

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 21/27

G01N 27/26

C12Q 1/68



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02148800.2

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 31 日

[11] 授权公告号 CN 1217192C

[22] 申请日 2002.11.21 [21] 申请号 02148800.2

[71] 专利权人 北京博奥生物芯片有限责任公司

地址 100084 北京市海淀区清华西路甲 2 号

共同专利权人 清华大学

[72] 发明人 郭良宏 董 栋 郑 东 王福泉

杨夕强 程 京

审查员 刘 铭

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关 畅

权利要求书 3 页 说明书 8 页 附图 2 页

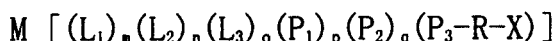
[54] 发明名称 光电化学标记物和用其进行光电化学分析的方法、仪器与试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了光电化学标记物和用其进行光电化学分析的方法及仪器与试剂盒，本发明所提供的光电化学标记物，具有如下的分子式： $M[(L_1)_m(L_2)_n(L_3)_o(P_1)_p(P_2)_q(P_3-R-X)]$ 其中，M 是金属离子； L_1 、 L_2 、 L_3 是 M 的单配位基配体； P_1 、 P_2 、 P_3 是 M 的多配位基配体；R 是间隔基；X 是能够将光电化学标记物连接到底物上的化学活性基团；m、n、o、p 和 q 是零或正整数；所有配体提供的价键总数等于 M 的配位数。本发明提供的光电化学分析方法，包括：a) 将含分析物的样品与反应物接触；所述分析物、反应物或分析物类似物中的一种或几种是用具有光电化学活性的分子标记的；b) 评价所述分析物和所述反应物之间的结合和/或反应。

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

1、光电化学标记物，具有如下的分子式：



其中，M 是金属离子；L₁、L₂、L₃ 是 M 的单配位基配体；P₁、P₂、P₃ 是 M 的多配位基配体；R 是间隔基；X 是能够将光电化学标记物连接到底物上的化学活性基团；m、n、o、p 和 q 是零或正整数；所有配体提供的价键总数等于 M 的配位数。

2、根据权利要求 1 所述的标记物，其特征在于：所述 M 为铁、钨、锌、镁或铝。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的标记物，其特征在于：所述 L₁、L₂、L₃ 是氰化物或硫氰化物。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的标记物，其特征在于：所述 P₁、P₂、P₃ 是含氮的芳香族杂环。

5、根据权利要求 4 所述的标记物，其特征在于：所述含氮的芳香族杂环为联吡啶、连吡啶、联三吡啶、菲酚、酞氰染料、取代的联吡啶、取代的连吡啶、取代的联三吡啶或取代的菲酚。

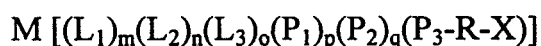
6、根据权利要求 5 所述的标记物，其特征在于：所述取代基团为烷基、芳基、芳烷基、羧酸酯、羧酸醛、羧酸酰胺、氰基、氨基、羟基羧基、羟基氨基、氨基羰基、脒、胍基、酰脲、含硫基团、含磷基团和 N-羟基琥珀酰亚胺的羧酸酯。

7、根据权利要求 1 或 2 所述的标记物，其特征在于：所述 R 是 C₂ 到 C₁₂ 烷基或聚乙二醇。

8、根据权利要求 1 或 2 所述的标记物，其特征在于：所述 X 为 N-羟基琥珀酰亚胺酯、巯基、环氧化物、乙醛、顺丁烯二酸酐、亚氨基酯、氨基、羧基、异硫氰酸酯、顺丁烯二酸亚胺、卤乙酰基、酰肼或磷酰胺化合物。

9、一种光电化学分析方法，包括：

a) 将可能含有分析物的样品与能和所述分析物在合适条件下结合和/或反应的反应物接触；所述分析物、所述反应物或分析物类似物中的一种或几种是用具有光电化学活性的分子标记的；所述光电化学标记物，具有如下的分子式：



其中，M 是金属离子；L₁、L₂、L₃ 是 M 的单配位基配体；P₁、P₂、P₃ 是 M 的多配位基配体；R 是间隔基；X 是能够将光电化学标记物连接到底物上的化学活性基团；m、n、o、p 和 q 是零或正整数；所有配体提供的价键总数等于 M 的配位数；

b) 评价所述分析物和所述反应物之间的结合和/或反应，确定在样品中存在所述分析物和/或所述分析物的量；所述评价为在电极存在的情况下用光将具有光电化学

活性的分子转化成激发态，评价激发的具有光电化学活性的分子和电极之间电子转移所产生的电流。

10、根据权利要求9所述的方法，其特征在于：所述分析物为细胞、细胞器、病毒、分子及其集合体或复合物。

11、根据权利要求10所述的方法，其特征在于：所述细胞为动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞、重组细胞或培养细胞；所述细胞器为细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、内质网、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体；所述分子为无机分子、有机分子或其复合物。

12、根据权利要求11所述的方法，其特征在于：所述有机分子为氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素、单糖、寡糖、脂类、激素、癌标记、类固醇、固醇、药物化合物、碳水化合物及其复合物。

13、根据权利要求10所述的方法，其特征在于：所述分析物为来自哺乳动物的样品或临床样品。

14、根据权利要求13所述的方法，其特征在于：所述哺乳动物为牛科、马科、鼠科、猫科动物，山羊、绵羊、兔、豚鼠、人、猴子、狗或猪；所述临床样品为血清、血浆、全血、痰、脑脊液、羊水、尿、胃肠内容物、头发、唾液、汗、齿龈刮取物或活体解剖组织。

15、根据权利要求9所述的方法，其特征在于：所述评价分析物和反应物之间的结合和/或反应的方法是酶联免疫吸附分析法、免疫印迹、免疫沉淀反应、放射性免疫测定、免疫染色、乳胶凝集素、间接红血球凝聚、补体结合、间接荧光免疫分析、用悬液计测量悬液法、流体细胞分析、化学发光分析、横向流体免疫测定分析、 μ -捕获分析、抑制分析、能量转移分析、亲和力分析、浊度免疫分析或时间分辨放大穴状化合物发射分析。

16、根据权利要求9所述的方法，其特征在于：所述电子转移后产生的处于基态的被氧化或还原的、具有光电化学活性的分子被再生剂还原或氧化成还原态或氧化态，可以用光再次激发。

17、根据权利要求16所述的方法，其特征在于：所述再生剂是对苯二酚。

18、一种光电化学分析仪，包括：

a) 在合适条件下可以与分析物结合或反应的反应物；

b) 附着在反应物、分析物或分析物类似物上的具有光电化学活性的分子；其中，具有光电化学活性的分子，有如下的分子式： $M [(L_1)_m(L_2)_n(L_3)_o(P_1)_p(P_2)_q(P_3-R-X)]$

其中，M是金属离子； L_1 、 L_2 、 L_3 是M的单配位基配体； P_1 、 P_2 、 P_3 是M的多配位基配体；R是间隔基；X是能够将光电化学标记物连接到底物上的化学活性基团；m、n、o、p和q是零或正整数；所有配体提供的价键总数等于M的配位数

c) 适合分析受激发的、具有光电化学活性的分子与电极之间的电子转移所产生的电流的电极；

d) 将被氧化或还原的光电化学活性分子转化到可以用光再次激发的基态的再生剂；

e) 电化学池，该池的壁可以让能够激发具有光电化学活性分子的光透过；

f) 发光装置，该装置具有能激发有光电化学活性分子的光源。

19、根据权利要求 18 所述的分析仪，其特征在于：所述分析仪还包括分离所述发光装置光谱的装置。

20、根据权利要求 19 所述的分析仪，其特征在于：所述分离光谱的装置包括一个单色仪或一个滤光器。

21、根据权利要求 18 或 19 或 20 所述的分析仪，其特征在于：所述光源为中空的阴极灯、氙弧灯、氙汞灯、金属卤化物灯、发光二极管或激光。

22、根据权利要求 18 或 19 或 20 所述的分析仪，其特征在于：所述仪器还包括区分受激发的、具有光电化学活性分子的电子转移和其它电子转移的装置。

23、根据权利要求 22 所述的分析仪，其特征在于：所述区分受激发的、具有光电化学活性分子的电子转移和其它电子转移的装置包括光束断路器、过滤器、透镜和内置放大器。

24、根据权利要求 22 所述的分析仪，其特征在于：所述区分受激的具有光电化学活性分子的电子转移和其它电子转移的装置包括第一个暴露在光下的工作电极和第二个黑暗中的工作电极。

25、光电化学分析试剂盒，它包括：

a) 在合适条件下可以与分析物结合或反应的反应物；所述分析物、所述反应物、或分析物类似物中的一种或几种是用具有光电化学活性分子标记的；所述光电化学标记物，具有如下的分子式： $M [(L_1)_m(L_2)_n(L_3)_o(P_1)_p(P_2)_q(P_3-R-X)]$

其中，M 是金属离子； L_1 、 L_2 、 L_3 是 M 的单配位基配体； P_1 、 P_2 、 P_3 是 M 的多配位基配体；R 是间隔基；X 是能够将光电化学标记物连接到底物上的化学活性基团；m、n、o、p 和 q 是零或正整数；所有配体提供的价键总数等于 M 的配位数；

b) 评价分析物和反应物之间结合和/或反应的装置；所述评价包括在电极存在的情况下用光将具有光电化学活性的分子转化成激发态，并且测量受激发的、具有光电化学活性的分子与电极之间的电子转移所产生的电流。

26、根据权利要求 25 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括再生剂。

光电化学标记物和用其进行光电化学分析的方法、仪器与试剂盒

技术领域

本发明涉及标记物、用该标记物进行分析目的物的方法、分析所用的专用仪器及试剂盒，特别是涉及光电化学标记物和用该光电化学标记物进行光电化学分析的方法及专用仪器与试剂盒。

背景技术

目前，对检测和量化化学、生物化学和生物物质的快速、高度专一的方法存在着越来越多的需求。最迫切需要的是测量少量药物、代谢物、微生物和其它具有诊断价值的物质的方法。比如麻醉药、毒药、用于治疗目的的药物、激素、致病微生物，病毒、抗体、代谢物、酶和核酸等。

可以利用生物化学和生物系统中所具备的对某一物质高度专一性结合的特点，来确定目的物的存在。例如，常用的基于抗原-抗体系统、核酸杂交技术和蛋白质-配体系统等方法。在这些方法中，一般用附着在一种或多种复合物上的可观察到的标记的存在与否来表明具有诊断价值的复合物的存在。

特定标记方法通常决定了用来检测相关物质的特定系统的有效性和多功能性。优选的标记物应便宜、安全并且能被有效地附着在多种化学、生物化学和生物物质上，同时这些物质的重要的结合特性不会改变。而且，优选的标记要稳定且能给出高度特征性的信号。优选标记的检测应快速、敏感、可重现，不需要昂贵、专门的设备或人员。优选标记的量化应不受诸如温度和所分析混合物的成分等变量的影响。

已经研究出了许多种标记物，每一种都有其特有的优势，但同时也存在着不足。例如，放射性标记是多功能的，可以在非常低的浓度下检测，然而它们比较昂贵、危险，需要复杂的设备和训练有素的操作人员，而且放射性标记不能用于均相方法。由于放射性废品对公众具有潜在的危害，并且没有处理场所，对这些废品的处理也越来越引起人们的关注。同时，放射性标记的使用也很耗费时间，有时检测放射性标记需要好几天的时间。

酶标记和基于吸收的检测工具是安全的，如 ELISA，但缺乏灵敏度及长期存放的稳定性。而且，在酶免疫检测，如 ELISA 中，包括大量的分析步骤，需要很长的反应时间。荧光的有机和无机分子是安全且稳定的，但不能提供与放射同位素标记一样的灵敏度。荧光标记需用激光作为激发源，光学检测复杂，并且设备成本也是一个主要的劣势。化学发光和电化学发光可以提供较高的检测灵敏度，但也具有光学检测的缺

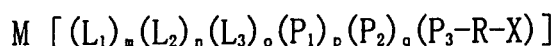
陷且具有相对较高的设备成本。

以前已经有对用于免疫测定的光电化学标记的描述。例如，美国专利 4,293,310 描述了一种仪器和方法，其中包括一种猝灭剂和一个带有发光装置的用来确定光电化学标记物质存在的电化学流体池。一旦用光激发，具有光电化学活性的标记物就会将电子转移到猝灭剂分子。随后用来自被固定在合适电势的流动池的电极的电子来还原被氧化的分子。该电子以光电流的形式测量，用光电流强度来确定系统中被标记的被测试物的数量。尽管所述方法比基于发光的检测方法所用的成像设备便宜，但该方法的检测范围是有限的，而且也受到干扰物干扰。（参考 Weber 等, Clin. Chem., 29: 1665-1672 (1983)）。

发明内容

本发明的目的是提供一种具有光电化学活性的标记物。

本发明所提供的光电化学标记物，具有如下的分子式：



其中，M 是金属离子；L₁、L₂、L₃ 是 M 的单配位基配体；P₁、P₂、P₃ 是 M 的多配位基配体；R 是间隔基；X 是能够将光电化学标记物连接到底物上的化学活性基团；m、n、o、p 和 q 是零或正整数；所有配体提供的价键总数等于 M 的配位数。

所述 M 优选为铁、钕、锌、镁或铝。

所述 L₁、L₂、L₃ 可以相同也可以不同，优选自氰化物或硫氰化物。

所述 P₁、P₂、P₃ 优选自含氮的芳香族杂环。所述含氮的芳香族杂环为联吡啶、联吡啶、联三吡啶、菲酚、酞菁染料、取代的联吡啶、取代的联吡啶、取代的联三吡啶或取代的菲酚。所述取代基团为烷基、芳基、芳烷基、羧酸酯、羧酸醛、羧酸酰胺、氰基、氨基、羟基羧基、羟基氨基、氨基羰基、脒、胍基、酰脲、含硫基团、含磷基团和 N-羟基琥珀酰亚胺的羧酸酯。

所述 R 可以是 C₂ 到 C₁₂ 烷基或聚乙二醇，但优选聚乙二醇。

所述 X 可以选自 N-羟基琥珀酰亚胺酯、巯基、环氧化物、乙醛、顺丁烯二酸酐、亚氨基酯、氨基、羧基、异硫氰酸酯、顺丁烯二酸亚胺、卤乙酰基、酰肼或磷酰胺化合物。

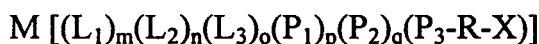
本发明的光电化学标记物可以通过化学合成方法获得，优选合成方法例子如下。首先将二氯二(2,2'-联吡啶)合钕与 4,4'-二羧酸-2,2'-联吡啶在热的碳酸氢钠水/甲醇中反应。酸化后，NaPF₆ 水溶液加入上述钕化合物。分离出的六氟磷酸盐用 N-羟基琥珀酰亚胺合成活化中间体。活化中间体可以用多种类似方法合成，也有多种结构不同但功能相似的活化中间体，用本领域的常规方法即可以得到。

本发明提供的光电化学（PEC）活性标记具有下述特征：1、PEC 标记在可见波长范围内有较强的吸收。2、PEC 标记激发态的能量水平高于电极的能量水平，确保电子转移可以发生。3、PEC 标记激发态的寿命足够长，足以使电子转移优于发光。4、PEC 标记的还原态和氧化态是稳定的。

本发明的第二个目的是提供一种安全、稳定、有效、便宜且能提供广泛检测范围的光电化学分析方法。

本发明提供的光电化学分析方法，包括：

a) 将可能含有分析物的样品与能和所述分析物在合适条件下结合和/或反应的反应物接触；所述分析物、所述反应物或分析物类似物中的一种或几种是用具有光电化学活性的分子标记的；所述光电化学标记物，具有如下的分子式：

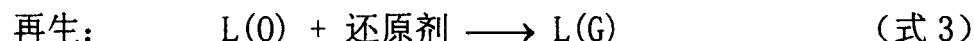
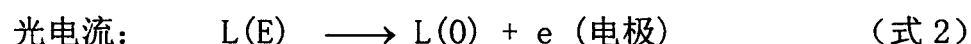
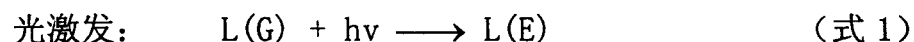


其中，M 是金属离子；L₁、L₂、L₃ 是 M 的单配位基配体；P₁、P₂、P₃ 是 M 的多配位基配体；R 是间隔基；X 是能够将光电化学标记物连接到底物上的化学活性基团；m、n、o、p 和 q 是零或正整数；所有配体提供的价键总数等于 M 的配位数；

b) 评价所述分析物和所述反应物之间的结合和/或反应，确定在样品中存在所述分析物和/或所述分析物的量；所述评价为在电极存在的情况下用光将具有光电化学活性的分子转化成激发态，评价激发的具有光电化学活性的分子和电极之间电子转移所产生的电流。

用上述方法可以确定在所述样品中分析物的存在和/或分析物的数量。

当用光激发具有光电化学活性的分子时，处于基态的电子会吸收光能量，从基态 L(G) 跃迁到激发态 L(E)（如式 1 所示）。受激电子有很强活性，可以很容易地失去。例如，受激电子可能从受激分子转移到具有较低能量水平的半导体电极，从而产生光电流（如式 2 所示）。一旦受激电子离开分子，它将成为氧化态 L(O)。如果溶液中存在还原剂，光电化学分子将回到原始态（还原基态），再次参与光电化学反应（如式 3 所示）。因此，光电流是不间断的，其光电化学反应原理如图 4 所示。



所述分析物为细胞、细胞器、病毒、分子及其集合体或复合物、来自哺乳动物的样品或临床样品。所述细胞为动物细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞、重组细胞或培养细胞；所述细胞器为细胞核、线粒体、叶绿体、核糖体、内质网、高尔基体、溶酶体、蛋白酶体、分泌小泡、液泡或微粒体；所述分子为无机分子、有机分子或其复合物；所述哺乳动物为牛科、马科、鼠科、猫科动物，山羊、绵羊、兔、豚鼠、人、猴子、狗或猪等；所述临床样品为血清、血浆、全血、痰、脑脊液、羊水、尿、胃肠

内容物、头发、唾液、汗、齿龈刮取物或活体解剖组织。所述有机分子为氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、维生素（如生物素、维生素 B₁₂、叶酸、维生素 E、维生素 A、抗坏血酸维生素 C）、单糖、寡糖、脂类、激素（如胰岛素、绒毛膜促性腺激素、甲状腺素、三碘甲腺原氨酸、卵泡刺激激素、促黄体生成激素、促甲状腺激素和雌激素三醇）、抗原和半抗原（如铁蛋白、血管舒缓激肽、前列腺素和肿瘤特异性抗原）、抗体（如微粒体抗体、抗肝炎抗体和抗过敏原抗体）、癌标记、代谢物（如 3', 5'-腺苷一磷酸和 3', 5'-鸟苷一磷酸）、类固醇、固醇、药物化合物（如氨基糖苷抗生素像庆大霉素、氨基丁卡那霉素 A、紫苏霉素、鸦片生物碱和麦角碱衍生物）、专一性结合受体（如甲状腺素结合球蛋白、亲和素、内源因子、钴胺传递蛋白）、碳水化合物及其复合物。“抗体”可以以任何合适的形式存在，并且也包括其片断或衍生物。代表性的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、Fab 片断、Fab' 片断、F(ab')₂ 片断、Fv 片断、微型双功能抗体、单链抗体和由抗体片断形成的多专一性抗体。“核酸”指任何核酸, 包括 DNA（脱氧核糖核酸）、RNA（核糖核酸）或多肽核糖核酸（PNA）。但并不限于此, 还包括 DNA、RNA、PNA 的任何已知碱基类似物, 如 4-乙酰基胞嘧啶、8-羟基-N-6-甲基腺苷、吡丙啶基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基) 尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫脲嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、次黄嘌呤、N-6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基次黄嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N-6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫胞嘧啶、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-硫代甲基-N-6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-含氧乙酸甲基酯、尿嘧啶-5-含氧乙酸、假尿嘧啶、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-含氧乙酸甲基酯、尿嘧啶-5-含氧乙酸、假尿嘧啶、2-硫胞嘧啶和 2,6-二氨基嘌呤。

可以用任何合适的分析方式来进行本发明的光电化学分析。例如, 可以用竞争分析方式来进行。在竞争分析中, 不对样品中的反应物和分析物进行标记, 使用具有光电化学活性标记的分析物或分析物类似物。也可以用夹心分析方式来进行, 在夹心分析方式中, 不对第一种反应物和来自样品的分析物进行标记, 而是使用具有光电化学活性标记的第二种反应物。例如, 第一抗体在电极上固定, 作为检测的捕获抗体。用具有光电化学活性的分子来标记第二抗体, 用含有被检测抗原的样品接触电极和第二抗体。在电极表面完成免疫反应之后, 用含有还原剂的溶液接触电极。将一束光直接指向电极, 并且用电子设备测量所得的光电流。还可以是专一结合对的一个成员在电

极表面被固定为捕获剂，用具有光电化学活性的分子来标记另一个专一结合对成员。在加入样品和发生了专一结合反应之后，标记分子积聚在电极表面，其数量与分析物浓度相关。为了检测反应，将一束光直接指向与含有还原剂的液体接触的电极，并且测量所得的光电流。“专一性结合对”指任何物质或一类物质，它对配体有排除其它物质的专一性结合的亲和力。例如抗原和结合到其上的抗体；半抗原和结合到其上的抗体；寄生和宿主结合对；DNA 和 DNA 结合对；DNA 和寡核苷酸结合对；DNA 和 RNA 结合对均属专一性结合对。在具体应用中，专一性结合对包括与样品配体互相作用的专一性结合分析试剂，或样品以免疫化学方式对配体的结合。例如，在试剂和/或样品配体或样品对配体的结合之间将存在抗原—抗体或半抗原—抗体关系。配体和结合伴侣之间的结合交互作用是专一性结合分析的基础，包括肽、蛋白质、碳水化合物、糖蛋白、类固醇、激素、维生素、代谢物、药物试剂、其它受体和结合物质之间的结合交互作用。

所述评价分析物和反应物之间的结合和/或反应的方法可以是酶联免疫吸附分析法（ELISA）、免疫印迹、免疫沉淀反应、放射性免疫测定（RIA）、免疫染色、乳胶凝集素、间接红血球凝聚（IHA）、补体结合、间接荧光免疫分析（IFA）、用悬液计测量悬液法、流体细胞分析、化学发光分析、横向流体免疫测定分析、 μ -捕获分析、抑制分析、能量转移分析、亲和力分析、浊度免疫分析或时间分辨放大穴状化合物发射（TRACE）分析。

所述评价包括在电极和还原再生剂或氧化再生剂存在的情况下用光将具有光电化学活性的分子转化成激发态，并且测定受激分子和电极之间的电子转移所产生的电流。电子转移后产生的处于基态的被氧化或还原的光电化学活性分子被再生剂还原或氧化成还原态，可以用光再次激发。所述再生剂优选的是对苯二酚。

本发明的又一目的是提供一种用于光电化学分析的专用仪器。

一种光电化学分析仪，包括：

一种光电化学分析仪，包括：

- a) 在合适条件下可以与分析物结合或反应的反应物；
- b) 附着在反应物、分析物或分析物类似物上的具有光电化学活性的分子；其中，具有光电化学活性的分子，有如下的分子式： $M[(L_1)_m(L_2)_n(L_3)_o(P_1)_p(P_2)_q(P_3-R-X)]$
其中，M 是金属离子； L_1 、 L_2 、 L_3 是 M 的单配位基配体； P_1 、 P_2 、 P_3 是 M 的多配位基配体；R 是间隔基；X 是能够将光电化学标记物连接到底物上的化学活性基团；m、n、o、p 和 q 是零或正整数；所有配体提供的价键总数等于 M 的配位数
- c) 适合分析受激发的、具有光电化学活性的分子与电极之间的电子转移所产生的电流的电极；
- d) 将被氧化或还原的光电化学活性分子转化到可以用光再次激发的基态的再生剂；
- e) 电化学池，该池的壁可以让能够激发具有光电化学活性分子的光透过；
- f) 发光装置，该装置具有能激发有光电化学活性分子的光源。

这里，“电极”指电子导体或半导体，通过它们电流可以进入或离开介质。可以使用已知的任何电极，如窄带半导体电极和宽带半导体电极。可以是纯半导体或含添加剂的半导体。还可以是包括一个半导体或者多个半导体的混合物。一种具体的应用实例是在导电玻璃电极上涂有一层单分散的纳米晶体氧化钛薄膜。介质可以是一种电解溶液、固体、熔体、气体或真空。“电化学池”也可以叫“电化学流动池”，指两个或多个电极的结合，对它们进行安排以便全部氧化还原反应可以产生电动势，包括干池、湿池、标准池、燃料池、固体电解液池和储备池。

为了使分析仪功能更完善，所述分析仪还包括分离所述发光装置光谱的装置。所述分离光谱的装置包括一个单色仪或一个滤光器。被分离光谱的波长在 400 nm 到 800 nm 之间。

分析仪的所述光源可以选自中空的阴极灯、氙弧灯、氙汞灯、金属卤化物灯、发光二极管或激光（如氙离子激光，适合于激发含钨物质）。优选的光谱范围在 400~800nm 之间。

为了使分析更精确，所述仪器还包括区分受激的具有光电化学活性分子的电子转移和其它电子转移的装置。所述区分受激的具有光电化学活性分子的电子转移和其它电子转移的装置可以设计成包括光束断路器、过滤器、透镜和内置放大器；也可以设计成包括第一个暴露在光下的工作电极和第二个黑暗中的工作电极。

本发明的再一目的是提供一种可以完成光电化学分析的试剂盒。

光电化学分析试剂盒，它包括：

光电化学分析试剂盒，它包括：

a) 在合适条件下可以与分析物结合或反应的反应物；所述分析物、所述反应物、或分析物类似物中的一种或几种是用具有光电化学活性分子标记的；所述光电化学标记物，具有如下的分子式： $M [(L_1)_m (L_2)_n (L_3)_o (P_1)_p (P_2)_q (P_3-R-X)]$

其中，M 是金属离子； L_1 、 L_2 、 L_3 是 M 的单配位基配体； P_1 、 P_2 、 P_3 是 M 的多配位基配体；R 是间隔基；X 是能够将光电化学标记物连接到底物上的化学活性基团；m、n、o、p 和 q 是零或正整数；所有配体提供的价键总数等于 M 的配位数；

b) 评价分析物和反应物之间结合和/或反应的装置；所述评价包括在电极存在的情况下用光将具有光电化学活性的分子转化成激发态，并且测量受激发的、具有光电化学活性的分子与电极之间的电子转移所产生的电流。

为了使试剂盒的功能更完善，所述试剂盒还包括再生剂。

为了便于使用者理解使用方法，所述试剂盒中还包括使用说明书。

利用本发明的方法检测分析物的优点是：1、激发源和检测信号是独立的物理参数，使得从激发源产生的干扰背景最小。2、与化学发光不同，本发明光电化学方法是用光启动的，可以通过打开或关闭光源很容易地对其进行控制。当光源关闭时，即没有光电化学反应。3、与荧光发光不同，本发明光电化学方法的光源不必是单色光。4、本发明光电化学方法的电子检测设备比基于发光检测（如荧光、化学发光和电化学发光）的设备中所用的成像设备便宜。白光激发和电子检测的结合大大降低了设备

成本。5、与其它光电化学分析相比，本发明的结果也比较好，其原因是在其它光电化学分析中产生光电流的物质是被氧化的基态标记分子。

本发明中可以通过调整电极的能量水平、再生剂的氧化还原电势、具有光电化学活性的分子和电极之间的距离，来确保测量到的受激的具有光电化学活性的分子和电极之间电子转移所产生的电流的准确性。

附图说明

图 1 为吸附在氧化钛薄膜电极上的钉三（4,4'-二羧基-2,2'-二吡啶）的光电流。

图 2 为吸附在氧化钛薄膜电极上的钉三（4,4'-二羧基-2,2'-二吡啶）的光谱。

图 3 为吸附了生物素-牛血清白蛋白的氧化钛电极的光电流反应。

图 4 为光电化学反应原理图。

具体实施方式

实施例 1、纳米结晶体氧化钛糊状物的制备

用浓缩的硝酸将水的酸度调到 pH 1。边搅拌边将四丁基钛酸酯滴加到上述水中以获得一种黄色溶液。在不断搅拌的同时加入所有四丁基钛酸酯之后，将温度升高到 80℃ 并且保持不变。溶液变成乳白色。在石英烧杯中加入 50mL 的溶液，在 230℃ 的温度下用高压灭菌装置灭菌 12 小时。用超声波将上边所形成的氧化钛纳米微粒分散，用 40% 的碳酸将其混合就可以获得氧化钛糊状物。

实施例 2、吸附了钉多吡啶的氧化钛电极的制备

用刮刀法在氧化铟锡导电玻璃上涂敷一层氧化钛。干燥后，在 450℃ 温度下将薄膜加热 30 分钟，然后冷却到 80℃。立即将电极浸入 1mM 完全溶解在乙醇中的钉多吡啶溶液中，在黑暗中浸泡 10 小时。用乙醇冲洗掉多余的钉多吡啶。

实施例 3、光电流测量

在基于时间的模式下，在 CHI 800 电化学分析仪上测量光电流。光源包括一个 500W 的氙灯和一个单色仪。矩形光电化学池是用磨光的玻璃制成的，包括一个铂对电极和一个 Ag/AgCl 参比电极。光束进入与池壁垂直的池中，在其背面作用于 TiO₂ 电极。手工拨动波长选择器，使单色仪射出的波长在 470 和 800nm 之间变化。钉多吡啶在 470nm 吸收最大，而在 800nm 无吸收。

如图 1 所示，吸附了钉三（4,4'-二羧基-2,2'-二吡啶）的氧化钛薄膜电极被放置在含有 10mM 对苯二酚/磷酸钠缓冲液的光电化学池中。在每个第 20 秒将单色仪选择器转到 470nm，在每个第 40 秒将其转到 800nm。红色迹线来自吸附了钉三（4,4'-二羧基-2,2'-二吡啶）的电极，然而黑色迹线来自未吸附的电极。

如图 2 所示, 吸附了钉三 (4, 4' -二羧基-2, 2' -二吡啶) 的氧化钛薄膜电极被放置在含有 10mM 对苯二酚/磷酸钠缓冲液的光电化学池中。单色仪选择器转到 700nm 和 380nm 之间, 并且测量相应的光电流。这样获得的光谱看起来类似于钉三 (4, 4' -二羧基-2, 2' -二吡啶) 的吸附光谱, 表明光电流是金属络合物产生的。

实施例 4、生物素标记的牛血清白蛋白 (生物素-BSA) 的制备

将 4.9mg 的生物素-NHS 溶解在 0.25mL 的 DMSO 中, 并且将其加入到溶解在 100mM、pH 值为 7.5 的磷酸钠溶液中的 5mL 的 2.5% 的牛血清白蛋白中。在室温下混合 2 小时。用一个 10K 截流管用离心法去除未反应的生物素-NHS。在 280nm 吸光率下确定 BSA 浓度。

实施例 5、钉复合物标记的亲素 (钉-亲素) 的制备

将 N-羟基琥珀酰亚胺 (23mg) 和 1-甲基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (156mg) 溶解在无水 DMF 中, 并且在冰浴中搅拌 2 分钟。加入钉二 (2, 2' -二吡啶) (4, 4' -二羧基-2, 2' -二吡啶) (9mg), 并且在冰浴中混合 5 小时。将 0.5mL 活化的钉络合物加入溶解在 5.3mL PBS (pH 值为 7.95) 中的 10mg 亲素中。在室温下轻轻地搅拌 1 小时。用 10K 截流管用离心法从标记蛋白中去除小分子。用紫外-可见分光光度计确定的标记比率是 1: 1.2 (钉: 亲素)。

实施例 6、用光电化学检测生物素-亲素的结合

在室温下通过将氧化钛电极在蛋白质溶液 (1.4mg/mL, pH 5.4) 中浸泡 2 小时, 用生物素-BSA 或 BSA 来对其进行涂敷。将一个用 BSA (没有生物素) 涂敷的电极放置在光电化学池中, 在上述实施例 3 中描述的步骤之后测量光电流。该测量可以提供背景电流。然后在室温下将其它用生物素-BSA 或 BSA 涂敷的电极用钉-亲素溶液 (1 μ M, 0.1M 磷酸钠缓冲液, pH 值为 7.5) 温育 1 小时。正如上边所描述的, 在用磷酸钠缓冲液冲洗后, 电极被用于光电流测量。用 BSA 涂敷的电极提供从钉-亲素到电极的非专一性结合的光电流, 而用生物素-BSA 涂敷的电极不但提供从钉-亲素到电极的非专一性结合的光电流, 而且也提供专一性结合的电流。专一性信号比非专一性信号强大约 6 倍 (如图 3 所示, 1 是与标记过的亲素接触的涂敷了生物素-BSA 的电极; 2 是与标记过的亲素接触的涂敷了 BSA 的电极)。

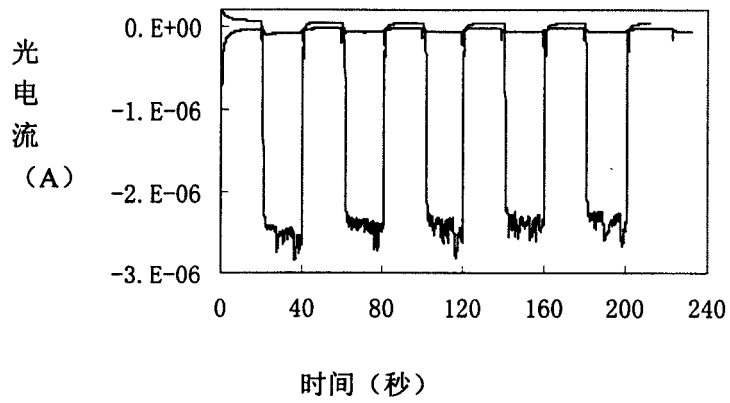


图 1

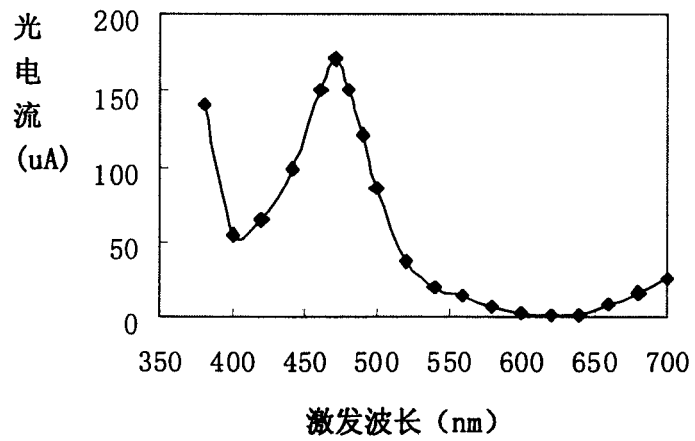


图 2

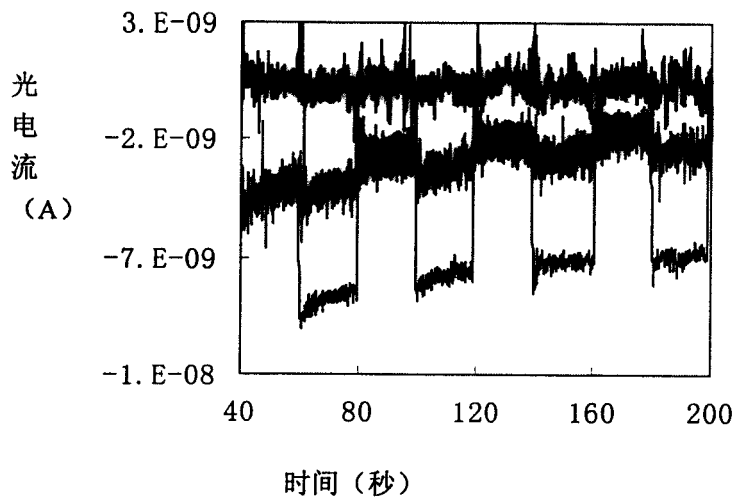


图 3

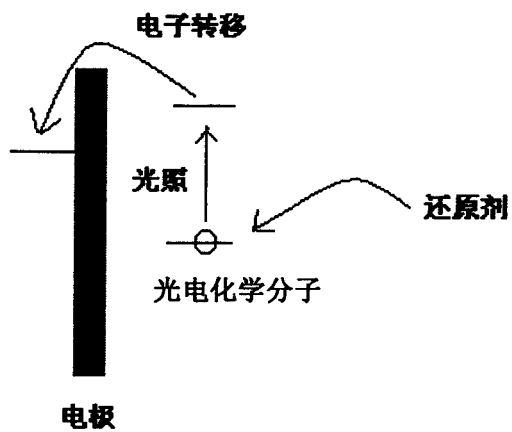


图 4

专利名称(译)	光电化学标记物和用其进行光电化学分析的方法、仪器与试剂盒		
公开(公告)号	CN1217192C	公开(公告)日	2005-08-31
申请号	CN02148800.2	申请日	2002-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	博奥生物有限公司 清华大学		
申请(专利权)人(译)	北京博奥生物芯片有限责任公司 清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京博奥生物芯片有限责任公司 清华大学		
[标]发明人	郭良宏 董栋 郑东 王福泉 杨夕强 程京		
发明人	郭良宏 董栋 郑东 王福泉 杨夕强 程京		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/58 G01N33/53 G01N21/27 G01N27/26		
CPC分类号	C12Q1/6816 G01N2458/30 G01N33/582		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1502993A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了光电化学标记物和用其进行光电化学分析的方法及仪器与试剂盒，本发明所提供的光电化学标记物，具有如下的分子式： $M[(L1)m(L2)n(L3)o(P1)p(P2)q(P3-R-X)]$ 其中，M是金属离子；L1、L2、L3是M的单配位基配体；P1、P2、P3是M的多配位基配体；R是间隔基；X是能够将光电化学标记物连接到底物上的化学活性基团；m、n、o、p和q是零或正整数；所有配体提供的价键总数等于M的配位数。本发明提供的光电化学分析方法，包括：a)将含分析物的样品与反应物接触；所述分析物、反应物或分析物类似物中的一种或几种是用具有光电化学活性的分子标记的；b)评价所述分析物和所述反应物之间的结合和/或反应。

光
电
流
(A)

