(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 105378460 A
(43)申请公布日 2016.03.02

(21)申请号 201380072773.4
(22)申请日 2013.12.11
(30)优先权数据
61/735,847 2012.12.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.08.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2013/050953 2013.12.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/089700 EN 2014.06.19
(71)申请人 多伦多大学理事会
地址 加拿大多伦多
(72)发明人 沃伦·切·沃·陈 凯文·明
(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102
代理人 陈卫 郑永泉
(51)Int.Cl.
G01N 21/64(2006.01)
G01N 33/536(2006.01)
G01N 33/58(2006.01)

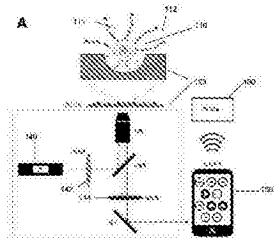
权利要求书3页 说明书17页 附图8页

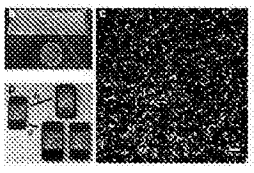
(54)发明名称

基于无线通信设备的检测系统

(57)摘要

本发明组合了条码技术与便携式无线通信设备的最新进展以设计简单和低成本的基于芯片的多路无线检测系统。该系统能够在几分钟内同时分析多个感兴趣的目标，并能用于包括医药、农业和环境等广泛领域的病原体或污染物检测。





CN 105378460 A

1. 一种用于同时鉴别多个感兴趣的目标的检测系统，该系统包括：

多路检测器，包括不同的初级和次级标签群，每个初级标签群被结合至特异性针对感兴趣目标的配体，当暴露于激发源时每个初级标签群能够发射对应于结合的目标特异性配体的第一信号，次级标签能够结合至另一目标特异性配体并在暴露于激发源时发射第二信号，在感兴趣的目标的存在下第一和第二信号的组合产生总信号；和

便携式无线通信设备，包括：(i) 用于捕捉第一和第二信号的图像捕捉装置，和 (ii) 用于分析所捕捉信号的处理装置，从而当捕捉到对应所述目标的总信号时发生对感兴趣目标的鉴别。

2. 权利要求 1 的系统，其中初级和次级标签包括条码、金属、半导体或基于有机物的纳米结构或分子、有机染料或其组合。

3. 权利要求 1 的系统，其中配体包括基于核苷酸的配体、基于氨基酸的配体、基于多糖的配体、基于蛋白质的配体、抗原、抗体、和激素或其它有机或无机分子。

4. 权利要求 1 的系统，其中第一和第二信号是光信号，且其中该系统进一步包括用于激发初级和次级标签的激发源，和用于从激发的初级和次级标签收集发射光信号的光学装置。

5. 权利要求 1 的系统，其中第一和第二信号是光信号，且其中便携式无线通信设备进一步包括用于激发初级和次级标签的激发源和用于从激发的初级和次级标签收集发射光信号的光学装置。

6. 权利要求 1 的系统，其中初级标签是条码。

7. 权利要求 6 的系统，其中条码被偶联至静态基质或通过动态基质在溶液中流动。

8. 权利要求 7 的系统，其中基质是选自玻璃、纸、纤维素或塑料的静态基质。

9. 权利要求 7 的系统，其中基质是动态基质，该动态基质包括微通道或毛细管网。

10. 权利要求 7 的系统，其中基质包括具有能够接收条码和次级标签群的多个缺口的表面或其上沉积条码和次级标签的基本上平的表面。

11. 权利要求 1 的系统，其中第一和第二信号是光信号，且其中该系统进一步包括物镜装置用于收集第一和第二光学信号。

12. 权利要求 1 的系统，其中无线通信设备包括通信装置，用于向远程位置 (i) 通过网络系统传输捕捉的信号，(ii) 通过网络系统传输捕捉信号的分析结果或 (iii) 通过网络系统传输捕捉信号和捕捉信号的分析结果。

13. 权利要求 1 的系统，其中捕捉信号的分析结果包括样品中多个目标的定量。

14. 权利要求 1 的系统，其中多个目标包括单细胞和多细胞微生物，无机分子和有机分子。

15. 权利要求 14 的系统，其中有机分子包括肽、蛋白质、寡糖、脂质、基因、核酸序列、氨基酸序列、RNA 序列和 DNA 序列且其中无机分子包含金属原子。

16. 权利要求 1 的系统，其中图像捕捉装置是能够将来自初级和次级标签的信号成像的相机。

17. 权利要求 1 的系统，其中所述处理器装置包括在执行的时候进行操作使得处理装置区分第一和第二信号的指令，用以例如鉴别样品中的目标或感兴趣的目标并定量所述目标或多个目标。

18. 权利要求 6 的系统，其中条码包括量子点。

19. 权利要求 1 的系统，其中便携式无线通信设备是智能手机、计算机、平板电脑或手表。

20. 一种用于在样品中同时检测多个感兴趣的目标存在的方法，该方法包括 :(a) 将样品与多路检测系统接触，该多路检测系统能够根据与多个感兴趣的目标的相互作用产生不同的信号，每个信号对应于所述多个目标的一个 ;(b) 通过便携式无线通信设备收集信号 ;和 (c) 使用便携式无线通信设备分析收集的信号以鉴别样品中多个感兴趣目标的存在。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述多路检测系统包括针对多个感兴趣的目标的每一个的不同的初级和次级标签群，每个初级标签群被结合至特异性针对多个感兴趣的目标之一的配体，当暴露于激发源时每个初级标签群能够发射对应结合的配体的第一信号，且次级标签能够结合至另一目标特异性配体并在暴露于激发源时发射第二信号，在感兴趣的目标的存在下每个群的第一和第二信号的组合产生总信号，且其中在步骤 (b) 之前该方法进一步包括将多路检测系统与样品暴露于激发源以产生对应感兴趣目标的第一和第二信号的不同群，从而当对应样品中一个目标的总信号被收集时鉴别该目标的存在。

22. 权利要求 21 的方法，其中在暴露于激发源之前所述方法进一步包括至少一个洗涤步骤以去除未结合的材料。

23. 权利要求 20、21 或 22 的方法，其中步骤 (c) 的分析包括定量样品中的多个目标。

24. 权利要求 22 的方法，其中初级和次级标签包括条码、金属、半导体或基于有机物的纳米结构和分子、有机染料或其组合。

25. 权利要求 22 的方法，其中配体包括基于核苷酸的配体、基于氨基酸的配体、基于多糖的配体、基于蛋白质的配体、抗原、抗体、和激素和其它有机和无机分子。

26. 权利要求 22 的方法，其中初级标签是条码。

27. 权利要求 26 的方法，其中条码偶联至静态基质或通过动态基质在溶液中流动。

28. 权利要求 27 的方法，其中基质是静态基质且其中该静态基质包括具有 (i) 能够接收多路检测系统的多个缺口的表面或 (ii) 其上沉积多路检测系统的基本上平的表面。

29. 权利要求 27 的方法，其中基质是选自玻璃、纸、纤维素或塑料基质的静态基质。

30. 权利要求 26 的系统，其中基质是动态基质，该动态基质包括微通道或毛细管网。

31. 权利要求 20、21 或 22 的方法，其中步骤 (b) 包括 :(i) 在第一终端收集信号，和 (ii) 通过网络系统将信号传输至第二终端 ;且其中步骤 (c) 包括在所述第一终端、在所述第二终端或在所述第一和第二终端分析信号。

32. 权利要求 31 的方法，其中第二终端在第一终端的远程位置。

33. 权利要求 32 的方法，其中第二终端包括第一终端的多个远程位置。

34. 权利要求 20、21 或 22 的方法，其中所述多个目标包括单细胞和多细胞微生物，无机分子和有机分子。

35. 权利要求 34 的方法，其中有机分子包括肽、蛋白质、寡糖、脂质、基因、核苷酸序列、氨基酸序列、RNA 序列和 DNA 序列且其中无机分子包括金属离子。

36. 用于同时检测多个感兴趣的目标的条码集，该条码集包括 :(a) 具有表面的基质 ;和 (b) 偶联至表面的不同条码群，每个条码群具有特异性针对多个目标之一的配体。

37. 权利要求 36 的集，其中所述条码集是便携式的。

38. 权利要求 36 的集，其中基质的表面包括能够接收不同条码群的多个缺口。

39. 权利要求 36 的集，其中基质的表面包括其上沉积不同条码群的基本上平的表面。

40. 权利要求 36 的集，其中基质是选自玻璃、纸、纤维素或塑料基质的静态基质。

41. 一种生产用于同时检测多个目标的条码集的方法，该方法包括：(a) 提供具有能够沉积条码的表面的基质；(b) 将基质的表面与不同的条码群接触，和 (c) 允许不同的条码群附着至基质的表面。

42. 权利要求 41 的方法，其中基质的表面包括能够接收多路检测系统的多个缺口。

43. 权利要求 41 的方法，其中基质的表面包括其上沉积多路检测系统的基本上平的表面。

44. 权利要求 41 的方法，其中基质是选自玻璃、纸、纤维素或塑料基质的静态基质。

基于无线通信设备的检测系统

技术领域

[0001] 本公开内容涉及信息管理、目标检测和决定支持领域，更具体的，涉及组合条码技术与无线通信设备，例如智能手机、平板电脑、个人设备助手或计算机技术来获得和分析并传输数据的系统和方法。特别的，本发明将条码技术与无线通信设备技术进行组合以设计一种基于芯片的多路检测系统，来分析和追踪疾病标志物、病原体、污染物或感兴趣的其他有机或无机目标的存在，并将收集的数据无线传输至指定位置或多个位置。

背景技术

[0002] 互联网技术、社交媒体和智能手机已经显著改变了全世界人群的交流方式。世界的一部分发生的事件的相关信息可以即刻在全球传播。然而，这些新兴交流策略尚未与检测设备充分整合以简化检测过程并允许对病原体、疾病标志物、污染物或其他感兴趣的有机或无机目标进行全球监控。在与疾病相关的实例中，由于成本限制、对稳定并复杂的基础设施的需求、设备规模和对能够解读诊断结果的熟练技术人员的需要，世界上很多人生活在不能获得新兴的分子检测系统的资源贫乏的环境中 (1-3)。结果，未诊断或误诊断的疾病会传播并变得药物耐受，导致经济负担、发病和死亡。将诸如智能手机——其购买量在2011年达到全球59亿台 (4)——和平板电脑等的无线通信设备与最先进的多路检测设备相整合将减轻这些问题，并允许对疾病或污染物传播的全球监控。

[0003] 至今，“智能”移动设备例如智能手机仅被用于成像侧流免疫分析上的测试线、荧光素标记的细菌和组织染料 (5-7)。然而，由于差的分析灵敏度，这些成像技术不能检测感染或污染早期，也不能以高通量的方式检测不同菌种或病原体，因为它们不能同时检测多个生物标志物。为了克服这些限制，已有人努力将手机技术与例如测流免疫分析和分子病理学的简单护理点 (point-of-care) 设备进行结合 (4-8)。但是这些技术具有差的分析灵敏度和受限的多功能。虽然文献中公开了组合的智能手机和成像技术，但是在将例如智能手机和平板电脑的无线通信设备技术与能够增加检测过程通量并能够同时检测例如病原体或污染物菌种或突变的多个目标的更复杂的目标检测方案进行偶联方面仍存在巨大挑战。

[0004] 条码技术的一个例子，量子点 (QD) 条码技术，在分子检测中是通用的，并能够检测多个目标，包括基因组或蛋白质组目标 (12-14)。由于在例如用于创建条码的微珠中引入了不同的发射QD，每个条码可包括一个独特的光学特征。然后使该条码缀合配体，所述配体能够特异性结合并鉴别例如分子、病原体标志物、污染物或整个病原体的感兴趣的目标。随着条码（初级标签）鉴定了感兴趣的目标，次级标签在目标上的结合表明通过条码配体对目标进行了成功捕捉。包括初级标签/条码信号和次级标签信号的光学特征显示对样品中感兴趣的目标的阳性检测。在点护理检测中使用这些条码的一个挑战是需要熟练技术人员来运行该检测，因为微珠数量、孵育时间和微珠稳定性的微小差异可能影响分析结果。将这些条码整合至一个芯片上的能力将减轻这些问题。在芯片上整合的微珠目前被用于序列分析，但是最终芯片的成本很高，因为微珠被整合在光学纤维的末端 (15)。因而，目前的荧

光微珠整合技术对于在远程或资源受限环境下的常规检测应用而言是不划算的。

[0005] 目前尚没有能够有效地同时检测多个感兴趣目标的将无线通信设备和条码技术进行组合的系统。特别的，目前尚没有能够有效并同时检测多个污染物或病原体并将污染物或病原体种类进行区分的将无线通信设备和条码技术进行组合的系统。因此，本发明的一个目标是提供一种组合条码技术和便携式无线通信设备技术的系统，以同时检测多个目标，例如污染物、疾病标志物、病原体、突变、肽、基因组目标、多糖和其它可能感兴趣的有机或无机目标。

[0006] 本发明进一步的一个目标是提供一种组合便携式无线通信设备技术和条码技术的系统和方法，且该系统和方法适于收集来自样品的信息、分析该信息并使用分析结果来同时鉴定多个感兴趣的目标。

[0007] 本发明进一步的一个目标是提供一种组合便携式无线通信设备技术和条码技术的系统和方法，且该系统和方法能够将收集的信息无线传输至远程站点用于存储或对信息进行进一步分析。

[0008] 本发明进一步和其它的目标将从下述发明概述、发明讨论和实施方式及其实施例中实现。

发明内容

[0009] 在本发明中提供了系统和方法，其组合了无线通信设备和条码多路检测系统，例如量子点条码，以能够同时检测多个有机和无机的感兴趣的目标，包括样品中的病原体、病原体标志物、肽、蛋白质组和基因组目标、多糖、有机和无机分子等等。本发明的系统允许使用具备相机以对来自多路检测系统的光信号进行成像的便携式无线通信设备对多个感兴趣的目标进行定量分析。本发明的系统和方法的无线功能允许它们被用于远程设置，能够对收集的数据和结果进行无线传输用于存储和 / 或在远程位置的进一步解读，并允许对目标进行绘图和监控。进一步，本发明的系统和方法允许全球实时监控病原体或污染物扩散和迁移，并能够潜在地简化流行病学绘图。

[0010] 在一个实施方式中，本发明涉及用于同时鉴定多个感兴趣的目标的检测系统。在一个实施方式中，该系统包括 :(a) 多路探测器，包括不同的初级和次级标签群 (population)，每个初级标签群被结合至特异性针对感兴趣的目标的配体，当暴露于激发源时，每个初级标签群能够发射对应于结合的目标特异性配体的第一信号，且当暴露于激发源时，次级标签能够结合至目标特异性配体并发射第二信号，在感兴趣的目标的存在下，一个群的第一和第二信号的组合产生了一个总信号 ;和 (b) 便携式无线通信设备，包括 : (i) 用于捕捉第一和第二信号的图像捕捉装置，和 (ii) 用于分析所捕捉的信号的处理装置，从而当捕捉到对应所述目标的总信号时发生对感兴趣的目标的鉴别。

[0011] 在本发明系统的一个实施方式中，初级和次级标签包括条码、金属、半导体或基于有机物的纳米结构或分子、有机染料或其组合。

[0012] 在本发明系统的另一个实施方式中，配体包括基于核苷酸的配体、基于氨基酸的配体、基于多糖的配体、基于蛋白质的配体、抗原、抗体、和激素或其它有机或无机分子。

[0013] 在本发明系统的另一个实施方式中，第一和第二信号是光信号，且其中系统进一步包括用于激发初级和次级标签的激发源，和用于从激发的初级和次级标签收集发射光信

号的光学装置。

[0014] 在本发明系统的另一个实施方式中，第一和第二信号是光信号，且其中便携式无线通信设备进一步包括用于激发初级和次级标签的激发源和用于从激发的初级和次级标签收集发射光信号的光学装置。

[0015] 在本发明系统的另一个实施方式中，初级标签是条码。

[0016] 在本发明系统的另一个实施方式中，条码被偶联至静态基质或通过动态基质在溶液中流动。

[0017] 在本发明系统的另一个实施方式中，基质是静态基质，包括具有 (i) 能够接收多路检测系统的多个缺口的表面或 (ii) 其上沉积多路检测系统的基本上平的表面。

[0018] 在本发明系统的另一个实施方式中，基质是选自玻璃、纸、纤维素或塑料的静态基质。

[0019] 在本发明系统的另一个实施方式中，基质是动态基质，该动态基质包括微通道或毛细管网。

[0020] 在本发明系统的另一个实施方式中，基质包括具有能够接收条码和次级标签群的多个缺口的表面或其上沉积条码和次级标签的基本上平的表面。

[0021] 在本发明系统的另一个实施方式中，第一和第二信号是光信号，且其中该系统进一步包括物镜装置用于收集第一和第二光学信号。

[0022] 在本发明系统的另一个实施方式中，无线通信设备包括通信装置，用于向远程位置 (i) 通过网络系统传输捕捉的信号、(ii) 通过网络系统传输捕捉信号的分析结果或 (iii) 通过网络系统传输捕捉信号和捕捉信号的分析结果。

[0023] 在本发明系统的另一个实施方式中，捕捉信号的分析结果包括样品中多个目标的定量。

[0024] 在本发明系统的另一个实施方式中，该多个目标包括单细胞和多细胞微生物，无机分子和有机分子。

[0025] 在本发明系统的另一个实施方式中，有机分子包括肽、蛋白质、寡糖、脂质、基因、核酸序列、氨基酸序列、RNA 序列和 DNA 序列，且其中无机分子包含金属原子。

[0026] 在本发明系统的另一个实施方式中，图像捕捉装置是能够对来自初级和次级标签的信号成像的相机。

[0027] 在本发明系统的另一个实施方式中，处理器装置包括在执行的时候进行操作使得处理装置区分第一和第二信号的指令，例如用以鉴别样品中的目标或感兴趣的目标并定量所述目标或多个目标。

[0028] 在本发明系统的另一个实施方式中，条码包括量子点。

[0029] 在本发明系统的另一个实施方式中，便携式无线通信设备是智能手机、计算机、平板电脑或手表。

[0030] 在一个实施方式中，本发明涉及一种用于在样品中同时检测多个感兴趣的目标存在的方法，该方法包括 :(a) 将样品与多路检测系统接触，该多路检测系统能够根据与多个感兴趣的目标的相互作用产生不同的信号，每个信号对应于所述多个目标的一个 ; (b) 通过便携式无线通信设备收集信号 ;和 (c) 使用便携式无线通信设备分析收集的信号以鉴别样品中多个感兴趣的目标的存在。

[0031] 在本发明的方法的一个实施方式中，多路检测系统包括针对多个感兴趣的目标的每一个的不同的初级和次级标签群，每个初级标签群被结合至特异性针对多个感兴趣的目标之一的配体，当暴露于激发源时每个初级标签群能够发射对应结合的目标特异性配体的第一信号，且次级标签能够结合至目标特异性配体并在暴露于激发源时发射第二信号，在感兴趣的目标的存在下每个群的第一和第二信号的组合产生总信号，且其中在步骤 (b) 之前该方法进一步包括将多路检测系统与样品暴露于激发源以产生对应感兴趣的目标的第一和第二信号的不同群，从而当对应样品中一个目标的总信号被收集时鉴别该目标的存在。

[0032] 在本发明的方法的另一个实施方式中，在暴露于激发源之前所述方法进一步包括至少一个洗涤步骤以去除未结合的材料。

[0033] 在本发明的方法的另一个实施方式中，步骤 (c) 的分析包括定量样品中的多个目标。

[0034] 在本发明的方法的另一个实施方式中，初级和次级标签包括条码、金属、半导体或基于有机物的纳米结构和分子、有机染料或其组合。

[0035] 在本发明的方法的另一个实施方式中，配体包括基于核苷酸的配体、基于氨基酸的配体、基于多糖的配体、基于蛋白质的配体、抗原、抗体、和激素和其它有机和无机分子。

[0036] 在本发明的方法的另一个实施方式中，初级标签是条码。

[0037] 在本发明的方法的另一个实施方式中，条码被偶联至静态基质或通过动态基质在溶液中流动。

[0038] 在本发明的方法的另一个实施方式中，基质是静态基质包括具有 (i) 能够接收多路检测系统的多个缺口的表面或 (ii) 其上沉积多路检测系统的基本上平的表面。

[0039] 在本发明的方法的另一个实施方式中，基质是选自玻璃、纸、纤维素或塑料基质的静态基质。

[0040] 在本发明的方法的另一个实施方式中，基质是动态基质，该动态基质包括微通道或毛细管网。

[0041] 在本发明的方法的另一个实施方式中，步骤 (b) 包括 :(i) 在第一终端 (end) 收集信号，和 (ii) 通过网络系统将信号传输至第二终端 ;且其中步骤 (c) 包括在所述第一终端、在所述第二终端或在所述第一和第二终端分析信号。

[0042] 在本发明的方法的另一个实施方式中，第二终端在第一终端的远程位置。

[0043] 在本发明的方法的另一个实施方式中，第二终端包括第一终端的多个远程位置。

[0044] 在本发明的方法的另一个实施方式中，多个目标包括单细胞和多细胞微生物，无机分子和有机分子。

[0045] 在本发明的方法的另一个实施方式中，有机分子包括肽、蛋白质、寡糖、脂质、基因、核苷酸序列、氨基酸序列、RNA 序列和 DNA 序列且其中无机分子包括金属离子。

[0046] 在一个实施方式中，本发明涉及用于同时检测多个感兴趣的目标的条码集 (assembly)，该条码集包括 :(a) 具有表面的基质 ;和 (b) 偶联至表面的不同条码群，每个条码群具有特异性针对多个目标之一的配体。

[0047] 在本发明的条码集的一个实施方式中，该集是便携式的。

[0048] 在本发明的条码集的另一个实施方式中，基质的表面包括能够接收多路检测系统

的多个缺口。

[0049] 在本发明的条码集的另一个实施方式中，基质的表面包括其上沉积多路检测系统的基本上平的表面。

[0050] 在本发明的条码集的另一个实施方式中，基质是选自玻璃、纸、纤维素或塑料基质的静态基质。

[0051] 在一个实施方式中，本发明是一种生产用于同时检测多个目标的条码集的方法，该方法包括：(a) 提供具有能够的表面的基质

Apple iPhone™ 4S 智能手机，曝光时间 0.05 s。(D) 显示了将图 C（图 D 左侧）的智能手机拍摄的光学图像无线传输至其它设备的照片。

[0052] 图 2 显示了分析和灵敏度曲线的图像。(A) 芯片上沉积的绿、黄和红条码的显微照片（原始为彩色，用箭头突出示例，在图 8 中分别鉴定为 B1、B4 和 B6），用 iPhone™ 4S 智能手机相机成像（荧光显微镜参数：20x 物镜，NA=0.50，λex=350/50，λem=430LP，曝光时间 =0.05 s）。使用亮视野显微镜可视化微孔。对荧光和亮视野图像进行叠加。(B) 分析后，将无线通信设备相机获得的微珠条码的荧光图像与目标分析物和次级标记的探针进行结合（荧光显微镜参数：20x 物镜，NA=0.50，λex=640/40，λem=692/40，曝光时间 =1 s）。绿珠和红珠（原始为彩色）呈现，但黄珠（用箭头突出的示例）未呈现。这表明 T1 和 T6 基因组目标在样品中存在，T4 不存在。值得注意的是，条码上的白色斑点是由来自在 B6 中浸渍的 Alexa647 荧光团和 640 nm 量子点的高组合强度的过度曝光所致。(C) 在此仅作为感染性疾病应用的示例使用的甲型流感病毒 H1N1 (T1)、H3N5 (T2) 和 H5N1 (T3) 和乙型肝炎 420 (T4) 和丙型肝炎 (T5) 遗传生物标志物的灵敏度曲线。所有误差线均基于来自 3 个重复的标准差进行计算。

[0053] 图 3 描述了在此仅作为感染性疾病应用的示例使用的 5 个感染性疾病目标链 T1-T5 以及一个阴性对照 T6 和一个阳性对照 T7 的多路检测。(A) 仅 T7 在杂交过程中呈现。(B) 目标 T1、T3、T5 和 T7 在杂交过程中呈现。(C) 目标 T2、T4，和 T7 在杂交过程中呈现。(D) 目标 T1、T2、T3 和 T7 在杂交过程中呈现。(E) 目标 T4、T5 和 T7 在杂交过程中呈现。(F) 除 T6 外的所有目标在杂交过程中呈现。注意在 F 中除 T6 外，A-F 中的所有其它值均被标准化为其对应的正值。

[0054] 图 4 是显示如根据本发明一个实施方式的 2.0 μm（圆圈）和 2.9 μm（方块）微珠的浓度和大小所确定的微孔芯片的微珠条码填充效率的图像。

[0055] 图 5 是显示量子点条码强度的图像。已知的条码强度对所有 7 个条码进行分布 (profile)。从左至右，竖条表示在滤片 λem=530/10（白色）、λem=580/10（线条）、λem=640/10（方格）和 λem=692/40（黑色）下观察到的强度。误差线基于来自 3 个重复的标准差进行计算。

[0056] 图 6 显示了针对专门设计的序列（捕捉序列：5'-GAG ACC ATC AAT GAG GAA GCT GCA GAA TGG GAT-3'；目标序列：5'-CGG CGA TGA ATA CCT AGC ACA CTT A CTA AT CCC ATT CTG CAG CTT CCT CAT TGA TGG TCT C-3'；次级探针序列：5'-Alexa647-TAA GTG TGC TAG GTA TTC ATC GCC G-3'），从用 (A) 电荷耦合器件 (CCD) 相机 (Retiga EXi Fast 1394, QImaging) 和 (B) iPhone™相机 (iPhone™ 4S, Apple Inc.) 拍摄的图像获得的灵敏度曲线的对比。横线表示检出限，两种情况下均为 ~15 fmol。所有误差线均基于来自 3 个重复的

标准差进行计算。

[0057] 图 7 是显示每个条码的捕捉链缀合效率 (conjugation efficiency) 的图像。误差线基于来自 2 个重复的标准差进行计算。

[0058] 图 8 是 DNA 序列及其对应的条码图像和对应的条码谱的列表。

具体实施方式

[0059] 在本说明书和随后的权利要求书中将引用被定义为具有如下含义的多个术语。所有的数字类指定，例如，尺寸和重量，包括范围，都是近似值，其典型地可以按照 0.1、1.0 或 10.0 的增量进行变化 (+) 或 (-)。所有的数字类指定都可被理解为在前面被术语“约”所修饰。

[0060] 除非上下文另有说明，否则单数形式“一”、“一个”和“该”包括了复数的引用。

[0061] 术语“包括”表示任何列举的元素都是必然被包括的，且其它元素可以可选地被包括。“基本上由……组成”表示任何列举的元素都是必然被包括的，在实质上影响所列举元素的基础和新颖特性的元素被排除，而其它元素可以可选地被包括。“由……组成”表示除了所列举的元素之外的所有元素均被排除。由这些术语的每一个所定义的实施方式均落入本发明的范围。

[0062] 本文使用的术语“配体”或“探针”指表现出选择性和 / 或特异性结合至一种或多种有机或无机目标的捕捉分子、有机或无机或分子组。目标可包括受体的特异性位点、探针、另一分子 (有机或无机) 或目标或整个微小生物 (单细胞或多细胞) 例如病原体。对一个给定的目标可以存在多于一个配体。配体在其与目标的结合亲和力方面可以彼此不同。配体的实例包括基于核苷酸的配体 (适体、寡核苷酸，等等)、基于氨基酸的配体 (抗体、肽、蛋白质、酶、受体，等等)、基于多糖的配体 (例如透明质酸)、抗原、激素 (包括肽激素)、脂质 / 磷脂激素和单胺激素，和能够结合至有机或无机目标的任何其它分子。

[0063] “多路的”可被理解为同时检测多于一个目标的存在的能力。多路检测系统可以包括条码、金属、半导体或基于有机的纳米结构或分子 (例如有机染料)。

[0064] 条码可以包括能够区分目标的任何种类的结构或系统。可被用于本发明的条码包括磁性、光学 (即量子点、有机染料)、电学、DNA 和平版条码。

[0065] 本文使用的“量子点”(QD) 是一种半导性光致发光材料，如本领域已知的 (例如，参见 Alivasatos，Science 271:933-937 (1996))。QD 的非限制性示例包括 :CdS 量子点、CdSe 量子点、CdSe/CdS 核 / 壳 (core/shell) 量子点、CdSe/ZnS 核 / 壳量子点、CdTe 量子点、PbS 量子点和 / 或 PbSe 量子点。如本领域技术人员已知的，CdSe/ZnS 表示 ZnS 壳包被在一个 CdSe 核的表面 (即 :“核 - 壳”量子点)。核 - 壳 QD 的壳材料具有较高的能带隙并使核 QD 表面钝化，导致比核 QD 更高的量子产率和更高的稳定性和更广的应用。

[0066] 量子点条码指含有不同荧光半导体纳米晶体组合的微珠。每个微珠可以包括一个独特的光学特征，其鉴别表面缀合的分子。使用 5-6 种不同颜色的量子点和 6 种强度水平能够设计约 10,000-40,000 种不同的光学条码 (9)。这使得显著的多路技术成为可能，且这些条码可以在流式细胞仪中 (10 - 13) 或微流体通道中 (14、15) 以及通过其它手段检测目标。

[0067] 无线通信设备指使用射频、红外线、微波或其它类型的电磁或声波代替电线、电缆

或光纤来传输或接收信号或数据的任何设备，且该设备包括用于获取图像、信号或数据的相机和用于保持对所述图像、信号或数据进行分析的电子元件。无线通信设备包括智能手机、平板电脑、智能手表、个人助理设备和便携式计算机。

[0068] 本发明显示多路检测系统(例如条码)与便携式无线通信设备(例如智能手机或平板电脑技术)的整合可被用在一个用于多路检测和鉴别感兴趣的目标并无线传输数据的系统中。该检测设备致力于将便携式无线通信设备与多路检测系统进行整合，其中光器件、激发源和检测器可被组合入一个目前智能手机或平板电脑大小的单一设备中。

[0069] 参见图 1A，在一个实施方式中，系统 100 可以包括用于在其上接收该多路检测系统的基质 120，和无线通信设备 130。如图 1A 所示，多路检测系统可包括初级标签 110、次级标签 112 和偶联至初级标签 110 和次级标签 112 的感兴趣目标的配体 111。次级标签可以被偶联至与结合至初级标签的配体相同的目标特异性配体，或结合至另一目标的特异性配体。在图 1 中，初级标签 110 表现为量子点条码。应当理解可以使用其它多路系统，并可以使用 QD 条码之外的其它初级标签。系统还可以包括用于激发初级标签 110 和次级标签 112 的激发源 140 ；具有物镜 150 以收集来自被激发的初级标签和次级标签的光学发射的光学装置 ；用于过滤来自激发源的光线和来自初级标签和次级标签的发射的一个或多个滤光器 142、144。系统 100 还可以包括用于无线接收由无线通信设备 130 收集的数据用以存储或进一步分析所收集数据的中央集成设备 160。

[0070] 可用于本发明系统的激发源的示例可包括发光二极管、激光二极管、激光和灯口(lamp burners)。非发光激发源的示例包括电势源。可用于本发明系统的光学滤光器可以包括吸收玻璃滤光器、染料滤光器、彩色滤光器、分色镜、分光镜和薄膜偏振片。

[0071] 在本发明的一个实施方式中，无线通信设备自身可以包括至少一个激发源、用于收集来自激发的条码和次级标签的发射的物镜和一个或多个滤光器。

[0072] 基质可以是任何适于接收多路检测系统且可以便携的基质。基质可以是静态或动态的。静态基质可以包括能够接收多路检测系统或能够沉积条码的基本上平的表面。基质可以包括载玻片、纤维素膜、纸、塑料膜或片等等。动态基质可以包括微通道或毛细管网。为方便起见，静态基质还可包括一个或多个孔，其能够帮助组织该多路检测系统。这些孔还可以用于将该多路系统保持在基质上。在静态基质的情况下，多路检测系统可被偶联至基质表面。在动态基质的情况下，多路检测系统可以在溶液中流过基质。

[0073] 参见图 1A，为了开发这一用于多路检测和 / 或鉴定和无线数据传输的系统 100，设计了一个多芯片平台，其可便携，可以通过将初级标签(例如条码 110)集合在微制造的基质 120 (例如玻片)表面上进行制造。图 1A 中描述的基质包括多个用于接收初级标签和次级标签的缺口或微孔 115。可将样品添加至基质 120，并可使用无线通信设备 130 收集或捕捉来自基质 120 的信号 125，去卷积该信号并将信号与特定目标关联，例如病原体、疾病标志物或污染物。

[0074] 特异性针对感兴趣目标的配体或探针可以被缀合或连接至初级标签(例如条码)和次级标签。配体或探针与条码或次级标签的缀合或连接将取决于所使用的配体或探针的类型及条码和次级标签的表面化学。缀合技术的示例包括碳化二亚胺介导、马来酰亚胺、n- 羟基琥珀酰亚胺或巯基 - 金属化学、DNA- 杂交、抗原 - 抗体、蛋白质 - 小分子 (链霉亲和素 - 生物素)。例如，基于寡核苷酸的配体或探针可以使用碳化二亚胺化学被缀合至每个条

码的表面。

[0075] 继续参见图 1A，具有缀合的配体 111 的条码 110 可以随后在包括多个缺口 115 的微制造的芯片或基质 120 上排列。缺口可以是 3 μm 直径的孔 (MicroPep)。可以使用任何本领域已知的技术制备条码珠，例如流聚焦技术 (16)。条码珠可以具有任何合适的大小。例如，它们可以具有与微孔直径相似的大小。可以将包括条码板的溶液，特别是缓冲溶液，直接添加到芯片上。然后可以使得条码被放置进每个孔中。在这些微珠被结合至微芯片后，在随后的分析过程中它们不容易从芯片上解除吸附。如图 4 所示，芯片上的填充效率由珠子的浓度和大小决定。在我们的分析中，我们通常使用 25-50% 的填充效率以使得捕捉分子最大化地进入珠表面。图 1B 是一个典型的微孔芯片的照片，其在每个孔中含有不同的条码。黑箭头显示芯片上待分析的一滴样品。可以允许样品在室温或更高温度下被孵育。然后可以清洗芯片并使用无线通信设备成像。图 1C 是由在芯片表面上装配的量子点条码的无线通信设备捕捉到的图片的微图。

[0076] 在另一个实施方式中，本发明的系统可被用于一种在样品中同时检测多个感兴趣目标的方法。在一个实施方式中，该方法可以包括 :(a) 将样品与其中分布有多路检测系统的基质接触，该多路检测系统能够根据与多个感兴趣的目标的相互作用产生不同的信号，每个信号对应于一个特定的目标 ;和 (b) 用无线通信设备从基质收集信号 ;和 (c) 使用无线通信设备分析收集的信号，从而可以同时检测样品中的多个目标。在本发明的一个方面步骤 (c) 的分析包括定量样品中的多个目标。

[0077] 申请人开发了一种简单的方法用以在芯片表面装配初级标签，例如微珠条码。在一个实施方式中，可以微制造具有 3.0 μm 直径的缺口的载玻片。然后可以将具有不同组合荧光团的微珠条码溶液 (其可以是约 3.0 μm 大小的微珠) 添加至芯片。微珠条码可以放置于每个微孔中。一旦结合至微孔，这些微珠即不会从微孔表面解吸附。微珠可以通过非共价力固定。条码的浓度和大小可以决定填充效率 (见图 4)。

[0078] 参见图 1A，可以将目标样品，例如受试者的生物学液体或环境样品，在含有初级标签 110、配体 111 和次级标签 112 的芯片 120 上孵育适度的时间，例如约 20 分钟，清洗或洗涤，并置于系统上进行分析。然后可以使用激发源 140 激发初级标签和次级标签。可以通过物镜收集光学信号。光学信号可以用一个或多个滤光器 142、144 进行过滤，用无线通信设备相机 130 成像，并用无线通信设备 130 进行分析或在中央集成设备 160 中或通过其它无线通信设备或两者进行远程分析。在本发明的一个实施方式中，可以使用定制算法将所收集的信号数据解读为阳性 (+) 或阴性检测 (-)，所述算法可以被整合 / 下载 / 上传至无线通信设备。数据可以被无线传输至中央集成设备用于进一步的评价、存储或用于绘制和追踪病原体或污染物。当配体结合目标且微珠的总信号包括了初级标签和次级标签两者时发生特定目标的检测。

[0079] 在本发明的方法的一个实施方式中，初级标签可被结合至第一配体且次级标签可被结合至第二配体，两种配体均具有针对同一感兴趣目标的亲和性。第一和第二配体可以相同或不同。在适当的孵育时间后，可以在标签结合到配体之后增加洗涤步骤以洗脱任何未结合的材料。然后可以将目标样品与结合至目标特异性配体的初级标签和结合至目标特异性配体的次级标签一起孵育一段适当的孵育时间。孵育后可以伴随着至少一个洗涤步骤以去除任何未结合的材料。然后洗涤步骤可以伴随着激发和分析步骤。

[0080] 在另一个实施方式中，次级标签可以被添加至结合至配体的初级标签。随后可以将目标样品与结合至配体的初级标签和次级标签一起孵育一段适当的孵育时间。可以在添加样品后进行洗涤步骤用以去除任何未结合的材料。可以在洗涤步骤后进行激发步骤。

[0081] 在另一个实施方式中，目标样品可以与结合至配体的初级标签一起孵育一段适当的孵育时间。然后可以加入次级标签孵育一段适当的孵育时间。可以在加入次级标签之前、加入次级标签之后或加入次级标签之前和之后进行洗涤步骤用以去除任何未结合的材料。可以在洗涤步骤后进行激发步骤。

[0082] 图 1B 显示了根据本发明的一个实施方式的微孔芯片，其在每个孔中具有不同的条码。在生物学分析中，样品，例如约 10 μL，可以被置于或加至芯片上（见黑箭头），40 ℃下孵育，洗涤，并成像。参见图 1C，无线通信设备相机可以捕捉芯片上集成的不同条码的图像（在图 1C 的情况下，5 个不同的 QD 条码）。这些条码可以被合适的激发源激发，例如 Hg 灯（λex=350/50）。光学信号可以通过物镜收集。光学信号可以用例如 430 nm 长通滤片进行过滤，并用无线通信设备成像，例如 Apple iPhone™ 4S 智能手机，曝光时间 0.05 s。图 1D 显示了光学图像向其它无线通信设备的无线传输。

[0083] 本发明的优点包括：(a) 与其它基于手机的方法相比检测一个或多个（即多于一个）目标（即多路）；(b) 与储存在溶液中的那些相比，条码在芯片上的沉积允许更高的条码可携带性并降低了条码分析过程中的步骤数量；(c) 设备自身也将是便携式的（并不比其将要连接的智能手机或平板电脑的体积大很多）；(d) 目前用于鉴别量子点条码的检测平台需要昂贵的设备和检测器，其在远程和资源受限环境下和在野外的应用是受限制的 (12,13)；(e) 本发明的系统和方法使用简易，因为流程较少且不复杂，从而免除了对熟练技术人员的需求；和 (f) 从样品放置到获得分析结果的检测相对快速（少于 30 分钟）。

[0084] 为了帮助对本发明的理解和制备，提供了以下说明性的、非限制性的实施例。

实施例

[0085] 量子点合成

在本实施方式中，峰值发射波长 540 nm（“QD540”）的量子点 (CdSeS 合金 -ZnS 覆盖）购自 CytoDiagnostics 并按说明使用。按照已发表的流程 (18 - 20) 合成并表征了峰值发射波长 589 nm（“QD589”）和 640 nm（“QD640”）的量子点 (QD)，并在氯仿中室温储存直至使用。也可使用其它类型的 QD 纳米颗粒。

[0086] 量子点条码合成

在本实施方式中，通过以不同比例将量子点 (QD540、QD589 和 QD640) 与基于聚合物的溶液进行混合来制备 QD 条码。聚合物溶液包括 Sigma-Aldrich 的溶于氯仿的聚（苯乙烯 - 共 - 马来酸酐）(32%，异丙苯终止），聚合物浓度 4 wt%。然后将得到的量子点聚合物溶液用 Harvard Apparatus 的注射泵以 0.9 mL/ 小时的速率引入 Ingeniatrics 的喷嘴系统，并以 180 mL/ 小时的速率引入双蒸 (DD) 水作为聚焦流体。然后将喷嘴系统潜入到部分装有 DD 水的烧杯内。原位合成聚合的条码珠，该条码珠在水中形成白色胶体悬浮液。合成后，关闭阀门并过夜搅拌使珠稳定，然后进行收集。使用 35 μm BD Falcon 尼龙网滤光器帽过滤所述珠，并使用自动化的 Beckman Coulter Vi- 细胞计数器表征，4 ° C 下储存于 DD 水中直至使用。制备 7 种不同条码所需的量子点浓度见于表 2。

[0087] 微孔芯片上的条码珠沉积

为了在具有多个 3 μm 直径的孔 (MicroPep) 的载玻片上的 5 种条码珠 (图 8 的 B1、B3、B4、B5、B6) 的高分散度和微孔填充效率，对每种珠制备了浓度为 $3x10^7$ 珠 /mL 的样品。然后，将 2 μL 的每种样品混合 35 μL 的 DD 水和含 1% Tween 的 5 μL 的 DD 水，以产生 $6x10^6$ 珠 /mL 的最终混合物浓度。然后将混合物超声 5 分钟以在将 30 μL 的混合物沉积至微孔芯片之前降低珠的聚集，所述芯片用 DD 水清洗并在沉积前使其干燥。然后将芯片置于含干燥剂的封闭的干燥室中以防止尘粒污染，并随后在成像前使其干燥 2 小时。注意在混合物中增加珠浓度会增加微孔填充效率 (图 4)，但聚集的可能性更大。

[0088] 条码珠缀合和确认

通过与 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨丙基) 碳化二亚胺盐酸盐 (EDC) 反应进行 DNA 捕捉链 (即在 C1-C7 的 5' 端存在的氨基) 向其对应条码珠 (即在 B1-B7 的聚合物 170 表面的羧基) 的缀合。商购的 HPLC 纯且没有进一步纯化即使用的来自 Bio Basic Inc. 的 DNA 捕捉链在 5' 端设计有一个胺基和 12 个碱基间隔 (spacer)。它们首先在 TE 缓冲液中以 10 pmol/μL 的浓度制备并储存于 4 ° C 直至进一步使用。为了进行缀合，首先将 EDC 以 100 mg/mL 的浓度溶解于 MES 缓冲液 (pH 5,100 mM)。约 106 个珠子混合 100 μL 的该 EDC 溶液，并使其将珠的羧基活化 10 分钟。然后，2.88 μL 的该 DNA 捕捉链溶液，对应于 28.8 pmol 的 DNA，被添加至珠溶液。过夜发生反应。

[0089] 为了确认缀合，1 μL 含 5% Tween 的 DD 水被添加至该 180 珠溶液，3000 g 下离心 5 分钟。然后，提取 50 μL 的上清液。对每个条码的对照情况 (即不缀合) 进行了相同的上述缀合流程，除了加入 DD 水代替珠子。在一个黑色的 96 孔板中，向个体的孔各自加入 10 μL 来自所有 7 个缀合情况的上清液、10 μL 来自所有 7 个对照情况的上清液、以及 10 μL 仅含有 DD 水的 4 个空白情况。首先通过将用 1 μL 的 DMSO 溶解的 Invitrogen 的 SYBR 绿 I 加入 10 mL 的 TE 缓冲液将其稀释为 1:10000 的稀释液，然后将 190 μL 的该溶液添加至每个含有样品的孔。所有反应在室温孵育 15 分钟，随后使用 BMG Labtech 的酶标仪读数。然后通过将缀合情况的荧光与它们对应的不含珠的对照相比较，确定每个条码的缀合量。也就是说，较弱的信号显示较大数量的缀合。将结果转换为百分比效率 (见图 7)。

[0090] 为了结束缀合过程，在提取 50 μL 的上清液用于确认后，去除了剩余的上清液。然后，缀合的珠被用 100 μL 含 0.05% Tween 的 DD 水洗涤 195 两次并在 3000 g 下离心 5 分钟去除任何未缀合的 DNA 捕捉链。然后将缀合的珠在 100 μL 含 0.05% Tween 的 DD 水中储存直至进一步使用。

[0091] 灵敏度分析

直接在微孔芯片上对所有感染性疾病 DNA 目标链 (图 8 的 T1-T5) 及其各自缀合的条码珠 (图 8 的 B1-C1 至 B5-C5) 进行了灵敏度分析。灵敏度结果见于图 5。在 TE 缓冲液中以 0、5、10、50、100、500、1000 和 2000 fmol/μL 的递增浓度对商购的 HPLC 纯且没有进一步纯化即使用的来自 Bio Basic Inc. 的 DNA 目标链进行了制备。在 TE 缓冲液中以 100 pmol/μL 的浓度对商购的 HPLC 纯且没有进一步纯化即使用的来自 IDT DNA Technologies 的 DNA 检测链 (在 5' 端具有 Alexa647 荧光团) 进行了制备。DNA 目标和检测链样品均储存于 4 ° C 直至进一步使用。为了进行分析，针对每个分析条件将 1 μL 的缀合珠样品——对应约 104 个缀合的珠——沉积在微孔芯片上，并干燥 1 小时。然后，将 1 μL 的每种 DNA 目

标链样品与5 μL的杂交缓冲液(10x SSC,0.1% SDS,加热至60 ° C)、3 μL的DD水和1 μL的DNA检测链或DD水(用于空白条件)进行混合。这导致每种分析条件下10 μL的总杂交体积,其包括空白、0、5、10、50、100、500、1000和2000 fmol。将每种分析条件的杂交溶液沉积覆盖微孔芯片上缀合的珠点并在40 ° C下215孵育20分钟。然后将微孔芯片浸入10 mL的洗涤缓冲液中(0.5x SSC,0.1% SDS,加热至40 ° C),搅拌洗涤20 s,然后在成像前干燥5分钟。注意必须要小心从而洗涤缓冲液不会在样品点上变干和结晶。

[0092] 多路分析

对于3-重多路分析(图2A和B),将2 μL的各缀合的条码样品(B1-C1(绿)、B4-C4(黄)和B6-C6(红))——每种对应于约$2x10^4$条码——与18 μL的DD水进行混合以产生初始液的4x稀释因子。溶液用于减少在芯片上沉积后珠子的聚集,这可能在分析过程中扰乱条码分辨率。为了进行分析,对于每种分析条件将5 μL的缀合的条码混合物——对应约$1.25x10^3$缀合的珠——沉积在微孔芯片上并干燥3小时。然后,将2 μL的T1和T6(每种浓度为2 pmol/μL)混合40 μL的杂交缓冲液(10x SSC,0.1% SDS,加热至60 ° C)、14 μL的DD水和16 μL的检测链(浓度100 pmol/μL)。这导致了70 μL的总杂交体积。从中使10 μL的杂交溶液沉积覆盖微孔芯片上缀合的条码点并在40 ° C孵育20分钟。然后将微孔芯片浸入10 mL的洗涤缓冲液(0.5x SSC,0.1% SDS,加热至40 ° C),搅拌洗涤20 s,在另一份10 mL的洗涤缓冲液中再次洗涤以进一步降低非特异性结合,然后在成像前干燥5分钟。注意必须要小心从而洗涤缓冲液不会在样品点上变干和结晶。

[0093] 研究了所有5种DNA目标链(T1-T5)及其对应的缀合条码(B1-C1至B5-C5)以及阴性和阳性对照情况(分别为B6-C6和T6,和B7-C7和T7)的交叉反应性(图3A-F)。首先,将6 μL的每种缀合的条码样品——每种对应约$6x10^4$条码——与126 μL的DD水混合以以产生初始液的4x稀释因子。溶液用于减少在芯片上沉积后珠子的聚集,这可能在分析过程中扰乱条码分辨率。为了进行分析,对于每种多路情况将8 μL的稀释的缀合条码混合物——对应约$2x10^4$缀合的珠——沉积在微孔芯片上并干燥4小时。然后,将2 μL的每个目标情况(阴性条件为DD水,阳性条件为浓度2 pmol/μL的对应的DNA目标链样品)混合35 μL的杂交缓冲液(10x SSC,0.1% SDS,加热至60 ° C)、14 μL的DD水和7 μL的检测链(浓度100 pmol/μL)。这导致对于每种多路情况70 μL的总杂交体积。从中针对每种多路情况使20 μL的杂交溶液沉积覆盖微孔芯片上缀合的条码点并在40 ° C孵育20分钟。然后将微孔芯片浸入10 mL的洗涤缓冲液(0.5x SSC,0.1% SDS,加热至40 ° C),搅拌洗涤20 s,在另一份10 mL的洗涤缓冲液中再次洗涤以进一步降低非特异性结合,然后在成像前干燥5分钟。注意必须要小心从而洗涤缓冲液不会在样品点上变干和结晶。

[0094] 样品成像

用Apple的iPhone™ 4S获得所有图像(除非另有说明),将其安装于10x放大率的Olympus IX70倒置显微镜上用于所有分析(10x物镜,NA=0.30)或32x放大率用于所有照片(20x物镜,NA=0.50,1.6x的进一步放大率)。使用连接至显微镜的水银灯通过激发-发射滤光器组[λex=350/50、λem=430LP](Thorlabs)、[λex=480/40、λem=530/10](Thorlabs)、[λex=480/40、λem=580/10](Thorlabs)、[λex=480/40、λem=640/10](Thorlabs)、和[λex=620/40,λem=692/40](Semrock,Brightline Cy5-4040A)来激发量

子点条码和 Alexa647 荧光团。发射滤光器 λem=530/10、λem=580/10 和 λem=640/10 分别对应量子点 QD540、QD589 和 QD640，并被用以分离其荧光用于解析条码。使用发射滤光器 λem=692/40 来分离检测链 Alexa647 荧光团的荧光作为工具来 270 检测与其对应的捕捉链杂交的分析物的数量。图像曝光时间使用来自 Apple 应用商店的 NightCap 应用 (app) 制成可调节的，且针对发射滤光器 λem=430LP、λem=530/10、λem=580/10、λem=640/10 和 λem=692/40 分别为 1/20 、1/5、1/5、1/5 和 1 s。

[0095] 图像分析

在 MathWorks' MATLAB 上书写了定制的算法用于所有的图像分析。该算法接受 5 个发射滤光图像 (λem=430LP、λem=530/10、λem=580/10、λem=640/10 和 λem=692/40) 作为输入，其包括样品和用于背景强度调节的不含珠微孔芯片的相同滤光图像。基于用户选择对图像进行裁剪以包括感兴趣的珠子。通过使用离散傅里叶变换登记 (registration) (21,22) 将裁剪的滤光图像与 λem=430LP 滤光图像对齐。然后该算法会使用霍夫变换 (23,24) 基于其在 λem=430LP 滤光图像中的外观来鉴别每个珠的大小和位置。然后将每个珠与跨四个剩余滤光图像的面积的平均像素强度进行关联。对每个珠，λem=530/10、λem=580/10 和 λem=640/10 滤光图像强度包括其强度谱，而 λem=692/40 滤光图像强度表明次级探针强度。为了鉴别芯片上的条码，首先建立了已知的条码强度谱 (图 6)。这些谱是通过对条码 B1-B7 (见图 8) 单独成像并对每个滤光器计算所有珠的中值滤光强度获得的。然后将一个珠的强度谱与每个已知条码的强度谱进行比较来鉴别目标条码。特别的，首先根据条码在滤光器 λem=530/10、λem=580/10 和 λem=640/10 中的最高强度大致将条码进行归类。计算了珠强度谱和已知条码的强度谱之间的欧几里得距离：

[1]

$$D_N = |I - I_{B_N}| = \sqrt{(I_{F_1} - I_{B_N F_1})^2 + (I_{F_2} - I_{B_N F_2})^2 + (I_{F_3} - I_{B_N F_3})^2 + \cdots + (I_{F_M} - I_{B_N F_M})^2}$$

D_N= 珠强度谱和条码 N (B1-B7) 的强度谱之间的欧几里得距离。

[0096] = 滤光器 M (λem=530/10、λem=580/10、λem=640/10) 的珠强度。

[0097] IBNFM= 滤光器 M (λem=530/10、λem=580/10、λem=640/10) 的条码 N (B1-B7) 的强度。

[0098] 目标条码被鉴定为其已知强度谱产生最小欧几里得距离的条码。最终，用相同条码对所有珠计算了中值分析强度 (即 λem=692/40 滤光器强度)，并定义为该条码的杂交信号。注意对应的背景强度被从 305 记录强度中减去，以调整用于芯片或激发源中内在的可能的强度变化。进一步对次级探针强度减去其 λem=692/40 滤光器强度对应的条码空白信号 (图 5 的黑条)。

[0099] 结果和讨论

我们评价了来自无线通信设备(在此情况下为智能手机)的相机是否能够成像不同的荧光发射条码，以及是否定制算法可被用于区分来自次级荧光标签的光学信号。我们首先确认了智能手机相机具备了用于鉴定芯片上每个条码化的珠的成像分辨率和灵敏度。我们设计了 5 种独特的荧光量子点条码并将其装配在芯片表面。这些条码含有以各种比率混合的 540、589 和 640 nm 波长的量子点发射 (图 8)。我们将该芯片置于显微镜载物台表面，用 Hg 灯激发 (λex=350/50)，用物镜 (20x，NA=0.50) 收集光学信号，过滤该发射

(λem=430LP),并用连接至显微镜目镜的Apple iPhone™ 4S智能手机(曝光时间=1/20 s)进行成像。图1C清楚地显示了能够视觉辨识不同条码荧光发射的能力。

[0100] 然后我们用MathWorks' MATLAB开发了一套算法,其能够鉴别条码和次级探针的信号。该算法接受5个发射滤光图像(λem=430LP、λem=530/10、λem=580/10、λem=640/10和λem=692/40)作为输入,其包括样品和用于背景强度调节的不含珠微孔芯片的相同滤光图像。

[0101] 仅举例说明,我们的系统包括安装在显微镜前部的Apple iPhone™ 4S智能手机和用于激发芯片上的条码的水银灯。设计算法用以通过将孔中每个微珠的光学信号与已知条码板(panel)的光学信号进行比较来鉴别条码(见图5)。参见图2A,将绿210、黄212和红214条码(图8中分别鉴定为B1、B4和B6)沉积在芯片上并用iPhone™成像。图2A显示iPhone™相机能够捕捉孔中每个条码的不同的光学发射。分析后,智能手机相机获得了与目标分析物和次级探针结合的微珠荧光图像(荧光显微镜参数:20x物镜,NA=0.50,λex=640/40和λem=692/40,曝光时间=1 s)。绿珠和红珠具有阳性信号。这表明样品中存在T1和T6基因组目标,而不存在T4。值得注意的是,条码上的白色斑点是由来自在B6中浸渍的Alexa647荧光团和640 nm量子点的高组合强度的过度曝光所致。图2b显示使用合适的过滤可以将条码的光学信号与次级探针进行区分。我们接下来比较了iPhone™相机与昂贵的电荷耦合器件(CCD)相机在检测芯片上的目标分析物中的分析表现。

[0102] 例如,使用模型基因组序列,我们演示了用于阳性检测的最终微珠复合物的夹心架构。我们制备了含有与序列5'-GAG ACC ATC AAT GAG GAA GCT GCA GAA TGG GAT-3'缀合的单一荧光条码的芯片。我们添加了含有目标序列5'-CGG CGA TGA ATA CCT AGC ACA CTT A CTA AT CCC ATT CTG CAG CTT CCT CAT TGA TGG TCT C-3'和Alexa647染料标记的次级序列5'-Alexa647-TAA GTG TGC TAG GTA TTC ATC GCC G-3'的溶液。对于阳性检测,来自微珠的光学信号包括条码和Alexa染料中的量子点。目标序列会杂交至次级探针和条码两者,且Alexa染料的荧光强度鉴定了目标分析物的浓度。我们显示iPhone™相机产生了相对于昂贵的CCD相机而言相似的检测限和动态范围(见图6)。这些研究确定iPhone™相机能够对芯片表面的条码成像,被用作生物分析的检测器,并可以降低量子点条码检测系统的成本和大小。

[0103] 仅有的另一个使用相机进行感染性疾病分子检测的研究未提供评价测流分析表现的分析曲线(5)。测流分析也不能是多路的,因此该技术被局限于检测以高浓度存在的分子。

[0104] 虽然由于测流系统在疾病标志物检测中的简单性,其优选的被用于发展中国家,但是它们典型的具有差的检测限,范围为mM至μM,且在同时分析多个生物标志物时具有受限制的能力。量子点条码的关键优点在于微珠中不同颜色和强度组合的量子点能够产生一个大的条码库,提供显著的复用能力。Nie和同事们估计使用5-6个不同的发射量子点能够产生10,000-40,000个不同的条码(14)。

[0105] 例如,我们选择了甲型流感病毒H1N1、H3N2和H5N1和20种乙型肝炎和丙型肝炎的基因目标用于演示我们的整合无线通信设备量子点条码芯片系统在多路检测中的应用。甲型流感病毒是空气传播的,具有高感染性,症状相似,在临床鉴别诊断中形成了巨大的困难,且仍有流行的风险(8,9)。血源性病毒乙型肝炎(HBV)和丙型肝炎(HCV)在资源有限

地区流行 (10)。这些感染在临床上难于区分，因为它们具有共同的症状，例如全身不适、黄疸和恶心和 / 或呕吐 (11)。

[0106] 我们针对 5 种感染性疾病生物标志物目标加上阴性和阳性对照设计了 7 种条码 (见图 8)。每种条码的分析灵敏度和线性动态范围 (见图 2C) 平均分别为 50 fmol 和多达 100 倍。在此我们演示了我们的芯片能够同时检测多个生物标志物目标。通过混合不同组合的基因目标序列，针对 5 种感兴趣的病原体的每一种加上一个阳性对照序列和一个次级荧光探针序列，我们制备了 6 个不同的模拟基因样品。例如，我们将制备刺入 (spike) 目标序列 T1、T3、T5 和 T7 或 T2、T4 和 T7 的溶液。将 10 μL 样品加至芯片并在 40℃孵育 20 分钟，用洗涤缓冲液清洗，干燥，成像，并用算法分析。图 3 显示我们能够针对所有 6 个样品鉴别溶液中所有的目标生物标志物。例如，在图 3B 中，我们的溶液含有序列 T1、T3、T5 和 T7，柱状图显示我们的技术能够区分含有次级探针的条码和不含有次级探针的条码 (T2、T4 和 T6)。

[0107] 本文表明量子点条码与无线通信设备技术的组合设计能够检测不同的目标类型，在本实施例中为感染性疾病标志物。本发明存在两个主要的发明点 :(a) 现在可以将条码很容易地运输至芯片上 ;和 (b) 条码与便携式无线通信设备技术允许在世界任何地方进行多路检测，而不必需要熟练技术人员来解读数据。该检测设备允许医院、环境控制机构、疾病控制中心和军方对污染物、病原体和其它感兴趣目标的发生和传播进行监控，且其可被用在护理点和护理机构以鉴别与癌症、糖尿病或心血管疾病和其它疾病或疾病标志物有关的目标，以及其它的农业和环境相关病原体和污染物。

[0108] 表 1 :SEQ ID NOs

编号	SEQ ID NO:	序列
C1	SEQ ID NO: 1	ccc tct tag ttt gca tag ttt ccc gtt atg
C2	SEQ ID NO: 2	act tgg ttg ttt ggg ggg gag ttg aat tca
C3	SEQ ID NO: 3	cca ttc cct gcc atc ctc cct cta taa aac
C4	SEQ ID NO: 4	tca gaa ggc aaa aaa gag agt aac t
C5	SEQ ID NO: 5	cat agt ggt ctg cgg aac cgg tga gt
C6	SEQ ID NO: 6	gac aat gct cac tga gga tag t
C7	SEQ ID NO: 7	cca ata tcg gcg gcc
T1	SEQ ID NO: 8	cgg cga tga ata cct agc aca ctt a cta ca taa cgg gaa act atg caa act aag agg g
T2	SEQ ID NO: 9	cgg cga tga ata cct agc aca ctt a cta tg aat tca act ccc ccc caa aca acc aag t
T3	SEQ ID NO: 10	cgg cga tga ata cct agc aca ctt a cta gt ttt ata gag gga gga tgg cag gga atg g
T4	SEQ ID NO: 11	cgg cga tga ata cct agc aca ctt a cta ag tta ctc tct ttt ttg cct tct ga
T5	SEQ ID NO: 12	cgg cga tga ata cct agc aca ctt a cta ac tca ccg gtt ccg cag acc act atg
T6	SEQ ID NO: 13	cgg cga tga ata cct agc aca ctt a cta ac tat cct cag tga gca ttg tc
T7	SEQ ID NO: 14	cgg cga tga ata cct agc aca ctt act agg ccg ccg ata ttg g
D	SEQ ID NO: 15	Alexa647-taa gtg tgc tag gta ttc atc gcc g

表 2. 合成的微珠列表。

条码	直径 (μm)	QD540 浓度 (μL/mL)	QD589 浓度 (μL/mL)	QD640 浓度 (μL/mL)
B1	2.70 ± 1.61	60		
B2	2.70 ± 1.36		57	
B3	2.70 ± 1.60	60	11.4	
B4	2.70 ± 1.60	12	57	
B5	2.70 ± 1.34		57	182
B6	3.50 ± 1.19			910
B7	2.70 ± 1.51			182

[0109]

参考文献

1. Yager P 等 人,(2006) Microfluidic diagnostic technologies for global public health. Nature 442:412－8. 335

2. Chin CD, Linder V, Sia SK (2007) Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities. Lab on a chip 7:41－57.

3. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E (2010) Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices.

4. 国际电信联盟统计数据,可获得自 :340 http://www.itu.int/ict/statistics.

5. Mudanyali O等人,(2012) Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone. Lab Chip. 2012 Aug 7;12(15):2678-86.

6. Zhu H, Sikora U, Ozcan A (2012) Quantum dot enabled detection of Escherichia coli using a cell-phone. The Analyst 137:2541 - 4. 345

7. Breslauer DN, Maamari RN, Switz N a, Lam W a, Fletcher D a (2009) Mobile phone based clinical microscopy for global health applications. PloS One 4:e6320.

8. Korteweg C, Gu J (2010) Pandemic influenza A (H1N1) virus infection and avian influenza A (H5N1) virus infection: a comparative analysis. Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire 88:575 - 87. 350

9. Smith GJD等人,(2009) Dating the emergence of pandemic influenza viruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:11709 - 12.

10. Yerly S等人,(2001) Nosocomial outbreak of multiple bloodborne viral infections. The Journal of Infectious Diseases 184:369 - 72.

11. Chu C等人,(2001) Hepatitis C : Comparison with acute heptitis B - Comparison of clinical, 355 virologic and pathologic features in patients with acute hepatitis B and C. Journal of Gastroenterology and Hepatology 16:209 - 214.

12. Giri S, Sykes EA, Jennings TL, Chan WCW (2011) Rapid screening of genetic biomarkers of infectious agents using quantum dot barcodes. ACS Nano 5:1580 - 7.

13. Klostranec JM等人,(2007) Convergence of quantum dot barcodes with microfluidics and 360 signal processing for multiplexed high-throughput infectious disease diagnostics. Nano Letters 7:2812 - 8.

14. Han M, Gao X, Su JZ, Nie S (2001) Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. Nature Biotechnology 19:631 - 5.

15. Walt DR (2010) Fibre optic microarrays. Chemical Society Reviews 39:38 - 50. 365

16. Zhu H, Mavandadi S, Coskun AF, Yaglidere O, Ozcan A (2011) Optofluidic fluorescent imaging cytometry on a cell phone. Analytical chemistry 83:6641 - 7.

17. Fournier-Bidoz S等人,(2008) Facile and rapid one-step mass preparation of quantum-dot barcodes. Angewandte Chemie (International ed in English) 47:5577 - 81.

18. Peng X, Schlamp MC, Kadavanich AV, Alivisatos AP (1997) Epitaxial Growth of Highly 370 Luminescent CdSe / CdS Core / Shell Nanocrystals with Photostability and Electronic Accessibility. Journal of American Chemical Society 119:7019 - 7029.

19. Hines MA, Guyot-Sionnest P (1996) Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals. The Journal of Physical Chemistry 100:468 - 471. 375

20. Dabbousi BO等人，(1997) (CdSe) ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. Journal of Physical Chemistry B 101:9463－9475.

21. Guizar-Sicairos M, Thurman ST, Fienup JR (2008) Efficient subpixel image registration algorithms. Optics Letters 33:156－8. 380

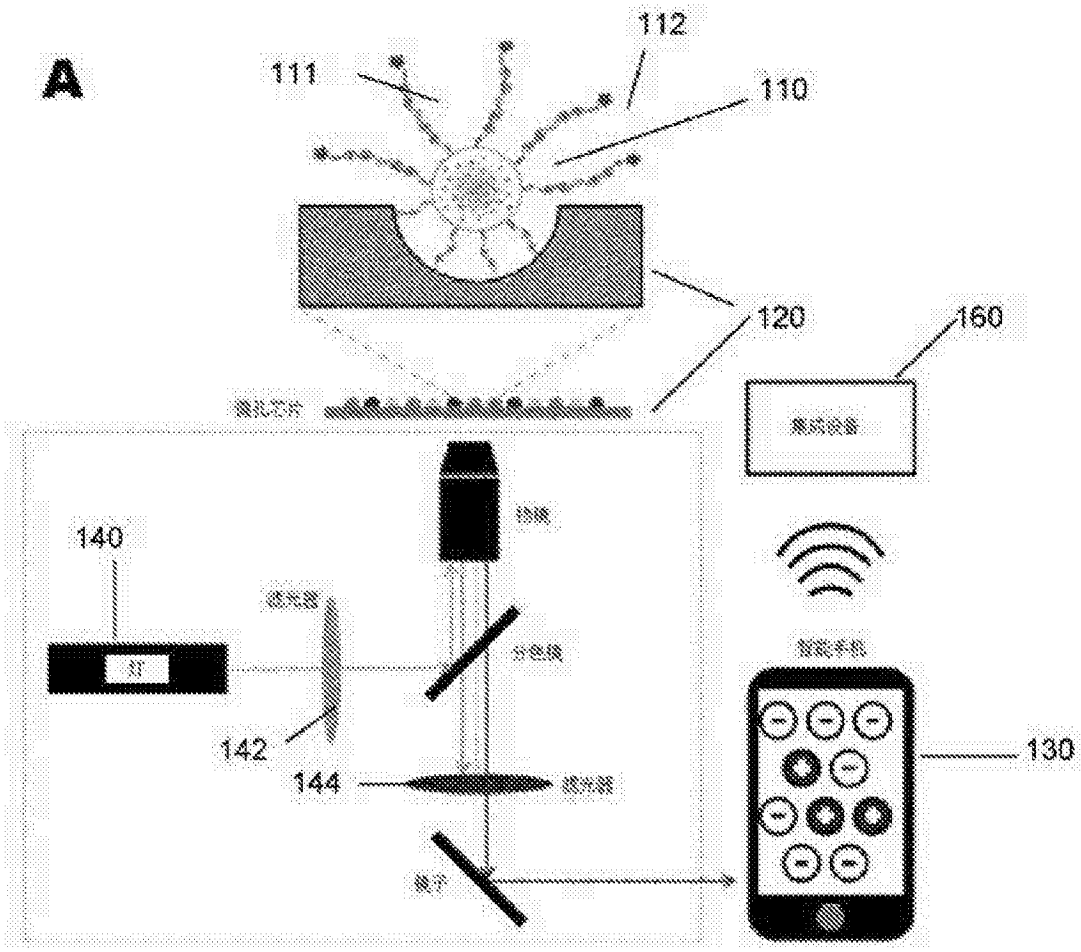
22. Guizar-Sicairos M Efficient subpixel image registration by cross-correlation. 可获得自:http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/18401-efficient-subpixel-image-registration-by-cross-correlation.

23. Ballard DH (1981) Generalizing the Hough Transform to detect arbitrary shapes. Pattern Recognition 13:111－122. 385

24. Peng T Detect circles with various radii in grayscale image via Hough Transform. 可获得自:http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/9168-detect-circles-with-various-radii-in-grayscale-image-via-hough-transform.

通过演示和描述的实施方式，描述了目前关注的制备和使用本发明的最佳模式。

[0110] 没有进行进一步详述，我们相信本领域普通技术人员在本文描述的基础上能够充分地利用本发明。本文引用的所有出版物以及优先权文件被整体引入作为参考。



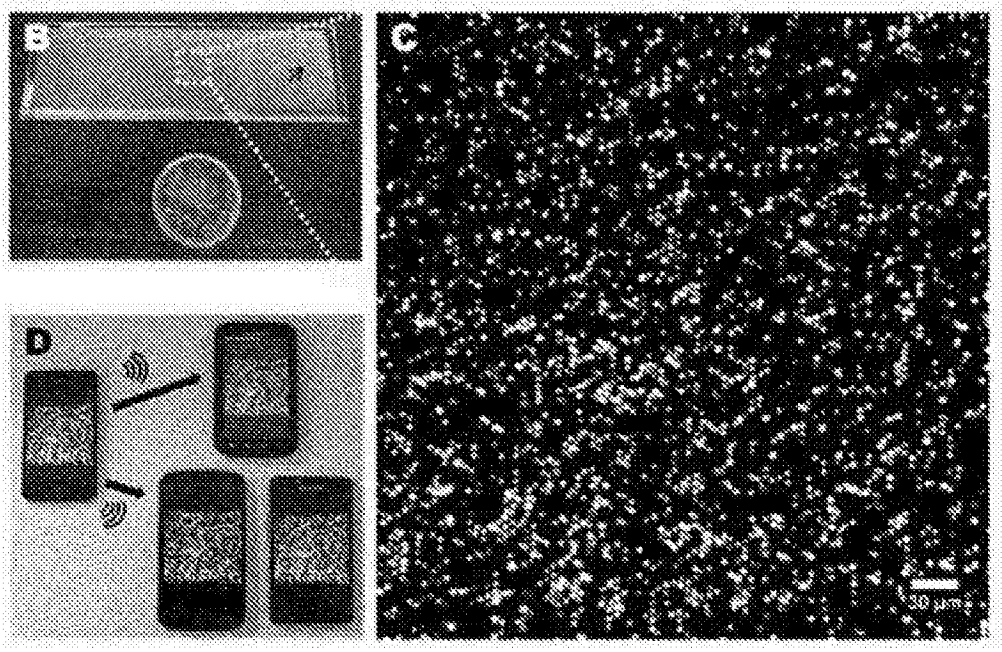


图 1

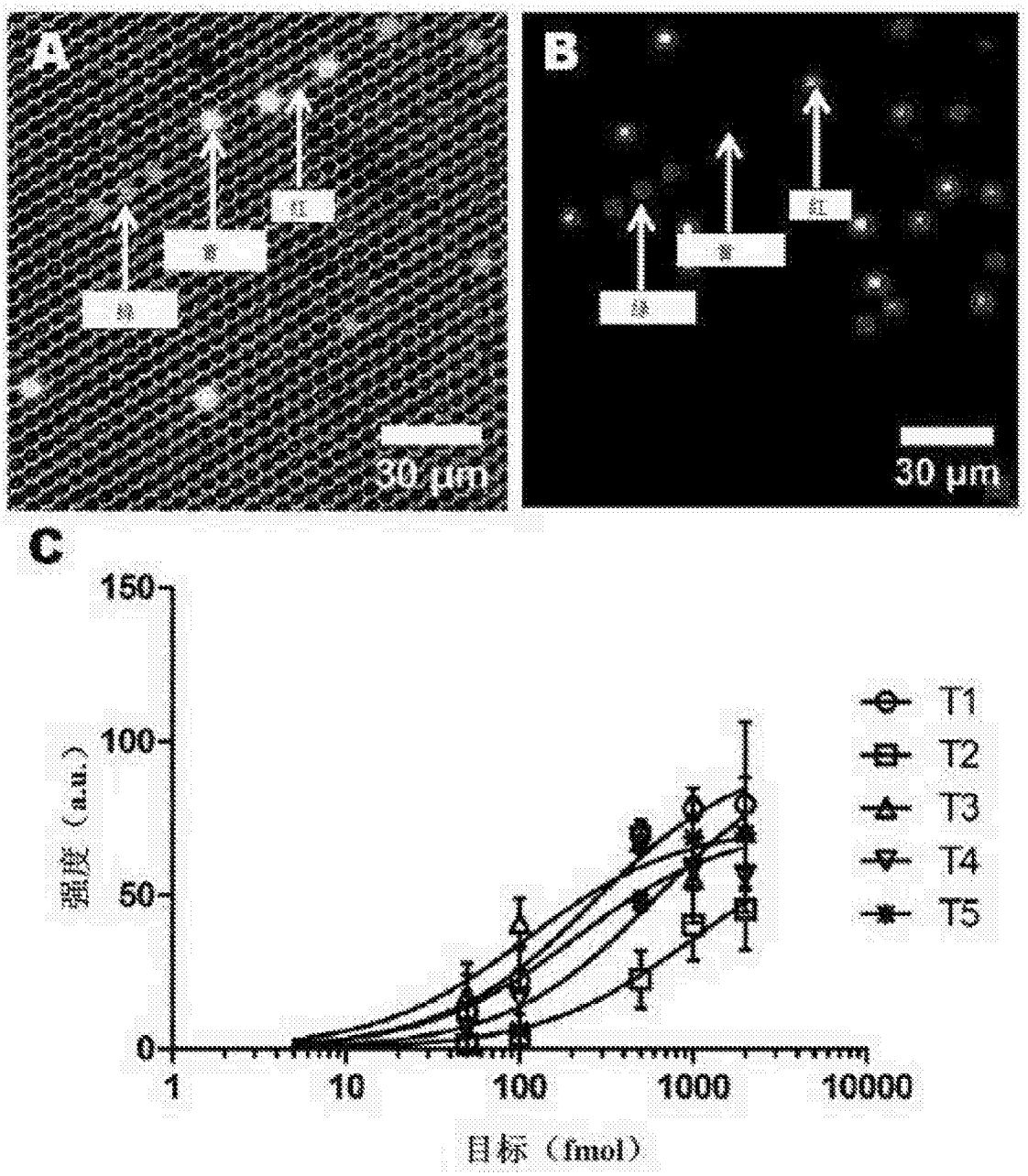

A
绿
黄
红
30 μm
B
绿
黄
红
30 μm
C
150
100
50
0
强度（a.u.）
1
10
100
1000
10000
目标（fmol）
T1
T2
T3
T4
T5

图 2

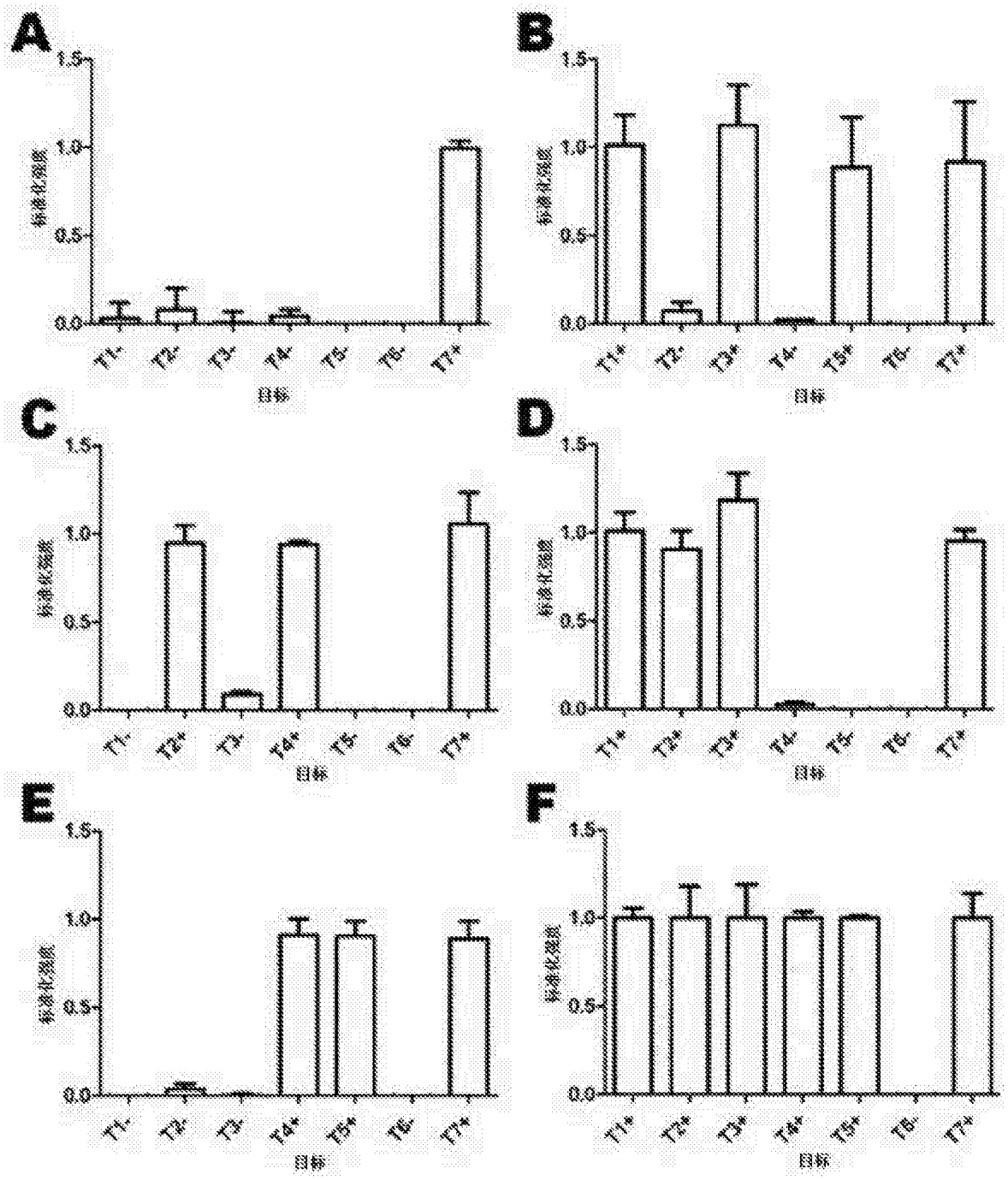


图 3

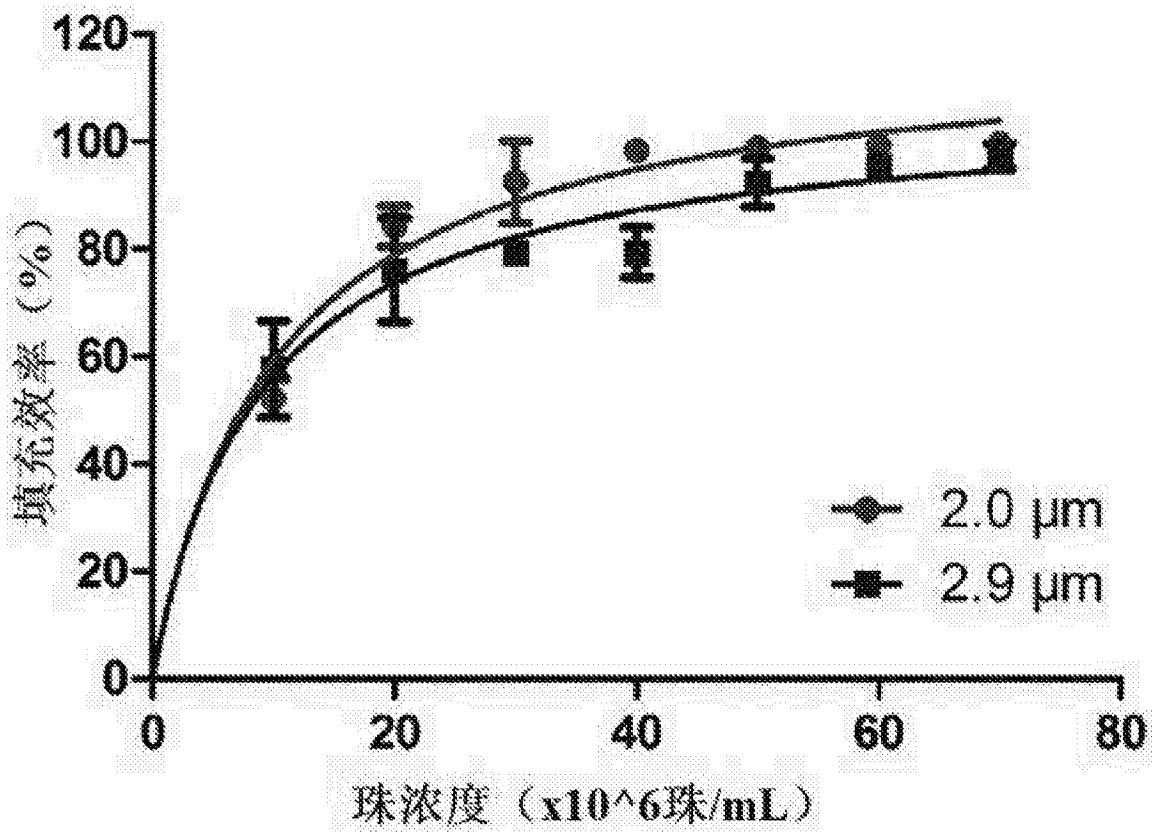


图 4

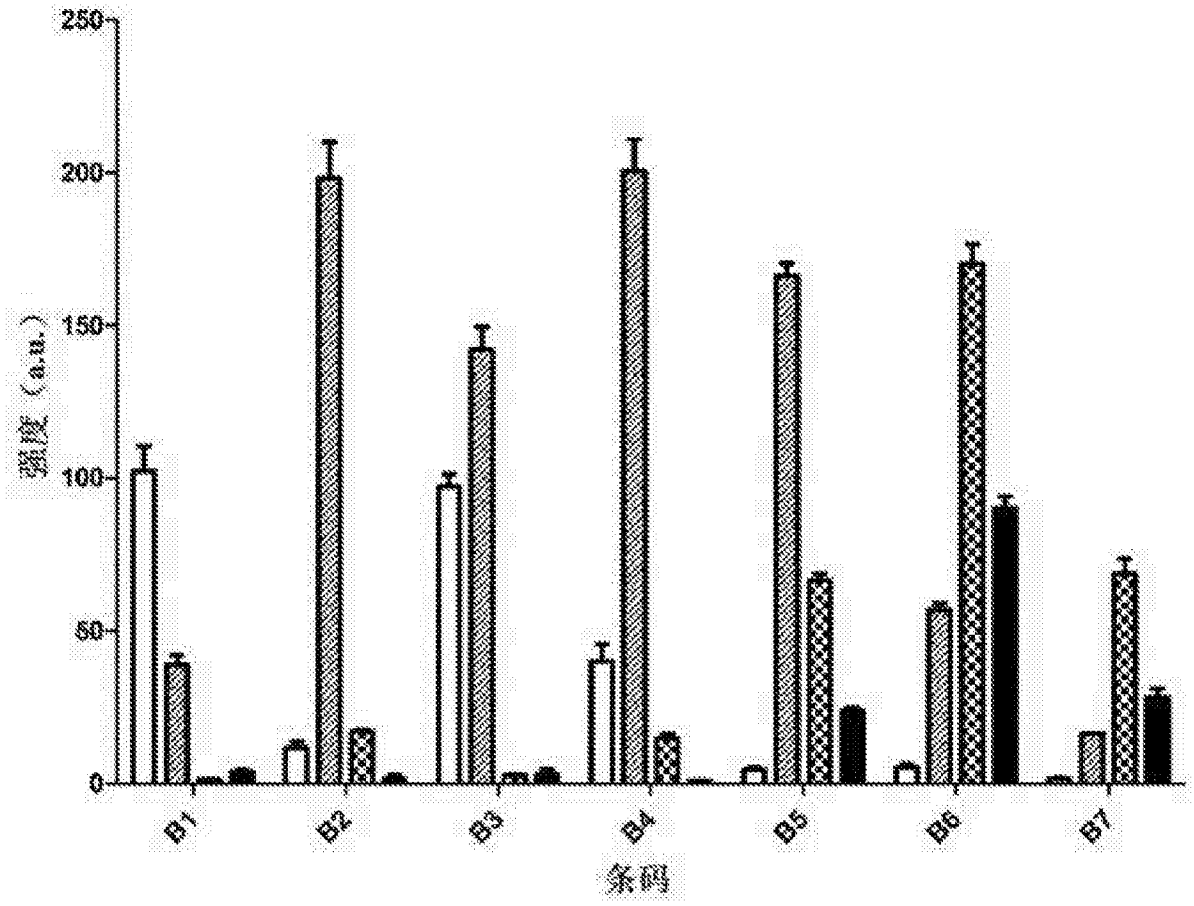


图 5

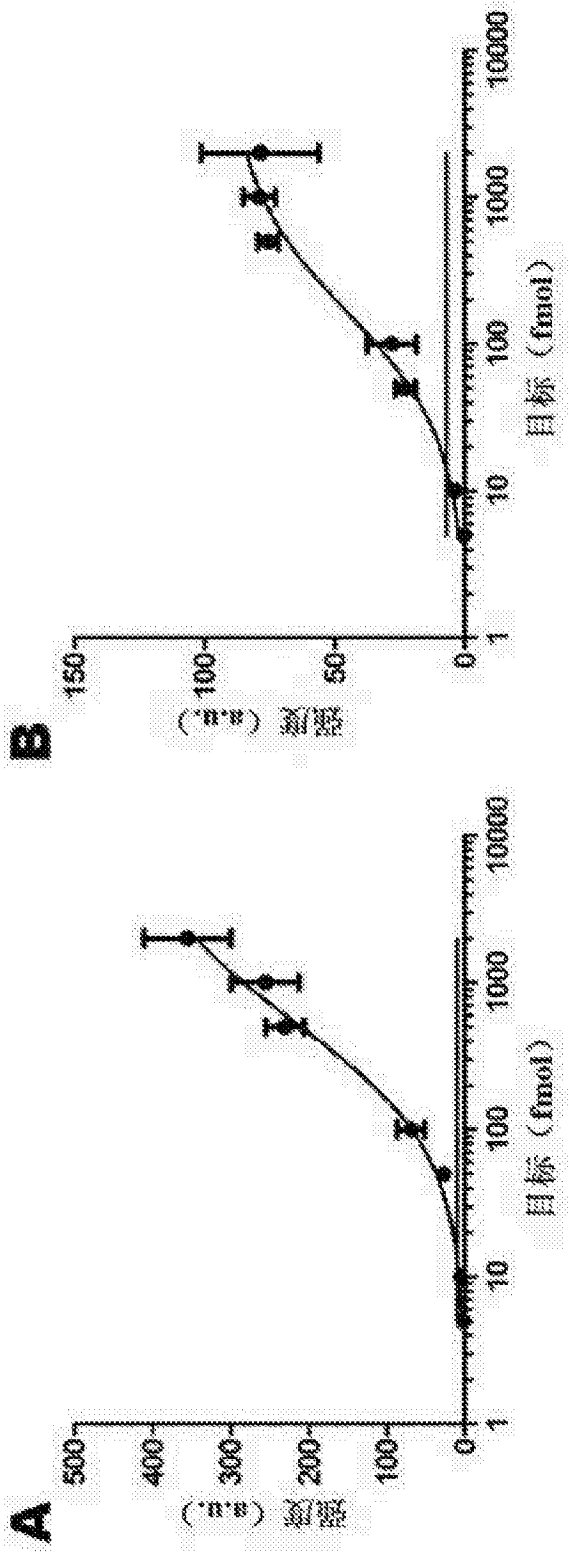

A
强度（a.u.）
500
400
300
200
100
0
1
10
100
1000
10000
目标（fmol）
B
强度（a.u.）
150
100
50
0
1
10
100
1000
10000
目标（fmol）

图 6

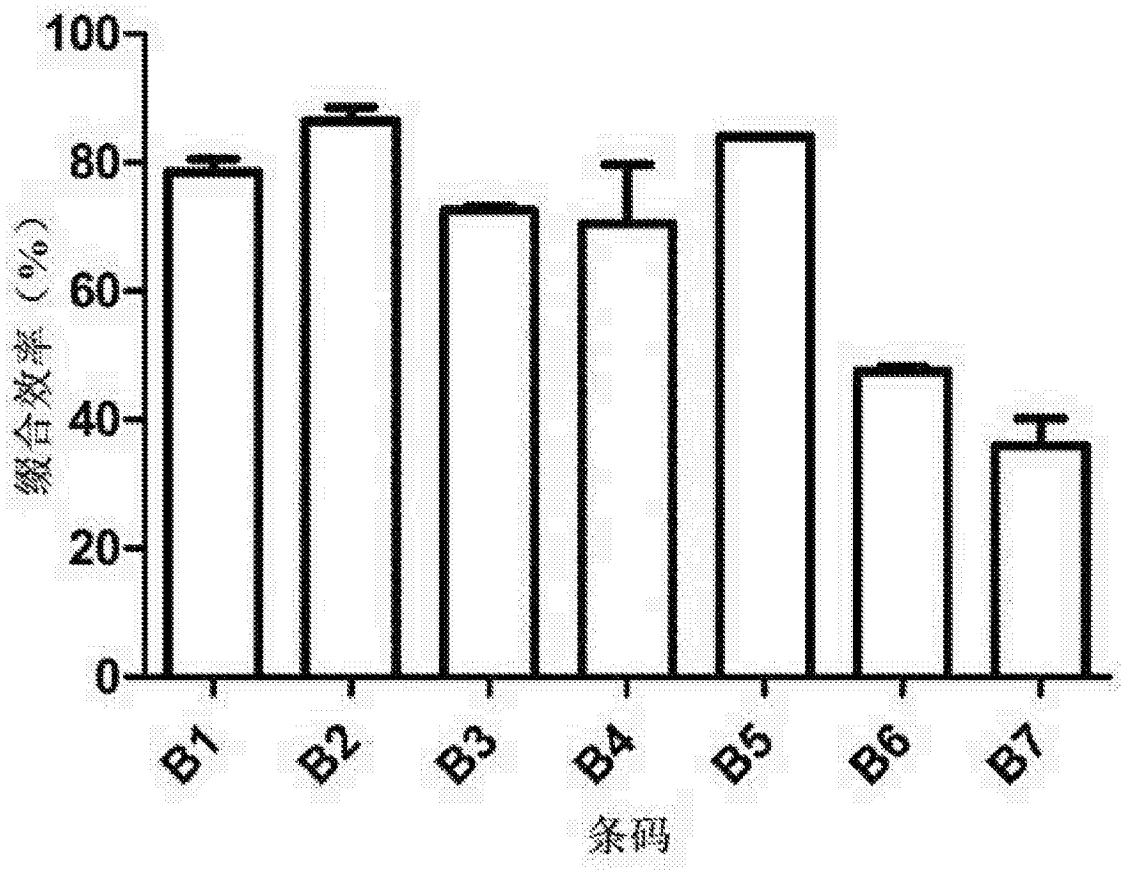


图 7

DNA序列及其对检查料的列表

检测生物标志物	探针名称序列（5'-3'）	目标名称序列（5'-3'）	第二探针名称序列	对应条码	对应条码峰
流感	C1	T1	0	B1	
肠病毒（非型特异性）（EV1）	CCC TCT TAG TTT GGA TAG TTT CCC GTT ATG	CGG CGA TGA ATA CCT AGC ACA CTT A CTA GA TAA CGG GAA ACT ATG CAA ACT AAG AGG G	5'-Alexa647-TAA GTG TGC TAG GTA TTC ATC GCC G-3'		
流感	C2	T2		B2	
腺病毒属（非型特异性）（HEX）	ACT TGG TTG TTT GGG GGG GAG TTG AAT TCA	CGG CGA TGA ATA CCT AGC ACA CTT A CTA TG AAT TCA ACT CCC CCC CAA ACA ACC AAG T			
流感	C3	T3		B3	
肠病毒（非型特异性）（HEX1）	CCA TTC CCT GCC ATC CTC CCT CTA TAA AAC	CGG CGA TGA ATA CCT AGC ACA CTT A CTA GT TTT ATA GAG GGA GGA TGG CAG GGA ATG G			
乙型肝炎（HBV）	C4	T4		B4	
呼吸道合胞病毒	TCA GAA GGC AAA AAA GAG AGT AAC T	CGG CGA TGA ATA CCT AGC ACA CTT A CTA AG TTA CTC TCT TTT TTG CCT TCT GA			
丙型肝炎（HCV）	C5	T5		B5	
呼吸道合胞病毒	CAT AGT GGT CTG CGG AAC CGG TGA GT	CGG CGA TGA ATA CCT AGC ACA CTT A CTA AC TCA CCG GTT CCG CAG ACC ACT ATG			
副流感病毒	C6	T6		B6	
	GAC AAT GCT CAC TGA GGA TAG T	CGG CGA TGA ATA CCT AGC ACA CTT A CTA AC TAT CCT CAG TGA GCA TTG TC			
副流感病毒	C7	T7		B7	
	CCA ATA TCG GCG GCC	CGG CGA TGA ATA CCT AGC ACA CTT A CTA GG CCG CCG ATA TTG G			

图 8