



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103026232 B

(45) 授权公告日 2015.02.04

(21) 申请号 201180021686.7

(22) 申请日 2011.03.01

(30) 优先权数据

61/309,165 2010.03.01 US

12/731,136 2010.03.24 US

61/441,894 2011.02.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.10.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/026665 2011.03.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/109379 EN 2011.09.09

(73) 专利权人 匡特里克斯公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 D·M·里森 D·弗尼尔

D·C·杜菲

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁泉

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102884431 A, 2013.01.16, 全文.

CN 1635146 A, 2005.07.06, 全文.

WO 2007098148 A2, 2007.08.30, 全文.

WO 2009029073 A1, 2009.03.05, 全文.

US 6582908 B2, 2003.06.24, 全文.

WO 2006055739 A2, 2006.05.26, 全文.

Rissin David M. et al.. Digital concentration readout of single enzyme molecules using femtoliter arrays and poisson statistics.. 《Nano letters》. 2006, 第6卷(第3期), 520-523.

Rissin David M. et al.. Digital readout of target binding with attomole detection limits via enzyme amplification in femtoliter arrays.. 《Journal of the American Chemical Society》. 2006, 第128卷(第19期), 6286-6287.

Christof M. Niemeyer et al.. Combination of DNA-directed immobilization and immuno-PCR: Very sensitive antigen detection by means of self-assembled DNA-protein conjugates.. 《Nucleic Acid Research》. 2003, 第31卷(第16期), 4-7.

审查员 杨冀川

权利要求书2页 说明书41页 附图15页

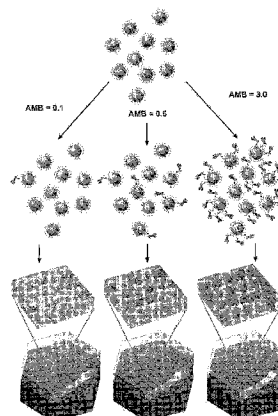
(54) 发明名称

扩大用于检测分子或颗粒的测定法中的动态范围的方法和系统

(57) 摘要

本文描述的是扩大用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒浓度的分析测定法和系统的动态范围的系统和方法。在一些实施方案中,方法包括将流体样品中的多个分析物分子空间隔离到多个位置内。可以指认位置的至少一部分,以测定包含至少一种分析物分子的所述位置的百分比。至少部分基于该百分比,使用模拟、基于强度的检测/分析方法/系统和/或数字检测/分析方法/系统,可以测定流体样品中的分析物分子的浓度的量度。在一些情况下,测定法可以包含多个捕获目

标的使用。



1. 一种用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度的方法,其包括:

使多个捕获体暴露于含有或怀疑含有至少一类分析物分子或颗粒的溶液,所述多个捕获体各自包括对于所述至少一类分析物分子或颗粒具有亲和力的结合表面,其中所述捕获体中的至少一些变得与至少一个分析物分子或颗粒连接,其中所述多个捕获体包含多个珠;

使经历暴露步骤的捕获体的至少一部分在空间上隔离到多个位置内,其中所述多个位置各自包含多个反应容器,反应容器的容积是约 10 阿升 - 约 100 皮升;

指认多个位置中的至少一些,且测定指示含有与至少一个分析物分子或颗粒连接的捕获体的所述位置百分比的量度,其中所述指认的位置是含有至少一个捕获体的位置;和

基于所述百分比,至少部分基于含有与至少一个分析物分子或颗粒连接的捕获体的位置数目,测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度,或至少部分基于指示多个分析物分子或颗粒的存在的信号的测量强度水平,测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述多个珠包含多个磁珠。

3. 权利要求 1 的方法,其中当含有至少一个捕获体并含有与至少一个分析物分子或颗粒连接的捕获体的所述位置的百分比是小于约 40% 时,所述流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度至少部分基于含有至少一个分析物分子或颗粒的位置数目。

4. 权利要求 1 的方法,其中当含有至少一个捕获体并含有与至少一个分析物分子或颗粒连接的捕获体的所述位置的百分比是大于约 30% 时,所述流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度至少部分基于指示多个分析物分子或颗粒存在的至少一种信号的强度水平。

5. 权利要求 1 的方法,其中当含有至少一个捕获体并含有与至少一个分析物分子或颗粒连接的捕获体的所述位置的百分比是约 30% - 约 50% 时,所述流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度是平均数,并且所述流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度至少部分基于含有至少一个分析物分子或颗粒的位置数目,且所述流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度至少部分基于指示多个分析物分子或颗粒存在的至少一种信号的强度水平。

6. 权利要求 1 的方法,其进一步包括至少一次本底信号测定。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述流体样品中的分析物分子的浓度量度至少部分基于测量的参数与校准曲线的比较。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述校准曲线至少部分通过测定至少一种校准因素形成。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述校准因素使用校准样品进行测定,其中包含与至少一个分析物分子连接的捕获体的所述位置的百分比是约 30% - 约 50%。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述流体样品中的分析物分子的浓度量度至少部分基于泊松分布调整。

11. 权利要求 1 的方法,其中所述珠不是磁性的。

12. 权利要求 1 的方法,其中含有至少一个分析物分子的所述位置的数目使用光学技术进行测定。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述光学技术包含 CCD 检测器的使用。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述多个反应容器在纤维光学束的末端上形成。

15. 权利要求 1 的方法,其进一步包括密封多个反应容器。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述多个反应容器的平均容积是约 1 飞升 - 约 1 皮升。
17. 权利要求 1 的方法,其中所述流体样品中的分析物分子或颗粒浓度小于约 $50 \times 10^{-15} \text{M}$ 。
18. 权利要求 1 的方法,其中在指认步骤中所述指认的位置的百分比是至少约 5%。
19. 权利要求 1 的方法,其中所述分析物分子或颗粒是蛋白质或核酸。
20. 权利要求 1 的方法,其进一步包括执行至少一个洗涤步骤。
21. 权利要求 1 的方法,其中所述分析物分子或颗粒包含酶促组分。
22. 权利要求 1 的方法,其中所述分析物分子在这样的条件下暴露于至少一种结合配体,从而使得基本上所有分析物分子与至少一种结合配体连接。
23. 权利要求 22 的方法,其中所述至少一种结合配体包含酶促组分。
24. 权利要求 22 的方法,其进一步包括将所述分析物分子或颗粒暴露于前体标记试剂。
25. 权利要求 24 的方法,其中所述前体标记试剂在暴露于所述酶促组分后转换为标记试剂。
26. 权利要求 25 的方法,其中在位置上的分析物分子或颗粒的存在通过测定至少一种前体标记试剂的存在进行测定。

扩大用于检测分子或颗粒的测定法中的动态范围的方法和系统

发明领域

[0001] 本文描述的是扩大用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒浓度的分析测定法和系统的动态范围的系统和方法。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求通过 Rissin 等人于 2011 年 2 月 11 日提交的, 名称为“Methods and Systems for Extending Dynamic Range in Assays for the Detection of Molecules or Particles”的美国临时专利申请序列号 61/441, 894 的利益。本申请还是通过 Rissin 等人于 2010 年 3 月 24 日提交的, 名称为“Methods and Systems for Extending Dynamic Range in Assays for the Detection of Molecules or Particles”的美国专利申请序列号 12/731, 136 的部分继续申请, 其要求通过 Rissin 等人于 2010 年 3 月 1 日提交的, 名称为“Methods and Systems for Extending Dynamic Range in Assays for the Detection of Molecules or Particles”的美国临时专利申请序列号 61/309, 165 的利益。上述申请各自通过引用合并入本文。

[0004] 发明背景

[0005] 能够快速且准确地检测, 和在特定情况下, 定量样品中的靶分析物分子的方法和系统是现代分析量度的基石。此类系统和方法在许多领域中采用, 例如学术和工业研究、环境评价、食品安全、医学诊断以及化学、生物学和放射学战试剂的检测。此类技术的有利特点可以包括特异性、速度和灵敏度。

[0006] 许多已知方法和技术受这些方法和技术可以准确检测的浓度的动态范围限制(例如有限的动态范围), 和 / 或当分子或颗粒以极低浓度存在时, 不具有对其进行检测的灵敏度。

[0007] 相应地, 需要扩大用于测定流体样品中的分子或颗粒的浓度量度的分析测定法和系统的动态范围的改良系统和方法。

[0008] 发明概述

[0009] 本文描述的是扩大用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒浓度的分析方法和系统的动态范围的系统和方法。在一些情况下, 本发明的主题涉及相关产品、针对特定问题的备选解决方案、和 / 或一种或多种系统和 / 或物品的多个不同用途。

[0010] 在一些实施方案中, 用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度的系统, 包括包含多个位置的测定法基底, 所述多个位置各自包含在此类位置内形成或包含的结合表面, 其中至少一个结合表面包含固定在结合表面上的至少一种分析物分子或颗粒, 配置为指认多个位置的至少一个检测器, 其能够产生指示在指认的每个位置上的分析物分子或颗粒的存在或不存在且具有随着在每个位置上的分析物分子或颗粒数目而改变的强度的至少一种信号, 和至少一个信号处理器, 其配置为由至少一种信号测定含有至少一个分析物分子或颗粒的所述位置百分比, 且进一步配置为基于该百分比, 至少部分基于含有至少一个分析物分子或颗粒的位置数目, 测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量

度,或至少部分基于指示多个分析物分子或颗粒的存在的至少一种信号的强度水平,测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度。

[0011] 在一些实施方案中,用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度的方法包括提供就对于至少一类分析物分子或颗粒具有亲和力的结合表面而言固定的分析物分子或颗粒,所述结合表面在基底上的多个位置之一内形成或包含,指认多个位置中的至少一些,且测定指示含有至少一个分析物分子或颗粒的所述位置百分比的量度,并且基于该百分比,至少部分基于含有至少一个分析物分子或颗粒的位置数目,测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度,或至少部分基于指示多个分析物分子或颗粒的存在的信号的测量强度,测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度。

[0012] 在一些实施方案中,用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度的方法包括使多个捕获体暴露于含有或怀疑含有至少一类分析物分子或颗粒的溶液,所述多个捕获体各自包括对于至少一类分析物分子或颗粒具有亲和力的结合表面,其中所述捕获体中的至少一些变得与至少一个分析物分子或颗粒连接,使经历暴露步骤的捕获体的至少一部分在空间上隔离到多个位置内,指认多个位置中的至少一些,且测定指示含有与至少一个分析物分子或颗粒连接的捕获体的所述位置百分比的量度,其中所述指认的位置是含有至少一个捕获体的位置,并且基于该百分比,至少部分基于含有与至少一个分析物分子或颗粒连接的捕获体的位置数目,测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度,或至少部分基于指示多个分析物分子或颗粒的存在的信号的测量强度水平,测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度。

[0013] 附图简述

[0014] 当与附图结合考虑时,本发明的其他方面、实施方案和特征由下述详述将变得显而易见。附图是示意性的并且不预期是按比例描绘的。为了明确的目的,当举例说明不是必须的时,并非每一个部件都在每一个图中标记,也并非显示了本发明的每个实施方案的每一个部件,以允许本领域普通技术人员理解本发明。在正文中提及的所有专利申请和专利通过引用整体合并。在本说明书中含有的说明书和通过引用合并的文件之间冲突的情况下,以本说明书包括定义为准。

[0015] 图 1 显示了如根据一些实施方案执行的,泊松(Poisson)分布调整的结果的图形显示;

[0016] 图 2 显示了根据一个实施方案,每个珠结合的酶的平均数目与流体样品中的酶浓度比较的图;

[0017] 图 3 显示了根据一个实施方案,每个珠结合的酶的平均数目与流体样品中的酶浓度比较的图,其中所述每个珠结合的酶的平均数目使用两种不同的分析方法进行计算;

[0018] 图 4A 显示了根据一个实施方案,由每个珠的平均分子(AMB)给出的,活性珠的部分与有效分析物浓度比较的曲线图,所述 AMB 由使用泊松分布的数字计数进行测定;

[0019] 图 4B 显示了根据一个实施方案,根据有效浓度 AMB 的模拟强度($I_{\text{珠}}/I_{\text{单一}}$)的曲线图;

[0020] 图 4C 显示了根据一个实施方案,根据来自(i)数字分析和(ii)模拟分析的活性珠数目,在 AMB (%CV) 中的不精确性的曲线图;

[0021] 图 5A 显示了本发明的一个实施方案的测定法方案的示意图,其中 AMB=0.1 (左)、

AMB=0.6 (中) 和 AMB=3 ;

[0022] 图 5B-D 显示了使用根据一些实施方案的测定法,在(D)0.1、(E)0.6 和 (F)3.0 的近似 AMB 时,在个别孔中的单数(singulated)珠生成的荧光图像;

[0023] 图 6 显示了根据一些实施方案,根据在珠上的酶数目产生的试卤灵分子数目的曲线图;

[0024] 图 7 显示了根据一些实施方案,荧光强度与时间比较的图,其可以用于测定光漂白速率;

[0025] 图 8 是描述采用前体标记试剂的本发明方法的步骤的一个实施方案的示意图;

[0026] 图 9A 和 9B 显示了采用光学检测系统的系统的非限制性例子;

[0027] 图 10 是显示采用具有光学检测系统的纤维光学组件的系统的示意性方框图;

[0028] 图 11 是描述通过基底与密封部件的配合用于形成多个反应容器的方法(步骤 A-D)的一个实施方案,且描述相对于基底的密封部件大小(E, F)的例子的示意性流程图;

[0029] 图 12A 描述了关于使用光进行检测的实验设置;

[0030] 图 12B 显示了已用密封部件密封的纤维光学阵列;

[0031] 图 13A 显示了根据一个实施方案,根据酶浓度的 AMB 曲线图;

[0032] 图 13B 显示了根据一个实施方案,包括根据酶浓度的活性珠 % 和 AMB 值的表;

[0033] 图 14A 和 14B 是根据一些实施方案,显示了 PSA 样品的组合数字和模拟分析的曲线图;

[0034] 图 15A 是根据一个实施方案,显示使用泊松统计量的活性珠 % 至 $AMB_{\text{数字}}$ 转换的数据表;和

[0035] 图 15B 显示了根据一些实施方案,根据酶浓度的活性珠 % (菱形)和 $AMB_{\text{数字}}$ (方形)的曲线图。

[0036] 详述

[0037] 本文描述的是扩大用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒(例如,细胞、细胞器及其他生物学或非生物学微粒)的浓度的分析测定法和系统的动态范围的系统和方法。在一些情况下,本发明的主题涉及相关产品、针对特定问题的备选解决方案、和 / 或一种或多种系统和 / 或物品的多个不同用途。应当理解,虽然下文的许多讨论涉及分析物分子,但这仅作为例子,并且可以检测和 / 或定量其他材料,例如以微粒形式的分析物。分析物分子和颗粒的一些示例性例子在本文中描述。

[0038] 通过采用两种或更多种技术用于测定流体样品中的分析物分子的浓度量度,本文描述的方法和系统可以用于扩大在特定实施方案中使用的分析方法和系统的动态范围。在一些实施方案中,如本文描述的,动态范围可以通过组合模拟、基于强度的检测 / 分析方法 / 系统和数字检测 / 分析方法 / 系统而进行扩大。在一些情况下,当流体样品中的分析物分子以低浓度范围存在时,可以检测单一分析物分子,并且可以测定分析物分子数目。流体样品中的分析物分子的浓度量度可以至少部分基于使用数字分析方法 / 系统的这个数据(例如分析物分子数目)。在一些情况下,数据可以进一步使用泊松分布调整进行处理。在更高浓度范围(例如在其中分离 / 检测 / 测定单一分析物分子可以变得更不实际的浓度水平时),流体样品中的分析物分子的浓度量度可以使用基于模拟、基于强度水平的技术进行测定。在模拟分析方法 / 系统中,浓度量度可以至少部分基于测量的相对信号强度,其中测量

的总强度可以与分析物分子的存在和数量相关。在特定实施方案中,模拟和数字能力可以组合在单一测定法/系统中,从而使得例如可以开发校准标准用于跨越宽动态范围的目的分析物分子。在一个此类例子中,可以使用数字和模拟定量技术生成单一校准曲线,其中校准的数字和模拟方案通过使用校准因数进行联系,如本文描述的。测试流体样品中未知浓度的分析物分子的测定可以至少部分基于通过使测试结果(例如含有分析物分子的位置数目/部分(数字)和/或测量的强度水平(模拟))与校准曲线相比较。

[0039] 术语“动态范围”以其在本领域中的普通含义给出,并且指流体样品中的分析物分子浓度范围,其可以通过系统或方法进行定量,而无需样品的稀释或浓缩或者产生类似结果的测定法条件中的变化(例如采用的试剂浓度等),并且其中分析物分子的测量浓度可以基本上准确地测定。流体样品中的分析物分子浓度可以视为基本上准确地测定的,如果流体样品中的分析物分子的测量浓度在流体样品中的分析物分子的实际(例如真正)浓度的约 10% 内。在特定实施方案中,流体样品中的分析物分子的测量浓度在下述实施方案中是基本上准确地测定的,其中测量的浓度在流体样品中的分析物分子的实际(例如真正)浓度的约 5% 内、在约 4% 内、在约 3% 内、在约 2% 内、在约 1% 内、在约 0.5% 内、在约 0.4% 内、在约 0.3% 内、在约 0.2% 内、或在约 0.1% 内。在一些情况下,测定的浓度量度与真正(例如实际)浓度相差不大于约 20%、不大于约 15%、不大于约 10%、不大于约 5%、不大于约 4%、不大于约 3%、不大于约 2%、不大于约 1%、或不大于约 0.5%。在一些实施方案中,通过使用所选测定方法测定已知浓度的流体样品中的分析物分子浓度,且使测量的浓度与实际浓度相比较,可以确定测定方法的准确度。

[0040] 在一些实施方案中,本发明的系统或方法可以能够经过超过约 1000 (3 对数)、约 10,000 (4 对数)、约 100,000 (5 对数)、约 350,000 (5.5 对数)、1,000,000 (6 对数)、约 3,500,000 (6.5 对数)、约 10,000,000 (7 对数)、约 35,000,000 (7.5 对数)、约 100,000,000 (8 对数) 或更多的动态范围来测量流体样品中的分析物分子浓度。

[0041] 在一些实施方案中,可以基本上准确地测定的流体样品中的分析物分子浓度(例如未知浓度)小于约 5000fM (飞摩尔)、小于约 3000fM、小于约 2000fM、小于约 1000fM、小于约 500fM、小于约 300fM、小于约 200fM、小于约 100fM、小于约 50fM、小于约 25fM、小于约 10fM、小于约 5fM、小于约 2fM、小于约 1fM、小于约 500aM (渺摩尔)、小于约 100aM、小于约 10aM、小于约 5aM、小于约 1aM、小于约 0.1aM、小于约 500zM (zeptomolar)、小于约 100zM、小于约 10zM、小于约 5zM、小于约 1zM、小于约 0.1zM 或更少。在一些情况下,检测极限(例如可以在溶液中测定的分析物分子的最低浓度)是约 100fM、约 50fM、约 25fM、约 10fM、约 5fM、约 2fM、约 1fM、约 500aM (渺摩尔)、约 100aM、约 50aM、约 10aM、约 5aM、约 1aM、约 0.1aM、约 500zM (zeptomolar)、约 100zM、约 50zM、约 10zM、约 5zM、约 1zM、约 0.1zM 或更少。在一些实施方案中,可以基本上准确地测定的流体样品中的分析物分子或颗粒浓度是约 5000fM- 约 0.1fM、约 3000fM- 约 0.1fM、约 1000fM- 约 0.1fM、约 1000fM- 约 0.1zM、约 100fM- 约 1zM、约 100aM- 约 0.1zM 或更少。检测上限(例如可以在溶液中测定的分析物分子的较高浓度)是至少约 100fM、至少约 1000fM、至少约 10pM (皮摩尔)、至少约 100pM、至少约 100pM、至少约 10nM (纳摩尔)、至少约 100nM、至少约 1000nM、至少约 10uM、至少约 100uM、至少约 1000uM、至少约 10mM、至少约 100mM、至少约 1000mM 或更大。在一些实施方案中,测定的流体样品中的分析物分子或颗粒浓度是小于约 $50 \times 10^{-15}\text{M}$ 、或小于约 $40 \times 10^{-15}\text{M}$ 、或小于约 $30 \times 10^{-15}\text{M}$ 、

或小于约 $20 \times 10^{-15}\text{M}$ 、或小于约 $10 \times 10^{-15}\text{M}$ 、或小于约、或小于约 $1 \times 10^{-15}\text{M}$ 。

[0042] 示例性组合的数字 / 模拟分析方法 / 系统

[0043] 下述部分描述了扩大用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒浓度的分析测定法和系统的动态范围的系统和方法。在一些实施方案中,采用的分析方法能够个别分离且检测以低浓度的单一分析物分子。在一些情况下,分析方法涉及使多种分析物分子在空间上隔离到在基底(例如板、芯片、光学纤维面等)表面中或上的多个位置内。在低浓度范围,分析物分子可以这样在空间上隔离,从而使得此类位置的统计上显著的部分不含分析物分子,其中至少一些位置含有至少一个分析物分子。可以与用于扩大动态范围的本发明的方法 / 系统联合使用的方法和系统在本文中描述。

[0044] 作为示例性方法且如本文更详细地描述的,流体样品中的多个分析物分子可以制备为变得就多个捕获体(例如珠)而言固定的,所述多个捕获体各自包括对于至少一类分析物分子具有亲和力的结合表面(参见例如,在通过 Duffy 等人于 2010 年 3 月 24 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects”的共同拥有的美国专利申请序列号 12/731,130 ;和通过 Duffy 等人于 2011 年 3 月 1 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects”的国际专利申请号(仍未确定)(代理人案号 Q0052.70011W000)中所述的方法和捕获体,所述专利各自通过引用合并入本文)。至少一些珠(例如与至少一个分析物分子连接的至少一些)可以空间分离 / 隔离到多个位置(例如反应容器)内,并且至少一些反应容器可以进行指认 / 查询,以检测珠和分析物分子的存在。在一些情况下,指认的多个反应容器是含有至少一个捕获体(例如与至少一个分析物分子连接或不与任何分析物分子连接)的反应容器总数量的部分或基本上所有。应当理解,虽然本文的许多讨论集中于包括在将多种分析物分子在空间上隔离到多个反应容器内之前,就珠(例如其他捕获体)而言固定分析物分子的方法,这决不是限制性的,并且其他方法 / 系统可以用于在空间上隔离分析物分子(例如其中分析物分子隔离到多个位置内,而不固定在捕获体上)。本领域普通技术人员将能够将本文描述的方法、系统和分析应用于不采用捕获体(例如珠)的方法。例如,参见通过 Walt 等人于 2007 年 2 月 16 日提交的,名称为“Methods and arrays for target analyte detection and determination of target analyte concentration in solution”的美国专利申请号 20070259448 ;通过 Walt 等人于 2007 年 2 月 16 日提交的,名称为“Methods and arrays for detecting cells and cellular components in small defined volumes”的美国专利申请号 20070259385 ;通过 Walt 等人于 2007 年 2 月 16 日提交的,名称为“Methods and arrays for target analyte detection and determination of reaction components that affect a reaction”的美国专利申请号 20070259381 ;通过 Walt 等人于 2007 年 8 月 20 日提交的,名称为“Methods for Determining the Concentration of an Analyte in Solution”的国际专利申请号 PCT/US07/019184 ;和通过 Duffy 等人于 2009 年 9 月 9 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Enzymes”的国际专利申请号 PCT/US09/005428,所述专利通过引用合并入本文。

[0045] 在将珠在空间上隔离到反应容器内之后,反应容器的至少一部分可以进行指认 / 查询,以测定含有与至少一个分析物分子连接的珠的指认的位置数目和 / 或百分比。在一

些情况下,指认的位置是含有至少一个珠(例如与至少一个分析物分子连接或不与任何分析物分子连接)的位置的至少一部分。含有与至少一个分析物分子连接的珠的位置百分比(“活性”珠的百分比)是与至少一个分析物分子连接的珠数目除以指认的珠总数目,乘以100%。备选地,需要时,活性百分比可以基于指认的位置数目,无论它们是否含有珠(即含有活性珠的位置作为指认的位置百分比)。如本领域普通技术人员应当理解的,在其中不采用的珠(或其他捕获体)的实施方案中,下述讨论中的“活性珠”百分比可以取代含有至少一个分析物分子的位置百分比(例如“活性位置”百分比)。

[0046] 在一些实施方案中,通过测定活性珠的数目/百分比,可以测定流体样品中的大量分析物浓度。特别是在低浓度水平(例如在数字范围浓度中),通过将珠计数为“开”(例如含有与至少一个分析物分子连接的珠的反应容器)或“关”(例如含有不与任何分析物分子连接的珠的反应容器),可以至少部分测定流体样品中的分析物分子的浓度量度。在分析物分子与珠的低比率时(例如小于约1:5、小于约1:10、小于约1:20或更少),几乎所有珠都与零或一个分析物分子连接。在这个范围中,活性珠的百分比(例如“开”反应容器)可以基本上随着增加的分析物浓度线性增加,并且数字分析方法可以有利地用于分析数据。

[0047] 然而,当分析物浓度增加时,珠的显著群体一般与超过一个分析物分子连接。即,至少一些珠与两个、三个等分析物分子连接。因此,当分析物浓度增加时,在某一点上,群体中的活性珠的百分比一般不与大量分析物浓度线性相关,因为更大比例的珠可以与超过一个分析物分子连接。在这些浓度范围中,数据仍可以有利地使用数字分析方法(例如计数“开”和“关”珠)进行分析,然而,它可以能够通过应用泊松分布调整改善测定法的准确度,以解释分析物分子的群体与珠群体的结合概率。例如,根据泊松分布调整,在报道约1.0活性珠%(例如与至少一个分析物分子连接的珠与珠总数目的比率是约1:100)的测定法中,约99%的珠不含分析物分子,约0.995%的珠与一种分析物分子连接,并且约0.005%的珠与两种分析物分子连接。作为比较,在报道约20.0活性珠%(例如与至少一个分析物分子连接的珠与珠总数目的比率是约1:5)的测定法中,约80%的珠不含分析物分子,约17.85%的珠与一种分析物分子连接,约2.0%的珠与两种分析物分子连接,并且约0.15%的珠与三种分析物分子连接。非线性效应(例如如在第二个比较实施例可见的)可以解释跨越整个浓度范围,其中使用泊松分布调整,仍存在统计上显著比例(例如如本文描述的-参见下文等式1和相关讨论)的不与样品中的任何分析物分子或颗粒连接的珠连接(例如其中数字分析方法/系统可以能够准确地测定浓度量度的范围,例如在一些情况下,高达约20活性珠%、高达约30活性珠%、高达约35活性珠%、高达约40活性珠%、高达约45活性珠%、高达约50活性珠%、高达约60活性珠%、高达约70活性珠%或更多)。如果事件的平均数目是已知的,那么泊松分布描述许多事件出现的可能性。如果出现的预期数目是 μ ,那么确切地存在 v 出现的概率($P_{\mu}(v)$)(v 是非负整数, $v=0,1,2,\dots$)可以通过等式1进行测定:

$$[0048] \quad P_{\mu}(v) = e^{-\mu} \left(\frac{\mu^v}{v!} \right) \quad (\text{等式 1})$$

[0049] 在本发明的一些实施方案中, μ 等于检测到的分析物分子数目与检测到的珠总数目(例如与任何分析物分子连接或不连接的)的比率,并且 v 是含有特定数目的分析物分子的珠数目(例如与0、1、2、3等个分析物分子连接的珠数目)。通过由实验测定 μ ,因此,可以

测定分析物分子的数目和通过进一步计算测定分析物分子的浓度。在数字 / 二元模式的测量中,其中与 1、2、3、4、等个分析物分子连接的珠是不能区别的(例如,其中 $v=1、2、3、4$ 是不能区别的),并且含有分析物分子的珠(或位置)仅仅表征为“开”。 $v=0$ 的出现可以最后测定为“关”珠(或位置)的数目。 $(P_{\mu}(0))$ 可以根据等式 2 进行计算:

$$[0050] \quad P_{\mu}(0) = e^{-\mu} \left(\frac{\mu^0}{0!} \right) = e^{-\mu} \quad (\text{等式 2})$$

[0051] 并且基于等式 2 的重排可以测定预期出现的数目 μ , 如等式 3 中给出的:

$$[0052] \quad \mu = -\ln[P_{\mu}(0)] \quad (\text{等式 3})。$$

[0053] 不与分析物分子连接的珠的出现数目 $P_{\mu}(0)$ 等于 1 减去具有所有其他出现的珠总数目(例如与至少一个分析物分子连接的珠),那么 μ 由等式 4 给出:

$$[0054] \quad \mu = \text{分析物分子数目} / \text{珠总数目} = -\ln(1 - \text{“开”珠的部分}) \quad (\text{等式 4})。$$

[0055] 在一些情况下, μ 在本文中也称为“AMB_{数字}”。重排等式 4, 计数位置中含有的流体样品中的分析物分子总数目可以使用等式 5 进行测定:分析物分子的数目 $= -\ln(1 - \text{“开”珠的部分}) \times (\text{珠总数目})$ (等式 5)。

[0056] 因此,分子的总数目可以由对于给定数目珠的“开”珠的部分进行测定,并且流体样品中的分析物分子的浓度量度可以至少部分基于这个数目(以及例如在测定法过程中样品的任何稀释度,查询的含有捕获体的孔的数目和体积等)。具有 1、2、3、4 等个结合的分析物分子的珠数目还可以通过由测定的 μ 和等式 1 计算 $P_{\mu}(1)$ 、 $P_{\mu}(2)$ 、 $P_{\mu}(3)$ 等进行测定。

[0057] 表 1 证实了泊松分布调整的潜在效用。列 A 显示了由测试的克分子浓度和体积计算的样品中的分析物分子数目。列 B 显示了在珠上捕获的分子的未调整数目,其中与任何数目(例如一个、两个、三个等)分析物分子连接的任何珠计数为与单一分析物分子连接。列 D 是泊松调整的数据,其中与两个分析物分子连接的珠计数为具有两个结合分子,并且与三个分子结合的珠计数为具有三个结合分子等。可以通过比较列 C 和 E, 可见未调整和调整的数据的比较。这些列给出了在每个浓度时测定法的计算捕获效率,其中捕获效率是捕获的分析物分子的测定数目(未调整或泊松调整的)除以流体样品中提供的分析物分子数目,乘以 100%。列 C 显示了使用未调整的数据计算的捕获效率,并且随着分析物分子的浓度增加观察到捕获效率中的减少。列 E 显示了使用泊松调整的数据计算的捕获效率。图 1 是示例性泊松分布调整结果的图形显示。未调整的数据衍生自伴随增加浓度的线性,而已实施泊松分布调整的数据通过标绘的浓度范围的基本部分是基本上线性的。使用列 D 中所示的结果,可以计算每个珠的分析物分子的平均数目(例如捕获的分子的泊松调整数目除以指认的珠总数目)。在特定实施方案中,所得到的每个珠的分析物分子的平均数目可以用于制备校准曲线,如本文描述的。

[0058] 表 1. 泊松分布调整

[0059]

	列 A	列 B	列 C	列 D	列 E
[SβG] (aM)	系统中的分子#	捕获的分子未 调整#	数字读数未调整的 捕获效率	捕获的分子的 泊松调整#	泊松调整的捕 获效率
0.35	21	28	132%	28	132%
0.7	42	33	79%	33	79%
3.5	211	159	75%	159	75%
7	421	279	66%	279	66%
35	2107	1778	84%	1782	85%
70	4214	3267	78%	3280	78%
350	21070	13514	64%	13748	65%
700	42140	30339	72%	31552	75%
3500	210700	122585	58%	146380	69%
7000	421400	178112	42%	235716	56%

[0060] 超过特定活性珠百分比(即,其中不再存在群体中存在的不与任何分析物分子或颗粒连接的统计上显著比例的珠,或对于其中可以存在群体中存在的统计上显著比例的珠的情况潜在有利,所述珠不与任何分析物分子或颗粒连接,但导致活性珠百分比超过特定水平 - 例如,大于或基本上大于约 40%、或约 50%、或约 60%、或约 70% (或活性位置百分比,在其中未采用珠的实施方案中)),在分析物分子浓度的测定中的准确度和 / 或可靠性中的改善可以潜在地通过下述实现:采用基于强度测量的模拟测定和分析,而不是如先前描述的数字 / 二元计数 / 泊松分布调整,或是对于如先前描述的数字 / 二元计数 / 泊松分布调整的补充。在更高的活性珠百分比时,由其他活性珠(例如阳性反应容器)围绕的活性珠(例如阳性反应容器)的概率更高,且可以在特定测定设置中对排他地使用数字 / 二元测定方法产生特定实际挑战。例如,在特定实施方案中,可检测组分从邻近反应容器到反应容器内的渗透可以在一定程度发生。在此类情况下基于模拟、强度水平的技术的使用可以潜在地获得更有利的性能。

[0061] 图 2 举例说明了泊松调整的数字读出技术的特点,在一些情况下,随着分析物浓度增加可以观察到这点,从而使得活性珠的数目增加至更高水平。在某一点上,在特定实施方案中,分析物分子的浓度可以达到这样的水平,其中含或不含泊松分布调整,数字读出技术不再作为如可能希望的就浓度而言的线性关系产生,并且由本发明的系统 / 方法采用的分析技术可以这样改变,从而使得采用模拟分析方法 / 系统。在模拟分析中,在高浓度时多种分析物分子与单一珠的连接可以能够更有效地和 / 或可靠地定量。可以测定来自含有至少一个分析物分子的多个反应容器的至少一种信号的强度。在一些情况下,测定的强度可以由含有至少一个分析物分子的查询的所有反应容器测定的总全部强度(例如反应容器的强度就整体而言进行测定)。在其他情况下,可以测定产生信号的每个反应容器的强度且求平均值,产生平均珠信号(ABS)。

[0062] 为了扩大本发明的测定方法 / 系统的动态范围以组合模拟和数字分析方法 / 系统,可以建立关于两种分析方法 / 系统的结果 / 参数的“联系”。在特定情况下,这可以借助于校准曲线来完成。在一些实施方案中,至少部分通过测量的参数与校准曲线的比较可以测定流体样品(例如测试样品)中的分析物分子的未知浓度量度,其中校准曲线包括涵盖数字和模拟浓度范围的数据点,并且因此与单一模式(即,仅数字或仅模拟)分析方法 / 系统相比较,具有扩大的动态范围。可以在与用于分析未知浓度的测试样品的那些基本上相似的

条件下,通过用已知浓度的多个标准化样品执行测定法而产生校准曲线。在一个例子中,校准曲线可以由使用模拟测量测定的数据转变为数字分析系统 / 方法,因为检测到的活性珠百分比减少至阈值或低于阈值(例如,约 40 活性珠 %、或约 50 活性珠 %、或约 60 活性珠 %、或约 70 活性珠 % 等)。

[0063] 为了制备组合的数字-模拟校准曲线,在特定实施方案中,在低浓度(数字)和高浓度(模拟)分析方案中获得的结果之间作出联系。在特定实施方案中,标准曲线使分析物分子浓度与定义为每个珠的分析物分子平均数目的参数相关,或 AMB 与溶液中的分子浓度比较。应当理解虽然下述讨论特征在于其中分析物分子恰好是酶的示例性实施方案,但这决不是限制性的,并且在其他实施方案中,可以采用其他类型的分析物分子或颗粒。例如,分析物分子可以是生物分子,并且测定法可以涉及包含酶促组分的结合配体的使用。如上所述,关于具有落入其中数字分析是优选的范围中的浓度的样品的 AMB 可以使用泊松分布调整进行测定。如下所述,关于具有落入其中模拟分析是优选的范围中的浓度的样品的 AMB 可以通过使用换算因数将模拟强度信号(例如平均珠信号)转换为 AMB 进行测定。

[0064] 在第一个示例性实施方案中,为了制备校准曲线且测定合适的换算因数,对校准样品执行测定法,其中活性珠的百分比(或在其中不采用珠的实施方案中,活性位置的百分比)是约 30%-约 50%、或约 35%-约 45%,或在一些情况下,约 40%,或在一些情况下,大于 50%。如上所述,关于这种样品的 AMB 可以使用泊松分布调整进行计算。对于这种样品,还测定平均珠信号(ABS)。关联 ABS 与 AMB 的换算因数(CF)可以例如根据等式 6 进行定义:

[0065] $CF = \text{AMB}_{\text{校准样品}} / \text{ABS}_{\text{校准样品}}$ (等式 6)。

[0066] 因此,在其中优选使用模拟测定的方案,关于样品(例如未知样品或具有将其置于模拟区中的浓度的校准样品)的 AMB 可以根据等式 7 进行计算:

[0067] $\text{AMB}_{\text{样品 } x} = CF \times \text{ABS}_{\text{样品 } x}$ (等式 7)。

[0068] 例如,在一个示例性实施方案中,校准曲线和换算因数可以如下进行测定。在下文显示的表 2 中,使用数字 / 二元读出方案测定的分析物分子(例如在这个示例性实施方案中的酶)的最高浓度(约 7fM)产生约 42.36% 活性孔。使用泊松分布调整来调整这种数字信号,以测定结合的分子的总数目,并且 AMB 测定为 0.551。还分析在这个浓度水平收集的数据,以测定平均珠信号(ABS 等于约 1041 荧光单位)。因此,如使用等式 6 计算的,模拟至数字换算因数是 0.000529AMB/ 荧光单位。对于具有相对高浓度范围的其他样品,通过应用这种换算因数可以测定 AMB 值(例如如等式 7 中所述的)。表 2 举例说明使用模拟至数字换算因数的平均珠信号(例如表 2 中的平均带珠的孔强度)至 AMB 的转换,以及在一些更低浓度时数字测定的 AMB 值。组合的数字 / 模拟校准数据可以在 AMB 值与浓度比较的单一校准曲线上标绘。图 3 显示了连同数字数据标绘的转换的模拟数据的图形显示。将模拟值转换为 AMB (数据点 14),且连同泊松调整的数字读出范围中的 AMB 值(数据点 12)一起标绘。

[0069] 表 2. 模拟读出至 AMB 的转换

[0070]

	fM	数字‘开’ 百分比	泊松调整的 数字 AMB	平均带珠的 孔强度 (模 拟测量)	使用换算因数将模 拟转换为泊松调整 的 AMB	组合的 AMB
模拟	700	---	---	17243	9.130	9.130
	350	---	---	13996	7.411	7.411
	70	---	---	5178	2.742	2.742
	35	---	---	3279	1.736	1.736
数字	7	42.36%	0.551	1041	---	0.551
	3.5	26.21%	0.304	---	---	0.304
	0.7	5.24%	0.054	---	---	0.054
	0.35	2.93%	0.030	---	---	0.030

[0071] 基于表 1 和 2 中制表的实验通过所述方法证实的动态范围大于 6 对数。一般地, 分析系统 / 方法的动态范围受下述束缚: 关于数字读出的检测下限 (例如在所述的具体实施例中, 约 227zM), 以及测试的和可通过模拟读出准确地定量的最高浓度 (例如在这个实施例中, 约 700fM), 即 6.5 对数。这个动态范围可以与对于相同测试样品在板阅读器上可以达到的约 3 对数的动态范围相比较, 所述板阅读器仅具有测量来自分子总体的模拟信号的能力。

[0072] 在第二个示例性实施方案中, 在分析物分子与珠的低比率时, 其中存在显著数目的不与分析物分子连接的珠 (“关” 珠), 相对于检测到的珠总数目, 活性、分析物分子连接的 (或 “开”) 珠的数目可以经由如上所述的泊松统计量用于测定 AMB (即 AMB_{数字})。然而, 在更高比率时, 从上文在第一个示例性实施方案中描述用于制备校准曲线的那种获得改良方法。在这个实施方案中, 在分析物分子与珠的更高比率时, 当大多数珠具有一种或多种分析物分子连接, 并且计数方法变得更不准确时, 由阵列中含有珠的孔 ($\bar{I}_{\text{珠}}$) 的平均荧光强度测定 AMB (即 AMB_{模拟})。为了将模拟方案中的 $\bar{I}_{\text{珠}}$ 转换为 AMB, 具有 <10 活性珠 % 的图像可以用于测定单一酶分子 ($\bar{I}_{\text{单一}}$) 的平均模拟强度。所有珠的 $\bar{I}_{\text{珠}}$ 与 $\bar{I}_{\text{单一}}$ 的比率提供模拟 AMB, 并且校准曲线可以如下所述进行制备。通过测量含有珠的孔的平均荧光强度, 以测定与检测到的每个珠连接的分子 (例如酶) 数目, 测定法的动态范围可以扩大超过数字方案。在这个实施方案中, AMB 可以由活性珠 ($\bar{I}_{\text{珠}}$) 的平均荧光强度值和由单一珠 (例如单一酶; $\bar{I}_{\text{单一}}$) 生成的平均荧光强度进行测定。在模拟范围中的阵列的 AMB (AMB_{模拟}) 通过等式 8 进行定义:

[0073]
$$AMB_{\text{模拟}} = (f_{\text{on}} \times \bar{I}_{\text{珠}}) / \bar{I}_{\text{单一}} \quad (\text{等式 } 8)$$

[0074] 为了测定 $\bar{I}_{\text{单一}}$, AMB_{数字} (例如参见等式 4) 和 AMB_{模拟} (等式 8) 可以在活性珠比例方面是相等的, 其中主要与一或零个分子连接的珠占优势, 例如如等式 9 中所示。在一些情况下, 当存在来自底物耗尽的可忽略不计的贡献时 (例如如本文描述的), 这些值是相等的。在一些情况下, 分析阵列, 并且如果 “开” 珠的部分 <0.1, 那么条件视为符合这些标准:

[0075]
$$\bar{I}_{\text{单一}} = (f_{\text{on}} \times \bar{I}_{\text{珠}}) / -\ln[1 - f_{\text{on}}], \text{ 在其中 } f_{\text{on}} < 0.1 \text{ 的阵列中 (等式 } 9)。$$

[0076] 随后可以对于数字 (AMB_{数字} (等式 4)) 和模拟 (AMB_{模拟} (等式 8)) 范围标绘 AMB, 并且两个曲线可以组合到一个校准曲线内。

[0077] 当在这个第二个实施方案中组合数字和模拟数据时, 可以采用实验以测定 $\bar{I}_{\text{单一}}$ 。该实验可以采用其中活性珠的比例是小于约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25% 或更多的样

品。在一些情况下,活性珠的比例是约 10%。如上所述,这可以通过使用覆盖这个范围的校准数据点或已知在这个范围中具有数字信号的特定对照样品来完成。对于在校准曲线中的两个或三个浓度具有 $f_{on} < 0.1$, 可以对个别珠的强度(例如个别酶分子的动态活性)求平均值,以测定 $\bar{I}_{单一}$ 。在酶的情况下,与单一酶分子速度(例如酶周转率)联系的固有变动的求平均值可以是这样的,从而使得观察到很少的或无至 $\bar{I}_{单一}$ 测量的显著变动。根据 N 次测量的平均单一酶强度($\bar{I}_{单一}$)中的不确定性可以由 $\sigma_{I_{单一}}/\sqrt{N}$ 给出,其中 $\sigma_{I_{单一}}$ 是正态分布的单一酶分子强度的宽度参数。例如,对于 30% 的平均单一酶速度的宽度参数,当对超过 1000 次单一分子测量求平均值时,对平均值 $\bar{I}_{单一}$ 添加的不确定性是 1%。当活性珠的比例增加(例如 10% 或更大)时,理论上数字计数和模拟强度可以用于测定 AMB。低于活性珠的特定百分比(例如,小于约 20%、小于约 15%、小于约 10%、小于约 5% 或更少),与多重酶连接的珠的贡献可能太小,从而使得 $\bar{I}_{珠}$ 不改变超过活性珠 % 的测量噪声,并且模拟方法不能提供准确结果。

[0078] 当 f_{on} 接近 100% 时,如上所述,计数“开”和“关”珠不能提供 AMB 的准确测量。在“开”珠的中间百分比时,可以考虑多重因素,以确定活性珠的比例的阈值,低于其使用 AMB_{数字}(等式 4),并且超过其使用 AMB_{模拟}(等式 8)。这个阈值的选择可以通过描绘发生于数字和模拟信号中的变动的 AMB 中的不精确性进行举例说明。

[0079] 例如,图 4A 显示了由 AMB 给出的,活性珠的比例针对有效浓度的曲线图,所述 AMB 由使用泊松分布的数字计数进行测定的(等式 4)。当浓度增加时,% 活性的斜率变得更浅,并且信号不精确性导致测定的浓度中的更多不精确性。图 4B 显示了根据有效浓度 AMB(等式 8)的模拟强度($I_{珠}/I_{单一}$)的曲线图。在低浓度时,强度测量中的变动可以使得难以检测多重酶中的小增加,并且外推的 AMB 的 CV 很高。图 4C 显示了根据来自(i)数字和(ii)模拟分析的 f_{on} ,在 AMB (%CV) 中的不精确性的曲线图,假定对于两种方法 7.1% 的固定信号 CV。在一些情况下,数字至模拟阈值(例如其中存在在使用数字分析(例如等式 4)或模拟分析(例如等式 8)之间测定浓度的转变的阈值是约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、或约 50%-约 80%、或约 60%-约 80%、或约 65%-约 75%。在特定实施方案中,阈值是约 70%、或约 75%-约 85%。关于样品实验参见实施例 8 和 9。

[0080] 图 5 描述了其中在改变 AMB 时作出测定的测定法。图 5A (左)显示了 AMB=0.1,其中每个活性珠主要与单一分析物分子统计上连接,并且可以执行数字分析。图 5A (中)显示了 AMB=0.6,其中显著数目的活性珠与超过一个分析物分子连接,并且可以执行模拟或数字分析。如果执行数字分析,那么每个珠的多重分析物分子可以使用泊松分布分析加以解释。图 5A (右)显示了 AMB=3,其中基本上所有的珠与超过一个分析物分子连接。在这种情况下,如本文描述的,通过测量活性珠的平均荧光强度和由通过单一分析物分子(例如酶)生成的平均荧光强度的了解,可以定量每个珠的分析物分子的平均数目。图 5B-D 显示了使用如本文描述的测定法,在(D)0.1、(E)0.6 和(F)3.0 的近似 AMB 时,在个别孔中的单数珠生成的荧光图像。

[0081] 一旦已开发了使 AMB 与流体样品中的分析物分子的浓度量度相关的校准曲线,就可以使用校准曲线测定测试样品(例如未知样品)的分析物分子的浓度量度。测定法可以以与对于校准样品执行的相似方式执行(例如包括就多个珠而言固定分析物分子,并且将多个珠的至少一部分在空间上隔离到多个反应容器内)。在将多个珠在空间上隔离到多个反

应容器内之后,可以查询多个反应容器的至少一部分,在特定实施方案中,多次。例如,可以执行至少约 1、至少约 2、至少约 3、至少约 4、至少约 5、至少约 6、至少约 7、至少约 8、至少约 9、至少约 10 次或更多次查询,所述查询隔开约 1 秒、约 2 秒、约 5 秒、约 10 秒、约 20 秒、约 30 秒、约 40 秒、约 50 秒、约 1 分钟或更久的时间段。每次查询可以产生一组数据。可以分析数据以测定与至少一个分析物分子连接的珠百分比(例如活性珠百分比)(或例如在其中不采用珠的实施方案中,活性位置的百分比)。

[0082] 在一些实施方案中,如果活性珠(或位置)的百分比是小于约 80%、小于约 70%、小于约 60%、小于约 50%、小于约 45%、小于约 40%、小于约 35%、小于约 30%、小于约 25%、或小于约 20%,那么流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度可以至少部分基于测定为含有至少一个分析物分子或颗粒的位置数目 / 百分比。即,至少一组数据可以使用如本文描述的数字分析方法(其可以进一步包括经由泊松分布调整的调整)进行分析。例如,AMB 可以如本文描述的(例如使用泊松分布调整)进行测定,并且通过 AMB 与校准曲线的比较可以测定浓度。在一些情况下,使用的数据组可以是在稍后时间(例如,以确保足够的时间用于酶促底物转换为可检测实体)收集的数据集。流体样品中的分析物分子的浓度量度可以至少部分基于测量的参数与校准曲线(例如至少部分通过测定至少一种校准因素形成的)的比较。

[0083] 在其他实施方案中,例如,如果活性珠的百分比相对很高,例如大于约 30%、大于约 35%、大于约 40%、大于约 45%、大于约 50%、大于约 60%、大于约 70%、大于约 80% 或更多,那么流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度可以至少部分基于指示多个分析物分子或颗粒存在的至少一种信号的强度水平量度。即,数据可以使用如本文描述的模拟分析方法之一进行分析。例如,AMB 可以使用等式 7 或等式 8 对于样品进行测定。AMB 可以与校准曲线相比较,以测定流体样品中的分析物分子的浓度量度。在一些情况下,使用的数据组可以是在较早(例如,如本文描述的,以限制与底物耗尽、光漂白等相关的困难)时间收集的数据集。流体样品中的分析物分子的浓度量度可以至少部分基于测量的参数与校准曲线(例如至少部分测定通过至少一种校准因素形成的)的比较。

[0084] 在另外其他实施方案中,例如对于其中活性珠的百分比可以是约 30%-约 80%、或约 40%-约 70%、或约 60%-约 80%、或约 65%-约 75%、或约 30%-约 50%、或约 35%-约 45%、或接近 40% 的中间浓度范围,流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度可以基于如通过数字分析方法测定的和如通过模拟分析方法测定的分析物分子或颗粒的浓度量度的平均值。即,至少一组数据可以使用如本文描述的数据分析方法和 / 或模拟分析方法之一进行分析。在 AMB 测定后(由数字和 / 或模拟分析方法和 / 或两者的平均值),AMB 可以与校准曲线相比较,以测定流体样品中的分析物分子的浓度量度。

[0085] 在一些实施方案中,除测定指示分析物分子的存在 / 浓度的信号外,可以测定至少一种本底信号。在一些情况下,在由一组数据计算 AMB 之前,背景数据集可以从分析的数据集中扣除。在将测试样品(例如可以固定在多个珠上的分析物分子)在空间上隔离到位置内之前,和 / 或在在空间上隔离之后但在暴露于多个酶促底物(或其他前体标记试剂)以显露信号之前,通过指认位置阵列,可以收集背景数据集。

[0086] 在一些实施方案中,除用于分析物捕获的多个捕获体外,还可以提供和 / 或采用多个对照目标。对照目标可以用于多个目的,包括但不限于对多个位置的方向的鉴定(例如在其中多个位置作为反应位点、反应容器等的阵列形成的情况),以帮助确定测定法的质

量,和 / 或帮助校准检测系统(例如光学查询系统),如下所述。应当理解,超过一类对照目标可以以任何测定法形式存在(例如测定测定法的质量的第一类对照目标,和充当位置标记的第二类对照目标),或单一类型的对照目标可以具有超过一种上述功能。

[0087] 在一些情况下,对照目标用于鉴定在阵列上的多个位置(例如反应容器、位点等)的方向(例如充当用于阵列的位置标记)。例如,对照目标可以随机或特别分布在阵列上,并且可以提供用于测定阵列的方向 / 位置的一个或多个参考位置。当比较在不同时间间隔时阵列的一部分的多个图像时,此类特点是有用的。即,阵列中的对照目标的位置可以用于登记图像。在一些情况下,在其中将小重叠区的多个图像组合以形成更大图像的实施方案中,对照目标可以用于提供参考位置。

[0088] 测定法中对照目标的存在可以提供关于测定法的质量的信息。例如,如果发现位置含有包含酶促组分但不存在标记试剂的对照目标(例如在包含酶促组分的对照目标暴露于前体标记试剂后,其产物可存在),那么这给出测定法的一些方面可能未适当地起作用的指示。例如,试剂的质量可以是妥协的(例如前体标记试剂的浓度太低,前体标记试剂的分解等),和 / 或可能并非所有位置都暴露于前体标记试剂。

[0089] 在一些实施方案中,对照目标可以用于检测系统进行校准。例如,对照目标可以输出可以用于校准光学检测系统的光信号。在一些实施方案中,对照目标可以进行表征且掺杂特定特征(例如荧光、颜色、吸光度等),其可以充当用于检测系统性能的质量控制检查。

[0090] 在一些情况下,对照目标可以用于对系统进行标准化(standardize)或正常化(normalize),以解释在测试中使用的阵列的不同部分之间和 / 或在两个不同阵列之间,经过时间过程等在不同测定法中不同系统部件的性能和 / 或特征的变动(例如检测系统、阵列、试剂等)。例如,实验设置、参数和 / 或变动可以导致在不同时间点由单个阵列或者在同时或不同时间点至少在两个阵列之间产生的信号(例如荧光信号)的强度变化。此外,在单个阵列中,阵列的不同部分可以产生不同本底信号。此类变动可以导致在阵列、阵列的部分或在多个时间之间的校准信号中的变化(例如平均珠信号的测定),其可以导致在一些情况下的不准确测定。可以引起变动的参数的非限制性例子包括标记试剂浓度、温度、焦点、检测光的强度、阵列中的位置深度和 / 或大小等。为了解释一些或所有此类变动的效应,在一些实施方案中,可以利用多个对照目标。在特定情况下,此类对照目标基本上不含与分析物分子或颗粒的连接。在特定实施方案中,小于约 20%、约 10%、约 5%、约 1% 等的对照目标与分析物分子或颗粒连接。对照目标可以是与捕获体可区别的(例如各自可以产生可区别的信号),并且系统可以这样配置,从而使得与对照目标连接的任何分析物分子无法解释分析物分子的浓度测定。来自对照目标的信号可以用于正常化在不同阵列之间或在单个阵列的区域中的查询值。例如,因为来自对照目标的信号应在阵列之间和 / 或在单个阵列附近是大致相等的,所以对照目标信号可以对合适的值正常化,并且非对照目标(例如与分析物分子连接的捕获体)的信号可以相应地调整。

[0091] 作为特异性例子,在一些情况下,可以对阵列提供等于或小于 10% 活性的一组对照目标。来自捕获体的 $I_{\text{单一}}$ 可以通过使数字 AMB (例如等式 4) 和模拟 AMB (例如等式 8) 相等进行测定。在流体样品中的分析物分子的低浓度时,活性对照目标的百分比在模拟区中,并且关于流体样品的 $AMB_{\text{模拟}}$ 可以使用使用对照目标测定的 $I_{\text{单一}}$ 进行计算(例如不使用使用

与来自流体样品的分析物分子连接的捕获体计算的 $I_{\text{单一}}$ 。这种方法可以减少在 $I_{\text{单一}}$ 中由阵列至阵列、阵列内和 / 或每日变动引起的 $AMB_{\text{模拟}}$ 中的任何不精确性,因为这个值使用对照目标进行测定(例如,其可以用对照目标的其他测定和 / 或查询进行校准)。

[0092] 对照目标可以分散遍及测定法的位置阵列或可以在与测定法捕获体分开的一组位置中隔离。例如,捕获体的隔离部分可以在与含有捕获体的区域分开的测定法位点上的区域中提供,并且关于这些位点的 $I_{\text{单一}}$ 值提供关于等式 8 的特异性共同特性(denominator)用于阵列这个特定部分或这组阵列。在此类情况下,捕获珠无需与对照目标可区别,因为对照目标与捕获体是空间分离的。

[0093] 在一些实施方案中,通过使用具有高分辨率的成像相机可以产生或增强增加的动态范围。例如,使用 12- 位相机获得上述测量(例如在表 2 中给出的)。相机的电子分辨率的“n”- 位特征显示可以测定 2^n 量化的模拟强度单位。因此,对于 12- 位相机,可以区别 4096 个不连续强度增量。因此,一般可以实现 3.6 对数级别的动态范围,并且增加相机的分辨率可以扩展浓度的动态范围,其可以在如本文描述的数字分析方案中准确地测量。

[0094] 一般而言,本发明的实践并不特别限制于任何特定动态范围或相机类型。代替或加上上文讨论的技术,其他方法 / 系统可以用于扩展或进一步扩展动态范围。例如,更大数量的珠(或其他捕获体)的检测可以扩展动态范围。在其结果在上表中制表的例子中,检测到暴露于包含分析物分子的样品的约 13% 的珠。然而,在其他实施方案中,增加查询的反应容器(例如位置)数目和 / 或通过使用具有更大视野的相机,可以检测到暴露于样品的高达 100% 的珠。通过检测增加数目的珠,动态范围可以在范围的数字计数末端扩展至少 1 对数多(例如约 4.5 对数到约 5.5 对数,将整个范围扩大至约 7.5 对数)。通过使用更多珠,动态范围还可以通过降低数字读出分析方法 / 系统的检测极限(LOD)得到扩大。例如,通过增加珠的数目,可以减少泊松噪声的限制效应,因为可以计数更多事件。在特定实施方案中,可以用上文描述的本发明的动态范围扩大技术中的一种或多种检测单一分析物分子 / 样品。动态范围还可以在更高浓度、模拟分析范围中扩大。例如,增加相机的电子分辨率(例如具有 24- 位光电倍增管的行扫描或使用先进的 16- 和 18- 位成像相机)可以扩大模拟测量的动态范围。

[0095] 如下所述,对于其中前体标记试剂用于促进可检测信号的产生的实施方案(例如其中使用酶标记的分析物分子或附着至分析物分子的连接配体的测定法),在分析物分子已隔离到多个位置内,且暴露于转换为可检测的标记试剂的前体标记试剂后以更短时间间隔的图像采集(即在更短的温育时间后),还可以能够扩大动态范围,因为可以检测到更少的标记试剂分子(例如转换的酶促底物分子)。例如,在其结果在表 2 中制表的实施例中,最低模拟测量是在 1041 模拟计数上(参见表 2)。使用的 12- 位相机具有从 16 计数到 65536 计数的动态范围。在一些实施方案中,通过减少温育时间,动态范围可以通过采集在计数的低末端时的测量得到扩大(例如最低的模拟测量可以潜在地以 16 计数(例如代替 1041 计数)进行制备),并且因此,总模拟动态范围将是 3.6 对数,等于约 8.1 对数的总数字 + 模拟动态范围。相似效应可以通过减少图像的采集时间(例如快门打开多久用于光落到 CCD 芯片)来实现。再次,那个时间可以降到最低,以给出在数字至模拟转换点的最低可能的模拟应答且使动态范围达到最大。这些变化可以潜在地导致在特定实施方案中对于 12- 位相机超过 9 对数的动态范围。例如,通过对此处描述用于 12- 位相机的数字和模拟测量实现变

化,可以实现 9.1 对数的总动态范围(5.5 对数数字 +3.6 对数模拟)。通过使用 16-、18- 和 24- 位成像系统,那个动态范围可以分别扩大至 10.3、10.9 和 12.7 对数。

[0096] 在一些情况下,本文描述的数字至模拟转换方法可以包括解释底物耗尽和 / 或光漂白的技术和分析。底物耗尽可以在其中测定法涉及检测标记试剂(例如荧光酶促产物)的实施方案中出现,所述标记试剂由前体标记试剂(例如酶促底物)在暴露于分析物分子(或与分析物分子连接的结合配体)后形成。例如,在其中反应容器含有超过一种分析物分子(或结合配体)的实施方案中,解释底物耗尽可以是有利的。例如,在特定实验中,考虑约 2.1 百万个底物分子是可获得的用于在反应容器中周转。在这个例子中,酶促组分,β-半乳糖苷酶具有在 100 μM 底物浓度时 186s⁻¹ 的周转率。如果仅存在一个酶促组分或分子(或结合配体) / 珠(例如存在于反应容器中),那么那种酶促组分经过三分钟实验的持续时间保留其 99% 活性。另一方面,如果平均起来存在 50 种酶促组分或分子 / 珠(或 / 反应容器,如在更高浓度的样品中),那么由于底物耗尽,约 43% 的总体活性可以在实验的持续时间丧失。总体反应室活性中的这种丧失可以导致比由含有十种酶促组分或分子的室期望的减少的强度值。

[0097] 为了减轻底物耗尽对模拟测量的准确度的作用,在一些实施方案中,可以采用多种技术,其中的两个例子在此处讨论。首先,收集分析的数据集的持续时间可以减少。例如,在 t=0 和 t=30 秒时的荧光图像可以用于计算强度值代替更长持续时间(例如 t=0 和 t=150 秒)。经过更短时间段执行测量可以减少耗尽的底物量,并且可以帮助维持荧光产物形成的线性率。此外,使含有荧光产物的反应室暴露于激发光两次(例如在 t=0 和 t=30 时)与更多次数(例如在 t=0、30、60、90、120、150 秒时)比较可以减少光漂白效应。表 3 举例说明对于示例性测定法实施方案,由于底物耗尽随着时间过去在酶活性中的减少。

[0098] 表 3. 随着时间过去在酶活性中的减少

[0099]

100μM RDG			
随着时间过去的周转率下降		酶#/带珠的孔	
t (s)	1	5	10
0	505	505	505
30	504	498	492
60	502	492	478
90	501	485	464
120	500	478	448
150	498	471	432
180	497	464	416
从 t=0 起剩余的%活性		酶#/带珠的孔	
t (s)	1	5	10
0	100%	100%	100%
30	100%	99%	97%
60	100%	97%	95%
90	99%	96%	92%

[0100]

120	99%	95%	89%
150	99%	93%	86%
180	98%	92%	82%

[0101] 例如,图 6 显示了考虑到底物耗尽,根据在含有珠的密封孔中的酶分子数目,来自 100 μM RPG 溶液经过测定法测量的过程,转换成试卤灵的 RGP 量的理论曲线。假定使用具有不受限制的灵敏度(例如不受位数目限制)的相机和在密封后立即起始成像执行测定,测定法可以保持近似线性的以经过 $\text{AMB}=50$ 。特别地,图 6 显示了根据在珠上的酶数目在 150 秒实验过程中产生的试卤灵分子数目的曲线图,其中存在建模的理论限制,其中(i)图像采集在 $t=0$ 时,紧在密封制备时,并且在任何 RGP 转换成试卤灵之前开始;和(ii)其中图像采集在密封后 $t=45$ 秒时开始。

[0102] 可以用于减轻底物耗尽的效应的另一种技术涉及增加底物浓度。在上述例子中的酶/底物对的 K_m 是约 62 μM 。酶的周转率通过如由米氏方程(Michaelis-Menten equation)阐明的底物浓度进行定义。在比 K_m 大得多的底物浓度时,酶周转率可以开始达到稳定水平。例如在约 400 μM 底物时,平均酶周转率是约 707s^{-1} ,而在约 200 μM 时,周转率是约 624s^{-1} ,并且在约 100 μM 时,平均周转是约 504s^{-1} 。将底物浓度从约 400 μM 减半到约 200 μM 导致周转率中的约 11%减少,而底物浓度从约 200 μM 减半到约 100 μM 导致周转率中的约 20%减少。相应地,如果底物耗尽在使用高底物浓度时的测定法测量过程中出现,那么与当使用更低底物浓度(例如接近于 K_m)时出现的耗尽相比较,耗尽可以对酶周转率具有较小作用。表 4 举例说明当底物浓度改变时,在耗尽效应中的变化的例子。

[0103] 表 4. 当底物浓度改变时的耗尽效应

[0104]

100μM RDG		200μM RDG	
随着时间过去的周 转率下降	酶#/带珠的孔	随着时间过去的周 转率下降	酶#/带珠的孔
t (s)	10	t (s)	10
0	505	0	624
30	492	30	618

[0105]

60	478	60	611
90	464	90	605
120	448	120	597
150	432	150	590
180	416	180	582
从 t=0 起剩余的% 活性 t (s)	酶#/带珠的孔 10	从 t=0 起剩余的% 活性 t (s)	酶#/带珠的孔 10
0	100%	0	100%
30	97%	30	99%
60	95%	60	98%
90	92%	90	97%
120	89%	120	96%
150	86%	150	95%
180	82%	180	93%

[0106] 为了减轻光漂白对原始荧光强度的作用,在一些实施方案中,可以测定荧光产物的光漂白速率。在图 7 中所示的例子中,通过在反应容器中装入含有待检测的荧光产物(10 μ M 试卤灵)的溶液,且经过 50 分钟用 2000 毫秒的曝光时间每 15 秒监控荧光下降,测定光漂白率。数据的指数拟合获得 0.0013s^{-1} 的光漂白速率, k_{ph} (参见图 7)。对于在每个测定法系统设置中使用的特异性光学参数可以测定独特的 k_{ph} , 并且可以用于调整对于光漂白对原始荧光强度的作用收集的数据集。

[0107] 下述部分提供与分析测定方法 / 系统、分析物分子、分析仪系统等的多个方面相关的另外描述、例子和指导,其可以用于实践上文描述的本发明的分析方法 / 系统的多个实施方案。另外的信息还可以在下述专利中找到:通过 Duffy 等人于 2010 年 3 月 24 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects”的美国专利申请序列号 12/731,130;通过 Duffy 等人于 2011 年 3 月 1 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects”的国际专利申请号(仍未确定)(代理人案号 Q0052.70011W000);通过 Walt 等人于 2007 年 2 月 16 日提交的,名称为“Methods and arrays for target analyte detection and determination of target analyte concentration in solution”的美国专利申请号 20070259448;通过 Walt 等人于 2007 年 2 月 16 日提交的,名称为“Methods and arrays for detecting cells and cellular components in small defined volumes”的美国专利申请号 20070259385;通过 Walt 等人于 2007 年 2 月 16 日提交的,名称为“Methods and arrays for target analyte detection and determination of reaction components that affect a reaction”的美国专利申请号 20070259381;通过 Duffy 等人于 2010 年 3 月 24 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules using Dual Detection Methods”的美国专利申请序列号 12/731,135(代理人案号 Q0052.70012US01);通过 Duffy 等人于 2011 年 3 月 1 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules using Dual Detection Methods”的国际专利申请号(仍未确定)(代理人案号 Q0052.70012W000);通过 Walt 等人于 2007 年 8 月 20 日提交的,名称

为“Methods for Determining the Concentration of an Analyte in Solution”的国际专利申请号 PCT/US07/019184;和通过 Duffy 等人于 2009 年 9 月 9 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Enzymes”的国际专利申请号 PCT/US09/005428。

[0108] 用于将分析物分子隔离到位置阵列内的方法和系统

[0109] 在特定实施方案中,本发明的测定方法和系统采用将分析物分子在空间上隔离到多个位置内的步骤,以促进检测/定量,从而使得每个位置包含/含有零或一个或多个分析物分子。此外,在一些实施方案中,包含位置的物品以这样的方式配置,从而使得每个位置可以个别地指认。虽然用于将多种分析物分子在空间上隔离到多个位置内的示例性实施方案在本文中描述,但可以潜在地采用许多其他方法。

[0110] 在一些实施方案中,用于测定流体样品中的分析物分子的浓度量度的本发明方法包括检测就对于至少一类分析物分子具有亲和力的结合表面而言固定的分析物分子。在特定实施方案中,结合表面可以在基底(例如板、盘、芯片、光学纤维末端等)上的多个位置之一内形成(例如在基底上的孔/反应容器的表面)或包含(例如在孔内含有的捕获体例如珠的表面)。可以指认位置中的至少一些,且可以制备指示含有至少一个分析物分子或颗粒的位置数目/百分比的量度。在一些情况下,基于该数目/百分比,可以测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度。如上文已详细描述,通过任选采用泊松分布调整的数字分析方法/系统和/或至少部分基于测量的信号强度,可以测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度。

[0111] 如上所述,在其中分析物分子就多个捕获体而言固定的实施方案中,指认的位置可以是含有至少一个捕获体(例如与任何分析物分子连接或不连接的)的位置,并且因此,在这些实施方案中,含有至少一个分析物分子的位置百分比还是与至少一个分析物分子连接的捕获体百分比(例如“活性”珠百分比)。因此,在一些实施方案中,用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度的方法包括使多个捕获体(例如珠)暴露于含有或怀疑含有至少一类分析物分子或颗粒的溶液,所述多个捕获体各自包括对于至少一类分析物分子或颗粒(例如多个捕获组分)具有亲和力的结合表面,其中所述捕获体中的至少一些变得与至少一个分析物分子或颗粒连接。捕获体(例如珠)的至少一部分可以在空间上隔离到多个位置(例如在表面上的反应容器)内。可以指认多个位置(例如在一些情况下,含有至少一个捕获体的位置)中的至少一部分,以测定指示含有至少一个分析物分子或颗粒的位置百分比(例如在一些情况下,与至少一个分析物分子连接的捕获体百分比)的量度。如上所述,在一些情况下,基于测定的百分比,至少部分基于含有至少一个分析物分子或颗粒的捕获体的数目/百分比,和/或至少部分基于指示多个分析物分子或颗粒的存在的信号的测量强度,可以测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度。

[0112] 另外,在一些情况下,用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度的系统包括包含多个位置(例如反应容器)的测定法基底(例如板、盘、载玻片、芯片、光学纤维末端等),所述多个位置各自包含在此类位置内形成(例如多个捕获组分)或含有此类表面(例如含有包含多个捕获组分的珠)的结合表面,其中至少一个结合表面包含固定在结合表面上的至少一种分析物分子或颗粒。该系统还可以包含至少一个检测器,其配置为指认多个位置的至少一部分,且能够产生指示在指认的每个位置上的分析物分子或颗粒的存在或不

存在且具有测量随着在每个位置上的分析物分子或颗粒数目而改变的强度水平的能力的至少一种信号。另外,该系统可以包含至少一个信号处理器,其配置为由至少一种信号测定含有至少一个分析物分子或颗粒的指认位置数目/百分比,且进一步配置为基于该数目/百分比,至少部分基于含有至少一个分析物分子或颗粒的位置数目(数字/二元分析),测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度,和/或至少部分基于指示多个分析物分子或颗粒的存在的至少一种信号的强度水平,测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度,使用先前描述的技术。

[0113] 本文提供的测定方法和系统可以采用如本文描述的多种不同组分、步骤和方面。例如,方法可以进一步包括测定至少一种本底信号的测定(例如且进一步包括从其他测定中扣除本底信号)、洗涤步骤等。在一些情况下,如本文描述的,测定法或系统可以包括至少一种结合配体的使用。在一些情况下,测定流体样品中的分析物分子的浓度量度至少部分基于测量的参数与校准曲线的比较。在一些情况下,如上所述,校准曲线至少部分通过测定至少一种校准因素来形成。

[0114] 在一些实施方案中,多种分析物分子可以在空间上隔离到多个位置内,其中所述位置包含多个反应容器。分析物分子可以跨越多个反应容器分隔,从而使得反应容器的至少一些含有至少一个分析物分子,并且统计上显著比例的反应容器不含分析物分子。含有至少一个分析物分子(或无分析物分子)的统计上显著比例的反应容器一般能够使用特定检测系统重现性检测且定量,并且一般将超过当用不含任何分析物分子的样品执行测定时测定的本底噪声(例如非特异性结合),除以指认的位置总数目。如本文对于呈现的实施方案使用的“统计上显著的部分”可以根据等式 10 进行估计:

$$[0115] \quad n > 3\sqrt{n} \quad (\text{等式 } 10)$$

[0116] 其中 n 是对于所选类别的事件的测定事件数目。即,当事件数目 n 大于事件数目平方根的三倍时,统计上显著的比例出现。例如,为了测定含有分析物分子或颗粒的反应容器的统计上显著的比例, n 是含有分析物分子的反应容器数目。作为另一个例子,为了测定与单一分析物分子连接的捕获体的统计上显著的比例, n 是与单一分析物分子连接的捕获体数目。

[0117] 在一些实施方案中,含有至少一个分析物分子(或在一些情况下,单一分析物分子,其中位置与分析物分子的比率将在统计上导致在每个位置中含有基本上仅零或一种分析物分子)的位置与位置(或捕获体)总数目的统计上显著比例是小于约 1:2、小于约 1:3、小于约 1:4、小于约 2:5、小于约 1:5、小于约 1:10、小于约 1:20、小于约 1:100、小于约 1:200、或小于约 1:500。因此,在此类实施方案中,不含任何分析物分子的位置(或捕获体)与位置(或捕获体)总数目的比例是至少约 1:100、约 1:50、约 1:20、约 1:10、约 1:5、约 1:4、约 1:3、约 1:2、约 1:1、约 2:1、约 3:1、约 4:1、约 5:1、约 10:1、约 20:1、约 50:1、约 100:1 或更大。

[0118] 在一些实施方案中,如前所述,含有至少一个分析物分子的位置百分比是小于约 50%、小于约 40%、小于约 30%、小于约 20%、小于约 10%、小于约 5%、小于约 2%、小于约 1%、小于约 0.5%、小于约 0.01% 或更少的位置(或捕获体)总数目。在一些实施方案中,不含(或与之结合的捕获体)任何分析物分子的位置百分比是至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98% 或更多的位置(或捕获体)总数目。

[0119] 用于将多种分析物分子或颗粒分隔到多个反应容器内的方法和技术在下述专利中描述:通过 Duffy 等人于 2010 年 3 月 24 日提交的, 名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects”的美国专利申请序列号 12/731, 130(代理人案号 Q0052. 70011US01);通过 Duffy 等人于 2011 年 3 月 1 日提交的, 名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects”的国际专利申请号(尚未确定)(代理人案号 Q0052. 70011W000);通过 Walt 等人于 2007 年 2 月 16 日提交的, 名称为“Methods and arrays for target analyte detection and determination of target analyte concentration in solution”的美国专利申请号 20070259448;通过 Walt 等人于 2007 年 2 月 16 日提交的, 名称为“Methods and arrays for detecting cells and cellular components in small defined volumes”的美国专利申请号 20070259385;通过 Walt 等人于 2007 年 2 月 16 日提交的, 名称为“Methods and arrays for target analyte detection and determination of reaction components that affect a reaction”的美国专利申请号 20070259381;通过 Walt 等人于 2007 年 8 月 20 日提交的, 名称为“Methods for Determining the Concentration of an Analyte in Solution”的国际专利申请号 PCT/US07/019184;和通过 Duffy 等人于 2009 年 9 月 9 日提交的, 名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Enzymes”的国际专利申请号 PCT/US09/005428, 所述专利通过引用合并入本文。

[0120] 在一些实施方案中, 测定方法可以包括多个捕获体的使用。多个捕获体(例如珠)可以配置为捕获分析物分子或颗粒。在一些情况下, 多个捕获体包含多个珠。珠可以是或不是磁性的。捕获体的至少一部分可以在空间上隔离到多个位置(例如反应容器/孔)内。在多种分析物分子就捕获组分而言连接之前、同时或之后, 多种分析物分子可以暴露于多个类型的结合配体。使用此类捕获组分的测定方法的多个其他方面在通过 Duffy 等人于 2010 年 3 月 24 日提交的, 名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects”的共同拥有的美国专利申请序列号 12/731, 130;和通过 Duffy 等人于 2011 年 3 月 1 日提交的, 名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects”的国际专利申请号(尚未确定)(代理人案号 Q0052. 70011W000), 所述专利各自通过引用合并入本文。特别地, 本文描述的方法和系统可以与在上文提及的申请中所述的单一分子方法和系统组合使用或在其上下文中使用。在一些情况下, 捕获体可以是其自身可检测的(例如荧光发射), 并且珠可以这样选择, 从而使得珠的检测不干扰或基本上不干扰分析物分子的检测。

[0121] 在一些实施方案中, 分析物分子可以是直接检测或间接检测的。在直接检测的情况下, 分析物分子可以包含可以直接查询和/或检测的分子或部分(例如荧光实体)。在间接检测的情况下, 另外的组分用于测定分析物分子的存在。在一些情况下, 分析物分子可以与前体标记试剂(例如酶促底物)组合, 并且在暴露于分析物分子后, 酶促底物可以转换为可检测产物(例如荧光分子)。在一些情况下, 在将分析物分子中的至少一些在空间上隔离到多个位置内之前、同时和/或之后, 多种分析物分子可以暴露于至少一种另外的反应组分。在一些情况下, 至少一些与至少一个分析物分子连接的多个捕获体可以暴露于多个结合配体。在特定实施方案中, 结合配体可以是适合于直接检测的(例如结合配体包含可检测分子或部分), 或可以是适合于间接检测的(例如包括可以将前体标记试剂转换成标记试剂的组

分),如下文更多讨论的。超过一类结合可以用于任何给定测定方法中,例如第一类结合配体和第二类结合配体。在一个例子中,第一类结合配体能够与第一类分析物分子连接,并且第二类结合配体能够与第一类结合配体连接。在另一个例子中,如本文描述的,第一类结合配体和第二类结合配体都可以与单一分析物分子的相同或不同表位连接。

[0122] 特定结合配体可以包含能够直接或间接促进检测的实体。在其中组分包含可测量性质(例如荧光发射、颜色等)的实施方案中,组分可以是适合于直接检测的。例如通过将前体标记试剂转换成标记试剂(例如在测定法中检测的试剂),组分可以促进间接检测。“前体标记试剂”是在暴露于合适的转换试剂(例如在结合配体中包含的酶促组分)后,可以转换为标记试剂的任何分子、颗粒等。“标记试剂”是使用所选检测技术,通过充当检测实体来促进检测的任何分子、颗粒等。

[0123] 在一些实施方案中,至少一种结合配体包含酶促组分。在一些实施方案中,分析物分子可以包含酶促组分。酶促组分可以将前体标记试剂(例如酶促底物)转换成标记试剂(例如可检测产物)。流体样品中的分析物分子的浓度量度随后可以至少部分基于通过测定含有标记试剂的位置数目(例如通过将含有标记试剂的位置数目与含有分析物分子的位置数目(或与至少一个分析物分子连接的捕获体数目与捕获体总数目)关联)进行测定。酶或酶促组分的非限制性例子包括辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶。用于检测的系统或其他非限制性例子包括其中核酸前体复制成多个拷贝或转换为可以容易地检测的核酸的实施方案,例如聚合酶链反应(PCR)、滚环扩增(RCA)、连接、环介导的等温扩增(LAMP)等。此类系统和方法将是本领域普通技术人员已知的,例如如“DNA Amplification:Current Technologies and Applications,”Vadim Demidov 等人,2004 中所述的。

[0124] 作为包括使用前体标记试剂的测定方法的例子,如图 8 中所示,提供了包含多个位置的基底 100,其中所述位置包含反应容器。在反应容器 101 (例如位置)中,分析物分子 102 就珠 103 (例如捕获体)而言进行固定。结合配体 104 与分析物分子 102 连接。结合配体 104 包含酶促组分(未显示)。前体标记试剂 106 转换为标记试剂 108 (在暴露于酶促组分后)。标记试剂 108 使用本文描述的方法进行检测。相比之下,反应容器 111 含有就珠 110 而言固定的分析物分子 112。在这个反应容器中,分析物分子 112 不与包含酶促组分的结合配体连接。因此,前体标记试剂 114 在反应容器中不转换为标记试剂。因此,与其中前体标记试剂转换为标记试剂的反应容器 101 相比较,这个反应容器将给出不同信号。在一些情况下,还可以存在含有不与分析物分子连接的珠的反应容器,例如,反应容器 121 含有珠 116。另外,一些反应容器可以不包含任何珠,例如反应容器 123。与不存在标记试剂的反应容器 101 相比较,反应容器 121 和 123 可以给出不同信号。然而,反应容器 121 和 123 可以含有前体标记试剂 117。超过一种前体标记试剂可以存在于任何给定反应容器中。

[0125] 在特定实施方案中,可以采用溶解或悬浮的前体标记试剂,其中所述前体标记试剂转换为标记试剂,其在液体中是不可溶的和 / 或变得固定在位置内和 / 或附近(例如在其中形成标记试剂的反应容器内)。此类前体标记试剂和标记试剂及其用途在通过 Duffy 等人于 2008 年 9 月 23 日提交的,名称为“High Sensitivity Determination of the Concentration of Analyte molecules in a Fluid Sample”的共同拥有的美国专利申请序列号 12/236,484 中所述,所述专利通过引用合并入本文。

[0126] 在一些实施方案中,技术可以用于阻止或减少分析物分子与捕获组分和 / 或捕获体的解离,和 / 或阻止或减少结合配体与分析物分子和 / 或另一种结合配体的解离。如本领域普通技术人员已知的,在所选分析物分子、捕获组分和 / 或结合配体之间(例如在抗体和抗原之间)的一些可逆亲和作用由热力学支配。相应地,在特定测定方法过程中的某一点上,一些解离可以在分析物分子和捕获组分和 / 或结合配体之间,和 / 或在结合配体和分析物分子和 / 或另一种结合配体之间出现。这可以导致比实际存在的减少数目的待检测的分析物分子(例如免疫复合物)。特定对的组分(例如抗体 - 抗原对)的解离常数、洗涤和 / 或流体暴露、在暴露和查询之间的时间、和 / 或其他因素,可以影响解离事件改变分析物分子和 / 或颗粒测定的程度。相应地,特定技术可以用于减少解离过程的效应。

[0127] 在第一个实施方案中,在多种分析物分子(例如经由捕获组分与捕获体结合的和 / 或与至少一种结合配体结合的)在空间上隔离到多个此类位置内之后,通过从测定法位置(例如孔)处去除流体,可以减少或消除解离。即,围绕位置或基本上在位置中或处的含有的所有或基本上所有流体可以被去除。例如,流体可以通过风干和 / 或真空干燥被去除。流体的去除可以减少或消除解离。紧在位置查询前,可以将流体加入位置内,从而使复合物再水合,以促进使用检测器的查询。

[0128] 在第二个实施方案中,通过使分析物分子与捕获组分交联,和 / 或通过使结合配体与分析物分子和 / 或第二种结合配体交联,可以减少或消除解离。例如,包含抗原的分析物分子可以与包含抗体的结合配体和 / 或捕获组分交联。可以采用的交联方法和技术是本领域普通技术人员已知的。

[0129] 在一些实施方案中,可以指认多个位置和 / 或可以基本上同时检测多个捕获体和 / 或目的种类 / 分子 / 颗粒。当在这个上下文中使用时,“基本上同时的”指在大致同时指认 / 检测目的位置 / 捕获体 / 种类 / 分子 / 颗粒,从而使得与在其中它们将不重叠的顺次指认 / 检测相对比,在其过程中至少两个目的位置 / 捕获体 / 种类 / 分子 / 颗粒指认 / 检测的时间段重叠。同时指认 / 检测可以通过使用多种技术来实现,包括光学技术(例如 CCD 检测器)。根据一些实施方案,将捕获体 / 种类 / 分子 / 颗粒在空间上隔离到多个不连续的可分辨位置内,通过允许多个位置基本上同时被指认而促进基本上同时检测。例如,对于其中个别种类 / 分子 / 颗粒与捕获体连接的实施方案,所述捕获体在检测过程中就其他捕获体而言在空间上隔离到多个不连续、可分开分辨的位置内,基本上同时指认多个不连续、可分开分辨的位置允许分辨个别捕获体,并且因此分辨个别种类 / 分子 / 颗粒(例如分析物分子)。例如,在特定实施方案中,多个分子 / 颗粒的个别分子 / 颗粒遍布多个反应容器分隔,从而使得每个反应容器含有零或仅一个物种 / 分子 / 颗粒。在一些情况下,至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、至少约 99.5% 的所有物种 / 分子 / 颗粒在检测过程中就其他物种 / 分子 / 颗粒而言是在空间上隔离的。多个物种 / 分子 / 颗粒可以是在下述时间段内基本上同时检测的:小于约 1 秒、小于约 500 毫秒、小于约 100 毫秒、小于约 50 毫秒、小于约 10 毫秒、小于约 1 毫秒、小于约 500 微秒、小于约 100 微秒、小于约 50 微秒、小于约 10 微秒、小于约 1 微秒、小于约 0.5 微秒、小于约 0.1 微秒、或小于约 0.01 微秒、小于约 0.001 微秒或更少。在一些实施方案中,多个物种 / 分子 / 颗粒可以是在下述时间段内基本上同时检测的:约 100 微秒 - 约 0.001 微秒、约 10 微秒 - 约 0.01 微秒或更少。

[0130] 在一些实施方案中,位置是任选查询的。显示出其光学标记中的变化的位置可以通过常规光学训练和光学检测系统进行鉴定。取决于检测种类(例如荧光实体的类型等)和操作波长,设计用于特定波长的光学滤光片可以用于位置的光学查询。在其中使用光学查询的实施方案中,该系统可以包含超过一个光源和 / 或多个滤光片,以调整光源的波长和 / 或强度。在一些实施方案中,来自多个位置的光信号使用 CCD 相机进行捕获。

[0131] 可以用于捕获图像的相机成像类型的其他非限制性例子包括电荷注入器件(CIDs)、补充金属氧化物半导体(CMOS)器件、科学 CMOS (sCMOS) 器件、和时间延迟整合(TDI)器件,如本领域普通技术人员已知的。相机可以得自商业来源。CID 是类似于 CCDs 的固态、二维多像素成像装置,但在如何捕获且阅读图像中不同。对于 CCD 的例子,参见美国专利号 3,521,244 和美国专利号 4,016,550。CMOS 器件也是二维、固态成像装置,但在如何收集且读出电荷中不同于标准 CCD 阵列。将像素构建到半导体技术平台内,其制造 CMOS 晶体管,从而允许来自基本读出电子学和显著校准电子学的信号中的显著增益构建到器件上。例如,参见美国专利号 5,883,83)。sCMOS 器件包含具有特定技术改良的 CMOS 成像技术,其允许极佳的灵敏度和动态范围。TDI 器件采用 CCD 器件,其允许像素列转移到邻近列内,并且允许继续收集光。这类器件一般以这样的方式使用,从而使得像素列的转移与收集图像的动作同步,从而使得移动图像可以整合显著量的时间且不被图像在相机上的相对运动模糊。在一些实施方案中,与光电二极管或光电倍增管(PMT)耦合的扫描反光镜系统可以用于成像。

[0132] 在一个实施方案中,多个位置直接作为在纤维光学束末端中的多个反应容器形成。根据一个实施方案,用于本发明的反应容器的阵列可以与光学检测系统,例如美国公开号 20030027126 中所述的系统联合使用。例如,根据一个实施方案,本发明的反应容器的阵列在纤维光学组件的一个末端中形成,所述纤维光学组件包含由包层纤维构成的纤维光学束,从而使得光在纤维之间不混合。

[0133] 图 9A 和 9B 显示了根据一些实施方案的本发明系统的非限制性例子。该系统包含光源 452、感光滤光片 454、双色分光镜(dichromatic mirror) 458、发射滤光片 460、物镜 470 和阵列 472。由光源 452 发出的光 453 经过感光滤光片 454。光反射离开双色分光镜 458,经过物镜 470 且照射在阵列 472 上。在一些情况下,通过漫射光减少功能元件 468,例如光圈或孔径,可以减少漫射光 464。由阵列发出的光 471 经过物镜 470 和发射滤光片 460。观察到光 462。该系统可以包含如对于特定应用所需的另外部件(例如另外的滤光片、反光镜、放大器件等),如本领域普通技术人员应当理解的。

[0134] 图 9A 中所示的系统可以另外包含帮助测定含有捕获体的反应容器数目的部件(例如使用白光)。备选地,另外的部件可以用于测定位置总数目和 / 或提供关于位置的地点(例如含有或不含有捕获体)的空间信息,其可以帮助证实在不同光方案(例如荧光、白光)下观察到的与位置的地点(例如可以产生掩蔽)对应的信号。

[0135] 在图 9A 和 9B 中,激发光由来源 452 发出且对准成束 453。感光滤光片 454 可以配置为仅透射激发荧光团的波长带(例如 575nm $\pm$ 10nm 用于试卤灵)。激发光通过二向性滤光片 458 向下反射,并且通过物镜 470 激发含有样品的基底 472。图像光通过物镜 470 收集,对准成束 471,并且通过二色性滤光片 458 透射。仅对应于荧光波长带(例如 670nm $\pm$ 30nm 用于试卤灵)的图像光通过发射滤光片 460 透射。其余准直束 462 仅含有发出的荧光波长,

其基本上通过相机系统成像。

[0136] 相同系统可以用于测定含有样品的位置(例如反应容器)的放置。包含含有捕获体的反应容器的阵列可以用“明视野”白光照明进行照明。可以通过恰好在收集物镜的数值孔径外,根据角度(例如如图 9A 中的 θ_1 可以是约 20 度、约 25 度、约 30 度、约 35 度、约 40 度或更大),将假对准的白光(例如白光 LED)导入阵列表面上而照明(例如使用图 9A 中所示的光源 475)阵列。击中阵列 472 表面的光(例如光 476)反射(且漫射)离开表面,对准 471,且通过物镜(470)收集。准直束随后通过相机系统成像。

[0137] 相同系统还可以用于测定哪个位置含有捕获体(例如珠)。任何特定珠可以与分析物分子和 / 或结合配体连接或不连接。阵列可以用“暗视野”白光照明进行照明的(例如使用如图 9A 中所示的光源 473)。可以通过基本上在收集物镜的数值孔径外,根据角度(例如如图 9A 中的 θ_2 是约 65 度、约 70 度、约 75 度、约 80 度、约 85 度),将假对准的白光(例如白光 LED473)瞄准到阵列表面上而照明阵列。击中阵列 472 表面的光(例如光 474)反射(且漫射)离开表面,对准 471,且通过物镜 470 收集。准直束随后通过相机系统成像。

[0138] 在一些实施方案中,可以采用如美国公开号 2003/0027126 中所述的光学检测系统。在示例性系统中,从在纤维光学束的远端形成的反应容器阵列返回的光经由使用放大变换器得到改变,以使得能够调整纤维的近端或远端的图像大小。放大的图像随后通过快门轮(shutter wheel)进行快门且滤过。随后通过电荷耦合器件(CCD)相机捕获图像。可以提供包括且执行图像处理软件的计算机,以处理来自 CCD 相机的信息,并且还任选可以配置为控制快门和滤光轮。如美国公开号 20030027126 中所述,束的近端由 z- 移动平台和 x-y 微动台接受。

[0139] 例如,图 10 显示了采用纤维光学组件 400 与光学检测系统的系统的示意性方框图。包含纤维光学束的纤维光学组件 400 或由包层纤维构成的阵列 402,从而使得光在纤维之间不混合。反应容器 401 的阵列在束的远端 412 形成和 / 或附着,其中近端 414 与 z- 移动平台 416 和 x-y 微动台 418 可操作地连接。这两个部件协同作用,以将束 402 的近端 414 对于显微镜物镜 420 适当地放置。由物镜 420 收集的光传送至具有三个指针立方滑块(pointer cube slider)422 的反射光荧光附加器。附加器 422 允许将光从 75 瓦 Xe 灯 424 通过物镜 420 导向耦合到纤维束 402 内。来自来源 424 的光通过聚光透镜 426 聚光,随后通过滤光和快门轮 428 滤过和 / 或进行快门,并且随后经过 ND 滤光片滑块 430。从束 402 的远端 412 返回的光经过附加器 422 至放大变换器 432,其使得纤维的近端或远端的图像大小的调整成为可能。经过放大变换器 432 的光随后通过第二个轮 434 进行快门且滤过。通过电荷耦合器件(CCD)相机 436 收集光。计算机 438 执行图像处理软件,以处理来自 CCD 相机 436 的信息,并且还任选控制系统的其他部件,包括但不限于第一个和第二个快门和滤光轮 428,434。用于实践本发明的一些实施方案的反应容器的阵列可以使用多个相容过程整合至或附着至纤维光学束的远端。在一些情况下,微孔在纤维光学束的每根个别纤维的中心形成,并且微孔可以是或不是密封的。纤维光学束的每根光学纤维可以传送来自在纤维的远端中心形成的单个微孔的光。这个特点使得能查询个别反应容器的光学标记,以鉴定每个微孔中的反应 / 内容物。因此,通过收集具有 CCD 阵列的束末端的图像,反应容器的光学标记可以个别查询和 / 或基本上同时成像。

[0140] 使用任何合适技术可以形成多个位置。在一些实施方案中,多个位置包含在基底

上的多个反应容器 / 孔。在特定实施方案中,反应容器可以配置为仅接受且含有单一捕获体。

[0141] 在本发明的一些实施方案中,例如通过第二个基底和密封部件的配合,多个反应容器可以是密封的(例如在分析物分子、结合配体和 / 或前体标记试剂引入后)。反应容器的密封可以是这样的,从而使得每个反应容器的内容物在测定法的剩余部分过程中不能逸出反应容器。在一些情况下,反应容器可以是在添加分析物分子和任选的至少一类前体标记试剂后密封的,以促进分析物分子的检测。对于采用前体标记试剂的实施方案,通过密封在一些或每个反应容器中的内容物,产生可检测标记试剂的反应可以在密封的反应容器内进行,从而产生可检测量的标记试剂,其保留在反应容器中用于检测目的。

[0142] 包含多个反应容器的多个位置可以使用多种方法和 / 或材料形成。在一些情况下,多个反应容器作为在第一个表面上的凹陷阵列形成。然而,在其他情况下,通过将包含多个凹陷的密封部件与基底配合,可以形成多个反应容器,所述基底可以具有无特点的表面或包括与在密封部件上的那些对齐的凹陷。装置部件中的任何,例如基底或密封部件,可以由顺应材料例如弹性体聚合材料构造,以帮助密封。表面可以是或变得是疏水的或含有疏水区,以使来自微孔的含水样品的渗滤降到最低。

[0143] 在一些情况下,密封部件可以能够接触微孔的阵列的外表面(例如如下文更详细地描述的纤维光学束的包覆),从而使得每个反应容器变得密封或分开,从而使得每个反应容器的内容物不能逸出反应容器。根据一个实施方案,密封部件可以是硅酮弹性体垫圈,其可以针对微孔的阵列放置,伴随跨越整个基底基本上均匀压力的施加。在一些情况下,反应容器可以在添加用于分析物捕获的多个捕获体和任选的可以用于促进分析物分子检测的任何前体标记试剂分子后密封。

[0144] 在基底上 / 中形成含有测定溶液的多个反应容器的非限制性例子在图 11 中描述。图 11,小图(A)显示了包含已暴露于测定溶液 141 (例如含有分析物分子的溶液)的多个微孔 139 和密封部件 143 的表面。在这个例子中的密封部件 143 包含基本上平坦的底面。基底 139 与密封部件 143 的配合形成多个密封的反应容器 145。在反应容器 148 之间的区域可以进行修饰,以帮助在反应容器之间的紧密密封的形成。

[0145] 第二个实施方案显示于图 11,小图(B)中,其中包含多个微孔 163 的密封部件 162 与已暴露于测定溶液 162 的基本上平坦的表面 158 配合,从而形成多个反应容器 164。

[0146] 在第三个实施方案中,如图 11,小图(C)中所示,包含多个微孔 167 的基底表面 166 与同样包含多个微孔 171 的密封部件 170 配合。在这个实施方案中,基底中的微孔和密封部件中的微孔是基本上对齐的,因此形成的每个反应容器 172 包含来自密封部件的微孔的部分和来自基底的微孔的部分。在图 11,小图(D)中,微孔是不对齐的,从而使得每个反应容器包含来自密封部件 173 的微孔或来自基底 175 的微孔。

[0147] 密封部件可以是与基底基本上相同大小的或可以是在大小上不同的。在一些情况下,密封部件与基底是大致相同大小的且与基底的基本上整个表面配合。在其他情况下,如图 11,小图(E)中所述,密封部件 176 小于基底 174,并且密封部件仅与基底的部分 178 配合。在另外一个实施方案中,如图 11,小图(F)中所述,密封部件 182 大于基底 180,并且仅密封部件的部分 184 与基底 180 配合。

[0148] 在一些实施方案中,反应容器可以都具有大致相同的容积。在其他实施方案中,反

应容器可以具有不同容积。每个个别反应容器的容积可以选择为适当的,以促进任何特定测定法方案。例如,在其中希望将用于每个容器中含有的分析物捕获体数目限制至小数目的一组实施方案中,反应容器的容积可以范围为阿升或更小到纳升或更大,取决于捕获体的性质、采用的检测技术和设备、在基底上的孔数目和密度、和在应用于含有孔的基底的流体中捕获体的期望浓度。在一个实施方案中,反应容器的大小可以这样选择,仅用于分析物捕获的单一捕获体可以完全包含在反应容器内(参见例如,通过 Duffy 等人于 2010 年 3 月 24 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects”的美国专利申请序列号 12/731,130;或通过 Duffy 等人于 2011 年 3 月 1 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects”的国际专利申请号(尚未确定)(代理人案号 Q0052.70011W000)),所述专利通过引用合并入本文)。

[0149] 依照本发明的一个实施方案,反应容器可以具有约 1 飞升-约 1 皮升、约 1 飞升-约 100 飞升、约 10 阿升-约 100 皮升、约 1 皮升-约 100 皮升、约 1 飞升-约 1 皮升、或约 30 飞升-约 60 飞升的容积。在一些情况下,反应容器具有小于约 1 皮升、小于约 500 飞升、小于约 100 飞升、小于约 50 飞升、或小于约 1 飞升的容积。在一些情况下,反应容器具有约 10 飞升、约 20 飞升、约 30 飞升、约 40 飞升、约 50 飞升、约 60 飞升、约 70 飞升、约 80 飞升、约 90 飞升、或约 100 飞升的容积。

[0150] 在测定法中采用的位置总数目和/或位置密度(例如在阵列中的反应容器数目/密度)可以取决于阵列的组成和最终用途。例如,采用的反应容器数目可以取决于采用的分析物分子和/或结合配体的类型数目、测定法的怀疑浓度范围、检测方法、捕获体的大小、检测实体的类型(在溶液中的游离标记试剂、沉淀标记试剂等)。通过利用多种技术和材料,可以制备含有约 2 到数十亿反应容器(或反应容器的总数目)的阵列。增加阵列中的反应容器数目可以用于增加测定法的动态范围,或允许多种样品或多个类型的分析物分子是平行测定的。阵列可以包含一千到一百万个反应容器/待分析的样品。在一些情况下,阵列包含超过一百万个反应容器。在一些实施方案中,阵列包含约 1,000-约 50,000、约 1,000-约 1,000,000、约 1,000-约 10,000、约 10,000-约 100,000、约 100,000-约 1,000,000、约 100,000-约 500,000、约 1,000-约 100,000、约 50,000-约 100,000、约 20,000-约 80,000、约 30,000-约 70,000、约 40,000-约 60,000 个反应容器。在一些实施方案中,阵列包含约 10,000、约 20,000、约 50,000、约 100,000、约 150,000、约 200,000、约 300,000、约 500,000、约 1,000,000 个或更多个反应容器。

[0151] 反应容器的阵列可以排列在基本上平坦的表面上或非平坦的三维排列中。反应容器可以以规则模式形成阵列或可以是随机分布的。在特定实施方案中,阵列是在基本上平坦的表面上位点的规则模式,允许位点在 X-Y 坐标平面中指认。

[0152] 在一些实施方案中,反应容器以固体材料形成。如本领域技术人员应当理解的,其中反应容器可以形成的潜在合适的材料数目非常大,并且包括但不限于玻璃(包括改良和/或官能化玻璃)、塑料(包括丙烯酸酯、聚苯乙烯以及苯乙烯及其他材料的共聚物、聚丙烯、聚乙烯、聚丁烯、聚氨基甲酸酯、环状烯烃共聚物(COC)、环状烯烃聚合物(COP)、Teflon[®]、多糖、尼龙或硝酸纤维素等)、弹性体(例如聚(二甲基硅氧烷)和聚氨基甲酸酯)、复合材料、陶瓷、二氧化硅或硅基材料(包括硅和改性硅)、碳、金属、光学纤维束等。一般而言,基底材

料可以选择为允许光学检测而无可观的自体荧光。在特定实施方案中,反应容器可以以弹性材料形成。

[0153] 在表面(例如基底或密封部件)中的反应容器可以使用本领域已知的多种技术形成,包括但不限于光刻法、冲压技术、模塑技术、蚀刻技术等。如本领域普通技术人员应当理解的,使用的技术可以取决于支持材料的组成和形状,以及反应容器的大小和数目。

[0154] 在特定实施方案中,通过在光学纤维束的一个末端上产生微孔,且利用平坦的顺应表面作为密封部件,形成反应容器的阵列。在特定此类实施方案中,在光学纤维束的一个末端中反应容器的阵列可以如下形成。首先,将微孔的阵列蚀刻到抛光的纤维光学束的末端内。用于形成且蚀刻纤维光学束的技术和材料是本领域普通技术人员已知的。例如,光学纤维的直径,纤维的核心和包覆区的存在、大小和组成,以及蚀刻的深度和特异性可以通过所选的蚀刻技术改变,从而使得可以形成所需容积的微孔。在特定实施方案中,通过优先蚀刻束中的个别玻璃纤维的核心材料,蚀刻过程产生微孔,从而使得每个孔与单根纤维大致对齐,且通过包覆材料与邻近孔分离。纤维光学阵列形式的潜在优点是它可以产生数千到数百万个反应容器,而不妥协微制造程序,并且它可以提供同时观察且任选指认许多反应容器的能力。

[0155] 每个微孔可以与束中的光学纤维对齐,从而使得光学纤维束可以携带激发和发射光来往孔,使得孔内容物的遥远查询成为可能。进一步地,光学纤维的阵列可以提供用于在邻近容器中的分子的同时或非同时激发的能力,而无在纤维之间的信号“串扰”。即,在一根纤维中透射的激发光不逸出至附近的纤维。

[0156] 备选地,多个反应容器的等价结构可以使用不利用光学纤维束的末端作为基底的其他方法和材料进行构造。例如,阵列可以通过本领域已知的技术产生的点、印刷或光刻法构造的基底;参见例如,W095/25116;W095/35505;PCT US98/09163;美国专利号5,700,637、5,807,522、5,445,934、6,406,845和6,482,593。在一些情况下,阵列可以使用如本领域普通技术人员已知的模塑、压花和/或蚀刻技术产生。

[0157] 在特定实施方案中,本发明提供了配备将密封部件应用于基底的机械平台的系统。平台可以放置在系统上的平台下。在所选反应组分已加入反应容器的阵列后,密封部件可以与阵列配合。例如,密封部件可以使用由机械平台施加的均匀压力夹在反应容器的平坦表面(例如显微镜载玻片)和阵列之间。

[0158] 非限制性实施方案在图12A中举例说明。将密封部件300置于机械平台302之上。将测定溶液304置于密封部件300之上。机械平台针对阵列306(例如纤维光学阵列向上运动),从而使得施加均匀压力。如图12B中所示,密封部件300与阵列306形成紧密密封。在其他情况下,改变的压力可以施加于密封部件,以在密封部件和阵列之间形成紧密密封。系统还可以包含可以用于分析阵列的另外部件312(例如显微镜、计算机等),如本文更多讨论的。

[0159] 在一些实施方案中,多个位置可以不包含多个反应容器/孔。例如,在其中采用捕获体的实施方案中,可以采用模式化的基本上平坦的表面,并且模式化区域形成多个位置。在一些情况下,模式化区域可以包含基本上亲水的表面,其由基本上疏水的表面基本上围绕。在特定实施方案中,多个捕获体(例如珠)可以由基本上亲水的介质(例如包含水)基本上围绕,并且珠可以暴露于模式化表面,从而使得珠在模式化区域(例如在表面上的亲水位

置)中连接,从而在空间上隔离多个珠。例如,在一个此类实施方案中,基底可以是或包括能够对于大量运输提供足够屏障(例如对流和 / 或扩散屏障)的凝胶或其他材料,以阻止用于分析物捕获的捕获体和 / 或前体标记试剂和 / 或标记试剂从材料上或中的一个位置移动到另一个位置,以便在指认位置且完成测定法所需的时帧过程中引起在含有不同捕获体的空间位置之间的干扰或串扰。例如,在一个实施方案中,通过将捕获体分散在水凝胶材料上和 / 或中,在空间上隔离多个捕获体。在一些情况下,前体标记试剂可以已经存在于水凝胶中,从而促进标记试剂的局部浓度的发展(例如在暴露于携带酶促组分的结合配体或分析物分子后)。作为另外一个实施方案,捕获体可以局限在一个或多个毛细管中。在一些情况下,多个捕获体可以吸附或局限在多孔或纤维基底例如滤纸上。在一些实施方案中,捕获体可以在均匀表面(例如平坦表面)上在空间上隔离,并且捕获体可以使用转换为基本上不溶性或沉淀的标记试剂的前体标记试剂进行检测,其保持局限在其中相应捕获体局限的位置处或附近。此类基本上不溶性或沉淀的标记试剂的使用在本文中描述。在一些情况下,单一分析物分子可以在空间上隔离到多个小滴内。即,单一分析物分子可以基本上包含在含有第一种流体的小滴内。小滴可以由第二种流体基本上围绕,其中所述第二种流体与第一种流体是基本上不能混合的。

[0160] 在一些实施方案中,在测定法过程中,可以执行至少一个洗涤步骤。在特定实施方案中,洗涤溶液这样选择,从而使得它不引起对于捕获体和 / 或分析物分子的配置的可观变化,和 / 或不破坏在测定法的至少两种组分之间(例如捕获组分和分析物分子)的任何特异性结合相互作用。在其他情况下,洗涤溶液可以是选择为与一种或多种测定法组分化学相互作用的溶液。如本领域普通技术人员应当理解的,洗涤步骤可以在本发明方法的过程中的任何合适时间点执行。例如,多个捕获体可以在使捕获体暴露于一种或多种溶液后洗涤,所述一种或多种溶液包含分析物分子、结合配体、前体标记试剂等。作为另一个例子,在分析物分子就多个捕获体而言固定后,可以对多个捕获体实施洗涤步骤,从而去除就捕获体而言未特异性固定的任何分析物分子。

[0161] 分析仪系统

[0162] 本发明还涉及用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度的系统,其配置为执行至少一些测定法步骤和 / 或上文描述的信号 / 数据处理步骤。

[0163] 例如,在特定实施方案中,本发明涉及用于测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度的系统,其包括包含多个位置的测定法基底,所述位置各自包含在此类位置内形成或包含的结合表面,其中至少一个结合表面包含固定在结合表面上的至少一种分析物分子或颗粒,至少一个检测器,其配置为指认多个位置,且能够产生指示在指认的每个位置上的分析物分子或颗粒的存在或不存在且具有随着在每个位置上的分析物分子或颗粒数目而改变的强度的至少一种信号,和至少一个信号处理器,其配置为由至少一种信号测定含有至少一个分析物分子或颗粒的位置百分比,且进一步配置为基于该百分比,至少部分基于含有至少一个分析物分子或颗粒的位置数目,测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度,或至少部分基于指示多个分析物分子或颗粒的存在的至少一种信号的强度水平,测定流体样品中的分析物分子或颗粒的浓度量度。

[0164] 在特定此类实施方案中,信号处理器可以包含或是图 10 中举例说明的计算机 438 的部分。信号处理器 / 计算机可以是系统的剩余部件的部分或与系统的剩余部件可操作连

接地耦合,并且在一些实施方案中,配置和/或程序设计为控制且调整系统的操作参数以及分析且计算值,如上所述。在一些实施方案中,信号处理器/计算机可以发送且接受控制信号,以设置和/或控制系统的其他部件的操作参数。在其他实施方案中,信号处理器/计算机可以与其他系统部件分离和/或就其他系统部件而言遥远位置,并且可以配置为经由直接和/或手提式工具接受来自系统的一个或多个其他部件的数据,例如经由手提式电子数据储存设备例如磁盘,或经由经过计算机网络例如因特网或局域网的通讯。

[0165] 信号处理器/计算机可以包括几个已知部件和线路,包括处理单元(即处理器)、存储系统、输入和输出装置和界面(例如互连机制),以及其他部件,例如运输线路(例如一个或多个信息转移总线(busses))、视频和音频数据输入/输出(I/O)子系统、专门目的的硬件,以及其他部件和线路,如下文更详细地描述的。进一步地,信号处理器/计算机可以是多元处理器计算机系统,或可以包括经由计算机网络连接的多个计算机。

[0166] 信号处理器/计算机可以包括处理器,例如商购可得的处理器,例如可从 Intel 获得的系列 x86、Celeron 和 Pentium 处理器之一,来自 AMD 和 Cyrix 的相似装置,可从 Motorola 获得的 680X0 系列微处理器,和来自 IBM 的 PowerPC 微处理器。许多其他处理器是可获得的,并且计算机系统并不限于特定处理器。

[0167] 处理器一般执行称为操作系统的程序,其中 Windows7、Windows Vista、WindowsNT、Windows95 或 98、UNIX、Linux、DOS、VMS、MacOS 和 OS8 是例子,其控制其他计算机程序的执行且提供调度、调试、输入/输出控制、记账(accounting)、编译、储存分配、数据管理和内存管理、通讯控制和相关服务。处理器和操作系统一起限定计算机平台,对于其以高级程序设计语言书写应用程序。信号处理器/计算机并不限于特定计算机平台。

[0168] 信号处理器/计算机可以包括存储系统,其一般包括计算机可读和可写入的非易失记录介质,其中磁盘、光盘、闪速存储器和磁带是例子。此类记录介质可以是可移去的,例如软盘、读/写 CD 或记忆棒,或可以是持久的,例如硬盘。

[0169] 此类记录介质一般以二进制形式(即,作为一和零的数列说明的形式)存储信号。盘(例如磁性或光学的)具有许多道,在其上可以存储一般以二进制形式的此类信号,即,作为一和零的数列说明的形式。此类信号可以限定待由微处理器执行的软件程序,例如应用程序,或待由应用程序处理的信息。

[0170] 信号处理器/计算机的存储系统还可以包括集成电路存储元件,其一般是易失的、随机存取存储器,例如动态随机存取存储器(DRAM)或静态存储器(SRAM)。一般地,在操作中,处理器引起程序和数据从非易失记录介质读取到集成电路存储单元内,其一般允许通过处理器对于程序指令和数据比非易失记录介质的更快速访问。

[0171] 处理器一般依照程序指令操作在集成电路存储元件内的数据,且随后在处理完成后将操作的数据拷贝到非易失记录介质。用于管理在非易失记录介质和集成电路存储元件之间的数据移动的多种机制是已知的,并且实现如上所述的方法、步骤、系统和系统元件的信号处理器/计算机并不限于其。信号处理器/计算机并不限于特定存储系统。

[0172] 上文描述的此类存储系统的至少一部分可以用于储存一个或多个数据结构(例如查找表)或上文描述的等式。例如,非易失记录介质的至少一部分可以储存数据库的至少一部分,所述数据库包括一个或多个此类数据结构。此类数据库可以是多类数据库中的任何,例如包括其中数据组构成由定界符分离的数据单元的一个或多个平面文件数据结构的

文件系统,其中数据组构成储存于表中的数据单元的关系数据库,其中数据组构成作为目标储存的数据单元的面向对象数据库,另一类数据库,或其任何组合。

[0173] 信号处理器/计算机可以包括视频和音频数据 I/O 子系统。子系统的音频部分可以包括模拟至数字(A/D)转换器,其接受模拟音频信息且将其转换为数字信息。数字信息可以使用已知的压缩系统压缩用于贮存于硬盘上,以在另一时间使用。I/O 子系统的一般视频部分可以包括视频图像压缩器/解压器,其中许多是本领域已知的。此类压缩器/解压器将模拟视频信息转换成压缩的数字信息,并且反之亦然。压缩的数字信息可以贮存于硬盘上用于在以后时间使用。

[0174] 信号处理器/计算机可以包括一个或多个输出装置。示例输出装置包括阴极射线管(CRT)、液晶显示器(LCD)及其他视频输出装置、打印机、通讯装置例如调制解调器或网络接口、储存设备例如盘或磁带、和声音输出装置例如扬声器。

[0175] 信号处理器/计算机还可以包括一个或多个输入装置。示例输入装置包括键盘、小键盘、跟踪球、鼠标、笔和输入板、例如如上所述的通讯装置、和数据输入装置例如音频和视频捕获装置和传感器。信号处理器/计算机并不限于本文描述的特定输入或输出装置。

[0176] 信号处理器/计算机可以包括专门程序设计的、专门目的的硬件,例如应用专用集成电路(ASIC)。此类专门目的的硬件可以配置为实现上文描述的方法、步骤、模拟、算法、系统和系统元件中的一种或多种。

[0177] 信号处理器/计算机及其部件可以使用一种或多种合适的计算机编程语言中的多种中的任何进行程序设计。此类语言可以包括过程编程语言,例如 C、Pascal、Fortran 和 BASIC,面向对象语言例如 C++、Java 和 Eiffel,及其他语言例如脚本语言或甚至汇编语言。

[0178] 方法、步骤、模拟、算法、系统和系统元件可以使用多种合适的编程语言中的任何实现,包括过程编程语言、面向对象的编程语言、其他语言及其组合,其可以通过此类计算机系统执行。此类方法、步骤、模拟、算法、系统和系统元件可以作为计算机程序的分离模块实现,或可以个别地作为分离的计算机程序实现。此类模块和程序可以在分离的计算机上执行。

[0179] 上文描述的方法、步骤、模拟、算法、系统和系统元件可以以软件、硬件或固件或三种的任何组合,作为上文描述的计算机实现的控制系统的一部分或作为独立部件实现。

[0180] 个别或组合的此类方法、步骤、模拟、算法、系统和系统元件可以作为在计算机可读介质上的可触知地体现为计算机可读信号的计算机程序产物实现,所述计算机可读介质例如非易失记录介质、集成电路存储元件或其组合。对于每种此类方法、步骤、模拟、算法、系统或系统元件,此类计算机程序产物可以包含在计算机可读介质上的可触知地体现的计算机可读信号,其限定例如作为一个或多个程序的部分的指令,由于通过计算机执行,所述指令指示计算机执行方法、步骤、模拟、算法、系统或系统元件。

[0181] 示例性靶分析物

[0182] 如本领域技术人员应当理解的,使用本发明的方法和系统可以检测且任选定量大量分析物分子和颗粒;基本上,能够制备为变得就结合配体而言固定的任何分析物分子可以使用本发明潜在地研究。可以包含分析物分子的潜在有利的特定更具体靶在下文提及。下文列表是示例性和非限制性的。

[0183] 在一些实施方案中,分析物分子可以是生物分子。生物分子的非限制性例子包括

激素、抗体、细胞因子、蛋白质、核酸、脂质、碳水化合物、脂质细胞膜抗原和受体(神经、激素、营养素和细胞表面受体)或其配体、或其组合。蛋白质的非限制性实施方案包括肽、多肽、蛋白质片段、蛋白质复合物、融合蛋白、重组蛋白、磷蛋白、糖蛋白、脂蛋白等。如本领域技术人员应当理解的,存在可以使用本发明就结合配偶体检测或估计的大量可能的蛋白质性质的分析物分子。除如上讨论的酶外,合适的蛋白质分析物分子包括但不限于免疫球蛋白、激素、生长因子、细胞因子(其中许多充当用于细胞受体的配体)、癌症标记等。生物分子的非限制性例子包括 PSA 和 TNF- α 。

[0184] 在特定实施方案中,分析物分子可以是宿主翻译修饰的蛋白质(例如磷酸化、甲基化、糖基化),并且捕获组分可以是对于翻译后修饰特异性的抗体。经修饰的蛋白质可以用包含多个特异性抗体的捕获组分进行捕获,并且随后捕获的蛋白质可以进一步结合至包含对于翻译后修饰具有特异性的第二抗体的结合配体。备选地,经修饰的蛋白质可以用包含对于翻译后修饰特异性的抗体的捕获组分进行捕获,并且随后捕获的蛋白质可以进一步结合至包含对于每种经修饰的蛋白质特异性的抗体的结合配体。

[0185] 在另一个实施方案中,分析物分子是核酸。核酸可以用互补核酸片段(例如寡核苷酸)进行捕获,并且随后任选用包含不同互补寡核苷酸的结合配体进行标记。

[0186] 合适的分析物分子和颗粒包括但不限于小分子(包括有机化合物和无机化合物)、环境污染物(包括杀虫剂、杀昆虫剂、毒素等)、治疗分子(包括治疗和滥用药物、抗生素等)、生物分子(包括激素、细胞因子、蛋白质、核酸、脂质、碳水化合物、细胞膜抗原和受体(神经、激素、营养素和细胞表面受体)或其配体等)、全细胞(包括原核(例如致病菌)和真核细胞包括哺乳动物肿瘤细胞)、病毒(包括逆转录病毒、疱疹病毒、腺病毒、慢病毒等)、孢子等。

[0187] 在一些实施方案中,分析物分子可以是酶。酶的非限制性例子包括氧化还原酶、转移酶、激酶、水解酶、裂解酶、异构酶、连接酶等。酶的另外例子包括但不限于聚合酶、组织蛋白酶、钙激活酶(calpains)、氨基转移酶例如 AST 和 ALT、蛋白酶例如半胱天冬酶、核苷酸环化酶、转移酶、脂肪酶、与心脏病发作相关的酶等。当本发明的系统/方法用于检测病毒或细菌因子的存在时,合适的靶酶包括病毒或细菌聚合酶和其他此类酶,包括病毒或细菌蛋白酶等。

[0188] 在其他实施方案中,分析物分子可以包含酶促组分。例如,分析物颗粒可以是具有存在于其细胞外表面上的酶或酶促组分的细胞。备选地,分析物颗粒是在其表面上不具有酶促组分的细胞。此类细胞一般使用下文描述的间接测定方法进行鉴定。酶促组分的非限制性例子是辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶。

[0189] 含有或怀疑含有分析物分子的流体样品可以衍生自任何合适来源。在一些情况下,样品可以包含液体、流动微粒固体(fluent particulate solid)、固体颗粒的流体悬液、超临界流体和/或气体。在一些情况下,分析物分子可以在测定前与其来源分离或由其来源纯化;然而,在特定实施方案中,含有分析物分子的未处理的样品可以直接测试。分析物分子的来源可以是合成的(例如在实验室中产生的)、环境(例如空气、土壤等)、哺乳动物、动物、植物或其任何组合。在特定例子中,分析物分子的来源是人体物质(例如血液、血清、血浆、尿、唾液、组织、器官等)。被分析的流体样品容积可以潜在地是在广泛范围的容积内的任何量,取决于许多因素,例如使用/可获得的捕获体数目、使用/可获得的位置数目等。在少数特定示例性实施方案中,样品容积可以是约 0.01 μ L、约 0.1 μ L、约 1 μ L、约 5 μ L、约

10uL、约 100uL、约 1mL、约 5mL、约 10mL 等。在一些情况下,流体样品的容积是约 0.01uL- 约 10mL、约 0.01uL- 约 1mL、约 0.01uL- 约 100uL、或约 0.1uL- 约 10uL。

[0190] 在一些情况下,流体样品在测定法中使用前可以进行稀释。例如,在其中分析物分子的来源是人体液(例如血液、血清)的实施方案中,流体可以用合适溶剂(例如缓冲液,例如 PBS 缓冲液)稀释。流体样品可以在使用前稀释约 1 倍、约 2 倍、约 3 倍、约 4 倍、约 5 倍、约 6 倍、约 10 倍或更多。样品可以加入包含多个捕获体的溶液中,或多个捕获体可以直接或作为溶液加入样品中。

[0191] 捕获组分

[0192] 在本发明的一些实施方案中,分析物分子可以就表面(例如捕获体的表面、位置(例如反应容器)的表面等)而言固定。在暴露于多个类型的结合配体之前、同时或之后,分析物分子可以就表面而言固定。在一些实施方案中,分析物分子就表面而言的固定可以帮助从溶液中去掉任何过量的结合配体,而无需从表面中(例如从反应容器中)逐出分析物分子的担心。一般地,捕获组分允许分子、颗粒或复合物附着至固体载体(例如捕获体、位置等),用于分子、颗粒或复合物的固定、检测、定量和 / 或其他分析的目的。

[0193] 如本领域技术人员应当理解的,捕获组分的组成将取决于分析物分子的组成。用于广泛多样靶分子的捕获组分是已知的或可以使用已知技术容易地发现或开发的。例如,当靶分子是蛋白质时,捕获组分可以包含蛋白质,特别是抗体或其片段(例如抗原结合片段(Fabs)、Fab' 片段、胃蛋白酶片段、F(ab')₂ 片段、全长多克隆或单克隆抗体、抗体样片段等)、其他蛋白质例如受体蛋白质、蛋白 A、蛋白 C 等或小分子。在一些情况下,用于蛋白质的捕获组分包括肽。例如,当靶分子是酶时,合适的捕获组分可以包括酶底物和 / 或酶抑制剂。在一些情况下,当靶分析物是磷酸化种类时,捕获组分可以包含磷酸盐结合试剂。例如,磷酸盐结合试剂可以包含金属离子亲和介质,例如美国专利号 7,070,921 和美国专利申请号 20060121544 中所述的那些。此外,当靶分子是单链核酸时,捕获组分可以是互补核酸。类似地,靶分子可以是核酸结合蛋白,并且捕获组分可以是单链或双链核酸;备选地,当靶分子是单链或双链核酸时,捕获组分可以是核酸结合蛋白。备选地,如美国专利 5,270,163、5,475,096、5,567,588、5,595,877、5,637,459、5,683,867、5,705,337 和相关专利中一般描述的,核酸“适体”可以开发用于捕获基本上任何靶分子。此外,例如,当靶分子是碳水化合物时,潜在合适的捕获组分包括例如抗体、凝集素和选择素。如本领域普通技术人员应当理解的,可以特异性结合目的靶分子的任何分子可以潜在地用作捕获组分。

[0194] 对于特定实施方案,合适的靶分析物分子 / 捕获组分对可以包括但不限于抗体 / 抗原、受体 / 配体、蛋白质 / 核酸、核酸 / 核酸、酶 / 底物和 / 或抑制剂、碳水化合物(包括糖蛋白和糖脂) / 凝集素和 / 或选择素、蛋白质 / 蛋白质、蛋白质 / 小分子;小分子 / 小分子等。根据一个实施方案,捕获组分是已知多聚化的细胞表面受体的部分(特别是细胞外部分),例如生长激素受体、葡萄糖转运蛋白(特别是 GLUT4 受体)、和 T 细胞受体,并且靶分析物是一种或多种受体靶配体。

[0195] 在特定实施方案中,捕获组分可以经由连接附着至表面,所述连接可以包含结合表面和 / 或捕获组分的任何部分、官能化或修饰,其促进捕获组分与表面的附着。在捕获组分和表面之间的连接可以包含一种或多种化学或物理(例如,经由范德华力、氢键合、静电相互作用、疏水 / 亲水作用;等的非特异性附着)键和 / 或提供此类键的化学接头。在特定

实施方案中,捕获组分包含捕获延长剂组分。在此类实施方案中,捕获组分包含结合分析物分子的第一个部分和可以用于附着至结合表面的第二个部分。

[0196] 在特定实施方案中,表面还可以包含保护或钝化层,其可以使在测定法过程中非捕获组分(例如分析物分子、结合配体)与结合表面的非特异性附着减少或降到最低,所述非特异性附着可以导致在检测过程中的假阳性信号,或者信号的丧失。在特定实施方案中可以用于形成钝化层的材料的例子包括但不限于:排斥蛋白质的非特异性结合的聚合物例如聚(乙二醇);具有这种性质的天然存在的蛋白质,例如血清清蛋白和酪蛋白;表面活性剂,例如两性离子型表面活性剂,例如磺基甜菜碱;天然存在的长链脂质;和核酸,例如鲑精 DNA。

[0197] 一个实施方案利用蛋白质性质的捕获组分。如本领域已知的,任何数目的技术都可以用于将蛋白质性质的捕获组分附着至广泛多样的固体表面。在这个上下文中的“蛋白质”或“蛋白质性质的”包括蛋白质、多肽、肽,包括例如酶和抗体。将反应部分加入蛋白质的广泛多样的技术是已知的,例如美国专利号 5,620,850 中概述的方法。蛋白质与表面的附着是已知的,例如参见 Heller, Acc. Chem. Res. 23:128(1990),和许多其他类似参考文献。

[0198] 在一些实施方案中,捕获组分(或结合配体)可以包含 Fab' 片段。与完整抗体相反, Fab' 片段的使用可以帮助减少在捕获组分和结合配体之间的非特异性结合。在一些情况下,捕获组分(或结合配体)的 Fc 区可以被去除(例如蛋白水解地)。在一些情况下,酶可以用于去除 Fc 区(例如可以产生 $F(ab')_2$ 片段的胃蛋白酶,和可以产生 Fab 片段的木瓜蛋白酶)。在一些情况下,捕获组分可以使用胺附着至结合表面,或可以用生物素(例如使用 NHS-生物素)进行修饰,以促进与抗生物素蛋白或链霉亲和素包被的捕获体表面的结合。可以对 $F(ab')_2$ 片段实施化学还原处理(例如通过暴露于 2-巯基乙醇),以在一些情况下,形成两个具有硫醇的 Fab' 片段。这些具有硫醇的片段随后可以经由与 Michael 受体例如马来酰亚胺反应进行附着。例如, Fab' 片段随后可以用试剂(例如马来酰亚胺-生物素)处理,以附着至少一个生物素部分(即生物素化的),以促进如上所述与链霉亲和素包被的表面的附着。

[0199] 如本领域众所周知的,例如,当分析物分子是核酸或核酸结合蛋白时,或当需要捕获组分充当用于结合蛋白质的适体时,特定实施方案利用核酸作为捕获组分。

[0200] 根据一个实施方案,每个结合表面包含多个捕获组分。在一些情况下,多个捕获组分可以随机分布在结合表面像“草坪(lawn)”上。备选地,捕获组分可以在空间上隔离到不同区域内,并且以任何所需方式分布。

[0201] 在特定实施方案中,例如当捕获组分和分析物分子是结合对的互补部分时,在捕获组分和分析物分子之间的结合是特异性的。在特定此类实施方案中,捕获组分特异性且直接结合分析物分子。“特异性结合”或“结合特异性”意指捕获组分结合分析物分子,其特异性足以区别分析物分子和测试样品的其他组分或污染物。例如,根据一个实施方案,捕获组分可以是特异性结合分析物分子(例如抗原)的一些部分的抗体。根据一个实施方案,抗体可以是能够特异性结合目的分析物分子的抗体。例如,合适的抗体包括但不限于单克隆抗体、双特异性抗体、微型抗体、结构域抗体、合成抗体(有时称为抗体模拟物)、嵌合抗体、人源化抗体、抗体融合物(有时称为“抗体缀合物”)和分别地各自的片段。作为另一个例子,分析物分子可以是抗体,并且捕获组分可以是抗原。

[0202] 根据其中分析物颗粒是生物细胞(例如哺乳动物、禽类、爬行动物、其他脊椎动物、昆虫、酵母、细菌细胞等)的一个实施方案,捕获组分可以是对于细胞表面抗原(例如细胞表面受体)具有特异性亲和力的配体。在一个实施方案中,捕获组分是粘附分子受体或其部分,其对于在靶细胞类型的表面上表达的细胞粘附分子具有结合特异性。在使用中,粘附分子受体结合在靶细胞的细胞外表面上的粘附分子,从而固定或捕获细胞。在其中分析物分子是细胞的一个实施方案中,捕获组分是纤连蛋白,其对于例如包含神经细胞的分析物颗粒具有特异性。

[0203] 在一些实施方案中,如本领域普通技术人员应当理解的,可以使用对于其与分析物分子的结合不是高度特异性的捕获组分检测分析物分子。例如,此类系统/方法可以使用不同捕获组分,例如不同结合配体的实验对象组,并且任何特定分析物分子的检测经由与这个结合配体实验对象组的结合“标记”进行测定,类似于其中“电子嗅觉器”工作的方式。这可以在特定小分子分析物的检测中发现特定效用。在一些实施方案中,在分析物分子和捕获组分之间的结合亲和力应足以在测定法的条件下保持结合,包括去除并非特异性结合的分子或颗粒的洗涤步骤。在一些情况下,例如,在特定生物分子的检测中,分析物分子与其互补捕获组分的结合常数可以是至少约 10^4 – 约 10^6M^{-1} 、至少约 10^5 – 约 10^9M^{-1} 、至少约 10^7 – 约 10^9M^{-1} 、大于约 10^9M^{-1} 或更大。

[0204] 结合配体和前体标记试剂/标记试剂

[0205] 在一些实施方案中,测定法可以包含至少一种结合配体的使用。结合配体可以选自能够与分析物分子连接和/或与另一种结合配体结合的任何合适的分子、颗粒等,如下文更多讨论的。特定结合配体可以包含能够促进直接(例如经由可检测部分)或间接检测的组分。例如通过将前体标记试剂分子转换成标记试剂分子(例如在测定法中检测的试剂),组分可以促进间接检测。在一些实施方案中,结合配体可以包含酶促组分(例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶等)。第一类结合配体可以与或不与另外的结合配体(例如第二类等)联合使用,如本文讨论的。

[0206] 在一些实施方案中,多种分析物分子(例如在一些情况下,就捕获体而言固定的)可以暴露于多个结合配体,从而使得结合配体与多种分析物分子中的至少一些连接。在一些情况下,大于约 80%、大于约 85%、大于约 90%、大于约 95%、大于约 97%、大于约 98%、大于约 99% 或更多的分析物分子与结合配体连接。

[0207] 对于捕获步骤,珠浓度的选择可以取决于几个竞争因素。例如,如果从热力学和动力学观点来看,存在足够的珠以捕获大多数靶分析物,那么它可以是有利的。作为示例性举例说明,热力学上,各自具有约 80,000 个捕获组分(例如抗体)结合的在 $100\text{ }\mu\text{L}$ 中的 200,000 个珠与约 0.3nM 的抗体浓度关联,并且在那个浓度时的抗体-蛋白质平衡可以在特定情况下产生靶分析物分子的相对高捕获效率(例如 >70%)。动力学上,对于在 $100\text{ }\mu\text{L}$ 中分散的 200,000 个珠,在珠之间的平均距离可以估计为约 $80\text{ }\mu\text{m}$ 。作为示例性分析物分子,例如 TNF- α 和 PSA 的蛋白质大小(分别为 17.3 和 30kDa)一般趋于在小于 1 分钟内分散 $80\text{ }\mu\text{m}$,从而使得经过 2 小时温育,此类分析物分子的捕获趋于不受动力学限制。此外,提供装载到阵列上的足够珠以将泊松噪声限制于所需或可接受的量也可以是有利的。考虑其中将在 $10\text{ }\mu\text{L}$ 容积中的 200,000 个珠装载到阵列上的情况作为例子,一般约 20,000–30,000 个珠可以变得陷入阵列的飞升大小的孔中。对于 1% 活性珠的一般本底信号(例如由于非特

异性结合等),这个装载将期望产生检测到 200 - 300 个活性珠的本底信号,对应于来自泊松噪声 6 - 7% 的变异系数(CV),这在一般实施方案中可以是可接受的。然而,超过特定浓度的珠浓度在特定情况下可以是不希望的,因为它们可以导致:a)在可以减少信号本底比的非特异性结合中的增加;和/或 b)分析物与珠不希望的低比率,从而使得活性珠的比例太低,导致来自泊松噪声的高 CV。在特定实施方案中,考虑例如上文描述的那些的因素平衡,提供约 200,000 至 1,000,000 个珠/100 μ L 测试样品是希望的,或在特定情况下,对于执行本发明的特定测定法最佳的。

[0208] 对于采用一种或多种结合配体以标记捕获的分析物分子的本发明测定法的实施方案,在特定情况下,调整用于获得希望或最佳性能的浓度可以是有利的。例如,考虑涉及其为蛋白质(捕获的蛋白质)的分析物分子且采用包含检测抗体的第一种结合配体和包含酶缀合物(例如 S β G)的第二种结合配体的实施方案,在一些情况下,用于标记捕获的蛋白质的检测抗体和酶缀合物(S β G)浓度可以是受限制或降到最低的,以获得可接受的本底信号(例如 1% 或更少)和泊松噪声。用于标记捕获的蛋白质的检测抗体和酶缀合物(S β G)浓度的选择可以是改善本发明的测定法的性能或最佳化特定本发明的测定方法中的因素。在特定情况下,可以希望仅标记捕获蛋白质的部分,以便避免由测定法产生的饱和信号。例如,对于其中观察到的本底水平等价于 $\sim 1 - 2$ fM 靶蛋白,从而使得分析物与珠的比率可以是约 0.3 - 0.6 的特定测定法,如果每一种蛋白质都用酶标记,那么活性珠的数目可以在约 25 - 40% 的范围中,这可以高于在一些情况下希望的。为了产生可以接近于关于数字检测测定法的动态范围下端的本底信号 - 考虑例如在特定情况下,1% 活性珠可以提供合理的基底噪声(noise floor)用于在本发明的数字检测测定法中的本底 - 通过使两种标记试剂的浓度限制或降到最低,或通过使用更短的温育时间,捕获的蛋白质的合适标记可以潜在地通过标记步骤的动力学控制来实现。例如,在其中标记浓度降到最低的实施方案中,使用标准的 ELISA 温育时间可以提供可接受的结果;例如使用 ~ 6 小时的总测定法时间。这个时间长度对于容忍关于样品的每日周转时间的测试可以是可接受的。对于更短的周转时间,例如 <1 小时(例如对于重点护理应用),测定法可以用更高浓度的标记伴随更短的温育执行。

[0209] 在一些实施方案中,可以使用超过一类结合配体。在一些实施方案中,可以提供第一类结合配体和第二类结合配体。在一些情况下,可以提供至少两类、至少三类、至少四类、至少五类、至少八类、至少十类或更多类结合配体。当其中一些与至少一个分析物分子连接的多个捕获体暴露于多类结合配体时,多种固定的分析物分子中的至少一些可以与每类结合配体中的至少一类连接。结合配体可以这样选择,从而使得它们以多种不同方式彼此相互作用。在第一个例子中,第一类结合配体能够与分析物分子连接,并且第二类结合配体能够与第一类结合配体连接。在此类实施方案中,第一类结合配体可以包含帮助分析物分子连接的第一种组分,和帮助第二类结合配体与第一类结合配体连接的第二种组分。在特定实施方案中,第二种组分是生物素,并且第二类的结合配体包含与生物素连接的酶或酶促组分。

[0210] 作为另一个例子,第一类结合配体和第二类结合配体可以与分析物分子直接连接。不受理论或任何特定机制束缚,通过仅将测定为含有第一类结合配体和/或第二类结合配体的位置(例如通过直接或间接检测)鉴定为含有分析物分子,第一类和第二类结合配

体两者的连接可以提供在执行测定法中的另外特异性和可靠性。此类测定方法可以减少由非特异性结合引起的假阳性数目,因为发现仅具有单一类型的结合配体(例如仅第一类标记试剂或第二类结合试剂)的位置将不视为或计数为包含分析物分子的位置。第一类结合配体可以包含第一类酶促组分,并且第二类结合配体可以包含第二类酶促组分,其不同于第一类酶促组分。包含分析物分子、第一类结合配体和第二类结合配体的捕获体可以暴露于第一类前体标记试剂,其在暴露于第一类酶促组分后转换为第一类标记试剂(例如包含第一个可测量性质),和第二类前体标记试剂,其在暴露于第二类酶促组分后,转换为第二类标记试剂(例如包含可与第一个可测量性质区别的可测量性质)。因此,仅测定为含有第一类标记试剂和第二类标记试剂的位置测定为含有分析物分子。作为另一个例子,第一类结合配体和第二类结合配体可以各自掺入组分(例如 DNA 标记),并且第三类结合配体可以包含与第一类和第二类结合配体的组分互补的两种组分(例如两类互补的 DNA 标记),其中第三类结合配体还包含用于直接或间接检测的分子或部分(例如在反应容器中第三类结合配体的存在是测定位置中分析物分子的存在或不存在所需的)。当第一类结合配体和第二类结合配体基本上彼此紧密接近地存在时(例如经由与分析物分子连接),可以出现第三类结合配体的结合,并且因此用于检测分析物分子。关于可以减少与非特异性结合相关的特定负面影响的方式使用超过一类结合配体的更多信息在下述专利中描述:通过 Duffy 等人于 2010 年 3 月 24 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules using Dual Detection Methods”的共同拥有的美国专利申请序列号 12/731,135;和通过 Duffy 等人于 2011 年 3 月 1 日提交的,名称为“Ultra-Sensitive Detection of Molecules using Dual Detection Methods”的国际专利申请号(仍未确定)(代理人案号 Q0052.70012W000),所述专利通过引用合并入本文。

[0211] 包括下述实施例以证实本发明的多个特点。根据本公开内容,本领域普通技术人员应当理解可以在公开的具体实施方案中作出许多改变,同时仍获得相同或相似的结果,而不背离如由附加权利要求定义的本发明的范围。相应地,下述实施例仅预期举例说明本发明的特定特点,但不一定例证本发明的完全范围。

[0212] 实施例 1

[0213] 下述实施例描述了在实施例 2-10 中使用的材料。光学纤维束购自 Schott North America (Southbridge, MA)。非强化的光泽硅酮片层得自 Specialty Manufacturing (Saginaw, MI)。盐酸、无水乙醇和分子生物学级别的 Tween-20 购自 Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO)。2.7- μ m 直径羧基末端的磁珠购自 Varian, Inc. (Lake Forest, CA)。1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)、N-巯基磺基琥珀酰亚胺(NHS)和 **SuperBlock®** T-20 Blocking Buffer 购自 Thermo Scientific (Rockford, IL)。链霉亲和素- β -半乳糖苷酶(S β G)购自 Invitrogen, Sigma-Aldrich, 或使用标准方案内部缀合。试卤灵- β -D-半乳糖吡喃糖苷(RGP)购自 Invitrogen (Carlsbad, CA)。纤维抛光剂和抛光消耗品购自 Allied High Tech Products (Rancho Dominguez, CA)。针对 PSA 的单克隆捕获抗体、针对 PSA 的单克隆检测抗体和纯化的 PSA 购自 BiosPacifiC. Chromalink™ 生物素化试剂购自 Solulink, Inc (San Diego, CA)。纯化的 DNA 购自 Integrated DNA Technologies。

[0214] 实施例 2

[0215] 下文描述了用于捕获示例性分析物 S β G 的由生物素官能化的 2.7- μ m 直径磁

珠制备的非限制性例子。由 DNA 捕获探针(5'-NH₂/C12-GTT GTC AAG ATG CTA CCG TTC AGA G-3')官能化的珠根据制造商的说明书进行制备。这些珠与 1 μM 生物素化的互补 DNA (5'-生物素 -C TCT GAA CGG TAG CAT CTT GAC AAC-3')一起在含有 0.5M NaCl 和 0.01%Tween-20 的 TE 缓冲液中温育过夜(16 小时)。在温育后,珠在含有 0.1%Tween-20 的 PBS 缓冲液中洗涤三次。将珠原液分布到微量滴定板内,给出在 100 μL 中的 400,000 个珠/孔。从微量滴定板孔中抽取缓冲液,将珠重悬浮且与在含有 0.05%Tween-20 的 Superblock 中的多个浓度的 SβG 一起温育 5 小时。随后将珠分离且用含有 0.1%Tween-20 的 5×PBS 缓冲液洗涤六次。

[0216] 在备选实施方案中,使用 200,000 个珠/100 μL SβG 靶溶液的珠浓度。将珠重悬浮且与在含有 0.05%Tween-20 的 SuperblockSuperBlock 中稀释的多个浓度的 SβG 靶溶液一起温育 54 小时。将 100 μL 多种靶溶液等分到微量滴定板内。随后用微量滴定板磁铁分离珠,并且用含有 0.1%Tween-20 的 5×PBS 缓冲液洗涤六次。对于检测,将珠重悬浮于含有 0.1%Tween-20 的 10 μL PBS 中,并且将等分试样装载到飞升容积孔阵列上。

[0217] 实施例 3

[0218] 下文描述了微孔阵列制备的非限制性例子。使用 30-、9- 和 1- 微米大小的金刚石研磨薄膜,在抛光机上顺次抛光约 5-cm 长的光学纤维束。将抛光的纤维束在 0.025M HCl 溶液中化学蚀刻 130 秒,并且随后立即浸入水内,以猝灭反应。平均起来,孔以约 1.5-1.7 μm/分钟的速率蚀刻。因此,3.25 μm 深度的孔在约 115 - 130 秒内产生。为了去除来自蚀刻的杂质,将蚀刻的纤维超声处理 5 秒,并且在水中洗涤 5 分钟。随后将纤维在真空下干燥,并且暴露于空气等离子体 5 分钟,以清洁且激活玻璃表面。将阵列在 2% 硅烷溶液中硅烷化 30 分钟,以使得表面疏水。在一些情况下,孔的尺度(例如,3.25 ± 0.5 μm)配置为保留孔中的单一珠同时维持良好密封。

[0219] 实施例 4

[0220] 下文描述了将珠装载到微孔内的非限制性例子。在珠装载到蚀刻的孔内之前,珠可以暴露于包含分析物分子的流体样品。为了将珠的溶液应用于纤维束中蚀刻的孔,将透明的 PVC 管道(1/16" I.D. 1/8" O.D.)和透明的热收缩(heat shrink)(3/16" ID)切割成约 1cm 长。首先将一片 PVC 管道置于纤维束的蚀刻末端上,以产生容纳珠溶液的储库,随后为在 PVC 管道和纤维束之间的界面周围的热收缩应用,以提供紧密密封。将 10 μL 浓缩的珠溶液吸取到由 PVC 管道产生的储库内。随后将纤维束以 3000rpm (~ 1300g)离心 10 分钟,以迫使珠进入蚀刻的孔内。在离心后取出 PVC 管道/热收缩组件。将纤维束的远端浸泡在 PBS 溶液中,以洗掉过量珠溶液,随后为用去离子水擦拭表面。在其中珠浓度是 200,000/10 μL 的实施方案中,这一般导致在 50,000 孔阵列中的 40 - 60% 孔由单一珠占据。

[0221] 实施例 5

[0222] 下文描述了珠和酶标记的珠在微孔阵列中的装载和检测的非限制性例子。含有水银光源、过滤立方体、目标和 CCD 相机的定做的成像系统用于采集荧光图像。使用定制的夹具将纤维束阵列固定在显微镜载物台上。将 β-半乳糖苷酶底物(RPG)的小滴置于硅酮垫圈材料上,并且置于与纤维阵列的远端接触。精确的机械平台将硅酮层移动到与蚀刻的光学纤维阵列的远端接触,产生分离的飞升反应容器的阵列。荧光图像在 577nm 处以曝光时间 1011 毫秒采集。对于每个纤维素阵列获得五帧(以 30 秒/帧)。使用图像分析软件分析

荧光图像,以测定在微孔阵列的每个孔内酶促活性的存在或不存在。使用使用 MathWorks MATLAB and MathWorks Image Processing 工具箱开发的图像处理软件分析数据。该软件比对获得的图像帧,鉴定反应容器位置,位置具有珠的反应容器,且测量经过预定时间段在反应容器强度中的变化。计数含有经过所有数据帧具有足够强度生长的珠的反应容器,并且活性反应容器的最终数目报道为所有鉴定的反应容器的百分比。

[0223] 将阵列用白光以及荧光成像,以鉴定含有珠的那些孔。在采集荧光图像后,将纤维束阵列的远(密封)端用白光照明,且在 CCD 相机上成像。由于光通过珠的散射,含有珠的那些孔在图像中看起来比不含珠的孔更亮。通过软件使用这种方法鉴定带珠的孔。

[0224] 实施例 6

[0225] 下述非限制性方法描述了扩大单一分子测量的动态范围。跨越宽范围的酶浓度(例如,关于浓度范围参见表 2)重复上文实施例 5 中所述的实验。在这个实验中生成的图像以不同方式进行分析,取决于测试的浓度。例如,如上文在详述中所述的,当与至少一种分析物分子(例如酶)连接的珠的百分比小于约 50% (或 45%、或 40%、或 35% 等) 时,通过计数“开”珠的总数目测定平均分子 / 珠。“开”珠鉴定为含有珠的孔(根据白光图像),并且其荧光在第一帧后的所有四个连续帧中增加,并且其总体荧光从第一帧到末一帧增加至少 20%。“开”珠的总数目可以使用泊松分布调整进行调整。在“开”珠的高比率时,由捕获的第二帧的强度测定平均珠信号。使用已知浓度的样品测定模拟至数字换算因数,所述已知浓度的样品具有约 30%–约 50% 的“开”珠百分比。关于已知浓度的样品的结果可以借助于换算因数在校准曲线上标绘。使用所得到的校准曲线,可以测定流体样品中未知浓度的分析物分子。例如,通过指认含有至少一个珠的多个位置中的至少一些,且测定指示含有至少一个分析物分子或颗粒的所述位置百分比的量度(例如“开”珠的百分比)。取决于该百分比,至少部分基于百分比或至少部分基于测量的信号强度,所述信号指示多个分析物分子或颗粒的存在,并且通过值与校准曲线的比较,可以测定流体样品中的分析物分子或颗粒的未知浓度量度。

[0226] 实施例 7

[0227] 下述实施例描述了生物素化的 PSA 检测抗体和酶缀合物的制备和表征。检测抗体使用 Chromalink™ 生物素化试剂进行生物素化。这种试剂含有经由赖氨酸残基将生物素基团与抗体附着的琥珀酰亚胺酯基团,和允许定量生物素分子数目 / 抗体的双芳基脒生色团。在抗 PSA 抗体上的生物素基团的平均数目范围为 7.5–9.5。链霉亲和素- β -半乳糖苷酶(S β G) 使用标准方案进行缀合。缀合物的 HPLC 表征指示 >80% 的缀合物分子含有一个 β -半乳糖苷酶分子,具有 1.2 酶 / 缀合物的平均值。与分子量标准比较指示与每个酶分子缀合的链霉亲和素分子的平均数目是 2.7。因为每个检测抗体含有多个生物素基团,所以与单个检测抗体结合的单个蛋白质分子可以结合多重酶缀合物,这是可能的。然而,在单一分子方案(AMB<0.1)中由酶连接的珠生成的荧光强度分析暗示多重酶缀合物不结合单一检测抗体分子;这些荧光强度与 β -半乳糖苷酶的单一分子的先前已知动力学一致。

[0228] 实施例 8

[0229] 下述实施例描述了 PSA 在磁珠上的捕获和酶标记的免疫复合物的形成。由针对 PSA 的单克隆抗体官能化的珠根据制造商的说明书进行制备。将测试溶液(100 μ L) 与 500,000 个磁珠的悬液一起在 23°C 温育 2 小时。随后将珠分离且在 5×PBS 和 0.1%Tween-20

中洗涤三次。将珠重悬浮且与含有检测抗体($\sim 1\text{nM}$)的溶液一起在 23°C 温育 60 分钟。随后将珠分离且在 $5\times\text{PBS}$ 和 $0.1\%\text{Tween-20}$ 中洗涤三次。将珠与含有 $\text{S}\beta\text{G}$ (15pM) 的溶液一起在 23°C 温育 30 分钟,分离且在 $5\times\text{PBS}$ 和 $0.1\%\text{Tween-20}$ 中洗涤七次。随后将珠重悬浮于 $25\mu\text{L}$ PBS 中,并且将 $10\mu\text{L}$ 珠溶液装载到飞升容积孔阵列上。

[0230] 实施例 9

[0231] 下述实施例描述了示例性系统,其中使用上文在第二个模拟分析实施方案(等式 8)的上下文中描述的分析执行组合的数字和模拟酶标记检测。可以通过组合 AMB 的数字和模拟测定来实现上文在实施例 7 中所述的 $\text{S}\beta\text{G}$ 结合测定法,且使用在其他实施例中所述的证实扩大的动态范围的方法和仪器。图 13 显示了由生物素呈现的珠群体的图像测定的 AMB ,所述珠已与范围为 zeptomolar 到皮摩尔的 $\text{S}\beta\text{G}$ 浓度一起温育。具体地,图 13A 和 13B 显示了通过组合数字和模拟测量来实现宽动态范围。图 13A 显示了根据酶浓度的 AMB 曲线图。误差条是经过三次重复的标准差。图 13B 显示了包括根据酶浓度的 % 活性和 AMB 值的表。对于 % 活性 $<70\%$ 使用等式 4 测定 AMB ,并且对于 % 活性 $>70\%$ 使用等式 8 测定 AMB 。在这个实施例中在模拟和数字之间的阈值是 10fM - 31.6fM 。

[0232] 对于具有活性珠 $\%<70\%$ 的图像,使用等式 4 测定 $\text{AMB}_{\text{数字}}$ 。所有具有 $<10\%$ 活性珠的阵列用于测定 $\bar{I}_{\text{单一}}$,总共 7566 个珠; $\bar{I}_{\text{单一}}$ 等于 298au 。测定在具有超过 70% 活性的图像中珠的平均荧光强度,并且使用等式 8 测定 $\text{AMB}_{\text{模拟}}$ 值。因为 0M $\text{S}\beta\text{G}$ 浓度不获得活性珠,所以这个实验中的检测下限无法使用本底加上 3s. d. 方法进行计算。使用先前建立的 $\text{LOD}220\text{zM}$,和在这个曲线的线性范围中检测到的最高浓度 316fM ,观察到用于检测酶标记的 6.2 对数线性动态范围。线性数字动态范围是 4.7 对数,并且模拟线性动态范围是 1.5 对数。

[0233] 实施例 10

[0234] 这个实施例描述了用于测量血清中的 PSA 的组合的数字和模拟系统和方法。组合的数字和模拟方法用于测定具有宽动态范围的 PSA 浓度。临床上, PSA 用于筛选前列腺癌且监控在已经历手术以摘除癌症的患者中该疾病的生物化学复发。在已经历根治性前列腺切除术(RP)的患者的血清中的 PSA 水平已知范围为 0.014pg/mL 至超过 100pg/mL 。为了在单次测试中成功地测量大多数患者中的 PSA 水平要求具有 4 对数动态范围的测定法。该实验如实施例 8 中所述的执行。图 14A 和 14B 显示了通过组合数字和模拟分析,本发明的 PSA 测定法的工作范围为 0.008pg/mL - 100pg/mL ,使得在一次经过中绝大多数的 RP 患者样品中的 PSA 水平的精确定量成为可能。具体地,图 14A 和 14B 显示了组合的数字和模拟 PSA 测定法结果,具有 4 对数工作范围和计算的 $\text{LOD}0.008\text{pg/mL}$ 。 AMB 在(图 14A)线性-线性空间和(图 14B)对数-对数空间中根据 PSA 浓度进行标绘。基于一式四份测量对于所有数据点显示了误差条。

[0235] 该测定法用于测量在根治性前列腺切除手术后在 $2-46$ 周(平均 $=13.8$ 周)时收集的 17 个前列腺癌患者的血清中的 PSA 浓度。这些样品接近于手术收集,以便推动数字 ELISA 的检测下限。此处,为了估计测定法跨越预期临床范围的动态范围,测试接近于手术收集的样品,以捕获其癌症将复发的具有最高 PSA 的患者。然而,使用第一流的 PSA 诊断测试(Siemens), PSA 在所有这些样品中是无法检测的。将血清样品在缓冲液中 $1:4$ 稀释,并且使用本文描述的方法测量 AMB 。类似于图 14B,通过从同时获得的校准曲线阅读 AMB 来测定关于每种样品的 PSA 浓度。表 4 概括了由这些样品测定的 AMB 和 PSA 浓度,连同由 $\%CV$

给出的关于信号和浓度的不精确。在一个实验中定量在所有样品中的 PSA。这些样品中的平均 PSA 浓度是 33pg/mL, 其中高为 136pg/mL 和低为 0.4pg/mL。当与已经历根治性前列腺切除术(RP)手术的患者中 PSA 的先前测量组合时, 在临床样品中检测到的 PSA 浓度范围为 0.46fM (0.014pg/mL) -4.5pM (136pg/mL), 证实由这个实施例的本发明测定法提供的良好动态范围的重要性。

[0236] 表 4. 对于来自 RP 后患者的 17 个血清样品测定的 AMB 和 [PSA] 概括^a

[0237]

样品 ID	平均 AEB	标准差 AEB	AEB CV, %	[PSA] (pg/mL)	标准差 [PSA]	[PSA] CV, %
S640	8.8	1.2	13	41.0	7.5	18
S641	0.87	0.08	10	4.1	0.4	11
S643	0.23	0.002	1	1.1	0.01	1
S644	15.2	1.0	6	136	13	10
S645	1.5	0.06	4	6.1	0.2	4
S647	11.0	0.1	1	80.4	1.9	2
S648	7.4	0.3	3	32.3	1.6	5
S649	1.5	0.2	11	6.1	0.6	10
S650	0.22	0.008	4	1.2	0.03	2
S651	0.50	0.02	5	2.3	0.1	4
S615	12.6	1.0	8	70.7	8.6	12
S653	1.3	0.2	18	5.0	0.8	16
S616	0.44	0.05	12	1.7	0.2	13
S618	13.6	0.7	5	79.2	6.2	8
S624	14.8	0.5	3	88.9	4.1	5
S627	0.098	0.003	3	0.39	0.01	3
S628	0.92	0.04	5	3.7	0.15	4

[0238] ^a 标准差和 CV 经过一式三份测试进行测定。样品 S644 具有超过

[0239] 校准曲线范围的 AEB 值, 但它的浓度通过外推进行测定。

[0240] 实施例 11

[0241] 图 15 证实了使用用于链霉亲和素- β -半乳糖苷酶(S β G)的测定法, 其导致具有充分确定的酶/珠比率的珠, 在校准曲线的数字范围中的泊松分布分析的非限制性例子。简言之, 将珠用生物素化的捕获分子官能化, 并且这些珠用于捕获多个浓度的 S β G 酶缀合物。将珠装载到飞升阵列内, 并且在将 RGP 溶液密封到阵列的孔内之后, 由反应室中共 2.5 分钟累积的结合的酶生成荧光, 其中每 30 秒采集荧光图像。在实验结束时采集阵列的白光图像。分析这些图像, 以鉴定含有珠的孔(根据白光图像), 且测定其中哪些珠已连接结合的酶分子(根据时间流逝的荧光图像。图 15B 显示了由等式 4 测定的 AMB_{数字} 维持直到 50% 活性的线性应答, 尽管在 f_{on} 中的非线性变动。具体地, 图 15 显示了(图 15A)使用泊松统计量, 活性珠 % 至 AMB_{数字} 的转换。中心柱是根据酶浓度由数字计数测定的活性珠部分。右侧柱是使用等式 4 由活性珠 % 测定的平均酶/珠(AMB)。这个转换使用数字计数方法统计上解释与多重酶分子连接的珠;(图 15B)显示了根据酶浓度的活性珠 % (菱形)和 AMB_{数字} (方形)的曲线图。活性珠 % 衍生自伴随增加浓度的线性, 如由泊松分布期望的。在这个实验中, 对于直到约 50 活性珠 % 的浓度, AMB_{数字} 是线性的。由经过三次测量的标准差测定误差条。

[0242] 虽然本发明的几个实施方案已在本文中描述且举例说明,但本领域普通技术人员将容易地设想多种其他工具和 / 或结构用于执行功能和 / 或获得结果和 / 或本文描述的一个或多个优点,并且此类变异和 / 或修饰各自视为在本发明的范围内。更一般地,本领域技术人员应当理解本文描述的所有参数、尺度、材料和配置意欲是示例性的,并且实际参数、尺度、材料和 / 或配置将取决于本发明的教导用于其的一个或多个具体应用。本领域技术人员将认识到,或能够使用不超过例行实验确定本文描述的本发明的具体实施方案的许多等价方案。因此,应当理解前述实施方案仅呈现作为例子,并且在附加权利要求和关于其的等价物的范围内,本发明可以以除已具体描述且请求保护外的方式进行实践。本发明涉及本文描述的每个个别特点、系统、物品、材料、试剂盒和 / 或方法。此外,如果此类特点、系统、物品、材料、试剂盒和 / 或方法并不互相矛盾,那么两个或更多个此类特点、系统、物品、材料、试剂盒和 / 或方法的任何组合包括在本发明的范围内。

[0243] 如本文在说明书和权利要求中使用的,除非明确指出相反,不定冠词“一个”和“一种”应当理解为意指“至少一个(种)”。

[0244] 在权利要求以及上文说明书中,所有转折词语例如“包含”、“包括”、“携带”、“具有”、“含有”、“涉及”、“容纳”等应当理解为开放末端的,即意指包括但不限于。仅转折词语“由……组成”和“基本上由……组成”应分别是封闭式或半封闭式转折词语。

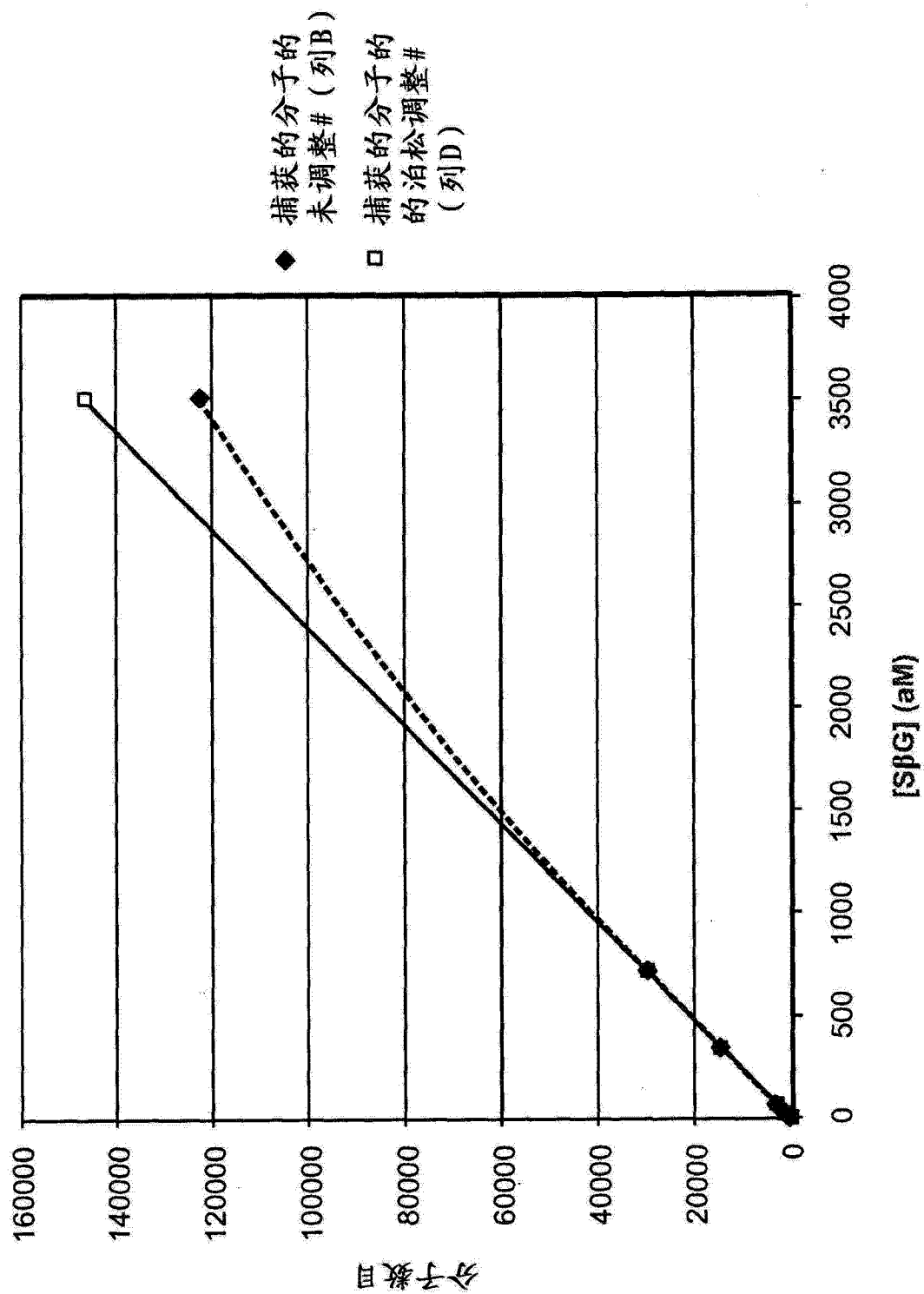


图 1

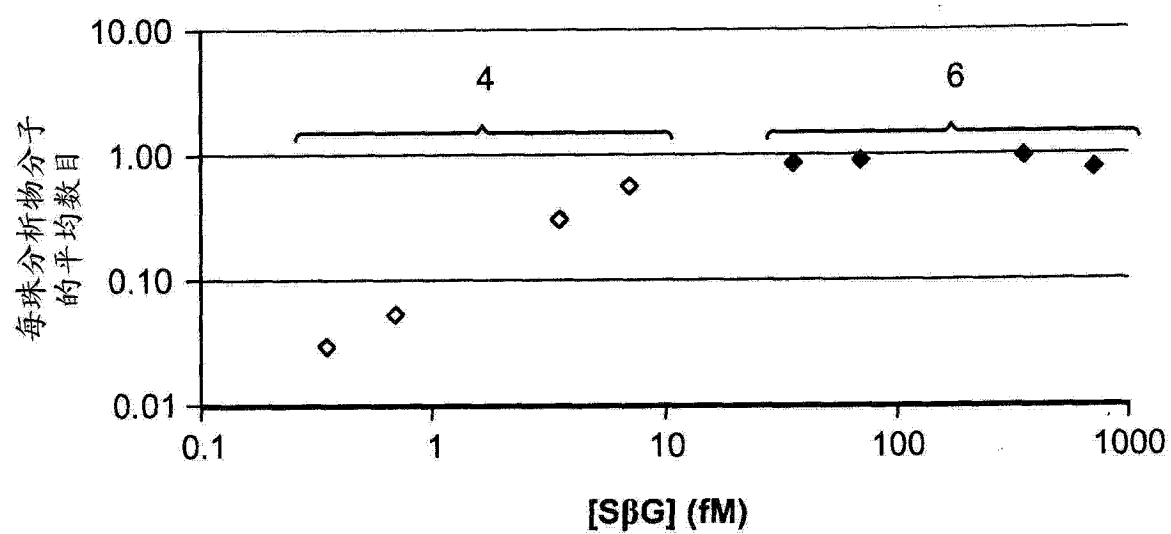


图 2

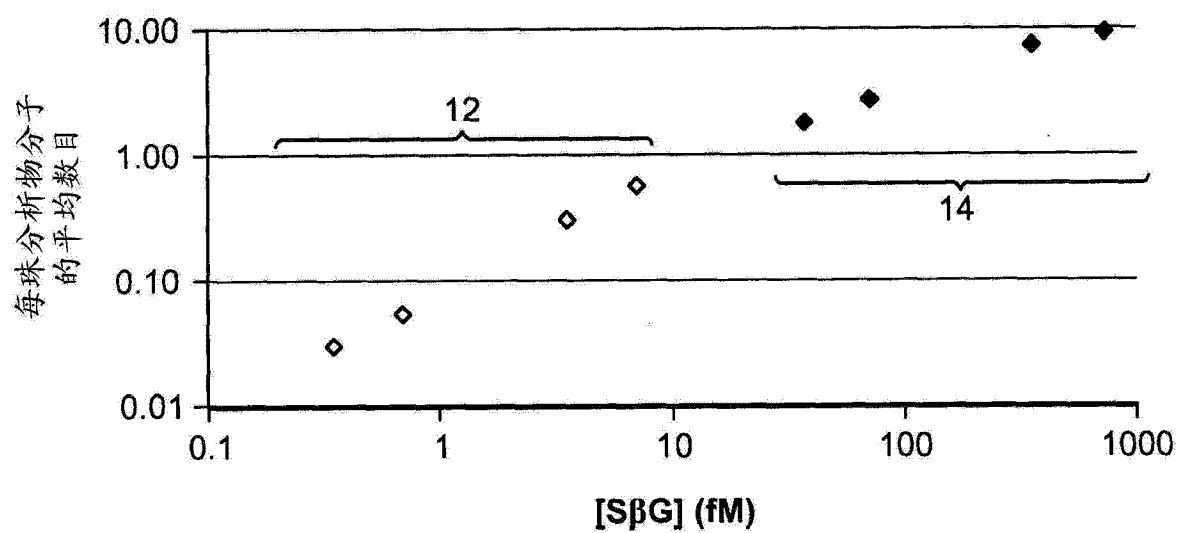


图 3

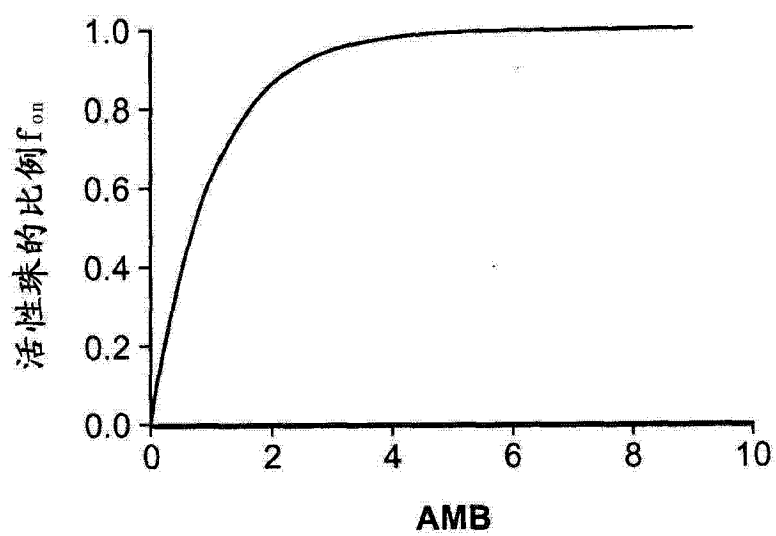


图 4A

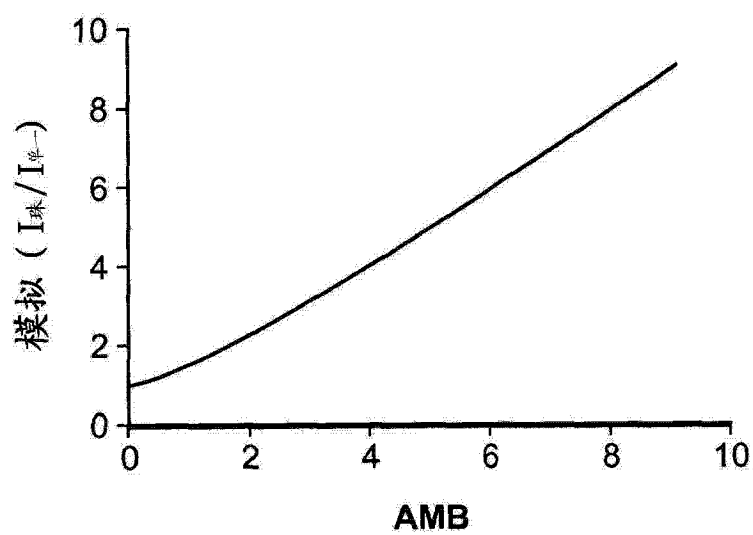


图 4B

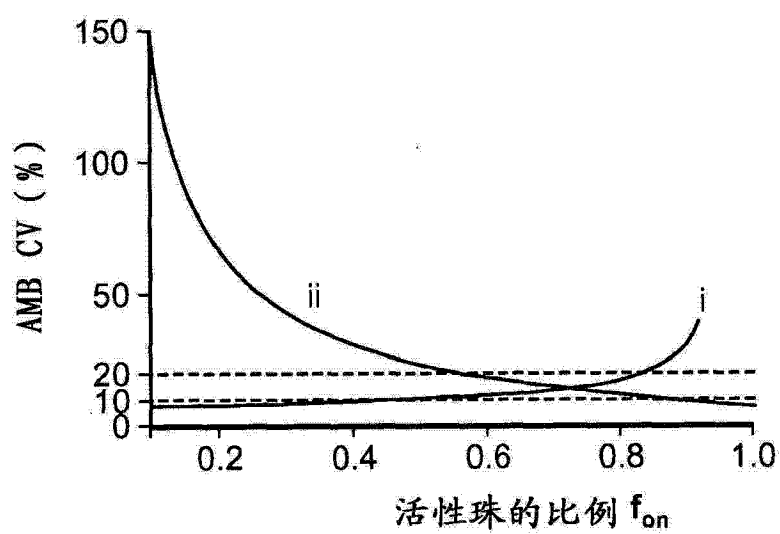


图 4C

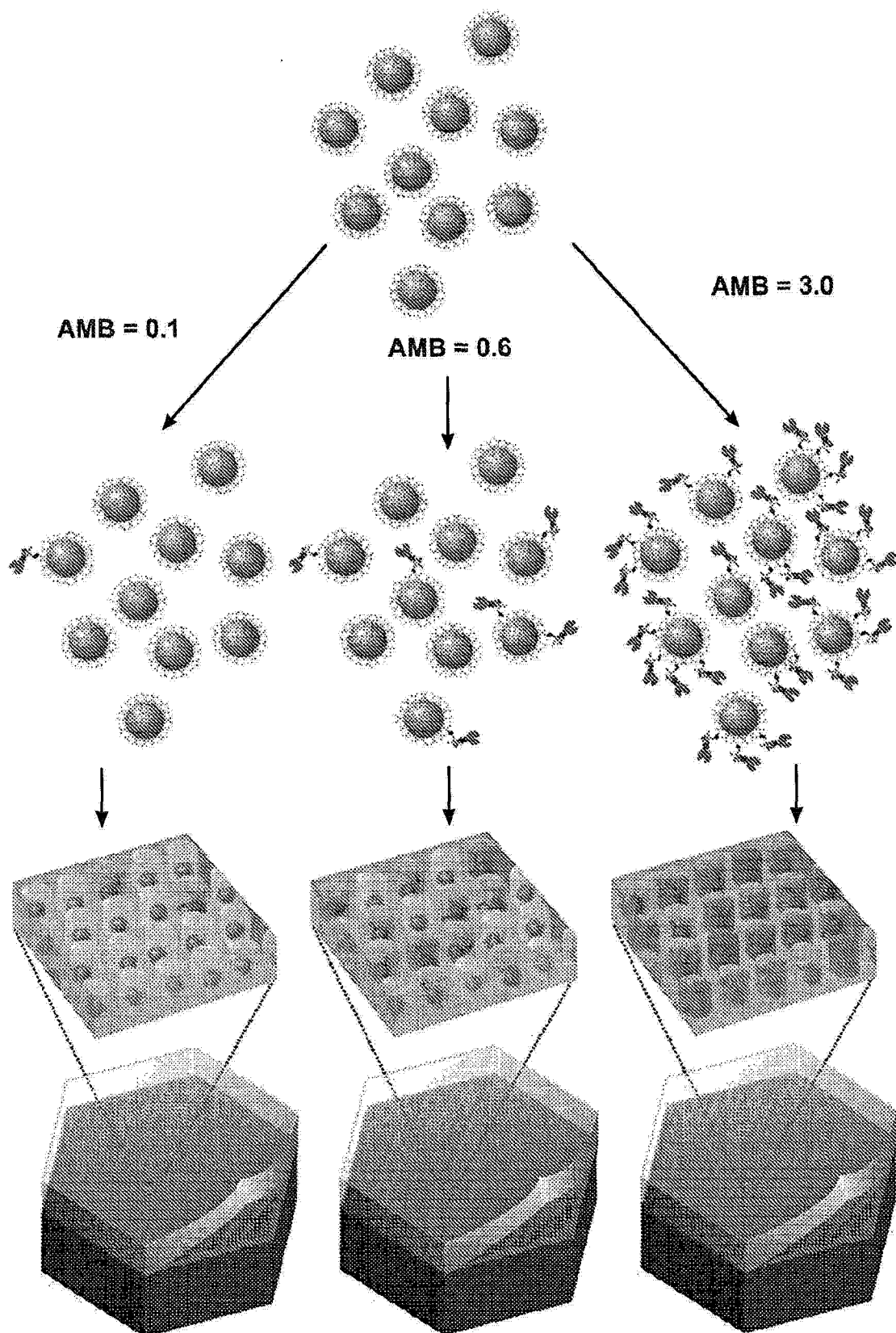


图 5A

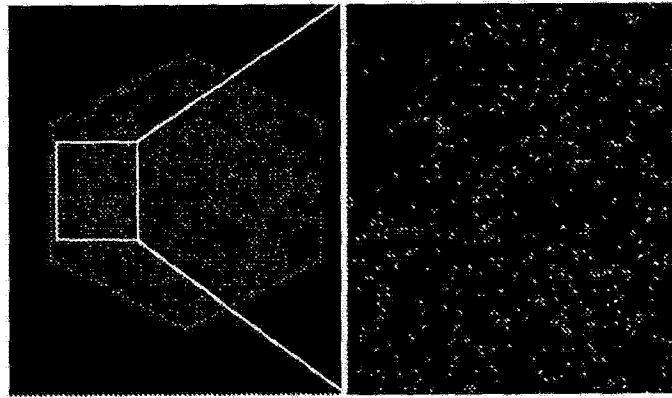


图 5B

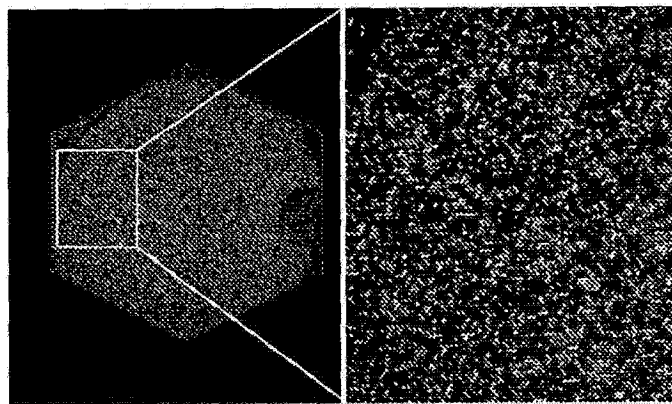


图 5C

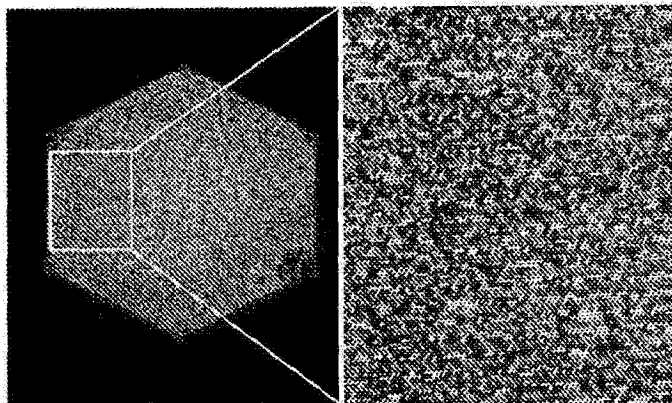


图 5D

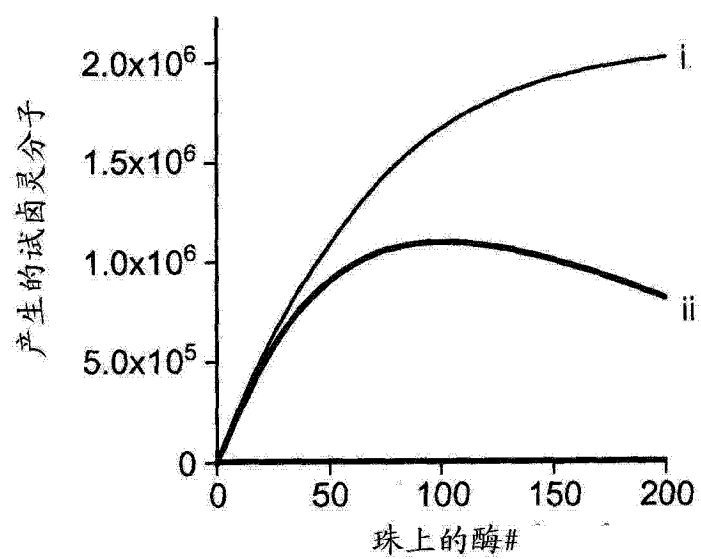


图 6

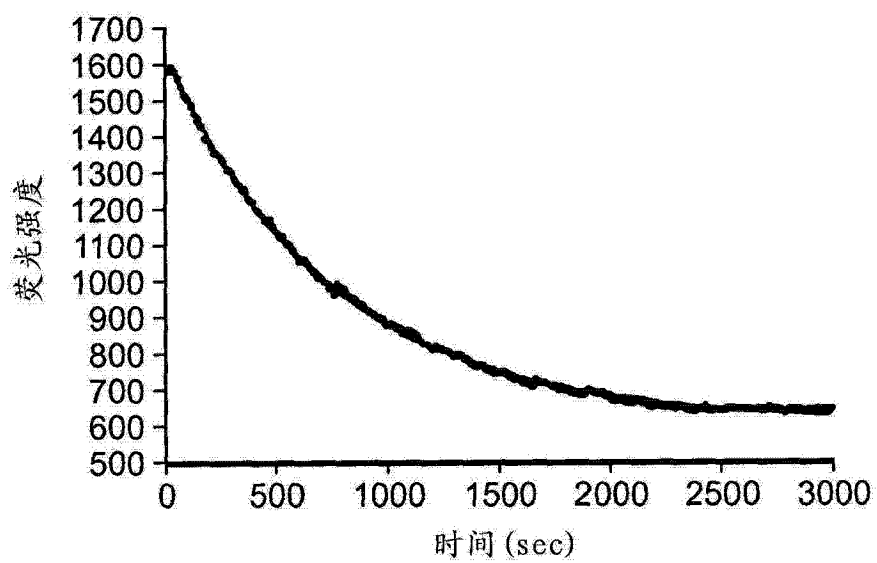


图 7

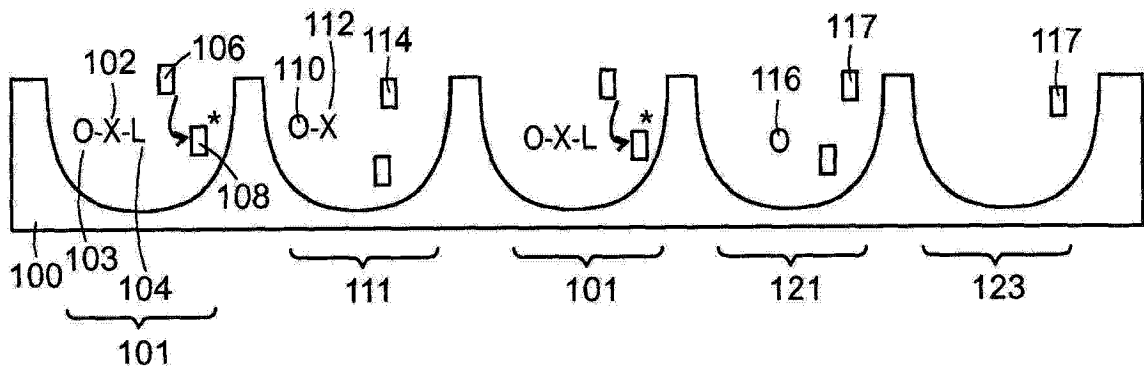


图 8

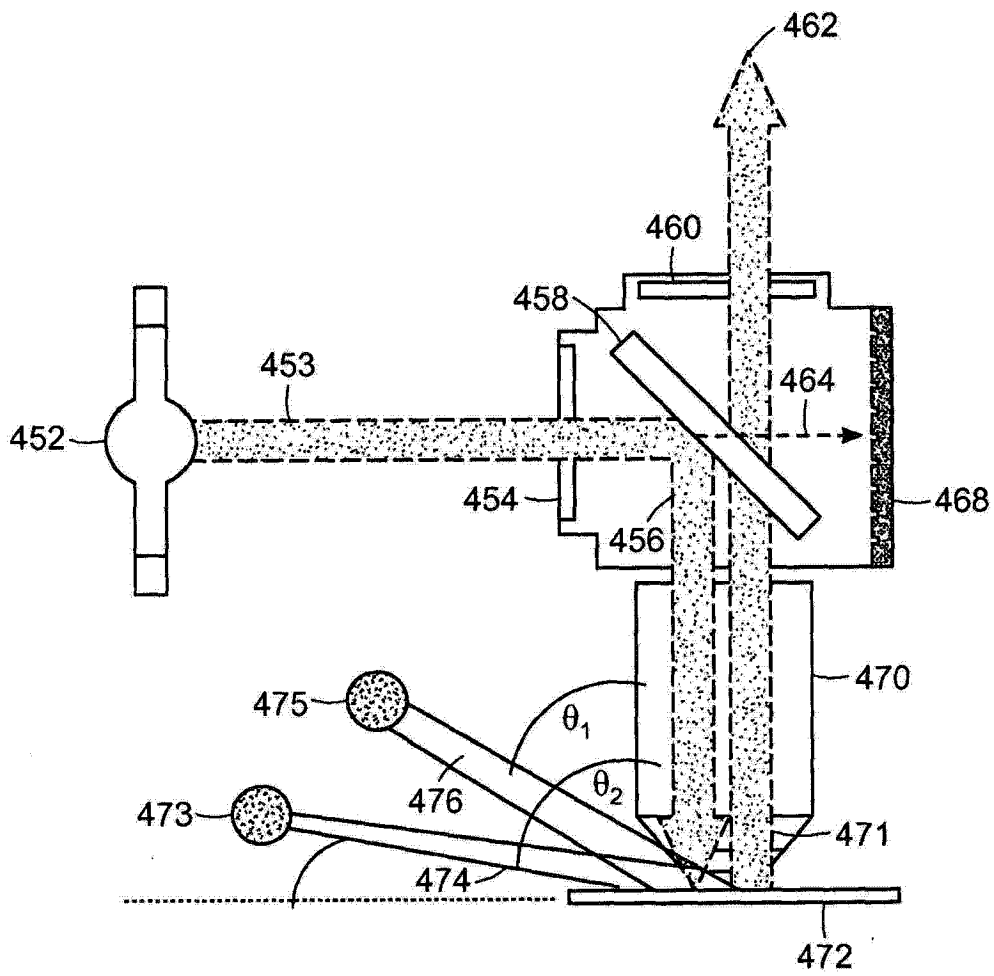


图 9A

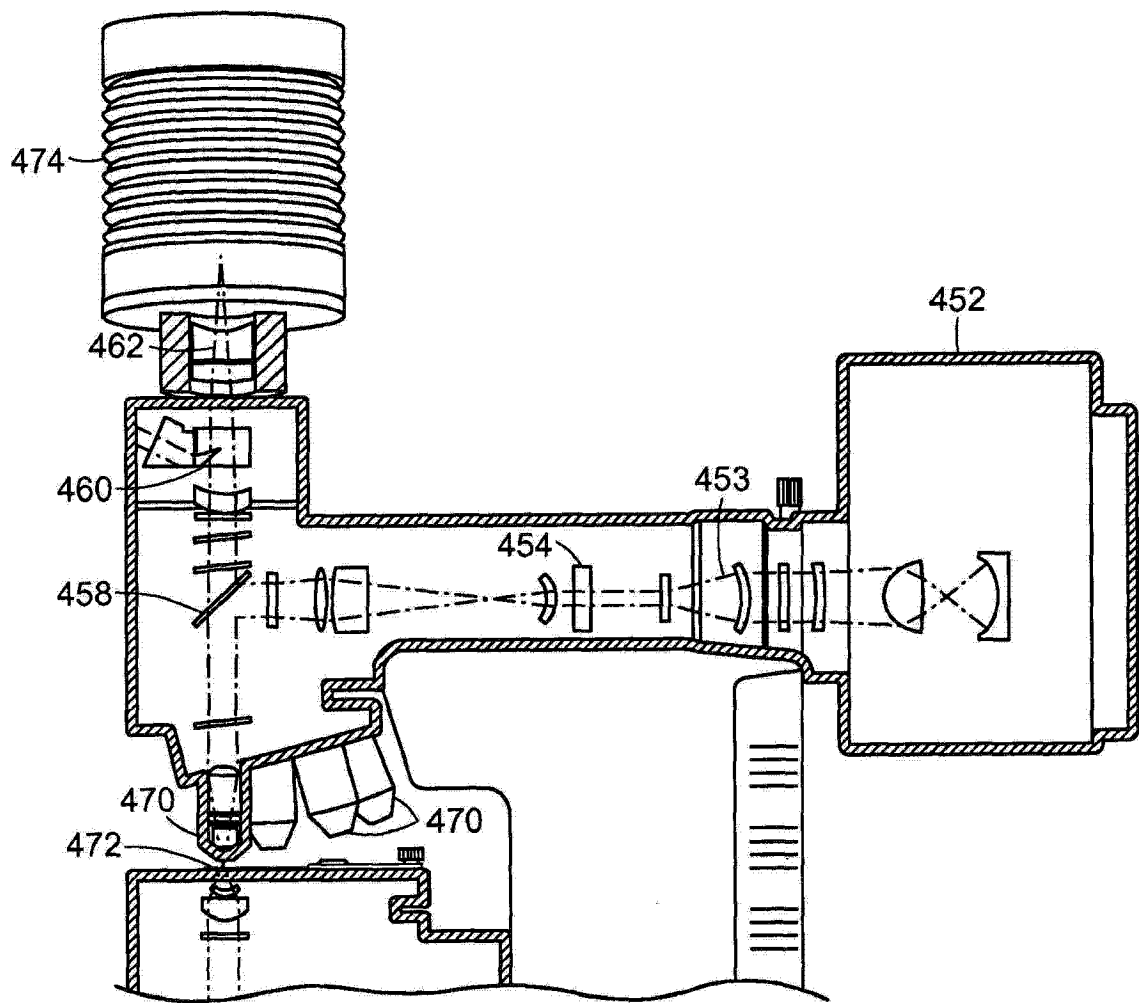


图 9B

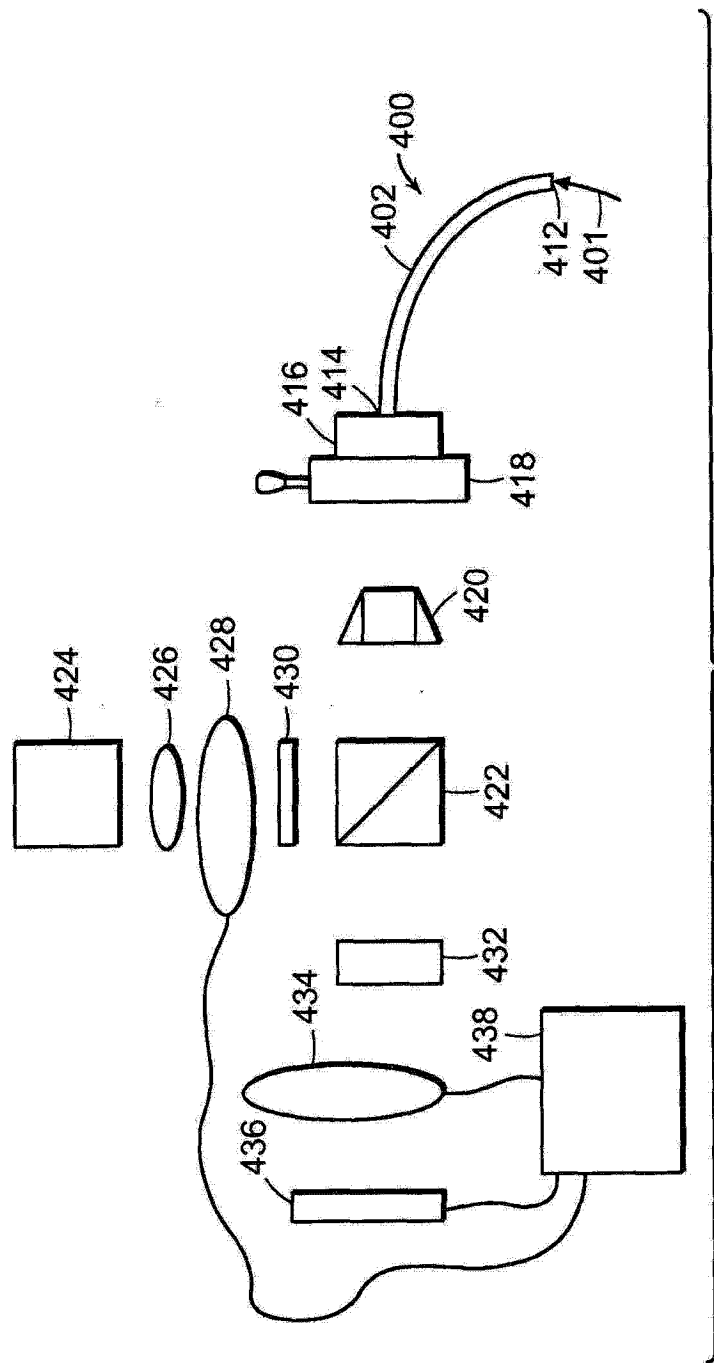


图 10

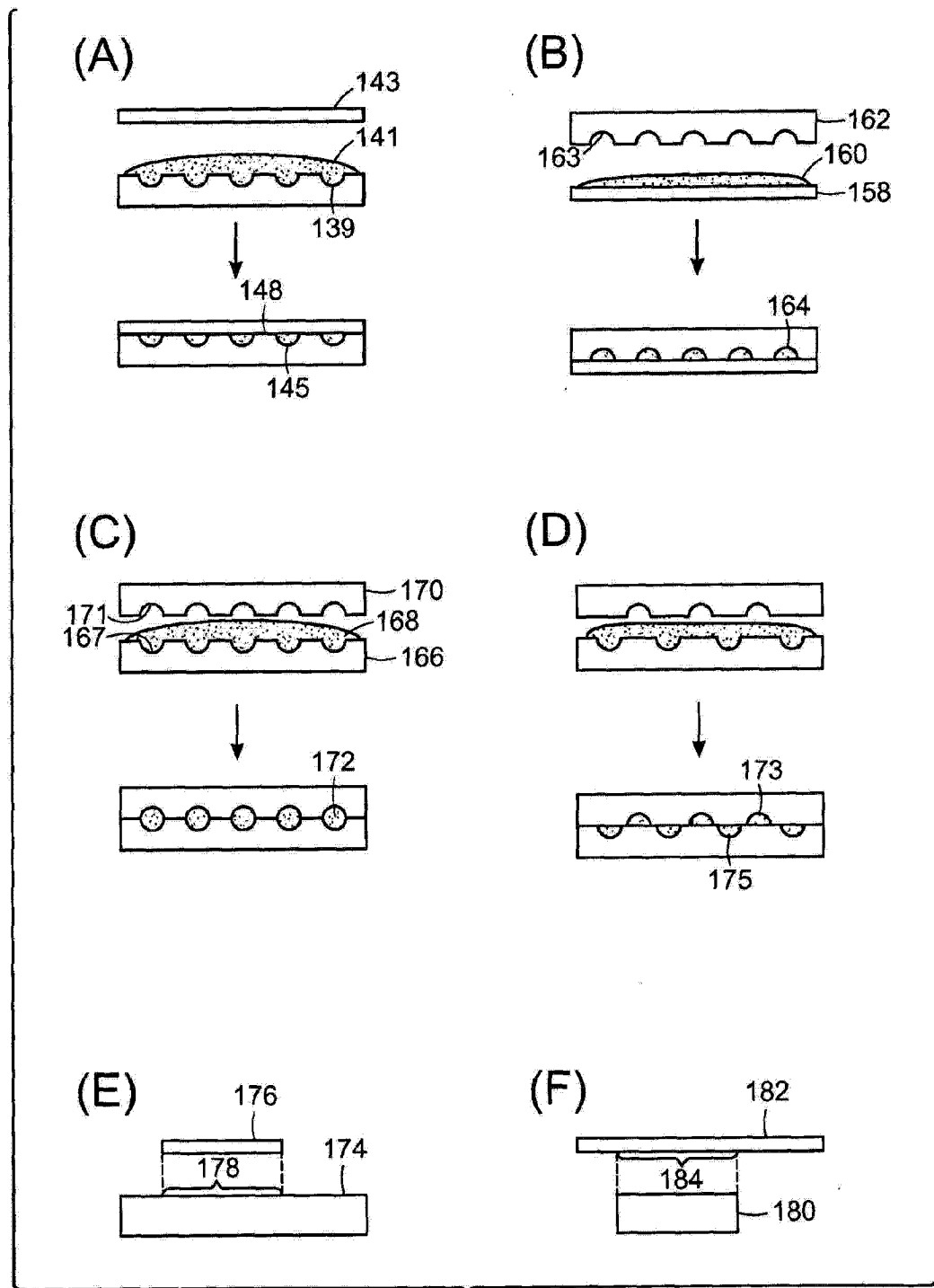


图 11

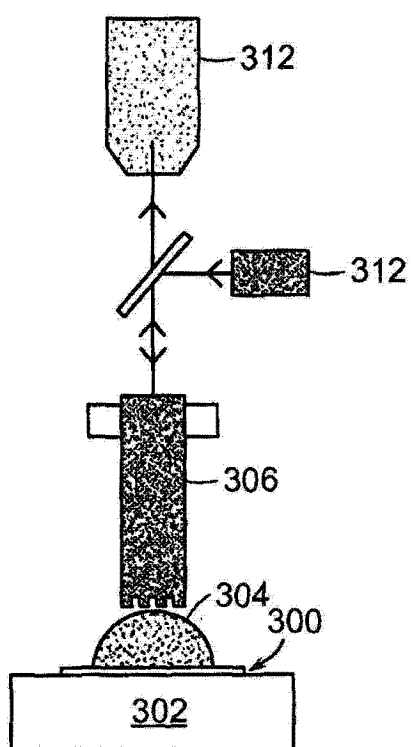


图 12A

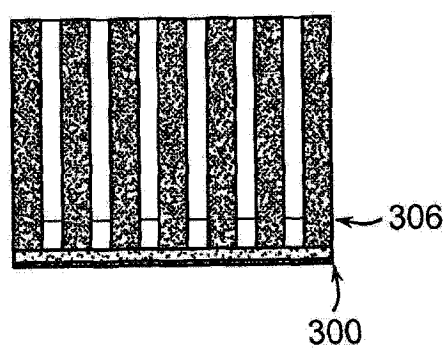


图 12B

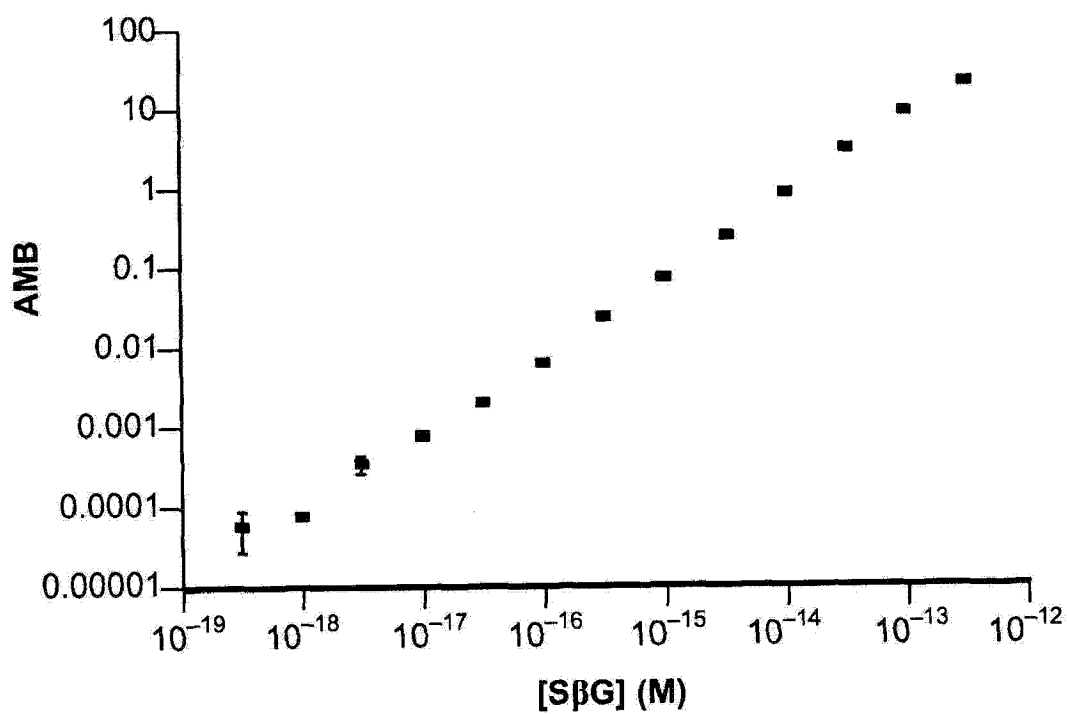


图 13A

[S _B G]	f _{on}	AMB	%CV
(M)	(活性%)	AMB _{数字} 或 AMB _{模拟}	AMB
0	0	0	0%
3.16×10^{-19}	0.006	5.5×10^{-5}	54%
1.00×10^{-18}	0.007	7.3×10^{-5}	ND
3.16×10^{-18}	0.03	3.4×10^{-4}	25%
1.00×10^{-17}	0.08	7.7×10^{-4}	11%
3.16×10^{-17}	0.20	2.0×10^{-3}	16%
1.00×10^{-16}	0.62	6.2×10^{-3}	7%
3.16×10^{-16}	2.36	2.39×10^{-2}	5%
1.00×10^{-15}	6.99	7.25×10^{-2}	5%
3.16×10^{-15}	21.89	0.2470	<1%
1.00×10^{-14}	56.16	0.8286	11%
3.16×10^{-14}	96.27	2.902	4%
1.00×10^{-13}	99.06	8.264	12%
3.16×10^{-13}	99.12	19.55	14%

图 13B

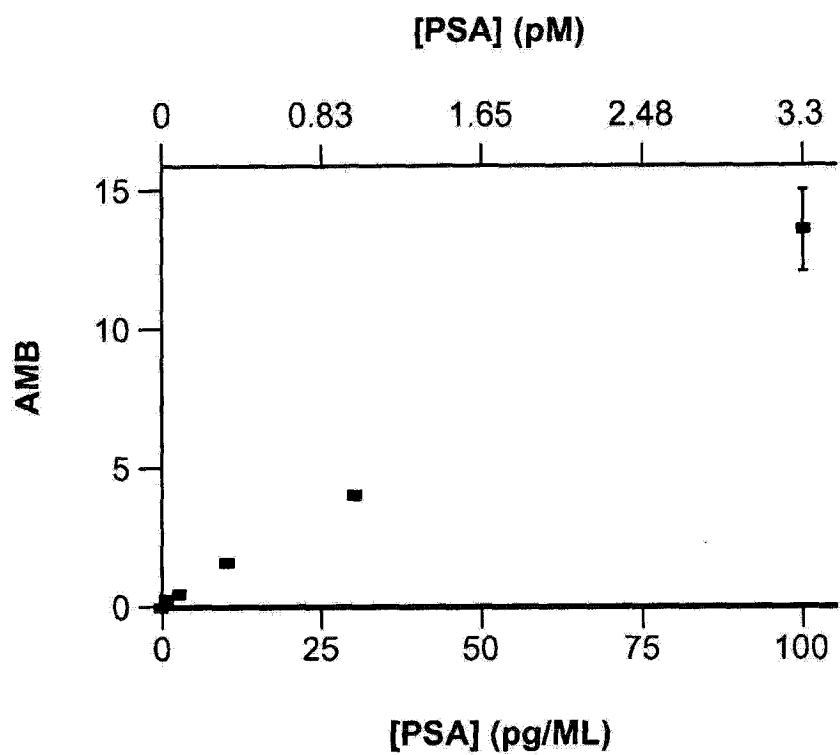


图 14A

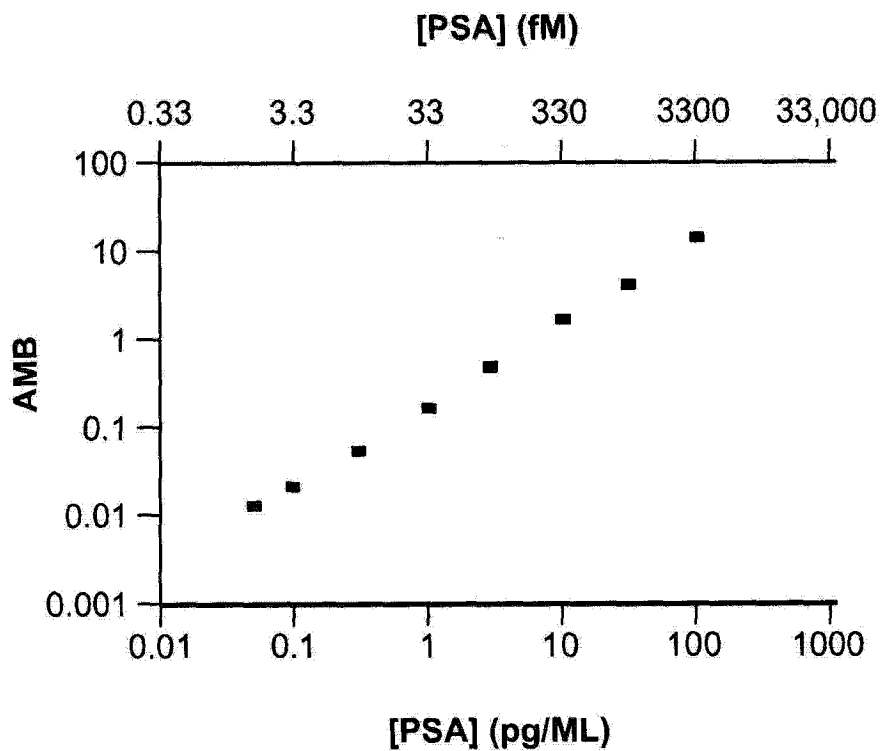


图 14B

$[S\beta G]$ (fM)	f_{on} (活性珠%)	$\mu = AMB$ 数字
0.6	5.07	0.0521
0.8	7.10	0.0736
1	8.89	0.0931
2	16.29	0.1778
4	31.33	0.3759
6	43.84	0.5769
8	53.42	0.7639

图 15A

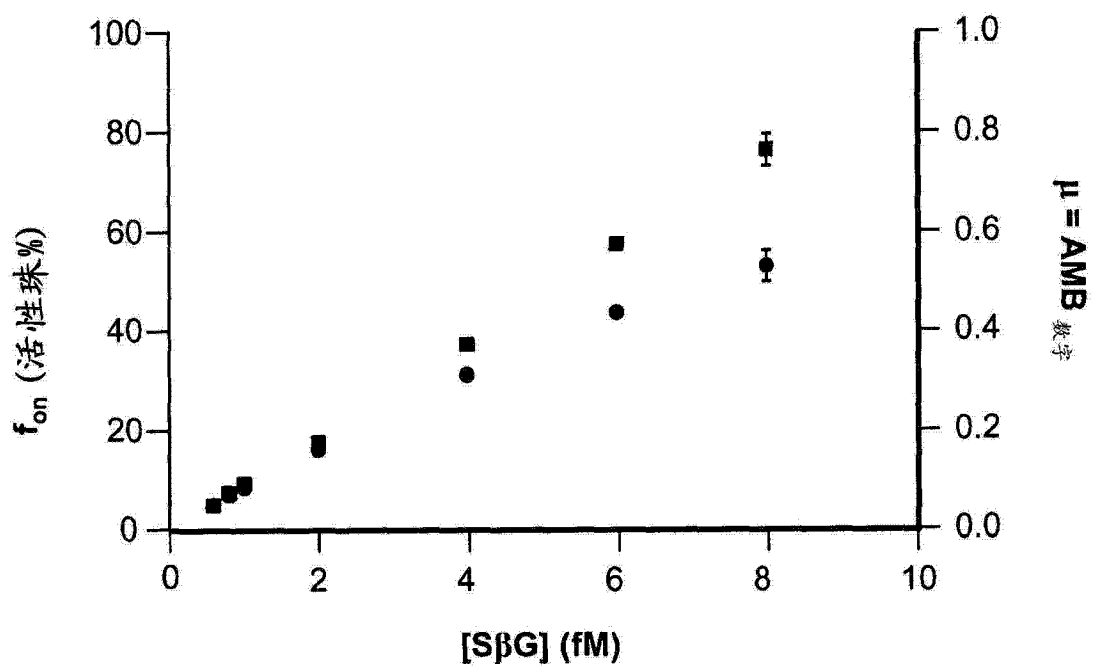


图 15B