



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105705938 B

(45) 授权公告日 2020.11.06

(21) 申请号 201480057503.0

(22) 申请日 2014.08.15

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105705938 A

(43) 申请公布日 2016.06.22

(30) 优先权数据  
61/867,263 2013.08.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.04.19

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/051313 2014.08.15

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02015/026663 EN 2015.02.26

(73) 专利权人 休斯敦大学系统  
地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 R·威尔逊 A·帕特森

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理  
有限公司 11262  
代理人 胡秋玲 郑霞

(51) Int.Cl.  
*G01N 21/64* (2006.01)  
*G01N 33/58* (2006.01)  
*G01N 33/53* (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 1547664 A, 2004.11.17  
CN 101410405 A, 2009.04.15  
CN 101762570 B, 2013.07.10  
CN 1388827 A, 2003.01.01  
CN 1414995 A, 2003.04.30

审查员 韩光皓

权利要求书5页 说明书32页 附图40页

### (54) 发明名称

磷光报告物

### (57) 摘要

在一些实施方式中,本发明涉及包含磷光报告物的物质的新组合物。在一些实施方式中,本发明的磷光报告物包括铝酸锶。在一些实施方式中,用铕和镝掺杂铝酸锶( $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$ )。本发明的其他实施方式涉及制备前述磷光报告物的方法。在一些实施方式中,该方法包括通过湿研磨和沉降的组合减小磷光粉末的尺寸。在其他实施方式中,本发明涉及在各种装置中,如诊断装置中检测磷光报告物的方法。



1. 一种持续发光的磷光报告物,所述报告物包含:  
至少一种持续发光的无机磷光颗粒,其中所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒包括碱土金属铝酸盐,并且其中所述持续发光的无机磷光颗粒包括从50nm至600nm的直径并具有范围为微秒至小时的发光寿命;  
包封所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒的壳;和  
设置在所述壳上的至少一种分子识别部分,其中所述分子识别部分选自下组:抗体、抗体片段、抗原、核酸、肽、蛋白质、和适体,其中所述持续发光的无机磷光颗粒形成所述磷光报告物的芯。
2. 如权利要求1所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述持续发光的磷光报告物通过所述至少一种分子识别部分结合至目标分析物以生成发光信号。
3. 如权利要求2所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,通过所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒的激发来检测所述发光信号。
4. 如权利要求3所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,通过电磁光谱的紫外光、或可见光、或其他光子来实现所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒的激发。
5. 如权利要求1所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒具有范围为10微秒至约1小时的所述发光寿命;或其中所述持续发光的无机磷光颗粒具有几小时的所述发光寿命。
6. 如权利要求1所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述碱土金属铝酸盐选自下组:铝酸锶、铝酸钙、铝酸镁、铝酸铍、和铝酸钡镁。
7. 如权利要求1所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒包含铝酸锶。
8. 如权利要求1所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒包含掺杂至少一种稀土金属的铝酸锶。
9. 如权利要求8所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述至少一种稀土金属包括镧、或铈、或镨系或其组合。
10. 如权利要求1所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒包括掺杂金属的无机金属氧化物基质材料。
11. 如权利要求1所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述包封所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒的壳包含硅基覆层。
12. 如权利要求11所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述硅基覆层选自下组:氧化硅、二氧化硅、硅酸盐和有机官能硅烷。
13. 如权利要求1所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述包封所述至少一种无机磷光颗粒的壳包含亲水性聚合物。
14. 如权利要求13所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述亲水性聚合物是聚乙二醇。
15. 如权利要求1所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述分子识别部分包括抗体、或抗体片段、或抗原、或核酸、或肽、或适体。
16. 如权利要求1所述的持续发光的磷光报告物,其特征在于,所述分子识别部分包括设置在所述包封所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒的壳上的接头。

17. 如权利要求16所述的持续发光的磷光报告物,其特征在於,所述接头选自下组:三乙氧基甲硅烷基丁醛 (TESBA)、聚乙二醇 (PEG)、同双官能聚乙二醇、异双官能聚乙二醇、(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷 (APTES) 和三烷氧基硅烷。

18. 如权利要求16所述的持续发光的磷光报告物,其特征在於,所述接头还包括用于偶合至目标分析物的至少一个官能团。

19. 如权利要求1所述的持续发光的磷光报告物,其特征在於,所述分子识别部分包含直接设置在所述壳上的官能团。

20. 如权利要求19所述的持续发光的磷光报告物,其特征在於,所述官能团选自下组:胺基、羧基、醛、酮、羟基、硫醇、和酰肼、酸酐、炔烃,和叠氮化物,及其组合。

21. 一种制备持续发光的磷光报告物的方法,所述方法包括:

制备持续发光的无机磷光颗粒,其中所述持续发光的无机磷光颗粒包括碱土金属铝酸盐,其中所述持续发光的无机磷光颗粒具有范围为微秒至小时的发光寿命,并且其中所述持续发光的无机磷光颗粒包括从50nm至600nm的直径;

将所述持续发光的无机磷光颗粒包封在壳中;并且

将至少一种分子识别部分设置在所述壳上,其中所述分子识别部分选自下组:抗体、抗体片段、抗原、核酸、肽、蛋白质、和适配体,并且其中所述持续发光的无机磷光颗粒形成所述磷光报告物的芯。

22. 如权利要求21所述的方法,其特征在於,所述制备持续发光的无机磷光颗粒的步骤包括无机磷光粉末的尺寸减小。

23. 如权利要求22所述的方法,其特征在於,所述尺寸减小包括湿研磨、或冷冻研磨、或振动研磨、或珠研磨、或干燥研磨、或磨碎研磨、或喷射研磨、或碾磨、或其组合。

24. 如权利要求22所述的方法,其特征在於,所述尺寸减小通过湿研磨和分级分离进行。

25. 如权利要求24所述的方法,其特征在於,在有机溶剂存在下进行所述湿研磨。

26. 如权利要求25所述的方法,其特征在於,所述有机溶剂选自下组:醇、乙酸乙酯、甲苯、环己烷、环戊烷和癸烷。

27. 如权利要求21所述的方法,其特征在於,所述持续发光的无机磷光颗粒具有超过10微秒至约1小时的所述发光寿命,或具有几小时的所述发光寿命。

28. 如权利要求21所述的方法,其特征在於,所述持续发光的无机磷光颗粒包含铝酸锶。

29. 如权利要求21所述的方法,其特征在於,所述持续发光的无机磷光颗粒包含掺杂至少一种稀土金属的铝酸锶。

30. 如权利要求29所述的方法,其特征在於,所述至少一种稀土金属包括铈、或镧、或镱系或其组合。

31. 如权利要求21所述的方法,其特征在於,所述包封所述持续发光的无机磷光颗粒的步骤使用 Stöber 法或 Stöber 法的修改形式。

32. 如权利要求21所述的方法,其特征在於,所述包封所述持续发光的无机磷光颗粒的壳包括硅基覆层。

33. 如权利要求32所述的方法,其特征在於,所述硅基覆层包括氧化硅、二氧化硅、硅酸

盐、或有机官能硅烷。

34. 如权利要求21所述的方法,其特征在于,所述包封所述持续发光的无机磷光颗粒的壳包括亲水性聚合物。

35. 如权利要求34所述的方法,其特征在于,所述亲水性聚合物是聚乙二醇。

36. 如权利要求21所述的方法,其特征在于,在所述包封步骤之前、期间或之后进行设置分子识别部分的步骤。

37. 如权利要求21所述的方法,其特征在于,通过物理吸附或通过共价连接来进行所述设置至少一种分子识别的步骤。

38. 如权利要求21所述的方法,其特征在于,所述设置至少一种分子识别部分的步骤包括用至少一种接头分子对所述壳的表面进行官能化。

39. 如权利要求38所述的方法,其特征在于,所述至少一种接头分子选自下组:三乙氧基甲硅烷基丁醛 (TESBA)、聚乙二醇 (PEG)、(3-氨丙基)三乙氧基硅烷 (APTES)、和三烷氧基硅烷。

40. 如权利要求38所述的方法,其特征在于,所述至少一种接头分子具有用于偶合至所述至少一种分子识别部分的至少一个官能团。

41. 如权利要求40所述的方法,其特征在于,所述至少一种官能团选自下组:胺基、羧基、醛、酮、羟基、硫醇、酰肼、酸酐、叠氮化物、和炔烃,及其组合。

42. 如权利要求40所述的方法,其特征在于,所述设置至少一种分子识别部分的步骤还包括通过所述官能团将所述接头分子与分子识别部分偶联。

43. 如权利要求21所述的方法,其特征在于,所述设置分子识别部分的步骤包括直接设置在所述壳上的至少一种官能团。

44. 如权利要求43所述的方法,其特征在于,所述至少一种官能团选自下组:胺基、羧基、醛、酮、羟基、硫醇、酰肼、酸酐、叠氮化物、和炔烃,及其组合。

45. 如权利要求43所述的方法,其特征在于,所述官能团偶联至至少一个聚乙二醇链的一个末端。

46. 如权利要求45所述的方法,其特征在于,所述聚乙二醇链的另一个末端偶联至所述至少一个分子识别部分。

47. 一种检测样品内的至少一种分析物的方法,所述方法包括以下步骤:

提供如权利要求1所定义的持续发光的磷光报告物;

在足够允许所述持续发光的磷光报告物通过所述至少一种分子识别部分结合至所述样品内的至少一种分析物的条件下,将所述持续发光的磷光报告物与所述样品接触;

检测所述持续发光的磷光报告物的发光信号;并且

基于检测到的发光信号确定分析物的存在或者对所述分析物定量。

48. 如权利要求47所述的方法,其特征在于,所述方法还包括预处理含所述分析物的样品的步骤。

49. 如权利要求48所述的方法,其特征在于,所述预处理的步骤涉及扩增所述分析物。

50. 如权利要求48所述的方法,其特征在于,所述预处理的步骤涉及部分纯化所述分析物。

51. 如权利要求47所述的方法,其特征在于,所述检测发光信号的步骤包括施加电磁辐

射。

52. 一种体外检测样品内至少一种分析物的方法,所述方法包括以下步骤:

提供如权利要求1所定义的持续发光的磷光报告物;

将所述持续发光的磷光报告物加载到多孔材料中;

在足够允许所述持续发光的无机磷光报告物通过所述至少一种分子识别部分结合至所述样品内的至少一种分析物的条件下,将所述样品与所述加载了所述持续发光的磷光报告物的多孔材料接触;

允许所述样品和所述持续发光的磷光报告物流动通过多孔膜;并且

检测所述膜上的发光区域或发光的缺失,以指示存在或缺少所述至少一种分析物。

53. 如权利要求52所述的方法,其特征在于,所述方法还包括对检测到的分析物定量。

54. 一种体外检测样品内至少一种分析物的方法,所述方法包括以下步骤:

提供如权利要求1所定义的持续发光的磷光报告物;

提供固定在表面上的至少一种第一分子识别元件,其中所述第一分子识别元件能够结合至所述至少一种分析物;

将所述样品与所述表面接触以允许所述至少一种分析物结合所述分子识别元件,以将所述分析物固定在所述表面上;

将所述持续发光的磷光报告物接触所述表面,以允许所述持续发光的磷光报告物结合至至少一种固定的分析物;并且

测量来自所述持续发光的磷光报告物的发光信号,以允许对所检测的分析物进行检测或定量,其中所述持续发光的磷光报告物包含:

设置在所述壳上的分子识别部分,其中所述分子识别部分结合至所述至少一种固定的分析物以生成所述发光信号。

55. 如权利要求54所述的方法,其特征在于,所述表面包括微流体芯片、或纸微流体、或膜、或微板、或用于浮选的微气泡、或透明表面。

56. 如权利要求54所述的方法,其特征在于,通过以下方式来检测来自所述持续发光的磷光报告物的发光:

提供适于光致激发所述持续发光的磷光报告物的光源;

提供能够检测来自所述持续发光的磷光报告物的发光的传感器;

用所述光源照射所述磷光报告物;

关闭所述光源;

等待一段确定的时间以允许背景衰减;并且

测量来自所述持续发光的磷光报告物的发光。

57. 如权利要求56所述的方法,其特征在于,所述能够检测发光的传感器是光电子装置。

58. 一种持续发光的磁性磷光报告物,所述报告物包含:

至少一种持续发光的无机磷光颗粒,其中所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒包括碱土金属铝酸盐并具有范围为微秒至小时的发光寿命,并且其中所述持续发光的无机磷光颗粒包括从50nm至600nm的直径;

封装所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒的壳;

设置在所述壳上的至少一种磁性部分;和

设置在所述壳上的至少一种分子识别部分,其中所述分子识别部分选自下组:抗体、抗体片段、抗原、核酸、肽、蛋白质、和适配体,并且其中所述持续发光的无机磷光颗粒形成所述持续发光的磷光报告物的芯。

59. 一种持续发光的磁性磷光报告物,所述报告物包含:

至少一种持续发光的无机磷光颗粒,其中所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒包括碱土金属铝酸盐,并且其中所述持续发光的无机磷光颗粒包括从50nm至600nm的直径并具有范围为微秒至小时的发光寿命;

至少一种磁性颗粒或磁性材料层;

包封所述至少一种持续发光的无机磷光颗粒和所述至少一种磁性颗粒或磁性材料层的壳;和

设置在所述壳上的至少一种分子识别部分,其中所述分子识别部分选自下组:抗体、抗体片段、抗原、核酸、肽、蛋白质、进而适配体,并且其中所述持续发光的无机磷光颗粒形成所述持续发光的磷光报告物的芯。

60. 一种检测样品内至少一种分析物的方法,所述方法包括以下步骤:

提供如权利要求58或59所定义的磁性磷光报告物;和

将所述持续发光的磁性磷光报告物与所述样品接触;

通过使用磁场来浓缩所述持续发光的磁性磷光报告物;

用所述浓缩的持续发光的磁性磷光报告物与表面接触,其中用对所述分析物有特异性的至少一种第二分子识别部分使所述表面官能化;

检测所述持续发光的磁性磷光报告物的发光信号;并且

基于检测到的发光信号确定分析物的存在或者对所述分析物定量。

61. 如权利要求60所述的方法,其特征在于,所述第一分子识别部分结合所述至少一种分析物以生成发光信号。

## 磷光报告物

[0001] 关于联邦资助研究/开发的声明

[0002] 本发明是在政府支持下由国家卫生研究院授予的基金号U54 AI057156资助完成。政府对本发明拥有某些权利。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2013年8月19日向美国专利商标局提交的美国临时专利申请号61/867,263的优先权,其全部内容通过引用纳入本文。

[0005] 背景

[0006] 已经使用各种测试和检测方法来特异性检测不同应用中的多种类型的分析物,如医学诊断、食品安全和质量保证、以及环境监测。现有的利用分析报告物的方法和系统在低资源设置中的成本、效率、灵敏度、通用性和可配置性方面存在多种限制。因此,需要更有效的技术和传感方法来克服这些限制。

[0007] 发明概述

[0008] 在一些实施方式中,本发明涉及包含磷光报告物的物质的新组合物。在一些实施方式中,磷光报告物是小磷光颗粒,如无机磷光体。在一些实施方式中,无机磷光体具有超过10微秒,并优选超过1分钟的发光寿命。在一些实施方式中,无机磷光体具有足够长的寿命使得可用合适激发波长的光源简短地激发颗粒,然后以足够高的强度以比激发源更长的波长发光,并在激发后持续足够长的时间用于时间分辨发光测量或成像。

[0009] 在一些实施方式中,本发明的磷光报告物包括铝酸铽。在一些实施方式中,铝酸铽掺杂铈和镝( $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+},\text{Dy}^{3+}$ )或一种或多种稀土金属的组合,优选镧系。在一些实施方式中,本发明的磷光报告物包括通过在无机基质材料(inorganic host material)中合适地掺杂稀土或过渡金属产生的无机磷光体。在一些实施方式中,无机基质材料可包括,但不限于,硫化锌、硫化钙、碱土金属硅酸盐(例如,硅酸铍、硅酸钙、硅酸镁和硅酸钡)、碱土金属铝酸盐(例如,铝酸钙、铝酸镁、铝酸铍和铝酸钡镁)、钛酸盐(例如,钛酸钙、钛酸镁、和钛酸铅),及其组合。在一些实施方式中,本发明的磷光报告物可包括掺杂金属以改变电子结构,生成磷光的无机金属氧化物基质材料。

[0010] 在一些实施方式中,可用阻隔物或壳,如硅基壳(例如,氧化硅、二氧化硅、硅酸盐或有机官能硅烷),氧化铝,其他无机金属氧化物,高度交联的聚合物网络,及其组合来被覆或包封磷光报告物。在一些实施方式中,覆层或包封可有助于防止由与周围环境中的水或化学物,或化合物的反应导致的磷光芯的发光性质的损失或降解。在一些实施方式中,可通过Stöber法或Stöber法的修改形式来进行被覆或包封。

[0011] 在一些实施方式中,可用水溶性部分,如聚乙二醇或亲水性聚合物被覆或功能化本发明的磷光报告物以使得所述报告物易于在水或水性溶液中分散。在一些实施方式中,可用降低分析试验或测试中的非特异性结合的部分被覆或功能化磷光报告物。

[0012] 在一些实施方式中,可用分子识别元件,如抗体或适体来修饰本发明的磷光报告物。在一些实施方式中,分子识别元件可共价连接至磷光报告物。在一些实施方式中,分子识别元件可非共价连接至磷光报告物,如通过物理吸附。

[0013] 在一些实施方式中,本发明的磷光报告物可与接头相联,如三乙氧基甲硅烷基丁醛(TESBA)、聚乙二醇(PEG)、(3-氨丙基)三乙氧基硅烷(APTES)、烷烃等。在一些实施方式中,与二氧化硅表面结合并且也具有与其他分子偶联的官能基团的反应性硅烷接头可附于磷光报告物的表面。在一些实施方式中,市售的带有用于与蛋白质偶联的反应性官能基团的三烷氧基硅烷聚乙二醇分子可直接连接至磷光报告物的无机二氧化硅或氧化铝表面。在一些实施方式中,可在用水溶性部分被覆磷光报告物之前、期间或之后将接头偶联至磷光报告物。例如,在一些实施方式中,磷光报告物可用反应性硅烷被覆,并随后用聚乙二醇偶联。

[0014] 在一些实施方式中,可用其表面上的各种官能团官能化磷光报告物。示例性的官能团包括,但不限于,胺基、羧基、醛、酮、羟基、硫醇、酰肼、酸酐、烯炔、炔炔、叠氮化物,及其组合。在更具体的实施方式中,官能化的磷光报告物可直接偶联至通过用高碘酸盐氧化抗体F<sub>c</sub>部分上的多糖在抗体上产生的醛。在其他实施方式中,特异性结合抗体的F<sub>c</sub>部分的蛋白A或其他蛋白质可连接至磷光报告物的表面,并然后用于以定向的方式结合抗体,以改善磷光报告物的结合效率。

[0015] 在一些实施方式中,磷光报告物可以是颗粒的形式。在一些实施方式中,颗粒的尺寸范围是约1000nm、600nm、400nm、300nm、200nm、100nm或50nm。

[0016] 本发明的其他实施方式涉及制备前述磷光报告物的方法。在一些实施方式中,该方法包括,通过湿研磨和沉降联用来减小无机磷光粉末的尺寸。例如,在一些实施方式中,用球磨机或罐磨机进行湿研磨。然后,将干燥无机磷光粉末分散在液体中,并在研磨介质(例如,由坚硬、致密材料如氧化锆组成的研磨介质)存在下放置在陶瓷、金属或塑料研磨罐中并研磨。

[0017] 在一些实施方式中,在有机溶剂如乙酸乙酯、甲苯、环己烷、环戊烷、癸烷及其组合存在下进行湿研磨。在一些实施方式中,有机溶剂是疏水性的并且具有低吸湿性。在一些实施方式中,有机溶剂并不影响无机材料的发光。在一些实施方式中,在醇,如乙醇、异丙醇、丁醇或其组合存在下进行湿研磨。

[0018] 在其他实施方式中,可使用替代性研磨技术和设备来减小无机磷光粉末的平均粒度。在一些实施方式中,这类技术包括,但不限于,冷冻研磨、振动研磨、珠磨、干燥研磨、磨擦研磨、喷射研磨、磨碎及其组合。在一些实施方式中,可使用除沉降以外的分级分离(fractionation)技术(例如,筛分、场流分级分离、切向流分离)来分离更窄的粒度分布。

[0019] 在一些实施方式中,本发明涉及一种用于检测样品内至少一种分析物的方法。这种方法包括提供磷光报告物的步骤。在一些实施方式中,该方法还包括将磷光报告物与样品接触。在一些实施方式中,该方法包括检测磷光报告物的发光信号的步骤。在一些实施方式中,该方法包括确定分析物存在并基于检测到的发光信号对分析物进行定量的步骤。

[0020] 在一些实施方式中,本发明涉及一种用于体外检测样品内至少一种分析物的方法。这种方法包括提供磷光报告物的步骤。在一些实施方式中,该方法还包括将磷光报告物加载到多孔材料中。在一些实施方式中,该方法包括将样品与加载了磷光报告物的多孔材料接触。在一些实施方式中,该方法包括使样品和磷光报告物流动通过多孔膜。在一些实施方式中,该方法包括检测膜上的发光区域或发光的缺失,以指示存在或缺少至少一种分析物。

[0021] 在一些实施方式中,本发明涉及一种用于体外检测样品内至少一种分析物的方法。这种方法包括以下步骤:提供磷光报告物;并提供固定在表面上的至少一种第一分子识别元件,其中固定的分子识别元件能够结合至少一种分析物。在一些实施方式中,该方法还包括将样品与表面接触以允许至少一种分析物结合分子识别元件,以固定分析物。在一些实施方式中,该方法包括将磷光报告物与表面接触,以使磷光报告物结合至少一种固定的分析物;并且测量来自磷光报告物的发光信号,以允许检测或定量分析物。

[0022] 在一些实施方式中,所述表面包括微流体芯片,或纸微流体,或膜,或微板,或用于浮选的微气泡、或透明表面。在一些实施方式中,磷光报告物包括至少一种无机磷光颗粒、包封至少一种磷光颗粒的壳,和位于壳上的第二分子识别部分。在一些实施方式中,第二分子识别部分结合至少一种固定的分析物以生成发光信号。

[0023] 在一些实施方式中,本发明涉及磁性磷光报告物。在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括至少一种无机磷光颗粒。在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括包封至少一种无机磷光颗粒的壳和位于壳上的至少一种磁性部分。在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括位于壳上的至少一种分子识别部分。在一些实施方式中,无机磷光颗粒形成磷光报告物的芯。

[0024] 在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括至少一种无机磷光颗粒和至少一种磁性颗粒或磁性材料层。在一些实施方式中,壳包封至少一种无机磷光颗粒和至少一种磁性颗粒或磁性材料层。在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括位于壳上的至少一种分子识别部分。在一些实施方式中,无机磷光颗粒和至少一种磁性颗粒或磁性层形成磷光报告物的芯。

[0025] 在一些实施方式中,本发明涉及一种用于检测样品内至少一种分析物的方法。这种方法包括提供磁性磷光报告物。在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括至少一种无机磷光颗粒和至少一种磁性颗粒或磁性材料层。在一些实施方式中,磁性磷光报告物还包括包封至少一种无机磷光颗粒和至少一种磁性颗粒或磁性材料层的壳。在一些实施方式中,报告物包括针对位于壳上的分析物有特异性的至少一种第一分子识别部分。

[0026] 在一些实施方式中,该方法还包括将前述磁性磷光报告物与样品接触。在一些实施方式中,该方法包括通过使用磁场来浓缩磁性磷光报告物。在一些实施方式中,该方法包括将浓缩的磁性磷光报告物与表面接触。在一些实施方式中,用针对分析物有特异性的至少一种第二分子识别部分来使表面功能化。在一些实施方式中,该方法还包括检测磁性磷光报告物的发光信号;和,基于检测到的发光信号来确定分析物存在或对分析物定量。在一些实施方式中,第一分子识别部分结合至少一种分析物以生成发光信号。

[0027] 在其他实施方式中,本发明涉及在各种方案设置(setting)中,如诊断方案设置中检测磷光报告物的方法(例如,图31)。在一些实施方式中,该方法包括检测来自磷光报告物的发光。在一些实施方式中,可通过激发磷光报告物来检测来自磷光报告物的发光。在多个实施方式中,可通过电子、磁场、光子或其组合来激发磷光报告物。在一些实施方式中,使用波长选择性机制在激发的同时检测发光。在一些实施方式中,可通过施加热来增强发光。在一些实施方式中,可在激发停止的1、10、100、1000或10000000毫秒内检测到发光。在一些实施方式中,可通过电子机制、光学机制、光电子机制、机械遮蔽、旋转、流动或重新定位机制来检测发光。

[0028] 在一些实施方式中,通过用膜基或数字照相机(例如,带CMOS、CCD或其他类型的传感器的数字照相机)成像,发光被用来定性或定量地获得试验中的信号。在一些实施方式中,可用发光计、荧光计、分光光度计或能够测量光强度的其他类似设备来测量发光。

[0029] 在一些实施方式中,可使用手机,智能手机,或便携式电子装置,诸如但不限于平板电脑、个人数字助理或笔记本电脑来检测来自磷光报告物的发光,用于定性或定量试验读取。在一些实施方式中,手机或便携式电子装置可与附属装置耦合,以允许检测来自磷光报告物的发光,以检测来测试样品中是否存在分析物。

[0030] 在一些实施方式中,本发明涉及增强磷光报告物的检测的方法。在一些实施方式中,使用平均技术,如图36-40所示的那些来在检测分析物是否存在的试验中实现来自所用磷光报告物的发光信号的更高信噪比。

[0031] 在一些实施方式中,可在多种试验方案设置中使用本发明的磷光报告物。在一些实施方式中,试验方案设置可包括但不限于,横向流动,表面-结合试验,流通试验,与漂浮材料相关的试验,或用于浓缩或力压缩的与磁性材料相关的试验。在一些实施方式中,本发明涉及包含磷光报告物的物质和多孔膜(诸如但不限于硝酸纤维素、玻璃纤维和棉花纤维)的组合物。在一些实施方式中,在用于分析物检测的试验中使用包含磷光报告物的物质和多孔膜的组合物。

[0032] 附图的简要说明

[0033] 图1显示了在不同波长下发射的铝酸锶磷光粉末的不同样品。材料的不同颜色允许进行基于光谱的多重试验。

[0034] 图2显示了购得的铝酸锶磷光粉末的能量色散X-射线光谱(EDS)数据,标出了C、O、Al、Dy、Sr、Ca、Eu和Dy的峰。

[0035] 图3A-3B显示了各种方案。示意性地显示了用于通过一般罐磨机或球磨机减小磷光颗粒的尺寸的研磨工艺(图3A)。绘图显示了可能会在研磨期间导致压裂和尺寸减小的颗粒的各种缺陷(图3B)(改编自陶瓷加工原理介绍(Introduction the Principles of Ceramic Processing)-J.Reed,1988)。

[0036] 图4A-4B显示了用Retsch MM301高速混合研磨机在不锈钢研磨罐中在乙醇中湿研磨之后铝酸锶磷光粉末的图像。铝酸锶显示对于不锈钢球和罐而言磨蚀性太强,导致钢颗粒明显污染产品,产生灰色。用其他研磨流体来进行实验,以确保污染是来自对钢物理磨损的机械作用,而不是化学现象。

[0037] 图5A-5B显示了铝酸锶磷光颗粒的光学显微图像。(图5A)最细级别的市售铝酸锶粉末,有效颗粒直径超过 $50\mu\text{m}$ 。(图5B)湿研磨后铝酸锶磷光颗粒产生直径低于 $10\mu\text{m}$ 的颗粒。

[0038] 图6显示了研磨的铝酸锶磷光颗粒的扫描电子显微镜(SEM)图像。相当大部分的颗粒具有亚微米直径。

[0039] 图7显示了绿色铝酸锶磷光体的发射光谱,以及在激发后几秒拍摄的研磨的磷光颗粒的胶体分散体的照片。研磨的颗粒没有快速沉降,并且也保留了长的发光寿命。

[0040] 图8显示了研磨的和尺寸分级的铝酸锶磷光体的粒度分布。用悬浮的微通道共振器设备来获得数据。

[0041] 图9显示了四乙氧基硅烷(TEOS)和水反应生成二氧化硅,并显示随着二氧化硅层随时间的生长,初始半径为 $r_0$ 且总半径为 $r(t)$ 的磷光颗粒的二氧化硅包封的示意图。

[0042] 图10A-10B显示了四乙氧基硅烷及其在二氧化硅包封过程中的水解产物的瞬时浓度的模型预测。显示了初始水浓度的两种不同的起始条件。(左) 5体积%的起始水浓度(图10A)。(右) 20体积%的起始水浓度(图10B)。

[0043] 图11显示了随时间变化的、针对初始水浓度的不同起始条件计算的环绕起始直径为500nm的颗粒周围的二氧化硅壳厚度。

[0044] 图12A-12B显示了用不同摩尔比的水与四乙氧基硅烷的二氧化硅包封实验的结果。来自不同包埋方案的颗粒在纯水中重悬,以形成相同浓度的胶体,并且测量随时间变化的发光以观察二氧化硅壳对防止水解的效果。(图12A) 20mM四乙氧基硅烷,0.5M氨,(图12B) 40mM四乙氧基硅烷,0.5M氨。

[0045] 图13显示了裸的未包封的铝酸锶磷光颗粒和二氧化硅包封的铝酸锶磷光体的XPS谱。

[0046] 图14显示了二氧化硅包封的铝酸锶磷光体,和用中性亲和素(NeutrAvidin)功能化的二氧化硅包封的磷光体的XPS谱。

[0047] 图15显示了PEG官能化的二氧化硅包封的铝酸锶磷光体的粒度分布。用尺寸可调纳米孔设备(IZON)来获取数据。

[0048] 图16是显示使二氧化硅包封的磷光颗粒与三乙氧基甲硅烷基丁醛(TESBA)反应,以引入供于部分与表面的共价连接的表面醛的反应的示意图。

[0049] 图17显示了通过由TESBA引入的表面醛和来自蛋白质的胺之间的还原胺化而带有偶合至表面的抗体的二氧化硅包封的磷光报告物的示意图。

[0050] 图18A-18B显示了用如图17所示功能化的抗-溶菌酶HyHEL-5磷光报告物进行的磷光体LFA实验。2个标记“+”的LFA试条具有通过将鸡蛋溶菌酶直接点样在硝酸纤维素膜上制备的测试线。标记“-”的试条是没有溶酶体的阴性对照。亮场照明下的LFA试条(图18A)。光激发和发光成像模式之后的LFA试条(图18B)。

[0051] 图19显示了采用抗-溶菌酶D1.3测试线的磷光体LFA实验。在特定浓度下使用鸡蛋溶菌酶(HEL)牛血清白蛋白(BSA)作为分析物。如图17所示的功能化的抗-溶菌酶HyHEL-5磷光颗粒用作报告物。

[0052] 图20显示了用在所有试条中用鸡蛋溶菌酶直接点样在膜上作为测试线的磷光体LFA实验。(左)抗-溶菌酶HyHEL-5磷光体用作报告物(右)二氧化硅包封的磷光体用作对照,以评价表面部分对磷光报告物通过膜的运输的影响。

[0053] 图21显示点样在Fusion 5玻璃纤维膜上的溶菌酶测试线的磷光体LFA实验,有6个重复。抗-溶菌酶HyHEL-5磷光体用作报告物。

[0054] 图22A-22C显示,利用用来自TESBA的磷光体上的表面醛的还原性胺化作用,用生物素-PEG-胺官能化的磷光报告物的示意图(图22A)。用中性亲和素测试线官能化并且用生物素-PEG磷光体作为报告物运行的LFA试条的亮场图像(图22B)。显示来自结合的生物素-PEG磷光报告物的测试线的发光的LFA试条的暗场图像(图22C)。左起第2试条和第4试条没有用磷光体点样,以显示从第1试条和第3试条的测试线发出的光来自磷光体而不是来自在测试线上吸附的蛋白质。

[0055] 图23显示了带有通过带末端羧酸基团的接枝PEG部分与抗体上的伯氨基之间的碳二亚胺化学反应形成的酰胺键共价连接的抗体的磷光报告物。PEG通过与来自TESBA的醛的

还原性胺化作用枝接磷光报告物。

[0056] 图24是显示通过抗-溶菌酶抗体和中性亲和素磷光报告物之间的夹心法检测生物素化的溶菌酶的示意图。

[0057] 图25显示了生物素化的溶菌酶分析物、HyHEL-5测试线、中性亲和素-PEG磷光报告物,和生物素化的BSA对照线的LFA实验。

[0058] 图26显示了图25中LFA实验的重复,还测试了其它的更低分析物浓度。

[0059] 图27显示了用如图25和图26所示的中性亲和素磷光报告物和生物素化的溶菌酶作为分析物,但在测试线D1.3处采用不同的单克隆抗-溶菌酶抗体的LFA实验。

[0060] 图28显示了采用图27所示的中性亲和素磷光体、生物素化的溶菌酶分析物、D1.3测试线和生物素化的BSA对照线,但采用脱脂奶粉钝化(passivize)的膜的LFA实验。

[0061] 图29显示了磷光报告物的时间门选或时间解析的发光试验的原理。在一段起始时间中,来自磷光颗粒和背景的光强度接近0。应用激发光源导致来自磷光报告物的发光增加,并且背景发光同时含有自体荧光和散射的激发光。当关闭激发光时,背景迅速衰减,而磷光报告物信号缓慢衰减,产生更高的信背比和较低检测限。

[0062] 图30显示在方案的进一步优化之后用图25和图26所示的中性亲和素磷光报告物的LFA实验。检测限接近100pg/mL。

[0063] 图31显示横跨来自图30所示的试验的LFA试条的宽度的测试线强度概况。该图显示了对分析物浓度定量的潜力并且有助于证明低检测限。

[0064] 图32A-32B显示了检测生物素化溶菌酶的LFA中的磷光报告物和金纳米颗粒的比较。图32A和图32B是独立试验。

[0065] 图33显示了生物素化的溶菌酶分析物和磷光报告物的LFA实验的定量分析。作图显示了测试线与对照线的强度比随分析物浓度的变化。

[0066] 图34是显示用固定在表面上的捕获抗体和磷光报告物,在夹心免疫试验中检测任意分析物的一般示意图。

[0067] 图35A-35B显示了用于检测分析物的磷光报告物的浮选试验。浮动的物体,如玻璃微泡,用抗体功能化并且结合至分析物,所述分析物由于浮动物体的漂浮而再位移至液体顶部(图35A)。检测到来自液体顶部的发光,并且,通过液体内的染料吸附来封闭来自未结合的磷光报告物的背景发光。SEM图像显示在预浮选分析试验实验中结合至玻璃微泡的磷光报告物(图35B)。

[0068] 图36显示沿侧流试条的长度向下的线扫描(line scan),其用中性亲和素磷光报告物和用作分析物的1ng/mL生物素化的溶菌酶运行。用iPhone5s获取图像。从来自单一图像的侧流试条的中间开始线扫描(A)。从同一侧流试条的中间开始,但来自40个图像的平均的线扫描显示了源自图像平均化的噪音减少(B)。

[0069] 图37显示了用于获得高信噪比的LFA试条的线扫描的图像平均化的替代性方法,使用采用了与图36相同的中性亲和素磷光报告物和1ng/mL的生物素化的溶菌酶分析物的模型系统。在这种情况下,单一图像取自侧流试条,并且对沿该单一图像的试条的长度向下的多个线扫描进行平均化。

[0070] 图38显示了图37所示的成像平均化方法,但是分析物浓度为0.1ng/mL。在单个线扫描中,噪音遮蔽了测试线,但是在通过平均化多个线扫描来减少噪音之后,来自测试线的

信号变得易于区分。

[0071] 图39A-39B显示了用iPhone 5s获取的,采用0.1ng/mL生物素化的溶菌酶和中性亲和素磷光报告物运行的LFA试条的灰度图像。图39A显示了单个图像。图39B显示了16个图像的平均化。

[0072] 图40A-40B显示了检测1ng/mL生物素化的溶菌酶的中性亲和素磷光报告物的LFA结果。用iPhone 5s获取的40RGB色图像的平均图像(图40A)。相应的强度概况(图40B)。

[0073] 图41A-41C显示用于检测分析物的本发明的优选方法和实施方式。磷光报告物应用在侧流试验中,在分析物存在下结合在测试线处。对照线确保试验正常发挥功能。磷光报告物加载在偶联垫中,该偶联垫连接至样品垫。吸收垫发挥槽的作用以辅助通过测试条芯吸液体。

[0074] 图42A-42B显示了具有电子发光读取的侧流试验。侧流试条被部分或完全地夹心于2个电极之间,其中至少一个是透明的以允许光透过。在电极之间施加恒定或交替电场,刺激磷光报告物发光。

[0075] 图43A-43C显示了能够对试验或测试进行时间门选发光成像的手机附属装置的示例,该试验或测试使用手机自带的光学硬件来纳入磷光报告物。该附属装置部分与手机保护套类似,并且手机能够简单地滑入该附属装置中。将测试卡(test cartridge)装载到该附属装置的插入端口,并且将测试卡内感兴趣的区域与手机的相机对齐。使用来自手机中设置的光源的闪光来对磷光报告物进行光激发。该附属装置也可纳入一个或多个镜片,其与手机中相机的光学器件对齐,以允许放大,增加灵敏度,或缩短工作距离。该附属装置也可含有如反射表面的元件,其以改善磷光报告物激发的方式重定向来自手机的光。

#### [0076] 发明详述

[0077] 应理解,前面的概况性描述和下列详细描述都只是示例性和说明性的,不构成对要求保护的主题的限制。在本申请中,单数形式的使用包括复数形式,词语“一个”或“一种”表示“至少一个/一种”,“或”字的使用表示“和/或”,除非另有具体说明。此外,使用术语“包括”以及其他形式,如“包含”和“含有”不是限制性的。同时,除非另外具体说明,术语如“元件”或“组分”同时包括包含一个单元的元件或组分或者包括超过一个单元的元件或组分。本文公开的参数(例如,温度、时间、浓度等)可以是大约的。

[0078] 本文所用章节标题用于组织目的,而不应理解为限制所述主题。本申请引用的包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和条约在内的所有文件或文件的部分,在此通过引用全文纳入本文以用于任何目的。当一篇或多篇所结合的文献及类似材料对术语的定义与本申请对该术语的定义相抵触时,以本申请为准。

[0079] 生物传感和分析化学中的许多技术和试验模式包括使用报告物或标记物来将分析物与分子识别部分的特异性结合转换成可观察的信号。因此,试验的分析灵敏度或检测限主要取决于报告物生成的信号的可检测性。报告物技术在信号生成的组成和机制方面具有广泛变化,其影响了灵敏度、线性和稳定性,使得一些类别的报告物比其他报告物更好地适应具体应用。

[0080] 现在,一些更稳健并广泛使用的医疗点测试模式是基于膜的,如侧流试验(LFA)或流通试验。这些测试采用分子识别元件进行膜功能化,以特异性结合并捕获一种或多种分析物,以及着色的亚微米颗粒,如金纳米颗粒或染色的胶乳颗粒,结合捕获的分析物允许可

视读出测试结果。然而,这些比色报告物限制了试验灵敏度,并且使用带不同报告物(如酶)的识别部分的相同系统的测试,能够提供优越的检测限。除了改善的检测限以外,其他报告物,如荧光纳米颗粒可提供测量的信号和分析物浓度之间更好的线性。

[0081] 尽管有这些优点,高灵敏度报告物技术具有阻碍其在医疗点方案设置中被广泛采用的多重问题。酶易于变性,导致其随着时间推移而丧失活性。此外,许多酶使用的底物需要不适合户外使用的冷藏或储存条件。几乎所有荧光染料易于光漂白,并且许多易于化学降解。

[0082] 在工业界和学术界已经对通过开发各种报告物包括金纳米颗粒、荧光标记物、量子点、上转换磷光体、磁性纳米颗粒等改善分析试验做了大量努力。与常规标记物如金纳米颗粒相比,使用用于信号读取的光致发光的报告物,如荧光纳米颗粒或量子点,可增强试验的灵敏度,并且也趋向于比酶促报告物更稳定。大多数光致发光报告物需要连续的激发光源用于成像和定量测量,这是因为激发状态的寿命通常很短(例如,对于有机荧光染料为10ns)。光学发光滤波器在阻断激发光传播到检测器方面不是完美有效的,并且除了生物样品基质以外,试验中使用的许多材料,如侧流或流通膜显示一些自发荧光。背景自发荧光降低了信噪比,并且通常造成对试验的检测限或灵敏度的妨碍。时间解析的光致发光还可通过允许背景自发荧光在激发源关闭之后衰减,并且进行延迟成像或定量测量,从而增加信噪比来改善试验的灵敏度。然而,时间解析的测量需要探针在激发状态中保持的时间比背景自发荧光的衰减时间长。

[0083] 磷光有机染料、有机金属复合物和金属螯合物一般具有比荧光探针和量子点更长的激发态寿命,并且已被用于检测分析物的时间解析的试验。然而,磷光有机金属染料和金属螯合物一般是昂贵的并且易于光漂白,这会降低诊断试验中的可靠性。此外,这些磷光染料具有10 $\mu$ s至1ms量级的较短的发光寿命。因此,用金属螯合物或有机金属磷光报告物的时间解析的光致发光试验需要具有快速响应时间和精确控制的激发和测量之间的时间延迟的精细设计的仪器。

[0084] 由于来自样品基质中非分析物分子的自发荧光,采用光致发光来检测分析物的基于实验室和医疗点试验通常对某些样品类型具有受限的灵敏度。在红外或近红外激发后发射可见光的上转换磷光体克服了来自样品基质的自发荧光的问题。然而,上转换磷光体具有低量子产率,并且因此需要强光源,如激光发射二极管,并且一般需要使用带有较昂贵光学硬件的复杂系统来实现所需的灵敏度。实际上,所有具有短发光寿命的光致发光报告物需要连续激发来读取,因此,需要光学滤波器来从散射的激发光中减去背景信号的强度。

[0085] 时间门选的光致发光可通过使用与荧光相比较长发光寿命的报告物(例如,100 $\mu$ s对比10ns),并且在激发和测量之间引入时间延迟使非特异性背景信号衰减,来克服自发荧光问题。另外,时间门选的光致发光能够允许人们构建装置而不需要滤光器,由于时间延迟器件散射的激发光也快速衰减。然而,对于最优灵敏度,用于时间门选的光致发光的现有报告物需要10-50 $\mu$ s的精确限定且较短的时间延迟,因为这些报告物中的一般有机金属染料或金属螯合物的发光寿命的范围是100-500 $\mu$ s。因此,难以使用这些报告物和许多消费装置(如手机和平板电脑中的相机)的光电子系统来实施时间门选的光致发光。

[0086] 已经发现无机磷光材料,如掺杂稀土金属或过渡金属的碱土金属铝酸盐用于发光显示器和涂料。无机磷光体具有比用于生物传感和分析化学中所用的许多报告物更长的发

光寿命和更高的化学和光学稳定性。这些性质使得无机磷光体成为克服现有技术中的报告物的问题的有吸引力的候选物。然而,现有技术没有教导制备基于这类材料的报告物用于分析物检测应用的方法,也没有证明如何利用这些材料的光学性质用于高灵敏检测。

[0087] 在用能量源,诸如但不限于光子、电子、电场或热刺激后发光的无机、陶瓷或晶体固体材料一般称为磷光体或磷光材料。无机、陶瓷或晶体固体内容中的术语“磷光”并不与有机染料或分子、有机金属化合物或分子,或金属螯合物络合物中发生或与之相关的磷光的物理现象混淆。在本发明中,除非另外具体说明,术语“磷光”、“磷光的”和磷光体是指无机、陶瓷或晶体固体材料。在本发明中,术语“磷光”、“长期磷光”和“持续发光”都是可互换使用的术语,以描述其中无机、陶瓷或晶体固体材料在用本文所述的能量源刺激之后以微秒至小时量级长时间发光的现象。

[0088] 在激发后持续几毫秒至几小时发光的持续发光纳米颗粒或微颗粒呈现出新的且潜在大幅改善的方式来设计用发光读数的定性和定量试验并且由于明显更低的背景自发荧光增强灵敏度,并使用最少的光学硬件。另外,无机持续发光的纳米颗粒对光漂白的耐受性一般比荧光染料、磷光无机和有机金属染料或化合物,甚至量子点强得多。

[0089] 在一个实施方式中,本发明涉及包含至少一种无机磷光颗粒的磷光报告物。在一些实施方式中,无机磷光颗粒被壳包封。在一些实施方式中,至少一种分子识别部分被设置在壳上。在一些实施方式中,无机磷光颗粒形成磷光报告物的芯。在一些实施方式中,磷光报告物通过至少一种分子识别部分结合至目标分析物以生成发光信号。在一些实施方式中,通过至少一种无机磷光颗粒的激发来检测发光信号。在一些实施方式中,通过电磁光谱的UV光,或可见光,或其他光子来实现至少一种无机磷光颗粒的激发。在一些实施方式中,至少一种无机磷光颗粒具有范围为约10微秒至约1小时的发光寿命。在一些实施方式中,至少一种无机磷光颗粒具有几小时的发光寿命。

[0090] 在一些实施方式中,至少一种无机磷光颗粒包含掺杂至少一种稀土金属或至少一种过渡金属的无机基质材料。在一些实施方式中,至少一种无机基质材料是硫化锌,或硫化钙,或碱土金属硅酸盐,或碱土金属铝酸盐,或钛酸盐。在一些实施方式中,碱土金属硅酸盐选自下组:硅酸铍、硅酸钙、硅酸镁和硅酸钡。在一些实施方式中,碱土金属铝酸盐选自下组:铝酸锶、铝酸钙、铝酸镁、铝酸铍,和铝酸钡镁。在一些实施方式中,钛酸盐选自下组:钛酸钙、钛酸镁和钛酸铅。在一些实施方式中,至少一种无机磷光颗粒包含掺杂至少一种稀土金属的铝酸锶。在一些实施方式中,至少一种稀土金属包括铈,或镨,或镧系或其组合。在一些实施方式中,至少一种无机磷光颗粒包括掺杂金属的无机金属氧化物基质材料。

[0091] 在一些实施方式中,包封至少一种无机磷光颗粒的壳包括硅基覆层。在一些实施方式中,硅基覆层选自下组:氧化硅、二氧化硅、硅酸盐和有机官能硅烷。在一些实施方式中,包封至少一种无机磷光颗粒的壳包括亲水性聚合物。在一些实施方式中,亲水性聚合物是聚乙二醇。

[0092] 在一些实施方式中,分子识别部分包括抗体、或抗体片段、或抗原、或核酸、或肽、或适体。在一些实施方式中,分子识别部分包括设置在包封至少一种无机磷光颗粒的壳上的接头。在一些实施方式中,接头选自下组:三乙氧基甲硅烷基丁醛(TESBA)、聚乙二醇(PEG)、同双官能聚乙二醇、异双官能聚乙二醇、(3-氨丙基)三乙氧基硅烷(APTES),和三烷氧基硅烷。在一些实施方式中,接头还包括用于偶联至目标分子的官能基团。在一些实施方

式中,分子识别部分包括直接设置在壳上的官能团。在一些实施方式中,官能团选自下组:胺基、羧基、醛、酮、羟基、硫醇、和酰肼、酸酐、炔烃、和叠氮化物。在一些实施方式中,至少一种无机磷光颗粒是纳米颗粒。在一些实施方式中,磷光报告物的尺寸是约10nm至约1000nm。

[0093] 在一些实施方式中,本发明涉及一种制备磷光报告物的方法,该方法包括制备无机磷光颗粒。在一些实施方式中,该方法包括将无机磷光颗粒包封在壳中。在一些实施方式中,该方法涉及将至少一种分子识别部分设置在壳上。在一些实施方式中,无机磷光颗粒形成磷光报告物的芯。在一些实施方式中,制备无机磷光颗粒的步骤包括减小无机磷光粉末的尺寸。在一些实施方式中,尺寸减小包括湿研磨、或冷冻研磨、或振动研磨、或珠研磨、或干燥研磨、或磨碎研磨、或喷射研磨、或碾磨、或其组合。在一些实施方式中,通过湿研磨和分级分离来进行尺寸减小。在一些实施方式中,在有机溶剂或醇存在下进行湿研磨。在一些实施方式中,有机溶剂选自下组:乙酸乙酯、甲苯、环己烷、环戊烷和癸烷。在一些实施方式中,醇是乙醇、或异丙醇、或丁醇。

[0094] 在一些实施方式中,包封无机磷光颗粒的步骤使用Stöber法或Stöber法的修改形式。在一些实施方式中,在包封步骤之前、期间或之后进行设置分子识别部分的步骤。在一些实施方式中,通过物理吸附或通过共价连接来进行设置至少一种分子识别的步骤。在一些实施方式中,设置至少一种分子识别部分的步骤包括用至少一种接头分子使壳的表面官能化。在一些实施方式中,至少一种接头分子选自下组:三乙氧基甲硅烷基丁醛(TESBA)、聚乙二醇(PEG)、(3-氨丙基)三乙氧基硅烷(APTES)、和三烷氧基硅烷。在一些实施方式中,至少一种接头分子具有用于偶联至至少一种分子识别部分的至少一个官能团。在一些实施方式中,至少一个官能团选自下组:胺基、羧基、醛、酮、羟基、硫醇、酰肼、酸酐、叠氮化物、和炔烃。在一些实施方式中,设置至少一种分子识别部分的步骤还包括通过官能团将接头分子与分子识别部分偶联。在一些实施方式中,分子识别部分包括抗体、抗体片段、抗原、核酸、肽、蛋白质、或适体。在一些实施方式中,设置分子识别部分的步骤包括在壳上直接设置至少一种官能团。在一些实施方式中,官能团偶联至至少一个聚乙二醇链的一个末端。在一些实施方式中,聚乙二醇链的另一个末端偶联至至少一个分子识别部分。

[0095] 在一些实施方式中,本发明涉及一种用于检测样品内至少一种分析物的方法。这种方法包括提供磷光报告物的步骤。在一些实施方式中,该方法还包括将磷光报告物与样品接触。在一些实施方式中,该方法包括检测磷光报告物的发光信号的步骤。在一些实施方式中,该方法包括确定分析物存在并基于检测到的发光信号对分析物进行定量的步骤。

[0096] 在一些实施方式中,本发明涉及一种用于体外检测样品内至少一种分析物的方法。这种方法包括提供磷光报告物的步骤。在一些实施方式中,该方法还包括将磷光报告物加载到多孔材料中。在一些实施方式中,该方法包括将样品与加载了磷光报告物的多孔材料接触。在一些实施方式中,该方法包括使样品和磷光报告物流动通过多孔膜。在一些实施方式中,该方法包括检测膜上的发光区域或发光的缺失,以指示存在或缺少至少一种分析物。在一些实施方式中,该方法还包括对检测到的分析物定量。

[0097] 在一些实施方式中,本发明涉及一种用于体外检测样品内至少一种分析物的方法。这种方法包括以下步骤:提供磷光报告物;并提供固定在表面上的至少一种第一分子识别元件,其中固定的分子识别元件能够结合至至少一种分析物。在一些实施方式中,该方法还包括将样品与表面接触,以允许至少一种分析物结合分子识别元件,以固定分析物。在一

些实施方式中,该方法包括将磷光报告物与表面接触,以使磷光报告物结合至少一种固定的分析物;并且测量来自磷光报告物的发光信号,以允许检测或定量分析物。在一些实施方式中,表面包括微流体芯片、或纸微流体、或膜、或微板、或用于浮选的微气泡、或透明表面。在一些实施方式中,磷光报告物包括至少一种无机磷光颗粒、包封至少一种磷光颗粒的壳,和位于壳上的第二分子识别部分。在一些实施方式中,第二分子识别部分结合至少一种固定的分析物以生成发光信号。在一些实施方式中,通过如下方式来检测磷光报告物的发光:提供适用于磷光报告物的光致激发光源;提供能够检测来自磷光报告物的发光的传感器;用光源照射磷光报告物;关闭光源;等待预定的一段时间以允许背景衰减;和测量来自磷光报告物的发射的光。

[0098] 在一些实施方式中,本发明涉及磁性磷光报告物。在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括至少一种无机磷光颗粒。在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括包封至少一种无机磷光颗粒的壳和位于壳上的至少一种磁性部分。在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括位于壳上的至少一种分子识别部分。在一些实施方式中,无机磷光颗粒形成磷光报告物的芯。

[0099] 在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括至少一种无机磷光颗粒和至少一种磁性颗粒或磁性材料层。在一些实施方式中,壳包封至少一种无机磷光颗粒和至少一种磁性颗粒或磁性材料层。在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括位于壳上的至少一种分子识别部分。在一些实施方式中,无机磷光颗粒和至少一种磁性颗粒或磁性层形成磷光报告物的芯。

[0100] 在一些实施方式中,本发明涉及一种用于检测样品内至少一种分析物的方法。这种方法包括提供磁性磷光报告物。在一些实施方式中,磁性磷光报告物包括至少一种无机磷光颗粒和至少一种磁性颗粒或磁性材料层。在一些实施方式中,磁性磷光报告物还包括包封至少一种无机磷光颗粒和至少一种磁性颗粒或磁性材料层的壳。在一些实施方式中,报告物包括针对位于壳上的分析物有特异性的至少一种第一分子识别部分。

[0101] 在一些实施方式中,该方法还包括将前述磁性磷光报告物与样品接触。在一些实施方式中,该方法包括通过使用磁场来浓缩磁性磷光报告物。在一些实施方式中,该方法包括将浓缩的磁性磷光报告物与表面接触。在一些实施方式中,用针对分析物有特异性的至少一种第二分子识别部分来使表面官能化。在一些实施方式中,该方法还包括检测磁性磷光报告物的发光信号;和,基于检测到的发光信号来确定分析物存在或对分析物定量。在一些实施方式中,第一分子识别部分结合至少一种分析物以生成发光信号。

[0102] 掺杂铈和镝的铝酸锶( $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+},\text{Dy}^{3+}$ )是长寿命的无机磷光体,其在激发后具有持续数小时的可见发光。其具有比更常见的市售磷光体,如掺杂硫化锌磷光体更高的发光强度,这使其成为体外诊断和其他结合试验中标记物的理想材料。铝酸锶具有高度光稳定性的额外优势,使得测试条或使用该磷光体的其他试验可以更晚的时间再成像而没有发光和灵敏度的明显损失,允许对试验结果进行可靠的二次确认。报告物的光稳定性也有助于确保试验之间的一致性,并且可延长使用发光标记物的诊断试剂盒的寿命。

[0103] 在一些实施方式中,本发明涉及制备用于诊断试验,如诊断免疫试验或核酸杂交试验的铝酸锶磷光体的方法。

[0104] 在一些实施方式中,本发明涉及磷光铝酸锶粉末。图1显示了在黑暗中成像的具有

不同粒度和发光波长的铝酸锶磷光体样品。用于生产磷光体的固态合成制法会产生大块的材料,其可使用设备如粉碎机和辊与特定网格尺寸的筛网组合研磨以获得一般应用如黑暗中发光的涂料所需的更细的材料。

[0105] 所购买的最细级别的磷光体的光学显微图像(图5A)显示大多数材料局限于有效直径远超 $10\mu\text{m}$ 的颗粒中,其对于大多数试验模式而言过大,因为斯托克斯沉降速度过快(例如,对于 $10\mu\text{m}$ 的铝酸锶球,在水中 $150\mu\text{m/s}$ )。为了在大多数试验模式中使用磷光报告物,希望颗粒显著小于最细级别的市售材料,使得颗粒易于在缓冲液或其他液体中悬浮。

[0106] 在一些实施方式中,可使用一般的砂浆和研杵来将市售粉末的体积降低至亚微米尺寸。在一些实施方式中,可使用湿研磨方法来将平均粒度降低至亚微米尺寸(图3)。在一些实施方式中,细级别的市售粉末可在研磨罐悬浮于含合适研磨介质的无水或疏水性溶剂中,并在碾磨上放置延长的一段时间(例如,长达9天)。

[0107] 在一些实施方式中,希望采用湿研磨来有效减小尺寸,因为干研磨可能在研磨罐的侧壁上产生粉末的致密包装的团聚体,这使得很大一部分的材料与研磨工艺分离。在一些实施方式中,将颗粒保持悬浮在溶液中有助于确保几乎所有的材料被均匀研磨。许多无机磷光体易于水解,因此在一些实施方式中需要无水或疏水性液体来降低粒度,同时保留颗粒的发光性质。

[0108] 申请人已经发现,通过研磨罐和研磨介质粉碎的材料相对硬度是影响研磨工艺性能的重要因素。在一些实施方式中,申请人使用2种不同的研磨器,美国Stoneware球磨器和Retsch MM301高速混合研磨器。高速混合研磨器使用不锈钢研磨罐和2cm不锈钢研磨球作为研磨介质,其证明在降低粒度上是无效的,因为铝酸锶对于钢是高度磨蚀性的并且导致污染(图4)。另外,甚至痕量水平的一些元素都可能有效破坏无机固体的发光,如铁在硫化锌磷光体中的情况那样,当选择研磨介质和研磨罐时必须考虑这点。显示亮光致发光的研磨磷光体的胶体分散体和相应发光光谱的图像示于图7。

[0109] 美国Stoneware研磨器使用陶瓷罐和氧化锆研磨介质,并且当用在50mL乙酸乙酯中悬浮的约5克铝酸锶粉末进行湿研磨时,证明在降低粒度并排除污染方面有效得多。图5显示所购买的磷光粉末在24小时的湿研磨之后的光学显微图像和大量尺寸减小。

[0110] 扫描电子显微镜(SEM)揭示了在大约1周的湿研磨之后的许多亚微米颗粒(图6)。通过离心差异沉降来去除较大颗粒并且分离具有较窄尺寸分布的部分。研磨和分离过程允许对在液体中不快速沉降,但仍然保留它们的持续发光性质的小颗粒进行分级分离(图7)。研磨和分级分离的组合可实现纳米尺寸的颗粒的较窄尺寸分布(图8)。

[0111] 铝酸锶在水中不稳定,并且易于水解,其极大降低或完全破坏了该材料的发光性质。使用修改的Stöber法进行二氧化硅包封,来使得颗粒有水稳定性,同时保留它们的发光性质。铝酸锶的二氧化硅包封是重要的,因为水是Stöber法必需的反应物,但是也会水解降解磷光体。需要硅前体四乙氧基硅烷(TEOS)的大量水解来形成包封颗粒的有效防水二氧化硅屏障,如图9-11所示。过长时间运行Stöber法或使用低浓度的磷光体可能在混合物中产生不希望的没有磷光芯的纯二氧化硅颗粒,并且可能会以过量二氧化硅包封颗粒,从而不利地影响发光。图12显示了Stöber法优化实验的结果,其证明需要高水浓度( $\approx 18\%v/v$ )使颗粒有水稳定性,这与二氧化硅壳厚度随着初始水浓度变化的模型预测相符(图11)。数据显示,包封的磷光体可在水中悬浮至少2周而没有发光的明显损失。根据申请人的经验,包

封的磷光体甚至在水中1个月都没有明显经历水解降解。

[0112] 使用能量色散X射线分光光谱法(EDS)用于所购得的磷光体的基本元素分析,以确认在Stöber法之后存在Si峰,并且寻找来自研磨的铅污染。图2显示了裸铝酸锶磷光体的EDS光谱。申请人没有观察到来自研磨的磷光体的任何铅EDS峰,表示可忽略污染。Si K $\alpha$ 和Sr L $\alpha$ 峰在1.7-1.8keV附近重叠,使得难以通过EDS验证成功的二氧化硅包封,因此使用X射线光电光谱(XPS)用于表面表征和分析。图13中的XPS数据确认存在Si,并且Sr和Al峰的抑制表明颗粒被有效地包封在二氧化硅中,二氧化硅壳的厚度为至少20nm。

[0113] 使用几种颗粒尺寸调整技术来分析磷光体,所述技术包括动态光散射(DLS)、采用亲和生物传感器阿基米德(Archimedes)颗粒度量系统的悬浮微通道共振器质量测量法(图8),和采用IZON尺寸可调纳米孔的基于单颗粒体积的测量法(图15)。数据证明申请人能够通过湿研磨和分级分离的组合来分离亚微米磷光体。去除直径大约1微米的较大颗粒对于诊断模式如侧流试验和流出试验而言是必要的,以使膜中孔的堵塞最小化。

[0114] 将抗体与颗粒表面偶联的初始策略包括如图16所示通过三乙氧基甲硅烷基丁醛(TESBA)引入表面醛,之后用蛋白质对表面醛进行直接还原胺化作用(图17)。

[0115] 在多个实施方式中,其他三烷氧基硅烷如(3-氨丙基)三乙氧基硅烷(APTES)和各种氯代硅烷在偶联化学方案稍加修饰下可用作TESBA的取代物。在多个实施方式中,交联剂如1,2-双(三乙氧基甲硅烷基)乙烷(BTEOSE)和双[3-(三甲氧基甲硅烷基)丙基]胺(BTMOSPA)也可与烷氧基硅烷联用以改善当颗粒在水或缓冲液中悬浮时表面反应基团的水解稳定性。

[0116] 侧流试验(LFA)是医疗点应用的最常见体外诊断模式之一。使用如图41所示的装置,使样品垫、偶联垫、膜和吸收垫连接来进行许多LFA,以制备用一些类型的分子识别部分官能化的免疫层析试条,用于检测分析物。图41中的装置存在许多变化形式,如将所有的元件(例如,样品垫、偶联垫等)合并成单个膜或垫,用于分析物检测。在本发明和申请的内容中,LFA一般是指,其中样品流动或芯吸或侧流通过多孔材料,以允许检测至少一种分析物或能够确认至少一种分析物存在的任何测试。LFA可仅仅是定性的,并且提供是/否的结果,但也可以是定量测试,以确定分析物的总量或浓度。可设计LFA,使得信号的存在以及该信号的强度,如来自磷光报告物的发光,与分析物的浓度成比例。也可将LFA设计成竞争性模式,使得分析物的存在降低了特定信号的强度,这是一种常用于检测小分子如滥用药物的技术。

[0117] 图18-21显示了用磷光体报告物尝试进行的LFA实验的结果,其中抗体通过醛直接偶合至磷光体,如图17所示。通常会观察到团聚并且难以让颗粒流动通过硝酸纤维素和玻璃纤维膜。通过将磷光报告物的表面醛与胺-PEG-生物素偶合来进行观察将PEG偶联至颗粒是否将改善磷光体运输通过侧流膜的初步实验(图22A-22B)。用中性亲和素在硝酸纤维素膜上点样测试线。对于膜中的磷光体几乎没有观察到LFA条中的背景信号,并且在测试线处观察到强信号。申请人已经观察到当用PEG官能化时,在离心沉降之后,磷光报告物更易于在水性溶液中重悬。其他亲水性或水溶性聚合物可与PEG联用或代替PEG以用于使磷光报告物官能化。在所有后续实验中,在生物偶联之前用PEG使磷光报告物官能化。

[0118] 异双官能胺-PEG-羧基通过还原性胺化与磷光报告物的表面醛偶联,并且使用末端羧基来通过使用1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)

的碳二亚胺化学来偶联至伯胺(图23)。图25-28和30-33显示了用由胺-PEG-羧基和中性亲和素功能化的磷光报告物检测生物素化的溶菌酶的各种LFA实验的结果。图24显示了说明用中性亲和素磷光报告物检测生物素化的溶菌酶的示意图。磷光报告物导致对分析物的高灵敏性检测,具有比在LFA中常用的金纳米颗粒更好的性能(图32),并且潜在地允许从发光信号直接定量。图31显示横跨来自图30所示的实验的LFA试条的宽度的测试线强度概况。测试线处的信号强度与分析物浓度成比例,并且可与校准曲线相关,以允许测定来自未知样品的分析物的浓度或量。图33显示了可经生成以允许分析物定量的一种类型的校准曲线的示例。在这种情况下,使用测试线强度与对照线强度的比率作为信号的定量度量。可采用其他定量手段,如绝对光子计数。

[0119] 在一些实施方式中,试验,如流通试验或LFA,经设计以使用磷光报告物来测试多种分析物。在一些实施方式中,通过使用基于光谱的多重化来测试多种分析物,其中具有不同发射光谱的不同磷光体经官能化以能够检测不同的分析物。在一些实施方式中,通过使用结合不同分析物的不同识别部分,并且用不同的识别部分使试验中使用的表面的不同位置官能化,来进行多重化。

[0120] 图29显示了以任意试验模式检测来自磷光报告物的发光。在一段起始时间中,除了从激发源散射的背景光以外,打开激发光源导致来自磷光报告物的光致发光增加,并且导致来自局部环境(包括试验装置材料和样品基质)的自发荧光的背景信号增加。在该说明中,来自磷光报告物和背景的背景信号是相等的。当关闭激发光时,背景信号快速衰减,而磷光报告物持续发光,导致信背比增加。

[0121] 申请人已经观察到磷光体可在优化后在LFA中用作多种分析物的标记物,包括完整病毒、细菌和多种蛋白质的检测。磷光报告物可用于除了LFA以外的试验模式,并且一般可用于图34示意图所示的任何结合试验。该示意图显示用于捕获分析物的表面上的抗体和颗粒上的抗体,但是颗粒上的抗体和固定在表面上的抗体都可用能够进行分子识别的任意其他部分(如核酸、凝集素、适体或其他分子)取代。

[0122] 申请人已经进行初步实验的一种试验模式是流通试验(FTA)。在FTA中,分子识别部分被吸附或固定在膜上,然后使样品和磷光报告物直接流动通过膜,而不是侧向流动通过。样品和磷光报告物可依次加入流通膜,或者经预混合然后加入膜。然后进行成像或定量测量以检测从膜发出的光,其一般而言但并非必然与分析物浓度成比例。

[0123] 申请人也已经在浮选试验中用磷光体进行实验,其中浮动物体(二氧化硅微泡或薄聚乙烯片)与分析物和磷光体形成夹心复合物,并且浮在样品溶液顶部,向前拖动磷光体。向混合物加入染料降低了来自溶液中悬浮的磷光报告物的背景信号,并且确保大多数的发光信号来自样品顶部的浮动物体和分析物结合的磷光体。图35显示了浮选实验的示意图,伴随与来自过去的浮选实验的微泡结合的磷光体的SEM图像。在该实验中,将用抗大肠杆菌抗体功能化的磷光报告物加入含大肠杆菌和用抗大肠杆菌抗体功能化的微泡的样品的微量离心管。管的内容物经混合,然后沉降,之后测量从顶部由结合磷光报告物的泡产生的发光。

[0124] 使用标准凝胶化学发光和荧光成像系统获取图33上所示的来自LFA实验的数据。也可用消费者电子器件中的低成本装置如手机相机来进行用磷光报告物运行的试验的读取。图39-40显示了用磷光报告物运行的LFA条的图像,其用2.5mW UV/蓝LED激发并用

iPhone 5s成像。以图29所示的时间门选的方式如下获取：简单照射试条来激发，然后关闭LED并捕获图像。可以使用手机或移动设备上的自带光源作为激发源。

[0125] 可通过寻找试条上是否存在测试线来对LFA结果进行一般解释(即，样品是阳性或阴性)。例如，图40A中测试线清晰可见，表明存在分析物。也可能通过观察显示沿着侧流试条长度向下的相对强度的线扫描并寻找测试线处足够量级或面积的峰来表明存在分析物(图36-38,图40B)。

[0126] 申请人已经显示能够使用各种平均化技术通过减少噪音来增强磷光报告物的可检测性。图36显示来自用中性亲和素磷光报告物进行的侧流试条的单个图像的线扫描，和来自同一试条的多个图像平均的线扫描，证明图像平均化在降低噪音水平上的有效性。图39也显示采用0.1ng/mL的低分析物浓度进行的这种图像平均化方法。图37显示从LFP试条的单个图像获得的单次线扫描和多个线扫描的平均化。这种线扫描平均化方法允许从来自磷光报告物的个体相对嘈杂的发光图像中检测分析物。还在图38中证明了线扫描平均化的有效性，其中强度概况中的测试线峰在平均化多次线扫描之后变得易于与噪音区分。图像平均化和线扫描平均化的组合可用于增强对来自磷光报告物的信号的可检测性。

[0127] 在一些实施方式中，磷光报告物可被整合到测试中，诸如但不限于LFA、流通试验、测深试验、芯片实验室试验、凝集试验、微流体、纸微流体、微板试验、多相系统、免疫-PCR或其他试验形式。在一些实施方式中，可使用带有一些类型的光检测器的电子装置读取、解释或分析这些测试。在一些实施方式中，电子装置是便携式电子装置，如手机、智能手机、个人数字助理、智能手表、平板电脑、笔记本电脑，或手提电脑。在一些实施方式中，便携式电子装置可连接至如图43A-43C所示的附属装置。在一些实施方式中，所述附属装置可发挥几个目的，其可包括遮挡背景和环境光、将测试卡或装置保持在一定位置上以能够检测来自磷光报告物的发光、提供用于光激发磷光报告物的光源、重新定向从便携式电子装置发出的光以照射或光激发磷光报告物、提供其他元件如加热元件或电子电路用于试验如变性、杂交、扩增、电泳等中的信号增强或其他功能或过程。

[0128] 在一些实施方式中，用于使用磷光报告物的测试的试验读取的便携式电子装置可将测试的结果传送到其他电子装置、网络、云、数据库或信息系统用于进一步分析、解释或储存。在一些实施方式中，如流行病学调查和研究中，便携式电子装置能够对单个测试进行地理位置标记，如记录进行测试的地理位置和时间。

[0129] 通常需要同时具有磁性的报告物，因为这可用于样品制备、用于运行试验之前对分析物的预浓缩，或其他导致试验性能普遍改善的过程。可通过将磷光报告物与磁性纳米颗粒结合、通过同时包封磷光体和磁性纳米颗粒或通过其他手段使磷光报告物有磁性。

[0130] 据报道，无机磷光颗粒可通过用长波长电磁辐射，如红激光或红外线的光刺激来有效变暗或去激发。可在使用磷光报告物的几个分析试验中利用这种光学性质。例如，可使用激光照射来降低所有磷光体或磷光体子集的发射亮度，尤其是特异性位于特定区域的磷光体，或者无遮蔽的磷光体。

[0131] 在本发明中，优选使用光来实现磷光标记物的激发，由此，测得的发光被分类为光致发光，并且磷光标记物的通过光的激发被称为光激发。在本发明中，优选可见光或紫外光激发磷光标记物，但是也可用电磁光谱的其他波长处的光子激发磷光标记物。应注意，无机磷光体，如本文所述的铝酸锶磷光体，还可通过光激发以外的方式经激发或刺激来发光，

包括但不限于,电子或离子轰击,施加振荡、交替或恒定电流,注入带电载体,加热,或在磷光颗粒所在的空间区域中施加电场或电势差,产生阴极发光或电致发光。在一些实施方式中,可通过使用利用迪什特里奥效应的装置或设备来检测磷光报告物,其中磷光体通过施加振荡电场显示出持久的发光。例如,可构建分析设备,其中在分析物存在下,磷光标记物在位于装置(如电容器)附近或该装置中的感兴趣区域中结合,该装置施加直接或交替电场使其产生发光或电致发光。

[0132] 图42显示了这种用于刺激来自LFA中的磷光报告物的电致发光的装置。在该装置中,磷光报告物位于2个电极之间的区域中,并且电极中的至少一个是透明的以使光透射到检测器。透明电极可包含透明基材和透明导电膜诸如但不限于氧化铟锡、掺杂氟的氧化锡、掺杂的锌氧化物、碳纳米管、石墨烯或透明导电氧化物。透明基材可包含多种材料,包括但不限于,玻璃、透明金属氧化物、聚合物、聚合物掺混物、聚合物复合物等。

[0133] 在一些实施方式中,可使用利用卡登-波耳效应的装置或设备来检测磷光报告物,其中之前由可见光或UV光激发的磷光体在施加电场之后发光或短暂闪光,并且检测发出的光,表明是否存在分析物。在一些实施方式中,通过电磁辐射和施加的电场的组合激发磷光报告物产生发光,检测该发光,表明是否存在分析物。

[0134] 在一些实施方式中,最初光激发磷光报告物,然后将其加热至升高的温度,产生热致发光,检测该发光以表明是否存在分析物。可通过各种手段来对磷光报告物加热,包括但不限于放热化学反应、磷光报告物附近材料的相变化、结晶、缩合、电磁辐射、微粒子辐射、离子轰击、感应、导电加热、对流加热、摩擦生热或其组合。

[0135] 先前段落中所述的应用提及其中检测分析物的试验,其包括在感兴趣的特定区域处或特定区域中报告物与分析物的直接结合,并且,来自感兴趣区域的发光表示阳性信号。在另一个实施方式中,检测分析物的读取方法是通过确定与预期没有分析物的位置的不同位置中是否存在标记物。特别感兴趣的是均相试验,其中结合(或抑制结合,或竞争)导致信号存在或信号缺失。例如,可从存在分析物的预定区域去除磷光标记物,然后,该区域发光降低或其他区域发光增加将表示阳性信号。

#### [0136] 样品制备

[0137] 在多个实施方式中,分析方法可包括一个或多个样品制备步骤。在一些实施方式中,样品制备步骤将利用各种样品制备试剂。在一些实施方式中,样品制备可包括,但不限于,浓缩、富集,和/或部分纯化感兴趣的分析物。

[0138] 在一些实施方式中,样品制备可包括,但不限于,使用滤器的各种浓度的来自液体或气体环境的稀释物的使用、从复杂血液样品中分离细胞子集、打破细胞以释放感兴趣的分析物、从固体样品中提取分析物,或去除可能会干扰之后的分析的脂质或颗粒。

[0139] 在一些实施方式中,样品制备可包括扩增待检测的分析物。例如,在一些实施方式中,扩增可包括使用聚合酶链反应来扩增核酸或成核链反应来扩增朊病毒蛋白,或者生物体的生长。另一种使标记物的可检测性扩大的方式是使生物分子组件,如肌动蛋白丝或免疫复合物生长。另一种方法是采用成核剂(例如,泡沫、晶体或聚合)作为标记物的元件。可行时,这些方法可极大地促进后续的分析。

#### [0140] 感兴趣的分析物

[0141] 可利用本发明的方法和磷光报告物来检测来自各种试样的各种感兴趣分析物。例

如,在一些实施方式中,感兴趣的分析物包括,但不限于,基因组DNA、甲基化、DNA、特定甲基化DNA序列、信使RNA、片段化DNA、片段化RNA、片段化mRNA、线粒体DNA、病毒RNA、微小RNA、原位聚合酶链反应(PCR)产物、多聚A mRNA、RNA/DNA杂合体、病原体DNA、病原体RNA、复制蛋白A(RPA)扩增产物、环介导的等温扩增产物(LAMP)、代谢物、代谢中间体、激素、病原体、病毒、细菌、真菌、细胞器、生物标记物、脂质、碳水化合物、蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、磷蛋白、蛋白质的特定磷酸化或乙酰化变体、或病毒外壳蛋白、细胞表面受体、蛋白质、核酸、mRNA、基因组DNA、PCR产物、cDNA、肽、激素、药物、孢子、病毒、SSU RNA、LSU-rRNA、5S rRNA、rRNA基因簇的间隔区DNA、5.8S rRNA、4.5S rRNA、10S RNA、RNA酶P RNA、引导RNA、端粒酶RNA、snRNA—例如U1RNA、scRNA、线粒体DNA、病毒DNA、病毒RNA、PCR产物、人DNA、人cDNA、人工RNA、siRNA、酶底物、酶、酶反应产物、细菌、病毒、植物、动物、真菌、酵母、霉菌、古细菌;真核生物;孢子;鱼;人;革兰氏阴性菌、鼠疫耶尔森菌(*Y. pestis*)、HIV1、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、天花病毒、小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)、染色体DNA;rRNA;rDNA;eDNA;mt DNA、cpDNA、人工RNA、质粒DNA、寡核苷酸;PCR产物;病毒RNA;病毒DNA;限制性片段;YAC、BAC、粘粒、激素、药物、农药、地高辛、胰岛素、HCG、莠去津、炭疽孢子、磷壁酸、朊病毒、化学物、毒素、化学战剂、生物战剂、污染物、基因组DNA、甲基化DNA、信使RNA、片段化DNA、片段化RNA、片段化mRNA、线粒体DNA、病毒RNA、微小RNA、原位PCR产物、聚A mRNA、RNA/DNA杂合体、蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、磷蛋白、蛋白质的特定磷酸化变体、病毒,或染色体。

#### [0142] 分析物源

[0143] 可从各种来源分离待检测或定量的分析物。例如,在一些实施方式中,可从如下来源分离分析物:细胞、体液、组织、活检样品、血液、血清、血浆、粪便、唾液、汗液、痰液、呕吐物、CSF、灌洗液、泪液、眼球液、细胞透过液、尿道或生殖器分泌物、来自伤口或感染区域的渗出液、鼻洗液、鼻拭子、喉拭子、尿液、头发、细胞裂解物、循环肿瘤细胞、FNAB细胞、FACS组分、免疫磁性分离物、空气过滤物、FFPE切片、新鲜冷冻的试样、饮用水、天然水、海水、土壤水、土壤沥出物、新鲜组织、冷冻组织、中性福尔马林-处理的组织、福尔马林固定的石蜡包埋的组织块、乙醇固定的石蜡包埋的组织块、血液样品、空气过滤物、组织活检、细针抽吸物、癌细胞、手术部位、土壤样品、水样品、完整生物体、孢子、遗传修饰的报告细胞、动物或人体液(血液、尿液、唾液、汗液、痰液、呕吐物、精液、活检样品、法医样品、肿瘤细胞、血管斑块、移植组织、皮肤、尿液;粪便、脑脊液);来自人或动物的拭子、来自任意前述动物或人体液的拭子、农产品(谷物、种子、植物、肉、牲畜、蔬菜、瘤胃内容物、乳液等);土壤、空气颗粒;PCR产物;纯化的核酸、扩增的核酸、天然水、受污染的液体;表面刮片或拭子;生物膜、动物RNA、细胞培养物、药物生产培养物、CHO细胞培养物、细菌培养物、病毒感染培养物、微生物集落、FACS-分选的群、激光捕获微切割组分、磁性分离的亚群、FFPE提取物、及其组合。在一些实施方式中,可分析完整的样品源。在一些实施方式中,可仅分析样品源的一部分。

[0144] 在一些实施方式中,待检测的分析物可获自衣服、鞋、服装、个人防护用具和个人装置、或其他用具、装置或在生产农产品或食品的工厂附近或周围的物体的表面或组件。在一些实施方式中,可从获自怀疑受到违禁物质或危险材料或者与违禁物质或危险材料生产相关的分析物污染的物体的任何表面或组件中获得待检测的分析物。

#### [0145] 样品预处理

[0146] 可以多种方式预处理待分析的样品。例如,在一些实施方式中,可通过离心、沉降、

分级分离、场流分级分离、淘析、整体性分离、提取、吸附、蛋白酶、核酸酶、透析、渗透、缓冲液交换、划分、洗涤、脱蜡、浸提、裂解、渗压、扩增、变性/复性、结晶、冷冻、冻融、冷却/加热、脱气、超声、加压、干燥、电泳、介电电泳、声光分选富集、沉淀、微囊化、灭菌、高压灭菌、萌发、培养、PCR、组织崩解、从FFPE提取、LAMP、NASBA、乳液PCR、苯酚提取、二氧化硅吸附、固定的金属亲和色谱(IMAC)、过滤、亲和捕获、从大体积稀释液体源捕获、空气过滤、手术活检、FNA、流式细胞术、激光捕获微切片,及其组合来预处理样品。

#### [0147] 分析物修饰

[0148] 可以多种方式修饰本发明的分析物。在一些实施方式中,可通过标记、偶联、甲基化、酯化、去磷酸化、磷酸化、乙酰化、去乙酰化、甲基化、去甲基化、偶联、卤代乙酸修饰、孵育、生长、脱囊、传代、培养、去封端、蛋白水解、核酸酶消化、cDNA制备、扩增、DNA球制备、PEG化、克隆扩增、增殖、电荷增强、杂交、抗体结合、吸附、适体结合、光-交联、还原、氧化,及其组合来修饰分析物。

#### [0149] 标记元件

[0150] 在一些实施方式中,可用多种元件标记本发明的分析物。在一些实施方式中,作为标记物的部分、全部、与之相关或与之结合的标记元件包括纳米颗粒、金颗粒、银颗粒、银、铜、锌、铁、铁氧化物、或其他金属覆层或沉积物、聚合物、拖动标签、磁性颗粒、浮动颗粒、微泡、金属颗粒、带电荷部分、二氧化硅、带或不带杂质(例如,石英、玻璃等)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚酰亚胺、氮化硅、金、银、量子点、CdS、碳点、磷光体如银激活的硫化锌或掺杂的铝酸锶、荧光、猝灭剂、聚合物、PMMA、聚苯乙烯、反射器、带条形码或标记的颗粒、多孔颗粒、薄皮颗粒、固体颗粒、纳米壳、纳米棒、IR吸收剂、微波吸收剂、微球、脂质体、微球、聚合引发剂、光枝接试剂、蛋白质、分子识别元件、接头、自组装单层、PEG、枝状聚合物、电荷修饰剂、PEG、硅烷偶合剂、从标记物表面自聚合物生长的引发剂、稳定化覆层、两性离子、两性离子性肽、两性离子性聚合物、磁性材料、居里温度低于200°C的磁性材料、酶、微生物纳米线、包括适体序列的DNA、修饰电导率的噬菌体、带分子识别元件与可检测元件的偶联物或融合物、链霉亲和素、中性亲和素、亲和素、或生物素结合蛋白质、生物素、生物素化的分子、生物素化的聚合物、生物素化的蛋白质、抗-抗体适体、导向抗体结合蛋白质的适体、叠氮化物或末端炔烃或其他点击化学参与物,及其组合。

#### [0151] 合成方法

[0152] 在一些实施方式中,通过固态合成方法来制备磷光报告物的磷光芯,其中所需最终磷光芯的元件的金属氧化物或前体在受控的气氛中的还原或惰性条件下在几百摄氏度到两千摄氏度范围的高温下掺混,并加热、焙烧或煅烧、退火、或烧结。在一些实施方式中,加入流料(如硼酸),通过降低温度、改善结晶性,或使磷光粉末具有更好的光学和发光性质来改善退火过程。在一些实施方式中,通过燃烧合成方法来制备磷光芯,其中前体是氧化物或盐的形式,一般是硝酸盐,其在溶剂中混合。向溶液中加入可燃烧燃料如尿素,然后将其混合并加热至几百摄氏度,引燃,并且形成材料,其然后还可经还原以通过在受控的气氛中在高温下退火来改善发光性质。在一些实施方式中,通过溶胶合成技术来制备磷光芯,其包括在液体溶液或胶体分散体中水解前体,之后干燥并煅烧或退火。在一些实施方式中,通过微乳化方法来制备磷光芯,其中不互溶组分如水和油在存在稳定化组分如表面活性剂、醇类或小有机的情况下合并。除了溶剂以外,加入最终磷光材料中元件的前体,并且将混

合物在还原气氛下加热至升高的问题,并且可能经进一步退火或煅烧以产生无机磷光材料。

#### [0153] 表面修饰方法

[0154] 在一些实施方式中,可对磷光芯进行处理以减少由水、化学物或可能接触芯的其他化合物导致的磷光芯降解。在一些实施方式中,磷光芯被包封或包被在材料中以防止芯降解。在优选的实施方式中,包封芯的材料由二氧化硅或氧化硅组成。在一些实施方式中,可通过与磷酸的反应来包封磷光芯。在一些实施方式中,可使用三乙醇胺或类似化合物来包封磷光芯。在一些实施方式中,可用铁氧化物或磁性材料来包封磷光芯。在一些实施方式中,磷光芯被包封在金属氧化物如氧化铝中。在一些实施方式中,磷光芯可被包封在聚合材料中,诸如但不限于,聚苯乙烯、PEG、聚乙烯、聚酰胺、聚氨酯、聚醚、聚酯、卤素-取代的烯烃的聚合物、丙烯酸或丙烯酸酯聚合物、硅基聚合物如聚(二甲基硅氧烷)、烯烃的聚合物、聚碳酸酯、电活性聚合物、铁电聚合物、液晶聚合物等。在一些实施方式中,磷光芯包封在聚合物复合物或聚合物掺混物中。在一些实施方式中,可用任意前述聚合物的共聚物或掺混物包封或包被磷光芯。在一些实施方式中,包封磷光芯的材料可含有荧光染料,优选具有与芯不同的发射波长的那些。在一些实施方式中,用材料的组合,如磷光芯上的二氧化硅内层和二氧化硅层上的聚合物基质层来包封磷光芯。

[0155] 在一些实施方式中,处理包封颗粒的表面以使其具有用于共价偶合分子的反应基团,该分子诸如但不限于聚合物、配体、分子识别元件、光致发光染料、肽、两性离子性分子、核酸等。在一些实施方式中,处理包封颗粒的表面以改善其在试验中的胶体稳定性并且减少聚集或非特异性结合。在一些实施方式中,将带有用于共价偶合或增强吸附分子识别元件的反应基团的分子引入包封颗粒的表面。在一些实施方式中,这些分子可包括异双官能聚合物、同双官能聚合物,和具有用于偶联的多个侧链或反应基团的聚合物。在一些实施方式中,可用用于从表面枝接聚合物的激活剂通过自由基聚合、原子转移自由基聚合、活性聚合、逐步生长聚合、或缩聚来修饰包封聚合物的表面。在一些实施方式中,可处理包封颗粒的表面以具有使聚合物从溶液枝接到表面上的反应性基团。在一些实施方式中,通过反应性硅烷,如三乙氧基甲硅烷基丁醛或(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷来修饰表面。在一些实施方式中,在表面修饰器件加入其他化合物来改善稳定性,如在硅烷化期间加入1,2-双-(三乙氧基甲硅烷基)乙烷或双(3-(三甲氧基甲硅烷基)丙胺。在一些实施方式中,通过分子识别元件的共价连接来修饰磷光报告物的表面。在一些实施方式中,通过吸附用于胶体稳定性或分子识别的分子来修饰磷光报告物的表面。

#### [0156] 分子识别元件

[0157] 在一些实施方式中,本发明的标记物元件也可与各种分子识别元件相联。在一些实施方式中,分子识别元件可以是标记物元件的部分,与标记物元件相联或连接至标记物元件。在一些实施方式中,分子识别元件可包括,但不限于,抗体、抗体片段、抗体类似物、亲和体、驼类动物或鲨鱼抗体类似物、核酸、糖、适体、配体、螯合剂、肽核酸、锁核酸、主链修饰的核酸、DARPin、分子印迹聚合物、凝集素、锁式探针、底物、受体、病毒蛋白、混合物、cDNA、金属螯合物、硼酸盐、肽、酶底物、酶反应产物、脂质双层、细胞、组织、微生物、酵母、细菌、寄生虫、原生动物、病毒、抗原、半抗原、生物素、激素、药物、抗-RNA/DNA杂合抗体、mutS、抗-DNA抗体、抗-甲基化抗体、或抗-磷酸化抗体。

[0158] 许多分析方法,包括本发明中感兴趣的那些,包括分子识别和将分子识别事件转换成可用信号。分子识别是指特定化学物质以高亲合力和特异性趋势互相结合,或与显示目标化学物质的生物体或病毒相联。分子识别的熟知示例包括互补DNA序列以非常高的亲合力杂交成有名的双螺旋结构,以及通过哺乳动物产生的抗体识别血流中的外来生物素或分子,或者通过刻意选择的单克隆抗体识别选择的分析物。有许多分子识别元件的其他示例,包括通过凝集素识别糖分子、通过蛋白质和核酸类似物识别核酸,由抗体片段、衍生物和类似物结合分析物,以及其他示例的宿主。

#### [0159] 扩增/扩大或信号增强方法

[0160] 在一些实施方式中,分子识别事件可被读取为可用信号。在一些实施方式中,可通过信号增强方法来扩增/扩大或增强信号,其可作用于分析物、标记物,或标记物的组分。在一些实施方式中,信号扩增/扩大或增强方法可包括孵育、生长、PCR、固相PCR、RPA、LATE、EATL,或热重启扩增、固相RCA、银染、金属沉积或涂板、镍、铜或锌沉积、金颗粒生长、聚合、颗粒结合、枝接、光枝接、点击化学、铜(I)-催化的叠氮和末端炔之间的1,2,3-三唑形成反应及其组合。

[0161] 在一些实施方式中,可通过光学传感器来读取或检测来自标记物元件的发光信号,所述光学传感器诸如但不限于,电荷耦合装置(CCD)传感器、CCD图像传感器、互补金属氧化物半导体(CMOS)传感器、CMOS图像传感器、照相机、手机相机、二极管、雪崩二极管、单光子雪崩二极管、超导纳米丝单光子检测器、光敏电阻器、光电倍增器、光电倍增管、光电管、光电发射管、光控开关、光电晶体管、光子晶体、光纤传感器、电光传感器、发光计,或荧光计。在一些实施方式中,可从光化学反应中读取、检测或推导来自标记物元件的发光信号,如发生在胶片中的那些,和来自标记物元件的发光刺激或引发的光化学反应。在一些实施方式中,来自标记物元件的发光信号可由肉眼或在光学放大器或强化器的辅助下读取或检测。

[0162] 在一些实施方式中,可通过如下方式来增强或扩增/扩大发光信号或信噪比:循环进行光激发和对于由标记物元件产生的光致发光的时间延迟的后续检测的过程,之后使来自循环的数据平均化。这种循环过程的一个具体示例是使用手机作为发光检测系统,其中手机相机闪光灯用作光激发源并且手机相机用作光检测器,用于对由标记物元件发出的光进行成像。手机相机闪光灯周期性地打开和关闭,从而在“开”状态中,标记物元件经光激发,并且当光源处于“关”状态时,通过手机相机检测由标记物元件发出的光。从循环过程中所得的图像经平均化或叠加,产生扩增/扩大的信号或更高的信噪比。这种循环过程并不限于手机相机和闪光灯;闪光灯可用任何适于光激发的光源代替,诸如但不限于,激光、激光二极管、发光二极管(LED)、有机发光二极管(OLED)、白炽灯、荧光灯、紧凑荧光灯、氙灯、汞灯、卤素灯、等离子显示器、液晶显示器、蜡烛、阳光等。可用任意合适的检测系统代替手机相机,如本文所述的那些。

[0163] 在一些实施方式中,可通过使用折射率匹配(index-matching)技术来增强来自磷光报告物的发光信号。在本文中,折射率匹配包括将用于侧流或纸微流体的多孔材料如膜浸没到具有相似折射率的溶剂中,从而减少光散射并提高光透射。折射率匹配可通过同时改善光激发并降低由于散射导致的来自磷光报告物的发光损失来改善对来自磷光报告物的发光信号的可检测性。

[0164] 在一些实施方式中,在使用带有超过一种类型的光检测元件,如典型RGB色相机中的红色、绿色、和蓝色像素的装置来检测来自磷光报告物的发光的情况中,可通过用加权因数计算发光值来增强来自磷光报告物的信号,该加权因数考虑磷光报告物的发射光谱以及红色、绿色和蓝色通道的相应量子产率。例如,具有520nm附近的强发射峰的绿色铝酸锶磷光报告物的给定RGB图像中计算的发光将具有向绿色通道的强加权,和向红色通道的轻加权。

#### [0165] 特异性增强

[0166] 在一些实施方式中,分析物检测的特异性可通过由化学或物理手段去除非特异性结合的标记物来增强。在一些实施方式中,去除的化学手段包括变性剂、温度、酸、碱、渗透剂、表面活性剂、聚合物和溶剂。在一些实施方式中,去除的物理手段包括力、振动、浮动、离心、沉降场流、磁力、电泳力、介电泳力、超声,和横向力。在一些实施方式中,可通过引入对去除手段有特定响应的部分来增强对去除的易感性,如用于电泳或基于沉降的去除的带电荷或致密部分。

#### [0167] 分析位置

[0168] 各种位置可用于样品分析。在一些实施方式中,分析步骤的位置,可单独或组合使用,其包括微板、管、颗粒或珠的表面、纳米孔阵列、流动注射分析设备、微流体芯片、导电表面、温度控制的环境、压力室、炉、辐射室、电泳、场流和色谱设备、显微台、发光计、库尔特原理装置、悬臂和FET传感器、真空腔、电子光学设备、单分子检测设备、单分子荧光检测设备、表面支承电极或柱、乳液、侧流膜、流出膜、侧流试验读取仪、流出试验读取仪、凝胶记录系统、自动化设备,及其组合。旋转或流动装置,或快速电子或机械挡板,通过在其衰减程度极大之前检测发光来增强灵敏度。在一些实施方式中,可能需要流动注射分析、“芯片实验室”和“CD实验室”方法。在一些实施方式中,优选依序进行超过一种类型的分析,在进行额外的方法之前使用或基于一种方法的结果来分级样品,或者通过将多种方法的结果整合在一起来进行所述分析。

#### [0169] 其它实施方式

[0170] 现将参考本发明的各个实施方式,和为这些实施方式提供支持的实验结果。申请人指出下述公开仅是说明目的,无意于以任何方式限制要求保护的主体范围。

#### [0171] 实施例1

##### [0172] 二氧化硅包封的磷光颗粒的制备

[0173] 将通过诸如固相合成、燃烧合成、溶胶合成或微乳化合成的方法制备的磷光铝酸锶粉末以约0.1g/mL的浓度分散在氧化锆研磨罐中的无水乙酸乙酯中,研磨罐在美国Stoneware球磨机中含圆柱形或球形氧化锆研磨介质,连续操作持续6-9天。研磨后,收集磷光体的分散体并且通过蒸发去除乙酸乙酯。在50mL离心管或适于离心的更大容器中以1-5mg/mL的浓度在乙醇中制备研磨的铝酸锶磷光颗粒的胶体悬浮液。管上的划分线标记了大于特定尺寸的颗粒将在特定相对离心力下在限定时间段内(例如,10分钟)沉降的距离。离心后,收集含小颗粒的悬浮液(即,划分线以上的液体)并且通过进一步离心浓缩颗粒。可通过离心诱导沉降,并去除含小颗粒的上清液来进行分级分离,以去除小于最小所需尺寸的颗粒。重复离心过程直至获得具有所需浓度和变异系数的组分。通过用在含20mM四乙氧基硅烷和0.25M氨的1:4水/乙醇混合物中悬浮的大约1mg/mL的磷光颗粒来制备溶液,来进行

二氧化硅包封。二氧化硅包封进行7-8小时,之后停止反应,并且在乙醇中洗涤颗粒以去除过量的试剂。

#### [0174] 实施例2

[0175] 通过“枝接”方法来制备PEG化的磷光报告物

[0176] 通过将1mg/mL的磷光颗粒在含5%v/v水和50mM TESBA的乙醇中反应30-60分钟来将表面醛引入二氧化硅包封的磷光颗粒。10-100mM的1-2-双-(三乙氧基甲硅烷基)乙烷(BTEOSE)可与TESBA一起加入来改善枝接的PEG的水解稳定性,其中精确的TESBA/BTEOSE比率取决于所需的PEG覆盖率。停止反应,并且颗粒在乙醇中洗涤,然后在升高的温度(例如,36-50°C)下减压固化。将醛-官能化的颗粒悬浮在含50-250mM氰基硼氢化钠还原剂和大约0.5mM H<sub>2</sub>N-PEG-COOH的水性缓冲液中,直至达到所需的PEG化。可用水性溶液进行洗涤。通过使用EDC和NHS的组的碳二亚胺化学法激活羧基、之后加入蛋白质或含氨基的分子识别元件(其发生反应与激活的羧基形成酰胺键)来进行生物偶联。可使用一种或多种含封闭蛋白质如牛血清白蛋白或酪蛋白,或会与激活的羧基发生反应小分子如乙醇胺或羟胺的溶液来进行钝化。

#### [0177] 实施例3

[0178] 通过还原性胺化的抗体定向固定

[0179] 如前所述,用TESBA将二氧化硅包封的磷光颗粒用醛官能化。将同双官能胺-PEG-胺(优选分子量3,400-10,000g/mol)加入含醛官能化的磷光颗粒和至少50mM氰基硼氢化钠还原剂的磷酸盐缓冲液中。枝接期间加入的胺-PEG-胺的分子浓度应该比单层包被胶体中所用颗粒所需的PEG链的最大量过量至少1-2个数量级。可通过考虑颗粒的平均表面积,PEG的理论包装密度的一般值(例如,5条链/nm<sup>2</sup>)来估计单个颗粒上单层所需的双官能PEG分子的数量。不足量的胺-PEG-胺可能会导致分子的2个氨基均与表面醛的共价偶合。PEG化可在室温下进行短至几个小时至24小时或更长。可通过缓冲液交换来停止反应,并且应该在水或缓冲液中洗涤颗粒。待与胺-PEG化的磷光颗粒偶联的抗体可以定向的方式共价结合,该方式与其他固定方法相比改善了结合效率。可在含约1mg/mL浓度的抗体的磷酸盐缓冲液或乙酸钠缓冲液中用1mM高碘酸钠在室温下持续约30分钟或者在降低的温度(例如,4°C)下持续2小时氧化位于Fc区附近的抗体上的多糖。现在含有来自高碘酸盐处理的醛的抗体和胺-PEG化的磷光颗粒可通过如前所述用氰基硼氢化钠的还原性胺化偶联。

#### [0180] 实施例4

[0181] 通过点击化学的抗体定向固定

[0182] 二氧化硅包封的磷光颗粒如前所述用来自TESBA的表面醛或用APTES之后用10-100-倍过量的戊二醛还原性胺化来修饰。在氰基硼氢化钠存在下,胺-PEG-炔烃分子(优选分子量3,400-10,000g/mol)在pH 6-8的磷酸盐缓冲液中与醛官能化的磷光颗粒混合直至获得所需的PEG覆盖率。PEG链的末端炔基团可以快速动力学与叠氮基团以极高特异性偶联。可修饰抗体的Fc的多糖以使其含有叠氮基团。在室温下,在铜催化剂存在下,在炔烃-PEG磷光颗粒存在下,修饰的抗体的混合物将产生抗体与颗粒的定向方式的共价连接,该共价连接具有更好的官能性。

#### [0183] 实施例5

[0184] 在侧流试验中从全血检测登革热NS1

[0185] 制备水稳定化的磷光颗粒并且用带官能团的亲水性或两性离子性聚合物接头官能化,供于抗-登革热病毒非结构蛋白1(NS1)抗体的共价偶联。如图41所示将抗-NS1磷光报告物通过分散、点样或用添加剂浸没加载到偶联物释放垫中,以改善LFA测试期间偶联物释放所需的稳定性、一致性和速度,并且减少LFA测试条内磷光报告物的非特异性结合。添加剂可包括各种表面活性剂,如吐温或曲通,聚合物如PEG、聚(乙烯醇),和糖或多糖如海藻糖。选择偶联物释放垫材料以最小化分析物和磷光报告物与垫的非特异性结合,并且在优选的实施方式中,该材料是玻璃纤维膜。选择能够分离全血用于分析而没有明显的红细胞溶血现象的多孔材料;这类材料可包括棉花、玻璃纤维膜,或其他多孔膜。选择具有合适的孔径以为了最优灵敏度或分析物可检测性使磷光报告物有效运输并控制流速的膜。在优选的实施方式中,从基于聚合物的背衬支持材料上的硝酸纤维素构建膜。用包含抗-NS1抗体的用于分析物检测的测试线来对膜点样,该抗体是多克隆或单克隆抗体,并且结合至与磷光报告物上的抗体不同的NS1蛋白质的表位。可用可由一些类型的分子识别部分组成的控制线对膜点样,该分子识别部分特异性结合磷光报告物。选择吸收垫以有效芯吸通过条的液体样品,并且理想上防止可能妨碍灵敏度的回流。完整的LFA试条包封在壳材料中,该可材料可经设计以符合便携式电子装置附属装置,如图43所示。10-100 $\mu$ L的血液样品收集并施加到样品垫上,之后加入洗涤或追加缓冲液以辅助驱动样品和磷光报告物通过LFA试条。在一段特定的时间(例如,10分钟)之后,将LFA测试卡加载到附属装置的插入端口,并且使用便携式电子装置来检测来自磷光报告物的发光。便携式电子装置可具有预加载的校准数据,其可用于确定样品中NS1的量或浓度。数据可经地理标记并且上传到网络或服务器中用于储存或进一步加工或分析。

#### [0186] 实施例6

#### [0187] 流通试验中的胃肠多重试验

[0188] 诺如病毒(Norovirus)是高度传感性的病原体,其经常造成肠胃炎流行。然而,多种其他病原体,如大肠杆菌和沙门氏菌可能导致具有相似症状的疾病。能对胃肠病原体进行多重化并且可使用较复杂样品如稀释的粪便的快速、灵敏医疗点测试将会是宝贵的工具。在本发明的一个实施方式中,可设计使用磷光报告物的流通试验,其中将制备用结合分析物的分子识别元件官能化的不同磷光报告物的不同的组。在离散点用互补分子识别部分使膜官能化,各点对应于不同的病原体。收集样品并与磷光报告物混合,允许磷光报告物与样品中的抗原结合。样品直接流动通过该膜,并且抗原-磷光报告物复合物在膜上的预定点处被特异性捕获,从而允许确定哪种病原体是疾病的病因。

#### [0189] 实施例7

#### [0190] 检测核酸

[0191] 在一些实施方式中,可使用磷光报告物来检测核酸的特异性序列。可根据应用从多种样品类型中检测核酸,如用于癌症诊断的肿瘤细胞裂解物。许多核酸测试可包括通过聚合酶链反应(PCR)、等温PCR、环介导的等温扩增(LAMP),或复制蛋白A(RPA)扩增的扩增步骤。可用单链DNA或RNA使磷光报告物功能化,该DNA或RNA与来自样品的分析物特异性的互补链的部分杂交。在一些实施方式中,目标互补核酸链具有特异性标签,其在扩增期间或通过其他方式引入,并且使带标签的链被识别该标签的表面捕获。例如,扩增产物可经生物素化以使其结合用亲和素包被的表面。在其他实施方式中,用与目标核酸链的小片段特异性

杂交的核酸链使表面功能化,其足够长以同时与含与目标核酸链的不同部分的互补序列的磷光报告物杂交。

#### [0192] 实施例8

##### [0193] 侧流试验中的光谱多重化

[0194] 可通过向试条加入多条测试线并用不同的分子识别元件使报告物官能化来容易地设计多重化侧流试验,以在分析物存在下在各测试线处特异性结合。替代的多重化方法是使用结合不同分析物的不同颜色或光谱上不同的报告物。在一个实施方式中,本发明的磷光报告物可用于区分基孔肯雅病毒(Chikungunya)和西尼罗河病毒(West Nile virus)导致的感染,使人虚弱的蚊子传播的疾病。用特异性结合人IgG抗体的抗人抗体来制备测试线。具有不同的发射光谱的磷光报告物,如绿色和红色发光颗粒,用抗原(如对不同病毒特异性的参与病毒复制的包膜蛋白或非结构蛋白)功能化。为了说明,可用基孔肯雅病毒特异性抗原使红色发光颗粒功能化,并且用西尼罗河病毒特异性抗原使绿色发光颗粒功能化。感染任意病毒足够时间以显示(illicit)免疫应答的患者将对于识别这些抗原的IgG抗体是血清阳性的。因此,基孔肯雅病毒感染将产生红色测试线,而西尼罗河病毒感染将产生绿色测试线。

#### [0195] 实施例9

##### [0196] 用手机检测发光

[0197] 在一些实施方式中,需要能够在医疗点设定中进行对分析物的高度灵敏的检测,并且具有将该数据连接至信息系统的能力。可容易地使用磷光报告物和多种不同的光检测系统来实现这种能力,但特别感兴趣的是将便携式电子装置如手机和平板电脑引入基于磷光报告物的测试。使用便携式电子装置天然的相机来检测来自磷光报告物的发光使得通过装置中的软件来立即自动分析测试,并然后将结果向用户显示。为了减少噪音,可使用图29所示的时间门选的磷光检测方法和图36和图39所示的图像平均化方法的循环用便携式电子装置实现对分析物水平的稳健定量。也可使用图37-38和图40所示的线扫描平均化方法来获得对应于分析物水平的尖峰或信号。本发明的磷光报告物可能仅仅是目前能够用手机和类似硬件进行灵敏门选磷光成像的光致发光报告物。目前用于时间解析的检测方案的有机金属染料和金属螯合物一般对于典型手机的光电系统的响应时间而言寿命太短。定量能力与手机能力(如地理标记和网络连接)的组合可特别用于环境监测应用,其中污染物的水平可能在特定位置处定量,并且然后数据被地理标记并传送到机构或第三方来做出决定并控制。

#### [0198] 实施例10

##### [0199] 流感检测和流行病学监测

[0200] 本文所述的多重化方法可用于区分甲型流感感染和乙型流感感染,并且可用于鉴定由近期特别有毒力或威胁性的病毒毒株导致的感染。试验模式可使用鼻拭子来收集样品,用侧流卡来检测分析物。将测试与手机或平板电脑的信息技术能力组合可能特别适用于实时监测感染性疾病发病和地理分布。例如,在流感大流行爆发期间,给予自我测试的医疗工作者或人员可使用手机与图43所示的附属装置的组合来自动化读取和分析测试。测试结果的信息如流感毒株的类型和位置将通过匿名患者数据加密,并上传至可能告知一般人群和医疗工作者特定区域中流感爆发的目前数量的信息系统。

[0201] 实施例10

[0202] 从唾液进行滥用药物的定量测试

[0203] 可使用磷光报告物检测小分子,如滥用药物或滥用药物的代谢物。在一些实施方式中,将结合感兴趣的小分子的捕获抗体固定在表面上。当小分子结合抗体时,所得的复合物具有被磷光报告物上的部分特异性识别的不同构象结构。在其他实施方式中,使用竞争性试验模式,其中磷光报告物和分子分析物竞争结合位点。在高分析物浓度下,更多的磷光报告物被置换,导致发光降低。当不存在分析物时,磷光报告物完全占据结合位点,导致高发光强度。

[0204] 实施例11

[0205] 用于灵敏分析物检测的电致发光

[0206] 可通过施加电场刺激本发明的磷光报告物来发光。电致发光提供了极大地降低背景信号的高灵敏度分析物检测的潜力,由于诊断测试中或样品基质中使用的大多数的材料并不在激发磷光报告物所需的电场下发出电磁辐射。通过在特定时间段内施加交替电场从磷光报告物中连续发光与整合的光检测偶合可改善灵敏度。可构建各种电致发光读取的系统,如图42中所示的那个。薄膜或微流体芯片可经工程改造以含有在较小距离(例如,100 $\mu$ m-2mm)中产生电场并允许检测来自磷光报告物所得电致发光的电极。光刺激和施加电场也可组合使用。

[0207] 实施例12

[0208] 肉眼读取试验

[0209] 在一些实施方式中,可通过观察预定位置处是否存在发光来从视觉上解读纳入磷光报告物的测试。可构建遮住环境光并使用户看到从磷光报告物特异性放射的光的装置。该装置可纳入用于光激发的光源,或者硬件来诱导电致发光或刺激热致发光。可向装置中加入镜片,如平凸透镜、双凸透镜、非球面透镜、凹透镜或其组合来增加放大倍率和可见度。在另一个实施方式中,可使用装置,如手持式图像强化器来辅助视觉读取。一些图像强化器更适于增强来自光子的电磁光谱的红色至红外区的信号。由于掺杂稀土金属和过渡金属如铬或锰而发出红光的红色硫化锌磷光体或磷光铝酸锶可直接用于这种图像强化器读取应用中。在一些实施方式中,偶联红色、近红外或红外荧光团至具有与该荧光团的激发光谱重叠的发射光谱的磷光体的表面可增强图像强化器的可检测性。

[0210] 实施例13

[0211] 热致发光信号扩增

[0212] 无机磷光固体中持续发光的机制多少与热致发光类似,并且包括捕集压稳定激发态的电荷载体,之后逐渐释放热。所得的发光随着温度变化,并且较高的温度可增加电子-孔洞的重组速率,并因此增加发光强度。可通过升高局部温度刺激本发明的磷光报告物以具有较高的发光强度。在一些实施方式中,可设计试验以纳入加热元件或使用放热反应来供热以增加来自磷光报告物的发光强度,产生更灵敏的分析物检测。

[0213] 实施例14

[0214] 自校准和试验可靠性改善方法

[0215] 在一些实施方式中,可在试验中或测试卡表面上的一些预定位置包封或固定无机磷光颗粒以提供已知的磷光信号,其可用作参照物来校准测试中使用的磷光报告物的强

度。在一些实施方式中,可在试验中平行使用至少2组具有不同识别部分或发射光谱的磷光颗粒作为校准从分析物结合产生的发光信号的手段。在一些实施方式中,可采用使用不同组的磷光报告物,如具有不同发光波长的颗粒检测相同的分析物来改善测试结果的置信度并且降低假阴性率和假阳性率。

#### [0216] 实施例15

#### [0217] 浮选试验

[0218] 图35所示的浮选试验模式提供了以最小化用户干扰和低风险的潜在危险分析物的局部环境污染检测分析物的简单方式。含在小可闭合管如PCR管中提供有用针对特异性分析物的分子识别部分官能化的玻璃微泡、磷光报告物,和光吸收染料如食物色素的管。样品,如全血或稀释的粪便,直接向管中加入,然后闭合所述管以最小化环境污染的风险。混合管的内容物,然后沉降,并且浮在液体的顶部形成任何泡-分析物-磷光报告体复合物。光吸收染料降低来自未结合的磷光报告物的背景发光,并且检测特异性来自浮在液体顶部的报告物的发光。

#### [0219] 实施例16

#### [0220] 磁性磷光报告物

[0221] 在一些实施方式中,特别优选具有带磁性的报告物。例如,磁性磷光报告物可与样品混合并且允许结合至少一种或多种分析物,之后可通过施加磁场来浓缩磁性报告物,以能够去除未结合的分析物。去除未结合的分析物可极大地减少或消除高剂量钩效应(hook effect),这可能延伸试验的动态范围。另外,去除诊断测试(如流通测试或LFA)中未结合的分析物之后施加磁性磷光报告物的浓缩溶液可改善试验的检测限或灵敏度。在其他实施方式中,磁性可通过施加磁场以增强报告物向用于检测的表面的质量运输来改善试验性能。例如,在微板或微流体形式中,用对分析物特异性的分子识别部分功能化的孔或通道底部的表面。使得磷光报告物在由布朗运动作为传质的主要驱动力的沉降、沉淀和扩散时较慢地与用于结合的表面接触。然而,施加磁场以驱动磁性报告物移向表面可减少总试验时间并改善灵敏度。制备磁性磷光报告物有多种策略。可使用氧化铁共沉淀法来向包封磷光芯的壳上直接添加超顺磁性的铁氧化物层。可同时使用本文所述的方法来包封磁性纳米颗粒和磷光芯,以产生同时具有磷光和磁性性质的杂合颗粒。在其他实施方式中,可用磁性部分或纳米颗粒来使包封的磷光颗粒的表面功能化。

#### [0222] 应用和优势

[0223] 采用本发明的磷光报告物的优势在于可使用简单设备或不使用设备来灵敏地检测磷光。此外,与许多一般的无机磷光体相比,本发明的磷光报告物(例如掺杂稀土金属的铝酸锶)是相对廉价的,并且显示出更高的量子效率、更长的发光寿命,和更高的相对强度。另外,本发明的磷光报告物(例如,铝酸锶磷光体)不易于光降解或光漂白,这是许多光致发光标记物的明显问题。没有光漂白意味着使用本发明的磷光报告物的测试可被激发并重新成像或重新测量多次,而没有发光活性的明显损失。

[0224] 由于它们的发射寿命长,本发明的磷光报告物也可用于不具有连续激发的读取系统。时间解析的光致发光检测的主要优势是来自样品基质或试验材料的背景自发荧光降低,以及通过消除昂贵的光学硬件如滤光器的需要设计更简单的试验读取装置的潜力。除了选定数量的有机金属染料或金属螯合物以外,实际上,各种类型的光致发光标记物具有

短寿命并且需要滤光器以减少来自散射的激发光和自发荧光的背景强度。在激发光谱的峰和发射光谱的峰之间有较窄缺口或斯托克偏移的有机荧光染料,如荧光素在用于灵敏检测荧光团和分析物的试验读取装置中需要高质量滤光器。理论上,通过选择高度单色激发源,距发射带有大斯托克偏移的激发带的光致发光标记物可用于试验而不需要滤光器。然而,实际上,寻找这种同样昂贵的激发源是不可行的,由于大多数激发源具有足够宽的发射峰使得背景信号与光致发光报告物的发射波长之间有重叠,这将干扰报告物的可检测性并降低试验灵敏度。本发明的磷光报告物能够以最小的光学硬件构建用于高灵敏光致发光试验的读取装置。在一些实施方式中,简单的装置,如手机相机和闪光灯或LED足够进行利用本发明的磷光报告物的光致发光读取试验。如此,本发明的磷光报告物可在各种诊断和分析方法中找到多种应用。此外,本发明的磷光报告物可以定性和定量方式使用。

[0225] 在一些实施方式中,可在试验装置如侧流中使用本发明的磷光报告物。在一些实施方式中,本发明的磷光报告物可在流通试验中结合至表面。在一些实施方式中,本发明的磷光报告物可用于诊断免疫试验,用于检测核酸、蛋白质、全病毒、细菌或小分子的试验中。在一些实施方式中,本发明的磷光报告物可用于用于诊断疾病、监测生物或临床相关分子的水平、检测麻醉物质、检测水、食物或其他样品中的病原体、体内成像、流式细胞术应用、监测环境中的化学物质水平、和其他应用的试验中的标记物。在一些实施方式中,可在设计检测生物标志物来在医疗点监测健康或诊断疾病的装置中采用本发明的磷光报告物。在一些实施方式中,设计读取侧流、流通、浮动和其他模式的发光的装置可纳入本发明的磷光报告物作为标记物。

[0226] 在一些实施方式中,本发明的磷光报告物可用于改善医疗点诊断。医疗点诊断具有通过提供用于检测感染性病原体和疾病生物标记物的简单、低成本系统来改善医疗质量的潜力。已经开发了多种纳入荧光标记物作为读取信号的医疗点诊断平台。然而,这些标记物中使用的有机染料易于光漂白,并且由于激发态的短寿命,荧光成像需要带昂贵的激发和发射滤光器的复杂光学系统。

[0227] 在一些实施方式中,在侧流装置中使用本发明的磷光报告物。在一些实施方式中,本发明的磷光报告物与分析物接触,并且流出膜至测试线,在那里,固定在膜上的抗体或其他识别元件结合分析物。通过用相机成像或通过用发光计或其他光检测装置来进行定量测量来测量发光。在诊断分析中使用来自磷光报告物的光强度。

[0228] 在一些实施方式中,本发明的磷光报告物用作沉降、磁性移位或浮选装置的组成部分。例如,在一些实施方式中,本发明的磷光报告物固定在漂浮的物体如微泡或薄聚合物片上以与分析物和生物功能化的磷光体形成免疫夹心。浮力然后可移位带有附连的磷光体的浮选模块至溶液的顶部,在那里对发光测量或成像。可使用染料来减少来自溶液中不与漂浮物体附连的磷光体的背景信号。

[0229] 在一些实施方式中,本发明的磷光报告物用作流出装置的组分。例如,在一些实施方式中,抗体或生物识别元件固定在膜上。含接触分析物的磷光报告物(例如,生物功能化的磷光体)的样品然后施加到膜的顶部。然后在膜上的生物识别元件、分析物和磷光报告物之间形成免疫夹心物。未结合的磷光报告物通过膜。然后对来自膜的发光进行成像或测量。

[0230] 在一些实施方式中,可在表面结合中使用本发明的磷光报告物。例如,在一些实施方式中,抗体或其他分子识别元件固定在表面上。含接触分析物的磷光报告物的样品然后

施加到表面上。在表面上的生物识别元件、分析物,和磷光报告物之间形成免疫夹心物。任选地通过流动力压缩来去除未结合的磷光体。然后对来自表面的发光进行成像或测量。

[0231] 在一些实施方式中,可通过除光以外的手段激发或刺激本发明的磷光报告物来产生发光。在一些实施方式中,可通过施加热、电流或电场来刺激磷光报告物。这些激发方法可在试验模式设计中有更多灵活性,并且可潜在产生增强的灵敏度。

[0232] 参考文献

[0233] [1]Bauer,C.Bieniarz和A.L.Hartman,“Nanoparticle Conjugates (纳米颗粒偶联物)”US 2009/0181398A1 2009.

[0234] [2]Benjamin R.Irvin,“Calibration System for use with Lateral Flow Assay Test Strips (与侧流试验测试条联用的校准系统)”US 8,101,415 B22012.

[0235] [3]H.Boehringer,G.Rowley和A.Pronovost,“Quantitative Lateral Flow Assays and Devices (定量侧流试验和装置)”US 6,924,153 B1 2005.

[0236] [4]D.V.Borich,S.Savoy,M.McAleer,A.Milder和D.Mitchell,“Universal Optical Imaging and Processing System (通用光学成像和处理系统)”US 7,803,322 B2 2010.

[0237] [5]E.P.Diamandis,“Europium and Terbium Chelators for the Time-Resolved Fluorometric Assays (用于时间解析的荧光分析试验的铕和铽螯合剂)”US 5,854,008 1998.

[0238] [6]Y.Dong,N.Wang,S.Cheng和Y.Li,“Aluminate-Based Blue Phosphors (基于铝酸盐的蓝色磷光体)”US 7,390,437 B2 2008.

[0239] [7]P.Gibbs,“Point-of-Care Immunoassay for Quantitative Small Analyte Detection (用于定量小分析物检测的医疗点免疫试验)”US 2013/0102003A1 2013.

[0240] [8]Y.Hirata,T.Sakaguchi和N.Takeuchi,“Phosphorescent Phosphor and Method of Manufacturing Thereof (磷光磷光体及其制造方法)”US 7,427,365 B2 2008.

[0241] [9]W.Hoheisel,C.Petry,M.Haase,K.Riwotzki和K.Bohmann,“Doped Nanoparticles as Biolabels (掺杂的纳米颗粒作为生物标记物)”US2004/0014060 A12004.

[0242] [10]I.Hurley,“Time-Resolved Fluorometer (时间解析的荧光计)”US 5,061,076 1991.

[0243] [11]H.Lee和M.A.Dineva,“Dipstick Assay (试纸试验)”US 7,713,746B2 2010.

[0244] [12]S.Lipp,“Method of Improving Moisture Resistance for Inorganic Materials that are Sensitive to Moisture (改善对水分敏感的无机材料的防水性的方法)”US 6,242,043 B1 2001.

[0245] [13]M.Maurer,N.Raetzo和R.Fischer,“Inorganic Phosphor,Obtainable by Wet Milling (可通过湿研磨获得的无机磷光体)”US 2011/0038947 A12011.

[0246] [14]A.Ozcan,H.Zhu和S.Mavandadi,“Compact Wide-Field Fluorescent Imaging on a Mobile Device (移动设备上的紧密宽领域荧光成像)”US 2012/0157160 A1 2012.

[0247] [15]A.Ozcan,O.Mudanyali,S.Dimitrov,U.Sikora,S.Padmanabhan和I.Navrus,

“Portable Rapid Diagnostic Test Reader(便携式快速诊断测试读取仪)”US 2013/0203043 A1 2013.

[0248] [16]R.J.Pet,M.M.C.I.van den Nieuwenhof和J.P.H.M.Duisters,“Method of Preparing a Luminescent Eu<sup>2+</sup>Activated Strontium Aluminate(制备发光Eu<sup>2+</sup>激活的铝酸锶的方法)”US 4,795,588 1989.

[0249] [17]J.Robert W.Hyland,J.P.Quintenz,B.T.Dunville和G.Subrahmanyam,“Photoluminescent Alkaline Earth Aluminate and Method for Making the Same(光致发光碱土金属铝酸盐及其制备方法)”US 6,969,475B2 2005.

[0250] [18]A.Sanjurjo,K.-H.Lau,D.Lowe,A.Canizales,J.Naixiong,V.Wong,L.Jiang,L.V.Schneider,N.Mufti,R.T.Rewick,M.Johansson和K.Kardos,“Production of Substantially Monodisperse Phosphor Particles(基本单分散的磷光颗粒的生产)”US 6,039,894 2000.

[0251] [19]D.Scherman,M.Bessodes,C.Chaneac,D.L.Gourier,J.-P.Jolivet,Q.L.M.De Chermont,S.Maitrejean和F.S.Pelle,“Persistent Luminescence Nanoparticles used in the form of a Diagnosis Agent for in vivo Optical Imaging(用于体内光学成像的诊断试剂形式的持久发光纳米颗粒)”US 8,709,383 B2 2014.

[0252] [20]X.Song,“Membrane-Based Lateral Flow Assay Devices that Utilize Phosphorescent Detection(利用磷光检测的膜基侧流试验装置)”US 8,557,604 B2 2013.

[0253] [21]W.Stober,“Method of Producing Monodisperse Silica Spheres Having a Dispersed Radioactive Tracer(生产具有分散的放射性示踪物的单分散二氧化硅球的方法)”US 3,634,558 1972.

[0254] [22]M.Sun,“Lateral Flow Test Device(侧流测试装置)”US 6,372,516B1 2002.

[0255] [23]H.J.Tanke,J.C.Slats和J.S.Ploem,“Inorganic Phosphor Labelled Macromolecules;a process for their preparation and their use for immunological or immunocytochemical assays(无机磷光体标记的大分子:其制备过程及其在免疫试验或免疫细胞化学试验中的用途)”US 5,043,2651991.

[0256] [24]U.Wiesner,H.Ow,D.R.Larson和W.W.Webb,“Fluorescent Silica-Based Nanoparticles(荧光二氧化硅基纳米颗粒)”US 8,298,677 B22012.

[0257] [25]C.-Y.Yang,“Light Source Device for Time-Delayed Detection of Fluorescence,and Image Pick-up System and Method(用于荧光的时间延迟检测的光源装置以及摄像系统和方法)”US 2013/0087719 A1 2013.

[0258] [26]K.Yang,X.Song,K.P.McGrath,R.Boga,S.R.Feaster和D.Cohen,“Flow-Through Assay Devices(流出试验装置)”US 2004/0106190 A1 2004.

[0259] [27]D.A.Zarling,M.J.Rossi,N.A.Peppers,J.Kane,G.W.Faris,M.J.Dyer,S.Y.Ng和L.V.Schneider,“Up-Converting Reporters for Biological and Other Assays Using Laser Excitation Techniques(用于使用激光激发技术的生物和其他试验的上转报告物)”US 5,674,698 1997.

- [0260] [28] A. J. Dekker, 《固态物理学》中的“Luminescence (发光)”, 伦敦: Macmillan & Co Ltd (麦克米伦出版社) 1962, 第398-417页.
- [0261] [29] J. Hampl, M. Hall, N. a Mufti, Y. M. Yao, D. B. MacQueen, W. H. Wright 和 D. E. Cooper, “Upconverting phosphor reporters in immunochromatographic assays (免疫层析试验中的上转磷光报告物)” *Anal. Biochem.*, 第288卷, 第2期, 第176-87页, 2001年1月.
- [0262] [30] P. T. Ji, X. Y. Chen 和 Y. Q. Wu, “Encapsulating  $\text{MAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$  ( $\text{M}=\text{Sr}, \text{Ca}, \text{Ba}$ ) phosphors with triethanolamine to enhance water resistance (用三乙醇胺包封  $\text{MAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$  ( $\text{M}=\text{Sr}, \text{Ca}, \text{Ba}$ ) 磷光体以增强防水性)” *Appl. Surf. Sci.*, 第258卷, 第5期, 第1888-1893页, 2011年12月.
- [0263] [31] E. Juntunen, T. Myyryläinen, T. Salminen, T. Soukka 和 K. Pettersson, “Performance of fluorescent europium(III) nanoparticles and colloidal gold reporters in lateral flow bioaffinity assay (荧光铕(III)纳米颗粒和胶体金报告物在侧流生物亲和试验中的性能)” *Anal. Biochem.*, 第428卷, 第1期, 第31-8页, 2012年9月.
- [0264] [32] P. Kingshott, H. Thissen 和 H. J. Griesser, “Effects of cloud-point grafting, chain length, and density of PEG layers on competitive adsorption of ocular proteins (PEG聚合物的云点枝接、链长度和密度对眼蛋白质的竞争性吸附的影响)” *Biomaterials*, 第23卷, 第9期, 第2043-56页, 2002年5月.
- [0265] [33] C. F. Lane, “Sodium Cyanoborohydride—A Highly Selective Reducing Agent for Organic Functional Groups (氰基硼氢化钠—有机官能团的高选择性还原剂)” *Synthesis (Stuttg.)*, 第1975卷, 第03期, 第135-146页, 1975.
- [0266] [34] L. Lee, E. Nordman, M. Johnson 和 M. Oldham, “A Low-Cost, High-Performance System for Fluorescence Lateral Flow Assays (用于荧光侧流试验的低成本高效系统)” *Biosensors*, 第3卷, 第4期, 第360-373页, 2013年10月.
- [0267] [35] X. Lü, “Silica encapsulation study on  $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$  phosphors ( $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$  磷光体的二氧化硅包封研究)” *Mater. Chem. Phys.*, 第93卷, 第2-3期, 第526-530页, 2005年10月.
- [0268] [36] T. Maldiney, A. Lecointre, B. Viana, A. Bessière, M. Bessodes, D. Gourier, C. Richard 和 D. Scherman, “Controlling electron trap depth to enhance optical properties of persistent luminescence nanoparticles for in vivo imaging (控制电子阱深度以增强用于体内成像的持久发光纳米颗粒的光学性质)” *J. Am. Chem. Soc.*, 第133卷, 第30期, 第11810-5页, 2011年8月.
- [0269] [37] M. Malmsten, K. Emoto 和 J. M. Van Alstine, “Effect of Chain Density on Inhibition of Protein Adsorption by Poly(ethylene glycol) Based Coatings (链密度对由聚乙二醇基覆层的蛋白质吸附的抑制)” *J. Colloid Interface Sci.*, 第202卷, 第2期, 第507-517页, 1998年6月.
- [0270] [38] T. Matsuzawa, “A New Long Phosphorescent Phosphor with High Brightness,  $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$  (具有高亮度的新型长磷光磷光体,  $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$ )” *J. Electrochem. Soc.*, 第143卷, 第8期, 第2670页, 1996.

- [0271] [39] E. Mine, A. Yamada, Y. Kobayashi, M. Konno 和 L. M. Liz-Marzán, “Direct coating of gold nanoparticles with silica by a seeded polymerization technique (通过种子聚合技术用二氧化硅直接包被金纳米颗粒)” *J. Colloid Interface Sci.*, 第264卷, 第2期, 第385–90页, 2003年8月.
- [0272] [40] O. Mudanyali, S. Dimitrov, U. Sikora, S. Padmanabhan, I. Navruz 和 A. Ozcan, “Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone (手机上整合的快速诊断测试读取平台)” *Lab Chip*, 第12卷, 第15期, 第2678–86页, 2012年8月.
- [0273] [41] S. Prabakar 和 R. a. Assink, “Hydrolysis and condensation kinetics of two component organically modified silica sols (双组份有机修饰硅溶胶的水解和缩合动力学)” *J. Non. Cryst. Solids*, 第211卷, 第1–2期, 第39–48页, 1997年4月.
- [0274] [42] S. Ramachandran, M. Singhal, K. McKenzie, J. Osborn, A. Arjyal, S. Dongol, S. Baker, B. Basnyat, J. Farrar, C. Dolecek, G. Domingo, P. Yager 和 B. Lutz, “A Rapid, Multiplexed, High-Throughput Flow-Through Membrane Immunoassay: A Convenient Alternative to ELISA (快速、多重化、高通量流出膜免疫试验: ELISA 的方便替代)” *Diagnostics*, 第3卷, 第2期, 第244–260页, 2013年4月.
- [0275] [43] J. S. Reed, 《陶瓷加工原理概论》中的 “Comminution (粉碎)”, 纽约: 约翰威利父子出版社 (John Wiley & Sons), 1988, 第255–272页.
- [0276] [44] Y. Ryu, Z. Jin, M. S. Kang 和 H. -S. Kim, “Increase in the detection sensitivity of a lateral flow assay for a cardiac marker by oriented immobilization of antibody (通过取向抗体固定增加心脏标记物的侧流试验的检测灵敏度)” *BioChip J.*, 第5卷, 第3页, 第193–198页, 2011年9月.
- [0277] [45] J. Sanchez and A. McCormick, “Kinetic and Thermodynamic Study of the Hydrolysis of Silicon Alkoxides in Acidic Alcohol Solutions (酸性醇溶液中硅醇盐水解的动态和热动力学研究)” *J. Phys. Chem.*, 第96卷, 第22期, 第8973–8979页, 1992年10月.
- [0278] [46] X. Song, L. Huang 和 B. Wu, “Bright and Monodispersed Phosphorescent Particles and their Applications for Biological Assays (亮且单分散的磷光颗粒及其在生物试验中的应用)” *Anal. Chem.*, 第80卷, 第14期, 第5501–7页, 2008年7月.
- [0279] [47] R. Wong 和 H. Y. Tse 编, *Lateral Flow Immunoassay*. Totowa, NJ: 哈马那出版社 (Humana Press), 2009.
- [0280] [48] Z. Zhang, A. E. Berns, S. Willbold 和 J. Buitenhuis, “Synthesis of poly (ethylene glycol) (PEG)-grafted colloidal silica particles with improved stability in aqueous solvents (具有水性溶剂中改善的稳定性的聚乙二醇 (PEG)-枝接的胶体二氧化硅颗粒的合成)” *J. Colloid Interface Sci.*, 第310卷, 第2期, 第446–55页, 2007年6月.
- [0281] [49] Y. Zhu, J. Zeng, W. Li, L. Xu, Q. Guan 和 Y. Liu, “Encapsulation of strontium aluminate phosphors to enhance water resistance and luminescence (包封铝酸锶磷光体以增强防水性和发光)” *Appl. Surf. Sci.*, 第255卷, 第17期, 第7580–7585页, 2009年6月.

[0282] [50] Y. Zhu, M. Zheng, J. Zeng, Y. Xiao 和 Y. Liu, "Luminescence enhancing encapsulation for strontium aluminate phosphors with phosphate (用磷酸盐对铝酸锶磷光体的发光增强包封)" Mater. Chem. Phys., 第113卷, 第2-3期, 第721-726页, 2009年2月.

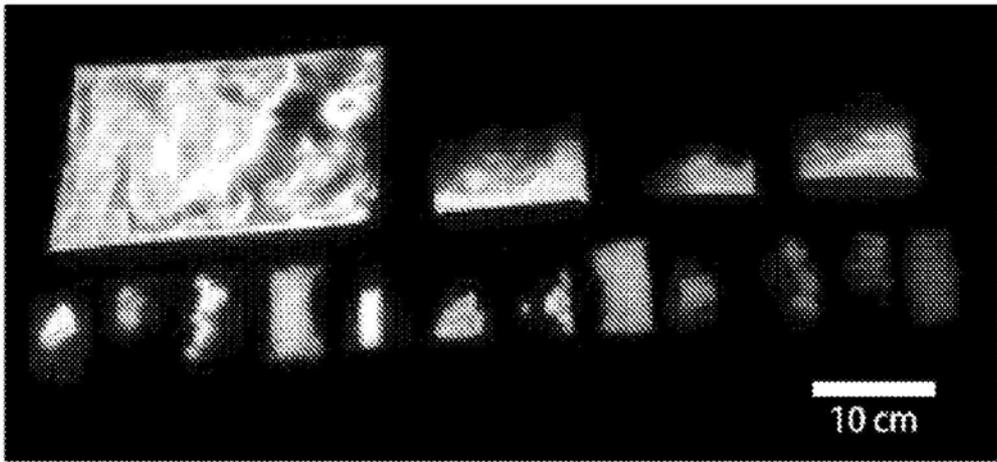


图1

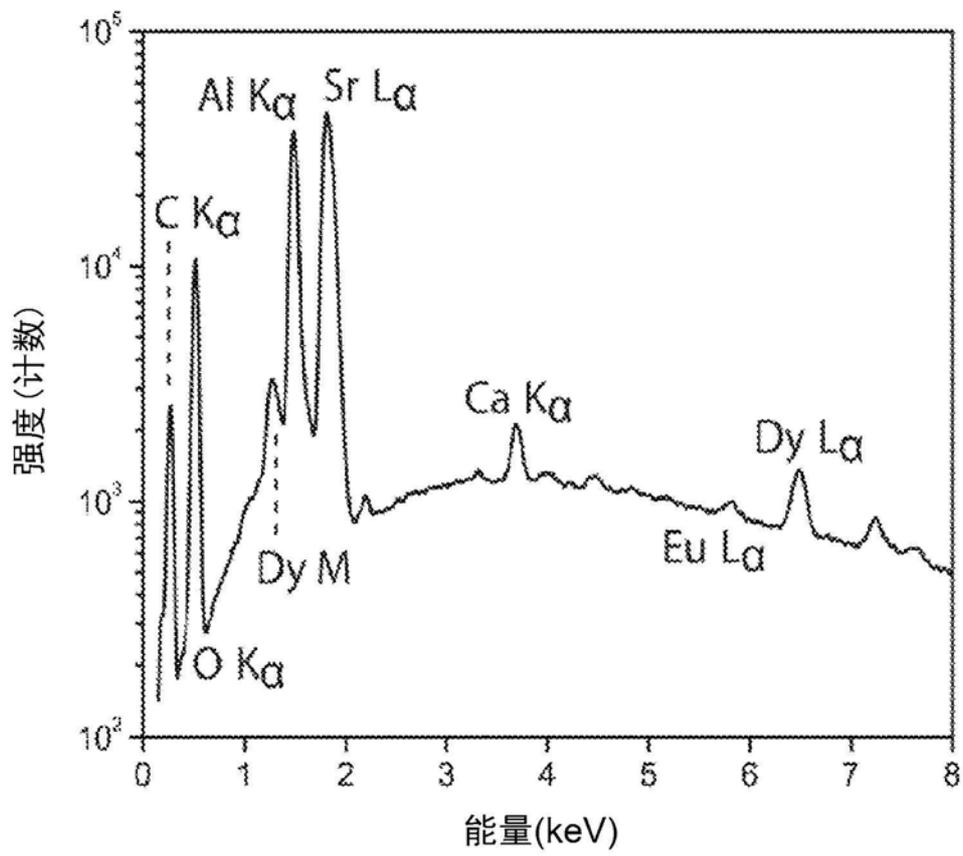


图2

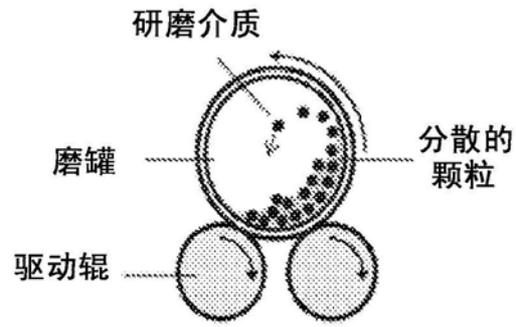


图3A

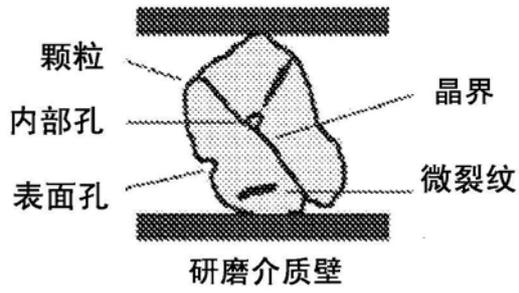


图3B

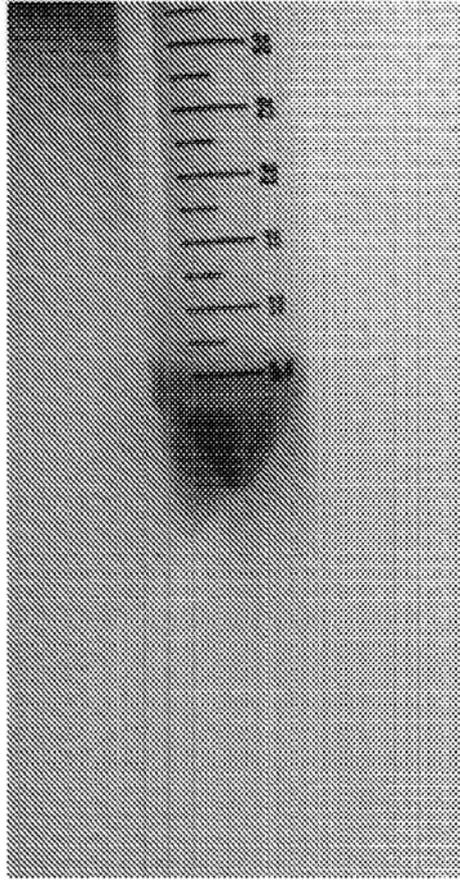


图4A

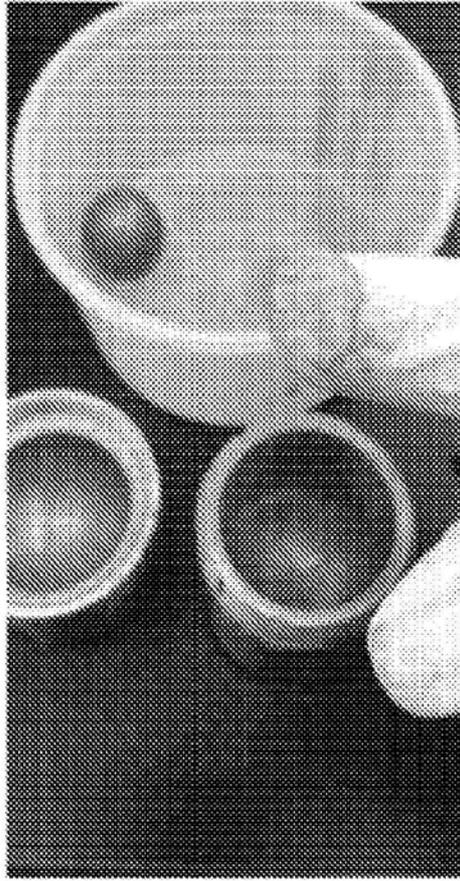


图4B

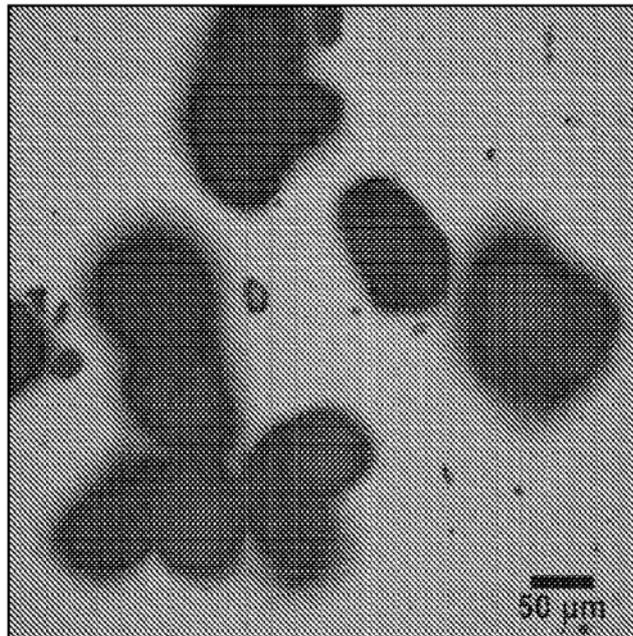


图5A

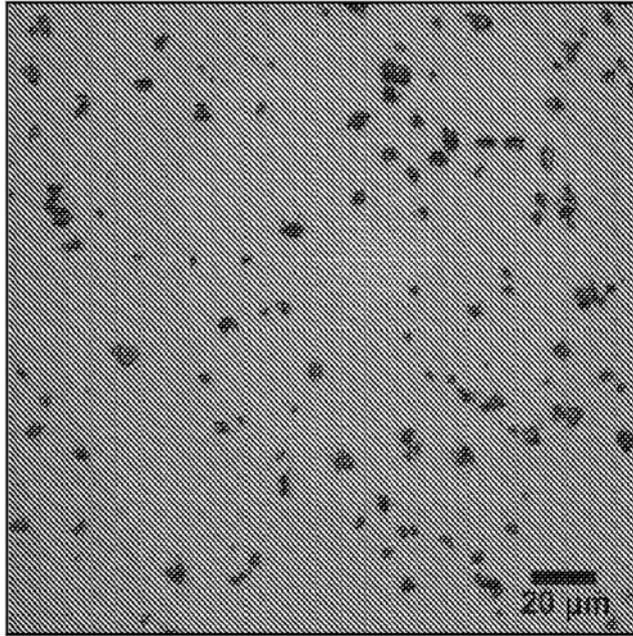


图5B

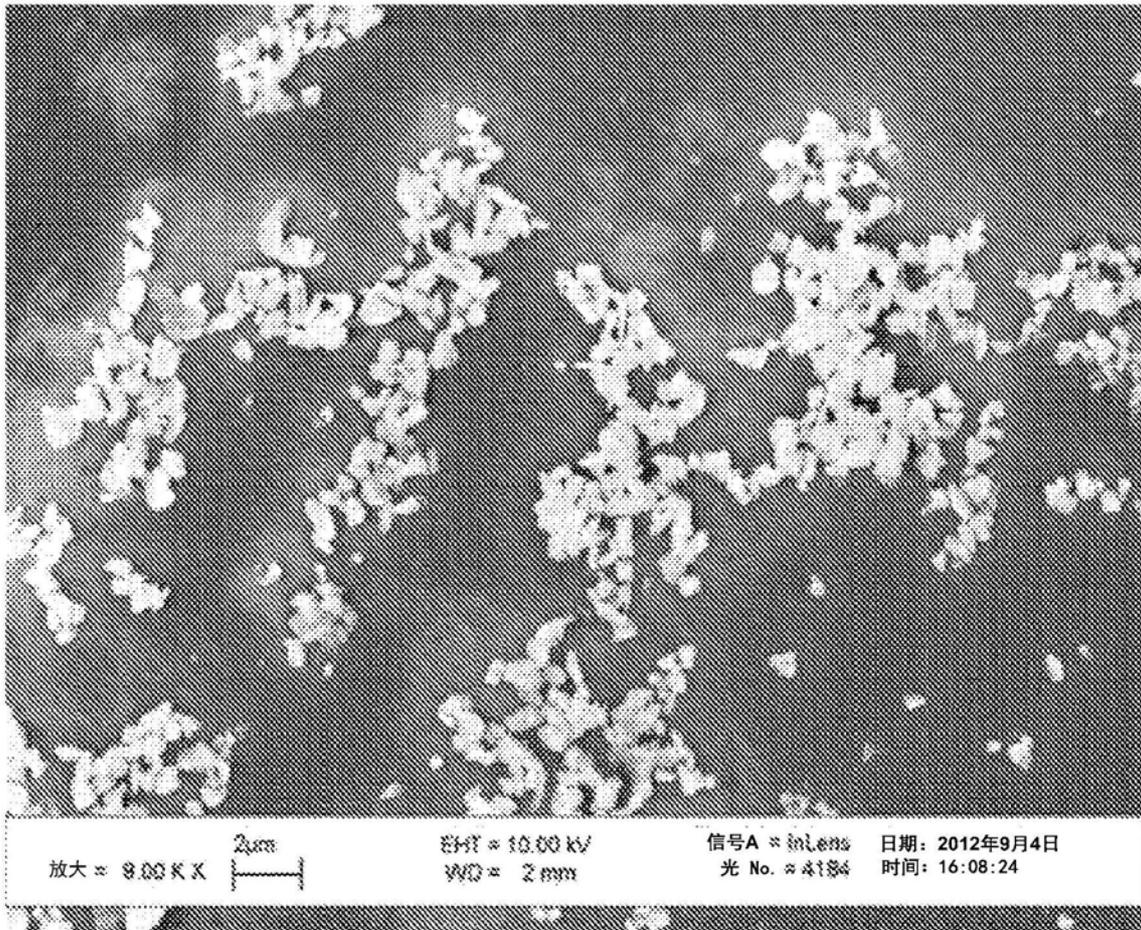


图6

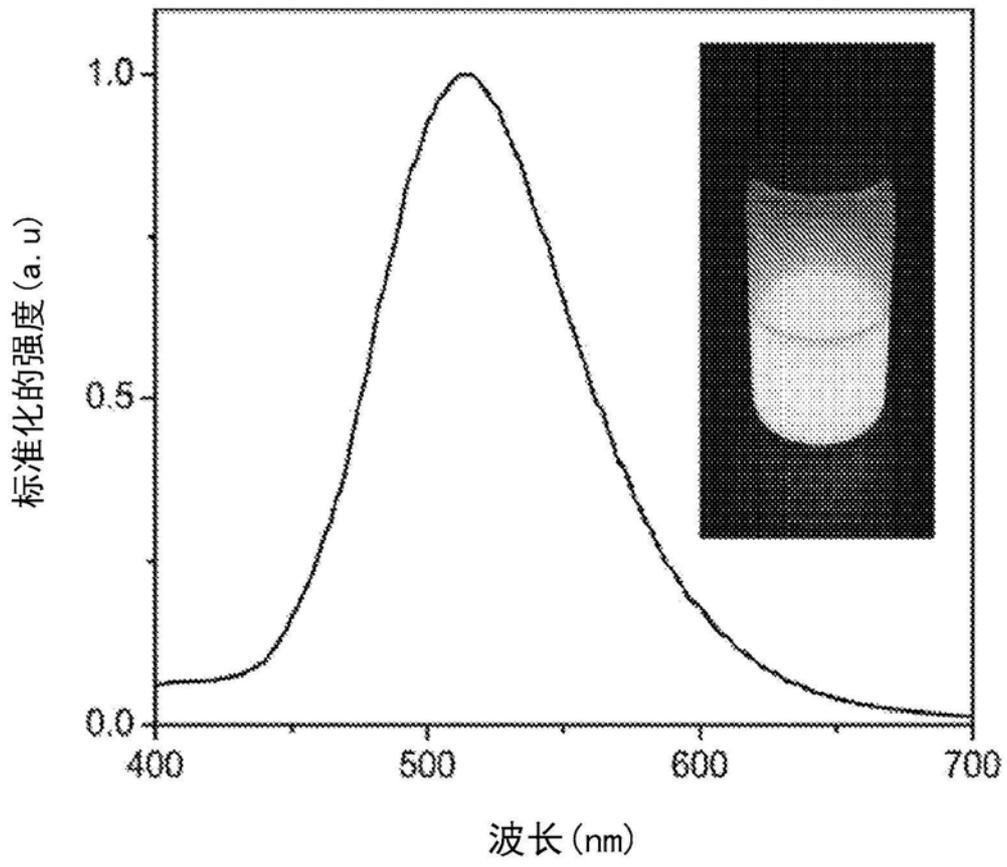


图7

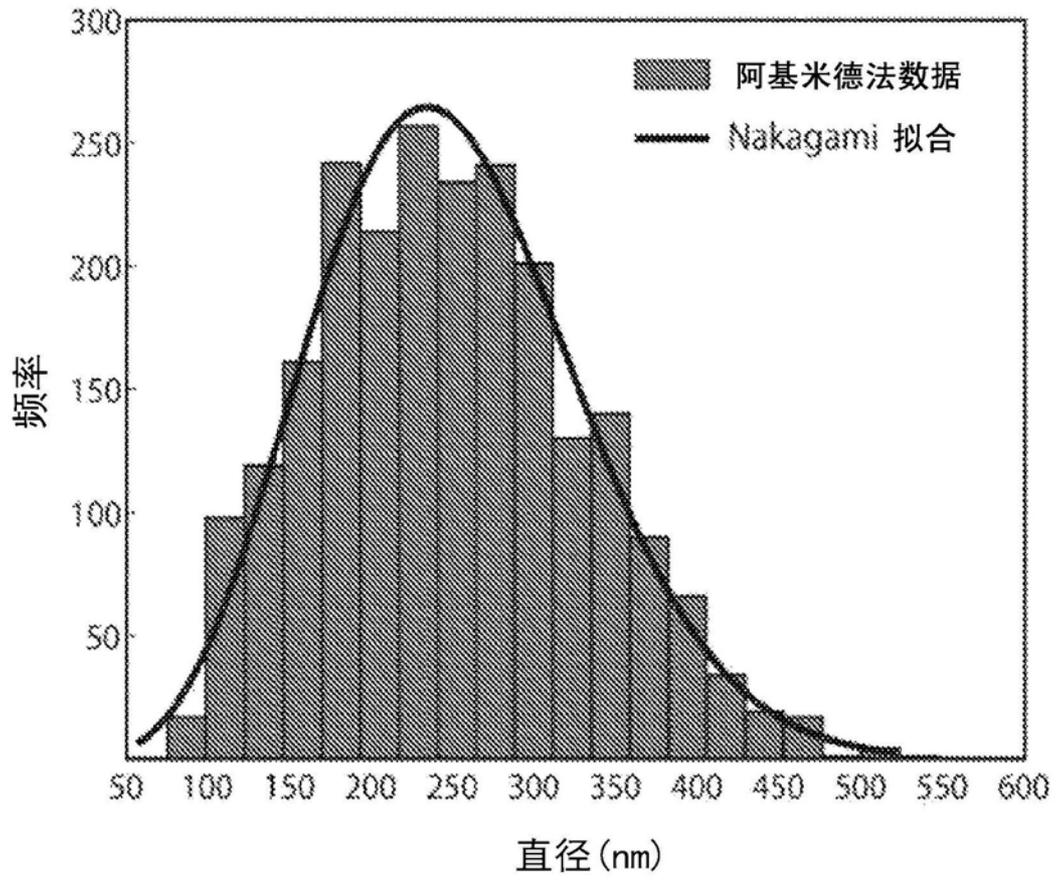


图8

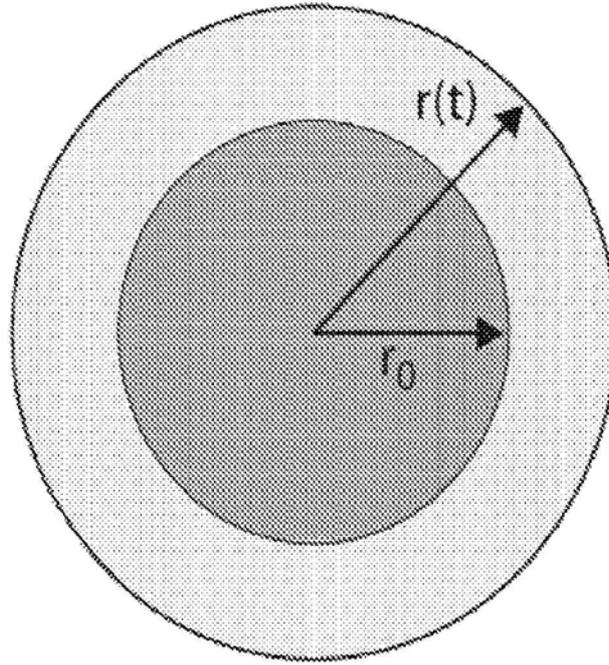
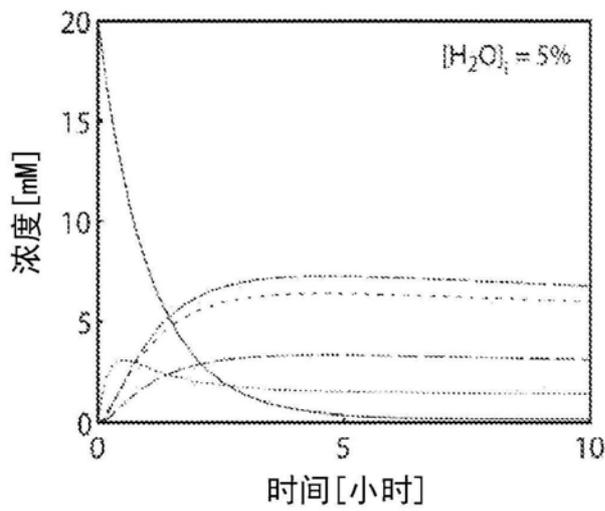


图9



—  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$       - - -  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3(\text{OH})$       ····  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2(\text{OH})_2$   
 - · - ·  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)(\text{OH})_3$       - - -  $\text{Si}(\text{OH})_4$

图 10A

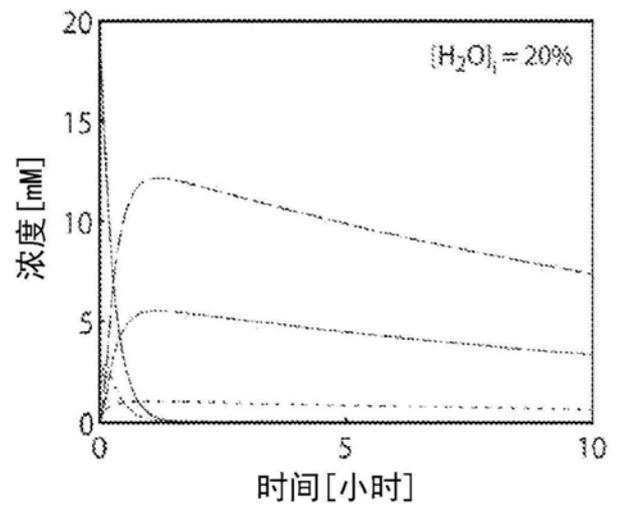


图 10B

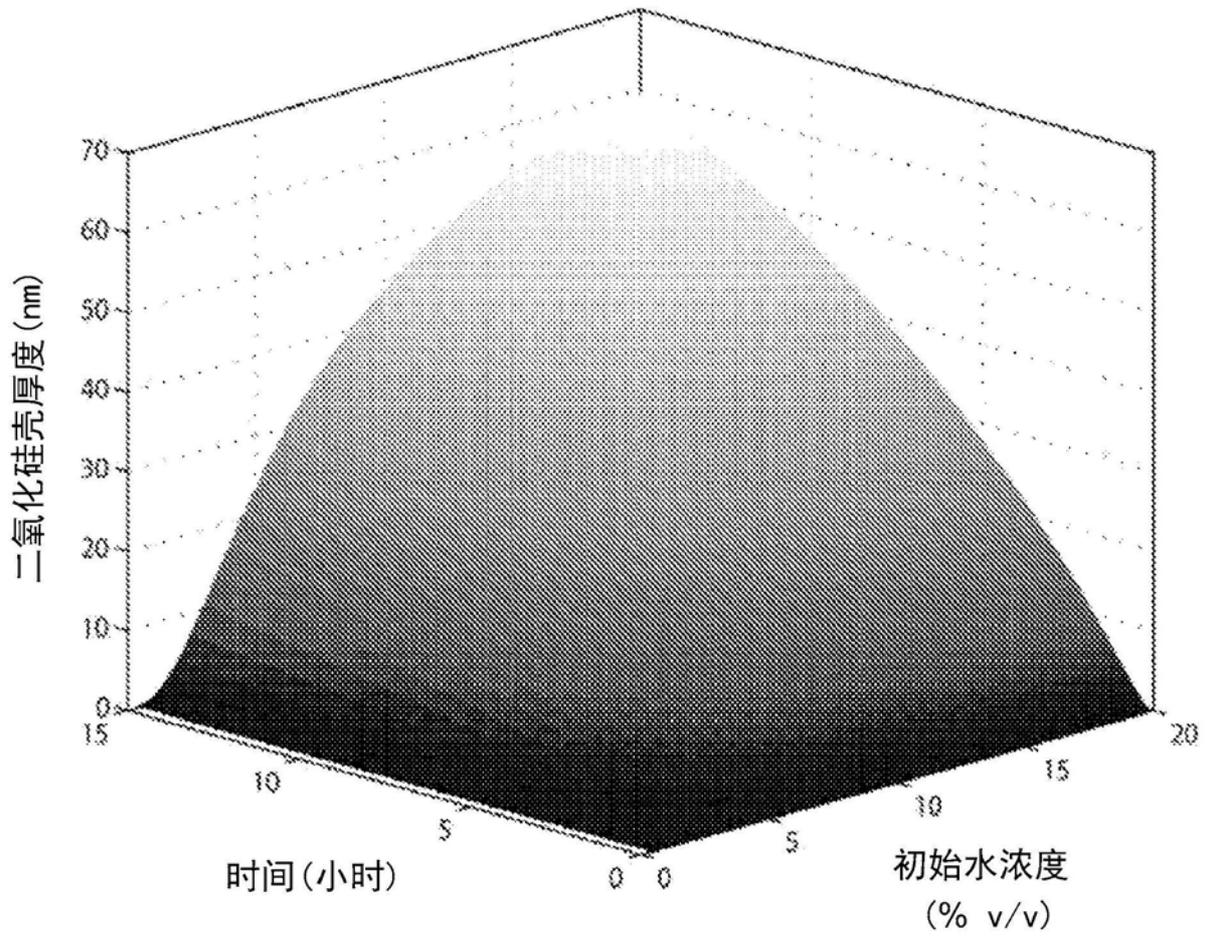


图11

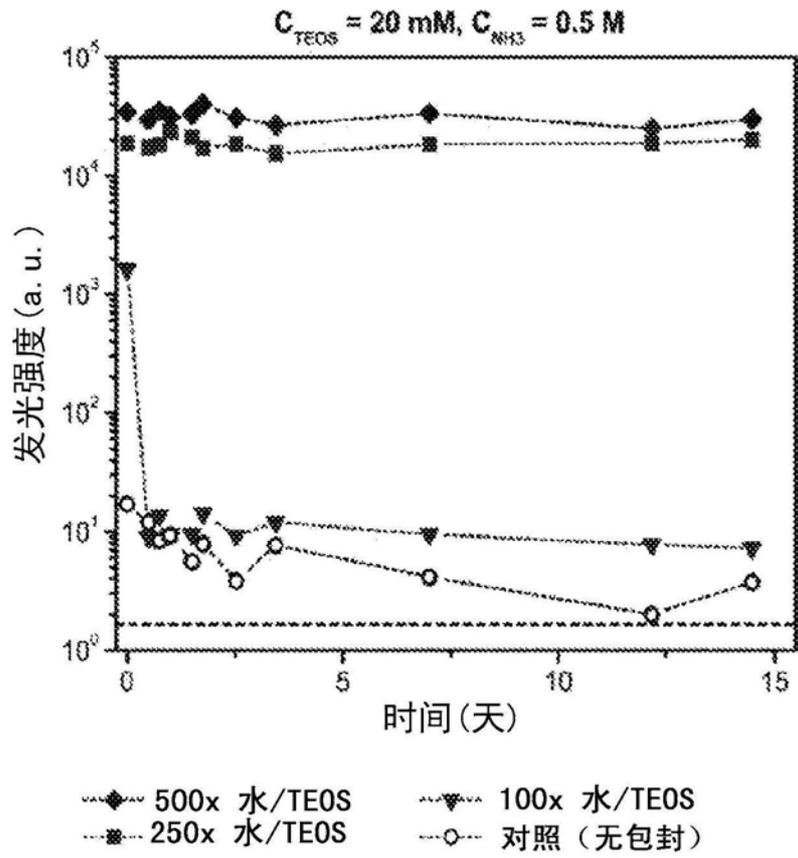


图12A

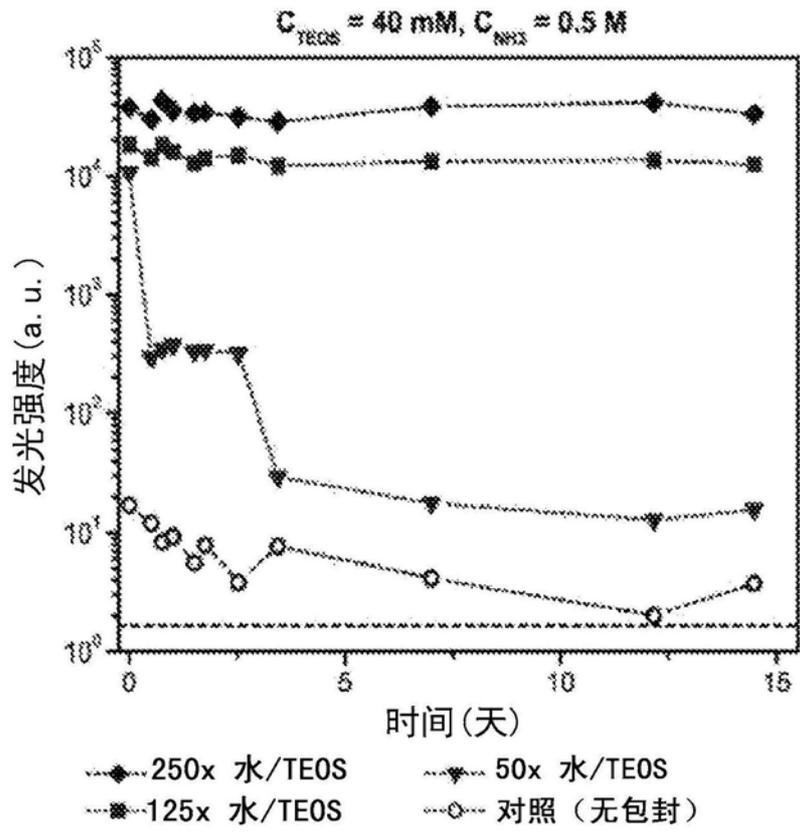


图12B

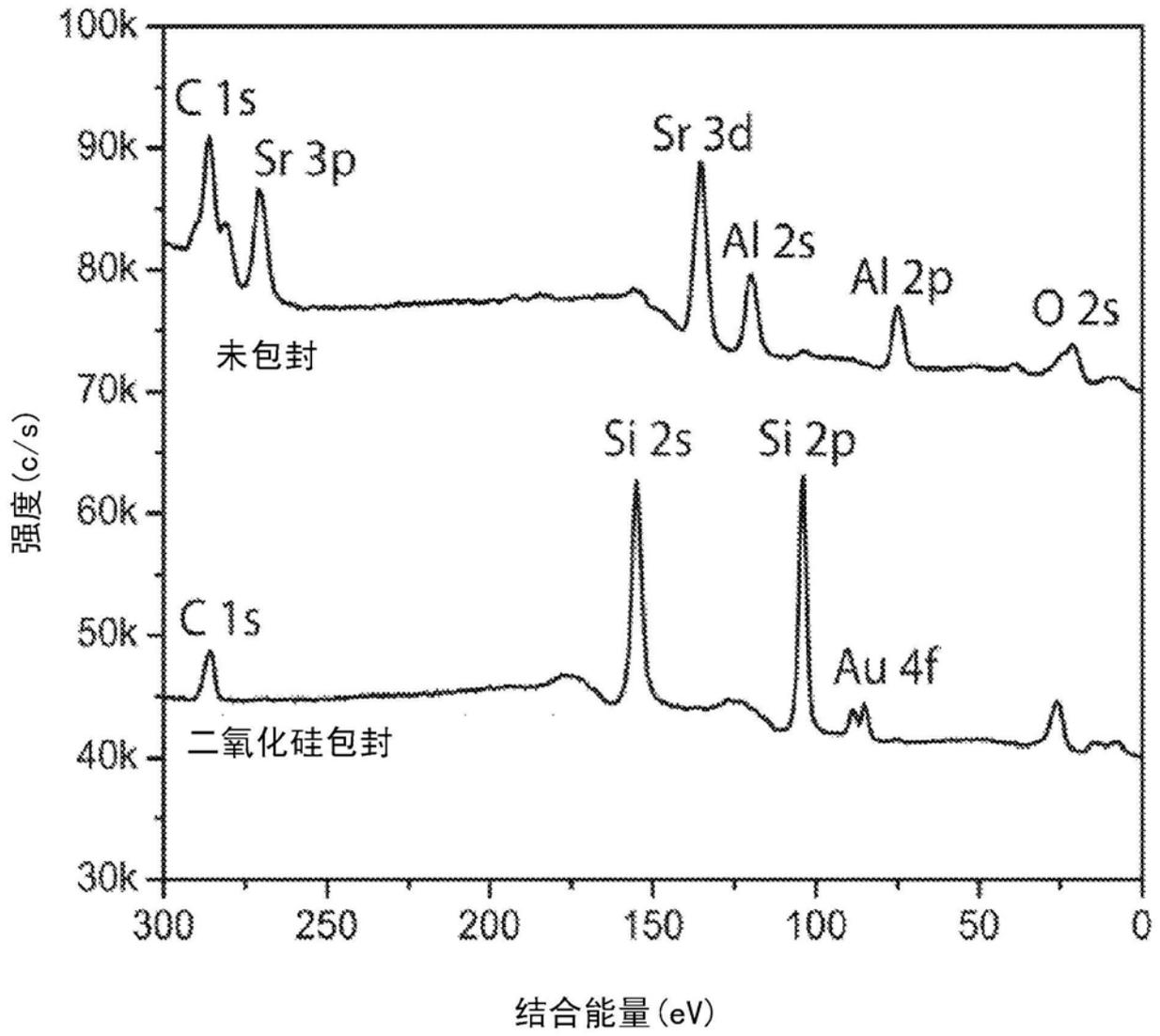


图13

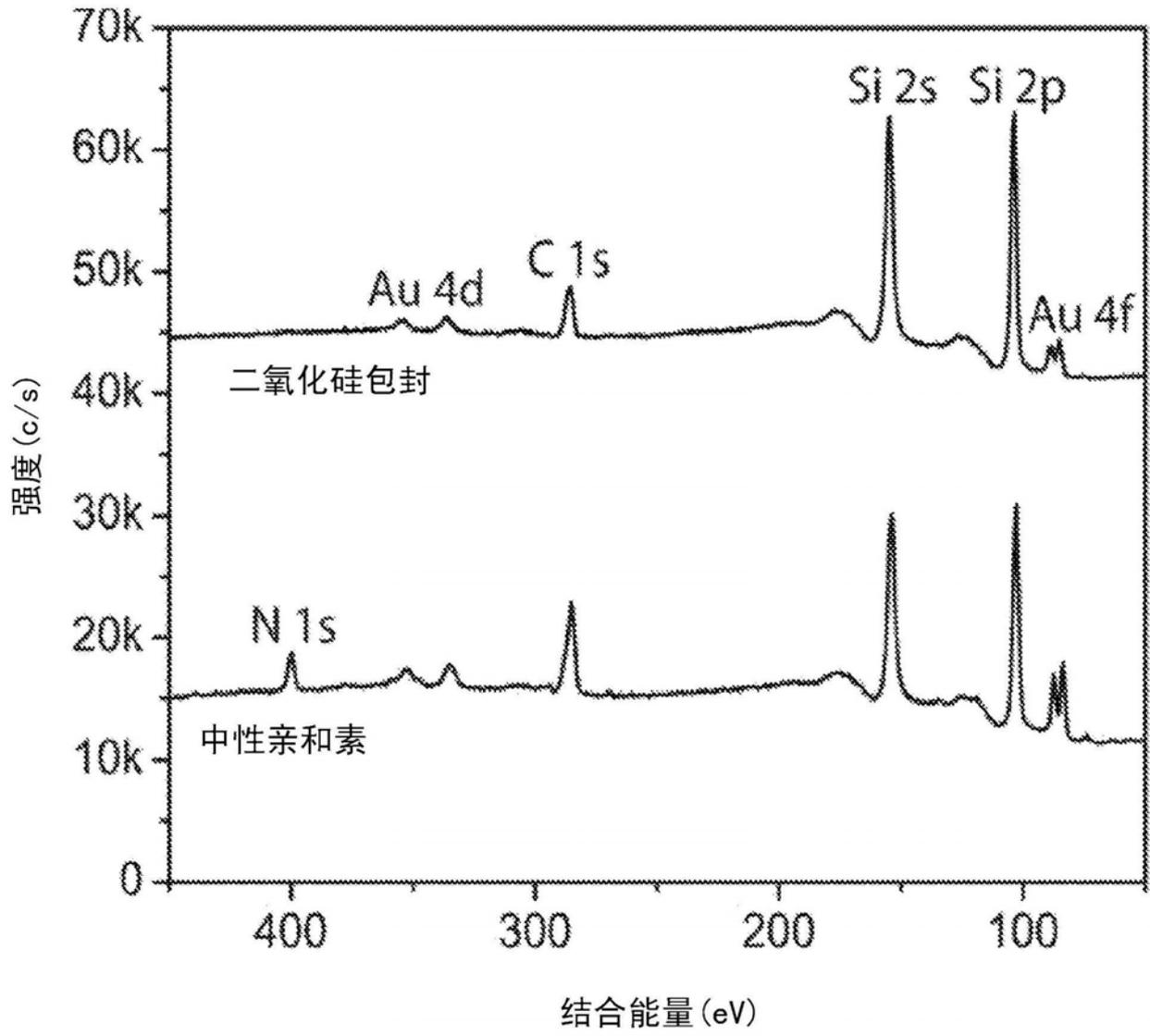


图14

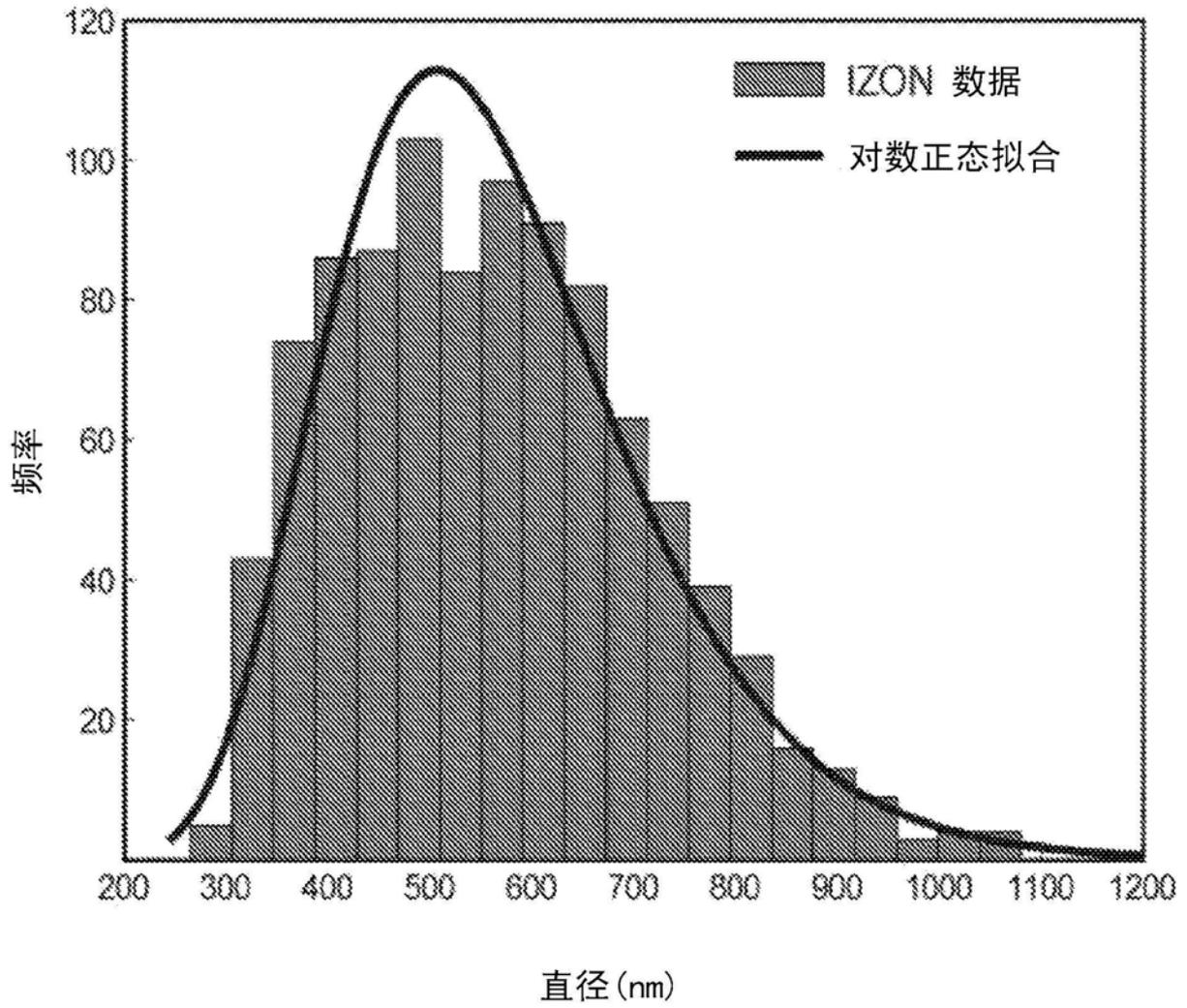


图15

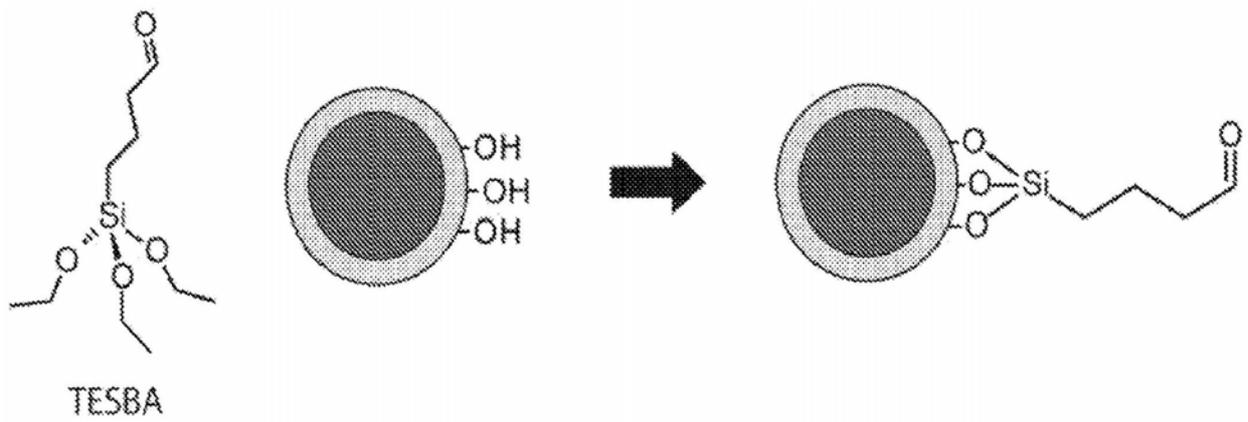


图16

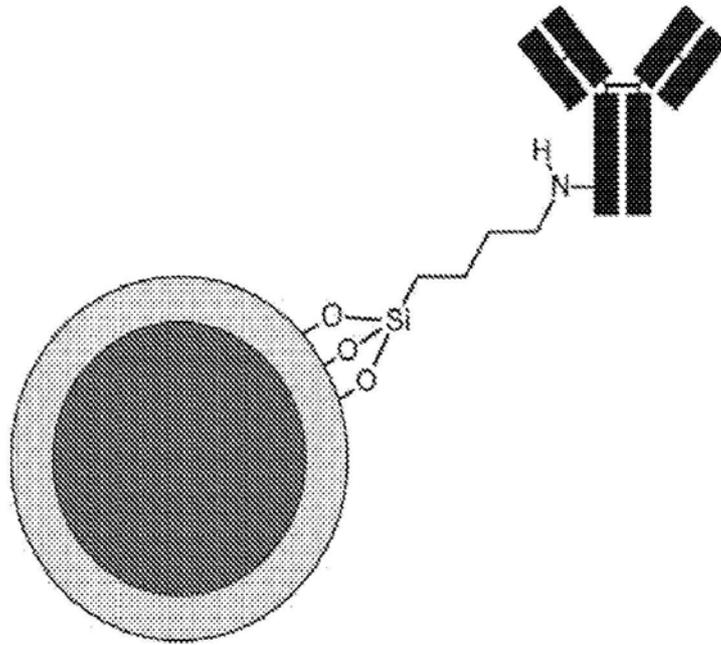


图17

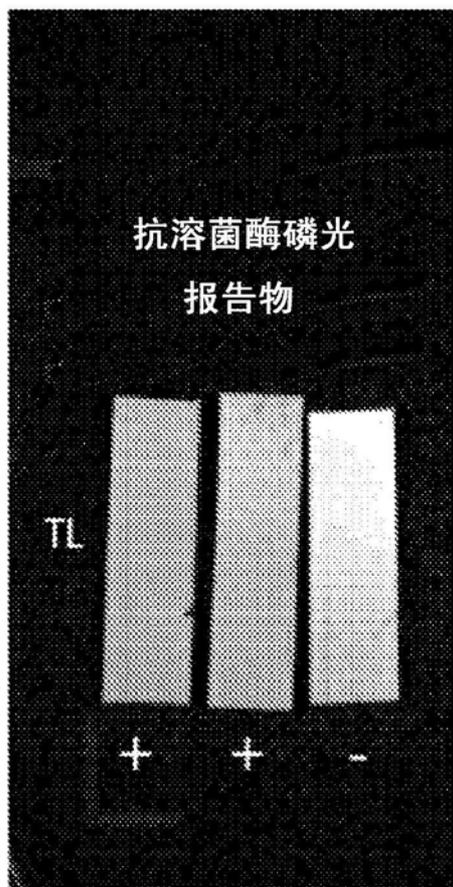


图18A

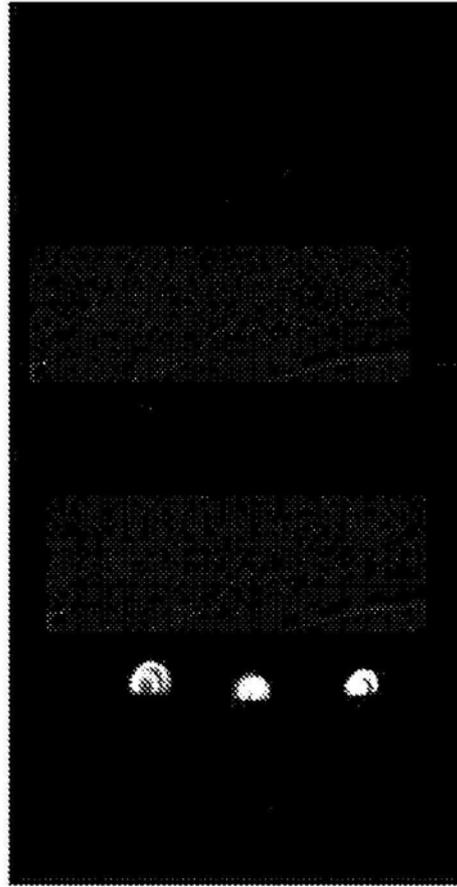


图18B

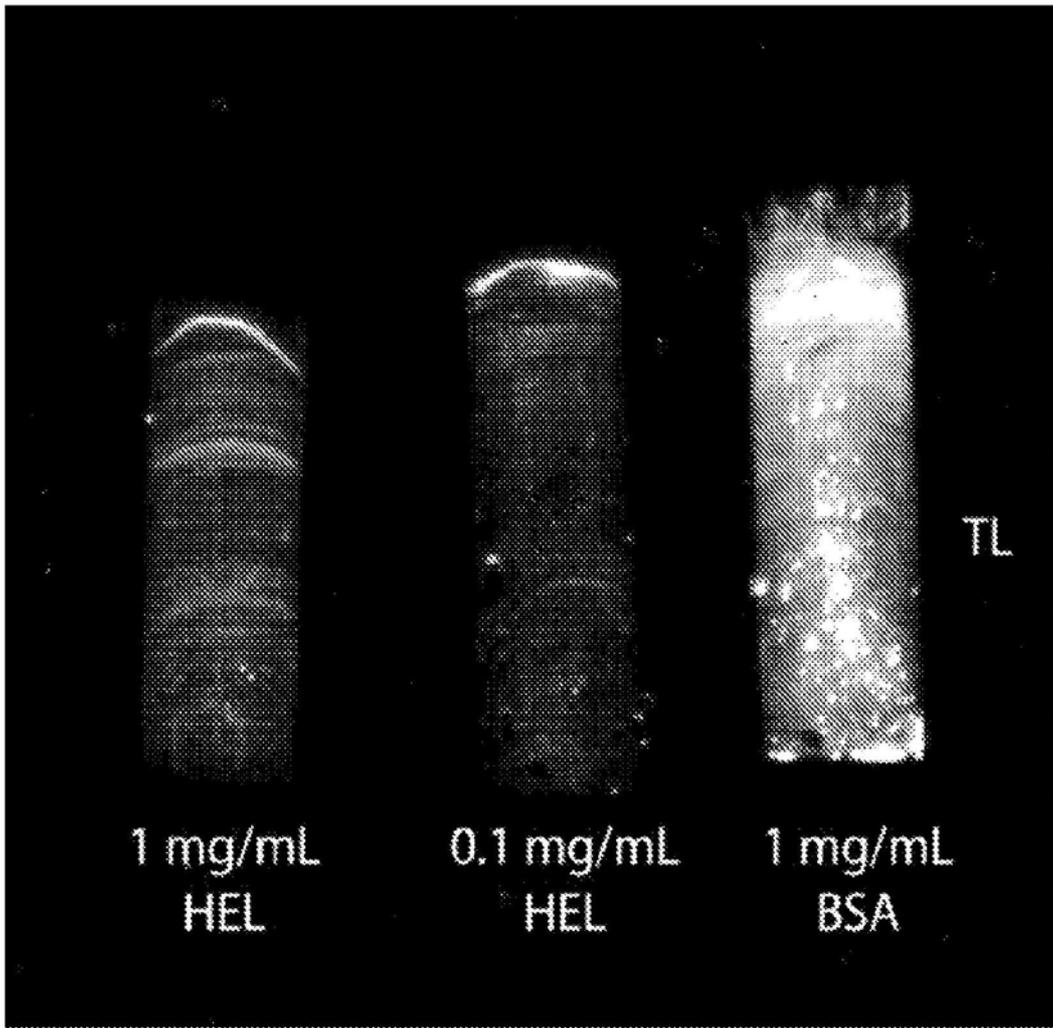


图19

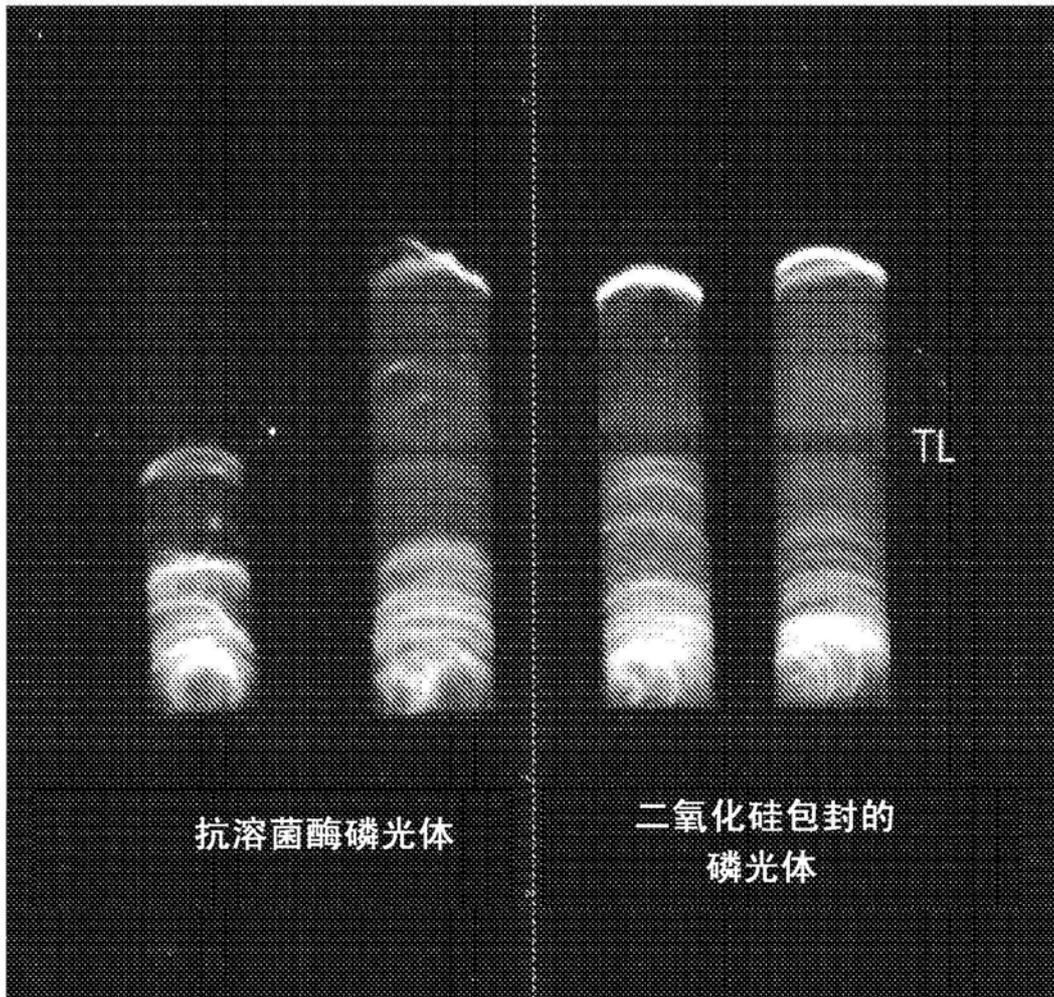


图20

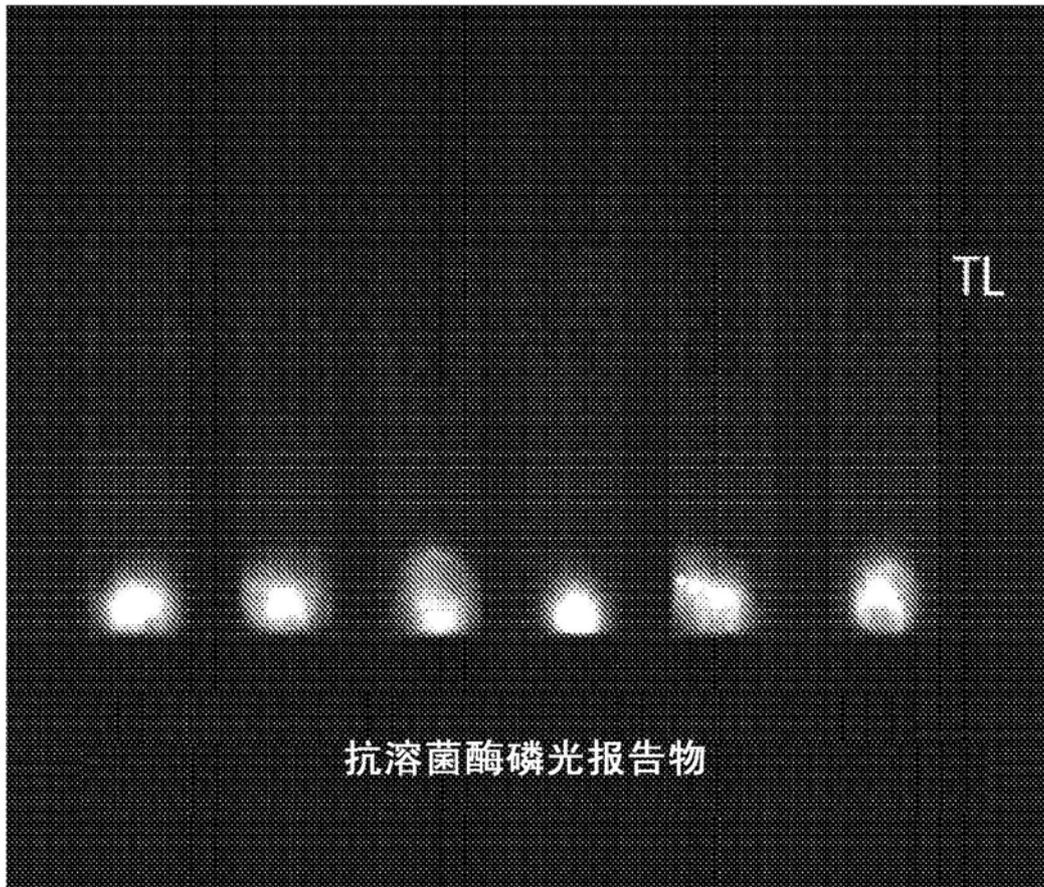


图21

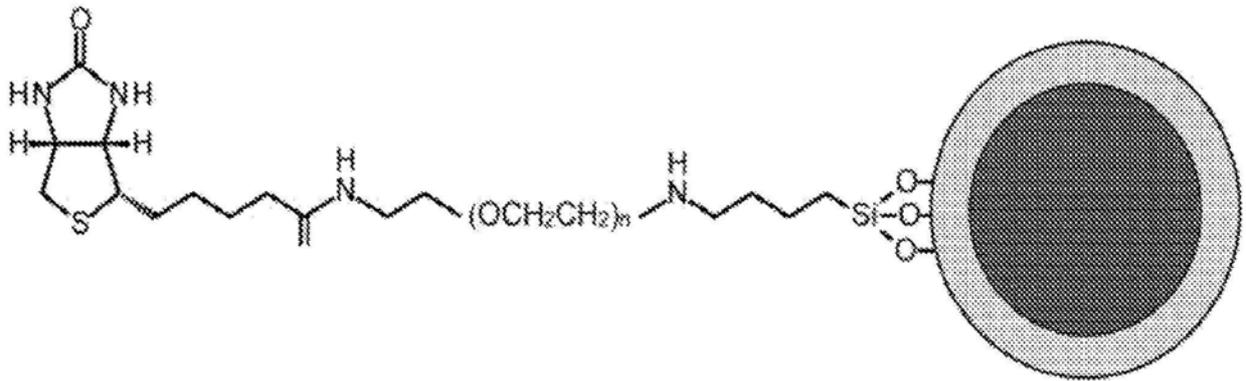


图22A

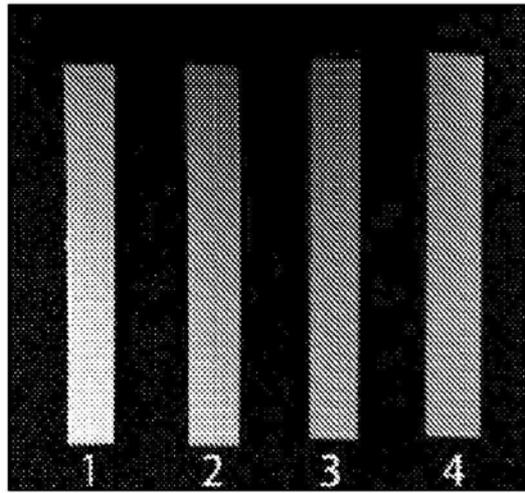


图22B

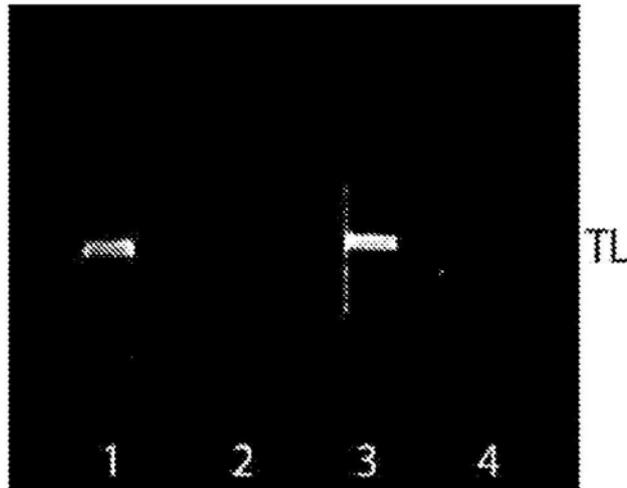


图22C

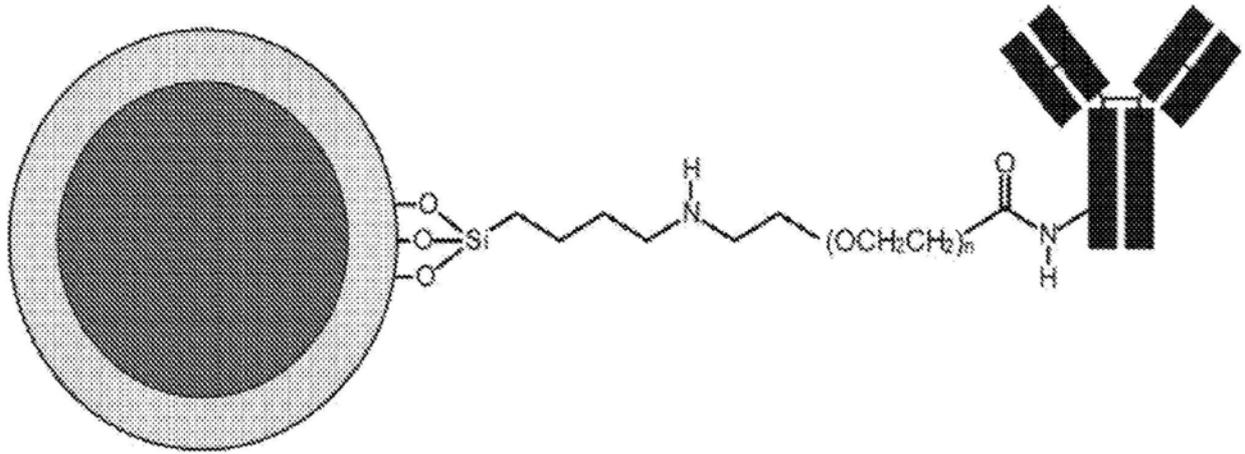


图23

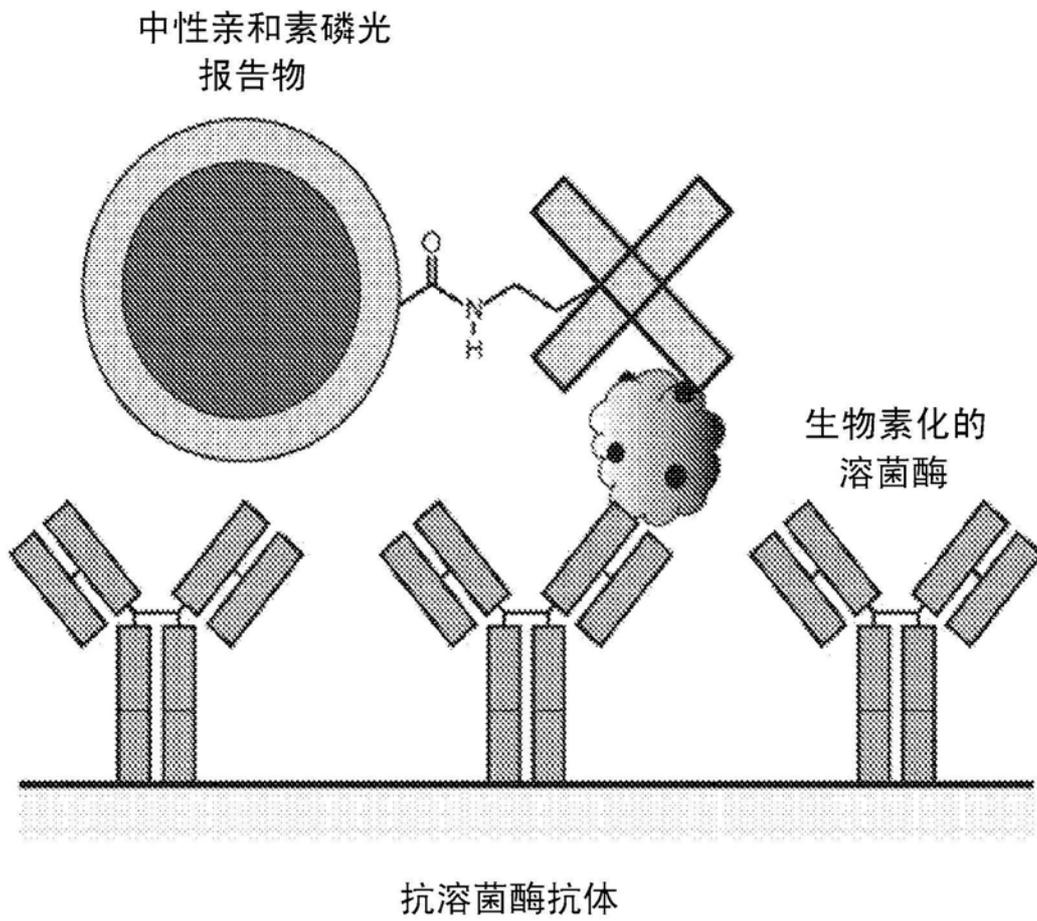


图24

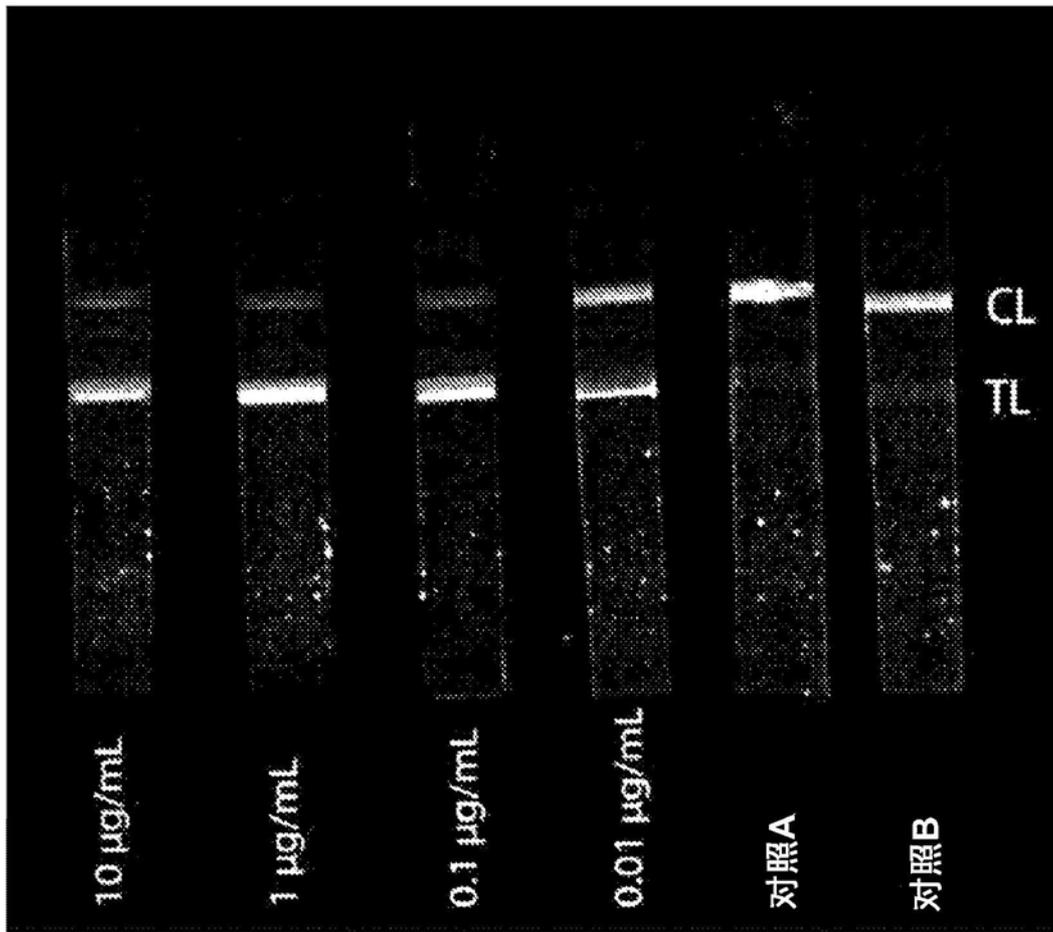


图25

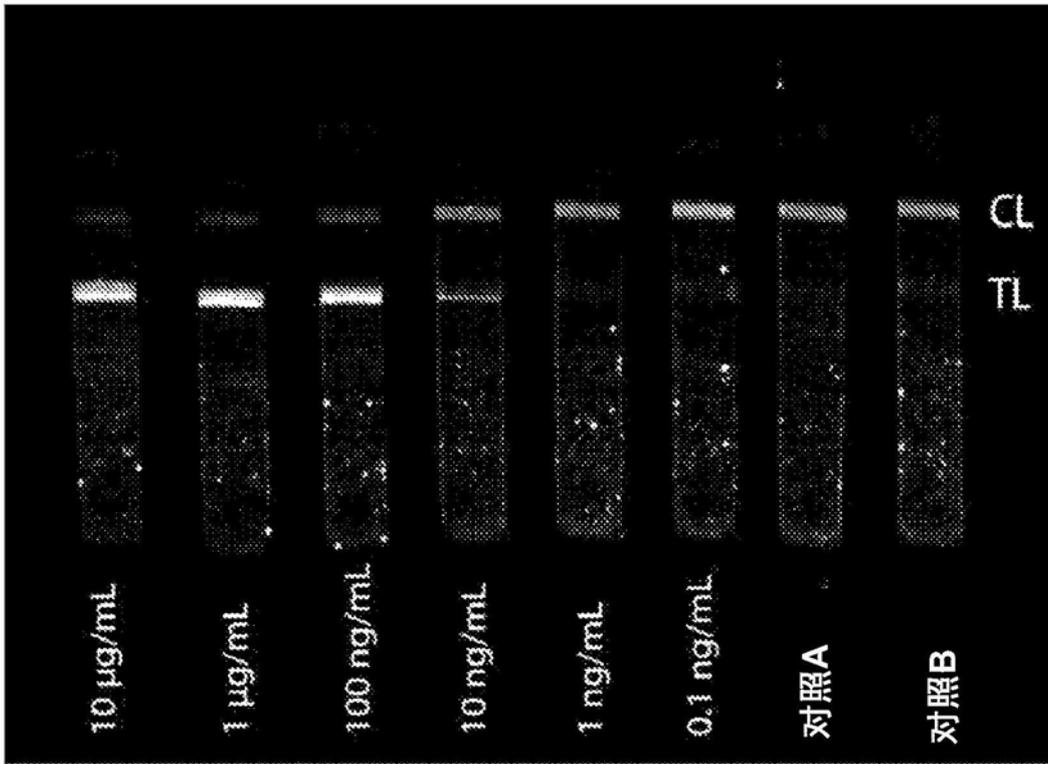


图26

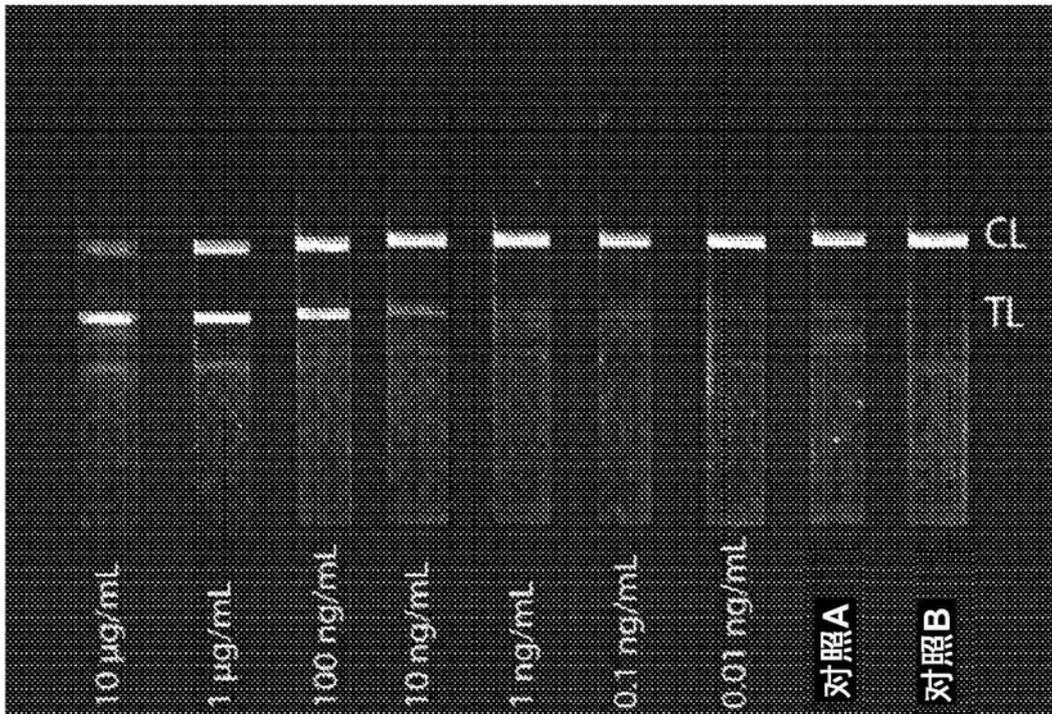


图27

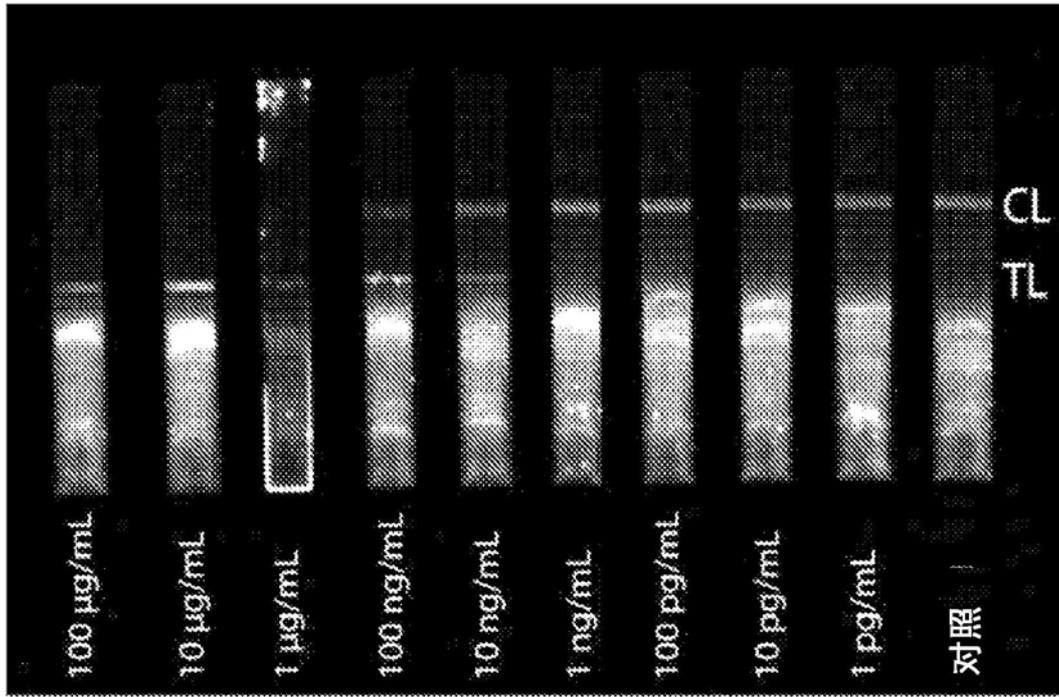


图28

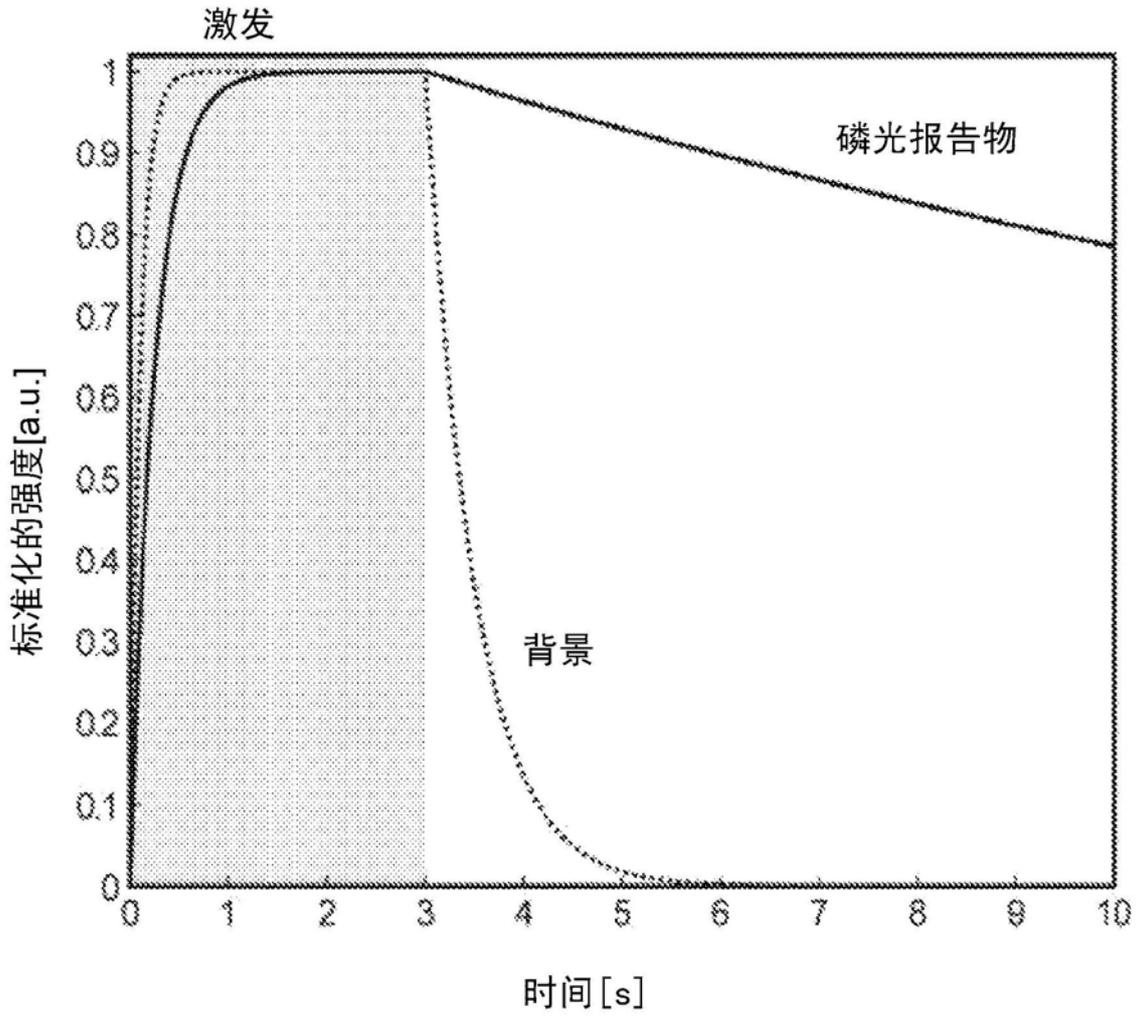


图29

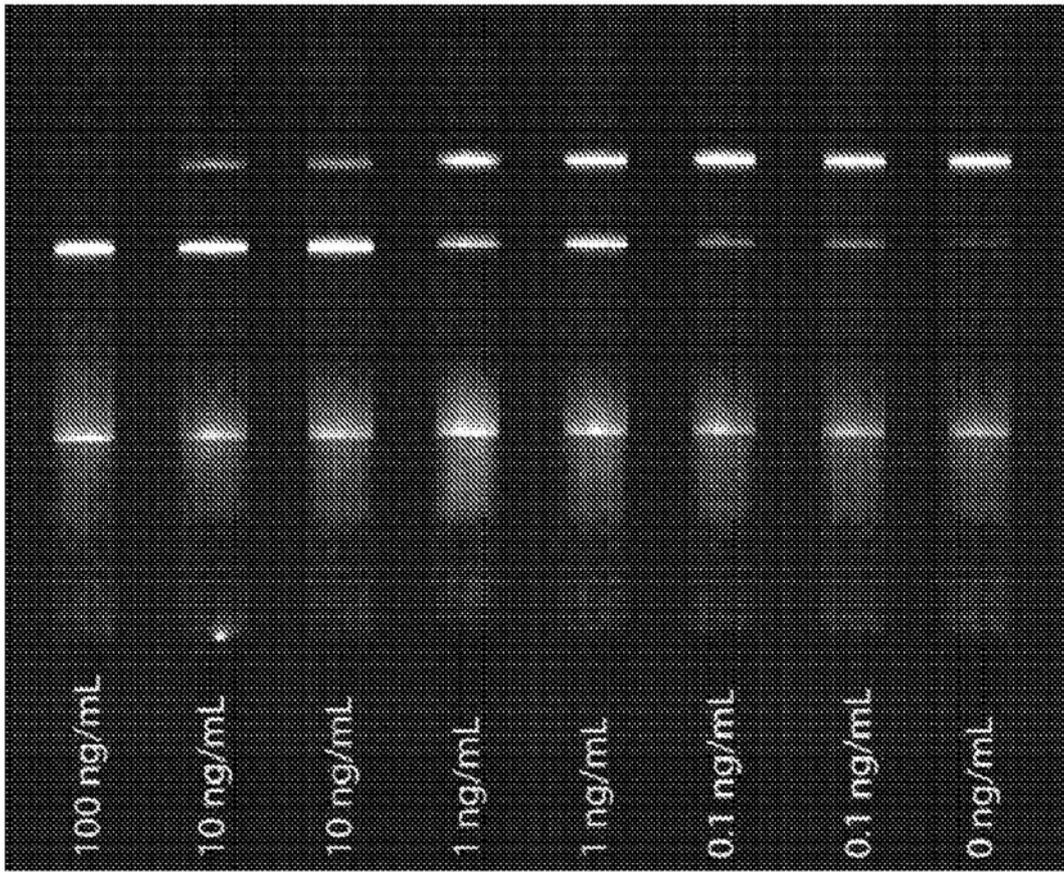


图30

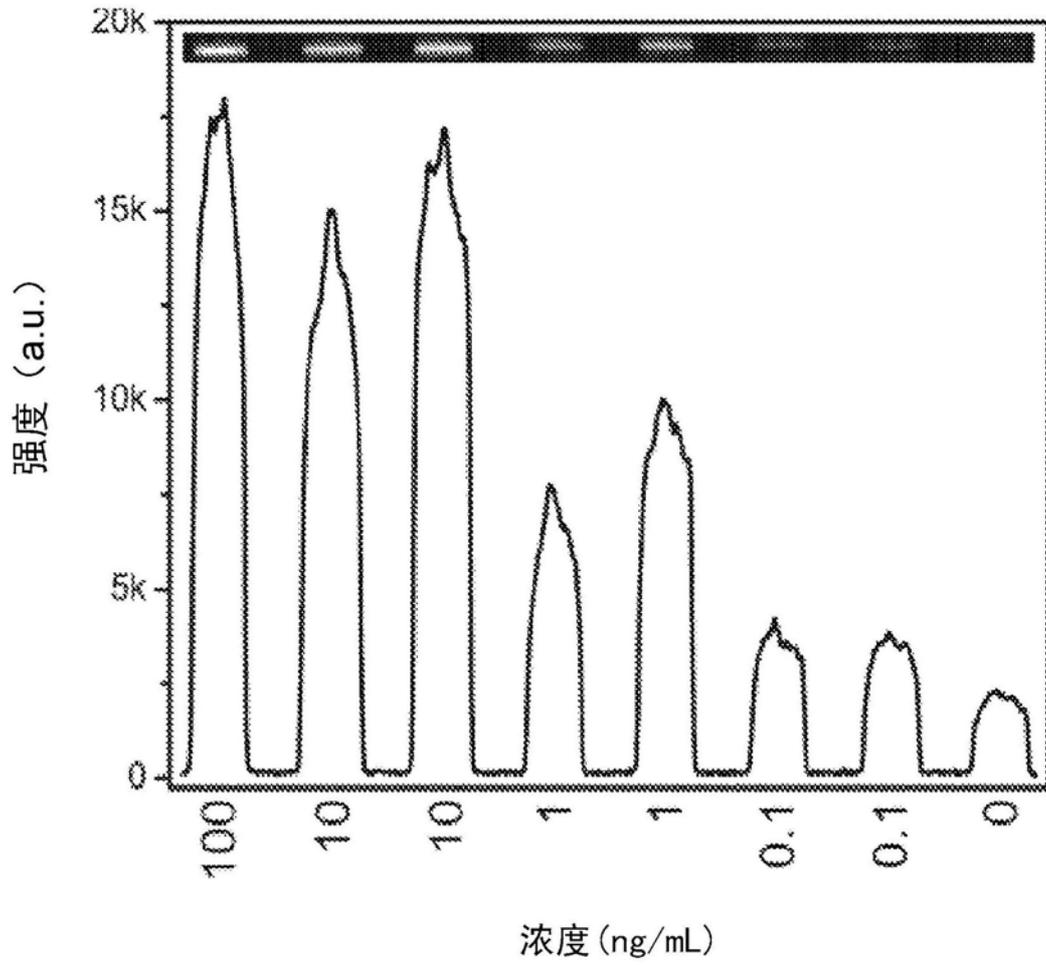


图31

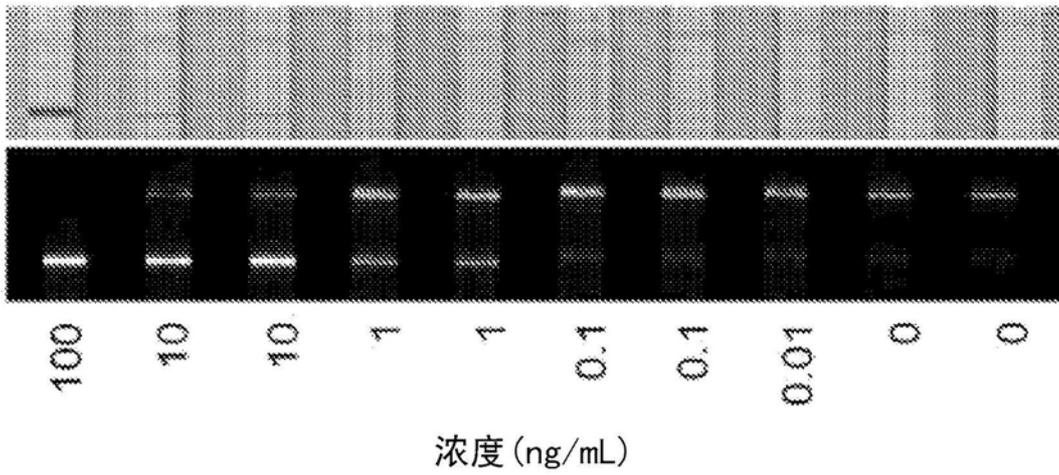


图32A

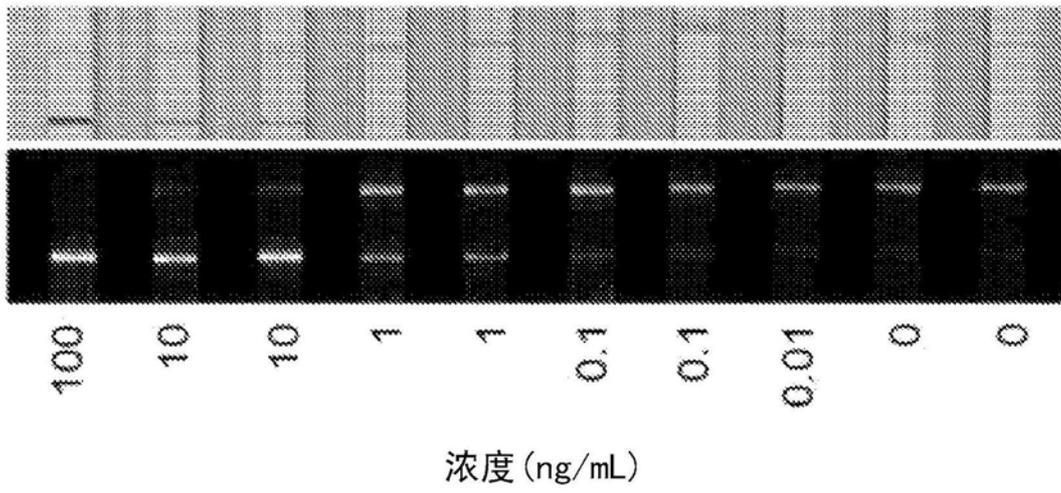


图32B

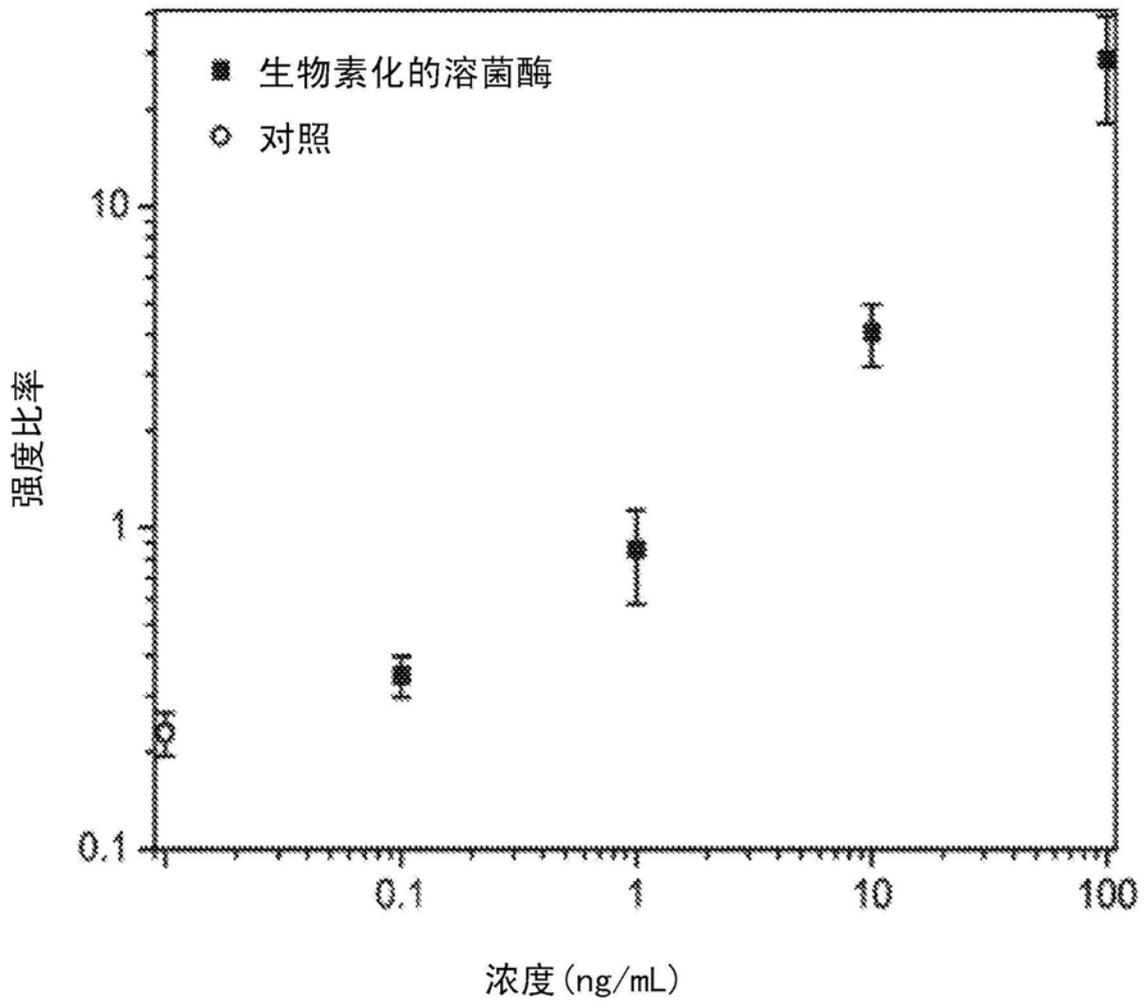


图33

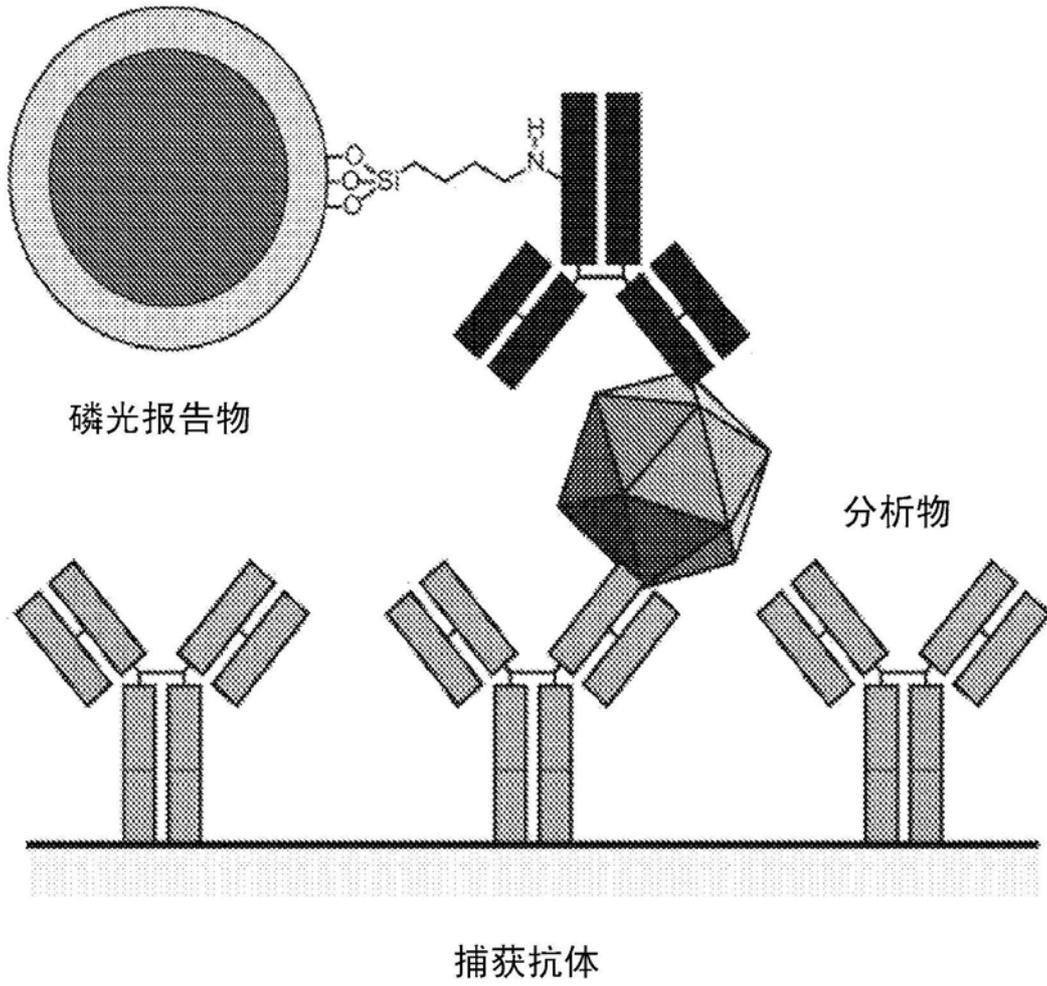


图34

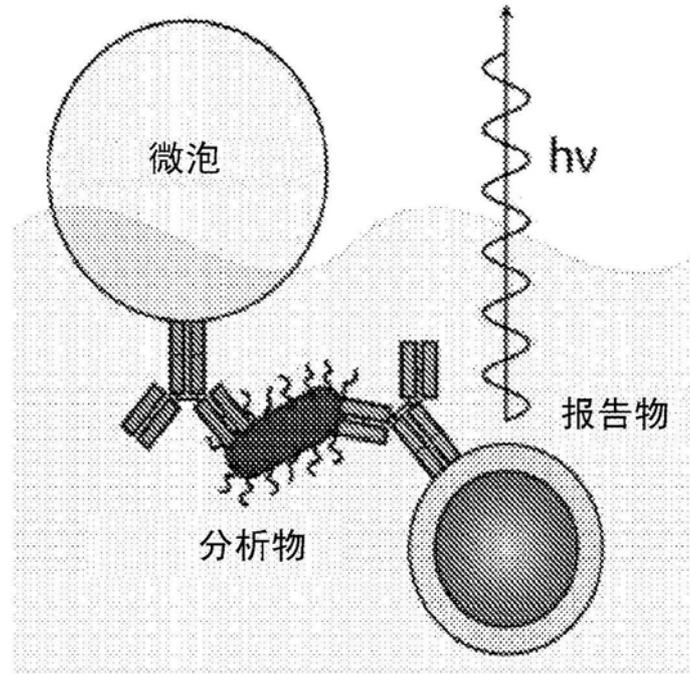


图35A

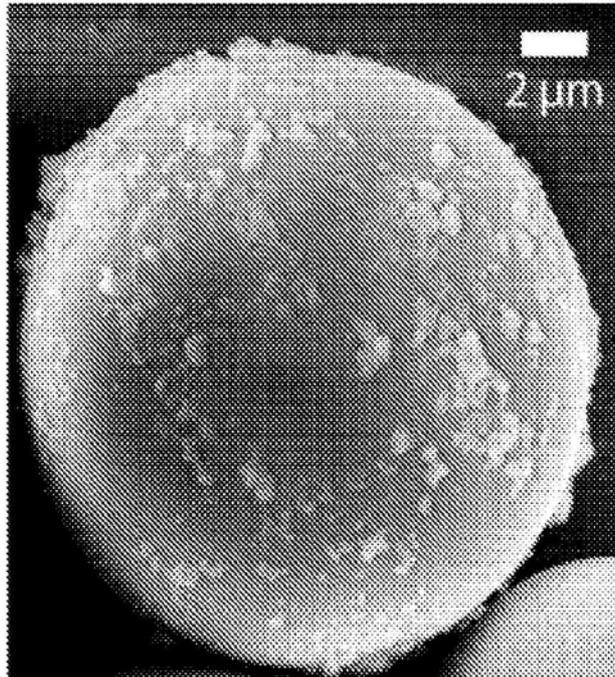


图35B

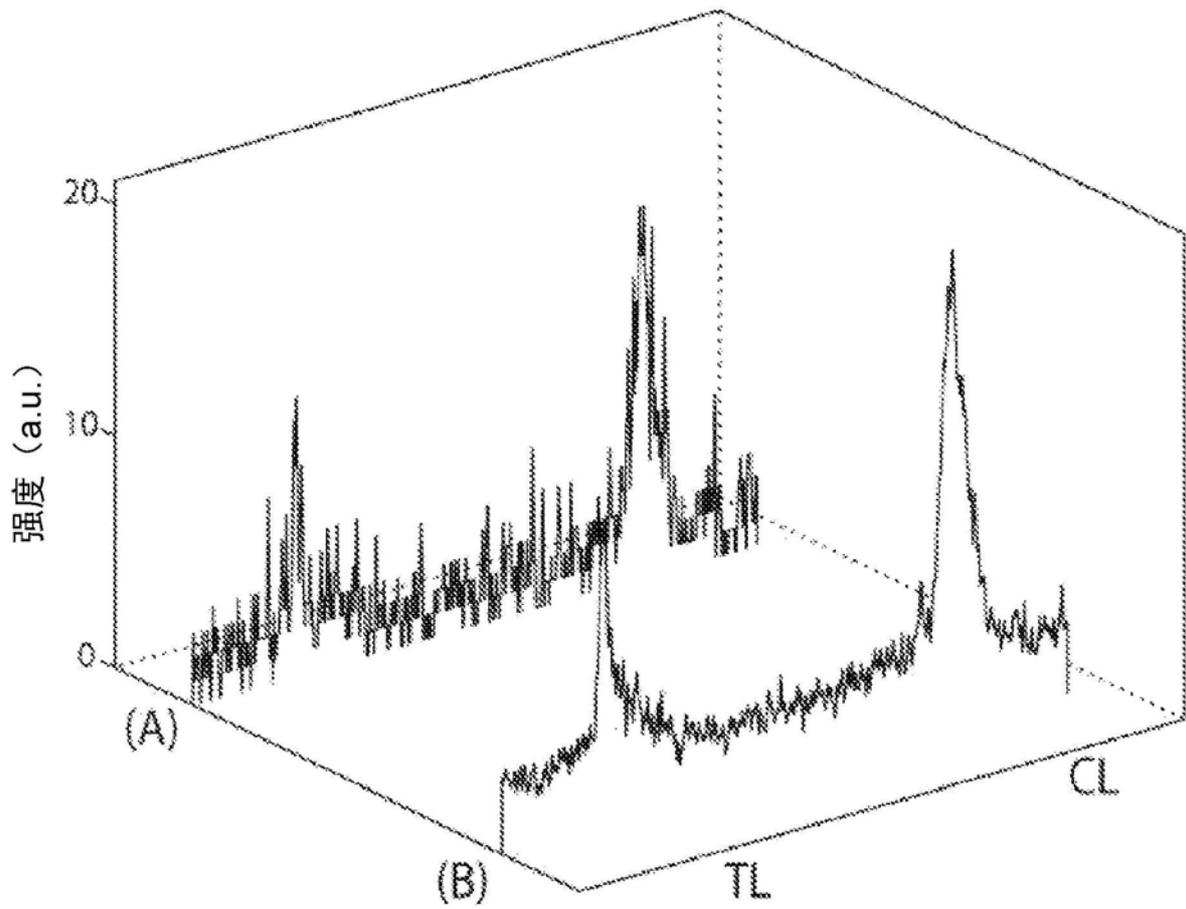


图36

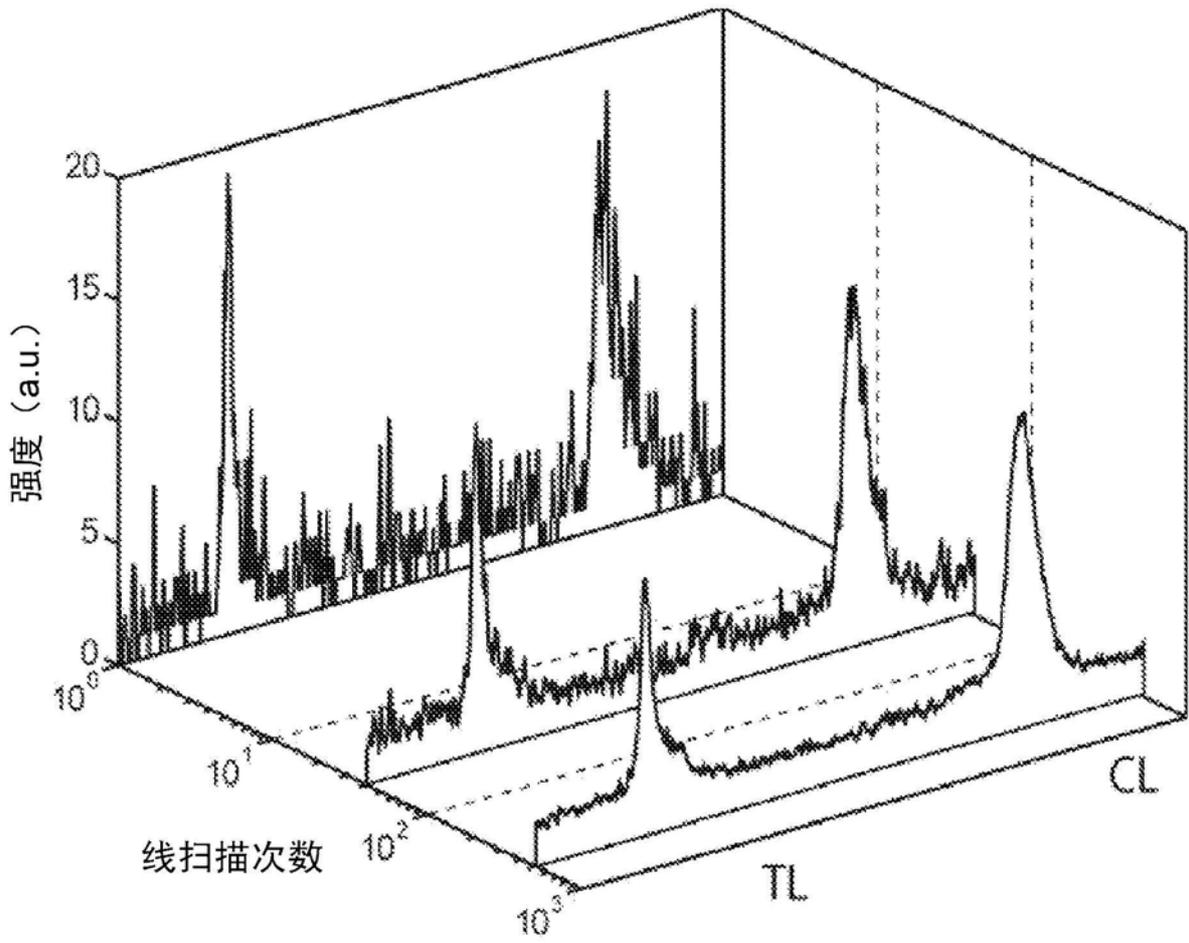


图37

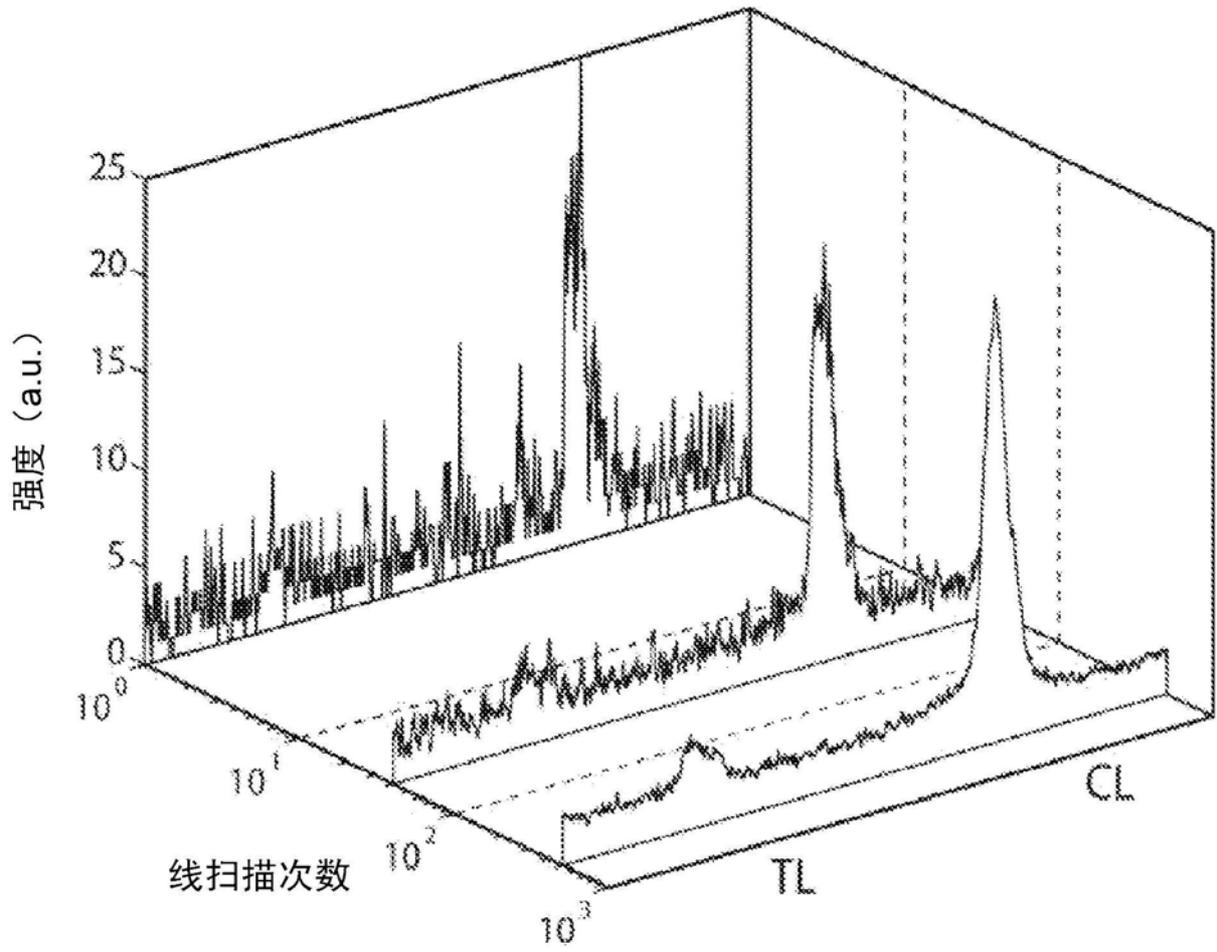


图38

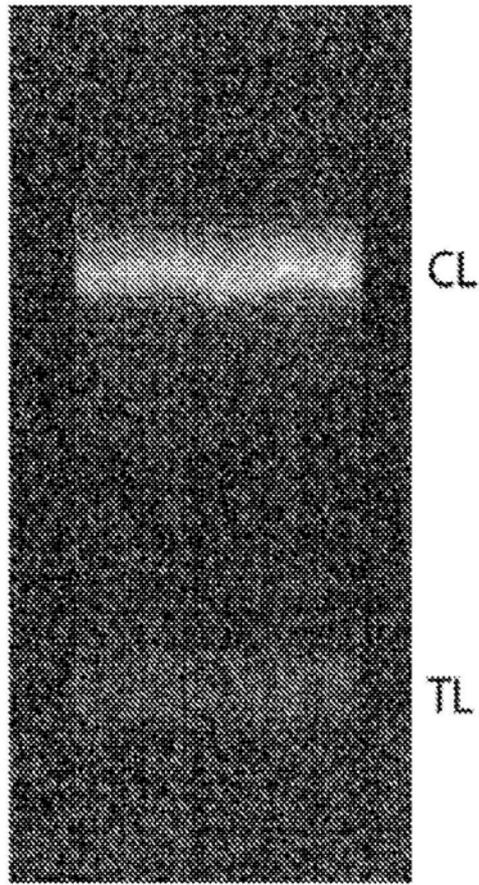


图39A

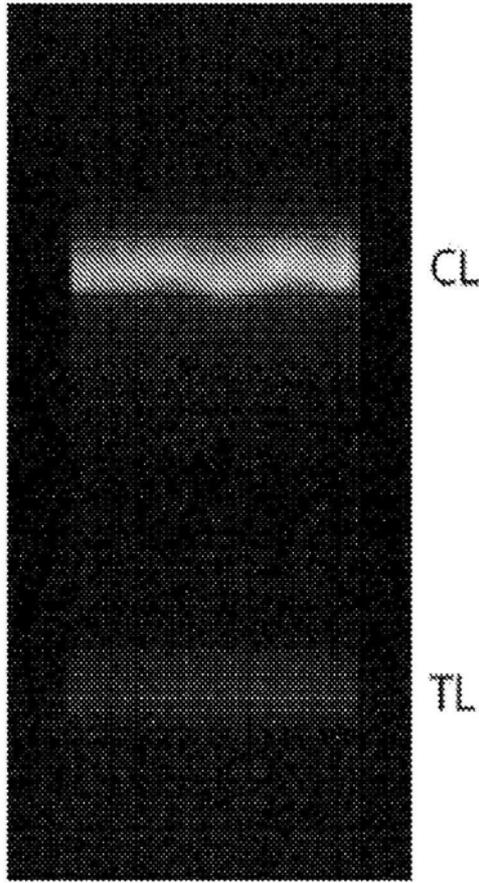


图39B

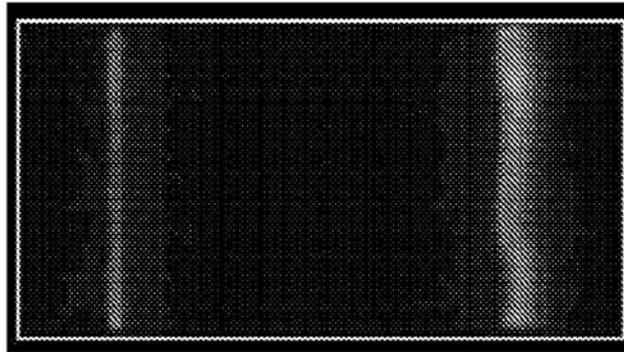


图40A

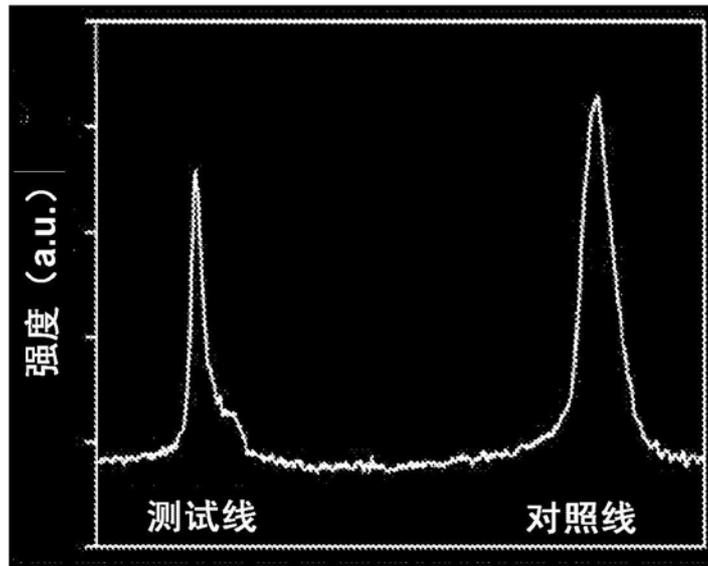


图40B

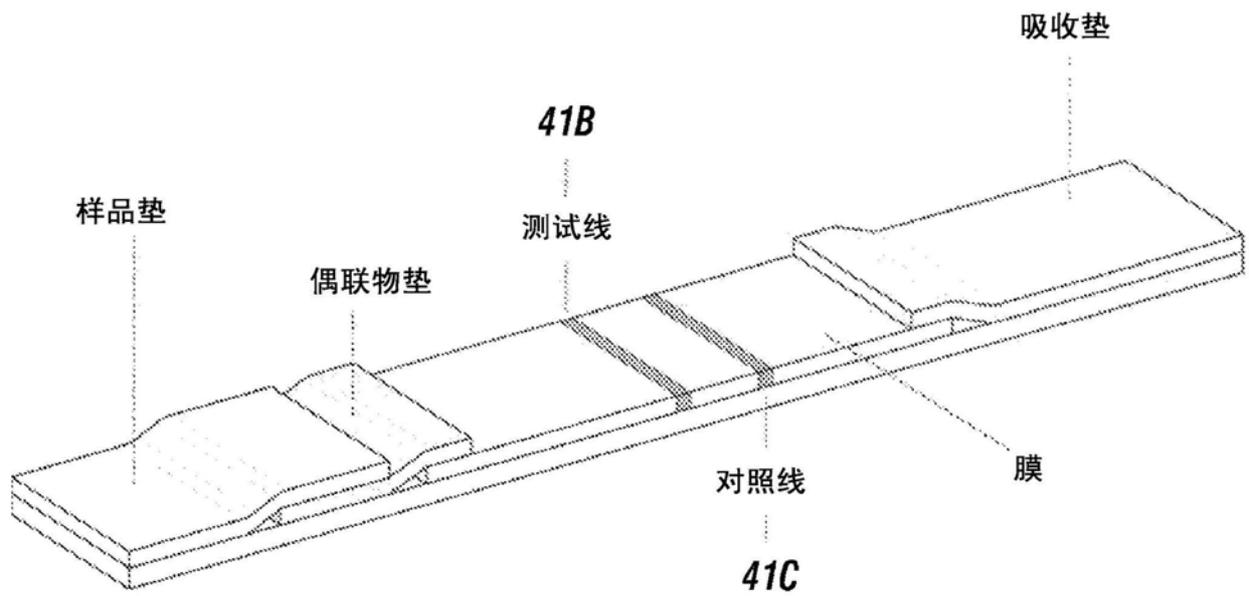


图41A

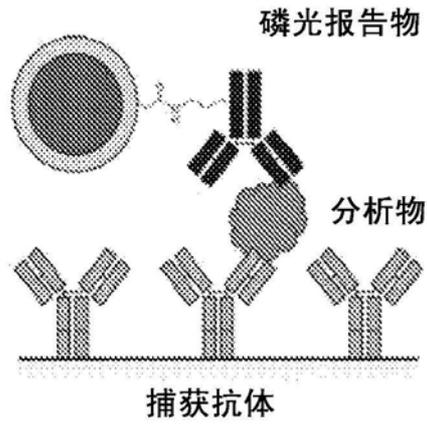


图41B

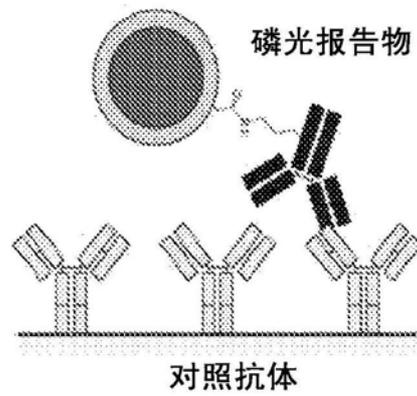


图41C

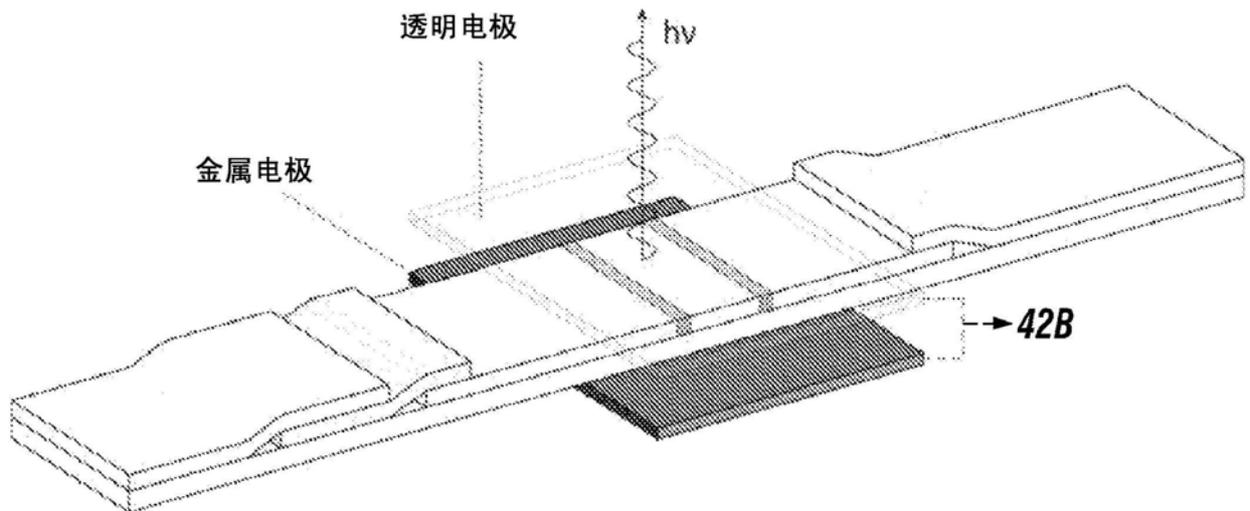


图42A

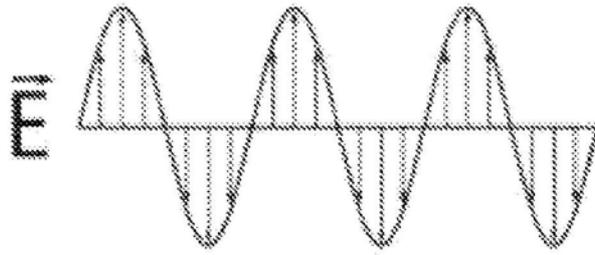


图42B

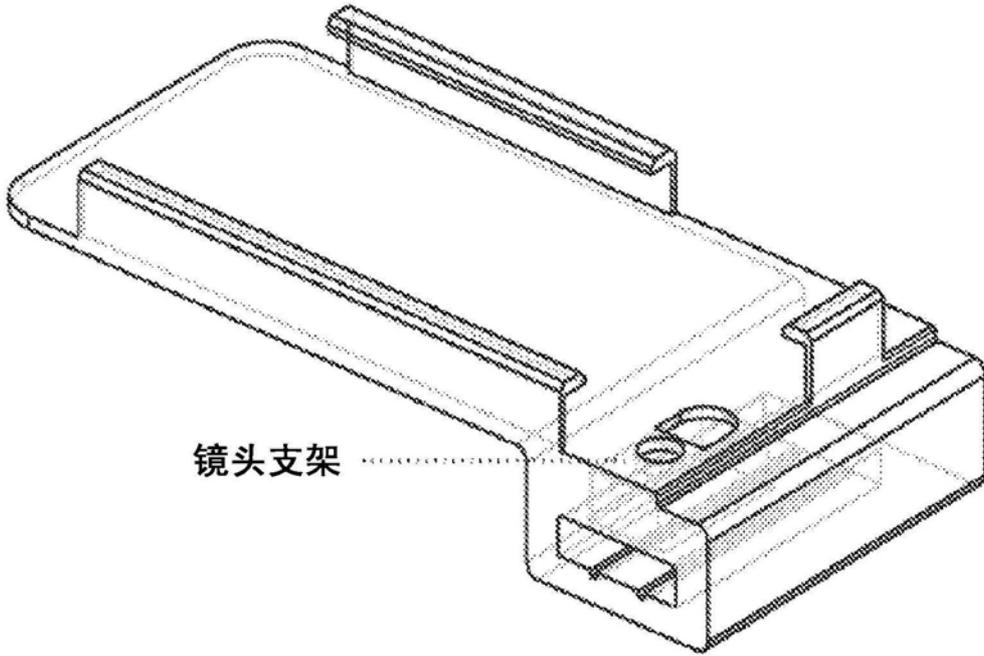


图43A

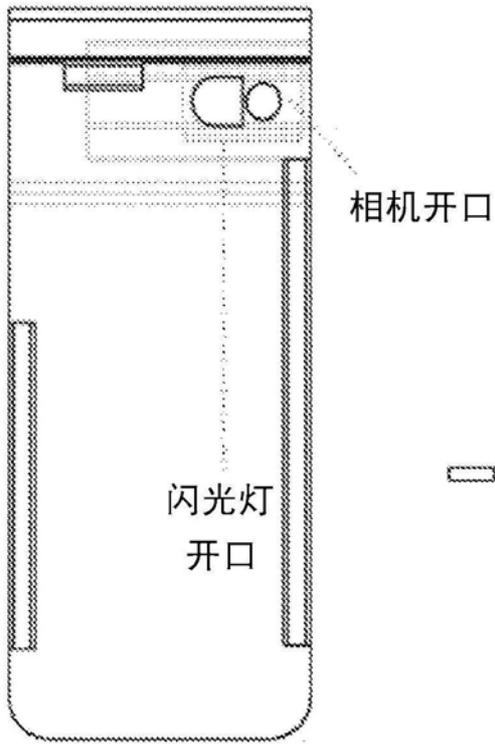


图 43B

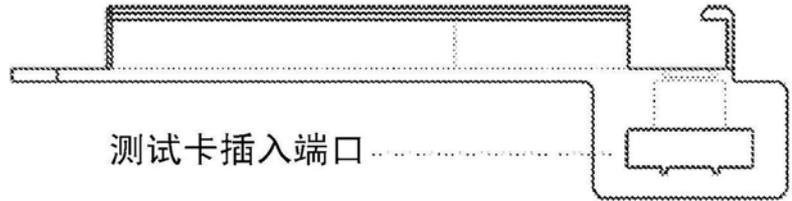


图 43C