



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117701675 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 15

(21) 申请号 202311707362.X

(22) 申请日 2014.02.21

(30) 优先权数据

61/767,875 2013.02.22 US

61/783,726 2013.03.14 US

(62) 分案原申请数据

201480010140.5 2014.02.21

(71) 申请人 普洛麦格公司

地址 美国威斯康辛州

(72) 发明人 迈克尔·P·瓦利

詹姆士·J·卡利

布洛克·宾考斯基

克里斯多弗·托德·艾格斯

基思·V·伍德

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

C12Q 1/66 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书15页 附图5页

(54) 发明名称

用于荧光素酶和核苷磷酸的发光检测的稳定
定制剂

(57) 摘要

本发明公开了含有用于产生光的D-荧光素
和L-荧光素以及荧光素酶的混合物的方法、试剂
盒和组合物,当随时间流逝储存时,所述组合物
具有改善的稳定性。D-荧光素和L-荧光素的混合
物可以用来检测样品中的ATP或者荧光素酶的存在
或量。

1. 一种用于检测荧光素酶活性的荧光素酶反应组合物,其包含 (a) 一定浓度的L-荧光素和一定浓度的D-荧光素的混合物,以及 (b) 三磷酸腺苷 (ATP)。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述L-荧光素的浓度超过所述D-荧光素的浓度。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述L-荧光素的浓度与所述D-荧光素的浓度以以下比率存在于所述混合物中:至少小于约2:1;至少约0.5:1至约2:1;至少约5:95至约55:45;至少约5:95至约75:25;至少约5:95至约50:50;至少约5:95至约25:75;或至少约5:95至约20:80。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其中与包含D-荧光素且无L-荧光素的混合物相比,所述一定浓度的D-荧光素和一定浓度的L-荧光素的混合物增加发光信号的半衰期。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的组合物,其中所述组合物在22℃的温度下储存至少1天后保留至少约50%的荧光素酶活性。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中所述混合物中L-荧光素的量和/或D-荧光素的量为以下中的至少一种:约1nM、约5nM、约10nM、约50nM、约100nM、约0.5μM、约1μM、约5μM、约10μM、约25μM、约50μM、约100μM、约250μM、约0.5mM或约1mM。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的组合物,其中所述组合物不含荧光素酶。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的组合物,其中所述混合物的pH值为约5至约9、约6.5至约7.8或约6.6至约6.8。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中所述D-荧光素是D-5' 氟荧光素。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的组合物,其中所述L-荧光素是L-5' 氟荧光素。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种选自如下的额外组分:缓冲剂、蛋白质稳定剂、镁离子、金属螯合剂、洗涤剂、消泡剂、无机磷酸盐、焦磷酸盐、AMP、辅酶A、还原剂或以上的任意组合。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种选自如下的额外组分:1,4-哌嗪二乙磺酸、1,2-二氨基环己烷四乙酸、Tergitol洗涤剂、Mazu消泡剂、硫酸镁、辅酶A、焦磷酸盐、DTT、亚硫酸盐、硫代硫酸盐、氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、磷酸钾、乙二胺四乙酸 (EDTA)、AMP、反式-1,2-环己二胺四乙酸 (CDTA) 或以上的任意组合。

13. 试剂盒,其包含权利要求1至12中任一项所述的组合物。

14. 根据权利要求13所述的试剂盒,其还包含荧光素酶。

15. 根据权利要求13或14所述的试剂盒,其还包含一种或多种选自如下的额外组分:缓冲剂、无机磷酸盐、螯合剂、消泡剂、盐、洗涤剂、含硫醇化合物、含硫还原剂或以上的任意组合。

用于荧光素酶和核苷磷酸的发光检测的稳定制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是中国专利申请201480010140.5号的分案申请201911407470.9的分案申请,要求2013年2月22日提交的美国临时申请No.61/767,875和2013年3月14日提交的美国临时申请No.61/783,726的优先权,这两个临时申请均通过引用的方式整体并入本文。

背景技术

[0003] 荧光素是外消旋化合物,在溶液中,其由D-荧光素外消旋至L-荧光素或者由L-荧光素外消旋至D-荧光素。D-荧光素可以用作荧光素酶的底物而产生光,而L-荧光素很大程度上是抑制性的并且导致发光减少。由于D-荧光素底物的可用性的变化和降低以及L-荧光素的抑制作用,在储存过程中D-荧光素至L-荧光素的缓慢外消旋对于利用荧光素酶活性的测定存在问题。

技术领域

[0004] 本公开涉及用于测定酶和代谢产物的组合物、方法和试剂盒。

发明内容

[0005] 在某些实施方案中,提供了包含荧光素酶、L-荧光素和D-荧光素的组合物,其中所述组合物基本上不含ATP。在某些实施方案中,提供了包含ATP、L-荧光素和D-荧光素的组合物,其中所述组合物基本上不含荧光素酶。

[0006] 在一些实施方案中,提供了包含D-荧光素、L-荧光素和ATP的组合物。

[0007] 在某些实施方案中,提供了包含荧光素酶、L-荧光素和D-荧光素和ATP的组合物,其中所述L-荧光素的浓度超过所述D-荧光素的浓度。

[0008] 在一些实施方案中,提供了包含组合物的试剂盒,所述组合物包含荧光素酶、L-荧光素和D-荧光素,所述组合物基本上不含ATP且包装在容器中。所述试剂盒可以包括至少一种额外组分,例如一种或多种洗涤剂,例如十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷,磷酸钾、消泡剂、缓冲剂、盐和螯合剂,例如乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0009] 在一些实施方案中,提供了包含组合物的试剂盒,所述组合物包含D-荧光素、L-荧光素和ATP,其中所述L-荧光素的浓度超过所述D-荧光素的浓度。所述试剂盒可以包括至少一种额外组分,例如一种或多种洗涤剂,例如十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷,磷酸钾、消泡剂、缓冲剂、盐和螯合剂,例如乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0010] 在一些实施方案中,提供了包含组合物的试剂盒,所述组合物包含L-荧光素、D-荧光素和ATP,所述组合物基本上不含荧光素酶且包装在容器中。所述试剂盒可以包括至少一种额外组分,例如缓冲剂、二价阳离子螯合剂、镁盐、离子型或非离子型洗涤剂、含硫醇化合物,如辅酶A或DTT、一种或多种含硫还原剂或其组合。

[0011] 在一些实施方案中,提供了用于测定样品中ATP的存在或量的方法,其中使包含荧光素酶、L-荧光素和D-荧光素的组合物与样品接触并检测和/或测量产生的发光度以测定

样品中ATP的存在或量。

[0012] 在一些实施方案中,提供了用于测定样品中荧光素酶的存在或量的方法、试剂盒或组合物,其中使包含D-荧光素、L-荧光素和ATP的组合物与样品接触,所述样品可以含有表达荧光素酶的细胞。然后检测和/或测量产生的发光度以测定样品中荧光素酶的存在或量。含有表达荧光素酶的细胞的样品可以是裂解的细胞、未加工的细胞提取物或澄清的细胞提取物。

[0013] 在一些实施方案中,提供了用于检测来自表达荧光素酶的细胞的荧光素酶活性的方法,其中荧光素酶在细胞中表达,并且使所述细胞与包含L-荧光素和D-荧光素的混合物接触,在所述混合物中所述L-荧光素与所述D-荧光素的比率为至少约5:95至约75:25。在一些实施方案中,所述混合物包含L-荧光素和D-荧光素,所述L-荧光素和所述D-荧光素的比率为至少约5:95至约55:45,或至少约5:95至约50:50。然后检测和/或测量产生的发光度以测定细胞中荧光素酶的存在或量。

[0014] 在一些实施方案中,提供了用于检测或定量细胞或其他样品中核苷磷酸例如ATP或ATP源的方法,其中使所述细胞或样品与包含L-荧光素和D-荧光素的混合物和荧光素酶接触,在所述混合物中所述L-荧光素与所述D-荧光素的比率为至少约0.5:1至约2:1。然后检测和/或测量产生的发光度以测定细胞中核苷磷酸的存在或量。

[0015] 在一些实施方案中,提供了用于进行荧光素酶反应的方法。将包含L-荧光素和D-荧光素的混合物在约0°C至约35°C的温度下储存一定时间段。当在荧光素酶活性测定中使用所述混合物时,测量了光输出,即发光度。允许所述混合物与含有或表达荧光素酶,ATP或ATP源的样品或部分样品接触,以形成反应测定物。然后检测反应测定物中产生的发光度。已经储存一定时间段的含有混合物的反应测定物产生光输出,在某些实施方案中,所述光输出为在储存时间段开始时(时间 $t=0$)含有所述混合物的可比较的反应测定物的光输出的至少约50%或至少约90%。在某些实施方案中,储存时间段可能为至少约30分钟,至少约1小时,至少约4小时或更长。

[0016] 在一些实施方案中,提供了用于配制用于荧光素酶反应的组分的方法。使D-荧光素和L-荧光素合并以形成混合物,所述混合物在约0°C至约35°C的温度下储存一定时间段,如约1、2、3或4小时或1周或2周的时间段。当在荧光素酶活性测定中使用所述混合物时,所述混合物允许产生光输出,即发光度,以致在所述时间段之后产生的光输出为在所述时间段开始时的光输出的至少约50%或至少约90%。

[0017] 本公开涉及包含荧光素酶、L-荧光素和D-荧光素的组合物。所述组合物基本上不含ATP。所述组合物可以包含至少约0.5:1至约2:1的L-荧光素与D-荧光素的比率。所述组合物可以包含至少约5:95至约55:45的L-荧光素与D-荧光素的比率。所述组合物可以具有至少约5且小于约9的pH。所述荧光素酶可以是甲虫荧光素酶,如萤火虫荧光素酶或叩头虫荧光素酶。D-荧光素可以是D-5'氟荧光素且L-荧光素是L-5'氟荧光素。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的额外组分:缓冲剂、蛋白质稳定剂、镁离子、金属螯合剂、洗涤剂、消泡剂、无机磷酸盐、焦磷酸盐、AMP、辅酶A、还原剂或其组合。所述组合物可以包含硫酸镁和反式-1,2-环己二胺四乙酸(CDTA)。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的额外组分:1,4-哌嗪二乙磺酸、1,2-二氨基环己烷四乙酸、Tergitol洗涤剂、Mazu消泡剂、硫酸镁、ATP、辅酶A、焦磷酸盐、DTT、亚硫酸盐和硫代硫酸盐。所述组合物还可以包含至少一种选自如下

的组分：氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾、乙二胺四乙酸 (EDTA) 和AMP。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少两种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少三种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少四种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少五种。所述组合物还可以包含镁离子、柠檬酸缓冲剂、MES缓冲剂、氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾和乙二胺四乙酸 (EDTA)。所述组合物还可以包含柠檬酸缓冲剂、HEPES缓冲剂、镁离子、乙二胺四乙酸 (EDTA)、磷酸钾、消泡剂、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷和AMP。与未包含L-荧光素的组合物相比，当在约0℃至约35℃之间的温度下储存时，所述组合物可以具有增加的储存寿命和/或稳定性。

[0018] 本公开涉及包含D-荧光素、L-荧光素和ATP的组合物。所述组合物基本上不含荧光素酶。所述组合物可以包含至少约0.5:1至约2:1的L-荧光素与D-荧光素的比率。所述组合物可以包含至少约5:95至约55:45的L-荧光素与D-荧光素的比率。所述组合物可以具有至少约5且小于约9的pH。所述荧光素酶可以是甲虫荧光素酶，如萤火虫荧光素酶或叩头虫荧光素酶。D-荧光素可以是D-5'氟荧光素且L-荧光素是L-5'氟荧光素。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的额外组分：缓冲剂、蛋白质稳定剂、镁离子、金属螯合剂、洗涤剂、消泡剂、无机磷酸盐、焦磷酸盐、AMP、辅酶A、还原剂或其组合。所述组合物可以包含硫酸镁和反式-1,2-环己二胺四乙酸 (CDTA)。所述组合物还包含至少一种选自如下的额外组分：1,4-哌嗪二乙磺酸、1,2-二氨基环己烷四乙酸、Tergitol洗涤剂、Mazu消泡剂、硫酸镁、ATP、辅酶A、焦磷酸盐、DTT、亚硫酸盐和硫代硫酸盐。所述组合物还包含至少一种选自如下的组分：氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾、乙二胺四乙酸 (EDTA) 和AMP。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少两种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少三种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少四种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少五种。所述组合物还可以包含镁离子、柠檬酸缓冲剂、MES缓冲剂、氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾和乙二胺四乙酸 (EDTA)。所述组合物还可以包含柠檬酸缓冲剂、HEPES缓冲剂、镁离子、乙二胺四乙酸 (EDTA)、磷酸钾、消泡剂、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷和AMP。与未包含L-荧光素的组合物相比，当在约0℃至约35℃之间的温度下储存时，所述组合物可以具有增加的储存寿命和/或稳定性。

[0019] 本公开涉及包含D-荧光素、L-荧光素和ATP的组合物，其中所述L-荧光素的浓度超过所述D-荧光素的浓度。所述组合物可以具有至少约5且小于约9的pH。所述荧光素酶可以是甲虫荧光素酶，如萤火虫荧光素酶或叩头虫荧光素酶。D-荧光素可以是D-5'氟荧光素且L-荧光素是L-5'氟荧光素。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的额外组分：缓冲剂、蛋白质稳定剂、镁离子、金属螯合剂、洗涤剂、消泡剂、无机磷酸盐、焦磷酸盐、AMP、辅酶A、还原剂或其组合。所述组合物可以包含硫酸镁和反式-1,2-环己二胺四乙酸 (CDTA)。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的额外组分：1,4-哌嗪二乙磺酸、1,2-二氨基环己烷四乙酸、Tergitol洗涤剂、Mazu消泡剂、硫酸镁、ATP、辅酶A、焦磷酸盐、DTT、亚硫酸盐和硫代硫酸盐。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的组分：氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾、乙二胺四乙酸 (EDTA) 和AMP。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少两种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少三种。所述组

合物可以包含所述额外组分中的至少四种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少五种。所述组合物还可以包含镁离子、柠檬酸缓冲剂、MES缓冲剂、氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾和乙二胺四乙酸 (EDTA)。所述组合物可以包含柠檬酸缓冲剂、HEPES缓冲剂、镁离子、乙二胺四乙酸 (EDTA)、磷酸钾、消泡剂、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷和AMP。与未包含L-荧光素的组合物相比,当在约0℃至约35℃之间的温度下储存时,所述组合物可以具有增加的储存寿命和/或稳定性。

[0020] 本公开涉及具有增加的储存寿命和/或稳定性的组合物。所述组合物可以包含荧光素酶、L-荧光素和D-荧光素,其中所述组合物基本上不含ATP。所述荧光素酶可以是甲虫荧光素酶。所述甲虫荧光素酶可以是萤火虫荧光素酶或叩头虫荧光素酶。所述组合物可以包含至少约0.5:1至约2:1的L-荧光素与D-荧光素的比率。所述组合物可以包含至少约5:95至约55:45的L-荧光素与D-荧光素的比率。与未包含L-荧光素的组合物相比,当在约0℃至约35℃的温度下储存时,所述反应混合物可具有增加的储存寿命和/或稳定性。所述组合物可以具有至少约5且小于约9的pH。D-荧光素可以是D-5'氟荧光素,且L-荧光素是L-5'氟荧光素。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的额外组分:缓冲剂、蛋白质稳定剂、镁离子、金属螯合剂、洗涤剂、消泡剂、无机磷酸盐、焦磷酸盐、AMP、辅酶A、还原剂或其组合。所述组合物可以包含硫酸镁和反式-1,2-环己二胺四乙酸 (CDTA)。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的额外组分:1,4-哌嗪二乙磺酸、1,2-二氨基环己烷四乙酸、Tergitol洗涤剂、Mazu消泡剂、硫酸镁、ATP、辅酶A、焦磷酸盐、DTT、亚硫酸盐和硫代硫酸盐。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的组分:氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾、乙二胺四乙酸 (EDTA) 和AMP。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少两种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少三种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少四种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少五种。所述组合物还可以包含镁离子、柠檬酸缓冲剂、MES缓冲剂、氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾和乙二胺四乙酸 (EDTA)。所述组合物可以包含柠檬酸缓冲剂、HEPES缓冲剂、镁离子、乙二胺四乙酸 (EDTA)、磷酸钾、消泡剂、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷和AMP。

[0021] 本公开涉及具有增加的储存寿命和/或稳定性的组合物。所述组合物包含D-荧光素、L-荧光素和ATP,其中所述组合物基本上不含荧光素酶。所述组合物可以包含至少约0.5:1至约2:1的L-荧光素与D-荧光素的比率。所述组合物可以包含至少约5:95至约55:45的L-荧光素与D-荧光素的比率。与未包含L-荧光素的组合物相比,当在约0℃至约35℃的温度下储存时,所述反应混合物可以具有增加的储存寿命和/或稳定性。所述组合物可以具有至少约5且小于约9的pH。D-荧光素可以是D-5'氟荧光素,且L-荧光素是L-5'氟荧光素。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的额外组分:缓冲剂、蛋白质稳定剂、镁离子、金属螯合剂、洗涤剂、消泡剂、无机磷酸盐、焦磷酸盐、AMP、辅酶A、还原剂或其组合。所述组合物可以包含硫酸镁和反式-1,2-环己二胺四乙酸 (CDTA)。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的额外组分:1,4-哌嗪二乙磺酸、1,2-二氨基环己烷四乙酸、Tergitol洗涤剂、Mazu消泡剂、硫酸镁、ATP、辅酶A、焦磷酸盐、DTT、亚硫酸盐和硫代硫酸盐。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的组分:氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾、乙二胺四乙酸 (EDTA) 和AMP。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少两

种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少三种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少四种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少五种。所述组合物还可以包含镁离子、柠檬酸缓冲剂、MES缓冲剂、氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾和乙二胺四乙酸 (EDTA)。所述组合物可以包含柠檬酸缓冲剂、HEPES缓冲剂、镁离子、乙二胺四乙酸 (EDTA)、磷酸钾、消泡剂、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷和AMP。

[0022] 本公开涉及具有增加的储存寿命和/或稳定性的组合物。所述组合物包含D-荧光素、L-荧光素和ATP,其中所述L-荧光素的浓度超过所述D-荧光素的浓度。与未包含L-荧光素的组合物相比,当在约0℃至约35℃的温度下储存时,所述反应混合物可以具有增加的储存寿命和/或稳定性。所述组合物可以具有至少约5且小于约9的pH。D-荧光素可以是D-5'氟荧光素,且L-荧光素是L-5'氟荧光素。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的额外组分:缓冲剂、蛋白质稳定剂、镁离子、金属螯合剂、洗涤剂、消泡剂、无机磷酸盐、焦磷酸盐、AMP、辅酶A、还原剂或其组合。所述组合物可以包含硫酸镁和反式-1,2-环己二胺四乙酸 (CDTA)。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的额外组分:1,4-哌嗪二乙磺酸、1,2-二氨基环己烷四乙酸、Tergitol洗涤剂、Mazu消泡剂、硫酸镁、ATP、辅酶A、焦磷酸盐、DTT、亚硫酸盐和硫代硫酸盐。所述组合物还可以包含至少一种选自如下的组分:氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾、乙二胺四乙酸 (EDTA) 和AMP。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少两种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少三种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少四种。所述组合物可以包含所述额外组分中的至少五种。所述组合物还可以包含镁离子、柠檬酸缓冲剂、MES缓冲剂、氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾和乙二胺四乙酸 (EDTA)。所述组合物还可以包含柠檬酸缓冲剂、HEPES缓冲剂、镁离子、乙二胺四乙酸 (EDTA)、磷酸钾、消泡剂、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷和AMP。

[0023] 本公开涉及包含包装在至少一个容器中的如上所述的组合物的试剂盒。

[0024] 本公开涉及试剂盒,所述试剂盒包含包装在第一容器中的如上所述的组合物和第二容器,所述第二容器包含至少一种选自如下的组分:柠檬酸缓冲剂、MES缓冲剂、氟化钠、十二烷基三甲基铵、羟基聚乙氧基十二烷、消泡剂、焦磷酸盐、磷酸钾、乙二胺四乙酸 (EDTA) 和AMP。与未包含L-荧光素的组合物相比,当在约0℃至约35℃之间的温度下储存时,所述组合物可以具有增加的储存寿命和/或稳定性。

[0025] 本公开涉及用于测定样品中ATP的存在或量的方法,其包括使如上所述的组合物与样品接触,以及检测所产生的发光度,由此测定样品中ATP的存在或量。所述样品可以包含完整的细胞。所述样品包括未加工的细胞裂解物或澄清的细胞裂解物。所述细胞可以为原核细胞或真核细胞。所述样品可以包含经纯化的酶,所述酶产生或使用ATP。与未包含L-荧光素的组合物相比,当在约0℃至约35℃之间的温度下储存时,所述组合物可以具有增加的储存寿命和/或稳定性。

[0026] 本公开涉及用于检测表达荧光素酶的细胞中荧光素酶活性的方法,所述方法包括在细胞中表达荧光素酶;使所述荧光素酶、所述细胞或其组合与包含L-荧光素和D-荧光素的混合物接触以及检测发光度,在所述混合物中所述L-荧光素和所述D-荧光素的比率为 (i) 至少约5:95至约75:25, (ii) 至少约5:95至约50:50, (iii) 至少约5:95至约25:75或 (iv)

至少约5:95至约20:80。所述细胞可以被裂解,并且包含荧光素酶的裂解的细胞可以与所述混合物接触。可以使裂解的细胞澄清以形成包含荧光素酶的澄清的细胞提取物,以及使所述澄清的细胞提取物与所述混合物接触。所述细胞可以为真核细胞,如哺乳动物细胞。所述混合物可能增加发光信号的半衰期。可以用荧光素酶编码序列瞬时转染所述细胞。所述混合物可以具有至少约6.5至小于约7.8的pH,或者至少约6.6至至少约6.8的pH。D-荧光素可以是D-5'氟荧光素且L-荧光素是L-5'氟荧光素。与未包含L-荧光素的组合物相比,当在约0℃至约35℃之间的温度下储存时,所述组合物可以具有增加的储存寿命和/或稳定性。所述混合物可以具有至少约5至约9的pH。

[0027] 本公开涉及用于进行荧光素酶反应的方法。所述方法包括:(a)将包含L-荧光素和D-荧光素的混合物在约0℃至约35℃之间的温度下储存至少约4小时的时间段,其中当在包含荧光素酶和ATP的测定物中与样品合并时,所述储存的混合物允许产生光输出,并且其中所述时间段之后的光输出为所述时间段开始时的光输出的至少约50%;以及(b)在步骤(a)之后,允许所述储存的混合物与(i)样品和(ii)ATP或ATP源、荧光素酶或其组合合并以形成反应测定物以及检测所产生的发光度。所述时间段可以为至少约12小时,所述温度可以为约0℃至约6℃或约20℃至约35℃。所述样品可以包含荧光素酶,且所述混合物包含ATP。所述样品可以包含ATP,且所述混合物包含荧光素酶。所述时间段之后的光输出为所述时间段开始时的光输出的至少约75%。所述混合物可以基本上不含ATP或荧光素酶。所述温度为约20℃至约35℃。所述温度可以为约0℃至约6℃,且所述时间段为至少约2周。所述时间段可以为至少约12周。所述时间段可以为至少约26周。所述时间段之后的光输出可以为所述时间段开始时的光输出的至少约90%。所述时间段之后的光输出可以为所述时间段开始时的光输出的至少约50%。所述方法还可以包括在步骤(b)之后,将所述储存的混合物与(i)荧光素酶和(ii)ATP或ATP源或(iii)其组合合并以形成第二混合物,以及检测所述第二混合物中所产生的发光度。所述混合物可以具有至少约5至约9的pH。所述混合物可以包含至少约5:95至约75:25的L-荧光素与D-荧光素的比率。

[0028] 本公开涉及用于配制用于荧光素酶反应的组分的方法。所述方法包括:(a)将D-荧光素和L-荧光素合并以形成混合物,(b)将所述混合物在约0℃至约35℃的温度下储存至少约2天的时间段。当在包含荧光素酶的测定物中与样品合并时,所述混合物允许产生光输出,并且其中所述时间段之后的光输出为所述时间段开始时的光输出的至少约50%。所述混合物可以基本上不含ATP或荧光素酶。所述温度可以为约20℃至约35℃。所述温度可以为约0℃至约6℃,并且所述时间段为至少约2周。所述时间段可以为至少约12周。所述时间段可以为至少约26周。所述时间段之后的光输出可以为所述时间段开始时的光输出的至少约90%。所述时间段之后的光输出可以为所述时间段开始时的光输出的至少约50%。所述方法还可以包括在步骤(b)之后,将所述储存的混合物与(i)荧光素酶、(ii)ATP或ATP源或(iii)其组合合并以形成第二混合物,以及检测所述第二混合物中所产生的发光度。所述混合物可以具有至少约5至约9的pH。所述组合物可以包含至少约5:95至约75:25的L-荧光素与D-荧光素的比率。

[0029] 本公开涉及用于增加发光信号的半衰期的方法。所述方法包括:(a)使包含荧光素酶的样品与包含D-荧光素、L-荧光素和ATP的混合物接触以形成反应测定物;以及(b)检测发光度;其中与包含D-荧光素且基本上不含L-荧光素的可比较的反应测定物相比,发光信

号的半衰期增加。所述发光信号的半衰期可增加至少约25%。所述发光信号的半衰期可增加至少约5倍。所述样品可以包括表达荧光素酶的细胞。所述细胞可以被裂解,并且所述样品可以包含裂解的细胞,所述裂解的细胞包含荧光素酶。所述样品可以包括澄清的细胞提取物,所述细胞提取物包含荧光素酶。所述细胞可以为原核细胞或真核细胞。D-荧光素可以为D-5'氟荧光素,L-荧光素为L-5'氟荧光素,并且其中可比较的反应测定物包含D-5'氟荧光素且基本上不含L-5'氟荧光素。

[0030] 本公开涉及用于进行荧光素酶反应的方法。所述方法包括:(a)将组合物与样品和ATP或ATP源、荧光素酶或其组合合并以形成反应测定物,所述组合物包括L-荧光素和D-荧光素;以及(b)检测产生的发光度,其中与未包含L-荧光素的组合物相比,如果所述组合物在约0℃至约35℃的温度下储存至少约4小时的时间段,则所述组合物具有增加的稳定性。当在包含荧光素酶和ATP的测定物中与样品合并时,所述储存的组合物允许产生光输出,并且其中所述时间段之后的光输出为所述时间段开始时的光输出的至少约50%。所述增加的稳定性可以包括增加的储存寿命和/或增加的信号稳定性。所述时间段可以为至少约12小时,所述温度为约0℃至约6℃或约20℃至约35℃。所述样品可以包含荧光素酶,且所述组合物可以包含ATP。所述样品可以包含ATP,且所述混合物包含荧光素酶。所述时间段之后的光输出可以为所述时间段开始时的光输出的至少约75%。所述组合物可以基本上不含ATP或荧光素酶。所述温度可以为约20℃至约35℃。所述温度可以为约0℃至约6℃,且所述时间段为至少约2周。所述时间段可以为至少约12周。所述时间段可以为至少约26周。所述时间段之后的光输出可以为所述时间段开始时的光输出的至少约90%。所述时间段之后的光输出可以为所述时间段开始时的光输出的至少约50%。所述方法还包括在步骤(b)之后,将所述组合物与(i)荧光素酶、(ii)ATP或ATP源或(iii)其组合合并以形成混合物,以及检测所述混合物中所产生的发光度。所述组合物可以具有至少约5至约9的pH。所述组合物可以包含至少约5:95至约75:25的L-荧光素与D-荧光素的比率。

[0031] 本公开涉及用于配制用于荧光素酶反应的组分的方法,所述方法包括将D-荧光素和L-荧光素合并以形成组合物,其中与未包含L-荧光素的组合物相比,如果所述组合物在约0℃至约35℃的温度下储存至少4小时的时间段,则所述组合物具有增加的稳定性,其中当在包含荧光素酶和ATP的测定物中与样品合并时,所述储存的组合物允许产生光输出,并且其中所述时间段之后的光输出为所述时间段开始时的光输出的至少约50%。所述增加的稳定性可包括增加的储存寿命和/或增加的信号稳定性。所述组合物可以基本上不含ATP或荧光素酶。所述温度可以为约20℃至约35℃。所述温度可以为约0℃至约6℃,且所述时间段为至少约2周。所述时间段可以为至少约12周。所述时间段可以为至少约26周。所述时间段之后的光输出可以为所述时间段开始时的光输出的至少约90%。所述时间段之后的光输出可以为所述时间段开始时的光输出的至少约50%。所述方法还包括在步骤(b)之后,将所述组合物与(i)荧光素酶、(ii)ATP或ATP源或(iii)其组合合并以形成混合物,以及检测所述混合物中所产生的发光度。所述组合物可以具有至少约5至约9的pH。所述组合物可以包含至少约5:95至约75:25的L-荧光素与D-荧光素的比率。

[0032] 通过考虑详细的说明书和附图,本发明的其他方面将会变得显而易见。

附图说明

[0033] 图1为描绘荧光素混合物在不同温度下储存不同的时间之后由含有L-荧光素和D-荧光素的测定物检测的发光度的图。

[0034] 图2为描绘荧光素储存不同的时间之后由含有D-荧光素或L-荧光素和D-荧光素两者的测定物检测的发光度的图。

[0035] 图3为描绘荧光素储存不同的时间之后由含有D-荧光素或L-荧光素和D-荧光素两者的测定物检测的发光度的图。

[0036] 图4显示描绘荧光素酶报告基因测定试剂中不同的D-/L-荧光素(5'-氟荧光素)比率对发光度(4A)和信号半衰期(4B)的影响的图。

[0037] 图5为描绘不同的D-/L-荧光素(5'-氟荧光素)比率对荧光素酶报告基因测定试剂的稳定性的影响的图。

[0038] 详述

[0039] 在储存期间液体制剂中的L-荧光素到D-荧光素的外消旋化产生荧光素的D-和L-对映异构体的混合物,其中D-荧光素可用作被荧光素酶的底物以产生光。可用于荧光素酶的D-荧光素的量的不可预测性对依赖于测定荧光素酶活性的测定是成问题的,如测量样品中代谢产物如ATP的量的测定。测定中L-荧光素的存在也可能是成问题的,因为它充当荧光素酶的抑制剂。

[0040] 在一些实施方案中,公开了包含以混合物形式提供的D-荧光素和L-荧光素的组合物。在一些实施方案中,所述组合物可以与荧光素酶一起使用以测量使用ATP的酶例如激酶的活性;以测量ATP的量或浓度;以通过ATP的中间产生来测量样品中的特定代谢产物;以提供经过一定时间段的稳定测量或者其组合。在一些实施方案中,所述组合物可以用于检测或测量由细胞表达的荧光素酶的量。令人惊讶的是,含有D-荧光素和L-荧光素的混合物的组合物相比于含有基本上纯的D-荧光素的组合物、或包含D-荧光素且基本上不含L-荧光素(如含有微量L-荧光素)的组合物显示优异的稳定性,其中测定性能下降极小。例如,当L-荧光素以存在的总荧光素的至少约1%,至少约5%,至少约10%,至少约15%,至少约25%,至少约30%,至少约35%,至少约40%,至少约45%,至少约50%,至少约55%,至少约60%,至少约65%,至少约70%或至少约75%或更多存在时,或当L-荧光素的量超过存在的D-荧光素的量时,可能出现优异的稳定性。可以通过ATP的中间产生测量的代谢产物包括但不限于,核苷二磷酸如腺苷二磷酸(ADP)、鸟苷二磷酸(GDP)、尿苷二磷酸(UDP)以及腺苷单磷酸(AMP)。在某些实施方案中,包含D-荧光素和L-荧光素的混合物的组合物任选地包含荧光素酶,且可以任选地基本上不含ATP、其他的核苷三磷酸、核苷二磷酸、核苷单磷酸或其组合。在其他实施方案中,包含D-荧光素和L-荧光素的混合物例如其中L-荧光素的浓度超过D-荧光素的浓度的混合物的组合物可以任选地包含ATP。

[0041] D-荧光素包括化合物(D-(-)-2-(6'-羟基-2'-苯并噻唑基)-二氢噻唑-4-羧酸),且L-荧光素包括化合物(L-(-)-2-(6'-羟基-2'-苯并噻唑基)-二氢噻唑-4-羧酸)和它们的盐形式。如本文中所使用,无论是D-或L-异构形式,荧光素包括盐形式,如钾盐、钠盐或其它碱金属或碱土金属盐、游离酸以及荧光素衍生物和它们的盐的形式,如氯荧光素和氟荧光素,例如5'-氟荧光素、7'-氟荧光素和5'-氯荧光素和7'-氯荧光素以及在美国公布申请2009-0075309中所公开的那些,所述美国公布申请的全部公开内容通过引用并入本文。

[0042] D-荧光素和L-荧光素(D-荧光素:L-荧光素)可以以至少约0.25:1、至少约0.3:1、至少约0.4:1、至少约0.5:1、至少约0.6:1、至少约0.7:1、至少约0.8:1、至少约0.9:1、至少约1:1且小于约4:1、小于约3.75:1、小于约3.5:1、小于约3.25:1、小于约3:1、小于约2.75:1、小于约2.5:1、小于约2.25:1、小于约2:1、小于1.9:1、小于约1.8:1、小于约1.7:1、小于约1.6:1、小于约1.5:1、小于约1.4:1、小于约1.3:1、小于约1.25:1、小于约1.2:1或小于约小于约1.1:1的比率存在。

[0043] L-荧光素和D-荧光素(L-荧光素:D-荧光素)可以以至少约0.1:99.9、至少约1:99、至少约2:98、至少约3:97、至少约4:96、至少约5:95、至少约10:90、至少约15:85、至少约20:80、至少约25:75、至少约30:70、至少约35:65、至少约40:60、至少约45:55、至少约49:51、或至少约50:50且小于约99:0.1、小于约99:1、小于约98:2、小于约97:3、小于约96:4、小于约95:5、小于约90:10、小于约85:15、小于约80:20、小于约75:25、小于约70:30、小于约65:35、小于约60:40、小于约55:45、小于约51:49或小于约50:50的比率存在。

[0044] 包含D-荧光素、L-荧光素和任选地荧光素酶的混合物可以基本上不含或排除任何量的核苷三磷酸、核苷二磷酸或它们的任意组合。例如,包含D-荧光素、L-荧光素和任选地荧光素酶的混合物可以基本上不含或排除任何量的ATP、GTP、CTP、m5UTP、UTP或它们的任意组合。包含D-荧光素、L-荧光素和任选地荧光素酶的混合物可以基本上不含或排除任何量的ADP、GDP、CDP、m5UDP、UDP或它们的任意组合。包含D-荧光素、L-荧光素和任选地荧光素酶的混合物可以包含小于约50 μ M ATP、小于约10 μ M ATP、小于约5 μ M ATP、小于约1 μ M ATP、小于约0.5 μ M ATP、小于约0.1 μ M ATP、小于约0.05 μ M ATP、小于约0.01 μ M ATP、小于约0.005 μ M ATP、或小于约0.001 μ M ATP、或小于约0.0001 μ M ATP或本文所述的其它核苷三磷酸。

[0045] 在一些实施方案中,包含D-荧光素、L-荧光素和任选地荧光素酶的混合物可以含有至少0.005 μ M ATP、至少约0.01ATP、至少约0.05 μ M ATP、至少约0.1 μ M ATP、至少约0.5 μ M ATP、至少约1 μ M ATP、至少约5 μ M ATP、至少约10 μ M ATP、至少约50 μ M ATP且小于约10mM ATP、小于约5mM ATP、小于约4mM ATP、小于约3mM ATP、小于约2mM ATP、小于约1mM ATP、小于约0.5mM ATP。例如,这样的混合物可以包含大于1:1、大于1.1:1、大于1.2:1、大于1.3:1、大于1.4:1、大于1.5:1、大于1.6:1、大于1.7:1、大于1.8:1、大于1.9:1、大于2:1、大于2.25:1、大于2.5:1,大于2.75:1或大于3:1的L-荧光素:D-荧光素的比率。

[0046] 包含D-荧光素和L-荧光素的混合物可以任选地基本上包括任何量的核苷三磷酸,例如ATP、GTP、CTP,核苷二磷酸,例如ADP、GDP、CDP或它们的任何组合。

[0047] 包含D-荧光素和L-荧光素的混合物在较长时间段内保持稳定,其中当混合物用于荧光素酶活性测定中时通过光输出测量稳定性。所述增加的稳定性可以是增加的储存寿命和/或增加的信号稳定性。与常规的制剂相比(在22 $^{\circ}$ C储存8小时后或在4 $^{\circ}$ C储存4天后,其可以显示约10%的活性损失),本发明的制剂显示增加的稳定性,即增加的储存寿命/稳定性。当在例如约4 $^{\circ}$ C(例如约1 $^{\circ}$ C至约6 $^{\circ}$ C)或约20 $^{\circ}$ C至25 $^{\circ}$ C或约20 $^{\circ}$ C至约35 $^{\circ}$ C,例如约22 $^{\circ}$ C(例如约20 $^{\circ}$ C至约25 $^{\circ}$ C,约20 $^{\circ}$ C至约35 $^{\circ}$ C,约22 $^{\circ}$ C至约35 $^{\circ}$ C,约22 $^{\circ}$ C至约30 $^{\circ}$ C,约25 $^{\circ}$ C至约35 $^{\circ}$ C,或约25 $^{\circ}$ C至约30 $^{\circ}$ C)的温度下储存时,在储存至少约8小时、至少约10小时、至少约12小时、至少约18小时、至少约1天、至少约2天、在至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约1周、至少约2周、至少约3周、至少约4周、至少约1个月、至少约2个月、至少约3个月、至少约4个月、至少约5个月、至少约6个月、至少约9个月、至少约12个月、至少约18个月、至少约2年、至少约3

年、至少约4年或更长的时间段之后,检测到至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%的原始活性(其中,在荧光素酶活性测定中在T=0在给定的一组条件下测量原始活性以及在基本上相同的条件下在之后的时间点测量随后的活性)。例如,在约20℃至约25℃,约20℃至约35℃,约22℃至约35℃,约22℃至约30℃,约25℃至约35℃,约25℃至约30℃的温度下,在约或至少约2个月的孵育之后,使用约50:50的L-荧光素和D-荧光素的混合物的本文所述的方法、组合物和试剂盒将具有至少约50%的剩余的原始活性。

[0048] 荧光素酶活性测定包括,例如,在最适合所使用的酶的pH的缓冲液中的荧光素酶、荧光素(例如1mM)、ATP(例如,3mM)、MgSO₄(例如,15mM)。可以存在其它任选的组分以优化或稳定所用的荧光素酶的活性。在本文实施例中描述荧光素酶活性测定的例子。在一些实施方案中,荧光素酶可以被纯化,或者可以在样品例如报告基因中表达荧光素酶。

[0049] 在本文中提供了包含D-荧光素和L-荧光素的混合物的试剂盒、方法和组合物。所述试剂盒,方法和组合物可以包括一种或多种荧光素酶,或者可以用于使用荧光素酶报告基因测定在转化的原核细胞或转染的真核细胞中测定荧光素酶。所述细胞可以是,例如,细菌细胞,如大肠杆菌(*E. coli*)、链霉菌属的种(*Streptomyces* spp.)、芽孢杆菌属的种(*Bacillus* spp.)、葡萄球菌属的种(*Staphylococcus* spp.)等;哺乳动物的细胞,如牛、山羊、绵羊、犬、猫、非人类灵长类动物(如猿),以及人细胞;哺乳动物细胞系,如CHO、COS、HEK293、HeLa、CV-1、SH-SY5Y和NIH 3T3细胞;植物细胞(双子叶或单子叶)或真菌细胞,如酵母,例如,毕赤酵母属(*Pichia*)、酵母属(*Saccharomyces*)或裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)。

[0050] 利用荧光素作为底物的荧光素酶,包括甲虫荧光素酶,例如常见的萤火虫(萤火虫科)荧光素酶。在文献中甲虫荧光素酶通常称为萤火虫荧光素酶;然而,萤火虫荧光素酶实际上是甲虫荧光素酶类的亚群。甲虫荧光素酶还包括叩头虫荧光素酶,如来自牙买加叩头虫(*Pyrophorus plagiophthalmus*)。甲虫荧光素酶可以由甲虫本身的灯笼提纯或由本领域中公知的蛋白表达系统纯化。

[0051] 甲虫荧光素酶,特别是来自北美萤火虫(*Photinus pyralis*)或宾夕法尼亚萤火虫(*Photuris pennsylvanica*)的萤火虫荧光素酶是本领域中众所周知的。北美萤火虫的荧光素酶(LucPpy)由如通过由基因的核苷酸序列编码的蛋白质计算的大约550个氨基酸(61kDa)组成。宾夕法尼亚萤火虫(*Photuris pennsylvanica*)萤火虫荧光素酶(LucPpe2)由545个氨基酸残基组成(GenBank 2190534;Ye等人,1997)。源自LucPpe2的突变荧光素酶(例如热稳定性和/或化学稳定性)可以包括LucPpe2m78(也称为78-0B10)、LucPpe2m90(也称为90-1B5)、LucPpe2m133(也称为133-1B2)和LucPpe2m146(也称为146-1H2)。然而,任何满足本文所列限制的荧光素酶可以用于本发明的组合物、方法和试剂盒。PCT/US99/30925公开了得到热稳定和/或化学稳定的荧光素酶如LucPpe2m78、LucPpe2m90、LucPpe2m133和LucPpe2m146的方法。

[0052] 可以使用分离和/或纯化的荧光素酶。荧光素酶天然环境的污染物组分是通常会干扰荧光素酶测定的物质,并且可以包括酶、激素和其他蛋白质性质或非蛋白质性质的物质。一种确定纯度的技术是应用在非还原或还原条件下使用考马斯蓝或银染的SDS-PAGE分析。

[0053] 用于本发明的组合物、试剂盒和方法的荧光素酶包括那些产生稳定的信号和/或具有热稳定性和/或化学稳定性的荧光素酶,即,它们在荧光素酶反应中产生增加的发光持续时间(定义为相对于荧光素酶反应开始时的发光度每30分钟小于50%的发光度损失)或在较高的温度下产生更大的酶稳定性。示例性荧光素酶在美国专利No.6,132,983、6,171,808、6,265,177、6,602,677、7,241,584、7,906,298和8,030,017以及美国专利申请公布No.2003-0068801、2006-0183212、2009-0137019、2011-0177540和2012-0009647中公开,其各自的公开内容在此通过引用整体并入本文。

[0054] 本发明的组合物、试剂盒和方法中的荧光素酶还包括产生“闪光”信号并且光输出的半衰期小于约30分钟、小于约25分钟、小于约20分钟、小于约15分钟、小于约10分钟、小于约5分钟、小于约4分钟、小于约3分钟、小于约2分钟或小于约1分钟的荧光素酶。

[0055] 荧光素酶包括在50℃下显示增加的热稳定性至少2小时,或在50℃下至少5小时的那些。热稳定性荧光素酶,当溶解于合适的水溶液中时,包括稳定半衰期为在约50℃大于约2小时,在50℃大于约5小时,在50℃大于约10小时,在约60℃大于约5小时,在约60℃大于约10小时,在约60℃大于约24小时,在约22℃大于约3个月或在约22℃大于约6个月的荧光素酶。

[0056] 在某些实施方案中,如本文所述,存在于包含L-荧光素和D-荧光素的外消旋混合物的反应混合物中的荧光素酶的量可以增加以提供基本上等同于不包含L-荧光素和D-荧光素的外消旋混合物的类似反应混合物的光输出。例如,荧光素酶的量可以增加至不包含L-荧光素和D-荧光素的外消旋混合物的反应混合物中的荧光素酶量的至少约120%、至少约150%、至少约200%(2倍)、至少约250%、至少约300%、至少约350%、至少约400%、至少约500%(5倍)、至少约600%、至少约700%、至少约800%、至少约900%或至少约1000%(10倍),以实现基本上等效的光输出。

[0057] 在某些实施方案中,本文所述的组合物、方法和试剂盒提供了在荧光素酶反应期间产生的发光信号的增加的半衰期,即,增加的信号稳定性。与由包含基本上纯的D-荧光素、或包含D-荧光素且基本上不含L-荧光素,诸如包含微量L-荧光素的荧光素酶反应所产生的发光信号相比,本文所述的含D-荧光素和L-荧光素的混合物的组合物、方法和试剂盒可以增加发光信号的半衰期(荧光素酶反应中所产生的发光度)至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约100%、至少约125%、至少约150%、至少约175%、至少约200%、至少约250%、至少约300%、至少约350%、至少约400%、至少约450%或至少约500%。在一些实施方案中,与由包含基本上纯的D-荧光素、或包含D-荧光素且基本上不含L-荧光素,诸如包含微量L-荧光素的荧光素酶反应所产生的发光信号相比,实现了发光信号半衰期增加至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约12倍、至少约15倍或至少约20倍。

[0058] 可以相对光单位(RLU)测量光输出。在一些实施方案中,当使用D-荧光素和L-荧光素的混合物时,荧光反应的初始光输出较低。例如,与包含基本上纯的D-荧光素、或包含D-荧光素且基本上不含L-荧光素,诸如包含微量L-荧光素的荧光素酶反应相比,所述初始光输出可为初始光输出的小于约95%、小于约90%、小于约85%、小于约80%、小于约75%、小

于约70%、小于约65%、小于约60%、小于约55%、小于约50%、小于约45%、小于约40%、小于约35%、小于约30%、小于约25%、小于约20%、小于约15%、小于约10%或小于约5%。在一些实施方案中,如本文所述,较低的初始光输出伴随荧光反应的半衰期的增加。

[0059] 在本文所述的试剂盒、方法和组合物中,荧光素酶可以以含有L-荧光素和D-荧光素的溶液如水溶液提供,或者可以以粉状或干燥的形式(其在使用前溶解),例如,在与D-荧光素和L-荧光素分离的容器中提供。在一些实施方案中,荧光素酶以溶解形式在与D-荧光素和L-荧光素分离的容器中提供。包括在本文所述的组合物、试剂盒和方法中的荧光素(无论是D-荧光素、L-荧光素还是D-荧光素和L-荧光素的组合)的量可以为至少约1nM、至少约5nM、至少约10nM、至少约50nM、至少约100nM、至少约0.5μM、至少约1μM、至少约5μM、至少约10μM、至少约25μM、至少约50μM、至少约100μM、至少约250μM、至少约0.5mM、至少约1mM且小于约50mM、小于约40mM、小于约30mM、小于约30mM、小于约10mM、小于约5mM、小于约4mM、小于约3mM或小于约2mM。

[0060] 除了本文所述的D-荧光素和L-荧光素的混合物之外,本文所述的试剂盒、组合物和方法可以包括一种或多种额外组分,如荧光素酶;缓冲剂如柠檬酸或柠檬酸盐缓冲剂、MES、1,4-哌嗪二乙磺酸、或HEPES;无机磷酸盐,例如焦磷酸或磷酸钾形式;螯合剂如EDTA、CDTA或1,2-二氨基环己烷四乙酸;盐,如氟化钠、硫酸镁;表面活性剂或洗涤剂如TERGITOL®(例如非离子型壬基酚乙氧基化物),十二烷基三甲基溴化铵(DTAB)或THESIT®(羟基聚乙氧基十二烷);消泡剂如INDUSTROL®DF204(有机消泡剂)或MAZU®DF(硅酮消泡剂);蛋白质稳定剂如明胶,PRIONEX®10%(明胶,A型)或白蛋白(例如BSA、HSA)或甘油;腺苷三磷酸(ATP)或腺苷单磷酸(AMP)。其它组分可以包括聚乙二醇、聚乙烯吡啶、冠醚或环糊精。额外组分可以包括,例如,以下的一种或多种:硫醇化合物,如辅酶A;还原剂,如二硫苏糖醇(DTT),用作还原剂的含硫化合物,如亚硫酸盐,硫代硫酸盐。

[0061] 可以包括在试剂盒、组合物和方法中的洗涤剂包括阳离子洗涤剂、阴离子洗涤剂、非离子洗涤剂或两性离子洗涤剂。洗涤剂可以包括,例如,Tergitol®洗涤剂(聚乙二醇醚(非离子型))、Brij35®洗涤剂(聚氧乙烯23月桂基醚)、Brij58®洗涤剂(聚氧乙烯20十六烷基醚($\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}\text{C}_{16}\text{H}_{33}$))、TritonX-100®洗涤剂(4-(1,3,3-四甲基丁基)苯基-聚乙二醇($\text{t-Oct-C}_6\text{H}_4-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH}$, $x=9-10$))、TritonX-305®洗涤剂(4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯基-聚乙二醇)、TritonN101®洗涤剂(聚氧乙烯-9,10支链壬基苯基醚)、CHAPS®洗涤剂(3-[3-胆酰胺基丙基]二甲铵基]-1-丙磺酸盐)、Chapso®洗涤剂(3-[3-胆酰胺基丙基]二甲基铵基-2-羟基-1-丙磺酸盐)、Bigchap®洗涤剂(N,N-二(3-D-葡萄糖酰氨基丙基)胆酰胺)、Thesit®去污剂(聚乙二醇400十二烷基醚($\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$))、Pluronic L64®洗涤剂(聚(乙二醇)-嵌段-聚(丙二醇)-嵌段-聚(乙二醇))、Rhodasurf870®洗涤剂(聚乙氧基(20)油醇)、Chemal LA-9®洗涤剂(聚氧乙烯9月桂醇)、Sulfonyl 465®洗涤剂(2,4,7,9-四甲基-5-癸炔(deceyne)-4,7-二醇乙氧基化物10)、脱氧胆酸盐、CTA3、Pierce C08®洗涤剂($\text{C8}=\text{辛基}-\beta\text{-D-吡喃葡萄糖苷}$)或者Pierce C10®洗涤剂($\text{n-正癸基}-\beta\text{-D-麦芽糖苷}(\text{C10烷基侧链})$)。

[0062] 在本文所述的方法、试剂盒和组合物中或在本文所述的利用D-荧光素和L-荧光素的测定中使用的含有D-荧光素和L-荧光素的混合物可以具有至少约5、至少约5.1、至少约5.2、至少约5.3、至少约5.4、至少约5.5、至少约5.6、至少约5.7、至少约5.8、至少约5.9、至少约6、至少约6.1、至少约6.2、至少约6.3、至少约6.4、至少约6.5、至少约6.6、至少约6.7、至少约6.8、至少约6.9、至少约7、至少约7.1、至少约7.2、至少约7.3、至少约7.4、至少约7.5、至少约7.6、至少约7.7、至少约7.8、至少约7.9、至少约8、至少约8.1、至少约8.2、至少约8.3、至少约8.4、或至少约8.5且小于约9、小于约8.9、小于约8.8、小于约8.7、小于约8.6、小于约8.5、小于约8.4、小于约8.3、小于约8.2、小于约8.1、小于约8、小于约7.9、小于约7.8、小于约7.7、小于约7.6、小于约7.5、小于约7.4、小于约7.3、小于约7.2、小于约7.1、小于约7、小于约6.9、小于约6.8、小于约6.7、小于约6.6、或小于约6.5的pH。在混合物组合物或测定物中可以保持一定pH以提供促进快速明亮的发光的环境,如约8至9的pH,或缓慢发光从而提供更持续的荧光,如小于约7.5或小于约7的pH。

[0063] 在储存一定时间段之前,D-荧光素和L-荧光素可以以本文所述的任意比率合并在一起。在储存之前,本文所述的试剂盒或组合物的荧光素酶、ATP或任何其他组分可以任选地与D-荧光素和L-荧光素的混合物合并。该混合物可以在至少约-85℃、至少约-80℃、至少约-75℃、至少约-50℃、至少约-40℃、至少约-30℃、至少约-25℃、至少约-20℃、至少约0℃、至少约1℃、至少约2℃、至少约3℃或至少约4℃且小于约45℃、小于约40℃、小于约38℃、小于约35℃、小于约30℃、小于约25℃、小于约22℃、小于约21℃、小于约20℃、小于约15℃、小于约10℃、小于约8℃或小于约6℃的温度下储存一定时间段。储存的时间段可以为至少约4小时,至少约8小时,至少约12小时,至少约1天,至少约1周,至少约2周,至少约4周,至少约2个月,至少约3个月,至少约4个月,至少约6个月,或至少约12个月。储存期间后剩余的D-荧光素的量可以是储存之前混合物中初始D-荧光素的量的至少约99%、至少约98%、至少约95%、至少约90%、至少约85%、至少约80%、至少约75%、或至少约70%、至少约65%、至少约60%、至少约55%、至少约54%、至少约53%、至少约52%或至少约51%。储存期间后剩余的D-荧光素的量可以是储存之前混合物中D-荧光素的初始量的至少约101%、至少约105%、至少约110%、至少约115%、至少约120%、至少约125%、至少约130%、至少约140%、至少约150%、至少约175%、至少约200%、至少约250%、至少约300%、至少约400%、至少约500%、至少约750%或至少约1000%,例如,如果所述制剂在储存之前包含比D-荧光素多的L-荧光素的话。

[0064] 通过产生发光的荧光素酶-荧光素反应,本文所述的组合物和试剂盒可以用于测定样品中ATP的存在或量。在利用ATP的反应,例如激酶反应之后,样品中可以存在ATP,以使样品中的ATP的量和所产生的发光度与利用ATP的酶的活性的量成反比。样品可以含有完整的细胞,可以是未经加工的或澄清的细胞裂解液或者可以包含经纯化的酶,所述酶产生或使用ATP。所述细胞可以为原核细胞或真核细胞。

[0065] 本文所公开的组合物和试剂盒可以用于测定样品中荧光素酶的存在和量。在转染例如荧光素酶基因,例如报告基因的瞬时或稳定转染后,样品中可以存在荧光素酶。所述样品可以含有完整的细胞,未加工的或澄清的细胞裂解液或包含整个动物,例如对整个动物成像。在无细胞提取物中表达荧光素酶编码序列例如兔网织红细胞裂解物或小麦胚芽翻译系统后,样品中可以存在荧光素酶。所述细胞可以为原核细胞或真核细胞。

[0066] 但是应当理解,在其申请中本发明并不限于在描述中所列或以下附图中所示的结构细节和组分排列。本发明能够实施其它实施方案,且能够以各种方式实施或进行。

[0067] 应当理解,在说明书中叙述的任何数值范围包括从下限值到上限值的所有值。例如,如果浓度范围描述为1%至50%,则意图是,在该说明中明确例举了例如2%至40%、10%至30%或1%至3%等的值。应当理解,在说明书中引述的任何数值范围包括从至少所述下限值(不含上限)的所有值,和高至所述上限值(不含下限)的所有值。这些仅是具体意图的例子,并且在列举的最小值和最大值之间且包括所述最小值和最大值的所有可能的数值组合被视为在本申请中明确地说明。

[0068] 但是应当理解,在其申请中本发明并不限于在描述中所列的结构细节和组分排列。此外,应当理解,本说明书中使用的措辞和术语是为了描述的目的,且不应被视为限制目的。在描述本发明的上下文中术语“一个”和“一种”以及“所述”和类似指示物将被解释为涵盖单数和复数形式,除非本说明书中另有说明或上下文中明显矛盾。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”将被解释为开放式术语(即,意味着“包括但不限于”),除非另有说明。除非在本说明书中另有说明或上下文中另有明显矛盾,否则可以以任何合适的顺序进行本说明书中所述的所有方法。本文引述的专利申请、专利和引用文献明确地且完全地通过引入整体并入。在不一致的解釋是可能的情况下,以本公开内容为准。

[0069] 本文提供的任何和所有的实施例或示例性语言(例如,“如”)的用途仅意图说明本公开的内容和实施方案,而不限制权利要求的范围。

[0070] 实施例1:加速的稳定性

[0071] 将5mM L-荧光素溶解于CellTiter-Glo(含有Ultra-Glo荧光素酶和5mM D-荧光素的ATP检测试剂;Promega Corporation)。将等分试样在不同温度下放置不同长度的时间,然后储存在-80℃。所有的样品同时解冻到室温,然后与1μM于水中的ATP以1:1混合。10分钟后测量发光度(RLU)。结果于图1所示。

[0072] 从较高温度下的衰变率,使用阿伦尼乌斯方程来计算较低温度下的衰变率。在22℃,计算10%性能损失在8.6天时发生。在4℃,计算10%和50%损失分别在4.2个月和2年时发生。在-20℃,计算10%的损失在20年时发生。

[0073] 实施例2:在22℃的实时稳定性。

[0074] 将具有和不具有5mM L-荧光素的CellTiter-Glo的等分试样在22℃放置不同长度的时间,然后储存在-80℃。所有的样品同时解冻到室温,然后与1μM于水中的ATP以1:1混合。10分钟后测量发光度(RLU)。结果于图2所示。

[0075] 对于不具有和具有L-荧光素的CellTiter-Glo,在22℃,10%性能变化分别在约12小时或约2周时发生。

[0076] 实施例3-荧光素和5'-氟荧光素的比较

[0077] 将5mM L-异构体荧光素或氟荧光素溶解于包含5mM各自的D-异构体的试剂(500mM MES,pH6,400mM KCl,3mM CDTA、20mM MgSO₄、2mM NaF、15μM焦磷酸四钠、2% Thesit,1% DTAB、0.2% Mazu和0.21mg/ml Ultra-Glo)中。然后,包括CellTiter-Glo的每种试剂与2μM于水中的ATP以1:1混合,且测量随着时间推移的发光度(RLU)。结果于表1所示。

[0078] 表1

[0079]	荧光素	5'-氟	RLU @ 10'	半衰期(小时)
	D		31,685,833	1.72
	D+L		7,229,377	6.66
		D	27,391,967	2.75
		D+L	12,016,733	5.56
		CTG	5,181,023	5.25

[0080] 尽管当比较D-异构体时在光输出方面仅存在适度差异,但是5'-氟荧光素的异构体混合物比具有大致相同的信号半衰期的荧光素的异构体混合物显著明亮。

[0081] 实施例4. 含有天然萤火虫荧光素酶的试剂的增加的稳定性

[0082] 将1mM L-荧光素溶解于包含1mM D-荧光素和13.54 μ g/ml天然萤火虫荧光素酶的试剂(50mM乙酸镁、25mM Tris乙酸,pH 7.75,0.1mM EDTA、0.002%叠氮化物、0.5mM DTT、1.3mg/ml BSA) (QuantiLum[®] 重组荧光素酶,Promega, Madison WI)。将等分试样在22 $^{\circ}$ C下放置不同长度的时间,然后储存在-80 $^{\circ}$ C。所有的样品同时解冻到室温,然后通过注射与20nM于水中的ATP以1:1混合。10秒延迟之后,测量发光度(RLU)并在10秒钟内求积分。结果于表3所示。

[0083] 对于不具有或具有L-荧光素的试剂,在22 $^{\circ}$ C,10%的性能变化分别在约5小时或约50小时时发生。

[0084] 实施例5. 荧光素酶报告基因测定试剂中不同的D-/L-荧光素比率对发光度和信号半衰期的影响

[0085] 将稳定表达萤火虫荧光素酶(CMV-Fluc)的HEK293细胞在100 μ l完全培养基(DMEM+10%胎牛血清+1 \times NEAA(非必需氨基酸))中的2.5 $\times 10^5$ 个细胞/ml铺板于白色96孔板中。然后将所述细胞在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂下孵育过夜。过夜孵育后,使平板平衡到22 $^{\circ}$ C。将含有1mM荧光素的100 μ l萤火虫荧光素酶报告基因测定试剂(其中D-5'-氟荧光素/L-5'-氟荧光素为100:0、95:5、90:10、85:15、80:20或75:25)添加到细胞中(n=3),并且在搅拌下孵育3分钟。在GloMax[®] Multi+上在22 $^{\circ}$ C每3分钟测量发光度,持续5小时。

[0086] 图4显示了不同的D-/L-荧光素比率对初始发光度(RLU) (A) 和信号半衰期(B)的影响。通过将发光度与单指数衰减拟合来计算信号半衰期。

[0087] 实施例6. 不同的D-/L-荧光素比率对荧光素酶报告基因测定试剂的稳定性的影响

[0088] 制备具有不同比率(100:0、90:10、80:20、70:30、60:40和50:50)的D-/L-5'-氟荧光素的萤火虫荧光素酶报告基因测定试剂。将每种试剂分成180 μ l等分试样并在22 $^{\circ}$ C水浴中孵育不同时间量(0、1、2、3、4或5天)。每个时间段后,将每个比率的试剂的等分试样在-80 $^{\circ}$ C冷冻。时间进程结束之后,将所有等分试样解冻,通过上下吸打来混合,并将50 μ l转移到96孔板的一式三份孔中,然后在22 $^{\circ}$ C平衡。在补充有0.1% Prionex的DMEM中将纯化的萤火虫荧光素(QuantiLum)稀释到0.69 μ g/ml且向每孔添加50 μ l,并混合3分钟。在GloMax[®] Multi+光度计上读取发光度。

[0089] 图5显示了当D-/L-5'-氟荧光素的比率接近50:50时荧光素酶报告基因测定试剂的室温稳定性增加。

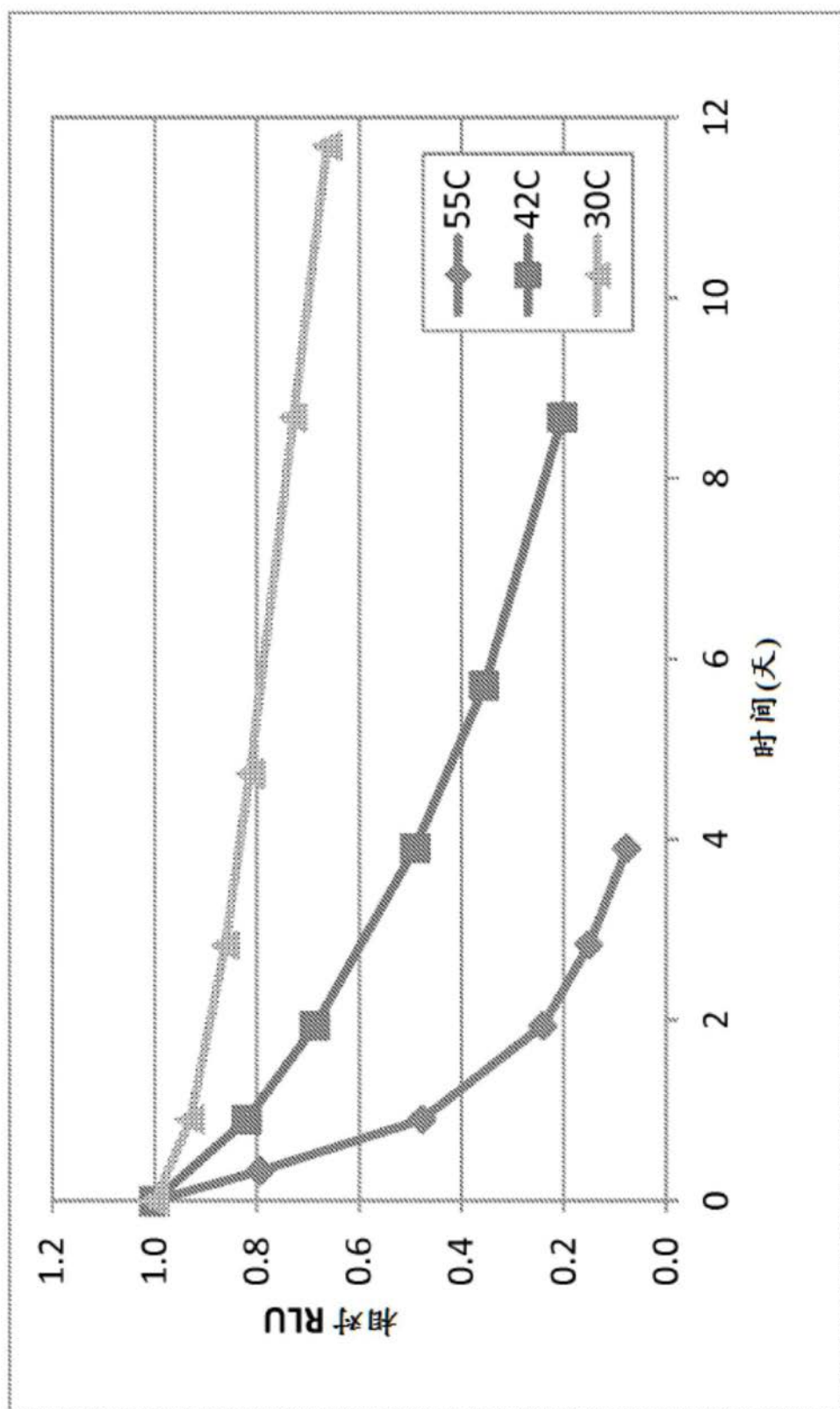


图1

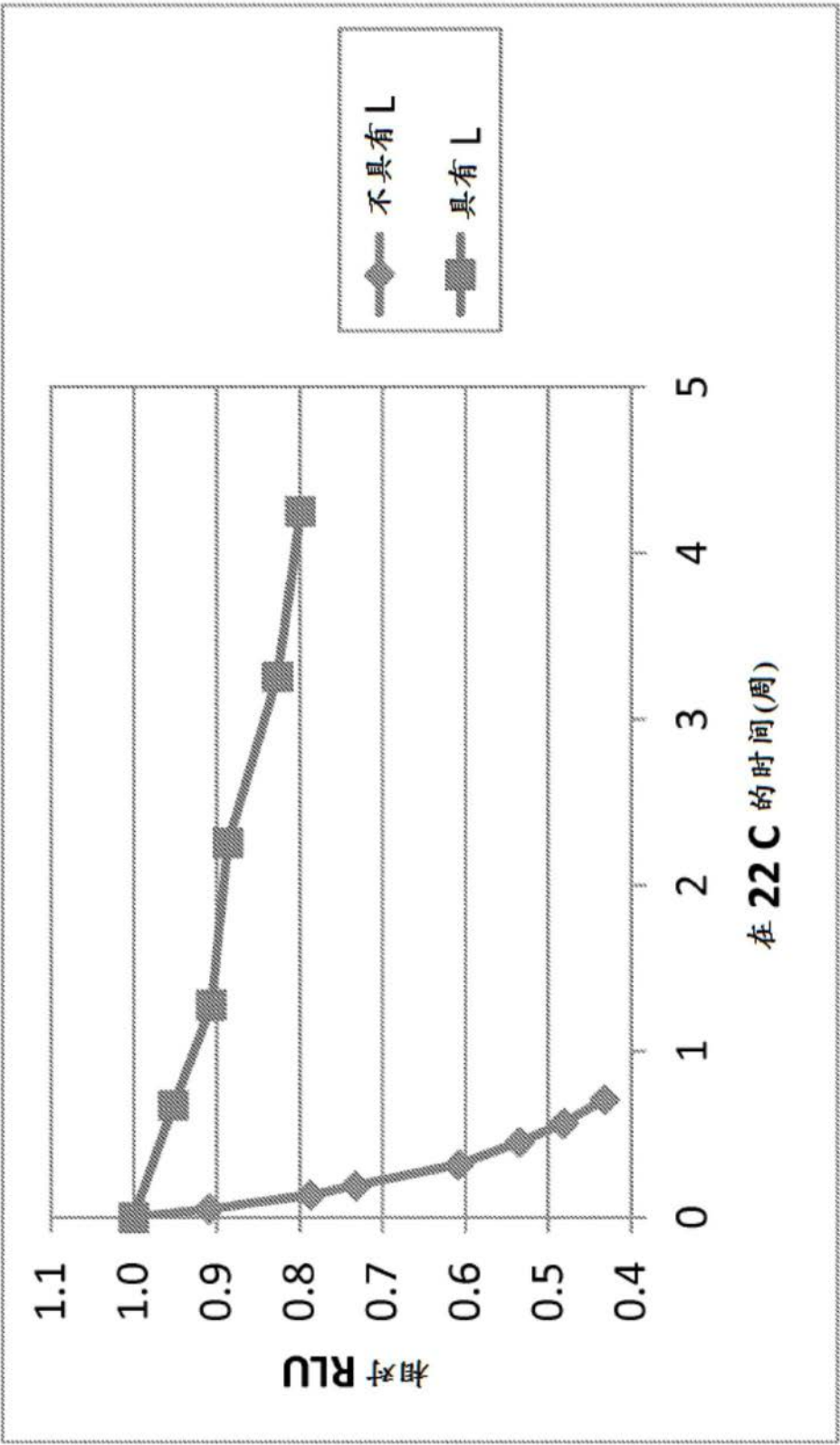


图2

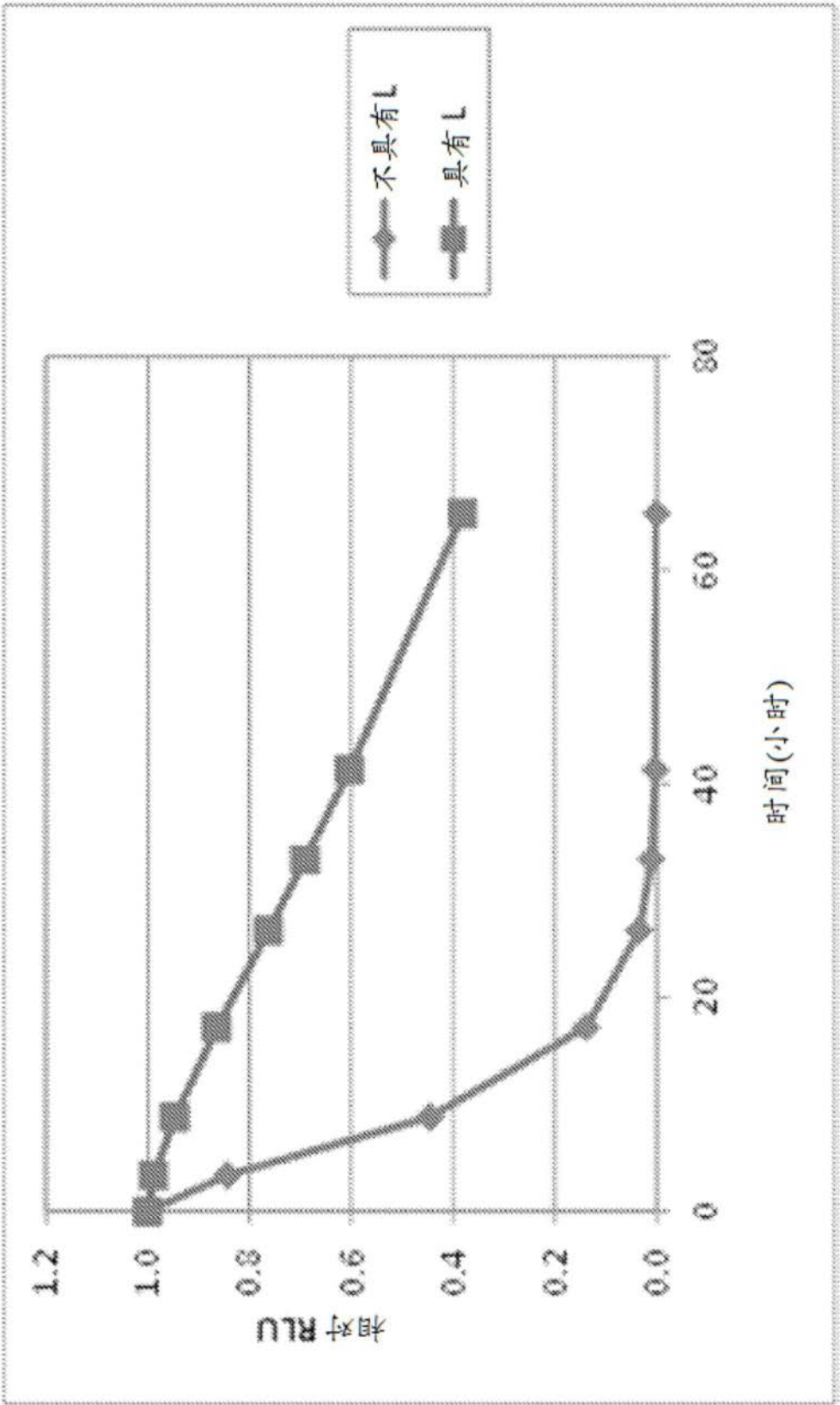


图3

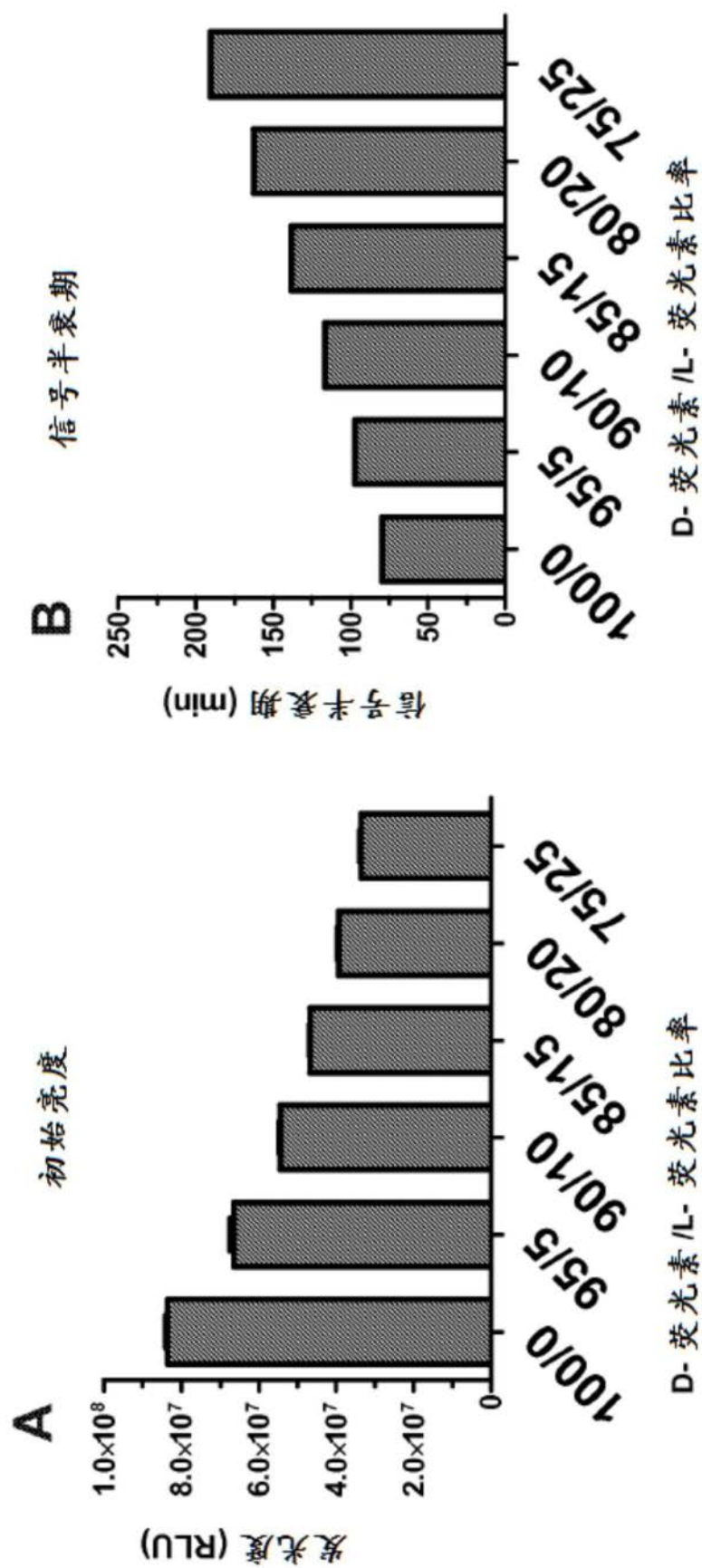


图4

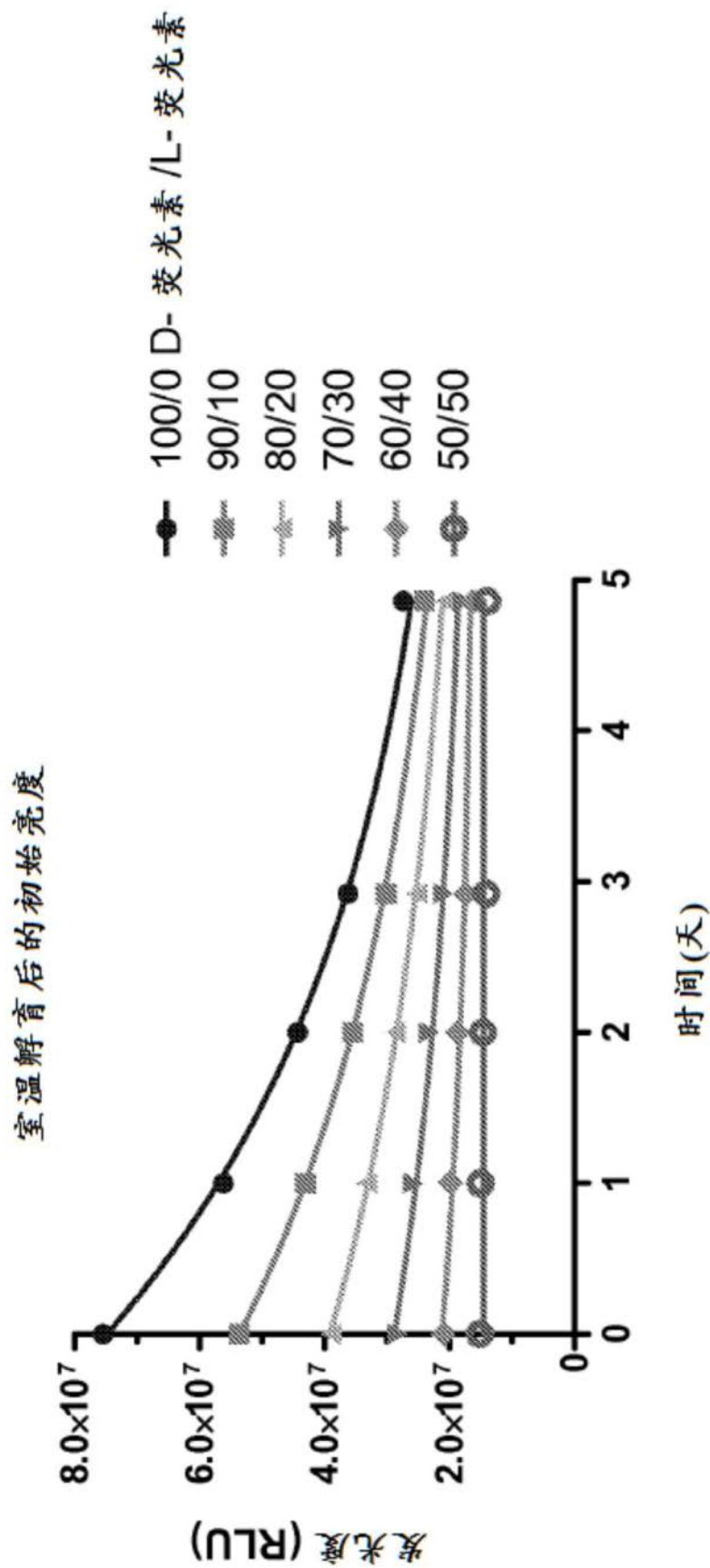


图5