



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1886661 B

(45) 授权公告日 2010.06.02

(21) 申请号 200480035437.3

(22) 申请日 2004.09.20

(30) 优先权数据

20045022 2004.01.30 FI

60/481,456 2003.10.01 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.05.30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/FI2004/000550 2004.09.20

(87) PCT申请的公布数据

W02005/033709 EN 2005.04.14

(73) 专利权人 沃拉克有限公司

地址 芬兰土尔库

(72) 发明人 V·莱塔拉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 权陆军 黄可峻

(51) Int. Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/542(2006.01)

G12Q 1/68(2006.01)

(56) 对比文件

US 2003/0160151, 2003.08.28, 摘要, 说明书第 5 页【0069】- 第 6 页【0072】, 附图 1-3.

审查员 樊颖

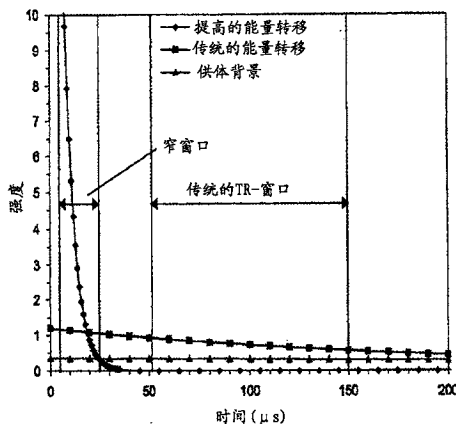
权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 6 页

(54) 发明名称

改进的均匀时间分辨能量转移测定

(57) 摘要

本发明涉及用于改进基于均匀 TR-FRET 的生物亲和力测定中的检测灵敏度的方法。所述灵敏度改善是由于采用寿命长的供体以及高的能量转移效率,和由于在时间窗口中对基于能量转移的受体发射进行了检测,所述时间窗口从供体激发开始计算在 1 微秒或以上但是小于 50 微秒的延迟后打开,而且所述时间窗口的宽度为 1 微秒或以上但是小于 100 微秒。本发明还涉及本改进的方法在多分析物测定中的用途。而且,本发明涉及适用于实施所述改进方法的设备。



1. 均匀时间分辨发光能量转移生物亲和力测定方法,其包括用能量供体标记的第一基团和用能量受体标记的第二基团,其中供体是受激态寿命长的发光标记而受体是受激寿命短的发光标记,并且测量了从供体标记到受体标记的能量转移变化,其特征在于:

- 所述基于能量转移的受体发射的检测在时间窗口中进行,所述时间窗口在 1 微秒或以上但小于 50 微秒的延迟后打开,所述延迟从供体激发计算,而且其中所述时间窗口的宽度为 1 微秒或以上但是小于 100 微秒,和

- 所述基于能量转移的受体发射的衰减被基本调整到在所述时间窗口内。

2. 权利要求 1 的测定方法,其特征在于所述延迟是 1-10 微秒,且所述宽度为 1-50 微秒。

3. 权利要求 1 或 2 的测定方法,其特征在于所述供体是受激态寿命为至少 100 微秒的镧系元素螯合物。

4. 权利要求 1 的测定方法,其特征在于所述基于能量转移的发射的衰减通过提高从所述供体到受体的能量转移效率而被调整到所述窗口内。

5. 权利要求 4 的测定方法,其特征在于如**Förster**等式所定义的供体和受体之间的距离 r 缩短。

6. 权利要求 4 或 5 的测定方法,其特征在于所述供体-受体对经选择从而使得如**Förster**等式所定义的距离参数 R_0 增加。

7. 权利要求 1 的测定方法,其特征在于同时检测至少两种分析物,其中每种分析物由特异性的供体-受体对检测。

8. 权利要求 7 的测定方法,其特征在于同时检测至少两种分析物,其中供体-受体对 D-A1 用于检测第一分析物,供体-受体对 D-A2 用于检测第二分析物,其中所述供体 D 对于所述供体-受体对而言相同或不同,而且所述第一受体 A1 的基于能量转移的发射在权利要求 1 或 2 限定的窗口中检测,所述第二受体 A2 的基于能量转移的发射在和第一受体 A1 在其中检测的窗口相同或不同的窗口中检测。

9. 权利要求 8 的测定方法,其特征在于同时检测多于两种分析物,其中所述最先两种分析物根据权利要求 8 进行检测,而第三和后续分析物通过其中所述供体和用于检测所述最先两种分析物的供体相同或不同的供体-受体对进行检测。

改进的均匀时间分辨能量转移测定

发明领域

[0001] 本发明涉及基于改进的、均匀的时间分辨能量转移的生物亲和力测定,其中灵敏度通过提高信号/背景比得到了提高。该改进的方法可用于检测单一分析物,或者同时检测两种或更多种分析物(多分析物检测)。本发明还涉及可用于实施所述改进方法的设备。

[0002] 发明背景

[0003] 本文中用于阐述本发明背景的出版物和其它材料,以及具体用来提供有关该实践的附加细节的案例,被引入作为参考。

[0004] 在两个分子的能量(供体(D)发射与受体(A)吸收)互相重叠而且互相间距合适距离的条件下,这两个分子之间发生**Förster**型不辐射的偶极-偶极能量转移(**Förster** (1948)Ann. Physik., 6, 55)。能量转移要求分子振动有正确取向。能量转移效率E由等式 $E = 1/(1+r^6/R_0^6)$ 表示,其中r是指供体和受体之间的距离,且 R_0 是供体-受体对和它们之间的介质的距离参数特征。对于采用常规供体-受体对的FRET试验而言,可用的距离尺度是 $\sim 10-100\text{\AA}$ 。

[0005] 荧光共振能量转移(FRET),也称作发光共振能量转移(LRET),已经广泛用于基础研究和生物分析技术中,作为均匀测定的平台以及作为测量生物分子中距离的光谱学标尺。Ullman首先描述了基于抗体识别反应将**Förster**型不辐射的能量转移应用到均匀生物分析测定中(Ullman, Scharzberg和Rubenstein(1967)J. Biol. Chem., 251:4172),且自此人们研制了大量的合适供体-受体探针对并应用于免疫测定(有关综述请参见I **Hemmilä**, Applications of Fluorescence in Immunoassays, Wiley, NY, 1991, 第8.3.4章)。

[0006] 由于能够完全区分由有机化合物和光散射引起的ns-寿命的背景荧光,所以时间分辨(TR)荧光分析法(在微秒-毫秒范围时域内的时间分辨)是非常好的用于均匀测定的测量方案。其中用于TR-FRET测量的合适供体包括镧系元素螯合物(穴状化合物)和一些其它金属配体络合物,它们的荧光寿命可以是微秒-毫秒时间区,所以允许能量转移在微秒-毫秒时间区内发生。这使得能够进行FRET信号的时间分辨检测。尤其是镧系元素和它们的荧光络合物在用作TR-FRET测量的供体中已经占据了重要位置。从1978年开始, Stryer、Thomas和Meares(例如,参见Thomas等,(1978), Proc. Natl. Acad. Sci., 75:5746)已经采用荧光镧系元素螯合物作为能量供体,且从此以后,人们已经描述了大量的基于均匀TR-FRET的测定方法,并取得了专利,所述方法具有局限和不足(Mathis(1995) Clin. Chem., 41, 1391; Selvin等(1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 10024)。

[0007] 在生物测定中,测定灵敏度一直都是很重要的参数。对基于FRET的测定进行测量的极其有效方式是监控受体荧光而不是供体荧光。这是因为在理想情况下,受体信号仅仅对能量转移具有特异性(受体由于能量转移被激发)而且荧光信号由仅仅一种荧光群体(fluorescent population)形成,这使得更容易进行灵敏性的检测。受体荧光监控也有助于避免和FRET探针不完全标记相关的问题。相反,供体荧光基本上总是包含至少两种不同的荧光群体:参与能量转移的供体和游离供体。两种群体在相同波长处发射,这意味着在供体

荧光通道中总是相对于高的背景（游离供体）来测量供体荧光信号中的变化。

[0008] 在 FRET 测定中的受体信号监控本身具有局限性，所述局限性基于探针对的能量转移方案以及在大多数情况下受体吸收和供体发射相互重叠的事实（有关非重叠性能量转移，请参见美国专利 No. 5998146）。所以，在基于光吸收的激发方法中，受体分子直接被供体激发光激发到和外部光源强度成比例的程度。同样由于所述光谱重叠，在某种程度上受激供体总是发射背景荧光到受体发射通道中。源自这些来源到受体发射通道的荧光信号对于能量转移而言是非特异性的，且限制了基于受体发射的 FRET 测定的灵敏度。

[0009] 人们已经描述了克服这些局限性的方法并得到了专利。Morrison 首先描述了采用瞬时区分（长寿命供体，短寿命受体和时间分辨）来避免直接受激受体分子的影响（Morrison(1988)Anal. Biochem., 174, 101；美国专利 No. 4822733）。他采用的是有机供体-受体对；苝供体（ $\tau = 400\text{ns}$ ）和藻红素受体（ $\tau = 4\text{ns}$ ）。采用发射带窄的供体可以减弱供体背景荧光在受体发射通道中的影响，这样使得能够对受体荧光进行更有效地滤光。例如，Selvin 等已经描述了在 TR-FRET 测量中采用钨螯合物和铽螯合物作为供体显著提高了 S/B 比（Selvin 等，(1994)J. Am. Chem. Soc., 116, 6029-6030；Selvin 等，(1994)Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 10024-10028）。Mathis 等采用总量子产额低的镧系元素穴状化合物作为 TR-FRET 测定中的供体，以减弱由游离供体导致的背景（美国专利 No. 5512493）。然而，仍然存在着对更灵敏 FRET- 测定的需求。

[0010] 人们也已经描述了基于均匀 FRET 的多分析物检测方法，其中由相同测定介质可以同时检测多于一种分析物。TagMan 方法（Lee 等 (1993)Nucl. Acids. Res., Vol 21, 16, 3761-3766）采用双标记寡核苷酸探针，其中荧光报道染料和猝灭剂两者附着在相同寡核苷酸中，而且探针的 Tag-DNA 聚合酶切割导致测定中信号发生变化。在 TagMan 双测定中，供体具有不同的发射波长，且供体信号通过光谱方法进行分辨。分子信标（Molecular Beacon）方法（Tyagi S. 和 Kramer F. R. (1996)Nat. Biotech., 14, 303-308, 美国专利 No. 5925517）也采用了双标记寡核苷酸探针，其中荧光报道染料和猝灭剂两者附着到相同寡核苷酸中。信号变化基于探针的自身杂交。当探针没有结合到靶上时，由于探针的自身杂交供体荧光猝灭，这导致报道染料和猝灭剂互相靠近。当结合到靶上时，自身杂交得以避免，且可以获得供体荧光。在双分子信标测定中，供体具有不同的发射波长，且不同的供体信号通过光谱方法进行分辨。**Hemmilä**等已经描述了基于均匀 TR-FRET 的多分析物检测，其中对不同分析物采用了独立的供体-受体对（WO 98/15830）。他们没有详细描述该方法，但是要求保护的供体是镧系元素螯合物（Eu、Tb、Sm），且要求保护的受体是寿命短的荧光团。人们可以假定**Hemmilä**描述的方法中信号分离是基于光谱可分辨的供体发射和 / 或光谱可分辨的受体发射的。

[0011] 有关光信号分离方法的问题是通常合适受体荧光团的发射光谱是宽的。难以完全避免染料信号之间所谓的串扰，这意味着一种染料在第二染料波长处的发射也占其总发射的一定百分比。在高灵敏度测定中，这种串扰降低了测定的检测极限，并可能导致假阳性结果，尤其是在所检测化合物之一和其它化合物相比严重过量的情况下。光谱串扰可以随后进行数学校正，但是它使数据处理更加困难。上述方法没有一种适于对所有分析物采用一个且相同的供体同时进行多分析物检测。**Hemmilä**描述的方法（WO98/15830）使得在多标记测定中采用一种供体和不同的受体，但是由于能量转移的光谱依赖性，所以针对该相

同供体的合适受体必须具有相当相似的光学性质。这样导致难以在光学上避免不同受体信号的串扰。

[0012] 常规的均匀 TR-FRET 生物亲和力测定通常基于使用寿命长的镧系元素螯合物作为供体分子以及采用有机发色团（纳秒寿命）作为受体分子。这些镧系元素螯合物的寿命通常为 $\sim 100\text{--}2500\ \mu\text{s}$ ，具体取决于螯合物结构。长的供体寿命（和游离受体的寿命相比较）使得基于能量转移的受体信号能够在微秒时间区内发生，且这使得能够对基于 FRET 的受体信号进行时间分辨检测。在微秒时间区内进行时间分辨检测（在激发脉冲后将信号和一定的延迟时间结合起来）有效去除了来自样品基质的纳秒寿命背景信号的影响，因此提高了测定的信号 / 噪声比 (S/B 比)。镧系元素供体的其它优点在于镧系元素的发射光谱由窄峰组成，这样使得在受体发射测量通道中能够对供体背景进行光谱减弱（采用滤光）。当适当选择了测量波长时，这使得在基于受体发射的 TR-FRET 测定中能够另外提高 S/B 比。

[0013] 通过改变能量转移速率来调整基于能量转移的受体荧光寿命的能力，在 TR-FRET 测量和应用中并没有充分利用。在采用 ms 寿命供体时将能量转移信号寿命缩短到数个微秒的能力也没有被用来提高 TR-FRET 测定灵敏度。例如，受体寿命调整已经得到了应用，其中已经开发了所谓的寿命和颜色都实现定制的发色团 (Chen 和 Selvin (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 657-660)。在这个应用中，ms 寿命供体和 ns 寿命受体被结合到刚性模板中，且形成的具有一定能量转移效率的能量转移络合物被认为是新型单一发色团，它可以进一步附着到目标分子上。但是，受体寿命调整并没有直接用来对 TR-FRET 测量进行最优化处理。在一些公开的论文中，当采用毫秒寿命供体和 ns 寿命受体时，在受体测量通道中已经获得了寿命非常短的荧光信号（微秒时标），但是所述信号的短暂并没有被特别用来提高测定灵敏度。在一些具体情况下，基于短寿命信号是直接由受激受体分子或者由检测器人为现象形成的这个假设，在 TR 数据分析中抛弃了短寿命受体群体（例如，参见美国专利 No. 5656433, Selvin 等 (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 6029-6030, Selvin 等 (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10024-10028)。然而，由于作为时间函数的非常强的信号衰减，所以直接受激的 ns 寿命受体并不能在微秒时标大量发射。除了检测器人为现象以外，高效能量转移方法还可以产生非常强的信号，该信号的寿命为几个微秒。采用尖端 TR 仪器，这种类型的现象可用来提高 TR-FRET 测定的灵敏度。

[0014] 人们迫切需要用于单分析物检测、但特别是用于多分析物测定的灵敏度提高的 TR-FRET 测定。本发明的目标是克服上述局限性。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明的目标是提供改进的、基于均匀时间分辨能量转移的生物亲和力测定，其中所述灵敏度通过提高信号 / 背景比得以提高。通过提高从供体到受体的能量转移效率以及通过在短暂延迟后在窄时间窗口 (time window) 中检测受体发射，实现了本目标。另一目标是基于所述改进的、基于均匀时间分辨能量转移的生物亲和力测定，提供同时检测两种或更多种分析物的方法。另一目标是提供能够测量在短暂延迟后受体发射的改进设备。

[0017] 因此，根据一个方面，本发明涉及均匀时间分辨发光能量转移生物亲和力测定，其包括用能量供体标记的第一基团和用能量受体标记的第二基团，其中供体是受激态寿命长的发光标记而受体是受激寿命短的发光标记，并且测量了从供体标记到受体标记的能量转移变化。根据本发明，对基于能量转移的受体发射的检测在时间窗口中进行，所述时间窗口

在 1 微秒或以上但小于 50 微秒的延迟后打开,所述延迟从供体激发开始计算,而且其中所述时间窗口的宽度为 1 微秒或以上但是小于 100 微秒。所述基于能量转移的受体发射的衰减被基本调整到在所述时间窗口内。

[0018] 根据另一方面,本发明涉及可用于进行上述均匀时间分辨发光能量转移测定的设备,其中所述设备包括用于供体激发的光源、用于检测基于能量转移的受体发射的检测器、激发滤光片、分色镜、样品、发射滤光片、光学透镜、计数器和数据分析仪。根据本发明,从激发光脉冲计算,由该设备导致的背景在小于 1 微秒内熄灭。

[0019] 根据第三方面,本发明涉及均匀的时间分辨发光能量转移生物亲和力测定,其包括用能量供体标记的第一基团和用能量受体标记的第二基团,其中所述供体是受激态寿命长的发光标记而所述受体是受激寿命短的发光标记,并且测量了从所述供体标记到所述受体标记的能量转移变化。根据本发明,

[0020] - 至少两种分析物被同时检测,而且每种分析物通过特异性供体-受体对检测,其中针对每一分析物的供体和/或受体可以相同或不同,和

[0021] - 针对不同分析物(i)的受体发射衰减时间(τ_i)不同,和

[0022] - 测量了受体发射信号的整个衰减曲线,和

[0023] - 用寿命等式

$$[0024] \quad I(t) = \sum_i \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

[0025] 拟合测得的衰减曲线,

[0026] 其中 $I(t)$ 是在时刻 t 的混合物强度, α_i 和 τ_i 是所述测量曲线中的第 i 种荧光群体的幅度和相应寿命,和

[0027] - 利用拟合的等式中的不同幅度 α_i 对不同分析物进行定量。

[0028] 附图简述

[0029] 图 1 示出了根据本发明的测定的原理,其中绘制了信号强度对时间的关系曲线。显示了传统 TR 窗口和根据本发明的窄窗口的比较。曲线解释:用菱形表示的曲线是根据本发明的调整到窄窗口内的受体发射;用矩形表示的曲线示出了传统市售 TR-FRET 测定的受体发射例子,且用三角形表示的曲线是来自未结合供体的背景。

[0030] 图 2A 和 2B 描述了将本方法用于同时检测两种分析物,并证实消除了受体信号的光学串扰。使来自第一分析物的受体的能量转移发射适应于短暂延迟后打开的窄窗口(菱形)。来自第二分析物的受体的能量转移发射的寿命(三角形)经调整后略微长于第一分析物的寿命,且在另一 TR 窗口中检测,所述 TR 窗口在第一分析物的短寿命受体信号已经衰减后的时刻打开(图 2A)。图 2B 示出了两种受体信号的相对强度对波长的关系曲线。第一分析物发射出对第二分析物光学通道的串扰,但是所述串扰通过采用合适的 TR 窗口定位得以避免。另一方面,第二分析物发射出对第一分析物 TR 窗口的串扰(分析物-2 在和分析物-1TR 窗口相同的时标进行发射),但是第二分析物的发射可以在光学上和第一分析物的发射相分离。

[0031] 图 3A 示出了对寿命不同(3.5 μ s 和 25 μ s)但在相同波长发射的两种荧光群体的衰减曲线的模拟(矩形)。为了比较,直线是相同荧光群体在单独测量时的相应衰减曲线。两种荧光群体都为该总衰减曲线贡献了自己的指数项。

[0032] 图 3B 举例说明了采用本方法作为 DNA 测定来同时检测两种不同的 DNA 序列（突变的和非突变的）。对于两种分析物而言，供体 - 受体距离不同，因而受体发射寿命不同。

[0033] 图 4 示出了实施根据本发明的方法的仪器装置。

[0034] 图 5 示出了对于 DNA 测定中供体和受体之间的各种距离而言，基于能量转移的受体发射的 S/B 比与时间的关系曲线。

[0035] 图 6 示出了对于 Δ -F508 稀释物系列而言，信号与靶浓度的关系曲线。

[0036] 图 7 示出了对于 Δ -F508 和 -2221ct 分析物的稀释物系列而言，单检测和双检测时的信号与浓度的关系曲线。

[0037] 发明详述

[0038] 本发明涉及用于改善基于均匀 TR-FRET 的测定的检测灵敏度的方法和设备。它进一步涉及实施均匀 TR-FRET 多标记测定的方法，其中从相同介质可以同时以改善的灵敏度检测多于一种分析物。所述方法可应用于 TR-FRET 测定，其中供体和受体通过特异性结合到分析物上形成能量转移络合物，且随后监控基于 FRET 的敏化的受体信号。

[0039] 为了在 TR 测量（在本情形中是基于能量转移的受体发射）中获得强信号，需要在该信号明显衰减之前，在激发脉冲后的最小化延迟后，测量基于能量转移的发射。在 TR 测量中必需的（最小）延迟时间是背景荧光寿命的函数。在生物测定中正常的背景荧光（所谓的自身荧光）由有机材料产生，且通常寿命为 $\sim 10\text{ns}$ 或以下。 $1\ \mu\text{s}$ 的延迟时间足以将寿命为 10ns 的背景衰减到原来的 $\sim 1/2.7 \times 10^{43}$ ，这表明在 TR 测量中理论上可以采用极其短的延迟。但是，由于当采用短延迟时间时市售 TR 仪器的性能受限，所以在常规 TR-FRET 测定中并没有利用这一方面。即使仪器用户界面允许选择极其短的延迟时间进行测量，但通常可用的最短延迟时间是 $\sim 10\text{--}100\ \mu\text{s}$ ，最通常 $> 50\ \mu\text{s}$ 。性能受限是因为采用短延迟时间，尤其是 $1\text{--}50\ \mu\text{s}$ 时，仪器背景和其它和仪器相关的问题增加，这导致灵敏性 TR 检测不可行，因此就不能检测出在 $1\text{--}50\ \mu\text{s}$ 时标内发生的快速事件。这是使常规 TR-FRET 化学最优化至信号寿命为 $\sim 100\text{--}1000\ \mu\text{s}$ 的部分原因，即使市场上的有些高级 TR 仪器可能适用于延迟时间极短的 TR 测量。

[0040] TR-FRET 受体发射测量的另一方面是 TR 窗口宽度。由于能量转移的光谱重叠原则，游离供体通常也以受体发射波长发射背景荧光。另外，由于在常规 TR-FRET 测定中使用的是长寿命供体，所以游离供体的背景信号不能通过瞬时方法进行区分。降低所得供体背景水平的合适方法是缩短 TR 窗口的宽度。但是，这个方面在常规 TR-FRET 测定中并没有充分利用，这是由于为了能对来自测定的统计学上足量的总体信号进行积分，TR 窗口必须相对较宽。

[0041] 对于供体寿命长（微秒）和受体寿命短（纳秒）的情况，基于 FRET 的受体信号的寿命是能量转移效率的函数， $E = 1 - \tau_{AD} / \tau_D$ ，（其中 E 是能量转移效率， τ_{AD} 是基于能量转移的受体发射的寿命或衰减，且 τ_D 是供体发射的寿命）。这意味着常规测定中在不导致 FRET 信号对仪器而言太快的条件下，能量转移效率不能太高（通常 $E \leq 50\%$ ）。当 FRET 信号寿命为 $\sim 100\text{--}1000$ 微秒时，由于在延迟时间内能量转移信号并没有完全猝灭，所以在常规 TR 仪器测量中可以采用 $\geq 50\ \mu\text{s}$ 的延迟时间。但是，由于受损的能量转移效率，所以基于 FRET 的信号并不是尽可能的高，且为了获得统计学上足量的总信号，需要相当长的信号积分时间（TR 窗口宽度为 $\sim 100\text{--}1000\ \mu\text{s}$ ）或者数目显著增加的激发脉冲。使用长 TR 窗口

增加了测定中测量的游离供体背景量。另外,当能量转移效率受损时,尽管积分时间长,但是由于能量转移过程慢,所以无论如何都有相当大部分的受体信号在测量窗口外面发射。在常规 TR-FRET 测定中,所谓的 TR 窗口透射率(比率:TR 窗口内的积分信号/衰减曲线的积分信号)低。

[0042] 长寿命供体(比如镧系元素螯合物,寿命为~1-5000 微秒,优选 1000-5000 微秒)和作为受体的短寿命荧光团使得 FRET 受体信号可以在微秒时间区内发生,这使得可以采用 TR 测量对纳秒寿命背景信号和直接受激受体分子的信号进行瞬时区分。但是,受体发射通道中的供体背景荧光(由于光谱重叠)总是限制 FRET 测量中的灵敏度,且它不能通过瞬时方法区分。本发明的主要观点是采用长寿命供体和高能量转移效率,以及利用短延迟时间和窄测量窗口在缩短的(从约 100-1000 微秒到约 1-最多 100 微秒)时标内进行 TR-FRET 测量。应该强调的是,本发明的新特征涉及 FRET 染料对,其中供体寿命长($\geq 1 \mu s$, 优选数百或数千微秒),并采用高能量转移速率获得了可检测的短寿命受体信号。如同本发明所述,采用短寿命供体(寿命小于几个微秒)并进行基于寿命的测量,可能获得相似或更短寿命的受体信号(例如,参见 Kang 等(2002) *J. Fluorescence*, 12, 1, 97-103)。然而,所述发明并不涉及那种系统,而且那种系统并不提供和本发明方法相同种类的优点。在分析物特异性络合物中的具有高能量转移效率(E)(例如, $E > 0.9$)的供体-受体群体,由于能量转移的概率增加,所以产生了提高的敏化受体信号。重要的是,基于 FRET 的受体信号的寿命取决于能量转移效率,且当能量转移效率高时,和未猝灭的供体相比,敏化受体信号的寿命显著缩短($\tau_{\text{受体}} = (1-E) \tau_{\text{供体}}$)。这使得可以在 TR-FRET 测量中能够利用时标缩短的好处。本发明的一个主要方面是通过适当提高能量转移效率调整受体信号的衰减,以使其基本适应于缩短的 TR 窗口。在延迟短而且测量窗口窄的情况下,由于 TR 窗口的透射率更好(比率:TR 窗口内的积分信号/衰减曲线的积分信号)以及能量转移概率增加,所以增强了测量到的能量转移信号。同时,检测到的由附近没有受体的受激供体群体产生的长寿命供体背景荧光的量作为窗口长度缩短的函数而减弱。供体寿命越长,从一定群体的游离供体得到的(在短 TR 窗口中)背景越低,这是因为长荧光寿命减少了在某时间点光子发射的概率。图 1 示出了根据本发明的测定的原理,其中绘制了信号强度对时间的关系曲线。示出了可用的常规 TR 窗口的例子和本发明的窄窗口。通过改善能量转移以及在窄窗口中检测受体发射,提高了检测灵敏度。在该窄窗口中,所述提高的受体信号可以几乎完全测量出来,同时检测到的背景信号变弱。这样和传统的 TR-FRET 测定相比,提高了 S/B 比,在所述传统的 TR-FRET 测定中受体发射寿命通常是 100-1000 微秒。

[0043] 如图 1 所示,基于能量转移的受体发射的衰减已经被调整,从而基本适应于窄(即,缩短的)时间窗口。这个情形是通过根据等式 $\tau_{\text{受体}} = (1-E) \tau_{\text{供体}}$ 调整从供体到受体的能量转移效率 E 来继而适当调整受体寿命获得的。能量转移效率又可以根据 Förster 等式 $E = 1/(1+(r/R_0)^6)$ 以多种方式增加,其中 r 是指供体和受体之间的距离,且 R_0 是供体-受体对和它们之间介质的距离参数特征(R_0 是 D-A 重叠积分、供体量子产额、介质折射率以及供体和受体偶极之间的取向因子的函数)。因此,缩短供体和受体之间的距离 r 使能量转移效率增加。备选地,或者另外,可以选择供体-受体对,从而使距离参数 R_0 增加,如上述 Förster 等式所定义的那样。高的 R_0 值也使能量转移效率提高。其它提高能量转移效率的方法也是公知的。例如,已经有人报导金属表面的存在会影响能量转移效率(Lakowicz

等 (2003) J. Fluorescence, Vol. 13, No. 1, 69-77)。

[0044] 优选, 延迟为 1-10 微秒, 更优选 1-5 微秒。时间窗口宽度优选为 1-50 微秒, 更优选为 1-25 微秒。

[0045] 供体优选为受激态寿命为至少 100 微秒的镧系元素螯合物。W098/15830 及其中引用的参考文献公开了特别合适的镧系元素螯合物。

[0046] 受体优选是量子产额尽可能接近一 (1)、而且摩尔吸光系数高, 优选超过 100000 的强发光分子。受体必须和供体有能量重叠, 优选受体的吸收和供体的能量供给性发射重叠。受体的优选特征是它在供体具有最小或者没有任何发射的波长处有强烈发射。受体的寿命要使得直接受激受体的发射应该在激发脉冲后的 $1\ \mu\text{s}$ 内完全衰减。在 W098/15830 及其中引用的参考文献中公开了合适受体的例子, 但是在本领域还有其它许多其它公知的受体。

[0047] 根据本发明的改进测定尤其适用于核酸测定, 在此供体标记探针和受体标记探针可以经分析, 从而在供体和受体之间形成极短的控制距离。但是, 这个方法也可应用到其它生物亲和力测定中, 前提是可以确保供体和受体之间的能量转移效率得到提高。

[0048] 本发明在多分析物测定中的用途

[0049] 通过对每种分析物采用独立的特异性供体 - 受体组合, 和利用通过调整能量转移效率来调整敏化受体发射寿命的能力, 可以进行均匀的 TR-FRET 多分析物测定。本发明的新特征是在不同受体存在着部分光学串扰的情况下, 对多种分析物采用一种且相同的供体分子, 以及基于信号寿命和滤光来分辨分析物特异性受体信号。本方法完全区分了受体标记的光学串扰, 这在正常情况下在对多种分析物采用相同供体时是极其可能的。但是, 如果可以通过光谱方法完全分辨不同的受体信号, 那么基于寿命的信号分离就不是必需的了。

[0050] 例如, 可以同时检测两种分析物, 其中用供体 - 受体对 D-A1 检测第一分析物, 且用供体 - 受体对 D-A2 检测第二分析物。对于两种分析物, 供体 D 可以不同, 但也可以相同。第一受体 A1 的基于能量转移的发射根据本发明采用短延迟和窄时间窗口检测, 而第二受体 A2 的基于能量转移的发射在当 A1 能量转移信号已经衰减时才打开的窗口中 (其可以在针对 A1 信号的 TR 窗口关闭之前或之后) 检测。因此, 可以同时采用信号寿命和滤光将不同的受体信号分开。在双测定中, 分析物 -1 受体信号的寿命可以通过使能量转移效率非常高而调短 (例如, 寿命 < 5 微秒), 且检测灵敏度也由本发明的窄时间窗口而得到提高。随后, 通过采用合适的分析物 -2 特异性供体 - 受体组合以及通过将能量转移效率仍旧保持在高水平, 将分析物 -2 受体信号的寿命调整成比分析物 -1 的寿命略长 (例如, 25-50 微秒)。现在, 如果针对分析物 -1 和分析物 -2 的受体存在着部分光学串扰, 则可以通过 TR 测量窗口的合适定位以及滤光来分离分析物信号。图 2A 和 2B 显示本方法用于同时检测两种分析物, 其中信号分离是基于荧光寿命和滤光的。分析物 -1 在分析物 -2 的发射通道发射 (图 2B), 但是通过对分析物 -2 采用合适的 TR 测量窗口并在分析物 -1 的串扰已经衰减时测量分析物 -2 的发射, 消除了这种串扰 (图 2A)。分析物 -2 在分析物 -1 的 TR 测量窗口内发射 (图 2A), 但所述串扰通过滤光得以消除 (图 2B)。无需数学校正。荧光团的常见特征是其发射光谱在发射最大值后有长的红移尾巴。这种宽光谱使光学信号分离变得困难, 即使荧光团的发射最大值互相相差数十纳米也是如此 (例如, 参见图 2B)。当对许多不同受体采用相同供体时, 在受体信号之间极其可能发生光学串扰。这是因为为了能够参与和某些供体

的能量转移过程,不同的受体必须具有相当类似的性质。

[0051] 在本发明的多分析物测定中,也可以基于荧光寿命分析来分离分析物信号。这通过测量受体信号的整个衰减曲线以及通过用寿命等式拟合该衰减数据而得以实现。发射寿命不同的多种受激群体的总荧光强度的时间依赖性可以用多-指数等式 [1] 表示

$$[0052] \quad [1] \quad I(t) = \sum_i \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

[0053] 其中, $I(t)$ 是在时刻 t 的混合物强度, α_i 和 τ_i 是第 i 种荧光群体在测得的曲线中的幅度和相应寿命。基本上,等式 [1] 意味着在被测混合物中的每一个具有不同寿命的荧光团都为混合物的衰减曲线贡献了自己的指数项。混合物的试验衰减数据可以根据等式 [1] 进行拟合,且在拟合的等式中,不同幅度 α_i 和具有不同寿命的荧光群体的浓度成比例。采用本发明的多分析物测定,不同的分析物可以经调整以具有明显可区分的受体发射寿命,而且可以为每种分析物预先确定寿命。该预定寿命在对分析物混合物的测量衰减数据进行拟合时进一步用作常数。这种其中拟合寿命可以预定的拟合程序,由于和拟合等式 [1] 中的所有参数相比,拟合参数数目下降,所以使荧光衰减曲线的拟合结果更精确。荧光寿命分析的其它优点在于不同分析物在相同波长处可以有自己的受体发射,而且基本上对所有分析物而言受体可以是相同的分子。分析物信号的不同寿命是在荧光寿命分析的情况下进行 TR-FRET 多分析物测定的必须要求。

[0054] 如果受体具有不同的发射波长,则可以分开测量和拟合两种分析物的衰减曲线。图 3A 示出了衰减曲线的例子,其中两种受激荧光群体以不同寿命发射。

[0055] 寿命数据可以例如采用多通道定标器 (scaler) 设备测量,所述定标器设备具有一定数目的数据通道。所述通道可以具有一定的时间长度 (例如,1 微秒)。有关激发时刻和检测器信号的信息被给予该设备。在激发时刻后,来自检测器的信号在第一微秒之内被通道 1 收集。在第二微秒以内,信号由通道 2 收集,等等。可以绘制出所有通道收集的信号对时间的关系曲线,以得到测得信号的衰减曲线。通道的时间长度限定了衰减数据的分辨率,而通道数以及通道的时间长度一起限定了测量的衰减数据的总时间长度。例如,当分辨率为 $1 \mu s$ 并且有 1000 个通道时,衰减数据的测量是从 0 到 1000 微秒进行的。优选地,衰减信号的收集时间应该足够长,从而使得信号完全熄灭。收集数据的终点取决于信号的寿命。优选在信号实际寿命的约 5-10 倍长的时间收集数据。将有关该信号的合适数据组送到处理器并用来进行曲线拟合。当数据含有误差时,例如,由于设备噪声,可以省略某些时间点,即某些通道。应该强调的是,还有许多和上述方法不同的其它方法适用于获取荧光信号的衰减信息。

[0056] 根据本发明的测定也可用于同时检测大于两种分析物的多分析物测定中。在这种情况下,前两种分析物可以如上所述进行检测 (同样通过对这两种分析物采用不同的供体并采用上述方法)。第三和后续的分析物可以进一步采用相同供体、合适的受体和能量转移速率来检测,这样使得能够基于上述原理分离不同的受体信号。优选地,检测后续分析物,从而使得接下来的分析物总是都有新供体可用。这样更容易找到合适的、光谱可分辨的受体,且也便于对每一种其它分析物进行寿命调整。对每一种分析物而言,可以将能量转移速率保持在非常高的水平,这提高了检测灵敏度。

[0057] 图 3B 示出了双 TR-FRET DNA 测定的模型系统。供体标记的 DNA 探针结合到两种

分析物上(单链DNA),且两种序列特异性探针对所述突变的或非突变的DNA序列进行识别。对两种分析物而言,供体-受体距离略微不同,因而敏化的受体发射寿命略微不同。如本发明所述,通过同时采用滤光和寿命,可以没有串扰地测量受体信号。

[0058] 实施根据本发明的方法的设备

[0059] 图4示出了用于实施根据本发明的均匀时间分辨发光能量转移测定的仪器装置。该设备包括用于供体激发的可调节光源1、激发滤光片2、用于折射激发光和发射光的透镜3、6和8、分色镜4、样品架5、发射滤光片7、用于检测基于能量转移的受体发射的检测器9和用于处理检测器信号的计数器10。短脉冲光通过激发滤光片2、透镜3和分色镜4照射到样品5上。样品中的供体吸收光能并受激。附近具有受体的供体参与能量转移,所述基于能量转移的受体发射透过分色镜4、透镜6和8以及发射滤光片7透射到达检测器9。对于测量信号适当选择激发滤光片2、分色镜4和发射滤光片7。计数器10进一步用来在所选TR窗口中测量每种受体的TR信号和/或测量发射的衰减曲线。重要的是该设备产生的背景要短于1微秒。因此,为了充分利用本发明方法的优点,需要特定的TR仪器。主要要求是计数窗口在激发脉冲后的合适时标(例如,在微秒等级)打开并具有高分辨率,从而使检测的短寿命受体信号可以具有最低水平的仪器噪声,所述噪声由光源、光学系统和TR检测器系统产生。这意味着该仪器至少配有脉冲宽度短的光源(从激发时刻开始,在1微秒后激发脉冲完全熄灭)和高质量的光学系统(非荧光的)以缩短仪器噪声寿命。另外,应该保护检测器系统免于遭受激发脉冲,从而克服(例如,采用遮光器、偏振器、选通器或一些其它方法)瞬时荧光脉冲(例如,直接激发光、光学系统的荧光、自身荧光和其它来源)在激发时刻冲击检测器,而不出现检测器噪声的增长。TR检测器还应该能够在窄计数窗口中测量高速光子流而不使其达到饱和。

[0060] 可用于激发供体的光源的例子是激光器,比如氮激光器,和传统上使用的氙灯相比,它在约10纳秒后熄灭,而后者完全消失需要约10-40微秒,具体取决于灯类型。

[0061] 下面通过非限制性实施例阐述本发明。

实施例

[0062] 实施例1

[0063] 在针对 Δ F508突变DNA靶的均匀FRET测定中调整基于能量转移的受体荧光寿命。

[0064] 采用四种不同的供体-和受体-探针组合对 Δ F508突变DNA进行了均匀测定(表1)。这些探针组合允许对相同测定进行四种不同的修改,其中所述基于能量转移的受体信号的寿命通过采用不同的供体-受体距离(D-A距离:6、8、10或12碱基对(bp)单链DNA)来调整。

[0065] 表1

[0066]

Δ F508 靶	5' TTAAAGAAAATATCATTTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCA3'
W01724-AlexaFluor647	3' Alexa647-modU-TACTTATATCTATGTCTTC5'

ΔF508 靶	5' TTAAAGAAAATATCATTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCA3'
W01725-AlexaFluor647	3' Alexa647-modU-TATATCTATGTCTTCGC5'
W01726-Eu	3' AAATTATAGTAACCACAAA-Eu5'
W01727-Eu	3' AAATTTTATAGTAACCACA-Eu5'

[0067]

D-A 对	D-A 距离 (BP)
W01724-Alexa647+W01726-Eu	6
W01724-Alexa647+W01727-Eu	8
W01725-Alexa647+W01726-Eu	10
W01724-Alexa647+W01727-Eu	12

[0068] ΔF508 突变靶 DNA 和特异性探针序列采用标准亚磷酰胺化学 (Expedite 8909DNA- 合成仪, PerSeptive Biosystems) 合成, 并采用聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步纯化 (有关凝胶电泳详细内容请参见 Sambrook 和 Russel, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001)。所述供体探针对于靶 DNA 的 ΔF508 突变而言具有特异性。供体, W8044-Eu 螯合物 (PerkinElmer Life and Analytical sciences, Wallac Oy, 芬兰), 采用改性的寡核苷酸嵌段附着到探针序列上 (Hovinen 等 (2001), *Org. Letters*, Vol. 3, No. 16, 2473-2476)。受体探针对靠近 ΔF508 突变位点的序列具有特异性。能量受体, AlexaFluor647 (Molecular Probes Inc., 德国) 通过氨基改性的寡核苷酸嵌段附着到探针序列上, 作为琥珀酰亚胺基酯 (Hovinen 等 (2001), *Org. Letters*, Vol. 3, No. 16, 2473-2476)。在标记后, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳对寡核苷酸进行纯化。

[0069] 在杂交测定中, 将 5nM ΔF508DNA- 靶 (或者空白样品中 0nM ΔF508DNA- 链) 在处于 200 μl 反应缓冲液 (15mM TRIS, 2.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% TRITON X-100) 中的含有 10nM 供体探针和 10nM 受体探针的检测混合物中温育 (2 小时, 室温 (RT))。所有四种测定组合 (不同的 D-A 距离) 在独立的反应管中温育。在温育后, 从每种测定中移取 4 份阳性重复样品和 12 份空白样品到微孔板 (25 μl/孔, 1508-0010 PerkinElmer Life and Analytical sciences, Wallac Oy, 芬兰)。在实验室级的 TR- 荧光计上, 采用氮激光器 (Oriel, 美国, < 10ns 脉冲, 45Hz)、光电倍增管 (Hamamatsu, 日本) 和分辨率为 0.1 μs 的 Turbo MCS 多通道定标器 (EG&G), 进行了时间分辨测量。通过 665nm 发射滤光片 (Omega Optical) 收集基于能量转移的发射 (AlexaFluor 647); 每孔积分 1000 个激发脉冲。采用 Origin 6.0 (Microcal Software, Inc.) 拟合寿命数据, 并采用 Microsoft Excel (Microsoft Corporation) 由 MCS 数据计算选通信号。

[0070] 结果和讨论

[0071] 表 2 示出了拟合的受体荧光寿命和理论计算的受体荧光寿命。得到的基于能量转移的受体荧光寿命取决于 D-A 距离,所述距离是根据 Förster 能量转移理论的预期结果。但是,在本试验中,距离依赖性并不单纯遵循 Förster 等式。W8044-Eu-AlexaFluor 647 供体-受体对的 R_0 距离经确定是 59.8Å ,且假定一个碱基对将 DNA 链的长度平均提高 3.4Å ,则可以利用等式 [2] 和 [3] 计算理论受体信号寿命。

$$[0072] \quad E = 1/(1+r^6/R_0^6) \quad [2]$$

$$[0073] \quad E = 1 - \tau_{AD}/\tau_D \quad [3]$$

[0074] 其中, r 表示供体和受体之间的距离, R_0 是临界能量转移距离, τ_{AD} 是基于能量转移的受体信号的寿命,且 τ_D 是未猝灭供体的寿命(对于本试验的 W8044-Eu 而言,为 $1270\text{ }\mu\text{s}$)。由于忽略了连接臂(在氨基改性嵌段中)和能量转移对取向可能导致的作用,所以理论计算值含有一定的误差。DNA 链的螺旋几何形状对实际 D-A 距离也有作用。在理论计算时并没有考虑这些作用,所以应该将该理论结果仅仅当作具有一定误差的理论信号行为的简化例子来考虑。

[0075] 试验结果清楚表明通过调整 D-A 距离可以定制基于能量转移的受体荧光的寿命,而且能够获得高于 90% 的极高能量转移效率(在本具体情况下,每种测定模型中 $E > 99\%$)。受体信号寿命的所得值以及理论值之间的差异很可能是由于供体和受体之间的单链 DNA 链的柔性所引起的,所述柔性导致难以估计测定模型中的真实 D-A 距离变化。

[0076] 表 2. 基于能量转移的受体荧光的所得寿命和理论计算寿命。 E 采用等式 [3] 和所得的受体寿命 ($\tau_D = 1270\text{ }\mu\text{s}$) 计算。

[0077]

D 和 A 之间的单链 DNA 长度	测量的受体寿命 (μs)	理论受体寿命 (μs)	$E_{\text{所得}}$
6	2.1	2.0	0.998
8	3.5	11.1	0.997
10	4.9	41.5	0.996
12	8.4	116.4	0.993

[0078] 图 5 示出了信号背景比对 TR 延迟时间的关系曲线,该图证实了短时标 TR 测量的理论依据。在激发脉冲后极短时间的延迟(在这种情况下是 $1-2\text{ }\mu\text{s}$)就足以区分测定的 ns-寿命背景(ns-背景=直接受激受体、有机样品材料.光散射等),且 S/B-曲线在激发脉冲后很快达到其最大值。在图 5 中,不同测定之间的性能差异部分是由于 TR 窗口的选择。对测定而言,最优的 TR 延迟时间和 TR 窗口长度(针对最优 S/B 比)取决于分析物信号的寿命,但是在这种情况下,TR 窗口长度并没有对不同测定模型分别进行最优化。对每一测定都采用了 $7.5\text{ }\mu\text{s}$ 的窗口长度,且图 5 的目的是证实缩短的时标对 TR-FRET 测量而言是否合适。测量参数和测定可以进一步最优化。

[0079] 实施例 2

[0080] 通过使用不同的光谱重叠因子调整基于能量转移的受体荧光的寿命

[0081] 在基于 DNA 双链的 FRET 模型系统中,证实了通过改变光谱重叠因子改变能量转移效率和基于所述能量转移的受体荧光的寿命的能力,其如表 3 所示。在模型系统中, W8044-Eu 供体标记的 DNA 链和受体标记的 DNA 链杂交。合成了受体链的 5 个不同版本,它们含有相同的 DNA 序列但含有不同的荧光受体染料。在杂交后, D-A 距离在每个样品中都相同,但是由于受体染料的不同吸收性质,对每个样品而言与供体的光谱重叠因子不同以及由此 R_0 不同。

[0082] DNA 序列采用标准亚磷酸胺化学 (Expedite 8909DNA- 合成仪, PerSeptive Biosystems) 合成,并采用聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步纯化(有关凝胶电泳详细内容请参见 Sambrook 和 Russel, Molecular cloning:a laboratory manual,3rd edition, Cold SpringHarbor Laboratory Press,New York,2001)。供体, W8044-Eu 螯合物 (PerkinElmer Life and Analytical sciences, Wallac Oy, 芬兰),采用改性的寡核苷酸嵌段附着到 DNA 序列上 (Hovinen 等 (2001), Org. Letters, Vol. 3, No. 16, 2473-2476)。能量受体来自 Alexa 染料系列 :AlexaFluor647、660、680、700 和 750 (Molecular Probes Inc., 德国)。受体染料通过氨基改性的寡核苷酸嵌段附着到 DNA 序列上,作为琥珀酰亚胺基酯 (Hovinen 等 (2001), Org. Letters, Vol. 3, No. 16, 2473-2476)。在标记后,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳对寡核苷酸进行纯化。

[0083] 针对每种测量制备三个不同样品。能量转移样品 :10nM Eu- 链和 50nM 受体 - 链 ;非能量转移样品 :10nM Eu- 链和 50nM 受体 - 链 ;Eu- 对照 :10nM Eu- 链。基于从能量转移样品获得的寿命 (τ_{AD}) 以及从非能量转移样品获得的寿命 (τ_D),计算了能量转移效率。测量 Eu- 对照以确认互补链与 Eu 链的杂交不显著影响供体寿命。

[0084] 所有样品都在 500 μ l 反应缓冲液 (15mM TRIS, 2.5mM $MgCl_2$, 50mM KCl, 0.1% TRITON X-100) 中温育 (2 小时, 室温)。在温育后,移取每种样品的 4 份阳性重复样品到微孔板 (50 μ l/孔, 1508-0010 PerkinElmer Life and Analytical sciences, Wallac Oy, 芬兰)。在实施例 1 所述的实验室级 TR- 荧光计上进行时间分辨测量。通过 665nm 发射滤光片 (Alexa Fluor 647)、730nm 发射滤光片 (AlexaFluor 660、680、700) 或者 780nm 发射滤光片 (Alexa Fluor 750) 以 1 μ s 的 MCS- 分辨率收集基于能量转移的发射。所有发射滤光片均来自 Omega Optical 公司。每孔积分 1000 个激发脉冲,并采用 Origin 6.0 (Microcal Software, Inc.) 对寿命数据进行拟合。

[0085] 表 4 示出了光谱重叠对基于能量转移的荧光的寿命的作用。可以发现,即使物理 D-A 距离保持相同,通过改变受体染料的光谱性质 (吸收),也可以调整受体寿命。

[0086] 表 3

[0087]

序列
5' -Eu-TAAAGAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTATAA3'
3' ATTTCTTTTATAGTAGA-AlexaFluor6475'
3' ATTTCTTTTATAGTAGA-AlexaFluor6605'

序列
3' ATTTCTTTTATAGTAGA-AlexaFluor6805'
3' ATTTCTTTTATAGTAGA-AlexaFluor7005'
3' ATTTCTTTTATAGTAGA-AlexaFluor7505'

[0088] 表 4

[0089]

D-A 对	τ_{AD} (μ s)	E _{所得}
Eu+AlexaFluor647	597.4	0.557
Eu+AlexaFluor660	594.9	0.559
Eu+AlexaFluor680	457.4	0.661
Eu+AlexaFluor700	416.2	0.692
Eu+AlexaFluor750	598.0	0.557

[0090] 实施例 3

[0091] 对 Δ F508 突变 DNA 靶的最优化检测灵敏度

[0092] 基于实施例 1 的结果,在 Δ F508 突变 DNA 测定中,选择 D-A 距离 8bp 作为缩短时标 TR 测量的最合适距离。另外,交换供体和受体探针,从而使得 Alexa 647 标记的探针(受体探针)现在对 Δ F508 突变位点具有特异性,而 W8044-Eu 标记的探针(供体探针)结合邻近该受体探针的 8 个碱基对。探针序列如表 5 所示。

[0093] 表 5

[0094]

Δ -F508 靶	5' TTAAAGAAAATATCATTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCA3'
W01705	3' <u>AAA</u> TTTATAGTAACCACA-AlexaFluor6475'
W01739	3' Eu-TACTTATATCTATGTCTTC5'

[0095] 探针采用实施例 1 所述方法合成和标记。同样,现在对杂交条件(NaCl-浓度、温度和探针多余量)和 TR 测量窗口(延迟和窗口长度)进行最优化,以获得针对均匀 TR-FRET Δ F508 突变 DNA 测定的最佳灵敏度。

[0096] 在杂交缓冲液(15mM TRIS、100nM NaCl、2.5mM MgCl₂、50mMKCl、0.1% TRITON X-100)中,制备 Δ F508 突变靶的稀释物系列(3nM、1nM、0.3nM、...、0.001nM)。该稀释物系

列的每个样品都在处于杂交缓冲液中的、含有 10nM Alexa 647 探针和 10nM W8044-Eu 探针的 150 μ l 检测混合物中温育 (2.5 小时, 室温)。这些杂交条件已经预先在各自的测量中进行了最优化。在温育后, 从每种测定中移取 4 份阳性重复样品和 12 份空白样品到微孔板 (25 μ l/孔, 1508-0010 PerkinElmer Life and Analytical sciences, Wallac Oy, 芬兰)。在实施例 1 所述的实验室级的 TR- 荧光计上进行时间分辨测量。通过 665nm 发射滤光片 (Omega Optical) 收集基于能量转移的发射 (AlexaFluor 647)。积分 1000 个激发脉冲, 分辨率为 0.1 μ s MCS- 分辨率, 并采用 2 μ s 的 TR 延迟和 10 μ s 的 TR 窗口长度由 MCS 数据计算了 TR 测量结果。

[0097] 该稀释物系列的测量曲线如图 6 所示。测定的检测极限是 7pM 的 Δ F508 突变靶 (检测极限 = avg(空白) + 3 * stdev(空白)), 且该测定一直到最高 3nM 靶浓度时保持线性范围。为了比较, 相同靶在不均匀 DELFIA 测定中的检测极限是 2pM。可以得出结论: 本发明的改进均匀 FRET 方法的性能和 DELFIA 性能非常相似。

[0098] 实施例 4

[0099] 均匀 TR-FRET 双测定: 理论的证据

[0100] 在本试验中, 通过对相同测定介质的 Δ F508 突变 DNA 和 -2221ct 突变 DNA 靶进行同时检测, 证实了基于 TR-FRET 的双测定的原理。TR-FRET 双测定的序列方案如表 6 所示。 Δ F508 靶和 Δ F508 特异性供体 - 和受体探针与实施例 3 中所用的相同。采用实施例 1 所述的方法合成并标记了 -2221ct 靶特异性 W8044-Eu 供体探针和 AlexaFluor 700 受体 - 探针。-2221ct 靶在杂交之前, 首先从纯化的基因组 DNA 样品中扩增 (不对称 PCR), 然后用 MinElute PCR 纯化试剂盒 (50) (Qiagen) 进一步纯化。两种 Alexa 染料的光谱和其发射之间的光学串扰如图 2B 所示 (AlexaFluor 647 (菱形)、AlexaFluor 700 (三角形))。

[0101] 表 6

[0102]

Δ -F508 靶	5' TTAAGAAAATATCATTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCA3'
W01705	3' <u>AAATTTTATAGTAACCACA</u> -AlexaFluor6475'
W01739	3' Eu-TACTTATATCTATGTCTTC5'
-2221ct 靶	5' <u>ACCCACTACACGCTGCTGGATCCTGGATCTCAGCTCCCTGGCCGACAACAC</u> TGGCAAACCTCTACTCATCCACGAAGGCCCTCCTGGGCATGGTGGTCCTTCCCAGC CTGGCAGTCTGTTCCCTCACACACCTTGTTAGTGCCAGCCCTGAGGTTGCAGCTG <u>GGGGTGCTCTGAAGGG3'</u>
W01747	3' AlexaFluor700-GGGACCGGC5'
W01753	3' Eu-TGTTGTGACCGT5'

[0103] 在试验中, Δ F508 和 -2221ct 稀释物系列首先在单测定中测量, 然后将该单测定结果和双测定结果比较。靶 DNA 的稀释物系列在杂交缓冲液 (15mM TRIS、100mM NaCl、2.5mM

MgCl₂、50mM KCl、0.1% TRITON X-100) 中制备。在单测定中,将稀释物系列的每个样品在含有 10nM 靶特异性受体探针和 10nM 靶特异性供体探针的 200 μ l 检测混合物中温育 (3 小时,室温)。在双测定中,将 ΔF508 和 -2221ct 样品同时在含有针对两种分析物的 10nM 特异性供体和受体的 200 μ l 检测混合物中温育 (3 小时,室温)。在双反应管中的相应稀释物如表 7 所示。在每个试验中,在将 -2221ct 样品加到检测混合物中之前,对所述 -2221ct 靶稀释物进行了变性 (4 分钟 +94°C, 2 分钟 +4°C)。使用合成的靶 ΔF508 时没有进行预处理。在温育后,从每种测定中移取 4 份阳性重复样品和 8 份空白样品到微孔板 (25 μ l/孔, 1508-0010 PerkinElmer Life and Analytical sciences, Wallac Oy, 芬兰)。在实施例 1 所述的实验室级的 TR- 荧光计上进行时间分辨测量。对每个样品采用 0.1 μ s 的 MCS 分辨率积分了 1000 个激发脉冲。通过 665nm 发射滤光片 (Omega Optical) 测量 ΔF508 分析物信号,并采用 2 μ s 的 TR 延迟和 10 μ s 的 TR 窗口长度分析数据。通过 730nm 发射滤光片 (Omega Optical) 测量 -2221ct 分析物信号,并采用 25 μ s 的 TR 延迟和 30 μ s 的 TR 窗口长度分析数据。

[0104] 表 7. 双测定中相同孔内的相应靶浓度

[0105]

样品	ΔF508 (nM)	-2221ct (nM)
1	1	30
2	0.3	10
3	0.1	3
4	0.03	1
5	0.01	0.3
6	0.003	0.1

[0106] 测量的测定曲线和双测定与单测定的比较如图 7 所示。对于 ΔF508 和 -2221ct 分析物两者而言,双测定结果和单测定结果相同,这显然可以作为 TR-FRET 双测定方法的理论的证据。采用本发明所述方法消除了受体的部分光学串扰。对于两种分析物而言,在最低浓度处双曲线和单曲线之间的很小差异可以通过测定结构进行解释。在单测定情况下,只有一种类型的供体探针存在于检测混合物中,而且在本试验中单测定中的总 Eu 探针浓度是 10nM。但是,本试验的双测定要求对两种分析物采用单独的供体探针,而且双测定中的总 Eu 探针浓度是 20nM。由于光谱重叠,部分 Eu 发射总是通过受体发射滤光片收集,且 Eu 浓度差异导致测量的 Eu 背景在双测定中加倍。在实际测定计数值极低的检测极限附近,可以发现这种信号增加。

[0107] 应该理解,本发明的方法可以以各种实施方案的形式结合,在此仅仅公开了其一部分。对本领域技术人员而言,显然存在着其它实施方案而且这些实施方案没有偏离本发

明的精神。因此,所述实施方案是示例性的,不应理解成是对本发明的限制。

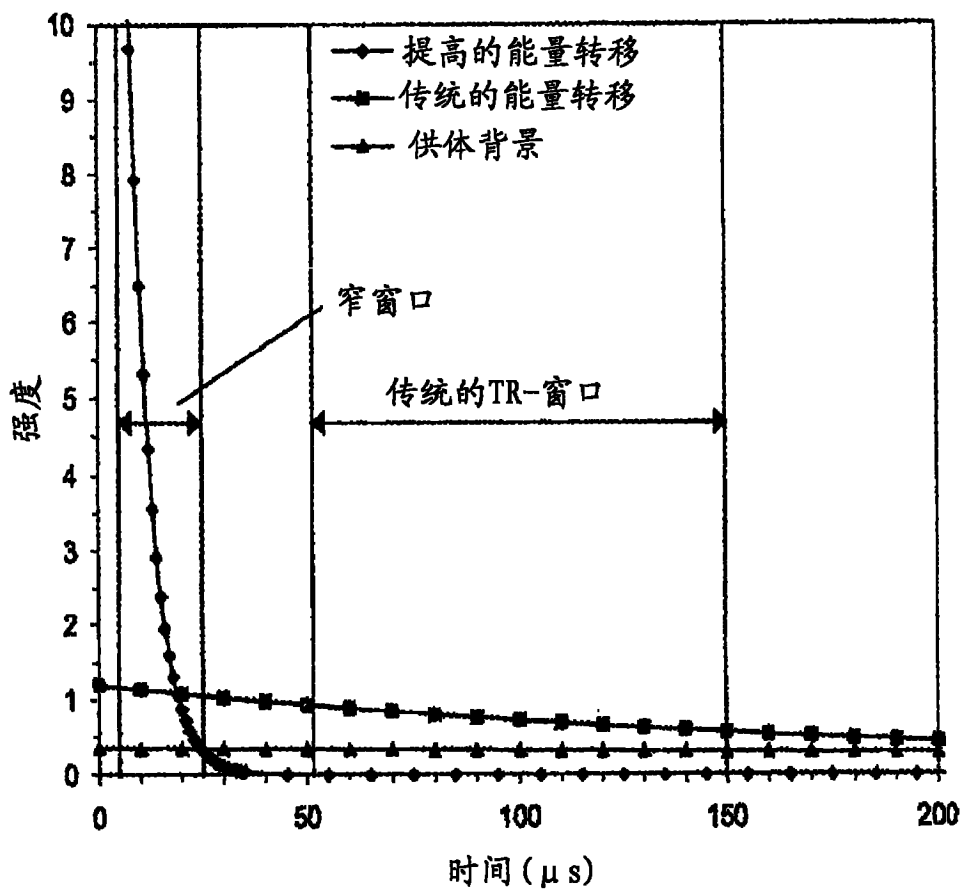


图 1

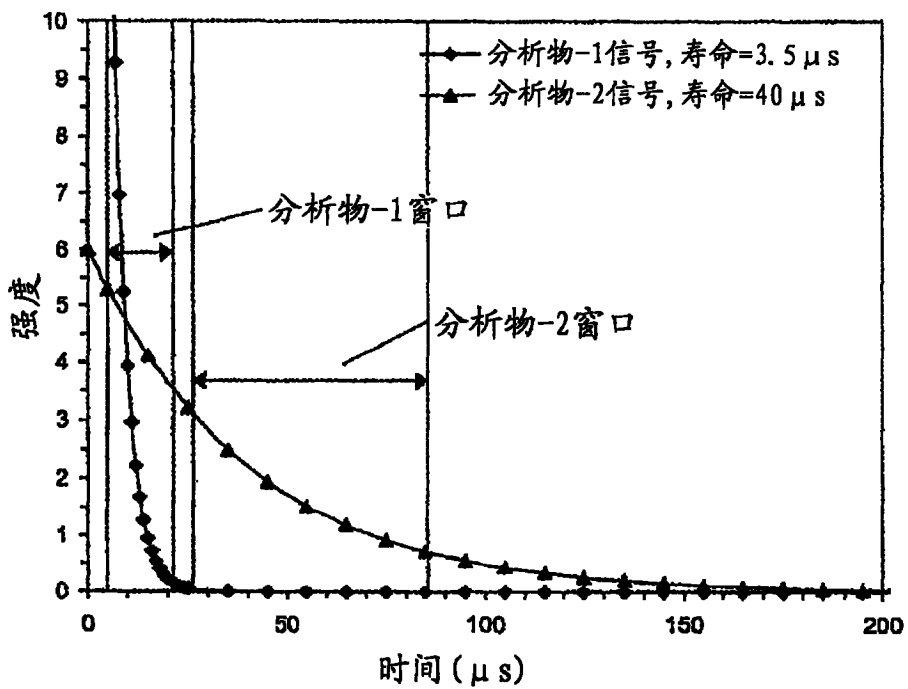


图 2A

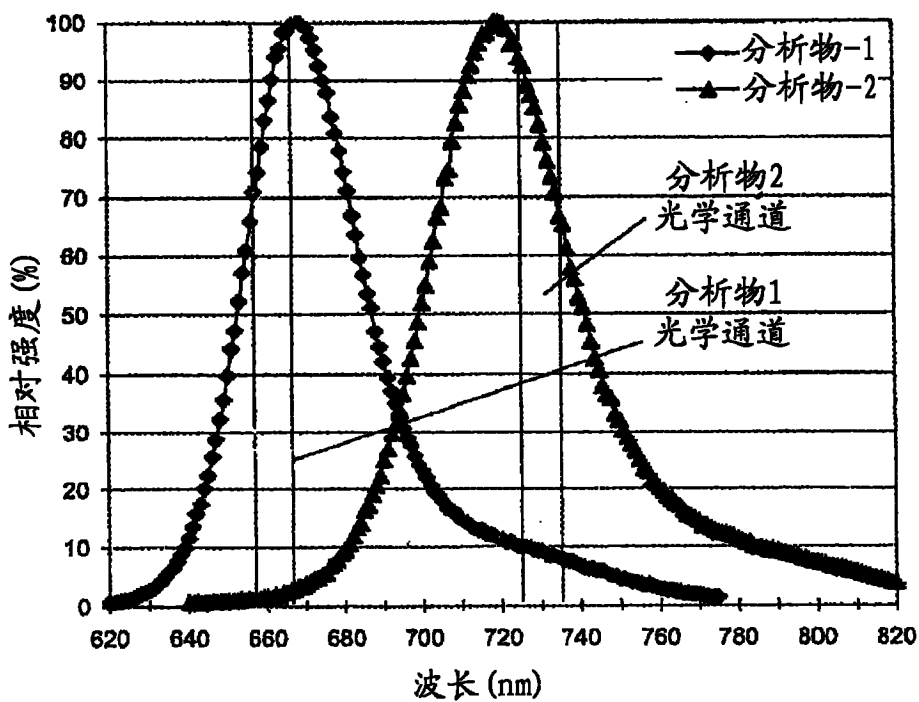


图 2B

寿命不同的两种荧光群体

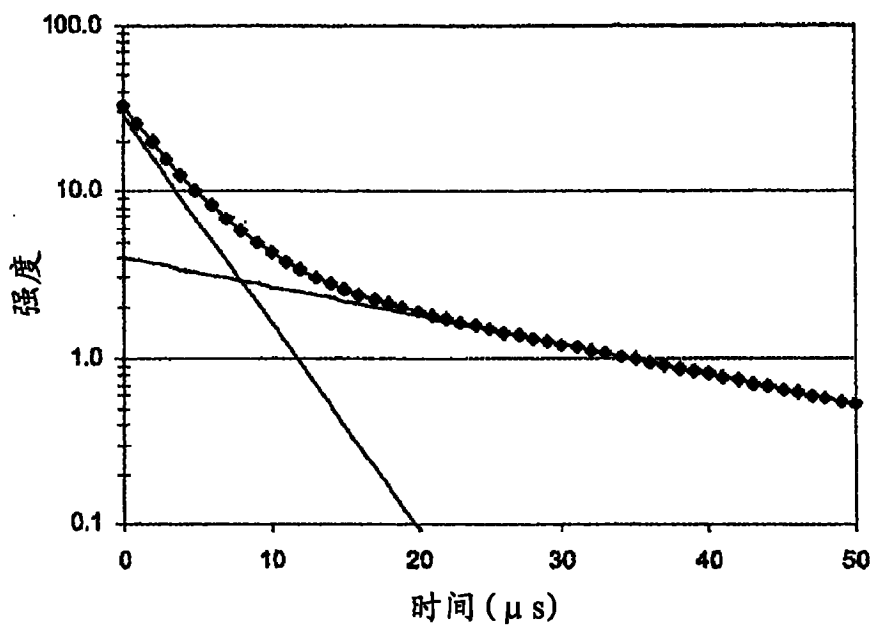


图 3A

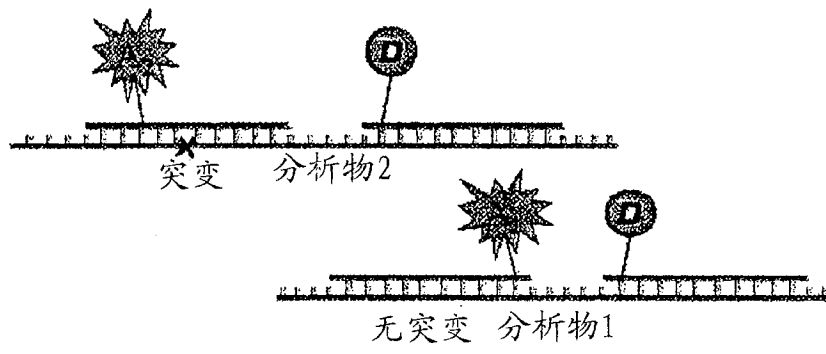


图 3B

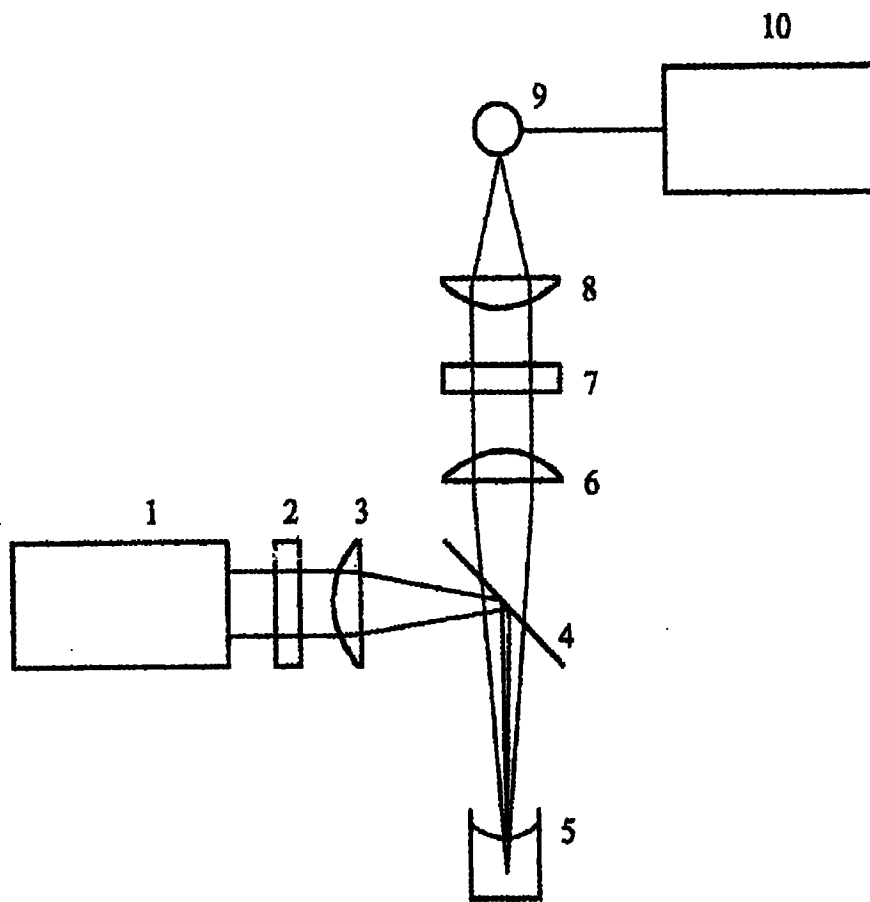


图 4

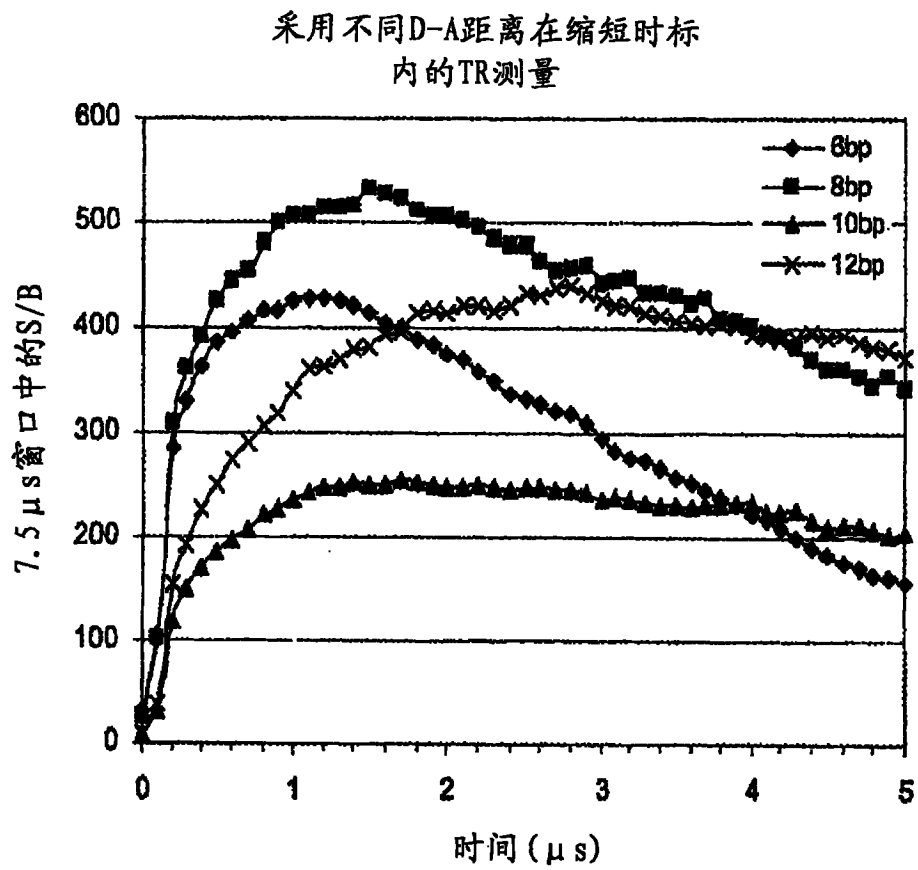


图 5

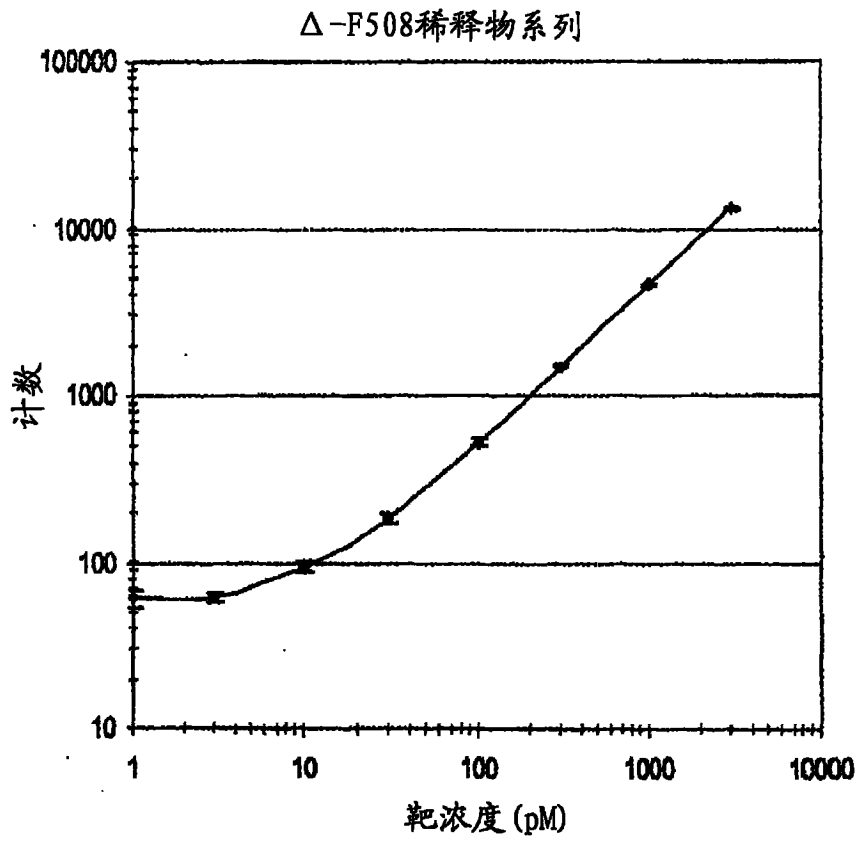


图 6

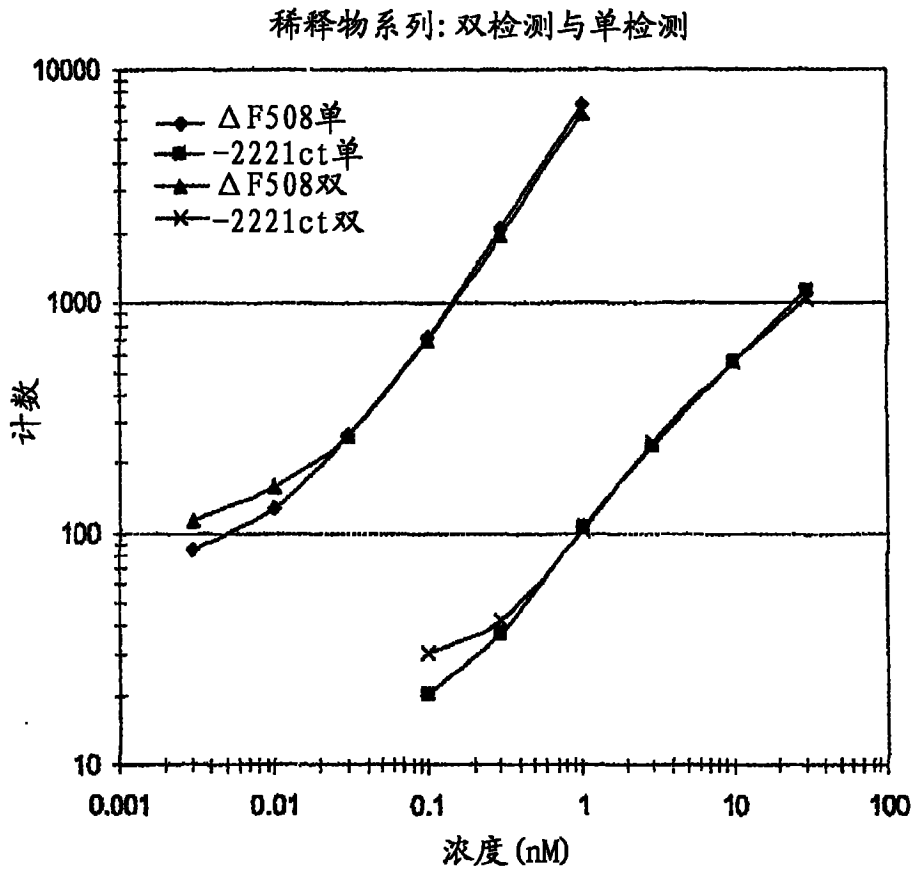


图 7