



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112400113 A

(43) 申请公布日 2021.02.23

(21) 申请号 201980046800.8

(22) 申请日 2019.07.10

(30) 优先权数据

62/697,521 2018.07.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/055895 2019.07.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/012390 EN 2020.01.16

(71) 申请人 3M创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 格雷戈里·W·西顿

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 王潜 郭国清

(51) Int.Cl.

G01N 33/536 (2006.01)

权利要求书2页 说明书21页

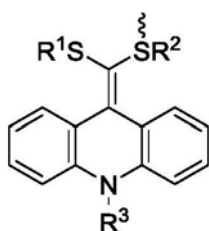
(54) 发明名称

特异性结合化学发光测定法

(57) 摘要

本发明公开了测定样品中的分析物的方法，
以及用于进行该测定的试剂盒。

1. 一种测定样品中的分析物的方法,所述方法包括形成反应混合物,以及将触发溶液与所述反应混合物混合;其中待测定的所述分析物能够存在于所述样品中,所述反应混合物为水性溶液,所述水性溶液包含化学发光标记的特异性结合配偶体,所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第一特异性结合配偶体的化学发光标记,所述化学发光标记的特异性结合配偶体能够结合到所述分析物以形成分析物结合的化学发光标记的特异性结合络合物,活化剂标记的特异性结合配偶体,所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第二特异性结合配偶体的活化剂标记,以及选择性信号抑制剂;并且其中所述方法还包括测量分析物信号,以及在测量所述分析物信号之后测量辉光信号。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述触发溶液还包含增强剂。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述增强剂选自酚化合物、芳香胺、苯并噁唑、羟基苯并噁唑、芳基硼酸以及任何前述物质的混合物。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述触发溶液还包含氧化剂或还原剂。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述触发溶液还包含过氧化物。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述选择性信号抑制剂选自抗坏血酸、异抗坏血酸、6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-羧酸、抗坏血酸6-棕榈酸酯、5,6-异亚丙基-抗坏血酸、丁基化羟基甲苯、谷胱甘肽、尿酸、一种或多种生育酚和儿茶素。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述活化剂标记为过氧化物酶。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含直接或间接连接到特异性结合配偶体的化学发光标记,其中所述化学发光标记具有下式



其中

波浪线指定与所述特异性结合配偶体的连接位点或与连接所述化合物和所述特异性结合配偶体的连接基团的连接位点;

R^1 和 R^2 独立地选自取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基,其中当 R^1 或 R^2 被取代时,是被1-3个取代基取代,每个取代基独立地选自羰基、羧基、三烷基甲硅烷基、 $-SO_3$ 、糖基、 $-PO_3$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、 $C(0)NHNH_2$ 、季铵和季磷;

R³选自取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基,其中当R¹或R²被取代时,是被1-3个取代基取代,每个取代基独立地选自羰基、羧基、三烷基甲硅烷基、-SO₃、糖基、-PO₃、卤素、羟基、巯基、氨基、C(O)NHNH₂、季铵和季磷。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体和所述活化剂标记的特异性结合配偶体各自结合到所述样品中的所述分析物。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含连接到所述分析物的类似物的化学发光标记的化合物,并且进一步地,其中所述分析物和所述化学发光标记的特异性结合配偶体竞争以与所述活化剂标记的特异性结合配偶体结合。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中未结合的化学发光底物选自鲁米诺,异鲁米诺,洛粉碱,吡啶酯,例如光泽精,和9,10-二氢吡啶,邻苯二甲酰肼,例如2,3-二氢-1,4-酞嗪二酮,荧光素,和包含1,2-二氧杂环丁烷的化合物,例如二酮、3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMPPD)和3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-β-D'-吡喃半乳糖-基氧基)苯基-1,2-二氧杂环丁烷(AMPGD)、3-(4-甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠和1,2-二氧杂环丁烷二酮、金刚烷叉基-金刚烷基-1,2-二氧杂环丁烷,特别是鲁米诺或异鲁米诺,并且更特别是鲁米诺根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法还包括检测分析物信号和背景信号。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包括测量来自包含未知量的分析物的测试样品的所述分析物信号和所述辉光信号。

13. 根据权利要求12所述的方法,所述方法还包括制作校准曲线,所述校准曲线将标准样品的所述分析物信号与所述分析物信号和所述辉光信号之和的商与所述标准样品中的已知浓度的分析物进行比较。

14. 根据权利要求13所述的方法,所述方法还包括通过将来自所述测试样品的所述分析物信号与所述分析物信号和所述辉光信号之和的商与校准曲线进行比较来定量所述测试样品中分析物的量。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述分析物信号为发光强度或发光强度曲线下面积,并且进一步地,其中所述辉光信号为发光强度或发光强度曲线下面积。

特异性结合化学发光测定法

背景技术

[0001] 溶液相发光测定法是已知的,例如在W02010099486中。已知的测定法基于特异性结合配偶体的特异性识别和结合在一起来检测物质的存在或量。例如,在免疫测定法中,抗体与特定的结合配偶体结合。又如,在核酸结合测定中,核酸链(例如适体)与特异性结合配偶体结合。一些测定法使用化学发光来产生信号并将该信号与分析物的量相关联。

发明内容

[0002] 测定样品中的分析物的方法可包括形成反应混合物以及将触发溶液与反应混合物混合。待测定的分析物能够存在于样品中,使得该测定可根据该测定的检测限来确定分析物的存在与否。

[0003] 该测定中所用的反应混合物通常为水性溶液,该水性溶液包含

[0004] 化学发光标记的特异性结合配偶体,其中该化学发光标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第一特异性结合配偶体的化学发光标记,并且其中该化学发光标记的特异性结合配偶体能够结合到该分析物以形成分析物结合的化学发光标记的特异性结合络合物。该反应混合物通常还包含活化剂标记的特异性结合配偶体,其中该活化剂标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第二特异性结合配偶体的活化剂标记。该反应混合物通常还包含选择性信号抑制剂。

[0005] 该方法还包括测量分析物信号,以及在测量分析物信号之后测量辉光信号。

具体实施方式

[0006] 在整个本公开中,为方便起见,常常使用单数形式例如“一种”、“一个”和“该/所述”;然而,除非上下文明确规定或清楚指示仅为单数,否则单数形式意指包括复数。当单独称为单数时,通常使用术语“仅仅一个”。

[0007] 例如“共同的”、“常常”、“典型的”、“典型地”、“常见的”和“通常地”的术语用于指制造或实践本文所述发明的共同、典型或常见的方式的特征。这些术语不应理解为意指此类特征存在于现有技术中,远少于它们在现有技术中共同、典型或常见的特征。

[0008] 本公开中的一些术语定义如下。其他术语对于本领域的技术人员将是熟悉的,并且应当被赋予本领域的普通技术人员将赋予它们的含义。

[0009] 分析物:待在测定中检测或定量的物质。在测定中通常使用对分析物(特别是一个或多个特异性结合配偶体)具有特异性结合亲和力的一种或多种物质以有利于检测分析物。分析物可以是特异性结合配偶体可结合的蛋白质、肽、核苷酸、核苷、抗体、半抗原、小分子(即,非聚合分子)等。示例性分析物不仅包括药物,例如类固醇、激素、蛋白质、糖蛋白、粘蛋白、核蛋白、磷蛋白、阿片类、维生素、抗菌剂、抗真菌剂、抗病毒剂、嘌呤、抗肿瘤剂、苯丙胺、氮杂卓类、前列腺素以及药物代谢物,而且还包括核苷、有机核苷、核苷酸、有机核苷酸、核糖核苷、DNA、DNA片段、RNA、RNA片段、PDNA、PDNA片段、适体、毒素,例如血毒素、光毒素、神经毒素、氰基毒素、二诺毒素、坏死毒素、肌毒素、霉菌毒素例如T-2霉菌毒素、黄曲霉毒素、

肉毒杆菌毒素、蓖麻毒素、蜂毒素以及其他环境毒素或生物毒素。分析物也可以是细胞、病毒、细菌或真菌。

[0010] 活化剂:实现化学发光化合物的活化使得在存在触发物的情况下化学发光化合物发光的化合物。

[0011] 活化剂标记的特异性结合配偶体:包括分析物的特异性结合成员和直接或间接(例如,通过连接基)结合到特异性结合配偶体的活化剂的反应物。

[0012] 化学发光化合物:例如通过转化成以电子激发态形成的另一种化合物或通过转化成电子激发态然后弛豫到基态而发生引起光发射的反应的化合物。激发态可以是单重或三重激发态。激发态可在弛豫到基态时直接发射光,或者可首先例如通过Forester或Dexter机制将能量转移到能量受体,该能量受体继而发射光。

[0013] 化学发光标记的特异性结合配偶体:包括分析物的特异性结合成员和直接或间接(例如,通过连接基)结合到特异性结合配偶体的化学发光化合物的反应物。

[0014] 分析物信号:与样品中存在的分析物的量相关的信号,例如来自测定的化学发光输出。当分析物信号为化学发光输出时,可将其测量为指定波长处的发光强度或测量为一段时间内的发光积分。

[0015] 辉光信号:在所有选择性信号降低剂已被消耗使得选择性信号降低剂不再降低测定中的信号之后出现的信号,例如化学发光输出。

[0016] 背景信号:不与样品中存在的分析物的量相关的信号,例如化学发光输出。

[0017] 不可逆键:使两个部分(通常为特异性结合配偶体和化学发光标记或特异性结合配偶体和活化剂标记)相关联的键,其在执行本文所述的测定时不会断裂。不可逆键可通过一些其他方式断裂,例如使用化合物或在物理条件例如温度下断裂,使得键在本文所述的测定期间不暴露。可为不可逆键的典型键包括共价键、离子键等。通过不可逆键连接的两个部分被称为“不可逆结合”。不可逆键区别于可逆结合相互作用,例如特异性结合配偶体或分析物与特异性结合配偶体的可逆结合。

[0018] 基于现有技术化学发光的测定法结合测定法,例如US20100267071中所述的免疫测定法,以及其他测定法,例如基于适体结合等的那些测定法,将具有未知分析物浓度的测试样品的化学发光信号与通过使用具有已知分析物浓度的多个样品生成的标准曲线进行比较。

[0019] 在特异性化学发光测定法中,如例如US20100267071中所述,将包含未知分析物浓度的测试样品与包含化学发光标记的特异性结合配偶体、活化剂标记的特异性结合配偶体和选择性信号抑制剂的测定溶液混合以形成反应混合物。然后将触发溶液与反应混合物混合。触发溶液包含氧化剂或还原剂,通常包含过氧化物,并且在许多情况下包含增强剂。

[0020] 该测定法以两种形式中的一种进行。在“竞争性测定”形式中,活化剂标记的特异性结合配偶体与化学发光标记的特异性结合配偶体在可预先形成或可原位形成的络合物中结合。当存在分析物时,分析物和化学发光标记的特异性结合配偶体竞争以结合化学发光标记的特异性结合配偶体。在存在触发溶液的情况下,化学发光标记的特异性结合配偶体上的结合到活化剂标记的特异性结合配偶体上的化学发光标记与引起发光的活化剂标记的特异性结合配偶体可操作地接近,并且因此被其活化。结合到分析物的化学发光标记的特异性结合配偶体不与活性标记的特异性结合配偶体可操作地接近,因此其化学发光标

记不被活化并且不发光。在该形式中,分析物信号为发光强度,并且其与分析物浓度负相关。

[0021] 一种替代形式为“夹心测定”形式,由此通常在分析物的不同部分上,活化剂标记的特异性结合配偶体和化学发光标记的特异性结合配偶体均与分析物结合,以使化学发光标记与活化剂标记的结合配偶体可操作地接近。所得的“夹心”络合物中的化学发光标记的特异性结合配偶体的化学发光标记与活化剂标记的特异性结合配偶体可操作地接近,因此发光。在不存在分析物的情况下,活化剂标记的结合配偶体不与活化剂标记的特异性结合配偶体可操作地接近,因此不发光。在该形式中,分析物信号为发光强度,并且其与分析物浓度正相关。

[0022] 在任一种情况下,在光度计中测量测试样品中的分析物信号的强度,并且与通过用具有已知分析物浓度的标准样品进行相同测定而构建的发光强度相对于浓度的标准曲线进行比较。然后将分析物信号与标准曲线相关联,提供分析物的浓度。

[0023] 虽然当被分析的样品仅包含分析物和水时这是可接受的,但化学发光的大多数商业应用也将包含除分析物之外的其他物质。例如,当分析来自食物物质的测试样品中是否存在某种毒素时,则除该毒素之外,通常还将存在许多化合物,例如来自食物物质的残余化合物。这些其他化合物可干扰分析物信号的产生,通常通过干扰产生化学发光物质的氧化或还原反应。在这种情况下,分析物信号与标准曲线的相关性将不会在测试样品中提供分析物的准确浓度,因为标准曲线将由不包含这些其他干扰化合物的溶液生成。这导致相关性误差,其中分析物信号与标准曲线的比较不能准确地提供测试样品中分析物的浓度。例如,可使用的一种选择性信号抑制剂是抗坏血酸,其也天然地或作为添加的抗氧化剂存在于许多食物物质中。如果测试样品中存在显著量的抗坏血酸,则其可进一步抑制来自测试样品的分析物信号的产生,并且通过分析物信号与标准曲线的相关性获得的浓度可过低。这可能是显著的问题,特别是当有害的食物污染物被测定时,因为该测定可能不正确地在食物实际上具有不安全水平的污染物时表明食物具有安全水平的污染物。

[0024] 更一般地讲,可由被分析样品中的其他化合物的干扰引起的分析物浓度误差可为显著的,在一些情况下可高达40%或甚至更大。在分析食物样品的毒素的示例中,一些毒素在低至5ppb或甚至更低的水平处对于动物食用是不安全的。因此,这些误差可意指一方面丢弃事实上可安全食用的食物样品,或者另一方面提供毒素以安全水平存在的错误信心与实际上毒素以可导致食用其的动物患病或死亡的不安全水平存在之间的差异。

[0025] 该问题的现有技术解决方案是不可接受的。从测试样品中除去除分析物之外的化合物以防止干扰结合是异常困难的,并且在商业环境中实现是不切实际的(如果可能的话),其中在测试样品中可存在数千、数万、或甚至更多种未知种类的不同化合物。另一种不可接受的现有技术解决方案是将测试样品显著稀释至其中除分析物之外的化合物的干扰可忽略的点。该溶液是不可接受的,因为分析物浓度也被稀释,因此分析物的检测下限(“LLD”)和定量下限(LLQ)降低。如上所述,许多相关分析物的浓度需要确定ppb水平,因此LLQ和LLD的降低使得涉及测试样品的大量稀释的解决方案不可接受。

[0026] 不仅可接受的解决方案应避免上述缺点,也就是说,其应该实际用于商业环境中并且不需要显著稀释测试样品,但其也应可与多种粘合剂一起使用,这意味着该技术不应依赖于结合配偶体(例如,抗体、适体等)的性质,使得其可应用于多种不同类型的结合测

定。

[0027] 本公开提供了此类技术方案。简而言之，本技术方案将在下文更详细地描述，涉及在来自分析物的信号不再可见之后并且在选择性信号抑制剂已被完全氧化或还原使得选择性信号抑制剂不再抑制未结合的化学发光标记的选择性粘合剂的信号之后，观察化学发光标记的特异性结合配偶体的信号，在本公开中被称为“辉光信号”。通过确定已知分析物浓度处的分析物信号和辉光信号，并根据以下公式绘制已知分析物浓度来构建校准曲线：分析物信号/(辉光信号+分析物信号)。当测量样品时，测量分析物信号和辉光信号，计算样品的分析物信号/(辉光信号+分析物信号)的值，然后将计算值与校准曲线进行比较，以获得样品中的分析物浓度。

[0028] 特异性结合配偶体

[0029] 采用两个标记的特异性结合配偶体：一个是活化剂标记的，并且另一个是化学发光标记的。特异性结合配偶体中的每个特异性结合配偶体是对另一种物质具有特异性亲和力的分子，通常是生物分子。示例包括DNA、RNA、寡核苷酸、适体、抗原、抗体、抗体-DNA嵌合体、半抗原、蛋白质、肽、凝集素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和生物素。

[0030] 每个特异性结合配偶体通常与其他配偶体不同，因为两个特异性结合配偶体不竞争分析物上的相同或重叠的结合位点。对于其中活化剂标记的特异性结合配偶体和化学发光标记的特异性结合配偶体两者的特异性结合配偶体部分是抗体的典型情况，抗体中的每个抗体在分析物上具有不同的、非竞争性表位。

[0031] 可组合使用的特异性结合配偶体(即，一个可具有化学发光标记而另一个可具有活化剂标记)的示例包括互补的寡核苷酸或多核苷酸，例如DNA、RNA、适体等，抗生物素蛋白-生物素、链霉抗生物素蛋白-生物素、激素-受体、凝集素-碳水化合物、IG蛋白A-结合蛋白受体、核酸-核酸结合蛋白、适体-适体和核酸-抗核酸抗体。US20100267071中讨论的特异性结合配偶体是合适的。

[0032] 这些方法中的任何一种均可适于竞争性测定形式或夹心测定形式。特异性结合配偶体的种类确定测定的形式，具体地，测定是夹心测定还是竞争性测定。在任一种情况下，选择用于化学发光标记的特异性结合配偶体的特异性结合配偶体以特异性结合分析物。最常见的是使用抗体，但也可使用上文所讨论的任何特异性结合配偶体。为了适应竞争性测定形式，将活化剂标记的特异性结合配偶体设计为活化剂-分析物类似物缀合物。在这种情况下，活化剂直接或通过包含如本文所讨论的辅助物质的连接基团与分析物的类似物缀合，该类似物可以是分析物本身或与分析物具有足够结构相似性的化合物，其也以与分析物基本上相同的方式结合化学发光标记的特异性结合配偶体。

[0033] 为了适应夹心测定形式，化学发光标记的特异性结合配偶体和活化剂标记的特异性结合配偶体特异性结合到分析物。在这种情况下，用于活化剂标记的特异性结合配偶体的特异性结合配偶体通常是抗体，但是它也可以是适体或上述任何特异性结合配偶体。在这种情况下，化学发光标记的特异性结合配偶体和活化剂标记的特异性结合配偶体均结合到分析物，通常结合到分析物上的不同结合位点。

[0034] 竞争性测定和夹心测定均是本领域已知的，并且用于完成这些适应的方法是已知的。关于测定形式和特异性结合配偶体的示例和附加细节可见于US20100267071。

[0035] 化学发光标记的特异性结合配偶体

[0036] 化学发光标记的特异性结合配偶体通常以小于 10^{-4}M ,具体地小于 10^{-6}M ,并且最具体地 10^{-11}M 至 10^{-7}M 的浓度存在于反应混合物中。

[0037] 化学发光标记的特异性结合配偶体包括通常通过不可逆键用化学发光标记来标记的特异性结合配偶体。通常,特异性结合配偶体的每个分子具有不可逆地结合到其上的至少一个化学发光标记。在一些情况下,可存在结合到每个特异性结合配偶体的多达 10^2 个或甚至更多的化学发光标记。每个特异性结合配偶体分子不必具有相同数量的化学发光标记。

[0038] 一个或多个化学发光标记可为任何合适的化学发光部分,该化学发光部分可通常通过不可逆键结合至特异性结合配偶体。该键(通常为不可逆键)可为直接连接或间接连接。在直接连接中,该一个或多个化学发光标记直接连接到特异性结合配偶体,而在一个或多个化学发光标记和特异性结合配偶体之间不使用连接基或辅助物质。直接连接通常通过不可逆键,例如离子键、共价键、疏水相互作用、氢键等,并且最常见的是共价键。

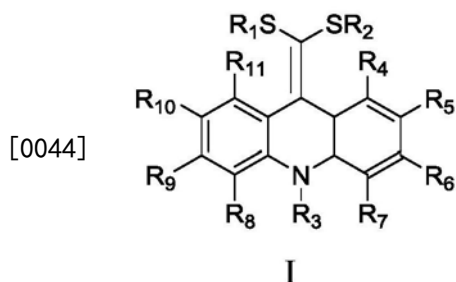
[0039] 当采用间接连接时,连接基(在本领域中有时称为辅助物质)用于连接一个或多个化学发光标记和特异性结合配偶体。任何合适的连接基团都可使用;合适的连接基团将不会阻止一种或多种化学发光标记发光,并且通常不会使化学发光标记的特异性结合配偶体不溶于水性介质。示例性连接基包括蛋白质,例如链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、中和亲和素、生物素、阳离子化BSA、fos、jun、钥孔血蓝蛋白、免疫球蛋白(包括其片段或部分)、脂质体、胶束、合成树枝状聚合物例如AMAM、合成聚合物例如聚丙烯酸、天然聚合物例如多糖例如官能化葡聚糖、多核苷酸、适体和寡核苷酸等。多糖,特别是氨基右旋糖酐或羧基右旋糖酐,以及自组装蛋白质是最常用的。

[0040] 化学发光标记通过使通式CL-L-RG的化合物与特异性结合配偶体反应而形成,其中CL表示化学发光部分,L表示连接基或共价键,并且RG表示反应性基团。一旦反应完成,化学发光部分变成化学发光标记的特异性结合配偶体上的化学发光标记。化学发光标记与触发溶液中的氧化剂或还原剂或与活化剂标记的特异性结合配偶体中的活化剂标记反应形成活化的化学发光化合物,其通常是化学发光标记的激发态。激发态可以是单重激发态或三重激发态。激发态可随发光而弛豫,或者其可经历能量转移到发射能受体,该发射能受体继而发光。在特定实施方案中,发光在添加触发溶液后非常快速地发生,更具体地讲,在添加触发溶液后2秒内达到峰值强度。然而,这不是必需的,因为只要在足够的时间段内测量分析物信号,较慢的反应也可给出准确的结果。

[0041] 适于结合到特异性结合配偶体(例如抗体或抗体片段)的多种化学发光化合物是本领域已知的。这些化学发光化合物中的任何一种均可用于本文所述的测定中。

[0042] 示例性化学发光部分和化学发光标记包括芳族环状二酰基肼,例如鲁米诺、异鲁米诺、氨基丁基乙基异鲁米诺、氨基己基乙基异鲁米诺、7-二甲基氨基萘-1,2-二羧酰肼、环取代的氨基邻苯二甲酰肼、蒽-2,3-二羧酰肼、菲-1,2-二羧酰肼、芘二羧酸酰肼、5-羟基邻苯二甲酰肼、6-羟基邻苯二甲酰肼;咕吨染料,例如荧光素、伊红、罗丹明染料、对甲氨基酚染料、化学发光芳香胺或杂环胺、MCLA、吡啶乙酸、异丁醛;三羟基芳族化合物,例如连苯三酚、间苯三酚和红酚,以及US5420275和US5324835中公开的酞嗪二酮化合物、吡啶酮二硫缩醛化合物,以及前述的组合。虽然这些标记中的任一个可与或不与发射能受体一起使用,但是异丁醛最常与发射能受体一起使用。

[0043] 一些化学发光标记可为式I的标记：



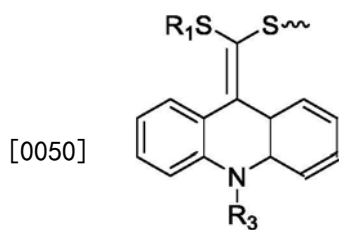
[0045] 在式I的标记中， R_1 和 R_2 中的每一者独立地为H或含有选自C、N、O、S、P、Si和卤素的1-50个原子加上足以满足非氢原子化合价的氢原子的有机部分。最常见地， R_1 和 R_2 中的每一者独立地为与特异性结合配偶体、H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基或取代的芳烷基的连接基团。当 R_1 和 R_2 被取代时，其最常见地被选自羰基、羧基、三(烷基)甲硅烷基、糖基、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{OSO}_3^-$ 、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{OPo}_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵和季磷的1-3个自由基取代。

[0046] 在式I的标记中， R_3 为H或含有选自C、N、O、S、P、Si和卤素的1-50个原子(最常见地1-20个原子)加上足以满足非氢原子化合价的氢原子的有机部分。最常见地， R_3 为与特异性结合配偶体、H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基或取代的芳烷基的连接基团。在这种情况下， R_3 最常具有1-20个碳原子。在许多情况下， R_3 为具有1至4个碳原子的烷基、苯基、苄基、取代的苄基、烷氧基烷基、羧基烷基或烷基磺酸。可能的是， R_3 ，特别是当其为烷基、取代的烷基、烯基或取代的烯基时，而且在其他情况下，共价结合到 R_7 或 R_8 形成环，通常形成五或六元环。当一个或多个上述部分被取代时，其最常见地被选自羰基、羧基、三(烷基)甲硅烷基、糖基、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{OSO}_3^-$ 、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{OPo}_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵和季磷的1-3个自由基取代。

[0047] 在标记式I中， R_4 - R_{11} 中的每一者独立地为H或含有选自C、N、O、S、P、Si和卤素的1-50个原子加上足以满足非氢原子化合价的氢原子的有机部分。最常见地， R_1 和 R_2 中的每一者独立地为与特异性结合配偶体、H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、烷氧基、芳氧基、卤素、氨基、取代的胺、羧基、羧基烷氧基、羧酰胺、氰基或磺酸根的连接基团。成对的近侧 R_4 - R_{11} 部分，例如 R_4 和 R_5 、 R_8 和 R_9 等可共价结合形成环。在这种情况下，该环通常为五至七元环，并且最通常为五或六元环。该环可为碳环或杂环，并且在后一种情况下可含有杂原子例如N、O或S，并且可为未取代的或在一个或多个碳原子或一个或多个杂原子上被取代。当一个或多个上述部分被取代时，其最常见地被选自羰基、羧基、三(烷基)甲硅烷基、糖基、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{OSO}_3^-$ 、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{OPo}_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵和季磷的1-3个自由基取代。

[0048] 最常见地，在式I中， R_4 - R_{11} 中的每一者为H。

[0049] 最常见地，所采用的式I的标记是式II的标记

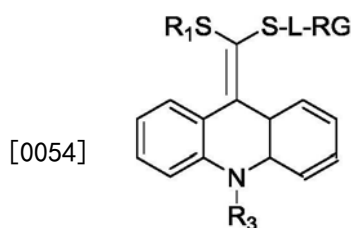


II

[0051] 其中波浪线表示与特异性结合配偶体的连接点。在这种情况下, R_3 通常为H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、芳烷基或取代的芳烷基。在这种情况下, R_3 最常具有1-20个碳原子, 特别是具有1-4个碳原子的烷基、苯基、苄基、取代的苄基、烷氧基烷基、羧基烷基或烷基磺酸。当一个或多个上述部分被取代时, 其最常见地被选自羰基、羧基、三(烷基)甲硅烷基、糖基、 $-SO_3^-$ 、 $-OSO_3^-$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-OPO_3^-$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵和季磷的1-3个自由基取代。

[0052] 在式II的特定标记中, 波浪线指定与特异性结合配偶体的连接位点或与连接化合物和特异性结合配偶体的连接基团的连接位点, R^1 和 R^2 独立地选自取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基, 其中当 R^1 或 R^2 被取代时, 是被1-3个取代基取代, 每个取代基独立地选自羰基、羧基、三烷基甲硅烷基、 $-SO_3$ 、糖基、 $-PO_3$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、 $C(0)NHNH_2$ 、季铵和季磷, 并且 R^3 选自取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基, 其中当 R^1 或 R^2 被取代时, 是被1-3个取代基取代, 每个取代基独立地选自羰基、羧基、三烷基甲硅烷基、 $-SO_3$ 、糖基、 $-PO_3$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、 $C(0)NHNH_2$ 、季铵和季磷。

[0053] 式II的标记通过特异性结合配偶体与式III的化合物的反应结合到特异性结合配偶体。

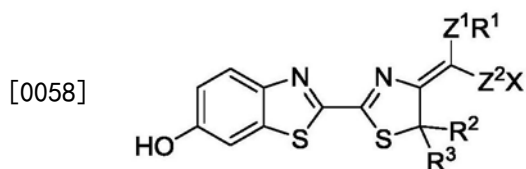


III

[0055] 其中L和RG如上所述。

[0056] 可使用的式III的化合物的示例提供于US20100267071的表8中。一般来讲, 式I和具体地式III的化合物可根据US20070172878中公开的方法制备。例如, 可商购获得的吡啶或N-取代的吡啶可用强碱处理, 然后用二硫化碳处理, 形成吡啶二硫代羧酸酯, 其继而通过常规的酯化方法进行酯化或部分酯化以安装取代基 R_1 。 R_2 可通过用强碱例如丁基锂或氢化钠使剩余巯基脱质子化而加入, 然后用合适的亲电试剂处理以连接 R_2 。取代基 R_1 和 R_2 可经历进一步的反应以操纵其上的官能团, 以便获得所需的式III的化合物。

[0057] 化学发光标记还可选自芳族环状二酰肼、三羟基芳族化合物、吡啶酮二硫缩醛化合物、吡啶酯、吡啶硫酯、吡啶烯醇以及具有下式的化合物



[0059] 其中

[0060] R¹选自具有1-20个碳的烷基、烯基、炔基、芳基和芳烷基或被独立地选自羰基、三烷基甲硅烷基、SO₃⁻、-OSO₃、糖基、PO₃⁻、-OPO₃、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵或季磷的1-3个基团部分取代的任一种前述基团，X选自C1-C8烷基、芳基、芳烷基、具有1-20个碳原子的烷基或烷基羰基、三烷基甲硅烷基、SO₃⁻、糖基和PO(OR') (OR'')，其中R'和R''独立地选自C1-C8烷基、氰基烷基、氰基芳基、氰基芳烷基、三烷基甲硅烷基、碱金属阳离子、碱土金属阳离子、铵阳离子和三烷基磷阳离子，Z¹和Z²独立地选自O和S原子，并且R²和R³独立地选自H和C1-C8烷基。

[0061] 另外的化学发光标记公开于US5497072、US523212、US5593845、US5922588、US60130803、US6696569、US6891057和US20100267071中。可采用这些或其他化学发光标记中的任一种。特别合适的化学发光标记和化学发光标记的特异性结合配偶体包括US20100267071中公开的那些。

[0062] 活化剂标记的特异性结合配偶体

[0063] 活化剂标记的特异性结合配偶体通常以小于10⁻⁴M，具体地小于10⁻⁶M，并且最具体地10⁻¹¹M至10⁻⁷M的浓度存在于反应混合物中。

[0064] 活化剂标记的特异性结合配偶体包括通常不可逆地结合到特异性结合配偶体的活化剂标记。可使用任何合适的活化剂标记。当化合物满足两个要求时，其可适于作为活化剂标记。首先，它能够从还原剂接受电子或向氧化剂提供电子，或在一些罕见情况下接受或提供多个电子，形成自由基、离子自由基，或在不常见的情况下形成离子。此类自由基、离子自由基或离子有时被称为活化的活化剂标记，并且活化的活化剂标记的形成有时被称为活化活化剂标记。其次，一旦形成活化的活化剂标记物，它应当能够活化化学发光标记的特异性结合配偶体上的化学发光标记，并且如果适用于未结合的化学发光底物，引起化学发光标记发光。

[0065] 典型的活化剂标记是过氧化物酶或具有过氧化物酶样活性的化合物。示例包括乳过氧化物酶、微过氧化物酶、髓过氧化物酶、卤代过氧化物酶、钒溴过氧化物酶、辣根过氧化物酶、真菌过氧化物酶、木质素过氧化物酶、Mn依赖性过氧化物酶、大豆过氧化物酶和不是酶但具有过氧化物酶样活性的过氧化物酶模拟化合物，例如Mn-TPPS4。

[0066] 活化剂标记的特异性结合配偶体可包括过氧化物酶或具有过氧化物酶样活性的化合物与生物分子的缀合物或络合物。在此类情况下，可采用的典型生物分子包括DNA、RNA、适体、抗体、抗体片段、抗体-DNA嵌合体、抗原、半抗原、蛋白质、肽、凝集素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和生物素。

[0067] 一个或多个活化剂标记通常通过不可逆键结合到特异性结合配偶体。该键(通常为不可逆键)可为直接连接或间接连接。在直接连接中，该一个或多个化学发光标记直接连接到特异性结合配偶体，而在一个或多个化学发光标记和特异性结合配偶体之间不使用连接基或辅助物质。直接连接通常通过不可逆键，例如离子键、共价键、疏水相互作用、氢键

等,并且最常见的是共价键。

[0068] 当采用间接连接时,连接基(在本领域中有时称为辅助物质)用于连接一个或多个化学发光标记和特异性结合配偶体。任何合适的连接基团都可使用;合适的连接基团将不会阻止一种或多种化学发光标记发光,并且通常不会使化学发光标记的特异性结合配偶体不溶于水性介质。示例性连接基包括蛋白质,例如链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、中和亲和素、生物素、阳离子化BSA、fos、jun、钥孔血蓝蛋白、免疫球蛋白(包括其片段或部分)、脂质体、胶束、合成树枝状聚合物例如AMAM、合成聚合物例如聚丙烯酸、天然聚合物例如多糖例如官能化葡聚糖、多核苷酸、适体和寡核苷酸等。多糖,特别是氨基右旋糖酐或羧基右旋糖酐,以及自组装蛋白质是最常用的。

[0069] 合适的活化剂标记的特异性结合配偶体包括US20100267071中公开的那些。

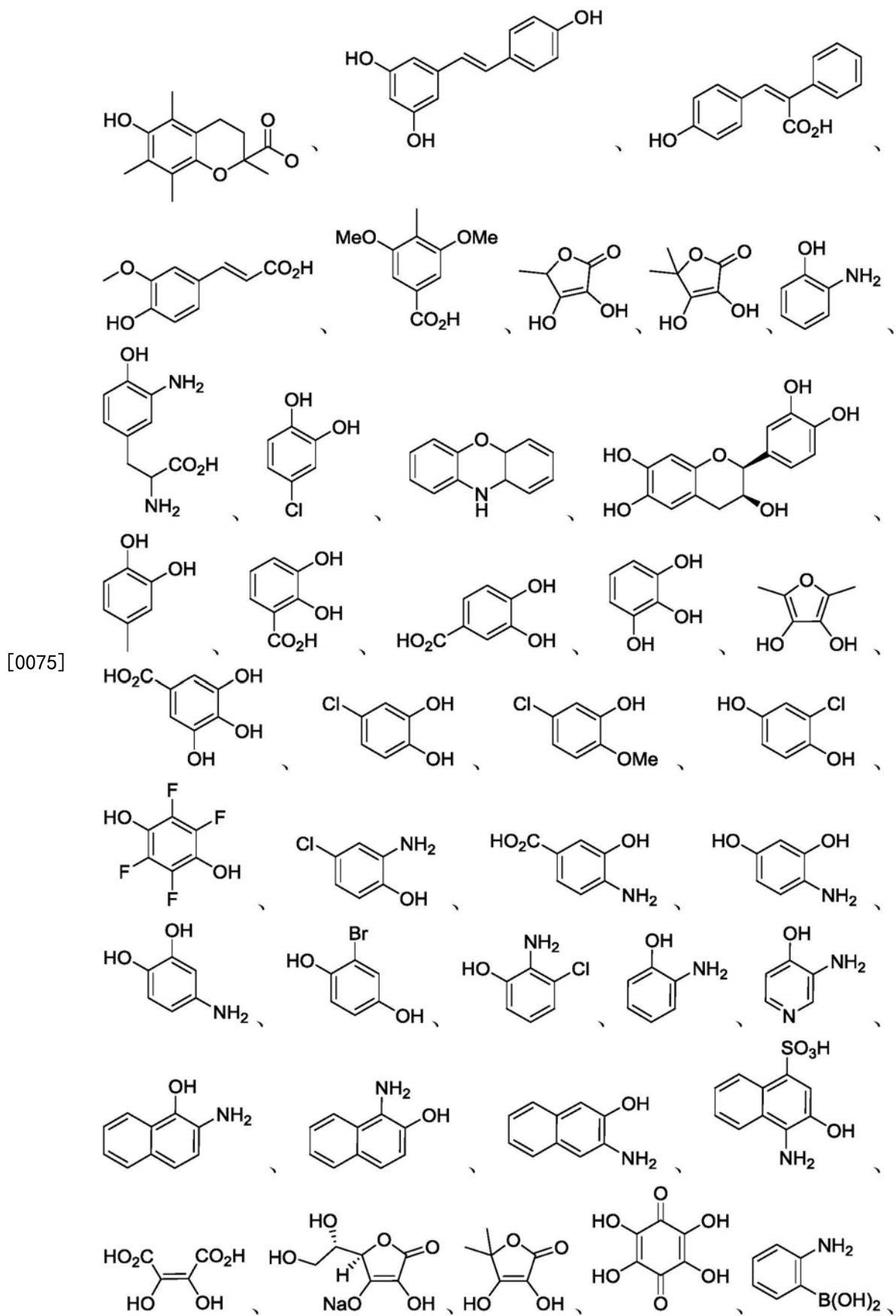
[0070] 选择性信号抑制剂

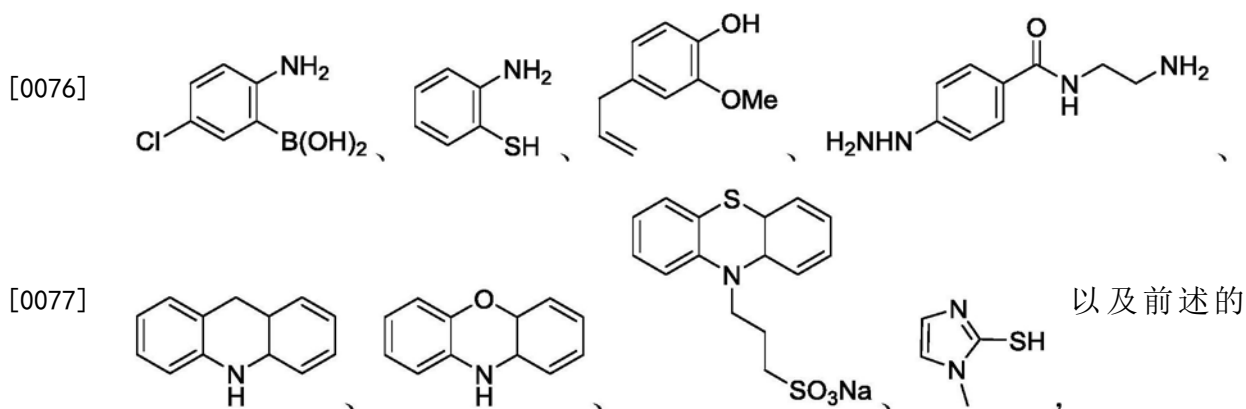
[0071] 选择性信号抑制剂降低由存在于反应混合物中但不参与本文所述的测定的过量化学发光标记的特异性结合配偶体引起的噪声信号。它们的功能更详细地描述于US20100267071中。

[0072] 通常,一种或多种选择性信号抑制剂以 10^{-6}M 至 10^{-1}M 、最常见 10^{-5}M 至 10^{-4}M 的浓度存在于反应混合物中。具体的浓度包括 $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 至 $5 \times 10^{-4}\text{M}$,并且更具体地讲 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 至 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 。

[0073] 适合用作选择性信号抑制剂的化合物包括抗氧化剂,特别是牺牲型抗氧化剂,以及其他分子,所述其他分子可与自由基、离子自由基反应,或在一些情况下与由氧化剂或还原剂与活化剂标记的选择性结合配偶体上的活化剂标记相互作用而形成的离子反应,或在一些情况下与氧化剂或还原剂反应。可采用任何抗氧化剂,因为出于本公开的目的,选择性信号抑制剂的各种选择以相同的方式起作用。具体地讲,与氧化剂或还原剂(通常为过氧化物)或与活化剂标记的特异性结合配偶体上的活化的活化剂标记反应,以淬灭过氧化物自由基或活化的活化剂标记。

[0074] 可用作选择性信号抑制剂的一些特定抗氧化剂在US20100267071中有所描述。示例包括谷胱甘肽、抗坏血酸(特别是L-抗坏血酸)、抗坏血酸盐(特别是L-抗坏血酸盐)、尿酸、L-抗坏血酸-6-棕榈酸酯、生育酚、5,6-异亚丙基-L-抗坏血酸、异抗坏血酸(包括D-异抗坏血酸、L-异抗坏血酸或两者)、亚硫酸钠、二乙基羟基胺、BHT、





组合。最常见地,使用生育酚或抗坏血酸,特别是抗坏血酸。

[0078] 在使用中,一种或多种选择性信号抑制剂可以任何合适的方式提供。例如,它们可作为触发溶液的组分提供,在这种情况下,当添加触发溶液时形成反应混合物。它们还可与化学发光标记的特异性结合配偶体或活化剂标记的特异性结合配偶体中的一者或两者一起提供,或者它们可作为固体或作为适当浓度的溶液单独添加。最常见地,一种或多种选择性信号抑制剂以比反应混合物中提供的浓度高十倍,或在一些情况下甚至高十倍的浓度提供在工作溶液中,特别是在添加触发溶液之后。工作溶液通常为水性的,并且在许多情况下可为水,例如缓冲水,但在一些情况下,其还可含有表面活性剂、乙醇、二醇等,以便提供足够高浓度的一种或多种选择性信号抑制剂。在任何情况下,将它们以适当的量添加,以在反应混合物中获得合适的浓度。

[0079] 触发溶液

[0080] 触发溶液提供由化学发光标记的特异性结合配偶体以及在一些情况下由背景试剂引起发光所需的一种或多种氧化剂或还原剂。一种或多种氧化剂或还原剂可通过与化学发光标记和(如果适用的话)背景剂直接反应来执行该功能,但更常见的是,一种或多种氧化剂或还原剂与活化剂标记的特异性结合配偶体上的活化剂标记反应以促进活化剂标记与化学发光标记的作用。

[0081] 一种或多种氧化剂或还原剂可以是活化活化剂标记的特异性结合配偶体上的活化剂标记的任何化合物。最常见地,一种或多种氧化剂或还原剂为与活化剂标记相互作用以活化活化剂标记的一种或多种过氧化物,该活化剂标记通常为过氧化物酶或具有过氧化物酶样活性的化合物。虽然可使用与过氧化物酶或具有过氧化物酶样活性的化合物反应的任何过氧化物,但常用的过氧化物包括烷基过氧化物、烷基氢过氧化物、过氧化氢、过氧化脲、过氧化氨基甲酸酯和过硼酸盐。过氧化物的浓度可变化,但通常为 10^{-8} M至3M,并且最常见为 10^{-3} M至 10^{-1} M。

[0082] 虽然不是必需的,但增强剂通常用作触发溶液的组分。增强剂可以是促进活化剂标记(通常是过氧化物酶)的反应性、降低测定中的噪音信号或两者的任何化合物。典型的增强剂包括酚类化合物、芳香胺、吩噻嗪或吩噻嗪与靛酚或吲哚苯胺的混合物、取代的羟基苯并噻唑、取代或未取代的芳基硼酸以及它们的酯和酸酐等。一些合适的增强剂公开于US20100267071、US5171668、US5206149和US5512451中。当采用增强剂时,增强剂通常以 10^{-5} M至 10^{-1} M的浓度存在。

[0083] 如上所讨论的,除了氧化剂或还原剂以及(当使用时)增强剂之外,一种或多种选

择性信号抑制剂还可存在于触发溶液中。

[0084] 触发溶液通常包含在水性溶剂中描述的各种溶质。水性溶剂通常为缓冲水。可使用可用于生物系统的任何缓冲液,只要其不干扰化学发光标记或测定的发光至不能产生足够的分析物信号的点。最有用的缓冲液将保持pH为5至10.5。特别有用的缓冲液保持pH为6.0-9.0,例如6.5-8.5,并且最特别是7.0-8.0。

[0085] 可使用的示例性缓冲液公开于US 20100267071中。最常见地,缓冲液选自磷酸盐、硼酸盐、乙酸盐、三(羟基甲胺)甲烷、甘氨酸、麦黄酮、2-氨基-2-甲基-1-丙醇、二乙醇胺、MOPS、HEPES、MES等。

[0086] 一种或多种洗涤剂或聚合物表面活性剂可用于增强发光或降低噪音信号。示例包括聚氧乙烯化烷基酚、聚氧乙烯化醇、聚氧乙烯化醚、聚氧乙烯化山梨醇酯、季铵盐(例如CTAB)和季磷盐。特别有用的示例是聚合物阳离子表面活性剂,最特别地讲是季铵盐和季磷盐。

[0087] 如上所讨论的,一种或多种选择性信号抑制剂可任选地存在于触发溶液中。

[0088] 例如,触发溶液可包含水性缓冲液、浓度为 10^{-5} M至1M的过氧化物和浓度为 10^{-5} M至 10^{-1} M的增强剂。又如,触发溶液可包含水性缓冲液、浓度为 10^{-5} M至1M的过氧化物、浓度为 10^{-5} M至 10^{-1} M的增强剂,以及浓度使得一种或多种选择性信号抑制剂在反应混合物中具有 10^{-6} M至 10^{-1} M的浓度的一种或多种选择性信号抑制剂。

[0089] 信号

[0090] 在竞争形式或夹心形式中,分析物信号可被测量为例如发光信号,例如荧光信号。最常见地,分析物信号可在添加触发溶液后几乎立即测量。分析物信号的持续时间通常仅为短暂的时间段,例如在添加触发溶液之后二十秒或更短、十秒或更短、五秒或更短、三秒或更短、两秒或更短、或甚至一秒或更短。此后,分析物信号不再可检测。在分析物信号不再可检测之后,由于选择性信号降低剂的存在,背景信号通常也不可检测或几乎不可检测。

[0091] 如上所讨论的,选择性信号降低剂通常为氧化剂或还原剂,并且最常见地为还原剂,其被牺牲氧化或还原以降低背景信号。一旦所有选择性信号降低剂通过氧化或还原被消耗,来自化学发光标记的选择性结合配偶体的信号不再被降低,并且辉光信号变得可检测。通常,在分析物信号不再可检测之后,但仍在添加触发溶液的短时间内,辉光信号将变得可检测。根据分析物信号的持续时间,在许多情况下,在添加触发溶液之后两分钟或更短、九十秒或更短、七十五秒或更短、六十秒或更短、四十五秒或更短、三十秒或更短、或甚至二十秒或更短时间内,辉光信号变得可检测。辉光信号通常是与分析物信号相同类型的信号,最常见的是发光,通常是荧光,因此可以与分析物信号相同的方式检测。

[0092] 可以至少两种方式调节辉光信号变得可检测的时间。首先,可改变选择性信号降低剂的浓度。增加选择性信号降低剂的量将增加在可测量辉光信号之前必须经过的时间,而减少选择性信号降低剂的量将减少在可测量辉光信号之前的时间。其次,可调节活化剂标记的特异性结合配偶体的量。增加化学发光标记的特异性结合配偶体的量将减少在可测量辉光信号之前必须经过的时间,而减少化学发光标记的特异性结合配偶体的量将增加在可测量辉光信号之前必须经过的时间。

[0093] 检测

[0094] 各种信号,例如辉光信号和分析物信号,可由本领域已知的任何装置检测。装置的

类型将取决于信号的类型。当信号为发光信号时,通常使用光度计或CCD相机。其他可用的检测器包括摄影胶片、X射线胶片、闪烁计数器、测光仪、透射率检测器(例如UV/Vis和IR检测器)等。最常见地,检测在试管中或在光度计中的多孔板中或在CCD相机前面进行。多孔板和CCD相机的使用可为方便的,因为在这种情况下,可同时在多孔板的不同孔中进行多个测试样品和标准样品的测定和检测。可用众多可商购获得的或本领域已知的光度计、CCD相机等中的任一种来执行检测。

[0095] 辉光信号、分析物信号或两者可为相应信号的最大波长($\lambda_{\text{最大}}$)的强度。另选地,辉光信号、分析物信号或两者可为与辉光荧光和分析物荧光相关的光谱峰的积分。

[0096] 定量

[0097] 在现有技术测定中,例如W02010099486中所述的那些,使用具有已知分析物浓度的多个标准样品的分析物信号来形成校准曲线。通过将测试样品的分析物信号与校准曲线进行比较来实现定量。发明人首次认识到,该现有技术的定量是不充分的,并且可产生大量误差,特别是当样品未高度稀释时。

[0098] 通过测量具有已知分析物浓度的多个标准样品的分析物信号和辉光信号,可在较低水平的稀释下实现精确定量。通过测量标准样品的分析物信号和辉光信号,并根据以下公式绘制分析物浓度来创建校准曲线:分析物信号/(辉光信号+分析物信号)。

[0099] 为了确定具有未知分析物浓度的样品中的分析物浓度,测量分析物信号和测试信号,然后将分析物信号/(辉光信号+分析物信号)的量与校准曲线进行比较,以便确定分析物浓度。该方法不仅可提供比不使用辉光信号制作校准曲线的未校正方法更准确的结果,而且在一些情况下,可比未高度稀释的ELISA测定法更准确,特别是对于具有干扰化合物的样品,而且在分析物本身可淬灭分析物信号的样品中。

[0100] 用途

[0101] 本文所述的测定法可用于多种体系中。ELISA体系是一种用途,但也可按照本文的指导和技术人员的知识采用涉及适体结合和其他非免疫原特异性结合配偶体的测定。示例包括溶液杂交测定、DNA印迹检测、RNA印迹检测、DNA或RNA测序、DNA或RNA指纹分析、菌落杂交和噬菌斑测定,所有这些均是本领域已知的。可分析可制备至少一种特异性结合配偶体的任何分析物。示例包括抗原、毒素、毒液、核酸、核苷酸、多核苷酸、药物、类固醇、半抗原、抗体、肽、肽片段、激素、受体、引物、小分子等。

[0102] 例示性实施方案的列表

[0103] 该实施方案列表旨在帮助理解本发明的特定方面。并非旨在进行限制。

[0104] 1. 一种测定样品中的分析物的方法,所述方法包括

[0105] 形成反应混合物,以及

[0106] 将触发溶液与所述反应混合物混合;其中

[0107] 待测定的所述分析物能够存在于所述样品中,

[0108] 所述反应混合物为水性溶液,所述水性溶液包含

[0109] 化学发光标记的特异性结合配偶体,所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含不可逆地结合到第一特异性结合配偶体的化学发光标记,所述化学发光标记的特异性结合配偶体能够结合到所述分析物以形成分析物结合的化学发光标记的特异性结合络合物,

[0110] 活化剂标记的特异性结合配偶体,所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含不可

逆地结合到第二特异性结合配偶体的活化剂标记,以及

[0111] 选择性信号抑制剂;并且其中所述方法还包括

[0112] 测量分析物信号,以及

[0113] 在测量所述分析物信号之后测量辉光信号。

[0114] 2.根据实施方案1所述的方法,其中所述反应混合物还包含增强剂。

[0115] 3.根据实施方案1所述的方法,其中所述触发溶液还包含增强剂。

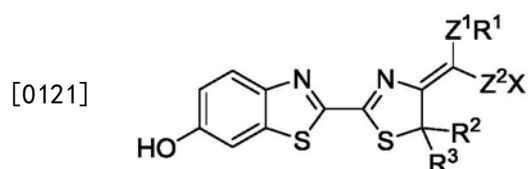
[0116] 4.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述选择性信号抑制剂引起由与
所述分析物形成络合物的所述化学发光标记的特异性结合配偶体与所述活化剂标记的特
异性结合配偶体之间的反应产生的信号的比率超过当不存在与所述分析物形成的络合物
时来自所述化学发光标记的特异性结合配偶体与所述活化剂标记的特异性结合配偶体之
间的反应的信号。

[0117] 5.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述选择性信号抑制剂选自具有
邻位或对位取向的至少两个羟基的芳族化合物、具有至少一个羟基和与所述至少一个羟基
中的一个或多个处于邻位或对位的氨基的芳族化合物、具有在烯键式不饱和基团上取代的
至少两个羟基和氮杂环基团的化合物。

[0118] 6.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述选择性信号抑制剂选自抗坏
血酸、异抗坏血酸、6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-羧酸、抗坏血酸6-棕榈酸酯、5,6-异亚
丙基-抗坏血酸、丁基化羟基甲苯、谷胱甘肽、尿酸、一种或多种生育酚和儿茶素。

[0119] 7.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述选择性信号抑制剂是抗坏血
酸。

[0120] 8.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述化学发光标记的特异性结合
配偶体包含直接或间接连接到特异性结合对成员的化学发光标记,其中所述化学发光标记
选自芳族环状二酰肼、三羟基芳族化合物、吡啶酮二硫缩醛化合物、吡啶酯、吡啶硫酯、吡啶
烯醇以及具有下式的化合物



[0122] 其中

[0123] R¹选自具有1-20个碳的烷基、烯基、炔基、芳基和芳烷基或被独立地选自羰基、三
烷基甲硅烷基、SO₃⁻、-OSO₃⁻、糖基、PO₃⁻、-OP(=O)(OR')₂、卤素、羟基、巯基、氨基、季铵或季磷的1-3个
基团部分取代的任一种前述基团;

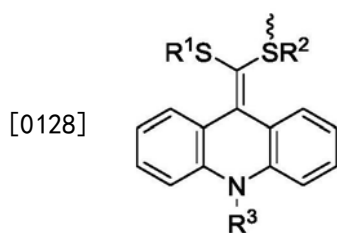
[0124] X选自C1-C8烷基、芳基、芳烷基、具有1-20个碳原子的烷基或烷基羰基、三烷基甲
硅烷基、SO₃⁻、糖基和PO(OR')₂(OR''),其中R'和R''独立地选自C1-C8烷基、氰基烷基、氰基芳
基、氰基芳烷基、三烷基甲硅烷基、碱金属阳离子、碱土金属阳离子、铵阳离子和三烷基磷阳
离子;

[0125] Z¹和Z²独立地选自O和S原子;并且

[0126] R²和R³独立地选自H和C1-C8烷基。

[0127] 9.根据实施方案1-7中任一项所述的方法,其中所述化学发光标记的特异性结合

配偶体包含直接或间接连接到特异性结合配偶体的化学发光标记,其中所述化学发光标记具有下式



[0129] 其中

[0130] 波浪线指定与所述特异性结合配偶体的连接位点或与连接所述化合物和所述特异性结合配偶体的连接基团的连接位点;

[0131] R^1 和 R^2 独立地选自取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基,其中当 R^1 或 R^2 被取代时,是被1-3个取代基取代,每个取代基独立地选自羰基、羧基、三烷基甲硅烷基、 $-SO_3$ 、糖基、 $-PO_3$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、 $C(0)NHNH_2$ 、季铵和季磷;

[0132] R^3 选自取代的烷基、未取代的烷基、取代的烯基、未取代的烯基、取代的炔基、未取代的炔基、取代的芳烷基和未取代的芳烷基,其中当 R^1 或 R^2 被取代时,是被1-3个取代基取代,每个取代基独立地选自羰基、羧基、三烷基甲硅烷基、 $-SO_3$ 、糖基、 $-PO_3$ 、卤素、羟基、巯基、氨基、 $C(0)NHNH_2$ 、季铵和季磷。

[0133] 10.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述活化剂标记的特异性结合配偶体包含直接或间接连接到特异性结合对成员的活化剂标记化合物,其中所述活化剂标记选自过渡金属盐、过渡金属络合物和酶,并且其中所述活化剂标记具有过氧化物酶活性。

[0134] 11.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述活化剂标记为过氧化物酶。

[0135] 12.根据实施方案11所述的方法,其中所述活化剂标记为辣根过氧化物酶。

[0136] 13.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述

[0137] 化学发光标记的特异性结合配偶体和活化剂标记的特异性结合配偶体中的至少一者包含辅助物质,所述辅助物质选自可溶性蛋白、链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、中和亲和素、生物素、阳离子化BSA、fos、jun、可溶性合成树枝状体、可溶性合成聚合物、多糖、葡聚糖、有机核苷酸、核苷酸、核苷、适体、脂质体和胶束。

[0138] 14.根据实施方案2-12中任一项所述的方法,其中所述增强剂为促进具有过氧化物酶活性的活化剂的催化转变的一种或多种化合物。

[0139] 15.根据实施方案13所述的方法,其中所述增强剂选自酚化合物、芳香胺、苯并噻唑、羟基苯并噻唑、芳基硼酸以及任何前述物质的混合物。

[0140] 16.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述触发溶液包含氧化剂或还原剂。

[0141] 17.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述触发溶液包含过氧化物。

[0142] 18.根据实施方案17所述的方法,其中所述过氧化物化合物选自烷基过氧化物、烷基氢过氧化物、过氧化氢、过氧化脲、过氧化氨基甲酸酯和过硼酸盐。

[0143] 19.根据实施方案18所述的方法,其中所述过氧化物为过氧化氢、烷基过氧化物或

烷基过氧化氢。

[0144] 20. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述触发溶液包含增强剂, 所述增强剂选自酚化合物、芳香胺、苯并噁唑、羟基苯并噁唑、芳基硼酸以及任何前述物质的混合物。

[0145] 21. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述触发溶液和所述反应混合物以及所述分析物的所有组分均为水溶性的。

[0146] 22. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述触发溶液、所述测定溶液或所述反应混合物均不包含直接或间接缀合至固相物质的材料。

[0147] 23. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号剂包含选自由以下项组成的组的化合物: 具有邻位或对位取向的至少两个羟基部分的芳族化合物、具有邻位或对位取向的羟基部分和氨基部分的芳族化合物、具有至少两个乙烯基羟基和氮杂环的化合物。

[0148] 24. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含抗坏血酸, 并且其中所述抗坏血酸具体地为L-抗坏血酸。

[0149] 25. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-羧酸。

[0150] 26. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含2-氨基酚。

[0151] 27. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含3-氨基-酪氨酸, 特别是3-氨基-L-酪氨酸。

[0152] 28. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含4-氯儿茶酚。

[0153] 29. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含吩噁嗪。

[0154] 30. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含2-溴苯-1,4-二醇。

[0155] 31. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含5,6-异亚丙基抗坏血酸。

[0156] 32. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述选择性信号抑制剂包含6-棕榈酸酯。

[0157] 33. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体和所述活化剂标记的特异性结合配偶体各自结合到所述样品中的所述分析物。

[0158] 34. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述化学发光标记的特异性结合配偶体包含连接到所述分析物的类似物的化学发光标记的化合物, 并且进一步地, 其中所述分析物和所述化学发光标记的特异性结合配偶体竞争以与所述活化剂标记的特异性结合配偶体结合。

[0159] 35. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述样品为包含已知浓度的分析物的标准样品。

[0160] 36. 根据实施方案35所述的方法, 所述方法还包括测量来自包含已知浓度的分析

物的多个标准样品的所述分析物信号和所述辉光信号。

[0161] 37. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 所述方法包括测量来自包含未知量的分析物的测试样品的所述分析物信号和所述辉光信号。

[0162] 38. 根据实施方案36所述的方法, 所述方法还包括制作校准曲线, 所述校准曲线将标准样品的所述分析物信号与所述分析物信号和所述辉光信号之和的商与所述标准样品中的已知浓度的分析物进行比较。

[0163] 39. 根据实施方案38所述的方法, 所述方法还包括通过将来自所述测试样品的所述分析物信号与所述分析物信号和所述辉光信号之和的商与校准曲线进行比较来定量所述测试样品中分析物的量。

[0164] 40. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述分析物信号为发光强度或发光强度曲线下面积。

[0165] 41. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中所述辉光信号为发光强度或发光强度曲线下面积。

[0166] 实施例

[0167] 材料

[0168] 乙二胺四乙酸二钾盐 (EDTA-二钾盐)、对香豆酸、吐温20、Tris碱、Tris盐酸盐和抗坏血酸钠购自密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO)。

[0169] 过氧化氢 (30%, BAKER分析) 购自宾夕法尼亚州拉德诺的VWR国际公司 (VWR International, Radnor, PA)。

[0170] 乙醇 (200标准强度) 购自宾夕法尼亚州普鲁士王市的Decon Labs公司 (Decon Labs Incorporated, King of Prussia, PA)。

[0171] PVP360 [平均分子量为360,000的聚 (乙烯基吡咯烷酮)] 和

[0172] PEG-6000 [平均分子量为6000的聚 (乙二醇)] 购自西格玛奥德里奇公司。

[0173] 黄曲霉毒素B1 (AFB1) 购自西格玛奥德里奇公司 (目录号A6636)。在使用之前, 制备AFB1在甲醇中的20ppm (份每一百万份) 溶液。

[0174] 根据表1中所述的溶液配方在PBS中制备表面活性剂A。

[0175] 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 购自马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific Incorporated, Waltham, MA)。

[0176] 表面活性剂B制备为MAKON-10表面活性剂 (伊利诺伊州诺斯菲尔德的斯泰潘公司 (Stepan Company, Northfield, IL)) 在PBS中的3%溶液 (以体积计)。

[0177] 抗黄曲霉毒素B1单克隆抗体 (抗AFB1) 购自纽约州雪莉村庄的创造性诊断公司 (Creative Diagnostics, Shirley, NY) (目录号DMAB2948)。

[0178] (抗AFB1)-吖啶 [缀合至吖啶的抗AFB1] 由宾夕法尼亚州西切斯特的生命诊断公司 (Life Diagnostics Incorporated, West Chester, PA) 制备并作为稳定缓冲液中的64微克/mL溶液提供。在使用之前, 将 (抗AFB1)-吖啶溶液用PBS按1:10 (以体积计) 稀释。

[0179] AFB1-HRP [缀合至辣根过氧化物酶 (HRP) 的AFB1] 以PBS中的7.05mg/mL溶液 (目录号DAGA-009H) 购自创造性诊断公司。在使用之前, 将AFB1-HRP溶液用PBS稀释至600ng/mL。

[0180] 表1. 表面活性剂A溶液

[0181]	组分	在PBS溶液中的浓度
	吐温20	3重量%
	PVP360	3重量%
	PEG-6000	3重量%

[0182] 实施例1的触发溶液制备为表2中所列组分的水性溶液。

[0183] 表2. 触发溶液组成

[0184]	组分	在触发溶液中的浓度 (g/L)
	对香豆酸	1.31
	EDTA-二钾盐	0.40
	吐温20	2.00
	过氧化氢 (30%)	11.33
	乙醇 (200标准)	32.00
	Tris碱	1.33
	Tris盐酸盐	2.22

[0185] 计算

[0186] 公式1:

[0187] 商公式分数 = 分析物信号 / [辉光信号 + 分析物信号]

[0188] 实施例1.

[0189] 干燥进料玉米使用Romer Series II研磨机 (特拉华州纽瓦克的罗墨实验室 (Romer Labs, Newark, DE)) 研磨并通过#20筛。将经过筛的玉米 (10g) 添加到50mL表面活性剂B中, 并且通过摇动混合5分钟。将来自样品的上清液通过0.45微米注射器式过滤器 (#F25029聚丙烯过滤器, 购自赛默飞世尔科技公司) 过滤。用滤液稀释AFB1原液样品 (上述甲醇中的20ppm溶液) 以制备六个测试样品, AFB1浓度为20ppb、5ppb、2.5ppb、1.25ppb、0.6ppb、和0.1ppb (ppb = 份每十亿份)。通过用表面活性剂B稀释AFB1原液样品来制备相应系列的六个标准样品。在每个AFB1浓度处制备三个重复样品。

[0190] 对于竞争性形式测定, 通过首先将掺有AFB1的样品 (10微升) 添加到微孔条中的孔中, 在微孔条 (目录号70200756107, 购自明尼苏达州梅普尔伍德的3M公司 (3M Company, Maplewood, MN)) 中制备样品。每个孔包含单个测试样品或标准样品。接下来, 将表面活性剂A (30微升)、AFB1-HRP溶液 (20微升) 和抗坏血酸钠溶液 (1微升的4mM PBS溶液) 依次添加到每个孔。用IKA MS1摇动器 (特拉华州威尔明顿的IKA基团公司 (IKA Works Incorporated, Wilmington, DE)) 以600rpm摇动微孔条10秒。然后将 (抗AFB1) -吡啶溶液 (20微升) 添加到每个孔, 并将微孔条以600rpm摇动5分钟。

[0191] 使用3M MLS II注射发光计 (购自3M公司) 将80微升触发溶液添加到每个孔。将仪器设定成使得在注射与发光信号测量之间不存在时间延迟。发光以相对光单位 (RLU) 测量。

[0192] 通过在注射触发溶液后立即积分三秒来测量初始分析物发光信号 (闪光信号)。

[0193] 通过在注射触发溶液后20秒至300秒的时间点收集一秒积分来测量辉光信号。将这些RLU值相加并以3/280 (0.0107) 的系数缩放, 以将辉光积分信号调节至与闪光信号相同的数量级。

[0194] 在表3中, 针对每个样品, 记录了测试样品的平均分析物信号 (RLU) 和标准样品的

平均分析物信号 (RLU) 值。

[0195] 在表4中, 针对每个样品 (测试样品和标准样品), 计算了平均商公式分数值 (由公式1计算)。值记录在表3中。

[0196] 在表5和表6中, 记录了每个测试样品和标准样品的所测量的分析物 (闪光) 信号和辉光信号。

[0197] 表3.

[0198]	样品中 AFB1 的浓度 (ppb)	测试样品(n=3)的平均分析物信号(RLU)与标准偏差(SD)	标准样品(n=3)的平均分析物信号(RLU)与标准偏差(SD)
	20	1121 (SD = 103)	1148 (SD = 81)
	5	1886 (SD = 210)	2661 (SD = 229)
	2.5	3026 (SD = 410)	3875 (SD = 342)
	1.25	3786 (SD = 362)	5072 (SD = 532)
	0.6	4822 (SD = 296)	6149 (SD = 328)
	0.1	5159 (SD = 219)	6627 (SD = 123)

[0199] 表4.

[0200]	样品中 AFB1 的浓度(ppb)	测试样品的平均商公式分数 (n=3)与标准偏差(SD)	标准样品的平均商公式分数 (n=3)与标准偏差(SD)
	20	0.110 (SD = 0.009)	0.096 (SD = 0.006)
	5	0.186 (SD = 0.021)	0.221 (SD = 0.013)
	2.5	0.290 (SD = 0.042)	0.331 (SD = 0.044)
	1.25	0.373 (SD = 0.051)	0.425 (SD = 0.046)
	0.6	0.482 (SD = 0.033)	0.511 (SD = 0.040)
	0.1	0.514 (SD = 0.020)	0.562 (SD = 0.019)

[0201] 表5.

[0202]	测试样品中 AFB1 的浓度 (ppb)	测试样品的分析物信号 (RLU)	测试样品的辉光信号 (RLU)
	20	977	8859

[0203]

20	1174	9552
20	1212	8734
5	1602	8573
5	1951	7478
5	2105	8710
2.5	3089	7628
2.5	3495	6698
2.5	2495	7943
1.25	3453	6979
1.25	4289	5347
1.25	3617	6899
0.6	4670	5642
0.6	4559	5270
0.6	5236	4687
0.1	5280	5283
0.1	5345	4502
0.1	4852	4877

[0204] 表6.

[0205]

标准样品中 AFB1 的浓度 (ppb)	标准样品的分析物信号 (RLU)	标准样品的辉光信号 (RLU)
20	1111	10792
20	1260	10932
20	1072	10790
5	2504	9756
5	2985	9691
5	2494	8733
2.5	3957	7098
2.5	4247	7356
2.5	3421	9323
1.25	5421	6155
1.25	5476	6806
1.25	4320	7630

[0206]

0.6	6258	6782
0.6	6485	4950
0.6	5704	6018
0.1	6788	5389
0.1	6602	4638
0.1	6490	5516