



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102812348 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201080059252. 1

(22) 申请日 2010. 12. 16

(30) 优先权数据

61/289, 053 2009. 12. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 06. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2010/000472 2010. 12. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/078794 EN 2011. 06. 30

(73) 专利权人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡市

(72) 发明人 许健威 奥利沃·马利尼

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

代理人 张淑珍 王维玉

(51) Int. Cl.

G01N 21/65(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2005089901 A1, 2005. 04. 28, 参见说明书第 42-46 段, 61-64 段及附图 1B 和附图 3.

CN 1930475 A, 2007. 03. 14, 全文.

CN 1934438 A, 2007. 03. 21, 全文.

Katrin Kneipp 等. Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering(SERS). 《Physical review E》. 1998, 第 57 卷 (第 6 期), 全文.

审查员 程莉莉

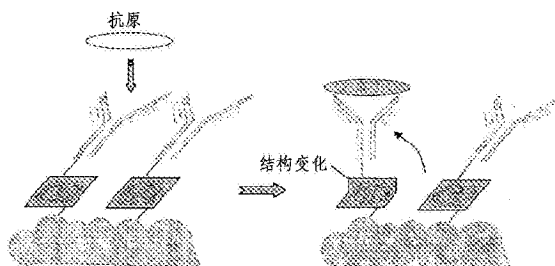
权利要求书2页 说明书14页 附图14页

(54) 发明名称

基于 SERS 的分析物检测

(57) 摘要

本发明涉及通过表面增强拉曼光谱(SERS)对分析物进行检测的方法,所述方法包括:使分析物与至少一种分析物结合分子相接触,所述分析物结合分子通过拉曼活性分子接头附着至使拉曼散射增强的金属衬底表面;以及对来自所述复合体的表面增强拉曼信号进行检测。另一方面,本发明涉及适用于所发明的基于 SERS 的分析物检测方法的缀合物和生物传感器。



1. 使用表面增强拉曼光谱对一种或多种分析物进行检测的方法,所述方法包括:
 - 使一种或多种分析物与包含至少一种分析物结合分子的缀合物相接触,所述分析物结合分子通过拉曼活性分子接头附着至使拉曼散射增强的金属衬底表面;以及
 - 对来自所述缀合物的表面增强拉曼光谱中的峰位移进行检测,作为分析物结合事件的指示,其中,所述缀合物的表面增强拉曼光谱中的峰位移与分析物的量相关。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述一种或多种分析物包含于样品中,并且所述检测在体外进行。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,在包含所述分析物的体液中对所述一种或多种分析物进行检测。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其中,所述体液选自于由血浆、血清、血液、淋巴液、Liquor 或尿所组成的组。
5. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述一种或多种分析物选自于由蛋白、肽、核酸、碳水化合物、脂质、细胞、病毒、小分子、或半抗原所组成的组。
6. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述至少一种分析物结合分子特异性地结合所述一种或多种分析物。
7. 如权利要求 6 所述的方法,其中,所述至少一种分析物结合分子选自于由抗体、抗体片段或抗体样分子所组成的组。
8. 如权利要求 6 所述的方法,其中,所述至少一种分析物结合分子为单克隆抗体或多克隆抗体。
9. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述方法为用于检测多于一种分析物的多元方法,其中在接触步骤中,使一种或多种分析物与包含多于一种的分析物结合分子的缀合物相接触,所述分析物结合分子通过拉曼活性分子接头附着至使拉曼散射增强的金属衬底表面。
10. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述至少一种分析物结合分子共价偶联至通过共价相互作用附着至所述衬底表面的拉曼活性分子接头。
11. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述拉曼活性分子接头选自于由下列物质所组成的组:6-巯基嘌呤、8-氮杂-腺嘌呤、N-苯甲酰基腺嘌呤、2-巯基-苯并咪唑、4-氨基-吡唑 [3,4-d] 嘧啶、玉米素、亚甲基蓝、9-氨基-吡啶、溴化乙锭、俾斯麦棕 Y、N-苄基-氨基嘌呤、硫堇醋酸盐、3,6-二氨基吡啶、6-氰基嘌呤、4-氨基-5-咪唑-甲酰胺盐、1,3-二亚氨基异吡啶、罗丹明 6G、结晶紫、碱性品红、苯胺蓝二铵盐、N-[(3-(苯胺基亚甲基)-2-氯-1-环己烯-1-基)亚甲基]苯胺单盐酸盐、0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐、9-氨基苄盐、碱性蓝、1,8-二氨基-4,5-二羟基蒽醌、原黄素半硫酸盐水合物、2-氨基-1,1,3-三氰基丙烯、变胺蓝 RT 盐、4,5,6-三氨基嘧啶硫酸盐、2-氨基-苯并噻唑、三聚氰胺、3-(3-吡啶基甲基氨基)丙腈、磺胺嘧啶银(I)、吡啶黄素、4-氨基-6-巯基吡唑 [3,4-d] 嘧啶、2-氨基嘌呤、腺嘌呤硫醇 FAD 氟腺嘌呤、4-氨基-6-巯基吡唑 [3,4-d] 嘧啶、罗丹明 110、腺嘌呤、5-氨基-2-巯基苯并咪唑、吡啶橙盐酸盐、醋酸甲酚紫、中性吡啶黄素、溴甲菲啶、5,10,15,20-四(N-甲基-4-吡啶基)卟啉四(对甲苯磺酸盐)、5,10,15,20-四(4-三甲基氨基苯基)卟啉四(对甲苯磺酸

盐)、3,5-二氨基吡啶盐酸盐、碘化丙啶(3,8-二氨基-5-(3-二乙基氨基丙基)-6-苯基菲啶鎓盐碘化甲碘化物)、反式-4-[4-(二甲基氨基)苯乙烯基]-1-甲基吡啶鎓碘化物;以及4-((4-(二甲基氨基)苯基)偶氮基)苯甲酸、其琥珀酰亚胺酯;或上述物质的衍生物。

12. 如权利要求11所述的方法,其中,所述拉曼活性分子接头为含有硫醇基团的化合物。

13. 如权利要求12所述的方法,其中,所述拉曼活性分子接头为6-巯基嘌呤。

14. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述至少一种分析物结合分子通过形成酰胺键而共价偶联至所述拉曼活性分子接头。

15. 如权利要求14所述的方法,其中,1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺被用作偶联剂。

16. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述金属衬底表面由贵金属或铜制成。

17. 如权利要求16所述的方法,其中,所述贵金属选自于由银和金所组成的组。

18. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述衬底为纳米颗粒。

19. 如权利要求18所述的方法,其中,所述纳米颗粒包被有贵金属或由贵金属组成。

20. 如权利要求19所述的方法,其中,所述贵金属选自于由银和金所组成的组。

21. 如权利要求19所述的方法,其中,所述纳米颗粒包被有银膜。

22. 如权利要求19所述的方法,其中,所述纳米颗粒为用柠檬酸盐稳定化的金纳米颗粒。

基于 SERS 的分析物检测

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 12 月 22 日提交的美国临时申请号 61/289,053 的优先权,并将其内容以引用的方式整体并入本文用于所有目的。

技术领域

[0003] 本发明归于光谱学和分子诊断学领域,涉及通过在光谱学上检测抗原 / 抗体结合事件(binding events) 而由表面增强拉曼光谱(SERS) 对分析物进行检测的方法。具体而言,本发明针对使用表面增强拉曼光谱(SERS) 对分析物进行检测的方法,所述方法包括:使分析物与至少一种分析物结合分子相接触,该分析物结合分子通过拉曼活性分子接头(Raman-active molecular linker) 附着至使拉曼散射增强的金属衬底表面;对来自所述复合体(compound) 的表面增强拉曼信号(surface enhanced Raman signal) 进行检测。另一方面,本发明涉及适用于所发明的基于 SERS 的分析物检测方法的缀合物和生物传感器。

背景技术

[0004] 在医疗实践中,对疾病进行的鉴别不仅需要识别症状,而且需要检测出明确地表明其存在的具体特征。此外,在无症状群体中进行的早期检测具有极度重要性:不仅促进了早期治疗,而且降低了健康维护成本。

[0005] 通常,只能想到通过对生物流体(如血液、尿和脑脊液) 分析其循环的疾病相关生物标志物(circulating disease-related biomarkers), 来筛选疾病发展的标记(生物标志物)。很少能够通过仅对一种单一的生物标志物的检测而实现精确的诊断,为了可靠的结果必须对一组标志物进行分析,如在多元(multiplexed) 分析中进行。此外,对多种生物标志物在疾病各阶段的表达模式进行监测不仅能够有助于预后(prognosis), 而且能够使得对疾病的发展情况进行跟踪。

[0006] 现在,大多数的蛋白生物标志物分析均基于免疫分析法。这些方法通常提供了由聚合物或玻璃制成的平台,该平台承载着处于不同位置(界限清楚) 的数种固定化抗体。这些分析包括:将所述平台暴露于样品,随后用一种或两种另外的抗体进行孵育,在上述两步之间进行若干个洗涤和封闭步骤(blocking steps) 以增强分析结果的特异性。通常通过荧光检测、发色团吸收或比色读数来进行检测。重要的是,传统的免疫分析法(即 ELISA 和荧光免疫分析法) 在每次分析中能检测出的蛋白数量方面其可扩展性有限。这归因于能够并入单个分析平台中的感应区(sensing area) 的数量有限(原因是:由于衍射极限而在读出系统中可实现的最小激光光斑尺寸),这对于感应区的有用尺寸强加了值不小于 200nm 的下限,尽管实际中该尺寸通常在 1 μ m 的范围内。尽管可争辩有可能对荧光免疫分析法进行改进、从而通过向各感应区中并入多于一种的荧光基团(例如,通过扩展每个感应区所使用的蛋白捕获荧光信标的数量) 来对多种分析物(即蛋白 / 生物标志物) 同时进行检测,但令人遗憾的是,宽的荧光带宽(60-90nm) 使得每个感应区的可检测荧光基团的最大数量被限制至约 3 种。换句话说,在传统的免疫分析法中,每个感应区可检测的蛋白的最大数量无法

超过 3 种。尽管近些年来已经开发出了许多免疫传感器阵列,但是仍然不存在真正快速、精确和可小型化的系统。

[0007] 振动光谱技术即红外(IR)、正常拉曼和表面增强拉曼(SER)已被考虑用于分析物检测。由于近 IR 和中 IR 技术受到了来自水性介质竞争吸收的限制,拉曼光谱技术逐渐成为首选的方法。拉曼散射的一个重要方面是频移量和分子振动模式之间的相关性。由于振动模式对分子的化学性质敏感,因此探测分子振动可揭露出与其化学几何结构(chemical geometry)和与其他分子的相互作用有关的信息。虽然许多技术(如核磁共振(NMR)和 X-射线晶体学)也可以提供得知化学结构的方法,但是因为易于制备样品,通过拉曼散射对振动状态进行光学测量提供了更方便的途径。出于这一原因,对于每种分子而言独一无二的拉曼光谱在未知物质种类(species)的识别中已被用作“指纹”;并且在更感兴趣的方面,拉曼散射被用于阐明构象变化。

[0008] 然而,在生物学情况下,这些应用受到限制,主要是由于弱的敏感性和对高激光功率以及复杂仪器的需要。通过表面增强拉曼光谱(SERS)的开发克服了这些缺点中的大多数,所述 SERS 中的光谱强度通过 SERS 活性分析物分子与衬底表面(例如,铜、金或银的纳米颗粒表面)的相互作用得以极大地增强。这些增强因子达到了单分子探测的水平有许多实例(Nicholas & Ricardo, Chem. Soc. Rev., 2008, 37, 946-954)。然而,对具有此类超乎寻常的敏感性的分子进行检测仍然依赖于分子纳米颗粒集合体(ensemble)的性质,并且目前局限于某些种类的 SERS 活性分子。

发明内容

[0009] 本发明允许将基于 SERS 的检测扩展至能够对每个感应区的多个蛋白进行检测的高度多元的系统。与免疫分析法相反,该检测不需要二抗或三抗,因此,使材料损耗减到最少。此外,由于以分子指纹检测为基础,本发明既不需要有色的底物也不需要外部的标记物(labeler)。

[0010] 在另外的方面,本发明的分析设计并不需要多个洗涤步骤。事实上,无洗涤步骤或仅有一个洗涤步骤足以实现检测。

[0011] 在第一方面,本发明由此涉及使用表面增强拉曼光谱(SERS)对一种或多种分析物进行检测的方法,所述方法包括:

[0012] - 使一种或多种分析物与至少一种分析物结合分子相接触,该分析物结合分子通过拉曼活性分子接头附着至使拉曼散射增强的金属衬底表面;以及

[0013] - 对来自所述复合体的表面增强拉曼信号进行检测。

[0014] 在这一方法的各种实施方式中,复合体的表面增强拉曼信号与分析物的量相关。分析物可被包含于样品中,并且检测可在体外进行。在所发明的方法的一个实施方式中,在包含所述分析物的体液中对分析物进行检测。所述体液可选自于由血浆、血清、血液、淋巴液(lymph)、liquor 和尿所组成的组。

[0015] 在所请求保护的方案的各种实施方式中,分析物为蛋白、肽、核酸、碳水化合物、脂质、细胞、病毒、小分子或半抗原。

[0016] 在一个实施方式中,分析物结合分子与分析物特异性地结合。所述分析物结合分子可选自于由抗体、抗体片段或抗体样分子(antibody like molecules)所组成的组。如

果分析物结合分子为抗体,所述抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0017] 该方法还可以是用于对多于一种的分析物进行检测的多元方法(multiplex method),其中,在接触步骤中使用多于一种的分析物结合分子。

[0018] 在所述方法的各种实施方式中,分析物结合分子共价偶联至拉曼活性分子接头,该拉曼活性分子接头通过共价相互作用附着至衬底表面。拉曼活性分子接头化合物可选自于由如下物质所组成的组:6-巯基嘌呤、8-氮杂-腺嘌呤、N-苯甲酰基腺嘌呤、2-巯基-苯并咪唑、4-氨基-吡唑[3,4-d]嘧啶、玉米素、亚甲基蓝、9-氨基-吡啶、溴化乙锭、俾斯麦棕Y、N-苄基-氨基嘌呤、硫堇醋酸盐、3,6-二氨基吡啶、6-氰基嘌呤、4-氨基-5-咪唑-甲酰胺盐酸盐、1,3-二氨基异吲哚啉、罗丹明6G、结晶紫、碱性品红、苯胺蓝二铵盐、N-[(3-(苯胺基亚甲基)-2-氯-1-环己烯-1-基)亚甲基]苯胺单盐酸盐、0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐、9-氨基苄酸盐、碱性蓝、1,8-二氨基-4,5-二羟基蒽醌、原黄素半硫酸盐水合物、2-氨基-1,1,3-三氰基丙烯、变胺蓝RT盐、4,5,6-三氨基嘧啶硫酸盐、2-氨基-苯并噻唑、三聚氰胺、3-(3-吡啶基甲基氨基)丙腈、磺胺嘧啶银(I)、吡啶黄素、4-氨基-6-巯基吡唑[3,4-d]嘧啶、2-氨基嘌呤、腺嘌呤硫醇FAD氟腺嘌呤、4-氨基-6-巯基吡唑[3,4-d]嘧啶、罗丹明110、腺嘌呤、5-氨基-2-巯基苯并咪唑、吡啶橙盐酸盐、醋酸甲酚紫、中性吡啶黄素、溴甲菲啶、5,10,15,20-四(N-甲基-4-吡啶基)卟啉四(对甲苯磺酸盐)、5,10,15,20-四(4-三甲基氨基苯基)卟啉四(对甲苯磺酸盐)、3,5-二氨基吡啶盐酸盐、碘化丙啶(3,8-二氨基-5-(3-二乙基氨基丙基)-6-苯基菲啶鎓碘化甲碘化物)、反式-4-[4-(二甲基氨基)苯乙基]-1-甲基吡啶鎓碘化物;和4-((4-(二甲基氨基)苯基)偶氮基)苯甲酸、其琥珀酰亚胺酯;或上述物质的衍生物。优选地,拉曼活性分子接头为包含硫醇基团的化合物。在一个实施方式中,所述拉曼活性接头分子为6-巯基嘌呤。

[0019] 在所发明的方法的各种实施方式中,分析物结合分子通过形成酰胺键共价偶联至拉曼活性分子接头。对于这一偶联,可将碳二亚胺、如1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺用作偶联剂。

[0020] 在各种实施方式中,金属衬底表面由贵金属或铜制成。所述贵金属可选自于由银和金所组成的组。

[0021] 在某些实施方式中,衬底为纳米颗粒。所述纳米颗粒可包被有贵金属或由贵金属组成。所述贵金属可例如选自金和银。在一个具体的实施方式中,纳米颗粒包被有银膜。在另一具体的实施方式中,纳米颗粒为用柠檬酸盐稳定化的金纳米颗粒。

[0022] 在另一方面,本发明涉及用于对分析物使用表面增强拉曼光谱进行检测的缀合物,所述缀合物包含分析物结合分子、拉曼活性接头分子和金属衬底,其中,分析物结合分子共价偶联至拉曼活性接头分子,拉曼活性接头分子共价附着至金属衬底。在该缀合物中,分析物结合分子和/或拉曼活性接头分子和/或金属衬底可如上文所定义,并与所发明的方法相关。

[0023] 在又一方面,本发明针对使用表面增强拉曼光谱对分析物进行检测的生物传感器,所述生物传感器包含一种或多种如本发明所述的缀合物。该生物传感器可进一步包含衬底,其中,纳米颗粒粘附至衬底。在各种实施方式中,该生物传感器被装配用于体内和/或体外用途。分析物可为蛋白、肽、核酸、碳水化合物、脂质、细胞、病毒、小分子或半抗原。

[0024] 在另一方面,本发明涉及本发明的生物传感器用于分析物检测的用途。该检测可在体内或体外进行。

附图说明

[0025] 图 1 示意性地示出基于 SERS 的纳米级传感器的原理。

[0026] 图 2 示意性地示出基于 SERS 的多元纳米级传感器的原理。

[0027] 图 3 为用于 SERS 测量的实验设备的示意图。

[0028] 图 4 显示出来源于如本发明所述传感器的 SERS 光谱,使用 6-巯基嘌呤(6-MP)作为拉曼活性接头分子。

[0029] 图 5 显示出基于 SERS 的传感器随抗原浓度变化的响应曲线。

[0030] 图 6 显示出以 100% 功率、10s 采集和 1 次积累得到的洁净衬底的光谱。三条曲线代表了三次测量 A、B 和 C 的光谱。

[0031] 图 7 显示出以 10% 功率、30s 采集和 2 次积累得到的包被有 6-MP 的 Au IME 衬底的光谱。三条曲线代表了三次测量 A、B 和 C 的光谱。

[0032] 图 8 显示出以 10% 功率、30s 采集和 2 次积累得到的包被有 6-MP-抗 p53 的 Au IME 衬底的光谱。三条曲线代表了三次测量 A、B 和 C 的光谱。

[0033] 图 9 显示出在 p53 存在的情况下,以 10% 功率、30s 采集和 2 次积累得到的包被有 6-MP-抗 p53 的 Au IME 衬底的光谱。三条曲线代表了三次测量 A、B 和 C 的光谱。

[0034] 图 10 显示出以 10% 功率、30s 采集和 2 次积累得到的包被有 6-MP-抗 p53 的 Au IME 衬底(冲洗后)的光谱。三条曲线代表了三次测量 A、B 和 C 的光谱。

[0035] 图 11 显示出图 7、图 8、图 9 和图 10 的所有“A”光谱的层叠。当加入抗 p53 和 p53 时没有观察到新的峰。

[0036] 图 12 显示出缀合有抗 p53 的生物传感器各自的光谱,三次测量为 a) A、b) B 和 c) C。

[0037] 图 13 显示出缀合有抗 p53 并用 p53 孵育的生物传感器各自的光谱,三次测量为 a) A、b) B 和 c) C。

[0038] 图 14 显示出在用 PBS 对生物传感器进行冲洗后,缀合有抗 p53 并用 p53 孵育的生物传感器各自的光谱,三次测量为 a) A、b) B 和 c) C。

[0039] 图 15 显示出图 12、图 13 和图 14 经叠加后的光谱。

具体实施方式

[0040] 当分子与携带低于其第一电子跃迁的光子能量的单色光相互作用时,可发生两种光学过程。在第一种占主导地位的过程中,大部分的入射光被弹性散射,而光子能量未被吸收;这被称为瑞利散射(Rayleigh scattering)。第二种相对较弱的过程涉及少量的入射光子能量被分子系统吸收,然后该分子系统经历从一种振动状态到另一振动状态的转变,接下来以从入射频率所“迁移”的频率进行随后的光的二次发射,这一光学作用在传统上被称为拉曼散射。

[0041] 拉曼散射的一个重要方面是频移量和分子振动模式之间的相关性,这里,振动模式是指分子振动的“方式”。由于振动模式对分子的化学性质敏感,因此探测分子振动可揭

露出与其化学几何结构有关的信息。虽然许多技术(如核磁共振(NMR)和 X-射线晶体学)也可以提供得知化学结构的方法,但是因为易于制备样品,通过拉曼散射对振动状态进行光学测量提供了更方便的途径(Garman E & Sweet RM, *Methods Mol Biol.*, 2007, 364, 63-94; Chen J & Brooks CL, *Prot.*, 2007, 67 (4), 922-930)。出于这一原因,对于每种分子独一无二的拉曼光谱在未知物质种类的识别中已被用作“指纹”;并且在更感兴趣的方面,拉曼散射被用于阐明构象变化。

[0042] 尽管其具有高特异性,但由于拉曼散射的低效率,拉曼光谱的用途受到限制。据估计,每 10^6 - 10^8 个散射光子中仅有 1 个为拉曼散射,这导致拉曼信号非常弱。

[0043] Fleischman 等在 1974 年首次观察到了表面增强拉曼光谱(SERS),对于吸附在电化学粗糙的银电极上的吡啶得到了非常强的拉曼信号(Fleischman M 等, *Chem. Phys. Lett.*, 1974, 26, 123)。对于引起拉曼散射中的这一增强作用(可高达未增强信号的 10^{14} 倍)而言,有两种机制已被广泛接受(Kneipp K 等, *Chem. Rev.*, 1999, 99 (10), 2957-2976)。这两种机制为电磁增强作用和化学增强作用。

[0044] 电磁增强作用占到了上述增强作用中的大多数(其因子为 10^4 - 10^7),由金属表面吸附的或非常接近于金属表面的分析物与激光束在金属中激发的表面等离子体激元场(surface plasmon fields)之间的相互作用产生(Moskovits M, *J. Raman Spectro.*, 2005, 36 (6-7), 485-496)。位于金属表面的传导电子显示出侧向运动自由度,这是由于它们仅仅受到“主体(bulk)”金属一侧的正电荷的限制。当光与这些电子相互作用时,它们一起振荡,这一振荡被称为表面等离子体激元(surface plasmon)。在粗糙表面上,振荡被局域化并垂直于表面平面,产生局部放大的电磁场,这成为 SERS 作用的原因。

[0045] 局域表面等离子激元(LSP)具有使光的吸收和散射最有效地发生的共振频率。这一频率取决于表面的性质(尺寸、粗糙度、形状、颗粒间距和介电环境)和金属(Kelly KL 等, *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107 (3), 668-677)。这在 SERS 衬底的制造中具有重要性,因为人们会想要操控共振频率来接近用以确保最大增强作用的激发频率(Haynes CL & Van Duyne RP, *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107 (30), 7426-7433)。

[0046] 化学增强作用被认为对总的增强作用仅贡献了 10 - 10^2 的数量级(Liang EJ & Kiefer W, *J. Raman Spectro.*, 1996, 27 (12), 879-885)。化学增强作用涉及:分析物和金属表面之间的电子耦合,所述电子耦合改变了分子的极化度;以及在拉曼散射中作为共振中间体的表面物质种类的形成。同时,人们已经提出了分析物和金属之间的电荷转移机制。

[0047] SERS 衬底通常是指良好设计的金属纳米结构,分析物吸附在该金属纳米结构上用于进行 SERS 采集(acquisition)。存在着三类 SERS 衬底:粗糙的金属表面;胶态金属纳米颗粒;和平面金属结构,例如在平面衬底、如玻璃上支持的金属纳米颗粒阵列(Vo-Dinh T, *Trac-Trends. Anal. Chem.*, 1998, 17 (8-9), 557-582; Baker GA & Moore DS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 382 (8), 1751-1770)。如上所述,作为 SERS 增强作用的原因的 LSP 高度依赖于 SERS 衬底的表面特征,使得 SERS 成为表面敏感技术。

[0048] 由于蛋白为弱的拉曼散射体,使用 SERS 无法容易地检测到它们与衬底的结合。然而,本发明的发明人等发现,使用基于 SERS 的纳米级应力传感器可对蛋白进行检测。在这一装置(setup)中,将分析物结合分子(如抗体)偶联至固定有 SERS 活性物质的衬底。作为分析物结合事件的结果,通过使 SERS 活性物质与衬底和 / 或抗体的键受到应力(例如拉伸

和压缩),诱导了 SERS 光谱中可检测的位移。令人惊奇的是,这使得可以对分析物结合进行高灵敏度和特异性的检测。

[0049] 因此,在第一方面,本发明针对使用表面增强拉曼光谱(SERS)对一种或多种分析物进行检测的方法,所述方法包括:

[0050] - 使一种或多种分析物与至少一种分析物结合分子相接触,该分析物结合分子通过拉曼活性分子接头附着至使拉曼散射增强的金属衬底表面;以及

[0051] - 对来自所述复合体的表面增强拉曼信号进行检测。

[0052] 本文中的术语“至少一个”或“一个或多个”可互换使用,就分子而论时是指 1 个、2 个、或 3 个以上,例如至少 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、12 个、14 个、15 个、20 个、25 个或大量分子。就此而论,术语“大量(a plurality of)”意味着多于两个,优选 3-100 个。

[0053] 本文所使用的术语“分析物结合分子”是指能够与所选择的分析物结合,从而形成由分析物结合分子和分析物组成的复合物(complex)的任何分子。优选地,这一结合是特异性的,从而使分析物和分析物结合分子之间形成特异性的复合物。

[0054] 本文所使用的“特异性地结合”和“特异性结合”意味着分析物结合分子基于对靶分子上的表位(epitope)或结合区域的识别而结合至靶分析物。相比于结合至样品中的其他化合物,分析物结合分子优选以更高的结合亲和力(binding affinity)来识别并结合至靶分子。在本发明的各种实施方式中,“特异性地结合”可意味着相比于结合至与靶分子无关的分子,抗体或其他生物分子以高出至少约 10^6 倍的亲和力、优选至少约 10^7 倍的亲和力、更优选至少约 10^8 倍的亲和力、最优选至少约 10^9 倍的亲和力结合至靶分子。一般而言,特异性结合是指比非特异性结合高出约 10^6 倍到约 10^9 倍的亲和力。在某些实施方式中,特异性结合其特征可在于比非特异性结合高出 10^9 倍的亲和力。可通过任何合适的方法对结合亲和力进行测定。这类方法是本领域已知的,包括但不限于:表面等离子体激元共振和等温滴定热法。在具体的实施方式中,分析物结合分子唯一地识别并结合至靶分析物。

[0055] 分析物结合分子可以是蛋白质分子、例如抗体(如单克隆抗体或多克隆抗体),在特异性的决定簇(determinant)或表位处免疫学意义上结合至靶分析物。术语“抗体”以广义使用,具体而言覆盖了单克隆抗体以及抗体变型或片段(例如, Fab、F(ab')₂、scFv、Fv 双体抗体(diabody)和线性抗体),只要它们显示出期望的结合活性。

[0056] 本文所使用的术语“单克隆抗体”是指从实质上均一的抗体群中得到的抗体,即,除了可能以较小的量存在的天然发生的突变外,该群包含的个体抗体是一致的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一的抗原位点。此外,与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的传统(多克隆)抗体制剂相反,各单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性之外,单克隆抗体具有以下优点:可通过杂交瘤培养合成单克隆抗体,不会受到其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示从实质上均一的抗体群中得到抗体这一特征,不应被理解为需要通过任何特定的方法生产抗体。单克隆抗体可包含“嵌合”抗体和人源化抗体。“嵌合”抗体为不同部分源自于不同动物物种的分子,例如具有来源于鼠 mAb 的可变区和人免疫球蛋白恒定区的分子。

[0057] 通过由培养物中的传代细胞系提供产生抗体分子的任何技术可得到单克隆抗体。这些技术包括但不限于:Koehler 和 Milstein 的杂交瘤技术(美国专利号 4, 376, 110)、人

B 细胞杂交瘤技术和 EBV- 杂交瘤技术。这类抗体可为包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 以及它们的任何亚类在内的任何免疫球蛋白种类。可在体外或在体内对产生 mAb 的杂交瘤进行培养。在体内产生高滴度 mAbs 使之成为非常有效的生产方法。

[0058] “多克隆抗体”为来源于用抗原或其抗原性功能衍生物(antigenic function derivative)免疫的动物血清的、非均一的抗体分子群。对于多克隆抗体的生产,可通过注射任选补充有佐剂的抗原或半抗原-载体缀合物来对宿主动物如兔子、小鼠和山羊进行免疫。

[0059] 或者,可使用单链抗体生产的技术(美国专利号 4,946,778)来生产合适的单链抗体。一般通过氨基酸桥接使 Fv 区的重链片段和轻链片段连接、产生单链多肽而形成单链抗体。

[0060] 可通过已知技术生成识别特异性表位的抗体片段。例如,这类片段包括但不限于:可通过胃蛋白酶消化抗体分子而产生的 F(ab')₂ 片段、可通过对 F(ab')₂ 片段的二硫键进行还原而生成的 Fab 片段。或者,可构建 Fab 表达库,使得可以快速且容易地鉴定具有期望的特异性的单克隆 Fab 片段。

[0061] 分析物结合分子还可为已发生修改或突变,从而以足够的结合亲和力来结合给定配体的任何其它蛋白支架(proteinaceous scaffold)。

[0062] 有用的支架的实例包括在美国专利申请 2005/0089932 或美国专利 6,682,736 中所述的支架。合适的支架的其它实例为例如在下述国际专利申请中所述的脂质运载蛋白家族(lipoprotein family)的成员:W099/16873、W0 00/75308、W0 03/029471、W0 03/029462、W0 03/029463、W0 2005/019254、W0 2005/019255 或 W0 2005/019256。

[0063] 按照上述,除脂质运载蛋白家族的成员之外,支架包括但不限于:EGF 样结构域、Kringle 结构域、I 型纤连蛋白结构域、II 型纤连蛋白结构域、III 型纤连蛋白结构域、PAN 结构域、Gla 结构域、SRCR 结构域、Kunitz/牛胰腺的胰蛋白酶抑制剂结构域、淀粉酶抑制肽、Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域、三叶草(P-型)结构域、C 型 von Willebrand 因子结构域、过敏毒素样结构域、CUB 结构域、I 型甲状腺球蛋白重复体(repeat)、A 类 LDL-受体结构域、Sushi 结构域、Link 结构域、I 型血小板反应蛋白结构域、免疫球蛋白结构域或免疫球蛋白样结构域(例如,结构域抗体或骆驼重链抗体)、C 型凝集素结构域、MAM 结构域、A 型 von Willebrand 因子结构域、促生长因子 B 结构域、WAP 型四个二硫键核心的结构域、C 型 F5/8 结构域、血红素结合蛋白结构域、SH2 结构域、SH3 结构域、层粘连蛋白型 EGF 样结构域、C2 结构域、Kappabodies、微抗体、Janusins、纳米抗体(nanobody)、adnectin、四连接素、微体(microbody)、affilin、亲合体(affibody)或锚蛋白、晶状体蛋白、打结素(knottin)、泛素、锌指蛋白、锚蛋白或锚蛋白重复蛋白或富含亮氨酸重复蛋白、avimer;以及通过人受体结构域家族的外显子改组发展出的多价 avimer 蛋白。

[0064] 如上所述,在本发明的某些实施方式中,分析物结合分子可为脂质运载蛋白家族成员的突变蛋白。在这些实施方式中的一些中,脂质运载蛋白折叠的 β -桶状结构的开口端(涵盖了脂质运载蛋白家族的天然配体结合位点)被用于形成靶分析物结合位点。蛋白的脂质运载蛋白家族的成员包括但不限于:Pieris brassicae 的胆汁三烯结合蛋白(SWISS-PROT 数据库登录号 P09464)、人泪脂质运载蛋白(SWISS-PROT 数据库登录号 M90424)、人载脂蛋白 D(SWISS-PROT 数据库登录号 P05090)、视黄醇结合蛋白(RBP)(例

如人或猪来源；人 RBP 的 SWISS-PROT 数据库登录号：P02753；猪 RBP 的 SWISS-PROT 数据库登录号：P27485)、人嗜中性明胶酶相关脂质运载蛋白(hNGAL, SWISS-PROT 数据库登录号 P80188)、大鼠 α_2 -微球蛋白相关蛋白(A2m, (SWISS-PROT 数据库登录号 P31052)、和小鼠 24p3/uterocalin (24p3, (SWISS-PROT 数据库登录号 P11672)、褐鼠(*Rattus norvegicus*) 的 Von Ebners 腺蛋白 2(VEG 蛋白 2；SWISS-PROT 数据库登录号 P41244)、猪(*Sus scrofa*) (pig) 的 Von Ebners 腺蛋白 2 (LCN1；SWISS-PROT 数据库登录号 P53715)、狗的主要变态反应原 Can fl 前体(ALL 1, SWISS-PROT 数据库登录号 018873)、以及烟草天蛾(*Manduca sexta*) 的虫青素 A 或虫青素 B (SWISS-PROT 数据库登录号分别为 P00305 和 Q00630)。

[0065] 分析物结合分子还可为能够与配体(一般为多肽配体或糖肽配体)形成结合复合物的结合蛋白、受体或其胞外结构域(ECD)。

[0066] 本领域技术人员将认识到,上述给出的非限制性实例描述了作为分析物结合分子的各种形式的抗体,上述非限制性实例还可以延伸至其它蛋白受体,例如重组、嵌合、杂交、截短等形式的非抗体受体。

[0067] 分析物结合分子还可以是非蛋白质受体,例如基于核酸的分子、如适体或 Spiegelmer (由 L-核糖核苷酸制成的适体)。

[0068] 在分析物结合分子为蛋白质分子的情况下,分析物结合分子可通过形成酰胺键共价偶联至拉曼活性分子接头。可通过碳二亚胺偶联实现这一共价偶联,例如使用 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺作为偶联剂。所述偶联可经由 N-端或 C-端或经由蛋白的一个或多个氨基酸侧链进行。可用于这一共价偶联的侧链包括但不限于:赖氨酸侧链、组氨酸侧链、半胱氨酸侧链、酪氨酸侧链、丝氨酸侧链、苏氨酸侧链、天冬氨酸侧链和谷氨酸侧链。

[0069] 术语“接头”或“接头分子”是指下述拉曼活性分子:将分析物结合分子连接至衬底表面,并通过 SERS 信号变化来促进对分析物进行的检测,该分析物与分析物结合分子特异性结合。拉曼活性分子与衬底表面相互作用,并因此提供了 SERS 信号。原则上,可使用满足下述条件的任何分子:与拉曼活性表面相互作用时可生成 SERS 信号,并且因为由结合至分析物结合蛋白的分析物所引起的分子应力,产生 SERS 信号变化。拉曼活性分子接头可选自于各种已知的拉曼活性化合物,所述拉曼活性化合物包括但不限于:6-巯基嘌呤、8-氮杂-腺嘌呤、N-苯甲酰基腺嘌呤、2-巯基-苯并咪唑、4-氨基-吡唑 [3, 4-d] 嘧啶、玉米素、亚甲基蓝、9-氨基-吡啶、溴化乙锭、俾斯麦棕 Y、N-苄基-氨基嘌呤、硫堇醋酸盐、3, 6-二氨基吡啶、6-氰基嘌呤、4-氨基-5-咪唑-甲酰胺盐酸盐、1, 3-二亚氨基异吲哚啉、罗丹明 6G、结晶紫、碱性品红、苯胺蓝二铵盐、N-[(3-(苯胺基亚甲基)-2-氯-1-环己烯-1-基)亚甲基]苯胺单盐酸盐、0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N, N', N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐、9-氨基苄盐酸盐、碱性蓝、1, 8-二氨基-4, 5-二羟基蒽醌、原黄素半硫酸盐水合物、2-氨基-1, 1, 3-三氰基丙烯、变胺蓝 RT 盐、4, 5, 6-三氨基嘧啶硫酸盐、2-氨基-苯并噻唑、三聚氰胺、3-(3-吡啶基甲基氨基)丙腈、磺胺嘧啶银(I)、吡啶黄素、4-氨基-6-巯基吡唑 [3, 4-d] 嘧啶、2-氨基嘌呤、腺嘌呤硫醇 FAD 氟腺嘌呤、4-氨基-6-巯基吡唑 [3, 4-d] 嘧啶、罗丹明 110、腺嘌呤、5-氨基-2-巯基苯并咪唑、吡啶橙盐酸盐、醋酸甲酚紫、中性吡啶黄素、溴甲菲啶、5, 10, 15, 20-四(N-甲基-4-吡啶基)卟啉四(对甲苯磺酸盐)、5, 10, 15, 20-四(4-三甲基氨基苯基)卟啉四(对甲苯磺酸盐)、3, 5-二氨基吡啶盐酸盐、碘化丙啶(3, 8-二

氨基-5-(3-二乙基氨基丙基)-6-苯基菲啶鎓碘化甲碘化物)、反式-4-[4-(二甲基氨基)苯乙烯基]-1-甲基吡啶盐碘化物;和4-((4-(二甲基氨基)苯基)偶氮基)苯甲酸、其琥珀酰亚胺酯;以及上述物质的衍生物。“衍生物”是指结构上与母体化合物密切相关的经修饰的化合物。优选的衍生物为经过修饰从而包含硫醇(SH)基团的化合物。所述硫醇基团使得接头分子共价偶联至金属表面。因此,在本发明方法包括的实施方式中,拉曼活性分子接头通过共价相互作用附着至衬底表面。

[0070] 术语“分析物”、“靶化合物”、“靶分子”或“靶”在本文中可互换使用,是指可通过结合至结合分子而在分析中被检测的任何物质;在一个实施方式中,上述物质可存在于样品中。因此,分析物可为存在其天然抗体或可制备出其抗体的任何物质,但不限于此。例如,分析物可为抗原、蛋白、多肽、核酸、半抗原、碳水化合物、脂质、细胞或任何其它各种生物或非生物分子、复合物或其组合。通常,分析物将会是来源于生物来源(如细菌样品、真菌样品、病毒样品、植物样品或动物样品)的蛋白、肽、碳水化合物或脂质。此外,然而,靶还可以是小的有机化合物,例如药物、药物代谢物、染料或在样品中存在的其它小分子。

[0071] 本文所使用的术语“样品”是指一份材料,通常是指来源于生物材料的生物基质、水性溶液或水性悬浮液。通过本发明的方法对分析物的存在进行分析的样品包括:例如细胞、组织、匀浆、裂解物、提取物和经纯化或部分纯化的蛋白、和其它生物分子;以及上述物质的混合物。

[0072] 典型地用于本发明方法中的样品的非限制性实例包括:人和动物的体液,如全血、血清、血浆、脑脊液、痰液、支气管冲洗液、支气管吸出物、尿、精液、淋巴液,以及呼吸道、肠道和生殖泌尿道的各种外分泌物、泪、唾液、乳汁、白血球、骨髓瘤等;生物流体,如细胞培养物上清液;可固定或未固定的组织标本;以及可固定或未固定的细胞标本。本发明方法中使用的样品将基于分析形式以及待分析的组织、细胞、提取物或其它材料(特别是生物材料)的性质而变化。对来自细胞或样品的蛋白提取物进行制备的方法是本领域公知的,并可被容易地修改,从而得到与本发明的方法相容的样品。对体液的检测也可以在体内进行,即,在不用首先收集样品的情况下进行。

[0073] “肽”泛指通过肽键连接的氨基酸短链。一般情况下,肽包括具有约2-100个、更典型地约4-50个、最常见约6-20个氨基酸的氨基酸链。“多肽”泛指通常比肽更长的、单独的直链或支链氨基酸序列。“多肽”通常在长度上包含至少约20-1000个氨基酸、更典型地至少约100-600个氨基酸、通常至少约200到约500个氨基酸。包括在内的还有一种具体氨基酸的均聚物,例如聚赖氨酸。“蛋白”包括单条多肽,还包括多条多肽链的复合物,所述多条多肽链可以相同或不同。

[0074] 蛋白中的多条链可通过二级结构、三级结构和四级结构以及氨基酸序列一级结构进行表征,多条链可以例如通过二硫键连在一起,并且可包含合成后修饰,例如但不限于糖基化作用、磷酸化作用、截短或其它加工。

[0075] 举例来说,诸如IgG蛋白的抗体一般由通过二硫键连在一起的四条多肽链(即,两条重链和两条轻链)组成。此外,蛋白可包含另外的组分,例如关联金属(associated metal)(例如,铁、铜和硫)或其它部分。肽、多肽和蛋白的定义包括但不限于:生物学上的活性和非活性形式;变性和天然形式;以及其变体形式、修饰形式、截短形式、杂交形式和嵌合形式。

[0076] 术语“接触”或“孵育”在本文中可互换使用，通常是指使一种组分、试剂、分析物或样品接近另一种。例如，接触可包括将包含分析物结合蛋白或其缀合物的溶液与样品混合。包含一种组分、试剂、分析物或样品的溶液还可包含其它组分或试剂、如二甲基亚砜(DMSO)或去污剂，所述其它组分或试剂促进混合、相互作用、摄取或对组分、试剂、分析物和 / 或样品之间的接触有利的其它物理或化学现象。

[0077] 本文所使用的术语“检测”是指证实给定分子的存在的方法。实现这一目的所使用的技术是表面增强拉曼光谱(SERS)。所述检测还可以是定量的，即，包括将被检测信号与分析物的量相关联。检测包括体外检测和体内检测。

[0078] 本文所使用的术语“半抗原”是指能够被抗体识别的、小的蛋白质抗原决定簇或非蛋白抗原决定簇。一般情况下，除部分较大的物质种类之外，半抗原并不会在动物体内诱发抗体形成。例如，小的肽半抗原常常偶联至载体蛋白、如钥孔戚血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)，从而产生抗半抗原抗体应答。

[0079] “抗原”是能够在动物体内引起抗体应答并被所得到的抗体识别的大分子。抗原和半抗原两者均包含至少一个抗原决定簇或“表位”，所述抗原决定簇或“表位”是抗原或半抗原结合至抗体的区域。一般情况下，半抗原上的表位为整个分子。

[0080] 本发明的方法还可以是用于检测多于一种分析物、即两种或多种不同分析物的多元方法。这通常需要在接触步骤中使用多于一种的分析物结合分子，从而使各分析物均被特异性的分析物结合分子所结合。通过使用产生不同 SERS 信号的不同拉曼活性接头分子，可对由众多不同的“分析物结合分子：分析物”复合物得到的信号进行解析。

[0081] 金属衬底表面可由贵金属或铜制成。本文所使用的“贵金属”涉及选自于由钌、铑、银、钯、钐、铟、铂和金所组成的组的金属，优选银和金。

[0082] 衬底可以是纳米颗粒，例如包被有如上定义的贵金属或铜的纳米颗粒或者由如上定义的贵金属或铜组成的纳米颗粒。该纳米颗粒可包被有银膜，或可以用柠檬酸盐稳定化的金纳米颗粒。本文所使用的“纳米颗粒”涉及尺寸在 1-100nm 之间的颗粒。

[0083] 本发明还涵盖了用于使用表面增强拉曼光谱对分析物进行检测的缀合物，其中，这些缀合物包含如上所定义的分析物结合分子、拉曼活性接头分子和金属衬底。本文所使用的术语“缀合物”是指已连接在一起的两个或多个分子。分子相互之间的连接可以是共价或非共价的，但优选是共价的。在这类缀合物的一个实施方式中，分析物结合分子共价偶联至拉曼活性接头分子，并且拉曼活性接头分子共价附着至金属衬底。

[0084] 这些缀合物可以是检测给定分析物的试剂盒的一部分，或者缀合物组分可以与偶联剂一起形成试剂盒的一部分，这要求在使用前形成缀合物。

[0085] 本发明还涉及使用表面增强拉曼光谱对分析物进行检测的生物传感器，所述生物传感器包含一种或多种上述缀合物、特别是纳米颗粒缀合物。所述生物传感器可进一步包含具有纳米颗粒的衬底，该纳米颗粒附着至或粘着至所述衬底。所述生物传感器可被配置用于体内和 / 或体外用途。这类生物传感器的用途是本发明的又一方面。这一用途可以是体内或体外用途，并可包括使生物传感器与包含分析物的介质(例如样品或体液)接触，然后由所述传感器检测 SERS 信号。在优选的实施方式中，生物传感器被配置用于允许对多于一种的分析物进行检测的多元方法。

[0086] 图 1a 中示出了本发明的一个实施方式。在这一特定的实施方式中，将为靶向感兴

趣的特异性分析物选择的抗体(可以如上文所定义)借助于拉曼活性分子接头锚定在 SERS 活性金属纳米结构表面上。在图中示意性地展示的接头仅仅用作实例,并非是限制性的。还可使用处于某种适当排布的、不包含芳香环或包含多个芳香环的接头分子。为确保抗体牢固地附着至纳米结构,通过适当的化学反应(例如通过由零长度偶联剂 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)形成酰胺键)使抗体共价连接到接头分子的一端,同时接头分子的另一端通过硫醇基团共价附着至金属纳米结构,从而使抗体锚定至纳米结构。

[0087] 虽然可用其它合适的化合物代替不同的组分,但是这一分子排布对于当前的传感器体系的运行是决定性的。

[0088] 本发明的发明人已经观察到并证明:由于与结合相关的应力,抗原分子与其抗体的结合可诱导两个成员(即,抗体和接头分子)的结构变化。不希望受任何具体理论的束缚,假定众多因子可产生这一与结合相关的应力。例如,在两个偶极类分子(dipole like molecules)之间的静电排斥和空间相互作用可产生应力。同时还表明,尽管静电排斥和立体排斥能发挥作用,构型熵能够取代(supersede)这些作用力并引起分子的重新定向/构型,随后产生应力。此外,邻近的结合分子间的水合作用力也可产生应力。发明人现在出人意料地发现,可利用这些作用力来检测抗原/抗体结合事件。在图 1b 和 1c 中示意性地示出了这一发明构思更精细的图片。

[0089] 在图 1b 给出的实例中,一开始使抗体/接头构建体以特定的角度定向。一旦抗原结合至抗体,诱导出排斥力引起抗体/接头构建体的重新定向,所述排斥力本质上可以是立体排斥力、静电排斥力、水合作用排斥力、熵排斥力。这一重新定向作用随后产生弯曲应力,并引起接头分子的内部结构变化。由于接头分子邻近 SERS-活性表面,这一重新定向作用诱导的分子内结构变化可借助于 SERS 光谱分析进行检测。在图 1c 所述的另一实施例中,一开始使抗体/接头构建体相对于 SERS-活性表面正常定向。一旦结合至抗原,邻近抗原分子间的排斥力引起抗体/接头构建体的重新定向,随后在接头结构内产生弯曲应力。正如在第一实例中,这一应力还可通过 SERS 光谱分析进行间接测定。

[0090] 对于当前的实施方式,对结合事件的检测很明显可以不需要洗涤步骤,这是因为样品介质内未结合的抗原或或污染物并没有处于 SERS 活性表面上的等离子体激元近场可及的范围内,因而它们的拉曼信号不会被放大,因此与接头信号相比可以忽略不计。当前设计提供的另一优点是接头的拉曼光谱的独特性,这使得对拉曼本底加以区别,从而改进了整个体系的敏感性。

[0091] 在图 2a 中示出了当前发明的另一实施方式。这一实施方式涉及高度多元的基于 SERS 的纳米级应力传感器用于蛋白检测。本发明人发现,因为没有显著的光谱重叠,这一传感器可以比在先的荧光检测方法更加小型化。SERS 光谱中窄的峰宽意味着可将信号串扰(signal crosstalk)减至最少,从而允许同时测量将于单个激光光斑内进行的多个结合事件。因此,当前的设计对于高度多元的感应平台而言是可扩展的。

[0092] 在这一具体实施方式中,感应区被进一步分成数个区域,各区域荷载有特异性的抗体/接头构建体。举例来说,在图 2a 中示出了三种不同的抗体/接头构建体。应当注意的是,三种抗体/接头构建体中的每种都是由不同的抗体和接头分子组成,从而使每个感应区可同时靶向高达 3 种抗原。在这一具体实施方式的一方面,感应区内的各子区域(sub-regions)不需要在尺寸上与激光光斑相仿。事实上,各子区域可比激光光斑更小,从

而使得在单个激光光斑内可同时探测多于一个的事件(参见图 2a 右侧的图)。这可以通过以下事实成为可能:不同接头分子的 SERS 光谱通常不会显著地重叠,因此可在计算上加以区分。事实上,只要接头的 SERS 光谱可加以区分,可由一个单独的激光光斑同时探测多于三个的结合事件。因此,这一实施方式为高度多元蛋白感应体系提供了可能性。

[0093] 其它实施方式在下述非限制性实施例的范围之中。

[0094] 实施例

[0095] 实施例 1:化学品

[0096] 从 Sigma Aldrich 得到 6-巯基嘌呤(6-MP)一水合物和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)。分别从 Invitrogen 和 1stBASE 得到甘氨酸和磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH7.4)。经纯化的小鼠抗人 p53 (0.5mg/ml)和重组人 p53 (10 μg, 处于 100 μL 中)购自 BD Biosciences Pharmingen。在这一实验中的使用的金 SERS 衬底通过电子束微影术(e-beam lithography)制造。

[0097] 实施例 2:将 6-MP 偶联至 SERS 衬底

[0098] 将 15.2mg 的 6-巯基嘌呤(6-MP)溶于 PBS 中,制得约 10mM 的溶液。将洁净的 Au IME 衬底浸入这一溶液中 1h,然后用去离子水冲洗并放置至干燥。在用 6-MP 处理前和处理后,得到拉曼光谱。

[0099] 实施例 3:将抗人 p53 固定至 6-MP 包被的 SERS 衬底上

[0100] 向 0.5ml PBS 中加入 4 μL 抗人 p53。通过将 2.4mg EDC 溶于 20ml PBS 中,制备 650 μM 的 EDC 溶液。向处于 PBS 中的抗人 p53 中加入 5 μL 的 EDC 溶液。将 6-MP 包被的 SERS 衬底在室温下浸入这一溶液中 2h,之后用 PBS 将该衬底彻底洗涤并简单地干燥。

[0101] 实施例 4:SERS 测量

[0102] 向 20 μL 的 PBS 中加入 2 μL 的 p53。将这一溶液在室温下加至衬底并孵育 30min。然后进行 SERS 测量。之后,将衬底用去离子水彻底冲洗,并在 PBS 中进行 SERS 测量。

[0103] 在图 3 中示出了实验设备的方案。简单来说,使用中性密度滤光片(Edmund Inc.)将 10mW 的 He-Ne 632.8nm 激光减弱至约 5mW。将同时起到光束扩展器和空间滤光片作用的一组镜片用于生产 7mm (Ø) 的均匀光束。经由分色镜(dichroic mirror)并通过 Olympus 40×、0.90NA 显微镜物镜,将所得到的光束聚焦至 SERS 应力传感器的感应区上。通过双面胶带将衬底固定至载玻片上。将 20 μL p53 溶液滴加至衬底上,用盖玻片覆盖,然后放置到拉曼系统的显微镜载物台上。样品上的激光功率经测量为 6mW。对于从 200cm⁻¹到 2000cm⁻¹收集的所有拉曼光谱,在实验中所使用的采集时间为 10s。通过同一物镜收集在传感器上生成的拉曼信号,然后聚焦进入 400 μm 光学纤维(Ocean Optics, Inc.),所述光学纤维将信号递送至单级的单色器(DoongWo, Inc.)。在这一研究中使用的光栅为 600g/mm, CCD 检测器(ANDOR Inc.)工作温度被设定为 -60°C。将 ANDOR 软件用于获取拉曼光谱和控制分光光度计。

[0104] 使用由拉曼系统制造商提供的 Wire 3.0 软件对原始的 SERS 光谱进行处理。首先进行直线基线扣除,移除任何本底荧光。使用 50% 高斯曲线进行主峰的曲线拟合,确定中心峰位置并测定峰宽和峰强度。

[0105] 在图 4 中示出了来源于 6-MP 应力传感器的示例性 SERS 光谱。很显然,由于抗体偶联至传感器表面以及分析物结合作用,没有新的峰形成,并且三条光谱的形状大体上类

似。这是因为蛋白是弱的拉曼散射体；随着分析物和金属纳米结构的分离增加，SERS 中的增强效应快速衰减。因此，来自抗 p53 抗体和 p53 抗原的贡献在与 6-MP 光谱一起时将并不显著。

[0106] 对 p53 加入前后的 SERS 峰位置进行曲线拟合，在表 1 中列出了中心波数。当加入 p53 时，在 $\sim 433\text{cm}^{-1}$ 、 $\sim 620\text{cm}^{-1}$ 、 $\sim 866\text{cm}^{-1}$ 、 $\sim 1000\text{cm}^{-1}$ 和 1290cm^{-1} 处的各峰显示出显著的正向位移，其中 $\sim 866\text{cm}^{-1}$ 和 $\sim 1000\text{cm}^{-1}$ 处的各峰表现出 $\sim 0.45\%$ 的最大位移百分比。对于 $\sim 1536\text{cm}^{-1}$ 和 $\sim 1571\text{cm}^{-1}$ 处的峰，还观察到了显著的负向位移。为理解光谱位移，有必要重温下拉曼散射的理论，并且理解通过其能级测定的、光与分子的相互作用。存在着两种类型的能级：与电子运动有关的电子能级；和与分子中的原子运动有关的振动、转动或平动能级。各电子能级具有其振动能级子集 (subset)。不同于光的吸收，拉曼散射并不要求入射光子的能量与跃迁到下一电子能级的能量相重合。取而代之的是，入射光子在能量方面通常要低得多，并且将分子从基态振动能级激发到中间虚能级。所述虚能级并不稳定，光子散射的同时分子返回到除基态外的较低振动能级。散射光子的能量对应于入射光子的能量与在振动能级间跃迁的能量之差 (拉曼位移)。因此，分子中的振动是拉曼效应的来源。通过组成原子之间的化学键将这些振动束缚在分子中。因此，在当前实验中观察到的峰位移暗示了当使 p53 结合到固定化抗 p53 抗体时，压缩或拉伸了 6-MP 内的某些键。当键被压缩或被束缚时，振动频率增加，产生较高的拉曼位移。对于被拉伸或未束缚的键来说反之亦然。从表 1 中可观察到，具有上移作用 (upshift) 的键是使 6-MP 结合至金衬底的键 (S-Au) 以及结合至抗 p53 的键 (N9)。同时，具有最大上移作用 ($\sim 865\text{cm}^{-1}$ 和 $\sim 1000\text{cm}^{-1}$) 的峰对应于 S-Au 振动。这可进行以下解释：S-Au 键成为 6-MP 与衬底的主要连接，因此，当 p53 结合时 S-Au 键经历了最大的压缩作用。

[0107] 表 1：位移峰的波段分配

位移	峰 (cm^{-1})	分配
上移	433.54	(v)S-C6, (br)pyrim
	620.42	(δ)C8-H(op), (δ)N9-H
	865.99	(br)pyrim, (δ)S-Au
	1000.04	(δ)S-Au
	1290	(v)N1-C2-N3
下移	1536.02	(v)N7-C8, (δ)C8-H, (δ)N9-H
	1571.92	(v)C2-N1, (v)C6-C5-C4, (δ)N9-H

[0109] 缩写词：v：拉伸振动；br：环呼吸振动； δ ：变形振动；op：平面外；pyrim：嘧啶。

[0110] 通过绘制 865cm^{-1} 、 1000cm^{-1} 和 1290cm^{-1} 处的峰位移随 p53 浓度的变化情况，构建对当前传感器的响应曲线。在图 5 中示出了所述曲线。这三个峰之所以被人为选定监测 p53 抗 p53 结合事件，仅仅是因为具有最显著的上移作用和相对大的强度。应当理解的是，还可以使用其它的结合敏感峰。从图 5 中可以看出，当前的传感器甚至在低至 10nM 的浓度下还能对 p53 抗原进行响应。

[0111] 在存在和不存在 p53 的情况下,于冲洗前后对洁净的衬底、6-MP 包被的衬底、抗 p53-6-MP 包被的衬底重复进行 SERS 测量。使用 100% 功率、10s 采集和 1 次积累作为设定,在传感器表面上的三个光斑处(A、B 和 C)对洁净的 Au IME 衬底进行分析。在图 6 中示出结果。之后,将衬底用 6-MP 包被,用 10% 功率、30s 采集和 2 次积累进行 SERS 测量(参见图 7)。下一步,使用 EDC 交联剂通过 6-MP 将抗 p53 抗体缀合至表面。接下来,以 10% 功率、30s 采集和 2 次积累进行生物传感器的进一步的 SERS 光谱分析。在图 8 和图 12 中示出了结果,其中,图 8 显示出三次测量的光谱叠加曲线图,而图 12a)-c) 单独地显示出各光谱,并包含峰的波数。此后,将 p53 加入到传感器中,并在 10% 功率、30s 采集和 2 次积累下记录 SERS 光谱(参见图 9 和图 13)。然后,用去离子水对表面进行彻底冲洗,并加入 PBS。使用下述参数得到 SERS 光谱:10% 功率、30s 采集和 2 次积累。图 10 和图 14 显示出这些记录的结果。显而易见的是,当向传感器表面添加抗 p53 和 p53 时,没有观察到新的峰。这在图 11 中尤其明显,图 11 表示由位置 A 的分析贯穿整个过程而得到的光谱的累积曲线图。图 15 表示在抗体缀合、p53 添加和传感器表面冲洗之后,由三次测量得到的光谱的累积曲线图。

[0112] 当 p53 结合至已固定在 Au IME 衬底上的抗 p53 抗体时,观察到了大的拉曼位移(参见图 15)。对应于 $\nu\text{C8-H}+\nu\text{N7-C8}+\nu\text{N9-C8}$ 、 $\alpha\text{C5-N7-C8}+\delta\text{N9-C8}+\alpha\text{C6-S}$ 、 $\alpha\text{S-H}$ 和 $\alpha\text{C2-H}+\delta\text{C8-H}+\alpha\text{N1-C2-N3}+\delta\text{N9-H}$ 的 ~ 866 、 ~ 947 、 ~ 1000 和 ~ 1292 峰显示出 $\sim 4-5\text{cm}^{-1}$ 最显著的位移。这些表示 6-MP 和衬底和 / 或抗体之间的键。

[0113] 当用去离子水对衬底进行冲洗并在 PBS 中取得拉曼光谱时,光谱十分类似于用 p53 孵育前的起始光谱(参见图 12、图 14 和图 15)。

[0114] 本文所述的发明可适宜地在缺少本文未特别公开的任意单个要素或多个要素、单个限制因素或多个限制因素时加以实施。因此,例如,术语“包含 / 包括 / 含有”(comprising/including/containing)等应该开放地及非限制性地理解。此外,本文使用的术语和表述被用作描述性的术语,而非限制性的术语,所述术语和表述的使用并不旨在排除这些术语和表述显示或记载的特征的任何等同特征或其一部分,但是应该认识到,在本发明请求保护的范围内的任何修改都是可以的。因此,应当明白,尽管已通过优选的实施方式和可选的特征具体公开了本发明,本领域技术人员仍可以采用此处所公开的其所包含的本发明的修改和变化,并且这些修改和变化被视为落入本发明的范围内。

[0115] 将所引用的全部文献的内容以引用的方式整体并入本文。

[0116] 本文已经对本发明进行了宽泛和一般性的描述。落入该一般性公开内容的每种范围较窄的形式和下位群组也构成本发明的一部分。这包括了利用但书和否定式限定从大类中排除了任何主题的本发明的上位说明,无论本文中是否对所排除的材料进行了具体叙述。

[0117] 其它实施方式也落入下述权利要求和非限制性实施例内。此外,一旦本发明的特征和方面是以马库什组的方式进行描述,本领域技术人员将认识到,本发明也因此将以马库什组中任意的单个成员或成员亚组的方式进行描述。

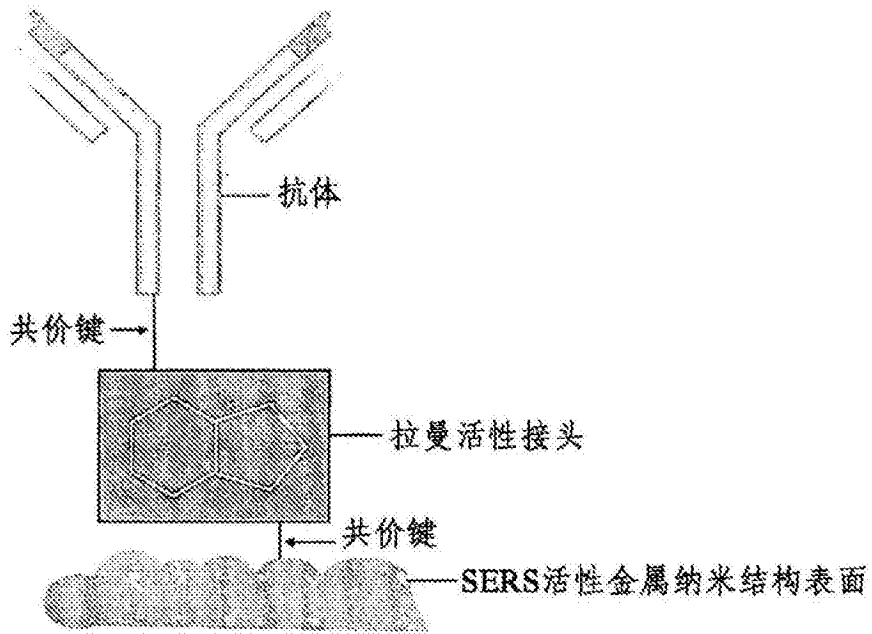


图 1(a)

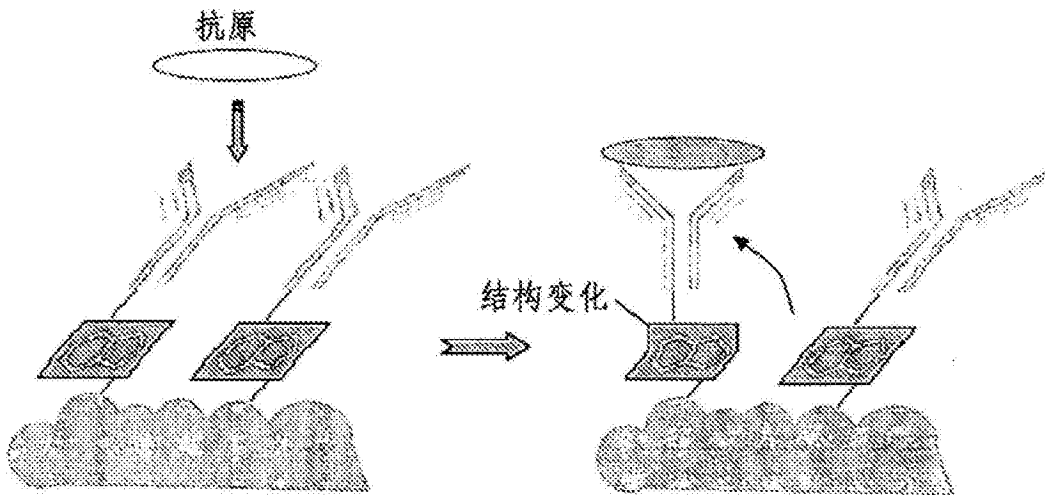


图 1(b)

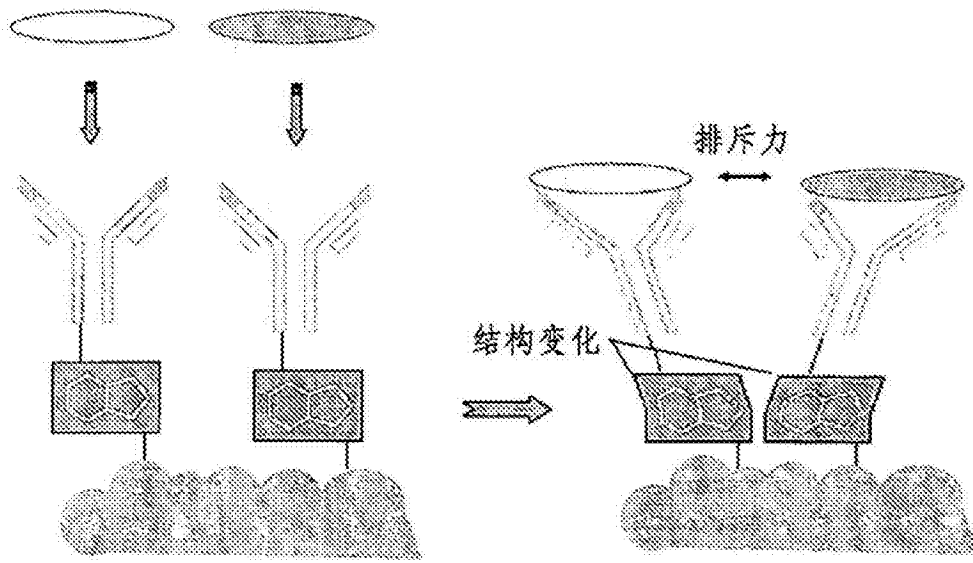


图 1(c)

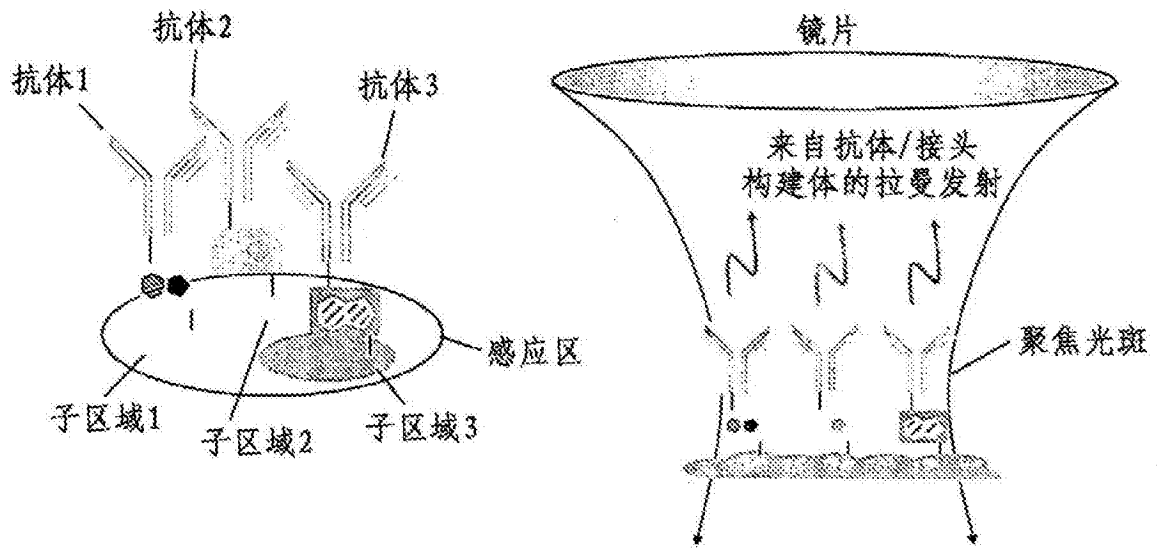


图 2

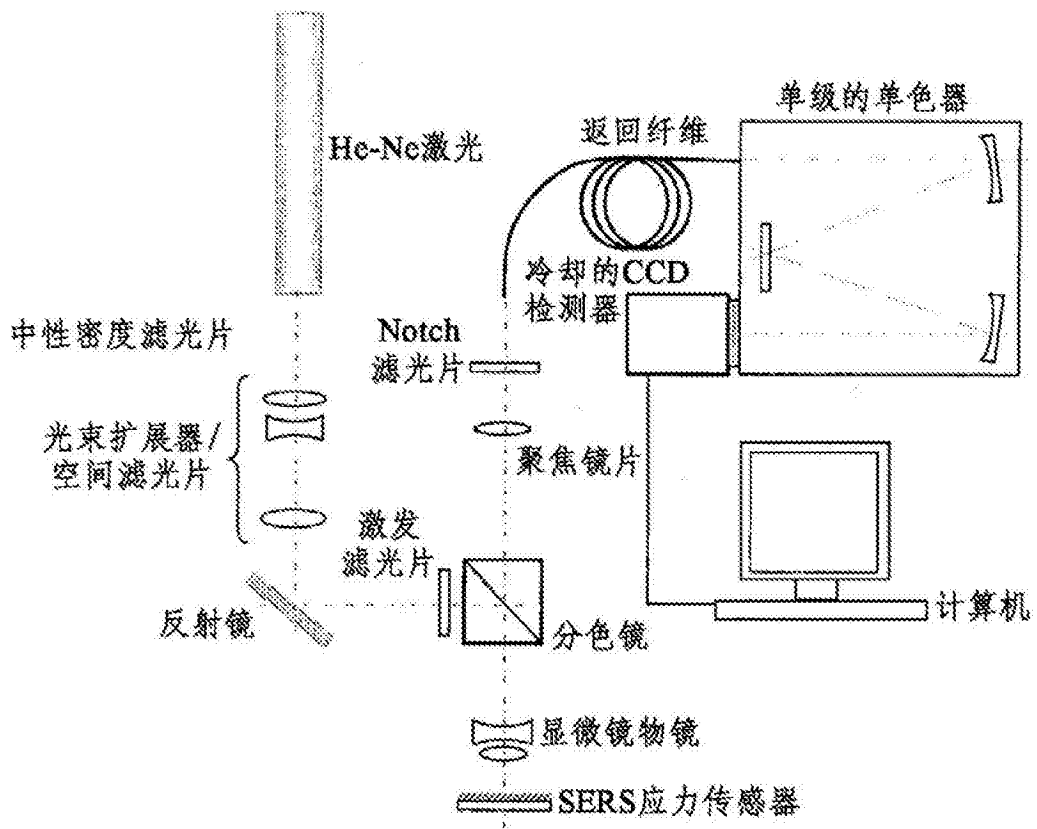


图 3

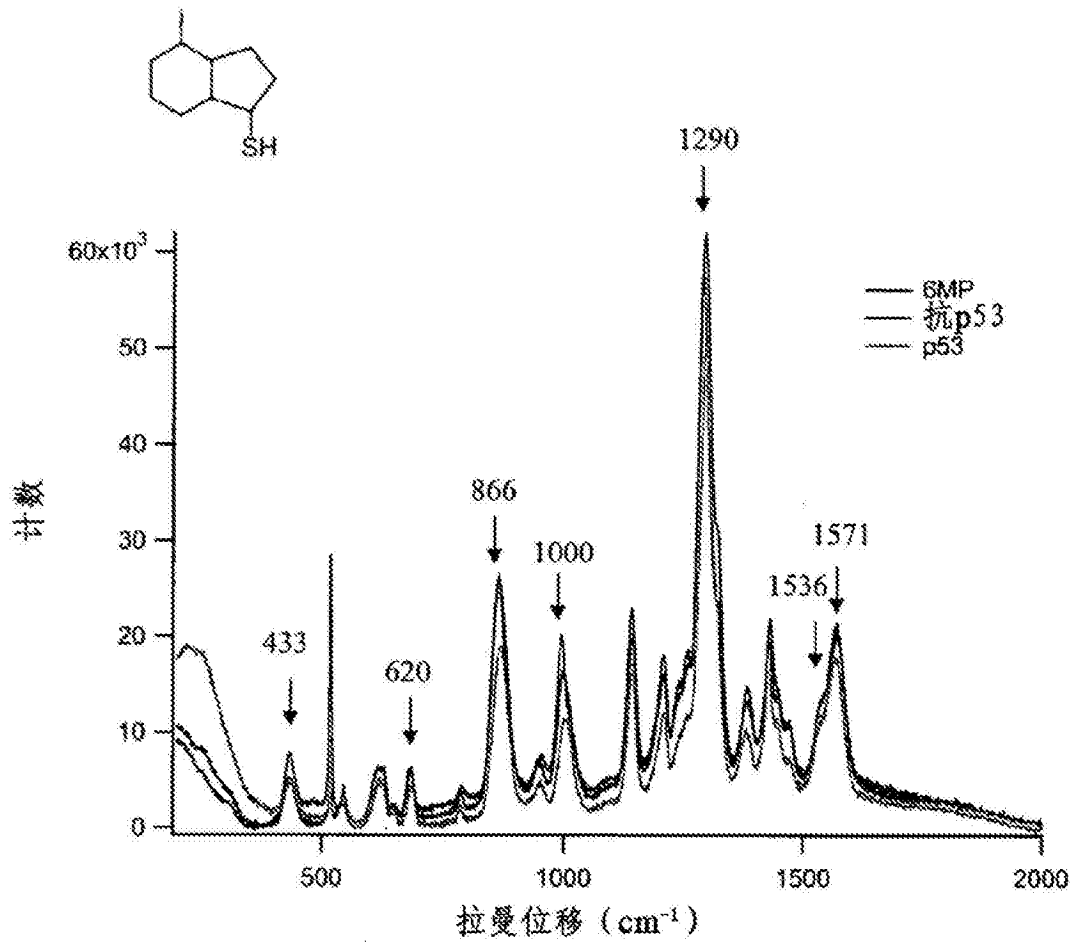


图 4

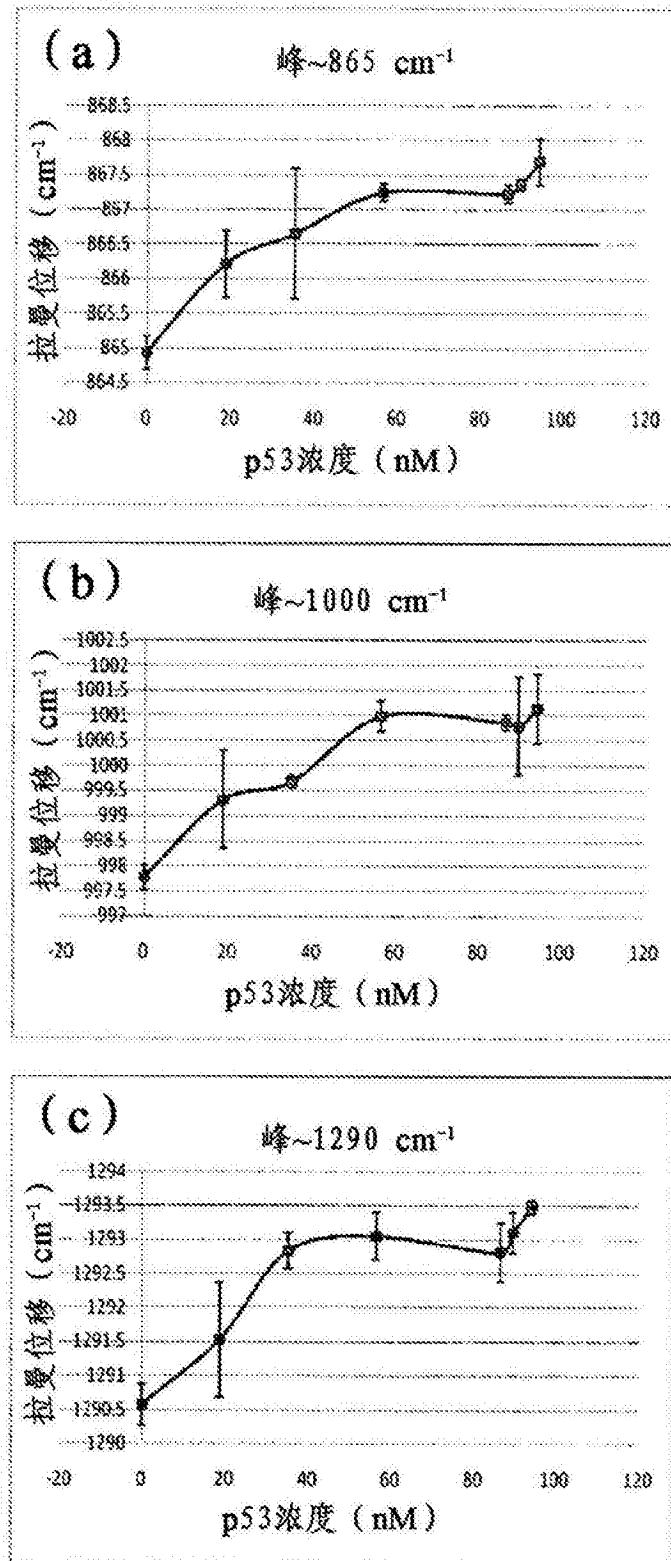


图 5

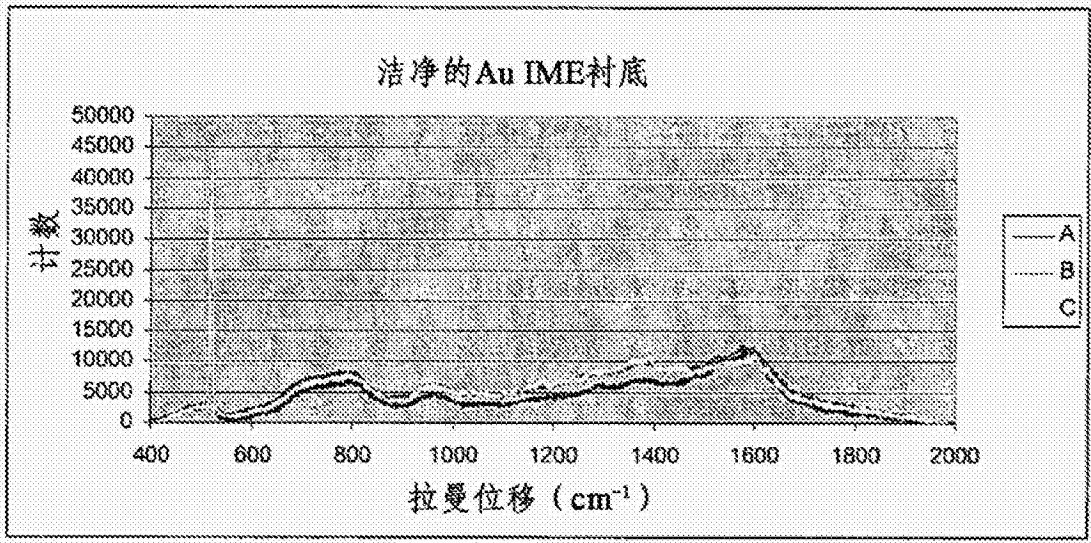


图 6

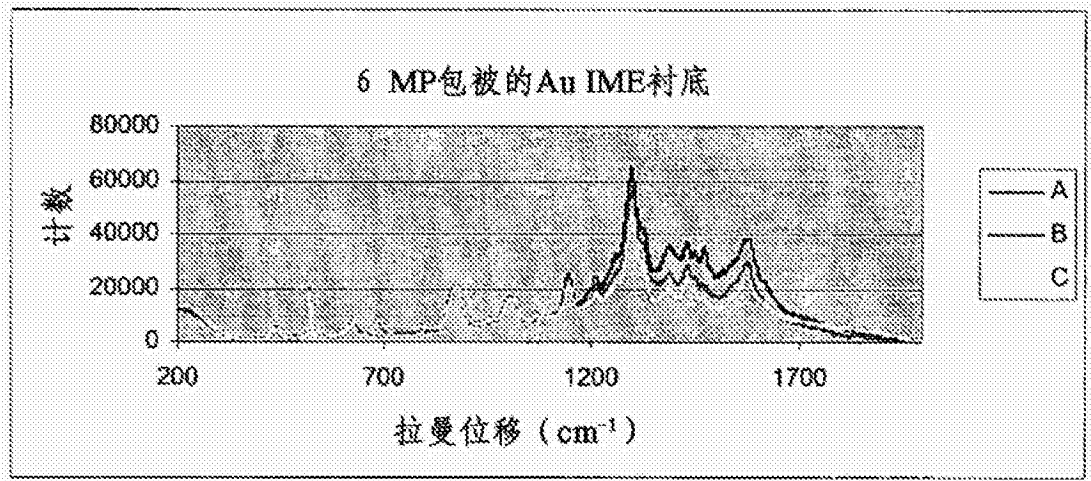


图 7

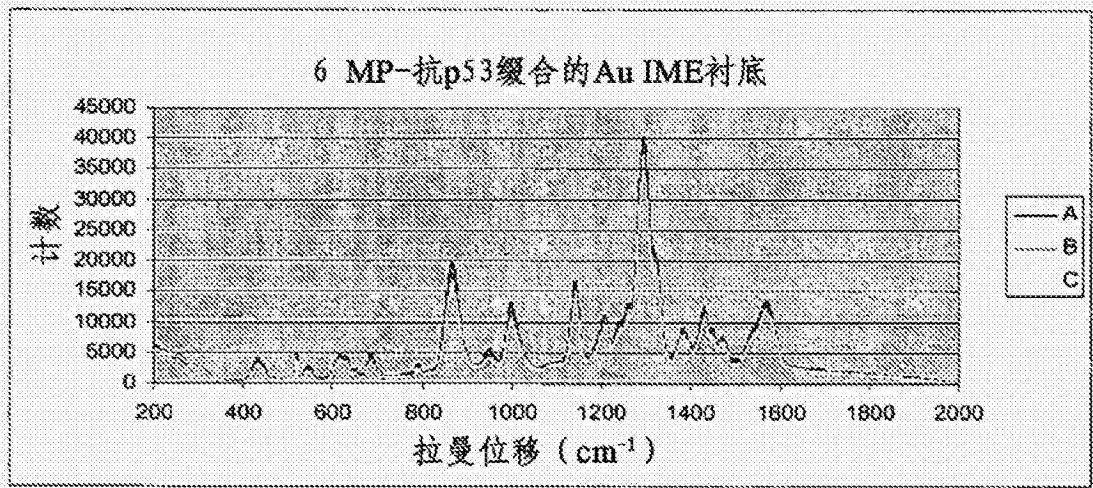


图 8

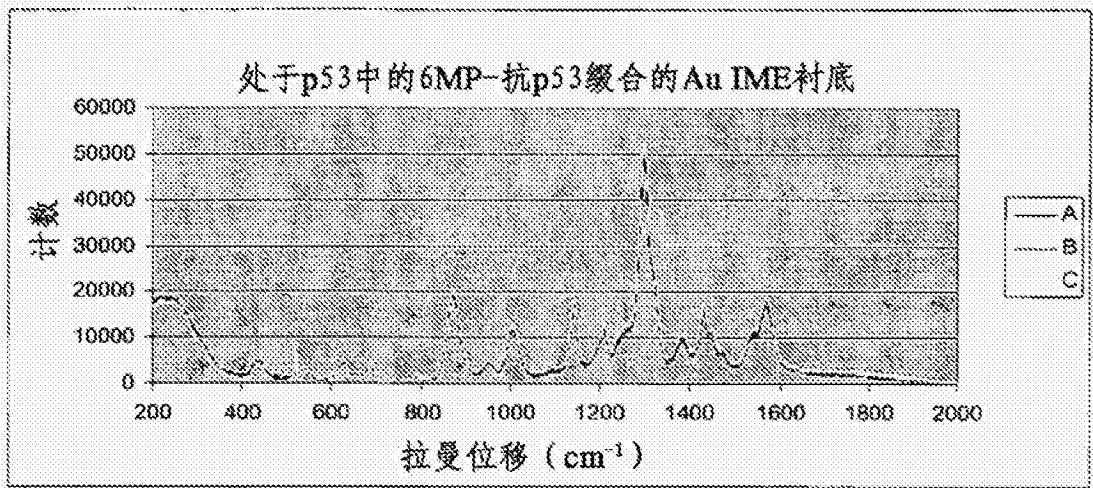


图 9

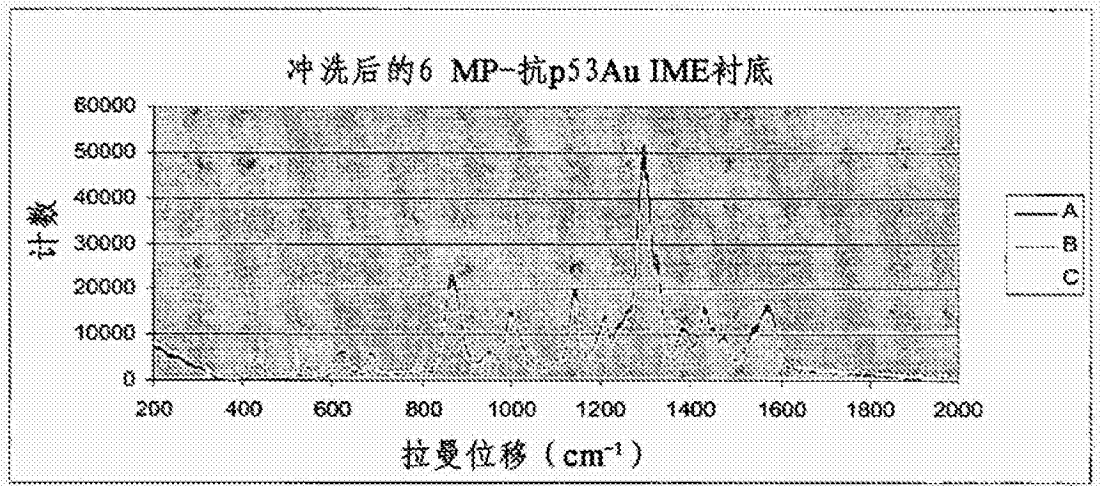


图 10

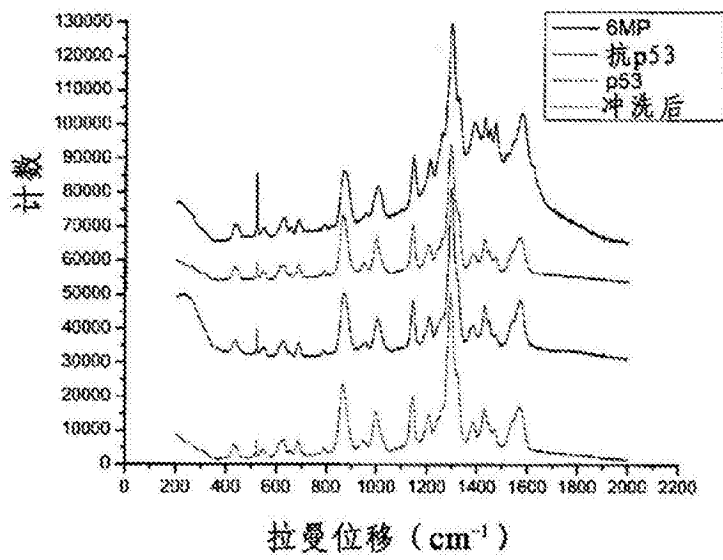


图 11

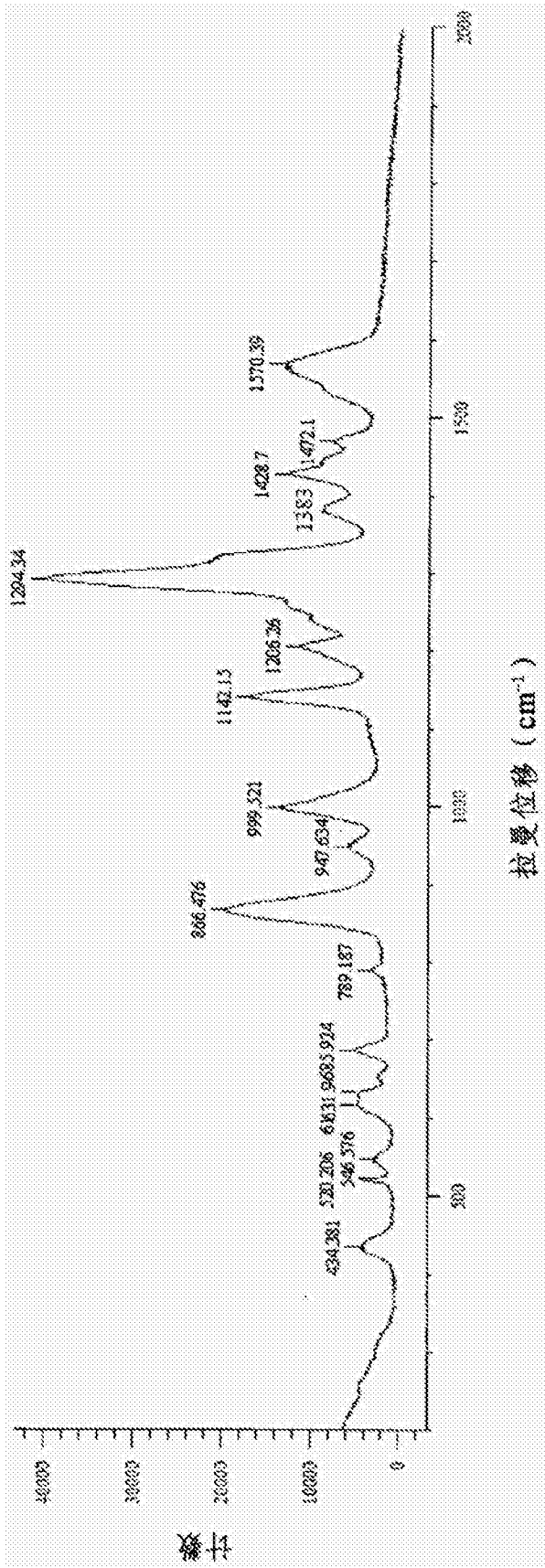


图 12(a)

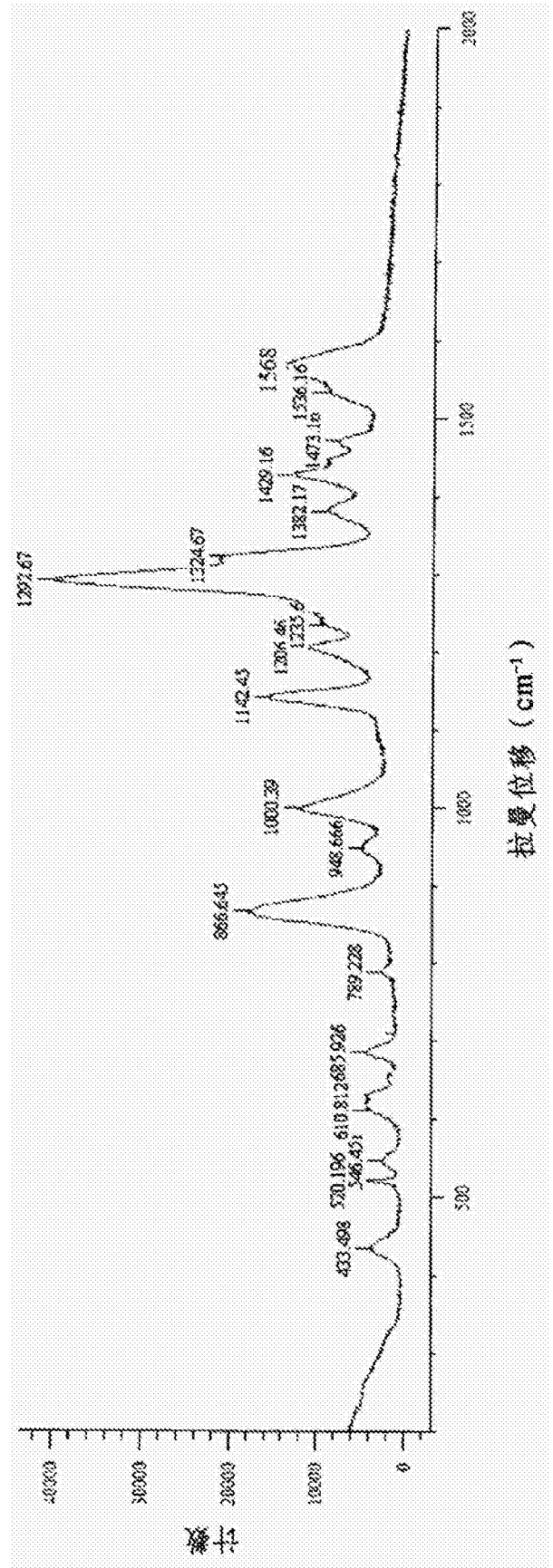


图 12(b)

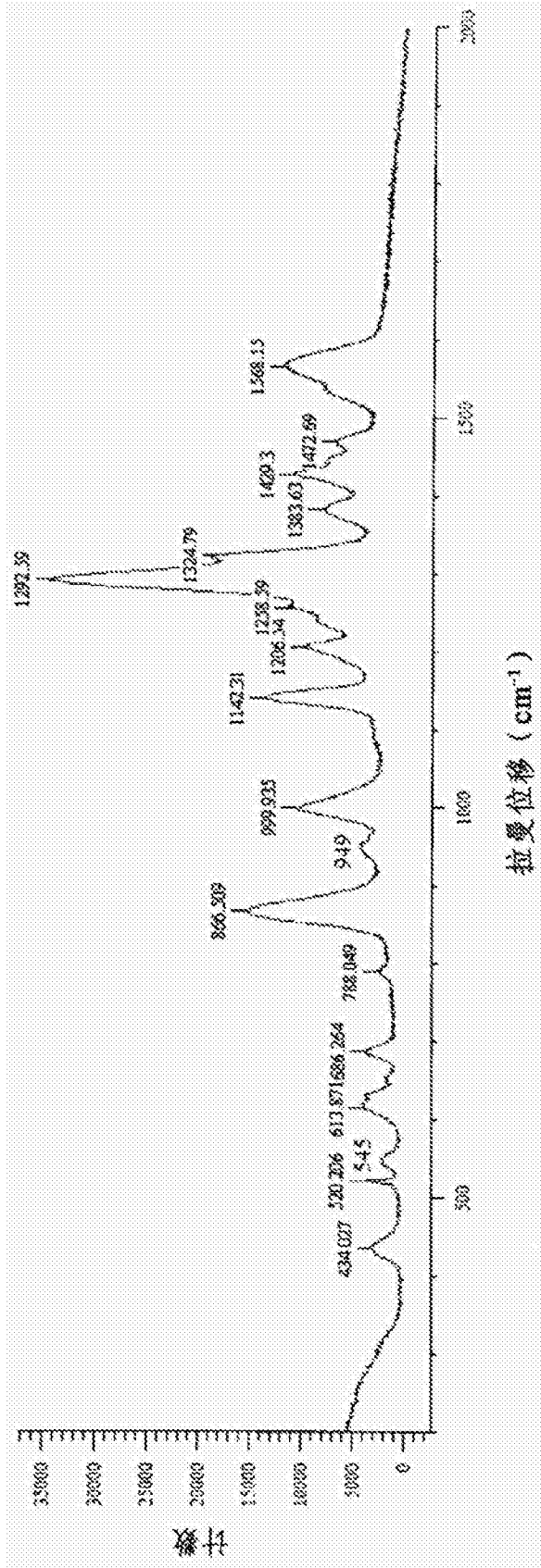


图 12(c)

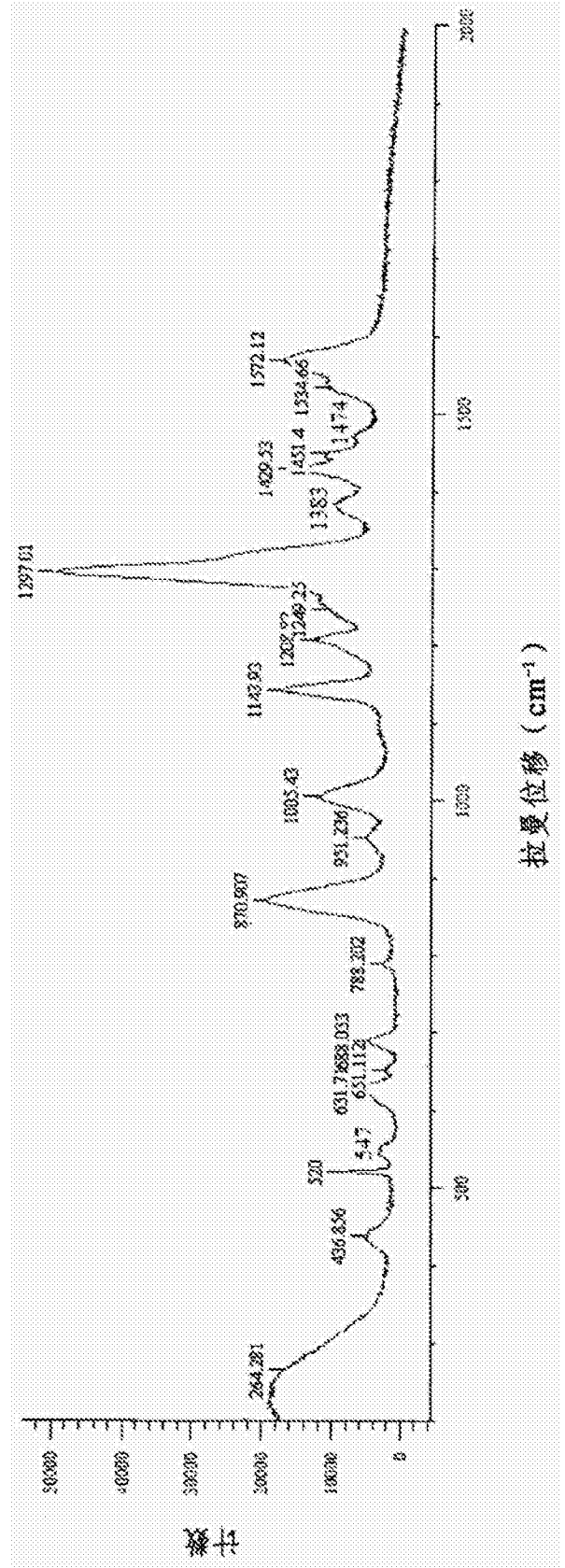


图 13(a)

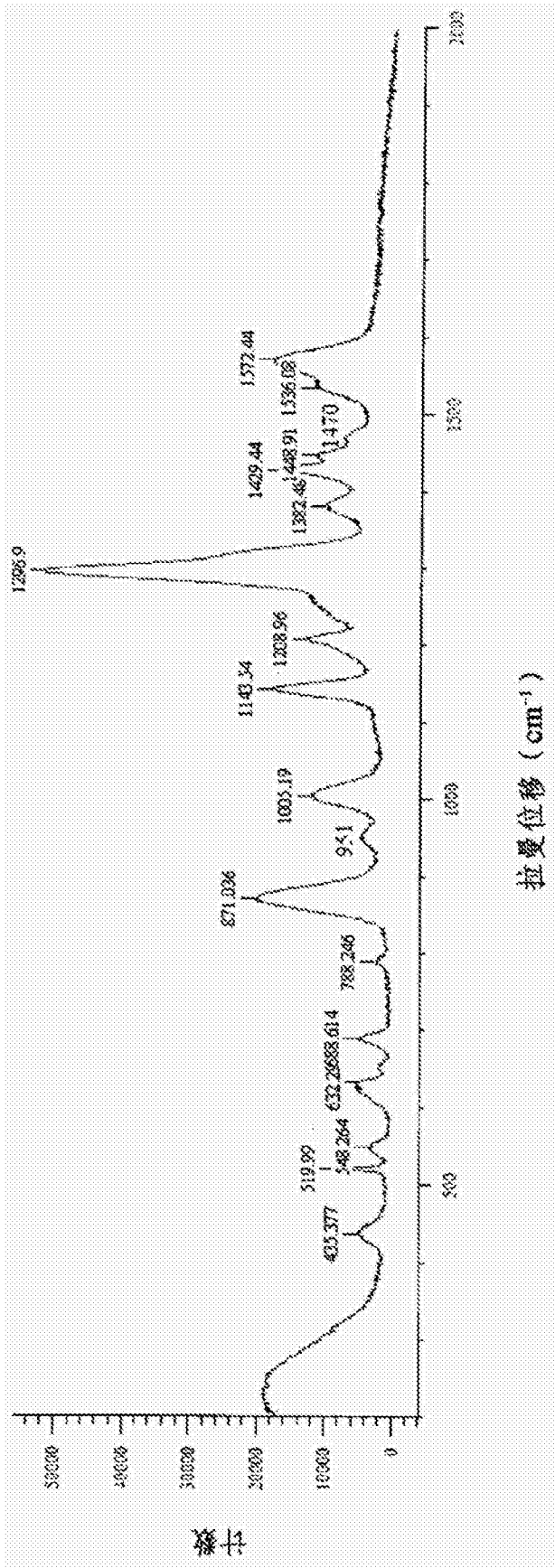


图 13(b)

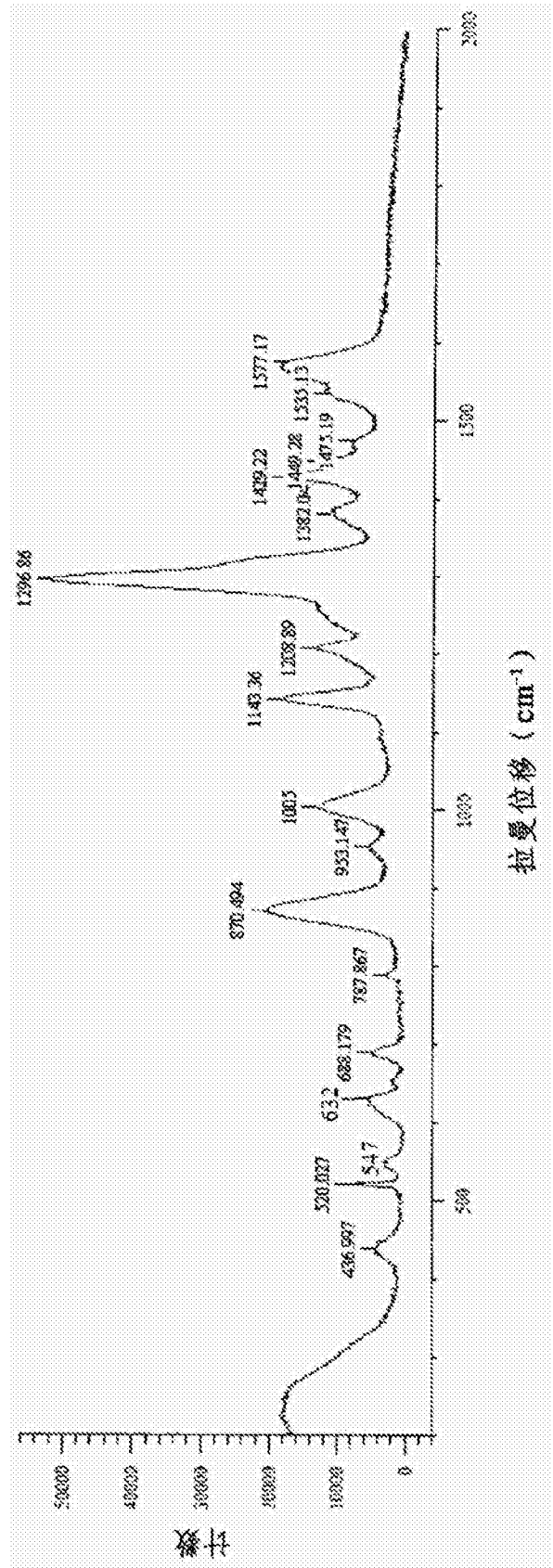


图 13(c)

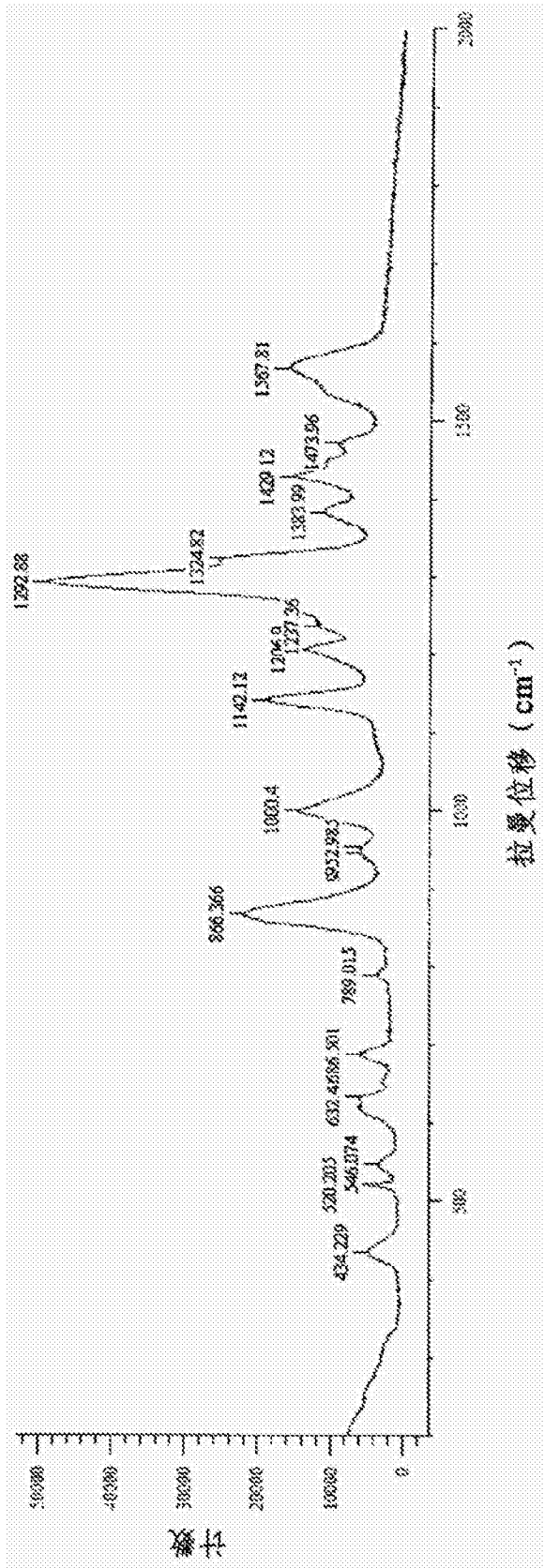


图 14(a)

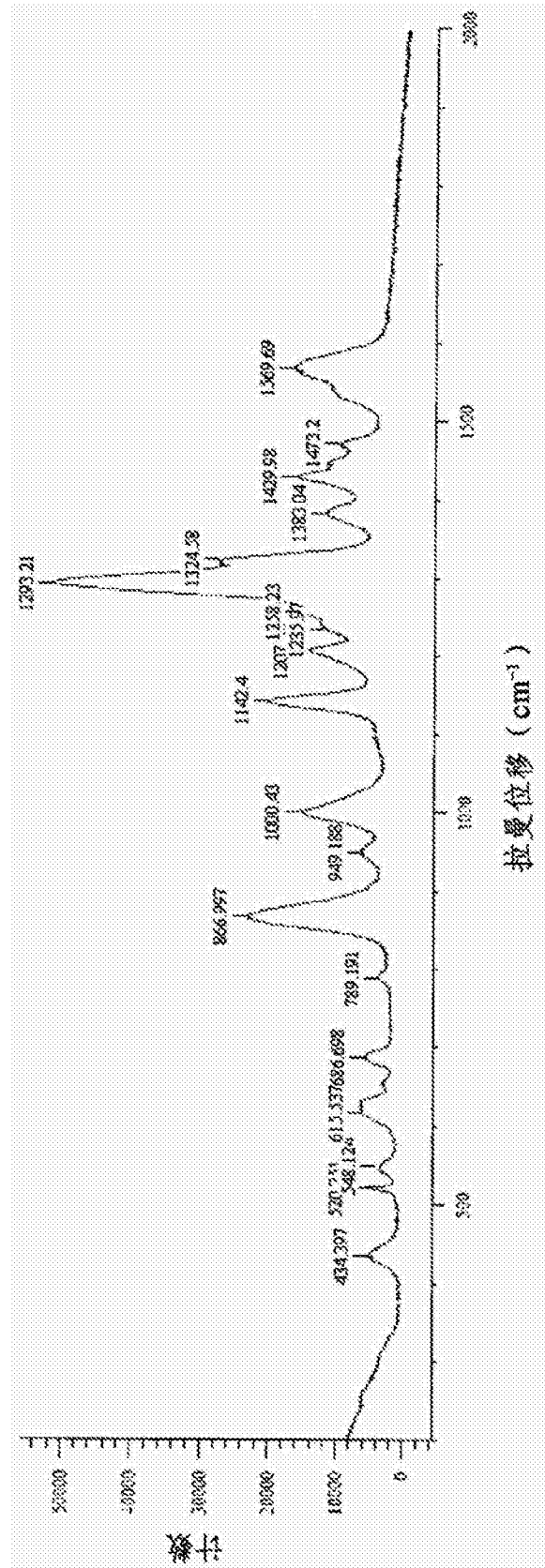


图 14(b)

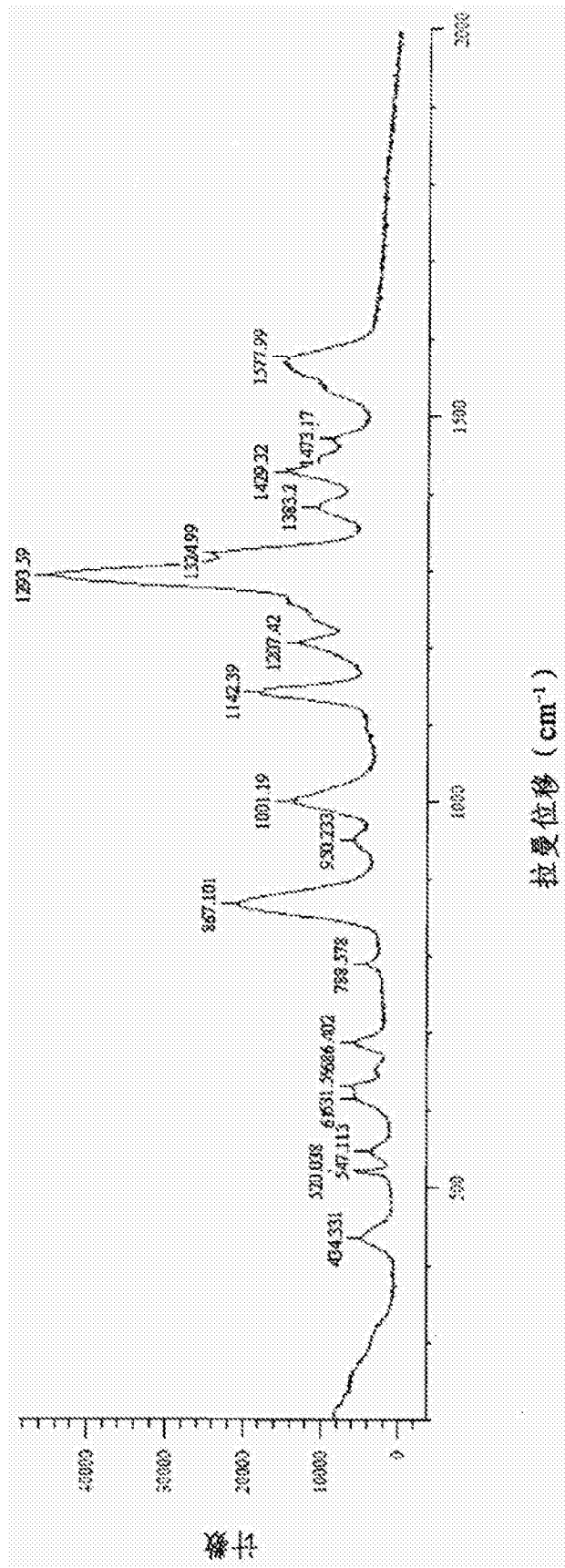


图 14(c)

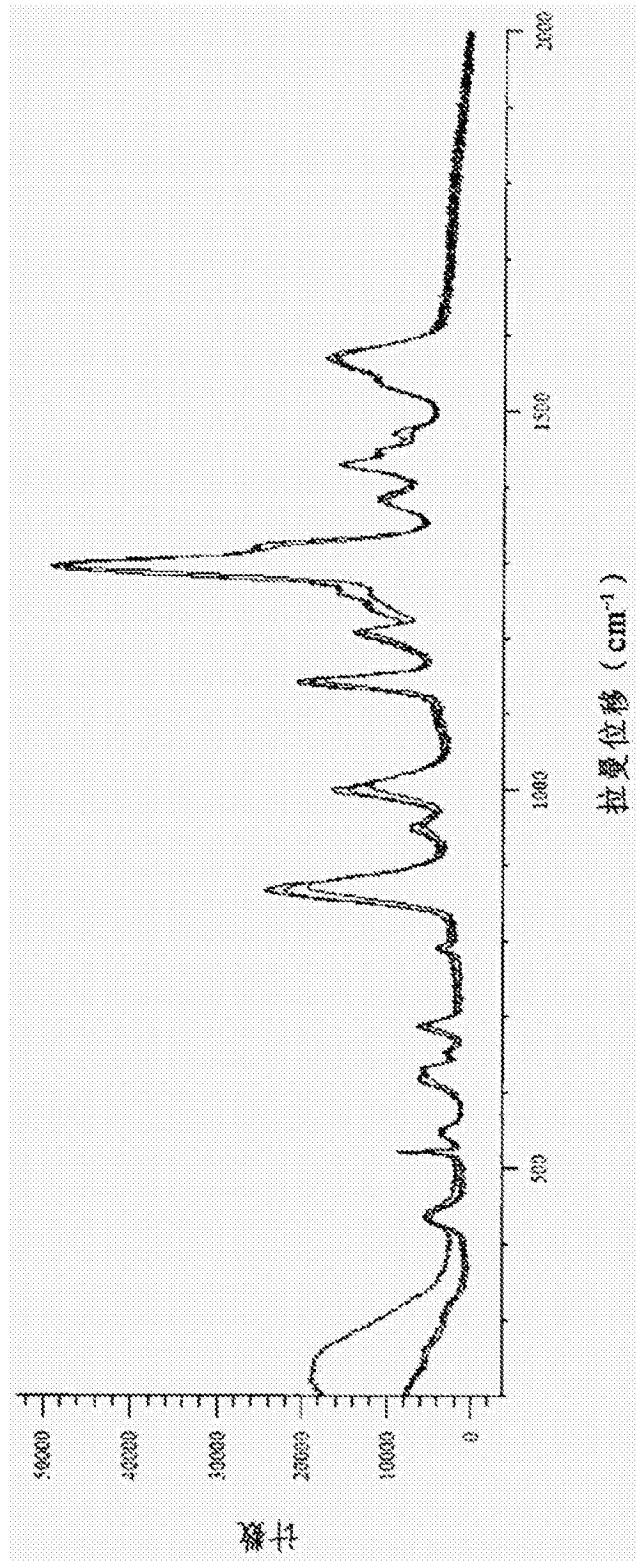


图 15

专利名称(译)	基于SERS的分析物检测		
公开(公告)号	CN102812348B	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201080059252.1	申请日	2010-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
当前申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
[标]发明人	许健威 奥利沃·马利尼		
发明人	许健威 奥利沃·马利尼		
IPC分类号	G01N21/65 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/658 G01N33/532 G01N33/54373 G01N33/553 G01N33/58		
代理人(译)	张淑珍 王维玉		
审查员(译)	程莉莉		
优先权	61/289053 2009-12-22 US		
其他公开文献	CN102812348A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及通过表面增强拉曼光谱 (SERS) 对分析物进行检测的方法，所述方法包括：使分析物与至少一种分析物结合分子相接触，所述分析物结合分子通过拉曼活性分子接头附着至使拉曼散射增强的金属衬底表面；以及对来自所述复合体的表面增强拉曼信号进行检测。另一方面，本发明涉及适用于所发明的基于SERS的分析物检测方法的缀合物和生物传感器。

