



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102576020 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 17

(21) 申请号 201080043001. 4
 (22) 申请日 2010. 09. 07
 (30) 优先权数据
 09171470. 9 2009. 09. 28 EP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2012. 03. 27
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/IB2010/054022 2010. 09. 07
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02011/036589 EN 2011. 03. 31
 (73) 专利权人 皇家飞利浦电子股份有限公司
 地址 荷兰艾恩德霍芬
 (72) 发明人 K·范奥明 J·J·H·B·施莱彭
 J·H·尼乌文赫伊斯
 (74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
 72002
 代理人 王英 刘炳胜
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/543 (2006. 01)
 (56) 对比文件
 EP 1616169 B1, 2009. 06. 24,
 CN 1813183 A, 2006. 08. 02,
 US 5843651 A, 1998. 12. 01,
 Kim van Ommering, et al..Electrostatic
 height modulation of bound particle labels
 by buffer exchange in an evanescent
 wave biosensor. 《Journal of Applied

Physics》.2010, 第108卷(第3期),
 D. M. Bruls, et al..Rapid integrated
 biosensor for multiplexed immunoassays
 based on actuated magnetic nanoparticles.
 《Lab on a Chip》.2009, 第9卷(第24期),
 Amber D. Wellman, et al..Multiplexed,
 Waveguide Approach to Magnetically Assisted
 Transport Evanescent Field Fluoroassays.
 《Anal. Chem. 》.2007, 第79卷(第17期),
 Kim van Ommering, et al..Confined
 Brownian motion of individual magnetic
 nanoparticles on a chip: Characterization
 of magnetic susceptibility.《APPLIED PHYSICS
 LETTERS》.2006, 第89卷(第14期),
 X. J. A. Janssen, et al..Controlled
 torque on superparamagnetic beads for
 functional biosensors. 《Biosensors and
 Bioelectronics》.2008, 第24卷(第7期),
 Kim van Ommering, et al..Analysis
 of individual magnetic particle motion
 near a chip surface. 《Journal of Applied
 Physics》.2009, 第105卷(第10期),
 Kim van Ommering, et al..Bond
 Characterization by Detection and
 Manipulation of Particle Mobility in an
 Optical Evanescent Field Biosensor.《Journal
 of Physics D: Applied Physics》.2010, 第43
 卷(第38期),

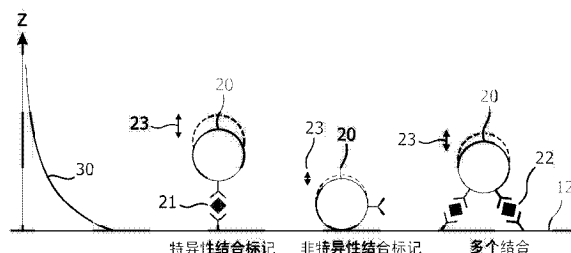
审查员 张绚

权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称
用于生物性结合的特性描述的方法

(57) 摘要
 本发明涉及利用光学渐逝场进行对与支撑物的表面结合的光散射标记的强度测量的领域。根据本发明,所述方法包括如下步骤:a) 提供测定物,所述测定物包括通过至少一种结合与支撑物的表面结合的至少一个光散射标记;b) 在所述标记与所述表面结合的同时测量光学渐逝场中的所

述标记的随时间的散射光强度的波动。根据本发明的方法允许识别不同的结合和/或区分不同的结合。



CN 102576020 B

1. 一种用于生物性结合的特性描述的方法,包括如下步骤:

a) 提供测定物,所述测定物包括通过至少一种结合与支撑物的表面结合的至少一个光散射标记;

b) 在所述标记与所述表面结合的同时测量光学渐逝场中的所述标记的随时间的散射光强度的波动,

其中,空间分辨地测量所述散射光强度以说明所述标记在所述表面的平面内的不同 xy 位置。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,用于测量所述标记的随时间的散射强度的时间帧为 ≥ 1 秒。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中,用于测量所述标记的随时间的散射强度的时间帧为 ≥ 20 秒。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,针对每个强度测量值的曝光时间为 ≤ 40 ms。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中,针对每个强度测量值的曝光时间为 ≤ 1 ms。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,使用 ≤ 75 nm 的空间分辨率。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中,使用 ≤ 15 nm 的空间分辨率。

8. 根据权利要求 1 至 6 中的一项所述的方法,其中,在步骤 b) 中所述至少一个标记被暂时朝向所述表面拉动和 / 或远离所述表面拉动和 / 或拉向与所述表面平行的不同方向。

9. 根据权利要求 1 至 6 中的一项所述的方法,其中,通过确定所述时间帧中的最大强度和最小强度之间的比率、通过确定所测量的强度值的标准偏差、通过做出所测量的强度值的柱状图并分析该柱状图的形状、和 / 或通过分析平均扩散系数或者傅里叶分析的功率谱来确定所述结合的结合活动性。

10. 根据权利要求 1 至 6 中的一项所述的方法,其中,所述标记是均匀的颗粒或者非均匀的颗粒。

11. 根据权利要求 1 至 6 中的一项所述的方法,其中,所述结合包括一个或多个生物分子。

12. 根据权利要求 1 至 6 中的一项所述的方法,其中,所述结合包括捕获抗体、靶标分子和链接物分子,所述抗体将所述靶标分子附接至所述支撑物的所述表面,所述链接物分子将所述标记附接至所述靶标分子。

13. 根据权利要求 1 至 6 中的一项所述的方法,其用于区分特异性结合和非特异性结合。

14. 根据权利要求 1 至 6 中的一项所述的方法,其用于区分通过单一结合与所述支撑物的所述表面结合的标记和通过多个结合与所述支撑物的所述表面结合的标记。

15. 根据权利要求 1 至 6 中的一项所述的方法,其用于测量至少一个结合的结合长度和 / 或结合柔性。

用于生物性结合的特性描述的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用光学渐逝场进行对与支撑物的表面结合的光散射标记 (label) 的强度测量的领域。

背景技术

[0002] 全内反射 (“TIR”) 或者全内反射显微镜方法 (“TIRM”) 在现有技术中是众所周知的。如果光以低于临界角 (的角度) 撞击第一介质和第二介质之间的界面, 并且后者具有比前者更小的折射率, 那么该光在第一介质之内被全反射。在这些情况下, 生成了电磁场, 即“渐逝场”。渐逝场穿透到光疏介质中。渐逝场的能量根据与界面的距离指数性地消散。参数“穿透深度”被定义为渐逝场的能量下降至其在界面处能量值的 $1/e$ 倍时所处的位置与界面的距离。

[0003] 光学渐逝场允许对穿透深度之内的对象进行光学检测。穿透深度是 100nm 的量级, 其值取决于入射的角度、光的波长以及第一和第二介质的折射率。

[0004] 用于在渐逝场之内检测对象的已知方法是使用能够被该场激发的荧光性对象。测量被激发对象的荧光。

[0005] 光散射对象也可以被用作检测对象。在渐逝场之内, 这些对象散射由渐逝场生成的光。可以利用照相机来监测该散射光。美国专利 No. 5599668 公开了一种用于实时测量在包括 DNA 阵列的支撑物的多个捕获位点上的光散射标记、即可检测对象的结合或融合的方法。根据这种方法, 在光学渐逝场的深度之内测量在这样的标记上被散射的光的强度。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种用于生物性结合的特性描述的方法。本发明的进一步目的在于提供这种方法的应用。

[0007] 这一目的通过根据权利要求 1 所述的方法来实现:

[0008] 结合特性例如是结合的长度、结合的柔性以及结合的活动性。在所述标记与所述表面结合的同时测量散射光强度随时间的波动, 并分析所测量的强度值, 允许对所述参数, 以及因此对结合的类型, 得出结论。根据本发明的方法允许识别不同的结合和 / 或区分不同的结合。

[0009] 在本发明的一个应用中, 所述方法用于区分特异性结合和非特异性结合。

[0010] 在本发明的另一应用中, 所述方法用于区分通过单一结合与支撑物的表面结合的标记和通过多个结合与支撑物的表面结合的标记。

[0011] 两种应用都能够有利地用于生物传感器, 其中, 测定物中的非特异性结合和 / 或多个结合通常限制了该生物传感器的灵敏度。根据本发明的方法允许区分特异性结合、非特异性结合和多个结合, 这允许改善该生物传感器的灵敏度。

[0012] 此外, 该方法能够用于区分两个不同的特异性结合和 / 或用于测量至少一个结合的结合长度和 / 或结合柔性。

[0013] 优选的是用于测量该标记的随时间的散射强度的时间帧为 ≥ 1 秒,优选 ≥ 20 秒。这种时间帧允许该标记处于在其布置(尤其是其相对于支撑物的表面的最小高度和最大高度)处的几乎所有位置。

[0014] 此外,优选的是利用 $\leq 40\text{ms}$,优选 $\leq 1\text{ms}$ 的曝光时间来完成每个强度测量。这种曝光时间允许测量标记的精确位置而不是归因于该曝光时间之内的移动的平均位置。

[0015] 根据本发明的优选实施例,空间分辨地测量散射光强度以说明标记在支撑物的表面的平面内的不同 xy 位置。对散射强度随时间的空间分辨地测量给出了能够用于描述结合的特性的额外信息。 $\leq 75\text{nm}$,优选 $\leq 15\text{nm}$ 的空间分辨率是优选的。

[0016] 根据本发明的另一优选实施例,在步骤 b) 中,至少一个标记被暂时地朝向表面拉动和/或远离所述表面拉动和/或拉向与所述表面平行的不同方向。将该标记拉向不同方向并在这些条件下测量散射强度能够给出关于结合的进一步信息。如果标记是例如磁性的,则能够利用磁体来实现将该标记拉向不同的方向。其他类型的致动也是可能的。

[0017] 根据本发明的另一优选实施例,该标记可以是均匀的或者非均匀的颗粒。

[0018] 归因于其非均匀性,非均匀标记能够导致进一步的强度波动,例如当结合的颗粒倾斜或者绕其中心旋转时。因此,在非均匀标记的情况下,不仅高度而且其他参数都影响强度。影响的程度还取决于结合的类型。这种依赖关系能够用于获得进一步的信息,并且因此,提高了检测灵敏度。此外,对于非均匀标记,还能够使用外部力将标记拉向不同的方向以获得关于结合的进一步信息。

[0019] 根据本发明的另一优选实施例,通过确定时间帧中的最大和最小强度之间的比率、通过确定所测量的强度值的标准偏差、通过做出所测量的强度值的柱状图并分析其形状、和/或通过分析平均扩散系数或者傅里叶分析的功率谱来确定结合的活动的活动性。

[0020] 根据优选实施例,所述结合包括一个或多个生物分子。

[0021] 如在本文中所使用的,术语“生物分子”涉及以这样的方式构造从而使其允许结合至支撑物以及靶标,以便于结合的形成的结构。这样的生物分子的范例是核酸、寡核苷酸、氨基酸、单糖、蛋白质、多糖和半抗原,例如,抗体或者外源凝集素,其能够结合诸如 DNA 序列、抗体或者抗原、或者酶的分子结构。此外,该术语还涉及普通的交联剂(linking agent),因为它们用于亲合色谱法、免疫组织化学法以及蛋白质-标签,这样的制剂的范例包括配体-受体相互作用、生物素和抗生物素蛋白(抗生物素蛋白)以及 GST- 标签。

[0022] 在特别优选的实施例中,所述结合包括捕获实体-在此为与表面结合的抗体-靶标分子和链接物。因而该抗体结合靶标分子并且链接物将标记附接至靶标分子,从而经由所形成的结合将所述标记连接至表面。

[0023] 特别的,该链接物可以是制备的测定物的一部分。标记加上链接物能够捕获在流体之内的靶标分子并将其带至试剂盒(cartridge)表面,将该靶标分子结合至该试剂盒表面上的抗体。

附图说明

[0024] 参照下文所描述的实施例,本发明的这些方面和其他方面将变得显而易见并得以阐述。

[0025] 在附图中:

[0026] 图 1 是用于生成光学渐逝场以及用于测量在该渐逝场中对象的散射光强度的波动的装置的示意图；

[0027] 图 2 是以三种不同方式：第一，通过单一结合，第二，无结合，以及第三，利用多个结合，与支撑物的表面结合的标记的示意图；

[0028] 图 3 是未在其上施加力和在其上施加力的特异性结合标记以及未在其上施加力和在其上施加力的非特异性结合标记的示意图；

[0029] 图 4 是显示针对特异性结合标记测量到的随时间的散射光强度的曲线图；

[0030] 图 5 是显示针对非特异性结合标记测量到的随时间的散射光强度的曲线图；

[0031] 图 6 是显示在暂时施加磁场的同时针对结合标记测量到的随时间的散射光强度的曲线图；

[0032] 图 7 示出了三个曲线图，其显示在暂时施加磁场的同时针对特异性结合标记测量到的随时间的标记的 x 位置和 y 位置以及散射光强度；

[0033] 图 8 是显示针对通过包括 DNA 的结合与支撑物的表面结合的标记测量到的随时间的散射光强度的曲线图；

[0034] 图 9 是显示所测量的强度的最大比率对比若干强度测量的 DNA 长度的曲线图，该若干强度测量针对一系列由不同长度 DNA 与支撑物的表面结合的相似标记；以及

[0035] 图 10-13 示出了图 9 中所示的四个标记的范例的最大高度和平均高度的若干 xy 绘图。

具体实施方式

[0036] 与支撑物的表面结合的标记的平均高度的变化以及具有不同的结合的标记的高度的活动性的变化预期为 1-100nm 的量级，并且因此是非常小的。如果这些类型的位移例如要通过显微镜检测，那么具有高光学分辨率是有利的。此外，在测定应用中，例如对于生物传感器，特别在生物传感器的灵敏度是一大挑战的较低浓度下，有利的是观察相当大的表面区域（通常 $> 0.1\text{mm}^2$ ）以具有足够数量的标记来获得可接受的统计结果。

[0037] 渐逝场的穿透深度通常在 20-200nm 的范围，这使其非常适于测量小位移。离开表面（z 方向）移动大于穿透深度的标记将从最大散射光变为几乎无散射光，这能够使用照相机非常精确地检测到。例如，在普通 CCD 照相机（255 灰度值）和大约 100nm 的穿透深度的情况下，能够合理地预期到低于几纳米的分辨率。

[0038] 此外，对平面内光学分辨率（x-y）的要求是不受影响的。当使用较低的浓度时，如在灵敏生物传感器测量中，标记表面密度通常十分小，例如为 1 标记 / $100\ \mu\text{m}^2$ ，其等价于 $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ 的区域。仅需要每标记一个像素，从而所要求的成像系统的平面内分辨率仅需要达到 $5\ \mu\text{m}$ ，并且仍然能够检测到小于 100nm 的垂直位移。

[0039] 图 1 示出了用于生成光学渐逝场以及用于测量该渐逝场中标记的散射光强度的装置的示意图。

[0040] 所述装置包括光源 1、试剂盒 2、光学系统 3 和照相机 4。

[0041] 试剂盒 2 包括支撑物 5、两个间隔件 6 和盖板 7。支撑物 5、间隔件 6 和盖板 7 形成被填充了流体的腔 8。支撑物 5 和盖板 7 对于由光源 1 发出的光的波长是透明的。

[0042] 支撑物 5 的折射率大于腔 8 内部流体的折射率。由光源 1 发出的光 10 耦合至试

剂盒 5 中并被导向至流体和支撑物 5 之间的界面 11 上。光 10 撞击界面 11 的入射角 θ 小于临界角,因而光 10 在界面 11 上被全反射,生成穿透腔 8 内部的流体的光学渐逝场。

[0043] 在该渐逝场的范围之内的流体内部的光散射标记将散射该渐逝场的光。散射光强度取决于该标记与界面 11 的距离。

[0044] 可以利用照相机 4 来检测散射光。在此象征性地显示为简单透镜的光学系统 3 将散射光聚焦到照相机 4 上。光学系统 3 能够包括多个光学部件。

[0045] 为了测量散射光,光学系统 3 和照相机 4 的不同布置是可能的。例如,光学系统 3 和照相机 4 能够被定位在试剂盒 2 之上或者试剂盒 2 之下。在这种情况下,由照相机 4 检测到的信号强度将针对光散射标记从表面离开的垂直位移从最大亮度变为几乎完全黑暗。此外,光学系统 3 和照相机 4 能够被定位在反射光 10 的光学路径上。信号强度将针对标记距表面的垂直位移从减小的到最大亮度。

[0046] 渐逝场的穿透深度被定义为:

$$[0047] \quad P_d = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}},$$

[0048] 其中, n_1 是支撑物 5 的折射率, n_2 是流体的折射率,能够通过改变光的波长 λ 或者光束 10 的入射角 θ 来调整该穿透深度。这允许在具有有限位移分辨率的大范围位移检测(高穿透深度)和具有高位移分辨率的小范围位移检测(低穿透深度)之间进行选择。通过使用例如两个不同波长或者两个不同入射角以及在检测光学系统处进行过滤,人们可以将这两种机制相结合。

[0049] 所描述的装置能够用于执行在以下段落中所描述的方法。然而,对于这一目的也可以使用现有技术中已知的备选装置。

[0050] 在标记上被散射的光的光强度取决于该标记距支撑物的表面的距离。如果标记通过结合与表面结合,结合标记与该表面的距离取决于结合的类型。因此,散射光的强度允许针对结合的类型得出结论。

[0051] 图 2 是以三种不同方式:第一,通过单一结合 21,第二,无结合,以及第三,利用多个结合 22,与支撑物 5 的表面 12 结合的标记 20 的示意图。利用曲线图 30 示出了渐逝场在与表面 12 垂直的方向(z 方向)上的强度降低。

[0052] 在渐逝场中标记 20 的散射光强度将取决于标记 20 与表面的距离。如从图 2 可以看出的,标记 20 的高度将针对不同的结合类型,例如特异性(单一结合 21)对比非特异性(无结合),或者单一结合 21 对比多个结合 22,而变化。对于特异性结合标记 20,预期“标准”的高度,对于非特异性结合标记 20(无结合)和通过多个结合 22 结合的标记 20,预期减小的高度。

[0053] 同样地,标记 20 的高度的活动性程度将针对不同的结合而变化。预期通过单一结合 21 与表面 12 结合的标记 20 的活动性大于与表面 12 非特异性结合的标记 20,或者通过多个结合 22 与表面 12 结合的标记 20。归因于布朗(Brownian)运动的热垂直活动性以箭头 23 显示。

[0054] 对于均匀的标记,如聚苯乙烯珠子,已知除了在表面附近的微小偏差,散射光强度由于标记和表面之间的距离增大而以与渐逝场相同的指数函数减小。然而,其他因素也可能贡献于标记的散射光强度,诸如吸收、散射不均匀性、颗粒粗糙度和旋转扩散,其可能导

致标记的高度和散射强度之间的不同关系。

[0055] 图 3 是未在其上施加力和在其上施加力的特异性结合标记 20, 以及未在其上施加力和在其上施加力的非特异性结合标记 20 的示意图。

[0056] 标记 20 的高度和其高度的活动性也可以受外力 (诸如流体力或者静电力) 的影响。这为区分不同的结合类型增加了额外的因素, 因为如图 3 所示, 对该力的响应的程度也将针对不同的结合类型而变化。

[0057] 在特异性结合标记 20 的情况下, 如果对标记 20 施加向上的力 F_1 , 那么结合 21 被拉伸, 增大了标记 20 的高度并减小了标记 20 的活动性。如果施加侧向力 F_2 , 那么标记 20 被拉向表面 12, 减小了标记 20 的高度并增大了标记 20 的活动性。在非特异性结合标记 20 的情况下, 如果对标记 20 施加向上的力 F_1 或者侧向力 F_2 , 那么预期标记的高度和活动性仅有极小的变化。

[0058] 当使用磁性标记时, 外部力的施加是很简单并且可控的, 因为这可以通过磁性完成。这允许例如为了更好的统计结果的力调节。

[0059] 为了获得好的位移分辨率, 也需要好的时间分辨率。如果成像系统能够检测标记的几纳米的位移, 那么应当选择成像的时间 (曝光时间), 使得标记不会移动大于几纳米。

[0060] 对于 500nm 的标记在溶液中自由扩散的典型值是 $1 \mu s$ 扩散 1nm, 或者 1ms 扩散 30nm。然而, 在表面附近的流体阻滞力能够将扩散降低 10 倍。然后 500nm 的颗粒在 1ms 中扩散 5nm。最后, 结合标记被结合限制了移动, 这将愈加降低其典型的“速度”, 放宽了对曝光时间的要求。为了获得 500nm 颗粒的 1nm 分辨率而估计的优选曝光时间是 1ms 的最大曝光时间。

[0061] 当选择比典型扩散时间更长的曝光时间时, 由于颗粒移动的强度波动将逐渐地达到平衡, 并且强度分布的极端将会失真。然而, 当将所测量的标记的强度信号与等效曝光时间相比较时, 在这些分布中将仍然存在信息。

[0062] 最后, 应当注意的是, 即使当选择短的曝光时间时, 也不必使用先进的高帧速率照相机, 因为能够频闪观测地采样布朗运动, 例如在每秒 30 帧时具有每帧 1ms 的曝光时间。

[0063] 图 4 到 7 示出了显示针对特异性结合标记 (图 4、6 和 7) 以及非特异性结合标记 (图 5) 测量的随时间的散射光强度的不同曲线图。

[0064] 对于这些测量, 参见图 1, 将典型的聚苯乙烯标准试剂盒的底部部分用作支撑物 5, 为了更好的可见性具有由玻璃制成的覆盖板 7。电磁体 (图 1 中未示出) 安装在这一试剂盒 2 之下以将标记朝着支撑物 5 的表面 12 拉动。通过来自顶部的显微镜 3 和 CCD-照相机 4 检测来自标记的散射光。光源 1 是 50mW 激光器, 具有 658nm 的波长, 被聚焦在界面 11 的大约 $200 \times 200 \mu m$ 的斑上, 以针对低曝光时间 ($\sim 1ms$) 的测量获得高光强度, 从而精确地测量归因于布朗运动的标记波动。

[0065] 在这一实施例中, 靶标是 99nm 长的双链 DNA 分子, 其一端结合至德克萨斯红 (TexasRed) 并且另一端结合至生物素。此外, 在这一实施例中, 光散射标记是具有大约 500nm 直径的超顺磁性珠子, 其被包覆着链接物分子, 在此是抗生蛋白链菌素。因而 DNA 的德克萨斯红结合端将结合至表面 12 上的抗德克萨斯红抗体, 同时 DNA 的生物素结合端将结合至超顺磁性珠子的抗生蛋白链菌素包覆层。通过这种方式, 抗体、靶标和链接物形成结合, 其将标记与表面连接。在这种情况下, 超顺磁性珠子是包括在聚苯乙烯矩阵内部的数千

个 5-10nm 的氧化铁颗粒的非均匀的颗粒。归因于小细粒尺寸,该氧化铁变为超顺磁性,因而在没有磁场时该颗粒不具有磁矩,并且在磁场中时在该颗粒中感生出磁矩。

[0066] 在下一步骤中,在标记与表面 12 结合的同时以及在该标记处在光学渐逝场之内的同时测量一个或多个这样的标记的随时间的散射光强度。

[0067] 图 4 示出了针对通过包括 99nm 的 DNA 的结合与表面结合的一个标记的根据帧数量的散射光强度的曲线图。在这一实施例中,帧数量是每秒 120 帧 (fps),曝光时间是 0.96ms。渐逝场的穿透深度是 90nm。

[0068] 图 4 示出了针对结合标记的典型强度数据集。强度的波动能够被清楚地观察到并且其能够升至 5 倍。如果散射强度将指数地随着珠子高度而衰减,人们计算出 145nm 的高度变化,这对于 99nm 的 DNA 是不太可能的。显然,其他因素也影响着散射强度,例如珠子的不均匀度。从 SEM(扫描电子显微镜)图可知,这种标记是很粗糙的。

[0069] 图 5 示出了针对与表面非特异性结合(无结合)的一个标记的根据帧数量的散射光强度(120fps,曝光时间 0.96ms)的曲线图。

[0070] 在这种情况下,强度波动的最大为 14%,这与如图 4 所示的与 DNA 结合的珠子是明显不同的(> 10 倍的差异)。此外,这一珠子示出为在这一成像系统的横向分辨率之内(15nm)在平面中(xy 位置)无移动。与 99nm 的 DNA 结合的其他珠子示出为在 30-200nm 之间的横向移动。

[0071] 应当注意的是,归因于其尺寸分布,不同的 500nm 的珠子的平均散射强度在珠子之间具有变化的数量级。

[0072] 图 6 示出了针对与表面特异性结合的一个标记的根据帧数量的散射光强度(120fps,曝光时间 0.96ms)的曲线图。通过对标记施加力,在这种情况下通过施加磁场,将该标记暂时拉向表面 12。

[0073] 如图 6 所示,在磁性致动下平均强度随着珠子被朝向表面拉动而增加。强度的波动减小,因为珠子被磁性限制在其高度。

[0074] 备选地或者另外,对标记施加的力可以具有不同的方向,例如侧向或者向上的方向。

[0075] 图 7 示出了三个曲线图,其显示了在暂时施加磁场的同时针对特异性结合标记测量到的标记随时间的 x 和 y 位置以及随时间的散射光强度。空间分辨率是 1 像素/150nm 并具有 15nm 的子像素分辨率。

[0076] 如图 7 中可见的,结合珠子示出了在磁性致动时降低的平均强度和增加的平均强度两者,其取决于在表面上的“着陆”位置。这指示珠子的不均匀度扮演了重要角色。独立于平均强度的行为,强度波动在磁性致动时是一直降低的。

[0077] 图 8 是显示了针对通过结合与支撑物的表面结合的标记另一测量的随时间的散射光强度的曲线图。

[0078] 用于测量珠子的散射光强度的方法原则上与以上描述的是相同的。然而,在这一实施例中,标记是均匀的聚苯乙烯珠子。将珠子附接至表面 12 的结合包括具有 99nm 的长度的 DNA。如果假设散射强度随着珠子高度指数性降低,人们计算出珠子的 82nm 的高度变化。

[0079] 图 9 示出了显示所测量强度的最大比率对比若干强度测量的 DNA 长度的曲线图,

该若干强度测量针对通过结合与支撑物 5 的表面 12 结合的一系列同样的标记。每个标记是均匀的聚苯乙烯珠子。每个结合包括具有特定长度的 DNA。在这种情况下,使用了四种不同长度的 DNA,即 36nm、48nm、99nm 和 201nm。图 9 因而示出了 4 个可区分的数据集,在每个数据集中有 11-17 个被测量的标记。通过强度波动的最大值和最小值来确定强度的最大比率。已经如以上描述执行了该测量。

[0080] 如图 9 所示,对于聚苯乙烯珠子,在 90nm 的场深度(其也是计算出的值)和 15nm 的额外结合长度的情况下,所测量的最大强度波动确实在从渐逝场深度所预期的值处为最大值。该额外结合长度可能是归因于抗体和链接物分子而造成的。

[0081] 图 10 到 13 示出了图 9 的四个标记的最大高度和平均高度的若干 xy 绘图。一个 x 像素或者 y 像素等于 150nm 距离并具有 15nm 的子像素分辨率。

[0082] 在图 10 中,绘图 30a 显示了从针对具有 201nm 的 DNA 长度的标记的强度测量确定的最大高度与标记的 x 和 y 位置的依赖关系,绘图 30b 显示了从针对具有 201nm 的 DNA 长度的标记的强度测量确定的平均高度与标记的 x 和 y 位置的依赖关系。最大高度是这样确定的:采用为某种方形的 x、y 位置(例如 0.2×0.2 像素),然后选择其位置落在这一正方形之内的所有数据点,并且最后确定在这一选定全体之内的最大高度。平均高度是这样确定的:采用同一方形的 x、y 位置,选定相同的数据点,并且然后确定在这一选定全体之内数据点的平均高度。

[0083] 类似的,图 11 中示出的绘图 31a 和 31b 分别显示了从针对具有 99nm 的 DNA 长度的标记的测量确定的 xy 依赖的最大高度和平均高度,图 12 中示出的绘图 32a 和 32b 分别显示了从针对具有 48nm 的 DNA 长度的标记的测量确定的 xy 依赖的最大高度和平均高度,以及图 13 中示出的绘图 33a 和 33b 分别显示了从针对具有 36nm 的 DNA 长度的标记的测量确定的 xy 依赖的最大高度和平均高度。

[0084] 在图 10 中所示的绘图中可以看出一个事实是,标记的活动性是越来越受限制的,即,当减小 DNA(即,结合)的长度时,最大高度的位移减小。

[0085] 从图 10 可以看出的另一事实是,随着 DNA 长度减少,平均高度开始更加接近地类似于最大高度,这意味分子是更不易活动的,并且因此在拉伸位置花费更多时间。

[0086] 如测量中所示的,具有不同特性的结合导致不同的测量结果。因此,根据本发明的方法允许表征结合或者区分不同的结合。

[0087] 当针对单个标记测量对比时间的强度信号时,人们能够在特定时间帧中计算最大和最小强度(如图 4 和 5 中所做的)。在这两个强度值之间的比率给出了关于标记的活动性程度的信息,以及因此关于结合类型的信息。

[0088] 另一种可能性是确定所测量的强度信号的标准偏差,这给出了活动性的平均波动程度以及其因而也是结合类型的特性描述。

[0089] 同样地,可以做出所测量的强度值的柱状图(histogram)。这给出了消除归因于噪声的稀有事件或者偏离值的机会,以及分析柱状图形状的机会。柱状图的形状将取决于在位置空间中的标记的状态密度(标记最远离表面的时间量将与标记更接近表面的时间量不同),并且因而也将给出关于结合类型的信息。

[0090] 当磁性致动用于将珠子朝向或者远离表面拉动时,参见图 6 和 7,可以对致动状态中的强度数据应用相同的分析(例如,分析比率最大/最小强度,分析标准偏差以及分析柱

状图),并且能够将所有的值与非致动状态相比较,导致关于结合类型的额外信息。

[0091] 在高位置分辨率结合单标记强度测量的情况下,也可以组合位置和强度数据两者,如图 10 所做的。诸如根据位置的最大强度、根据位置的平均强度以及根据位置的标准偏差的参数,给出了关于位置空间中标记的状态的密度的额外信息,以及因此关于结合类型的额外信息,尤其例如是关于结合长度和结合柔性的额外信息。

[0092] 人们还能够使用所测量的强度信号中的时间动态信息来分析系统的动力学,例如通过分析平均扩散系数或者傅里叶分析的功率谱,给出了关于结合活动性的额外信息。

[0093] 最后,当在所测量的强度信号中不仅涉及颗粒高度并且也涉及颗粒性质(形状、粗糙度)时(这对于我们已经示出的某些磁性颗粒类型而言情况确实如此),其能够用于获得更多的信息。如果仅考虑标记高度,高于预期的波动实际上能够提高检测灵敏度。可以改良智能致动方案,诸如将结合珠子拉向不同的方向,以及分析其采样的不同状态。更大的结合活动性将导致可能采样状态的更大变化,并且因而不同的测量信号是针对结合活动性的度量。

[0094] 根据本发明的方法能够应用于诸多应用中。

[0095] 在一个实施例中,该方法用于生物传感器以区分特异性结合和非特异性结合,因而增强了检测灵敏度并且改善了生物传感器的检测限制。

[0096] 在另一实施例中,该方法用于检测单一结合或者多个结合的存在,给出了对靶标浓度和检测到的标记数量之间关系的更好理解。

[0097] 最后,本发明用于不仅能够检测靶标分子存在,而且还能够给出关于该分子的信息的功能性生物传感器,所述分子信息例如是结合长度或者结合柔性或者分子状态的改变。例如,该方法能够用于获得关于受外部环境(例如盐浓度)的影响的 DNA 持续长度的信息,以检测蛋白质的折叠和展开,和/或检测改变靶标分子状态的对结合靶标分子的酶反应。

[0098] 虽然已经在附图和前述描述中详细图示和描述了本发明,但是这种图示和描述应当被认为是说明性或者示例性的,而不是限制性的;本发明不限于所公开的实施例。本领域技术人员在实行所要求的发明时,通过对附图、公开内容和权利要求的研究,可以理解和实现对所公开实施例的变型。在权利要求中,词汇“包括”不排除其他元件或步骤,并且不定冠词“一”或“一个”不排除多个。在相互不同的从属权利要求中陈述某些措施的这一仅有事实,并不表示不能有利地使用这些措施的组合。权利要求中的任何附图标记不应被解释为对范围构成限制。

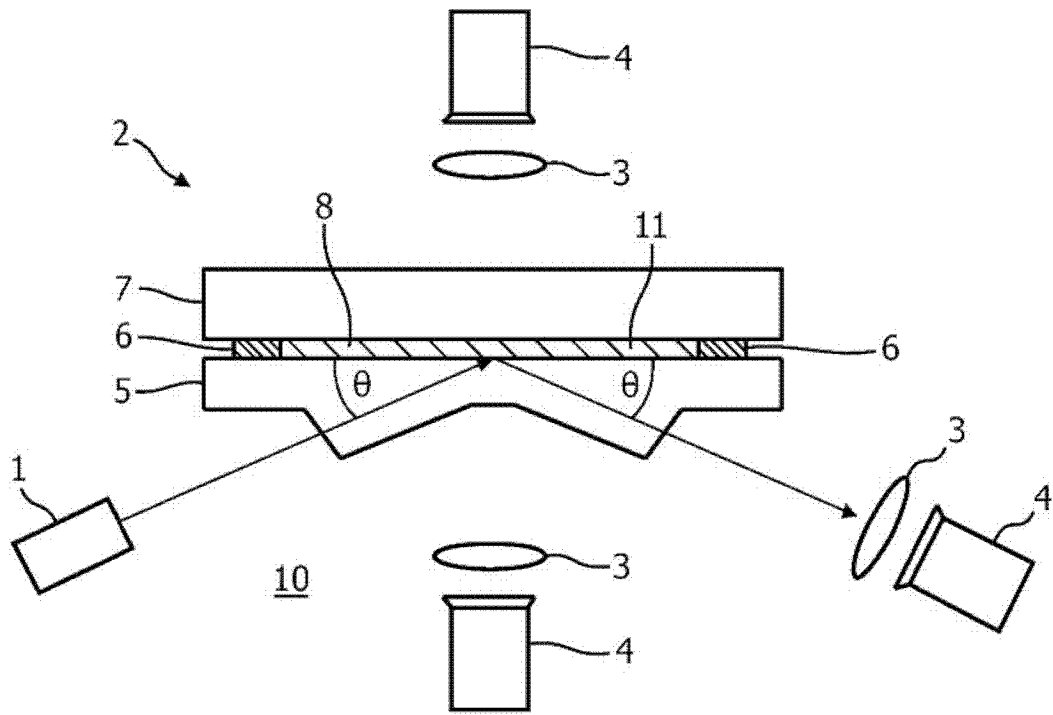


图 1

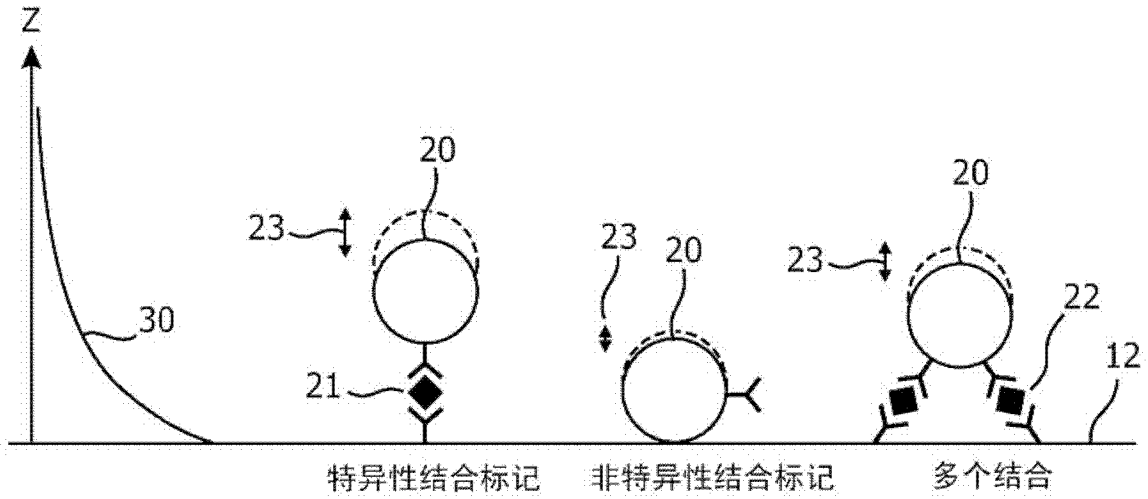


图 2

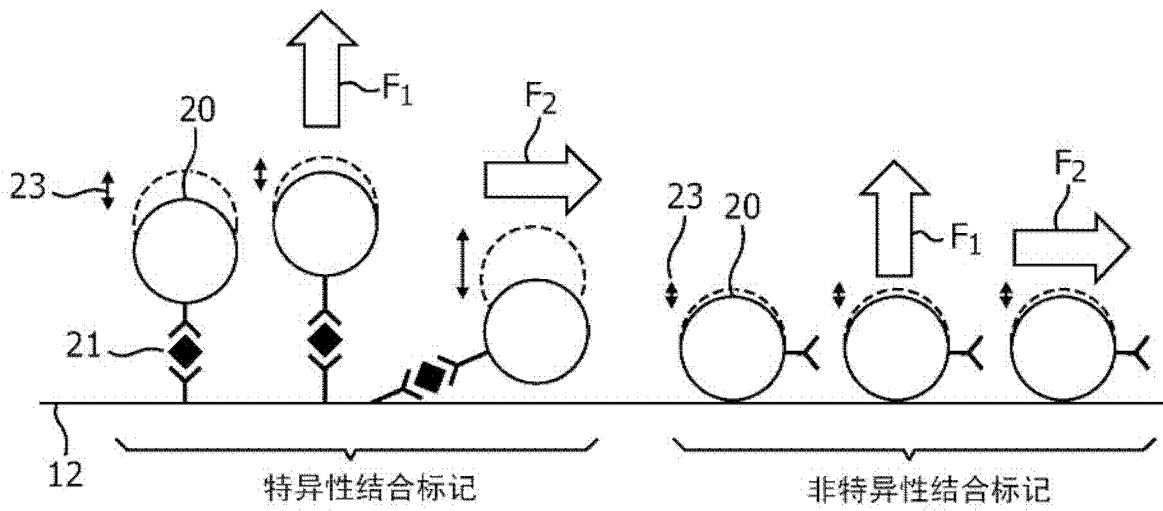


图 3

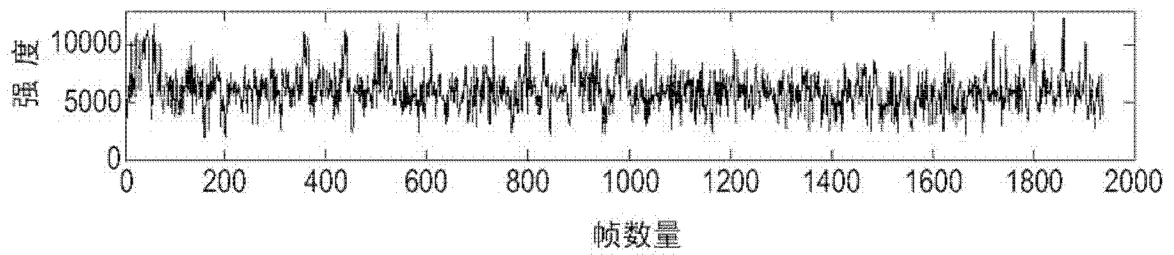


图 4

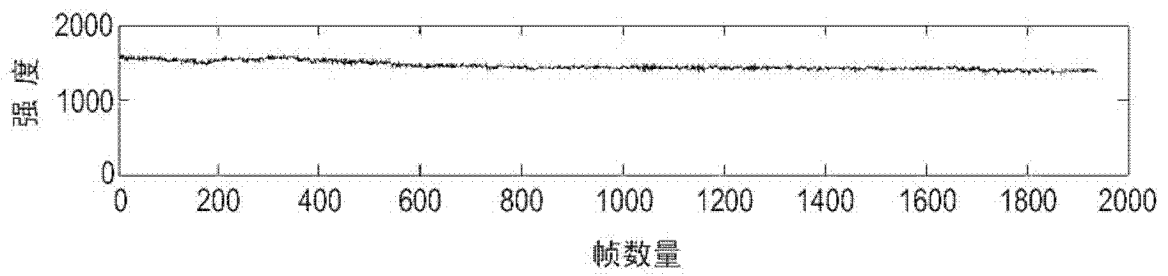


图 5

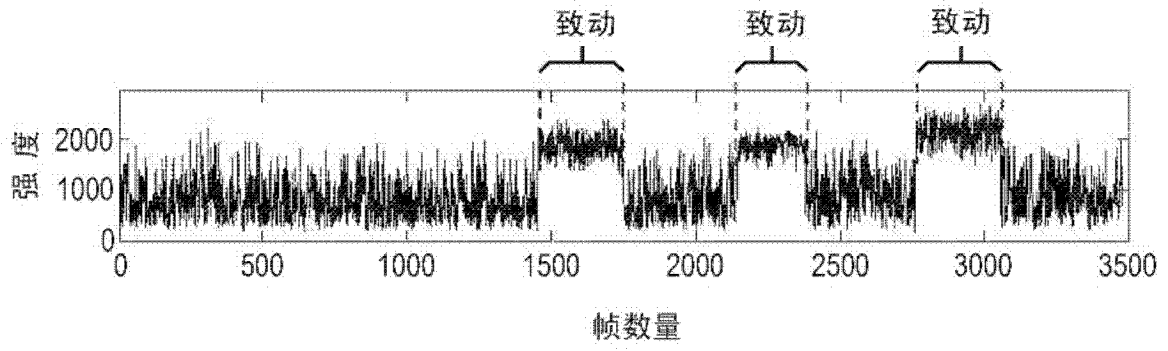


图 6

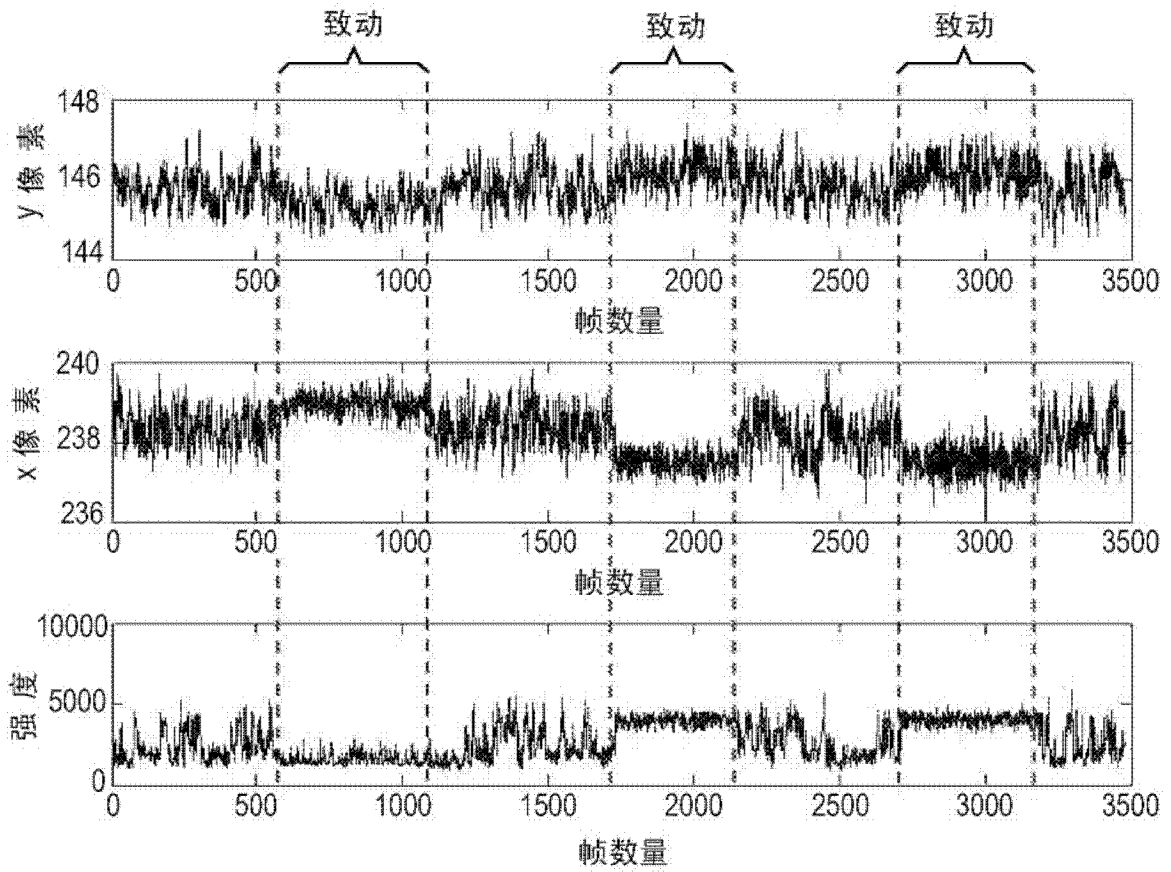


图 7

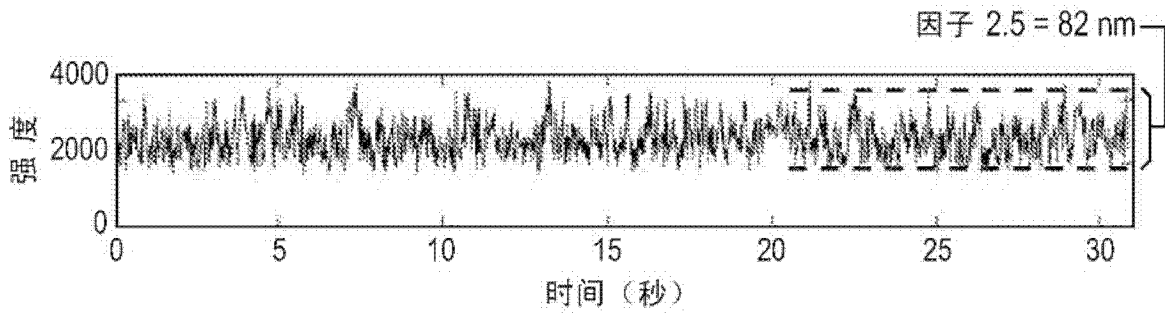


图 8

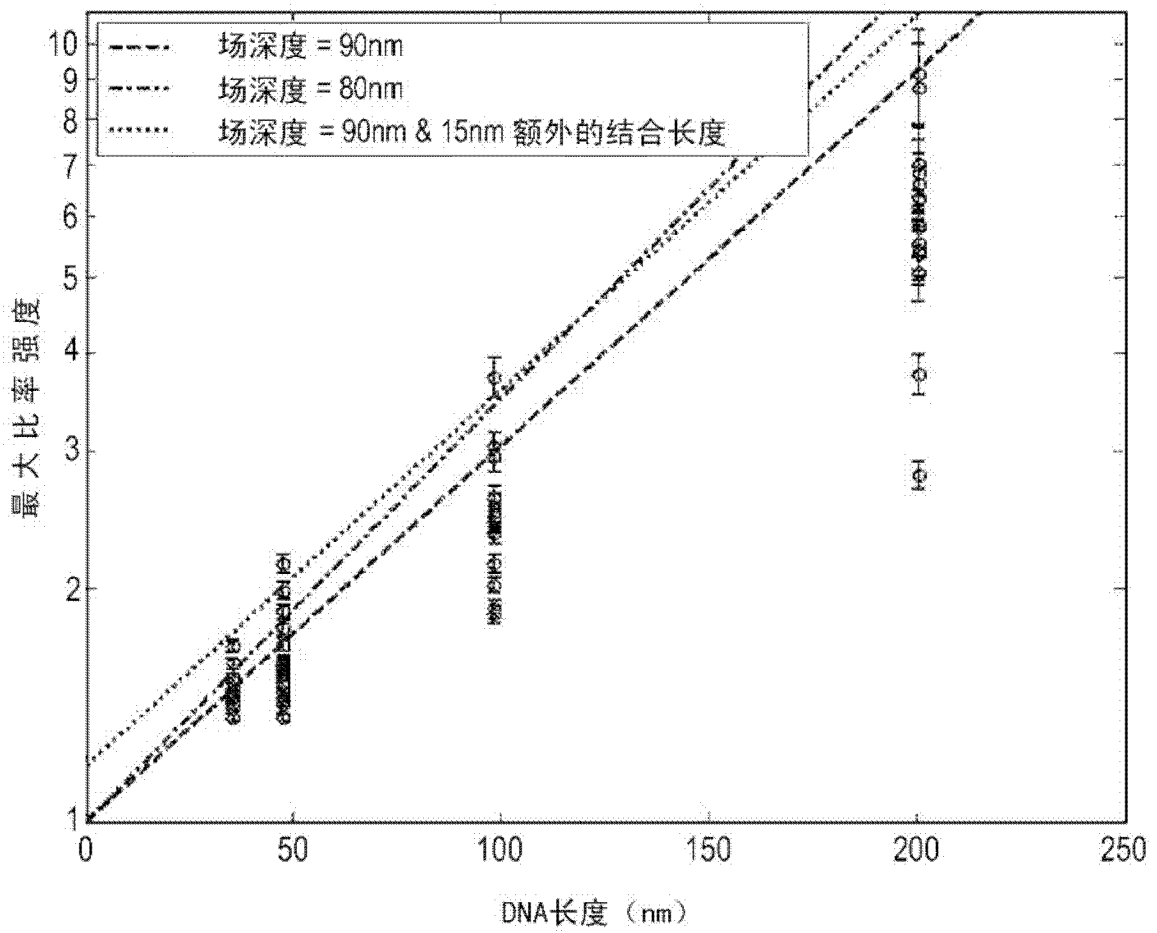


图 9

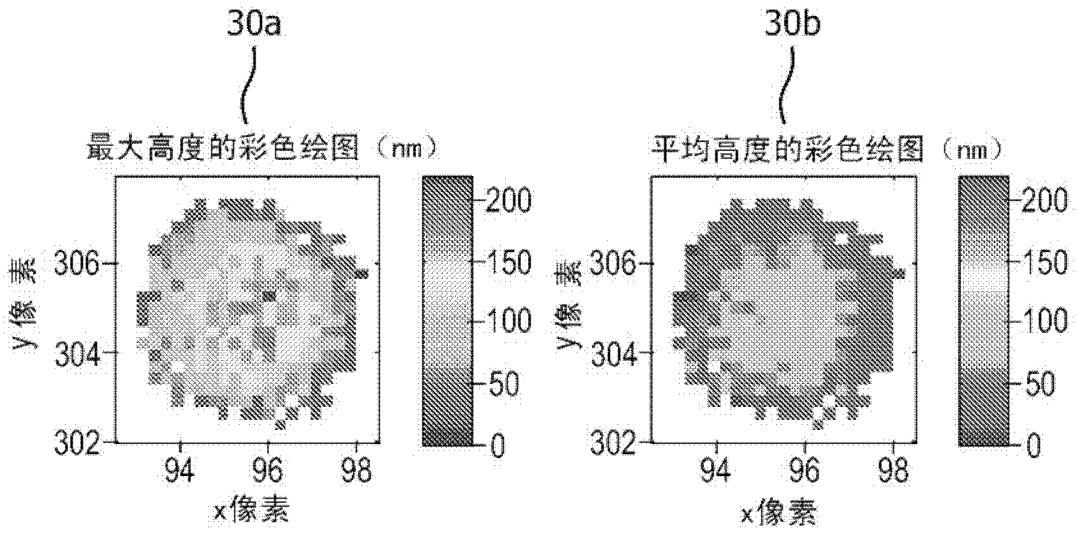


图 10

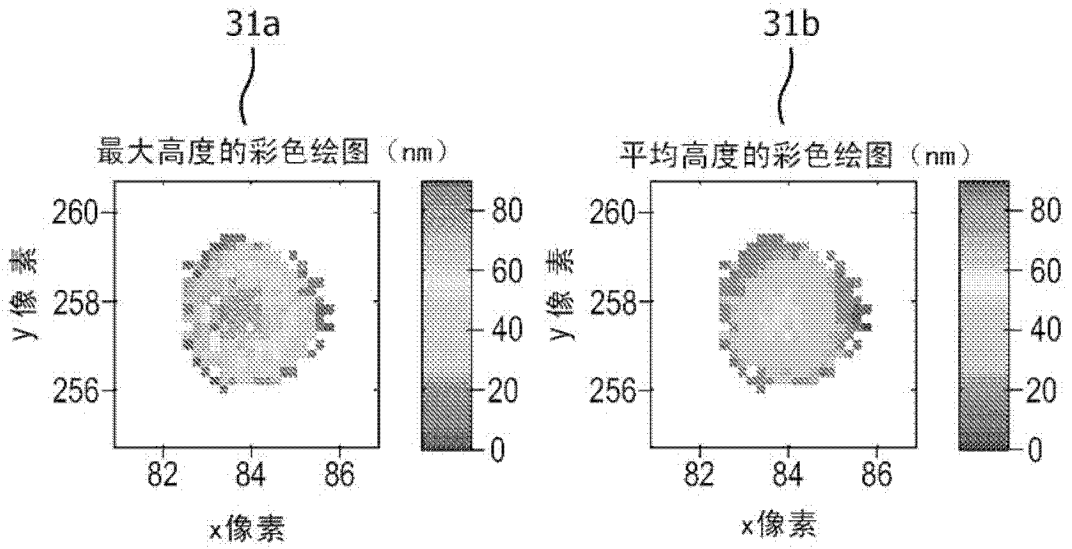


图 11

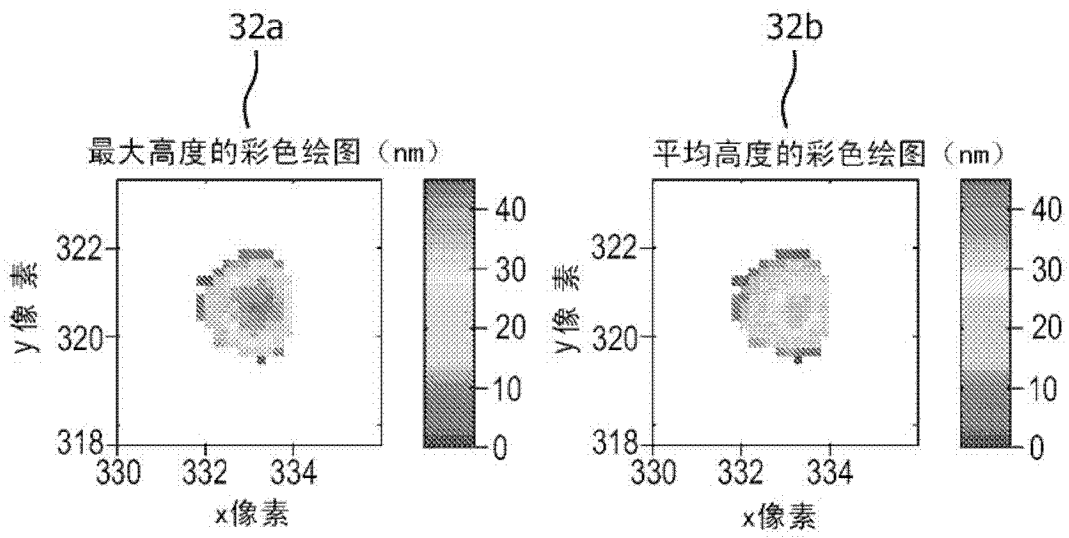


图 12

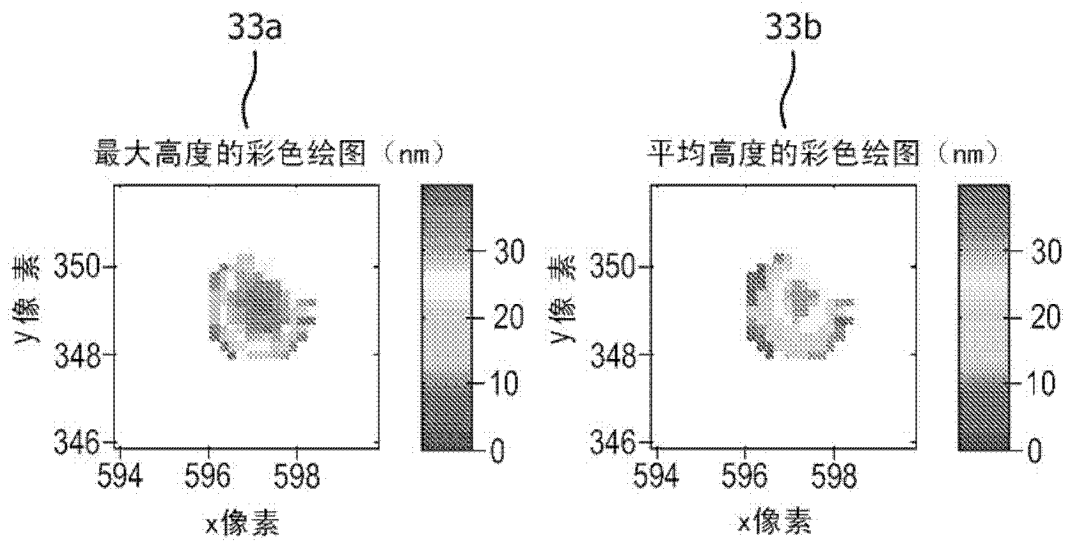


图 13