



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110785498 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 24

(21) 申请号 201880019334.X

(22) 申请日 2018.02.08

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110785498 A

(43) 申请公布日 2020.02.11

(30) 优先权数据

62/456,598 2017.02.08 US  
62/457,084 2017.02.09 US  
62/456,904 2017.02.09 US  
62/457,075 2017.02.09 US  
62/459,267 2017.02.15 US  
62/459,303 2017.02.15 US  
62/459,337 2017.02.15 US  
62/460,083 2017.02.16 US  
62/460,052 2017.02.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.09.25

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2018/017494 2018.02.08

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/148463 EN 2018.08.16

(73) 专利权人 上海宜晟生物科技有限公司

地址 200245 上海市闵行区昆阳路1508号2  
幢4层409室

(72) 发明人 斯蒂芬·Y·周 丁惟 张珣璠  
李骥 戚骥

(74) 专利代理机构 北京百欧知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11930  
专利代理师 吴泳历

(51) Int.Cl.  
C12Q 1/6834 (2006.01)  
C12Q 1/686 (2006.01)

(56) 对比文件  
US 2007254372 A1,2007.11.01  
US 2015338346 A1,2015.11.26  
US 2014154668 A1,2014.06.05  
Wen-Di Li等.Three-dimensional cavity  
nanoantenna coupled plasmonic nanodots  
for ultrahigh and uniform surface-  
enhanced Raman scattering over large  
area.《Optics Express》.2011,第19卷(第5期),

审查员 陈依晗

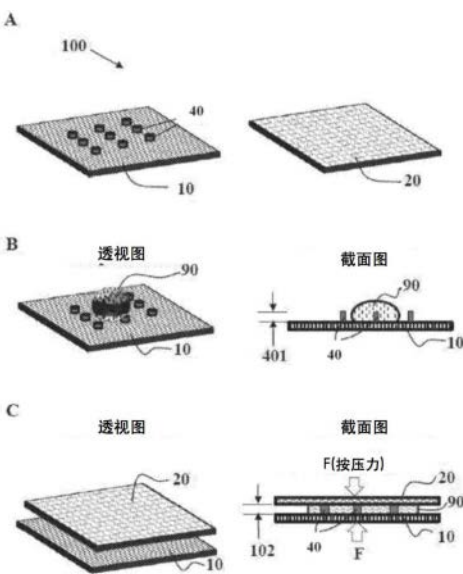
权利要求书3页 说明书42页 附图23页

(54) 发明名称

核酸杂交检测

(57) 摘要

本文提供了用于进行均相核酸检测分析的方法和装置。该装置可以包括一对板,其中一个板包含(i)表面扩增表面;和(ii)靶标特异性核酸探针,其固定在所述扩增表面上并且特异性结合靶标核酸的一部分;第二板包括样品接触区域,该样品接触区域包含试剂储存位点,该试剂储存位点包含与靶标核酸的另一部分特异性结合的靶标特异性核酸检测剂。在一些实施方案中,可以在不从装置表面清洗未结合标记的情况下下读取装置。



1. 一种用于进行均相核酸检测分析的方法, 包含:

(a) 获得用于核酸杂交分析的装置, 包含

(i) 第一板和第二板, 可相对彼此移动形成不同构造, 包括开放构造和闭合构造,

(ii) 所述第一板和所述第二板各自包含用于接触含有或疑似含有一种或多种靶标核酸的样品的样品接触区域;

(iii) 所述第一板的样品接触区域上包含结合位点, 所述结合位点包含被固定并且特异性结合所述靶标核酸的一部分的靶标特异性核酸探针;

(iv) 所述第二板的样品接触区域包括检测试剂储存位点, 所述检测试剂储存位点包含特异性结合所述靶标核酸的另一部分的靶标特异性核酸检测剂;

(v) 其中一个或两个所述板包含固定在各自的样品接触区域的间隔件, 并且至少一个所述间隔件位于样品接触区域内部;

所述间隔件具有预定的均匀的高度和预定的间隔件间距;

一个或两个所述板是柔性的, 并且柔性板的厚度乘以柔性板的杨氏模量在60到750 GPa- $\mu\text{m}$ 的范围内;

间隔件间距 (ISD) 的四次方除以柔性板的厚度 (h) 和杨氏模量 (E),  $\text{ISD}^4 / (hE)$  为  $5 \times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{GPa}$  或更小;

(b) 当所述板处于开放构造时, 将所述样品沉积在所述板中的一个或两个上;

(c) 将所述板闭合形成闭合构造, 其中, 所述靶标特异性核酸检测剂接触到所述样品后溶解和扩散到所述样品中; 并且

(d), 在 (c) 之后, 当所述板仍然处于所述闭合构造并且没有任何清洗步骤时, 通过读取装置读取所述第一板的样品接触区域以产生信号图像来检测所述靶标特异性核酸检测剂的标记;

其中: 配置 (i) 所述闭合构造中的样品的厚度, (ii) 所述闭合构造中溶解到样品中的所述靶标特异性核酸检测剂的浓度, 以及 (iii) 邻近依赖性信号扩增层的扩增因子, 使得在不洗掉任何生物材料或所述检测剂的情况下经由所述靶标核酸间接结合至所述靶标特异性核酸探针的所述靶标特异性核酸检测剂是可见的;

其中所述开放构造被配置为, 其中所述两个板的内表面之间的平均间距是至少  $200\mu\text{m}$ ; 以及

其中所述闭合构造是在样品被沉积之后配置而成, 在所述闭合构造中, 其中所述样品的至少一部分被所述两个板压成均匀厚度的薄层, 所述薄层的均匀厚度由所述板的所述样品接触区域所限定并被所述板和间隔件调节, 并且所述板的内表面之间的平均间距小于  $200\mu\text{m}$ ;

所述方法为非诊断目的。

2. 一种用于权利要求1所述的方法的装置, 包含:

(i) 第一板和第二板, 可相对彼此移动形成不同构造, 包括开放构造和闭合构造

(ii) 所述第一板和所述第二板在其各自的表面上具有样品接触区域, 用于接触含有或疑似含有具有一种或多种靶标核酸的靶标分析物的样品;

(iii) 所述第一板上的所述样品接触区域具有结合位点, 所述结合位点包含有被固定并特异性结合所述靶标核酸的一部分的捕获试剂;

(iv) 所述第二板的样品接触区域具有检测试剂储存位点,其具有可结合至所述靶标核酸的另一部分的标记的检测剂;

(v) 其中一个或两个所述板包含固定在各自的样品接触区域的间隔件,并且至少一个所述间隔件位于样品接触区域内部;

所述间隔件具有预定的均匀的高度和预定的间隔件间距;

一个或两个所述板是柔性的,并且柔性板的厚度乘以柔性板的杨氏模量在60到750 GPa- $\mu\text{m}$ 的范围内;

间隔件间距(ISD)的四次方除以柔性板的厚度(h)和杨氏模量(E), $\text{ISD}^4/(hE)$ 为 $5 \times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{GPa}$ 或更小;其中所述构造之一是开放构造;当所述板处于开放构造时,将所述样品沉积在所述板中的一个或两个上;

其中所述构造中的另一个是闭合构造,其中所述样品的至少一部分在所述两个板之间;并且

其中,配置所述闭合构造中的样品的厚度、所述闭合构造中的样品中溶解的标记的浓度和所述邻近依赖性信号扩增层的扩增因子,使得任何间接结合所述靶标特异性核酸探针的标记在不洗掉未结合的标记的情况下是可见的。

3. 根据权利要求2所述的装置,其中第一板的样品接触区域还包含邻近依赖性信号扩增层,其中所述捕获试剂固定在所述邻近依赖性信号扩增层的表面上。

4. 根据权利要求2所述的装置,还包含热循环仪。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中第一板的样品接触区域还包含邻近依赖性信号扩增层,其中捕获试剂固定在所述邻近依赖性信号扩增层的表面上。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,在所述闭合构造中,所述靶标分析物的大部分在300秒或更短的时间内结合到所述靶标特异性核酸探针上。

7. 根据权利要求2所述的装置,其中,在所述闭合构造中,所述靶标分析物的大部分在300秒或更短的时间内结合到所述捕获试剂上。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中,在所述闭合构造中,所述靶标分析物的大部分在60秒或更短的时间内结合到所述靶标特异性核酸探针上。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述靶标核酸是DNA或RNA,包括基因组DNA、cfDNA、cDNA、ctDNA、mRNA和miRNA。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述装置还包含热循环仪。

11. 根据权利要求5所述的方法,其中,对所述闭合构造中的,所述样品的厚度、溶解于所述样品中的所述靶标特异性核酸检测试剂的浓度和所述邻近依赖性信号扩增层的扩增因子进行配置以使得在所述闭合构造中不洗掉未结合的靶标特异性核酸检测试剂的情况下,直接或间接结合结合至所述靶标特异性核酸探针的所述靶标特异性核酸检测试剂的是可见的。

12. 根据权利要求1所述的方法,在步骤(c)关闭所述板形成闭合构造后,其中经由所述靶标核酸间接结合至所述靶标特异性核酸探针的所述靶标特异性核酸检测剂在等于或小于60秒内是可见的。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述闭合构造中,所述储存位点在所述第一板上所述结合位点的上方。

14. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述靶标特异性核酸探针和所述靶标特异性核酸检测剂形成包含所述标记的夹层结构。

15. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述板被设置了铰链, 所述铰链被配置为使板在开放构造和闭合构造之间转换。

16. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述标记结合到所述邻近依赖性信号扩增层。

17. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述检测的灵敏度为0.1nM或更小。

18. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 还包括使用海绵来去除未结合到所述靶标特异性核酸探针的生物材料或标记。

19. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述邻近依赖性信号扩增层包含D2PA。

20. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述邻近依赖性信号扩增层包含金属材料层。

21. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述邻近依赖性信号扩增层包含连续金属膜, 所述连续金属膜由选自由金、银、铜、铝、其合金及其组合组成的群组的材料制成。

22. 根据权利要求1所述的方法, 其中第一板的所述样品接触区域还包含金属材料层, 其局部增强或充当反射器, 或两者兼而有之, 以增强光信号。

23. 根据权利要求5所述的方法, 其中, 所述邻近依赖性信号扩增层包含金属材料层和位于所述金属材料层顶部上的介电材料, 其中所述靶标特异性核酸探针置于所述介电材料上。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述金属材料层是均匀金属层、纳米结构化金属层、或其组合。

25. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述邻近依赖性信号扩增层的信号的增加是通过等离子体增强。

26. 根据权利要求1所述的方法, 其中在步骤(d) 通过拉曼散射检测一个或多个所述靶标核酸分析物。

27. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述第一板的所述样品接触区域进一步包含含有所述邻近依赖性信号扩增层但不包含所述靶标特异性核酸探针的位点。

28. 根据权利要求5所述的方法, 其中步骤(d) 在还包括通过读取包含所述邻近依赖性信号扩增层但不包含所述靶标特异性核酸探针的位点来计算背景信号。

29. 根据权利要求2所述的装置, 其中所述板被设置了铰链, 所述铰链被配置为使板在开放构造和闭合构造之间转换。

30. 根据权利要求5所述的方法, 其中调节所述邻近依赖性信号扩增层的扩增因子以使来自直接或间接结合到所述靶标特异性核酸探针的单个标记的光学信号可见。

## 核酸杂交检测

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年2月8日提交的序列号为62/456,598 (ESX-032PRV)、于2017年2月15日提交的序列号为62/459,337 (ESX-033PRV2)、于2017年2月9日提交的序列号为62/457,084 (ESX-017PRV)、于2017年2月15日提交的序列号为62/459,267 (ESX-017PRV2)、于2017年2月9日提交的序列号为62/456,904 (ESX-027PRV)、于2017年2月15日提交的序列号为62/459,303 (ESX-027PRV2)、于2017年2月9日提交的序列号为62/457,075 (ESX-035PRV)、于2017年2月16日提交的序列号为62/460,052 (ESX-035PRV2)、以及于2017年2月16日提交的序列号为62/460,083 (ESX-035PRV3)的美国临时申请的优先权,这些申请全部并入本文。

### 技术领域

[0003] 其中本发明涉及进行生物和化学分析(例如但不限于测定)的装置和方法。

### 背景技术

[0004] 传统的核酸杂交测定是复杂的、耗时的、费力的,并且需要实验室设置和大量的样品。例如,通常需要几个小时来完成Southern印迹。此外,传统的核酸杂交分析需要相对大体积的样品(通常>100uL),这在样品有限或缺乏的许多情况下是不适用的。因此,需要开发需要尽可能少的样品的快速、准确、便携和/或廉价的核酸杂交测定。此外,理想的是该测定可以由非专业人员进行。本发明满足了这些需要。

### 附图说明

[0005] 本领域技术人员将理解,下面描述的附图仅用于说明的目的。附图不旨在以任何方式限制本发明的范围。附图不是完全按比例绘制的。在给出实验数据点的图中,连接数据点的线仅用于引导观察数据,而没有其它意义。

[0006] 图1示出了QMAX(Q:量化;M:扩增;A:加入试剂;X:加速;也称为压缩调节开放流(CROF))装置的实施例,其包括第一板和第二板。图(A)示出了当这些板分开时处于开放构造的这些板的透视图;图(B)示出了在开放构造下将样品沉积在第一板上的透视图和截面图;图(C)是处于闭合构造的QMAX装置的透视图和截面图。

[0007] 图2是根据本发明一些实施方案的示例性核酸杂交测定的说明。

[0008] 图3示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。

[0009] 图4示出了基于图3所示方案的核酸杂交测定的结果。

[0010] 图5示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。

[0011] 图6示出了基于图5所示方案的核酸杂交测定的结果。

[0012] 图7示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。

[0013] 图8示出了基于图7所示方案的核酸杂交测定的结果。

[0014] 图9示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。

[0015] 图10示出了基于图9所示方案的核酸杂交测定的结果。

- [0016] 图11示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。
- [0017] 图12示出了基于图11所示方案的核酸杂交测定的结果。
- [0018] 图13示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。
- [0019] 图14示出了基于图13所示方案的核酸杂交测定的结果。
- [0020] 图15示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。
- [0021] 图16示出了基于图15所示方案的核酸杂交测定的结果。
- [0022] 图17示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。
- [0023] 图18示出了基于图17所示方案的核酸杂交测定的结果。
- [0024] 图19示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。
- [0025] 图20示出了基于图19所示方案的核酸杂交测定的结果。
- [0026] 图21示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。
- [0027] 图22示出了基于图21所示方案的核酸杂交测定的结果。
- [0028] 图23示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。
- [0029] 图24示出了基于图23所示方案的核酸杂交测定的结果。
- [0030] 图25示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。
- [0031] 图26示出了基于图25所示方案的核酸杂交测定的结果。
- [0032] 图27示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。
- [0033] 图28示出了基于图27所示方案的核酸杂交测定的结果。
- [0034] 图29示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。
- [0035] 图30示出了基于图29所示方案的核酸杂交测定的结果。
- [0036] 图31示出了本发明核酸杂交测定的示例性测定方案。
- [0037] 图32示出了miR21核酸序列和错配序列的示例性设计。
- [0038] 图33示出了基于图32的设计和图31的测定的信号强度和变化。
- [0039] 图34示出了基于图31所示方案的核酸杂交测定的结果。
- [0040] 图35示出了如何使用间隔件实现该装置。
- [0041] 图36是QMAX的第一板上的孔的示例性实施例的示意图。(a) 第一板上的孔的顶视图: (i) 圆形孔, 构成正方形点阵, (ii) 矩形孔, 构成正方形点阵, (iii) 三角形孔, 构成六边形点阵, (iv) 圆形孔, 无周期性。(b) 第一板上的孔阵列的顶视图: (i) 无金属涂层, (ii) 在孔底部上具有金属涂层, (iii) 在孔侧壁上具有金属涂层, (iv) 在孔的底部和侧壁上都具有金属涂层。
- [0042] 图37是示出该方法的实施方式的流程图。
- [0043] 图38示出了用于核酸测序的第一板制备步骤的实施例。
- [0044] 图39是用于捕获靶标核酸的闭合构造的QMAX装置的示例性实施方案的示意图。
- [0045] 图40示出了使用1pM浓度的1 $\mu$ L靶标核酸样品用(a) QMAX捕获靶标DNA的代表性时程研究。

### 具体实施方式

[0046] 以下详细描述通过示例而非限制的方式示出了本发明的一些实施例。本文使用的章节标题和任何副标题仅用于组织目的, 而不应被解释为以任何方式限制所描述的主题。

章节标题和/或副标题下的内容不限于章节标题和/或副标题,而是适用于本发明的整个描述。

[0047] 任何出版物的引用是为了在申请日之前公开,并且不应被解释为承认本权利要求无权凭借在先发明而先于此类出版物。此外,所提供的公开日期可以不同于实际的公开日期,实际的公开日期可能需要被独立地确认。

[0048] QMAX设备和测试

[0049] 在生物和化学测定(即,测试)中,简化测定操作或加速测定速度的装置和/或方法通常具有很大价值。

[0050] 在QMAX(Q:量化;M:扩增;A:加入试剂;X:加速;也称为压缩调节开放流(CROF))测定平台中,QMAX卡使用两个板来将样品的形状操作成薄层(例如,通过压缩)(如图1所示)。在某些实施方案中,板操纵需要通过人手动或其它外力多次改变两个板的相对位置(称为:板构造)。需要设计QMAX卡以使手动操作容易且快速。

[0051] 在QMAX测定中,板构造之一是开放构造,其中两个板完全或部分分离(板之间的间隔不受间隔件控制)并且可以沉积样品。另一种构造是闭合构造,其中以开放构造沉积的样品的至少一部分被两个板压缩为高度均匀厚度的层,该层的均匀厚度由板的内表面限定并且由板和间隔件调节。

[0052] 在QMAX测定操作中,操作者需要首先使两个板处于准备用于样品沉积的开放构造,然后将样品沉积在一个或两个板上,最后将板闭合到闭合位置。在某些实施方案中,QMAX卡的两个板最初在彼此之上,并且需要被分离以进入用于样品沉积的开放构造。当板之一是薄塑料膜(175 $\mu$ m厚的PMMA)时,这种分离难以用手进行。本发明旨在提供使某些测定(例如QMAX卡测定)的操作容易且快速的装置和方法。

[0053] 本发明的一个方面是具有将两个或更多个板连接在一起的铰链,使得板能够以与书类似的方式开放和闭合。

[0054] 本发明的另一方面是构造铰链的材料,使得铰链能够在调节之后自保持板之间的角度。

[0055] 本发明的另一方面是构造铰链的材料,其保持QMAX卡处于闭合构造,使得整个QMAX卡可以滑入和滑出卡槽,而不会引起两个板的意外分离。

[0056] 本发明的另一方面是提供开放机构,例如但不限于板边缘上的凹口或连接到板上的条,使得使用者更容易操纵板的定位,例如但不限于用手分离板。

[0057] 本发明的另一方面是提供一种能够控制多于两个板的旋转的铰链。

[0058] 术语“压缩开放流(COF)”是指通过以下方式改变沉积在板上的可流动样品的形状的方法:(i)将另一个板放置在样品的至少一部分的上面,和(ii)然后通过将两个板朝向彼此推动而在两个板之间压缩样品;其中该压缩减小了该样品的至少一部分的厚度并且使得该样品流入这些板之间的开放空间中。术语“压缩调节开放流”或“CROF”(或“自校准压缩开放流”或“SCOF”或“SCCOF”)(也称为QMAX)是指特定类型的COF,其中压缩后部分或全部样品的最终厚度由间隔件“调节”,其中间隔件放置于两个板之间。这里,CROF装置可与QMAX装置互换使用。

[0059] 除非另有说明,术语“间隔件”或“止动件”是指当放置在两个板之间时对两个板之间的最小间隔设定限制的机械物体,当将两个板压缩在一起时可以达到该限制。即,在压缩

中,间隔件将停止两个板的相对运动,以防止板间距变得小于预设(即预定)值。

[0060] 术语“间隔件具有预定高度”和“间隔件具有预定间隔件间距”分别是指间隔件高度和间隔件间距的值在QMAX处理之前是已知的。如果在QMAX处理之前不知道间隔件高度和间隔件间距的值,则不预定间隔件高度和间隔件间距的值。例如,在珠粒作为间隔件喷射在板上的情况下,其中珠粒落在板的随机位置,间隔件之间的距离不是预定的。非预定间隔件间距的另一实施例是间隔件在QMAX处理期间移动。

[0061] 在QMAX处理中,术语“间隔件固定在其相应的板上”是指间隔件连接到板的位置,并且在QMAX处理中保持连接到该位置(即,间隔件在相应的板上的位置不改变)。“间隔件与其相应的板固定”的实施例是间隔件由板的一件材料整体地制成,并且间隔件相对于板表面的位置在QMAX处理期间不改变。“间隔件不与其相应的板固定”的实施例是间隔件通过粘合剂粘合到板上,但是在板的使用期间,在QMAX处理期间,粘合剂不能将间隔件保持在其在板表面上的原始位置处,并且间隔件移动离开其在板表面上的原始位置。

[0062] 在QMAX处理中,术语两个板的“开放构造”是指这样的构造,其中两个板部分地或者完全地分开,并且板之间的间隔不受间隔件的调节。

[0063] 在QMAX处理中,术语两个板的“闭合构造”是指板彼此面对的构造、间隔件和样品的相关体积在板之间、板之间的相关间距以及因此样品的相关体积的厚度由板和间隔件调节,其中相关体积是样品的整个体积的至少一部分。

[0064] 在QMAX处理中,术语“样品厚度由板和间隔件调节”是指,对于板、样品、间隔件和板压缩方法的给定条件,在板的闭合构造下样品的至少一个端口的厚度可以根据间隔件和板的性质预先确定。

[0065] 在QMAX装置中,术语板的“内表面”或“样品表面”指接触样品的板的表面,而板的另一表面(不接触样品)称为“外表面”。

[0066] 除非特别说明,否则在QMAX处理中,术语物体的“高度”或“厚度”是指物体在垂直于板表面的方向上的尺寸。例如,间隔件高度是间隔件在垂直于板表面的方向上的尺寸,并且间隔件高度和间隔件厚度是指同一样东西。

[0067] 除非特别说明,否则在QMAX处理中,术语物体的“区域”是指平行于板表面的物体的区域。例如,间隔件区域是平行于板表面的间隔件区域。

[0068] 术语QMAX装置指的是在样品上进行QMAX(例如CROF)处理的装置,并且具有或不具有连接两个板的铰链。

[0069] 术语“具有铰链的QMAX装置”和“QMAX卡”是可互换的。

[0070] 术语“角度自保持(angle self-maintain)”、“角度自保持的(angle self-maintaining)”或“旋转角度自保持的(rotation angle self-maintaining)”是指铰链的特性,其在将板从初始角度移动到该角度的外力从板移除之后基本上保持两个板之间的角度。

[0071] 术语“邻近依赖性信号扩增层”、“邻近依赖性信号扩增层”或“表面信号扩增层/表面”是指以邻近依赖性方式扩增来自分析物或标记的分析物(例如发光标记)的信号的信号扩增层。在使用这种层时,分子越靠近信号扩增层的表面,来自分析物或标记分析物的信号就增加。显然,由靠近该层的第一标记分子产生的信号的强度将高于由远离该层的第二标记分子产生的信号。例如,在邻近依赖性信号扩增层100nm内的标记分子的信号大于远离邻



近依赖性扩增层1 $\mu$ m或更远的标记分子的信号。

[0072] 可以使用“一次性集总”和“像素计数”方法来检测信号。一次性集总方法是确定由多个结合事件产生的总信号的那些方法。像素计数方法是识别各个结合事件并对其进行数字计数的方法。

[0073] 在某些实施方案中,QMAX装置被配置成具有0.1nM或更小,例如10pM或更小,或1pM或更小,或100fM或更小,例如10fM或更小,包含1fM或更小,或0.5fM或更小,或100aM或更小,或50aM或更小,或20aM或更小的检测灵敏度。在某些实施方案中,QMAX装置被配置成具有10aM到0.1nM范围内,例如20aM到10pM,50aM到1pM,包括100aM到100fM范围内的检测灵敏度。在一些情况下,QMAX装置被配置成能够检测1ng/mL或更低浓度,例如100pg/mL或更低浓度、包括10pg/mL或更低浓度、1pg/mL或更低浓度、100fg/mL或更低浓度、10fg/mL或更低浓度,或5fg/mL或更低浓度的分析物。在一些情况下,QMAX装置被配置成能够检测浓度范围在1fg/mL至1ng/mL(例如5fg/mL至100pg/mL,包含10fg/mL至10pg/mL)的分析物。在某些实施方案中,QMAX装置被配置成具有5个数量级或更大,例如6个数量级或更大,包含7个数量级或更大的动态范围。

[0074] 免清洗均质QMAX装置的实施例

[0075] 在这些实施方案中,在底物的顶表面附近,存在扩增区,其中只有与底物结合或非常接近的标记得到增强。

[0076] 板可相对于彼此移动成不同的构造。其中一种构造是开放构造,其中两个板部分或完全分开,并且板之间的间隔不受间隔件的限制。在一些实施方案中,相应板的内表面包括样品接触区域,其占据整个内表面的一部分。在某些实施方案中,间隔件定位在样品接触区域内。在一些实施方案中,间隔件不固定到任何一个板上,而是在样品中混合。

[0077] 样品是任何需要测试的液体。在一些实施方案中,样品是有或没有处理或稀释的体液。例如,体液可以是全血、血浆、血清、尿液、唾液、汗液或呼吸冷凝物。在一些实施方案中,样品是血液。在某些实施方案中,样品包含血浆。在某些实施方案中,样品包含全血。在某些实施方案中,样品是已经用缓冲液稀释的血液或血浆,稀释倍数为0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000或1,000,000或在任意两个值之间的范围内。在一些实施方案中,样品包含任何序列的靶标核酸,例如cfDNA、ctDNA、cfRNA、mirna等。

[0078] 没有任何限制本方法和装置使用的意图,在一些实施方案中,该方法可用于从临床样品中鉴定微生物病原体。在这些实施方案中,靶标序列可以来自多种不同的病原体(例如,至少10种或至少100种不同的病原体),而不知道哪种病原体引起感染,可以使用本方法、组合物和试剂盒识别的微生物包括但不限于:多种革兰氏(+)细菌、多种革兰氏(-)细菌、多种肠杆菌科细菌、多种肠球菌属细菌、多种葡萄球菌属细菌,和多种弯曲杆菌属细菌、大肠杆菌(*E.coli*)、各种菌株的大肠杆菌(*E.coli*),比如,K12-MG1655、CFT073,0157:H7EDL933,0157:H7VT2-Sakai等,肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、多种念珠菌属物种,包含白色念珠菌、热带念珠菌、都柏林念珠菌、维斯假丝酵母、近平滑念珠菌、肺炎克雷伯氏菌、多种分枝杆菌属,比如结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、牛分枝杆菌卡介菌、瘰癧分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、龟分枝杆菌、戈氏分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、日内瓦分枝杆菌、蟾分枝杆菌(*M.xenoi*)、猿分枝杆菌、偶发分枝杆菌、玛尔摩分枝杆菌、

隐藏分枝杆菌、嗜血分枝杆菌、非洲分枝杆菌、利斯特氏菌属物种、衣原体属物种、支原体属物种、沙门氏菌属物种、布鲁氏菌属物种、耶尔森氏菌属物种等。因此,本方法能够将微生物识别到微生物的属、种、亚种、菌株或变种的水平。

[0079] 在一些实施方案中,样品中的靶标核酸序列的实施例可以来自炭疽芽孢杆菌(LF)、蓝氏贾第鞭毛虫、军团菌、总大肠菌群(包括粪便大肠菌群和大肠杆菌)、病毒(肠)葡萄球菌(例如表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌(肠毒素A、B、C、G、I、细胞、TSST-1)、粪肠球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌(志贺样毒素、F4、F5、H、K、O、噬菌体K1、K5、K13),其它革兰氏阳性菌和革兰氏阴性杆菌、艰难梭菌、拟杆菌属、微小隐孢子虫(GP900、p68或隐痛、卵囊)、白色念珠菌、炭疽芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、栗褐芽孢杆菌、芽孢杆菌、球芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌0157:H7、诺如病毒、单核细胞增生利斯特氏菌、问号钩端螺旋体、双股钩端螺旋体、空肠弯曲杆菌、大肠杆菌弯曲杆菌、产气荚膜梭菌、黄曲霉、寄生曲霉、埃博拉病毒、荚膜组织胞浆菌、皮炎芽生菌、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌(例如铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌、肠炎沙门氏菌、产气肠杆菌、赫曼肠杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌和宋内志贺氏菌)、脊髓灰质炎病毒、甲型流感病毒、疾病特异性朊病毒(PrP-d)、甲型肝炎病毒、弓形虫、霍乱弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌、粪肠球菌、屎肠球菌。

[0080] 可使用本发明的装置,系统和方法在诊断样品中检测的其它病原体包括但不限于:水痘带状疱疹、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MSRA)、金黄色葡萄球菌、人葡萄球菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌、头葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌、模拟葡萄球菌、肺炎链球菌和白色念珠菌;淋病(淋病奈瑟菌)、梅毒(梅毒螺旋菌)、衣原体(腹股沟淋巴肉芽衣原体)、非淋菌性尿道炎(解脲支原体)、软性下疳(杜克雷嗜血杆菌)、滴虫(阴道毛滴虫);铜绿假单胞菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MSRA)、肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、嗜麦芽寡养单胞菌、副流感嗜血杆菌、大肠杆菌、粪肠球菌、粘质沙雷氏菌、副溶血性嗜血杆菌、阴沟肠球菌、白色念珠菌、卡他莫拉菌、肺炎链球菌、弗氏柠檬酸杆菌、屎肠球菌、产酸克雷伯氏菌、荧光假单胞菌、脑膜炎奈瑟球菌、化脓性链球菌、卡氏肺孢子虫、肺炎克雷伯菌、嗜肺军团菌、肺炎支原体和结核分枝杆菌等。

[0081] 在特定的实施方案中,样品可以从生物样品如细胞、组织、体液和粪便中获得。感兴趣的体液包括但不限于羊水、房水、玻璃体液、血液(例如,全血、分馏的血液、血浆、血清等)、母乳、脑脊髓液(CSF)、耳垢(耳屎)、乳糜、食糜、内淋巴、外淋巴、粪便、胃酸、胃液、淋巴、粘液(包括鼻引流和痰)、心包液、腹膜液、胸膜液、脓液、风湿液、唾液、皮脂(皮肤油)、精液、痰液、汗液、滑液、泪液、呕吐物、尿液和呼出的冷凝物。在特定实施例中,样品可从受试者(例如,人)获得,且其可在用于受试者分析之前处理。例如,在分析之前,蛋白质/核酸可以在使用之前从组织样品中提取,其方法是已知的。在特定实施方案中,样品可以是临床样品,例如,从患者收集的样品。

[0082] 标记是发光标记或光学可检测标记,直接或间接地,在其与捕获剂结合之前或之后。该标记是具有拉曼散射、色度、发光、荧光、电致发光、化学发光和/或电化学发光信号的标记。如本文所用,术语“发光标记”是指在外部的激发下可发光的标记。这可以是发光。荧光标记(包括染料分子或量子点)和发光标记(例如,电致发光或化学发光标记)是发光标记的类型。外部激发是用于荧光的光(光子)、用于电致发光的电流和用于化学发光的化学反应。

外部激发可以是上述的组合。短语“标记的分析物”是指用发光标记可检测地标记的分析物,以便可以通过评估标记的存在来检测分析物。标记的分析物可以被直接标记(即,分析物本身可以直接结合标记,例如,通过强键,例如,共价键或非共价键),或者标记的分析物可以被间接标记(即,分析物与第二捕获剂结合,第二捕获剂被直接标记)。

[0083] 当靶标分析物或标记距离扩增层1nm、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、1 $\mu$ m、2 $\mu$ m、5 $\mu$ m、10 $\mu$ m或任意两个值之间的范围时;以及1nm至50nm、50nm至100nm、100nm至200nm、200nm至500nm的优选范围时,扩增层扩增来自靶标分析物或靶标分析物的标记的信号。

[0084] 术语“扩增”是指信号强度的增加,例如信号增加至少10倍、增加至少100倍、增加至少1,000倍、增加至少10,000倍,或增加至少100,000倍。

[0085] 在一些实施方案中,邻近依赖性信号扩增层包含但不限于,于2010年5月21日提交的美国临时专利申请号61/347178、于2012年4月10日提交的美国临时专利申请号61/622,226、于2012年10月1日提交的美国临时专利申请号61/708,314、于2013年3月15日提交的美国临时专利申请号61/800,915、于2013年3月15日提交的美国临时专利申请号61/801,933、于2013年3月15日提交的美国临时专利申请号61/801,096、于2013年3月15日提交的美国临时专利申请号61/801,424、于2013年3月15日提交的美国临时专利申请号61/794,317、于2014年12月10日提交的美国临时专利申请号62/090,299、于2014年10月21日提交的美国临时专利申请号62/066,777、于2015年9月29日提交的美国临时专利申请号62/234,538、于2013年6月13日提交的美国实用新型专利申请13/699,270、于2013年3月15日提交的美国实用新型专利申请号13/838,600、于2014年8月13日提交的美国实用新型专利申请号14/459,239、于2014年8月13日提交的美国实用新型专利申请号14/459,251、于2014年3月16日提交的美国实用新型专利申请号14/852,412、于2015年9月30日提交的美国实用新型专利申请号14/871,678、于2015年10月5日提交的美国实用新型专利申请号14/431,266、于2015年3月25日提交的美国实用新型专利申请号14/668,750、于2015年9月11日提交的美国实用新型专利申请号14/775,634、于2015年9月11日提交的美国实用新型专利申请号14/775,638、于2015年9月11日提交的美国实用新型专利申请号14/852,417、于2015年12月9日提交的美国实用新型专利申请号14/964,394、于2011年5月20日提交的PCT申请号(指定美国)PCT/US2011/037455、于2013年3月15日提交的PCT申请号(指定美国)PCT/US2013/032347、于2013年10月1日提交的PCT申请号(指定美国)PCT/US2013/062923、于2014年3月16日提交的PCT申请号(指定美国)PCT/US2014/030108、于2014年3月14日提交的PCT申请号(指定美国)PCT/US2014/029675、于2014年3月14日提交的PCT申请号(指定美国)PCT/US2014/028417、于2014年3月15日提交的PCT申请号(指定美国)PCT/US2014/029979、于2015年10月20日提交的PCT申请号(指定美国)PCT/US2015/056518、于2016年9月27日提交的PCT申请号(指定美国)PCT/US2016/054025中所描述的邻近依赖性信号扩增层,出于所有目的其全部公开内容通过引用并入本文。

[0086] 信号扩增层可以包括由选自金、银、铜、铝、其合金及其组合的材料制成的连续金属膜。信号扩增层包含高扩增区域和低扩增区域,其中高扩增区域比所述低扩增区域在所述表面扩增更多的信号,其中所述层的所述低扩增区域已经被选择性地掩蔽,其中所述信号扩增层包含(i)两个或更多个突起,(ii)两个或更多个金属结构,和(iii)金属结构之间

的两个或更多个间隙;因此增加了靶标分析物结合到高扩增区并被检测的可能性。

[0087] 信号扩增层可以包含:

[0088] (i) 基板上的基本连续的金属背板;

[0089] (ii) 一个或多个电介质或半导体柱,其从金属背板或从基板延伸通过背板中的孔;以及

[0090] (iii) 在柱顶部上的金属圆盘,其中圆盘的边缘的至少一部分通过间隙与金属背板分离;

[0091] 其中所述间隙以及这些金属边缘的一部分是该高信号扩增区域的一部分,其中该金属圆盘的形状选自由圆形、多边形、棱锥形、椭圆形、细长条形,或其任何组合组成的组。金属圆盘与金属膜间隔0.5nm至30nm的距离,圆盘的平均侧向尺寸为20nm至250nm;其中该信号扩增层包含一个或多个金属圆盘,该金属圆盘的形状选自由圆形、多边形、棱锥形、椭圆形、细长条形,或其任何组合组成的组,其中这些圆盘的平均侧向尺寸在20nm至250nm的范围内,并且相邻圆盘之间的间隙在0.5nm至30nm的范围内。

[0092] 其中金属结构由选自金、银、铜、铝、其合金及其组合的材料制成。

[0093] 其中所述柱是周期性的或非周期性的,或者所述金属结构具有随机形状。

[0094] 其中被扩增的信号是拉曼散射、色度、发光、荧光、电致发光、化学发光和/或电化学发光。

[0095] QMAX装置的第一板进一步包含连接捕获剂与所述信号扩增层的分子连接层,其中所述分子粘附层是自组装单层(SAM),其中SAM的每个分子包含三个部分:(i)对信号扩增层具有特异性亲和力的头部基团,(ii)对捕获剂具有特异性亲和力的末端基团,和(iii)连接头部基团和末端基团的接头,其中接头的长度决定金属信号扩增层和附着的捕获剂之间的平均间距,该平均间距可以影响装置的光放大。

[0096] QMAX装置的第二板样品接触区域可包括含有检测剂的储存位点,该检测剂在接触样品时溶解到样品中并在样品中扩散,其中每种捕获剂、靶标分析物和相应的检测剂能够在第一板的结合位点中形成捕获剂-靶标分析物-检测剂夹层体。

[0097] 根据前述段落中任一项所述的装置,其中第二板样品接触区域包括含有检测剂的储存位点,检测剂在接触样品时溶解到样品中并在样品中扩散,其中检测剂结合捕获剂并竞争性抑制捕获剂与靶标分析物之间的结合。

[0098] 在一些实施方案中,荧光标记的增强机理被称为等离子体增强。由于金属纳米结构的接近而增强的荧光强度使得我们可以以传感形式检测用荧光分子标记的生物标记的更低浓度或用于组织成像。金属增强的荧光(MEF)产生于由于荧光团经历的增强的局部场以及荧光团与近处金属纳米颗粒的电磁耦合而增加的激发速率。因此,金属纳米结构能够产生期望的效果,例如增加的荧光量子产率、降低的寿命和更好的荧光团光稳定性。在过去的十年中,许多现有的和新的纳米颗粒和结构已经出现在设计用于通过MEF改进荧光团的荧光强度和光稳定性的文献中。金属纳米结构由于其控制入射光的能力而长期以来被研究。局部表面等离子体激元(LSP)是限于金属纳米结构和纳米颗粒的电荷密度振荡。如果考虑颗粒,则外场能够相对于固定的离子核置换金属纳米颗粒中的自由电子。该位移建立了导致电荷密度的相干振荡的恢复力。这称为局部表面等离子体共振(LSPR)。LSPR是造成电磁场增强的主要原因,电磁场增强被认为导致表面增强拉曼散射(SERS)。当观察到荧光分

子在这种等离子体效应存在下表现出增强的发射时,产生了MEF场。可以看到当光被金属纳米颗粒吸收和散射时发生的不同光学响应的表现形式。由于上述机理,等离子体效应和相关增强在表面附近10nm-200nm。

[0099] 如上所述,在一些实施方案中,所述方法在没有清洗的情况下进行,其中清洗步骤是在结合步骤之后除去第一板上的未结合靶标分析物的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或任何两个值之间的范围的步骤。通常,清洗步骤包括用缓冲液清洗板1次、2次、3次。

[0100] 在一些实施方案中,第二板样品接触区域包含含有检测剂的储存位点,所述检测剂在接触样品时溶解到样品中并在样品中扩散,其中每种捕获剂、靶标分析物和相应的检测剂能够在第一板的结合位点中形成捕获剂-靶标分析物-检测剂夹层体。

[0101] 免洗均质QMAX测定灵敏度的理论分析

[0102] 确定(具有标记的)靶标分析物在基板(第一板)上的最终捕获密度(直接与测定的LoD或灵敏度相关)为 $d_c$ ;

[0103] 定义液体中的标记密度为 $D_L$ ;

[0104] 定义扩增因子为A;

[0105] 定义扩增因子在基板的 $L_A$ 内是均匀的;

[0106] 通过X-板定义液体高度为 $L_X$  ( $L_X \gg L_A$ );

[0107] 定义液体的标记信号强度标准偏差(sd)为 $\sigma$ ;

[0108] 由于来自捕获荧光团的信号必须大于来自液体的  $(1+3 \times sd) \times$  背景信号,因此:

[0109]  $Ad_c \geq (1+3\sigma)(D_L L_X + AD_L L_A)$

[0110] 用该方法可检测的最小捕获密度(与LoD成比例)是:

[0111] 
$$d_c = \frac{(1+3\sigma)(L_X + AL_A)D_L}{A}$$

[0112] 显然,增加底物的扩增系数(A)、降低QMAX厚度( $L_X$ )可以改善QMAX卡形式的免洗均相测定的性能(灵敏度)。但减小QMAX厚度可能会减小结合量。因此,存在QMAX间隙尺寸或液体厚度的参数的折衷。

[0113] 用于核酸杂交测定的QMAX装置实施例

[0114] 图2是根据本发明一些实施方案的示例性核酸杂交测定的说明。

[0115] 测定方法概述

[0116] (A). 芯片制备:捕获探针固定在基板表面;

[0117] (B). 芯片封闭:用封闭剂封闭芯片。

[0118] (C). 样品引入:将含有感兴趣的靶标的生物流体(全血、血浆、血清、唾液、尿液、汗液等)以游离核酸或含有细胞/颗粒的核酸的形式加到基板表面上;

[0119] (D) QMAX卡闭合和按压:将具有面向下的微观结构侧的QMAX卡放置在芯片的顶部并按压。将所需的细胞裂解试剂、蛋白质变性试剂、杂交试剂和标记的检测探针在QMAX Card侧进行干燥,使之具有微观结构;

[0120] (E) - (F). 细胞或颗粒裂解、靶标序列捕获和检测:将干燥的试剂溶解在生物流体中。如果需要,通过裂解试剂裂解细胞(或颗粒)以释放靶标核酸序列。释放的或游离的靶标核酸序列然后被固定在基板表面上的捕获探针捕获,并通过杂交被标记的检测探针检测;

[0121] (G).清洗:剥离QMAX卡、用含有合适清洗溶液的吸收材料清洗基板表面;

[0122] (H).信号检测:通过检测器检测来自标记的检测探针的信号。

[0123] 简要实验步骤

[0124] 如图2(A)所示,将具有与靶标核酸序列区域互补的特定序列的DNA寡核苷酸(捕获探针)涂覆在基板表面上。被称为“捕获探针(1)”的DNA寡核苷酸通常长度为10-50bp,并且3'末端被修饰以促进在基板上的涂覆。常用的3'末端修饰包括但不限于硫醇、二硫醇、胺、生物素等。可用于捕获探针固定的基板包括但不限于金表面、PMMA、PS等。涂覆在基板上的捕获探针的密度对于捕获探针的可接近性是关键,因此影响测定灵敏度。在一个应用中,可以将对单一靶标核酸序列特异的单一类型捕获探针固定在基板上。在另一个应用中,可以将特异于不同靶标核酸序列或单一靶标核酸序列的不同区域的不同类型的捕获探针固定在基板上。优选室温涂覆过夜,但可以缩短。涂覆后,使用PBST缓冲液洗掉未涂覆的捕获探针。

[0125] 如图2(B)所示,然后用封闭剂溶液封闭基板表面。合适的封闭剂包括但不限于小分子封闭剂,例如6-巯基-己醇,或蛋白质封闭剂,例如牛血清白蛋白、酪蛋白、奶粉等。封闭在室温下进行至少30分钟。然后用PBST清洗基板表面并备用。

[0126] 如图2(C)所示,将生物样品加入到涂覆有捕获探针的基板表面上。生物样品可通过直接滴加在基板表面上或通过转移工具促进而引入。可以应用的生物样品包括但不限于纯全血、血浆、血清、尿液、唾液、汗液等。感兴趣的靶标可以是游离核酸、核酸和蛋白质复合物的形式,或者在人细胞、动物细胞、植物细胞、细菌细胞、真菌细胞、病毒颗粒等内部。感兴趣的靶标包括但不限于线性核酸、环状核酸、单链核酸、双链核酸等。

[0127] [1]本文所用的术语“核酸”是指任何DNA或RNA分子,或DNA/RNA杂合体,或DNA和/或RNA的混合物。因此,术语“核酸”旨在包括但不限于基因组或染色体DNA、质粒DNA、扩增的DNA、cDNA、总RNA、mRNA、miRNA和小RNA。术语“核酸”还旨在包括天然DNA和/或RNA分子,或合成的DNA和/或RNA分子。在一些实施方案中,样品中存在无细胞核酸,如本文所用,“无细胞”表示核酸不包含在任何细胞结构中。在一些其它实施方案中,核酸包含在细胞结构中,其包括但不限于人细胞、动物细胞、植物细胞、细菌细胞、真菌细胞和/或病毒颗粒。样品中可以存在无细胞核酸形式或细胞结构内或其组合形式的核酸。在一些其他实施方案中,核酸在导入到第一板的内表面上之前被纯化。还在另外的实施方案中,核酸可以在与其它分子比如蛋白质和脂质结合的复合物内。

[0128] 如图2(D)所示,在一些实施方案中,必要的试剂,包括但不限于细胞裂解试剂、蛋白质变性试剂、核酸杂交缓冲液和标记的检测探针等,被点样或直接干燥在具有微型结构的X-板(在一些实施方案中标记为QMAX卡)的侧面。在样品引入之后,将X-板的干燥试剂(8)侧面朝下并按压在样品和基板上。

[0129] 在一些实施方案中,细胞溶解试剂包括但不限于盐、去污剂、酶和其它添加剂。本文中的术语“盐”包括但不限于锂盐(例如氯化锂)、钠盐(例如氯化钠)、钾(例如氯化钾)、三异丙基乙磺酰(Tris)和羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)。本文中的术语“去污剂”可以是离子型的,包含阴离子型和阳离子型、非离子型或两性离子型。本文所用的术语“离子去污剂”包括在溶于水时部分或全部为离子形式的任何去污剂。合适的阴离子型去污剂包括但不限于十二烷基硫酸钠(SDS)或其他碱金属烷基硫酸盐或类似的去污剂、酰肌氨酸,或它们的组

合。本文中的术语“酶”包括但不限于溶菌酶、纤维素酶和蛋白酶。此外,细胞裂解试剂中还可包括螯合剂,包含但不限于EDTA、EGTA和其他聚氨基酸,和一些还原剂,比如二硫苏糖醇(dTT)。

[0130] 如图2(E)所示,在将X-板按压在基板上之后,将干燥的试剂溶解在生物流体中。细胞裂解试剂有助于破坏细胞壁和细胞膜以释放靶标核酸分析物。蛋白质变性试剂,例如SDS,使核酸相关结合蛋白变性以释放游离核酸。干燥的杂交试剂的组成对于提供合适的盐浓度以维持杂交复合物的强度以及减少来自生物样品的非特异性结合是关键的。例如,加入氯化钠和柠檬酸钠以在杂交缓冲液中提供理想的离子强度。可以加入聚蔗糖和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)以加速杂交过程。加入牛血清白蛋白以减少来自生物样品的干扰。具有针对靶标核酸序列的特异性互补序列的标记检测探针用于通过杂交检测靶标核酸序列。

[0131] 如图(F)所示,无细胞靶标核酸序列和/或释放的靶标核酸分析物通过序列特异性杂交被捕获探针捕获。同时,用标记的检测探针通过序列特异性杂交检测捕获的靶标核酸序列。可在基板上按压X-板一定时间。实验数据表明2分钟后,捕获的靶标核酸序列达到平衡。

[0132] 如图2(g)所示,将X-板从基板上剥离。将含有合适清洗缓冲液(优选5XSSC和0.05%吐温20)的吸收材料(例如海绵)放置并轻轻地压在基板表面上。在清洗过程中,从基板表面除去细胞碎片、蛋白质、非特异性核酸等。

[0133] 在一些实施方案中,可以使用具有不同离子强度的缓冲液以增加信噪比。实施例包括但不限于0.1X SSC、0.5X SSC、1XSSC、2XSSC或5XSSC。清洗步骤通常包括清洗板1次、2次或3次或更多次。在一些实施方案中,每个清洗步骤可以使用相同类型的清洗缓冲液。在一些实施方案中,在每个清洗步骤中可以使用不同的清洗缓冲液。

[0134] 在一些实施方案中,使用0.05%吐温20。在一些实施方案中,可以使用其它去污剂。如本文所用,术语“去污剂”可以是离子的,包含阴离子和阳离子的、非离子的或两性离子的。本文所用的术语“离子去污剂”包括在溶于水时部分或全部为离子形式的任何去污剂。合适的阴离子型去污剂包括但不限于十二烷基硫酸钠(SDS)或其他碱金属烷基硫酸盐或类似的去污剂、酰肌氨酸,或它们的组合。

[0135] 如图2(H)所示,从基板上剥离吸收材料。通过合适的检测器测量从标记的检测探针产生的信号强度。

[0136] 核酸杂交测定的实施例和结果

[0137] 实施例1:使用96孔板通过IR800标记的检测探针检测M-板上TE缓冲液中的miR21杂交测定

[0138] 测定细节(参见图3):

- [0139] • 将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针在金M-板表面室温涂覆过夜;
- [0140] • PBST冲洗3次,再用50 $\mu$ MMCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0141] • 向各孔中加入50 $\mu$ l miR21靶标(在TE缓冲液中稀释),与50 $\mu$ l 1 $\mu$ MIR800标记的检测探针(在H7140杂交缓冲液中稀释)混合;
- [0142] • 室温杂交2小时;
- [0143] • 用DNA清洗剂(5XSSC+0.05%吐温20)冲洗M-板3次;
- [0144] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。



[0145] 测定结果(参见图4)：

- [0146] • 观察到标准化信号强度与TE缓冲液中miR21靶标浓度的相关性。
- [0147] • 使用2小时杂交方案在M-板上的TE缓冲液中实现了510fMmiR21靶标的LoD。
- [0148] • 实现了6个数量级的动态范围。

[0149] 实施例2:使用96孔板通过IR800标记的检测探针检测M-板上10%血浆中的miR21杂交测定。

[0150] 测定细节(参见图5)：

- [0151] • 将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针在金M-板表面室温涂覆过夜；
- [0152] • PBST冲洗3次,再用50uMMCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次；
- [0153] • 向各孔中加入50u1miR21靶标(掺入10%血浆中),与50u11uMIR800标记的检测探针(稀释于H7140杂交缓冲液中)混合；
- [0154] • 室温杂交2小时；
- [0155] • 用DNA清洗剂(5XSSC+0.05%吐温20)冲洗M-板3次；
- [0156] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。

[0157] 测定结果(参见图6)：

- [0158] • 观察到标准化信号强度与10%血浆中miR21靶标浓度之间的相关性。
- [0159] • 使用2小时杂交方案在M-板上在10%血浆中实现了820fMmiR21靶标的LoD
- [0160] • 实现了6个数量级的动态范围。
- [0161] • 10%血浆中的测定灵敏度与TE缓冲液相似,表明在血浆基质中没有显著干扰。

[0162] 实施例3:用96孔板通过IR800标记的检测探针检测M-板上纯全血中miR21杂交测定。

[0163] 测定细节(参见图7)：

- [0164] • 将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针在金M-板表面室温涂覆过夜；
- [0165] • PBST冲洗3次,再用50uMMCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次；
- [0166] • 向各孔中加入50u1miR21靶标(掺入纯全血),与50u11uMIR800标记的检测探针(在H7140杂交缓冲液中稀释)混合；
- [0167] • 室温杂交2小时；
- [0168] • 用DNA清洗剂(5XSSC+0.05%吐温20)冲洗M-板3次；
- [0169] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。

[0170] 测定结果(参见图8)：

- [0171] • 观察到标准化信号强度与纯全血miR21靶标浓度的相关性。
- [0172] • 使用2小时杂交方案在M-板上纯全血中实现了9.7pMmiR21靶标的LoD。
- [0173] • 实现了6个数量级的动态范围。
- [0174] • 在纯全血中的测定灵敏度与TE缓冲液和10%血浆相当,表明了在全血底物中的稳健测定性能。

[0175] 实施例4:时程研究——用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡通过IR800标记的检测探针检测金薄膜上纯全血miR21杂交测定。

[0176] 测定细节(参见图9)：

- [0177] • 室温下将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针涂覆在金薄膜上过夜；



- [0178] • PBST冲洗3次,再用50uMMCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0179] • 在芯片表面滴加0.5ul的1uMmiR21靶标(在纯全血中稀释),与0.5ul的1uMIR800标记的检测探针(在H7140杂交缓冲液中稀释)混合;
- [0180] • 用具有30μm间隔件的QMAX卡按压,在室温下杂交不同的时间;
- [0181] • 用DNA清洗剂(5XSSC+0.05%吐温20)冲洗芯片表面3次;
- [0182] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。
- [0183] 测定结果(参见图10):
- [0184] • 当在miR21杂交测定中使用IR800标记的检测探针,并用具有30μm间隔件的QMAX卡按压时,2分钟杂交时间的信号强度高于1分钟杂交时间的信号强度。
- [0185] • 2分钟后,信号强度饱和。
- [0186] • 因此,2分钟的杂交时间用于进一步的核酸杂交测定,包含使用IR800标记的检测探针和具有30μm间隔件的QMAX卡。
- [0187] 实施例5:时程研究--用具有30μm间隔件的QMAX卡通过链霉亲和素-40nm珠检测金薄膜上纯全血miR21杂交测定。
- [0188] 测定细节(参见图11):
- [0189] • 室温下将1μM硫醇化捕获探针涂覆在金薄膜上过夜;
- [0190] • PBST冲洗3次,再用50uMMCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0191] • 在芯片表面滴加0.5μlmiR21靶标(在TE缓冲液中稀释),与0.5μl1uM生物素化检测探针(在H7140杂交缓冲液中稀释)混合;
- [0192] • 用具有30μm间隔件的QMAX卡按压,室温杂交2分钟;
- [0193] • 用DNA清洗剂(5XSSC+0.05%吐温20)冲洗芯片表面3次;
- [0194] • 滴加1μl链霉抗生物素蛋白-40nm珠粒(在4%BSA中1:10稀释)。
- [0195] • 用具有30μm间隔件的QMAX卡按压并在室温下等待不同的时间;
- [0196] • 用DNA清洗剂冲洗芯片表面3次;
- [0197] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号
- [0198] 测定结果(参见图12):
- [0199] • 当在miR21杂交测定中使用IR800标记的检测探针,并用具有30μm间隔件的QMAX卡按压时,2分钟杂交时间的信号强度高于1分钟杂交时间的信号强度。
- [0200] • 信号强度在5min达到峰值。
- [0201] • 因此,5分钟的杂交时间用于进一步的核酸杂交测定,包含使用链霉抗生物素蛋白-40nm珠和具有30μm间隔件的QMAX卡。
- [0202] 实施例6:用具有30μm间隔件的QMAX卡通过IR800标记的检测探针检测金薄膜上TE缓冲液中的miR21杂交测定。
- [0203] 测定细节(参见图13):
- [0204] • 室温下将1μM硫醇化捕获探针涂覆在金薄膜上过夜;
- [0205] • PBST冲洗3次,再用50uMMCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0206] • 在芯片表面滴加0.5μlmiR21靶标(在TE缓冲液中稀释),与0.5μl1uMIR800标记的检测探针(在H7140杂交缓冲液中稀释)混合;
- [0207] • 用具有30μm间隔件的QMAX卡按压,室温杂交2分钟;

- [0208] • 用DNA清洗剂 (5XSSC+0.05%吐温20) 冲洗芯片表面3次;
- [0209] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。
- [0210] 测定结果 (参见图14):
- [0211] • 观察到标准化信号强度与TE缓冲液中miR21靶标浓度的相关性。
- [0212] • 在2分钟杂交下,使用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡,在TE缓冲液中实现了861pMmiR21靶标的LoD。
- [0213] • 实现了3个数量级的动态范围。
- [0214] 实施例7:使用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡,通过生物素化的检测探针和链霉抗生物素蛋白-40nm珠粒检测金薄膜上的TE缓冲液中的miR21杂交测定。
- [0215] 测定细节 (参见图15):
- [0216] • 室温下将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针涂覆在金薄膜上过夜;
- [0217] • PBST冲洗3次,再用50 $\mu$ MCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0218] • 在芯片表面滴加0.5 $\mu$ lmiR21靶标 (在TE缓冲液中稀释),与0.5 $\mu$ l1 $\mu$ M生物素化检测探针 (在H7140杂交缓冲液中稀释) 混合;
- [0219] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡按压,室温杂交2分钟;
- [0220] • 用DNA清洗剂 (5XSSC+0.05%吐温20) 冲洗芯片表面3次;
- [0221] • 滴加1 $\mu$ l链霉抗生物素蛋白-40nm珠粒 (在4%BSA中1:10稀释)。
- [0222] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡按压,室温下等待5分钟;
- [0223] • 用DNA清洗剂冲洗芯片表面3次;
- [0224] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。
- [0225] 测定结果 (参见图16):
- [0226] • 观察到标准化信号强度与TE缓冲液中miR21靶标浓度的相关性。
- [0227] • 在2分钟杂交下,使用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡,在TE缓冲液中获得了28nMmiR21靶标的LoD。
- [0228] • 实现了1个数量级的动态范围。
- [0229] 实施例8:用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡通过IR800标记的检测探针检测金薄膜上纯全血中的miR21杂交测定。
- [0230] 测定细节 (参见图17):
- [0231] • 室温下将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针涂覆在金薄膜上过夜;
- [0232] • PBST冲洗3次,再用50 $\mu$ MCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0233] • 在芯片表面滴加0.5 $\mu$ lmiR21靶标 (在纯全血中稀释),与0.5 $\mu$ l1 $\mu$ MIR800标记的检测探针 (在H7140杂交缓冲液中稀释) 混合;
- [0234] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡按压,室温杂交2分钟;
- [0235] • 用DNA清洗剂 (5XSSC+0.05%吐温20) 冲洗芯片表面3次;
- [0236] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。
- [0237] 测定结果 (参见图18):
- [0238] • 观察到标准化信号强度与纯全血中miR21靶标浓度的相关性。
- [0239] • 在2分钟杂交下,使用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡,在纯全血中实现了8.41pMmiR21靶标的LoD

- [0240] • 实现了5个数量级的动态范围。
- [0241] • 使用QMAX卡显著缩短了测定时间(从2小时到2分钟),在金薄膜上具有几乎相同的灵敏度(9.7pM相比8.41pM)。
- [0242] 实施例9:用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡通过生物素标记的检测探针和链霉亲和素-40nm珠检测金薄膜上纯全血中的miR21杂交。
- [0243] 测定细节(参见图19):
- [0244] • 室温下将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针涂覆在金薄膜上过夜;
- [0245] • PBST冲洗3次,再用50uMMCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0246] • 在芯片表面滴加0.5 $\mu$ lmiR21靶标(在纯全血中稀释),与0.5 $\mu$ l1uM生物素化检测探针(在H7140杂交缓冲液中稀释)混合;
- [0247] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡按压,室温杂交2分钟;
- [0248] • 用DNA清洗剂(5XSSC+0.05%吐温20)冲洗芯片表面3次;
- [0249] • 滴加1 $\mu$ l链霉抗生物素蛋白-40nm珠(在4%BSA中1:10稀释)。
- [0250] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡按压,室温下等待5分钟;
- [0251] • 用DNA清洗剂冲洗芯片表面3次;
- [0252] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。
- [0253] 测定结果(参见图20):
- [0254] • 观察到标准化信号强度与纯全血中miR21靶标浓度的相关性。
- [0255] • 使用2min杂交方案在纯全血中实现了8.8nMmiR21靶标的LoD
- [0256] • 实现了2个数量级的动态范围。
- [0257] 实施例10:使用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡,通过生物素化的检测探针和链霉抗生物素蛋白-40nm珠粒检测金薄膜上纯全血中的miR21杂交测定。
- [0258] 测定细节(参见图21):
- [0259] • 室温下将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针涂覆在金薄膜上过夜;
- [0260] • PBST冲洗3次,再用50uMMCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0261] • 在芯片表面滴加0.5 $\mu$ lmiR21靶标(在纯全血中稀释),与0.5 $\mu$ l1uM生物素化检测探针(在H7140杂交缓冲液中稀释)混合;
- [0262] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡按压,室温杂交2分钟;
- [0263] • 用DNA清洗剂(5XSSC+0.05%吐温20)冲洗芯片表面3次;
- [0264] • 滴加1 $\mu$ l链霉抗生物素蛋白-40nm珠(在4%BSA中1:10稀释)。
- [0265] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡按压,室温下等待5分钟;
- [0266] • 用DNA清洗剂冲洗芯片表面3次;
- [0267] • 使用倒置显微镜进行像素化测量。
- [0268] 测定结果(参见图22)
- [0269] • 观察到标准化信号强度与纯全血中miR21靶标浓度的相关性。
- [0270] • 在2分钟杂交下,使用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡,在纯全血中实现了87pMmiR21靶标的LoD。
- [0271] • 实现了2个数量级的动态范围。
- [0272] 实施例11:用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡,用生物素标记的检测探针和链霉亲和素-

Cy5检测金薄膜上纯全血中的miR21杂交测定。

[0273] 测定细节 (参见图23) :

- [0274] • 室温下将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针涂覆在金薄膜上过夜;
- [0275] • PBST冲洗3次,再用50 $\mu$ MCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0276] • 在芯片表面滴加0.5 $\mu$ l miR21靶标 (在纯全血中稀释),与0.5 $\mu$ l 1 $\mu$ M生物素化检测探针 (在H7140杂交缓冲液中稀释) 混合;
- [0277] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡按压,室温杂交2分钟;
- [0278] • 用DNA清洗剂 (5XSSC+0.05%吐温20) 冲洗芯片表面3次;
- [0279] • 滴加1 $\mu$ l 500ng/ml链霉抗生物素蛋白-Cy5。
- [0280] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡按压,室温下等待2分钟;
- [0281] • 用DNA清洗剂冲洗芯片表面3次;
- [0282] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。

[0283] 测定结果 (参见图24)

- [0284] • 观察到标准化信号强度与纯全血中miR21靶标浓度的相关性。
- [0285] • 在2分钟杂交下,使用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡,在纯全血中实现了68pM miR21靶标的LoD。
- [0286] • 实现了4个数量级的动态范围。
- [0287] • 使用链霉抗生物素蛋白-Cy5作为检测标记 (68pM) 的测定灵敏度不如使用IR800作为标记 (8.41pM) 的好。

[0288] 实施例12:用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡通过IR800标记的检测探针检测M-板上纯全血中的miR21杂交测定。

[0289] 测定细节 (参见图25) :

- [0290] • 室温下将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针涂覆在M-板上过夜;
- [0291] • PBST冲洗3次,再用50 $\mu$ MCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0292] • 在芯片表面滴加0.5 $\mu$ l miR21靶标 (在纯全血中稀释),与0.5 $\mu$ l 1 $\mu$ MIR800标记的检测探针 (在H7140杂交缓冲液中稀释) 混合;
- [0293] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡按压,室温杂交2分钟;
- [0294] • 用DNA清洗剂 (5XSSC+0.05%吐温20) 冲洗M-板3次;
- [0295] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。

[0296] 测定结果 (参见图26)

- [0297] • 观察到标准化信号强度与纯全血中miR21靶标浓度的相关性。
- [0298] • 在2分钟杂交下,使用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡,在纯全血中实现了10pM miR21靶标的LoD。
- [0299] • 实现了5个数量级的动态范围。
- [0300] • 同样,使用QMAX卡显著缩短了测定时间 (从2小时到2分钟),在金薄膜上具有几乎相同的灵敏度 (10pM相比8.41pM)。

[0301] • 然而,使用M-板不能提高测定灵敏度,这可能是由于M-板的质量差。

[0302] 实施例13:用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡通过IR800标记的检测探针检测M-板上纯全血中的miR21杂交测定。

[0303] 测定细节(参见图27):

- [0304] • 室温下将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针涂覆在M-板上过夜;
- [0305] • PBST冲洗3次,再用50uMMCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0306] • 在芯片表面滴加0.5 $\mu$ l miR21靶标(在纯全血中稀释),与0.5 $\mu$ l 1uMIR800标记的检测探针(在H7140杂交缓冲液中稀释)混合;
- [0307] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡按压,室温杂交2分钟;
- [0308] • 用DNA清洗剂(5XSSC+0.05%吐温20)冲洗M-板3次;
- [0309] • 使用倒置显微镜进行像素化测量。

[0310] 测定结果(参见图28)

- [0311] • 观察到标准化信号强度与纯全血中miR21靶标浓度的相关性
- [0312] • 用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡,在2min杂交条件下,用像素化测量法,在纯全血中实现了350fMmiR21靶标的LoD
- [0313] • 当通过像素化方法(350fM)测量时,它比相同测定的Lump-sum测量方法(10pM)的敏感度高大约2个数量级

[0314] 实施例14:通过IR800标记的检测探针检测30 $\mu$ m X-孔上纯全血中的miR21杂交测定。

[0315] 测定细节(参见图29):

- [0316] • 室温下将1 $\mu$ M硫醇化捕获探针涂覆在X-孔上过夜;
- [0317] • PBST冲洗3次,再用50uMMCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0318] • 在芯片表面滴加0.5 $\mu$ l miR21靶标(在纯全血中稀释),与0.5 $\mu$ l 1uMIR800标记的检测探针(在H7140杂交缓冲液中稀释)混合;
- [0319] • 用PET薄膜按压,室温下杂交2分钟;
- [0320] • 用DNA清洗剂(5XSSC+0.05%吐温20)冲洗X-孔3次;
- [0321] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。

[0322] 测定结果(参见图30)

- [0323] • 观察到标准化信号强度与纯全血中miR21靶标浓度的相关性
- [0324] • 使用具有30 $\mu$ m间隔件的QMAX卡,在2min杂交下,在纯全血中实现了140fMmiR21靶标的LoD

- [0325] • 用PET膜按压略微改善了LoD(按压LoD=140pM与没有按压LoD=336pM)

[0326] 实施例15:使用96孔板通过IR800标记的检测探针检测M-板上纯全血中的miR21杂交中的单碱基对分化。

[0327] 测定细节(参见图31和32):

- [0328] • 将500nM硫醇化捕获探针在金M-板表面室温涂覆过夜;
- [0329] • PBST冲洗3次,再用50uMMCH封闭30分钟,再用PBST冲洗3次;
- [0330] • 向各孔中加入50u1的10nMmiR21靶标(在纯全血中稀释),与50u1的100nMIR800标记的检测探针(在H7140杂交缓冲液中稀释)混合;
- [0331] • 室温杂交2小时;
- [0332] • 用DNA清洗剂(1XSSC+0.05%吐温20)冲洗M-板3次;
- [0333] • 利用拉曼显微镜测量一次性集总信号。

[0334] 测定结果(参见图33或34):

[0335] • 完全匹配的miR21靶标在所有测试的错配靶标中产生最高的信号强度。

[0336] • 错配碱基对对信号强度的影响取决于位置。

[0337] • 位于杂交区域中心的错配碱基对比位于杂交区域末端的错配碱基对具有更显著的影响。

[0338] • 即使仅在杂交区末端引入单个错配碱基对,其导致信号强度降低约3倍

[0339] 实验条件概述

实施例	样品	方法	基板	体积	标记	测量	LoD
1	TE	96 孔	M-板	100 ul	IR800	一次性集总	510nm
2	10 %血浆	96 孔	M-板	100 ul	IR800	一次性集总	820 fM
3	全血	96 孔	M-板	100 ul	IR800	一次性集总	9.7 pM
4	全血	96 孔	M-板	100 ul	IR800	一次性集总	
[0340] 5	全血	96 孔	M-板	100 ul	IR800	一次性集总	
6	TE	X-板	金薄膜	1 ul	IR800	一次性集总	861 pM
7	TE	X-板	金薄膜	1 ul	40 纳米珠粒	一次性集总	28nm
8	全血	X-板	金薄膜	1 ul	IR800	一次性集总	8.41 pM
9	全血	X-板	金薄膜	1 ul	40 纳米珠粒	一次性集总	8.8nm

	10	全血	X-板	金薄膜	1 ul	40 纳米珠粒	像素化	87 pM
	11	全血	X-板	金薄膜	1 ul	Cy5	一次性集总	68 pM
[0341]	12	全血	X-孔	M-板	1 ul	IR800	一次性集总	10 pM
	13	全血	X-板	M-板	1 ul	IR800	像素化	350 fM
	14	全血	X-孔		1.5 ul	IR800	一次性集总	140 pM
	15	全血	X-孔		1.5 ul	IR800	一次性集总	

[0342] 在所有实验中,分析物是miR21核酸。

[0343] 本发明的实施例

[0344] A1.一种用于核酸杂交测定的装置,包含:

[0345] 第一板、第二板以及间隔件,其中:

[0346] i. 板可相对于彼此移动成不同的构造;

[0347] ii. 每个板分别包括内表面,内表面具有用于接触包含核酸分析物的样品的样品接触区域,

[0348] iii. 这些间隔件具有预定的基本上均匀的高度,

[0349] iv. 该第一板包括涂覆在该第一板的内表面上的核酸捕获探针,并且

[0350] v. 第二板包括涂覆在第二板的内表面上的核酸检测探针;

[0351] 所述构造之一是开放构造,其中:这两个板是部分或完全分开的,这些板之间的间距不受这些间隔件调节,并且该样品被沉积在这些板中的一个或两个上;

[0352] 所述构造中的另一个是闭合构造,该闭合构造是在样品以开放构造沉积之后的构造,并且在该闭合构造中:在两个板之间至少有一个间隔件,沉积的样品的至少一部分被板压缩成厚度高度均匀的层,并且相对于板基本上停滞,其中层的均匀厚度受到两个板的内表面限制并由板和间隔件调节;

[0353] 其中该捕获探针被构造成互补地结合到该分析物的一部分上并且将该分析物固定到该第一板的内表面上;以及

[0354] 其中该检测探针被构造成扩散到具有均匀厚度的层中并且互补地结合到该分析物的另一部分上以产生可检测信号。

[0355] B1.一种核酸分析方法,包含:

[0356] (a) 获得包含核酸分析物的液体样品;

[0357] (b) 获得段落A1-A12中任一段所述的装置;其中:

[0358] (c) 当板处于开放构造时将样品沉积在一个或两个板上,

[0359] (d) 在(c)之后,将这两个板结合在一起并且将这些板按压成闭合构造,

[0360] (e) 检测和测量来自均匀厚度层的信号,从而确定核酸分析物的存在和/或量。

[0361] A2.根据实施方案A1所述的装置,其中该第一板进一步包含涂覆在该第一板的内表面上的封闭剂。

[0362] A3.根据前述任一实施方案所述的装置,其中第一板和/或第二板进一步包含涂覆在相应板的内表面上的稳定剂。

[0363] A4.根据实施方案A3所述的装置,其中稳定剂选自:糖,聚合物,甘油及其混合物。

[0364] A5.根据实施方案A3所述的装置,其中稳定剂是蔗糖或葡萄糖。

[0365] A6.根据前述任一实施方案所述的装置,其中捕获探针共价结合到第一板的内表面。

[0366] A7.根据前述任一实施方案所述的装置,其中捕获探针通过硫醇键结合到第一板的内表面。

[0367] A8.根据实施方案A7所述的装置,其中附着试剂是蛋白A。

[0368] A9.根据前述任一实施方案所述的装置,其中样品包含全血。

[0369] A10.根据前述任一实施方案所述的装置,其中样品包含血清。

[0370] A11.根据前述任一实施方案所述的装置,其中间隔件固定在第二板的内表面上。

[0371] A12.根据前述任一实施方案所述的装置,其中检测探针和/或捕获探针具有10-40bp的长度。

[0372] B2.根据实施方案B1所述的方法,其中第一板还包括涂覆在第一板的内表面上的封闭剂。

[0373] B3.根据前述任一实施方案所述的方法,其中第一板和/或第二板进一步包含涂覆在相应板的内表面上的稳定剂。

[0374] B4.根据实施方案B3所述的方法,其中稳定剂选自:糖、聚合物、甘油及其混合物。

[0375] B5.根据实施方案B3所述的方法,其中稳定剂是蔗糖或葡萄糖。

[0376] B6.根据前述任一实施方案所述的方法,其中捕获探针共价结合到第一板的内表面。

[0377] B7.根据前述任一实施方案所述的方法,其中捕获探针通过内表面与结合到捕获

探针的附着试剂上的非极性残基之间的疏水性相互作用,通过被动吸收而附着到第一板的内表面。

[0378] B8.根据实施方案B7所述的方法,其中附着试剂是蛋白A。

[0379] B8.根据前述任一实施方案所述的方法,其中样品包含全血。

[0380] B9.根据前述任一实施方案所述的方法,其中样品包含血浆。

[0381] B10.根据前述任一实施方案所述的方法,其中间隔件固定在第二板的内表面上。

[0382] B11.根据前述任一实施方案所述的方法,在步骤(e)之前和步骤(d)之后,还包括将均匀厚度的层孵育预定时间段。

[0383] B12.根据实施方案B11所述的方法,其中预定时间段等于或长于检测探针穿过均匀厚度层扩散到样品中所需的时间。

[0384] B13.根据前述任一实施方案所述的方法,其中样品沉积在第一板上。

[0385] B14.根据前述任一实施方案所述的方法,在步骤(c)之后步骤(d)之前,进一步包含将样品在第一板上孵育预定时间段。

[0386] B15.根据实施方案B14所述的方法,其中预定时间段等于或长于捕获探针和分析物之间结合达到平衡所需的时间。

[0387] B16.根据前述任一实施方案所述的方法,在步骤(d)之前和步骤(c)之后,进一步包含清洗第一板的内表面。

[0388] B17.根据前述任一实施方案所述的方法,在步骤(e)之前和步骤(d)之后,进一步包含将板切换到开放构造并且清洗第一板的内表面。

[0389] B18.根据前述任一实施方案所述的方法,其中第一板的内表面用吸附在海绵中的清洗液清洗。

[0390] B19.根据前述任一实施方案所述的方法,其中通过挤压海绵以将清洗溶液释放到第一板的内表面上并松开海绵以再吸收清洗溶液来进行清洗。

[0391] B20.根据前述任一实施方案所述的方法,其中清洗改进了对可检测信号的检测极限(LOD)。

[0392] 相关文件

[0393] 本发明包括各种实施方案,只要各种组分彼此不矛盾就可以以多种方式组合。实施方案应当被认为是单个发明文件:每个申请具有作为参考文献的其它申请,并且也出于所有目的而整体地被引用,而不是作为离散的独立文件。这些实施方案不仅包括当前文件中的公开内容,而且包括在此引用、并入或要求优先权的文件。

[0394] (1) 定义

[0395] 在本申请中或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/426065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中定义了用于描述本文公开的装置、系统和方法的术语,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0396] 术语“CROF卡(或卡)”、“COF卡”、“QMAX卡”、“Q卡”、“CROF装置”、“COF装置”、“QMAX装置”、“CROF板”、“COF板”以及“QMAX-板”是可互换的,除了在一些实施方案中,COF卡不包括间隔件;并且这些术语是指一种装置,该装置包括第一板和第二板,第一板和第二板可相对



于彼此移动成不同构造(包括开放构造和闭合构造),并且该装置包括用于调节板间间距的间隔件(COF卡的一些实施方案除外)。术语“X-板”是指CROF卡中的两个板之一,其中间隔件固定到该板。在2017年2月7日提交的序列号为62/456065的临时申请中有给出COF卡、CROF卡和X-板的更多描述,出于所有目的将该申请整体并入本文。

#### [0397] (2) Q卡、间隔件和均匀样品厚度

[0398] 本文公开的装置、系统和方法可包括或使用Q卡、间隔件和均匀样品厚度实施方式,用于样品检测、分析和量化。在一些实施方案中,Q卡包括间隔件,其有助于使样品的至少一部分成为高度均匀的层。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/426065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了间隔件的结构、材料、功能、变化和尺寸以及间隔件和样品层的均匀性,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

#### [0399] (3) 铰链、开放凹口、凹槽边缘和滑块

[0400] 本文公开的装置、系统和方法可以包括或使用Q卡,用于样品检测、分析和量化。在一些实施方案中,Q卡包括铰链、凹口、凹槽和滑块,其有助于促进Q卡的操作和样品的测量。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/426065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了铰链、凹口、凹槽和滑块的结构、材料、功能、变化和尺寸,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

#### [0401] (4) Q卡、滑块和智能手机检测系统

[0402] 本文公开的装置、系统和方法可以包括或使用Q卡,用于样品检测、分析和量化。在一些实施方案中,Q卡与滑块一起使用,所述滑块允许智能手机检测系统读取该卡。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/426065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了Q卡、滑块和智能手机检测系统的结构、材料、功能、变化、尺寸和连接,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

#### [0403] (5) 检测方法

[0404] 本文公开的装置、系统和方法可包括或用于各种类型的检测方法。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/426065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了检测方法,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

#### [0405] (6) 标记

[0406] 本文公开的装置、系统和方法可以采用用于分析物检测的各种类型的标记。在本

文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/426065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了标记,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0407] (7) 分析物

[0408] 本文公开的装置、系统和方法可用于操作和检测各种类型的分析物(包括生物标记)。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/426065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了分析物,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0409] (8) 应用(领域和样品)

[0410] 本文公开的装置、系统和方法可以用于各种应用(领域和样品)。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/426065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了应用,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0411] (9) 云

[0412] 本文公开的装置、系统和方法可以采用云技术进行数据传输、存储和/或分析。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/426065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了相关的云技术,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0413] 柱间隔件的平顶

[0414] 在本发明的某些实施方案中,间隔件是具有平坦顶部和固定在一个板上的脚部的柱,其中平坦顶部具有表面变化小的平滑度,且变化小于5nm、10nm、20nm、30nm、50nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、1000nm,或在任何两个值之间的范围内。优选的平柱顶光滑度是50nm或更小的表面变化。

[0415] 此外,表面变化是相对于间隔件高度的,且柱平顶表面变化与间隔件高度的比率小于0.5%、1%、3%、5%、7%、10%、15%、20%、30%、40%,或在任何两个值之间的范围内。优选的平柱顶光滑度具有小于2%、5%或10%的柱平顶表面变化与间隔件高度的比率。

[0416] 柱间隔件的侧壁角度

[0417] 在本发明的某些实施方案中,间隔件是具有侧壁角的柱。在一些实施方案中,侧壁角小于5度(从表面的法向测量)、10度、20度、30度、40度、50度、70度,或在任何两个值之间的范围内。在优选实施例中,侧壁角度小于5度、10度或20度。

[0418] 通过不精确的压力按压形成均匀的薄流体层

[0419] 在本发明的某些实施方案中,通过使用具有不精确力的按压形成均匀的薄流体样品层。术语“不精确按压力”没有增加细节,然后增加不精确按压力的定义。如本文所用,在力(例如,“不精确按压力”)的上下文中,术语“不精确”是指力

[0420] (a) 具有在施加力时未知或不可精确预测的量值;(b) 具有在 $0.01\text{kg}/\text{cm}^2$  (平方厘米)至 $100\text{kg}/\text{cm}^2$ 范围内的压力,(c) 从一次施加力到下一次施加力的量值变化;以及(d) (a)和(c)中的力的不精确度(即变化)是实际施加的总力的至少20%。

[0421] 不精确的力可以由人手施加,例如,通过在拇指和食指之间将物体夹在一起,或者通过在拇指和食指之间将物体夹在一起并摩擦在一起。

[0422] 在一些实施方案中,手按压的不精确力具有 $0.01\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $0.1\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $0.5\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $2\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $5\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $10\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $20\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $30\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $40\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $50\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $60\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $100\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $150\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $200\text{kg}/\text{cm}^2$ 、或任何两个值之间的范围;和 $0.1\text{kg}/\text{cm}^2$ 至 $0.5\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $0.5\text{kg}/\text{cm}^2$ 至 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 至 $5\text{kg}/\text{cm}^2$ 、 $5\text{kg}/\text{cm}^2$ 至 $10\text{kg}/\text{cm}^2$  (压力)的优选范围的压力。

[0423] 间隔件填充系数。

[0424] 术语“间隔件填充系数”或“填充系数”是指间隔件接触面积与总板面积的比率,其中间隔件接触面积在闭合构造下是指间隔件的顶表面接触到板的内表面的接触面积,总板面积是指间隔件平顶接触的那个板的内表面的总面积。由于存在两个板并且每个间隔件具有两个接触表面,每个接触表面接触一个板,所以填充系数是最小的填充系数。

[0425] 例如,如果间隔件是具有正方形( $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ )的平顶、几乎均匀的横截面和 $2\mu\text{m}$ 高的柱,并且间隔件是周期性的,周期为 $100\mu\text{m}$ ,则间隔件的填充系数是1%。如果在上述示例中,柱间隔件的脚部是 $15\mu\text{m} \times 15\mu\text{m}$ 的正方形,则填充系数仍是定义的1%。

[0426] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中间隔件具有柱状形状和几乎均匀的横截面。

[0427] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中间隔件间距(SD)等于或小于约 $120\mu\text{m}$  (微米)。

[0428] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中间隔件间距(SD)等于或小于约 $100\mu\text{m}$  (微米)。

[0429] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中间隔件间距(ISD)的四次方除以柔性板的厚度(h)和杨氏模量(E) ( $\text{ISD}^4/(\text{hE})$ ) 为 $5 \times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{GPa}$ 或更小。

[0430] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中间隔件间距(ISD)的四次方除以柔性板的厚度(h)和杨氏模量(E) ( $\text{ISD}^4/(\text{hE})$ ) 为 $5 \times 10^5 \mu\text{m}^3/\text{GPa}$ 或更小。

[0431] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中间隔件具有柱状形状、大致平坦的顶表面、预定的大致均匀的高度和预定的恒定间隔件间距,间隔件间距比分析物的尺寸大至少约2倍,其中间隔件的杨氏模量乘以间隔件的填充系数等于或大于 $2\text{MPa}$ ,其中填充系数是间隔件接触面积与总板面积的比率,且其中对于每一间隔件,间隔件的侧向尺寸与其高度的比率为至少1(一)。

[0432] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中间隔件具有柱状形状、大致平坦的顶表面、预定的大致均匀的高度和预定的恒定间隔件间距,该间隔件间距比分析物的尺寸大至少约2倍,其中间隔件的杨氏模量乘以间隔件的填充系数等于或大于 $2\text{MPa}$ ,其中该填

充系数是该间隔件接触面积与该总板面积的比率,并且其中对于每个间隔件,间隔件的侧向尺寸与其高度的比率为至少1(一),其中间隔件间距(ISD)的四次方除以柔性板的厚度(h)和杨氏模量(E) ( $ISD^4/(hE)$ ) 为 $5 \times 10^6 \mu m^3/GPa$ 或更小。

[0433] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中间隔件的间隔件间距与间隔件的平均宽度的比率为2或更大,且间隔件的填充系数乘以间隔件的杨氏模量为2MPa或更大。

[0434] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中分析物是蛋白质、肽、核酸、合成化合物或无机化合物。

[0435] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品是生物样品,生物样品选自羊水、房水、玻璃体液、血液(例如,全血、分馏的血液、血浆或血清)、母乳、脑脊髓液(CSF)、耳垢(耳屎)、乳糜、食糜、内淋巴、外淋巴、粪便、呼吸、胃酸、胃液、淋巴、粘液(包括鼻引流和痰)、心包液、腹膜液、胸膜液、脓液、风湿、唾液、呼出的冷凝物、皮脂、精液、痰液、汗液、滑液、泪液、呕吐物和尿液。

[0436] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中所述间隔件呈柱状且柱的宽度与高度的比率等于或大于1。

[0437] 根据前述任一实施方案所述的方法,其中沉积在一个或两个板上的样品具有未知体积。

[0438] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中间隔件具有柱的形状,且柱具有基本上均匀的横截面。

[0439] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品用于检测、纯化和定量与某些疾病的阶段相关的化合物或生物分子。

[0440] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品与传染病和寄生虫病、损伤、心血管疾病、癌症、精神障碍、神经精神障碍、肺病、肾病以及其他器质性疾病有关。

[0441] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品涉及微生物的检测、纯化和定量。

[0442] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品涉及来自环境(例如,水、土壤或生物样品)的病毒、真菌和细菌。

[0443] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品涉及对食品安全或国家安全造成危害的化合物或生物样品(例如,有毒废物、炭疽)的检测、定量。

[0444] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品与医学或生理监视器中的生命参数的量化相关。

[0445] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品与葡萄糖、血液、氧水平、总血细胞计数相关。

[0446] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品与来自生物样品的特异性DNA或RNA的检测和定量相关。

[0447] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品与用于基因组分析的染色体和线粒体中DNA的遗传序列的测序和比较相关。

[0448] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品涉及例如在药物合成或纯化期间检测反应产物。

[0449] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品是细胞、组织、体液和粪便。

[0450] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品是人、兽医、农业、食品、环境和药物测试领域中的样品。

[0451] 根据前述任一实施方案所述的方法或装置,其中样品是选自毛发、指甲、耳蜡、呼吸、结缔组织、肌肉组织、神经组织、上皮组织、软骨、癌样品或骨的生物样品。

[0452] 根据前述任一实施方案所述的装置或方法,其中间隔件间距在 $5\mu\text{m}$ 到 $120\mu\text{m}$ 的范围内。

[0453] 根据前述任一实施方案所述的装置或方法,其中间隔件间距在 $120\mu\text{m}$ 到 $200\mu\text{m}$ 的范围内。

[0454] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中柔性板具有在 $20\mu\text{m}$ 到 $250\mu\text{m}$ 范围内的厚度和在 $0.1$ 到 $5\text{GPa}$ 范围内的杨氏模量。

[0455] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中对于柔性板,柔性板的厚度乘以柔性板的杨氏模量在 $60$ 到 $750\text{GPa}\cdot\mu\text{m}$ 的范围内。

[0456] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中均匀厚度样品层在至少 $1\text{mm}^2$ 的侧向区域上是均匀的。

[0457] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中均匀厚度样品层在至少 $3\text{mm}^2$ 的侧向区域上是均匀的。

[0458] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中均匀厚度样品层在至少 $5\text{mm}^2$ 的侧向区域上是均匀的。

[0459] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中均匀厚度样品层在至少 $10\text{mm}^2$ 的侧向区域上是均匀的。

[0460] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中均匀厚度样品层在至少 $20\text{mm}^2$ 的侧向区域上是均匀的。

[0461] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中均匀厚度样品层在 $20\text{mm}^2$ 到 $100\text{mm}^2$ 范围内的侧向区域上是均匀的。

[0462] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中均匀厚度样品层具有高达 $\pm 5\%$ 或更好的厚度均匀性。

[0463] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中均匀厚度样品层具有高达 $\pm 10\%$ 或更好的厚度均匀性。

[0464] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中均匀厚度样品层具有高达 $\pm 20\%$ 或更好的厚度均匀性。

[0465] 根据前述任一装置实施方案所述的装置,其中均匀厚度样品层具有高达 $\pm 30\%$ 或更好的厚度均匀性。

[0466] 其他注释

[0467] 在以下列举的段落中描述了本公开所述的发明主题的其他实施例。

[0468] 必须注意,如本文和所附权利要求中所使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指示对象,除非上下文另外明确指出,例如当使用词语“单个”时。例如,提及“分析物”包括单个分析物和多个分析物,提及“捕获剂”包括单个捕获剂和多个捕获剂,提及“检测剂”包括单个检测剂和多个检测剂,提及“试剂”包括单个试剂和多个试剂。

[0469] 如本文所用,术语“适配”和“配置”是指元件、部件或其他物件被设计和/或用于执

行给定功能。因此,术语“适配”和“配置”的使用不应被解释为表示给定的元件、组件或其他物件简单地“能够”执行给定的功能。类似地,被表述为配置以执行特定功能的物件可以另外或可选地被描述为可操作以执行该功能。

[0470] 如本文所用,当提及本公开所述的一个或多个部件、特征、细节、结构、实施方案和/或方法时,使用短语“例如”、短语“作为示例”和/或仅仅为术语“示例”和“示例性”旨在传达所描述的部件、特征、细节、结构、实施方案、和/或方法是本公开所述的部件、特征、细节、结构、实施方案、和/或方法的说明性的、非排他性的示例。因此,所描述的部件、特征、细节、结构、实施方案、和/或方法不是限制性的、必需的或排他性的/穷尽的;并且其他部件、特征、细节、结构、实施方案、和/或方法,包含结构上和/或功能上类似和/或等效的部件、特征、细节、结构、实施方案、和/或方法,也在本公开的范围。

[0471] 如本文所用,关于一个以上实体的列表,短语“至少一个”和“一个或多个”是指实体列表中的任何一个或多个实体,并且不限于实体列表中具体列出的每个实体中的至少一个。例如,“A和B中的至少一个”(或等同地,“A或B中的至少一个”,或等同地,“A和/或B中的至少一个”)可指单独的A、单独的B,或A和B的组合。

[0472] 如本文所用,置于第一实体和第二实体之间的术语“和/或”是指以下情况之一:(1) 第一实体,(2) 第二实体,以及(3) 第一实体和第二实体。使用“和/或”列出的多个实体应当以相同的方式来解释,即如此结合的实体的“一个或多个”。除了由“和/或”子句具体标识的实体之外,可以任选地存在其他实体,无论其与具体标识的那些实体相关还是无关。

[0473] 当本文提及数值范围时,本发明包括其中包括端点的实施方案,其中排除两个端点的实施方案,以及其中包括一个端点而排除另一个端点的实施方案。应当假定包括两个端点,除非另有说明。此外,除非另有说明或从上下文和本领域普通技术人员的理解来看是显而易见的。

[0474] 在任何专利、专利申请或其他参考文献通过引用并入本文并且(1) 定义术语的方式与本公开的未并入部分或任何其他并入的参考文献不一致和/或(2) 以其他方式与本公开的未并入部分或任何其他并入的参考文献不一致的情况下,应当以本公开的未并入部分为准,并且术语或其中并入的公开内容应当仅以术语被定义和/或并入的公开内容最初存在的参考文献为准。

#### 具体实施方式

[0475] 以下详细描述通过示例而非限制的方式示出了本发明的一些实施方案。本文使用的章节标题和任何副标题仅用于组织目的,而不应被解释为以任何方式限制所描述的主题。章节标题和/或副标题下的内容不限于章节标题和/或副标题,而是适用于本发明的整个描述。

[0476] 任何出版物的引用是为了在申请日之前公开,并且不应被解释为承认本权利要求无权凭借在先发明而先于此类出版物。此外,所提供的公开日期可以不同于实际的公开日期,实际的公开日期可能需要被独立地确认。

[0477] 术语“CROF卡(或卡)”、“COF卡”、“QMAX卡”、“Q卡”、“CROF装置”、“COF装置”、“QMAX装置”、“CROF板”、“COF板”以及“QMAX-板”是可互换的,除了在一些实施方案中,COF卡不包括间隔件;并且这些术语是指一种装置,该装置包括第一板和第二板,第一板和第二板可相对于彼此移动成不同的构造(包括开放构造和闭合构造),并且该装置包括调节板间间距的间

隔件(COF的一些实施方案除外)。术语“X-板”是指CROF卡中的两个板之一,其中间隔件固定到该板。COF卡、CROF卡和X板的更多描述在于2017年2月7日提交的申请号为62/456065的临时申请和于2017年2月8日提交的申请号为62/456287的美国临时申请以及于2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中描述,所有这些文献的全部内容出于所有目引入本文。

[0478] 用于核酸捕获测序的QMAX装置

[0479] 图1是QMAX(Q:量化;M:扩增;A:加入试剂;X:加速;也称为压缩调节开放流(CROF))装置的示例性实施方案的示意图;,该装置可用于捕获用于测序的核酸。在图1中,QMAX装置处于开放构造。(a)QMAX包括第一板,第二板和第二板上的孔。(b)第一板上的孔阵列的顶视图。(c)第二板上的柱阵列的顶视图。

[0480] 一种用于捕获用于测序的核酸的QMAX装置,包含:

[0481] 第一板,第二板和孔,其中

[0482] (a)第一板和第二板可相对于彼此移动成不同的构造,并且在其各自的表面上具有用于接触包含靶标分析物的流体样品的样品接触区域;

[0483] (b)所述第二板在所述样品接触区域中具有多个孔,其中每个孔具有(i)50 $\mu$ m或更小的孔深度,(ii)基本上小于所述样品的孔体积,和(iii)捕获探针的结合位点,捕获探针固定在所述位点,并且所述捕获探针捕获所述靶标探针;

[0484] 其中所述构造之一是开放构造,其中:所述第一板的内表面与所述第二板中的孔的边缘之间的平均间距为至少300 $\mu$ m,并且所述样品沉积在所述板中的一个或两个上;

[0485] 其中所述构造中的另一种是闭合构造,所述闭合构造是在所述样品以所述开放构造沉积之后的构造;在闭合构造中,样品的至少一部分在孔内,并且第一板的内表面和第二板中的孔的边缘之间的平均间距小于开放构造中的平均间距的1/10(十分之一)。

[0486] 图36是QMAX的第一板上的孔的示例性实施例的示意图。(a)第一板上的孔的顶视图:(i)圆形孔,构成正方形点阵,(ii)矩形孔,构成正方形点阵,(iii)三角形孔,构成六边形点阵,(iv)圆形孔,无周期性。(b)第一板上的孔阵列的顶视图:(i)无金属涂层(ii)在孔底部上具有金属涂层(iii)在孔侧壁上具有金属涂层(iv)在孔的底部和侧壁上都具有金属涂层。

[0487] 在一些实施方案中,第一板上的孔的间距(孔到孔中心的平均距离)为1nm、10nm、100nm、500nm、1 $\mu$ m、5 $\mu$ m、50 $\mu$ m、500 $\mu$ m、1mm或任何两个值之间的范围;以及10nm至100nm、100nm至500nm、500nm至1 $\mu$ m、1 $\mu$ m至10 $\mu$ m或10 $\mu$ m至50 $\mu$ m的优选范围(间距)。

[0488] 在一些实施方案中,第一板上的孔的尺寸(平均长度或直径)为1nm、10nm、100nm、500nm、1 $\mu$ m、5 $\mu$ m、50 $\mu$ m、500 $\mu$ m、1mm,或任何两个值之间的范围;和10nm-100nm、100nm-500nm、500nm-1 $\mu$ m、1 $\mu$ m-10 $\mu$ m或10 $\mu$ m-50 $\mu$ m(尺寸)的优选范围。

[0489] 在一些实施方案中,第一板上的孔的深度为1nm、10nm、100nm、500nm、1 $\mu$ m、5 $\mu$ m、50 $\mu$ m、500 $\mu$ m、1mm,或任何两个值之间的范围;以及10nm至100nm、100nm至500nm、500nm至1 $\mu$ m、1 $\mu$ m至10 $\mu$ m或10 $\mu$ m至50 $\mu$ m(深度)的优选范围。

[0490] 在一些实施方案中,孔深度是0,是指在第一板上没有孔。

[0491] 在一些实施方案中,孔改为“柱”,柱高度为1nm、10nm、100nm、500nm、1 $\mu$ m、5 $\mu$ m、50 $\mu$ m、500 $\mu$ m、1mm、或任何两个值之间的范围;以及10nm至100nm、100nm至500nm、500nm至1 $\mu$ m、1 $\mu$

m至10 $\mu$ m或10 $\mu$ m至50 $\mu$ m(柱高度)的优选范围。

[0492] 在一些实施方案中,孔(i)无金属涂层(ii)在孔底部(柱顶部)上具有金属涂层(iii)在孔侧壁(柱侧面)上具有金属涂层(iv)在孔底部和侧壁上都具有金属涂层。

[0493] 在一些实施方案中,涂层金属是金、铝、银、铜、锡和/或它们的组合。

[0494] 在一些实施方案中,孔面积比率(孔面积与表面的总面积的比率)为40%到50%、50%到60%、60%到70%、70%到80%、80%到90%、90%到99%或介于任何两个值之间的范围。

[0495] 在一些实施方案中,第一板上的孔数目大于样品中的核酸探针数目。

[0496] 例如,第一板上的总孔数为600的1-2倍,2-5倍,5-10倍,10-100倍,100-1000倍,1000-10000倍,如果核酸探针浓度为1fM,体积为1 $\mu$ L;

[0497] 例如,第一板上的总孔数为600,000的1-2倍,2-5倍,5-10倍,10-100倍,100-1000倍,1000-10000倍,如果核酸探针浓度为1pM,体积为1 $\mu$ L;

[0498] 例如,第一板上的总孔数为600,000,000的1-2倍,2-5倍,5-10倍,10-100倍,100-1000倍,1000-10000倍,如果核酸探针浓度为1nM,体积为1 $\mu$ L;

[0499] 在一些实施方案中,在核酸捕获步骤之后,以这样的方式实现孔数,大多数孔捕获不超过1个靶标核酸探针。

[0500] 表1显示了1 $\mu$ L样品中DNA探针数目的一个实施例,浓度为1fM至100pM。

[0501] 表2示出了具有1 $\mu$ m到1mm的孔间距的2cm $\times$ 2cm区域中的孔数的一个实施例。

[0502] 例如,在第一板上,具有100 $\mu$ m的孔间距,4cm<sup>2</sup>大小的孔的总数为40000。如果使用这种孔板测量1 $\mu$ L样品中的1fMDNA样品,其具有600个DNA探针,则统计上每个孔将具有不超过一个分子。

[0503] 在一些实施方案中,第二板是X-板。

[0504] 在一些实施方案中,第一板可以是具有平坦或工程固体表面的任何材料。第一板的实施例包括但不限于:塑料、硅、PMMA、金和玻璃。在一些实施方案中,第二板可以是具有平坦或工程固体表面的任何材料。第一板的实施例包括但不限于:塑料、硅、PMMA、金和玻璃。

[0505] 在一些实施方案中,第一板由包括碳、锗、硒、硅、砷化镓(GaAs)、氮化镓(GaN)、磷化铟(InP)、硒化锌(ZnSe)和碳化硅(SiC)的半导体制成;金属包括金、铝、银、铜、锡和/或它们的组合。

[0506] 在一些实施方案中,该第一板面向该第二板的表面被限定为该第一板的内表面;第二板面向第一板的表面也被限定为第二板的内表面。在一些实施方案中,各个板的内表面包含用于接触包含核酸的样品的样品接触区域。样品接触区域可占据相应内表面的部分或全部。如图35所示,第二板可包含固定在第二板的内表面上的间隔件。然而,应当注意,在一些实施方案中,间隔件固定在第一板的内表面上,而在其他实施例中,间隔件固定在第二板和第一板的内表面上。

[0507] 图35示出了处于开放构造的板的截面图,其中第一板和第二板部分或完全分开,允许样品沉积在板中的一个或两个上。

[0508] 第一板和第二板可相对于彼此移动成不同的构造。其中一种构造是开放构造,其中两个板部分或完全分开,并且板之间的间隔不受间隔件的限制。图35示出了开放构造的



板,其中可以将样品添加到第一板、第二板或这两个板上。在一些实施方案中,相应板的内表面包括样品接触区域,其占据整个内表面的一部分。在某些实施方案中,间隔件定位在样品接触区域内。在一些实施方案中,间隔件不固定到任何一个板上,而是混合在样品中。

[0509] 利用QMAX装置进行核酸捕获测序的方法

[0510] 图37是显示在核酸测序中使用QMAX装置进行核酸探针捕获步骤的示例性过程中的基本步骤的流程图。

[0511] 一种捕获用于测序的核酸探针的方法,包含:

[0512] (a) 通过涂覆捕获探针制备第一板;

[0513] (b) 获得权利要求1的装置;

[0514] (c) 获得含有靶标核酸的样品;

[0515] (d) 当所述板配置为开放构造时,将所述样品沉积在一个或两个板上;其中:第一板的内表面和第二板中的孔的边缘之间的平均间距为至少300 $\mu\text{m}$ ;

[0516] (e) 在(d)之后,将权利要求1的装置的两个板移动成闭合构造,在该闭合构造中,样品的至少一部分在这些孔中,并且第一板的内表面与第二板中的孔的边缘之间的平均间距小于开放构造中的平均间距的1/10(十分之一);

[0517] (f) 剥离第二板,并清洗第一板;

[0518] (g) 然后进行核酸测序步骤。

[0519] 如本文所用,术语“核酸”和“核苷酸”旨在与它们在本领域中的用途一致,并且包括天然存在的种类或其功能类似物。特别有用的核酸功能类似物能够以序列特异性方式与核酸杂交或能够用作特定核苷酸序列复制的模板。天然存在的核酸通常具有含磷酸二酯键的主链。类似物结构可具有替代的主链连接,包括本领域已知的任何种类的主链连接。天然存在的核酸通常具有脱氧核糖(例如在脱氧核糖核酸(DNA)中发现的)或核糖(例如在核糖核酸(RNA)中发现的)。核酸可以含有具有本领域已知的这些糖基团的任何类似物的核苷酸。核酸可包括天然或非天然核苷酸。在这点上,天然脱氧核糖核酸可以具有一个或多个选自腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或鸟嘌呤的碱基,核糖核酸可以具有一个或多个选自尿嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶或鸟嘌呤的碱基。可包括在核酸或核苷酸中的有用的非天然碱基是本领域已知的。当术语“探针”或“靶标”用于指核酸时,在本文的方法或组合物的上下文中用作核酸的语义标识符,并且不一定限制核酸的结构或功能超出另外明确指出的范围。术语“探针”和“靶标”可类似地应用于其他分析物,比如蛋白质、小分子、细胞等。

[0520] 如本文所用,术语“捕获探针”是指与具有互补序列的核酸杂交的核酸。

[0521] 本文所用的术语“互补的”是指通过氢键与目的靶标核酸碱基配对的核苷酸序列。在典型的Watson-Crick碱基配对中,在DNA中,腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)形成碱基对,鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)形成碱基对。在RNA中,胸腺嘧啶被尿嘧啶(U)取代。因此,A与T互补、G与C互补。通常,“互补的”是指与感兴趣的靶标完全互补的核苷酸序列,使得序列中的每个核苷酸与靶标核酸中相应位置的每个核苷酸互补。当核苷酸序列与非靶标序列不完全互补(100%互补)但由于核苷酸序列的某些片段与非靶标序列的互补性仍可能与非靶标序列碱基配对时,可以计算互补百分比以评估非特异性(脱靶标)结合的可能性。通常,50%或更少的互补不会导致非特异性结合。此外,70%或更少的互补序列在严格杂交条件下不会导致非特异性结合。

[0522] 在一些实施方案中,捕获探针附着于第一板的表面。在某些实施方案中,捕获探针可以固定在第一板的内表面上。

[0523] 如本文所用,术语“涂覆”当用作动词时旨在表示在表面上提供层或覆盖物。表面的至少一部分可设有层或覆盖物。在一些情况下,整个表面可设有层或覆盖物。在另一种情况下,只有一部分表面具有层或覆盖物。当用于描述表面和材料之间的关系时,术语“涂层”是指材料在表面上作为层或覆盖物存在。该材料可以密封该表面,例如防止液体或气体与该表面接触。然而,该材料不需要形成密封。例如,该材料对于液体,气体,或液体或气体中携带的一种或多种组分可以是多孔的。可涂覆表面的示例性材料包括但不限于凝胶、聚合物、有机聚合物、液体、金属、第二表面、塑料、二氧化硅或气体。

[0524] 如本文所用,术语“连接”是指两个物体彼此接合、紧固、粘附、连接或结合的状态。例如,诸如核酸的分析物可以通过共价键或非共价键连接到诸如凝胶或固体支持物的材料上。共价键的特征在于原子之间共享电子对。非共价键是不涉及共享电子对的化学键,并且可以包括例如氢键、离子键、范德华力、亲水相互作用和疏水相互作用。

[0525] 在几个实施方案中,附着于第一板的引物核酸可用于捕获和/或扩增模板核酸。引物可以是与连接到文库中不同靶标核酸的通用接头序列杂交的通用引物(即每个靶标核酸包括与文库中其它靶标核酸不同的靶标区域,并且文库中的一些靶标核酸具有相同的通用接头序列)。在一些实施方案中,靶标核酸可以附着到凝胶材料上,并且引物(无论是在溶液中还是附着到凝胶上)可以用于扩增附着的靶标核酸(即靶标核酸可以用作扩增的模板)。

[0526] 更具体地,在步骤(a)中,在一些实施方案中,第一板包含完全或部分涂覆在第一板的内表面上的捕获探针。

[0527] 在一些实施方案中,第一板包含完全或部分涂覆在第一板上的孔内的捕获探针。

[0528] 在一些实施方案中,第一板包含捕获探针,其完全或部分涂覆在第一板上的孔中的金属上。

[0529] 在一些实施方案中,可以通过印刷、喷雾、浸泡或任何其它施加捕获探针均质层的方法将捕获探针施加到表面。在某些实施方案中,捕获探针在第一板上干燥。

[0530] 更具体地,在步骤(c)中,如本文所用,术语“文库”是指具有不同化学组成的分析物的集合。通常,文库中的分析物将是具有属或纲的共同特征或特征的不同物种,但在某些方面不同。例如,文库可包括核苷酸序列不同但在具有糖-磷酸骨架方面相似的核酸种类。

[0531] 如本文所用,术语“不同的”,当用于指核酸时,是指核酸具有彼此不同的核苷酸序列。两个或多个核酸可以具有沿其全长不同的核苷酸序列。或者,两个或多个核酸可具有沿其长度的大部分不同的核苷酸序列。例如,两个或多个核酸可具有对于两个或多个分子不同的靶标核苷酸序列部分,同时也具有在两个或多个分子上相同的通用序列部分。

[0532] 在一些实施方案中,本发明的方法,在步骤(f)之前和步骤(e)之后,还包括将均匀厚度层孵育预定的时间段。

[0533] 在某些实施方案中,预定的时间段等于或长于靶标核酸穿过均匀厚度层扩散到样品中所需的时间。

[0534] 在某些实施方案中,预定的时间段等于或长于靶标核酸穿过均匀厚度层扩散到样品中并被捕获探针捕获所需的时间。

[0535] 在某些实施方案中,预定的时间段等于或长于靶标核酸穿过均匀厚度层扩散到样

品中,被捕获探针捕获并被扩增以在每个孔中产生单个核酸的克隆群体所需的时间。

[0536] 如本文所用,术语“克隆群体”是指相对于特定核苷酸序列是同源的核酸群体。同源序列通常有至少10个核苷酸那样长,但甚至可以更长,包括例如至少50、100、250、500、1000或2500个核苷酸那样长。克隆群体可以来源于单个靶标核酸或模板核酸。克隆群体可包括至少2、5、10、100、1000或更多拷贝的靶标核苷酸序列。拷贝可存在于单个核酸分子中,例如作为多联体,或拷贝可存在于分开的核酸分子上(即克隆群体可包括至少2、5、10、100、1000或更多具有相同靶标核苷酸序列的核酸分子)。通常,克隆群体中的所有核酸将具有相同的核苷酸序列。应当理解,在不脱离克隆性的情况下,在克隆群体中可以发生可忽略数量的污染核酸或突变(例如由于扩增人工产物)。因此,群体可以是至少80%,90%,95%或99%克隆的。在一些情况下,可以存在100%纯的克隆群体。

[0537] 本文所述的方法可使用多种扩增技术中的任一种。可使用的示例性技术包括但不限于聚合酶链式反应(PCR)、滚环扩增(RCA)、多置换扩增(MDA)或随机引物扩增(RPA)。在特定的实施方案中,用于扩增的一种或多种引物可以附着到凝胶材料上。在PCR实施方案中,用于扩增的引物之一或两者可以附着到凝胶材料上。利用两种附着引物的形式通常被称为桥扩增,因为双链扩增子在位于已经复制的模板序列侧翼的两个附着引物之间形成桥样结构。可用于桥式扩增的示例性试剂和条件描述于例如,美国专利号5,641,658;美国专利公开号2002/0055100;美国专利号7,115,400;美国专利公开号2004/0096853;美国专利公开号2004/0002090;美国专利公开号2007/0128624;和美国专利公开号2008/0009420,其各自通过引用并入本文。也可以用附着于凝胶材料的扩增引物之一和溶液中的第二引物进行PCR扩增。使用一种固相附着引物和溶液相引物的组合的示例性形式是乳液PCR,例如,Dressman等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 100:8817-8822(2003)、WO 05/010145或美国专利公开号2005/0130173或2005/0064460中所描述,其各自通过引用并入本文。乳液PCR是对形式的说明,应当理解,为了本文所述方法的目的,乳液的使用是任选的,实际上对于几个实施方案,不使用乳液。此外,引物不需要直接连接到ePCR参考文献中所述的固体支持物上,而是可以连接到本文所述的凝胶材料上。在一些固相PCR或桥式扩增形式中,靶标核酸可附着于凝胶材料并用作扩增的模板。

[0538] RCA技术可经修改以用于本发明的方法中。可用于RCA反应的示例性组分和RCA产生扩增子的原理描述于例如Lizardi等人,Nat.Genet.19:225-232(1998)和美国专利申请公开号2007/0099208A1中,其各自通过引用并入本文。用于RCA的引物可以在溶液中或附着到凝胶材料上。

[0539] 可以修改MDA技术以用于本公开的方法中。MDA的一些基本原理和有用条件描述于例如,Dean等人,Proc Natl.Acad.Sci.USA 99:5261-66(2002);Lage等人,Genome Research 13:294-307(2003);Walker等人,病毒检测的分子方法,Academic Press,Inc.,1995;Walker等人,Nucl.Acids Res.20:1691-96(1992);美国专利号5,455,166;5,130,238;和6,214,587,其各自通过引用并入本文。用于MDA的引物可以在溶液中或附着到凝胶材料上。

[0540] 在特定的实施方案中,可以使用上面举例说明的扩增技术的组合。例如,RCA和MDA可以组合使用,其中RCA用于在溶液中产生多联扩增子(例如使用液相引物)。然后将扩增子用作MDA的模板,使用附着于凝胶材料的引物。在该实施例中,在组合的RCA和MDA步骤

之后产生的扩增子将附着到凝胶材料上。扩增子通常含有靶标核苷酸序列的串联重复。

[0541] 扩增技术,比如上面举例说明的那些,可用于产生具有多拷贝靶标核酸的含凝胶特征。单个特征,例如孔,可以具有单分子多联体形式的核苷酸序列克隆群,例如由RCA产生的核苷酸序列克隆群,或者具有相同序列的许多核酸分子形式的核苷酸序列克隆群,例如由桥PCR产生的核苷酸序列克隆群。通常,具有几个拷贝的扩增靶标的核酸将附着到凝胶材料上。

[0542] 在某些实施方案中,预定时间段小于10秒、20秒、30秒、45秒、1分钟、1.5分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20分钟、30分钟或60分钟,或者在任何两个值之间的范围内。

[0543] 在一些实施方案中,对于本发明的方法,将样品沉积在第一板上。在某些实施方案中,在步骤(d)之后步骤(e)之前,将样品在第一板上孵育预定的时间段。在某些实施方案中,预定时间段等于或长于捕获抗体和分析物之间结合达到平衡所需的时间。在某些实施方案中,预定时间段小于10秒、20秒、30秒、45秒、1分钟、1.5分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20分钟、30分钟或60分钟,或者在任何两个值之间的范围内。

[0544] 在一些实施方案中,对于本发明的方法,在步骤(e)之后,可以清洗第一板的内表面以除去未结合的分子。对于该方法,在将板切换到闭合构造之前进行清洗。在一些实施方案中,对于本发明的方法,在步骤(e)之前和步骤(d)之后,在步骤(f)之前和步骤(e)之后,可以将板切换至开放构造(例如通过移除第二板)并且可以清洗第一板的内表面。对于该方法,在将板切换到闭合构造之前进行清洗。在某些实施方案中,这样的步骤降低了非特异性结合并降低了信号噪声。在某些实施方案中,每个清洗步骤仅包括一次或多次清洗。在一些实施方案中,进行两个清洗步骤。在一些实施方案中,仅进行一个清洗步骤。

[0545] 在一些实施方案中,内表面可以用吸收在海绵中的清洗溶液清洗。在一些实施方案中,通过挤压海绵以将清洗液释放到第一板的内表面上并松开海绵以再吸收清洗液来进行清洗。在一些实施方案中,清洗改善了可检测信号的检测极限(LOD)。

[0546] 在步骤(f)之后,在第一板上捕获的核酸可以用于许多生物学应用,包含测序程序,例如合成测序(SBS)技术。简言之,SBS可通过使靶标核酸与一种或多种标记的核苷酸、DNA聚合酶等接触而引发。使用靶标核酸作为模板延伸引物的那些特征将掺入可检测的标记核苷酸。任选地,标记的核苷酸可以进一步包括可逆终止性质,一旦核苷酸被添加到引物中,其终止进一步的引物延伸。例如,可以将具有可逆终止子基团的核苷酸类似物添加到引物中,使得随后的延伸不能发生,直到加入去封闭剂以除去该基团。因此,对于使用可逆终止的实施方案,可以将去封闭剂递送到流动细胞(在检测发生之前或之后)。清洗可以在不同的递送步骤之间进行。然后可以重复该循环n次以使引物延伸n个核苷酸,从而检测长度为n的序列。例如,在Bentley等人的Nature 456:53-59(2008),WO 04/018497;WO 91/06678;WO 07/123744;美国专利号7,057,026;7,329,492;7,211,414;7,315,019或7,405,281,和美国专利申请公开号2008/0108082A1中描述了可容易地适于与通过本公开的方法产生的阵列一起使用的示例性SBS程序、流体系统和检测平台,其各自通过引用并入本文。

[0547] 可以使用采用了环状反应的其它测序方法,例如焦磷酸测序。焦磷酸测序检测无机焦磷酸盐(PPi)的释放,因为特定的核苷酸掺入新生的核酸链中(Ronaghi等人,分析生物

化学242(1),84-9(1996);Ronaghi,Genome Res.11(1),3-11(2001);Ronaghi等人Science 281(5375),363(1998);美国专利号6,210,891;6,258,568和6,274,320,其各自通过引用并入本文)。在焦磷酸测序中,释放的PPi可通过ATP磺酰化酶转化为三磷酸腺苷(ATP)来检测,所得ATP可通过萤光素酶产生的光子来检测。因此,可以通过发光检测系统监测测序反应。用于基于荧光的检测系统的激发辐射源对于焦磷酸测序过程不是必需的。例如在WIPO专利申请序列号PCT/US11/57111,美国专利申请公布2005/0191698A1,美国专利7,595,883和美国专利7,244,559中描述了可用于将焦磷酸测序应用于本公开的阵列的有用的流体系统、检测器和程序,其各自通过引用并入本文。

[0548] 连接测序反应也是有用的,包括例如Shendure等人.Science 309:1728-1732(2005);美国专利号5,599,675;和美国专利号5,750,341中描述的那些,其各自通过引用并入本文。一些实施方案可以包括例如Bains等人,Journal of Theoretical Biology 135(3),303-7(1988);Drmanac等人,Nature Biotechnology 16,54-58(1998);Fodor等人,Science 251(4995),767-773(1995);和W01989/10977中所述的杂交测序方法,其各自通过引用并入本文。在连接测序和杂交测序的方法中,存在于含凝胶的孔(或其它凹形特征)中的核酸经受寡核苷酸递送和检测的重复循环。用于本文或本文引用的参考文献中阐述的SBS方法的流体系统可容易地适于递送用于连接测序或杂交测序方法的试剂。通常,寡核苷酸被荧光标记,并且可以使用荧光检测器来检测,荧光检测器类似于本文或本文引用的参考文献中所描述的关于SBS方法的那些荧光检测器。

[0549] 一些实施方案可以利用涉及实时监测DNA聚合酶活性的方法。例如,核苷酸掺入可以通过携带荧光团的聚合酶和 $\gamma$ -磷酸根标记的核苷酸之间的荧光共振能量转移(FRET)相互作用来检测,或用零模式波导检测。基于FRET的测序技术和试剂描述于,例如Levene等人.Science 299,682-686(2003);Lundquist等人.Opt.Lett.33,1026-1028(2008);Korlach等人.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105,1176-1181(2008),其公开内容通过引用并入本文。

[0550] 一些SBS实施方案包括检测核苷酸掺入延伸产物后所释放的质子。例如,基于释放质子检测的测序可以使用可商购自Ion Torrent (Guilford, Conn., 生命科技子公司)的电检测器和相关技术或美国专利申请公开号2009/0026082A1;2009/0127589A1;2010/0137143A1;或2010/0282617A1中描述的测序方法和系统,其各自通过引用并入本文。在特定的实施方案中,用于检测释放质子的电检测器可以修改为包括孔,并且所述孔可以包含本文所述的凝胶材料。

[0551] 在QMAX的一些实施例中,一个或两个板的样品接触区域包括一个压缩开放流动监测表面结构(MSS),该压缩开放流动监测表面结构被配置为监测在COF之后已经发生了多少流动。例如,在一些实施方案中,MSS包括浅正方形阵列,其将引起对样品中的组分(例如血液中的血细胞)的摩擦。通过检查样品的一些组分的分布,可以获得与样品及其组分在COF下的流动相关的信息。

[0552] MSS的深度可以是间隔件高度的1/1000、1/100、1/100、1/5、1/2或在任何两个值的范围内,并且呈突出或孔形。

[0553] 本发明的实施例

[0554] 图38示出了用于核酸测序的第一板制备步骤的实施例。

[0555] 该实施例中的第一板是在1mm厚的丙烯酸基板上制造的尺寸为 $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ ,周期为5

$\mu\text{m}$ ,深度为 $1\mu\text{m}$ 的方形孔。在每个孔的底部沉积100nm金和1nm钛。在该装置中,第一板每 $1\text{mm}^2$ 面积具有40,000个孔。通过包括纳米压印光刻,反应离子蚀刻(RIE),电子束蒸发等的大面积纳米制造方法制造这种纳米结构。

[0556] 选择1uM硫醇化捕获探针室温下涂覆在孔底部的金上过夜;

[0557] 然后将第一板用PBST冲洗3次,然后用50uMMCH封闭30分钟,然后用PBST冲洗3次;

[0558] 图39是用于捕获靶标核酸的闭合构造的QMAX装置的示例性实施方案的示意图。

[0559] 将 $1\mu\text{L}$ 靶标探针(浓度远小于在TE缓冲液中稀释的1pM,以确保样品中总核酸探针的数目远小于第一板上的孔数目)在开放构造中加到第一板上;

[0560] 在一些实施方案中,靶标探针结合标记以促进结合探针的以下测量和评价。标记是发光标记或光学可检测标记,直接或间接地,在其与捕获剂结合之前或之后。该标记是具有拉曼散射、色度、发光、荧光、电致发光、化学发光和/或电化学发光信号的标记。如本文所用,术语“发光标记”是指在外激发下可发光的标记。这可以是发光。荧光标记(包括染料分子或量子点)和发光标记(例如,电致发光或化学发光标记)是发光标记的类型。外激发是用于荧光的光(光子)、用于电致发光的电流和用于化学发光的化学反应。外激发可以是上述的组合。短语“标记的分析物”是指用发光标记可检测地标记的分析物,以便可以通过评估标记的存在来检测分析物。标记的分析物可以被直接标记(即,分析物本身可以直接结合标记,例如,通过强键,例如,共价键或非共价键),或者标记的分析物可以被间接标记(即,分析物结合第二捕获剂,第二捕获剂被直接标记)。

[0561] 用手将第二板按压在液体的顶部,QMAX为闭合构造;这里使用的第二板是在 $175\mu\text{m}$  PMMA基板上具有 $30\times 40\mu\text{m}$ 柱尺寸、 $80\mu\text{m}$ 间距、 $30\mu\text{m}$ 柱高度的X-板。

[0562] 将QMAX装置孵育1分钟;剥离第二板;

[0563] 用含有DNA清洗剂(5XSSC+0.05%吐温20)的海绵冲洗第一板3次;

[0564] 第一板准备好用于随后的核酸测序步骤。

[0565] 结果示例

[0566] 图40显示了捕获靶标DNA的代表性时程研究(a)使用QMAX,使用 $1\mu\text{L}$ 浓度为1pM的靶标核酸样品;(b)使用常规96微孔板,使用 $100\mu\text{L}$ 浓度为10fM的核酸样品;(c)使用常规96微孔板,使用 $100\mu\text{L}$ 浓度为1pM的靶标核酸样品。x轴是孵育时间。y轴是来自结合在捕获的核酸上的IR-800染料的荧光信号。实验过程遵循图37的流程图。

[0567] 显然,QMAX装置具有最快的孵育饱和时间(约1分钟)并且需要最小的样品体积( $1\mu\text{L}$ )。在常规96微孔中孵育第一板时,低浓度(10fM)  $100\mu\text{L}$ 样品在120分钟内捕获过程不饱和,并且第一板具有低得多的信号;在常规96微孔中孵育第一板时,具有相同的高浓度(1pM)的  $100\mu\text{L}$ 样品,捕获过程不如QMAX装置饱和得快,并且需要100倍QMAX装置所需的样品体积。

[0568] 如这些实施例所展示的,在一些实施方案中,本发明提供了一种用于捕获用于测序的核酸的平台,该平台是快速的、简单的、便携的并且仅需要少至 $1\mu\text{L}$ 或更少的样品。本发明可以在指定参数的浅封闭空间内进行核酸捕获,从而可以精确控制样品体积和捕获时间。在一些实施方案中,分子的布朗运动被限制在浅空间中,使得可以更快地达到分子结合的平衡。该平台可适用于在传统微量滴定板中进行的任何核酸测序,因此具有广泛的应用。

[0569] 其他实施例

[0570] 在本文所述的装置或方法中,间隔件的高度可以是100nm、 $1\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 、 $20\mu\text{m}$ 、50

$\mu\text{m}$ 、500 $\mu\text{m}$ 、1mm、或在任何两个值之间的范围；和500nm至1 $\mu\text{m}$ 、1 $\mu\text{m}$ 至10 $\mu\text{m}$ 、或10 $\mu\text{m}$ 至30 $\mu\text{m}$ 、30 $\mu\text{m}$ 至50 $\mu\text{m}$ 的优选范围。

[0571] 在本文所述的装置或方法中，间隔件可以具有1 $\mu\text{m}$ 或更小的高度，因此饱和和孵育时间（或饱和结合时间）对于蛋白质小于0.1秒，对于核酸（20bp）小于0.1秒。

[0572] 在本文所述的装置或方法中，间隔件可以具有2 $\mu\text{m}$ 或更小的高度，因此饱和和孵育时间（或饱和结合时间）对于蛋白质小于0.3秒，对于核酸（20bp）小于0.1秒。

[0573] 在本文所述的装置或方法中，间隔件可以具有5 $\mu\text{m}$ 或更小的高度，因此饱和和孵育时间（或饱和结合时间）对于蛋白质小于2秒，对于核酸（20bp）小于1秒。

[0574] 在本文所述的装置或方法中，间隔件可具有10 $\mu\text{m}$ 或更小的高度，因此饱和和孵育时间（或饱和结合时间）对于蛋白质而言小于10秒，对于核酸而言小于5秒（20bp）。

[0575] 在本文所述的装置或方法中，间隔件可以具有30 $\mu\text{m}$ 或更小的高度，因此饱和和孵育时间（或饱和结合时间）对于蛋白而言小于60秒、对于核酸（20bp）而言小于30秒。

[0576] 在本文所述的装置或方法中，间隔件可以具有50 $\mu\text{m}$ 或更小的高度，因此饱和和孵育时间（或饱和结合时间）对于蛋白质小于2分钟，对于核酸（20bp）小于1分钟。

[0577] 在本文所述的装置或方法中，间隔件可以具有100 $\mu\text{m}$ 或更小的高度，因此饱和和孵育时间（或饱和结合时间）对于蛋白质小于10分钟，对于核酸（20bp）小于5分钟。

[0578] 在本文所述的装置或方法中，可以将样品孵育饱和结合时间。在一些实施方案中，饱和结合时间等于或长于靶标实体在闭合构造下扩散穿过均匀厚度层的厚度所花费的时间。在一些实施方案中，饱和结合时间等于或长于靶标实体在闭合构造下扩散穿过均匀厚度层的厚度并结合到结合位点所花费的时间。在一些实施方案中，饱和结合时间显著短于靶标实体侧向扩散穿过结合位点的最小侧向尺寸所花费的时间。在一些实施方案中，饱和结合时间是其中在孵育结束时，与结合位点结合的靶标实体的大部分来自样品的相关体积。在一些实施方案中，孵育允许靶标实体与结合位点结合，并且其中相关体积是在闭合构造下高于结合位点的样品的一部分。

[0579] 在某些实施方案中，孵育时间为1秒至10秒。在某些实施方案中，孵育时间为10秒至30秒。在某些实施方案中，孵育时间为30秒至60秒。在某些实施方案中，孵育时间为1分钟至5分钟。在某些实施方案中，孵育时间为5分钟至10分钟。在某些实施方案中，孵育时间为10分钟至30分钟。

[0580] 本实施例

[0581] 一种用于进行均相核酸检测分析的方法，包含：

[0582] (a) 获得包含第一板和第二板的QMAX装置，其中

[0583] 第一板和第二板各自包含用于接触含有一种或多种靶标核酸的样品的样品接触区域；

[0584] 第一板在其样品接触区域上包含结合位点，结合位点包含：

[0585] (i) 表面扩增表面；以及

[0586] (ii) 靶标特异性核酸探针，其被固定在所述扩增表面上并且特异性结合靶标核酸的一部分；以及

[0587] 第二板包括样品接触区域，样品接触区域包括试剂储存位点，试剂储存位点包括与靶标核酸的另一部分特异性结合的靶标特异性核酸检测剂；

- [0588] (b) 当板处于开放构造时,将样品沉积在板中的一个或两个上;
- [0589] (c) 将板闭合成闭合构造;以及。
- [0590] (d) 在(c)之后,当板仍然处于闭合构造并且没有任何清洗步骤时,通过读取装置读取样品接触区域以产生信号图像来检测靶标核酸;
- [0591] 其中:配置(i)闭合构造中的样品的厚度,(ii)闭合构造中的样品中溶解的标记的浓度,以及(iii)邻近依赖性扩增表面的扩增因子,使得通过靶标核酸间接结合至核酸探针的标记在不洗掉未结合至表面扩增表面的任何生物材料或标记的情况下是可见的;
- [0592] 其中所述构造之一是开放构造,其中两个板的内表面之间的平均间距是至少200 $\mu$ m;以及
- [0593] 其中所述构造中的另一个是闭合构造,其中样品的至少一部分在两个板之间并且板的内表面之间的平均间距小于200 $\mu$ m。
- [0594] 一种用于分析均质样品的装置,包含:
- [0595] 第一板、第二板和结合位点,其中
- [0596] (a) 第一板和第二板可相对于彼此移动成不同的构造,并且在其各自的表面上具有用于接触包含靶标分析物的样品的样品接触区域,
- [0597] (b) 第一板上的样品接触区域具有结合位点,结合位点包含:
- [0598] (i) 邻近依赖性信号扩增层,和
- [0599] (ii) 靶标特异性核酸探针,其附着于所述邻近依赖性信号扩增层并结合靶标核酸的一部分;
- [0600] (c) 第二板上的样品接触区域包含试剂储存位点,所述试剂储存位点包含与靶标核酸的另一部分结合的靶标特异性核酸检测剂;
- [0601] 其中所述构造之一是开放构造;
- [0602] 其中所述构造中的另一个是闭合构造,其中样品的至少一部分在两个板之间;以及
- [0603] 其中,配置闭合构造中的样品的厚度、闭合构造中样品中溶解的标记的浓度和邻近依赖性信号扩增层的扩增因子,使得任何间接结合靶标特异性核酸探针的标记在不洗掉未结合的标记的情况下是可见的。
- [0604] 一种设备,包含热循环仪和实施方案2所述的装置。
- [0605] 一种设备,包含热循环仪、实施方案2所述的装置和用于实时PCR的读取器。
- [0606] 一种用于快速核酸检测分析的方法,包含:
- [0607] (a) 获得包含第一板和第二板的QMAX装置,其中
- [0608] 第一板和第二板各自包含用于接触含有一种或多种靶标核酸的样品的样品接触区域;
- [0609] 第一板在其样品接触区域上包含结合位点,结合位点包含靶标特异性核酸探针,靶标特异性核酸探针被固定在该位点上并且特异性结合靶标核酸的一部分;以及
- [0610] 第二板包括样品接触区域,样品接触区域包括试剂储存位点,试剂储存位点包括与靶标核酸的另一部分特异性结合的靶标特异性核酸检测剂;
- [0611] (b) 当板处于开放构造时,将样品沉积在板中的一个或两个上;
- [0612] (c) 将板闭合成闭合构造以孵育一段时间;以及。



[0613] (d) 打开板,再次按压板,将含有清洗液的清洗海绵按压一段时间,然后松开清洗海绵;

[0614] (e) 在(d)之后,用读取装置读取样品接触区域以产生信号图像;

[0615] 其中:配置(i)处于闭合构造中的样品的厚度,(ii)处于闭合构造中的样品中溶解的标记的浓度,和(iii)邻近依赖性扩增表面的扩增因子,使得通过靶标核酸间接结合至核酸探针的标记在不洗掉未结合至邻近依赖性扩增表面的任何生物材料或标记的情况下是可见的;

[0616] 其中所述构造之一是开放构造,其中两个板的内表面之间的平均间距是至少200 $\mu$ m;以及

[0617] 其中所述构造中的另一个是闭合构造,其中样品的至少一部分在两个板之间并且板的内表面之间的平均间距小于200 $\mu$ m。

[0618] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中,对闭合构造中的第一板与第二板之间的间距进行配置以使得靶标分析物与捕获剂的饱和结合时间为300秒或更短。

[0619] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中,对闭合构造中的第一板与第二板之间的间距进行配置以使得靶标分析物与捕获剂的饱和结合时间为300秒或更短。

[0620] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中,对闭合构造中的第一板与第二板之间的间距进行配置以使得靶标分析物与捕获剂的饱和结合时间为60秒或更短。

[0621] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中靶标核酸是DNA或RNA,包括基因组DNA、cfDNA、cDNA ctDNA、mRNA和miRNA。

[0622] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中从步骤(b)到获得结果的时间小于10分钟。

[0623] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中,对闭合构造中的样品的厚度、闭合构造中溶解于样品中的标记的浓度和表面扩增层的扩增因子进行配置以使得在闭合构造中直接或间接结合到探针的任何标记在不洗掉未结合标记的情况下是可见的。

[0624] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中结合到邻近依赖性扩增表面的标记在小于60秒内是可见的。

[0625] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中结合到邻近依赖性扩增表面的标记在小于60秒内是可见的。

[0626] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中在闭合构造中,储存位点大致在第一板上的结合位点的上方。

[0627] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中靶标特异性核酸探针和靶标特异性核酸检测剂形成包含标记的夹层体结构。

[0628] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中在不使用清洗步骤来移除未结合到扩增表面的任何生物材料或标记的情况下读取信号。

[0629] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中通过对单独结合事件进行计数来读取结合到扩增表面的标记。

[0630] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中通过一次性集总读取方法读取结合到扩增表面的标记。

[0631] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中所述分析具有0.1nM或更小的检

测灵敏度。

[0632] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中所述分析包括使用海绵来移除未结合到扩增表面的生物材料或标记。

[0633] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中信号扩增层包含D2PA。

[0634] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中信号扩增层包含金属材料层。

[0635] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中信号扩增层包含连续金属膜,所述连续金属膜由选自由金、银、铜、铝、其合金及其组合组成的群组的材料制成。

[0636] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中不同金属层局部增强或充当反射器,或两者兼而有之,以增强光信号。

[0637] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中信号扩增层包含金属材料层和位于金属材料层顶部上的介电材料,其中捕获剂位于介电材料上。

[0638] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中金属材料层是均匀金属层、纳米结构化金属层或其组合。

[0639] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中通过等离子体增强来扩增信号。

[0640] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中所述分析包括通过拉曼散射检测标记。

[0641] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中第一板的样品接触区域进一步包含含有邻近依赖性扩增表面但不含有靶标特异性核酸探针的位点。

[0642] 前述任一实施方案所述的装置、设备或方法,其中所述分析包括通过读取包含邻近依赖性扩增表面但不包含靶标特异性核酸探针的位点来计算背景信号。

[0643] 前述任一实施方案所述的装置或方法,其中装置进一步包含固定在其中一个板上的间隔件,所述间隔件调节所述闭合构造中的第一板与第二板之间的间距。

[0644] 前述任一实施方案所述的装置或方法,其中调节表面扩增层的扩增因子以使来自直接或间接结合到捕获剂的单个标记的光学信号可见。

[0645] 在本文所述的装置或方法中,间隔件的高度可以是100nm、1 $\mu$ m、5 $\mu$ m、10 $\mu$ m、20 $\mu$ m、50 $\mu$ m、500 $\mu$ m、1mm,或在任何两个值之间的范围;和500nm至1 $\mu$ m、1 $\mu$ m至10 $\mu$ m、或10 $\mu$ m至30 $\mu$ m、30 $\mu$ m至50 $\mu$ m的优选范围。

[0646] 在本文所述的装置或方法中,间隔件可以具有1 $\mu$ m或更小的高度,因此饱和和孵育时间(或饱和结合时间)对于蛋白质小于0.1秒,对于核酸(20bp)小于0.1秒。

[0647] 在本文所述的装置或方法中,间隔件可以具有2 $\mu$ m或更小的高度,因此饱和和孵育时间(或饱和结合时间)对于蛋白质小于0.3秒,对于核酸(20bp)小于0.1秒。

[0648] 在本文所述的装置或方法中,间隔件可以具有5 $\mu$ m或更小的高度,因此饱和和孵育时间(或饱和结合时间)对于蛋白质小于2秒,对于核酸(20bp)小于1秒。

[0649] 在本文所述的装置或方法中,间隔件可具有10 $\mu$ m或更小的高度,因此饱和和孵育时间(或饱和结合时间)对于蛋白质而言小于10秒,对于核酸而言小于5秒(20bp)。

[0650] 在本文所述的装置或方法中,间隔件可以具有30 $\mu$ m或更小的高度,因此饱和和孵育时间(或饱和结合时间)对于蛋白而言小于60秒、对于核酸(20bp)而言小于30秒。

[0651] 在本文所述的装置或方法中,间隔件可以具有50 $\mu$ m或更小的高度,因此饱和和孵育时间(或饱和结合时间)对于蛋白质小于2分钟,对于核酸(20bp)小于1分钟。

[0652] 在本文所述的装置或方法中,间隔件可以具有100 $\mu\text{m}$ 或更小的高度,因此饱和孵育时间(或饱和结合时间)对于蛋白质小于10分钟,对于核酸(20bp)小于5分钟。

[0653] 相关文件

[0654] 本发明包括各种实施方案,只要各种组分彼此不矛盾就可以以多种方式组合。实施方案应当被认为是单个发明文件:每个申请以其它申请作为参考文献,并且也出于所有目的被整体地引用,而不是作为离散的独立文件。这些实施方案不仅包括当前文件中的公开内容,而且包括在此引用、并入或要求优先权的文件。

[0655] (10) 定义

[0656] 在本申请中或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456287的美国临时申请、以及2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中定义了用于描述本文公开的装置、系统和方法的术语,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0657] 术语“CROF卡(或卡)”、“COF卡”、“QMAX卡”、“Q卡”、“CROF装置”、“COF装置”、“QMAX装置”、“CROF板”、“COF板”以及“QMAX-板”是可互换的,除了在一些实施方案中,COF卡不包括间隔件;并且这些术语是指一种装置,该装置包括第一板和第二板,第一板和第二板可相对于彼此移动成不同构造(包括开放构造和闭合构造),并且该装置包括调节板间间距的间隔件(COF卡的一些实施方案除外)。术语“X-板”是指CROF卡中的两个板之一,其中间隔件被固定到该板。在2017年2月7日提交的序列号为62/456065的临时申请中给出了COF卡、CROF卡和X-板的更多描述,该申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0658] (11) Q卡、间隔件和均匀样品厚度

[0659] 本文所公开的装置、系统和方法可包括或使用Q卡、间隔件和均匀样品厚度实施方式,用于样品检测、分析和量化。在一些实施方案中,Q卡包括间隔件,其有助于使样品的至少一部分成为高度均匀的层。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456287的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了间隔件的结构、材料、功能、变化和尺寸以及间隔件和样品层的均匀性,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0660] (12) 铰链、开放凹口、凹槽边缘和滑块

[0661] 本文公开的装置、系统和方法可以包括或使用Q卡,用于样品检测、分析和量化。在一些实施方案中,Q卡包括铰链、凹口、凹槽和滑块,其有助于促进Q卡的操作和样品的测量。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456287的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了铰链、凹口、凹槽和滑块的结构、材料、功能、变化和尺寸,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0662] (13) Q卡、滑块和智能手机检测系统

[0663] 本文公开的装置、系统和方法可以包括或使用Q卡,用于样品检测、分析和量化。在

一些实施方案中,Q卡与滑块一起使用,所述滑块允许智能手机检测系统读取该卡。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456287的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了Q卡、滑块和智能手机检测系统的结构、材料、功能、变化、尺寸和连接,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0664] (14) 检测方法

[0665] 本文公开的装置、系统和方法可包括或用于各种类型的检测方法。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456287的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了检测方法,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0666] (15) 标记、捕获剂和检测剂

[0667] 本文公开的装置、系统和方法可以采用用于分析物检测的各种类型的标记、捕获剂和检测剂。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456287的美国临时申请、以及2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了标记,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0668] (16) 分析物

[0669] 本文公开的装置、系统和方法可用于操作和检测各种类型的分析物(包括生物标记)。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456287的美国临时申请、以及2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了分析物,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0670] (17) 应用(领域和样品)

[0671] 本文公开的装置、系统和方法可以用于各种应用(领域和样品)。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456287的美国临时申请、以及2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了应用,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0672] (18) 云

[0673] 本文公开的装置、系统和方法可以采用云技术进行数据传输、存储和/或分析。在本文中公开了或在分别于2016年8月10日和2016年9月14日提交的申请号为PCT/US2016/045437和PCT/US0216/051775的PCT申请(指定美国)、2017年2月7日提交的申请号为62/

456065的美国临时申请、2017年2月8日提交的申请号为62/456287的美国临时申请、以及2017年2月8日提交的申请号为62/456504的美国临时申请中列出、描述和总结了相关的云技术,所有这些申请的全部内容出于所有目的并入本文。

[0674] 没有任何限制本方法和装置使用的意图,在一些实施方案中,该方法可用于从临床样品中鉴定微生物病原体。在这些实施方案中,靶序列可以来自多种不同的病原体(例如,至少10种或至少100种不同的病原体),而不知道哪种病原体会引起感染。可以使用本方法、组合物和试剂盒识别的微生物包括但不限于:多种革兰氏(+)细菌、多种革兰氏(-)细菌、多种肠杆菌科细菌、多种肠球菌属细菌、多种葡萄球菌属细菌,和多种弯曲杆菌属细菌、大肠杆菌(*E. coli*)、各种菌株的大肠杆菌(*E. coli*),比如,K12-MG1655、CFT073,0157:H7EDL933,0157:H7VT2-Sakai等,肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、多种念珠菌属物种,包含白色念珠菌、热带念珠菌、都柏林念珠菌、维斯假丝酵母、近平滑念珠菌、肺炎克雷伯氏菌、多种分枝杆菌属菌种,比如结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、牛分枝杆菌卡介菌、瘰癧分枝杆菌、堪萨斯分支杆菌、龟分枝杆菌、戈氏分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、日内瓦分枝杆菌、蟾分枝杆菌(*M. xenoi*)、猿分支杆菌、偶发分枝杆菌、玛尔摩分枝杆菌、隐藏分枝杆菌、嗜血分枝杆菌、非洲分枝杆菌、利斯特氏菌属物种、衣原体属物种、支原体属物种、沙门氏菌属物种、布鲁氏菌属物种、耶尔森氏菌属物种等。因此,本方法能够将微生物识别到微生物的属、种、亚种、菌株或变种的水平。

[0675] 其他注释

[0676] 在以下列举的段落中描述了本公开所述的发明主题的其他实施例。

[0677] 必须注意,如本文和所附权利要求中所使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指示对象,除非上下文另外明确指出,例如当使用词语“单个”时。例如,提及“分析物”包括单个分析物和多个分析物,提及“捕获剂”包括单个捕获剂和多个捕获剂,提及“检测剂”包括单个检测剂和多个检测剂,提及“试剂”包括单个试剂和多个试剂。

[0678] 如本文所用,术语“适配”和“配置”是指元件、部件或其他物件被设计和/或用于执行给定功能。因此,术语“适配”和“配置”的使用不应被解释为表示给定的元件、组件或其他物件简单地“能够”执行给定的功能。类似地,被表述为配置以执行特定功能的物件可以另外或可选地被描述为可操作以执行该功能。

[0679] 如本文所用,当提及本公开所述的一个或多个部件、特征、细节、结构、实施方案和/或方法时,使用短语“例如”、短语“作为示例”和/或仅仅是术语“示例”和“示例性”旨在传达所描述的部件、特征、细节、结构、实施方案、和/或方法是本公开所述的部件、特征、细节、结构、实施方案、和/或方法的说明性的、非排他性的示例。因此,所描述的部件、特征、细节、结构、实施方案、和/或方法不是限制性的、必需的、或排他性的/穷尽的;并且其他部件、特征、细节、结构、实施方案、和/或方法,包含结构上和/或功能上类似和/或等效的部件、特征、细节、结构、实施方案、和/或方法,也在本公开的范围內。

[0680] 如本文所用,关于一个以上实体的列表,短语“至少一个”和“一个或多个”是指实体列表中的任何一个或多个实体,并且不限于实体列表中具体列出的每个实体中的至少一个。例如,“A和B中的至少一个”(或等同地,“A或B中的至少一个”,或等同地,“A和/或B中的至少一个”)可指单独的A、单独的B,或A和B的组合。

[0681] 如本文所用,置于第一实体和第二实体之间的术语“和/或”是指以下情况之一:

(1) 第一实体, (2) 第二实体, 以及 (3) 第一实体和第二实体。使用“和/或”列出的多个实体应当以相同的方式来解释, 即如此结合的实体的“一个或多个”。除了由“和/或”子句具体标识的实体之外, 可以任选地存在其他实体, 无论其与具体标识的那些实体相关还是无关。

[0682] 当本文提及数值范围时, 本发明包括其中包括端点的实施方案, 其中排除两个端点的实施方案, 以及其中包括一个端点而排除另一个端点的实施方案。应当假定包括两个端点, 除非另有说明。此外, 除非另有说明或从上下文和本领域普通技术人员的理解来看是显而易见的。

[0683] 在任何专利、专利申请或其他参考文献通过引用并入本文并且 (1) 定义术语的方式与本公开的未并入部分或任何其他并入的参考文献不一致和/或 (2) 以其他方式与本公开的未并入部分或任何其他并入的参考文献不一致的情况下, 应当以本公开的未并入部分为准, 并且术语或其中并入的公开内容应当仅以术语被定义和/或并入的公开内容最初存在的参考文献为准。

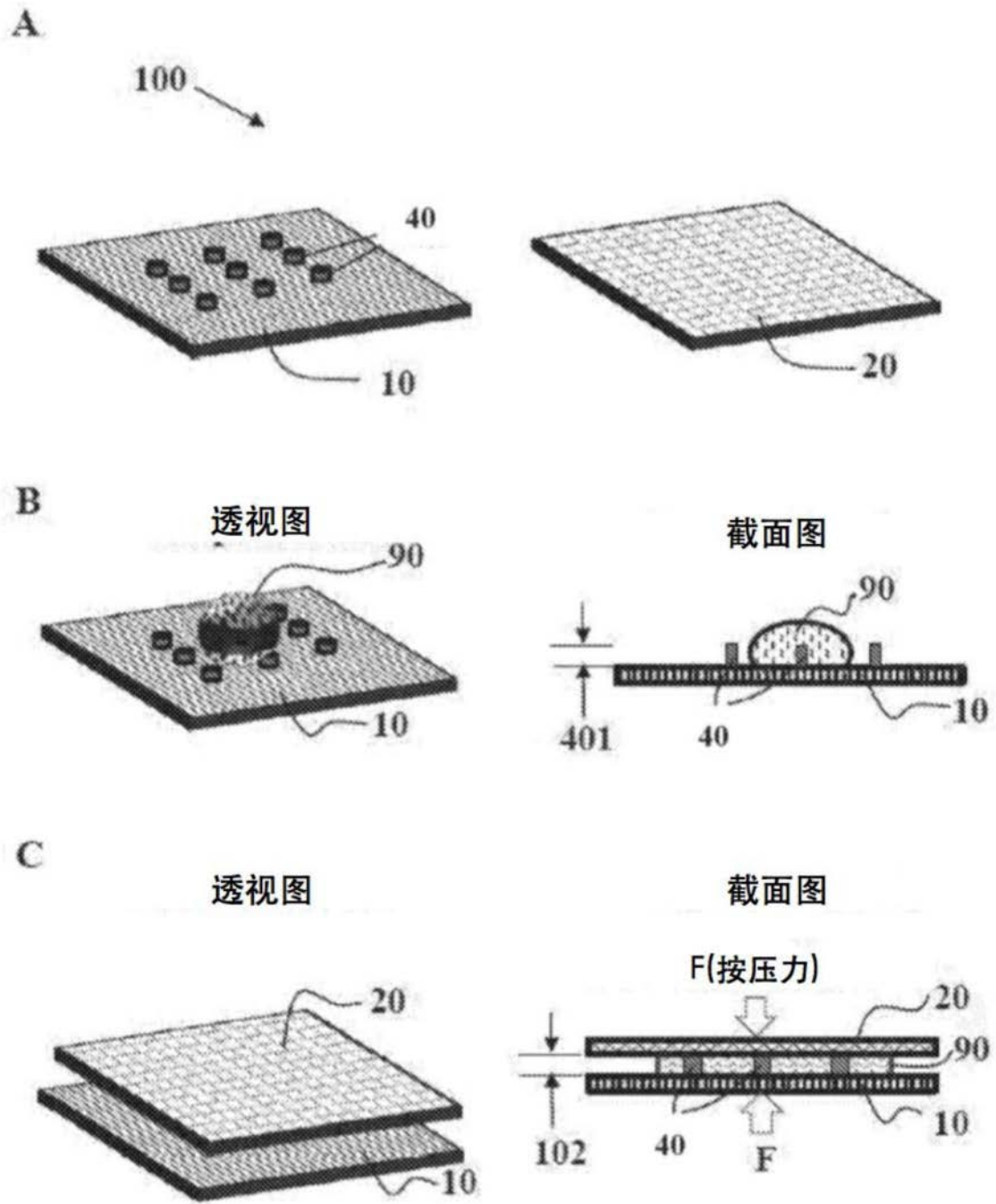


图1

## 截面视图

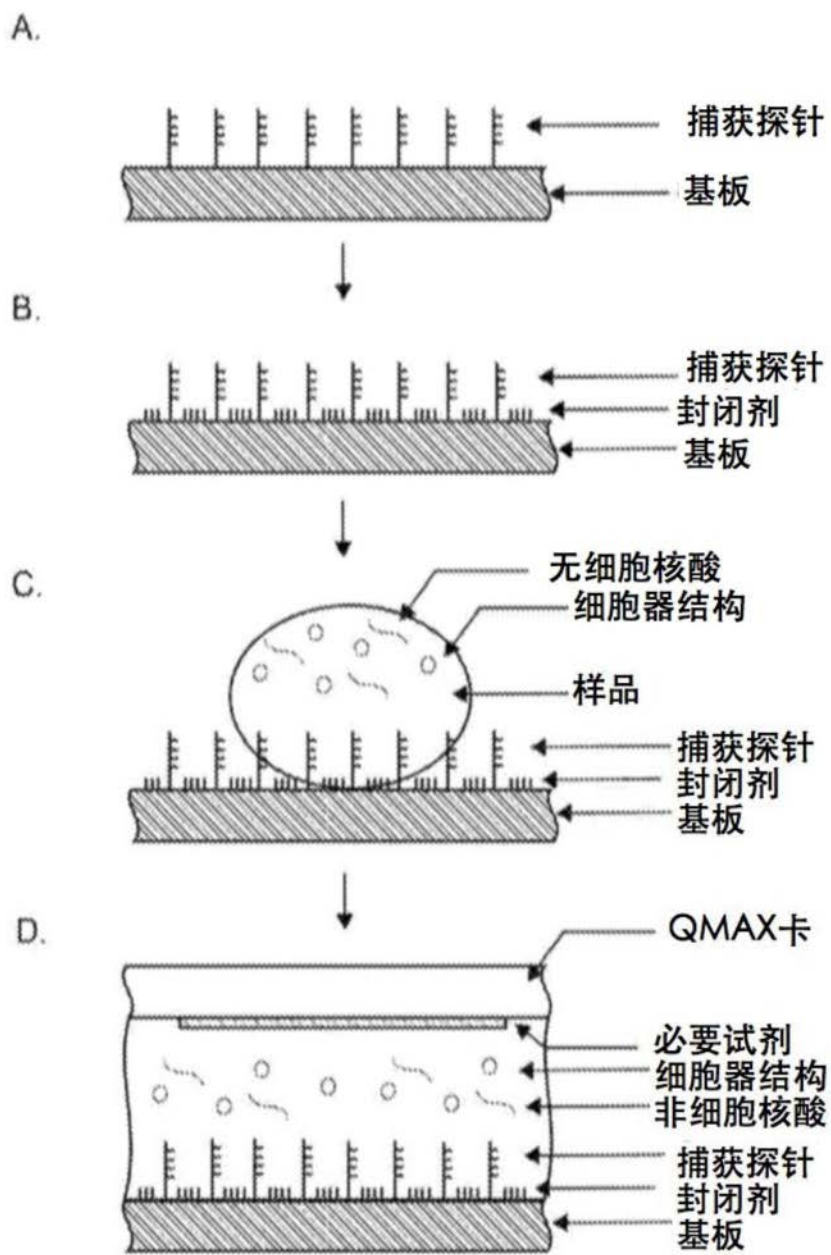


图2



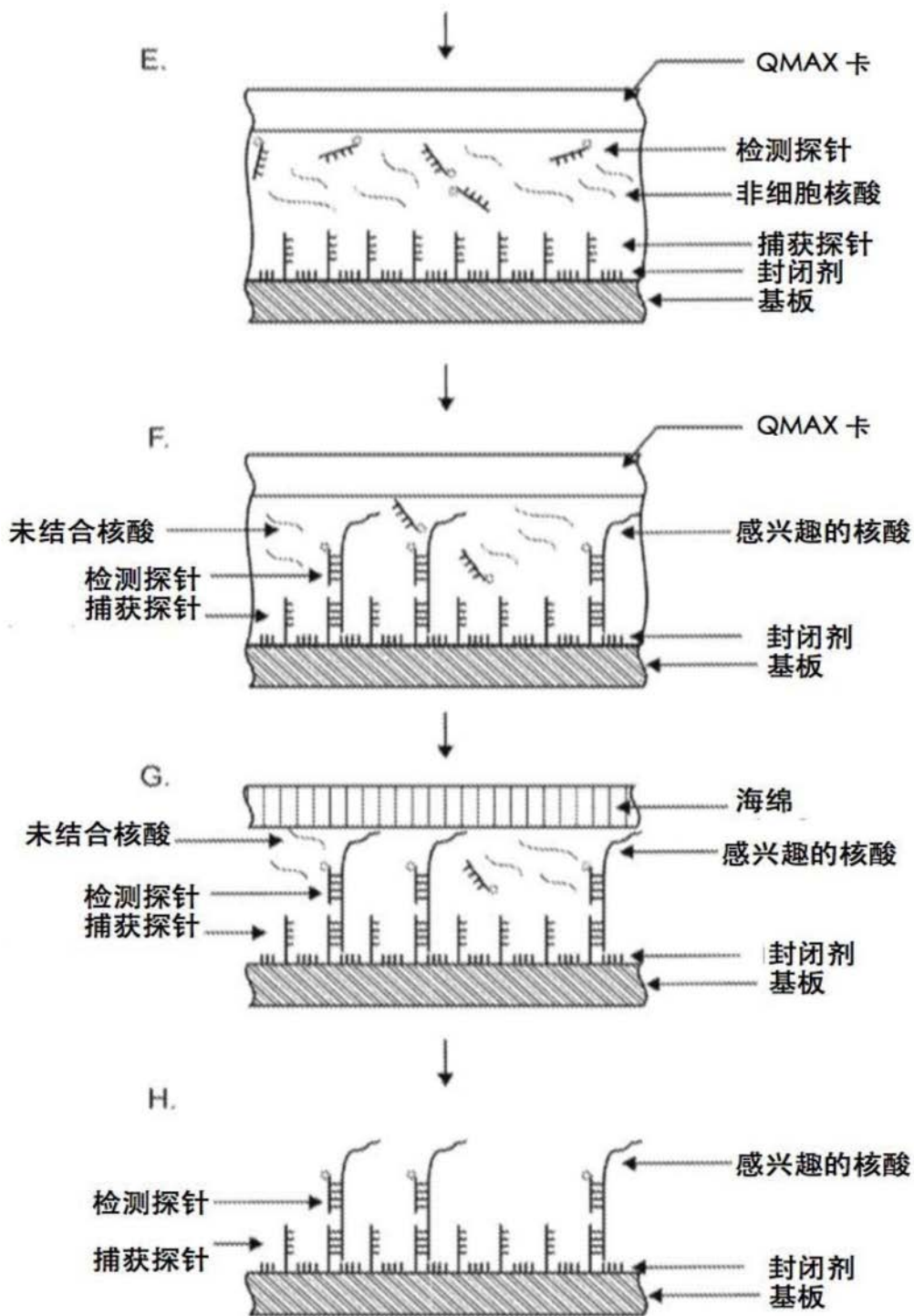


图2(继)

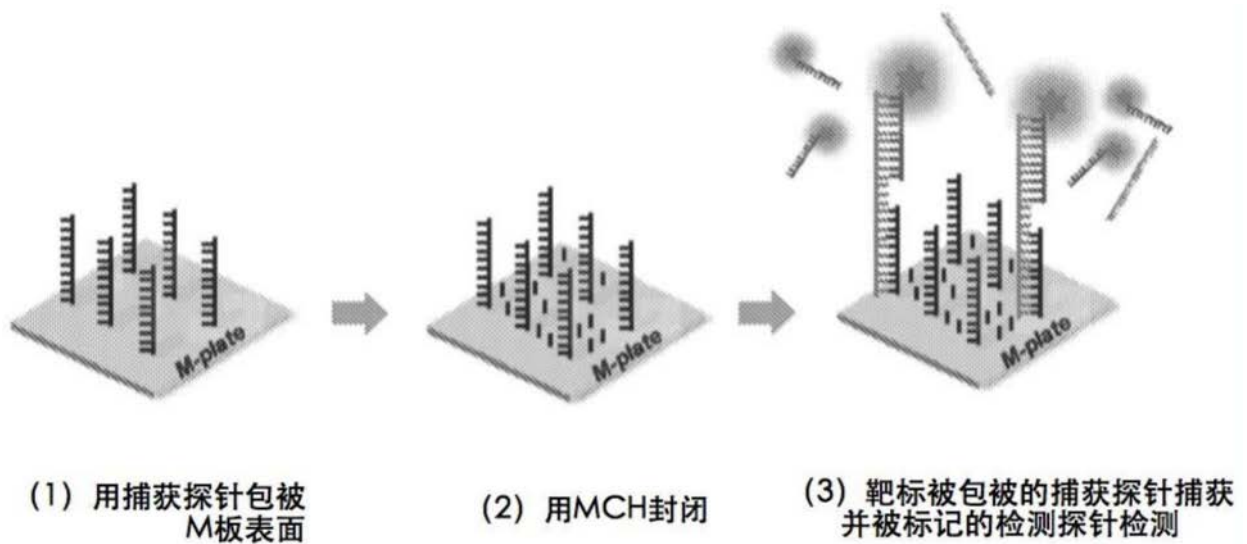


图3

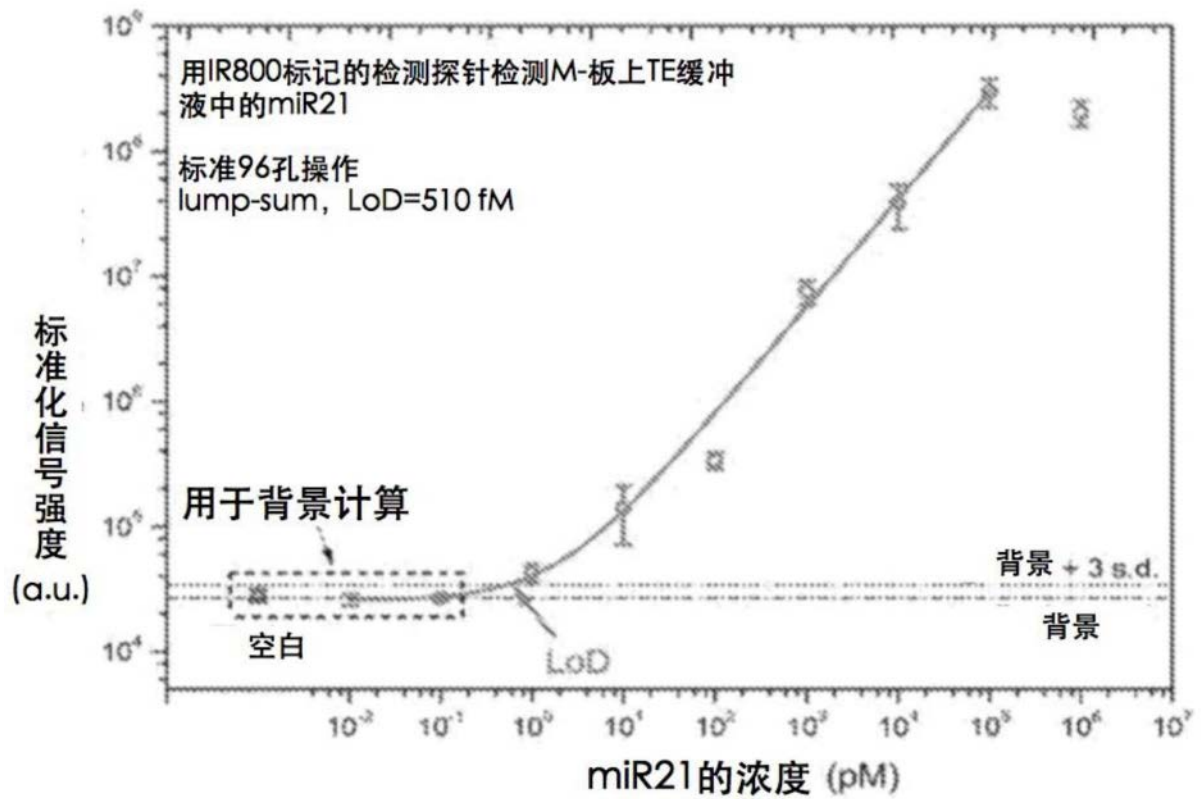


图4

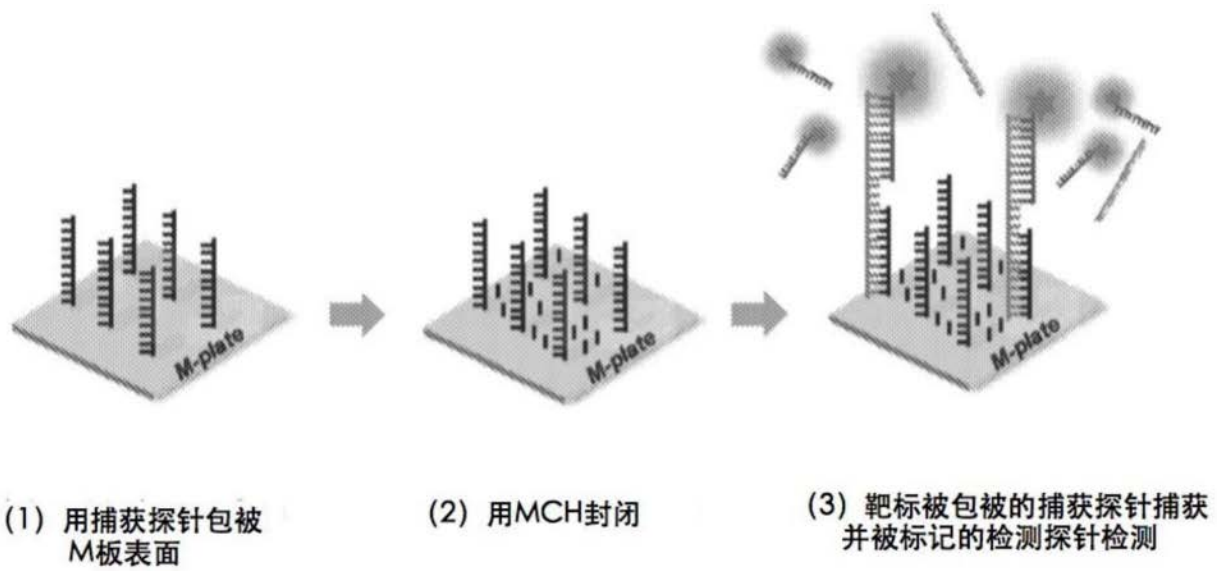


图5

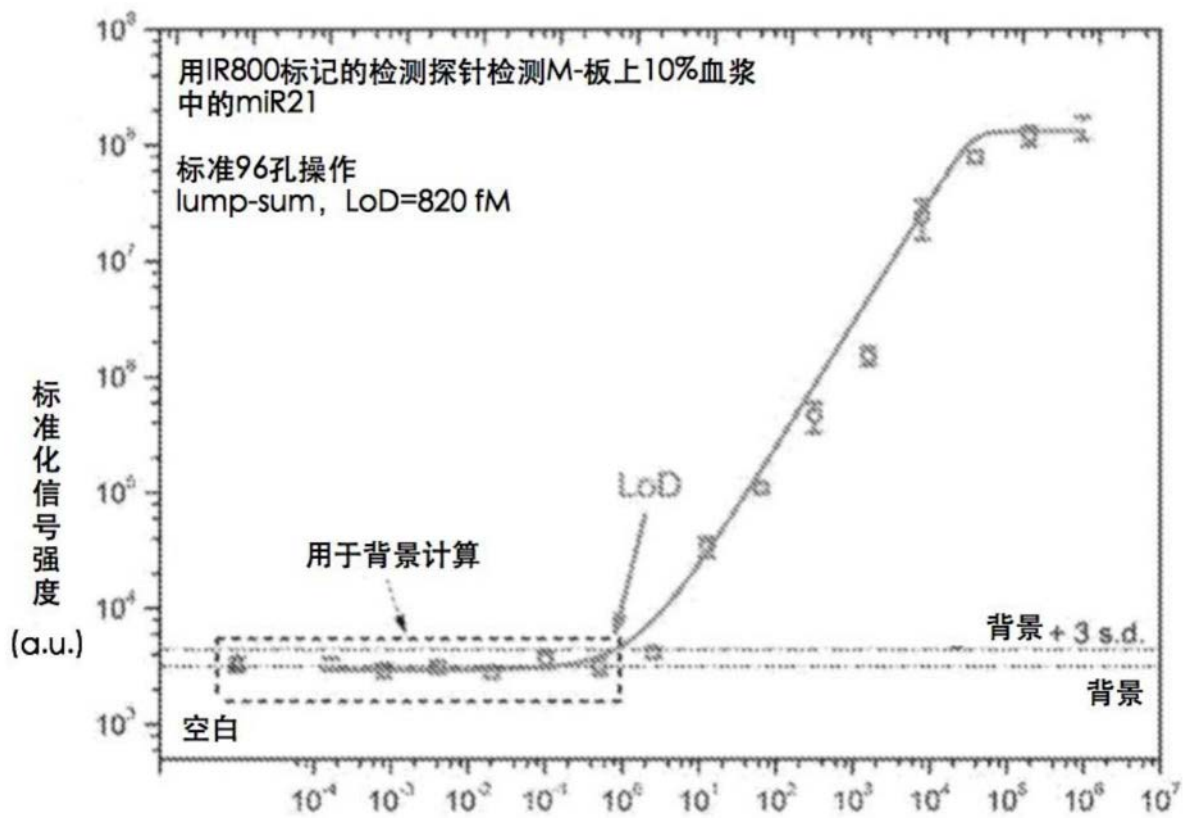


图6

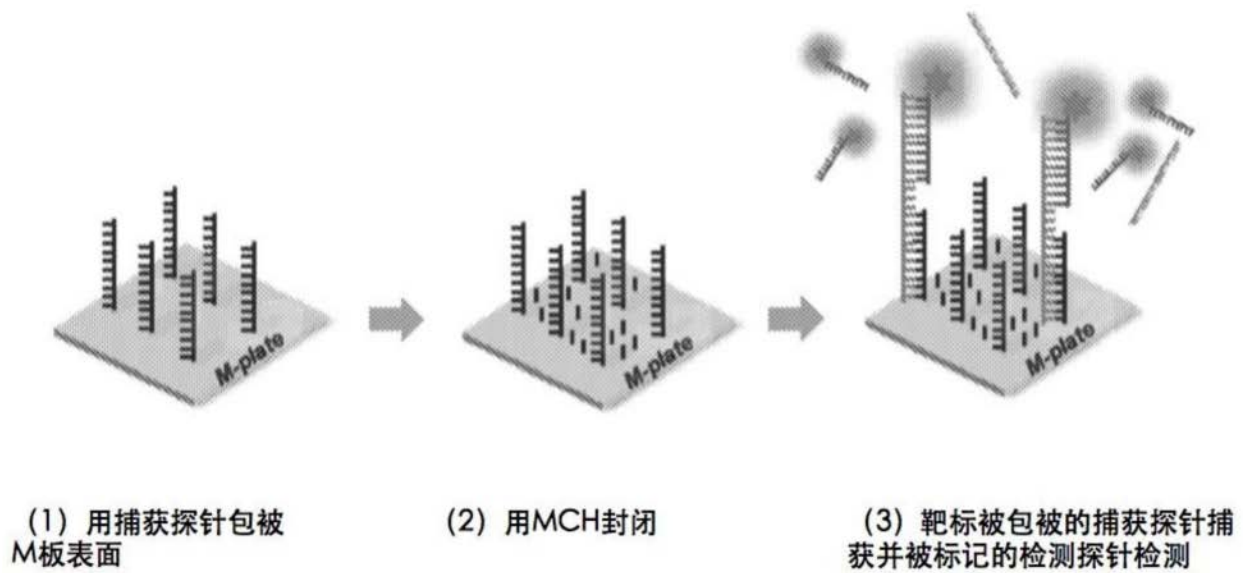


图7

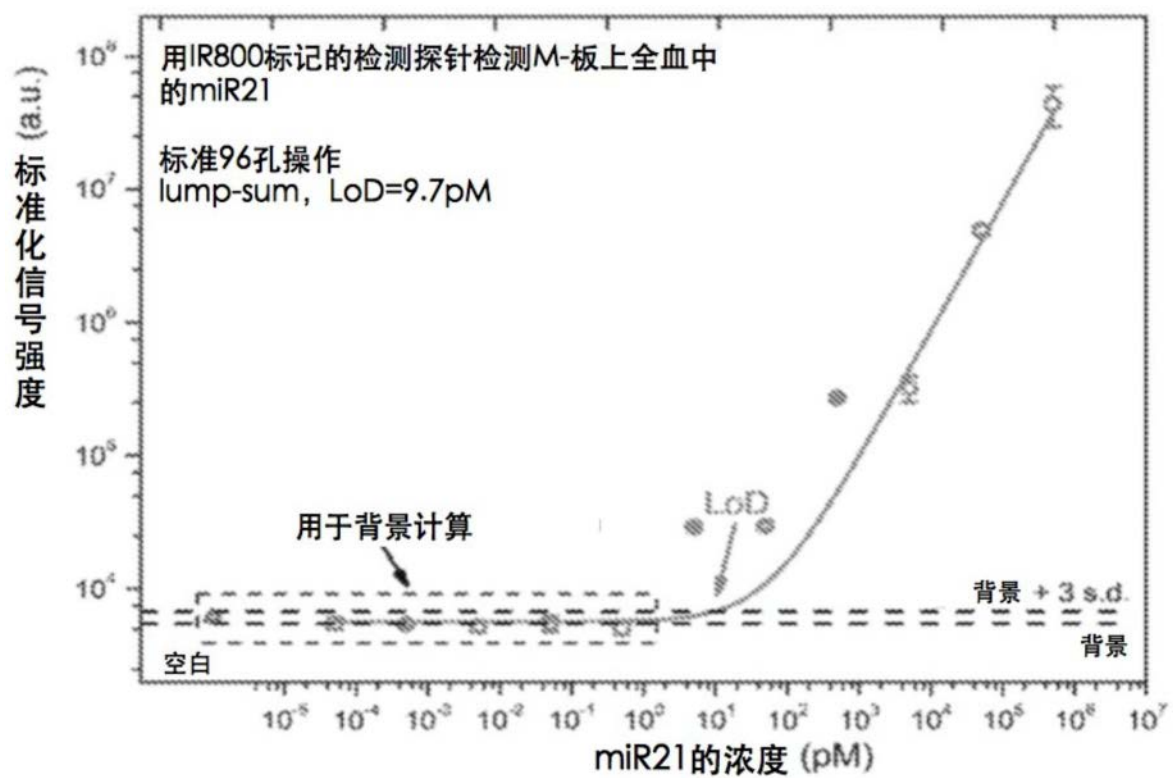


图8

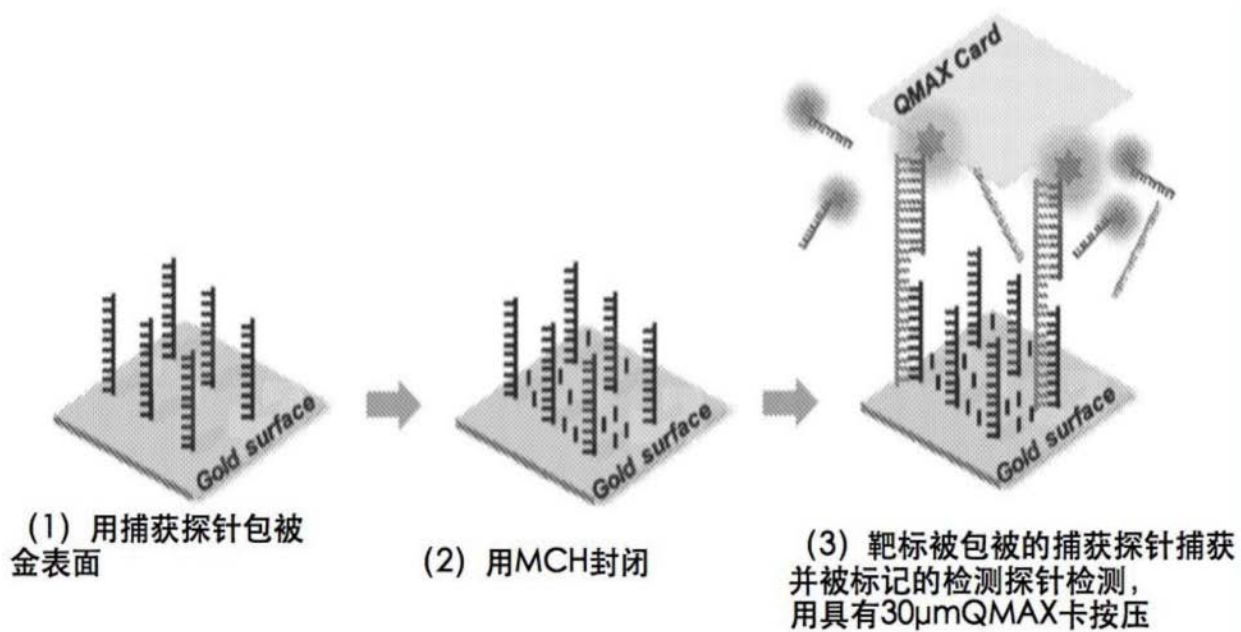


图9

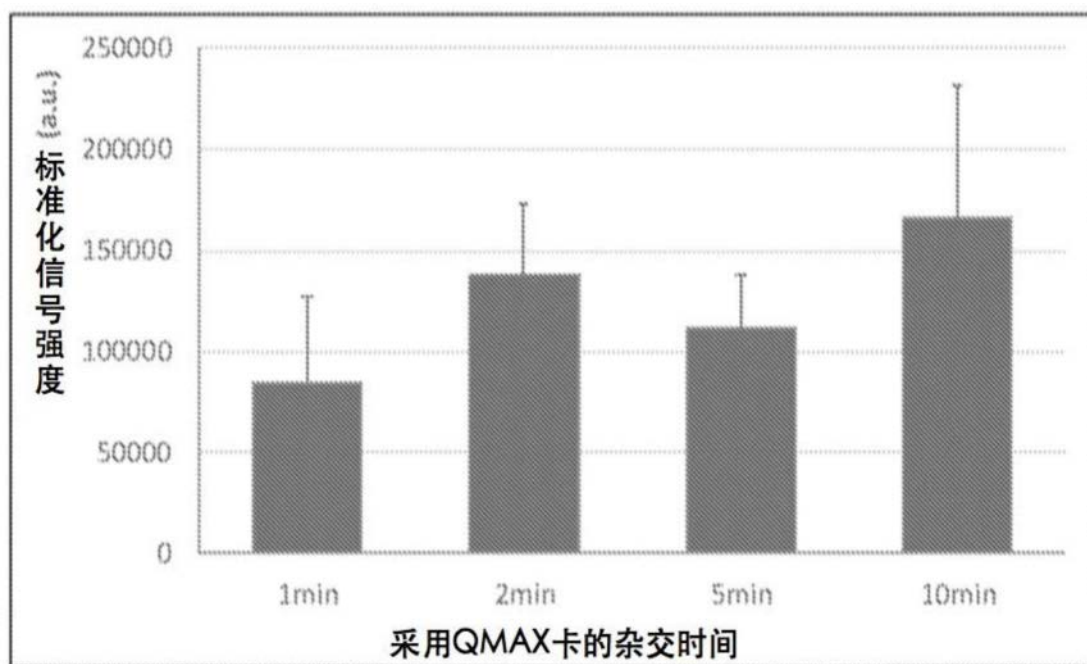


图10



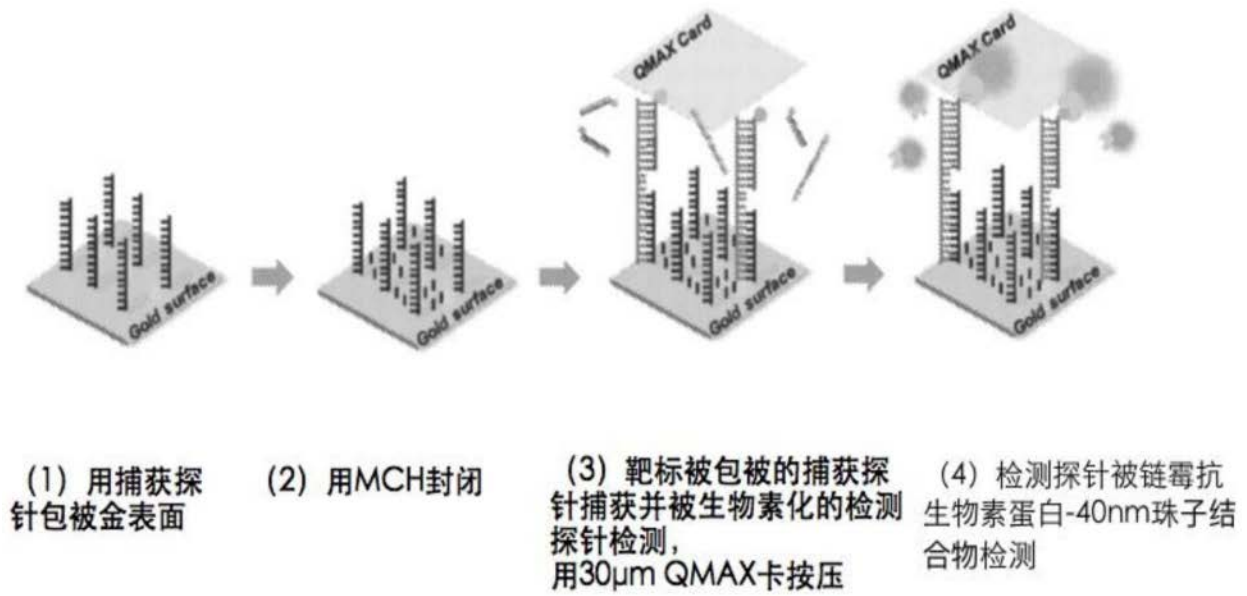


图11

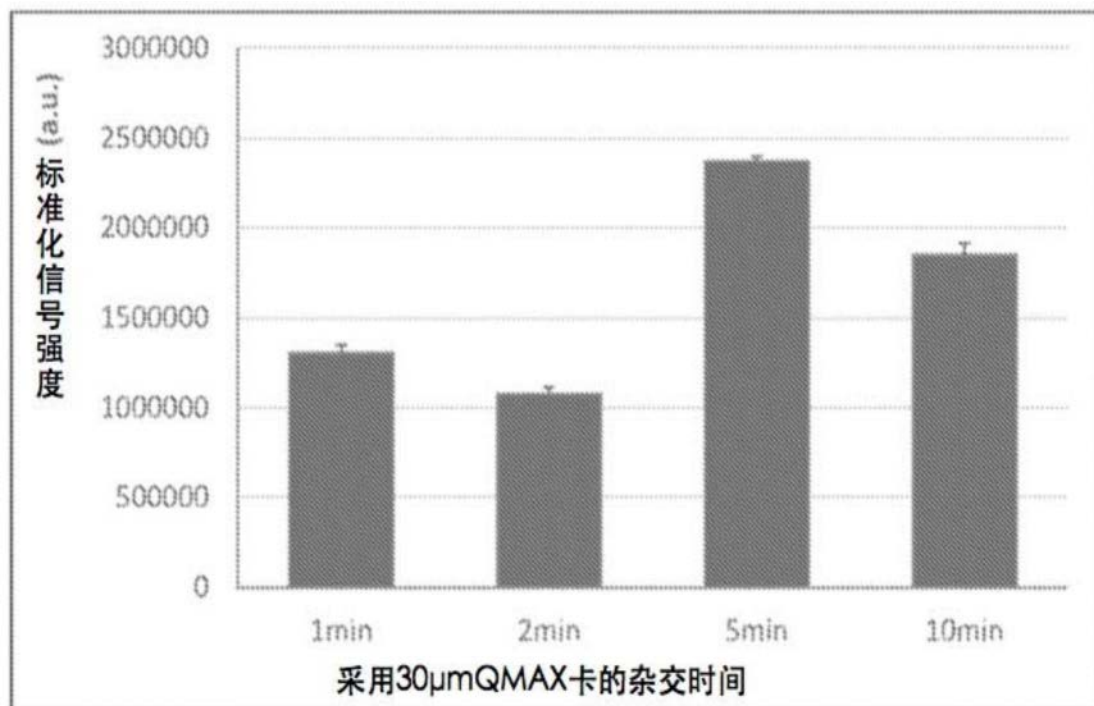
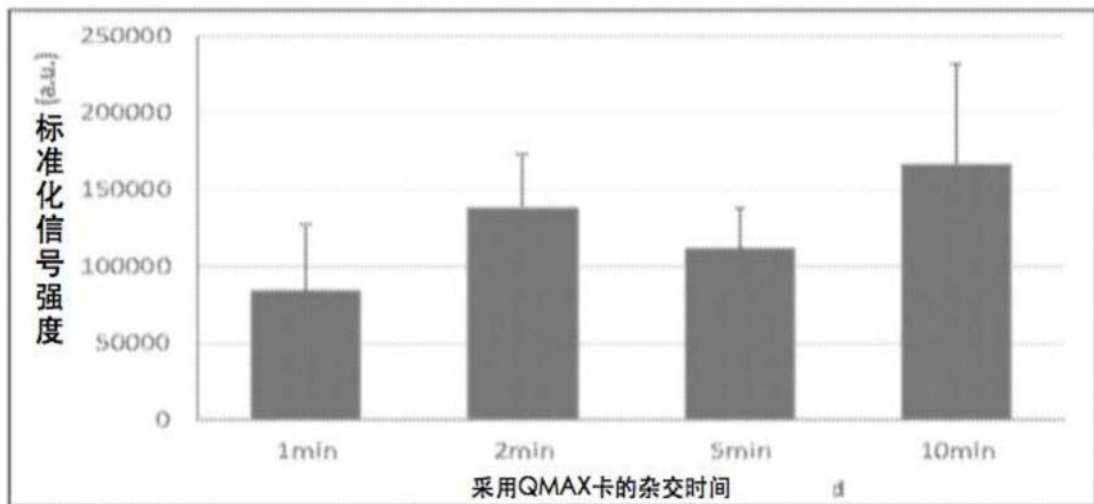


图12



(1) 采用捕获探针包被金表面

(2) 用MCH封闭

(3) 靶标被包被的捕获探针捕获并被标记的检测探针检测，用30 $\mu$ mQMAX卡按压

图13

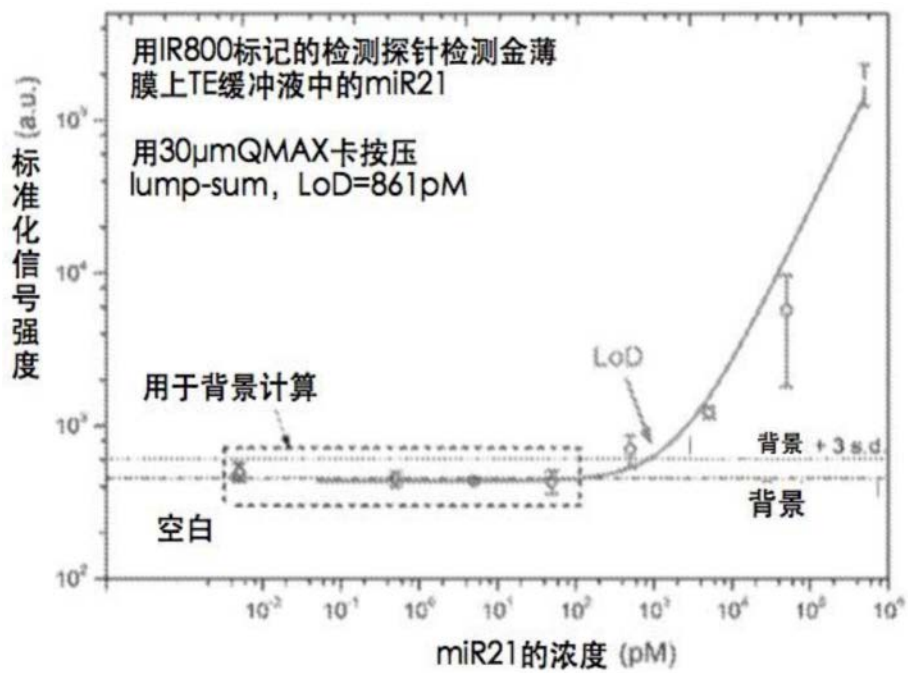
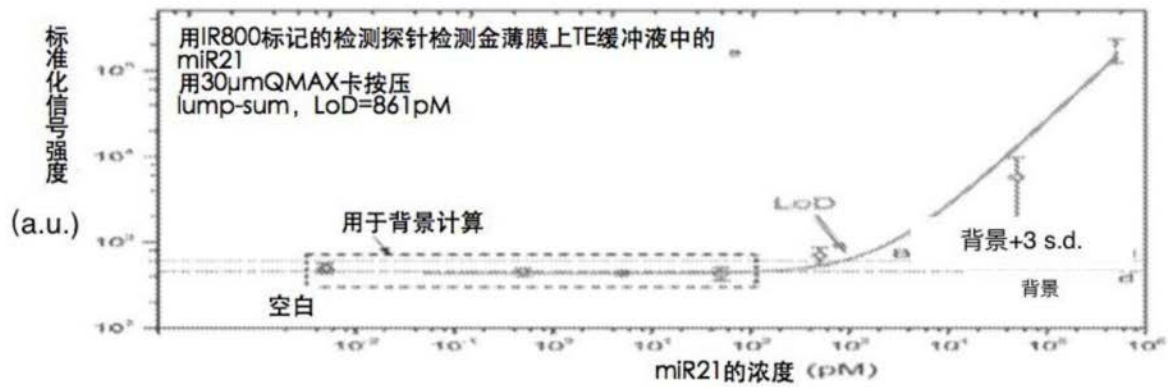


图14



(1) 采用捕  
获探针  
包被金表面

(2) 用MCH封闭 (3) 靶标被包被的捕获探针捕  
获并被生物素化的检测探针检  
测,  
用30 $\mu$ mQMAX卡按压

(4) 检测探针被链霉抗  
生物素蛋白-40nm珠粒  
结合物检测

图15

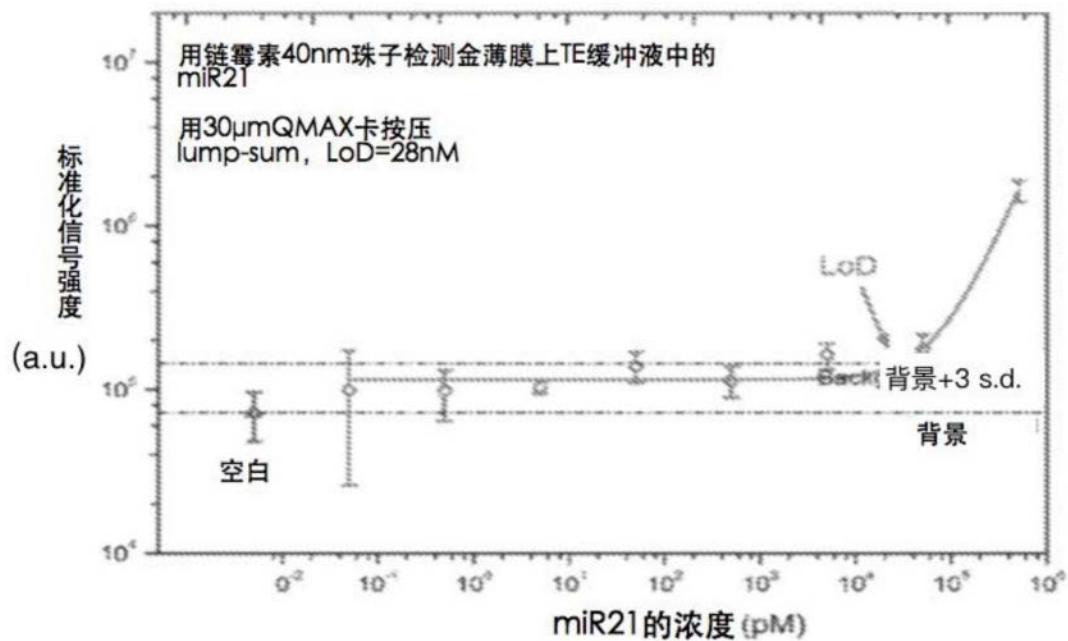


图16



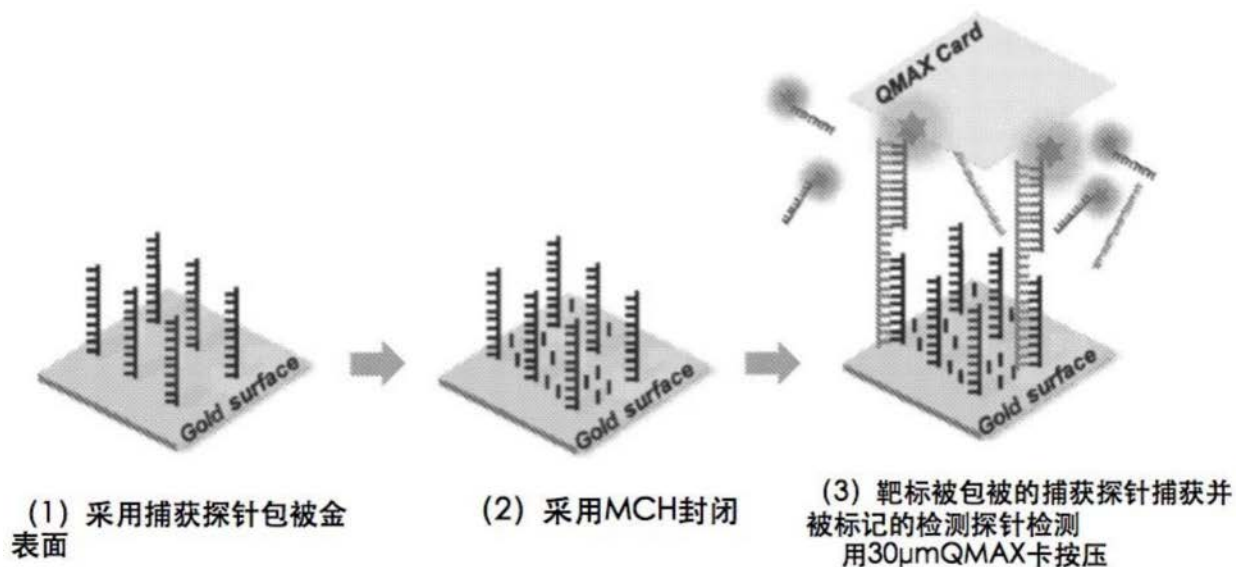


图17

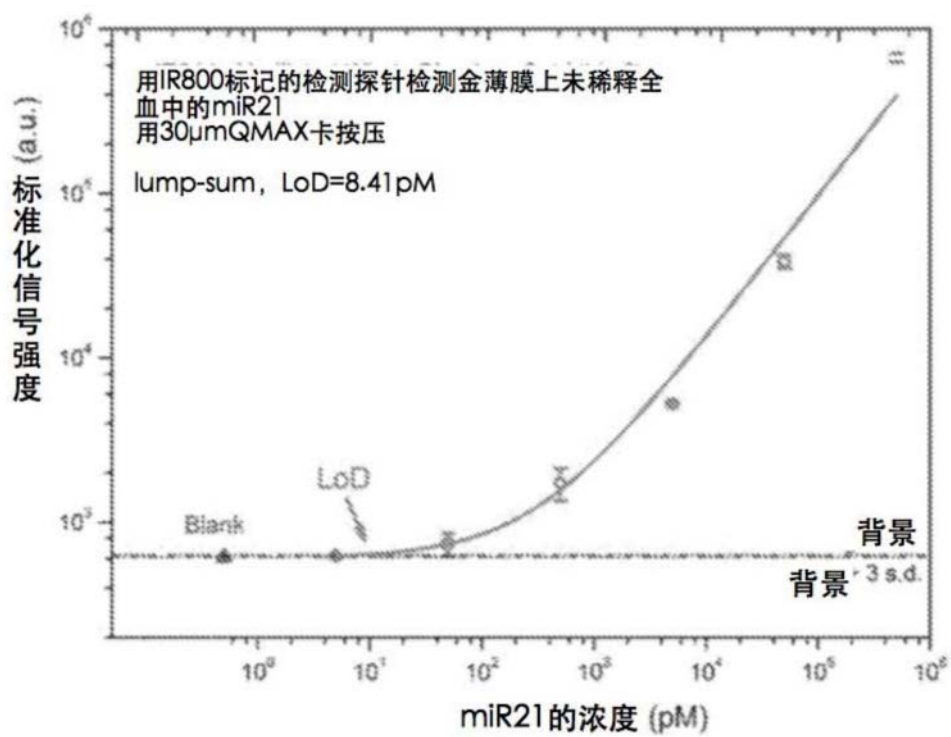


图18

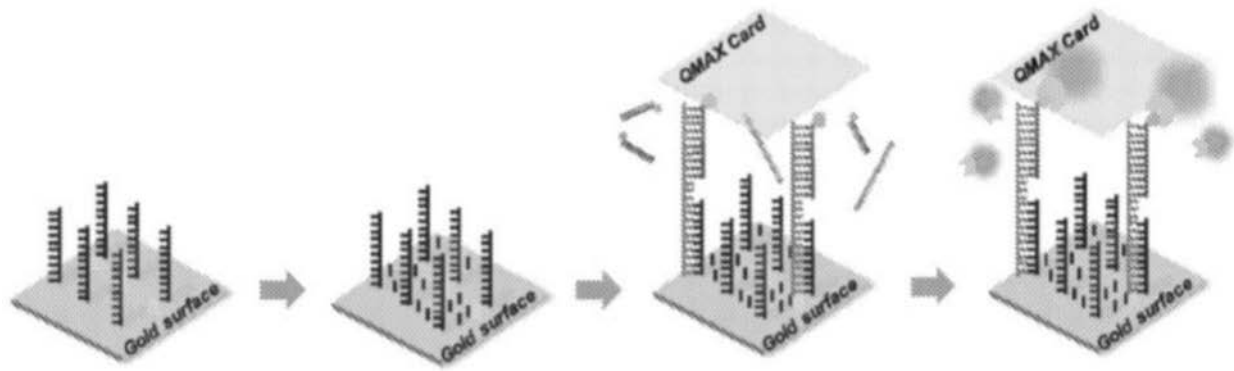


图19

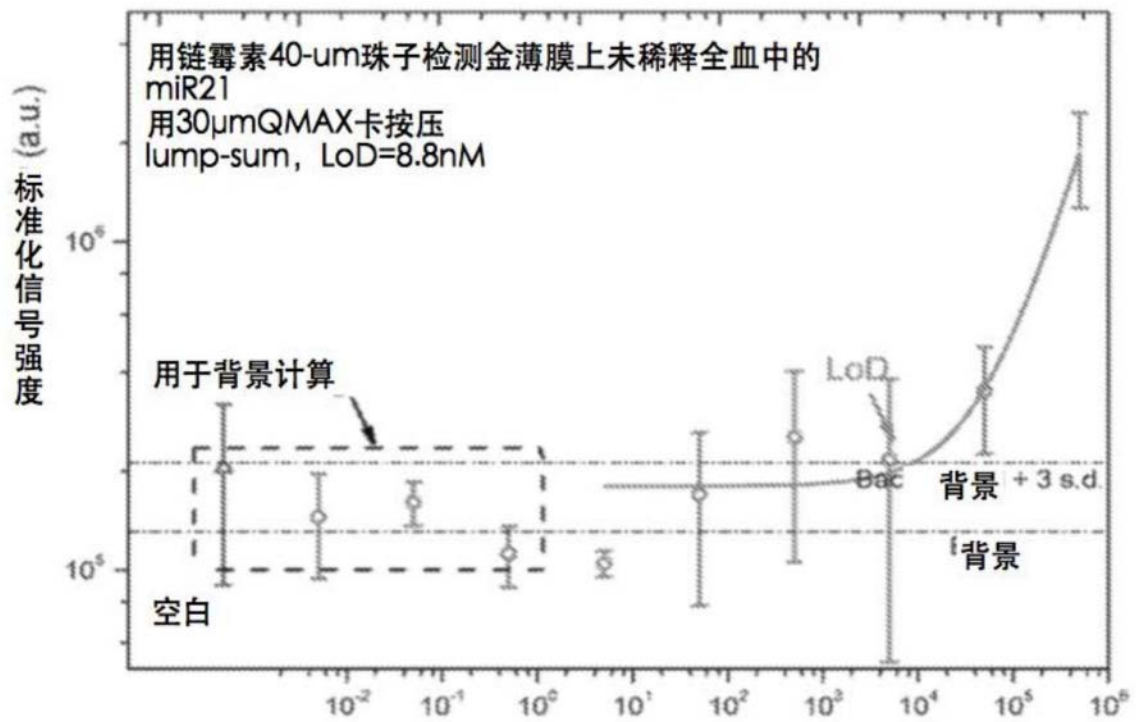
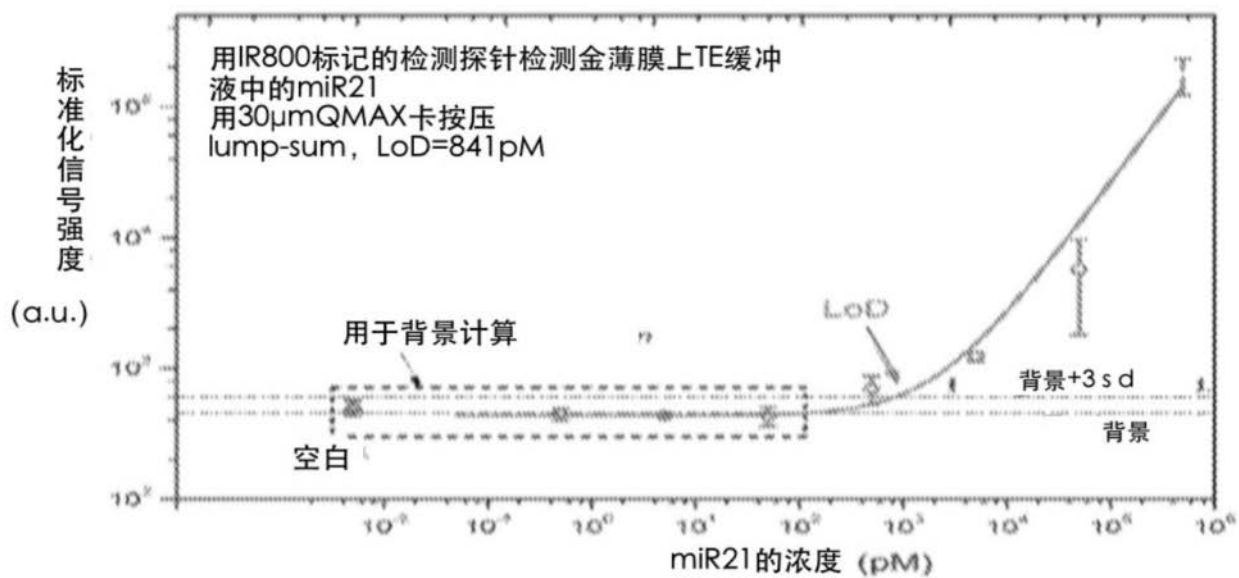


图20



(1) 采用捕获探针  
包被金表面

2) 采用MCH封闭

(3) 靶标被包被的捕获探  
针捕获并被生物素化的检  
测探针检测  
用30 $\mu$ mQMAX卡按压

(4) 检测探针  
被40nm珠子-链霉素  
结合物检测

图21

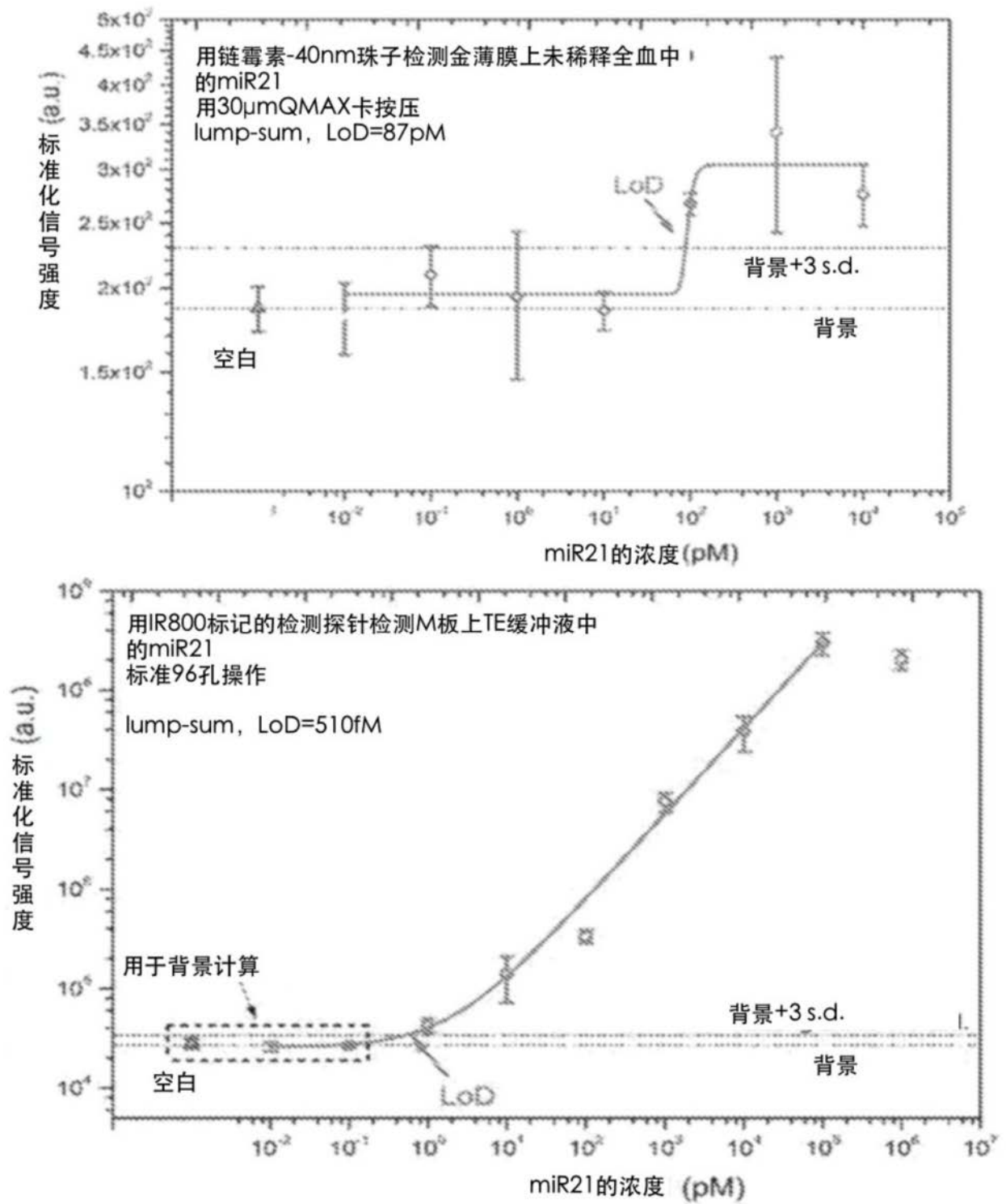


图22

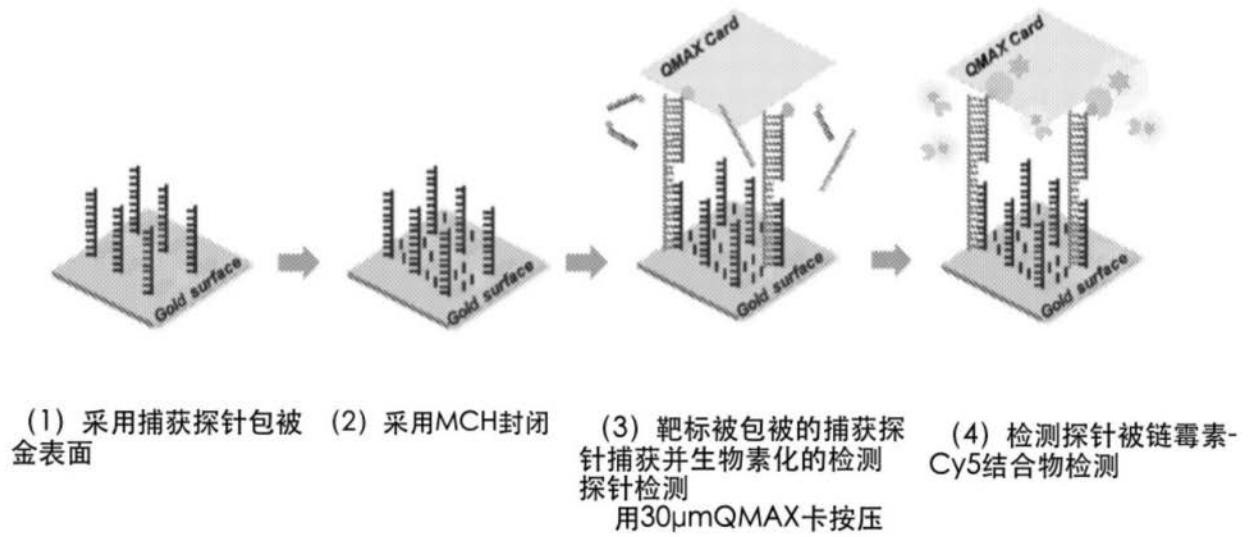


图23

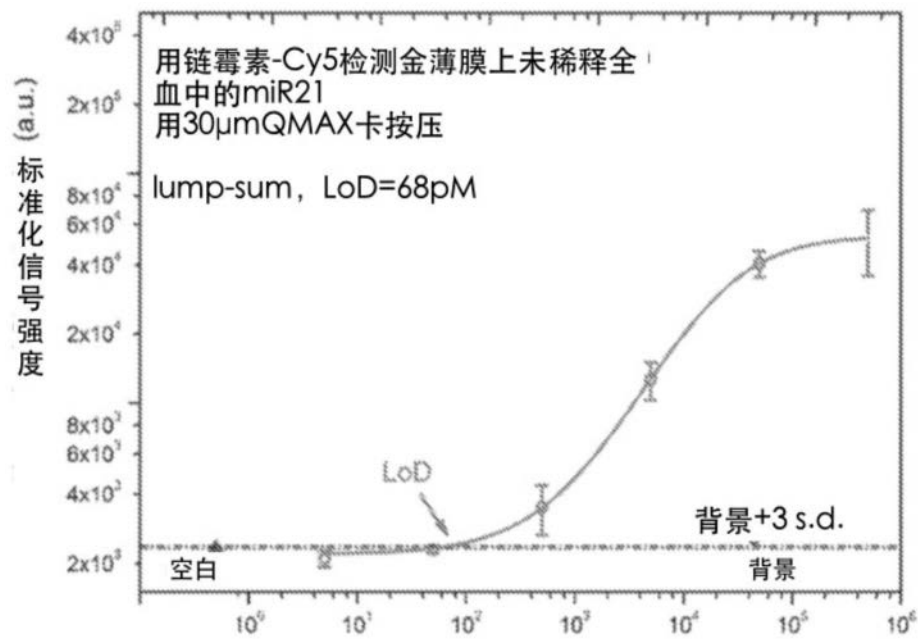


图24

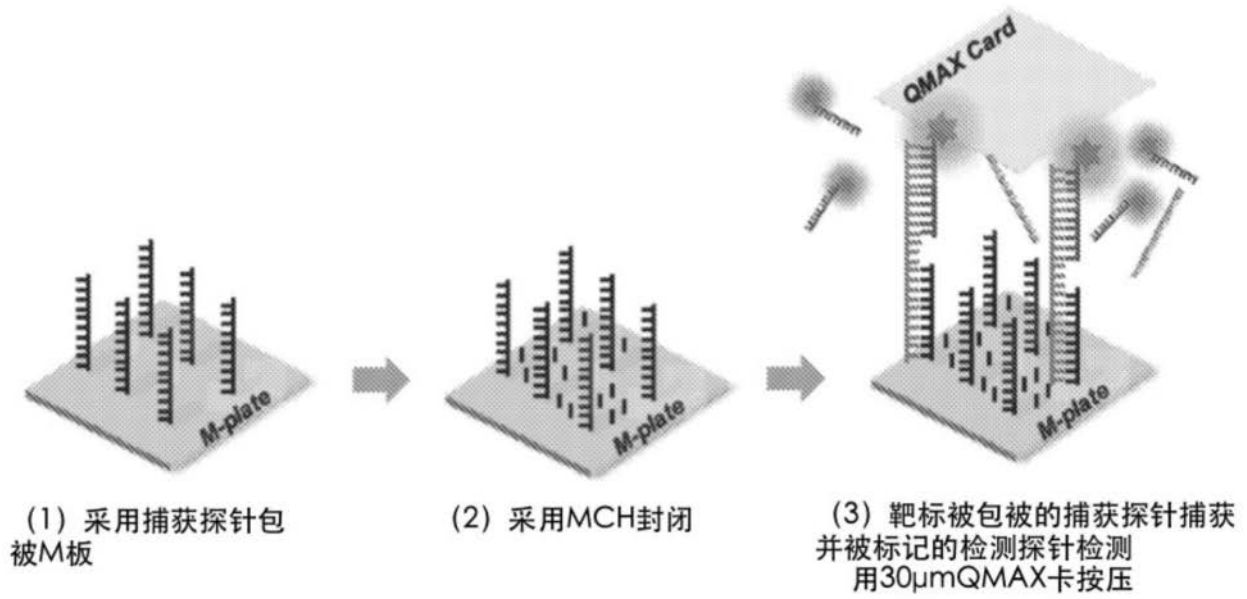


图25

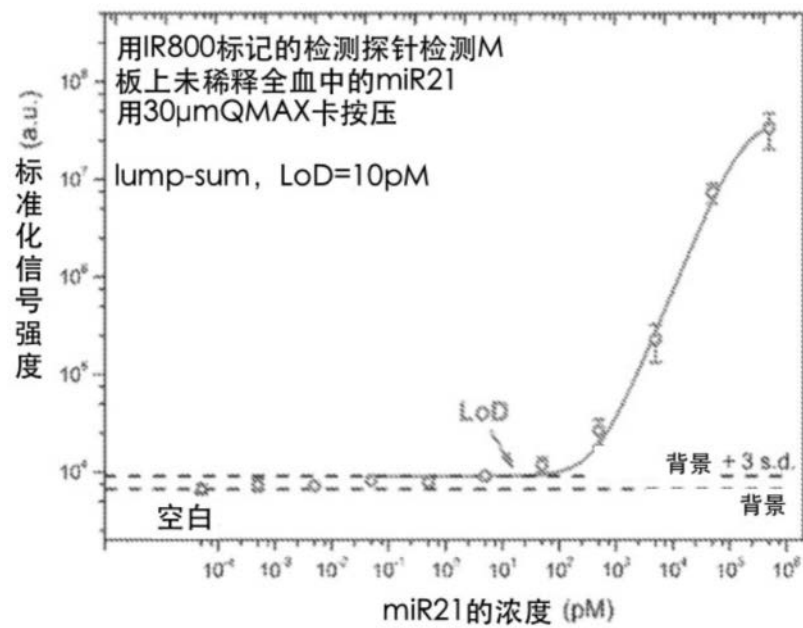


图26

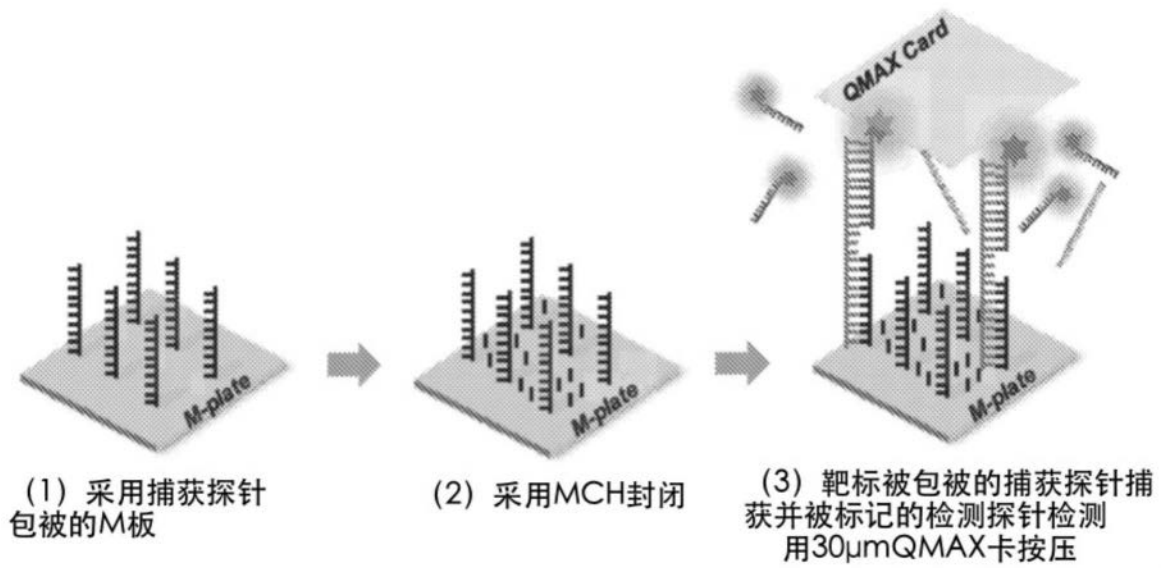


图27

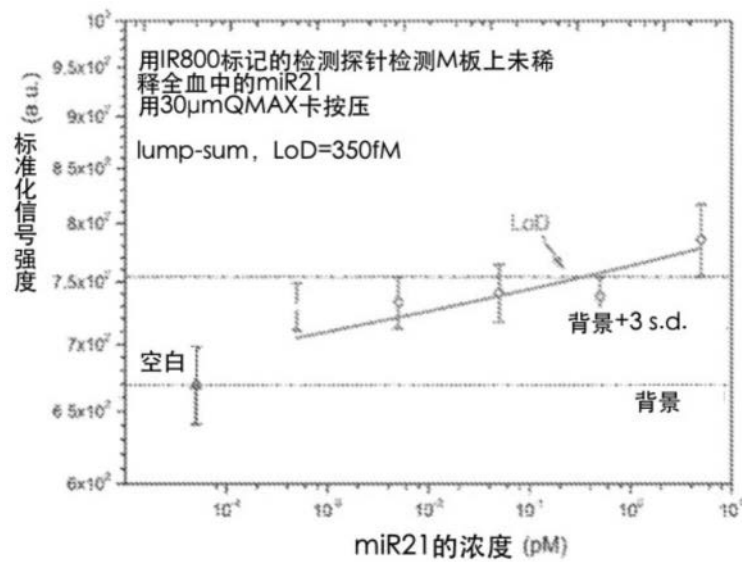


图28

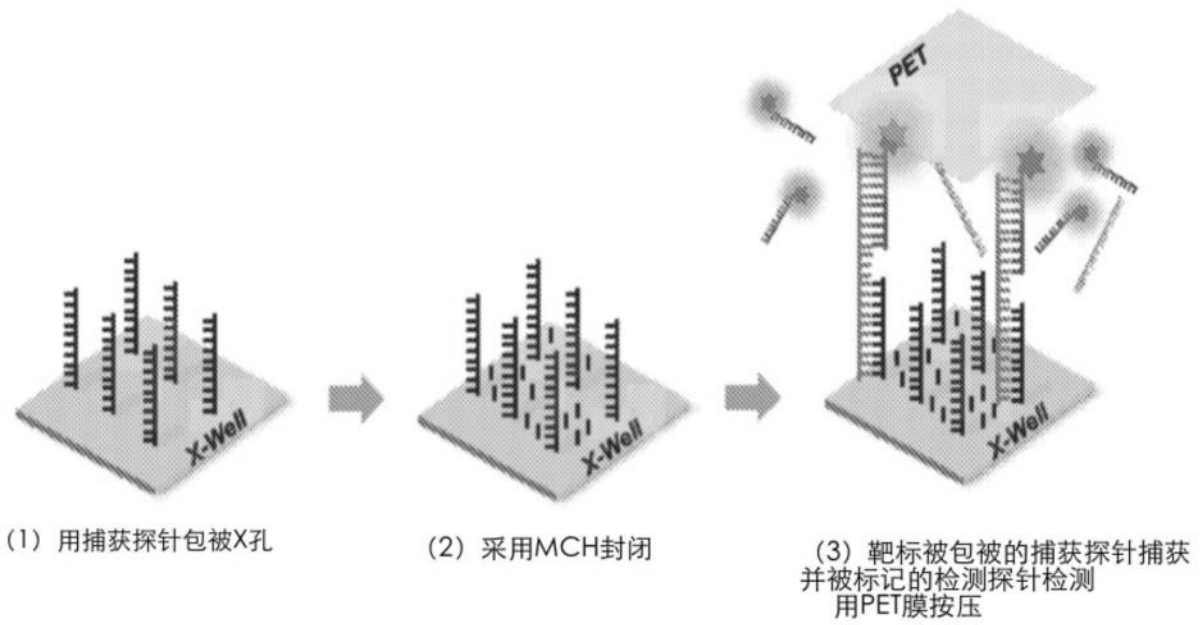


图29

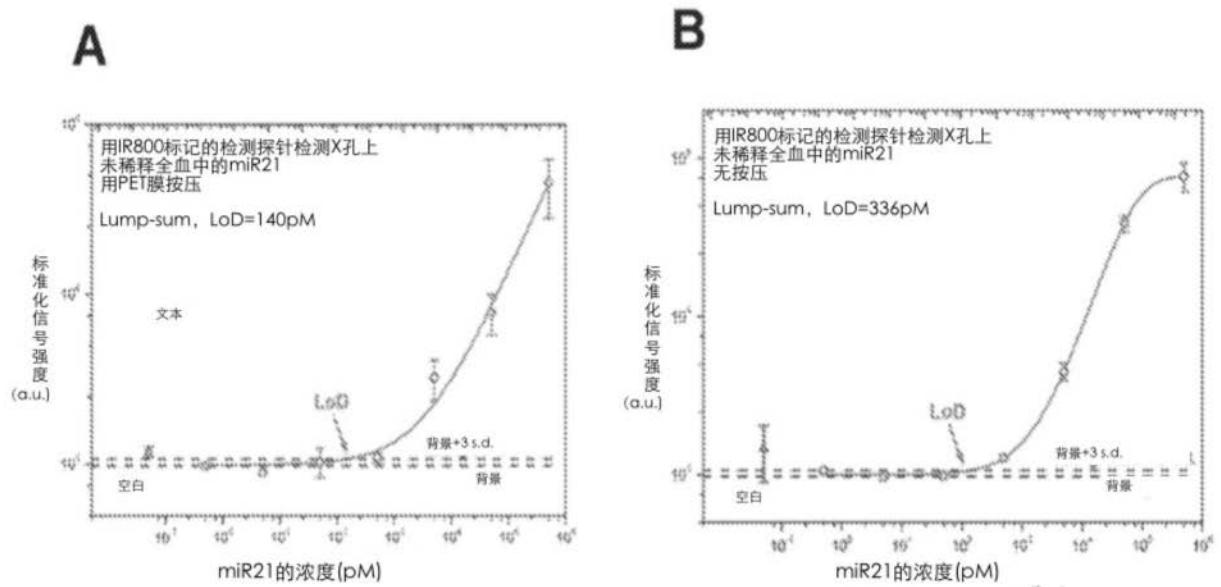


图30



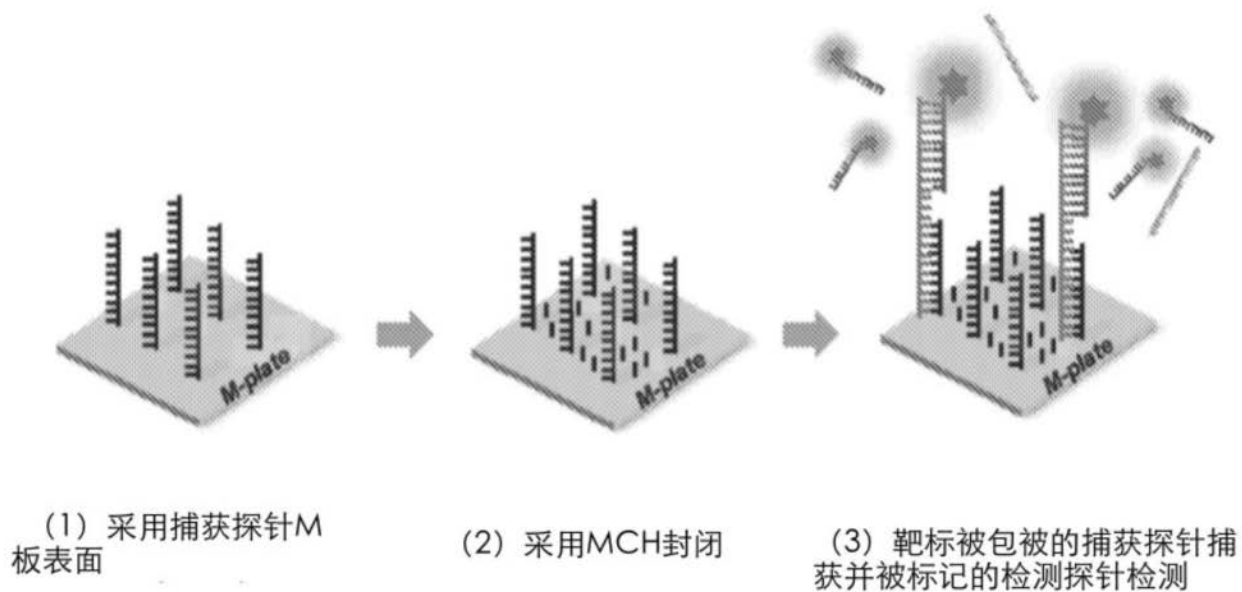


图31

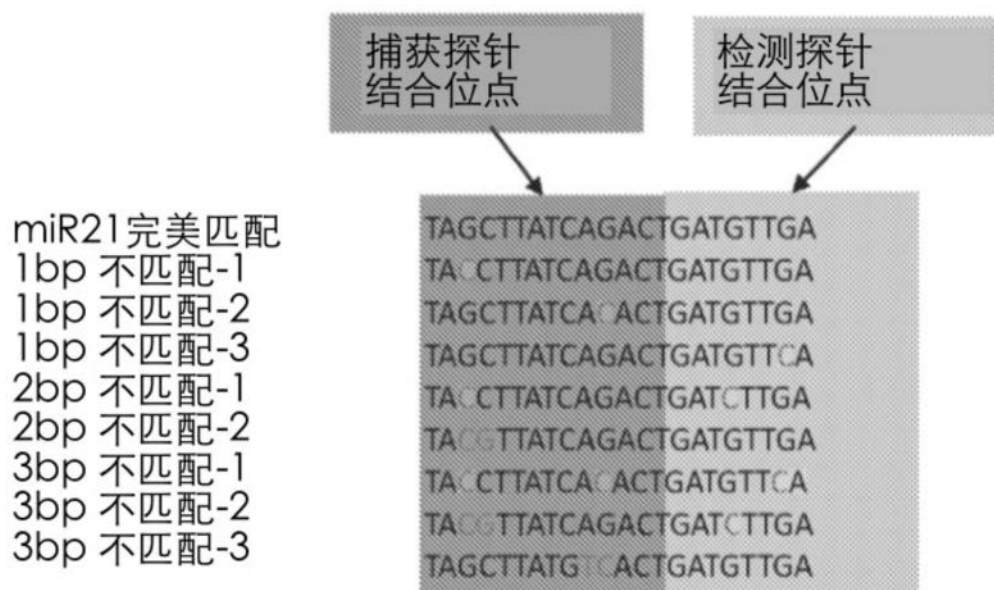


图32

靶标	标准化信号强度 (a.u.)	倍数改变
miR21靶标 (完美匹配)	1.76E+06	--
1bp 不匹配-1	5.09E+04	34.6
1bp 不匹配-2	6.27E+05	2.8
1bp 不匹配-3	2.36E+05	7.5
2bp 不匹配-1	1.16E+04	151.5
2bp 不匹配-2	2.39E+04	73.6
3bp 不匹配-1	6.36E+03	276.6
3bp 不匹配-2	6.71E+03	262.4
背景 (无靶标)	8.02E+03	219.5
	7.08E+03	248.7

图33

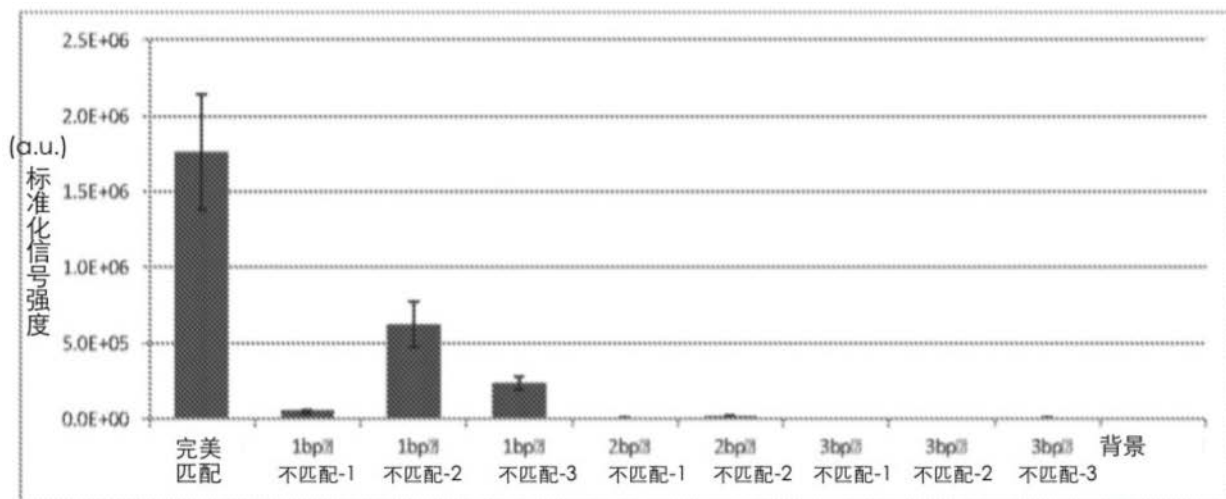


图34

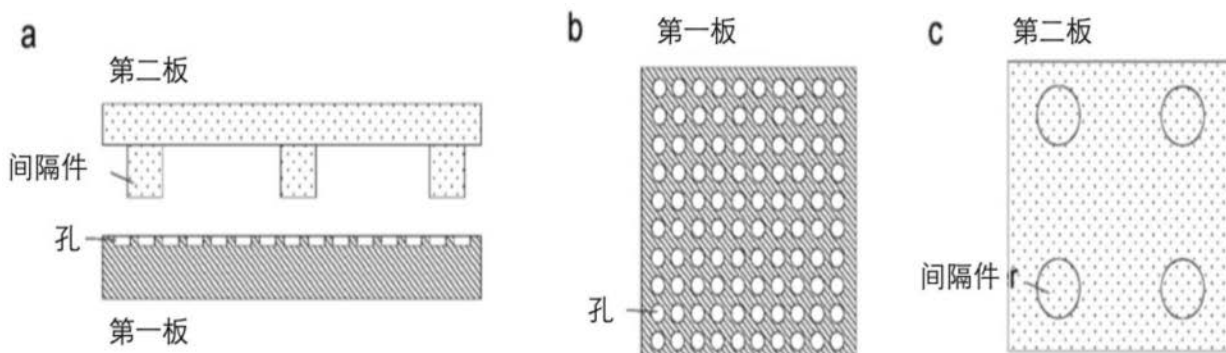


图35

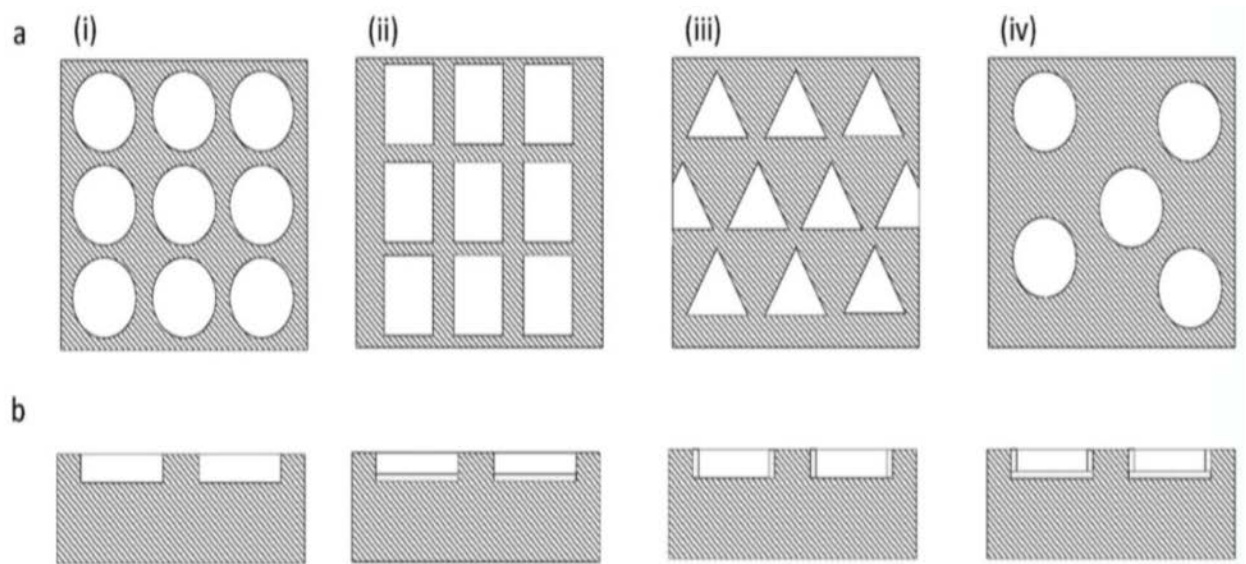


图36

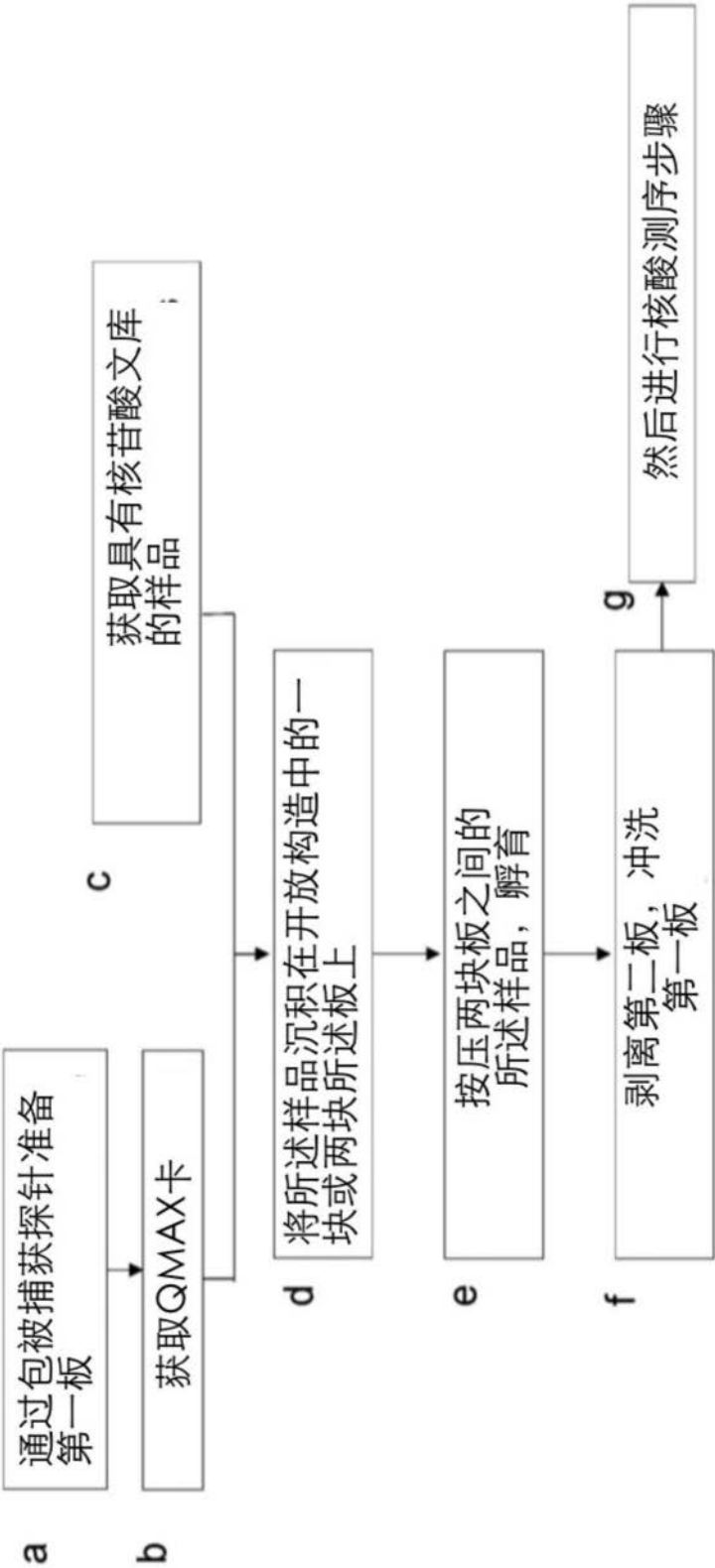


图37

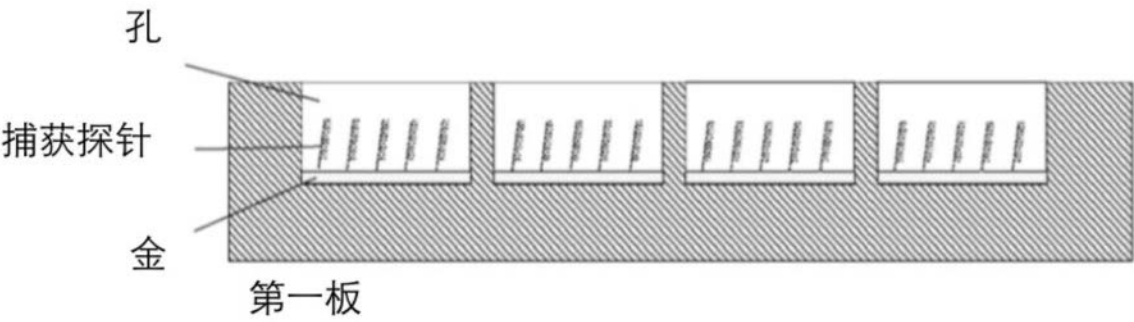


图38

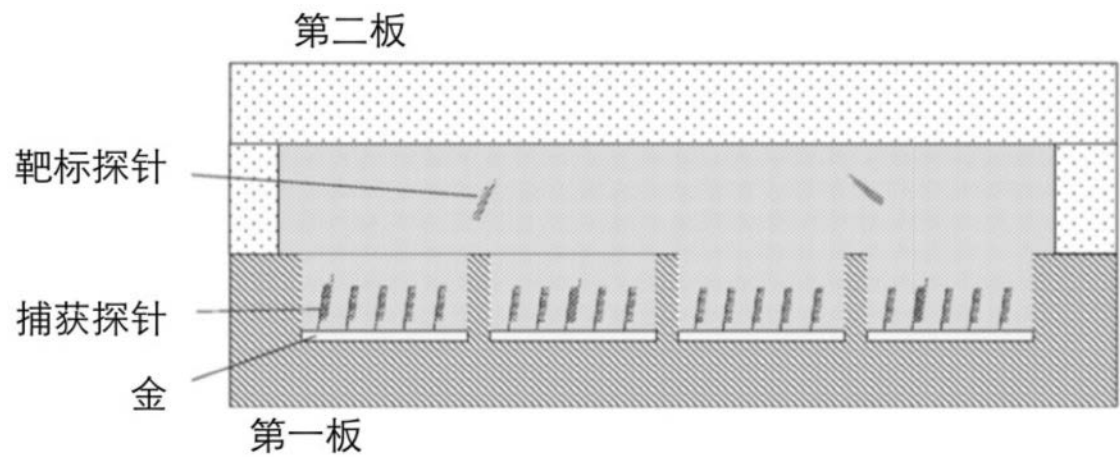


图39

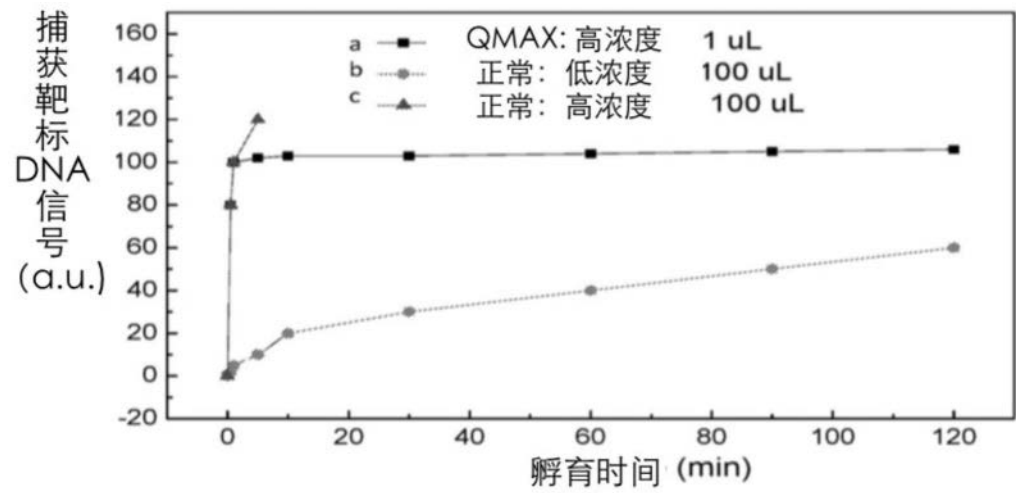


图40