(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114341641 A
(43)申请公布日 2022.04.12

(21)申请号 202180003838.4

(22)申请日 2021.05.25

(30)优先权数据
2020904881 2020.05.25 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.12.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2021/050497 2021.05.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/237283 EN 2021.12.02

(71)申请人 金·保罗·杰里米
地址 澳大利亚维多利亚州
申请人 罗·卡姆登·杨华

(72)发明人 金·保罗·杰里米
罗·卡姆登·杨华

(74)专利代理机构 北京大成律师事务所 11352
代理人 李佳铭 王芳

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 27/74(2006.01)
B03C 1/01(2006.01)
B82Y 5/00(2006.01)
B01L 3/00(2006.01)
G01R 33/02(2006.01)
G01R 33/12(2006.01)
H01F 7/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书24页 附图2页

(54)发明名称

磁性纳米颗粒对于分析物的检测和定量的用途

(57)摘要

本发明描述了一种用于检测样品中分析物的方法和装置,所述方法包括使包含目标分析物的样品与可磁化颗粒接触,所述颗粒涂布有与所述目标分析物互补的结合分子,得到结合和未结合的结合剂复合物,将包含结合和未结合的结合剂复合物两者的所述可磁化颗粒定位于磁场传感器附近,改变所述磁场足以从其靠近所述磁场传感器处释放至少一部分的包含结合和未结合的结合剂复合物两者的所述可磁化颗粒,和测量从所述可磁化颗粒相对于所述磁性传感器的净移动所检测的磁性信号的变化,所述净移动为平移的或旋转的移动。

CN 114341641 A

1.一种用于检测样品中分析物的方法,所述方法包括

• 使包含目标分析物的样品与可磁化颗粒接触,所述颗粒涂布有与所述目标分析物互补的结合分子,从而得到结合和未结合的结合剂复合物,

• 将包含结合和未结合结合剂复合物两者的所述可磁化颗粒定位于磁场传感器附近,

• 改变磁场足以从它们靠近所述磁场传感器处释放至少一部分的所述可磁化颗粒,所述可磁化颗粒包括结合和未结合的结合剂复合物两者,和

• 测量从所述可磁化颗粒相对于所述磁性传感器的净移动所检测的磁性信号的话,所述净移动为平移或旋转移动。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括提供一种样品测试装置,所述样品测试装置包括:

• 样品井或样品库,

• 一个或多个磁体,所述一个或多个磁体用于在所述样品井或样品库中生成磁场,以及

• 磁场传感器,所述磁场传感器用于测量所述样品井或样品库中所述磁场随时间的变化。

3.根据权利要求2或3所述的方法,其中所述方法还包括提供样品测试装置,所述样品测试装置包括改变所述磁场足以从其靠近所述磁性传感器处释放至少一部分的所述可磁化颗粒。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述样品中所述分析物的检测和量化取决于经由磁场传感器所检测的可磁化颗粒的量。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述可磁化颗粒以特异性结合至所述分析物的分子进行功能化。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述样品和所述可磁化颗粒由微流体装置进行处理。

7.根据权利要求6所述的方法,其中所述微流体装置有利于所述可磁化颗粒和所述分析物之间的结合。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述可磁化颗粒为可磁化颗粒。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述可磁化颗粒为顺磁性的或铁磁性的。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述可磁化颗粒具有约5nm至约5000nm的平均粒度。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述微流体装置将所述可磁化颗粒和所述分析物定位成与所述磁性传感器非常接近。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述可磁化颗粒和所述分析物带至距所述磁性传感器的感测元件1μm至5,000μm范围内。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述一个或多个磁体(或电磁体)使所述可磁化颗粒对准。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述一个或多个磁体生成随时间变化的磁场。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述磁场生成器可生成连续的量值。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述磁场生成器可使所述磁场在接通和断开之间交替。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述磁场以这样的方式生成和定位:使其对于所述可磁化颗粒的影响最大化,但使其对于所述磁性传感器的影响最小化。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述磁场传感器测量由所述可磁化颗粒所生成的磁场强度随时间的变化。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的方法,其中所述磁场传感器适于使其对于所述可磁化颗粒的感测最大化并且使对于所述磁体的感测最小化。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述传感器的数据采集与所述微流体装置同步。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的方法,其中数据从所述传感器连续地获取。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述获取数据标记为(1)自然环境和/或周围环境,或(2)样品数据。

23.根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述方法基于所述信号采集的同步以及所述微流体装置的操作而校准。

24.根据权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述数据在约1秒至约60秒的时间段内获取。

25.根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其中从所述磁场传感器所输出的所述信号通过由信号放大器来提高。

26.根据权利要求1至25中任一项所述的方法,其中从所述磁场传感器所输出的所述信号为电压读数,所述电压读数与其感测的所述磁场强度成比例。

27.根据权利要求1至26中任一项所述的方法,其中所述磁场传感器的所述电压在量值上提高至较高电压,其中所有变化与原始信号成比例地保持于兼容数据处理和收集电子器件的范围内。

28.根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其中所述放大信号从电压读数转换为数字比特流并且由计算机记录和/或分析。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的方法,其中所述转换由模数转换器(ADC)来执行。

30.根据权利要求1至29中任一项所述的方法,其中所述方法:

a)在15秒内生成充分磁性信号以检测和/或测量所述样品中目标分析物的量,或

b)具有至少约0.05pg/mL的检测限值(LOD),或

c)具有至少约0.1pg/mL的定量限值(LOQ),或

d)(a)至(c)中的一者或多者。

31.一种用于执行根据权利要求1至30中任一项所述的方法的装置,其中所述装置包括所述磁场传感器、用于生成磁场的一个或多个磁体,以及样品井或样品库。

32.一种用于检测样品中分析物的装置,所述装置包括

•样品井,所述样品井与微流体装置分开或集成至所述微流体装置中,

• 一个或多个磁体,所述一个或多个磁体用于在所述样品井中生成磁场,以及

• 磁场传感器,所述磁场传感器用于测量邻近所述样品井的所述磁场随时间的变化,以及

• 其中所述一个或多个磁体适于控制所述可磁化颗粒相对于所述磁场传感器的位置,并且磁性传感器适于使用,使得所述磁性传感器可检测所述可磁化颗粒相对于所述磁性传感器的净移动的变化,所述净移动为平移的或旋转的。

33.根据权利要求31或32所述的装置,其中所述装置在任何取向上为可操作的。

磁性纳米颗粒对于分析物的检测和定量的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测样品中分析物的方法，并且更具体地，涉及可磁化纳米颗粒和磁性传感器系统的用途。本发明还涉及一种用于基于使用可磁化纳米颗粒而检测分析物的装置。

背景技术

[0002] 存在许多已知方法来检测和量化样品中的分析物。此类系统需要通过检测和测量结合至分析物的复合物来量化分析物的间接方法。通常，此类方法依赖于结合或识别系统，由此可视化辅助物涂布或连接至结合至样品中的分析物的结合分子。

[0003] 结合分子可以包括基于其对目标分析物的亲和力而特别选择的抗体、酶或药理学试剂。直接地结合分析物的分子本身可以酶或荧光团来标记(在荧光标记的情况下)。

[0004] 另选地，直接地结合分析物的分子本身可未标记，而是结合至其它结合剂，该结合剂本身以酶或荧光团来标记。这种额外标记过程可放大信号并减少背景染色。众所周知的复合物为抗生物素蛋白-生物素复合物和过氧化物酶-抗过氧化物酶技术。

[0005] 用于检测和量化样品中分析物的技术需为快速的、灵敏的、定性的和/或可小型化的，以满足体外诊断的需求。由于粘性力的增加，装置的小型化可导致流体的缓慢和低效混合。

[0006] 即时检测可减少诊断测试的周转时间，从而改善工作流程，并且因而潜在地有助于改善患者护理。此类系统必须包括用以检测生物标志物(例如蛋白质标志物或核酸标志物)的感测技术。可磁化颗粒已用于检测从基础研究至高通量测试的手动分析中的分析物。

[0007] 用于检测附接至可磁化颗粒的分析物的许多现有装置需要复杂配置，这些配置不适合或不容易适于即时检验应用中的小型化。

[0008] 可磁化颗粒的用途依赖于颗粒与结合分子(例如，对于目标分析物具有高亲和力的抗体)的功能化，以允许结合至目标分析物，随后进行流体交换步骤以实现分离和纯化。据报道，分析物捕获率与悬浮颗粒的总表面积并且因此与颗粒浓度成比例。然而，在集成多步骤芯片实验室测定中，极高浓度颗粒的使用对下游过程具有缺点，因为高颗粒浓度通常增加了非特异性颗粒-颗粒以及颗粒-表面相互作用，增强了场诱导颗粒聚集，引起了颗粒浓缩步骤中的空间位阻，阻碍了颗粒上的化学反应，并在空间上位阻了颗粒与生物感测表面之间的反应。

[0009] 目标分析物可以低浓度存在于样品内，该样品还包含高浓度的背景材料，例如血液或唾液。在此类复杂基质中，非特异性分子对于可磁化颗粒的非特异性粘合可降低测定的有效性。

[0010] 基于磁性颗粒的目标分析物捕获过程包括两种成分(目标分析物和磁性颗粒)之间的相遇，并且可能依赖于这两种成分以非常特定的方式相对于彼此对齐它们的外表面。因此，两种组分的缔合速率可受限于这两种组分的结合位点的扩散和几何约束，并且还可通过最终化学反应来降低。

[0011] 分析物可捕获于流动流体或静态流体中。在无流动的情况下，依赖于表面固定抗体的方法受限于扩散并且可具有减小结合速率。

[0012] 在磁性颗粒捕获目标分析物之后，需要额外处理来检测。如果仅用作载体，那么可磁化颗粒通常结合至识别分子，诸如发光标记或荧光分子。对于准确检测，重要的是仅标记所结合分析物，并且仅检测所结合标记。这需要数个洗涤或分离步骤。

[0013] 可磁化颗粒还可用作标记以指示目标分析物在感测表面处的结合。凝集测定采用了一种过程，其中当样品流体中存在特定分析物时，形成了颗粒的聚集体。聚集的程度为流体内分析物的浓度的量度。凝集测定对于试剂的要求很高，因为该测定以一个步骤来执行，而无需分离或严格度。

[0014] 在磁性凝集测定中，颗粒簇的形成通过在磁场的影响条件下将颗粒聚集在一起来加速。此类方法的一个问题在于，当分析物浓度远小于可磁化颗粒浓度时，少量的颗粒聚集体得以形成，受泊松统计学制约。磁场的施加可通过在温育期间施加磁场来增强。然而，磁场还可增加颗粒之间的非特异性结合。非特异性结合(即，该结合未由目标分析物介导)导致假阳性信号。非特异性结合可源自数种类型的相互作用，诸如范德华相互作用、静电相互作用和疏水相互作用，从而引起背景水平以及结果的统计变化，从而影响量化的限值和方法的精度。

[0015] 可磁化颗粒的使用意味着额外力可施加至颗粒，例如以使结合颗粒与未结合颗粒分离。

[0016] 检测方法的分析性能的评估基于量化限值(LoQ)，即，可以给定所需精度进行量化的最低生物标志物浓度。

[0017] 由于检测灵敏度、分子特异性和应用复杂性的增加需求，优化特定应用的可磁化颗粒和选择合适检测方法对于磁性纳米技术界仍具有挑战性。

[0018] GMR在免疫测定中的使用已用于夹层型方法(诸如ELISA)，其中分子目标通过添加带标记磁性探针而固定于传感器表面上(参见Koh和Josephson的“磁性纳米颗粒传感器(Magnetic nanoparticle sensors)”，《传感器》2009年:9，第8130-45页以及姚和徐的“分子成像和诊断应用中磁性纳米材料的检测(Detection of magnetic nanomaterials in molecular imaging and diagnosis applications)”，《纳米技术》，2014年修订版:3;第247-268页)。

[0019] 一些技术利用超导量子干涉装置(SQUID)来检测和测量磁性标记细菌中的Néel弛豫(磁性偶极的错位)。在此类技术中，磁场进行脉冲化以引起磁性偶极对准，并且后续偶极错位得以检测。

[0020] 本发明的一个目的是解决上述问题的一者或多者，和/或提供一种用于检测样品中的分析物的方法和/或至少向公众提供可用选择。

发明内容

[0021] 在第一方面，描述了一种用于检测样品中分析物的方法，该方法包括

[0022] • 使包含目标分析物的样品与可磁化颗粒接触，该颗粒涂布有与目标分析物互补的结合分子，从而得到结合和未结合的结合剂复合物，

[0023] • 将包含结合和未结合结合剂复合物两者的可磁化颗粒定位在磁场传感器附近，

[0024] •改变磁场足以从其靠近磁场传感器处释放至少一部分的可磁化颗粒,该可磁化颗粒包括结合和未结合的结合剂复合物两者,和

[0025] ·测量由于可磁化颗粒相对于磁性传感器的净移动(平移或旋转移动)而从可磁化颗粒所检测的磁性信号的变化。

[0026] 在另一方面,描述了一种用于检测样品中分析物的方法,该方法包括

[0027] ·提供样品测试装置,该样品测试装置包括

[0028] o样品井或样品库,

[0029] o一个或多个磁体,该一个或多个磁体用于在样品井或样品库中生成磁场,以及

[0030] o磁场传感器,该磁场传感器用于测量样品井或样品库中的磁场随时间的变化,以及

[0031] ·使包含目标分析物的样品与样品井内的可磁化颗粒接触,该颗粒涂布有与目标分析物互补的结合分子,

[0032] ·将可磁化颗粒定位于磁性传感器附近,

[0033] ·充分地改变磁场以允许可磁化颗粒相对于磁性传感器移动(平移或旋转移动)。

[0034] 在另一方面,描述了一种用于检测分析物的方法,其中该方法:

[0035] a)在10秒内生成充分磁性信号以检测和/或测量样品中目标分析物的量,或

[0036] b)具有至少约0.05pg/mL的检测限值(LOD),或

[0037] c)具有至少约0.1pg/mL的量化限值(LOQ),或

[0038] d)(a)至(c)中的一者或多者。

[0039] 在另一方面,描述了一种用于检测样品中分析物的装置,该装置包括

[0040] •样品井或样品库,

[0041] ·一个或多个磁体,该一个或多个磁体用于在样品井中生成磁场,以及

[0042] ·磁场传感器,该磁场传感器用于测量样品井中磁场随时间的变化,以及

[0043] 其中一个或多个磁体和磁性传感器适于使用,使得磁性传感器可基于可磁化颗粒相对于磁性传感器的净移动(平移或旋转移动)而检测磁场的变化。

[0044] 在另一方面,描述了一种用于检测样品中分析物的诊断系统,该系统包括

[0045] •使包含目标分析物的样品与可磁化颗粒接触,该颗粒涂布有与目标分析物互补的结合分子,

[0046] ·将可磁化颗粒定位于磁场传感器附近,

[0047] ·改变磁场足以从它们靠近磁场传感器处释放至少一部分的可磁化颗粒,和

[0048] •测量随着可磁化颗粒相对于磁性传感器移动(平移或旋转移动)而从可磁化颗粒所检测的磁性信号的变化,以及

[0049] 其中诊断系统配置成

[0050] a)在20秒内获取充分磁性信号以检测和/或测量样品中目标分析物的量,或

[0051] b)具有至少约0.05pg/mL的检测限值(LOD),或

[0052] c)具有至少约0.1pg/mL的量化限值(LOQ),或

[0053] d)包括(a)至(c)中的一者或多者。

[0054] 下述实施例的任一者或多者可涉及上述方面的任一者。

[0055] 在一种配置中,装置或诊断系统在5秒、10秒、15秒或20秒内获得充分磁性信号以

检测和/或测量样品中目标分析物的量，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间。

[0056] 在一种配置中，施加磁场以将可磁化颗粒定位于磁场传感器附近。

[0057] 在一种配置中，磁场混合了样品。

[0058] 在一种配置中，样品中分析物的检测和量化取决于经由磁场传感器所检测的可磁化颗粒的量。

[0059] 在一种配置中，可磁化颗粒使用离心力、声学或压电进行定位。

[0060] 在一种配置中，可磁化颗粒以特异性结合至分析物的分子进行功能化。

[0061] 在一种配置中，样品和可磁化颗粒通过微流体装置进行处理。优选地，微流体装置有利于可磁化颗粒和分析物之间的结合。

[0062] 在一种配置中，磁场促进或增强可磁化颗粒与目标分析物的结合。

[0063] 在一种配置中，可磁化颗粒为磁性颗粒。

[0064] 在一种配置中，可磁化颗粒为顺磁性的。

[0065] 在一种配置中，可磁化颗粒为铁磁性的。

[0066] 在一种配置中，检测通过芯片实验室装置来提供。优选地，芯片实验室装置包括微流体装置。

[0067] 在一种配置中，芯片装置具有多重芯片组设计。

[0068] 在一种配置中，可磁化颗粒具有约5nm至约500nm的平均粒度，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间。

[0069] 在一种配置中，可磁化颗粒具有约5nm、10nm、50nm、100nm、150nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm或500nm的平均粒径，并且合适范围可选自这些值中的任一者之间。

[0070] 在一种配置中，可磁化颗粒具有约500nm、550nm、600nm、650nm、700nm、750nm、800nm、850nm、900nm、950nm或1000nm的平均粒径，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间。

[0071] 在一种配置中，可磁化颗粒具有约1000nm、1500nm、2000nm、2500nm、3000nm、3500nm、4000nm、4500nm或5000nm的平均粒度，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间。

[0072] 在一种配置中，微流体装置将可磁化颗粒和分析物定位成与磁性传感器非常接近。

[0073] 在一种配置中，可磁化颗粒和分析物与磁性传感器的感测元件相距1μm、10μm、100μm、500μm、1000μm、2000μm、3000μm、4000μm或5,000μm，并且可用范围可选自这些数值的任一者之间。

[0074] 在一种配置中，一个或多个磁体(或电磁体)使可磁化颗粒对准。

[0075] 在一种配置中，一个或多个磁体生成了随时间变化的磁场。

[0076] 在一种配置中，磁场生成器可生成连续的量值。

[0077] 在一种配置中，磁场生成器可使磁场在接通和断开之间交替。

[0078] 在一种配置中，磁场以这样的方式来生成并定位：使其对于可磁化颗粒的影响最大化，但使其对于磁性传感器的影响最小化。

[0079] 在一种配置中，磁场传感器适于最大化其对可磁化颗粒的感测并且最小化来自磁

体的感测。

[0080] 在一种配置中，传感器的数据采集与微流体装置同步，使得当微流体装置已处理可磁化颗粒并将其定位成与磁性传感器非常接近时，传感器的磁场信号作为样品的数据为可识别的。

[0081] 在一种配置中，数据从传感器连续地获取。优选地，数据通过处理磁性传感器的信号来获取。

[0082] 在一种配置中，获取数据标记为1)自然环境和/或周围环境，或(2)测试数据。优选地，数据至(1)自然环境和/或周围环境或(2)测试数据的分类取决于数据采集的同步以及微流体装置的操作。

[0083] 在一种配置中，该方法基于信号采集的同步与微流体装置的操作而校准。

[0084] 在一种配置中，数据在约1秒、2秒、3秒、4秒、5秒、6秒、7秒、8秒、9秒、10秒、20秒、30秒、40秒、50秒、60秒、90秒或120秒的时间段内进行采集，并且可用范围可在这些数值的任一者之间进行选择。

[0085] 在一种配置中，从磁性传感器所输出的信号由信号放大器来提供。

[0086] 在一种配置中，从传感器所输出的信号为电压读数，该电压读数与其感测的磁场强度成比例。

[0087] 在一种配置中，传感器的电压在量值上提高至较高电压，其中所有变化与原始信号成比例地保持于兼容数据处理和收集电子器件的范围。

[0088] 在一种配置中，放大信号从电压读数转换为数字比特流并由计算机记录。

[0089] 在一种配置中，转换由模数转换器(ADC)执行。

[0090] 在一种配置中，转换率或采样率可为50赫兹至500,000赫兹。

[0091] 在一种配置中，转换分辨率或采样分辨率可为16位至32位。

[0092] 在一种配置中，信号输出以数学运算进行数字处理，以生成可用于解释和分析的读数。

[0093] 在一种配置中，装置或诊断系统的使用具有至少0.05pg/mL、0.06pg/mL、0.07pg/mL、0.08pg/mL、0.09pg/mL、0.10pg/mL、0.15pg/mL或0.20pg/mL的LOD，并且可用范围可在这些数值的任一者之间进行选择。

[0094] 在一种配置中，装置或诊断系统的使用具有至少0.1pg/mL的LOD。

[0095] 在一种配置中，装置或诊断系统的使用具有至少0.10pg/mL、0.11pg/mL、0.12pg/mL、0.13pg/mL、0.14pg/mL、0.15pg/mL、0.16pg/mL、0.17pg/mL、0.18pg/mL、0.19pg/mL或0.20pg/mL的LOQ，并且可用范围可在这些数值的任一者之间进行选择。

[0096] 在一种配置中，装置或诊断系统的使用具有至少0.1pg/mL的LOQ。

[0097] 本说明书中使用的术语“包括(comprising)”是指“至少部分地由……组成”。当解释本说明书中的包括该术语的陈述时，在每个陈述中以该术语开头的特征都需要存在，但是也可以存在其他特征。诸如“包括(comprise)”和“包括(comprised)”的相关术语将以相同的方式解释。

[0098] 意图是，对本文公开的数字范围的提及(例如1至10)也包含对该范围内所有有理数(例如1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9和10)以及该范围内的任意有理数范围(例如2至8、1.5至5.5和3.1至4.7)的提及。

[0099] 可以说本发明广义上包括本申请说明书中所指或指出的部分、要素和特征(单独地或共同地),以及所述部分、要素或特征中的任何两个或多个的任何或全部组合,以及在本文中提及具有与本发明相关的领域中的已知等同物的特定整数时,这些已知等同物被视为结合在本文中,如同单独阐述一样。

[0100] 对于本发明所涉及领域的技术人员,在不脱离如所附权利要求书所限定的本发明范围的情况下,本发明的许多构造变化和广泛不同实施例和应用将为显而易见的。本文的公开和描述为纯粹说明性的,并且非旨在以任何意义为限制性的。

附图说明

[0101] 现在将仅通过举例的方式并参考附图描述本发明,附图中:

[0102] 图1为流程图,示出所描述方法的设置。

[0103] 图2为微流体装置的示意图。

[0104] 图3为示出信号相对于灵敏度的图表,示出了约0.5pg的LoQ。

[0105] 图4为照片,示出了对于对照颗粒、50pg的颗粒和500,000pg的颗粒随时间的信号采集。

具体实施方式

[0106] 描述了一种用于检测样品中分析物的方法,该方法包括以下步骤:

[0107] • 使包含目标分析物的样品与可磁化颗粒接触,该颗粒涂布有与目标分析物互补的结合分子,从而得到结合和未结合的结合剂复合物,

[0108] • 施加磁场以将包含结合和未结合的结合剂复合物两者的可磁化颗粒定位于磁场传感器附近(“捕获”步骤),

[0109] ·改变磁场足以从其靠近磁场传感器处释放至少一部分的可磁化颗粒,包括结合和未结合的结合剂复合物(“释放”步骤),和

[0110] • 测量由于可磁化颗粒相对于磁性传感器的净移动而从可磁化颗粒所检测的磁性信号的变化。该移动为平移移动或旋转移动。

[0111] 所描述方法基于将可磁化颗粒和分析物复合物带至磁场传感器附近的概念。调节磁场强度以允许可磁化颗粒和分析物复合物扩散(即,通过平移或旋转移动)远离磁场传感器。然后,磁场传感器测量通过可磁化颗粒由于布朗旋转或扩散所生成的磁场强度随时间的变化,该布朗旋转或扩散允许可磁化颗粒-分析物复合物的量的量化,然后允许确定样品中分析物的量。也就是说,结合和未结合的结合剂复合物基于其扩散特性进行区分。可磁化珠(即,结合和未结合的复合物两者)相对于磁场传感器物理地移动,使得结合和未结合复合物可机械能区分(假设由于不同扩散特性,它们将移动至不同程度)。

[0112] 概括地说,分析样品的方法可存在三个阶段。第一阶段可为预采样基线感测阶段。本阶段执行以在未存在样品的情况下获得基线读数。基线读数向后续样品读数提供了基础比较。预采样基线感测阶段可耗用1秒、2秒、3秒、4秒或5秒,并且合适范围可选自这些数值的任一者之间(例如,约1秒到约5秒、约1秒到约4秒、约2秒至约5秒、约2秒至约3秒或约3秒至约5秒)。

[0113] 第二阶段可为将样品加载至装置中。本阶段可包括样品混合和分析物-结合物复

合(即,其中功能化可磁化颗粒结合至分析物)。本阶段可耗用大约3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟或8分钟,并且合适范围可选自这些数值的任一者之间(例如,约3分钟到约8分钟、约3分钟到约7分钟、约3分钟到约5分钟、约4分钟至约8分钟、约4分钟至约6分钟或约5分钟至约8分钟)。

[0114] 第三阶段可为样品读取阶段。也就是说,可磁化颗粒位于磁场传感器附近,磁场改变以释放至少一部分的结合和未结合的结合剂复合物,并且磁性传感器测量从可磁化颗粒由于其相对于磁性传感器的净移动所检测的磁性信号的变化。本阶段可耗用大约10秒、11秒、12秒、13秒、14秒、15秒、16秒、17秒、18秒、19秒或20秒,并且合适范围可选自这些数值的任一者之间(例如,约10秒至约20秒、约10秒至约18秒、约10秒至约15秒、约11秒至约20秒、约11秒至约19秒、约11秒至约16秒、约11秒至约15秒、约12秒至约20秒、约12秒至约18秒、约12秒至约15秒、约13秒至约20秒、约13秒至约19秒、约13秒至约17秒,或约13秒至约15秒)。

[0115] 如上文所述及,样品中分析物的量基于由磁性传感器所检测的磁性信号的变化而确定。磁性传感器基于可磁化颗粒的净移动而检测变化。一旦从其靠近磁场传感器处释放,则包含结合和未结合的结合剂复合物的可磁化颗粒将移动远离磁场传感器。本移动将基于布朗扩散而为随机的。

[0116] 通常,磁场传感器位于靠近或邻近(在非样品侧)样品井或样品库的表面。当结合和未结合的可磁化颗粒位于磁场传感器附近时,结合和未结合的可磁化颗粒可位于或靠近样品井或样品库的壁的表面,直至释放。一旦从其靠近磁场传感器处释放,则可磁化颗粒可平移地或旋转地移动。考虑到其靠近样品井或样品库的表面,结合和未结合的可磁化颗粒通常可相对于样品井或样品库的表面以180°移动自由度移动。布朗扩散意味着,可磁化颗粒可在任何方向上移动,包括朝向磁场传感器。由磁场传感器所检测的磁性信号基于结合和未结合的可磁化颗粒的净移动。

[0117] 本发明的益处可包括快速检测(例如,参见实例2)和高度灵敏检测方法(例如,参见实例1和实例3)。

[0118] 当考虑分析物与溶液中游离的可磁化颗粒之间的相遇时,扩散相遇步骤可分为(1)通过流体体积的扩散传输的过程,和(2)近表面对准的过程.在体积传输生成颗粒和目标分析物之间的第一次相遇的情况下,随后近表面对准过程处理反应物的结合位点的对准率。体积传输本质上为平移过程,而该对准由反应物的平移和旋转移动性两者来确定。

[0119] 当自由组分在溶液中反应时,由于高度特异性对准约束,该对准过程(即,旋转扩散)为重要限制,但体积传输(即,平移扩散)不是限制。在当组分的一者附着至表面时的情况下,体积传输可变为限制。

[0120] 纳米和微米尺寸的磁性材料的磁性性质不同于对应块状磁性材料的磁性性质。通常,可磁化颗粒基于其在存在和不存在所施加磁场情况下磁性行为而分类为顺磁性、铁磁性、亚铁磁性、反铁磁性或超顺磁性。

[0121] 抗磁性材料在不存在磁场的情况下未表现出偶极矩;并且在存在磁场的情况下,它们逆着磁场的方向对准。

[0122] 顺磁性颗粒在不存在磁场的情况下表现出随机偶极矩;并且在存在磁场的情况下,它们与磁场的方向对准。

[0123] 铁磁性材料表现出对准偶极矩。

[0124] 亚铁磁性和反铁磁性材料表现出交替对准偶极矩。

[0125] 在一个实施例中，可磁化颗粒为顺磁性颗粒。当经受磁场时，此类颗粒将变为磁性的。一旦移除磁场，则颗粒将开始失去其磁性特性。

[0126] 在一个另选实施例中，可磁化颗粒为铁磁性颗粒。也就是说，无论是否经受磁场，它们始终表现出磁性特性。

[0127] 市售的可磁化颗粒包括赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific)的Dynaparticles M-270、Dynaparticles M-280、Dynaparticles MyOne T1和Dynaparticles MyOne C1；美天旎公司(Miltenyi Biotec)的μMACS MicroParticles；威勤球栅尺公司(SPHEROTECH)的SPHERO™超顺磁性颗粒、SPHERO™顺磁性颗粒和SPHERO™铁磁性颗粒。

[0128] 可磁化颗粒可由本身由氧化铁形成的铁氧体(诸如磁铁矿和磁赤铁矿)来形成。用于合成氧化铁和金属取代的铁氧体可磁化颗粒的各种方法为已知的，诸如共沉淀法、热分解法和水热法。结合水溶性表面涂层材料，诸如聚乙二醇(PEG)，共沉淀法过程在碱性溶液中使用化学计量的亚铁盐和铁盐，其中该涂层提供胶体稳定性和生物相容性。可磁化颗粒的尺寸和性质可通过调整还原剂浓度、pH值、离子强度、温度、铁盐源，或Fe^{2+}与Fe^{3+}的比率来控制。

[0129] 可磁化颗粒的尺寸和形状可通过改变反应条件来定制，诸如有机溶剂的类型、加热速率、表面活性剂和反应时间。这种方法导致可磁化颗粒在10nm至100nm的尺寸范围内的狭窄尺寸分布。Fe^{2+}可由其它金属取代以提高饱和磁化度。

[0130] 在合成过程期间，可磁化颗粒可涂布有疏水涂层。如果这样，那么制造可磁化颗粒的方法可包括配体交换的额外步骤，使得可磁化颗粒可分散在水中以用于进一步使用。

[0131] 可磁化颗粒可通过多元醇-水热还原来制造，该多元醇-水热还原产生了在数十纳米至数百纳米的尺寸范围内的水分散可磁化颗粒。氧化铁可磁化颗粒的尺寸和表面功能化可通过调整溶剂系统、还原剂和所用表面活性剂的类型进行优化。本过程可用于合成FePt可磁化颗粒。

[0132] 可磁化颗粒可通过反向油包水胶束方法来制造。本方法形成了铁前体的水性纳米液滴的微乳液，该微乳液通过油相中的表面活性剂与通过沉淀所获得的磁性纳米颗粒来稳定。氧化铁纳米晶体可通过组合微乳液和二氧化硅溶胶-凝胶来组装，该二氧化硅溶胶-凝胶可通过共沉淀成具有100nm以上的直径的可磁化颗粒来获得。

[0133] 金属可磁化颗粒可为单金属的(例如，Fe、Co或Ni)或双金属的(例如，FePt和FeCo)。合金可磁化颗粒可通过物理方法来合成，包括真空沉积和气相蒸发。这些方法可产生具有高饱和磁化度(约207emu/g)的FeCo可磁化颗粒，并且可经由Fe^{3+}和Co^{2+}盐的还原来合成。

[0134] 可磁化颗粒可包括单个金属或金属氧化物核。可磁化颗粒可包括多个核、多层的磁性材料和非磁性材料。可磁化颗粒可包括具有磁性壳的二氧化硅或聚合物核的涂层。非磁性核颗粒可包括二氧化硅或其它聚合物。

[0135] 可磁化颗粒可包括涂布有磁性壳的电介质二氧化硅核。磁性壳可由Co、FePt或Fe_3O_4来形成。该壳还可包括稳定剂，诸如二氧化硅壳或聚电解质层。可磁化颗粒可为介孔可磁化颗粒。

[0136] 可磁化颗粒上的涂层可限定可磁化颗粒和生物分子(诸如分析物)之间的相互作

用,以及其生物相容性。涂层可用于限定表面电荷,该表面电荷与涂层一起可改变磁性颗粒的流体动力学尺寸。可磁化颗粒的流体动力学尺寸可改变磁性颗粒的功能。

[0137] 可磁化颗粒可涂布有提供静电和空间排斥力的特定涂层。此类涂层可有助于可磁化颗粒的稳定,该稳定可防止可磁化颗粒的附聚或沉淀。

[0138] 可磁化颗粒可包括由无机材料所形成的涂层。此类可磁化颗粒可形成有核-壳结构。例如,可磁化颗粒通过生物相容性二氧化硅或金来涂布(例如,涂布有二氧化硅的合金磁性纳米颗粒、FeCo和CoPt)。该壳可提供以配体(例如硫醇)来修饰可磁化颗粒的平台。其它无机涂层材料可包括钛酸盐或银。例如,可合成银涂布的氧化铁可磁化颗粒并且可与碳糊整合。

[0139] 壳可由二氧化硅形成。以二氧化硅涂布的益处为二氧化硅涂布的可磁化颗粒与通用功能分子和表面反应基团共价结合的能力。二氧化硅壳可例如通过利用溶胶-凝胶原理的Stober方法或Philipse方法或其组合来制造。可磁化颗粒的核可涂布有四乙氧基硅烷(TEOS),例如通过TEOS在碱性条件下的水解,该碱性条件使TEOS缩合并聚合成磁性核表面上的二氧化硅壳。钴可磁化颗粒可利用组合了(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷和TEOS的修改Stober方法进行涂布。

[0140] Philipse方法在磁性核上形成了硅酸钠的二氧化硅壳。第二层的二氧化硅可通过Stober方法来沉积。反相微乳液法可用于以二氧化硅来涂布。本方法可与表面活性剂一起使用。表面活性剂可选自Igeoal CO-520以提供约5nm至约20nm的二氧化硅壳厚度。优选地,用于制造二氧化硅壳的试剂选自氨基封端的硅烷或烯烃封端的硅烷。优选地,氨基封端的硅烷为(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷(APTMS)。优选地,烯烃封端的硅烷为(3-甲基丙烯酰氧基丙基)三甲氧基硅烷。

[0141] 可磁化颗粒可涂布有金。金涂布的氧化铁纳米颗粒可通过化学方法、反微乳液和激光促进方法的任一者来合成。金涂布的可磁化颗粒可通过将金直接地涂布于可磁化颗粒核上来合成。另选地,金涂布的可磁化颗粒可通过将二氧化硅用作金涂层的中间层来合成。优选,还原方法用于将金壳沉积于可磁化颗粒上。

[0142] 金属氧化物或二氧化硅涂布的磁性核可首先在将约2nm至约3nm的金纳米晶种(来自氯金酸)静电地附着至表面之前以(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷进行功能化,然后添加还原剂以形成金壳。优选地,还原剂为选自柠檬酸钠或四(羟甲基)氯化鏻的温和还原剂。在一些实施例中,金壳通过乙酸金(III)($Au(OOCCH_3)_3$)的还原来形成。在一些实施例中,金壳通过反胶束形成于金属磁性核(例如,镍和铁)上。

[0143] 可磁化颗粒可以有机配体进行功能化。该功能化可原位执行(即,在合成步骤期间提供于可磁化颗粒上的功能配体)或合成后执行。可磁化颗粒可以末端羟基基团(-OH)、氨基基团(-NH_2)和羧基基团(-COOH)进行功能化。该功能化可通过改变水热合成中所用的表面活性剂(例如,葡聚糖、壳聚糖或聚(丙烯酸))来实现。

[0144] 合成后可磁化颗粒的功能化可允许在任何可磁化颗粒表面上的定制配体的功能化。合成后功能化可通过配体添加和配体交换来进行。配体添加包括两亲分子(包含疏水部段和亲水组分)的吸附以形成双层结构。配体交换以新功能配体替换原始表面活性剂(或配体)。优选地,新配体包含能够经由强化学键合或静电引力而结合于可磁化颗粒表面上的官能团。在一些实施例中,可磁化颗粒还包括用于水中的稳定和/或生物功能化的官能团。

[0145] 可磁化颗粒可涂布有配体，该配体增强了离子稳定性。官能团可以选自羧酸盐、磷酸盐和儿茶酚(例如，多巴胺)。配体可为用于涂布富含羟基基团的表面(例如，金属氧化物磁性颗粒或二氧化硅涂布的磁性颗粒)的硅氧烷基团。配体可为连接可磁化颗粒和各种功能配体(例如胺、羧酸盐、硫醇和环氧化物)的小硅烷配体。硅烷配体可选自N-(三甲氧基甲硅烷基丙基)乙二胺三乙酸和(三乙氧基甲硅烷基丙基)琥珀酸酐以提供羧酸酯封端的磁性颗粒。官能团可选自膦酸和儿茶酚(以提供亲水尾基)。官能团可选自氨基封端的膦酸。官能团可选自用于在水溶液中分散的3-(三羟基甲硅烷基)丙基甲基膦酸酯。配体可选自二羟基氢化肉桂酸、柠檬酸或硫代苹果酸，以用于水中分散的可磁化颗粒。

[0146] 在一些实施例中，可磁化颗粒聚合物配体进行功能化。聚合物可选自天然聚合物(例如，淀粉、葡聚糖或壳聚糖)、PEG、聚丙烯酸(PAA)、聚(甲基丙烯酸)(PMAA)、聚(N,N-亚甲基-双丙烯酰胺)(PMBBAm)和聚(N,N/-亚甲基双丙烯酰胺-共-甲基丙烯酸缩水甘油酯)(PMG)。

[0147] 可磁化颗粒表面上的官能团用作连接剂以结合互补生物分子。生物分子可为小生物分子。小生物分子可选自维生素、肽和适体。生物分子可为较大生物分子。较大生物分子可选自DNA、RNA和蛋白质。

[0148] 关于核酸附着，核酸可通过非化学方法(例如静电相互作用)或化学方法(例如共价键合)进行缀合。核酸链可以官能团来修饰。官能团可选自硫醇或胺，或其任何组合。

[0149] 较大生物分子的缀合可依赖于其与广泛范围内的减法和合成类似物的特异性结合相互作用，诸如特异性受体-底物识别(即，抗原-抗体和生物素-抗生物素蛋白相互作用)。

[0150] 可使用一特定对的蛋白质来将物质固定于磁性颗粒上。物理相互作用包括静电、亲水-疏水和亲和相互作用。

[0151] 在一些实施例中，生物分子具有与磁性聚合物涂层(例如，聚乙烯亚胺或聚乙烯亚胺)的电荷相反的电荷。例如，带正电的可磁化颗粒结合带负电的DNA。

[0152] 可磁化颗粒可利用生物素-抗生物素蛋白相互作用。生物素分子和四聚链霉亲和素具有位点特异性吸力以及低非特异性结合，以用于控制相互作用生物分子的方向，诸如抗体的Fab区朝向其抗原的暴露。

[0153] 可磁化颗粒可使用共价缀合而结合至生物分子。共价缀合可选自同双功能/异双功能交联剂(氨基基团)、碳二亚胺偶联(羧基基团)、马来酰亚胺偶联(氨基基团)、直接反应(环氧基团)、马来酰亚胺偶联(硫醇基团)、席夫碱缩合(醛基基团)和点击反应(炔/叠氮基团)。

[0154] 可磁化颗粒可具有约5nm、10nm、50nm、100nm、150nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm或500nm的平均粒度，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间(例如，约5nm至约500nm、约5nm至约400nm、约5nm至约250nm、约5nm至约100nm、约5nm至约50nm、约10nm至约500nm、约10nm至约450nm、约10nm至约300nm、约10nm至约150nm、约10nm至约50nm、约50nm至约500nm、约50nm至约350nm、约50nm至约250nm、约50nm至约150nm、约100nm至约500nm、约100nm至约300nm、约150nm至约500nm、约150nm至约450nm，或约200nm至约500nm)。

[0155] 可磁化颗粒可具有约500nm、550nm、600nm、650nm、700nm、750nm、800nm、850nm、900nm、950nm或1000nm的平均粒度，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间(例如，约

500nm至约1000nm、约500nm至约850nm、约500nm至约700nm、约550nm至约1000nm、约550nm至约800nm、约600nm至约1000nm、约600nm至约900nm、约650nm至约1000nm、约650nm至约950nm、约650nm至约800nm，或约700nm至约1000nm)。

[0156] 可磁化颗粒可具有约1000nm、1500nm、2000nm、2500nm、3000nm、3500nm、4000nm、4500nm或5000nm的平均粒度，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间(例如，约1000nm至约5000nm、约1000nm至约4000nm、约1500nm至约5000nm、约1500nm至约4500nm、约1500nm至约3500nm、约2000nm至约5000nm、约2000nm至约4000nm、约2500nm至约5000nm、约2500nm至约3500nm、约3000nm至约5000nm)。

[0157] 可磁化珠的粒度变化可小于10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或1％，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间。

[0158] 微流体实现了较快分析和减少相应时间。微流体系统还提供了使样品的制备自动化的能力，从而减少了由于人为错误的污染和假阳性的风险。此外，微流体系统需要低样品量。通过增加表面积与体积的比率、减少通过微米和纳米制造的通道和腔室的试剂消耗和/或使过程的所有步骤自动化，微流体可减小扩散距离。

[0159] 微流体允许小型化，从而允许芯片实验室应用。微流体可用作生物传感器的一部分，例如，包括用于获取生物样品(例如，唾液和/或龈沟液)，处理流体(例如，与一种或多种试剂组合和/或检测与生物分子的相互作用，等等)的通道。

[0160] 微流体可需要一定程度的样品制备。样品制备可包括细胞裂解、洗涤、离心、分离、过滤和洗脱。在一些实施例中，样品制备在芯片外进行制备。在一个另选实施例中，样品制备在芯片上进行制备。

[0161] 在一些配置中，微流体系统包括硬质或柔性材料，并且可包括可整合至装置中的电子器件。电子器件可包括无线通信电子器件。

[0162] 微流体系统可为流通式或固定式系统。例如，微流体系统可包括相对于微流体系统静止的磁场传感器。

[0163] 微流体系统可被动地操作。例如，微流体系统可在被动扩散条件下操作。也就是说，微流体系统不需要主动生成的流动来有效地执行。

[0164] 微流体系统可包括库网络，这些苦可通过微流体通道来连接。微流体通道可配置用于主动计量或被动计量。这可允许样品流体抽吸至微流体通道中并且传送至样品腔室中。

[0165] 微流体系统可包括微流体通道，这些微流体通道配置成允许在不同时间进入装置上的不同样品和/或检测区域。例如，整合至对准器中或对准器上的微流体装置可配置成经由流体的时间采样来提供定时。例如，微流体系统可设计成实现以时间顺序和受控定时的采样。在一些变型中，微通道内流体的定时可主动地定时，例如通道经由阀(例如机电阀、电磁阀、压力阀)的释放而打开。在微流体网络中控制流体的阀的实例包括压电、电动和化学方式。

[0166] 微流体可包括顺序地布置的多个微流体通道。流体可以计量速率抽吸至微流体中。样品进入通道的定时可交错。

[0167] 装置可执行信号复用。即，该装置可用于以受控间隔对多个生物标记物进行采样和/或测量。例如，该装置可用于提供至一个或多个样品腔室的进入。该装置可包括由装置

中的控制电路所控制的一个或多个阀。一个或多个阀可彼此连接。因此，该装置可适于执行共同样品本体中多种分析物的同时检测。此外或另选地，该装置可配置成执行相同目标的多个样品的同时多次检测。

[0168] 微流体通道可具有在约0.001mm^{2}至0.01mm^2、0.01mm^{2}至0.1mm^2、0.1mm^{2}至0.25mm^2、0.25mm^{2}至0.5mm^2、0.1mm^{2}至1mm^2、0.5mm^{2}至1mm^2、1mm^{2}至2mm^{2}或2mm^{2}至10mm^{2}的范围内的横截面，并且可用范围可在这些数值的任一者之间进行选择。

[0169] 在一些实施例中，微流体接收在约0.1μL至1μL、1μL至5μL、5μL至10μL、10μL至20μL或20μL至50μL或更多的范围内的预定样品体积，并且可用范围可在这些数值的任一者之间进行选择。

[0170] 图2示出了微流体装置1的实例。微流体装置1可包括多个通道2，通道2布置成将液体和颗粒流从样品插入区域4引导朝向传感器3。

[0171] 通道可具有如上文所述及的剖面尺寸，并且更优选地为约0.1mm^2(0.1mm×1.0mm)。通道可具有可变长度。例如，通道可为1mm、5mm、10mm、15mm、20mm、25mm、30mm、35mm、40mm、45mm、50mm、60mm、70mm、80mm、90mm、100mm、120mm、140mm、160mm、180mm、200mm、250mm或300mm长，并且可用范围可在这些数值的任一者之间进行选择(例如，约1mm至10mm、1mm至20mm、1mm至50mm、1mm至100mm、1mm至200mm、1mm至300mm、10mm至20mm、10mm至40mm、10mm至60mm、10mm至80mm、10mm至100mm、50mm至100mm、50mm至150mm、50mm至200mm、50mm至250mm、50mm至300mm、100mm至200mm或100mm至300mm长)。

[0172] 通道的上述尺寸有利于被动毛细管流动。

[0173] 在使用时，样品经由样品插入区域4引入至微流体装置1。

[0174] 在一些实施例中，过滤膜可存在于插入区域4处以分离并允许样品的期望组分通过。例如，允许血浆从血液传送至微流体装置1中，但不允许细胞进入。过滤膜的存在取决于样品的性质，以及其是否包含期望未传送至微流体装置1中的组分。

[0175] 一旦引入至插入区域4中，则样品将随后接触微流体通道2并且流动通过通道回路的其余部分。

[0176] 微流体装置1以包括紧邻通道2的一个或多个磁性传感器3。例如，微流体装置1可包括排列于微流体装置1周围的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个磁性传感器。如图5所示，微流体装置1包括位于通道2接合点处的六个磁性传感器(6)。

[0177] 在一个实施例中，微流体装置1包括两个或更多个磁体，例如，诸如永磁体或电磁体，这些磁体布置成紧邻通道，这些通道可激活以将可磁化颗粒抽吸通过通道2中的液体来增强混合。混合可例如进行1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟或10分钟，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间。混合的定时可取决于测定要求，诸如目标分析物的样品体积、粘度、组成和检测范围。

[0178] 为实现混合，磁体(例如，电磁体)可布置于通道或微流体装置1的大体相对端部。例如，磁体可控制或切换成使得它们将可磁化颗粒牵拉朝向通道或微流体装置1的一端，并且然后作用相反以将可磁化颗粒牵拉朝向通道或微流体装置1的另一端。本周期可重复多次，直至已达到期望混合水平。

[0179] 磁体可为电磁体。电磁体可以施加约0.5高斯、1高斯、5高斯、10高斯、15高斯、20高斯、25高斯、30高斯、35高斯、40高斯、45高斯或50高斯的场强，并且合适范围可选自这些数

值的任一者之间。

[0180] 当样品准备用于分析时，磁体然后可进行控制或切换以将可磁化颗粒定位成非常靠近磁性传感器。磁体可施加约0.01高斯、0.05高斯、0.1高斯、0.2高斯、0.3高斯、0.4高斯、0.5高斯、0.6高斯、0.7高斯、0.8高斯、0.9高斯、1高斯、5高斯、10高斯、50高斯或100高斯的磁场强度，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间。然后，获取样品数据，如所描述。

[0181] 可磁化颗粒由磁性传感器来感测。

[0182] 磁性传感器可选自自旋电子传感器、原子磁力计(AM)、核磁共振(NMR)系统、磁通门传感器、法拉第感应线圈传感器、金刚石磁力计，和基于域壁的传感器。

[0183] 基于体积的传感器(例如平面霍尔效应(PHE)传感器)提供了简单且快速的样品制备和检测。由于可磁化颗粒和传感器之间的短距离，基于表面的传感器(诸如巨磁电阻(GMR))提供了较低检测限值(单个颗粒)。然而，这些技术通常需要费力的样品和/或底物制备。由于检测灵敏度、分子特异性和应用复杂性的增加需求，针对特定应用优化可磁化颗粒和选择适当检测方法对于磁性纳米技术仍为挑战性的。自旋电子传感器可选自巨磁电阻(GMR)、隧道磁阻(TMR)、各向异性磁阻(AMR)和平面霍尔效应(PHE)传感器。

[0184] GMR效应发现于20世纪80年代，并且已传统上用于数据记录。自旋阀以微米尺寸的设计提供了较高灵敏度。自旋阀GMR传感器包括具有交替铁磁层和非磁性层的人工磁性结构。磁阻效应由横穿不同层的传导电子之间的自旋轨道耦合来引起。磁阻的变化通过这种自旋相关的传感器提供了定量分析。GMR传感器可用于检测DNA-DNA或蛋白质(抗体)-DNA相互作用。传感器阵列的尺寸可调整以用于个体可磁化颗粒的检测。GMR传感器可与反铁磁性颗粒组合地使用。

[0185] 平面霍尔效应为基于铁磁性材料的各向异性磁阻效应的一种交换偏置坡莫合金平面传感器。PHE传感器可为自旋阀PHE或PHE桥式传感器。PHE传感器可能够执行单颗粒感测。

[0186] 描述了一种用于检测样品中分析物的方法，该方法包括：

[0187] •使包含目标分析物的样品与可磁化颗粒接触，该颗粒涂布有与目标分析物互补的结合分子，从而得到结合和未结合的结合剂复合物，

[0188] ·将包含结合和未结合的结合剂复合物两者的可磁化颗粒定位于磁场传感器附近，

[0189] •改变磁场足以从其靠近磁场传感器处释放至少一部分的可磁化颗粒，该可磁化颗粒包括结合的和未结合的结合剂复合物两者，和

[0190] •测量从可磁化颗粒相对于磁性传感器的净移动(即，平移或旋转移动)所检测的磁性信号的变化。

[0191] 如图1所示，根据本方法的一个实施例的设置可广泛地包括微流体装置、传感器、磁体、信号放大器、模数转换器和计算机。

[0192] 目标分析物可为与由提供至可磁化颗粒的结合分子互补并且能够由其结合的任何物质或分子。例如，目标分析物可选自包括蛋白质、肽、核酸、脂质或碳水化合物的组。

[0193] 目标分析物可为选自包括抗体、酶、信号分子或激素的组的蛋白质或其片段。

[0194] 目标分析物可为选自包括DNA、RNA、cDNA、mRNA或rRNA的组的核酸。

[0195] 该方法可检测单个样品中的一种以上的目标分析物。例如，该方法可检测单个样

品中的两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、10种或更多种、15种或更多种、20种或更多种的目标分析物。

[0196] 待分析的样品可为可包含一种或多种目标分析物的任何样品。例如，样品可为临床、兽医、自然环境、食品、法医或其它合适生物样品。

[0197] 临床样品可选自体液。例如，体液可选自血液、汗液、唾液、尿液、痰、精液、粘液、眼泪、脑脊髓液、羊水、胃液、龈沟液或间质流体。

[0198] 自然环境样品可选自包括水、土壤或气溶胶的组。

[0199] 本发明的益处可在于，样品制备为不费力的或不难以制备的。样品制备将所建立生物化学用于分子功能化和附着，无论在微流体表面或可磁化颗粒表面上。

[0200] 待分析的样品可直接地添加至样品井或微流体装置，而无需额外处理。

[0201] 样品可经受一个或多个样品处理步骤。应当理解，合适样品处理步骤可取决于待分析样品的类型和/或性质。在一些实施例中，样品处理步骤可选自包括稀释、过滤或提取(例如，液体-液体、固相)的组。例如，全血样品可利用基于纤维素的过滤器进行过滤以分离待分析的血浆。

[0202] 该方法的第一步骤可包括将待分析的样品与含有自由可扩散的可磁化颗粒的制剂相组合，这些颗粒涂布有与样品井或样品库中的目标分析物互补的结合分子(结合剂复合物)。在适当的情况下，术语“结合剂复合物”可互换地用于指代涂布结合分子的可磁化颗粒。

[0203] 在一些实施例中，可磁化颗粒可具有有限扩散性。这可发生于其中可磁化颗粒与大分子交联或衍生化的情况下。大分子可为水凝胶或PEG连接剂。当将该装置用于多重测定以用于一个样品中的多个目标或样品的检测时，可发生这种情况。

[0204] 本方法可通过提供在溶液中可移动且自由可扩散的结合剂复合物而改善结合分子结合目标分析物的速率。当样品和结合剂复合物制备相组合时，结合剂复合物为自由可扩散的，并且结合分子能够在整个样品体积中与目标分析物进行相互作用。由于结合剂复合物和目标分析物两者为自由可扩散的并且悬浮于样品体积中，目标分析物和结合剂复合物之间的平均物理距离可能为小的。因此，结合速率可改善，并且接合平衡可显著较快地实现。

[0205] 在诸如ELISA的检测测定中，诸如抗体的结合分子固定于宏观物体上，例如测试井的表面。在此类方法中，目标分析物和抗体之间的物理距离可根据分析物在样品体积中的位置而显著地改变。例如，靠近样品体积的顶部的目标分析物可十分远离于所固定抗体，并且将不太可能捕获和结合。因此，结合速率可受限于目标分析物在样品体积中朝向所固定抗体扩散的速率。

[0206] 样品和结合剂复合物可允许组合适当时间量以允许结合分子达到结合平衡。在一些实施例中，允许结合达到平衡的适当时间量可为约1秒、2秒、3秒、4秒、5秒、10秒、20秒、30秒、45秒、60秒、90秒、120秒、180秒、240秒、300秒或360秒，并且可用范围可在这些数值的任一者之间进行选择(例如，约1秒至30秒、1秒至60秒、1秒至120秒、10秒至30秒、10秒至60秒、10秒至90秒、30秒至60秒、30秒至90秒、30秒至120秒、60秒至90秒、60秒至120秒、60秒至180秒、90秒至120秒、90秒至180秒、90秒至240秒、180秒至240秒、180秒至300秒、180秒至360秒)。

[0207] 磁场生成器可用于诱导样品的磁流体动力混合以改善达到结合平衡的速率。在此类实施例中，磁场生成器用于诱导样品体积中的结合剂复合物的移动。

[0208] 通过随着所结合分析物移动远离磁场传感器而测量磁场的变化，生成了允许样品中分析物的量化的信号。

[0209] 磁场传感器可为片上磁力计。磁场传感器可具有至少1mV/V/高斯的灵敏度。在一些实施例中，磁场传感器可检测和/或测量至少约10毫高斯、1毫高斯、100微高斯或10微高斯的磁场。

[0210] 磁场传感器可包括多轴线，例如单轴线、双轴线或三轴线。

[0211] 磁场传感器可为Honeywell HMC 1021S磁力计。在另一个实施例中，磁场传感器可为Honeywell HMC1041Z磁性传感器。在其它实施例中，磁场传感器可选自包括Honeywell HMC 1001、HMC 1002、HMC 1022、HMC 1051、HMC 1052、HMC 1053或HMC 2003磁力计的组。

[0212] 磁场传感器可包括具有定制部件的订制磁场传感器。

[0213] 可同时使用多个磁场传感器来测量磁场的变化。例如，对于小型便携式应用，可使用两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、10个、12个、14个、16个、18个、20个、22个或24个磁场传感器。

[0214] 磁场传感器可设置于装置的较小区域中。例如，24个磁场传感器可提供至大约13mm×19mm的区域。由于与该磁场传感器配置一起使用的较短微流体通道，此类配置可允许较快样品至数据时间，如上文在段落[0081]至[0082]中所讨论。这种配置还允许较小和更便携的装置。

[0215] 该装置可包括每cm^2印刷电路板的约5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个磁场传感器，并且可用范围可在这些数值的任一者之间进行选择(例如，每cm^2印刷电路板的约5至约15、约5至约13、约5至约10、约6至约15、约6至约12、约6至约9、约7至约15、约7至约约14、约7至约13、约7至约10、约8至约15、约8至约14、约8至约11、约9至约15、约9至约13或约10至约15个传感器)。

[0216] 在一些实施例中，多个磁场传感器可同时用于测量磁场的变化。例如，对于小型便携式应用和原位实验室或临床应用，可使用50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个或120个磁场传感器，并且可用范围可在这些数值的任一者之间进行选择(例如，约50至约120、约50至约100、约50至约90、约50至约80、约60至约120、约60至约110、约60至约90、约70至约110、约70至约90、约80至约120或约80至约110个磁场传感器)。

[0217] 在一些实施例中，多个磁场传感器可同时用于测量磁场的变化。例如，对于实验室或临床、研究或工业应用，可使用1000个、1250个、1500个、1750个、2000个、2250个、2500个、2750个或3000个磁场传感器。

[0218] 本方法的另一步骤可包括将磁场施加至样品以将结合剂复合物定位于磁场传感器附近。如段落[0171]中所描述的磁场生成器可用于生成磁场以将结合和未结合的结合剂复合物操纵至允许磁场传感器有效地测量由可磁化颗粒所生成的磁场变化的位置。

[0219] 在一些实施例中，结合剂复合物可利用微流体、声学、压电或其它合适手段而定位于磁场传感器附近。在其它实施例中，结合剂复合物可通过离心来定位。

[0220] 在一些实施例中，磁场可在使样品体积中的可磁化颗粒移动朝向磁场传感器的方向上生成。磁场传感器可设置于相对于测试井或微流体装置的任何位置。例如，如果磁场传

感器位于测试井或样品库下方，那么磁场将使可磁化颗粒移动朝向测试井或样品库的底部。在另一个实例中，如果磁场传感器位于测试井或样品库上方，那么磁场将使可磁化颗粒移动朝向测试井或样品库的顶部。

[0221] 在一些实施例中，所生成的磁场可为静态的或动态的。

[0222] 在一些实施例中，所生成磁场的强度可进行调制。

[0223] 不希望受理论束缚，该磁场(即，偏置场)的调制具有使可磁化颗粒与传感器对准以在检测期间实现最高检测灵敏度的主要功能。对于铁磁性颗粒，假设它们具有其自有永久磁场，其中偏置场关闭，从而导致磁性颗粒的错位。对于顺磁性(或超顺磁性)颗粒，由于其磁场必须由外部场来诱导，偏置场起到诱导此类场的额外功能。

[0224] 偏置场可进行调制以支持不同可磁化颗粒，因为不同颗粒(无论化学成分或物理尺寸)可需要不同偏置场强度和配置。

[0225] 在一些实施例中，磁场可以使其对于可磁化颗粒的影响最大化但其对于磁场传感器的影响最小化的方式来生成和定位。磁场生成器可生成于和/或定位成靠近磁场传感器。在一些实施例中，磁场生成器位于磁场传感器的上方、下方或旁边。在一些实施例中，磁场生成器可定位于与磁场传感器相同的竖直平面或水平平面上。

[0226] 该方法的另一步骤可包括，当结合和未结合的结合剂复合物定位在磁场传感器附近时，充分地改变磁场以从其磁场传感器附近释放至少一部分的结合剂复合物。

[0227] 在一些实施例中，磁场可逐渐地减小。

[0228] 在一些实施例中，磁场可瞬时移除。

[0229] 在一些实施例中，磁场的形状可为可变的。

[0230] 随着施加至样品的磁场减小和/或移除，结合和未结合的结合剂复合物从磁场进行释放，并且可自由地扩散(平移移动)远离其磁场传感器附近。随着施加至样品的磁场减小和/或去除，结合剂复合物也可相对于磁场传感器旋转(旋转移动)。

[0231] 根据本方法，结合和未结合的结合剂复合物可根据格雷厄姆分子扩散定律(即，扩散速率与其分子量的平方根成反比)基于分子扩散特性的变化进行区分。扩散速率可例如以下公式进行计算：

[0232] $$\frac{R_A}{R_B} = \sqrt{\frac{M_B}{M_A}}$$

[0233] 其中：

[0234] R_A＝分子A的扩散速率，

[0235] R_B＝分子B的扩散速率，

[0236] M_A＝分子A的分子量，和

[0237] M_B＝分子B的分子量。

[0238] 由于结合至目标分析物的结合剂复合物相比于未结合的结合剂复合物将具有较大分子量，根据格雷厄姆定律，未结合的结合剂复合物将具有较高扩散速率。因此，结合和未结合的结合剂复合物可基于其动力学特征进行区分。

[0239] 本方法的另一步骤可包括，随着可磁化颗粒相对于磁场传感器移动(经由平移或旋转移动)，测量从可磁化颗粒所检测的磁性信号的变化。如前述段落所详细描述，磁场传

感器测量由可磁化颗粒所生成的磁场强度随时间的变化。本方法使用磁场随时间的变化，这仅需要一种结合分子以用于目标分析物的结合。

[0240] 在一些实施例中，磁场随时间的变化可通过测量磁阻效应和随时间的信号下降来确定。

[0241] 由与磁场传感器相关的可磁化颗粒所生成的磁场信号符合磁性偶极场公式：

[0242] $$\mathbf{B}(\mathbf{m},\mathbf{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi}\frac{3(\mathbf{m}\cdot\hat{\mathbf{r}})\hat{\mathbf{r}} - \mathbf{m}}{r^3}$$

[0243] 其中

[0244] B为场

[0245] r为从偶极的位置至对场进行测量的位置的矢量

[0246] r为距偶极的距离r的绝对值

[0247] $\hat{\mathbf{r}} = \frac{\mathbf{r}}{r}$ 为平行于r的单位矢量

[0248] m为(矢量)偶极力矩

[0249] μ_0为自由空间的导磁率

[0250] 基于磁性偶极场公式，检测信号下降至距磁场传感器的距离的三次方。与上文所描述的扩散动力学相结合，这种现象可用于后续段落所描述的信号生成。

[0251] 由于未结合的结合剂复合物的较高扩散速率，当相比于结合至目标分析物的结合剂复合物时，未结合的结合剂复合物可以较快速率进一步移动远离传感器。扩散速率的差异将随着时间生成磁场衰减信号。衰减速率取决于结合和未结合的结合剂复合物的分子量，其中相比于结合的结合剂复合物，未结合的结合剂复合物将具有较快衰减速率。

[0252] 衰减速率可以衰减曲线来建模。衰减曲线可用于在结合和未结合的结合剂复合物之间进行区分。例如，加速衰减曲线可指示未结合的结合剂复合物，并且减弱衰减曲线可指示结合的结合剂复合物。

[0253] 该方法可包括多轮的下述步骤以生成随时间的信号曲线来区分结合和未结合的结合剂复合物，以量化目标分析物。

[0254] • 施加磁场以将可磁化颗粒定位于磁场传感器附近。

[0255] • 改变磁场足以从其磁场传感器附近处释放至少一部分的可磁化颗粒。

[0256] • 随着可磁化颗粒移动远离磁性传感器，测量从可磁化颗粒所检测的磁信号的变化。

[0257] 该方法可通过测量由结合或未结合的结合剂复合物所生成的总磁场强度而包括基准校准步骤。

[0258] 由可磁化颗粒所生成的磁场信号可为由于可磁化颗粒的固有特性，或其可由外部磁场来诱导。

[0259] 磁场传感器以这样的方式定位，使其对于可磁化颗粒的感测最大化但使对于磁场生成器的感测最小化。

[0260] 可磁化颗粒的磁场或信号可为其原子构造固有的，或者可由外部磁场来诱导。

[0261] 传感器的数据获取可与微流体装置同步。这可允许检测传感器的数据表征于样品数据或自然环境或周围环境数据之间。例如，通过磁性传感器所检测的样品未注入微流体

装置的信号将该数据表征为自然环境或周围环境数据。数据作为自然环境或周围环境数据的表征可有助于建立背景，并且还可有助于准备校准数据。

[0262] 在磁性传感器检测到将样品注入微流体装置之后的信号(该信号与可磁化颗粒至磁性传感器附近的定位一致)的情况下，此类数据可表征为样品数据。

[0263] 传感器的数据获取可为连续的。也就是说，磁性传感器连续地传递信号，并且基于数据收集与样品至微流体装置的注入的同步，将该数据表征为样品数据或背景数据。

[0264] 传感器数据可在一段时间内获取，以从可磁化颗粒测量磁性信号的变化。动作或事件可从所感测磁性信号的变化进行推断。动作或事件可包括可磁化磁体由于流体流、外部磁力或扩散的移动。

[0265] 该方法可包括处理磁场传感器的原始数据输出以量化样品中目标分析物的量。利用前述段落中所详细描述的硬件和软件实施方式的组合，可执行原始数据处理。

[0266] 原始数据输出的处理可包括利用信号放大器放大磁场传感器的信号输出。磁场传感器的信号输出可为与所感测磁场成比例的电压读数。在一些实施例中，信号放大器为德州仪器INA819放大器。

[0267] 磁场传感器的电压读数可在量值上放大至较高电压(与初始电压读数成比例)，该较高电压兼容数据处理和收集电子器件部件。

[0268] 原始数据输出的处理还可包括将磁场传感器的模拟数据输出转换为数字数据输出。例如，电压读数可转换为由计算机可记录的数字比特流。

[0269] 模数转换可利用模数转换器(ADC)来执行。

[0270] 转换或取样分辨率可为16位、24位、32位、64位、128位、256位或512位。

[0271] 检测方法的分析性能的评估通常通过测量剂量-反应曲线来完成，检测限值(LoD)可从剂量-反应曲线来推导。LoD为对于所选置信水平可检测的物质(生物标记物)的最低数量。所选测定(生物标志物、生物材料、样品基质、温育时间等)可对于LoD具有强力影响。还使用了量化限值(LoQ)，即，以给定所需精度可量化的最低生物标记物浓度。如果剂量-反应曲线具有良好灵敏度，即，如果该信号作为目标浓度的函数而强烈变化，那么LoQ接近于LoD。

[0272] 本方法可提供约0.05pg/mL、0.1pg/mL、0.2pg/mL、0.3pg/mL、0.4pg/mL、0.5pg/mL、0.6pg/mL、0.7pg/mL、0.8pg/mL、0.9pg/mL、1.0pg/mL、1.5pg/mL或2.0pg/mL的LoQ，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间。

[0273] 本方法可提供约0.1pg/mL、1.1pg/mL、1.2pg/mL、1.3pg/mL、1.4pg/mL、1.5pg/mL、1.6pg/mL、1.7pg/mL、1.8pg/mL、1.9pg/mL或2.0pg/mL的LoD，并且合适范围可选自这些数值的任一者之间。

[0274] 本发明描述了检测和量化样品中分析物的方法、试剂和系统。

[0275] 高通量筛选(HTS)系统允许大量的测定在较短时间内执行。HTS系统可包括微板、微板读取器、机器人液体和微板处理平台。在一些实施例中，当前所描述方法的一个或多个步骤可利用HTS系统来执行。

[0276] 在一些实施例中，微板可包括例如6个、12个、24个、48个、96个、384个或1536个样品井。

[0277] 在一些实施例中，磁性传感器可提供至微板。

[0278] 在一些实施例中，机器人液体处理装置可用于将样品和/或试剂分布于微板上。

[0279] 在一些实施例中，本方法可利用HTS系统来部分地或完全地自动化。

[0280] 用于检测分析物的装置可在任何取向上为可操作的。本方法的装置操作或性能不依赖于重力来有效地起作用。也就是说，无论装置如何取向，该装置可执行本方法。例如，该装置可以倒置配置为可操作的，其中磁场传感器在样品库或微流体装置上方进行取向。

[0281] 应当理解，本方法可广泛地用于需要目标分析物的检测和/或量化的任何应用中。特别地，该方法可用于需要以下项的应用中：

[0282] i)快速确定，或

[0283] ii)灵敏确定，或

[0284] iii)定量确定，或

[0285] iv)或(i)至(iii)的任何组合；

[0286] 样品中目标分析物的存在。

[0287] 例如，合适应用可包括临床、兽医、自然环境、食品安全或法医应用。

[0288] 在一些实施例中，临床应用可包括样品中生物标志物的诊断检测，该生物标志物可指示临床状况。在一个实例中，该方法可用于血样中特异性抗体的快速、灵敏和定量诊断检测，该特异性抗体可指示病原体的潜在感染。在另一个实例中，该方法可用于特定蛋白生物标志物的诊断检测，该特定蛋白生物标志物在癌症中过度表达。诊断检测可对于横跨不同物种的样品来执行。

[0289] 临床状况可选自感染，例如细菌、真菌、病毒(例如，肝炎和HIV)(例如，生物标志物，诸如肝炎和HIV抗体)、寄生虫(例如，微生物寄生虫[例如，疟疾]、线虫、昆虫寄生虫)的感染。

[0290] 临床状况可选自疾病，诸如心脏病(生物标志物，诸如BNP)、癌症(例如，实体器官癌、血癌、其它癌症)(例如，生物标志物，诸如Ca-125和其它肿瘤标志物)、神经系统疾病(例如，多发性硬化症、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病)(例如，生物标志物，诸如CNS免疫球蛋白)、呼吸系统疾病(例如，生物标志物，诸如血清ACE)、肝脏疾病(例如，生物标志物，诸如肝功能测试和白蛋白)、肾脏疾病(例如，生物标志物，诸如肌酐和蛋白质)。

[0291] 临床状况可选自器官损伤或衰竭，诸如脑损伤(例如，生物标志物，诸如胶质纤维酸性蛋白或GFAP)、肾损伤(例如，生物标志物，诸如血清肌酸)、心脏损伤(例如，生物标志物，诸如肌酸激酶肌肉)、肺损伤(例如，生物标志物，诸如细胞间粘附分子-1或ICAM1等)或肝损伤(例如，生物标志物，诸如碱性磷酸酶)。

[0292] 临床状况可选自内分泌失调，诸如糖尿病(例如，生物标志物，诸如胰岛素、升高HbA1C)、甲状腺功能障碍、甲状腺激素、垂体病症(例如，生物标志物，诸如ACTH、催乳素、促性腺激素、促甲状腺激素、生长激素、抗利尿剂激素)、甲状旁腺疾病(例如，生物标志物，诸如甲状旁腺激素)、肾上腺疾病(例如，生物标志物，诸如皮质醇、醛固酮、肾上腺素、DHEAS)、性激素失衡(例如，生物标志物，诸如雄激素和雌激素)、类癌肿瘤(例如，生物标志物，诸如5-HIAA、VIPoma、血清VIP)、骨转换升高(例如，生物标志物，诸如P1NP)。

[0293] 临床状况可选自脂质紊乱(例如，生物标志物，诸如胆固醇和甘油三酯)。

[0294] 临床状况可选自营养障碍(例如，维生素缺乏、吸收不良综合征、营养不良、维生素代谢障碍)(例如，生物标志物，诸如维生素水平、铁水平、矿物质水平)。

[0295] 临床状况可选自炎症或炎性疾病(例如,生物标志物,诸如ESR、Crp和其它急性期蛋白)。

[0296] 临床状况可选自自身免疫疾病(例如,生物标志物,例如特异性抗体标志物)。

[0297] 临床状况可选自过敏性疾病(例如,生物标志物,诸如类胰蛋白酶)。

[0298] 临床状况可选自物理创伤,诸如电击(例如,生物标志物,诸如肌酐激酶)。

[0299] 临床状况可选自免疫缺陷病症(例如,常见可变免疫缺陷)(例如,生物标志物,诸如补体、白细胞和免疫球蛋白)。

[0300] 临床状况可选自凝血障碍(例如,血栓形成倾向)(例如,生物标志物,诸如凝血因子和其它标志物)。

[0301] 临床状况可选自遗传性或获得性酶障碍、缺乏或过量以及其它先天性或获得性代谢缺陷(例如,Bartter综合征、先天性肾上腺增生)(例如,生物标志物,诸如电解质、酶水平、酶的代谢产物)。

[0302] 临床状况可选自电解质紊乱,诸如高钾血症和高钠血症(例如,生物标志物,诸如电解质)。

[0303] 临床状况可选自药物不良反应或中毒(例如,生物标志物,诸如药物水平和药物代谢物的水平)。

[0304] 对于兽医学而言,临床状况可选自肾功能衰竭、FIV/AIDS(猫科动物)、癌症和任何器官功能/衰竭的生物标志物。

[0305] 在一些实施例中,临床病症可为兽医受试者的病症,诸如猫科动物、犬科动物、牛科动物、绵羊科动物、马科动物、猪科动物或鼠科动物。

[0306] 在一些实施例中,自然环境应用可包括自然环境样品中污染物的检测。自然环境污染物可选自诸如,例如铅、颗粒物、微塑料和激素等的污染物。

[0307] 例如,该方法可用于监测和量化水样中的重金属。

[0308] 在一些实施例中,食品安全应用可包括食品样品中病原体的检测。例如,该方法可用于快速地且灵敏地检测细菌病原体对牛奶的巴氏杀菌后污染。

[0309] 实例

[0310] 实例1:灵敏度和检测限值

[0311] 本研究的目的是测试检测的灵敏度。

[0312] 将特定量的可磁化颗粒添加至微流体系统以用于检测。系统的设置总结如下。

[0313] • 磁性传感器:Honeywell HMC 1021S磁力计

[0314] ·可磁化颗粒:Thermo Fisher Dynaparticles T1(1μm)链霉亲和素颗粒

[0315] ·生物标签:链霉亲和素

[0316] • 放大器:德州仪器INA826

[0317] • 颗粒的数量:

[0318] o样品1:对照——0pg的颗粒

[0319] o样品2:0.5pg的颗粒

[0320] o样品3:5pg的颗粒

[0321] o样品4:50pg的颗粒

[0322] o样品5:500pg的颗粒

[0323] o样品6:50,000pg的颗粒

[0324] o样品7:500,000pg的颗粒

[0325] • 传感器数据的采集:

[0326] o每次读取0.012秒

[0327] o每个样品1,200个读数

[0328] o大约15秒的总读取时间

[0329] 在引入微流体系统后,颗粒通过微流体装置定位于传感器上。磁体激活以使可磁化颗粒靠近磁性传感器。然后断开磁体,并使用位于传感器下方的永磁体来生成偏置场。磁场传感器测量由可磁化颗粒(随着其扩散远离磁性传感器)所生成的磁场强度随着时间的变化。该装置通过测量可磁化颗粒相对于磁场传感器的净移动而确定样品中分析物的量。

[0330] 获取每个样品的传感器数据。

[0331] 传感器数据然后处理如下。应用30个样品窗口移动平均滤波器,和将数据跨时间平均并且归一化为阴性对照样品(样品1)。

[0332] 图3为示出以竖直轴线所检测的信号的图表,该竖直轴线表示为任意单位(a.u.)的信号。

[0333] 颗粒的数量表示为水平轴线上的皮克(pg)。

[0334] 结果表明,灵敏度和信号采集以较大数量的颗粒来改善。

[0335] 图3的图表为灵敏度曲线图,并且表明约0.5pg的LoQ。

[0336] 实例2:检测速度

[0337] 本研究的目的是测试检测系统的速度。

[0338] 将特定量的可磁化颗粒添加到微流体系统以用于检测。系统的设置总结如下。

[0339] • 磁性传感器:Honeywell HMC 1021S磁力计

[0340] ·可磁化颗粒:Thermo Fisher Dynaparticles T1(1μm)链霉亲和素颗粒

[0341] ·生物标签:链霉亲和素

[0342] • 放大器:德州仪器INA826

[0343] • 颗粒的数量:

[0344] o样品1:对照——0pg的颗粒

[0345] o样品2:50pg的颗粒

[0346] o样品3:500,000pg的颗粒

[0347] • 传感器数据的获取:

[0348] o每次读取0.012秒

[0349] o每个样品1,200个读数

[0350] o大约15秒的总读取时间

[0351] 在引入微流体系统后,颗粒通过微流体装置定位于传感器上。磁体激活以使可磁化颗粒靠近磁性传感器。然后断开磁体,并且使用位于传感器下方的永磁体来生成偏置场。磁场传感器测量由可磁化颗粒(随着它们扩散远离磁性传感器)所生成的磁场强度随着时间的变化。该装置通过测量可磁化颗粒相对于磁场传感器的净移动而确定样品中分析物的量。

[0352] 获取每个样品的传感器数据。

[0353] 传感器数据然后处理如下。应用30个样品窗口移动平均滤波器，和将数据跨时间平均并且归一化为阴性对照样品(样品1)。

[0354] 图4示出了图表，该图表以竖直轴线示出随时间的信号获取，该竖直轴线表示为任意单位(a.u.)的信号。

[0355] 每次读取的时间点表示为水平轴线上的秒(s)。

[0356] 结果表明，该方法可在15秒内获取充分信号，以定性测量和区分样品中所存在的颗粒的数量。

[0357] 图4的图表为数据获取时间曲线图，并且表明15秒内的快速样品检测和数据收集。

[0358] 图4的图表示出，上述系统响应于极少量的颗粒(即，在皮克范围内)，并且可在数秒内快速地检测和区分。

[0359] 实例3:样品中链霉亲和素蛋白的检测

[0360] 本研究的目的是表明样品中链霉亲和素蛋白作为目标分析物的定量检测。

[0361] 与乳胶颗粒(不可磁化颗粒)缀合的生物素用于捕获添加至微流体系统以用于检测的特定量的链霉亲和素并与之关联。系统的设置总结如下。

[0362] ·磁性传感器:Honeywell HMC 1021S磁力计

[0363] ·可磁化颗粒:Thermo Fisher Dynaparticles T1(1um)链霉亲和素颗粒

[0364] • 生物标签:链霉亲和素

[0365] • 放大器:德州仪器INA826

[0366] • 实例

[0367] o样品1:与可磁化颗粒缀合的0pmoles/ml的链霉亲和素蛋白

[0368] o样品2:与可磁化颗粒缀合的0.33pmoles/ml的链霉亲和素蛋白

[0369] o样品3:与可磁化颗粒缀合的3.3pmoles/ml链霉亲和素蛋白

[0370] o样品4:与可磁化颗粒缀合的33pmoles/ml链霉亲和素蛋白

[0371] o样品5:与可磁化颗粒缀合的330pmoles/ml链霉亲和素蛋白

[0372] • 传感器数据的获取:

[0373] o每次读取0.012秒

[0374] o每个样品1,200个读数

[0375] o大约15秒的总读取时间

[0376] 在引入微流体系统后，颗粒通过微流体装置定位于传感器上。磁体激活以使可磁化颗粒靠近磁性传感器。然后断开磁体，并使用位于传感器下方的永磁体来生成偏置场。磁场传感器测量由可磁化颗粒(随着它们扩散远离磁性传感器)所生成的磁场强度随着时间的变化。该装置通过测量可磁化颗粒相对于磁场传感器的净移动而确定样品中分析物的量。

[0377] 获取每个样品的传感器数据。

[0378] 传感器数据然后处理如下。应用30个样品窗口移动平均滤波器，和将数据跨时间平均并归一化为阴性对照样品(样品1)。

[0379] 表1示出了经由生物素捕获和链霉亲和素蛋白的缔合所检测的信号，该信号为任意单位(a.u.)。

[0380] 表1:链霉亲和素浓度相对于检测信号

[0381]

链霉亲和素的浓度		检测信号
(皮摩尔/毫升)	(纳克/毫升)	(a.u.)
0.00	0.00	0.00
0.33	17.5	163.74
3.30	175	198.26
33.00	1750	224.43
330.00	17500	480.68

[0382] 表1表明,本发明的方法可检测3.3pmol/mL和更低的链霉亲和素的水平。

[0383] 实例4:灵敏度和量化限值

[0384] 本研究的目的是表明不同物种的样品中生物标志物的灵敏度和定量检测。

[0385] 可磁化颗粒以重组抗体进行功能化,其中每种抗体分别靶向特定生物标志物。功能化可磁化颗粒用于捕获每个样品中的特定浓度的生物标志物并与之关联,该每种样品添加至微流体系统以用于量化。系统的设置总结如下。

[0386] • 磁性传感器:Honeywell HMC 2003磁力计

[0387] • 可磁化颗粒:Nanocs MP25-AV(直径30nm),以抗体进行化学功能化:

[0388] o抗人CRP检测抗体(研发系统DY1707)

[0389] o抗人白蛋白检测抗体(研发系统DY1455)

[0390] o抗犬IL-6检测抗体(研发系统DY1609)

[0391] o抗犬VEGF-A检测抗体(研发系统DY1603)

[0392] o抗猫TNFa检测抗体(研发系统DY2586)

[0393] o抗猫GM-CSF检测抗体(研发系统DY987)

[0394] o抗马TNFa检测抗体(研发系统DY1814)

[0395] • 放大器:Honeywell HMC 2003内置放大器

[0396] • 传感器数据的获取:

[0397] o每次读取0.007秒

[0398] o每个样品1,000个读数

[0399] o大约10秒的总读取时间

[0400] • 样品(重组蛋白):

[0401] o人CRP

[0402] o人白蛋白

[0403] o犬IL-6

[0404] o犬VEGF-A

[0405] o猫TNFa

[0406] o猫GM-CSF

[0407] o马TNFa

[0408] 在引入微流体系统后,颗粒通过微流体装置定位于传感器上。磁体激活以使可磁

化颗粒靠近磁性传感器(“捕获”步骤)。然后断开磁体(“释放”步骤)。磁场传感器测量由可磁化颗粒(随着它们扩散远离磁性传感器)所生成的磁场强度随时间的变化。

[0409] 获取每个样品的传感器数据。

[0410] 传感器数据然后处理如下。数据在首先10个读数中进行平均,然后对每个相对阴性对照样品进行归一化。

[0411] 表2示出了经由抗体捕获和与每个样品的生物标志物的缔合所检测的传感器值(任意单位[a.u.])。

[0412] 表2.生物标志物浓度相对于传感器值

[0413]

生物标志物浓度 (pg/mL)	传感器值(a.u.)						
	人 CRP	人白蛋白	犬 IL-6	犬 VEGF-A	猫 TNFa	猫 GM-CSF	马 TNFa
10000	0.033	0.057	0.020	0.031	-	0.031	0.028
1000	0.031	0.042	0.019	0.026	0.026	0.035	0.025
100	0.030	0.033	0.011	0.026	0.018	0.031	0.026
10	0.010	0.023	0.016	0.019	0.013	0.019	0.017
1	0.010	0.032	0.008	0.010	0.012	0.012	0.015
0.1	-	0.008	-	0.007	0.009	0.011	0.008
0	0	0	0	0	0	0	0
R^2值	0.88	0.86	0.88	0.95	0.91	0.90	0.96

[0414] 表2的结果表明各种物种的一系列生物标志物的在0.1pg/mL范围内的量化限值。结果还表明了0.1pg/mL至10,000pg/mL的6个数量级的生物标志物检测。

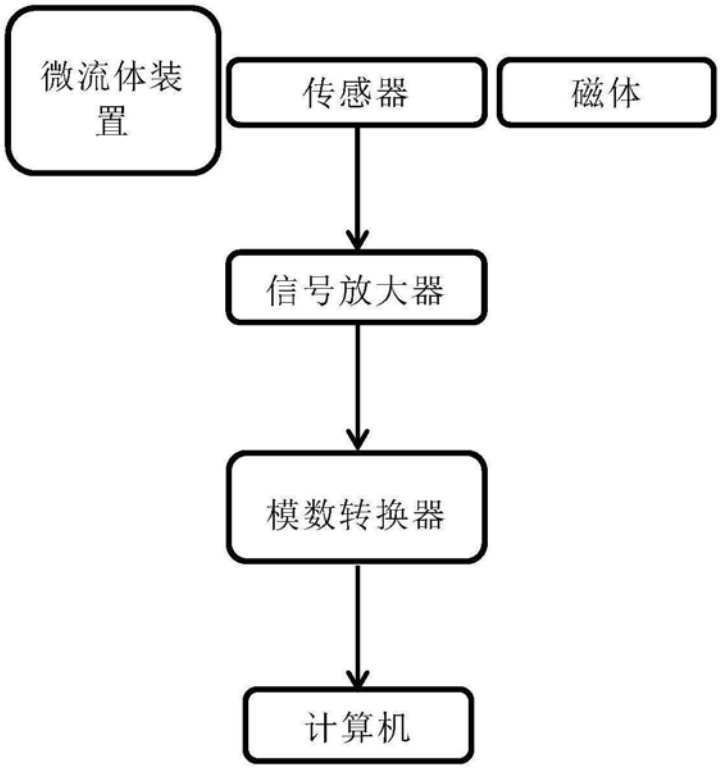

图1

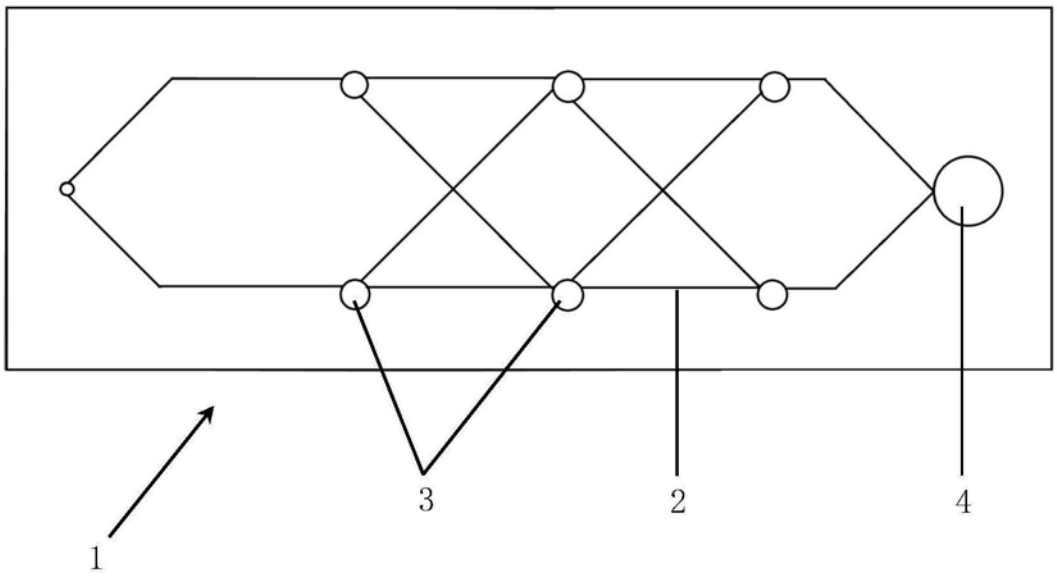

图2

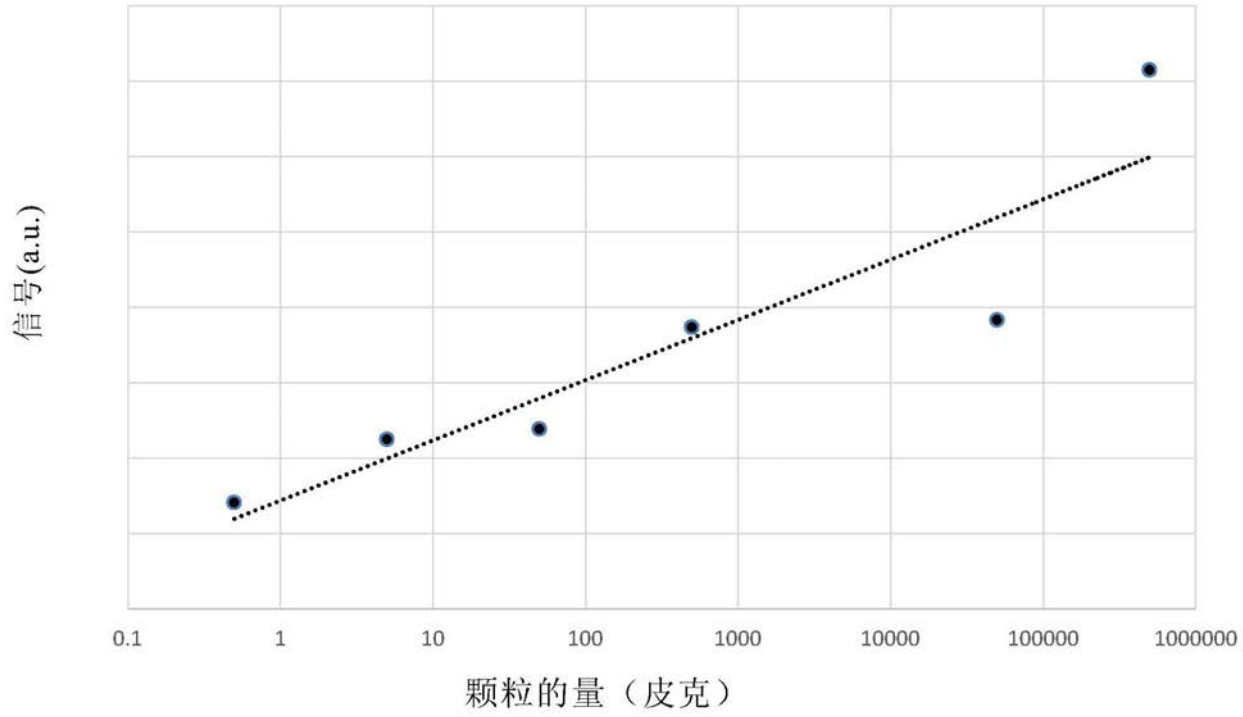
信号(a.u.)
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
颗粒的量（皮克）

图3

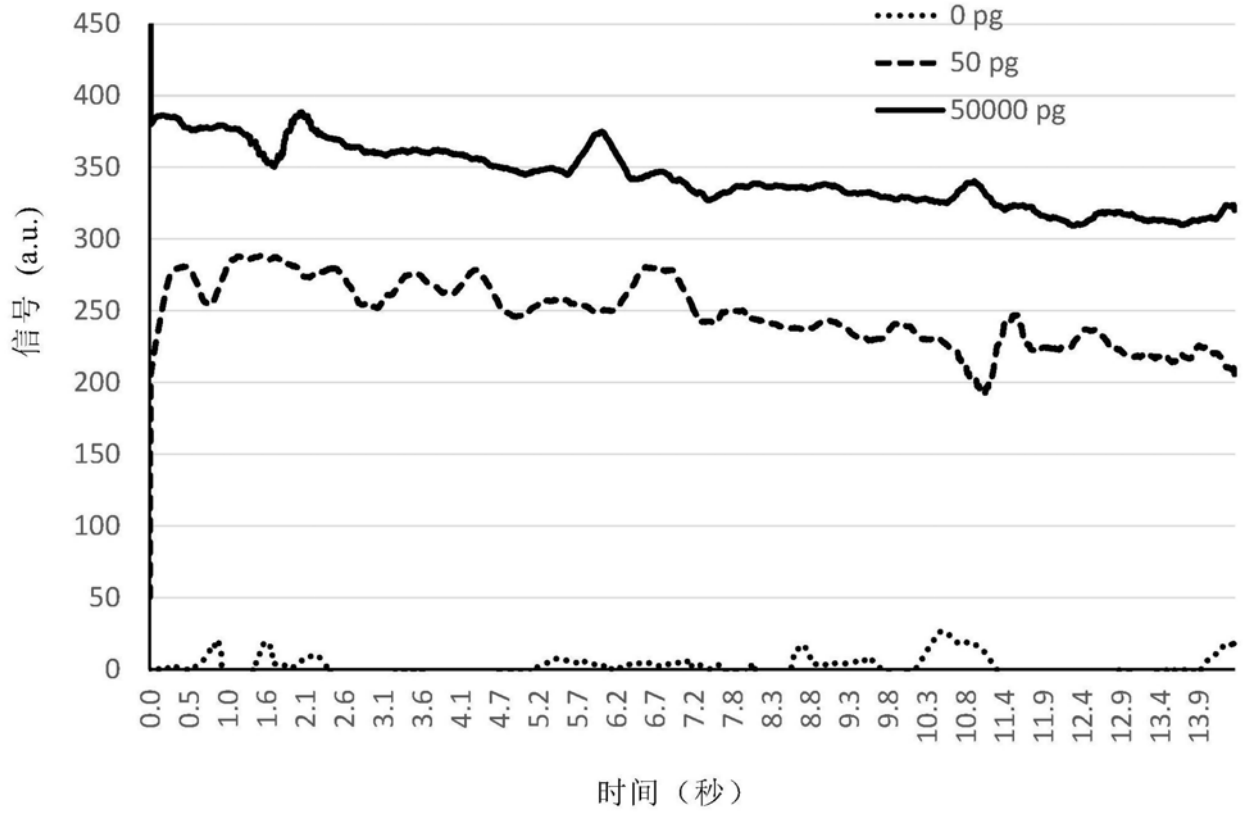
0 pg
50 pg
50000 pg
信号 (a.u.)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0.0
0.5
1.0
1.6
2.1
2.6
3.1
3.6
4.1
4.7
5.2
5.7
6.2
6.7
7.2
7.8
8.3
8.8
9.3
9.8
10.3
10.8
11.4
11.9
12.4
12.9
13.4
13.9
时间（秒）

图4