



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102239245 A

(43) 申请公布日 2011.11.09

(21) 申请号 200980146571.3

代理人 权陆军 林毅斌

(22) 申请日 2009.09.24

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12M 1/34 (2006.01)

61/099,830 2008.09.24 US

G01N 33/53 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.05.23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/058270 2009.09.24

(87) PCT申请的公布数据

W02010/036827 EN 2010.04.01

(71) 申请人 施特劳斯控股公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 E·阿布拉姆斯 S·吉特

L·香菲尔德 G·西克

D·斯特劳斯 G·杨茨

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

权利要求书 4 页 说明书 52 页 附图 47 页

(54) 发明名称

用于检测分析物的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种改进的用于灵敏且特异性地检测靶分子、细胞或病毒的方法。本发明的方法使用大面积成像来检测与靶物特异性的选择部分结合的单个标记的靶物。本发明通过一个或更多液体层使用靶物特异性的选择，消除了洗涤步骤，所述液体层可以含有光学染料和密度试剂。通过消除洗涤，本发明简化了仪器化工程，并使用户步骤和成本最小化。本发明使用灵敏的图像分析来计算大面积中的单个靶物，是可放大的，且可以用于复杂性范围是从手工到高度自动化的系统中。

1. 用于检测样品中一种或更多种靶物的方法,所述方法包括:
 - a) 提供包含检测表面的容器,所述检测表面具有最短线性尺寸 $\geq 1\text{ mm}$ 的检测区;
 - b) 在容器的液体覆盖层中,使信号发射部分、选择部分接触包含所述靶物的组合物,以形成所述靶物和所述信号发射部分或选择部分的络合物;
 - c) 施加选择力,以移动所述覆盖层中的所述选择部分通过下面的垫子层,并接触检测表面;和
 - d) 同时检测与检测区相对应的检测带内的所述信号发射部分的单个络合物,由此在小于 $5\times$ 的放大率检测所述靶物,
其中所述方法不包括洗涤步骤,且其中所述靶物在至少2个正交维数测量小于50微米。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述信号发射部分包含光子信号发射特征。
3. 如权利要求1所述的方法,其中所述信号发射部分或选择部分缀合到种类-结合分子上。
4. 如权利要求3所述的方法,其中所述种类-结合分子是抗体、抗原、凝集素、核酸分子、配体、受体或小分子。
5. 如权利要求1所述的方法,其中所述下面的垫子层包含染料,所述染料干扰投向或来自信号发射部分的光的生成或透射。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述信号发射部分特异性地结合所述靶物。
7. 如权利要求1所述的方法,其中所述靶物是细胞。
8. 如权利要求7所述的方法,其中所述细胞是细菌细胞。
9. 如权利要求1所述的方法,其中所述细菌细胞是金黄色葡萄球菌细胞或炭疽芽孢杆菌细胞。
10. 如权利要求7所述的方法,另外包括,使所述细胞接触第二个信号发射部分,该信号发射部分特异性地结合所述细胞的内部组分。
11. 如权利要求10所述的方法,其中所述内部组分是核酸分子或脂质。
12. 如权利要求10所述的方法,另外包括,在步骤(c)后,光漂白所述第二个信号发射部分,并检测在所述覆盖层或所述下面的垫子层中的来自步骤(b)的所述信号发射部分。
13. 如权利要求1所述的方法,其中所述靶物是由微生物细胞分泌的分子。
14. 如权利要求1所述的方法,其中所述信号发射部分是荧光颗粒。
15. 如权利要求1所述的方法,其中所述信号发射部分包含DNA染色剂。
16. 如权利要求1所述的方法,其中,在步骤(b)之前,使所述样品与微生物生长培养基相组合,然后温育超过1小时。
17. 如权利要求16所述的方法,其中所述微生物生长培养基包含抗生素或微生物生长抑制剂。
18. 如权利要求1所述的方法,其中所述信号发射部分或所述选择部分在所述容器中是干燥形式。
19. 如权利要求1所述的方法,其中所述下面的垫子层在所述容器中是干燥形式。
20. 如权利要求19所述的方法,其中在步骤(b)中,包含所述靶物的所述组合物水合所述下面的垫子。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其中在步骤 (b) 中,包含所述靶物的所述组合物水合所述覆盖层和所述下面的垫子层。

22. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述覆盖层另外包含染料,所述染料干扰投向或来自信号发射部分的光的生成或透射。

23. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶物选自人促甲状腺激素或炭疽芽孢杆菌抗原。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述抗原选自致死因子 (LF)、保护抗原 (PA) 和聚-D-γ-谷氨酸 (PDGA) 荚膜多肽。

25. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶物是甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA) 细胞。

26. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶物存在于生物流体中,或从生物流体得到。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其中所述生物流体是人全血、血清、血浆、粘液或尿。

28. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述选择力是重力、磁力、电势、离心力、向心力、浮力密度、过滤或压力。

29. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述信号发射部分包括荧光团、化学发光剂、生物发光剂、共振光散射颗粒、光吸收或发色信号发射剂、上转化磷光体。

30. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述选择部分包括磁性颗粒、二氧化硅颗粒或铁蛋白。

31. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述选择部分缀合到靶物竞争物上;在步骤 (b) 中形成的络合物是在选择部分和信号发射部分之间以及在靶物和信号发射部分之间;所述靶物不会特异性地结合选择部分;且通过在没有靶物存在下形成的选择部分和信号发射部分的络合物的量的减小,间接地进行所述靶物的检测。

32. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述容器是具有大于 2mm 的成像深度的成像孔。

33. 用于检测样品中一种或更多种靶物的方法,所述方法包括:

a) 提供包含检测表面的容器,所述检测表面具有最短线性尺寸 $\geq 1 \text{ mm}$ 的检测区;

b) 在所述容器的液体中,使一个或更多个信号发射部分、选择部分接触包含所述靶物的组合物,以形成所述靶物和所述信号发射部分或选择部分的络合物;

c) 施加选择力,以移动所述络合物通过液体,并接触检测表面;和

d) 同时检测与检测区相对应的检测带内的所述信号发射部分的单个络合物,由此在小于 5× 的放大率检测所述靶物,

其中所述方法不包括洗涤步骤,且其中所述靶物在至少 2 个正交维数测量小于 50 微米。

34. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述信号发射部分包含光子信号发射特征。

35. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述信号发射部分或选择部分结合到种类 - 结合分子上。

36. 如权利要求 35 所述的方法,其中所述种类 - 结合分子是抗体、抗原、凝集素、核酸分子、配体、受体或小分子。

37. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述信号发射部分特异性地结合所述靶物。

38. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述靶物是细胞。

39. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述细胞是细菌细胞。
40. 如权利要求 39 所述的方法,其中所述细菌细胞是金黄色葡萄球菌细胞或炭疽芽孢杆菌细胞。
41. 如权利要求 38 所述的方法,另外包括,使所述细胞接触第二个信号发射部分,该信号发射部分特异性地结合所述细胞的内部组分。
42. 如权利要求 41 所述的方法,其中所述组分是核酸分子或脂质。
43. 如权利要求 41 所述的方法,另外包括,在步骤 (c) 后,光漂白所述第二个信号发射部分,并检测 (a) 的所述信号发射部分。
44. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述靶物是由微生物细胞分泌的分子。
45. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述信号发射部分是荧光颗粒。
46. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述信号发射部分包含 DNA 染色剂。
47. 如权利要求 33 所述的方法,其中,在步骤 (b) 之前,使所述样品与微生物生长培养基相组合,然后温育超过 1 小时。
48. 如权利要求 47 所述的方法,其中所述微生物生长培养基包含抗生素或微生物生长抑制剂。
49. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述信号发射部分或所述选择部分在所述容器中是干燥形式。
50. 如权利要求 49 所述的方法,其中所述信号发射部分或所述选择部分在步骤 (b) 中被水合。
51. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述液体另外包含染料,所述染料干扰投向或来自信号发射部分的光的生成或透射。
52. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述检测步骤 (d) 包括,通过直接捕获、磁性捕获或基于密度的捕获,检测所述靶物。
53. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述靶物选自人促甲状腺激素或炭疽芽孢杆菌抗原。
54. 如权利要求 53 所述的方法,其中所述抗原选自致死因子 (LF)、保护抗原 (PA) 和聚-D-γ-谷氨酸 (PDGA) 荚膜多肽。
55. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述靶物是甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA) 细胞。
56. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述靶物存在于生物流体中,或从生物流体得到。
57. 如权利要求 56 所述的方法,其中所述生物流体是人全血、血清、血浆、粘液或尿。
58. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述选择力是重力、磁力、电势、离心力、向心力、浮力密度、过滤或压力。
59. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述信号发射部分包括荧光团、化学发光剂、生物发光剂、共振光散射颗粒、光吸收或发色信号发射剂、或上转化磷光体。
60. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述选择部分包括磁性颗粒、二氧化硅颗粒或铁蛋白。
61. 如权利要求 33 所述的方法,其中所述选择部分缀合到靶物竞争物上;在步骤 (b) 中形成的络合物是在选择部分和信号发射部分之间以及在靶物和信号发射部分之间;所述

靶物不会特异性地结合选择部分；且通过在没有靶物存在下形成的选择部分和信号发射部分的络合物的量的减小，间接地进行所述靶物的检测。

62. 如权利要求 33 所述的方法，其中所述容器是具有大于 2mm 的成像深度的成像孔。

用于检测分析物的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求 2008 年 9 月 24 日提交的美国临时申请号 61/099,830 的利益，其通过引用并入本文。

背景技术

[0002] 检测特定靶物的重要性。用于检测特定的分子、细胞和病毒靶物的方法，是医学和兽医诊断、环境试验和工业质量控制的基础工具。在临床医学中用于检测特定靶物的方法的实例包括柜台有售的快速妊娠试验、用于测定传染因子对特定抗生素的抗性的微生物学培养试验，和血样中癌症标志物的高度自动化的试验。检测食物中的病原体污染物、用于药物开发的候选化合物的高效筛选、定量药物中的活性成分，例证了依赖于用于测定特定靶物的存在的方法的工业生产用途。需要测试特定靶物的环境用途包括，检测供水污染、空气传播的生物威胁因子和家庭的真菌污染。

[0003] 用于检测特定靶物的方法的希望的属性。用于检测特定靶物的方法应当是准确的，也就是说，它们应当是灵敏的和特异性的。所述方法应当足够灵敏，以检测以显著量存在的靶物。而且它们应当是特异性的；它们不应当指示不以显著量存在的靶物。其它有益属性包括潜在靶分析物的宽度、快速结果、容易使用、节省成本、靶物量化、和自动化。不同的希望的属性的重要性可以取决于特定用途和测试地点。

[0004] 靶物的宽度。测试方法应当能检测宽范围的特定靶物。代表性的靶物类型包括人细胞（例如，在 HIV/AIDS 诊断中的 CD4+ 细胞）、细菌细胞（例如，甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌或 MRSA 或大肠杆菌）、病毒（例如，丙型肝炎病毒）、朊病毒（例如，牛海绵状脑病因子，即“疯牛病”的病因）、大分子（例如，蛋白、DNA、RNA、碳水化合物）和小分子（例如，化学治疗药、脂质、糖、氨基酸、核苷酸）。

[0005] 标记特定靶物。一个用于检测特定细胞、病毒或分子的重要方案是，用光学上可检测的标记来标记靶物，所述标记特异性地结合靶物。靶物特异性标记可以具有不同类型的靶物结合部分，包括大分子（例如，抗体、蛋白受体、核酸、碳水化合物和凝集素）和小分子（例如，激素、滥用药、代谢物）。靶物特异性标记的可检测的信号发射部分可以使用多种信号发射模式，包括荧光、磷光、色原体发光(chromogenicity)、化学发光、光散射和拉曼散射。

[0006] 用于检测特异地标记的靶物的存在的方法。已经为检测样品中特异地标记的靶分子、细胞和病毒的存在而开发了许多方法。所述技术的差别在于容纳的样品的类型、标记与靶物的结合模式、由标记递送的信号的类型、检测的标记的靶物的多样性、将结合的标记与未结合的标记区分开的方法、和用于检测特异地标记的靶物的技术。

[0007] 使用哪种方法取决于要检测的分析物的类型、测试地点、需要的自动化程度、临幊上有关的浓度范围、操作人员的技术、和价格敏感性。例如，免疫测定使用靶物特异性的抗体进行检测。为了使它们是光学上可检测的，可以将抗体连接到信号发射部分上，包括放射性同位素、荧光分子、化学发光分子、生成有色产物的酶、用荧光化合物染色的颗粒、共振光

散射颗粒或量子点。基于抗体的技术包括手工侧向流、ELISA、流式细胞术、直接荧光免疫测定、蛋白印迹和高度自动化的中心实验室方法。类似地，特定核酸序列的检测可以使用与许多类型的信号部分结合的互补核酸探针，其中使用包括核酸扩增、DNA 和 RNA 印迹以及原位杂交在内的方法。

[0008] 使用成像来计数标记的靶物。成像是用于检测在检测表面上的特异性地选择的标记的靶物的有力方法。成像方法将从检测区中的每个点发射出的光信号映射成图像中的对应点。相反，非成像检测方法通常整合从整个检测区发射出的光信号。

[0009] 一些成像方法可以检测和计数单个标记的靶分子。与检测区整合方法相比，计算特异性地标记的靶分子可以导致非常低靶物水平的检测。基于图像的靶物计数方法的灵敏度优点主要源自下述事实，即随着靶物水平降低，光信号与背景之比基本上保持恒定。相反，对于检测区整合方法，随着靶物水平降低，信号与背景之比降低。

[0010] 一类方法通过用显微光束系统性扫描检测区来建立图像。扫描方法比使用数字阵列检测器（例如，CCD 或 CMOS 照相机）来同时计算整个检测区中的特异性地标记的靶物的方法耗费更多时间。

[0011] 用于灵敏的靶物计数的在低放大率的大面积成像。一些方法使用高放大率显微术来计算单个微型靶物。显微成像缺少灵敏度，因为每个图像仅取样小面积。可以对更大的面积连续成像，但是许多图像的获取是费力的、昂贵的且耗时的。或者，可以使用在低放大率的大面积成像，单个地检测和计算标记的微型靶物。低放大率成像可以在单个图像中计算在相对大面积中的小量微型靶物。

[0012] 已经开发了一些使用大面积自动化数字成像的方法，用于同时检测单个标记的靶物。这些方法通常在毛细管室中检测标记的靶物，并使用侧向流来去除未结合的标记。关于其它侧向流方法，该技术方案使自动化复杂化，并限制可以方便地分析的样品的体积。

[0013] 使用选择来从游离标记和其它标记的实体分离特异性地标记的靶物。为了检测特异性地标记的靶物，方法通常必须从结合的标记去除或区分开未结合的标记和其它标记的实体。一个常见的方案使用标记的靶物络合物的物理选择，然后可以通过重复洗涤来去除游离标记。该方案尽管有效，但是通常需要劳力（对于手工方法而言）或复杂的液体处理工程（对于自动化系统而言）。

[0014] 标记的靶物络合物的选择，可以通过对靶物特异性的结合部分包被的表面上的物理捕获来介导（例如，在 ELISA 或侧向流试验中的捕获抗体，或在微阵列试验中的 DNA 探针）。类似地，通过使用靶物 - 结合部分包被的选择颗粒，可以从游离标记分离标记的靶物络合物。例如，在去除游离标记的洗涤步骤中，可以使用磁性选择来选择结合到靶物特异性的磁性颗粒上的标记的靶物络合物。

[0015] 通过使用毛细管流来从标记的靶物（其通过捕获在表面上而被选择）洗去游离标记，侧向流方法可以在一定程度上简化洗涤过程。这类洗涤可能需要加入洗液，作为额外的用户步骤。侧向流方法不是非常灵敏的，且通常不适用于图像分析、自动化或高处理量。

[0016] 不需要洗涤来从特异性地标记的靶物去除游离标记的方法。已经开发了几种方法，其检测用标记的靶物特异性的结合部分特异性地络合的靶物。一类方法使用除非它们结合靶物时不发射信号的标记。这些标记具有限制，因为它们不会发射足够强的信号用于单个标记的靶物的有效大面积检测。不需要洗涤的另一种方法通过液相屏障进行选择，以

从未结合的标记中分离出标记的靶物络合物。该方案使用检测区整合而不是灵敏的图像分析,因而缺少高灵敏度。

发明内容

[0017] 本发明提供了一种改进的用于灵敏且特异性地检测靶分子、细胞或病毒的方法。本发明的方法使用大面积成像来检测与靶物特异性的选择部分结合的单个标记的靶物。本发明通过一个或更多个液体层使用靶物特异性的选择,消除了洗涤步骤,所述液体层可以含有光学染料和密度试剂。通过消除洗涤,本发明简化了仪器化工程,并使用户步骤和成本最小化。本发明使用灵敏的图像分析来计算大面积中的单个靶物,是可放大的,且可以用于复杂性范围是从手工到高度自动化的系统中。

[0018] 在一个方面,本发明表征了用于检测样品中一种或更多种靶物的方法,例如,测量在至少 2 个正交维数的小于 50 微米的方法:提供具有检测表面的容器,所述检测表面具有最短线性尺寸 $\geq 1 \text{ mm}$ 的检测区;在容器的液体覆盖层中,使信号发射部分(例如,具有光子信号发射特征)、选择部分接触包含靶物的组合物,以形成靶物和信号发射部分或选择部分的络合物;施加选择力,以移动覆盖层中的选择部分通过下面的垫子层,并接触检测表面;和检测与检测区相对应的检测带内的信号发射部分,由此检测靶物。所述方法不包括洗涤步骤。下面的垫子层可以包括染料,其干扰投向或来自信号发射部分的光的生成或透射。

[0019] 在一个有关的方面,本发明表征了用于检测样品中一种或更多种靶物的方法,例如,测量在至少 2 个正交维数的小于 50 微米的方法:提供具有检测表面的容器,所述检测表面具有最短线性尺寸 $\geq 1 \text{ mm}$ 的检测区;在容器的液体中,使一个或更多个信号发射部分(例如,具有光子信号发射特征)、选择部分接触包含靶物的组合物,以形成靶物和信号发射部分或选择部分的络合物;施加选择力,以移动络合物通过液体,并接触检测表面;和检测与检测区相对应的检测带内的信号发射部分,由此检测靶物。所述方法不包括洗涤步骤。

[0020] 在本发明的不同的实施方案中,所述信号发射部分或选择部分缀合到种类-结合分子上,诸如抗体、抗原、凝集素、核酸分子、配体、受体或小分子。优选地,所述信号发射部分特异性地结合靶物。可以同时检测靶物与检测带中的信号发射部分的单个络合物,例如,使用光电阵列检测器。优选地,检测采用小于 5 \times 的放大率,例如,零放大率。示例性的靶物是细胞,诸如细菌细胞(例如,金黄色葡萄球菌细胞或炭疽芽孢杆菌)或由微生物细胞分泌的分子。当检测细胞时,所述方法可以另外包括,使细胞接触特异性地结合细胞内部组分(例如,核酸分子或脂质)的第二个信号发射部分。可以光漂白(photobleach)第二个信号发射部分,所述方法可以包括,在光漂白以后,检测原始的信号发射部分。示例性的信号发射部分是荧光颗粒和 DNA 染色剂。可以将样品与微生物生长培养基相组合,例如,所述培养基包含抗生素或微生物生长抑制剂,然后温育超过 1 小时,再接触选择或信号发射部分。信号发射部分或选择部分可以以干燥形式存在于容器中。当存在时,下面的垫子层可以以干燥形式存在于容器中。所述包含靶物的组合物可以水合容器中干燥形式的任意试剂。在某些实施方案中,所述组合物水合下面的垫子和信号发射和选择部分,从而生成 2 个液体层。靶物可以存在于生物流体中,或从生物流体得到,所述生物流体例如,人全血、血清、血浆、粘液或尿。示例性的选择力包括重力、磁力、电势、离心力、向心力、浮力密度、过滤、和压力。信号发射部分可以包括荧光团、化学发光剂、生物发光剂、共振光散射颗粒、光吸收或发

色信号发射剂或上转化 (up-converting) 磷光体。选择部分可以包括磁性颗粒、二氧化硅颗粒或铁蛋白。一种示例性的容器是具有大于 2mm 的成像深度的成像孔。

[0021] 所述方法可以用作竞争测定, 其中选择部分缀合到靶物竞争物上; 在选择部分和信号发射部分之间以及在靶物和信号发射部分之间形成络合物; 所述靶物不会特异性地结合选择部分; 且通过在没有靶物存在下形成的选择部分和信号发射部分的络合物的量的减小, 间接地进行靶物的检测。

[0022] 在试验装置中可以含有一些或所有试验试剂。用户可以手工地或通过自动化仪器加入一些或所有试剂。试验装置可以是简单的容器。或者, 它们可以是复杂的筒, 包括, 例如, 一个或更多个下述物体: 载泵、流控通道、阀、试剂储存器、电子器件、检测器、样品输入模块和废物模块。

[0023] 在某些实施方案中, 所述方法采用标记颗粒作为信号发射部分。标记颗粒与靶物的接触, 导致靶物: 标记颗粒络合物的形成。标记颗粒可以用于所述方法中, 其量会产生指定的标记比, 例如, 小于 100。

[0024] “成像”是指从检测区同时获取图像。

[0025] “洗涤”是指这样的过程, 其从容器或表面物理地去除液体, 所述液体含有来自靶物的不希望的组分, 所述靶物不同于不希望的组分, 被保留、选择或捕获在容器中或表面上。

[0026] “不需要洗涤”的试验是指这样的试验, 其中不使用洗涤步骤来检测靶物。

[0027] “分析仪”或“成像分析仪”是指这样的仪器, 其具有本文定义的允许检测区同时成像的阵列光检测器和成像光学器件。分析仪可以具有许多用于增强检测的其它功能, 包括用于将选择力施加于选择部分上、运输或温育的模块。

[0028] “孔”是指可以容纳液体的容器。孔通常具有 $\geq 1\text{ mm}$ 的孔深度。

[0029] “成像孔”是指可以用于通过成像来检测标记的靶物的孔。成像孔具有检测表面, 在所述表面上, 成像分析仪可以检测标记的靶物颗粒。位于检测表面和成像分析仪的光检测器之间的材料具有用于支持标记的靶物的成像检测的光学性质。例如, 所述材料通常是可穿透的, 且在与装置的信号发射部分的信号标志相对应的光谱区中具有低光学背景。

[0030] “成像孔深度”是指沿着垂直于检测表面的轴的成像孔高度。

[0031] “垫子”、“密度垫子”、“液体垫子”、“垫子层”或“液体密度垫子”是指其密度大于覆盖层的基本上液体层(例如, 所述液体层的密度比覆盖层大至少 1%、2%、5%、8%、10%、15%、20%、30%、35%、40% 或 50% 或更多)。在本发明中, 垫子存在于成像孔中, 位于检测表面和包括样品和实验试剂的液体层之间。该垫子提供了实验试剂和检测表面之间的物理分离。使用选择, 与选择部分络合的标记的靶物移动穿过垫子, 并沉积在检测表面上进行成像。垫子的致密液体层将未与选择部分络合的信号发射部分从检测带排除。

[0032] “染料”是指加入反应中的物质或混合物, 其干扰投向或来自信号发射部分的光的生成或透射。所述染料减小或消除在检测带以外发出的信号, 同时允许检测从检测带内的信号发射部分衍生出的信号。对于包括荧光信号发射部分的装置, 染料可以吸收荧光激发频率、荧光发射频率或二者的光。不同的染料性质可以用于该目的, 包括光散射和吸收。在不同的实施方案中, 所述染料会使信号减小至少 50%、75%、85%、90%、95% 或甚至 99%。

[0033] “染色的垫子”是指包括染料的垫子。染色的垫子同时提供主体反应从检测带的物

理排除（随着染色的垫子的密度而变化），同时防止或减小信号从覆盖反应向检测器的透射（随着致密层中包括的染料而变化）。

[0034] “取样装置”是指用于收集样品的装置。取样装置的实例包括拭子、毛细管、擦拭器、烧杯、多孔过滤器、吸水过滤器和吸头。

[0035] “靶物”是指可能存在于样品中的细胞、病毒、分子（例如，大分子诸如蛋白、DNA、RNA 或碳水化合物，和小分子，诸如化学治疗药、脂质、糖、氨基酸、或核苷酸）或分子络合物，通过本发明测试其存在。

[0036] “靶物竞争物”是指与靶物竞争结合种类 - 结合分子的细胞、病毒、分子（例如，大分子诸如蛋白、DNA、RNA 或碳水化合物，和小分子，诸如化学治疗药、脂质、糖、氨基酸、或核苷酸）或分子络合物。靶物竞争物可以是与选择部分缀合或稳定连接的靶物。

[0037] “靶物种类”是指多个靶物共有的一个或更多个特征，使得多个靶物被视作对于使用本发明构建的实验目的而言是相同的。例如，对于用于检测所有 HIV 病毒的实验，所述种类是 HIV。这样的实验会检测所有 HIV 病毒，而不区分 HIV-1 和 HIV-2 变体。在该情况下，靶物的种类包括 HIV-1 和 HIV-2。另一个实验的目的可能是将 HIV-1 与 HIV-2 区分开。在该情况下，每类 HIV 被视作不同的种类。如果实验目的是检测白色假丝酵母菌，3 个探针被视作对于实验目的而言是相同的，因为它们具有共同特征，即它们特异地结合白色假丝酵母菌，且被视作属于相同的靶物种类分子。

[0038] “种类 - 结合分子”是指特异地结合种类特异性的结合位点的分子或分子络合物。种类 - 结合分子的实例是杂交基因组 DNA 的核酸探针；已经在体外选择或“进化”成特异地结合蛋白上的位点的核酸适体；结合细胞抗原或血清蛋白的抗体；和特异地结合激素受体或结合分子（诸如抗生素蛋白）的配体（诸如表皮生长因子或生物素）。如果它们结合不同的且无重叠的种类特异性的结合位点，则 2 个种类 - 结合分子是不同的。可以根据它们的分子组成提及种类 - 结合分子，例如，种类结合的寡核苷酸、探针、抗体、配体等。根据本发明的术语“抗体”包括、例如，能特异地结合分子或分子络合物的任意多肽，包括、例如，完整的整个抗体、嵌合抗体、双体、双特异性的抗体、Fab 片段、 $F(ab')_2$ 分子、单链 Fv (scFv) 分子、串联 scFv 分子和适体。完整的整个抗体包括单克隆抗体诸如鼠单克隆抗体 (mAb)、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化的抗体和人抗体。所述抗体也可以包括合成地衍生的序列。

[0039] “特异地结合”是指以小于 10^{-6} M、更优选小于 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M 或 10^{-12} M 和最优选小于 10^{-13} M、 10^{-14} M 或 10^{-15} M 的解离常数结合分子或分子络合物的种类 - 结合分子。种类 - 结合分子与靶物种类的特异性结合可以在结合条件下发生于作为实验扫描的种类的成员的基本上所有靶物（例如，至少约 70%、80%、90%、95%、99% 或更多的靶物结合种类 - 结合分子），但基本上不发生于可能存在于样品中的其它分子（例如，小于约 1%、5%、10%、15%、20% 或 25% 非靶分子结合种类 - 结合分子）。在扫描的种类中的靶物所结合的种类 - 结合分子的数目相对于不在这样的种类中的靶物所结合的数目，通常是 2 倍、5 倍、10 倍、或大于 50 倍大。

[0040] “捕获分子”是指稳定地结合在表面、膜或非颗粒的其它基质上的种类 - 结合分子。

[0041] “信号元件”是指直接产生可检测信号的分子或颗粒。短语“直接产生”表示下述事实，即信号元件是可检测信号的直接来源或关键调节剂。因而，如果信号是源自荧光团的

光子，则所述荧光团是光子的直接来源，且因此是信号元件。如果信号是由 RLS 颗粒散射的光子，则所述 RLS 颗粒是信号元件。或者，如果信号是从辣根过氧化物酶的发色沉淀产物透射或散射的光，则所述发色产物是信号元件。

[0042] 信号元件的一个特征是，这样的元件不可分成部分，使得每个部分产生与整体相当（按照特征，不一定按照强度）的信号。因而，2 nm 直径量子点是信号元件，因为分割它会改变得到的纳米晶体的特征（发射谱）。用诸如荧光素等荧光染料浸渍的 5 μm 颗粒不是信号发射元件，因为它可以分成部分，使得每个部分具有与完整颗粒相当的信号发射特征。相反，分子荧光素是信号发射元件。信号产生酶（例如，萤光素酶、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶）的可检测产物也被视作信号元件。这样的信号元件（或它们的前体，当存在前体向信号元件的化学转化时）可以是可扩散物质、不溶产物和 / 或不稳定中间体。例如，酶碱性磷酸酶将化学发光底物 CDP-Star (NEN；目录号 NEL-601) 转化成活化产物，它是发射光子的信号元件。

[0043] “信号发射部分”是指这样的分子、颗粒或物质，其包括或产生（在酶的情况下）一个或更多个信号元件，且是或可以稳定地连接到种类 - 结合分子上。信号发射部分可以共价地或非共价地、直接地或间接地（例如，通过一个或更多个连接物或“化学连接物”部分，或通过缀合到相同颗粒上的两个部分）结合到种类 - 结合分子上。信号发射部分的实例包括羧基化的量子点；修饰成结合核酸探针或抗体探针的荧光团（诸如德克萨斯红）；抗生蛋白链菌素 - 包被的荧光聚苯乙烯颗粒（其可以缀合到生物素化的种类特异性的结合蛋白上）；含有重复核酸序列的滚环复制产物，每个所述序列可以杂交几个寡核苷酸，所述寡核苷酸以荧光修饰的核苷酸为尾巴，且在 5' 末端含有种类特异性的结合寡核苷酸。信号发射部分可以包括物理上不同的元件。例如，在某些情况下，所述信号发射部分是缀合到种类 - 结合分子（例如抗体）上的酶（例如，碱性磷酸酶）。当碱性磷酸酶的底物（例如，CDP-Star 或 BM 紫，分别来自 NEN 和 Roche）被转化成信号元件产物（例如，发射光子的不稳定中间体，或可沉淀的发色产物）时，产生信号。对于种类 - 结合分子、酶促信号发射部分和在不同时间应用于反应中的底物，它不是罕见的。

[0044] “颗粒”是指尺寸小于 50 微米的基质。一群或一批颗粒的尺寸被定义为颗粒样品的最长正交维数对的平均测量。最长正交维数对是这样的颗粒正交维数对，其长度总和是该颗粒的所有这种总和的最大值。如果 2 个颗粒的样品分别具有 1 微米 × 2 微米和 2 微米 × 3 微米的最长正交维数对，最长正交维数对的平均测量是 2 微米 [(1+2+2+3)/4 = 2 微米]。颗粒样品的最长正交维数对的平均测量是，例如，小于 50 微米、小于 20 微米或小于 5 微米。

[0045] 许多颗粒具有一些固体特征。但是，可能不是刚性的分子支架或络合物也被定义为颗粒。例如，树枝状聚合物或其它分支分子结构被视作颗粒。类似地，脂质体是另一类颗粒。颗粒可以结合或缀合到信号元件上。经常用反映它们的尺度或几何形状的术语，表示颗粒。例如，术语纳米球、纳米颗粒或纳米珠用于表示沿着任意给定轴测量小于 1 微米的颗粒。类似地，术语微球、微粒或微珠用于表示沿着任意给定轴测量小于 1 毫米的颗粒。颗粒的实例包括胶乳颗粒、聚丙烯酰胺颗粒、磁体微粒、铁磁流体（磁性纳米颗粒）、量子点等。

[0046] “标记颗粒”是指可以特异地结合靶物并产生信号的颗粒。标记颗粒缀合到信号发射部分和种类 - 结合分子上。

[0047] “靶物：标记颗粒络合物”是指一种或更多种靶物特异性地结合的标记颗粒。

[0048] “标记比”是指在接触步骤中靶物与标记颗粒之比。例如，如果使 1×10^7 标记颗粒接触含有 1×10^6 靶物的样品，则标记比是 0.1。为了计算标记比的目的，仅考虑可以特异性地结合标记颗粒的靶物。例如，在计算中不包括物理上不可达到的靶物（例如，隔绝在细胞隔室中）。

[0049] 信号元件或信号部分的“信号特征”(signal character) 是指由所述信号元件或信号发射部分产生的信号的一个或更多个方面，其可以用于与其它信号元件或信号发射部分区分开。例如，用荧光素和罗丹明标记的信号发射部分的信号特征是荧光。放射转发器的特征是射频。光子信号发射特征的实例是荧光、光散射、磷光、反射比、吸光度、化学发光和生物发光。所有(除了最后 2 个实例以外) 光子信号发射特征依赖于外部辐照（例如白光源、激光源、或日光）。相反，化学发光和生物发光是独立于外部光源的信号发射特征。

[0050] “信号标志”(signal signature) 是指结合实验靶物种类的信号发射部分的组合的特征性信号发射特性。结合 4 类抗体(其中之一缀合到荧光素分子上，其中 3 类用罗丹明分子缀合) 的靶物具有用荧光素和罗丹明的组合的加权的吸光度和发射谱描述的信号标志。

[0051] “选择力”是指用于捕获、分离、移动或隔绝靶物的力。选择力的实例包括重力、磁力、电势、离心力、向心力、浮力密度和压力。通过单独作用于靶物上的选择力，可以移动靶物。或者，可以使选择力特异性地作用于与选择部分结合的靶物上（参见下文定义）。

[0052] 施加选择力来移动靶物的实例包括：靶物的离心；结合到磁性颗粒上的靶物的磁性选择；用金属颗粒标记的靶物的重力沉降；和通过真空气过滤将靶物沉积在多孔膜上。在下面的实施例中包括了选择力的应用的其它实例。

[0053] “选择部分”是指这样的原子、分子、颗粒或其它实体，其可以缀合到种类 - 结合分子上，并给种类 - 结合分子赋予通过选择力被选择性地捕获、分离、移动或隔绝的能力。当种类 - 结合分子：选择部分络合物特异性地结合靶物时，所述靶物通常还可以通过选择力被选择性地捕获、分离、移动或隔绝。“选择性的”表示选择力对选择部分和结合的实体的移动的优先赋予易感性超过选择部分未结合的实体。

[0054] 顺磁颗粒和铁蛋白是选择部分的实例。在溶液中下沉的致密的二氧化硅颗粒是另一类选择部分。当被种类 - 结合分子包被且结合微生物靶物时，这样的颗粒会造成靶物在水溶液中下沉，由此将结合的靶物与其它样品未结合的组分分离。

[0055] “选择特征”是指可用于捕获、选择或移动选择部分的选择部分的一个或复数个方面。例如，顺磁颗粒的选择特征是磁性。在水溶液中快速下沉的二氧化硅颗粒的选择特征是密度。

[0056] “大致平面的”表面或基底是指这样的表面，其可以平行地对齐假想平面，使得当从该表面上的任何 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 正方形中的点向假想平面上的最近点测量距离时，平均距离的绝对值小于 50 微米。

[0057] “检测表面”是指，在本发明的某些实施方案中，在其上面沉积靶物的大致平面基底的表面。在使用光子信号发射特征的实施方案中，如果所述检测表面是透光的，通过检测表面的任一面，可以实现检测。如果所述检测表面是不透光的，通过沉积靶物的检测表面的一面，可以实现检测。

[0058] “检测区”是指通过本发明同时分析的检测表面区域或检测带。检测区的最长线性尺寸通常大于 1 mm, 例如, 大于 5 mm、10 mm 或 15 mm。例如, 通过包括集合透镜和 CCD 芯片的光学装置同时成像的载玻片部分可以测量 0.8 cm × 0.5 cm。则检测区是 0.4 cm²。

[0059] “检测带”是指可以在其中检测靶物的体积。检测带具有与检测区相同的尺度, 但是具有与可以在其中检测和鉴别标记颗粒的深度相对应的深度。检测带的深度因此依赖于用于评分阳性信号的阈值标准。当使用光学检测时, 检测带的深度依赖于场的光学深度。

[0060] 检测区的“最长尺度”是指在检测区周边上的 2 个点之间可以绘制的最大长度线。例如, 如果检测区是测量为 0.3 cm × 0.4 cm 的矩形, 检测区的最长尺度是对角线 0.5 cm。如果检测区是半长径长度为 7 mm 且半短径长度为 2.5 mm 的椭圆形, 检测区的最长尺度是 14 mm。

[0061] 检测区的“最短尺度”是指在检测区周边上的 2 个点之间可以绘制的最小长度线。例如, 如果检测区是测量为 0.3 cm × 0.4 cm 的矩形, 检测区的最短尺度是对角线 0.3 cm。如果检测区是半长径长度为 7 mm 且半短径长度为 2.5 mm 的椭圆形, 检测区的最短尺度是 5 mm。

[0062] “大面积检测”或“大面积成像”是指用于检测微型靶物的方法, 其中检测区(通过检测装置同时分析的区域)远远大于靶物。用于大面积检测的检测区具有≥ 1 mm 的线性尺度。相反, 微型靶物实质上更小, 通常在至少 2 个正交维数测量小于 50 μm。大面积检测的实例包括: 用 CCD 照相机对 9 mm 直径检测区成像; 通过用具有 1 cm 长尺寸的 CCD 线性扫描器扫描, 对 2 cm × 1 cm 矩形成像; 使用直接暴露于照相胶片, 对含有微生物靶物的 4 cm × 4 cm 滤光片成像; 和在快速侧向流试验纸检验中, 目检与 1 cm × 3 cm 实验区上的微型靶物相对应的色斑。

[0063] “缀合”或“稳定结合”是指 2 个实体之间的物理结合, 其中结合的平均半衰期是在 PBS 中在 4°C 至少 1 天。

[0064] 在检测区部分中“同时检测”靶物是指在一个步骤中检测来自大致平面的检测表面部分的信号。使用 CCD 芯片、目检或基于光电二极管的信号整合对检测区的靶物进行大面积成像, 是同时检测的实例。

[0065] “样品”是指通过本发明扫描靶物的存在的物质。

[0066] “直接目检”是指在没有除了可佩戴式矫正透镜以外的其它仪器的辅助下的目检。例如, 直接目检可以用于在某些快速侧向流试验中检测纳米金颗粒的淡红色的反射信号。

[0067] “光电检测器”是指将光子信号转换成电信号的人造装置或仪器。光电检测器的实例包括 CCD 检测器、光电倍增管检测器和光电二极管检测器、例如, 雪崩光电二极管。

[0068] “辐照”是指用电磁辐射照射。不同波长的电磁辐射可以用于辐照。它包括, 例如, 用在 X-射线、紫外线、可见光或红外线光谱区域中的波长辐照。应当指出, 辐照不一定在可视区。

[0069] 具有“光子信号发射特征”的信号元件或信号发射部分是指这样的信号元件或信号发射部分, 其可以通过光子的发射、反射、散射、折射、吸收、捕获或重定向或光子行为的任意其它调节或组合来检测。具有光子信号发射特征的信号元件或信号发射部分的某些实例包括: 荧光团德克萨斯红(荧光信号发射特征); CDP-Star(化学发光信号发射特征); 萤光素酶(生物发光信号发射特征); 共振光散射颗粒(光散射信号发射特征); BM 紫

(光吸收或发色信号发射特征); 和上转化磷光体(吸收2个长波长光子,并发射1个更短波长光子)。

[0070] PBS是磷酸盐缓冲盐水溶液,其含有:120 mM NaCl、2.7 mM KC1和10 mM 磷酸盐缓冲液(钠盐)pH 7.4。

[0071] PBS-TBP是磷酸盐缓冲盐水溶液,其含有:120 mM NaCl、2.7 mM KC1和10 mM 磷酸盐缓冲液(钠盐)pH 7.4,所述磷酸盐缓冲液含有2 mg/ml BSA、0.05% 吐温20和0.05% v/v Proclin® 300。

[0072] Tris-TBP是20 mM Tris HCL pH 7.4,其含有2 mg/ml BSA、0.05% 吐温20和0.05% v/v Proclin® 300。

[0073] EDAC是(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺。

[0074] BSA是牛血清白蛋白。

[0075] CCD是电荷耦合器件。

[0076] CFU是集落形成单位(与存活细菌细胞的数目相对应的细菌浓度的度量)。

[0077] HBV是乙型肝炎病毒。

[0078] HCV是丙型肝炎病毒。

[0079] HIV是人免疫缺陷病毒。

[0080] TSH是促甲状腺激素。

[0081] 除非另外指出,在本说明书中描述的微生物菌株从维吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(ATCC)得到。

附图说明

[0082] 图1. 特异性的和非特异性的标记的比较。

[0083] 图2. 用于使样品接触其它反应组分的方法。

[0084] 图3. 捕获靶物的不同方法。

[0085] 图4. 用发荧光的DNA染色剂标记金黄色葡萄球菌——金黄色葡萄球菌DNA的SYTO-13®染色的相对对数荧光强度。

[0086] 图5. 用缀合到荧光纳米颗粒上的鸡抗-A蛋白抗体标记金黄色葡萄球菌细胞。被抗体包被的荧光颗粒染色的金黄色葡萄球菌细胞的相对对数荧光强度。

[0087] 图6. 通过流式细胞术测定金黄色葡萄球菌特异性的荧光颗粒的结合效率。

[0088] 图7. 测试被抗-金黄色葡萄球菌抗体包被的磁性颗粒。生物试验显示了在磁性选择后金黄色葡萄球菌磁性捕获百分比与磁性颗粒的数目的关系。

[0089] 图8. 铬变素2R染料吸收在与成像仪使用的激发和发射滤光器透过的光相对应的波长的光。

[0090] 图9. 染料可以用于减弱来自荧光颗粒的信号。

[0091] 图10. 使用磁性捕获和染料测定人血清中的人促甲状腺激素(hTSH)。

[0092] 图11. 证实使用人促甲状腺激素试验试剂对染料和垫子的影响的染料-垫子试剂的实验。

[0093] 图12. 证实使用TSH试验试剂对染料和垫子的影响的染料垫子试剂的实验。hTSH的磁性选择实验。

- [0094] 图 13. 当样品是全血时,形成双层系统所需的密度试剂的浓度。
- [0095] 图 14. 通过计算经染料垫子选择后的单个荧光微粒,对全血中 hTSH 的灵敏检测。
- [0096] 图 15. 使用磁性捕获、垫子染料试剂、载体磁体,检测人全血中的人促甲状腺激素(hTSH) (实施例 8)。
- [0097] 图 16. 使用分散的磁性捕获和垫子染料试剂,测定人血浆中的人促甲状腺激素(hTSH) (实施例 9)。
- [0098] 图 17. 使用分散的磁性捕获和垫子染料试剂,测定人血浆中的人促甲状腺激素(hTSH) (实施例 9)。
- [0099] 图 18. 使用磁性捕获和垫子染料试剂,检测人血浆中的细菌炭疽芽孢杆菌致死因子(LF) (实施例 10)。
- [0100] 图 19. 使用磁性捕获和垫子染料试剂,检测人血浆中的细菌炭疽芽孢杆菌致死因子(LF) (实施例 10)。
- [0101] 图 20. 使用磁性捕获和垫子染料试剂,检测人血浆中的细菌炭疽芽孢杆菌保护抗原(PA) (实施例 11)。
- [0102] 图 21. 使用磁性捕获和垫子染料试剂,检测人血浆中的细菌炭疽芽孢杆菌保护抗原(PA) (实施例 11)。
- [0103] 图 22. 检测人尿中的细菌炭疽芽孢杆菌聚-D-γ-谷氨酸(PDGA) 荚膜多肽 (实施例 12)。
- [0104] 图 23. 检测人尿中的细菌炭疽芽孢杆菌聚-D-γ-谷氨酸(PDGA) 荚膜多肽 (实施例 12)。
- [0105] 图 24. 通过自动化分析,检测人全血中的细菌炭疽芽孢杆菌致死因子 (实施例 13)。
- [0106] 图 25. 用于检测细菌蛋白炭疽芽孢杆菌聚-D-γ-谷氨酸荚膜多肽的竞争免疫测定 (实施例 14)。
- [0107] 图 26. 用于人 TSH 和细菌炭疽芽孢杆菌 PA 和 PDGA 的阳性和阴性内部试验对照 (实施例 15)。
- [0108] 图 27. 在通过染料垫子进行磁性选择后,计算被 DNA 染色剂标记的单个金黄色葡萄球菌细胞 (实施例 16)。
- [0109] 图 28. 使用 DNA 染色剂和特异性的磁体的非特异性标记的金黄色葡萄球菌染料垫子试验的特异性 (实施例 16)。
- [0110] 图 29. 通过使用非特异性的 Sybr Green DNA 染色进行检测,并使用染料垫子试剂进行磁性选择,检测金黄色葡萄球菌 (实施例 16)。
- [0111] 图 30. 用缀合到荧光纳米颗粒上的鸡抗 - 蛋白 A 抗体标记金黄色葡萄球菌细胞 (实施例 17)。
- [0112] 图 31. 使用特异性标记(缀合到荧光纳米颗粒上的鸡抗 - 蛋白 A 抗体)的金黄色葡萄球菌试验的特异性 (实施例 17)。
- [0113] 图 32. 通过使用缀合到荧光颗粒上的鸡抗 - 蛋白 A 抗体进行检测,并使用染料垫子试剂进行磁性选择,检测金黄色葡萄球菌细胞 (实施例 17)。
- [0114] 图 33. 通过细胞的选择性生长和免疫检测,检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌

(MRSA) 的方法 (实施例 18)。

[0115] 图 34. 通过细胞的选择性生长和免疫检测, 检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA) (实施例 18)。

[0116] 图 35. 人促甲状腺激素试剂的试剂 - 低压冻干的稳定化 (实施例 19)。

[0117] 图 36. 使用低压冻干的试剂的人促甲状腺激素试验 (实施例 19)。

[0118] 图 37. 甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌试剂的试剂 - 低压冻干的稳定化 (实施例 20)。

[0119] 图 38. 使用低压冻干的试剂的金黄色葡萄球菌试验 (实施例 20)。

[0120] 图 39. 通过选择的络合物的移动, 特异地检测生物素 (实施例 21)。

[0121] 图 40. 在使用光漂白的试验中, 特异地检测金黄色葡萄球菌 (实施例 22)。

[0122] 图 41. 光漂白用于鉴别图像中的碎片 (debris) 的应用, 其中所述标记是对光漂白敏感的 (实施例 23)。

具体实施方式

[0123] 本发明的概述。本发明测试样品中微型靶物 (细胞、病毒、分子 (例如, 大分子诸如蛋白、DNA、RNA 或碳水化合物, 和小分子, 诸如化学治疗药、脂质、糖、氨基酸、核苷酸) 或分子络合物) 的存在, 其中使用灵敏的大面积来计数单个标记的靶物和不需要洗涤步骤的方法。本发明的这些属性允许准确的、灵敏的、特异性的、快速的、容易地使用的、和节省成本的测试, 同时简化仪器化工程, 并使用户步骤最少化。所述方法可以使用在本文中和在 2009 年 9 月 24 日提交的标题为 “Imaging analyzer for testing analytes” 的国际申请号 _____ (其通过引用并入本文) 中所述的成像分析仪来实现, 和 / 或用在本文中和在 2009 年 9 月 24 日提交的标题为 “Kits and devices for detecting analytes” 的国际申请号 _____ (其通过引用并入本文) 中所述的试剂盒或装置来实现。

[0124] 在下面的部分中描述了所述方法的一些关键功能和属性 :

1. 样品
2. 靶物
3. 样品处理
4. 实验装置
5. 标记
6. 选择
7. 试验形式
8. 接触
9. 沉积
10. 区分标记的靶物
11. 检测
12. 分析
13. 组合装置
1. 样品

可能含有靶物且可以通过本发明测试的样品可以是液体、固体、气体或所有 3 种的组

合。样品类型包括临床样品（例如，血液或尿）、生产样品（例如，食品或药物）和环境样品（例如，空气、表面或水）。样品可以是基本上均匀的，例如含有溶质和少数微粒的液体，或样品可以是非均匀的，诸如泥土或来自环境样品（诸如土壤）的其它颗粒的悬浮液。样品可以含有一类或更多类靶物，且所述靶物可以是天然的或合成的靶物，或天然的和合成的靶物的混合物，例如血液可以含有激素（天然物质）和合成的药物。

[0125] 使用本发明可以测试的样品来源可以包括人类、动物、植物，且样品类型可以包括尿、血液、胆汁、滑膜关节液、血清、血浆、脊髓液、羊水、汗水、鼻和呼吸道液体、阴道分泌物、精液、伤口渗出物、痰和支气管肺泡灌洗液、来自节肢动物或软体动物的血淋巴、或从植物获得的流体（诸如细胞液）。样品还可以包括来自人类或其它生物体的固体，和可能具有液体或固体特性的样品（诸如粪便），它们可以从澄清液体至坚硬固体等，诸如骨，毛发，干燥的细胞，皮肤样品，新鲜的、冷冻的或固定的病理样品，和从鼻、鼻咽、咽喉、腋窝、会阴或直肠部位采取的拭子。其它生物样品包括来自生物来源的气体，诸如屁，或从口腔或鼻腔收集的气体。

[0126] 样品包括来自天然的、工业的或商业来源的材料，包括原料、生产中的、制造好的或完成的产品，诸如食物、饮料、动物饲料、化妆品、药品或兽医产品、肥料、聚合物、塑料、橡胶、木材或纸产品、编织物、和用于人类或动物的局部或内部应用的产品、或上述任一种的中间体。其它类型的样品包括来自研究或测试实验室的材料，诸如细胞培养上清液、体外培养的细胞、来自用于研究或测试的动物（诸如小鼠或豚鼠）的样品、或用于测试目的而培养或采集的植物样品。样品可以包括来自天然来源的液体、固体或气体，诸如用于监测细菌或化学物质的湖或河水样品，要测试化学物质、毒素或微生物的土壤。

[0127] 使用本发明，还可以测试生产环境监测样品，诸如从工业或医学设备得到的样品（对于环境或化学监测而言）。例如，通过拭或抹用于生产或储存食物或饮料的装置的表面，可以得到样品。

[0128] 样品可以含有活微生物，例如象在发酵液中，在来自具有血液感染的人的血样中，或在某些食物产品中。

[0129] 样品体积可以从数升至纳升。例如，在测试饮用水中污染物的存在时，样品可以是数升水；可以处理样品，以浓缩可能存在的任意靶物。相反，如果研究人员希望针对毒素或药物对活小鼠的作用进行长期研究，且样品是从小鼠得到的全血，则希望限制样品体积。

[0130] 2. 靶物

靶物是在样品中可能存在的细胞、病毒、分子（例如，大分子诸如蛋白、DNA、RNA 或碳水化合物，和小分子，诸如化学治疗药、脂质、糖、氨基酸、核苷酸）或分子络合物，且其存在可以通过本发明来测试。使用本发明，可以检测和 / 或定量许多不同类型的靶物。灵敏地检测许多不同类型的靶物的能力，是本发明的优点。

[0131] 靶物的大小可以变化。诸如人卵细胞或巨核细胞等靶物的直径可以是 100 微米或更大；循环的肿瘤细胞可以是几微米；细菌的直径可以是 1 微米；而蛋白或核酸靶物的大小可以是几至数百纳米。更小的靶物（诸如抗生素、毒素和杀虫剂）的尺寸可以是 10 纳米或更小。

[0132] 靶物的丰度可以变化。例如，血样中存在的细菌或病毒的浓度可以是小于 1 个细胞或 CFU 或病毒 /10 mL 至大于 1×10^6 CFU 或病毒颗粒 /mL；类似地，诸如促甲状腺激素、

人绒毛膜促性腺激素或前列腺特异性的抗原等蛋白的浓度可以变动巨大。例如，血清中人绒毛膜促性腺激素的浓度可以变动超过 4 个数量级，从小于 5 至大于 150,000 mIU/mL。

[0133] 靶物可以是来自多细胞生物的细胞或细胞碎片。细胞靶物的实例可以包括细胞，诸如精子、花粉、真菌或植物孢子、和从血液或其它生物流体得到的细胞。例如，在血液中可以发现 CD4+ 细胞和循环的肿瘤细胞；前者被用于 HIV 检测，后者可以用于癌症诊断。细胞碎片的实例包括血小板、人血液的正常组分、和亚细胞级分诸如细胞核、线粒体、溶酶体、或过氧化物酶，它们可以从样品处理产生。

[0134] 靶物可以是微生物或微生物的一部分，诸如细胞壁的片段，或 2 个或更多个微生物的聚集体。微生物可以包括病毒、细菌、细菌孢子、古细菌、真菌、原生生物或多细胞微生物诸如线虫类、桡足类或轮虫类。在许多样品（如环境土壤样品，或来自人类消化系统的样品）中，微生物可能结合到微粒上，或可能作为混合菌群的一部分存在。

[0135] 靶物可以是生物或人工聚合物，包括核酸、蛋白和肽、多糖和在不同类型的聚合物之间或在不同类型的聚合物和非聚合化合物之间的共价或非共价络合物，诸如被辅基共价修饰的酶。靶物还可以包括已经被破坏的生物聚合物，诸如已经被紫外线辐射破坏的 DNA 分子。聚合的靶物还可以包括合成的聚合物和生物聚合物的合成类似物，其已经被修饰成包含合成的化合物，诸如合成的寡核苷酸，其可以包括在自然界中通常不存在的部分。肽和肽类似物（诸如逆 - 反肽（retro-reverso peptide））是可以作为靶物的另一类化合物。

[0136] 靶物可以是天然的分子或合成的分子。天然化合物的实例包括维生素、激素、神经递质、脂类、氨基酸、糖类、次级代谢物、毒素和信息素。合成的分子的实例包括杀虫剂、化学中间体、单体、成形剂、表面活性剂和其它工业产品。靶物还可以是药物化合物，例如，药物。

[0137] 使用本发明可以检测或定量蛋白。蛋白包括，例如，细胞因子、激素、酶、结构蛋白、受体等。蛋白靶物还可以经历修饰，这种修饰的存在可能是令人感兴趣的，诸如血液中糖基化的血红蛋白的量，这是在糖尿病的诊断和治疗中使用的标志物。蛋白可以与其它蛋白或其它分子（诸如核酸或低分子量分子诸如 FAD）一起存在于不同的络合物中。

[0138] 在酶的情况下，检测酶（主要靶物）或酶的产物（次级靶物）可能是有用的。例如，通过提供内酰胺抗生素诸如苄青霉素，并检测苄基青霉噻唑酸，可以检测内酰胺酶。

[0139] 3. 样品处理

根据待测样品和试验，可以以不同的方式将样品呈递给试验。这些包括、但不限于：在运输介质中的拭子或从取样部位得到的拭子；全血、血清或血浆的试管；使用刺指针后在指尖处呈现的全血滴，或在耳垂或其它表面（诸如前臂）上呈现的全血滴；存在于容器中的成形的或未成形的大便；诸如印迹到运输介质（诸如滤纸或膜）上的全血等样品；在皮肤或其它体表上呈现的泪滴或汗滴。

[0140] 根据样品的性质和实验要求，样品处理可能具有几个功能，但是通常用于提高靶物用于测试的可用性。理想地，样品处理需要用户端的微量工作。样品处理可以发生于不同时间和不同地点。样品处理可以发生于样品到达测试地之前，在收集地或运输中的某点，或样品处理可以作为测试过程的一部分而发生，或样品处理可以发生于测试地，但不是作为测试过程的一部分。样品处理可以发生于 2 个或更多个分散的阶段或步骤，例如可以存在加工，以在收集地保存靶物，并在测试地进一步加工，以使靶物适用于试验。

[0141] 样品处理可以作为样品收集的一部分而发生。例如，如果血液收集管含有 EDTA，可

以在收集过程中防止血液凝固；用户除了选择正确的收集管以外，不需要做任何其它工作。

[0142] 有些样品处理操作包括从固体、半固体或液体基质或从收集装置提取靶物。例如，检测骨样品中的靶物的实验可能包括下述步骤：机械破碎，并进行液体提取，以将靶物溶解到液相中，使得它们适用于试验，并浓缩靶物，从而提高试验的灵敏度。其它过程（包括过滤或离心样品）可以用于从可溶性样品去除微粒，以允许测试均匀的液体。这可能包括，加工血液以生成血浆或血清，或在测试艰难梭菌毒素之前从粪便样品去除固体。样品处理方法可以包括下述步骤：诸如纯化，从诸如拭子或过滤器等取样装置洗脱，以批式或连续模式离心，电泳或渗析（diaphoresis），色谱法，用水性或有机稀释剂或溶剂萃取或混合，使用聚合物或盐的两相分配，用于匀浆化或破碎的超声处理，加压，例如使用弗氏细胞压碎器来破碎微生物。机械样品处理包括用筛子筛分；机械破碎，诸如切、砍、压制或压榨和研磨。

[0143] 其它加工操作包括稀释或浓缩样品或以其它方式调制样品，以便测试。例如，检测在大水样品中存在的低浓度微生物的实验可能包括过滤和浓缩步骤。可以合并或组合样品，以减少总数或需要的实验。还可以使用样品处理来提高实验结果的质量。在某些情况下，样品可能不经样品处理就适用于测试，但是加工会提高结果的质量。例如，不经样品处理就检测血液或血浆中的蛋白靶物是可能的，但是通过诸如离心等步骤，可以提高试验的灵敏度。因而，样品处理的量和类型由下述因素决定：样品的性质，靶物的性质，和用户对速度、容易使用、节省成本、再现性、不受干扰、分辨率和灵敏度的要求。

[0144] 样品处理可以包括，加入不同的化学试剂。例如，通过加入酸或碱来调节样品的pH，或通过加入NaCl来调节盐浓度，或加入试剂来造成靶物或其它物质沉淀，可能是必要的。化学试剂的加入可以造成几个步骤同时发生，例如，聚合物的加入可以造成样品形成两相系统，其中靶物被富集在一个相中，而干扰物质被富集在另一个相中。可以加入化学试剂来使样品着色，例如，颜料的添加可以辅助用户鉴别样品。可以加入去污剂来实现细胞的裂解（例如，可以加入皂苷来裂解哺乳动物细胞，而不裂解细菌细胞），溶解组分，或改善样品在诸如过滤等其它步骤过程中的润湿或流动。化学试剂可以在其它步骤之前加入，作为预处理，例如，在过滤之前，可以加入去污剂，以溶解样品。

[0145] 为了不同的原因，可以加入酶，作为样品处理步骤的一部分。组织的解聚可能是必要的，以使细胞适用于测试。另外，众所周知，某些酶（诸如溶菌酶或溶葡萄球菌酶）会降解细菌的细胞壁；这些酶的加入，可以用于将靶物从细菌细胞内释放出来。在样品处理过程中可以加入核酸酶，例如，为了降低处理后生物样品的粘度。也可以使用酶来将底物转化成靶物。

[0146] 可以使用样品处理来保持靶物免于降解或修饰，例如，在收集时，可以将蛋白酶抑制剂加入样品中，以确保蛋白靶物不被蛋白酶降解和变得不可检测。还可以在任意时刻加入诸如Proclin®或叠氮化钠等防腐剂，以防止生物生长；例如，众所周知，许多微生物会分泌蛋白酶和核酸酶，这些酶可能降解目标靶物。样品处理可能包括加热或冷却样品的步骤。例如，可以冷冻样品，以抑制在样品收集和测试之间的微生物的生长；可以使用冷冻来防止不稳定靶物的降解。

[0147] 当样品含有微生物时，在允许生物生长或选择性生长的条件下处理样品，可能是有用的。例如，在测定血液中是否存在细菌的实验中，获知单个细菌是否存在于几毫升体积的样品中，可能是有用的。在该情况下，在细菌生长培养基中进行或不进行稀释地温育样

品,将允许细菌分裂和生长。在某些情况下,诸如检测在可能含有其它微生物的样品中的一种特定微生物,可能有用的是,处理样品,使得仅目标生物存活,或使样品处于揭示生物的特定生长性能的生长条件。例如,为了检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌在血液中的存在,可能有用的是,混合样品和含有抗生素的生长培养基,使得甲氧西林抗性的生物生长,而甲氧西林敏感的生物不生长。

[0148] 可以组合样品处理方法。例如,可能必要的是,离心或过滤器样品,以去除微粒,然后去除干扰物质,并通过色谱法浓缩和纯化靶物。可以手工地或通过自动化装置完成加工步骤。

[0149] 4. 实验装置

本发明可以在许多结构的实验装置中实现。为了实现本发明的步骤,所述装置通常包含:允许样品和其它组件彼此接触的反应孔,和包含检测表面的成像孔,所述检测表面允许由检测器对单个标记的靶物络合物成像。所述检测表面允许来自检测带的信号向检测器发射。所述成像孔也可以用作反应孔。或者,实验装置可能包含单独的反应孔和成像孔。或者,可以使用含有两类孔的单独装置。可以手工地或自动地将实验反应从反应孔移动到成像孔。

[0150] 反应孔和成像孔也可以执行其它功能。例如,在成像孔的检测表面中或附近,可能存在框标,以辅助聚焦,或允许在分析过程中对准图像,或所述容器可以设计成容纳生物危害的样品。实验装置的孔可以生产成含有实验组件,减少以后的试剂添加步骤。所述实验装置可以是一次用弃的(也就是说,使用一次就抛弃),或可以清洁并再次使用。

[0151] 基于实验装置的功能要求、成本和生产复杂性,选择用于实验装置的材料和生产方法。例如,通常使用透明的低荧光塑料来构建成像孔。通过使用商品塑料和高容积生产方法,可以使成本最小化。一类有用的容器是由低成本材料(诸如聚苯乙烯)制成,通过高容积方法形成,诸如注射模塑,其产生非常可再现的部件,每个部件具有低成本。

[0152] 5. 标记

为了检测靶物在反应中的存在,使靶物接触并结合信号发射部分。当对它们成像时,检测带内的标记的靶物会产生可检测的信号。

[0153] 可用于靶物标记过程中的信号发射部分可以具有许多信号发射特征,包括荧光、光散射、拉曼散射、磷光、发光、化学发光、生物发光和颜色。

[0154] 许多类型的信号发射部分可以与试验一起使用,正如在下面的实施例中所证实的。这些包括、但不限于,单个荧光团,包括荧光染料如荧光素、罗丹明、Cy®染料系列(GE healthcare)和Alexa®系列(Invitrogen),它们可以被修饰,用于化学偶联到蛋白或核酸上;荧光核酸染料如碘化丙啶或SYBR®和SYTO®染色剂(Invitrogen),它们当与核酸结合时会发荧光;与绿荧光蛋白或藻胆蛋白类似的荧光蛋白;和量子点。通过将多个荧光团掺入信号发射部分中,可以产生更高强度的信号。例如,荧光地标记的聚合物和荧光微粒可以携带多个荧光团,并产生高-强度信号。当与适当底物一起温育时会产生化学发光、生物发光或发色信号的酶,在有它们的底物存在下,也可以构成信号发射部分。一般而言,考虑待测样品的性质(例如固有的荧光)和检测方法(例如基于CCD的成像,其通过特定的滤光片集合),选择信号发射部分。

[0155] 在本发明的某些实施方案中,使用特异性的标记来选择性地标记靶物。特异性的

标记包括与一个或更多个上述信号发射部分缀合或稳定结合的一类或更多类结合分子。种类结合分子的实例包括：抗体（如果靶物是抗原）；抗原（如果靶物是抗体）；凝集素（如果靶物含有适当的糖部分）；与目标靶序列互补的核酸探针；受体（如果靶物是受体配体）；和配体（如果靶物是受体）。

[0156] 基于在要连接的两个部分上可利用的化学基团，选择用于将种类结合分子共价连接到信号发射部分上的方法。诸如 Hemanson (Greg T. Hermanson 的 Bioconjugate Techniques, 和 Shan S. Wong 的 Chemistry of Protein conjugation and Cross-Linking) 等参考文献，允许本领域技术人员使用许多缀合方法。在一种常用的方法中，在适合缀合分子的反应条件下，将化学活化的信号发射部分（例如，用 N- 羟基琥珀酰亚胺修饰的荧光颗粒或染料分子）缀合到特定结合部分（例如，抗体）的游离氨基上。在另一种常见方法中，在合成探针时，将荧光地标记的核苷酸掺入寡核苷酸探针中。

[0157] 通过信号发射部分和种类结合分子之间的非共价结合，可以形成某些信号发射部分络合物。例如，在荧光聚苯乙烯微粒的情况下，通过将特异性的结合部分吸附到微粒表面上，可以生产稳定地结合的标记的特异性的结合部分。

[0158] 也可以使用共价连接和非共价稳定结合的组合来生产信号发射部分络合物。例如，可以将种类结合分子化学缀合到生物素上，且可以将信号发射部分化学缀合到抗生素蛋白链菌素或抗生物素蛋白上。当接触这些组分时，形成特异性的标记。这类特异性的标记可以形成在进行实验之前，或可以将组分分别加入反应中，从而在反应过程中生成特异性的标记。

[0159] 本发明的某些实施方案使用未与种类结合分子络合的标记。这些非特异性的标记通常通过结合样品中的分子的化学类别或功能类别或与其反应，产生可检测的信号。图 1 解释了特异性的和非特异性的标记之间的差异。一类非特异性的标记可以化学地修饰在样品中普遍存在的化学基团，包括靶物。例如，N- 羟基琥珀酰亚胺 - 活化的荧光染料可以偶联在样品中到处存在的游离胺，如果靶物存在于样品中且含有游离胺，它会被荧光地标记。或者，N- 羟基琥珀酰亚胺 - 活化的生物素可以用于将生物素偶联到在样品中到处存在的游离胺上。在该情况下，通过加入与生物素或抗生素蛋白链菌素络合的信号发射部分，可以标记靶物和其它含有胺的样品组分。核酸标记剂（实例包括碘化丙啶和 SYTO 和 SYBR 染料系列，购自 Invitrogen）可以用于标记样品中的所有可接近的核酸，包括含有核酸的靶物。非特异性标记的另一个实例是，当靶物是活细胞时，标记样品中的所有有代谢活性的细胞。这可以如下实现：通过使用活细胞染料或代谢染色剂如醋酸荧光素，它们被活细胞代谢，生成信号发射部分。

[0160] 6. 选择

本发明通常使用选择来沉积检测带中的标记的靶物用于成像，并分离或区分结合的和游离的信号发射部分。

[0161] 在本发明中可以采用许多选择特征，每个特征与特定选择部分集合有关。选择特征包括、但不限于，磁性选择、基于浮力密度的选择、通过重力或离心、电泳、介电电泳、过滤、和简单的捕获到固相上。

[0162] 选择的选择部分应当与选择特征的对应选择力相容。对于磁性选择，相容的选择部分包括超顺磁颗粒、铁磁流体和铁蛋白。对于基于密度的选择，相容的选择部分的密度大

于反应物整体,包括诸如二氧化硅颗粒、三聚氰胺颗粒、聚苯乙烯颗粒或其它致密颗粒等部分。当可以通过它的大小或通过它的结合特定类型的过滤器的能力来选择标记的靶物时,可以使用过滤作为选择模式。捕获选择模式包括,通过固定化在表面上的捕获分子,特异性地或非特异性地捕获标记的靶物络合物。当结合剂被固定化在检测带处或附近时,捕获选择在本发明中是最有用的,使得标记的靶物络合物的捕获会固定化检测带内的络合物用于成像。

[0163] 在本发明的许多实施方案中,例如在磁性选择的情况下,通过选择部分与标记的靶物结合,生成可选择的络合物,实现选择过程。在其它情况下,标记的靶物的选择特征允许在没有预先形成可选择的络合物的情况下进行选择。例如,特异地标记的细菌的过滤,在选择过程中使用靶物的尺寸来选择所有细菌(包括标记的靶物)到过滤器上,其中成像会鉴别出标记的靶物。

[0164] 选择部分可以特异地或非特异地结合靶物。靶物特异性的选择部分络合物具有连接到一个或更多个种类特异性的结合部分上的选择部分。抗-TSH 抗体-缀合的磁性颗粒是靶物特异性的选择部分络合物的实例。种类特异性的选择部分络合物会结合靶物,但是不结合样品中存在的其它组分。也可以生产非特异性的选择部分络合物,其结合样品中的宽组分类别,包括靶物。非特异性的选择部分络合物的一个实例是缀合到聚阳离子上的磁性颗粒,所述聚阳离子会结合样品中的所有聚阴离子组分,包括聚阴离子靶物。

[0165] 生产靶物特异性的和非特异性的选择部分络合物。用于生产靶物特异性的和非特异性的选择部分的方法,可以与上面关于生产标记部分的特异性标记所述的那些方法相同。将特异性的或非特异性的结合部分共价地或非共价地连接到选择部分上,形成组分之间的稳定结合。在某些情况下,选择部分的结合特征是选择部分所固有的。例如,如果需要聚阳离子选择剂,其本身是聚阳离子的颗粒可以不经进一步修饰地使用。

[0166] 也可以使用共价连接和非共价稳定结合的组合,生产靶物特异性的选择部分。例如,可以将种类结合分子化学缀合到生物素上,且可以将选择部分化学缀合到抗体蛋白链菌素或抗生物素蛋白上。这类靶物特异性的信号发射部分可以形成在进行实验之前,或可以将组分分别加入反应中,从而在反应过程中生成靶物特异性的信号发射部分。

[0167] 7. 试验形式

本发明可以检测宽范围的靶物。许多实施方案以“夹心”形式进行,其靶物被标记,以允许通过成像方法检测到,且额外地与选择部分络合,以允许在检测带内沉积标记的靶物,使它们可以被成像。标记和选择方法的精确选择取决于样品的性质、要使用的检测方法、和靶物自身的性质。

[0168] 针对它们与特异性的结合部分的反应,将靶物分成 3 类:小分子靶物、没有重复决定簇的大分子靶物、和多价靶物。

[0169] 小分子(半抗原)通常可以仅被单个特异性的结合部分结合。这不允许它们被连接到信号发射和选择部分上的种类结合部分同时结合。在本发明中,小分子的检测可以通过竞争形式来实现,其中靶物的加入会抑制在检测带内的信号发射部分的捕获。小分子的检测存在 3 种基础竞争形式的本发明实施方案。在一个竞争测定实施方案中,用于信号发射和用于选择的种类结合分子彼此互补,其中一个种类结合分子是靶物竞争物,另一个是结合靶物或靶物竞争物的种类结合分子。在样品中没有靶物的情况下,信号发射部分和选

择部分直接彼此结合,所以当进行本发明的沉积步骤时,可测量的信号可以沉积在检测带中,并成像。如果靶分子存在于样品中,会抑制信号发射和选择部分之间的络合物形成,所以沉积在检测带中的信号的量与加入反应中的靶物的量成反函数。在第二个竞争测定实施方案中,信号发射部分和选择部分都缀合到靶物竞争物上。通过在反应中供给的至少二价的种类特异性的分子(例如抗体),实现信号发射部分和捕获部分的交联。加入的靶物与二价的种类特异性的结合分子的结合,会抑制交联反应,导致当靶物存在于反应中时,信号的量减少。在第三个竞争实施方案(c)中,信号发射和选择部分各自缀合到种类-结合分子上,后者可以结合靶物。至少二价的靶物竞争物缀合物的加入会诱导选择性的信号-选择部分络合物的形成。另外,靶物的加入会减少信号发射部分和选择部分之间的交联络合物的形成。

[0170] 大分子靶物通常大到足以接纳独立的种类特异性的结合部分(包括大多数没有多个相同亚基的蛋白和没有重复序列的核酸序列)的至少2个无重叠的结合位点。可以如下检测没有重复序列或决定簇的大分子靶物:通过使用结合靶物上的无重叠区域的结合分子(包括种类特异性的结合分子),允许信号发射部分和选择部分都与靶物络合,而不彼此干扰。具有氨基酸或核苷酸重复序列的大分子、具有至少2个相同亚基的多聚体蛋白、和具有特异性结合决定簇的多个拷贝的病毒或细胞,可以接収单个靶物上的超过一个种类特异性的结合剂的结合,允许、但不要求使用与信号发射部分和选择部分二者缀合的单个种类特异性的结合部分。

[0171] 8. 接触

接触步骤允许形成与选择部分络合的标记的靶物。标记的靶物的形成和与选择部分络合的靶物的形成可以以任意次序先后发生,或可以同时发生。

[0172] 本领域技术人员会理解,可以加入额外组分来提高反应的速率、再现性、稳定性或质量。这些额外组分可以包括:用于控制反应的pH的缓冲液,以及稀释剂、去污剂和其它添加剂,用于减少组分之间的非特异性结合、增加反应中靶物的可用性、提高络合物形成的效率、或用于其它目的。在诸如Christopher Price & David Newman, Principles and Practice of Immunoassay等参考文献中,讨论了额外组分的选择原理。

[0173] 反应的组分(包括靶物、标记、选择部分和额外组分)可以以多种物理结构和预装配程度和以多种次序加入反应中。如果希望先后反应,可以温育第一组组分(例如靶物、添加剂和标记的混合物),然后加入(例如,选择部分和任选的额外添加剂)。所有组分可以以液体形式加入,每种组分分别加入反应孔中。或者,可以预混合液体组分,以实现更少的液体加入步骤。另外,一些或所有供应的反应组分(例如除了样品以外的所有组分)可以在加入反应之前冻干或干燥,且干燥可以对每种组分或组合混合物分别进行。干燥可以以多种形式进行,包括在反应孔中以饼的形式干燥试剂,干燥散装(in bulk)试剂并分配干粉,或冻干单位剂量试剂球并将球分配进反应孔中。通过加入单独的样品,或加入样品和稀释剂,可以重配干燥的试剂。图2解释了向反应中加入组分的一些实施方案。

[0174] 样品和试剂组分的加入可以由操作人员手工地实现,通过使用仪器或筒控制液体流动来自动化,或通过自动化和手工方法的组合来实现。试剂可以散装地供给操作人员或自动化仪器,并在反应时分配,或可以在一次性使用的反应孔或筒内预分配装载(onboard)。

[0175] 混合方法可以任选地施加于反应,以使反应均匀和 / 或增加反应速率。混合可以通过下述方法实现,包括:搅拌,在样品中包含机械混合器(例如,螺旋桨),或通过外部施加的超声或压电混合装置。

[0176] 提供温育阶段,以允许发生接触反应,优选地至结束,或任选地达到足够的反应程度,使得最小量的靶物可以被检测出,可检测量的标记的靶物 - 选择部分络合物可以沉积在检测带中并被检测器成像。

[0177] 进行本发明的接触步骤后,反应混合物含有众多反应产物,包括标记的靶物 - 选择部分络合物、没有结合选择部分的标记的靶物、没有结合标记的靶物 - 选择部分络合物、以及未反应的靶物、标记和选择剂。这些反应物和反应产物通常以均匀形式分散在混合物中。

[0178] 9. 沉积

本发明的一个实施方案包括,将标记的靶物沉积在检测带内用于成像。作为一个替代方案,本发明的一个方法可以包括,检测在检测带内的靶物竞争物(所述靶物竞争物可以沉积或未沉积在检测表面上),作为靶物在样品中存在的指标。使用的沉积模式随采用的选择部分的类型而变化。选择模式的实例如图 3 所示。

[0179] 在直接捕获的情况下,选择部分由种类特异性的或非特异性结合部分组成,所述结合部分包被或缀合在检测带内,例如,直接缀合在成像窗口的内表面上,或缀合在连接物或间隔聚合物(其缀合到成像窗口上)上。在该情况下,在单个步骤中,使靶物接触选择部分,并进行络合物的沉积。

[0180] 在过滤是将标记的可过滤的络合物沉积在检测带中的模式的情况下,标记的靶物或标记的靶物 - 选择部分络合物的尺寸或其它性质导致标记的靶物或标记的靶物 - 选择部分络合物沉积在过滤器上,所述过滤器放在检测带内。

[0181] 其它沉积模式需要向选择部分(包括与标记的靶物络合的选择部分的集合)施加力,造成它们沉积在检测带内。在磁性选择的情况下,通过施加磁力,将磁性响应的选择部分沉积在检测带内。如果施加的力是基本上均匀的,且具有垂直于检测表面的力向量,例如通过将成像孔放在具有适当结构的永磁体阵列上面,标记的络合物的沉积可以在检测窗口中基本上是均匀的。标记的靶物在检测区中的均匀沉积可以用于计算反应物中的靶物,因为它们分开排列,允许计算标记的物体。当磁力在成像窗口平面中不均匀时,标记的络合物可以在检测带内沉积成图案(图 3)。例如,使用比成像窗口尺寸更小的强磁体,可以导致磁性响应的选择部分(包括与标记的靶物络合的那些)在成像窗口边界内沉积成点或堆。这种标记的靶物以非均匀图案的沉积可以用于数据分析,因为在沉积带内检测到的多个标记是标记的靶物 - 选择部分络合物的组分。

[0182] 密度分离。如果在试验中使用的选择部分的密度大于反应液体,且如果检测带是在反应孔底部,可以将重力用作沉积力。在该情况下,沉积可以如下实现:允许选择部分(与它们结合的任意标记的靶物一起)沉降到检测带,它们可以在这里成像。或者,可以将离心力施加于致密选择部分,以加速它们向检测带的沉积。可以使用反应孔的形状来控制密度 - 介导的选择过程中的沉积模式。在孔底部的平面成像区会导致致密选择部分和它们结合的标记的靶物的均匀沉积,使得计算得到的图像中的物体更容易。可以设计非平面的表面,以导致络合物沉积在反应孔的最低点,允许在结合到选择部分上的标记的靶物和在反

应混合物中的未结合的标记之间进行几何区分（图 3）。

[0183] 在本发明的范围内，并非总是要求沉积，尤其是，如果在其中进行反应的容器的尺寸允许反应中的所有标记都落入检测带内。在该情况下，使用其它方法来区分标记的靶物 - 选择部分络合物和未结合的标记。

[0184] 10. 区分标记的靶物

本发明提供了改进的用于区分在检测带中沉积的信号发射部分（作为结合靶物的结果）和未结合选择的靶物的标记的方法。当存在的标记超过靶物很多时（当本发明的试验被设计成具有高灵敏度和短温育时间时，需要如此），区分结合的标记和游离的标记是一个特殊问题。提高结合的和游离的标记之间的区分，会通过降低背景信号（不是由于标记的靶物 - 选择部分络合物而在图像中检测到的信号），提高本发明试验的灵敏度和特异性。通过上述沉积步骤，在检测带中物理地浓缩络合物；但是，在检测带内的未结合的标记和在检测带外的未结合的标记都可以为图像提供可检测的光信号。

[0185] 作为成像的光学筛选剂的染料。本发明区分结合的标记和游离的标记，无需使用洗涤步骤，从而增加了本发明的使用容易性。适当染料在本发明试验中的整合，可以用作光学分离装置，以增加在检测带中的标记与未在检测带中的标记的区分。当将光学检测用于成像、且反应介质可基本上透过激发光或其它辐照光（像对产生成像信号的反射光或发射光一样），可以理解，在检测带外的未结合的标记可以为图像提供大非特异性光信号。这在图 9 和 11 的左图中予以解释。在成像之前将染料包含进反应中，可以用于减小由存在于检测带之外的未结合的标记产生的信号。在适当浓度的染料允许检测在检测表面处或附近的检测带中的荧光，同时掩蔽来自剩余溶液中的未结合的标记的信号发射贡献。在信号发射部分是荧光的情况下，使用的染料可以具有与荧光信号发射部分的激发或发射波长重叠的光吸收，或可以吸收激发光和发射光。图 8 显示了一种这样的染料铬变素 2R 的吸收波谱，其与用于 Invitrogen 黄绿 Fluospheres® 的成像检测的激发和发射滤光器的透射波谱重叠，所述 Fluospheres® 在该实施例中用作信号发射部分。图 9 表明，向孔中加入铬变素 2R 染料会屏蔽检测带中由检测带以外的标记产生的信号。令人惊奇地，在该图中可以看出，染料的加入仍然允许辨别检测带内的荧光颗粒。

[0186] 可以操作加入反应中的染料的浓度，以控制检测带的深度。在优选的染料浓度，可以辨别在检测表面的大约 50–100 微米内的信号发射部分，同时使距离检测表面超过大约 100 微米的信号发射部分的贡献最小化。由染料提供的光学屏蔽的有效性，与染料吸收光的能力以及穿过样品的光所遇到的染料分子的数目（光程长度）有关。如果染料浓度过低，来自大多数重叠的未结合的信号发射部分的信号会被检测到，而如果染料浓度过高，来自在成像表面附近的标记的靶物的信号会被减小。实际上，无论成像系统的场深度，在反应中使用的染料的浓度可以用于在光学上定义检测带。

[0187] 可以在反应序列中的任意时间，将染料加入反应中。有些实施方案可以掺入染料作为反应的添加剂。在其它实施方案中，在完成接触步骤后，加入染料。染料也可以是下述的垫子实施方案的组分。

[0188] 本发明的染料可以是单一染料或染料混合物，用于吸收适当波长的光；适当染料的选择随使用的信号发射部分和要应用的光学成像系统而变化。例如，对于具有 515 nm 发射最大值的和 505 nm 激发最大值的黄绿荧光 Fluospheres®，使用具有激发带通滤光器

475 \pm 29.5 nm 和发射滤光器 535 \pm 25 nm 的成像系统, 铬变素 2R 或酸性红 1 染料是用于产生光学屏蔽效应的适当染料的 2 个实例。本领域技术人员能够找到适用于该目的的其它染料。诸如 Floyd Green 的 The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators (Aldrich Chemical Company, Inc. 1990) 等参考文献列出了许多可能用于本发明的染料。

[0189] 可以预见到可用于信号发射的光学屏蔽的其它类型的染料。当通过它的颜色区分信号发射部分时, 可以预期吸收与待测颜色互补的波长的光的染料作为本发明实施方案的光学屏蔽。光散射颗粒也可以用作颜色反应的光学屏蔽的“染料”。黑色颗粒(包括黑印度墨汁)会吸收许多波长的光, 且也可以提供光学屏蔽。

[0190] 在使用含有铁的磁性颗粒作为选择部分的情况下, 大量磁性颗粒在反应中的使用可以在检测带中沉积不透光的颗粒层。经过该层的光穿过被封闭, 仅停留在磁性颗粒层和成像表面之间的信号发射部分被成像。

[0191] 使用垫子来从检测带排除未结合的信号发射部分。除了由在检测带之外的未结合的信号发射部分发出的信号(这可以通过加入染料来解决)以外, 也可以在检测带内发现未结合的标记, 其随着它在反应体积中的随机分布而变化。该标记在光学上与在图像中的特异性地沉积的信号发射部分不可区分, 并减少检测的灵敏度。

[0192] 在本发明的方法中, 通过从检测带排除反应的未选择的组分, 可以使在检测带内的未结合的信号最小化。这可以如下实现: 在开始将选择部分沉积在检测带中的过程之前, 在主体反应物和成像表面之间放置一个液体层, 其密度高于主体反应物, 且至少象检测带一样深。在反应混合物和成像窗口之间的致密层或“垫子”的使用, 可以以几种方式整合进本发明的试验中。优选地, 但不要求, 主体反应物不与成像表面直接接触。可以将致密层或“垫子”放入成像孔中, 然后将反应混合物铺在它上面。这是一个优选的方案, 因为它会避免反应混合物和检测表面之间的接触, 使得信号发射部分仅通过沉积进入检测带。在另一个优选的实施方案中, 将生成致密垫子所需的组分预分配在成像孔中, 并干燥, 从而在上面的接触步骤中在反应温育期间, 重配干燥的物质, 并形成致密的底层, 其至少填充检测带体积。在一个次优选的替代方案中, 可以将致密垫子铺在成像孔的主体反应物下面, 以占据检测带, 然后开始选择部分的沉积。

[0193] 在每种情况下, 选择部分(与它们结合的任意标记的靶物一起)的沉积, 造成选择部分运输到主反应混合物之外, 并进入停留在检测带内的致密垫子层中。该过程会使在检测带内发现的未结合的标记的量最小化, 由此通过成像可检测到。

[0194] 许多致密材料可以用于构成检测带内的致密层。密度大于水且与水不混溶的液体是一个替代方案。含有高溶质浓度(如浓度为 7.5% w/v 至 35% w/v 的蔗糖)的溶液、碘克沙醇(商品名 Optiprep®, 浓度为 10% 或更高, 更优选 15% 或更高, 最优选 15–30%)、泛影葡胺或 Percoll® 可以用于生成致密底层。

[0195] 可以溶解来生产高密度溶液的其它溶质包括 NaCl、MgCl₂、Ficoll、CsCl、甲泛葡胺或白蛋白。优选地, 下面的溶液的密度充分不同于主体反应物, 使 2 个层之间的混合最小化, 且反应物中的微粒组分不会自发地穿过垫子沉淀。例如, 下面的溶液(致密层或垫子)可以具有这样的密度, 它比覆盖层大至少 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、10.0、12.0、15.0 或 20.0 kg/L 或更多。还优选地, 致密溶液的粘度较低, 以避免

阻碍标记的选择部分络合物在检测带内的沉积。在图 8 中解释了致密层的维持叠加主体反应物和成像表面之间的分离的能力,其中铺在致密垫子层上面的全血不会沉降到成像孔底部。

[0196] 当检测器被构造成仅检测带受到激发源辐照时,致密底层可以足以允许信号发射部分在检测带中的选择性成像。这可以如下实现:提供其光束与检测窗口平面平行的激发光,并通过检测窗口检测荧光信号。该方案使主体反应物中的叠加信号部分的光学贡献最小化。

[0197] 染料垫子层。致密垫子层与加入的染料的组合会有效地减少由反应物中未结合的信号发射部分产生的背景信号。垫子防止未结合的信号发射部分出现在检测带中,而染料防止检测由叠加主体反应物中的未结合的信号产生的信号,由此分离与沉积在检测带内的选择部分络合的标记的靶物的信号发射贡献。上述的垫子实施方案可以与本发明的染料相组合,用于本发明的染色的垫子实施方案。在图 11 中解释了向垫子试剂加入染料的一个直接的实例。在下面的实施例 8 -13 和 15-20 中,解释了染色的垫子的应用实施例。它们证实了该形式在许多样品类型(包括人全血、血清、血浆和尿,它们具有许多靶物,包括人促甲状腺激素、炭疽芽孢杆菌的蛋白和多肽抗原)中的应用,和在检测金黄色葡萄球菌和甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌(MRSA)细胞中的应用。在实施例中使用了 3 种不同的信号发射部分,包括 0.5 μM 荧光颗粒、0.2 μM 荧光颗粒和 SYBR 核酸染色。

[0198] 占据的体积至少等于检测带体积的染色的致密层可以放入成像孔中,并将反应混合物铺在它上面,然后进行本发明的沉积步骤。或者,在成像带内形成染色的致密层所需的材料可以以下述方式干燥在成像孔中,所述方式使得在温育混合物期间,反应混合物重配染色的致密层,以允许形成标记的靶物 - 信号发射部分络合物。尽管可能将染色的致密垫子层铺在反应混合物和成像表面之间,优选地,反应混合物的未结合的标记在反应期间不直接接触成像表面。

[0199] 光漂白的检测带。不需要洗涤的本发明的另一个实施方案使用染料在反应中的添加,其中通过暴露于荧光部分的激发波长的光,光漂白荧光信号发射部分。所述反应可以在成像孔中进行。在接触步骤过程中,或在反应的接触步骤以后,将染料掺入反应物中。以光漂白存在于检测带中的信号发射部分、而不光漂白叠加信号发射部分的方式,将光施加于检测带。进行沉积步骤,将标记的靶物 - 选择部分沉积在检测带中,在所述检测带中,已经事先光漂白了其它荧光素。当对检测带成像时,检测的信号来源于标记的靶物 - 选择部分络合物,允许灵敏地检测来自结合的标记级分的信号,而排除来自单个反应混合物中的未结合的标记的信号,无需物理地操作反应液体。

[0200] 本发明的另一个实施方案可用于计算样品中的微生物细胞。该实施方案使用光漂白来区分由靶细胞导致的标记的靶物 - 选择部分络合物级分和由与反应物中的可溶性靶物的反应导致的级分。一个实例是这样的反应,其通过用对光漂白不敏感的荧光颗粒标记细菌细胞壁上的蛋白 A,检测金黄色葡萄球菌细胞。通过可与超顺磁微粒上的蛋白 A 反应的抗体,实现选择。含有金黄色葡萄球菌的样品也可以含有游离的蛋白 A,其可以造成该形式的标记的靶物 - 选择部分络合物的形成。如果希望知道在图像中检测到的哪个信号是由反应物中的细胞产生、哪个是由可溶性的物质产生,可以额外地用核酸染色剂来标记细胞,所述核酸染色剂可通过与信号发射颗粒相同的滤光片集合检测到,但是对光漂白敏感。通过

染色的垫子将标记的靶物 - 信号发射部分络合物沉积到检测带中以后, 对检测带成像, 从而检测标记的细胞和络合的信号发射颗粒。然后对检测带施加足够的光, 以造成标记的细胞的光漂白, 并获取另一个图像。第一个图像和第二个图像之间的差异, 会确定由细胞形成的络合物。

[0201] 通过跟踪移动来区分标记的靶物 : 选择部分络合物。在另一个实施方案中, 结合的和游离的标记的分离可以使用下述事实来实现 : 结合的标记呈现(take on)它结合的选择部分的选择性质。例如, 被靶物络合到磁性颗粒上的荧光标记颗粒获得磁场指导的运动性质。如果将反应构造成可以对单个结合的和未结合的标记成像, 则当在与成像表面基本上平行的方向用力向量施加磁场时, 与磁性颗粒络合的标记会在磁力方向移动, 而未结合的标记随机移动。如果使用长曝光进行成像, 每个移动的标记可以在图像上显示为划线或“彗星”。在实施例 21 中解释了该实施方案。或者, 在磁场指导运动的时间段中, 可以得到一系列图像, 并可以通过运动的视频记录来追踪标记的运动。

[0202] 该试验实施方案的一个优点是, 它是非破坏性的, 因此可以用于测定结合反应的动力学。在靶物、标记和选择部分之间的反应的最初阶段期间, 观察到小量的标记的靶物响应于选择力的施加而移动。随着反应进展, 逐渐增多量的标记变得对选择力有响应。另外, 可以改变力向量的方向, 同时保持该力基本上平行于检测表面的平面, 从而证实在观察下的信号发射部分的磁性响应性。

[0203] 使用致密颗粒作为选择部分, 也可以构建该试验实施方案。使用在反应室中心的检测窗口, 可以构建反应孔。设计成可以对单个结合的和未结合的标记成像的室, 当在垂直位置定向检测窗口时, 允许由重力导致致密颗粒沉降, 由此流过垂直定向的检测窗口。获取图像, 以测定携带结合的标记的致密颗粒的分数, 或平行于检测窗口平面、在重力方向移动的结合的标记的频率。这些图像可以是具有长曝光的单个图像形式, 允许进行分析, 以通过在图像或视频序列上的力向量的方向定向的划线或“彗星”的生成, 跟踪信号发射部分的运动。可以象时漏一样反转筒, 从而提供对变成重力响应性的信号发射部分的数目进行系列观察的可能性, 和由致密颗粒的沉降导致的反应的连续混合。

[0204] 11. 检测

在本发明的方法中, 使用数字成像, 检测沉积在检测带中的标记的靶物 - 选择部分络合物。必须提供适用于检测信号发射部分的数字成像仪。如果信号发射部分是荧光的或发磷光的, 还提供适当的激发光来源和激发和发射滤光器。如果信号发射部分是化学发光的或生物发光的或产色的, 致密垫子还含有适当的底物和辅因子, 用于生成信号。

[0205] 用于本发明中的检测器包括这样的任意检测器, 当供给适当透镜、滤光器和辐照源时, 其可以产生存在于检测带中的标记的数字图像。检测器可以包括 CCD 照相机、CMOS 照相机、行扫描照相机、CMOS 雪崩光电二极管(APD's)、光电二极管阵列、光电倍增管阵列或其它类型的数字成像检测器。

[0206] 使用检测器来产生检测带的一个或更多个数字图像。它们可以包括一个或一系列的单个图像或一组连续图像(例如视频)。

[0207] 成像可以在单个成像条件集合下实现, 或成像条件可以在图像之间变化。例如, 多色荧光成像可以用于检测多路试验, 其中分开的和光学上可区分的信号发射部分各自用于检测不同的靶物。为了对多种荧光素成像, 可以改变激发光的波长和发射光的滤光片集合,

以对相同反应孔中的一系列不同的信号发射部分成像。

[0208] 在某些情况下,连续图像可以用于区分碎片。在信号发射部分对光漂白敏感的情况下,可以获取最初的图像,其检测由信号发射部分产生的信号,但是其也含有通过固有的荧光或光散射可检测到的碎片。提供足够的激发光来光漂白信号发射部分以后,可以得到第二个图像。第二个图像中的荧光信号由碎片产生,且可以从特异性的靶物捕获的分析中消除。实施例 23 提供了进行碎片检测的该方案的一个例证。

[0209] 12. 分析

数字成像的使用可以扩展本发明的试验的动态范围。在本发明的一个优选的实施方案中,在成像时,沉积在检测带中的每个捕获的靶物可以导致数字图像中可检测的对象的产生。当在图像中存在要检测的单独的明亮的物体的足够少的对象时,可以将单个对象鉴别为图像中的团迹,并计算。该方案允许准确地计数小量信号部分,甚至当检测到的总信号仅占图像的总像素的小比例时。如果在图像中整合图像中的每个像素的总信号,特定信号会因取它与数目多很多的具有背景范围内的强度的像素的噪音的平均值而丢失。随着检测到的对象的数目的增加,来自这些对象的信号开始合并,简单的对象计数变得不准确。在该情况下,可以整合信号的总强度,从而允许准确定定量和使用成像装置的整个动态范围。

[0210] 标准曲线可以用于将从含有未知量的靶物的样品的数字图像分析衍生出的信号与用已知水平的靶物产生的信号相关联。在非竞争测定实施方案的情况下,特定信号随着样品中存在的靶物的数目而增加。在竞争测定的情况下,信号随着样品中存在的靶物的量的增加而降低。

[0211] 通过包含平行的内部对照来检测样品干扰。众所周知,某些样品可能干扰靶物的检测,甚至在最佳分析条件下。该干扰可以是阳性的,造成在没有靶物存在下的高信号,或是阴性的,造成试验不能检测出阳性样品。在实际的样品基质中加入与实验样品平行运行的内部对照,可以区分真实的和假的实验结果。在图 26 中图解了该对照方案的表示。当将对照加入实验样品中时,预见到阳性对照(例如,向实验样品中加入预定量的靶物)会增加可确定的增加信号。如果阳性对照未被检测出,样品可以视作具有阴性干扰,并适当地解释。类似地,用于抑制由样品中的靶物产生的信号(例如,通过加入大量种类特异性的结合部分,其用于将标记结合到靶物上)的阴性对照,会导致由阳性样品产生的信号的减小。在阴性对照孔中没有表现出减小的信号的阳性样品要么是假阳性,要么是非常高的真阳性。通过样品的稀释,可以区分这些替代方案。或者,阴性对照可以含有不与靶物反应的无关物(信号发射部分 - 特异性的捕获部分络合物)。实施例 16 解释了使用平行的内部阳性和阴性对照进行的试验。

[0212] 13. 组合装置

本发明的反应可以以多种方式呈现给用户。一般而言,根据本发明检测靶物所需的每种组分都要提供给用户,所述用户供给待测样品,用于检测靶物的存在。这些组分包括:

接触反应的组分:

- 反应孔,其与成像孔分离或组合
- 与结合部分缀合的信号发射部分,根据靶物检测的需要
- 与结合部分缀合的选择部分,根据靶物检测的需要
- 反应的最佳性能所需的添加剂

● 染料、垫子和 / 或染色的垫子,用于光学地和 / 或物理地分离主体反应物与检测带
在一个实施方案集合中,将反应组分与反应孔中的样品相组合。在所有反应物都已经
与样品混合后,将反应物转移至成像孔,然后将选择部分沉积进检测带中,并成像。可以将
每种液体组分作为单个添加物加入到反应孔中。在实施例 13 的高处理量冲击波试验仪器
中,体现了该装配方法。或者,可以组合液体,并作为一个或两个添加物加入到反应中,从而
减少实现本发明所需的分配步骤的数目。染料、垫子或染色的垫子可以作为液体分配进成
像孔中,将反应混合物叠加在垫子上面,如在实施例 13 中所例证的,或可以在成像孔中干
燥,并通过加入反应混合物进行再水合。或者,可以将反应组分以干燥的或低压冻干的形式
预分配到反应孔中,通过加入样品或稀释剂 + 样品进行再水合,然后转移至成像孔中的染
料、垫子或染色的垫子。干燥可以以多种形式进行,包括在反应孔中以饼的形式干燥试剂,
干燥散装 (in bulk) 试剂并分配干粉,或冻干单位剂量试剂球并将球分配进反应孔中。

[0213] 当包括染色的垫子在内的所有组分都在单个反应 / 成像孔中预分配和干燥时,会
极大地简化本发明的实践。染色的垫子可以干燥在检测表面附近,使它在反应过程中再水
合,并保护成像表面免于反应物。可以以下述形式提供干燥的反应组分:其在加入样品、稀
释剂或样品 + 稀释剂后立即再水合,并在再水合的染料垫子上面形成单独的层。反应组分
可以以饼的形式直接铺在干燥的垫子上面,如在实施例 20 中所例证的,或可以分别干燥成
单元剂量试剂球 (实施例 19) 或作为块试剂,分配在反应孔中,在干燥的染色的垫子上面。
在该实施方案中,单个液体加入足以实现本发明的所有步骤,不需要将试剂从一个容器转
移到另一个容器。该形式适合手工地、通过自动化仪器、或通过在自含筒内的流体转移来实
现。

[0214] 样品和试剂组分的加入可以由操作人员手工地实现,通过使用仪器或筒控制液
体流动来自动化,或通过自动化和手工方法的组合来实现。试剂可以散装地供给操作
人员或自动化仪器,并在反应时分配,或可以在一次性使用的反应孔或筒内预分配装载
(onboard)。

实施例

[0215] 关于下述非限制性实施方案,进一步描述了本发明。除非另外指出,在实施例中特
别描述的方法的任意要素通常可以一般地用于本发明的方法中。关于用于实现所述方法的
成像分析仪、软件和装置的其它细节,也描述在 2009 年 9 月 24 日提交的标题为“Imaging
analyzer for testing analytes”的国际申请号 _____ 中,和 2009 年 9 月 24 日提交
的标题为“Kits and devices for detecting analytes”的国际申请号 _____ 中,它们二
者通过引用并入本文。

[0216] 实施例 1. 用发荧光的 DNA 染色剂标记金黄色葡萄球菌

本实施例描述了使用发荧光的 DNA 染色剂标记金黄色葡萄球菌细菌细胞,它证实了标
记细菌靶物进行成像检测的方法。标记细菌靶物在许多分析情况中是重要的,如应用于临
床的、工业的和环境的分析。用发荧光的染料标记细菌,在本发明的背景下具有普遍用途,
因为可以产生的巨大信号允许使用未放大的成像来容易地计算细菌。

[0217] 方法。如下用 SYTO-13® 标记金黄色葡萄球菌。在 35°C 在胰蛋白酶处理过的大
豆汤 (Acumedia, 目录号 7164A) 中培养金黄色葡萄球菌 (ATCC 菌株 29213) 的培养物 2

小时,以达到对数生长期。在 Zeiss 显微镜上的计数室中,计数细胞数目,并在 PBS-TBP 溶液 (10 mM 磷酸盐,140 mM 氯化钠,3 mM 氯化钾 (Calbiochem, 目录号 524650),0.05% w/v 吐温 20 (Acros, 目录号 2333600010),2 mg/mL 牛血清白蛋白 (Sigma-Aldrich, 目录号 A3059) 和 0.05% v/v ProClin™ 300 (Supelco 目录号 48912-U) (调至 pH 7.4) 中稀释至 1.67×10^8 细胞/mL。用盐水溶液 (0.9 % w/v 氯化钠, JT Baker, 目录号 3629-07) 将 SYTO-13® (Invitrogen/Molecular Probes, 目录号 S7575) 1 :20 稀释。标记反应混合物含有 6 μL 稀释的金黄色葡萄球菌细胞溶液、10 μL 稀释的 SYTO-13® 溶液和 984 μL PBS-TBP。将反应混合物温育 2 min。然后在 Partec Cyflow 流式细胞计上分析样品,所述流式细胞计设定为,在 520 nm 的发射波长的绿荧光触发,增益设定在 300。

[0218] 结果。图 4 显示了未被 SYTO-13® 标记的金黄色葡萄球菌细胞 (左图) 相对于被 SYTO-13® 标记的细胞 (右图) 的对数荧光强度。可以看出,标记的细胞被 520 nm 的荧光容易地检测出。

[0219] 结论。实施例 1 的结果证实,细菌细胞靶物可以被高强度地荧光地标记。

[0220] 替代实施方案。以后的实施例将证实,用核酸染色剂(如 SYTO-13®)标记的细菌可通过未放大的成像技术检测出。其它核酸染色剂可以以类似的方式用于荧光地标记细菌细胞,具有在许多波长的荧光激发和发射;这些染色剂包括 SYTO® 染色剂家族 (Invitrogen) 的其它成员、和 SYBR® 核酸染色剂家族的成员、碘化丙啶或碘化己啶(hexidium iodide)。这类染色方法会标记样品中所有含有核酸的细胞。从下面的实施例可以看出,通过组合基于核酸的细胞标记法和种类特异性选择方法,可以增强试验对特定种类的靶物的特异性。这允许,例如,从标记的细胞的混合物中检测一个特定种类的细胞,产生靶物特异性的试验,例如 检测来自伤口的混合细菌培养物中的金黄色葡萄球菌。在下面描述了许多选择方法,作为实施例 4 中的替代实施方案 (例如,可以用 SYTO-13® 标记金黄色葡萄球菌,并通过染料 - 垫子试剂,用与抗金黄色葡萄球菌抗体缀合的磁性颗粒进行选择,参见下面的实施例 18)。通过该方案可以标记其它类型的化学类别,并通过特异性选择进行检测,然后成像;一个实施例是用尼罗红标记在人血清脂蛋白中的脂类,然后用与抗 - 人载脂蛋白 B 抗体缀合的磁性颗粒特异地选择低 - 密度脂蛋白。这允许测定样品中的低密度脂蛋白络合物的脂质含量。可以容易地预见到许多类似的实施方案。

[0221] 可以使用具有不同的信号特征 (例如荧光、化学发光、光吸收、光散射、磷光、酶反应性和拉曼散射) 的标记。也可以使用不同的信号发射部分 (具有不同的信号发射特征) 例如,二醋酸荧光素 (荧光酯酶底物)、SYBR® 绿® (荧光 DNA 染色剂)、苏丹黑 (脂质染色)、产生不溶产物的酶底物、聚苯乙烯颗粒、含有荧光染料的聚苯乙烯颗粒、胶体金等。

[0222] 所述方法可以用于靶物的标记法中,所述靶物可以包括、但不限于:细胞、病毒、细胞器、脂蛋白和分子,包括蛋白、寡核苷酸、脂类、寡糖和小有机和无机分子。

[0223] 还可以在标记之前加工样品,例如可以用甲醇固定细胞。可以提取和纯化 DNA。

[0224] 实施例 2. 与鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 抗体缀合的荧光颗粒的生产

本实施例描述了与鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 抗体缀合的荧光颗粒的生产。这些颗粒用作金黄色葡萄球菌的特异性标记,因为它们包含与种类结合部分络合的信号发射部分,因此特异地结合靶物。靶物特异性的荧光颗粒在本发明的背景下具有普遍用途,因为这些颗粒发射巨大信号,并可以使用未放大的成像来容易地计算。

[0225] 所述颗粒可以用于检测和计算许多样品中的低浓度的单个细胞和分子靶物的方法中,所述样品包括临床的、工业的和环境的样品。所述方法也可以用于提高复杂基质中的信号稳定性(例如荧光颗粒的应用可以减少样品中非靶物组分的猝灭)。

[0226] 方法。洗涤具有200 nm直径的羧基化的黄绿荧光颗粒(Fluospheres)(Invitrogen, 目录号8811),并重新悬浮于调节至pH 5.5的1% w/v的50 mM 2-吗啉代乙磺酸(Aldrich, 目录号69889)中。然后如下活化微粒:先后加入碘基-N-羟基琥珀酰亚胺(Thermo Pierce, 目录号24510)和1-乙基-3-(二甲氨基丙基)碳二亚胺(Thermo Pierce, 目录号22980),各自在2 mg/mL的终浓度,并温育30分钟。洗涤颗粒,并缓慢地加入鸡抗-金黄色葡萄球菌蛋白A抗体(Meridian OEM, 目录号C5B01-296),至2.0 mg/mL的终浓度;将该混合物在搅拌下在室温温育16小时。然后将该混合物与50 mg/mL牛血清白蛋白溶液(Sigma-Aldrich, 目录号A3059)1:1混合,并温育2小时。温育后,加入调节至pH 8.0的1 M乙醇胺溶液(Sigma-Aldrich, 目录号E9508),使得乙醇胺的终浓度是100 mM,并将该混合物温育1小时。然后洗涤抗体衍生化的荧光微粒,并重新悬浮于20 mM Tris溶液((JT Baker 目录号4109-02),0.05% w/v吐温20(Acros 目录号2333600010),2 mg/mL牛血清白蛋白(Sigma-Aldrich, 目录号A3059),0.05% w/v ProClin 300(Supelco, 目录号48912-U),调节至pH 7.8)并简单地声处理,以确保颗粒是单体,这通过Partec Cyflow流式细胞计来确认。

[0227] 替代实施方案。存在多种用于生产信号发射部分络合物的方法。通过非共价或共价化学连接,可以被动地吸附或连接种类结合部分(例如抗体可以被动地吸附到聚苯乙烯颗粒上,通过非共价的生物素-抗生蛋白链菌素连接进行连接,或经由碳二亚胺化学方法通过蛋白氨基基团和羧化的颗粒上的颗粒羧化物基团之间的共价键进行连接)。许多有用的缀合方法是已知的(Bioconjugate Techniques Hermanson 1996 Academic Press)。

[0228] 可以使用不同的种类标记部分,包括但不限于:抗体(包括不同的免疫球蛋白类型)和其它蛋白(例如凝集素、激素受体等)、寡核苷酸和它们的合成类似物(例如肽核酸、适体等)、寡糖(例如肝素等)、有机聚合物(例如硫酸葡聚糖等)和小分子(例如药物、非肽激素、生物素、染料等)。

[0229] 可以生产具有许多特异性的特异性标记。通过选择缀合到颗粒表面上的种类结合分子,控制使用荧光颗粒作为信号发射部分的试验的特异性。例如,抗-TSH抗体的应用会产生这样的荧光颗粒,它会标记TSH,并允许通过成像检测它。

[0230] 所述的方法可以用于靶物的标记法中,所述靶物可以包括、但不限于:细胞、病毒、细胞器、脂蛋白和分子,包括蛋白、寡核苷酸、脂类、寡糖和小有机和无机分子。

[0231] 通过组合靶物的标记法和靶物特异性的选择方法,可以增强试验对靶物的特异性(如在实施例1中所讨论的,和在实施例6、9-19、21-24中所描述的)。

[0232] 可以使用不同的信号特征,例如荧光、化学发光、光吸收、光散射、磷光、酶反应性和拉曼散射。

[0233] 不同的信号标志的颗粒可以缀合到不同的种类特异性的结合分子上,以允许在单个反应中同时检测多个靶物。也可以使用不同的信号发射部分(具有不同的信号发射特征)例如,二醋酸荧光素(荧光酯酶底物)、SYBR® 绿(荧光DNA染色剂)、苏丹黑(脂质染色)、产生不溶产物的酶底物、聚苯乙烯颗粒、含有荧光染料的聚苯乙烯颗粒、胶体金等。

[0234] 实施例 3. 使用特异性地结合细胞表面上的蛋白 A 的荧光纳米颗粒来标记金黄色葡萄球菌细胞

本实施例描述了使用靶物特异性的荧光颗粒来标记金黄色葡萄球菌细菌细胞的方法。靶物特异性的荧光颗粒的使用在本发明的背景下具有普遍用途,因为这些颗粒发射巨大信号,并可以使用未放大的成像来容易地计算。所述方法因而可以用于检测和计算临床的、工业的和环境的样品中的低浓度的单个细胞和分子靶物。

[0235] 本实施例证实了使用流式细胞术,可以用靶物特异性的荧光颗粒标记金黄色葡萄球菌。

[0236] 方法。使用如实施例 2 所述生产的抗 - 蛋白 A 抗体包被的荧光颗粒来标记金黄色葡萄球菌细胞。在 35°C 在胰蛋白酶处理过的大豆汤 (Acumedia, 目录号 7164A) 中培养金黄色葡萄球菌 (ATCC 菌株 29213) 的培养物 2 小时,以达到对数生长期 ($OD_{600} = 0.3$)。在 Zeiss 显微镜上的血球计数器中,计数金黄色葡萄球菌细胞,并在 PBS-TBP 溶液中将细胞稀释至 1×10^7 细胞 /mL。通过与 $1.5 \mu\text{L}$ 4.67 mM 碘化己啶一起在室温温育 1 mL 稀释的细胞 10 分钟,用碘化己啶 (Molecular Probes, L-7005) 对这些细胞染色。

[0237] 构建了一系列金黄色葡萄球菌标记反应混合物,输入抗体包被的荧光颗粒的数目在所述系列中变动。每个 $50 \mu\text{L}$ 混合物含有 $30 \mu\text{L}$ PBS-TBP、 $10 \mu\text{L}$ 碘化己啶染色的金黄色葡萄球菌细胞 (1×10^7 细胞 /mL) 和 $10 \mu\text{L}$ 来自实施例 2 的抗体 - 包被的荧光颗粒(浓度为 0.5×10^{10} 至 5×10^{10} 颗粒 /mL)。在室温温育反应物 30 min。温育后,将反应混合物稀释至 1 mL PBS-TBP,并温育另外 2 min。然后在 Partec Cyflow 流式细胞计上分析样品,所述流式细胞计设定为,在 590 nm 的发射波长的红荧光触发,增益设定在 395。从单个颗粒的荧光的测量值,计算每个碘化己啶标记的细胞捕获的荧光颗粒的数目。

[0238] 结果。图 5 显示了使用 1×10^{10} 抗体包被的荧光颗粒 /ml 来标记金黄色葡萄球菌细胞的结果。图 A 显示了仅具有金黄色葡萄球菌细胞的反应的直方图,图 B 显示了仅具有荧光颗粒的反应的直方图,图 C 显示了含有金黄色葡萄球菌细胞和荧光颗粒的反应的直方图。从数据显而易见,当反应混合物含有细胞和荧光颗粒时,仅观察到在 520 nm 的荧光信号 (图 C)。单独的细胞或单独的荧光颗粒没有产生超过背景的任何信号 (图 A 和 B)。图 6 显示了荧光细胞标记对标记所使用的荧光颗粒的浓度的依赖性,通过每个细胞结合的颗粒的平均数目来指示。加入 2×10^{10} 细胞 /ml 荧光颗粒时,标记几乎被饱和。在使用的所有颗粒浓度,多个颗粒结合到每个金黄色葡萄球菌细胞上。

[0239] 结论。该数据证实了抗体 - 包被的荧光颗粒用于特异性地标记细胞 (例如金黄色葡萄球菌) 的应用。如在以后的实施例中所证实的,这里使用的标记方法在本发明的背景下可以与用于将标记的靶物和游离的信号发射部分和其它标记的实体区分开的方法相组合。结果显示出巨大的标记,其可以使用所述方法得到,每个金黄色葡萄球菌细胞具有多达 18 个荧光颗粒。

[0240] 替代实施方案。其它类型的可检测的特异性标记可以用于本实施例中,包括不同直径的荧光颗粒或不同信号发射标志的荧光颗粒。其它信号发射部分可以用于生产特异性标记;例如,Alexa® 490 荧光地标记的抗体可以用于金黄色葡萄球菌检测。

[0241] 可以使用不同的信号特征 (例如荧光、化学发光、光吸收、光散射、磷光、酶反应性和拉曼散射) 的标记。

[0242] 所述的方法可以用于靶物的检测中,所述靶物可以包括、但不限于:细胞、病毒、细胞器、脂蛋白和分子,包括蛋白、寡核苷酸、脂蛋白、脂类、寡糖和小有机和无机分子。

[0243] 与特异性选择部分的应用相组合的该标记方法可以用于金黄色葡萄球菌细胞的基于成像的检测。

[0244] 还可以在标记之前加工样品,例如可以用甲醇固定细胞。可以提取和纯化 DNA。

[0245] 实施例 4. 用抗 - 蛋白 A 抗体缀合的磁性颗粒的生产

实施例 4 描述了用抗体缀合的磁性颗粒的生产,所述抗体针对金黄色葡萄球菌的蛋白 A,所述蛋白 A 用作检测金黄色葡萄球菌细胞的特异性选择剂。本实施例描述了结合靶物的特异性选择部分的生产和功能测试。

[0246] 特异性选择部分可以与标记组合使用,用于生产标记的靶物 - 选择部分络合物。当沉积在检测带中时,通过基于成像的检测方法可以检测这些络合物。

[0247] 所述方法可以用于从复杂样品(例如生物流体如血液,和尿,或奶,废水,工业产物等)中选择和浓缩出靶物。

[0248] 方法。下面描述了用于生产用鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 抗体缀合的磁性颗粒的方法和它们的功能性测试。洗涤 292 nm 直径的羧基化的磁性颗粒 (Ademtech, 目录号 0213),并重新悬浮,以得到调节至 pH 5.5 的在 50 mM 2- 吡啶代乙磺酸 (Aldrich, 目录号 69889) 中的 1% w/v 悬浮液。然后如下活化微粒:先后加入磺基-N- 羟基琥珀酰亚胺 (Thermo Pierce, 目录号 24510) 和 1- 乙基 -3-(二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (Thermo Pierce, 目录号 22980),各自在 2 mg/mL 的终浓度,并温育 30 分钟。然后洗涤颗粒,并缓慢地加入鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 抗体 (Meridian OEM, 目录号 C5B01-296),达到 0.5 mg/mL 的终浓度。将该混合物在搅拌下在室温温育 16 小时。温育后,将该反应混合物与等体积的 50 mg/mL 牛血清白蛋白溶液 (Sigma-Aldrich, 目录号 A3059) 混合,并进一步温育 2 小时。温育后,加入调节至 pH 8.0 的 1 M 乙醇胺溶液 (Sigma-Aldrich, 目录号 E9508),使得乙醇胺的终浓度是 100 mM,并温育 1 小时。然后洗涤抗体缀合的磁体微粒,并重新悬浮于 PBS-TBP 溶液中,并简单地声处理,以确保颗粒是单体。生产后,如下在生物试验中使用金黄色葡萄球菌,测试抗体 - 包被的磁性颗粒的捕获效率。在 35°C 在胰蛋白酶处理过的大豆汤 (Acumedia, 目录号 7164A) 中培养金黄色葡萄球菌 (ATCC 菌株 29213) 的培养物 2 小时,以达到对数生长期。在 Zeiss 显微镜上的血球计数器中,计数细胞数目,并在 PBS 溶液 (10 mM 磷酸盐,140 mM 氯化钠,3 mM 氯化钾 (Calbiochem 目录号 524650),调至 pH 7.4) 中稀释至 1.57×10^5 细胞 / mL。在 PBS 中稀释鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 抗体磁性颗粒至 0.625×10^9 至 5×10^9 颗粒 / mL 的系列浓度。对于每个 50 μ L 反应,混合 10 μ L 稀释的金黄色葡萄球菌细胞 (10,000 细胞)、10 μ L 磁性颗粒和 30 μ L PBS,并温育 15 min。温育后,将 20 μ L 每种反应混合物覆盖于在 96- 孔半面积直径清澈平板 (Greiner, 目录号 675001) 的孔中的 70 μ L 垫子溶液 (由 30% OptiPrep® 组成, Sigma 目录号 D1556) 的上面。使用磁棒仪器,磁性地选择磁性颗粒和与它们结合的细胞 4 min。磁性选择后,小心地取出含有未选择的细胞的顶层,然后用 PBS 重配含有磁性地选择的细胞的溶液部分 (底层)。然后将两种溶液的等分试样涂布在胰蛋白酶处理过的大豆汤琼脂平板上,并在 32.5°C 温育过夜。次日,用眼睛计数每个平板上的菌落数目,并使用下式,计算磁性地捕获的金黄色葡萄球菌细胞 (CFU) :磁性地捕获的 CFU 的百分比 = [磁性地捕获的菌落数目 / (磁性地捕获

的菌落数目 + 非磁性地捕获的菌落数目)] × 100。

[0249] 结果。图 7 显示了金黄色葡萄球菌 CFU 的磁性捕获与加入试验中的磁性颗粒数目的关系。这些结果证实, 使用抗 - 蛋白 A 抗体包被的磁性珠子, 可以特异地捕获金黄色葡萄球菌细胞。

[0250] 结论。结果证实了鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 抗体缀合的磁性颗粒用于选择金黄色葡萄球菌细胞的应用, 其中使用独立于细胞的标记的选择过程的检测方法。本实施例教导了用于生产本发明的选择部分的方法。可以容易地预见到其它选择部分和它们的生产。

[0251] 替代实施方案。当与标记金黄色葡萄球菌靶细胞的适当方法组合时, 该选择方法可以用于通过基于成像的检测方法, 检测样品中金黄色葡萄球菌的存在。可以使用其它选择模式, 包括 : 密度 (通过重力或离心的选择)、过滤、捕获在成像孔表面上、和电荷 (电泳)。如果使用其它选择模式, 会将不同的选择部分缀合到抗 - 蛋白 A 抗体上。在有些实施方案中, 可以不使用仪器地进行选择 (例如重力选择)。

[0252] 可以将其它类型的选择部分用于磁性选择, 包括不同直径和组成的顺磁颗粒 (例如金属, 包括铁、镍、钴等, 铁磁流体)。

[0253] 可以使用不同的生产方法来将种类结合部分连接到选择部分上 (如在例如实施例 2 的替代实施方案中关于信号发射部分所述)。

[0254] 可以使用不同的种类标记部分, 包括、但不限于 : 抗体 (包括不同的免疫球蛋白类型) 和其它蛋白 (例如凝集素、激素受体等)、寡核苷酸和它们的合成的类似物 (例如肽核酸、适体等)、寡糖 (例如肝素等)、有机聚合物 (例如硫酸葡聚糖等) 和小分子 (例如药物、非肽激素、生物素、染料等)。

[0255] 通过在种类内选择特定靶物 (例如从血液中选择人促甲状腺激素, 或从鼻样品选择金黄色葡萄球菌细胞), 选择可以是特异性的。通过选择标记的靶物种类 (例如从人血浆选择脂蛋白), 试验也可以是特异性的。

[0256] 所述的方法可以用于许多靶物的选择中, 所述靶物可以包括、但不限于 : 细胞、病毒、细胞器、脂蛋白和分子, 包括蛋白、寡核苷酸、脂类、寡糖和小有机和无机分子。

[0257] 实施例 5. 人血清中人促甲状腺激素的测定

本实施例证实了在不包括洗涤步骤的测定中, 染料用于减小信号背景的应用。它组合了使用抗体偶联的荧光颗粒对靶物的特异性标记和使用抗体偶联的磁性颗粒对靶物的特异性选择。向反应中加入染料, 允许检测检测带中的信号发射部分, 同时消除由位于检测带之外的反应中的未结合的颗粒造成的信号。在本实施例中, 描述了在人血清中的人促甲状腺激素 (hTSH) 的测定, 其使用小鼠单克隆抗 -hTSH 抗体包被的荧光颗粒进行标记, 并组合地用在染料存在下成像的小鼠单克隆抗 -hTSH 抗体包被的磁性颗粒进行磁性选择。

[0258] 通过包含染料, 增强了测定的特异性, 所述染料吸收用作信号发射部分的荧光部分的激发和 / 或发射波长。该染料将成像信号发射靶物络合物的能力限制在检测带中。在图 8 中显示了铬变素 2R 的波谱。实线显示了测得的染料铬变素 2R 的吸收波谱。用括号指示在图像仪中使用的激发和发射滤光器的透射特性, 所述括号跨滤光器的 FWHM 规格 (FWHM specification)。

[0259] 方法。在该实验中, 证实了染料会减少来自荧光微粒的信号。使用 2 mm 直径的粘性

硅橡胶垫圈 (Grace)，在显微镜载玻片上形成孔。加入 40 μL 荧光颗粒 (Invitrogen 目录号 8813) 的等分试样，其含有或不含有 5.5 mg/mL 铬变素 2R 溶液 (Sigma-Aldrich C3143)。然后在高流通量自动化图像分析仪中对孔成像。该方法描述了不经洗涤在有染料存在下使用磁性捕获和荧光颗粒标记法对人血清中的 hTSH 进行免疫测定的方法。如在实施例 2 中所述，制备抗 -hTSH 包被的荧光颗粒，进行下述修改：使用 500 nm 荧光颗粒 (Invitrogen 目录号 8813)，且抗体是小鼠单克隆抗 -hTSH (Meridian OEM 目录号 MAT04-005)。如在实施例 4 中所述，制备抗 -hTSH 包被的磁性颗粒，进行下述修改：抗体是小鼠单克隆抗 -hTSH (Thermo Seradyn 目录号 MIT-0409)。通过将已知量的重组 hTSH (Cell Sciences，目录号 CRT505B) 掺加到事先清除内源性 TSH 的合并的人血清中，制备实验样品。在 96 孔微孔滴定板中进行反应。反应物 (50 μL) 含有 2 μL 用抗 -hTSH 抗体包被的荧光颗粒 (0.02 % w/v)、2 μL 用抗 -hTSH 包被的磁性颗粒 (0.25 % w/v)、21 μL 200 mM EPPS 缓冲液 (含有 400 mM 1,3 二氨基丙烷，pH 7.8) 和 25 μL 含有不同浓度的 hTSH 的血清样品。混合反应组分后，在环境温度温育反应物 10 min，以允许形成 hTSH 与荧光颗粒和磁性颗粒的‘夹心’免疫络合物。温育后，将 50 μL 25 mg/mL 染料 (铬变素 2R (Sigma-Aldrich C3143)、0.5% w/v 鱼明胶 (Sigma-Aldrich 目录号 G7765) 在 PBS-TBP 中的溶液加入孔中。然后将平板放在磁体阵列上，其中磁体位于每个孔的中央底部。磁性地选择磁性颗粒 -hTSH- 荧光颗粒络合物 10 分钟后，在自动化成像分析仪上对平板成像，曝光时间为 0.1 秒。然后使用成像软件，计算单个荧光颗粒。另一个实验取出上面的反应混合物，并吸量等分试样到垫子层上面，有和没有铬变素 2 R 存在。

[0260] 结果。图 9 是如在上面的第二个实验中所述有和没有染料的孔的图像，并证实了本发明的一个实施方案，其中使用染料来将选择的靶物 - 信号发射部分络合物的检测限制在检测带。图 10 中的数据显示了 hTSH 免疫测定的剂量响应曲线，指示通过在有染料存在下进行未放大的成像，不经整合洗涤步骤地进行免疫测定。

[0261] 结论。该结果表明，作为本发明的一个实施方案，染料的使用允许用户进行免疫测定，无需使用洗涤步骤来去除未反应的信号发射部分。所述方法允许通过信号发射络合物、选择部分和染料的组合，检测在复杂基质中的低浓度靶物 (图 10)，所述染料减少来自在检测带之外的游离的信号发射部分和未选择的信号发射部分非靶物络合物的背景。

[0262] 替代实施方案。本实施例的方法可以用于检测多种靶物，其中使用其它适当的种类特异性的结合部分替换在本实施例中使用的抗 -TSH 抗体。在其它实施方案中，可以使用不同的信号特征，例如荧光、化学发光、光吸收、光散射、磷光、酶反应性和拉曼散射，并选择适当的染料。例如染料甲苯胺蓝 O 可以与荧光标记德克萨斯红 (硫代罗丹明) 一起使用。

[0263] 实施例 6. 使用染料 - 垫子试剂减少试验背景，所述试剂允许进行完整试验，无需任何洗涤步骤来去除未反应的测定反应物，并进行未放大的成像。

[0264] 在本实施例中，描述了可用于实践本发明的染料 - 垫子试剂 (例如，含有染料和密度试剂的混合物的试剂)。本实施例提供了制备说明，并证实了染料 - 垫子试剂属性可以用于减少试验背景和在一个容器中进行试验，无需洗涤来分离测定反应物。

[0265] 存在于检测带之外的未结合的信号发射部分可以建立靶物的未放大成像的背景。通过加入将成像限制在检测带的染料，可以减少该背景 (实施例 5)。在该实施例中，我们使用染料与密度试剂的组合来进一步减少信号发射背景，其中通过从检测带排除未结合的信

号发射部分,允许仅检测由选择过程导致沉积在检测带中的信号。

[0266] 方法。使用 2 mg/ml 铬变素 2R (Sigma-Aldrich 目录号 C3143) 和 60% wt/wt 蔗糖 (JT Baker, 目录号 4097-04) 在 Tris-TBP 中的溶液,制备蔗糖染料 - 垫子试剂。使用 2 mg/ml 铬变素 R2 (Sigma-Aldrich 目录号 C3143) 和 25% v/v Optiprep® (Sigma-Aldrich, 目录号 D1556) 在 Tris-TBP 中的溶液,制备 Optiprep® 染料 - 垫子试剂。

[0267] 在一个实验中,反应混合物 (50 μL) 含有 2 μL 用抗 - hTSH 抗体包被的荧光颗粒 (0.02 % w/v)、2 μL 用抗 -hTSH 包被的磁性颗粒 (0.25 % w/v)、21 μL 200 mM EPPS 缓冲液(含有 400 mM 1,3 二氨基丙烷, pH 7.8) 和 25 μL 含有不同浓度的 hTSH 的血清样品。混合反应组分后,在环境温度温育反应物 10 min,以允许形成 hTSH 与荧光颗粒和磁性颗粒的‘夹心’免疫络合物。温育后,将 25 μL 反应混合物铺在 30μL 垫子试剂上面,所述垫子试剂含有或没有铬变素 R2 染料组分,在具有清澈底部的黑色微量培养板 (Corning 3881) 中。在高流通量自动化成像分析仪上,对孔成像。

[0268] 在单独的实验中,将上面的反应混合物 (25 μL) 铺在染料垫子试剂 (含有铬变素 R2 染料) 上面。然后在高流通量自动化成像分析仪上对孔成像。对孔成像后,使用磁棒仪器,对这些孔进行磁性选择。5 min 磁性选择步骤后,对相同孔重新成像。

[0269] 结果。图 11 表明,染料在染料 - 垫子试剂中的存在,彻底屏蔽了源自检测带之外的任何信号。图 12 所示的结果证实,在有染料存在下,可以检测通过荧光颗粒 -TSH- 磁性颗粒络合物的磁性选择而沉积在检测带中的信号发射部分。

[0270] 结论。可以看出,染料 - 垫子的组合急剧减少了来自被密度层从检测带中分离的未反应的试剂和非靶物络合物的背景。本实施例证实了染料 - 垫子试剂对本发明的贡献,并允许不经过洗涤地通过未放大的成像来检测靶物。在 + 靶物图像中可以辨别单个荧光信号发射颗粒,并通过软件直接计数。

[0271] 替代实施方案。替代实施方案也可以结合其它密度试剂,包括其它常用的密度试剂,诸如碘克沙醇、泛影钠、甲泛影钠、甲泛葡胺、蔗糖和其它糖类、寡糖、合成聚合物 (例如 Ficoll) 和不同的盐诸如氯化铯、溴化钾等。

[0272] 替代实施方案可以使用其它信号发射部分和其它染料,可以用于匹配使用的信号发射部分的信号发射特征。例如染料甲苯胺蓝 O 可以与荧光标记德克萨斯红 (硫代罗丹明) 一起使用。

[0273] 实施例 7. 染料垫子试剂对红血细胞悬浮液的视觉证实。

[0274] 本实施例视觉地证实了垫子试剂的维持叠加反应混合物(其可以包括固体如颗粒和细胞)与邻近检测表面的检测带之间的分离的能力。通过它的阻止全血样品中的红血细胞沉降到含有适当密度的垫子的孔的底部的能力,证实了垫子用于使覆盖反应物与检测带分离的用途。

[0275] 方法。将 Optiprep® (Sigma-Aldrich D1556) 的 20μL 10、15、20、25、30、35 和 40% v/v 溶液的等分试样吸量到 Nunc 384 孔澄清微孔滴定板的孔中。将牛全血 (10 μL) 铺在 Optiprep® 溶液的上面,并温育 15 分钟。温育后,视觉地检查孔的任何混合,并使用数字照相机照相。

[0276] 结果。显示在图 13 中的图像证实,大于或等于 25% v/v 的 Optiprep® 浓度能保持全血样品与检测带 (孔底) 完全分离至少 15 min。

[0277] 结论。可以看出，垫子的使用会维持叠加试剂混合物和检测带之间的分离。除了避免来自样品的组分沉降到检测带中以外，在该密度范围中的垫子会从检测带排除未结合的标记，因为标记颗粒的密度小于本实施例的红血细胞。未结合的标记的排除，会增加特异地选择的标记的检测的灵敏度。本实施例是证实染料垫子试剂的功能的本发明的实施方案。

[0278] 替代实施方案。其它试剂可以用于生成本实施例的致密垫子。当使用它们来制备类似密度的垫子时，叠加反应物与检测带的分离是类似的。

[0279] 实施例 8. 人全血中人促甲状腺激素的检测

本实施例描述了通过不含任何洗涤步骤的未放大的成像测定人全血中的人促甲状腺激素 (hTSH)。测定使用小鼠单克隆抗 -hTSH 包被的荧光的且磁性的的颗粒来将信号发射部分和选择部分结合到在人全血样品中所含有的 TSH 分子上。使用磁性选择，通过染料垫子，将荧光颗粒 -TSH- 磁性颗粒络合物沉积到检测带中。在反应孔中进行反应，并将反应混合物转移到成像孔中的染色的垫子的上面，然后施加磁性选择。

[0280] 方法。在一个实验中，20 μL 反应混合物包括：10 μL 200 mM EPPS (Sigma-Aldrich 目录号 E9502) 缓冲液(含有 400 mM 1,3 二氨基丙烷 (Sigma-Aldrich 目录号 D230807) pH 7.8), 2 μL 被抗 - hTSH 抗体包被的荧光颗粒 (0.02 % w/v), 2 μL 被抗 -hTSH 包被的磁性颗粒 (0.25 % w/v), 1 μL 未包被的 Dynal Dynabeads ® ‘载体’ 磁体 (Dynabeads (7.2 mg/mL) 在 20 mM Tris-TBP 溶液中预温育 15 min, 然后使用), 和 5 μL 其中已经事先掺杂了 hTSH 的全血样品。将反应混合物温育 10 min (注：预期‘载体’磁体会加速磁性选择步骤，但不是实践本发明所必需的)。在一个单独的 384 孔黑色孔聚苯乙烯平板中，将 10 μL 染色的垫子试剂 (含有 2 mg/ml 铬变素 2R 的 30% w/v Optiprep®) 加入特定孔中。在温育结束时，将每种反应混合物的 5 μL 等分试样铺在染料垫子层的上面，并将平板放在具有平行磁棒的板夹上。然后将平板和磁体装置放入高流通量自动化成像分析仪中。然后在上述的分析仪上对孔成像，曝光时间为 0.1 秒。然后使用成像软件，计算单个荧光颗粒。

[0281] 结果。在图 14 中的数据显示了在没有和有靶物存在下试验孔的未放大的图像的实施例。图 15 显示了通过使用自动化软件分析图像产生的全血中的 TSH 试验的剂量响应曲线数据。这 2 个结果显示了使用不经任何洗涤步骤的未放大的成像对来自复杂基质(如全血)的 hTSH 的特异性的且灵敏的检测。

[0282] 结论。实施例 8 证实，使用抗-TSH- 缀合的荧光颗粒(用于信号发射)和抗 -TSH- 缀合的磁性颗粒(用于选择)的试验形式与染色的 - 垫子和未放大的成像的使用的组合，允许检测复杂基质(如人血液)中的 TSH，无需洗涤步骤。

[0283] 可以在 + 靶物图像中辨别单个荧光信号发射颗粒，并通过软件直接地计数。

[0284] 通过染料 - 垫子试剂的包含，会增强试验的特异性。染料会吸收用作标记的荧光部分的激发和 / 或发射波长。该染料将对信号发射靶物络合物成像的能力限制在检测带。致密垫子的加入允许使选择性的络合物与非选择性的络合物分离，进一步减少背景。

[0285] 替代实施方案。其它实施方案可以使用不同的信号发射部分、选择部分和染料和垫子组分。

[0286] 其它实施方案可以使用相同的试验形式来检测许多不同的靶物，包括细胞、病毒、细胞器、脂蛋白和分子，包括蛋白、寡核苷酸、脂类、寡糖和小有机和无机分子。

[0287] 所述方法适用于含有复杂基质的样品，包括全血、血浆、粪便、废水、奶等。

[0288] 也可以在选择之前处理样品，例如可以离心全血以去除细胞组分，可以用甲醇固定细胞，可以提取和纯化 DNA，可以释放通常发现结合到血清因子上的激素、蛋白和维生素，和通过其它过程。

[0289] 尽管该试验包括同时接触抗-TSH 荧光颗粒、抗-TSH 磁性颗粒、和来自样品的 TSH，本发明的试验可以连续进行。例如，可以用抗-TSH 荧光颗粒预标记靶物，然后加入抗-TSH 磁性颗粒。

[0290] 实施例 9. 人血浆中人促甲状腺激素的检测。

[0291] 本实施例描述了通过不含任何洗涤步骤的未放大的成像测定人血浆中的人促甲状腺激素 (hTSH)。测定使用小鼠单克隆抗-hTSH 包被的荧光的且磁性的的颗粒来将信号发射部分和选择部分结合到在人全血样品中所含有的 TSH 分子上。使用磁性选择，通过染料垫子，将荧光颗粒-TSH-磁性颗粒络合物沉积到检测带中。在反应孔中进行反应，并将反应混合物转移到成像孔中的染色的垫子的上面，然后施加磁性选择。

[0292] 方法。在一个实验中，反应混合物 (20 μ L) 含有：10 μ L 200 mM EPPS (Sigma-Aldrich 目录号 E9502) 缓冲液(含有 400 mM 1,3 二氨基丙烷 (Sigma-Aldrich 目录号 D230807) pH 7.8), 2 μ L 被抗-hTSH 抗体包被的荧光颗粒 (0.02 % w/v), 2 μ L 被抗-hTSH 包被的磁性颗粒 (0.25 % w/v), 和 5 μ L hTSH (掺入人血浆中，所述人血浆事先使用在实施例 5 中生产的抗-hTSH 抗体包被的磁性颗粒去除 hTSH)。将反应物温育 10 min。在一个单独的 384 孔黑色孔聚苯乙烯平板中，将 10 μ L 染色的垫子试剂 (含有 5 mg/ml 铬变素 2R 的 30% w/v Optiprep[®]) 加入特定孔中。在温育结束时，将每种反应混合物的 5 μ L 等分试样铺在单个孔的染料垫子层的上面，并将平板放在具有平行磁棒的板夹上。然后将平板和磁体装置放入高流通量自动化成像分析仪中。然后在上述的分析仪上对孔成像，曝光时间为 0.1 秒。然后使用成像软件，计算单个荧光颗粒。

[0293] 结果。在图 16 中的数据显示了在没有和有靶物存在下试验孔的未放大的图像的实施例。图 17 显示了通过使用自动化软件分析图像产生的剂量响应数据。这 2 个结果显示了使用不经任何洗涤步骤的未放大的成像对来自复杂基质(如血浆)的 hTSH 的特异性的且灵敏的检测。

[0294] 结论。实施例 9 证实，使用抗-TSH-缀合的荧光颗粒(用于信号发射)和抗-TSH-缀合的磁性颗粒(用于选择)的试验形式与染色的 - 垫子和未放大的成像的使用的组合，允许检测复杂基质(如人血浆)中的 TSH，无需洗涤步骤。

[0295] 可以在 + 靶物图像中辨别单个荧光信号发射颗粒，并通过软件直接地计数。

[0296] 通过染料 - 垫子试剂的包含，会增强试验的特异性。染料会吸收用作标记的荧光部分的激发和 / 或发射波长。该染料将对信号发射靶物络合物成像的能力限制在检测带。致密垫子的加入允许使选择性的络合物与非选择性的络合物分离，进一步减少背景。

[0297] 替代实施方案。其它实施方案可以使用不同的信号发射部分、选择部分和染料和垫子组分。

[0298] 其它实施方案可以使用相同的试验形式来检测许多不同的靶物，包括细胞、病毒、细胞器、脂蛋白和分子，包括蛋白、寡核苷酸、脂类、寡糖和小有机和无机分子。

[0299] 所述方法适用于含有复杂基质的样品，包括全血、血浆、粪便、废水、奶等。

[0300] 也可以在选择之前处理样品，例如可以离心全血以去除细胞组分，可以用甲醇固定细胞，可以提取和纯化 DNA，可以释放通常发现结合到血清因子上的激素、蛋白和维生素，和通过其它过程。

[0301] 尽管该试验包括同时接触抗-TSH 荧光颗粒、抗-TSH 磁性颗粒、和来自样品的 TSH，本发明的试验可以连续进行。例如，可以用抗-TSH 荧光颗粒预标记靶物，然后加入抗-TSH 磁性颗粒。

[0302] 实施例 10：人血浆中炭疽芽孢杆菌 (Anthrax) 致死因子的检测。

[0303] 本实施例描述了人血浆中细菌毒素(炭疽芽孢杆菌致死因子)的测定。该测定使用小鼠单克隆抗-Anthrax 致死因子包被的荧光的且磁性的颗粒来将信号发射部分和选择部分结合到在人血浆样品中所含有的致死因子分子上。使用磁性选择，通过染料垫子，将荧光颗粒 - 致死因子 - 磁性颗粒络合物沉积到检测带中。在反应孔中进行反应，并将反应混合物覆盖到成像孔中的染色的垫子的上面，然后施加磁性选择。

[0304] 方法。反应混合物 (50 μL) 含有：10 μL 200 mM EPPS (Sigma-Aldrich 目录号 E9502) 缓冲液(含有 400 mM 1,3 二氨基丙烷 (Sigma-Aldrich 目录号 D230807) pH 7.8)，10 μL 被抗-Anthrax 致死因子抗体(作为包被抗体)包被的荧光颗粒 (0.007 % w/v)，10 μL 被抗-Anthrax 致死因子抗体 (IQ Corp.，目录号 LF-IQ) (如实施例 2 所述制备，其中使用抗-Anthrax 致死因子抗体) 包被的磁性颗粒 (0.05 % w/v) (如实施例 4 所述制备，进行下述修改：使用抗-Anthrax 致死因子单克隆抗体作为包被抗体)，10 μL 缓冲液(含有 1 mg/mL 藻酸 (Sigma-Aldrich 目录号 A2158)、2.5 % w/v 聚乙烯吡咯烷酮 (Sigma-Aldrich 目录号 PVP40)、0.5 mg/mL 牛 γ 球蛋白 (Lampire Laboratories 目录号 7400805) 和 1 mg/mL 小鼠 γ 球蛋白 (Jackson Immunoresearch 目录号 015-000-002) PBS 溶液 pH 7.4)，和 10 μL 添加了重组炭疽致死因子 (List Laboratories 目录号 172b) 的人血浆样品。将反应物温育 10 min。在一个单独的具有清澈底部的 96 孔黑色孔聚苯乙烯平板中，将染料垫子试剂 (含有 2 mg/ml 铬变素 2R 的 15% Optiprep[®]) 加入特定孔中。在温育结束时，将每种反应混合物的 40 μL 等分试样铺在染料垫子层的上面，并将平板放在磁棒上。然后将平板放入高流通量自动化成像分析仪中。在上述的分析仪上对孔成像，曝光时间为 0.1 秒。然后使用软件，计算单个荧光颗粒。

[0305] 结果。图 18 显示了在没有和有靶物存在下试验孔的未放大的图像的实施例。图 19 显示了通过使用自动化软件分析图像产生的剂量响应数据。这 2 个结果显示了使用不经任何洗涤步骤的未放大的成像对来自复杂基质(如血浆)的炭疽致死因子的特异性的且灵敏的检测。

[0306] 结论。实施例 10 证实，使用抗 - 致死因子 - 缀合的荧光颗粒(用于信号发射)和抗 - 致死因子 - 缀合的磁性颗粒(用于选择)的试验形式与染色的 - 垫子和未放大的成像的使用的组合，允许检测复杂基质(如人血浆)中的炭疽致死因子，无需洗涤步骤。

[0307] 在低靶物浓度，可以在 + 靶物图像中辨别单个荧光信号发射颗粒，并通过软件直接地计数。

[0308] 通过染料 - 垫子试剂的包含，会增强试验的特异性。染料会吸收用作标记的荧光部分的激发和 / 或发射波长。该染料将对信号发射靶物络合物成像的能力限制在检测带。致密垫子的加入允许使选择性的络合物与非选择性的络合物分离，进一步减少背景。

[0309] 替代实施方案。其它实施方案可以使用不同的信号发射部分、选择部分和染料和垫子组分。

[0310] 其它实施方案可以使用相同的试验形式来检测许多不同的靶物，包括细胞、病毒、细胞器、脂蛋白和分子，包括蛋白、寡核苷酸、脂类、寡糖和小有机和无机分子。

[0311] 所述方法适用于含有复杂基质的样品，包括全血、血浆、粪便、废水、奶等。

[0312] 也可以在选择之前处理样品，例如可以离心全血以去除细胞组分，可以用甲醇固定细胞，可以提取和纯化 DNA，可以释放通常发现结合到血清因子上的激素、蛋白和维生素，和通过其它过程。

[0313] 尽管该试验包括同时接触抗 - 靶物荧光颗粒、抗 - 靶物磁性颗粒和来自样品的靶物，本发明的试验可以连续进行。例如，可以用抗 - 靶物荧光颗粒预标记靶物，然后加入抗 - 靶物磁性颗粒。

[0314] 实施例 11. 人血浆中炭疽芽孢杆菌 (Anthrax) 保护抗原的检测。

[0315] 本实施例描述了人血浆中细菌毒素组分(炭疽芽孢杆菌的 Anthrax 保护抗原)的测定。该测定使用小鼠单克隆抗 -Anthrax 保护抗原包被的荧光的且磁性的颗粒来将信号发射部分和选择部分结合到在人血浆样品中所含有的保护抗原分子上。使用磁性选择，通过染料垫子，将荧光颗粒 - 保护抗原 - 磁性颗粒络合物沉积到检测带中。在反应孔中进行反应，并将反应混合物覆盖到成像孔中的染色的垫子的上面，然后施加磁性选择。

[0316] 方法。反应混合物 (50 μL) 含有 :20 μL PBS-TBP + 400 mM 1,3 二氨基丙烷 (Sigma-Aldrich 目录号 D230807) pH 7.8, 10 μL 被抗 -Anthrax 保护抗原抗体 [C3, Meridian Biodesign, 目录号 C86613M] 包被的荧光颗粒 (0.007 % w/v) (如实施例 2 所述制备，其中使用抗 -Anthrax 保护抗原抗体作为包被抗体)，10 μL 被抗 -Anthrax 保护抗体 [BAP-0105 Meridian Biodesign, 目录号 C86501M] 包被的磁性颗粒 (0.05 % w/v) (如实施例 4 所述制备，进行下述修改：使用抗 -Anthrax 保护抗原作为包被抗体)，和 10 μL 掺加了重组炭疽保护抗原 (List Laboratories, 目录号 171A) 的人血浆样品。将反应物温育 10 min。在一个单独的具有清澈底部的 96 孔黑色孔聚苯乙烯平板中，将 90 μL 染色的垫子试剂 (含有 2 mg/ml 铬变素 2R 的 15% Optiprep[®]) 加入特定孔中。在温育结束时，将反应混合物的 40 μL 等分试样铺在染料垫子层的上面，并将平板放在构建的磁棒上。然后将平板放入高流通量自动化成像分析仪中。在上述的分析仪上对孔成像，曝光时间为 0.1 秒。然后使用软件，计算单个荧光颗粒。

[0317] 结果。图 20 显示了在没有和有靶物存在下试验孔的未放大的图像的实施例。图 21 显示了通过使用自动化软件分析图像产生的剂量响应数据。这 2 个结果显示了使用不经任何洗涤步骤的未放大的成像对来自复杂基质(如血浆)的炭疽保护抗原的特异性的且灵敏的检测。

[0318] 结论。实施例 11 证实，使用抗 -Anthrax 保护抗原 - 缀合的荧光颗粒(用于信号发射)和抗 -Anthrax 保护抗原 - 缀合的磁性颗粒(用于选择)的试验形式与染色的 - 垫子和未放大的成像的使用的组合，允许检测复杂基质(如人血浆)中的炭疽保护抗原，无需洗涤步骤。

[0319] 通过染料 - 垫子试剂的包含，会增强试验的特异性。染料会吸收用作标记的荧光部分的激发和 / 或发射波长。该染料将对信号发射靶物络合物成像的能力限制在检测带。

致密垫子的加入允许使选择性的络合物与非选择性的络合物分离,进一步减少背景。

[0320] 替代实施方案。其它实施方案可以使用不同的信号发射部分、选择部分和染料和垫子组分。

[0321] 其它实施方案可以使用相同的试验形式来检测许多不同的靶物,包括细胞、病毒、细胞器、脂蛋白和分子,包括蛋白、寡核苷酸、脂类、寡糖和小有机和无机分子。

[0322] 所述方法适用于含有复杂基质的样品,包括全血、血浆、粪便、废水、奶等。

[0323] 也可以在选择之前处理样品,例如可以离心全血以去除细胞组分,可以用甲醇固定细胞,可以提取和纯化 DNA,可以释放通常发现结合到血清因子上的激素、蛋白和维生素,和通过其它过程。

[0324] 尽管该试验包括同时接触抗 - 靶物荧光颗粒、抗 - 靶物磁性颗粒和来自样品的靶物,本发明的试验可以连续进行。例如,可以用抗 - 靶物荧光颗粒预标记靶物,然后加入抗 - 靶物磁性颗粒。

[0325] 实施例 12. 人尿中细菌炭疽芽孢杆菌聚-D-γ-谷氨酸荚膜多肽 (PDGA) 的检测。

[0326] 本实施例描述了人尿中细菌荚膜多肽(炭疽芽孢杆菌的聚-D-γ-谷氨酸)的测定。该测定使用小鼠单克隆抗-PDGA-包被的荧光的且磁性的颗粒来将信号发射部分和选择部分结合到在人血浆样品中所含有的 PDGA 上。使用磁性选择,通过染料垫子,将荧光颗粒-PDGA-磁性颗粒络合物沉积到检测带中。在反应孔中进行反应,并将反应混合物覆盖到成像孔中的染色的垫子的上面,然后施加磁性选择。

[0327] 方法。50 μL 反应混合物由下列组成:20 μL PBS-TBP,10 μL 被抗-Anthrax PDGA 抗体包被的荧光颗粒 (0.007% w/v) (如实施例 2 所述制备,其中使用抗-Anthrax PDGA 抗体作为包被抗体),10 μL 被抗-Anthrax PDGA 抗体包被的磁性颗粒 (0.025 % w/v) (如实施例 4 所述制备,进行下述修改:抗-Anthrax PDGA 作为包被抗体) 和 10 μL 掺加聚-D-γ-谷氨酸 (合成的 50-聚体, AnaSpec) 的人尿样品。将反应物温育 5 min。在一个单独的具有清澈底部的 96 孔黑色孔聚苯乙烯平板中,将染料垫子试剂 (含有 2 mg/ml 铬变素 2R 的 15% Optiprep®) 加入特定孔中。在温育结束时,将反应混合物的 40 μL 等分试样铺在染料垫子层的上面,并将平板放在针磁体阵列上 7 分钟。在高流通量自动化成像分析仪中对平板成像,曝光时间为 0.1 秒。然后使用软件,计算单个荧光颗粒。

[0328] 结果。图 22 显示了在没有和有靶物存在下试验孔的未放大的图像的实施例。图 23 显示了通过使用自动化软件分析图像产生的剂量响应数据。这 2 个结果显示了人尿中 PDGA 的特异性的且灵敏的检测,证实了可以用作本发明的样品的基质的多样性。

[0329] 结论。实施例 12 证实,使用抗-PDGA-缀合的荧光颗粒(用于信号发射)和抗-PDGA-缀合的磁性颗粒(用于选择)的试验形式与染色的 - 垫子和未放大的成像的使用的组合,允许检测尿中的炭疽保护抗原,无需洗涤步骤。

[0330] 替代实施方案。因为 PDGA 是具有任意单个单克隆抗体的多个结合位点的重复聚合物,替代实施方案可以使用缀合到荧光的且磁性的颗粒上的单个抗体。

[0331] 其它实施方案可以使用不同的信号发射部分、选择部分和染料和垫子组分。

[0332] 其它实施方案可以使用相同的试验形式来检测许多不同的靶物,包括细胞、病毒、细胞器、脂蛋白和分子,包括蛋白、寡核苷酸、脂类、寡糖和小有机和无机分子。

[0333] 所述方法适用于含有复杂基质的样品,包括全血、血浆、粪便、废水、奶等。

[0334] 也可以在选择之前处理样品，例如可以离心全血以去除细胞组分，可以用甲醇固定细胞，可以提取和纯化 DNA，可以释放通常发现结合到血清因子上的激素、蛋白和维生素，和通过其它过程。

[0335] 尽管该试验包括同时接触抗 - 靶物荧光颗粒、抗 - 靶物磁性颗粒和来自样品的靶物，本发明的试验可以连续进行。例如，可以用抗 - 靶物荧光颗粒预标记靶物，然后加入抗 - 靶物磁性颗粒。

[0336] 实施例 13：通过自动化分析检测人全血中的炭疽芽孢杆菌（Anthrax）致死因子。

[0337] 本实施例描述了完全自动化的高处理量冲击波试验仪器用于测定人全血中的细菌毒素（炭疽芽孢杆菌致死因子）的应用。该测定使用小鼠单克隆抗-Anthrax 致死因子 - 包被的荧光的且磁性的颗粒来将信号发射部分和选择部分结合到在人血浆样品中所含有的致死因子分子上。使用磁性选择，通过染料垫子，将荧光颗粒 - 致死因子 - 磁性颗粒络合物沉积到检测带中。将样品载体呈递给仪器，所述样品载体含有掺加了不同浓度的致死因子的全血样品。装配仪器，并温育反应孔中的反应物，然后将每个反应物覆盖到成像孔中的染色的垫子的上面，并将孔运输到磁性选择台，自动地对孔成像。

[0338] 方法。试验组合物与在实施例 10 所述的组合物相同。将所有试剂装载进高流通量冲击波试验仪器的试剂杯中。在计算机控制下，通过完全自动化的机器人移液器，进行下述的所有吸量步骤。首先，将 10 μL 200 mM EPPS (Sigma-Aldrich 目录号 E9502) 缓冲液(其含有 400 mM 1,3 二氨基丙烷 (Sigma-Aldrich 目录号 D230807) pH 7.8) 加入反应杯中，然后吸量 10 μL 试剂(含有在 PBS 中的 1 mg/mL 藻酸 (Sigma-Aldrich 目录号 A2158)、2.5 % w/v 聚乙烯吡咯烷酮 (Sigma-Aldrich 目录号 PVP40)、0.5 mg/mL 牛 γ 球蛋白 (Lampire Laboratories 目录号 7400805) 和 1 mg/mL 小鼠 γ 球蛋白 (Jackson Immunoresearch 目录号 015-000-002))。加入 10 μL 掺加了炭疽致死因子 ((List Laboratories, 目录号 172b) 的人全血。随后，加入 10 μL 抗-Anthrax 致死因子荧光颗粒的 0.007 % w/v 稀释物 (如实施例 10 所述制备) 和抗-Anthrax 致死因子磁性颗粒的 10 μL 0.05 % w/v 稀释物 (如实施例 10 所述制备)，通过装载(onboard)混合器混合，并温育 6 min。在温育期间，自动地向单独的成像杯中加入 90 μL 染色的垫子试剂 (含有 10 mg/ml 铬变素 2R 的 30% Optiprep[®])。温育后，将 40 μL 反应混合物铺在分析仪成像孔中的染料 - 垫子层的上面。然后将成像杯自动地移动到分析仪内的磁体上面，并进行磁性分离 1 min。将磁性颗粒沉积到检测带中以后，将成像杯自动地移动到成像台上，然后在分析仪上成像，曝光时间为 0.1 秒。然后计算单个荧光颗粒，并使用分析仪上的软件，以自动化的分析样品结果。

[0339] 结果。在图 24 中显示了使用完全自动化的冲击波试验仪器产生的数据。该图显示了使用软件自动化分析获取的图像所产生的剂量响应曲线。这些结果证实了使用不具有任何洗涤步骤的未放大的成像对来自复杂基质(如人血液)的炭疽芽孢杆菌致死因子的完全自动化的、特异性的、且灵敏的检测。

[0340] 结论。实施例 13 证实，本发明的试验可以在高处理量系统中完全自动化。

[0341] 实施例 14 - 炭疽芽孢杆菌（Anthrax）荚膜肽 - 聚 - γ -D- 谷氨酸 (PDGA) 的测定 - 竞争形式。

[0342] 实施例 15 描述了使用放大成像, 使用竞争测定形式测定 Anthrax 聚 - γ -D- 谷氨酸 (PDGA), 无需洗涤步骤。小分子 (半抗原) 通常仅可以被单个特异性的结合部分结合。这不允许它们被连接到信号发射和选择部分上的种类结合部分同时结合。通过使用‘竞争’形式, 通过本发明的方法, 仍然可以分析这样的靶物。许多不同形式的‘竞争’结合试验是本领域众所周知的。

[0343] 在本实施例中使用的‘竞争’形式使用多个靶物, 所述靶物缀合到选择部分上, 形成靶物竞争物。在样品中没有靶物的情况下, 缀合到靶物特异性的种类结合部分上的荧光颗粒会结合靶物竞争物, 并在试验中被选择和检测。当存在靶物时, 它与靶物竞争物竞争结合荧光颗粒, 由此减少在试验中检测到的信号的量。该减少与存在的靶物的量成比例。

[0344] 方法。在实施例 13 中描述了抗 -PDGA 抗体包被的荧光颗粒的制备。如实施例 4 所述, 生产抗生蛋白链菌素包被的磁性颗粒, 经过下述修改: 其中将抗生蛋白链菌素 (Prozyme SA10) 缀合到磁性颗粒(而不是抗体)上。将过量的生物素化的合成的 PDGA 9-聚体肽 (由 Anaspec 生产) 加给抗生蛋白链菌素 - 包被的磁性颗粒, 并温育 1 小时。然后在 PBS-TBP、pH 7.4 中充分洗涤 PDGA 磁性颗粒。将 2 μL 抗 -PDGA 抗体包被的荧光颗粒与 25 μL 含有不同浓度的 PDGA₉- 甲状腺球蛋白缀合物的样品相混合, 然后与 2 μL PDGA- 磁性颗粒相混合。在摇动下, 将反应物温育 5 分钟。稀释反应物, 并放在磁体上, 以分离结合的和未结合的荧光颗粒。去除上清液, 并通过在 Victor 2 荧光计中读数, 检测捕获的荧光。大量抗体 - 包被的荧光颗粒被抗原 - 包被的磁性颗粒捕获。信号抑制 (竞争) 的程度与样品中的细菌荚膜肽的量相对应。

[0345] 结果。在图 25 中显示的结果表明, 使用磁性捕获的竞争免疫测定形式可以用于检测靶物 (来自炭疽芽孢杆菌的 PDGA) 是否存在。数据证实了使用‘竞争’形式的结合试验特有的抑制试验曲线。

[0346] 结论。实施例 14 显示了可以与本发明的某些实施方案一起使用的替代试验形式 (竞争), 用于检测来自不同样品的靶物, 且可以容易地整合进本发明的试验中。

[0347] 替代实施方案。如上所述, 与含有不同量的 PDGA₉ 肽的样品一起, 混合抗 -PDGA 荧光颗粒和 PDGA- 竞争物 - 偶联的磁性颗粒。接触步骤后, 将反应混合物铺在染色的垫子上面, 进行磁性选择, 并在高流通量自动化成像分析仪中成像, 曝光时间为 0.1 秒。在样品中没有 PDGA₉ 的情况下, 大量颗粒被捕获在检测带中。随着样品中 PDGA 的量增加, 捕获的颗粒的数目减少。

[0348] 存在多种可以用于本发明中的本领域众所周知的‘竞争’结合试验形式。在另一个竞争测定实施方案中, 信号发射部分和选择部分都缀合到靶物竞争物上。通过在反应物中供给的至少二价的种类特异性的分子 (例如抗体), 实现信号发射部分和捕获部分的交联。通过加入的靶物与二价的种类特异性的结合部分的结合, 抑制交联反应, 导致信号的量减少 (当靶物存在于反应物中时)。在第三个竞争实施方案中, 信号发射和选择部分各自缀合到可以结合靶物的种类特异性的结合部分上。至少二价的靶物竞争物缀合物的加入, 会诱导选择信号 - 选择部分络合物的形成。另外, 靶物的加入, 会减少信号发射部分和选择部分之间的交联络合物的形成。

[0349] 其它实施方案可以使用这些竞争测定形式中的任一种的不同的信号发射部分、选择部分和染料和垫子组分。

[0350] 实施例 15. 阳性和阴性内部对照用于确保测定准确度的应用

本实施例描述了实验样品的平行的内部阳性对照和内部阴性对照运行在本发明的某些实施方案中的整合,以测试实验结果上的基质效应。在实验基质中的内部对照运行的整合,会确保实验结果的准确度,减少假结果和对再检验的需求。

[0351] 当将对照加入实验样品中时,预见到阳性对照(例如,将预定量的靶物加入实验样品中)会增加可确定的增加信号。如果阳性对照未被检测出,样品可以视作具有阴性干扰,并适当地解释。类似地,用于抑制由样品中的靶物产生的信号(例如,通过加入大量种类特异性的结合部分,其用于将标记结合到靶物上)的阴性对照,会导致由阳性样品产生的信号的减小。在阴性对照孔中没有表现出减小的信号的阳性样品要么是假阳性,要么是非常高的真阳性。通过样品的稀释,可以区分这些替代方案。

[0352] 方法。该实验使用抗-靶物抗体包被的荧光的且磁性的颗粒,用于检测如实施例 5、11 和 12 所述的不同的对应靶物 hTSH、炭疽保护抗原 (PA) 和炭疽荚膜聚-D-γ-谷氨酸 (PDGA)。将含有和没有靶物的样品(各 100 pg/mL) 的单独反应混合物加入 3 个孔中的每一个中,每个试验使用下述的反应混合物,具有下述添加:对于样品定量, PBS-TBP, pH 7.4; 对于阳性内部对照,在 PBS-TBP 中的 100 pg/mL 靶物;对于阴性内部对照,在 PBS-TBP 中的大量过量(1 μg/mL) 的游离的靶物特异性的抗体(在抗体包被的荧光颗粒上的相同抗体)(细节参见实施例 5、11 和 12)。将样品温育 10 min。在一个单独的具有清澈底部的 96 孔黑色孔聚苯乙烯平板中,将染料垫子试剂(90 μL) 加入特定孔中。在温育结束时,将反应混合物的 40 μL 等分试样铺在染料垫子层的上面,并将平板放在磁棒阵列上,以进行选择步骤。将平板放入高流通量自动化成像分析仪中,对孔成像,曝光时间为 0.1 秒。然后使用软件,计算单个荧光颗粒。

[0353] 结果。图 26 显示了在含有和没有靶物的实验样品中的实验性的、阳性的和阴性的内部对照运行的每个试验(hTSH、Anthrax PA 和 Anthrax PDGA) 的图像。从该图可以看出,该方法允许为假阴性和假阳性反应校正试验结果。

[0354] 结论。该实验证实了在本发明中提出的实施方案之一,它是关于对照,即本发明的内部对照工作,且可以用于确保结果的准确性。结果显示了在含有和没有靶物的孔中的预期的信号和无信号(+ 和 -)。如预期的,阳性内部对照孔在所有孔中显示出阳性信号,如预期的,阴性内部对照没有显示出信号。

[0355] 替代实施方案。在本发明的某些实施方案中,阴性或阳性内部对照可以单独使用。替代阴性对照包括与无关的种类-结合分子缀合的信号发射部分的使用。

[0356] 在本发明的其它实施方案中,可以使用阴性和阳性内部对照来验证使用的试剂的性能,包括在筒内或在孔中干燥的那些。

[0357] 阳性和阴性内部对照可以用于具体实施方案中,诸如样品中抗药细菌或癌细胞的检测。在这些实施方案中,可以使用对照来证实,生长步骤适当地发生,并区分抗药的和药物敏感的细胞群体。

[0358] 实施例 16. 通过非特异性的 SYBR® 绿 I 染色和使用特异性地结合细胞表面抗原蛋白 A 的磁性纳米颗粒来特异性检测金黄色葡萄球菌细胞。

[0359] 本实施例描述了使用非特异性染色剂染色金黄色葡萄球菌细胞、随后使用靶物特异性的磁性颗粒来检测特定靶物的方法。靶物特异性的磁性颗粒与非特异性染色的组

合使用，在本发明的背景下具有普遍用途，因为染色和靶物的捕获允许使用未放大的成像来容易地计算靶物。

[0360] 本实施例使用未放大的成像证实了，使用 SYBR® 绿 1 染料可以容易地标记金黄色葡萄球菌，并使用靶物特异性的磁性颗粒特异性地捕获。

[0361] 所述方法因而可以用于检测和计算临床的、工业的和环境的样品中的低浓度的单个细胞和分子靶物。

[0362] 方法。在图 27 中显示了使用 SYBR® 绿 1 和抗 - 蛋白 A 抗体包被的磁性颗粒的金黄色葡萄球菌试验的示意图。使用 SYBR® 绿 1 和如实施例 4 所述生产的抗 - 蛋白 A 抗体包被的磁性颗粒，标记金黄色葡萄球菌细胞。在 35°C 在生长培养基 TSB（胰蛋白酶处理过的大豆汤，Acumedia 目录号 7164A）中培养金黄色葡萄球菌（ATCC 菌株 29213）的培养物 2 小时，以达到对数生长期 ($OD_{600} = 0.3$)。使用在 Zeiss 显微镜上的 Petroff-Hausser 计数池，计数金黄色葡萄球菌细胞，并在新鲜的 TSB 中稀释细胞至 2×10^5 细胞 /mL。在 96 孔聚碳酸酯 PCR 板（Fisher Scientific，目录号 14230237）中进行反应。反应混合物（50 μ L）含有 25 μ L 金黄色葡萄球菌细胞（5,000 细胞）、20 μ L SYBR® 绿 1 染料（在盐水中 1:2000X 稀释）和 5 μ L 悬浮于 PBS-TBP 溶液（10 mM 磷酸盐，140 mM NaCl，3 mM KCl（Calbiochem 目录号 524650）、0.05% w/v 吐温 20（Acros 目录号 2333600010）、2 mg/mL BSA（Sigma-Aldrich）、0.05% w/v ProClin 300（Supelco），调至 pH 7.4）中的抗 - 蛋白 A 包被的磁性颗粒（ 2×10^{10} 颗粒 /mL）。通过抽吸，将测定反应物混合均匀，并在环境温度在黑暗中温育 15 min。温育后，将 40 μ L 反应混合物覆盖在 70 μ L 染色的垫子溶液（含有 5 mg/mL 铬变素 2R（Sigma-Aldrich C3143）的 15% OptiPrep®（Sigma 目录号 D1556））上，所述垫子溶液预等分在 96- 孔半面积直径透明底黑色平板（Grainer，目录号 675096）中。为了选择在孔底部处的细胞 - 颗粒络合物，然后通过将它放在磁体上 4 min，对平板施加磁力。然后从磁体取下平板，并放入高流通量自动化成像分析仪中。然后在上述的分析仪上对孔成像，曝光时间为 0.1 秒。然后使用软件，计算单个荧光细胞。

[0363] 结果。图 28 显示了使用 SYBR® 绿 1 标记金黄色葡萄球菌细胞和使用抗体包被的磁性颗粒的特异性捕获的试验结果的图像。图 A 显示了含有不具有金黄色葡萄球菌细胞的反应物（阴性对照）的孔的图像。图 B 显示了含有 5000 个金黄色葡萄球菌细胞的反应物的孔的图像，且图 C 显示了含有 50,000 个表皮葡萄球菌细胞的反应物（作为特异性对照）的孔的图像。从数据显而易见，只有当反应混合物含有金黄色葡萄球菌细胞时，才观察到高荧光对象数目（图 B）。含有零细胞对照和表皮葡萄球菌的孔没有产生超过背景的任何信号（图 A 和 C）。图 29 证实了本文所述的方法能检测和计算低浓度的单个细胞靶物。

[0364] 结论。在本发明的背景下，该数据证实了抗体 - 包被的磁性颗粒可以用于特异性地捕获标记的细胞（例如金黄色葡萄球菌）。此外，测定是高度特异性的，因为非金黄色葡萄球菌细菌（例如表皮葡萄球菌）没有产生超过背景的信号，指示试验特异性。如在以后的实施例中所证实的，本文使用的捕获和标记方法在本发明的背景下可以与用于区分捕获靶物和游离的信号发射部分和其它标记的实体的方法相组合。

[0365] 在低靶细胞浓度，可以在 + 靶物图像中辨别单个荧光细胞，并通过软件直接地计数。

[0366] 替代实施方案。可以使用其它核酸染色剂来标记细胞用于检测，或可以采用其它

类型的荧光细胞染色。可以采用靶物特异性的标记来进行细胞检测；例如，缀合到抗 - 蛋白 A 抗体或 Alexa®490- 标记的抗 - 蛋白 A 抗体上的荧光颗粒可以用作标记。另外，可以将其它选择模式用于该试验中，包括使用致密颗粒的选择。

[0367] 实施例 17. 使用抗体 - 包被的荧光颗粒和特异性地结合细胞表面抗原蛋白 A 的磁性纳米颗粒来特异性检测金黄色葡萄球菌细胞

本实施例描述了使用抗 - 蛋白 A 抗体包被的荧光颗粒（实施例 2）特异性地标记金黄色葡萄球菌细菌细胞、和使用磁性颗粒（实施例 4）来检测特定靶物的特异性捕获的方法。靶物特异性的荧光的且磁性的颗粒与染料 - 垫子的组合使用，在本发明的背景下具有普遍用途，因为染色和靶物的捕获允许使用未放大的成像来容易地计算靶物，无需任何洗涤步骤。

[0368] 所述方法因而可以用于检测和计算临床的、工业的和环境的样品中的低浓度的单个细胞和分子靶物。

[0369] 方法。在图 30 中显示了使用抗 - 蛋白 A 抗体包被的荧光颗粒和抗 - 蛋白 A 抗体包被的磁性颗粒的金黄色葡萄球菌试验的示意图。在 35°C 在生长培养基 TSB（胰蛋白酶处理过的大豆汤，Acumedia 目录号 7164A）中培养金黄色葡萄球菌（ATCC 菌株 29213）的培养物 2 小时，以达到对数生长期 ($OD_{600} = 0.3$)。使用在 Zeiss 显微镜上的 Petroff-Hausser 计数池，计数金黄色葡萄球菌细胞，并在新鲜的 TSB 中稀释细胞至 1×10^6 细胞 /mL。在 96 孔聚碳酸酯 PCR 板（Fisher Scientific，目录号 14230237）中进行反应。反应混合物（50 μ L）含有 20 μ L PBS-TBP、10 μ L 金黄色葡萄球菌细胞（10,000 细胞）、10 μ L 抗 - 蛋白 A 抗体包被的荧光颗粒（ 1.25×10^{10} 颗粒 /mL）和 10 μ L 抗 - 蛋白 A 抗体包被的磁性颗粒（ 6.25×10^9 颗粒 /mL）。通过抽吸，将测定反应物混合均匀，并在环境温度温育 30 min。温育后，将 20 μ L 反应混合物覆盖在 70 μ L 染色的 - 垫子溶液（含有 5 mg/mL 铬变素 2R（Sigma-Aldrich C3143）的 15% OptiPrep®（Sigma 目录号 D1556））上，所述垫子溶液预等分在 96- 孔半面积直径澄清底黑色平板（Grainer，目录号 675096）中。为了选择在孔底部处的细胞 - 颗粒络合物，然后通过将它放在磁体上，对平板施加磁力。然后从磁体取下平板，并放入高流通量自动化成像分析仪中。然后在上述的分析仪上对孔成像，曝光时间为 0.1 秒。然后使用软件，计算单个荧光细胞。我们已经使用表皮葡萄球菌（ATTC 菌株 12228）作为特异性对照，其也以与上述类似的方式进行测定。

[0370] 结果。图 31 显示了试验结果的未放大的图像，其中采用抗体包被的荧光颗粒（作为信号发射部分）和抗体包被的磁性颗粒（作为选择部分）各自对金黄色葡萄球菌细胞的特异性标记和捕获。图 A 显示了含有不具有金黄色葡萄球菌细胞的反应物（阴性对照）的孔的图像。图 B 显示了含有 4000 个金黄色葡萄球菌细胞的反应物的孔的图像，且图 C 显示了含有 40,000 个表皮葡萄球菌细胞的反应物（作为特异性对照）的孔的图像。从数据显而易见，只有当反应混合物含有金黄色葡萄球菌细胞时，才在图像中看到高的单个荧光对象数目（图 B）。零细胞孔以及含有表皮葡萄球菌的孔没有产生超过背景的任何信号（图 A 和 C）。图 32 证实了本文所述的方法能检测和计算低浓度的单个细胞靶物。

[0371] 结论。在本发明的背景下，该数据证实了信号发射部分（抗体 - 包被的荧光颗粒）和选择部分（磁性颗粒）在均匀试验（无洗涤步骤）中用于特异性地标记和选择金黄色葡萄球菌细胞并计算在低靶物浓度的细胞的应用。此外，测定是高度特异性的，因为非金黄色葡萄球菌细菌（例如表皮葡萄球菌）没有产生超过背景的信号，指示试验特异性。如在以

后的实施例中所证实的，本文使用的捕获和标记方法在本发明的背景下可以与用于区分捕获靶物和游离的信号发射部分和其它标记的实体的方法相组合。

[0372] 在低靶细胞浓度，可以在 + 靶物图像中辨别单个荧光细胞，并通过软件直接地计数。

[0373] 替代实施方案。在其它实施方案中，可以使用核酸染色剂来标记细胞用于检测，或可以采用其它类型的非特异性的荧光细胞染色。可以采用靶物特异性的标记来进行细胞检测；例如，Alexa®490- 标记的抗 - 蛋白 A 抗体可以用作标记。另外，可以将其它选择模式用于该试验中，包括使用致密颗粒的选择。

[0374] 实施例 18. 通过选择性生长、随后非特异性 SYBR® 绿 I 染色、并使用特异地结合细胞表面抗原蛋白 A 的磁性纳米颗粒，特异地检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA)

在本实施例中，我们描述了基于生长期间的表型选择对抗药细菌的测定，用于快速地检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA)。本实施例描述了使用非特异性染色剂染色金黄色葡萄球菌细胞、然后使用靶物特异性的磁性颗粒来检测特定靶物的方法。选择性生长然后使用靶物特异性的磁性颗粒和非特异性染色的组合，在本发明的背景下具有普遍用途，因为差别生长、随后对靶物的染色和捕获允许使用未放大的成像容易地计算靶物，并检测细菌的差别特征（诸如抗药性）。

[0375] 本实施例使用差别生长和未放大的成像证实，使用 SYBR® 绿 1 染料染色，并使用靶物特异性的磁性颗粒的特异性捕获，可以容易地检测抗药细菌。

[0376] 所述方法因而可以用于检测和计算临床的、工业的和环境的样品中的低浓度的单个细胞和分子靶物。

[0377] 本实施例使用未放大的成像证实，使用 SYBR® 绿 1 染料可以容易地标记金黄色葡萄球菌，且使用靶物特异性的磁性颗粒可以特异地捕获。

[0378] 方法。在图 33 中显示了使用选择性生长、随后用未放大的成像快速检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的示意图。通过计数在 3 个不同的生长条件（无生长，没有抗生素的生长，和有抗生素存在的生长）下温育样品的等分试样产生的细胞的数目，可以检测 MRSA。存在 3 种可能的细胞类型：非金黄色葡萄球菌，甲氧西林 - 敏感的金黄色葡萄球菌 (MSSA)、和甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA)。将给定样品中的细胞接种进上述 3 种培养基中，并培养几个倍增时间，用于对 MRSA 细胞进行可靠检测，随后是金黄色葡萄球菌的特异性检测。

[0379] 选择性生长。对于该实验，我们已经使用了甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (MSSA: ATCC 菌株 29213)、甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA: ATCC 菌株 43300) 和表皮葡萄球菌（表皮葡萄球菌 ATTC 菌株 12228）。在 35°C、在没有任何抗生素的生长培养基 TSB（胰蛋白酶处理过的大豆汤，Acumedia 目录号 7164A）中培养这些细胞 2-3 小时，以达到对数生长期 ($OD_{600} = 0.3$)。使用在 Zeiss 显微镜上的 Petroff-Hausser 计数室，计数金黄色葡萄球菌 / 表皮葡萄球菌细胞，并在新鲜的 TSB 中稀释细胞至 1×10^4 细胞 / mL。将每份细胞 (100 μL) 接种进 100 μL 新鲜的 TSB 培养基中，所述 TSB 培养基分别含有 0.1% w/v ProClin 300 (Supelco)、仅 TSB、和含有 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢西丁 (Sigma, 目录号 C4786) 的 TSB。在 35°C 在 24- 孔微孔滴定板 (Corning 目录号 25820) 中培养 4 小时。培养后，如下

测定这些样品。

[0380] 测定。在 96 孔聚碳酸酯 PCR 板 (Fisher Scientific, 目录号 14230237) 中进行测定反应。反应混合物 (50 μL) 含有 25 μL 来自每个生长样品的培养基、20 μL SYBR® 绿 1 染料 (在 0.9% 氯化钠溶液中 1:2000X 稀释) 和 5 μL 抗 - 蛋白 A 包被的磁性颗粒 (悬浮于 PBS-TBP pH 7.4 中) (2×10^{10} 颗粒 /mL)。通过抽吸, 将测定反应物混合均匀, 并在环境温度在黑暗中温育 15 min。温育后, 将 40 μL 反应混合物覆盖在 70 μL 染色的垫子溶液 (含有 5 mg/mL 铬变素 2R (Sigma-Aldrich C3143) 的 15% OptiPrep® (Sigma 目录号 D1556)) 上, 所述垫子溶液预等分在 96- 孔半面积直径澄清底黑色平板 (Grainer, 目录号 675096) 中。为了选择在孔底部处的细胞 - 颗粒络合物, 然后通过将它放在磁体上 4 min, 对平板施加磁力。然后从磁体取下平板, 并放入高流通量自动化成像分析仪中。然后在上述的分析仪上对孔成像, 曝光时间为 0.1 秒。然后使用软件, 计算单个荧光细胞。

[0381] 结果。图 34 显示了使用 SYBR® 绿 1 的 MRSA 试验和使用抗体包被的磁性颗粒的特异性捕获的试验结果。上图 (MSSA) 显示了含有甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (MSSA) 的孔的图像, 中图 (MRSA) 显示了含有甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的孔的图像, 下图显示了含有表皮葡萄球菌 (阴性对照) 的孔的图像。从数据显而易见, MSSA 显示出在仅一个孔中的生长 (没有抗生素的生长), 而 MRSA 显示出在没有和有抗生素 (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢西丁) 存在下的生长。相反, 当使用表皮葡萄球菌时, 没有检测到细菌, 这指示 MSRA 试验的特异性。

[0382] 结论。该数据证实, 选择性生长与使用抗体 - 包被的磁性颗粒标记和特异性捕获细菌细胞的组合, 可以用于区分抗生素敏感的细胞和抗生素抗性的细胞。如在以前的实施例中所证实的, 本文使用的捕获和标记方法在本发明的背景下可以与用于区分捕获靶物和游离的信号发射部分和其它标记的实体的方法相组合。

[0383] 在低靶细胞浓度, 可以在 + 靶物图像中辨别单个荧光细胞, 并通过软件直接地计数。

[0384] 实施例 19. 通过低压冻干促甲状腺激素 (hTSH) 试剂来稳定化单个试剂

本实施例描述了通过低压冻干来稳定化用于检测人促甲状腺激素 (hTSH) 的单个试剂。在本实施例中描述的方法普遍适用于在本发明的其它实施方案中使用的试剂。

[0385] 试验试剂的稳定化会延长在本发明中描述的试验试剂的贮存期限和性能。

[0386] 干燥试剂的长期储存对于试剂的用户而言具有经济价值, 且当应用于不定期需要试剂、但是其需要突然增加 (诸如生物恐怖事件或流行病爆发) 的情况时, 是特别重要的。

[0387] 低压冻干的试剂也可以用于生产单元化的 (unitized) 试剂, 诸如一次性使用的药筒。

[0388] 所述的方法可以与生产的试剂一起用于检测和计算临床的、工业的和环境的样品中的低浓度的单个细胞和分子靶物。

[0389] 方法。在一个实验中, 如下进行 hTSH 试验组分 (荧光的 / 磁性颗粒和染色的 - 垫子) 的单个低压冻干。将 Dura-Stop 冷冻干燥器预冷却至 -45°C 。在黑壁 384- 孔微孔滴定板 (Costar, 目录号 3544) 的特定孔的底部, 低压冻干染料 - 垫子试剂 10 μL (如实实施例 7 所述制备, 进行下述修改: 在试剂中包含 5% w/v 海藻糖 (Sigma-Aldrich 目录号 T9449))。加入后, 在 Dura-Stop 冷冻干燥器中, 在 -45°C 、在大气压下冷冻平板 1 小时, 并

施加真空。将平板低压冻干 16 小时；使冷冻干燥器达到 -5°C 4 小时，然后在 25°C 1 小时。释放压力，并取出平板，用 PCR 平板膜密封，在室温在干燥器中储存备用。如下进行 hTSH 颗粒试剂的低压冻干。制备 5 μL 160 mM EPPS (Sigma-Aldrich 目录号 E9502) 缓冲液 pH 7.6 (其含有 320 mM 1,3 二氨基丙烷 (Sigma-Aldrich 目录号 D230807))、5%w/v 海藻糖 (Sigma-Aldrich 目录号 T9449)、抗 -hTSH 抗体包被的荧光颗粒的 0.003 % w/v 稀释物、和抗 -hTSH 抗体包被的磁性颗粒 (如实施例 6 所述制备颗粒试剂) 的 0.08 % w/v 稀释物的混合物的低压冻干球，这通过将 5 μL 混合物滴准确地泵入装有液氮的绝缘烧杯中来实现。然后立即将冷冻的球放入预冷却至 -45°C 的 Dura-Stop 冷冻干燥器中。立即施加真空，将球低压冻干 16 小时，使冷冻干燥器达到 -5°C 4 小时，然后在 25°C 1 小时，在室温在干燥器中储存备用。

[0390] 通过对比使用新鲜的液体试剂和低压冻干的试剂的 hTSH 试验，测定低压冻干的试剂的性能。通过将重组 hTSH (Cell Sciences, 目录号 CRT505B) 加入 PBS-TBP 中，制备 2 个不同的靶物 (hTSH) 溶液 (62.5 和 250 pg/mL)。将荧光的且磁性的抗 -hTSH 抗体包被的颗粒的低压冻干球 (如上生产) 放在装有低压冻干的染料 - 垫子试剂的特定孔的上面 (图 35 显示了试验示意图)。在一个单独的 384 孔黑壁清澈底部微孔滴定板 (Costar) 中，将 10 μL 染料垫子试剂 (如实施例 7 所述，进行下述修改：包含 5% w/v 海藻糖 (Sigma-Aldrich 目录号 T9449)) 吸量到特定孔中。温育后，将 250 pg/mL TSH 溶液的 5 μL 等分试样加入 5 μL 160 mM EPPS (Sigma-Aldrich 目录号 E9502) 缓冲液 (其含有 320 mM 1,3 二氨基丙烷 (Sigma-Aldrich 目录号 D230807))、5%w/v 海藻糖 (Sigma-Aldrich 目录号 T9449)、抗 -hTSH 荧光颗粒的 0.003 % w/v 稀释物、和抗 -hTSH 磁性颗粒的 0.08 % w/v 稀释物的混合物中，并在 96 孔聚碳酸酯 PCR 板 (Fisher Scientific, 目录号 14230237) 的特定孔中温育 10 min。温育后，将 7.5 μL 该混合物铺在液体染料 - 垫子孔的上面。在温育液体试剂的过程中，将 20 μL 62.5 pg/mL hTSH 溶液小心地吸量到低压冻干的试剂的特定孔的上面。然后通过将平板放在磁棒上 5 min，对平板施加磁力。然后将平板放入高流通量分析自动化分析仪中。然后在分析仪上对孔成像，曝光时间为 0.1 秒。

[0391] 结果。图 36 (上图) 显示的条形图指示了与液体试剂孔 (液体试剂被指定为 100% 回收率) 相比，低压冻干的试剂孔中的 hTSH 的回收率。图 36 (下图) 显示了当使用液体试剂和低压冻干的试剂进行测定时，代表性的孔的未放大的图像。使用低压冻干的试剂对 hTSH 的回收率类似于液体试剂 (具有测定实验误差)，这指示类似的性能。

[0392] 结论：数据证实，低压冻干的试剂可以用于测定 hTSH，且表现得象液体试剂一样好。使用低压冻干的试剂可以实践本发明，所述试剂延长了本发明的有用性。

[0393] 实施例 20. 单个试剂的稳定化——一起低压冻干用于检测层中金黄色葡萄球菌的试剂

本实施例描述了通过一起低压冻干来稳定化用于检测层中金黄色葡萄球菌的试剂。在本实施例中描述的方法普遍适用于在本发明的其它实施方案中使用的试剂。

[0394] 试验试剂的稳定化会延长在本发明中描述的试验试剂的贮存期限和性能。

[0395] 干燥试剂的长期储存对于试剂的用户而言具有经济价值，且当应用于不定期需要试剂、但是其需要突然增加 (诸如生物恐怖事件或流行病爆发) 的情况时，是特别重要的。

[0396] 低压冻干的试剂也可以用于生产单元化的 (unitized) 试剂，诸如一次性使用的药

简。

[0397] 所述的方法可以与生产的试剂一起用于检测和计算临床的、工业的和环境的样品中的低浓度的单个细胞和分子靶物。

[0398] 方法。本实施例证实了通过一起低压冻干层中的试剂来稳定化试剂的另一种方法(图 37)。在本实施例中,在层中低压冻干用于检测金黄色葡萄球菌细菌细胞的试剂。将 Dura-Stop 冷冻干燥器预冷却至 -45°C。将染色的 - 垫子试剂的等分试样 (65 μL) (10% v/v Optiprep® (Sigma-Aldrich D1556), 其含有 2 mg/mL 铬变素 R2 (Sigma-Aldrich 目录号 C3143) 和 5% w/v 海藻糖 (Sigma-Aldrich, 目录号 T9449)) 吸量到试验孔中。将平板放入冷冻干燥器中,并将试剂层冷冻 1 小时。从冷冻干燥器取出试验孔,将 25 μL 完全试剂混合物小心地覆盖到冷冻的染料垫子层的上面,所述完全试剂混合物含有 1:2000 稀释的 SYBR® 绿 1 (Invitrogen 目录号 S-7563)、0.9% 氯化钠、0.005 % w/v 鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 磁性颗粒 (如实施例 4 所述生产) (在 TBS-TBP pH 7.4 中)。立即将试验孔返回冷冻干燥器,并冷冻 1 小时。施加真空,将孔在 -45°C 低压冻干 16 小时。然后,将温度设定在 -5°C 6 小时,随后在 25°C 2 小时。结束后,关掉冷冻干燥器,并释放真空。取出孔,并覆盖 PCR 膜,在干燥器中储存备用。

[0399] 通过对使用新鲜的液体试剂和低压冻干的试剂进行的金黄色葡萄球菌试验,测定低压冻干的试剂的性能。在生长培养基 TSB (胰蛋白酶处理过的大豆汤, Acumedia 目录号 7164A) 中在 35°C 培养金黄色葡萄球菌 (ATCC 菌株 29213) 的培养物 2 小时,达到对数生长期 ($OD_{600} = 0.3$)。在 Zeiss 显微镜上的 Petroff-Hausser 计数室中,计数金黄色葡萄球菌细胞,并在新鲜的 TSB 中将细胞稀释至 2×10^5 细胞 /mL。在 96 孔聚碳酸酯 PCR 板 (Fisher Scientific, 目录号 14230237) 中进行反应。反应混合物 (50 μL) 含有在 PBS-TBP 中的 25 μL 金黄色葡萄球菌细胞 (5,000 细胞) (或无细胞作为阴性对照)、20 μL SYBR® 绿 1 染料 (在 0.9% 氯化钠中 1:2000X 稀释) 和悬浮于 PBS-TBP pH 7.4 中的 5 μL 鸡抗 - 蛋白 A 抗体包被的磁性颗粒 (2×10^{10} 颗粒 /mL)。通过吸量,混合试验反应物,并在暗处在环境温度温育 15 分钟。温育后,将 40 μL 反应混合物覆盖在 70 μL 垫子溶液 (由含有 5 mg/mL 铬变素 2R (Sigma-Aldrich C3143) 的 15% OptiPrep® (Sigma 目录号 D1556) 组成) 上,所述垫子溶液预先等分在 96- 孔半面积直径澄清底黑色平板 (Grainer, 目录号 675096) 中。对于干燥试剂试验,将在 120 μL PBS-TBP 中的金黄色葡萄球菌细胞 (5,000 细胞) (或无细胞作为阴性对照) 加到含有低压冻干试剂的特定孔的上面,并在暗处在环境温度温育孔 15 分钟。为了选择在孔底部的细胞 - 颗粒络合物,然后通过把它放在磁体上 4 分钟,对平板施加磁力。然后从磁体取下平板,并放在高流通量自动化成像分析仪中。然后在上述分析仪上对孔成像,曝光时间为 0.1 秒。然后使用软件,计算单个荧光细胞。

[0400] 结果。图 38 (上图) 显示的条形图指示了与液体试剂孔相比,低压冻干的试剂孔中的金黄色葡萄球菌计数。图 38 (下图) 显示了当使用低压冻干的试剂进行测定时,代表性的孔 (含有和没有金黄色葡萄球菌细胞) 的未放大的图像。使用低压冻干的试剂的金黄色葡萄球菌计数类似于液体试剂 (具有测定实验误差),这指示类似的性能。

[0401] 结论:结果证实,在层中一起低压冻干的试剂可以表现得象液体试剂一样好。使用低压冻干的试剂可以实践本发明,所述试剂延长了本发明的有用性。

[0402] 替代实施方案。可以调节低压冻干条件诸如温度和时间,且除了上面列出的那些

以外,不同的试剂可以经历类似的处理。或者,可以通过蒸发(实施例 19 和 20)或通过气态沉积,干燥试剂。例如,可以将如上混合的试剂放入处于高温的烘箱中,或置于室温或低于室温,其中允许水分以蒸汽形式脱离(由于相对湿度差)。或者,可以将试剂放在干燥室中,以从试剂去除水分。可以使用液体和固体的组合。

[0403] 实施例 21. 通过成像和选择的靶物信号发射部分络合物的移动的组合来特异性检测生物素。

[0404] 上面的实施例 8-17 描述了特异地显像和测定在低浓度或低靶物数目的靶物的方法,其中使用信号发射部分、选择部分和染料 - 垫子试剂来减少来自游离的信号发射络合物和结合到非靶物上的未选择的信号发射络合物的“背景”信号。

[0405] 这些方法可以在一个容器中实现,无需洗涤步骤。本实施例描述了在选择步骤后进一步减少背景的方法。在本实施例中,磁性选择部分在与成像表面方向平行的方向移动,并连续成像。只有真实的信号发射部分 - 靶物 - 选择部分络合物会随着选择力的位置的改变而移动。通过使用以更长曝光采集的图像或通过图像序列,可以将真实的信号发射部分 - 靶物 - 选择部分络合物的移动视作划线或“彗星”。在成像区中的游离的信号发射部分和未选择的非靶物信号发射部分靶物络合物会随机移动,或根本不移动。只有表现出对移动的正确响应的那些对象被图像分析软件计数为真实的信号对象。

[0406] 所述的方法可以与生产的试剂一起用于检测和计算临床的、工业的和环境的样品中的低浓度的单个细胞和分子靶物。

[0407] 方法: 使用在实施例 4 中所述的方法,进行下述修改,生产抗生蛋白链菌素磁性颗粒: 缀合抗生蛋白链菌素 (Thermo Pierce 目录号 21122) 来替代抗体,并使用羧基化的 400 nm 磁性颗粒 (Merck EMD, 目录号 M1030/40/7283)。在 PBS-TBP 溶液 pH 7.4 中,以与抗生蛋白链菌素磁性颗粒的数倍比例,混合荧光生物素包被的 (1 μM) 颗粒,并温育 15 min。用 PBS-TBP 洗涤络合物,并稀释至 400,000 Fluor 络合物 /mL 的终浓度。然后将该溶液与 40 mg/mL 铬变素 2R 溶液 (Sigma-Aldrich, 目录号 C3143) 相混合,并装载上 Kova 塑料载玻片。在具有绿荧光滤光器的 Zeiss 倒置显微镜上,对载玻片成像。钕磁体在载玻片下面移动,并以长曝光记录图像。

[0408] 结果。在图 39 中显示了选择的络合物移动(即,‘彗星’)的图像。它证实了选择的信号发射 - 靶物 - 选择部分络合物的移动和未选择的背景荧光的不移动。

[0409] 结论。图像证实了所述方法用于区分选择的信号发射 - 靶物 - 选择部分络合物与未选择的背景荧光对象的能力,这增加了测定特异性。本发明的该实施方案可以提高使用不经洗涤的未放大的成像计算靶物的特异性。

[0410] 替代实施方案。其它实施方案。选择力的移动可以是在与成像表面平行的二维平面中的超过一个方向。

[0411] 在其它实施方案中,可以使用不同的信号特征,例如荧光、化学发光、光吸收、光散射、磷光、酶反应性和拉曼散射。

[0412] 其它实施方案可以使用不同的信号发射部分(具有不同的信号发射特征),例如,二醋酸荧光素(荧光酯酶底物)、SYBR® 绿®(荧光 DNA 染色剂)、苏丹黑(脂质染色)、产生不溶产物的酶底物、聚苯乙烯颗粒、含有荧光染料的聚苯乙烯颗粒、胶体金等。

[0413] 在这些其它实施方案中,其它染料可以用于匹配使用的不同的信号发射特征和部

分。

[0414] 可以使用不同的种类标记部分,包括、但不限于:抗体(包括不同的免疫球蛋白类型)和其它蛋白(例如凝集素、激素受体等)、寡核苷酸和它们的合成类似物(例如肽核酸、适体等)、寡糖(例如肝素等)、有机聚合物(例如硫酸葡聚糖等)和小分子(例如药物、非肽激素、生物素、染料等)。

[0415] 通过在种类内选择特定靶物(例如从血液中选择 hTSH, 或从鼻样品选择金黄色葡萄球菌细胞),选择可以是特异性的。通过选择标记的靶物种类(例如从人血浆选择脂蛋白),试验也可以是特异性的。

[0416] 所述的方法可以用于选择靶物,所述靶物可以包括、但不限于:细胞、病毒、细胞器、脂蛋白和分子,包括蛋白、寡核苷酸、脂类、寡糖和小有机和无机分子。

[0417] 所述方法适用于含有复杂基质的样品,包括全血、血浆、粪便、废水、奶等。

[0418] 也可以在选择之前处理样品,例如可以用甲醇固定细胞。可以提取和纯化DNA。可以释放通常发现结合到血清因子上的激素、蛋白和维生素,和通过其它过程。也可以在标记后选择样品,例如可以在选择之前,用信号发射部分络合物预标记靶物。

[0419] 实施例 22. 使用 SYBR® 绿标记的光漂白和鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 用于特异性检测金黄色葡萄球菌细菌细胞的应用。

[0420] 在低浓度或数目的靶物的检测需要特异性检测信号发射部分 - 靶物 - 选择部分络合物。本实施例描述了使用 SYBR® 绿的光漂白和鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记的金黄色葡萄球菌细菌细胞来增强金黄色葡萄球菌细胞的特异性检测的方法。

[0421] 所述方法利用来自荧光颗粒的荧光信号与发荧光的 DNA 染色到光漂白的信号相比的相对稳定性。

[0422] 在图 40 的简图中显示了该方法的概要。使用 2 种不同的信号发射部分(它们对光漂白的敏感性存在差异)和磁性选择部分标记靶物。磁性地选择络合物,并成像。将样品暴露于光足够的时间,使信号发射部分之一被光漂白。采集第二个图像。仪器软件然后进行图像分析,其中仅在被光漂白的信号的像素附近的像素处的信号发射部分被计数为信号发射事件。

[0423] 所述方法可以与在上述实施例中描述的本发明的其它实施方案一起用于检测和计算临床的、工业的和环境的样品中的低浓度的单个细胞和分子靶物。

[0424] 方法。在 35°C 在 TSB 生长培养基(胰蛋白酶处理过的大豆汤, Acumedia 目录号 7164A) 中培养金黄色葡萄球菌(ATCC 菌株 29213) 的培养物 2 小时, 以达到对数生长期($OD_{600} = 0.3$)。在 96 孔聚碳酸酯 PCR 板(Fisher Scientific, 目录号 14230237) 中进行反应。反应混合物(50 μ L) 含有:25 μ L 在 PBS-TBP 中的金黄色葡萄球菌细胞(5,000 细胞)或仅 PBS-TBP(无细胞)、20 μ L 与 0.005 % w/v 鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 荧光颗粒(如实施例 3 所述)混合的 SYBR® 绿 1 染料(在盐水中 1:2000X 稀释)、和 5 μ L 悬浮于 PBS-TBP 溶液中的 0.005 % w/v 鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 磁性颗粒(如实施例 4 所述生产)。通过抽吸,将测定反应物混合均匀,并在环境温度在黑暗中温育 15 min。温育后,将 40 μ L 反应混合物覆盖在 70 μ L 垫子溶液(由 15% OptiPrep® (Sigma 目录号 D1556) 和 5 mg/mL 铬变素 2R (Sigma-Aldrich C3143) 组成, 预等分在 96-孔半面积直径澄清底黑色平板(Grainer, 目录号 675096) 中) 上。为了选择在孔底部处的细胞 - 颗粒络合物, 然后

通过将它放在磁体上 4 min, 对平板施加磁力。从磁体取下平板, 并放入高流通量自动化成像分析仪中。对孔成像, 光漂白, 并在分析仪上再次成像。以 0.1 秒曝光时间, 采集第一个图像; 辐照平板 2 次, 每次 1 秒, 以光漂白 SYBR® 绿, 然后再次成像, 曝光时间为 0.1 秒。图像分析软件计算在被光漂白的信号部分附近的信号部分。在本实施例中, 这仅包括在 SYBR® 绿标记的金黄色葡萄球菌细胞附近的那些鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 荧光颗粒。

[0425] 结论: 本实施例证实了通过光漂白与图像分析的组合, 在试验中检测特异性的信号。光漂白与不经洗涤的靶物的未放大的成像在本发明中的应用, 会减少试验中来自干扰材料的干扰, 并生成特异性的结果。

[0426] 替代实施方案。本实施例的方法可以应用于对光漂白的敏感性存在差异的任意荧光标记对。具体标记可以代表信号发射部分对中的光漂白抗性的或敏感的部分。

[0427] 可以使用不同的种类标记部分, 包括、但不限于: 抗体 (包括不同的免疫球蛋白类型) 和其它蛋白 (例如凝集素、激素受体等)、寡核苷酸和它们的合成类似物 (例如肽核酸、适体等)、寡糖 (例如肝素等)、有机聚合物 (例如硫酸葡聚糖等) 和小分子 (例如药物、非肽激素、生物素、染料等)。

[0428] 实施例 23. 用 SYBR® 绿标记光漂白用于特异性检测金黄色葡萄球菌细菌细胞的应用。

[0429] 在低浓度或数目的靶物的检测需要特异性检测信号发射部分 - 靶物 - 选择部分络合物。本实施例描述了使用 SYBR® 绿标记的金黄色葡萄球菌细菌细胞的光漂白来增强真实的信号发射部分 - 靶物 - 选择部分络合物相对于非特异性背景的特异性检测的方法。

[0430] 所述方法利用一些标记方法对光漂白的敏感性。通过计数用未放大的成像显像的荧光信号发射部分进行的荧光检测, 可能具有由荧光碎片产生的背景。该方法允许通过使用特定信号的光漂白鉴别非特异性荧光信号, 从而检测荧光碎片。

[0431] 在图 41 的简图中显示了该方法的概要。用信号发射部分和磁性选择部分标记靶物。磁性地选择络合物, 并成像。将样品暴露于光足够的时间, 使信号发射部分被光漂白。采集第二个图像。仪器软件然后在第二个图像中进行图像分析, 所述第二个图像从第一个图像中减去。然后将剩余的信号发射部分 (它们被光漂白) 计算为特异性的信号。

[0432] 所述方法可以与在上述实施例中描述的本发明的其它实施方案一起用于检测和计算临床的、工业的和环境的样品中的低浓度的单个细胞和分子靶物。

[0433] 方法。在 32.5°C 在 TSB 生长培养基 (胰蛋白酶处理过的大豆汤, Acumedia 目录号 7164A) 中培养金黄色葡萄球菌 (ATCC 菌株 29213) 的培养物 2 小时, 以达到对数生长期 ($OD_{600} = 0.3$)。在 96 孔聚碳酸酯 PCR 板 (Fisher Scientific, 目录号 14230237) 中进行反应。混合反应混合物, 所述反应混合物 (50 μ L) 含有: 25 μ L 在 PBS-TBP 中的金黄色葡萄球菌细胞 (5,000 细胞) 或仅 PBS-TBP (无细胞)、20 μ L SYBR® 绿 1 染料 (在盐水中 1:2000X 稀释)。5 μ L 的 0.005 % w/v 鸡抗 - 金黄色葡萄球菌蛋白 A 磁性颗粒 (如实例 4 所述生产) 悬浮于 PBS-TBP 溶液中。通过抽吸, 将测定反应物混合均匀, 并在环境温度在黑暗中温育 15 min。温育后, 将 40 μ L 反应混合物覆盖在 70 μ L 垫子溶液 (由 15% OptiPrep® (Sigma 目录号 D1556) 和 5 mg/mL 铬变素 2R (Sigma-Aldrich C3143) 组成, 预等分在 96- 孔半面积直径澄清底黑色平板 (Grainer, 目录号 675096) 中) 上。为了选择在孔底部处的细胞 - 颗粒络合物, 然后通过将它放在磁体上, 对平板进行磁性选择。从磁体取

下平板，并放入使用未放大的成像的高流通量自动化成像分析仪中。然后以 0.1 秒曝光时间对孔成像，通过辐照平板 2 次、每次 1 秒，进行光漂白，然后在分析仪上再次成像 0.1 秒。图像分析软件然后从第一个图像减去第二个图像。将剩余的信号部分计算为金黄色葡萄球菌细菌细胞。

[0434] 结果：图 41 中的图像例证了该方法。第一个图像是原始图像，第二个图像是光漂白以后的图像，最后的图像是软件产生的从图像 1 减去图像 2 的图像，并显示了光漂白的特异性地标记的 SYBR ® 绿标记的金黄色葡萄球菌。图像表明，从数据减去了大片荧光碎片。

[0435] 结论：本实施例证实了通过光漂白与图像分析的组合，在试验中去除非特异性信号。光漂白与不经洗涤的靶物的未放大的成像在本发明中的应用，会减少试验中来自干扰材料的干扰，并生成特异性的结果。

[0436] 替代实施方案。本实施例的其它实施方案包括不同的事件次序。在选择步骤之前，首先光漂白含有试剂的试验孔，然后进行选择和未放大的成像。该实施方案可以用于干扰材料可以被光漂白的情况。

[0437] 实施例 24. 用于检测靶物的自动化成像分析仪

概述。本实施例证实了本发明在自动化分析仪中的自动执行（图 43, 44）。所述分析仪接受含有成像孔的筒（图 42），使用磁性选择将标记的靶物选择部分的络合物沉积到成像孔的检测表面上。所述分析仪包含用于对单个标记的靶物络合物成像的 CMOS 照相机，且具有用于样品容器运输、温育、聚焦、图像分析和结果报告的软件和硬件。所述分析仪具有高达 40 个样品 / 小时的处理量，这可用于高体积临床实验室检验用途。它也可以用于食物处理和兽医检验用途。

[0438] 描述。所述分析仪具有 2 个队列，用于接受样品容器的堆叠（图 43, 44）。设计队列来接受 1-8 个样品容器的堆叠。当将堆叠放在任一个输入队列开口时，光电传感器（Omron 光电逆反射传感器 E3T-SR21）被触发，向控制软件发出信号，以活化步进电机（Arcus DMAX-KDRV-23），将堆叠移动进分析仪中进行处理。

[0439] 当堆叠准备好在任一个队列中处理时，分析仪首先处理堆叠中的顶部样品容器。用安装在台架机器人上的光电传感器（Omron 光电逆反射传感器 E3T-SR21）找到堆叠的顶部（图 44）。所述机器人用传感器扫描每个队列，以最大堆叠高度开始，并向下移动，直到样品容器触发传感器。找到后，台架机器人取下顶部样品容器。

[0440] 样品容器在系统中的移动，由 3 个动力系统完成（图 43, 44）。这些系统称作输入系统、主台架系统和图像仪台架系统。每个系统在下面详述。所述系统能够独立操作，特定操作偶尔需要同步化。

[0441] 输入系统由上述的步进电机（Arcus DMAX-KDRV-23）提供动力的单个传送带（图 43, 44）组成。该带将样品容器从起始进入点移动到为台架机器人捡取指定的位置。当前一个样品容器已经在捡取位置时，所述带移动新样品容器，直到它接触在它前面的样品容器。在该点，所述带在样品容器下面滑动，所述样品容器排成队列等待捡取位置。

[0442] 在台架系统中存在 3 个步进电机（Arcus DMAX-KDRV-17）（图 44）。每个电机连接到不同长度的直线台子（Automation Solutions, DL20DW-XZ）。最长的台子控制台架 Y（左和右）方向。该台子锚定在基板上。Y 台子平台连接最短的台子，后者控制台架 X（前和后）方向。X 台子平台连接用于控制台架 Z（上和下）方向的台子。Z 台子连接一对叉

子。这些叉子含有这样的部件,它们允许对准在样品容器中模塑的部件(图42)。Z台子平台还连接光电传感器(Omron 光电逆反射传感器 E3T-SR21)。所述传感器用于测量堆叠高度,如上所述。

[0443] 通过调节X和Z台子来使用叉子,台架捡起样品容器。一旦样品容器被叉子抓住,X台子向后移动,以给Y台子留出空间。在该位置,Y台子可以将样品容器移动到任意位置进行处理,而不冲撞分析仪的结构。

[0444] 图像仪台架系统由2个步进电机(Arcus DMAX-KDRV-17)组成,它们连接到2个直线台子(Automation Solutions, DL20DW-XZ)上。长台子称作图像仪X台子。该台子控制图像仪台架的前和后运动。图像仪X台子连接图像仪Z台子,后者控制图像仪台架的垂直运动。Z台子连接平台,该平台在它的表面上具有对准部件,它们与样品容器上的类似对准部件重合(图43, 44)。

[0445] 图像仪Z台子与其它台子的差别在于,具有细螺距螺丝机构。它具有5微米的分辨率,不同于分析仪上的其它台子的50微米分辨率。该差距允许精细焦距调节以及高度的精细控制,以开始反应测定。在下面详细讨论这些部件。

[0446] 主台架机器人从输入位置拾起样品容器后,它被带到条形码读取器(Microscan MS1)。在样品容器上的1D条形码编码包括批号、实验类型和实验参数在内的信息。当读取时,控制程序将信息储存在数据结构中,用于追踪样品容器和保留分析结果。

[0447] 在该分析仪中发生两类温育。它们是用于样品生长的恒温温育和用于测定反应的环境温度温育。在扫描样品容器条形码后,样品开始进入生长孔。主台架机器人将样品容器移动到图像仪台架平台(图44)。台架将样品容器放在平台上以后,图像仪台架升高成像平台,直到样品容器上的柱塞帽(图42)被图像仪Z台子顶部的部件压迫。通过下压柱塞,液体样品被迫从样品输入储存器移动到生长室(生长试剂在这里被低压冻干)。接着,样品容器被主台架机器人放入装载的恒温培养箱(图43, 44)。样品容器被在35℃温育4小时,以允许细菌细胞生长。

[0448] 所述培养箱具有由机器制造部件构成的架子(上侧、下侧、前侧、后侧、左侧、右侧)。架子底含有这样的部件,其与样品容器底上的部件配合(图43, 44)。使用绝缘泡沫构建培养箱壁,所述绝缘泡沫将培养箱分成4个室。培养箱的后壁的形状适合在4个室前面的4个机器制造的门。使用致动器(Firgelli L12-50-100-12-I),打开和关闭门。培养箱的加热使用加热条(OMEGA, SRFG-310/10-P),它们从培养箱顶部和底部穿到外面。用绝缘泡沫覆盖加热条以及任意暴露的外表面,门除外。

[0449] 生长温育结束后,开始试验。主台架机器人从生长培养箱取下样品容器,并把它移动到图像仪台架平台(图44)。台架将样品容器放在平台上以后,通过升高平台,直到样品容器上的柱塞帽(图42, 44)被图像仪Z台子顶部的部件完全压迫,图像仪台架开始试验。通过第二次下压柱塞,液体样品被迫从生长室移动进成像室(试验试剂在这里被低压冻干)。液体一旦进入成像室,试剂马上被再水合,并开始测定反应。图像仪台架返回捡取位置,且主台架机器人将样品容器移动到反应温育站。该温育持续15分钟,并在室温发生。

[0450] 所述反应培养箱由15个架子的系统组成。单个架子具有这样的部件,其与在样品容器底上的部件配合,用于定位对准。

[0451] 反应结束后,通过磁性选择选择靶物。主台架机器人将样品容器从架子移动到磁

体位置（图 43, 44, 46）。磁性选择进行 5 分钟，然后主台架将样品容器移动到成像平台。如图 44 所示，磁性捕获站由 2 个相同的磁体组合装置组成。所述组合装置含有稀土固态型磁体（钕 - 铁 - 硼 N48 NdFeB，22x22x100mm 条），如图 46 所示。这允许 2 个样品容器在重叠的时间段发生磁性选择。

[0452] 磁性选择后，进行成像。成像子系统（图 45）设计成与荧光信号发射部分一起工作。通过以 475 纳米波长为中心的带通滤光器过滤的蓝光，激发信号发射部分。在通过以约 535 纳米波长为中心的带通滤光器过滤光以后，收集发射光。辐照组件、检测光学器件和照相机都位于成像组合装置的样品容器下面（图 44）。

[0453] 磁性捕获结束后，主台架机器人将样品容器从磁体站移动到图像仪台架机器人（图 44）。图像仪台架机器人将样品容器移动到远方传感器（Keyence LK-G37）。测量与每个成像孔的距离，并计算焦距。图像仪台架机器人定位到 CMOS 照相机（Mightex BCN-B013）上，其获取每个孔的 8 位灰度图像。对每个孔成像 10 次，并累加，以得到更高位灰度图像进行分析。

[0454] 使用装载的软件进行图像分析。分析结束后，图像仪台架机器人将样品容器移动到弹射系统。所述样品容器然后离开平台，并进入生物危害废物容器（图 43）。分析数据后，结果以及弹筒信息被储存在计算机上，打印出来（Seiko，DPU-30），并显示在 LCD 触摸屏监视器（AEI，ALCDP7WVGATS）上（图 43）。

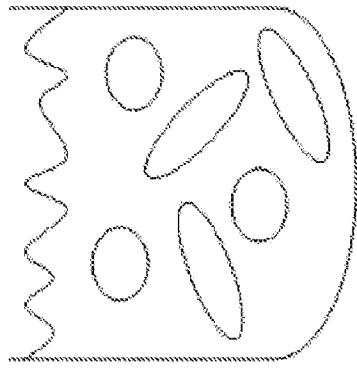
[0455] 所述系统设计成由单个运行 Ubuntu Linux 2.6 的小板计算机（Ampro，RB800R）控制。所有组件直接地或通过控制板连接至计算机。直接连接至计算机的组件包括电机控制器（Galil，DMC-2183-DC24-DIN）、LCD 监视器（AEI，ALCDP7WVGATS）、CMOS 照相机（Mightex，BCN-B013）、距离传感器（Keyence LK-G37）和打印机（Seiko，DPU-30）。通过电机控制器连接的组件包括光电传感器（Omron，E3T-SL22）、主台架和图像仪台架的步进电机（Arcus，DMAX-KDRV-17）、输入台运输器的步进电机（Arcus DMAX-KDRV-23），和 LED（Lumileds，LXHL-PB09）。

[0456] 结果。图 47 显示了使用实施例 16 的方法和本实施例的自动化成像分析仪（图 43, 44），检测图 42 所示的筒中的单个标记的金黄色葡萄球菌细胞。

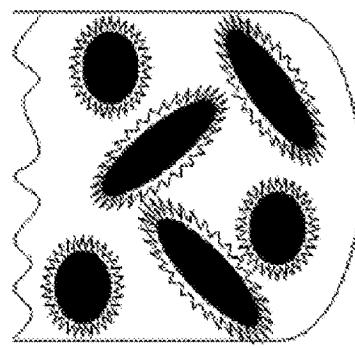
[0457] 结论。该分析仪可以自动处理样品容器，具有最少的用户相互作用。所述样品容器与分析仪相互作用，其支持根据需要处理，样品生长、未放大的成像和集成的废物处理。所述分析仪允许使用 CMOS 照相机不经放大地检测已经结合到信号发射和选择部分上的单个靶物。

 金黄色葡萄球菌
 标记的金黄色葡萄球菌
 大肠杆菌
 标记的大肠杆菌

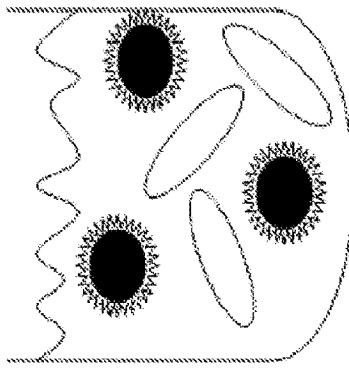
含有金黄色葡萄球菌和
大肠杆菌的样品



非特异性的标记染色所有核酸



金黄色葡萄球菌特异性的信号结合络合物



特异性的和非特异性的标记

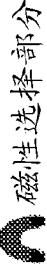
样品	标记	另外的组分 /稀释剂	选择剂	另外的组分 /稀释剂
单独添加液体	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 液体
组合添加液体	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 液体
组合添加液体	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 液体
一些试剂干燥	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 干燥的	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 液体
所有试剂干燥	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 干燥的	<input type="checkbox"/> 干燥的	<input type="checkbox"/> 干燥的
所有试剂干燥并组合	<input type="checkbox"/> 液体	<input type="checkbox"/> 干燥的	<input type="checkbox"/> 干燥的	<input type="checkbox"/> 干燥的

用于使样品接触其它反应组分的方法

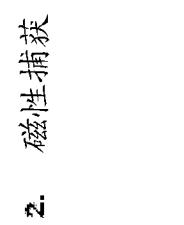
选择

直接捕获

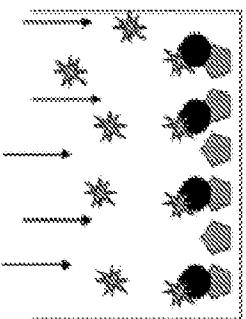
或种类特异性的结合部分或非特异性的结合部分



2. 磁性捕获



3. 基于捕获的密度



捕获物的不同方法

捕获连接到检测表面上

检测带

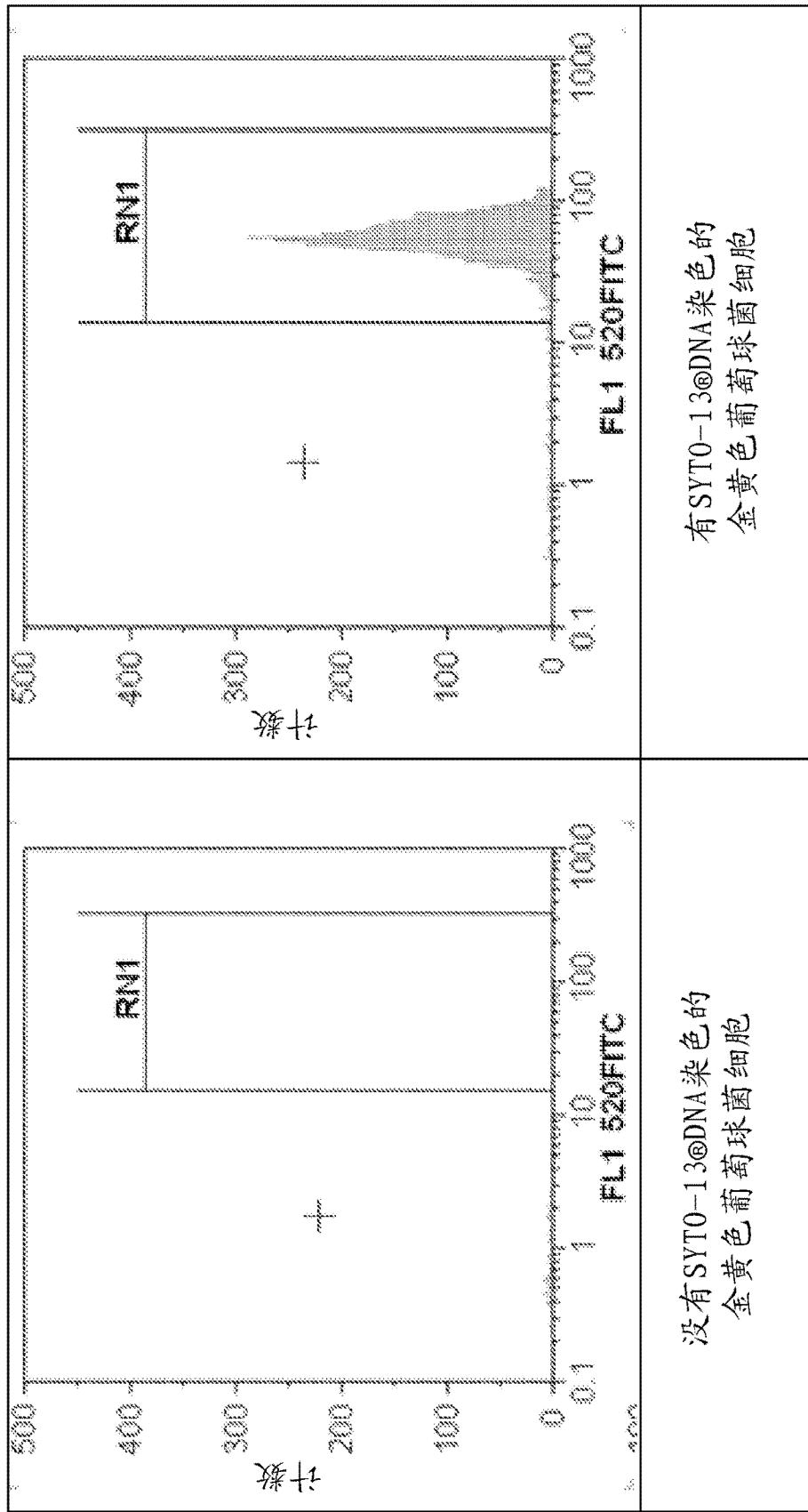
捕获在检测表面上

基本上均匀的磁力

均匀沉淀

非均匀沉积

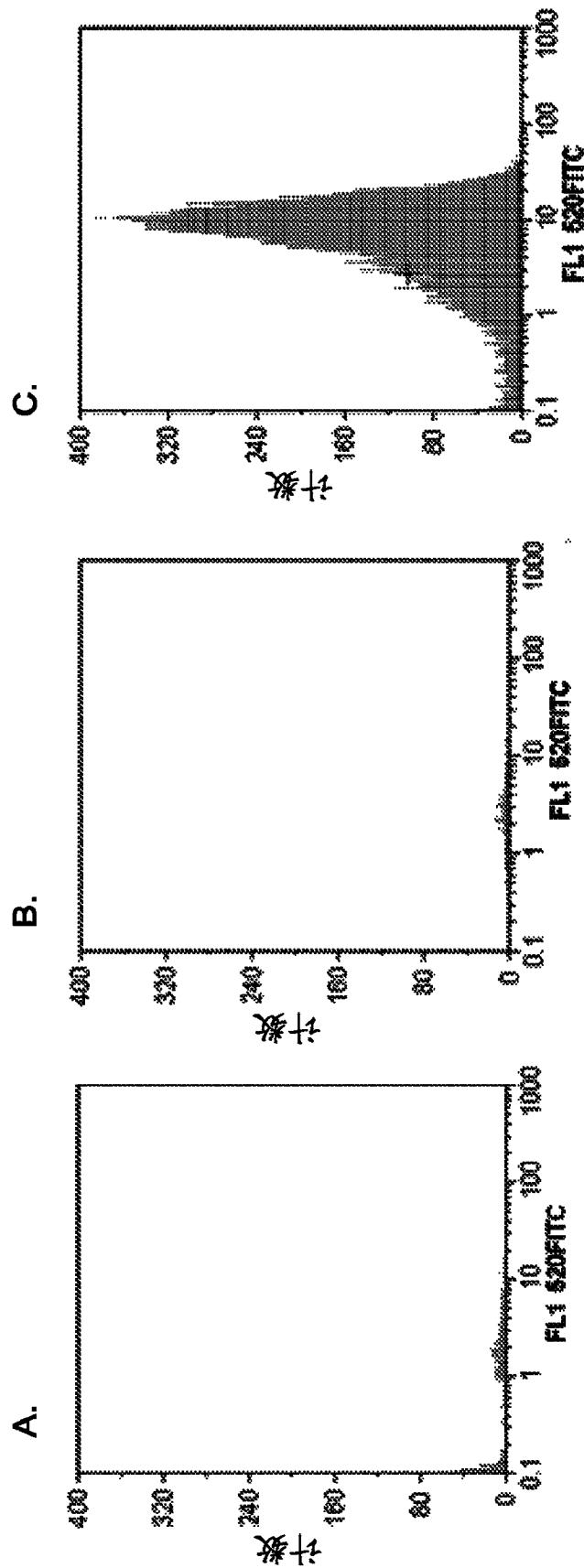
图 3



用发荧光的DNA染色剂标记金黄色葡萄球菌——金黄色葡萄球菌 DNA的
SYTO-13®染色的相对对数荧光强度（实施例1）

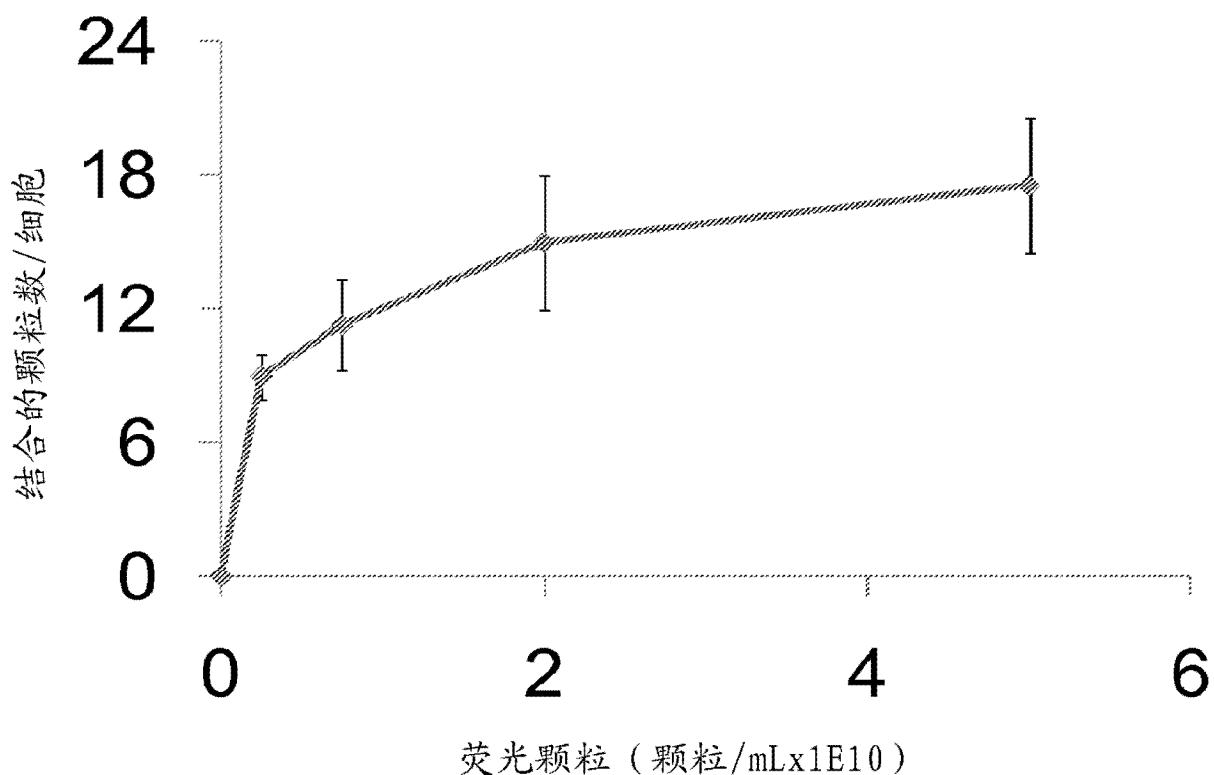
有SYTO-13®DNA染色的
金黄色葡萄球菌细胞

没有SYTO-13®DNA染色的
金黄色葡萄球菌细胞



用缀合到荧光纳米颗粒上的鸡抗-蛋白A抗体标记金黄色葡萄球菌细胞。
被抗体包被的荧光颗粒染色的金黄色葡萄球菌细胞的相对对数荧光强度（实施例3）

图 5



通过流式细胞术测定金黄色葡萄球菌特异性的
荧光颗粒的结合效率（实施例3）

图 6

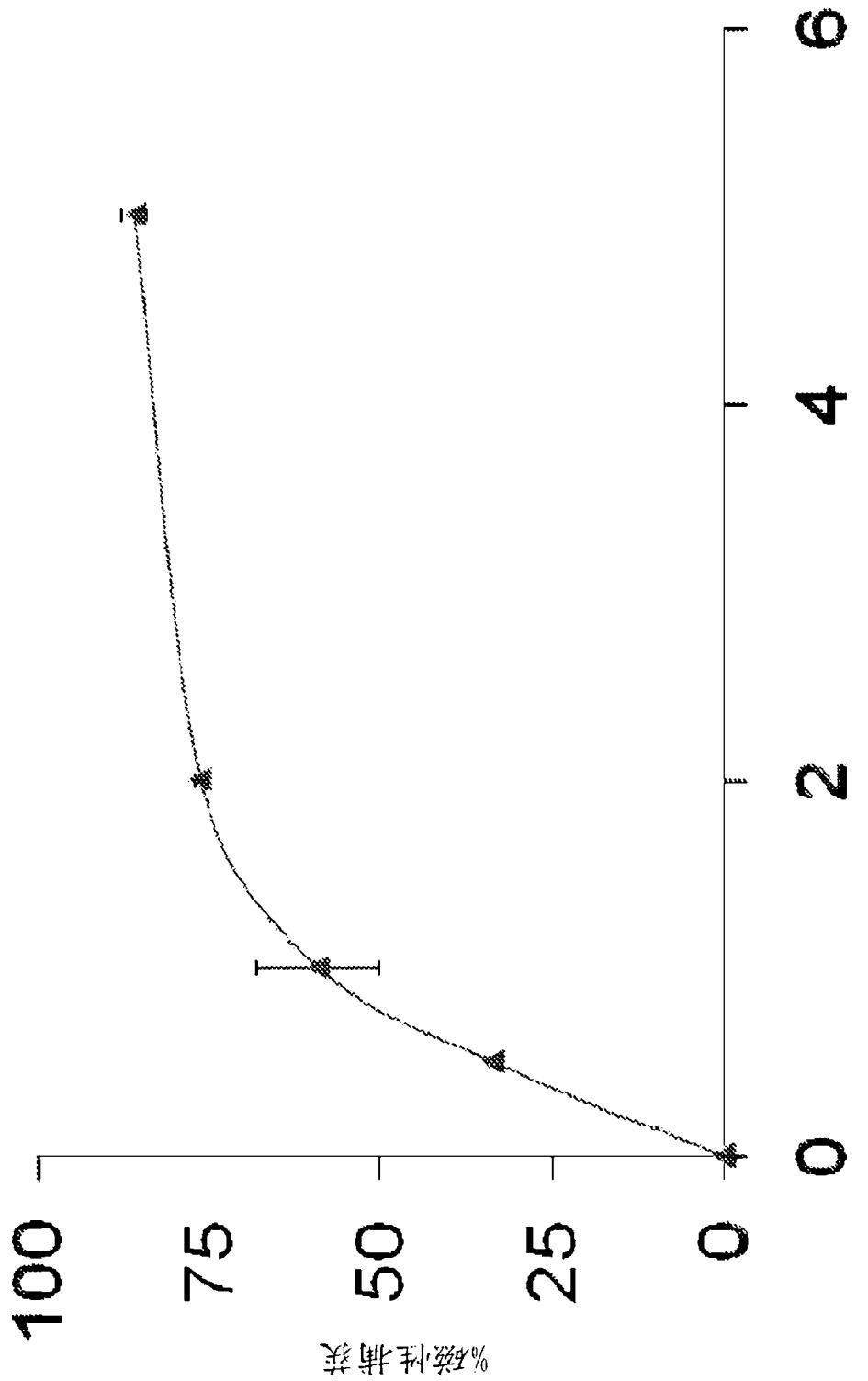
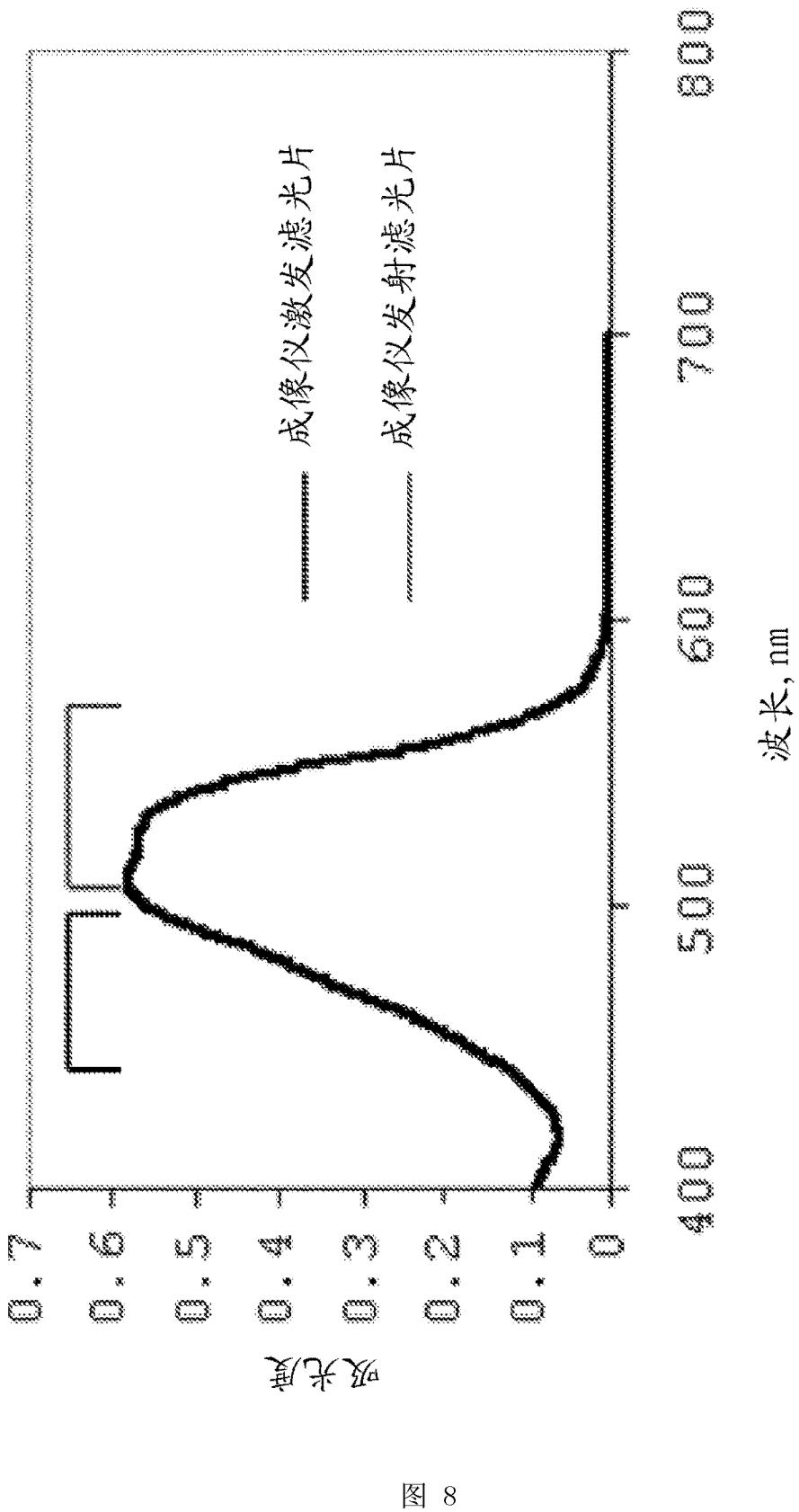


图 7

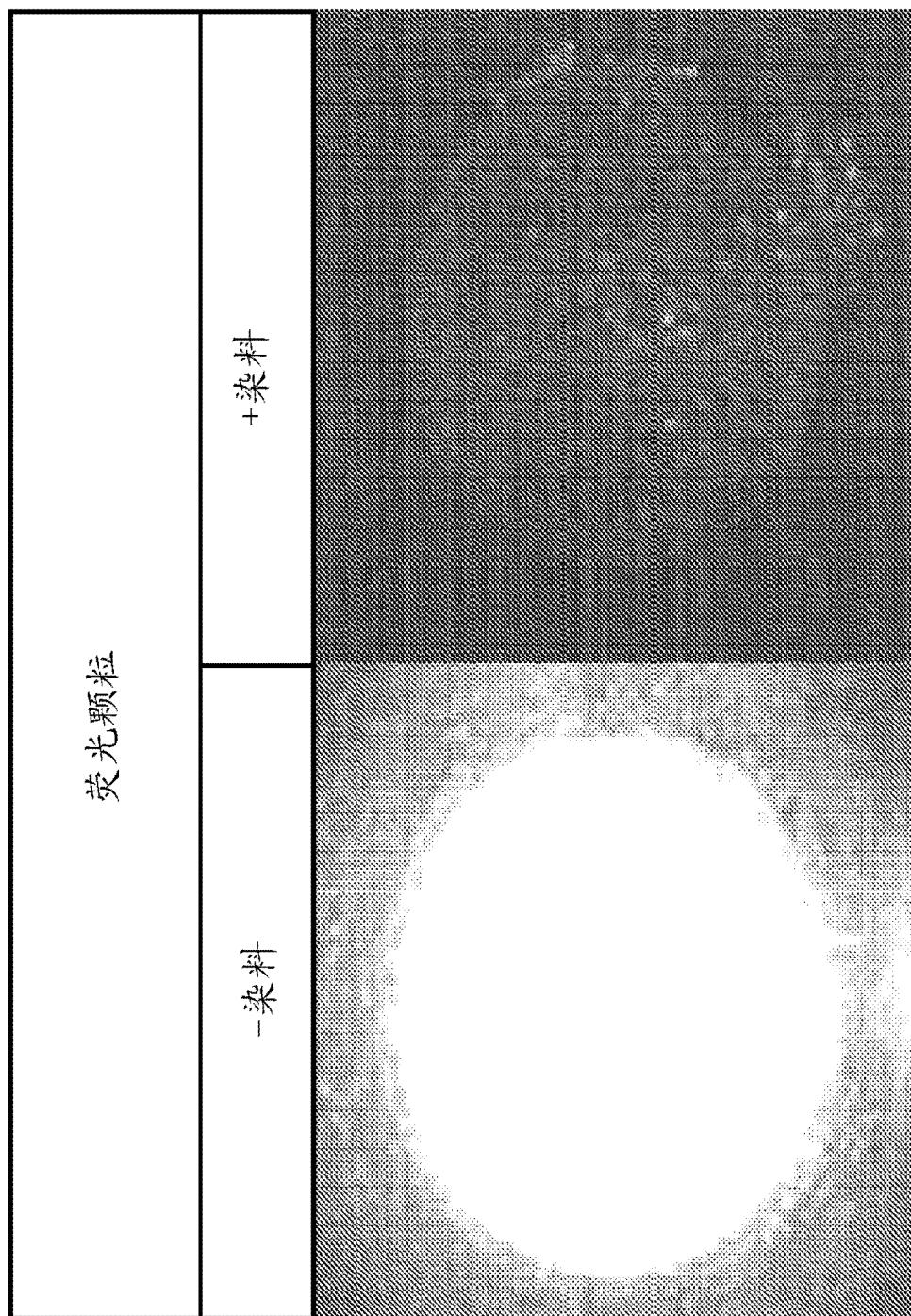
[磁性颗粒] × 10⁹/mL

测试被抗-金黄色葡萄球菌抗体包被的磁性颗粒。
生物试验显示了在磁性选择后金黄色葡萄球菌磁性捕获
百分比与磁性颗粒的数目的关系（实施例4）

铬变素2R的吸收波谱



铬变素2R染料吸收在与成像仪使用的激发和发射
滤光器透过的光相对应的光的波长的光（实施例5）



染料可以用于减弱来自荧光颗粒的信号（实施例5）

图 9

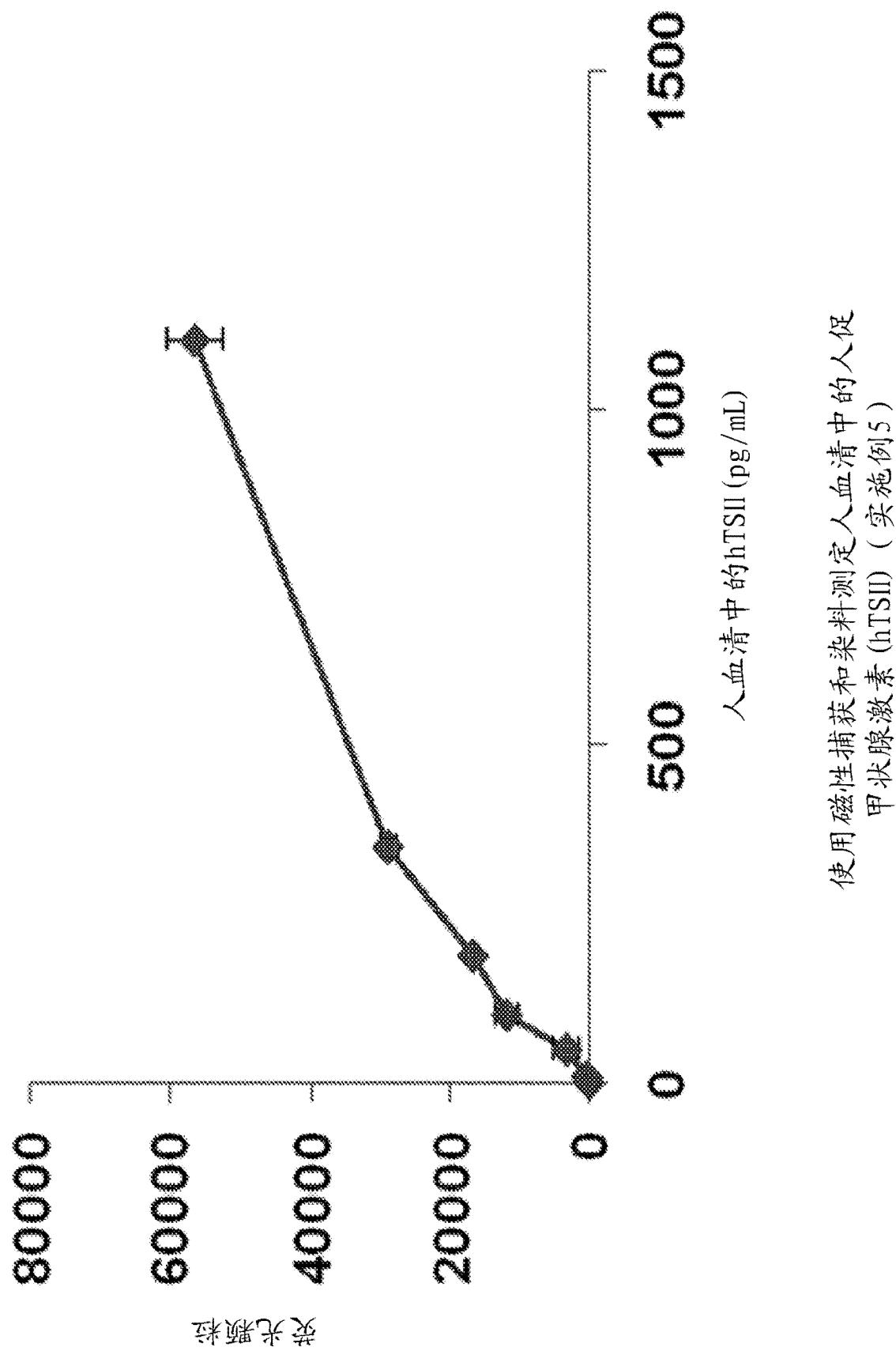
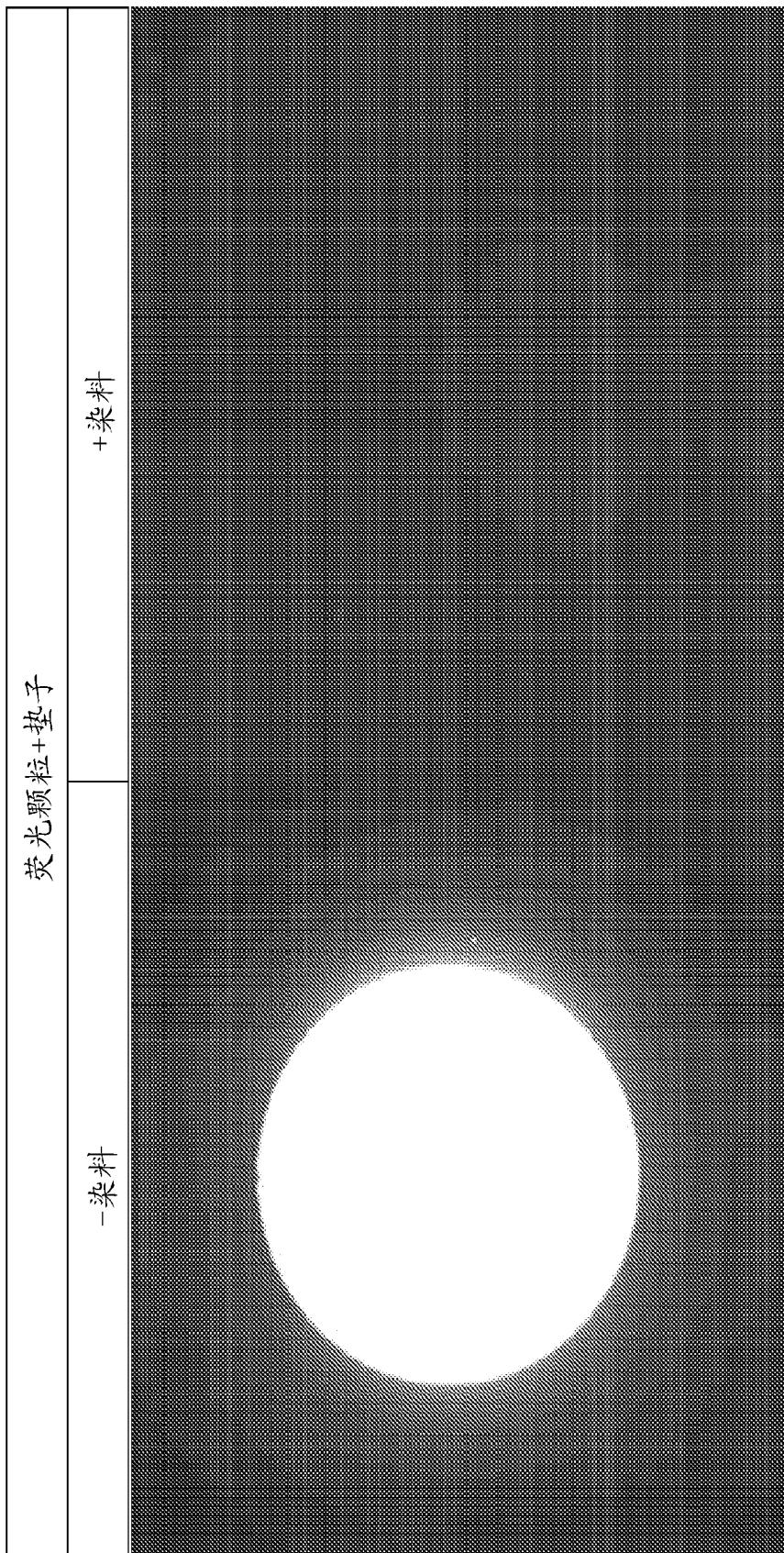
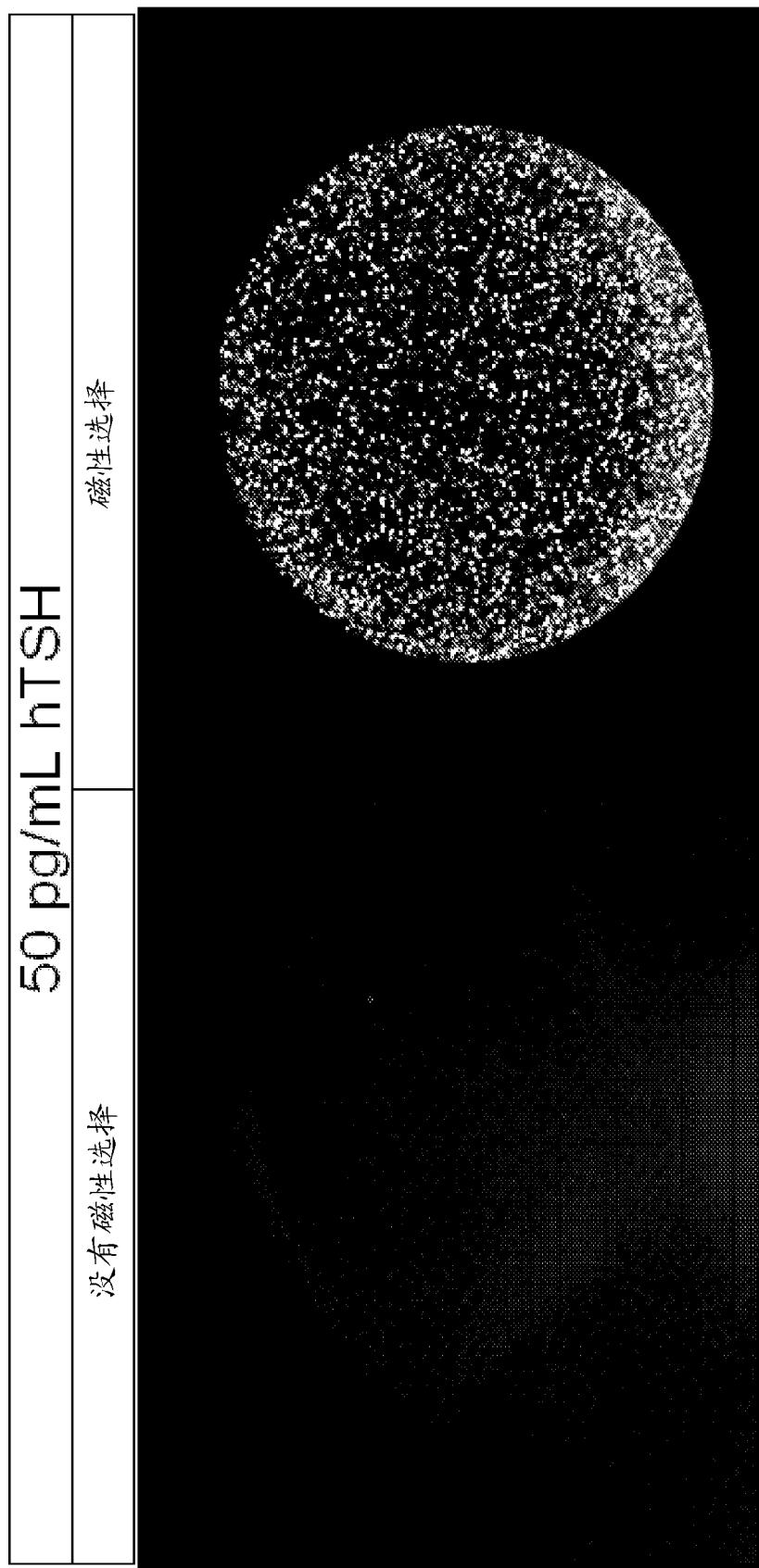


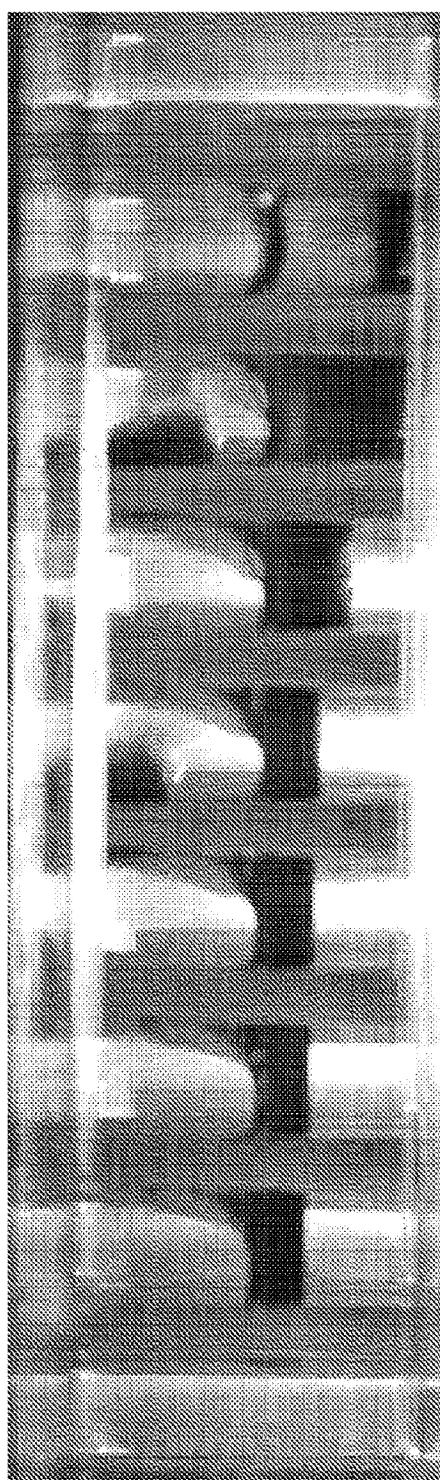
图 10



证实使用人促甲状腺激素试验试剂对染料和垫子
的影响的染料-垫子试剂的实验（实施例6）

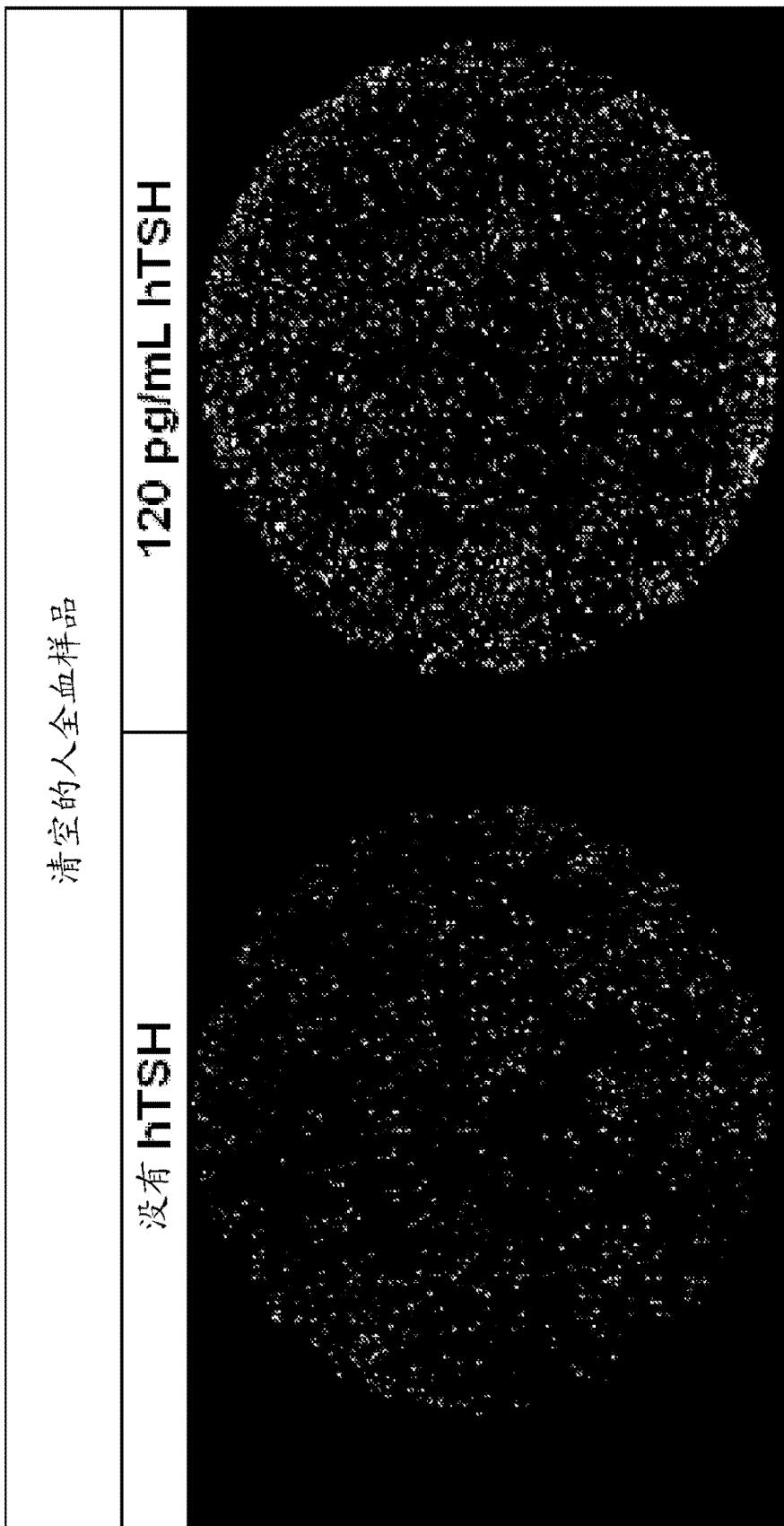


证实使用TSII试验试剂对染料和垫子的影响的染料垫子试剂
的实验-hTSII的磁性选择实验（实施例6）

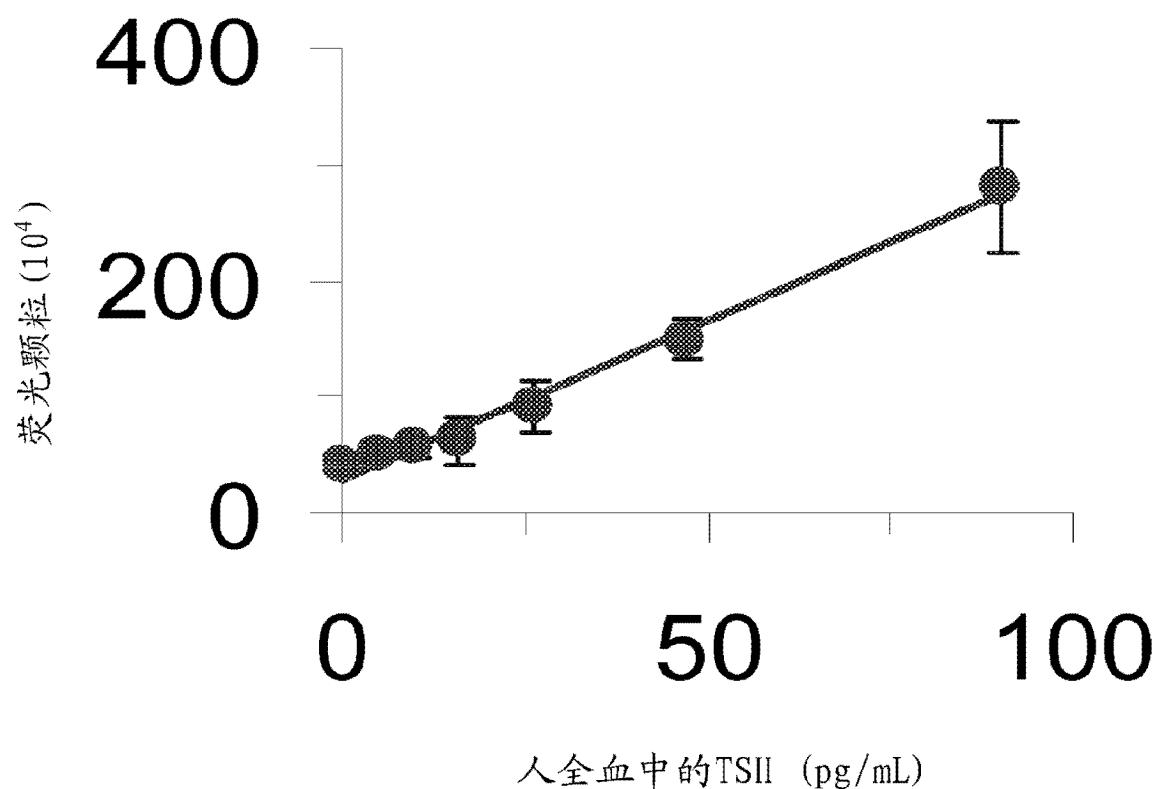


当样品是全血时，形成双层系统所需的密度试剂的浓度（实施例7）

图 13

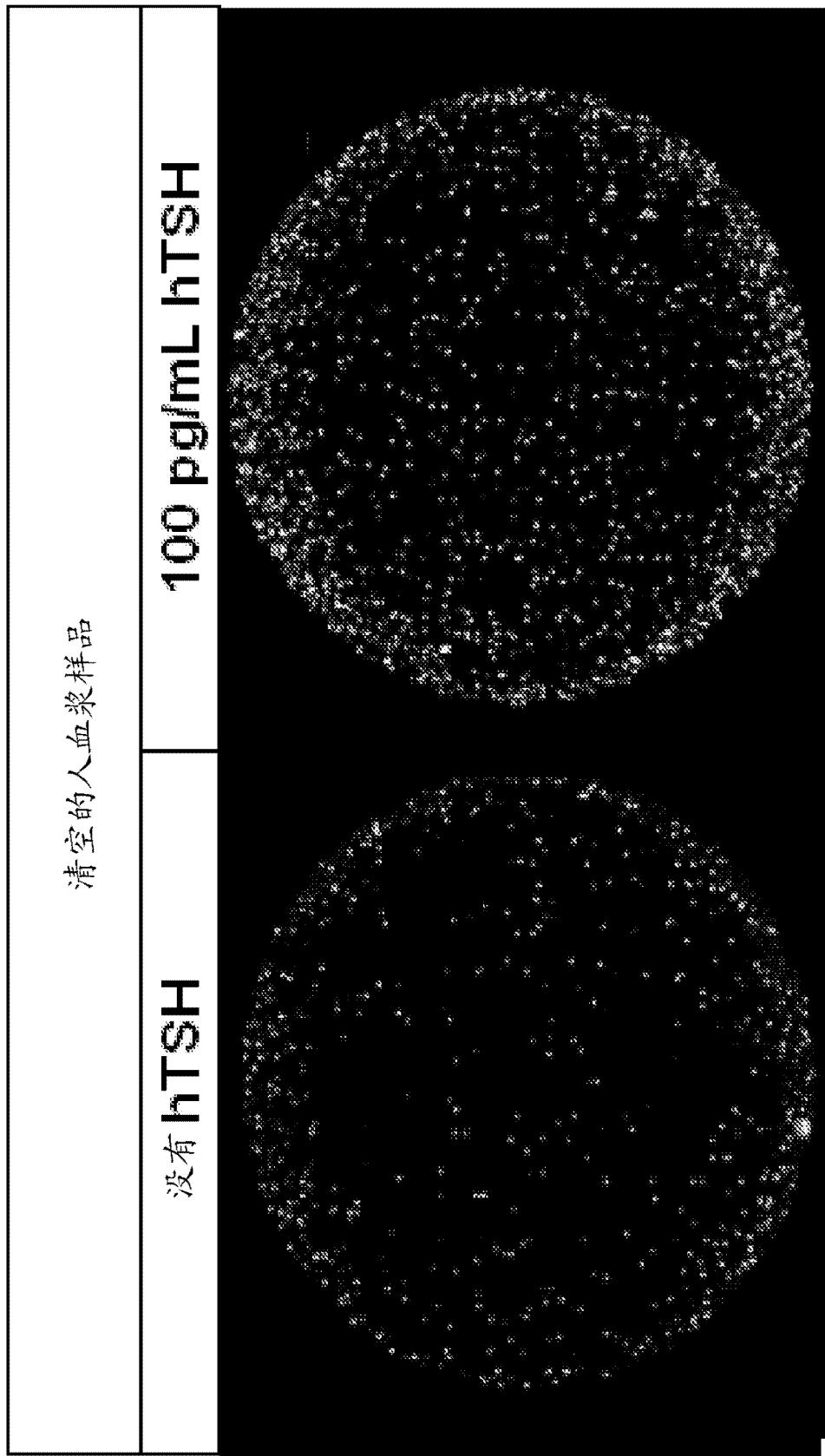


通过计算经染料垫子选择后的单个荧光微粒，
对全血中 hTSII的灵敏检测（实施例8）

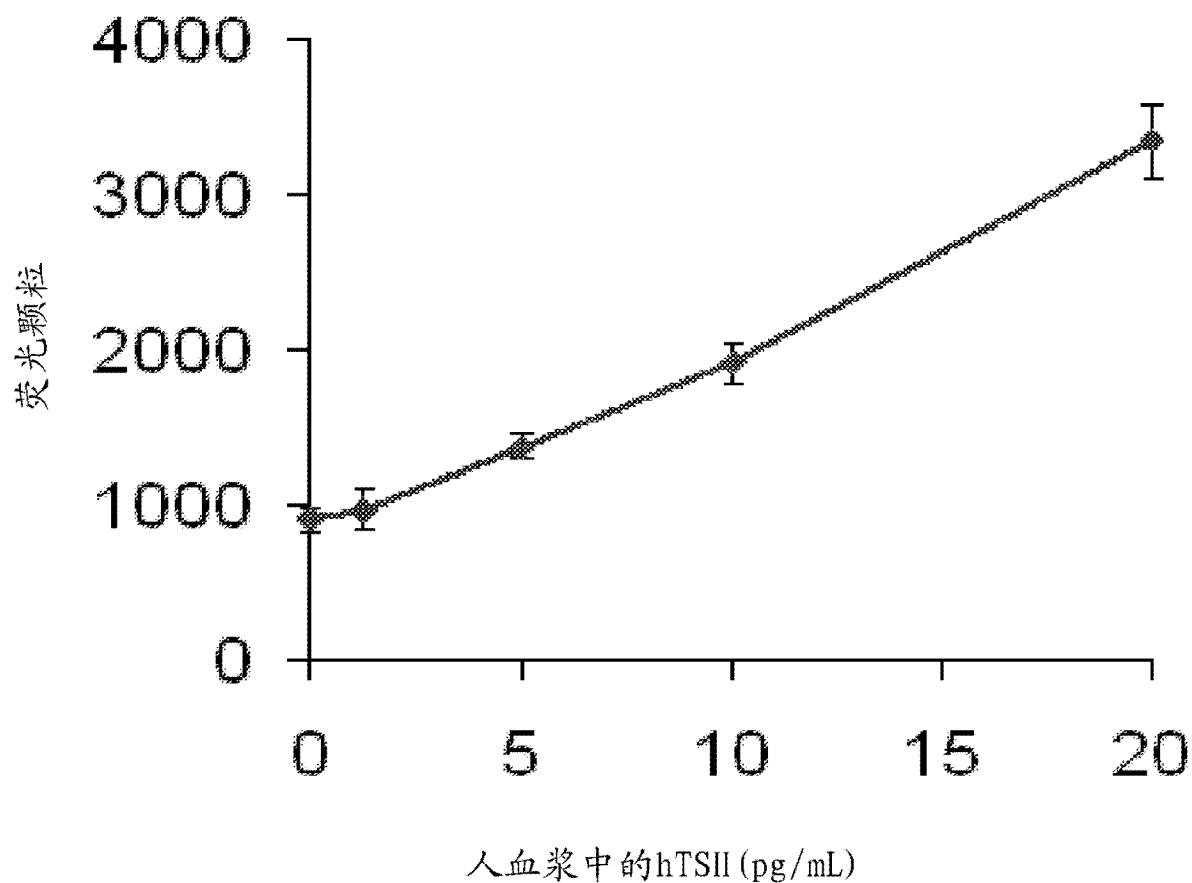


使用磁性捕获、垫子染料试剂、载体磁体，检测人全血中的人促甲状腺激素 (hTSH) (实施例8)

图 15

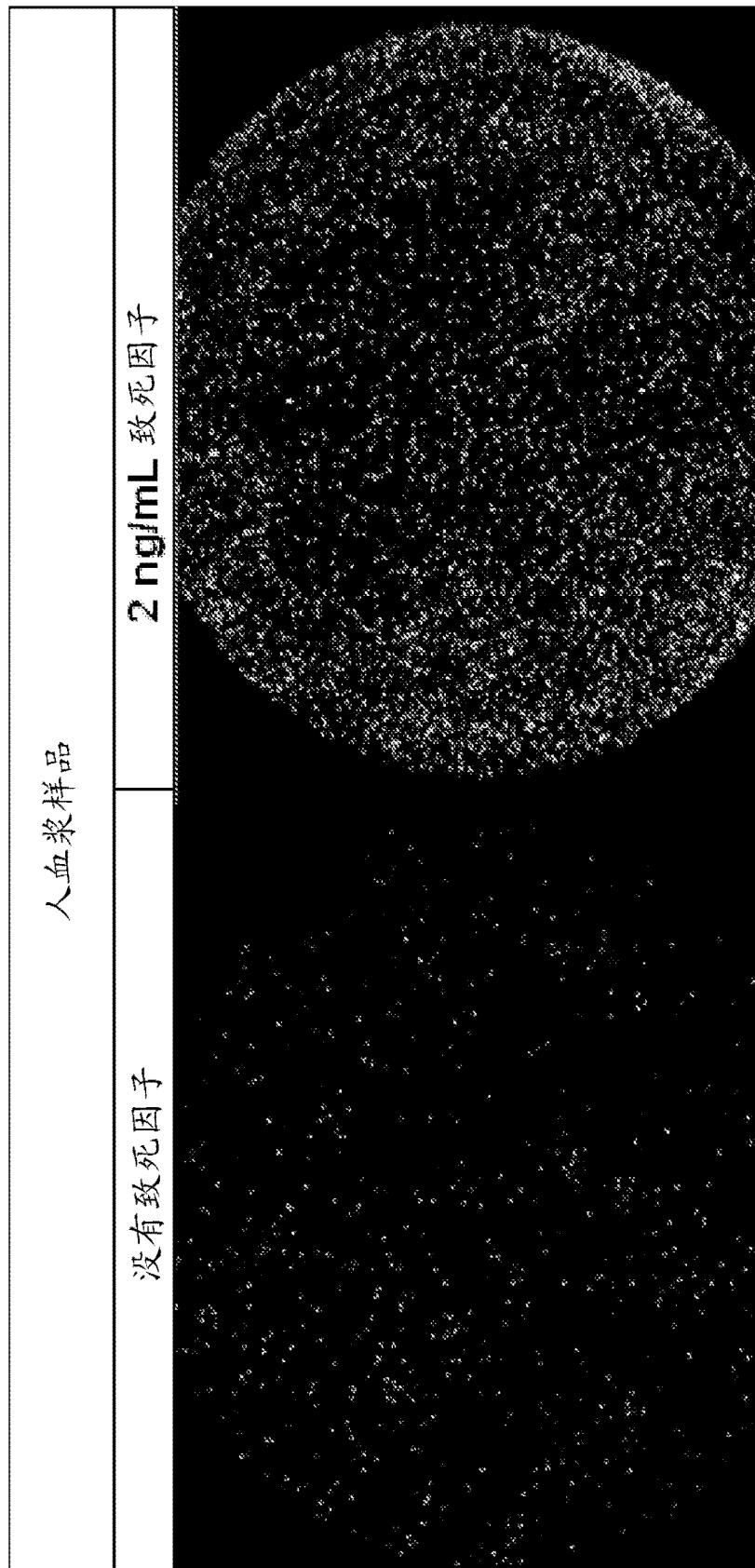


使用分散的磁性捕获和垫子染料试剂，
测定人血浆中的人促甲状腺激素 (hTSH) (实施例9)



使用分散的磁性捕获和垫子染料试剂，
测定人血浆中的人促甲状腺激素 (hTSH) (实施例9)

图 17



使用磁性捕获和垫子染料试剂，检测人血浆中的
炭疽芽孢杆菌致死因子(LF) (实施例10)

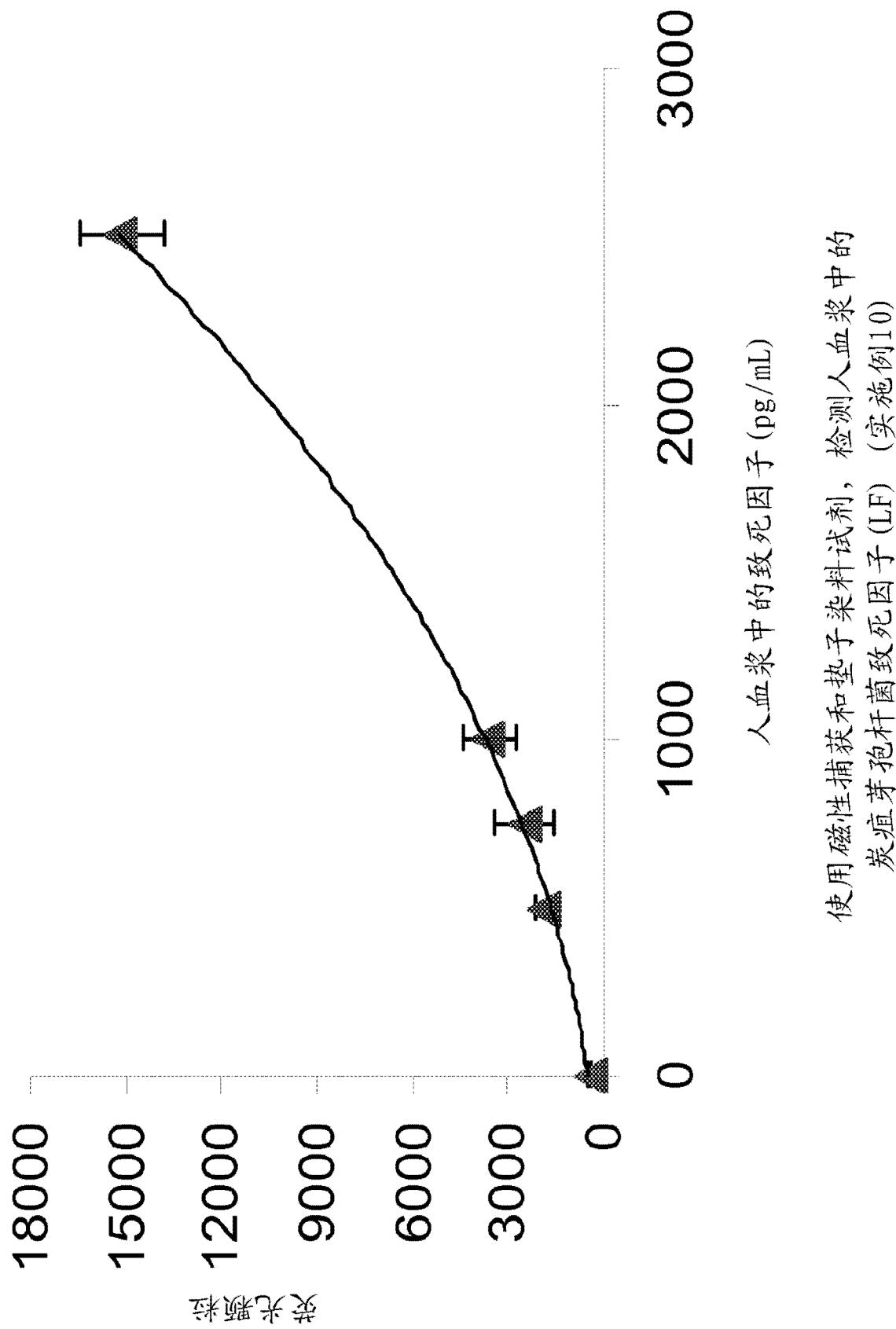
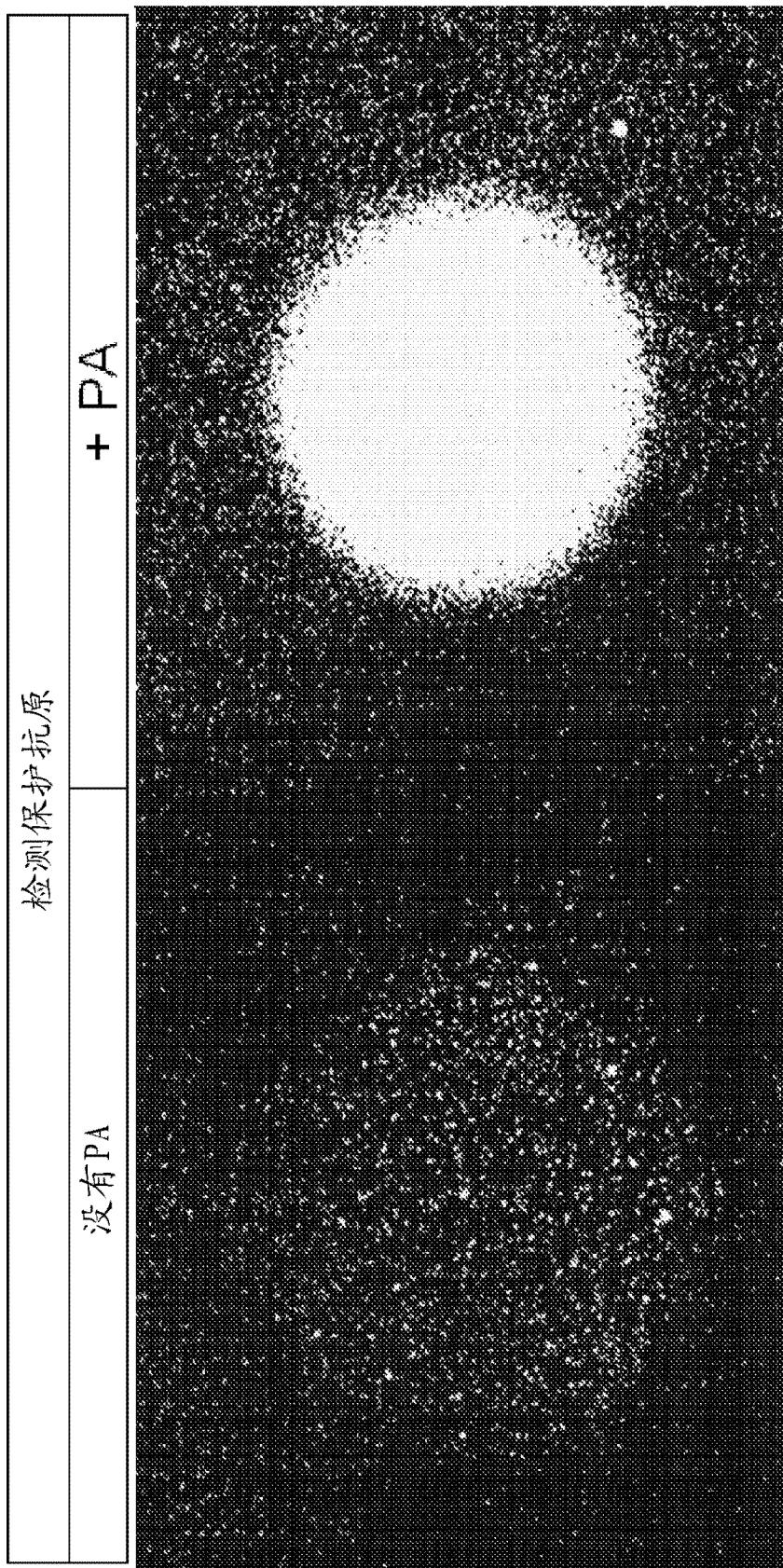


图 19



使用磁性捕获和垫子染料试剂，检测人血浆中的
炭疽芽孢杆菌保护抗原 (PA) (实施例11)

图 20

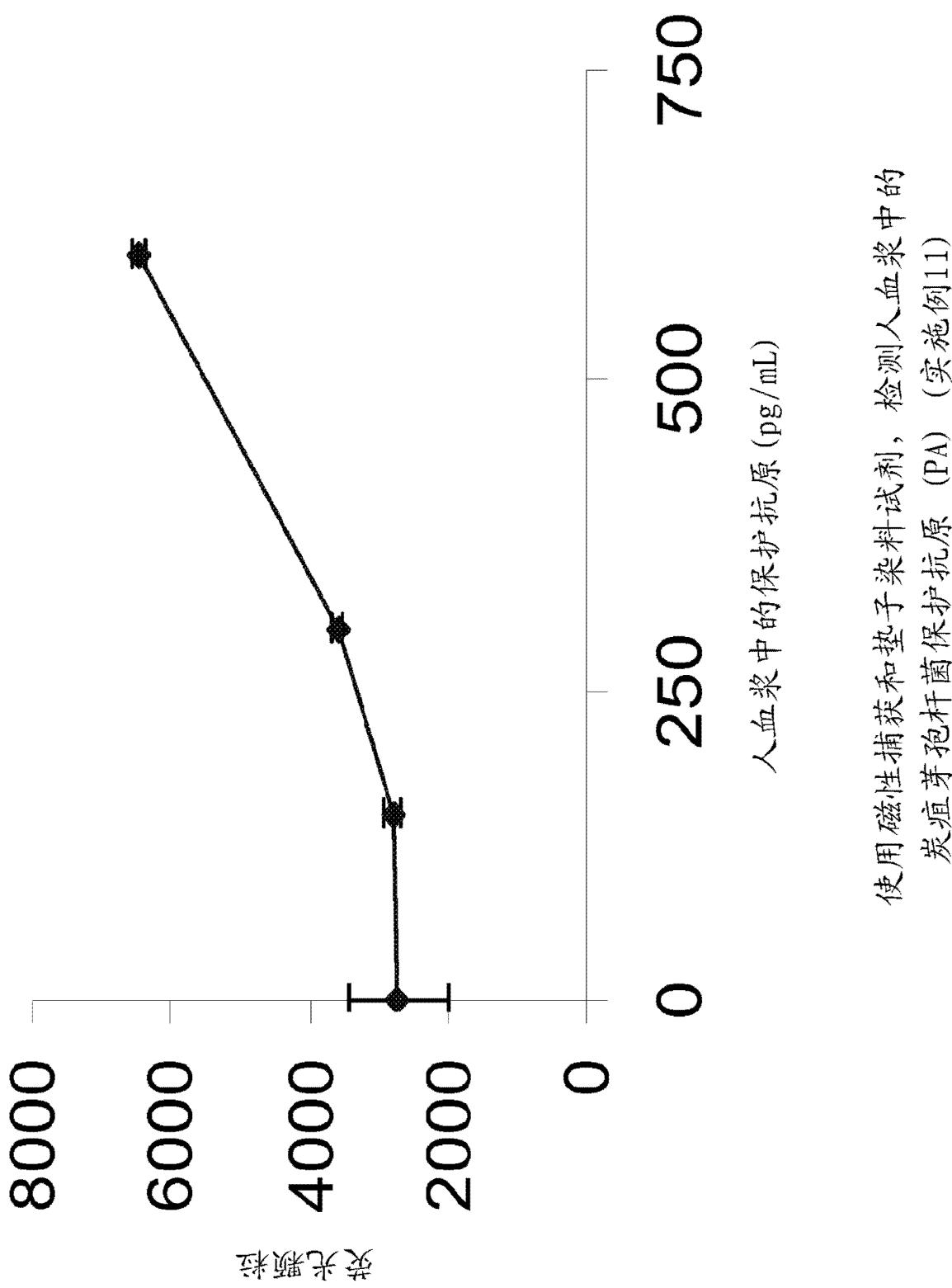
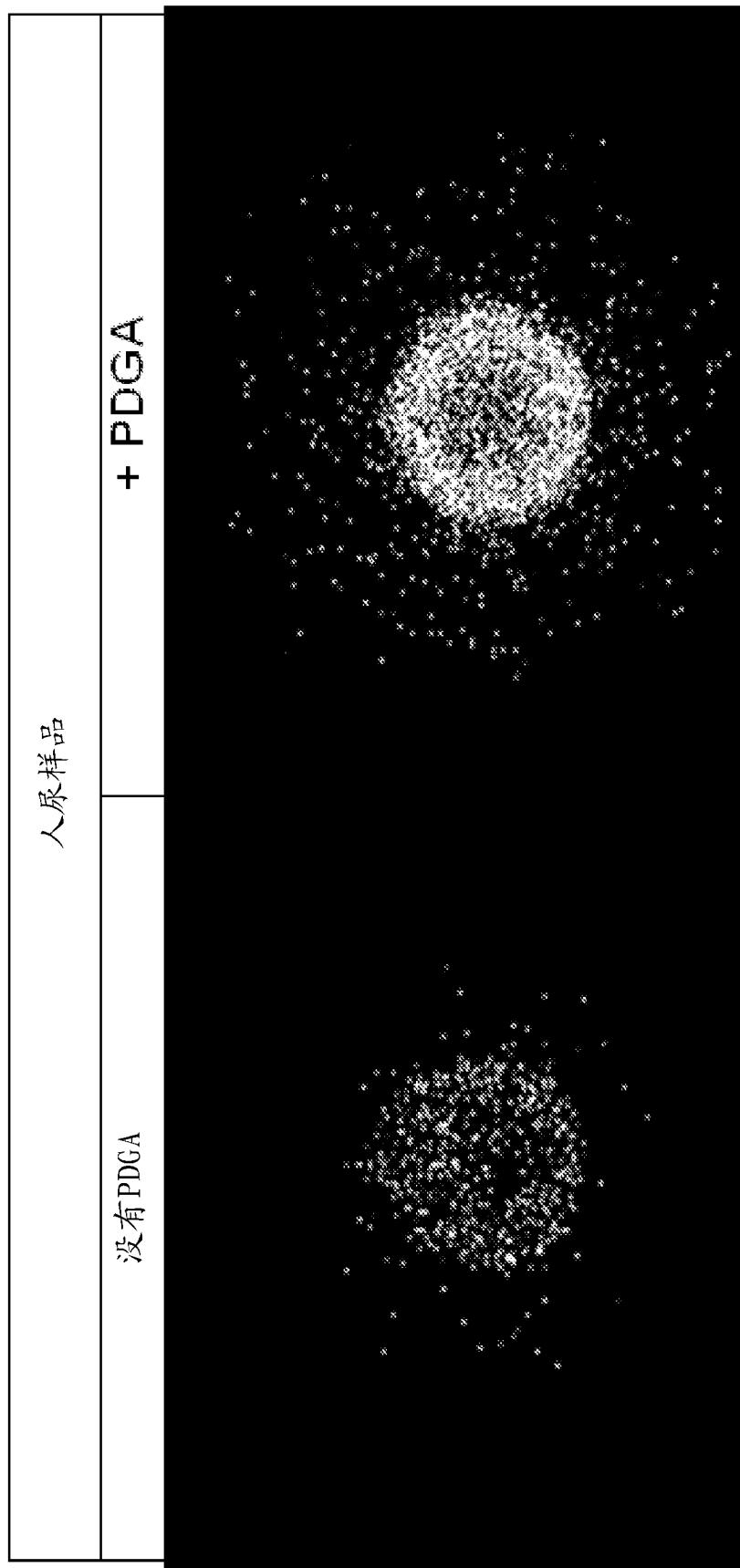


图 21



检测人尿中的炭疽芽孢杆菌聚-D- γ -谷氨酸 (PDGA) 荚膜多肽 (实施例12)

图 22

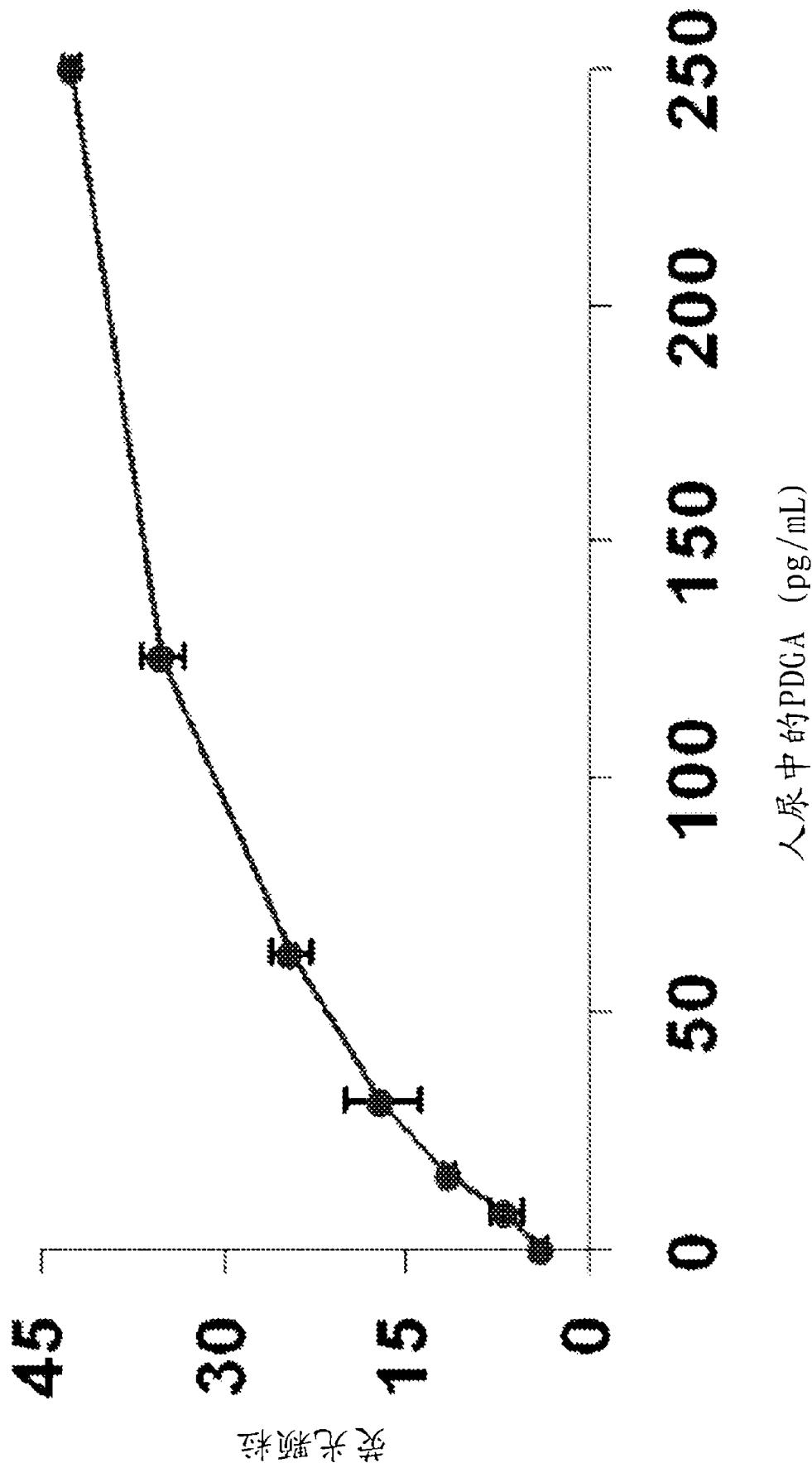


图 23

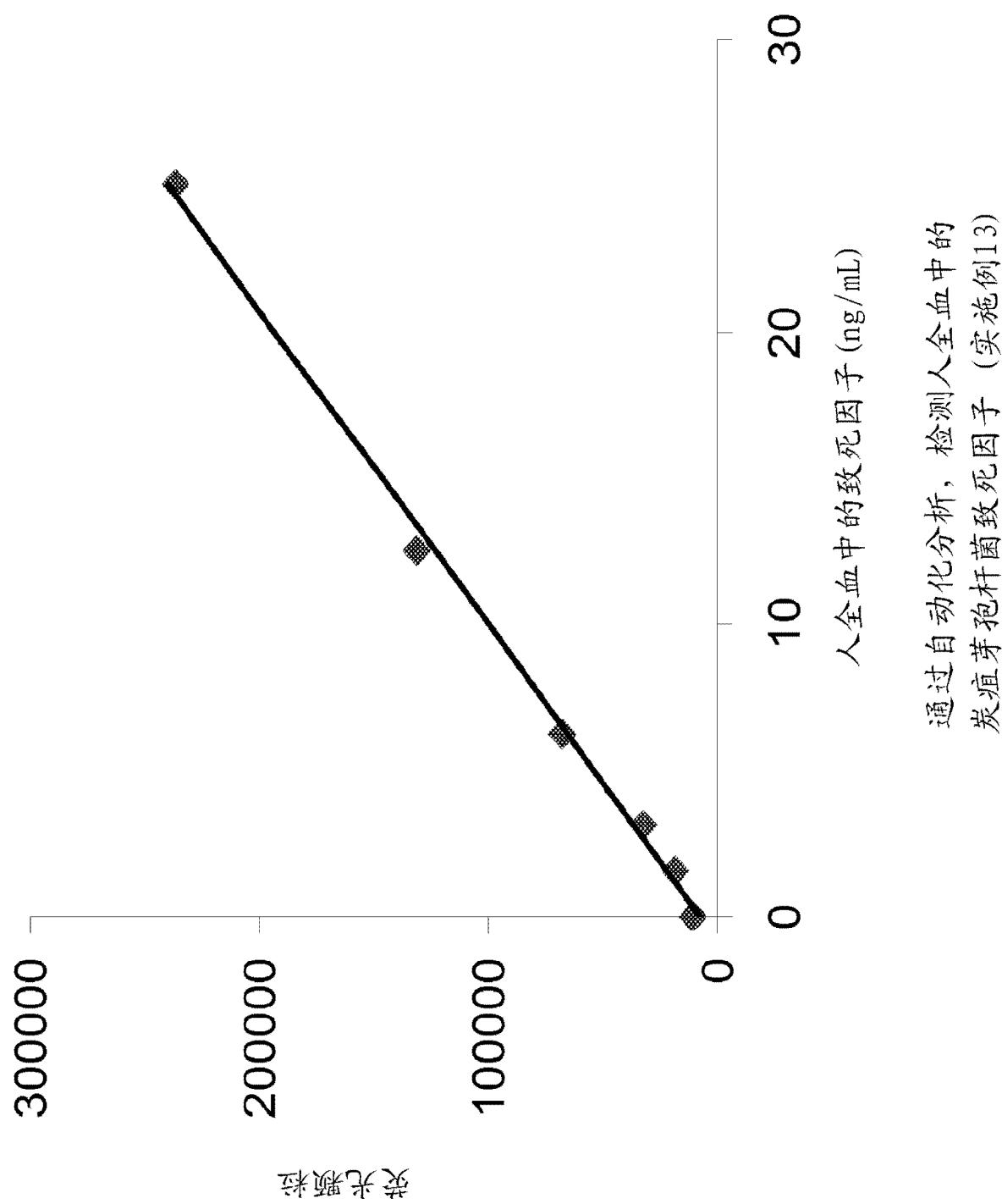
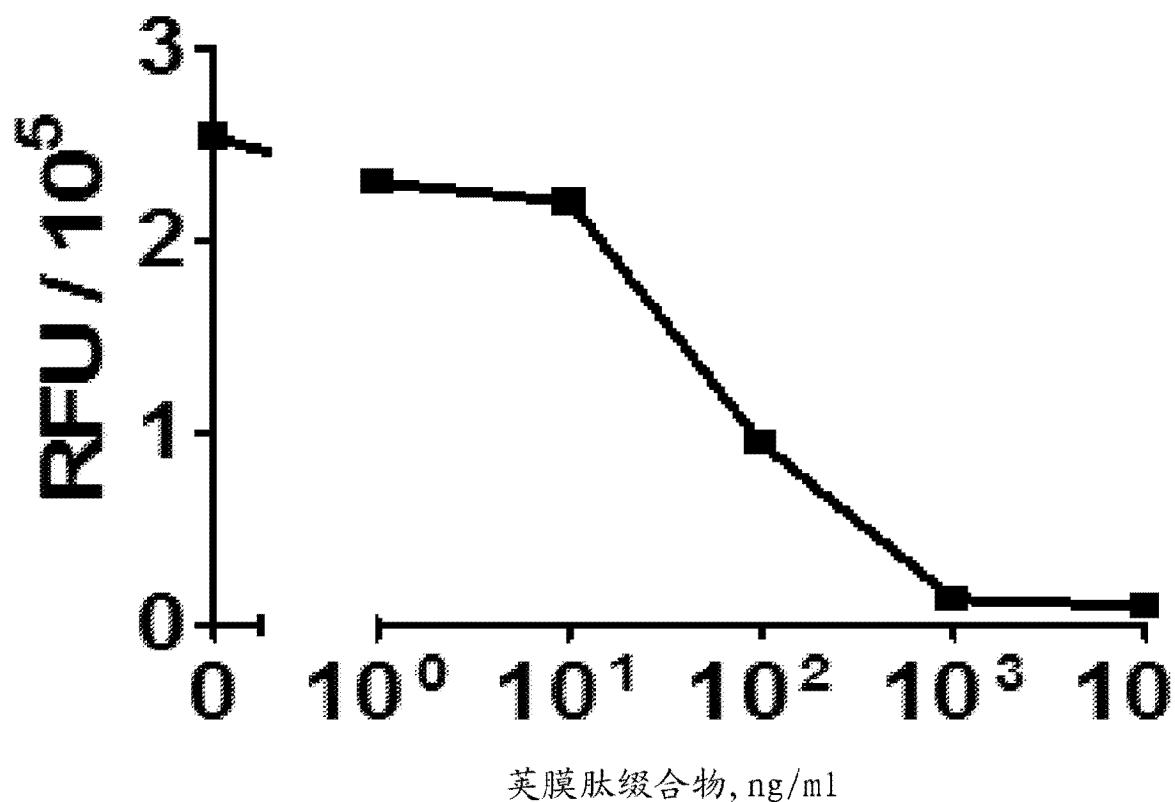


图 24



用于检测炭疽芽孢杆菌蛋白聚-D-γ-
谷氨酸荚膜多肽的竞争免疫测定(实施例14)

图 25

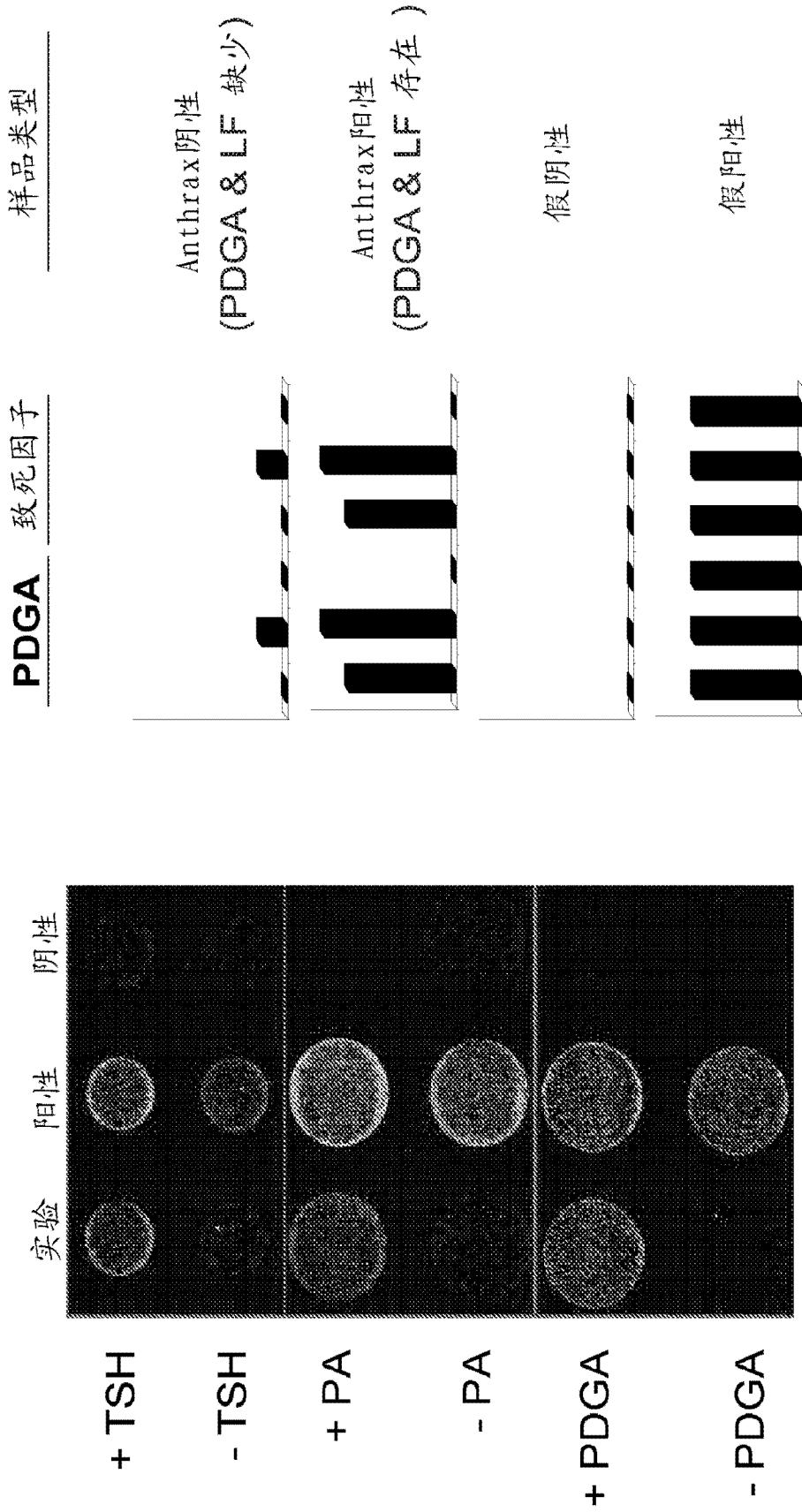
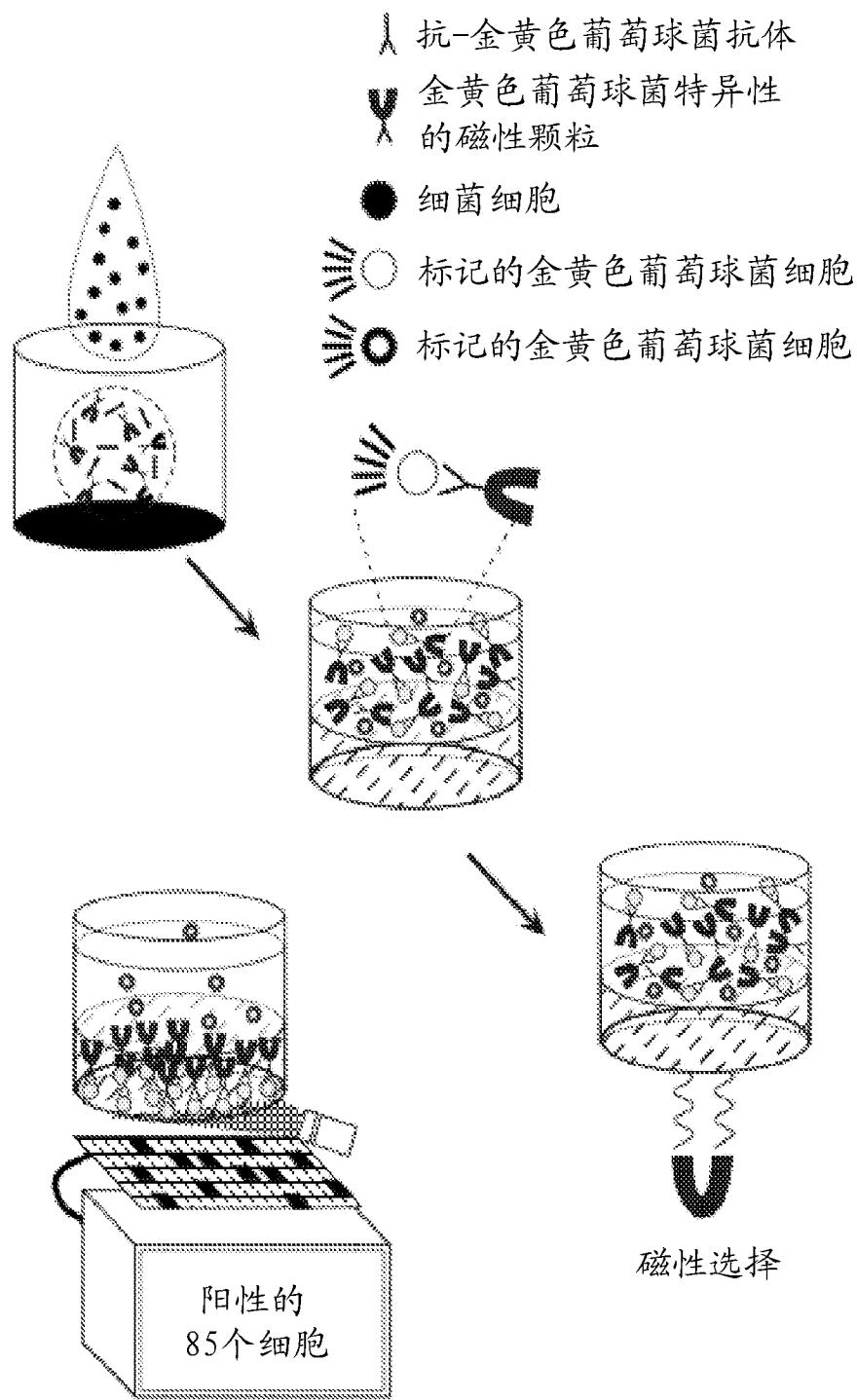


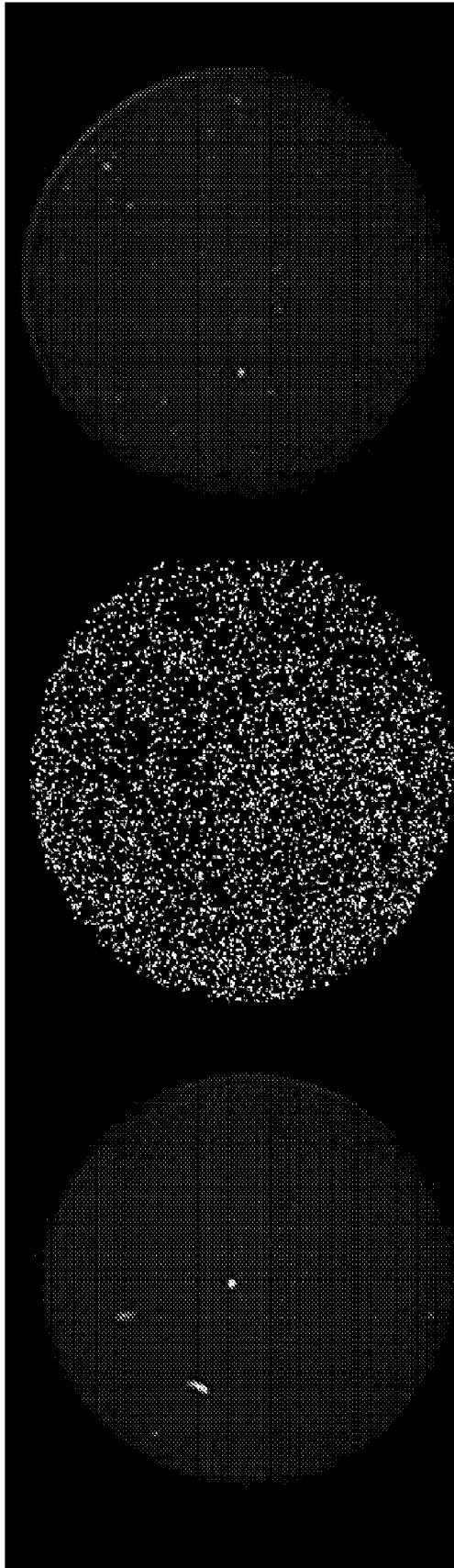
图 26



用发荧光DNA染色剂标记金黄色葡萄球菌。使用未放大的数字成像，多路金黄色葡萄球菌试验计数单个标记的金黄色葡萄球菌细胞。细胞计数技术是通过差别生长测定抗生素敏感性的基础(实施例16)

图 27

Sybr®试验金黄色葡萄球菌检测试验		
没有细胞	5,000金黄色葡萄球菌细胞	50,000 表皮葡萄球菌细胞



通过使用非特异性的Sybr® Green DNA染色进行检测，并使用染料垫子试剂进行磁性选择，检测金黄色葡萄球菌（实施例16）

图 28

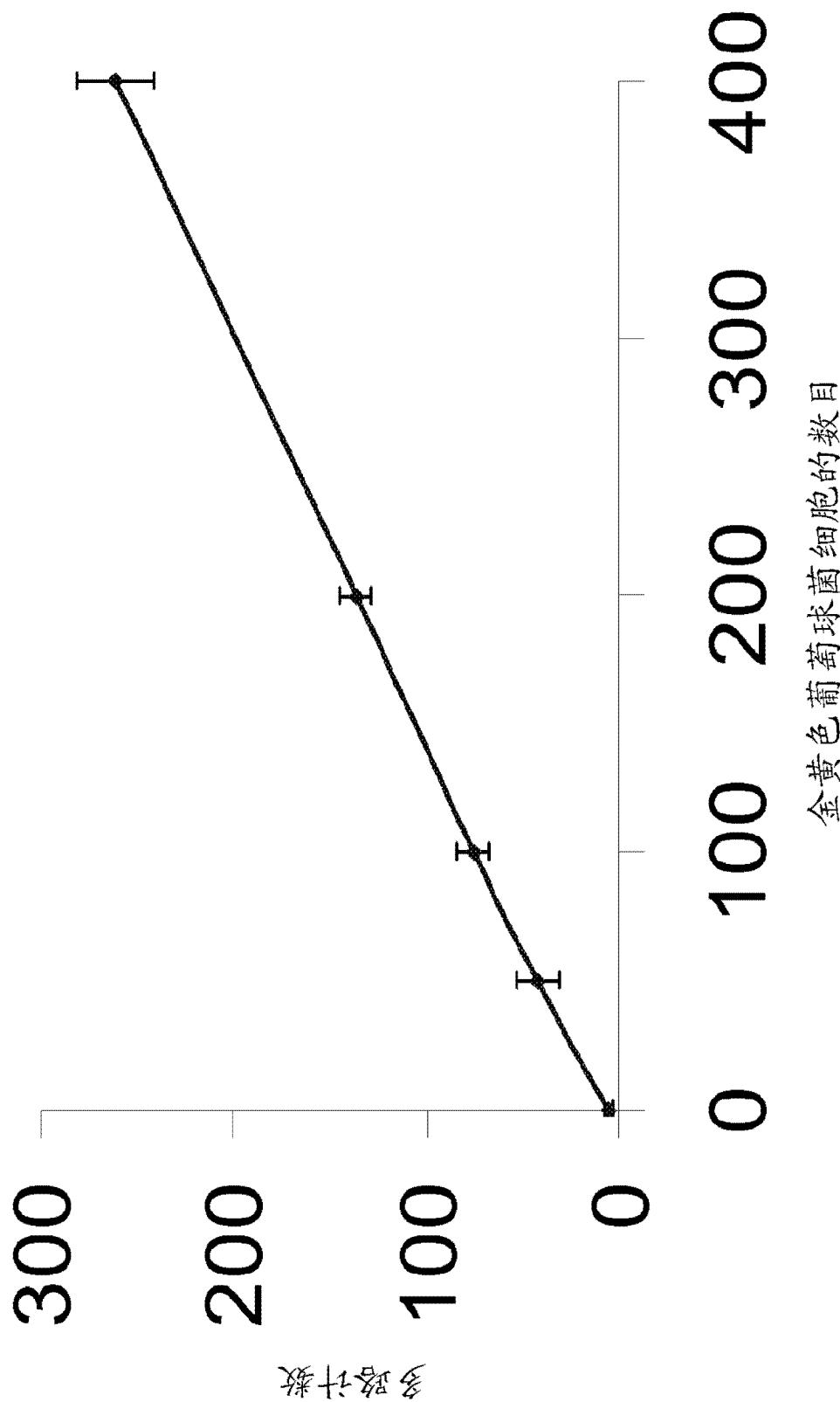
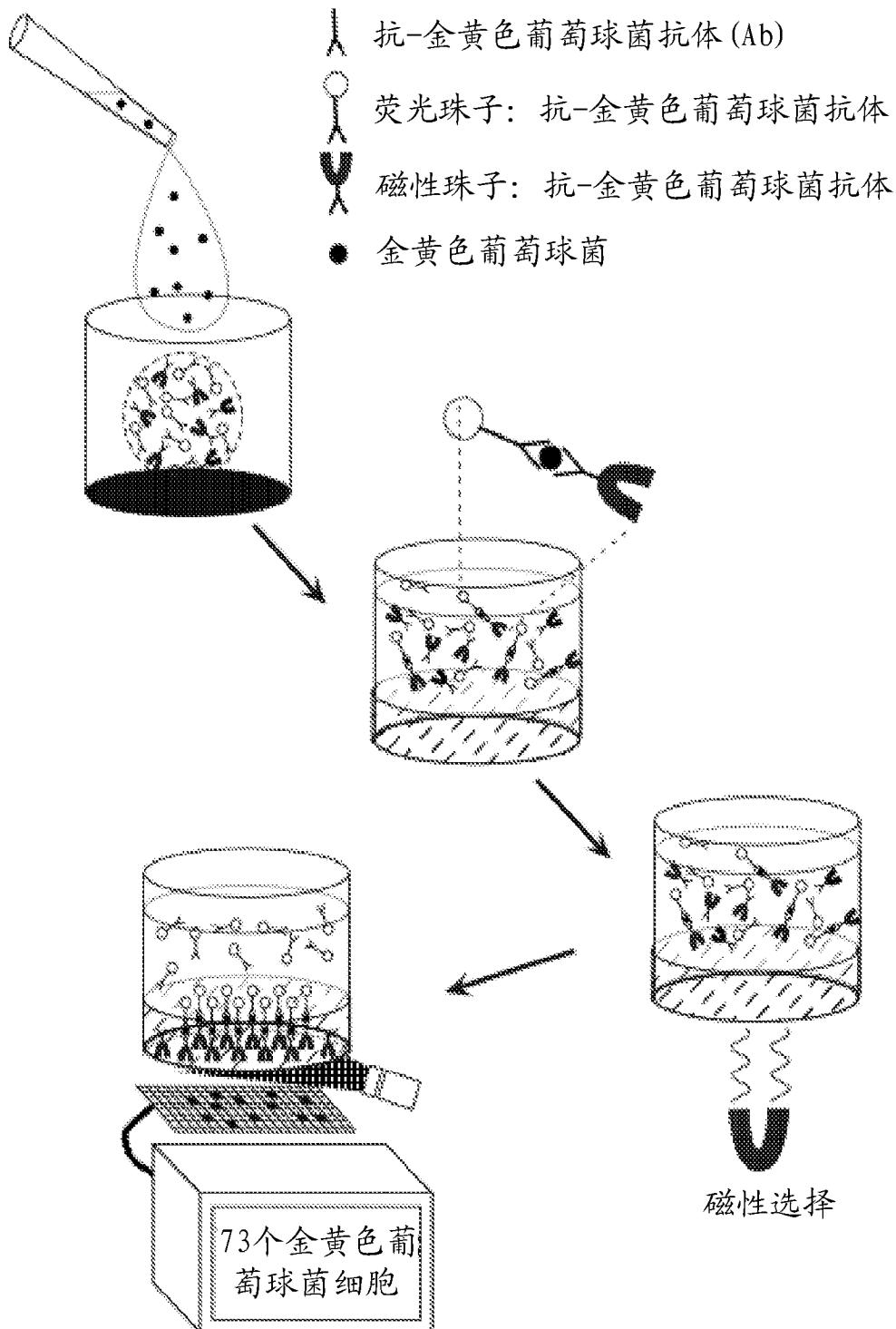


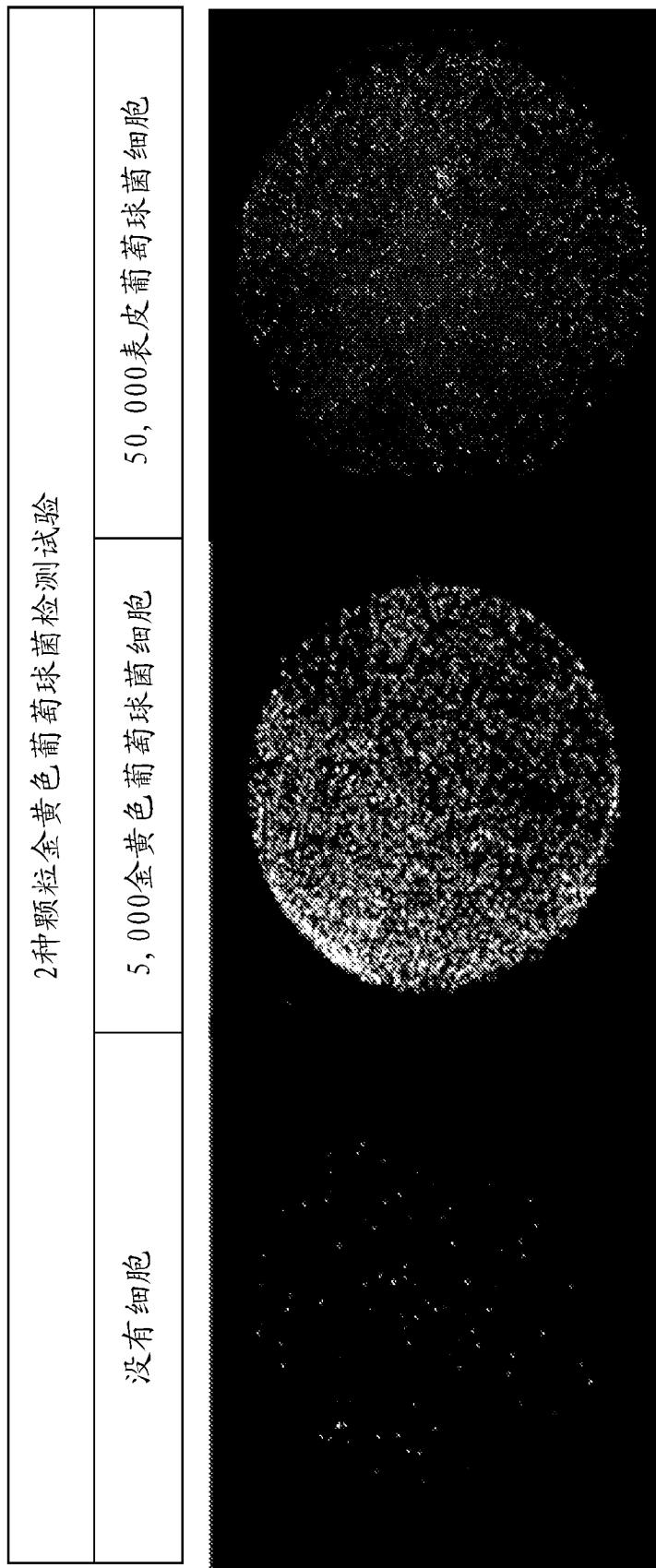
图 29

通过使用非特异性的Sybr Green DNA染色进行检测，并使用染料垫子试剂进行磁性选择，检测金黄色葡萄球菌（实施例16）



用缀合到荧光纳米颗粒上的鸡抗-蛋白A抗体
标记金黄色葡萄球菌细胞 (实施例17)

图 30



使用缀合到荧光纳米颗粒上的鸡抗-A抗体标记
金色葡萄球菌细胞 (实施例17)

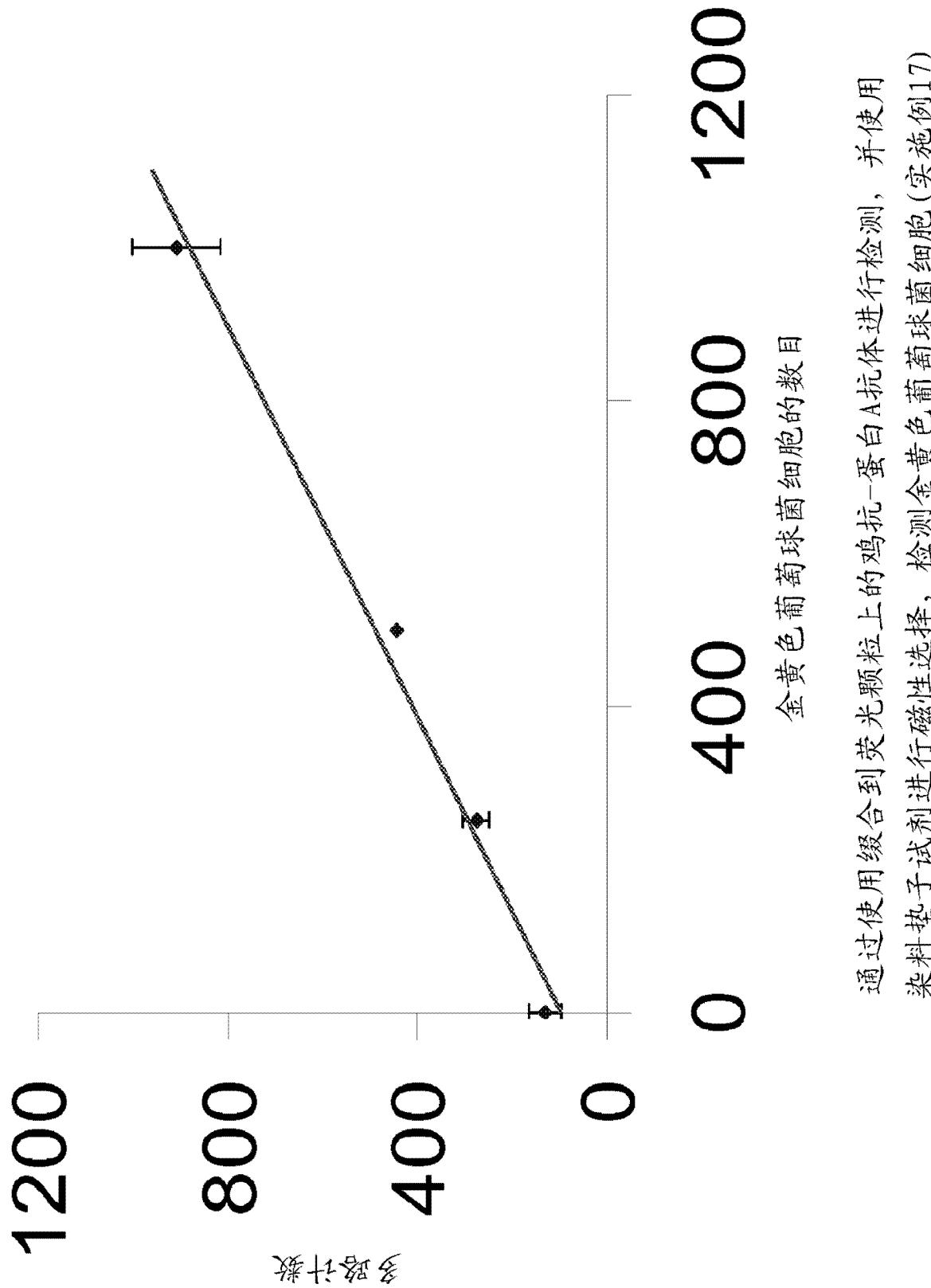
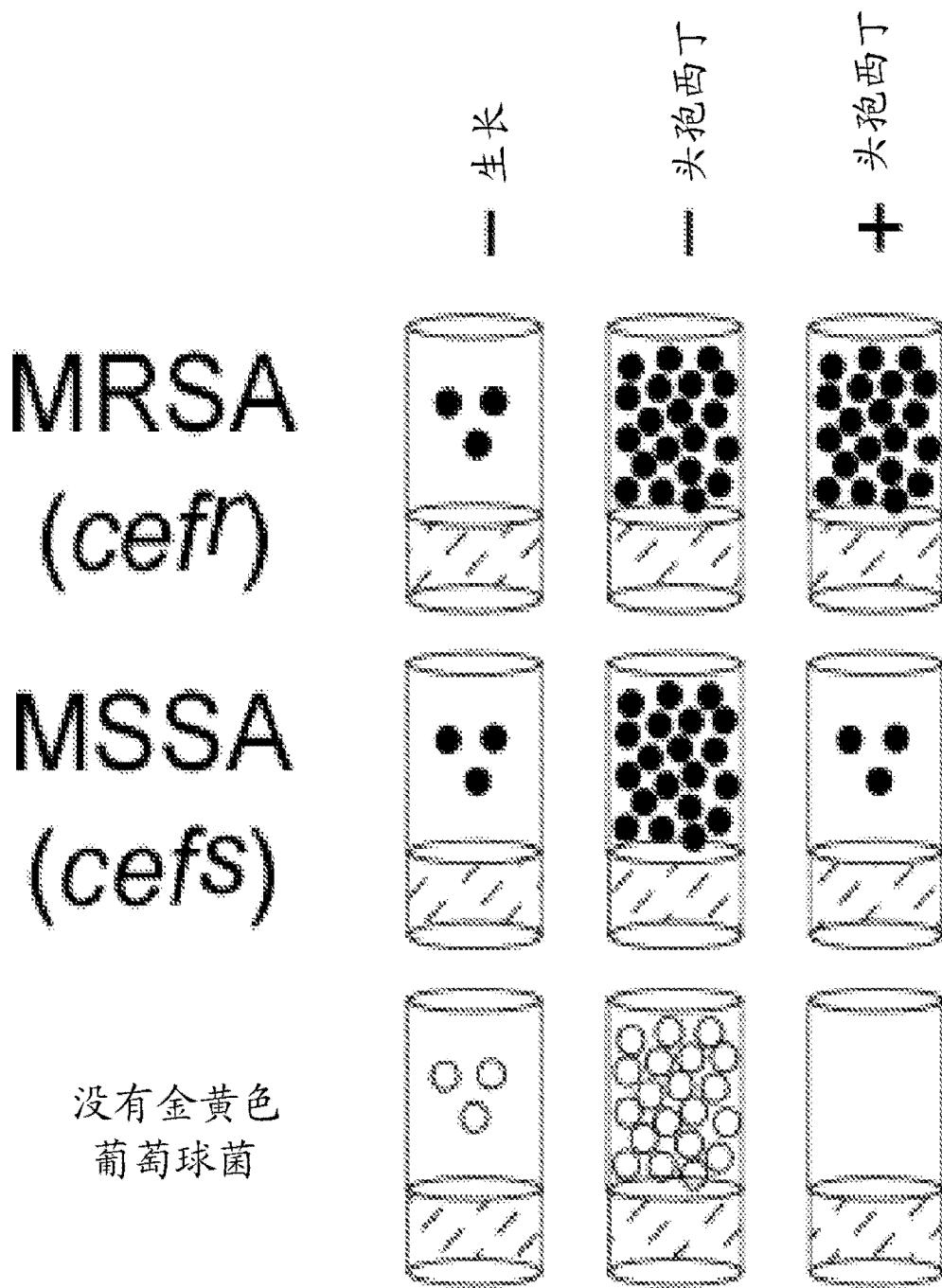
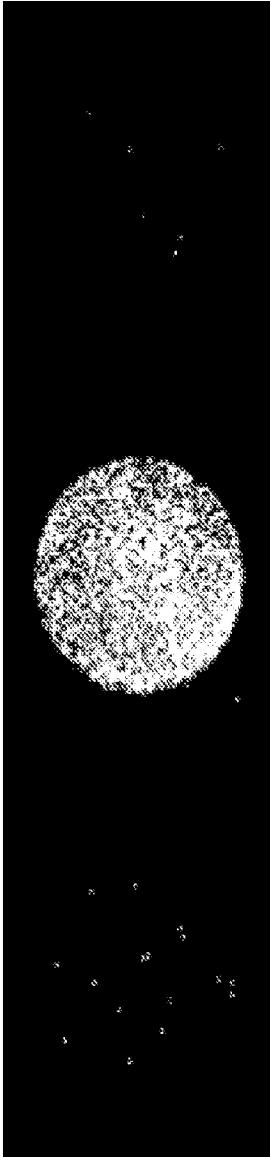
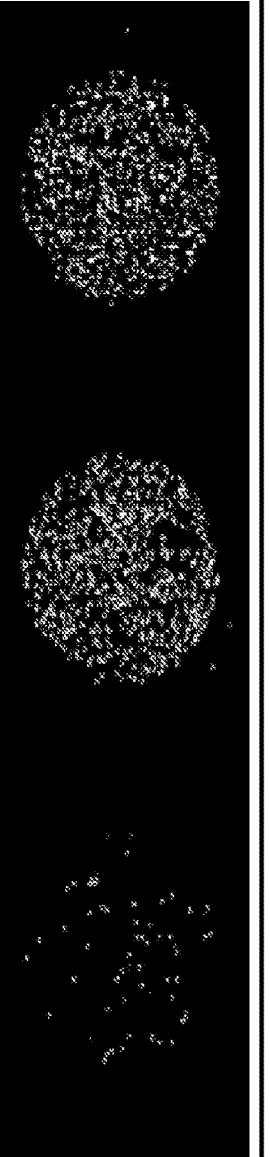
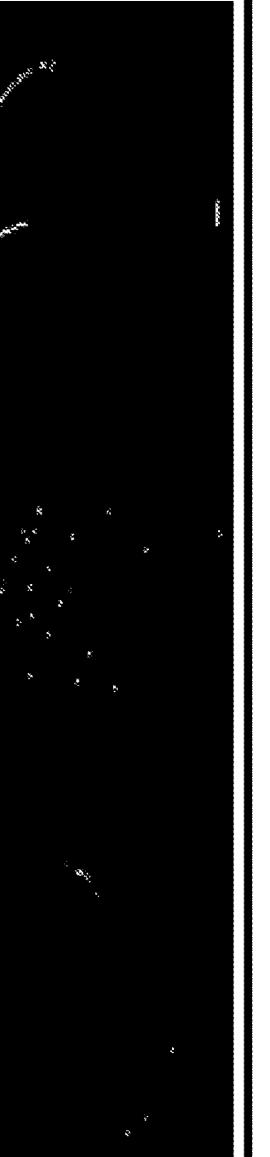
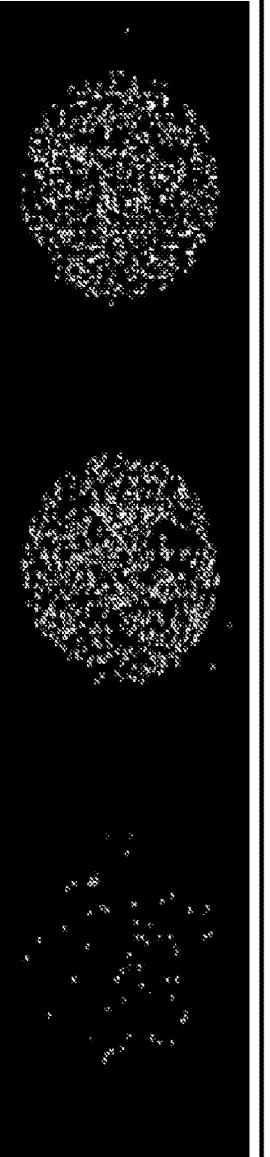
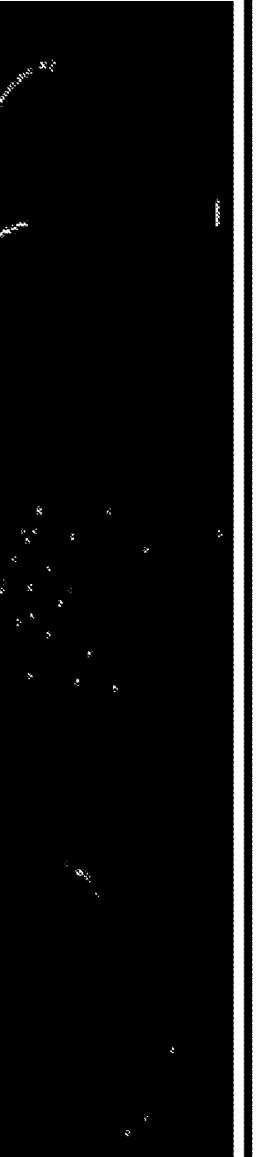
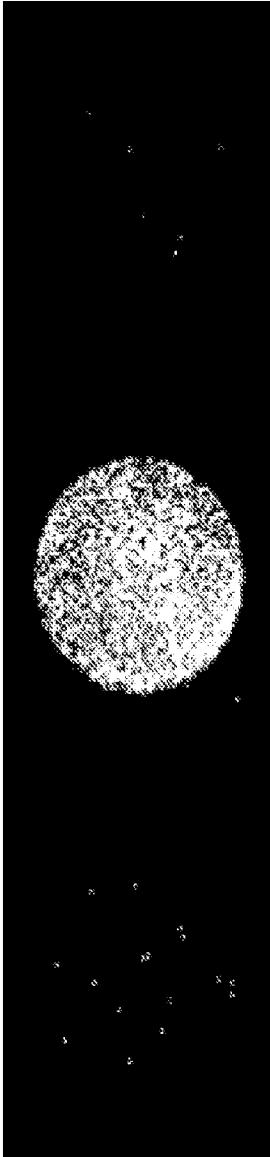
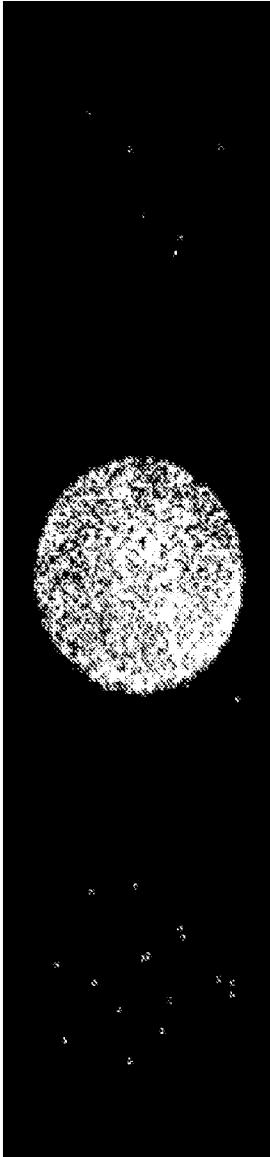
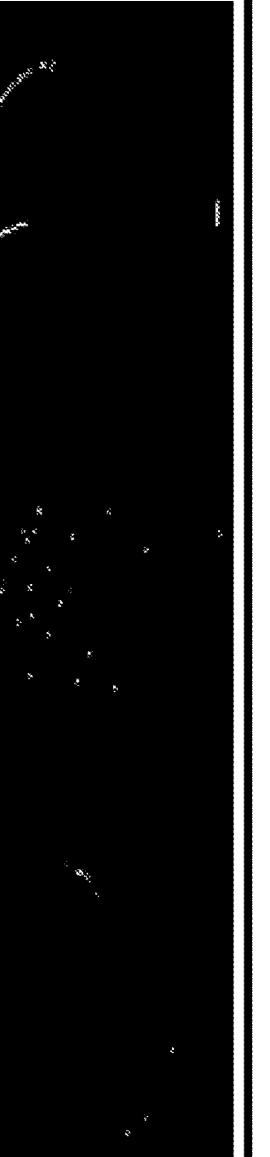
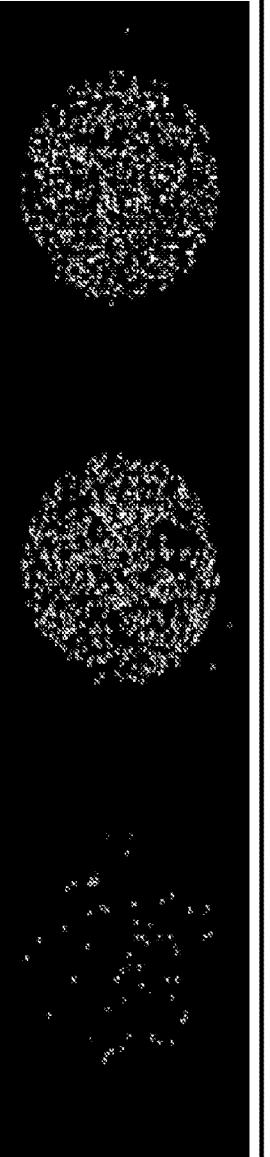


图 32



通过细胞的选择性生长和免疫检测，
检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌
(MRSA) 的方法 (实施例18)

图 33

菌株	没有生长	没有CFX的生长	在CFX中生长
MSSA			
MRSA			
表皮葡萄球菌			

通过细胞的选择性生长和免疫检测，检测甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (MRSA) (实施例18)

图 34

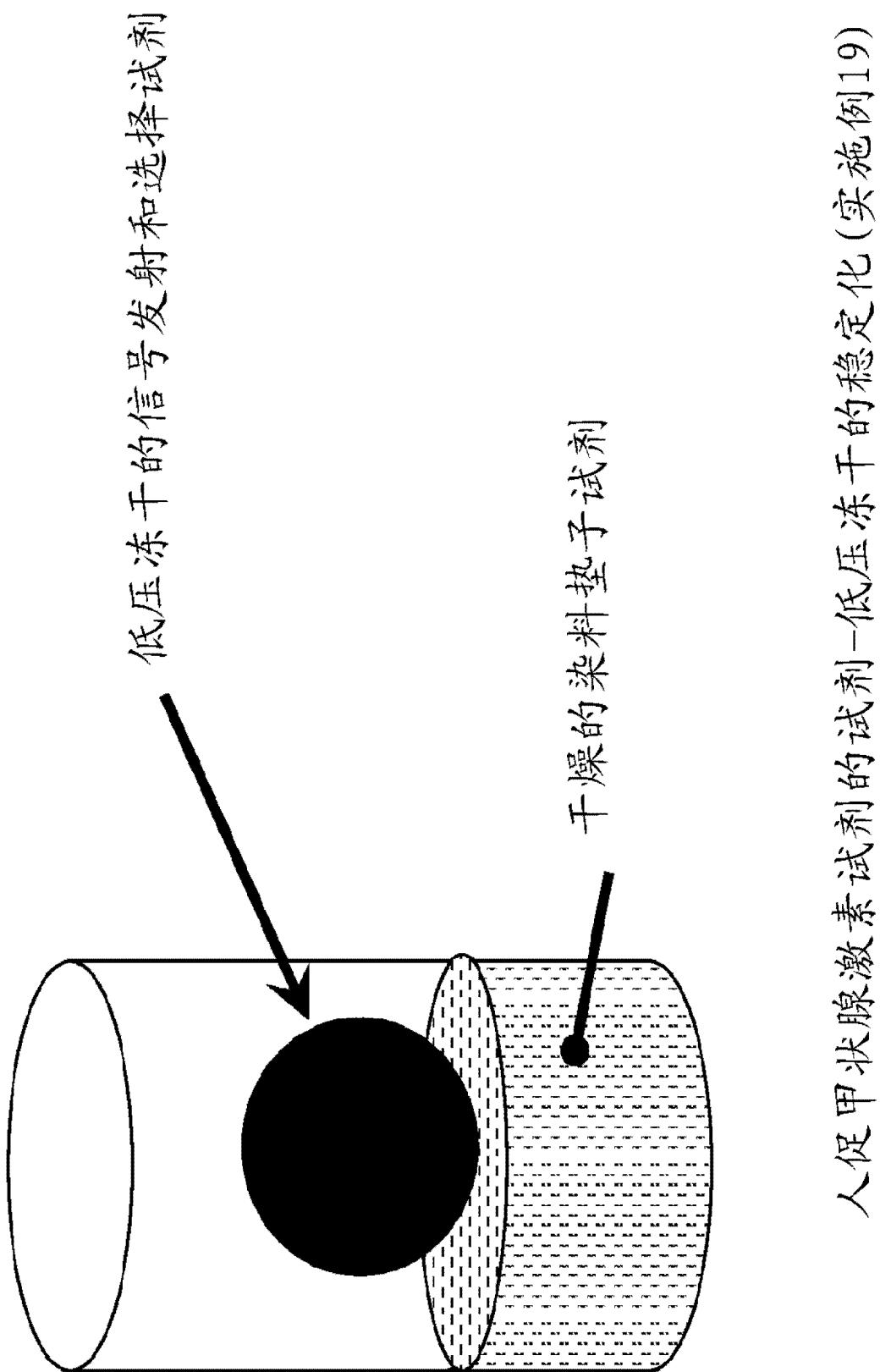
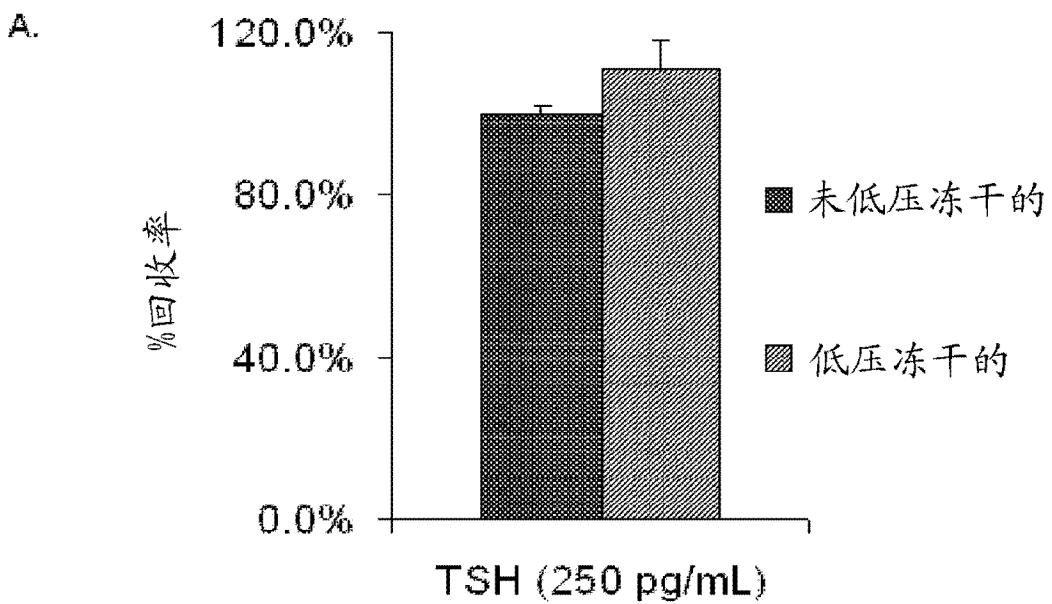
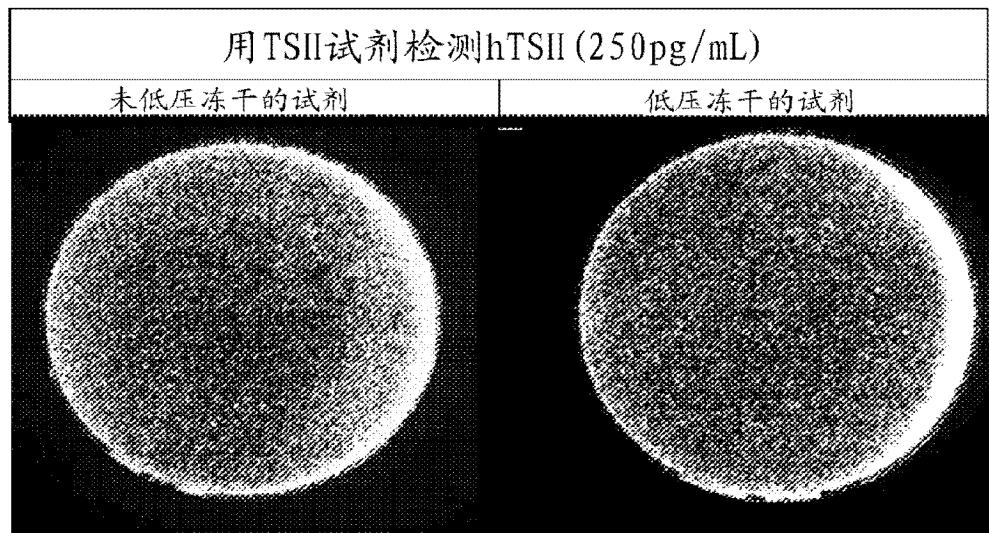


图 35



B.



使用低压冻干的试剂的人促甲状腺激素试验(实施例19)

图 36

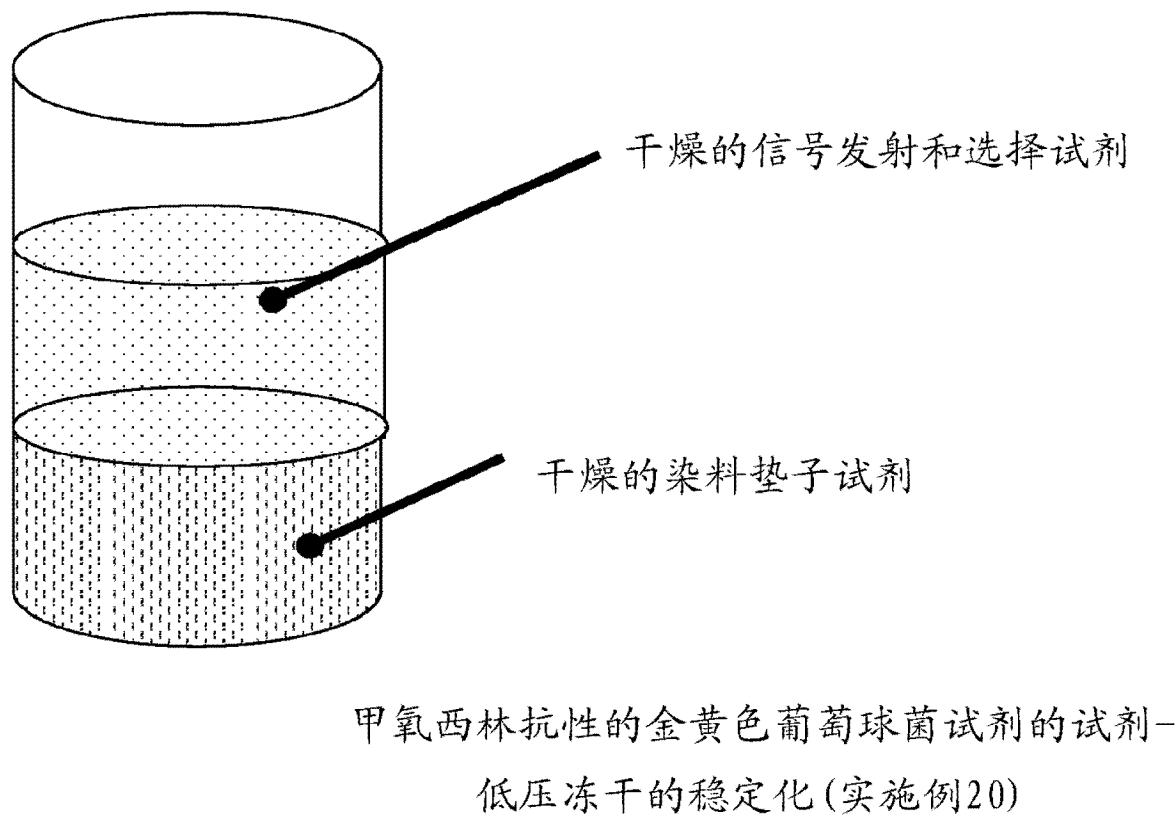
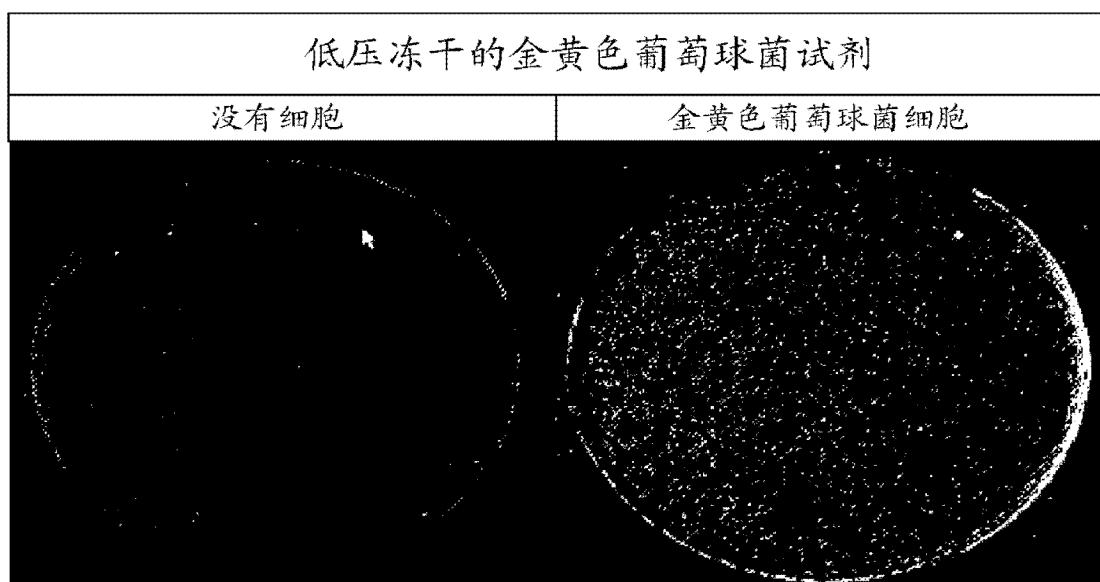
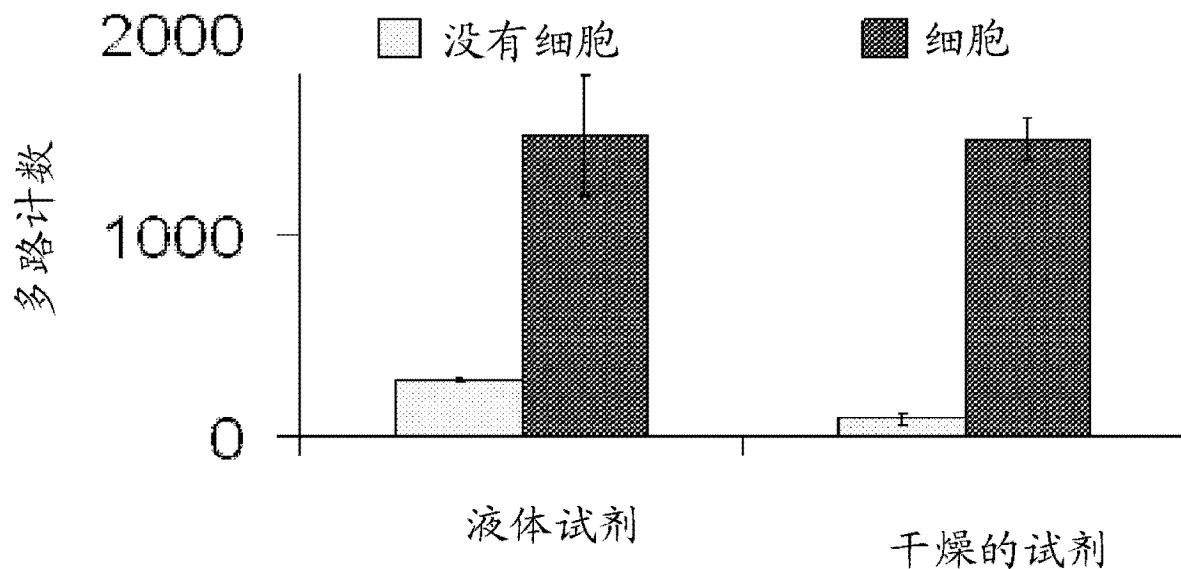


图 37

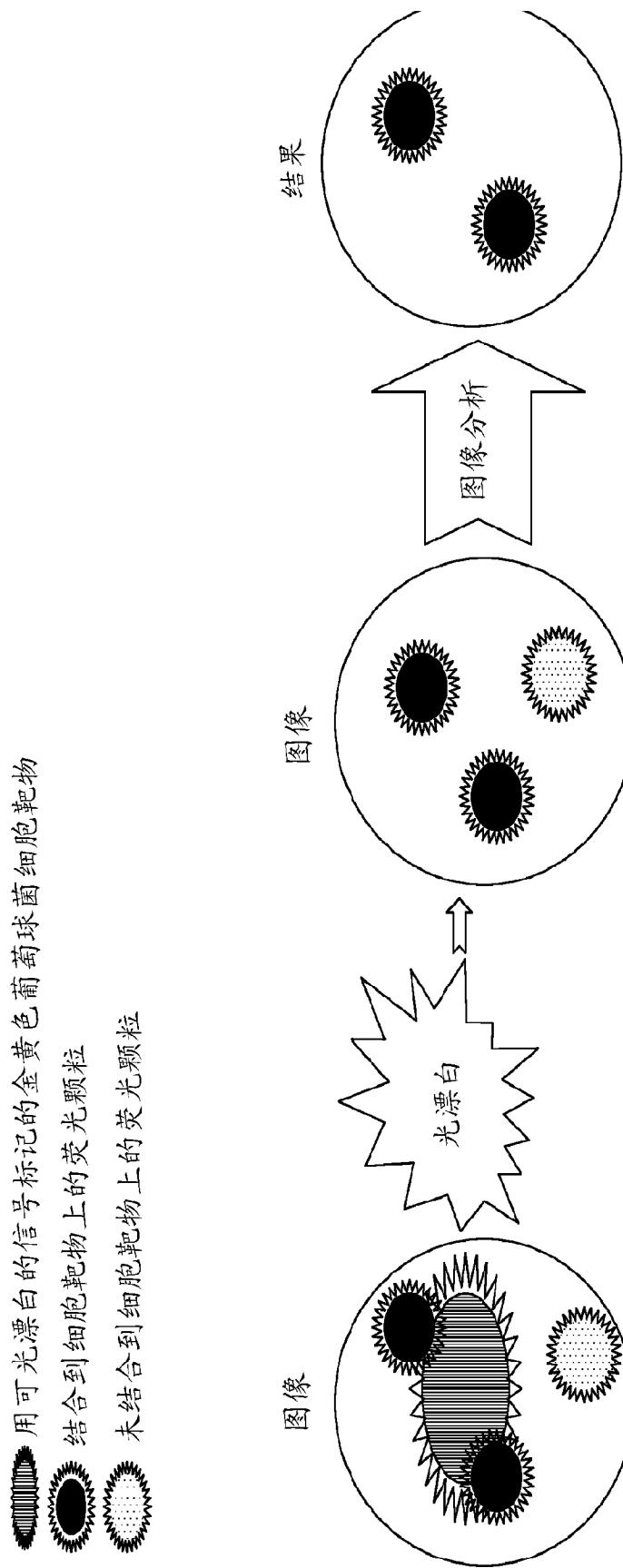


使用低压冻干的试剂的金黄色葡萄球菌试验(实施例20)

图 38



通过选择的络合物的移动，特异性地检测生物素（实施例21）



在使用光漂白的试验中，特异地检测金黄色葡萄球菌（实施例22）

图 40

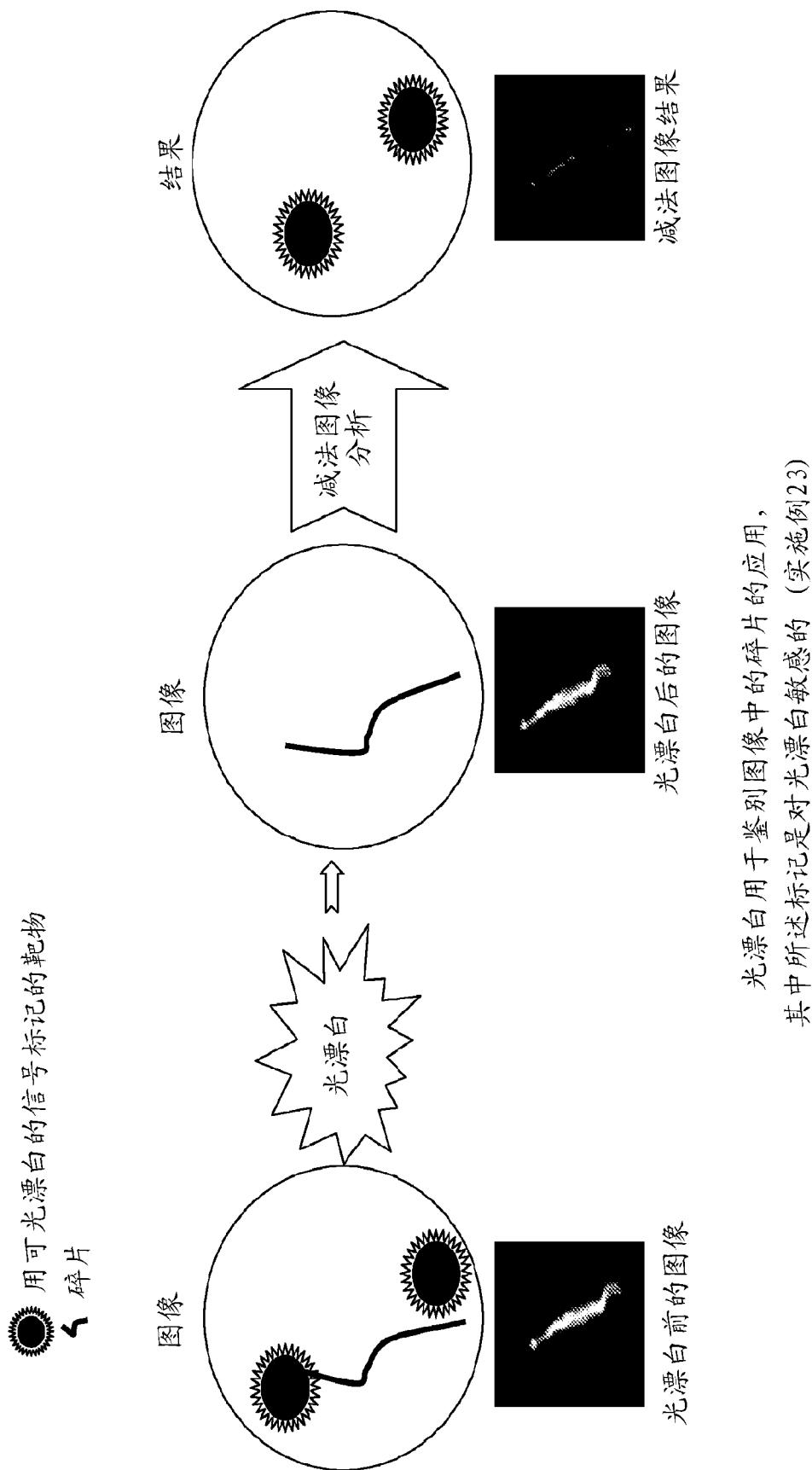
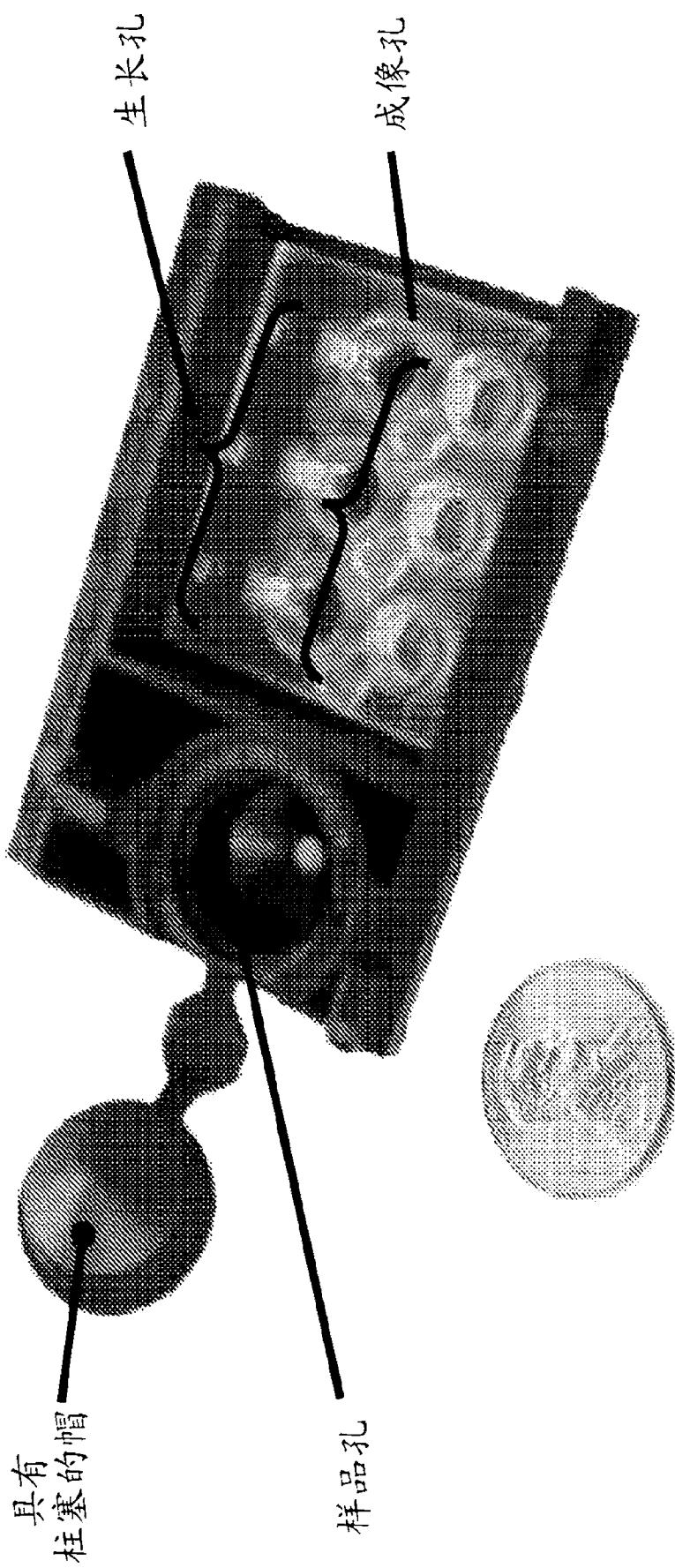
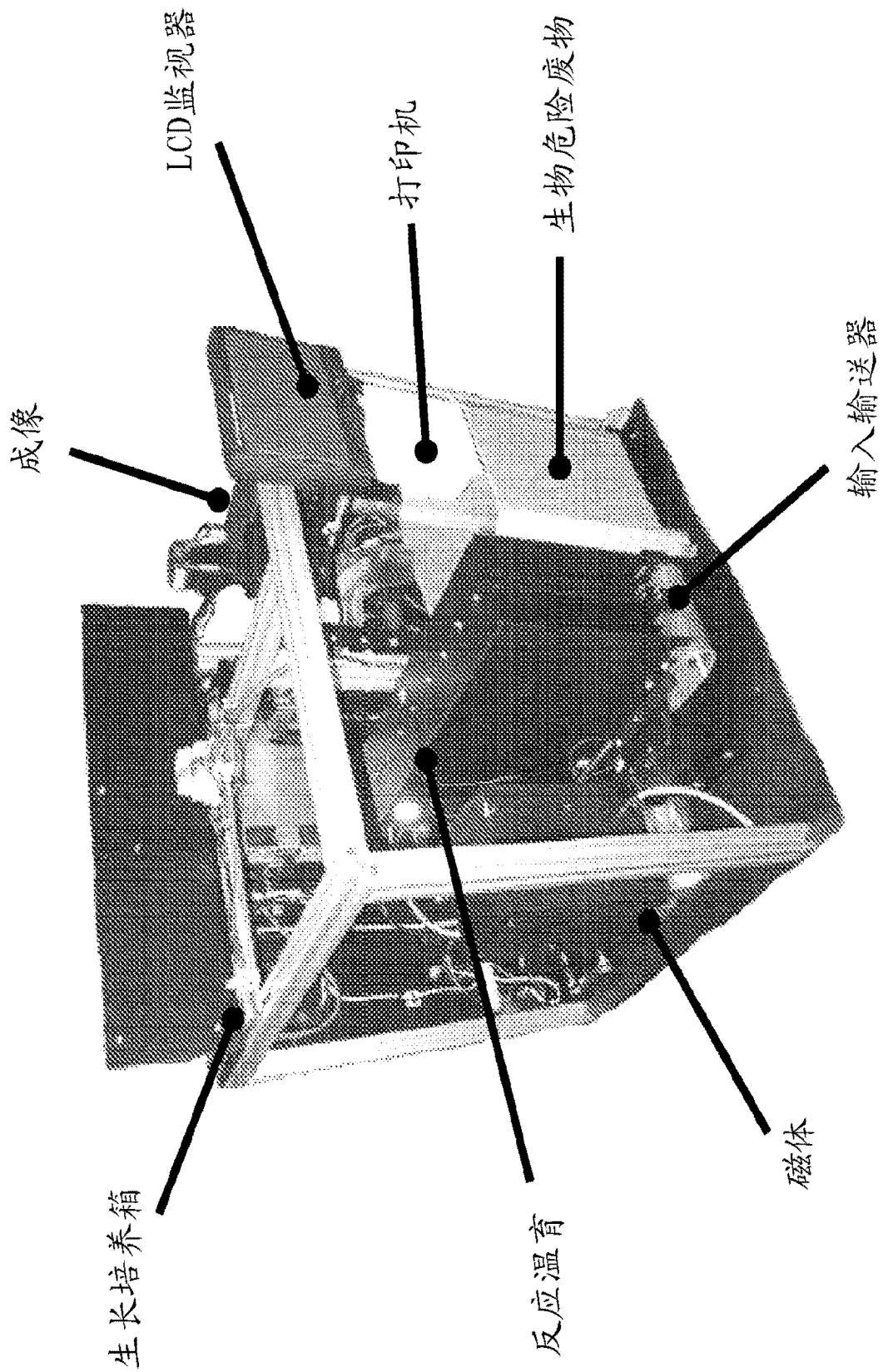


图 41



简实施方案(实施例9)

图 42



分析仪照片 (实施例14)

图 43

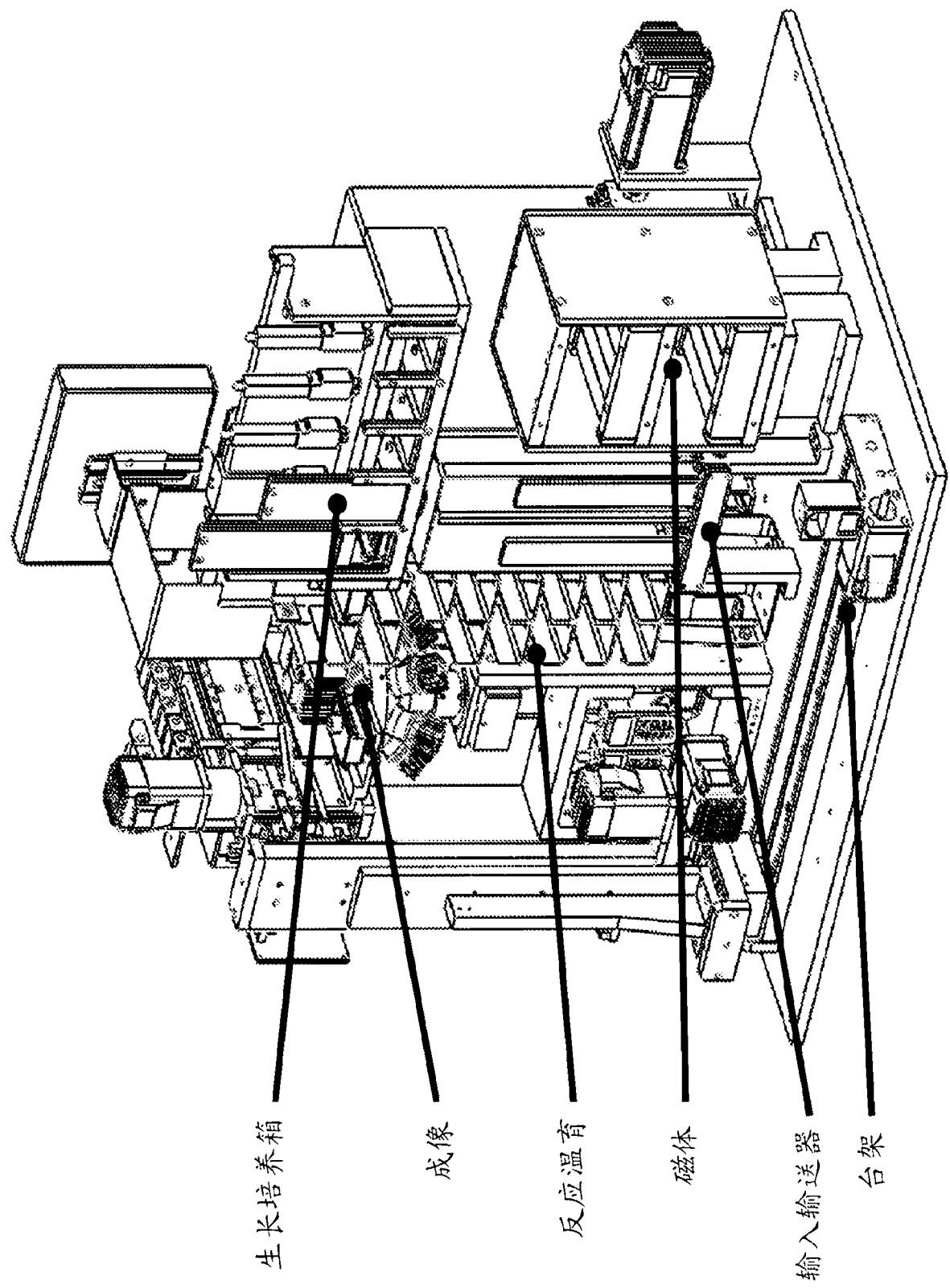
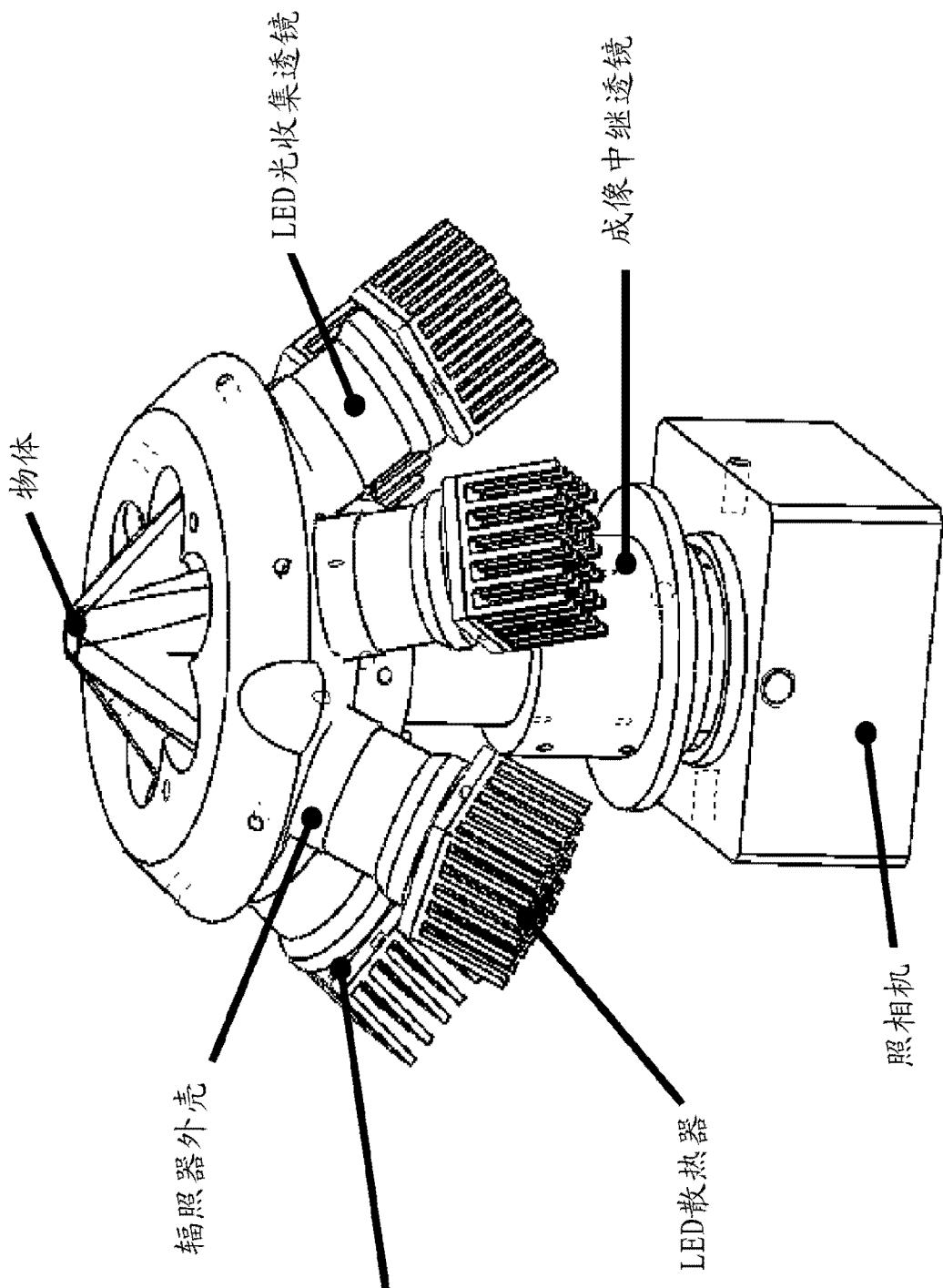
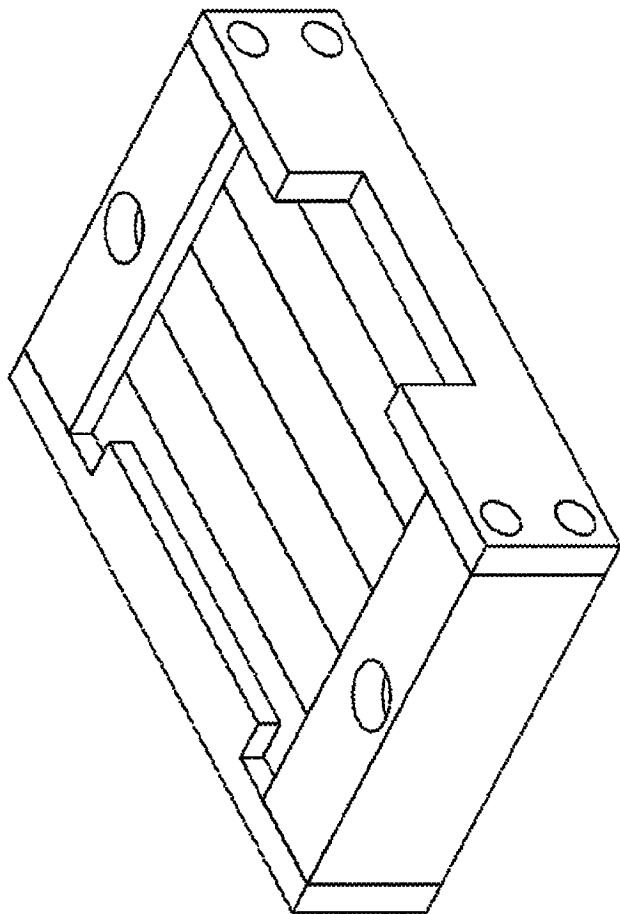


图 44



具有机器人的自动化分析仪的成像光学系统简图
(实施例1和实施例9)

图 45



条磁性组合装置（实施例2）

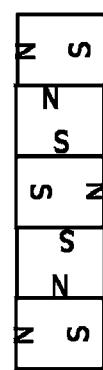
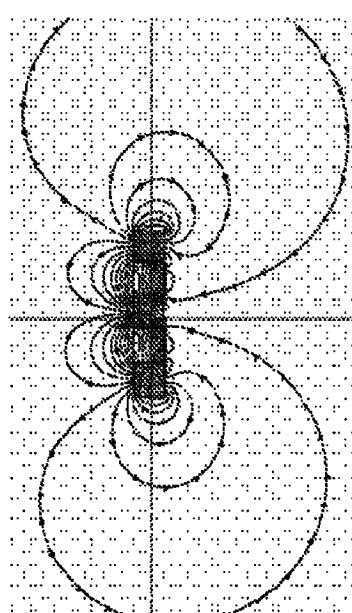
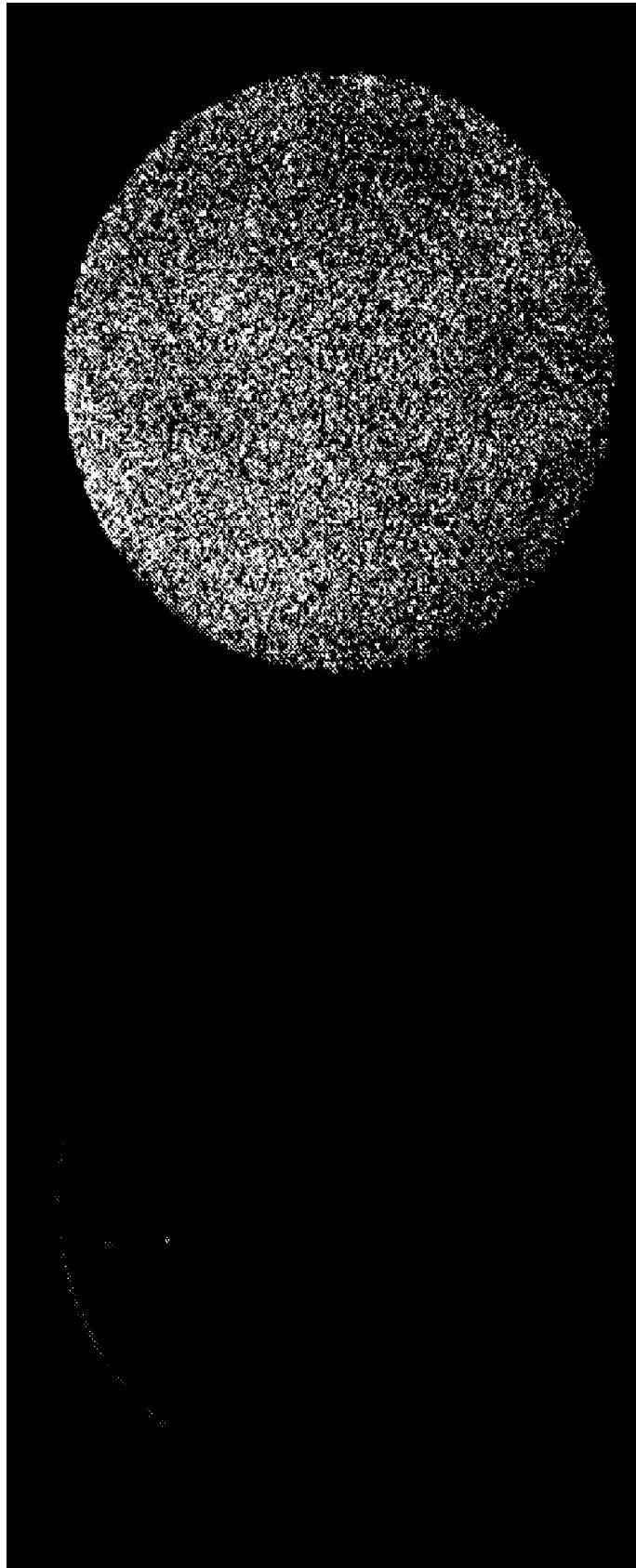


图 46

无金色葡萄球菌细胞
金色葡萄球菌细胞



在自动化分析仪上在含有染料垫子的筒中检测与磁性颗粒
结合的单个标记的金色葡萄球菌细胞