



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103108587 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 15

(21) 申请号 201180035201. X

(22) 申请日 2011. 05. 17

(30) 优先权数据

61/345259 2010. 05. 17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 01. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/036811 2011. 05. 17

(87) PCT申请的公布数据

W02011/146486 EN 2011. 11. 24

(71) 申请人 杜克大学

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 A. 基尔科蒂 A. 赫克纳尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 刘健 李炳爱

(51) Int. Cl.

A61B 5/055 (2006. 01)

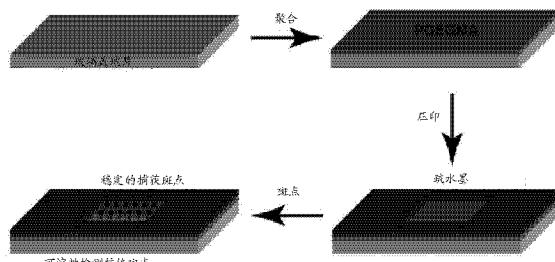
权利要求书2页 说明书19页 附图13页

(54) 发明名称

检测装置和相关使用方法

(57) 摘要

公开的是用于检测来自样品的分析物的装置和方法。



1. 装置,其包含:
 - a. 包含表面的基底;
 - b. 在所述表面上的防污聚合物层;
 - c. 在所述聚合物层上的至少一个捕获区,包含至少一种捕获试剂;和
 - d. 在所述聚合物层上的至少一个不稳定区,包含至少一种检测试剂和赋形剂;其中所述捕获区和所述不稳定区是空间分离的。
2. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述防污聚合物层包含多个刷状分子。
3. 根据权利要求 2 所述的装置,其中所述多个刷状分子中的至少一个包含单体核心基团。
4. 根据权利要求 3 所述的装置,其中所述单体核心基团选自苯乙烯、丙烯腈、乙酸酯、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、乙烯醇、乙烯酸及其组合。
5. 根据权利要求 2 所述的装置,其中所述多个刷状分子中的至少一个包含蛋白质抗性首基。
6. 根据权利要求 5 所述的装置,其中所述蛋白质抗性首基包含亲水首基或 kosmotrope。
7. 根据权利要求 6 所述的装置,其中所述蛋白质抗性首基包含糖、寡糖、三(丙基亚砜)、羟基、甘油、磷酰胆碱、三(肌氨酸)、N-乙酰氨基糖、甜菜碱、羧基甜菜碱、磺基甜菜碱、全甲基化山梨糖醇、 $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ 或六甲基磷酸酰胺。
8. 根据权利要求 2 所述的装置,其中所述防污聚合物层包含聚(寡聚(乙二醇)甲基丙烯酸甲酯)。
9. 根据权利要求 1 所述的装置,其包含多个捕获区,每个捕获区包含至少一种捕获试剂。
10. 根据权利要求 9 所述的装置,其中所述多个捕获区包含至少两种不同的捕获试剂。
11. 根据权利要求 9 所述的装置,其中所述多个捕获区各自包含不同的捕获试剂。
12. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述捕获试剂是生物标记。
13. 根据权利要求 12 所述的装置,其中所述生物标记包含细胞、小分子配体、脂质、碳水化合物、多核苷酸、肽、蛋白质、抗原或抗体。
14. 根据权利要求 12 所述的装置,其中所述生物标记与疾病或病症相关。
15. 根据权利要求 14 所述的装置,其中所述生物标记与传染病相关。
16. 根据权利要求 15 所述的装置,其中所述传染病选自病毒、细菌、古细菌、涡虫或真菌感染。
17. 根据权利要求 16 所述的装置,其中所述传染病是性传播疾病。
18. 根据权利要求 1 所述的装置,其包含多个不稳定区,每个不稳定区包含至少一种检测试剂。
19. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述检测试剂包含小分子配体、脂质、碳水化合物、多核苷酸、肽、蛋白质、抗原或抗体。
20. 根据权利要求 19 所述的装置,其中所述抗体是非人抗体。
21. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述检测试剂包含选自下述的检测部分:生色团、荧光团、放射性标记、多核苷酸、小分子、酶、纳米颗粒、微粒、量子点或向上转化剂。

22. 根据权利要求 1 所述的装置, 其中所述赋形剂选自盐、碳水化合物、糖、乳化剂、水溶性聚合物及其任何组合。
23. 根据权利要求 22 所述的装置, 其中所述赋形剂是聚(乙二醇)。
24. 根据权利要求 1 所述的装置, 其中至少一个不稳定区进一步包含肝素。
25. 根据权利要求 1 所述的装置, 其中所述基底包含玻璃、硅、金属氧化物或聚合物。
26. 根据权利要求 1 所述的装置, 其进一步包含在所述基底和所述聚合物层之间的连接层。
27. 根据权利要求 1 所述的装置, 其进一步包含试剂以区分在所述表面或所述聚合物层上的检测区。
28. 根据权利要求 27 所述的装置, 其中所述试剂是疏水墨。
29. 根据权利要求 27 所述的装置, 其中所述试剂是蜡。
30. 制造根据权利要求 1 所述的装置的方法, 所述方法包括:
 - a. 提供包含表面的基底;
 - b. 在所述表面上形成防污聚合物层;
 - c. 将至少一种捕获试剂印刷到所述聚合物层上; 和
 - d. 将至少一种检测试剂和至少一种赋形剂印刷到所述聚合物层上;其中所述捕获试剂印刷到所述聚合物层上与所述检测试剂和赋形剂空间分离的区域中。
31. 筛选受试者中的疾病或病症的方法, 其包括:
 - a. 从所述受试者中获得生物学样品;
 - b. 使所述生物学样品与权利要求 1 的装置接触足以允许所述不稳定区中的检测试剂溶解的时间;
 - c. 检测所述疾病或病症的存在, 其中在所述装置上的至少一个捕获区上的可检测信号指示所述受试者中疾病或病症的存在。
32. 权利要求 31 所述的方法, 其中所述疾病包括传染病。
33. 用于测定受试者中的疾病、病症或生物学状态的诊断测定, 其包括:
 - a. 从所述受试者中获得生物学样品;
 - b. 使所述生物学样品与权利要求 1 的装置接触足以允许所述不稳定区中的检测试剂溶解的时间;
 - c. 检测所述疾病、病症或生物学状态的存在, 其中在所述装置上的至少一个捕获区上的可检测信号指示所述受试者中的疾病、病症或生物学状态的存在。
34. 权利要求 33 所述的诊断测定, 其中所述疾病是传染病。
35. 权利要求 33 所述的诊断测定, 其中所述测定是即时测定。
36. 试剂盒, 其包含权利要求 1 的装置、一组缓冲液和 / 或试剂、和使用说明书。

检测装置和相关使用方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

本申请要求于 2010 年 5 月 17 日提交的美国临时专利申请号 61/345,259 的优先权,所述美国临时专利申请的公开内容整体通过引用并入本文。

[0002] 背景

基于核酸技术的微阵列是充分建立的工具,其用于应用例如基于基因表达模式的遗传分析和诊断中。其他微阵列平台技术例如蛋白质(抗体)阵列、和基于复杂生物学样品(细胞制备物、全血等)分析的测定由于技术挑战的结果并未同样开发,所述技术挑战在核酸阵列中不一定发现。此类挑战包括复杂的和/或多步骤的样品处理、不一致的结合活性或非核苷酸捕获试剂的稳定性缺乏、基于测定条件(例如可溶性、pH 等)结合功能的差异、和非特异性结合缔合(例如生物分子与微阵列表面)。此类非特异性结合可以妨碍信号检测,因为它生成高背景信号(噪音)。进一步地,微阵列技术一般采用另外的制备步骤,例如涉及样品分馏或纯化的步骤,和/或在其与捕获试剂结合之前或之后可检测基团与分析物的结合或缔合。

[0003] 相应地,使得具有最低限度或无样品前处理步骤的单个样品中的一种或多种分析物的检测成为可能,具有对于在样品组分和基底之间的非特异性缔合的低倾向,并采用单个或少量测定步骤的装置和方法可以提供超过现有装置和检测方法的优点。

[0004] 概述

在一个方面,公开内容提供了包含下述的装置:包含表面的基底;在表面上的防污聚合物层;在聚合物层上的至少一个捕获区,包含至少一种捕获试剂;和在聚合物层上的至少一个不稳定区,包含至少一种检测试剂和赋形剂;其中所述捕获区和不稳定区是空间分离的。

[0005] 在另一个方面,公开内容提供了制造本文描述的装置的方法,该方法包括:提供包含表面的基底;在表面上形成防污聚合物层;将至少一种捕获试剂印刷到聚合物层上;和将至少一种检测试剂和至少一种赋形剂印刷到聚合物层上;其中所述捕获试剂印刷到聚合物层上与检测试剂和赋形剂空间分离的区域中。

[0006] 在另一个方面,公开内容提供了筛选受试者中的疾病或病症的方法,其包括:从受试者中获得样品;使样品与本文描述的装置接触足以允许不稳定区中的检测试剂溶解的时间;和检测疾病或病症的存在,其中可检测,其中在装置上的至少一个捕获区上的可检测信号指示受试者中疾病或病症的存在。

[0007] 在另一个方面,公开内容提供了用于鉴定受试者中的疾病、病症或生物学状态的诊断测定,其包括:从受试者中获得样品;使样品与本文描述的装置接触足以允许不稳定区中的检测试剂溶解的时间;检测受试者中的疾病、病症和/或生物学状态的存在,其中在装置上的至少一个捕获区上的可检测信号指示受试者中的疾病、病症或生物学状态的存在。

[0008] 公开内容涉及由于下述说明书和附图将变得显而易见的其他方面和实施方案。

[0009] 附图简述

图 1 描述了已涂有 POEGMA、用疏水墨压印并用“捕获斑点”和“不稳定斑点”印刷的示例性一次性芯片。

[0010] 图 2 描述了在玻璃载玻片上合成 POEGMA 聚合物层。

[0011] 图 3 描述了示例性装置的横截面。

[0012] 图 4 描述了示例性装置的横截面。

[0013] 图 5 描述了示例性阵列形式。

[0014] 图 6 描述了使用示例性装置测定来自受试者的血样的示例性方法。

[0015] 图 7 描述了通过椭圆对称法测量的在氧化硅和引发剂硅烷修饰的氧化硅（对照：0）上不同厚度的 POEGMA 刷上的蛋白质吸附。图例：Ly（溶菌酶）、Fn（纤连蛋白）、BSA（牛血清白蛋白）、FBS（胎牛血清）。

[0016] 图 8 描述了：(A) 由血清查询的 IL-6 微阵列的图像。(A) 在聚 (OEGMA) 上的缓冲液和血清中的 OPG 剂量响应曲线。(C) 在聚 (OEGMA) 和硝酸纤维素上的血清中的 IL-6 剂量响应曲线。(D) 对于由全血查询的 IL-6 微阵列的剂量响应曲线。在 B-D 中，纵坐标显示在斑点中的背景减去的平均荧光强度，并且 X 轴显示溶液中的分析物浓度。误差条代表标准差。

[0017] 图 9 描述了：A) 在暴露于由 1 mg/mL b-Ab（左）和 0.0001 mg/mL（右）b-Ab 溶液印刷的、稀释系列的链霉亲和素 -Cy5 后的生物素化抗体 (b-Ab) 斑点；B) 斑点对于稀释系列的链霉亲和素 -Cy5 的剂量响应曲线。

[0018] 图 10 描述了在加入一滴缓冲液之前和之后，用 b-Ab 捕获斑点和 Cy5- 链霉亲和素不稳定斑点印刷的示例性芯片的荧光图像。

[0019] 图 11 描述了在印刷后 RT 贮存 1 天后（灰色三角）和在印刷后贮存 23 天后（黑色圆圈），对于 BNP 测定的剂量响应曲线。

[0020] 图 12 描述了具有用蜡网格压印的 POEGMA 刷的玻璃载玻片的图像。(A) 说明在单个蜡栅栏 (corral) 的中心点上的抗体阵列的图像。(B) 由含有可溶性荧光检测试剂的斑点围绕的内部 4x4 抗体阵列的放大荧光图像。

[0021] 图 13 描述了对于 IgG 和 IgM 的示例性测定的结果。A) 印刷的测定芯片。B) 对于作为不稳定的检测斑点一起共印刷的 IgG 和 IgM 的共印刷的检测抗体。C) 其中芯片与 PBS 一起孵育的阴性对照。D) 其中仅 Cy5- 抗 IgG 检测试剂印刷到不稳定斑点中的测定。E) 其中仅 Cy5- 抗 IgM 检测试剂印刷到不稳定斑点中的测定。F) 其中芯片与鸡血一起孵育的阴性对照。

[0022] 图 14 描述了来自测定的捕获荧光，其中不同分子量的 PEG 预印刷到聚合物层上，和 / 或与捕获试剂溶液一起包括。

[0023] 详述

公开内容在其应用中并不限于下述说明书中阐述或附图中举例说明的组分构建和排列的细节。公开内容中所述的目的能够具有其他实施方案并以多种方法实践或进行。此外，本文使用的措辞和术语用于描述的目的且不应视为限制性的。“包括”、“包含”、“具有”、“含有”、“涉及”及其变化在本文中的使用意欲涵盖其后列出的项目及其等价物以及另外的项目。为了促进公开内容原理的理解的目的，参考具有用于描述其的举例说明性语言的多个方面和有关实施方案。

[0024] 冠词“一 (a)”、“一 (an)”和“该 (the)”在本文中用于指冠词的一个或超过一个(即,至少一个)语法对象。例如,“元件”意指至少一个元件并且可以包括超过一个元件。类似地,提及“细胞”包括多个细胞,并且在一些实施方案中,可以包括组织和 / 或器官。类似地,如本文使用的术语“和 / 或”应理解为包括在有关短语内叙述的任何单个元件,以及两个或更多个元件的任何组合,包括所有元件。

[0025] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语都具有与公开内容所属领域普通技术人员通常理解相同的含义。

[0026] 定义

虽然认为下述术语由本领域普通技术人员充分理解,但阐述下述定义以促进公开主题的解释。尽管目前描述了代表性方法、装置和材料,但与本文描述的那些相似或等价的任何方法、装置和材料都可以用于公开主题的实践或测试中。

[0027] 如本文使用的,术语“样品”或“生物学样品”指从其自然或天然状态获得的任何材料,以便促进任何所需操作和 / 或进一步处理和 / 或修饰。样品或生物学样品可以包含细胞、组织、液体(例如生物学液体)、蛋白质(例如抗体、酶、可溶性蛋白质、不溶性蛋白质)、多核苷酸(例如 RNA、DNA)、膜制备物等,其可以任选进一步从其自然或天然状态分离和 / 或纯化。“生物学液体”指源于生物学生物体的任何液体。示例性生物学液体包括但不限于血液、血清、血浆、淋巴液、胆汁液、尿、唾液、粘液、痰、泪、脑脊髓液(CSF)、支气管肺泡灌洗液、鼻咽灌洗液、直肠灌洗液、阴道灌洗液、结肠灌洗液、鼻灌洗液、喉灌洗液、滑液、精液、腹水液、脓、母乳、耳液、汗液和羊膜液。生物学样品可以处于其天然状态,或通过加入组分例如试剂、或去除一种或多种天然组成成分(例如血液血浆)的修饰状态。

[0028] 如本文使用的,术语“生物标记”指与生物学状态或生物学过程相关的物质,例如疾病状态或疾病或病症的诊断或预后指示剂(例如鉴定疾病或病症的存在或以后发展的可能性的指示剂)。生物标记的存在或不存在、或生物标记浓度的增加或减少可以与特定状态或过程相关和 / 或指示特定状态或过程。生物标记可以包括但不限于细胞或细胞组分(例如病毒细胞、细菌细胞、真菌细胞、癌细胞等)、小分子、脂质、碳水化合物、核酸、肽、蛋白质、酶、抗原和抗体。生物标记可以衍生自传染剂例如细菌、真菌或病毒,或可以是内源分子,与健康个体相比较,所述内源分子在患有疾病或病症的受试者中以更大或更小的丰度被发现(例如基因或基因产物的表达的增加或减少)。

[0029] 如本文使用的,术语“检测部分”是可通过方法检测的任何部分或化合物,所述方法包括但不限于光谱的、光化学的、生物化学的、免疫化学的、化学的、电化学的、放射性和其他物理方法。检测部分可以是可间接检测的;例如,检测部分可以是其为特异性结合对的成员的部分或化合物,其中所述结合对的第二个成员包括可以直接检测的检测部分。此类检测部分的非限制性和已知例子是生物素,其可以与包含检测部分例如荧光团的亲和素或链霉亲和素结合。示例性检测部分包括但不限于荧光团、生色团、放射性标记、多核苷酸、小分子、酶、纳米颗粒和向上转化剂(upconverter)。

[0030] 如本文使用的,术语“传染病”(本文缩写为 ID)指由传染剂引起的那些疾病,所述传染剂包括但不限于微生物,例如病毒、细菌、古细菌、涡虫、变形虫和真菌。

[0031] 如本文使用的,术语“聚合物”以其如本领域使用的普通含义给出,即特征在于通过共价键连接的一个或多个重复单位(单体)的分子结构。重复单位可以都是相同的,或

在一些情况下，在聚合物内可以存在超过一种类型的重复单位。术语聚合物预期涵盖任何类型的聚合物，包括均聚物、共聚物（例如随机共聚物、嵌段共聚物、接枝共聚物等），及其掺和物、组合和混合物。聚合物可以是线性、分支、星状的等。

[0032] 如本文使用的，术语“区域”指在材料表面上的限定区域。区域可以通过在具有不同组成的两种材料之间的独特界面鉴定且受其约束。

[0033] 如本文使用的“特异性结合对”指显示出与彼此的特异性结合，或相对于其他分子与彼此增加的结合的两个分子。特异性结合对可以显示出功能结合活性，例如受体和配体（例如药物、蛋白质或碳水化合物）、抗体和抗原等；或结构结合活性，例如蛋白质/肽和蛋白质/肽；蛋白质/肽和核酸；以及核苷酸和核苷酸等。一般地，结合对的一个成员可以充当本文描述的装置中的捕获试剂，并且捕获试剂可以与所述结合对的第二个成员结合，其可以作为样品例如生物学液体中的分析物存在。如上所述，如本文使用的“分析物”可以是特异性结合对的任何第二个成员。一般地，分析物是样品例如生物学液体的组成成分，或在样品例如生物学液体中发现。分析物可以是如上所述的生物标记。

[0034] 如本文使用的，术语“受试者”和“患者”可互换使用且指人和非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，包括但不限于非人灵长类、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。在特定实施方案中，受试者是人患者。

[0035] 以一般含义，公开内容涉及这样的装置，其包括包含表面的基底；在表面上的防污聚合物层；在聚合物层上的至少一个捕获区，包含至少一种捕获试剂；和在聚合物层上的至少一个不稳定区，包含至少一种检测试剂和赋形剂；其中所述捕获区和不稳定区是空间分离的。公开内容还提供了包含装置的方法、测定和试剂盒。防污聚合物层可以提供在样品组分和基底和/或聚合物层之间的非特异性结合的减少。在聚合物层上的不稳定区可以通过减少涉及一般测定的必需步骤而允许简化的方法和测定，例如仅仅使装置的表面与样品接触且随后检测来自捕获区的任何信号，同时仍提供高度灵敏的检测限值。装置和相关方法高度适合于许多背景，包括研究和临床实验室以及大规模即时（point-of-care）测定。

[0036] 基底

多种不同类型的基底可以依照公开内容使用。

[0037] 在实施方案中，基底包含允许应用聚合物层的表面。在一些实施方案中，基底是无标记的光学或质量检测器（例如表面等离振子共振检测器、光波导器、椭圆对称检测器等），并且基底的表面是传感表面（例如将与生物学液体接触的表面部分）。此类装置的例子包括但不限于美国专利号 6,579,721；6,573,107；6,570,657；6,423,055；5,991,048；5,822,073；5,815,278；5,625,455；5,485,277；5,415,842；4,844,613；和 4,822,135 中所述的那些。

[0038] 在其他实施方案中，基底是生物传感器、测定板等。例如，基底可以是光学生物传感器，例如美国专利号 5,313,264、5,846,842、5,496,701 等中所述的那些。基底还可以是电势测定或电化学生物传感器，例如美国专利号 5,413,690 或 PCT 申请 WO98/35232 中所述的。基底可以是金刚石膜生物传感器，例如美国专利号 5,777,372 中所述的。相应地，基底可以是有机或无机的；可以是金属（例如铜或银）或非金属；可以是聚合物或非聚合物；可以是传导、半传导或不传导的（绝缘的）；可以是反射或非反射的；可以是多孔或非多孔的；等。例如，基底可以包含聚乙烯、聚四氟乙烯、聚苯乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚碳酸酯、

金、硅、氧化硅、氮氧化硅、铟、氧化钽、氧化铌、钛、氧化钛、铂、铱、氧化铟锡、金刚石或金刚石样膜等。

[0039] 基底可以是适合于“基于芯片”和“基于针”的组合化学技术的基底。全部可以依照已知技术进行制备。参见例如，美国专利号 5,445,934、5,288,514 和 5,624,711。

[0040] 如上所述的基底可以由任何合适材料形成，包括但不限于选自下述的材料：金属、金属氧化物、合金、半导体、聚合物（例如以任何合适形式的有机聚合物包括纺织的、非纺织的、塑模的、挤出的、浇铸的等）、硅、氧化硅、陶瓷、玻璃及其复合物。

[0041] 如本文描述的用于形成基底的聚合物可以是任何合适的聚合物，包括但不限于：聚（乙烯）(PE)、聚（丙烯）(PP)、聚（丁二烯）(PB) 的顺和反异构体、聚（异戊二烯）的顺和反异构体、聚（对苯二甲酸乙二醇酯）(PET)、聚苯乙烯 (PS)、聚碳酸酯 (PC)、聚(ϵ -己内酯) (PECL 或 PCL)、聚（甲基丙烯酸甲酯）(PMMA) 及其同系聚合物、聚（丙烯酸甲酯）及其同系聚合物、聚（乳酸）(PLA)、聚（乙醇酸）、聚原酸酯、聚（酸酐）、尼龙、聚酰亚胺、聚二甲基硅氧烷 (PDMS)、聚丁二烯 (PB)、聚乙烯醇 (PVA)、聚丙烯酰胺及其同系聚合物例如聚(N-异丙基丙烯酰胺)、氟化聚丙烯酸酯 (PFOA)、聚（乙烯-丁烯）(PEB)、聚（苯乙烯-丙烯腈）(SAN)、聚四氟乙烯 (PTFE) 及其衍生物、聚烯烃塑性体、及其组合和共聚物等。

[0042] 基底可以任选具有在基底表面上形成的另外层例如金或氧化层，例如以促进聚合物层或连接层的沉积，如下文进一步讨论的。

[0043] 连接层

取决于基底和聚合物的选择，连接层可以任选包括在基底和聚合物层之间。例如，连接层可以由化合物形成，所述化合物包含与引发剂偶联（例如共价偶联）的锚定基团 (anchor group)（例如直接偶联或通过中间连接基团偶联）。锚定基团的选择将取决于在其上形成连接层的基底，并且引发剂的选择将取决于用于形成如下文更详细地讨论的防污聚合物的具体反应。

[0044] 锚定基团 (anchoring group) 可以使化合物或连接层与基底的表面共价或非共价偶联。非共价偶联可以是通过任何合适的次级相互作用，包括但不限于疏水作用、氢键合、范德华力、离子键、金属-配体相互作用等。

[0045] 基底材料和相应锚定基团的例子包括例如金、银、铜、镉、锌、钯、铂、汞、铅、铁、铬、锰、钨及其与含硫官能团的任何合金，所述含硫官能团例如硫醇、硫化物、二硫化物（例如-SR 或 -SSR，其中 R 是 H、烷基例如低级烷基或芳基）等；具有硅烷和氯硅烷的掺杂或无掺杂的硅（例如-SiR₂Cl，其中 R 是 H、烷基例如低级烷基或芳基）；具有羧酸作为锚定基团的金属氧化物，例如二氧化硅、氧化铝、石英、玻璃等；具有亚硝酸盐和异氰化物的铂和钯；和具有羟肟酸的铜。适合作为锚定基团的另外的合适官能团包括二苯甲酮、酰基氯、酸酐、环氧化物、磺酰基、磷酰基、羟基、膦酸酯、膦酸、氨基酸基团、酰胺等。参见例如，美国专利号 6,413,587。

[0046] 任何合适的引发剂可以通过在对于引发剂的活性并不关键的位置上引入共价键而掺入锚定基团内。此类引发剂的例子包括但不限于溴代异丁酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯-C1、聚苯乙烯-C1、AIBN、2-溴代异丁酸酯、氯苯、六溴甲基苯、六氯甲基苯、二溴二甲苯、溴丙酸甲酯 (methyl bromopropionate)。引发剂的另外例子包括美国专利号 6,413,587 中所述的那些引发剂（例如在其第 10-11 栏）和美国专利号 6,541,580 中所述的那些引发

剂。

[0047] 如上所述,连接基团或“间隔物”可以插入锚定基团和引发剂之间。接头可以是极性、非极性、带正电、带负电或不带电的,并且可以是例如饱和或不饱和、线性或分支的亚烷基、杂亚烷基、亚芳烷基、烷亚芳基或其他亚烃基(hydrocarbylene),例如卤化亚烃基,特别是氟化亚烃基。合适的接头是3 - 20个碳原子的饱和亚烷基基团,即 $-(\text{CH}_2)_n-$,其中n是包括3 - 20在内的整数。参见例如,美国专利号6,413,587。接头的另一个合适实施方案是3 - 20个单位的多缩乙二醇,即 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$,其中n是包括3 - 20在内的整数。

[0048] 锚定层可以通过任何合适技术沉积。它可以作为自装配的单层沉积。它可以通过经由化学反应(参见例如,美国专利号6,444,254)或经由反应性等离子体蚀刻或电晕放电处理修饰基底而产生。它可以通过等离子体沉积过程进行沉积。它可以通过旋转涂布或浸涂进行沉积。它可以通过喷漆进行沉积。它还可以通过沉积、印刷、压印等进行沉积。它可以作为连续层或不连续(例如模式化)层进行沉积。

[0049] 在一些实施方案中,基底可以是通常用于微阵列生产的玻璃、氧化硅或其他无机或半导体材料(例如氧化硅、氮化硅)或化合物半导体(例如砷化镓和砷化铟镓)。在一些实施方案中,基底可以是微量滴定(微孔)板。

[0050] 在一些实施方案中,锚定基团可以是硅烷或氯硅烷(例如,-SiR₂Cl,其中R是H、烷基例如低级烷基或芳基)。

[0051] 在一些实施方案中,连接层在两个分开步骤中在基底上形成。例如,在第一个步骤中,烷基硅烷或烷硫醇的锚定层可以沉积到表面上例如二氧化硅或玻璃或金,并且呈现末端反应性官能团(例如胺)。随后,包含第一官能团的双功能分子可以与第一个步骤中沉积的第一连接层反应,所述第一官能团针对由第一连接层呈现的末端基团反应。双功能分子的第二官能团含有部分基团,所述部分基团充当用于聚合物层聚合的引发剂例如ATRP引发剂。

[0052] 聚合物层

本文描述的装置的聚合物层显示出防污性质。如本文就聚合物层而言使用的,防污涉及生物体的生长抑制(例如减少或预防),以及在聚合物和生物体或生物分子(例如细胞、蛋白质、核苷酸等)之间的非特异性或偶然结合相互作用。聚合物的防污性质可以通过任何合适方法引入,例如防污(或可替代地,抗污)剂的掺入或通过聚合物自身的结构/体系结构。防污剂是本领域已知的,并且可以通过技术人员根据装置的具体用途或防污剂的可用性进行选择。非限制性例子包括具有杀生物活性的有机和无机化合物,以及可以与聚合物层一起掺入或与聚合物层结合的化合物,在接触后所述聚合物层减少或抑制生物分子(例如细胞、蛋白质、核苷酸、碳水化合物/脂质等)与聚合物的非特异性结合相互作用。

[0053] 一些实施方案提供了具有提供防污性质的结构或体系结构的聚合物层。在一些实施方案中,聚合物可以适当包括刷状聚合物,其一般而言通过具有一个或多个基团的单体核心基团的聚合形成,所述基团作用于抑制与之偶联的生物分子(例如细胞、蛋白质、核苷酸、碳水化合物/脂质等)的结合。适当地,单体核心基团可以与蛋白质抗性首基(head group)偶联。

[0054] 聚合物层可以使用游离基聚合技术适当地形成,例如催化链转移聚合、引发-转移-终止剂介导的聚合(例如光引发-转移-终止剂介导的聚合)、自由基聚合、稳定自由

基介导的聚合 (SFRP)、原子转移游离基聚合 (ATRP)、和可逆的添加 - 片段化链转移 (RAFT) 聚合。

[0055] 例如, 单体形成刷状聚合物的自由基聚合可以依照已知技术进行, 例如美国专利号 6, 423, 465、6, 413, 587 和 6, 649, 138, 美国专利申请号 2003/0108879 中所述的, 及其对于本领域技术人员显而易见的变化。

[0056] 单体形成刷状聚合物的原子转移游离基聚合也可以依照已知技术进行, 例如美国专利号 6, 541, 580 和 6, 512, 060, 美国专利申请号 2003/0185741 中所述的, 及其对于本领域技术人员显而易见的变化。

[0057] 可以使用可通过上文讨论的过程聚合的任何合适的核心乙烯基单体, 包括但不限于苯乙烯、丙烯腈、乙酸酯、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、乙烯醇、乙烯酸及其组合。

[0058] 在一些实施方案中, 聚合物层通过寡聚 (乙二醇) 甲基丙烯酸甲酯 (OEGMA) 的表面引发的 ATRP (SI-ATRP) 以形成聚 (OEGMA) (POEGMA) 膜而形成。在一个实施方案中, 聚合物层是通过甲基丙烯酸酯和甲氧基封端的 OEGMA 的共聚作用制备的官能化的 POEGMA 膜。适当地, POEGMA 聚合物可以在单个步骤中形成。

[0059] 一般而言, 通过本文描述的过程 (或本领域已知的或对于本领域技术人员显而易见的其他过程) 形成的刷状分子可以是长度为 2 或 5 直到 100 或 200 纳米, 或更长, 并且可以以 10、20 或 40 至直到 100、200 或 500 毫克 / 米或更高的密度沉积到表面部分上。

[0060] 蛋白质抗性基团可以是亲水首基或 kosmotropes。例子包括但不限于寡糖、三 (丙基亚砜)、羟基、甘油、磷酰胆碱、三 (肌氨酸) (Sarc)、N- 乙酰哌嗪、甜菜碱、羧基甜菜碱、磺基甜菜碱、全甲基化山梨糖醇、六甲基磷酸酰胺、分子内两性离子 (例如, $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$) (ZW)、和甘露醇。

[0061] kosmotrope 蛋白质抗性首基的另外例子包括但不限于 :

- $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{OH}$;
- O (甘露醇) ;
- $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2(\text{CH}(\text{OCH}_3))_4\text{CH}_2\text{OCH}_3$;
- $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^- / \text{Na}^+$ (1:1) ;
- $\text{N}(\text{CH}_3)_2^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$;
- $\text{C}(\text{O})\text{Pip}(\text{NAc})$ (Pip = 哌嗪基)
- $\text{N}(\text{CH}_3)_2^+\text{CH}_2\text{CO}_2^-$;
- $\text{O}([\text{Glc}-\alpha(1,4)-\text{Glc}-\beta(1)]^-)$;
- $\text{C}(\text{O})(\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{C}(\text{O}))_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$;
- $\text{N}(\text{CH}_3)_2^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$;
- $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{P}(\text{O})(\text{N}(\text{CH}_3)_2)_2^-$; 和
- $(\text{S}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{S}(\text{O})\text{CH}_3$ 。

[0062] 参见例如, Kane 等人, Langmuir 19, 2388-91 (2003) (例如表 1)。

[0063] 在一些实施方案中, 合适的蛋白质抗性首基包含聚 (乙二醇) (PEG), 例如 3 - 20 个单体单位的 PEG。

[0064] 在进一步的组分沉积到聚合物层上之前, 具有任选连接层和聚合物层的基底可以

是干燥的或至少肉眼可见干燥的（即，对于触摸干燥的或对于目视检查干燥的，但在聚合物层中保留结合水或水合水）。例如，为了增强捕获试剂的固定，聚合物层可以适当地保留结合水或水合水，但不含大量表面水。如果具有连接层和聚合物层的基底已以烘干形式贮存，那么结合水或水合水可以通过使聚合物层快速暴露于水（例如通过浸入水中）和后续吹干表面（例如用氮或氩喷嘴）再引入。可替代地，结合水或水合水可以通过使聚合物层暴露于环境空气对于大气水与聚合物层结合足够的时间再引入。

[0065] 捕获区

该装置包括包含至少一种捕获试剂的至少一个捕获区，所述捕获试剂可以与聚合物层非共价结合。捕获区的数目可以广泛不同并且可以取决于几种因素，包括基底的大小和形状、装置的预期用途（例如即时诊断、实验对象组阵列（例如，用于筛选 DNA、MMChips（微小 RNAs）、蛋白质、组织、细胞、化学化合物、抗体、碳水化合物等的微阵列）等。捕获区包含的捕获试剂一般是特异性结合对的一个成员。合适的捕获试剂的例子包括但不限于抗原、抗体、肽、蛋白质、核酸、核酸或肽适配体、配体、受体等。实施方案涉及包含多个捕获区的装置，例如诊断实验对象组阵列，所述捕获区包含多种不同的捕获试剂。

[0066] 在实施方案中，捕获试剂可以包含与任何感兴趣的疾病、病症或生物学状态相关的生物标记。相应地，捕获试剂的选择可以通过本文描述的装置和方法的预期用途或应用驱动，并且可以包括已知与任何感兴趣的疾病、病症或生物学状态相关的任何分子，或怀疑与任何感兴趣的疾病、病症或生物学状态相关的任何分子。因此，捕获试剂的选择在本领域技术人员基于本领域可获得的知识的能力之内。

[0067] 在一些实施方案中，捕获试剂可以包含与任何感兴趣的微生物感染相关的生物标记，其例子包括但不限于：炭疽、禽流感、肉毒中毒、水牛痘 (Buffalopox)、基孔肯雅热 (Chikungunya)、霍乱、球孢子菌病、克雅氏病、克里米亚 - 刚果出血热、登革热、登革出血热、白喉、Ebola 出血热、肠出血性大肠杆菌 (Ehec) (大肠杆菌 (E. Coli) 0157)、脑炎、圣路易 (Saint-Louis)、肠出血性大肠埃希杆菌感染肠道病毒 (Enterohaemorrhagic escherichia coli infection Enterovirus)、经食物传播的疾病、肾综合征出血热、汉坦病毒肺综合征、肝炎、人免疫缺陷病毒 (HIV)、流感、日本脑炎、拉沙热、军团杆菌病、利什曼病、钩端螺旋体病、李斯特菌病、虱传播的斑疹伤寒、疟疾、马尔堡出血热、麻疹、脑膜炎球菌病、猴痘、心肌炎尼帕病毒、奥绒热 (O' Nyong-Nyong fever)、百日咳、瘟疫、脊髓灰质炎、狂犬病、回归热、裂谷热、严重急性呼吸器官综合征 (SARS)、志贺氏菌病、天花疫苗意外暴露、葡萄球菌食物中毒、梅毒、兔热病、伤寒症、西尼罗河病毒、黄热病等。

[0068] 捕获试剂可以通过任何合适的技术沉积到聚合物层上，所述技术例如缩微印刷或微印记，包括压电或其他形式的非接触性印刷和直接接触性羽毛笔印刷。当捕获试剂印刷到聚合物层上时，它可以适当地吸附到聚合物层内，从而使得当装置暴露于液体例如生物学液体时，它保持结合。刷状聚合物还可以提供保护性环境，从而使得当装置贮存时，捕获试剂保持稳定。例如，在其中捕获试剂是肽或蛋白质例如抗原蛋白质或抗体的实施方案中，刷状聚合物层可以保护捕获试剂免于降解，允许装置贮存于环境条件下。

[0069] 当通过多种捕获试剂沉积到聚合物层上的不连续位置形成阵列时，可以制备 1、3、5、10、100 或直到 1000 个探针位置 /cm² 的探针密度。现代非接触性阵列仪 (arrayers) 可以用于沉积步骤中，以产生具有最多至 1,000,000 个探针位置 /cm² 的阵列。例如，使用浸

蘸笔纳米平板印刷术,可以制备具有最多至 10 亿不连续的探针位置 /cm² 的阵列。应当理解的是,如本文描述,取决于具体应用,在每个捕获斑点上的具体分子种类可以是不同的,或一些可以是相同的(例如以提供一些冗余或对照)。

[0070] 捕获试剂可以印刷到聚合物层上以形成捕获区。一个或多个捕获区可以以任何特定方式排列,并且可以包含任何所需形状或模式,例如斑点(例如具有任何一般的几何形状)、线或其他合适模式,所述形状或模式允许鉴定在聚合物和基底表面上的捕获区。在实施方案中,多种捕获试剂可以以预定模式排列,从而使得捕获试剂的身份与基底上的特定位置相关。

[0071] 不稳定区

该装置另外包括包含至少一种检测试剂和赋形剂的至少一个不稳定区。在一些实施方案中,在与液体例如生物学液体、缓冲液或含水溶剂接触后,捕获试剂可以保持与聚合物层(例如聚合物刷)非共价结合,而不稳定区中存在的赋形剂可以吸附到聚合物刷内且阻断检测试剂的吸附。相应地,当暴露于含水液体例如包含生物学液体的样品时,检测试剂可以溶解且释放到液体中,并且可以与感兴趣的分析物结合。赋形剂也可以在贮存过程中进一步稳定检测试剂。

[0072] 在一些实施方案中,检测试剂可以包含能够与特异性结合对的第二个成员结合的化合物。当溶解且释放到样品(例如生物学液体)内时,如果特异性结合对的第二个成员存在于液体中,那么它可以与检测试剂结合。然后所述第二个成员可以与装置的捕获区中的捕获试剂结合。可替代地,当已与捕获试剂结合时,检测试剂可以遇到特异性结合对的第二个成员。例如,如果捕获试剂是抗原蛋白质,并且分析物是可以特异性结合抗原蛋白质的患者生成的抗体时,检测试剂可以包含抗人抗体。

[0073] 在一些实施方案中,不稳定区可以包含两种不同试剂以形成“夹心”型测定。在此类实施方案中,第一种试剂可以与分析物结合,而其他试剂与第一种试剂结合,以形成随后可以与捕获试剂结合的“夹心”。例如,检测试剂可以包含生物素,其可以结合用检测部分官能化的亲和素或链霉亲和素。

[0074] 检测试剂进一步包含可检测部分,所述可检测部分直接或间接提供可检测信号。示例性检测部分包括但不限于荧光团、生色团、放射性标记、多核苷酸、小分子、酶、纳米颗粒和向上转化剂(upconverter)。在一些实施方案中,检测部分可以是荧光团例如花青(例如 CyDyes,例如 Cy3 或 Cy5)、荧光素、罗丹明、香豆素、荧光蛋白质或其功能片段,或它可以包含小分子例如生物素,或它可以包含金、银或胶乳颗粒。

[0075] 在一些实施方案中,赋形剂是分子或分子的组合,所述分子选择的方式使得允许在检测试剂和聚合物之间存在稳定但不持久的结合。在实施方案中,赋形剂可以是在含水溶液(例如缓冲液、水、样品、生物学液体等)中部分可溶、基本上可溶或可溶的。在此类实施方案中,赋形剂的非限制性例子可以选自盐、碳水化合物(例如糖,例如葡萄糖、岩藻糖、果糖、麦芽糖和海藻糖)、多元醇(例如甘露醇、甘油、乙二醇)、乳化剂、水溶性聚合物及其组合。此类赋形剂是本领域众所周知的,并且可以基于在赋形剂和检测试剂之间的相互作用、赋形剂和聚合物之间的相互作用、赋形剂在特定介质中的可溶性、和此类因素的任何组合进行选择。在一些实施方案中,赋形剂包含 PEG。

[0076] 检测试剂和赋形剂可以通过任何合适技术沉积到聚合物层上,所述技术例如缩微

印刷或微印记，包括压电或其他形式的非接触性印刷和直接接触性羽毛笔印刷。检测试剂和赋形剂的混合物可以同时沉积，或赋形剂可以在检测试剂之前沉积。

[0077] 当通过多种检测试剂沉积到聚合物层上的不连续位置形成阵列时，可以制备 1、3、5、10、100 或直到 1000 个探针位置 /cm² 的探针密度。现代非接触性阵列仪可以用于沉积步骤中，以产生具有最多至 1,000,000 个探针位置 /cm² 的阵列。例如，使用浸蘸笔纳米平板印刷术，可以制备具有最多至 10 亿不连续的探针位置 /cm² 的阵列。应当理解的是，取决于具体应用，在每个捕获点上的具体分子种类可以是不同的，或一些可以是相同的（例如以提供一些冗余或对照）。

[0078] 其他元件

在一些实施方案中，该装置可以进一步包含试剂以区分聚合物层上的模式化区域，从而使得液体（例如生物学液体）将保持局限于聚合物层上的指定区域，从而使得它接触捕获区和不稳定区。此类试剂可以是例如在捕获试剂和不稳定区的组分的沉积之前，在聚合物层上印刷的疏水墨。可替代地，试剂可以是蜡。在其他实施方案中，可以通过选择用于基底的合适几何学和 / 或体系结构，例如允许样品分散至包含捕获试剂和不稳定斑点的组分的区域的几何学，而在装置上包含或定向样品。在一些实施方案中，基底可以包含孔、或一系列互联孔。

[0079] 在一些实施方案中，例如当生物学液体是血样时，不稳定区可以包含抗凝剂以预防血液凝固。示例性抗凝剂包括但不限于维生素 K 拮抗剂例如香豆素、肝素和低分子量肝素。

[0080] 在一些实施方案中，该装置可以进一步包含用对照试剂印刷的区域。例如，当检测试剂包含抗人抗体时，可以沿着捕获区印刷人 IgG 的对照捕获区，以验证抗人检测抗体的活性并且使来自检测部分的信号例如荧光强度均一化。

[0081] 装置贮存

在捕获试剂、检测试剂、赋形剂及其他任选组分沉积后，如上所述，例如通过轻柔干燥、吹干、冻干或在环境温度暴露于环境空气而任选地干燥该装置，持续对于物品干燥或至少肉眼可见干燥所需的足够时间。一旦装置是干燥或至少肉眼可见干燥的，它就可以密封在容器（例如不透性或半透性聚合物容器）中，它可以贮存于其中并运送至用户。一旦密封在容器中，在一些实施方案中，当贮存于 25℃ 的温度时，装置就可以具有至少 2 – 4 个月，或直到 6 个月或更多的贮存期限（例如没有超过 20、30 或 50 百分比的结合活性的丧失）。

[0082] 检测

在本文描述的装置暴露于生物学样品（例如生物学液体）后，可以使用本领域已知的任何合适方法检测来自检测试剂的信号。示例性方法包括但不限于目视检测、荧光检测（例如荧光显微镜检测）、闪烁计数、表面等离振子共振、椭圆对称法、原子力显微镜检测、表面声波装置检测、放射自显影术和化学发光。如本领域技术人员应当理解的，检测方法的选择取决于采用的具体检测试剂。

[0083] 试剂盒

在一些实施方案中，公开内容还提供了用于在本文描述的方法中使用的试剂盒。试剂盒可以包括如本文描述的装置，和任选的另外组分例如缓冲液、试剂和关于实施本文描述的方法的说明书。缓冲液和试剂的选择取决于具体应用，例如测定的背景（即时、研究、临

床)、待测定的一种或多种分析物、使用的检测部分等。例如,如果捕获试剂是多核苷酸并且感兴趣的分析物是互补多核苷酸,那么试剂盒可以包括加入生物学液体的样品中的裂解缓冲液,以便从样品制备可用于结合的多核苷酸。

[0084] 试剂盒还可以包括信息材料,其可以是描述、指导、销售的或涉及本文描述的方法和 / 或用于本文描述的方法的装置用途的其他材料。在实施方案中,信息材料可以包括关于装置产生、装置的物理性质、有效期、分批或生产场所信息等等的信息。

[0085] 示例性测定设计

下述段落更详细地描述了公开内容的一个非限制性实施方案。

[0086] 在一些实施方案中,公开内容提供了允许小型化、多路测定的一次性芯片,其可以对于一种或多种感兴趣的 IDs 测试生物学液体。在一些实施方案中,测定可以在一个步骤中进行。在特定实施方案中,测定可以无需预处理或微流体而进行。除了用于结合感兴趣的生物标记的稳定捕获斑点外,装置还包括不稳定微斑点 (microspots),其允许次级检测试剂沿着捕获试剂印刷。在与一滴生物学液体接触后,在不稳定斑点中的这些次级试剂可以溶解到溶液内且标记样品中存在的目标。

[0087] 在这种技术的一个实施方案中,且如图 1 中所示,根据公开内容的测定包含一次性芯片,由一次性芯片组成,或基本上由一次性芯片组成,所述一次性芯片已涂有 POEGMA,且随后用疏水墨印刷,所述疏水墨区分 POEGMA 的模式化区域。用于在玻璃基底上合成 POEGMA 刷的程序概括于图 2 中。模式区含有个别捕获试剂的斑点。POEGMA 刷的亲水性质允许一滴血液扩散跨越整个 POEGMA 表面,而疏水墨产生可以使血滴局限于分析区的“栅栏”。POEGMA 的模式化区域还含有“不稳定斑点”,其包括荧光标记的检测抗体,和可溶性聚乙二醇。

[0088] 在一些实施方案中,捕获斑点中的捕获试剂可以是诊断感兴趣的 ID 的抗原。当来自患者的液体(例如血液)样品应用于芯片时,样品中的患者生成的抗体可以与抗原结合。在此类实施方案中,不稳定斑点可以包括荧光标记的抗人抗体,其可以与固定的患者生成的抗体结合。测定的此类实施方案在图 3 中举例说明。

[0089] 在其他实施方案中,捕获斑点中的捕获试剂可以是针对诊断感兴趣的 ID 的抗原的抗体。当来自患者的液体(例如血液)样品应用于芯片时,样品中的患者生成的抗原可以与抗体结合。在此类实施方案中,不稳定斑点可以包括对于相同抗原上的不同表位特异性的荧光标记的抗体,其可以与固定的患者生成的抗原结合。测定的此类实施方案在图 4 中举例说明。

[0090] 在特定实施方案中,将待用作捕获试剂的抗原蛋白质或抗体作为每种抗原的一行个别斑点点在 POEGMA 表面上,以便提供独立重复且从而改善测定的稳定性。例如,含有不同捕获抗体密度的微斑点的微阵列可以允许范围宽得多的分析物浓度落在给定检测器的动态范围内,并且从而可以消除通常运行单个样品的测试的稀释系列。低分析物浓度可以在高捕获抗体密度的区域中检测,而高分析物浓度可以在低捕获抗体密度的区域中检测。

[0091] 如图 5 中所述,阵列可以以确保检测抗体斑点在与血样接触后溶解的方式格式化。在该图中,十二个分开的捕获区作为斑点印刷,具有各自含三种不同的捕获试剂的四组斑点。在捕获斑点周围印刷包括 Cy5 标记的抗人抗体作为检测试剂的不稳定区。

[0092] 可溶性 PEG 也包括在不稳定斑点中。可溶性 PEG 可以优先吸附到 POEGMA 刷内,并

且阻断检测抗体吸附到刷内。相应地,尽管由于压电喷墨印刷和肉眼可见的干燥过程局限于斑点中,但检测抗体事实上是“不稳定”状态,因为在与含水溶液接触后,它们可以容易地溶解且释放到血滴内。过量可溶性 PEG 的添加还可以在贮存过程中稳定荧光标记的检测抗体,并且当测试血滴引入时,可以充当帮助再溶解检测抗体的赋形剂。

[0093] 在与一滴血液接触后,标记的检测抗体将溶解到溶液内。在一些实施方案中,检测抗体可以是抗人抗体,其可以与血样中存在的所有人抗体结合且从而标记所述人抗体。同时,血液中存在的分析物(如果存在的话)(即患者生成的针对抗原的抗体)可以与稳定印刷的抗原斑点结合。在其他实施方案中,检测抗体可以是对于感兴趣的抗原的特异性抗体。在与血样接触后,如果抗原存在于样品中,那么检测抗体可以与抗原结合,其依次又可以与捕获试剂抗体结合。

[0094] 作为阳性对照,人 IgG 的斑点可以沿着抗原斑点印刷。这些对照的作用是验证抗人检测抗体的活性,并且还可以用于跨越测定使荧光强度归一化,以减少测定间变异性。

[0095] 为了预防血液凝固,酶肝素也可以印刷到不稳定斑点中的 POEGMA 刷上。肝素可以在印刷前与 PEG 混合,或可以在分开步骤中自身印刷。

[0096] 在一个实施方案中,且如下文在图 6 中所示,可以对患者实施手指针刺,并且将所得到的血滴应用于芯片表面。印刷到芯片表面上的疏水墨引起血滴仅扩展跨越一个或多个目标检测区,其中它溶解为在检测区内印刷的可溶性检测试剂和肝素(以预防血液的凝固)。

[0097] 当溶解的、荧光标记的检测抗体通过血滴由其印刷斑点溶解时,必须发生三个系列事件以生成阳性信号。这些事件包括下述:(1) 血液中存在的分析物与个别捕获试剂的固定且无荧光的斑点的结合产生夹心的前半部分;(2) 血液侧面扩散通过聚合物刷导致可溶性检测抗体从其印刷斑点的移动;(3) 在进入捕获试剂和分析物的复合物(夹心的前半部分)后,荧光标记的检测抗体与其各自的分析物-捕获试剂斑点结合,完成夹心且导致在其中未标记试剂已印刷的位置上的荧光斑点的形成。

[0098] 在这个实施方案中,测定基于支持数据:通过含有分析物的溶液的扩散,作为“不稳定斑点”印刷的荧光标记的检测抗体通过血流携带至印刷并稳定固定的捕获试剂的相邻行。因此,显现来自用不同捕获试剂印刷的斑点的荧光的出现提供了不同分析物(阳性)的明确鉴定。与通过使用掺料到全血内的分析物的稀释系列预校正装置的常规荧光免疫测定相同地进行不同分析物的浓度的定量。

[0099] 根据这个实施方案的测定解决了如下 POC 测试中的每个关键需要:(1) 通过小型化、多路化、一步、现场处理,并且通过无需预处理或微流体的情况下在得自手指针刺的未稀释全血中直接测试而减少 ID 测试的成本;(2) 为了简化 ID 筛选过程,在二维中的扩散使空间定位的试剂结合在一起,以产生功能测定,并且从而消除了关于液体转移步骤、样品或试剂的微流体操作和洗涤步骤的需要;(3) 这个多路平台能够在无需样品预处理的情况下用单滴血液筛选 ID 标记的实验对象组;(4) 测定将是快速的,其减轻通常与通讯 ID 测试结果相关的困难;和(5) 所公开设计的实际检测方案是夹心型荧光免疫测定,其提供目前在本领域中可获得的最高灵敏度。

[0100] ID 筛选中的这个量级的改善具有显著影响整个人群的健康的潜力。为了控制传染病,过程的一个部分是定期筛选,以鉴定通过空气、食物、水或物理接触传播的多种病原体,

并且认为开发所提议的筛选平台使得定期和广泛的 ID 筛选对于大得多百分比的人群更可接近。最后,高度适应并且模块化的设计在用作用于许多其他需要领域的诊断中同样是有用的,包括在临床试验中的生物标记监测、大范围流行筛选、生物防御和新发现的生物标记的大规模验证。

[0101] ID 筛选的方法

下述节段描述了目前的 ID 筛选方法的几个障碍,以及各自如何通过例如上文描述的实施方案来解决。

[0102] 成本

用于单个传染病标记的最准确的基于免疫测定的测试被称为酶联免疫吸附测定(ELISA),其每个测试的标记花费约 \$16 美元并且要求平均 6 小时的技术人员时间。使得多路成为可能的近期的改善目前能够以约 \$14 美元的成本测试四种传染剂的一个阵列,并且要求平均约 4.5 小时的技术人员时间。然而,这些测试要求使用约 \$110,000 – \$160,000 美元价值的实验室设备。此外,每个测试要求使用约 200 μ L 血清或血浆,其必须从通过静脉抽血得自患者的全血样品分离。这种抽血一般在即时获得,且随后必须转运至中央实验室用于实际测试。

[0103] 通过使样品收集、处理和测试的关键方面流线化,根据本实施方案所述的装置如下显著减少了成本:(1) 通过直接测试得自手指针刺的未稀释全血而消除了所有预处理;(2) 测试小型化,以减少作为捕获试剂和检测抗体点上的试剂 - 蛋白质抗原的量;和(3) 一步、现场处理。此外,测试可以是多路的并且能够靶向 IDs 实验对象组,同时使成本不显著增加超过单个 ID 测试的成本。可以无需使用样品预处理或使用微流体来使细胞与分析物溶液分离而实现这一点,这是由于独特的蛋白质和细胞抗性聚合物刷允许用飞摩尔的检测限值从全血进行荧光免疫测定,这在本文进一步详细描述。

[0104] 提供多路测试的实施方案产生进一步的优点。许多已集中于受到最大媒体关注的 IDs,例如 HIV,导致通常缺乏对于需要测试其他 IDs 的一般群体的期望或紧迫性。关于这个问题的合适解决方案是每当要求单个 ID 测试时,提供用于整个 IDs 实验对象组的测试,这可以仅导致相对于针对单个 ID 的测试成本的增加。本文描述的装置的小型化帮助遏制成本,因为印刷到本文描述的装置上的捕获试剂和检测抗体具有趋于零的小的皮升数量。当要求对于受指责(stigmatized) 疾病例如 HIV 的特异性测试时,多路还可以帮助一些人经历的不适,因为 HIV 是在芯片上存在的几种 IDs 之一。具有覆盖许多 IDs 包括食物和空气传播的 IDs 的多路测试,允许个体对于要求测试感觉更少忧虑。此外,经改造的功能表面(由发明人开发)的新应用允许装置的小型化,以减少所需的捕获试剂的量,并且有效消除标准实验室 ID 筛选测试的最显著成本之一,例如基于板的 ELISAs。此外,通过采用近期开发的喷墨印迹技术,可以以大约数美分(several cents)/芯片的成本制造一次性、多路传感器芯片。

[0105] 减少测定成本的实施方案提供几个优点,例如以更少钱测试更多人的能力。但是通过减少对于高度发达的卫生保健基础设施的所需依赖达到的降低成本也是重要的。例如,在发展中国家中的旅行诊所具有有限的时间和人员,并且具有单步骤、现场处理的多路测试显著增加患者的通量和检测的感染的数目。此外,产生小型化、多路测定消除了巨大量的材料并且显著减少运输和贮存的负担。特别地,本公开内容的蛋白质稳定性使得芯片

在环境温度中的运输和贮存成为可能,避免关于昂贵的气候控制贮存和转运的需要。

[0106] 测定简单性和读出时间

已经历 ID 测试的个人注意到导致作为不适的结果通知的焦虑的等待期(通常数天到数周)和回避未来测试的原因。如果要求第二次就诊以收到测试结果,那么超过 50% 的患者不返回。研究还已显示如果等待时间是 100 分钟,那么最高达 50% 的患者将在收到测试结果前离开,如果等待时间是 50 分钟,那么约 20% 的患者将离开。本公开内容的装置和方法通过在 5 分钟时期内实现结果而消除了这个问题。这帮助确保测试和结果都在单次就诊过程中提供,并且将消除患者提供用于结果通知的联系信息的需要(提供这个信息可以导致患者隐私忧虑,这是测试回避的另一个原因)。

[0107] 要求通过静脉穿刺抽取的全血样品的测试要求高度熟练工人的显著努力、时间和可用性。除了血样的实际抽取外,许多诊断还要求血液分离成细胞和血浆。这要求另外的设备和专业知识,增加了测定成本和读出时间,并且限制了提供即时诊断的能力。另外,静脉穿刺过程自身可以导致患者中的医学并发症,并且许多个体对于针和静脉穿刺感到的强烈厌恶。所有这些忧虑可以通过产生这样的测试得到减少,所述测试能够检测仅数微升血液中的 IDs 实验对象组,所述数微升血液可以经由手指针刺容易地获得。此外,通过产生具有检测数微升血液中的多重目标的能力的测试,对于新生儿测试的增加的接近是可能的,在所述新生儿中抽取更大数量的血液是成问题的,并且由于所需血液的数量,通常要求在血液抽取时进行输血。本文描述的装置和方法对于新生儿的 ID 筛选也具有造成显著影响的潜力,当母亲的医疗史是无法获得的(例如在战争、饥荒和斗争的情况下),或必须研究已知 ID 从母亲到新生儿的潜在传播时,这是通常需要的。

[0108] 最后,通过依赖扩散以使两组空间分离的试剂集合以生成信号,本文描述的装置和方法消除了对于洗涤或液体转移步骤的需要。这消除了对于昂贵或复杂微流体的需要,这从而减少芯片前成本 (pre-chip cost),并且当它们实际上用临床样品野外测试时,消除了对于大多数当代“芯片实验室”设计如此常见的失败主因。

[0109] 更高通量的 ID 测试可以通过减少所需材料(例如针和采血小瓶的消除,以及其适当处置的关注)来达到。此外,除了手指针刺采血针外,在本公开内容的装置和方法中产生的仅有一次性项目是小片玻璃或塑料,其充当测定的血液接触表面。数千个这些可以用一升漂白剂溶液消毒,并且可以将这些表面处置在常规垃圾中。此外,在低资源背景中的测试通常在隔离区域中发生。虽然将测试运送至这些区域增加了接近,但是任何类型的随访是不存在的或仅在长时间段后发生缺失经常的情况。此外,面对面通讯通常是唯一选择,因为其他方法例如邮件、电话或电子邮件是不能利用或不可靠的。由于这些原因,快速结果是必需的。如上所述,选项例如基于侧面流动条的测试可用于这些情况,但是它们的灵敏度是有限的并且关于这种形式的多路测试的潜力也是有限的。

[0110] 灵敏度

在一些实施方案中描述的装置提供在标准实验室测试例如基于板的 ELISA 测试中发现的灵敏度,具有廉价、手提式和快速结果侧面流动条测试的优点。这通过在装置的设计中利用新材料(本文进一步详细讨论的)来达到。通过使用廉价的表面包被层能够消除生物分子和细胞的非特异性吸附。因此,因为消除了在生物测定中由于蛋白质的偶然吸附引起的背景噪音的最大来源,本文描述的装置和方法提供了可以达到先前难以达到的灵敏度水

平的实施方案。

[0111] 一般地,最灵敏的测定要求技术高端和资本密集型健康护理基础设施的支持。在目前方法中,在即时获得的患者样品必须转运至维持进行实际测试所需的设备和人员的实验室。低资源背景只是缺乏对于此类设施的接近,这排除这些区域具有对于最灵敏诊断的接近。根据一些实施方案所述的装置提供了现场分析,其允许高度灵敏的诊断用于在其中健康护理基础设施较不发达的背景中。

[0112] 本领域技术人员容易理解上文公开的示例性实施方案将充分适合于进行所述目的且获得结果和优点,以及其中固有的那些。这个实施方案中描述的方法、程序、处理、分子和具体化合物仅仅代表更一般技术的一个考虑应用,并且不应视为限制于上文更一般地公开的方面和实施方案。

[0113] 下述非限制性实施例预期是纯粹举例说明的,并且显示依照公开内容进行的具体实验。

实施例

[0114] 实施例 1. 在玻璃载玻片上合成 POEGMA 刷

POEGMA 刷如下在玻璃上构造(图 2,所有化学制品都购自 Sigma):首先,将玻璃载玻片(VWR)在 3:1 H₂SO₄:H₂O₂ 的溶液中清洁 30 分钟。在用去离子 H₂O 清洗且干燥后,将清洁的载玻片浸入 10% 氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)的乙醇溶液中 30 分钟,并且随后用乙醇清洗且在 120°C 干燥 3 小时(步骤 1)。随后将载玻片浸入 1% 溴代异丁酰溴和 1% 三乙胺的二氯甲烷溶液中 30 分钟,用二氯甲烷和乙醇清洗,并且用 N₂ 吹干(步骤 2)。随后将载玻片在氩气下浸入 5 mg/mL Cu(I)Br、12 mg/mL 二吡啶和 300 mg/mL 寡聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯的脱气聚合作用溶液中 12 小时(步骤 3)。最后,将载玻片用去离子 H₂O 清洗且用 N₂ 吹干。

[0115] 实施例 2. POEGMA 刷的蛋白质抗性

通过纤连蛋白(Fn)、牛血清白蛋白(BSA)、溶菌酶(Ly)(所有蛋白质都以 1 mg/mL 的 PBS 溶液,pH = 7.4) 和未稀释的胎牛血清(FBS)的吸附,测试在硅片上生长的 POEGMA 刷的蛋白质抗性。通过椭圆对称法测量作为 POEGMA 膜厚度的函数的蛋白质层厚度,且显示于图 7 中。在阴性对照 - 具有固定的 ATRP 引发剂的表面 - 上的吸附蛋白质厚度取决于蛋白质而改变,并且对于其他蛋白质和 FBS 的范围为 ~10 Å(Ly) 至 ~25 Å。相比之下,薄 POEGMA 刷(~14 Å 厚度)显示所有蛋白质和血清的显著更少的蛋白质吸附。POEGMA 刷的厚度增加至 ~95 Å 或更大消除所有蛋白质的吸附和最显著地消除血清蛋白质的吸附至低于椭圆对称法的 1 Å 检测限值。

[0116] 实施例 3. 抗体微阵列的印刷

无接触 PerkinElmer Piezorray 用于在室温和一定湿度将 Ab 微阵列印刷到 POEGMA 基底上。关于 IL-6 和骨保护素(OPG)(R&D Systems)的抗体由 50 μg/mL 溶液印刷且允许非共价吸附到 100 nm 厚的聚合物刷内:(1) 在玻璃上,和(2) 在未修饰的硝酸纤维素基底(Whatman, 阳性对照)上通过 SI-ATRP 生长的 100 nm 厚的 POEGMA 刷。在印刷后,通过将印刷的载玻片置于真空下而促进斑点的干燥。

[0117] 首先使阵列与稀释系列的 100 mL 分析物掺料的(analyte-spiked)PBS 或血清一起伴随搅拌孵育 2 小时,随后与具有 1%(w/v)BSA 的 PBS 中的 100 ml 1 mg/ml 生物素化的

二抗孵育 1 小时。最后,通过在 100 mL 1 μ g/ml 链霉亲和素 -Cy5 中孵育 30 分钟使阵列显色,随后用 Axon Genepix 4200 荧光微阵列扫描仪扫描。在每个孵育步骤后,将阵列用 1% BSA (w/v) 和 0.1% (w/v) Tween-20 的 PBS 溶液 30 秒洗涤两次。

[0118] 显示于图 8A 中的关于点在玻璃上的 POEGMA 上的 IL-6 测定的微阵列斑点的荧光图像显示随着渐增的分析物浓度的荧光强度的增加。斑点甚至在 0.1 pg/mL (5 fM) 的 IL-6 浓度也可以在视觉上与背景区分。图 8A 还显示在阵列构造和后续夹心免疫荧光测定自始至终, POEGMA 基质保留其抵抗非特异性蛋白质吸附的能力,因为在测试前测量的斑点周围的背景区域中的荧光强度显示在程序完成后无强度的增加。在 POEGMA 上的这种背景信号转变为血清中飞摩尔的检测限值 (LODs), 和跨越五个数量级的分析物浓度的动力范围 (图 8B 到 8D)。此外,尽管采用孵育和清洗步骤,不存在斑点的析出 (图 8A), 其证实了捕获抗体的稳定固定。

[0119] 在缓冲液和血清中关于点在 POEGMA 上的 OPG 特异性抗体的 OPG 剂量应答曲线 (图 8B) 显示了使用蛋白质抗性基底的另一个重要后果,因为它们显示 LODs 在缓冲液和血清中几乎相同。这些结果与大多数其他荧光免疫测定形成对比,在其他荧光免疫测定中,与相同测定中的缓冲液中的 LOD 相比较,在含有高浓度的外来蛋白质的复杂生理溶液中的 LOD 一般大几个数量级。尽管来自在 POEGMA 上的斑点阵列的绝对信号低于得自点在硝酸纤维素上的阵列的绝对信号 (原始数据未显示),但得自 POEGMA 刷的背景信号 (其接近玻璃基底的自体荧光水平) 显著低于来自硝酸纤维素的背景信号。作为血清中的 IL-6 浓度的函数,点在硝酸纤维素和 POEGMA 上的 IL-6 特异性抗体阵列的荧光应答显示于图 8C 中。数据显示来自硝酸纤维素上印刷的捕获 Ab 斑点的荧光信号仅可见至 10 pg/ml 的浓度,而在 POEGMA 上的信号低至 100 fg/ml 的浓度仍清晰可见。尽管与硝酸纤维素相比来自点在 POEGMA 刷上的抗体阵列的绝对信号更低,但在 POEGMA 刷上显著更低的背景荧光更多地补偿了更低的来自斑点的绝对信号。另外,点在玻璃上的 POEGMA 刷上的针对 IL-6 的抗体可以检测直接来自未稀释的全血的 IL-6,具有 ~15 fM 的 LOD (图 8D)。

[0120] 实施例 4. 印刷的抗体微阵列的剂量应答

两个不同浓度的生物素化的抗体 (b-Ab) 用于产生在 POEGMA 刷表面上的微阵列,其随后暴露于稀释系列的链霉亲和素 -Cy5 (图 9A)。印刷溶液的浓度差异 4 个数量级 (1mg/mL b-Ab 和 .0001mg/mL b-Ab)。通过使阵列暴露于已知浓度的 Cy5 标记的链霉亲和素获得这些微阵列针对链霉亲和素的剂量应答 (图 9B)。具有高 b-Ab 浓度的斑点显示出从 4 fM 到 4 nM 的六个数量级的动力范围。具有低 b-Ab 浓度的斑点也具有从 1 pM 到 1 μ M 的六个数量级的动力范围,并且证明对于定量更高浓度的 Cy-5 链霉亲和素 (其在高 b-Ab 浓度的斑点中生成检测器饱和信号) 是有用的。通过组合两个斑点浓度的应答,获得 9 个数量级的应答。

[0121] 实施例 5. 稳定 b-Ab 捕获斑点和链霉亲和素 -Cy5 不稳定斑点的印刷

将具有五个生物素化的 Ab 斑点的阵列印刷到 POEGMA 表面上,以形成捕获试剂的“稳定的”固定斑点。此外,将链霉亲和素 -Cy5 和可溶性 PEG 的溶液点在可溶性 PEG 的预印刷斑点之上,以产生检测试剂的“不稳定”斑点的 8x2 阵列。该装置显示于图 10A 中,在其中稳定斑点在左小图的顶部部分中不可见,因为不是发荧光的。在一周贮存后,将 50 μ L PBS 吸取到阵列的表面上,以测试链霉亲和素 -Cy5 斑点溶解到溶液内且与生物素化的 Ab 捕获

斑点结合的能力。如图 10B 中所示, 足够量的活性 Cy5- 链霉亲和素溶解到溶液内, 并且通过生物素化的 Ab 斑点捕获以产生可检测信号。

[0122] 实施例 6. BNP 测定的剂量应答

在室温 (RT) 贮存 1 天后和在贮存 23 天后, 测量印刷在 POEGMA 上的测定用于检测脑利钠肽 (brain natriuretic peptide) (关于心脏损伤的生物标记) 的剂量应答。进行这个测定以确定:(1) 用测定可能的定量, 和 (2) 其在贮存后的稳定性。将分析物孵育 20 分钟以模拟 POC 测试条件。5 参数逻辑拟合法拟合数据, 且获得 8 pg/ml 的 LOD, 如图 11 中所示; 相比之下, i-Stat 测试 (Abbott) 具有 14 pg/mL 的 LOD。重要的是, 即使在贮存 3 周后, 在测定的 LOD 或 DR 中也不存在差异。这些结果也与其他研究者的先前观察结果一致:PEG 可以在环境条件下稳定蛋白质。在环境条件下的长贮存期限是用于即时装置 (point-of-care devices) 的重要属性, 因为这些印刷的诊断装置将无需在 4°C 贮存于缓冲液中, 从而使得印刷的芯片可以在室温转运、贮存且使用, 这是对于在其中可能不容易获得致冷条件的低资源设置中使用重要的属性。

[0123] 实施例 7. 检测人 IgGs 和 IgMs 的测定

在这个实施例中, 制备检测来自血液的人 IgGs 和 IgMs 的测定。选择这些分析物是因为健康供体血液可以用于这个目的。图 12 显示了测定的构造。首先通过 SI-ATRP 在玻璃载玻片上生长 ~100 nm 厚的 POEGMA 刷。随后使用载玻片压印器将玻璃载玻片用网格图形的蜡压印, 以使样品局限于这个芯片的活性区。接下来将抗体阵列喷墨印刷到单个蜡栅栏的中心; 每个斑点直径为 ~150 μm。内部 4x4 阵列是捕获 Abs (Ab_cs) 的斑点, 以形成“稳定的”捕获斑点; 行 1 和 4 是抗小鼠 Ab_c (阳性对照); 行 2: 抗人 IgG Ab_c; 行 3: 抗人 IgM Ab_c。接下来, 将检测混合物 (cocktail) 印刷作为“不稳定”斑点的 3 个外部行 (图 23B)。这些斑点含有小鼠 Cy-5- 抗人 IgG 和 / 或小鼠 Cy-5- 抗人 IgM (检测 Ab 具有不同于 Ab_cs 的针对人 IgG 和 IgM 的表位)、肝素和 10X- 摩尔过量的 PEG5000 的混合物。内部 4x4 抗体阵列不具有固有荧光, 并且由于来自印刷的 Ab 的光散射, 在图 12B 中仅仅勉强可见。外部斑点是可见的, 因为它们含有以足够高浓度的 Cy5- 标记的 Ab_d's, 足以使它们饱和荧光检测器且因此看起来是白色的。

[0124] 将来自手指针刺的一滴血液 (~20 μL) 施加到疏水栅栏内的测定表面, 并且孵育 5 分钟。将表面用来自挤压瓶的 ~1 mL 缓冲液快速清洗, 所述缓冲液应去除松散结合的血细胞和蛋白质。血液流动至边缘且与疏水栅栏结合, 表现为在边缘周围的红色 (未显示)。图 13 显示了测定的结果。在图 13B 中, 人 IgG 和 IgM 的 Ab_ds 作为不稳定检测斑点 (具有 PEG+ 肝素) 共印刷, 从而使得在血液中孵育后产生完全夹心, 导致在行 2 和 3 中都出现的荧光斑点。在图 13B-F 中的边缘信号是由于在通过洗涤步骤从 POEGMA 刷去除后, 来自与疏水栅栏结合的血液的散射。在全血中, IgG 的浓度是大致 5 mg/mL (33 μM) 和 IgMs 的浓度是 1.5 mg/mL (1.6 μM), 提示甚至在这个最初实验中, 这些蛋白质分析物也应在这个水平由未稀释的血液检测。图 13C 和 13F 显示了其中芯片与 PBS (C) 或鸡血 (F) 一起孵育的阴性对照实验, 从而使得仅阳性对照: 行 1 和 4 发光, 而行 2 和 3 未显示荧光。图 13D 和 13E 是两种其他对照; 在图 13D 中, 仅 Cy5- 抗 IgG Ab_d 印刷到不稳定斑点中, 从而使得行 2 发光, 而行 3 则不发光, 而在小图 13E 中, 仅 Cy5- 抗 IgM Ab_d 印刷到不稳定斑点中, 从而使得行 3 发光, 而行 2 则不发光。应当指出 Cy5-Ab_ds 以高浓度印刷到不稳定斑点的外部环境中, 并且在与血

液接触后仅是部分溶解的,从而使得其残留荧光仍饱和检测器。

[0125] 实施例 8. 赋形剂印刷模式的评估

就其对印刷的捕获试剂抗体 (Ab_d) 溶解的作用评估两种方法:(1) 可溶性 PEG 加入 Ab_d 的印刷溶液中,和(2) 在 Ab_d 印刷前,可溶性 PEG 直接预印刷到 POEGMA 刷内。

[0126] 评估 PEG 的三种分子量:1000、11000 和 66000 Da。这些 PEGs 各自以 1 mg/mL 的浓度加入 Cy-5 标记的心肌肌钙蛋白 I(cTnI) 抗体的印刷溶液中。将以 1 mg/mL 浓度的可溶性 PEG 印刷到 POEGMA 刷上,然后将检测试剂印刷到这些 PEG 的斑点上。在印刷可溶性 PEG 的微斑点后,将 Ab_d 微斑点直接印刷到先前印刷的 PEG 之上。为了测定将 PEG 加入印刷溶液中的有效性,将 Ab_d 的斑点印刷在 cTnI Ab_c 斑点阵列周围。将 20 μ L 含有 cTnI 的缓冲液加入阵列中,其允许 Cy-5 抗 cTnI 抗体斑点溶解到溶液内,且标记 cTnI。

[0127] 在扫描后,测定在标记的 cTnI 捕获后由稳定 Ab_c 斑点生成的信号。将 MW 10000 或 66000 的 PEG 加入印刷的检测抗体溶液中改善了检测抗体的可用性。预印刷的 PEG 看起来不会极大影响检测抗体的可用性。

[0128] 实施例 9. 用于 HBV 和 HIV 的单一分析物和多路夹心测定

制备由涂有 POEGMA 的一次性芯片组成的微阵列,其边界随后用微阵列载玻片压印器(ArrayIt Corp.)由疏水烃墨(hydrocarbon ink)印刷。疏水墨将产生将血滴局限于芯片的活性区的“栅栏”。对于单一分析物测定,这个活性区将是对于乙型肝炎表面抗原(HBsAg)特异性的个别 Ab_c 的印刷的“稳定”斑点。还将印刷一行 HBsAg 以充当阳性对照。对于多路 D4 测定,p24 和 gp41(用于 HIV-1)、和 gp36(用于 HIV-2)也将印刷在分开行中,并且 HIV 抗原的斑点将沿着作为阳性对照的捕获抗体斑点印刷。 Ab_c 将作为一行个别斑点点在 POEGMA 表面上,以便提供独立重复且从而改善检测的统计学和测定的稳定性。POEGMA 刷的亲水性质和体系结构将允许血滴扩散跨越芯片的活性 POEGMA 区。

[0129] 除了捕获 Abs 的“稳定”斑点外,还将印刷荧光标记的检测抗体 (Ab_d) 的可溶性“不稳定”斑点。阵列以类似于图 5 中所示那种的方式格式化。为了确保印刷的 Ab_d 的不稳定斑点在与血液接触后溶解,将可溶性 PEG 加入印刷溶液中。这种可溶性 PEG 将优先吸附到 POEGMA 刷内,且阻断 Ab_d 吸附到刷内。尽管仅仅由于喷墨印刷和肉眼可见的干燥过程局限于斑点中,但这些 Ab_d 事实上处于“不稳定”状态,并且在与含水溶液接触后可以容易地溶解且释放。过量可溶性 PEG 加入检测 Ab 的作用是在贮存过程中稳定检测试剂,并且重要的是当测试血滴引入时,充当帮助再溶解检测 Ab 的赋形剂。在与一滴血液接触后,这些标记的抗体将溶解到溶液内且与血样中存在的所有目标结合且从而标记所述目标。作为阳性对照,HBV 和 HIV 抗原的斑点将沿着捕获抗体斑点印刷。这些对照的作用是验证检测试剂的活性,并且还可以用于跨越测定使荧光强度归一化,以减少测定间变异性。为了预防凝固,与过量 PEG 类似地混合的不稳定肝素斑点也印刷到刷上。

[0130] 实施例 10. 能够直接检测在全血中的多重传染性标记的自包含测定(self-contained assay)

在这个实施例中,对于 POC 免疫测定,使用作为“不稳定斑点”印刷的检测试剂开发用于 HBV 的定量单一分析物测定以及用于 HBV 和 HIV 的定量多重分析物 D4 测定。

[0131] 在检测 HIV 感染中有用的抗体应答一般针对三类抗原蛋白质:包膜抗原(ENV)、聚合酶基因产物(POL)和种群特异性抗原(GAG)。一般而言,单一 HIV 抗原对于血清学诊断是

不够灵敏或特异性的,从而使得抗原的组合对于血清学诊断是最有用的。主要包膜抗原将是 gp41,而 gp120 和 gp160 作为备份。用于评估的来自核心蛋白质主要抗原是 p24(GAG),而其他抗原包括 p55(其为 p24 的前体的 GAG 蛋白质)和 p53(POL)。HIV-2 感染的鉴定也是重要的。用于 HIV-2 的前导候选抗原是 gp36(ENV),HIV-1 的 gp41 的类似物。

[0132] HBV 的诊断是直接的,因为 HBsAg 在样品中的存在指示感染。针对 HBsAg 的商购可得的单克隆和多克隆抗体在这个平台中估计,以确定最适合于该平台的那些抗体。

[0133] 单个分析物定量测定。最佳化的 POEGMA 表面和检测试剂印刷条件,例如本文描述的那些,将用于印刷抗 HBsAg 微斑点的阵列(以类似于图 5 中所示的阵列的形式)。抗 HBsAg Ab 的五个重复斑点包含在阵列中的单一行中,并且还将印刷一行 HBsAg 以充当阳性对照。Cy5 标记的抗 HBsAg 检测抗体的微斑点将印刷在捕获抗体和阳性对照行周围的区域中。在一个载玻片上将印刷二十四个阵列,并且四个载玻片将装配成 96 孔板形式。使用目标掺料的缓冲液生成涵盖 0g/mL – 100g/mL 浓度的剂量应答曲线,随后生成来自自由 1 fM – 1 μM 分析物掺料的 HBV 阴性人血液的剂量应答曲线。剂量应答数据将拟合至五参数逻辑(5-PL)拟合。参数评估将使用 MATLAB(版本 6.5)通过大规模置信域反射牛顿算法(large-scale trust-region reflexive Newton algorithm)进行。就其 LOD、DR 和 COV 而言评估测定。对于用肝素化全血(通过检测混合物的溶解而肝素化)的测定,来自表面的血液去除对于成像荧光是必需的。因此,采用去除来自表面的血液的不同“去除”方案:(1) 使用 Visine 瓶逐滴洗涤表面;(2) 芯片插入缓冲液填充的具有轨道(tracks)的瓶内,所述轨道指导芯片的插入和浸入及其从瓶中的去除。我们首先使用 Wilhelmy 板平衡,以将芯片以不同速率插入且收回至缓冲液内,持续时间为用于最佳化这个方案的不同的孵育总时间。测定血液“去除”方法对测定 LOD、DR 和 COV 的影响,并且最佳方案用于所有血液分析。

[0134] 多重分析物定量测定。最佳化的 POEGMA 表面和检测试剂印刷条件,例如本文描述的那些,将用于印刷抗 HBsAg、抗 p24、抗 gp41 和抗 gp36 捕获 Ab 微斑点的阵列(以类似于图 5 中所示的阵列的形式)。每种捕获抗体的五个重复斑点包含在阵列中的单一行中,并且还将存在每种抗原的一行阳性对照。由必需的 Cy5 标记的检测抗体的混合物组成的微斑点将印刷在捕获抗体和阳性对照行周围的区域中。使用分析物掺料的缓冲液,随后为分析物掺料的人血(HIV/HBV 阴性的),生成剂量应答曲线,并且如先前对于单一分析物测定所述拟合数据。单一分析物 HBsAg 的剂量应答曲线将与得自 4 分析物 D4 测定的剂量应答曲线相比较,以在潜在交叉反应性的方面检查同时暴露于多重分析物和 4 种不同检测 Abs 印刷到相同芯片上对 D4 测定性能的作用。进一步地,我们注意到,尽管这些多重分析物测定将在这个 SA 中定量表征,但当信号超过 3σ LOD(其中 LOD 通过血液中的剂量应答曲线确定)的阈值时,它们仅以定性 - 是 / 否形式 - 用于 SA4 中,以确定分析物的存在或不存在。

[0135] 本文引用的所有专利、出版物和参考文献在此完全引入作为参考。在其中本说明书和引入作为参考的文件包括冲突和 / 或不一致内容的情况下,以本说明书为准。如果引入作为参考的两个或更多个文件包括就彼此而言冲突和 / 或不一致的内容,那么以具有稍后生效日期的文件为准。

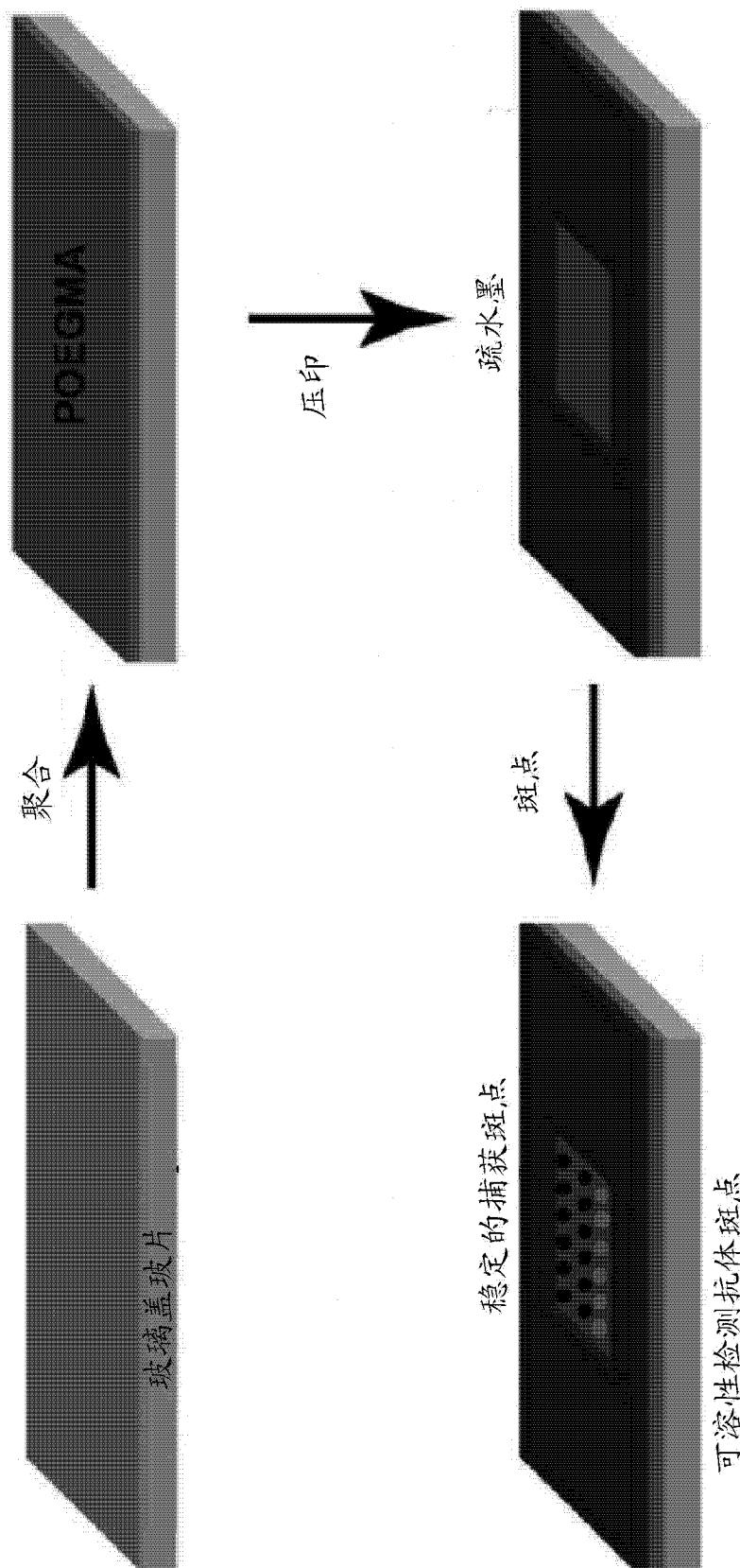


图 1

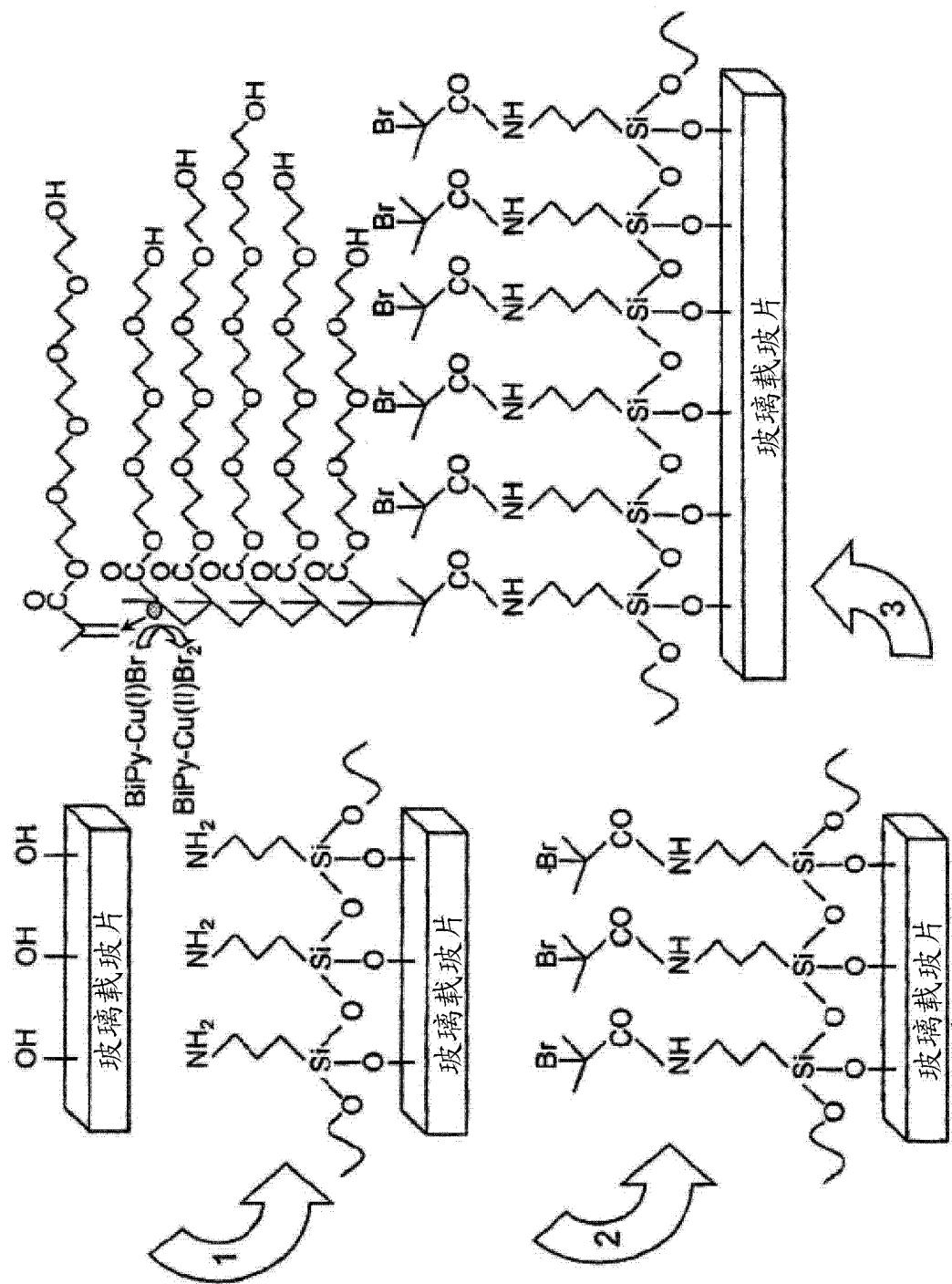


图 2

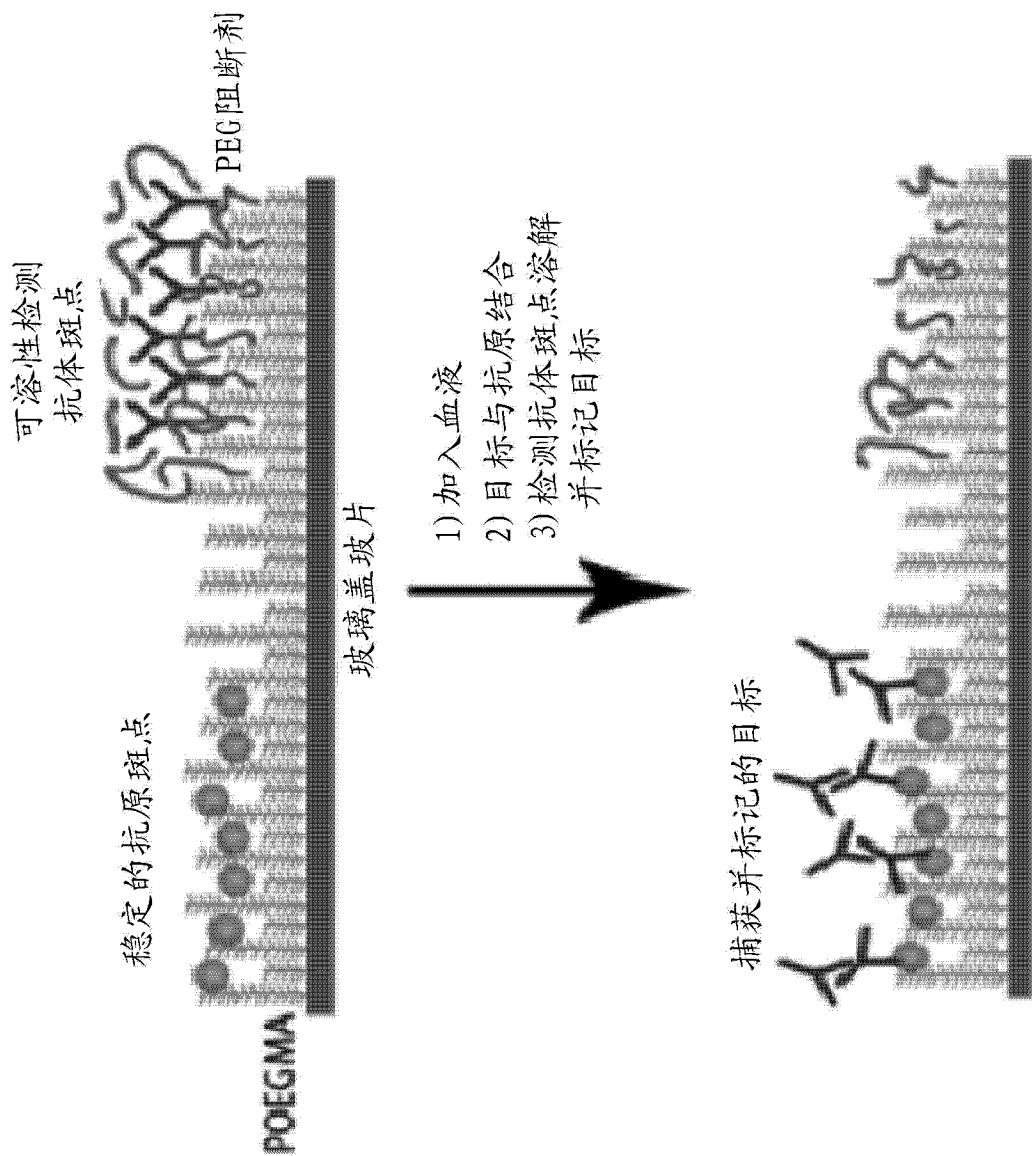


图 3

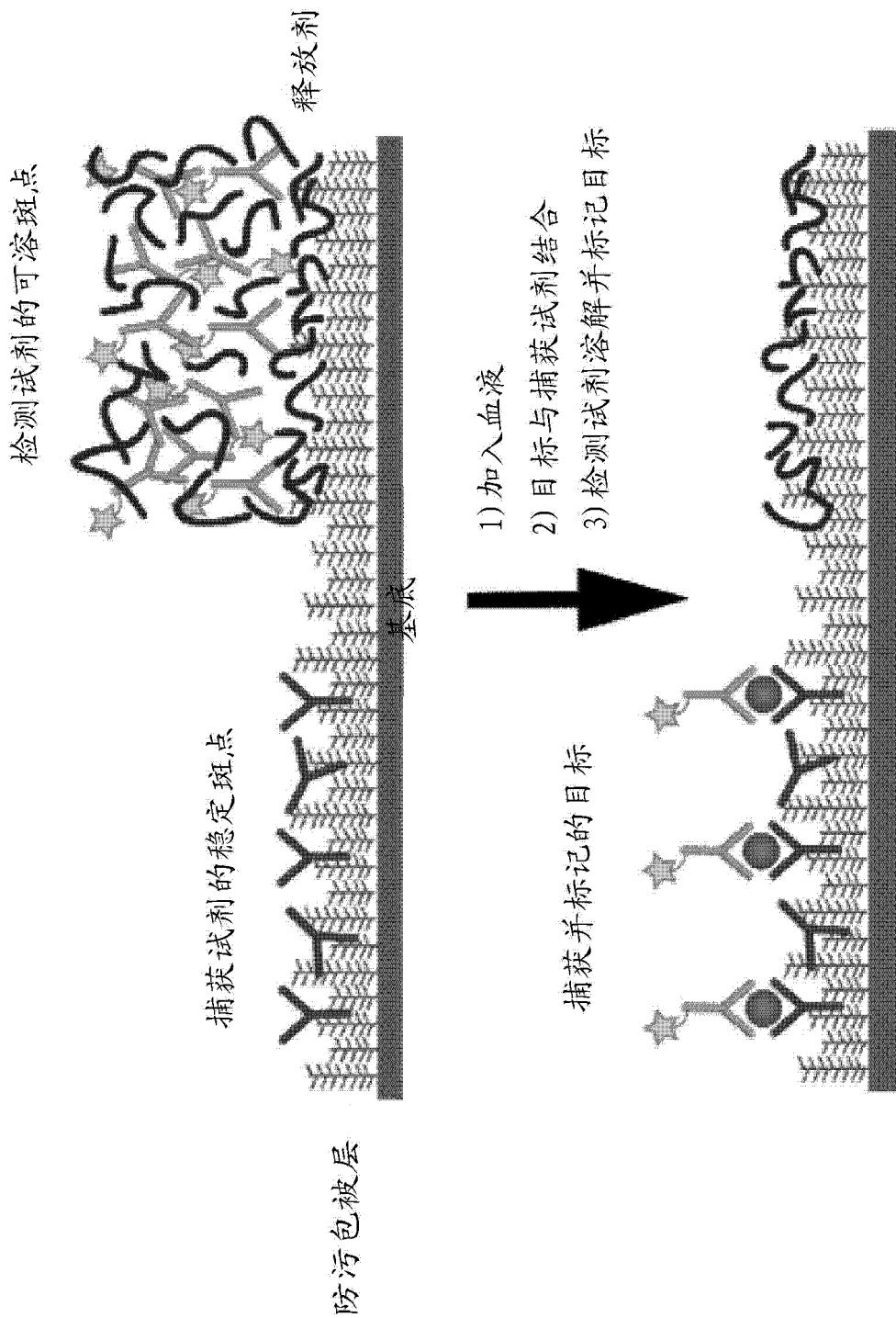


图 4

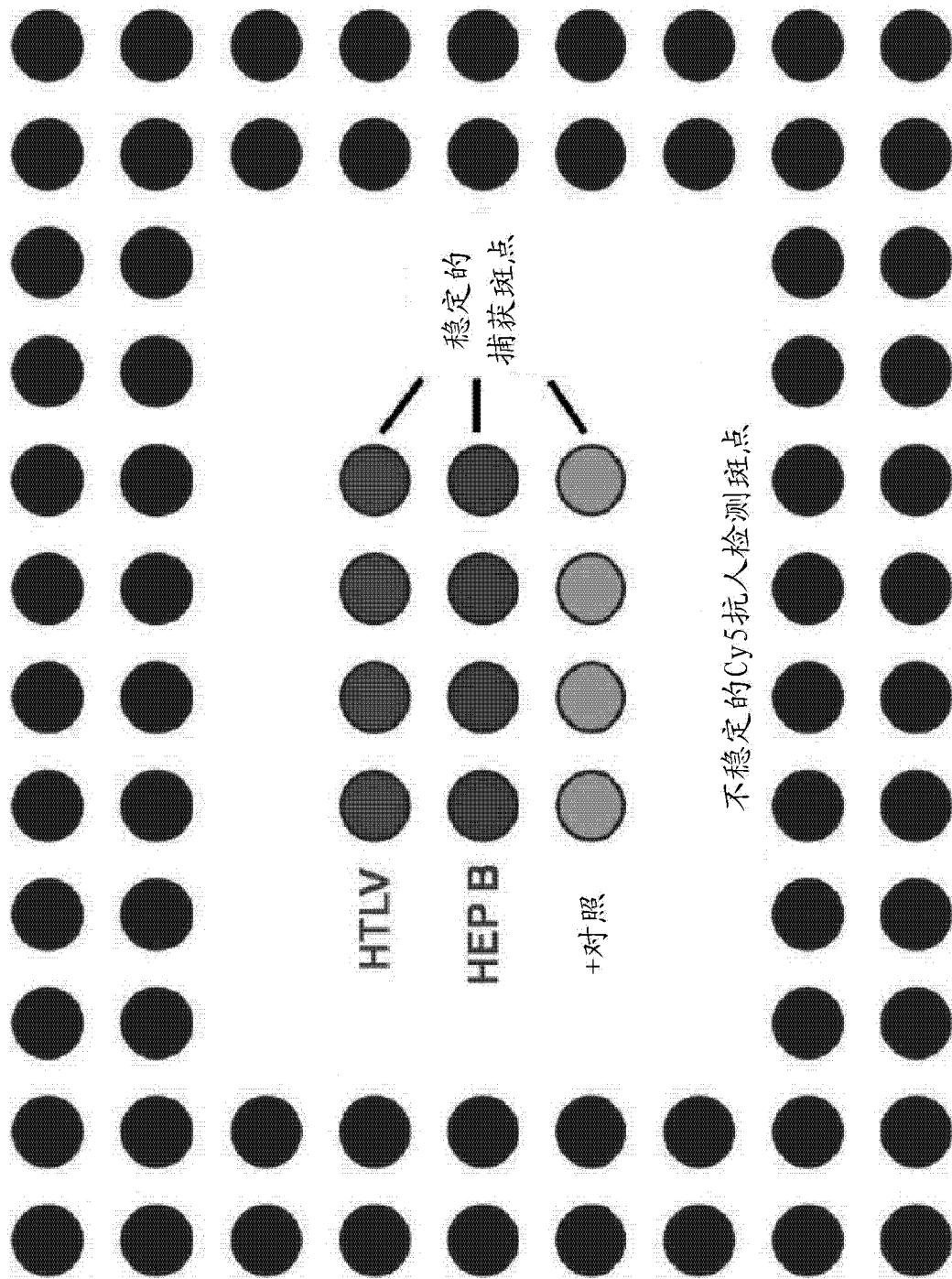
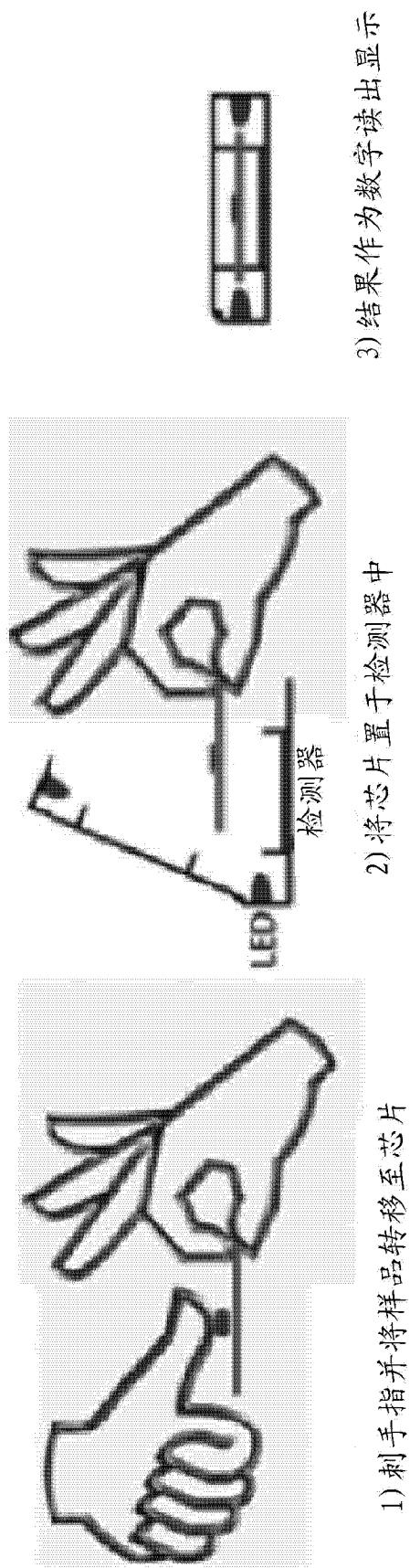


图 5



- 1) 刺手指并将样品转移至芯片
- 2) 将芯片置于检测器中
- 3) 结果作为数字读出显示

图 6

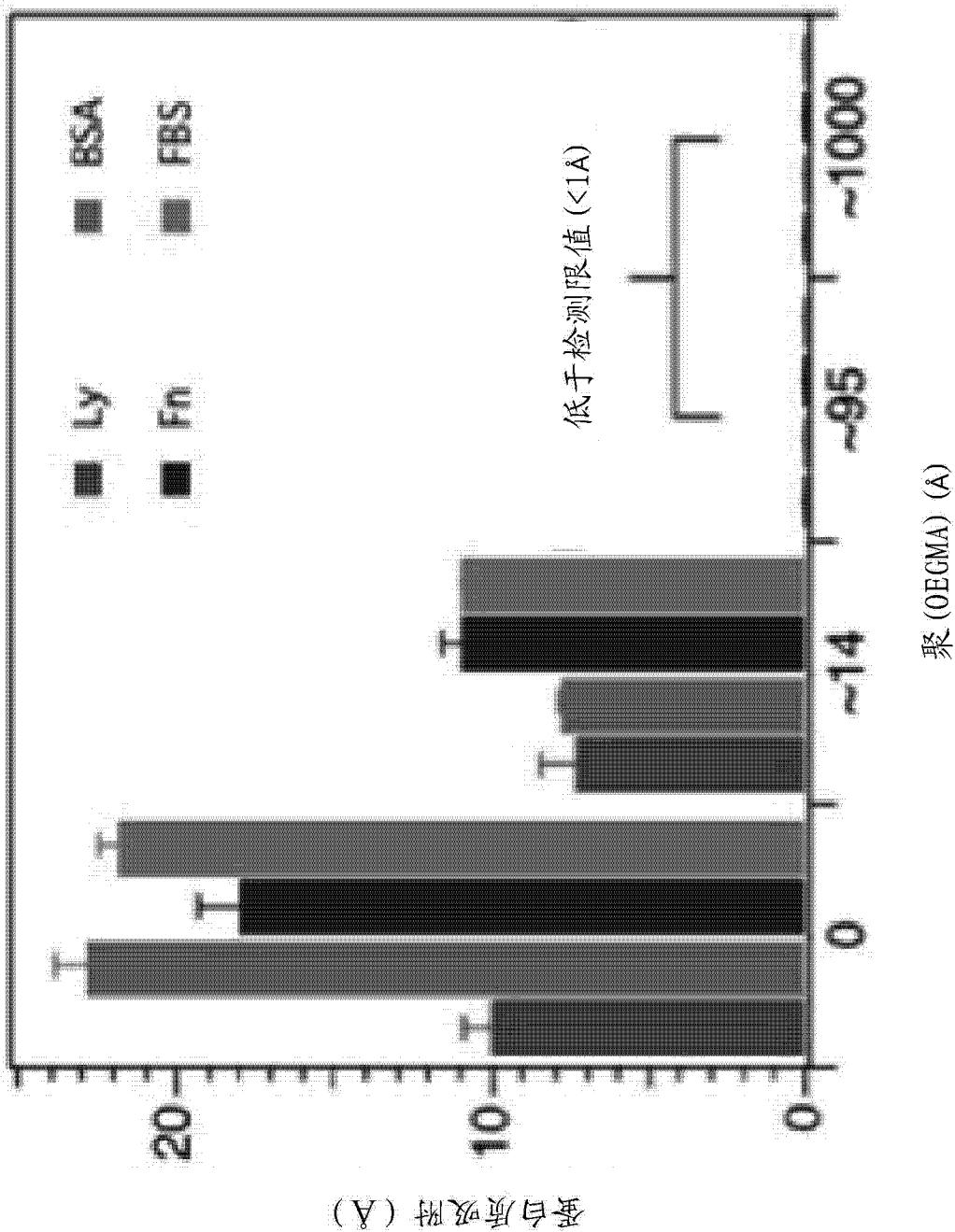


图 7

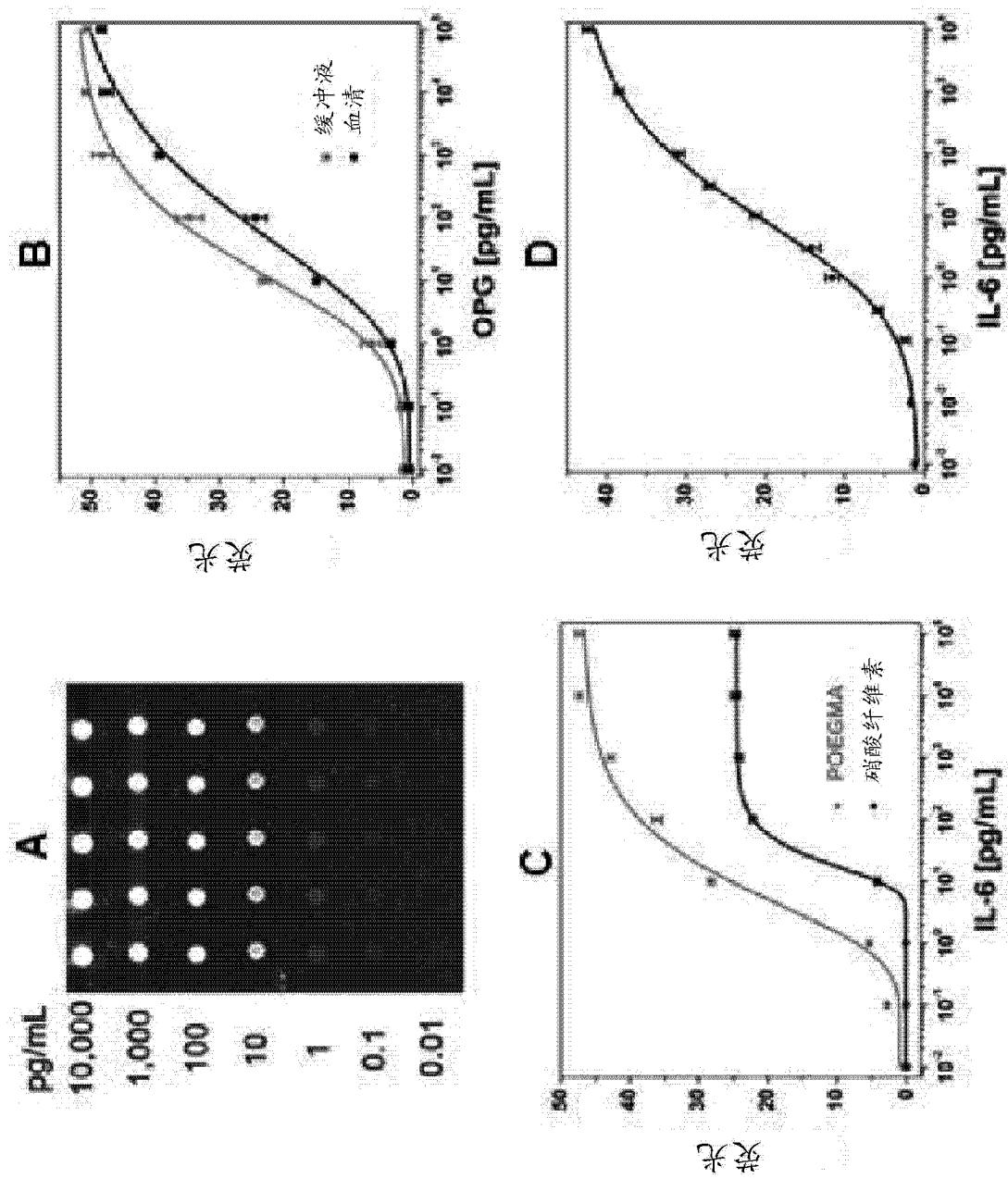


图 8

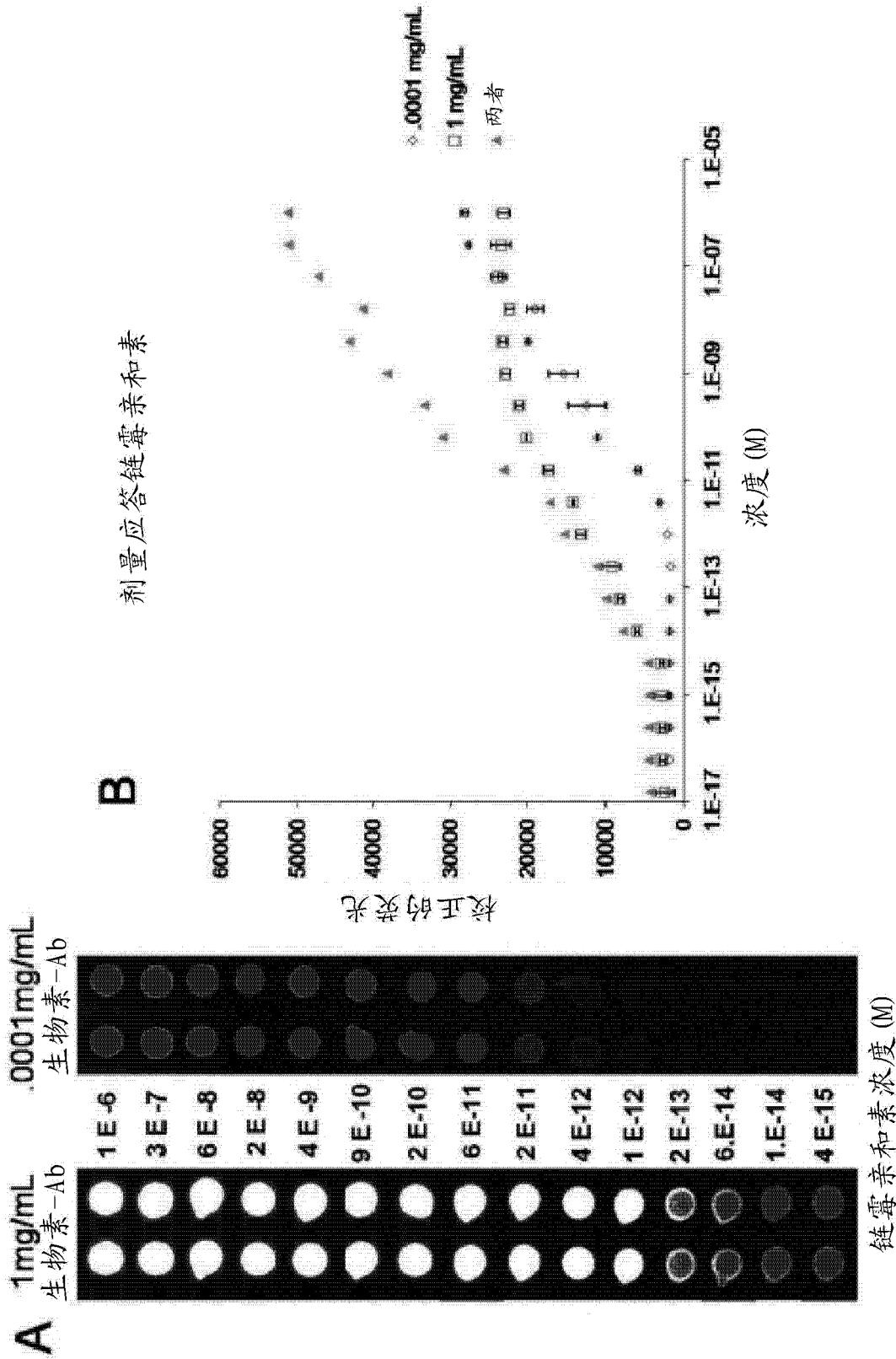


图 9

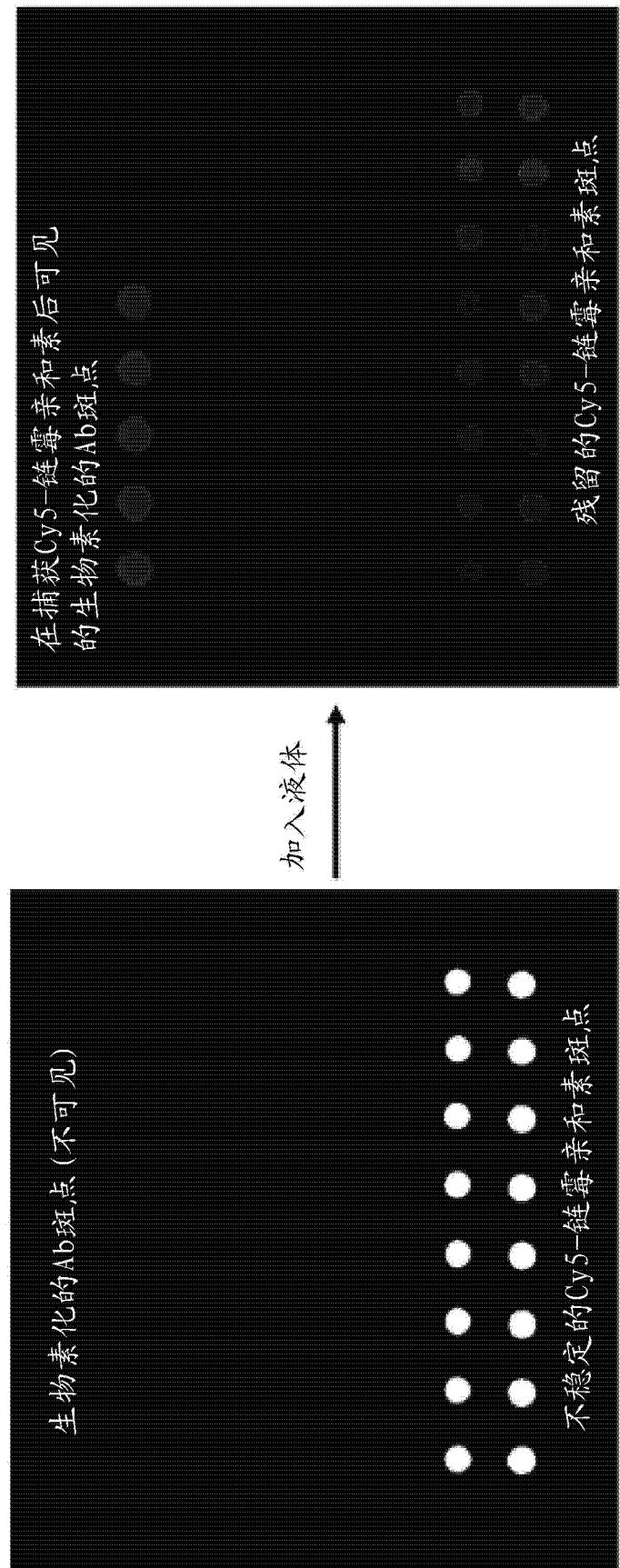


图 10

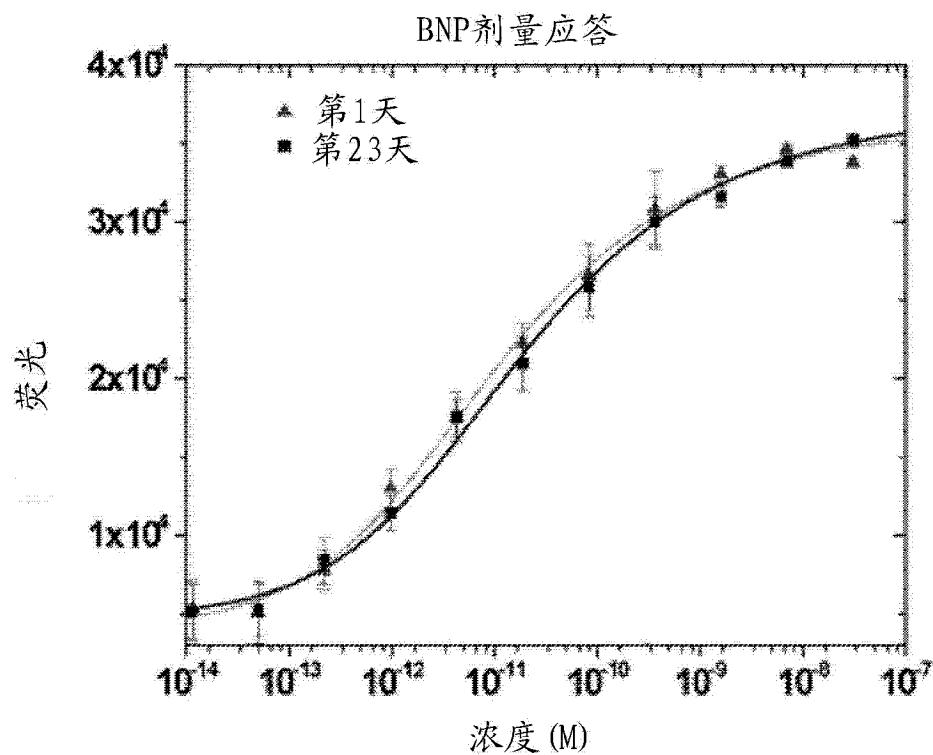


图 11

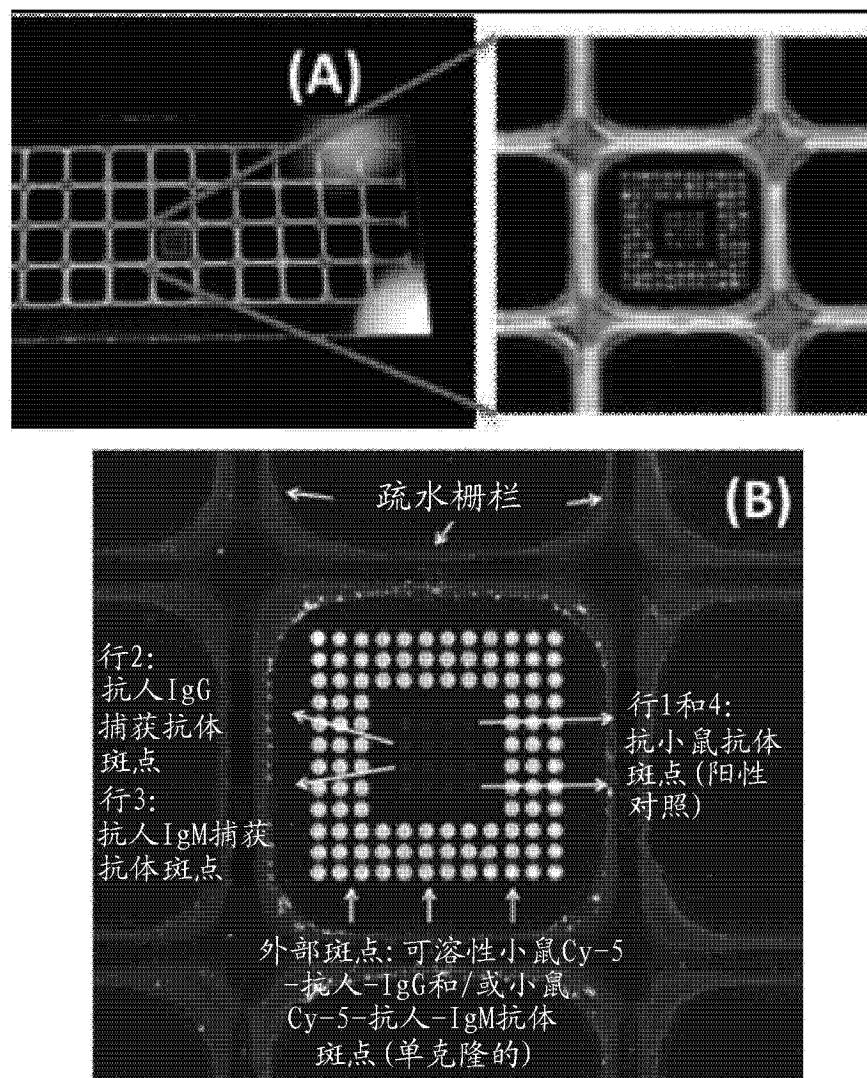


图 12

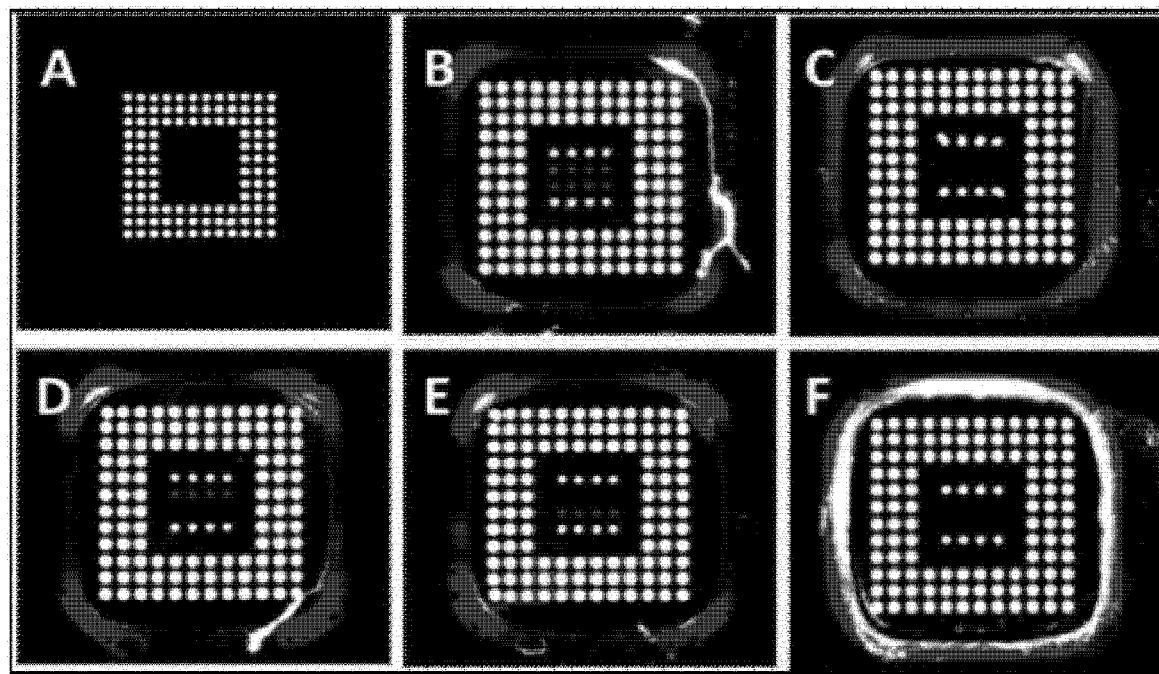


图 13

捕获的荧光

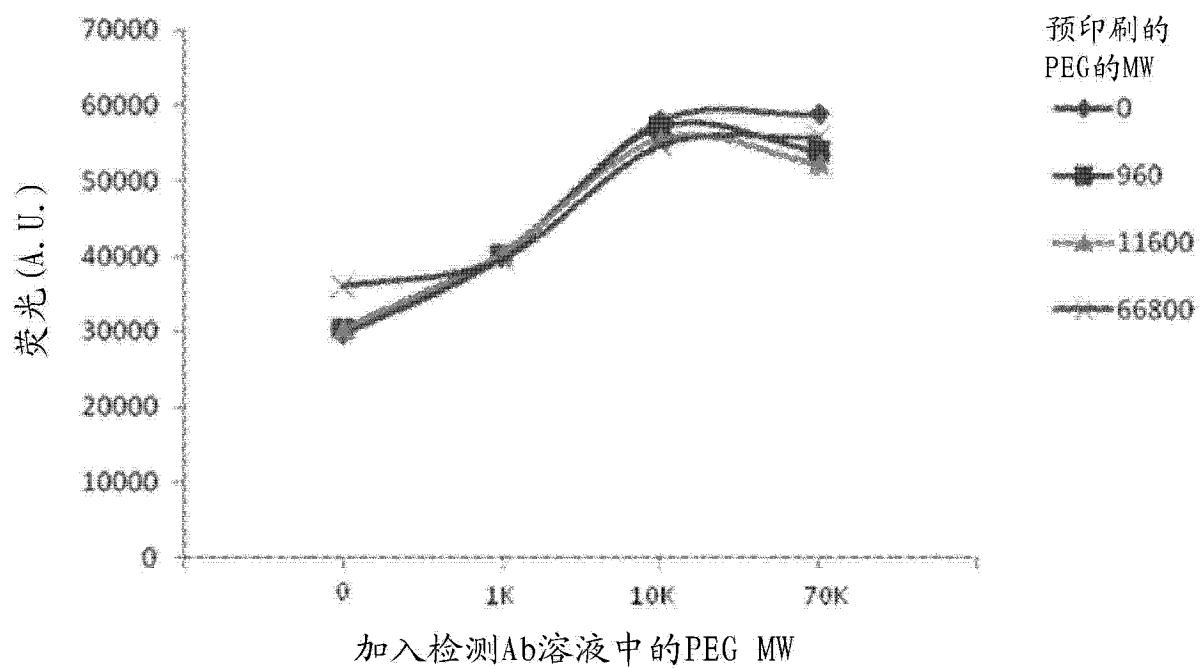


图 14