



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116762002 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 15

(21) 申请号 202180072817.8

(22) 申请日 2021.08.26

(30) 优先权数据

63/070,796 2020.08.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.04.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/047830 2021.08.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/047085 EN 2022.03.03

(71) 申请人 纳米马赛克公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 J·博伊斯 A·华纳 权奇敏

J·威尔金森

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 刘晓东

(51) Int.Cl.

G01N 21/77 (2006.01)

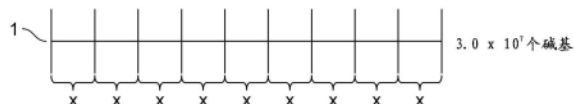
权利要求书4页 说明书57页 附图51页

(54) 发明名称

用于无偏蛋白质组研究的传感器、其制造和使用方法

(57) 摘要

本发明总体上涉及用于发现、筛选和/或定量对表型有贡献的一种或多种蛋白质的制品(例如传感器)和方法,所述制品和方法促进蛋白质组、外显子组或外显子组-密码子序列区域的广泛探询。



1. 一种确定蛋白质小组的方法,所述蛋白质小组包括选自研究受试者所属或与之相关的物种的全蛋白质编码基因组的一组测试蛋白质,所述方法包括以下步骤:

(a) 拼接来自全基因组的蛋白质编码基因以构建蛋白质编码基因组;

(b) 确定所述蛋白质编码基因组中基本上均匀间隔的多个标记位置;以及

(c) 鉴定与蛋白质编码基因组中每个标记位置相关的蛋白质,以产生所述测试蛋白质的组,其中每种蛋白质由包含位于所述蛋白质编码基因组中每个标记位置附近的单核苷酸多态性(SNP)的基因编码。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述蛋白质编码基因是外显子,并且所述蛋白质编码基因组是外显子组。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述蛋白质编码基因是编码序列(CDS)区,并且所述蛋白质编码基因组是外显子组-CDS。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述SNPS是同义SNPS、非同义SNPS或其组合。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述标记位置在所述蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS上彼此间隔约25kb、50kb、100kb、200kb、300kb、600kb、1,200kb、6,000kb或12,000kb。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述SNP是与编码蛋白质的基因组、外显子组或外显子组-CDS中的标记位置最接近的SNP。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述SNP是与所述标记位置最接近的非同义SNP,其中结合部分能够特异性结合由包含所述非同义SNP的基因编码的蛋白质。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中所述SNP是与所述标记位置最接近的同义SNP,其中结合部分能够特异性结合由含有所述同义SNP的基因编码的蛋白质。

9. 一种确定蛋白质小组的方法,所述蛋白质小组包括选自研究受试者所属或与之相关的物种的全蛋白质编码基因组的一组测试蛋白质,所述方法包括以下步骤:

(a) 拼接来自全基因组的蛋白质编码基因以构建蛋白质编码基因组;

(b) 确定所述蛋白质编码基因组中基本上均匀间隔的多个标记位置;以及

(c) 鉴定与所述蛋白质编码基因组中每个标记位置相关的蛋白质,以产生测试蛋白质的组,其中每种蛋白质是由所述相关标记所在的蛋白质编码基因组区域编码的蛋白质。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述蛋白质编码基因是外显子,并且所述蛋白质编码基因组是外显子组。

11. 根据权利要求9或10所述的方法,其中所述蛋白质编码基因是编码序列(CDS)区,并且所述蛋白质编码基因组是外显子组-CDS。

12. 根据权利要求9-11中任一项所述的方法,其中所述标记位置在所述蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中彼此间隔约例如25kb、50kb、100kb、200kb、300kb、600kb、1,200kb、6,000kb或12,000kb。

13. 一种传感器,其用于检测从研究受试者收获的样品中多种蛋白质的存在或定量其量,从而对所述样品进行无偏倚蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究,所述传感器包括:

限定多个可寻址小孔的平板,每个小孔包含设置在其中的载网,其中(i)所述载网包含

多个纳米结构阵列,每个纳米结构阵列包含多个纳米结构,和(ii)每个纳米结构阵列用一种或多种结合部分功能化,用于结合一组测试蛋白质中的一种或多种蛋白质,以进行无偏倚蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究,

任选地,其中所述测试蛋白质的组已经预先通过以下步骤确定:

(a) 确定在所述研究受试者所属或与之相关的物种的蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中基本上均匀间隔的多个标记位置;以及

(b) 鉴定与所述蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中每个标记位置相关的蛋白质,以产生测试蛋白质的组,其中每种蛋白质由包含位于所述外显子组中每个标记位置附近的单核苷酸多态性(SNP)的基因编码。

14. 根据权利要求13所述的传感器,其中所述SNPS是同义SNPS、非同义SNPS或其组合。

15. 根据权利要求13所述的传感器,其中所述标记位置在所述蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中彼此间隔约25kb、50kb、100kb、200kb、300kb、600kb、1,200kb、6,000kb或12,000kb。

16. 根据权利要求13-15中任一项所述的传感器,其中所述传感器包含至少20种不同的结合部分,用于结合所述测试蛋白质的组的每一个成员。

17. 根据权利要求13-16中任一项所述的传感器,其中所述SNP是与蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中的标记位置最接近的SNP。

18. 根据权利要求17所述的传感器,其中所述SNP是与所述标记位置最接近的非同义SNP,其中结合部分能够特异性结合由包含所述非同义SNP的基因编码的蛋白质。

19. 根据权利要求17所述的传感器,其中所述SNP是与所述标记位置最接近的同义SNP,其中结合部分可以特异性结合由包含所述同义SNP的基因编码的蛋白质。

20. 根据权利要求13-19中任一项所述的传感器,其中所述SNP位于距相应标记位置不到1,000个碱基的位置。

21. 根据权利要求13-20中任一项所述的传感器,其中所有SNP位于距每个相应标记位置不到1,000个碱基的位置。

22. 根据权利要求13-21中任一项所述的传感器,其中小孔内的所有纳米结构阵列用结合部分功能化,以结合所述测试蛋白质的组内的特定蛋白质。

23. 根据权利要求13-22中任一项所述的传感器,其中小孔内的纳米结构阵列的一部分用结合部分功能化,所述结合部分用于结合所述测试蛋白质的组内的特定蛋白质。

24. 根据权利要求13-23中任一项所述的传感器,其中所述结合部分是抗体、纳米抗体、适体或亲和探针。

25. 根据权利要求13-24中任一项所述的传感器,其中每个纳米结构包括纳米针。

26. 根据权利要求13-25中任一项所述的传感器,其中所述纳米结构与平面支撑体或柔性基底中的至少一者成为整体。

27. 一种生产传感器的方法,所述传感器用于检测从研究受试者收获的样品中多种蛋白质的存在或定量其量,从而对所述样品进行无偏倚蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究,所述方法包括以下步骤:

(a) 确定在所述研究受试者所属或与之相关的物种的蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中基本上均匀间隔的多个标记位置;

(b) 鉴定与所述编码蛋白质的基因组、外显子组或外显子组-CDS中的每个标记位置相关的蛋白质,以产生一组测试蛋白质,其中每个蛋白质由基因编码,所述基因包含位于所述外显子组中每个标记位置附近的单核苷酸多态性(SNP);以及

(c) 用多个不同的结合部分功能化所述传感器的纳米结构,每个结合部分能够结合所述测试蛋白质的组中的蛋白质,从而检测所述测试蛋白质的存在或定量其量,如果所述测试蛋白质存在于样品中的话。

28. 根据权利要求27所述的方法,所述方法包括重复步骤(a)-(c)从而产生一系列传感器,其中用于产生第二传感器的标记位置从用于产生第一传感器的标记位置偏移预定距离。

29. 根据权利要求27或28所述的方法,其中所述SNPS是同义SNPS、非同义SNPS或其组合。

30. 根据权利要求27-29中任一项所述的方法,其中所述标记位置在所述蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中彼此间隔25kb、50kb、100kb、200kb、300kb、600kb、1,200kb、6,000kb或12,000kb。

31. 根据权利要求27-29中任一项所述的方法,其中所述传感器包含用于结合所述测试蛋白质的组的至少20种不同结合部分。

32. 根据权利要求27-31中任一项所述的方法,其中所述SNP是与所述蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中的标记位置最接近的SNP。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述SNP是与所述标记位置最接近的非同义SNP,其中结合部分能够特异性结合由包含所述非同义SNP的基因编码的蛋白质。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述SNP是与所述标记位置最接近的同义SNP,其中结合部分能够特异性结合由含有所述同义SNP的基因编码的蛋白质。

35. 根据权利要求27-34中任一项所述的方法,其中所述SNP位于距相应标记位置不到1,000个碱基的位置。

36. 根据权利要求27-34中任一项所述的方法,其中所有SNP均位于距每个相应标记位置不到1,000个碱基的位置。

37. 根据权利要求27-36中任一项所述的方法,其中所述结合部分是抗体、纳米抗体、适体或亲和探针。

38. 一种传感器,其通过权利要求27-37中任一项的方法生产。

39. 根据权利要求38所述的传感器,其中所述传感器包括用多个不同结合部分功能化的多个纳米结构,每个结合部分能够结合所述测试蛋白质的组中的蛋白质,从而检测所述测试蛋白质的存在或定量其量,如果所述测试蛋白质存在于所述样品中的话。

40. 一种对目的样品进行无偏倚的蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究的方法,所述方法包括:

(a) 将一部分所述样品施加到权利要求13-37中任一项的传感器上;

(b) 检测来自所述传感器的纳米结构的可检测信号;以及

(c) 从所述可检测的信号确定所述样品中所述测试蛋白质的存在和/或量。

41. 根据权利要求40所述的方法,其还包括用至少一个额外的传感器重复步骤(a)-(c)以筛选所述目的样品的蛋白质小组。

42. 根据权利要求40所述的方法,其中检测可检测的信号包括检测至少一部分所述纳米结构的性质变化。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述性质是光学性质。

44. 根据权利要求40-43中任一项所述的方法,其中在应用于所述传感器之前未稀释所述样品。

45. 根据权利要求40-44中任一项所述的方法,其中所述样品是体液、组织提取物或细胞上清液。

用于无偏蛋白质组研究的传感器、其制造和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年8月26日提交的美国专利申请第63/070,796号的权益和优先权,其全部公开内容通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及与用于发现、筛选和/或定量对表型有贡献的蛋白质的全蛋白质组、外显子组或外显子组-密码子序列(CDS)区域广泛探询(exome-codon sequence (CDS) region wide interrogation)相关的制品和方法。

技术背景

[0004] 目前,几个主要挑战阻碍了医学诊断、生物标志物发现和药物发现的领域。挑战之一是缺乏可用于探询从低丰度的蛋白质(例如,存在于患者样品中的)到更丰富的蛋白质的宽动态范围的蛋白质的定量技术。

[0005] 蛋白质组研究领域通常涉及基于分子的路径和生物相互作用的先验知识选择用于探询的蛋白质。所得的蛋白质小组通常受到可被探询的蛋白质数目以及蛋白质组中蛋白质的宽度限制。确定与表型相关的蛋白质的另一个挑战是提供方法和蛋白质小组,其促进野生型蛋白质相对于受影响的蛋白质组探询,以便获得在所研究的条件下可能起作用的宽范围蛋白质之间无偏倚的方法。

[0006] 目前的蛋白质小组选择通常受到所采用的读出技术的限制,其中专用于每种蛋白质的独特传感器的数量不足以覆盖足够宽的动态范围,以允许蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS宽探询所需的生物标志物的宽度。

[0007] 一种商购可得的方法使用邻近延伸测定,其中允许一对寡核苷酸标记的抗体(“探针”)在均相测定中与样品中存在的靶蛋白成对结合,而不需要洗涤。当两个探针非常接近时,通过依赖于接近度的DNA聚合事件形成新颖的PCR靶序列。随后使用标准实时PCR(RT-PCR)检测和定量所得的靶序列。这种方法的局限是动态范围有限,因此可以探询的蛋白质数量有限。

[0008] 此外,科学和医学研究者通常限于选择疾病聚焦的靶标,这通常导致有利于探询有限数量(例如,少于500个)的蛋白质的小组。例如,商购可得的心血管检测板(cardiovascular panel)使得能够进行多重免疫测定(邻近延伸测定),用于分析大约90种心血管疾病(CVD)相关的蛋白质生物标志物。在另一个实例中,多重免疫测定炎症小组可以通过靠近连接测定(proximity ligation assay)进行探询,所述靠近连接测定有助于分析大约90种炎症相关蛋白。

[0009] 在另一种方法中,缀合有抗体的珠粒组以多重夹心免疫测定形式检测分析物。该组中的每个珠粒通过两种寻址染料的不同含量来识别,第三种染料用于通过缀合有生物素的抗体和缀合有链霉抗生物素蛋白的第二步检测器读出分析物的结合。在基于流式细胞仪的专用平台上采集数据。然而,这种方法具有有限的动态范围,限制了可被探询的标记,因

此不便于真正的全蛋白质组探询。例如, 示例性测定包含50重珠粒试剂盒, 其允许分析50种人细胞因子和趋化因子。

[0010] 尽管到目前为止已经做出了努力, 但是仍然需要新的方法来以无偏倚方式在蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS中探询大量的丰度和低丰度蛋白质, 所述方法可用于鉴定给定表型的新生物标志物。

发明内容

[0011] 本发明部分基于用于以无偏倚方式探询跨基因组编码的大量蛋白质(例如, 高丰度和低丰度蛋白质)的方法的发展。该方法可以与传感器和读出技术结合使用, 以促进无偏倚蛋白质组分析。

[0012] 一个方面, 本公开提供了确定蛋白质小组的方法, 所述蛋白质小组包括选自研究受试者所属或与之相关的物种的全蛋白编码基因组的一组测试蛋白质。该方法包括: (a) 从目的物种的全基因组中剪接蛋白质编码基因(例如, (i) 内含子和外显子, (ii) 外显子或(iii) 编码序列区), 以构建蛋白质编码基因组(例如, 分别为(i) 蛋白质组、(ii) 外显子组或(iii) 外显子组-CDS); (b) 确定在蛋白质编码基因组(例如, 分别为(i) 蛋白质组、(ii) 外显子组或(iii) 外显子组-CDS)中基本上均匀间隔的多个标记位置; 以及(c) 鉴定与蛋白质编码基因组(例如, 分别为(i) 蛋白质组、(ii) 外显子组或(iii) 外显子组-CDS)中每个标记位置相关的蛋白质, 以产生测试蛋白质的组, 其中每种蛋白质由包含位于蛋白质编码基因组中每个标记位置附近的单核苷酸多态性(SNP)的基因编码。

[0013] 在某些实施方案中, 蛋白质编码基因包括外显子和内含子, 并且蛋白质编码基因组是蛋白质组。或者, 蛋白质编码基因是外显子, 蛋白质编码基因组是外显子组。或者, 蛋白质编码基因是编码序列(CDS)区, 蛋白质编码基因组是外显子组-CDS。

[0014] 可以设想, 任何前述方法可包括一个或多个以下特征。例如, SNPS可以是同义的SNPS、非同义的SNPS或其组合。在蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中, 标记位置可以彼此间隔约25kb、50kb、100kb、200kb、300kb、600kb、1,200kb、6,000kb或12,000kb。

[0015] SNP可以是蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中最接近标记位置的SNP。SNP是与生物标志物位置最接近的非同义SNP, 其中结合部分可以特异性结合由含有所述非同义SNP的基因编码的蛋白质。所述SNP可以是与标记位置最靠近的同义SNP, 其中结合部分可以特异性结合由含有同义SNP的基因编码的蛋白质。

[0016] 另一方面, 本发明提供了确定蛋白质小组的方法, 所述蛋白质小组包含选自研究受试者所属或与之相关的物种的全蛋白质编码基因组的一组测试蛋白质。该方法包括: (a) 从目的物种的全基因组中剪接蛋白质编码基因(例如, (i) 内含子和外显子, (ii) 外显子, 或(iii) CDS)以构建蛋白质编码基因组(例如, 分别为(i) 蛋白质组, (ii) 外显子组或(iii) 外显子组-CDS), (b) 确定蛋白质编码基因组(例如, 分别为(i) 蛋白质组, (ii) 外显子组或(iii) 外显子组-CDS)中基本上均匀间隔的多个标记位置; 以及(c) 鉴定与蛋白质编码基因组(例如, 分别为(i) 蛋白质组, (ii) 外显子组或(iii) 外显子组-CDS)中每个标记位置相关的蛋白质以产生测试蛋白质的组, 其中每种蛋白质是由相关标记所在的基因组区域编码的蛋白质。

[0017] 在某些实施方案中, 所述蛋白质编码基因包括外显子和内含子, 并且所述蛋白质

编码基因组是蛋白质组。或者,所述蛋白质编码基因是外显子,所述蛋白质编码基因组是外显子组。或者,所述蛋白质编码基因是编码序列(CDS)区,所述蛋白质编码基因组是外显子组-CDS。

[0018] 预期在蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中,标记位置可以彼此间隔约25kb、50kb、100kb、200kb、300kb、600kb、1,200kb、6,000kb或12,000kb。

[0019] 另一方面,本公开提供了传感器,用于检测从研究受试者收获的样品中多种蛋白质的存在或定量其量,从而对样品进行无偏倚蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究。该传感器包括限定多个可寻址小孔的平板,每个小孔包括设置在其中的载网,其中(i)载网包括多个纳米结构阵列,其中每个纳米结构阵列包括多个纳米结构,以及(ii)每个纳米结构阵列用一种或多种结合部分功能化,用于结合一个测试蛋白质组中的一种或多种蛋白质,以进行无偏倚蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究。任选地,所述测试蛋白质的组通过以下方式预先确定:(a)确定研究受试者所属或与之相关的物种的蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中基本上均匀间隔的多个标记位置;以及(b)鉴定与蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中每个标记位置相关的蛋白质,以产生所述测试蛋白质的组,其中每种蛋白质由包含位于外显子组中每个标记位置附近的单核苷酸多态性(SNP)的基因编码。

[0020] 可以设想,可以以各种不同的方式配置传感器。例如,SNPS可以是同义的SNPS、非同义的SNPS或其组合。在蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中,标记位置可以彼此间隔约25kb、50kb、100kb、200kb、300kb、600kb、1,200kb、6,000kb或12,000kb。

[0021] 传感器可包括至少20种不同的结合部分,用于结合测试蛋白质的组的每个成员。

[0022] SNP可以是蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中最接近标记位置的SNP。SNP可以是与标记位置最接近的非同义SNP,其中结合部分可以特异性结合由含有所述非同义SNP的基因编码的蛋白质。SNP可以是与标记位置最接近的同义SNP,其中结合部分可以特异性结合由含有所述同义SNP的基因编码的蛋白质。

[0023] SNP可位于距离相应标记位置不到1,000个碱基的位置。所有SNP可位于距离每个相应标记位置不到1,000个碱基的位置。

[0024] 小孔内的所有纳米结构阵列可用结合部分(例如,抗体、纳米抗体、适体或亲和探针)进行功能化,用于结合测试蛋白质的组内的特定蛋白质。小孔内纳米结构阵列的一部分可用结合部分进行功能化,用于结合测试蛋白质的组内的特定蛋白质。

[0025] 每个纳米结构可包括纳米针或基本上由其组成。纳米结构(例如纳米针)可与平面支撑物或柔性衬底中的至少一者整合。

[0026] 在另一方面,本公开提供了生产传感器的方法,所述传感器用于检测从研究受试者收获的样品中多种蛋白质的存在或定量其量,从而对样品进行无偏倚蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究。该方法包括:(a)确定研究受试者所属或与之相关的物种的蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中基本上均匀间隔的多个标记位置;(b)鉴定与蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中的每个标记位置相关的蛋白质,以产生一个测试蛋白质的组,其中每种蛋白质由包含位于外显子组中每个标记位置附近的单核苷酸多态性(SNP)的基因编码;以及(c)用多种不同的结合部分功能化传感器的纳米结构,每种结合部分能够结合测试蛋白质的组中的蛋白质,从而检测测试蛋白质的存在,或定量

其量,如果测试蛋白质存在于样品中的话。

[0027] 可以设想,该方法可包括一个或多个以下特征。可以重复步骤(a)-(c),从而产生一系列传感器,其中用于产生第二传感器的标记位置从用于产生第一传感器的标记位置偏移预定距离。在蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中,标记位置可以彼此间隔25kb、50kb、100kb、200kb、300kb、600kb、1,200kb、6,000kb或12,000kb。

[0028] 传感器可以包括至少20种不同的结合部分,用于结合测试蛋白质组。结合部分可以是抗体、纳米抗体、适体或亲和探针。

[0029] SNP可以是同义SNP、非同义SNP或其组合。根据情况,SNP可以是蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中最接近标记位置的SNP。SNP可以是最接近标记位置的非同义SNP,其中结合部分可以特异性结合由含有所述非同义SNP的基因编码的蛋白质。或者,SNP可以是与标记位置最接近的同义SNP,其中结合部分可以特异性结合由含有所述同义SNP的基因编码的蛋白质。SNP可位于距离相应标记位置不到1,000个碱基的位置。在某些实施方案中,SNP可位于距离每个相应标记位置不到1,000个碱基的位置。

[0030] 本公开还提供了通过任何前述方法产生的传感器。传感器可包括用多个不同的结合部分功能化的多个纳米结构,每个结合部分能够结合所述测试蛋白质组中的蛋白质,从而检测测试蛋白质的存在,或者定量测试蛋白质的量,如果测试蛋白质存在于样品中的话。

[0031] 在另一方面,本公开提供了对目的样品进行无偏倚蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS宽范围关联研究的方法。该方法包括(a)将所述样品的至少一部分施加到本文所述的任何传感器上;(b)检测来自传感器和纳米结构的可检测信号;以及(c)从可检测信号确定样品中测试蛋白质的存在和/或量。

[0032] 预期该方法可以包括一个或多个以下特征。可以用至少一个另外的传感器重复步骤(a)-(c),以筛选目的样品的蛋白质小组。检测可检测信号的步骤可包括检测至少一部分的所述纳米结构的性质(例如,光学性质)的变化。在施加至传感器之前,可以稀释样品或可以不稀释样品。根据情况,样品可以是体液、组织提取物或细胞上清液。

[0033] 当结合附图考虑时,根据以下各种非限制性实施方案的详细描述,本公开的其它有利方面和新颖特征将变得显而易见。

附图说明

[0034] 在附图中,在不同的视图中,相同的附图标记通常指代相同的部分。此外,附图不一定按比例绘制,相反,重点通常放在说明本公开的原理上。在以下描述中,参考以下附图描述了本发明的各种实施方式。

[0035] 图1A-图1F涉及识别目的基因组中标记和标记位置的方法以及相关的蛋白质、传感器和此类传感器的特征。图1A是根据本发明的一个实施方案的示意图,其示出了用于鉴定在目的基因组中定位的标记位置处均匀间隔的标记的方法。图1B的示意图示出了通过在标记位置的至少100个碱基对内从家族中选择至少一个成员来确定所代表的一个或多个蛋白质家族。图1C是根据本发明的一个实施方案的示意图,其示出了外显子组中均匀间隔的标记核苷酸和一对标记核苷酸之间的至少一个cSNP的选择,所述cSNP距离核苷酸标记至多3kb。图1D是根据本发明的一个实施方案的示意图,其示出了外显子组中均匀间隔的核苷酸和一对标记核苷酸之间的至少一个nscSNP的选择,所述nscSNP距离核苷酸标记至多10kb。

图1E是根据本发明的一个实施方案的示意图,其示出了具有多个小孔的板,每个小孔包括纳米结构阵列的载网。图1F的示意图显示根据本发明的一个实施方案的传感器与现有技术测定法相比的动态范围。

[0036] 图2A是目标传感器中不同形式的纳米结构系列的示意图。图2B是描绘用于测量超低浓度、低浓度、中等浓度和高浓度分析物的一系列示例性传感器的示意图。

[0037] 图3A-图3C显示了本发明的示例性传感器在大动态范围内测量分析物的可操作性。图3A是根据本发明的一个实施方案的示意图,其描绘了包括数字和模拟(色移(color shifting))纳米结构阵列的传感器。图3B的图示描绘了通过结合数字单分子定量(左手边图)和模拟定量(右手边图)在6log动态范围内对Tau蛋白进行定量。图3C的图像描绘数字传感器作为分析物浓度的函数的可操作性。

[0038] 图4是显示由图3B中例示的传感器产生的示例性数据的数字和模拟测量的曲线图。

[0039] 图5图示根据本发明一个实施方案的示例性的基于硅晶片的传感器,所述传感器包括一个系列数字纳米结构(25,600个)和三个系列的模拟纳米结构(每个系列1,000个)。

[0040] 图6图示根据本发明一个实施方案的另一个示例性基于硅晶片的传感器,所述传感器包括多个系列的数字纳米结构和三个系列的模拟纳米结构。

[0041] 图7的示意图描绘了根据本发明一个实施方案的示例性纳米结构的横断面视图。

[0042] 图8的示意图描绘了根据本发明一个实施方案的由两种不同材料组成的示例性纳米结构的横断面视图。

[0043] 图9A-图9D是根据本发明一个实施方案的一系列横截面示意图,其示出了通过光致抗蚀剂图案化(photoresistant patterning)、显影和蚀刻工艺制造一系列示例性纳米结构。

[0044] 图10A-图10G是根据本发明一个实施方案的一系列横截面示意图,其示出了通过在衬底上沉积层、在沉积层上旋涂光致抗蚀剂、对抗蚀剂进行图案化和显影、在抗蚀剂上蒸发金属、去除溶液中的抗蚀剂、蚀刻衬底和去除光致抗蚀剂来制造一系列示例性纳米结构。

[0045] 图11A-图11F是根据本发明一个实施方案的一系列横截面示意图,其示出了通过在衬底上涂覆两层、对顶层抗蚀剂进行图案化、对抗蚀剂进行显影、在图案化的抗蚀剂上蒸发材料、剥离和旋涂额外的低粘度材料以获得特定的表面条件来制造一系列示例性纳米结构。

[0046] 图12A-图12F是根据本发明一个实施方案的一系列横截面示意图,其示出了通过在氧化物衬底上图案化光致抗蚀剂、对抗蚀剂进行显影、在抗蚀剂上沉积硅、剥离和生长硅以在图案化衬底上生长附加结构来制造一系列示例性纳米结构。

[0047] 图13A-图13D是根据本发明一个实施方案的一系列横截面示意图,其示出了用模具对光致抗蚀剂进行图案化。

[0048] 图14A是根据本发明一个实施方案的示意图,其显示了具有多个纳米结构系列的硅晶片的示意图,图14B是据本发明一个实施方案的示意图,其显示了单个纳米结构系列的放大图像。图14C是本发明一个实施方案的示意图,其中使用了纳米结构针上的单一抗体无标记测定。与纳米结构针偶联的抗体捕获测试样品中的特定分析物,以产生可定量的信号。图14D是本发明一个实施方案的示意图,其中使用了纳米结构针上的单一抗体。与纳米结构

针偶联的抗体捕获测试样品中的特定分析物,以产生可定量的信号,并且所产生的信号被放大。图14E是本发明一个实施方案的示意图,其中使用了纳米结构针上的双抗体(夹心)测定。将第一抗体与纳米结构针偶联以捕获测试样品中的分析物,以产生可定量的信号,将第二抗体加入到反应中以形成夹心结构,并且扩大所产生的信号。

[0049] 图15A-图15D是基于衬垫的接近传感器(gasket-based approach sensor)设计的示意图。图15A描绘了4重衬垫。图15B描述了覆盖一半传感器的混合16重衬垫和覆盖另一半的标准96孔板。图15C描绘了双衬垫层方法,其中第一层包括4重衬垫,第二衬垫被分层以覆盖所述4重小孔中的四个。图15D描绘了混合4重衬垫,其中第二衬垫层覆盖4重小孔中的四个,覆盖传感器的一半,标准96孔板覆盖另一半。

[0050] 图16A和图16B是根据本发明一个实施方案的包含系列纳米结构的纳米传感器组件(消耗品)的透视图。

[0051] 图17A和图17B是包括晶片衬底、衬垫和保持基座的盒组件的示意图(图17A)和显示盒组件的部件的分解透视图(图17B)。

[0052] 图18是根据本发明一个实施方案的单重盒和1000重盒的示意图。

[0053] 图19是根据本发明一个实施方案的与传感器一起使用的检测系统的透视图。

[0054] 图20是根据本发明一个实施方案的示意图,其描绘用于对示例性传感器成像的示例性光学检测系统。

[0055] 图21是根据本发明一个实施方案的示意图,其描绘了对传感器的探询。读出信号可以是光学的(例如,成像)、电的或机械的。

[0056] 图22的示意图显示了包含数字纳米结构的示例性传感器的输出的数据分析。

[0057] 图23是示出根据本发明一个实施方案的算法的流程图。

[0058] 图24A和图24B是根据本发明一个实施方案的示意图,其描绘了被配置为同时检测和/或定量多种分析物的系列纳米结构。

[0059] 图25是根据本发明一个实施方案的示意图,其描绘了分析物与纳米结构之间的相互作用。

[0060] 图26是根据本发明一个实施方案,通过从左到右捕获1种、2种和5种分析物,描述纳米结构的结合能力的示意图。

[0061] 图27是根据本发明一个实施方案的示意图,其描绘了其中分析物的数量少于能够捕获分析物的纳米结构的数量的非饱和测定。

[0062] 图28是根据本发明一个实施方案的示意图,其描绘了在非饱和测定条件下阵列中的系列纳米结构,其中分析物被阵列中一部分纳米结构结合。

[0063] 图29是描绘示例性的无标记免疫测定的示意图。

[0064] 图30是描绘示例性的基于标记的免疫测定的示意图。

[0065] 图31是根据本发明一个实施方案的示例性的基于颗粒的测定法的示意图,所述测定使用一对结合抗原的抗体(Ab1和Ab2)来测定分析物(抗原)的存在和/或量,其中在通过(Ab2)抗体捕获(通过活化的纳米结构)进行检测之前,结合在溶液中进行。

[0066] 图32是根据本发明一个实施方案的示例性的基于颗粒的测定的示意图,所述测定使用一对结合抗原的抗体(Ab1和Ab2)来测定分析物(抗原)的存在和/或量,其中在通过(Ab2)抗体捕获(通过活化的纳米结构)进行检测之前,结合在溶液中进行。

[0067] 图33是根据本发明一个实施方案的示例性的基于颗粒的测定的示意图,所述测定使用一对结合抗原的抗体(Ab1和Ab2)来测定分析物(抗原)的存在和/或量,其中在通过酶(HRP)捕获(通过激活的纳米结构)进行检测之前,结合在溶液中进行。

[0068] 图34是根据本发明一个实施方案的示例性的基于颗粒的测定法的示意图,其中使用一对结合抗原的抗体(Ab1和Ab2)来确定分析物(抗原)的存在和/或量,其中结合在溶液中进行,然后通过用互补寡核苷酸功能化的纳米结构的寡核苷酸捕获进行检测。

[0069] 图35A-图35C是描述用于一个示例性多重测定法的试剂的示意图。

[0070] 图36A-图36H描述了在基于垫板的设计中测试的一系列细胞因子抗体在1pg/ml至10,000pg/ml浓度范围内的标准滴定曲线,分别包括IL-1b(图36A)、IL-2(图36B)、IL-10(图36C)、IL-15(图36D)、IL-6(图36E)、IL-8(图36F)、GM-CSF(图36G)和IP-10(图36H)。

具体实施方式

[0071] 本公开部分基于开发用于以无偏倚方式探询基因组中编码的大量蛋白质(例如,高丰度和低丰度蛋白质)的方法。本公开提供了用于实施目的受试者的物种(或与物种相关的)的无偏倚蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究的方法。具体而言,提供了用于鉴定与相应核酸标记相关的蛋白质的方法,所述核酸标记在遍及目的物种的蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS中设置的标记位置处间隔开,还提供了制造用于探询此类蛋白质的传感器的方法,用于执行蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS中编码的蛋白质的探询的传感器,以及使用此类传感器的方法。

[0072] 本发明的一些实施方案包括用于检测特定表型中涉及的蛋白质的存在和/或定量其量的蛋白质小组、传感器、测定和生化方法。本发明的一些实施方案可用于例如诊断、生物标记发现或药物开发应用。

[0073] 本文描述了从物种的整个蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS中选择的一小组蛋白质的制备,其包括在遍及该物种的基因组(例如,蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS(编码序列))上的某一区域均匀间隔的核苷酸标记附近选择蛋白质(例如,对应于SNP的蛋白质)。人外显子组包含大约3000万个碱基,编码存在于人类蛋白质组中的蛋白质。本文所述的方法可用于鉴定用于对目的物种的整个蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS进行无偏探询的蛋白质。

[0074] 本文描述了传感器,其包括用对应于确定的蛋白质小组的结合部分功能化的纳米结构,诸如纳米针。

[0075] 还提供了与纳米结构结合工作的生物测定法,以及利用比珠粒小大约一千倍的纳米结构,从而允许研究者使用比靶分子多得多的着陆位点(landing site),允许至少六个数量级的动态范围的方法。宽动态范围允许构建用于无偏倚分析的蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS宽探询小组。提供了新颖的方法,用于选择蛋白质以构建覆盖蛋白质组以最大化覆盖度并驱动无偏倚结果的小组。

[0076] 在一些实施方案中,所描述的方法可以应用于传感器(例如,包括纳米结构)与被探询的蛋白质的数量比至少为2:1的任何系统中。

[0077] 产生蛋白质小组的方法

[0078] 一方面,本公开提供了确定蛋白质组的方法,该蛋白质组包括选自研究受试者所

属或与之相关的物种的全蛋白质编码基因组的一个测试蛋白质组。该方法包括：(a) 从目的物种的全基因组中剪接蛋白质编码基因（例如，(i) 内含子和外显子，(ii) 外显子或(iii) 编码序列区），以构建蛋白质编码基因组（例如，分别为(i) 蛋白质组、(ii) 外显子组或(iii) 外显子组-CDS）；(b) 确定在蛋白质编码基因组（例如，分别为(i) 蛋白质组、(ii) 外显子组或(iii) 外显子组-CDS）中基本上均匀间隔的多个标记位置；以及(c) 鉴定与蛋白质编码基因组（例如，分别为(i) 蛋白质组、(ii) 外显子组或(iii) 外显子组-CDS）中每个标记位置相关的蛋白质，以产生测试蛋白质的组，其中每种蛋白质由包含位于蛋白质编码基因组中每个标记位置附近的单核苷酸多态性(SNP)的基因编码。在某些实施方案中，所述蛋白质编码基因包括外显子和内含子，并且所述蛋白质编码基因组是蛋白质组。或者，蛋白质编码基因是外显子，所述蛋白质编码基因组是外显子组。或者，所述蛋白质编码基因是编码序列(CDS)区，所述蛋白质编码基因组是外显子组-CDS。

[0079] 如本文中所示，术语“剪接”是指从给定基因组中选择给定亚组的核苷酸序列（例如，蛋白质编码基因、外显子和编码序列区），然后将所得核苷酸序列重新连接（例如，以基因组中相对于彼此的相同空间关系）的过程。在一些实施方案中，通过选择蛋白质编码基因（例如，包含外显子和内含子的序列）将核苷酸序列剪接在一起，并将所得的蛋白质编码基因重新连接以形成蛋白质组。在一些实施方案中，通过选择外显子（例如，包含编码序列区和非翻译区的序列）将核苷酸序列剪接在一起，并且将所得外显子重新连接以形成外显子组。在一些实施方案中，通过选择编码序列区(CDS)将核苷酸序列剪接在一起，并将所得的CDS重新连接形成外显子组-CDS。

[0080] 如本文中所示，术语“标记”或“标记核苷酸”等在蛋白质编码基因组的上下文中的理解为意指在给定标记位置处的一个核苷酸或一组核苷酸。如本文中所示，术语“标记位置”应理解为意指标记或标记核苷酸位于蛋白质编码基因组（例如，蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS）内的位置。

[0081] 在一些实施方案中，蛋白质编码基因是指与蛋白质相关的核苷酸序列，包括这种蛋白质的外显子和内含子。在一些实施方案中，“蛋白质编码基因组”是指由该基因组编码的所有蛋白质的核苷酸序列（例如，外显子和内含子），也可称为蛋白质组。

[0082] 在一些实施方案中，蛋白质编码基因是指与蛋白质相关的核苷酸序列，包括这种蛋白质的外显子（例如，编码序列区(CDS)和非翻译区（例如，5'和3' UTR））。在这个实施方案中，内含子序列被去除。在一些实施方案中，“蛋白质编码基因组”是指所有蛋白质的核苷酸序列，包括由该基因组编码的所有蛋白质的外显子（例如，编码序列区(CDS)和非翻译区（例如，5'和3' UTR）），也可称为外显子组。

[0083] 在一些实施方案中，蛋白质编码基因是指与蛋白质相关的核苷酸序列，包括这种蛋白质的编码序列区(CDS)。在这个实施方案中，内含子和外显子的非翻译区被去除。在一些实施方案中，“蛋白质编码基因组”是指所有蛋白质的核苷酸序列，包括由该基因组编码的所有蛋白质的CDS，也可称为外显子组-CDS。

[0084] 另一方面，本发明提供了确定蛋白质小组的方法，所述蛋白质小组包含选自研究受试者所属或与之相关的物种的全蛋白质编码基因组的一组测试蛋白质。该方法包括：(a) 从目的物种的全基因组中剪接蛋白质编码基因（例如，(i) 内含子和外显子，(ii) 外显子，或(iii) CDS）以构建蛋白质编码基因组（例如，分别为(i) 蛋白质组，(ii) 外显子组或(iii) 外

显子组-CDS), (b) 确定蛋白质编码基因组(例如,分别为(i) 蛋白质组, (ii) 外显子组或(iii) 外显子组-CDS)中基本上均匀间隔的多个标记位置;以及(c) 鉴定与蛋白质编码基因组(例如,分别为(i) 蛋白质组, (ii) 外显子组或(iii) 外显子组-CDS)中每个标记位置相关的蛋白质以产生测试蛋白质的组,其中每种蛋白质是由相关标记所在的蛋白质组的区域编码的蛋白质。在某些实施方案中,蛋白质编码基因包括外显子和内含子,并且蛋白质编码基因组是蛋白质组。或者,蛋白质编码基因是外显子,蛋白质编码基因组是外显子组。或者,蛋白质编码基因是编码序列(CDS)区,蛋白质编码基因组是外显子组-CDS。

[0085] 如本文中所述,通过从物种的整个蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS中选择蛋白质来产生蛋白质小组,其中所述蛋白质对应于在遍及该物种的基因组(例如,蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组编码序列(CDS))的某个区域均匀间隔的核苷酸标记附近的SNP。在某些实施方案中,通过从物种的整个蛋白质组中选择蛋白质来产生蛋白质小组,其中基于与遍及该物种的基因组(例如,蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组编码序列(CDS))上的某个区域均匀间隔的核苷酸标记的接近度(即,独立于SNP)来选择蛋白质。

[0086] 在构建蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS之后,记录在蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中基本上均匀间隔的多个标记位置,并选择与蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中的每个标记位置相关的蛋白质,以产生蛋白质小组。在某些实施方案中,每种蛋白质由包括位于每个标记位置附近的单核苷酸多态性(SNP)的基因编码。标记位置可在外显子组中以选定的距离(诸如25kb、50kb、100kb、200kb、300kb、600kb、1,200kb、6,000kb或12,000kb)彼此隔开。根据情况,然后鉴定与每个核苷酸标记最接近的单核苷酸多态性(SNP)。在一些实施方案中,一个或所有SNP可位于距离相应的核苷酸标记位置不到1,000个碱基的位置。

[0087] 然后鉴定与SNP相关的蛋白质(即,由包含所述SNP的基因编码的蛋白质),以产生蛋白质小组。SNP可以是同义SNP、非同义SNP或其组合。SNP可以是最接近外显子组中标记位置的SNP。在一些实施方案中,SNP可以是最接近标记位置的非同义SNP,其中结合部分可以特异性结合由含有所述非同义SNP的基因编码的蛋白质。在其它实施方案中,SNP是与标记位置最接近的同义SNP,其中结合部分可以特异性结合由含有所述同义SNP的基因编码的蛋白质。在一些实施方案中,所述结合部分是抗体、纳米抗体、亲和探针或适体。

[0088] 在一些实施方案中,所选蛋白质具有商购可得的抗体。在一些实施方案中,所选蛋白质不具有商购可得的抗体,并且使用本领域已知的技术产生新的抗体。在一些实施方案中,所选蛋白质不具有商购可得的抗体,并且例如,选择与核苷酸标记第二接近的SNP,并且将包括所述第二接近SNP的蛋白质包括在传感器中。

[0089] 如下根据图1A-图1D描述这些方法的实例。参考图1A,根据本发明的一些实施方案,组装并比对序列1(例如,蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS)。在一些实施方案中,通过将整个基因组中的所有蛋白质编码基因(例如,包含外显子和内含子的核苷酸序列)剪接成连续序列来构建蛋白质编码基因组。在一些实施方案中,通过剪接整个基因组中的所有外显子(例如,包含非翻译序列(例如,5'和3' UTR)和编码序列的核酸序列)来构建外显子组。在一些实施方案中,通过仅剪接整个基因组中的编码序列区(例如,去除了非翻译区(例如,5'和3' UTR)的外显子)来构建外显子组-CDS。蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS的组装和比对发生在参考图1B-图1D所概述的步骤之前。

[0090] 参考图1B,在一个实施方案中,通过选择外显子组中均匀间隔的核苷酸(即,标记2)以及该标记任一侧的100个碱基对来构建一个小组。因此,在该实例中,两个相邻标记5之间的距离X是200个碱基对。这±100个碱基对的区域被认为是外显子组的选择蛋白质的“区域”。选择外显子组的至少0.1%、1%或10%。从每个区域编码的蛋白质家族中选择一种蛋白质包含在蛋白质小组中。

[0091] 参考图1C,在另一个聚焦于编码单核苷酸多态性(cSNP)的实施方案中,在外显子组中选择均匀间隔的标记X,并且在相邻标记对之间,距离标记至多3千碱基(KB)的范围内,鉴定至少一个cSNP。这些±3Kb的区域中的每一个被认为是一个区域。选择外显子组的至少0.1%、1%或10%。从每个区域编码的蛋白质家族中选择一种蛋白质包含在蛋白质组中。

[0092] 参考图1D,在另一个聚焦于非编码单核苷酸多态性(nscSNP)的实施方案中,在外显子组中选择均匀间隔的标记,并且在相邻标记对之间,在距离标记至多10千碱基的范围内鉴定至少一个nscSNP。这些±10千碱基的区域中的每一个都被认为是一个区域。选择外显子组的至少0.1%、1%或10%。从每个区域编码的蛋白质家族中选择一种蛋白质包含在蛋白质组中。

[0093] 传感器的制造方法

[0094] 另一方面,本公开提供了传感器,用于检测从研究受试者收获的样品中多种蛋白质的存在或定量其量,从而对样品进行无偏倚蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究。所述传感器包括限定多个可寻址小孔的平板,每个小孔包括设置在其中的载网,其中(i)所述载网包括多个纳米结构阵列,每个纳米结构阵列包括多个纳米结构,以及(ii)每个纳米结构阵列用一个或多个结合部分功能化,用于结合测试蛋白质组中的一种或多种蛋白质,以进行无偏倚全蛋白质组、全外显子组或全外显子组-CDS关联研究。在蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS宽范围关联研究的上下文中,术语“无偏倚的”或“无偏的”可互换使用,并被理解为意指主要基于编码蛋白质或肽的基因在目的物种的基因组中的位置来选择用于探测的靶蛋白(或生物标志物蛋白),而不考虑该蛋白或肽是否与特定疾病、病症或生物途径相关。任选地,测试蛋白质的组通过以下方式预先确定:(a)确定研究受试者所属或与之相关的物种的蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中基本均匀间隔的多个标记位置;以及(b)鉴定与蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中每个标记位置相关的蛋白质,以产生测试蛋白质的组,其中每种蛋白质由包含位于外显子组中每个标记位置附近的单核苷酸多态性(SNP)的基因编码。

[0095] 该传感器使得能够检测从研究受试者收获的样品中多种蛋白质(例如,来自如上所述产生的蛋白质小组的多种蛋白质)的存在或定量其量,以对样品进行无偏倚蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究。使用上述方法确定给定物种的蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中基本均匀间隔的多个核苷酸标记位置。标记位置可在外显子组中以选定的距离(诸如25kb、50kb、100kb、200kb、300kb、600kb、1,200kb、6,000kb或12,000kb)彼此隔开。在一个实施方案中,从外显子组中选择100个随机标记,其中标记间隔300kb。

[0096] 在某些实施方案中,然后鉴定与每个核苷酸标记最接近的单核苷酸多态性(SNP)。在一些实施方案中,核苷酸标记与两个或更多个SNP等距,并且SNP是随机选择的。然后鉴定与SNP相关的蛋白质(即,由包括SNP的基因编码的蛋白质),以产生跨越整个蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS的随机选择的测试蛋白质的组。SNP可以是同义SNP、非同义

SNP或其组合。SNP可以是外显子组中最接近标记位置的SNP。在一些实施方案中,SNP可以是最接近标记位置的非同义SNP,其中结合部分可以特异性结合由含有所述非同义SNP的基因编码的蛋白质。在其它实施方案中,SNP是与标记位置最接近的同义SNP,其中结合部分可以特异性结合由含有所述同义SNP的基因编码的蛋白质。

[0097] 在一些实施方案中,独立于相邻的SNP(即,基于它们与核苷酸标记的距离)选择蛋白质。在一些实施方案中,选择紧接核苷酸标记的蛋白质。在一些实施方案中,选择与核苷酸标记最接近的其抗体可商购获得的蛋白质。

[0098] 在一些实施方案中,所选蛋白质具有商购可得的抗体或适体。在一些实施方案中,所选蛋白质不具有商购可得的抗体或适体,并且产生新的抗体。在一些实施方案中,所选蛋白质不具有商购可得的抗体或适体,并且例如,选择与核苷酸标记第二接近的SNP,并且将包含所述第二接近SNP的蛋白质包括在传感器中。在一些实施方案中,没有商业抗体或适体可用于包含第三接近SNP的蛋白质,将为所选蛋白质开发重组抗体或适体。例如,可通过在相展示或酵母展示上筛选文库来开发重组抗体或纳米抗体。

[0099] 一个或所有SNP可以位于距离相应核苷酸标记位置不到1,000个碱基的位置。

[0100] 传感器的纳米结构用多种不同的结合部分功能化,每种结合部分能够结合测试蛋白质的组中的蛋白质,从而检测测试蛋白质的存在或定量其量,如果存在于样品中的话。传感器可包括多种不同的结合部分,诸如至少20种、25种、50种、100种、150种、300种、600种或1200种不同的结合部分,用于结合测试蛋白质的组。结合部分可以是抗体、纳米抗体、亲和探针或适体。

[0101] 在一些实施方案中,结合部分,例如抗体,用于筛选蛋白质的存在或不存在。在一些实施方案中,结合部分,例如抗体,用于筛选蛋白质的总量。在一些实施方案中,结合部分,例如抗体,用于筛选蛋白质的特定变体,例如蛋白质的突变变体。在一些实施方案中,结合部分(例如抗体)用于筛选蛋白质的特定翻译后修饰,例如蛋白质的磷酸化或糖基化形式。

[0102] 可以重复这些步骤以产生一系列传感器,其中用于产生第二传感器的核苷酸标记位置与用于产生第一传感器的标记位置偏移预定距离。可以重复这种方法以产生一系列传感器,其中每个传感器能够检测由沿着基因组的核苷酸序列编码的蛋白质,所述蛋白质与由该系列中的其他传感器检测的蛋白质有所偏移。这种迭代传感器生产可用于在人蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS中产生一系列无偏选择的标记蛋白。

[0103] 在一些实施方案中,在无偏选择的蛋白质的初始筛选之后,传感器的蛋白质有显著变化。第二种靶向蛋白质传感器(例如,能够检测相关蛋白质诸如家族成员的传感器)可用于进一步探测蛋白质水平、蛋白质信号传导等的变化。

[0104] 参考图1E,用于检测样品中多种蛋白质的存在或定量其量的传感器包括平板。根据本发明的一个实施方案的平板3(在本文也称为小组或蛋白质小组)可包括可寻址小孔的阵列,例如8x 12(96板)、16x 24(384板)、32x 48(1536板)孔。例如,96孔板的每个小孔4包括设置在其中的载网5,例如10x 10的载网,载网的每个区块6为例如约400微米x 400微米,并且用不同的结合部分例如抗体功能化。更具体地,载网5的每个区块6包括一个纳米结构阵列7,每个纳米结构阵列包括多个纳米结构,如下论述的。每个纳米结构阵列用一种或多种结合部分例如抗体、纳米抗体、亲和探针或适体功能化,用于结合测试蛋白质组中的一种

或多种蛋白质,以进行蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究。在一些实施方案中,小孔中的所有纳米结构阵列用结合部分功能化,用于结合测试蛋白质组中的特定蛋白质。在其它实施方案中,用结合部分功能化小孔内的纳米结构阵列的一部分,用于结合测试蛋白质组内的特定蛋白质。

[0105] 传感器可以包括约25种、50种、100种、150种、300种、600种或1200种不同的结合部分,用于结合测试蛋白质组的每一个成员。

[0106] 通过首先确定研究受试者所属或与之相关的物种的蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中基本上均匀间隔的多个标记位置来确定测试蛋白质的组。在蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中,标记位置可以彼此间隔约25kb、50kb、100kb、200kb、300kb、600kb、1,200kb、6,000kb或12,000kb。

[0107] 然后,鉴定与蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中每个标记位置相关的蛋白质,以产生测试蛋白质的组。每种蛋白由包含位于外显子组中每个标记位置附近的单核苷酸多态性(SNP)的基因编码。所述SNP可以是同义SNP、非同义SNP或其组合。所述SNP可以是与蛋白质编码基因组、外显子组或外显子组-CDS中标记位置最接近的SNP。在一些实施方案中,所述SNP是与标记位置最接近的非同义SNP,其中结合部分可以特异性结合由含有所述非同义SNP的基因编码的蛋白质。在其它实施方案中,所述SNP是与标记位置最接近的同义SNP,其中结合部分可以特异性结合由含有所述同义SNP的基因编码的蛋白质。所述SNP-或所有SNP-可位于距离相应标记位置不到1,000个碱基的位置。

[0108] 使用方法

[0109] 可以如下对目的样品进行无偏倚蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究。样品可以是例如体液(例如血液、血清、血浆、唾液等)、组织提取物或细胞上清液。所述样品的一部分可应用于上述传感器的任何实施方案。根据具体情况,在应用于传感器之前,可以稀释样品,或不稀释样品。

[0110] 然后定量来自传感器的纳米结构的可检测信号。例如,可以检测至少一部分纳米结构的性质例如光学性质(例如荧光)的变化。样品中测试蛋白质的存在和/或量由可检测的信号确定。可以用至少一个额外的传感器重复这些步骤,以筛选目的样品的蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS。

[0111] 如本文中所示,术语“受试者”是指待通过本发明的方法和组合物测试的生物体。此类生物体优选包括哺乳动物(例如,人、小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猫、马、牛、猪或非人灵长类动物,诸如猴子、黑猩猩、狒狒和恒河猴),更优选为人。

[0112] 本申请中描述的传感器的应用包括但不限于生物标志物鉴定、诊断(例如,用于鉴定患有疾病或病症的受试者的诊断,或伴随诊断)、患者分层方案和药物开发。生物标志物鉴定应用包括但不限于鉴定给定目的表型的生物标志物(例如,对药物或治疗剂的耐受性、对药物或治疗剂的抗性、代谢敏感性等)或用于特定的疾病状态(例如,心血管疾病、炎症性疾病、自身免疫性疾病、心理疾患、神经变性疾病、癌症等)。此类生物标志物可以与受试者的表型和/或疾病状态的存在相关联,或者指示受试者相对于一般人群而言发展表型和/或疾病状态的风险升高。诊断应用包括但不限于在受影响的受试者中进行的受试者的特定疾病状态(例如,心血管疾病、炎症性疾病、自身免疫性疾病、心理疾患、神经变性疾病、癌症等)的风险评估和/或鉴定,用于确定受试者是否可对药物有反应的伴随诊断。患者分层应用包括但

不限于鉴定用于临床研究的患者或鉴定可能对给定药物有反应的患者。药物开发应用包括但不限于针对期望的反应在蛋白质小组中筛选特定疾病状态(例如,心血管疾病、炎症性疾病、自身免疫性疾病、心理疾病、神经变性疾病、癌症等)的已知或新型治疗剂和/或生物制剂。

[0113] 在BMC Res Notes (2019) 12:315中,Piovesan等人从NCBI基因网上提取人蛋白质编码基因的信息。在一个实施方案中,根据Piovesan的基因表,所有蛋白质编码基因的基因ID、基因符号、染色体登录号、起始和终止位置都按照它们在从1号染色体至X和Y染色体的人基因组中的位置顺序显示。然后将所有蛋白质编码基因剪接在一起,用于蛋白质编码基因组的连续编号,总长度为1,255,970,826bp。

[0114] 在一个实施方案中,为了以无偏倚方式构建100重蛋白质小组,沿着剪接的基因放置100个核苷酸位置标记,每个标记位于 $12,559,708*i$,其中*i*是标记的顺序。标记之间的间距为12,559,708。对于第*i*个标记,使用单核苷酸多态性数据库(dbSNP),定位与位置标记*i*最接近的SNP。然后,定位包含已鉴定的SNP的基因并将其作为第*i*个蛋白包含在该小组中。按照上述程序编制蛋白质列表,并在下面的实施例1中进一步描述。

[0115] 在一个实施方案中,为了以无偏倚方式构建100重蛋白质小组,从外显子组(例如,从蛋白质编码基因中排除内含子的核苷酸序列)构建蛋白质小组。可以从Piovesan的基因表(如上所述)中选择蛋白质的一种同种型,并记录3' UTR、CDS和5' UTR的起始和终止位置以鉴定外显子。然后可将所有的外显子剪接在一起,产生62,184,186bp的总外显子长度。

[0116] 通过沿着剪接的基因放置100个位置标记(每个标记位于 $621,842*i$,其中*i*是标记的顺序),可以从上述外显子组以无偏倚方式产生100重蛋白质小组。标记之间的间距为621,842bp。对于第*i*个标记,使用单核苷酸多态性数据库(dbSNP),可以定位最接近位置标记*i*的SNP。然后,定位包含所鉴定的SNP的基因并将其作为第*i*种蛋白质包括在该小组中。由上述方案产生的所得蛋白质列表如表5所示。

[0117] 在鉴定了蛋白质后,可将对蛋白质特异的可检测部分(例如,抗体、纳米抗体、亲和探针或适体)结合到传感器的表面上。在一些实施方案中,可用各种展示技术(例如,相展示或酵母展示)开发重组抗体或纳米抗体。在一些实施方案中,可用SELECT技术开发适体。在一个实例中,可为每个靶标开发单抗体或双抗体对。在一个实例中,可为每一个靶标开发双抗体对。接下来,对于100种蛋白质的小组,用印刷技术,诸如喷墨或压电印刷,将对每种蛋白质特异的100种不同的亲和探针点在每个载网上。例如,可使用下述方法测量蛋白质的浓度。

[0118] 下文提供了关于传感器结构、操作和制造以及纳米结构的功能化和测定的其它细节。

[0119] I. 传感器考虑因素

[0120] 本文公开的传感器有助于在大动态范围内以高灵敏度检测和/或定量目的样品中的蛋白质或肽的量。本文还公开了包含这种传感器的盒、检测系统以及使用这种传感器、盒和系统的方法,以检测和/或定量样品中蛋白质或肽的量,从而促进蛋白质组、外显子组或外显子组-CDS关联研究。

[0121] 图1F示出了用本文描述的传感器可实现的动态范围 10^8 ,所述传感器可检测样品中浓度范围在小于0.01pg/mL (10fg/mL) 与 $1\mu\text{g/mL}$ 或更大(至少8log)之间的分析物。一般而

言,其它商购可得的测定系统(例如,典型的手动ELISA、特殊的手动ELISA、基于微流体的ELISA测定、基于印迹的技术(例如,蛋白质印迹和点印迹技术)和基于自动珠粒的技术)可以测量目的样品中的分析物,但是不能测量用本文公开的传感器可实现的整个动态范围内的分析物。因此,使用本文所述的传感器可有助于测量在迄今为止只能使用现有技术测定系统的组合来实现的浓度范围内的分析物浓度。

[0122] (A) 传感器配置

[0123] 可以设想,传感器可包括各种配置的纳米结构。例如,如图2A所示,传感器可包括第一系列纳米结构20d,例如,被配置用于数字定量的一系列纳米结构(图2A(i));第二系列纳米结构20a,例如,被配置用于模拟定量的一系列纳米结构(图2A(ii));两个系列的纳米结构20d(图2A(iii));两个系列的纳米结构20a(图2A(iv));两个系列的纳米结构:一个20d,一个20a(图2A(v));以及三个系列的纳米结构:一个20d,两个20a(图2A(vi))。根据待检测的分析物(例如,蛋白质或肽)和期望的动态范围,可以设想,传感器可包括不同配置的其他系列的纳米结构。

[0124] 如本文中所示,术语“纳米结构”被理解为意指任何结构,例如纳米传感器,其至少一个维度的长度在至少1nm至小于1000nm的范围内。如本文中所示,术语“数字定量”被理解为意指籍以检测(例如,光学检测)一系列纳米结构中在结合一种或多种分析物时从一种状态翻转到另一种状态的单个纳米结构的定量方法。“数字系列”或“数字阵列”被理解为意指被配置成允许数字定量的纳米结构的相应系列或阵列。

[0125] 如本文中所示,术语“模拟定量”被理解为意指籍以在纳米结构结合多种分析物时,检测一系列纳米结构中纳米结构的可检测性质(例如,光学可检测性质,例如颜色)的基本均匀的变化的定量方法。在某些实施方案中,可检测性质的变化(例如,颜色变化)作为待检测分析物的预校准浓度范围内目的样品中分析物的浓度的函数而发生。术语“基本上均匀”被理解为意指至少60%、70%、80%、90%或95%的纳米结构共享相同的可检测性质,例如颜色。“模拟系列”或“模拟阵列”被理解为意指被配置成允许模拟检测的纳米结构的相应系列或阵列。

[0126] 在一个用于检测目标样品中分析物的存在或定量其量的示例性传感器中,该传感器包括第一区域和第二区域。第一区域包括第一系列纳米结构,其能够结合分析物并产生指示样品中在第一浓度范围内的分析物浓度的可检测信号。第二区域包括第二系列的不同纳米结构,其能够结合分析物并产生指示样品中在不同的第二浓度范围内的分析物浓度的可检测信号,其中传感器能够在第一浓度范围和第二浓度范围内定量样品中分析物的量。第一浓度范围可具有比第二浓度范围更低的可检测值,和/或第二浓度范围可以具有比第一浓度范围更高的可检测值。可以设想,第一浓度范围可与第二浓度范围重叠。

[0127] 应当理解,本文所述的传感器能够检测样品中在跨越至少3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个数量级(或3、4、5、6、7、8、9、10、11或12log)的范围(也称为动态范围)内的分析物浓度。在某些实施方案中,传感器能够检测样品中在跨越至少5、6、7、8或9个数量级(或5、6、7、8或9个对数)的浓度范围内的分析物浓度。传感器可被配置成测量给定分析物的浓度,该浓度在从小于1pg/mL至大于100ng/mL、从小于0.1pg/mL至大于1μg/mL、或从小于0.01pg/mL至大于100μg/mL、或从小于1fg/mL至大于1mg/mL的范围内,其中例如在施加到传感器之前不需要稀释样品。

[0128] 在一个示例性传感器中,第一区域包括第一系列纳米结构,其能够结合分析物并产生指示样品中第一浓度范围内的分析物浓度的可检测信号,其中结合分析物的第一系列的单个纳米结构在结合分析物时被检测(例如,光学检测),因此根据第一系列中结合了分析物分子的单个纳米结构的数量来测定样品中分析物的浓度(如果在第一浓度范围内)。第二区域包括第二系列的不同纳米结构,其能够结合分析物并产生指示样品中在不同的第二浓度范围内的分析物浓度的可检测信号,其中通过模拟检测第二区域中纳米结构的可检测性质(例如,光学可检测的性质,诸如颜色)的基本上均匀的变化作为分析物浓度的函数来测定样品中分析物的浓度(如果在第二浓度范围内),其中传感器能够在第一浓度范围和第二浓度范围内定量样品中分析物的量。

[0129] 第一浓度范围具有比第二浓度范围更低的可检测值,和/或第二浓度范围具有比第一浓度范围更高的可检测值。可以设想,第一浓度范围可与第二浓度范围重叠。

[0130] 在每个前述传感器中,传感器的第一区域任选地包括以下的一项或多项:(I) 相邻纳米结构的中心间距为至少 $1\mu\text{m}$; (ii) 每个纳米结构的最小横截面尺寸或直径为至少 10nm ; (iii) 每个纳米结构的最大横截面尺寸或直径不超过 200nm ; 或(iv) 每个纳米结构的高度在 50nm 至 1000nm 的范围内。该传感器任选地还包括(i) 基准标记或(ii) 纳米结构制造控制特征中的一个或多个。

[0131] 可以设想,任何传感器可以包括一个或多个以下特征。例如,可以设想,传感器还可包括第三区域,所述第三区域包括第三系列的另外的不同纳米结构,其能够结合分析物并产生指示样品中第三浓度范围内的分析物浓度的可检测信号,其中传感器能够在第一、第二和/或第三浓度范围内定量样品中分析物的量。

[0132] 类似地,任何第二系列中的纳米结构可包括以下一项或多项:(i) 平均高度、(ii) 平均体积、(iii) 平均表面积、(iv) 平均质量和(v) 分析物结合位点的平均数,大于第一系列中纳米结构的相应平均数。

[0133] 此外,每当传感器包括第三系列时,第三系列的纳米结构可包括以下一项或多项:(i) 平均高度、(ii) 平均体积、(iii) 平均表面积、(iv) 平均质量和(v) 分析物结合位点的平均数,大于任何第二系列中纳米结构的相应平均数。

[0134] 用结合分析物的结合剂,例如结合分析物的结合剂,例如生物结合剂,将第一系列中的纳米结构,以及适用时,第二和第三系列中的纳米结构功能化。生物结合剂可以是例如抗体、适体、配体-受体对的成员、酶或核酸。在某些情况下,在第一系列中使用对分析物的结合亲和力高于第二、第三或后续系列中的结合剂对分析物的结合亲和力的结合剂可以是有利的。

[0135] 传感器可被设计成检测和/或定量样品中任何目的分析物。例如,分析物可以是生物分子,例如蛋白质,包括例如蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、核蛋白和肽,包括前述蛋白质的肽片段。此外,给定传感器中的纳米结构或一系列纳米结构可被配置为同时或顺序结合、检测和/或定量多种不同的分析物。例如,传感器可包括多种不同的结合剂,用于检测测试样品中相应的多种不同的分析物。

[0136] 该传感器可被配置成通过光学性质、电性质或机械性质的变化来检测分析物的结合。例如,传感器可被配置成通过至少一个系列的纳米结构的光学可检测特性(例如,颜色、光散射、折射或共振(例如,表面等离子共振、电共振、电磁共振和磁共振))的变化来检测分

析物的结合。

[0137] 可以设想,传感器可以以各种不同的方式配置。例如,第一、第二或第三系列的纳米结构中的至少一个可包括纳米结构阵列。或者,第一、第二和第三系列的纳米结构中的每一个都可包括纳米结构阵列。可以设想,传感器可包括单个系列的纳米结构或多个系列的纳米结构,例如,对于检测不同浓度范围内的分析物有效的多个系列的纳米结构。当传感器包括多个系列的纳米结构时,可以(i)以相同的方式(例如,通过数字检测,其中检测或定量单个纳米结构,或者通过模拟检测,其中将给定系列内的纳米结构的光学性质的累积变化作为浓度的函数来进行检测)或者(ii)以不同的方式(例如通过数字检测和模拟检测的组合)操作不同系列的纳米结构。此外,可以设想,传感器可包括通过数字检测和/或模拟检测操作的多个不同系列。例如,传感器可包括进行操作以在相同浓度范围内通过数字检测来检测分析物的多个系列和/或进行操作以在不同浓度范围内通过模拟检测来检测分析物的多个系列。

[0138] 例如,在数字检测过程中,在第一系列纳米结构中,在结合单个分析物分子或少于预定数量的分析物分子时检测结合分析物的单个纳米结构,因此,根据第一系列中结合了分析物分子的单个纳米结构的数量来测定样品中分析物的浓度(如果存在于第一浓度范围内)。例如,相对于(i)未结合分析物的单个纳米结构的剩余数量或(ii)第一系列中纳米结构的总数,通过数字计数第一系列中已结合分析物的单个纳米结构的数量来测定样品中分析物的浓度。

[0139] 在这种方法中,通常在传感器区域中对大量纳米结构进行密集地图案化。当纳米结构的数量大于待检测的分析物的数量时,例如,基于质量转移和泊松分布效应,每个纳米结构通常最多捕获单个分析物。根据分析物是否被结合,每个纳米结构可具有两种状态之一(例如,表示为1或0)。因此,在暴露于具有分析物的样品之后,具有状态1的纳米结构的数量可以等于分析物的数量。在某些实施方案中,每个单独的纳米结构可以仅具有有限数量的结合位点来捕获一个或几个(例如,少于10个)分析物,例如蛋白质或肽。每个纳米结构具有从1至几个(<10)的相应信号标度,因此计数分子的数量可以等同于计数每个纳米结构的离散信号。各系列纳米结构的不同信号水平形成了可被检测的纳米镶嵌图案。

[0140] 类似地,可通过对第二和/或第三系列中已结合了分析物的单个纳米结构的数量相对于(i)适当系列中没有结合分析物的单个纳米结构的剩余数量或(ii)相应的第二和/或第三系列中纳米结构的总数进行数字计数,来测定分析物的浓度(如果在如图2A(iii)描绘的第二范围内,或者在第三范围内)。换句话说,在第一浓度范围、第二浓度范围和任选的第三(或更多)浓度范围内的样品中分析物的浓度根据第一系列、第二系列和/或任选的第三(或更多)系列的每一个中已结合了分析物分子的单个纳米结构的数量来测定。

[0141] 任选地或另外地,可通过模拟检测第二区域和/或第三区域中纳米结构的光学可检测性质的基本均匀变化作为分析物浓度的函数来测定分析物的浓度(如果在第二浓度范围或任选的第三浓度范围内)。例如,光学可检测性质的变化可以是第二系列和/或任选的第三系列产生的基本均匀的颜色变化作为分析物浓度的函数。换句话说,通过模拟检测第二区域和/或第三区域每一个中纳米结构的光学可检测性质的基本均匀的变化,来确定第二浓度范围和任选的第三(或更多)浓度范围内的样品中分析物的浓度。

[0142] 每个单独的纳米结构系列(或区域)可包括多达10,000个目的分析物分子的结合

位点。每个区域都有预先校准的连续信号标度(模拟标度),其与该区域捕获的蛋白质数量有关。每个区域的模拟标度对应于用于读出的物理信号的逐渐变化。不同的标度可对应于例如来自检测器(例如,光学检测器)下的每个区域的不同颜色。该区域定义了纳米马赛克(nanomosaic),其具有连续性质变化(例如颜色变化)作为分析物浓度的函数。例如,在光学检测的情况下,不同的标度可以涉及以下的一项或多项:(i)显微镜下区域的光强度,其具有作为浓度函数的连续强度变化,或(ii)电子测量值,例如每个区域的电流或电压信号,其具有作为浓度函数的连续电流或电压信号。

[0143] 可以设想,给定系列中的纳米结构可以是平面和/或曲面纳米结构。纳米结构可被设置在平面支撑体和/或柔性衬底上,其中纳米结构可以与平面支撑体和/或柔性衬底成为一体。纳米结构可由半导体材料(例如硅)或金属制成。

[0144] 可以设想,传感器还可包括基准标记,例如可通过亮视野显微镜检查和/或暗视野显微镜检查进行光学检测的基准标记。基准标记可用于校准传感器在检测系统的检测视野内的位置。传感器还可包含一种或多种纳米结构制造控制,其证明例如所制造的纳米结构显示出作为纳米结构直径的函数的颜色变化。

[0145] 在另一个示范性传感器中,如图2A(i)所示,传感器包括第一区域,该第一区域包括能够结合分析物并产生指示样品中分析物的浓度在第一浓度范围内的可检测信号的第一系列纳米结构,其中在结合分析物时光学检测结合分析物的第一系列的单个纳米结构,因此,根据第一系列中已结合分析物分子的单个纳米结构的数量来测定样品中分析物的浓度(如果在第一浓度范围内)。传感器的第一区域任选地包括以下一个或多个特征:(i)相邻纳米结构的中心间距至少为 $1\mu\text{m}$; (ii)每个纳米结构的最小横截面尺寸或直径至少为 10nm ; (iii)每个纳米结构的最大横截面尺寸或直径不超过 200nm ;或(iv)每个纳米结构的高度在 50nm 至 1000nm 的范围内。该传感器任选地还包括第二区域,其包括(i)基准标记或(ii)纳米结构制造控制特征中的一项或多项。

[0146] 在另一个示范性传感器中,如图2A(ii)所描绘的,传感器包括第一区域,其包括能够结合分析物并产生指示样品中分析物的浓度在第一浓度范围内的可检测信号的第一系列纳米结构,其中通过模拟检测第一区域中纳米结构的光学可检测特性的基本均匀变化来确定样品中分析物的浓度(如果在第一浓度范围内),所述光学可检测特性的变化为分析物浓度的函数。第一区域还包括以下的一者或多者:(i)相邻纳米结构的中心到中心间距至少为 $1\mu\text{m}$; (ii)每个纳米结构的最小横截面尺寸或直径至少为 100nm ; (iii)每个纳米结构的最大横截面尺寸或直径不超过 300nm ;或(iv)每个纳米结构的高度在 50nm 至 1000nm 的范围内。该传感器任选地还包括第二区域,该第二区域包括(i)基准标记或(ii)纳米结构制造控制特征中的一者或多者。

[0147] 所公开的传感器的感测区域是与生物分析物相互作用的物理点。在某些实施方案中,感测区域被分成不同的部分,每个部分针对特定的浓度范围。在非常低的浓度下,可使用单分子纳米结构的阵列。如果分析物被单分子传感器捕获,传感器产生数字“是”信号,因此,分子的浓度可以与数字传感器的计数相关。在中至低浓度范围,具有一定动态范围以产生模拟信号的较大纳米结构用于测量分析物的浓度。读出信号可以是与纳米结构相关的共振光谱或散射强度等。为了提高检测精度,可使用这些传感器的阵列来获得统计平均值。

[0148] 作为非限制性示例,可将传感器的感测区域分成多个区域。举例来说,图2B是具有

四个传感器区域32、34、36、38的传感器30的示意图。每个区域包括一系列纳米结构20。在一个实施方案中，超低浓度传感器区域32的一系列纳米结构20d确定单分子灵敏度。结果，分析物的浓度与翻转产生可检测的信号，例如“是”数字信号的单分子纳米结构20d的数量相关。低、中和高浓度传感器区域34、36、38的纳米结构20a具有增加的尺寸，因此具有较低的灵敏度，但是动态范围越来越大。区域32、34、36、38中的每一个都针对特定的动态范围进行了优化。可将从每个区域获得的结果聚集在一起，以提供可由区域32、34、36、38实现的动态范围的聚集产生的动态范围。

[0149] 图3A描绘了示例性传感器的示意图以及使用这种传感器实现的目的分析物的定量。该传感器30包括具有配置用于数字定量的一系列纳米结构20d的第一区域50和具有配置用于模拟定量的一系列纳米结构20a的第二区域60，其中颜色的变化指示不同的浓度。在该实例中，对范围从pg/mL至ng/mL的分析物浓度执行数字定量70，对范围从ng/mL至g/mL的分析物浓度执行模拟定量80。当分析物的浓度在pg/mL至ng/mL的范围内时，可以基于区域50中改变状态（例如，从一种状态翻转至另一种状态）的系列中的纳米结构的数量来测量分析物浓度。然而，当分析物的浓度达到可检测范围的上限时，区域50中的传感器变得饱和，并且传感器不能定量更高浓度的分析物。当至少60%、70%、80%、90%、95%或更多的结合位点已经结合了分析物时，第一系列可发生饱和。结果，该传感器30还包括多个系列的纳米结构，当样品中的分析物浓度落入给定系列的纳米结构可检测的分析物浓度范围内时，所述纳米结构改变它们的光学性质（例如，检测为颜色变化）。在该实施方案中，区域60中的系列纳米结构被校准以在相邻或重叠浓度范围内改变它们的光学性质（例如，颜色）。

[0150] 在图3B中，传感器40包括一系列用于数字检测/定量的纳米结构70和一系列用于模拟检测/定量的纳米结构80。特别地，用于数字检测的系列纳米结构70包括呈阵列形式的纳米结构20d。随着分析物（例如，Tau蛋白）的浓度从1.2pg/mL增加至10ng/mL，从一种状态翻转到另一种状态的纳米结构的数量增加，如每个板90下的比率所示。当分析物浓度等于或高于10ng/mL时，该系列纳米结构饱和，因为所有或基本上所有的纳米结构（例如，至少60%、70%、80%、90%、95%的结合位点具有结合的分析物）已经从一种状态翻转到另一种状态。右侧的方框示出了被配置用于模拟检测80的一系列纳米结构20a中光学性质的变化（例如，色度变化）。例如，当分析物的浓度增加至10ng/mL时，系列纳米结构的光学性质（例如，色调）的变化不会改变。然而，当分析物的浓度大于10ng/mL时，系列纳米结构的光学性质的变化变得可检测，例如，作为分析物浓度的函数的颜色变化。更大的动态范围可通过在传感器中包括额外系列的纳米结构（例如，数字阵列和/或模拟阵列）（其被校准来检测和定量其它浓度范围内的分析物）来实现。

[0151] 图3C示出了由本文所述传感器100执行的数字定量。如所示出的，传感器能够检测浓度为50fg/mL的分析物分子（Tau蛋白的分子），其中2046个数字纳米结构（20d）中有96个从一种光学性质翻转到可由检测器检测的另一种光学性质。在该特定实例中，当所有或基本上所有的纳米结构从一种光学状态翻转到另一种光学状态时，传感器100在约50pg/mL的分子浓度下变得饱和。

[0152] 图4是描绘从由图3B的示例性传感器40获得的测量值汇编的数据的曲线图。在1pg/mL至1ng/mL的分析物浓度范围内，数字定量模式70提供了高灵敏度和3log的动态范围。在1ng/mL至1μg/mL的分析物浓度范围内，模拟比色测量80将可检测浓度范围扩展了额

外的3log。形成跨越整个动态范围的连续曲线的数字定量测量与模拟定量测量之间的转换可使用本文所述的类型的算法来自动化。在该实例中,使用配置用于数字定量的一系列纳米结构与配置用于模拟定量的一系列纳米结构的组合,获得了6log的动态范围。已经发现,本文所述的传感器可使用小体积的样品(例如,小于100 μ L、50 μ L、25 μ L、10 μ L或5 μ L)以高灵敏度(例如,50fg/mL)实现大动态范围(例如,6log或更大)。

[0153] 纳米结构可具有任何合适的形状和/或尺寸。例如,在一些情况下,纳米结构可以是纳米针、纳米线、纳米棒、纳米锥等。其它形状也是可能的,例如纳米带、纳米丝、纳米管等。在某些实施方案中,纳米结构垂直排列,尽管其它角度或排列也是可能的。纳米结构,诸如纳米针、纳米点、纳米盘、纳米柱等,由于它们能够通过耦合到表面极化激元(surface polariton)来限制电磁能量而具有单分子水平的灵敏度。

[0154] 传感器的物理形式可以通过自下而上和/或自上而下的方法在表面上制造的纳米结构(例如纳米针、纳米线、纳米柱、纳米点等)的阵列或矩阵。该表面可以是平坦表面,诸如晶片的顶面。或者,该表面也可以是弯曲的或柔性的,或者是三维结构诸如纤维或线等的一部分。

[0155] 传感器的功能形式可包括纳米光学结构、纳米机械结构或纳米电结构。因此,读出信号包括但不限于光信号、电信号和机械信号。因此,分析物的浓度可通过纳米结构的光学、电学或纳米机械性质的变化来测定。光学特征包括例如表面等离子共振、纳米光子共振、电共振、磁共振、散射、吸收、荧光、颜色变化等。电特征包括例如电阻、电容、电流、电压等。纳米机械特征包括例如振动共振、振动幅度、机械质量等。

[0156] 前述结构也可用于通过观察分析物的光学性质(例如表面等离子体共振、散射强度或吸收)的变化来检测高浓度的分析物。这些结构的灵敏度和检测范围与结构的尺寸密切相关。平面制造技术实现了不同尺寸和形状的纳米结构在一个器件中的可扩展和灵活集成。不同的纳米结构可用于实现高灵敏度和高动态范围,用于确定生物样品中的分子和分析物。

[0157] 在某些实施方案中,可以设计不同结构的表面性质,使得第一系列纳米结构中的纳米结构结合分析物的结合亲和力可以高于第二和/或第三系列纳米结构中的纳米结构结合分析物的结合亲和力。这可通过使用对给定分析物具有不同结合亲和力的结合剂来实现。因此,在低浓度下,分析物优先被单分子纳米结构捕获和检测。随着浓度增加,第一系列的纳米结构饱和,来自其它系列的纳米结构的信号可以用于扩展动态范围。

[0158] 图5是包括多个系列纳米结构的示例性传感器(例如,纳米马赛克芯片)150的图示。在传感器150左手侧的列中,分开的区域表示制造控制结构155,其表明纳米结构随着纳米结构直径增加而改变颜色。中间区域160代表多个单独的阵列(即,16个阵列),每个阵列定义了相应系列的纳米结构(共同包括25,600个纳米结构,每个纳米结构定义了单分子纳米结构),其被配置用于测量超低浓度水平的分析物的数字定量。右手侧的区域包括用于模拟定量的三个系列的纳米结构(例如,第二、第三和第四系列的纳米结构),其被描绘为区域165、170、175。区域165、170、175中的每一个都被校准以测量在三个独立的相邻或重叠的浓度范围内的分析物浓度。在某些实施方案中,这三个区域可各自包括1,000个纳米结构。

[0159] 在另一个实施方案中,如图6中所图示的,另一个示例性传感器(例如纳米马赛克芯片)150包括许多系列(区域)的纳米结构。在中心,基准标记200被定位成帮助将传感器与

光学检测系统对准。基准标记可以是任何期望的设计。例如,如图6所示,基准标记200包括菱形图案和三个三角形图案,它们以不具有旋转对称性的方式排列,以提供位置和旋转方向的信息。结果,基准标记可用于(i)定位传感器位置,以及(ii)对准纳米结构的水平面和垂直面。制造控制结构155被设置在基准周围。数字单分子纳米结构20d的阵列设置在传感器的左侧和右侧区域,模拟分子纳米结构20a的阵列设置在围绕基准和制造控制结构的中间行。图6所示的制造控制包括8个纳米结构(例如,纳米针)区块,其直径范围为80nm至150nm。暗视野成像下纳米结构(纳米针)的颜色随着直径的增加而改变。

[0160] 在某些实施方案中,纳米结构按照从与衬底附着的末端或点确定的长度为小于约500nm、450nm、350nm、300nm、250nm、200nm、150nm、100nm、50nm、30nm、20nm、10nm、5nm、3nm或2nm。在某些实施方案中,纳米结构的长度可为至少约2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm或500nm。

[0161] 纳米结构可具有任何合适的横截面形状,例如正方形、圆形、三角形、椭圆形、多边形、星形、不规则形状等。纳米结构可在其整个长度上保持相同的横截面形状,或者可在纳米结构的不同部分具有不同的横截面形状。另外,纳米结构可具有任何合适的横截面直径。横截面直径可以是恒定的(例如,如在纳米针或纳米棒中),或者是变化的(例如,在纳米锥中)。平均截面直径可以例如小于约1,000nm、750nm、500nm、400nm、300nm、200nm、175nm、150nm、125nm、100nm、75nm、50nm、40nm、30nm、20nm或10nm。在某些实施方案中,横截面直径可为至少约10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、75nm、100nm、125nm、150nm、175nm、200nm、300nm、400nm、500nm、750nm或1,000nm。在各种实施方案中,组合也是可能的。例如,纳米结构的平均直径可介于50nm与300nm之间、75nm与250nm之间或100nm与200nm之间。

[0162] (B) 制造考虑因素

[0163] 纳米结构可由任何合适的材料形成,并且可与其上设置有纳米结构的衬底相同或不同。在某些实施方案中,纳米结构(例如,纳米针)可由硅和/或其它合适的半导体材料(例如,锗)形成。另外,材料的非限制性实例包括金属(例如,镍或铜)、二氧化硅、玻璃等。

[0164] 在某些实施方案中,纳米结构(例如,纳米针)可以设置在可由单一材料形成的衬底上。换句话说,纳米结构(例如,纳米针)和下面的衬底(例如,平面衬底)可以是一体的,并且可由相同的材料形成。在其它方法中,纳米结构(例如,纳米针)可以结合或粘附至下面的基底(例如,平面基底),所述基底可由相同的材料或不同的材料形成。

[0165] 可以设想,本文所述的传感器可通过多种不同的方法例如使用半导体制造方法制造。如上所述以及下文更详细描述,可使用任何合适的方法来形成可用于制造本文所述的传感器的系列纳米结构。实例包括但不限于刻蚀技术,诸如电子束蚀刻、光刻、X射线蚀刻、极紫外线蚀刻、离子投影蚀刻等。可选地或另外地,纳米结构可由一种或多种易于用合适的蚀刻剂蚀刻的材料形成。

[0166] 例如,在某些实施方案中,纳米结构可由一种或多种易于用合适的蚀刻剂蚀刻的材料形成。例如,纳米结构可包括诸如二氧化硅或玻璃的材料,其可使用HF(氢氟酸)或BOE(缓冲氧化物蚀刻)来蚀刻。作为另一个实例,纳米结构可包括诸如铜、铁、镍和/或钢等金属,所述金属可使用诸如HCl(盐酸)、HNO₃(硝酸)、硫酸(H₂SO₄)等酸和/或诸如氯化铁(FeCl₃)或硫酸铜(CuSO₄)等其它蚀刻化合物来蚀刻。作为另一个实例,纳米结构可包括硅或

其它半导体材料,所述半导体材料可使用诸如EDP(乙二胺和邻苯二酚的溶液)、KOH(氢氧化钾)和/或TMAH(氢氧化四甲铵)等蚀刻剂来蚀刻。在一些情况下,纳米结构还可包括塑料或聚合物,例如聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯、聚全氟丁烯乙烯基醚等。可使用KOH(氢氧化钾)和/或其它酸(诸如本文所述的那些酸)来蚀刻。

[0167] (i) 纳米结构制造

[0168] 可以设想,本文所述的传感器可通过常规半导体制造技术,例如CMOS技术来制造,所述制造技术已经以成本有效的方式产生了高通量和高产量的高制造能力。通过使用此类方法,可以制造包括一个或多个系列的纳米结构(例如纳米针、纳米点、纳米盘、纳米线和纳米柱)的传感器,所述纳米结构设置在衬底上或与衬底成为一体。示例性纳米结构示意图地描绘在图7和图8中。作为非限制性实例,图7示出了几种纳米结构20,其可用当前的纳米制造技术直接在衬底上形成,所述纳米制造技术包括电子束蚀刻、光刻、纳米压印等。例如,纳米结构20可以是纳米柱(均匀纳米针)、纳米盘、锥形纳米针或纳米点。另外,图8描绘了分别由两种或更多种材料(例如第一和第二材料300和305)制造的纳米结构20(例如,纳米针)。如下所述,每种材料的组成可用于控制纳米结构结合分析物的结合能力,或实现特定的光学性质、电性质或磁性质。

[0169] 纳米结构的制造可以在晶片规模或芯片规模以同等的缩放能力进行。在该类型的方法中,首先为设计的纳米结构制作掩模。在某些实施方案中,使用与设计结构相反的结构作为掩模上的图案。例如,使用旋涂或浸涂工艺将光致抗蚀剂涂覆到晶片或芯片上。然后可将光致抗蚀剂暴露于穿过掩模到达光致抗蚀剂的电磁辐射。此后,对曝光的光致抗蚀剂进行显影。在某些实施方案中,也可通过激光束或电子束直接写入光致抗蚀剂上的图案。然后,可通过物理气相沉积(包括热蒸发、电子束蒸发、溅射或化学沉积,或者所需材料的原子层沉积)将光致抗蚀剂上的图案转移到衬底上。

[0170] 在某些实施方案中,可使用自上而下的蚀刻工艺(包括湿法蚀刻、干法蚀刻诸如反应离子蚀刻、溅射蚀刻和/或气相蚀刻)将光致抗蚀剂上的图案转移到衬底。可将图案化、沉积、蚀刻和功能化过程重复多次循环。在某些实施方案中,可使用半导体制造工艺来制造纳米针、纳米柱、纳米点和/或纳米线的阵列。在其它实施方案中,纳米针、纳米柱、纳米点和/或纳米线的阵列可使用模压工艺来制造。

[0171] 示例性制造方法描述于图9A-图9D中所示的横截面视图中。更具体地,参照图9A,将一层电子束抗蚀剂或光致抗蚀剂310涂覆到半导体衬底320(诸如硅衬底)上。参考图9B,然后通过电子束暴露或电磁辐射暴露来对抗蚀剂层进行图案化,以例如通过使用Elionix或Raith电子束蚀刻系统形成抗蚀剂层特征325。参考图9C,将抗蚀剂在抗蚀剂显影剂中显影,以去除其部分并仅留下抗蚀剂特征325。参考图9D,然后用图案化的抗蚀剂作为掩模进行蚀刻工艺。蚀刻工艺可以是例如湿法或干法蚀刻。合适的湿法蚀刻可以是例如乙二胺焦儿茶酚(EDP)、氢氧化钾(KOH)或氢氧化四甲铵(TMAH)的溶液。结果,产生了硅纳米针330,其中抗蚀剂325设置在纳米针的顶面上。纳米针的高度范围可为2nm至1000nm。纳米针的直径范围可为10nm至1000nm。可使用常规湿法蚀刻缓冲剂(未示出)去除抗蚀剂特征325。

[0172] 可使用化学气相沉积或原子层沉积或两者的组合来化学活化蚀刻结构的表面。这种活化工艺也可在湿溶液中进行。然后,化学活化的结构准备好通过例如化学吸附(例如共价结合)或物理吸附来结合生物材料,本文所述的结合剂。

[0173] 合适的硅衬底可以是例如圆形12”硅晶片。为了符合生物分子筛选协会(SBS)推荐的微孔板规格,将圆形晶片切成矩形。切割步骤可以在如上所述的制造过程结束时执行。或者,可以在制造过程开始时切割成晶片深度的一半;然后,在完成所有制造步骤(包括旋涂、图案化、沉积和蚀刻)之后,可以容易地将晶片切割成SBS形式。

[0174] 另一种制造方法描述于图10A-图10G所示的横截面图中。参考图10A,使用化学气相沉积、原子层沉积或两者的组合,在硅衬底320的顶面上形成二氧化硅层335。该层的厚度范围可为2nm至100nm。将包括例如聚甲基丙烯酸甲酯的抗蚀剂层310旋涂至二氧化硅层335上。参考图10B和图10C,通过电子束或电磁辐射对抗蚀剂层310进行图案化,然后在抗蚀剂显影剂中显影以形成抗蚀剂特征325。参考图10D,通过例如使用例如Sharon热蒸发器或Denton电子束蒸发器的热蒸发(或电子蒸发),将铝层340沉积在图案化的抗蚀剂层特征325上。铝层340的厚度优选为20nm至100nm。参考图10E,执行剥离工艺以去除抗蚀剂层特征325,在二氧化硅层335上留下铝掩模。参考图10F,执行蚀刻工艺,诸如利用STS ICP RIE系统或Oxford等离子体RIE系统的反应离子蚀刻,以蚀刻氧化硅纳米针335。RIE蚀刻还可进行到硅层320中,产生双层SiO₂-Si纳米结构。参考图10G,可以在铝蚀刻剂缓冲液(例如1-5% HNO₃、H₃PO₄和CH₃COOH的混合物)中从硅纳米针342的顶部蚀刻掉铝掩模340。

[0175] 在图11A-图11F所示的横断面视图中描绘了另一种制造方法。参考图11A,二氧化硅层335生长在硅衬底320的顶面上。抗蚀剂层310被旋涂到二氧化硅层335上。参考图11B和图11C,通过电子束或电磁辐射对抗蚀剂层310进行图案化,然后在抗蚀剂显影剂中显影以形成抗蚀剂特征325。参考图11D,通过例如热蒸发(或电子蒸发)工艺,在图案化的抗蚀剂层310上沉积金属层,诸如铝层340。参考图11E,然后执行剥离工艺以去除抗蚀剂层310,留下设置在衬底上的氧化物层上的铝纳米针。参考图11F,涂层345可被旋涂以改变衬底的表面性质。涂层可以是疏水材料,诸如TEFLON,或聚乙二醇分子层。涂层的厚度小于铝纳米针的高度。

[0176] 图12A-图12F所示的横截面图中描绘了另一种制造方法。参考图12A,将抗蚀剂层310旋涂在氧化物衬底350上。氧化物层可以是热生长的氧化硅,或者通过化学气相沉积形成。在一些实施方案中,衬底350可以是载玻片。参考图12B和图12C,电磁辐射可用于在抗蚀剂层310中对特征进行图案化,然后将抗蚀剂层310在抗蚀剂显影剂中显影以形成抗蚀剂特征325。参考图12D,通过例如使用化学气相沉积,在图案化的抗蚀剂层310上沉积硅层355。参考图12E,执行剥离工艺以去除图案化的抗蚀剂层310,这在氧化物衬底上导致硅纳米点360结构。参考图12F,可使用硅纳米点360作为晶种,通过例如VLS(气-液-固)法,外延生长硅纳米针结构365。

[0177] 在图13A-图13D所示的横截面图中描述了另一种制造方法,其中可通过使用模具对光致抗蚀剂层进行图案化。参考图13A,模具370由例如Si或石英制成。模具可通过高分辨率图案化技术诸如电子束蚀刻来制造。模具具有与待复制的靶纳米结构相似的特征尺寸。参考图13B,将抗蚀剂层310旋涂在硅衬底320上。参考图13C,然后通过纳米压印或纳米压模(nanostamping)将模具370中的特征压印到抗蚀剂中,然后通过例如UV或热交联。参考图13D,压印的光致抗蚀剂可用作后续蚀刻工艺的掩模,以获得硅纳米结构。

[0178] 参考图14A和图14B,通过重复本文上述的制造步骤,有可能产生在晶片320上制造的多个传感器375,以产生例如设置在每个晶片320上的10x 10的传感器阵列。如图14B所

示,每个传感器包括纳米结构(例如设置在硅衬底上的纳米针330)的阵列。

[0179] 应当注意,图10-图14中描绘的纳米结构有至少一个维度在1-999nm、1-750nm、1-500nm、1-400nm、1-300nm、1-200nm、1-100nm、10-999nm、10-750nm、10-500nm、10-400nm、10-300nm、10-200nm、10-100nm、20-999nm、20-750nm、20-500nm、20-400nm、20-300nm、20-200nm、20-100nm、30-999nm、30-750nm、30-500nm、30-400nm、30-300nm、30-200nm、30-100nm、40-999nm、40-750nm、40-500nm、40-400nm、40-300nm、40-200nm、40-100nm、50-999nm、50-750nm、50-500nm、50-400nm、50-300nm、50-200nm或50-100nm的范围内。例如在图14B中,纳米结构之间的间距,即中心间距离,通常为1-100 μm ,例如至少1.5 μm 、2 μm 、3 μm 、4 μm 、5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 、9 μm 、10 μm 、20 μm 、30 μm 、40 μm 、50 μm 、60 μm 、70 μm 、80 μm 或90 μm 。其它尺寸可用于结构的间距。如图14A所示,图14B中的纳米结构阵列在其整体上也可以以阵列形式排列。例如,如图14A所示,两个纳米结构阵列之间的间距的范围可为小于100 μm 至大于数厘米。此外,可以设想,纳米结构的间距和尺寸在芯片的不同部分中或在每个纳米结构系列内可以不同。在各种实施方案中,这些的任意组合也是可能的。

[0180] 此外,可以控制周期性结构中纳米结构之间的距离或间距,例如,使得纳米结构形成元表面(meta-surface)。例如,间距可被设置成小于入射光的波长。例如,间距可以小于700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm、100nm、50nm、25nm、10nm、9nm、8nm、7nm、6nm、5nm、4nm、3nm或2nm,和/或大于1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、25nm、50nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm或700nm。例如,在某些情况下,间距可介于400nm与500nm之间。纳米结构可具有本文提供的任何维度。在某些情况下,纳米结构的平均横截面直径或者最小或最大横截面尺寸小于入射光的波长。在某些情况下,单个纳米结构被配置为光学可分辨的,其中,例如,间距可以小于100 μm 、小于10 μm 、小于5 μm 和/或大于1 μm 或大于5 μm 。

[0181] 表1描述了本文所述的用于光学读出的纳米结构的示例性参数。

[0182] 表1

参数	最小值	典型值或范围	最大值	单位
数字纳米结构的横截面尺寸或直径	10	60-95	150	nm
[0183] 模拟纳米结构的横截面尺寸或直径	100	取决于分析物浓度 (例如,可为 110-130)	1,000	nm
相邻纳米结构的中心间距	1	1.5 - 3	取决于衬底尺寸	μm
纳米结构的高度	50	100-250	1,000	nm

[0184] 表2描述了本文所述的用于机械读出的纳米结构的示例性参数。

[0185] 表2

参数	最小值	典型值或范围	最大值	单位
数字纳米结构的横截面尺寸或直径	0.1	60-95	100	nm
[0186] 模拟纳米结构的横截面尺寸或直径	100	取决于分析物浓度	100,000	nm
相邻纳米结构的中心间距	10	10-100	取决于衬底尺寸	μm
纳米结构的高度	50	100-1,000	10,000	nm

[0187] 表3描述了本文所述的用于电读出的纳米结构的示例性参数。

[0188] 表3

参数	最小值	典型值或范围	最大值	单位
数字纳米结构的横截面尺寸或直径	5	10-100	500	nm
[0189] 模拟纳米结构的横截面尺寸或直径	100	取决于分析物浓度	1000	nm
相邻纳米结构的中心间距	10	100-1,000	取决于衬底尺寸	μm
纳米结构的高度	10	100-500	10,000	nm

[0190] (ii) 纳米结构功能化

[0191] 用结合分析物的结合剂(例如结合分析物的结合剂,例如生物结合剂)对第一系列和在适用的情况下第二和第三系列中的纳米结构进行功能化。生物结合剂可以是例如抗体、适体、配体-受体对的成员、酶或核酸。在某些情况下,例如,当第一系列用于测量非常低浓度的分析物时,在第一系列中使用对分析物的结合亲和力高于第二、第三或后续系列中的结合剂的结合剂可能是有利的。

[0192] 施加到给定纳米结构上的结合剂的数量可根据所需的测定法,例如所需的动态范围、待检测的分析物的数量等而变化。例如,在某些情况下,纳米结构可用1种、5种、10种、20种、25种、50种、75种、100种或更多种结合剂官能化。这些值的范围可为1-1,000个/纳米结构、1-500个/纳米结构、1-250个/纳米结构、1-100个/纳米结构、1-50个/纳米结构、1-25个/纳米结构、1-10个/纳米结构或1-5个结合剂/纳米结构。

[0193] 传感器可被设计成检测和/或定量样品中的任何目的分析物。此外,给定传感器中的纳米结构或纳米结构系列可被配置成同时或顺序结合、检测和/或定量多种不同的分析物。例如,传感器可包括多种不同的结合剂,用于检测测试样品中相应的多种不同的分析物。

[0194] 可以在各种样品中检测和/或定量分析物。样品可呈允许测量分析物的任何形式。换句话说,样品必须允许分析物提取或处理,以允许检测分析物,诸如薄切片的制备。因此,样品可以是新鲜的,通过合适的低温技术保存的,或者通过非低温技术保存的。在某些实施

方案中,样品是体液样品,诸如血液、血清、血浆、尿液、脑脊液或间质液样品。在某些实施方案中,样品是例如从通过使用常规活检器械和程序获得的活检样品获得的组织提取物。内窥镜活组织检查、切除活组织检查、切口活组织检查、细针活组织检查、穿孔活组织检查、刮削活组织检查和皮肤活组织检查是本领域技术人员可用来获得组织样品的公认医疗程序的实例。用于随后分析的组织制备的合适技术是本领域技术人员所熟知的。在某些实施方案中,样品是细胞样品或细胞上清液样品。

[0195] 分析物包括生物分子,例如蛋白质,包括蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、核蛋白和肽,包括前述蛋白质中任一种的肽。示例性的基于蛋白质的分析物包括例如但不限于细胞因子、抗体、酶、生长因子、激素、结构蛋白、转运蛋白、受体、DNA结合蛋白、RNA结合蛋白、免疫系统蛋白、伴侣蛋白等。

[0196] 在某些实施方案中,分析物是细胞因子,例如干扰素(例如,IFN α 、IFN β 和IFN γ)、白细胞介素(例如,IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-17和IL-20)、肿瘤坏死因子(例如,TNF α 和TNF β)、红细胞生成素(EPO)、FLT-3配体、gIp10、TCA-3、MCP-1、MIF、MIP-1 α 、MIP-1 β 、Rantes、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),以及任何前述物质的功能片段。

[0197] 在某些实施方案中,分析物是抗体。抗体的实例包括但不限于抗EGFR、抗HER2、抗PD1、抗PIK3CA、抗抗Tau、抗RhoA、抗 β 肌动蛋白、抗 α 微管蛋白、抗 β 微管蛋白、抗YAP、抗TAZ、抗NRF2、抗SIRT1、抗SIRT2、抗GIRK2、抗IL-6、抗IL-9、抗FLT3、抗BCMA、抗生长素释放肽(anti-ghrelin)、抗催产素、抗催乳素和抗松弛素。

[0198] 在某些实施方案中,分析物是酶。酶的实例包括但不限于亚硝酸盐还原酶、硝酸盐还原酶、谷胱甘肽还原酶、硫氧还蛋白还原酶、亚硫酸盐氧化酶、细胞色素p450氧化酶、一氧化氮双加氧酶、硫胺酶、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、半胱氨酸脱硫酶、硫辛酰基合酶、磷脂酶A、乙酰胆碱酯酶、胆碱酯酶、磷脂酶C、果糖二磷酸酶、磷脂酶D、淀粉酶、蔗糖酶、几丁质酶(chitinase)、溶菌酶、麦芽糖酶、乳糖酶、 β -半乳糖苷酶、透明质酸酶、解旋酶、ATP酶和DNA聚合酶。

[0199] 在某些实施方案中,分析物是生长因子。生长因子的实例包括但不限于集落刺激因子(CSF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)和血管内皮生长因子(VEGF)。

[0200] 在某些实施方案中,分析物是激素。激素的实例包括但不限于肾上腺素、褪黑激素、去甲肾上腺素、三碘甲状腺原氨酸、甲状腺素、多巴胺、前列腺素类、白三烯类、前列环素、血栓烷、胰淀素(或胰岛淀粉样多肽)、抗苗勒氏管激素(或苗勒氏管抑制因子或激素)、脂连蛋白、促肾上腺皮质激素(或促肾皮素(corticotropin))、血管紧张素原和血管紧张素、抗利尿激素(或加压素、精氨酸加压素)、心房钠尿肽(或心房肽)、脑钠尿肽、降钙素、胆囊收缩素、促肾上腺皮质激素释放激素、皮质抑制素、脑啡肽、内皮素、红细胞生成素、促卵泡激素、甘丙肽、胃抑制多肽、胃泌素、生长素、胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1、促性腺激素释放激素、生长激素释放激素、hepcidin、人绒毛膜促性腺激素、人胎盘催乳素、生长激素、抑制素、胰岛素、胰岛素样生长因子(或生长介素)、瘦素、促脂素、促黄体生成素、促黑素细胞激素、胃动素、食欲素、骨钙素、催产素、胰多肽、甲状旁腺激素、垂体腺苷酸环化酶激活

肽、催乳素、催乳素释放激素、松弛素、肾素、胰液素、生长抑素、血小板生成素、促甲状腺激素(或促甲状腺素)、促甲状腺素释放激素、血管活性肠肽、鸟苷素、尿鸟苷素、睾酮、脱氢表雄酮、雄烯二酮、双氢睾酮、醛固酮、雌二醇、雌酮、雌三醇、皮质醇、孕酮、骨化三醇(1,25-二羟基维生素D3)和骨化二醇(25-羟基维生素D3)。

[0201] 在某些实施方案中,分析物是结构蛋白。结构蛋白的实例包括但不限于肌动蛋白、肌球蛋白、连环蛋白、角蛋白、血小板溶素、胶原蛋白、原纤维蛋白、丝聚蛋白、明胶、紧密连接蛋白、层粘连蛋白、弹性蛋白、肌联蛋白和骨质。

[0202] 在某些实施方案中,分析物是转运蛋白。转运蛋白的实例包括但不限于EAAT1、EAAT2、EAAT3、EAAT4、EAAT5、葡萄糖转运蛋白、多巴胺转运蛋白、去甲肾上腺素转运蛋白、血清素转运蛋白、囊泡单胺转运蛋白、ATP结合盒转运蛋白、V型ATP酶、P型ATP酶、F型ATP酶和视紫质。

[0203] 在某些实施方案中,分析物是受体。受体的实例包括但不限于G蛋白偶联受体、肾上腺素能受体、嗅觉受体、受体酪氨酸激酶、表皮生长因子受体(EGFR)、胰岛素受体、成纤维细胞生长因子受体、高亲和力神经营养因子受体、肝配蛋白受体、整联蛋白、低亲和力神经生长因子受体和NMDA受体。

[0204] 在某些实施方案中,分析物是DNA结合蛋白。DNA结合蛋白的实例包括但不限于H1/H5、H2、H3、H4、鱼精蛋白类和转录因子(例如,c-myc、FOXP2、FOXP3、MyoD、p53等)。

[0205] 在某些实施方案中,分析物是RNA结合蛋白。RNA结合蛋白的实例包括但不限于锯齿状RNA效应分子同源物(Serrate RNA effector molecule homolog,SRRT)、TAP/NXF1、ZBP1、GLD-1、GLD-3、DAZ-1、PGL-1、OMA-1、OMA-2、Pumilio、Nanos、FMRP、CPEB和Staufen。

[0206] 在某些实施方案中,分析物是免疫系统蛋白质。免疫系统蛋白质的实例包括但不限于CD34、CD31、CD117、CD45、CD11B、CD15、CD24、CD44、CD114、CD182、CD4、CD8、CD3、CD16、CD91、CD25、CD56、CD30、CD31、CD38、CD47、CD135和FOXP3。

[0207] 在某些实施方案中,分析物是伴侣蛋白。伴侣蛋白的实例包括但不限于GRP78/BIP、GRP94、GRP170、钙联蛋白、钙网蛋白、HSP47、ERp29、蛋白质二硫键异构酶(PDI)、脯氨酰异构酶、ERp57、HSP70、HSP90和HSP100。

[0208] 纳米结构可使用本领域已知的标准化学物质来功能化。首先,可使用标准化学法(包括标准接头化学法)活化纳米结构的表面以结合结合剂。

[0209] 结合剂可包含或被工程改造成包含能够直接或通过化学接头与纳米结构表面反应(例如,通过纳米结构表面上或表面处存在的硅烷醇基团)的官能团。

[0210] 在一种方法中,纳米结构的表面硅烷醇基团可用一种或多种具有反应性基团(例如伯胺)的活化剂(诸如烷氧基硅烷、氯硅烷或替代的硅烷形式)活化。具有反应性基团的示例性烷氧基硅烷可包括例如氨基硅烷(例如,(3-氨基丙基)-三甲氧基硅烷(APTMS)、(3-氨基丙基)-三乙氧基硅烷(APTES)、(3-氨基丙基)-二乙氧基-甲基硅烷(APDEMS)、3-(2-氨基乙基氨基丙基)三甲氧基硅烷(AEAPTMS)、缩水甘油氧基硅烷(例如,(3-缩水甘油氧基丙基)-二甲基-乙氧基硅烷(GPMES))或巯基硅烷(例如,(3-巯基丙基)-三甲氧基硅烷(MPTMS)或(3-巯基丙基)-甲基-二甲氧基硅烷(MPDMS)。具有反应性基团的示例性氯硅烷包括甲基丙烯酸3-(三氯甲硅烷基)丙酯(TPM)和10-异氰酰癸基三氯硅烷。

[0211] 此后,可以使用各种交联剂将结合剂上的官能团,例如赖氨酸残基侧链上的伯胺,

连接于添加到纳米结构表面的反应性基团。示例性的交联剂可包括例如同双功能交联剂(例如戊二醛、双马来酰亚胺基己烷、双(2-[琥珀酰亚胺氧基羰基氧基]乙基)砒(BSOCOES)、[双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯](BS3)、(1,4-二-(3'-[2吡啶基二硫代]-丙酰胺基)丁烷)(DPDPB)、辛二酸二琥珀酰亚胺酯(DSS)、酒石酸二琥珀酰亚胺酯(DST)、酒石酸磺基二琥珀酰亚胺酯(磺基DST)、二硫代双(丙酸琥珀酰亚胺酯)(DSP),3,3'-二硫代双(丙酸磺基琥珀酰亚胺酯)(DTSSP),乙二醇双(琥珀酸琥珀酰亚胺酯)(EGS)、可碘化的双(β -[4-叠氮基水杨酰胺基]-乙基)二硫化物(BASED)、同双功能NHS交联试剂(例如,双N-琥珀酰亚胺基-[戊乙二醇]酯(双(NHS)PEO-5),以及PEG或葡聚糖聚合物的同双官能异硫氰酸酯衍生物)和异双官能交联剂(例如,4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基(6-氨基己酸酯)(LC-SMCC)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基(6-氨基己酸酯)(LC-SMCC)、N-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(SMPB)、N-羟基-琥珀酰亚胺和N-乙基-'(二甲基氨基丙基)碳二亚胺(NHS/EDC)、N- ϵ -马来酰亚胺基-己酸)酰肼(sulfoEMCS)、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯(SATA)、单氟环辛炔(MFCO)、双环[6.1.0]壬炔(BCN)、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代丙酸酯(SATP)、马来酰亚胺基和二苯并环辛炔酯(DBCO酯)以及1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC))。

[0212] 举例来说,本文所述的纳米结构可通过烷氧基硅烷(例如,APTMS)活化,以修饰表面硅烷醇基的游离羟基,从而产生反应性基团(例如,伯胺)。然后,纳米结构上产生的反应性基团(例如伯胺)可与交联剂(例如戊二醛)反应,所述交联剂与存在于例如蛋白质(例如目的抗体)中的赖氨酸氨基酸的侧链中的游离胺基团形成共价键联。

[0213] 可以设想,本领域已知的其它活化和缀合化学物质可用于将一种或多种结合剂共价偶联至本文所述纳米结构的表面。

[0214] 可以设想,给定的纳米结构或系列纳米结构可用结合目的分析物的结合剂来功能化。本文使用的术语“结合剂”是指与目的分析物特异性结合的试剂。与结合剂结合使用的术语“优先结合”或“特异性结合”是指这样的试剂,与所述试剂与除所述靶分析物外的分子的结合和/或缔合相比,该试剂与特定靶分析物的结合和/或缔合(i)更稳定、(ii)更快速、(iii)亲和力更强、(iv)持续时间更长、或(v)(i)-(iv)中任意两项或更多项的组合。例如,特异性或优先结合靶分析物的结合剂是这样的结合结构域,与所述结合结构域和不同分析物的结合相比,该结合结构域与靶分析物的结合具有例如更强亲和力、亲合性、更加容易和/或持续时间更长。结合剂对分析物的亲和力可为约100nM、50nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.5nM、0.1nM或0.01nM,或更强,如通过表面等离子体共振所测定的。例如,结合剂对分析物的亲和力可在约0.01nM至约100nM、约0.1nM至约100nM、或约1nM至约100nM的范围内。应当理解,优先结合第一靶分析物的结合剂可以优先结合或不优先结合第二靶分析物。因此,“优先结合”不一定要(尽管其可包括)排它性结合。

[0215] 示例性结合剂包括酶(例如,结合底物和抑制剂)、抗体(例如,结合抗原)、抗原(例如,结合靶抗体)、受体(例如,结合配体)、配体(例如,结合受体)、核酸单链聚合物(例如,结合核酸分子以形成例如DNA-DNA、RNA-RNA或DNA-RNA双链),以及与靶分析物结合的合成分子。天然的、合成的、半合成的和遗传改变的大分子可以用作结合剂。结合剂包括生物结合

剂,例如抗体、适体、受体、酶或核酸。

[0216] 如本文中所用,除非另有说明,否则术语“抗体”应被理解为指完整抗体(例如,完整单克隆抗体)或抗体的抗原结合片段(例如,单克隆抗体的抗原结合片段),包括已被修饰、工程改造或化学缀合的完整抗体或抗原结合片段。已被修饰或工程改造的抗体的实例包括嵌合抗体、人源化抗体和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。抗原结合片段的实例包括Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、单链抗体(例如,scFv)、微型抗体和双链抗体。

[0217] 在某些实施方案中,抗体与其靶标结合的K_d为约300pM、250pM、200pM、190pM、180pM、170pM、160pM、150pM、140pM、130pM、120pM、110pM、100pM、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、20pM或10pM或更低。抗体可具有人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgE同种型。

[0218] 生产抗体以及其它蛋白结合剂的方法是本领域已知的。例如,蛋白质结合剂可以从天然来源纯化或使用重组DNA技术产生。例如,编码例如蛋白质结合剂的DNA分子可以通过化学方法或重组DNA方法合成。可将所得的编码期望的基于蛋白质的结合剂的核酸掺入(连接)到表达载体中,所述表达载体可通过常规转染或转化技术引入宿主细胞。转化的宿主细胞可以在允许宿主细胞表达编码目的蛋白质的基因的条件下生长。具体的表达和纯化条件将根据所采用的表达系统而变化。例如,如果要在大肠杆菌中表达基因,首先通过将工程改造的基因定位在合适的细菌启动子(例如Trp或Tac)和原核信号序列的下游,将其克隆到表达载体中。表达的分泌蛋白在折射体(refractile body)或包涵体中积累,并且可以在通过弗氏压碎器(French press)或超声处理破碎细胞后收获。然后溶解折射体,通过本领域已知的方法使蛋白质重折叠和切割。如果要在真核宿主细胞例如CHO细胞中表达工程改造的基因,首先将其插入含有合适的真核启动子、分泌信号、poly A序列和终止密码子的表达载体中。可使用常规技术将基因构建体引入真核宿主细胞。此后,在允许基于蛋白质的结合剂表达的条件下培养宿主细胞。表达后,可使用本领域已知的技术(包括例如亲和和标签诸如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或组氨酸标签)收获并纯化或分离多肽。

[0219] 示例性的基于核酸的结合剂包括适体和spiegelmers。适体是基于核酸的序列,对特定的靶分子具有很强的结合活性。就结合亲和力和功能性而言,Spiegelmers类似于适体,但具有防止酶促降解的结构,这是通过使用核酸酶抗性L-寡核苷酸而不是天然存在的核酸酶敏感性D-寡核苷酸来实现的。

[0220] 适体是以高亲和力和特异性结合靶分子的特异性核酸序列,并通过通常称为配体的进化选择性进化(Selective Evolution of Ligands by Evolution)(SELEX)的方法进行鉴定,如美国专利第5,475,096号和5,270,163号中所述。每个SELEX鉴定的核酸配体是给定靶化合物或分子的特定配体。SELEX方法基于这样的观察,即核酸具有足够的形成各种二维和三维结构,并且在其单体中具有足够的可用的化学多样性,以作为几乎任何化学化合物的配体(形成特定的结合对),无论是单体的还是聚合的。任何大小或组成的分子都可作为靶标。

[0221] 应用于高亲和力结合的应用的SELEX方法包括从候选寡核苷酸的混合物中进行选择,并使用相同的一般选择方案逐步重复结合、分配和扩增,以实现几乎任何期望的结合亲和力和选择性标准。从核酸混合物(优选包含随机化序列的区段)开始,SELEX方法包括以下步骤:在有利于结合的条件下使混合物与靶标接触,将未结合的核酸与那些已经特异性结合到靶分子的核酸分离,解离核酸-靶复合物,扩增从核酸-靶复合物解离的核酸以产生富

含配体的核酸混合物,然后重复结合、分离、解离和扩增步骤,重复所需的循环次数以产生对靶分子高度特异的高亲和力核酸配体。因此,该方法允许针对特定功能性(诸如与给定靶分子的结合)筛选大的随机核酸分子库。

[0222] SELEX方法还包括鉴定含有经修饰的核苷酸的高亲和力核酸配体,所述经修饰的核苷酸赋予配体改进的特性,诸如改进的体内稳定性和蛋白酶抗性。此类修饰的实例包括核糖和/或磷酸和/或碱基位置的化学取代。美国专利第5,660,985号和第5,580,737号中描述了SELEX方法鉴定的含有经修饰的核苷酸的核酸配体,其包括含有一个或多个在2'位置用例如2'-氨基、2'-氟和/或2'-O-甲基部分修饰的核苷酸的高度特异性的核酸配体。

[0223] 不使用可能需要额外修饰以变得对核酸酶活性更具抗性的适体,可以设想,在本发明的实践中可使用由L-核糖或L-2'脱氧核糖单元组成的spiegelmer(镜像适体)(参见美国专利第8,841,431号、8,691,784号、8367,629号、8,193,159号和8,314,223号)。与天然D-寡核苷酸适体相比,spiegelmer中的手性转化导致改善的血浆稳定性。L-核酸是天然存在的D-核酸的对映异构体,由于核酸酶的广泛存在,其在水溶液和生物样品中不是十分稳定。天然存在的核酸酶,特别是来自动物细胞的核酸酶不能降解L-核酸。

[0224] 使用体外选择,可以选择与靶分子(例如D-肽)的合成对映异构体结合的寡核苷酸。然后将所得适体重新合成为L-构型,以产生spiegelmer(来自镜子的德语“spiegel”),该Spiegelmer以与原始适体相同的对镜像靶标的亲和力和特异性结合生理靶标。该方法已用于合成结合例如铁调素(参见美国专利第8,841,431号)、MCP-1(参见美国专利第8,691,784号、8367,629号和8,193,159号)和SDF-1(参见美国专利第8,314,223号)的spiegelmer。

[0225] 在一个示例性测定中,用结合目的分析物的结合剂(例如,抗体)来功能化小孔的一个区块中的一个纳米结构阵列。小孔的每个区块中的每个纳米结构阵列用不同的结合剂(例如,抗体)进行功能化。功能化后,如果样品中存在分析物,在允许结合剂形成结合剂-分析物复合物的条件下,将样品(例如,血浆/血清样品)加入小孔中。分析物与抗体的结合导致纳米结构阵列的光学可检测特性例如荧光的变化。

[0226] 可使用印刷技术将不同的结合部分(诸如抗体)置于设置在小孔中的纳米结构阵列的载网中的不同纳米结构上。印刷可包括例如抗体的接触印刷(Gesim微接触印刷机,Arrayit NanoPrint)、喷墨印刷(ArrayJet,Fujifilm)或压电分配(Perkin Elmer Piezorray,Biodot压电分配器,Gesim NanoPlotter)。

[0227] 还可设想,对于某些测定,例如无标记测定,结合剂-分析物复合物(例如,抗体379-分析物380复合物)的单独形成导致纳米结构(例如,纳米针381)或纳米结构阵列的光学可检测性质的变化(图14C)。对于其它测定,例如基于标记的测定,样品中的分析物可以普遍地附着有官能团(例如生物素)。第二结合剂(例如,链霉抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白-HRP或链霉抗生物素蛋白-AP)可用于进一步与官能团(例如,生物素)反应,所述官能团与分析物形成复合物,这导致或增加纳米结构或纳米结构阵列的光学可检测性质的变化(例如,颜色变化382)(图14D)。还设想了,第三化学试剂(例如,3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB))可以与第二结合剂发生化学反应,以在纳米结构上形成额外的物质,该物质进一步增加纳米结构的光学可检测性质(例如,荧光)的变化。

[0228] 在一个示例性的夹心免疫测定中,用结合目的分析物的结合剂(例如,抗体)对小孔的一个区块中的一个纳米结构阵列进行功能化。小孔的每个区块中的每个纳米结构阵列

用不同的结合剂(例如,抗体)进行功能化。功能化后,在允许第一结合剂形成第一结合剂-分析物复合物(如果样品中存在分析物的话)的条件下,将待分析目标分析物的存在和/或量的样品(例如血浆/血清样品)加入小孔中。然后,在允许第二结合剂形成第二结合剂-分析物复合物的条件下,将结合目的分析物的第二组结合剂(例如,第二抗体例如第二抗体383的混合物)加入到纳米结构或系列纳米结构中。分析物与第一和第二结合剂的结合产生呈“夹心”构型的复合物。夹心复合物的形成可导致纳米结构或纳米结构阵列的光学可检测性质的变化(例如,颜色变化382)。还设想了,第二抗体可用官能团(例如生物素)标记,因此第三结合剂(例如链霉抗生物素蛋白)可以进一步附着到第二结合剂上,以在纳米结构上形成额外的物质,所述物质进一步增加纳米结构的光学可检测性质的变化(图14E)。

[0229] 结合剂可以是单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、纳米抗体、抗体片段等。结合剂也可以是适体。适体是以高亲和力和特异性结合靶分子的特异性核酸序列,并通过通常称为配体的进化选择性进化(SELEX)的方法进行鉴定,如美国专利第5,475,096号和5,270,163号中所述。每个SELEX鉴定的核酸配体是给定靶化合物或分子的特定配体。SELEX方法基于这样的观察,即核酸具有足够的形成各种二维和三维结构,并且在其单体中具有足够的可用的化学多样性,以作为几乎任何化学化合物的配体(形成特定的结合对),无论是单体的还是聚合的。任何大小或组成的分子都可作为靶标。

[0230] 纳米结构可使用本领域已知的标准化学物质来功能化。首先,可使用标准化学物质(包括标准接头化学物质)活化纳米结构的表面以结合结合剂。

[0231] 结合剂可包含或被工程改造成包含能够直接或通过化学接头与纳米结构表面反应(例如,通过纳米结构表面上或表面处存在的硅烷醇基团)的官能团。

[0232] 在一种方法中,纳米结构的表面硅烷醇基团可用一种或多种具有反应性基团(例如伯胺)的活化剂(诸如烷氧基硅烷、氯硅烷或替代的硅烷形式)活化。具有反应性基团的示例性烷氧基硅烷可包括例如氨基硅烷(例如,(3-氨基丙基)-三甲氧基硅烷(APTMS)、(3-氨基丙基)-三乙氧基硅烷(APTES)、(3-氨基丙基)-二乙氧基-甲基硅烷(APDEMS)、3-(2-氨基乙基氨基丙基)三甲氧基硅烷(AEAPTMS)、缩水甘油氧基硅烷(例如,(3-缩水甘油氧基丙基)-二甲基-乙氧基硅烷(GPMES))或巯基硅烷(例如,(3-巯基丙基)-三甲氧基硅烷(MPTMS)或(3-巯基丙基)-甲基-二甲氧基硅烷(MPDMS)。具有反应性基团的示例性氯硅烷包括甲基丙烯酸3-(三氯甲硅烷基)丙酯(TPM)和10-异氰酸癸基三氯硅烷。

[0233] 此后,可以使用各种交联剂将结合剂上的官能团,例如赖氨酸残基侧链上的伯胺,连接于添加到纳米结构表面的反应性基团。示例性交联剂可包括例如同双功能交联剂(例如戊二醛、双马来酰亚胺基己烷、双(2-[琥珀酰亚胺氧基羰基氧基]乙基)砒(BSOCOES)、[双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯](BS3)、(1,4-二-(3'-[2-吡啶基二硫基]-丙酰胺基)丁烷)(DPDPB)、辛二酸二琥珀酰亚胺酯(DSS)、酒石酸二琥珀酰亚胺酯(DST)、酒石酸磺基二琥珀酰亚胺酯(磺基DST)、二硫代双(丙酸琥珀酰亚胺酯)(DSP),3,3'-二硫代双(丙酸磺基琥珀酰亚胺酯)(DTSSP),乙二醇双(琥珀酸琥珀酰亚胺酯)(EGS)、可碘化的双(β -[4-叠氮基水杨酰胺基]-乙基)二硫化物(BASED)、同双功能NHS交联试剂(例如,双N-琥珀酰亚胺基-[戊乙二醇]酯(双(NHS)PEO-5),以及PEG或葡聚糖聚合物的同双官能异硫氰酸酯衍生物)和异双官能交联剂(例如,4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基琥珀酰亚胺基(SMCC)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基(6-氨基己酸酯)(LC-SMCC)、N-马来酰亚胺

基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、琥珀酰亚胺4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(SMPB)、N-羟基-琥珀酰亚胺和N-乙基-’(二甲基氨基丙基)碳二亚胺(NHS/EDC)、N-ε-马来酰亚胺基-己酸)酰肼(sulfoEMCS)、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯(SATA)、单氟环辛炔(MFCO)、双环[6.1.0]壬炔(BCN)、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代丙酸酯(SATP)、马来酰亚胺基和二苯并环辛炔酯(DBCO酯)以及1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)。

[0234] 在一些实施方案中,基于可定制衬垫的方法可用于掩蔽芯片的区域,例如,可在芯片上的指定位置功能化抗体、适体或其它结合试剂。例如,图15A显示了与SBS 96板布局匹配的4重衬垫385。衬垫在SBS 96单小孔387的尺寸内具有四个小的小孔386。溶液可以手动吸取,也可以用液体处理器(handler)注入每个小孔中。在整个96孔板中,小的小孔数量可以不同。参见图15B,在该实施方案的一个改进中,其中板的一半在SBS 96单孔内有16个小的小孔(16重388),而板的另一半在SBS 96单孔内只有一个孔。本文设想板的一部分(例如,1/4或1/2的板)可包括一种尺寸的衬垫,而其它部分可包括另一种尺寸的衬垫,或没有衬垫。

[0235] 在一些实施方案中,使用乙烯基切割来制造衬垫,以获得粗略的尺寸。在某些实施方案中,所述粗略的尺寸等于或大于约1mm。在一些实施方案中,激光切割可用于实现等于或大于约25μm的特征尺寸。在一些实施方案中,软光刻图案化可用于实现约0.5μm或高于约0.5μm的特征尺寸。在一些实施方案中,软光刻图案化可用于实现约0.5μm或高于约0.5μm的特征尺寸。

[0236] 在一些实施方案中,将样品装载到芯片上,并且将不同组的小孔覆盖于第二衬垫层下。图15C显示了这样的实施方案,其中第一层衬垫在单个SBS 96孔内具有四个小的小孔。分别在每个小的小孔的表面上功能化不同的结合试剂。接下来,制作覆盖四个SBS 96小孔(因此,覆盖16个小的小孔)的第二衬垫层,以掩盖芯片表面。最后,将样品装载到大的小孔389中(在图15C中用虚线表示)。类似于第一层,第二层中的小孔不需要具有相同的尺寸。该实施方案的实例如图15D所示,其中第二衬垫层左侧一半上的小孔具有覆盖四个SBS 96单小孔的尺寸,而右侧一半上的小孔仅覆盖了一个SBS 96单小孔。

[0237] II. 盒

[0238] 本文所述的传感器一旦制成,就可被包括在或以其它方式组装到用于检测系统的盒中。该盒可用于检测目的样品中分析物的存在或定量其量。该盒包括限定至少一个小孔的外壳,所述小孔包括任一个或多个前述传感器。外壳可以限定多个小孔,每个小孔包括任一个或多个前述传感器。这些小孔可由衬底限定(例如,与衬底成一体),或者可由设置在衬底上的衬垫中形成的孔限定。

[0239] 参考图16A、图16B、图17A和图17B,本文所述的传感器可被结合到盒组件(耗材组件)400中。盒组件可包括外壳或基座410、其上设置有系列纳米结构的晶片衬底420和衬垫430。当放置在晶片衬底420上时,衬垫430可以限定小孔,其中每个小孔的基部可包括一个或多个传感器。晶片衬底插入外壳或基座410中,所述外壳或基座410被配置成固持衬底且可容易地插入到检测系统中。外壳或基座可由各种不同的材料(例如,诸如铝等金属,以及塑料或橡胶)制成。外壳或基座可具有诸如成角度的拐角的特征,以便于将其放置到传感器系统中和/或确认方向。

[0240] 衬垫430可由例如硅酮或塑料制成,其尺寸和形状被设置成放置在晶片衬底上,开口440的尺寸被设置成与晶片衬底一起产成小孔,该小孔包括设置在晶片衬底上或其内的传感器。限定小孔的开口440的尺寸可被设置成包括至少一部分(例如2 μ L、3 μ L、4 μ L、5 μ L、6 μ L、7 μ L、8 μ L、9 μ L、10 μ L、20 μ L或50 μ L)待分析的样品。通常,小孔包括由衬垫430限定的壁和由晶片衬底420限定的底部,传感器设置在小孔中的衬底上。小孔直径范围可为600 μ m至90mm(例如,1mm至80mm),并且可具有1mm的厚度。在一些实施方案中,小孔可在制造过程中与衬底形成一体。

[0241] 图18显示了单重(single plex)可消耗盒400和1000重可消耗盒400'的透视图。在这些实施方案中,用于单重盒的传感器被配置成检测和/或定量单一分析物,而1,000重盒被配置成同时检测和/或定量多达1,000种不同的分析物。此外,调整衬垫430中的小孔440的尺寸和位置,以容纳单个小孔中包括的传感器的数量。应当理解,本文所述的技术是可扩展的,并且该盒可被制造成各种形状和尺寸。在某些实施方案中,该盒被配置成符合生物分子筛选协会(SBS)的微孔板尺寸标准,例如标准96孔微孔板。因此,晶片衬底和基座都的开关都可以是矩形的,其中基座具有128mm的长度和86mm的宽度,这有利于与各种液体处理系统连接并便于在各种液体处理平台上携带。

[0242] III. 系统考虑因素

[0243] 本文还描述了用于检测目的样品中分析物的存在或定量其量的系统。该系统包括(a)接收室,其用于接收任何一个或多个前述传感器、任何一个或多个前述盒;(b)光源,其用于照亮至少第一系列和/或任何第二系列和/或任何第三系列纳米结构;和(c)检测器,其用于检测至少第一系列和/或任何第二系列和/或任何第三系列的纳米结构的光学性质的变化;以及任选的(d)实施计算机算法的计算机处理器,所述算法识别第一浓度范围与任意的任何第二浓度范围之间的界面以及任意的任何第二浓度范围与任何第三浓度范围之间的界面。

[0244] 参考图19和图20,示例性传感器系统500被配置成便于检测目的样品中的分析物或定量其量。传感器系统500可包括具有触摸屏接口520和例如数据端口530的系统外壳510。可定制外壳中的装载/卸载门540的尺寸并将其配置成使得能够将盒400引入到传感器系统的接收室550中,所述接收室包含例如用于相对于光学检测系统570保持和定位盒的X-Y载物台560。光源580被配置成将光传输通过照相机/检测器590。照相机被配置成在使用期间定位在盒上方,并检测设置在盒中的衬底420上的至少第一、第二和/或第三系列的纳米结构的光学性质的变化。光源580被配置成照亮纳米结构,例如设置在盒的晶片衬底上的纳米结构。该系统可包括计算机600,其包括用于执行算法的计算机处理器,该算法用于识别第一浓度范围和/或第二浓度范围和/或第三浓度范围之间的界面,并用于定量样品中的分析物。传感器系统还可包括用于控制系统的控制平台610。因此,该系统包括三个主要的子组件:控制系统、成像系统和盒处理系统。这些子组件可使用商购可得的部件来最小化供应链的复杂性并减少组装时间。

[0245] 成像系统包括光学检测系统570,其中光源580被配置成引导光通过照明器组件620和物镜630,以照射到设置在传感器的衬底上的多个纳米结构上。在与传感器相互作用之后,反射光穿过物镜630并被检测器590捕捉。光阑640设置在物镜630上方。光阑是暗视野光阑,其控制照明,包括照明如何到达衬底以及图像如何传输到检测器。显微镜系统的机械

管长度被表示为L1,并且范围可为10mm至300mm。物镜的工作距离被指定为L2,并且范围可为约2mm至约5mm。在某些实施方案中,L1大于L2。

[0246] 如图21所示,测量可以是光学测量。例如,光源580可用于照射其上设置有纳米结构20和分析物650的衬底320,并且一个或多个检测器590被定位成检测照射到衬底的光。从衬底偏转的光可以与光源方向相同、方向相反、方向正交或与光源成一定角度。可处理通过使用光学检测系统获得的图像中存在的数以提供样品中存在的分析物的浓度。

[0247] 图22显示与传感器和相关系统的各种实施方案相关的信息学的一种方法。平均而言,给定区域中的所有纳米结构具有基本上相同的构型,并且统计上具有基本相似的分析物结合位点的数量或数目。因此,对于样品中给定浓度的分析物,可以设想,该区域中的每个纳米结构结合相同数量的分子。为了使传感器具有宽的动态范围,可以提供具有各种配置的纳米结构的多个数字和模拟区域。

[0248] 当样品中分析物的浓度在传感器的数字区域中从最低可检测浓度变化到最高可检测浓度时,系统被配置成检测纳米结构的数量或数目,所述数量或数目证明高于阈值的对应于分析物的结合的单独的颜色变化(例如,通过从一个状态翻转到另一个状态)。表现出可检测的颜色变化或已经翻转的离散纳米结构的百分比越高,结合的分析物的数量就越多,因此样品中分析物的浓度就越高。如图22所示,这种翻转行为可以以各种形式(包括显示数据聚类的散点图、显示数据分布的直方图等)直观地呈现。还可提供每个区域的比较图像,显示暴露于样品之前以及暴露之后的传感器的特定区域。可提供第三注释图像,更清楚地描述翻转确定的结果。还有利地呈现了数字数据,指示翻转的和有效的纳米结构的绝对数量,以及翻转的与有效的纳米结构的相关比值。具体来说,“翻转的针”表示已经超过阈值并被计数为阳性的传感器的数量。“总有效针”表示作为总群体的一部分计数的传感器的数量。行为超出预期参数的传感器将被丢弃,不包括在后续分析中。只有剩余的传感器被认为是“有效的”。翻转率是翻转针的计算值除以总有效针。也可以描述剔除率(rejection rate),即从前期图像(pre-image)中丢弃的针的百分比。这用作衡量传感器质量/健康的量度。剔除率约为10%或更高的传感器被视为质量低劣,通常无法提供可靠的数据。

[0249] 然而,在一些更高的阈值浓度下,所有数字区域纳米结构都具有结合的分析物。传感器的数字区域实际上已变得饱和。所有的纳米结构都已翻转,没有明显的局部颜色变化。在这一点上,注意力转移到模拟区域,其通常具有拥有更多结合位点的更大的纳米结构。

[0250] 给定纳米结构的颜色变化程度可以与结合分子的总质量与该纳米结构的总质量的比率相关。可能仅能够结合少于100个分子的较小模拟区域纳米结构(例如,纳米针)最初能够表现出冷色调(例如,在蓝/绿范围内)。可能能够结合数百个分子的较大模拟区域纳米结构(例如,纳米针)最初能够表现出较暖的色调(例如,在黄色/橙色范围内)。在模拟区域中较高的可检测浓度下,随着更多的分析物结合到给定的纳米结构上,可检测的色调向更暖的方向偏移。因此,对于样品中特定的分析物浓度,未暴露的蓝色纳米结构在结合后显示出更绿的色调。当样品中的分析物浓度较高时,色调会变得更黄。类似地,在被配置成检测较高浓度的具有较大纳米结构和更多结合位点的模拟区域中,对于样品中的特定分析物浓度,初始未暴露的黄色纳米结构在结合后显示出橙色更深的色调。当样品中的分析物浓度较高时,色调会变得更红。

[0251] 虽然仅用单个模拟纳米结构可检测到色移,但是有利地使用一系列或阵列的相似

尺寸的纳米结构的区域。通过提供相似尺寸的纳米结构的大分布,可提供平均读数以更可靠地检测模拟区域的色移,并因此检测分析物浓度。

[0252] 更具体地,图23显示了一种方法的流程图,所述方法用于在系统水平上聚集传感器的一个实施方案的各种数字和模拟区域的检测输出,以在传感器的整个动态范围内可靠地检测分析物浓度。这种形式的混合信息引擎算法的使用允许使用离散的数字和模拟区域来可靠地排除来自数字区域的不准确的较高浓度数据和来自模拟区域的不准确的较低浓度数据。

[0253] 在图23的步骤1中,将清洁传感器的各种数字和模拟区域光学成像为传感器的整体图像的一部分,以提供特定传感器的每个区域及其相关纳米结构的图像状态(例如,存在或不存在、初始色调等)的可靠基线记录。在步骤2中,将传感器暴露于样品,样品中的任何分析物结合到纳米结构上的相关位点,并且随后常规地准备传感器以用于随后的成像。在步骤3中,系统捕捉传感器的曝光后图像,将所述图像用于与步骤1的图像进行比较,以检测数字区域中的翻转和模拟区域中的任何色调变化。在步骤4中,算法鉴定传感器的不同检测区域(即,一个或多个数字区域和一个或多个模拟区域)以及它们相对于传感器的基准标记的布局。这允许系统关联和对准前后图像,以鉴定每个图像中对应的纳米结构。步骤5和6需要在每个相应区域中逐个纳米结构的基础上对前后图像数据进行单独、离散的分析。对于数字区域,步骤7A通过确认局部图像中高于阈值的足够大的偏移(以鉴定具有结合的分析物的每个纳米结构)来定量和计数具有结合的分析物的纳米结构的数量。对于模拟区域,步骤7B检测局部和整个模拟区域的色调变化,证明局部图像中高于前期图像颜色的足够大的偏移,以认为纳米结构局部和整体具有结合的分析物。在步骤8中,假设模拟区域中的颜色变化超过预定阈值,则认为模拟区域已经检测到在其可检测范围内的分析物浓度。通过将检测到的颜色变化与存储在系统存储器中的标准曲线进行比较来确定对应于颜色变化的分析物的实际浓度,所述标准曲线是用浓度已知的对照样品产生的。然而,如果模拟区域中的颜色变化没有超过预定的阈值,则认为分析物的浓度低于该模拟区域可以可靠检测的浓度。如果有较低浓度配置的模拟区域可用,则可进行类似的分析。否则,系统依赖于传感器的数字区域中翻转的纳米结构的数字计数。通过将翻转的数字纳米结构的数量与存储在系统存储器中的标准曲线进行比较来确定对应于翻转的纳米结构的数量或数目的分析物的实际浓度,所述标准曲线是用浓度已知的对照样品产生的。

[0254] 在另一个实施方案中,用于确定数字定量测量与模拟测量之间的转变的示例性算法包括以下步骤:(a)测量在施加待测溶液时相对于第一系列中的纳米结构已经从一种状态改变(翻转)至另一种状态的纳米结构;(b)测量施加待测溶液时第二系列中的纳米结构的颜色空间变化;以及(c)如果第二系列的颜色空间变化大于预选阈值,则使用步骤(b)中鉴定的模拟测量,并且如果第二系列的颜色空间变化小于预选阈值,则使用步骤(a)中鉴定的数字测量。

[0255] 可以设想,基于纳米结构(例如,纳米针)和结合剂以及其它试剂的选择,有可能同时检测和/或定量多种分析物。例如,如图24A所示,传感器可包括衬底420,其上设置有可以结合两种单独且不同的分析物的第一系列纳米结构700和第二系列纳米结构710。根据待检测的分析物的数量,可以设想衬底可包含许多系列的纳米结构。类似地,如图24B所示,传感器可包括其上设置有一系列两种不同的纳米结构700、710的衬底,这两种纳米结构结合两

种单独且不同的分析物。可以设想,所述系列的纳米结构可包括与额外分析物结合的纳米结构。

[0256] IV. 测定法

[0257] 本文还描述了检测目标样品中分析物(例如蛋白质)的存在或定量其量的方法。该方法包括:(A)将至少一部分样品施加到任何一个或多个前述传感器上;以及(b)检测第一系列和/或任何第二系列和/或任何第三系列纳米结构的光学性质的变化,从而检测样品中分析物的存在或定量其量。

[0258] 传感器可检测各种样品例如体液、组织提取物和/或细胞上清液中的分析物。示例性体液包括例如血液、血清、血浆、尿液、脑脊液或间质液。

[0259] 该方法包括将至少一部分样品与本文所述的结构、传感器、盒或系统组合,并检测分析物与所述结构、传感器、盒或系统的结合的存在和/或定量其量。例如,在分析物与本文所述的纳米结构或一系列纳米结构结合之后,可通过纳米结构或系列纳米结构的光学可检测性质的变化来检测分析物的结合。在某些实施方案中,光学可检测性质是颜色、光散射、折射或共振(例如,表面等离子共振、电共振、电磁共振和磁共振)。在某些实施方案中,电磁辐射可被施加到纳米结构或一系列纳米结构,并且当纳米结构或系列纳米结构与怀疑包含分析物的样品相互作用时,所施加的电磁辐射可被改变。例如,分析物的存在可导致强度、颜色或荧光的变化。

[0260] 在另一个实施方案中,该方法包括将一部分样品施加到包括第一区域和第二区域的传感器上。第一区域包括第一系列纳米结构,其能够结合分析物并产生指示样品中分析物的浓度在第一浓度范围内的可检测信号。第二区域包括第二系列不同的纳米结构,其能够结合分析物并产生指示样品中分析物的浓度在不同的第二浓度范围内的可检测信号。例如,使用电磁辐射探询所述区域以检测来自第一和第二系列的纳米结构的可检测信号,所述信号指示样品中分析物的存在和/或量。然后可从可检测的信号中确定分析物的存在和/或量,从而在第一浓度范围和第二浓度范围内检测样品中分析物的存在或定量其量。

[0261] 在另一个实施方案中,该方法包括将一部分样品施加到包括第一区域和第二区域的传感器上。第一区域包括第一系列纳米结构,其能够结合分析物并产生指示样品中分析物的浓度在第一浓度范围内的可检测信号,其中在结合分析物时光学检测结合分析物的第一系列的单个纳米结构,因此根据第一系列中结合了分析物分子的单个纳米结构的数量来测定样品中分析物的浓度(如果在第一浓度范围内)。第二区域包括第二系列的不同纳米结构,其能够结合分析物并产生指示样品中分析物的浓度在第二不同的浓度范围内的可检测信号,其中根据通过模拟检测第二区域中纳米结构的光学可检测性质的基本均匀变化来测定样品中分析物的浓度(如果在第二浓度范围内),所述光学可检测性质的变化是分析物浓度的函数。例如,使用电磁辐射探询所述区域以检测来自第一和第二系列的纳米结构的可检测信号,所述信号指示样品中分析物的存在和/或量。然后可从可检测的信号中确定分析物的存在和/或量,从而在第一浓度范围和第二浓度范围内检测样品中分析物的存在或定量其量。

[0262] 在一个示例性测定中,纳米结构或系列纳米结构用结合目的分析物的结合剂(例如,抗体)功能化。功能化后,如果样品中存在分析物,则在允许结合剂形成结合剂-分析物复合物的条件下,将包含靶分析物的样品(例如流体样品)加入到纳米结构或系列纳米结构

中。分析物与抗体的结合导致纳米结构或系列纳米结构的光学可检测性质的变化。可以设想,对于某些测定,例如无标记测定,仅形成结合剂-分析物复合物导致纳米结构或系列纳米结构的光学可检测性质的变化。对于其它测定,例如基于标记的测定,与分析物形成复合物的第二结合剂也可包括标记,所述标记在复合物中直接或间接导致或增加纳米结构或系列纳米结构的光学可检测性质的改变。可以设想,纳米结构可检测分析物的存在和/或量,而不需要颗粒或珠粒附着到纳米结构或以其它方式与纳米结构缔合。

[0263] 在一个示例性夹心免疫测定中,纳米结构或系列纳米结构用结合目的分析物的第一结合剂(例如,第一抗体)功能化。功能化后,如果样品中存在分析物,则在允许第一结合剂形成第一结合剂-分析物复合物的条件下,将待测定靶分析物的存在和/或量的样品(例如流体样品)加入纳米结构或系列纳米结构中。然后,在允许第二结合剂形成第二结合剂-分析物复合物的条件下,将结合目的分析物的第二结合剂(例如,第二抗体)加入纳米结构或系列纳米结构中。分析物与第一和第二结合剂的结合产生呈“夹心”构型的复合物。夹心复合物的形成可导致纳米结构或系列纳米结构的光学可检测性质的变化。然而,可以设想,对于某些测定,例如无标记分析,仅形成夹心复合物导致纳米结构或系列纳米结构的光学可检测性质的变化。对于其它测定,例如基于标记的测定,夹心复合物中的第二结合剂可包括标记,所述标记直接或间接导致或增加纳米结构或列纳米结构的光学可检测性质的变化。

[0264] 图25描述了其中分析物650与固定在纳米结构20上的结合剂750相互作用的示例性测定。纳米结构的捕获能力由纳米结构与可用捕获剂之间的尺寸关系决定。图26描述了示例性测定,其中纳米结构20与结合的分析物650之间的比例为1:1(左图),纳米结构与结合的分析物之间的比例为1:2(中间图),纳米结构与结合的分析物之间的比例为1:5(右图)。图27描述了示例性测定,其中纳米结构20的数量多于分析物650,在这种情况下,每个纳米结构可能最多捕获一个分析物。如上所述,纳米结构20可用纳米制造技术直接在衬底上制造。图28描述了设置在硅衬底320上的纳米制造的纳米结构20,其中分析物650结合于纳米结构的一部分。分析物与纳米结构之间的结合发生在固体界面上。可以测量纳米结构以确定其表面上结合分析物的数量。图25-图28描述了无标记免疫测定的实例,其中单一结合剂(例如,抗体或适体)用于结合目标分析物。该方法可用于测量或以其它方式定量结合亲和力、结合动力学(结合和解离速率)等。

[0265] 图29描述了示例性的无标记免疫测定,其中多个第一抗体(Ab1)被固定在纳米结构20的暴露于流体的表面上。此后,将包含待检测和/或定量的分析物(O)的样品与纳米结构单独接触,或者结合(优选通过第二不同的表位)第二抗体(Ab1)与纳米结构接触。第二抗体(Ab2)可以在分析物之后添加。两种抗体(Ab1和Ab2)和分析物(O)(如果存在的话)形成固定在纳米结构20表面上的复合物。复合物与纳米结构的结合可以引起纳米结构的性质变化,该变化可用检测系统检测到。图30描述了示例性的基于标记的免疫测定,其基本上如上文结合图29所述进行,不同之处在于在该实施方案中,第二抗体被标记。复合物与纳米结构20的结合可通过标记760直接(例如,通过金标记)或间接(例如,通过产生进一步产物的酶)检测,以引起可用检测系统检测的纳米结构性质变化。

[0266] 在一个可选测定中,将待分析靶分析物的存在和/或量的样品(例如,流体样品)在允许第一结合剂形成第一结合剂-分析物复合物的条件下与(i)第一结合剂(例如,抗体)一

起孵育,以及在允许第二结合剂形成第二结合剂-分析物复合物的条件下与(ii)结合目的分析物的第二结合剂(例如,第二抗体)一起孵育。分析物与第一和第二结合剂的结合产生呈“夹心”构型的复合物,其在溶液中是游离的。然后,根据测定,在使得复合物或其组分被纳米结构或系列纳米结构结合以产生纳米结构或系列纳米结构的性质(例如,光学可检测性质)变化的条件下,将复合或未复合的第一结合剂、第二结合剂和/或分析物加入纳米结构或系列纳米结构中。在某些实施方案中,一种或两种抗体用生物素标记,并且如果任何纳米结构或系列纳米结构已用例如抗生物素蛋白或生物素功能化,则可将夹心复合物固定在表面上。

[0267] 典型地,当结合剂是抗体时,那么在每个测定步骤之间,可以用温和的去垢剂溶液洗涤结合有分析物的纳米结构。典型的方案还包括一个或多个封闭步骤,其包括使用非特异性结合蛋白诸如牛血清白蛋白或酪蛋白来封闭或减少蛋白质试剂与纳米结构的不期望的非特异性结合。

[0268] 用于基于标记的测定的示例性标记包括放射性标记物、荧光标记物、可视标记物、酶标记物或其它用于诊断或预后测定的常规可检测标记物,例如颗粒,诸如乳胶或金颗粒,或诸如乳胶或金溶胶颗粒。示例性的酶标记物包括例如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、 β -半乳糖苷酶(β -Gal)和葡萄糖氧化酶(GO)。当标记物是酶时,该测定包括添加合适的酶底物,所述酶底物产生导致纳米结构或系列纳米结构的光学可检测性质变化的信号。底物可以是,例如,生色底物或发荧光底物。HRP的示例性底物包括OPD(邻苯二胺二盐酸盐;其与HRP反应后变成琥珀色)、TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺;其与HRP反应后变成蓝色)、ABTS(2,2'-连氨基-双[3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸]-二铵盐;其与HRP反应后变成绿色)、2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS);3-氨基-9-乙基吡唑(AEC);3,3'-二氨基联苯胺;StayYellow(AbCam™产品);和4-氯-1-萘酚(4-CN或CN)。碱性磷酸酶的示例性底物包括PNPP(对-硝基苯磷酸,二钠盐;其与碱性磷酸酶反应后变黄)、5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯(BCIP)和氯化对硝基蓝四唑鎓(NBT);Stay Green(AbCam™产品);和4-氯-2-甲基苯重氮鎓(又名Fast Red)。 β -Gal的示例性底物包括邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)和5-溴-4-氯-3-吡啶基-B-D-吡喃半乳糖苷(X-Gal)。GO的示例性底物包括2,2',5-5'-四对硝基苯基-3,3'-(3,3'-二甲氧基-4,4'-联苯撑)-二氯化四唑(t-NBT)。一种优选酶具有快速且稳定的周转率。

[0269] 当需要时,标记物和结合试剂可通过接头(例如可切割的接头,例如可光切割的接头、可酶切割的接头)连接,例如共价结合。可光切割的接头是可通过暴露于电磁辐射(例如可见光、紫外光或红外光)而被切割的接头。可光切割的接头所需的光波长取决于所用的可光切割的接头的结构。示例性的可光切割的接头包括但不限于含有邻硝基苄基部分、对硝基苄基部分、间硝基苄基部分、硝基吡啶部分、溴羟基香豆素部分、溴羟基噻啉部分、羟基苯酰基部分、二甲氧基安息香部分或其任意组合的化学分子。示例性的酶可切割的接头包括但不限于DNA、RNA、肽接头、 β -葡萄糖苷酸接头或其任意组合。

[0270] 图31示出了一种示例性的分析物定量测定法,其包括用生物素标记的第一抗体(Ab1)和用HRP标记的第二抗体(Ab2)。在这个阶段,两种抗体都没有固定在纳米结构上。例如,每种抗体通过分析物上单独的表位与靶分析物结合。第一抗体、第二抗体和分析物的孵育导致夹心复合物的形成(参见步骤1)。然后夹心复合物被抗生物素蛋白或链霉抗生物素

蛋白包覆的表面(例如,链霉抗生物素蛋白包覆的珠粒)捕获,所述表面与缀合于Ab1的生物素结合(见步骤2)。可以设想,这种捕获策略捕获的分析物比用预先固定(例如,包覆)在固体表面上的抗体直接捕获的分析物多。在洗涤步骤后,如果需要,通过改变溶液条件(例如,通过改变pH、盐浓度或温度)从链霉抗生物素蛋白表面洗脱Ab2(参见,步骤3),然后将其施加于活化的(但未功能化的)纳米结构或系列活化的纳米结构(参见,步骤4),于是洗脱的Ab2分子被活化的纳米结构捕获。然后将HRP底物(例如,TMB)施加于纳米结构或系列纳米结构,然后将其催化转化成在纳米结构或系列纳米结构上形成的产物(例如,沉淀物),所述产物产生可检测的信号(参见,步骤5),然后该信号可被系统检测到(参见,步骤6)。

[0271] 图32示出了另一个示例性的分析物定量测定法,其包括用生物素标记的第一抗体(Ab1)和用HRP标记的第二抗体(Ab2)。Ab1通过可光可切割的接头与生物素共价连接。每种抗体都与靶分析物结合。第一抗体、第二抗体和分析物的孵育导致夹心复合物的形成(参见步骤1)。然后夹心复合物被与Ab1上的生物素结合的抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白包覆的表面(例如链霉抗生物素蛋白包覆的珠粒)捕获(见步骤2)。在富集和洗涤后,如果需要,然后切割光可切割的接头,从链霉抗生物素蛋白表面除去夹心复合物(参见,步骤3),并且将复合物施加于活化的纳米结构或系列活化的纳米结构(参见,步骤4),于是Ab2或含Ab2的复合物被一种或多种活化的纳米结构捕获。然后将HRP底物(例如,TMB)施加于纳米结构或系列纳米结构,然后将其催化转化成在纳米结构或系列纳米结构上形成的产物(例如,沉淀物),所述产物产生可检测的信号(参见,步骤5),然后该信号可被系统检测到(参见,步骤6)。

[0272] 图33示出了另一个示例性的分析物定量测定法,其包括用生物素标记的第一抗体(Ab1)和用生物素标记的第二抗体(Ab2)。每种抗体都与靶分析物结合。第一抗体、第二抗体和分析物的孵育导致夹心复合物的形成(参见步骤1)。然后夹心复合物被抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白包覆盖的表面(例如,链霉抗生物素蛋白包覆的珠粒)捕获,所述表面与Ab1或Ab2上的生物素结合(见步骤2)。然后,加入通过光可切割的接头与链霉抗生物素蛋白共价连接的HRP(步骤3),所述HRP与Ab1或Ab2上的游离生物素结合。在富集和洗涤之后,如果合适的话,光可切割的接头被切割以释放HRP,然后HRP被应用于活化的纳米结构或系列活化的纳米结构并被其捕获(参见,步骤4)。HRP底物的添加在纳米结构或系列纳米结构的表面上产生产物(例如,沉淀物),所述产物产生可检测的信号(参见,步骤5),然后所述信号可被系统检测到(参见,步骤6)。

[0273] 图34示出了另一个示例性的分析物定量测定法,其包括用生物素标记(例如,共价偶联)的第一抗体和用寡核苷酸标记(例如,共价偶联)的第二抗体。寡核苷酸通过位于例如荧光团或酶的一端的可切割的接头与抗体连接。可切割的接头可以是插入在寡核苷酸一端的尿嘧啶或多个尿嘧啶。寡核苷酸可以作为步骤1中靶分析物的条形码。这可以用与不同分析物结合的抗体来进行,以促进多重反应。如果样品中存在目标分析物,则每种抗体都会与之结合。第一抗体、第二抗体和分析物的孵育导致夹心复合物的形成(参见步骤1)。并行地,纳米结构或系列纳米结构可用与作为待检测的每种分析物的条形码的寡核苷酸互补的寡核苷酸功能化(参见步骤1')。然后夹心复合物被链霉抗生物素蛋白包覆的表面(例如,链霉抗生物素蛋白包覆的珠粒)捕获,所述表面与第一抗体上的生物素结合(参见步骤2)。在富集和洗涤后,视情况而定,每个复合物中的寡核苷酸可通过可切割的接头的切割而释放(见

步骤3),将所述寡核苷酸施加于附着于纳米结构或系列纳米结构的互补寡核苷酸并被其捕获(见步骤4),然后通过系统检测其(步骤5)。分析物的身份和/或浓度可由设置在纳米结构表面上的互补寡核苷酸捕获的条形码寡核苷酸来确定。

[0274] 图35示出了用于一种示例性多重检测测定法的试剂。例如,多个单独的珠粒被相应的多个捕获抗体Ab1、Ab2、Ab3等包覆,所述抗体与相应的多种靶分析物结合(图35A)。相应的多种检测抗体用寡核苷酸(分析物的条形码)通过可切割的(例如,光可切割的)接头标记(见图35B),然后将其与颗粒组合。图35C表示具有2x5纳米结构阵列的传感器765,其中不同区域包含与相应条形码寡核苷酸互补的捕获寡核苷酸。将珠粒组合并与样品混合。在允许夹心复合物形成后,洗涤珠粒,通过切割可切割的接头释放寡核苷酸。然后将释放的条形码寡核苷酸(有或无标记)施加于具有捕获寡核苷酸的区域传感器(见图35D),所述释放的条形码寡核苷酸在适当的情况下被捕获和检测到。抗体包覆珠粒的数量、寡核苷酸标记的抗体的数量和寡核苷酸印刷的区域的数量可以根据待进行的所需测定法按比例缩放。

[0275] 在整篇说明书中,当组合物(例如,传感器、盒或系统)被描述为具有、包括或包含特定的组件时,或者当工艺和方法被描述为具有、包括或包含特定的步骤时,可以设想,另外,本发明的组合物基本上由所述组件组成,或者由所述组件组成,并且根据本发明的工艺和方法基本上由所述处理步骤组成或由所述处理步骤组成。

[0276] 在本申请中,当元件或组件被认为包括在所列举的元件或组件的列表中和/或选自所列举的元件或组件的列表时,应该理解,所述元件或组件可以是所列举的元件或组件中的任一个,或者所述元件或组件可自由两个或更多个所列举的元件或组件组成的组。

[0277] 另外,应该理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,无论在本文中是明确的还是隐含的,本文所述的组合物(例如,传感器、盒或系统)或方法的元件和/或特征可以以多种方式组合。例如,当提及特定特征时,除非从上下文中另有理解,否则该特征可用于本发明组合物的各种实施方案和/或本发明的方法中。换句话说,在本申请中,已经以使得能够书写和绘制清楚和简明的申请的方式描述和描绘了实施方案,但是希望并且将理解,实施方案可以在不脱离本教导和(一个或多个)发明的情况下进行各种组合或分离。例如,应当理解,本文描述和描绘的所有特征可以适用于本文描述和描绘的一个(或多个)发明的所有方面。

[0278] 应该理解,除非从上下文和使用中另外理解,否则表述“.....中的至少一个”单独地包括该表述之后的每个所述对象以及两个或多个所述对象的各种组合。与三个或更多个所述对象结合的表述“和/或”应该被理解为具有相同的含义,除非从上下文中另外理解。

[0279] 术语“包括”、“含有”、“具有”、“有”、“包含”(包括其语法上的等同物)的使用,应该被理解为通常是开放式的和非限制性的,例如,不排除额外的未引用的元件或步骤,除非另有具体说明或从上下文中理解。

[0280] 当术语“约”在数量值之前使用时,除非另有具体说明,否则本发明还包括具体数量值本身。如本文中所示,除非另有说明或推断,否则术语“约”是指相对于标称值的 $\pm 10\%$ 的变化。

[0281] 应当理解,只要本发明保持可操作,步骤的顺序或执行某些动作的顺序并不重要。此外,可以同时两个或更多个步骤或动作。

[0282] 本文使用的任何和所有实例或示例性语言,例如“诸如”或“包括”,仅仅旨在更好地说明本发明,除非声明,否则不对本发明的范围构成限制。说明书中的任何语言都不应被解释为表示任何未要求保护的要素对于本发明的实践是必不可少的。

[0283] 实施例

[0284] 以下实施例仅仅是说明性的,并不旨在以任何方式限制本发明的范围或内容。

[0285] 实施例1-连续人蛋白质编码基因组的构建及用于传感器的100重蛋白质小组的无偏选择

[0286] 本实施例描述了跨越人蛋白质编码基因组的无偏100种蛋白质小组的产生。

[0287] 为了建立人蛋白质编码基因组,基于Piovesan的基因表(BMC Res Notes (2019) 12:315, Piovesan等人,通过引用并入本文),记录所有蛋白质编码基因的基因ID、基因符号、染色体登录号、起始和终止位置,并按照它们从1号染色体至X和Y染色体的人基因组中的位置顺序显示。然后将所有蛋白质编码基因剪接在一起,用于外显子组的连续编号,这产生1,255,970,826bp的总长度。所得蛋白质编码基因组的样品如表4所示。

[0288] 表4

[0289]

基因ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	染色体链	基因长度bp	Cumu-基因_长度
729759	OR4F29	NC_000001.11	50740	451678	-	939	939
148398	SAMD11	NC_000001.11	25741	944581	+	18841	19780
26155	NOC2L	NC_000001.11	44203	959299	-	15097	34498
339451	KLHL17	NC_000001.11	960103	965719	+	5617	94953
84069	PLEKHN1	NC_000001.11	965820	975108	+	9289	144357
84808	PERM1	NC_000001.11	975198	982117	-	6920	200681
57801	HES4	NC_000001.11	998962	1001052	-	2091	259096
9636	ISG15	NC_000001.11	1013467	1014540	+	1074	318585
375790	AGRN	NC_000001.11	1020102	1056119	+	36018	414092

[0290]

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	染色体链	基因长度 bp	Cumu-基因长度
401934	RNF223	NC_000001.11	1071746	1074307	-	2562	512161
54991	C1orf159	NC_000001.11	1081811	1116361	-	34551	644781
254173	TTL10	NC_000001.11	1173709	1197936	+	24228	801629
8784	TNFRSF18	NC_000001.11	1203508	1207901	-	4394	962871
7293	TNFRSF4	NC_000001.11	1211326	1216812	-	5487	1129600
51150	SDF4	NC_000001.11	1216908	1232067	-	15160	1311489
126792	B3GALT6	NC_000001.11	1232249	1235041	+	2793	1496171
388581	C1QTNF12	NC_000001.11	1242446	1247218	-	4773	1685626
118424	UBE2J2	NC_000001.11	1253912	1273854	-	19943	1895024
6339	SCNN1D	NC_000001.11	1280436	1292029	+	11594	2116016
116983	ACAP3	NC_000001.11	1292384	1307925	-	15542	2352550
126789	PUSL1	NC_000001.11	1308563	1311677	+	3115	2592199
54973	INTS11	NC_000001.11	1311585	1324687	-	13103	2844765
80772	CPTP	NC_000001.11	1324757	1328896	+	4140	3101564
83756	TAS1R3	NC_000001.11	1331324	1335320	+	3997	3362360
1855	DVL1	NC_000001.11	1335278	1349142	-	13865	3636935
54587	MXRA8	NC_000001.11	1352689	1363541	-	10853	3922406
54998	AURKAIP1	NC_000001.11	1373730	1375516	-	1787	4209664
81669	CCNL2	NC_000001.11	1385711	1399342	-	13632	4510554
55052	MRPL20	NC_000001.11	1401896	1407313	-	5418	4816862
441869	ANKRD65	NC_000001.11	1418420	1422471	-	4052	5127222
643965	TMEM88B	NC_000001.11	1426128	1427787	+	1660	5439242
64856	VWAI	NC_000001.11	1435523	1442882	+	7360	5758622
219293	ATAD3C	NC_000001.11	1449689	1470158	+	20470	6098472
83858	ATAD3B	NC_000001.11	1471732	1509466	+	37735	6476057
55210	ATAD3A	NC_000001.11	1512143	1534687	+	22545	6876187
339453	TMEM240	NC_000001.11	1534778	1540360	-	5583	7281900

[0291]

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	染色体链	基因长度 bp	Cumu-基因_长度
29101	SSU72	NC_000001.11	1541673	1574882	-	33210	7720823
643988	FNDC10	NC_000001.11	1598008	1600096	-	2089	8161835
142678	MIB2	NC_000001.11	1613730	1630610	+	16881	8619728
8510	MMP23B	NC_000001.11	1631681	1635638	+	3958	9081579
984	CDK11B	NC_000001.11	1635226	1659619	-	24394	9566998
728661	SLC35E2B	NC_000001.11	1659798	1692804	-	33007	10085837
728642	CDK11A	NC_000001.11	1702383	1724565	-	22183	10626859
9906	SLC35E2A	NC_000001.11	1724838	1745999	-	21162	11189043
65220	NADK	NC_000001.11	1751232	1780509	-	29278	11780505
2782	GNB1	NC_000001.11	1785285	1891117	-	105833	12477800
163688	CALML6	NC_000001.11	1913751	1917294	+	3544	13178639
339456	TMEM52	NC_000001.11	1917590	1919301	-	1712	13881190
85452	CFAP74	NC_000001.11	1921951	2003837	-	81887	14665628
2563	GABRD	NC_000001.11	2019329	2030753	+	11425	15461491
5590	PRKCZ	NC_000001.11	2050470	2185399	+	134930	16392284
199990	FAAP20	NC_000001.11	2184457	2212720	-	28264	17349455
6497	SKI	NC_000001.11	2228695	2310213	+	81519	18389088
79906	MORN1	NC_000001.11	2319202	2391751	-	72550	19501271
11079	RER1	NC_000001.11	2391292	2405444	+	14153	20626687
5192	PEX10	NC_000001.11	2404802	2412574	-	7773	21759050
9651	PLCH2	NC_000001.11	2412481	2505530	+	93050	22984918
55229	PANK4	NC_000001.11	2508531	2526628	-	18098	24228978
388585	HES5	NC_000001.11	2528745	2530554	-	1810	25474848
8764	TNFRSF14	NC_000001.11	2556365	2565622	+	9258	26729976
127281	PRXL2B	NC_000001.11	2586460	2591469	+	5010	27990114
79258	MMEL1	NC_000001.11	2590639	2633042	-	42404	29290994
100287898	TTC34	NC_000001.11	2636988	2789737	-	152750	30745455

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	染色体链	基因长度 bp	Cumu-基因长度
140625	ACTRT2	NC_000001.11	3021482	3022903	+	1422	32201338
63976	PRDM16	NC_000001.11	3068227	3438621	+	370395	34027616
27237	ARHGEF16	NC_000001.11	3454583	3481115	+	26533	35880427
1953	MEGF6	NC_000001.11	3487942	3624770	-	136829	37870067
127262	TPRGIL	NC_000001.11	3624992	3630131	+	5140	39864847
49856	WRAP73	NC_000001.11	3630767	3650107	-	19341	41878968
7161	TP73	NC_000001.11	3652565	3736201	+	83637	43976726
148870	CCDC27	NC_000001.11	3752398	3771645	+	19248	46093732
388588	SMIM1	NC_000001.11	3772761	3775982	+	3222	48213960
57470	LRRC47	NC_000001.11	3780220	3796504	-	16285	50350473
9731	CEP104	NC_000001.11	3812081	3857233	-	45153	52532139
1677	DFFB	NC_000001.11	3857267	3885429	+	28163	54741968
339448	C1orf174	NC_000001.11	3889133	3900293	-	11161	56962958
55966	AJAPI	NC_000001.11	4654775	4792518	+	137744	59321692
261734	NPHP4	NC_000001.11	5862808	5992473	-	129666	61810092
8514	KCNAB2	NC_000001.11	5992298	6101193	+	108896	64407036
26038	CHD5	NC_000001.11	6101787	6180134	-	78348	67082504
6146	RPL22	NC_000001.11	6185020	6199619	-	14600	69772572
388591	RNF207	NC_000001.11	6206004	6221299	+	15296	72477936
23463	ICMT	NC_000001.11	6221193	6235984	-	14792	75197878
390992	HES3	NC_000001.11	6244192	6245578	+	1387	77919314
387509	GPR153	NC_000001.11	6247346	6260975	-	13630	80654380
442868	BPY2C	NC_000024.10	25030901	25052104	-	21204	1,255,967,409
9085	CDY1	NC_000024.10	25622095	25625511	+	3417	1,255,970,826

[0292]

[0293] 为了以无偏倚方式构建100重蛋白质组,从12,559,708bp开始沿着剪接的基因放置100个位置标记,每个标记位于 $12,559,708 * i$,其中*i*是标记的顺序。标记之间的间距为12,559,708bp。对于第*i*个标记,使用单核苷酸多态性数据库(dbSNP),定位了与位置标记*i*最接近的SNP。然后,定位包含已鉴定的SNP的基因并将其作为第*i*种蛋白包含在该小组中。表5列出了100种蛋白质的小组。

[0294] 表5

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	基因长度 bp
249	ALPL	NC_000001.11	21508982	21578412	69431
11004	KIF2C	NC_000001.11	44739704	44767767	28064
9829	DNAJC6	NC_000001.11	65264694	65415869	151176
343099	CCDC18	NC_000001.11	93179802	93279037	99236
81611	ANP32E	NC_000001.11	150218417	150236156	17740
27101	CACYBP	NC_000001.11	174999435	175012027	12593
6900	CNTN2	NC_000001.11	205042937	205078272	35336
7257	TSNAX	NC_000001.11	231528653	231566524	37872
[0295] 3241	HPCAL1	NC_000002.12	10302124	10427617	125494
27436	EML4	NC_000002.12	42169338	42332548	163211
27332	ZNF638	NC_000002.12	71276593	71435061	158469
3987	LIMS1	NC_000002.12	108534355	108687246	152892
80731	THSD7B	NC_000002.12	136765562	137677712	912151
79809	TTC21B	NC_000002.12	165873362	165953838	80477
23671	TMEFF2	NC_000002.12	191948300	192194933	246634
3488	IGFBP5	NC_000002.12	216672105	216695549	23445
152330	CNTN4	NC_000003.12	2098803	3059080	960278
152110	NEK10	NC_000003.12	27107336	27369460	262125
1795	DOCK3	NC_000003.12	50674969	51384198	709230

[0296]

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	基因长度 bp
9039	UBA3	NC_000003.12	69054730	69080373	25644
10225	CD96	NC_000003.12	111542079	111665996	123918
131034	CPNE4	NC_000003.12	131533560	132285696	752137
100505385	IQCJ-SCHIP1	NC_000003.12	159069252	159897366	828115
8626	TP63	NC_000003.12	189596746	189897279	300534
80333	KCNIP4	NC_000004.12	20728520	21948751	1220232
23284	ADGRL3	NC_000004.12	61201256	62078335	877080
401145	CCSER1	NC_000004.12	90127394	91602219	1474826
54532	USP53	NC_000004.12	119212583	119295518	82936
56884	FSTL5	NC_000004.12	161383892	162164034	780143
170690	ADAMTS16	NC_000005.10	5140330	5320304	179975
23530	NNT	NC_000005.10	43601092	43705566	104475
10184	LHFPL2	NC_000005.10	78485215	78770256	285042
1176	AP3S1	NC_000005.10	115841606	115914081	72476
9752	PCDHA9	NC_000005.10	140847772	141012344	164573
2561	GABRB2	NC_000005.10	161288429	161548124	259696
84830	ADTRP	NC_000006.12	11713523	11779628	66106
25862	USP49	NC_000006.12	41789896	41895361	105466
57579	FAM135A	NC_000006.12	70413404	70561174	147771
221264	AK9	NC_000006.12	109492855	109691212	198358
57224	NHSL1	NC_000006.12	138422043	138692616	270574
5071	PRKN	NC_000006.12	161347417	162727802	1380386
9734	HDAC9	NC_000007.14	18086942	19002416	915475
644	BLVRA	NC_000007.14	43758122	43807342	49221
781	CACNA2D1	NC_000007.14	81946444	82443806	497363
100130771	EFCAB10	NC_000007.14	105565108	105581864	16757
60412	EXOC4	NC_000007.14	133253067	134067137	814071

[0297]

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	基因长度 bp
155435	RBM33	NC_000007.14	155644494	155781485	136992
55806	HR	NC_000008.11	22114419	22133384	18966
8601	RGS20	NC_000008.11	53851808	53959304	107497
168975	CNBD1	NC_000008.11	86866442	87428652	562211
401474	SAMD12	NC_000008.11	118131828	118621995	490168
57589	RIC1	NC_000009.12	5629030	5778633	149604
23349	PHF24	NC_000009.12	34810040	34982544	172505
65268	WNK2	NC_000009.12	93184156	93327581	143426
158135	TTLL11	NC_000009.12	121815674	122093606	277933
5588	PRKCQ	NC_000010.11	6393038	6580646	187609
6840	SVIL	NC_000010.11	29457338	29737001	279664
22891	ZNF365	NC_000010.11	62374157	62672011	297855
2894	GRID1	NC_000010.11	85599555	86366493	766939
114815	SORCS1	NC_000010.11	106573663	107181138	607476
3784	KCNQ1	NC_000011.10	2444991	2849110	404120
63982	ANO3	NC_000011.10	26189123	26667907	478785
28992	MACROD1	NC_000011.10	63998554	64166652	168099
51501	HIKESHI	NC_000011.10	86302211	86345943	43733
23705	CADM1	NC_000011.10	115173625	115504523	330899
56341	PRMT8	NC_000012.12	3381349	3593973	212625
55297	CCDC91	NC_000012.12	28190427	28550166	359740
121227	LRIG3	NC_000012.12	58872155	58920538	48384
8411	EEA1	NC_000012.12	92772509	92975228	202720
23389	MED13L	NC_000012.12	115958576	116277219	318644
51761	ATP8A2	NC_000013.11	25372011	26025851	653841
55901	THSD1	NC_000013.11	52377167	52406494	29328
2259	FGF14	NC_000013.11	101720855	102402428	681574

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	基因长度 bp
57697	FANCM	NC_000014.9	45135939	45200890	64952
64093	SMOC1	NC_000014.9	69879388	70032366	152979
145270	PRIMA1	NC_000014.9	93718298	93789029	70732
56924	PAK6	NC_000015.10	40239091	40277487	38397
6095	RORA	NC_000015.10	60488284	61229303	741020
79631	EFL1	NC_000015.10	82130220	82262763	132544
54715	RBFOX1	NC_000016.10	5239752	7713343	2473592
83985	SPNS1	NC_000016.10	28973999	28984769	10771
388289	C16orf47	NC_000016.10	73125865	73891931	766067
9135	RABEP1	NC_000017.11	5282263	5386340	104078
40	ASIC2	NC_000017.11	33013087	34156806	1143720
6827	SUPT4H1	NC_000017.11	58345175	58352238	7064
125058	TBC1D16	NC_000017.11	79932343	80035875	103533
1000	CDH2	NC_000018.10	27932878	28177446	244569
10892	MALT1	NC_000018.10	58671386	58753806	82421
1786	DNMT1	NC_000019.10	10133344	10195135	61792
6261	RYR1	NC_000019.10	38433700	38587564	153865
55968	NSFL1C	NC_000020.11	1442162	1467793	25632
9139	CBFA2T2	NC_000020.11	33490070	33650031	159962
60437	CDH26	NC_000020.11	59957764	60037971	80208
54097	FAM3B	NC_000021.9	41304229	41357727	53499
8224	SYN3	NC_000022.11	32507820	33058391	550572
3730	ANOS1	NC_000023.11	8528874	8732187	203314
347404	LANCL3	NC_000023.11	37571569	37684463	112895
546	ATRX	NC_000023.11	77504878	77786269	281392
23157	SEPT6	NC_000023.11	119615724	119693370	77647
9085	CDY1	NC_000024.10	25622095	25625511	3417

[0298]

[0299]

实施例2-使用传感器的100重蛋白质小组对患者样品进行蛋白质分析

[0300]

试。

本实施例描述了对人蛋白质编码基因组的无偏100种蛋白质小组的患者样品的测

[0301]

设计了示例性的100重蛋白质小组(例如,表5),并选择了对每种蛋白质特异的抗

体。传感器平板布局如图1E所示。小孔以SBS-96格式放置,每个小孔包括10x 10的载网。每个载网都有纳米结构阵列。所有小孔都用戊二醛和(3-氨基丙基)-三甲氧基硅烷(APTMS)活化。接下来,使用印刷技术在每个载网中的相应传感器阵列上将100重小组中的每种蛋白质特异的抗体功能化。每个96孔板包含96个小孔,其可一式两份地运行48个样品。将来自测试组(例如一组将被探询蛋白质与表型的关系的受试者(例如,疾病组))和对照组的血浆或血清样品加入小孔中。分析来自每个传感器阵列的数字和模拟信号,以覆盖大动态范围的蛋白质浓度。比较对照组与测试组的蛋白质浓度。因此,鉴定了一组生物标志物,以最好地将测试组与对照组区分开。

[0302] 实施例3-排除内含子的连续人外显子组的构建及用于传感器的100重蛋白质小组的无偏选择

[0303] 本实施例描述了跨越人外显子组(其不包括内含子序列)的无偏100种蛋白质小组的产生。

[0304] 从外显子组构建蛋白质小组(即,从蛋白质编码基因中排除内含子)。从Piovesan的基因表(如上所述)中选择蛋白质的一种同种型,并记录3'UTR3、CDS和5'UTR的起始和终止位置以标记外显子。然后将所有外显子剪接在一起,这产生了62,184,186bp的总外显子长度。所得外显子组的样品如表6所示。

[0305]

表 6

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	CDS_起始位置	CDS_终止位置	UTR5'_起始位置	UTR5'_终止位置	UTR3'_起始位置	UTR3'_终止位置	UTR3'_长度_bp	UTR3'_长度_bp
729759	OR4F29	NC_000001.11	50740	451678	450740	451678	451679	451678	450740	450739	0	1
48398	SAMD11	NC_000001.11	25741	944581	925942	944153	925741	925941	944154	944581	428	429
26155	NOC2L	NC_000001.11	44203	959299	944694	959240	959241	959299	944203	944693	491	492
339451	KLHL17	NC_000001.11	960103	965719	960694	965191	960587	960693	965192	965719	528	529
84069	PLEKHNI	NC_000001.11	965820	975108	966532	974575	966497	966531	974576	975108	533	534
84808	PERM1	NC_000001.11	975198	982117	976172	981029	981030	982117	975199	976171	973	974
57801	HES4	NC_000001.11	998962	1001052								
9636	ISG15	NC_000001.11	1013467	1014540	1013574	1014478	1013467	1013573	1014479	1014540	62	63
375790	AGRN	NC_000001.11	1020102	1056119	1020173	1054981	1020123	1020172	1054982	1056119	1138	1139
401934	RNF223	NC_000001.11	1071746	1074307	1071817	1072566	1072567	1074307	1071746	1071816	71	72
54991	C1orf159	NC_000001.11	1081811	1116361	1082893	1091543	1091544	1116356	1081818	1082892	1075	1076
254173	TTL10	NC_000001.11	1173709	1197936	1179216	1197847	1173906	1179215	1197848	1197933	86	87
8784	TNFRSF18	NC_000001.11	1203508	1207901	1203591	1206571	1206572	1206709	1203508	1203590	83	84
7293	TNFRSF4	NC_000001.11	1211326	1216812	1211555	1214127	1214128	1214168	1211326	1211554	229	230
51150	SDF4	NC_000001.11	1216908	1232067	1217512	1228793	1228794	1232067	1216908	1217511	604	605
126792	B3GALT6	NC_000001.11	1232249	1235041	1232279	1233268	1232249	1232278	1233269	1235041	1773	1774

[0306]

基因 ID	基因 符号	染色体 登录号	染色体 起始位置	染色体 终止位置	CDS_ 起始位置	CDS_ 终止位置	UTR5'_ 起始位置	UTR5'_ 终止位置	UTR3'_ 起始位置	UTR3'_ 终止位置	UTR3'_ 长度_ bp	UTR3'_ 长度_ bp
388581	C1QTNF1 2	NC_000001.11	1242446	1247218	1242548	1246690	1246691	1246722	1242446	1242547	102	103
118424	UBE2J2	NC_000001.11	1253912	1273854	1255203	1263361	1263362	1273854	1253912	1255202	1291	1292
6339	SCNN1D	NC_000001.11	1280436	1292029	1280662	1291610	1280436	1280661	1291611	1292029	419	420
116983	ACAP3	NC_000001.11	1292384	1307925	1293564	1307815	1307816	1307889	1292384	1293563	1180	1181
126789	PUSL1	NC_000001.11	1308563	1311677	1308644	1311379	1308580	1308643	1311380	1311677	298	299
54973	INTS11	NC_000001.11	1311585	1324687	1311859	1324608	1324609	1324687	1311585	1311858	274	275
80772	CPTP	NC_000001.11	1324757	1328896	1326911	1327763	1324763	1326910	1327764	1328896	1133	1134
83756	TASIR3	NC_000001.11	1331324	1335320	1331346	1334464	1331346	1331345	1334465	1335320	856	857
1855	DVL1	NC_000001.11	1335278	1349142	1336142	1349065	1349066	1349112	1335278	1336141	864	865
54587	MXRA8	NC_000001.11	1352689	1363541	1353604	1358504	1358505	1363541	1352689	1353603	915	916
54998	AURKAIP 1	NC_000001.11	1373730	1375516	1373801	1374756	1374757	1375438	1373730	1373800	71	72
81669	CCNL2	NC_000001.11	1385711	1399342	1387231	1399306	1399307	1399342	1385711	1387230	1520	1521
55052	MRPL20	NC_000001.11	1401896	1407313	1402083	1407217	1407218	1407313	1401896	1402082	187	188
441869	ANKRD65	NC_000001.11	1418420	1422471	1419542	1421005	1421006	1421444	1418420	1419541	1122	1123
643965	TMEM88 B	NC_000001.11	1426128	1427787	1426128	1427787	1426128	1426127	1427788	1427787	0	1
64856	VWA1	NC_000001.11	1435523	1442882	1435749	1439787	1435523	1435748	1439788	1442882	3095	3096
219293	ATAD3C	NC_000001.11	1449689	1470158	1450684	1468530	1449689	1450683	1468531	1470158	1628	1629

[0307]

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	CDS_起始位置	CDS_终止位置	UTR5'_起始位置	UTR5'_终止位置	UTR3'_起始位置	UTR3'_终止位置	UTR3'_长度_bp	UTR3'_长度_bp
83858	ATAD3B	NC_000001.11	1471732	1509466	1471885	1495817	1471755	1471884	1495818	1496204	387	388
55210	ATAD3A	NC_000001.11	1512143	1534687	1512269	1534072	1512143	1512268	1534073	1534687	615	616
339453	TMEM240	NC_000001.11	1534778	1540360	1535359	1540346	1540347	1540360	1534778	1535358	581	582
29101	SSU72	NC_000001.11	1541673	1574882	1542066	1574557	1574558	1574882	1541673	1542065	393	394
643988	FNDC10	NC_000001.11	1598008	1600096	1599335	1600015	1600016	1600096	1598008	1599334	1327	1328
142678	MIB2	NC_000001.11	1613730	1630610	1615460	1630530	1615415	1615459	1630531	1630610	80	81
8510	MMP23B	NC_000001.11	1631681	1635638	1632219	1634625	1632181	1632218	1634626	1634654	29	30
984	CDK11B	NC_000001.11	1635226	1659619	1635764	1657485	1657486	1659097	1635226	1635763	538	539
728661	SLC35E2B	NC_000001.11	1659798	1692804	1665782	1676699	1676700	1692804	1661478	1665781	4304	4305
728642	CDK11A	NC_000001.11	1702383	1724565	1702907	1722818	1722819	1724565	1702383	1702906	524	525
9906	SLC35E2A	NC_000001.11	1724838	1745999	1725414	1739557	1739558	1745999	1724838	1725413	576	577
65220	NADK	NC_000001.11	1751232	1780509	1752904	1765406	1765407	1780147	1751232	1752903	1672	1673
2782	GNB1	NC_000001.11	1785285	1891117	1787331	1825453	1825454	1891117	1785285	1787330	1778	1779
442868	BPY2C	NC_000024.10	25030901	25052104	25038098	25044023	2504402	2505210	25030901	2503809	553	554
9085	CDY1	NC_000024.10	25622095	25625511	25622443	25624527	2562211	2562244	25624528	2562490	375	376

[0308] 通过从621,842bp开始沿着剪接的基因放置100个位置标记,以无偏倚方式从上述外显子组产生100重蛋白质小组,每个标记位于621,842*I,其中I是标记的顺序。标记之间

的间距为621,842bp。对于第i个标记,使用单核苷酸多态性数据库(dbSNP),定位了与位置标记i最接近的SNP。然后,定位含有鉴定的SNP的基因,并将其作为第i种蛋白质包括在小组中。由上述方案产生的所得蛋白质列表如表7所示。

[0309] 表7

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	基因长度 bp
55672	NBPF1	NC_000001.11	16562427	16613605	51179
10657	KHDRBS1	NC_000001.11	32013694	32060859	47166
387338	NSUN4	NC_000001.11	46340177	46365152	24976
5567	PRKACB	NC_000001.11	84077975	84238498	160524
9860	LRIG2	NC_000001.11	113073170	113132260	59091
2312	FLG	NC_000001.11	152302175	152325203	23029
4921	DDR2	NC_000001.11	162631265	162786573	155309
343450	KCNT2	NC_000001.11	196225779	196608576	382798
149643	SPATA45	NC_000001.11	212830141	212847649	17509
64388	GREM2	NC_000001.11	240489573	240612372	122800
84226	C2orf16	NC_000002.12	27576522	27582722	6201
7840	ALMS1	NC_000002.12	73385758	73609919	224162
51263	MRPL30	NC_000002.12	99181079	99199557	18479
84083	ZRANB3	NC_000002.12	135164218	135531236	367019
3232	HOXD3	NC_000002.12	176157163	176173102	15940
940	CD28	NC_000002.12	203706475	203739756	33282
5757	PTMA	NC_000002.12	231708525	231713541	5017
9779	TBC1D5	NC_000003.12	17157162	17742739	585578

[0310]

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	基因长度 bp
10201	NME6	NC_000003.12	48288402	48302904	14503
317649	EIF4E3	NC_000003.12	71679289	71754773	75485
165631	PARP15	NC_000003.12	122575926	122639047	63122
116931	MED12L	NC_000003.12	151085665	151436677	351013
4026	LPP	NC_000003.12	188152152	188890671	738520
80306	MED28	NC_000004.12	17614628	17625628	11001
2926	GRSF1	NC_000004.12	70815782	70843274	27493
27123	DKK2	NC_000004.12	106921802	107036296	114495
1519	CTSO	NC_000004.12	155924118	155953896	29779
1004	CDH6	NC_000005.10	31193655	31329146	135492
3842	TNPO1	NC_000005.10	72816591	72914388	97798
1657	DMXL1	NC_000005.10	119071002	119249432	178431
153768	PRELID2	NC_000005.10	145587325	145835369	248045
90249	UNC5A	NC_000005.10	176810559	176880898	70340
10279	PRSS16	NC_000006.12	27247701	27256620	8920
60685	ZFAND3	NC_000006.12	37819531	38154624	335094
25821	MTO1	NC_000006.12	73461731	73501456	39726
29940	DSE	NC_000006.12	116254152	116441261	187110
54516	MTRFIL	NC_000006.12	152987366	153003439	16074
25928	SOSTDC1	NC_000007.14	16461481	16465849	4369
55915	LANCL2	NC_000007.14	55365448	55433742	68295
222865	TMEM130	NC_000007.14	98846488	98870050	23563
168850	ZNF800	NC_000007.14	127342871	127392798	49928
116988	AGAP3	NC_000007.14	151085831	151144436	58606
23087	TRIM35	NC_000008.11	27284886	27311319	26434
63978	PRDM14	NC_000008.11	70051613	70071327	19715
5168	ENPP2	NC_000008.11	119557077	119673576	116500

[0311]

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	基因长度 bp
158358	KIAA2026	NC_000009.12	5860254	6008489	148236
320	APBA1	NC_000009.12	69427532	69673012	245481
83856	FSD1L	NC_000009.12	105442183	105552433	110251
56262	LRR8A	NC_000009.12	128882112	128918042	35931
22944	KIN	NC_000010.11	7750962	7788027	37066
1.01E+08	TIMM23B	NC_000010.11	49942033	49988221	46189
1E+08	KLLN	NC_000010.11	87859161	87863437	4277
85450	ITPRIP	NC_000010.11	104309696	104338493	28798
977	CD151	NC_000011.10	832952	838835	5884
89797	NAV2	NC_000011.10	19345200	20121601	776402
931	MS4A1	NC_000011.10	60455809	60470752	14944
220064	LTO1	NC_000011.10	69665563	69675397	9835
7225	TRPC6	NC_000011.10	101451470	101583928	132459
90952	ESAM	NC_000011.10	124753123	124762327	9205
259296	TAS2R50	NC_000012.12	10985913	10986912	1000
54407	SLC38A2	NC_000012.12	46358188	46372862	14675
11081	KERA	NC_000012.12	91050491	91058354	7864
79794	C12orf49	NC_000012.12	116713320	116738100	24781
55504	TNFRSF19	NC_000013.11	23570248	23676105	105858
729240	PRR20C	NC_000013.11	57154061	57157082	3022
54930	HAUS4	NC_000014.9	22946228	22957142	10915
145407	ARMH4	NC_000014.9	57993536	58152305	158770
85439	STON2	NC_000014.9	81260650	81436464	175815
7337	UBE3A	NC_000015.10	25337234	25439381	102148
50506	DUOX2	NC_000015.10	45092648	45114161	21514
22801	ITGA11	NC_000015.10	68297433	68432312	134880
8826	IQGAP1	NC_000015.10	90388241	90502243	114003

[0312]

基因 ID	基因符号	染色体登录号	染色体起始位置	染色体终止位置	基因长度 bp
146562	C16orf71	NC_000016.10	4734288	4749396	15109
23475	QPRT	NC_000016.10	29670588	29698699	28112
55336	FBXL8	NC_000016.10	67159988	67164174	4187
54758	KLHDC4	NC_000016.10	87693537	87765992	72456
1949	EFNB3	NC_000017.11	7705202	7711375	6174
399687	MYO18A	NC_000017.11	29073510	29180389	106880
9001	HAP1	NC_000017.11	41722639	41734646	12008
3131	HLF	NC_000017.11	55264960	55325176	60217
80022	MYO15B	NC_000017.11	75587545	75626851	39307
84617	TUBB6	NC_000018.10	12307669	12329826	22158
10892	MALT1	NC_000018.10	58671386	58753806	82421
55620	STAP2	NC_000019.10	4324043	4338877	14835
22983	MAST1	NC_000019.10	12833931	12874953	41023
342865	VSTM2B	NC_000019.10	29525431	29564555	39125
11100	HNRNPUL1	NC_000019.10	41262476	41307783	45308
3661	IRF3	NC_000019.10	49659569	49665875	6307
284306	ZNF547	NC_000019.10	57363435	57379559	16125
64412	GZF1	NC_000020.11	23361585	23375399	13815
8202	NCOA3	NC_000020.11	47501857	47656877	155021
337978	KRTAP21-2	NC_000021.9	30746794	30747233	440
51586	MED15	NC_000022.11	20507542	20587632	80091
25829	TMEM184B	NC_000022.11	38219291	38273034	53744
171483	FAM9B	NC_000023.11	9024232	9034127	9896
2623	GATA1	NC_000023.11	48786540	48794311	7772
27330	RPS6KA6	NC_000023.11	84058346	84187935	129590
10495	ENOX2	NC_000023.11	130622330	130903317	280988
9085	CDY1	NC_000024.10	25622095	25625511	3417

[0313]

- [0314] 实施例4-使用传感器的100重蛋白质小板对患者样品进行蛋白质分析
- [0315] 本实施例描述了人外显子组的无偏100-蛋白质小组的患者样品的测试。
- [0316] 设计了示例性的100重蛋白质小组(例如,表7),并选择了对每种蛋白质特异的抗

体。传感器板布局如图1E所示。小孔以SBS-96格式放置,每个小孔包括10x 10的载网。每个载网都有纳米结构阵列。所有孔都用戊二醛和(3-氨基丙基)-三甲氧基硅烷(APTMS)活化。接下来,使用印刷技术在每个载网中的相应传感器阵列上将100重小组中的每种蛋白质特异的抗体功能化。每个96孔板包含96个小孔,其可一式两份地运行48个样品。将来自测试组(例如一组将被探询蛋白质与表型的关系的受试者(例如,疾病组))和对照组的血浆或血清样品加入小孔中。分析来自每个传感器阵列的数字和模拟信号,以覆盖大动态范围的蛋白质浓度。比较对照组与测试组的蛋白质浓度。因此,鉴定了一组生物标志物,以最好地将测试组与对照组区分开。

[0317] 实施例5-使用传感器的100重蛋白质小组对患者样品进行蛋白质分析

[0318] 本实施例描述了使用夹心免疫测定法对无偏100-蛋白质小组的患者样品的测试。

[0319] 设计示例性的100重蛋白质小组(例如,表5或表7),并选择对每种蛋白质特异的第一抗体。传感器平板布局如图1E所示。

[0320] 将来自测试组(例如将被探询蛋白质与表型的关系的受试者组)(例如,疾病组)和对照组的血浆或血清样品添加到待分析靶分析物的存在和/或量的小孔中。如果样品中存在分析物,则在允许第一抗体形成第一抗体-分析物复合物的条件下,将样品加入小孔中。然后,在允许第二抗体形成第二抗体-分析物复合物的条件下,加入结合目的分析物的第二组抗体(第二抗体)。分析物与第一和第二抗体的结合产生呈“夹心”构型的复合物(图14E)。分析来自每个传感器阵列的数字和模拟信号,以覆盖大动态范围的蛋白质浓度。比较对照组与测试组的蛋白质浓度。由此鉴定了一组生物标志物,以最好地将测试组与对照组区分开。

[0321] 实施例6-传感器的衬垫方法蛋白质小组(gasket-approach protein panel)的设计

[0322] 本实施例描述了使用衬垫方法来测定蛋白质水平的示例性传感器。

[0323] 按照图15A所述的布局,在96孔板(“SBS 96”)中使用衬垫方法。使用第一衬垫将板的每个小孔分成四个小的小孔,并且将单种抗体点在每个小的小孔中以产生定制的多重测定(例如,4个小的小孔/96孔板的小孔,总共384个小孔)。参考图15A,对IL-1 β 、IL-2、IL-6和IL-8特异的抗体沉积在平板的位置A1、A3、A5、A7、A9和A11中的四个小的小孔的每一个中;将对IL-10、IL-15、GM-CSF和IP-10特异的抗体沉积到平板的A2、A4、A6、A8、A10和A12中的四个小的小孔的每一个中。对B至H行重复相同的模式。将每个小孔中的抗体溶液以5 μ g/mL的浓度孵育2小时。接下来,剥离第一衬垫层,用氮气干燥芯片,并将其储存在4 $^{\circ}$ C下备用。在施加测试样品之前,将覆盖两个相邻SBS 96单个小孔(例如,A1和A2,因此,来自第一衬垫层的八个的小的小孔)的第二衬垫层施加到芯片上。

[0324] 将重组蛋白IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、IL-15、GM-CSF和IP-10的混合物(每种蛋白的浓度为10ng/mL)掺入缓冲液中,以3倍系列稀释(总共12个稀释点),并施用到第二衬垫的不同小孔中。孵育2小时后,将浓度为0.5 μ g/mL的针对IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、IL-15、GM-CSF和IP-10的生物素化的检测抗体的混合物溶液施加到第二衬垫的每个小孔中。在常规洗涤步骤后,将0.5 μ g/ml的链霉抗生物素蛋白-HRP溶液施加到第二衬垫的每个小孔中,并孵育0.5小时。然后,将重新配制的TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)溶液施加到第二衬垫的每个小孔中,以在每个小孔中的纳米针传感器上产生不溶性沉积物。暗视野成像

仪器被用来捕捉纳米针的所有图像。对显示颜色变化的针进行计数,并使用与纳米针总数的比例来确定百分比(在图36中以“纳米单位”显示)。图36A-图36H是显示IL-1b(图36A)、IL-2(图36B)、IL-10(图36C)、IL-15(图36D)、IL-6(图36E)、IL-8(图36F)、GM-CSF(图36G)和IP-10(图36H)的检测的图。总的来说,图36显示,随着蛋白质浓度的升高,具有颜色变化输出的纳米针的数量增加。

[0325] 通过引用并入

[0326] 本文提及的每个专利和科学文献的全部公开内容出于所有目的通过引用并入本文。

[0327] 等同物

[0328] 在不脱离本发明的精神或基本特征的情况下,本发明可以以其它特定形式实施。因此,前述实施方案在所有方面都被认为是说明性的,而不是对本文所述的本发明的限制。因此,本发明的范围由所附权利要求书而不是由前面的描述来指示,并且在权利要求书的等同物的含义和范围内的所有变化都旨在包含在其中。

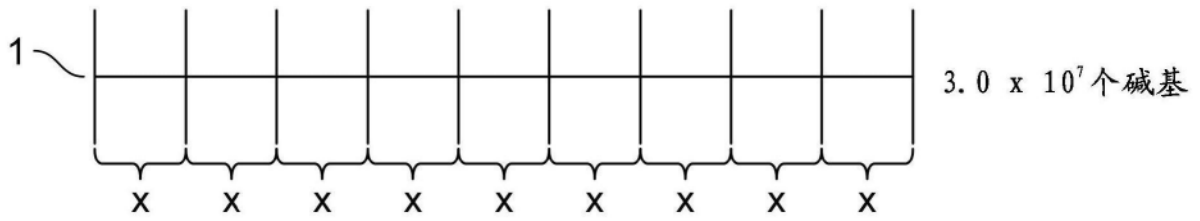


图1A

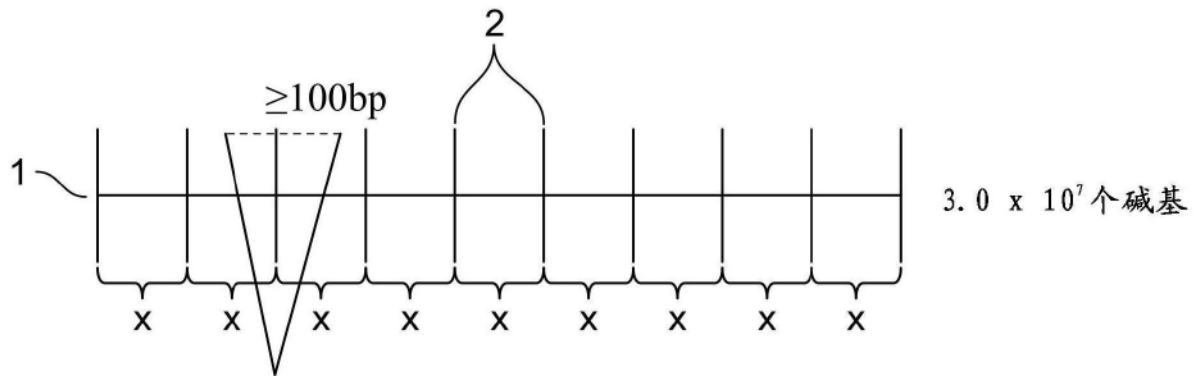


图1B

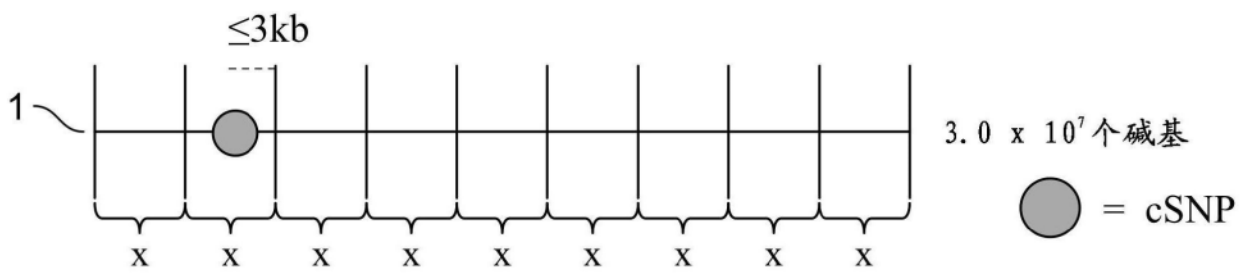


图1C

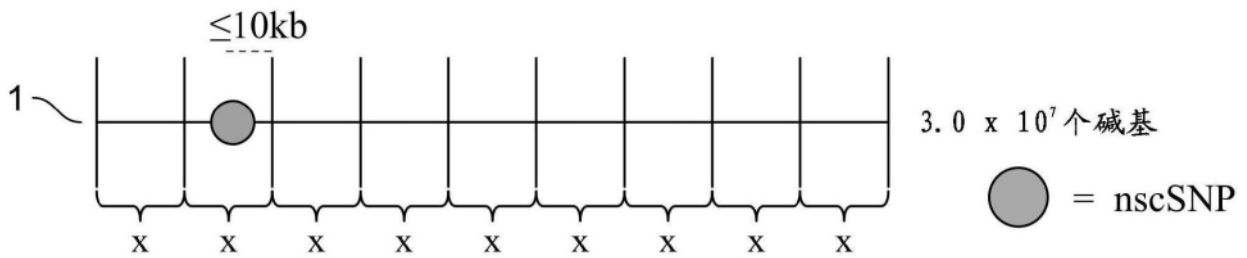


图1D

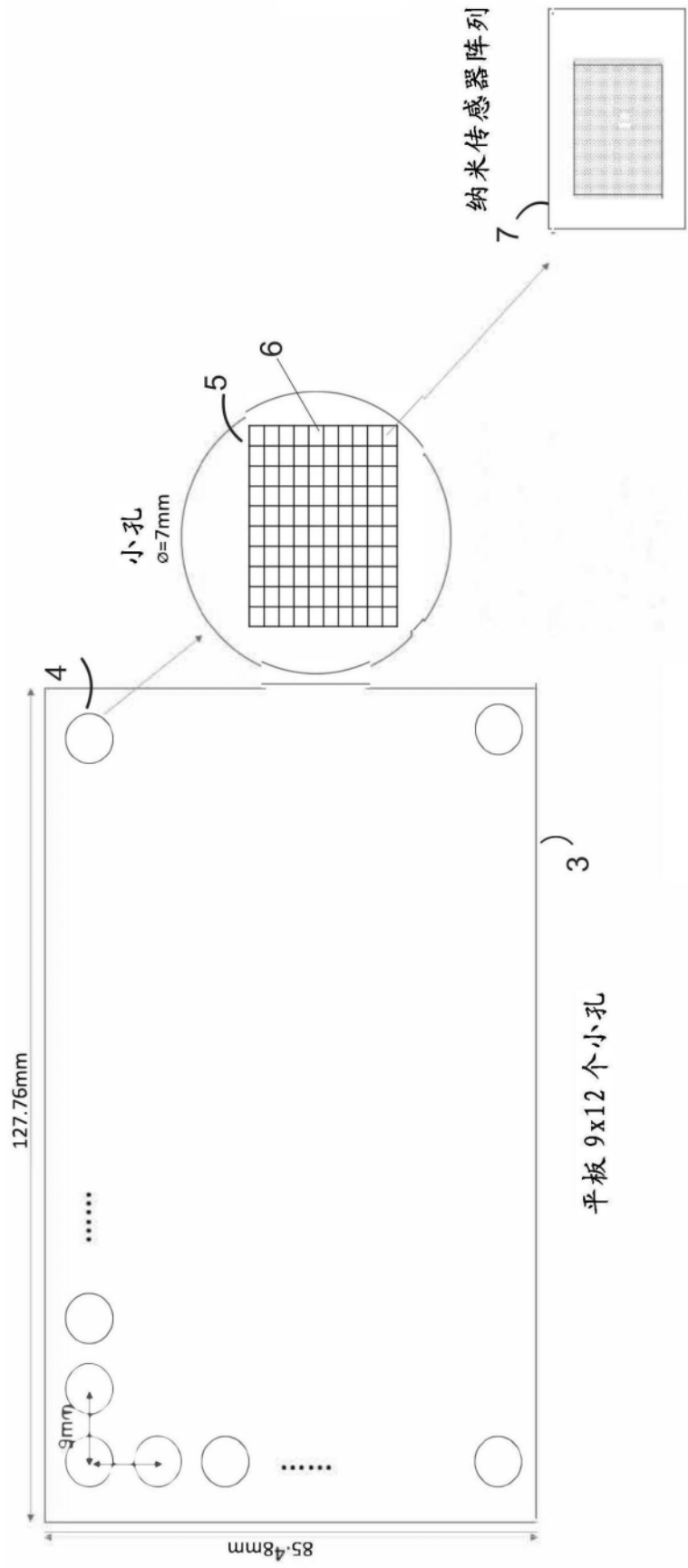


图1E

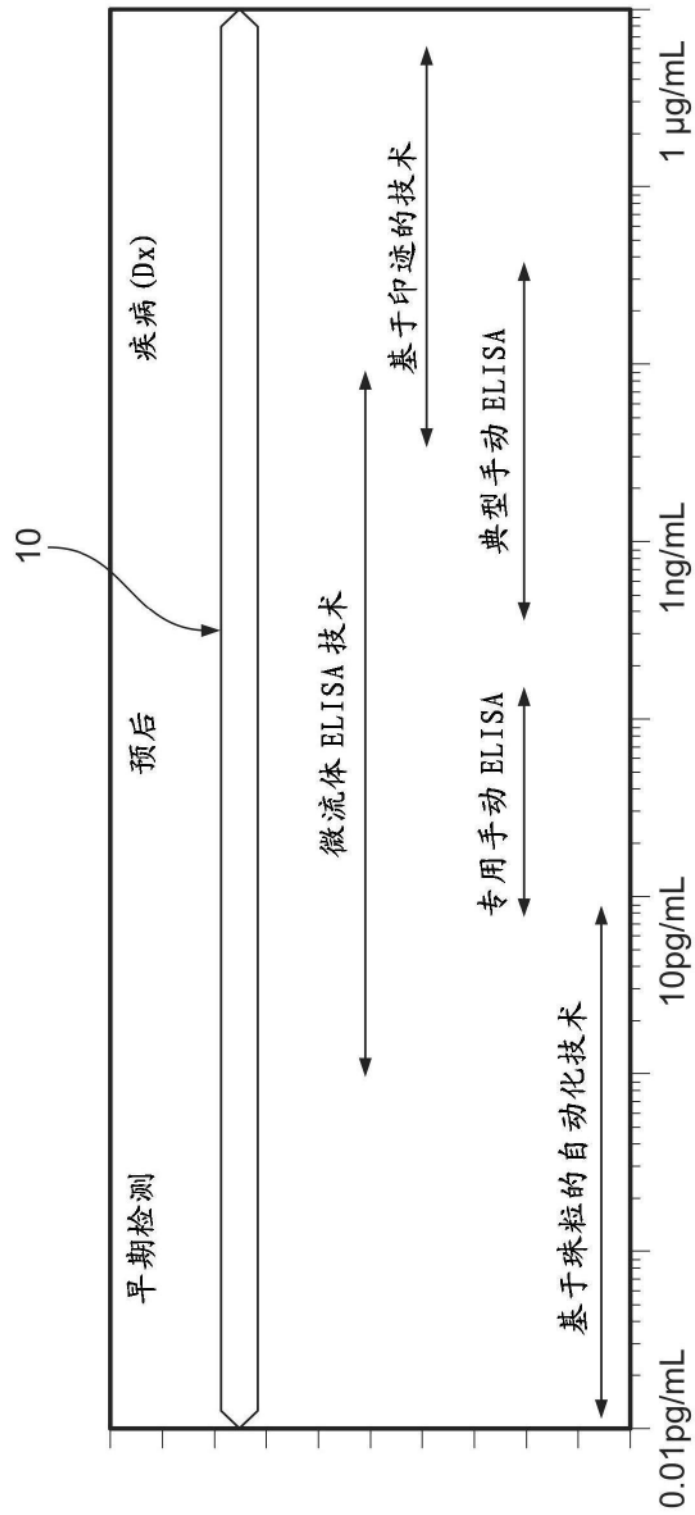


图1F

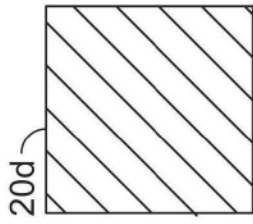


图 2A(iii)

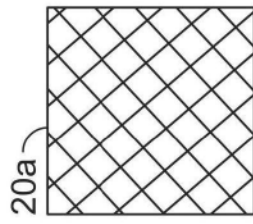


图 2A(v)

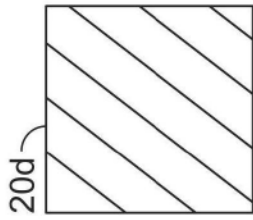


图 2A(ii)

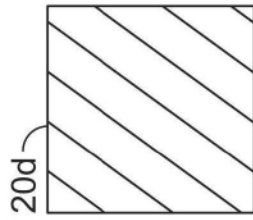


图 2A(i)

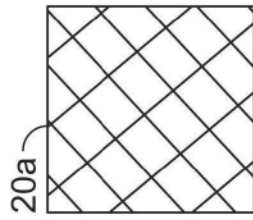


图 2A(iv)

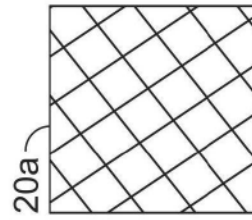


图 2A(vi)

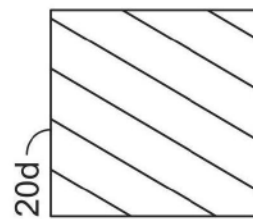
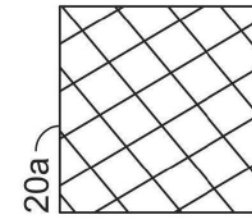


图2A

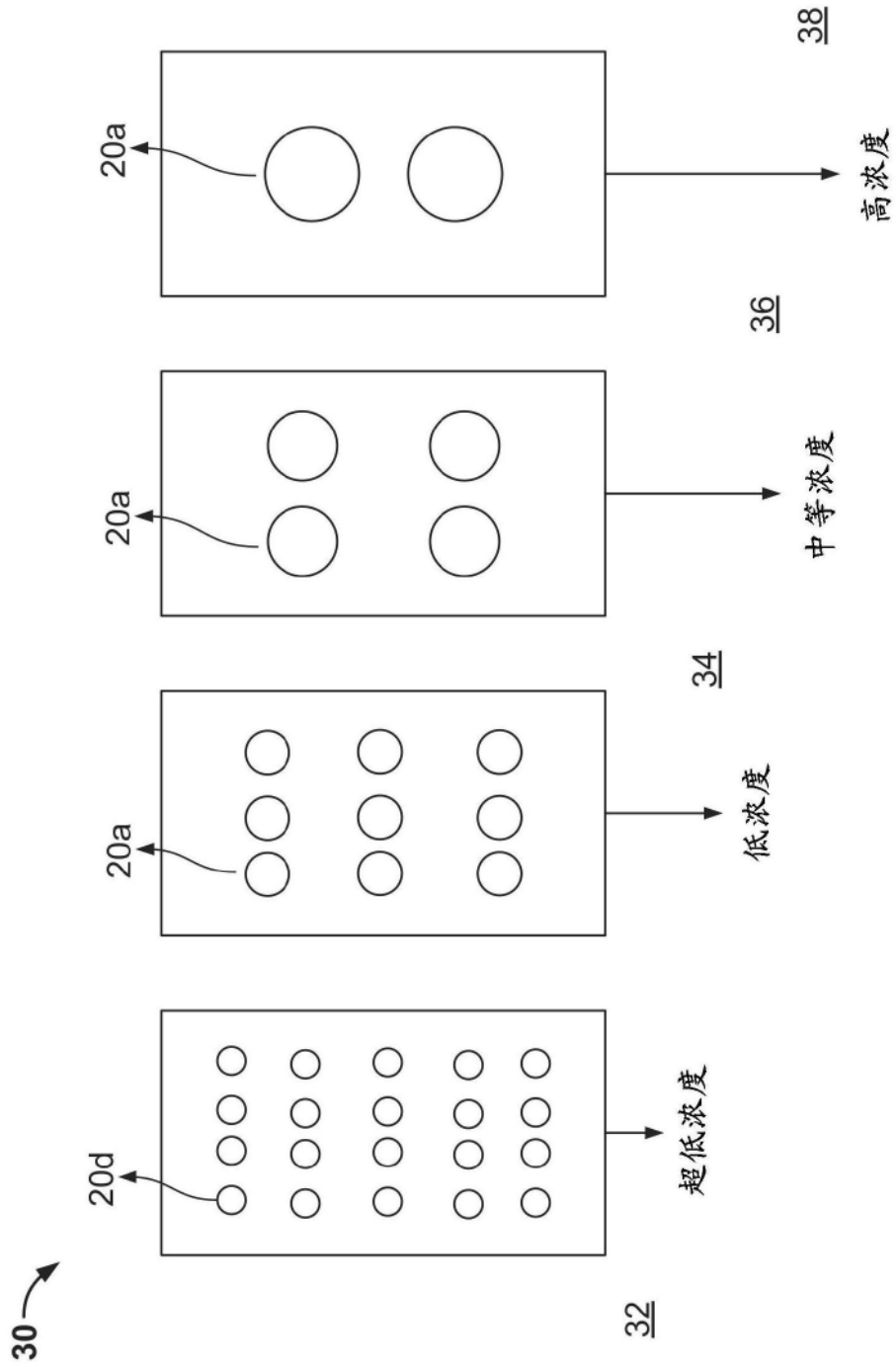


图2B

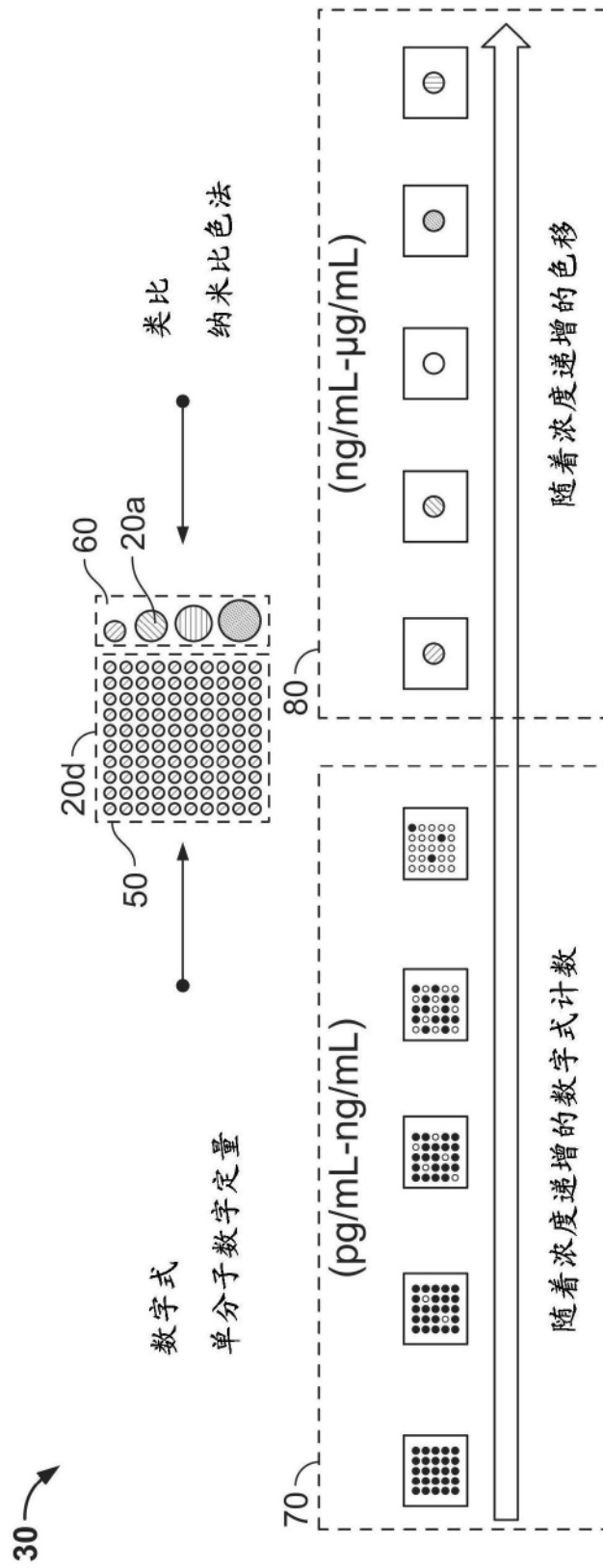


图3A

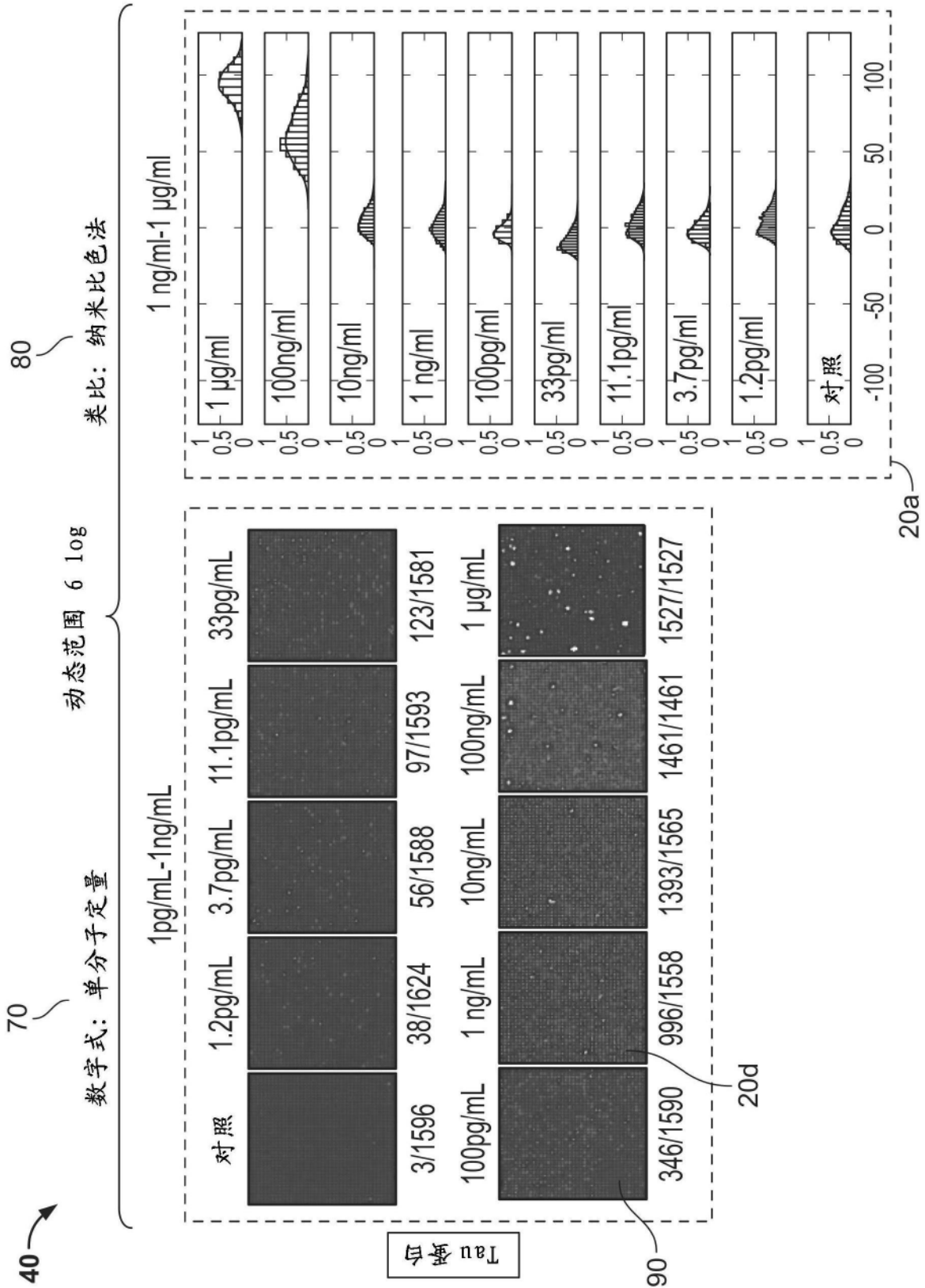


图3B

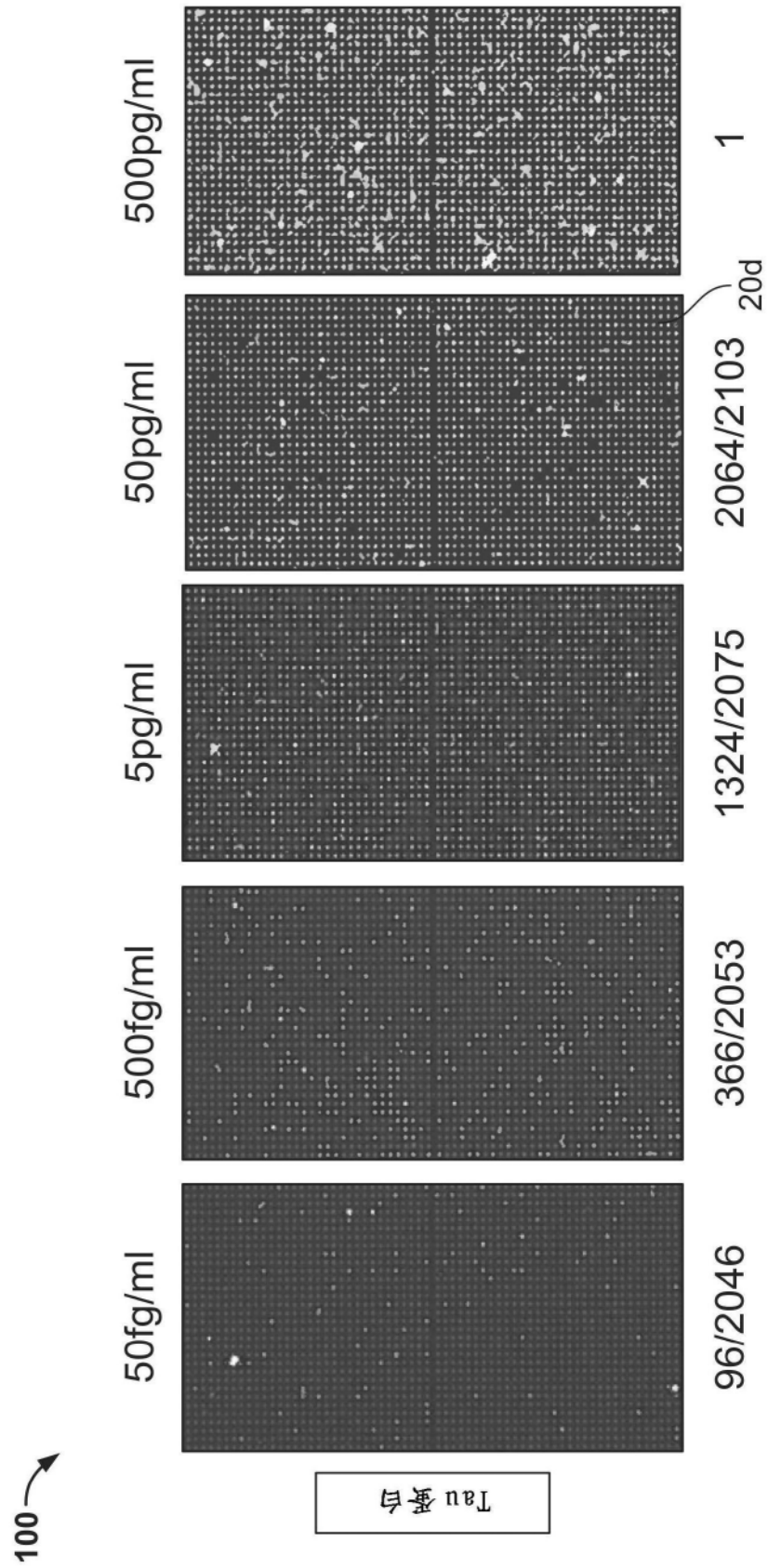


图3C

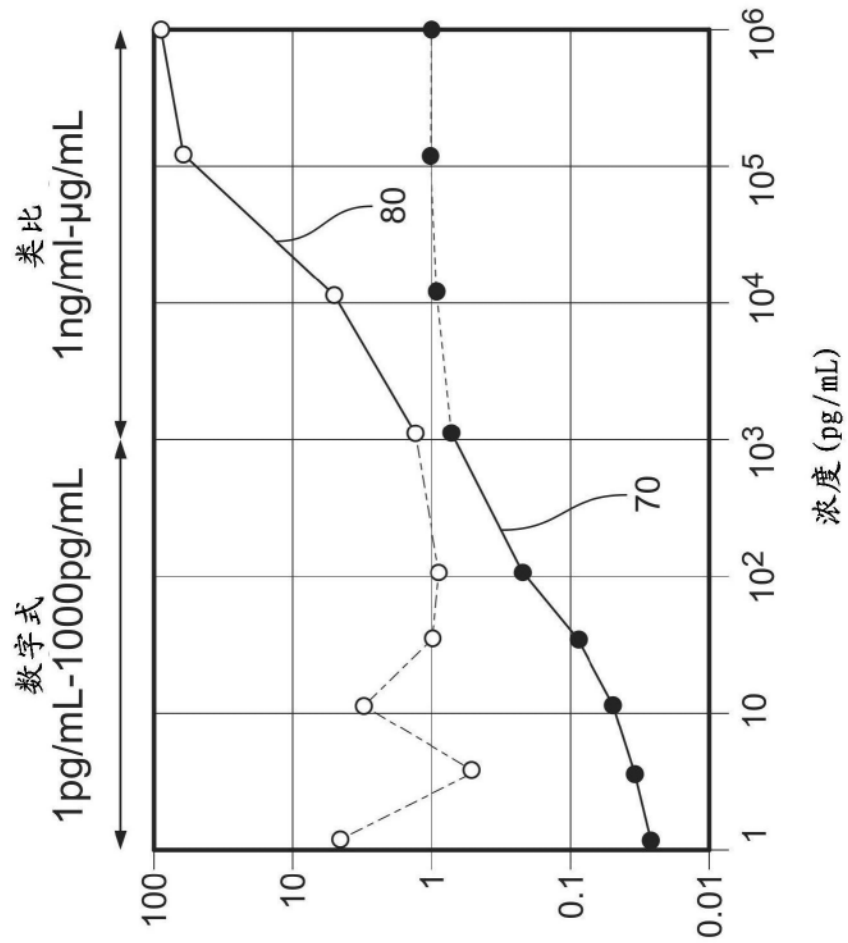


图4

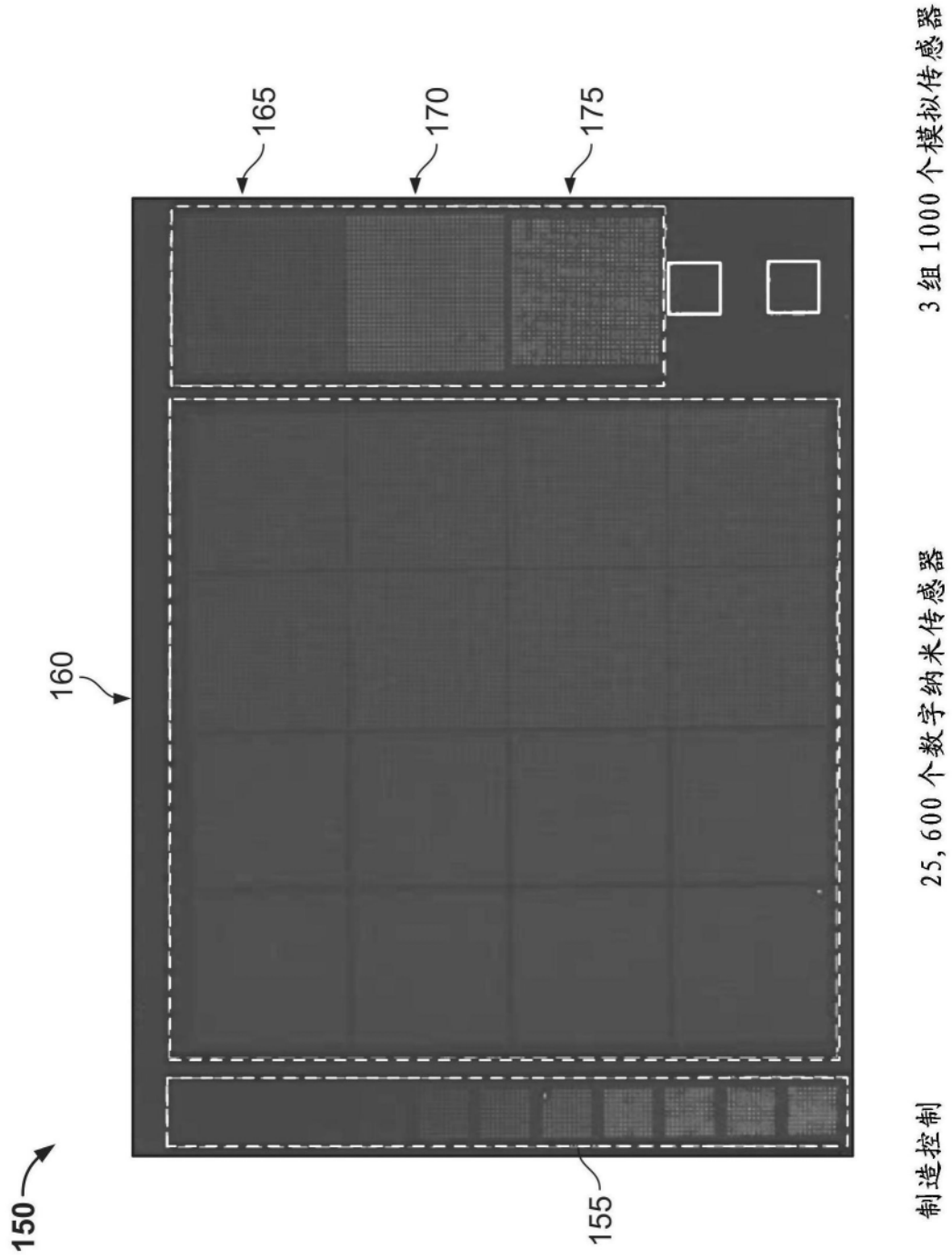


图5

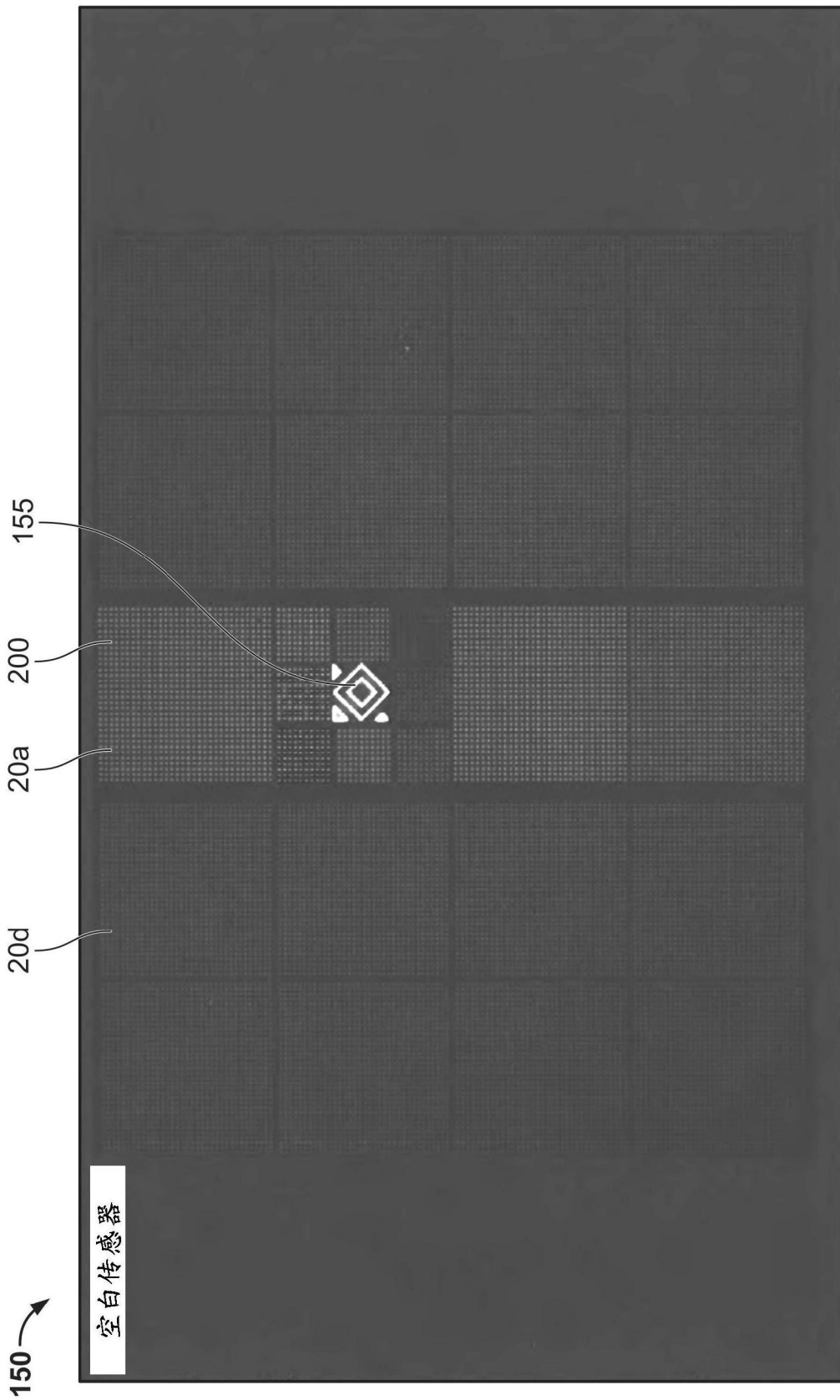


图6

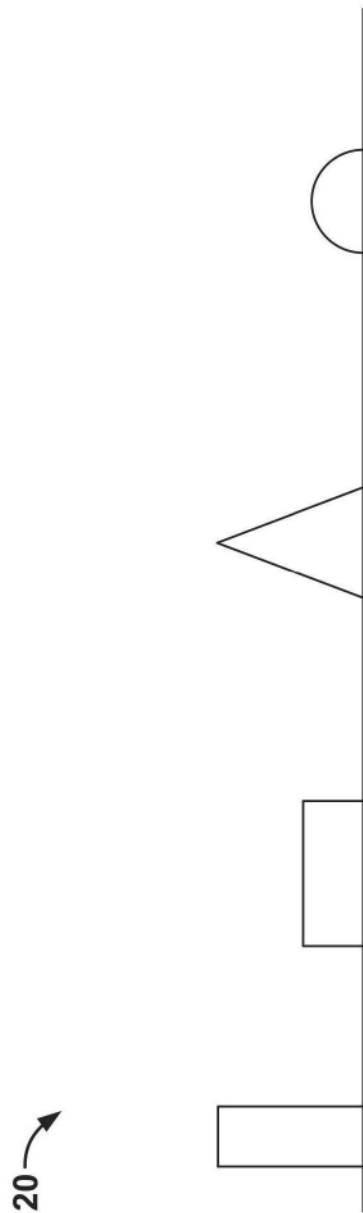


图7

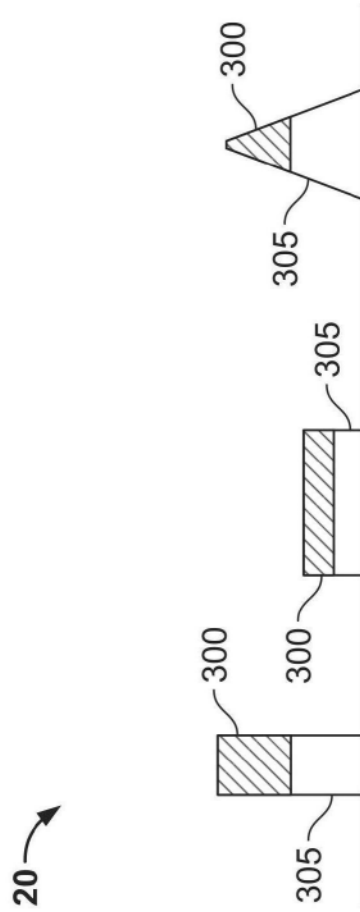


图8

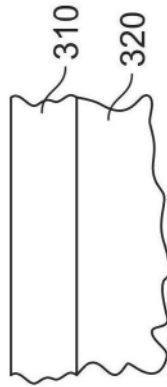


图9A

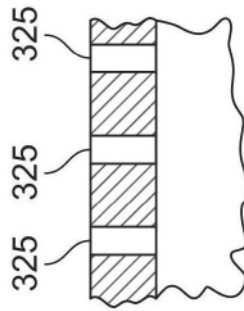


图9B

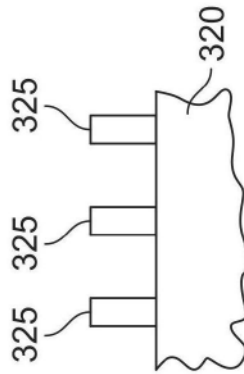


图9C

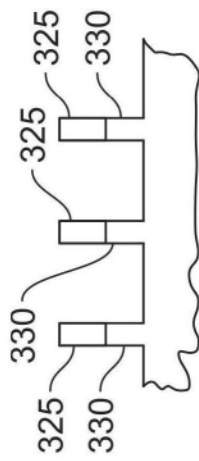


图9D

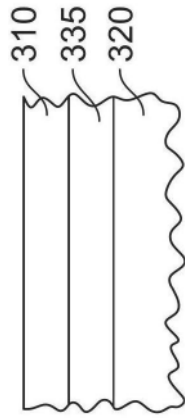


图10A

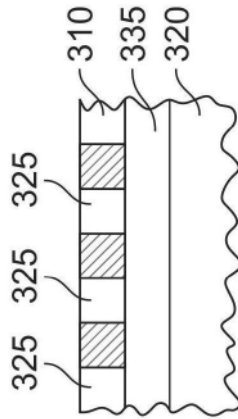


图10B

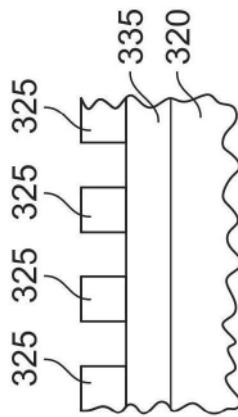


图10C

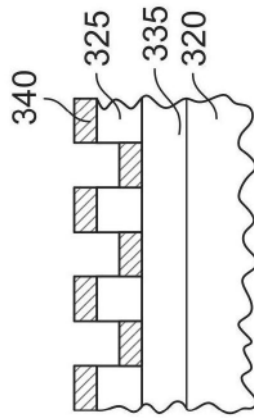


图10D

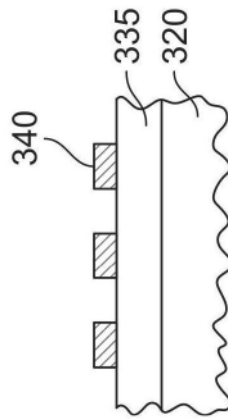


图10E

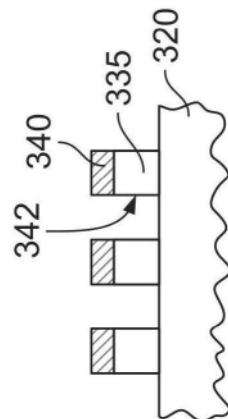


图10F

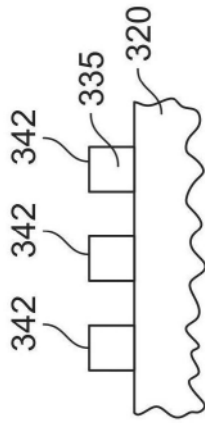


图10G

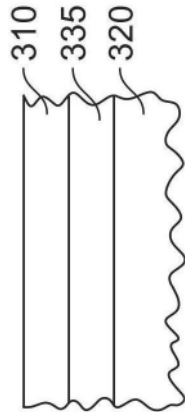


图11A

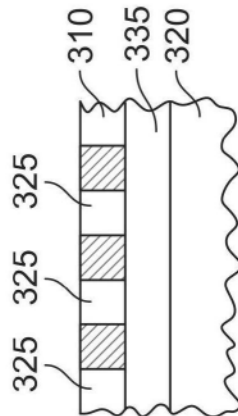


图11B

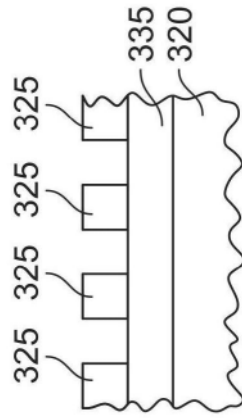


图11C

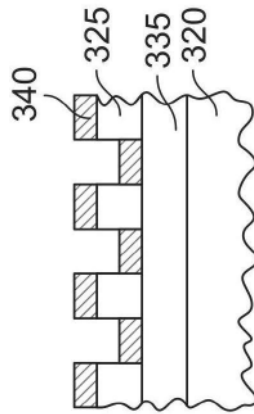


图11D

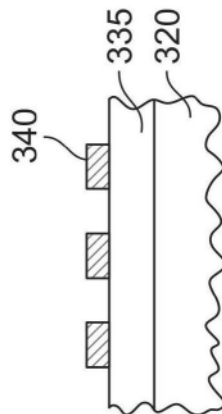


图11E

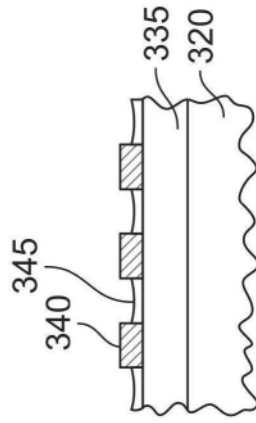


图11F



图12A

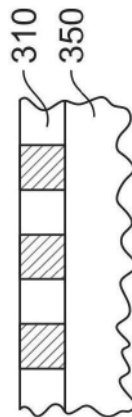


图12B

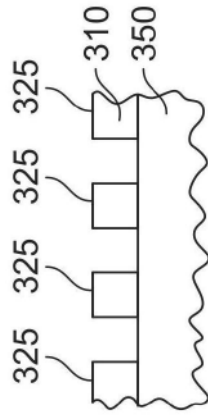


图12C

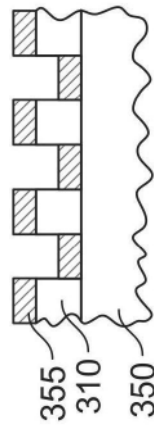


图12D

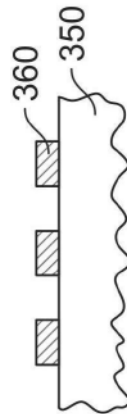


图12E

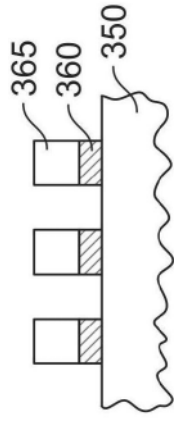


图12F



图13A

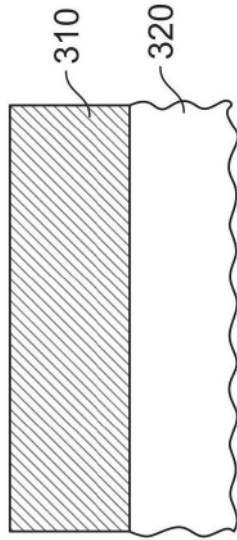


图13B

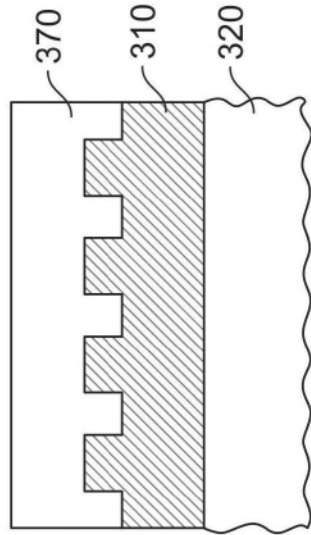


图13C

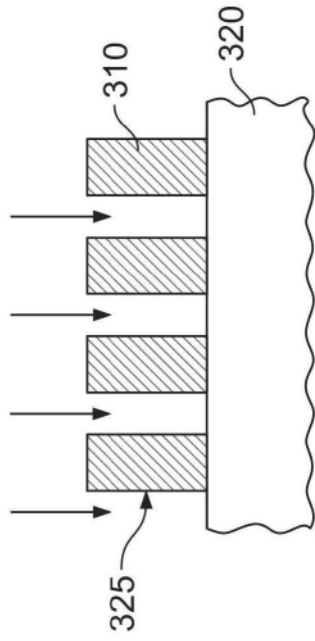


图13D

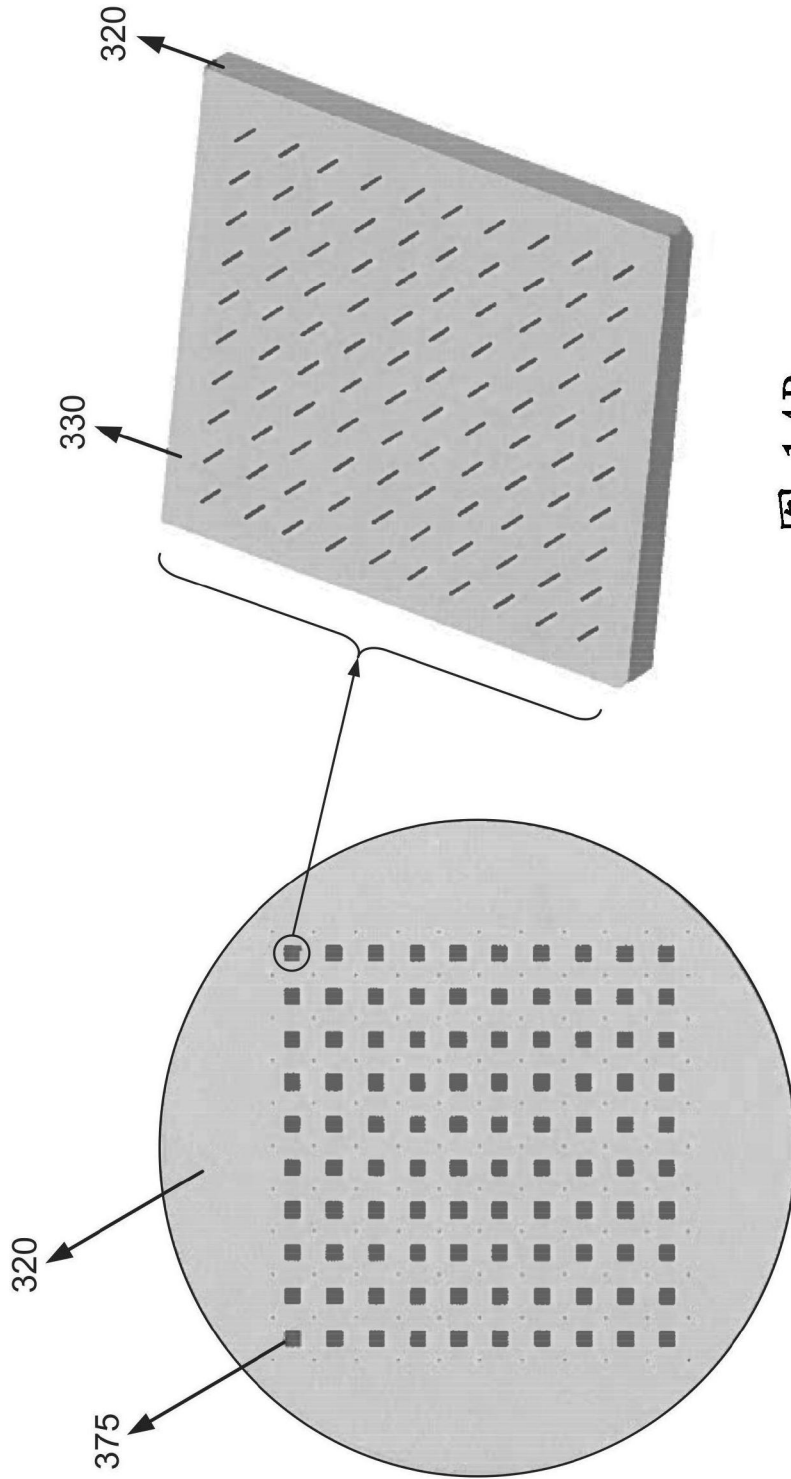


图 14B

图 14A

单抗体无标记测定

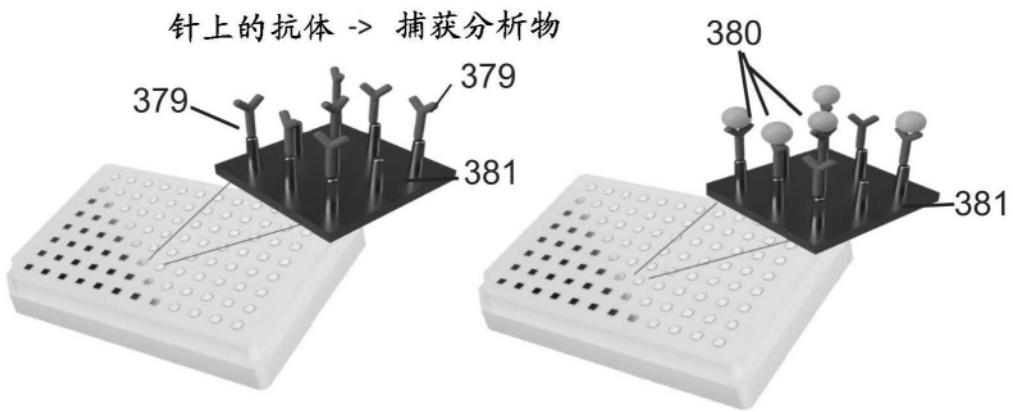


图14C

具有扩增的单抗体测定

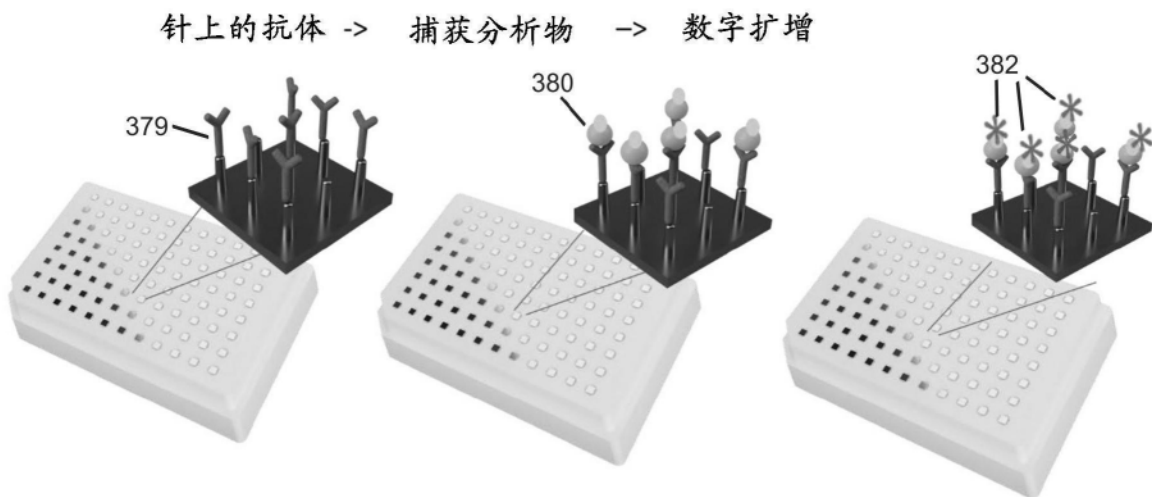


图14D

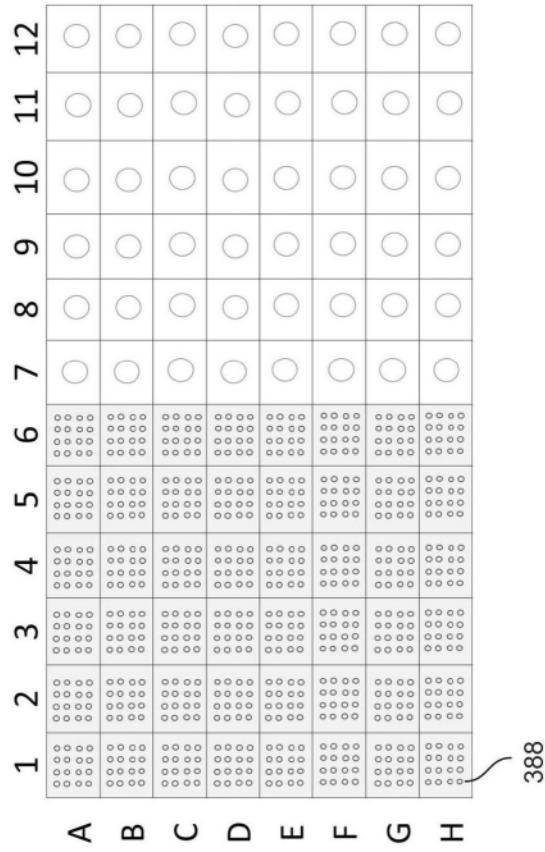


图15B

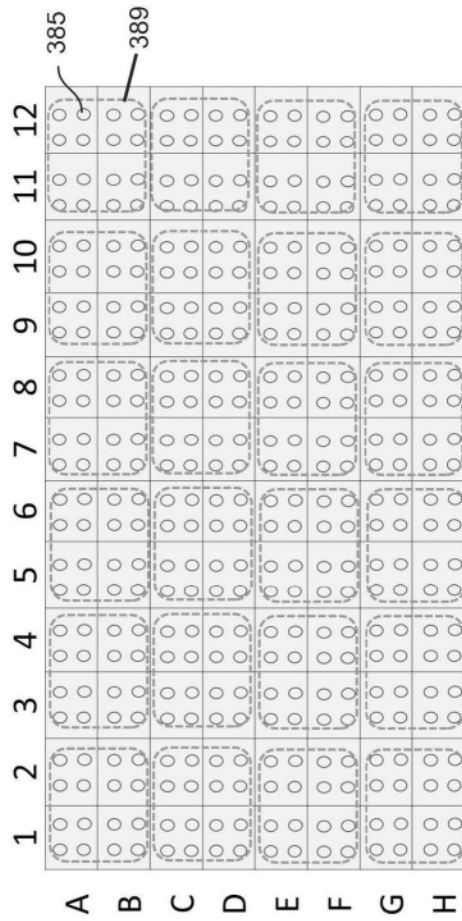


图15C

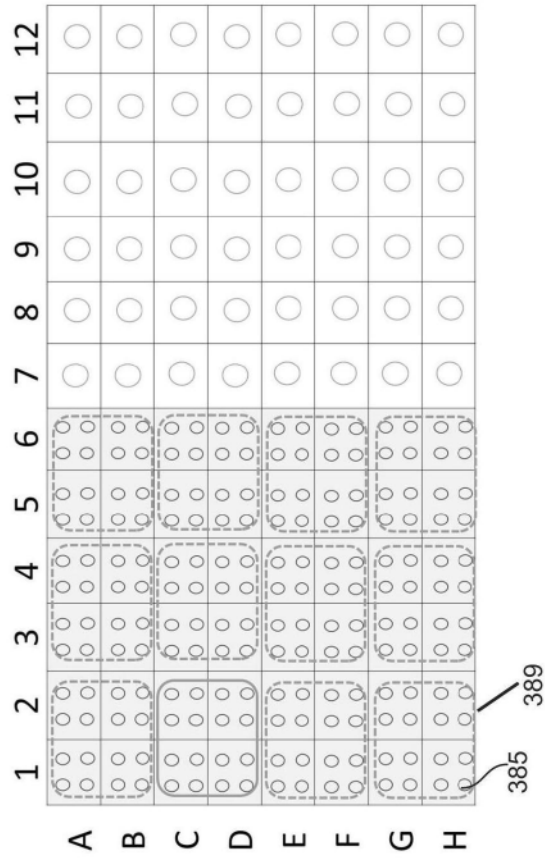


图15D

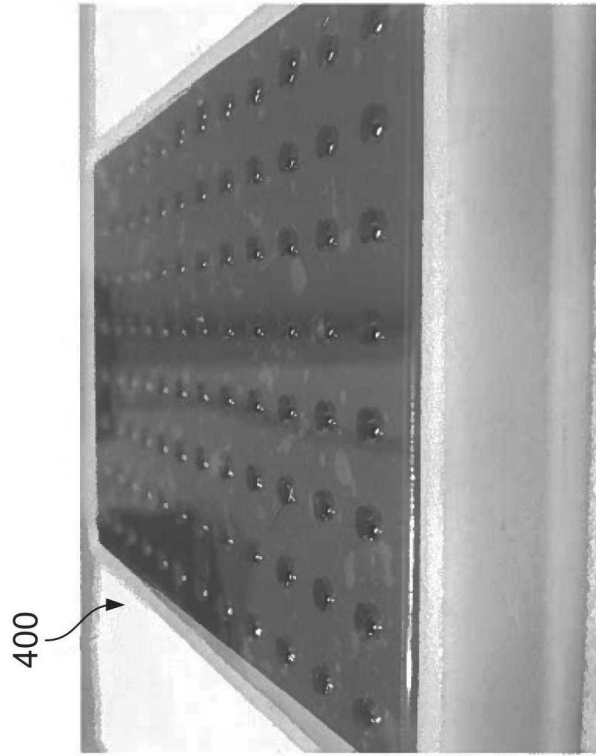


图16A

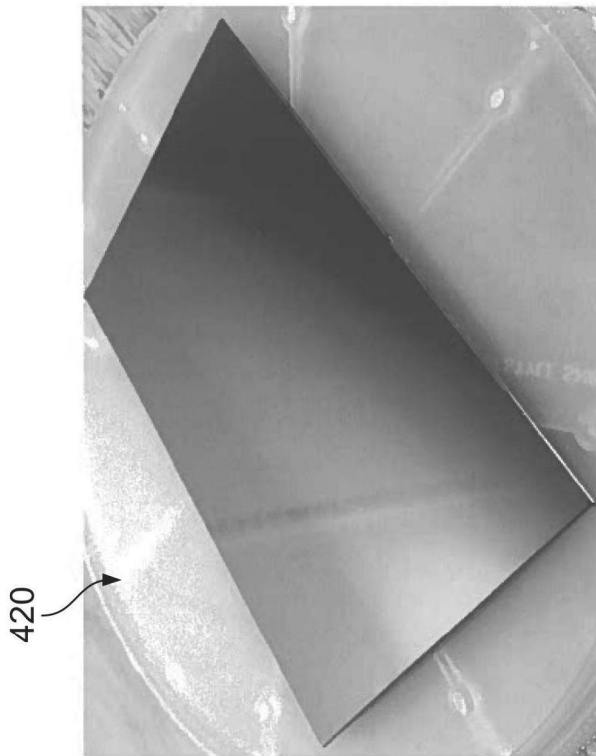


图16B

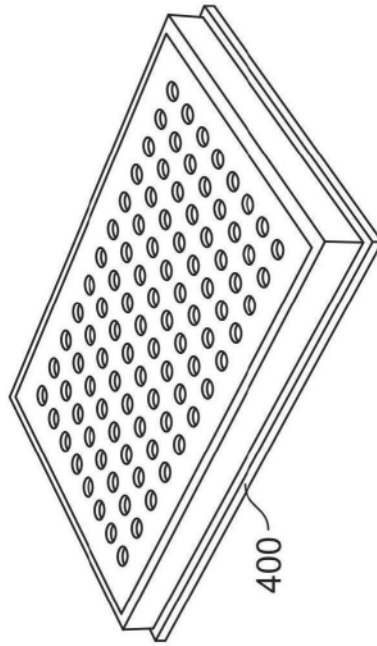


图17A

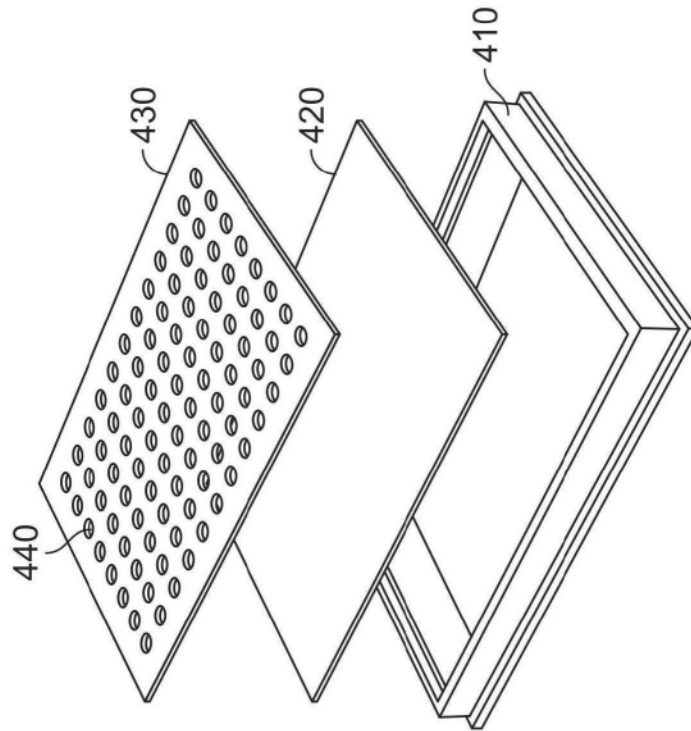


图17B

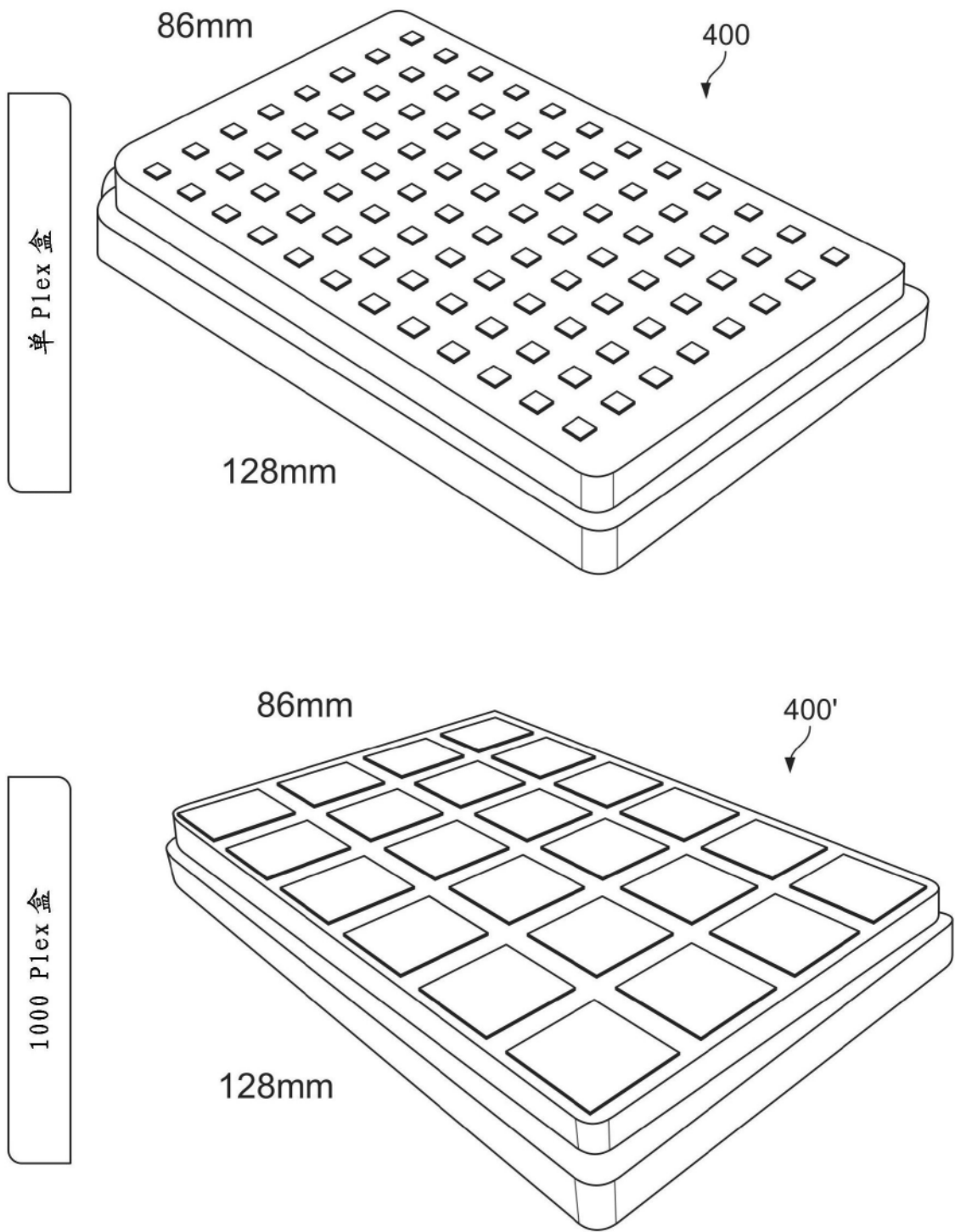


图18

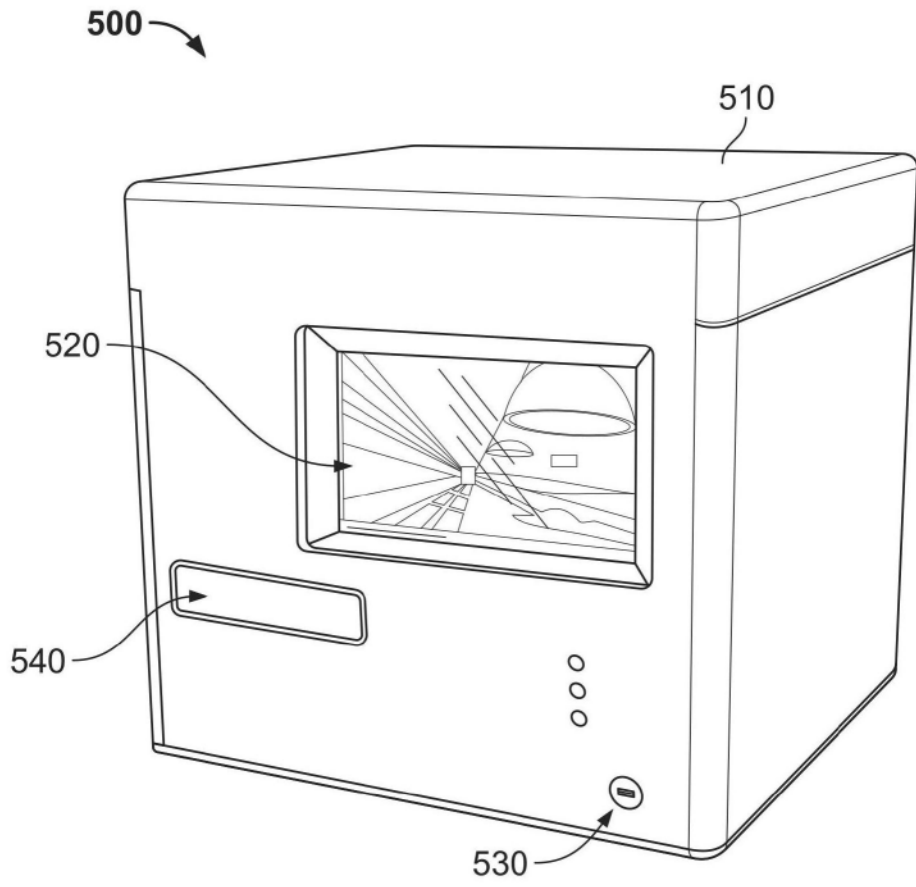


图19

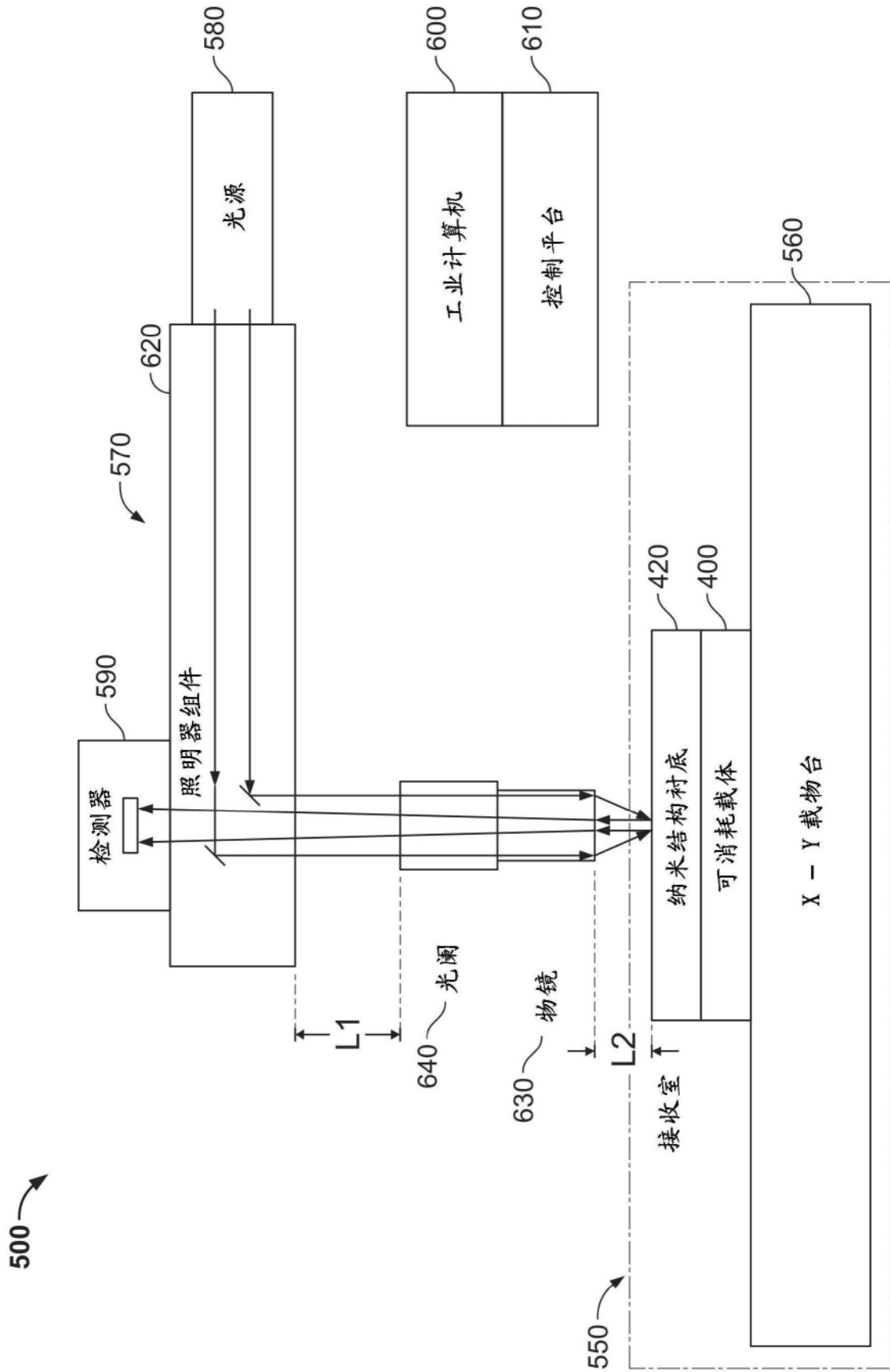


图20

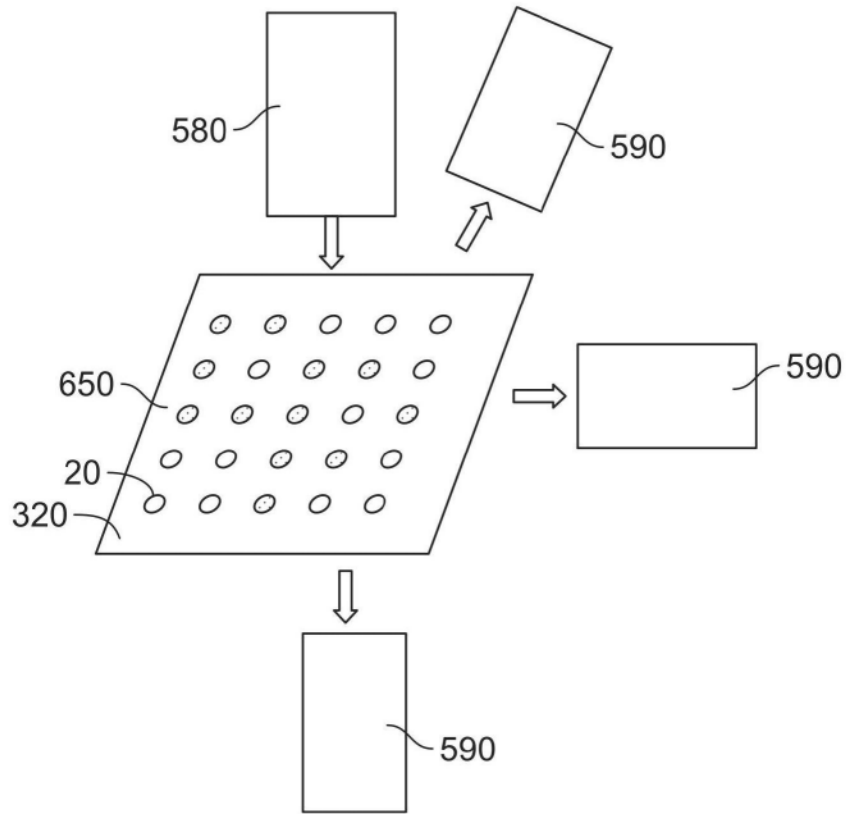


图21

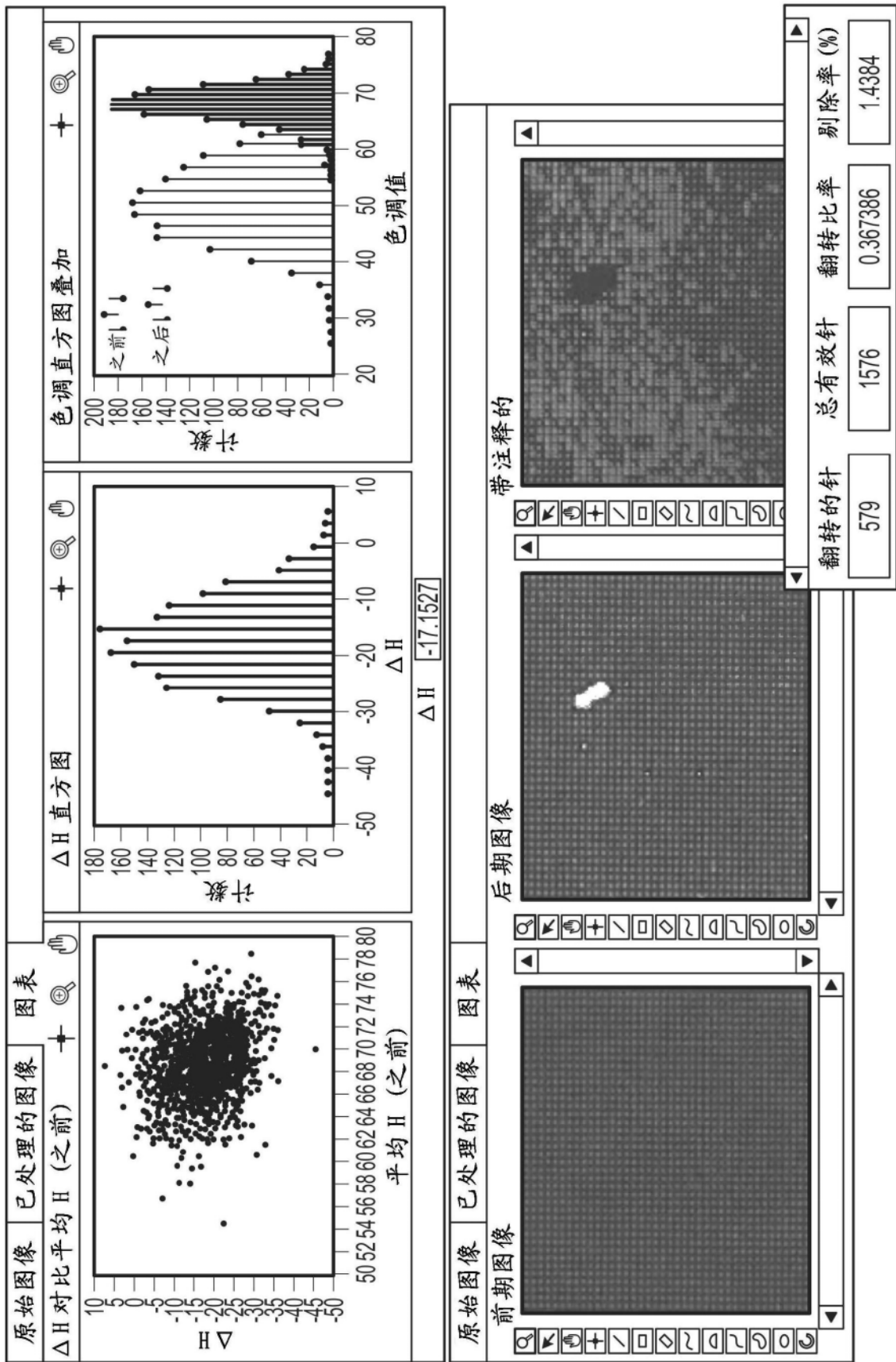


图22

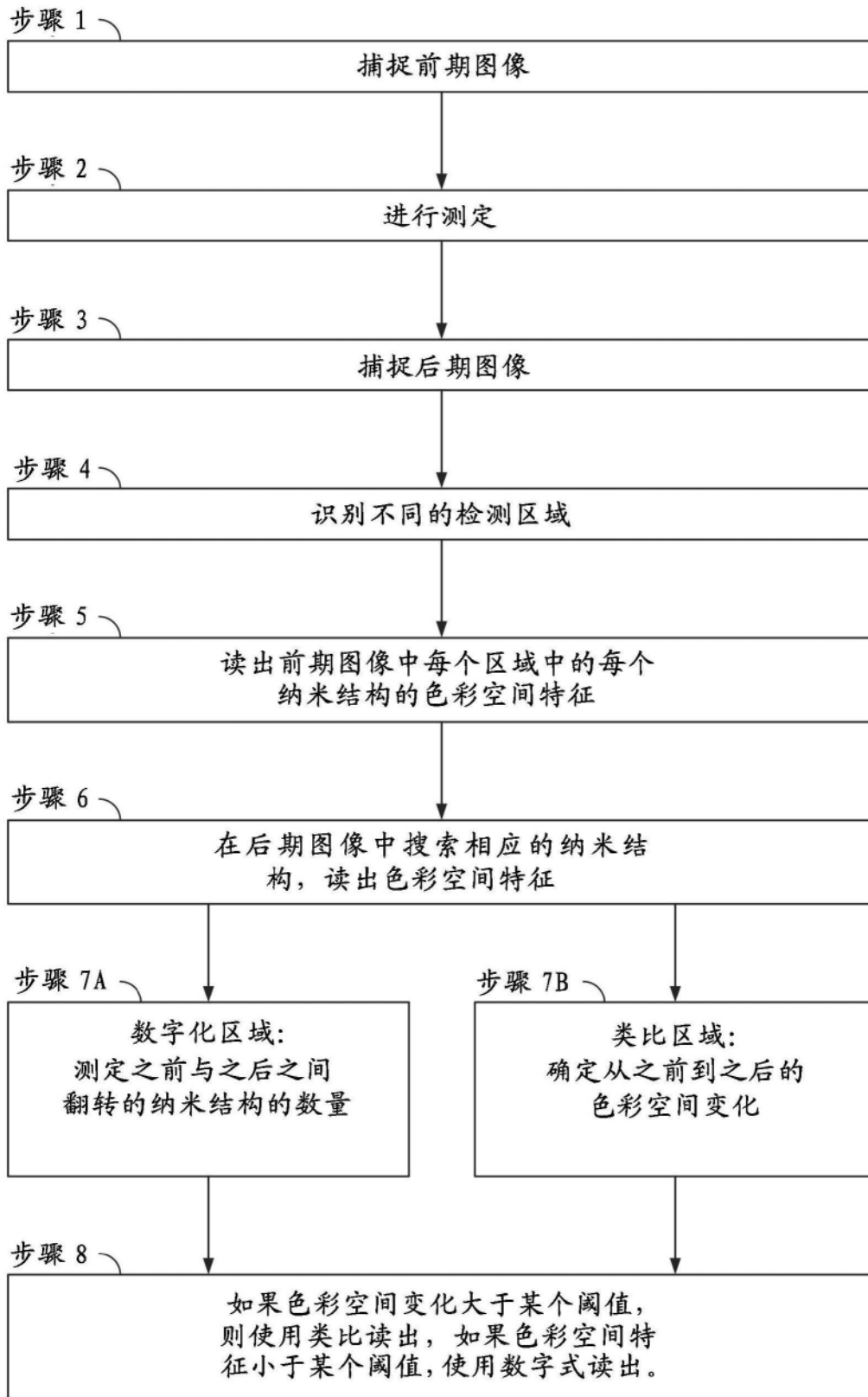


图23

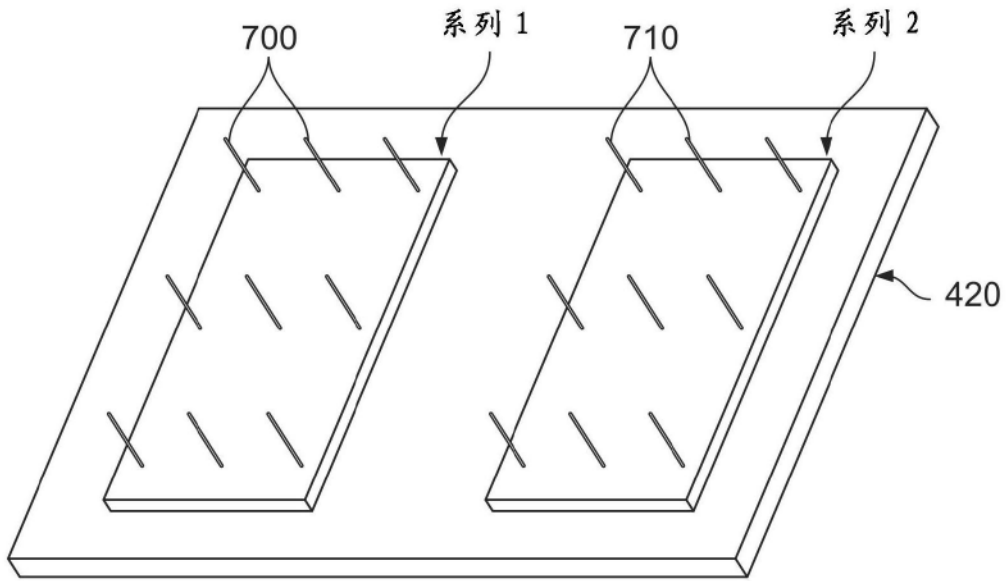


图24A

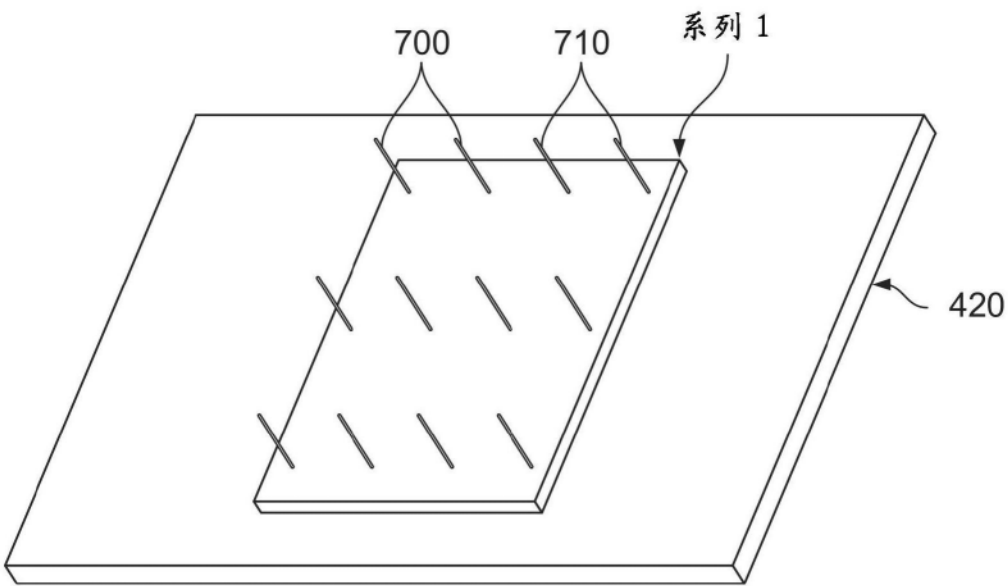


图24B

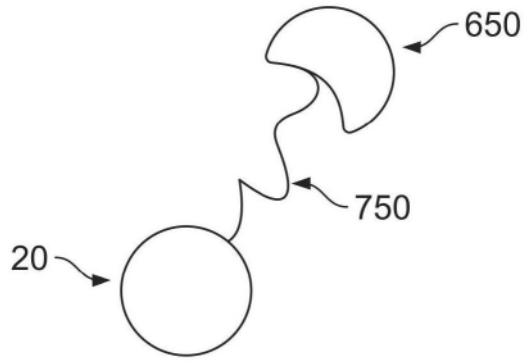


图25

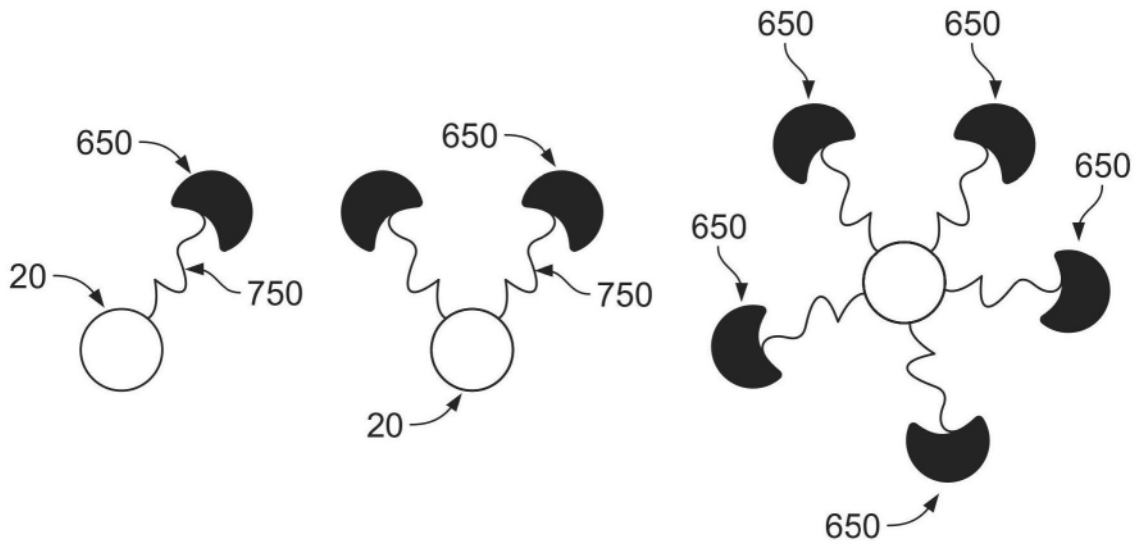


图26

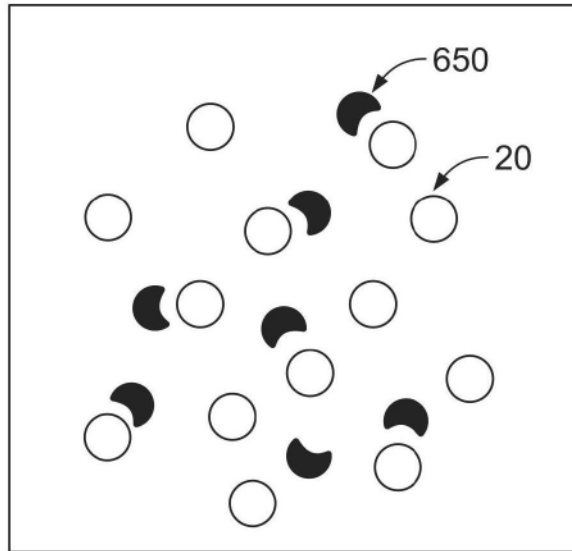


图27

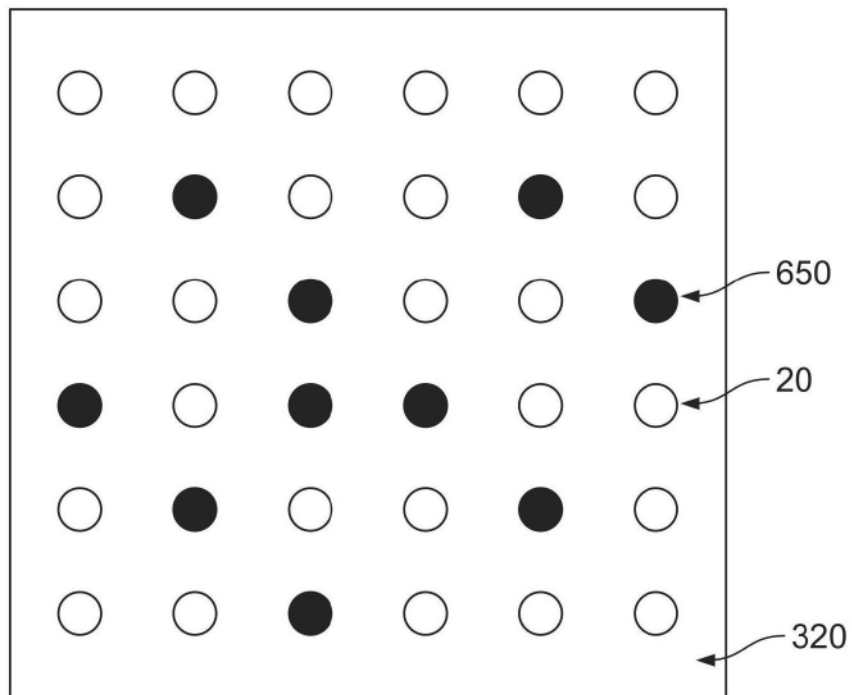


图28

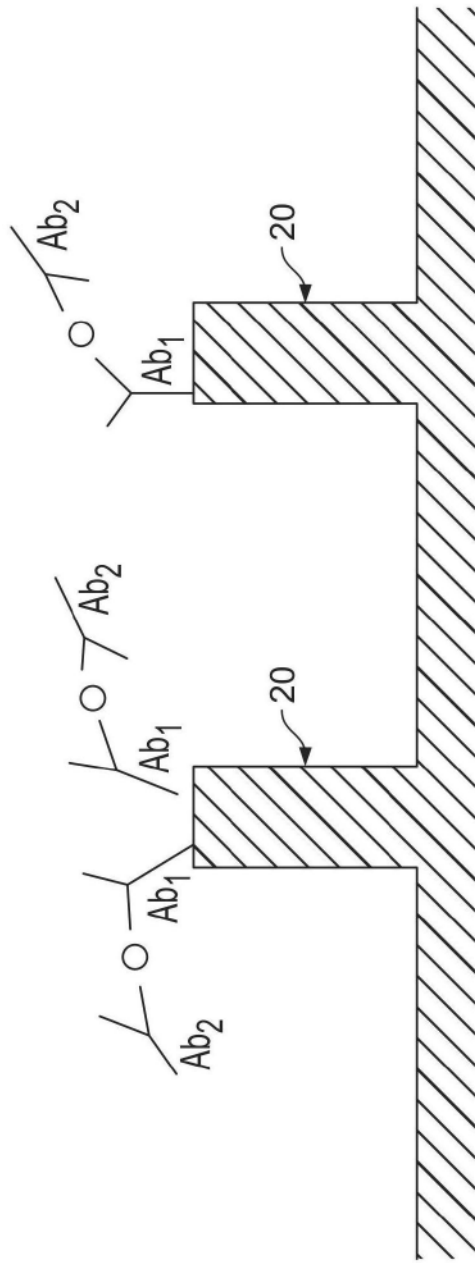


图29

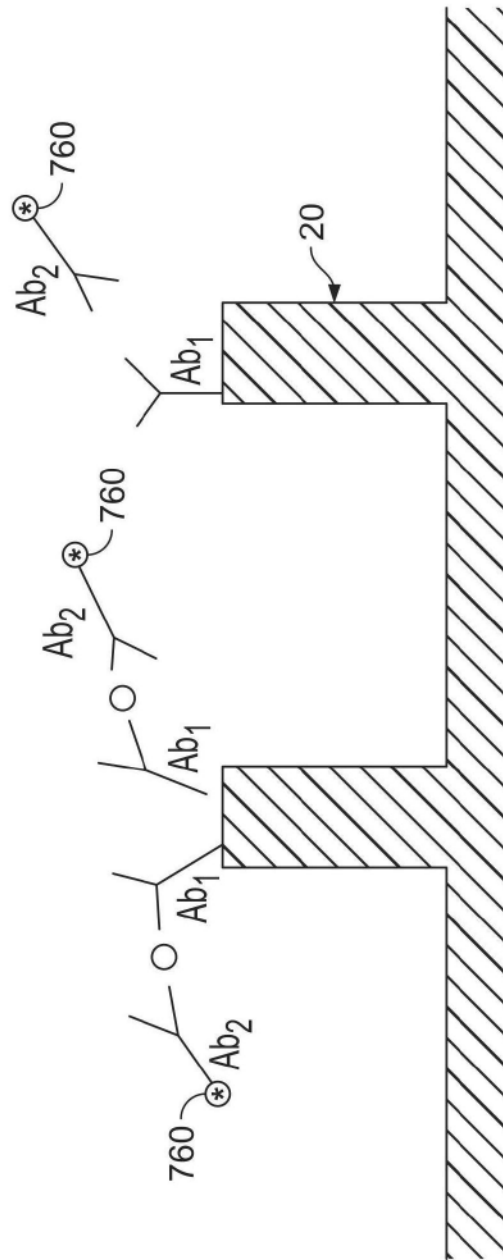


图30

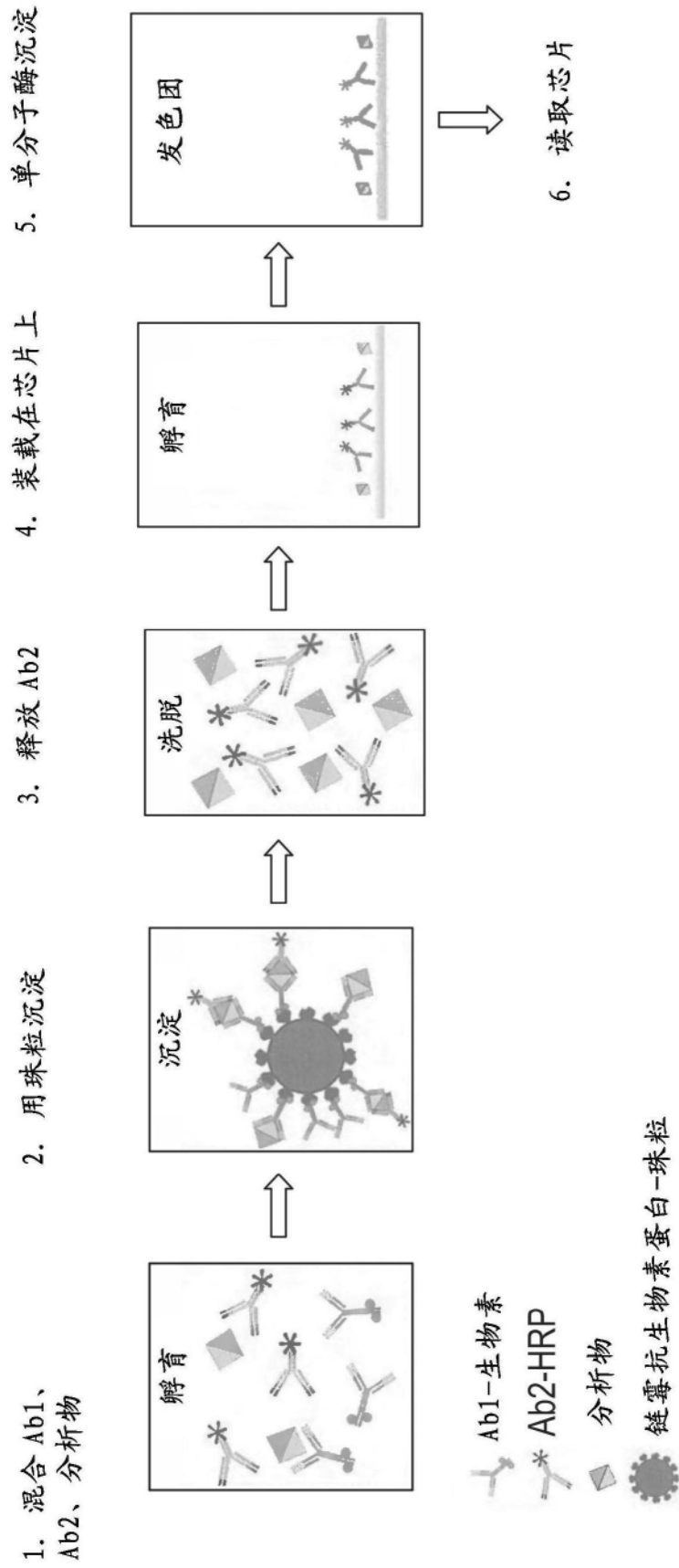


图31

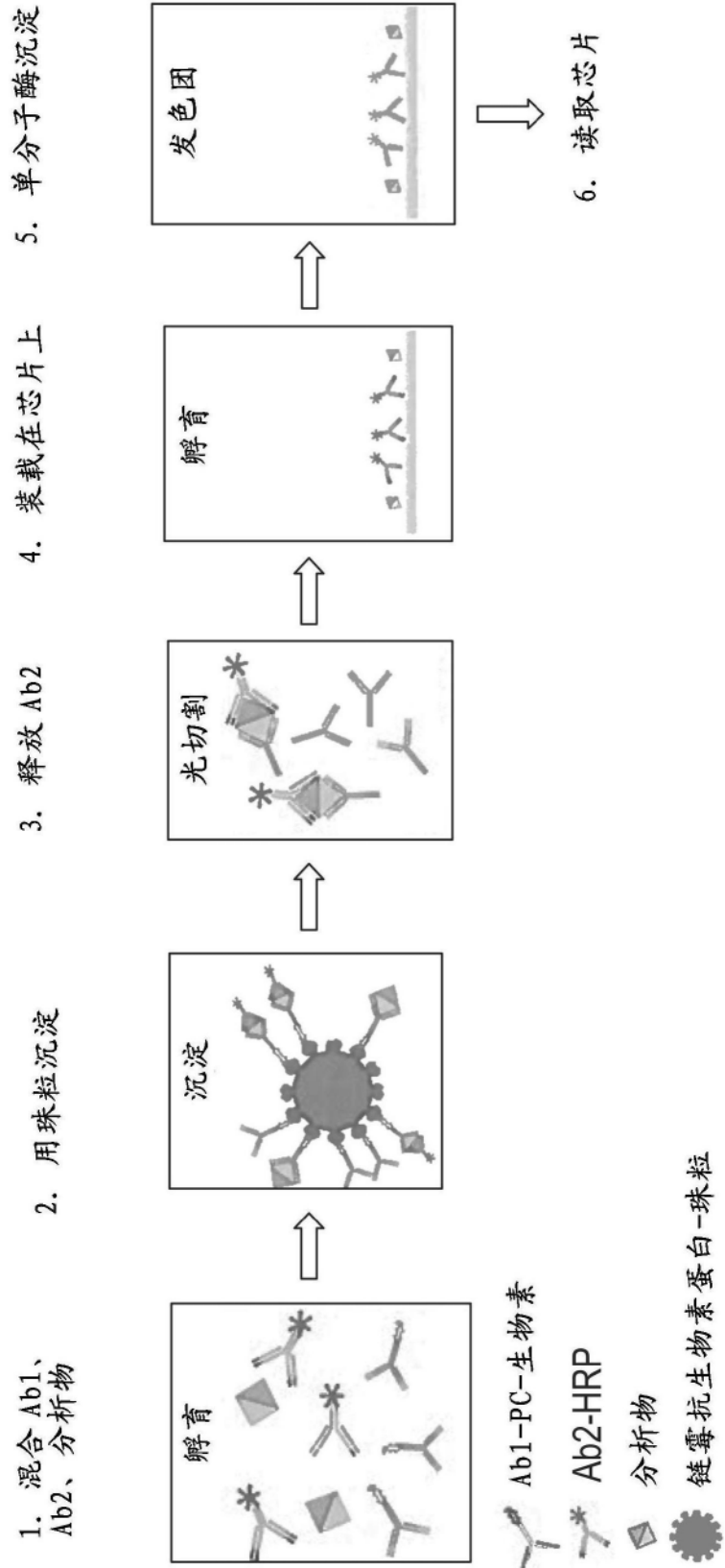


图32

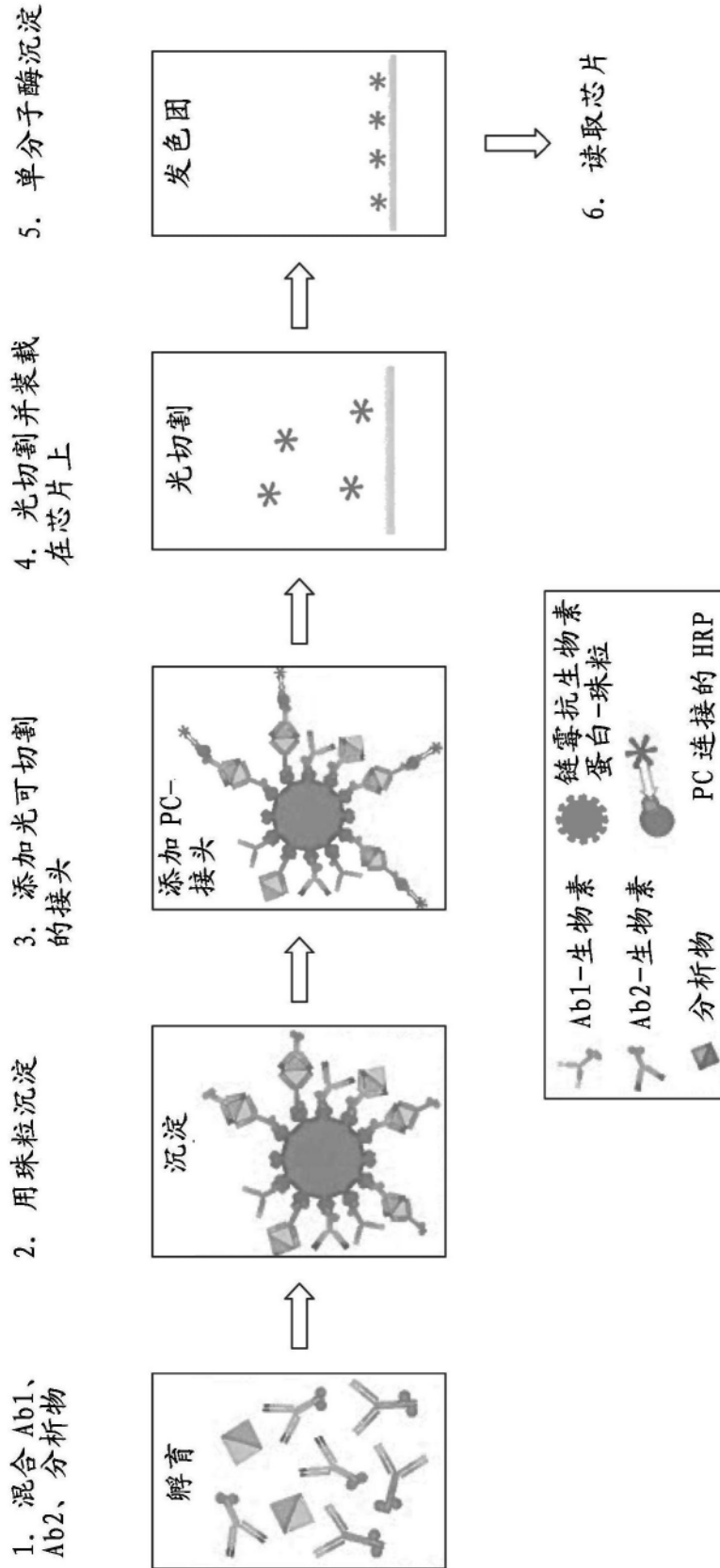


图33

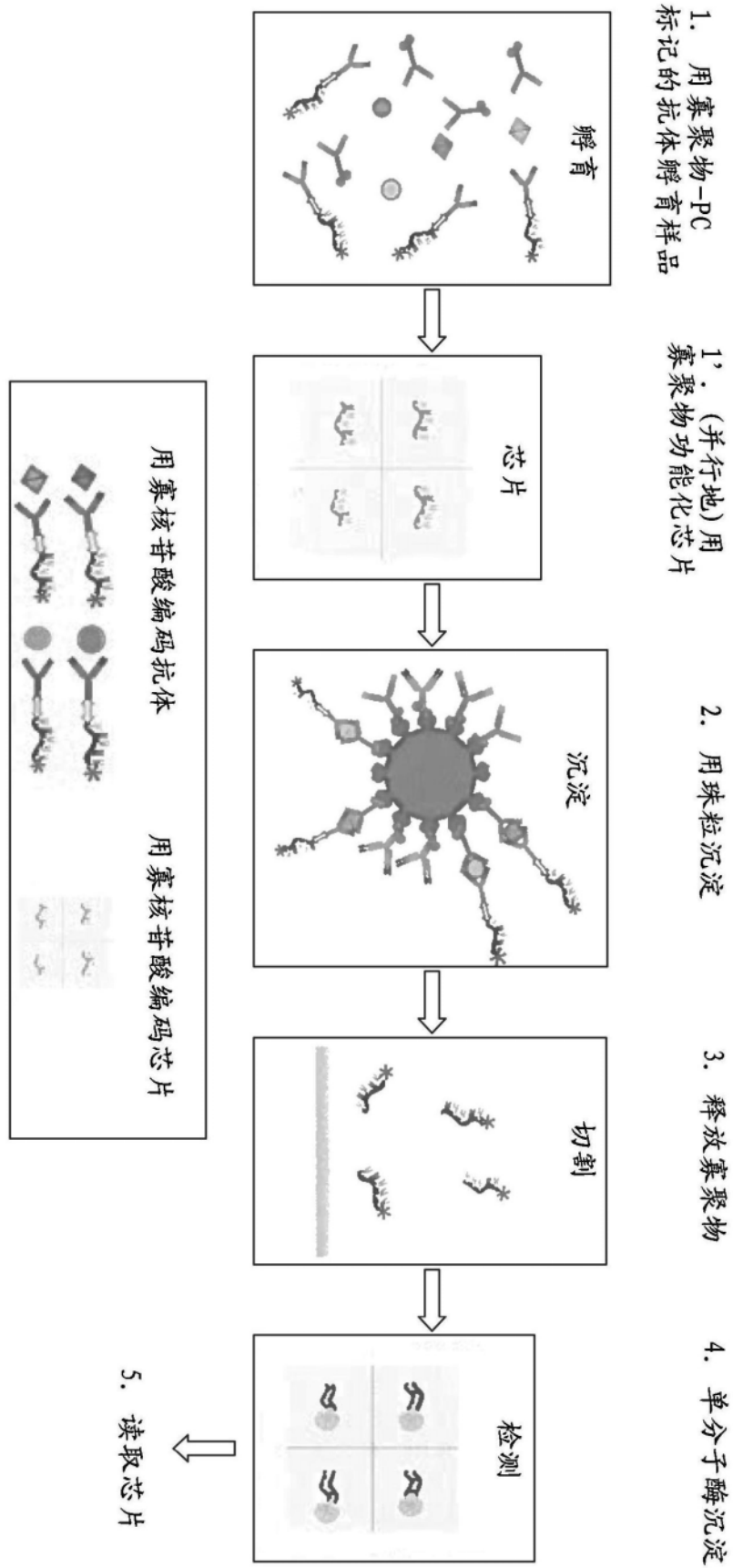


图34

用抗体预包覆的珠粒

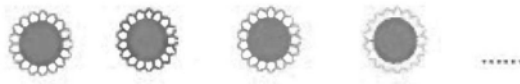


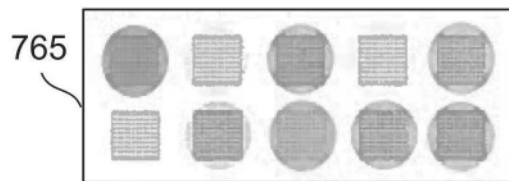
图35A

通过可切割的单元用寡聚物连接抗体



图35B

2x5 纳米针阵列的实例，不同的点
用与抗体连接的寡核苷酸互补的寡
核苷酸打印



切下，在芯片上杂交并读取芯片上的信号

图35C

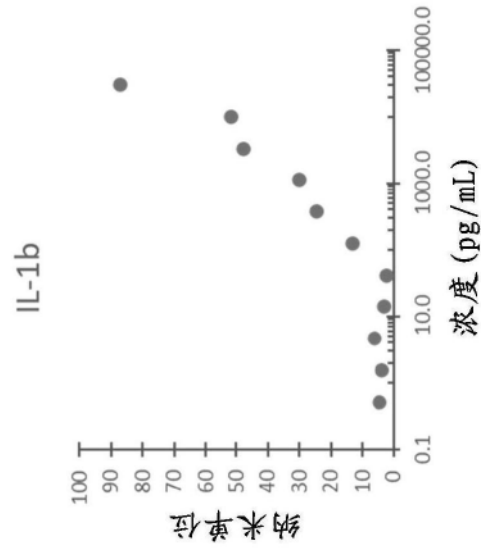


图36A

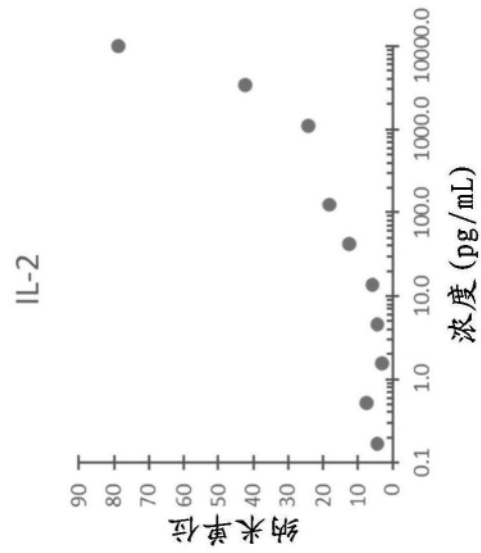


图36B

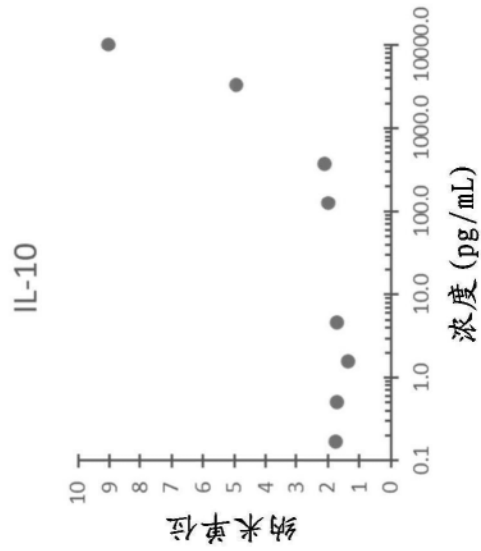


图36C

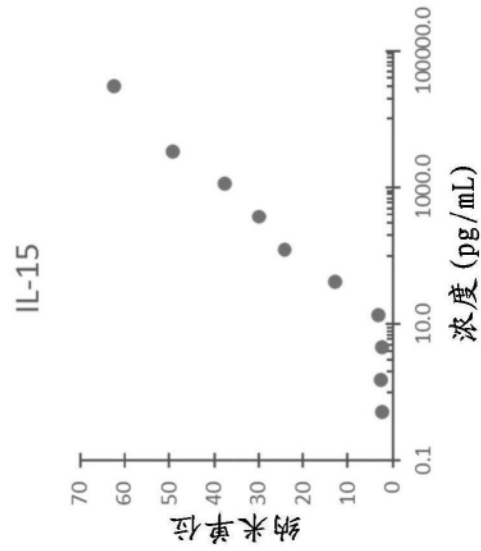


图36D

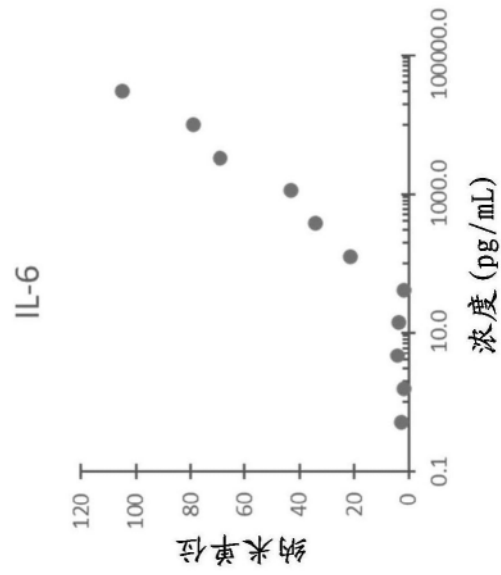


图36E

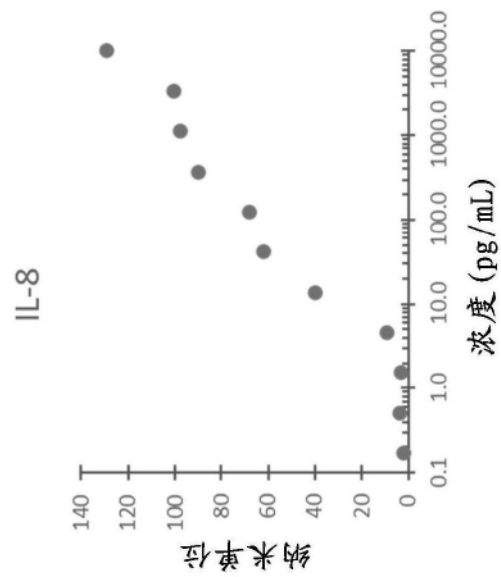


图36F

