

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103543094 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

---

(21) 申请号 201310484661. 1

(22) 申请日 2008. 12. 18

(30) 优先权数据

61/015, 142 2007. 12. 19 US

(62) 分案原申请数据

200880127122. X 2008. 12. 18

(71) 申请人 神谷来克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 理查德 . A. 利文斯顿

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 刘蕾

(51) Int. Cl.

G01N 15/14 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

---

权利要求书3页 说明书59页 附图5页

(54) 发明名称

单分子检测用扫描分析器和使用方法

(57) 摘要

本发明涉及用于检测单分子或分子复合物的分析器，所述分析器使用迁移穿过样品的电磁辐射以检测分子的存在或不存在而不会在样品之间夹带。

1. 一种单分子分析器,所述分析器包含:
  - (a) 用于为包含样品的样品容器提供电磁辐射的电磁辐射源;
  - (b) 用于将来自所述电磁辐射源的电磁辐射导向样品中的询问空间的系统;
  - (c) 用于使所述询问空间迁移通过样品的至少一部分由此形成可移动的询问空间的迁移系统;和
  - (d) 用于检测所述询问空间中的单分子在该分子存在时所发射的电磁辐射的检测器,其中所述检测器与所述询问空间可操作地相连。
2. 如权利要求 1 所述的单分子分析器,其中所述迁移系统能在线性路径和非线性路径中的一个或多个中迁移所述询问空间。
3. 如权利要求 2 所述的单分子分析器,其中所述非线性路径包含基本环形路径。
4. 如权利要求 2 所述的单分子分析器,其中所述非线性路径包含螺旋形路径。
5. 如权利要求 2 所述的单分子分析器,其中所述非线性路径包含栅格模式。
6. 如权利要求 1 所述的单分子分析器,所述分析器还包含具有表面的容器,所述表面用于将至少一个样品收纳并限制在该表面上。
7. 如权利要求 1 所述的单分子分析器,其中所述样品容器是板。
8. 如权利要求 7 所述的板,其中所述板是微滴定板。
9. 如权利要求 1 所述的单分子分析器,其中所述询问空间的体积为约  $15 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $11000 \mu\text{m}^3$ 。
10. 如权利要求 1 所述的单分子分析器,其中所述询问空间的体积为约  $200 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $3000 \mu\text{m}^3$ 。
11. 如权利要求 1 所述的单分子分析器,其中所述询问空间的体积为约  $500 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $600 \mu\text{m}^3$ 。
12. 如权利要求 6 所述的单分子分析器,其中所述分子附在所述容器的表面上。
13. 如权利要求 12 所述的单分子分析器,其中所述分子通过非共价键附在所述容器的表面上。
14. 如权利要求 13 所述的单分子分析器,其中所述非共价键形成于所述分子与一个或多个抗体之间,所述一个或多个抗体与所述容器的表面共价或非共价地结合。
15. 如权利要求 1 所述的单分子分析器,所述单分子分析器还包含显微镜物镜,其中所述显微镜物镜的视场深度和成像于所述显微镜物镜的光圈直径共同限定了所述询问空间。
16. 如权利要求 1 所述的单分子分析器,所述单分子分析器还包含显微镜物镜,其中所述显微镜物镜的视场深度和电磁辐射束的侧向幅度共同限定了所述询问空间。
17. 如权利要求 1 所述的单分子分析器,其中所述迁移系统被构造和设置为使所述询问空间迁移通过样品的所述部分一次以上。
18. 如权利要求 17 所述的单分子分析器,其中所述迁移系统被构建和设置为在第一次和第二次时以足够慢的速度迁移通过样品的同一部分,从而使得在所述询问空间第一次迁移通过所述样品部分时检测到的受关注分子在存在时能在所述样品部分第一次被询问空间询问以后基本扩散离开所述样品部分,并且还使得后续的受关注分子在存在时能在所述样品部分第二次被询问空间询问时基本扩散进入所述样品部分内。
19. 如权利要求 18 所述的单分子分析器,其中所述迁移系统被构建和设置为以基本环

形模式迁移所述询问空间,其中所述系统能够以约 100RPM ~ 约 1000RPM 的速度迁移所述询问空间。

20. 如权利要求 17 所述的单分子分析器,其中所述迁移系统被构建和设置为以下述方式迁移所述询问空间:使得检测点在经过足够的时间后返回所述样品部分,由此使在第一次通过时被检测到的分子能扩散离开所述部分而其它分子能扩散进入所述部分。

21. 如权利要求 1 所述的单分子分析器,其中所述分析器适于和构造为依次检测在第一样品中特定类型的单分子存在或不存在和检测在第二样品中所述类型的单分子存在或不存在,其中在第一样品和第二样品之间没有夹带。

22. 一种微滴定板,所述微滴定板包含:

(a) 底部,所述底部包含对于波长为 550nm ~ 800nm 的光基本透明的材料,并包含具有下述厚度的一个或多个部分:该厚度使得能通过位于所述部分的第二侧的大数值孔径透镜而在所述部分的第一侧上形成图像,且其中没有任何图像部分形成于底部内;和

(b) 表面,所述表面适于和构造为用于将至少一种液体样品收纳和限制在所述表面上。

23. 如权利要求 22 所述的微滴定板,其中所述底部对于波长为 600nm ~ 750nm 的光是透明的。

24. 如权利要求 22 所述的微滴定板,其中所述底部对于波长为 630nm ~ 740nm 的光是透明的。

25. 如权利要求 22 所述的微滴定板,其中所述底部对于波长为 630nm ~ 640nm 的光是透明的。

26. 如权利要求 22 所述的微滴定板,其中所述表面包含微孔。

27. 如权利要求 22 所述的微滴定板,其中所述板包含下述材料:所述材料发射的荧光少于聚苯乙烯。

28. 一种检测样品中单分子存在或不存在的方法,所述方法包括:

(a) 将来自电磁辐射源的电磁辐射导向样品中的询问空间;

(b) 在位于样品的第一位置处的询问空间中检测第一单分子存在或不存在;

(c) 使询问空间迁移通过样品至该样品中的后续位置;

(d) 在样品的后续位置中检测后续单分子存在或不存在;和

(e) 根据需要重复步骤 (c) 和 (d),以便在一个以上样品位置中检测单分子存在或不存在。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其中所述询问空间的体积为约 15 μ m<sup>3</sup> ~ 约 11000 μ m<sup>3</sup>。

30. 如权利要求 28 所述的方法,其中所述询问空间的体积为约 200 μ m<sup>3</sup> ~ 约 3000 μ m<sup>3</sup>。

31. 如权利要求 28 所述的方法,其中所述询问空间的体积为约 500 μ m<sup>3</sup> ~ 约 600 μ m<sup>3</sup>。

32. 如权利要求 28 所述的方法,其中所述询问空间在非线性路径中迁移。

33. 如权利要求 32 所述的单分子分析器,其中所述非线性路径包含基本环形路径。

34. 如权利要求 32 所述的单分子分析器,其中所述非线性路径包含螺旋形路径。

35. 如权利要求 28 所述的方法,其中,相对于被导向至位于样品内的询问空间处的电磁辐射,所述样品保持基本静止。

36. 如权利要求 28 所述的方法,其中所述询问空间迁移通过样品的第一部分一次以上。

37. 如权利要求 36 所述的方法,其中所述询问空间再一次以足够慢的速度迁移通过所述样品的第一位置,从而使得在所述询问空间第一次迁移通过所述样品位置时检测到的受关注分子在存在时能在所述样品位置第一次被询问空间询问以后基本扩散离开所述样品位置,并且还使得后续的受关注分子在存在时能在所述样品位置第二次被询问空间询问时基本扩散进入所述样品位置内。

38. 如权利要求 36 所述的方法,其中所述询问空间以下述方式被迁移:使得检测点在经过足够的时间后返回所述第一样品位置,由此使在第一次通过时被检测到的分子能扩散离开所述位置而其它分子能扩散进入所述位置。

39. 如权利要求 28 所述的方法,所述方法还包括依次检测在样品中特定类型的单分子存在或不存在,然后检测在第二样品中同一类型的单分子存在或不存在,其中在第一样品和第二样品之间没有夹带。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其中所述第一样品和第二样品被被收纳和限制在非一次性设备中。

## 单分子检测用扫描分析器和使用方法

[0001] 本申请是申请日为 2008 年 12 月 18 日、申请号为 200880127122.X、发明名称为“单分子检测用扫描分析器和使用方法”的专利申请的分案申请。

### 背景技术

[0002] 生物医学研究、医学诊断、预后、监测和治疗选择、生物恐怖检测和其它涉及分析物的多个低体积、低浓度样品的分析的领域中的进展已经导致了能在不断降低的浓度下灵敏地检测样品中的颗粒的样品分析系统的发展。美国专利第 4,793,705 和 5,209,834 号描述了此前的实现极为灵敏的检测的系统。本发明提供了在该领域中进一步的发展。

### 发明内容

[0003] 本文提供了一种单分子分析器，所述单分子分析器包含：(a) 用于为包含样品的样品容器提供电磁辐射的电磁辐射源；(b) 用于将来自所述电磁辐射源的电磁辐射导向样品中的询问空间 (interrogation space) 的系统；(c) 用于使询问空间迁移通过样品的至少一部分由此形成可移动询问空间的迁移系统；和 (d) 用于检测询问空间中的单分子在该分子存在时所发射的电磁辐射的检测器，其中检测器与询问空间可操作地相连。在某些实施方式中，单分子分析器具有如下迁移系统：其中所述迁移系统能在一个或多个线性路径和非线性路径中迁移所述询问空间。在某些实施方式中，所述非线性路径基本为环形路径。在某些实施方式中，所述非线性路径基本为螺旋形模式。在某些实施方式中，所述非线性路径基本为栅格模式 (raster pattern)。在某些实施方式中，本文所述的单分子分析器还包含具有表面的容器，所述表面适于和构造为将至少一个样品收纳和限制在该表面上。在某些实施方式中，所述样品容器是板。在某些实施方式中，所述板是微滴定板。

[0004] 在所述单分子分析器的某些实施方式中，所述询问空间的有效体积为大于约  $1 \mu m^3$ 、大于约  $2 \mu m^3$ 、大于约  $3 \mu m^3$ 、大于约  $4 \mu m^3$ 、大于约  $5 \mu m^3$ 、大于约  $10 \mu m^3$ 、大于约  $15 \mu m^3$ 、大于约  $30 \mu m^3$ 、大于约  $50 \mu m^3$ 、大于约  $75 \mu m^3$ 、大于约  $100 \mu m^3$ 、大于约  $150 \mu m^3$ 、大于约  $200 \mu m^3$ 、大于约  $250 \mu m^3$ 、大于约  $300 \mu m^3$ 、大于约  $400 \mu m^3$ 、大于约  $450 \mu m^3$ 、大于约  $500 \mu m^3$ 、大于约  $550 \mu m^3$ 、大于约  $600 \mu m^3$ 、大于约  $750 \mu m^3$ 、大于约  $1000 \mu m^3$ 、大于约  $2000 \mu m^3$ 、大于约  $4000 \mu m^3$ 、大于约  $6000 \mu m^3$ 、大于约  $8000 \mu m^3$ 、大于约  $10000 \mu m^3$ 、大于约  $12000 \mu m^3$ 、大于约  $13000 \mu m^3$ 、大于约  $14000 \mu m^3$ 、大于约  $15000 \mu m^3$ 、大于约  $20000 \mu m^3$ 、大于约  $30000 \mu m^3$ 、大于约  $40000 \mu m^3$  或大于约  $50000 \mu m^3$ 。在某些实施方式中，所述询问空间的体积为小于约  $50000 \mu m^3$ 、小于约  $40000 \mu m^3$ 、小于约  $30000 \mu m^3$ 、小于约  $20000 \mu m^3$ 、小于约  $15000 \mu m^3$ 、小于约  $14000 \mu m^3$ 、小于约  $13000 \mu m^3$ 、小于约  $12000 \mu m^3$ 、小于约  $11000 \mu m^3$ 、小于约  $9500 \mu m^3$ 、小于约  $8000 \mu m^3$ 、小于约  $6500 \mu m^3$ 、小于约  $6000 \mu m^3$ 、小于约  $5000 \mu m^3$ 、小于约  $4000 \mu m^3$ 、小于约  $3000 \mu m^3$ 、小于约  $2500 \mu m^3$ 、小于约  $2000 \mu m^3$ 、小于约  $1500 \mu m^3$ 、小于约  $1000 \mu m^3$ 、小于约  $800 \mu m^3$ 、小于约  $600 \mu m^3$ 、小于约  $400 \mu m^3$ 、小于约  $200 \mu m^3$ 、小于约  $100 \mu m^3$ 、小于约  $75 \mu m^3$ 、小于约  $50 \mu m^3$ 、小于约  $25 \mu m^3$ 、小于约  $20 \mu m^3$ 、小于约  $15 \mu m^3$ 、小于约  $14 \mu m^3$ 、小于约  $13 \mu m^3$ 、小于约  $12 \mu m^3$ 、小于约  $11 \mu m^3$ 、小于约  $10 \mu m^3$ 、小于约  $5 \mu m^3$ 、小于

约  $4 \mu\text{m}^3$ 、小于约  $3 \mu\text{m}^3$ 、小于约  $2 \mu\text{m}^3$  或小于约  $1 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，所述询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $1000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，所述询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $100 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，所述询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $50 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，所述询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，所述询问空间的体积为约  $3 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $7 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，所述询问空间的体积为约  $15 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $11000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，所述询问空间的体积为约  $200 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $3000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，所述询问空间的体积为约  $500 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $600 \mu\text{m}^3$ 。

[0005] 在所述单分子分析器的某些实施方式中，所述单分子附在容器表面上。在某些实施方式中，所述分子通过非共价键附在所述容器的表面上。在另一个实施方式中，所述非共价键形成于所述分子和与所述容器的表面共价地或非共价地结合的抗体之间。在另一个实施方式中，所述非共价键形成于所述分子和位于容器表面的抗体之间。在某些实施方式中，所述单分子分析器还包含显微镜物镜 (microscope objective)，其中所述显微镜物镜的视场深度 (depth of field) 和激光束的侧向幅度共同限定了所述询问空间。在某些实施方式中，视场深度和成像于所述显微镜物镜的光圈 (aperture) 的直径共同限定了所述询问空间。在某些实施方式中，所述显微镜物镜适于和构造为收集从位于询问空间内的单分子发射的电磁辐射。在某些实施方式中，询问空间能被迁移通过样品的一部分。在某些实施方式中，迁移系统被构造和设置为使询问空间迁移通过样品的所述部分一次以上。在某些实施方式中，迁移系统被构建和设置为在第一次和第二次时以足够慢的速度迁移通过样品的同一部分，从而使得在询问空间第一次迁移通过所述样品部分时检测到的受关注分子能在所述样品部分第一次被询问空间询问以后基本扩散离开所述样品部分，并且还使得后续的受关注分子当存在时能在所述样品部分第二次被询问空间询问时基本扩散进入所述样品部分内。在某些实施方式中，迁移系统被构建和设置为以如下方式迁移询问空间：使得检测点在经过足够的时间后返回所述样品部分，从而在第一次通过时被检测到的分子能扩散离开所述部分而其它分子能扩散进入所述部分。在某些实施方式中，所述单分子分析器还包含能以基本环形模式迁移询问空间的系统。在该实施方式中，所述系统能以约  $100\text{RPM}$  ~ 约  $1000\text{RPM}$  的速度迁移询问空间。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度大于  $100\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度大于  $300\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度大于  $500\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度大于  $700\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度大于  $900\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度小于  $1000\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度小于  $800\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度小于  $600\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度小于  $400\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度小于  $200\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约  $100\text{RPM}$  ~ 约  $1000\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约  $200\text{RPM}$  ~ 约  $900\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约  $300\text{RPM}$  ~ 约  $800\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约  $400\text{RPM}$  ~ 约  $700\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约  $450\text{RPM}$  ~ 约  $600\text{RPM}$ 。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约  $450\text{RPM}$  ~ 约  $550\text{RPM}$ 。

[0006] 在某些实施方式中，所述单分子分析器适于和构造为依次检测在第一样品中特定类型的单分子存在或不存在和检测在第二样品中所述类型的单分子存在或不存在，其中在第一样品和第二样品之间没有夹带。

[0007] 本文还提供了一种微滴定板，所述微滴定板包含：(a) 底部，所述底部包含对于波长为 550nm ~ 800nm 的光基本透明的材料并包含具有下述厚度的一个或多个部分：该厚度使得能通过位于所述部分的第二侧的大数值孔径透镜而在所述部分的第一侧上形成图像，且其中没有任何图像部分形成于底部内；和 (b) 表面，所述表面适于和构造为用于将至少一种液体样品收纳和限制在该表面上。在某些实施方式中，所述底部对于波长为 600nm ~ 750nm 的光基本透明。在某些实施方式中，所述底部对于波长为 630nm ~ 740nm 的光基本透明。在某些实施方式中，所述底部对于波长为 630nm ~ 640nm 的光基本透明。在某些实施方式中，所述板表面包含一系列微孔 (microwell)。在某些实施方式中，所述板包含比聚苯乙烯所发荧光更少的材料。

[0008] 本文还提供了一种仪器，所述仪器能依次检测在第一样品中特定类型的单分子存在或不存在和检测在第二样品中所述类型的单分子存在或不存在，其中所述仪器适于和构造为使得在第一样品和第二样品之间没有夹带。

[0009] 本文还提供了一种方法，所述方法能依次检测在第一样品中特定类型的单分子存在或不存在和检测在第二样品中所述类型的单分子存在或不存在，其中在第一样品和第二样品之间没有夹带。在某些实施方式中，在第一样品和第二样品中检测到受关注的单分子，其中所述第一样品和第二样品被收纳和限制在非一次性设备中。

[0010] 本文提供了一种用于检测样品中单分子存在或不存在的方法，所述方法包括：(a) 将来自电磁辐射源的电磁辐射导向样品中的询问空间；(b) 在位于样品的第一位置处的询问空间中检测第一单分子存在或不存在；(c) 使询问空间迁移通过样品至样品中的后续位置；(d) 在样品的后续位置中检测后续单分子存在或不存在；和 (e) 根据需要重复步骤 (c) 和 (d)，以便在一个以上样品位置中检测单分子存在或不存在。在本发明的某些实施方式中，询问空间的有效体积大于约  $1 \mu m^3$ 、大于约  $2 \mu m^3$ 、大于约  $3 \mu m^3$ 、大于约  $4 \mu m^3$ 、大于约  $5 \mu m^3$ 、大于约  $10 \mu m^3$ 、大于约  $15 \mu m^3$ 、大于约  $30 \mu m^3$ 、大于约  $50 \mu m^3$ 、大于约  $75 \mu m^3$ 、大于约  $100 \mu m^3$ 、大于约  $150 \mu m^3$ 、大于约  $200 \mu m^3$ 、大于约  $250 \mu m^3$ 、大于约  $300 \mu m^3$ 、大于约  $400 \mu m^3$ 、大于约  $450 \mu m^3$ 、大于约  $500 \mu m^3$ 、大于约  $550 \mu m^3$ 、大于约  $600 \mu m^3$ 、大于约  $750 \mu m^3$ 、大于约  $1000 \mu m^3$ 、大于约  $2000 \mu m^3$ 、大于约  $4000 \mu m^3$ 、大于约  $6000 \mu m^3$ 、大于约  $8000 \mu m^3$ 、大于约  $10000 \mu m^3$ 、大于约  $12000 \mu m^3$ 、大于约  $13000 \mu m^3$ 、大于约  $14000 \mu m^3$ 、大于约  $15000 \mu m^3$ 、大于约  $20000 \mu m^3$ 、大于约  $30000 \mu m^3$ 、大于约  $40000 \mu m^3$  或大于约  $50000 \mu m^3$ 。在某些实施方式，询问空间的有效体积小于约  $50000 \mu m^3$ 、小于约  $40000 \mu m^3$ 、小于约  $30000 \mu m^3$ 、小于约  $20000 \mu m^3$ 、小于约  $15000 \mu m^3$ 、小于约  $14000 \mu m^3$ 、小于约  $13000 \mu m^3$ 、小于约  $12000 \mu m^3$ 、小于约  $11000 \mu m^3$ 、小于约  $9500 \mu m^3$ 、小于约  $8000 \mu m^3$ 、小于约  $6500 \mu m^3$ 、小于约  $6000 \mu m^3$ 、小于约  $5000 \mu m^3$ 、小于约  $4000 \mu m^3$ 、小于约  $3000 \mu m^3$ 、小于约  $2500 \mu m^3$ 、小于约  $2000 \mu m^3$ 、小于约  $1500 \mu m^3$ 、小于约  $1000 \mu m^3$ 、小于约  $800 \mu m^3$ 、小于约  $600 \mu m^3$ 、小于约  $400 \mu m^3$ 、小于约  $200 \mu m^3$ 、小于约  $100 \mu m^3$ 、小于约  $75 \mu m^3$ 、小于约  $50 \mu m^3$ 、小于约  $25 \mu m^3$ 、小于约  $20 \mu m^3$ 、小于约  $15 \mu m^3$ 、小于约  $14 \mu m^3$ 、小于约  $13 \mu m^3$ 、小于约  $12 \mu m^3$ 、小于约  $11 \mu m^3$ 、小于约  $10 \mu m^3$ 、小于约  $5 \mu m^3$ 、小于约  $4 \mu m^3$ 、小于约  $3 \mu m^3$ 、小于约  $2 \mu m^3$  或小于约  $1 \mu m^3$ 。在某些实施方式

中,询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $1000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $100 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $50 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为约  $3 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $7 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为约  $15 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $11000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为约  $200 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $3000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为约  $500 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $600 \mu\text{m}^3$ 。

[0011] 在所述方法的某些实施方式中,所述询问空间在非线性路径中迁移。在另一个实施方式中,所述非线性路径包含基本环形路径。在另一个实施方式中,所述非线性路径包含基本螺旋形路径。在另一个实施方式中,相对于被导向至位于样品内的询问空间的电磁辐射,样品保持基本静止。在某些实施方式中,样品在 x-y 轴中迁移,且电磁辐射源保持基本静态。在某些实施方式中,电磁辐射与样品均相对于彼此而迁移。在某些实施方式中,询问空间迁移通过样品的第一位置一次以上。在某些实施方式中,所述询问空间再一次以足够慢的速度迁移通过样品的第一位置,从而使得在询问空间迁移通过所述样品位置时被检测到的受关注分子当存在时能在所述样品位置被询问空间第一次询问以后基本扩散离开所述样品位置,并且还使得后续关注分子当存在时能在所述样品位置被询问空间第二次询问时基本扩散进入所述样品位置内。在某些实施方式中,以下述方式迁移询问空间:使得检测点在经过足够的时间后返回所述第一样品位置,从而使在第一次通过时被检测到的分子能扩散离开所述位置而其它分子能扩散进入所述位置。在某些实施方式中,所述方法还包括依次检测在样品中特定类型的单分子存在或不存在和检测在第二样品中同一类型的单分子存在或不存在,其中在第一样品和第二样品之间没有夹带。在所述方法的某些实施方式中,所述第一样品和第二样品被收纳和限制在非一次性设备中。

[0012] 通过引用并入

[0013] 本文通过引用并入本说明书中的所有出版物和专利申请,其程度等同于具体并单独指定将每个单独的出版物或专利申请通过参考并入。

## 附图说明

[0014] 本发明的新颖特点在所附权利要求中特别进行陈述。通过参考以下详细说明和附图可获得更好的对本方面的特点和优点的理解,所述详细说明对其中利用了本发明的原理的说明性实施方式进行描述,而在所述附图中:

[0015] 图 1A 说明了从顶部观察所见的扫描单分子分析器;

[0016] 图 1B 说明了从侧面观察所见的扫描单分子分析器;

[0017] 图 2 描绘了显示出作为分子量为 155KDa 的分子的扩散半径的函数的该分子的扩散时间的图。

[0018] 图 3 显示了使用扫描单分子分析器产生的检测事件数据。

[0019] 图 4 显示了使用扫描单分子分析器通过检测一系列已知浓度的样品而产生的标准曲线。

## 具体实施方式

## [0020] I. 引言

[0021] 本发明提供了用于高度灵敏地检测单分子和用于确定样品中所述分子的浓度的仪器、试剂盒、组合物和方法。在某些实施方式中，本发明的仪器、组合物、方法和试剂盒的灵敏度和精度可通过选自但不限于以下因素的因素组合而获得：具有适当波长和输出功率的电磁源、适当的询问空间尺寸、大数值孔径的透镜、能检测单个光子的检测器以及用于对单分子计数的数据分析系统。本发明的仪器被称作“单分子检测器”或“单颗粒检测器”，且被术语“单分子分析器”和“单颗粒分析器”所涵盖。在某些实施方式中，本发明的试剂盒和方法的灵敏度和精度通过使用本发明的仪器连同选自但不限于以下因素的因素组合而获得：展示出使得分子能在单分子水平被检测的特性的分子标记和在本文所述的仪器中测试所述标记的方法。

[0022] 本发明的仪器、试剂盒和方法尤其可用于灵敏和精确地检测单分子或小分子以及用于确定样品中所述分子的浓度。

[0023] 在某些实施方式中，本发明提供了用于通过检测单分子而灵敏检测和确定分子浓度的仪器和试剂盒、用于此类检测和确定的标记和在样品分析中使用此类仪器和标记的方法。特别地，本发明的仪器、试剂盒和方法的灵敏度和精度使得可能处于极低浓度（例如，低于约 100 飞摩尔、10 飞摩尔、1 飞摩尔、0.1 飞摩尔、0.01 飞摩尔或 0.001 飞摩尔）的分子（例如，生物状态标记物）的浓度。在其它实施方式中，本发明的仪器和试剂盒能确定样品中在较大动态浓度范围内的物种的浓度（例如，分子的浓度）而无需对样品进行稀释或其它处理，例如，在大于  $10^5$  倍、 $10^6$  倍或  $10^7$  倍的浓度范围内。

[0024] 本发明的仪器、试剂盒和方法的高灵敏度使得可使用此前因缺乏检测灵敏度而不可用的标记物，例如，生物标记物。本发明的仪器、试剂盒和方法的高灵敏度还有助于建立新型标记物。目前存在大量可获取的可能用于确定生物状态的标记物，但其由于目前受对其较低浓度范围的测定的限制而在目前未被实际使用。在某些情形中，异常高水平的标记物可通过当前方法检测，但正常范围未知。在某些情形中，异常高水平的标记物可通过当前方法检测，但正常范围尚未被确立。在某些情形中，正常范围的较高处的标记物可以被检测，但正常范围的较低处或低于正常范围的水平不能被检测。在某些情形中，例如癌症或感染的标记物，任何水平的标记物都能表明生物状态的存在，且检测灵敏度的提高对于早期诊断是一个优势。在某些情形中，标记物浓度在多个时间点的变化速率或没有变化提供了最有用的信息，但当前分析方法不允许在病况的较早阶段（此时其通常最可治疗）中进行时间点采样。在某些情形中，仅能通过使用在临床设定中不实际或不可用的繁琐方法（例如需要复杂样品处理和较为耗时的分析的方法）来在临床有用的水平对标记物进行检测。另外，存在如下的潜在生物状态标记物：其浓度低至足以使通过当前方法仍极难或无法检测其存在。

[0025] 本发明的分析方法和组合物提供了使得能够检测处于此前无法检测的标记物浓度的生物状态标记物的灵敏度、精度和稳健性（robustness）水平，由此使得能将此类标记物从确认性标记物或仅可用于有限的研究设定中的标记物“重新利用（repurposing）”为可用于临床设定和 / 或大规模临床设定（包括临床试验）中的诊断性、预后性、治疗针对性或其它类型的标记物。这类方法允许确定此类标记物的正常和非正常范围。

[0026] 如此重新利用的标记物可用于例如：检测正常状态（正常范围）、检测（例如对于

治疗、如药物施用的)响应物 / 非响应物 (responder/non-responder);检测早期疾病或病变发生(例如,癌症早期检测、心肌缺血的早期检测);疾病分期(例如,癌症);疾病监测(例如,糖尿病监测、对治疗后癌症复发的监测);疾病机制研究;和治疗毒性(例如,药物治疗的毒性)的研究。

[0027] 由此,本发明提供了用于灵敏检测标记物的方法和组合物,以及确立标记物的正常和非正常水平的值的进一步方法。在其它实施方式中,本发明提供了基于对于标记物所确立的值的诊断、预后和 / 或治疗选择的方法。本发明还提供了用于此类方法中的组合物,例如,用于超灵敏检测标记物的检测试剂。

[0028] II. 扫描分析器系统用仪器和系统

[0029] 本发明的方法采用扫描分析器,例如,单分子检测器。此类单分子检测器包括如下文所述的实施方式。

[0030] A. 设备 / 系统

[0031] 在一方面,本文所述的系统和方法采用能检测样品中的单个分子的扫描分析器系统。在一个实施方式中,所述扫描分析器系统能对位于样品容器内的样品提供来自电磁辐射源的电磁辐射。单分子分析器包含将来自电磁辐射源的电磁辐射导向样品中的询问空间的系统。单分子分析器还包含用于将询问空间迁移通过样品的至少一部分由此形成可移动询问空间的迁移系统。在某些实施方式中,单分子分析器的检测器与单分子分析器的询问空间可操作地相连,由此使该检测器可检测到在单分子存在时从询问空间中的所述分子发出的辐射。

[0032] 在一方面,所述扫描分析器系统包含用于激发以荧光标记进行标记的单分子的电磁辐射源。在一个实施方式中,分析器系统的电磁辐射源是激光。在另一个实施方式中,电磁辐射源是连续波激光。

[0033] 在一个典型实施方式中,当询问空间与标记相遇时,电磁辐射源激发与该标记相连的荧光部分。在某些实施方式中,荧光标记部分包含一个或多个荧光染料分子。在某些实施方式中,荧光标记部分是量子点 (quantum dot)。如本文所述的任何合适的荧光部分均可用作标记。

[0034] 在一个典型实施方式中,扫描分析器系统包含用于将电磁辐射导向样品中的询问空间的系统。在某些实施方式中,样品的浓度使得询问空间不易于包含一个以上受关注的分子;例如,在多数情况下,询问空间含有 0 或 1 个受关注的单分子。然后可使询问空间移动通过样品以便检测位于整个样品中的单分子。在一个典型实施方式中,来自电磁辐射源的电磁辐射将与标记相连的荧光部分激发为电磁辐射,并使该电磁辐射所被导向的询问空间移动通过样品。

[0035] 通常,扫描分析器系统还包含用于将询问空间迁移通过样品的至少一部分并由此形成可移动询问空间的迁移系统。该可移动询问空间可检测位于样品的不同部分中的多个受关注的单分子。

[0036] 询问空间经过标记,随后该标记在受电磁辐射源激发时发射可检测量的能量。在一个典型实施方式中,单分子分析器含有与询问空间可操作地相连的检测器,该检测器用以检测由询问空间中的单分子发出的电磁辐射。电磁辐射检测器能够检测由标记(例如,由标记的荧光部分)发出的能量。

[0037] B. 扫描单分子分析器

[0038] 如图 1A 和 1B 所示,这里所述的是扫描分析器系统 100 的一个实施方式。分析器系统 100 包含电磁辐射源 110、第一校准镜 (alignment mirror) 112、第二校准镜 114、二向色镜 160、安装于扫描电机 120 的轴 124 上的旋转扫描镜 122。如图 1B 所示,旋转扫描镜 122 将电磁辐射源反射通过第一扫描透镜 130、通过第二扫描透镜 132 并通过显微镜物镜 140 到达样品板 170。使用管透镜 (tube lens) 180、光圈 182、检测器滤光器 188、检测器透镜 186 和检测器 184 来检测与位于样品板 170 上的单分子相关的荧光。接着,通过与检测器 184 可操作地偶联的处理器 (未示出) 来处理信号。在某些实施方式中,整个扫描分析器系统 100 安装于底板 190 上。

[0039] 在操作中,校准电磁辐射源 110 以使得其输出 126 (例如,光束) 从第一校准镜 112 的前表面 111 反射至第二校准镜 114 再反射至安装于二向色镜托架 162 的二向色镜 160。然后二向色镜 160 将电磁辐射 126 反射至位于扫描电极 120 的轴 124 尖端处的扫描镜 122。然后电磁辐射 126 通过第一扫描透镜 130 和第二扫描透镜 132 到达显微镜物镜 140。物镜 140 将光束 126 聚焦穿过样品板 170 的底部 174,并将光束 126 导向位于光束 126 所进入的样品板 170 的相对侧的询问空间。使电磁辐射束 126 通过第一扫描透镜 130 和第二扫描透镜 132 以确保所有到达物镜 140 的光都有效地耦合。光束 126 使与位于样品板上的受关注单分子相连的标记激发。所述标记发出辐射,该辐射由物镜 140 收集。其后电磁辐射返回通过扫描透镜 130、132,后者确保来自物镜 140 的辐射的耦合效率。所检测的辐射从扫描镜 122 的前表面反射至二向色镜 160。由于所检测的荧光不同于电磁辐射源 110 的颜色,通过二向色镜 160 的荧光因而穿过光透镜 180、光圈 182、检测器滤光器 188 和检测器透镜 186 而到达检测器 184。检测器滤光器 188 使因光散射或环境光产生的异常噪声信号最小化,同时使由与颗粒结合的激发荧光部分所发射的信号最大化。处理器根据本文所述的方法处理来自颗粒的光信号。

[0040] 在一个优选实施方式中,显微镜物镜 140 具有一定的数值孔径 (numerical aperture)。如本文所用的,“大数值孔径透镜”包括具有大于或等于 0.6 的数值孔径的透镜。数值孔径是对由物镜捕获的经高度衍射的成像光线的数目的量度。较高的数值孔径使得不透明度渐增的光线能够进入物镜并由此产生更高分辨率的图像。图像亮度也随数值孔径增大而增加。大数值孔径透镜可商购自许多供应商,并且在所述分析器系统中可使用任何一种具有大于或等于约 0.6 的数值孔径的透镜。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为约 0.6 ~ 约 1.3。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为约 0.6 ~ 约 1.0。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为约 0.7 ~ 约 1.2。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为约 0.7 ~ 约 1.0。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为约 0.7 ~ 约 0.9。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为约 0.8 ~ 约 1.3。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为约 0.8 ~ 约 1.2。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为约 0.8 ~ 约 1.0。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为至少约 0.6。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为至少约 0.7。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为至少约 0.8。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为至少约 0.9。在某些实施方式中,透镜的数值孔径为至少约 1.0。在某些实施方式中,显微镜物镜的孔径约为 1.25。

[0041] 大数值孔径 (NA) 的显微镜物镜是在进行透过样品板 170 的壁或底部的单分子检测时通常必需的,其工作距离较短。工作距离是从透镜前方至处于焦点的物体的距离。在

某些实施方式中，物镜必需处在物体的 350 微米以内。在某些实施方式中，当使用 NA 为 0.8 的显微镜物镜 140 时，可使用 Olympus40X/0.8NA 水浸物镜 (Olympus America, Inc., USA)。该物镜具有 3.3mm 的工作距离。在某些实施方式中，可使用具有 2mm 工作距离的 Olympus60X/0.9NA 水浸物镜。由于后一种透镜是水浸透镜 (water immersion lens)，因而物镜与样品之间的空间 142 必须充满水。这可通过使用水泡器 (water bubbler) (未示出) 或某些其它适合用于将水贮于物镜和样品板的底部之间的水管装置来完成。

[0042] 在所有实施方式中，将电磁辐射源设定为使得激光波长足以激发与颗粒相连的荧光标记。在某些实施方式中，电磁辐射源 110 是发射可见光谱中的光的激光。在某些实施方式中，该激光是波长为 639nm 的连续波激光。在其它实施方式中，该激光是波长为 532nm 的连续波激光。在其它实施方式中，该激光是波长为 422nm 的连续波激光。在其它实施方式中，该激光是波长为 405nm 的连续波激光。在不脱离本发明的范围的情况下，可使用任何具有适于激发本发明的方法和组合物中所用荧光部分的波长的连续波激光。

[0043] 在单分子分析器系统 100 中，随着询问空间从经标记的单分子经过，被导向至该询问空间的电磁辐射源的光束 126 使得该标记进入激发态。当颗粒从其激发态弛豫时，发射出可检测的光猝发 (burst of light)。在询问空间经过颗粒所需的时间长度中，该激发 - 发射循环被每个颗粒反复许多次。这使得分析器系统 100 能在询问空间经过颗粒时对每个颗粒检测到数十至数千个光子。检测器 184 记录由荧光颗粒发射的光子，并具有时滞，该时滞表明询问空间经过经标记的颗粒的时间。光子强度由检测器 184 记录，而采样时间被分为多个时段 (bin)，其中所述时段是具有可自由选择的时间通道宽度的均一的任意时间段。对每个时段中所含的信号数进行评估。当存在颗粒时，可使用数种统计分析方法中的一种或多种。这些方法包括确定分析器系统的基线噪声和确定处于高于基线噪声的统计水平的荧光标记的信号强度以便减轻来自检测器的错误正信号。

#### [0044] 1. 电磁辐射源

[0045] 所述分析器系统的某些实施方式采用化学发光标记。这些实施方式可能不需要颗粒检测用 EM 源。在其他实施方式中，外在标记或颗粒的内在特征是与光相互作用的，例如，荧光标记或光散射标记。在此类实施方式中，使用 EM 辐射源来照射标记和 / 或颗粒。优先用于激发荧光标记的 EM 辐射源。

[0046] 在某些实施方式中，分析器系统由电磁辐射源 110 组成。在不脱离本发明的范围的情况下，可在扫描分析器系统 100 中使用任何数目的辐射源。此前的美国专利申请第 11/048,660 号已经公开了多种电磁辐射源，本文通过参考将其并入。在某些实施方式中，不同的连续波电磁 (EM) 辐射源发射处于相同波长的电磁辐射。在其它实施方式中，不同的源发射不同波长的 EM 辐射。

[0047] 在一个实施方式中，EM 源 110 是产生 200nm ~ 1000nm 的波长的连续波激光。连续波激光提供连续照射而不采用中断其照射的辅助的电子或机械装置 (例如，快门)。此类 EM 源的优点是小型、耐用和相对廉价。另外，它们通常能够产生比其它光源更大的荧光信号。适合的连续波 EM 源的具体实例包括但不限于：氩气型、氪气型、氦氖型、氦镉型激光以及可调谐二极管激光 (红光至红外区)，每种都具有倍频的可能性。在使用连续波激光的实施方式中，3mW 的电磁辐射源可以具有足以激发荧光标记的能量。这种能量输出的光束的直径可以为 2 μm ~ 5 μm。当在 3mW 曝光时，经标记的颗粒可以被激光束曝光约 1 毫秒。

在替代性实施方式中，颗粒可以被激光束曝光等于或小于约 500 微秒。在一个替代性实施方式中，曝光时间可小于或等于约 100 微秒。在一个替代性实施方式中，曝光时间可小于或等于约 50 微秒。在一个替代性实施方式中，曝光时间可小于或等于约 10 微秒。

[0048] 发光二极管 (LED) 是另一种低成本、高度耐用的照射源。超亮 LED 和具有高吸收截面和量子产率的染料的进展已使得 LED 可用于单分子检测。此类 LED 光可单独地或与其它光源组合用于颗粒检测，所述其它光源例如汞弧灯、元素弧光灯、卤素灯、电弧放电、等离子放电及其任意组合。

[0049] 在一个实施方式中，EM 源包含脉冲波激光。在此类实施方式中，脉冲尺寸、尺寸、聚焦光斑和激光发射的总能量必须足以激发所述荧光标记。在某些实施方式中，可使用小于 1 纳秒的激光脉冲。在某些脉冲激光应用中可能优选具有这种持续时间的脉冲。在其它实施方式中，可用 1 纳秒的激光脉冲。在其它实施方式中，可用 2 纳秒的激光脉冲。在其它实施方式中，可用 3 纳秒的激光脉冲。在其它实施方式中，可用 4 纳秒的激光脉冲。在其它实施方式中，可用 5 纳秒的激光脉冲。在其它实施方式中，可用 2 纳秒～5 纳秒的脉冲。在其它实施方式中，可使用具有更长的持续时间的脉冲。

[0050] 最佳激光强度取决于单染料的光漂白特性和横穿询问空间所需的时长（包括颗粒速度、如果使用一个以上询问空间时询问空间之间的距离、以及询问空间的尺寸）。为获取最大信号，可在不会使较大百分比的染料发生光漂白的最高强度对样品进行照射。优选强度为使得经过颗粒横穿询问空间的时间后不超过 5% 的染料被漂白。

[0051] 根据染料分子类型和染料分子被刺激的时长来设定激光功率。该功率还取决于询问空间穿过样品的速度。激光功率被定义为光束输送的能量的速率，以焦 / 秒或瓦为单位。为了在颗粒穿过时对询问空间提供恒定量的能量，随着激光的输出功率的增加，激光能照射颗粒的时间变少。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量大于约 0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90 或 100 微焦 (microJoule)。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 0.1 微焦～100 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 1 微焦～100 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 1 微焦～50 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 2 微焦～50 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 3 微焦～60 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 3 微焦～50 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 3 微焦～40 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 3 微焦～30 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 1 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 3 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 5 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 10 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间

由询问空间接收的总能量为约 15 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 20 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 30 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 40 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 50 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 60 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 70 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 80 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 90 微焦。在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询问空间接收的总能量为约 100 微焦。

[0052] 在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 1mW、2mW、3mW、4mW、5mW、6mW、7mW、8mW、9mW、10mW、13mW、15mW、20mW、25mW、30mW、40mW、50mW、60mW、70mW、80mW、90mW、100mW 或大于 100mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 1mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 3mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 5mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 10mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 15mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 20mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 30mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 40mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 50mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 60mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 90mW。

[0053] 激光照射询问空间的时间可以被设定为不少于约 1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900 或 1000 毫秒。激光照射询问空间的时间可以被设定为不大于约 2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、1500 或 2000 毫秒。激光照射询问空间的时间可以被设定为约 1 毫秒～1000 毫秒。激光照射询问空间的时间可以被设定为约 5 毫秒～500 毫秒。激光照射询问空间的时间可以被设定为约 5 毫秒～100 毫秒。激光照射询问空间的时间可以被设定为约 10 毫秒～100 毫秒。激光照射询问空间的时间可以被设定为约 10 毫秒～50 毫秒。激光照射询问空间的时间可以被设定为约 10 毫秒～20 毫秒。激光照射询问空间的时间可以被设定为约 5 毫秒～50 毫秒。激光照射询问空间的时间可以被设定为约 1 毫秒～100 毫秒。在某些实施方式中，激光照射询问空间的时间为约 1 毫秒。在某些实施方式中，激光照射询问空间的时间为约 5 毫秒。在某些实施方式中，激光照射询问空间的时间为约 10 毫秒。在某些实施方式中，激光照射询问空间的时间为约 25 毫秒。在某些实施方式中，激光照射询问空间的时间为约 50 毫秒。在某些实施方式中，激光照射询问空间的时间为约 100 毫秒。在某些实施方式中，激光照射询问空间的时间为约 250 毫秒。在某些实施方式中，激光照射询问空间的时间为约 500 毫秒。在某些实施方式中，激光照射询问空间的时间为约 1000 毫秒。

[0054] 在某些实施方式中，激光用提供 3mW、4mW、5mW 或大于 5mW 的输出功率的激光照射询问空间 1 毫秒、250 毫秒、100 毫秒、50 毫秒、25 毫秒或 10 毫秒。在某些实施方式中，用提

供 3mW 的输出功率的激光照射标记，并照射标记约 1000 毫秒。在其他实施方式中，用提供不超过约 20mW 的输出功率的激光照射标记少于 1000 毫秒。在其它实施方式中，用 20mW 输出功率的激光对标记照射少于或等于约 250 毫秒。在某些实施方式中，用约 5mW 输出功率的激光对标记照射少于或等于约 1000 毫秒。

[0055] 2. 光学扫描系统

[0056] 本文所述的扫描分析器系统不同于此前在其它地方描述的传统单分子分析器。在流式细胞术和其它荧光光谱方法中，样品流经询问空间。相反，本文所提供的分析器中的询问空间相对于样品移动。这可通过将样品容器相对于仪器固定并移动电磁辐射束来完成。替代性地，可将电磁辐射束固定并将样品板相对于该电磁辐射束移动。在某些实施方式中，可使用这两者的组合。在迁移样品板以创建可移动询问空间的实施方式中，限制性因素是可足够光滑地移动板以使位于样品板上的样品不受震动并且使询问空间处于所需位置的能力。

[0057] 在一个实施方式中，电磁辐射源 110 聚焦于分析器系统 100 的样品板 170 上。来自连续波电磁辐射源 110 的光束 126 经光学聚焦穿过样品板的底部而到达位于样品板 170 上的样品内的指定深度平面。可使用反射镜或透镜来完成对样品的光学扫描。在某些实施方式中，反射镜 122 被安装于扫描电机 120 的扫描电机轴 124 的末端上，但相对于轴 124 以较小角度倾斜。在某些实施方式中，随着反射镜 122 的转动，其可反射电磁辐射束 126，由此创建一个小环。通过将反射镜 122 置于物镜 140 与二向色镜 160 之间，物镜焦点处的光斑可在样品周围移动。在某些实施方式中，以环形模式扫描样品。在此类实施方式中，可形成直径为约 500 μm ~ 约 750 μm 的扫描环。在某些实施方式中，可形成直径为约 600 μm ~ 约 650 μm 的扫描环。可形成直径为约 630 μm 的扫描环。在某些实施方式中，当使用直径为 630 μm 的扫描环时，可以以约 8 转 / 秒（或约 500RPM）横穿扫描环，这相当于将样品以约 5 μl / 分钟的速率泵入流动源。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为大于 100RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为大于 300RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为大于 500RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为大于 700RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为大于 900RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为小于 1000RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为小于 800RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为小于 600RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为小于 400RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为小于 200RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约 100RPM ~ 约 1000RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约 200RPM ~ 约 900RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约 300RPM ~ 约 800RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约 400RPM ~ 约 700RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约 450RPM ~ 约 600RPM。在某些实施方式中，询问空间的扫描速度为约 450RPM ~ 约 550RPM。随着改进的电学和光学的发展，除以二维模式扫描以外，可能还需要在 z 轴扫描，以避免重复扫描同一分子。在某些此前提及的实施方式中，光学扫描模式使得在每次扫描样品的一部分时能扫描基本不同的部分。

[0058] 在某些实施方式中，样品由电磁辐射源扫描，其中该电磁辐射询问样品的一部分。受关注的单分子可能存在也可能不存在于询问空间中。在某些实施方式中，将样品的一部分扫描第一次，然后随即扫描第二次。在某些实施方式中，将相同的样品部分扫描多次。在

某些实施方式中，对样品进行扫描以使检测光斑在经过足够时间后第二次返回样品的一部分，由此使在第一次通过时被检测到的分子已飘移或扩散离开样品的该部分，而其它分子已飘移或扩散进入该部分。当样品的同一部分被扫描至少一次或多次时，扫描速度可能慢至足以允许分子扩散进入和离开被询问的空间。在某些实施方式中，使询问空间在第一次和第二次以足够慢的速度迁移通过样品的同一部分，从而使得在询问空间迁移通过所述样品部分时被检测到的受关注分子能在所述样品部分被询问空间第一次询问以后基本扩散离开所述样品部分，并且还使得后续关注分子当存在时能在所述样品部分被询问空间第二次询问时基本扩散进入所述样品部分内。图 2 显示了分子量为 155KDa 的分子的扩散时间相对于相应扩散半径的图。如本文所用，“扩散半径”是指在 X 轴所指明的时间中，从起始点起的分子最有可能扩散的距离的标准偏差。

[0059] 在某些实施方式中，采用替代性扫描模式。在某些实施方式中，扫描模式可能近似于圆弧。在某些实施方式中，扫描模式包含至少一个 90° 的角度。在某些实施方式中，扫描模式包含至少一个小于 90° 的角度。在某些实施方式中，扫描模式包含至少一个大于 90° 的角度。在某些实施方式中，扫描模式基本为正弦曲线。在某些实施方式中，可使用如前所述的一个反射镜来进行光学扫描。在一个替代性实施方式中，可使用至少两个反射镜来进行光学扫描。多个反射镜允许以直线进行扫描以及允许系统来回进行扫描，从而创建蛇形模式。替代性地，多反射镜光学扫描设置允许以栅格模式进行扫描。

[0060] 在一个替代性实施方式中，可使用光楔 (optical wedge) 来进行光学扫描。楔式扫描仪提供环形扫描模式并且因无需扫描透镜而使光路缩短。光楔类似于具有极小角度的棱镜。可将光楔安装于电磁辐射源的轴上。光楔旋转以创建光学扫描模式。在一个替代性实施方式中，可使用电子机械托架来安装扫描镜。在此类实施方式中，所述电子机械托架将具有两个音圈 (voice coil)。一个音圈会使扫描镜在垂直方向位移。另一个音圈会使扫描镜在水平方向位移。使用此实施方式，可以创建任何所需扫描模式。

[0061] 在某些实施方式中，扫描颗粒分析器以二维取向扫描位于模具样品板中的样品，例如，沿着样品的 x-y 平面。在某些实施方式中，可以以三维取向来扫描样品，这由在 x-y 平面和 z 方向的扫描构成。在某些实施方式中，可以同时沿 x-y 和 z 方向对样品进行扫描。例如，可以以螺旋模式扫描样品。在某些实施方式中，可以仅在 z 方向扫描样品。

[0062] 在某些实施方式中，扫描透镜 (130, 如图 1A 和 1B 所示) 能将扫描光路重新导向物镜的光瞳。扫描透镜将扫描镜上的光轴的图像聚焦至物镜的出瞳 (exit pupil)。不论扫描镜与显微镜物镜之间的距离如何，扫描透镜确保扫描光束保持在物镜中心，由此改善图像和扫描光束的光采集效率。

### [0063] 3. 询问空间

[0064] 本文所述的发明涵盖了询问空间的使用，可认为该询问空间是其中可在受关注的单分子存在时对其进行检测的有效样品体积。尽管存在各种计算样品的询问空间的方法，最简单的确定询问空间的有效体积 (V) 的方法是计算检测体积的有效截面。由于通常通过将检测体积迁移穿过静止样品来将检测体积扫过样品，该体积通常是在测量时间段中检测体积的横截面积扫过一定距离的结果。如果样品浓度 (C) 已知，且一定时段期间所检测到的分子数 (N) 已知，则样品体积由所检测的分子数除以样品浓度构成，或  $V = N/C$  (其中，样品浓度的单位为分子 / 单位体积)。

[0065] 例如,在本文所述的系统的某些实施方式中,对所有检测到的光子计数并以 1 毫秒片段(光子计数时段)进行加和。如果受关注的分子存在于该 1 毫秒片段中,则所检测到的光子的计数通常显著高于背景。因此,检测体积已相对于样品移动过的距离是用于计算单个片段中采样的体积(即询问空间)的大致距离。在该实例中,如果对样品分析 60 秒,则可以有效地扫描 60,000 个片段。如果将有效体积除以片段数,则所得体积基本上是单个片段的体积,即询问空间。在数学上,单个片段的体积(即询问空间体积(Vs))等于所检测分子数(N)除以样品浓度,再乘以片段时段数(C•n——其中 n 表示在 N 个分子数被计数期间的片段时段的数目)。仅出于示例性目的,考虑一个 1 飞摩尔浓度的已知标准物运行通过 60,000 个片段,且检测到 20 个标准物分子。于是,询问空间体积 Vs 等于  $N/(C \cdot n)$  或  $20/(602.214 \cdot 6E4)$ ,或  $553.513 \mu m^3$ 。因此,在该实例中,作为对应于一个光子计数时段的一个样品的有效体积的询问空间体积为  $553.513 \mu m^3$ 。

[0066] 另外,从此前所述的询问体积,可用具有与本文所述的发明相似的光学器件的毛细管流动系统来近似得出样品片段的横截面积。横截面积(A)通过以询问体积(Vs)除以检测片段移动的距离(t)来近似得出。检测片段移动的距离(t)由  $i \cdot r \cdot s/x$  给出,其中 t 是流速(r)、样品粘度(i)、片段时段时间(s)和毛细管横截面(x)的函数。仅出于示例性目的,考虑时段时间(s)为 1 毫秒、流速(r)为  $5 \mu L/\text{分钟}$ 、粘度因子(i)为 2,且毛细管横截面积为(x)  $10,000 \mu m^2$ 。于是,检测片段移动的距离(t)由  $i \cdot r \cdot s/x$  或  $(2*5 \mu L/\text{分钟} * 1E-3 \text{ 秒})$  或  $16.7 \mu m$  给出。检测器光斑的有效横截面积(A)还可以以  $Vs/t$  来计算,或者  $(553.513 \mu m^3)/(16.7 \mu m)$  或  $33 \mu m^2$ 。注意,询问体积(Vs)和询问体积的横截面积的值均取决于时段划分时间。

[0067] 询问空间的尺寸的下限受当前可利用的激发能量的波长的限制。询问空间尺寸的上限由所需的信噪比决定——询问空间越大,来自例如拉曼散射的噪声越大。在某些实施方式中,询问空间的体积为大于约  $1 \mu m^3$ 、大于约  $2 \mu m^3$ 、大于约  $3 \mu m^3$ 、大于约  $4 \mu m^3$ 、大于约  $5 \mu m^3$ 、大于约  $10 \mu m^3$ 、大于约  $15 \mu m^3$ 、大于约  $30 \mu m^3$ 、大于约  $50 \mu m^3$ 、大于约  $75 \mu m^3$ 、大于约  $100 \mu m^3$ 、大于约  $150 \mu m^3$ 、大于约  $200 \mu m^3$ 、大于约  $250 \mu m^3$ 、大于约  $300 \mu m^3$ 、大于约  $400 \mu m^3$ 、大于约  $500 \mu m^3$ 、大于约  $550 \mu m^3$ 、大于约  $600 \mu m^3$ 、大于约  $750 \mu m^3$ 、大于约  $1000 \mu m^3$ 、大于约  $2000 \mu m^3$ 、大于约  $4000 \mu m^3$ 、大于约  $6000 \mu m^3$ 、大于约  $8000 \mu m^3$ 、大于约  $10000 \mu m^3$ 、大于约  $12000 \mu m^3$ 、大于约  $13000 \mu m^3$ 、大于约  $14000 \mu m^3$ 、大于约  $15000 \mu m^3$ 、大于约  $20000 \mu m^3$ 、大于约  $30000 \mu m^3$ 、大于约  $40000 \mu m^3$  或大于约  $50000 \mu m^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为小于约  $50000 \mu m^3$ 、小于约  $40000 \mu m^3$ 、小于约  $30000 \mu m^3$ 、小于约  $20000 \mu m^3$ 、小于约  $15000 \mu m^3$ 、小于约  $14000 \mu m^3$ 、小于约  $13000 \mu m^3$ 、小于约  $12000 \mu m^3$ 、小于约  $11000 \mu m^3$ 、小于约  $9500 \mu m^3$ 、小于约  $8000 \mu m^3$ 、小于约  $6500 \mu m^3$ 、小于约  $6000 \mu m^3$ 、小于约  $5000 \mu m^3$ 、小于约  $4000 \mu m^3$ 、小于约  $3000 \mu m^3$ 、小于约  $2500 \mu m^3$ 、小于约  $2000 \mu m^3$ 、小于约  $1500 \mu m^3$ 、小于约  $1000 \mu m^3$ 、小于约  $800 \mu m^3$ 、小于约  $600 \mu m^3$ 、小于约  $400 \mu m^3$ 、小于约  $200 \mu m^3$ 、小于约  $100 \mu m^3$ 、小于约  $75 \mu m^3$ 、小于约  $50 \mu m^3$ 、小于约  $25 \mu m^3$ 、小于约  $20 \mu m^3$ 、小于约  $15 \mu m^3$ 、小于约  $14 \mu m^3$ 、小于约  $13 \mu m^3$ 、小于约  $12 \mu m^3$ 、小于约  $11 \mu m^3$ 、小于约  $10 \mu m^3$ 、小于约  $5 \mu m^3$ 、小于约  $4 \mu m^3$ 、小于约  $3 \mu m^3$ 、小于约  $2 \mu m^3$  或小于约  $1 \mu m^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为约  $1 \mu m^3$  ~ 约  $10000 \mu m^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为约  $1 \mu m^3$  ~ 约  $1000 \mu m^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积为约  $1 \mu m^3$  ~ 约  $100 \mu m^3$ 。

的体积为约  $1 \mu m^3$  ~ 约  $50 \mu m^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $1 \mu m^3$  ~ 约  $10 \mu m^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $2 \mu m^3$  ~ 约  $10 \mu m^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $3 \mu m^3$  ~ 约  $7 \mu m^3$ 。

[0068] 4. 样品板

[0069] 本文所述的发明的某些实施方式使用样品板 170 来收纳针对受关注的分子进行检测的样品。在某些实施方式中，所述样品板是微滴定板。微滴定板由底部 172 和顶表面 174 组成。在某些实施方式中，微滴定板的顶表面 174 由至少一个孔构成，以收纳受关注的样品。在某些实施方式中，微滴定板由多个孔构成，以收纳多个样品。本文所述的系统足够灵敏，因此仅需要较小的样品尺寸。在某些实施方式中，样品尺寸可小于约  $100 \mu l$ 。在某些实施方式中，样品尺寸可小于约  $10 \mu l$ 。在某些实施方式中，样品尺寸可小于约  $1 \mu l$ 。在某些实施方式中，样品尺寸可小于约  $0.1 \mu l$ 。在某些实施方式中，样品尺寸可小于约  $0.001 \mu l$ 。在某些实施方式中，微滴定板可以是用微细加工技术构建的微滴定板。在某些实施方式中，板的顶表面可以是光滑的。可将样品的尺寸设定为使得该样品因该样品自身的表面张力而独立 (self-contained)。在此类实施方式中，样品在板表面上形成微滴。在某些实施方式中，可在其后对样品进行针对受关注分子的扫描。

[0070] 通常，透过样品板材料（例如，透过微孔的壁）对样品进行扫描。在某些实施方式中，透过样品板的底部对样品进行扫描。在某些实施方式中，样品板的底部由对光透明的材料制成。在某些实施方式中，样品板的底部由对电磁辐射透明的材料制成。样品板对于受关注的激发波长是透明的。使用透明材料使得激发光束的波长能通过样品板并激发受关注的分子或与受关注分子偶联的荧光标记。板的透明度还使得检测器能检测来自受激发的受关注分子的发射。在某些实施方式中，底部材料对于波长为  $550nm \sim 800nm$  的光是基本透明的。在某些实施方式中，底部材料对于波长为  $600nm \sim 700nm$  的光是基本透明的。在某些实施方式中，板材料对于波长为  $620nm \sim 680nm$  的光是基本透明的。在某些实施方式中，板材料对于波长为  $630nm \sim 660nm$  的光是基本透明的。在某些实施方式中，板材料对于波长为  $630nm \sim 640nm$  的光是基本透明的。

[0071] 此外，还考虑到样品板的厚度。样品通过穿过板材料的一部分的电磁辐射源进行扫描。板的厚度使得能在通过通过大数值孔径透镜扫描的板部分的第一侧上形成图像，所述大数值孔径透镜位于被扫描的板部分的第二侧上。此类实施方式有助于在样品内而不是在底部内形成图像。所形成的图像对应于系统的询问空间。图像应形成于受关注的单分子的深度。如前所述，板的厚度取决于所用透镜的工作距离和视场深度。商购板的厚度通常为 650 微米。

[0072] 板可由允许激发能量穿透该板的任何合适材料制成。在某些实施方式中，板由聚苯乙烯制成。在某些实施方式中，板由聚碳酸酯制成。在某些实施方式中，板由聚乙烯制成。在某些实施方式中，可使用商购板，例如品牌为 NCNC™ 的板。在优选实施方式中，板由具有低荧光的材料制成，由此减少背景荧光。例如，优选的材料可能比由聚苯乙烯制成的板发出的荧光更少。因板材料造成的背景荧光还可通过使板的厚度最小化而避免。

[0073] 在某些实施方式中，样品由可能含有特定类型的分子的较小体积的流体构成。在此类实施方式中，受关注的单分子在存在时能在流体体积中的任何位置被检测和计数。在某些实施方式中，对样品进行扫描包括对更浓缩的较小样品进行扫描。在此类实施方式中，

光学扫描可在样品板的表面发生,例如,如果最高浓度的分子位于样品板表面时。如果单分子吸附于板表面或者如果其与板表面所附着的抗体或其它结合分子相结合,则可能发生这种情况。当使用抗体来捕获受关注的单分子时,可将抗体涂布于样品板表面,例如微孔的底部。其后受关注的单分子与位于微孔内的抗体结合。在某些实施方式中,执行洗脱步骤以除去结合的关注单分子。然后可在较小的样品体积中检测未结合的分子存在或不存在。在执行洗脱步骤的某些实施方式中,单分子可能与顺磁珠相连,也可能不与之相连。如果不使用珠,则可将洗脱缓冲液添加至样品孔中,且可以检测受关注的单分子存在或不存在。在某些实施方式中,将顺磁珠用作捕获珠以便捕获受关注的单分子。

[0074] 在本文所述的扫描单分子分析器的某些实施方式中,电磁(EM)辐射源被导向样品询问空间而不通过样品板的材料。在导向样品的光束的同一侧上的样品中生成像。在此类实施方式中,可以但并非必须使用水浸透镜,以透过气-液界面而将样品成像。在物镜不与样品接触的零夹带系统中,不会发生样品间的样品夹带。

#### [0075] 5. 检测器

[0076] 在一个实施方式中,对在暴露于电磁辐射之后由荧光标记发出的光进行检测。所发出的光可为例如紫外光、可见光或红外光。参见图1A和1B,检测器184(或其它实施方式)能捕获来自荧光部分的光子猝发(photo burst)的振幅和持续时间,并将光子猝发的振幅和持续时间转化为电信号。可使用如CCD相机、视频输入模块相机和条纹相机(streak camera)等检测装置来产生具有连续信号的图像。其它实施方式使用如辐射热计、光电二极管、光电二极管阵列、雪崩式光电二极管和产生连续信号的光电倍增管等装置。可使用前述检测器的任何组合。

[0077] 可对询问空间与其对应检测器之间的发射电磁辐射的数种明显特性进行检测,这些特性包括:发射波长、发射强度、猝发尺寸、猝发持续时间和荧光偏振。在某些实施方式中,检测器是在反向偏压中使用的光电二极管。这种光电二极管组通常具有极高的电阻。该电阻在适当频率的光照射于P/N结上时减小。因此,受到反向偏压的二极管可通过检测流经其的电流而被用作检测器。基于该效应的电流比基于零偏压的电流对光更为敏感。

[0078] 在所述分析器系统的一个实施方式中,光电二极管可以是雪崩式光电二极管。相比于常规光电二极管,这些光电二极管能在高得多的反向偏压下工作,由此使得每个由光产生的载体被雪崩式击穿(avalanche breakdown)倍增。这一内部结果在光电二极管内增益,由此增加装置的有效响应性和灵敏度。光电二极管的选择由荧光标记的颗粒所发出的能量或发射波长决定。在某些实施方式中,检测器是检测300nm~1700nm的能量的雪崩式光电二极管检测器。在另一个实施方式中,可使用硅雪崩式光电二极管来检测300nm~1100nm的波长。在另一个实施方式中,光电二极管是检测800nm~2600nm的能量的砷化镓镓光电二极管。在另一个实施方式中,可使用铟镓砷光电二极管来检测900nm~1700nm的波长。在某些实施方式中,光电二极管是检测190nm~1100nm的能量的硅光电二极管。在另一个实施方式中,光电二极管是检测800nm~1700nm的能量的锗光电二极管。在其它实施方式中,光电二极管是检测1000nm~3500nm的能量的硫化铅光电二极管。在某些实施方式中,雪崩式光电二极管是设计来检测波长为400nm~1100nm的能量的单光子检测器。单光子检测器可商购(例如,Perkin Elmer, Wellesley, MA)。

[0079] 在某些实施方式中,分析器系统可以包含至少一个检测器。在其它实施方式中,分

析器系统可以包含至少两个检测器，且每个检测器可以被选择和设置来检测处于特定波长范围的光的能量。例如，可使用两个分开的检测器来检测用不同标记进行标记的颗粒，所述不同标记在受 EM 源激发后发出具有不同光谱的能量的光子。在一个实施方式中，分析器系统可以包含能检测 450nm ~ 700nm 的荧光能量（例如，绿色染料（例如，Alexa Fluor546）发出的荧光能量）的第一检测器和能检测 620nm ~ 780nm 的荧光能量（例如，深红色染料（例如，Alexa Fluor647）发出的荧光能量）的第二检测器。其它实施方式使用检测 400nm ~ 600nm 的荧光能量（例如，蓝色染料（例如，Hoechst33342）发出的荧光能量）的检测器，和检测 560nm ~ 700nm 的能量（例如，红色染料（例如，Alexa Fluor546 和 Cy3）发出的能量）的检测器。

[0080] 可使用包含两个或多个检测器的系统来检测个体颗粒，所述颗粒各自由发射不同光谱的光的两个或多个标记所标记。例如，两个不同检测器能检测已用两种染料标记进行标记的抗体。替代性地，可将包含两个检测器的分析器系统用于检测不同类型的颗粒，每种类型的颗粒各自由不同的染料分子或者由两种或多种染料分子的混合物进行标记。例如，可使用两个不同检测器来检测识别两种不同蛋白的两种不同类型的抗体，每种类型的抗体由不同染料标记或者由两种或多种染料标记分子的混合物进行标记。通过改变两种或多种染料标记分子的比例，可用两个检测器对两种或多种不同颗粒类型进行分别检测。可以理解，在不脱离本发明的范围的情况下，可使用三个或多个检测器。

[0081] 本领域技术人员应该理解，无论是否有一个或多个询问空间被限制于流动池内，可在每个询问空间配置一个或多个检测器，并且可将每个检测器设置来检测上文所列出的发射电磁辐射的任何特性。多检测器的使用（例如，用于多个询问空间）已于此前的在先申请中公开，本文通过参考从美国专利申请第 11/048,660 号并入。一旦将颗粒标记来使其可被检测（或者如果颗粒拥有使其可被检测的固有特性），则可在不脱离本发明的范围的情况下使用本领域中已知的任何合适的检测机制，例如，CCD 相机、视频输入模块相机、条纹相机、辐射热计、光电二极管、光电二极管阵列、雪崩式光电二极管和产生连续信号的光电信增管及其组合。可以被检测的电磁辐射的不同特性包括：发射波长、发射强度、猝发尺寸、猝发持续时间、荧光偏振及其任意组合。

### [0082] III. 单分子检测用分子

[0083] 本发明的仪器、试剂盒和方法可用于灵敏地检测和确定许多不同类型的单分子的浓度。特别地，所述仪器、试剂盒和方法可用于灵敏地检测和确定生物状态标记物的浓度。本文所用术语“单分子的检测”既指直接检测，也指间接检测。例如，可用荧光标记对单分子进行标记，且分子 - 标记复合物在本文所述的仪器中进行检测。替代性地，可用荧光标记对单分子进行标记，然后使荧光标记从该单分子脱离，并在本文所述的仪器中检测所述标记。术语单分子检测涵盖了这两种形式的检测。

#### [0084] A. 概述

[0085] 可使用本发明的分析器和相关方法检测的分子的实例包括：例如蛋白、核酸、糖类等生物聚合物和小分子（有机小分子和无机小分子）。具体而言，本文所述的仪器、试剂盒和方法可用于检测生物样品中的蛋白和小分子的单分子，以及确定所述样品中此类分子的浓度。

[0086] 术语“蛋白”、“多肽”、“肽”和“寡肽”在本文中可互换使用，并且包括包含由肽键连

接在一起的两个或多个氨基酸的任何组合物。可以理解，多肽可以含有除通常称为 20 种天然存在氨基酸的 20 种氨基酸之外的其它氨基酸。此外，多肽可以包含一个或多个氨基酸，包括经本领域已知的任何方法修饰（不管是天然地还是非天然地修饰）的末端氨基酸。多肽修饰的实例包括例如糖基化或其它后翻译修饰。可存在于本发明的多肽中的修饰包括但不限于：乙酰化、酰基化、ADP 核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、多核苷酸或多核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键的形成、脱甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸酯的形成、甲酰化、 $\gamma$ -羧基化、糖化 (glycation)、糖基化、GPI 锚定物形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰、氧化、蛋白水解处理、磷酸化、异戊基化、消旋化、硒化、硫化、经转移 RNA 介导的对蛋白的氨基酸添加（例如，精氨酸化）和泛素化。

[0087] 由本仪器、试剂盒和方法检测的分子可以为游离的，或为复合物（例如，抗体 - 抗原复合物，或更一般而言的蛋白 - 蛋白复合物，例如肌钙蛋白复合物或前列腺特异抗原 (PSA) 复合物）的一部分。

[0088] B. 生物状态标记物

[0089] 在某些实施方式中，本发明提供了用于灵敏检测生物标记物的组合物和方法，和此类标记物在诊断、预后和 / 或治疗方法的确定中的使用。

[0090] 本发明的标记物可以为例如与生物体的生物状态（例如，如疾病或非疾病态等状况）相关的任何组合物和 / 或分子或者组合物和 / 或分子的复合物。标记物可以为例如，小分子、多肽、核酸（如 DNA 和 RNA）、脂质（如磷脂）或者胶束、细胞组分（例如，线粒体或叶绿体）等。本发明所考虑的标记物可以是此前所已知的或未知的。例如，在某些实施方式中，本文的方法能鉴定可用作受关注的生物状态或受关注的状况的标记物的新型多肽，而在其他实施方式中，将已知多肽鉴定为受关注的生物状态或状况的标记物。使用本发明的系统可以使得能够观察那些标记物，例如，在确定有机物的生物状态中具有高度应用潜力但仅以低浓度存在的多肽，例如从患病组织“浸出”的那些多肽。其它的具有高度应用潜力的标记物或多肽可以是那些与疾病有关的标记物或多肽，例如，产生于肿瘤 - 宿主环境中的标记物或多肽。在本发明的方法和组合物中可使用可提供有关生物状态的信息的任何合适的标记物。本文所用术语“标记物”涵盖了可在来自生物体的样品中被检测且其检测或定量提供了关于该生物体的生物状态的信息的任何分子。

[0091] 生物状态包括但不限于：表型状态；影响生物体的状况；发育阶段；年龄；健康情况；病理学；疾病检测、过程或分期；感染；毒性；或对于化学因素、环境因素或药物因素的响应（例如，药物响应表型、药物毒性表型或药物有效性表型）。

[0092] 本文所用术语“生物体”是指由至少一个细胞组成的生命体。生物体可以简单如单细胞生物体，或复杂如哺乳动物。本发明的生物体优选为哺乳动物。此类哺乳动物可以为例如人类，或者如灵长类（例如，猴、猩猩等）、驯养动物（例如，狗、猫、马等）、农场动物（例如，山羊、绵羊、猪、牛等）或实验动物（例如，小鼠、大鼠等）等动物。生物体优选为人类。

[0093] 在某些实施方式中，本发明的方法和组合物针对各类标记物，例如，细胞因子、生长因子、肿瘤学标记物、炎症标记物、内分泌标记物、自身免疫标记物、甲状腺标记物、心血管标记物、糖尿病标记物、传染病标记物、神经学标记物、呼吸道标记物、胃肠道标记物、肌

肉骨骼标记物、皮肤病学不良状态和代谢标记物。

[0094] 下表1提供了已由本发明的方法和组合物测定的这些种类的标记物的实例，并且提供了由本发明的方法和组合物检测的所述标记物的浓度，以及由本发明的单分子分析器系统针对特定标记物所计出的颗粒数目。

[0095] 表 1. 标记物类别和所述类别中的示例性标记物

[0096]

细胞因子	摩尔浓度	分子
IL-12p70	$2.02 \times 10^{-14}$	$6.09 \times 10^{+5}$
IL-10	$5.36 \times 10^{-14}$	$1.61 \times 10^{+6}$
IL-1 $\alpha$	$5.56 \times 10^{-14}$	$1.67 \times 10^{+6}$
IL-3	$5.85 \times 10^{-14}$	$1.76 \times 10^{+6}$
IL-12p40	$6.07 \times 10^{-14}$	$1.83 \times 10^{+6}$
IL-1ra	$6.12 \times 10^{-14}$	$1.84 \times 10^{+6}$
IL-12	$8.08 \times 10^{-14}$	$2.44 \times 10^{+6}$
IL-6	$9.53 \times 10^{-14}$	$2.87 \times 10^{+6}$
IL-4	$1.15 \times 10^{-13}$	$3.47 \times 10^{+6}$
IL-18	$1.80 \times 10^{-13}$	$5.43 \times 10^{+6}$
IL-10	$1.88 \times 10^{-13}$	$1.13 \times 10^{+7}$
IL-5	$1.99 \times 10^{-13}$	$5.98 \times 10^{+6}$
Eotaxin	$2.06 \times 10^{-13}$	$1.24 \times 10^{+7}$
IL-16	$3.77 \times 10^{-13}$	$1.14 \times 10^{+7}$
MIG	$3.83 \times 10^{-13}$	$1.15 \times 10^{+7}$
IL-8	$4.56 \times 10^{-13}$	$1.37 \times 10^{+7}$
IL-17	$5.18 \times 10^{-14}$	$1.56 \times 10^{+7}$
IL-7	$5.97 \times 10^{-13}$	$1.80 \times 10^{+7}$
IL-15	$6.13 \times 10^{-13}$	$1.84 \times 10^{+7}$

IL-13	$8.46 \times 10^{-13}$	$2.55 \times 10^{+7}$
IL-2R( 可溶 )	$8.89 \times 10^{-13}$	$2.68 \times 10^{+7}$
IL-2	$8.94 \times 10^{-13}$	$2.69 \times 10^{+7}$
LIF/HILDA	$9.09 \times 10^{-13}$	$5.47 \times 10^{+7}$
IL-1 $\beta$	$1.17 \times 10^{-12}$	$3.51 \times 10^{+7}$
Fas/CD95/Apo-1	$1.53 \times 10^{-12}$	$9.24 \times 10^{+7}$
MCP-1	$2.30 \times 10^{-12}$	$6.92 \times 10^{+7}$
肿瘤学	摩尔浓度	分子
EGF	$4.75 \times 10^{-14}$	$2.86 \times 10^{+6}$
TNF- $\alpha$	$6.64 \times 10^{-14}$	$8.00 \times 10^{+6}$
PSA( 第三代 )	$1.15 \times 10^{-13}$	$6.92 \times 10^{+6}$
VEGF	$2.31 \times 10^{-13}$	$6.97 \times 10^{+6}$
TGF- $\beta$ 1	$2.42 \times 10^{-13}$	$3.65 \times 10^{+7}$
FGFb	$2.81 \times 10^{-13}$	$1.69 \times 10^{+7}$
TRAIL	$5.93 \times 10^{-13}$	$3.57 \times 10^{+7}$

[0097]

TNF-RI (p55)	$2.17 \times 10^{-12}$	$2.62 \times 10^{+8}$
炎症	摩尔浓度	分子
ICAM-1( 可溶 )	$8.67 \times 10^{-15}$	$5.22 \times 10^{+4}$
RANTES	$6.16 \times 10^{-14}$	$3.71 \times 10^{+6}$
MIP-2	$9.92 \times 10^{-14}$	$2.99 \times 10^{+6}$
MIP-1 $\beta$	$1.98 \times 10^{-13}$	$5.97 \times 10^{+6}$
MIP-1 $\alpha$	$2.01 \times 10^{-13}$	$6.05 \times 10^{+6}$
MMP-3	$1.75 \times 10^{-12}$	$5.28 \times 10^{+7}$

内分泌学	摩尔浓度	分子
17 β - 雌二醇 (E2)	$4.69 \times 10^{-14}$	$2.82 \times 10^{+6}$
DHEA	$4.44 \times 10^{-13}$	$2.67 \times 10^{+7}$
ACTH	$1.32 \times 10^{-12}$	$7.96 \times 10^{+7}$
胃泌素	$2.19 \times 10^{-12}$	$1.32 \times 10^{+8}$
生长激素 (hGH)	$2.74 \times 10^{-12}$	$1.65 \times 10^{+8}$
自身免疫	摩尔浓度	分子
GM-CSF	$1.35 \times 10^{-13}$	$8.15 \times 10^{+6}$
C 反应性蛋白 (CRP)	$3.98 \times 10^{-13}$	$2.40 \times 10^{+7}$
G-CSF	$1.76 \times 10^{-12}$	$1.06 \times 10^{+8}$
甲状腺	摩尔浓度	分子
环 AMP	$9.02 \times 10^{-15}$	$5.43 \times 10^{+5}$
降钙素	$3.25 \times 10^{-14}$	$1.95 \times 10^{+6}$
甲状旁腺素	$1.56 \times 10^{-13}$	$9.37 \times 10^{+6}$
心血管	摩尔浓度	分子
B- 促尿钠排泄肽	$2.86 \times 10^{-13}$	$1.72 \times 10^{+7}$
NT-proBNP	$2.86 \times 10^{-12}$	$8.60 \times 10^{+7}$
C 反应性蛋白, HS	$3.98 \times 10^{-13}$	$2.40 \times 10^{+7}$
β - 血小板球蛋白	$5.59 \times 10^{-13}$	$3.36 \times 10^{+7}$
糖尿病	摩尔浓度	分子
C 肽	$2.41 \times 10^{-15}$	$1.45 \times 10^{+5}$
瘦素	$1.89 \times 10^{-13}$	$1.14 \times 10^{+7}$
传染病	摩尔浓度	分子
IFN- γ	$2.08 \times 10^{-13}$	$1.25 \times 10^{+7}$

IFN- $\alpha$	$4.55 \times 10^{-13}$	$2.74 \times 10^{+7}$
代谢	摩尔浓度	分子
生物无损 PTH(1 ~ 84)	$1.59 \times 10^{-12}$	$1.44 \times 10^{+8}$
PTH	$1.05 \times 10^{-13}$	$9.51 \times 10^{+6}$

### [0098] 细胞因子

[0099] 对于研究和诊断而言,细胞因子都可用作多种状况、疾病和病理的标记物,且本发明的组合物和方法包括用于检测和定量细胞因子的标记、使用此类标记来确定正常和异常水平的细胞因子、以及基于此类水平的诊断、预后和 / 或治疗决定的方法。

[0100] 目前存在超过 100 种细胞因子 / 趋化因子,其协同和不协同调节受到临床关注。为了将特定的疾病过程与细胞因子水平的变化相关联,理想的方法需要针对给定的细胞因子或多种细胞因子以高灵敏度对样品进行分析。目前用在标记物分析组中且可用于本发明的方法和组合物的示例性细胞因子包括但不限于:BDNF、CREB pS133、总 CREB(CREB Total)、DR-5、EGF、ENA-78、Eotaxin、脂肪酸结合蛋白、碱性 FGF、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、GCP-2、粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF(GM-CSF)、生长相关癌基因角质形成细胞(GRO-KC)、HGF、ICAM-1、IFN-  $\alpha$ 、IFN-  $\gamma$ 、白细胞介素(IL-10、IL-11、IL-12、IL-12p40、IL-12p40/p70、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1  $\alpha$ 、IL-1  $\beta$ 、IL-1ra、IL-1ra/IL-1F3、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9)、干扰素诱导型蛋白(10IP-10)、JE/MCP-1、角质形成细胞(KC)、KC/GROa、LIF、淋巴细胞趋化因子(lymphotactin)、M-CSF、单核细胞趋化蛋白(MCP-1)、MCP-1(MCAF)、MCP-3、MCP-5、MDC、MIG、巨噬细胞炎性(MIP-1  $\alpha$ )、MIP-1  $\beta$ 、MIP-1  $\gamma$ 、MIP-2、MIP-3  $\beta$ 、OSM、PDGF-BB、激活时受调节的、正常 T 细胞表达和分泌的(RANTES)、Rb(pT821)、Rb(总)、Rb pSpT249/252、Tau(pS214)、Tau(pS396)、Tau(总)、组织因子、肿瘤坏死因子-  $\alpha$ (TNF-  $\alpha$ )、TNF-  $\beta$ 、TNF-RI、TNF-RII、VCAM-I 和 VEGF。在某些实施方式中,细胞因子是 IL-12p70、IL-10、IL-1  $\alpha$ 、IL-3、IL-12p40、IL-1ra、IL-12、IL-6、IL-4、IL-18、IL-10、IL-5、eotaxin、IL-16、MIG、IL-8、IL-17、IL-7、IL-15、IL-13、IL-2R(可溶性)、IL-2、LIF/HILDA、IL-1  $\beta$ 、Fas/CD95/Apo-1 和 MCP-1。

### [0101] 生长因子

[0102] 可用于本发明的方法和组合物中的生长因子包括:EGF 配体,例如,双向调节蛋白、LRIG3、 $\beta$  动物纤维素、神经调节蛋白 1/NRG1、EGF、神经调节蛋白 3/NRG3、Epigen、TGF-  $\alpha$ 、表皮调节素、TMEFF1/Tomoregulin-1、HB-EGF、TMEFF2、LRIG1;EGF R/ErbB 受体家族,例如,EGF R、ErbB3、ErbB2、ErbB4;FGF 家族,例如,FGF 配体(酸性 FGF、FGF-12、碱性 FGF、FGF-13、FGF-3、FGF-16、FGF-4、FGF-17、FGF-5、FGF-19、FGF-6、FGF-20、FGF-8、FGF-21、FGF-9、FGF-22、FGF-10、FGF-23、FGF-11、KGF/FGF-7)、FGF 受体(FGF R1 ~ 4、FGF R3、FGF R1、FGF R4、FGF R2、FGF R5)、FGF 调节剂(FGF-BP);刺猬因子(Hedgehog)家族,沙漠刺猬因子(Desert Hedgehog)、声波刺猬因子(Sonic Hedgehog)、印度刺猬因子(Indian Hedgehog);刺猬因子相关分子和调节剂 BOCA、GLI-3、CD0、GSK-3  $\alpha$  /  $\beta$ 、DISP1、GSK-3  $\alpha$ 、Gas1、GSK-3  $\beta$ 、GLI-1、Hip、GLI-2;IGF 家族,IGF 配体(IGF-I、IGF-II)、IGF-I 受体(CD221)IGF-I R,和

IGF 结合蛋白 (IGFBP) 家族 (ALS、IGFBP-5、CTGF/CCN2、IGFBP-6、Cyr61/CCN1、IGFBP-L1、Endocan、IGFBP-rp1/IGFBP-7、IGFBP-1、IGFBP-rP10、IGFBP-2、NOV/CCN3、IGFBP-3、WISP-1/CCN4、IGFBP-4) ;受体酪氨酸激酶 Ax1、FGF R4、C1q R1/CD93、FGF R5、DDR1、Flt-3、DDR2、HGF R、Dtk、IGF-I R、EGF、R IGF-II R、Eph、INSRR、EphA1、胰岛素 R/CD220、EphA2、M-CSF R、EphA3、Mer、EphA4、MSP R/Ron、EphA5、MuSK、EphA6、PDGF R $\alpha$ 、EphA7、PDGF R $\beta$ 、EphA8、Ret、EphB1、RTK 样孤儿受体 1/ROR1、EphB2、RTK 样孤儿受体 2/ROR2、EphB3、SCF R/c-kit、EphB4、Tie-1、EphB6、Tie-2、ErbB2、TrkA、ErbB3、TrkB、ErbB4、TrkC、FGF、R1-4VEGF R、FGF R1、VEGF R1/Flt-1、FGF R2、VEGF R2/KDR/Flk-1、FGF R3、VEGF R3/FU-4 ;蛋白多糖和调节蛋白多糖,聚集蛋白聚糖 (Aggrecan)、Mimecan、Agrin、NG2/MCSP、双糖链蛋白聚糖 (Biglycan)、骨粘附蛋白聚糖 (Osteoadherin)、核心蛋白聚糖 (Decorin)、Podocan、DSPG3、 $\delta$ -肌聚糖 (Sarcoglycan)、Endocan、粘结蛋白聚糖 (Syndecan)-1/CD138、Endoglycan、粘结蛋白聚糖-2、Endorepellin/ 基底膜蛋白聚糖 (Perlecan)、粘结蛋白聚糖-3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 (Glypican)2、粘结蛋白聚糖-4、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、睾丸蛋白聚糖 (Testican)1/SPOCK1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 5、睾丸蛋白聚糖 2/SPOCK2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 6、睾丸蛋白聚糖 3/SPOCK3、人基膜聚糖 (Lumican)、多功能蛋白聚糖 (Versican)、蛋白聚糖调节剂、芳基硫酸酯酶 A/ARSA、氨基葡萄糖 (N-乙酰基)-6-硫酸酯酶 /GNS、Exostosin 样 2/EXTL2、HS6ST2、Exostosin 样 3/EXTL3、艾杜糖-2-硫酸酯酶 /IDS、GalNAc4S-6ST ;SCF、Flt-3 配体和 M-CSF Flt-3、M-CSF R、Flt-3 配体、SCF、M-CSF、SCF R/c-kit ;TGF- $\beta$  超家族 (与炎症标记物所列相同) ;VEGF/PDGF 家族,神经纤毛蛋白 (Neuropilin)-1、P1GF、神经纤毛蛋白-2、P1GF-2、PDGF、VEGF、PDGF R $\alpha$ 、VEGF-B、PDGF R $\beta$ 、VEGF-C、PDGF-A、VEGF-D、PDGF-AB、VEGF R、PDGF-B、VEGF R1/Flt-1、PDGF-C、VEGF R2/KDR/Flk-1、PDGF-D、VEGF R3/FH-4 ;Wnt 相关分子 Dickkopf 蛋白和 Wnt 抑制剂、Dkk-1、Dkk-4、Dkk-2、Soggy-1、Dkk-3、WIF-1Frizzled 及相关蛋白,Frizzled-1、Frizzled-8、Frizzled-2、Frizzled-9、Frizzled-3、sFRP-1、Frizzled-4、sFRP-2、Frizzled-5、sFRP-3、Frizzled-6、sFRP-4、Frizzled-7、MFRP Wnt 配体, Wnt-1、Wnt-8a、Wnt-2b、Wnt-8b、Wnt-3a、Wnt-9a、Wnt-4、Wnt-9b、Wnt-5a、Wnt-10a、Wnt-5b、Wnt-10b、Wnt-7a、Wnt-11、Wnt-7b ;其它 Wnt 相关分子,如 APC、Kremen-2、Axin-1、LRP-I、 $\beta$ -连环蛋白、LRP-6、蓬乱蛋白-1、Norrin、蓬乱蛋白-3、PKC $\beta$ 1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、Pygopus-1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 5、Pygopus-2、GSK-3 $\alpha$  /  $\beta$ 、R-脊椎蛋白 (Spondin)1、GSK-3 $\alpha$ 、R-脊椎蛋白 2、GSK-3 $\beta$ 、R-脊椎蛋白 3、ICAT、RTK 样孤儿受体 1/ROR1、Kremen-1、RTK 样孤儿受体 2/ROR, 以及其它生长因子, CTGF/CCN2、 $\beta$ -NGF、Cyr61/CCN1、Norrin、DANCE、NOV/CCN3、EG-VEGF/PK1、骨织素 (Osteocrin)、Hepassocin、PD-ECGF、HGF、前颗粒蛋白 (Progranulin)、LECT2、血小板生成素、LEDGF 和 WISP-1/CCN4。

#### [0103] 炎症标记物

[0104] 可用于本发明的方法和组合物中的炎症标记物包括 ICAM-1、RANTES、MIP-2、MIP-1- $\beta$ 、MIP-1- $\alpha$  和 MMP-3。其它炎症标记物包括 :粘附分子,例如,整合蛋白 (integral)  $\alpha$  1 $\beta$  1、 $\alpha$  2 $\beta$  1、 $\alpha$  3 $\beta$  1、 $\alpha$  4 $\beta$  1、 $\alpha$  5 $\beta$  1、 $\alpha$  6 $\beta$  1、 $\alpha$  7 $\beta$  1、 $\alpha$  8 $\beta$  1、 $\alpha$  9 $\beta$  1、 $\alpha$  V $\beta$  1、 $\alpha$  4 $\beta$  7、 $\alpha$  6 $\beta$  4、 $\alpha$  D $\beta$  2、 $\alpha$  1 $\beta$  2、 $\alpha$  M $\beta$  2、 $\alpha$  V $\beta$  3、 $\alpha$  V $\beta$  5、 $\alpha$  V $\beta$  6、 $\alpha$  V $\beta$  8、 $\alpha$  X $\beta$  2、 $\alpha$  IIb $\beta$  3、 $\alpha$  IELb $\beta$  7、 $\beta$ -2 整合素、 $\beta$ -3 整合素、 $\beta$ -2 整合素、 $\beta$ -4 整合素、 $\beta$ -5 整合素、 $\beta$ -6 整合素、 $\beta$ -7 整合素、 $\beta$ -8 整合素、 $\alpha$ -1 整合素、 $\alpha$ -2 整合素、 $\alpha$ -3 整合素、 $\alpha$ -4 整合素、

$\alpha$ -5 整合素、 $\alpha$ -6 整合素、 $\alpha$ -7 整合素、 $\alpha$ -8 整合素、 $\alpha$ -9 整合素、 $\alpha$ -D 整合素、 $\alpha$ -L 整合素、 $\alpha$ -M 整合素、 $\alpha$ -V 整合素、 $\alpha$ -X 整合素、 $\alpha$ -IIb 整合素、 $\alpha$ -IELb 整合素；整合素相关分子，例如， $\beta$ -IG-H3、Melusin、CD47、MEPE、CD151、骨桥蛋白、IBSP/骨唾液酸糖蛋白 II、RAGE、IGSF8；选择蛋白，例如，E-选择蛋白、P-选择蛋白、L-选择蛋白；和配体，例如，CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、PSGL-1、玻连蛋白(vitronectin)、玻连蛋白受体、纤连蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白、层粘连蛋白、ICAM-1、ICAM-3、BL-CAM、LFA-2、VCAM-1、NCAM 和 PECAM。其它炎症标记物包括细胞因子，例如，IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\epsilon$ 、- $\kappa$ 、- $\tau$  及 - $\zeta$ 、IFN- $\omega$ 、IFN- $\gamma$ 、IL29、IL28A 和 IL28B、IL-1、IL-1 $\alpha$  和  $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30 和 TCCR/WSX-1。其它炎症标记物包括细胞因子受体，例如，普通  $\beta$  链、IL-3R $\alpha$ 、IL-3R $\beta$ 、GM-CSF R、IL-5R $\alpha$ 、普通  $\gamma$  链/IL-2R $\gamma$ 、IL-2R $\alpha$ 、IL-9R、IL-2R $\beta$ 、IL-4R、IL-21R、IL-15R $\alpha$ 、IL-7R $\alpha$ /CD127、IL-1ra/IL-1F3、IL-1R8、IL-1RI、IL-1R9、IL-1RII、IL-18R $\alpha$ /IL-1R5、IL-1R3/IL-1R AcP、IL-18R $\beta$ /IL-1R7、IL-1R4/ST2SIGIRR、IL-1R6/IL-1R rp2、IL-11R $\alpha$ 、IL-31RA、CNTF R $\alpha$ 、瘦素 R、G-CSF R、LIF R $\alpha$ 、IL-6R、OSM R $\beta$ 、IFN- $\alpha$ / $\beta$  R1、IFN- $\alpha$ / $\beta$  R2、IFN- $\gamma$  R1、IFN- $\gamma$  R2、IL-10R $\alpha$ 、IL-10R $\beta$ 、IL-20R $\alpha$ 、IL-20R $\beta$ 、IL-22R、IL-17R、IL-17RD、IL-17RC、IL-17B R、IL-13R $\alpha$  2、IL-23R、IL-12R $\beta$  1、IL-12R $\beta$  2、TCCR/WSX-1 和 IL-13R $\alpha$  1。其它炎症标记物包括趋化因子，例如，CCL-1、CCL-2、CCL-3、CCL-4、CCL-5、CCL-6、CCL-7、CCL-8、CCL-9、CCL-10、CC-11、CCL-12、CCL-13、CCL-14、CCL-15、CCL-16、CCL-17、CCL-18、CCL-19、CCL-20、CCL-21、CCL-22、CCL-23、CCL-24、CCL-25、CCL-26、CCL-27、CCL-28、MCK-2、MIP-2、CINC-1、CINC-2、KC、CINC-3、LIX、GRO、胸腺趋化因子-1、CXCL-1、CXCL-2、CXCL-3、CXCL-4、CXCL-5、CXCL-6、CXCL-7、CXCL-8、CXCL-9、CXCL-10、CXCL-11、CXCL-12、CXCL-13、CXCL-14、CXCL-15、CXCL-16、CXCL-17、XCL1、XCL2 和脂肪细胞因子(Chemerin)。其它炎症标记物包括趋化因子受体，例如，CCR-1、CCR-2、CCR-3、CCR-4、CCR-5、CCR-6、CCR-7、CCR-8、CCR-9、CCR-10、CXCR3、CXCR6、CXCR4、CXCR1、CXCR5、CXCR2、Chem R23。其它炎症标记物包括肿瘤坏死因子(TNF)，例如，TNF $\alpha$ 、4-1BB 配体/TNFSF9、LIGHT/TNFSF14、APRIL/TNFSF13、淋巴毒素、BAFF/TNFSF13B、淋巴毒素 $\beta$ /TNFSF3、CD27 配体/TNFSF7、OX40 配体/TNFSF4、CD30 配体/TNFSF8、TL1A/TNFSF15、CD40 配体/TNFSF5、TNF- $\alpha$ /TNFSF1A、EDA、TNF- $\beta$ /TNFSF1B、EDA-A2、TRAIL/TNFSF10、Fas 配体/TNFSF6、TRANCE/TNFSF11、GITR 配体/TNFSF18 和 TWEAK/TNFSF12。其它炎症标记物包括 TNF 超家族受体，例如，4-1BB/TNFRSF9、NGF R/TNFRSF16、BAFF R/TNFRSF13C、骨保护素/TNFRSF11B、BCMA/TNFRSF17、OX40/TNFRSF4、CD27/TNFRSF7、RANK/TNFRSF11A、CD30/TNFRSF8、RELT/TNFRSF19L、CD40/TNFRSF5、TACI/TNFRSF13B、DcR3/TNFRSF6B、TNF RI/TNFRSF1A、DcTRAIL R1/TNFRSF23、TNF RII/TNFRSF1B、DcTRAIL R2/TNFRSF22、TRAIL R1/TNFRSF10A、DR3/TNFRSF25、TRAIL R2/TNFRSF10B、DR6/TNFRSF21、TRAIL R3/TNFRSF10C、EDAR、TRAIL R4/TNFRSF10D、Fas/TNFRSF6、TROY/TNFRSF19、GITR/TNFRSF18、TWEAK R/TNFRSF12、HVEM/TNFRSF14 和 XEDAR。其它炎症标记物包括 TNF 超家族调节剂，例如，FADD、TRAF-2、RIP1、TRAF-3、TRADD、TRAF-4、TRAF-1 和 TRAF-6。其它炎症标记物包括急性期反应物和急性期蛋白。其它炎症标记物包括 TGF- $\beta$  超家族配体，例如，激活素(激活素 A、激活素 B、激活素 AB、激活素 C)、BMP(骨形态生成蛋白)(BMP-2、BMP-7、BMP-3、BMP-8、

BMP-3b/GDF-10、BMP-9、BMP-4、BMP-10、BMP-5、BMP-15/GDF-9B、BMP-6)、Decapentaplegic、生长 / 分化因子 (GDF) (GDF-1、GDF-8、GDF-3、GDF-9GDF-5、GDF-11、GDF-6、GDF-15、GDF-7)、GDNF 家族配体、Artemin、神经营养因子 (Neurturin)、GDNF、Persephin、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$  3、TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  5、LAP (TGF- $\beta$  1)、潜 TGF- $\beta$  bp1、潜 TGF- $\beta$  1、潜 TGF- $\beta$  bp2、TGF- $\beta$  1.2、潜 TGF- $\beta$  bp4、TGF- $\beta$  2、Lefty、MIS/AMH、Lefty-1、Nodal、Lefty-A、激活素 RIA/ALK-2、GFR  $\alpha$ -1/GDNF R  $\alpha$ -1、激活素 RIB/ALK-4、GFR  $\alpha$ -2/GDNF R  $\alpha$ -2、激活素 RIIA、GFR  $\alpha$ -3/GDNF R  $\alpha$ -3、激活素 RIIB、GFR  $\alpha$ -4/GDNF R  $\alpha$ -4、ALK-1、MIS RII、ALK-7、Ret、BMPR-IA/ALK-3、TGF- $\beta$  RI/ALK-5、BMPR-IB/ALK-6、TGF- $\beta$  RII、BMPR-II、TGF- $\beta$  RIIb、Endoglin/CD105 和 TGF- $\beta$  RIII。其它炎症标记物包括 TGF- $\beta$  超家族调节剂, 例如, Amnionless、NCAM-1/CD56、BAMBI/NMA、Noggin、BMP-1/PCP、NOMO、Caronte、PRDC、Cerberus1、SKI、Chordin、Smad1、Chordin 样 1、Smad2、Chordin 样 2、Smad3、COCO、Smad4、CRIM1、Smad5、Cripto、Smad7、Crossveinless-2、Smad8、Cryptic、SOST、DAN、潜 TGF- $\beta$  bp1、核心蛋白聚糖、潜 TGF- $\beta$  bp2、FLRG、潜 TGF- $\beta$  bp4、卵泡抑素、TMEFF1/Tomoregulin-1、卵泡抑素样 1、TMEFF2、GASP-1/WFIKKNRP、TSG、GASP-2/WFIKKN、TSK、Gremlin 和 Vasorin。其它炎症标记物包括 EGF 配体, 例如, 双向调节蛋白、LRIG3、 $\beta$ -动物纤维素、神经调节蛋白 1/NGF1、EGF、神经调节蛋白 3/NGF3、Epigen、TGF- $\alpha$ 、表皮调节素、TMEFF1/Tomoregulin-1、HB-EGF、TMEFF2 和 LRIG1。其它炎症标记物包括 EGF R/ErbB 受体家族, 例如, EGF R、ErbB3、ErbB2 和 ErbB4。其它炎症标记物包括纤维蛋白原。其它炎症标记物包括 SAA。其它炎症标记物包括神经胶质标记物, 例如,  $\alpha$  1-抗胰蛋白酶、C-反应性蛋白 (CRP)、 $\alpha$  2-巨球蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、Mac-1 和 F4/80。其它炎症标记物包括髓过氧化物酶。其它炎症标记物包括补体标记物, 例如, C3d、C1q、C5、C4d、C4bp 和 C5a-C9。其它炎症标记物包括主要组织相容性复合体 (MHC) 糖蛋白, 例如, HLA-DR 和 HLA-A、D、C。其它炎症标记物包括小神经胶质标记物, 例如, CR3 受体、MHC I、MHC II、CD31、CD11a、CD11b、CD11c、CD68、CD45RO、CD45RD、CD18、CD59、CR4、CD45、CD64 和 CD44。其它炎症标记物包括  $\alpha$  2 巨球蛋白受体、成纤维细胞生长因子、Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RII、CD8、LCA (CD45)、CD18、CD59、Apo J、簇蛋白、2 型纤溶酶原激活剂抑制剂、CD44、巨噬细胞集落刺激因子受体、MRP14、27E10、4-羟基壬烯酸蛋白缀合物、I.  $\kappa$ . B、NF.  $\kappa$ . B、cPLA. sub. 2、COX-2、基质金属蛋白酶、膜脂质过氧化反应和 ATP 酶活性。HSPC228、EMP1、CDC42、TLE3、SPRY2、p40BBP、HSPC060 和 NAB2, 或 HSPA1A、HSPA1B、MAPRE2 和 OAS1 表达的下调、TACE/ADAM17、 $\alpha$ -1-酸性糖蛋白、促血管生成素 1/MIF、促血管生成素 2/CD14、 $\beta$ -防御素 2/MMP-2、ECF-L/CHI3L3、MMP-7、EGF、MMP-9、EMAP-II、MSP、EN-RAGE、一氧化氮、内皮素 1、骨活素 (Osteoactivin)/GPNMB、FPR1、PDGF、FPRL1、穿透素 3/TSG-14、FPRL2、Gas6、PLUNC、GM-CSF、RAGE、S100A10、S100A8、S100A9、HIF-1  $\alpha$ 、P 物质 (Substance P)、TFPI、TGF- $\beta$  1、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4、TLR4、LBP、TREM-1、白细胞三烯 A4、水解酶 TSG-6、脂质运载蛋白 (Lipocalin)-1、uPA、M-CSF 和 VEGF。

[0105] 其它各种标记物

[0106] 可用于本发明的方法和组合物的肿瘤学标记物包括 EGF、TNF- $\alpha$ 、PSA、VEGF、TGF- $\beta$  1、FGFb、TRAIL 和 TNF-RI (p55)。

[0107] 可用于本发明的方法和组合物的内分泌功能标记物包括 17  $\beta$ -雌二醇 (E2)、DHEA、ACTH、胃泌素和生长激素 (hGH)。

[0108] 可用于本发明的方法和组合物的自身免疫标记物包括 GM-CSF、C 反应性蛋白和 G-CSF。

[0109] 可用于本发明的方法和组合物的甲状腺功能标记物包括环 AMP、降钙素和甲状旁腺素。

[0110] 可用于本发明的方法和组合物的心血管标记物包括心肌肌钙蛋白 I、心肌肌钙蛋白 T、B-促尿钠排泄肽、NT-proBNP、C 反应性蛋白 HS 和  $\beta$ -血小板球蛋白。

[0111] 可用于本发明的方法和组合物的糖尿病标记物包括 C 肽和瘦素。

[0112] 可用于本发明的方法和组合物的传染病标记物包括 IFN- $\gamma$  和 IFN- $\alpha$ 。

[0113] 可用于本发明的方法和组合物的代谢标记物包括生物无损 PTH(1 ~ 84) 和 PTH。

[0114] 生物学状态标记物

[0115] 标记物能指示受关注的特定表型状态的存在。表型状态的实例包括由改变的环境、药物治疗、基因操控或突变、损伤、饮食改变、老化或任何其它的单个生物体或者生物体类别或子类的特征产生的表型。

[0116] 在某些实施方式中，受关注的表型状态是经临床诊断的疾病状态。此类疾病状态包括例如癌症、心血管病、炎性疾病、自身免疫疾病、神经性疾病、传染病和妊娠相关病症。替代性地，可使用标记物检测健康状态。

[0117] 本发明的某些方面中包括癌症表型。本文的癌症的实例包括但不限于：乳腺癌、皮肤癌、骨癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、脑癌、喉癌、胆囊癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、神经组织癌、头颈癌、结肠癌、胃癌、支气管癌、肾癌、基底细胞癌、溃疡型和乳突型鳞状细胞癌、转移性皮肤癌、骨肉瘤、尤因氏肉瘤、网状细胞肉瘤、骨髓瘤、巨细胞肿瘤、小细胞肺癌肿瘤、非小细胞肺癌、胆石、胰岛细胞肿瘤、原发性脑肿瘤、急性和慢性淋巴细胞和粒细胞肿瘤、多毛细胞肿瘤、腺瘤、增生、髓样癌、嗜铬细胞瘤、粘膜神经瘤、肠神经节细胞瘤、增生性角膜神经肿瘤、类马氏综合征肿瘤 (marfanoid habitus tumor)、威尔姆氏肿瘤、精原细胞瘤、卵巢肿瘤、平滑肌肿瘤、宫颈非典型增生和原位癌、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、软组织肉瘤、恶性类癌、局部皮肤损伤、蕈样肉芽肿、横纹肌肉瘤、卡波西氏肉瘤、骨源性肉瘤和其他肉瘤、恶性高钙血症、肾细胞瘤、真性红细胞增多症、腺癌、多形胶质母细胞瘤、白血病、淋巴瘤、恶性黑色素瘤、表皮样癌以及其他癌和肉瘤。

[0118] 在本发明的其它应用中可以包括心血管病。心血管病的实例包括但不限于：充血性心力衰竭、高血压、心律失常、动脉粥样硬化、胆固醇、预激综合征 (Wolff-Parkinson-White Syndrome)、长 QT 综合征、心绞痛、心动过速、心动过缓、房颤、心室颤动、心肌缺血、心肌梗死、心包填塞、心肌炎、心包炎、致心律失常性右心室发育不良、肥厚性心肌病、威廉斯综合征、心脏瓣膜疾病、心内膜炎、细菌性疾病、肺动脉闭锁、主动脉瓣狭窄、雷诺氏病、胆固醇栓塞、瓦伦贝格氏综合征、Hippel-Lindau 病和毛细血管扩张症。

[0119] 本发明的其它实施方式中可以包括炎症性疾病和自身免疫疾病。炎症性疾病和自身免疫疾病包括但不限于：类风湿性关节炎、非特异性关节炎、喉炎性疾病、炎症性肠道疾病、牛皮癣、甲状腺功能低下（例如，桥本甲状腺炎）、结肠炎、1 型糖尿病、盆腔炎疾病、中枢神经系统炎症性疾病、颞动脉炎、风湿性多肌痛、僵直性脊椎炎、结节性多动脉炎、瑞特综合征、硬皮病、系统性红斑狼疮和红斑狼疮。

[0120] 本发明的方法和组合物还可以提供有关传染病标记物的实验室信息，所述传染病

标记物包括：腺病毒、百日咳杆菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、霍乱毒素、霍乱毒素 $\beta$ 、空肠弯曲菌、巨细胞病毒、白喉毒素、Epstein-Barr NA、Epstein-Barr EA、Epstein-Barr VCA、幽门螺旋杆菌、乙型肝炎病毒(HBV)核、乙型肝炎病毒(HBV)包膜、乙型肝炎病毒(HBV)表面(Ay)、丙型肝炎病毒(HCV)核、丙型肝炎病毒(HCV)NS3、丙型肝炎病毒(HCV)NS4、丙型肝炎病毒(HCV)NS5、甲型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒(HEV)orf23KD、戊型肝炎病毒(HEV)orf26KD、戊型肝炎病毒(HEV)orf33KD、人类免疫缺陷病毒(HIV)-1p24、人类免疫缺陷病毒(HIV)-1gp41、人类免疫缺陷病毒(HIV)-1gp120、人类乳头瘤病毒(HPV)、单纯疱疹病毒HSV-1/2、单纯疱疹病毒HSV-1gD、单纯疱疹病毒HSV-2gG、人类T细胞白血病病毒(HTLV)-1/2、甲型流感、甲型流感H3N2、乙型流感、杜氏利什曼原虫、莱姆病、流行性腮腺炎、肺炎支原体、结核分枝杆菌、副流感1、副流感2、副流感3、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、风疹、麻疹、链球菌溶血素O、破伤风毒素、梅毒螺旋体15kd、梅毒螺旋体p47、克氏锥虫、弓形虫和水痘带状疱疹的标记物。

[0121] IV. 标记

[0122] 在某些实施方式中，本发明提供了包括用于高度灵敏地检测和定量如标记物等分子的标记的方法和组合物。

[0123] 本领域技术人员可以认识到，可使用许多策略来标记靶标分子，以使得能够在颗粒的混合物中对其进行检测和辨别。可通过任何已知方法来连接标记，包括利用标记与靶标的非特异性或特异性相互作用的方法。标记能在电场中提供可检测的信号或影响颗粒的移动性。可以直接地或通过结合伴侣来完成标记。

[0124] 在某些实施方式中，标记包含受关注分子的结合伴侣，其中该结合伴侣与荧光部分相连。本发明的组合物和方法可使用高荧光部分。下文对适用于本发明的组合物和方法的荧光部分进行更详细的描述。

[0125] 在某些实施方式中，本发明通过了用于检测生物分子的标记，该生物分子包含与荧光部分相连的该生物分子的结合伴侣，其中所述荧光部分在受到在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出至少约200个光子，其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于5微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于3微焦。在某些实施方式中，所述荧光部分包含多个荧光体，例如，约2~4、2~5、2~6、2~7、2~8、2~9、2~10或者约3~5、3~6、3~7、3~8、3~9或3~10个荧光体。在某些实施方式中，所述生物分子是蛋白或小分子。在某些实施方式中，所述生物分子是蛋白。荧光体可以是荧光染料分子。在某些实施方式中，荧光染料分子包含至少一个取代的吲哚鎓环体系，其中吲哚鎓环的3位碳上的取代基含有化学反应性基团或共轭的物质。在某些实施方式中，染料分子是选自Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor647、Alexa Fluor680或Alexa Fluor700的Alexa Fluor分子。在某些实施方式中，染料分子是选自Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor680或Alexa Fluor700的Alexa Fluor分子。在某些实施方式中，染料分子是Alexa Fluor647染料分子。在某些实施方式中，染料分子含有第一类染料分子和第二类染料分子(例如，两种不同的Alexa Fluor染料分子)，例如其中第一类和第二类染料分子具有不同的发射光谱。第一类与第二类染料分子的数目比可以为例如4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3或1:4。结合伴侣可以为例如抗体。

[0126] 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测标记物的标记，其中所述标记包含所述标记物的结合伴侣和荧光部分，其中所述荧光部分在受到在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出至少约 200 个光子，其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。在某些实施方式中，所述荧光部分包含荧光分子。在某些实施方式中，所述荧光部分包含多个荧光分子，例如，约 2 ~ 10、2 ~ 8、2 ~ 6、2 ~ 4、3 ~ 10、3 ~ 8 或 3 ~ 6 个荧光分子。在某些实施方式中，所述标记包含约 2 ~ 4 个荧光分子。在某些实施方式中，荧光染料分子包含至少一个取代的吲哚鎓环体系，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或共轭的物质。在某些实施方式中，荧光分子选自 Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor647、Alexa Fluor680 或 Alexa Fluor700。在某些实施方式中，荧光分子选自 Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor680 或 Alexa Fluor700。在某些实施方式中，荧光分子是 Alexa Fluor647 分子。在某些实施方式中，所述结合伴侣包含抗体。在某些实施方式中，所述抗体是单克隆抗体。在其它实施方式中，所述抗体是多克隆抗体。

[0127] 所述抗体可对于任何合适的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于选自以下的标记物具有特异性：细胞因子、生长因子、肿瘤学标记物、炎症标记物、内分泌标记物、自身免疫标记物、甲状腺标记物、心血管标记物、糖尿病标记物、传染病标记物、神经学标记物、呼吸道标记物、胃肠道标记物、肌肉骨骼标记物、皮肤病学病症和代谢标记物。

[0128] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为细胞因子的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述细胞因子选自 BDNF、CREB pS133、总 CREB (CREB Total)、DR-5、EGF、ENA-78、Eotaxin、脂肪酸结合蛋白、碱性 FGF、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、GCP-2、粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF (GM-CSF)、生长相关癌基因角质形成细胞 (GRO-KC)、HGF、ICAM-1、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、白细胞介素 (IL-10、IL-11、IL-12、IL-12p40、IL-12p40/p70、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1ra、IL-1ra/IL-1F3、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9)、干扰素诱导型蛋白 (10IP-10)、JE/MCP-1、角质形成细胞 (KC)、KC/GROa、LIF、淋巴细胞趋化因子、M-CSF、单核细胞趋化蛋白 (MCP-1)、MCP-1 (MCAF)、MCP-3、MCP-5、MDC、MIG、巨噬细胞炎性 (MIP-1 $\alpha$ )、MIP-1 $\beta$ 、MIP-1 $\gamma$ 、MIP-2、MIP-3 $\beta$ 、OSM、PDGF-BB、激活时受调节的、正常 T 细胞表达和分泌的 (RANTES)、Rb (pT821)、Rb (总)、Rb pSpT249/252、Tau (pS214)、Tau (pS396)、Tau (总)、组织因子、肿瘤坏死因子 -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、TNF- $\beta$ 、TNF-RI、TNF-RII、VCAM-I 和 VEGF。

[0129] 在某些实施方式中，所述细胞因子选自 IL-12p70、IL-10、IL-1 $\alpha$ 、IL-3、IL-12p40、IL-1ra、IL-12、IL-6、IL-4、IL-18、IL-10、IL-5、eotaxin、IL-16、MIG、IL-8、IL-17、IL-7、IL-15、IL-13、IL-2R (可溶性)、IL-2、LIF/HILDA、IL-1 $\beta$ 、Fas/CD95/Apo-1 和 MCP-1。

[0130] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为生长因子 (GF) 的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于作为生长因子 TGF- $\beta$  的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述生长因子是：EGF 配体，例如，双向调节蛋白、LRIG3、 $\beta$  动物纤维素、神经调节蛋白 1/NRG1、EGF、神经调节蛋白 3/NRG3、Epigen、TGF- $\alpha$ 、表皮调节素、TMEFF1/Tomoregulin-1、HB-EGF、TMEFF2、LRIG1；EGF R/ErbB 受体家族，例如，EGF R、ErbB3、ErbB2、ErbB4；FGF 家族，例如，FGF 配体 (酸性 FGF、FGF-12、碱性 FGF、FGF-13、FGF-3、FGF-16、FGF-4、FGF-17、FGF-5、FGF-19、FGF-6、FGF-20、FGF-8、FGF-21、FGF-9、FGF-22、FGF-10、FGF-23、FGF-11、

KGF/FGF-7)、FGF 受体 (FGF R1 ~ 4、FGF R3、FGF R1、FGF R4、FGF R2、FGF R5)、FGF 调节剂 (FGF-BP) ;刺猬因子家族,沙漠刺猬因子、声波刺猬因子、印度刺猬因子;刺猬因子相关分子和调节剂 BOC、GLI-3、CDO、GSK-3 $\alpha$  /  $\beta$  、DISP1、GSK-3 $\alpha$  、Gas1、GSK-3 $\beta$  、GLI-1、Hip、GLI-2 ;IGF 家族, IGF 配体 (IGF-I、IGF-II)、IGF-I 受体 (CD221) IGF-I R, 和 IGF 结合蛋白 (IGFBP) 家族 (ALS、IGFBP-5、CTGF/CCN2、IGFBP-6、Cyr61/CCN1、IGFBP-L1、Endocan、IGFBP-rp1/IGFBP-7、IGFBP-1、IGFBP-rP10、IGFBP-2、NOV/CCN3、IGFBP-3、WISP-1/CCN4、IGFBP-4) ;受体酪氨酸激酶 Ax1、FGF R4、C1q R1/CD93、FGF R5、DDR1、Flt-3、DDR2、HGF R、Dtk、IGF-I R、EGF、R IGF-II R、Eph、INSRR、EphA1、胰岛素 R/CD220、EphA2、M-CSF R、EphA3、Mer、EphA4、MSP R/Ron、EphA5、MuSK、EphA6、PDGF R $\alpha$  、EphA7、PDGF R $\beta$  、EphA8、Ret、EphB1、RTK 样孤儿受体 1/ROR1、EphB2、RTK 样孤儿受体 2/ROR2、EphB3、SCF R/c-kit、EphB4、Tie-1、EphB6、Tie-2、ErbB2、TrkA、ErbB3、TrkB、ErbB4、TrkC、FGF、R1-4VEGF R、FGF R1、VEGF R1/Flt-1、FGF R2、VEGF R2/KDR/Flk-1、FGF R3、VEGF R3/FU-4 ;蛋白多糖和调节蛋白多糖,聚集蛋白聚糖、Mimecan、Agrin、NG2/MCSP、双糖链蛋白聚糖、骨粘附蛋白聚糖、核心蛋白聚糖、Podocan、DSPG3、 $\delta$ -肌聚糖、Endocan、粘结蛋白聚糖-1/CD138、Endoglycan、粘结蛋白聚糖-2/Endorepellin/基底膜蛋白聚糖、粘结蛋白聚糖-3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 2、粘结蛋白聚糖-4、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、睾丸蛋白聚糖 1/SPOCK1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 5、睾丸蛋白聚糖 2/SPOCK2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 6、睾丸蛋白聚糖 3/SPOCK3、人基膜聚糖、多功能蛋白聚糖、蛋白聚糖调节剂、芳基硫酸酯酶 A/ARSA、氨基葡萄糖 (N-乙酰基)-6-硫酸酯酶/GNS、Exostosin 样 2/EXTL2、HS6ST2、Exostosin 样 3/EXTL3、艾杜糖-2-硫酸酯酶/IDS、GalNAc4S-6ST ;SCF、Flt-3 配体和 M-CSF Flt-3、M-CSF R、Flt-3 配体、SCF、M-CSF、SCF R/c-kit ;TGF- $\beta$  超家族 (与炎症标记物所列相同);VEGF/PDGF 家族, 神经纤毛蛋白 1、P1GF、神经纤毛蛋白-2、P1GF-2、PDGF、VEGF、PDGF R $\alpha$  、VEGF-B、PDGF R $\beta$  、VEGF-C、PDGF-A、VEGF-D、PDGF-AB、VEGF R、PDGF-B、VEGF R1/Flt-1、PDGF-C、VEGF R2/KDR/Flk-1、PDGF-D、VEGF R3/FH-4 ;Wnt 相关分子 Dickkopf 蛋白和 Wnt 抑制剂、Dkk-1、Dkk-4、Dkk-2、Soggy-1、Dkk-3、WIF-1Frizzled 及相关蛋白, Frizzled-1、Frizzled-8、Frizzled-2、Frizzled-9、Frizzled-3、sFRP-1、Frizzled-4、sFRP-2、Frizzled-5、sFRP-3、Frizzled-6、sFRP-4、Frizzled-7、MFRP Wnt 配体, Wnt-1、Wnt-8a、Wnt-2b、Wnt-8b、Wnt-3a、Wnt-9a、Wnt-4、Wnt-9b、Wnt-5a、Wnt-10a、Wnt-5b、Wnt-10b、Wnt-7a、Wnt-11、Wnt-7b ;其它 Wnt 相关分子, 如 APC、Kremen-2、Axin-1、LRP-I、 $\beta$ -连环蛋白、LRP-6、蓬乱蛋白-1、Norrin、蓬乱蛋白-3、PKC $\beta$  1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、Pygopus-1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 5、Pygopus-2、GSK-3 $\alpha$  /  $\beta$  、R-脊椎蛋白 1、GSK-3 $\alpha$  、R-脊椎蛋白 2、GSK-3 $\beta$  、R-脊椎蛋白 3、ICAT、RTK 样孤儿受体 1/ROR1、Kremen-1、RTK 样孤儿受体 2/ROR, 以及其它生长因子, CTGF/CCN2、 $\beta$ -NGF、Cyr61/CCN1、Norrin、DANCE、NOV/CCN3、EG-VEGF/PK1、骨织素、Hepassocin、PD-ECGF、HGF、前颗粒蛋白、LECT2、血小板生成素、LEDGF 和 WISP-1/CCN4。

[0131] 在某些实施方式中, 所述抗体对于作为癌症标记物 (肿瘤学标记物) 的标记物具有特异性。在某些实施方式中, 所述标记物对于作为癌症标记物 EGF 的标记物具有特异性。在某些实施方式中, 所述标记物对于作为癌症标记物 TNF- $\alpha$  的标记物具有特异性。在某些实施方式中, 所述标记物对于作为癌症标记物 PSA 的标记物具有特异性。在某些实施方式中, 所述标记物对于作为癌症标记物 VEGF 的标记物具有特异性。在某些实施方式中, 所述

标记物对于作为癌症标记物 TGF- $\beta$  的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述标记物对于作为癌症标记物 FGFb 的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述标记物对于作为癌症标记物 TRAIL 的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述标记物对于作为癌症标记物 TNF-RI (p55) 的标记物具有特异性。

[0132] 在其它实施方式中，所述抗体对于癌症标记物  $\alpha$ -胎蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 ER  $\beta$  /NR3A2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 ErbB2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物激肽释放酶 3/PSA 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 ER  $\alpha$  /NR3A1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物孕酮 R/NR3C3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 A33 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 MIA 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 Aurora A 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 MMP-2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 Bcl-2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 MMP-3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物钙粘蛋白 -13 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 MMP-9 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 E- 钙粘蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 NEK2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物碳酸酐酶 IX 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物神经巢蛋白 (Nestin) 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物  $\beta$ -连环蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 NG2/MCSP 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物组织蛋白酶 D 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物骨桥蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 CD44 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 p21/CIP1/CDKN1A 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 CEACAM-6 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 p27/Kip1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 Cornulin 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 p53 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 DPP A4 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物催乳素具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 ECM-1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 PSP94 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 EGF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 S100B 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 EGF R 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 S100P 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 EMMPRIN/CD147 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 SCF R/c-kit 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物成纤维细胞活化蛋白  $\alpha$ /FAP 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物丝氨酸蛋白酶抑制蛋白 E1/PAI-1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物酸性 FGF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物血清淀粉样蛋白 A4 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物碱性 FGF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物存活素具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物半乳

糖凝集素 -3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TEM8 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TIMP-1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 HIN-1/Secretoglobin3A1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TIMP-2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 IGF-I 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TIMP-3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 IGFBP-3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TIMP-4 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 IL-6 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TNF- $\alpha$ /TNFSF1A 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物激肽释放酶 6/ 神经脉蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TRAF-4 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 M-CSF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 uPA 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物蛋白裂解酶 (Matriptase)/ST14 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 uPAR 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物间皮素 (Mesothelin) 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 VCAM-1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物甲硫氨酸氨肽酶具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 VEGF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物甲硫氨酸氨肽酶 2 具有特异性。

[0133] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为炎症标记物的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 ICAM-1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 RANTES 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 MIP-2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 MIP-1 $\beta$  具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 MIP-1 $\alpha$  具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 MMP-3 具有特异性。

[0134] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为内分泌功能标记物的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于内分泌功能标记物 17 $\beta$ -雌二醇 (E2) 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于内分泌功能标记物 DHEA 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于内分泌功能标记物 ACTH 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于内分泌功能标记物胃泌素具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于内分泌功能标记物生长激素具有特异性。

[0135] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为自身免疫疾病标记物的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于自身免疫疾病标记物 GM-CSF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于自身免疫疾病标记物 C 反应性蛋白 (CRP) 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于自身免疫疾病标记物 G-CSF 具有特异性。

[0136] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为甲状腺功能标记物的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于甲状腺功能标记物环 AMP 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于甲状腺功能标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于甲状腺功能标记物降钙素具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于甲状腺功能标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于甲状腺功能标记物甲状旁腺素具有特异性。

[0137] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为心血管功能标记物的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物 B- 促尿钠排泄肽具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物 NT-proBNP 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物 C 反应性蛋白 HS 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物  $\beta$ - 血小板球蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物心肌肌钙蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物心肌肌钙蛋白 I 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物心肌肌钙蛋白 T 具有特异性。

[0138] 在某些实施方式中，所述抗体对于糖尿病标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于糖尿病标记物 C 肽具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于糖尿病标记物瘦素具有特异性。

[0139] 在某些实施方式中，所述抗体对于传染病标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于传染病标记物 IFN- $\gamma$  具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于传染病标记物 IFN- $\alpha$  具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于传染病标记物 TREM-1 具有特异性。

[0140] 在某些实施方式中，所述抗体对于代谢标记物生物无损 PTH(1 ~ 84) 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于代谢标记物 PTH 具有特异性。

[0141] 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-1 $\beta$  具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TNF- $\alpha$  具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-6 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TnI (心肌肌钙蛋白 I) 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-8 具有特异性。

[0142] 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 Abeta40 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 Abeta42 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 cAMP 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 FAS 配体具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物碱性 FGF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 GM-CSF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IFN- $\alpha$  具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-1a 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-4 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-5 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-12 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-13 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-17 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 MCP-1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 MIP-1a 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 RANTES 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 VEGF 具有特异性。

[0143] 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 ACE 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物激活素 A 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物脂肪细胞因子具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物抑渴蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 AgRP 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于

标记物 AKT1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物白蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物  $\beta$  动物纤维素具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 韩蛙皮素 (bombesin) 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 CD14 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 CD-26 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 CD-38 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 CD-40L 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 CD-40s 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 CDK5 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 补体 C3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 补体 C4 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 C 肽具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 CRP 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 EGF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 E- 选择蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 FAS 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 FASLG 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 胎球蛋白 A 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 纤维蛋白原具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 胃促生长素 (ghrelin) 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 高血糖素 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 生长激素 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 结合球蛋白 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 肝细胞生长因子 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 HGF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 ICAM1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IFNG 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IGF1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-1RA 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-6sr 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-8 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-10 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 ILGFBP1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 ILGFBP3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 胰岛素样生长因子 1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 LEP 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 M-CSF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 MMP2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 MMP9 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 NGF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 PAI-1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 RAGE 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 RSP4 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 抵抗素 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 性激素结合球蛋白 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 SOCX3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TGF  $\beta$  具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 促凝血酶原激酶 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TNF R1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 VCAM-1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 VWF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TSH 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 EPITOME 具有特异性。

[0144] 在某些实施方式中，所述抗体对于与受关注分子相对应的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物心肌肌钙蛋白 I 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TREM-1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-6 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-8 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物白细胞三烯 T4 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 Akt1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TGF- $\beta$  具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 Fas 配体具有特异性。

[0145] A. 结合伴侣

[0146] 可使用对于待检测的分子（如标记物）的形式具有必需的特异性的任何合适的结合伴侣。如果所述分子（如标记物）具有几种不同形式，则可以存在不同特异性的结合伴侣。合适的结合伴侣是本领域中已知的，并且包括抗体、适体、凝集素和受体。一类可用且多用途的结合伴侣是抗体。

[0147] 1. 抗体

[0148] 在某些实施方式中，结合伴侣是对于待检测分子具有特异性的抗体。本文所用属于“抗体”是宽泛属于，且在普通意义上用于包括但不限于指代天然存在的抗体以及非天然存在的抗体，包括例如单链抗体、嵌合抗体、双功能抗体和人源化抗体及其抗体结合片段。可以理解，对于产生抗体的分子的表位或区域的选择将决定其特异性，例如，对于分子的不同形式（如果存在时）的特异性或对于全部形式（例如，分子的全部或基本全部形式）的特异性。

[0149] 抗体制备方法已得到良好建立。本领域技术人员可以认识到，可以利用许多程序来制备抗体，例如，如 Antibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow 和 David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y. 中所述。本领域技术人员还可以认识到，可通过各种程序从遗传信息制备模拟抗体的结合片段或 Fab 片段 (Antibody Engineering:A Practical Approach (Borrebaeck, C 编 ), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992))。分子（如蛋白）和标记物的单克隆和多克隆抗体也可商购 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota; HyTest, HyTest Ltd., Turku Finland; Abeam Inc., Cambridge, MA, 美国 ;Life Diagnostics, Inc., West Chester, PA, 美国 ;Fitzgerald Industries International, Inc., Concord, MA01742-3049 美国 ;BiosPacific, Emeryville, CA)。

[0150] 在某些实施方式中，抗体是多克隆抗体。在其他实施方式中，抗体是单克隆抗体。

[0151] 捕获结合伴侣和检测结合伴侣对（例如，捕获和检测抗体对）可用于本发明的实施方式中。因此，在某些实施方式中，施用异源性测试方案，其中通常施用两种结合伴侣（例如两种抗体）。一个结合伴侣是通常固定于固体支持体上的捕获伴侣，而另一个结合伴侣是通常带有相连的可检测标记的检测结合伴侣。此类抗体对可获自上述资源，例如， BiosPacific, Emeryville, CA。也可通过本领域内公知的方法来设计和制备抗体对。本发明的组合物包含抗体对，其中该抗体对的一者是如本文所述的标记，而另一者是捕获抗体。

[0152] 在某些实施方式中，有用的是施用与作为捕获抗体和 / 或检测抗体的多种物种交叉反应的抗体。此类实施方式包括通过确定例如作为心脏损害标记物的心肌肌钙蛋白向血液中的释放而测定药物毒性。交叉反应性抗体使得能够研究将作用于一个物种（例如，非

人类物种)的毒性,并且能将结果直接转移至在测试试剂中使用相同抗体或抗体对的对于另一个物种(例如,人类)的研究或临床观察中,由此减小不同测试之间的可变性。因此,在某些实施方式中,用作受关注分子的标记物(例如,心肌肌钙蛋白,如心肌肌钙蛋白I)的结合伴侣的一种或多重抗体可以是交叉反应性抗体。在某些实施方式中,抗体与来自选自人类、猴、狗和小鼠的至少两个物种的标记物(如心肌肌钙蛋白)交叉反应。在某些实施方式中,抗体与来自由人类、猴、狗和小鼠组成的整个组的标记物(如心肌肌钙蛋白)交叉反应。

[0153] B. 荧光部分

[0154] 在本发明所用标记的某些实施方式中,结合伴侣(例如抗体)与荧光部分相连。该荧光部分的荧光可足以使得能够在单分子检测器(如本文所述的单分子检测器)中进行检测。

[0155] 本文所用术语“荧光部分”包括一种或多种荧光体,所述荧光体的总荧光使得能在本文所述的单分子检测器中检测到所述荧光部分。因此,荧光部分可以包含单个荧光体(例如,量子点或荧光分子)或多个荧光体(例如,多个荧光分子)。可以理解,当本文所用术语“部分(moiety)”指代荧光体(例如,多个荧光分子)的基团,每个单独荧光体可以分别与结合伴侣相连,或者荧光体可以连接在一起,条件是荧光体作为一个基团而提供足以被检测的荧光。

[0156] 通常,荧光部分的荧光与以下因素的组合有关:量子效率、足以使所述荧光部分能在单分子检测器中高于背景水平而可被检测的光漂白缺乏、以及测试的所需检出限、准确度和精度所必需的一致性。例如,在某些实施方式中,荧光部分的荧光使得能够在本文所述的仪器中对分子(如标记物)以小于约10pg/ml、5pg/ml、4pg/ml、3pg/ml、2pg/ml、1pg/ml、0.1pg/ml、0.01pg/ml、0.001pg/ml、0.00001pg/ml或0.000001pg/ml的检出限以及小于约20%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%以下(例如约10%以下)的变差系数(coefficient of variation)进行检测和/或定量。在某些实施方式中,荧光部分的荧光使得能够在本文所述的仪器中对分子(如标记物)以小于约5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml或0.001pg/ml的检出限以及小于10%的变差系数进行检测和/或定量。

[0157] 如本文所用的术语“检出限”包括能将样品鉴定为包含受关注物质的分子的最低浓度,例如,第一个非零值。其可由零的可变性和标准曲线的斜率来定义。例如,可通过运行标准曲线、确定标准曲线的零值并对该值添加两个标准偏差来确定测试的检出限。产生信号的关注分子的浓度等于作为“检出低限”浓度的值。

[0158] 此外,荧光部分具有与其在所选测试中的用途相一致的性质。在某些实施方式中,测试为免疫测试,其中荧光部分与抗体相连;该荧光部分不必与企图抗体或蛋白聚集,也不必进行与该测试的所需准确性和精度相一致的任何进一步聚集。在某些实施方式中,优选的荧光部分是具有以下组合的荧光部分(例如,染料分子):1)高吸收系数;2)高量子产率;3)高光稳定性(低光漂白性);和4)与受关注分子(例如,蛋白)的标记的相容性,从而可以施用本发明的分析器和系统对其进行分析(例如,不会造成受关注蛋白的沉淀,或者已与所述荧光部分相连的蛋白的沉淀)。

[0159] 可用于本发明的某些实施方式中的荧光部分(例如,单个荧光染料分子或多个荧

光染料分子)可以根据其在受EM辐射刺激时的光子发射特征来进行限定。例如,在某些实施方式中,本发明利用在受到在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、350、400、500、600、700、800、900或1000个光子的荧光部分(例如,包含单个荧光染料分子或多个荧光染料分子的荧光部分),其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于5微米的光斑上,且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于3微焦。可以理解,通过激光输出功率和染料部分的曝光时长的许多不同组合可以获得所述总能量。例如,可将输出功率1mW的激光使用3ms,3mW的激光使用1ms,6mW的激光使用0.5ms,12mW的激光使用0.25ms等等。

[0160] 在某些实施方式中,荧光部分包含平均至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个荧光体(如荧光分子)。在某些实施方式中,荧光部分包含平均不多于约2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个荧光体(如荧光分子)。在某些实施方式中,荧光部分包含平均约1~11、约2~10、约2~8、约2~6、约2~5、约2~4、约3~10、约3~8、约3~6、约3~5、约4~10、约4~8、约4~6、约2、3、4、5、6个或大于约6个荧光体。在某些实施方式中,荧光部分包含平均约2~8个荧光体。在某些实施方式中,荧光部分包含平均约2~6个荧光体。在某些实施方式中,荧光部分包含平均约2~4个荧光体。在某些实施方式中,荧光部分包含平均约3~10个荧光体。在某些实施方式中,荧光部分包含平均约3~8个荧光体。在某些实施方式中,荧光部分包含平均约3~6个荧光体。“平均”是指在代表一组本发明的标记的给定样品中(其中该样品含有多个结合伴侣-荧光部分单元),特定的荧光体与结合伴侣的摩尔比(由标准分析方法确定)对应于所指定的数目或数目范围。例如,在其中所述标记包含作为抗体的结合伴侣且荧光部分包含多个具有特定吸收的荧光染料分子的实施方式中,可使用分光光度测试,其中将所述标记的溶液稀释至适当水平,取280nm处的吸收来确定蛋白(抗体)摩尔浓度,并取例如650nm(对于Alexa Fluor647而言)的吸收来确定荧光染料分子的摩尔浓度。后者的摩尔浓度与前者之比代表与每个抗体相连的荧光部分中的荧光体(染料分子)的平均数。

### [0161] 1. 染料

[0162] 在某些实施方式中,本发明使用包含荧光染料分子的荧光部分。在某些实施方式中,本发明使用在受到在该分子的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约50个光子的荧光染料分子,其中所述激光聚焦于含有所述分子的直径不小于5微米的光斑上,且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于3微焦。本发明使用在受到在该分子的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约75个光子的荧光染料分子,其中所述激光聚焦于含有所述分子的直径不小于5微米的光斑上,且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于3微焦。本发明使用在受到在该分子的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约100个光子的荧光染料分子,其中所述激光聚焦于含有所述分子的直径不小于5微米的光斑上,且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于3微焦。本发明使用在受到在该分子的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约150个光子的荧光染料分子,其中所述激光聚焦于含有所述分子的直径不小于5微米的光斑上,且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于3微焦。本发明使用在受到在该分子的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约200个光子的荧光染料分子,其中所述激光聚焦于含有所述分子的直径不小于5微米的光斑上,且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于3微焦。

[0163] 在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 50 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 100 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 150 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 200 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 300 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 500 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。

[0164] 下表 2 中给出了可用于本发明的荧光部分中的有用荧光体的非囊括性列表。在某些实施方式中，荧光染料选自 Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor647、Alexa Fluor700、Alexa Fluor750、荧光素、B- 藻红蛋白、别藻蓝蛋白、PBXL-3 和 Qdot605。在某些实施方式中，荧光染料选自 Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor700、Alexa Fluor750、荧光素、B- 藻红蛋白、别藻蓝蛋白、PBXL-3 和 Qdot605。

[0165] 表 2. 荧光体

[0166]	<u>染料</u>	<u>E Ex (nm)</u>	<u>E (M)-1</u>	<u>Em (nm)</u>	<u>MMw</u>
--------	-----------	------------------	----------------	----------------	------------

	Bimane	380	5,700	458	282.31
	Dapoxyl	373	22,000	551	362.83
	二甲基氨基香豆素-4-乙酸	375	22,000	470	344.32
	海蓝(Marina blue)	365	19,000	460	367.26
	8-苯胺基苯-1-磺酸	372		480	
	Cascade 蓝	376	23,000	420	607.42
	Alexa Fluor 405	402	35,000	421	1028.26
	Cascade 蓝	400	29,000	420	607.42
	Cascade 黄	402	24,000	545	563.54
	太平洋蓝	410	46,000	455	339.21
	PyMPO	415	26,000	570	582.41
	Alexa Fluor 430	433	15,000	539	701.75
	Atto-425	438		486	
	NBD	465	22,000	535	391.34
	Alexa Fluor 488	495	73,000	519	643.41
	荧光素	494	79,000	518	376.32
	俄勒冈绿 488	496	76,000	524	509.38
	Atto 495	495		522	
	Cy2	489	150,000	506	713.78
[0167]	DY-480-XL	500	40,000	630	514.60
	DY-490-XL	486	27,000	532	536.58
	DY-500-XL	505	90,000	555	596.68
	DY-520-XL	520	40,000	664	514.60
	Alexa Fluor 532	531	81,000	554	723.77
	BODIPY 530/550	534	77,000	554	513.31
	6-HEX	535	98,000	556	680.07
	6-JOE	522	75,000	550	602.34
	罗丹明 6G	525	108,000	555	555.59
	Atto-520	520		542	
	Cy3B	558	130,000	572	658.00
	Alexa Fluor 610	612	138,000	628	
	Alexa Fluor 633	632	159,000	647	约 1200
	Alexa Fluor 647	650	250,000	668	约 1250
	BODIPY 630/650	325	101,000	640	660.50
	Cy5	649	250,000	670	791.99
	Alexa Fluor 660	663	110,000	690	
	Alexa Fluor 680	679	184,000	702	
	Alexa Fluor 700	702	192,000	723	
	Alexa Fluor 750	749	240,000	782	
	B-藻红蛋白	546, 565	2,410,000	575	240,000
	B-藻红蛋白	480, 546, 565	1,960,000	578	240,000
	别藻蓝蛋白	650	700,000	660	700,000
	PBXL-1	545		666	
	PBXL-3	614		662	

[0168] Atto-tec 染料

[0169]

名称	Ex (nm)	Em (nm)	QY	口 (ns)
Atto-425	436	486	0.9	3.5
Atto-495	495	522	0.45	2.4
Atto-520	520	542	0.9	3.6
Atto-560	561	585	0.92	3.4
Atto-590	598	634	0.8	3.7
Atto-610	605	702	0.7	3.3
Atto-655	665	630	0.3	1.9
Atto-680	680	690	0.3	1.8

[0170] Dyomics Fluor

[0171]

标记	Ex (nm)	摩尔吸收* [l·mol⁻¹·cm⁻¹]	Em (nm)	分子量 [g·mol⁻¹]
DY-495/5	495	70,000	520	489.47
DY-495/6	495	70,000	520	489.47
DY-495X/5	495	70,000	520	525.95
DY-495X/6	495	70,000	520	525.95
DY-505/5	505	85,000	530	485.49
DY-505/6	505	85,000	530	485.49
DY-505X/5	505	85,000	530	523.97
DY-505X/6	505	85,000	530	523.97
DY-550	553	122,000	578	667.76
DY-555	555	100,000	580	636.18
DY-610	609	81,000	629	667.75
DY-615	621	200,000	641	578.73
DY-630	636	200,000	657	634.84
DY-631	637	185,000	658	736.88
DY-633	637	180,000	657	751.92
DY-635	647	175,000	671	658.86
DY-636	645	190,000	671	760.91
DY-650	653	170,000	674	686.92
DY-651	653	160,000	678	888.96
DYQ-660	660	117,000	-	668.86
DYQ-661	661	116,000	-	770.90
DY-675	674	110,000	699	706.91
DY-676	674	145,000	699	807.95
DY-680	690	125,000	709	634.84
DY-681	691	125,000	708	736.88
DY-700	702	96,000	723	668.86
DY-701	706	115,000	731	770.90
DY-730	734	185,000	750	660.88
DY-731	736	225,000	759	762.92
DY-750	747	240,000	776	712.96
DY-751	751	220,000	779	814.99
DY-776	771	147,000	801	834.98
DY-780-OH	770	70,000	810	757.34
DY-780-P	770	70,000	810	957.55
DY-781	783	98,000	800	762.92
DY-782	782	102,000	800	660.88

[0172]

EVOblue-10	651	101.440	664	389.88
EVOblue-30	652	102.000	672	447.51

[0173] 量子点 : Qdot525、QD565、QD585、QD605、QD655、QD705、QD800

[0174] 可用于本发明的合适染料包括经修饰的羧花青染料。此类修饰包括羧花青染料的吲哚鎓环的修饰，该修饰使得在 3 位存在反应性基团或缀合的物质。与用结构相似的羧花青染料标记（通过 1 位的氮原子结合）的缀合物相比，吲哚鎓环的所述修饰提供的缀合物在蛋白、核酸和其它生物高分子上具有均匀且显著更强的荧光。除相比于结构相似的染料在基本相同的波长处具有更强的荧光发射、以及在与生物高分子聚合时其吸收光谱中的伪像 (artifact) 减少以外，修饰的羧花青染料比结构相似的染料在峰值吸收波长处具有更大的光稳定性和更高的吸收（消光系数）。因此，修饰的羧花青染料在使用修饰染料及其缀合物的测试中产生了更高的灵敏度。优选的修饰染料包括具有至少一个取代的吲哚鎓环体系的化合物，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或缀合的物质。其它染料化合物包括并入有氮杂氮茚鎓 (azabenzazolium) 环部分和至少一个磺酸酯部分的化合物。美国专利 6,977,305 中描述了可用于检测本发明的各种实施方式中的各分子的修饰的羧花青染料，本文通过参考并入其全部内容。因此，在某些实施方式中，本发明的标记利用包含取代的吲哚鎓环体系的荧光染料，其中所述吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或缀合物基团。

[0175] 在某些实施方式中，标记包含荧光部分，该荧光部分包含一种或多种 Alexa Fluor 染料 (Molecular Probes, Eugene, OR)。Alexa Fluor 染料公开于美国专利 Patent 6,977,305、6,974,874、6,130,101 和 6,974,305 中，本文通过参考并入其全部内容。本发明的某些实施方式利用选自 Alexa Fluor647、Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor555、Alexa Fluor610、Alexa Fluor680、Alexa Fluor700 和 Alexa Fluor750 的染料。本发明的某些实施方式利用选自 Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor647、Alexa Fluor700 和 Alexa Fluor750 的染料。本发明的某些实施方式利用选自 Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor555、Alexa Fluor610、Alexa Fluor680、Alexa Fluor700 和 Alexa Fluor750 的染料。本发明的某些实施方式利用 Alexa Fluor647 分子，该分子在约 650nm ~ 660nm 具有最大吸收且在约 660nm ~ 670nm 具有最大发射。Alexa Fluor647 染料单独使用或与其它 Alexa Fluor 染料组合使用。

[0176] 通过添加聚乙烯等疏水性基团来使目前可获取的有机荧光物 (fluor) 的疏水性降低，从而可以改进此类有机荧光物。替代性地，可通过使当前磺化的有机荧光物具有两性离子性而使该当前磺化的有机荧光物（如 Alexa Fluor647 染料）的酸性降低。用修饰的荧光物标记的颗粒（如抗体）较不易与免疫测试中的表面和蛋白非特异性地结合，由此使得能够产生具有更高灵敏度和更低背景的测试。用于出于增加单分子检测系统的灵敏度的目的而修饰和改进荧光染料的性质的方法是本领域内已知的。优选的是，所述修饰改善了斯托克斯位移而同时保持了高量子产率。

[0177] 2. 量子点

[0178] 在某些实施方式中，用于使用本发明的分析器系统来检测样品中的分子的荧光标记部分是量子点。量子点 (QD) 也称为半导体纳米晶体或人工原子，是含有 100 ~ 1,000 中

的任何数目电子的半导体晶体，其直径为 2nm ~ 10nm。某些 QD 的直径为 10nm ~ 20nm。QD 具有高量子产率，这使其对于光学应用特别有用。QD 是通过形成激子而发荧光的荧光团，激子与传统荧光团的激发态相似，但具有多达 200 纳秒的长得多的寿命。该性质为 QD 提供了低光漂白性。可通过改变 QD 的尺寸和形状以及 QD 电势的深度来控制 QD 的能级。小的激子 QD 的一个光学特征是显色，而这由该量子点的尺寸所决定。量子点越大则越红，或更偏向荧光光谱的红端。量子点越小则越蓝，或者更偏向蓝端。决定能量并因而决定荧光颜色的带隙能 (bandgap energy) 与 QD 的尺寸的平方成反比。更大 QD 具有更多能级，且这些能级间隔更近，由此使得 QD 能吸收含更少能量的光子（即更靠近光谱的红端的那些光子）。由于量子点的发射率取决于带隙，因而可以以极大的精度来控制量子点的输出波长。在某些实施方式中，用单分子分析器系统检测的蛋白以 QD 进行标记。在某些实施方式中，将单分子分析器用于检测以一个 QD 标记的蛋白，并使用滤光器以允许在不同波长检测不同蛋白。

[0179] QD 具有较宽激发和窄发射的性质，这在与滤色共同使用时仅需要单个电磁辐射源以在对单个样品中的多个靶标的多重分析期间分辨个别信号。因此，在某些实施方式中，所述分析器系统包含一个连续波激光和各自以一个 QD 标记的颗粒。经胶体制备的 QD 是自由漂浮的，并且能经由金属配位官能团与多种分子相连。这些官能团包括但不限于硫醇、胺、腈、膦、氧化膦、磷酸、羧酸或其它配体。通过使合适的分子与表面建和，可将量子点分散或溶解于几乎任何溶剂中或者并入多种无机和有机膜中。可以直接通过马来酰亚胺脂偶联反应将量子点 (QD) 与抗生素素链霉亲和蛋白偶合，或者通过马来酰亚胺 - 硫醇偶联反应将 QD 与抗体偶合。这产生具有共价连接于表面上的生物分子的材料，从而产生具有高度特异性活性的缀合物。在某些实施方式中，将用单分子分析器检测的蛋白用一个量子点标记。在某些实施方式中，所述量子点的直径是 10nm ~ 20nm。在其它实施方式中，所述量子点的直径是 2nm ~ 10nm。在其它实施方式中，所述量子点的直径是约 2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、11nm、12nm、13nm、14nm、15nm、16nm、17nm、18nm、19nm 或 20nm。可用的量子点包括 QD605、QD610、QD655 和 QD705。优选的量子点是 QD605。

[0180] C. 结合伴侣 - 荧光部分组合物

[0181] 本发明的标记通常含有结合伴侣（例如抗体），该结合伴侣与荧光部分结合以便为本文所述的仪器中的检测和定量所需的荧光。结合伴侣和用于本文所述单分子检测器中的检测的荧光部分的任何合适的组合都能用作本发明中的标记。在某些实施方式中，本发明提供了用于生物状态标记物的标记，其中该标记包含所述标记物的抗体和荧光部分。所述标记物可以是上述任何标记物。所述抗体可以是上述任何抗体。荧光部分可以连接来使得所述标记能够在受到在所述荧光部分的激发波长发光的激光的刺激而发出平均至少约 50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、350、400、500、600、700、800、900 或 1000 个光子，其中所述激光聚焦于含有所述标记的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。在某些实施方式中，所述荧光部分可以是能够在受到在所述荧光部分的激发波长发光的激光的刺激而发出平均至少约 50、100、150 或 200 个光子，其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。所述荧光部分可以包含一个或多个染料分子，该染料分子的结构包含取代的吲哚鎓环体系，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或缀合物基团。所述标记组合物可以包含荧光部分，该荧光部分包含选自

Alexa Fluor488, Alexa Fluor532, Alexa Fluor647, Alexa Fluor700 或 Alexa Fluor750 的一个或多个染料分子。所述标记组合物可以包含荧光部分,该荧光部分包含选自 Alexa Fluor488, Alexa Fluor532, Alexa Fluor700 或 Alexa Fluor750 的一个或多个染料分子。所述标记组合物可以包含荧光部分,该荧光部分包含作为 Alexa Fluor488 的一个或多个染料分子。所述标记组合物可以包含荧光部分,该荧光部分包含作为 Alexa Fluor555 的一个或多个染料分子。所述标记组合物可以包含荧光部分,该荧光部分包含作为 Alexa Fluor610 的一个或多个染料分子。所述标记组合物可以包含荧光部分,该荧光部分包含作为 Alexa Fluor647 的一个或多个染料分子。所述标记组合物可以包含荧光部分,该荧光部分包含作为 Alexa Fluor680 的一个或多个染料分子。所述标记组合物可以包含荧光部分,该荧光部分包含作为 Alexa Fluor700 的一个或多个染料分子。所述标记组合物可以包含荧光部分,该荧光部分包含作为 Alexa Fluor750 的一个或多个染料分子。

[0182] 在某些实施方式中,本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物,所述组合物包含 Alexa Fluor 分子,例如选自上述组的 Alexa Fluor 分子,如与对所述标记物特异的抗体相连的 Alexa Fluor647 分子。在某些实施方式中,所述组合物包含平均约 1to11、约 2to10、约 2to8、约 2to6、约 2to5、约 2to4、约 3to10、约 3to8、约 3to6、约 3to5、约 4to10、约 4to8、约 4to6、约 2、3、4、5、6 个或多于约 6 个 Alexa Fluor647 分子,该 Alexa Fluor647 分子与可检测所述标记物的抗体相连。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物,所述组合物包含平均约 1 ~ 11、约 2 ~ 10、约 2 ~ 8、约 2 ~ 6、约 2 ~ 5、约 2 ~ 4、约 3 ~ 10、约 3 ~ 8、约 3 ~ 6、约 3 ~ 5、约 4 ~ 10、约 4 ~ 8、约 4 ~ 6、约 2、3、4、5、6 个或多于 6 个 Alexa Fluor647 分子,该 Alexa Fluor647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物,所述组合物包含平均约 2 ~ 10 个 Alexa Fluor647 分子,该 Alexa Fluor647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物,所述组合物包含平均约 2 ~ 8 个 Alexa Fluor647 分子,该 Alexa Fluor647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物,所述组合物包含平均约 2 ~ 6 个 Alexa Fluor647 分子,该 Alexa Fluor647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物,所述组合物包含平均约 2 ~ 4 个 Alexa Fluor647 分子,该 Alexa Fluor647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物,所述组合物包含平均约 3 ~ 8 个 Alexa Fluor647 分子,该 Alexa Fluor647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物,所述组合物包含平均约 3 ~ 6 个 Alexa Fluor647 分子,该 Alexa Fluor647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物,所述组合物包含平均约 4 ~ 8 个 Alexa Fluor647 分子,该 Alexa Fluor647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。

[0183] 可通过任何合适的方法来将荧光部分或构成荧光部分的荧光体与结合伴侣(如抗体)相连;此类方法是本领域内公知的,且示例性方法在实施例中给出。在某些实施方式中,在将荧光部分与结合伴侣连接而形成用于本发明的方法中的标记之后,并在使用该标记对受关注的标记物进行标记之前,可使用所述标记执行过滤步骤。例如,可将抗体-染料

标记在使用前过滤例如通过 0.2 微米过滤器或任何合适的用于除去聚集物的过滤器。用于本发明的测试中的其它试剂也能例如通过 0.2 微米过滤器或任何合适的过滤器而过滤掉。不受限于理论,据认为这种过滤除去了例如抗体 - 染料标记的一部分聚集体。此类聚集体能作为一个单元与受关注的蛋白结合,但在洗脱缓冲液中释放时,所述聚集物很可能崩解。因此,当从仅与单个受关注蛋白分子结合的聚集物检测到数个标记时,可能产生假阳性结果。不论理论如何,已发现过滤可减少后续测试中的假阳性并改善准确性和精度。

[0184] 可以理解,免疫测试常常采用夹心形式,其中使用对于相同分子(如标记物)的结合伴侣对(如抗体)。本发明还涵盖了结合伴侣对(如抗体),其中两个抗体对于相同分子(如相同标记物)都具有特异性,且其中至少所述结合伴侣对中的一者是本文所述的标记。因此,对于包含结合伴侣和荧光部分的任何标记而言,本发明还涵盖了如下的一对结合伴侣:其中第一结合伴侣(如抗体)是所述标记的一部分,而第二结合伴侣(如抗体)通常未经标记且充当捕获结合伴侣。另外,结合伴侣对常用于 FRET 测试。可用于本发明的 FRET 测试公开于美国专利申请第 11/048,660 中,本文通过参考并入其全部内容,且本发明还涵盖了其中每个结合伴侣都包含 FRET 标记的结合伴侣对。

[0185] V. 高度灵敏的分子分析

[0186] 在一方面,本发明提供了用于确定样品中单分子(如标记物分子)存在或不存在的方法,所示方法包括:i) 将所述分子如果存在时用标记进行标记;和 ii) 检测所述标记存在或不存在,其中检测到标记存在表明样品中存在所述单分子。在某些实施方式中,所述方法能以小于约 100、80、60、50、40、30、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.01、0.005 或 0.001 飞摩尔的检出限检测分子。在某些实施方式中,所述方法能够以小于约 100 飞摩尔的检出限检测分子。在某些实施方式中,所述方法能够以小于约 10 飞摩尔的检出限检测分子。在某些实施方式中,所述方法能够以小于约 1 飞摩尔的检出限检测分子。在某些实施方式中,所述方法能够以小于约 0.1 飞摩尔的检出限检测分子。在某些实施方式中,所述方法能够以小于约 0.01 飞摩尔的检出限检测分子。在某些实施方式中,所述方法能够以小于约 0.001 飞摩尔的检出限检测分子。可通过使用适当的标准物(例如,国家标准和技术研究所的参照标准材料)来确定检出限。

[0187] 所述方法还提供了通过检测样品中分子的单分子来确定样品中分子(例如,表明生物学状态的标记物)的浓度的方法。单分子的“检测”包括直接和间接检测分子。在间接检测的情形中,可以检测对应于单分子的标记,例如与所述单分子相连的标记。

[0188] 在某些实施方式中,本发明提供了用于确定生物样品中蛋白的单分子存在或不存在的方法,所示方法包括用标记对所述分子进行标记和在单分子检测器中检测所述标记存在或不存在,其中所述标记包含荧光部分,该荧光部分能够在受到在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出至少约 200 个光子,其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上,且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。在某些实施方式中,单分子检测器可以包含一个以上询问空间。样品中的单分子的检出限可小于约 10、1、0.1、0.01 或 0.001 飞摩尔。在某些实施方式中,检出限小于约 1 飞摩尔。检测可以包括对荧光部分所发出的电磁辐射的检测。所述方法还可以包括将荧光部分暴露于电磁辐射中,例如,激光提供的电磁辐射,所述激光如具有约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20mW 的输出功率的激光。在某些实施方式中,激光刺激胃询问

空间提供了约 10 微秒～1000 微秒或者约 1000、250、100、50、25 或 10 微秒的光。在某些实施方式中，所述标记还包含对于与所述分子的结合具有特异性的结合伴侣，例如抗体。在某些实施方式中，所述荧光部分包含荧光染料分子，例如包含至少一个取代的吲哚鎓环体系的染料分子，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或缀合物质。在某些实施方式中，所述染料分子是选自 Alexa Fluor488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor647、Alexa Fluor680 或 Alexa Fluor700 的 Alexa Fluor 分子。在某些实施方式中，所述染料分子是 Alexa Fluor647 染料分子。在某些实施方式中，荧光部分包含多个 Alexa Fluor647 染料分子。在某些实施方式中，所述多个 Alexa Fluor647 染料分子包含约 2～4 个 Alexa Fluor647 染料分子，或约 3～6 个 Alexa Fluor647 染料分子。在某些实施方式中，荧光部分是量子点。所述方法还可以包括测定样品中蛋白的浓度。

[0189] 在某些实施方式中，检测标记存在或不存在包括：(i) 将来自电磁辐射源的电磁辐射导向询问空间；(ii) 提供足以刺激标记（如荧光部分）以便在如果询问空间中存在标记时发出光子的电磁辐射；(iii) 将询问空间迁移穿过样品，由此移动询问空间来检测其它单分子存在或不存在；和(iv) 检测步骤 (ii) 的曝光期间发出的光子。所述方法还可以包括确定询问空间中的背景光子水平，其中背景水平表示在以与步骤 (ii) 中相同的方式受到电磁辐射但在询问空间中没有标记时询问空间的平均光子发射。所述方法还可以包括将步骤 (iv) 中检测到的光子量与阈值光子水平进行比较，其中步骤 (iv) 中检测到的光子量大于阈值水平则表明标记存在，而步骤 (iv) 中检测到的光子量小于或等于阈值水平则表明标记不存在。

[0190] A. 样品

[0191] 样品可以为任何合适的样品。通常，样品为生物样品，例如生物流体。此类流体包括但不限于支气管肺泡灌洗液 (BALF)、血液、血清、血浆、尿液、鼻拭子、脑脊液、胸膜液、关节液、腹膜液、羊水、胃液、淋巴液、组织间液、组织匀浆、细胞提取物、唾液、痰、粪便、生理分泌物、泪液、粘液、汗液、奶、精、精液、阴道分泌物、溃疡和其它表面皮疹、水泡液和脓液以及组织（包括正常组织、恶性组织和疑似组织或者任何其它的可能含有受关注的靶标颗粒的身体组成部分的活组织检查）提取物。其它类似的样本（例如、细胞后组织培养物或者培养液）也是受关注的。

[0192] 在某些实施方式中，所述样品是血液样品。在某些实施方式中，所述样品是血浆样品。在某些实施方式中，所述样品是血清样品。在某些实施方式中，所述样品是尿液样品。在某些实施方式中，所述样品是鼻拭子。

[0193] B. 样品制备

[0194] 通常，可使用可产生对应于受关注分子（如待测定的生物状态标记物）的标记的任何样品制备方法，其中所述标记可在本发明的仪器中检测。如本领域中已知，可以以同源性或异源性方式进行其中将标记添加至一个或多个分子的样品制备。在某些实施方式中，以同源性方式形成样品制剂。在采取同源性方式的分析器系统中，不将未结合的标记从样品中除去。参见例如，美国专利申请第 11/048,660 号。在某些实施方式中，通过添加与受关注的一个或多个颗粒结合的一个或多个经标记的抗体来对所述一个或多个颗粒进行标记。

[0195] 在某些实施方式中，使用异源性测试方式，其中通常采用一个除去未结合标记的步骤。此类测试方式是本领域中公知的。一个特别有用的测试方式是夹心测试，例如夹心

免疫测试。在这种方式中,使用捕获结合伴侣将受关注的分子(如生物状态标记物)捕获于例如固体支持体上。然后必要时将不合需要的分子和其它物质洗涤除去,接着结合包含检测结合伴侣和可检测标记(如荧光部分)的标记。进一步的冲洗除去未结合的标记,然后将可检测标记释放,其通常但不是必然仍与检测结合伴侣相连。在替代性实施方式中,将样品和标记添加至捕获结合伴侣而不在其间进行洗涤,例如同时添加。其它变化形式对于本领域技术人员是显而易见的。

[0196] 在某些实施方式中,用于检测受关注分子(如生物状态标记物)的方法使用带有作为捕获结合伴侣的抗体(如单克隆抗体)的夹心测试。所述方法包括将样品中的分子与固定于结合表面上的捕获抗体结合,和将包含检测抗体的标记与形成“夹心”复合物的分子结合。如本文所述,所述标记包含检测抗体和荧光部分,后者使用例如本发明的单分子分析器进行检测。已知有许多夹心免疫测试的实例,一些实例如 Grubb 等的美国专利第 4,168,146 号和 Tom 等的美国专利第 4,366,241 中所述,本文通过参考并入两者的全部内容。对于特定标记物的进一步具体实例描述于实施例中。

[0197] 捕获结合伴侣可以与固体支持物相连,例如,微滴定板或顺磁珠。在某些实施方式中,本发明提供了受关注分子(如生物状态标记物)的结合伴侣,其与顺磁珠相连。可使用对于期望捕获的分子特异的任何合适的结合伴侣。结合伴侣可以是抗体,如单克隆抗体。抗体的制备和来源如本文其它部分所述。可以理解,本文鉴定为可用作捕获抗体的抗体也可用作检测抗体,反之亦然。

[0198] 结合伴侣(如抗体)与固体支持物的连接可以是共价或非共价的。在某些实施方式中,所述连接是非共价的。本领域内公知的非共价连接的实例是生物素与抗生物素蛋白及抗生物素链霉亲和蛋白之间的非共价连接。因此,在某些实施方式中,如微滴定板或顺磁珠等固体支持物与捕获结合伴侣(如抗体)通过非共价连接(例如,生物素-抗生物素蛋白/抗生物素链霉亲和蛋白相互作用)而相连。在某些实施方式中,所述连接是共价连接。因此,在某些实施方式中,如微滴定板或顺磁珠等固体支持物与捕获结合伴侣(如抗体)通过共价连接而相连。

[0199] 捕获抗体可以以优化对受关注分子的捕获的取向而共价连接。例如,在某些实施方式中,结合伴侣(如抗体)以定向方式与固体支持物(如微滴定板或顺磁珠)相连。

[0200] 用于定向连接抗体与固体支持物的示例性方案如下。将 IgG 溶解于 pH5.5 的 0.1M 醋酸钠缓冲液中至最终浓度为 1mg/ml。添加等体积的冰冷的 20mM 高碘酸钠在 0.1M 醋酸钠(pH5.5)中的溶液。使 IgG 在冰上氧化半小时。添加 0.5 体积的 1M 甘油来淬灭过量的高碘酸盐试剂。通过超滤除去氧化反应的低分子量副产物。将氧化的 IgG 组分稀释至合适的浓度(通常为 0.5mg/ml IgG)并与酰肼活化的多孔板在室温反应至少 2 小时。通过用硼酸盐缓冲盐水或其它合适的缓冲液洗涤多孔板来除去未结合的 IgG。然后在必要时将板干燥保存。如果微珠材料适于此类连接,则可以遵循类似方案将抗体与微珠相连。

[0201] 在某些实施方式中,固体支持体是微滴定板。在某些实施方式中,固体支持体是顺磁珠。顺磁珠的实例是抗生物素链霉亲和蛋白 C1 (Dynal, 650.01-03)。其它合适的珠对于本领域技术人员显而易见。用于将抗体与顺磁珠连接的方法在本领域内公知。一个实例给出于实施例 2 中。

[0202] 受关注的分子与固定于固体支持物上的捕获结合伴侣(如捕获抗体)相接触。在

样品与捕获抗体接触之前,可使用某些样品制剂,例如来自血液样品或浓缩程序的血清制剂。在免疫测试中结合蛋白的方案是本领域内公知的,并且包括在实施例中。

[0203] 结合所允许的时间将根据条件而有所不同;显而易见,在某些设定、尤其是临床设定中,更短的结合时间更为理想。例如顺磁珠的使用可以减少结合所需时间。在某些实施方式中,将受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)结合所允许的时间小于约12、10、8、6、4、3、2或1小时,或者小于约60、50、40、30、25、20、15、10或5分钟。在某些实施方式中,将受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)结合所允许的时间小于60分钟。在某些实施方式中,将受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)结合所允许的时间小于40分钟。在某些实施方式中,将受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)结合所允许的时间小于30分钟。在某些实施方式中,将受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)结合所允许的时间小于20分钟。在某些实施方式中,将受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)结合所允许的时间小于15分钟。在某些实施方式中,将受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)结合所允许的时间小于10分钟。在某些实施方式中,将受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)结合所允许的时间小于5分钟。

[0204] 在某些实施方式中,在受关注的分子颗粒与捕获结合伴侣(如捕获抗体)结合之后,样品中非特异性结合的颗粒以及其它不合需要的物质被洗涤除去,从而基本仅留下特异性结合的受关注分子的颗粒。在其它实施方式中,在添加样品和标记之间没有采用洗涤,这可减少样品制备时间。因此,在某些实施方式中,结合受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)以及结合标记与受关注分子所允许的时间均小于约12、10、8、6、4、3、2或1小时,或者小于约60、50、40、30、25、20、15、10或5分钟。在某些实施方式中,结合受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)以及结合标记与受关注分子所允许的时间均小于约60分钟。在某些实施方式中,结合受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)以及结合标记与受关注分子所允许的时间均小于约40分钟。在某些实施方式中,结合受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)以及结合标记与受关注分子所允许的时间均小于约30分钟。在某些实施方式中,结合受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)以及结合标记与受关注分子所允许的时间均小于约20分钟。在某些实施方式中,结合受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)以及结合标记与受关注分子所允许的时间均小于约15分钟。在某些实施方式中,结合受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)以及结合标记与受关注分子所允许的时间均小于约10分钟。在某些实施方式中,结合受关注分子与捕获结合伴侣(如抗体)以及结合标记与受关注分子所允许的时间均小于约5分钟。

[0205] 某些免疫测试诊断试剂、包括用于测定受关注分子的捕获和信号抗体可以源自动物血清。能够结合其它物种的免疫球蛋白的内源性人类嗜异性抗体或人类抗动物抗体存在于大于10%的患者的血清或血浆中。这些循环性嗜异性抗体可能干扰免疫测试的测定。在夹心免疫测试中,这些嗜异性抗体能将捕获和检测(诊断)抗体桥连,由此产生假阳性信号,或者其能阻断诊断抗体的结合,由此产生假阴性信号。在竞争性免疫测试中,嗜异性抗体能与分析抗体结合并抑制其与受关注分子的结合。嗜异性抗体还能阻断或促进抗体-关注分子复合物从游离的关注分子的分离,尤其是当在分离系统中使用抗物种抗体时。因此,这些嗜异性抗体干扰的影响难以预测,且若能阻断嗜异性抗体的结合则是有利的。在本发明的某些实施方式中,免疫测试包括使用一种或多种嗜异性抗体阻断剂来耗尽样品的嗜异

性抗体的步骤。待于免疫测试中进行试验的从样品中除去嗜异性抗体的方法是已知的,且包括:将样本在90°C于pH5.0的醋酸钠缓冲液中加热15分钟,并在1200g离心10分钟;使用聚乙二醇(PEG)使嗜异性免疫球蛋白沉淀;使用蛋白A或蛋白G将干扰性的嗜异性免疫球蛋白从样本中免疫提取出;或添加非免疫小鼠IgG。本发明的方法的实施方式考虑到在用单分子检测器分析之前制备样品。可以确定预处理法的适当性。可减小因嗜异性抗体造成的免疫测试干扰的生物化学品可商购。例如,称为MAK33的产品是h-CK-MM的IgG1单克隆抗体,可获自Boehringer Mannheim。MAK33plus产品含有IgG1和IgG1-Fab的组合。polyMAK33含有与IgG1聚合的IgG1-Fab,而polyMAC2b/2a含有与IgG2b聚合的IgG2a-Fab。Bioreclamation Inc., East Meadow, NY. 销售称为免疫球蛋白抑制试剂的第二种可中和嗜异性抗体的商购生物化学品。该产品时来自多个物种的免疫球蛋白(IgG和IgM)制剂,主要为来自Balb/c小鼠的小鼠IgG2a, IgG2b和IgG3。在某些实施方式中,可使用本领域已知方法将嗜异性抗体从样品中免疫提取出,例如通过将干扰性抗体与蛋白A或蛋白G结合来耗尽样品中的嗜异性抗体。在某些实施方式中,可使用一种或多种嗜异性抗体阻断剂来中和嗜异性抗体。嗜异性抗体阻断剂可选自抗同种型嗜异性抗体阻断剂、抗独特型嗜异性抗体阻断剂和抗-抗独特性嗜异性抗体阻断剂。在某些实施方式中,可使用嗜异性抗体阻断剂的组合。

[0206] 将标记在添加样品的同时添加,或在添加样品和洗涤之后添加。用于将抗体和其它免疫标记与蛋白结合的方案是本领域公知的。如果标记结合步骤与捕获结合步骤分开,标记结合所允许的时间可能很重要,例如,临床应用或其它对时间敏感的设定中。在某些实施方式中,将关注分子与标记(例如抗体-染料)结合所允许的时间小于12、10、8、6、4、3、2或1小时,或者小于约60、50、40、30、25、20、15、10或5分钟。在某些实施方式中,将关注分子与标记(例如抗体-染料)结合所允许的时间小于60分钟。在某些实施方式中,将关注分子与标记(例如抗体-染料)结合所允许的时间小于50分钟。在某些实施方式中,将关注分子与标记(例如抗体-染料)结合所允许的时间小于40分钟。在某些实施方式中,将关注分子与标记(例如抗体-染料)结合所允许的时间小于30分钟。在某些实施方式中,将关注分子与标记(例如抗体-染料)结合所允许的时间小于20分钟。在某些实施方式中,将关注分子与标记(例如抗体-染料)结合所允许的时间小于15分钟。在某些实施方式中,将关注分子与标记(例如抗体-染料)结合所允许的时间小于10分钟。在某些实施方式中,将关注分子与标记(例如抗体-染料)结合所允许的时间小于5分钟。过量标记通过洗涤除去。

[0207] 在某些实施方式中,不将标记从受关注的蛋白洗脱。在其它实施方式中,将标记从受关注的蛋白洗脱。优选的洗脱缓冲液可有效释放标记而不会产生显著的背景。有用的是如果洗脱缓冲液是抑菌性的情形。本发明所用洗脱缓冲液可以包含离液剂(chaotrope)、缓冲液、涂布微滴定板表面的白蛋白和选择用于产生相对较低的背景的表面活性剂。离液剂可以包括脲、胍盐化合物或其它可用离液剂。缓冲液可以包括硼酸盐缓冲盐水或其它可用缓冲液。蛋白载体可以包括例如白蛋白(如人、牛或鱼的白蛋白)、IgG或其它可用载体。表面活性剂可以包括离子型或非离子型洗涤剂,包括Tween20、Triton X-100和十二烷基硫酸钠(SDS)等。

[0208] 在另一个实施方式中,固相结合测试可以为竞争性结合测试。一种此类方法如下。

首先,将固定于结合表面上的捕获抗体与以下物质竞争性结合:i) 样品中的受关注分子(生物状态标记物),和ii) 包含可检测标记(检测试剂)的分子的标记类似物。其次,使用单分子分析器测定标记的量。另一种此类方法如下。首先,将具有可检测标记(检测试剂)的抗体与以下物质竞争性结合:i) 样品中的受关注分子(生物状态标记物),和ii) 固定于结合表面上的分子类似物(捕获试剂)。其次,使用单分子分析器测定标记的量。“分子类似物”在本文中是指与分子竞争对捕获抗体的结合的物种。竞争性免疫测试的实例公开于Deutsch等的美国专利4,235,601号、Liotta的美国专利第4,442,204号和Buechler等的美国专利第5,208,535号,本文通过参考并入其全部内容。

[0209] C. 关注分子的检测和浓度确定

[0210] 洗脱后,用单分子检测器检测样品中标记存在或不存在。样品可以不含标记、含单个标记或含多个标记。标记的数目对应于在捕获步骤期间捕获的受关注分子(如生物状态标记物)的分子数或与其成正比(如果采用样品的稀释液或部分)。

[0211] 可使用任何合适的能检测与受关注分子共同使用的标记的单分子检测器。合适的单分子检测器如本文所述。通常,检测器是系统的一部分,该系统包含用于采样制备好的样品的自动进样器和可选的回收样品的回收系统。

[0212] 在某些实施方式中,在单分子分析器中分析样品,该单分子分析器使用激光来照射含有样品的询问空间,使用检测器来检测从询问空间发出的辐射,使用扫描电机及与该电机连接的反射镜来使询问空间迁移通过样品。在某些实施方式中,单分子分析器还包含显微镜物镜,该显微镜物镜随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光,例如,大数值孔径显微镜物镜。在某些实施方式中,将激光和检测器设置为共焦排列。在某些实施方式中,激光是连续波激光。在某些实施方式中,检测器是雪崩式光电二极管检测器。在某些实施方式中,使用与扫描电机相连的反射镜使询问空间迁移通过样品。在某些实施方式中,使用与扫描电机相连的多个反射镜或棱镜使询问空间迁移通过样品。在某些实施方式中,本发明提供了分析器系统,该分析器系统包含能自动对多个样品进行采样而在后续测定的样品之间具有零夹带的采样系统。在某些实施方式中,询问空间的体积为大于约 $1\mu\text{m}^3$ 、大于约 $2\mu\text{m}^3$ 、大于约 $3\mu\text{m}^3$ 、大于约 $4\mu\text{m}^3$ 、大于约 $5\mu\text{m}^3$ 、大于约 $10\mu\text{m}^3$ 、大于约 $15\mu\text{m}^3$ 、大于约 $30\mu\text{m}^3$ 、大于约 $50\mu\text{m}^3$ 、大于约 $75\mu\text{m}^3$ 、大于约 $100\mu\text{m}^3$ 、大于约 $150\mu\text{m}^3$ 、大于约 $200\mu\text{m}^3$ 、大于约 $250\mu\text{m}^3$ 、大于约 $300\mu\text{m}^3$ 、大于约 $400\mu\text{m}^3$ 、大于约 $500\mu\text{m}^3$ 、大于约 $550\mu\text{m}^3$ 、大于约 $600\mu\text{m}^3$ 、大于约 $750\mu\text{m}^3$ 、大于约 $1000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $2000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $4000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $6000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $8000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $10000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $12000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $13000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $14000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $15000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $20000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $30000\mu\text{m}^3$ 、大于约 $40000\mu\text{m}^3$ 或大于约 $50000\mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积小于约 $50000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $40000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $30000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $20000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $15000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $14000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $13000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $12000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $11000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $9500\mu\text{m}^3$ 、小于约 $8000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $6500\mu\text{m}^3$ 、小于约 $6000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $5000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $4000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $3000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $2500\mu\text{m}^3$ 、小于约 $2000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $1500\mu\text{m}^3$ 、小于约 $1000\mu\text{m}^3$ 、小于约 $800\mu\text{m}^3$ 、小于约 $600\mu\text{m}^3$ 、小于约 $400\mu\text{m}^3$ 、小于约 $200\mu\text{m}^3$ 、小于约 $100\mu\text{m}^3$ 、小于约 $75\mu\text{m}^3$ 、小于约 $50\mu\text{m}^3$ 、小于约 $25\mu\text{m}^3$ 、小于约 $20\mu\text{m}^3$ 、小于约 $15\mu\text{m}^3$ 、小于约 $14\mu\text{m}^3$ 、小于约 $13\mu\text{m}^3$ 、小于约 $12\mu\text{m}^3$ 、小于约 $11\mu\text{m}^3$ 、小于约 $10\mu\text{m}^3$ 、小于约 $5\mu\text{m}^3$ 、小于约 $4\mu\text{m}^3$ 、小于约 $3\mu\text{m}^3$ 、小于约 $2\mu\text{m}$ 或小

于约  $1 \mu\text{m}$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $1000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $100 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $50 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $2 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $3 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $7 \mu\text{m}^3$ 。

[0213] 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $1000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $100 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $2 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $3 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $7 \mu\text{m}^3$ 。

[0214] 在其它实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出

的光的大数值孔径显微镜物镜、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $1 \mu m^3$  ~ 约  $10000 \mu m^3$ 。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $1 \mu m^3$  ~ 约  $1000 \mu m^3$ 。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $1 \mu m^3$  ~ 约  $100 \mu m^3$ 。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $1 \mu m^3$  ~ 约  $10 \mu m^3$ 。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $2 \mu m^3$  ~ 约  $10 \mu m^3$ 。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $2 \mu m^3$  ~ 约  $8 \mu m^3$ 。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询问空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的大数值孔径显微镜物镜、检测从询问空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询问空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询问空间为约  $3 \mu m^3$  ~ 约  $7 \mu m^3$ 。在这些实施方式中的任何一个中，所述分析器可以仅含一个询问空间。

[0215] 在某些实施方式中，单分子检测器能确定样品中受关注分子的浓度，其中样品的浓度范围可以跨越至少约 100 倍、1000 倍、10,000 倍、100,000 倍、300,000 倍、1,000,000 倍、10,000,000 倍或 30,000,000 倍。

[0216] 在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到包含于样品板中的第一样品和第二样品之间的小于约 50%、40%、30%、20%、15% 或 10% 的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约  $100 \mu l$ 、 $90 \mu l$ 、 $80 \mu l$ 、 $70 \mu l$ 、 $60 \mu l$ 、 $50 \mu l$ 、 $40 \mu l$ 、 $30 \mu l$ 、 $20 \mu l$ 、 $15 \mu l$ 、 $10 \mu l$ 、 $5 \mu l$ 、 $4 \mu l$ 、 $3 \mu l$ 、 $2 \mu l$  或  $1 \mu l$ ，且其中所述分析物以小于约 100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、10、5、4、3、2 或 1 飞摩尔的浓度存在。在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 50% 的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约  $100 \mu l$ ，且其中所述分析物以小于约 100 飞摩尔的浓度存在。在某些实施方

式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 40% 的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约 50  $\mu$ l，且其中所述分析物以小于约 50 飞摩尔的浓度存在。在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 20% 的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约 20  $\mu$ l，且其中所述分析物以小于约 20 飞摩尔的浓度存在。在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 20% 的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约 10  $\mu$ l，且其中所述分析物以小于约 10 飞摩尔的浓度存在。在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 20% 的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约 5  $\mu$ l，且其中所述分析物以小于约 5 飞摩尔的浓度存在。

[0217] 对本发明的仪器和方法的极高灵敏度作出贡献的特点在于检测标记和对其计数的方法，所述标记在某些实施方式中与待检测的单分子相连或更通常的是对应于待检测的单分子。简言之，通过使询问空间迁移通过样品板而将样品板中所装样品有效划分为一系列检测事件，其中来自具有适当的标记中所用荧光部分的激发波长的激光的 EM 辐射在预定的时间段被导向所述波长，并检测在该时段发出的光子。每个预定时段是一个“时段”。过给定时段中检测到的光子总数超过预定阈值水平，则对该时段登记检测事件，即已检测到标记。如果光子总是未达预定阈值水平，不记录检测时间。在某些实施方式中，处理中的样品浓度稀至足以使得对于较大百分比的检测事件而言检测事件表示仅有一个标记通过窗口，这对应于原始样品中的受关注的单分子。因而，很少有检测时间表示错与一个标记存在于单一时段中。在某些实施方式中，施行进一步的细条以使得在处理中样品中的更大的标记浓度能被准确检测，即两个或多个标记作为单个检测事件被检测到的概率不再无关紧要时的浓度。

[0218] 在不脱离本发明的范围的情况下，虽然可使用其它时段时间，但在某些实施方式中，将时段时间选择为约 1 微秒～约 5 毫秒。在某些实施方式中，时段时间大于约 1 微秒、2 微秒、3 微秒、4 微秒、5 微秒、6 微秒、7 微秒、8 微秒、9 微秒、10 微秒、15 微秒、20 微秒、30 微秒、40 微秒、50 微秒、60 微秒、70 微秒、80 微秒、90 微秒、100 微秒、200 微秒、250 微秒、300 微秒、400 微秒、500 微秒、600 微秒、700 微秒、750 微秒、800 微秒、900 微秒、1000 微秒、2000 微秒、3000 微秒、4000 微秒或 5000 微秒。在某些实施方式中，时段时间小于约 2 微秒、3 微秒、4 微秒、5 微秒、6 微秒、7 微秒、8 微秒、9 微秒、10 微秒、15 微秒、20 微秒、30 微秒、40 微秒、50 微秒、60 微秒、70 微秒、80 微秒、90 微秒、100 微秒、200 微秒、250 微秒、300 微秒、400 微秒、500 微秒、600 微秒、700 微秒、750 微秒、800 微秒、900 微秒、1000 微秒、2000 微秒、3000 微秒、4000 微秒或 5000 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒～1000 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒～750 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒～500 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒～250 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒～100 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒～50 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒～40 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒～30 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒～25 微秒。在某些实施方式中，时段时

间约为 1 微秒~20 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒~10 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒~7.5 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒~5 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 5 微秒~500 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 5 微秒~250 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 5 微秒~100 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 5 微秒~50 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 5 微秒~20 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 5 微秒~10 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 10 微秒~500 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 10 微秒~250 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 10 微秒~100 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 10 微秒~50 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 10 微秒~30 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 10 微秒~20 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 2 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 3 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 4 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 5 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 6 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 7 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 8 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 9 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 10 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 11 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 12 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 13 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 14 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 5 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 15 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 16 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 17 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 18 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 19 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 20 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 25 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 30 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 40 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 50 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 100 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 250 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 500 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 750 微秒。在某些实施方式中，时段时间约为 1000 微秒。

[0219] 在某些实施方式中，确定样品中颗粒-标记复合物的浓度包括确定背景噪声水平。在某些实施方式中，从平均噪声水平或均方根噪声确定背景噪声水平。在其它实施方式中，选择典型的噪声值或统计值。通常，预计噪声会遵循泊松分布。

[0220] 随着询问空间迁移通过样品，导向询问空间的激光束在遇到标记时产生光子激发。通过仅考虑具有高于预定阈值能级的能量的光子激发，将有标记发射的光子与背景光或背景噪声发射区分开，由此解释了样品中存在的背景噪声的量。背景噪声通常包含例如由样品中存在的未标记颗粒的内在荧光产生的低频发射、分析用样品制备中所用缓冲液或稀释剂、拉曼散射和电子噪声。在某些实施方式中，指定给背景噪声的值作为多个时段中检测到的平均背景信号噪声而计算，是在预定时长中在询问空间中检测到的光子信号的测定。在某些实施方式中，对于每个样品作为对该样品特异性的数字来计算背景噪声。

[0221] 在给出背景噪声的值后，可以指定阈值能级。如上所述，阈值被确定来区分由标记的荧光产生的真实信号与背景噪声。可将阈值选择来使得来自随机噪声的假阳性信号的数目最小化而同时也使被舍弃的真实信号的数目最小化。用于选择阈值的方法包括确定高于噪声水平的固定值并给予噪声信号的分布计算阈值。在一个实施方式中，将阈值设定为高于背景信号的标准偏差的固定值。假设噪声为泊松分布，使用此方法可以估计在整个实验

进程中的假阳性信号的数目。在某些实施方式中，阈值水平作为高于背景噪声的四个标准偏差 ( $\sigma$ ) 而计算。例如，假设平均背景噪声水平为 200 光子，分析器系统确立了  $4 \sqrt{200}$  的高于 200 光子的平均背景 / 噪声水平的阈值水平为 256 光子。因此，在某些实施方式中，确定样品中标记的浓度包括确立阈值水平，高于该阈值水平的光子信号表示存在标记。相反，不存在具有大于阈值水平的能级的光子信号表明不存在标记。

[0222] 进行许多次时段测量以确定样品浓度，且对于每次时段测量均确定标记存在或不存在。通常，在 1 分钟内可以进行 60,000 次测量。当时段尺寸为 1ms 时，在 1 分钟内进行 60,000 次测量。对于更小的时段尺寸，进行的测量数目相应地更大，例如，与 10 微秒的时段尺寸相当的是每分钟 6,000,000 次测量。由于进行了如此多的测量，没有任何单次测量是至关重要的，由此提供了较高的误差界限。在确定处理中的样品中的标记浓度时，确定不含标记的时段（“否”时段）不被计数，而仅对确定含有标记（“是”时段）进行计数。在“否”时段或缺乏标记的时段中进行的不计数测量增加了信噪比和测量精度。由此，在某些实施方式中，确定样品中标记的浓度包括对反映出存在标记的时段测量的检测。

[0223] 通过减少在其中检测到颗粒 - 标记复合物的时段测量期间检测背景噪声的时间，可以增加分析系统的信噪比或灵敏度。例如，考虑持续 1 毫秒的时段测量，其间在一个颗粒 - 标记复合物在 250 微秒中穿过询问空间时检测到该复合物。在这些条件下，所述 1 毫秒中的 750 微秒用于检测背景噪声发射。通过减少时段时间可以改善信噪比。在某些实施方式中，时段时间是 1 毫秒。在其它实施方式中，时段时间是 750 毫秒、500 毫秒、250 毫秒、100 毫秒、50 毫秒、25 毫秒或 10 毫秒。其它时段时间如本文所述。

[0224] 影响测量的其它因素为荧光部分的亮度或暗度、光圈图像的尺寸或激光束的侧向幅度、询问空间迁移通过样品的速率和激光的功率。允许检测标记的相关因素的各种组合对于本领域技术人员是显而易见的。在某些实施方式中，调节时段时间而不改变扫描速度。本领域技术人员可以理解，随时段时间减少，导向询问空间的激光输出功率必须增加，以维持在所述时段时间期间对询问空间施加的恒定总能量。例如，如果时段时间从 1000 微秒减少至 250 微秒，作为第一近似，激光输出功率必须增加大约 4 倍。这些设定使得在 250 微秒中能检测到与在此前设定的 1000 微秒期间计数的光子数相同的光子数，并允许以更低的背景和更大的灵敏度进行更快的样品分析。另外，可以调节询问空间迁移通过样品的速度，以便加速样品处理。这些数字仅为示例性，本领域技术人员可以根据需要调节参数以获得所需结果。

[0225] 在某些实施方式中，当例如询问空间由激光束所照射的光斑的尺寸所限时，询问空间小于样品体积。在某些实施方式中，可通过调节分析器的光圈 182 (图 1A 和 1B) 和减小物镜成像至检测器的受照射体积来限定询问空间。在其中询问空间被限定为小于样品的横截面积的实施方式中，可通过由复合物发出的信号对标准曲线的插值来确定标记浓度，所述标准曲线是施用一个或多个已知标准浓度的样品而产生。在其它实施方式中，可通过比较测定的颗粒与内标标准物 (internal label standard) 来确定标记浓度。在其中对稀释样品进行分析的实施方式中，在计算起始样品中的关注分子的浓度时，考虑稀释因子。

[0226] 为了确定处理中样品中的标记浓度，相对于时段总数所表示的样品体积，确定了“是”时段中所含标记的总数。因此，在一个实施方式中，确定处理中样品中的标记浓度包括确定检测为“是”的标记的总数并将检测到标记的总数与所分析的总样品体积相关联。所

分析的总样品体积是在指定时间间隔中询问空间迁移所通过的样品种积。替代性地，样品中的标记复合物的浓度由多个时段中的标记发出的信号对标准曲线的插值而确定，所述标准曲线通过确定相同数目的时段中由标记产生的信号而从含有已知浓度的所述标记的标准样品产生。

[0227] 在某些实施方式中，将在时段中检测到的各个标记的数目与处理中样品中的颗粒的相对浓度进行关联。在相对较低浓度，例如在低于约  $10^{-16}M$  浓度，标记的数目与时段中检测到的光子信号成正比。因此，在较低标记浓度，光子信号被提供作为数字信号。在相对更高的浓度，例如在高于约  $10^{-16}M$  浓度，光子信号与标记的成比例性 (proportionality) 丧失，这是因为两个或多个标记几乎同时穿越询问空间并被计数为一个的可能性变得显著。因此，在某些实施方式中，通过减小时段测量的时长来对在浓度大于约  $10^{-16}M$  的样品中的个体颗粒进行分辨。

[0228] 在其它实施方式中，对任何一个时段中存在的多个颗粒发出的总光子信号进行检测。这些实施方式允许如下的本发明的单分子检测器：其中的动态范围为至少 3、3.5、4、4.5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 或大于 8 的对数值 (log)。

[0229] 本文所用术语“动态范围”是指可以无须进行稀释或其它处理来改变不同浓度的连续样品的浓度而由仪器定量的样品浓度范围，其中以对预期用途适当的准确度来确定浓度。例如，如果微滴定板在一个孔中含有浓度为 1 飞摩尔的受关注分析物的样品，在另一个孔中含有浓度为 10,000 飞摩尔的受关注分析物的样品，而在第三个孔中含有浓度为 100 飞摩尔的受关注分析物的样品，则具有至少  $4\log$  的动态范围和 1 飞摩尔的定量下限的仪器能对所有样品的浓度进行准确定量而不用进行进一步处理以调节浓度（例如稀释）。准确性可通过标准方法而确定，例如测定具有跨越动态范围的浓度的一系列标准物并构建标准曲线。所得标准曲线的拟合的标准量度可用作准确性的量度，例如大于约 0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98 或 0.99 的  $r^2$ 。

[0230] 可通过改变对来自检测器的数据的分析方式并可能在检测器和询问空间之间使用衰减器来提高动态范围。在所述动态范围的低端，处理中的样品为足够稀，以致每个检测事件（即，每次高出时段中的阈值水平的光子激发（“事件光子 (event photon)”）可能仅代表一个标记。在此条件下，对数据进行分析以将检测事件计为单分子，从而将每个时段分析为如上所述的对于标记的存在的简单“是”或“否”。对于更浓的处理中样品，其中两个或多个标记占据一个时段的可能性变得显著，相当多的时段中的事件光子数明显大于预期的单个标记的数目。例如，相当多的时段中的事件光子数对应于预期的单个标记的数目的 2 倍、3 倍或者比其更大。对于这些样品，仪器改变其数据分析方法以将事件光子总数对处理中样品的时段进行整合。该总数与所有时段中的标记总数成正比。对于浓度甚至更大的处理中样品，其中在大多数时段中存在许多标记，背景噪声成为来自每个时段的总信号中无足轻重的部分，而仪器改变其数据分析方法以对每个时段中的总光子进行计数（包括背景）。当浓度使得到达检测器的光强度超出检测器对光子准确计数的能力（即，使检测器饱和）时通过在样品板与检测器之间使用衰减器可以实现动态范围的进一步增加。

[0231] 仪器可以包含数据分析系统，该数据分析系统接收来自检测器的输入数据并确定对运行中的样品的适当分析方法，并基于该分析输出数值。如果仪器包含衰减器，数据分析系统还可以输出使用或不使用衰减器的指示。

[0232] 通过利用所述方法,所述仪器的动态范围可以极大地增加。在某些实施方式中,所述仪器能测定大于约 1000(3log)、10,000(4log)、100,000(5log)、350,000(5.5log)、1,000,000(6log)、3,500,000(6.5log)、10,000,000(7log)、35,000,000(7.5log) 或 100,000,000(8log) 的动态范围中的样品浓度。在某些实施方式中,所述仪器能测定大于约 100,000(5log) 的动态范围中的样品浓度。在某些实施方式中,所述仪器能测定大于约 1,000,000(6log) 的动态范围中的样品浓度。在某些实施方式中,所述仪器能测定大于约 10,000,000(7log) 的动态范围中的样品浓度。在某些实施方式中,所述仪器能测定在约 1 ~ 10 飞摩尔到至少约 1000 飞摩尔、10,000 飞摩尔、100,000 飞摩尔、350,000 飞摩尔、1,000,000 飞摩尔、3,500,000 飞摩尔、10,000,000 飞摩尔或 35,000,000 飞摩尔的动态范围中的样品浓度。在某些实施方式中,所述仪器能测定在约 1 ~ 10 飞摩尔到至少约 10,000 飞摩尔的动态范围中的样品浓度。在某些实施方式中,所述仪器能测定在约 1 ~ 10 飞摩尔到至少约 100,000 飞摩尔的动态范围中的样品浓度。在某些实施方式中,所述仪器能测定在约 1 ~ 10 飞摩尔到至少约 1,000,000 飞摩尔的动态范围中的样品浓度。在某些实施方式中,所述仪器能测定在约 1 ~ 10 飞摩尔到至少约 10,000,000 飞摩尔的动态范围中的样品浓度。

[0233] 在某些实施方式中,本发明的分析器或分析器系统能以小于约 1 纳摩尔、1 皮摩尔、1 飞摩尔、1 渺摩尔 (attomolar) 或 1zeptomolar 的检出限检测分析物 (如生物标记物)。在某些实施方式中,当分析物 (生物标记物) 在样品中以小于约 1 纳摩尔、1 皮摩尔、1 飞摩尔、1 渺摩尔 (attomolar) 或 1zeptomolar 的浓度存在时,且当每个样品的尺寸小于约 100  $\mu$  l、50  $\mu$  l、40  $\mu$  l、30  $\mu$  l、20  $\mu$  l、10  $\mu$  l、5  $\mu$  l、2  $\mu$  l、1  $\mu$  l、0.1  $\mu$  l、0.01  $\mu$  l、0.001  $\mu$  l 或 0.0001  $\mu$  l 时,所述分析器或分析器系统能够检测到一个样品与另一个样品之间小于约 0.1%、1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60% 或 80% 的分析物或多个分析物 (例如,一个或多个生物标记物) 的浓度改变。在某些实施方式中,当分析物在样品中以小于约 1 皮摩尔的浓度存在时,且当每个样品的尺寸小于约 50  $\mu$  l 时,所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20% 的分析物的浓度改变。在某些实施方式中,当分析物在样品中以小于约 100 飞摩尔的浓度存在时,且当每个样品的尺寸小于约 50  $\mu$  l 时,所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20% 的分析物的浓度改变。在某些实施方式中,当分析物在样品中以小于约 50 飞摩尔的浓度存在时,且当每个样品的尺寸小于约 50  $\mu$  l 时,所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20% 的分析物的浓度改变。在某些实施方式中,当分析物在样品中以小于约 5 飞摩尔的浓度存在时,且当每个样品的尺寸小于约 50  $\mu$  l 时,所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20% 的分析物的浓度改变。在某些实施方式中,当分析物在样品中以小于约 5 飞摩尔的浓度存在时,且当每个样品的尺寸小于约 5  $\mu$  l 时,所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20% 的分析物的浓度改变。在某些实施方式中,当分析物在样品中以小于约 1 飞摩尔的浓度存在时,且当每个样品的尺寸小于约 5  $\mu$  l 时,所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20% 的分析物的浓度改变。

[0234] VI. 样品夹带

[0235] 夹带 (carryover) 在诊断中是不合需要的。在一个样品中检测到受关注的分子不

能损害在后续受测样品中对受关注分子的检测的准确性。本文所述的单分子分析器能够在一个样品中检测单分子存在或不存在,继而在后续样品中检测单分子存在或不存在,而在样品之间没有夹带。本文所述的发明提供了能依次检测第一样品中特定类型的单分子存在或不存在并检测第二样品中该类型单分子存在或不存在,其中所述仪器被改造或配置来使得在第一和第二样品之间没有夹带。本文还提供了依次检测第一样品中特定类型的单分子存在或不存在并检测第二样品中该类型单分子存在或不存在的方法,其中在第一和第二样品之间没有夹带。

[0236] 在某些实施方式中,在同一样品板上运行多个样品。在某些实施方式中,针对相同类型的关注单分子对样品进行测试。在某些实施方式中,第一样品中测试的单分子类型与第二样品中测试的分子类型不同。这相当于以下情形:运行例如其中将原始样品分为多个样品的测试组,所述多个样品中的每一个都针对不同类型的关注单分子进行测试。

[0237] 在某些实施方式中,样品板含有一个待测样品。在某些实施方式中,样品板含有两个待测样品。在某些实施方式中,多个样品可在同一样品板上进行测试。在理论上,可以连续运行 10 个、100 个、1000 个或多于 1000 个样品而在连续测试的任何两个样品之间没有夹带。所述系统仅因受样品板的局限而受样品数的限制。

[0238] 建立零夹带的系统对于其中容纳待测样品的容器是一次性的系统而言较为简单。在此类系统中,只要检测工具不与样品接触,则在采用一次性容器时不会产生夹带的机会。一次性容器包括如比色皿或毛细管等物品。本文提供的发明对容纳于一次性和非一次性容器中的连续样品的测试。本发明公开了其中不可能存在样品之间的夹带的仪器设置。

#### [0239] VII. 单分子分析器的使用方法

[0240] 本文还提供了用于检测样品中单分子存在或不存在的方法,所述方法包括:(a) 将电磁辐射从电磁辐射源导向样品中的询问空间;(b) 在位于样品的第一位置处的询问空间中检测第一单分子存在或不存在;(c) 使询问空间迁移通过样品至样品中的后续位置;(d) 在样品的后续位置中检测后续单分子存在或不存在;和(e) 根据需要重复步骤(c) 和(d),以便在一个以上样品位置中检测单分子存在或不存在。在某些实施方式中,询问空间的体积大于约  $1 \mu m^3$ 、大于约  $2 \mu m^3$ 、大于约  $3 \mu m^3$ 、大于约  $4 \mu m^3$ 、大于约  $5 \mu m^3$ 、大于约  $10 \mu m^3$ 、大于约  $15 \mu m^3$ 、大于约  $30 \mu m^3$ 、大于约  $50 \mu m^3$ 、大于约  $75 \mu m^3$ 、大于约  $100 \mu m^3$ 、大于约  $150 \mu m^3$ 、大于约  $200 \mu m^3$ 、大于约  $250 \mu m^3$ 、大于约  $300 \mu m^3$ 、大于约  $400 \mu m^3$ 、大于约  $500 \mu m^3$ 、大于约  $550 \mu m^3$ 、大于约  $600 \mu m^3$ 、大于约  $750 \mu m^3$ 、大于约  $1000 \mu m^3$ 、大于约  $2000 \mu m^3$ 、大于约  $4000 \mu m^3$ 、大于约  $6000 \mu m^3$ 、大于约  $8000 \mu m^3$ 、大于约  $10000 \mu m^3$ 、大于约  $12000 \mu m^3$ 、大于约  $13000 \mu m^3$ 、大于约  $14000 \mu m^3$ 、大于约  $15000 \mu m^3$ 、大于约  $20000 \mu m^3$ 、大于约  $30000 \mu m^3$ 、大于约  $40000 \mu m^3$  或大于约  $50000 \mu m^3$ 。在某些实施方式中,询问空间的体积小于约  $50000 \mu m^3$ 、小于约  $40000 \mu m^3$ 、小于约  $30000 \mu m^3$ 、小于约  $20000 \mu m^3$ 、小于约  $15000 \mu m^3$ 、小于约  $14000 \mu m^3$ 、小于约  $13000 \mu m^3$ 、小于约  $12000 \mu m^3$ 、小于约  $11000 \mu m^3$ 、小于约  $9500 \mu m^3$ 、小于约  $8000 \mu m^3$ 、小于约  $6500 \mu m^3$ 、小于约  $6000 \mu m^3$ 、小于约  $5000 \mu m^3$ 、小于约  $4000 \mu m^3$ 、小于约  $3000 \mu m^3$ 、小于约  $2500 \mu m^3$ 、小于约  $2000 \mu m^3$ 、小于约  $1500 \mu m^3$ 、小于约  $1000 \mu m^3$ 、小于约  $800 \mu m^3$ 、小于约  $600 \mu m^3$ 、小于约  $400 \mu m^3$ 、小于约  $200 \mu m^3$ 、小于约  $100 \mu m^3$ 、小于约  $75 \mu m^3$ 、小于约  $50 \mu m^3$ 、小于约  $25 \mu m^3$ 、小于约  $20 \mu m^3$ 、小于约  $15 \mu m^3$ 、小于约  $14 \mu m^3$ 、小于约  $13 \mu m^3$ 、小于约  $12 \mu m^3$ 、小于约  $11 \mu m^3$ 、小于约  $10 \mu m^3$ 、小于约  $5 \mu m^3$ 、小于

约  $4 \mu\text{m}^3$ 、小于约  $3 \mu\text{m}^3$ 、小于约  $2 \mu\text{m}^3$  或小于约  $1 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $1000 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $100 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $50 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $1 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $2 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $10 \mu\text{m}^3$ 。在某些实施方式中，询问空间的体积为约  $3 \mu\text{m}^3$  ~ 约  $7 \mu\text{m}^3$ 。

[0241] 本文还提供了用于检测单分子存在或不存在的方法，其中询问空间以非线性路径迁移。在另一个实施方式中，所述非线性路径包括基本环形的路径。在另一个实施方式中，所述非线性路径包括螺旋模式。本发明提供了检测询问空间中的单分子存在或不存在的方法，其中所述询问空间迁移通过样品。在某些实施方式中，本发明提供的样品相对于仪器基本保持静止。在某些实施方式中，本发明提供的样品相对于仪器进行迁移。在某些实施方式中，样品和电磁辐射两者相对于彼此均进行迁移。在其中样品相对于仪器进行迁移的实施方式中，样品可在其容器（如微孔）中保持静止。尽管单分子能够在一个或一系列询问空间中扩散进出，该单分子所在的介质保持静止。因此，本系统使得无需流动的流体而可对单分子进行检测。

[0242] 实施例

[0243] 实施例 1：分子检测和标准曲线生成

[0244] 图 3 显示了使用本发明的装置进行的单分子检测。该图显示出纵轴上的检测到的荧光代表性数据与横轴上的时间（毫秒）的关系。在扫描单分子分析器遇到询问空间内的一个或多个经标记的分子时产生图中所示尖峰（spike）。总荧光信号包括个体检测事件（DE）的综合，其中一个检测事件包含高于背景噪声的荧光。对记录期间的所有事件的计数可以被称为“DE”值。在低浓度时，DE 值对应于检测到的分子的数目。在更高浓度时，其中两个或多个分子能一次通过检测点，检测到的分子的数目可能高于 DE 值。

[0245] 图 4 显示了采用扫描单分子分析器生成的标准曲线。为生成该曲线，将样品制备为已知浓度并施用本发明的装置进行测定。图中显示了 3 条曲线。上方曲线对应于所检测的总光子（TP）。中间的曲线对应于所检测的事件光子（EP）。下方曲线对应于所检测的事件（DE）。该图显示了纵轴上的这些测量的每一次的值（“计数”）与横轴上的已知样品浓度（pg/ml）的关系。图中圆圈是在其已知浓度作图的计数。实曲线是对 4 参数对数曲线的数据的最小二乘法拟合。符号“+”是在其插值浓度而非其已知浓度作图的计数。符号“+”表明拟合曲线穿过实际数据的吻合程度。该数据表明，随着样品浓度的改变，检测到的分子数明显发生改变。

[0246] 实施例 2：生物标记物心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的夹心测试

[0247] 测试：该测试的目的在于检测人血清中心肌肌钙蛋白 I (cTNI) 的存在。测试形式包括施用小鼠单克隆捕获抗体和山羊多克隆检测抗体的两步夹心免疫测试。需要 10 微升样品。该测试的工作范围是  $0\text{pg}/\text{ml}$  ~  $900\text{pg}/\text{ml}$ ，典型的分析性检出限为  $1\text{pg}/\text{ml}$  ~  $3\text{pg}/\text{ml}$ 。测试需要约 4h 的实验时间完成。

[0248] 材料：在下述程序中使用以下材料。测试板包含干净的 384 孔 NUNC<sup>TM</sup>Maxisorp，产品 464718。用包含 BiosPacific A34440228P 批号 A0316 的单克隆抗体（在 pH9.6 的 0.05M 碳酸钠中为  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）在室温将所述板被动涂布过夜，并用磷酸盐缓冲盐水（PBS）中的 5%

蔗糖、1%BSA 阻断,然后储存于 4℃。对于标准曲线,施用人类心肌肌钙蛋白 I(BiosPacific 目录号 J34000352)。标准浓度用稀释剂是免疫耗尽内源性 cTnI 的人血清,等分并储存于 -20℃。将标准物在 96 孔锥形聚丙烯板 (NUNC™ 产品号 249944) 中稀释。使用以下缓冲液和溶液:(a) 测试缓冲液(带有 1%BSA 和 0.1%Triton X-100 的硼酸盐缓冲盐水 (BBS)) ;(b) 被动阻断溶液(含有 2mg/ml 小鼠 IgG(Equitech Bio)、2mg/ml 山羊 IgG(Equitech Bio) 和 2mg/ml MAK33 IgG1 Poly(Roche#11 939 661) 的测试缓冲液);(c) 检测抗体(以肽 3(BiosPacific G-129-C) 亲和纯化的山羊多克隆抗体,以荧光染料 Alexa Fluor647 标记,储存于 4℃);(d) 检测抗体稀释液(50% 测试缓冲液,50% 被动阻断溶液);(e) 洗涤缓冲液(硼酸盐缓冲盐水 Triton 缓冲液 (BBST)(1.0M 硼酸盐、15.0M 氯化钠、10%Triton X-100, pH8.3));(f) 洗脱缓冲液(带有 4M 脲、0.02%Triton X-100 和 0.001%BSA 的 BBS);和(g) 偶联缓冲液(0.1M NaHCO<sub>3</sub>)。

[0249] Alexa Fluor647 标记的抗体的制备:通过将 Alexa Fluor647 缀合来制备检测抗体 G-129-C。将 100 μg 的 G-129-C 溶于 400 μl 的偶联缓冲液中。通过将溶液转移至 YM-30 过滤器并让溶液和过滤器进行离心而将抗体溶液浓缩至 50 μl。通过添加 400 μl 偶联缓冲液来将 YM-30 过滤器和抗体洗涤 3 次。通过向过滤器中添加 50 μl 偶联缓冲液、翻转过滤器并在 5,000 × g 离心 1 分钟来回收抗体。所得抗体溶液的浓度约为 1 μg/μl ~ 2 μg/μl。通过将一瓶 Alexa Fluor647 在 20 μl DMSO 中重建而制备 Alexa Fluor 647 NHS 酯储备溶液。将该溶液在 -20℃ 储存至多 1 个月。将 3 μl 的 Alexa Fluor647 储备溶液与抗体溶液在黑暗中混合 1 小时。其后,向抗体 Alexa Fluor647 溶液添加 7.5 μl 的 1M Tris 并混合。将该溶液用 YM-30 超滤以除去低分子量组分。通过添加 PBS 将含有与 Alexa Fluor647 缀合的抗体的保留物的体积调节至 200 μl ~ 400 μl。向溶液中添加 3 μl 110%NaN<sub>3</sub>。将所得溶液转移至 Ultrafree0.22 离心单元并在 12,000 × g 离心 2 分钟。收集含有缀合抗体的滤液并用于测试中。

[0250] 程序:通过将 cTnI 标准物的储备溶液在标准稀释剂中连续稀释来制备标准物(0 ~ 900pg/ml),以便获得 1.2pg/ml ~ 4.3 μg/ml 的 cTnI 浓度。向合适的板的各孔内添加 10 μl 被动阻断溶液和 10 μl 标准物或样品。将标准物以四等分试样运行。优选用低荧光封口膜将板密封、在 300RPM 离心 1 分钟并在 25℃ 振荡时温育 2h。将板洗涤 5 次,并在纸巾上进行离心直至电机在反转位置达到 3000RPM。制备检测抗体的 1nM 工作稀释液,并将 20 μl 检测抗体添加至各孔内。将板密封并离心,然后在振荡时将测试在 25℃ 温育 1h。向各孔添加 30 μl 洗脱缓冲液,然后将板密封并将测试在 25℃ 温育半小时。可以立即对板进行分析,或将其在 4℃ 储存至多 48h 然后进行分析。

[0251] 为进行分析,以 40 μl/分钟对每孔采集 20 μl,并以 16.7mm/秒的扫描速率对 5 μl 进行分析。基于 4 标准偏差 (σ) 来分析数据。将原始信号对标准物浓度作图。对于较低浓度范围进行线性拟合,而对于整个标准曲线进行非线性拟合。检出限 (LOD) 经计算为 LOD=(3 × (0 样品的 σ))/线性拟合斜率。从对于样品信号适当的线性或非线性等式确定样品浓度。

[0252] 然后将样品板加载至扫描单分子分析器中。通过使询问空间通过样品来测定单独标记的抗体,询问空间的通过速度使得在激光激发后来自仅一个荧光标记的发射在受限空间中被检测到。总荧光信号是如上所述的个体荧光信号的总和。

[0253] 实施例 3 :基于夹心珠的 TnI 测试

[0254] 上述测试使用其中采用塑料表面来固定靶标分子的微滴定板形式。单颗粒分析器系统还与在溶液中进行的测试相容,所述测试使用微粒或珠来分离结合和未结合的实体。

[0255] 材料 :MyOne 抗生物素链霉亲和蛋白 C1 微粒 (MP) 获自 Dynal (650.01-03, 10mg/ml 储备溶液)。所用缓冲液包括 :(a) 10× 硼酸盐缓冲盐水 Triton 缓冲液 (BBST) (1.0M 硼酸盐、15.0M 氯化钠、10%Triton X-100, pH8.3) ;(b) 测试缓冲液 (2mg/ml 普通山羊 IgG、2mg/ml 普通小鼠 IgG 和处于 0.1M Tris (pH8.1) 中的 0.2mg/ml MAB-33-IgG 聚合物, 0.025M EDTA、0.15M NaCl、0.1%BSA、0.1%Triton X-100 和 0.1%NaN<sub>3</sub>, 于 4°C 储存) ; 和 (c) 洗脱缓冲液 (带有 4M 脲、0.02%Triton X-100 和 0.001%BSA 的 BBS, 于 2°C~8°C 储存)。用于基于珠的夹心测试的抗体包含 :(a) Bio-Ab (具有 1~2 生物素 /IgG 的 A34650228P(BiosPacific)) ; 和 (b) Det-Ab (缀合有 Alexa Fluor647 的 G-129-C(BiosPacific), 2~4 个荧光物 /IgG)。标准物为重组人心肌肌钙蛋白 I(BiosPacific, 目录号 J34120352)。校正物稀释液是带有 EDTA 的 30mg/ml BSA 在 Tris 缓冲盐水 (TBS) 中的溶液。

[0256] 微粒涂布 :将 100 μl 的 MP 储备溶液置于 Eppendorf 管中。通过应用磁体、除去上清液、除去磁体和在洗涤缓冲液中重悬来将 MP 用 100 μl BBST 洗涤缓冲液洗涤 3 次。洗涤后将 MP 重悬于 100 μl 测试缓冲液中, 并加入 15 μg Bio-Ab。将混合物在室温恒定混合下温育 1h。如上所述用 1ml 洗涤液将 MP 洗涤 5 次。洗涤后将 MP 重悬于 15ml 测试缓冲液中 (或 100 μl, 以在 4°C 储存)。

[0257] 标准物和样品的制备 :将标准物用校正稀释剂稀释以制成正确的标准曲线, 通常为 200pg/ml ~ 0.1pg/ml。将冷冻血清和血浆样品在室温 13,000rpm 离心 10 分钟。小心地将澄清后的血清或血浆移除以避免团粒或漂浮物, 并转移至新管内。将各 50 μl 的标准物和样品移液至适当孔内。

[0258] 捕获靶标 :在重悬于 15ml 含 400mM NaCl 的测试缓冲液中之后, 将 150 μl MP 添加至各孔内。将混合物在 Boekel Jitterbug 微孔板温育振荡器上于室温温育 1h。

[0259] 洗涤和检测 :将板置于磁体上, 并在让磁体捕获 MP 之后除去上清液。将板从磁体移除后, 添加 250 μl 洗涤缓冲液。再次将板置于磁体上, 并在让磁体捕获 MP 之后除去上清液。向每孔添加 20 μl Det-Ab。如果需要可将 Det-Ab 首先在含 400mM NaCl 的测试缓冲液中稀释至 500ng/ml。将混合物在 Boekel Jitterbug 微孔板温育振荡器上于室温温育 30 分钟。如上所述将板用洗涤缓冲液洗涤 3 次。洗涤后, 添加 250 μl 洗涤缓冲液, 并将样品转移至新的 96 孔板中。将洗涤步骤重复 2 次。然后添加 20 μl 洗脱缓冲液, 并将混合物在 Boekel Jitterbug 微孔板温育振荡器上于室温温育 30 分钟。

[0260] 过滤 MP 和转移至 384 孔板 :将标准物和样品转移至置于 384 孔测试板顶部的 384 孔过滤板内。将板在室温 3000rpm 离心。除去过滤板并添加合适的校正物。将板覆盖并准备进行扫描单分子检测。

[0261] 扫描单分子检测器 :利用电磁辐射源扫描样品孔中的样品。使询问空间迁移通过样品。以足够慢的速度扫描样品, 从而在样品扫描期间可以测定经个别标记的抗体。这可通过将询问空间设定为使得在激光激发之后仅一个荧光分子在存在时的发射能在受限的空间中被检测到而实现。以每个信号表示一个数字事件, 从而该设置能够实现极高的分析灵敏度。总荧光信号作为个体数字事件的总和而确定。对于数百至数千的受检测事件 / 样

品,每个经计数的分子是一个阳性数据点。本发明的 cTnI 测试的检出限通过平均值加  $3\sigma$  方法确定(见上)。

[0262] 尽管在本文中已经显示并描述了本发明的优选实施方式,但对于本领域技术人员显而易见的是,此类实施方式仅作为实例的方式给出。在不脱离本发明的情况下,多种变形形式、变化形式和替代形式将对本领域技术人员显而易见。应该理解,在实践本发明时可以采用本文所述的发明实施方式的各种替代方案。本文意在使后续权利要求对本发明的范围进行限定且由此将这些权利要求及其等价方式内的方法和结构被涵盖在内。

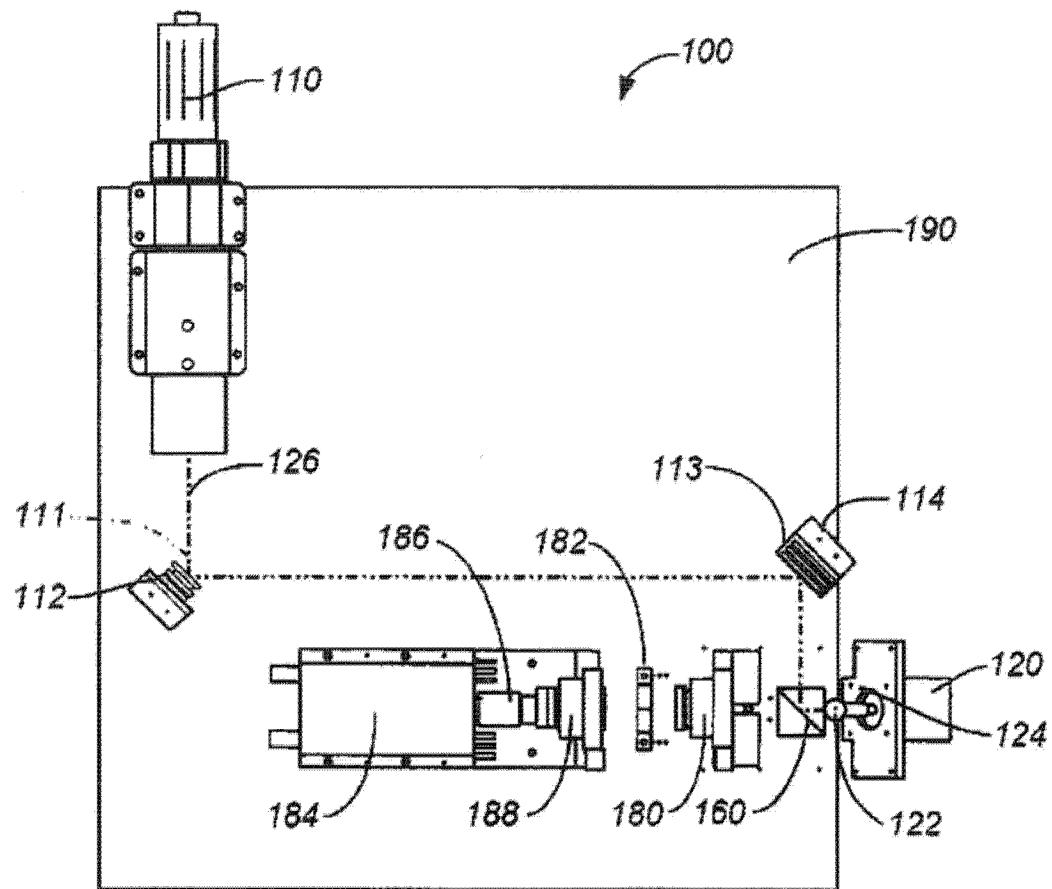


图 1A

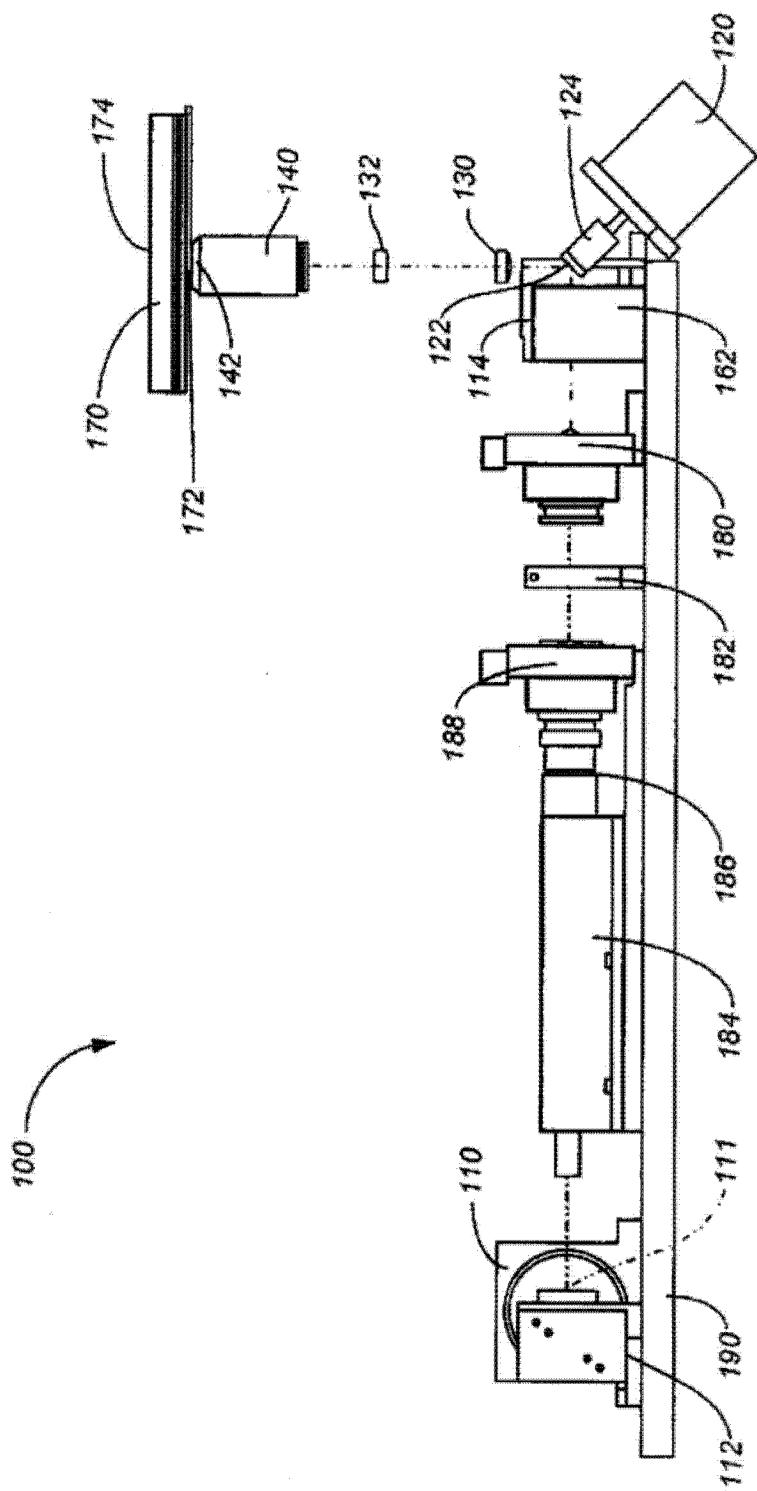


图 1B

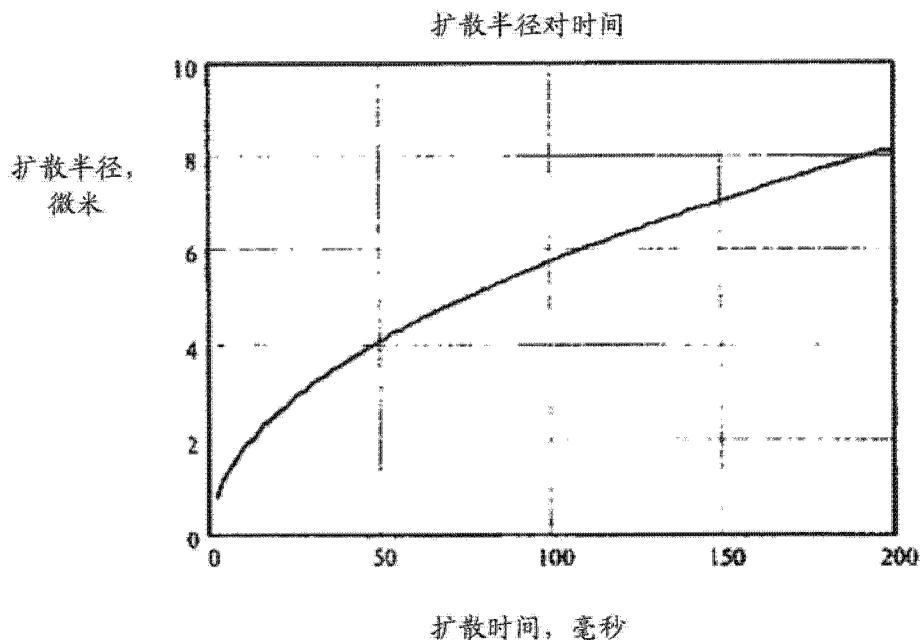


图 2

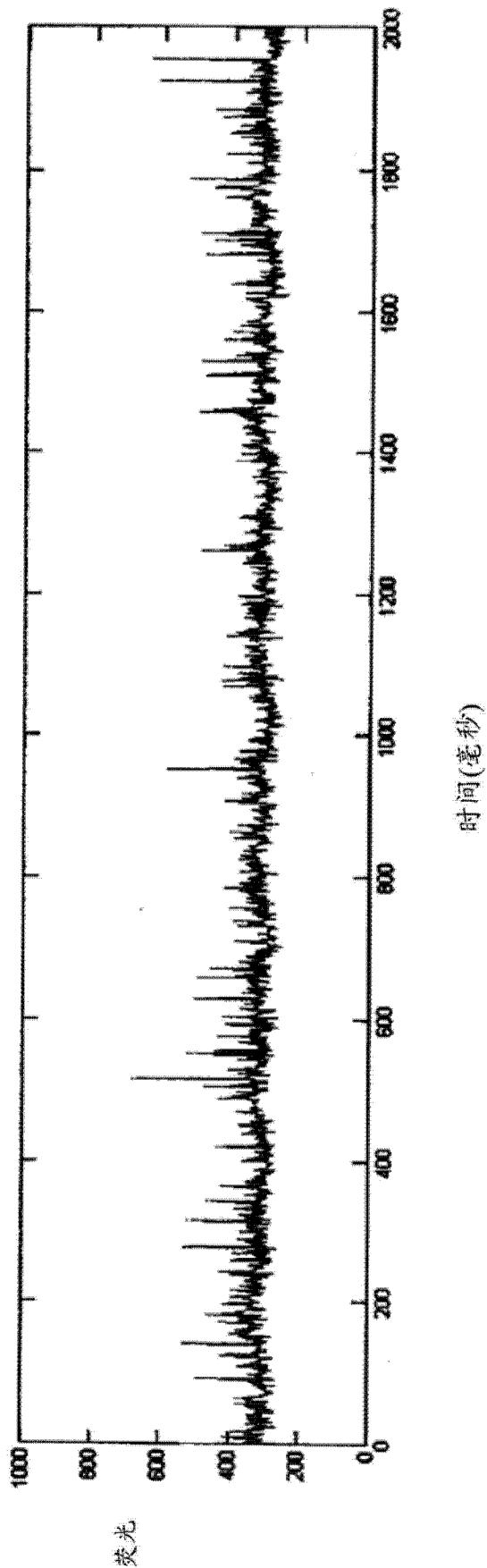


图 3

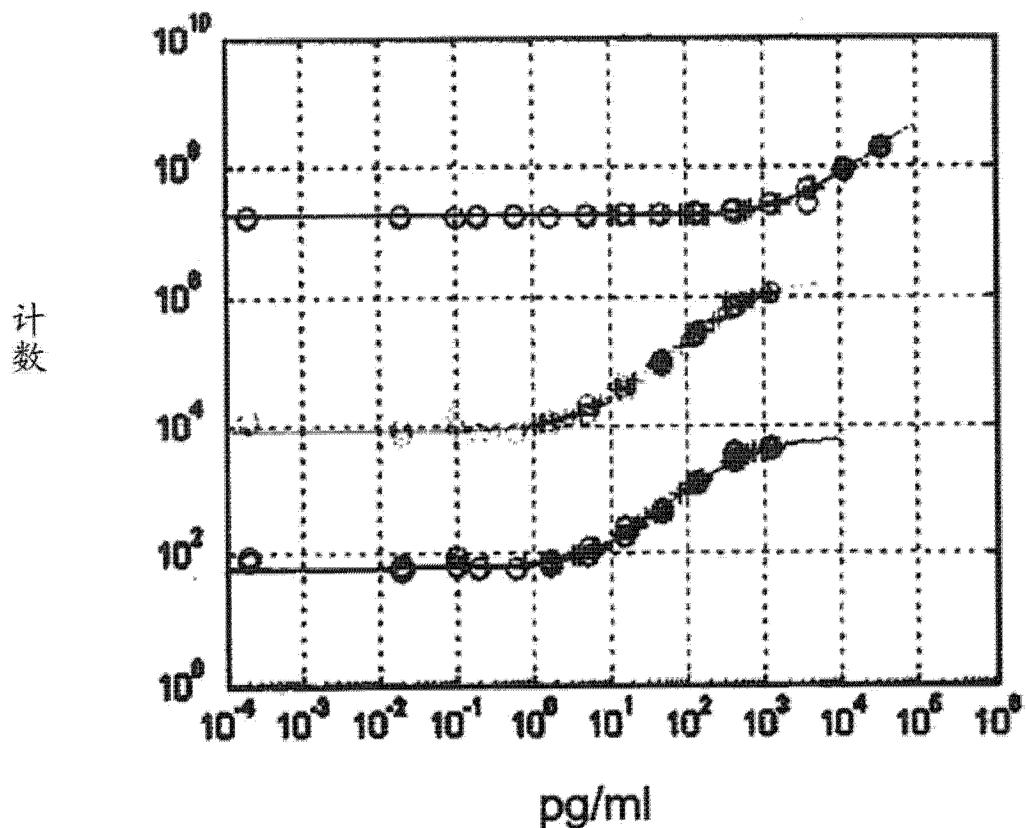


图 4