



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101971029 B

(45) 授权公告日 2013. 08. 07

(21) 申请号 200880125056. 2

(22) 申请日 2008. 11. 25

(30) 优先权数据

0723137. 6 2007. 11. 26 GB

0812679. 9 2008. 07. 10 GB

0812845. 6 2008. 07. 14 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 07. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2008/003931 2008. 11. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02009/068862 EN 2009. 06. 04

(73) 专利权人 英国政府创新、大学与技能部

地址 英国伦敦

(72) 发明人 罗伯特·安德鲁·波特

马泰乌兹·希曼斯基

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 20030186274 A1, 2003. 10. 02, 全文.

W0 2005121792 A1, 2005. 12. 22, 全文.

Murielle Dequaire, et al. An

Electrochemical Metalloimmunoassay Based on a Colloidal Gold Label. 《Anal. Chem. 》. 2000, 第 72 卷 (第 22 期), 全文.

Shaojun Guo, et al. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. 《Analytica Chimica Acta, 》. 2007, 第 598 卷 (第 2 期), 全文.

审查员 许珊萍

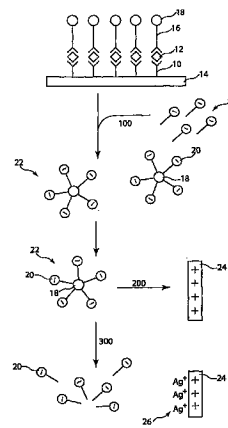
权利要求书2页 说明书12页 附图16页

(54) 发明名称

电化学检测金属标记的分析物

(57) 摘要

描述了用于确定样品中金属标记的分析物 (12) 的存在或量的方法。所述方法包括以下步骤: 将释放剂 (20) 添加至所述金属标记的分析物 (12), 从而将所述金属标记物 (18) 从所述分析物 (12) 中释放, 所述释放剂 (20) 与金属标记物 (18) 形成带电稳定物质 (22), 施加电势从而将所述带电稳定物质 (22) 送至电极 (22), 在正电势下溶解所述带电稳定物质 (22), 从而形成金属离子 (26), 和执行量化测定步骤如阳极溶出伏安法来确定所述金属标记的分析物 (12) 的存在或量。



1. 用于确定样品中金属标记的分析物 (12) 的存在或量的方法, 所述方法包括以下步骤:

将释放剂 (20) 添加至所述金属标记的分析物, 从而将金属标记物 (18) 从所述分析物中释放, 所述释放剂和所述金属标记物一起形成不可溶的带电物质 (22), 施加电势从而将所述带电物质送至电极 (24), 其中释放剂是能够在金属标记物表面上形成带电层并因此能够使其在一定电势下迁移的任何盐或化学物质,

向所述带电物质施加正电势以形成金属离子 (26), 和

执行量化测定步骤以确定所述金属标记的分析物的存在或量。

2. 如权利要求 1 中所述的方法, 其中通过施加正电势将所述带电物质 (22) 送至电极 (24), 所述正电势也导致所述金属离子 (26) 的形成。

3. 如权利要求 1 或 2 中所述的方法, 其中所述带电物质 (22) 带负电。

4. 如权利要求 1 或 2 中所述的方法, 其中所述释放剂 (20) 包括具有带电单元的硫醇。

5. 如权利要求 1 或 2 中所述的方法, 其中所述释放剂 (20) 是硫氰酸铵或硫氰酸钾。

6. 如权利要求 1 或 2 中所述的方法, 其中所述释放剂 (20) 是硫代硫酸盐或带电的硫醇链。

7. 如权利要求 1 或 2 中所述的方法, 其中所述释放剂 (20) 提供多个离子以形成所述带电物质。

8. 如权利要求 7 中所述的方法, 其中所述释放剂 (20) 提供多个氯离子以形成所述带电物质 (22)。

9. 如权利要求 8 中所述的方法, 其中所述释放剂 (20) 是 NaCl 或 HCl。

10. 如权利要求 1 或 2 中所述的方法, 还包括用所述金属标记物 (18) 标记所述分析物 (12) 的步骤, 其中所述分析物 (12) 与结合部分 (16) 温育, 所述结合部分 (16) 能够结合所述分析物并用所述金属标记物标记。

11. 如权利要求 10 中所述的方法, 还包括将所述分析物 (12) 与另一种结合部分 (10) 温育的步骤, 所述结合部分 (10) 能够与所述分析物结合并被固定于固体支持物 (14)。

12. 如权利要求 11 中所述的方法, 其中所述固体支持物 (14) 是可动的或固定的。

13. 如权利要求 12 中所述的方法, 其中所述可动的固体支持物 (14) 是磁化的。

14. 如权利要求 12 或 13 中所述的方法, 其中所述金属标记物 (18) 是金属纳米粒子且其中所述固体支持物 (14) 是比所述金属纳米粒子更大或更小的粒子, 从而容许从结合的金属纳米粒子中滤出未结合的金属纳米粒子。

15. 权利要求 12 或 13 所述的方法, 其中所述固体支持物 (14) 是带电粒子, 从而容许电分离。

16. 如权利要求 12 中所述的方法, 其中所述固定的固体支持物 (14) 是三维表面或结构。

17. 如权利要求 16 中所述的方法, 其中所述固定的固体支持物 (14) 是三维多孔结构。

18. 如权利要求 12 中所述的方法, 其中所述固定的固体支持物 (14) 是二维表面或结构。

19. 如权利要求 1 或 2 中所述的方法, 其中所述金属标记物 (18) 是微粒标记物或纳米粒子。

20. 如权利要求 19 中所述的方法,其中所述金属标记物(18)是银纳米粒子或金纳米粒子。
21. 如权利要求 20 中所述的方法,其中所述金属标记物(18)是银纳米粒子。
22. 如权利要求 1 或 2 中所述的方法,其中所述量化测定步骤是伏安法。
23. 如权利要求 22 中所述的方法,其中所述伏安法是阳极溶出伏安法。

电化学检测金属标记的分析物

技术领域

[0001] 本发明涉及电化学测定，具体地所述测定利用金属纳米粒子作为电化学标记物。

背景技术

[0002] 涉及金属标记物的现有技术测定，诸如 W02005/121792 中所述的那些，需要化学氧化剂来溶解金属纳米粒子。关于这一点的问题是该氧化剂可以通过破坏扫描的基线而干扰扫描的电化学曲线。W02005/121792 中所述的测定依赖于金属离子的形成，从而使该金属通过电解被转移到电极表面。这在分析生物样品时引起问题。生物样品溶液中的蛋白质和其他分子典型地与金属离子结合，从而使它们电化学失活。金属离子还可以通过与化学氧化物的螯合 / 偶联而引起电化学失活。

[0003] W02004/016160 公开了化学氧化还原裂解剂 (cleavant) 从纳米粒子标记的分析物中释放有机聚合物纳米粒子的应用。然后使用电化学流式细胞计数来检测由氧化还原裂解剂从聚合物纳米粒子释放的氧化还原产物 (诸如金属离子)。

发明内容

[0004] 本发明试图克服一种或多种以上问题。

[0005] 根据本发明的第一方面，提供用于确定金属标记的分析物在样品中的存在或量的方法，所述方法包括以下步骤：将释放剂 (release agent) 加入到金属标记的分析物中以从所述分析物中释放金属标记物，所述释放剂和所述金属标记物一起形成带电物质 (charged species)，施加电势 (potential) 从而将所述带电物质送至电极，向所述带电物质施加正电势以形成金属离子，和执行量化测定步骤以确定金属标记的分析物的存在或量。

[0006] 金属离子在电极表面处形成。因此金属离子仅有很小的机会在测量前被灭活。因此不需要在金属离子和螯合剂之间形成复合物。而且，由于使用电化学势来溶解金属标记物，所以不需要使用化学氧化剂和避免与化学氧化剂有关的问题。

[0007] 带电物质典型是不可溶的。

[0008] 典型地，释放剂包括带电成分，释放剂的带电成分和金属纳米粒子一起形成带电物质。

[0009] 通过应用正电势，带电物质可以被送至电极，这也导致金属离子的形成。

[0010] 带电物质优选带负电，但是在一些实施方案中其可以带正电。

[0011] 释放剂可以是能够在金属标记物表面上形成带电层并因此能够使其在一定电势下迁移的任何盐或化学物质。

[0012] 释放剂可以包括具有带电单元的硫醇。硫醇起作用来使金属标记物和分析物之间的结合变性或将其破坏。该带电单元为金属标记物提供电荷。

[0013] 合适的释放剂的实例包括硫氰酸铵和硫氰酸钾。代替硫氰酸盐，释放剂可以包括硫代硫酸盐或带电的硫醇链。释放剂可以提供离子以形成带电物质。例如，合适的释放剂包

括 NaCl 或 HCl, 它们能够提供氯离子以形成带电物质。NaCl 和 HCl 特别有效用作释放剂, 因为它们在氧化后不与金属离子形成复合物。

[0014] 释放剂优选浓度为约 1M 以上。该范围是优选的, 因为低于该摩尔浓度, 银灵敏度不佳。

[0015] 所述方法还可以包括使用金属标记物标记分析物, 其中所述分析物与能够与所述分析物结合的结合部分温育, 并被所述金属标记物标记。分析物可以用另一种结合部分来温育, 所述结合部分能够与所述分析物结合并固定于固体支持物。所述固体支持物可以是可动的或固定的, 固体支持物可以是磁化的, 固体支持物可以是比金属纳米粒子更大或更小的粒子, 从而容许从结合的金属纳米粒子中滤出未结合的金属纳米粒子, 固体支持物可以是带电的粒子, 以容许电分离, 固体支持物可以是多孔结构, 固体支持物可以是 2 维或 3 维表面或结构。

[0016] 在优选的实施方案中, 金属标记物是银或金, 例如银纳米粒子或金纳米粒子。优选地, 金属标记物是微粒或纳米粒子标记物诸如银纳米粒子。

[0017] 分析物可以间接标记的, 其中标记物附着于一种物质或结合部分, 该物质或结合部分再结合分析物。

[0018] 所述量化测定步骤可以是伏安法, 诸如阳极溶出伏安法 (ASV)。

附图说明

[0019] 现将仅通过举例和参考附图的方式描述优选的实施方案, 其中:

[0020] 图 1 示意性图示本发明的一个实施方案;

[0021] 图 2 和 3 显示标准溶液 $\text{AgNO}_3 + 1\text{M NH}_4\text{SCN}$ (1–50ppm Ag^+) 的阳极溶出伏安法 (ASV) 扫描结果;

[0022] 图 4 和 5 显示标准溶液 $\text{AgNO}_3 + 1\text{M NH}_4\text{SCN}$ (0.01–0.8ppm Ag^+) 的阳极溶出伏安法 (ASV) 扫描结果;

[0023] 图 6 和 7 显示在存在氧化剂铁氰化物的条件下的 Ag^+ 浓度;

[0024] 图 8–11 显示在存在 / 缺乏铁氰化物的条件下的 Ag^+ 浓度;

[0025] 图 12 和 13 显示在存在或不存在 NH_4SCN 的条件下的银纳米粒子的吸光度;

[0026] 图 14a–f 显示 80% 和 100% 银纳米粒子溶液对尺寸分布的影响;

[0027] 图 15 和 16 比较关于 KSCN 和 NH_4SCN 的结果;

[0028] 图 17 和 18 比较预处理时间对方法的实施方案的影响;

[0029] 图 19 显示关于肌红蛋白的测定的结果, 以确定最大化该测定灵敏度所需要的抗体量;

[0030] 图 20–23 显示关于方法的其他实施方案的结果; 和

[0031] 图 24 和 25 图示其中所测物质不带电的阴性结果。

具体实施方案

[0032] 所述测定确定目的分析物 (诸如抗体、模拟表位或核酸链) 的存在或量, 且图 1 中示意性示范一个实施方案。在优选的实施方案中, 能够结合目的分析物 12 的第一结合部分 10 附着于固相 14 (表面或磁性粒子)。能够结合分析物 12 上不同区域的第二结合部分用

金属标记物 18、典型地微粒标记物来标记。

[0033] 将包含分析物 12 的样品溶液加至固体支持物 14。分析物 12 与第一结合部分 10 结合。支持物 14 然后与包含标记的第二结合部分 16 的溶液温育,所述标记的第二结合部分 16 结合分析物 12。有效地,在基底和银粒子 18 之间出现“夹心结构”,由此捕获粒子 18。然后除去未结合的粒子(诸如提供清洗)。这确保所述粒子不被氧化。

[0034] 在优选的实施方案中,银纳米粒子 18 用作电化学标记物。银纳米粒子 18 提供电化学信号的分子放大,因为每个 40nm 银纳米粒子包含约 10^6 银离子。因此,测定的灵敏性提高。另外,银是优选的,因为它形成可以作为生物纳米标记物 18 使用的稳定纳米粒子。此外,银纳米粒子 18 易于电氧化形成银离子。一些其他金属纳米粒子需要苛刻的化学氧化剂来形成金属离子。

[0035] 在优选的实施方案中,将硫氰酸铵 20 引入 100 并从其生物复合物中去除银纳米粒子 18 并形成在银纳米粒子周围化学结合的层(可以是单层),从而生成带负电的纳米粒子 22。带电纳米粒子 22 可以在电势下迁移 200 到正电极表面。在该电极处的银纳米粒子然后在正电势 300 下溶解形成银离子 26。银离子 26 然后通过累积溶出伏安法(accumulation stripping voltammetry)测量。一小部分银离子 26 可以采用与螯合剂复合物的形式,其中释放剂能够螯合银离子。

[0036] 可以使用其他释放剂 20(诸如具有带电单元的硫醇,例如硫代硫酸盐)。还可以使用非硫醇盐分子,诸如 NaCl 和 HCl。

[0037] 比较例 1

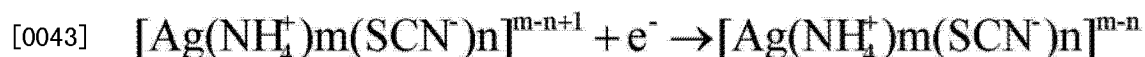
[0038] 该比较例解释在形成 W02005/121792 中公开的方法中测量的电活性复合物背后的化学。

[0039] 1. 测量银离子 (Ag^+) 复合物

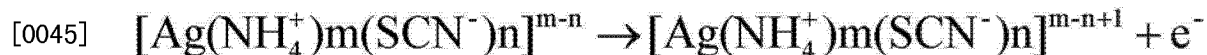
[0040] 银离子在存在 NH_4SCN 的条件下形成强电活性复合物:



[0042] 那些复合物可以利用 ASV 电化学测量。在该过程中,处于负电势的银复合物首先沉积在碳糊电极表面上:



[0044] 然后将电势改变为正值,银复合物从电极溶出,产生电流峰值。



[0046] 硫氰酸铵还形成与其他金属离子的复合物,且硫氰酸铵将这些金属离子的电化学定位而远离银离子复合物的电化学,由此消除了光谱干扰。

[0047] 制备 AgNO_3 标准溶液 (1.25, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50 和 62.5ppm AgNO_3)。向每个 160 μl 标准溶液中,加入 40 μl 15M NH_4SCN 。随后,将 50 μl 每种 AgNO_3 和 NH_4SCN 溶液随之应用在电极上并进行 ASV。ASV 参数如下:

[0048] a) +0.4V, 10s (预处理)

[0049] b) 线性扫描 +0.4V $\rightarrow$ -1.6V, 扫描速度 = 1V/s 和跨步电势 = 0.005V

[0050] c) -1.6V, 5s

[0051] d) -1.2V, 55s

[0052] e) 线性扫描 $-1.2\text{V} \rightarrow +0.1\text{V}$, 扫描速度 = 1V/s 和跨步电势 = 0.01V

[0053] 2) 在每次测量之间, 电极用 $5\text{M NH}_4\text{SCN}$ 清洗, 运行 ASV 并然后用薄纸擦拭。

[0054] 表 1

Ag ⁺ [ppm]	1	5	10	20	30	40	50
[0055]	14.40E-07	2.48E-06	5.34E-06	1.03E-05	1.39E-05	1.68E-05	2.34E-05
	24.23E-07	2.48E-06	4.86E-06	9.73E-06	1.62E-05	1.69E-05	2.10E-05
	33.91E-07	2.51E-06	4.73E-06	1.07E-05	1.45E-05	1.77E-05	1.96E-05
	平均值	4.18E-07	2.49E-06	4.97E-06	1.02E-05	1.49E-05	1.71E-05
[0056]	标准偏差	2.48E-08	1.94E-08	3.19E-07	4.8E-07	1.21E-06	4.61E-07
	CV%	5.93	0.78	6.42	4.69	8.17	2.69
							8.96

[0057] 结果显示在图 2 和 3 中。峰下面积与 1-50ppm 范围内的 Ag⁺ 浓度成比例。

[0058] 比较例 2

[0059] 利用较低 Ag⁺ 浓度进行相同的实验。

[0060] 表 2

[0061]

Ag ⁺ [ppm]	0.01	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5	0.8
1	无峰	无峰	无峰	1.2E-08	6.4E-08	1.6E-07	2.7E-07
2	无峰	无峰	无峰	1.7E-08	6.4E-08	1.5E-07	2.5E-07
3	无峰	无峰	无峰	5.1E-09	5.4E-08	1.5E-07	2.4E-07
平均值	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	1.1E-08	6.1E-08	1.5E-07	2.5E-07
标准偏差	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	5.7E-09	5.9E-09	7.0E-09	1.2E-08
CV%	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	51.62	9.76	4.59	4.83

[0062] 结果显示在图 4 和 5 中。

[0063] 比较例 3

[0064] 现有技术测定, 诸如 W02005/121792 中所述的测定, 使用氧化剂 (铁氰酸盐) 来形成银离子, 从而用于实施例 1 和 2 中所述的方法中。以下测量在存在 $0.05\text{M K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 和 $0.01\text{M K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的条件下进行。

[0065] 表 3

[0066]

Ag ⁺ [ppm]	1	2	3	4	5	6	7	8
1	3.39E-07	7.31E-07	1.13E-06	1.57E-06	1.90E-06	2.07E-06	2.41E-06	2.73E-06
2	3.45E-07	7.34E-07	1.07E-06	1.50E-06	1.89E-06	2.20E-06	2.52E-06	2.79E-06
3	2.99E-07	7.34E-07	1.14E-06	1.47E-06	1.88E-06	2.23E-06	2.52E-06	2.83E-06
平均值	3.28E-07	7.33E-07	1.12E-06	1.51E-06	1.89E-06	2.17E-06	2.48E-06	2.78E-06
标准偏差	2.5E-08	1.65E-09	4.07E-08	5.26E-08	1.37E-08	8.83E-08	6.36E-08	5.17E-08
CV%	7.633131	0.225412	3.650072	3.47912	0.722371	4.074576	2.562306	1.859349

[0067] 获得的结果显示在图 6-9 中。同时,具有或不具有铁氰化物的银离子的校准曲线非常相似,扫描结果的形状不同。

[0068] 以下实施例举例说明本发明优选实施方案的主题。

[0069] 实施例 4

[0070] 具有或不具有铁氰化物的银纳米粒子的电化学性质

[0071] 制备 5M NH_4SCN , 0.25M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 和 0.05M $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的“混合”溶液。制备 2 份 160 μl 银纳米粒子溶液。将 40 μl 15M NH_4SCN 加入第一份银溶液中。将 40 μl 所述混合溶液加入第二份溶液中。一旦制备,将 50 μl 各种溶液随之加至电极上并进行 ASV。

[0072] 表 4

银纳米粒 子	无 Fe	+ Fe
1	12.23E-06	2.36E-06
2	22.06E-06	2.28E-06
3	1.93E-06	2.15E-06
4	1.37E-06	1.88E-06
平均值	1.9E-06	2.17E-06
标准偏差	3.72E-07	2.12E-07
CV%	19.60653	9.807044

[0074] 结果显示在图 10 中。银纳米粒子在硫氰酸盐的存在下生成与由具有铁氰化物的银纳米粒子生成的峰相似但更强的峰。然而,基线在不具有铁氰化物氧化剂的银纳米粒子的情形中更好。基线更平且在溶出峰后不存在电流上升(在铁氰化物的情形中在溶出峰后存在电流上升)。峰判定和积分或高度确定因此更容易。

[0075] 更甚者(如在下一个实验中所示),峰下面积与银纳米粒子浓度成比例:

[0076] 表 5

[0077]

纳米 粒子 [%]	1	4	8	16	32	48	64	80
1无峰	1.19E-07	2.66E-07	5.21E-07	9.99E-07	1.70E-06	2.10E-06	2.42E-06	
2无峰	1.18E-07	2.07E-07	4.31E-07	9.57E-07	1.51E-06	1.88E-06	2.66E-06	
3无峰	8.77E-08	2.14E-07	4.23E-07	9.25E-07	1.44E-06	1.95E-06	2.31E-06	
4无峰	6.31E-08	1.81E-07	4.10E-07	8.49E-07	1.29E-06	1.75E-06	2.21E-06	
平 均								
值	#DIV/0!	9.70E-08	2.17E-07	4.46E-07	9.32E-07	1.49E-06	1.92E-06	2.40E-06
标 准								
偏差	#DIV/0!	2.69E-08	3.54E-08	5.08E-08	6.32E-08	1.7E-07	1.46E-07	1.93E-07
CV%	#DIV/0!	27.77	16.32	11.40	6.78	11.41	7.58	8.04

[0078] 这些数据显示在图 11 中。

[0079] 实施例 5

[0080] 为了检查 NH_4SCN 是否溶解银纳米粒子,可以使用光谱法。具有和不具有 NH_4SCN 的银纳米粒子的吸光度可以从 500 至 300nm 测量。

[0081] 银纳米粒子 (40nm) 在约 400nm 处具有吸收峰,且我们可以观察到在加入 NH_4SCN 后该峰消失。这可能意味着银纳米粒子溶解,但根据文献,该峰消失的机制是不同的:SCN 作为单层偶联于银粒子表面,且银纳米粒子形成聚集物。这是银纳米粒子在 400nm 处吸光度降低而在约 550nm 处获得新的吸收峰的原因,因此用更宽范围的波长重复该实验。

[0082] 这些数据显示在图 12 和 13 中。

[0083] UV 光谱显示在 400nm 处信号的降低和在约 650nm 处信号的宽峰增加,这说明纳米粒子尺寸的增加。

[0084] 实施例 6

[0085] 在该实验中,在具有 1M NH_4SCN (过滤的) 的 100%银纳米粒子溶液和 80%银纳米粒子溶液中的银粒子尺寸利用 Malvern ζ 定径仪来测量。图 14a 显示 100%银纳米粒子溶液的结果。测量在 $t = 0$ 进行并在 $t = 3$ 小时进行另外三次测量。

[0086] 银纳米粒子溶液的测量显示银纳米粒子在溶液中是稳定的。这显示在图 14b 中。在加入 NH_4SCN 后,银纳米粒子的尺寸改变,如图 1c 中所示。在加入硫氰酸铵后,从结果中可以清楚地看到粒子已经聚集且完全不溶解 (见图 14d)。

[0087] 1 小时后,聚集物的尺寸似乎增长 (见图 14e 和 f)。

[0088] 实施例 7

[0089] 由数据显示硫氰酸铵在银纳米粒子周围形成硫氰酸盐单层。类似的结果可以通过

改变分子但保持硫氰酸根单元而获得。在该实验中,银纳米粒子和银离子的测量用 NH_4SCN 以及用 KSCN 来准备:

[0090] 表 6

n	2.56ppm Ag^+		80% 银纳米粒子	
	1M KSCN	1M NH_4SCN	1M KSCN	1M NH_4SCN
1	4.51E-06	4.78E-06	3.64E-06	8.24E-06
2	5.10E-06	5.01E-06	7.69E-06	5.10E-06
3	5.62E-06	5.09E-06	4.94E-06	4.78E-06
4	5.78E-06	5.09E-06	7.89E-06	3.14E-06
5	5.34E-06	5.06E-06	9.84E-06	5.78E-06
6	7.05E-06	5.12E-06	7.85E-06	6.82E-06
7	5.04E-06	4.94E-06	8.09E-06	4.79E-06
8	5.39E-06	4.57E-06	7.93E-06	7.90E-06
9	5.27E-06	4.78E-06	6.79E-06	7.32E-06
10	5.64E-06	5.19E-06	9.88E-06	7.71E-06
平均值	5.47E-06	4.96E-06	7.45E-06	6.16E-06
标准偏差	6.64E-07	1.94E-07	1.94E-06	1.69E-06
CV%	12.13	3.90	26.06	27.43

[0092] 结果显示在图 15 和 16 中。

[0093] 我们可以观察到 KSCN 也与 Ag^+ 和与银纳米粒子形成电活性复合物,从而产生电流峰。

[0094] 实施例 8

[0095] 我们以上证明硫氰酸盐在银纳米粒子表面上形成单层,从而形成带电纳米粒子。这导致纳米粒子聚集。带电粒子在正电势下迁移至电极。以下两个实验显示银纳米粒子可以如何通过阳极溶出伏安法测量。首先,检查预处理时间 ($U = +0.4\text{V}$) 对银离子和银纳米粒子的测量值的影响 (见表 7):

[0096]

表 7

2.56ppm Ag + 在 1M NH4SCN 中												
时间[s]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20
1	5.25E-06	5.83E-06	5.85E-06	5.83E-06	5.85E-06	5.81E-06	5.98E-06	5.67E-06	5.78E-06	4.69E-06	5.47E-06	5.41E-06
2	5.67E-06	5.76E-06	6.13E-06	6.29E-06	6.18E-06	6.07E-06	5.96E-06	5.88E-06	5.86E-06	5.91E-06	5.55E-06	5.64E-06
3	5.57E-06	6.11E-06	5.83E-06	6.01E-06	5.95E-06	5.84E-06	5.90E-06	5.61E-06	6.13E-06	5.91E-06	5.91E-06	5.73E-06
平均值	5.49E-06	5.90E-06	5.94E-06	6.04E-06	5.99E-06	5.91E-06	5.95E-06	5.72E-06	5.92E-06	5.50E-06	5.64E-06	5.59E-06
标准偏差												
差	2.22E-07	1.86E-07	1.70E-07	2.32E-07	1.66E-07	1.45E-07	3.82E-08	1.42E-07	1.84E-07	7.04E-07	2.37E-07	1.65E-07
CV%	4.03624	3.15993	2.86715	3.84781	2.77693	2.45108	0.64229	2.48712	3.11015	12.7879	4.2055	2.94536

[0097]

80% 银纳米粒子，在 1M NH4SCN 中

时间[s]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	40
1	1.16E-06	3.45E-06	4.40E-06	3.86E-06	6.32E-06	5.72E-06	5.77E-06	7.04E-06	7.34E-06	8.03E-06	9.14E-06	9.12E-06	9.94E-06
2	1.55E-06	3.08E-06	3.48E-06		5.01E-06	6.64E-06	6.12E-06	5.46E-06	7.63E-06	9.01E-06	8.96E-06	1.06E-05	1.04E-05
3	1.33E-06	4.00E-06	3.46E-06	3.52E-06	5.64E-06	7.29E-06	8.29E-06	6.47E-06	7.68E-06	8.76E-06	7.71E-06	1.02E-05	1.01E-05
平均值	1.35E-06	3.51E-06	3.78E-06	3.69E-06	5.66E-06	6.55E-06	6.73E-06	6.32E-06	7.55E-06	8.60E-06	8.60E-06	9.97E-06	1.02E-05
标准偏差													
差	1.95E-07	4.62E-07	5.38E-07	2.37E-07	6.56E-07	7.91E-07	1.36E-06	8.02E-07	1.81E-07	5.07E-07	7.81E-07	7.63E-07	2.25E-07
CV%	14.5031	13.1592	14.2104	6.41866	11.5892	12.0772	20.2901	12.6885	2.39723	5.89705	9.08262	7.65	2.21985

[0098] 阳离子的测量值是与时间无关，而银纳米粒子的测量值是时间依赖性的。这证明正电势对测量信号具有影响（见图 17）。

[0099] 如图 18 中所示,第二种方法是为了保持预处理时间相同(10s)并改变预处理的电势。

[0100] 来自 Ag^+ 的电流信号与电势无关;来自银纳米粒子的信号是电势依赖性的。

[0101] 电势对银离子根本无影响,但强烈影响银纳米粒子。这些数据显示在银纳米粒子 ASV 的最后步骤过程中测量的电活性物质是在预处理时间过程中形成。银纳米粒子及其带电覆盖层(coverage)在电势梯度下迁移至电极。电极处的正电势将银纳米粒子溶解为银离子。银离子因此可以在电极上累积,并溶出而进行测量。技术人员应该知道如何进行这一步。

[0102] 实施例 9

[0103] 电化学免疫测定如下进行:

[0104] 银纳米粒子和抗体缀合

[0105] 1. 离心沉淀处于 5x2-ml 管中的 10ml 银纳米粒子(British Biocell(英国生物细胞))(13200rpm, 5mins, 4°C)。

[0106] 2. 弃上清并将 5 个沉淀物合并在一个管中,以使得银纳米粒子最终体积为 1ml。

[0107] 3. 添加抗体溶液(Hytest),以获得所需浓度($\sim 0.05\text{mg/ml}$)。

[0108] 4. 在滚筒混合器上温育 40min。

[0109] 5. 以 13200rpm, 5mins, 4°C 离心(从上清中回收纳米粒子,如果需要)。

[0110] 6. 将沉淀物重新混悬在 1ml 封闭缓冲液(3% BSA)中。

[0111] 7. 在滚筒混合器上温育 40min。

[0112] 8. 以 13200rpm, 5mins, 4°C 离心(从上清中回收纳米粒子,如果需要)。

[0113] 9. 通过将沉淀物重新混悬在 1ml 0.1M 硼酸盐缓冲液 pH7.5 中,然后离心沉淀(13200rpm, 5mins, 4°C)(从上清中回收纳米粒子,如果需要)和再次将其重新混悬在 1ml 0.1M 硼酸盐缓冲液 pH7.5 中来清洗沉淀物。

[0114] 10. 在 4°C 保存,直至使用。

[0115] 电免疫测定:

[0116] 1. 用 50 μl 第一抗体溶液(在 PBS 中 10 $\mu\text{g/ml}$)包被板。

[0117] 2. 在 4°C 温育过夜(板密封)。

[0118] 3. 用 200 μl 洗涤缓冲液洗涤 3x。

[0119] 4. 添加 150 μl 封闭缓冲液(Pierce#37536)并在振荡器上温育 30 分钟。

[0120] 5. 用 200 μl 洗涤缓冲液洗涤 3x。

[0121] 6. 在洗涤缓冲液中制备第一浓度(最高)的分析物并在洗涤缓冲液中进行连续稀释。

[0122] 7. 添加 50 μl 分析物溶液并在振荡器上温育 30 分钟。

[0123] 8. 用 200 μl 洗涤缓冲液洗涤 3x。

[0124] 9. 在洗涤缓冲液中稀释银纳米粒子-抗体缀合物 5x,并将其 50 μl 加入各孔中。在振荡器上温育 1 小时。

[0125] 10. 用 200 μl 洗涤缓冲液洗涤 3x。

[0126] 11. 在 4°C 保存过夜(密封并无洗涤缓冲液)

[0127] 12. 添加 50 μl 11M NH_4SCN 并在混合器上摇动 1h。

[0128] 13. 将来自每个孔的溶液应用到碳糊电极的表面上并运行阳极溶出伏安法 (ASV)。

[0129] ASV 步骤如下：

[0130] a) 步骤：+0.4V, 10s (预处理)

[0131] b) 线性扫描：0.0V → -1.6V, 扫描速度 = 1V/s 和跨步电势 = 0.005V

[0132] c) 步骤：-1.6V, 5s (成核)

[0133] d) 步骤：-1.2V, 55s (电活性物质的沉积 [还原])

[0134] e) 线性扫描：-1.2V → +0.1V, 扫描速度 = 1V/s 和跨步电势 = 0.01V (电活性物质的溶出 [氧化])。在该扫描过程中, 产生峰电流且峰下面积 (即库伦数) 与电活性物质浓度成比例。

[0135] 电势是相对于参比电极。参比电极典型地是 D2 碳硫氰酸铵参比电极。

[0136] 实施例 10

[0137] 肌红蛋白测定以观察最大化测定灵敏性所需的抗肌红蛋白 Hytest4E2 抗体的量

[0138] 包被抗体的浓度不显著影响该测定。对于改变 4E2 抗体的量, 灵敏性非常优秀且校准曲线非常相似 (5, 10 和 15 μ g/ml), 如图 19 中所示。然而, 太高浓度的包被抗体可以负面影响该测定。这非常取决于所用的抗体及其附着的表面。获得的灵敏性很好, 在约 50ng 肌红蛋白 /ml 处达到平台期。与基于分析物的酶法检测的经典 ELISA 相比, 该灵敏性相似或甚至更好。

[0139] 将释放剂诸如具有带电单元的硫醇添加至固相分析物银纳米粒子复合物。合适的释放剂的实例包括硫氰酸铵和硫氰酸钾。备选地, 可以使用硫代硫酸盐。硫醇是优选的, 因为它们比其他试剂更有效地结合银。

[0140] 硫醇弱化抗体的相互作用, 以使得银纳米粒子从复合物中释放。带电的硫醇还在银纳米粒子周围形成一层, 从而使该粒子带电, 并容许其电迁移至电极, 在该电极处进行测量。测量可以利用 ASV 进行。ASV 是一种分析技术, 其包括将金属相预浓缩至电极表面上和在阳极电势扫描过程中选择性氧化各种金属相物质。银-硫醇带电纳米粒子是电活性的和稳定的。电活性带电纳米粒子可以通过电化学方式电镀到电极上, 作为预浓缩步骤。一旦在电极处, 银纳米粒子通过在正电势下氧化而电化学溶解。通过将电势反转为负电势, 将离子电镀在电极上。然后银板从电极上电化学溶出 (通过再次应用正电势), 从而提供更强的银峰信号。从电极溶出的银离子的量可以与用于提供信号的银纳米粒子的数量有关, 用于提供信号的银纳米粒子的数量与测定的固相上捕获的分析物数量有关。

[0141] 代替如上所述的“夹心”或非竞争性免疫测定, 其他形式可以等同地用于捕获银粒子, 诸如竞争免疫测定或基于半抗原的测定。这样的测定是公知的。

[0142] 金属纳米粒子可以商购获得, 且可以通过已知方法缀合于结合部分。

[0143] 结合部分可以是任何物质, 其能够结合待检测的分析物, 例如蛋白质、肽、抗体或其片段、核酸。

[0144] 第一结合部分不需要固定在固体支持物上。

[0145] 实施例 11

[0146] 带电银纳米粒子如上关于实施例 4 (无铁氰化物) 所述制备, 区别是使用 1M 硫代硫酸盐作为释放剂。银纳米粒子-硫代硫酸盐物质通过 ASV 测量。

[0147] 结果显示在图 20 中,且证明硫代硫酸盐是该方法中使用的合适释放剂。

[0148] 实施例 12

[0149] 重复实施例 11 的实验,区别是使用 1M NaCl 作为释放剂。图示 NaCl 是合适释放剂的结果显示在图 21 中。

[0150] 实施例 13

[0151] 重复实施例 11 的实验,区别是使用金纳米粒子代替银纳米粒子。使用 1M HCl 作为释放剂。结果显示在图 22 中。

[0152] 实施例 14

[0153] 重复实施例 13 的实验,区别是使用 1M 硫氰酸盐作为释放剂。结果显示在图 23 中。

[0154] 比较例 15

[0155] 在缺乏带电释放剂的条件下,对金和银纳米粒子进行 ASV。图 24(金)和 25(银)图示在纳米粒子不带电时,没有观察到峰。

[0156] 在一种改进中,可以通过使用金和银纳米粒子二者检测相同样品中的两种不同分析物。在该情形中,金纳米粒子附着于识别第一分析物的第一结合部分。金离子和银离子在相同电极上通过 ASV 测量时,提供不同的可区分的峰。

[0157] 可以提供试剂盒。该试剂盒可以包括用于结合分析物的金属标记物,至少一种释放剂,具有至少一个用于使金属标记物与分析物结合的区域 of 的装置和至少 2 个电极,所述释放剂用于一旦与分析物结合便释放金属试剂并用于形成具有金属标记物的带电纳米粒子。任选地,该试剂盒可以包括能够结合目的分析物并用金属标记物标记的结合部分。所述装置可以是多孔板。

[0158] 通过参考,将本申请要求其优先权的 GB0723137.6 和 GB0812845.6 中的公开内容、以及本申请中所附的摘要引入本文。

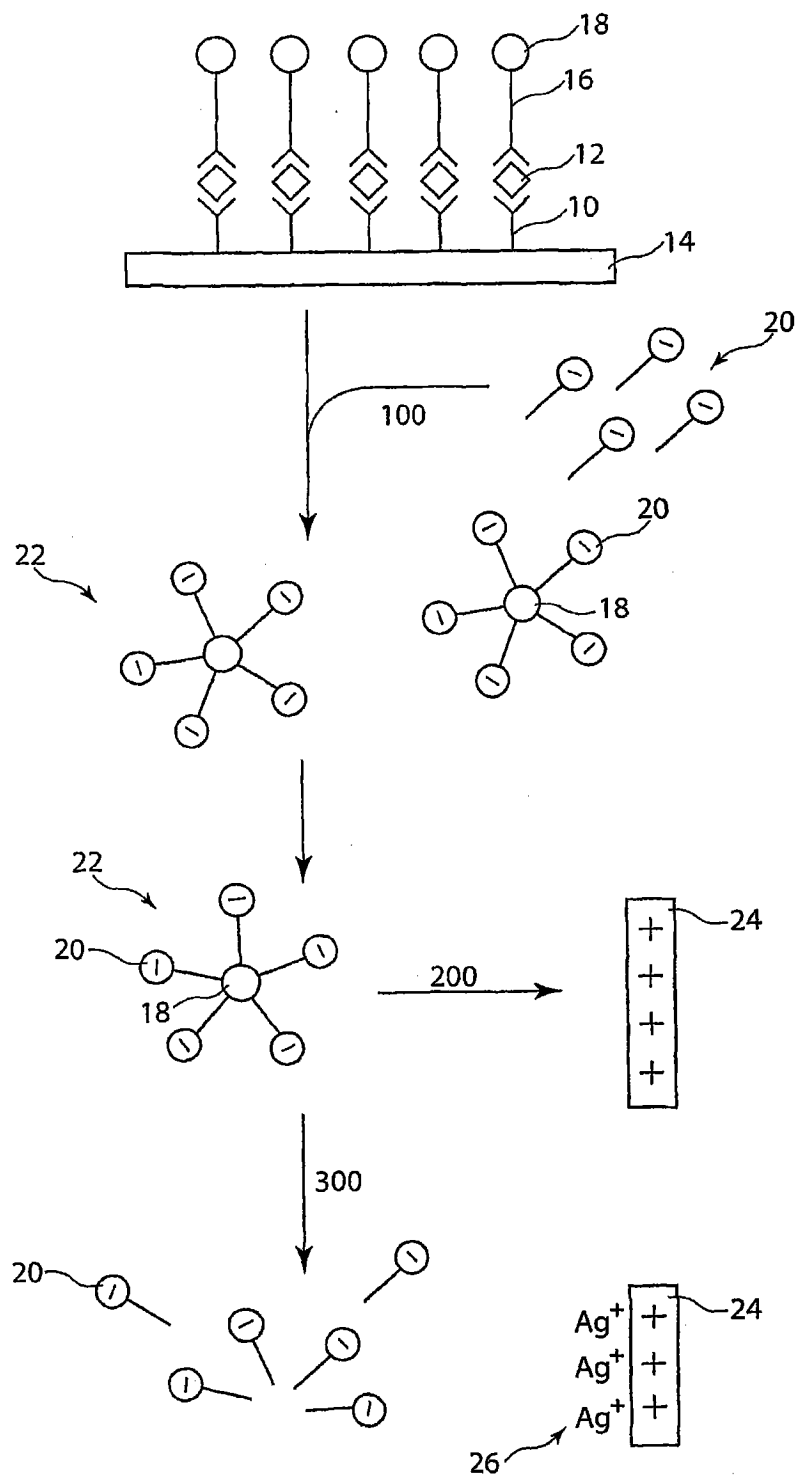


图 1

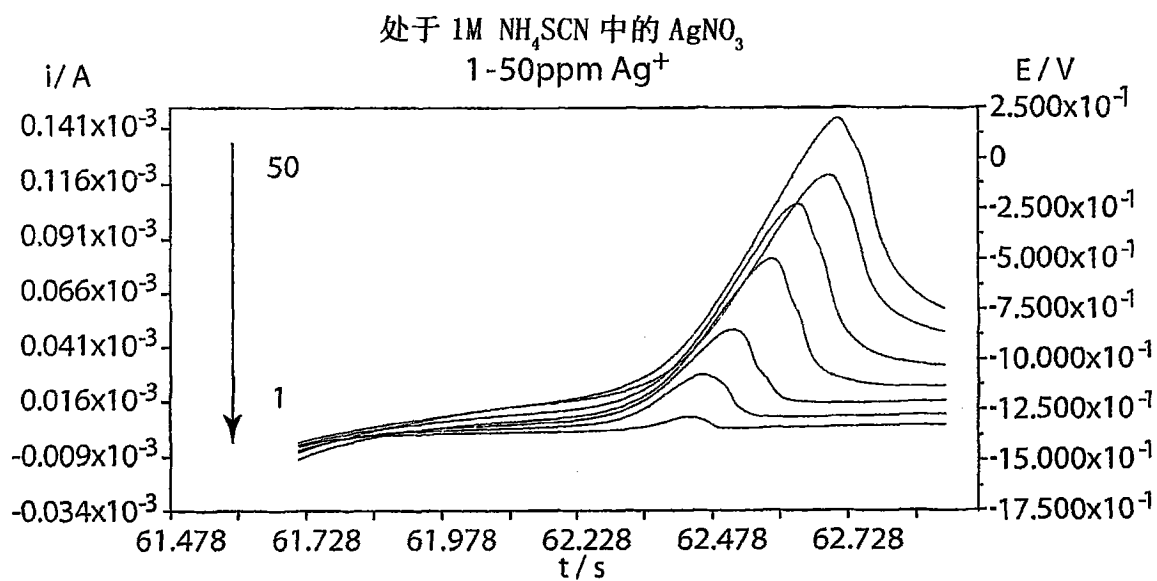


图 2

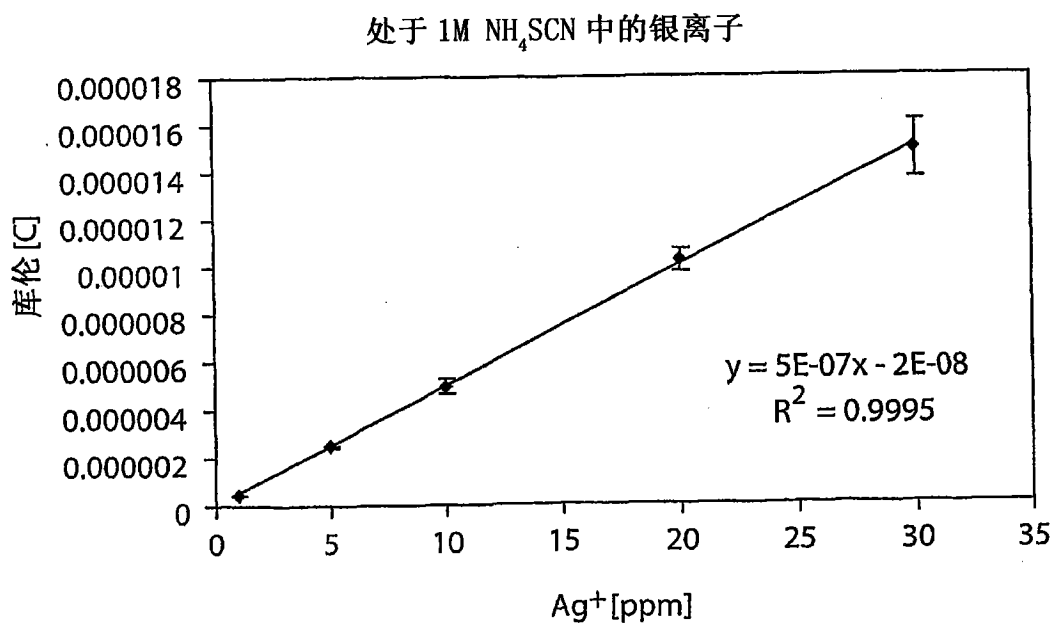


图 3

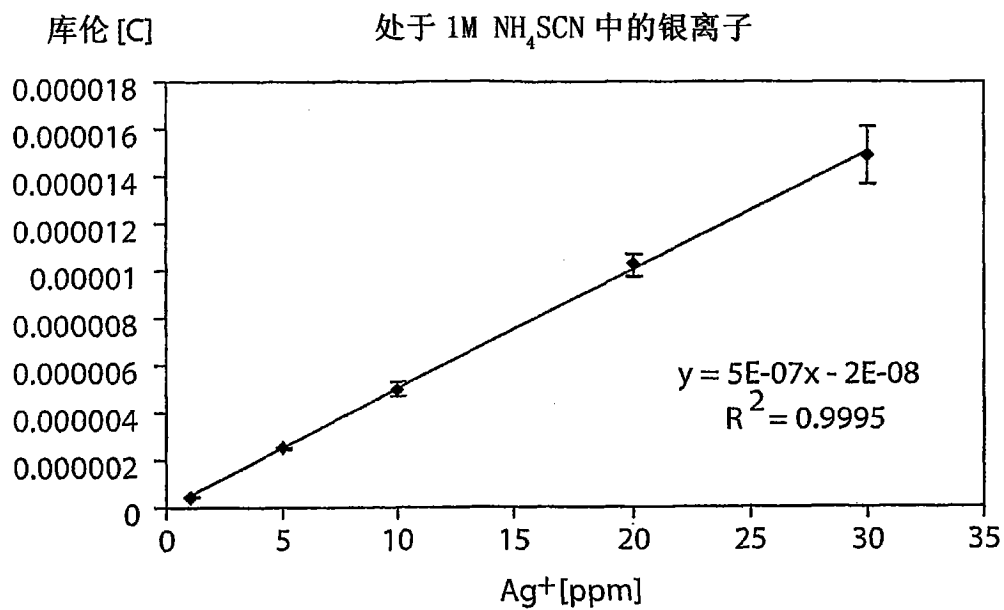


图 4

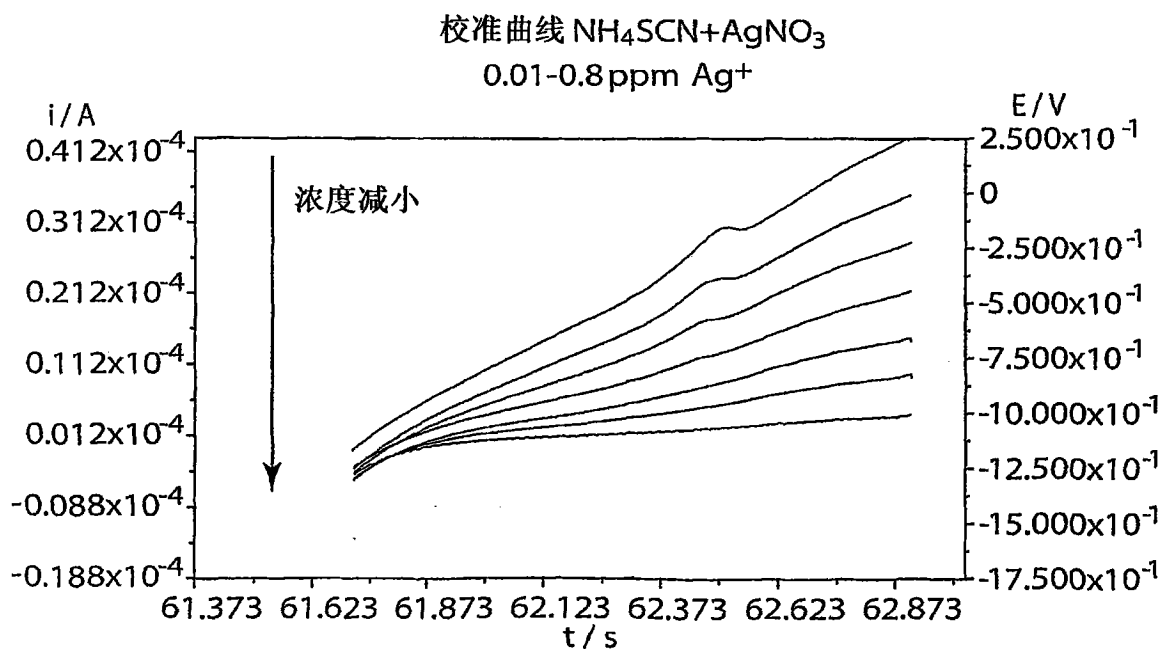


图 5

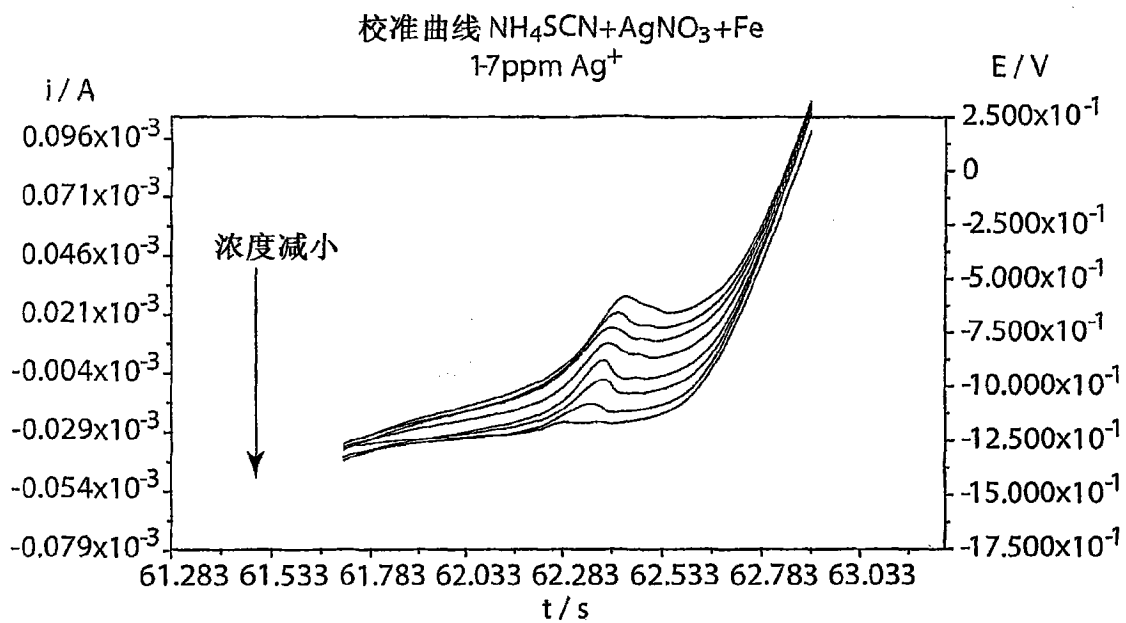


图 6

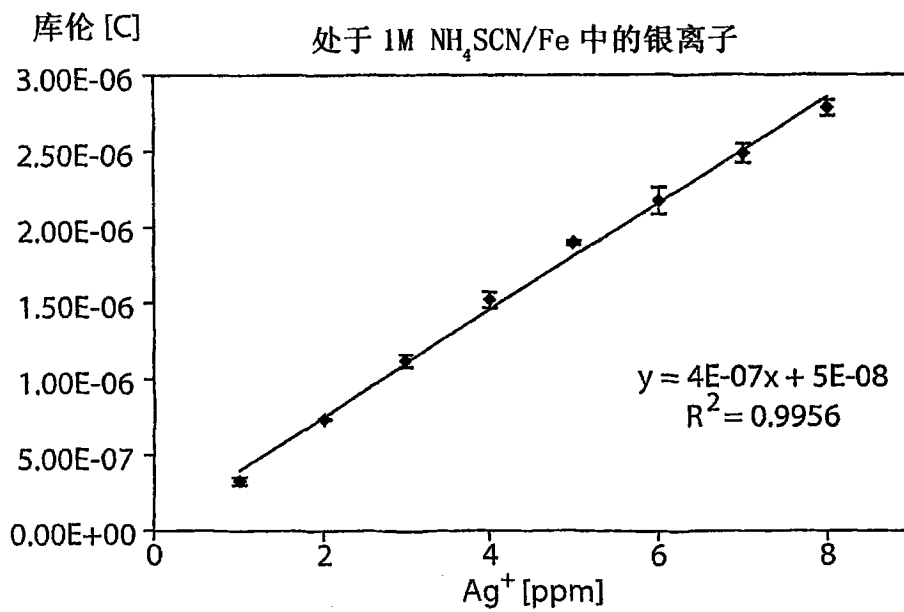


图 7

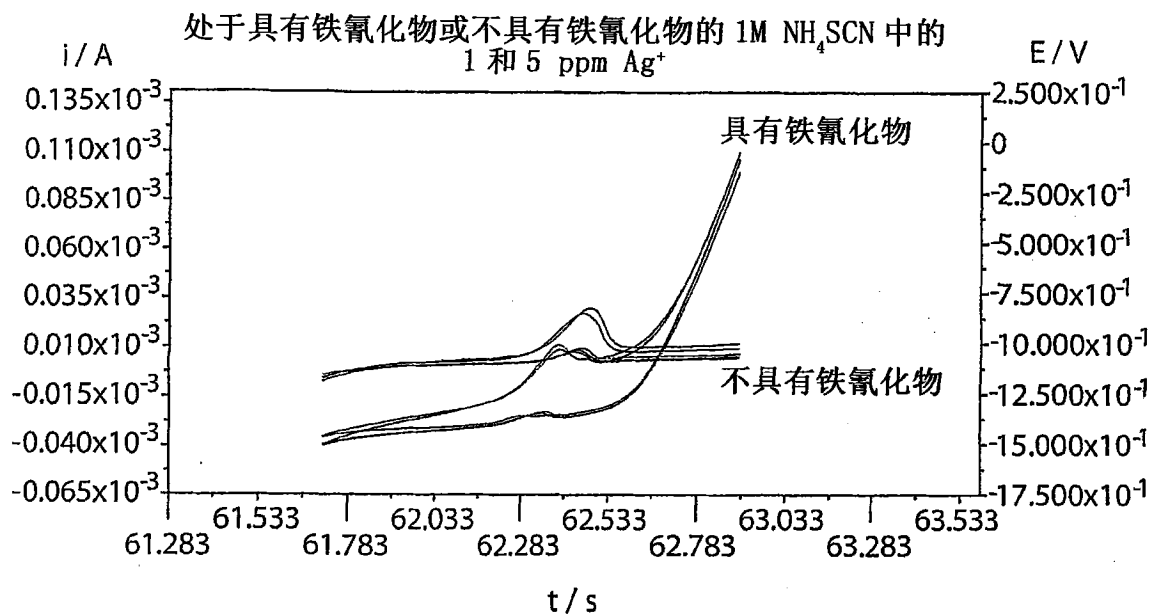


图 8

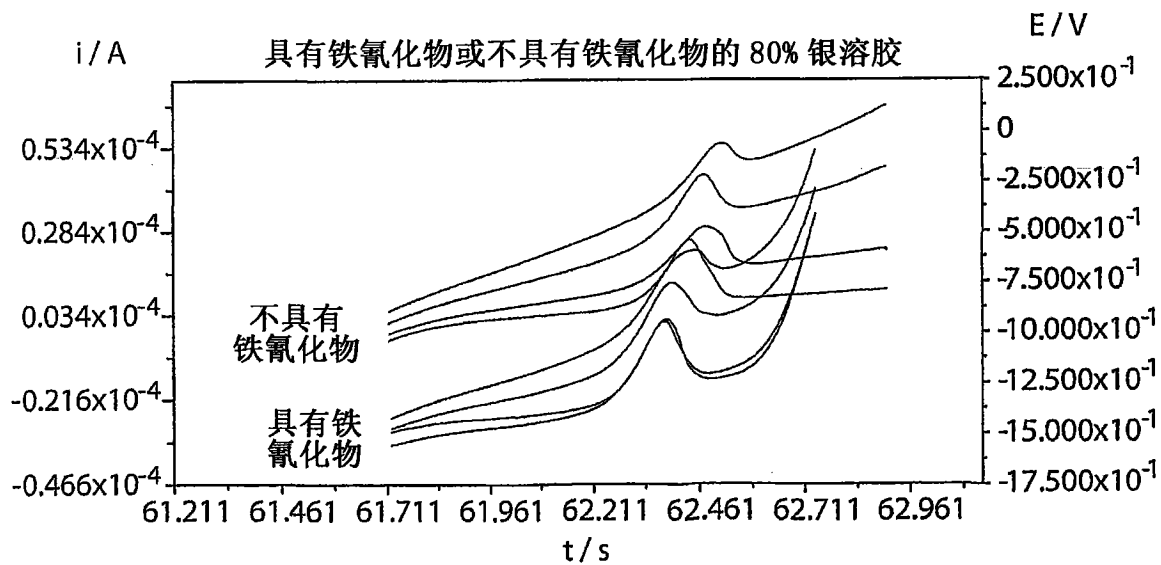


图 9

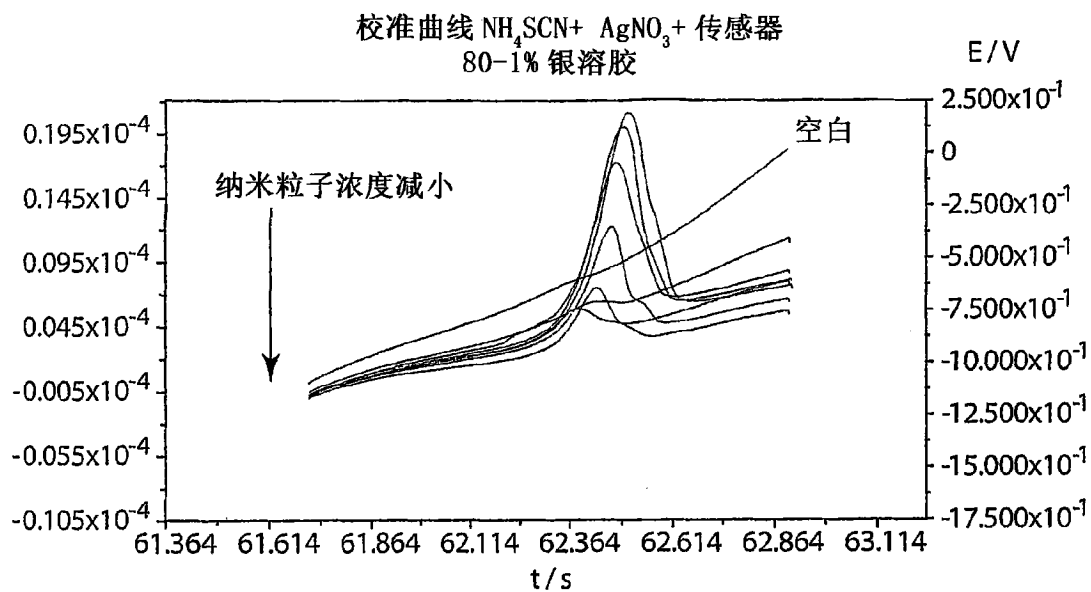


图 10

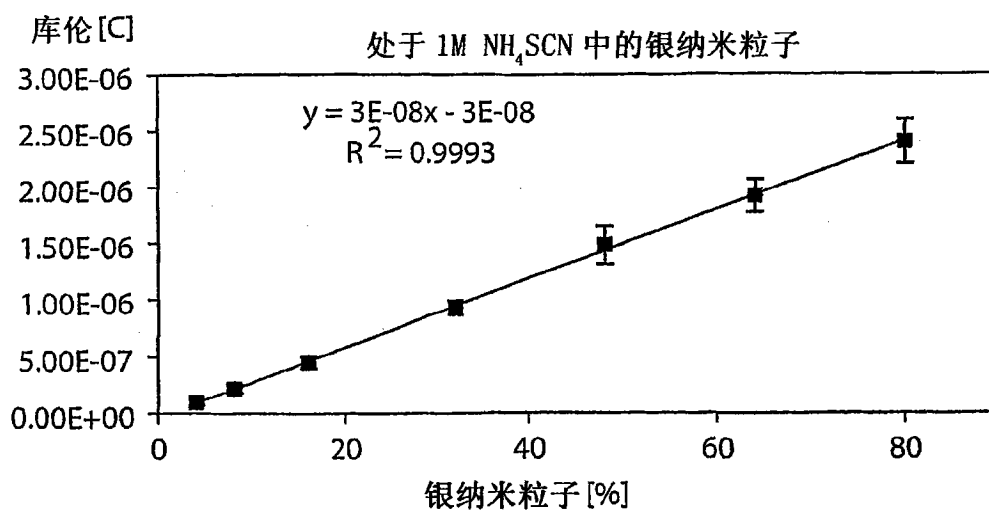


图 11

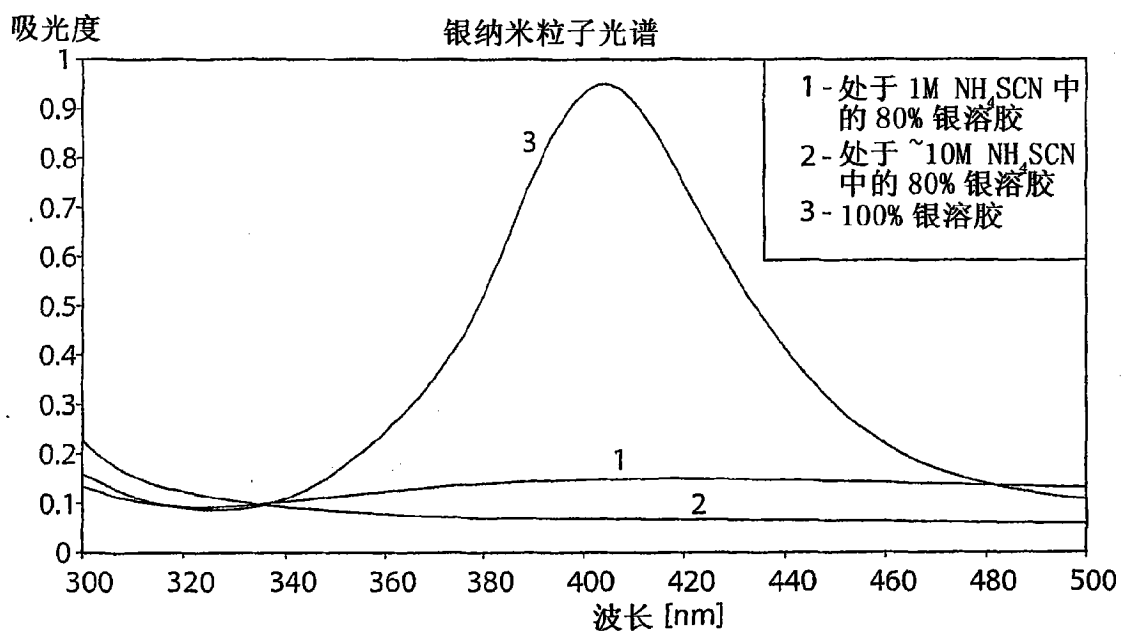


图 12

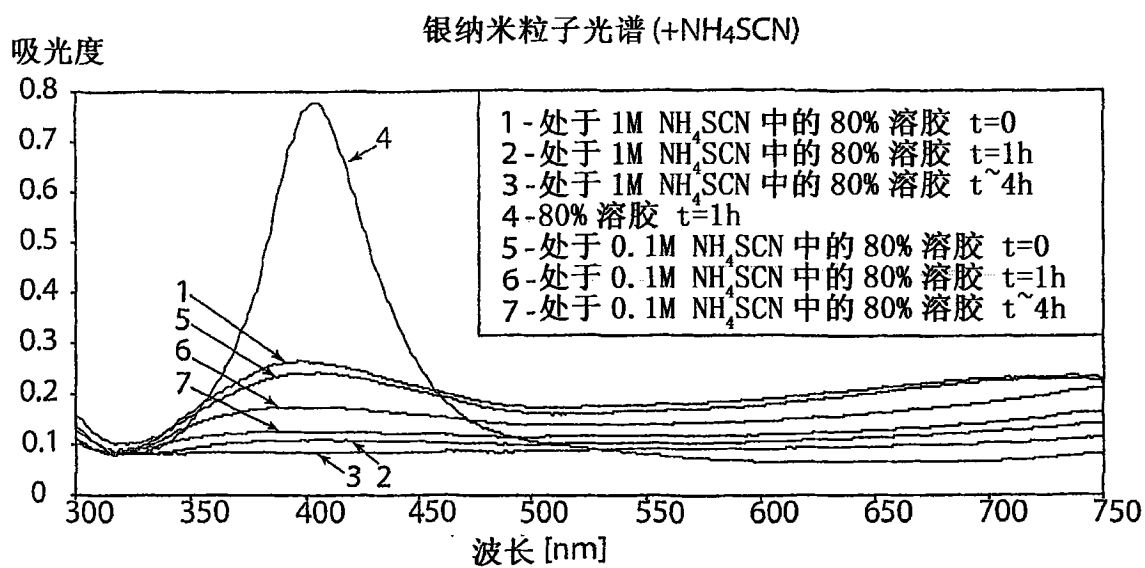


图 13

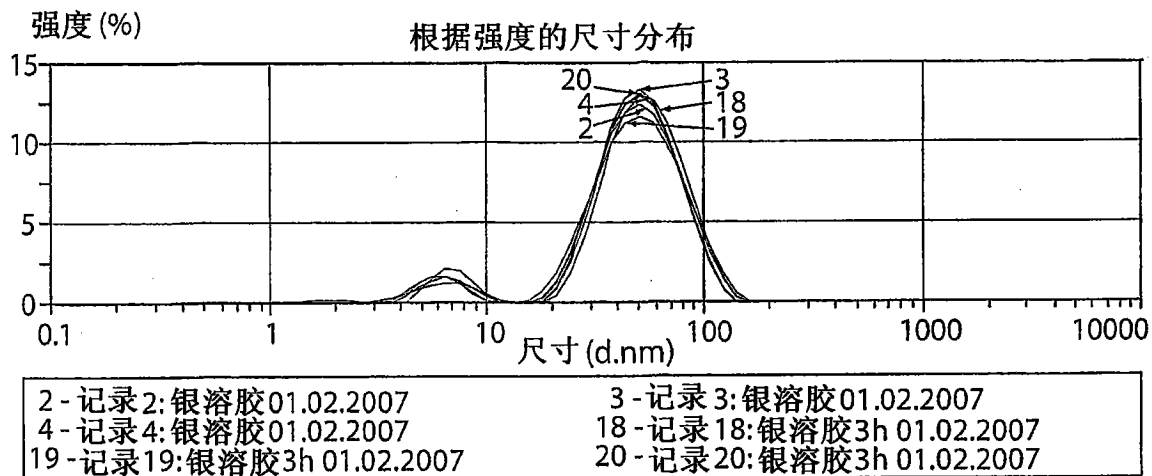


图 14a

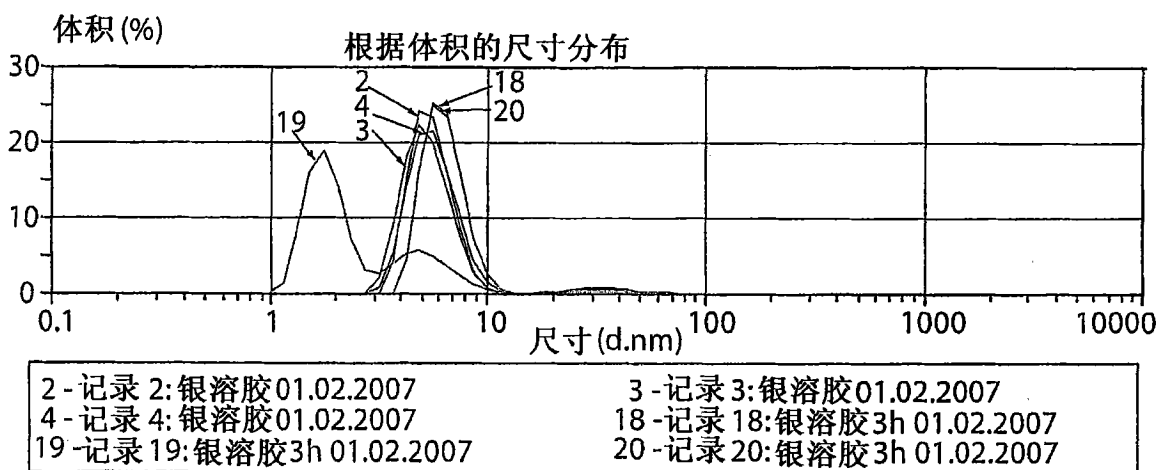


图 14b

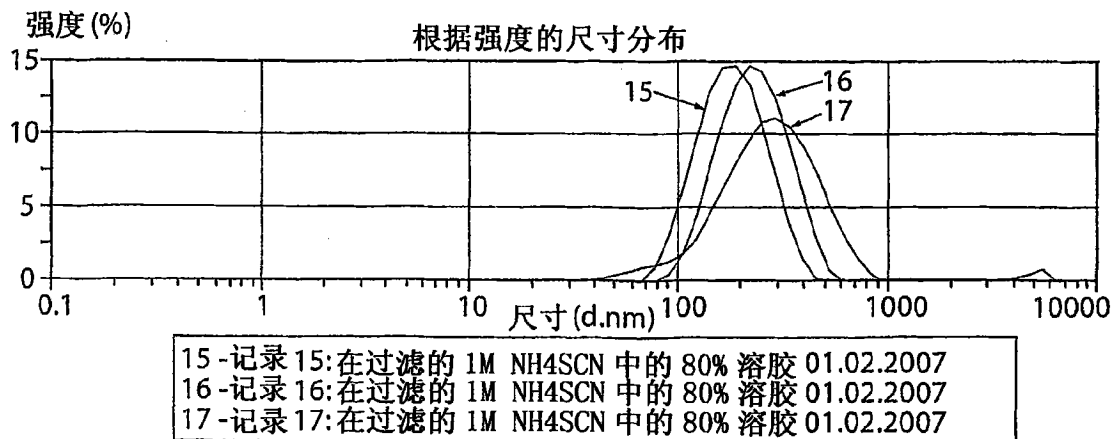


图 14c

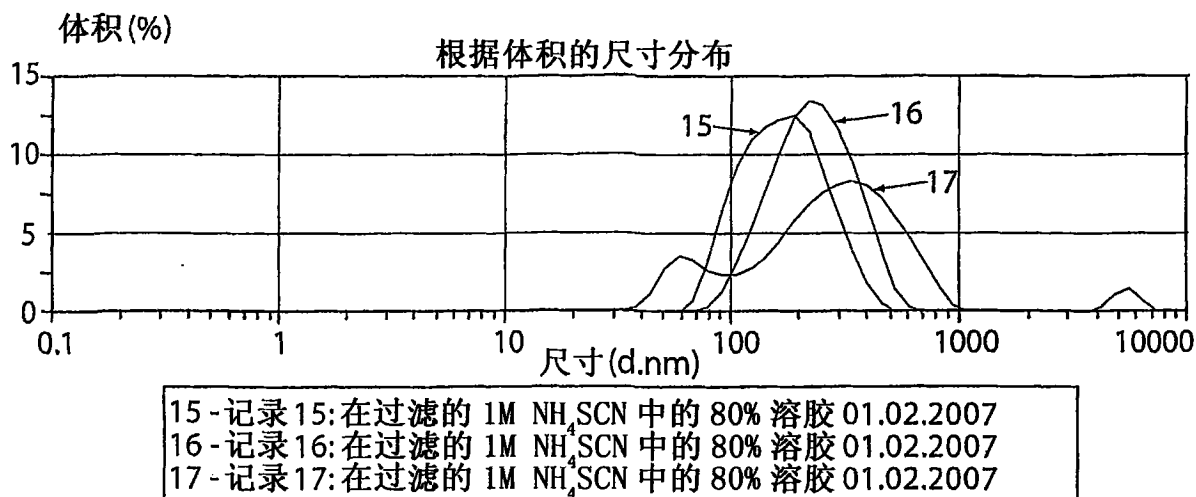


图 14d

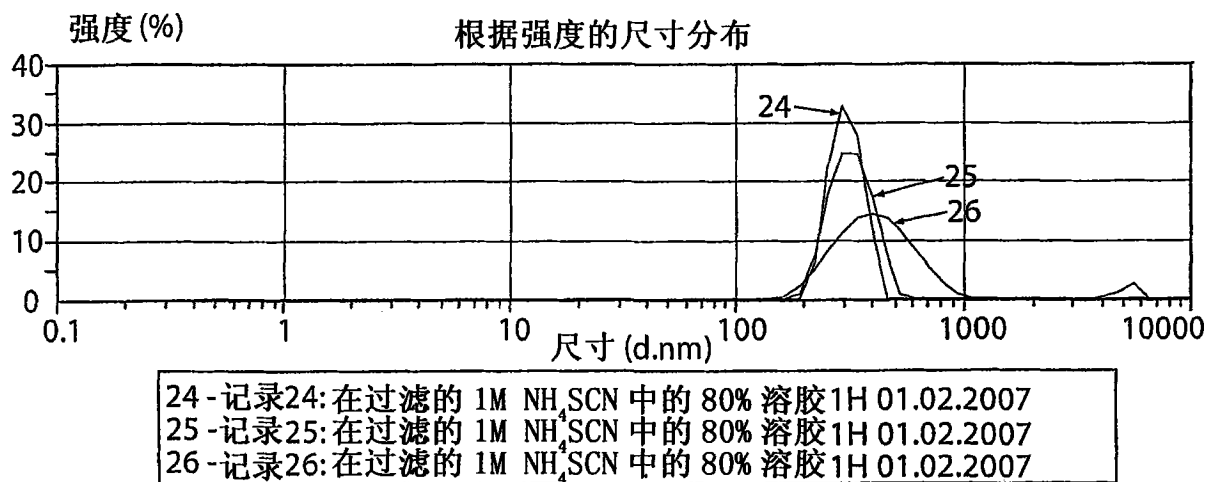


图 14e

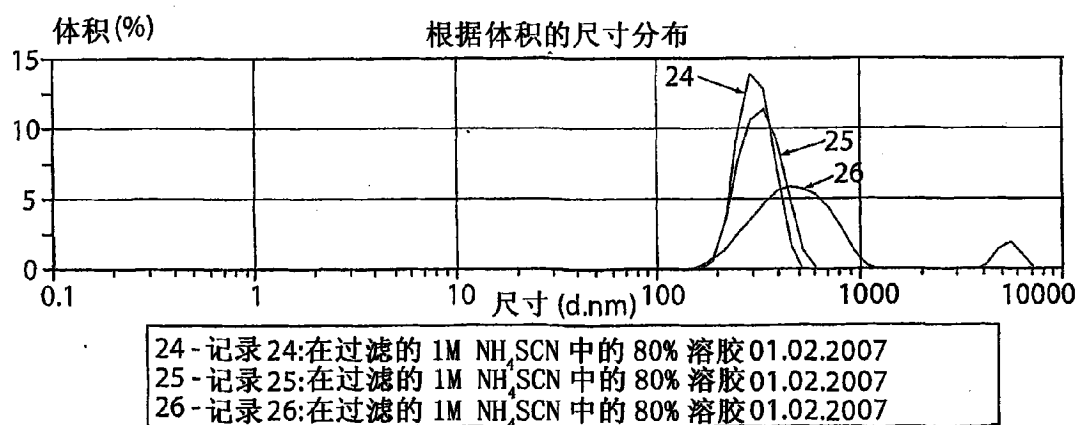


图 14f

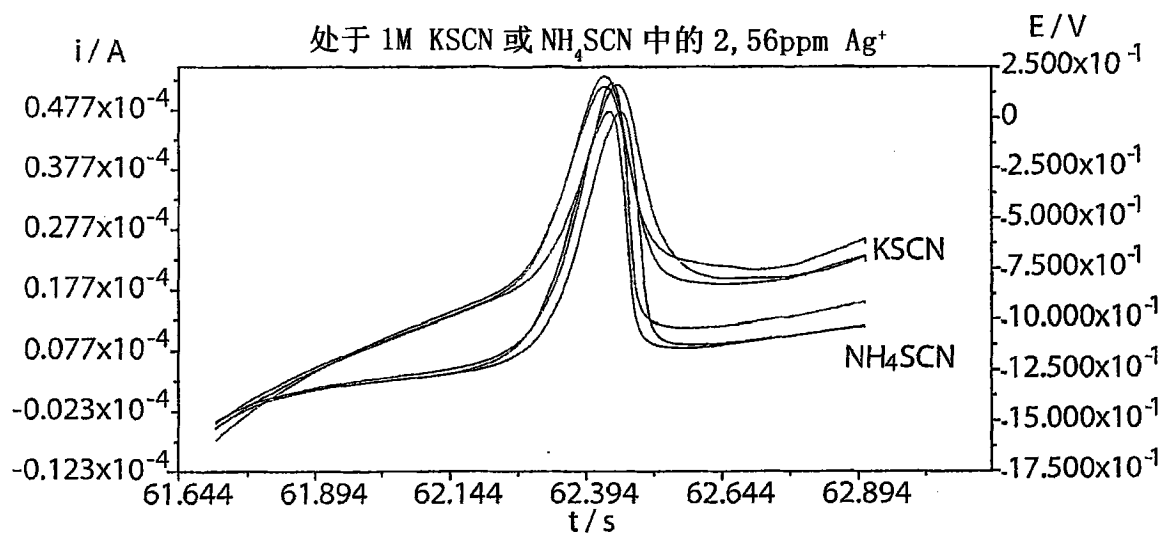


图 15

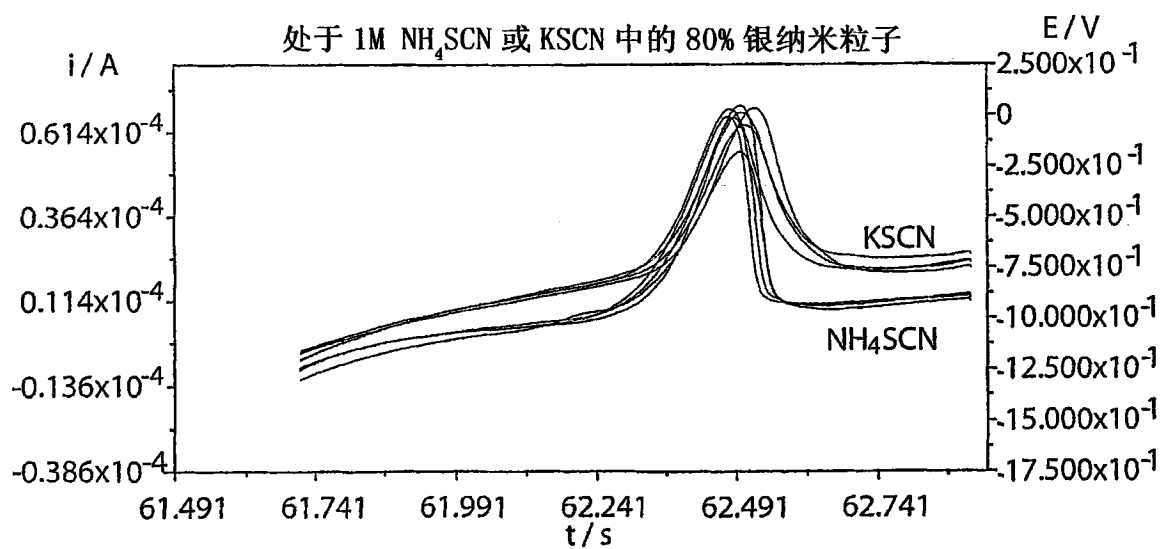


图 16

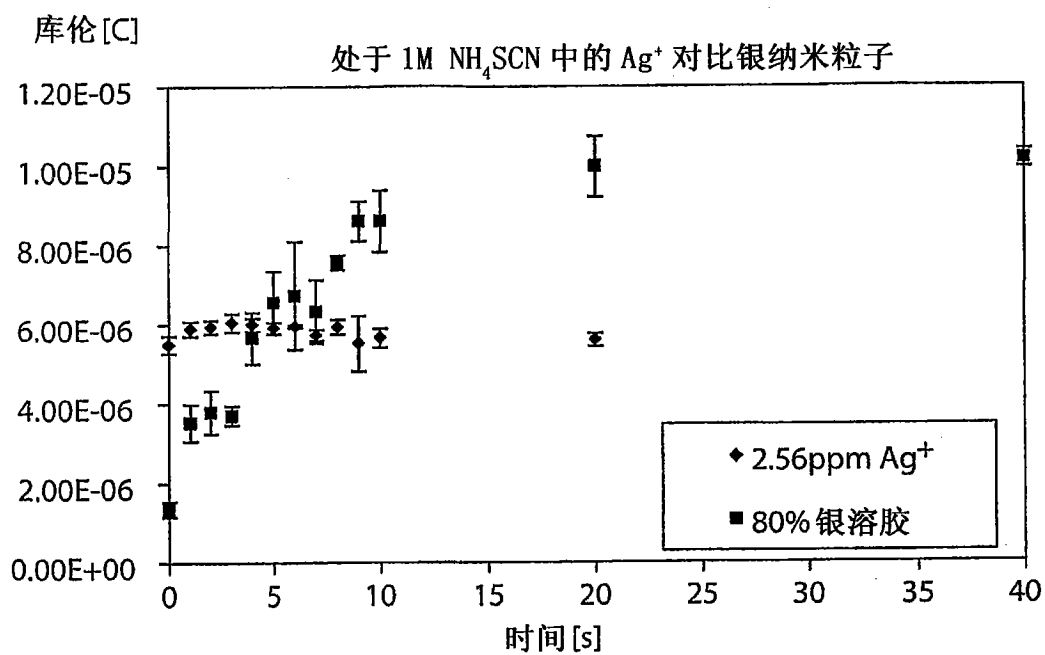


图 17

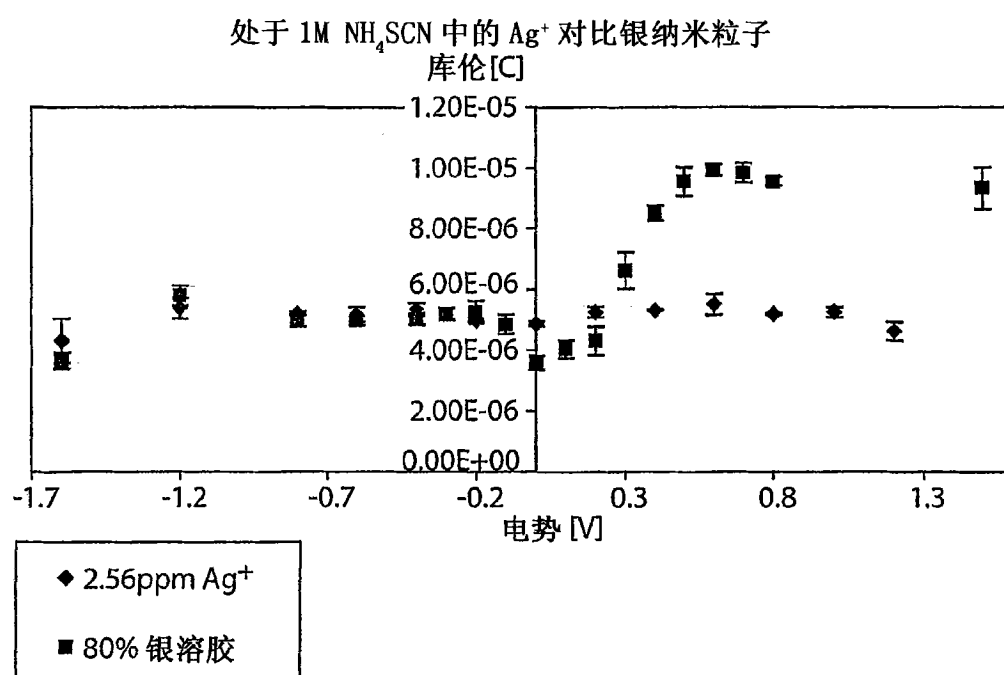


图 18

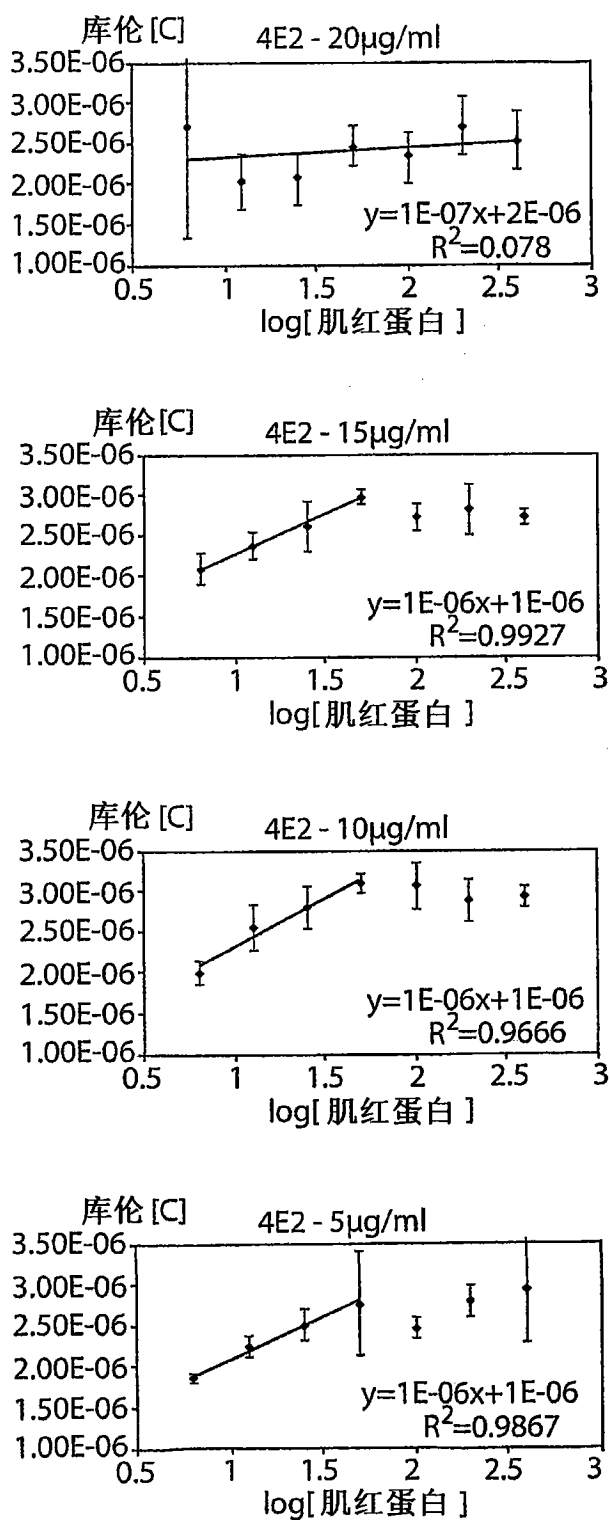


图 19

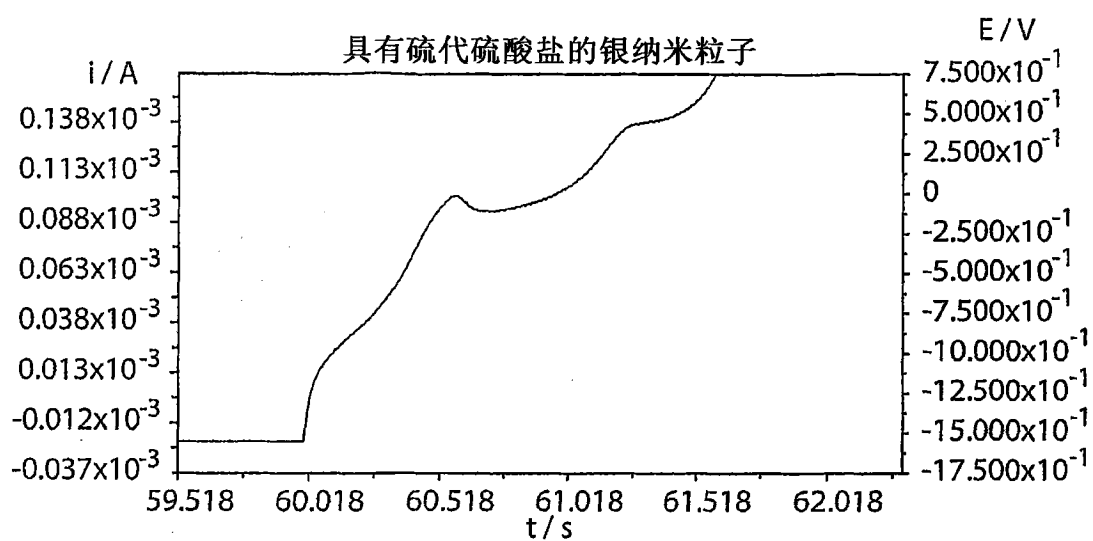


图 20

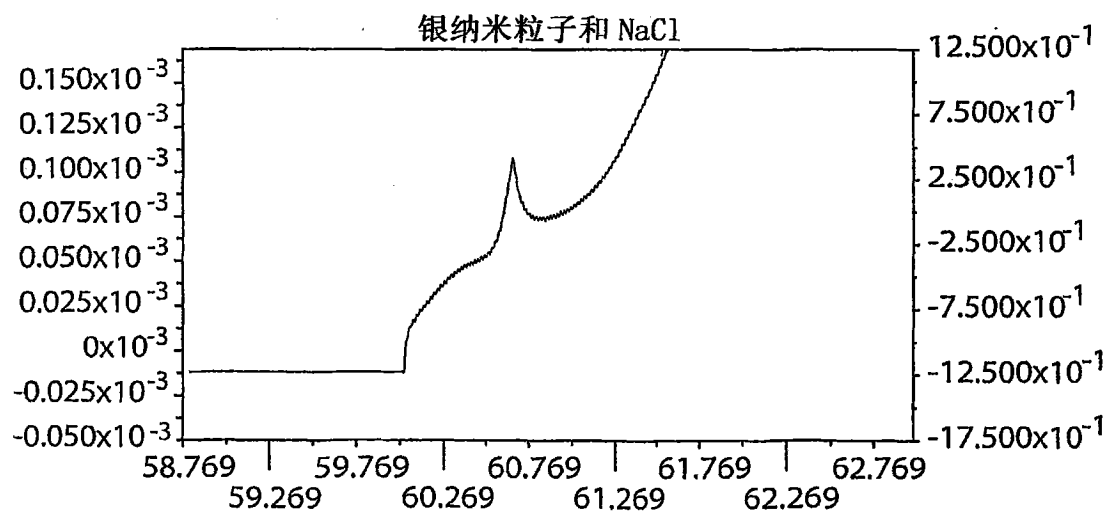


图 21

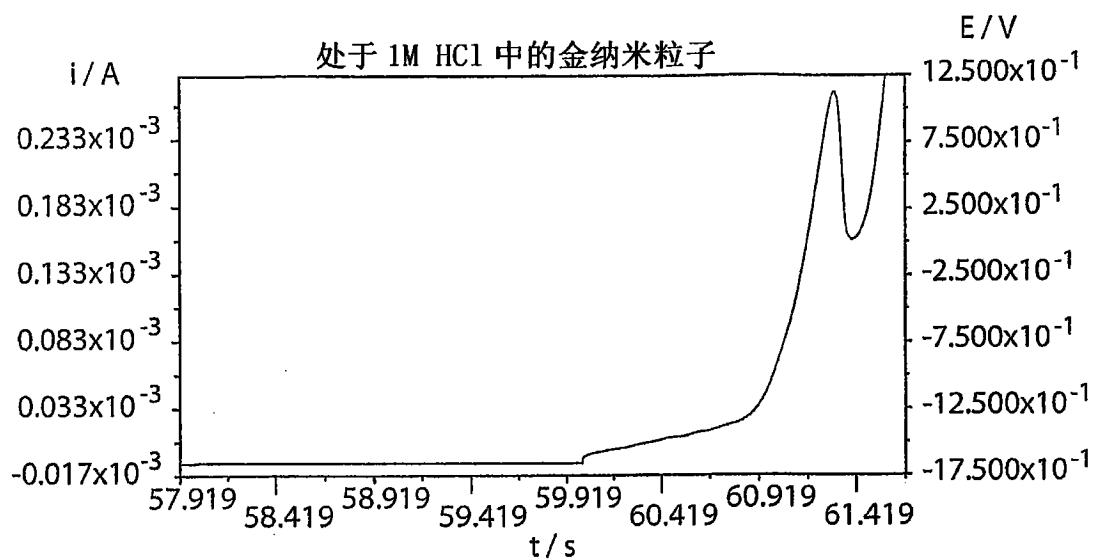


图 22

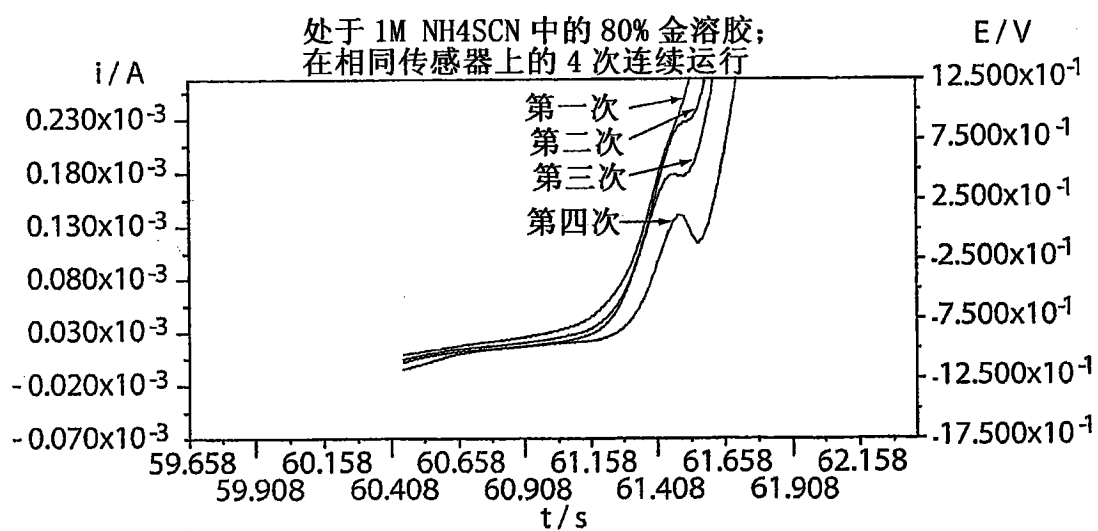


图 23

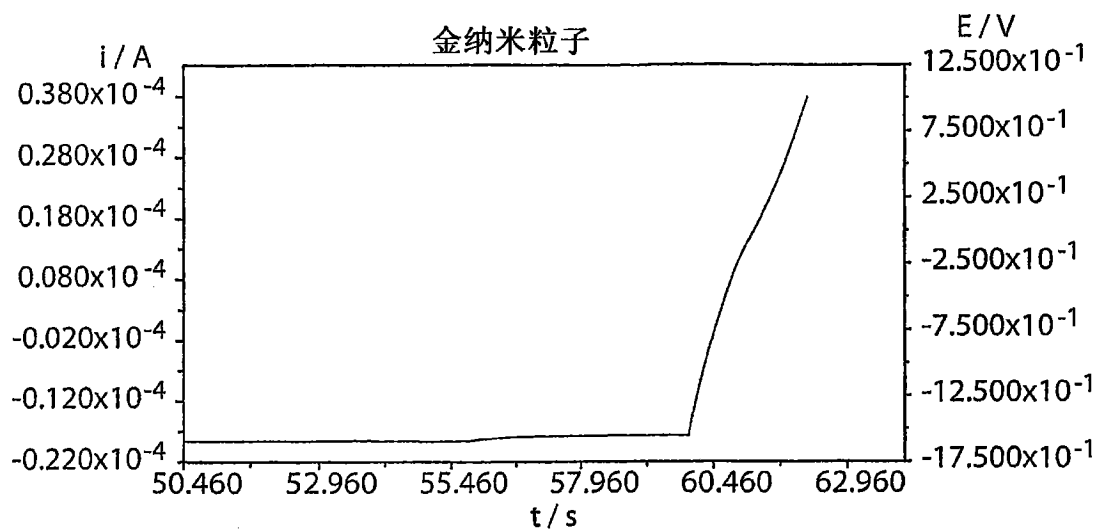


图 24

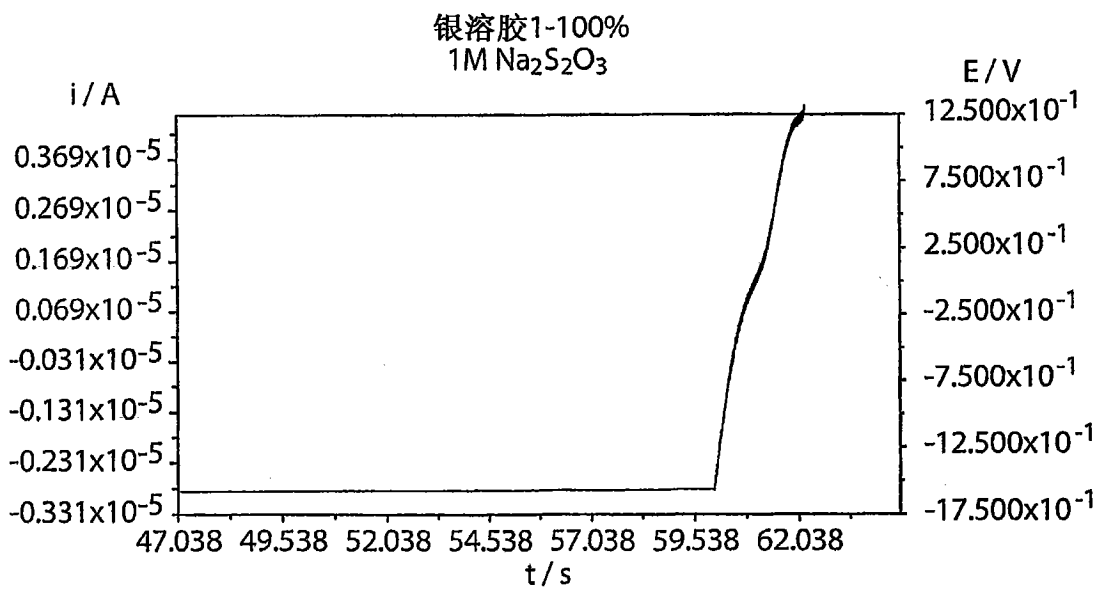


图 25