(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103097894 A
(43)申请公布日 2013.05.08

(21)申请号 201180032753.5

(22)申请日 2011.05.25

(30)优先权数据
10168221.9 2010.07.02 EP
11158688.9 2011.03.17 EP

(85)PCT申请进入国家阶段日
2012.12.31

(86)PCT申请的申请数据
PCT/IB2011/052265 2011.05.25

(87)PCT申请的公布数据
WO2012/001546 EN 2012.01.05

(71)申请人 皇家飞利浦电子股份有限公司
地址 荷兰艾恩德霍芬

(72)发明人 A·兰佐尼 M·W·J·普林斯

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
代理人 舒雄文 蹇炜

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)

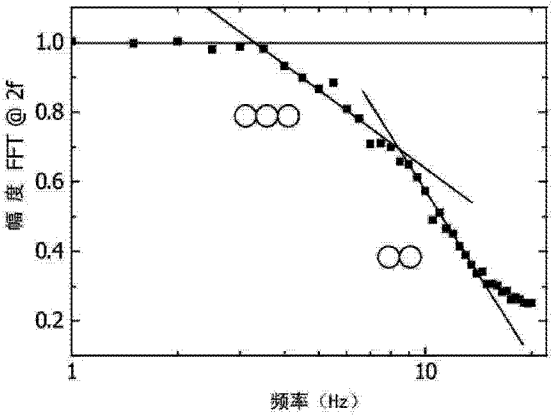
权利要求书1页 说明书9页 附图15页

(54)发明名称

通过散射对致动的簇的探测

(57)摘要

提供了一种探测涂覆有生物反应剂的超顺磁颗粒的簇的方法。提供了待分析的流体中的所述超顺磁颗粒的悬浮物。归因于所述流体内分析物的存在，容许所述颗粒形成簇；并且将以至少一个频率旋转的磁场施加至溶液。将光引导至所述流体，以及提取在磁场的频率的两倍的频率处的散射光的强度的幅度。通过根据磁场的频率来确定在两倍的场处的散射光的所测得的强度的幅度，可以实现频率相关的测量。可以使用频率相关的测量来确定簇的临界频率，以区分具有不同尺寸的簇或测量流体中的颗粒的磁化率的平均值和磁化率的统计离散。此外，提供了用于用于探测超顺磁颗粒的簇的设备的设备。



CN 103097894 A

1. 一种用于探测涂覆有生物反应剂的超顺磁颗粒的簇的方法，包括以下步骤：

(a) 在待分析的流体中提供所述超顺磁颗粒的悬浮物；

(b) 归因于所述流体内分析物的存在，容许所述颗粒形成簇；

(c) 施加以至少一个频率旋转的磁场；

(d) 将光束引导至所述流体；以及

(e) 测量所述流体中的所述颗粒散射的光的强度；以及

(f) 确定在所述磁场的频率的较高次谐波处的散射光的所测得的强度的幅度。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，散射光的所测得的强度的所述幅度是在所述磁场的频率的较高次谐波处测量的。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述至少一个频率至少约为 1。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述磁场约为 1 至 10mT。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中，根据所述磁场的频率来确定在两倍的所述场处的散射光的所测得的强度的所述幅度，以实现频率相关的测量。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中，使用所述频率相关的测量来测量特定尺寸的簇的临界频率。

7. 如权利要求 5 所述的方法，其中，使用所述频率相关的测量来探测具有不同尺寸的簇的存在。

8. 如权利要求 5 所述的方法，其中，使用所述频率相关的测量来测量用于所述流体中的所述颗粒的磁化率的平均值和 / 或所述磁化率的统计离散。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中，探测具有两个颗粒的簇。

10. 如权利要求 1 所述的方法，其中，在所述旋转的平面外测量所述流体中的所述颗粒散射的光的所述强度。

11. 一种用于探测超顺磁颗粒的簇的设备，包括：

(a) 光源(30)，用于将光束引导至包括待分析的流体中的超顺磁颗粒的悬浮物的比色皿(10)；

(b) 用于施加至少一个频率的旋转磁场的构件；以及

(c) 探测器(40)，用于探测所述流体中的所述颗粒散射的光并测量所散射的光的强度，

所述设备适于确定在所述磁场的频率的较高次谐波处的散射光的所测得的强度的幅度，优选地在所述磁场的频率的两倍的频率处的散射光的所测得的强度的所述幅度。

12. 如权利要求 11 所述的设备，其中，所述光源(30)为激光器。

13. 如权利要求 11 所述的设备，其中，所述探测器(40)布置在暗场配置中，其中优选地，光学构件(41)用于收集以数个角度散射到所述探测器(40)上的光。

14. 如权利要求 11 所述的设备，其中，所述至少一个频率至少约为 1。

15. 如权利要求 11 所述的设备，其中，所述磁场具有 1 至 10mT。

16. 如权利要求 11 所述的设备，其中，所述设备适于确定在所述磁场的频率的两倍的频率处的散射光的所测得的强度的所述幅度。

通过散射对致动的簇的探测

技术领域

[0001] 本发明涉及簇(cluster)测定,特别是涉及基于磁性颗粒的簇的旋转致动的簇测定。

背景技术

[0002] 活体外诊断中的测试能够具有数种测定形式。簇测定是一类测定,其中,形成的颗粒簇的量指示样品中生物成分的存在和/或浓度。由于迅速的体动力学、容易制造及成本低,簇测定是有吸引力的。

[0003] 簇测定的问题是缺乏灵敏度。提高灵敏度的一种方式是利用磁性颗粒来执行簇测定。使用磁性颗粒的优点是在培养期间能够形成场感生链。这已经由例如 Baudry 等在“Acceleration of the recognition rate between grafted ligands and receptors with magnetic forces”,Proc.Natl.Acad.Sci.103,2006,p.16076-16078 中示出。

[0004] 为了在执行簇测定时探测其它磁性颗粒的背景中的非常低的浓度的簇,WO2010/026551A1 建议通过施加旋转磁场来选择性地致动归因于分析物而形成的超顺磁颗粒的簇。

[0005] 根据 WO2010/026551A1,提供了待分析的流体中的例如珠子的超顺磁颗粒的悬浮物,其中超顺磁颗粒涂覆有生物活性剂(bioactive agent)。于是,归因于存在于流体内的分析物,容许颗粒形成簇。随后,通过施加旋转磁场来选择性地致动超顺磁颗粒的簇。磁场的幅度随时间变化。优选地,旋转磁场的频率在临界频率以下,使得特定尺寸的簇以与外场相同的频率旋转。最终,探测选择性地致动的簇。WO2010/026551A1 还提供了用于根据上述方法来执行簇测定的设备。

发明内容

[0006] 在基于磁性颗粒的簇的旋转致动的上述类型的簇测定中,仍然存在以高度控制的方式来选择性地致动特定尺寸的簇的需求。具体地,存在探测不同尺寸的簇并区分不同簇尺寸的需求。

[0007] 能够通过光学散射来探测溶液中的簇。由于簇具有细长形状,所以当将光引导至溶液时,簇的暴露于入射光束的截面根据簇的取向变化。簇散射的光的量从而依赖于簇相对于入射光束的取向。由于颗粒的球形形状,所以单颗粒对散射光的作用是可以忽略的。

[0008] 当施加外部旋转磁场时,如 WO2010/026551A1 中描述的方法中用于选择性地致动簇所做的,给定长度的每一个簇能够与高达临界频率的外场同步旋转,当超过临界频率时,净旋转速率降低。在满旋转期间,每一个周期,簇将相同的面积暴露于入射光束两次。对于线性簇,并且特别是围绕垂直于入射光束的轴旋转的两颗粒簇,基本对应于仅单个颗粒的截面的面积每一个周期暴露于入射光束两次,因为其它颗粒由颗粒覆盖。因此,以外部磁场的频率的两倍的频率对散射光强度进行调制。

[0009] 散射光能够与输入光具有相同波长,但是也能够与其具有不同波长。例如,能够使

用荧光颗粒或荧光标记颗粒，荧光颗粒或荧光标记颗粒以与输入光束光的波长不同的波长辐照光。波长滤波器能够用于探测路径中以在不同波长之间进行区别，以提高信噪比并能够区分来自不同类型的颗粒的信号(即，颗粒多路复用)。能够使用具有不同光学性质的颗粒，并且能够在光路中对具有不同光学性质的颗粒进行区别。

[0010] 基于这些总体思想，本发明根据一个实施例提供一种用于探测涂覆有生物反应(bioreactive)剂的超顺磁颗粒的簇的方法。提供了待分析的流体中的超顺磁颗粒的悬浮物。归因于流体内分析物的存在，容许颗粒形成簇，并且将以至少一个给定频率旋转的磁场施加于溶液。将光引导至流体并且提取磁场的频率的较高次谐波处的散射光的强度的幅度。因为调制信号通常在旋转磁场的频率的两倍的频率处，所以优选地提取磁场的频率的两倍的频率处的散射光的强度的幅度。优选地，在暗场配置中，即在远离光束至流体的方向的方向上，测量散射光的强度。因为所有散射光对信号做贡献，所以期望收集全部的散射光以得到最大信号。实践中，诸如透镜的光学构件优选地用于收集以数个角度散射到探测器上的光。旋转磁场的优选频率和强度取决于颗粒的尺寸和磁性性质。旋转磁场的频率应当优选地至少约为 1Hz。作为上限，临界频率的 30 倍大的频率值是优选的。关于场强，下限应当是最小强度以具有两颗粒簇的旋转。上限应当是在测量时间期间感生可忽略的磁性链接的最大场强。典型地，可以使用约 1 至 50Hz 的频率值和约 1 至 10mT 的强度值。

[0011] 给定长度的每一个簇能够与高达临界频率的外场同步地旋转，在临界频率以上，净旋转速率降低。簇越长，则临界频率的值越低。结果，在外场的频率的两倍的频率处的调制量在临界频率以下恒定并且在较高频率处急剧下降。发生此临界转变处的频率，即临界频率的值，可以通过根据磁场的频率来测量磁场的频率的两倍的频率处的散射光的强度的幅度来确定。

[0012] 此外，使用此方法，归因于对不同簇尺寸变化的临界频率的值，可以区别簇的尺寸。例如，当存在于溶液中的颗粒的总体包括不同尺寸的簇时，在频率相关的光学信号中将存在数个临界转变。此外，通过测量其中存在两颗粒簇的颗粒的总体的频率相关的光学信号，能够精确地特征化颗粒的磁性性质。具体地，能够获得颗粒的总体的磁化率的平均值和磁化率的统计离散。

[0013] 在另一实施例中，本发明提供了用于探测超顺磁颗粒的簇的设备，包括用于将光引导至包括待分析的流体中的超顺磁颗粒的悬浮物的比色皿的光源和用于施加旋转磁场的构件以及用于探测流体中散射的光的探测器。

[0014] 根据以下描述的实施例，本发明的这些和其它方面将变得明显，并且将参照以下描述的实施例阐述本发明的这些和其它方面。

附图说明

[0015] 图 1 示意性地示例了根据本发明的实施例的探测光学簇的光学机构；

[0016] 图 2 示例了光学信号生成的模型并示出了单个两颗粒簇的信号的计算的频率依赖关系；

[0017] 图 3 示出了作为 Mason 数的函数的根据本发明的实施例测得的光学信号；

[0018] 图 4 示出了用于含有单颗粒、两颗粒簇、以及三颗粒簇的溶液的频率相关的光学信号的测量结果；

[0019] 图 5 示意性地示例了涉及磁性颗粒的簇的旋转致动的测定的工序；

[0020] 图 6 示出了根据本发明的实施例获得的生物测定后的频率相关的光学信号；

[0021] 图 7 示出了根据本发明的实施例的光磁系统和纳米颗粒测定；

[0022] 图 8 示出了根据本发明的实施例测得的作为颗粒浓度以及磁场性质的函数的光学散射信号；

[0023] 图 9 示出了根据本发明的实施例的测得的用于缓冲剂中和血浆（plasma）中的测定的剂量响应曲线；以及

[0024] 图 10 示出了根据本发明的实施例测得的对缓冲剂中的 bBSA 的三个浓度的频率响应。

具体实施方式

[0025] 图 1 示出了根据本发明的实施例的光学机构的略图。由（玻璃）比色皿 10 中的超顺磁颗粒形成的磁性簇 20 由磁场旋转，磁场例如是由四个外部电磁体（未示出）生成的。

[0026] 光源，优选激光器 30，发出聚焦于玻璃比色皿 10 的中心的准直激光束，玻璃比色皿 10 中放置有生物样品。利用与主光轴近似成 30 度放置的透镜收集流体中的颗粒散射的光，实现了暗场配置。透镜 41 用于收集以大约 30° 的数个角散射到探测器 40 上的光。当利用磁场来致动簇 20 时，由于它们的细长形状，它们暴露时间相关的截面于入射激光束。结果，光电探测器 40 探测的散射光的量取决于簇相对于入射光束的取向。

[0027] 探测方法的主要优点是，由于单颗粒的球形形状，它们对信号的作用可以被忽略。两颗粒簇在临界频率以下的频率与场同步旋转。在临界频率以上，簇示出了摆动和减小的净旋转频率，如 WO2010/026551A1 中更详细地描述的。

[0028] 对于基于散射的探测的最近的引用是 Sandhu 等在 NanoLetters，2010，10，p.446-551 中的公开。Sandhu 等致动并探测具有非常长的长度的颗粒链。相比而言，本发明聚焦于短簇，特别是两颗粒簇，的灵敏探测，其在具有非常低的目标浓度的测定中是重要的。

[0029] 在（线性）簇的旋转动力学的定量描述中，在满旋转期间，每一个周期，簇将相同面积暴露于入射光两次，如图 2 中所示例，以外场的频率的两倍的频率调制散射光强度，其中线性簇具体是两颗粒簇。首先（to first order），光学散射信号与 yz 平面中的投影面积成比例。根据测量，提取外场的频率的两倍的频率处的光学信号的幅度。

[0030] 给定长度的每一个簇能够与高达临界频率的外场同步旋转，在超过临界频率时，净旋转速率降低。簇越长，则临界频率的值越低。结果，在外场的频率两倍的频率处的调制的量在临界频率以下恒定，而在较高频率处急剧下降。图 2 示出了具有角度不相关的幅度的旋转场的情况下的计算的曲线。

[0031] 通过测量其中存在两颗粒簇的颗粒的总体（ensemble）的频率相关的光学信号，能够精确地特征化颗粒的磁性性质。不必具有独立簇的视觉图像，如 Ranzoni 等在 Lab Chip，2010，10，第 179-188 页中描述的。利用快速测量，能够测试簇的总体。如果颗粒的磁化率的值存在可变性，则用于不同的两颗粒簇的临界频率在外场频率的稍微不同的值处发生。结果，代替调制量的急剧降低，预期到平滑得多的转变（见图 3）。根据测得的曲线，获得了用于颗粒的总体的磁化率的平均值以及磁化率的统计离散（spread）。

[0032] 图 3 示出了对于涂覆有抗生蛋白链菌素的 465nm 颗粒(Microparticles GMBH)的实验结果。作为 Mason 数的函数绘示了调制量，Mason 数是定义为粘性与磁性扭矩之间的比率的无量纲参数。在施加的场的不同的大小处记录频率相关的信号并根据基于运动和投影的模型的等式对其进行拟合。对实验参数的不同的值获得的测量结果压缩到(collapse onto)单个通用曲线上。图 3 示出了以极端控制方式给特定类型的簇施加扭矩和旋转是可能的。临界频率以上，调制以及斜率的逐渐降低可以用于估计纳米尺寸的对象的磁化率的统计离散和平均值。

[0033] 此外，由于临界频率的值，能够区分簇的尺寸。两颗粒簇具有最高临界频率；归因于簇的较高的粘性拖曳，较长的链具有较低的临界频率的值。当数个簇种类存在于样品中时，在光学信号的频率依赖关系中将存在数个临界转变。图 4 示出了用于同时包含单颗粒、两颗粒簇、以及三颗粒簇的溶液的频率相关的光学信号的测量结果。第一临界频率对应于三联体(triplet)停止与外场同步旋转的事实。当外场的频率比用于双联体(doublet)的临界频率高时，信号以具有两倍的陡度的斜率降低。特别是，在 0-4Hz 的范围中，两个簇类型均与施加的场同步旋转。三颗粒簇的临界频率约为 4Hz。两颗粒簇的临界频率约为 8Hz。

[0034] 能够应用不同的生物测定形式。例如，在本身已知的夹心簇测定中，在颗粒之间捕获(“夹置”)分析物。还有，能够使用其它测定形式。这里，我们给出竞争测定(competitive assay)或抑制测定(inhibition assay)的范例，即适合于小分子的探测的形式。在一可能的实施例中，使用两种颗粒核素：涂覆有分析物类似物的第一种；以及涂覆有抗分析物抗体的第二种。当颗粒暴露于不包含分析物的样品时，则抗体将会自由接合至分析物类似物，成簇不受到抑制，形成了许多成簇的颗粒，并且信号导致最大值。越多的分析物存在于样品中，则越多的抗体被阻挡，并且不能形成化学键，导致低数量的簇和许多单颗粒。这给出了对于竞争测定的典型剂量响应行为(对于低分析物浓度，信号高，且对于高分析物浓度，信号低)。

[0035] 图 5 中示例了基于旋转致动的磁性颗粒簇的生物测定。测定能够概括于以下步骤中：

[0036] 与分析物一起培养(至少一分钟)涂覆有具体识别分析物的生物分子的超顺磁颗粒(见图 5a)。在此阶段，超顺磁颗粒能够截获分析物并使分析物固定于它们的表面上。

[0037] 而在溶液中，颗粒彼此以相当慢的动力学彼此碰撞：两颗粒簇的形成需要许多小时。施加旋转磁场，使得颗粒在数秒的时间规模中形成长链，并且它们保持极接近(见图 5b)。簇形成反应大大加速，并且形成了两颗粒簇。在以上提到的 Baudry 等在 Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 2006, p. 16076-16078 中描述了产生链以加速簇形成的概念。

[0038] 当去除场时，归因于热运动，颗粒能够重新分散，除非通过生化键保持极接近。归因于非特定键，颗粒也能够保持耦合。在此特定范例中，施加旋转磁场以形成颗粒的长链，颗粒由偶极子 - 偶极子相互作用保持靠近一起。由于振动和旋转的一定的自由度，颗粒之间的有效接合是可能的，并且形成了两颗粒簇。给予簇一些时间来扩散，然后进行通过旋转致动的探测。

[0039] 图 6(左画面)示出了生物测定的结果。已经与浓度为 25pmol/l 的生物素化的 BSA (biotinylated-BSA)一起，在 PBS 和 5% w/v 的 BSA 形成的缓冲剂中，对涂覆有抗生蛋白链菌素的 Ademtech 500nm 的颗粒进行了 60min 的培养。然后培养颗粒 10 分钟，容许它们在

以 1Hz 旋转的 5mT 的场下形成链。

[0040] 已经将样品暴露于 40kHz 的超声波以减小非特定成簇的量。已经利用 4.5mT 的场进行了光学信号的测量；已经对每个测量点在 1kHz 对光学信号采样了 3 秒。对于没有分析物的测量，临界频率移动至较低频率。这是归因于已经形成了不可忽略数量的三颗粒链并且它们的特征在于较低临界频率的事实。当用于双联体的临界频率相交时，曲线的斜率加倍。

[0041] 已经利用与浓度为 8pmol/l 的生物素化的 BSA 一起培养的 300nm 的颗粒执行了另一实验(图 6 右画面)，遵循相同实验程序。示出了 8pmol/l 和 0pmol/l 处的实验结果。归因于较小的颗粒尺寸，测量结果更加嘈杂。然而，临界转变在 8pmol/l 的情况下是清楚可见的，而在样品中存在 0pmol/l 的 BSA 时，仅背景信号是可见的。

[0042] 图 7 中勾画了实验布置。沿 z 轴准直的激光束照明玻璃比色皿。四个电磁体在比色皿内引起旋转磁场，这使得磁性纳米致动器在 xz 平面中旋转。光电探测器收集沿与 z 轴成近似 30 度的角度散射的光。图 7b 描述测定的不同阶段。容许目标蛋白质的有效捕获的短的培养之后是施加磁场以引起链形成。在链中，纳米颗粒相互作用并经由捕获的目标分子迅速形成纳米颗粒间的键。以下，去除场以容许链分解。最终，施加选择性地致动纳米致动器以进行探测的旋转磁场。

[0043] 嵌于单纳米颗粒的总体中的两颗粒纳米致动器的灵敏和选择性探测基于两个相区分的特征，即磁性各向异性和光学各向异性。两颗粒纳米制动器的磁性形状各向异性使得能够进行频率控制的旋转，而纳米致动器的光学各向异性生成光学散射光的调制。单颗粒对光学调制的作用可以忽略，因为它们缺少两颗粒纳米致动器的特征磁性和光学各向异性。图 7c 示出了以频率 $\omega_f/2\pi = 1\text{Hz}$ 旋转的 $\mu_0 H = 3.5\text{mT}$ 的场中的纳米致动器的测得的光学散射。信号周期等于施加的场的周期的一半。这是独立(individual)颗粒的等同物和两颗粒纳米致动器的得到的点对称性的直接结果。数据示出了，在纳米致动器垂直于光束对准时，即在纳米致动器将它们最大的几何截面朝向入射光束暴露时，散射最高。最低信号的取向接近沿光束的取向。图 1d 对包括半径 a 的两个纳米颗粒的纳米致动器示出了作为φna，纳米制动器轴与 z 轴的角度，的函数的计算的几何截面面积。几何截面面积复制半周期特征并具有与光学散射信号相同的相位，但是曲线的形状相当不一样。例如，测得的散射曲线示出了在纳米致动器几乎沿光束对准($\varphi na \sim n\pi$)时，感兴趣的精细特性。该特性能够对纳米致动器的差分散射截面$\sigma_{na}(\upsilon,\varphi)$的角度相关的性质起作用。

[0044] 在实验机构中，利用低数值孔径透镜(NA = 0.025)将准直激光束聚焦到方形截面的玻璃比色皿的中心。低数值孔径透镜保证 1mm 的聚焦深度。该聚焦深度与比色皿(1mm)内的光路相当。束腰计算为直径近似为 32μm。结果，光学探查体积近似为 1nl。利用蓝光激光器(405nm，NichiaNDV4212T，工作于 120mW)测量了 300nm 的纳米颗粒(抗生蛋白链菌素涂覆的 Bio-AdemBeads，AdemTech)。利用红光激光器(658nm，SanyoDL-6147-240，工作于 40mW)测量了 500nm 的纳米颗粒(抗生蛋白链菌素涂覆的 Masterbeads，AdemTech)。

[0045] 激光束的焦点和玻璃比色皿放置在四极电磁体的中心，四极电磁体在竖直平面中生成旋转磁场。利用霍尔探针对磁体进行了校准，并且磁体生成 70mT 的最大场。磁体的频率响应的测量示出了，仅在数百 Hz 以上的频率处，线圈的自感变得重要。以与主光轴大致 30 度的角度测量了散射光，因为发现此配置最大化了强度。探测路径包括将散射光聚

焦到光电探测器(New Focus,2031 型,增益 2.10^6)上的透镜。在 3s 期间在 1kHz 处对光电探测器测得的电压信号进行采样,并且将其存储在使用数字数据获取的文档中(National Instrument NI-DAQ6259)。数据通过 FFT 算法在 MATLAB 中处理以计算信号幅度。2f 峰的 FWHM 值约为 5mHz。

[0046] 利用校准样品研究系统的光学响应。来自储液的纳米颗粒在包含 5%w/v 的 BSA 的 PBS 缓冲剂(10mM,pH 7.4)(均从 Sigma-Aldrich 购买)中稀释为 0.1mg/ml 的浓度。利用在 40KHZ 和 50W 工作的声针(sonic needle)对样品进行声波处理(sonicate)3s。以 MCR300 流变仪 Antoon Paar Physica 测得的溶液粘性为 2.32±0.09Pa.s。已经在显微镜下检查了样品,并且两颗粒纳米致动器的数量与单颗粒的数量之间的比率确定为近似为 5%;没有显著部分的较大簇能够被识别(小于总数(total population)的 0.1%).

[0047] 当执行测定时,纳米颗粒储液在缓冲剂中稀释为 2mg/ml,并且溶液暴露于 40kHz 和 50W 的超声波 3s 以最小化初始样品中成簇的纳米颗粒的数量。将 3μl 体积的抗生蛋白链菌素涂覆的纳米颗粒添加至 3μl 的生物素化的 BSA(bBSA,Sigma Aldrich,cod.A8549),最终浓度在 60fM 与 10nM 之间。培养纳米颗粒和 bBSA 10s。其后,在磁性链接(chaining)阶段期间,样品暴露于以 1Hz 旋转的 5.3mT 的场达 2 分钟。在探测步骤之前,利用去离子水将溶液稀释为 85μg/ml,因为那给出的空白值近似为仪器噪声的 10 倍。测量对频率扫描的光学响应,并且每一个实验点是对于 3.5mT 的场强的 3s 平均时间的结果。利用 1Hz 与 25Hz 之间的频率探查了样品。对于人血浆(human plasma)的实验,利用永久磁体将 2mg/ml 的溶液中的纳米颗粒吸引至小瓶的底部,去除上清液并通过相等体积的加标(spiked)人血浆对其进行替换。从 20 个健康捐献者的纯人肝磷脂血浆池(从 Innovative 购买)获得血浆。通过利用 PBS 缓冲剂中的 30μM 的 pBSA 对整个血浆进行加标,并且通过随后在整个血浆中稀释为达到剂量响应曲线所需的目标浓度,制备了所有样品。从而,最终样品中的 PBS 缓冲剂的量是可忽略的。用于链接和探测的致动协议与用于缓冲剂中的测定的相同。在探测之前,血浆样品稀释为 55μg/ml 的最终纳米颗粒浓度,因为那给出的空白值近似为仪器噪声的 10 倍。一式三份地测量剂量响应曲线中的所有点。

[0048] 图 7a 示出了聚焦于四个电磁体的中心处的准直激光束,该中心处放置玻璃比色皿。相对于入射激光束以近似 30 度的角度散射的光聚焦到光电探测器上。图 7b 示出了生物测定的三个阶段。首先,利用目标蛋白质培养生物活化的纳米颗粒。其后,施加旋转磁场以驱动纳米颗粒链的形成,这使得能够进行有效的纳米颗粒间接合。最终,去除磁场以容许未接合的纳米颗粒重新分散,并且在频率选择性磁场致动下探测光学散射。图 7c 示出了测得的来自以 1Hz 旋转的磁场中的两颗粒纳米致动器的典型光学散射信号。图 7d 示出了旋转期间两颗粒纳米致动器的计算的几何截面。

[0049] 为了校准光磁探测系统,对不同的溶液浓度执行实验,见图 8。储液稀释为 2mg/ml 的颗粒浓度,并且被声波处理,导致具有许多单纳米颗粒和低数量的两颗粒纳米致动器的溶液。通过光学显微术量化校准样品的组分,示出了 1:20 的两颗粒纳米致动器与单纳米颗粒的比率。未观测到较大尺寸的簇。通过 FFT 算法(快速傅立叶变换)以 3 秒的积分时间对作为时间的函数的光学信号的记录的曲线进行分析。FFT 频谱(见插图)仅示出了偶数谐波,如从纳米致动器的点对称所预期的。2f 处的峰占频谱的支配地位。2f 峰的大小示出了对颗粒浓度的线性依赖关系,具有约二十的动态范围。根据曲线的斜率、溶液中两颗粒纳米

致动器的已知浓度、以及我们的系统中的光学探查体积(约 1nL),对我们的机构中的每个两颗粒纳米致动器的光学信号推导了$0.7v/\sqrt{Hz}$的值。

[0050] 系统容许纳米致动器的磁性性质的详细特征。在“Ranzoni,A.;Janssen,X.J.A.;Ovsyanko,M.;Ijzendoorn,L.J.;Prins,M.W.J.Lab on a Chip 10,(2),179-188”中,已经研发了用于旋转磁场中的单个两颗粒致动器的运动等式。在低频状况,纳米致动器与施加的场同步旋转。在临界频率处,施加的场与磁矩之间的相位差最大,所以施加了最大的扭矩,并且实现了最大的旋转频率。在临界频率以上,旋转示出了摆动(wiggling)行为,其中,前进和逆向运动交替出现。逆向旋转减小了净前向角速度,一种对于外场的增加频率变得更强的效果。当磁性形状各向异性占支配地位地生成磁性扭矩时,描述在以频率 ωf 在 xz 平面中旋转的均匀磁场$\vec{H}$中的两颗粒纳米制动器的运动的等式由下式给出:

[0051] $$\frac{d\phi_{na}}{dt}=\omega_{crit}\sin\left[2(\phi_i-\phi_{na})\right]\text{和}\sin(\phi_i-\omega_f t)+\frac{\chi}{16}\sin\left[2(\phi_i-\phi_{na})\right]=0 \qquad (1)$$

[0052] 其中,$\omega_{crit}=\mu_0\chi^2H^2/168\eta$ 表示临界频率的值,φ_i是感生的磁矩的方向与 z 轴之间的角度,φ_{na}是纳米致动器的柱对称轴与 z 轴之间的角度,μ0 是真空的磁导率,χ 是磁性纳米颗粒材料的无量纲体积磁化率,并且 η 是流体介质的粘性。通过平衡磁性和粘性扭矩推得等式。等式与纳米颗粒的尺寸不相关,因为磁性和粘性扭矩均与颗粒的体积成比例,这意指我们的致动方法原理上可应用于宽广范围的颗粒尺寸。

[0053] 图 8b 示出了对两颗粒纳米致动器和单颗粒的混合物测得的,针对不同大小的施加的磁场,纳米制动器的旋转的频率依赖关系。在低频状况,信号与频率不相关,因为纳米致动器与施加的场同步旋转。在中间频率,观测到了信号的逐渐降低。信号的降低能够归因于能够与磁场同步旋转的两颗粒纳米致动器的数量的渐进变小。纳米颗粒的尺寸和磁性含量的统计离散导致临界频率的分布;具有最低体积磁化率的纳米制动器首先偏离同步旋转,并且在较高频率,越来越多的纳米致动器进入摆动旋转的状况。在摆动状况(regime)中,2f 调制的幅度降低,并且FFT 信号出现于较低频率处。根据中间频率曲线延伸至 1 的点确定临界频率,如图 8b 中所指示。插图示出了作为施加的场的函数的测得的临界频率;观测的二次依赖关系证明纳米致动器的磁性形状各向异性在旋转的原点。

[0054] 数据也能够表述为无量纲参数 Mason 数的函数,Mason 数表示粘性与磁性扭矩之间的比率:

[0055] $$Mn=\frac{168\eta\omega}{\mu_0\chi^2H^2} \qquad (2)$$

[0056] 在临界频率处(见等式 1),Mason 数等于 1。在图 8c 中,作为 Mason 数的函数绘示了直径 300nm 和 500nm 的纳米颗粒的数据。测量点压缩到特定于颗粒类型的单个曲线。通过对磁化率值的假定的正态分布的响应进行求和,已经对曲线进行了建模。对于 500nm 的颗粒,对 χ = 2.4±0.8 发现了好的曲线拟合,与通过振动样品测磁法(Vibrating Sample Magnetometry,VSM)发现的 2.65 的值一致。对于 300nm 的颗粒,曲线拟合产生 χ = 2.0±0.9,这与 2.15 的 VSM 值以及来自受限的 Brownian 运动分析的数据形成好的对比。

[0057] 在以上实验中,证明了光学散射是特征化两颗粒纳米致动器的总体的旋转动力学的精确工具以及 2f 信号的幅度是样品中的纳米致动器的量的精确量度。已经如图 7b 中所示地研究了测定,使用了抗生蛋白链菌素涂覆的磁性纳米颗粒和生物素化的 BSA (bBSA)作

为目标分子。培养 6μl 的磁性纳米颗粒和 bBSA 的样品 10 秒钟。样品经历 2 分钟的磁性链接，并且然后被稀释以将来自纳米颗粒的信号调谐至光电探测器的动态范围并避免随后的探测阶段期间潜在的簇生长。在频率选择性磁性致动下执行探测。进一步的细节在补充信息中给出。

[0058] 如图 8 中所示，两颗粒纳米致动器与单颗粒的比率为约 1:20。画面 a 中的线性行为示出了信号与存在于样品中的纳米致动器的数量成比例并容许我们估计每个两颗粒纳米致动器的信号。插图示出了在 250μg/ml 的颗粒浓度和 5Hz 的场频率处测得的信号的傅立叶变换。画面 b 示出了针对磁场的数个强度值，直径 500nm 的颗粒的频率相关响应。低和中间频率处线性拟合的交叉点给出了临界频率的值(对 7.5mT 的测量示出直线)。插图示出了作为磁场强度的函数的临界频率的值；二次拟合证明偶极子 - 偶极子相互作用是磁性扭矩的主要来源。画面 c 示出了与图 9b 中相同的数据，但是现在作为无量纲 Mason 数的函数绘示。指示了低频(LF)、中间频率(IF)和高频(HF)区。为了拟合数据，针对具有体积磁化率的正态分布的 100 个纳米致动器的总体对等式(1)进行数值求解。分布的平均数选择为等于通过图 8b 的插图中示出的临界频率的测量获得的平均值；改变标准偏差以通过最小化均方差来最好地拟合实验数据。500nm 的直径的 Masterbead 的数据给出了 2.4±0.8 的体积磁化率。300nm 的直径的 Bioadembead (见插图)的数据给出了 2.0±0.9 的体积磁化率。

[0059] 图 9 示出了用于缓冲剂(画面 a)和血浆(画面 b)中的测定的剂量响应曲线。光磁信号作为目标浓度的函数清楚地增加。有趣地，缓冲剂中的剂量响应曲线示出了两个有区别的斜率，以图中的点线勾画。斜率的改变能够归因于纳米致动器的尺寸分布的转变。尺寸分布取决于 bBSA 分子的数量与纳米颗粒的数量的比率。在培养期间，纳米颗粒浓度近似为 10pM。所以，在 2pM 以下的目标浓度，仅两颗粒纳米致动器统计地可能形成。当 bBSA 分子的数量增大并且变得与纳米颗粒的数量可比较时，纳米致动器包括两个以上的纳米颗粒的可能性增大。

[0060] 对于每一个测量点，如图 8b 中那样执行频率扫描，对 3.5mT 的场大小测得的。信号对应于 FFT 频谱的 2f 信号的低频平稳值(plateau value)(1 至 5Hz)。虚线是对眼睛的引导。在画面 a 中，最终纳米颗粒浓度是 85μg/ml。低浓度处的信号水平对应于光学探查体积中近似 20 个两颗粒纳米致动器。虚线示出了反应纳米致动器尺寸分布的两个斜率，如图 10 中进一步详细示出的。在画面 b 中，最终颗粒浓度是 55μg/ml；在低浓度处的信号对应于探查体积中粗略地 50 个两颗粒纳米致动器的存在。与缓冲剂相比，血浆中的较高的空白值能够归因于复杂基质中干扰剂的存在。

[0061] 为进一步研究浓度依赖关系，针对三个浓度的 bBSA 测量了频率响应曲线。图 10 示出了对于缓冲剂中三个浓度的 bBSA 的频率响应(画面 a 中 0.63pM、画面 b 中 3.15pM、以及画面 c 中 250pM)。根据低和中间频率处的拟合之间的交叉推得临界频率。对于 0.6pM 的目标浓度，临界频率约为 13Hz，对于 3.1pM 减小至 7Hz，而对于 250pM 变为 4.8Hz。实际上，随着斜率陡度增大，3.1pM 处的曲线示出了两个临界转变。3.1pM 处的两个斜率能够归因于可比较量的两颗粒和三颗粒纳米致动器的同期存在。

[0062] 在 3.5mT 的场中以 3 秒的平均时间执行测量。归因于增大尺寸的纳米致动器的存在，临界频率对增大的 bBSA 浓度移动至较低值。由于纳米致动器的较大尺寸和数量，低频

率处的信号随抗原浓度增大。通过拟合实验点获得点线，并且点线用于估计临界频率。在3.15pM的浓度处的数据示出了由两个和三个纳米颗粒构成的纳米致动器的共存，分别由近似地 $\omega_{crit}/2\pi = 7Hz$ 和 16Hz 的临界频率特征化。在较后的临界频率，频率相关的信号的斜率加倍。

[0063] 低频浓度相关的信号导致如图 9a 中的剂量响应曲线。发现定义为信号等于 $S_b + 3\sigma_b$ 处的水平的探测限度在 400fM 以下，S_b 为空白信号的平均值，而 σ_b 为空白信号的标准偏差。探测限度由纳米颗粒的非特定接合过程确定。信号在约 100pM 的目标浓度处饱和，由可用于纳米致动器形成的有限数量的纳米颗粒引起。

[0064] 归因于大量的潜在地干扰的分子 19，分析测定在诸如血浆的复杂生物基质中是特别有挑战性的。图 9b 示出了在人血浆中测得的剂量响应曲线。光学信号随抗原的浓度增大，并且在近似 100pM 的值达到饱和。在血浆中未看到如在缓冲剂中观测的斜率转变。原因是，归因于生成纳米颗粒之间的非特定接合的干扰剂的存在，空白水平比血浆中高。空白水平具有约 13％的变化，这给出了接近 5pM 的值作为探测限度。

[0065] 利用本发明，提供了测量来自旋转颗粒簇的光散射的简单和有成本效益的机构。利用本发明，能够磁性地特征化纳米尺寸的颗粒的总体，并且在不同簇尺寸之间进行区别是可能的。设备和方法还适合于快速和灵敏的凝集测定，例如皮可摩尔目标浓度的探测。

[0066] 虽然已经在附图和前述描述中详细示例并描述了本发明，但是该示例和描述应示为示例性或范例性的，而非限制性的；本发明从而不限于公开的实施例。根据对附图、说明书、以及所附权利要求的研究，本领域技术人员在实践所声称的发明中能够理解并实施对公开的实施例的改变。权利要求中，词语“包括”不排除其它元件或步骤，并且不定冠词“一个”或“一”不排除多个。单个处理器或单元可以履行权利要求中记载的数项的功能。某些措施记载在相互不同的从属权利要求中的仅有事实不表示不能有利地使用这些措施的组合。权利要求中的任何参考符号不应视为限制范围。

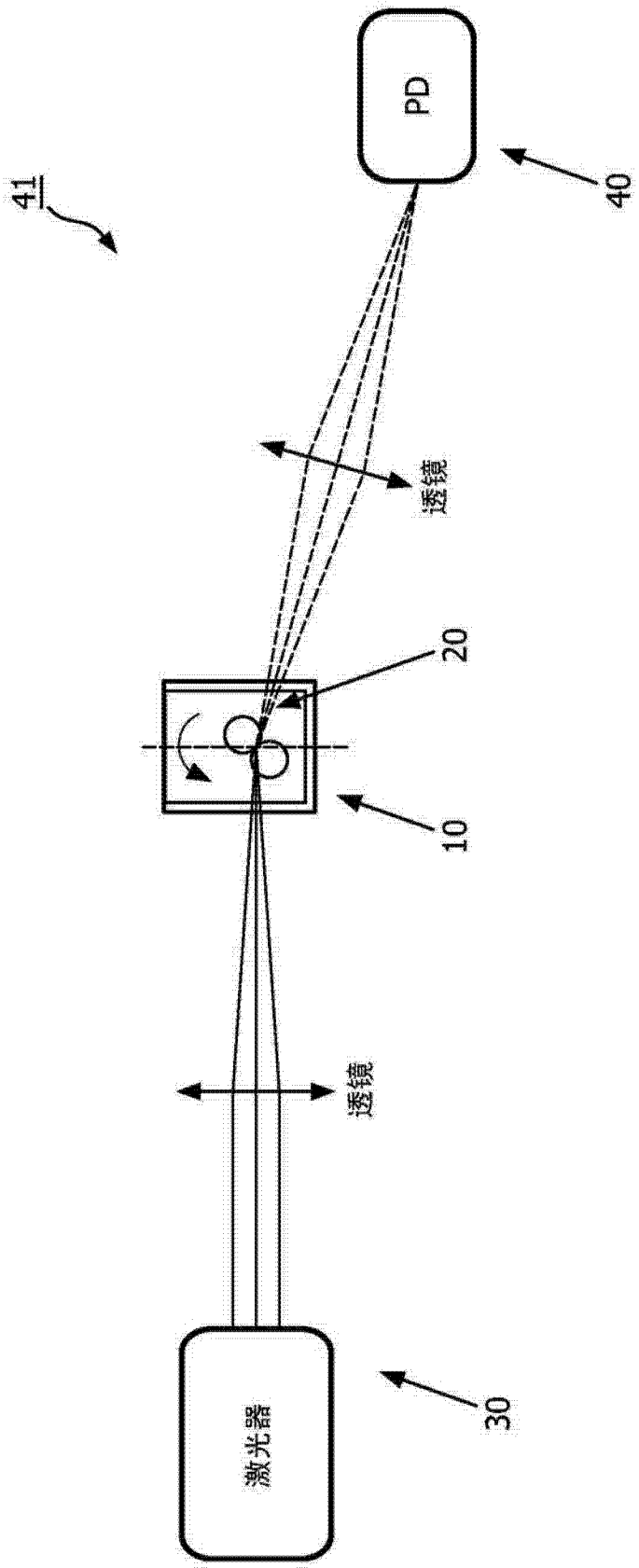


图 1

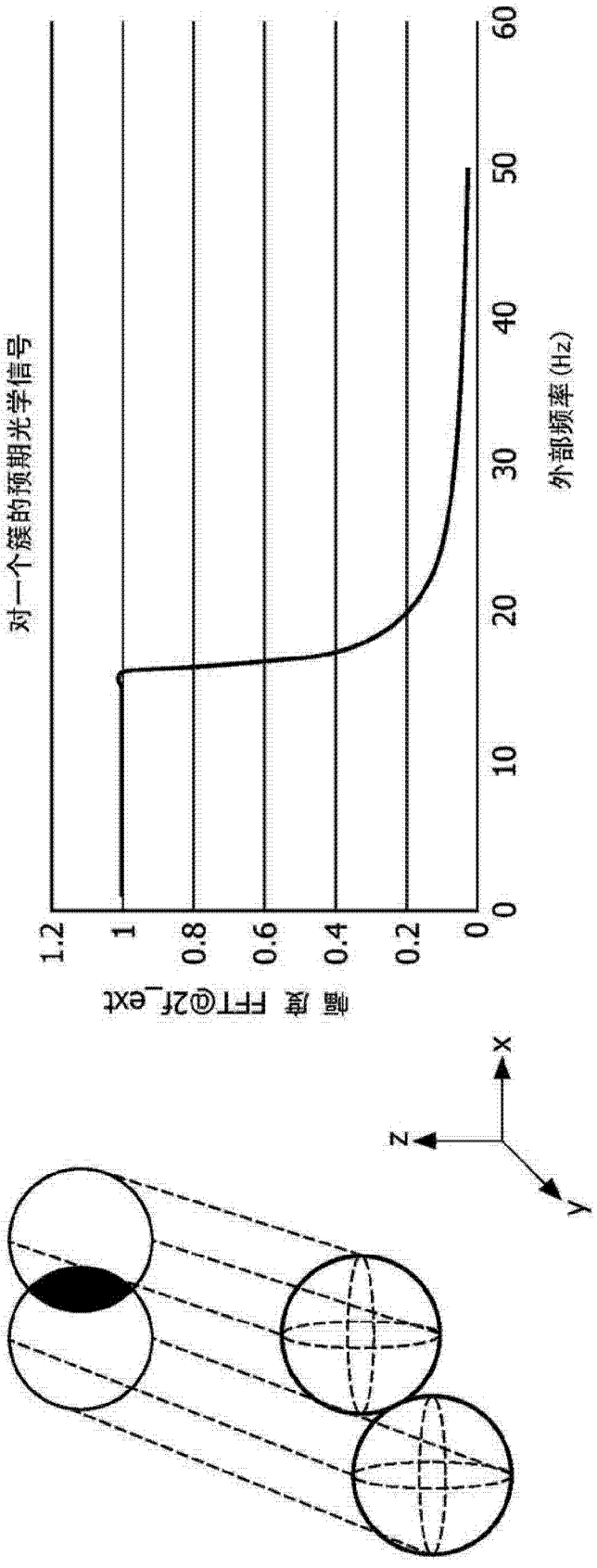

对一个簇的预期光学信号
幅度 FFT@2f_ext
外部频率(Hz)
0
10
20
30
40
50
60
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
x
z
y

图 2

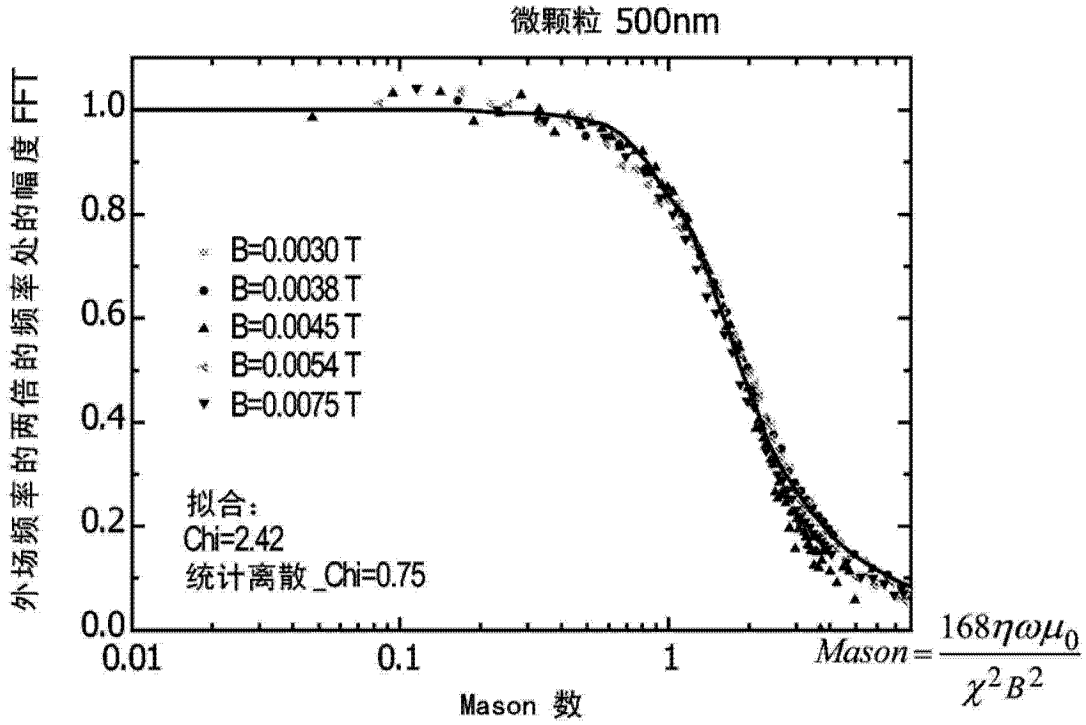

微颗粒 500nm
外场频率的两倍的频率处的幅度 FFT
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
B=0.0030 T
B=0.0038 T
B=0.0045 T
B=0.0054 T
B=0.0075 T
拟合：
Chi=2.42
统计离散 _Chi=0.75
0.01
0.1
1
Mason 数
$Mason = \frac{168\eta\omega\mu_0}{\chi^2 B^2}$

图 3

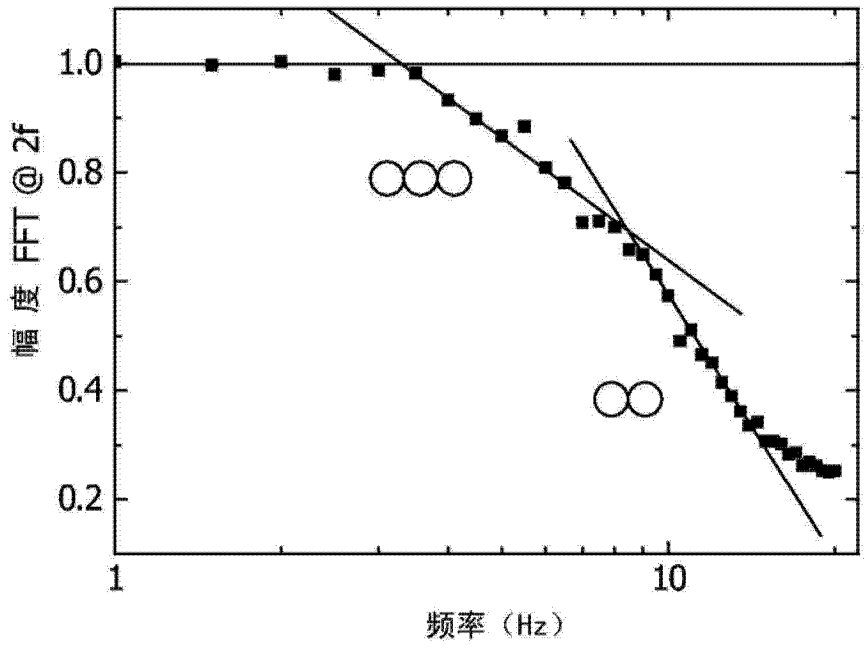

幅 度 FFT @ 2f
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
1
10
频率（Hz）

图 4

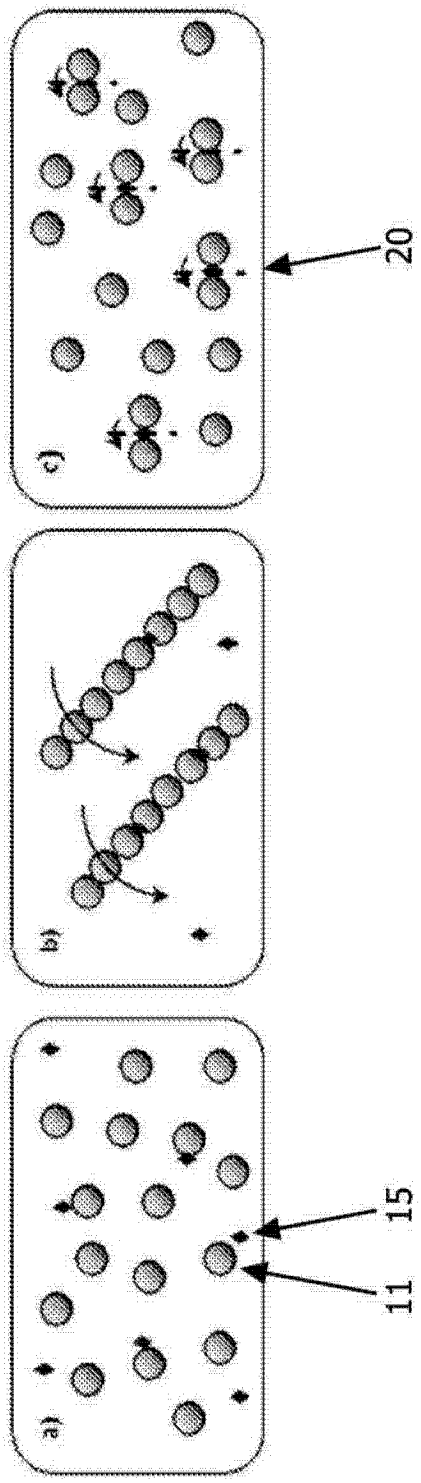


图 5

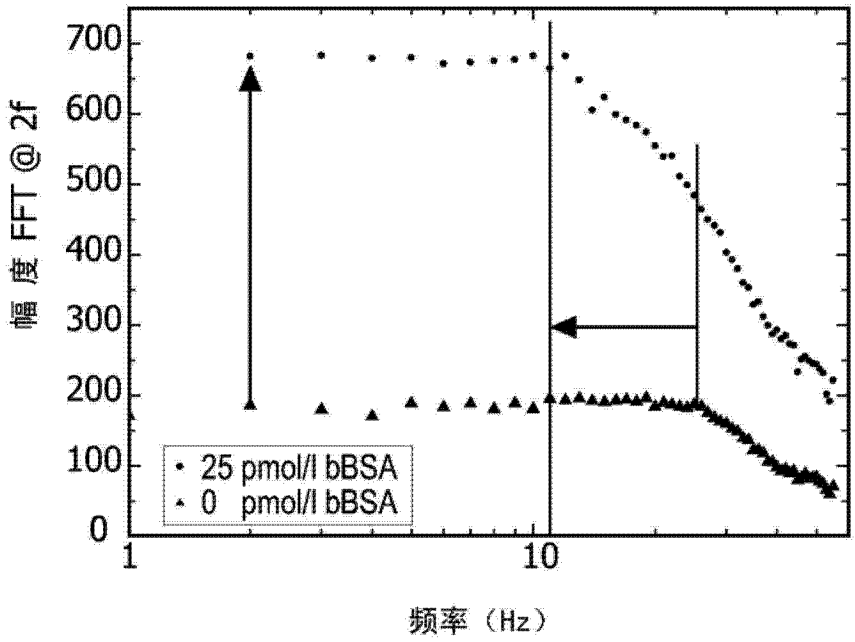

幅度 FFT @ 2f
700
600
500
400
300
200
100
0
1
10
频率（Hz）
25 pmol/l bBSA
0 pmol/l bBSA

图 6a

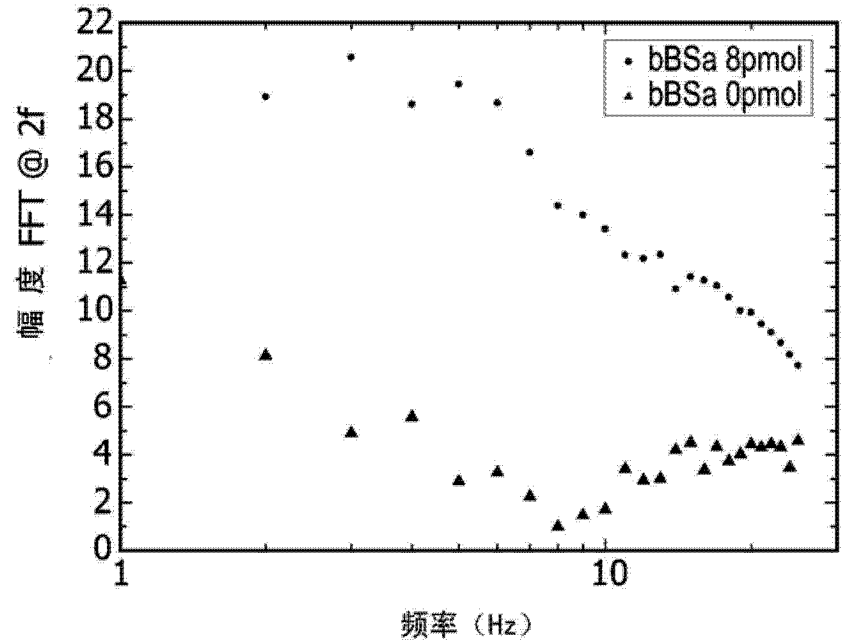

幅度 FFT @ 2f
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
1
10
频率（Hz）
bBSa 8pmol
bBSa 0pmol

图 6b

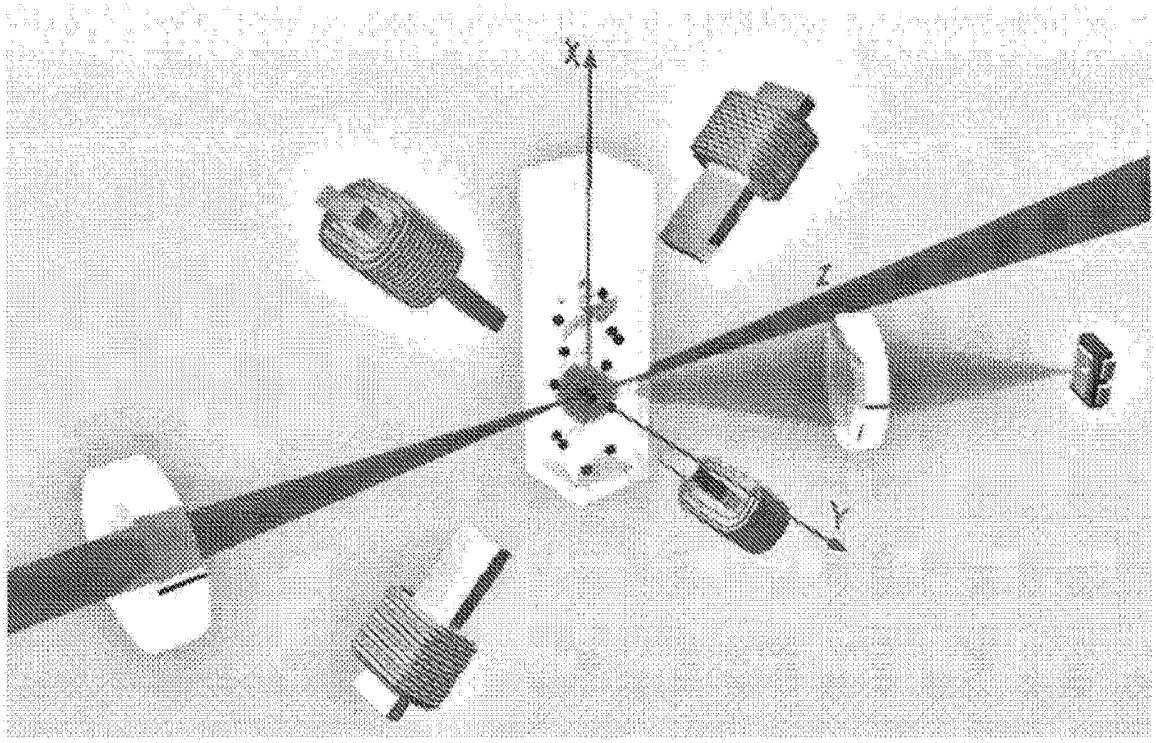


图 7a

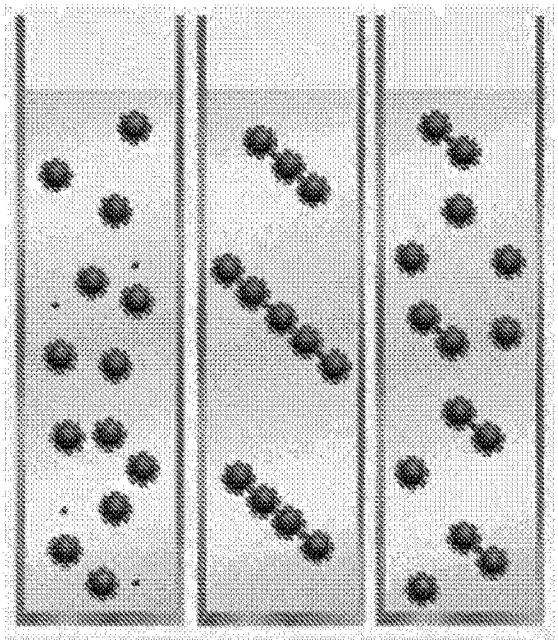


图 7b

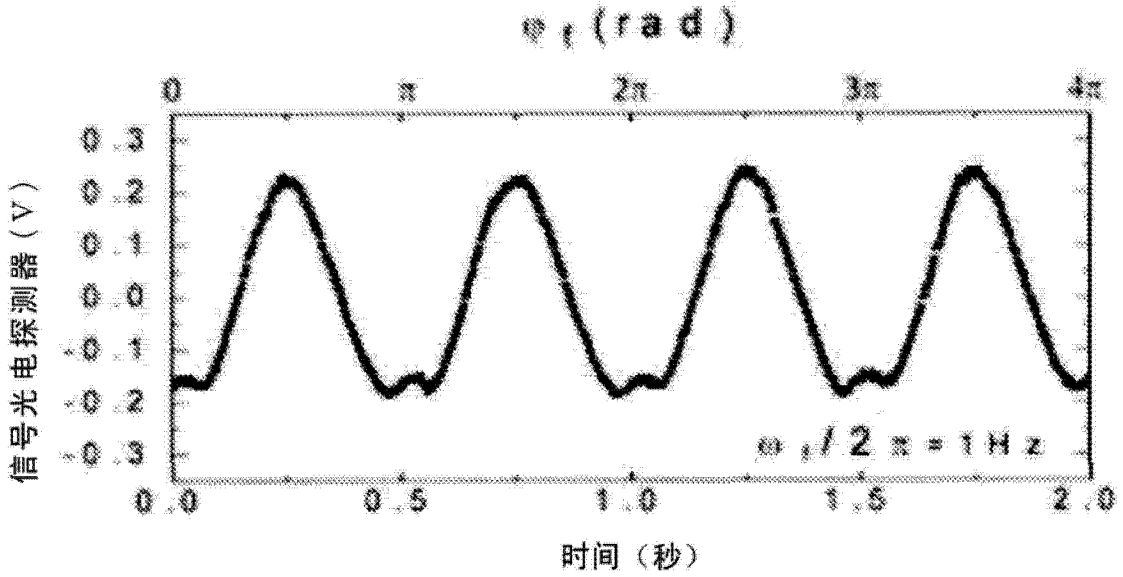

φ t (rad)
0
π
2π
3π
4π
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
信号光电探测器（V）
ω t / 2 π = 1 Hz
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
时间（秒）

图 7c

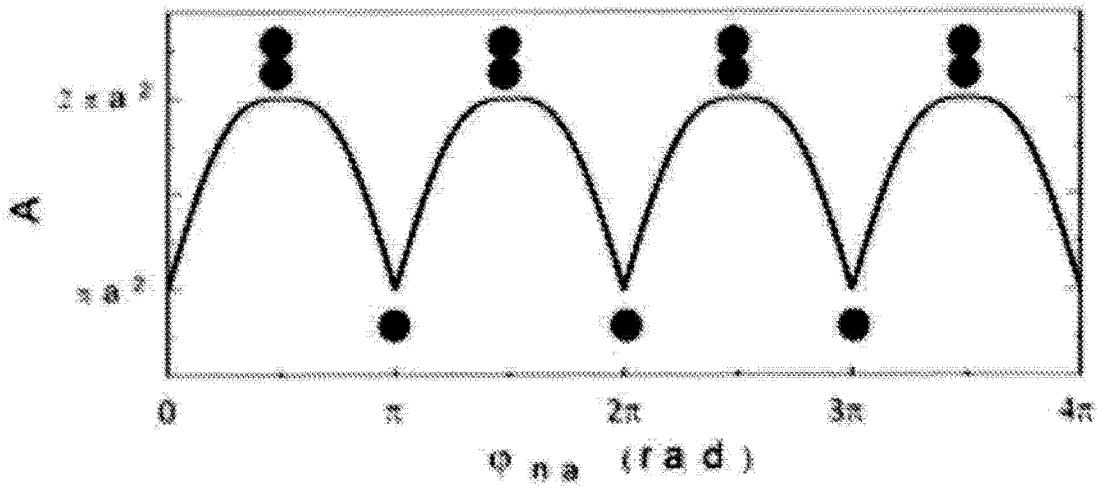

A
φ na (rad)
0
π
2π
3π
4π

图 7d

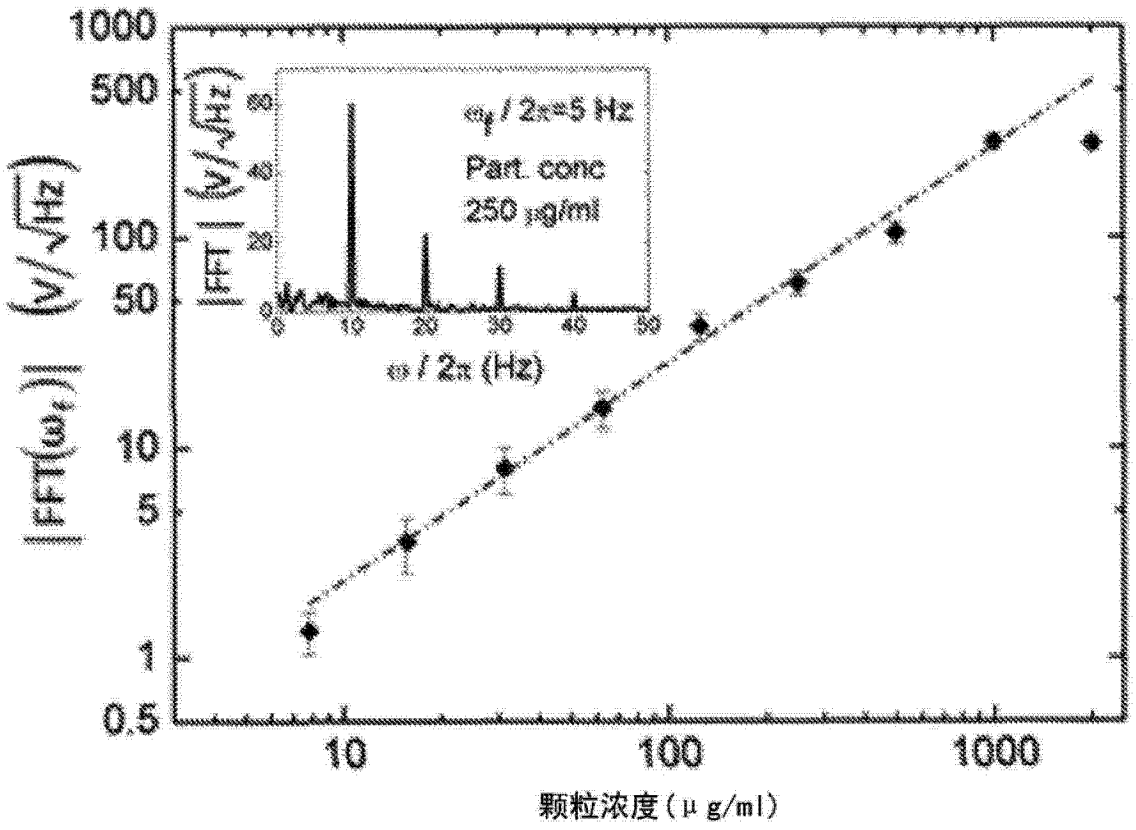

1000
500
100
50
10
5
1
0.5
10
100
1000
颗粒浓度（μg/ml）
|FFT(ω_c)| (V/√Hz)
|FFT| (V/√Hz)
ω_c / 2π=5 Hz
Part. conc
250 μg/ml
ω / 2π (Hz)

图 8a

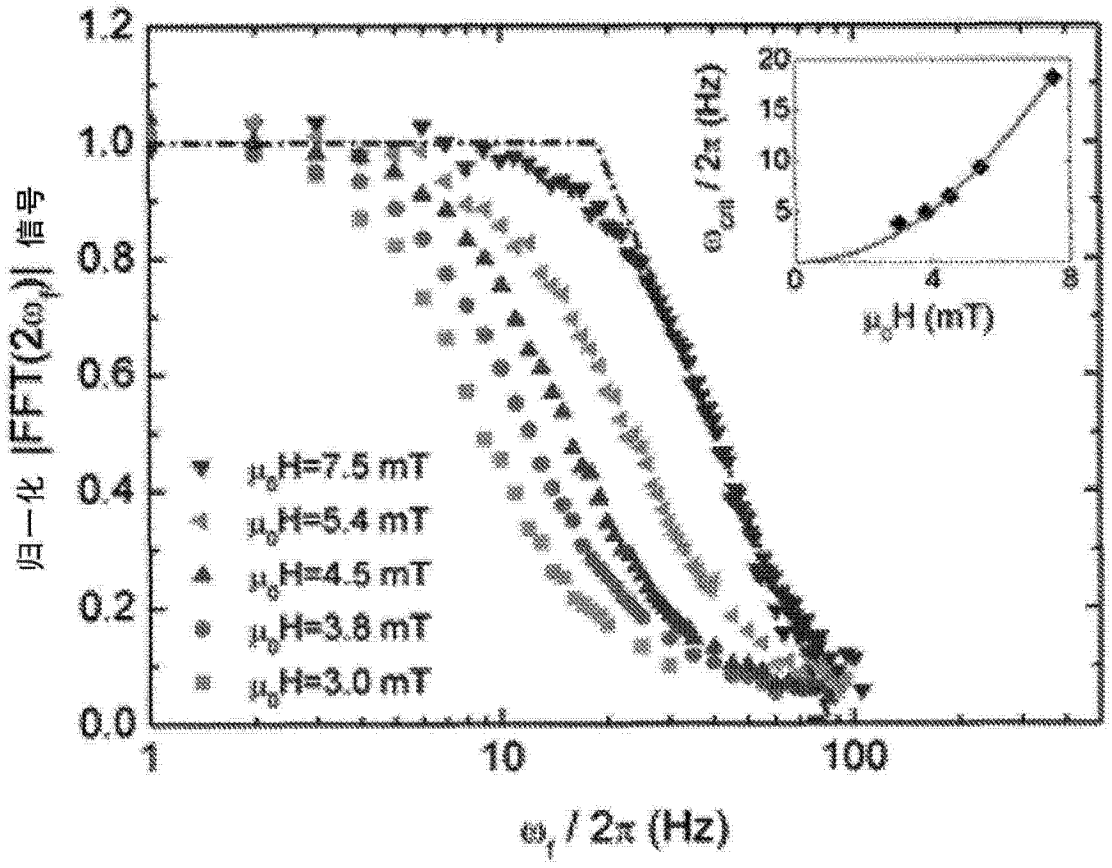

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
归一化 |FFT(2ω_μ)| 信号
1
10
100
ω_f / 2π (Hz)
μ0H=7.5 mT
μ0H=5.4 mT
μ0H=4.5 mT
μ0H=3.8 mT
μ0H=3.0 mT
ω_cm / 2π (Hz)
20
15
10
5
0
4
8
μ0H (mT)

图 8b

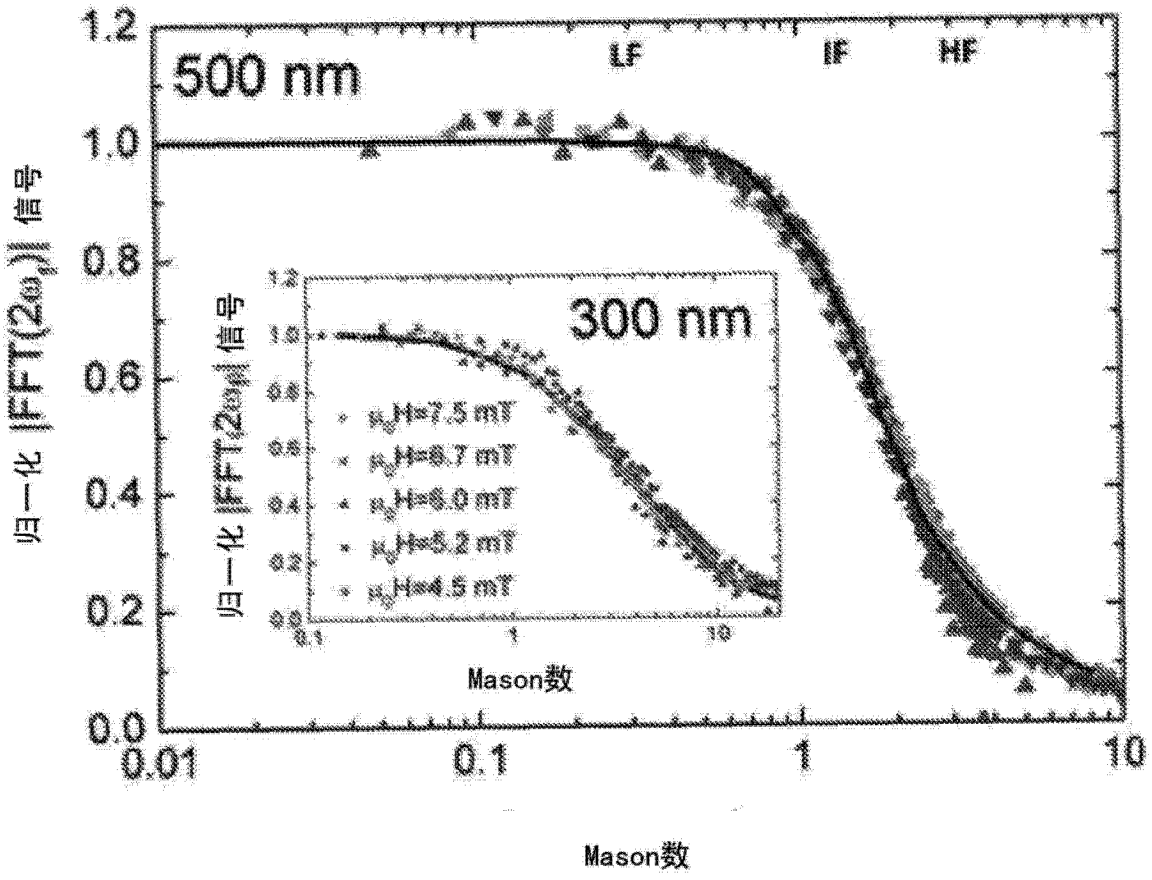

500 nm
LF
IF
HF
300 nm
μ_0H=7.5 mT
μ_0H=6.7 mT
μ_0H=6.0 mT
μ_0H=5.2 mT
μ_0H=4.5 mT
归一化 |FFT(2ω_f)| 信号
Mason数
Mason数

图 8c

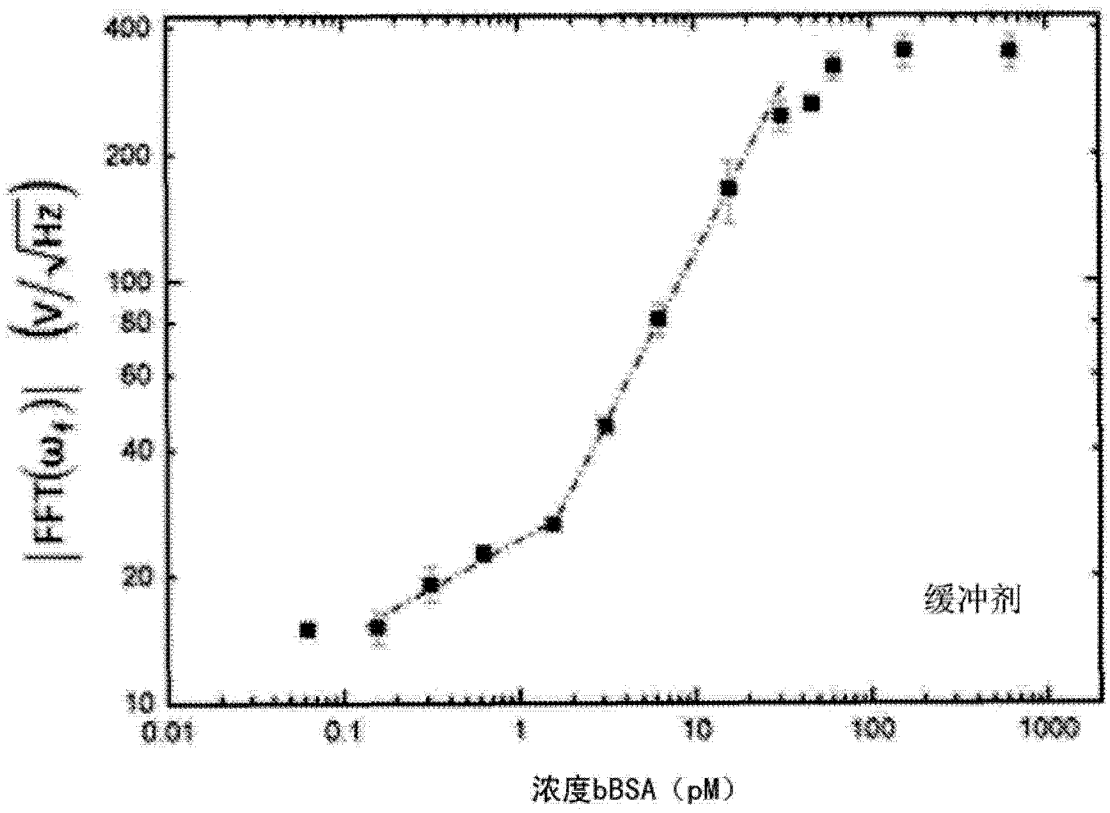

400
200
100
80
60
40
20
10
0.01
0.1
1
10
100
1000
$|FFT(\omega_r)|$ $(V/\sqrt{Hz})$
缓冲剂
浓度bBSA（pM）

图 9a

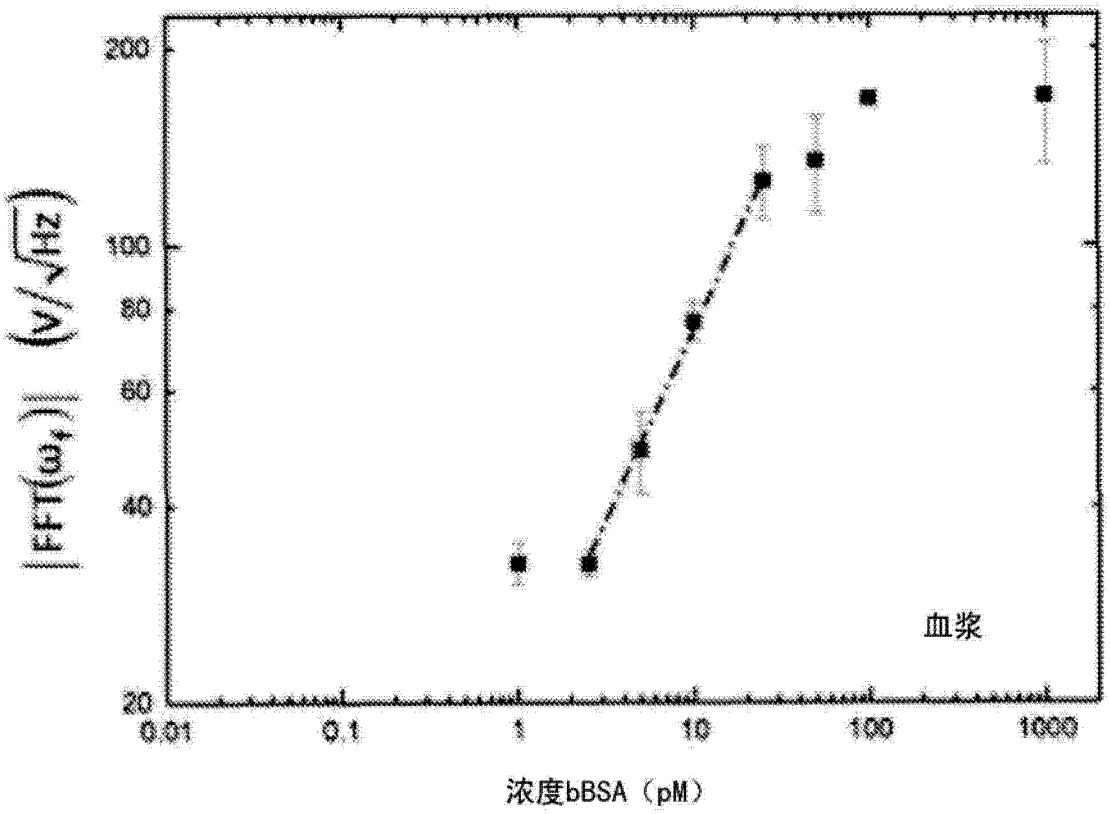

200
100
80
60
40
20
0.01
0.1
1
10
100
1000
$|FFT(\omega_+)|$ $(V/\sqrt{Hz})$
血浆
浓度bBSA（pM）

图 9b

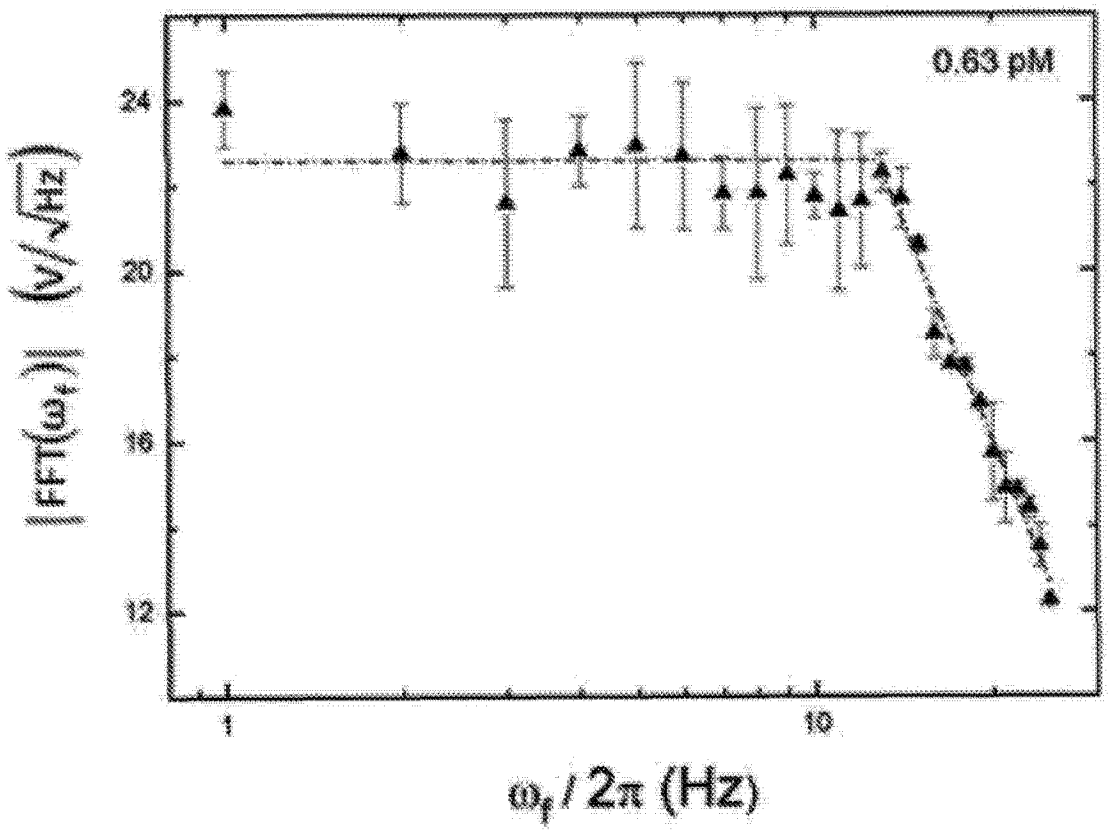


图 10a

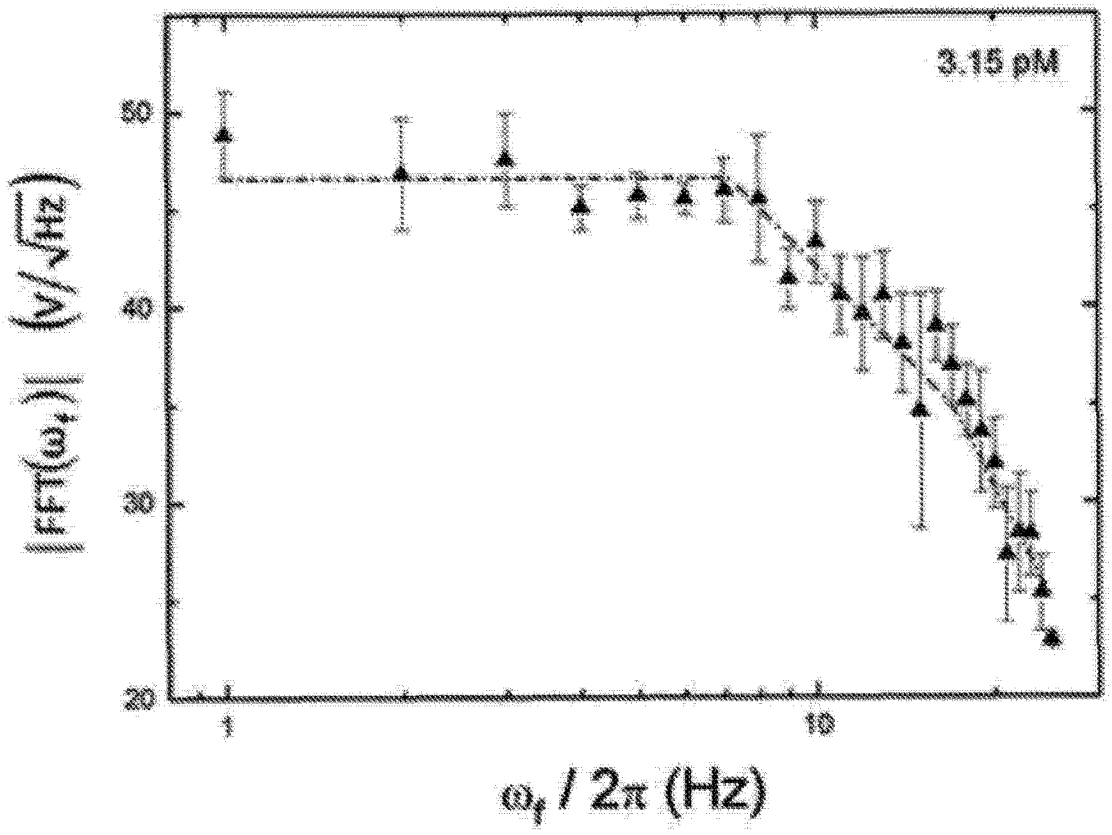


图 10b

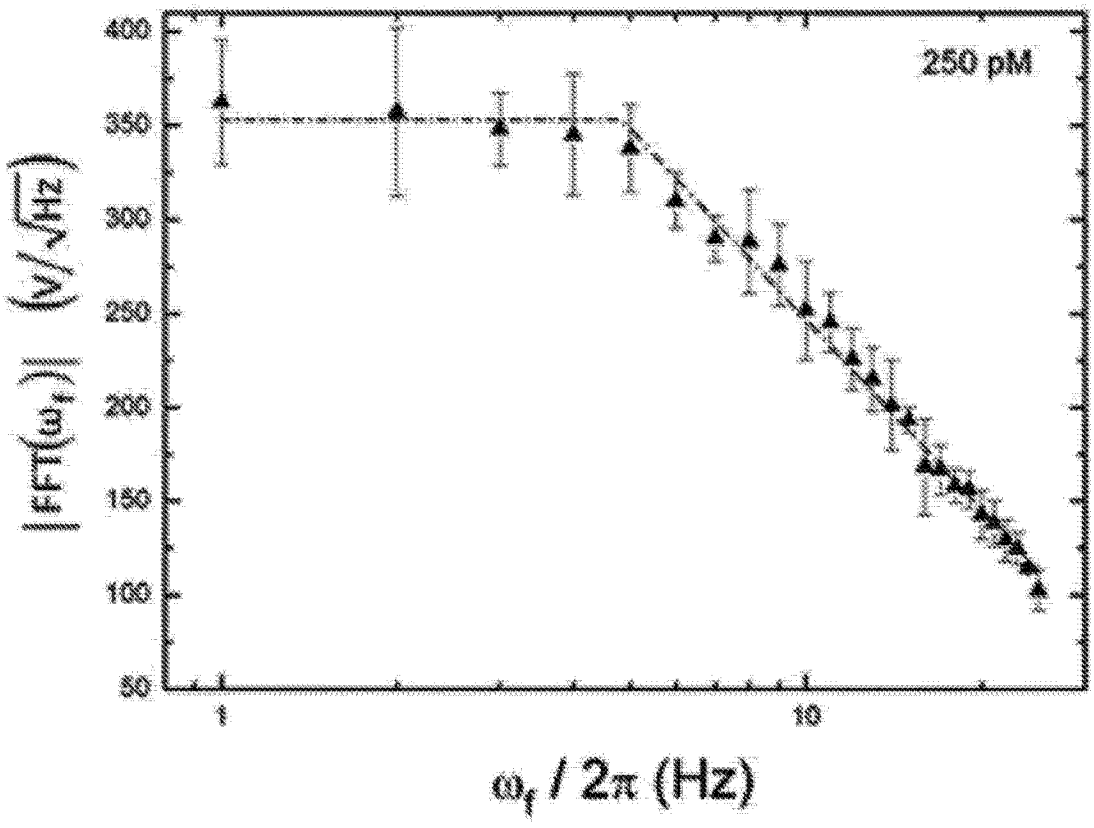

250 pM
400
350
300
250
200
150
100
50
1
10
$|FFT(\omega_f)|$ (V/$\sqrt{Hz}$)
$\omega_f / 2\pi$ (Hz)

图 10c