



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103917870 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201280053829. 7

(22) 申请日 2012. 11. 16

(30) 优先权数据

61/560, 752 2011. 11. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 04. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/065683 2012. 11. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2013/075031 EN 2013. 05. 23

(73) 专利权人 贝克顿·迪金森公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 黄伟 斯科特·博恩海默

(74) 专利代理机构 北京友联知识产权代理事务

所（普通合伙） 11343

代理人 尚志峰 汪海屏

(51) Int. Cl.

G01N 33/50(2006. 01)

G01N 35/08(2006. 01)

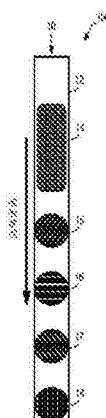
权利要求书2页 说明书25页 附图7页

(54) 发明名称

用于检测样品中的分析物的方法和系统

(57) 摘要

本披露提供了用于对一个样品中一种或多种分析物进行检测的方法。这些方法的方面包括使一个样品（例如，一种生物样品，例如血液）流经一个通道，该通道包括与其表面稳定结合的一个分析物特异性捕获域，其中该分析物特异性捕获域包括针对一种分析物展示一种特异性结合成员的颗粒；并且对该分析物特异性捕获域进行成像以检测该分析物是否存在该样品中。还提供了可以在实践这些主题方法中使用的系统、装置以及试剂盒。如在此所述的方法和组合物发现可用于多种不同的应用中，包括诊断应用。



1. 检测一种分析物是否存在于一个样品中的方法,该方法包括:

使该样品流经一个毛细管通道,该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个第一分析物特异性捕获域,其中该第一分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒;并且

对该第一分析物特异性捕获域进行成像以检测该分析物是否存在于该样品中,其中该成像是在没有将这些颗粒从该样品中分离的情况下进行的;

其中该毛细管通道具有一个高度,该高度是颗粒直径的50倍或更小。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中该检测是定量的。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中该检测是定性的。

4. 根据权利要求1所述的方法,包括在使该样品流经该毛细管通道之前对该样品进行标记。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中这些颗粒是珠粒。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中这些颗粒是细胞。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中该样品是一种生物样品。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中该样品是来自人类。

9. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括基于该分析物是否存在于该样品中,生成一个诊断性报告。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中这些颗粒与该毛细管通道的一个上表面缔合,并且该成像是从该毛细管通道的所述上表面之上进行的。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个第二分析物特异性捕获域,其中该第二分析物特异性捕获域包括在其表面上对于一个第二分析物展示一种特异性结合成员的颗粒;并且其中该方法进一步包括对该第二分析物特异性捕获域进行成像,以检测该第二分析物是否存在于该样品中。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中该第一和第二分析物特异性捕获域位于该毛细管通道中不同的位置处。

13. 用于检测一种分析物是否存在于一个样品中的一种系统,该系统包括:

一个毛细管通道,该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度是颗粒直径的50倍或更小;以及

一个成像器,该成像器被配置为从该分析物特异性捕获域获得一个图像,其中,所述成像器被配置为在没有将这些颗粒从该样品中分离的情况下检测所述分析物特异性捕获域中的所述分析物。

14. 根据权利要求13所述的系统,其中该系统进一步包括一个处理模块,该处理模块被配置为基于从该成像器获得的该图像来输出关于该分析物是否存在于该样品中的一个结果。

15. 一种用于检测一种分析物是否存在于一个样品中的装置,该装置包括:

一个毛细管通道,该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特

异性结合成员的捕获珠粒，其中该毛细管通道具有一个高度，该高度是颗粒直径的50倍或更小。

16. 使得对于一种分析物展示一种特异性结合成员的捕获珠粒与一个毛细管通道的一个内表面稳定缔合的一种方法，该方法包括：

用氧等离子体处理该毛细管通道的该表面，以产生一种等离子体蚀刻的表面；并且将这些捕获珠粒与该毛细管通道的该内表面稳定缔合，以将这些捕获珠粒沉积在该等离子体蚀刻的表面上。

17. 一种用于检测分析物是否存在于样品中的试剂盒，包括：

一个毛细管通道，该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个分析物特异性捕获域，其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒，其中该毛细管通道具有一个高度，该高度是颗粒直径的50倍或更小；以及

一个分析物特异性标记，其中，所述分析物特异性捕获域中的所述分析物被配置为是在没有将这些颗粒从该样品中分离的情况下被检测的。

## 用于检测样品中的分析物的方法和系统

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C. §119(e),本申请案要求2011年11月16日提交的美国临时专利申请序列号61/560,752的提交日期的优先权;将该申请案的披露通过引用结合于此。

[0003] 简介

[0004] 定点照护(point-of-care, POC)测试协助疾病的诊断,尤其是在医疗保健公共设施薄弱的资源受限的环境中,并且质量和及时的医疗护理的获得是一个挑战。POC测试常常提供快速的结果,允许及时启动适当的治疗。重要地,POC测试可以常常足以简单的而可在初级护理水平上使用,并且可用在具有很少至没有实验室公共设施的远程环境中。因此,POC测试提供了超过其他类型测定的某些优点,例如基于流式细胞术的微粒免疫测定,这提供了高的准确性和多路复用,但由于繁琐的样品制备和昂贵的仪器对于POC环境常常是不适当的。

[0005] 例如,POC测试协助HIV/AIDS的诊断或治疗。在大多数资源受限制的国家中,对于HIV/AIDS的抗逆转录病毒疗法的合格性是基于CD4+T-淋巴细胞的计数。传统的CD4计数技术要求静脉血样品由实验室处理。在对于HIV感染的测试阳性之后,患者立即提供血液样品,或如果HIV咨询和测试地点不取血液样品则求助于另一机构。然后将血液样品送至实验室,以用于处理使用,例如基于流式细胞术的测定。取决于实验室能力,在患者已经提供样品之后,结果典型地获得于2天与14天之间。患者被要求返回诊所,以接收他们的结果,在此之后,他们可以就未来的HIV护理和/或治疗受到建议。然后,在此类环境中大约40%的患者不提供血液样品或不返回至诊所来获得他们的结果。在患者仍然处于临床环境中时,POC测试可以通过简化血液收集过程并且通过使这些结果可获得来协助HIV/AIDS的诊断。另外,POC测试可以有潜力地允许此类患者在他们家的隐私中进行自我测试,尤其是用于受非难的疾病例如HIV/AIDS。

[0006] 对感染性疾病的大多数POC测试对于每个测试仅提供单个诊断。近来,多路复用的POC测试已经得以开发,例如Multiplo® POC测试(MedMira公司,NS,加拿大)。多路复用的POC测试可以原则上诊断多重感染性疾病,由此提供多个病症(例如,HIV、乙型和丙型肝炎、梅毒等)的同时检测的希望,并对患者和提供者具有更大的便利性。然而,当前,在现实世界环境中它们的性能的证据是有限的。使用在定点照护时可获得的廉价且容易的技术,从单个样品(例如,单个手指针刺血滴)中对多重感染性疾病的快速诊断会大大改进全球健康结果。

[0007] 概述

[0008] 本披露提供了用于对一个样品中一种或多种分析物进行检测的方法。这些方法的方面包括使一个样品(例如,一种生物样品,例如血液或血液产品)流经一个通道,该通道包括与其表面稳定结合的一个分析物特异性捕获域,其中该捕获域包括针对一种分析物展示一种特异性结合成员的颗粒;并且对该分析物特异性捕获域进行成像以检测该分析物是否存在于该样品中。还提供了可以在实践这些主题方法中使用的系统、装置以及试剂盒。这些方法和组合物发现在各种不同应用中可使用,包括诊断性应用、环境测试应用等。

[0009] 本披露提供了用于检测分析物是否存在于样品中的方法,这些方法包括使该样品流经一个毛细管通道,该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定结合的一个分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒;并且对该分析物特异性捕获域进行成像以检测该分析物是否存在于该样品中。感兴趣的颗粒包括但不限于珠粒(例如,对于分析物展示特异性结合成员的捕获珠粒)、抗体和其抗原结合片段、核苷酸序列等等。

[0010] 本披露还提供了用于检测多个分析物(例如,2个或更多个分析物,例如,大约3至5个分析物,大约5至8个分析物,大约8至12个分析物,等)是否存在于样品中的方法。例如,为了检测第一和第二分析物,这些方法可以包括使该样品流经一个毛细管通道,该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定结合的第一和第二分析物特异性捕获域,其中该第一分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该第一分析物展示一种特异性结合成员的颗粒,并且其中该第二分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该第二分析物展示特异性结合成员的颗粒;并且对该第一和第二分析物特异性捕获域进行成像,以检测该第一和第二分析物是否存在于该样品中。第一和第二结合成员域可以位于在毛细管通道中的不同位置处。此类方法可以被适配为通过例如添加针对于那种分析物的第三、第四、第五等等分析物特异性捕获域来检测第三、第四、第五等等分析物是否存在于样品中。

[0011] 本披露的实施例使得能够快速检测样品中的一种或多种分析物(例如,2种或更多种,例如3、4、5种等)。这种检测可以是定性的和/或定量的。各种分析物可以通过本披露的方法来检测,包括生物和/或非生物来源的分析物(例如,化学的和/或合成的分析物)。感兴趣的分析物包括但不限于细胞、抗体、多肽、多核苷酸、等。在某些方面,分析物是一种生物标志。因此,本披露的方法可以协助在一位受试者中从获得自该受试者的生物样品中对一种或多种病症的检测、监测、和/或诊断。这些方法的实施例经得起POC测试以使用廉价技术从单个生物样品(例如,单个手指针刺血滴)中检测多重感染性疾病的考验。

[0012] 这些方法的方面包括生成一个报告,该报告基于检测分析物是否存在于获得自受试者的样品中来指示受试者患有一种或多种病症的可能性。本披露的方法可以包括:基于一种或多种病症的可能性来选择用于受试者的疗法。本披露的方法可以包括:基于一种或多种病症的可能性来给予用于受试者的疗法。在受试者经受治疗时,本披露的方法可以包括:基于一种或多种测定的结果来修饰用于受试者的疗法。

[0013] 本披露的方法可以用于广泛的样品类型,包括含有有机和/或非有机材料的样品。有机材料可以是生物或非生物来源。感兴趣生物样品的实例包括但不限于血液(例如,全血)、唾液、尿液、胆汁、等等。此类样品可以获得自体外来源(例如,来自培养生长的实验室细胞的细胞悬浮液)或获得自体内来源(例如,哺乳动物受试者、人类受试者、等)。在其他方面,样品仅包括非有机材料,例如化学来源(例如,合成)的材料。在某些实施例中,样品包括有机和非有机材料两者。

[0014] 本披露的方法的方面包括对一种分析物进行标记。分析物的标记可以是直接的或间接的,如在此更完整地描述的。在某些方面,在使样品流经毛细管通道之前将样品进行标记。实施例进一步还包括或取而代之地,在使样品流经毛细管通道之后,使分析物特异性标记流经毛细管通道。可以使用广泛的标记来实践主题方法,其中感兴趣标记包括但不限于吲哚碳菁(C3)、吲哚二碳菁(C5)、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、德克萨斯红(Texas Red)、太

平洋蓝(Pacific Blue)、俄勒冈绿(Oregon Green)488、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)-355、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)488、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)532、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)546、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)-555、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)568、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)594、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)647、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)660、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)680、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)700、JOE、丽丝胺(Lissamine)、罗丹明绿(Rhodamine Green)、BODIPY、异硫氰酸荧光素(FITC)、羧基荧光素(FAM)、藻红蛋白、罗丹明、二氯罗丹明(dRhodamine)、羧基四甲基罗丹明(TAMRA)、羧基-X-罗丹明(ROX)、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、PicoGreen、RiboGreen、等等。

[0015] 本披露还提供了用于检测分析物是否存在于样品中的装置。这些装置的方面包括一个毛细管通道，该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个分析物特异性捕获域，其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒(例如，捕获珠粒)。还提供了制作装置的方法。例如，提供了用于稳定缔合颗粒(例如，捕获珠粒)与通道表面(例如，塑料毛细管通道)的方法，这些颗粒对于分析物展示特异性结合成员。

[0016] 本披露进一步提供了用于检测分析物是否存在于样品中的系统。本披露的系统的实施例方面包括一个毛细管通道，该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个分析物特异性捕获域，其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒；以及成像器，该成像器被配置为从分析物特异性捕获域获得图像。感兴趣的成像器包括但不限于显微镜(例如，低功率显微镜)、照相机(例如，CCD照相机)、光学扫描器等等。系统可以包括一种处理器，例如包含在处理模块中的处理器，该处理模块被配置为基于从该成像器获得的该图像来输出关于该分析物是否存在于该样品中的一个结果。

[0017] 本披露还提供了试剂盒(例如包括一种或多种分析物特异性标记的试剂盒)，以及包括毛细管通道的装置，该毛细管通道包括在已知位置处与其内表面稳定缔合的分析物特异性捕获域，其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示特异性结合成员的颗粒(例如，如上所述的装置)。

[0018] 在回顾本披露时，这些和其他方面将对于本领域的普通技术人员来说是清楚的。

[0019] 从20世纪60年代早期开始，免疫测定已经变成广泛用于临床诊断和生命科学研究中的至关重要的生物分析技术。常规的免疫测定技术，例如ELISA(酶联免疫吸附测定)，将生物分子(例如生物分子)的结合特异性与标记(例如，放射性同位素、酶和荧光标记)的灵敏性相结合，并且提供了低成本进行生物分析的实用方案。然而，这些测定典型地需要在最终测量之前进行大量液体分离(即洗涤)步骤以去除未结合的标记分子，并且对于需要高水平自动化的更高通量的应用或者需要用户友好型和低成本测定程序的定点照护应用不是最适的。在最近三十年中，已经开发并上市了许多非洗涤免疫测定技术，包括EMIT(酶倍增免疫测定技术)、CEDIA(克隆酶供体免疫测定)、LOCI(发冷光氧通道传输测定)、TR-FRET(时间分辨荧光共振能量转移)以及荧光偏振。这些技术需要对感测生物分子或仪器的复杂的制备，并且具有受限制的应用，具体而言是在定点照护应用中。

[0020] 为了解决对于适用于从小容量样品(例如，手指针刺全血)中对多重疾病同时检测

的多路复用定点照护免疫测定的未满足的需要,我们已经开发了将多路复用微粒免疫测定与微流体测定设计和廉价的数据成像/图像处理结合的新颖方法,制成了在不进行样品制备的情况下用于准确测量全血中的感染性疾病标志的易于生产平台。在常规ELISA测定中正常需要的洗涤步骤是通过以下方式来去除:在减少来自测定溶液中的未结合标记分子的干扰的同时,特异地测量微粒上所结合的荧光标记分子。不像常规测定—其中在没有空间分离的情况下从大量体积的测定溶液对结合的光学信号进行测量,数据成像提供了样品中详细的二维信息。采用成像过程和计算机分析,来自每个微粒的光强度可以特异地在二维空间中进行测量。在此所述的我们的新方法的另一方面是限定的高度与粒度之比。在通道高度与颗粒之比为50或更少的情况下,在第三z维度上样品和未结合的荧光标记的干扰受到限制。与典型的基于微量滴定板的ELISA测定设置(其中,从板的顶部,通过几毫米的包含未结合标记分子和其他潜在干扰物质的测定溶液,对来自结合在微量滴定板的底部上的标记分子的结合光信号进行测量)相比,我们的新方法涉及用薄层测定流体对微粒进行成像,由此使测定能够在不需要洗涤步骤的情况下得以进行。作为实例,在我们的发明的一个实施例中,在50 $\mu\text{m}$ 高度的流体通道内对7.5 $\mu\text{m}$ 直径的微粒进行成像,由此显著地减少来自样品溶液的干扰并且去除了测定溶液的大量分离(洗涤)的需要。

[0021] 附图简要说明

[0022] 当结合附图阅读时,本发明可以从以下详细说明书得到最好的理解。以下图包括在附图中:

[0023] 图1提供了本披露的方法和装置的某些实施例的示意图。

[0024] 图2,图A-B提供了本披露的实施例的示意图。图A:本披露的方法和装置的某些实施例的示意图,使用HIV作为实例。图B:在实例中描述的实验测定的示意图。

[0025] 图3,图A-B提供了在流体流入筒内之后显示装置表面化学对珠粒粘附至毛细管通道表面上的能力的作用的图像。图A:BD TruCount<sup>TM</sup>珠粒粘附至塑料装置的毛细管通道,其中将该装置表面用氧等离子体进行处理。图B:珠粒失去在未用氧等离子体进行处理的筒表面上的粘附性,并且被洗掉。箭头指示已经由于流体经由毛细作用流动通过毛细管通道而移动的捕获珠粒。

[0026] 图4,图A-C提供了使用本披露的方法和装置利用固定化BDCompBead(用抗小鼠Ab包被)对全血中的标记的小鼠抗体进行检测而获得的数据。误差条代表在单个通道中3个重复(FOV)的标准偏差。图A-C显示了分别用APC、PE-Cy5、和PE标记的小鼠抗体的检测。

[0027] 图5是根据本披露的实施例的筒型装置的图示。

[0028] 详细说明

[0029] 本披露提供了用于对一个样品中一种或多种分析物进行检测的方法。这些方法的方面包括使一个样品(例如,一种生物样品,例如血液或血液产品)流经一个通道,该通道包括与其表面稳定结合的一个分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括针对一种分析物展示一种特异性结合成员的颗粒;并且对该分析物特异性捕获域进行成像以检测该分析物是否存在于该样品中。还提供了可以在实践这些主题方法中使用的系统、装置以及试剂盒。

[0030] 在更详细地描述本发明之前,应理解的是本发明不被限制于描述的具体实施例,因为这些可以改变。还应理解的是,在此使用的术语仅是出于描述具体实施例的目的,并且

不旨在限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0031] 在提供了一个范围的值时,应理解每个中间值,到下限的第十个单位(除非上下文清晰地另外指示),该范围的上限与下限之间以及任何其他陈述的或在该范围内的中间值均被涵盖在本发明之内。这些更小范围的上限和下限可以独立地被包括在更小范围之内,并且也被涵盖在本发明之内,服从于在所陈述范围内任何确切排除的限制。在所陈述的范围包括一个或两个限制时,排除了那些被包括的限制的任一个或两者的范围也被包括在本发明之内。

[0032] 除非另外限定,在此使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员所一般理解的具有相同含义。虽然类似于或等同于在此描述的那些的任何方法和材料也可以用于本发明的实践或测试中,现在将对代表性说明性方法和材料进行描述。

[0033] 在本说明书中引用的所有公开物和专利通过引用结合于此,就像每个单独公开物或专利被确切地并且单独地指示为通过引用被结合并且通过引用结合于此,以结合所引用的这些公开物来披露和描述这些方法和/或材料。任何公开物的引用是针对其在提交日期之前的披露,并且不应该理解为承认因为在先发明而本发明无权先于此些公开物。另外,提供的公开物的日期可以不同于真实公开日期,真实公开日期可能需要被独立核实。

[0034] 应指出,如在此使用的,并且在所附权利要求书中,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”、以及“该(the)”包括复数指代物,除非上下文另外清晰地指示。另外指出的是,权利要求书可以撰写为排除任何可选择的要素。这样,本声明旨在充当对于此类与权利要求要素的叙述相结合的排除性术语如“单独地(solely)”、“仅(only)”等等的使用,或“否定型”限制的使用的先行基础。

[0035] 如将对于本领域技术人员清楚的是,在阅读本披露时,在此描述和展示的单独实施例的每一个具有离散的构成和特征,这些构成和特征可以在不偏离本发明的范围或精神的情况下易于与任何其他一些实施例的特征分离或与其组合。可以按照所叙述的事件的顺序或按照逻辑上可行的任何其他顺序来进行任何叙述的方法。

#### [0036] 方法

[0037] 如上所述,本披露提供了用于检测分析物是否存在与样品中的方法。这些方法的方面包括使一个样品(例如,一种生物样品,例如血液或血液产品)流经一个通道,该通道包括与其表面稳定结合的一个分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括针对一种分析物展示一种特异性结合成员的颗粒;并且对该分析物特异性捕获域进行成像以检测该分析物是否存在与该样品中。

[0038] 这些方法的实施例包括对来自单个样品中的多于一种的分析物进行检测,即多路复用分析物检测。因此,本披露提供了用于鉴定来自单个样品的多个分析物的多路复用测定。这些主题方法可以用于检测是否有2种或更多种分析物存在于样品中,包括3种或更多种,例如大约2种至100种分析物,例如3至5种分析物,5至8种分析物,8至12种分析物,12至15种分析物,15至20种分析物,20至30种分析物,30至40种分析物,40至50种分析物,50至60种分析物,60至70种分析物,70至80种分析物,80至90种分析物,或90至100种分析物。因为根据某些实施例的测定具有针对分析物检测的空间构成,例如在毛细管通道表面上的捕获域的位置唯一地鉴定出捕获域靶向的那种分析物,可以在一些情况下针对100种或更多种分析物对一种样品进行筛选。

[0039] 例如,为了检测第一和第二分析物,这些方法可以包括使该样品流经一个毛细管通道,该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定结合(例如固定)的第一和第二分析物特异性捕获域,其中该第一分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该第一分析物展示一种特异性结合成员的颗粒,并且其中该第二分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该第二分析物展示特异性结合成员的颗粒;并且对该第一和第二分析物特异性捕获域进行成像,以检测该第一和第二分析物是否存在于该样品中。第一和第二结合成员域可以位于在毛细管道中的不同位置处。此类方法可以被适配为通过例如添加针对于那种分析物的第三、第四、第五等等分析物特异性捕获域来检测第三、第四、第五等等分析物是否存在于样品中。

[0040] 在一些实施例中,检测一种或多种目标分析物是否存在于样品中的方法可以在3小时或更短时间内完成,包括60分钟或更短,例如30分钟或更短,20分钟或更短,10分钟或更短,5分钟或更短,或1分钟或更短。这样,这些方法的方面可以用于POC测试中。

[0041] 在一些情况下,这些测定是“免洗”测定。通过免洗测定,意指在捕获步骤与成像步骤之间不包括洗涤步骤的方案。这样,在样品与捕获域接触之后,不对捕获域进行洗涤或以其他方式处理,以在成像之前去除样品组分。换言之,在不用首先将任何样品组分从捕获域去除的情况下,从捕获域获得图像。

[0042] 在一些实施例中,本发明的检测分析物是否存在于样品中的方法是定性的,其中分析物的检测是定性的,例如,对该分析物存在或不存在于样品中作出确定。在一些实施例中,本发明的检测分析物是否存在于样品中的方法是定量的,其中该分析物的检测是定量的。这些方法可以包括确定样品中的分析物颗粒(例如,抗体)的数目的定量测量。在一些实施例中,对样品中的分析物颗粒的数目的定量包括确定分析物颗粒存在于的数目是否在预定阈值之上或之下。

[0043] 图1提供了本披露的实施例的示意图。在这个实施例中,样品10被引入毛细通道12中。通道12包含含有试剂14的区域。在此区域中的试剂可以被保存和/或干燥。样品10在此区域14上流动,与可能存在的任何试剂混合。然后样品在一种或多种分析物特异性捕获域上流动(例如,经由毛细管作用)。在呈现于图1中的图示中,该实例提供了一个用于检测第一分析物的第一分析物特异性捕获域15,一个用于检测第二分析物的第二分析物特异性捕获域16,一个用于检测第三分析物的第三分析物特异性捕获域17,以及一个用于检测第四分析物的第四分析物特异性捕获域18。可以对各个分析物特异性捕获域15-18进行成像以检测对应的分析物是否存在于样品10中。在一些情况下,可以采用成像工具(如通过装置和/或算法所实施的)来获得对每个珠粒的独立测量(相同测定),将这些独立测量进行统计学上的组合以给出一个总体结果。相应地,图1展示多路复用测定。

[0044] 图2图A提供了本披露的实施例的示意图。在这个非限制性实例200中,将样品20(例如,全血)加载到筒装置(例如,如更详细地描述于下文的,参见例如图5)的具有宽度w(例如w=3mm、5mm等)的毛细通道22内。通道22被设计为将保存的试剂24(例如,保存的抗人抗体-别藻蓝蛋白(APC))通过引入样品20而悬浮,与样品20混合,并且然后进入捕获域25和26。插图显示了通道12和捕获域26的特写侧视图。通道12具有高度h,其中h等于:比被包含在捕获域26中的颗粒的平均直径大50倍或大了小于50倍。此捕获域26包含加载在通道顶表面(例如,最接近成像器的表面)上的颗粒。这些颗粒展示结合成员28(例如,gp41抗原),该

结合成员结合至存在于样品20中的目标分析物30(例如,抗-gp41抗体)。标记32(例如,保存的抗人抗体-别藻蓝蛋白(APC))也结合,导致复合物的形成(例如,颗粒/抗-gp41抗体/APC-抗人抗体复合物,参见例如图2,图B)。可以使用任何便利的方案(例如,使用LED,例如红光LED)进行分析物特异性捕获域的成像(底部图像)。在某些方面,在不用将颗粒从样品分离的情况下,进行成像。可以从通道22的顶部进行成像。在成像中,可以通过任何便利的方案测量荧光,以提供定性或定量测量,例如通过以下方式测量荧光:使用带CCD-照相机检测器和适当滤光器的低功率显微镜经由通过筒顶部进行成像。可以在图像处理和分析之后对颗粒上的荧光强度进行定量。对于多路复用测定,可以将用不同疾病相关抗原包被的颗粒粘在毛细管通道中的唯一位置处。以此方式,相同的标记可以用于所有的捕获域,简化了成像方案,因为可以采用图像的位置来确定分析物的身份。可替代地,两种或更多种捕获域可以存在于通道的重叠位置中或相同位置中,例如,其中对于每个分析物采用不同的标记,或其中对于珠粒鉴定的可替代标准例如另外检测通道中的大小或强度用于使来自多重测定的珠粒处于重叠位置。

[0045] 现在将在下文更详细地描述这些方法的不同步骤和方面。

[0046] 分析物

[0047] 如上所述,本披露提供了用于检测分析物是否存在于样品中的方法。术语“分析物”被广泛地使用并且大体上在此是指有待检测的兴趣化合物或组合物。

[0048] 各种分析物可以通过本披露的方法来检测,包括生物和/或非生物来源的分析物(例如,化学的和/或合成的分析物)。感兴趣分析物的实例包括但不限于细胞、药物、激素、多肽、蛋白质(例如,抗体)、多糖、核酸、化学品、重金属、病原体(例如,细菌、朊病毒、真菌、病毒,等)及其组合。

[0049] 在某些方面,分析物是一种生物标志。如在此使用的“生物标志”大体上是指有机生物分子(例如,抗体),当与另一种表型状态(例如,不患有一种疾病或患有不同的疾病)相比时,该有机生物分子有区别地存在于从具有一种表型状态(例如,患有该疾病)的受试者中取得的样品中。如果相对于第二表型状态在第一表型状态中的生物标志的平均或中值水平被计算为代表统计学上的显著差异,则生物标志区别性地存在于不同的表型状态之间。对于统计学显著性的一般测试(除了其他之外)包括t-检验、ANOVA、克鲁斯卡尔-沃利斯(Kruskal-Wallis)、威尔科克森(Wilcoxon)、曼-惠特尼(Mann-Whitney)以及让步比。单独或组合的生物标志提供了受试者属于感兴趣表型状态的相对可能性的量度。这样,生物标志可以发现作为用于例如以下项的标志的用途:疾病(诊断)、药物治疗效果(治疗诊断)等等。因此,生物标志是在测定中协助诊断、治疗诊断等等的分析物。

[0050] 适用于鉴定一种或多种病症(例如,感染性疾病)的兴趣的生物标志包括但不限于描述于例如感染性疾病生物标志数据库(*Infectious Disease Biomarker Database*)中的那些。该工具在将“www.”置于“biomarker.korea.ac.kr/index.jsp”之前所定位的网址中是可获得的。感染性疾病生物标志数据库描述于杨(Yang)等人(2008),《核酸研究》(Nucleic Acid Res.)36:D455-D460;将该文献的披露通过引用结合于此。适用于实践主题方法的适合的生物标志以及特异性标志成员被进一步描述于例如S艾杜(S Aidoo)等人(2001)《临床微生物杂志》(J.Clin.Microbiol.)39:2572-2575,关于HIV;HS申(Shin),等人(2001)《临床诊断实验免疫学》(Clin.Diagn.Lab.Immunol.)8:9-13,关于乙型肝炎;R阿尔

温(Allwinn)等人,(1999)《感染》(Infection)27:365-367,关于登革热;E阿拉兹(Araz),等人(2000)《热带医学卫生研究协会汇报》(Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.)94:55-56,关于疟疾;B贝达尔(Berdal)等人(2000)《感染性疾病斯堪的纳维亚杂志》(Scand.J.Infect.Dis.)32:287-291,关于兔热病;S尚托(Chanteau)等人(2000)《医学微生物国际杂志》(Int.J.Med.Microbiol.)290:279-283,关于腺鼠疫(bubonic plague);W钦(Ching)等人(2001)《临床诊断实验免疫学》(Clin.Diagn.Lab.Immunol.)8:409-414,关于斑疹伤寒;J多明格斯(Dominguez)等人(1999)《临床微生物感染疾病欧洲杂志》(Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.)18:896-898,关于军团病;WH施里尔(Schrier)等人(1998)《临床化学》(Clin.Chem.)44:293-298,关于幽门螺旋杆菌(H.pylori)感染;将其披露通过引用结合于此。

[0051] 样品

[0052] 可以检测样品中的一种或多种分析物。如在此使用的术语“样品”意指包含在任何希望浓度的悬浮液中的一种或多种单独分析物的任何流体。例如,该样品可以包含 $10^{11}$ 或更少、 $10^{10}$ 或更少、 $10^9$ 或更少、 $10^8$ 或更少、 $10^7$ 或更少、 $10^6$ 或更少、 $10^5$ 或更少、 $10^4$ 或更少、 $10^3$ 或更少、500或更少、100或更少、10或更少、或一个分析物/毫升。该样品可以包含已知数目的分析物分子或未知数目的分析物分子。

[0053] 在实践本披露的方法中,该样品可以是一种生物样品。“生物样品”涵盖多种从受试者获得的样品类型。该定义涵盖生物流体,例如,血液(包括血液部分(例如血清、血浆));以及其他生物来源的液体样品(例如,唾液、尿液、胆汁)。“血液样品”是指生物样品,它是从受试者的血液获得,并且包括适用于本发明方法中的分析的全血和血液部分(例如,血浆或血清)。通常,没有凝结的血液样品中细胞组分和非细胞组分的分离(例如,通过离心)提供血液血浆样品,而凝结(凝固)的血液的这种分离提供血液血清样品。血液生物样品的实例包括外周血或衍生自外周血的样品。该定义还包括在它们的采购之后已经通过以下方式被操作的样品,例如通过用试剂进行处理、溶解、或富集某些组分(例如一种或多种有待测定的多肽)。例如,生物样品(例如,血液)可以针对一种含有感兴趣的一种或多种分析物的部分来富集。

[0054] 在本披露的方法中有用的适合的生物样品包括生物流体(例如,血液样品,例如全血,血液部分(例如,血清,血浆))以及其他生物来源的液体样品。在生物样品是血液样品时,血液样品可以获得自新鲜血液或储存血液(例如,血库中的血液)。生物样品可以是专门获得用于本披露测定的血液样品,或者是获得用于其他目的并可以被二次取样以用于本披露测定的血液样品。

[0055] 样品可以是在采购之后通过以下方式来操作:例如,通过用试剂进行处理,溶解,和/或针对有待测定的一种或多种分析物来富集某些组分。可以按照需要通过稀释于适当的缓冲溶液中来预处理样品,如果希望的话将其进行浓缩,或将其通过任何个方法进行分级,包括但不限于超速离心、通过快速性能液相(FPLC)进行分级、或沉淀。

[0056] 因此,在一些实施例中,样品是获得自体内来源。在某些实施例中,样品的来源是“哺乳动物”或“哺乳类”,其中这些术语被广泛地用于描述在哺乳纲之内的生物,包括食肉目(例如,狗和猫)、啮齿目(例如,小鼠、豚鼠、和大鼠)、以及灵长类(例如,人类,黑猩猩,以及猴子)。在一些情况下,受试者是人类。这些方法可以应用于获得自两性的以及在任何发

育阶段(即新生儿、婴儿、幼年、青春期、成年)的人类受试者的样品,其中在某些实施例中,人类受试者是幼年、青春期、成年人。尽管本发明可以应用于来自人类受试者的样品,但应理解的是,这些方法还可以对来自其他动物受试者(即,在“非人类受试者”中)的样品来进行,这些其他动物受试者例如但不限于鸟、小鼠、大鼠、狗、猫、牲畜以及马。

[0057] 在实践本披露的方法中,该样品可以是一种非生物样品。例如,样品可以包括获得自例如土壤、食物、水等的非生物颗粒的悬浮液。感兴趣的非生物样品包括用于环境测试的样品,如在此更完整描述的。

[0058] 该样品大小本身也可以变化。在某些实施例中,样品包括 $100\mu\text{l}$ 或更少的流体,例如 $50\mu\text{l}$ 或更少,包括大约5至 $50\mu\text{l}$ 。可以通过例如手指刺破获得样品(例如,该样品包括单个手指针刺血滴)。在又其他实施例中,该样品大小可以更大,例如 $100\mu\text{l}$ 或更多,例如 $500\mu\text{l}$ 或更多,包括 $1\text{ml}$ 或更多,例如 $5\text{ml}$ 或更多,例如其中若干毫升的样品流过捕获域以累积来自极低浓度分析物的信号。任何获得样品的便利手段可以用于实践主题方法。

[0059] 使样品流动

[0060] 在主题方法的实施例中,样品流动通过一个通道。术语“流动着”和“流动”是指在采用或不采用外部手段(例如,泵,注射器,等等)的情况下样品在任何方向上的移动。因此,流动的实例包括机械辅助的流体流动,例如使用泵(例如,注射泵,蠕动泵,或蠕动泵)实现的流动。因此,流动的实例还包括完全被动的流动,例如重力式流体流动、毛细管作用等等。

[0061] 在此使用术语“毛细管作用”以指代在不用外部手段的情况下流体垂直和/或横向的流动。毛细管作用可以在流体置于“毛细管通道”中时发生,该通道是具有允许流体经由毛细管作用移动的特性的通道、通路或导管。

[0062] 例如,样品(例如,全血)可以通过毛细管作用在具有有益于针对那种特定样品类型而产生毛细管作用的大小和/或其他特性的通道中流动。影响毛细管流动的因素包括描述于例如S查克拉博蒂(S Chakraborty)(2005)《实验芯片》(Lab Chip.)5(4):421-430中的那些。因此,样品可以流经毛细管通道,其中该流体被引入通道中(例如,与通道接触,注入通道中,等),借此毛细管作用导致流体移动通过该通道。

[0063] 在某些实施例中,通道是“微”通道。此类通道可以具有在毫米或更小数量级(例如,小于或等于大约1毫米)的至少一个横截面维度。可以调整该维度,在一些实施例中,该至少一个横截面维度是500微米或更小。在一些实施例中,再次当应用允许时,横截面维度是100微米或更小,例如50微米或更小,包括1微米或更小。

[0064] 横截面维度是大体上垂直于中线流动方向的那个,但是应该理解的是,当遇上通过弯管或趋于改变流动方向的其他特征的流动时,运行中的横截面维度不需要严格垂直于流动。还应该理解的是,在一些实施例中,微通道可以具有两个或更多个横截面维度,例如矩形横截面的高度和宽度或椭圆横截面的主轴和次轴。可以对这些维度的任一个针对在此呈现的大小进行比较。应指出,在实践本披露的方法中采用的微通道可以具有比例非常失调的两个维度-例如,具有10至200如20至100微米高度的矩形横截面,以及在mm或更大的数量级上的如3至10mm或更大的宽度。微米例如,在图2图A中描绘的通道具有矩形横截面,该横截面具有50微米高度和3mm宽度。当然,某些装置可以采用其中两个或更多个轴在大小上非常相似或甚至相同的通道(例如,具有方形或圆形横截面的通道)。

[0065] 鉴于上述内容,应理解的是在此描述的原则和设计特征可以放大规模至更大的装

置和系统,包括采用达到了毫米或甚至厘米规模通道横截面的通道的装置和系统。因此,当描述一些“微”装置和系统时,预期该描述在一些实施例中同样适用于一些更大规模的装置。

[0066] 可以针对用于一个或多个分析物特异性捕获域的一个或多个粒度而改变通道的维度。在某些方面,颗粒和通道高度的相对大小是使得通道高度和/或宽度小于颗粒平均直径的大约50倍,例如颗粒平均直径的大约25-50倍,包括平均直径的5-10倍,或平均直径的3-5倍。例如,如果颗粒是具有大约 $7.5\mu\text{m}$ 平均直径的珠粒,在某些实施例中,通道的高度和/或宽度将是大约 $375\mu\text{m}$ 或更小,包括 $75\mu\text{m}$ 或更小,例如 $37.5\mu\text{m}$ 或更小(例如 $22.5\mu\text{m}$ )。

[0067] 可以针对利用的具体样品类型以通道的高度改变通道的横截面维度,使得该样品可以分离为一层或多层。例如,在样品是生物样品(例如血液)时,全血中的红细胞将沉淀在通道底部,留下更清澈的血浆在顶部。因此,可以通过在通道中具有适合的高度维度(例如,大约 $375\mu\text{m}$ 或更小,包括大约 $37.5\mu\text{m}$ 或更小,例如大约 $22.5\mu\text{m}$ )使血浆和红细胞被动分离。在此类方面,分析物特异性捕获域可以稳定地与通道的某些表面结合,以便优先地与一个或多个此类层相互作用。使用血液的以上实例,与通道顶表面稳定结合的分析物特异性捕获域将优先地与存在于血浆中的一种或多种分析物相互作用,同时与通道底表面稳定结合的分析物特异性捕获域将优先与存在于红细胞部分中的一种或多种分析物相互作用。因此,通过改变通道的维度和分析物特异性捕获域的放置(例如,在通道的顶表面上),对检测(例如,荧光检测)的来自红细胞的潜在干扰得以清除,允许针对全血不用分离而进行样品测定。

[0068] 样品通过通道的流速可以改变。在使用严格被动流动(例如,重力式流体流动,毛细管作用,等等)使样品流动时,将通过多个因素(例如,样品类型(例如粘性)、通道的维度,等等)来规定流速。在其他方面,流动可以是机械辅助(例如,使用泵,例如注射泵、蠕动泵或蠕动泵)的以实现所希望的流速(例如, $0.01\mu\text{l}/\text{min}$ 或更大, $0.1\mu\text{l}/\text{min}$ 或更大, $1\mu\text{l}/\text{min}$ 或更大, $10\mu\text{l}/\text{min}$ 或更大, $100\mu\text{l}/\text{min}$ 或更大, $1\text{ml}/\text{min}$ 或更大,或 $100\text{ml}/\text{min}$ 或更大)。

[0069] 流体流动的总时间将因此取决于例如通道流速和长度的因素。在某些方面,总的流动时间是使得该样品具有足够的时间与可以存在于通道中的一种或多种试剂混合。再次回到图1,例如,样品10通过毛细管作用流经毛细管通道12。样品10经过包含试剂14的区域,此后该样品继续在分析物特异性捕获域15-18上流动(经由毛细管作用)。因此,在试剂14的区域与分析物特异性捕获域15-18之间的距离可以取决于样品与存在的一种或多种试剂混合所希望的时间而改变。

[0070] 在某些方面,通道可以被配置为一种流经装置。“流经”是指样品可以穿过入口进入通道,被携带穿过通道,并且然后进而通过出口退出通道。本披露的方法的方面包括收集从通道退出的样品。在某些方面,可以对收集的样品进行进一步分析(例如,通过一种或多种测定,例如基于流式细胞术的测定等等)。

[0071] 结合成员

[0072] 如上所述,这些方法的方面包括使样品流经一个通道,该通道包含与其表面稳定结合的分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括针对分析物展示特异性结合成员的颗粒。如在此使用的术语“结合成员”是指特异性地结合至目标分析物的任何试剂(例如,蛋白质(例如抗体)、小分子,等等)。术语“特异结合”、“特异地结合”等等是指相对

于溶液或反应混合物中的其他分子或部分而言优先结合至一种分子。在一些实施例中，结合成员与其特异性结合的目标分析物之间的亲和力(当它们特异性地结合彼此为结合复合物时)被表征为以下 $K_d$ (解离常数): $10^{-6}M$ 或更小,例如 $10^{-7}M$ 或更小,包括 $10^{-8}M$ 或更小,例如 $10^{-9}M$ 或更小、 $10^{-10}M$ 或更小、 $10^{-11}M$ 或更小、 $10^{-12}M$ 或更小、 $10^{-13}M$ 或更小、 $10^{-14}M$ 或更小,包括 $10^{-15}M$ 或更小。“亲和力”是指结合的强度,增加的结合亲和力与更低的 $K_d$ 相关。这样,“特异性地结合”或“特异结合”不是意为排除给定的结合成员与多于一个感兴趣分析物结合。例如,特异性地结合至感兴趣分析物多肽的抗体可以能够以弱的又可检测的水平(例如,显示10%或更少的与感兴趣多肽结合)结合其他多肽。这种弱结合或背景结合,易于与结合至感兴趣多肽的特异性抗体辨别,例如通过使用适当的对照。

[0073] 在某些方面,结合成员可以是抗体、或其抗原结合片段。如在此使用的,术语“抗体”包括任何同型抗体或免疫球蛋白,维持对抗原的特异性结合的抗体片段(包括但不限于Fab、Fv、scFv、以及Fd片段)、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、以及融合蛋白(包括抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白质)。抗体可以进一步轭合至其他部分,例如,特异性结合对的成员,例如,生物素(生物素-抗生物素蛋白特异性结合对)等等。被该术语涵盖的还有Fab'、Fv、F(ab')<sub>2</sub>和其他维持对抗原的特异性结合的抗体片段、以及单克隆抗体。在其他方面,结合成员可以是抗原,其中一种或多种目标分析物是抗体。

[0074] 这些方法的实施例的方面包括被包含在颗粒中和/或颗粒上的结合成员,例如捕获珠粒(例如,BD CompBeads,BD生物科学公司,圣何塞(San Jose),加利福尼亚州(CA))。这些颗粒可以针对一种或多种分析物展示特异结合成员(例如,抗原)。

[0075] 这些颗粒可以是任何便利的大小,并且是从任何便利的材料制得(例如,聚苯乙烯珠粒、乳胶珠粒、玻璃珠粒、磁珠粒,等)。在某些方面,颗粒和通道高度的相对大小被调整为使得通道高度是颗粒直径的50倍或更小,例如颗粒直径的5-10倍,包括颗粒直径的3-5倍。颗粒还可以是天然存在的颗粒,例如,细胞或其衍生物。

[0076] 颗粒本身可以位于在通道内的一个或多个分析物特异性捕获域中。该一个或多个分析物特异性捕获域可以位于通道内的一个或多个任何便利位置处。在一些实施例中,结合成员域的一个或多个位置是已知的,同时在其他实施例中该一个或多个位置不是已知的。在给定测定中,颗粒可以具有相同或不同的大小。例如,在一些情况下颗粒可以具有不同的大小和或标记自身以增加可以在给定测定中得以检测到的唯一分析物的数目。

[0077] 在一些情况下,该一个或多个捕获域位于使信噪比最大化的区域处。在某些方面,该一个或多个分析物特异性捕获域位于使用期间最接近成像器部件(例如,荧光检测器)的毛细管通道的内表面上。例如,在成像器位于通道顶部外表面的近侧时(其中顶部是相对于重力源),该一个或多个分析物特异性捕获域可以位于通道的顶表面上。将一种或多种分析物特异性捕获域定位于通道顶表面上可以改进这些方法的准确性和/或简化样品制备,例如通过去除一个或多个分离步骤。例如,在样品是生物样品(例如血液)时,全血中的红细胞将沉淀在通道底部,留下更清澈的血浆在顶部(其中顶部是相对于万有引力确定的)。通过将一个或多个分析物特异性捕获域放置于通道顶表面上,并且从通道顶部进行成像,对检测(例如,荧光检测)的来自红细胞的潜在干扰得以清除,允许针对全血不用分离而进行样品测定。

[0078] 这些颗粒可以通过任何适合手段,例如通过颗粒与通道之间的共价和/或非共价

结合继续定位在该一个或多个分析物特异性捕获域内。例如,可以通过例如吸附、吸收、从挥发性溶剂溶液中蒸发沉积、颗粒与通道之间的共价键合、或免疫固定来完成颗粒与通道的稳定缔合。共价键合可以例如涉及通过偶联剂(例如,卤化氰,如溴化氰,或通过使用戊二醛)将颗粒键合至通道,如在美国专利号4,186,146中所描述的,将该文献的披露通过引用结合于此。免疫固定至通道可以直接通过吸收、或通过共价键,或通过本领域技术人员熟知的各种各样的接头。进行这些程序的方法是通过以下文献给出的,例如,伊玛尼(Iman)和霍恩比(Hornby),《生物化学杂志》(Biochemical Journal)(129卷;255页);加慕贝尔(Campbell),霍恩比(Hornby),和莫瑞斯(Morris),《生物化学与生物物理学报》(Biochem.Biophys.Acta)(1975),384卷;307页;马提森(Mattisson)和尼尔森(Nilsson),《F.E.B.S.快报》(F.E.B.S.Letters),(1977)104卷,78页;以及美国专利号4,376,110和4,452,901;将文献的披露通过引用结合于此。

[0079] 感兴趣的用于将分析物特异性捕获域的颗粒与表面稳定缔合的方法进一步包括但不限于描述于以下文献中的方法:DR特弗诺(Thevenot),等人,《生物传感与生物电子学》(Biosens.Bioelectron.)16,121-131(2001);AF科林斯(Collings),等人,《物理学进展报告》(Rep.Prog.Phys.)60,1397-1445(1997);YG李(Li),等人,《分析化学杂志》(Anal.Chim.Acta)382,277-282(1999);MA布雷默(Breimer),等人,《生物传感与生物电子学》(Biosens.Bioelectron.)18,1135-1147(2003);XD东(Dong),等人,《生物电化学与生物能源》(Bioelectrochem.Bioenerg.)42,63-69(1997);JT安徒生(Andersen),等人,《生物电化学与生物能源》(Bioelectrochem.Bioenerg.)44,57-63(1997);FS李格勒(Ligler),等人,《分析化学》(Anal.Chem.)74,713-719(2002);M.曼宁(Manning),等人,《材料科学与工程》(Mater.Sci.Eng.)C23,347-351(2003);OA.萨迪克(Sadik),等人,《分析化学》(Anal.Chem.)74,3142-3150(2002);A阿克科云(Akkoyun),等人,《生物传感与生物电子学》(Biosens.Bioelectron.)17(8),655-664(2002);S科尼耶(Cosnier.),《生物传感与生物电子学》(Biosens.Bioelectron.)14,443-456(1999);S.科尼耶(Cosnier),等人,《电化学学报》(Electrochim.Acta)44(11),1833-1836(1999);O欧尔哥亥(Ouerghi),等人,《电分析化学杂志》(J.Electroanal.Chem.)501,62-69(2001);J王(Wang),等人,《电化学通讯》(Electrochim.Commun.)5,83-86(2003);F燕(Yan),等人,《分析化学》(Anal.Chem.)73,5272-5280(2001);B霍克(Hock),等人,《生物传感与生物电子学》(Biosens.Bioelectron.)17,239-249(2002);将这些文献的披露通过引用结合于此。

[0080] 在某些方面中,这些颗粒通过颗粒与通道表面之间的完全被动的(即非共价的)相互作用而保持定位于一个或多个分析物特异性捕获域内。此类相互作用可以是足够强的,以便甚至在流体流经通道之后将颗粒仍保持粘附至通道表面(参见例如图3,图A)。例如,内表面可以是等离子体蚀刻的内表面,并且这些颗粒可以是稳定与其缔合的,例如如在下文(除了其他位置之外)实验部分所描述的。

[0081] 包含针对目标分析物的结合成员的一个或多个分析物特异性捕获域可以存在于通道中。例如,在某些方面,一种分析物特异性捕获域针对一种目标分析物而存在。在其他方面,包含针对一种目标分析物的结合成员的两个或更多个(例如,2至10个,大约10至20个,等)分析物特异性捕获域是存在的。当两个或更多个分析物特异性捕获域针对一种目标分析物存在时,分析物特异性捕获域可以是均质的或异质的(即,在针对目标分析物的结合

成员、所使用颗粒的类型、所使用颗粒的大小等方面不同)。

[0082] 在这些方法用于检测两种或更多种分析物是否存在于样品中时,一个或多个分析物特异性捕获域可以针对每个目标分析物而存在。针对不同目标分析物的分析物特异性捕获域可以位于通道内的不同位置,从而使不同目标分析物的多路复用检测能够进行。例如,针对第一分析物的第一分析物特异性捕获域可以位于与针对第二分析物的第二分析物特异性捕获域不同的位置处,从而使得每个分析物特异性捕获域的成像可以检测该第一或第二分析物是否存在于样品中。第三、第四、第五等分析物特异性捕获域可以类似地定位以允许样品中第三、第四、第五等分析物的检测。参见,例如图1。

[0083] 在某些方面,第一、第二等分析物的颗粒还位于或取而代之位于重叠的(包括相同的)分析物特异性捕获域。在此类方面,颗粒可以展示结合成员,可以针对第一、第二等分析物对这些结合成员区别性地标记。以此方式,这些颗粒可以稳定地与相同的或重叠的位置缔合,并且然而与针对不同抗原的颗粒相区别(例如,通过它们的荧光发射相区别)。

[0084] 在希望时,质量控制域也可以存在,例如具有与其缔合的有已知特征的颗粒的域,该域在成像期间提供信号,该信号可以被采用作为测定结果的对照或参比。

#### [0085] 标记

[0086] 在一些实施例中,这些方法涉及在对目标分析物是否存在于样品中进行检测中的标记的使用。如在此使用的,术语“标记”和“可检测的标记”是指能够检测的分子,包括但不限于放射性同位素、荧光剂、化学发光剂、发色团、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂、发色团、染料、金属离子、金属溶胶、配体(例如,生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素或半抗原)、嵌入染料等等。术语“荧光剂”是指能够展现可检测范围内的荧光的一种物质或其部分。

[0087] 感兴趣的标记包括直接和间接可检测的标记两者。标记可以直接结合至分析物,和/或结合至分析物/结合成员复合物(参见,例如,图2,图A-B)。图2图B呈现了可能的标记方案,其中展示结合成员28的颗粒26(例如,抗小鼠Ab)与标记的Ab检测试剂32结合。

[0088] 在某些方面,在使样品流经毛细管通道之前将样品进行标记。实施例进一步还包括或取而代之地,在使样品流经毛细管通道之后,使分析物特异性标记流经毛细管通道。

[0089] 在某些方面,标记可以被包括在通道之内,并且在样品流经通道时与样品混合。例如,使用展示于图1中的实例,在样品10通过毛细管作用流经毛细管通道12时,样品10通过包含试剂14的区域,在此之后该样品继续在分析物特异性捕获域15-18上流动(经由毛细管作用)。在一些方面,包含试剂14的区域可以包括当样品流经通道时与样品混合的一种或多种标记。

[0090] 合适的用于在此处描述的方法中使用的标记包括通过光谱的、光化学的、生物化学的、免疫化学的、电子的、光学的、化学的或其他手段间接或直接可检测的任何分子。感兴趣的标记包括但不限于:荧光素及其衍生物;罗丹明及其衍生物;菁蓝及其衍生物;香豆素及其衍生物;级联蓝(Cascade Blue)及其衍生物;荧光黄(Lucifer Yellow)及其衍生物;BODIPY及其衍生物;等等。感兴趣的标记还包括:荧光团,例如吲哚碳菁(C3)、吲哚二碳菁(C5)、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、德克萨斯红(Texas Red)、太平洋蓝(Pacific Blue)、俄勒冈绿(Oregon Green)488、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)-355、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)488、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)532、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)546、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)-555、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)568、

亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)594、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)647、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)660、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)680、亚历克萨荧光染料(Alexa fluor)700、JOE、丽丝胺(Lissamine)、罗丹明绿(Rhodamine Green)、BODIPY、异硫氰酸荧光素(FITC)、羧基荧光素(FAM)、藻红蛋白、罗丹明、二氯罗丹明(dRhodamine)、羧基四甲基罗丹明(TAMRA)、羧基-X-罗丹明(ROX)、LIZ、VIC、NED、PET、SYBR、PicoGreen、RiboGreen、等等。

[0091] 可以使用光检测器以检测发射光来对荧光标记进行检测。适合的检测器包括但不限于如在美国专利号7,927,561和7,738,094中描述的检测器；将其披露通过引用结合于此。典型地，酶标记是通过以下方式来检测：为酶提供底物，并且对通过酶对底物的作用产生的反应产物进行检测；比色标记可以通过简单地使带色标记可视化来检测；并且抗原标记可以通过提供一种特异性地结合至抗原标记的抗体(或其结合片段)来检测。特异性地结合至抗原标记的抗体可以是直接或间接可检测的。例如，抗体可以结合至一种提供信号(例如，荧光)的标记部分(例如，荧光团)；抗体可以结合至酶(例如，过氧化物酶、碱性磷酸酶、等)，该酶在供有适当底物(例如，荧光-酪胺，FastRed等)时产生可检测产物(例如，荧光产物)；等等。

[0092] 在这些方法是多路复用时，一种或多种分析物可以用不同的标记进行标记。在某些方面，标记被选择为使得标记可以与彼此区分开，例如，第一标记与第二标记的发射光谱基本上是不重叠的。

[0093] 成像

[0094] 如上所述，这些方法的实施例包括使一个或多个分析物特异性捕获域成像以检测该目标分析物是否存在于样品中。

[0095] 分析物特异性捕获域的成像可以使用任何便利的方案来进行。术语“成像”被广泛地使用来指代针对来自捕获域的信号的存在或不存在评价一个区域的任何方式，其中该信号是如果标记存在于捕获域中时由标记产生的一个信号。换言之，当捕获域被成像时，使用任何便利的方案来对它评估以检测标记是否存在于该域中。在某些方面，成像可以涉及使用光学扫描器或显微镜，例如带有CCD-照相机检测器和适当滤光器的低功率显微镜。在某些方面，成像可以涉及专用成像装置的使用，该装置被配置为用于在本披露的方法中使用(例如，Alere Pima, BD CD4定点照护等等)。

[0096] 成像可以涉及图像处理的使用。任何便利的图像处理方案可以用于本披露的方法中。例如，成像可以涉及2D图像处理。这种处理可以例如涉及通过大小和/或强度使颗粒与背景区别，以便对被包含在特异性成员结合域之内的颗粒的强度(例如，荧光强度)进行定量。

[0097] 在某些方面，以上步骤中的一个或多个可以使用可商购的成像软件进行，例如来自Pipeline Pilot(Accelrys)、ImageJ、Matlab、Perkin Elmer Velocity、Media Cybernetics ImagePro Plus、Metamorph、和/或Nikon Elements的先进成像工具箱。在其他方面，该过程的一个或多个步骤是通过定制软件模块进行的。

[0098] 报告

[0099] 这些方法可以用于检测获得自受试者的生物样品中的一种或多种生物标志。一种或多种生物标志的检测可以指示受试者患有或有患有一种或多种病症的风险(例如，HIV、

乙型和丙型肝炎,梅毒、疟疾,等)。

[0100] 本披露的方法可以包括生成一个报告,该报告指示该方法的结果并且提供关于这些结果如何可能应用于受试者的护理的指导。如在此使用的“报告”通常是指电子文档或文件(例如, pdf文件, 监测器展示)以及有形文档(例如, 纸质报告)。受试者报告可以完全地或部分地通过电子方式生成,例如呈现在电子显示器上(例如, 计算机监测器)。

[0101] 报告中的方法结果可以包括例如测定的一种或多种目标分析物的量的一个或多个。该水平可以被报告为定量评分(例如, 浓度, 例如pg/ml血清)和/或半定量评分(例如, 反映分析物相对于对照水平或所选择的阈值水平的量的评分)。该方法结果可以可任选地包括针对对照分析物的测定结果。

[0102] 报告可以包括基于受试者中一种或多种病症可能性为临床医生提供对受试者的治疗建议的指导。例如, 报告可以包括关于进一步评估和/或避免昂贵的和侵入性的评估的建议和/或关于治疗干预(例如, 给予药物、建议手术干预, 等)、改变治疗方案(例如调整药物剂量(例如, 增加或减少剂量)、调整给药方案(例如, 增加或减少给药频率和/或量)等等)的建议。

[0103] 一个报告可以进一步包括以下项中的一个或多个:1)患者信息(例如,名称,医学信息(例如,年龄、性别、症状(例如,可以与该一种或多种病症的诊断相关的症状)等),2)关于生物样品的信息(例如,当获得时,其类型);3)关于进行测定的地点和方式的信息(例如,测试设施,测定形式);4)服务提供者信息;和/或5)说明性报告,它可以提供叙述,该叙述提供对结果的至少部分解释以便协助临床医生的诊断。

[0104] 因此,在此披露的方法可以进一步包括生成或输出报告的步骤,该报告提供方法结果和可任选地其他信息,例如如在此所述的治疗指导。该报告可以按电子介质的形式提供(例如,计算机监测器上的电子展示),或按有形介质的形式提供(例如,打印在纸上或其他有形介质上的报告)。关于可能性的评价可以称作“风险报告”或简单地为“诊断结果”。准备报告的人或实体(“报告生成者”)还可以进行例如样品收集、样品处理等等的步骤。可替代地,除了报告生成者之外的实体可以进行例如样品收集、样品处理等等的步骤。可以将报告提供给一名用户。“用户”可以是例如健康专家(例如,临床医生、实验室技术人员、医师等)。

#### [0105] 装置和系统

[0106] 本披露还提供了用于检测分析物是否存在于样品中的装置和系统。

[0107] 这些装置的方面包括一个毛细管通道,该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定结合的一个分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒(例如,捕获珠粒)。

[0108] 如上所述,使样品流经通道可以涉及使用“微”通道,该“微”通道具有在毫米或更小数量级上(例如,1毫米或更小)的至少一个横截面维度,其中在一些实施例中,横截面维度是100微米或更小(包括50微米或更小,例如1微米或更小)。因此,在一些实施例中,使用微型品制造技术制造本披露的装置。

[0109] 装置可以由任何便利材料制成,其中通道包括玻璃、塑料等等。这些装置可以被配置为一次性的和/或低成本地制造,并且可以有助长期储存(例如,储存不需要冷链储存)。

[0110] 在某些方面,这些装置被配置为使得保存的试剂位于一个或多个与颗粒分离的位置,并且流体被配置为使得样品的引入重悬浮这些试剂、与它们混合、然后进入包含颗粒的检测区。制造此类装置的通常方法包括描述于例如美国专利号8,025,850中的那些;将其披露通过引用结合于此。

[0111] 感兴趣装置包括筒和/或筒型装置。这种装置的非限制性实例呈现于图5中。该装置300包括本体102,该本体包括顶部101。顶部101可以铰链连接和/或拴系至本体102,使得顶部101可以开放或移动以暴露样品加载区111。样品可以加载在样品加载区111中,借此样品流动进入本体102内的通道112(例如,毛细管通道)中。通道112可以是直的、弯曲的等等。在图5中,例如,通道112包括直的和弯曲的部分。通道112可以包含含有试剂114的区域。在此区域中的试剂可以被保存和/或干燥。样品在此区域114上流动,与可能存在的任何试剂混合。然后样品在一种或多种分析物特异性捕获域(例如,分析物特异性捕获域115)上流动(例如,经由毛细管作用)。可以进而对分析物特异性捕获域115进行成像以检测目标分析物是否存在于样品中,例如通过以下方式测量荧光:使用带CCD-照相机检测器和适当滤光器的低功率显微镜经由通过筒300顶部进行成像。

[0112] 在装置300中,样品加载区111可以包括皮肤刺穿元件(例如,针和/或针刺元件),以刺穿受试者的皮肤来产生样品(例如血液)。因此在此类实施例中,该样品加载区111使得样品能够从受试者中获得,并且使样品直接地加载在装置300中,而不用另外的样品制备。

[0113] 装置300的本体102可以从任何便利的一种或多种材料制成,例如塑料、玻璃等。在某些方面,本体102是透明的和/或由以下材料制成:该材料允许存在于通过本体102的通道112中一个或多个分析物特异性捕获域的成像。本体102和顶部101可以被配置为基本上防尘、耐脏、防水、防湿、耐温等等。

[0114] 此类装置的大小可以改变。在某些方面中,装置的长度可以是6英尺或更小,例如5英尺、4英尺、3英尺、2英尺或1英尺。装置的宽度可以改变,在一些方面范围是从1英尺或更小(例如,大约0.5英尺至1.0英尺)至3英尺或更多。在某些方面,宽度是0.1-0.5英尺、0.5-1.0英尺、1.0至1.5英尺、1.5至2.0英尺、2.0至2.5英尺、2.5至3.0英尺、或3.0至5.0英尺。装置的深度(例如,厚度)还可以改变,其范围是从0.1至1英尺或更大,包括大约0.1-0.5英尺、0.5-1.0英尺、或1.0至1.5英尺。

[0115] 装置300和/或本体102的形状可以被配置为插入成像器中,例如成像器中的端口或插座中。因此,装置的形状和/或维度可以通过这种成像器的端口或插座的形状和/或维度来指示,或者这种成像器的端口或插座的形状和/或维度可以通过装置的形状和/或维度来指示。装置插入成像器的端口或插座中可以在不用成像器的电路直接暴露于被包含在装置中的样品(例如,血液样品)的情况下,协助装置中一个或多个分析物特异性捕获域的成像。

[0116] 本披露进一步提供了用于检测分析物是否存在于样品中的系统。本披露的系统的实施例方面包括一个毛细管通道,该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒;以及成像器,该成像器被配置为从分析物特异性捕获域获得图像。感兴趣的成像器包括但不限于显微镜(例如,低功率显微镜)、照相机(例如,CCD照相机)、光学扫描器等等。

[0117] 本披露的方法可以是计算机实施的,从而使得方法步骤(例如,测定、成像,等等)全部或部分自动化。因此,本披露的系统可以包括处理系统(该处理系统大体上包括至少一个处理器或处理单元或多个处理器),存储器,至少一个输入装置和至少一个输出装置,经由一个总线或一组总线而联接在一起。在某些实施例中,输入装置和输出装置可以是相同的装置。该存储器可以是以任何形式的存储装置,例如易失性或非易失性存储器、固态存储装置、磁装置等。处理器可以包括多于一种相异的处理装置,例如用以操作在处理系统中的不同功能。

[0118] 本披露的系统可以包括多个另外的部件,例如,数据输出装置(如监测器、打印机、和/或扬声器),数据输入装置(如界面接口、鼠标、键盘等),流体处理部件、电源、等。

#### [0119] 试剂盒

[0120] 还提供了用于实践以上所述方法的一个或多个实施例的试剂盒。主题试剂盒可以包括不同的构成和试剂,例如毛细管通道装置(例如,筒装置);样品制备试剂,包括标记样品的试剂等,例如如上所述的。

[0121] 在一些方面,试剂盒包括一种或多种分析物特异性标记、以及包括毛细管通道的装置,该毛细管通道包括在已知位置处与其内表面稳定结合的分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示特异性结合成员的颗粒(例如,如上所述的装置)。

[0122] 在一些情况下,试剂盒至少包括发现用于方法(例如,如上所述的)中的试剂;以及具有储存于其中的计算机程序的计算机可读取介质,其中该计算机程序在下载在计算机中时运行计算机以执行如在此所述的测定,以检测分析物是否存在于样品中;以及具有地址的物理基质,从该地址可获得计算机程序。

[0123] 除了以上部件之外,主题试剂盒还进一步包括用于实践这些方法的说明书。这些说明书可以按多种形式存在于主题试剂盒中,这些形式中的一种或多种可以存在于试剂盒中。这些说明书可以存在的一种形式是:作为在合适介质或基质上打印的信息(例如,上面打印有信息的一张或多张纸),在试剂盒的包装中打印的信息,在包装插入物中打印的信息,等等。又另外的手段可以是在其上已经记录有信息的计算机可读取介质,例如CD、DVD、蓝光光碟(Blu-Ray)、闪存盘、等等。可以存在的又另外的手段是可以在远离的地方经由因特网用来获取信息的网址。任何方便的方式可以存在于试剂盒中。

#### [0124] 实用性

[0125] 主题方法、装置、系统以及试剂盒发现在希望检测分析物是否存在于样品中时的各种不同应用中可使用。

#### [0126] 诊断测试应用

[0127] 例如,本披露的方法、装置、系统和/或试剂盒可以用于从获得自受试者的生物样品中协助对受试者的病症的诊断。此类方法、装置、系统、和/或试剂盒可以多路复用,允许从单个样品(例如,单个手指针刺血滴)对多重病症(例如,多重感染性疾病)的快速诊断。因此,本披露协助生物样品中一种或多种生物标志的定点照护检测,由此为患者和提供者提供了更大的便利,并且改进了全球健康结果。

[0128] 感兴趣病症的实例包括但不限于感染性疾病和/或感染(例如,病毒感染),如HIV/AIDS、登革热、西尼罗热、疟疾、里夫特裂谷热(Rift Valley fever)、埃博拉病毒(ebola)、

天花、黄热病、梅毒以及乙型肝炎。一种或多种病症，例如如上所列的一种或多种病症可以经得起受试者中的检测和诊断，因为多种适合的特异性结合成员是已知的，包括描述于以下文献中的特异性结合成员：例如，S艾杜(S Aidoo)等人(2001)《临床微生物杂志》(J.Clin.Microbiol.)39:2572-2575,关于HIV;HS申(Shin),等人(2001)《临床诊断实验免疫学》(Clin. Diagn. Lab. Immunol.)8: 9-13,关于乙型肝炎;R阿尔温(Allwinn)等人, (1999)《感染》(Infection)27:365-367,关于登革热;E阿拉兹(Araz),等人(2000)《热带医学卫生研究协会汇报》(Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.)94:55-56,关于疟疾;B贝达尔(Berdal)等人(2000)《感染性疾病斯堪的纳维亚杂志》(Scand.J.Infect.Dis.)32:287-291,关于兔热病;S尚托(Chanteau)等人(2000)《医学微生物国际杂志》(Int.J.Med.Microbiol.)290:279-283,关于腺鼠疫(bubonic plague);W钦(Ching)等人(2001)《临床诊断实验免疫学》(Clin.Diagn.Lab.Immunol.)8:409-414,关于斑疹伤寒;J多明格斯(Dominguez)等人(1999)《临床微生物感染疾病欧洲杂志》(Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.)18:896-898,关于军团病;WH施里尔(Schrier)等人(1998)《临床化学》(Clin.Chem.)44:293-298,关于幽门螺旋杆菌(H.pylori)感染；将其披露通过引用结合于此。

[0129] 例如，在某些方面，适合的结合成员可以是特异地由针对发现于病毒衣壳上的抗原的抗体(即目标分析物)所结合的抗原。例如，本披露的方法、装置、系统和/或试剂盒可以用于HIV/AIDS的诊断中，其中被包含在一个或多个分析物特异性捕获域中的颗粒展示结合成员(例如，gp41抗原)，该结合成员特异地结合至目标分析物(例如，抗gp41抗体)以协助HIV/AIDS的诊断。

[0130] 因此，本披露的方法、装置、系统和/或试剂盒可以提供结果，可以进而应用这些结果以协助对受试者护理的决策。另外的实例提供于下文。

[0131] 测定指导的治疗和治疗的监测

[0132] 本披露的方法可以帮助临床医生为受试者做出治疗决策，例如该方法的结果是否表明受试者可以或不可以获益于用于HIV/AIDS的抗逆转录病毒疗法。也可以考虑临床迹象、症状和其他因素例如家族病史以协助疗法的选择。

[0133] 这些方法结果可以在是否应该给予对病症的任何治疗疗法方面指导临床医生。

[0134] 本披露的方法可以协助对经受病症治疗的受试者的监测治疗。例如，在受试者已经接受治疗时，该方法可以提供监测治疗的方法。在这种情况下，方法结果可以指导临床医生调整疗法，例如，是否继续治疗(例如，以便避免复发)、增加或减少剂量、在患者没有接受足够的治疗益处时(例如，患者不响应治疗)改变治疗方案(例如，从单一疗法到组合疗法，或从非手术疗法到手术疗法)等等。监测治疗的此类方法在指导进一步的治疗决策中是有用的，例如指示是否继续给予药物方案。使用本披露的方法监测治疗的方法可以与其他用于评价受试者是否响应于治疗(是“响应者”)或是否未展现足够治疗有益响应(是“非响应者”)的方法组合使用。

[0135] 针对临床试验群体鉴定受试者

[0136] 本披露的方法发现可用于基于受试者患有或有患有一种或多种病症风险的可能性来鉴定适用于被包括或排除于临床试验的受试者。例如，本披露的方法可以用于鉴定适用于被包括在临床试验中的受试者(例如，因为他们患有一种或多种病症)。在另一个实例

中,本披露的方法可以用于鉴定患有一种或多种病症的受试者以便将此类受试者从临床试验排除(例如,在临床试验旨在针对没有第二病症的受试者中的第一病症评价药物功效时)。还可以将如在此描述的方法和装置用于临床试验环境下的新生物标志的测试中,因为POC形式减少了要求健康护理人员的工作,并且降低了错误的风险;并且降低了对患者程序的复杂性,由此增加招募。并且,通过从样品的相同滴(例如手指针刺)进行多路复用测试,可以借由所研究新生物标志得到对于监测或分类患者的多重临床相关结果。

[0137] 环境测试应用

[0138] 本披露的方法、装置、系统和/或试剂盒还可以用于多个环境测试应用中,其中它们可以用于检测分析物,例如杀虫剂、多氯联苯(PCB)、重金属、内分泌干扰素(EDC)、病原体(例如,病原细菌)等等。

[0139] 作为一个实例,多氯联苯—产生免疫异常、生殖功能障碍和增加的甲状腺素体积所牵连的化合物,可以使用本披露的方法、装置、系统和/或试剂盒来检测,其中抗-PCB抗体用作特异性结合成员。适合的抗PCB抗体描述于例如S本德尔(Bender)等人,《环境科学技术》(Environ.Sci.Techol.)32,788-797(1998)和M马西拉(Masila)等人,《生物技术生物过程工程》(Biotechnol.Bioprocess Eng.)5,407-412(2000)中;将其披露通过引用结合于此。

[0140] 类似地,可以在一个样品中检测在结构上类似于内源性雌激素的一种或多种内分泌干扰素(EDC)。EDC是可以在人类和非人类动物中干扰体内内分泌系统并产生不利的发育、生殖、神经、和免疫影响的化学品。适合的用于检测EDC(例如,烷基酚乙醇盐、双酚A、以及线性磺酸烷基苯)的特异性结合成员是已知的,并且描述于例如T松永(Matsunaga)等人,《分析化学学报》(Anal.Chim.Acta)475,75-83(2003)中;将其披露通过引用结合于此。

[0141] 本披露的方法、装置、系统和/或试剂盒还可以用于病原体的检测中,例如可以发现于土壤、食品和海水及江水中的病原细菌。针对多种病原体(例如,球芽孢杆菌(*Bacillus globigii*)、MS2噬菌体、以及葡萄球菌肠毒素(*Staphylococcal enterotoxin*))的适合特异性结合成员是已知的,并且描述于例如CA罗(Weber),等人,《分析化学》(Anal.Chem.)71,3846-3852(1999)中;将其披露通过引用结合于此。

[0142] 示例性实施方案

[0143] 本披露的非限制性示例性实施例提供如下:

[0144] 1. 检测一种分析物是否存在于一个样品中的方法,该方法包括:

[0145] 使该样品流经一个毛细管通道,该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定结合的一个分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒,并且其中该毛细管通道具有比这些颗粒的平均直径大了小于50倍的高度;并且

[0146] 对该分析物特异性捕获域进行成像以检测该分析物是否存在于该样品中,其中该成像是在没有将这些颗粒从该样品中分离的情况下进行的。

[0147] 2. 根据1所述的方法,其中该检测是定量的。

[0148] 3. 根据1所述的方法,其中该检测是半定量的。

[0149] 4. 根据1所述的方法,其中该检测是定性的。

[0150] 5. 根据1-4中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些

颗粒的平均直径大了小于40倍。

[0151] 6. 根据1-5中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于30倍。

[0152] 7. 根据1-6中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于20倍。

[0153] 8. 根据1-7中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于10倍。

[0154] 9. 根据1-8中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于5倍。

[0155] 10. 根据1-9中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于3倍。

[0156] 11. 根据1-10中任一项所述的方法,包括在使该样品流经该毛细管通道之前对该样品进行标记。

[0157] 12. 根据11所述的方法,其中该标记包括一种荧光标记。

[0158] 13. 根据1-12中任一项所述的方法,包括在使该样品流经该毛细管通道之后使一种分析物特异性标记流经该毛细管通道。

[0159] 14. 根据13所述的方法,其中该分析物特异性标记包括一种荧光标记。

[0160] 15. 根据13或14所述的方法,其中该分析物特异性标记包括一种抗体或其一种抗原结合片段。

[0161] 16. 根据1-15中任一项所述的方法,其中这些颗粒是捕获珠粒。

[0162] 17. 根据16所述的方法,其中这些捕获珠粒是用一种特异性结合至该分析物的结合试剂包被。

[0163] 18. 根据1-17中任一项所述的方法,其中该样品是一种生物样品。

[0164] 19. 根据1-18中任一项所述的方法,其中该生物样品是来自人类。

[0165] 20. 根据18或19所述的方法,其中该生物样品是血液或血液产品。

[0166] 21. 根据20所述的方法,其中该血液产品是血清或血浆。

[0167] 22. 根据18-21中任一项所述的方法,包括从该受试者获得该生物样品。

[0168] 23. 根据1-22中任一项所述的方法,其中该分析物是一种抗体或其一种抗原结合片段。

[0169] 24. 根据1-23中任一项所述的方法,包括生成一个报告,该报告基于对该分析物是否存在与该样品中的检测来指示一种病症的可能性。

[0170] 25. 根据24所述的方法,其中该病症是选自下组,该组由以下各项组成:HIV、疟疾、梅毒、登革热、以及糖尿病。

[0171] 26. 根据24或25所述的方法,其中所述生成一个报告是通过一个计算机进行的。

[0172] 27. 根据26所述的方法,其中在一个远离该计算机的位置处将该报告展示给一个输出装置。

[0173] 28. 根据1-27中任一项所述的方法,其中该成像包括检测一种荧光发射,以检测该分析物是否存在与该样品中。

[0174] 29. 根据1-28中任一项所述的方法,其中该成像是从该通道的一个顶表面进行的。

- [0175] 30. 根据1-29中任一项所述的方法,其中该成像是从该通道的一个侧表面进行的。
- [0176] 31. 根据1-30中任一项所述的方法,其中该成像是从该通道之下进行的。
- [0177] 32. 根据1-31中任一项所述的方法,其中该成像包括2D图像处理。
- [0178] 33. 一种检测第一和第二分析物是否存在于一个样品中的方法,该方法包括:
- [0179] 使该样品流经一个毛细管通道,该毛细管通道包括在已知位置处与其内表面稳定结合的第一和第二分析物特异性捕获域,其中该第一分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该第一分析物展示一种特异性结合成员的颗粒,并且其中该第二分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该第二分析物展示一种特异性结合成员的颗粒,其中该毛细管通道具有比这些颗粒平均直径大了小于50倍的高度;并且
- [0180] 对这些第一和第二分析物特异性捕获域进行成像以检测这些第一和第二分析物是否存在于该样品中。
- [0181] 34. 根据33所述的方法,其中该成像是在没有将这些颗粒从该样品分离的情况下进行的。
- [0182] 35. 根据33或34所述的方法,其中该检测是定量的。
- [0183] 36. 根据33或34所述的方法,其中该检测是半定量的。
- [0184] 37. 根据33或34所述的方法,其中该检测是定性的。
- [0185] 38. 根据33-37中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于40倍。
- [0186] 39. 根据33-38中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于30倍。
- [0187] 40. 根据33-39中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于20倍。
- [0188] 41. 根据33-40中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于10倍。
- [0189] 42. 根据33-41中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于5倍。
- [0190] 43. 根据33-42中任一项所述的方法,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于3倍。
- [0191] 44. 根据33-43中任一项所述的方法,其中这些第一和第二分析物特异性捕获域位于该毛细管通道中不同的位置处。
- [0192] 45. 根据33-44中任一项所述的方法,进一步包括:检测一个第三分析物是否存在于该样品中,其中该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定结合的一个第三分析物特异性捕获域,其中该第三分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该第三分析物展示一种特异性结合成员的颗粒;并且对该第三分析物特异性捕获域进行成像,以检测该第三分析物是否存在于该样品中。
- [0193] 46. 根据33-45中任一项所述的方法,包括在使该样品流经该毛细管通道之前对该样品进行标记。
- [0194] 47. 根据46所述的方法,其中该标记包括一种荧光标记。
- [0195] 48. 根据33-47中任一项所述的方法,包括在使该样品流经该毛细管通道之后使一

一种分析物特异性标记流经该毛细管通道。

[0196] 49. 根据48所述的方法,其中该分析物特异性标记针对该第一和第二分析物而言是特异性的。

[0197] 50. 根据48或49所述的方法,其中该分析物特异性标记包括一种荧光标记。

[0198] 51. 根据48-50中任一项所述的方法,其中该分析物特异性标记包括一种抗体或其一种抗原结合片段。

[0199] 52. 根据33-51中任一项所述的方法,其中这些颗粒是捕获珠粒。

[0200] 53. 根据52所述的方法,其中这些捕获珠粒是用一种特异性结合至该第一或第二分析物的结合试剂包被。

[0201] 54. 根据33-53中任一项所述的方法,其中该样品是一种生物样品。

[0202] 55. 根据33-54中任一项所述的方法,其中该生物样品是来自人类。

[0203] 56. 根据54或55所述的方法,其中该生物样品是血液或血液产品。

[0204] 57. 根据56所述的方法,其中该血液产品是血清或血浆。

[0205] 58. 根据54-57中任一项所述的方法,包括从该受试者获得该生物样品。

[0206] 59. 根据33-58中任一项所述的方法,其中该第一分析物是一种抗体或其一种抗原结合片段。

[0207] 60. 根据33-59中任一项所述的方法,其中该第二分析物是一种抗体或其一种抗原结合片段。

[0208] 61. 根据33-60中任一项所述的方法,包括生成一个报告,该报告基于对该第一分析物是否存在于该样品中的检测来指示一种病症的可能性。

[0209] 62. 根据61所述的方法,其中该病症是选自下组,该组由以下各项组成:HIV、疟疾、梅毒、登革热、以及糖尿病。

[0210] 63. 根据61或62中所述的方法,包括生成一个报告,该报告基于对该第二分析物是否存在于该样品中的检测来指示一种第二病症的可能性。

[0211] 64. 根据63所述的方法,其中该第二病症是选自下组,该组由以下各项组成:HIV、疟疾、梅毒、登革热、以及糖尿病。

[0212] 65. 根据61-64中任一项所述的方法,其中所述生成一个报告是通过一个计算机进行的。

[0213] 66. 根据65所述的方法,其中在一个远离该计算机的位置处将该报告展示给一个输出装置。

[0214] 67. 根据33-66中任一项所述的方法,其中该成像包括检测一种荧光发射,以检测这些第一和第二分析物是否存在于该样品中。

[0215] 68. 根据33-67中任一项所述的方法,其中该成像是从该通道的一个顶表面进行的。

[0216] 69. 根据33-68中任一项所述的方法,其中该成像是从该通道的一个侧表面进行的。

[0217] 70. 根据33-69中任一项所述的方法,其中该成像是从该通道之下进行的。

[0218] 71. 根据33-70中任一项所述的方法,其中该成像包括2D图像处理。

[0219] 72. 用于检测一种分析物是存在于一个样品中的一种系统,该系统包括:

[0220] 一个毛细管通道,该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒,并且其中该毛细管通道具有比这些颗粒平均直径大了小于50倍的高度;以及

[0221] 一个成像器,该成像器被配置为从该分析物特异性捕获域获得一个图像。

[0222] 73.根据72所述的系统,其中该系统进一步包括一个处理模块,该处理模块被配置为基于从该成像器获得的该图像来输出关于该分析物是否存在于该样品中的一个结果。

[0223] 74.根据72或73所述的系统,其中该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个第二分析物特异性捕获域,其中该第二分析物特异性捕获域包括在其表面上对于一个第二分析物展示一种特异性结合成员的颗粒;并且其中该成像器被配置为从该第二分析物特异性捕获域获得图像。

[0224] 75.根据74所述的系统,其中该系统进一步包括一个处理模块,该处理模块被配置为基于从该成像器获得的该图像来输出关于该第二分析物是否存在于该样品中的一个结果。

[0225] 76.根据72-75中任一项所述的系统,其中该毛细管通道是可去除的。

[0226] 77.根据72-76中任一项所述的系统,其中该成像器是一种光学扫描器或显微镜。

[0227] 78.根据72-77中任一项所述的系统,包括一个计数器,该计数器被配置为对来自该分析物特异性捕获域的分析物的一个量进行定量。

[0228] 79.一种用于检测一种分析物是否存在于一个样品中的装置,该装置包括:

[0229] 一个毛细管通道,该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个分析物特异性捕获域,其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒,并且其中该毛细管通道具有比这些颗粒平均直径大了小于50倍的高度。

[0230] 80.根据79所述的装置,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于40倍。

[0231] 81.根据79-80中任一项所述的装置,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于30倍。

[0232] 82.根据79-81中任一项所述的装置,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于20倍。

[0233] 83.根据79-82中任一项所述的装置,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于10倍。

[0234] 84.根据79-83中任一项所述的装置,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于5倍。

[0235] 85.根据79-84中任一项所述的装置,其中该毛细管通道具有一个高度,该高度比这些颗粒的平均直径大了小于3倍。

[0236] 86.根据79-85中任一项所述的装置,其中这些颗粒是捕获珠粒。

[0237] 87.根据79-86中任一项所述的装置,其中该毛细管通道是塑料的。

[0238] 88.使针对一个分析物展示一种特异性结合成员的捕获珠粒与一个毛细管通道的一个内表面稳定缔合的一种方法,该方法包括:用氧等离子体处理该毛细管通道的该表面,

以产生一种等离子体蚀刻的表面；并且使这些捕获珠粒沉积在该等离子体蚀刻的表面上。

[0239] 89. 一种试剂盒，包括：

[0240] 一个毛细管通道，该毛细管通道包括在一个已知位置处与其内表面稳定缔合的一个分析物特异性捕获域，其中该分析物特异性捕获域包括在其表面上对于该分析物展示一种特异性结合成员的颗粒，并且其中该毛细管通道具有比这些颗粒平均直径大了小于50倍的高度；以及

[0241] 一个分析物特异性标记。

[0242] 实例

[0243] 如可以从以上提供的披露所理解的，本披露具有各种各样的应用。因此，提出以下实例以便为本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整披露和描述，并且不旨在限制诸位发明人考虑作为他们的发明的范围，它们也不旨在表示以下实验是进行的所有或仅有的实验。本领域的技术人员将易于认识到多种可以改变或修饰以产生本质上相似结果的非关键参数。因此，提出以下实例以便为本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整披露和描述，并且不旨在限制诸位发明人考虑作为他们的发明的范围，它们也不旨在表示以下实验是进行的所有或仅有的实验。已经作出努力以确保关于使用数目的准确性（例如，量，维度，等），但一些实验误差和偏差应被考虑在内。

[0244] 实例1：使捕获珠粒与塑料毛细管室稳定缔合

[0245] 使得用抗小鼠抗体（BD CompBeads，BD生物科学公司，圣何塞（San Jose），加利福尼亚州（CA））包被的捕获珠粒与定制的模制环烯聚合物塑料毛细管室的表面稳定地缔合。为了在流体流入筒之后，测试珠粒特性、缓冲特性以及毛细管室表面化学性对珠粒粘附至表面的能力的影响，进行了一系列的测试。

[0246] 在给定条件下，表面化学性对珠粒粘附至塑料表面的能力的影响是通过将BD TruCount<sup>TM</sup>珠粒附接在塑料表面上并且使人血浆流经表面来测试的。使用定做的数字成像系统来对珠粒进行成像。珠粒特性对捕获珠粒粘附至塑料毛细管室表面的能力的影响描绘于图3图B中。

[0247] 毛细管室表面化学性对捕获珠粒粘附至塑料毛细管室表面的能力的影响描绘于图3图B中。相比之下，用氧等离子体处理的筒表面允许珠粒粘附至筒表面（图3图A）。

[0248] 实例2：对样品中的分析物的检测

[0249] 以下以下实验的大体示意概述呈现于图2图A-B中。捕获珠粒（BD CompBeads，BD生物科学公司，圣何塞（San Jose），加利福尼亚州（CA））与毛细管室的上表面稳定地缔合，如在以上实例1中所描述的。这些珠粒是用抗小鼠抗体包被的，使得这些珠粒捕获样品中的任何小鼠抗体。将这些珠粒用固定在毛细管室上表面上的部位中的小鼠抗人抗体进行标记。这些珠粒通过珠粒与塑料室表面之间固有的可能被动的相互作用而继续定位于该部位中。

[0250] 该毛细管通道被设计为使得通道高度小于捕获珠粒直径的大约10倍，其中在通道高度是捕获珠粒直径的大约3-5倍时观察到理想性能。

[0251] 在这样的维度下，相对低的通道高度减少了背景荧光信号，并且更好地允许来自捕获珠粒的荧光信号被CCD照相机（例如，并入成像装置中的CCD照相机）测量，如在美国专利号7,927,561和7,738,094中所描述的；将其披露各自通过引用结合于此。毛细管通道是由塑料制成。

[0252] 将三种分别用APC、PE-Cy5、和PE标记的不同标记的小鼠抗体群体添加至人类全血样品中。然后将20 $\mu$ L的人类全血引入毛细管通道中。允许该样品通过毛细管作用向毛细管下面移动至固定捕获珠粒的部位,从而允许经标记抗体的捕获。

[0253] 然后使用低功率显微镜对被捕获和标记的抗体的荧光进行测量。使用滤光器将光从三种使用的染料中分离,由此使得荧光的独立测量能够进行。显示于图4图A-C中的结果显示,使用低功率显微镜时对于每个染料的荧光读数是容易可检测的。

[0254] 虽然前述发明已经出于清楚理解的意图通过说明和实例的方式,在某些细节上得以描述,但鉴于本披露的传授,对于本领域的普通技术人员容易清楚的是可以在不偏离所附权利要求书的精神或范围的情况下对其作出某些改变和修饰。

[0255] 因此,前述内容仅说明本发明的原理。将理解的是本领域的技术人员将能够设计不同的安排,这些不同的安排虽然没有在此明确地描述或显示,但实施本发明的原理并且被包括在其精神和范围之内。此外,在此引用的所有实例和有条件的语言原则上旨在帮助读者理解本发明的原理而不受此类确切引用的实例和条件的限制。并且,引用本发明的原理、方面、以及实施例的所有在此的陈述连同其具体实例旨在涵盖其结构和功能等效物两者。另外,预期此类等效物包括当前已知的等效物以及有朝一日发展的等效物,即不论结构而执行相同功能的发展的任何要素。因此,本发明的范围不是旨在限制于在此显示和描述的示例性实施例。而本发明的范围和精神是通过所附权利要求书来实施。

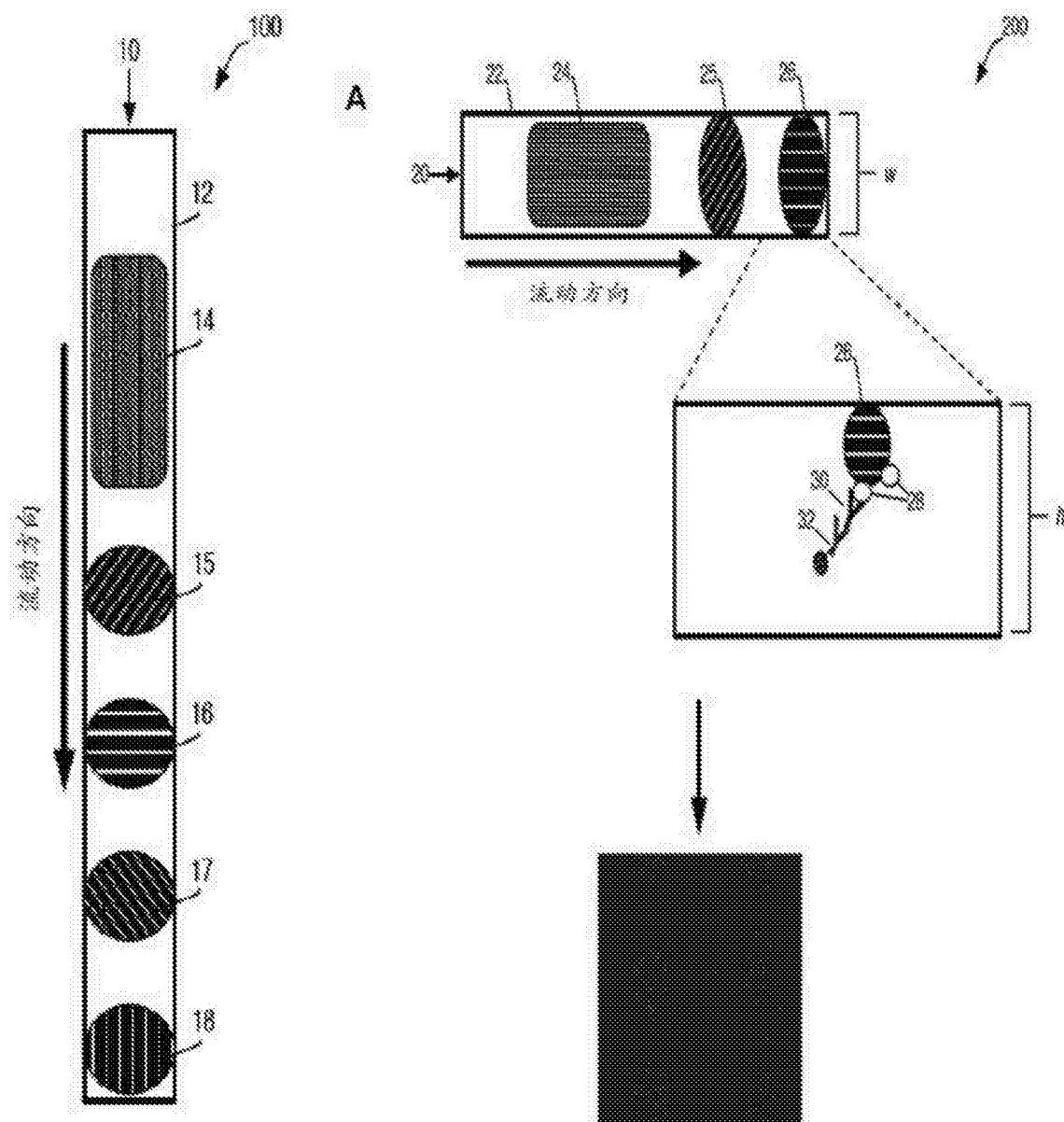


图1

图2

B

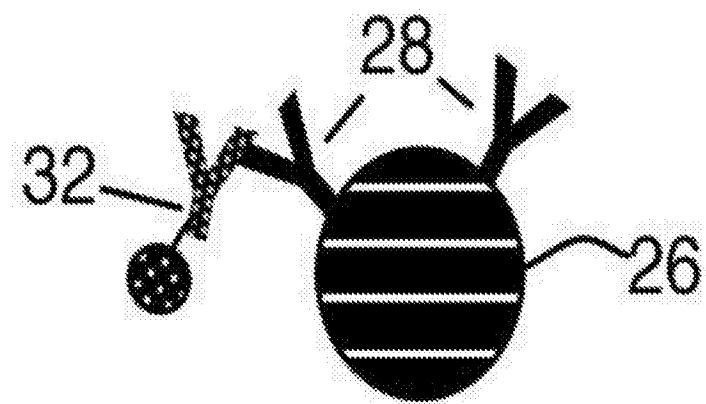


图2(续)

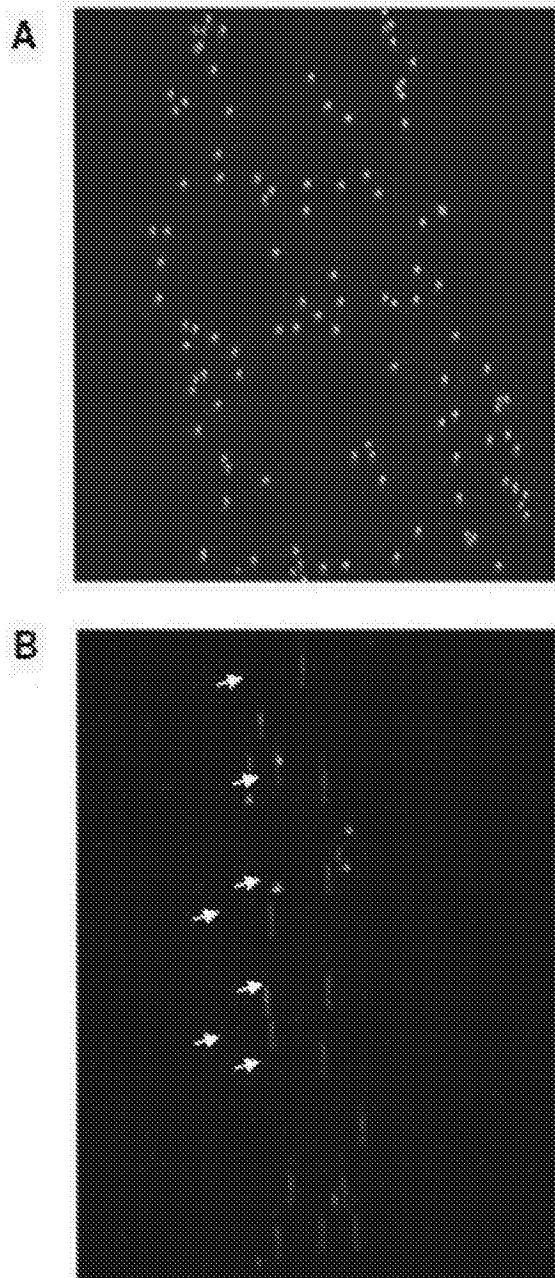


图3

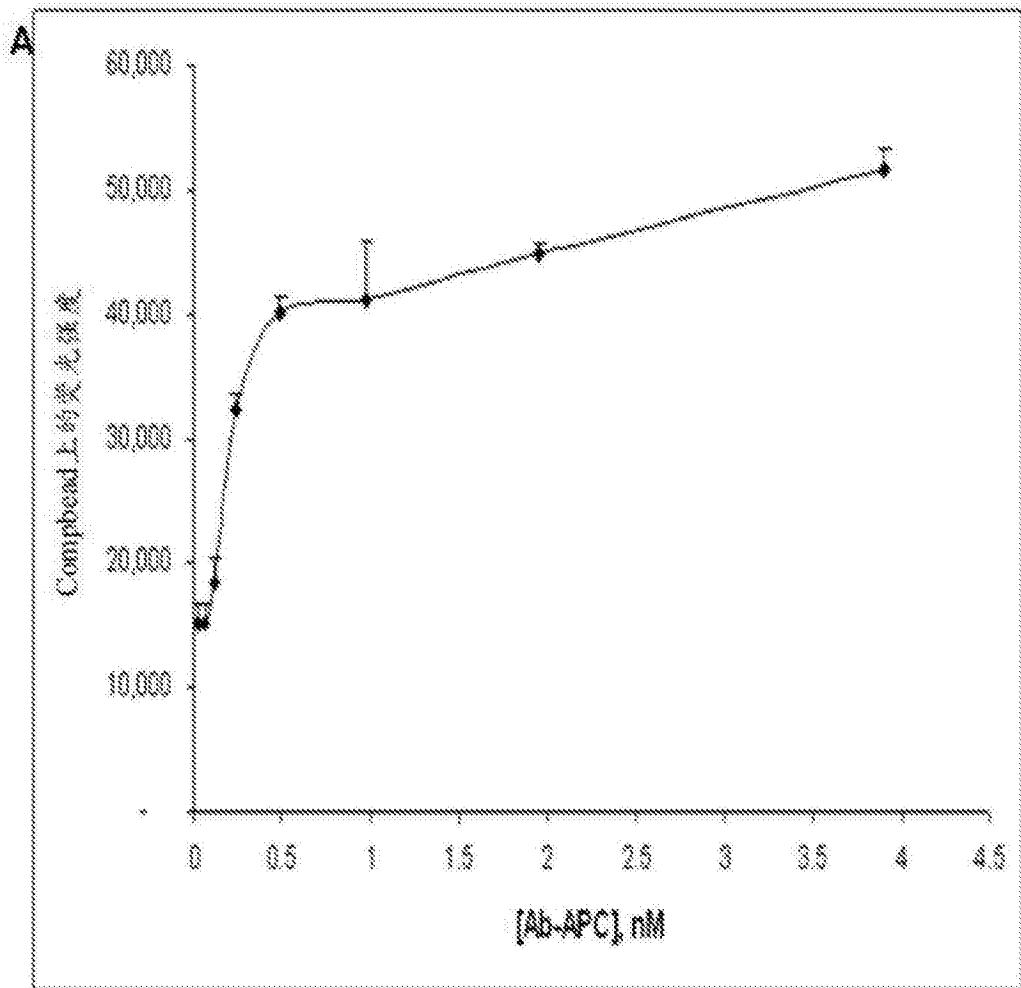


图4

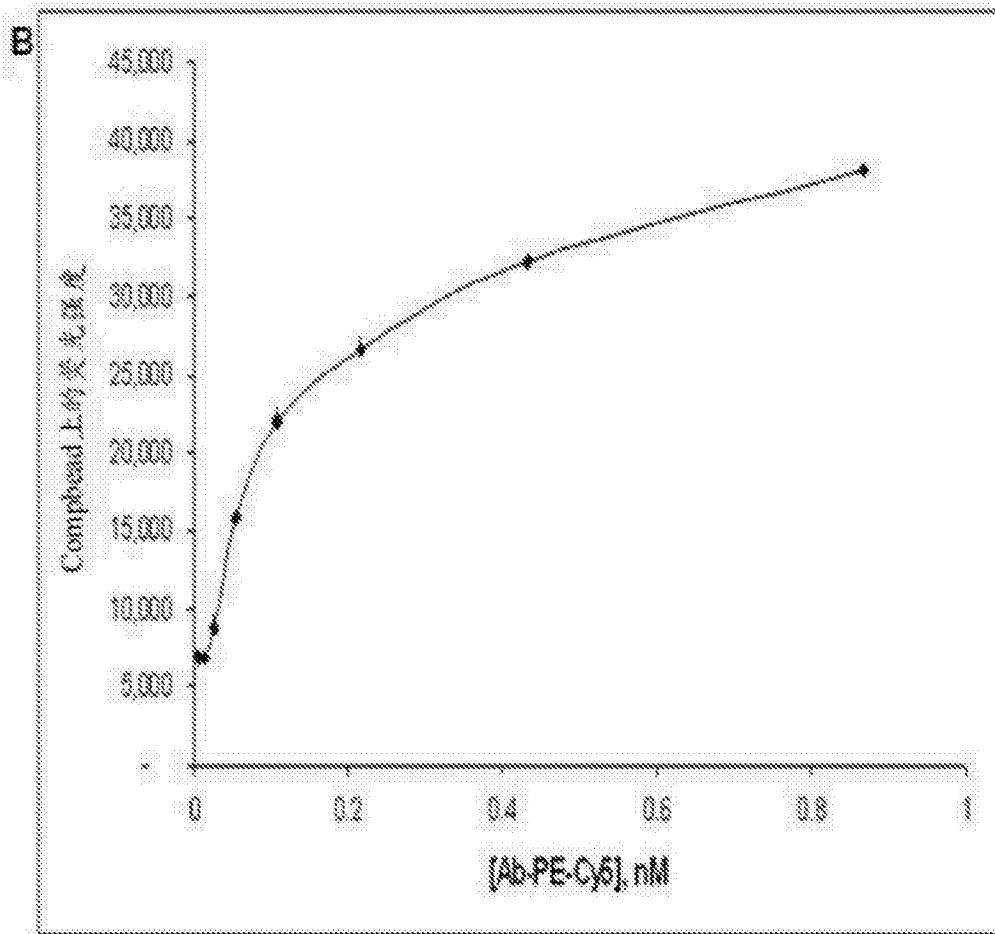


图4(续)

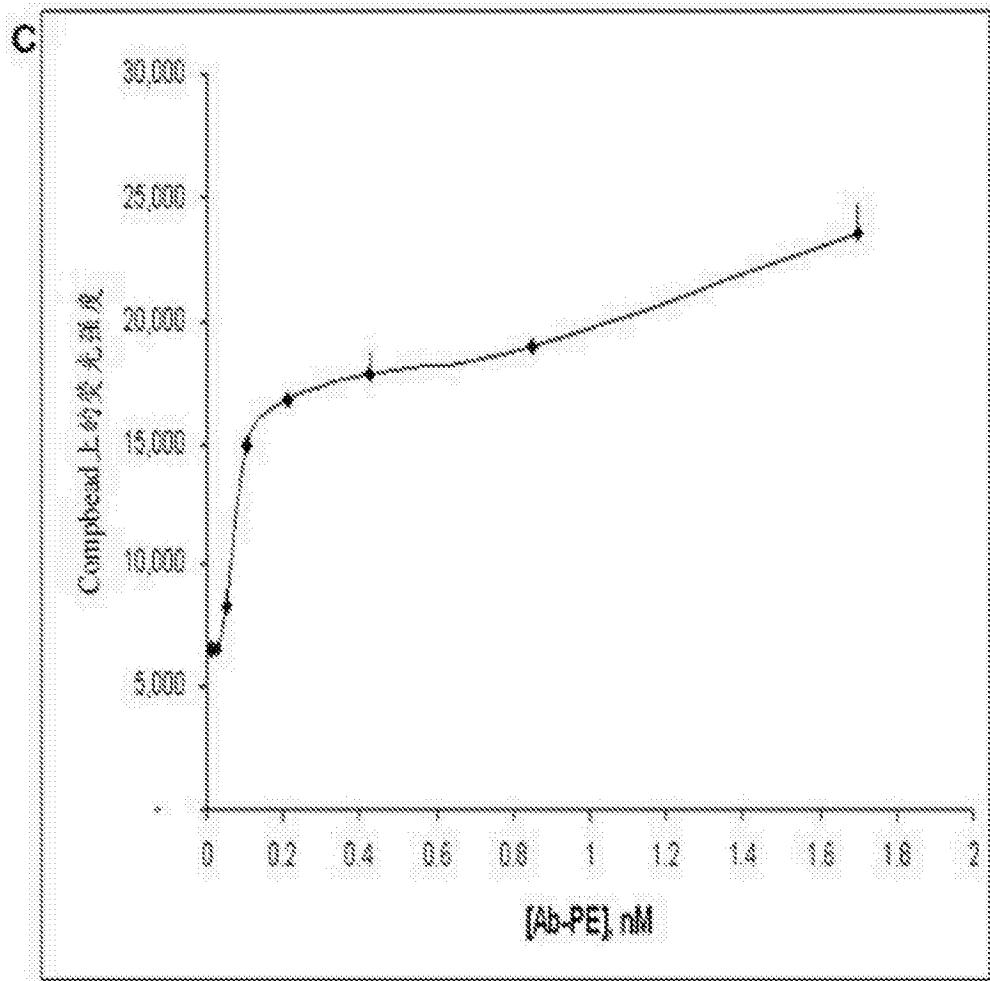


图4(续)

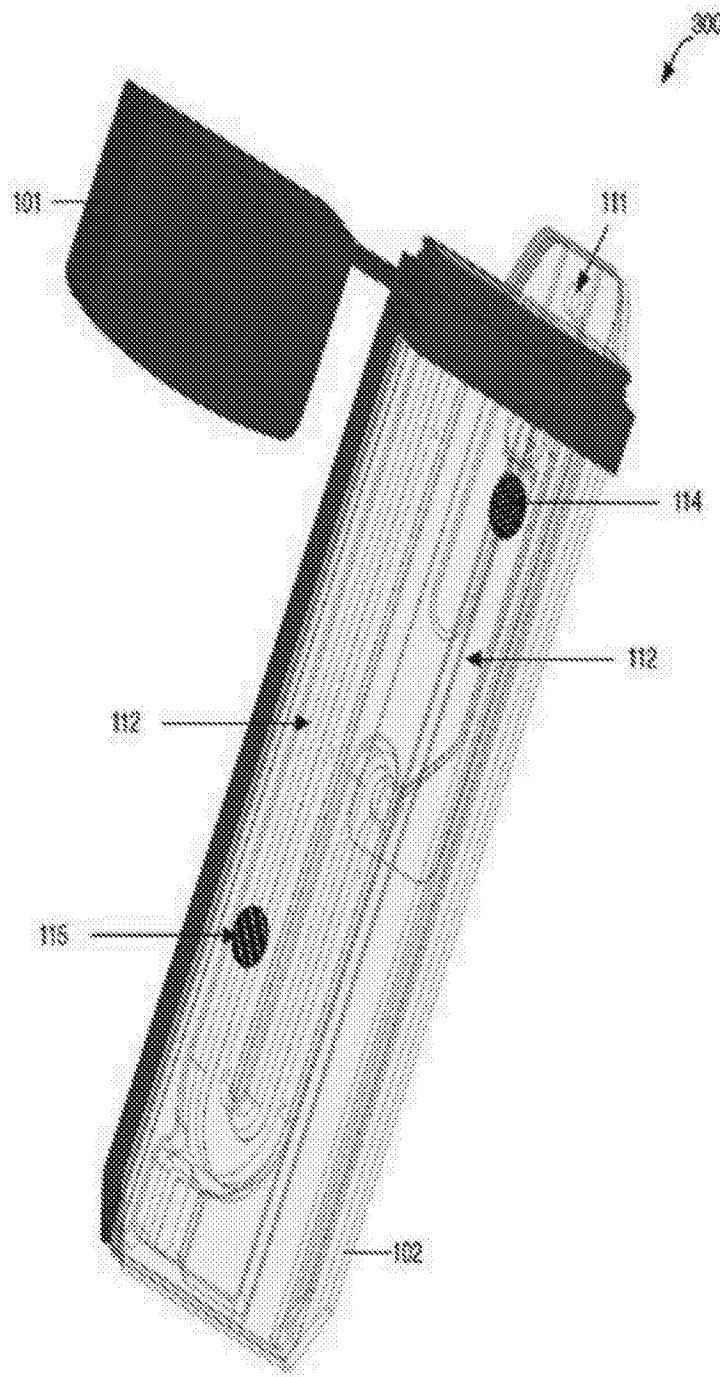


图5