

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/573

G01N 33/553 C07K 16/44



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97194334.6

[45] 授权公告日 2004 年 11 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1174248C

[22] 申请日 1997.3.5 [21] 申请号 97194334.6

[30] 优先权

[32] 1996. 3. 6 [33] US [31] 08/611,347

[86] 国际申请 PCT/US1997/003653 1997.3.5

[87] 国际公布 WO1997/033176 英 1997.9.12

[85] 进入国家阶段日期 1998.11.2

[71] 专利权人 梅索磅秤技术有限公司

地址 美国特拉华州

[72] 发明人 R·J·马西 M·T·马丁

L·董 M·鲁 A·菲舍

F·詹梅森 P·梁 R·霍克

J·K·勒兰德

审查员 汪妍瑜

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 杨厚昌

权利要求书 6 页 说明书 82 页 附图 12 页

[54] 发明名称 用于电致化学发光测定的石墨纳管、其组合物、测定试剂以及测定方法

[57] 摘要

通过化学取代来官能化的包含管状 fullerenes (常称为“buckytubes”)和纤丝的石墨纳管在电致化学发光测定中被用作固体载体。在用于测定之前,所述石墨纳管用官能团生物分子化学改性。电致化学发光配合物与所述官能团生物分子改性的纳管的结合使得可以通过多种形式检测各种分子包括核酸、抗原、酶和酶底物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种石墨纳管，所述石墨纳管连接了一种测定工作物质，该测定工作物质与电致化学发光标记相连。
- 5 2. 权利要求1的石墨纳管，其中所述电致化学发光标记含有稀土金属。
3. 权利要求1的石墨纳管，其中所述测定工作物质是一种酶生物传感器。
4. 权利要求1的石墨纳管，其中所述石墨纳管含有石墨炭。
- 10 5. 权利要求1的石墨纳管，其中所述电致化学发光标记含有一种或多种稀土金属或过渡金属。
6. 权利要求5的石墨纳管，其中所述电致化学发光标记包含一种或多种选自钌、铱、铕、铈、镧、钨、钼、钽、钇、铜、铬或钨的金属。
- 15 7. 权利要求5的石墨纳管，其中所述电致化学发光标记包含选自钌、铱和铕的金属原子。
8. 权利要求1的石墨纳管，其中所述电致化学发光标记包含：
 - (a) 选自钌、铱和铕的金属原子；和
 - (b) 含氮的杂环芳族多齿金属配位体。
- 20 9. 权利要求1的石墨纳管，其中所述测定工作物质包含抗体、蛋白质受体、抗生物素蛋白、抗生物素链菌素、蛋白质A、蛋白质G、生物素或核酸。
10. 权利要求9的石墨纳管，其中所述测定工作物质包含抗体。
11. 权利要求1的石墨纳管，其中所述石墨纳管是磁响应的。
- 25 12. 一种用于检测存在于样品中的目标分析物的组合物，该组合物包含：
 - (i) 含有一个官能团的石墨纳管，和
 - (ii) 一种与所述官能团相连的测定工作物质，所述测定工作物质能与分析物、具有与分析物相当的结合性的化合物或分析物的结合配体结合。
- 30 13. 权利要求12的组合物，其中所述测定工作物质与目标分析物

结合。

14. 权利要求 13 的组合物, 所述组合物还包含第二种结合到分析物上的测定工作物质, 所述第二种测定工作物质被连接到电致化学发光标记上。

5 15. 权利要求 12 的组合物, 其中所述测定工作物质能与分析物结合。

16 权利要求 14 的组合物, 其中所述电致化学发光标记包含一种或多种稀土金属或过渡金属。

10 17. 权利要求 16 的组合物, 其中所述电致化学发光标记包含一种或多种选自钷、铕、铽、铈、镨、钕、钐、铈、钆、钇、铜、铬或钨的金属。

18. 权利要求 17 的组合物, 其中所述电致化学发光标记包含选自钷、铕和铽的金属原子。

15 19. 权利要求 14 的组合物, 其中所述电致化学发光标记包含:
(c) 选自钷、铕和铽的金属原子; 和
(d) 含氮的杂环芳族多齿金属配位体。

20. 权利要求 12 的组合物, 其中所述测定工作物质包含抗体、蛋白质受体、抗生物素蛋白、抗生物素链菌素、蛋白质 A、蛋白质 G、生物素或核酸。

20 21. 权利要求 14 的组合物, 其中所述第二种测定工作物质选自:
a. 所述目标分析物的特定结合配体; 和
b. 加入的目标分析物或加入的具有与所述目标分析物相当的结合性的化合物, 其与所述目标分析物在结合到所述目标分析物的结合配体上存在竞争。

25 22. 权利要求 12 的组合物, 其中所述测定工作物质共价连接到所述官能团。

23. 权利要求 12 的组合物, 其中所述测定工作物质通过包含生物素-抗生物素链菌素相互作用的键合连接到所述石墨纳管。

30 24. 一种用于对样品中存在的目标分析物进行结合测定的方法, 所述方法包括下列步骤:

(a) 形成一种组合物, 所述组合物包含:

- i. 选自钨、钼和铼的金属原子;和
- ii. 含氮的杂环芳族多齿金属配位体。

33. 权利要求 24 的方法, 所述方法还包括在电极表面收集所述复合物的步骤。

5 34. 权利要求 24 的方法, 其中所述第一种测定工作物质和/或所述第二种测定工作物质包含抗体、蛋白质受体、抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、蛋白质 A、蛋白质 G、生物素或核酸。

10 35. 权利要求 24 的方法, 其中通过包含生物素-抗生蛋白链菌素相互作用的键合, 所述第一种测定工作物质连接到所述标记化合物和/或所述第二种测定工作物质连接到所述石墨纳管。

36. 权利要求 24 的方法, 所述方法还包括使用磁场在电极表面收集所述石墨纳管的步骤。

37. 权利要求 24 的方法, 其中所述目标分析物是酶; 所述测定工作物质和/或所述第二种测定工作物质包含为所述酶而设的底物。

15 38. 权利要求 37 的方法, 其中所述酶将底物裂解从而将所述标记化合物由所述石墨纳管释放和/或将所述测定工作物质由所述石墨纳管释放。

39. 权利要求 24 的方法, 其中所述石墨纳管是磁响应的。

20 40. 一种用于对存在于样品中的目标分析物进行结合测定的方法, 所述方法包括下列步骤:

(a) 形成一种组合物, 所述组合物包含:

(i) 所述样品,

(ii) 与能被诱导电致化学发光的标记化合物连接的第一种测定工作物质, 和

25 (iii) 许多结合到第二种生物活性测定工作物上的官能化石墨纳管;

(b) 培养所述组合物以形成一种包含至少一个所述的许多个官能化石墨纳管和所述标记化合物的复合物;

(c) 诱导在所述复合物中的标记化合物电致化学发光, 和

30 (d) 测量所发的光, 以测定或检测所述样品中目标分析物。

41. 权利要求 40 的方法，其中所述复合物在一电极表面被收集。

42. 一种在基于微粒结合测定中用作试剂的物质的组合物，所述组合物包含结合到一测定工作物上的官能化石墨纳管和至少一种另外的选自下列物质的组分：

- 5 (a) 电解质；
 (b) 电致化学发光标记；
 (c) 目标分析物或具有与所述目标分析物相当的结合性的化合物；
 (d) 一种目标分析物或具有与所述目标分析物相当的结合性的化合物的结合配体；
10 (e) 一种能与(c)或(d)反应的活性组分；
 (f) 一种还原剂；和
 (g) 一种电致化学发光反应增强剂；

但是其条件是在任何试剂组合物中所含的任何两种组分在贮存时均不会相互反应从而削弱其在所要进行的测定中的功能。

15 43. 权利要求 42 的组合物，所述组合物包含磁响应石墨纳管。

44. 一种用于基于结合反应和电致化学发光现象的测量的测定方法中的测定试剂，所述试剂包含：

- (a) 一种电解质；
 (b) 许多与第一种测定工作物结合的磁响应官能化石墨纳管；和
20 (c) 与具有电致化学发光性的化学部分结合的第二种测定工作物。

45. 一种用于对存在于样品中的目标分析物进行测定的方法，所述方法包括下列步骤：

- (a) 形成一种组合物，所述组合物包含：
25 (i) 所述样品，和
 (ii) 一种与一种组分结合的官能化石墨纳管，所述组分本身与一种能被诱导电致化学发光的标记化合物结合，其中所述组分是目标分析物的作用物；

- (b) 在允许所述分析物解离所述组分的条件下培养所述组合物;
- (c) 从所述组合物中分离所述石墨纳管;
- (d) 诱导所述游离的标记化合物发光; 和
- (e) 测量所发射的光, 以测定所述样品中目标分析物的存在。
- 5 46. 一种用于进行电致化学发光结合测定的测定试剂, 所述试剂包含在一个或多个容器中:
- i. 连接到第一种测定工作物质的石墨纳管; 和
- ii. 连接到电致化学发光标记的第二种测定工作物质。
47. 权利要求 46 的测定试剂, 其中所述电致化学发光标记包含一
- 10 种或多种金属原子。
48. 权利要求 46 的测定试剂, 其中所述电致化学发光标记包含稀土金属原子或过渡金属原子。
49. 权利要求 46 的测定试剂, 其中所述电致化学发光标记包含选自钌、铱和铕的金属原子。
- 15 50. 权利要求 46 的测定试剂, 其中所述电致化学发光标记包含:
- i. 选自钌、铱和铕的金属原子; 和
- ii. 含氮的杂环芳族多齿金属配位体。
51. 权利要求 46 的测定试剂, 其中所述第一种测定工作物质和/或所述第二种测定工作物质包含抗体、蛋白质受体、抗生物素蛋白、
- 20 抗生蛋白链菌素、蛋白质 A、蛋白质 G、生物素或核酸。
52. 权利要求 46 的测定试剂, 其中通过包含生物素-抗生蛋白链菌素相互作用的键合, 所述第一种测定工作物质连接到所述石墨纳管和/或所述第二种测定工作物质连接到所述标记化合物。
53. 权利要求 46 的测定试剂, 其中所述石墨纳管是磁响应的。
- 25 54. 一种石墨纳管, 所述石墨纳管连接到选自下列的至少两个组分: (i)电致化学发光标记;(ii)酶; 和 (iii) 酶辅助因子。
55. 权利要求 54 的石墨纳管, 其中所述石墨纳管与酶生物传感器连接, 其中所述酶生物传感器包括能被诱导电致化学发光的标记化合物。

30

用于电致化学发光测定的石墨纳管、其组合物、测定试剂
以及测定方法

5

本申请是1994年11月30日提出的共同未决的Massey等人的申请系列08/346832号的部分连续申请而08/346832又是1993年11月24日提出的申请系列08/158193号的连续申请；后一申请是1991年2月6日提出的申请系列07/652427号的连续申请和1990年6月18日提出的申请系列07/539389号的部分连续申请；后一申请是1988年11月3日提出的现已放弃的名为电致化学发光分析的申请系列07/266882号的连续申请。本申请也是共同未决的Fischer等人于1994年12月8日提出的名为功能化纳管(nanotubes)的申请系列08/352400号的部分连续申请。这些申请的主题通过引用并入本文中。

15

发明领域

本发明一般涉及进行结合测定的方法和装置，更具体地说涉及通过测量由一种或多种测定系统的标记组分来测定目标分析物的存在。更准确地说本发明涉及改善了灵敏度的精确、可重现、准确的均相或多相特异性结合测定，其中在引起电致化学发光前，将发光组分在测定组合物中浓缩并在检测系统收集。

20

发明背景

对于生化和生物物质中目标分析物的检测和定量已形成了众多方法和系统。能测量痕量微生物、药物、激素、病毒、抗体、核酸和其它蛋白质的方法和系统对研究人员和临床医师具有重大的价值。

25

基于为人熟悉的结合反应如抗原-抗体反应、核酸杂化技术和蛋白质-配位体系统已经形成了大量技术。在许多生化和生物结合系统中的高度特异性使得许多测定方法和系统在研究和诊断中具有重要的

价值。有代表性的是，目标分析物的存在通过连接到一种或多种结合材料上的可观察的“标记物”的存在或不存在来指示。特别有意义的是能通过光化学、化学和电化学方法使其发光的标记物。“光致发光”是一种材料吸收电磁辐射时被诱导发光的方法。荧光和磷光均属光致发光的类型。“化学发光”方法通过能量的化学转移引起发光物质的产生。“电致化学发光”是电化学引起发光物质的产生。

现已形成了将含目标分析物的样品与用一种化学发光标记物标记的反应剂混合的化学发光测定技术。将反应混合物进行培养，一部分标记反应剂与分析物结合。培养后，将混合物结合的和未结合的部分分离，标记物在任一部分或两部分中的浓度可通过化学发光技术来测定。在某一部分或两部分中测得的化学发光水平指示了在生物样品中目标分析物的含量。

电致化学发光(ECL)测定技术是对化学发光技术的改进。它们提供了目标分析物的存在性和浓度的灵敏和精确的测量。在这种技术中，为了引发发光，经培养的样品被置于伏安工作电极的处理下。在适合的化学环境中，这种电致化学发光通过在特定时间和以特定方式施加于工作电极上的电压来引发。测定标记物产生的光，它指示了分析物的存在性或含量。对于这种 ECL 技术的更全面阐述可参见 PCT 公开的说明书 US 85/01253(WO 086/02734)、PCT 公开的说明书 US 87/00987 和 PCT 公开的说明书 US 88/03947。所述说明书公开的内容通过引用并入此文中。

在测定过程中，在无需分离步骤下进行电致化学发光测定以及在不同分析物浓度下，使调制信号最大从而使精确和灵敏的测试得以进行均是需要的。在先有技术中的用于不分离测定的方法是使用悬浮在测定样品中与一种或多种所述测定的结合组分结合的微粒物质的方法。

美国专利说明书 539389(PCT 公开说明书 US 89/04919)阐述了基于发光现象的灵敏、特异性的结合测定方法，其中惰性微粒物质特异

性地与测定系统中的一种结合反应剂结合。所述测定可以以多相(一个或多个分离步骤)测定方式进行,也可优选以均相(无分离步骤)测定方式进行。

5 US 89/04919 涉及基于测量发光现象的结合反应的测定用组合物,该组合物包含许多具有能与测定混合物组分结合的表面的悬浮颗粒。另一方面,它涉及检测或定量样品中目标分析物的系统,该系统能使用该发明的测定组合物完成其测定方法。该系统包括诱导标记化合物在测定介质中发光的装置和测量其发光以检测样品中目标分析物存在性的装置。

10 已发现将已与电化学发光部分相连接的测定系统的组分与悬浮的微粒物质结合极大地调节了由与那个组分相连的电致化学发光部分发出的光信号强度,依此提供了监测测定系统的特定结合反应的方法。悬浮颗粒被发现对通过连接仍未与悬浮微粒物质结合的所述系统的组分的电致化学发光部分产生的发光信号强度基本或完全没有影响。

15 因此,US 89/04919 涉及检测样品中目标分析物的方法,该方法包括下列步骤(1)形成一种组合物,该组合物含(a)可能含目标分析物的样品,(b)测定工作物质,选自(i)目标分析物或目标分析物的类似物,(ii)目标分析物或其所述类似物的结合配体(partner),和(iii)能与(i)或(ii)
20 结合的活性组分,其中所述物质之一与具有能被诱导发光的化学部分的标记化合物相连接,和(c)许多能与分析物和/或一种在(b)(i)、(ii)或(iii)中定义的物质特异结合的悬浮颗粒;(2)培养所述组合物,使其形成包含一种颗粒物和所述标记化合物的配合物;(3)诱导所述标记化合物发光;和(4)测量由所述组合物发出的光以检测样品中目标分析物的存
25 在。通过比较所测组合物的发光与含已知量分析物的组合物的发光情况,同样的这些方法可用于样品中分析物的定量。

可以是天然或合成的目标分析物的类似物是具有与分析物相当的结合性的化合物,但也包括更高或更低结合能力的化合物,适用于

该发明的结合配体是为人熟悉的。其例子有抗体、酶、核酸、植物血凝素、辅助因子和受体。能与分析物或其类似物和/或与其结合配体结合的活性组分可以是第二种抗体或一种蛋白质如蛋白质A或蛋白质G或可以是抗生物素蛋白或生物素或进入结合反应的为本领域人员熟悉的另一组分。

所述发光可有利地来源于通过将标记化合物(无论是否结合到特异性结合配体上)置于伏安工作电极的影响下诱导产生的电致化学发光(ECL)。所述 ECL 活性混合物通过在特定时间和以特定的产生光的方式,在工作电极上施加一电压而可控引发发光。尽管发射可见光是一有益特征,但是所述组合物或系统也可能发射其它类型的电磁辐射,诸如红外光或紫外光、X-射线、微波等。所用的术语“电致化学发光”、“电致化学发光的”、“发光”和“发光的”包括光和其它形式的电磁辐射的发射。

US 89/04919 中所述的方法可在各种研究和临床设置中进行的测定中检测和定量极小量的分析物。但是研究人员和临床医生的需求使得其有必要降低由这些方法进行的测定的检测限,以提高这些测定的灵敏度和提高可进行的速度。

在本领域已知有多种方法通过在测量步骤前先浓缩来提高来自标记物质的信号。例如在美国专利 4652333 中,标记有荧光、磷光或原子荧光标记物的颗粒在进行测量步骤前通过微孔过滤被浓缩。

在测量步骤前,通过例如将磁响应标记颗粒物吸到测量容器的表面,来将标记的免疫化学物质浓缩也是在本领域为人熟悉的。例如,在美国专利 4731337、4777145 和 4115535 中,这种颗粒物被吸到容器壁上,然后被照射光以激发荧光发射。

在美国专利 4945045 中,颗粒物被浓缩在磁电极上。由一标记的化学介体促进的电化学反应在电极处发生。当结合发生时,免疫化学结合反应改变了所述介体的效能而得到经调制的信号。

尽管不受表面激发的任何具体机理解释如电致发光的束缚,但是

相信 5 在固相复合物上的标记物肯定在电极处氧化。这需要电子从标记物往电极移动。相信电子通过称为隧道效应的现象制造了这种“跳跃”，其中电子在没有必要“越过”势垒的情况下通过空间(势能非常高的区域如所述溶液)。它能通过能垒，从而从一个分子到另一个分子或从一个分子到一个电极而没有另外的能量输入。但是，这种隧道效应现象只能运作非常短的距离。发生隧道效应现象的可能性随二种物质间距离的增加成指数关系下降。如果所述距离低于 25 埃(2.5nm)，那么在两种物质间发生隧道效应现象的可能性是相当高的，但是如果该距离更大，则这种可能性是相当低的。25 Å 的距离是本领域技术人员 10 采用的拇指规则，但并不是绝对限。

因此，只有电极表面 25 Å 内的那些 ECL 标记物可望参与 ECL 过程。在电极表面 25 Å 内的颗粒物的面积一般是极小的。

因此，人们不能期望来自颗粒表面的 ECL 的可测量程度达到任何显著水平。此外，由 ECL 过程产生的光必须通过颗粒到达光电倍增管。因为所述颗粒物是基本不透明的(其浓缩的悬浮液是黑色的)，人们不能期待(即使 ECL 可产生大量的光)光可通过所述颗粒物并用光电倍增管测量。 15

自 70 年代以来，石墨纳管和纤丝一直被认作是各种应用的目标材料。亚微石墨纤丝有时被称为蒸汽生长碳纤维。碳纤丝是具有 10μ 以下，优选 0.5μ 以下，更优选 0.2μ 以下直径的蠕虫状的碳沉积物。它们以各种形式存在并且一直通过在金属表面各种含碳气体的催化分解来制备。几乎自从电子显微检查法出现以来，这种蠕虫状碳沉积物一直受到关注。可参见一个良好的早期的综述和介绍：Baker and Harris, Chemistry and Physics of Carbon (Walker and Thrower ed., Vol. 14, 1978, p. 83), 该文献通过引用并入此文中。也可参见通过引用并入此文中的下列文献：Rodriguez, N., J. Mater. Research, Vol. 8. p. 25 3233(1993)。

在 1976 年，Endo 等人(参见 Obelin, A. and Endo, M., J. of Crystal

Growth, Vol. 32 (1976), pp. 335-349, 通过引用并入此文中)阐述了这种碳纤丝生长的基本机制。从那可见源于在含烃气体的存在下变得碳过饱和的一种金属催化剂颗粒。一个筒形有序石墨芯被压出, 其立即(按照 Endo 等人所述)被涂上热解沉积石墨的外层。这些具有热解外涂层的纤丝一般具有超过 0.1μ , 通常是 $0.2-0.5\mu$ 的直径。

通过引用并入此文的, 1983 年 Tennent 的美国专利 4663230 成功地生成了没有沾染热解碳的筒形有序石墨芯。这样, Tennent 的发明提供了可达到更小直径[一般 $35-700 \text{ \AA}$ ($0.0035-0.070\mu$)]的纤丝和可达到有序的“生长出的”石墨表面的方法。也已生长出了结构不够完美但也没有热解碳外层的纤丝碳。

纤丝、buckytubes 和纳纤维和作为增强材料的可购买得到的长碳纤维是可区别的。与具有所需要大的而且不可避免地有限的纵横比的纤丝相反, 长碳纤维具有至少 10^4 并经常是 10^6 或以上的纵横比(L/D)。长纤维的直径也远大于纤丝, 它总是大于 1.0μ , 一般是 $5 - 7\mu$ 。

长碳纤维通过有机前体纤维[通常是人造纤维、聚丙烯腈(PAN)和沥青]的热解制备。因此在其结构内它们可能包括杂原子。“这样制成的”长碳纤维的石墨性质各不相同, 但它们都要进行随后的石墨化步骤。石墨平面的石墨化、取向和结晶性程度的差异(如果存在)、杂原子的潜在存在和甚至是基材直径的绝对差均会使这种长纤维偏离纳纤维化学的预测值。

Tennent 的美国专利 4663230 描述了没有连续热碳外涂层并具有实际与纤丝轴平行的多个石墨外层的碳纤丝。由于这样, 可以归结它们的特征为具有其 C-轴, 这些轴与石墨的弯曲层的切线垂直, 实际与其圆筒轴垂直。它们一般具有不大于 0.1μ 的直径, 长度与直径比至少为 5。要求实际没有连续的热碳外涂层, 即来自于用来制备它们的气体原料的热裂解的热解沉积碳。

特此通过引用并入此文的 Tennent 等人的美国专利 5171560 描述了没有热外涂层并具有实际平行于纤丝轴的石墨层, 从而使所述层在

所述纤丝轴上的凸出部分延伸至至少二个纤丝直径的距离的碳纤维。
一般来说,这种纤丝实际上是直径实际恒定的圆筒形的石墨纳管,包
含其 C - 轴实际与其圆筒轴垂直的筒形石墨层。它们实际没有热解沉
积碳,具有小于 0.1μ 的直径和大于 5 的长度与直径比。这些纤丝正是
5 本发明主要感兴趣的纤丝。

关于碳纤维聚集体的形成的进一步细节可参见 Snyder 等人 1988
年 1 月 28 日提出的美国专利说明书 149573 号和 1989 年 1 月 28 日提
出的 PCT 说明书 US 89/00322(“Carbon Fibrils”) WO 89/07163 和 Moy
等人 1989 年 9 月 28 日提出的美国专利说明书 413837 和 1990 年 9 月
10 27 日提出的 PCT 说明书 US 90/05498(“Fibril Aggregates and Method of
Making Same”) WO 91/05089, 所有这些专利申请均转让给与本发明
相同的授让人并被通过引用并入此文中。

通过引用并入此文中的 Moy 等人 1992 年 5 月 22 日提出的 USSN
07/887307 描述了作为具有各种宏观形态结构(通过扫描电子显微检查
15 法测定)的聚集体制备的纤丝,其中它们被随意相互缠绕而形成类似于
鸟巢的纤丝缠绕球(“BN”);或作为实际具有相同的相对取向和具有
精梳纱的外表(“CY”)[如每根纤丝的纵向轴(尽管各自弯曲或缠绕)
与束中间周围纤丝以相同的方向延伸]的直的至稍弯或扭结的碳纤维
束组成的聚集体制备的纤丝;或作为由疏松相互缠绕形成“开网”
20 (“ON”)结构的直的到稍弯或扭结的纤丝组成的聚集体制备的纤丝。
在开网结构中,纤丝缠绕的程度大于在精梳纱聚集体(其中各纤丝实际
具有相同的相对取向)中观察到的程度,但小于鸟巢聚集体中的缠绕程
度。CY 和 ON 聚集体比 BN 更易分散,使得它们可用于需要均匀性
贯穿于整个结构的复合制作中。

25 当纤丝轴上石墨层的凸出物延伸不到二个纤丝直径的距离时,石
墨纳纤维在横截面上的碳平面呈现出鲑鱼骨状外表。它们被称为鱼骨
纤丝。通过引用并入此文中的 Geus 的美国专利 4855091 提供了实际没
有热解外涂层的鱼骨纤丝的制备方法。这些纤丝也可用于本发明的实

施中。

形态结构类仿于上述催化生长纤丝的碳纳管已在高温碳弧中生成(Iijima, Nature 354 56 1991)。现在普遍接受(Weaver, Science 265 1994)这些弧生纳纤维具有与早期的 Tennent 的催化生长纤丝具有相同的形态结构。弧生碳纳纤维也可用于本发明。

发明目的

因此本发明的目的之一是提供使用具有高表面积颗粒物以固定测定工作物质来有利地获得高的光发射的发光测定方法。

本发明的另一目的是提供使用能被诱导发光的化合物标记的石墨纳管(纤丝)的组合物和测定方法。

本发明的再一目的是提供用于这种测定的官能化纤丝。

发明的介绍

术语定义

术语“ECL 部分”、“含金属 ECL 部分”、“标记物”、“标记化合物”和“标记物质”可互换使用。称为“ECL 部分”、“含金属 ECL 部分”、“有机金属的”、“金属螯合物”、“过渡金属螯合物”、“稀土金属螯合物”、“标记化合物”、“标记物质”和“标记物”的物质与各种分子诸如分析物或其类似物、分析物或其类似物的结合配体，以及这种前述结合配体的另外的结合配体或能与分析物、其类似物或如上述的结合配体结合的活性组分的相连接属于本发明的范围。前述物质也可以与一个或多个结合配体和/或一个或多个活性组分的混合物相连接。此外，前述物质也可与结合结合配体、活性组分或一种一个或多个结合配体和/或一个或多个活性组分的混合物的分析物或其类似物相连接。将众多前述物质直接与分析物或其类似物结合或通过上面讨论的其它分子与分析物或其类似物结合也属于本发明的范围。为简要起见，这些配位体均称为测定工作物。

术语检测和定量被称为“测量”，可以理解定量可能需要参比组合物和校准物的制备。

术语配合物的收集和浓缩可互换使用，用于说明在测定组合物内配合物的浓缩和在例如电极表面上配合物的收集。

5

附图简介

图 1 是用于进行本发明的基于微粒的无分离测定和分离测定的电池(cell)的示意图。

图 2 是用于图 1 电池的电压控制装置的简图。

10 图 3 是显示在 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的肽纤丝上特定酶水解位置的示意图。

图 4 是使用抗生物素蛋白纤丝的 DNA 探针测定的示意图。

图 5 是通过加入 N_ϵ -(叔丁氧基羰基)-L-赖氨酸制备二官能纤丝的反应图解的示意图。

15 图 6 是合成基于 ECL 的双官能生物传感器纤丝的反应图解的图示。

图 7 是双官能 ECL 基的生物传感器纤丝的图示。

图 8 是由 D-葡萄糖-6-磷酸酯脱氢酶催化的反应的图示。

20 图 9 是使用纤丝载的 ECL 基的生物传感器进行葡萄糖-6-磷酸酯脱氢酶的 ECL 检测的图示。

图 10 是一种醇脱氢酶(ADH)基的 ECL 生物传感器的图示。

图 11 是固定在 Dynal M450 珠上(左)和固定在烷基纤丝上(右)的 ADH 基的生物传感器的图示。

25 图 12 是使用固定在珠上和纤丝上的一种酶生物传感器进行乙醇的 ECL 检测的图示。

图 13 是与通过二种不同方法制备的羧基纤丝和 PEG 改性的纤丝结合的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的测定图示。

本发明概述

在本发明最广泛的实施方案中，本发明在于与连接能被诱导发光的标记化合物的组分相连接的纳管。特别是，所述纳管为石墨纳管，所述发光是电致化学发光。在一个实施方案中，所述组分是酶生物传感器。

本发明也在于用于检测样品中存在的目标分析物的组合物，所述组合物包含：

(i) 具有一个官能团的石墨纳管，和

(ii) 一种与所述官能团相连的测定工作物质，所述测定工作物质能直接或间接地与分析物结合。

在一个实施方案中，与所述官能团结合的测定工作物又与分析物结合。所述组合物还包括与分析物相结合的第二种测定工作物，所述第二种测定工作物被连接到能被诱导发光的标记化合物上。

所述测定工作物至少含一种选自下列的物质：

(i) 加入的目标分析物或加入的所述分析物的类似物；

(ii) 一种所述分析物的结合配体或一种所述类似物的结合配体；和

(iii) 能与(i)或(ii)结合的一种活性组分。

所述物质(i)、(ii)或(iii)中的一种与具有能被诱导发光的化学部分的标记化合物相连接。

具体地说，本发明提供了以下技术方案：

1. 一种石墨纳管，所述石墨纳管连接了一种测定工作物质，该测定工作物质与电致化学发光标记相连。
2. 上述1的石墨纳管，其中所述电致化学发光标记含有稀土金属。
3. 上述1的石墨纳管，其中所述测定工作物质是一种酶生物传感器。
4. 上述1的石墨纳管，其中所述纳管含有石墨炭。
5. 上述1的石墨纳管，其中所述电致化学发光标记含有一种或

多种稀土金属或过渡金属。

6. 上述5的石墨纳管，其中所述电致化学发光标记包含一种或多种选自钷、铕、铽、镱、铈、钆、铟、钇、钼、铟、铊、铋、铜、铬或钨的金属。

7. 上述5的石墨纳管，其中所述电致化学发光标记包含选自钷、铕和铽的金属原子。

8. 上述1的石墨纳管，其中所述电致化学发光标记包含：

(a) 选自钷、铕和铽的金属原子；和

(b) 含氮的杂环芳族多齿金属配位体。

9. 上述1的石墨纳管，其中所述测定工作物质包含抗体。

10. 上述1的石墨纳管，其中所述测定工作物质包含抗体、蛋白质受体、抗生物素蛋白、抗生物素链菌素、蛋白质A、蛋白质G、生物素或核酸。

11. 上述1的石墨纳管，其中所述纳管是磁响应的。

12. 一种用于检测存在于样品中的目标分析物的组合物，该组合物包含：

(i) 含有一个官能团的石墨纳管，和

(ii) 一种与所述官能团相连的测定工作物质，所述测定工作物质能与分析物、具有与分析物相当的结合性的化合物或分析物的结合配体结合。

13. 上述12的组合物，其中所述测定工作物质与目标分析物结合。

14. 上述13的组合物，所述组合物还包含第二种结合到分析物上的测定工作物质，所述第二种测定工作物质被连接到电致化学发光标记上。

15. 上述12的组合物，其中所述测定工作物质能与分析物结合。

16. 上述14的组合物，其中所述电致化学发光标记包含一种或多种稀土金属或过渡金属。

17. 上述16的组合物，其中所述电致化学发光标记包含一种或

多种选自钌、铱、铕、铈、铊、铂、钨、钨、钨、钨、铜、铬或钨的金属。

18. 上述 17 的组合物, 其中所述电致化学发光标记包含选自钌、铱和铕的金属原子。

19. 上述 14 的组合物, 其中所述电致化学发光标记包含:

(c) 选自钌、铱和铕的金属原子; 和

(d) 含氮的杂环芳族多齿金属配位体。

20. 上述 12 的组合物, 其中所述测定工作物质包含抗体、蛋白质受体、抗生物素蛋白、抗生物素链菌素、蛋白质 A、蛋白质 G、生物素或核酸。

21. 上述 14 的组合物, 其中所述第二种测定工作物质选自:

a. 所述目标分析物的特定结合配体; 和

b. 加入的目标分析物或加入的具有与所述目标分析物相当的结合性的化合物, 其与所述目标分析物在结合到所述目标分析物的结合配体上存在竞争。

22. 上述 12 的组合物, 其中所述测定工作物质共价连接到所述官能团。

23. 上述 12 的组合物, 其中所述测定工作物质通过包含生物素-抗生物素链菌素相互作用的键合连接到所述纳管。

24. 一种用于对样品中存在的目标分析物进行结合测定的方法, 所述方法包括下列步骤:

(a) 形成一种组合物, 所述组合物包含:

(i) 所述样品,

(ii) 与能被诱导电致化学发光的标记化合物连接的第一种测定工作物质, 和

(iii) 许多结合到第二种测定工作物上的官能化石墨纳管;

(b) 培养所述组合物以形成一种包含石墨纳管和所述标记化合物的复合物;

(c) 在测量区收集所述复合物;

蛋白链菌素、蛋白质 A、蛋白质 G、生物素或核酸。

35. 上述 24 的方法，其中通过包含生物素-抗生蛋白链菌素相互作用的键合，所述第一种测定工作物质连接到所述标记化合物和/或所述第二种测定工作物质连接到所述纳管。

36. 上述 24 的方法，所述方法还包括使用磁场在电极表面收集所述纳管的步骤。

37. 上述 24 的方法，其中所述目标分析物是酶；所述测定工作物质和/或所述第二种测定工作物质包含为所述酶而设的底物。

38. 上述 37 的方法，其中所述酶将底物裂解从而将所述标记化合物由所述纳管释放和/或将所述测定工作物质由所述纳管释放。

39. 上述 24 的方法，其中所述纳管是磁响应的。

40. 一种用于对存在于样品中的目标分析物进行结合测定的方法，所述方法包括下列步骤：

(a) 形成一种组合物，所述组合物包含：

(i) 所述样品，

(ii) 与能被诱导电致化学发光的标记化合物连接的第一种测定工作物质，和

(iii) 许多结合到第二种生物活性测定工作物上的官能化纳管；

(b) 培养所述组合物以形成一种包含至少一个所述的许多个官能化纳管和所述标记化合物的复合物；

(c) 诱导在所述复合物中的标记化合物电致化学发光，和

(d) 测量所发的光，以测定或检测所述样品中目标分析物。

41. 上述 40 的方法，其中所述复合物在一电极表面被收集。

42. 一种在基于微粒结合测定中用作试剂的物质的组合物，所述组合物包含结合到一测定工作物上的官能化石墨纳管和至少一种另外的选自下列物质的组分：

(a) 电解质；

(b) 电致化学发光标记；

(c) 目标分析物或具有与所述目标分析物相当的结合性的化合物；

(d) 一种目标分析物或具有与所述目标分析物相当的结合性的化合物的结合配体;

(e) 一种能与(c)或(d)反应的活性组分;

(f) 一种还原剂; 和

(g) 一种电致化学发光反应增强剂;

但是其条件是在任何试剂组合物中所含的任何两种组分在贮存时均不会相互反应从而削弱其在所要进行的测定中的功能。

43. 上述 42 的组合物, 所述组合物包含磁响应石墨纳管。

44. 一种用于基于结合反应和电致化学发光现象的测量的测定方法中的测定试剂, 所述试剂包含:

(a) 一种电解质;

(b) 许多与第一种测定工作物结合的磁响应官能化石墨纳管;

和

(c) 与具有电致化学发光性的化学部分结合的第二种测定工作物。

45. 一种用于对存在于样品中的目标分析物进行测定的方法, 所述方法包括下列步骤:

(a) 形成一种组合物, 所述组合物包含:

(i) 所述样品, 和

(ii) 一种与一种组分结合的官能化石墨纳管, 所述组分本身与一种能被诱导电致化学发光的标记化合物结合, 其中所述组分是目标分析物的作用物;

(b) 在允许所述分析物解离所述组分的条件下培养所述组合物;

(c) 从所述组合物中分离所述石墨纳管;

(d) 诱导所述游离的标记化合物发光; 和

(e) 测量所发射的光, 以测定所述样品中目标分析物的存在。

46. 一种用于进行电致化学发光结合测定的测定试剂, 所述试剂包含在一个或多个容器中:

i. 连接到第一种测定工作物质的纳管; 和

ii. 连接到电致化学发光标记的第二种测定工作物质。

47. 上述 46 的测定试剂，其中所述电致化学发光标记包含一种或多种金属原子。

48. 上述 46 的测定试剂，其中所述电致化学发光标记包含稀土金属原子或过渡金属原子。

49. 上述 46 的测定试剂，其中所述电致化学发光标记包含选自钷、铽和铕的金属原子。

50. 上述 46 的测定试剂，其中所述电致化学发光标记包含：

i. 选自钷、铽和铕的金属原子；和

ii. 含氮的杂环芳族多齿金属配位体。

51. 上述 46 的测定试剂，其中所述第一种测定工作物质和/或所述第二种测定工作物质包含抗体、蛋白质受体、抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、蛋白质 A、蛋白质 G、生物素或核酸。

52. 上述 46 的测定试剂，其中通过包含生物素-抗生蛋白链菌素相互作用的键合，所述第一种测定工作物质连接到所述纳管和/或所述第二种测定工作物质连接到所述标记化合物。

53. 上述 46 的测定试剂，其中所述纳管是磁响应的。

54. 一种石墨纳管，所述石墨纳管连接到选自下列的至少两个组分：(i)电致化学发光标记；(ii)酶；和 (iii) 酶辅助因子。

55. 上述 54 的石墨纳管，其中所述纳管与酶生物传感器连接，其中所述酶生物传感器包括能被诱导电致化学发光的标记化合物。

广义而言，所述颗粒物是官能化纤丝，即其表面已与一种或多种物质反应或接触以提供供不同化学物质化学取代或物理吸附的活性部位的纤丝。

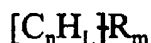
Macarthy 等人通过引用并入此文中的，1989 年 5 月 15 日提出的美国专利说明书 351967 中介绍了用于氧化碳纤丝表面的方法，它包括在足以氧化所述纤丝表面的反应条件(如时间、温度和压力)下，使纤丝与包括硫酸 (H_2SO_4) 和氯酸钾 ($KClO_3$) 在内的一种氧化剂接触。按照 McCarthy 等人的方法氧化的纤丝是不均匀氧化碳纤丝，就是说，碳原子

被羧基、醛、酮、酚和其它羰基的混合物取代。

也已有人用硝酸处理来将纤丝不均匀氧化。国际专利说明书 PCT/US 94/10168 公开了含各种官能团混合物的氧化纤丝的形成。 Hoogenvaad, M. S. 等人(在 Sixth International Conference on Scientific
5 Basis for the Preparation of Heterogeneous Catalysts, Brussels, Belgium, 1994 年, 9 月提交的文章 “Metal Catalysts supported on a Novel Carbon Support” 中)也发现在纤丝载的贵金属的制备中, 首先用硝酸
氧化纤丝表面是有利的。这种用酸的预处理在碳载贵金属催化剂的制备中是一标准步骤, 在这种碳的通常来源固定的情况下, 该步骤除了
10 将它官能化外也用来清洁不良材料的表面。

在发表的文献中, MaCarthy 和 Bening [Polymer Preprints ACS Div. of Polymer Chem. 30 (1) 420 (1990)]为了验证所述表面含有各种
氧化基团, 制备了氧化纤丝的衍生物。选择他们制备的化合物苯胺、
卤代芳香酯、亚铈盐等, 是因为其可分析性例如可被鲜艳地染色或展
15 现一些其它强而易鉴别和辨别的信号。

所述颗粒物优选是官能化纤丝, 它一般具有下列通式:



式中 n 是一个整数, L 是小于 0.1n 的一个数, m 是小于 0.5n 的一个
数,

20 每个 R 均相同并选自 SO₃H、COOH、NH₂、OH、CHO、
CN、COCl、卤代基、COSH、SH、COOR'、SR'、SiR₃'、
Si(OR')_yR'_{3-y}、Si(O-SiR₂')OR'、R''、Li、AlR₂'、Hg-X、TiZ₂ 和
Mg-X,

Y 是等于或小于 3 的一个整数,

25 R' 是烷基、芳基、环烷基或芳烷基,

R'' 是氟烷基、氟芳基、氟代环烷基、氟代芳烷基或环芳基,

X 是卤代基, 和

Z 是羧酸根或三氟乙酸根。

所述碳原子 C_n 是实际基本直径的实际圆筒型的、石墨纳管的表面碳原子。所述纳管包括具有大于 5 的长度与直径比和小于 0.5μ ，优选小于 0.1μ 的直径的那些纳管。所述纳管也可以是实际没有热解沉积碳的实际圆筒形的石墨纳管，更优选其特征在于在纤丝轴上具有延伸至至少两个纤丝直径距离的石墨层的凸出物的那些纳管和/或具有其 C-轴实际与其圆筒轴垂直的圆筒形石墨层的那些纳管。这些组合物是均匀的，其每个 R 均是相同的。

所述颗粒物也包括不均匀取代的纳管。它们包括下式的组合物：



式中 n、L、m、R 和所述纳管本身与上述定义相同，条件是每个 R 均不含氧或者如果各 R 是含氧基团，那末 COOH 不存在。

具有式 $[C_nH_L]R_m$ 的官能化纳管(式中 n、L、m、R 和 R' 与上述意义相同，所述碳原子是具有大于 5 的长度与直径比的鱼骨纤丝的表面碳原子)也包括作为本发明范围内的颗粒物。它们可被均匀或不均匀地取代。所述纳管最好没有热外涂层并具有小于 0.5μ 的直径。

本发明的颗粒物也包括具有下式的官能化纳管：



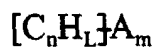
式中 n、L、m、R' 和 R 与上述意义相同。碳原子 C_n 是实际恒定直径的实际圆筒形石墨纳管的表面碳原子。所述纳管具有大于 5 的长度与直径比和小于 0.5μ ，优选小于 0.1μ 的直径。所述纳管可以是实际没有热解沉积碳的纳管。更优选所述纳管是在纤丝轴上石墨层的凸出物延伸至至少两个纤丝直径的距离的那些纳管和/或具有其 C-轴实际与其圆管轴垂直的圆筒石墨层的那些纳管。

在均匀和不均匀取代的两种纳管中，表面原子 C_n 被反应。大多数在一石墨纤丝表面层的碳原子与在石墨中的碳原子一样是底面碳原子。底面碳原子对化学浸蚀是相对惰性的。在缺陷部位，例如石墨面不能完全围绕纤丝延伸之处，存在着类似于石墨面的边缘碳原子的

碳原子(参见 Urry, Elementary Equilibrium Chemistry of Carbon, Wiley, New York 1989, 有关边缘原子和底面原子的讨论)。

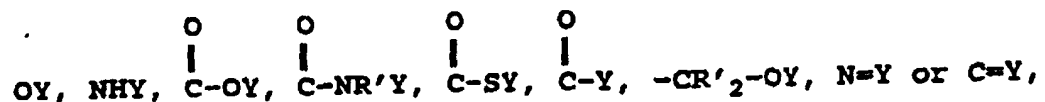
在缺陷部位, 所述纳管下部、内层的边缘或底面碳可能会被暴露。术语表面碳包括纳管最外层所有的底面碳和边缘碳和可能在最外层的缺陷部位暴露的下层的底面碳和/或边缘碳。边缘碳是活性的, 必须包含某个杂原子或基团以满足碳价。

上述取代的纳管可有利的进一步官能化。这种组合物包括下式的组合物:



式中碳是纳管的表面碳, n 、 L 和 m 与上述定义相同,

A 选自:



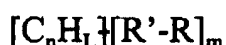
Y 是一种蛋白质、一种肽、一种酶、一种抗体、一种核苷酸、一种低聚核苷酸、一种抗原或一种酶底物、一种酶抑制剂或一种酶底物的过渡态类似物的一个适合的官能团或选自: $R'-OH$, $R'-NH_2$, $R'SH$, $R'CHO$, $R'CN$, $R'X$, $R'SiR'_3$, $R'Si(OR')_yR'_{3-y}$, $R'Si(O-SiR'_2)_2OR'$, $R'-R''$, $R'-N-CO$, $(C_2H_4O)_wH$, $(C_3H_6O)_wH$, $(C_2H_4O)_w-R'$, $(C_3H_6O)_w-R'$ 和 R' , 和

20

W 是大于 1 小于 200 的一个整数。

碳原子 C_n 是实际恒定直径的实际圆筒形的石墨纳管的表面碳。所述纳管包括具有大于 5 的长度与直径比和小于 0.1μ , 优选小于 0.05μ 的直径的纳管。所述纳管也可以是实际没有热解沉积碳的实际圆筒形的石墨纳管。更优选它们具有的特征为具有延伸至至少两个纤维直径的距离的在所述纤维轴上的石墨层的凸出物和/或它们包含其 C-轴实际与其圆筒轴垂直的圆筒形石墨层。所述纳管最好没有热外涂层并且具有小于 0.5μ 的直径。

结构如下的官能纳管:

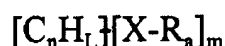


也可官能化而形成具有下式的组合物:



- 5 式中 n 、 L 、 m 、 R' 和 A 与上述定义相同。碳原子 C_n 是实际恒定直径的实际圆筒形石墨纳管的表面碳。所述纳管包括具有大于 5 的长度与直径比和小于 0.5μ ，优选小于 0.1μ 的直径的纳管。所述纳管也可以是实际没有热解沉积碳的实际圆筒形的石墨纳管。更优选它们的特征为具有在纤丝轴上延伸至至少两个纤丝直径的距离的石墨层凸出物的和/或具有其 C - 轴实际与其圆筒轴垂直的圆筒形石墨层。所述纳管
- 10 优选没有热外涂层并具有小于 0.5μ 的直径。

本发明的颗粒物也包括上面吸附了某些环状化合物的纳管。它们包括下式物质的组合物:

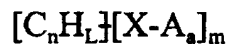


- 15 式中 n 是一个整数， L 是小于 $0.1n$ 的一个数， m 是小于 $0.5n$ 的一个数， a 是 0 或小于 10 的一个数， X 是一多环芳香部分、多元杂环芳香部分或金属多元杂环芳香部分， R 与上述定义相同。碳原子 C_n 是实际恒定直径的实际圆筒形石墨纳管的表面碳。所述纳管包括具有大于 5 的长度与直径比和小于 0.5μ ，优选小于 0.1μ 的直径的纳管。所述纳管也可以是实际没有热解沉积碳的实际圆筒形的石墨纳管，更优选特征为具有在所述纤丝轴上处延伸至至少两个纤丝直径的石墨层凸出物的纳管和/或具有其 C - 轴实际与其圆筒轴垂直的圆筒形石墨层的纳管。所述纳管优选没有热外涂层并具有小于 0.5μ 的直径。
- 20

- 优选的环状化合物是 Cotton 和 Wilkinson (Advanced Organic Chemistry 76 页)所述的平面大环化合物。更优选的吸附用的环状化合物是卟啉类和酞菁类。
- 25

所吸附的环状化合物可被官能化。这种组合物包括下式的化合

物:



式中 m、n、L、a、X 和 A 与上面定义相同，所述碳是如上所述的实际圆筒形的石墨纳管的表面碳原子。

- 5 如上所述官能化的碳纤丝可被掺入基质中。最好，所述基质是一种有机聚合物(如一种热固性树脂诸如环氧树脂、双马来酰亚胺树脂、聚酰胺树脂或聚酯树脂；一种热塑性树脂；一种反应注塑树脂；或一种高弹体诸如天然橡胶、苯乙烯-丁二烯橡胶或顺-1,4-聚丁二烯)；一种无机聚合物(例如一种聚合的无机氧化物诸如玻璃)、一种金属(例如铅或铜)
- 10 或一种陶瓷材料(例如卜特兰水泥)。

- 没有被具体理论束缚，因为其改良的表面性质更易与所述聚合物一致或因为经改性的官能团(特别是羟基或胺基)作为端基直接与所述聚合物键合，经官能化的纤丝更好地分散于聚合物体系中。这样，聚合物体系诸如聚碳酸酯、聚氨酯、聚酯或聚酰胺/酰亚胺直接与所述纤
- 15 丝键合使得纤丝更易分散并具改良的粘合性。

- 通过将碳纤丝与一强氧化剂接触足以使所述纤丝表面氧化的时间以及将所述纤丝进一步与适合将一官能团加到经氧化的表面上的反应剂接触而将官能团引到碳纤丝的表面。所述氧化剂优选由在强酸中的一种碱金属氯酸盐的溶液组成。在另外的实施方案中，所述碱金属
- 20 氯酸盐是氯酸钠或氯酸钾。在优选的实施方案中，所用的强酸是硫酸。足够达到氧化的时间是约 0.5-约 24 小时。

- 通过将碳纤丝与一种氧化剂接触足以使所述碳纤丝表面氧化的时间，以将表面氧化的碳纤丝与适合将一官能团加到所述碳纤丝表面上的反应剂接触，并进一步将表面官能化的纤丝与有效产生碳纤丝网的交联剂接触，产生碳纤丝网。优选的交联剂是一种多元醇、多胺或
- 25 多元羧酸。

所述官能化纤丝也可以是刚性的纤丝网形式。例如，一种良好分散的、酸官能化纤丝的三维网可通过将酸基(纤丝内的)与多元醇或多

胺交联形成一刚性网来稳定。

所述纤丝颗粒也包括通过联接本发明的官能化纤丝形成的三维网。这些配合物包括至少两种通过一种或多种包括一个直接键或化学部分的联接剂连接的官能化纤丝。这些网包括相当均匀相等孔径的多孔介质。

尽管这些纤丝间的间隙在大小及形状上均是不规则的，但它们可被看作孔并通过用来检定多孔介质的方法来检定。在这种网中间隙的大小可通过纤丝的浓度和分散水平以及交联剂的浓度和链长来控制。

包括所述颗粒物的配合物可在例如一种电极表面上收集，其中它通过在该电极上施加一个电压被激发和诱导电致化学发光。尽管本发明优选通过在测定区即可导致发光的表面上收集配合物来进行，但本发明也包括其中所述配合物被收集于测量区并在该区进行后面的处理或采取其它步骤来诱导和测量发光的方法。

所述配合物的收集可通过几种不同的方法进行，包括重力沉降、过滤、离心和构成配合物一部分的磁响应颗粒物的磁吸引。所述几种实施方案在下面进一步详细叙述。

本发明也在于进行样品中存在的目标分析物结合分析的方法，包括下列步骤：

(a) 形成一种组合物，它包含：

(i) 所述样品，

(ii) 含有一种与能被诱导发光的一种标记化合物连接的组分的一种测定工作物质，和

(iii) 许多结合到测定工作物上的官能化石墨纳管；

(b) 培养所述组合物以形成一种包含所述官能化石墨纳管和所述标记化合物的复合物；

(c) 在测定区收集所述复合物；

(d) 通过表面选择激发，诱导所述复合物中的标记化合物发光，

和

(e) 测量所发的光, 以测定样品中目标分析物的存在。

具体地说, 在诱导发光和测量所述发光的装置的表面收集所述配合物。

5 本发明方法有利地以电致化学发光的测量为基础, 其中所述配合物在电极表面收集。

本发明也在于以在一电极表面电致化学发光的测量为基础的进行样品中存在的目标分析物的结合分析的方法, 包括下列步骤:

(a) 形成一种组合物, 包含:

(i) 所述样品,

10 (ii) 含有一种与能被诱导电致化学发光的标记化合物相连接的组分的一种测定工作物质, 和

(iii) 许多结合到一种测定工作物上的官能化石墨纳管;

(b) 培养所述组合物以形成一种包含所述官能化石墨纳管和所述标记化合物的复合物;

15 (c) 收集所述复合物;

(d) 使所述收集的复合物与一种电极表面接触并通过在所述电极上施加电压诱导在所述复合物中的标记化合物发光, 和

(e) 测量在电极表面所发的光, 以测定样品中目标分析物的存在。

20 本发明还在于以在一种电极表面电致化学发光的测量为基础的进行在样品中存在的目标分析物的结合分析的一种方法, 包括下列步骤:

(a) 形成一种组合物, 包含:

(i) 所述样品,

25 (ii) 含有一种与能被诱导电致化学发光的一种标记化合物相连接的组分的一种测定工作物质, 和

(iii) 许多结合到一种测定工作物上的、磁响应、悬浮、官能化的石墨纳管;

(b) 培养所述组合物, 以形成一种包含石墨纳管和所述标记化合物的复合物;

(c) 通过在所述石墨纳管上施加一个磁场来收集所述复合物;

5 (d) 使所述收集的复合物与一种电极表面接触并通过在所述电极上施加电压来诱导在所述复合物中的标记化合物发光; 和

(e) 测量在电极表面所发的光, 以测量样品中目标分析物的存在。

所述磁场的施加引起所述配合物在所述电极的表面收集。

10 此外, 本发明在于基于微粒的结合分析中用作试剂物质的组合物, 它包含官能化石墨纳管和至少一种选自下列物质的其它组分:

(a) 电解质;

(b) 含 ECL 部分的标记化合物;

(c) 目标分析物或所述目标分析物的类似物;

(d) 一种目标分析物的结合配体或其类似物;

15 (e) 一种能与(c)或(d)反应的活性组分;

(f) 一种还原剂; 和

(g) 一种电致化学发光反应增强剂; 但是其条件是在任何试剂组合物中所含的任何二种组分在贮存时均不会相互反应而削弱其在所要进行的测定中的功能。

20 所述试剂可包含磁响应石墨纳管。

本发明也在于用于基于结合反应的测定和电致化学发光现象的测量的一种测定试剂, 包含:

(a) 一种电解质;

(b) 许多具有与测定工作物结合表面的磁响应官能化石墨纳管;

25 和

(c) 一种具有结合性的标记物, 所述标记物包含具有电致化学发光性质的化学部分。

本发明还在于进行样品中存的目标分析物测定的方法, 包括下列

步骤:

(a) 形成一种组合物, 包含:

(i) 所述样品, 和

5 (ii) 一种连接到一种与能被诱导发光的标记化合物相连接的测定组分上的官能化石墨纳管, 其中所述组分是一种目标分析物的作用物;

(b) 在允许所述分析物解离所述组分的条件下培养所述组合物;

(c) 从所述组合物中分离所述官能化石墨纳管;

(d) 诱导所述标记化合物发光; 和

10 (e) 测量所发的光, 以测定样品中目标分析物的存在。

尽管可进行分批测定, 然而在流动池中可进行连续或半连续测定。在流动池中, 所述固相保留在测量池中, 而溶液则流过并流出所述池。如果固相(如颗粒物)比水稠密即具有比水大的密度(大于
1.0g/ml), 那么颗粒物上的重力使得其落到所述池的底部。所述池可建
15 成当流体流过所述池时, 颗粒物将沉降到其底部的形式, 所述池也可建成大部分样品被容纳在 ECL 系统的工作电极上方一柱形室的所述池中的形式。在池中必须有足够的停留时间以便使颗粒物在被诱导 ECL 前沉降到所述电极表面上。

在本发明的另一实施方案中, 含密度大于测定组合物中其余物质的悬浮纤丝的测定组合物可进行离心, 以便将所述颗粒物转移到测量
20 区并随后在那里与例如诱导电致化学发光的电极接触, 或者在所述离心步骤中直接使其与电极接触。

在该实施方案中, 测量池配有快速转动样品和样品容器的装置。离心力使样品中的纤丝从样品容器的转动轴向外移动并在样品容器的
25 外表面上收集。这种样品容器的外表面可构成 ECL 测量系统的工作电极。

在第三种实施方案中, 所述纤丝可通过过滤从所述测定组合物移出。在这种实施方案中, 所述颗粒物不需要具有大于测定组合物中其

它成分的密度。所述纤丝通过将溶液抽过过滤器(如泵送通过过滤器)并在过滤器表面收集所述颗粒物来从溶液中分离并浓缩。该过滤器表面被例如涂以一薄的金属膜,它可在 ECL 检测系统中作为工作电极。

5 在另一实施方案中,悬浮的纤丝是磁响应的,例如它们可以是顺磁的或铁磁的,并且在测量区被收集或者优选地通过在所述颗粒物上加一个磁场而直接在一种电极表面上收集。测量池装有磁铁。当颗粒物停留在配料池中或流过流动池时,磁铁的磁场在其上施加磁力而使它们与大部分溶液分离而到达离磁铁最近处的池表面上。如果磁铁以适当取向放置并置于靠近 ECL 检测系统工作电极处,所述颗粒物将会
10 浓缩在该工作电极的表面上。

几种不同的多相和均相方式的结合测定可使用在一电极表面收集和浓缩所述配合物的上述方法来完成。在一多相结合分析中,所述配合物在测量标记物的发光前从组合物中分离出来。在均相分析中,没有进行结合(到固相物质)和未结合的标记试剂的分离。

15 在均相测定中,当所述配合物浓缩在工作电极的表面时,测得的标记物的信号比没有一收集步骤的情况下大得多。相反,未配合的标记试剂的信号则是不变的。因此,尽管在测量池中未配合标记试剂的存在,来自收集的配合物的信号比没有配合物收集步骤的测定中的信号强。收集处理的结果是所述结合分析的检测限得到了很大改善。

20 在本发明的一个优选的实施方案中,均相结合测定过程包括了就地分离的步骤。在测定组合物即样品、测定工作物和颗粒物已被泵入测定池中并且所述配合物已被捕获在工作电极上后,一没有标记物或标记试剂的第二种流体被泵入通过所述池,依此进行就地洗涤或从测定组合物的未结合组分中分离配合物。这种测定方法技术上是多相结合测定。然而,这种在测定池内进行分离的能力是有益的,它不需要
25 另外的分离装置并且该过程一般比外部分离方法快得多。

本发明的多相结合测定通过将所述测定组合物的各组分加以混合并让它们反应预定的时间来进行。然后将所述测定组合物进行将溶

液与颗粒物分离的分离步骤。然后测量所述配合物或溶液的电致化学发光。在浓缩步骤后测量所述配合物的 ECL，使分析物的测量比没有浓缩时的情况具更好的准确性和更低的检测限。

5

代表实施例

在本发明的一个代表性实施例中，官能化的纤丝与抗生素蛋白(一种测定工作物)进一步反应，以制备其用于 ECL 测定。然后将如此改性的纤丝与生物素标记(biotinylated)的低聚核苷酸(测定工作物)反应形成用于一 DNA 探查测定的纤丝-抗生素蛋白-生物素-低聚核苷酸配合物。在作为所述标记有 ECL 部分的目标分析物补充的第二种低聚核苷酸的存在下，所述配合物可作为在夹合测定中为所述探针补充的低聚核苷酸目标分析物的探针。

10

本发明的详述

从下面特定优选实施方案的说明，可更清楚和全面地理解本发明和其其它目标和特征。

15

本发明可广泛应用于能参与结合反应的目标分析物。这些反应包括例如抗原-抗体、配位体受体、DNA 和 RNA 相互作用和其它已知的反应。本发明涉及定性和定量检测多组分样品中这类目标分析物存在的不同方法和测定。

20

样品

可能包含可以为固体、乳液、悬浮液、液体或气体形式的目标分析物的样品可以来自例如细胞和细胞衍生的产物、水、食品、血、血清、毛发、汗、尿、粪便、组织、唾液、油、有机溶剂或空气。所述样品还可以包括例如水、乙腈、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、正甲基吡咯烷酮或醇类或其混合物。

25

分析物

典型的分析物是样品中存在的完整细胞或表面抗原、亚细胞粒子、病毒、普利翁蛋白、类病毒、抗体、抗原、半抗原、脂肪酸、核酸、蛋白质、脂蛋白、多糖、脂多糖、糖蛋白、肽、多肽、细胞代谢物、激素、药剂、合成有机分子、有机金属分子、安定药、巴比妥酸盐、生物碱、甾族化合物、维生素、氨基酸、糖、植物血凝素、重组体或衍生蛋白、生物素、抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素或无机分子。一般来说，目标分析物的存在浓度为 10^{-3} 摩尔或以下，例如低至 10^{-12} 摩尔或更低。

测定工作物

与含目标分析物的样品混合的目标工作物包含至少一种选自下列物质的目标分析物：(i)加入的如上定义的目标分析物或其类似物，(ii)目标分析物或其所述类似物的结合配体，和(iii)一种能与(i)或(ii)结合的如上定义的活性组分，其中所述物质之一与化合物或部分如能被诱导发光的 ECL 部分相连接。标记物可以是完整细胞或表面抗原、亚细胞粒子、病毒、普利翁蛋白、类病毒、抗体、抗原、半抗原、脂质、脂肪酸、核酸、多糖、蛋白质、脂蛋白、脂多糖、糖蛋白、肽、多肽、细胞代谢物、激素、药剂、安定药、巴比妥酸盐、生物碱、甾族化合物、维生素、氨基酸、糖、非生物聚合物(优选可溶的)、植物血凝素、重组体或衍生蛋白、合成有机分子、有机金属分子、无机分子、生物素、抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素。在一个实施方案中，所述试剂是一种与抗体、抗原、核酸、半抗原、小核苷酸序列、低聚物、配位体、酶或生物素、抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、蛋白质 A、蛋白质 G 或其配合物或能通过蛋白质相互作用与初级结合配体结合的另一个二级结合配体结合的电致化学发光部分。

可以是天然也可以是合成的目标分析物的类似物一般是具有与上述分析物一致的结合性的化合物，但也可以是更高或更低结合能力

的化合物。能与分析物或其类似物和/或与其结合配体结合并通过它所述 ECL 部分可与分析物相连的活性组分合适为第二种抗体或蛋白质诸如蛋白质 A 或蛋白质 G 或抗生物素蛋白或生物素或本领域已知的参与结合反应的另一组分。

5

标记物

有利情况下，所述 ECL 部分是金属螯合物。适合的所述螯合物的金属是任何在被加在所述反应体系的电化学条件下会发光的金属螯合物的金属。这种金属螯合物的金属是例如过渡金属(诸如 d-段过渡金属)或稀土金属。所述金属优选钌、铱、铈、铈、铈、铈、铂、铟、钇、钼、铟、铜、铬或钨。特别优选的是钌和铱。

10

在这种螯合物中与金属相连的配位体事实上通常是杂环或有机物，它们决定着金属螯合物是否可溶于含水环境或可溶于有机或其它非水环境中。所述配位体可以是多齿的，并且可以被取代。多齿配位体包括芳族配位体和脂族配位体。适合的芳族多齿配位体包括芳族杂环配位体。优选的芳族杂环配位体是含氮基诸如像联吡啶、联吡嗪 (bipyrazyl)、三联吡啶和菲酚基。适合的取代基包括例如烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、取代芳烷基、羧酸酯、醛、甲酰胺、氰基、氨基、羟基、亚氨基、羧基羰基、氨基羰基、脒、胍盐、酰脲、含硫基、含磷基和 N-羟基琥珀酰亚胺的羧酸酯。所述螯合物可具有一个或多个单齿配位体，各种这类配位体是为本领域人员所熟知的。适合的单齿配位体包括例如一氧化碳、氰化物、异氰化物、卤化物和脂族、芳族和杂环的膦、胺、芪和胂。

15

20

适合的螯合物的例子有双[(4, 4'-甲酯基)-2, 2'-联吡啶]-2-[3-(4-甲基-2, 2'-联吡啶-4-基)丙基]-1, 3-二氧戊环钌(II); 双(2, 2'-联吡啶)[4-(丁-1-醛)-4'-甲基-2, 2'-联吡啶]钌(II); 双(2, 2'-联吡啶)[4-(4'-甲基-2, 2'-联吡啶-4'-基)-丁酸]钌(II); 三(2, 2'-联吡啶)钌(II); (2, 2'-联吡啶)[双-双(1, 2-二苯膦基)亚乙基]2-[3-(4-甲基-2, 2'-联吡啶-4'-基)丙基]-1, 3-二

25

氧戊环钡(II); 双(2,2'-联吡啶)[4-(4'-甲基-2,2'-联吡啶)丁胺]钇(II); 双(2,2'-联吡啶)[1-溴-4-(4'-甲基-2,2'-联吡啶-4-基)丁烷]钇(II); 双(2,2'-双吡啶)马来酰亚氨基乙酸, 4-甲基-2,2'-联吡啶-4'-丁酰胺钇(II)。其它 ECL 部分参见共同转让的 PCT 公开的专利说明书 US 87/00987 和 PCT 公开的专利说明书 88/0394 中的说明。

ECL 部分的功能是作为将电化学能导入反应体系中的结果发出电磁辐射。为做到这一点, 它们必须能被激到一个激发的能态并且一旦从该激发态下降也能发出电磁辐射如光的光子。尽管不希望被 ECL 部分参与电致化学发光反应的机制的理论分析所束缚, 我们相信通过将电化学能引入到反应体系中, 它被氧化, 然后通过与体系中存在的还原剂的相互作用而转变成激发态, 这种状态是较不稳定的, 所述金属螯合物很快回落到更稳定的状态。在该过程中, 所述螯合物放出可检测的电磁辐射如光的光子。

按照本发明掺入的金属螯合物或其它含金属的 ECL 部分的量在体系与体系间各不相同的。一般来说, 所用的这部分的量是可有效地导致一种可测量及(如需要)可定量的来自前述组合物或体系的电磁能发射的量。目标分析物的检测和/或定量一般通过将来自一含目标分析物的样品和 ECL 部分的发光与用已知量的目标分析物和 ECL 部分配制的校准标准物发出的光进行比较来进行。该假定是均相形式。在多相方式下, 在 ECL 分析前先进行前面讨论的分离。

正如本领域普通技术人员均能意识到的, 含金属 ECL 部分的同一性和含量将根据所采用主要条件体系与体系间各不相同。获得所需结果所合适的含金属 ECL 部分和其足够的用量可由具有本发明知识的本领域技术人员按经验决定而不用过多的实验。

石墨纳管

所述纳管可作为以各种几种形态包括分散、聚集、簇或膜形式的一种固体载体与较大的载体包括珠粒结合来用于分析中或与另一种材

料混合，作为复合物如多孔柱中使用。纳管主要由可化学改性的石墨碳组成。它们一般具有不大于 $0.1\mu\text{m}$ 的直径和至少5的长度与直径比率。一般来说，它们具有 $0.01\mu\text{m}$ 的直径和 $1-10\mu\text{m}$ 的长度。

5 官能化纳管

有利地，所述纤丝是官能化纤丝，即其表面被均匀或不均匀改性而具有与其结合的官能化学部分的纤丝。所述纤丝表面可通过与氧化介质或其它化学介质反应而被官能化。所述纤丝表面可通过化学反应或通过本身具有化学活性的物质的物理吸附来均匀改性。所述纤丝表面可例如通过氧化改性并通过与其它官能团反应进一步改性。所述纤丝表面可用一系列官能团改性，从而使纤丝可在各种包括电致化学发光测定中的结合组分的底物中的化学基团起化学反应或与化学基团物理结合。

15 纤丝的配合物结构可通过一系列化学连接剂使纤丝上的官能团相互连接来获得。

介绍用于纤丝表面的化学改性方法和用在纤丝表面上物理吸附物质的方法，以便在各情况下提供与纤丝表面结合的官能部分。

结合于测定工作物的官能化纳管

20 官能化纤丝可与各种生物分子反应以备其用于ECL测定中。各种测定工作物如抗体、受体或其它结合部分可与官能化纤丝反应以备其用于ECL测定中。

颗粒物

25 石墨纳管可共价或非共价结合到较大的固相物如颗粒物上。

所述颗粒物有利地包括具有 $0.05-200\mu\text{m}$ ，优选 $0.1-100\mu\text{m}$ ，最优选 $0.5-10\mu\text{m}$ 的微粒物质和一种能与分析物和/或一种或多种上面子段(b)(i)、(b)(ii)或(b)(iii)中定义的其他物质结合的表面组分。例如，所

述微粒物可以是交联淀粉、糊精、纤维素、蛋白质、有机聚合物、苯乙烯共聚物诸如苯乙烯/丁二烯共聚物、丙烯腈/丁二烯/苯乙烯共聚物、乙烯乙酰基丙烯酸酯共聚物或氯乙烯/丙烯酸酯共聚物、惰性无机颗粒物、二氧化铬、铁的氧化物、二氧化硅、二氧化硅混合物和蛋白质或其混合物。所述颗粒物需要悬浮在 ECL 体系中。

测定介质

为了运作其中电极导入电化学能的体系，需要提供电极浸入其中并含有 ECL 部分的电解质。电解质是一个相，通过它电荷载于离子上。一般来说，所述电解质是液相的，它是一种或多种盐或其它物质在水中的溶液、一种有机液体或有机液体的混合物或水与一种或多种有机液体的混合物。但是，其它形式的电解质也可用于某些本发明的实施方案中。例如，所述电解质可以是一种或多种物质在一种流体如液体、气体或超临界流体中的分散体或可以是一种或多种物质在固体、气体或超临界流体中的溶液。

适用的电解质是一种盐在水中的溶液。所述盐优选钠盐或钾盐，但是混入其它阳离子也适用于某些实施方案中，只要所述阳离子不干扰电致化学发光相互作用顺序即可。所述盐的阴离子，可以是例如磷酸根，但是在本发明的某些实施方案中也允许使用其它阴离子，只要所选阴离子不干扰电致化学发光相互作用顺序即可。

所述组合物也可以是非水的。尽管在某些时候，可有利地使用超临界流体，但更常规的是在一种非水组合物中使用包含有机液体的电解质。正像含水电解质一样，非水电解质也是通过它，电荷载于离子上的一个相。正常情况下，这意味着一种盐被溶解于有机液体介质中。适用的有机液体的例子有乙腈、二甲基亚砷(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、甲醇、乙醇和二种或多种前述物质的混合物。要说明的是，可溶于有机液体的四烷基铵盐诸如四丁基铵四氟硼酸盐可与它们一起使用以形成无水电解质。

在某些本发明的实施方案中，所述电解质是一缓冲体系。磷酸盐缓冲液通常是有益的。例子有磷酸钠/氯化钠的水溶液和磷酸钠/氯化钠的水溶液。

5 其它测定组分

正如共同转让的名为“利用胺衍生的还原剂的电致化学发光反应”的 PCT 公开的专利说明书 US 89/04859(其公开的内容通过引用并入此文中)所说明的那样，有必要包括还原剂，一般是一种胺或(一个较大分子的)胺部分，它被氧化并能自动分解将其转变成一种高度还原的物质。据信所述胺或胺部分也被导入反应体系的电学能氧化。10 所述胺或胺部分失去一个电子，然后脱质子化或自身重排成为一强还原剂。该试剂与含氧化金属的 ECL 部分相互作用使它处于上面讨论的激发态。为了发挥其作用，所述胺或胺部分优选具有带能给出的电子的碳中心基和可然后作为为形成所述还原剂的脱质作用期间质子给体的 α 碳。胺衍生的还原剂提供了将含金属 ECL 部分转变到其激发态所15 需的激发，由此发射出可测的电磁辐射。

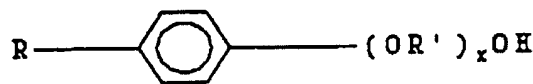
在本发明的实施中可使用很宽范围的胺和相应的胺部分。一般来说，要选择胺或胺部分以适合进行电致化学发光分析的体系的 pH 要求。另一相关的因素是所述胺或胺部分应能适应于分析时其应发挥作20 用的环境，即适应于事实上可能的有水或非水环境。另一个考虑是所选的胺或胺部分应在普通条件下形成足以还原体系中氧化的含金属 ECL 部分的胺衍生还原剂。

在本发明中有利地使用的胺(和源于其的相应部分)是脂族胺诸如伯、仲和叔烷基胺，各胺的烷基具有一至三个碳原子，所述胺还包括25 取代脂族胺。三丙胺是一种特别优选的胺，它导致相对来说电磁辐射的特别高强度发射，这增强了所用实施方案中检测和定量的灵敏度和准确性。适用的还有二胺诸如胍和多胺诸如聚(乙烯亚胺)。适用于本发明实施的其它胺的例子有三乙醇胺、三乙胺、1,4-二氮杂双环-

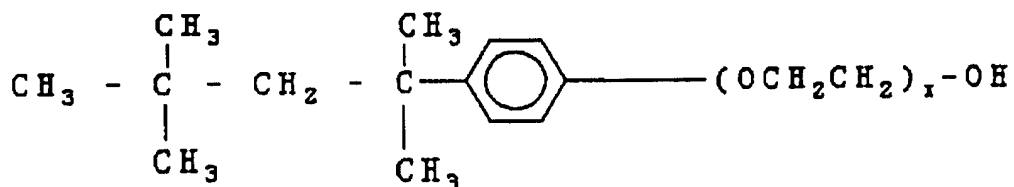
(2,2,2)-辛烷、1-哌啶乙醇、1,4-哌嗪-双-(乙烷磺酸)、三异丙胺和聚(乙烯亚胺)。

一般来说，本发明所用的含金属 ECL 部分是限制反应成分，因此，一般所述胺或胺部分也相应地以化学计量过量提供。例如，所述胺或胺部分的使用浓度为 50 - 150mM。在约 7 的 pH 下使用时，100mM 的浓度通常是有益的。在某些实施方案中，胺或胺部分浓度的上限由胺或胺部分在所采用的环境如水中的最大溶解度来决定。一般来说，胺或胺部分的用量是足以使氧化的含金属 ECL 部分转变到其激发态而导致发光的量。具有本文所述知识的本领域技术人员不用过多实验就可根据经验来确定有利地用于具体待分析体系的胺或胺部分的用量。

正如名为“增强的电致化学发光反应”的共同转上的 PCT 公开的专利说明书 US 89/04915(其内容通过引用并入此文中)中所述的，本发明的测定需要在一种增强剂的存在下进行，所述增强剂一般是下式的化合物。



式中 R 是氢或 C_nH_{n+1} ，R' 是 C_nH_{2n} ，X 为 0 至 70，n 为 1 至 20。特别是，n 为 1 至 4。具体实例有以商品名 Triton X-100 的可购买得到的下式的一种物质：



式中 X 是 9 - 10，和商品名为 Triton N-401(NPE-40)可购买到的下式的一种物质：



5 式中 X 是 40。一般所用的增强剂的量是足以在电磁辐射的发射中带来所需提高的量。一般来说，所述量是 0.01-5.0%，更具体地说是 0.1-1.0%(v/v)。该说明书的主题内容通过引用并入此文中。

按照本发明掺入的 ECL 部分通过被激发至激发态而被诱导发出电磁辐射。这通过将掺入了 ECL 部分的体系施加电化学能来完成。发生 ECL 部分和构成强还原剂的物质的氧化的电势取决于其实际化学结构以及其它因素诸如体系的 pH 和用于引入电化学能的电极的性质。本领域普通技术人员熟知如何确定一电致化学发光体系的最佳电势和发射波长。激发所述 ECL 体系的某些优选方法公开于共同转上的 PCT 公开的专利说明书 US 89/01814 中，该专利内容通过引用并入此文中。

测量电致化学发光的装置

进行本发明的测定的装置说明于图 1 和图 2 中。图 1 公开了一种有益的 ECL 装置，但是本发明方法并不限于在装置 10 中的应用，而可在其它类型的 ECL 装置中使用，这些装置包括一工作电极或提供电化学能以触发 ECL 部分电致化学发光的其它触发表面。尽管本发明方法可以以静态方式或流通态方式进行，但装置 10 包括一流通池，对包括结合测定样品在内的许多类型的样品来说，它提供了独特的优越性。进行本发明的 ECL 测定的装置的进一步细节可参见共同转让的公开的 PCT 专利说明书 US 89/04854 以及 US 90/01370 中。

装置 10 包括一电化学池 12、一光检测/测量装置 14(它可有利地是一光电倍增管(PMT)、光电二极管、电荷耦合器件、照相软片或照相乳剂等)和一个泵 16(它有利地为一蠕动泵，用以将流体送进、送过

和送出池 12)。或者，也可使用一排代泵。在池 12 和 PMT14 间配置了一闸开关 18，它可以可控制地运作，只在 ECL 测量时打开使 PMT14 接受池 12 的光。所述闸开关也可例如在维护时关闭。装置 10 还包括没在图 1 中标出的遮光罩，以将各组件置于其中并在 ECL 测量时阻隔 PMT14 接收外来光。

池 12 本身包括第一个固定部件 20，一进口管 22 和一出口管 24 通过其中，其可有利地用不锈钢制成。固定部件 20 具有第一外表面 26 和限定池 12 的储样区 30 一侧面的第二内表面 28，其中池 12 在装置 10 的相应运作时存有清洗溶液和/或调节溶液和/或测量溶液。进口管 22 和出口管 24 从外表面 26 到内表面 28 通过固定部件 20 并且开口到储样区 30。有利地由不锈钢制成的第二固定部件 32 也具有第一外表面 34 和第二内表面 36。第二固定部件 32 通过有利地由聚四氟乙烯或其它非污染性材料制成的环性隔板 38 与第一固定部件 20 隔开。这样，固定部件 30 的外表面 34 限定了储样区 30 的第二侧面的一部分。隔板 38 具有一外部分 40 和一中心孔 42，中心孔内缘 44 限定了储样区 30 的侧壁。外部分 40 封住了第一固定部件 20 的内表面 28 与第二固定部件 32 的外表面 34 的联系以防止溶液从所述两表面 28、34 之间的储样区 30 流出。固定部件 32 还具有一中心孔 46，其中一窗口 48 作为外表面 34 的一连续部分被密封安装以限定储样区 30 第二侧面的其余部分。窗口 48 由基本完全透过 ECL 部分发出的电致化学发光波长的材料构成。因此窗口 48 有利地由玻璃、塑料、石英等制成。

进口管 22 在其邻近于隔板 38 的第一端 50 处与储样区 30 相交，出口管 24 在其邻近于隔板 38 的第二端 52 处与储样区 30 相交。由此，进口管 22、储样区 30 和出口管 24 的组合提供了进入、通过和排出池 12 的窄的基本为溶液层流的连续流动通道。

装在第一固定部件 20 的内表面 28 上的是一个工作电极系统 54，在所述实施方案中，它包括第一和第二工作电极 56 和 58。在另一实施方案中，单个工作电极可被有利地提供，或者只有电极 56 可以是工

作电极。工作电极 56、58 位于可发生目标电化学反应和 ECL 反应之处。工作电极 56、58 是固体伏安电极，因此可有利地用铂、金、碳或其它可有效地用于此目的的材料制成，分别与工作电极 56、58 相连的连接器 60、62 通过第一固定部件 20 通出。

5 连接器 60、62 两者均连接到第一个在图 2 中所示的电压控制器 66 的“工作电极”端 64 上。电压控制器 66 有利地以恒电位器的方式操作以将电压信号提供到工作电极 56、58 上并可任选地在 ECL 测量期间测量来自其的电流。或者，连接器 60、62 可与电压控制器各自单独的端点相连以进行单独运作。

10 电压控制器 66 的恒电位器操作进一步通过一个反电极 68 和可任选但有利的一个参比电极 70 来进行。在所述实施方案中，固定部件 32 由不锈钢制成，反电极 68 存在于固定部件 32 的暴露的表面 72、74 中。反电极 72、74 和工作电极 56、58 提供了将电势加在储样区 30 内的溶液上的界面，而给予了所述化学反应以能量并触发了样品中的电致化学发光和/或提供了清洁和调节池 12 表面的能量。反电极
15 72、74 通过一连线器 76 连接到电压控制器 66 的第二“反电极”端 78 上。

参比电极 70 提供了用作工作电极 56、58 施加的电压参照的参比电压，例如+1.2 伏对参比。参比电极 70 有利地位于在离池 12 位置
20 80 处的出口管 24 内，并通过一连线器 82 与电压控制器 66 的第三“参比电极”端 84 相连。在所述三个电极的模式中，电流并不流过参比电极 70。参比电极 70 可在三电极操作模式中使用以提供均衡、已知和稳定的电压，因此可有利地由银/氯化银(Ag/AgCl)构成或是饱和甘汞电极(SCE)。电压控制器 66 可以以只用工作电极 56 和作为反/参比电
25 极的电极 58 的双电极操作方式操作。在这种双电极操作方式中，反/参比电极 58 电连接到电压控制器 66 上的电压控制端 78 和 84 上。在这种情况下，电压控制器 66 基本作为电池运作。电压控制器 66 供应电压信号到工作电极 56 和反电极 58 上，并可任选地测量通过各电极

的电流。参比电极 70 可或者是由铂、金、不锈钢或其它材料构成的所谓的“准参比”电极，它提供了较不稳定的电压，相对于接触的溶液它仍是可测的。在双电极和三电极方式中，参比电极 70 或 58 用作提供参比值的目的是，依靠这个参比值来测量加到工作电极 56 上的电压。现认为均衡的电压参比值是更有利。在其恒电位操作中电压控制器 66 通过相应于参比电极 70 而在工作电极 56、58 上提供一已知电压，同时测量工作电极 56、58 和反电极 72、74 之间的电流量来控制各个电极。用于该目的的恒电位器是已知的，因此电压控制器 66 的内部结构可相当于产生上述功能的商品恒电位器，它本身并不构成本发明的一部分。确实，装置 10 可选择制成没有内部电压控制器 66，可改成与单独控制的外部恒电位器连接来提供送到电极 56、58、72、74 和 70 所需的电压信号。这些以下述具体方式施加的电压信号为工作电极 56、58 的表面以及有利地为整个池 12 的表面提供了可重复的初始条件 - 一项明显有助于改善 ECL 测量精确性的特征。

泵 16 有利地置于出口管 24 处用于以箭头 A 的方向将样品区的溶液“吸”入进口管 22。所述溶液将流过进口管 22、储样区 30 和出口管 24，通过参比电极 70 并以箭头 B 的方向流出。或者，泵 16 可置于进口管 22 处用于将溶液“压”过装置 10。这种通过进口管 22、储样区 30 和出口管 24 的同样的流动通道有利地被用于通过池 12 的所有溶液和流体，由此每种流体在迫使前一种流体流出池 12 中均进行了流体动力清洗过程。可控制泵 16 中止其运作以使具体溶液在池 12 中保持一段时间。

装置 10 的流通结构使得在没有使工作电极 56、58(或反电极和参比电极 72、74、70)暴露于空气中的情况下，允许工作电极连续暴露在一种或多种溶液中时被加上一可变电压或被持续维持在运作前的电势水平。暴露于空气中，打开了到达参比电极 70 的电路，容许破坏在工作电极 56、58 上表面条件的重现性的、未知、随机的电压波动。所述流通结构容许在电极系统 54 被清洗和调节的清除步骤和一种或

多种测量波形或扫描触发 ECL 的测量步骤之间快速交替。

本发明也涉及试剂组合物。广义地说，试剂组合物可以是任何一种本发明测定体系的组分，即(a)电解质，(b)含一 ECL 部分的标记化合物，(c)一测定工作物与其结合的官能化纤维，可任选地结合到颗粒
5 物上，包括磁响应颗粒物，(d)目标分析物或该目标分析物的类似物，
(e)一种目标分析物或其类似物的结合配体，(f)能与(d)或(e)反应的活性
组分，(g)一种还原剂，或(h)一种电致化学发光反应增强剂。为便于使
用，所述试剂可互相混合使用，也就是说，只要存贮时各组分不相互
10 反应而损害其在所准备的测定中的功能，那么就可制成两组分、三组
分 and 更多组分混合物。合乎需要的是，所述试剂为含颗粒物以及一种
或多种其它组分的双组分或多组分混合物。

本发明也涉及配套器材。所述配套器材可包括含有一种或多种上
述(a)到(h)组分的容器或者所述配套器材可包括含有一种或多种含那
些组分的混合物的上述试剂组合物的容器，所有均用于本发明的测定
15 方法和系统中。

纤维官能化的方法

本发明的官能化纤维可直接通过磺化、脱氧合纤维表面的亲电子
加成或金属取代来制备。当使用电弧生长纤维时，在官能化前它们
20 可能需要彻底纯化。Ebbesen 等人(Nature 367 519 (1994))阐述了这种
纯化的方法。

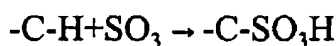
碳纤维最好在与官能化剂接触前被处理。这种处理可包括将纤维
分散于一溶剂中。然后在一些情况下，在进一步接触前可将碳纤维过
25 滤并干燥。

1.磺化

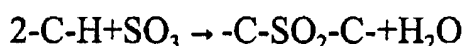
背景技术介绍于 March. J. P., Advanced Organic Chemistry, 3rd Ed.
Wiley, New York 1985; House, H., Modern Synthetic Reactions, 2nd Ed.,

Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA 1972 .

活化的 C-H(包括芳族的 C-H)键可用发烟硫酸(含多至 20 % SO₃ 的浓硫酸溶液)磺化。常规方法是用发烟硫酸在约 80 °C 温度下在液相磺化。但是,活化的 C-H 键也可用 SO₃ 在惰性的非质子传递溶剂中磺化。或用 SO₃ 在气相磺化。该反应是:



过度反应导致按下列反应形成砜:



10

制备 A

用硫酸进行 C - H 键的活化

反应在气相中进行与在溶液中进行在结果上没有显著差异。气相反应在通过 Lindberg 炉加热的水平石英管反应器中进行。配有气体进口/出口管的含具 20 % SO₃ 的浓硫酸的多颈烧瓶被用作 SO₃ 源。

15

将一放置了称重的纤丝(BN 或 CC)样品的瓷舟置于配有气体入口的 1'' 管中; 其出口和一浓硫酸发泡器相连。用氩气冲洗反应器 20 分钟以除去所有空气, 将样品加热到 300 °C 达 1 小时以除去残留湿气。干燥后, 在氩气氛下将温度调节到反应温度。

20

当所需的温度稳定后, 将 SO₃ 源与反应器管相连并用氩气流携带 SO₃ 气进入石英管反应器。让反应在所需温度进行到所需时间, 然后在流动的氩气氛下让反应器冷却。然后在 5'' Hg 真空、90 °C 下将纤丝干燥得到干重得率。通过与 0.100N NaOH 反应并用 0.100N HCl 反滴定, 以 pH 6.0 为终点来测定磺酸(-SO₃H)含量。

25

液相反应在含 20 % SO₃ 的浓硫酸中, 于装有温度计/温度控制器和磁力搅拌器的多颈 100cc 烧瓶中进行。在浓 H₂SO₄ 中的纤丝淤浆(50)被置于烧瓶中。在加到反应器前, 发烟硫酸溶液(20cc)被预热至约 60 °C。反应后, 所述酸淤浆被倾于碎冰上并立即用 1L 去离子水稀释。将固体物过滤并用去离子水彻底洗涤直至洗脱液的 pH 没有变化。然后

将纤丝在 5'' Hg 真空、100 °C 下干燥。由于过滤时的转移损失，不能获得准确的重量得率。其结果列于表 I 中。

表 I

反应小结

X.	试验 #	反应	样品重 Wt. g	纤丝类型	T °C	时间	干重得率	SO ₃ H 浓 meq/g
1A	118-60A	气态	0.20	CY	110	15 m	9.3%	0.50
1B	118-61A	气态	0.20	BN	100	30 m	8.5%	0.31
1C	118-61B	气态	0.20	BN	65	15 m	4.2%	0.45
1D	118-56A	液态	1.2	CY	50	10 m		0.33
1E	118-56B	液态	1.0	CY	25	20 m		0.40

气相反应或液相反应的磺酸含量没有显著差异。温度则有影响。较高反应温度(气相)产生较高含量的砒。在 118 - 61B 中，4.2 % 重量收率与磺酸含量(理论值是 0.51 meq/g)相符。试验 60A 和 61A 具有太高的重量得率而不能单独通过磺酸含量解释。因此估计也形成了相当量的砒。

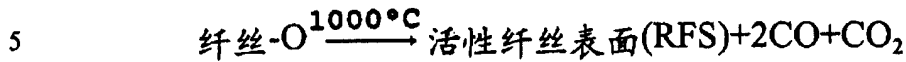
2. 向无氧化物纤丝表面的加成

背景技术介绍于 Urry, G., Elementary Equilibrium Chemistry of Carbon, Wiley, New York 1989 .

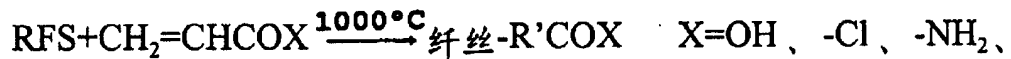
在纤丝中的表面碳表现像石墨，即它们被排成含底面碳和边缘碳的六方形片状体。尽管底面碳对化学侵袭相对惰性，但边缘碳是活性的并肯定含有一些杂原子或基团以满足碳价。纤丝也具有基本上是边缘碳的表面缺陷部位并含杂原子或基团。

连接到纤丝表面碳上的最常见的杂原子是氢(生产中的主要气体组分); 氧(由于其高反应性和因为其痕量存在难以避免); 和 H₂O(由于催化剂的关系它总是存在的)。在真空中约 1000 °C 下热解将以未知的机制，但以已知的化学计量使所述表面在复杂反应中脱氧合。其产物是 2:1 比率的 CO 和 CO₂。得到的纤丝表面含有对活性烯烃非常活泼

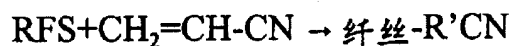
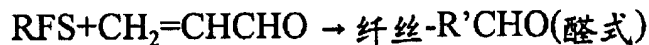
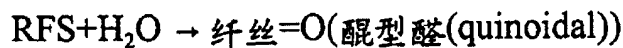
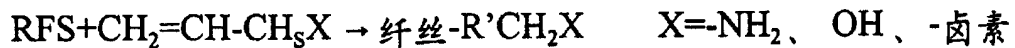
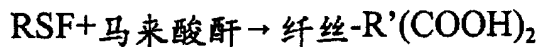
的以 $C_1 - C_4$ 顺序的基团。所述表面在真空中或在惰性气体的存在下是稳定的，但在暴露于反应气体前保留了高反应性。因此，纤维可在真空或惰性气氛下于约 1000°C 热解、在同样的这些条件下冷却并在较低温度下与适当的分子反应而产生稳定的官能团。典型实例有：



接着：



-H



15 式中 R' 是一烷基(烷基、环烷基等)。

制备 B

通过丙烯酸与无氧化物纤维表面反应制备官能化纤维

20 将装有一克 BN 纤维的瓷舟置于装有一热电偶并位于 Lindberg 管式炉中的水平 1'' 石英管中。其末端配有气体进口/出口。将所述管用干燥、脱氧的氩气清洗 10 分钟，然后将炉温升至 300°C 并保持 30 分钟。此后，将温度以 100°C 的增量升到 1000°C 并保持 16 小时。到时间后，将所述管在流动的氩气氛下冷却至室温(RT)。然后将氩气流分

25 流通过 50°C 下盛有单纯的纯化丙烯酸并配有气体进口/出口的多颈烧瓶。丙烯酸/氩气的流动在室温下持续 6 小时。到时间后，首先通过用氩气清洗，然后通过 $<5''$ 真空、 100°C 下真空干燥来除去残留的未反应丙烯酸。所述羧酸含量通过与过量 0.100N NaOH 反应并用 0.100N

HCl 反滴定至 pH 7.5 的终点来测定。

制备 C

通过丙烯酸与无氧化物纤丝表面反应制备官能化纤丝

- 5 除了热解和冷却在 10^{-4} 托真空下进行外，以与上述过程类似的方式重复所述过程。如前述过程中那样将经纯化的丙烯酸蒸气用氩气稀释。

制备 D

- 10 通过马来酸与无氧化物的纤丝表面反应制备官能化纤丝

除在室温下的反应剂是纯化的马来酸酐(MAN)(通过将氩气通过 80 °C 的熔融 MAN 浴将其带入反应器中)外，重复在制备 B 中的步骤。

制备 E

- 15 通过丙烯酰氯与无氧化物纤丝表面反应制备官能化纤丝

除了在室温下的反应剂是纯化的丙烯酰氯(通过在 25 °C 下将氩气通过单纯的丙烯酰氯将其送入反应器)外，重复制备 B 中的步骤。酰氯含量通过与过量 0.100N NaOH 反应并用 0.100N HCl 反滴定来测定。

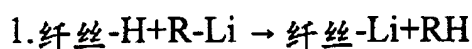
- 20 纤丝在真空中的热解使纤丝表面脱氧合。在一 TGA 装置中，3 个 BN 纤丝样品在真空或在经纯化的 Ar 流中于 1000 °C 热解，其平均重量损失为 3 %。气相色谱分析只分别检测到约 2:1 比率的 CO 和 CO₂。获得的表面极具活性，活化烯烃诸如丙烯酸、丙烯酰氯、丙烯酰胺、丙烯醛、马来酐、烯丙胺、烯丙醇或烯丙基卤化物甚至在室温下也会反应，形成只含与活化烯烃结合的官能度的清洁产物。因此，
- 25 只含羧酸的表面可通过与丙烯酸或马来酐的反应来得到；只含酰氯的表面可通过与丙烯酰氯反应得到；只含醛的表面可通过与丙烯醛的反应得到；只含羟基的表面可通过与烯丙醇反应得到；只含胺的表面可通过与烯丙胺反应得到；只含卤化物的表面可通过与烯丙基卤化物反

应得到。

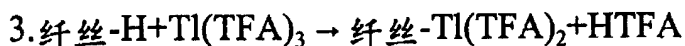
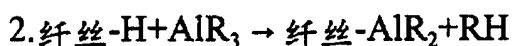
3. 金属取代

背景技术可参见 March, Advanced Organic Chemistry, 3rd ed., p.
5 545.

芳族 C-H 键可用各种有机金属试剂金属取代而产生碳-金属键 (C-M)。M 通常是 Li、Be、Mg、Al 或 Tl；但是，也可使用其它金属。最简单的反应是通过在活化芳香化合物中氢的直接取代：

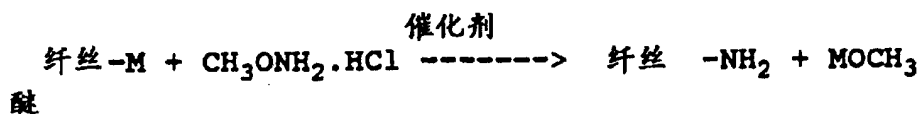
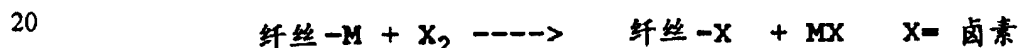
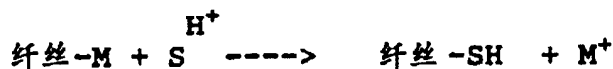


10 该反应可能另外需要一种强碱诸如叔丁醇钾或螯合二胺。质子惰性溶剂是需要的(链烷烃、苯)。



TFA=三氟乙酸根 HTFA=三氟乙酸

15 金属取代衍生物是一级单官能化纤丝的例子。但是它们可进一步反应形成其它一级单官能化纤丝。一些反应可在相同装置中在没有分离中间产物的情况下相继进行。



制备 F

纤丝-Li 的制备

将一克 CC 纤丝置于一瓷舟中并插入到本身置于 Lindberg 管式炉中的一个 1'' 石英管反应器中。管端配有气体进口/出口。在连续流过 H₂ 的条件下，将纤丝在 700 °C 加热二小时，将任何表面氧化处转变成 C-H 键。然后在流动的 H₂ 气氛下将反应器冷却至室温。

用干燥的脱氧合庚烷(具 LiAlH₄)将氢化的纤丝转移到 1L 多颈园底烧瓶中，烧瓶上装有用于去除所有空气和维持惰性气氛的纯化的氩气清洗系统、冷凝器、磁力搅拌器和可用注射器穿过其注入液体的橡胶密封垫。在氩气氛下，用注射器加入含 5mmol 丁基锂于庚烷中的 2 % 溶液，在慢慢回流下搅拌淤浆 4 小时。到时间后，在氩气氛手套箱中，通过重力过滤分离出纤丝并用干燥的、脱氧庚烷在过滤器上洗涤几次。将纤丝转移到配有活塞的 50CC 园底烧瓶中并在 50 °C、10⁻⁴ 托真空下干燥。锂浓度通过将纤丝样品与过量 0.100N HCl(去离子中)反应并用 0.100N NaOH 反滴定至 pH 5.0 的终点来测定。

制备 G

纤丝-Tl(TFA)₂ 的制备

按制备 E 中的方法，将一克 CC 纤丝氢化并用已通过用干燥氩气重复清洗而已脱气的 HTFA 载入到多颈烧瓶中。将 5mmol Tl(TFA)₃ 在 HTFA 中的 5 % 溶液通过橡胶密封垫加入到烧瓶中并且将这种淤浆在缓慢回流下搅拌 6 小时。反应后，如制备 A 中那样将纤丝收集和干燥。

制备 H

纤丝-OH 的制备

(只含 OH 官能作用的氧化衍生物)

在一氩气氛手套袋中，用干燥脱氧合的庚烷将在制备 F 中制备的

0.5g 锂化纤丝转移到配有活塞和磁搅棒的 50CC 单颈烧瓶中。将该烧瓶移到所述手套袋中并用磁力搅拌器搅拌。然后，将活塞打开敞空并将淤浆搅拌 24 小时。到时间后，通过过滤分离纤丝并用含水 MeOH 洗涤并在 5'' 真空、50 °C 下干燥。OH 基的浓度通过在 80 °C 下与乙酸酐的二噁烷标准溶液(0.252M)反应，将 OH 基转变成乙酸酯来测定，在这过程中，每摩尔反应的酸酐释出 1 当量的乙酸。总酸含量、游离乙酸和未反应的乙酸酐通过用 0.100 N NaOH 滴定到 pH 7.5 的终点来测定。

10

制备 I

纤丝-NH₂的制备

按制备 G 中的方法制备一克钨化纤丝。将纤丝在二噁烷中形成淤浆并加入溶于二噁烷的 0.5g 三苯膦。在 50 °C 将淤浆搅拌几分钟，接着在 50 °C 加氨气 30 分钟。然后通过过滤分离纤丝，在二噁烷中洗涤，然后在去离子水中洗涤并在 5'' 真空、80 °C 下干燥。胺浓度通过与过量乙酸酐反应并用 0.100 N NaOH 反滴定游离乙酸和未反应的酸酐来测定。

15

4.衍生的多环芳烃、多杂环芳烃和平面大环化合物

20

纤丝的石墨表面容许芳香化合物的物理吸附。这种吸引是通过范德瓦尔力进行的。这些力在多环杂环芳烃化合物和石墨表面的底面碳之间是相当大的。在可能发生竞争性表面吸附的条件下或吸附物具有高溶解性的条件下可能发生解吸。

25

制备 J

在纤丝上卟啉和酞菁的吸附

对于纤丝上的物理吸附而言，优选的化合物是已知在石墨或碳黑上强烈吸附的衍生卟啉或酞菁。几种化合物是可用的，例如四羧酸卟啉

啉、钴(II)酞菁或二锂酞菁。后两者可衍生成羧酸形式。

当它们被逐渐加入时，卟啉或酞菁的载荷量可通过溶液的脱色来测定。溶液的深色(四羧酸卟啉的甲醇溶液为深粉红色，CO(II)或二锂酞菁的丙酮或吡啶溶液是深蓝绿色)随着分子被吸附在纤丝的黑表面上除去而脱色。

载荷量通过这个方法估计，衍生物的足迹(footprints)从其大致测量值(约 140 平方埃)计算。对于 250m²/g 的纤丝平均表面积，最大载荷量将为约 0.3mmol/g。

四羧酸卟啉通过滴定分析。吸附的完全性通过在常温和升高的温度下在含水体系中的颜色释放来测定。

在载荷时，纤丝淤浆先被混合(韦林氏挽合器)和搅拌。在颜色不再放出后一些淤浆被超声处理，但是无影响。

载荷后，在相同溶剂中洗涤试验 169 - 11、- 12、- 14 和-19-1(见表 II)以除去吸着色素。所有在洗脱液中均显示出了连续的浅色，所以很难精确地测到饱和点。试验 168-18 和-19-2 使用计量的供吸附的色素并且在载荷后只被非常轻柔地洗涤。

四羧酸卟啉(从丙酮)和钴酞菁(从吡啶)被载于纤丝上，以备进一步表征鉴定(分别为试验 169-18 和-19-2)。

四羧酸卟啉的分析

过量碱的加入(pH 11-12)使滴定淤浆立即成粉红色。尽管这并不干扰滴定，但这表明高 pH 下卟啉解吸。羧酸浓度通过反滴定过量的 NaOH 到 pH 7.5 的终点来测定。滴定得到每克酸 1.10 毫克当量的载荷，等于 0.275meq/g 卟啉。

钴酞菁或二锂酞菁的分析

这些被吸附物的浓度只通过褪色实验估算。30 分钟后淡兰绿色不褪之处被作为饱和点。

许多取代的多环芳烃或多杂环芳香化合物被吸附在纤丝表面。为了粘附，芳环的数目应大于二每环/侧官能团。因此，含三稠合环的取代蒽、菲等、或含四个或多个稠环的多官能衍生物可用来取代卟啉或酞菁衍生物。同样，可使用取代芳香杂环诸如喹啉或含四环或更多环的多元取代杂环芳烃。

表 II 总结了三种卟啉/酞菁衍生物的载荷实验结果:

表 II
吸附试验小结

实验	试验号	被吸附物	纤丝重	溶剂	载荷		mg/g 滴定
					g/g	形式	
10A	169-11	TCAPorph	19.6 mg	丙酮	0.18g/g	酸	未分析
10B	169-12	TCAPorph	33.3 mg	H ₂ O	0.11	Na 盐	未分析
10C	169-14	DiLiPhth	119.0 mg	丙酮	0.170	Li	未分析
10D	169-19-1	CoPhth	250.0 mg	吡啶	0.187	Co	0.335(cal)
10E	169-18	TCAPorph	1.00 g	丙酮	0.205	酸	1.10(T)
10F	169-19-2	CoPhth	1.40 g	吡啶	0.172	Co	0.303(cal)

TCAPorph=四羧酸卟啉 (cal)=计算值
DiLiPhth=二锂酞菁 (T)=滴定值
CoPhth=钴(II)酞菁

5. 氯酸盐或硝酸氧化

有关通过强氧化剂诸如在浓硫酸中的氯酸钾或硝酸的石墨氧化的文献包括 R.N. Smith. Quarterly Review 13, 287 (1959); M.J.D. Low, Chem. Rev. 60, 267 (1960)。一般来说，边缘碳(包括缺陷部位)起化学反应而形成羧酸、酚和其它氧化基团的混合物。其机制是复杂的，涉及自由基反应。

制备 K

用氯酸盐进行羧酸官能化纤丝的制备

通过用一刮勺混合，将 CC 纤丝样品在浓 H₂SO₄ 中形成淤浆，然

后转移到配有气体进口/出口和顶部搅拌器的反应器烧瓶中。伴随搅拌并在慢速氩流下，在室温并以试验时限分部分加入 NaClO_3 试剂。在整个试验过程中产生氯气并被排出反应器进入 NaOH 水溶液阱。试验结束时，纤丝淤浆被倾倒在碎冰上并被真空过滤。将滤饼转移到一索氏套管中并在索氏抽提器中用去离子水洗涤，每隔几个小时交换一次新鲜水。洗涤一直持续到新鲜去离子水加入到纤丝样品中后水的 pH 没有变化为止。然后过滤分离出纤丝并在 5'' 真空、 100°C 下干燥过夜。

羧酸含量通过将样品与过量 0.100 N NaOH 反应并用 0.100 N HCl 反滴定至 pH 7.5 的终点来测定。其结果列于表 III 中。

10

表 III
直接氧化试验结果

实验	试验号	纤丝	组分, g		时间 小时	洗涤水 Ph	反应酸	
			NaClO_3	H_2SO_4			Wgt	meq/g
11A	168-30	10.0	8.68	450	24	5.7	10.0	0.78
11B	168-36	12.0	13.9	600	24	5.9	13.7	0.75

15

制备 L

用硝酸制备羧酸官能化纤丝

称取一定量纤丝样品用适当强度的硝酸在装有一顶部搅拌器和一水冷凝器的园底多颈刻度反应器烧瓶中形成淤浆。在不停搅拌下，调节温度并使反应进行到规定时间。无论酸强度多少，当温度超过 70°C 不久就释出棕色烟雾。反应后，将淤浆倾倒在碎冰上并用去离子水稀释。将淤浆过滤并通过下列方法除去过量酸：在索氏抽提器中清洗并每隔几小时用新鲜去离子水置换储器中的水直到清洗淤浆样品的去离子水 pH 不再变化为止。将纤丝在 5'' 真空、 100°C 下干燥过夜。称取一部分纤丝与标准 0.100 N NaOH 反应，其羧酸含量通过用 0.100 N HCl 反滴定测量。表面氧含量通过 XPS 测定。通过在 Waring 搅拌机中高速档混合 2 分钟测得水中分散性为 0.1 % (重量)。结果小结于表 IV

25

中。

表 IV
直接氧化试验小结

5 实验	组分			温度 °C	时间	重量 损失	COOH meq/g	ESCA, at%		分散性 H ₂ O
	Gms. 纤维	CC 酸	酸浓度					C	O	
12A	1(BN)	300	70%	室温	24 hr	0	<0.1	98	2	P
12B	1(BN)	300	15	回流	48	<5%	<0.1	未分析		P
12C	20(BN)	1.0 1	70	回流	7	25%	0.8	未分析		G
12D	48(BN)	1.0 1	70	回流	7	20%	0.9	未分析		G

P=差 ; G=好

10

6. 官能化纤维的次级衍生物

羧酸官能化纤维

15 可直接从羧酸制备的次级衍生物的数目基本上是无尽的。醇或胺易与酸键合形成稳定的酯或酰胺。如果醇或胺是双官能或多官能分子的一部分，那末通过 O-或 NH-的键合留下作为侧基的其它官能度。次级试剂的典型例子有：

通式	侧基	实例
HO-R, R=烷基、芳烷基、芳基、氟代乙醇、聚合物、SiR' ₃	R-	甲醇、苯酚、三氟碳化合物、OH-端的聚酯、硅烷醇
H ₂ N-R R=和上述相同	R-	胺、苯胺、氟化胺、甲硅烷基胺、胺端的聚酰胺
Cl-SiR ₃	SiR ₃ -	氯硅烷
HO-R-OH, R=烷基、芳烷基、CH ₂ O-	HO-	乙二醇、PEG、季戊四醇、双酚 A
H ₂ N-R-NH ₂ , R=烷基、芳烷基	H ₂ N-	乙二胺、聚乙二胺
X-R-Y, R=烷基等;	Y-	聚酰胺酰胺

X=OH 或 NH₂; Y=SH, CN 巯基乙醇
 C=O、CHO、(链)烯烃、炔、
 芳族化合物、杂环化合物

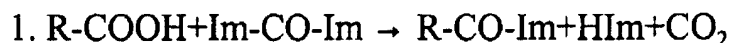
所述反应可用任何用醇或胺将羧酸酯化或胺化的方法来进行。这些方法中，采用了使用 N,N'-羰基二咪唑(CDI)作为酯或酰胺的酰化剂的 H. A. Staab, Angew, Chem. Internat. Edit., (1), 351 (1962)的方法和使
 5 用 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)激活羧酸酰胺化的 G. W. Anderson, et al., J. Amer. Chem. Soc. 86, 1839 (1964)的方法。

制备 M

官能化纤丝次级衍生物的制备

10 N,N'-羰基二咪唑

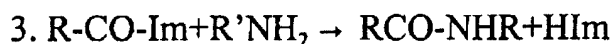
该方法要求使用洁净、干燥、质子惰性的溶剂(例如甲苯或二噁烷)。化学计量量的试剂是足够的。对于酯来说，在惰性气氛(氩)中将羧酸化合物在甲苯中与溶于甲苯中的化学计量量的 CDI 在室温下反应
 2 小时。在这段时间里，CO₂被释出。二小时后，加入醇和催化量的
 15 乙醇钠并在 80 °C 继续反应 4 小时。对常规醇来说，收率是定量的。所述反应是：



Im=Imidazolid, HIm=咪唑



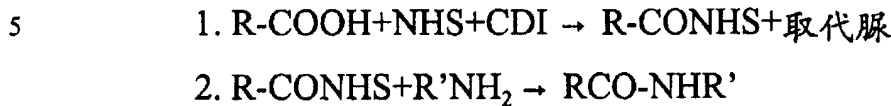
20 胺的酰胺化在室温无催化下进行。在该方法中第一步是相同的。放出 CO₂后，在室温下加入按化学计量的胺并反应 1 - 2 小时。该反应是定量的。该反应是：



25

N-羟基琥珀酰亚胺

用伯胺胺化羧酸的活化通过 N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxy succinamyl ester)进行; 碳化二亚胺作为取代脲被用来结合释出的水。然后通过伯胺反应在室温下将 NHS 酯转变成酰胺。该反应为:

甲硅烷基化

三烷基甲硅烷氯化物或三烷基硅烷醇按下式立即与酸中 H 反应:



少量的二氮杂-1,1,1-双环辛烷(DABCO)被用作催化剂。适合的溶剂是二噁烷和甲苯。

制备 N15 从羧酸官能化纤丝制备酯/醇衍生物

按制备 K 制备羧酸官能化纤丝。其羧酸含量为 0.75meq/g。以甲苯作为溶剂在室温下将纤丝在惰性气氛下与按化学计量量的 CDI 反应直到停止释放 CO₂ 为止。此后, 以少量 NaOEt 作为催化剂将淤浆在 80 °C 与 10 倍摩尔过量的聚乙二醇(MW 600)反应。在二小时的反应后, 20 通过过滤分离纤丝, 用甲苯洗涤并在 100 °C 干燥。

制备 O从羧酸官能化纤丝制备酰胺/胺衍生物(177-041-1)

25 在装有橡胶塞的 100ml 园底烧瓶中, 将 0.242g 氯酸盐氧化的纤丝 (0.62meq/g)在搅拌下悬浮于 20ml 无水二噁烷中。加入 20 倍摩尔过量的 N-羟基琥珀酰亚胺(0.299g)并让其溶解。接着加入 20 倍摩尔过量的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDAC)(0.510g), 在室温下连续搅拌 2 小时。到时间后停止搅拌, 抽走上清液, 固体物用无水二噁

烷和 MeOH 洗涤并在 0.45 μ 聚砜膜上过滤。再另用 MeOH 洗涤滤膜上的固体物并真空干燥至恒重。基于观察到的 6 % 的重量得率，NHS - 活化的氧化纤丝的收率为 100 %。

5 将 100 μ l 乙二胺(en)加入到 10ml 0.2M NaHCO₃ 缓冲液中。加入等体积的乙酸(HOAc)维持 pH 近 8。激烈搅拌下加入 NHS - 活化的氧化纤丝(0.310g)并反应 1 小时。再加入 300 μ l en 和 300 μ l HOAc 再反应 10 分钟。将溶液在 0.45 μ 聚砜膜上过滤并顺序用 NaHCO₃ 缓冲液、1 % HCl 去离子水和 EtOH 洗涤。固体物在真空下干燥过夜。通过与 NaOH 反应将 HCl 盐转变回到游离胺(177 - 046 - 1)以备进一步分析和反
10 应。

进行 ESCA 以定量存在于胺化纤丝(GF/NH₂)上的 N 量。177-046-1 的 ESCA 分析表明为 0.90(原子)% N(177-059)。为进一步确定多少这种 N 是作为易接近胺基和活性胺基两者存在的，通过与五氟苯甲醛的气相反应产生与可利用的伯胺基的相应的 Schiff 碱键合来制备衍
15 生物。ESCA 分析结果仍显示所期待的 0.91(原子)% N 和 1.68(原子)% F。这意味着在胺化纤丝上有 0.34(原子)% N 以活性伯胺存在(5F 每五氟苯甲醛分子)。0.45(原子)% N 的水平会被认为已与每个 N 的自由端完全反应。所测得的水平表明了与 NHS-活化的氧化纤丝的 N 反应的非常高的收率并证实了可利用自由胺基的反应性。

20 在从 ESCA 数据计算得到的 0.34 原子% 自由胺形式存在的 N 水平上，所述纤丝已几乎被可与其它物质偶合的自由胺基完全覆盖。

制备 P

从羧酸官能化纤丝制备甲硅烷基衍生物

25 在惰性气氛下，将按制备 K 制备的酸官能化纤丝在二噁烷中形成淤浆。在搅拌下，加入按化学计量量的氯代三乙基硅烷，并反应 0.5 小时，之后加入几滴 5 % DABCO 的二噁烷溶液。再让该体系反应 1 小时，然后通过过滤收集纤丝并在二噁烷中洗涤。将纤丝在 V'' 真空、

100 °C 下干燥过夜。

表 V 汇总了所述次级衍生物制备。产物通过 ESCA 分析得到 C、O、N、Si 和 F 表面含量。

表 V

5

次级衍生物制备小结

反应剂	侧基	ESCA 分析, 原子 %					
		S	C	N	O	Si	F
As Grown	----	--	98.5	--	1.5	--	--
氯酸盐氧化的	-COOH, C=O, C-OH	--	92.4	--	7.6	--	--
10	$H_2N-C_2H_4-NH_2$	--	99.10	0.90	--	--	--
	$-CONHC_2H_4N=OC_6F_5$	--	97.41	0.91	--	--	1.68

制备 Q

从羧酸官能化纤丝制备甲硅烷衍生物

15 在惰性气氛下, 将按制备 K 制备的酸官能化纤丝在二噁烷中形成淤浆。在搅拌下, 加入按化学计量量的氯代三乙基硅烷并反应 0.5 小时, 之后加入几滴 5 % DABCO 的二噁烷溶液。再让该体系反应一小时, 然后通过过滤收集纤丝并在二噁烷中洗涤。将纤丝在 5'' 真空、100 °C 下干燥过夜。

20 表 VI 汇总了所述次级衍生物制备。产物通过 ESCA 分析。分析结果证实加入了所需的侧基。产物通过 ESCA 分析得到 C、O、N、Si 和 F 表面含量。

表 VI

次级衍生物制备小结

反应剂	侧基	ESCA 分析, 原子 %					
		S	C	N	O	Si	F
25	CF_3CH_2OH						未分析
	$-COOCH_2CF_3$						未分析
	PolyEG-600						未分析
	$-CO-(OC_2H_4O-)H$						未分析
	$HO-C_2H_4-SH$						
	$-COOC_2H_4SH$						
	$Cl-SiEt_3$						
	$-COSiEt_3$						

磺酸官能化纤维

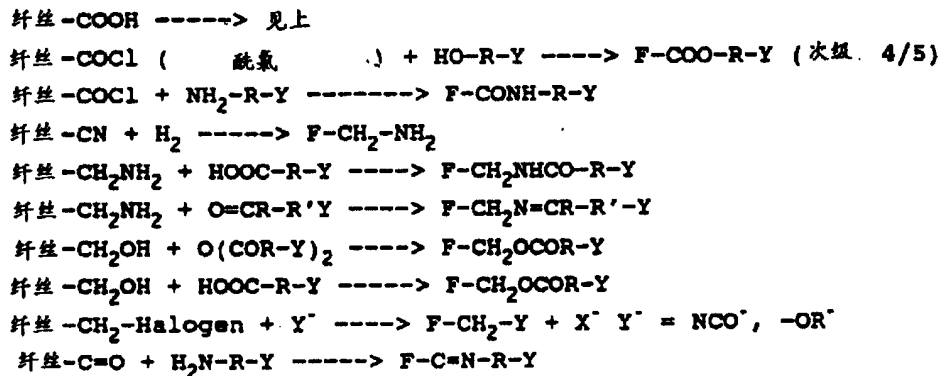
可将按制备 A 制备的芳基磺酸进一步反应形成次级衍生物。磺酸可通过 LiAlH_4 或三苯膦与碘的混合物还原成硫醇(March, J. P., p. 1107)。它们也可通过与二烷基醚反应转变成磺酸酯, 即



通过亲电子加成到无氧纤维表面或通过金属取代官能化的纤维

通过活化的亲电子试剂加成到无氧纤维表面获得的初级产物具有 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{COCl}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2$ -卤素或 $\text{HC}=\text{O}$ 侧基。它们可通过下列反应转变成次级衍生物:

10



15

通过多环芳烃或多杂环芳烃或平面大环化合物的吸附官能化的纤维

20

二锂酞菁: 一般来说, 来自酞菁(Pc)基的两个 Li^+ 离子被大多数金属(特别是多价金属)配合物所置换。因此, 用与非易变配位体结合的金属离子置换 Li^+ 离子是一种将稳定官能团置于纤维表面的方法。几乎所有过度金属配合物可从 Pc 置换 Li^+ 而形成稳定非易变的螯合物。然后, 这点使该金属与适合配位体结合。

25

钴(II)酞菁

钴(II)配合物特别适合于此。 Co^{++} 离子可取代两个 Li^+ 离子形成一种非常稳定的螯合物。然后 Co^{++} 离子可与一配位体配位, 诸如与含有

一个带一侧羧酸基的吡啶环并已知优先与吡啶基结合的烟酸配位。在过量烟酸的存在下，Co(II)Pc 可被电化学氧化成 Co(III)Pc，与烟酸的吡啶部分形成一种不易变的配合物。这样，烟酸配位体的自由羧酸基被牢固地结合到纤丝表面。

- 5 其它适合的配位体有氨基吡啶或乙二胺(侧 NH_2)、巯基吡啶(SH)或其它在一端含有一氨基或吡啶基部分，和在另一端含有任何所需官能的其它多官能配位体。

7.3 维结构

- 10 氧化纤丝比非氧化纤丝更易分散于含水介质中。具中孔和大孔(孔径 $>2\text{nm}$)的稳定、多孔、三维结构作为催化剂或色谱载体是非常有用的。因为纤丝可在极具特性的基础上分散，通过交联稳定的良好分散的样品允许其被制成这种载体。对于这种应用而言，官能化纤丝是理想的，因为它们易分散于含水介质或极性介质中，其官能度提供了交
- 15 联点。此外，其官能度提供了支承催化部位或层析部位的点。其最终结果是刚性、三维结构，具有易进入的整个表面区域和支承活性剂的官能部位。

- 在催化中这些载体的典型应用包括其用作通过浸渍制备的金属催化剂如贵金属氢化催化剂的高度多孔载体。此外，通过其官能度结
- 20 合结构的非常高的多孔性使分子催化剂束缚固定在载体上的能力使人们可以以多相方式进行均相反应。所束缚的分子催化剂基本上是悬挂于一连续液相中，同均相反应器相类似，其中它可利用伴随均相反应的选择性和速率方面的优点。但是，被束缚在固体载体上使得所述活性物和(在许多情况下)非常昂贵的催化剂易于分离和回收。

- 25 这些稳定刚性的结构也容许进行此前非常困难的反应，诸如通过将一适合的对映体催化剂或选择性底物结合到所述载体上来进行不对称合成或亲合色谱。通过金属-Pc 或金属-卟啉配合物的衍生化也可以容许回收与所述金属离子结合的配位体，还有通过次级衍生物与配位

体结合的任何分子。例如，当所述官能化纤丝的三维结构是电极或电极一部分以及所述官能化来源于 Co(II)Pc 吸附的情况下，在烟酸存在下 Co(II)到 Co(III)的电化学氧化将产生带一作为侧基的羧酸的非易变 Co(III)-吡啶基配合物。连接一适合的抗原、抗体、催化抗体或其它部位-特定的捕集剂将可进行原本非常困难达到的分子的选择性分离(亲合色谱)。在清洗电极除去吸着物质后，可将含目标分子的 Co(III)配合物电化学还原，以回收易变的 Co(II)配合物。然后可通过易变的 Co(II)配位体的质量作用取代回收含目标分子的在 Co(II)上的配位体，依此实现原本非常困难或需高费用进行的分子(如手性药物)的分离和回收。

三维结构的另一例子是纤丝-陶瓷复合物。

制备 R

氧化铝-纤丝复合物的制备(185-02-01)

使用 and u/s 粉碎机将一克硝酸氧化的纤丝(185-01-02)高度分散在 100CC 去离子水中。将纤丝淤浆加热至 90 °C，缓慢加入溶于 20CC 丙醇中的 0.04mol 三丁醇铝溶液。持续回流 4 小时，之后移走冷凝器以驱赶醇。30 分钟后再装入冷凝器并使淤浆在 100 °C 回流过夜。得到外观均匀的黑溶胶。将溶胶冷却至室温，一星期后形成具光滑表面的黑凝胶。将所述凝胶在空气中于 300 °C 加热 12 小时。

通过 SEM 检查所述氧化铝-纤丝复合物。裂面的显微图表明纤丝在凝胶中均匀分散。

制备 S

二氧化硅-纤丝复合物的制备(173-85-03)

用超声将二克硝酸氧化的纤丝(173-83-03)高度分散在 200CC 乙醇中。在室温下，缓慢将溶于 50CC 乙醇中的 0.1 mol 四乙氧基硅烷溶液加到淤浆中，接着加入 3CC 浓 HCl。将混合物加热至 85 °C 并保持

该温度直到其体积减至 100CC，让混合物冷却并放置到成为一黑色固态凝胶。将凝胶在空气中于 300 °C 加热。

通过 SEM 检查这种二氧化硅-纤丝复合物。裂面的显微图表明纤丝在凝胶中均匀分散。

5 可用其它陶瓷料诸如三元氧化物以及氧化锆、二氧化钛、稀土氧化物来进行类似物的制备。

正如前面叙述和实例所说明的，本发明可应用于多种多样的官能化纳管的配制中。

10 所用的术语和表达只用作描述而无限定之意，在这类术语和表达的使用中，这里无意排斥表明其特征的同样含义术语的使用以及其分部分的说明，应认识到在本发明的范围内可进行各种修改。

本发明优选实施方案的说明

15 尽管本发明的测定中可使用宽范围的纳管，但一般来说所述纳管具有 1.0-5.0g/ml 的密度，优选具有 1.1-2.0 g/ml 的密度。最佳密度的选择为本领域技术人员通晓，在重力驱动的测定中沉降速率是在测定速度和对在电极表面产生一均匀配合物层的需要之间的一折衷值。

20 也可使用具有一宽范围平均直径的纳管。可使用平均直径为 0.001-100 μ m 的颗粒，所述颗粒最好具有 0.01-10 μ m 的平均粒径。纳管的长度至少为直径的五倍。

在所述测定组合物中也可使用宽范围的颗粒浓度。例如，浓度范围可从 1×10^{-9} g/ml 到 1×10^{-2} g/ml，优选 1×10^{-8} - 1×10^{-3} g/ml。需要选择颗粒的密度、粒径和浓度以使颗粒沉降速率至少为 0.5mm/min 并优选更快的速率。

25 在实施本发明的过滤方式中，过滤装置需要具有宽的颗粒平均直径的 0.01-90 % (以平均直径测量的) 的孔径，优选具有颗粒平均粒径 10-90% 的孔径。

所述纳管可以是顺磁或是铁磁的，可涂覆各种连接结合化合物的

材料, 结果使所述磁性颗粒可在测定中使用。用于本发明的磁性纳管需要具有至少 0.001 cgs 单位的磁化率, 最好具有至少 0.01 cgs 单位的磁化率。所述磁性纳管可具有宽范围的密度, 即实际可从低于水的 0.01g/ml 到 5g/ml, 优选 0.5-2g/ml。粒径范围可以是 0.001-100 μ m, 5 优选 0.01-10 μ m。颗粒的浓度范围可宽至 1×10^{-9} - 1×10^{-2} g/ml, 优选 1×10^{-8} - 1×10^{-3} g/ml。

所用的磁性纳管需要具有如像 EP 0180384 所述的低的剩磁, 从而在磁场从电极表面除去后, 纳管可去磁并可被清出测定池。需要选择磁性纳管的密度、浓度和粒径, 以使沉降时间至少为 0.5mm/min, 10 优选高于该速率。在磁性池的操作中, 为了不干扰光电倍增管的运作, 经常需要在诱导电致化学发光前从电极表面除去磁装置。

测定

用本发明方法可进行各种测定。使用官能化的碳纳管进行测定。15 所述测定包括使用碳纳管(纤丝)的水解酶的 ECL 检测。碳纳管(纤丝)用水解酶的底物化学改性。底物上离纤丝的最远端连接一 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的衍生物。这种固相的常规结构是: 纤丝-底物(易断(scissile)键)- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 。如果断开所述易断键的酶存在, 底物的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 端通过酶的作用被释放到溶液中。在纤丝与酶混合与培养后, (通过过滤或离心)将纤丝从溶液中除去。测定剩余溶液的 ECL。如果酶存在, 底物的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 端将存在于溶液中并会发光。这样, 特效酶的存在导致了来自所述混合物的溶液相的光发射。所述测定法是, 一种用于蛋白酶的新的 ECL 测定法, 因为它并不涉及抗体(它不是一种免疫测定法)。因此, 它具有是酶活度的测定法而不是酶存在的测定法(酶可以是钝性的)的优点。此外, 该测定使用纤丝做为固体载体。因为纤丝的高表面积和在结合生物分子诸如酶底物的适应性它们是吸引人的。此外, 官能化纤丝可形成流通膜(簇)。酶混合物可快速流过以释放 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 并使所述测定快速和方便。25

使用纤丝和 ECL 进行 DNA 探查测定。碳纳管(纤丝)在 DNA 探查测定中用作固体载体, 作为分离介质以从可能包括生物流体和加入试剂的复杂混合物中分离分析物。通过共价结合(经 NHS 酯)或通过吸附到烷基纤丝上将所述纤丝用抗生素蛋白(或抗生蛋白链菌素)改性。生物素标记 ssDNA(“分析物”)结合到抗生物素蛋白纤丝上并通过已用 Ru(bpy)₃²⁺ 标记的互补单绞合低聚核苷酸的 ECL 检测。

检测自然(未生物素标记)DNA 片断的一种形式是竞争性形式, 其中 Ru(bpy)₃²⁺ 标记的低核苷酸可与自然 DNA 结合, 也可与导入的生物素标记 DNA 结合。这样, 存在的分析物(非生物素标记 DNA)越多, 留下越少的标记低聚核苷酸以与生物素标记 DNA 结合, 当将其浮获在抗生素蛋白纤丝上就会发出 ECL 信号。

这代表着碳纳管首次用于 DNA 分析中。其优点有: (1)碳纳管具有非常高的表面积, 这意味着这种固体载体所需用量比其它固体载体所需用量少。(2)纤丝是导电体, 这对于在 ECL 应用中的固体载体(其中固体载体搁在电极上)来说是一种有吸引力的性质。作为导电体, 可比非导电的其它载体在电化学接触中有更多表面积。

使用固定在碳纳管(纤丝)上的抗体的基于 ECL 的免疫测定将是有利的。抗体纤丝可以竞争性免疫测定形式(其中分析物和 Ru(bpy)₃²⁺ 标记的分析物之间在与抗体纤丝结合上存在竞争)或以夹合形式(其中 Ru(bpy)₃²⁺ 标记的第二种抗体与抗体纤丝-分析物配合物结合)用于 ECL 应用中。在两种情况下, ECL 光发射均指示目标分析物的存在与否。抗体可通过几种不同的方法, 通过共价或非共价方式固定在纤丝上。对于非共价固定, 抗体被吸附在未改性的纤丝上或被吸附在已改性增强了吸附性能的纤丝上。这种改性纤丝具有疏水附属物(烷基链或苯基-烷基链)。抗体在纤丝上的共价固定可通过三种不同方法进行: 通过羧化纤丝的 NHS 酯活化、通过抗体碳水化合物基的还原胺化和通过巯基/马来酰亚胺基纤丝与还原的或马来酰亚胺基-改性的抗体反应。抗体固定在碳纤丝上是有利的。抗体纤丝和抗体的其它固定载体

相比有许多独特的性质。这些优点包括高单位重量表面积、电导性(特别在 ECL 应用中)和化学与物理稳定性。

碳纳管被用作基于 ECL 的生物传感器。双官能纤丝被制备,其中酶辅助因子 NAD^+ 的衍生物与一个官能团结合, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的一种衍生物与另一个官能团(COOH)结合。将所述生物传感器纤丝与含有分析物(一种脱氢酶,这里是 G6PDH)的溶液混合,并加入脱氢酶的底物(这里是葡萄糖-6-磷酸酯)。接着让酶与其底物反应适当的时间并将在纤丝上的 NAD^+ 基转变成 NADH , 在 ECL 仪器中测量纤丝的 ECL。生物传感器纤丝的 ECL 性能的变化指示了酯 G6PDH 的存在。发现具有下述优点: (1) NAD^+ 和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 共反应剂的贴近导致比分子间 ECL 反应更有效的分子内 ECL 反应。(2)ECL 活性试剂[NAD^+ 和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 共反应剂]被固定在纤丝上, 这使它们沉降或被磁力吸附到 ECL 电极上, 导致光发射增强。(3)纤丝具有极高的表面积, 从而可以固定大量的共反应剂[NAD^+ 和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$], 理论上增强了脱氢酶检测时的光输出。(4)纤丝是导体 - 当所述生物传感器到达电极时, 其大部分实际并不与电极接触的表面积可接收电压并参与 ECL 反应。(5)所述生物传感器被设计成用来检测使用 NAD^+ 或 NADH 作为辅助因子的脱氢酶。许多这种酶存在并可用本发明检测。

碳纤丝被用作一酶生物传感器的固体载体。因为所述酶生物传感器是水溶性的, 它只可用一次, 除非它被固定(固定化使它可从分析物溶液中回收)。美国专利说明书系列 08/467712 号对固体载体和(固体)电极上的固定化进行了讨论并提出了权利要求。本专利说明书验证了碳纤丝作为固体载体的用途。所述酶生物传感器可通过吸附附着于纤丝上。所述纤丝可以是未改性的纤丝或优选为经化学改性的纤丝。纤丝的化学改性优选通过烷基化进行。生物传感器的吸附通过培养和酶生物传感器与烷基化纤丝的混合来进行。作为固体载体的纤丝之所以是新的和具吸引力是因为: (1)它们具有潜在地导致高的光发射的高的固定化表面积, (2)蛋白质诸如所述生物传感器可被方便地被吸附而没

有共价化学结合, (3)纤丝是导电性的, 当与电极接触时可增强 ECL, (4)纤丝本身可构成电极, 在这种情况下电极本身是一生物传感器载体。

5 磁化颗粒可用作分离装置。例如在一复杂混合物诸如血中可能存在一分析物的诊断工作中从复杂混合物分离出具体分析物是有用的。因为复杂混合物可能干扰分析物的分析, 因此需要将分析物结合到一固体表面上, 从而可将整个混合物从分析物上洗掉从而可进行其检测。如果所需的分析物可特异结合到磁化颗粒上, 那么这种颗粒物就可通过磁体保留, 可从分析物上洗去复杂混合物, 然后进行检测。因为纤丝是能特异和有效地结合生物分子的颗粒物, 磁化纤丝有利地被用作固相分离装置, 特别是在 ECL 分析中。纤丝通过进行处理诸如化学反应或其所悬浮的溶剂的变化(例如从水到二甲基甲酰胺)来磁化。据推测这种处理导致了在许多纤丝的物理聚集上的变化。因为纤丝中含有一些铁[约 0.5 % (重量)], 它们具有一旦聚集就实际磁化的能力。10 进行几种处理以提高纤丝的磁化率。要求这些处理能引起在纤丝聚集上的变化, 这本身又使纤丝被有效地吸到磁体上。磁化纤丝具有至少两项独特的优点。第一, 它们具有非常高的单位重量表面积。因此获得同样的结果只需要使用较少的纤丝(例如与 Dynal 珠相比)。第二, 纤丝是导电性的。这样, 在诸如磁化颗粒被保留在一电极上的 ECL 等应用中它们具有有利条件。因此, 因为其具导电性, 它们实际成为电极的一部分, 增强了光输出效能。20

实施例

(1)装置

25 使用如图 1 和 2 所示的采用三电极的流通装置。
工作电极 - 金片, 3mm 直径
反电极 - 金片, 3mm 直径
参比电极 - Ag/AgCl

特氟隆垫片(0.15''厚)

有机玻璃面板

入口管=.042'' id, 聚丙烯

吸气速率: 0.01-5ml/min 可调

5 恒电位器: 微处理器控制

发光计: Hamamatsu R374 PMT(低增益红敏管); PMT 电压在
0-1400V 可调

(2)ECL 测量程序(三电极池操作)

10 所述 ECL 测量程序包括三个步骤: (1)预稳定, (2)测量, 和(3)清
洗。所述预稳定步骤涉及以 2.0V/sec 进行三角波电压的施用: 0.0V 到
+2.2V 到-1.0V 到+0.6V。测定步骤涉及以 1.0V/s 进行的从+0.6V 至
+2.8V 到+2.0V 的三角波形的应用。清洗步骤涉及从+0.0V 到+3.0V 到
15 -0.5V 到 0.0V 的方波电压的应用。所有电压值均是以 Ag/AgCl 参比电
极为基准的。

实施例 1

钌标记肽纤维的合成

本实施例显示在 ECL 分析器中的一种酶检测试剂的合成。

20

钌肽纤维合成:

通过常规的溶液相方法合成 FmocNH-Gly-Lys(N^ε-CBZ)-Phe-Gly-
COOH 四肽, 将这种肽(71mg, 0.093mmol)与一种 Ru(bpy)₃²⁺ 的伯胺衍
生物(IGEN, Inc., Gaithersburg, MD)(73mg, 0.078 mmol)、用作活化试剂
25 的 EDC(17.8mg, 0.093mmol)和作为催化剂的 HOBT(12.58mg,
0.093mmol)反应。其产物 FmocNH-Gly-Lys(N^ε-CBZ)-Phe-Gly-CO-
NH-Tag (170mg, 0.223mmol)用吡啶(96ml)和二氯甲烷(1.1ml)去保护。
四肽-Ru(bpy)₃²⁺化合物的结构通过 ¹H-NMR 确证。将羧基纤维

(54mg)加到四肽-Ru(bpy)₃²⁺(5mg, 0.003mmol)的二氯甲烷(2ml)溶液中。然后加入 EDC(5.8mg, 0.03mmol)和 HOBT(4mg, 0.03mmol)。将该反应混合物搅拌过夜。将纤丝用水、甲醇、乙腈和二氯甲烷彻底洗涤。将产品纤丝用在乙腈(4ml)中的三甲基硅烷基碘化物(TMSI, 1ml)在
5 40 °C 处理 3 小时。将最终的产物纤丝用水、甲醇、乙腈、IGEN 标准 ECL 测定缓冲液(IGEN, Inc., Gaithersburg, MD)和二氯甲烷彻底洗涤。

实施例 2

10 使用 Ru(bpy)₃²⁺ 标记的肽纤丝进行胰蛋白酶和糜蛋白酶活性的 ECL 测定

按实施例 1 所述, 将 Ru(bpy)₃²⁺ 标记的四肽[NH₂-Gly-Lys-Phe-Gly-Ru(bpy)₃²⁺]与羧基化的纤丝结合。这种 Ru(bpy)₃²⁺-标记的肽纤丝(RPF)被用来检测水解酶胰蛋白酶和糜蛋白酶的活性。简要地说, 将所述 RPF
15 加入到含有任一种酶或两种酶的水溶液中。因为所述肽被设计成含有胰蛋白酶和糜蛋白酶的特异裂解部位(图 3), 以及因为纤丝是一固体, 酶的作用会将 Phe-Gly- Ru(bpy)₃²⁺(胰蛋白酶)或 Gly- Ru(bpy)₃²⁺(糜蛋白酶)释放到溶液中。培养适合的时间使所述酶将固相肽裂解后, 通过
20 标准方法诸如离心、过滤或用一磁体移除纤丝来将水溶液与纤丝分离。然后通过 ECL 检测水溶液中释放出的 Phe-Gly- Ru(bpy)₃²⁺或 Gly- Ru(bpy)₃²⁺。

尽管这里所示的是胰蛋白酶和糜蛋白酶的测定, 但是其它水解酶也可用与适当的 Ru(bpy)₃²⁺-标记的酶底物结合的纤丝来检测。这种酶(和改性的纤丝)包括: 核酸酶[使用与 Ru(bpy)₃²⁺ 标记的 RNA、单绞合
25 DNA 或双绞合 DNA 结合的纤丝]、葡萄糖苷酶[使用与 Ru(bpy)₃²⁺ 标记的糖、低聚糖或多糖结合的纤丝]或脂酶(使用与 Ru(bpy)₃²⁺ 标记的类脂类结合的纤丝)。

实施例 3

用纤丝进行胰蛋白酶的 ECL 检测

将 30 μ l 在 1mM HCl 中的 58.9 μ M 胰蛋白酶(终浓度=0.59 μ M)或
30 μ l 的 1mM HCl 加入到 2.97ml 在标准 ECL 测定缓冲液(IGEN, Inc.,
5 Gaithersburg, MD)中的 RPF(纤丝-Gly-Lys-Phe-Gly- Ru(bpy)₃²⁺)悬浮液
(2.2mg/ml)中。然后在室温下旋转两种悬浮液。定期停止转动, 将悬浮
液迅速离心并测量含水上清液的 ECL。培养 30 分钟后的 ECL 结果表
明样品的 ECL 比率(具胰蛋白酶样品的 ECL/没有胰蛋白酶样品的 ECL)
是 1.29。44 小时后, 所述 ECL 比率是 2.05。这些结果证明胰蛋白酶
10 可通过其从纤丝水解释出电致化学发光钌标记物的能力来检测。

实施例 4

用纤丝进行糜蛋白酶的 ECL 检测

将 30 μ l 在 1mM HCl 中的 34.2 μ M 糜蛋白酶(终浓度=0.34 μ M)或
15 30 μ l 的 1mM HCl 加入到 2.97ml 在标准 ECL 测定缓冲液(IGEN, Inc.,
Gaithersburg, MD)中的 RPF(纤丝-Gly-Lys-Phe-Gly- Ru(bpy)₃²⁺)悬浮液
(0.15mg/ml)中。然后在室温下旋转两种悬浮液。定期停止转动, 将悬
浮液迅速离心并测量含水上清液的 ECL。ECL 结果表明最初(时间=0)
样品的 ECL 比率(具糜蛋白酶的 ECL/没有糜蛋白酶的 ECL)为 1.06。
20 培养 30 分钟后, 所述比率升至 1.25, 培养 23 小时后, 所述比例升至
1.85。这些数据表明糜蛋白酶活性可通过所述酶从纤丝固体载体释放
电致化学发光标记物 Ru(bpy)₃²⁺的能力来检测。

实施例 5

经 NHS 酯共价连接蛋白质与纤丝

为证明蛋白质可经 NHS 酯共价连接到纤丝上, 按下述将抗生蛋
白链菌素、抗生物素蛋白和胰蛋白酶连接到纤丝上。

将 0.5mg NHS-酯纤丝用 5mM 磷酸钠缓冲液(pH=7.1)洗涤并弃去

上清液。将 200 μ l 抗生素蛋白链菌素溶液(1.5mg 在相同的缓冲液中)加到
纤丝中并在室温下将所述混合物转动 5.5 小时。然后顺序各用 1ml 下
列缓冲液洗涤纤丝: 5mM 磷酸钠(pH=7.1)、 PBS(0.1M 磷酸钠,
0.15M NaCl, pH=7.4)、 ORIGEN 测定缓冲液(IGEN, Inc., Gaithersburg,
5 MD)和 PBS。将这种抗生素蛋白链菌素纤丝贮在 PBS 缓冲液中备用。

将 2.25mg NHS-酯纤丝在 500 μ l 5mM 磷酸钠缓冲液(pH=7.1)中超声
处理 40 分钟并弃去上清液。将纤丝悬浮在 500 μ l 5mM 磷酸钠缓冲
液(pH=7.1)中并加入 300 μ l 含 2mg 抗生物素蛋白(Sigma, A-9390)由相
同缓冲液制备的抗生物素蛋白溶液。将混合物在室温下转动二小时,
10 在 4 $^{\circ}$ C 贮放过夜并在室温下再转动一小时。用 1ml 5mM 磷酸钠缓冲液
(pH=7.1)洗涤所述纤丝四次并用 PBS 缓冲液洗涤两次。将所述抗生物
素蛋白纤丝悬浮在 200 μ l PBS 缓冲液中存贮。

通过将 1.1mg NHS-酯纤丝(按抗生物素蛋白纤丝中的方法处理)和
200 μ l 在 5mM 磷酸钠缓冲液(pH=7.1)中制备的 1.06mM 胰蛋白酶溶液
15 混合并在室温下转动 6.5 小时来制备胰蛋白酶纤丝。然后用 1ml 5mM
磷酸钠缓冲液(pH=7.1)洗涤胰蛋白酶纤丝三次并将其悬浮在 400 μ l 相
同缓冲液中贮存。

实施例 6

20 使用 ECL 分析器进行 DNA 探查测定

为消除 ECL 测定中分析物在抗生素蛋白链菌素(或抗生物素蛋白)结
合的纤丝上的非特异性结合, 将这些纤丝用 4mg/ml BSA(牛血清白蛋
白)溶液在室温下封闭 6 小时并在 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。

所述 DNA 探查测定如图 4 所示。实验开始先用 5mM 磷酸钠缓冲
25 液(pH=7.1)洗涤 115 μ g BSA 封闭的抗生物素蛋白-纤丝和抗生素蛋白链
菌素纤丝(来自实施例 5)二次。每种纤丝被等分成各含 100 μ l 相同缓冲
液的约 57 μ g 纤丝的两个试管中。将一个试管抗生素蛋白链菌素(抗生物

素蛋白)纤丝与 4 μ l 的 4nM 与钆标记物标记的低聚物结合的生物素标记 DNA(70 核苷酸)混合。在另一管中加入 4 μ l 钆标记物标记的低聚物(与在生物素标记 DNA 样品中相同的浓度)只用于对照测定。将反应混合物在室温下培养 15 分钟并用 300 μ l ORIGEN 测定缓冲液(IGEN, Inc., Gaithersburg, MD)洗涤七次,然后将纤丝悬浮在 600 μ l ORIGEN 测定缓冲液中并等分成两管,利用重力捕获纤丝进行重复 ECL 计数。所述 ECL 测定的结果小结如下:

样品	ECL 计数
抗生物素蛋白纤丝(对照)	161
抗生物素蛋白纤丝(DNA 探查剂)	2212
抗生物素蛋白链菌素纤丝(对照)	885
抗生物素蛋白链菌素纤丝(DNA 探查剂)	4248

同样的抗生物素蛋白纤丝测定也使用纤丝的磁捕获来进行。除了 DNA 与纤丝结合后没有洗涤外,实验步骤和上述的相同。样品用程序化步骤在 ECL 分析器中洗涤。抗生物素蛋白纤丝 DNA 探查剂的 ECL 计数为 3835, 其对照为 205。

吸附在 C₈-纤丝上的抗生物素蛋白也通过使用如上述的纤丝的磁捕获的 DNA 探查剂测定来检查。其 ECL 计数为抗生物素蛋白纤丝 DNA 探查剂的 15792 对其对照的 205。

实施例 7

抗体在碳纳管上的共价固定

本实施例的目标是将抗体固定在碳纳管的表面上。这种抗体改性的纳管可用于各种应用中,包括特定分析物的免疫分析检测和生物特异亲和分离。免疫分析可使用抗体改性的纳管作为固体载体来进行。如果所述固体载体是固定的或者是可与溶液相分离的(例如通过过滤、离心或磁性),那末固体载体的使用就容许有清洗步骤。清洗步骤的采用将使抗体改性的纳管可用于多种类型的基于电致化学发光的免

疫测定中。这种抗体改性的纳管可作为常规使用的磁珠的替代物或作为能通过过滤俘获的可悬浮载体或作为一次应用柱体形成的永久固定的载体。

5 在伯胺和羧基之间的纤丝 - 抗体结合

NHS 酯纤丝的制备

将 148.4mg 碳纤丝(Hyperion Catalysis International, Cambridge, MA)在 CH_2Cl_2 /二噁烷混合物中的悬浮液与 239mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 399mg EDC 混合并让反应进行 4 小时。得到的 NHS 酯改性纤丝(NHS - 纤丝)的产量为 214.7mg。

抗体改性纤丝的制备

将 NHS 酯纤丝(84.5mg)用 1.0ml 偶联缓冲液(0.2M NaHCO_3 , pH8.1)预处理, 然后悬浮于另一 1.0ml 偶联缓冲液(0.1M 磷酸钠, 0.5M NaCl, pH7.5)中。将单克隆抗体(抗葡萄糖氧化酶(1.5mg 在 2.0ml 偶联缓冲液中)加入到纤丝中并将悬浮液转动 1 小时, 让 NHS 纤丝与抗体反应(主要与抗体的赖氨酸侧链反应)。将得到的纤丝过滤并用偶联缓冲液重复洗涤。

20

葡萄糖氧化酶与抗体改性纤丝的结合

在抗体改性纤丝上的无抗体覆盖部位通过用 1% 溶于磷酸盐缓冲液(pH 6.0)的 BSA 转动 10 分钟来封闭。将葡萄糖氧化酶溶解于该 BSA 溶液中并将这种溶液与纤丝混合 1.5 小时, 最后用中性 pH 磷酸盐缓冲液清洗纤丝直到在 280nm 处洗脱液的分光光度监测观察不到蛋白质为止。

25

抗体改性纤丝上的抗体的检测

在纤丝上的官能抗体分子通过结合的抗原葡萄糖氧化酶的催化活性定量。葡萄糖氧化酶活性通过将酶样品(游离酶或与抗体改性纤丝特异性结合的酶)加入到含有 0.1M 磷酸钠(pH 6.0)、20 μ M 葡萄糖、
5 183nM 辣根过氧化物酶和 30 μ M 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)的比色杯中进行分光光度测定。葡萄糖氧化酶的活性通过在 25 $^{\circ}$ C, 414nm 处分光光度测定吸光度增加(绿色形成)的比率来测量。结合酶的定量结果表明每克纤丝有 1.52 μ mol 官能抗体。

10

伯胺和碳水化合物基团之间的纤丝-抗体偶联

氨基纤丝的制备

在室温下将 NHS-纤丝(214.7mg)在新制备的 0.2M NaHCO₃(pH 8.1)中的悬浮液与 1,2-二氨基乙烷(100 μ l)混合。将该悬浮液搅拌约 5 小时。然后将这种混合物在布氏漏斗中吸滤并用水(3 \times 10ml)和甲醇(3 \times 15 10ml)洗涤并在真空中干燥过夜。氨基纤丝的产量为 144mg。茚三酮试验结果证明二氨基乙烷(非结合的)仍被吸附到纤丝上。将纤丝再悬浮于水中并用超声处理 90 分钟。茚三酮试验结果表明了纤丝被充分解离了非共价结合胺。

20

抗体改性纤丝的制备

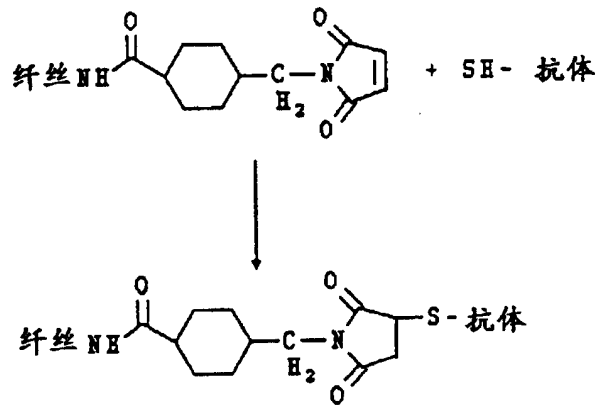
将 NAP-5 柱用 100mM 乙酸盐(pH 5.5)平衡并加入单克隆抗体(抗-葡萄糖氧化酶, 1.5mg 在 300 μ l 缓冲液中)并用缓冲液(1ml)洗脱。让该溶液在室温下与 50 μ l 20mM NaIO₄(最终 NaIO₄浓度为 1mM)反应 2 小时。该反应通过加到预平衡的 NAP-10(0.15M KH₂PO₄, pH6.0)终止并用
25 相同的缓冲液洗脱。在含氨基纤丝的 10ml 试管中收集洗脱液并使这种悬浮液反应 2-3 小时。然后将纤丝用反应缓冲液洗涤并贮存在 5ml KH₂PO₄(pH 5.5)中。

在抗体改性纤丝上的抗体的检测

在纤丝上的官能化抗体分子通过结合抗原即上述的葡萄糖氧化酶的催化活性定量。结合酶的定量结果表明每克纤丝有 $0.36\mu\text{mol}$ 官能抗体。

5

马来酰亚胺和巯基间的纤丝-抗体偶联



10

小鼠单克隆抗体的还原

15

将二硫苏糖醇(DTT, 25mg, 0.16mmol)加入到抗体溶液(2.47mg, 在 2.9ml 中)中并将该混合物在室温下培养 1 小时。还原的抗体用 PD-10 一次性凝胶过滤柱(pharmacia)纯化。

抗体和马来酰亚胺的共价偶联

20

将马来酰亚胺纤丝(0.18mg)和普通纤丝(0.15mg)在室温下超声处理 15 分钟并在 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 30 分钟。然后, 将纤丝离心并除去上清液。然后在室温下将纤丝与还原抗体(12.4mg)在磷酸钠缓冲液(0.1M, pH7.2, 1.1ml)中培养 4 小时。

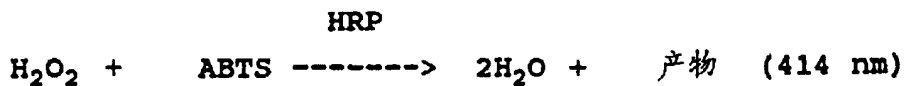
25

使用辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗-小鼠抗体

定量抗体纤丝上的抗体

将小鼠抗体纤丝在 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 用在磷酸钠缓冲液(0.1M, pH 7.5, 1ml)中的 0.1 % PEG 预培养 30 分钟。然后, 将其离心并除去上清液。将小

鼠抗体纤丝在室温下用在含 0.1 % PEG 的磷酸钠缓冲液(0.1M, pH 7.5, 500ml)中的 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体(0.01mg)培养 2 小时。然后用磷酸钠缓冲液(0.1M, pH 7.5, 1ml)中的 0.1 % PEG 洗涤该纤丝五次。通过分光光度法测量结合酶的催化活性来测定结合 HRP 的量。所述酶反应如下所示:



其结果表明在纤丝上小鼠抗体的密度是每克纤丝 1.84mg 抗体, 在普通(对照)纤丝上小鼠抗体的密度是每克纤丝 0.48mg 抗体(非特异性结合的程度是约 26 %).

实施例 8

通过加入赖氨酸制备双官能化纤丝

N_α -CBZ-L-赖氨酸苄基酯的合成:

其反应顺序如图 5 所示。将 N_ϵ -(叔丁氧羰基)-L-赖氨酸(2g, 8.12mmol)溶于甲醇(40ml)和水(40ml)中并用三乙胺将 pH 调整到 8。将 N-(苄氧羰基-氧代)琥珀酰亚胺在二噁烷中的溶液(2.4g, 9.7mmol 在 20ml 中)加入到上述混合物中并用三乙胺将 pH 保持在 8-9。将反应混合物搅拌过夜。通过旋转蒸发除去溶剂而获得粗制 N_α -CBZ- N_ϵ -(叔丁氧羰基)-L-赖氨酸。用 0.2M 碳酸钙(4ml)处理 N_α -CBZ- N_ϵ -(叔丁氧羰基)-L-赖氨酸并除去水层获得一种白色固体物。将所述固体物再悬浮于 N,N-二甲基甲酰胺(40ml)和苄基溴(1.16ml)中。将反应混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物用乙酸乙酯和水处理, 并将有机层通过硫酸镁干燥。除去溶剂获得粗制 N_α -CBZ- N_ϵ -(叔丁氧羰基)-L-赖氨酸苄基酯, 并使用 25 % 己烷/乙酸乙酯作溶剂通过硅胶层析纯化。在 0 °C 将三氟乙酸加入到在二氯甲烷在(10ml)中的 N_α -CBZ- N_ϵ -(叔丁氧羰基)-L-赖氨酸苄基酯(1g, 2.2mmol)中。将该反应混合物在 0 °C 搅拌 10 分钟, 然后在室温下再搅拌 2.5 小时。除去溶剂得到粗产物。通过硅胶层析

获得纯的 N_{α} -CBZ-L-赖氨酸苄基酯。

N_{α} -CBZ-L-赖氨酸苄基酯纤丝的合成:

5 将 N_{α} -CBZ-L-赖氨酸苄基酯的溶液(148mg, 0.32mmol, 在 20ml 二氯甲烷和 176 μ l 三乙胺中)加入到羧基纤丝(300mg)在二氯甲烷(18ml)的悬浮液中。然后加入 HOBT(43.3mg, 0.32mmol)和 EDC(61.3mg, 0.32mmol)。在室温下将反应混合物搅拌过夜获得粗产物。将产物纤丝用甲醇、二氯甲烷和水充分洗涤, 然后在真空下干燥。

10 双官能化纤丝 Fib-Lys(COOH)NH₂ 的合成

将氢氧化钠(1N, 4ml)加入到在甲醇(4ml)中的 N_{α} -CBZ-L-赖氨酸苄基酯纤丝(113mg)中, 将该反应混合物搅拌过夜。将产物 N_{α} -CBZ-L-赖氨酸纤丝用水和甲醇充分洗涤并将纤丝在真空下干燥。向 N_{α} -CBZ-L-赖氨酸纤丝(50mg)在乙腈(4ml)的悬浮液中加入三甲基硅烷碘化物
15 (1ml)。将该混合物在 40 °C 搅拌 3 小时。将最终的双官能化纤丝用水、甲醇、0.5N 氢氧化钠、乙腈和二氯甲烷充分洗涤。氨基酸分析显示每克纤丝有 0.3 μ mol 赖氨酸。

羟基、羰基(或氨基)双官能化纤丝可通过这里所述的类似方法, 通过使用丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸来制备。硫羟基(thiolated)和羰基(或氨基)双官能化纤丝可使用半胱氨酸制备。羰基和氨基双官能化纤丝可
20 使用天冬氨酸或谷氨酸制备。

实施例 9

作为基于 ECL 的生物传感器的碳纳管

25 向双官能纤丝(113mg)在二氯甲烷(8ml)的悬浮液中加入 4-二甲氨基吡啶(DMAP, 19.5mg, 0.16mmol)和 1,3-二环己基碳二亚胺(DCC, 33mg, 0.16mmol)(图 6)。将混合物搅拌 5 分钟, 然后加入 4-甲基-4'-(8-

羟基辛基)2,2'-联吡啶(47mg, 0.16mmol)。在室温下将反应混合物搅拌过夜。得到的产物纤丝顺序用 DMF、50 % 二噁烷/水、甲醇和水充分洗涤。将纤丝悬浮于乙醇(4ml)和水(4ml)的混合物中并加入顺-二氯双(2,2'-联吡啶)钌(II)二水合物(45.2mg, 0.087mmol)。将该混合物在 110
5 °C 回流 5.5 小时。将这种钌配合物-改性纤丝用水、标准 ECL 测定缓冲液(IGEN, Inc., Gaithersburg, MD)、甲苯、50 % 二噁烷/水充分洗涤, 然后顺序在乙腈、乙二醇和甲醇中回流。将这种钌配合物-改性纤丝在乙腈(4ml)中与 TMSI(4ml)在 40 °C 反应 4 小时以使 CBZ 基去保护, 然后用甲醇、水和氢氧化钠(1N)洗涤。将这种终产物在真空下干燥。然后
10 后将纤丝悬浮于二氯甲烷(5ml)中并加入三乙胺(5 滴)。向该悬浮液中加入琥珀酸酐(40mg)。将该反应混合物在室温下搅拌过夜并将产物用二氯甲烷、甲醇和水洗涤并在真空下干燥。将这种羧酸/钌配合物-改性纤丝再悬浮于二噁烷(5ml)中, 然后加入 N-羟基琥珀酰亚胺(100mg)和 EDC (167mg)。将反应混合物在室温下搅拌 4 小时。得到的 NHS 酯/
15 钌配合物-改性纤丝用二噁烷和甲醇洗涤。将 NHS 酯/钌配合物-改性纤丝再悬浮于二噁烷(2ml)中并加入 NAD 类似物的碳酸氢钠溶液(75ml 在 2ml 0.2M、pH 8.6 的 NaHCO₃ 中)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。然后将纤丝用水、碳酸氢钠(0.2M)和甲醇充分洗涤, 然后在真空下干燥得到生物传感器纤丝。

20

实施例 10

作为基于 ECL 的生物传感器的碳纳管的使用

一种基于 ECL 的生物传感器通过纤丝的化学改性来制备。这种改性纤丝使用 NH₂/COOH 双官能化纤丝(实施例 8)来制备。向一个官能
25 团(NH₂)加上一个 NAD⁺类似物并向另一个官能团加上一个 Ru(bpy)₃²⁺的衍生物。这种生物传感器纤丝的结构如图 7 所示。

将所述生物传感器设计成便于接受 NAD(P)⁺/NAD(P)H 作为辅助因子的脱氢酶和便于接受 NAD(P)⁺/NAD(P)H 作为辅助因子的脱氢酶

底物的检测。已知 NAD(P)^+ 和 NAD(P)H 在促使 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ECL 的能力方面有极大的差异(E. Jameison et al., Analytical Chemistry, in press)。因此, 脱氢酶的活度可通过其还原/氧化 $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ 的能力来检测, 而这种还原/氧化 $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ 的能力又可通过 NAD(P)^+ 和 NAD(P)H 产生 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 电致化学发光能力上的差异来观测(图 8)。同样, 因为脱氢酶在其底物上的作用定比地伴随着 NAD(P)^+ 转变成 NAD(P)H 或 NAD(P)H 转变成 NAD(P)^+ , 其底物的存在也通过电致化学发光检测。

要使用纤丝载荷的基于 ECL 的生物传感器, 则将所述生物传感器与一种含有脱氢酶和未知量的该脱氢酶的底物(该底物是被分析物)的水溶液或一种含有脱氢酶底物和未知量的脱氢酶(该脱氢酶是分析物)的水溶液混合。培养适当时间以进行酶反应和使固定在纤丝上的 NAD(P)^+ 或 NAD(P)H 还原或氧化后, 将纤丝吸入 ECL 仪器中测量纤丝的 ECL。ECL 测量在一种不含可测浓度的三丙胺(因为在本发明中 $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ 是三丙胺的替代物)的缓冲液中进行。

这种基于 ECL 的生物传感器的具有吸收力的特征有: 在纤丝上的同一双官能基上 $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ 与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的邻近, 这在电化学 ECL 机理上增强了电子传递的效率(分子内电子传递比分子间电子传递更有效); ECL 活性试剂 $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ 和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 两者都载于可磁保留在 ECL 仪器电极上的纤丝上, 这将增加光发射; 纤丝具有可固定高密度(每单位重量)的 $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ 和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的极高表面积, 这将让更多光被发射; 所述生物传感器是通用的, 它能检测许多不同的分析物(接受 NAD(P)^+ 或 NAD(P)H 作为辅助固子的任何脱氢酶或这些酶的底物)。

25

实施例 11

使用纤丝载荷的基于 ECL 的生物传感器检测

葡萄糖-6-磷酸酯脱氢酶(G6PDH)

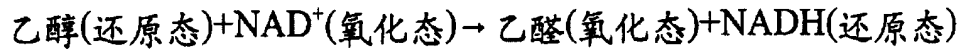
将由共价结合到双官能化加合物上的 NAD^+ 类似物和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 类似物两者改性的纤丝(ECL 生物传感器纤丝)用于检测酶即葡萄糖-6-磷酸酯脱氢酶。将 ECL 生物传感器纤丝($860\mu\text{g/ml}$)与含有约 $50\mu\text{M}$ 葡萄糖-6-磷酸酯的中性 pH 缓冲溶液混合。向一个试管中加入 G6PDH, 其浓度为 $3.6\mu\text{M}$ 。向第二个对照试管中加入去离子水。立即测量纤丝的 ECL。图 9 显示在时间为零时, 具有 G6PDH(DH+)和没有 G6PDH(DH-)的纤丝的 ECL 为相同水平。由测定缓冲液(无纤丝)得到的背景 ECL 也被显示(A.B.)。培养 42 小时(在室温下转动)后, 更多纤丝被提取并且其 ECL 被再次测量。如图 9 所示, 测定缓冲液(A.B.)的 ECL 和没有 G6PDH(DH-)的纤丝的 ECL 相当于时间为零时所见的 ECL。但是, 含 G6PDH(DH+)样品的 ECL 实际比时间为零时的 ECL 低。该结果表明 G6PDH 活度可用载有 ECL 生物传感器的纤丝检测。在没有纤丝情况下, 单独用这里所用的具体 NAD^+ 类似物(未固定)和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (未固定)试验, 结果证实 NAD^+ 类似物的还原(NADH)型没有其氧化(NAD^+)型更有效地导致 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 电致化学发光。

实施例 12

使用碳纳管作为基于 ECL 的酶生物传感器载体

制备含有已与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)酶辅助因子的类似物和钌(II)三联吡啶($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)的类似物两者相连的脱氢酶的酶生物传感器。限定所述 NAD^+ 类似物使其在结合时能在酶的辅助因子的结合部位结合并自然作用(即它能够通过正常化学机制在所述酶的天然底物存在下被所述酶还原)。此外, 限定所述 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 类似物, 使其能与 NAD^+ 物理接触(图 10)。在 ECL 仪器诸如 IGEN Origen[®] 分析仪(IGEN, Inc., Gaithersburg, MD)中, NAD^+ 和其还原形式 NADH 促使 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 电致化学发光到不同程度。因此, 基于其光输出, 可测定溶液中是否存在 NAD^+ 、 NADH 或这两者的某些混合物(F. Jameison et al., Analytical Chemistry, in press)。这样, 所述生物传感器利用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的 ECL 反

应的效能间的差异测定 NAD^+ 的还原程度, 从而测定所述酶的底物的存在。例如, 乙醇脱氢酶催化下列反应:



5 基于乙醇脱氢酶的 ECL 生物传感器可将乙醇转变成乙醛, 同时将 NAD^+ 转变成 NADH , 因为固定在生物传感器上的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的 ECL 性质取决于 NAD^+ 或 NADH 是否被固定, 所述酶生物传感器的 ECL 可报告乙醇的存在。这种生物传感器的一个具吸引力的特点是因为 ECL 反应时所述辅助因子的 NADH 形式被再氧化成 NAD^+ 形式, 因此一个生物传感器分子可重复用于检测多个分析物分子。

10 因为所述生物传感器是以一种可溶性酶(一种脱氢酶)为基础的并且分析物(例如乙醇)也是可溶的, 所以将生物传感器固定是有益的, 这样可使它重复地用于分析不同的含分析物的样品而不会被所用的含分析物溶液洗掉。这种固定用基于乙醇脱氢酶(ADH)的 ECL 生物传感器进行(见图 10 中的图示)。图 11 显示了所述基于 ADH 的生物传感器在 Dynal M450 珠(Lake Success, NY)上的固定(左)和在烷基纤丝上的固定(右)。两图均没有按比例画出, 生物传感器分子实际上比固定载体的尺寸小得很多。所述烷基纤丝通过氧化纤丝(带 COOH 基)与 1-氨基辛烷反应来制备。在两种情况下(珠和纤丝), 所述酶生物传感器通过 15 在缓冲的水溶液中非共价吸附固定。

20 乙醇使用珠和纤丝两者固定的 ECL 基于 ADH 的生物传感器来检测。吸附在珠或纤丝上的酶传感器的量, 通过在 280nm(在 280nm 处的吸光度指示溶液中的蛋白质含量)下的 UV 吸收测量溶液中剩余(未被吸附的)蛋白质量来测定。其结果表明每 mg 纤丝结合 0.308mg ADH 生物传感器, 而每 mg 珠结合 0.015mg ADH 生物传感器。因此以每单位重量固体载体计, 纤丝的吸附能力超过 Dynal 珠吸附能力 20.5 倍。

25 乙醇的 ECL 检测通过将吸附在珠上的 ADH 生物传感器(0.50-1.25mg)或吸附在纤丝上的 ADH 生物传感器(0.04-0.10mg)与含 0.1M 磷酸钠缓冲液(pH 7.2)、12mM 氨基脲(semicarbazide)的溶液混合来进

行。一些样品也含 0.5mM 的分析物即乙醇。将涂有生物传感器的固体载体吸到 IGEN Origen[®] ECL 分析仪(IGEN, Inc., Gaithersburg, MD)中并测量 ECL。一个这种实验的结果在图 12 中显示。在珠或纤丝二种情况下, 酶生物传感器的 ECL 信号由于乙醇的存在而下降。这个结果和在这种 NAD⁺类似物的氧化/还原状态对 Ru(bpy)₃²⁺电致化学发光的影响的溶液研究(使用未固定的 NAD⁺/NADH 和未固定的 Ru(bpy)₃²⁺)中获得的结果一致。这些结果表明纤丝可用作 ECL 中酶的载体, 特别是用作基于酶的 ECL 生物传感器的载体。也应指出, 尽管使用了少于 20 倍的纤丝, 但使用纤丝所看到的结果和使用 Dynal 珠所看到的结果是类似的。

实施例 13

生物素标记纤丝和双官能生物素标记烷基纤丝

已发现纤丝表面可被生物素标记或同时烷基化和生物素标记。含这种改性物的纤丝然后可与任何抗生蛋白链菌素结合物质诸如抗生蛋白链菌素珠和抗生蛋白链菌素酶结合。

纤丝由于其高表面积而提供了作为固体载体的巨大优越性。可由强磁体制成的珠在分离测定上是非常有用的。此中所述的生物素标记纤丝结合了所述纤丝和所述珠两者的优点。生物素标记烷基纤丝是相同概念的延伸但展现了另外的烷基纤丝的蛋白质吸附性质。

涂有抗生蛋白链菌素和生物素的纤丝可在诊断中使用并且可用作电致化学发光测定中的俘获剂。

本发明的一个新的特征是二种固体载体在一种纤丝上的结合而产生一种双官能化纤丝。此外, 所公开的方法提高了珠的表面积并增强了纤丝的磁化。

生物素标记纤丝的制备

通过将基本按制备 O 中所述制备的 2.4mg 氨基纤丝与 9mg 在

0.2M NaHCO₃(pH 8.15)缓冲液中的 NHS 酯长链生物素混合制备生物素标记纤丝。将这种混合物在室温下转动四小时并用同样的缓冲液洗二次。

5 生物素标记烷基纤丝的制备

通过两步反应制备生物素标记烷基纤丝。首先，将 4.25mg 双官能纤丝(含氨基和羧基)与 25mg NHS 酯长链生物素混合。洗涤纤丝并在真空下干燥。

第二步反应是通过混合 4mg 生物素标记双官能纤丝与 11mg EDC[1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺]、7.5mg DMAP (4-二甲氨基吡啶)和 10 μ l 于 0.5ml DMF 中的 NH₂(CH₂)₇CH₃ 来进行。将所述混合物在室温下搅拌过夜。最后得到的生物素标记烷基纤丝用 CH₂Cl₂、MeOH 和 dH₂O 洗涤。

15

实施例 14

在 ECL 测定中用作固体载体的生物素标记纤丝

生物素标记纤丝可在涉及需要抗生素蛋白链菌素 - 生物素或抗生物素蛋白 - 生物素相互反应的形式 ECL 测定中使用。生物素标记纤丝例如可用抗生蛋白链菌素进一步衍生化。共价连接到纤丝(见实施例 13)上的生物素可与抗生蛋白链菌素形成强的非共价结合相互作用。因为抗生蛋白链菌素是具四个相同结合部位的四聚蛋白，所以与生物素标记纤丝结合的抗生蛋白链菌素几乎肯定具有可结合另外的生物素标记试剂的未被占据的结合部位。这样，生物素标记纤丝将被转变成抗生蛋白链菌素覆盖的纤丝。

25

有许多分析试验可用这种纤丝 - 生物素 - 抗生蛋白链菌素(FBS)载体进行。例如生物素标记抗 - 分析物抗体可被俘获在所述 FBS 载体上(在所述抗体与分析物配合前或后)。使用生物素标记抗 - 分析物抗

体的测定方法被良好地建立起来。这种测定法包括目标分析物与导入的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的分析物竞争与抗-分析物抗体结合的竞争测定法。游离(未结合)分析物和游离(未结合) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的分析物可从纤维固定的抗体洗掉。洗涤步骤取决于通过包括离心、过滤的常规方法或通过磁体吸引而与溶液相物理分离的纤维。

除了竞争测定法外,也可在 FBS 载体上进行夹合型免疫测定。夹合免疫分析在诊断领域通常是为人熟知的,在特定的 ECL 检测中也是如此。这种测定涉及同时与两种抗体结合的分析物;第一种“主”抗体通过例如生物素标记而被俘获在一固体表面上,“次”抗体没有被俘获于一固体表面,但用信息基团诸如 ECL 应用中的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记。这种夹合测定可使用纤维作为固体俘获载体进行,依此纤维如上段所述被俘获。所以,在这种测定中,所述纤维将会与生物素共价联接,而生物素将与抗生蛋白链菌素相连,抗生蛋白链菌素本身又与生物素标记主抗体相连,主抗体将与分析物(如果存在)相连,分析物将与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的次抗体相连。

同样, DNA 探查测定可使用 FSB 载体进行。生物素标记绞合 DNA 可与 FBS 载体结合并可在互补的单绞合分析物 DNA 分子和互补的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的低聚核苷酸之间发生竞争性杂化。

另一类型的生物素标记纤维、生物素标记烷基化纤维可在免疫测定和 DNA 探查测定中使用。如实施例 13 中所述,双官能纤维可通过生物素与一种类型的官能团共价结合和烷基链与另一种类型的官能团共价结合来改性。得到的烷基化、生物素标记的纤维可在特异性与抗生蛋白链菌素或抗生物素蛋白(通过生物素)结合中以及蛋白质的(通过烷基链)吸附中使用。

烷基纤维可用于与其它固体纤维结合,诸如抗生蛋白链菌素涂覆的磁珠,包括 Dynal 磁珠。纤维覆盖于这种珠上的一个优点是它们具有高得多的表面积(每单位重量)。因此,如果纤维可结合到磁珠的外表面,那末这将极大地提高表面积,从而提高所述磁珠的结合能力。

可以想象烷基化、生物素标记纤丝可与抗生蛋白链菌素涂覆的珠混合而导致高亲和力抗生蛋白链菌素(珠)-生物素(纤丝)相互作用,从而使纤丝涂覆的珠具极高的表面积。因为烷基纤丝可通过吸附结合蛋白质,所以纤丝涂覆的珠可进一步与吸附的蛋白质包括抗生蛋白链菌素和抗体衍生化。正如上面所述,抗生蛋白链菌素或抗体涂覆的纤丝可用于免疫测定和 DNA 探查分析。因此,纤丝涂覆的珠可通过极大提高其表面积的改善珠的性能,从而在一指定测定中只需更少的珠就可获得相同的结果。

10

实施例 15

磁化的碳纳管

纤丝可具有磁性。作为纤丝制备方法的结果,使纤丝具有磁性或非磁性的程度受纤丝中存在的催化剂量来控制。这种方法公开于美国专利 4663230、5165909 和 5171560 中。

15

纤丝的磁性在纤丝被官能化后即成为烷基纤丝、蛋白质结合纤丝等后被观察到。在特定反应(例如烷基化)后,纤丝向磁体迁移的速度明显比反应前快得多。这种现象的一种假设是:在反应过程中可能发生某种聚集或溶剂化作用。但是其真实机制现在仍未被确定。

20

实施例 16

Ru(Bpy)₃与 PEG 改性纤的非特异结合的还原

25

用超声制备在 50mM 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)中 1.0mg/ml 的氯化盐氧化纤丝、使用过氧化苯甲酰的用 PEG 改性的纤丝和通过 NHS 酯连接的用 PEG 改性的纤丝的贮备分散体。分别将其各 2ml 的 10 倍系列稀释液置于 5 支聚丙烯试管中。向每支试管和 3 个缓冲液空白中加入 50 μ l 在相同缓冲液中的 Ru(Bpy)₃贮备液(约 10 μ M)。也制备三支没有 Ru(Bpy)₃的缓冲液试管,将所有试管在涡动混合器中混合并培养过夜。将所有试管离心以分离纤丝并将 0.1ml 上清液的等分试样转移到

新试管中并用 1.0ml Origen[®] 测定缓冲液 (IGEN, Inc., Gaithersburg, MD) 稀释并用一台 Magnalyzer[®] (IGEN, Inc., Gaithersburg, MD) 通过 ECL 分析 Ru(Bpy)₃。剩余在上清液中的 Ru(Bpy)₃ 的水平间接反映了没有与纤维特异性结合和的量 (图 13)。对于两种 PEG 改性的纤维材料来说, 在多至 0.1mg/ml 的纤维水平下, 实际上所有 Ru(Bpy)₃ 都留在上清液中。在所述纤维水平 1.0 mg/ml 下, 在上清液中的 Ru(Bpy)₃ 有 20 - 30% 的下降。相反, 对于氯化盐氧化纤维来说, 在 1.0mg/ml 下, 基本上没有 Ru(Bpy)₃ 留在上清液中, 而在没有 PEG 改性的这些纤维在 0.1mg/ml 水平下, 在上清液中的 Ru(Bpy)₃ 有 20 - 30% 的下降。

参考文献

1. Beaucage SL, Caruthers MH., 脱氧核苷亚磷酰胺, 一类新的合成脱氧核苷酸的重要中间体, Tetrahedron Lett 1982;22:1859-62.
2. Shibata DK, Arnheim N, Martin JW., 用聚合酶链反应检测在石蜡包埋组织中的人类乳头状瘤病毒, J. Exp. Med. 1988; 167: 225-30.
3. Yanofsky, C. 等人, (1981) Nucleic Acids Res., 24, 6647-6668.
4. Updyke TV, Nicolson GL., 用生物素酰化的单克隆抗体和链霉抗生物素 - 琼脂糖进行的膜抗原的免疫亲和分离, Methods Enzymol, 1986; 121: 717-25.
5. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik DC, Wolf DE., 通过非放射荧光源能量转移检测核酸杂交, Proc. Natl. Acad. Sci., 1988; 85: 8790-4.
6. Ngo TT., 用伯或仲羟基活化聚合物的方法, Makromol. Chem. Macromol. Symp., 1988; 17:224-39.
7. Coutlee F, Bobo L, Mayur K, Yoken RH, Viscidi RP., 用生物素酰化的 RNA 探针对 DNA 的免疫检测: 单克隆抗体对 DNA - RNA 杂

- 种的活性的研究, *Anal. Biochem.*, 1989; 181: 96-105.
8. Casadei J., Powell MJ., Kenten JH., 用哺乳动物表达载体对作为嵌合抗体的水母发光蛋白的表达和分泌, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990; 87: 2047-51.
9. 分子克隆, 实验室手册, 第2版, Sambrook, J. Cold Spring Harbor Laboratory New York.
10. Heney, G. And Orr., G.A., (1981) *Anal. Biochem.*, 114: 92-96.
11. Mullis KB, Faloona FA, DNA 经聚合酶催化的链反应在活体外的特殊合成, *Methods Enzymol*, 1987; 155: 335-50.
12. Lyons J, Janssen JWG, Bartram C, Layton M, Mufti GJ, 在骨髓发育异常病症中 Ki-ras 和 N-ras 癌基因的突变, *Blood*, 1988; 71: 1707-12.
13. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA, 用热稳定的 DNA 聚合酶进行 DNA 引物定向酶催扩增, *Science*, 1988; 239: 487-491.
14. Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM, 在人类颈癌细胞系中人类乳头状瘤病毒顺序的存在和表达, *Am. J. Pathol.*, 1985; 119: 361-6.
15. Reddy EP, Reynolds RK, Santo E, Barbacid M., 用于经 T24 人类膀胱癌基因获得转化性能的点突变, *Nature*, 1982; 300: 149-52.
16. Marmur J., (1961), *J. Mol. Biol.* 3, 208.

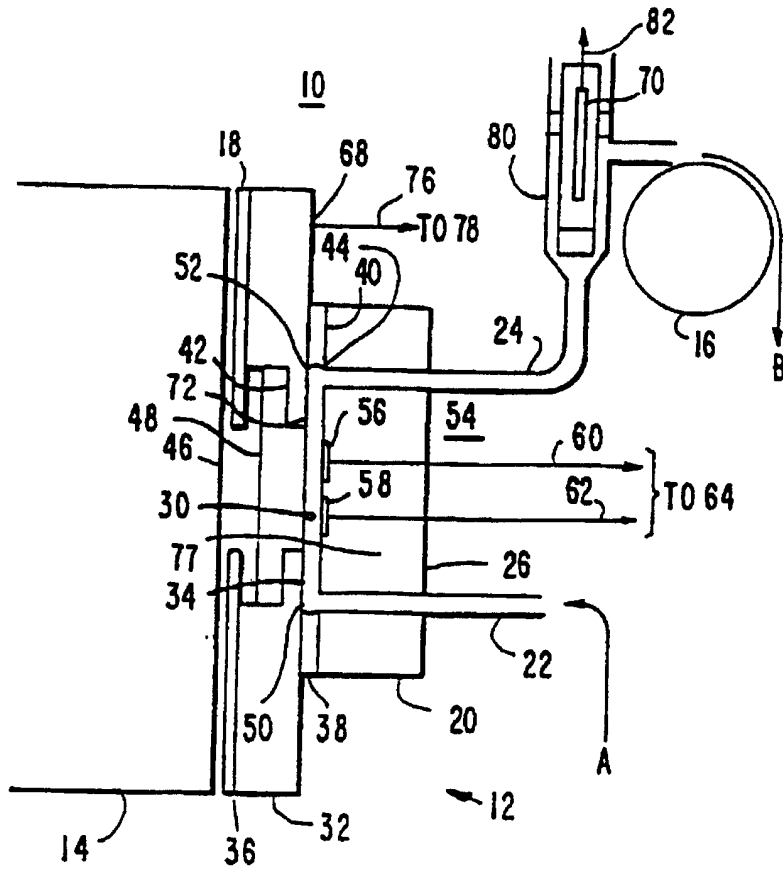


图 1

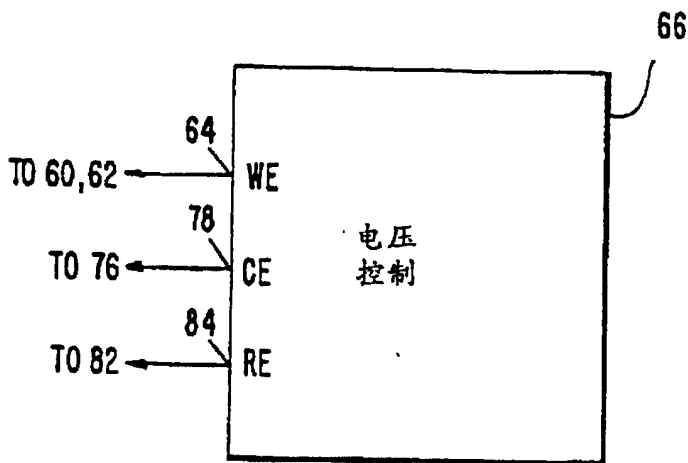
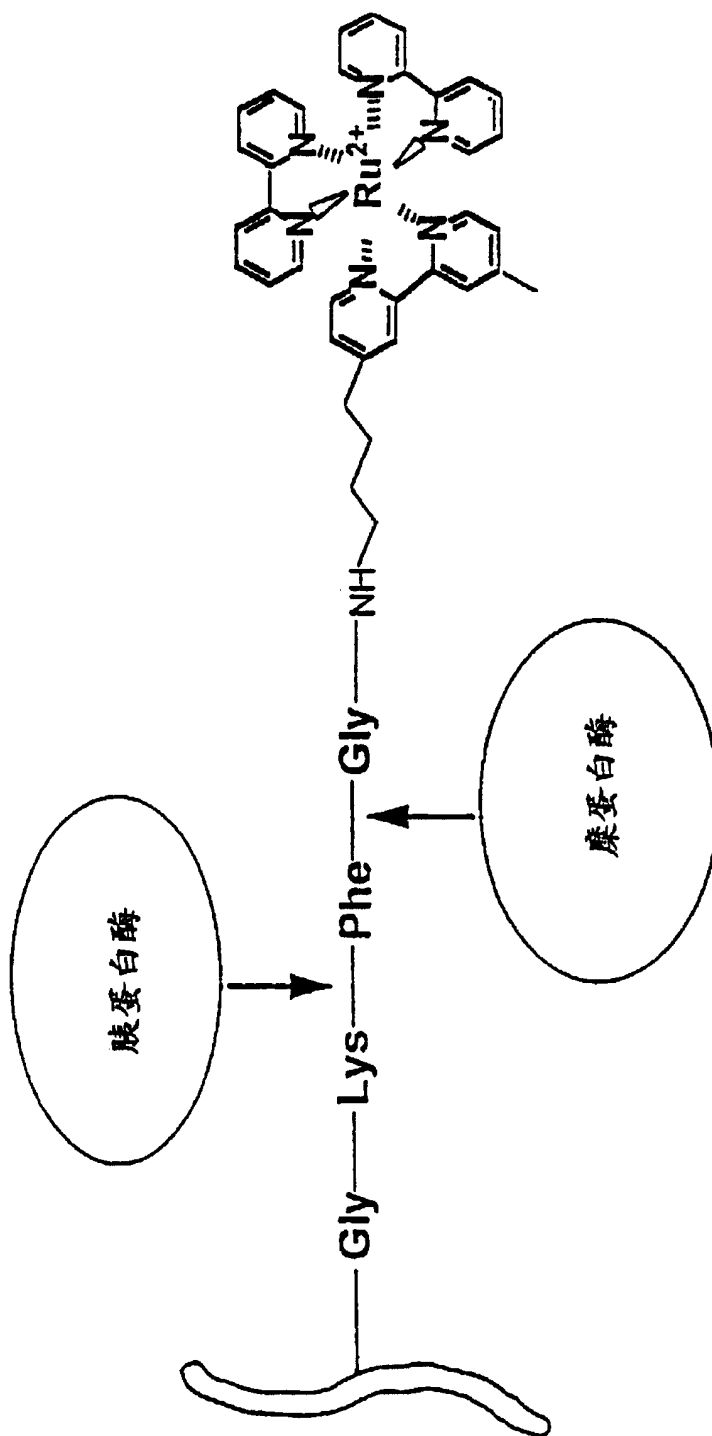


图 2

图 3



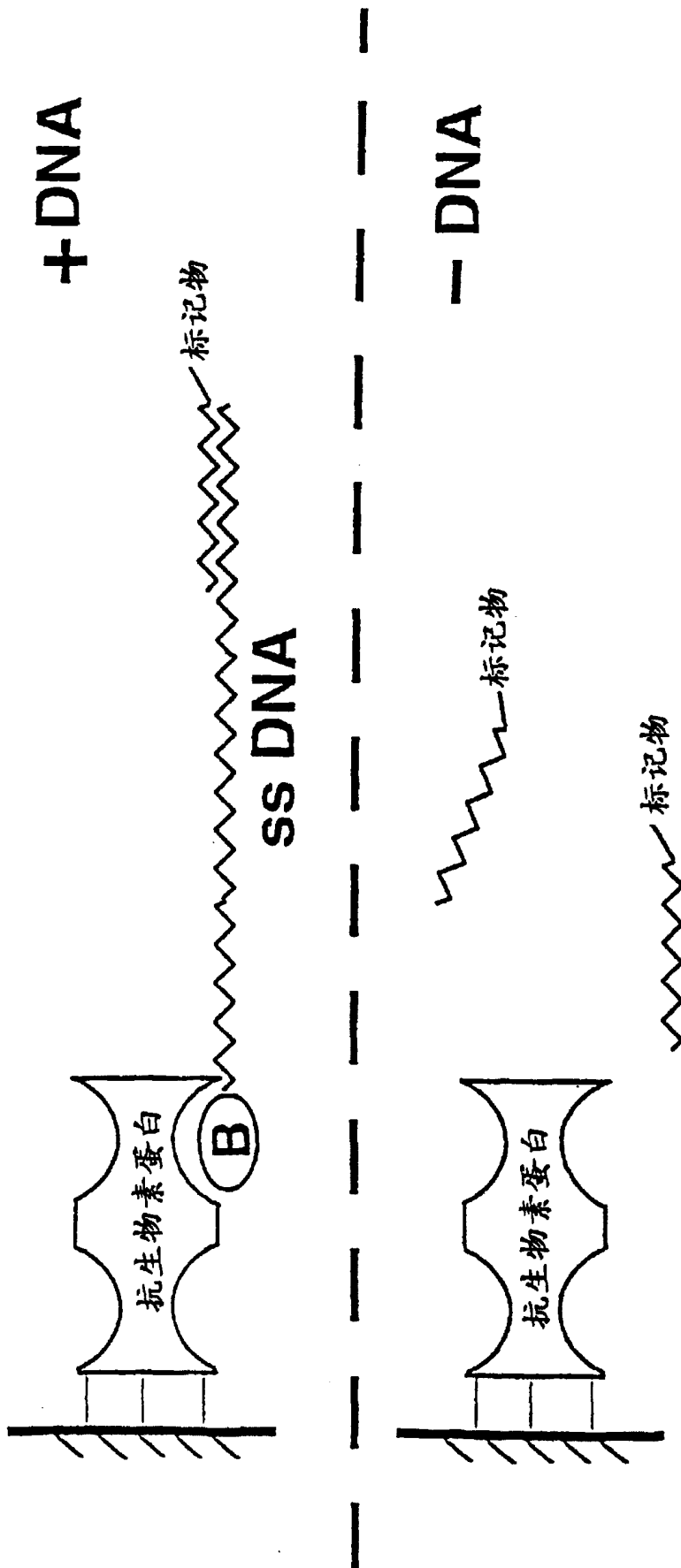


图 4

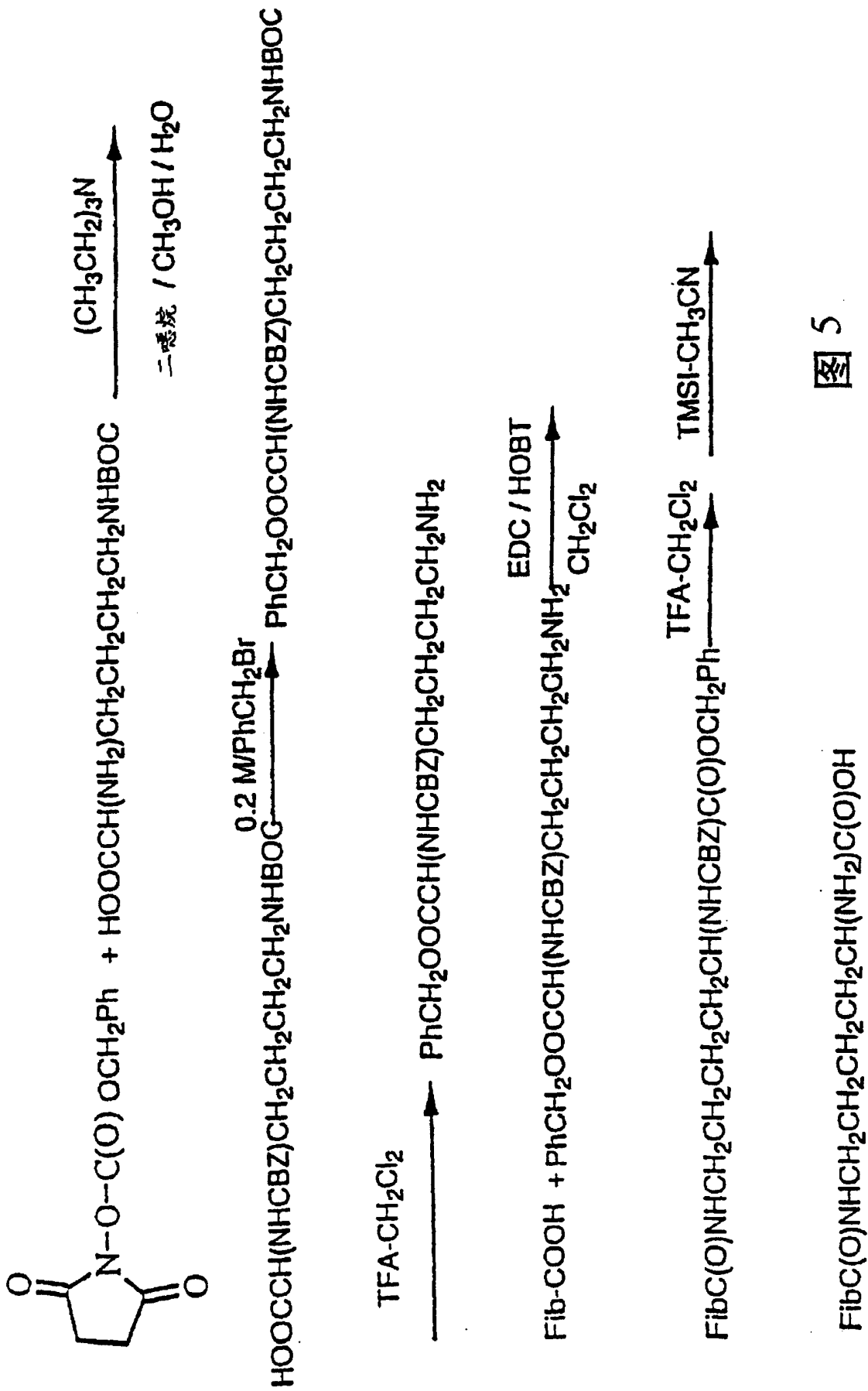


图 5

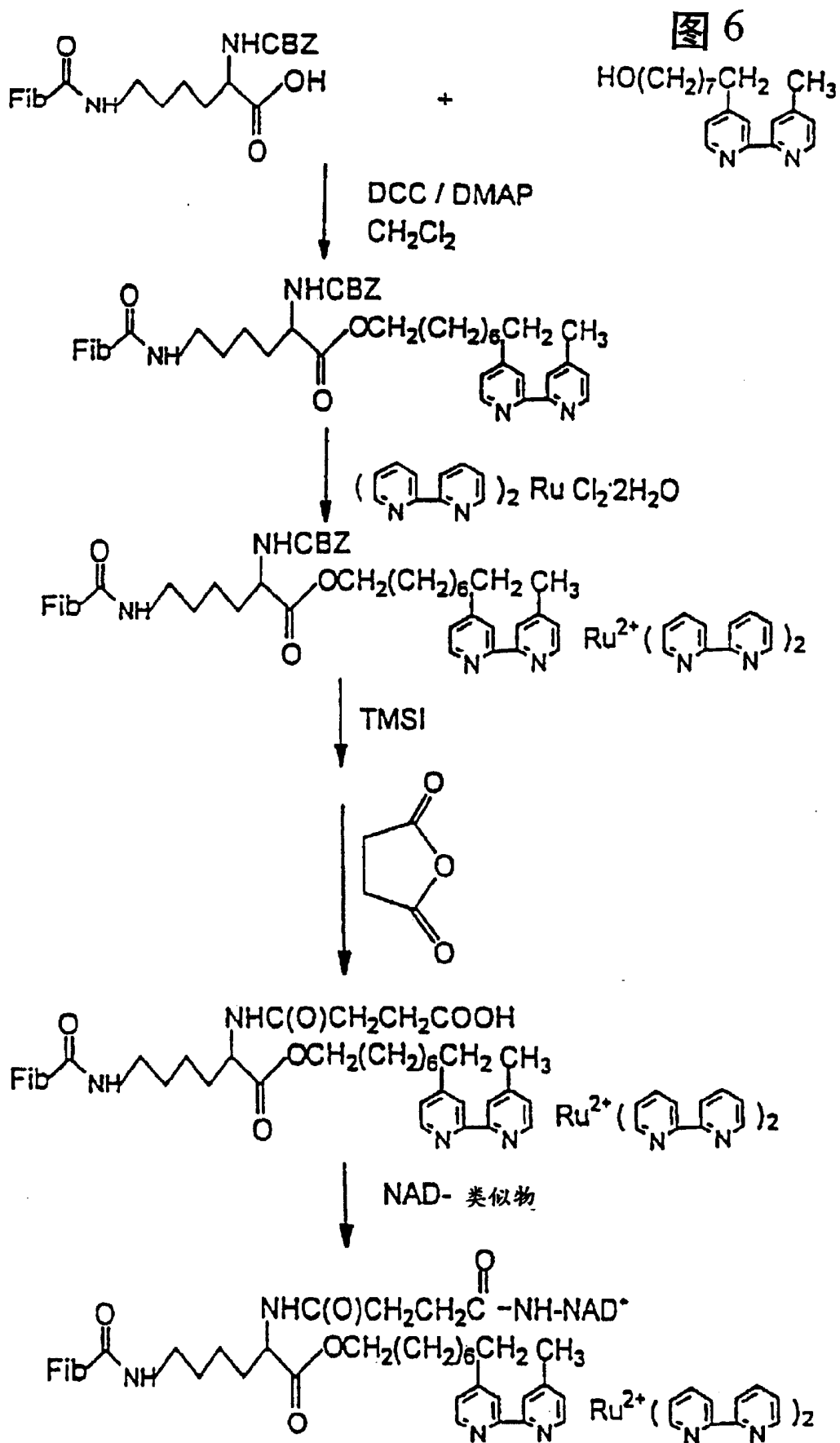
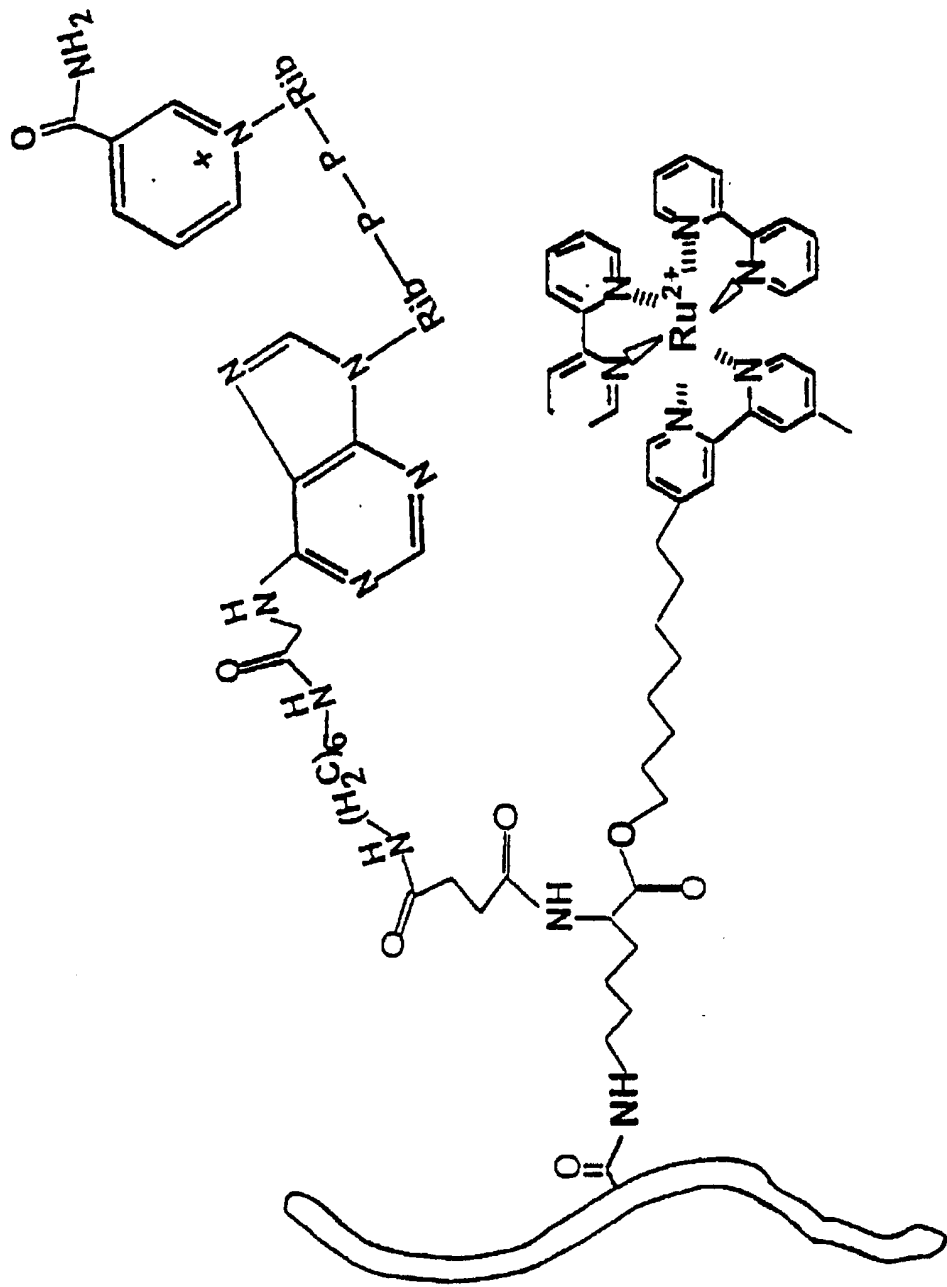


图 7



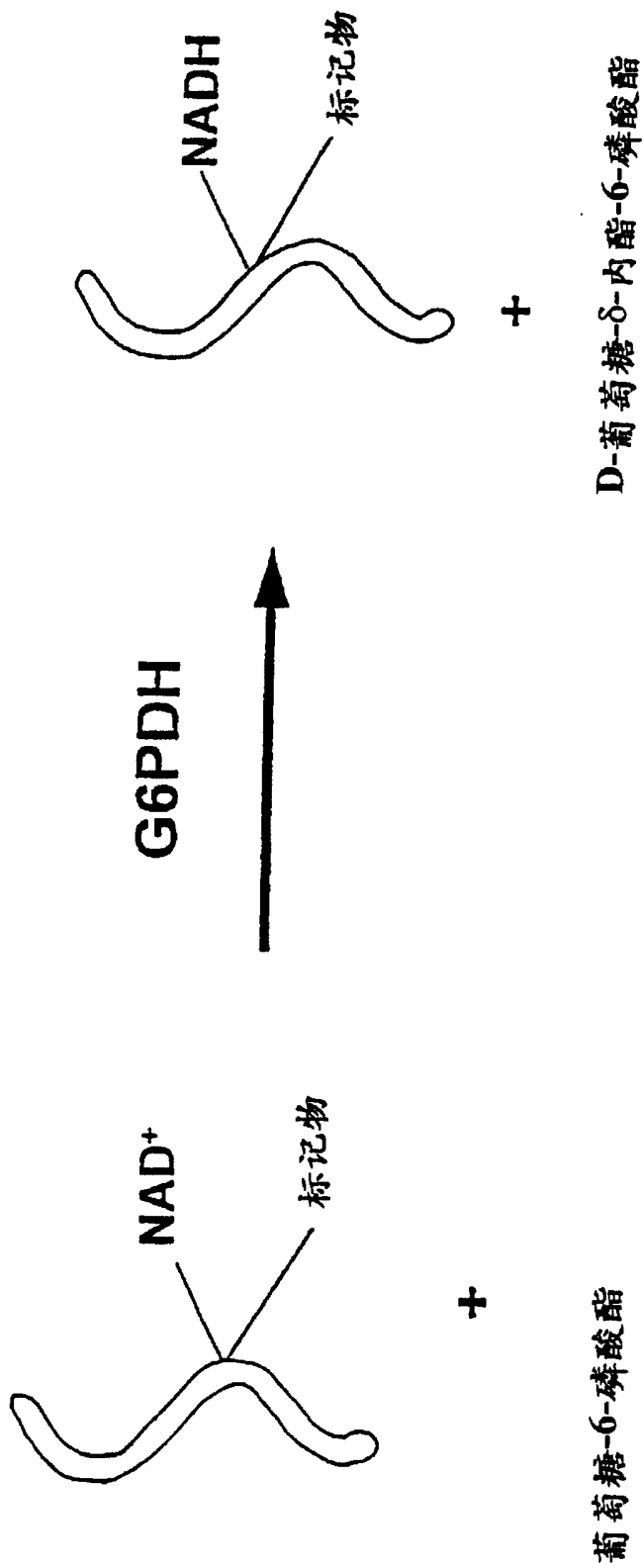
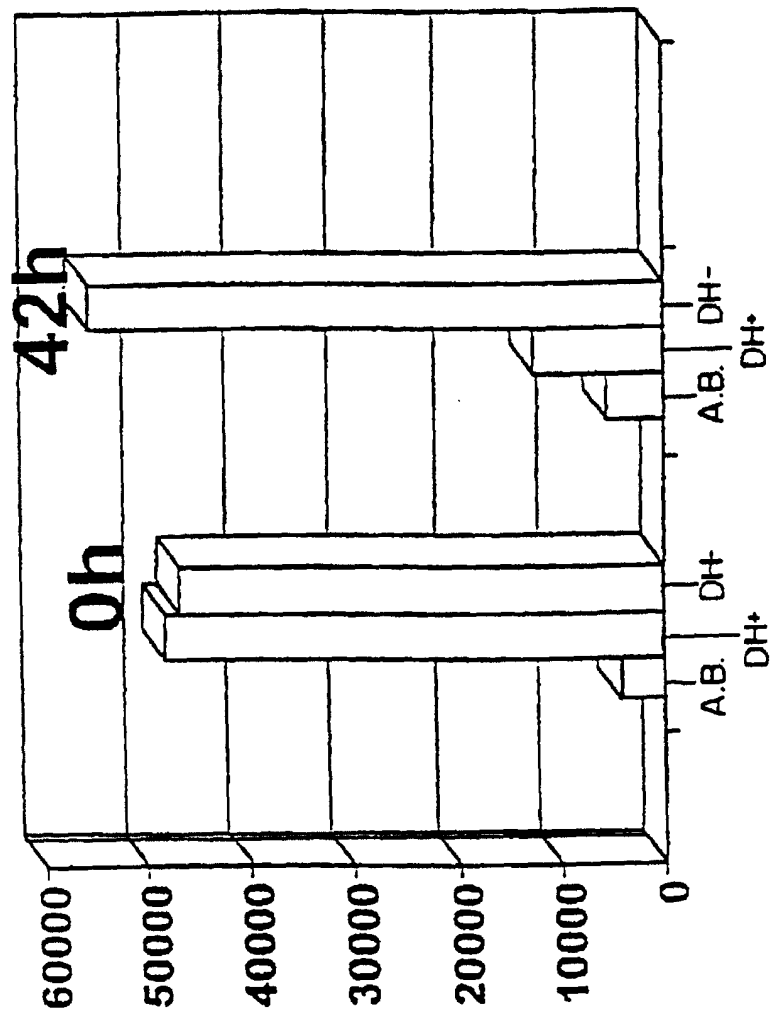


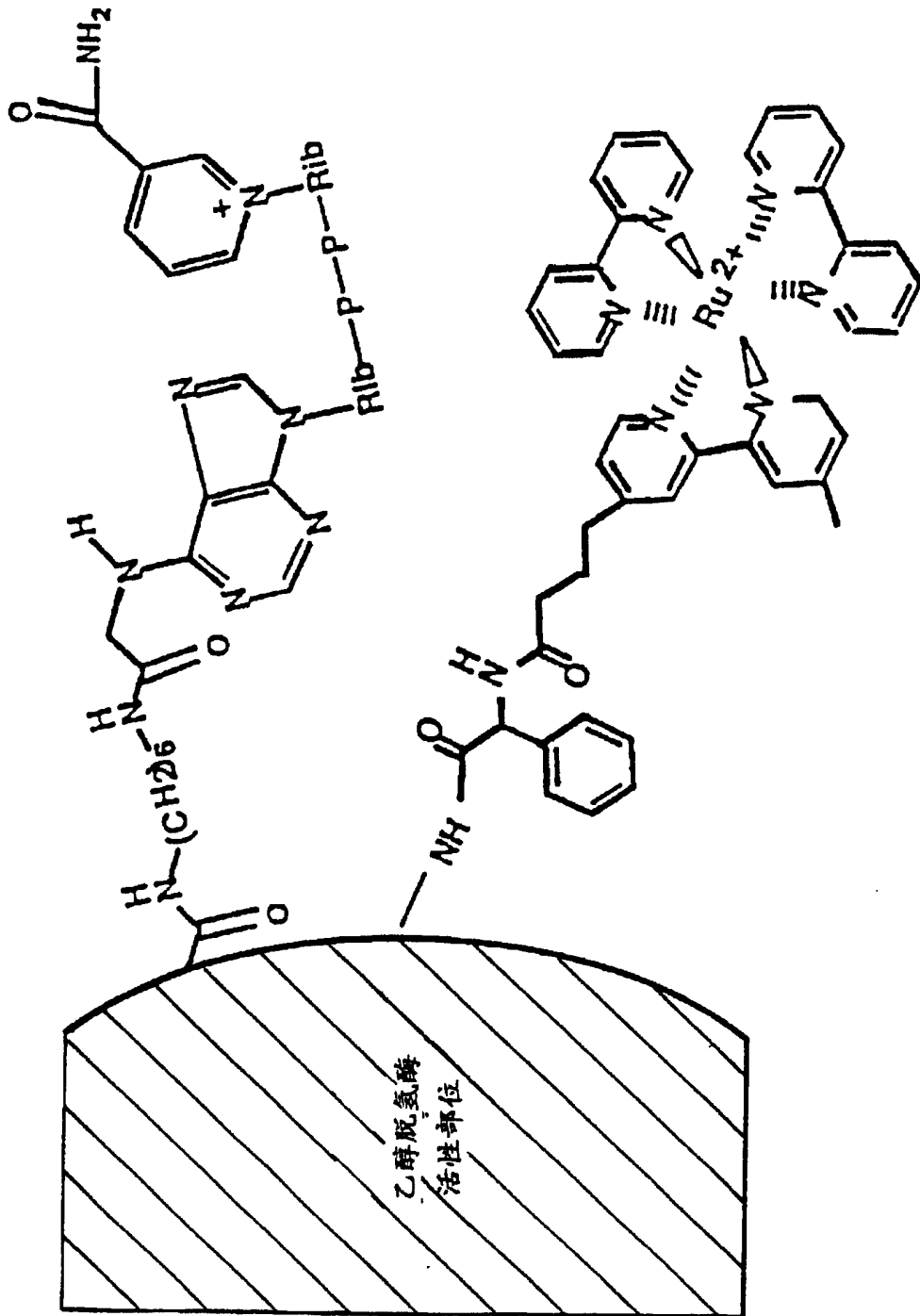
图 8

图 9



ECL 计数

图 10



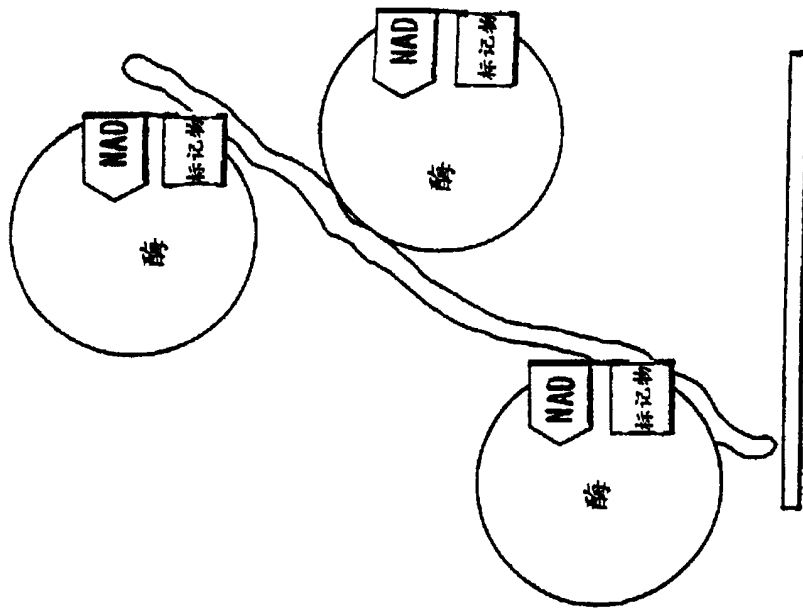


图 11B

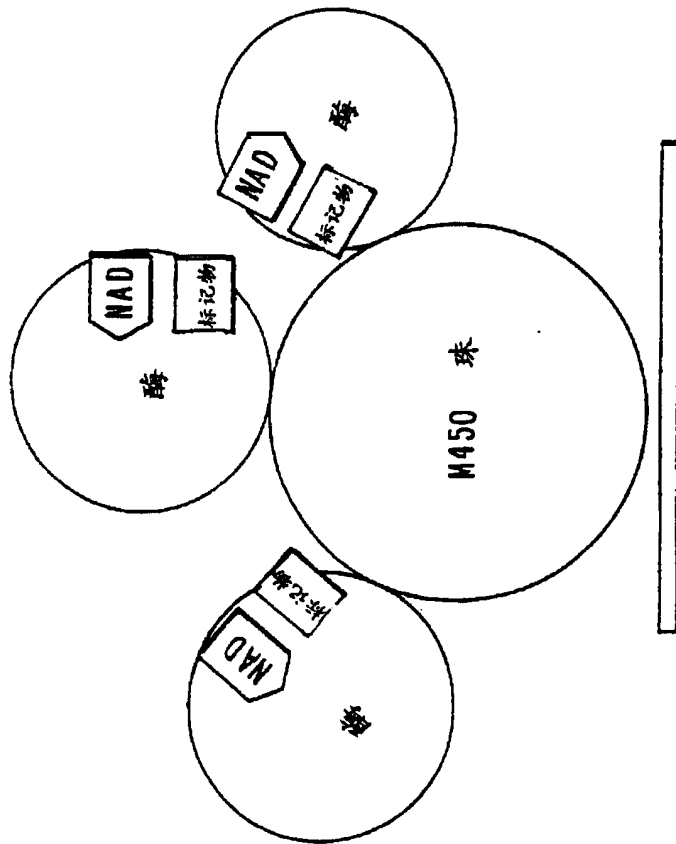


图 11A

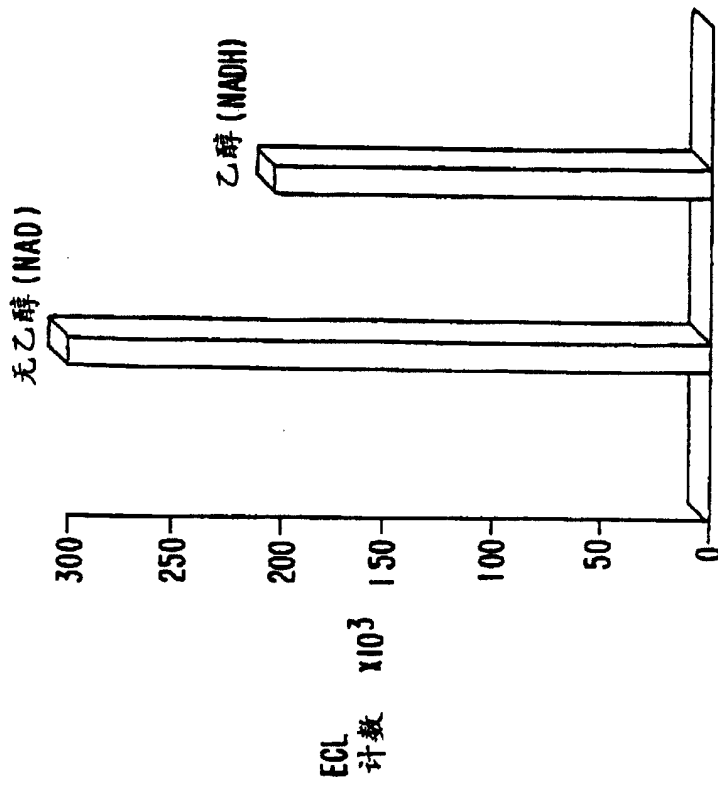


图 12A

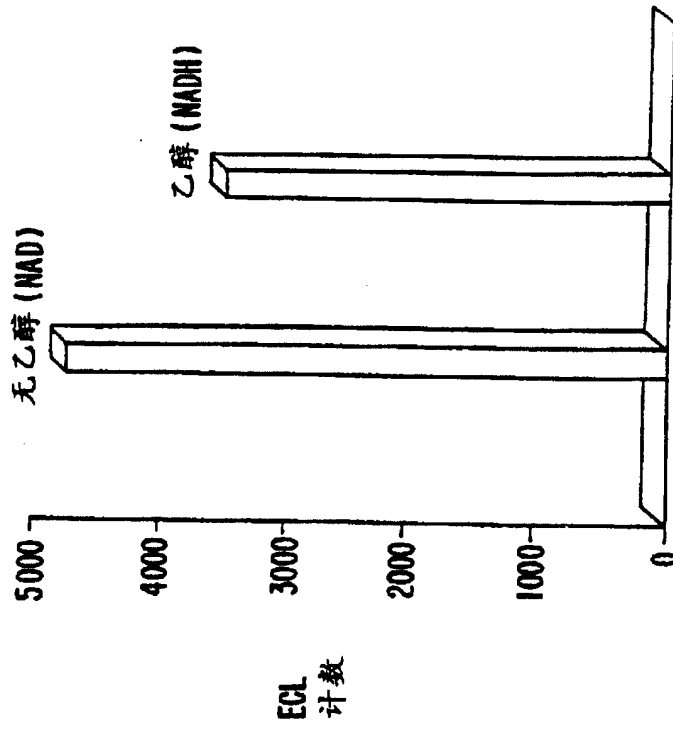


图 12B

图 13

