



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115176156 A

(43) 申请公布日 2022. 10. 11

(21) 申请号 202080096605.9

(22) 申请日 2020.12.15

(30) 优先权数据

19216596.7 2019.12.16 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.08.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/086171 2020.12.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/122563 EN 2021.06.24

(71) 申请人 布林克公司

地址 德国耶拿

(72) 发明人 云根·恩尔曼川特

伊万·伦卡维克

凯瑟琳·斯蒂尔莫茨

斯蒂芬·胡博得 托马斯·艾林戈

苏珊·科林格 奥利沃·莱姆茨

莉亚·坎茨

(74) 专利代理机构 北京安杰律师事务所 11627

专利代理师 吴立

(51) Int.Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2006.01)

权利要求书12页 说明书45页

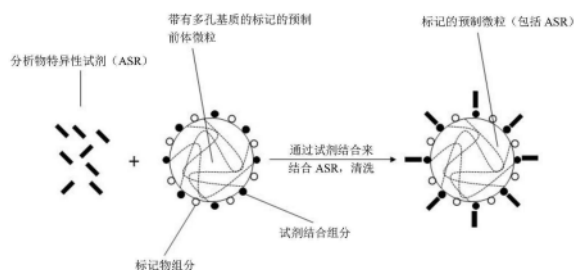
序列表2页 附图17页

(54) 发明名称

预制微粒及其前体的文库

(57) 摘要

本发明涉及用于对样品中的一种或几种分析物进行特异性检测的预制微粒以及此类微粒的前体,在本文中有时也被称为“前体微粒”。具体地,本发明涉及此类预制微粒的文库和此类前体微粒的文库。此外,本发明涉及用于制备此类文库的试剂盒和使用此类文库在样品中检测感兴趣的分析物的试剂盒。此外,本发明涉及优选地使用此类试剂盒检测和/或定量水性样品中感兴趣的分析物的方法。



1. 一种用于制备预制微粒文库的预制前体微粒文库, 所述预制微粒被配置用于对样品中的一种或几种感兴趣的分析物进行特异性检测, 此类特异性检测是通过适合的化学反应或生物化学反应在此类微粒内发生的, 所述文库中的每个所述预制前体微粒包含:

- 多孔基质, 优选为多孔聚合物基质, 所述多孔基质具有用于容纳水性样品并为分析物的特异性检测提供反应空间的空隙体积;

- 试剂结合组分, 其允许分析物特异性试剂附连、优选可逆地附连到所述前体微粒; 所述试剂结合组分是下述物质之一:

(i) 聚合物或聚合物混合物, 其形成所述多孔基质或者是所述多孔基质;

(ii) 附连到所述多孔基质的试剂结合分子;

(iii) 固定在所述多孔基质上的至少一个可电离基团或多个可电离基团, 所述可电离基团能够根据所述前体微粒周围的环境条件改变其电荷;

(iv) 固定在所述多孔基质上的至少一个带电荷基团或多个带电荷基团;

(v) (i) - (iv) 的任何组合;

- 标记物组分, 其附连到所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合, 用于在附连到所述前体微粒时识别所述分析物特异性试剂。

2. 根据权利要求1所述的文库, 其中在所述文库中存在至少两个独立的预制前体微粒子集, 优选地三个以上独立的预制前体微粒子集, 并且每个子集具有附连到所述子集内的所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分, 使得通过附连到每个子集、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分来区分所述至少两个以上独立的预制前体微粒子集。

3. 一种用于对样品中的一种或几种感兴趣的分析物进行特异性检测的预制微粒文库, 此类特异性检测是通过适合的化学反应或生物化学反应在此类微粒内发生的, 每个所述预制微粒包含根据权利要求1-2中的任一项所述的预制前体微粒, 并且还包含附连、优选可逆地附连到所述前体微粒的分析物特异性试剂。

4. 根据权利要求3所述的预制微粒文库, 其中附连到每个所述前体微粒的所述分析物特异性试剂经由所述试剂结合组分, 通过下述机制附连、优选可逆地附连:

a) 所述分析物特异性试剂与形成所述多孔聚合物基质或作为所述多孔聚合物基质的一部分的所述聚合物或聚合物混合物 (i) 的直接结合;

b) 所述分析物特异性试剂被偶联到结合实体, 所述结合实体进而与所述试剂结合分子 (ii) 结合;

c) 在所述可电离基团具有适合的净电荷的条件下所述分析物特异性试剂与所述可电离基团 (iii) 的直接结合;

d) 所述分析物特异性试剂与所述聚合物上的所述带电荷基团 (iv) 的直接结合, 其中所述分析物特异性试剂具有至少一个可电离基团或多个可电离基团, 所述可电离基团能够根据所述分析物特异性试剂周围的环境条件改变其电荷; 或

e) (a) - (d) 的任何组合。

5. 根据权利要求1-2中的任一项所述的预制前体微粒文库或根据权利要求3-4中的任一项所述的预制微粒文库, 其中

- 所述聚合物 (i) 是水凝胶形成剂, 其选自: ia) 合成聚合物, 例如聚(甲基)丙烯酸甲酯、

聚酰胺;ib) 基于硅酮的聚合物,例如聚二甲基硅氧烷;ic) 天然存在的聚合物,其选自例如琼脂糖、几丁质、壳聚糖、葡聚糖、藻酸盐、卡拉胶、纤维素、岩藻多糖、褐藻淀粉的多糖,选自黄原胶、阿拉伯胶、印度树胶、瓜尔胶、刺槐豆胶、黄蓍胶、刺梧桐胶和菊粉的胶,例如胶原蛋白、明胶的多肽,例如聚赖氨酸的聚氨基酸,以及多核苷酸;并且所述聚合物混合物是任何上述物质的组合;

-所述试剂结合分子(ii)选自:亲和素、特别是四聚体亲和素,链霉亲和素,单体亲和素,在其生物素结合位点中具有硝化的酪氨酸的亲和素,衍生自亲和素或与亲和素相关、并保留亲和素的结合功能的其他蛋白质,生物素,脱硫生物素,亚氨基生物素,具有可切割的间隔物臂的生物素,硒生物素,氧代生物素,高生物素,降生物素,亚氨基生物素,二氨基生物素,生物素亚砷,生物素砷,表生物素,5-羟基生物素,2-硫代生物素,氮杂生物素,碳生物素,生物素的甲基化衍生物,酮生物素,衍生自生物素或与生物素相关、并保留生物素的结合功能的其他分子;

-所述至少一个可电离基团(iii)或所述权利要求4的d)的可电离基团选自:

- N-2-乙酰胺基-2-氨基乙磺酸(ACES);
- N-2-乙酰胺基-2-亚氨基二乙酸(ADA);
- 氨基甲基丙二醇(AMP);
- 3-1,1-二甲基-2-羟乙基氨基-2-羟基丙磺酸(AMPSO);
- N,N-双-2-羟乙基-2-氨基乙磺酸(BES);
- N,N-双-2-羟乙基甘氨酸(BICINE);
- 双-2-羟乙基亚氨基三羟甲基甲烷(Bis-Tris);
- 1,3-双三羟甲基甲基氨基丙烷(Bis-Tris丙烷);
- 4-环己基氨基-1-丁磺酸(CABS);
- 3-环己基氨基-1-丙磺酸(CAPS);
- 3-环己基氨基-2-羟基-1-丙磺酸(CAPSO);
- 2-N-环己基氨基乙磺酸(CHES);
- 3-N,N-双-2-羟乙基氨基-2-羟基丙磺酸(DIPSO);
- N-2-羟乙基哌嗪-N-3-丙磺酸(EPPS);
- N-2-羟乙基哌嗪-N-4-丁磺酸(HEPBS);
- N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES);
- N-2-羟乙基哌嗪-N-2-丙磺酸(HEPPSO);
- 2-N-吗啉乙磺酸(MES);
- 4-N-吗啉丁磺酸(MOBS);
- 3-N-吗啉丙磺酸(MOPS);
- 3-N-吗啉-2-羟基丙磺酸(MOPSO);
- 哌嗪-N,N-双-2-乙磺酸(PIPES);
- 哌嗪-N,N-双-2-羟基丙磺酸(POPSO);
- N-三羟甲基-甲基-4-氨基丁磺酸(TABS);
- N-三羟甲基-甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS);
- 3-N-三羟甲基-甲基氨基-2-羟基丙磺酸(TAPSO);

- N-三羟甲基-甲基-2-氨基乙磺酸(TES)；
- N-三羟甲基甲基甘氨酸(TRICINE)；
- 三羟甲基氨基甲烷(Tris)；
- 多羟基胺；
- 咪唑及其衍生物,即咪唑类,特别是含有羟基的衍生物；
- 三乙醇胺二聚体和聚合物；以及
- 二聚/三聚/寡聚/聚氨基酸,例如Ala-Ala、Gly-Gly、Ser-Ser、Gly-Gly-Gly或Ser-Gly、寡聚His、聚His、寡聚Lys、聚Lys。

6. 根据权利要求1-2、5中的任一项所述的预制前体微粒文库或根据权利要求3-5中的任一项所述的预制微粒文库，

其中所述多孔聚合物基质、或形成所述多孔聚合物基质或作为其一部分的所述聚合物或聚合物混合物由未交联的聚合物组成，其中优选地形成所述多孔聚合物基质或作为其一部分的所述聚合物或聚合物混合物由琼脂糖或琼脂糖与明胶的组合组成，其中更优选地，在所述琼脂糖与明胶的组合中，所述琼脂糖以0.1% (w/v) 至4% (w/v) 的范围存在，并且所述明胶以0.1% (w/v) 至20% (w/v)、优选地0.5% (w/v) 至20% (w/v) 的范围存在。

7. 根据权利要求3-6中的任一项所述的预制微粒文库，其中所述分析物特异性试剂选自：核酸，包括适体、Spiegelmer；抗体或抗体片段；能够特异性结合分析物或分析物复合体的非抗体蛋白质，例如受体、受体片段和亲和蛋白；其中优选地所述分析物特异性试剂选自核酸，特别是核酸寡聚体和核酸引物。

8. 根据权利要求3-7中的任一项所述的预制微粒文库，其中针对每个所述微粒，所述分析物特异性试剂经由所述试剂结合组分，通过下述机制可逆地附连到所述微粒：b) 所述分析物特异性试剂被偶联到结合实体，所述结合实体进而与所述试剂结合分子(ii)结合，其中

- 所述结合实体独立地选自生物素、脱硫生物素、亚氨基生物素、具有可切割的间隔物臂的生物素、硒生物素、氧代生物素、高生物素、降生物素、亚氨基生物素、二氨基生物素、生物素亚砷、生物素砷、表生物素、5-羟基生物素、2-硫代生物素、氮杂生物素、碳生物素、生物素的甲基化衍生物、酮生物素、衍生自生物素或与生物素相关并保留生物素的结合功能的其他分子；并且所述试剂结合分子独立地选自亲和素和链霉亲和素；反之亦然；或者

- 所述结合实体是生物素，并且所述试剂结合分子选自单体亲和素、在其生物素结合位点中具有硝化的酪氨酸的亲和素和衍生自亲和素或与亲和素相关并保留亲和素的结合功能的其他蛋白质；反之亦然。

9. 根据权利要求3-8中的任一项所述的预制微粒文库，其中所述文库用于对几个样品中的单个感兴趣的分析物进行特异性检测，其中在所述文库中存在至少两个独立的预制微粒子集，优选地三个以上独立的预制微粒子集，

并且每个子集

- 具有附连到所述子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分；并且

所述至少两个或三个以上独立的子集全都具有

- 附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的相同的分析物特异性试剂，所述分析物特

异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的；

使得所述至少两个以上独立的预制微粒子集在附连的分析物特异性试剂方面相同，但区别在于

- 附连到每个子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分；

并且每个子集由所述相应标记物组分明确定义并且是通过所述相应标记物组分可识别的。

10. 根据权利要求3-8中的任一项所述的预制微粒文库，其中所述文库用于对单一样品中的多个感兴趣的分析物进行特异性检测，其中在所述文库中存在至少两个独立的预制微粒子集，优选地三个以上独立的预制微粒子集，

并且每个子集

- 具有附连到所述子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分；并且

- 具有附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的不同的分析物特异性试剂；每种分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的；

使得所述至少两个以上独立的预制微粒子集的区别在于

- 附连到每个子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分；

和

- 附连到每个子集的相应分析物特异性试剂；

并且每个子集由所述相应标记物组分和所述相应分析物特异性试剂明确定义并且是通过所述相应标记物组分和所述相应分析物特异性试剂可识别的。

11. 根据权利要求3-8中的任一项所述的预制微粒文库，其中所述文库用于对几个样品中的多个感兴趣的分析物进行特异性检测，其中在所述文库中存在多个不同的独立的预制微粒子集，

并且每个子集

- 具有附连到所述子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分；并且

其中在所述多个独立的预制微粒子集中存在不同类别的独立的预制微粒子集，其中每个所述类别包含几个微粒子集，每个类别具有附连到所述微粒的多孔基质的不同的分析物特异性试剂，并且一个类别内的所有微粒子集附连有相同的分析物特异性试剂；每种分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的；

使得在所述文库中，所述多个不同的独立的预制微粒子集的区别在于

- 附连到每个子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分；

并且

每个独立的微粒子集形成一类微粒子集的一部分；

并且每个子集由所述相应标记物组分和所述相应分析物特异性试剂明确定义并且是通过所述相应标记物组分和所述相应分析物特异性试剂可识别的；并且

使得所述不同类别的微粒子集的区别在于附连到所述微粒的多孔基质的相应分析物特异性试剂；并且每个所述不同类别包含几个微粒子集，一个类别内的所有子集均附连有相同的分析物特异性试剂。

12. 一种用于制备根据权利要求3-11中的任一项所述的预制微粒文库的试剂盒, 所述试剂盒包含:

- 至少两个容器、即第一容器和第二容器, 和可选的其他容器, 每个容器含有:

• 权利要求1-2、5和6中的任一项所定义的预制前体微粒子集, 并且每个子集具有附连到所述子集内的所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特标记物组分, 使得两个所述预制前体微粒子集的区别在于附连到每个子集、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分;

- 另一个容器, 其含有:

• 调制溶液, 其能够通过下述机制将分析物特异性试剂经由所述试剂结合组分附连、优选可逆地附连到所述前体微粒的所述子集:

a) 所述分析物特异性试剂与形成所述多孔聚合物基质或作为所述多孔聚合物基质的一部分的所述聚合物或聚合物混合物(i)的直接结合;

b) 所述分析物特异性试剂被偶联到结合实体, 所述结合实体进而与所述试剂结合分子(ii)结合;

c) 在所述可电离基团具有适合的净电荷的条件下所述分析物特异性试剂与所述可电离基团(iii)的直接结合;

d) 所述分析物特异性试剂与所述聚合物上的所述带电荷基团(iv)的直接结合, 其中所述分析物特异性试剂具有至少一个可电离基团或多个可电离基团, 所述可电离基团能够根据所述分析物特异性试剂周围的环境条件改变其电荷; 或

e) (a) - (d) 的任何组合;

所述试剂结合组分如权利要求1中所定义, 所述试剂结合分子如权利要求1、4和5中的任一项中所定义, 并且所述结合实体如权利要求4-5中的任一项中所定义, 所述聚合物或聚合物混合物如权利要求1、4-6中的任一项中所定义, 所述可电离基团如权利要求1、4和5中的任一项中所定义, 并且所述分析物特异性试剂如权利要求3-4、7和8中的任一项中所定义。

13. 一种制备根据权利要求3-11中的任一项所述的预制微粒文库的方法, 所述方法包括:

- 以任何顺序提供:

• 如权利要求1-2、5和6中所定义的预制前体微粒文库;

• 如权利要求3-4、7和8中的任一项中所定义的至少一种分析物特异性试剂;

- 将所述预制前体微粒文库或其所选的子集与所述至少一种分析物特异性试剂在允许所述至少一种分析物特异性试剂附连、优选可逆地附连到一些或所有所述预制前体微粒的条件下混合, 由此产生根据权利要求5-13中的任一项所述的预制微粒文库;

- 可选地清洗所述预制微粒, 以从其除去任何未附连的分析物特异性试剂。

14. 一种用于在样品中检测分析物的试剂盒, 所述试剂盒包含:

a)

- 含有通用检测组合物的容器, 所述通用检测组合物包含用于执行分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂, 其中所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应是核酸扩增, 所述通用检测组合物包含缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶

如Taq聚合酶、以及用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料,或

-含有第一检测组合物的容器以及含有第二检测组合物的另一个容器,所述第一检测组合物包含用于执行分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂,所述第二检测组合物包含检测试剂,其中所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应是免疫化学检测反应,所述第一检测组合物包含用于执行免疫化学检测反应的试剂,例如缓冲液和偶联到适合的报告酶并且对与在所述免疫化学检测反应中用作分析物特异性试剂(ASR)的第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白相同的分析物特异的第二抗体或第二抗体片段;并且所述第二检测组合物包含所述报告酶的适合的底物作为检测试剂,所述底物在被所述报告酶反应后变为可检测的,优选地是可光学检测的,更优选地是可通过荧光检测的,或

-含有第一检测组合物的容器以及包含第二检测组合物的另一个容器,所述第一检测组合物包含用于执行分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂,所述第二检测组合物包含检测试剂,其中所述化学检测反应或生物化学反应是免疫化学检测反应,所述第一检测组合物包含用于执行免疫化学检测反应的试剂,例如缓冲液和偶联到适合的寡核苷酸标签并且对与在所述免疫化学检测反应中用作分析物特异性试剂(ASR)的第一抗体相同的分析物特异的第二抗体或第二抗体片段;并且所述第二检测组合物包含作为检测试剂的缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶如Taq聚合酶和用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料,以及适用于扩增所述附连到第二抗体的寡核苷酸标签的引物;

和

b)

-含有可选地补充有乳化剂的非水性相例如油、例如氟代烃油的容器;和

c)

-用于混合组分的混合容器,其中优选地所述试剂盒还包含:

d)

-用于执行检测反应的容器;并且其中更优选地所述试剂盒还包含

e)

-根据权利要求12所述的试剂盒,或

-根据权利要求3-11中的任一项所述的预制微粒文库。

15.一种在水性样品中检测和/或定量感兴趣的分析物的方法,所述方法包括下述步骤:

-以任何顺序提供:

- 已知或怀疑含有感兴趣的分析物的水性样品;

- 通用检测组合物,其包含用于执行所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂;

- 根据权利要求3-11中的任一项所述的预制微粒文库,其中附连到所述微粒的所述分析物特异性试剂被选择成使得其是能够与所述感兴趣的分析物特异性结合或反应的;

-可选地将所述水性样品与所述通用检测组合物混合;

-将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育,从而允许所述微粒文库在所述微粒的空隙体积中吸收水性样品,并且可选地如果所述感兴趣的分析物存在于所述样品中,允许所述微粒文库结合所述感兴趣的分析物;

- 可选地清洗所述微粒；
- 如果所述水性样品以前尚未与所述通用检测组合物混合，则向所述微粒添加所述通用检测组合物；
- 将所述预制微粒文库转移到非水性相中并除去围绕所述各个预制微粒的任何水性相，从而产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间，所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积；
- 可选地通过施加外部触发物来释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂；
- 执行所述感兴趣的分析物的检测反应；
- 检测和/或定量所述感兴趣的分析物。

16. 根据权利要求15所述的方法，其中所述感兴趣的分析物是核酸，并且

-所述分析物特异性试剂是核酸或核酸对，其与所述感兴趣的分析物足够互补，能够在杂交条件下与所述感兴趣的分析物杂交，其中优选地所述分析物特异性试剂是用于扩增所述感兴趣的分析物的适合的引物或引物对；

-所述通用检测组合物包含除引物之外用于执行所述感兴趣的核酸分析物的扩增反应的试剂，其中特别地，所述通用检测组合物包含缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶如Taq聚合酶、以及用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料；

-所述转移步骤是其中将所述预制微粒转移到非水性相中并悬浮，并可选地用所述非水性相反复清洗的步骤，所述步骤更可选地还涉及过滤或机械搅拌以确保形成微粒的单分散悬液，并且在任何微粒外部不残留水性相或基本上不残留水性相；

-所述可选地通过施加外部触发物释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂的步骤是暂时提高温度、改变pH或改变盐浓度的步骤，优选为提高温度，更优选地从环境温度提高到>90℃的温度；

-所述执行检测反应的步骤是如果所述分析物存在于所述水性样品中，则执行所述分析物的扩增反应的步骤；并且

-所述检测和/或定量所述感兴趣的分析物的步骤是检测和/或定量所述扩增的分析物的步骤。

17. 一种在水性样品中检测和/或定量感兴趣的分析物的方法，所述方法包括下述步骤：

- 以任何顺序提供：
 - 已知或怀疑含有感兴趣的分析物的水性样品；
 - 第一检测组合物，其包含执行所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应所必需的试剂；
 - 第二检测组合物，其包含检测试剂；
 - 根据权利要求3-11中的任一项所述的预制微粒文库，其中附连到所述微粒的所述分析物特异性试剂被选择成使得其是能够与所述感兴趣的分析物特异性结合或反应的；
- 可选地，将所述水性样品与所述第一检测组合物混合；
- 将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育，并且如果所述水性样品尚未与所述第一检测组合物混合，也与所述第一检测组合物孵育，从而允许所述微粒文库在所述微粒的空隙体积中吸收水性样品和所述第一检测组合物，并且可选地如果所述感兴趣的分析物结合

存在于所述样品中,从而允许所述微粒文库与所述感兴趣的分析物结合;

- 可选地清洗所述预制微粒文库,以除去任何未吸收或未反应的第一检测组合物;

- 将所述包括吸收的水性样品的预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育,从而允许所述微粒文库吸收所述第二检测组合物;

- 可选地进一步清洗所述预制微粒文库,以除去任何未吸收或未反应的第二检测组合物;

- 将所述预制微粒文库转移到非水性相中并除去各个预制微粒周围的任何水性相,从而产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间,所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积;其中优选地,所述转移到非水性相中的步骤在将所述预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育后立即进行;

- 可选地,通过施加外部触发物来释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂;

- 通过检测和/或定量所述检测试剂来检测和/或定量所述感兴趣的分析物。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述感兴趣的分析物是蛋白质或其他非核酸分子,并且

- 所述分析物特异性试剂是能够特异性结合所述蛋白质分析物或其他非核酸分析物的第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白;

- 所述第一检测组合物包含执行免疫化学检测反应所必需的试剂,例如缓冲液和偶联到适合的报告酶并对所述分析物特异的第二抗体或第二抗体片段;

- 所述第二检测组合物包含所述适合的报告酶的适合底物作为检测试剂,所述底物在被所述报告酶反应后变为可检测的,优选地是可光学检测的,更优选地是可通过荧光检测的;

- 所述将所述水性样品与所述预制微粒文库并与所述第一检测组合物孵育的步骤是如果存在所述分析物,执行涉及所述水性样品中的所述分析物与所述第一抗体、第一抗体片段或非抗体蛋白的结合,从而形成分析物与所述第一抗体、第一抗体片段或非抗体蛋白的复合体的免疫化学反应的步骤;所述免疫化学反应还涉及所述第二抗体与所述复合体的结合,由此形成第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白、分析物和第二抗体之间的夹心体;

- 所述第一个可选的清洗所述文库的步骤是从所述文库除去任何未结合的第二抗体的步骤;

- 所述将包含吸收的水性样品的所述预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育的步骤是允许所述底物被所述报告酶反应的步骤;

- 所述另一个可选的清洗所述文库的步骤是从所述文库除去任何未反应的底物的步骤;

- 所述转移步骤是其中将所述预制微粒转移到非水性相中并悬浮,并可选地用所述非水性相反复清洗的步骤,更可选地还涉及过滤或机械搅拌,以确保形成微粒的单分散悬液,并且在任何微粒外部不残留水性相或基本上不残留水性相;

- 所述可选的通过施加外部触发物释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂的步骤是暂时提高温度、改变pH或改变盐浓度的步骤,优选为提高温度,更优选地从环境温度提高到 $>90^{\circ}\text{C}$ 的温度的步骤;

- 所述检测和/或定量所述感兴趣的分析物的步骤是检测和/或定量所述反应的底物的

步骤。

19. 一种在水性样品中检测和/或定量感兴趣的分析物的方法,所述方法包括下述步骤:

- 以任何顺序提供:
 - 已知或怀疑含有感兴趣的分析物的水性样品;
 - 第一检测组合物,其包含执行所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应所必需的试剂;
 - 第二检测组合物,其包含检测试剂;
 - 根据权利要求3-11中的任一项所述的预制微粒文库,其中附连到所述微粒的所述分析物特异性试剂被选择成使得其是能够与所述感兴趣的分析物特异性结合或反应的;
- 可选地,将所述水性样品与所述第一检测组合物混合;
- 将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育,并且如果所述水性样品尚未与所述第一检测组合物混合,也与所述第一检测组合物孵育,从而允许所述微粒文库在所述微粒的空隙体积中吸收水性样品和所述第一检测组合物,并且可选地如果所述感兴趣的分析物存在于所述样品中,允许所述微粒文库结合所述感兴趣的分析物;
- 可选地清洗所述预制微粒文库,以除去任何未吸收或未反应的第一检测组合物;
- 将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育,从而允许所述微粒文库吸收所述第二检测组合物;
- 可选地进一步清洗所述预制微粒文库,以除去任何未吸收或未反应的第二检测组合物;
- 将所述预制微粒文库转移到非水性相中并除去各个预制微粒周围的任何水性相,从而产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间,所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积;
- 可选地,通过施加外部触发物来释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂;
- 执行所述感兴趣的分析物的检测反应;和
- 检测和/或定量所述感兴趣的分析物。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述感兴趣的分析物是蛋白质或其他非核酸分子,并且

- 所述分析物特异性试剂是能够特异性结合所述蛋白质分析物或其他非核酸分析物的第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白;
- 所述第一检测组合物包含执行免疫化学检测反应所必需的试剂,例如缓冲液和偶联到适合的寡核苷酸标签并对与所述第一抗体相同的分析物特异的第二抗体或第二抗体片段;
- 所述第二检测组合物包含作为检测试剂的缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶如Taq聚合酶、用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料、以及适用于扩增所述附连到第二抗体的寡核苷酸标签的引物;
- 所述将所述水性样品与所述预制微粒文库并与所述第一检测组合物孵育的步骤,是如果存在所述分析物,执行涉及所述水性样品中的所述分析物与所述第一抗体、第一抗体片段或非抗体蛋白的结合,从而形成分析物与所述第一抗体、第一抗体片段或非抗体蛋白

的复合体的免疫化学反应的步骤;所述免疫化学反应还涉及所述第二抗体与所述复合体的结合,从而形成第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白、分析物与第二抗体之间的夹心体;

-所述第一个可选的清洗所述文库的步骤是从所述文库除去任何未结合的第二抗体的步骤;

-所述将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育的步骤,是允许所述第二检测组合物中的所述引物与所述附连到第二抗体的寡核苷酸标签杂交的步骤;

-所述另一个可选的清洗所述文库的步骤是从所述文库除去任何未杂交的引物的步骤;

-所述转移步骤是其中将所述预制微粒转移到非水性相中并悬浮,并可选地用所述非水性相反复清洗的步骤,更可选地还涉及过滤或机械搅拌,以确保形成微粒的单分散悬液,并且在任何微粒外部不残留水性相或基本上不残留水性相;

-所述可选的通过施加外部触发物释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂的步骤是暂时提高温度、改变pH或改变盐浓度的步骤,优选为提高温度,更优选地从环境温度提高到 $>90^{\circ}\text{C}$ 的温度的步骤;

-所述执行检测反应的步骤是执行所述寡核苷酸标签的扩增反应的步骤;并且

-所述检测和/或定量所述感兴趣的分析物的步骤是检测和/或定量所述扩增的寡核苷酸标签的步骤。

21. 根据权利要求15-20中的任一项所述的方法,其中所述通过施加外部触发物释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂的步骤通过升高所述微粒暴露到的温度来进行。

22. 根据权利要求15-21中的任一项所述的方法,其中

-所述方法是在例如来自于不同患者的多个水性样品中检测和/或定量单一分析物的方法,

-在所述方法中,提供了已知或怀疑含有感兴趣的分析物的多个不同的水性样品,例如来自于不同患者的样品,

-在所述方法中提供的预制微粒文库是根据权利要求9所述的文库,其中在此类文库中提供了与提供并且待测试的不同水性样品同样多或至少同样多的独立的微粒子集,其中所有所述独立的子集均具有附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的相同的分析物特异性试剂,所述分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的;

-在所述将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育的步骤中,将每个所述不同的水性样品独立地与所述文库的独立的微粒子集孵育;

-在所述将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与第二检测组合物孵育的步骤中,将所述文库的每个所述独立的微粒子集独立地与所述第二检测组合物孵育;

-所述将所述文库转移到非水性相中的步骤对每个微粒子集独立地进行,即将每个独立的微粒子集独立地转移到非水性相中,并为每个子集独立地除去各个微粒周围的水性相,从而为每个子集独立地产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间,所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积,

其中所述方法在所述将所述文库转移到非水性相中的步骤之后,在随后进行所述感兴趣的分析物的检测反应之前和检测和/或定量所述感兴趣的分析物之前,还包括将所述非

水性相中所有独立的子集的所述多个隔绝的反应空间混合在一起的步骤。

23. 根据权利要求15-21中的任一项所述的方法, 其中

- 所述方法是在单一水性样品中检测和/或定量多种分析物的方法,
- 在所述方法中, 提供了已知或怀疑含有多种感兴趣的分析物的单一水性样品,
- 在所述方法中提供的预制微粒文库是根据权利要求10所述的文库, 其中在此类文库中提供了与待检测的不同的感兴趣的分析物同样多或至少同样多的独立的微粒子集, 并且每个所述独立的子集具有附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的不同的分析物特异性试剂; 每个分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的;

- 在所述将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育的步骤中, 将所述水性样品与所述文库的所有所述独立的微粒子集一起孵育;

- 在所述将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与第二检测组合物孵育的步骤中, 将所述文库的所有所述独立的微粒子集与所述第二检测组合物一起孵育;

- 所述将所述文库转移到非水性相中的步骤对所有微粒子集一起进行, 即将所有微粒子集一起转移到非水性相中并除去各个微粒周围的水性相, 从而产生用于检测和/或定量所述多个分析物的多个隔绝的反应空间, 所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积。

24. 根据权利要求15-21中的任一项所述的方法, 其中

- 所述方法是在多个水性样品中检测和/或定量多种分析物的方法,
- 在所述方法中, 提供了已知或怀疑含有多种感兴趣的分析物的多个不同的水性样品, 例如来自于不同患者的样品,

- 在所述方法中提供的预制微粒文库是根据权利要求11所述的文库, 其中在此类文库中存在不同类别的独立的预制微粒子集, 每个所述类别包含几个微粒子集并且每个所述类别具有附连到所述微粒的多孔基质的不同的分析物特异性试剂, 并且一个类别内的所有微粒子集附连有相同的分析物特异性试剂; 每种分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的; 其中在所述方法中, 在所述提供所述文库的步骤中:

- 提供了与待检测的不同分析物同样多或至少同样多的独立的微粒子集的不同类别,
- 在每个类别中提供了与所提供并待测试的水性样品同样多或至少同样多的不同的微粒子集,

- 在所述文库内提供了与待测试的不同水性样品乘以待检测的不同感兴趣的分析物的数目的乘积同样多或至少同样多的不同的微粒子集,

- 在所述将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育的步骤中, 将正好一个水性样品与来自于每个类别的正好一个微粒子集孵育, 并且将每个水性样品与所述文库中的微粒类别同样多的来自于不同类别的不同微粒子集一起孵育,

- 在所述将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与第二检测组合物孵育的步骤中, 将合并的来自于已与一个相应的水性样品孵育的不同类别的微粒子集与所述第二检测组合物一起孵育,

- 所述将所述文库转移到非水性相中的步骤对每个水性样品独立地进行, 即将合并的之前已与一个相应的水性样品孵育的微粒子集一起转移到非水性相中并除去各个微粒周围的水性相, 从而为每个水性样品独立地产生用于检测所述多种分析物的多个隔绝的反应

空间,所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积,

其中所述方法优选地在所述将所述文库转移到非水性相中的步骤之后,在随后进行所述感兴趣的分析物的检测反应之前和检测和/或定量所述感兴趣的分析物之前,还包括将所述非水性相中所有独立的样品的所述多个隔绝的反应空间混合在一起的步骤。

25. 根据权利要求15-24中的任一项所述的方法,其中在所述检测和定量所述感兴趣的分析物的步骤中,所述分析物的定量通过选自下述方法来进行:

- a) 数字核酸扩增,特别是数字聚合酶链反应 (PCR),
- b) 实时定量核酸扩增,特别是实时聚合酶链反应 (PCR);
- c) 免疫化学检测方法,特别是数字免疫化学检测方法,例如数字免疫测定法如数字酶联免疫吸附测定法 (ELISA);
- d) 与核酸扩增组合的免疫化学检测方法,例如免疫-聚合酶链反应,特别是数字免疫-PCR;

其中如果所述感兴趣的分析物是核酸,则定量使用方法a) 或b) 中的任一者或a) 与b) 的组合来进行;并且其中如果所述分析物是蛋白质、肽或其他非核酸分析物,则定量使用方法c) 或d) 中的任一者来进行。

预制微粒及其前体的文库

背景技术

[0001] 本发明涉及用于对样品中的一种或几种分析物进行特异性检测的预制微粒以及此类微粒的前体,在本文中有时也被称为“前体微粒”。具体地,本发明涉及此类预制微粒的文库和此类前体微粒的文库。此外,本发明涉及用于制备此类文库的试剂盒和使用此类文库在样品中检测感兴趣的分析物的试剂盒。此外,本发明涉及优选地使用此类试剂盒检测和/或定量水性样品中感兴趣的分析物的方法。

[0002] 灵敏地检测样品中的多种分析物是合乎需要的。已开发了用于同时检测溶液中的分析物的各种不同方法。例如,为了灵敏地检测核酸,已使用了利用模板特异性扩增,允许检测样品中的核酸序列的方法。为此目的,更长可以获得并使用已被充分描述的方法,例如聚合酶链反应(PCR)、重组酶聚合酶反应(RPA)、转录介导的扩增(TMA)、环介导的扩增反应(LAMP)等。然而,所使用的试剂的交叉反应性将可实现的多路复用水平限制到在同一测定法中待检测的少量靶。

[0003] 对于蛋白质抗原的灵敏检测,模板依赖性的扩增不可行。然而,已将核酸扩增方法与经典的免疫测定法格式组合。例如在免疫-PCR(Adler,Wacker等,2003)中,使用了固定到固相的结合抗体和附连有核酸序列标记物的检测抗体。在由所述第一抗体、抗原和第二抗体组成的夹心体形成后,利用扩增反应扩增附连到所述第二抗体的核酸序列。在另一种测定法格式中(Todd,Freeze等,2007),在结合到固相的抗体、抗原和提供有荧光团的第二抗体之间形成夹心体。所述荧光团被选择性地且定量地切割,并使用分子流式计数器逐个分子地计数。检测到的荧光团的数目直接对应于结合的分析物的数目。

[0004] 一种被称为SiMOA的方法(Rissin,Kan等,2010) (“单分子阵列”)也是基于单一结合事件的数字分析。首先利用第一抗体将抗原捕获到固体粒子的外侧。将用酶标记的第二抗体结合到所述抗原。将所述固体粒子与含有底物的溶液接触,所述底物被所述酶转变成荧光产物。所述粒子被放置在阵列的小空腔中,使得在空腔中仅含有一个粒子和少量溶液。然后将所述充当反应空间的空腔用非水性溶液覆盖,从而隔离各个空腔。通过对具有可检测信号的各个空腔进行计数并通过对每个空腔中的信号定量,实现了抗原浓度的超灵敏测定。

[0005] 为了便于所使用的微载体的操作改进,已使用了磁性粒子(Tekin和Gijs,2013)。

[0006] (Leng,Zhang等,2010)描述了共价附连有引物核苷酸的水凝胶粒子,将改性的琼脂糖聚合物用于引物结合。然后将所述引物-改性琼脂糖与扩增试剂和含有靶的溶液混合,并使用微流体液滴发生器形成水凝胶微粒。将所述在油中形成的琼脂糖乳液用于扩增/检测。

[0007] 在本领域中,对满足下述要求的样品中的多种分析物的平行检测存在着需求:

[0008] a) 与分析物特异性反应没有交叉干扰,

[0009] b) 对每种分析物具有高灵敏度和特异性,和

[0010] c) 使用极少的设备进行分析物特异性试剂的简单设置和组合。

[0011] 本发明旨在提供并满足这些需求。

发明内容

[0012] 现在参考各种不同的方面和实施方式描述本发明：

[0013] 第一方面，本发明涉及：

[0014] 1. 一种用于制备预制微粒文库的预制前体微粒文库，所述预制微粒被配置用于对样品中的一种或几种感兴趣的分析物进行特异性检测，此类特异性检测是通过适合的化学反应或生物化学反应在此类微粒内发生的，所述文库中的每个所述预制前体微粒包含：

[0015] - 多孔基质，其具有用于容纳水性样品并为分析物的特异性检测提供反应空间的空隙体积；

[0016] - 试剂结合组分，其允许分析物特异性试剂附连、优选可逆地附连到所述前体微粒；所述试剂结合组分是下述物质之一：

[0017] (i) 聚合物或聚合物混合物，其形成所述多孔基质或者是所述多孔基质；

[0018] (ii) 附连到所述多孔基质的试剂结合分子；

[0019] (iii) 固定在所述多孔基质上的至少一个可电离基团或多个可电离基团，所述可电离基团能够根据所述前体微粒周围的环境条件改变其电荷；

[0020] (iv) 固定在所述多孔基质上的至少一个带电荷基团或多个带电荷基团；

[0021] (v) (i) - (iv) 的任何组合；

[0022] - 标记物组分，其附连到所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合，用于在附连到所述前体微粒时识别所述分析物特异性试剂。

[0023] 2. 根据实施方式1所述的文库，其中在所述文库中存在至少两个独立的预制前体微粒子集，优选地三个以上独立的预制前体微粒子集，并且每个子集具有附连到所述子集内的所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分，使得通过附连到每个子集、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分来区分所述至少两个以上独立的预制前体微粒子集。

[0024] 3. 根据实施方式1-2中的任一项所述的文库，其中所述标记物组分是至少两种不同染料、优选为至少两种荧光染料的混合物，其中所述至少两种不同染料、优选地所述至少两种荧光染料以所述至少两种不同染料的相应的确定比率和/或以确定量存在于所述前体微粒的每个子集上，使得所述前体微粒的不同子集彼此之间的区别在于所述至少两种不同染料的相应比率和/或量，从而允许通过附连到前体微粒的相应子集或包含在其中的所述至少两种不同染料的相应的比率和/或量来区分所述前体微粒的不同子集。

[0025] 4. 根据实施方式1-3中的任一项所述的文库，其中所述多孔基质是多孔聚合物基质。

[0026] 5. 另一方面，本发明还涉及一种用于对样品中的一种或几种感兴趣的分析物进行特异性检测的预制微粒文库，此类特异性检测是通过适合的化学反应或生物化学反应在此类微粒内发生的，每个所述预制微粒包含根据实施方式1-4中的任一项所述的预制前体微粒，并且还包含附连、优选可逆地附连到所述前体微粒的分析物特异性试剂。

[0027] 6. 根据实施方式5所述的预制微粒文库，其中附连到每个所述前体微粒的所述分析物特异性试剂经由所述试剂结合组分，通过下述机制附连、优选可逆地附连：

[0028] a) 所述分析物特异性试剂与形成所述多孔聚合物基质或作为所述多孔聚合物基质的一部分的所述聚合物或聚合物混合物(i)的直接结合；

[0029] b) 所述分析物特异性试剂被偶联到结合实体,所述结合实体进而与所述试剂结合分子(ii)结合;其中优选地,所述试剂结合分子和结合实体被选择成使得它们以可逆的方式相互作用,即彼此结合;

[0030] c) 在所述可电离基团具有适合的净电荷的条件下所述分析物特异性试剂与所述可电离基团(iii)的直接结合;

[0031] d) 所述分析物特异性试剂与所述聚合物上的所述带电荷基团(iv)的直接结合,其中所述分析物特异性试剂具有至少一个可电离基团或多个可电离基团,所述可电离基团能够根据所述分析物特异性试剂周围的环境条件改变其电荷;或

[0032] e) (a) - (d) 的任何组合。

[0033] 7. 根据实施方式1-4中的任一项所述的预制前体微粒文库或根据实施方式5-6中的任一项所述的预制微粒文库,其中

[0034] -所述聚合物(i)是水凝胶形成剂,其选自:ia)合成聚合物,例如聚(甲基)丙烯酸甲酯、聚酰胺;ib)基于硅酮的聚合物,例如聚二甲基硅氧烷;ic)天然存在的聚合物,其选自例如琼脂糖、几丁质、壳聚糖、葡聚糖、藻酸盐、卡拉胶、纤维素、岩藻多糖、褐藻淀粉的多糖,选自黄原胶、阿拉伯胶、印度树胶、瓜尔胶、刺槐豆胶、黄蓍胶、刺梧桐胶和菊粉的胶,例如胶原蛋白、明胶的多肽,例如聚赖氨酸的聚氨基酸,以及多核苷酸;并且所述聚合物混合物是任何上述物质的组合;

[0035] -所述试剂结合分子(ii)选自:亲和素、特别是四聚体亲和素,链霉亲和素,单体亲和素,在其生物素结合位点中具有硝化的酪氨酸的亲和素,衍生自亲和素或与亲和素相关并保留亲和素的结合功能的其他蛋白质,生物素,脱硫生物素,亚氨基生物素,具有可切割的间隔物臂的生物素,硒生物素,氧代生物素,高生物素,降生物素,亚氨基生物素,二氨基生物素,生物素亚砷,生物素砷,表生物素,5-羟基生物素,2-硫代生物素,氮杂生物素,碳生物素,生物素的甲基化衍生物,酮生物素,衍生自生物素或与生物素相关并保留生物素的结合功能的其他分子;应该指出,在所述分析物特异性试剂的附连可逆的实施方式中,所述试剂结合分子和结合实体优选被选择成使得它们以可逆的方式相互作用,即彼此结合;

[0036] -所述至少一个可电离基团(iii)或所述实施方式6的d)的可电离基团选自:

[0037] • N-2-乙酰胺基-2-氨基乙磺酸(ACES);

[0038] • N-2-乙酰胺基-2-亚氨基二乙酸(ADA);

[0039] • 氨基甲基丙二醇(AMP);

[0040] • 3-1,1-二甲基-2-羟乙基氨基-2-羟基丙磺酸(AMPSO);

[0041] • N,N-双-2-羟乙基-2-氨基乙磺酸(BES);

[0042] • N,N-双-2-羟乙基甘氨酸(BICINE);

[0043] • 双-2-羟乙基亚氨基三羟甲基甲烷(Bis-Tris);

[0044] • 1,3-双三羟甲基甲基氨基丙烷(Bis-Tris丙烷);

[0045] • 4-环己基氨基-1-丁磺酸(CABS);

[0046] • 3-环己基氨基-1-丙磺酸(CAPS);

[0047] • 3-环己基氨基-2-羟基-1-丙磺酸(CAPSO);

[0048] • 2-N-环己基氨基乙磺酸(CHES);

[0049] • 3-N,N-双-2-羟乙基氨基-2-羟基丙磺酸(DIPSO);

- [0050] • N-2-羟乙基哌嗪-N-3-丙磺酸 (EPPS) ;
- [0051] • N-2-羟乙基哌嗪-N-4-丁磺酸 (HEPBS) ;
- [0052] • N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES) ;
- [0053] • N-2-羟乙基哌嗪-N-2-丙磺酸 (HEPPSO) ;
- [0054] • 2-N-吗啉乙磺酸 (MES) ;
- [0055] • 4-N-吗啉丁磺酸 (MOBS) ;
- [0056] • 3-N-吗啉丙磺酸 (MOPS) ;
- [0057] • 3-N-吗啉-2-羟基丙磺酸 (MOPSO) ;
- [0058] • 哌嗪-N-N-双-2-乙磺酸 (PIPES) ;
- [0059] • 哌嗪-N-N-双-2-羟基丙磺酸 (POPSO) ;
- [0060] • N-三羟甲基-甲基-4-氨基丁磺酸 (TABS) ;
- [0061] • N-三羟甲基-甲基-3-氨基丙磺酸 (TAPS) ;
- [0062] • 3-N-三羟甲基-甲基氨基-2-羟基丙磺酸 (TAPSO) ;
- [0063] • N-三羟甲基-甲基-2-氨基乙磺酸 (TES) ;
- [0064] • N-三羟甲基甲基甘氨酸 (TRICINE) ;
- [0065] • 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) ;
- [0066] • 多羟基胺;
- [0067] • 咪唑及其衍生物 (即咪唑类), 特别是含有羟基的衍生物;
- [0068] • 三乙醇胺二聚体和聚合物; 以及
- [0069] • 二聚/三聚/寡聚/聚氨基酸, 例如Ala-Ala、Gly-Gly、Ser-Ser、Gly-Gly-Gly或Ser-Gly、寡聚His、聚His、寡聚Lys、聚Lys。
- [0070] 8. 根据实施方式1-4、7中的任一项所述的预制前体微粒文库或根据实施方式5-7中的任一项所述的预制微粒文库。
- [0071] 其中所述多孔聚合物基质、或形成所述多孔聚合物基质或作为其一部分的所述聚合物或聚合物混合物由未交联的聚合物或聚合物混合物组成, 其中优选地形成所述多孔聚合物基质或作为其一部分的所述聚合物或聚合物混合物由琼脂糖或琼脂糖与明胶的组合组成, 其中更优选地, 在所述琼脂糖与明胶的组合中, 所述琼脂糖以0.1% (w/v) 至4% (w/v) 的范围存在, 并且所述明胶以0.1% (w/v) 至20% (w/v)、优选地0.5% (w/v) 至20% (w/v) 的范围存在。
- [0072] 9. 根据实施方式5-8中的任一项所述的预制微粒文库, 其中所述分析物特异性试剂选自: 核酸, 包括适体、Spiegelmer; 抗体或抗体片段; 能够特异性结合分析物或分析物复合体的非抗体蛋白质, 例如受体、受体片段和亲和蛋白; 其中优选地所述分析物特异性试剂选自核酸, 特别是核酸寡聚体和核酸引物。
- [0073] 10. 根据实施方式5-9中的任一项所述的预制微粒文库, 其中针对每个所述微粒, 所述分析物特异性试剂经由所述试剂结合组分, 通过下述机制可逆地附连到所述微粒: b) 所述分析物特异性试剂被偶联到结合实体, 所述结合实体进而与所述试剂结合分子(ii) 结合, 其中
- [0074] -所述结合实体独立地选自生物素、脱硫生物素、亚氨基生物素、具有可切割的间隔物臂的生物素、硒生物素、氧代生物素、高生物素、降生物素、亚氨基生物素、二氨基生物

素、生物素亚砷、生物素砷、表生物素、5-羟基生物素、2-硫代生物素、氮杂生物素、碳生物素、生物素的甲基化衍生物、酮生物素、衍生自生物素或与生物素相关并保留生物素的结合功能的其他分子；并且所述试剂结合分子独立地选自亲和素和链霉亲和素；反之亦然；或者

[0075] -所述结合实体是生物素，并且所述试剂结合分子选自单体亲和素、在其生物素结合位点中具有硝化的酪氨酸的亲和素和衍生自亲和素或与亲和素相关并保留亲和素的结合功能的其他蛋白质；反之亦然；应该指出，在这个优选实施方式中，所述试剂结合分子和结合实体被选择为使得它们以可逆的方式相互作用，即彼此结合。

[0076] 11. 根据实施方式5-10中的任一项所述的预制微粒文库，其中所述文库用于对几个样品中的单个感兴趣的分析物进行特异性检测，其中在所述文库中存在至少两个独立的预制微粒子集，优选地三个以上独立的预制微粒子集，

[0077] 并且每个子集

[0078] -具有附连到所述子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分；并且

[0079] 所述至少两个或三个以上独立的子集全都具有

[0080] -附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的相同的分析物特异性试剂，所述分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的；

[0081] 使得所述至少两个以上独立的预制微粒子集在附连的分析物特异性试剂方面相同，但区别在于

[0082] -附连到每个子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分；

[0083] 并且每个子集由所述相应标记物组分明确定义并且是通过所述相应标记物组分可识别的。

[0084] 12. 根据实施方式5-10中的任一项所述的预制微粒文库，其中所述文库用于对单一样品中的多个感兴趣的分析物进行特异性检测，其中在所述文库中存在至少两个独立的预制微粒子集，优选地三个以上独立的预制微粒子集，

[0085] 并且每个子集

[0086] -具有附连到所述子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分；并且

[0087] -具有附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的不同的分析物特异性试剂；每种分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的；

[0088] 使得所述至少两个以上独立的预制微粒子集的区别在于

[0089] -附连到每个子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分；和

[0090] -附连到每个子集的相应分析物特异性试剂；

[0091] 并且每个子集由所述相应标记物组分和所述相应分析物特异性试剂明确定义并且是通过所述相应标记物组分和所述相应分析物特异性试剂可识别的。

[0092] 13. 根据实施方式5-10中的任一项所述的预制微粒文库，其中所述文库用于对几个样品中的多个感兴趣的分析物进行特异性检测，其中在所述文库中存在多个不同的独立的预制微粒子集，

[0093] 并且每个子集

[0094] -具有附连到所述子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分;并且

[0095] 其中在所述多个独立的预制微粒子集中存在不同类别的独立的预制微粒子集,其中每个所述类别包含几个微粒子集,每个类别具有附连到所述微粒的多孔基质的不同的分析物特异性试剂,并且一个类别内的所有微粒子集附连有相同的分析物特异性试剂;每种分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的;

[0096] 使得在所述文库中,所述多个不同的独立的预制微粒子集的区别在于

[0097] -附连到每个子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分;并且

[0098] 每个独立的微粒子集形成一类微粒子集的一部分;

[0099] 并且每个子集由所述相应标记物组分和所述相应分析物特异性试剂明确定义并且是通过所述相应标记物组分和所述相应分析物特异性试剂可识别的;并且

[0100] 使得所述不同类别的微粒子集的区别在于附连到所述微粒的多孔基质的相应分析物特异性试剂;并且每个所述不同类别包含几个微粒子集,一个类别内的子集的所有微粒均附连有相同的分析物特异性试剂。

[0101] 14.一种用于制备根据实施方式5-13中的任一项所述的预制微粒文库的试剂盒,所述试剂盒包含:

[0102] -至少两个容器、即第一容器和第二容器,和可选的其他容器,每个容器含有:

[0103] •实施方式1-4、7和8中的任一项所定义的预制前体微粒子集,并且每个子集具有附连到所述子集内的所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分,使得两个所述预制前体微粒子集的区别在于附连到每个子集、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分;

[0104] -另一个容器,其含有:

[0105] •调制溶液,其能够通过下述机制将分析物特异性试剂经由所述试剂结合组分附连、优选可逆地附连到所述前体微粒的所述子集:

[0106] a)所述分析物特异性试剂与形成所述多孔聚合物基质或作为所述多孔聚合物基质的一部分的所述聚合物或聚合物混合物(i)的直接结合;

[0107] b)所述分析物特异性试剂被偶联到结合实体,所述结合实体进而与所述试剂结合分子(ii)结合;

[0108] c)在所述可电离基团具有适合的净电荷的条件下所述分析物特异性试剂与所述可电离基团(iii)的直接结合;

[0109] d)所述分析物特异性试剂与所述聚合物上的所述带电荷基团(iv)的直接结合,其中所述分析物特异性试剂具有至少一个可电离基团或多个可电离基团,所述可电离基团能够根据所述分析物特异性试剂周围的环境条件改变其电荷;或

[0110] e) (a) - (d)的任何组合;

[0111] 所述试剂结合组分如实施方式1中所定义,所述试剂结合分子如实施方式1、6和7中的任一项中所定义,并且所述结合实体如实施方式6-7中的任一项中所定义,所述聚合物或聚合物混合物如实施方式1、6-8中的任一项中所定义,所述可电离基团如实施方式1、6和

7中的任一项中所定义,并且所述分析物特异性试剂如实施方式5-6、9和10中的任一项中所定义。

[0112] 15.根据实施方式14所述的试剂盒,其还包含:

[0113] -含有清洗缓冲液的另一个容器,所述清洗缓冲液用于从微粒除去游离的、即未附连的分析物特异性试剂,而不除去附连到微粒的分析物特异性试剂。

[0114] 16.根据实施方式14和15中的任一项所述的试剂盒,其还包含:

[0115] -用于将组分混合在一起的至少一个混合容器,优选地几个混合容器,更优选地与各自含有前体微粒子集的容器同样多的混合容器。

[0116] 17.另一方面,本发明还涉及一种制备根据实施方式5-13中的任一项所述的预制微粒文库的方法,所述方法包括:

[0117] -以任何顺序提供:

[0118] • 如实施方式1-4、7和8中所定义的预制前体微粒文库;

[0119] • 如实施方式5-6、9和10中的任一项中所定义的至少一种分析物特异性试剂;

[0120] -将所述预制前体微粒文库或其所选的子集与所述至少一种分析物特异性试剂在允许所述至少一种分析物特异性试剂附连、优选可逆地附连到一些或所有所述预制前体微粒的条件下混合,由此产生根据实施方式5-13中的任一项所述的预制微粒文库;

[0121] -可选地清洗所述预制微粒,以从其除去任何未附连的分析物特异性试剂。

[0122] 18.根据实施方式17所述的方法,其中所述方法使用如实施方式14-16中的任一项所定义的试剂盒来进行,其中所述文库以所述试剂盒的所述至少两个容器的形式提供,每个容器含有

[0123] • 如实施方式1-4、7和8中的任一项所定义的预制前体微粒子集,并且每个子集具有附连到所述子集内的所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分,使得所述至少两个预制前体微粒子集的区别在于附连到每个子集、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分;

[0124] 其中所述允许所述至少一种分析物特异性试剂附连、优选可逆地附连到一些或所有所述预制前体微粒的条件,通过将所述预制前体微粒文库或其所选的子集与所述至少一种分析物特异性试剂在实施方式14中所定义的调制溶液存在下混合来产生,其中优选地,所述调制溶液是缓冲液。

[0125] 19.一种用于在样品中检测分析物的试剂盒,所述试剂盒包含:

[0126] a)

[0127] -含有通用检测组合物的容器,所述通用检测组合物包含用于执行分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂,其中所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应是核酸扩增,所述通用检测组合物包含缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶如Taq聚合酶、以及用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料,或

[0128] -含有第一检测组合物的容器以及含有第二检测组合物的另一个容器,所述第一检测组合物包含用于执行分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂,所述第二检测组合物包含检测试剂,其中所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应是免疫化学检测反应,所述第一检测组合物包含用于执行免疫化学检测反应的试剂,例如缓冲液和偶联到适合的报告酶并且对与在所述免疫化学检测反应中用作分析物特异性试剂(ASR)的第

一抗体、抗体片段或非抗体蛋白相同的分析物特异的第二抗体或第二抗体片段；并且所述第二检测组合物包含所述报告酶的适合的底物作为检测试剂，所述底物在被所述报告酶反应后变为可检测的，优选地是可光学检测的，更优选地是可通过荧光检测的，或

[0129] -含有第一检测组合物的容器以及包含第二检测组合物的另一个容器，所述第一检测组合物包含用于执行分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂，所述第二检测组合物包含检测试剂，其中所述化学检测反应或生物化学反应是免疫化学检测反应，所述第一检测组合物包含用于执行免疫化学检测反应的试剂，例如缓冲液和偶联到适合的寡核苷酸标签并且对与在所述免疫化学检测反应中用作分析物特异性试剂 (ASR) 的第一抗体相同的分析物特异的第二抗体或第二抗体片段；并且所述第二检测组合物包含作为检测试剂的缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶如Taq聚合酶和用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料，以及适用于扩增所述附连到第二抗体的寡核苷酸标签的引物；

[0130] 和

[0131] b)

[0132] -含有可选地补充有乳化剂的非水性相例如油、例如氟代烃油的容器；

[0133] 和

[0134] c)

[0135] -用于混合组分的混合容器。

[0136] 20. 根据实施方式19所述的试剂盒，其还包含：

[0137] d)

[0138] -用于执行检测反应的容器。

[0139] 21. 根据实施方式19-20中的任一项所述的试剂盒，其还包含：

[0140] e)

[0141] -根据实施方式14-16中的任一项所述的试剂盒，或

[0142] -根据实施方式5-13中的任一项所述的预制微粒文库。

[0143] 22. 另一方面，本发明还涉及一种在水性样品中检测和/或定量感兴趣的分析物的方法，所述方法包括下述步骤：

[0144] -以任何顺序提供：

[0145] • 已知或怀疑含有感兴趣的分析物的水性样品；

[0146] • 通用检测组合物，其包含用于执行所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂；

[0147] • 根据实施方式5-13中的任一项所述的预制微粒文库，其中附连到所述微粒的所述分析物特异性试剂被选择成使得其是能够与所述感兴趣的分析物特异性结合或反应的；

[0148] -可选地将所述水性样品与所述通用检测组合物混合；

[0149] -将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育，从而允许所述微粒文库在所述微粒的空隙体积中吸收水性样品，并且可选地如果所述感兴趣的分析物存在于所述样品中，允许所述微粒文库结合所述感兴趣的分析物；

[0150] -可选地清洗所述微粒；

[0151] -如果所述水性样品以前尚未与所述通用检测组合物混合，则向所述微粒添加所

述通用检测组合物；

[0152] -将所述预制微粒文库转移到非水性相中并除去围绕所述各个预制微粒的任何水性相，从而产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间，所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积；

[0153] -可选地通过施加外部触发物来释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂；

[0154] -执行所述感兴趣的分析物的检测反应；

[0155] -检测和/或定量所述感兴趣的分析物。

[0156] 23. 根据实施方式22所述的方法，其中所述感兴趣的分析物是核酸，并且

[0157] -所述分析物特异性试剂是核酸或核酸对，其与所述感兴趣的分析物足够互补，能够在杂交条件下与所述感兴趣的分析物杂交，其中优选地所述分析物特异性试剂是用于扩增所述感兴趣的分析物的适合的引物或引物对；

[0158] -所述通用检测组合物包含除引物之外用于执行所述感兴趣的核酸分析物的扩增反应的试剂，其中特别地，所述通用检测组合物包含缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶如Taq聚合酶以及用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料；

[0159] -所述转移步骤是其中将所述预制微粒转移到非水性相中并悬浮，并可选地用所述非水性相反复清洗的步骤，所述步骤更可选地还涉及过滤或机械搅拌以确保形成微粒的单分散悬液，并且在任何微粒外部不残留水性相或基本上不残留水性相；

[0160] -所述可选地通过施加外部触发物释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂的步骤是暂时提高温度、改变pH或改变盐浓度的步骤，优选为提高温度，更优选地从环境温度提高到>90℃的温度；

[0161] -所述执行检测反应的步骤是如果所述分析物存在于所述水性样品中，则执行所述分析物的扩增反应的步骤；并且

[0162] -所述检测和/或定量所述感兴趣的分析物的步骤是检测和/或定量所述扩增的分析物的步骤。

[0163] 24. 另一方面，本发明还涉及一种在水性样品中检测和/或定量感兴趣的分析物的方法，所述方法包括下述步骤：

[0164] -以任何顺序提供：

[0165] • 已知或怀疑含有感兴趣的分析物的水性样品；

[0166] • 第一检测组合物，其包含执行所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应所必需的试剂；

[0167] • 第二检测组合物，其包含检测试剂；

[0168] • 根据实施方式5-13中的任一项所述的预制微粒文库，其中附连到所述微粒的所述分析物特异性试剂被选择成使得其是能够与所述感兴趣的分析物特异性结合或反应的；

[0169] -可选地，将所述水性样品与所述第一检测组合物混合；

[0170] -将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育，并且如果所述水性样品尚未与所述第一检测组合物混合，也与所述第一检测组合物孵育，从而允许所述微粒文库在所述微粒的空隙体积中吸收水性样品和所述第一检测组合物，并且可选地如果所述感兴趣的分析物结合存在于所述样品中，从而允许所述微粒文库与所述感兴趣的分析物结合；

[0171] -可选地清洗所述预制微粒文库，以除去任何未吸收或未反应的第一检测组合物；

[0172] -将所述包括吸收的水性样品的预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育,从而允许所述微粒文库吸收所述第二检测组合物;

[0173] -可选地进一步清洗所述预制微粒文库,以除去任何未吸收或未反应的第二检测组合物;

[0174] -将所述预制微粒文库转移到非水性相中并除去各个预制微粒周围的任何水性相,从而产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间,所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积;其中优选地,所述转移到非水性相中的步骤在将所述预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育后立即进行;

[0175] -可选地,通过施加外部触发物来释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂;

[0176] -通过检测和/或定量所述检测试剂来检测和/或定量所述感兴趣的分析物。

[0177] 25. 根据实施方式24所述的方法,其中所述感兴趣的分析物是蛋白质或其他非核酸分子,并且

[0178] -所述分析物特异性试剂是能够特异性结合所述蛋白质分析物或其他非核酸分析物的第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白;

[0179] -所述第一检测组合物包含执行免疫化学检测反应所必需的试剂,例如缓冲液和偶联到适合的报告酶并对所述分析物特异的第二抗体或第二抗体片段;

[0180] -所述第二检测组合物包含所述适合的报告酶的适合底物作为检测试剂,所述底物在被所述报告酶反应后变为可检测的,优选地是可光学检测的,更优选地是可通过荧光检测的;

[0181] -所述将所述水性样品与所述预制微粒文库并与所述第一检测组合物孵育的步骤是如果存在所述分析物,执行涉及所述水性样品中的所述分析物与所述第一抗体、第一抗体片段或非抗体蛋白的结合,从而形成分析物与所述第一抗体、第一抗体片段或非抗体蛋白的复合体的免疫化学反应的步骤;所述免疫化学反应还涉及所述第二抗体与所述复合体的结合,由此形成第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白、分析物和第二抗体之间的夹心体;

[0182] -所述第一个可选的清洗所述文库的步骤是从所述文库除去任何未结合的第二抗体的步骤;

[0183] -所述将包含吸收的水性样品的所述预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育的步骤是允许所述底物被所述报告酶反应的步骤;

[0184] -所述另一个可选的清洗所述文库的步骤是从所述文库除去任何未反应的底物的步骤;

[0185] -所述转移步骤是其中将所述预制微粒转移到非水性相中并悬浮,并可选地用所述非水性相反复清洗的步骤,更可选地还涉及过滤或机械搅拌,以确保形成微粒的单分散悬液,并且在任何微粒外部不残留水性相或基本上不残留水性相;

[0186] -所述可选的通过施加外部触发物释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂的步骤是暂时提高温度、改变pH或改变盐浓度的步骤,优选为提高温度,更优选地从环境温度提高到 $>90^{\circ}\text{C}$ 的温度的步骤;

[0187] -所述检测和/或定量所述感兴趣的分析物的步骤是检测和/或定量所述反应的底物的步骤。

[0188] 26. 另一方面,本发明还涉及一种在水性样品中检测和/或定量感兴趣的分析物的

方法,所述方法包括下述步骤:

[0189] -以任何顺序提供:

[0190] • 已知或怀疑含有感兴趣的分析物的水性样品;

[0191] • 第一检测组合物,其包含执行所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应所必需的试剂;

[0192] • 第二检测组合物,其包含检测试剂;

[0193] • 根据实施方式5-13中的任一项所述的预制微粒文库,其中附连到所述微粒的所述分析物特异性试剂被选择成使得其是能够与所述感兴趣的分析物特异性结合或反应的;

[0194] -可选地,将所述水性样品与所述第一检测组合物混合;

[0195] -将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育,并且如果所述水性样品尚未与所述第一检测组合物混合,则也与所述第一检测组合物孵育,从而允许所述微粒文库在所述微粒的空隙体积中吸收水性样品和所述第一检测组合物,并且可选地如果所述感兴趣的分析物存在于所述样品中,允许所述微粒文库结合所述感兴趣的分析物;

[0196] -可选地清洗所述预制微粒文库,以除去任何未吸收或未反应的第一检测组合物;

[0197] -将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育,从而允许所述微粒文库吸收所述第二检测组合物;

[0198] -可选地进一步清洗所述预制微粒文库,以除去任何未吸收或未反应的第二检测组合物;

[0199] -将所述预制微粒文库转移到非水性相中并除去各个预制微粒周围的任何水性相,从而产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间,所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积;

[0200] -可选地,通过施加外部触发物来释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂;

[0201] -执行所述感兴趣的分析物的检测反应;和

[0202] -检测和/或定量所述感兴趣的分析物。

[0203] 27. 根据实施方式26所述的方法,其中所述感兴趣的分析物是蛋白质或其他非核酸分子,并且

[0204] -所述分析物特异性试剂是能够特异性结合所述蛋白质分析物或其他非核酸分析物的第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白;

[0205] -所述第一检测组合物包含执行免疫化学检测反应所必需的试剂,例如缓冲液和偶联到适合的寡核苷酸标签并对与所述第一抗体相同的分析物特异的第二抗体或第二抗体片段;

[0206] -所述第二检测组合物包含作为检测试剂的缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶如Taq聚合酶、用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料、以及适用于扩增所述附连到第二抗体的寡核苷酸标签的引物;

[0207] -所述将所述水性样品与所述预制微粒文库并与所述第一检测组合物孵育的步骤,是如果存在所述分析物,执行涉及所述水性样品中的所述分析物与所述第一抗体、第一抗体片段或非抗体蛋白的结合,从而形成分析物与所述第一抗体、第一抗体片段或非抗体蛋白的复合体的免疫化学反应的步骤;所述免疫化学反应还涉及所述第二抗体与所述复合体的结合,从而形成第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白、分析物与第二抗体之间的夹心体;

[0208] -所述第一个可选的清洗所述文库的步骤是从所述文库除去任何未结合的第二抗体的步骤；

[0209] -所述将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育的步骤，是允许所述第二检测组合物中的所述引物与所述附连到第二抗体的寡核苷酸标签杂交的步骤；

[0210] -所述另一个可选的清洗所述文库的步骤是从所述文库除去任何未杂交的引物的步骤；

[0211] -所述转移步骤是其中将所述预制微粒转移到非水性相中并悬浮，并可选地用所述非水性相反复清洗的步骤，更可选地还涉及过滤或机械搅拌，以确保形成微粒的单分散悬液，并且在任何微粒外部不残留水性相或基本上不残留水性相；

[0212] -所述可选的通过施加外部触发物释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂的步骤是暂时提高温度、改变pH或改变盐浓度的步骤，优选为提高温度，更优选地从环境温度提高到>90℃的温度的步骤；

[0213] -所述执行检测反应的步骤是执行所述寡核苷酸标签的扩增反应的步骤；并且

[0214] -所述检测和/或定量所述感兴趣的分析物的步骤是检测和/或定量所述扩增的寡核苷酸标签的步骤。

[0215] 28. 根据实施方式22-27中的任一项所述的方法，其中所述通过施加外部触发物释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂的步骤通过升高所述微粒暴露到的温度来进行。

[0216] 29. 根据实施方式22-28中的任一项所述的方法，其中

[0217] -所述方法是在例如来自于不同患者的多个水性样品中检测和/或定量单一分析物的方法，

[0218] -在所述方法中，提供了已知或怀疑含有感兴趣的分析物的多个不同的水性样品，例如来自于不同患者的样品，

[0219] -在所述方法中提供的预制微粒文库是根据实施方式11所述的文库，其中在此类文库中提供了与提供并且待测试的不同水性样品同样多或至少同样多的独立的微粒子集，其中所有所述独立的子集均具有附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的相同的分析物特异性试剂，所述分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的；

[0220] -在所述将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育的步骤中，将每个所述不同的水性样品独立地与所述文库的独立的微粒子集孵育；

[0221] -在所述将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与第二检测组合物孵育的步骤中，将所述文库的每个所述独立的微粒子集独立地与所述第二检测组合物孵育；

[0222] -所述将所述文库转移到非水性相中的步骤对每个微粒子集独立地进行，即将每个独立的微粒子集独立地转移到非水性相中，并为每个子集独立地除去各个微粒周围的水性相，从而为每个子集独立地产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间，所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积，

[0223] 其中所述方法在所述将所述文库转移到非水性相中的步骤之后，在随后进行所述感兴趣的分析物的检测反应之前和检测和/或定量所述感兴趣的分析物之前，还包括将所述非水性相中所有独立的子集的所述多个隔绝的反应空间混合在一起的步骤。

[0224] 30. 根据实施方式22-28中的任一项所述的方法，其中

- [0225] -所述方法是在单一水性样品中检测和/或定量多种分析物的方法，
- [0226] -在所述方法中，提供了已知或怀疑含有多种感兴趣的分析物的单一水性样品，
- [0227] -在所述方法中提供的预制微粒文库是根据实施方式12所述的文库，其中在此类文库中提供了与待检测的不同的感兴趣的分析物同样多或至少同样多的独立的微粒子集，并且每个所述独立的子集具有附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的不同的分析物特异性试剂；每个分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的；
- [0228] -在所述将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育的步骤中，将所述水性样品与所述文库的所有所述独立的微粒子集一起孵育；
- [0229] -在所述将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与第二检测组合物孵育的步骤中，将所述文库的所有所述独立的微粒子集与所述第二检测组合物一起孵育；
- [0230] -所述将所述文库转移到非水性相中的步骤对所有微粒子集一起进行，即将所有微粒子集一起转移到非水性相中并除去各个微粒周围的水性相，从而产生用于检测和/或定量所述多个分析物的多个隔绝的反应空间，所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积。
- [0231] 31. 根据实施方式22-28中的任一项所述的方法，其中
- [0232] -所述方法是在多个水性样品中检测和/或定量多种分析物的方法，
- [0233] -在所述方法中，提供了已知或怀疑含有多种感兴趣的分析物的多个不同的水性样品，例如来自于不同患者的样品，
- [0234] -在所述方法中提供的预制微粒文库是根据实施方式13所述的文库，其中在此类文库中存在不同类别的独立的预制微粒子集，每个所述类别包含几个微粒子集并且每个所述类别具有附连到所述微粒的多孔基质的不同的分析物特异性试剂，并且一个类别内的所有微粒子集附连有相同的分析物特异性试剂；每种分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的；其中在所述方法中，在所述提供所述文库的步骤中：
- [0235] • 提供了与待检测的不同分析物同样多或至少同样多的独立的微粒子集的不同类别，
- [0236] • 在每个类别中提供了与所提供并待测试的水性样品同样多或至少同样多的不同的微粒子集，
- [0237] • 在所述文库内提供了与待测试的不同水性样品乘以待检测的不同感兴趣的分析物的数目的乘积同样多或至少同样多的不同的微粒子集，
- [0238] -在所述将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育的步骤中，将正好一个水性样品与来自于每个类别的正好一个微粒子集孵育，并且将每个水性样品与所述文库中的微粒类别同样多的来自于不同类别的不同微粒子集一起孵育，
- [0239] -在所述将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与第二检测组合物孵育的步骤中，将合并的来自于已与一个相应的水性样品孵育的不同类别的微粒子集与所述第二检测组合物一起孵育，
- [0240] -所述将所述文库转移到非水性相中的步骤对每个水性样品独立地进行，即将合并的之前已与一个相应的水性样品孵育的微粒子集一起转移到非水性相中并除去各个微粒周围的水性相，从而为每个水性样品独立地产生用于检测所述多种分析物的多个隔绝的反应空间，所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积，

[0241] 其中所述方法优选地在所述将所述文库转移到非水性相中的步骤之后,在随后进行所述感兴趣的分析物的检测反应之前和检测和/或定量所述感兴趣的分析物之前,还包括将所述非水性相中所有独立的样品的所述多个隔绝的反应空间混合在一起的步骤。

[0242] 32. 根据实施方式22-31中的任一项所述的方法,其中在所述检测和定量所述感兴趣的分析物的步骤中,所述分析物的定量通过选自下述的方法来进行:

[0243] a) 数字核酸扩增,特别是数字聚合酶链反应(PCR),

[0244] b) 实时定量核酸扩增,特别是实时聚合酶链反应(PCR);

[0245] c) 免疫化学检测方法,特别是数字免疫化学检测方法,例如数字免疫测定法如数字酶联免疫吸附测定法(ELISA);

[0246] d) 与核酸扩增组合的免疫化学检测方法,例如免疫-聚合酶链反应,特别是数字免疫-PCR;

[0247] 其中如果所述感兴趣的分析物是核酸,则定量使用方法a)或b)中的任一者或a)与b)的组合来进行;并且其中如果所述分析物是蛋白质、肽或其他非核酸分析物,则定量使用方法c)或d)中的任一者来进行。

[0248] 发明详述

[0249] 本发明人设计了一种预制前体微粒文库,其充当用于制备即用型和/或“预装型”预制微粒文库的起点。此类预制微粒文库旨在并被配置用于根据用户的需求,对样品中的一种或几种、优选地对重感兴趣的分析物进行特异性检测。此类预制微粒文库极为通用,并且可以由选择样品中待检测的具体分析物的终端用户以可定制的方式制备。当在本文中使用时,充当制备“预制微粒文库”的起点的“预制前体微粒文库”与此类“预制微粒文库”的区别仅在于相应的预制前体微粒尚未包含附连的分析物特异性试剂(在本文中有时也被缩写为“ASR”)或几种此类分析物特异性试剂。然而,通过将分析物特异性试剂附连到此类前体微粒,可以容易地将此类前体微粒转变成即用型微粒。由于所述前体微粒与相应的微粒的区别仅在于附连的分析物特异性试剂,因此相应的预制微粒的质量和细节与为它们所源自的相应的前体微粒所描述的相同。因此,在所述预制前体微粒文库中,文库中的每个所述预制前体微粒包含多孔基质,优选为多孔聚合物基质,该多孔基质具有用于容纳水性样品和为分析物的特异性检测提供反应空间的空隙体积。这同样也适用于得到的相应微粒。使用此类微粒进行的分析物的特异性检测,在上述由所述微粒的多孔基质提供的反应空间内通过化学反应或生物化学反应来进行。通常,此类化学反应或生物化学反应是靶(分析物)扩增反应或信号放大反应。靶扩增反应的典型实例是核酸扩增反应例如PCR。信号放大反应的典型实例是免疫化学反应例如免疫测定。

[0250] 此外,文库中的每个所述预制前体微粒(和文库中的每个所述预制微粒)包含试剂结合组分,其允许分析物特异性试剂附连、优选可逆地附连到所述前体微粒。优选的实施方式是其中所述分析物特异性试剂被可逆地附连到所述前体微粒的实施方式。正如上文概述的,此类试剂结合组分是下述物质之一:

[0251] (i) 聚合物或聚合物混合物,其形成所述多孔基质或者是所述

[0252] 多孔基质;

[0253] (ii) 附连到所述多孔基质的试剂结合分子;

[0254] (iii) 固定在所述多孔聚合物基质上的至少一个可电离基团或多个可电离基团,

所述可电离基团能够根据所述前体微粒周围的环境条

[0255] 件改变其电荷;

[0256] (iv) 固定在所述多孔基质上的至少一个带电荷基团或多个带电

[0257] 荷基团;

[0258] (v) (i) - (iv) 的任何组合。

[0259] 此外,文库中的每个所述预制前体微粒包含标记物组分,其附连到所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合,并且这也适用于从此类阈值前体微粒得到的相应的预制微粒。所述附连到前体微粒或微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的标记物组分用于识别(在“独特地标记”或“独特地标志”的意义上)附连到所述前体微粒时的分析物特异性试剂。此类标记物的实例在(Mandecki, Ardelit等,2006;Wilson, Cossins等,2006; Birtwell和Morgan,2009)等中给出。所述附连到前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的标记物组分当涉及整个预制前体微粒文库(或整个预制微粒文库)考虑时是特别相关的:当在本文中使用时,术语“文库”意指多个微粒或微粒的集合,其中在此类多个微粒或微粒的集合或文库中存在着至少两种不同类型的此类微粒,在本文中有时被称为“子集”。在优选实施方式中,存在至少两个预制前体微粒(或微粒)的子集,优选地三个以上预制前体微粒(或微粒)的子集,并且每个子集具有附连到所述子集内的所述前体微粒(或微粒)、包含在其中或以其他方式与其结合的独特标记物组分,使得所述至少两个以上预制前体微粒(或微粒)的子集的区别在于附连到每个子集、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分。在此类不同子集的文库中,相应的子集通常并且优选彼此独立地储存,例如在不同容器中。这意味着当在本文中使用时,这个术语“独立的子集”意指在物理上与其他子集分开的前体微粒或微粒的集合或子集。这种物理分隔可以通过围绕此类子集的屏障来实现。在简单的实施方式中,此类独立的子集可以位于其自身的容器或区室中。通常,可以将多个子集合并以形成靶向不同分析物/靶的文库(其中不同子集靶向不同的分析物),所述文库随后可用于执行测定,产生样品中待检测/定量的分析物/靶横跨代表所述文库内的多个子集的微粒的分布。

[0260] 在优选实施方式中,所述识别前体微粒(和从其得到的微粒)的每个子集的标记物组分是至少两种不同染料、优选为至少两种荧光染料的混合物,所述染料以所述至少两种不同染料的相应的确定比率和/或确定量存在于、优选地附连到所述前体微粒(和从其得到的微粒)的每个子集上。因此,在这种实施方式中,前体微粒的不同子集彼此的区别在于所述至少两种不同染料的相应比率和/或量,从而允许通过附连到前体微粒的相应子集的至少两种不同染料的相应比率和/或量来区分所述前体微粒的不同子集。

[0261] 在另一个实施方式中,所述标记物组分可以包含在所述前体微粒内。同样地,此类标记物组分可以是包含在所述前体微粒内的至少两种不同染料的混合物,并且相应的前体微粒的不同子集彼此的区别在于所述至少两种不同染料的相应比率和/或量,使得前体微粒的不同子集彼此的区别在于包含在所述微粒内的至少两种不同染料的相应比率和/或量,从而允许通过包含在前体微粒的相应子集内的所述至少两种不同染料的相应比率和/或量来区分前体微粒的不同子集。

[0262] 子集特异性标记(或编码)可以如以前所确立的来实现(Fulton, McDade等,1997)。

[0263] 在其他实施方式中,所述相应的前体微粒(和相应的微粒)的标记也可以通过相应

微粒的不同形状来实现。这将是其中所述标记物组分未附连到前体微粒或包含在前体微粒内,而是“以其他方式”与前体微粒“结合”的前体微粒(和相应的微粒)的实施方式的实例。这种实施方式预设了至少两种不同标记物组分的同时存在,即在这种情况下,用于标记前体微粒的相应前体微粒的形状可以被区分。在这个实例中,不同的形状可以意味着不同的外部形状、不同的内部结构、多孔基质内的不同内部容积等。

[0264] 优选地,所述前体微粒(和所述微粒)的多孔基质是多孔聚合物基质,暗示了所述相应的前体微粒(和从其得到的所述微粒)由聚合物或聚合物混合物制成或包含它们。

[0265] 正如上文概述的,通过经由试剂结合组分将分析物特异性试剂附连、优选地通过将此类试剂可逆地附连到所述前体微粒,可以将所述预制前体微粒文库转变成预制微粒文库。不同的微粒子集可能附连有相同的分析物特异性试剂,或者它们可能附连有不同的分析物特异性试剂。

[0266] 当在本文中使用时,术语“分析物特异性试剂”(“ASR”)意指能够特异性靶向或识别感兴趣的分析物的试剂。此类特异性靶向或此类特异性识别本身体现在此类分析物特异性试剂与此类感兴趣的分析物特异性结合或与其特异性反应的能力上。在一个实施方式中,分析物特异性试剂选自:核酸,包括适体、spiegelmer、核酸寡聚体和核酸引物;抗体或抗体片段;能够特异性结合分析物或分析物复合体的非抗体蛋白,和亲和蛋白。在优选实施方式中,分析物特异性试剂选自核酸,特别是核酸寡聚体和核酸引物。核酸引物特别适合于执行核酸扩增。在一个实施方式中,当所述分析物特异性试剂是核酸引物时,此类分析物特异性试剂事实上是一对引物,其在感兴趣的分析物内随后将被扩增(和检测)的区域两侧。可选地,在此类(一对引物作为分析物特异性试剂的)实施方式中,此类分析物特异性试剂可能另外包含与所述引物一起提供,并允许检测所述相应的引物和得到的扩增产物的可检测探针。

[0267] 当在本文中使用时,术语“感兴趣的分析物”意指可能希望在样品中检测和/或定量的任何分子实体。有时,该术语“分析物”在本文中与术语“靶”同义。在一个实施方式中,感兴趣的分析物可以是核酸;在另一个实施方式中,感兴趣的分析物可以是蛋白质、肽或其他非核酸实体。

[0268] 根据本发明的文库和相应的微粒或前体微粒可以被干燥,例如冷冻干燥。根据本发明的实施方式,可以使用凝胶形成剂来形成预制前体微粒(和从其得到的微粒),并且此类凝胶形成剂如上文进一步定义。在一个实施方式中,此类凝胶形成剂用于形成前体微粒(和从其得到的微粒),其随后可以被干燥,优选地冷冻干燥。在干燥后,所述粒子可以作为粉末储存。在涉及凝胶形成剂的某些实施方式中,此类凝胶形成剂形成凝胶,所述凝胶还能够经历向溶胶状态的转变。具体地,此类转变可以在施用外部触发物例如温度、pH或盐条件的改变后发生。

[0269] 本发明人令人吃惊地发现,通过提供根据本发明的预制微粒或其前体的整个文库,有可能提供小型化且通用的工具,其可用于即时护理环境,并充当可以以非常通用的方式用于检测反应的限定的反应空间,例如用于执行样品中的分析物的数字检测。由于所述微粒充当或提供受限的反应空间,因此它们在本文中有时也被称为“纳米反应器”。根据本发明的实施方式,预制微粒(或“纳米反应器”)可以通过选择待附连的分析物特异性试剂来定制。这种定制生产特别有利于其中所述分析物特异性试剂的附连是可逆的优选实施方

式。对于文库中的不同微粒子集,可能附连有相同或不同的分析物特异性试剂。

[0270] 当在本文中使用时,术语“相同的分析物特异性试剂”和“不同的分析物特异性试剂”意指下述事实,即当两个分析物特异性试剂相同时,意味着它们靶向和/或识别同一种感兴趣的分析物,而如果它们不同,则它们靶向和/或识别不同的感兴趣的分析物。因此,在其中不同的微粒子集彼此之间的区别在于所附连或含有的相应的分析物特异性试剂的预制微粒文库中,这意味着这些不同子集将靶向和/或识别不同的感兴趣的分析物。另一方面,如果不同子集附连有或含有相同的分析物特异性试剂,这意味着它们识别和/或靶向同一种感兴趣的分析物。

[0271] 当在本文中使用时,术语“微粒”意指平均维度在微米范围内的粒子。

[0272] 在一个实施方式中,根据本发明的微粒具有约 $1\mu\text{m}$ - $200\mu\text{m}$ 、优选地 $5\mu\text{m}$ - $150\mu\text{m}$ 、更优选地 $10\mu\text{m}$ - $100\mu\text{m}$ 的平均尺寸或平均维度或平均直径。在一个实施方式中,根据本发明的微粒是球形或卵形或椭圆形的,优选为球形的,并且上述维度是指这种球形、卵形或椭圆形微粒的平均直径。在一个实施方式中,所述微粒具有(球形)液滴的形状。在另一个实施方式中,根据本发明的微粒是球形体或准球形体,即具有球体(或接近于球体)的形状,这种球体具有上述维度的平均直径。通常,根据本发明的微粒是多孔的并具有多孔聚合物基质,所述基质具有用于容纳水性样品并为分析物的特异性检测提供反应空间的空隙体积。

[0273] 当在本文中使用时,前体微粒通过向其附连分析物特异性试剂转变成微粒。因此,预制前体微粒文库用于制备预制微粒文库的目的。相应的得到的微粒用于执行样品中一种或几种感兴趣的分析物的特异性检测和/或定量的目的,这取决于有多少种不同的分析物特异性试剂被附连到所述微粒(例如由用户定义)。如果仅附连有一种分析物特异性试剂(或仅仅一个分析物特异性“试剂集”,其包含检测单一分析物所必需的多种组分,例如用于靶核酸的扩增引物和可选的检测探针),则此类文库只能用于检测单一感兴趣的分析物,尽管仍在可以凭借附连的相应标记物组分区分的多个样品中;如果不同的分析物特异性试剂被附连到此类预制微粒文库中的不同微粒,则此类文库可用于检测一种或几种样品中的不同感兴趣的分析物。

[0274] 在优选实施方式中,所述分析物特异性试剂被可逆地附连到相应的前体微粒。当在本文中在一个实体被“可逆地附连”到另一个实体的上下文中使用时,“可逆”或“可逆地附连”优选地意指所述实体之间的附连在适合条件下可以被“撤销”,但在适合条件下也允许所述实体变得再次彼此附连的附连类型。这种可逆附连的释放通常可以以下述方式发生和实现,即保持所述实体本身、特别是它们的结构和结合能力不变,并允许所述两个实体彼此之间的附连(即结合)和释放的重复循环。这种可逆附连的典型实例是核酸的两条互补链在适合条件例如杂交条件下的杂交,如果得到的双链被暴露于一组不同的条件例如升高的温度,导致所述双链再次解链成单链,则所述杂交可以被逆转。在冷却后,所述两条链可能再次重新退火,由此证实了所涉及的附连的可逆本质。在上述意义上不是“可逆的”附连的实例是野生型生物素与野生型链霉亲和素之间的结合,这是已知最强的非共价结合事件之一,并且不能被逆转,除非一个或两个实体在结构上被改变或可能甚至被破坏,例如通过变性。

[0275] 根据本发明的实施方式,所述分析物特异性试剂与相应的前体微粒的附连的可逆本质有利于根据用户的需求定制微粒,并且也能改编相应的微粒文库以适应于各种不同的

方法。因此取决于相应的护理点环境及其需求,可以容易地制造个性化和/或定制文库。此外,所述分析物特异性试剂的可逆附连使得可以在需要的情况下拆下此类分析物特异性试剂,例如当此类分析物特异性试剂应该可用于(且可自由扩散到)后续反应时,例如在需要(可自由扩散的)分析物特异性试剂的自由可及性的方法流程中。优选地,这种可逆附连利用具有试剂结合组分的前体微粒来进行,所述试剂结合组分允许分析物特异性试剂可逆地附连到所述前体微粒。在优选实施方式中,这种试剂结合组分是附连到所述前体微粒的多孔聚合物基质的试剂结合分子。这种试剂结合分子被设计成或旨在与结合实体结合,所述结合实体进一步被偶联到所述分析物特异性试剂。因此,在这个优选实施方式中,在一方面是附连到所述前体微粒的多孔聚合物基质的试剂结合分子与另一方面是所述分析物特异性试剂偶联到的结合实体之间,存在着相互作用。在这个优选实施方式中,所述试剂结合分子和结合实体被选择成使得它们以可逆的方式相互作用,即彼此结合。作为实例,所述附连到多孔聚合物基质的试剂结合分子可以是链霉亲和素或其衍生物,并且所述分析物特异性试剂偶联到的结合实体可以是生物素或生物素衍生物例如脱硫生物素,反之亦然(即试剂结合分子是生物素或生物素衍生物例如脱硫生物素,并且所述结合实体是链霉亲和素或其衍生物),只要所述两个实体之间的相互作用是可逆的并且结合可以被再次逆转即可。如果例如所述分析物特异性试剂是核酸引物(或一对核酸引物和可选的检测探针),则这些引物可以例如被容易地偶联到脱硫生物素或甚至以这种脱硫生物素化的形式商业提供。另一方面,所述多孔聚合物基质可能附连有试剂结合分子,其可以是链霉亲和素。对于终端用户,在环境条件下选择一对特异性针对感兴趣的分析物的脱硫生物素-引物,并将其可逆地附连到在多孔聚合物基质上附连有链霉亲和素的前体微粒,是极为简单且容易的。在环境条件下生物素衍生物与链霉亲和素之间的结合事件,可以通过简单地在适合条件下将所述前体微粒暴露于这种生物素衍生物标记的引物的溶液,容易地实现。可以使用产生促进结合的条件“调制溶液”。这种调制溶液可以例如是提供适合的pH和盐环境的缓冲液。另一方面,如果随后例如在核酸扩增期间将温度升高,则由于试剂结合分子与结合实体之间的结合的可逆本质,所述分析物特异性试剂可以容易地变得再次从所述微粒脱离,因为在高温条件下,在一方面是附连到所述前体微粒的多孔聚合物基质的试剂结合分子(例如链霉亲和素)与另一方面是所述分析物特异性试剂上的结合实体(例如引物上的脱硫生物素)之间的结合不再可能。在这种脱离后,所述分析物特异性试剂因此完全可用于进行任何扩增反应。

[0276] 当在本文中使用时,术语“衍生自亲和素或与亲和素相关的蛋白质”意指在结构或序列上与亲和素相似或具有或保留了亲和素的结合功能的任何蛋白质。

[0277] 当在本文中使用时,术语“衍生自生物素或与生物素相关的分子”是指在结构上与生物素相似并具有或保留了生物素的结合功能的任何分子。

[0278] 在相应的文库的一个实施方式中,所述文库中的每个预制前体微粒或微粒均包含多孔聚合物基质,其具有用于接受水性样品并为分析物的特异性检测提供反应空间的空隙体积。这种多孔聚合物基质由聚合物或聚合物混合物形成,更优选地由水凝胶形成剂或此类水凝胶形成剂的混合物形成或者是它们。在优选实施方式中,形成所述多孔聚合物基质的聚合物或聚合物混合物具有在凝胶状态和溶胶状态之间切换的能力。在一个实施方式中,所述形成多孔聚合物基质或者是其一部分的聚合物或聚合物混合物不是交联聚合物。

所述聚合物或聚合物混合物不被交联的实施方式在不同状态例如凝胶状态和溶胶状态之间的切换方面是特别好且通用的。在特别优选实施方式中,所述聚合物是琼脂糖,更优选为琼脂糖与明胶的组合。如果使用琼脂糖与明胶的组合,优选地所述琼脂糖以0.1% (w/v) 至4% (w/v) 的范围存在,并且所述明胶以0.1% (w/v) 至20% (w/v)、优选地0.5% (w/v) 至20% (w/v) 的范围存在。在一个特定实施方式中,所述多孔聚合物基质中的琼脂糖浓度为0.5% (w/v),并且明胶的浓度在1% (w/v) 至2% (w/v) 的范围内。

[0279] 由本发明人设计的技术是高度通用的,因为它允许通过使用附连有与样品中待检测的分析物同样多的不同分析物特异性试剂的预制微粒文库来检测样品中的多种分析物。因此,根据一个实施方式,在预制微粒文库中存在者少两个预制微粒子集,优选地三个以上预制微粒子集,其中每个子集具有附连到所述子集的微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分,并且每个子集具有附连到所述子集的微粒的独特的分析物特异性试剂,使得所述至少两个以上预制微粒子集的区别在于附连或包含的相应标记物组分以及附连到每个子集的相应的分析物特异性试剂,因此每个子集可以由所述相应标记物组分和相应的分析物特异性试剂明确定义和识别。在此类文库中,提供有与待检测的不同感兴趣的分析物同样多或至少同样多的独立的微粒子集,并且每个所述独立的子集具有附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的不同的分析物特异性试剂,每种分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的。这种文库尤其被描述在实施方式12中并在权利要求10中要求保护,它的用途尤其被描述在实施方式30中并在权利要求23中要求保护,其实例参考图10B)、图10C) 和图10E) 示出并进一步描述。

[0280] 在仅有一种待检测的感兴趣的分析物但可能在不同样品中的情况下,本发明在一个实施方式中还提供了一种预制微粒文库,其中在所述文库中存在至少两个预制微粒子集,优选地三个以上预制微粒子集,其中每个子集具有附连到所述子集的所述粒子、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分,并且所述至少两个或三个以上子集全都具有附连到所述子集的所述微粒的相同的分析物特异性试剂,使得所述至少两个以上预制微粒子集在附连的分析物特异性试剂方面相同,但区别在于附连到每个子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分。这种特定文库对于检测多种样品、即优选地与所述文库中的子集同样多的样品中的单一分析物,特别有用。换一种说法,在此类文库中,提供有与所提供且待测试的不同水性样品同样多或至少同样多的独立的微粒子集,其中所述独立的子集全都具有附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的相同的分析物特异性试剂,所述分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的。这种文库尤其被描述在实施方式11中并在权利要求9中要求保护,它的用途尤其被描述在实施方式29中并在权利要求22中要求保护,其实例参考图10A) 示出并进一步描述。

[0281] 此外,由本发明人设计的技术还允许检测几个样品中的多个分析物,包括使用附连有与样品中待检测的分析物同样多的不同分析物特异性试剂的预制微粒文库,并且在所述文库中总共存在多个不同的独立的微粒子集,其总数等于待测试的样品数量乘以待检测和/或定量的分析物的数量。因此,根据一个这样的实施方式,在这种预制微粒文库中存在不同的独立的微粒子集,每个子集具有附连、包含或以其他方式结合的独特的标记物组分。此外,在这种文库中存在不同类别的独立的预制微粒子集,每个所述类别包含几个微粒子集,在这个类别中的子集附连有相同的分析物特异性试剂,而属于不同类别的微粒子集具

有附连到所述微粒的多孔基质的不同分析物特异性试剂。换句话说，一个类别内的所有微粒粒子集均附连有相同的分析物特异性试剂(并因此旨在用于检测和定量同一种分析物)，而一个类别内的不同子集旨在与不同样品一起使用。如果将这种文库用于检测和/或定量多个样品中的多个分析物的方法中，则在这种文库中

[0282] • 提供了与待检测的不同分析物同样多或至少同样多的不同类别的独立的微粒粒子集，

[0283] • 在每个类别中提供了与所提供并待测试的水性样品同样多或至少同样多的不同的微粒粒子集，

[0284] • 在所述文库中总共提供了与待测试的不同水性样品的数量与待检测的不同感兴趣的分析物的数量的乘积同样多或至少同样多的不同的微粒粒子集，

[0285] 这种文库尤其被描述在实施方式13中并在权利要求11中要求保护，它的用途尤其被描述在实施方式31中并在权利要求24中要求保护，其实例参考图10D)、图11A)和图11B)示出并进一步描述。

[0286] 本发明的通用性也通过下述事实反映出来，即根据本发明的文库可以通过适合的试剂盒极为容易地制备，所述试剂盒可以由决定哪些分析物是感兴趣的并因此应该被检测和有多少样品必须被调查的终端用户使用。

[0287] 因此，一方面，本发明提供了一种用于制备如上所定义的预制微粒文库的试剂盒，其中所述试剂盒包含：

[0288] -至少两个容器、即第一容器和第二容器，和可选的其他容器，每个容器含有：

[0289] • 如上文进一步定义的预制前体微粒粒子集，并且每个子集具有附连到所述子集内的所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分，使得包含在所述至少两个容器中的两个所述预制前体微粒粒子集的区别在于附连、包含或以其他方式结合的相应标记物组分；

[0290] -另一个容器，其含有：

[0291] • 如上文进一步定义的调制溶液，其能够通过下述机制将分析物特异性试剂经由所述前体微粒的所述试剂结合组分可逆地附连到所述前体微粒的所述子集：

[0292] a) 所述分析物特异性试剂与形成所述多孔聚合物基质或作为所述多孔聚合物基质的一部分的所述聚合物混合物(i)的直接结合；

[0293] b) 所述分析物特异性试剂被偶联到结合实体，所述结合实体进而与上文进一步定义的所述试剂结合分子(ii)结合；

[0294] c) 在所述可电离基团具有适合的净电荷的条件下所述分析物特异性试剂与上文所定义的所述可电离基团(iii)的直接结合；

[0295] d) 所述分析物特异性试剂与所述聚合物上的上文所定义的所述带电荷基团(iv)的直接结合，其中所述分析物特异性试剂具有至少一个可电离基团或多个可电离基团，所述可电离基团能够根据所述分析物特异性试剂周围的环境条件改变其电荷；或

[0296] e) (a) - (d)的任何组合；其中所述试剂结合组分、试剂结合分子、结合实体、聚合物或聚合物混合物、可电离基团和分析物特异性试剂如上文进一步所定义。

[0297] 使用这种实施方式，终端用户能够产生预制微粒文库，该预制微粒文库是针对所选数量和类型的感兴趣的分析物所特异性的并且可以与所选数量的样品一起使用。所述相

应和所需的分析物特异性试剂例如引物或抗体的附连,简单地通过在优选地由上述调制溶液例如缓冲液建立或产生的适合条件下将所述预制前体微粒暴露于所述分析物特异性试剂来进行。

[0298] 如果在一个实施方式中,将要在单一样品中检测多种感兴趣的分析物,则使用根据本发明的试剂盒来产生相应的预制微粒文库,其中存在不同的微粒子集,每个子集对特定的感兴趣的分析物特异,并且每个子集在附连到每个子集、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分方面不同。这种文库尤其被描述在实施方式12中并在权利要求10中要求保护,它的用途尤其被描述在实施方式30中并在权利要求23中要求保护,其实例参考图10B)、图10C)和图10E)示出并进一步描述。

[0299] 另一方面,如果希望并打算在例如来自于不同患者的多个样品中检测单一分析物,则将产生相应的文库,其中存在预制微粒的不同子集,并且所有微粒均附连有相同的分析物特异性试剂,但在附连到每个子集、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分方面仍然不同。这种文库尤其被描述在实施方式11中并在权利要求9中要求保护,它的用途尤其被描述在实施方式29中并在权利要求22中要求保护,其实例参考图10A)示出并进一步描述。应该指出,在常规的“合并”方法中,将例如来自于不同患者的不同样品合并在一起,然后检查这种合并物中特定分析物的存在。如果在这种常规方法中证明所述合并物显示出指示所述分析物存在于至少一个最初用于产生所述合并物的样品中的阳性信号,则必须在逐个样品的基础上将整组样品单个地重新测试,以便最终检测哪个单个样品是阳性的。与此相反,如果检测到阳性信号,根据本发明的文库不需这种单个样品的重复测试。这是因为在根据本发明的文库中可以在单个微粒(其显示出阳性信号)的水平上确定这种阳性微粒属于哪个样品。这甚至在这种(阳性)微粒与已被用于探测不同(患者)样品的其他微粒混合(即在“合并物”中)的情况下也是可能的,所述“混合物”(或“合并物”)通常在所述文库的所有微粒上进行检测反应时遇到。

[0300] 作为第三种可能性,也可以提供可用于在多个样品中检测超过一种感兴趣的分析物例如两种感兴趣的分析物的文库。在这种文库中,每个微粒子集的区别在于与每个子集附连、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分,但将存在成对或三个一组或四个一组或n个一组的子集附连有相同的分析物特异性试剂(如果将要测试2、3、4或n个样品中的特定感兴趣的分析物的话)。此外,在这种文库中将存在成对或三个一组、四个一组或n个一组的微粒子集,并且这些成对、……n个一组的子集中的每个子集附连有不同的分析物特异性试剂(如果将要检测2、3、4、或n个不同的固形物的分析物的话)。这种文库尤其被描述在实施方式13中并在权利要求11中要求保护,它的用途尤其被描述在实施方式31中并在权利要求24中要求保护,其实例参考图10D)、11A)和11B)示出并进一步描述。同样地,出于上文概述的原因,这不同于如果合并物被证明是阳性的话,需要整个合并物和各个样品的重复测试的常规合并方法。

[0301] 在一个实施方式中,所述用于制备预制微粒文库的试剂盒还可以包含另一个容器,其含有用于从微粒除去游离的、即未附连的分析物特异性试剂,而不除去附连到所述微粒的分析物特异性试剂的清洗缓冲液或清洗溶液。在另一个实施方式中,所述用于制备预制微粒的试剂盒还包含用于将组分混合在一起的至少一个混合容器,优选地几个混合容器,更优选地与含有前体微粒子集的容器同样多的混合容器。

[0302] 在一个实施方式中,将组分混合在一起可以在含有预制前体微粒的相应子集的相同容器中进行。然而,在其他实施方式中,谨慎的做法是单独地提供一个或几个这种专门指定的混合容器。在微粒子集在已被单独地提供有不同分析物特异性试剂后被合并的情况下,这可能是特别有用的。

[0303] 另一方面,本发明还涉及一种制备预制微粒文库的方法,其中在这种方法中,以任何顺序提供如上所定义的预制前体微粒文库和至少一种分析物特异性试剂两者。在这种方法中,将所述预制前体微粒文库或其所选的子集与所述至少一种分析物特异性试剂在允许所述至少一种分析物特异性试剂附连、优选可逆地附连到一些或所有所述预制前体微粒的条件下混合,由此产生根据本发明的预制微粒文库。

[0304] 可选地,所述方法还包括清洗所述预制微粒,以从其除去任何未附连的分析物特异性试剂。

[0305] 在一个实施方式中,这种方法可以使用如上所定义的用于制备文库的试剂盒来进行,其中所述文库以所述试剂盒的所述至少两个容器的形式提供,每个容器含有如上所定义的预制前体微粒子集,并且每个子集具有附连到所述子集内的所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分,使得所述至少两个预制前体微粒子集的区别在于附连到每个子集、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分;

[0306] 其中所述允许所述至少一种分析物特异性试剂附连、优选可逆地附连到一些或所有所述预制前体微粒的条件,通过将所述预制前体微粒文库或其所选的子集与所述至少一种分析物特异性试剂在如上所定义的调制溶液存在下混合来产生,其中优选地,所述调制溶液是缓冲液。

[0307] 在如上进一步定义的制备预制微粒文库的方法的优选实施方式中,所述方法包括:

[0308] -以任何顺序提供:

[0309] • 预制前体微粒文库,每个子集被提供在如上进一步定义的独立的容器中,或者将预制前体微粒的几个子集一起提供在独立的容器中;

[0310] • 如上进一步定义的至少一种分析物特异性试剂;

[0311] • 将所述预制前体微粒文库的子集独立地与一种或多种分析物特异性试剂或者将所述预制前体微粒文库的所选合并的子集与所述至少一种分析物特异性试剂,在允许所述至少一种分析物特异性试剂附连、优选可逆地附连到一些或所有所述预制前体微粒的条件下混合,从而产生如上进一步定义的预制微粒文库;

[0312] • 可选地清洗所述预制微粒,以从其除去任何未附连的分析物特异性试剂;

[0313] • (可选地)将所述单个或混合的子集合并成一个具有不同子集的微粒文库,所述子集具有选择性附连到所述文库的确定子集的分析物特异性试剂。

[0314] 另一方面,在本文中有时被称为“制备试剂盒”的如上所定义的用于制备预制微粒文库的试剂盒,可以充当平台以提供用于检测分析物的试剂盒。后一种试剂盒在本文中有时也被称为“检测试剂盒”,与作为用于制备预制微粒文库的试剂盒的“制备试剂盒”相反。

[0315] 另一方面,本发明还涉及一种用于在样品中检测分析物的试剂盒(“检测试剂盒”),所述检测试剂盒包含:

[0316] a)

[0317] -含有用于核酸扩增的通用检测组合物的容器,所述通用检测组合物包含用于执行分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂,其中所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应是核酸扩增,所述通用检测组合物包含缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶如Taq聚合酶和用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料,或

[0318] -含有第一检测组合物的容器以及含有第二检测组合物的另一个容器,所述第一检测组合物包含用于执行分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂,所述第二检测组合物包含检测试剂,所述第一检测组合物包含用于执行免疫化学检测反应的试剂,例如缓冲液和偶联到适合的报告酶并且对与在所述免疫化学检测反应中用作分析物特异性试剂(ASR)的第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白相同的分析物特异的第二抗体或第二抗体片段;并且所述第二检测组合物包含所述报告酶的适合的底物作为检测试剂,所述底物在被所述报告酶反应后变得可检测,优选地可光学检测,更优选地可通过荧光检测,或

[0319] -含有第一检测组合物的容器,所述第一检测组合物包含用于执行分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂,以及包含第二检测组合物的另一个容器,所述第二检测组合物包含检测试剂,其中所述化学反应或生物化学反应是免疫化学检测反应,所述第一检测组合物包含用于执行免疫化学检测反应的试剂,例如缓冲液和偶联到适合的寡核苷酸标签并且对与在所述免疫化学检测反应中用作分析物特异性试剂(ASR)的第一抗体相同的分析物特异的第二抗体或第二抗体片段;并且所述第二检测组合物包含作为检测试剂的缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶如Taq聚合酶和用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料,以及适用于扩增所述附连到第二抗体的寡核苷酸标签的引物;

[0320] 和

[0321] b)

[0322] -含有可选地补充有乳化剂的非水性相例如油、例如氟代烃油的容器;

[0323] 和

[0324] c)

[0325] -用于混合组分的混合容器。

[0326] 在一个实施方式中,所述检测试剂盒可以包含d)用于执行检测反应的另一个容器。

[0327] 根据本发明,所述检测试剂盒与本文中所定义并在上文进一步描述的微粒文库相结合使用。

[0328] 因此,在某些实施方式中,所述检测试剂盒还可以包含如上进一步定义的预制微粒文库。在根据本发明的这种微粒文库中,所述微粒包含也如上文所定义的分析物特异性试剂。这些微粒包含的分析物特异性试剂充当用于通过化学反应或生物化学反应执行检测的限定的反应空间。所述相应的分析物特异性试剂特异性靶向或识别所述感兴趣的分析物。

[0329] 在其他实施方式中,如上所定义的预制微粒文库与所述试剂盒分开提供并且不构成其一部分。

[0330] 在根据本发明的实施方式的检测试剂盒中,组分a)有效地是待使用的检测类型的决定性组分。因此,组分a)存在各种不同的可能性:取决于打算执行何种检测以及因此取决

于待检测的分析物,这种组分a)可以被配置用于在核酸扩增背景下执行检测或用于在免疫化学检测的背景下执行检测,或用于在免疫-扩增反应例如免疫-PCR的背景下执行检测。

[0331] 因此,这种组分a)也可以是含有在核酸扩增的背景下使用的通用检测组合物的容器。这种在核酸扩增的背景下使用的通用检测组合物包含缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶例如Taq聚合酶和用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料。

[0332] 或者,在免疫化学检测的背景下,组分a)可以是两个独立容器的组合,其中这种组合的第一容器含有第一检测组合物,其包含用于执行免疫化学检测的试剂,例如缓冲液和偶联到适合的报告酶并且对与在所述免疫化学反应中用作分析物特异性试剂的第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白相同的分析物特异的第二抗体或第二抗体片段。在这种情形中,术语“对分析物特异的”当用于第二抗体的情形中时,意味着所述第二抗体能够特异性识别或靶向与用作分析物特异性试剂的第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白相同的分析物,不论这种分析物是游离的还是已经结合到所述在免疫化学检测反应中用作分析物特异性试剂的第一抗体、片段等。所述用作分析物特异性试剂的第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白是如上所定义的微粒的一部分,并且如上所定义的这些微粒的文库可以构成所述检测试剂盒的一部分,或者可以与这种试剂盒分开提供。

[0333] 组分a)的第三种选项是用于在免疫扩增反应例如免疫-PCR的背景中检测的选项。在这个实施方式中,组分a)是两个独立容器的组合,其中第一容器包含第一检测组合物,其包含用于执行免疫化学检测反应的试剂,例如缓冲液和偶联到适合的寡核苷酸标签并且对与用作分析物特异性试剂的第一抗体、抗体片段或非抗体蛋白相同的分析物特异的第二抗体或第二抗体片段;并且所述第二容器包含第二检测组合物,并且这种第二检测组合物包含作为检测试剂的缓冲液、三磷酸单核苷、扩增酶例如适合的核酸聚合酶例如Taq聚合酶和用于检测扩增产物例如扩增的核酸的核酸染料,以及适用于扩增所述附连到第二抗体的寡核苷酸标签的引物。

[0334] 根据本发明的文库极容易制备并且极为通用,可用于广泛类型的分析或诊断应用:

[0335] 例如,正如已在上文进一步概括的,根据本发明的一个实施方式的文库可用于在多个不同样品中检测单一分析物的方法中。相应的子集通常被提供在独立容器中,允许用相应的样品质询所述子集。在这种实施方式中,所述文库中存在的独立的微粒子集的数量至少等于(或有时大于)所述多个不同样品中的样品数量。如果所述文库中存在的独立的微粒子集的数量大于所述多个不同样品中的样品数量,则不必使用整个文库(包括所有子集)。这种文库被描述在实施方式11中。

[0336] 作为另一个实例并且也如已在上文进一步概括的,根据本发明的一个实施方式的文库可用于在单一样品中检测多种分析物的方法。所述文库的子集可以被合并提供在单一容器中,或者可以在最初提供在独立的容器中之后合并并在单一容器中,并用所述样品同时质询。在这种实施方式中,所述文库中存在的独立的微粒子集的数量至少等于(或有时大于)所述单一样品中待检测的分析物的数量。如果所述文库中存在的独立的微粒子集的数量大于所述单一样品中待检测的分析物的数量,则不必使用整个文库(包括所有子集)。这种文库被描述在实施方式12中。

[0337] 作为另一个实例,根据本发明的一个实施方式的文库可用于在多个不同样品中检

测多种分析物的方法中。在这种情况下,所述文库包含不同子集的子文库,每个子集代表不同类别的分析物特异性试剂,并且每个子文库被用于用不同的样品质询。这种文库被描述在实施方式13中。

[0338] 当在本文中使用时,术语“子文库”和“类别”意指下述内容:

[0339] 当在本文中使用时,术语“类别”意指所述文库中具有相同分析物特异性试剂(ASR)的所有微粒子集的整体。一个类别中的子集的所有微粒对一种感兴趣的分析物特异。在一个类别中,不同子集彼此的区别在于它们相应的标记物组分。在一个类别中,不同的子集被保持在独立的容器中,因为每个所述不同子集被用于质询不同的样品。

[0340] 当在本文中使用时,在用于在多个不同样品中检测多种分析物的方法的背景中,术语“子文库”意指所述文库中被用于在一个时间质询一种特定样品的所有微粒子集的整体。因为存在多个不同样品,因此所述文库包含独立的前体的不同子文库,每个所述子文库被用于质询不同的样品。在每个子文库中,一个子文库中的每个预制微粒子集附连有不同的分析物特异性试剂,每种分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的。

[0341] 因此,有效情况下,每个子文库含有来自于每个类别的一个微粒子集,使得在每个子文库中每个微粒子集附连有不同的分析物特异性试剂。

[0342] 当在本文中使用时,在被用于“质询”样品的子集的背景中,术语“质询样品”意指其中将这种子集暴露于特定样品或与特定样品孵育,允许所述微粒子集将样品吸收到微粒的空隙体积中的情景。

[0343] 当在与微粒文库孵育或用微粒文库质询的样品的背景中或在暴露于样品的微粒文库的背景中使用时,术语“孵育”、“质询”(interrogate)和“暴露于”全都意指其中将样品和文库彼此保持接触一段足以允许所述微粒将样品吸收到它们的空隙体积中的时间的情景。

[0344] 当在本文中使用时,术语“样品”或“水性样品”意指从环境分离的任何适合的流体,例如待分析一种或几种分析物的存在和/或其相应的量的体液或其组分。例如,所述样品可以是待分析的水性溶液,其例如从特定环境例如患者,特别是从患者组织或患者体液获得。这种样品可以是体液或其组分。实例是血液、血浆、血清、唾液、尿液、泪液、汗液、淋巴、精液和脑脊液。所述术语也可以是指已经历一些加工步骤例如核酸提取、细胞剥离、分析物富集等的样品,并代表了含有所述分析物并且将要经历本发明中概述的试剂和步骤的液体。在一个实施方式中,当在本文中使用时,术语“样品”或“水性样品”是指从生物体的身体获得的液体样品,其可能被或可能尚未被进一步加工例如使感兴趣的分析物可及或可用于进一步分析。优选地,这种“样品”或“水性样品”选自血液、血浆、血清、尿液、汗液、泪液、痰液、淋巴、精液、腹水、羊水、胆汁、乳汁、滑液、腹膜液、心包液、脑脊液、乳糜和尿液,其中更优选地,所述样品是血浆。优选地,这种水性样品被进一步加工,例如它在经历根据本发明的方法之前可以被裂解或消化或以其他方式处理。作为实例,如果所述水性样品是血浆,这种血浆可能已被进一步裂解和/或消化,以摆脱否则可能干扰后续检测反应的组分。例如,如果所述感兴趣的分析物是特定核酸,可能首先将所述水性样品例如血浆用蛋白酶或其他适合的酶消化以除去任何不想要的蛋白质或肽以及脂类或其他不想要的组分,然后再使它经历根据本发明的方法。因此当在本文中使用时,“水性样品”也可能是指从任何上述体液获得的提取物;它可能是例如利用适合的提取,例如使用细胞破碎(如有必要)、除去脂

类、蛋白质和不想要的核酸(如有必要)和核酸纯化和/或特定核酸的富集,从任何上述体液获得的核酸提取物。在某些实施方式中,核酸提取物可以使用乙醇或另一种适合的醇产生。

[0345] 根据本发明的实施方式,在所述用于在多个不同样品中检测多种分析物的方法中的文库中,存在多个不同的独立的预制微粒子集,

[0346] 并且每个子集

[0347] -具有附连到所述子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特的标记物组分;并且

[0348] 其中在所述多个独立的预制微粒子集中存在不同类别的独立的预制微粒子集,每个所述类别包含几个微粒子集并且每个类别具有附连到所述粒子的多孔基质的不同的分析物特异性试剂,并且一个类别中的所有微粒子集附连有相同的分析物特异性试剂;每种分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的;并且

[0349] 使得在所述文库中,所述多个不同的独立的预制微粒子集的区别在于

[0350] -附连到每个子集的所述微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分;并且

[0351] 每个独立地微粒子集构成一类微粒子集的一部分;

[0352] 并且每个子集可以由所述相应的标记物组分和所述相应的分析物特异性试剂明确地定义和识别;并且

[0353] 使得所述不同类别的微粒子集的区别在于附连到所述微粒的多孔基质的相应的分析物特异性试剂;并且每个所述不同类别包含几个微粒子集,一个类别中的子集的所有微粒附连有相同的分析物特异性试剂。

[0354] 当将这种文库用于在多个不同样品中检测多种分析物的方法中时,应该指出在这种文库中存在多个独立的预制微粒子集,其中在所述多个独立的预制微粒子集中存在独立的预制微粒子集的多个子文库,每个所述子文库被用于质询不同的样品。每个所述子文库包含几个预制微粒子集,并且子文库中的每个子集附连有不同的分析物特异性试剂。

[0355] 这种文库被描述在实施方式13中。

[0356] 根据本发明的某些实施方式的微粒的一个特别有用的特点在于它们也可能通过分析物与下述物质结合来促进所述分析物从样品的富集:

[0357] (i) 结合到所述微粒分析物特异性试剂;

[0358] (ii) 形成所述多孔聚合物基质或者是所述聚合物基质的聚合物或聚合物混合物;

[0359] (iii) 固定在所述多孔聚合物基质上的一个或多个可电离基团或多个可电离基团,所述可电离基团能够根据所述前体微粒或微粒周围的环境条件改变其电荷;

[0360] (iv) 固定在所述多孔聚合物基质上的一个或多个带电荷基团或多个带电荷基团;

[0361] (v) (i) - (iv) 的任何组合;

[0362] 并因此可用作样品中的分析物/靶的富集、清洁和检测/定量的手段。

[0363] 可以在实际中用于促进分析物从样品的富集的结合到微粒的分析物特异性试剂(即上述选项(i))的典型实例是抗体或抗体片段,能够特异性结合分析物或分析物复合体的非抗体蛋白例如受体、受体片段,以及亲和蛋白。

[0364] 另一方面,本发明涉及一种在水性样品中检测和/或定量感兴趣的分析物的方法,所述方法包括下述步骤:

[0365] -以任何顺序提供：

[0366] • 已知或怀疑含有感兴趣的分析物的水性样品；

[0367] • 通用检测组合物，其包含用于执行所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应的试剂；

[0368] • 根据本发明的上述限定实施方式中的任一者的预制微粒文库，其中附连到所述微粒的所述分析物特异性试剂被选择成使得其是能够与所述感兴趣的分析物特异性结合或反应的；

[0369] -可选地将所述水性样品与所述通用检测组合物混合；

[0370] -将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育，从而允许所述微粒文库在所述微粒的空隙体积中吸收水性样品并可选地结合所述感兴趣的分析物，如果存在于所述样品中的话；

[0371] -可选地清洗所述微粒；

[0372] -如果所述水性样品以前尚未与所述通用检测组合物混合，则向所述微粒添加所述通用检测组合物；

[0373] -将所述预制微粒文库转移到非水性相中并除去围绕所述各个预制微粒的任何水性相，从而产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间，所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积；

[0374] -可选地通过施加外部触发物来释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂；

[0375] -执行所述感兴趣的分析物的检测反应；

[0376] -检测和/或定量所述感兴趣的分析物。

[0377] 当所述感兴趣的分析物是核酸并且所述检测反应是核酸扩增反应时，这种方法是特别有用的。

[0378] 另一方面，本发明涉及一种在水性样品中检测和/或定量感兴趣的分析物的方法，所述方法包括下述步骤：

[0379] -以任何顺序提供：

[0380] • 已知或怀疑含有感兴趣的分析物的水性样品；

[0381] • 第一检测组合物，其包含执行所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应所必需的试剂；

[0382] • 第二检测组合物，其包含检测试剂；

[0383] • 根据本发明的上述限定实施方式中的任一者的预制微粒文库，其中附连到所述微粒的所述分析物特异性试剂被选择成使得其是能够与所述感兴趣的分析物特异性结合或反应的；

[0384] -可选地，将所述水性样品与所述第一检测组合物混合；

[0385] -将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育，并且如果所述水性样品尚未与所述第一检测组合物混合的话，也与所述第一检测组合物孵育，从而允许所述微粒文库在所述微粒的空隙体积中吸收水性样品和所述第一检测组合物，并可选地与所述感兴趣的分析物结合，如果存在于所述样品中的话；

[0386] -可选地清洗所述预制微粒文库，以除去任何未吸收或未反应的第一检测组合物；

[0387] -将所述包括吸收的水性样品的预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育，从而

允许所述微粒文库吸收所述第二检测组合物；

[0388] -可选地进一步清洗所述预制微粒文库，以除去任何未吸收或未反应的第二检测组合物；

[0389] -将所述预制微粒文库转移到非水性相中并除去各个预制微粒周围的任何水性相，从而产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间，所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积；其中优选地，所述转移到非水性相中的步骤在将所述预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育后立即进行；

[0390] -可选地，通过施加外部触发物来释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂；

[0391] -通过检测和/或定量所述检测试剂来检测和/或定量所述感兴趣的分析物。

[0392] 当所述感兴趣的分析物是蛋白质或其他非核酸并且所述检测反应是免疫化学检测时，这种方法是特别有用的。

[0393] 另一方面，本发明还涉及一种在水性样品中检测和/或定量感兴趣的分析物的方法，所述方法包括下述步骤：

[0394] -以任何顺序提供：

[0395] • 已知或怀疑含有感兴趣的分析物的水性样品；

[0396] • 第一检测组合物，其包含执行所述分析物的化学检测反应或生物化学检测反应所必需的试剂；

[0397] • 第二检测组合物，其包含检测试剂；

[0398] • 根据本发明的上述限定实施方式中的任一者的预制微粒文库，其中附连到所述微粒的所述分析物特异性试剂被选择成使得其是能够与所述感兴趣的分析物特异性结合或反应的；

[0399] -可选地，将所述水性样品与所述第一检测组合物混合；

[0400] -将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育，并且如果所述水性样品尚未与所述第一检测组合物混合，则也与所述第一检测组合物孵育，从而允许所述微粒文库在所述微粒的空隙体积中吸收水性样品和所述第一检测组合物并可选地结合所述感兴趣的分析物，如果存在于所述样品中的话；

[0401] -可选地清洗所述预制微粒文库，以除去任何未吸收或未反应的第一检测组合物；

[0402] -将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与所述第二检测组合物孵育，从而允许所述微粒文库吸收所述第二检测组合物；

[0403] -可选地进一步清洗所述预制微粒文库，以除去任何未吸收或未反应的第二检测组合物；

[0404] -将所述预制微粒文库转移到非水性相中并除去各个预制微粒周围的任何水性相，从而产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间，所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积；

[0405] -可选地，通过施加外部触发物来释放附连到所述微粒的分析物特异性试剂；

[0406] -执行所述感兴趣的分析物的检测反应；和

[0407] -检测和/或定量所述感兴趣的分析物。

[0408] 当所述感兴趣的分析物是蛋白质或其他非核酸并且所述分析物的检测通过与扩增反应偶联的免疫化学检测进行时，这种方法是特别有用的。这种反应的典型实例是免疫-

PCR反应。

[0409] 根据本发明的微粒文库可以根据用户的需求定制,并且可用于广范围的各种不同方法。

[0410] 因此,在一个实施方式中,

[0411] -所述方法是在例如来自于不同患者的多个水性样品中检测和/或定量单一分析物的方法,

[0412] -在所述方法中,提供了已知或怀疑含有感兴趣的分析物的多个不同的水性样品,例如来自于不同患者的样品,

[0413] -在所述方法中提供的预制微粒文库是根据实施方式11所述的文库,其中在此类文库中提供了与提供并且待测试的不同水性样品同样多或至少同样多的独立的微粒子集,其中所有所述独立的子集均具有附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的相同的分析物特异性试剂,所述分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的;

[0414] -在所述将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育的步骤中,将每个所述不同的水性样品独立地与所述文库的独立的微粒子集孵育;

[0415] -在所述将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与第二检测组合物孵育的步骤中,将所述文库的每个所述独立的微粒子集独立地与所述第二检测组合物孵育;

[0416] -所述将所述文库转移到非水性相中的步骤对每个微粒子集独立地进行,即将每个独立的微粒子集独立地转移到非水性相中,并为每个子集独立地除去各个微粒周围的水性相,从而为每个子集独立地产生用于检测所述分析物的多个隔绝的反应空间,所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积,

[0417] 其中所述方法在所述将所述文库转移到非水性相中的步骤之后,在随后进行所述感兴趣的分析物的检测反应之前和检测和/或定量所述感兴趣的分析物之前,还包括将所述非水性相中所有独立的子集的所述多个隔绝的反应空间混合在一起的步骤。

[0418] 在另一个实施方式中,

[0419] -所述方法是在单一水性样品中检测和/或定量多种分析物的方法,

[0420] -在所述方法中,提供了已知或怀疑含有多种感兴趣的分析物的单一水性样品,

[0421] -在所述方法中提供的预制微粒文库是根据实施方式12所述的文库,其中在此类文库中提供了与待检测的不同的感兴趣的分析物同样多或至少同样多的独立的微粒子集,并且每个所述独立的子集具有附连到所述子集的所述微粒的多孔基质的不同的分析物特异性试剂;每个分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的;

[0422] -在所述将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育的步骤中,将所述水性样品与所述文库的所有所述独立的微粒子集一起孵育;

[0423] -在所述将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与第二检测组合物孵育的步骤中,将所述文库的所有所述独立的微粒子集与所述第二检测组合物一起孵育;

[0424] -所述将所述文库转移到非水性相中的步骤对所有微粒子集一起进行,即将所有微粒子集一起转移到非水性相中并除去各个微粒周围的水性相,从而产生用于检测和/或定量所述多个分析物的多个隔绝的反应空间,所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积。

[0425] 在又一个实施方式中,

[0426] -所述方法是在多个水性样品中检测和/或定量多种分析物的方法，

[0427] -在所述方法中，提供了已知或怀疑含有多种感兴趣的分析物的多个不同的水性样品，例如来自于不同患者的样品，

[0428] -在所述方法中提供的预制微粒文库是根据实施方式13所述的文库，其中在此类文库中存在不同类别的独立的预制微粒子集，每个所述类别包含几个微粒子集并且每个所述类别具有附连到所述微粒的多孔基质的不同的分析物特异性试剂，并且一个类别内的所有微粒子集附连有相同的分析物特异性试剂；每种分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的；其中在所述方法中，在所述提供所述文库的步骤中：

[0429] • 提供了与待检测的不同分析物同样多或至少同样多的独立的微粒子集的不同类别，

[0430] • 在每个类别中提供了与所提供并待测试的水性样品同样多或至少同样多的不同的微粒子集，

[0431] • 在所述文库内提供了与待测试的不同水性样品乘以待检测的不同感兴趣的分析物的数目的乘积同样多或至少同样多的不同的微粒子集，

[0432] -在所述将所述水性样品与所述预制微粒文库孵育的步骤中，将正好一个水性样品与来自于每个类别的正好一个微粒子集孵育，并且将每个水性样品与所述文库中的微粒类别同样多的来自于不同类别的不同微粒子集一起孵育，

[0433] -在所述将包括吸收的水性样品的所述预制微粒文库与第二检测组合物孵育的步骤中，将合并的来自于不同类别的微粒子集与所述第二检测组合物一起孵育，所述子集之前已与一个相应的水性样品孵育，

[0434] -所述将所述文库转移到非水性相中的步骤对每个水性样品独立地进行，即将合并的之前已与一个相应的水性样品孵育的微粒子集一起转移到非水性相中并除去各个微粒周围的水性相，从而为每个水性样品独立地产生用于检测所述多种分析物的多个隔绝的反应空间，所述反应空间包含水性相并局限于所述微粒的所述空隙体积，

[0435] 其中所述方法优选地在所述将所述文库转移到非水性相中的步骤之后，在随后进行所述感兴趣的分析物的检测反应之前和检测和/或定量所述感兴趣的分析物之前，还包括将所述非水性相中所有独立的样品的所述多个隔绝的反应空间混合在一起的步骤。

[0436] 对于上述方法中的定量，在某些实施方式中，在所述检测和定量所述感兴趣的分析物的步骤中，所述分析物的定量通过选自下述的方法来进行：

[0437] a) 数字核酸扩增，特别是数字聚合酶链反应 (PCR)，

[0438] b) 实时定量核酸扩增，特别是实时聚合酶链反应 (PCR)；

[0439] c) 免疫化学检测方法，特别是数字免疫化学检测方法，例如数字免疫测定法如数字酶联免疫吸附测定法 (ELISA)；

[0440] d) 与核酸扩增组合的免疫化学检测方法，例如免疫-聚合酶链反应，特别是数字免疫-PCR；

[0441] 其中如果所述感兴趣的分析物是核酸，则定量使用方法a) 或b) 中的任一者或a) 与b) 的组合来进行；并且其中如果所述分析物是蛋白质、肽或其他非核酸分析物，则定量使用方法c) 或d) 中的任一者来进行。

[0442] 具体对于分析物的定量而言，本发明的通用性也通过下述事实反映出来，即根据

本发明的微粒文库的实施方式允许样品中多种分析物的平行(多路)超灵敏检测。具体地,这适用于根据实施方式12-13中的任一者的文库。更具体地,这特别适用于根据实施方式12的文库(其是用于检测和/或定量样品中的多种分析物的文库)。尽管每个微粒代表分立的信号放大空间或靶扩增空间,允许与已建立的数字检测技术相似的单分子检测,但所述微粒可用于在样品中同时检测并甚至定量多种不同的分析物(即多个分析物种类)(>1),由此可以通过下述公式确定每种不同分析物的可实现的理论检测极限:

$$[0443] \quad N = \log_{\left(\frac{B-1}{B}\right)}(1-P) \text{ 或 } P(B, N) = 1 - \left(1 - \frac{1}{B}\right)^N$$

[0444] 其中

[0445] B = 不同类型的微粒的数目,每个类型(或“子集”)对一种单独分析物的检测特异

[0446] N = 样品中一种特定分析物种类的分析物分子的数目

[0447] P = 如果使用 B 种不同类型的微粒并且如果样品中存在的不同分析物种类的数目 $\leq B$,特定分析物种类实际存在于对这种分析物特异的相应微粒类型中的概率,

[0448] 所述公式来自于分析物分子在用所述样品质询的所有微粒中的二项式分布。检测极限用 N 表示,其中 P 被设定为95%。为清楚起见,所述公式没有考虑分析物在待分析分析物的存在和数量的体液样品中的分布。

[0449] 此外,根据本发明的微粒文库的实施方式通过将定量数字和定量实时分析方法桥接,能够实现用于分析物定量的优雅方法。尽管这个陈述对于在所述微粒上使用的任何种类的信号或靶扩增测定法都是正确的,但可以以PCR扩增为例来说明利用根据本发明的方法的实施方式来定量靶的方法。靶分子的定量优选地通过数字PCR(dPCR)来进行,因为这种方法允许比实时定量PCR(qPCR)更灵敏和精确的定量。数字PCR的缺点是测量范围的固有限制,其取决于对一种样品/分析物特异的微粒的数目。为了克服这个限制,本发明用实时定量PCR来补充数字PCR的分析,以用于高于数字PCR测量范围的靶浓度。这种方法的实施需要在PCR结束时和实时PCR的所有循环期间获取荧光图像。将所有获取的图像用图像分析算法进行分析,以便定量反应器区室中每个微粒的荧光水平。一种分割算法将明亮的圆盘状微粒对象与暗背景分开。在这种分割信息的基础上,最终将圆形拟合到微粒对象的轮廓,允许估算平均微粒荧光和微粒体积。实时PCR图像的分析包括在连续图像中跟踪微粒位置,以允许在每个相应微粒中监测反应过程中的荧光。

[0450] 应用的定量方法的选择是基于在扩增反应后仍为阴性、即未显示出扩增的微粒的数目/比例。这个信息从数字PCR数据获取。如果超过阴性微粒数目/比例的预定下限(即如果阴性微粒的数目/比例高于这个预定的下限),则可以应用终点泊松分析。否则,即如果阴性微粒的数目/比例低于这个预定的下限,则使用在所有循环期间获取的实时定量PCR数据进行实时分析。允许使用泊松仍能进行稳健定量的阴性微粒比例的合理下限为0.5%。每个微粒的相应平均靶数目为5.3。为了考虑荧光图像上可能的假象,附加的要求可以是例如50的阴性微粒总数的下限。

[0451] 终点泊松分析如下进行:确定阴性微粒的比例,并应用泊松校正来解释阳性微粒可以含有超过一个靶分子的事实。区分阳性和阴性微粒的阈值从已知为阴性的微粒的荧光信号强度直接估算。通过执行微粒体积特异性泊松校正,将可能的微粒体积变化考虑到定量中。测量之间总微粒体积的可能变化也通过算法被校正。

[0452] 如果靶浓度超过数字PCR的测量范围,则实时分析将非线性函数拟合到每个单个微粒的荧光信号过程。所述拟合的非线性模型将S型和线性函数相结合,其中所述S型分量揭示出扩增动力学,并且线性分量代表了信号的基线。循环阈值(Ct)从具有最大二阶导数的S型函数的定义值的切线与基线的交点来计算。每个微粒的相应靶数目使用校准数据集来计算。

[0453] 这种定量原理也在图12和图13中以及实施例3中说明。

[0454] 此外,参考附图,在所述附图中:

[0455] 图1示出了用于产生预制前体微粒文库(图的左侧部分)和用于随后产生预制微粒文库(图的右侧部分)的过程的实施方式。在图的左侧部分中产生了预制前体微粒,其各自具有附连到所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分;并且对不同的预制前体微粒使用不同的标记物组分重复了在图的左侧部分上的这个过程,从而产生了预制前体微粒的不同子集。其结果是一种预制前体微粒文库,其中在所述文库中存在至少两个独立的预制微粒子集或也可能存在三个以上独立的预制微粒子集,每个子集具有附连到所述子集中的所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特标记物组分,使得所述至少两个以上独立的预制前体微粒子集的区别在于附连到每个子集或包含在每个子集中的相应标记物组分。在图的右侧部分上,每个预制前体微粒子集装载有分析物特异性试剂(ASR)。如果所述微粒文库将要用于检测不同分析物,则附连到每个微粒子集的相应的分析物特异性试剂是不同的。如果所述文库将要用于检测相同的分析物但用于多个样品,则附连到不同微粒子集的相应的分析物特异性试剂是相同的。所述得到的预制微粒文库是非常通用的,因此可以根据不同需要来制备和使用。它可用于检测单一样品中的多种分析物,或者可用于检测多个样品中的单一分析物。

[0456] 在图1中示出的实施方式中,所述分析物特异性试剂(ASR)的结合通过试剂结合组分发生,所述试剂结合组分可能是上文进一步列出的可能性(i)-(v)之一。作为实例,在最简单的形式下,所述试剂结合组分可以是形成微粒的多孔聚合物基质或者是所述聚合物基质的聚合物或聚合物混合物。在另一个实施方式中,它可以是附连到所述多孔聚合物基质的特异性试剂结合分子。在又一个实施方式中,它可能是可电离基团或多个可电离基团,或者它可能是固定在所述多孔聚合物基质上的带电荷基团或多个带电荷基团,或者它可能是任何上述物质的组合。在优选实施方式中,所述试剂结合组分是附连到多孔聚合物基质的试剂结合分子,所述多孔聚合物基质进而与偶联到分析物特异性试剂的结合实体相互作用。这个实施方式的实例在下文进一步示出,其中作为实例,所述附连到多孔聚合物基质的试剂结合分子是链霉亲和素分子或链霉亲和素相关分子。它在分析物特异性试剂上的对应物、即与所述试剂结合分子结合的结合实体是脱硫生物素或类似的分子,允许与链霉亲和素或亲和素的可逆附连。可逆性的实现是因为所述结合实体(在所述分析物特异性试剂(ASR)上)与试剂结合分子(在所述多孔聚合物基质上)之间的结合可以通过施加外部触发物来释放,例如改变所述微粒暴露到的温度。对于本领域技术人员,显然这个实施方式的许多不同变化形式是可能且可以设想的。

[0457] 图2示出了方案的实施方式,所述方案概括了前体微粒和在结合分析物特异性试剂后从其得到的预制微粒之间的关系。提供具有多孔聚合物基质的预制前体微粒。所述多孔聚合物基质具有用于容纳水性样品并为分析物的特异性检测提供反应空间的空隙体积。

所述预制前体微粒还包含试剂结合组分,其允许分析物特异性试剂附连、优选可逆地附连到所述前体微粒。此外,所述前体微粒附连有标记物组分,所述标记物组分允许识别所述前体微粒(和随后得到的预制前体微粒以及被附连到所述前体微粒的分析物特异性试剂)。还示出了被附连到所述预制前体微粒的分析物特异性试剂(ASR)。应该指出,作为实例,这种分析物特异性试剂可能是一对核酸引物和可选的探针,其对特定(核酸)分析物特异并且允许这种分析物的扩增和检测,如果所述分析物存在于相应的微粒随后暴露到的样品中的话。尽管在该图中所有ASR显示相同,但设想了这些引物对和可选的探针有资格作为一种分析物特异性试剂。分析物特异性试剂的其他实例可以是对特定分析物特异的(第一)抗体。

[0458] 图3A示出了在水性样品中检测感兴趣的分析物的方法的示例性方案的实施方式,其中提供了根据本发明的实施方式的微粒文库并将其暴露到这种水性样品。将文库暴露到样品和包含扩增/检测试剂的检测组合物(或“与它们孵育”)。作为这种暴露的结果,所述微粒文库允许将所述水性样品和检测组合物吸收在所述微粒的空隙体积中并可选地结合或富集所述感兴趣的分析物,如果它们在样品中存在的话。取决于所述文库中附连到微粒的不同分析物特异性试剂的类型和数目,可以检测一种或几种不同的分析物。在所述文库已被暴露到所述样品和检测组合物后,将所述文库转移到非水性相中,并且例如通过在微粒上施加机械力来除去各个预制微粒周围的水性相。然而,每个微粒在其相应的空隙体积中仍具有内部水性相。作为这种在非水性相中的转移和除去任何周围水性相的结果,产生了多个隔绝的反应空间,所述反应空间充当允许检测所述分析物的“反应器”,并且所述反应空间包含水性相并局限于相应微粒的空隙体积。取决于相应微粒的具体性质,使这种微粒经历相转变例如凝胶-溶胶转变(即从固态或准固态凝胶状态转变成液体可溶状态)可能是优选的,这将有效地触发附连到所述微粒的相应的分析物特异性试剂的释放。这可以通过施加外部触发物例如温度变化、pH变化、添加特定化学试剂等来进行。在优选实施方式中,这种外部触发物是温度的升高。凝胶-溶胶转变通常也导致微粒悬液(固体在液体中)转变成微滴(以前的固体微粒)在液体相中的适合的乳液(液体在液体中)。所述相应的微粒在转移到非水性相并可选地释放出分析物特异性试剂后,经历所述感兴趣的分析物的检测反应。由于每个微粒在非水性相中是隔绝的,因此在不同微粒/由这种微粒提供的反应空间之间没有串扰。取决于感兴趣的分析物的类型和分析物特异性试剂,这种检测反应可以是扩增反应(在所述感兴趣的分析物是核酸的情况下),或者它可以是免疫化学反应(例如如果所述感兴趣的分析物是蛋白质的话)。随后,可以在各个微粒中检测所述感兴趣的分析物。或者,所述检测反应也可以是免疫-扩增反应,其中在第一步中使用第一抗体结合感兴趣的分析物,并使用第二抗体形成夹心物,而所述第二抗体被附连到寡核苷酸标签,其在第二步中可以使用适合的引物扩增。由于每个微粒具有特异性标记物组分,因此可以将特定分析物和与其相关(或产生)的信号的存在指派到在其中检测到所述信号的相应微粒的标记物组分。

[0459] 图3B示出了在水性样品中检测和/或定量感兴趣的分析物的方法的示例性方案的实施方式,其中提供了根据本发明的实施方式的微粒文库,并将其在有利于所述分析物与微粒的结合的条件下暴露到这种水性样品。可以将所述带有结合的分析物的微粒用适合的缓冲液清洗,以便除去任何不想要的材料。随后,将所述文库暴露到包含扩增/检测试剂的检测组合物。在已暴露到包含必需的扩增/检测试剂的检测组合物后,将所述文库转移到非

水性相中,从而有效地在每个微粒内产生隔绝的反应空间,并因此有效地产生多个隔绝的反应空间。每个微粒含有包括样品和必需的扩增/检测试剂的水性相,并被周围的非水性相与其他微粒隔绝。随后进行扩增/检测反应,并且可以在逐个微粒的基础上检测感兴趣的分析物。由于每个微粒具有其自身的标记物组分,如果所述分析物存在于相应的微粒中会产生相应的分析物特异性信号,因此这种信号和相应的分析物的存在可以指派到单个微粒的相应标记物组分并因此指派到所述单个微粒。

[0460] 图4示出了如实施例1中详细描述的进行编码的前体微粒的合成实施方式。使用不同标记的明胶和琼脂糖,产生了具有不同标记物组分的琼脂糖/明胶微粒。在左侧示出了相应的不同标记的明胶类型。在中间的照片中示出了多个由此产生的不同标记的微粒的图像,并在右侧示出了在两个独立的荧光通道中为各个微粒获得的荧光信号的散点图,以及利用相应的荧光检测到的不同前体微粒的假彩色图像。9种不同类型的前体微粒可以根据它们的荧光清楚地地区分为独立的粒子群体。

[0461] 图5示出了通过为引物寡核苷酸(所述寡核苷酸充当分析物特异性试剂)选择适合的结合实体,可以将它们可逆地附连到根据本发明的实施方式制备的链霉亲和素包被的微粒。在这个实例中,所述微粒上的试剂结合分子是链霉亲和素,并且所述分析物特异性试剂上的结合实体是生物素或脱硫生物素。脱硫生物素允许可逆附连,而生物素不允许。为了在脱硫生物素的情况下证实所述附连的可逆本质,将交联的微粒与带有荧光标记的寡核苷酸标签的生物素(图A)或带有荧光标记的寡核苷酸标签的脱硫生物素(图C)孵育(“装载”阶段)。所述孵育(“装载”)在室温下进行。清洗所述微粒并获取荧光图像。在两个图像(左侧和中上的图像,图A和C)中微粒均清晰可见。然后将温度升高至95℃(“变性”阶段)并再次清洗微粒。尽管生物素标记的寡核苷酸仍结合到所述微粒(正如可以通过图B中的剩余荧光看到的),脱硫生物素标记的寡核苷酸(和与其相关的荧光)明显已被所述处理除去(在图D中没有荧光)。右侧的条形图(图E)是在加热之前和之后从微粒获得的信号的定量表述。

[0462] 因此,显示了通过使用这种可逆结合的实体(例如脱硫生物素),可以从微粒基质释放出引物寡核苷酸。对于在非水性环境中由所述微粒产生的液滴空间中的高效扩增反应,这是优选的特点。尽管即使使用附连的引物也可能实现一定程度的扩增,但为了获得最佳扩增反应条件,引物寡核苷酸理想情况下不应结合到任何基质,因此将在任何扩增反应之前被故意地释放。

[0463] 图6示出了根据本发明的实施方式制备的微粒的显微镜图像。将所述微粒用抗CD45抗体包被,并与用荧光染料吖啶橙染色的全血孵育。在小心地用PBS缓冲液清洗所述样品后,将所述微粒成像。根据本发明的实施方式制备的具有35-50μm之间的可变直径的微粒可以与背景区分开,并且一些微粒带有附连到所述微粒的单个细胞。由于CD45是白细胞特征性的表面抗原,因此所述结合的细胞可能是白细胞。这个实施方式清楚地显示,此类微粒也可用于选择性结合细胞群体并单选出各个粒子上的细胞,随后可以根据本发明,按照图3A和图3B中概述的过程进行处理。

[0464] 图7示出了使用根据本发明的4种不同标记的微粒(“纳米反应器”)的文库在单一样品中检测几种分析物的方法(“分析物多路复用”)的实施方式。该图7示例了在实施例3中进行的实验。使用了四种不同类型的微粒(在所述图和本文别处有时也被同义地称为“纳米反应器”)(通过将靶特异性引物和探针(作为分析物特异性试剂)附连到相应的微粒制备成

对四种不同的分子靶rpoB、IS6110、IS1081和atpD特异),它们可以根据相应的标记物组分区分开。在图7A中示出了三个灰度图像,代表了用于对颜色标记的琼脂糖-明胶杂合微粒进行显微成像的三个荧光通道。根据在通道1和通道2中获得的荧光信号,可以为检测到的微粒指派四种不同的标记物,正如通过散点图示例的。另一个通道即通道3被用于监测核酸扩增信号(例如PCR信号)。每个标记物组分对应于特定的靶(分析物)(如果存在的话)。图7B中每种微粒类型(或“子集”)的1D图示出了阳性和阴性信号,它们被转变成每单位体积的样品检测到的拷贝数的规格。图7B示出了不同纳米反应器(或微粒)类型(也即不同分析物)的信号强度;在扩增后可以看出,在这里测试的样品中,分别对rpoB和atpD特异的微粒类型(“子集”)0和微粒类型(“子集”)3显示出阳性信号,表明在原始样品中存在这些分析物。所述图还表明存在阳性和阴性微粒。通过对所述阳性和阴性微粒计数并使用泊松分析,可以以极大的精确度确定样品中靶的数目。因此,这也能够以极大的精确度进行定量。与此相反,分别对分析物IS6110和IS1081特异的微粒类型(“子集”)1和微粒类型(“子集”)2没有提供阳性信号,表明在原始样品中不存在这些分析物。

[0465] 图8示出了用于制备预制微粒文库的试剂盒(“制备试剂盒”)的实施方式。这种试剂盒的这种实施方式包含至少两个以上容器,每个容器含有如上文进一步定义的预制前体微粒子集。每个预制前体微粒子集

[0466] 具有附连到所述前体微粒、包含在其中或以其他方式与其结合的独特标记物组分,使得预制前体微粒的不同子集的区别在于与其附连、包含在其中或以其他方式与其结合的相应标记物组分。所述试剂盒还包含另一个容器,其含有调制溶液(例如缓冲液如PBS缓冲液或水),所述调制溶液能够使分析物特异性试剂附连、优选可逆地附连到所述前体微粒子集。在优选实施方式中,这种试剂盒还包含另一个容器,其含有用于从微粒除去游离的、即未附连的分析物特异性试剂,但不除去附连到微粒的分析物特异性试剂的清洗缓冲液。此外,在优选实施方式中,这种试剂盒还包含一个或多个混合容器,用于将组分混合在一起。还示出了由这种试剂盒的用户选择并提供的不同分析物特异性试剂,使得这种用户可以根据用户的需求产生预制微粒的文库。相应的分析物特异性试剂的附连通过使用所述试剂盒中包含的调制溶液来促进。

[0467] 图9示出了根据本发明的实施方式用于在样品中检测分析物的试剂盒(“检测试剂盒”)的实施方式。在这个示例性图中,所述试剂盒包含含有通用检测组合物(其是包含执行检测反应所需的试剂但不含任何分析物特异性试剂(ASR)的组合物)的容器,含有非水性相例如油和可选的适合的乳化剂的容器。此外,这种试剂盒可以可选地含有一个或几个混合容器。此外也是可选的,这种试剂盒可能包含另一个起到反应器作用的容器。在这个实施方式中,可以独立地提供所述预制微粒文库以及样品,并将这种文库在所述试剂盒的混合容器中暴露到所述样品和检测试剂。然后,使用“反应器”、即随后也在其中进行后续检测反应的容器进行相转移。

[0468] 图10A-图10D示出了根据本发明的实施方式的不同的示例性文库。图10A示出了用于在几个样品中检测单一分析物的示例性文库。图10A中示出的文库是用于在两个不同样品中检测单一分析物的最简单的文库。正如可以看到的,在这种文库中存在两个微粒子集,它们附连有相同的分析物特异性试剂,但彼此的区别在于相应的标记物组分(“1”和“2”)。这种文库中的每个子集用于检测相同的分析物,但在不同样品中。图10B示出了用于在单一

样品中检测几种分析物的简单的示例性文库。在这种情况下,可以检测的分析物是两种不同的分析物,因为在所述文库中存在两个不同的子集,每个子集附连有不同的分析物特异性试剂。此外,所述子集的区别在于它们相应的标记物组分(“1”和“2”)。所述两个不同子集最初可以储存在容器中,但最终在将它们暴露到样品时可以合并到单一容器中。图10C是用于在单一样品中检测几种分析物的另一个示例性文库。在这个示例性文库中提供了四个不同的微粒子集,每个子集附连有独特的分析物特异性试剂。此外,所述相应子集彼此的区别在于它们的标记物组分(“1”、“2”、“3”和“4”)。最初,所述不同的子集可以储存在独立的容器中,但最终在将它们暴露到样品时可以合并在一起,在所述样品中怀疑存在四种不同的分析物。图10D是用于在几个样品中检测几种分析物的示例性文库。正如可以看到的,存在8个不同的微粒子集。相应的微粒子集各自具有独特的标记物组分(“1”至“8”),但存在四对微粒子集,每对子集附连有不同的分析物特异性试剂,并且每对中的两个子集附连有相同的分析物特异性试剂。有时在本申请中,附连有相同的分析物特异性试剂但区别在于它们相应的标记物组分的微粒子集,在本文中有时也被称为是一个“类别”的一部分。图10D中示出的示例性文库可用于检测两个样品中四种分析物的存在。因此,将每个样品用四个微粒子集探测或质询或暴露到四个微粒子集,每个子集附连有不同的分析物特异性试剂。这种用于质询同一个样品(在所述几个样品中的)的不同微粒子集在本文中有时也被称为微粒子集的“子文库”。“类别”和“子文库”的概念在图11中进一步概括和解释。

[0469] 图10E示出了在单一样品中检测几种分析物的方法的示例性流程图,其中示出了文库的产生,其允许使用这种文库中的四种不同分析物特异性试剂(ASR)检测四种不同的分析物。相应的微粒使用不同的标记物组分(“1”至“4”)不同地标记,并因此可以被区分。得到的文库是图10C的示例性文库。在将微粒转移到非水性相中后,将所述单一样品暴露到所述文库以及必需的检测组合物。然后进行检测反应,并对得到的信号进行检测和分析。

[0470] 图11A和图11B示出了用于在几个样品中检测几种分析物的示例性文库。在这里示出的这种特定情况下,存在三个不同的样品将要测试四种不同分析物的存在。正如可以在图11A中看到的,每个待测试的样品存在四个不同的微粒子集。然而,同时也存在附连有相同分析物特异性试剂的三个微粒子集,从而形成了三个一组(或N元组)的附连有相同分析物特异性试剂的微粒子集。在这种N元组(附连有相同的分析物特异性试剂)中,存在与待测试的样品同样多的不同子集(有时“至少同样多”的不同子集,如果不是所述N元组的所有子集最终都用于实验的话)。因此,在有效情况下,N表示待测试的样品的数目。这种N元组在本文中有时也被称为“类别”,其是指文库中附连有相同的分析物特异性试剂的所有微粒子集的整体。一个类别中的子集的所有微粒都对一种感兴趣的分析物特异。与此相反,术语“子文库”意指文库中用于在一个时候质询一个特定样品的所有微粒子集的整体。在每个子文库中,每个预制微粒子集附连有不同的分析物特异性试剂,每种分析物特异性试剂是对一种感兴趣的分析物特异的。在图11A中,子文库1、2和3各自含有四个微粒子集,并且每个子文库中的这四个微粒子集最初可以储存在独立容器中。然而,当将相应的子文库与相应的样品进行接触时,可以将每个子文库中的相应的微粒子集合并。然后,可以可选地清洗已暴露到它们相应的样品的微粒,然后将它们暴露到包含用于执行扩增/检测反应的必需试剂的适合的检测组合物。随后进行相转移,并将相应的微粒转移到非水性相中,从而作为悬液有效地为每个样品产生多个隔绝的反应空间。在所述相应的微粒已被转移到非水性相中之

后,可以将它们合并并在单一容器中,并且可以进行适合的扩增/检测反应。

[0471] 图12说明了将数字和实时定量PCR的组合用于微粒中的靶定量。这里呈现的定量方法利用了数字PCR,如果靶浓度没有超过测量范围的上限的话。数字PCR更加精确,并且对PCR抑制剂具有更高抗性。示出了由统计效应引起的数字PCR的置信区间(“CI”)。它们通过在测量范围的下端样品采集的泊松分布和在测量范围的上端靶在微粒上的二项式分布来确定。样品采集的泊松分布也对实时PCR的不精确性有贡献。然而此外,实时PCR还完全受制于PCR过程的可变本性。与PCR完成后的二元荧光读数相比,扩增反应期间的定量荧光读数更可能受反应效率的可变性影响。基于实时定量PCR的商业化测试测定法的典型可重复性范围为非常低的靶浓度下的大约 $0.30 \log \text{ cp/mL}$ (每mL的拷贝数)至高靶浓度下的 $0.10 \log \text{ cp/mL}$ 。所提出的定量方法的优点在于优选地只将实时定量PCR应用于较高的靶浓度,与较低浓度相比此时所述方法能够获得更精确的结果。总而言之,所述方法允许利用定量PCR(qPCR)的大动态范围和检测范围的下端处利用数字PCR的精细灵敏度和定量精确度。在一个实施方式中,在已执行根据本发明的检测方法后,可以使用下述示例性准则来实现定量:在阴性(暗)微粒的数目为可用于测试测定的所有微粒的 $>0.5\%$ 的情况下,应用泊松分析(数字)。对于低于该值的任何值,应用实时分析。这对应于每个微粒5.3个靶的近似平均浓度(λ)。可以通过引入阴性微粒的总数为例如每次分析50个的最低要求,来考虑荧光图像上可能的假象。

[0472] 更一般地,在已执行根据本发明的检测方法后,可以使用下述示例性准则来实现定量:如果阴性微粒(即其中不可检测到信号的微粒)的数目超过 $0.1-1.0\%$ 、优选地 $0.5-1.0\%$ 、更优选地 $0.5-0.8\%$ 范围内的百分率,则应用泊松分布。如果阴性微粒(即其中不可检测到信号的微粒)的数目低于 $0.1-1.0\%$ 范围内的百分率,优选地低于 $0.5-1.0\%$ 范围内的百分率,更优选地低于 $0.5-0.8\%$ 范围内的百分率,则应用定量实时分析,例如涉及循环阈值的确定(例如使用比较 C_T 方法,也被称为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法(参见例如Schmittgen等,2008, Nature Protocols, 3, pp.1101-1108))。

[0473] 进一步的详情在实施例3中解释。

[0474] 图13示出了在PCR扩增期间从油中的微粒上采集的一系列图像获得的实时荧光数据。左侧示出了检测区室的图像和特异性用于扩增的一个荧光通道中的终点荧光信号。中间的图示出了从左侧的荧光图像选择的12个代表性个体微粒的荧光强度。在荧光图像中检测到的所有微粒的计算 ct 值的分布示出在右侧的直方图中。

[0475] 此外,参考下述实施例,提供所述实施例是为了说明而不是限制本发明。

实施例

[0476] 实施例1

[0477] 编码的前体微粒的合成

[0478] 用荧光染料标记明胶用于识别分析物特异性试剂

[0479] 利用NHS偶联化学,将来自于A型牛皮或B型猪皮的明胶的丙酮不溶性级分用两种荧光染料的不同混合物标记。将Cy®3单NHS酯和Cy®5单NHS酯(GE Healthcare)溶解在DMSO中,以在磷酸钾缓冲液(pH 8.0, 无菌过滤)中制成 $1\% \text{ (w/v)}$ 的最终溶液。利用与游离明胶氨基相比8倍摩尔过量的相应染料标记25mL的 $0.25\% \text{ (w/v)}$ 的任一种明胶类型。使用

Multi-Rotator PTR-60 (Grant-bio) 在竖直模式下将标记物溶液在4℃孵育过夜。使用饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液通过反复的硫酸铵沉淀来实现荧光标记的明胶的纯化。或者, 可以进行超速离心、使用异丙醇、丙酮或甲醇的溶剂萃取、使用琼脂糖凝胶柱的凝胶过滤或透析。在任一种情况下, 纯化被重复到流出物变得透明且不显示出荧光。最后将纯化的荧光标记的明胶样品真空干燥。

[0480] 制备明胶/琼脂糖混杂溶液

[0481] 制备了由四种组分组成的混杂水凝胶溶液用于制备纳米反应器。

[0482] 组分1: 来自于A型牛皮G1890 (Sigma) 或B型猪皮G9391 (Sigma) 的丙酮不溶性明胶

[0483] 组分2: 低熔点2-羟乙基琼脂糖 (A4018, Sigma)

[0484] 组分3: Cy3标记的明胶 (A型或B型)

[0485] 组分4: Cy5标记的明胶 (A型或B型)

[0486] 为了产生组分1的均匀的4% (w/v) 溶液, 将40mg组分1溶解在1mL无核酸酶水 (Carl Roth) 中, 并在50℃和轻柔搅拌 (750rpm) 下孵育。同样地, 将20mg组分2溶解并融化在1mL无核酸酶水中, 并在80℃和轻柔搅拌下孵育, 以制备均匀的2% (w/v) 琼脂糖溶液。为了制备每种标记的明胶的4% (w/v) 溶液, 将组分3和4的干燥的沉积物转移到相应体积的无核酸酶水中并在55℃孵育直至明胶熔化。将所有四种组分混合并用无核酸酶水补足, 以产生分别对于总明胶来说终浓度为1% (w/v) 并且对于琼脂糖A4018来说终浓度为0.5% (w/v) 的混杂水凝胶溶液。将各种不同体积的组分3和组分4混合, 产生n种不同颜色的微球集。在这个实施方式中, 将重悬浮的组分3和组分4以1:0、3:1、1:3、0:1的比例, 以最高3% (v/v) 的总明胶分数混合, 以获得四种单独的标记物组分 (分别为标记物组分1-4), 用于识别分析物特异性试剂并允许4重反应测定。所有溶液在进一步使用之前保持在55℃。

[0487] 非交联明胶/琼脂糖微粒的产生

[0488] 使用QX100/QX200液滴数字 (ddPCR™) 系统 (BioRad) 或改良的μEncapsulator系统 (Dolomite microfluidics) 的部件来制备单分散的颜色编码的琼脂糖-明胶混杂微粒。在BioRad系统的情况下, 将DG8柱筒保持在热混合器上以将溶液保持在55℃。在装载50μL明胶/琼脂糖混杂溶液后, 将100μL含有2-5% Picosurf 2的乳液试剂HFE-7500 (Sphere Fluidics) 施加到柱筒的底部孔中。通过在连接到收集孔的注射器上轻柔拉拔, 在所述孔中施加真空。或者, 可以将QX200™/QX100™液滴发生器用于液滴产生。每个孔产生大约80,000个直径100μm的水凝胶液滴。

[0489] 在Dolomite微流体系统的情况下, 可以使用简单的流动聚焦装置, 在悬液形成的一步法中制备单分散的混杂微粒。详细地, 将标准的亲氟性质的液滴联结芯片 (100μm) 与4路线性连接器和芯片接口H一起用于连接管路与芯片之间的流体连接。两个Mitos P-泵递送所述水凝胶溶液和载体油。通过集成加热装置对所述系统进行了改良, 所述加热装置被放置在加热板顶上, 允许将明胶/琼脂糖混杂溶液维持在液态并加热驱动液, 以确保在油和明胶/琼脂糖混杂溶液在芯片联结部发生接触时具有一致的温度。HFE-7500/Picosurf 2和所述混杂水凝胶溶液均用0.22μm滤器预过滤, 然后将它们分别放置在P-泵 (Mitos) 和液滴系统的加热装置内的水凝胶储液器中。将所述加热装置的温度设定到55℃。将流体管线在2000mbar下启动1min。将流速调整到15-17μl/min以实现稳定的液滴形成。使用Dolomite Flow Control Advanced软件监测参数。

[0490] 在两种情况下,将颜色编码的琼脂糖-明胶混杂微粒在冰上收集在2mL微量离心管或15mL falcon管中,以开始所述混杂水凝胶的固化。为了防止微粒的水性相在油-空气边界处的损失,用500 μ L无核酸酶水覆盖500 μ L含有微粒的乳液油。随后,将微粒在4 $^{\circ}$ C储存至少1h(优选地过夜),以形成稳定的混杂支架。

[0491] 从连续相回收混杂微粒

[0492] 固化的混杂微粒堆积在乳液油顶上。用移液管小心地除去乳液油,注意不要除去粒子。然后,向管添加500 μ L 1H,1H,2H,2H-全氟代辛醇(PF0;Sigma)以打破悬液。为了将所述混杂水凝胶粒子转移到油相中,将管涡旋振荡5s并以2,500x g离心5s。将混杂水凝胶微粒转移到新的1.5mL微量离心管中。可选的:可以重复这个程序以除去残留的氟代烃油和表面活性剂。在PF0清洗后,将回收的微粒用1mL无核酸酶水清洗一次。使用显微镜目测检查微粒的质量和尺寸。示例性的9种微粒制剂示出在图4中(左侧为微量管中的各个微粒制剂的有色沉积物,中间的图像中示出了一组混合的9种不同微粒)。

[0493] 混杂前体微粒的功能化

[0494] 为了能够用分析物特异性组分装备混杂前体微粒,建立了一种灵活的结合化学。使用下述3步流程将链霉亲和素共价附连到微粒的混杂基质的含胺部分上。首先,使用SPDP试剂(NHS)酯的胺反应性部分并进行后续的还原步骤,将巯基添加到链霉亲和素。在第二步中,使用磺基-SMCC交联试剂将前体微粒的一部分氨基进行马来酰亚胺活化。最后,将活化的链霉亲和素和马来酰亚胺活化的混杂微粒偶联,产生具有多孔聚合物基质和试剂结合组分的纳米反应器前体。

[0495] 流程1:SPDP交联

[0496] 允许3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-羧基琥珀酰亚胺酯(N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯;SPDP;P3415,Sigma)交联剂的小瓶在打开前平衡到室温,以防止冷凝。对于链霉亲和素的SPDP修饰,使用与链霉亲和素相比2倍摩尔过量的SPDP。将SPDP溶解在50 μ L DMF中,给出0.23摩尔的SPDP溶液。也将300mg 15.8U/mg的链霉亲和素(SA10;Prozyme)溶解在10mL含有20mM NaCl的100mM磷酸钾缓冲液(pH 7.5中以制备30mg/mL溶液。将所述溶液以3000rpm离心,并将上清液保持在冰上用于进一步实验。将全部体积(50 μ L)的SPDP溶液添加到30mL链霉亲和素溶液,并允许反应在4 $^{\circ}$ C进行过夜。通过添加Tris至终浓度为100mM并在室温继续孵育30min,将反应淬灭。在后续步骤中,通过使用Vivacon 500超滤柱(100kDa MWC0)(Sartorius Stedim Biotech)以8000rpm离心15min,从链霉亲和素溶液中除去未反应的SPDP。舍弃穿流液,并用含有20mM NaCl的100mM磷酸钾缓冲液重复清洗5次。通过与2mM DTT在环境温度孵育30min,将活化的链霉亲和素还原。从而从修饰的链霉亲和素上除去吡啶-2-硫酮基团。

[0497] 流程2:明胶片段的马来酰亚胺活化(磺基-SMCC的偶联)

[0498] 允许新的一瓶4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸3-磺基-N-羧基马来酰亚胺酯钠盐(磺基-SMCC;M6035,Sigma)在打开之前充分平衡到环境温度。将含胺混杂微粒在不含胺的偶联缓冲液(磷酸钾,20mM NaCl pH 7.2)中清洗三次。在即将使用前,制备用于偶联的10mg/mL磺基-SMCC储用溶液。将足够的磺基-SMCC储用溶液添加到微粒溶液,以获得与可用氨基相比10倍摩尔过量的交联试剂(在B型明胶的情况下,预计明胶的10%的氨基酸带有游离氨基)。将50%(v/v)水凝胶微粒浆液与10mM磺基-SMCC孵育并立即置于冰上。使用

Multi-Rotator PTR-60 (Grant-bio) 在竖直模式下,允许反应在4℃和100rpm下进行过夜。通过添加Tris至终浓度为100mM然后在室温孵育30min,将反应淬灭。通过在偶联缓冲液中重复清洗并以1000rcf离心,来纯化马来酰亚胺活化的粒子。

[0499] 流程3:活化的蛋白质的偶联

[0500] 将马来酰亚胺活化的微粒和巯基修饰的链霉亲和素偶联。马来酰亚胺基团与巯基在pH 6.5-7.5下反应,以形成稳定的不可切割的硫醚键。

[0501] 通过添加2-巯基乙醇 (Sigma) 至终浓度为2mM并在1000rpm摇床中在RT孵育30min进行淬灭。使用N-(2-羟乙基) 马来酰亚胺 (Sigma) 以给出6mM的终浓度并在RT下孵育并混合,进行第二个淬灭步骤。结合能力使用生物素化的染料偶联物来确定。

[0502] 实施例2

[0503] 文库制备

[0504] 作为分析物特异性试剂的靶特异性引物与前体微粒的可逆附连

[0505] 每种荧光颜色标记的混杂水凝胶微粒能够特异性检测不同的感兴趣的靶。为了用与靶相容的引物集装备每个类别的微粒,将功能化的明胶/琼脂糖混杂微粒等分试样与脱硫生物素化的引物在单独的2.0mL微量离心管中孵育。所述寡核苷酸的脱硫生物素组成部分在温度升高时促进寡核苷酸从微粒的释放,并在后续的信号放大步骤中形成乳液。这使所述寡核苷酸可立即用于检测反应。

[0506] 因此,将前体微粒用无核酸酶水清洗一次,然后将微粒沉积物重悬浮在等量的无核酸酶水中以制造50%的微粒浆液。制备了不同标记的浆液等分试样,其中将50%微粒浆液的等分试样沉积下来。向一个微球沉积物添加等体积的每种靶特异性脱硫生物素标记的引物对(组分5-8)以获得50%的珠子浆液,每种引物的终浓度为200nM,从而指派特定的分析物特异性试剂。为了确保引物与混杂水凝胶基质的高效结合,将两种组分在20℃孵育15min,同时以1000rpm振摇。将微球用体积高五倍的无核酸酶水清洗三次,以除去未附连的引物。

[0507] 组分5:rpoB引物对(分析物特异性试剂1)

[0508] -0.2μM脱硫生物素标记的rpoB正义引物(5'-ATCAACATCCGGCCGGTGGTCGCC-3') SEQ ID NO:1 (Metabion International AG)

[0509] -0.2μM脱硫生物素标记的rpoB反义引物(5'-TCACGTGACAGACCGCCGGGC-3') SEQ ID NO:2 (Metabion International AG)

[0510] 组分6:IS6110引物对(分析物特异性试剂2)

[0511] -0.2μM脱硫生物素标记的IS6110正义引物(5'-CGCCGCTTCGGACCACCAGCAC-3') SEQ ID NO:3 (Metabion International AG)

[0512] -0.2μM脱硫生物素标记的IS6110反义引物(5'-GTGACAAAGGCCACGTAGGCGAACC-3') SEQ ID NO:4 (Metabion International AG)

[0513] 组分7:IS1081引物对(分析物特异性试剂3)

[0514] -0.2μM脱硫生物素标记的IS1081正义引物(5'-GCGCGGCAAGATCATCAATGTGGAG-3') SEQ ID NO:5 (Metabion International AG)

[0515] -0.2μM脱硫生物素标记的IS1081反义引物(5'-GCCACCGCGGGGAGTTTGTGC-3') SEQ ID NO:6 (Metabion International AG)

[0516] 组分8:atpD(内部对照)引物对(分析物特异性试剂4)

[0517] -0.2 μ M脱硫生物素标记的内部对照(Bac.globigii)正义引物(5'-GCGCGCAAGATCATCAATGTGGAG-3')SEQ ID NO:7(Metabion International AG)

[0518] -0.2 μ M脱硫生物素标记的内部对照(Bac.globigii)反义引物(5'-GCCACGCGGGGAGTTTGTCTG-3')SEQ ID NO:8(Metabion International AG)

[0519] 微粒文库的冻干

[0520] 可选地,将微球文库冻干以给出干燥的分析物/靶特异性微粒沉积物,用于长期储存。因此,将等量的所需靶特异性微粒移液在一起并使用涡旋振荡器充分混合。向所述微粒文库增补等体积的600mg/mL海藻糖溶液,以产生含有30%(w/v)海藻糖的微粒文库浆液。随后,在无RNase/DNase PCR排管中准备100 μ l的文库等分试样,以备冻干。赋形剂(例如海藻糖)的类型及其在冻干制剂中的浓度影响冷冻干燥的微粒在过程中的晚些时候暴露到洗脱液时溶胀的程度。

[0521] 在干冰上冷冻2h后,使用Alpha 2-4 LSCplus冷冻干燥机(Christ)将文库等分试样在真空下冷冻干燥(-25 $^{\circ}$ C和0.1mbar)。将样品留在冷冻干燥机中总共200min的时间。主要的干燥阶段在0.01mbar下保持3h,并从-25 $^{\circ}$ C至25 $^{\circ}$ C逐步提高温度。最终的干燥步骤在25 $^{\circ}$ C和0.05mbar下进行20min。最终产物是:

[0522] 组分9:冻干的纳米反应器文库

[0523] -包含用于在一个样品中平行检测rpoB、IS6110、IS1081和内部对照所需的靶特异性试剂。

[0524] 实施例3

[0525] 使用纳米反应器的分析物多路复用

[0526] 在下面的实施方式中,使用纳米反应器文库的靶特异性微粒将样品(洗脱液)封装在单分散悬液中。

[0527] 分析物和通用检测试剂向纳米反应器文库的装载

[0528] 用于纳米反应器内的分析物检测的通用试剂被提供为用衍生自上游样品制备过程的含有分析物的洗脱液重悬浮的冷冻干燥的沉积物提供。在这个实施例中,通过使用无核酸酶水中的rpoB、IS6110、IS1081和atpD的具有待扩增的靶序列(最初衍生自H37Rv DNA)的确定浓度的纯化的PCR产物来模拟真正的样品。

[0529] 将整个体积的不含模板分子或含有确定量靶分子的样品(100 μ l)在MTB(=结核分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis))阴性患者的痰液洗脱物中稀释,并添加到冻干的通用试剂沉积物(组分10)。通过简短的涡旋振荡步骤将所述试剂小心地重悬浮。同样,将整个体积的包括模板分子在内的通用试剂混合物添加到纳米反应器文库沉积物(组分9)。允许所述多孔微粒在环境温度和1000rpm振摇下吸收包括所有检测试剂和模板分子在内的整个液体15min。在这个过程中,四种模板在四种类型的试剂特异性纳米反应器之间随机分配。在后续的数字扩增步骤中,只有与纳米反应器的特异性试剂集匹配的模板可以被扩增并检测。因此,数字扩增中阳性事件的数目减少了n倍,其中n对应于纳米反应器文库中纳米反应器类型的数目。

[0530] 组分10由下述终浓度的物质组成

[0531] -PCR缓冲液:20mM Tris HCl,22mM KCl,22mM NH₄Cl,3mM MgCl₂

[0532] -0.2U/ μ l Hot Start Taq DNA聚合酶(biotechrabbit GmbH)

[0533] -0.4mM dNTPs(biotechrabbit GmbH)

[0534] -1 μ M **EvaGreen®**荧光DNA染色剂(JenaBioscience GmbH)或0.4 μ M TaqMan探针

[0535] -0.1% (w/v) 低生物负载、无蛋白酶、用于分子生物学的BSA(Sigma)

[0536] 装载的微粒的相转移

[0537] 通过将微粒分散在组分11中将纳米反应器文库转移到非水性相中,以防止靶特异性反应之间的串扰。使用1.5mL微量离心管将全部水性相(100 μ L)与过量的组分11(500 μ L)进行接触。施加高剪切力以将水性微粒在氟代烃油中解聚并乳化成单个纳米反应器。通过使用Sonifier™ S-450和Ultrasonics Sonifier™ Cup Horn(Branson)施加超声波或通过将管以大约20/s的频率在微量离心管架的孔上简单地滑动20次并同时管压紧在架表面上,来搅拌所述混合物。这施加机械应力并破坏水性微粒之间的吸引力并产生表面张力,从而形成悬液/乳液。所述水凝胶微粒和过量的水性相两者都在油相中乳化。通过将新鲜悬液清洗三次并温和地离心(400rcf),来消除作为副产物产生的亚微米级液滴。用相同的油(组分11)重复清洗除去了基本上所有不想要的液滴。组分11还产生了所述悬液的有效热稳定性,用于后续的数字乳液/悬液PCR。

[0538] 组分11:相转移和信号放大油

[0539] -HFE-7500氟代烃油(3M Deutschland GmbH)

[0540] 添加有

[0541] -2-5% (v/v) PicoSurf(Dolomite Microfluidics)或2-5% (v/v) FluoSurf(Emulseo)

[0542] 微粒模板化反应空间中的平行数字PCR扩增反应

[0543] 将含有封装的样品的单分散悬液转移到面积约为2.5cm²并且层厚度为100 μ m的检测区室中。所述区室的检测窗由0.8mm聚碳酸酯(Makrolon 6555;Covestro AG)制成,而所述区室的相反一侧由抛光且未改性的透明125微米聚碳酸酯(Lexan 8010)薄膜(Koenig Kunststoff GmbH)构成,便于单个纳升反应所需的高效热传递。由于反应区室的维度,迫使悬浮在氟代烃油中的纳米反应器形成单层。因此,微胶囊为后续的平行信号放大反应提供了大约20000-30000个纳米反应器(5000-7500/靶)的间隔平均的阵列。

[0544] 使用改良的PELTIER元件30x30x4.7mm,19.3W(Quick-Ohm,Küpper&Co.GmbH,#QC-71-1.4-3.7M)和已建立的区室特异性PCR控制模式,对微粒进行超快温度循环。使用的热条件是:在95℃初始变性30s,然后是30-45个循环的两步PCR,其由95℃变性1s和64℃退火/延长4s构成。由于其溶胶-凝胶切换能力,所述悬液变成了含有单个纳升液滴的乳液。此外,当一开始加热至95℃时,微粒从明胶基质释放脱硫生物素结合的靶特异性寡核苷酸,使它可用于PCR。各个靶的多路扩增在得到的纳米反应腔室中发生。

[0545] 自动图像采集由BLINK工具箱软件触发,并使用装备有5x物镜(视野为4.416mm x 2.774mm)和pE-4000(CoolLED Ltd.)光源的荧光显微镜(Zeiss AxioObserver)完成。所述显微镜还装备有三个荧光滤光片组(Cy5ET、Cy3 ET、FITC/FAM HC,AHF Analysentechnik)和安装有带有反应区室的热循环仪的自动x-y台。

[0546] 图像采集设置如下:100-1000ms,增益为1-10x。标记物识别需要两个图像($\lambda_{exc 1}$ = 550nm, $\lambda_{exc 2}$ = 650nm),特异性PCR信号需要一个图像($\lambda_{exc 3}$ = 470nm)。对于可选的纳

米反应器特异性实时分析,在热循环流程的每个退火步骤结束时,在所述区室的一个位置处可以获取对应于三个荧光通道的三张图像。

[0547] 在热流程完成后,使用相同的设备在上述设置下扫描整个检测区室。使用前面概述的设置,总共需要30个图像来覆盖扩增/检测区室的尺寸。图7A示出了三个荧光通道的相同区域的图像,其中通道1和2代表标记物比率,编码了伴随微粒提供的分析物特异性试剂,通道3示出了具有阴性(暗)和阳性(亮)扩增信号的微粒。右侧的图示出了在通道1和2中为每种微粒获得的荧光信号的散点图。可以清楚地识别四种不同的微粒种类。可选地,将纳米反应器从50°C-90°C进行逐步升温(2°C/步)以分析扩增产物的DNA解链行为,以便确定特异性程度或鉴定例如SNP。通过在每个温度步骤获取荧光图像来监测DNA应变变性和相关的荧光信号衰减。

[0548] 微粒的解码和多路分析

[0549] 所有获取的图像都经历自动多面图像处理算法。所述方法采用利用最大稳定极值区域(MSER)的图像分割,从基于MSER的图像分割结果检测相邻的液滴。详细地,首先对图像进行涉及中值过滤的预处理。其次,将MSER算法应用于图像背景以确定背景轮廓的凸转点及其Delaunay三角剖分,以识别液滴/微粒之间的适当切割。此外,使用MSER算法对液滴/微粒进行分割。最后,对液滴/微粒轮廓进行合理性检查(对比度、形状、凸度)。随后收集所有分割的液滴/微粒的特点,包括每个通道中的荧光信号、位置、直径/体积等。将实验数据应用于Jupyter脚本,识别各个标记物(荧光染料Cy3和Cy5的组合)及其相应的特异性扩增和熔解曲线信号。

[0550] 下述的数据读出是可能的:

[0551] a) 终点分析(数字读出)

[0552] 将PCR扩增至终点,并由此为每个单独标记物确定荧光阳性和阴性液滴的总数。阳性液滴含有特定靶的至少1个拷贝,因此显示出高于定义的强度阈值的荧光信号增加。所述阈值衍生自先前进行的没有模板的扩增反应。每个标记的靶的液滴数字PCR数据在一维或二维图中查看。所述软件首先对每个纳米反应器体积的阴性和阳性分数进行聚类,然后将阳性液滴分数拟合到泊松算法,以确定靶DNA分子的初始浓度,以拷贝/mL输入物为单位。由于上述测定是4重反应,因此液滴根据添加的模板浓度聚类成不同的组:

[0553] a) 标记物组分1(1:0比例的Cy3和Cy5),检测信号(EvaGreen/探针)阴性

[0554] b) 标记物组分1(1:0比例的Cy3和Cy5),检测信号(EvaGreen/探针)阳性

[0555] c) 标记物组分2(3:1比例的Cy3和Cy5),检测信号(EvaGreen/探针)阴性

[0556] d) 标记物组分2(3:1比例的Cy3和Cy5),检测信号(EvaGreen/探针)阳性

[0557] e) 标记物组分3(1:3比例的Cy3和Cy5),检测信号(EvaGreen/探针)阴性

[0558] f) 标记物组分3(1:3比例的Cy3和Cy5),检测信号(EvaGreen/探针)阳性

[0559] g) 标记物组分4(0:1比例的Cy3和Cy5),检测信号(EvaGreen/探针)阴性

[0560] h) 标记物组分4(0:1比例的Cy3和Cy5),检测信号(EvaGreen/探针)阳性

[0561] 在图7B中示出了带有相应标记物组分的每种微粒的这种一维图。对于类型0和3,阳性微粒明显有别于阴性微粒,而类型2和3仅显示出阴性微粒。样品中的计算靶浓度示出在图7B中的表中。

[0562] b) 实时分析

[0563] 通过PCR的所有循环中跟踪每个靶特异性纳米反应器的平均像素强度,为单个纳米反应器生成实时荧光曲线。它们表现出PCR的典型的指数、线性和平台阶段,与在微升规模反应中观察到的相当。使用Levenberg-Marquardt算法对所有纳米反应器进行S型和线性拟合。(改变PCR与pre-PCR的阈值标准来消除曲线。负和消除实时曲线是生成一条荧光周期曲线,并且如果在后荧光周期中确定。假假(蒸发纳米反应器,人工制品)被识别并排除在分析之外。使用上升(PCR后相对于PCR前的荧光变化)判据来消除难以置信的曲线。产生阴性和阳性实时曲线,并且如果是阳性的则确定循环阈值。鉴定出假阳性(蒸发的纳米反应器,假象)并将它们排除在分析之外。

[0564] 文献:

[0565] Adler,M.,R.Wacker和C.M.Niemeyer(2003),用于蛋白质的常规超灵敏定量的实时免疫PCR测定法(A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins),Biochem Biophys Res Commun 308(2):240-250.

[0566] Birtwell,S.和H.Morgan(2009),用于高通量多路悬液测定法的微粒编码技术(Microparticle encoding technologies for high-throughput multiplexed suspension assays),Integr Biol (Camb) 1(5-6):345-362.

[0567] Fulton,R.J.,R.L.McDade,P.L.Smith,L.J.Kienker和J.R.Kettman,Jr.(1997),使用FlowMetrix系统的高级多路分析(Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system),Clin Chem 43(9):1749-1756.

[0568] Leng,X.,W.Zhang,C.Wang,L.Cui和C.J.Yang(2010),用于高度平行且高效的单分子乳液PCR的琼脂糖液滴微流体装置(Agarose droplet microfluidics for highly parallel and efficient single molecule emulsion PCR),Lab Chip 10(21):2841-2843.

[0569] Mandecki,W.,B.Ardelt,T.Coradetti,H.Davidowitz,J.A.Flint,Z.Huang,W.M.Kopacka,X.Lin,Z.Wang和Z.Darzynkiewicz(2006),微型转发器这种在细胞毒性测定中作为细胞生长的平台的小型RFID电子芯片,(Microtransponders,the miniature RFID electronic chips,as platforms for cell growth in cytotoxicity assays),Cytometry Part A 69A(11):1097-1105.

[0570] Rissin,D.M.,C.W.Kan,T.G.Campbell,S.C.Howes,D.R.Fournier,L.Song,T.Piech,P.P.Patel,L.Chang,A.J.Rivnak,E.P.Ferrell,J.D.Randall,G.K.Provuncher,D.R.Walt和D.C.Duffy(2010),单分子酶联免疫吸附测定法检测亚飞摩尔浓度的血清蛋白(Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations),Nature Biotechnology 28:595-599.

[0571] Tekin,H.C.和M.A.Gijs(2013),超灵敏蛋白质检测:基于微流体磁珠的测定法的案例(Ultrasensitive protein detection:a case for microfluidic magnetic bead-based assays),Lab Chip 13(24):4711-4739.

[0572] Todd,J.,B.Freese,A.Lu,D.Held,J.Morey,R.Livingston和P.Goix(2007),使用单分子计数的超灵敏的基于流动的免疫测定法(Ultrasensitive Flow-based Immunoassays Using Single-Molecule Counting).

[0573] Wilson,R.,A.R.Cossins和D.G.Spiller(2006),用于高通量多路检测的编码的微

载体 (Encoded microcarriers for high-throughput multiplexed detection), Angew Chem Int Ed Engl 45 (37) :6104-6117.

序列表

<110> 布林克公司

<120> 预制微粒及其前体的文库

<130> AJ4799PT2203

<150> EP19216596.7

<151> 2019-12-16

<160> 8

<170> BiSSAP 1.3.2

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 脱硫生物素标记的rpoB正义引物

<400> 1

atcaacatcc ggccggtggt cgcc 24

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 脱硫生物素标记的rpoB反义引物

<400> 2

tcacgtgaca gaccgccggg c 21

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 脱硫生物素标记的IS6110正义引物

<400> 3

cgccgcttcg gaccaccagc ac 22

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 脱硫生物素标记的IS6110反义引物

<400> 4
gtgacaaagg ccacgtaggc gaacc 25
<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 脱硫生物素标记的IS1081正义引物
<400> 5
gcgcggcaag atcatcaatg tggag 25
<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 脱硫生物素标记的IS1081反义引物
<400> 6
gccaccgcgg ggagtttgtc g 21
<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 脱硫生物素标记的内部标准(Bac. globigii)正义引物
<400> 7
gcgcggcaag atcatcaatg tggag 25
<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 脱硫生物素标记的内部标准(Bac. globigii)反义引物
<400> 8
gccaccgcgg ggagtttgtc g 21

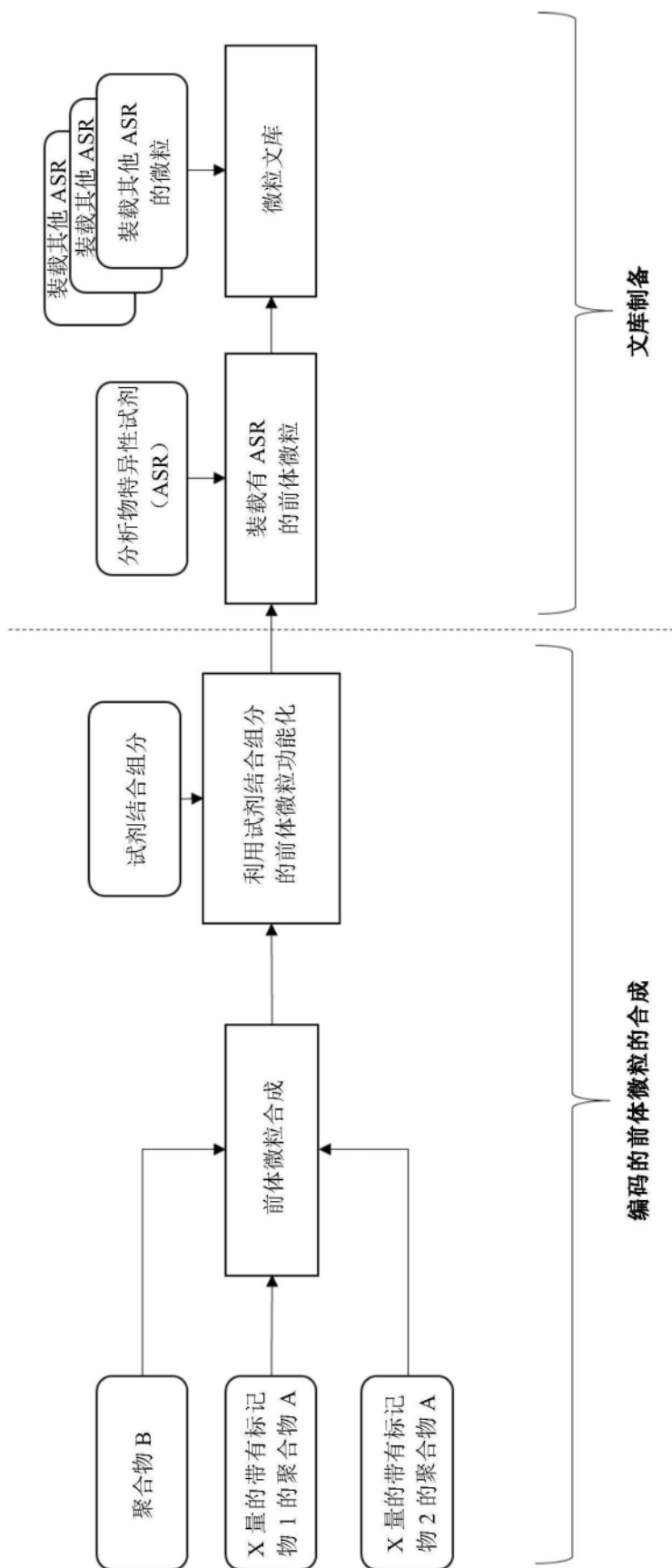


图1

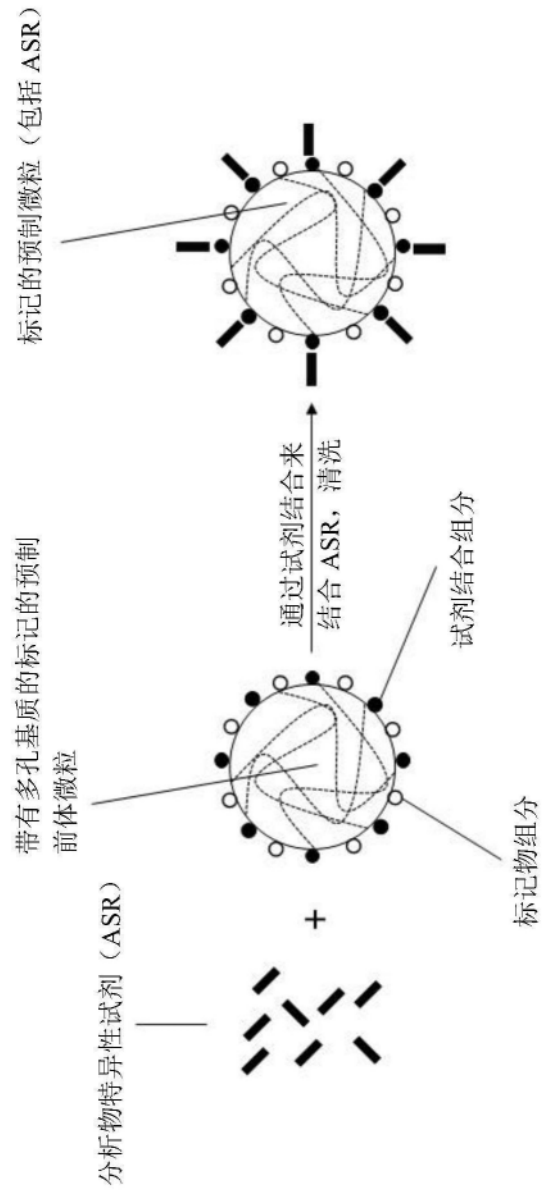


图2

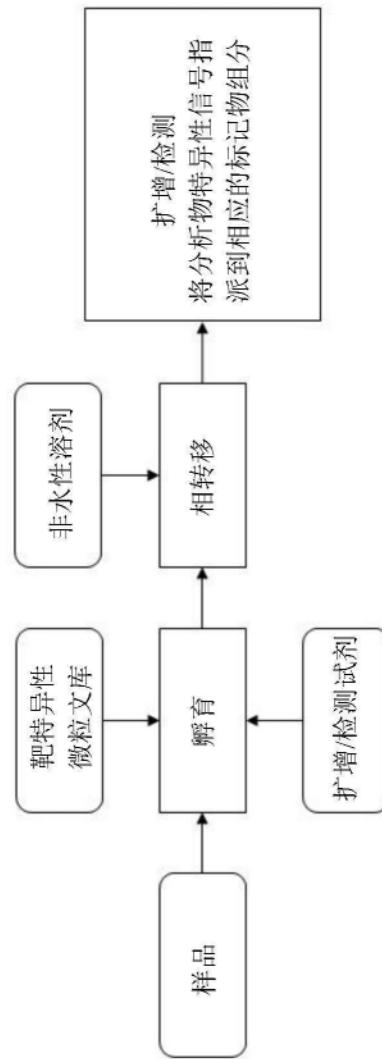


图3A

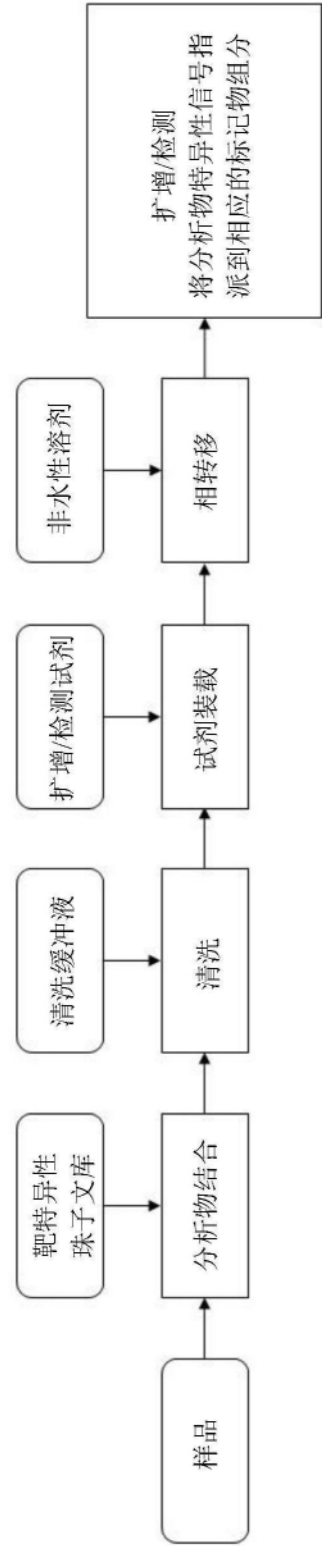


图3B

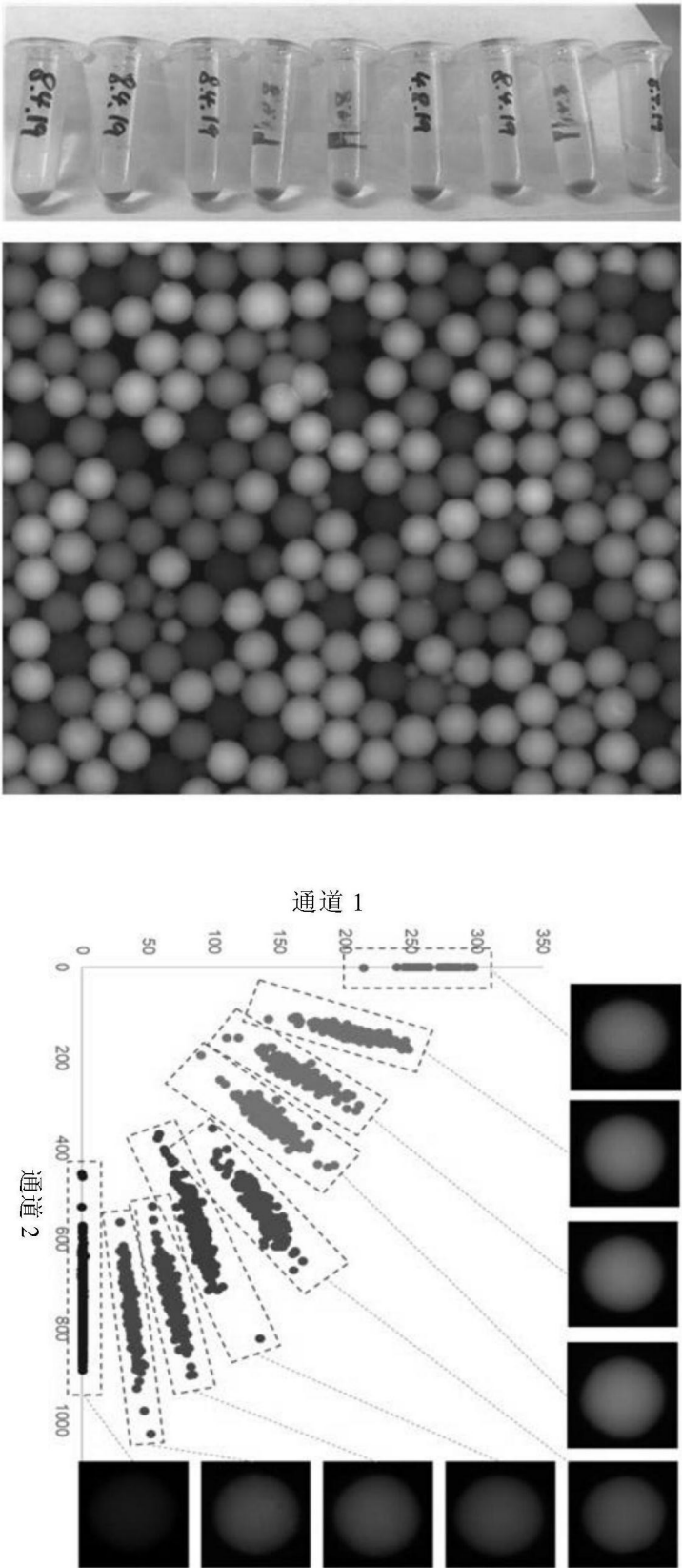


图4

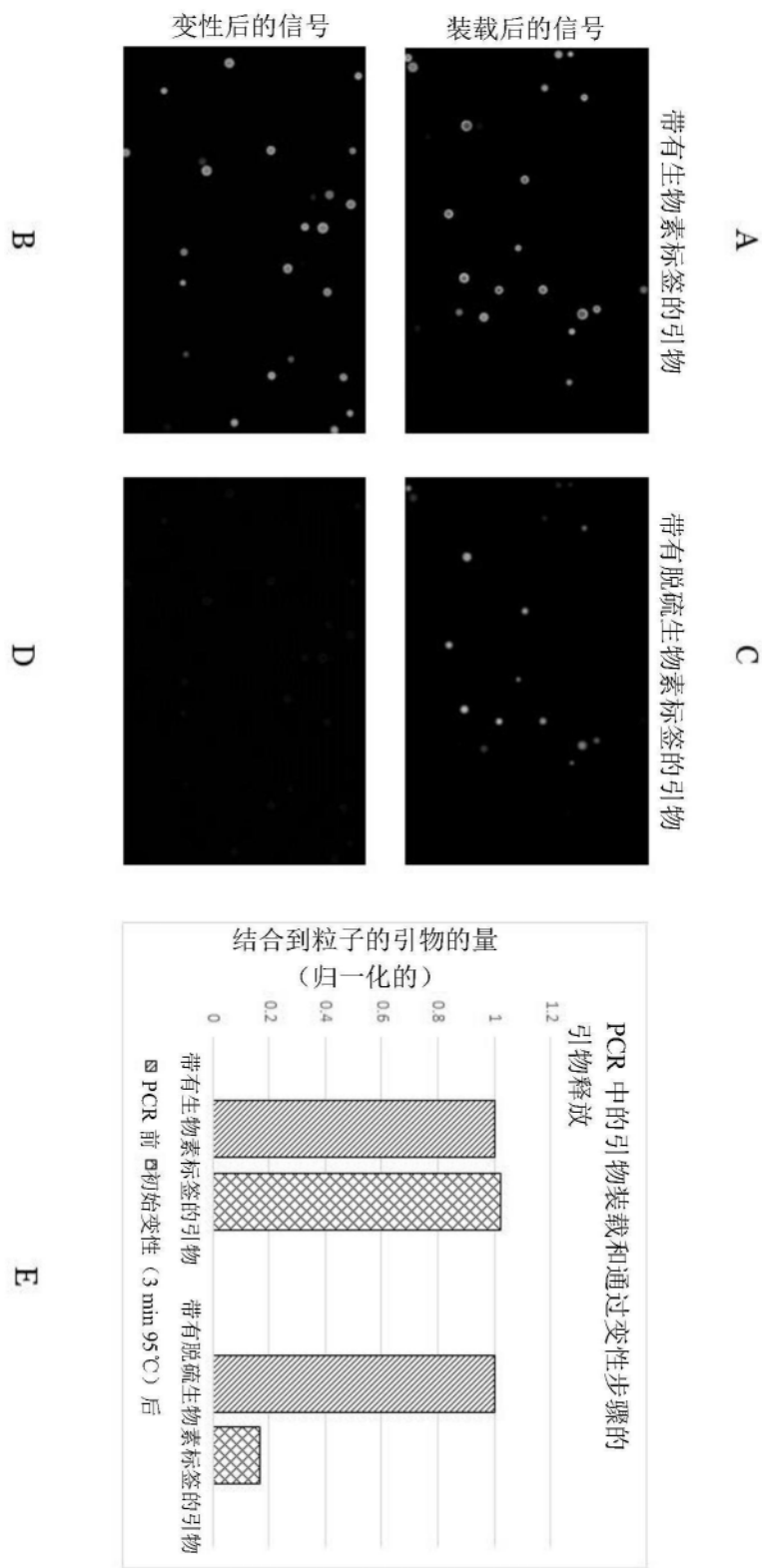


图5

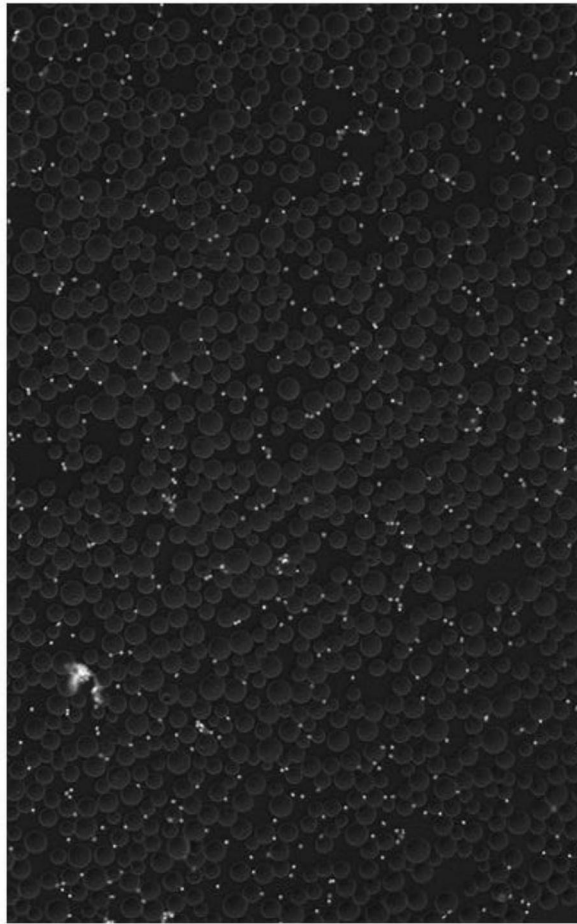


图6

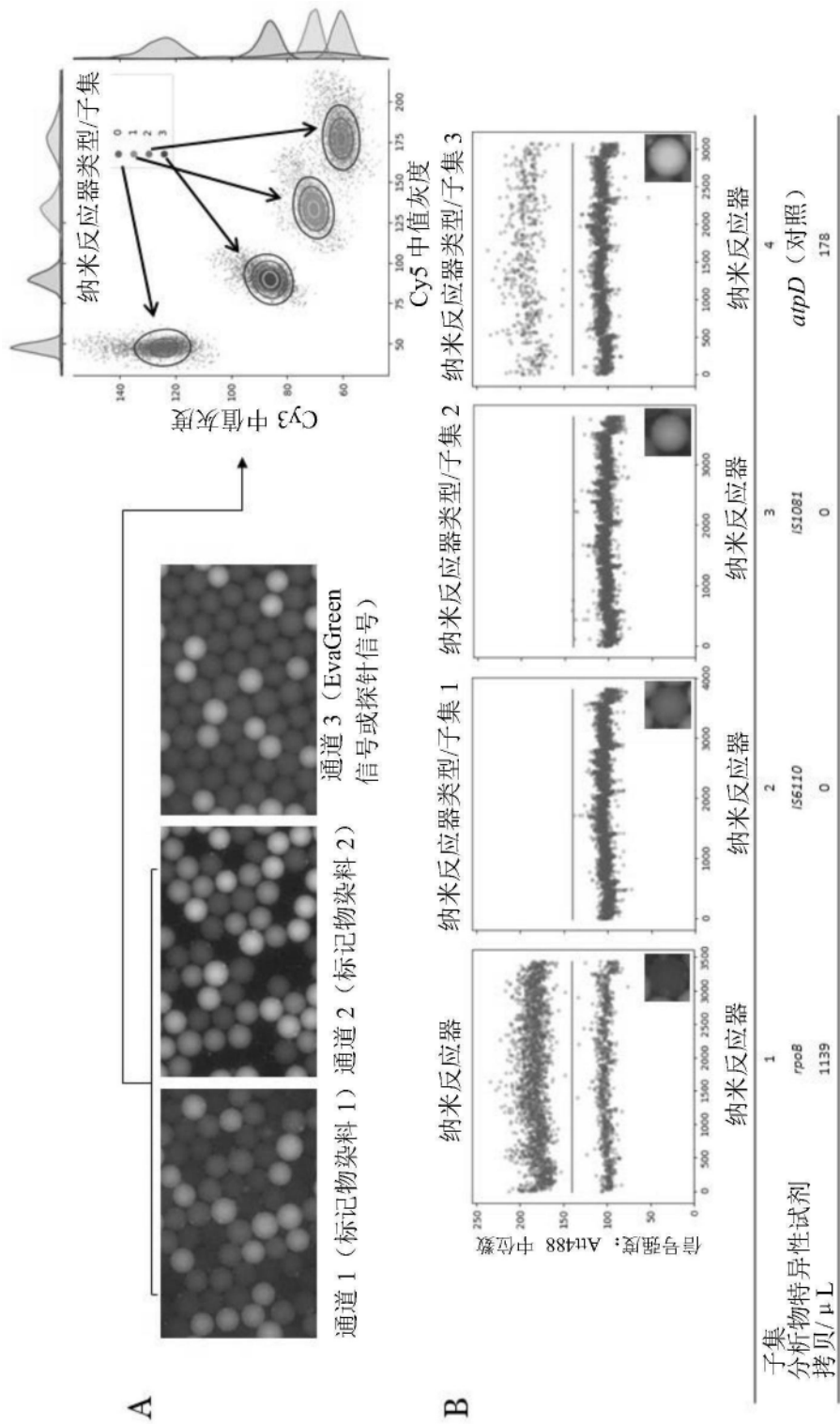


图7

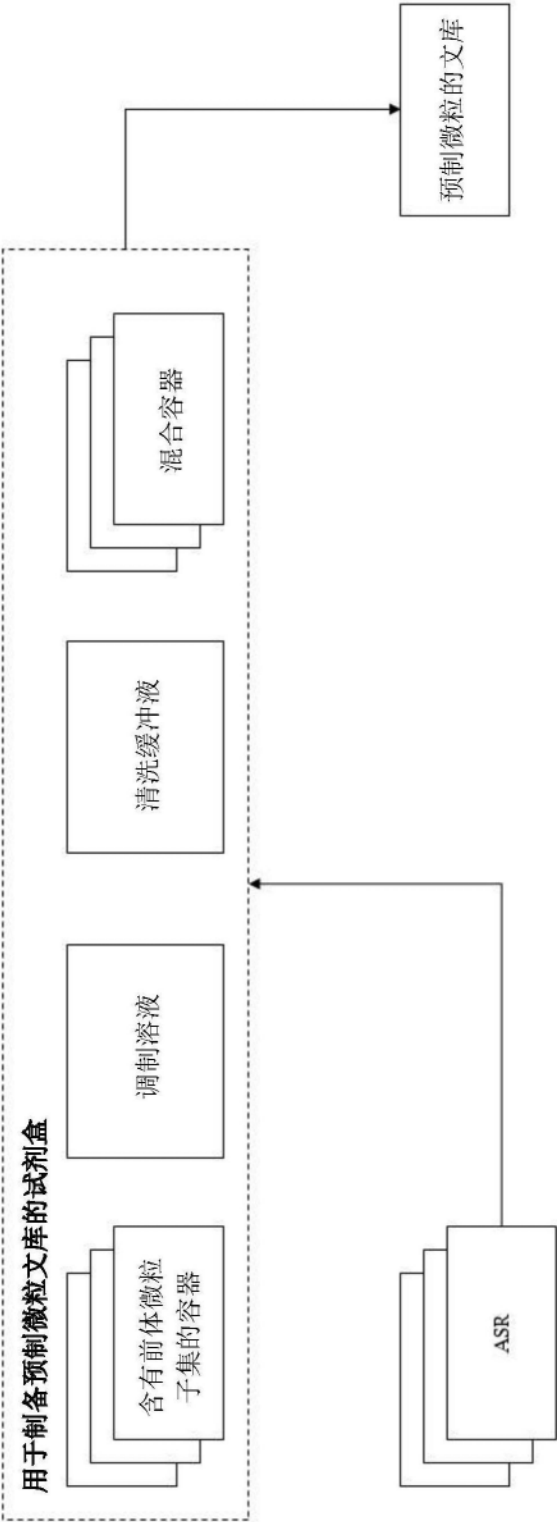


图8

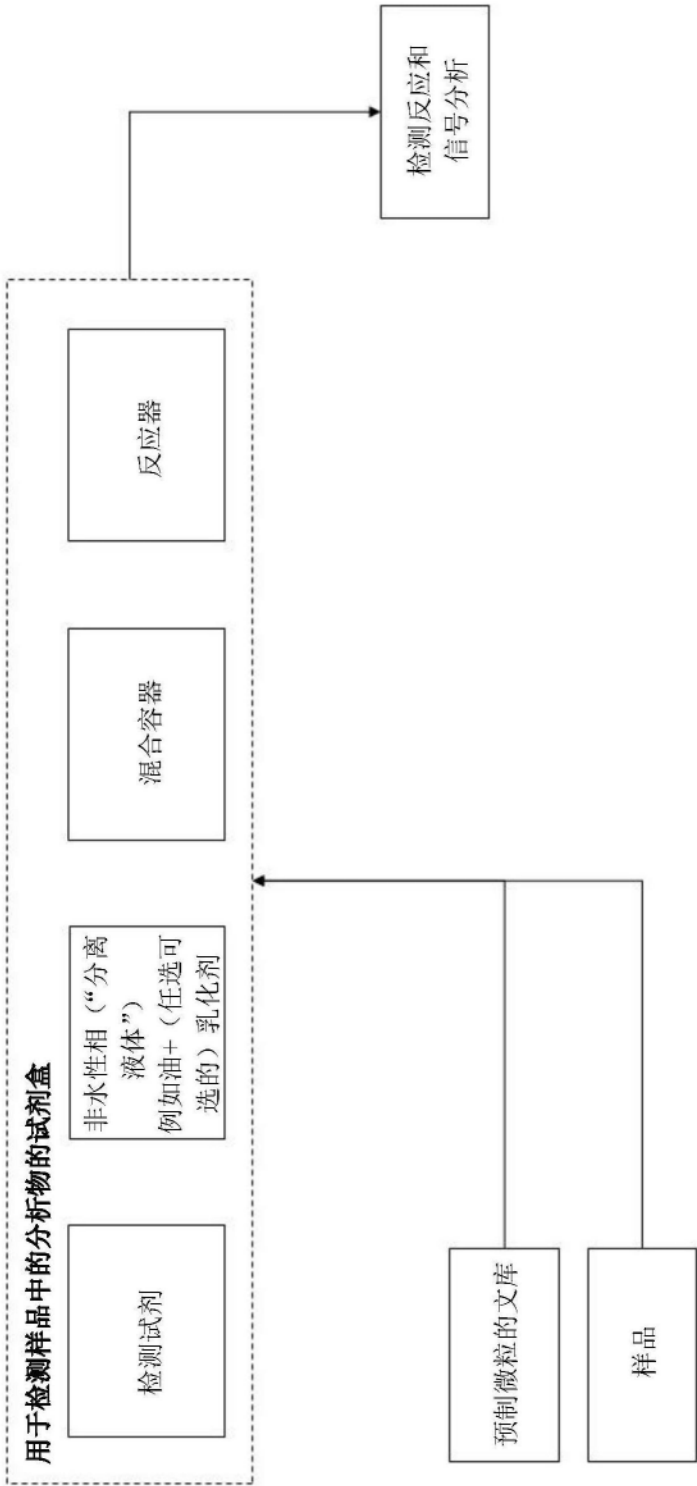


图9

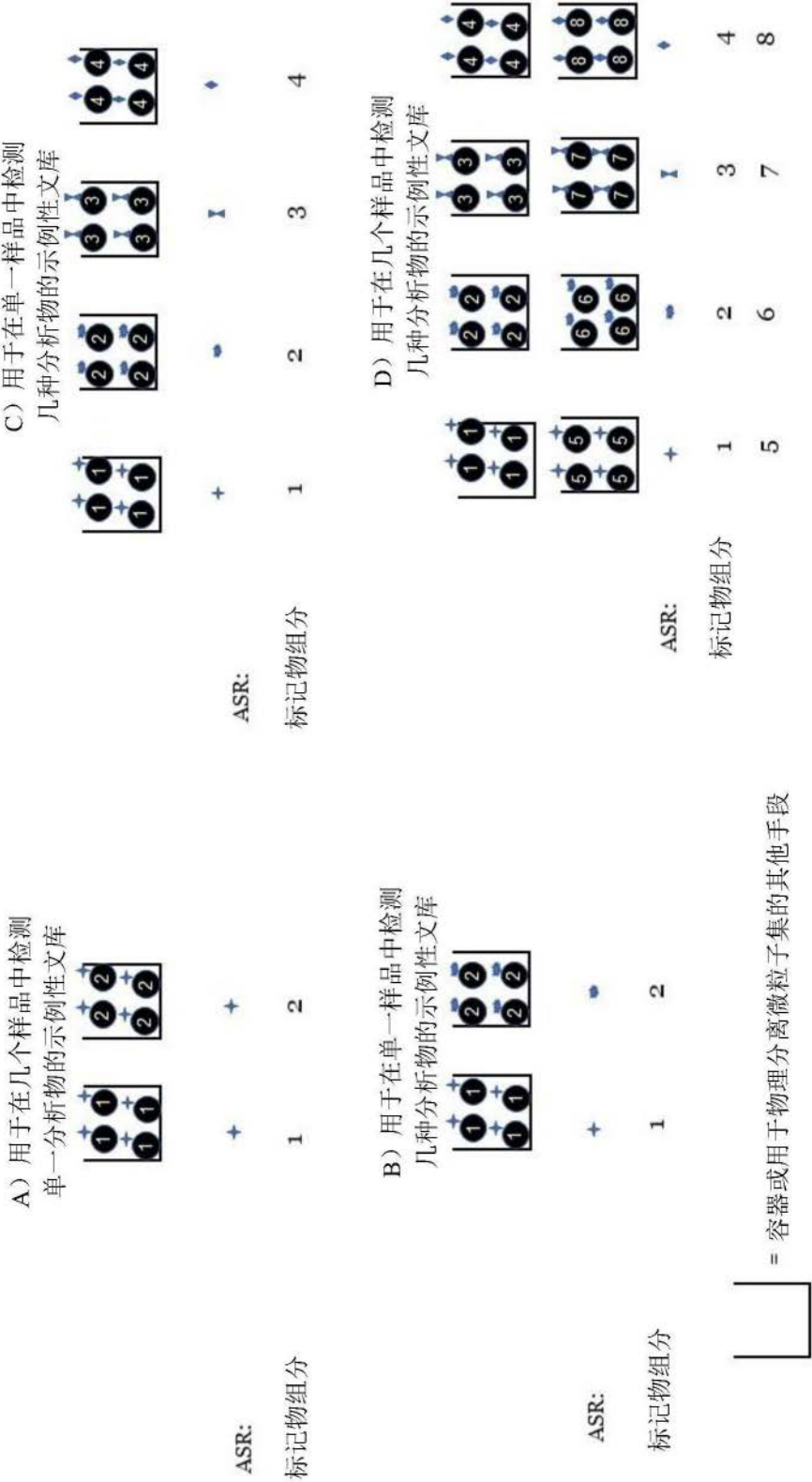


图10A) -D)

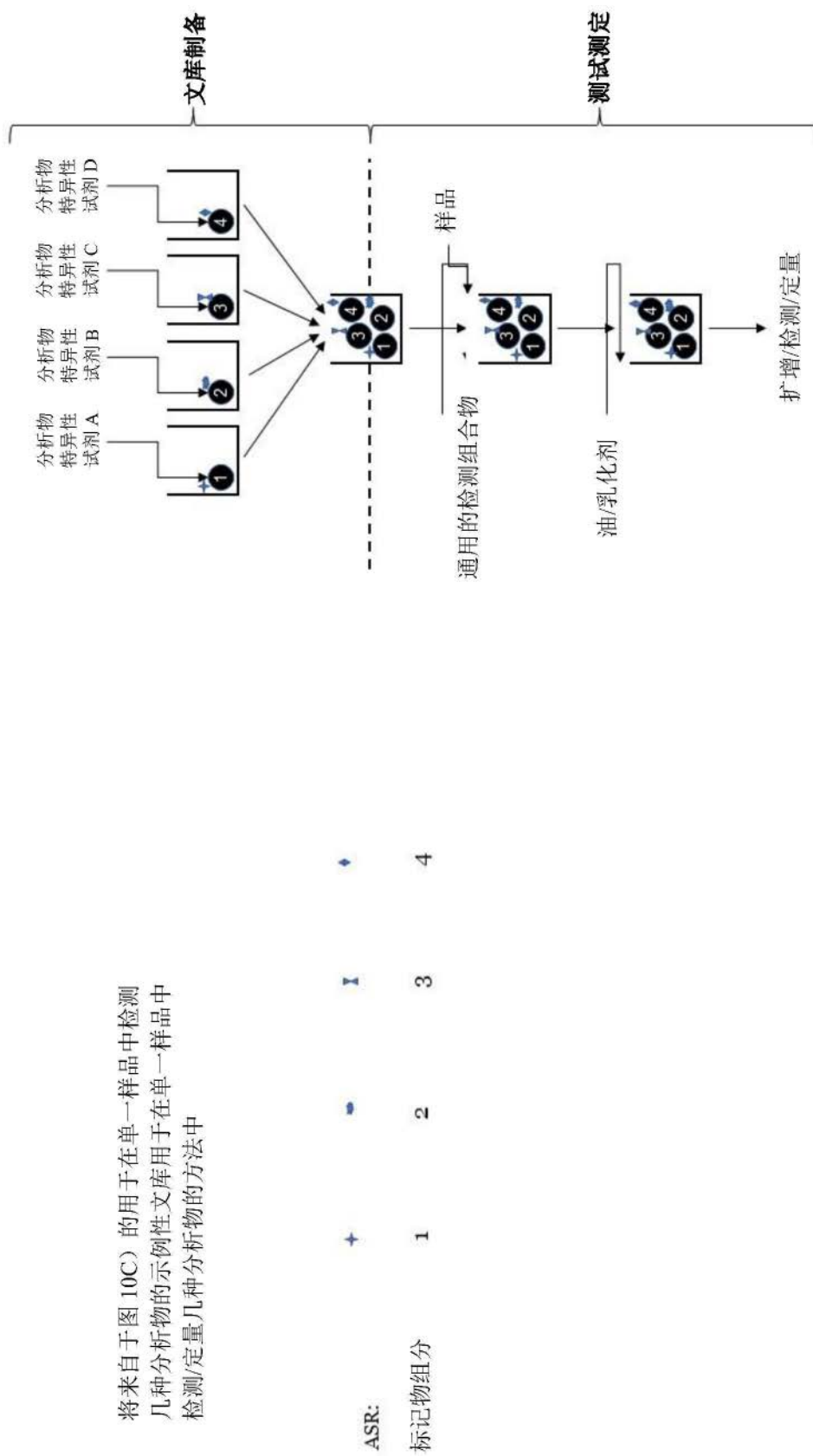


图10E)

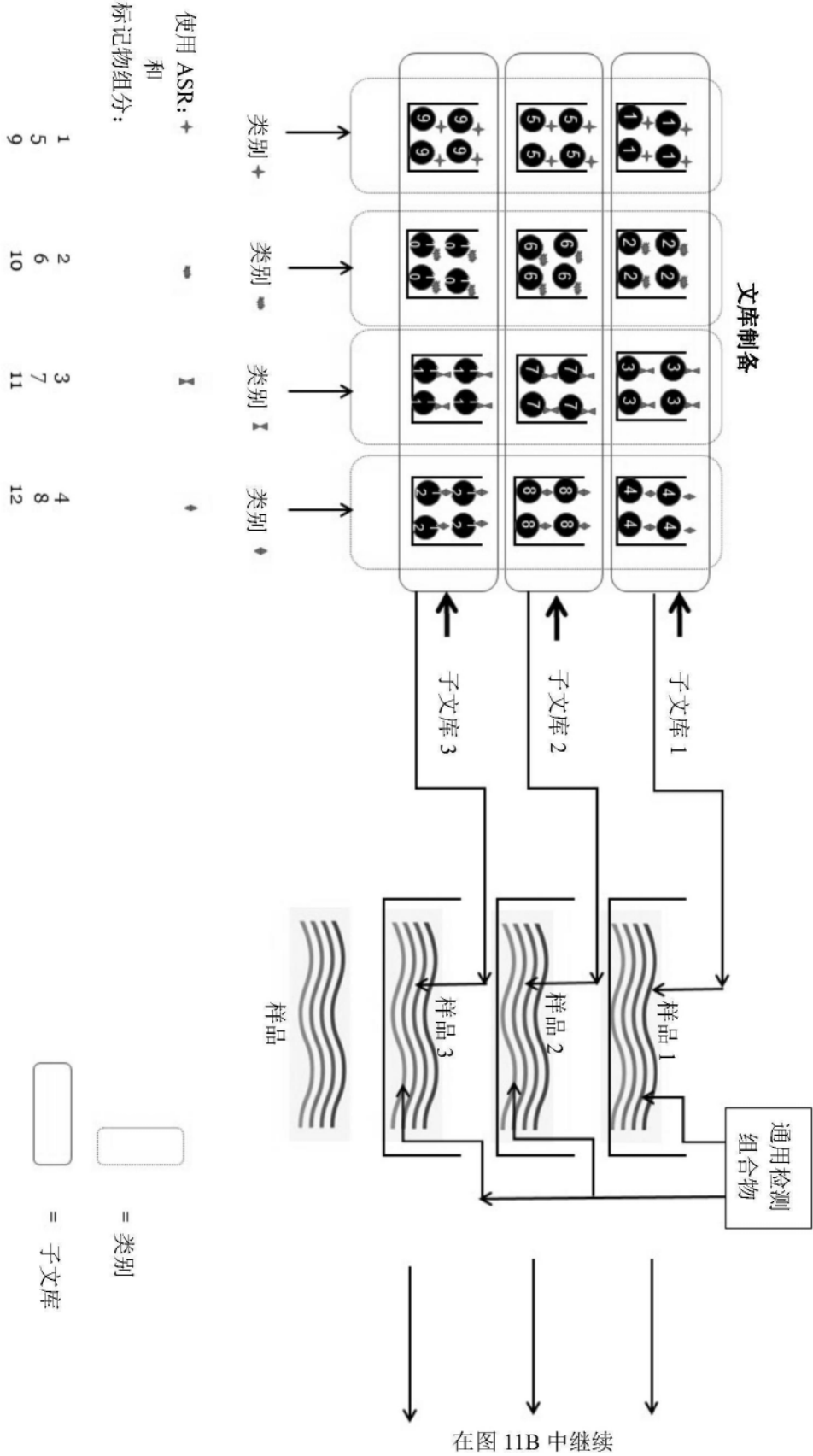


图11A

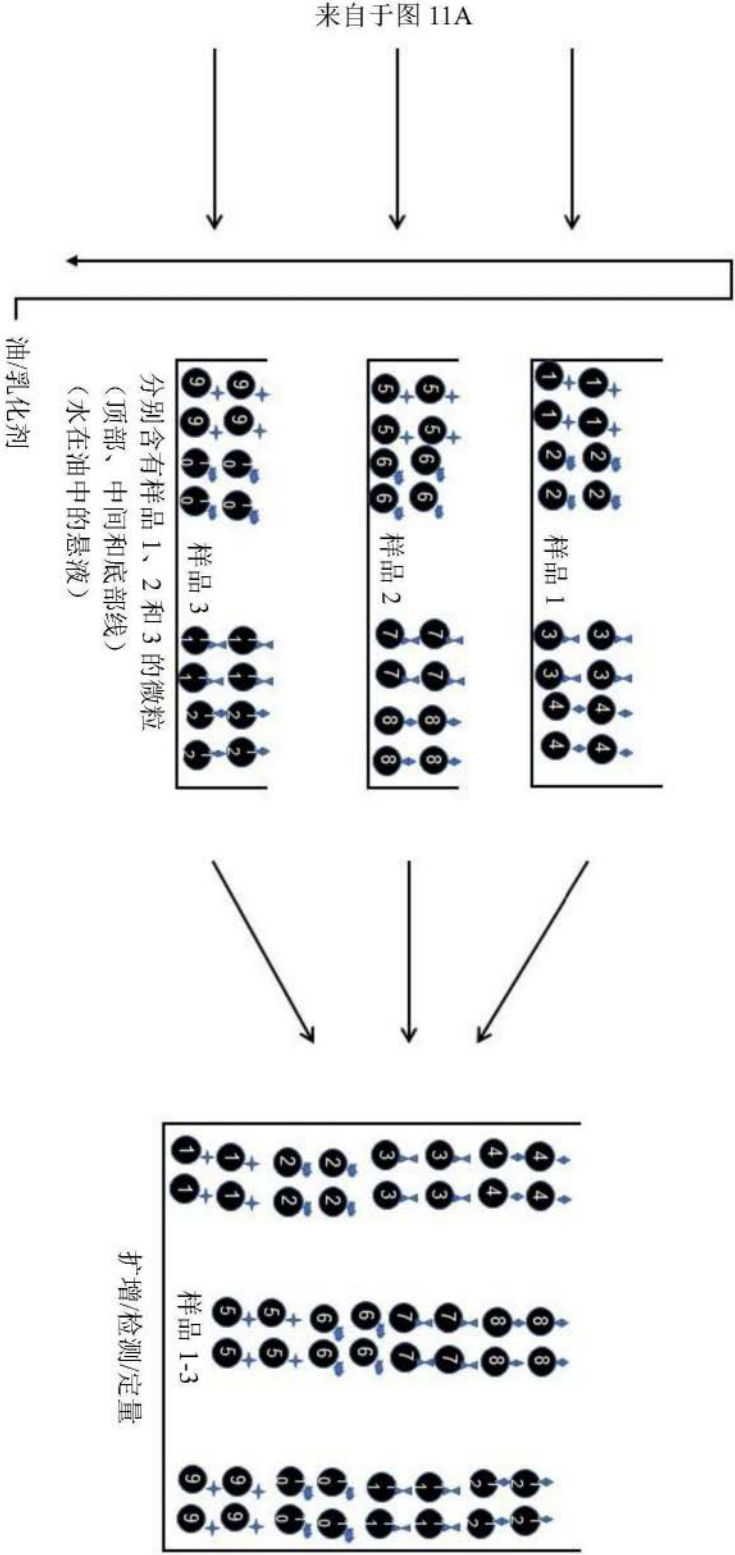


图11B

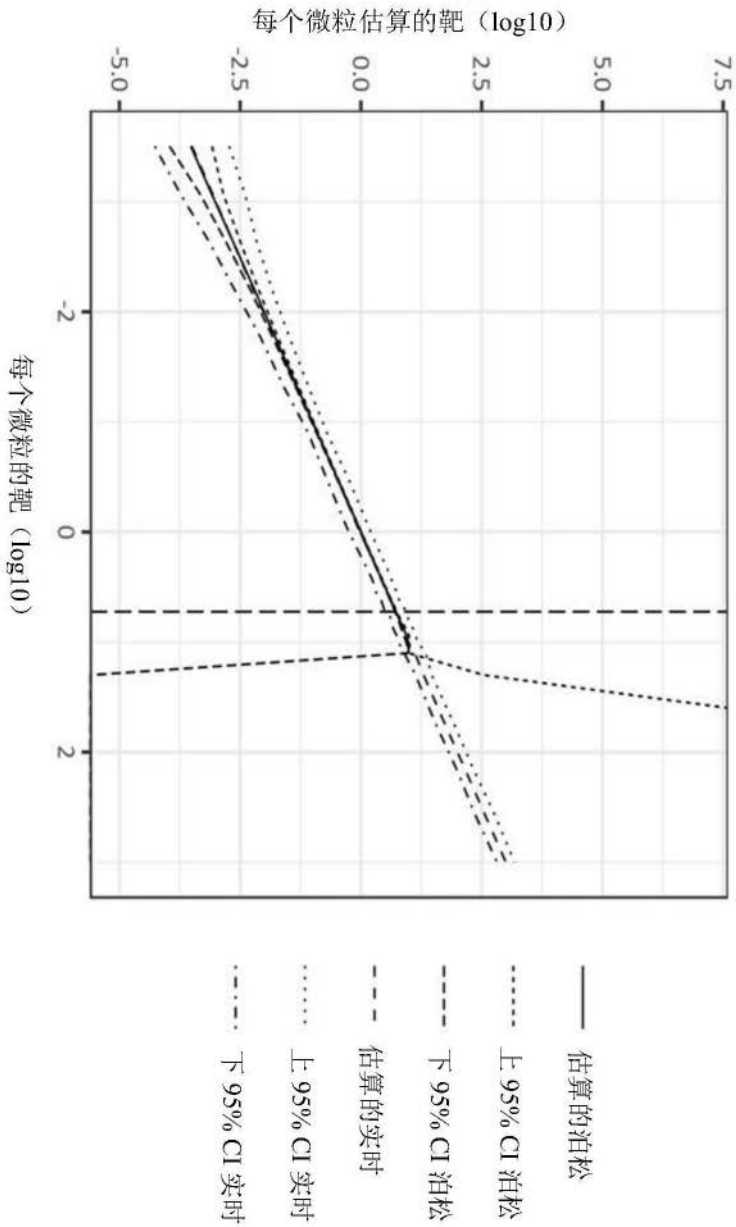


图12

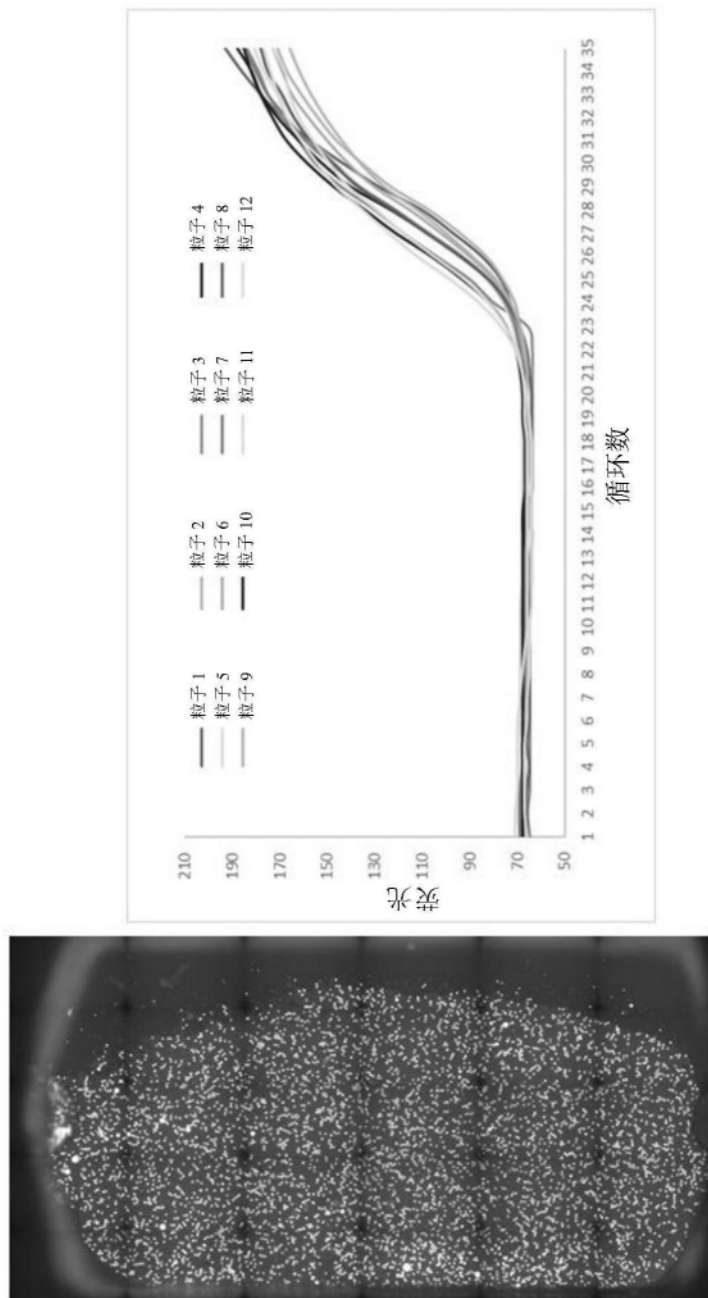


图13

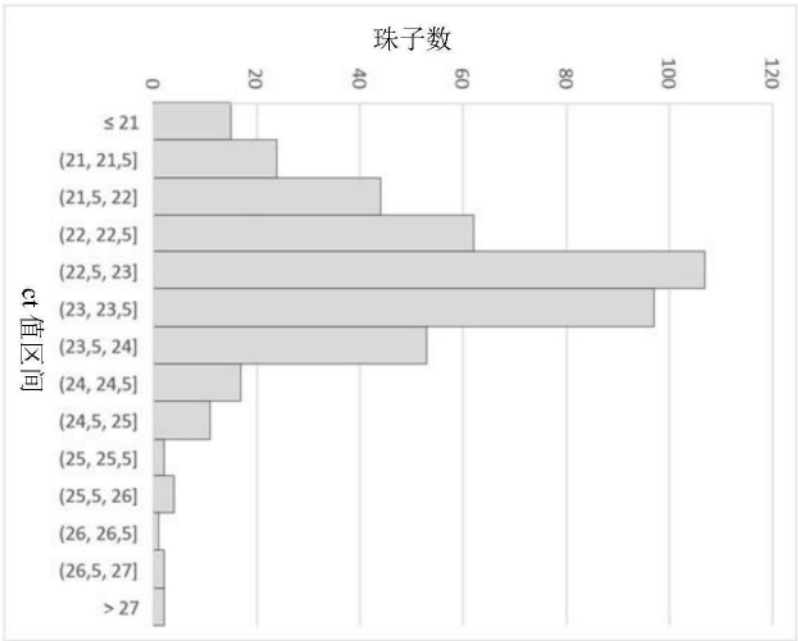


图13 (续)