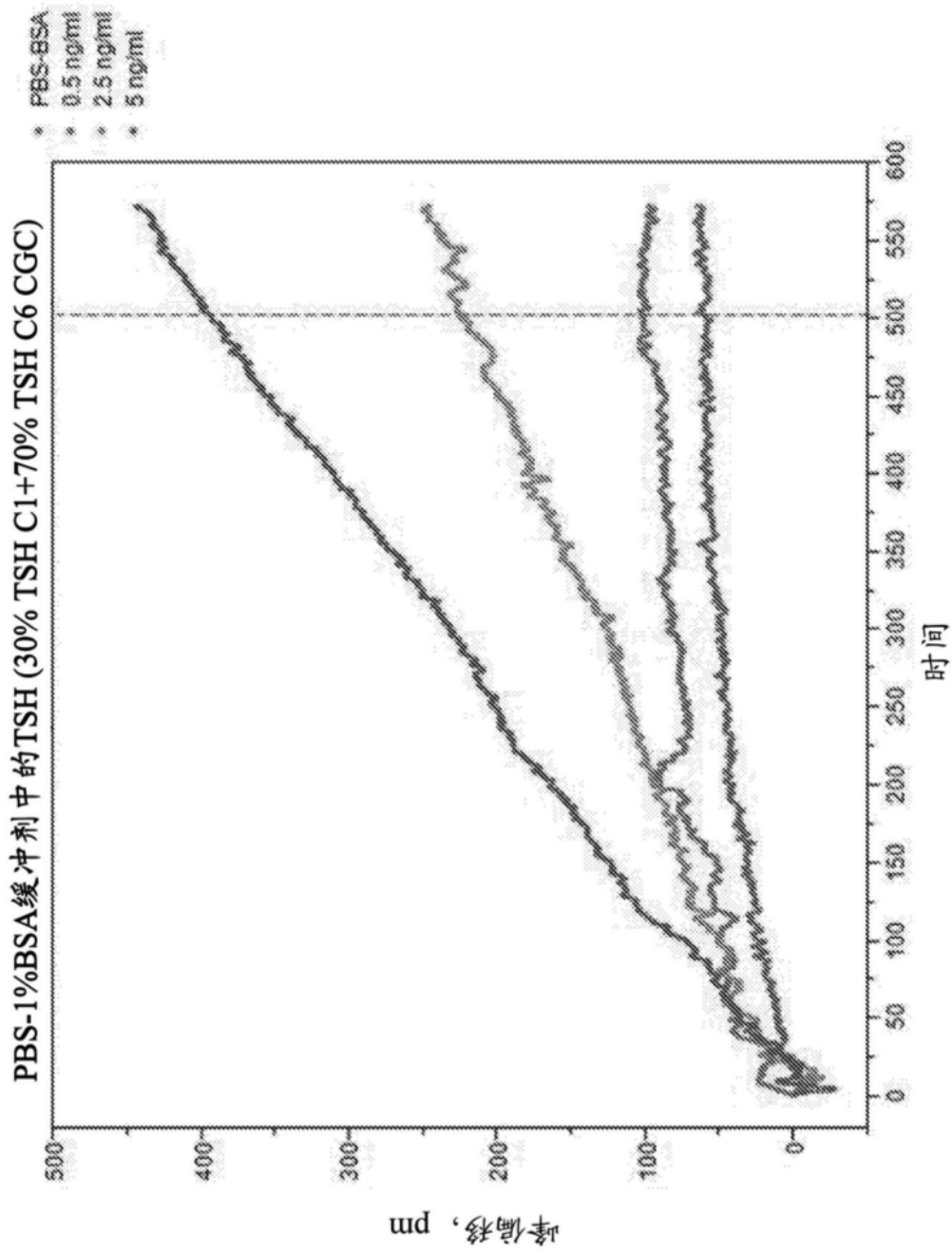


图9A

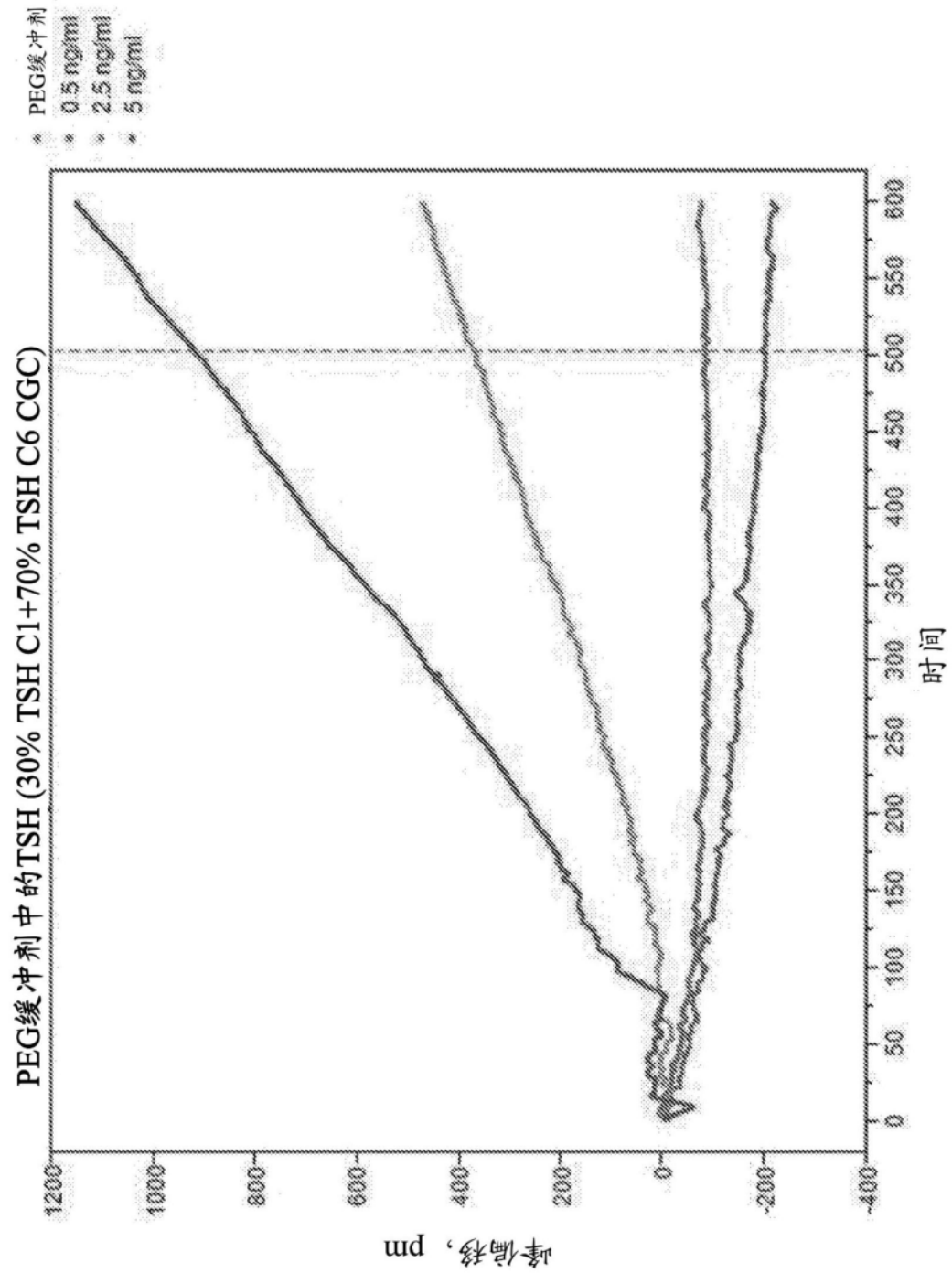


图9B

	0 ng/ml	0.5 ng/ml	2.5 ng/ml	5 ng/ml
30%C1+70%C6 PBS-BSA	62.8	104.1	222.3	394.6
30%C1+70%C6 PEG 缓冲剂	-194.4	-80.6	369.7	920.4
50%C1+50%C6 PBS-BSA	91.2	119.4	270.0	470.2

图9C

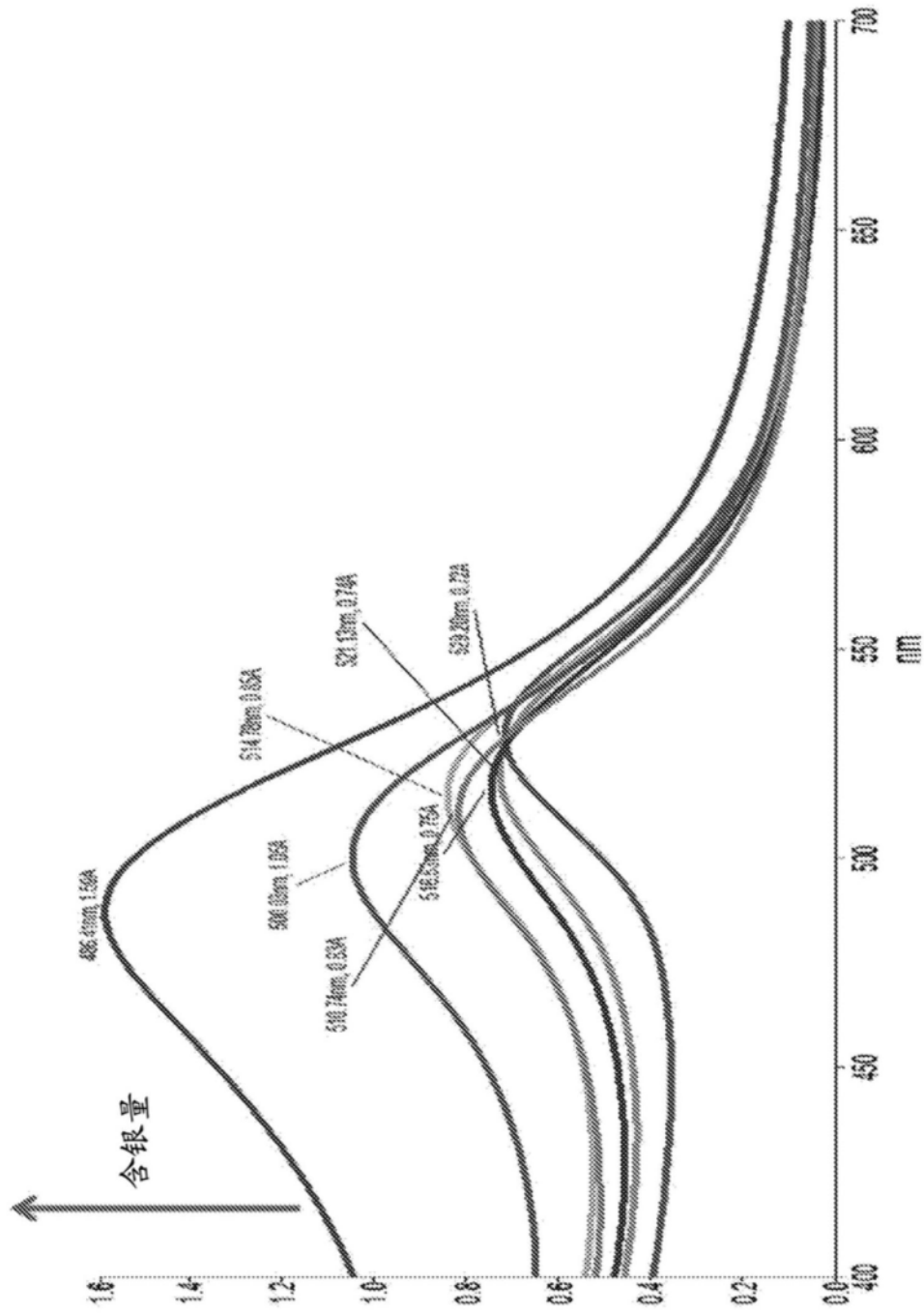


图10

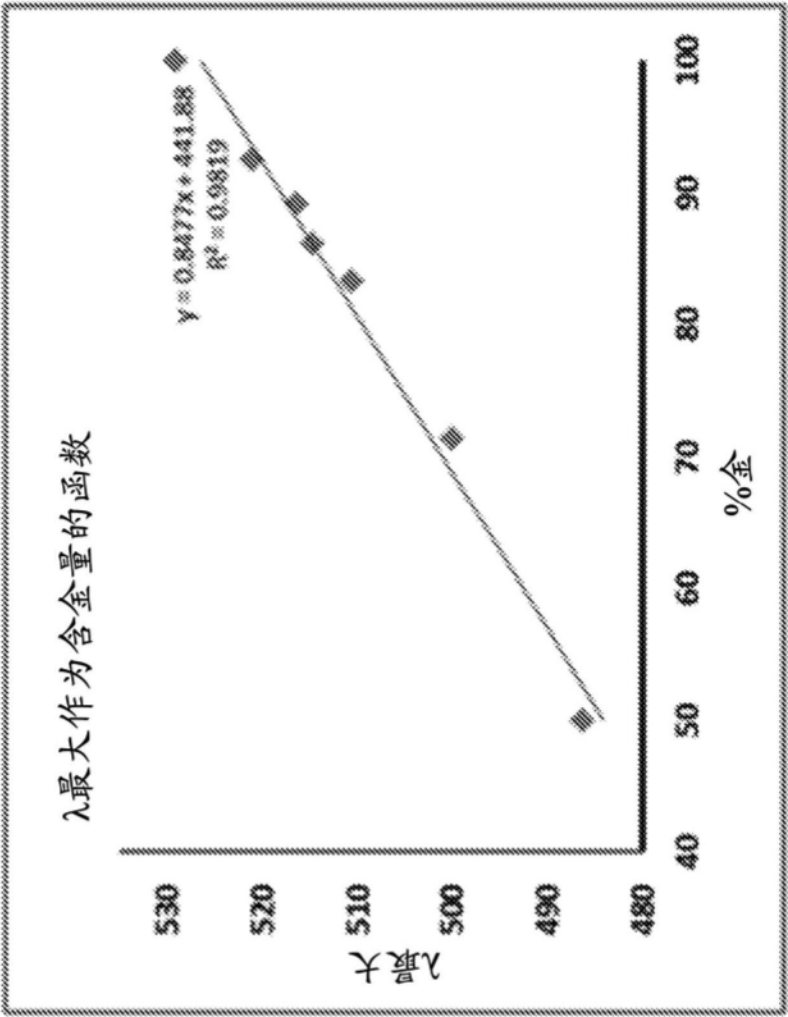


图11

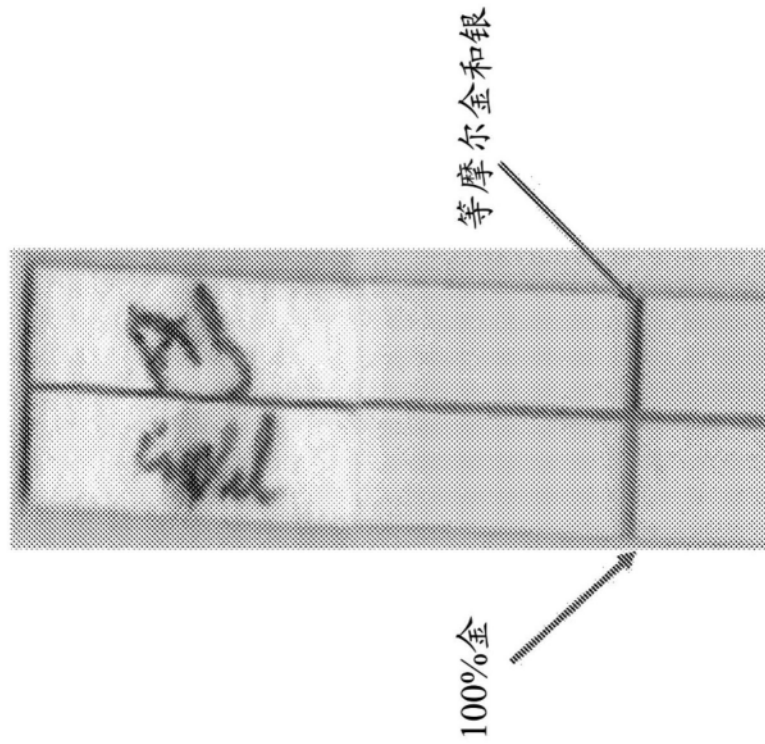


图12

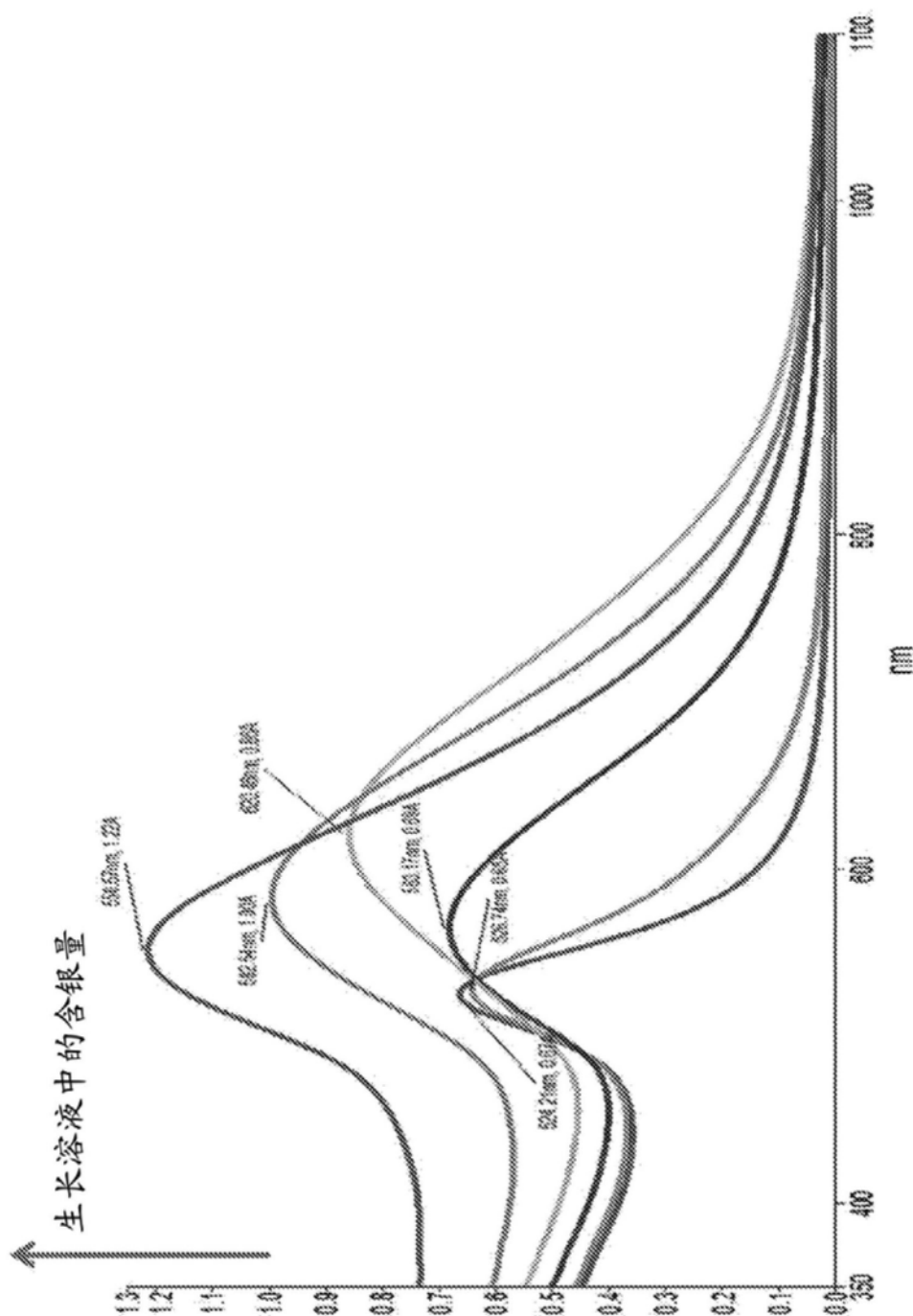


图13



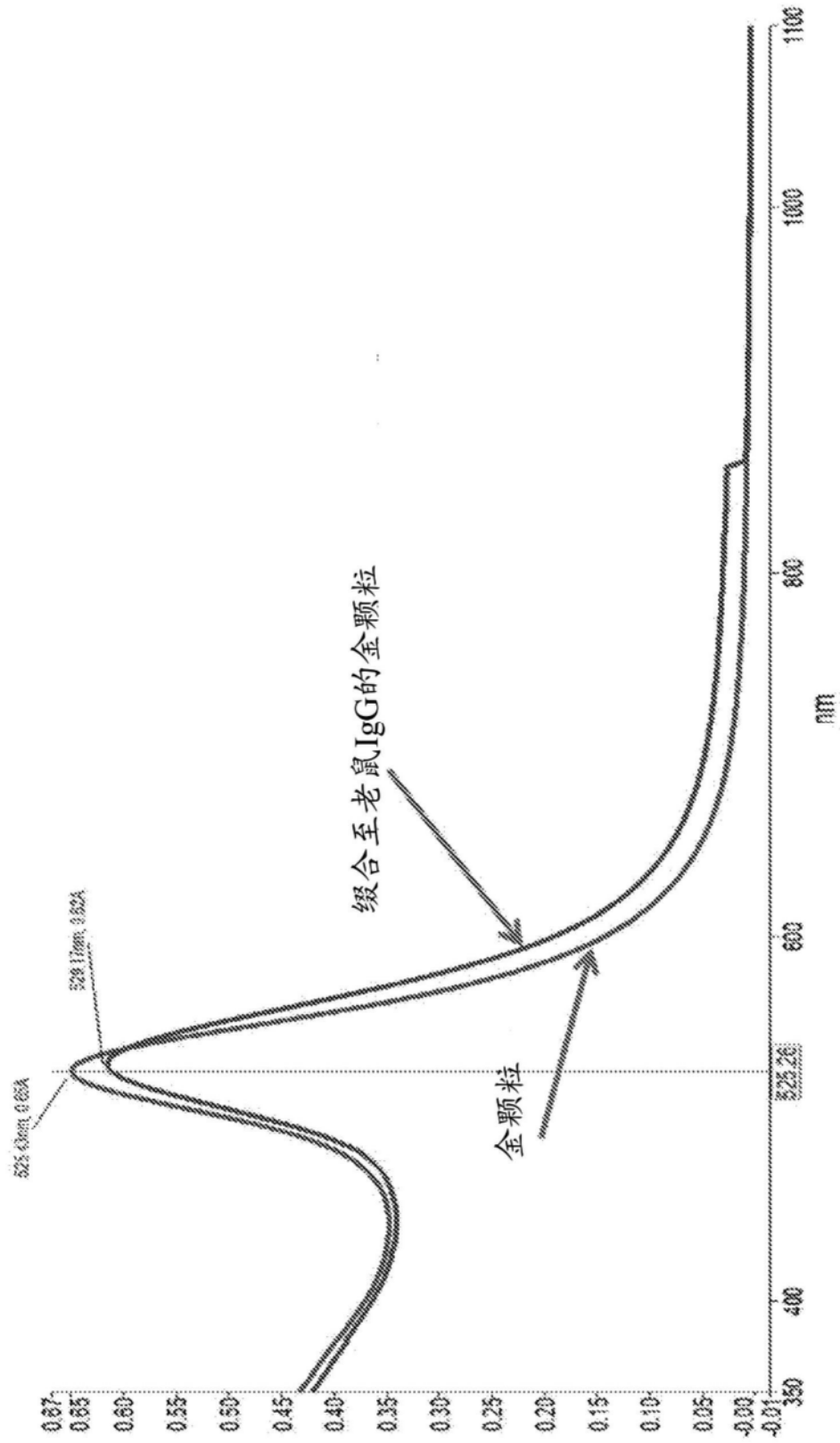


图14

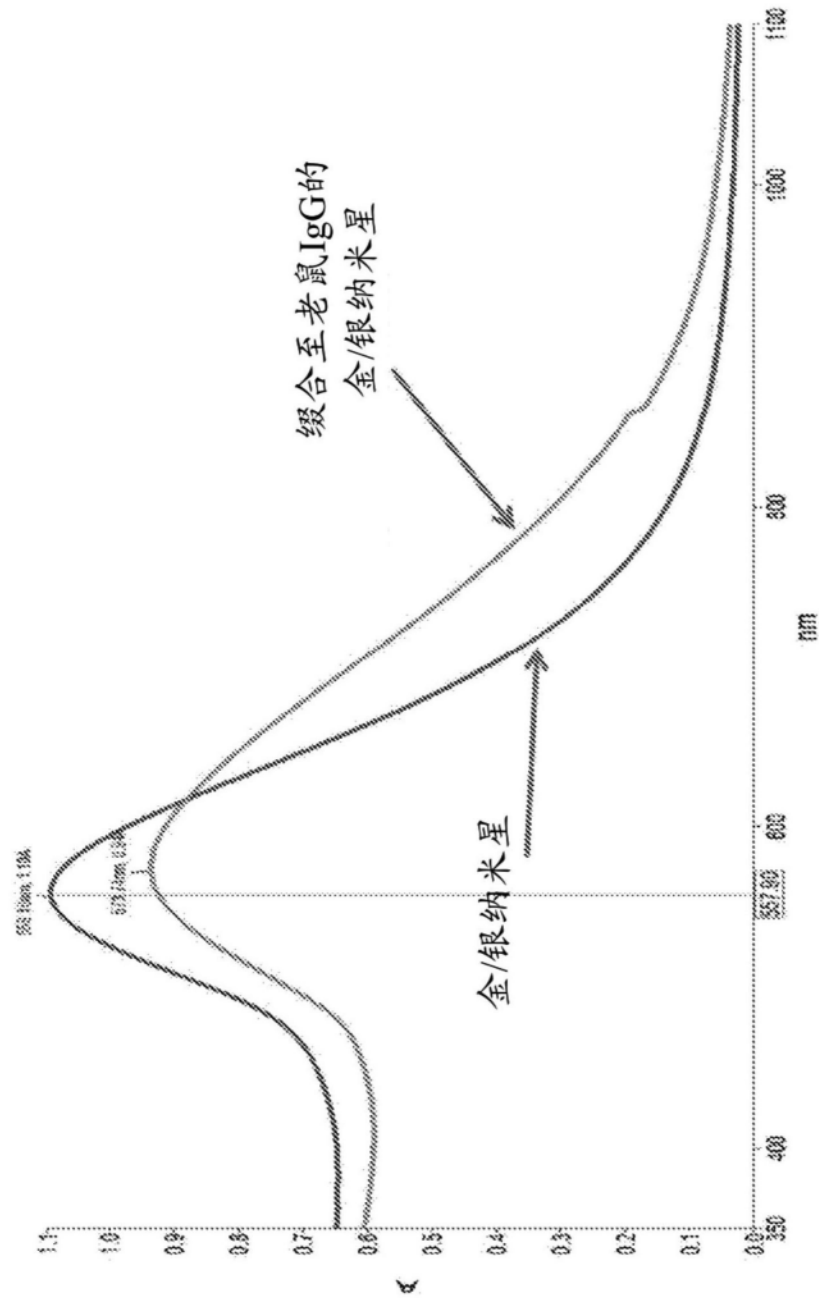


图15

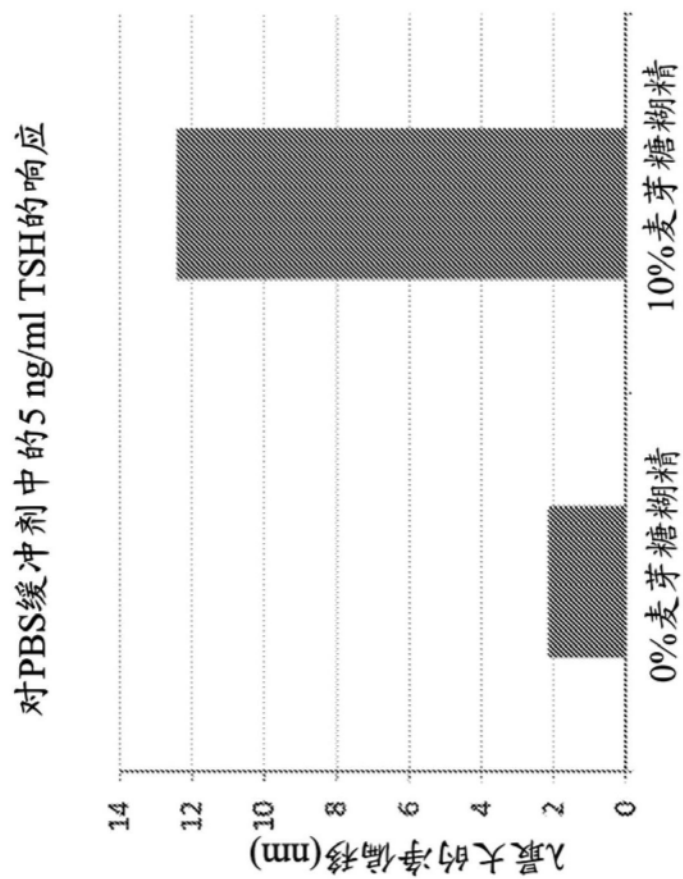
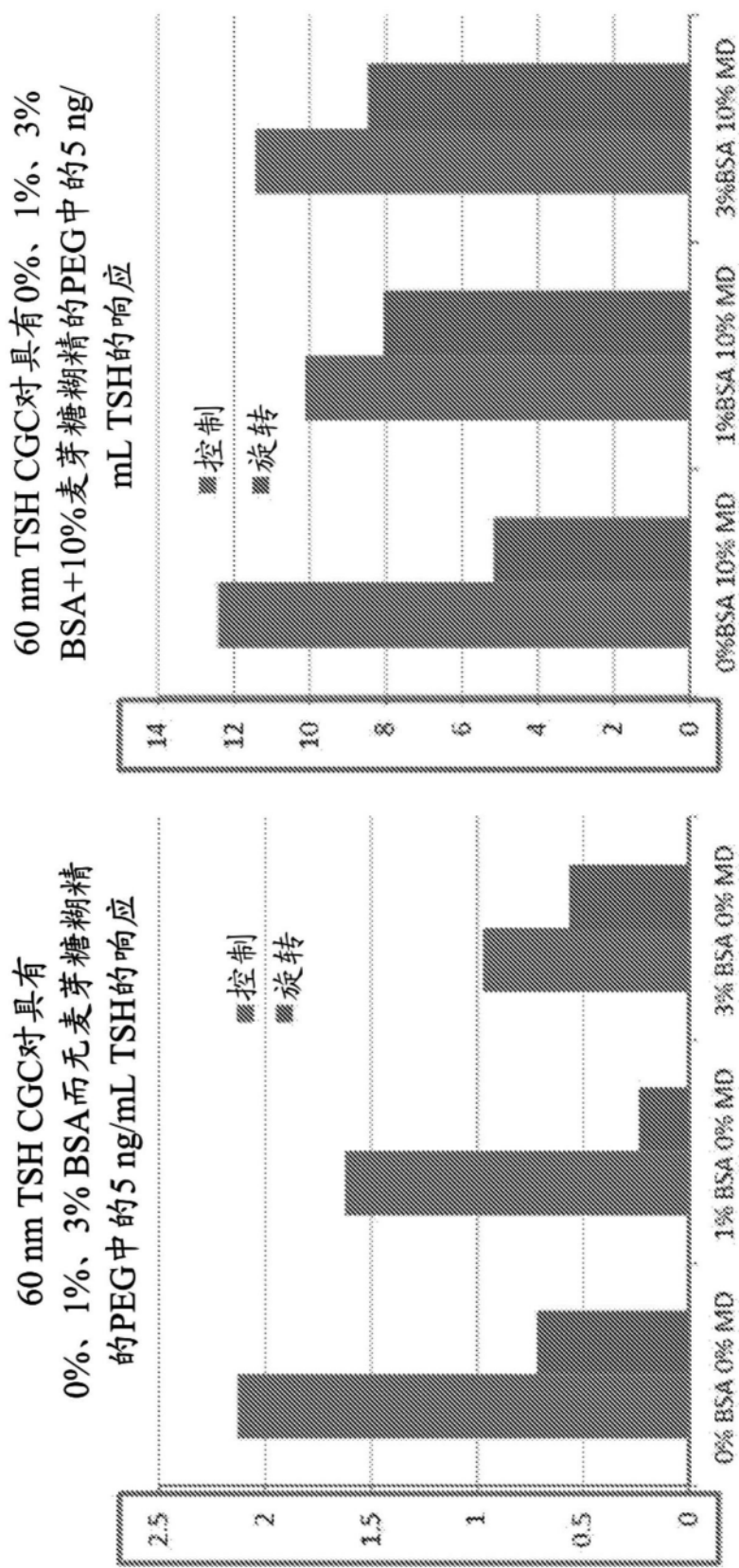


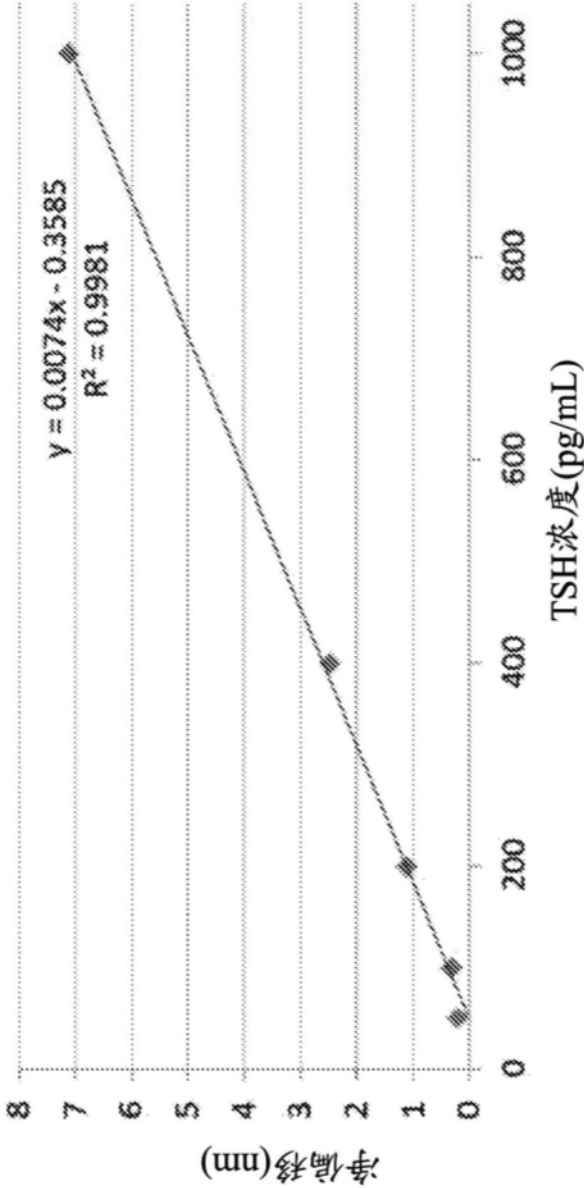
图16



将缓合物溶液以1600 xg离心4分钟以便模拟分析转子上的状况

图17

针对PEG/BSA和麦芽糖糊精中的TSH的pg水平灵敏度



具有10%麦芽糖糊精DE 4-7的PEG 缓冲剂中的pg/mL TSH				
	50	100	200	400
λ T50 (nm)	543.732	543.003	545.915	545.982
λ T600 (nm)	543.93	543.303	547.012	548.458
净偏移(nm)	0.198	0.300	1.097	2.476

图18