(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102016552 A
(43)申请公布日 2011.04.13

(21)申请号 200980116372.8
(22)申请日 2009.03.04
(30)优先权数据
61/033,897 2008.03.05 US
61/038,714 2008.03.21 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.11.05
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2009/036086 2009.03.04
(87)PCT申请的公布数据
WO2009/126380 EN 2009.10.15
(71)申请人 神谷来克斯公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 菲利普·J·戈伊克斯
罗伯特·普斯卡斯 约翰·托德
理查德·A·利文斯顿
道格拉斯·赫尔德 萨拉·阿吉
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 刘蕾 沙捷
(51)Int.Cl.
G01N 21/64(2006.01)
G01N 33/58(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 148 页 附图 37 页

(54)发明名称

用于分子的高灵敏性检测的方法和组合物

(57)摘要

本发明公开了使用高灵敏性分子检测来检测和监测受试对象中的病况的方法。本发明提供了检测或监测受试对象中的病况的方法，所述方法包括检测来自该受试对象的第一样品中的第一标记物和检测第二标记物，其中所述第一标记物包括如心脏肌钙蛋白-I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)等生物标记物，且其中所述第一标记物的检出限小于约10pg/ml。第二标记物可以为生物标记物、生理学标记物、分子标记物或遗传标记物。

CN 102016552 A

1. 一种检测或监测受试对象中的病况的方法，所述方法包括检测来自所述受试对象的第一样品中的第一标记物和检测第二标记物，其中所述第一标记物包含心脏肌钙蛋白 -I(cTnI) 或血管内皮生长因子 (VEGF)，且其中所述第一标记物的检出限小于约 20pg/ml。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中对至少一个标记物的检测包括使所述样品与用于所述标记物的标记接触并检测所述标记的存在或缺失，其中检测到所述标记的存在表明相应的标记物的存在。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述标记包含荧光部分，且其中所述检测包括使所述标记通过单分子检测器，其中所述单分子检测器包含 ：

(a) 用于刺激所述荧光部分的电磁辐射源 ；

(b) 用于接收从所述电磁源发出的电磁辐射的巡查空间 ；和

(c) 与所述询查空间可操作地连接的电磁辐射检测器，该检测器用于确定受到刺激的荧光部分的电磁特性。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述第一标记物的检出限为约 10pg/ml ～约 0.01pg/ml。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中检出限的变差系数 (CV) 为约 20％～约 1％。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述样品的大小为约 10μl ～约 0.1μl。

7. 如权利要求 1 所述的方法，还包括将所述第一样品分为两个或更多个等分样品，并在所述两个或更多个等分样品中检测至少一个标记物。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述样品包括血浆、血清、细胞溶解产物或组织样品。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述第二标记物包括生物标记物、生理学标记物或遗传标记物。

10. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述第二标记物包括蛋白。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其中所述第一标记物与所述第二标记物中的至少一个以小于 10pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。

12. 如权利要求 10 所述的方法，其中所述第二标记物的检出限为约 20pg/ml ～约 0.01pg/ml。

13. 如权利要求 10 所述的方法，其中所述第二标记物包括 B 型利钠肽、IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-8、IL-10、TNF-α、IFN-γ、cTnI、VEGF、胰岛素、GLP-1(活性)、GLP-1(完全)、TREM1、白细胞三烯 E4、Akt1、Aβ-40、Aβ-42、Fas 配体或 PSA。

14. 如权利要求 10 所述的方法，其中所述第二标记物是细胞因子。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其中所述细胞因子是 G-CSF、MIP-1α、IL-10、IL-22、IL-8、IL-5、IL-21、INF-γ、IL-15、IL-6、TNF-α、IL-7、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-1α、IL-12、IL-17α、IL-1β、MCP、IL-32 或 RANTES。

16. 如权利要求 14 所述的方法，其中所述细胞因子是 IL-10、IL-8、INF-γ、IL-6、TNF-α、IL-7、IL-1α 或 IL-1β。

17. 如权利要求 10 所述的方法，其中所述第二标记物包括载脂蛋白、缺血修饰白蛋白

(IMA)、纤连蛋白、C 反应蛋白 (CRP)、B 型利钠肽 (BNP) 或髓过氧化物酶 (MPO)。

18. 如权利要求 1 所述的方法，还包括测定第一标记物的浓度，和在第二标记物包含蛋白时测定第二标记物的浓度。

19. 如权利要求 1 所述的方法，还包括在第二标记物包含蛋白时测定第一标记物浓度与第二标记物浓度之比。

20. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述第二标记物包含生理学标记物。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其中所述生理学标记物包括心电图 (EKG)、压力测试、核成像、超声、胰岛素耐受性、体重指标、血压、年龄、性别或睡眠窒息。

22. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述第二标记物包含分子标记物。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述分子标记物包括胆固醇、LDL/HDL/Q-LDL、甘油三酯、尿酸、肌酐、血葡萄糖或维生素 D。

24. 如权利要求 22 所述的方法，其中分子标记物包括 LDL/HDL/Q-LDL 或甘油三酯的细分组分。

25. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述第二标记物包含遗传标记物。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其中所述遗传标记物包括编码载脂蛋白的基因中的变异体。

27. 如权利要求 26 所述的方法，其中所述载脂蛋白是 ApoE。

28. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述病况包括心脏损伤、炎性疾病、增生性病症、代谢病症、血管生成、动脉粥样硬化或糖尿病。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其中所述心脏损伤包括心肌梗塞、坏死、心脏机能受损、不稳定心绞痛、斑块、心脏衰竭、冠状动脉疾病或风湿性心脏病。

30. 如权利要求 28 所述的方法，其中所述增生性病症包括癌症。

31. 如权利要求 30 所述的方法，其中所述癌症包括乳腺癌、前列腺癌或淋巴瘤。

32. 如权利要求 18 所述的方法，还包括确定来自受试对象的第一样品和第二样品之间的标记物浓度变化，由此将所述变化用于检测或监测病况。

33. 如权利要求 19 所述的方法，还包括确定来自受试对象的第一样品和第二样品之间的第一标记物与第二标记物的浓度比的变化，由此将所述变化用于检测或监测病况。

34. 如权利要求 32 或 33 所述的方法，其中在从受试对象获取第一样品和获取第二样品之间执行医疗程序。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述医疗程序包括手术程序、压力测试或治疗性干预。

36. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述监测包括监测疾病进程、疾病复发、风险评估、治疗效力或手术效力。

37. 一种检测样品中的单分子的方法，所述方法包括：

(a) 当在样品中存在颗粒时用标记对该颗粒进行标记；和

(b) 检测所述标记的存在或缺失，其中检测到所述标记的存在表明在样品中存在所述单颗粒；

其中所述单颗粒的检出限小于 20pg/ml；且

其中所述单颗粒包括心脏肌钙蛋白 I(cTnI)、B 型利钠肽 (BNP、proBNP 或

NT-proBNP)、TREM-1、白细胞介素 1α(IL-1α)、白细胞介素 1β(IL-1β)、白细胞介素 4(IL-4)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)、白细胞介素 10(IL-10)、干扰素 γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、胰高血糖素样肽 1(GLP-1)、白细胞三烯 E4(LTE4)、转化生长因子 β(TGFβ)、Akt1、Aβ-40、Aβ-42、Fas 配体(FasL)或血管内皮生长因子(VEGF)的单分子、片段或复合物。

38. 如权利要求 37 所述的方法，其中所述单颗粒的检出限为约 10pg/ml ～约 0.01pg/ml。

39. 一种包含组合物的试剂盒，所述组合物包含针对两种或更多种生物标记物的两种或更多种抗体，其中所述两种或更多种抗体与荧光染料部分相连，其中所述两种或更多种生物标记物包含如权利要求 37 所述的颗粒，其中所述部分在受到在所述部分激发波长处发光的激光刺激时能够发射至少约 200 个光子，其中所述激光聚焦于包含所述部分的直径不小于约 5 微米的光斑上，并且其中由所述激光导向该光斑的总能量不大于约 3 微焦，其中所述组合物被包装在合适的包装内。

用于分子的高灵敏性检测的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2008年3月5日提交的题为“Methods and Compositions for Highly Sensitive Detection of Molecules”的美国临时申请第61/033,897号和于2008年3月21日提交的题为“Ultrasensitive Assays and Methods of Use for the Detection VEGF”的美国临时申请第61/038,714号的优先权权益；本文通过引用并入这两个申请的全部内容。

背景技术

[0003] 生物医学研究、医学诊断、预后、监测和治疗选择、生物恐怖检测和其它涉及分析物的多个低体积、低浓度样品的分析的领域中的进展已经导致了能灵敏地检测在不断降低的浓度的样品中的颗粒的样品分析系统的发展。美国专利第4,793,705和5,209,834号描述了此前的实现极为灵敏的检测的系统。本发明提供了该领域中的进一步进展。

发明内容

[0004] 在一个实施方式中，本发明提供了一种用于检测或监测受试对象的病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品中的第一标记物并检测第二标记物，其中第一标记物包含心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)，且其中第一标记物的检出限小于约20pg/ml。在某些实施方式中，对至少一个标记物的检测包括使样品与标记物的标记接触并检测该标记的存在或缺失，其中检测到标记存在表明相应的标记物的存在。在某些实施方式中，所述标记包含荧光部分，并且所述检测包括使标记通过单分子检测器，其中所述单分子检测器包括：(a)用于刺激荧光部分的电磁辐射源；(b)用于接收从电磁源发出的电磁辐射的询查空间；和(c)与所述巡查空间可操作地连接的电磁辐射检测器，该检测器用于确定受激荧光部分的电磁特性。

[0005] 在某些实施方式中，第一标记物的检出限为约10pg/ml～约0.01pg/ml。在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约10pg/ml。在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约5pg/ml。在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约1pg/ml。在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约0.5pg/ml。在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约0.1pg/ml。在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约0.05pg/ml。在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约0.01pg/ml。在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约0.005pg/ml。在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约0.001pg/ml。在某些实施方式中，检出限变差系数(coefficient of variation)(CV)为约20％～约1％。在某些实施方式中，检出限变差系数(CV)为约100％～约1％。在某些实施方式中，检出限变差系数(CV)为约75％～约1％。在某些实施方式中，检出限变差系数(CV)为约50％～约1％。在某些实施方式中，检出限变差系数(CV)为约25％～约1％。在某些实施方式中，检出限变差系数(CV)为约20％～约1％。在某些实施方式中，检出限变差系数(CV)为约15％～约1％。在某些实施方式中，检出限变差系数(CV)为约10％～约1％。在某些实施方式中，检出限变差系数(CV)为约5％～

约 1％。 在某些实施方式中，样品尺寸为约 10μl～约 0.1μl。 在某些实施方式中，样品尺寸为约 100μl～约 0.1μl。 在某些实施方式中，样品尺寸为约 75μl～约 0.1μl。 在某些实施方式中，样品尺寸为约 50μl～约 0.1μl。 在某些实施方式中，样品尺寸为约 25μl～约 0.1μl。 在某些实施方式中，样品尺寸为约 20μl～约 0.1μl。 在某些实施方式中，样品尺寸为约 5μl～约 0.1μl。 在某些实施方式中，样品尺寸为约 1μl～约 0.1μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 100μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 75μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 50μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 25μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 20μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 15μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 10μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 5μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 2μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 1μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 0.5μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 0.1μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 0.05μl。 在某些实施方式中，样品尺寸小于约 0.01μl。

[0006] 在某些实施方式中，所述方法还包括将第一样品分为两个以上的等分样品并在这两个以上的等分样品种检测至少一个标记物。 在某些实施方式中，样品包括血浆、血清、细胞溶解产物或组织样品。 在某些实施方式中、样品包含支气管肺泡灌洗液(BAL)、血液、血清、血浆、尿液、鼻拭子、脑脊液、胸腔积液、滑膜液、腹膜液、羊水、胃液、淋巴液、组织间液、组织匀浆、细胞提取物、唾液、痰液、粪便、生理分泌物、眼泪、粘液、汗液、乳汁、精液、精液、阴道分泌物、来自溃疡和其它表面疹的液体、水泡液和脓肿、以及组织提取物（包括正常的、恶性的和怀疑的组织或身体的任何其它可能含有所关注的靶标颗粒的组成部分的活组织检查）。如细胞或组织培养物或培养液等其它类似样本也是所关注的。

[0007] 在某些实施方式中，第二标记物包括生物标记物、生理学标记物或遗传标记物。 在某些实施方式中，第二标记物包括蛋白。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 10pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 100pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 75pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 50pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 25pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 20pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 15pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 10pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 5pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 2pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 1pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 0.5pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某

些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 0.1pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 0.05pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。 在某些实施方式中，第一标记物与第二标记物中的至少一个以小于 0.01pg/ml 的浓度见于来自正常个体的样品中。

[0008] 在某些实施方式中，第二标记物的检出限为约 10pg/ml ～约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 10pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 5pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 1pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.5pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.1pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.05pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.005pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.001pg/ml。

[0009] 在某些实施方式中，第二标记物包含 B 型利钠肽、 IL-1α 、 IL-1β 、 IL-6、 IL-8、 IL-10、 TNF-α 、 IFN-γ 、 cTnI、 VEGF、胰岛素、 GLP-1（活性）、 GLP-1（完全）、 TREM1、白三烯 E4、 Akt1、 Aβ-40、 Aβ-42、 Fas 配体或 PSA。 在某些实施方式中，第二标记物是细胞因子。 在某些实施方式中，细胞因子是 G-CSF、 MIP-1α 、 IL-10、 IL-22、 IL-8、 IL-5、 IL-21、 INF-γ 、 IL-15、 IL-6、 TNF-α 、 IL-7、 GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-1α 、IL-12、IL-17α 、IL-1β 、MCP、IL-32 或 RANTES。在某些实施方式中，细胞因子是 IL-10、IL-8、INF-γ 、IL-6、TNF-α 、IL-7、IL-1α 或 IL-1β 。 在某些实施方式中，第二标记物包括载脂蛋白、缺血修饰白蛋白 (IMA)、纤连蛋白、C 反应蛋白 (CRP)、B 型利钠肽 (BNP) 或髓过氧化物酶 (MPO)。

[0010] 在某些实施方式中，本发明的方法还包括确定第一标记物的浓度并且如果第二标记物包含蛋白则确定第二标记物的浓度。 在某些实施方式中，本发明的方法包括如果第二标记物包含蛋白则确定第一标记物浓度相比于第二标记物浓度的比值。

[0011] 在某些实施方式中，第二标记物包含生理学标记物。 在某些实施方式中，生理学标记物包含心电图 (EKG)、压力测试、核成像、超声、胰岛素耐受性、体重指标、血压、年龄、性别或睡眠窒息。

[0012] 在某些实施方式中，第二标记物包含分子标记物。 在某些实施方式中，分子标记物包含胆固醇、 LDL/HDL/Q-LDL、甘油三酯、尿酸、肌酐、血葡萄糖或维生素 D。 在某些实施方式中，分子标记物包含 LDL/HDL/Q-LDL 或甘油三酯的细分组分 (subfraction)。

[0013] 在某些实施方式中，第二标记物包含遗传标记物。 在某些实施方式中，遗传标记物包含编码如 ApoE 等载脂蛋白的基因中的变异。 在某些实施方式中，遗传标记物包含单核苷酸多态性 (SNP)。 在某些实施方式中，遗传标记物包括插入、缺失、融合或其它突变。 在某些实施方式中，遗传标记物包含表观遗传标记物，例如 DNA 甲基化或印记 (imprinting)。

[0014] 在本发明的方法的某些实施方式中，病况包括心脏损伤、炎性疾病、增生性病症、代谢病症、血管生成、动脉粥样硬化或糖尿病。 在某些实施方式中，心脏损伤包括心肌梗塞、坏死、心脏机能受损、不稳定心绞痛、斑块、心脏衰竭、冠状动脉疾病或风

湿性心脏病。 在某些实施方式中，增生性病症包括癌症。 在某些实施方式中，癌症包括乳腺癌、前列腺癌或淋巴瘤。

[0015] 在某些实施方式中，本发明的方法还包括确定来自受试对象的第一样品和第二样品之间的标记物浓度变化，由此将此变化用于检测或监测病况。 在某些实施方式中，本发明的方法还包括确定来自受试对象的第一样品和第二样品之间的第一标记物与第二标记物的浓度比值的变化，由此将此变化用于检测或监测病况。 在某些实施方式中，在从受试对象获取第一样品和获取第二样品之间执行医疗程序。 在某些实施方式中，医疗程序包括手术程序、压力测试或治疗性干预。 在某些实施方式中，将来自受试对象的一系列样品用于检测或检测病况。 在某些实施方式中，随时间进行收集系列样品并评估该系列样品中的浓度变化。

[0016] 在某些实施方式中，本发明所述监测包括检测疾病进程、疾病复发、风险评估、治疗效力或手术效力。

[0017] 在一个实施方式中，本发明提供了用于检测样品中的单颗粒的方法，所述方法包括：(a) 如果样品中存在颗粒则用标记对该颗粒进行标记；和 (b) 检测所述标记的存在或缺失，其中检测到所述标记的存在表明样品中存在所述单颗粒；其中所述单颗粒的检出限小于 20pg/ml；且其中所述单颗粒包括心脏肌钙蛋白 I(cTnI)、B 型利钠肽 (BNP、proBNP 或 NT-proBNP)、TREM-1、白细胞介素 1α (IL-1α)，白细胞介素 1β (IL-1β)、白细胞介素 4(IL-4)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)、白细胞介素 10(IL-10)、白细胞介素 γ (IFN-γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、胰高血糖素样肽 1(GLP-1)、白细胞三烯 E4(LTE4)、转化生长因子 β (TGFβ)、Akt1、Aβ-40、Aβ-42、Fas 配体 (FasL) 或血管内皮生长因子 (VEGF) 的单分子、片段或复合物。 在某些实施方式中，单颗粒的检出限为约 10pg/ml ～约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，单颗粒的检出限小于约 10pg/ml。 在某些实施方式中，单颗粒的检出限小于约 5pg/ml。 在某些实施方式中，单颗粒的检出限小于约 1pg/ml。 在某些实施方式中，单颗粒的检出限小于约 0.5pg/ml。 在某些实施方式中，单颗粒的检出限小于约 0.1pg/ml。 在某些实施方式中，单颗粒的检出限小于约 0.05pg/ml。 在某些实施方式中，单颗粒的检出限小于约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，单颗粒的检出限小于约 0.005pg/ml。 在某些实施方式中，单颗粒的检出限小于约 0.001pg/ml。

[0018] 在某些实施方式中，本发明提供了包含含有两种或更多种的针对两种或更多种生物标记物的抗体的组合物的试剂盒，其中所述两种或更多种抗体与荧光染料部分相连，其中所述两种或更多种生物标记物包含如上所述的颗粒，其中所述荧光部分在受到在所述荧光部分的激发波长处发光的激光刺激时能够发射至少约 200 个光子，其中所述激光聚焦于包含所述荧光部分的直径不小于约 5 微米的光斑上，并且其中由所述激光导向该光斑的总能量不大于约 3 微焦，其中所述组合物被包装在合适的包装内。

[0019] 参考引用

[0020] 本文通过参考并入本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请，其程度等同于具体并个别地指明将每个单独的出版物、专利或专利申请通过参考并入。

附图说明

[0021] 在所附权利要求中具体描述了本发明的新颖特点。通过参考对其中利用本发明的原理的说明性实施方式进行描述的以下具体描述以及附图将获得对本发明的特点和优点的更好的理解，在所述附图中：

[0022] 图 1A 和 1B 说明了单颗粒分析器的组件的布置的示意图。图 1A 显示了包含一个电磁源和一个电磁检测器的分析器；图 1B 显示了包含两个电磁源和一个电磁检测器的分析器。

[0023] 图 2A 和 2B 说明了单颗粒分析器用毛细管流动池的示意图。图 2A 显示了包含一个电磁源的分析器的流动池；图 2B 显示了包含两个电磁源的分析器的流动池。

[0024] 图 3A 和 3B 说明了显示单颗粒分析器的激光和检测器光学器件的常规 (A) 和共聚焦 (B) 安置的示意图。图 3A 显示了具有一个电磁源和一个电磁检测器的分析器的布置；图 3B 显示了具有两个电磁源和一个电磁检测器的分析器的布置。

[0025] 图 4 说明了多标记物检测或病况监测的流程图。

[0026] 图 5 说明了其中客户端工作站接收来自远程计算机的测试结果的计算机系统。

[0027] 图 6 说明了用于范围浓度的 cTnI 的线性化标准曲线。

[0028] 图 7A 是说明在 0.1pg/ml ～ 0.2pg/ml 的 LoD 时的 100μl 样品和 50μl 样品的 cTnI 的分析灵敏度的图。图 7B 是说明标准曲线信号的下端的图。

[0029] 图 8 说明了在相应的变差系数 (CV) 为 10％时，由第 99 百分比值确立的在 cTnI 浓度为 7pg/ml 时 cTnI 的生物学阈值（截留浓度）。

[0030] 图 9 说明了使用本发明的分析器系统确定的 cTnI 测试结果与由国家标准和技术局 (NIST) 提供的标准测定值之间的相关性 ($R^2 = 0.9999$)。

[0031] 图 10 说明了在来自在急诊室呈现胸痛的患者的系列血清样品的 cTnI 检测。将用本发明的分析器系统进行的测定与用商购测试进行的测定进行了比较。

[0032] 图 11 说明了 cTnI 的正常生物学浓度分布和来自呈现胸痛的患者的血清样品中的 cTnI 浓度的分布。

[0033] 图 12 说明了 LTE4 竞争曲线。LOD 被确定为 1.5pg/ml LTE4。

[0034] 图 13 说明了显示 Akt1 浓度的标准曲线的图。LOD 经计算为 25pg/ml Akt1。

[0035] 图 14 说明了显示 TGFβ 浓度标准曲线的图。LOD 经计算为 350pg/ml TGFβ。

[0036] 图 15 说明了一种试剂盒的示意图，所述试剂盒包含：用于检测样品中的单个蛋白分子和至少一个标记的分析器系统，所述标记包含荧光部分和所述蛋白分子的结合伴侣，其中所述分析器包含用于刺激所述荧光部分的电磁辐射源；用于使标记通过的毛细管流动池；用于使标记在毛细管流动池中移动的动力来源；在毛细管流动池内限定的询查空间，该询查空间用于接收由电磁源发出的电磁辐射；和与询查空间可操作地连接的电磁辐射检测器，其中所述荧光部分在受到在所述荧光部分的激发波长处发光的激光刺激时能够发射至少约 200 个光子，其中所述激光聚焦于包含所述荧光部分的直径不小于约 5 微米的光斑上，并且其中由所述激光导向该光斑的总能量不大于约 3 微焦。

[0037] 图 16 说明了在由单颗粒分析器系统开发的夹心分子免疫测试中测定的 TREM-1 标准曲线。所述测试的线性范围为 100fM ～ 1500fM。

[0038] 图 17A ～ F 说明了 IL-6 和 IL-8 的检测。A)：IL-6 标准物，根据给出 0.1pg/ml ～

10pg/ml 的线性响应的商购试剂盒（R&D Systems， Minneapolis， MN）进行稀释。 B）：低于 1pg/ml 的 IL-6 标准曲线。 C）和 D）：在血库捐献者 EDTA 样本中鉴定的 IL-6(C) 和 IL-8(D) 的分布。 E）：通过将分析器的检测从对分子计数（数字信号）切换为检测在较高浓度的分析物中产生的光子总数（模拟信号）可以将在任何分析物的低浓度时的检测范围扩展至更高浓度。 所述单颗粒分析器具有 6 个对数值的经扩展的线性动态范围。 6 对数值检测范围基于从数字检测向模拟检测的切换。 F）：显示通过对个体颗粒发出的光子进行计数（数字信号）而确定的低 IL-6 浓度范围（0.1fg/ml ～ 10fg/ml）和更高的 IL-6 浓度范围（10fg/ml ～ 1pg/ml）的非线性化标准曲线。

[0039] 图 18 说明了本发明的测试与传统测试的比较。

[0040] 图 19A 是说明人 VEGF 测试的表现的图；图 19B 是在最低浓度时的测试表现的图。

[0041] 图 20A 是说明小鼠 VEGF 测试的表现的图；图 20B 是在最低浓度时的测试表现的图。

[0042] 图 21 是比较本发明的 VEGF 测试与人血浆 ELISA 测试的图。

[0043] 图 22A 是比较使用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞时在细胞溶解产物和培养基中检测到的 VEGF 水平的图；图 22B 是比较使用 HT-29 结肠腺癌细胞时在细胞溶解产物和培养基中检测到的 VEGF 水平的图。

[0044] 图 23 是对本发明的 VEGF 测试与小鼠血浆样品的 ELISA 测试的比较。

[0045] 图 24A 是说明使用 B16 黑色素瘤小鼠细胞系时在细胞溶解产物和培养基中检测到的小鼠 VEGF 浓度的图；图 24B 是说明使用 4T1 乳癌时在细胞溶解产物和培养基中检测到的小鼠 VEGF 浓度的图；图 24C 是说明使用 CT26 结肠癌细胞系时在细胞溶解产物和培养基中检测到的小鼠 VEGF 浓度的图。

[0046] 图 25A 说明了显示出对 VEGF 的高灵敏检测的图。 图 25B 说明了下端标准曲线信号。

[0047] 图 26 说明了使用不同的免疫测试格式时对人 VEGF 的检测的测定水平与预期水平的比较：1）基于磁性微粒的单分子计数（MP-SMC）；2）基于 384 孔板的单分子计数（Plate-SMC）；和 3）基于辣根过氧化物酶的酶联免疫吸附测试（HRP-ELISA）。

[0048] 图 27A 说明了在来自健康的和乳腺癌患者的 10μl 血浆样品中检测到的人 VEGF 的水平。 显示了相对于标准 ELISA 格式（LOD = 31.2pg/ml）的使用本发明的方法时的检出限（LOD）（Errena；LOD = 3.5pg/ml）。 图 27B 说明了在 10μl 裂解物样品中的相似数据。

[0049] 图 28A ～ C 说明了合并的 VEGF 模拟测定和数字测定。

[0050] 图 29A 说明了显示出 Aβ-40 测试的特异性和线性的图。 图 29B 是显示 Aβ-42 测试的特异性和线性的图。

[0051] 图 30A 是说明 IL-1α 的测试曲线拟合的图。 图 30B 是说明 IL-1α 测试标准曲线信号的下端的图。

[0052] 图 31A 是说明 IL-1β 测试曲线拟合的图。 图 31B 说明了 IL-1β 曲线信号的下端标准曲线。

[0053] 图 32A 是说明 IL-4 测试曲线拟合的图。 图 32B 是下端处的 IL-4 测试标准曲线信号。

[0054] 图 33A 是说明 IL-6 测试曲线拟合的图。 图 33B 是下端处的 IL-6 测试标准曲线信号。

具体实施方式

[0055] 提纲

[0056] I. 引言

[0057] II. 用于通过本发明的方法和组合物的灵敏检测的分子

[0058] A. 概述

[0059] B. 标记物

[0060] III. 标记

[0061] A. 结合伴侣

[0062] 1. 抗体

[0063] B. 荧光部分

[0064] 1. 染料

[0065] 2. 量子点

[0066] C. 结合伴侣 - 荧光部分组合物

[0067] IV. 高灵敏分子分析

[0068] A. 样品

[0069] B. 样品制备

[0070] C. 对关注分子的检测和确定浓度

[0071] V. 适于高灵敏分子分析的仪器和系统

[0072] A. 装置 / 系统

[0073] B. 单颗粒分析器

[0074] 1. 电磁辐射源

[0075] 2. 毛细管流动池

[0076] 3. 驱动力

[0077] 4. 检测器

[0078] C. 采样系统

[0079] D. 样品制备系统

[0080] E. 样品回收

[0081] VI. 使用高灵敏分子分析的方法

[0082] A. 方法

[0083] B. 示例性标记物

[0084] 1. 心脏损伤

[0085] 2. 感染

[0086] 3. 细胞因子

[0087] a. 白细胞介素 1

[0088] b. 白细胞介素 4

[0089] c. 白细胞介素 6

[0090] 4. 炎性标记物

[0091] a. 白细胞三烯 E4

[0092] b.TGF β

[0093] 5.Akt1

[0094] 6.Fas 配体

[0095] 7.VEGF

[0096] 8. 淀粉样 β 蛋白

[0097] C. 多标记物分析组

[0098] 1. 多生物标记物分析组

[0099] 2. 混合标记物分析组

[0100] D. 检测和监测

[0101] E. 临床方法

[0102] VII. 试剂盒

[0103] VIII. 实例

[0104] I. 引言

[0105] 本发明提供了用于单分子的高灵敏检测以及用于样品中分子浓度的确定的仪器、试剂盒、组合物和方法。 在某些实施方式中，本发明的仪器、组合物、方法和试剂盒的灵敏度和精度可以通过选自但不限于以下因素的因素的组合来实现：合适波长和输出功率的电磁源、适当的询查空间尺寸、高数值孔径透镜、能检测单光子的检测器和用于对单分子进行计数的数据分析系统。 本发明的仪器称作“单分子检测器”或“单颗粒检测器”，并且也由术语“单分子分析器”和“单颗粒分析器”所涵盖。 在某些实施方式中，本发明的试剂盒和方法的灵敏度和精度通过将本发明的仪器与选自但不限于以下因素的因素的组合共同使用而实现：展示出使分子能在单分子水平被检测到的分子用标记，和在本文所述的仪器中测试标记的方法。

[0106] 本发明的仪器、试剂盒和方法尤其可用于单分子或小分子的灵敏和精确检测，以及用于确定样品中的分子浓度。

[0107] 在某些实施方式中，本发明提供了用于通过检测单分子来灵敏检测和确定分子浓度的仪器和试剂盒、用于此类检测和确定的标记、和在样品分析中使用此类仪器和标记的方法。 特别地，本发明的仪器、试剂盒和方法的灵敏度和精度使得可以在极低浓度（例如，低于约 100 飞摩尔、10 飞摩尔、1 飞摩尔、0.1 飞摩尔、0.01 飞摩尔或 0.001 飞摩尔的浓度）检测和确定分子（例如，生物学状态标记物）的浓度。 在其它实施方式中，本发明的仪器和试剂盒能够在较大的动态浓度范围内（例如，在大于 10^5 倍、10^6 倍或 10^7 倍的浓度范围内）确定样品中物种的浓度（例如，分子的浓度）而无需对样品进行稀释或其它处理。

[0108] 本发明的仪器、试剂盒和方法的高灵敏度使得可以使用此前因缺乏检测灵敏度而不可用的标记物（例如，生物标记物）。 本发明的仪器、试剂盒和方法的高灵敏度还有助于建立新的标记物。 目前存在大量可获取的能用于确定生物学状态但由于目前在测量其较低浓度范围时的限制而没有实际采用的标记物。 在某些情形中，通过目前的方法可以检测到异常高水平的标记物，但尚未确立正常范围。 在某些情况下，标记物的较高正

常范围可检测，但较低正常范围或低于正常值的水平无法检测。 在某些情况下，例如癌症或感染的标记物，任何的标记物水平都能表明生物学状态的存在，而检测灵敏度的提高有利于早期诊断。 在某些情况下，标记物浓度在多个时间点上的变化速率或没有变化提供了最有用的信息，但目前的分析方法不允许在病况的早期阶段（此时其通常最可被治疗）进行时间点采样。 在某些情况下，仅能通过使用在临床设定中不实际或不可用的繁琐方法（例如，需要复杂样品处理和耗时的分析的方法）来在临床可用的水平检测标记物。 另外，存在如下的生物学状态潜在标记物，其具有足够低的浓度而使其存在极难或不可能通过目前的方法来检测。

[0109] 本发明的分析方法和组合物提供了使得能够在此前无法检测到标记物的浓度对生物学状态标记物进行检测的灵敏度、精度和稳健性，由此使得可以将此类标记物从确认性标记物或仅可用于有限的研究设定中的标记物“重新利用”为诊断性标记物、预后性标记物、治疗导向性标记物或其它类型的可用于临床设定和/或用于大规模临床设定（包括临床试验）中的标记物。 此类方法使得能够确定此类标记物的正常和非正常范围。

[0110] 如此重新利用的标记物可以用于例如：检测正常状态（正常范围）；检测响应物/非响应物（例如，对于如药物施用等治疗的响应物/非响应物）；检测早期疾病或病理的出现（例如，早期疾病检测、早期心脏缺血的检测）；疾病分期（例如，癌症）；疾病监测（例如，糖尿病监测、对治疗后癌症复发的监测）；疾病机理研究；和治疗毒性（例如，药物治疗毒性）的研究。

[0111] 因此本发明提供了用于灵敏检测标记物的方法和组合物，还提供了确立标记物的正常和异常水平的值的方法。 在其它实施方式中，本发明提供了基于对标记物确立的值的诊断、预后和/或治疗选择方法。 本发明还提供了用于此类方法中的组合物，例如，用于标记物的超灵敏检测的检测试剂。

[0112] II. 本发明的方法和组合物的灵敏检测的分子

[0113] 本发明的仪器、试剂盒和方法可以用于许多不同类型的单分子的检测。 具体而言，所述仪器、试剂盒和方法可用于生物学状态标记物的灵敏检测和浓度确定。 本文所用的术语“单分子检测”既指直接检测也指间接检测。 例如，可以用荧光标记将单分子标记，并在本文所述的仪器中检测分子-标记复合物。 替代性地，可以用荧光标记将单分子标记，然后使荧光标记从该单分子分离，并在本文所述的仪器中检测该标记。 术语单分子检测涵盖了两种检测形式。

[0114] A. 概述

[0115] 可以使用本发明的分析器和相关方法检测的分子的实例包括：例如蛋白、核酸、糖类等生物聚合物和小分子（有机小分子和无机小分子）。具体而言，本文所述的仪器、试剂盒和方法可用于检测生物样品中的蛋白和小分子的单分子，以及确定所述样品中此类分子的浓度。

[0116] 术语“蛋白”、“多肽”、“肽”和“寡肽”在本文中可互换使用，并且包括包含由肽键连接在一起的两个或多个氨基酸的任何组合物。 可以理解，多肽可以含有除通常称为 20 种天然存在氨基酸的 20 种氨基酸之外的其它氨基酸。 此外，多肽可以包含一个或多个氨基酸，包括经本领域已知的任何方法修饰（不管是天然地还是非天然地修饰）的末端氨基酸。 多肽修饰的实例包括例如糖基化或其它后翻译修饰。 可存在于

本发明的多肽中的修饰包括但不限于：乙酰化、酰基化、ADP 核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、多核苷酸或多核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键的形成、脱甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸酯的形成、甲酰化、γ-羧基化、糖化(glycation)、糖基化、GPI 锚定物形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解处理、磷酸化、异戊基化、消旋化、硒化、硫化、经转移 RNA 介导的向蛋白的氨基酸添加（例如，精氨酸化）和泛素化。

[0117] 由本仪器、试剂盒和方法检测的分子可以为游离的，或为复合物（例如，抗体-抗原复合物，或更一般而言的蛋白-蛋白复合物，例如肌钙蛋白复合物或前列腺特异抗原 (PSA) 复合物）的一部分。本领域技术人员可以理解，在提及蛋白时，本发明可以检测其片段、多肽、突变体、变异体或复合物。

[0118] B. 生物学状态标记物

[0119] 在某些实施方式中，本发明提供了用于灵敏检测生物标记物的组合物和方法，和此类标记物在诊断、预后和/或治疗方法的确定中的使用。

[0120] 本发明的标记物可以为例如与生物体的生物学状态（例如，如疾病或非疾病态等状况）相关的任何组合物和/或分子或者组合物和/或分子的复合物。标记物可以为例如，小分子、多肽、核酸（如 DNA 和 RNA）、脂质（如磷脂）或者胶束、细胞组分（例如，线粒体或叶绿体）等。本发明所考虑的标记物可以是此前所已知的或未知的。例如，在某些实施方式中，本文的方法能鉴定可以用作所关注的生物学状态或所关注的状况的标记物的新型多肽，而在其他实施方式中，将已知多肽鉴定为所关注的生物学状态或状况的标记物。使用本发明的系统可以使得能够观察那些标记物，例如，在确定有机物的生物学状态中具有高度应用潜力但仅以低浓度存在的多肽，例如从患病组织“浸出”的那些多肽。其它的具有高度应用潜力的标记物或多肽可以是那些与疾病有关的标记物或多肽，例如，产生于肿瘤-宿主环境中的标记物或多肽。在本发明的方法和组合物中可以使用可提供有关生物学状态的信息的任何合适的标记物。本文所用术语“标记物”涵盖了可以在来自生物体的样品中被检测且其检测或定量提供了关于该生物体的生物学状态的信息的任何分子。

[0121] 生物学状态包括但不限于：表型状态；影响生物体的状况；发育阶段；年龄；健康情况；病理学；疾病检测、过程或分期；感染；毒性；或对于化学因素、环境因素或药物因素的响应（例如，药物响应表型、药物毒性表型或药物有效性表型）。

[0122] 本文所用术语“生物体”是指由至少一个细胞组成的任何生命体。生物体可以简单如单细胞生物体，或复杂如哺乳动物。本发明的生物体优选为哺乳动物。此类哺乳动物可以为例如人类，或者如灵长类（例如，猴、猩猩等）、驯养动物（例如，狗、猫、马等）、农场动物（例如，山羊、绵羊、猪、牛等）或实验动物（例如，小鼠、大鼠等）等动物。生物体优选为人类。

[0123] 在某些实施方式中，本发明的方法和组合物针对各类标记物，例如，细胞因子、生长因子、肿瘤学标记物、炎症标记物、内分泌标记物、自身免疫标记物、甲状腺标记物、心血管标记物、糖尿病标记物、传染病标记物、神经学标记物、呼吸道标记物、胃肠道标记物、肌肉骨骼标记物、皮肤病学病症标记物和代谢标记物。

[0124] 表 1 提供了已由本发明的方法和组合物测定的这些种类的标记物的实例，并且提供了由本发明的方法和组合物检测的所述标记物的浓度，以及由本发明的单颗粒分析器系统针对特定标记物所计出的颗粒数目。

[0125] 表 1. 标记物类别和类别中的示例性标记物

[0126]

细胞因子	摩尔浓度	分子
IL-12 p70	$2.02X10^{-14}$	$6.09X10^{+5}$
IL-10	$5.36X10^{-14}$	$1.61X10^{+6}$
IL-1 α	$5.56X10^{-14}$	$1.67X10^{+6}$
IL-3	$5.85X10^{-14}$	$1.76X10^{+6}$
IL-12 p40	$6.07X10^{-14}$	$1.83X10^{+6}$
IL-1ra	$6.12X10^{-14}$	$1.84X10^{+6}$
IL-12	$8.08X10^{-14}$	$2.44X10^{+6}$
IL-6	$9.53X10^{-14}$	$2.87X10^{+6}$
IL-4	$1.15X10^{-13}$	$3.47X10^{+6}$
IL-18	$1.80X10^{-13}$	$5.43X10^{+6}$
IP-10	$1.88X10^{-13}$	$1.13X10^{+7}$
IL-5	$1.99X10^{-13}$	$5.98X10^{+6}$
Eotaxin	$2.06X10^{-13}$	$1.24X10^{+7}$
IL-16	$3.77X10^{-13}$	$1.14X10^{+7}$
MIG	$3.83X10^{-13}$	$1.15X10^{+7}$
IL-8	$4.56X10^{-13}$	$1.37X10^{+7}$
IL-17	$5.18X10^{-13}$	$1.56X10^{+7}$

IL-7	$5.97X10^{-13}$	$1.80X10^{+7}$
IL-15	$6.13X10^{-13}$	$1.84X10^{+7}$
IL-13	$8.46X10^{-13}$	$2.55X10^{+7}$
IL-2R（可溶性）	$8.89X10^{-13}$	$2.68X10^{+7}$
IL-2	$8.94X10^{-13}$	$2.69X10^{+7}$
LIF/HILDA	$9.09X10^{-13}$	$5.47X10^{+7}$
IL-1β	$1.17X10^{-12}$	$3.51X10^{+7}$
Fas/CD95/Apo-1	$1.53X10^{-12}$	$9.24X10^{+7}$
MCP-1	$2.30X10^{-12}$	$6.92X10^{+7}$
肿瘤学	摩尔浓度	分子
EGF	$4.75X10^{-14}$	$2.86X10^{+6}$
TNF-α	$6.64X10^{-14}$	$8.00X10^{+6}$
PSA（第 3 代）	$1.15X10^{-13}$	$6.92X10^{+6}$
VEGF	$2.31X10^{-13}$	$6.97X10^{+6}$
TGF-β 1	$2.42X10^{-13}$	$3.65X10^{+7}$
FGFb	$2.81X10^{-13}$	$1.69X10^{+7}$
TRAIL	$5.93X10^{-13}$	$3.57X10^{+7}$
TNF-RI(p55)	$2.17X10^{-12}$	$2.62X10^{+8}$
炎症	摩尔浓度	分子
ICAM-1（可溶性）	$8.67X10^{-15}$	$5.22X10^{+4}$
RANTES	$6.16X10^{-14}$	$3.71X10^{+6}$

MIP-2	$9.92X10^{-14}$	$2.99X10^{+6}$
MIP-1β	$1.98X10^{-13}$	$5.97X10^{+6}$
MIP-1α	$2.01X10^{-13}$	$6.05X10^{+6}$
MMP-3	$1.75X10^{-12}$	$5.28X10^{+7}$
内分泌学	摩尔浓度	分子
17β-雌二醇 (E2)	$4.69X10^{-14}$	$2.82X10^{+6}$
DHEA	$4.44X10^{-13}$	$2.67X10^{+7}$
ACTH	$1.32X10^{-12}$	$7.96X10^{+7}$
促胃液素	$2.19X10^{-12}$	$1.32X10^{+8}$
生长激素 (hGH)	$2.74X10^{-12}$	$1.65X10^{+8}$
自身免疫	摩尔浓度	分子
GM-CSF	$1.35X10^{-13}$	$8.15X10^{+6}$
C-反应蛋白 (CRP)	$3.98X10^{-13}$	$2.40X10^{+7}$
G-CSF	$1.76X10^{-12}$	$1.06X10^{+8}$
甲状腺	摩尔浓度	分子
环形 AMP	$9.02X10^{-15}$	$5.43X10^{+5}$
降钙素	$3.25X10^{-14}$	$1.95X10^{+6}$
甲状旁腺激素 (PTH)	$1.56X10^{-13}$	$9.37X10^{+6}$
心血管	摩尔浓度	分子
B-利钠肽	$2.86X10^{-13}$	$1.72X10^{+7}$
NT-proBNP	$2.86X10^{-12}$	$8.60X10^{+7}$

C- 反应蛋白，HS	$3.98X10^{-13}$	$2.40X10^{+7}$
β - 血小板球蛋白 (BTG)	$5.59X10^{-13}$	$3.36X10^{+7}$
糖尿病	摩尔浓度	分子
C- 肽	$2.41X10^{-15}$	$1.45X10^{+5}$
瘦素	$1.89X10^{-13}$	$1.14X10^{+7}$
传染病	摩尔浓度	分子
IFN- γ	$2.08X10^{-13}$	$1.25X10^{+7}$
IFN- α	$4.55X10^{-13}$	$2.74X10^{+7}$
代谢	摩尔浓度	分子
生物无损 PTH(1-84)	$1.59X10^{-12}$	$1.44X10^{+8}$
PTH	$1.05X10^{-13}$	$9.51X10^{+6}$

[0127]

[0128]

[0129] 1. 细胞因子

[0130] 对于研究和诊断而言，细胞因子都可用作多种状况、疾病和病理的标记物，且本发明的组合物和方法包括用于检测和定量细胞因子的标记、使用此类标记来确定正常和异常水平的细胞因子、以及基于此类水平的诊断、预后和 / 或治疗决定的方法。

[0131] 目前存在超过 100 种细胞因子 / 趋化因子，其协同和不协同调节受到临床关注。 为了将特定的疾病过程与细胞因子水平的变化相关联，理想的方法需要针对给定的细胞因子或多种细胞因子以高灵敏度对样品进行分析。 目前用在标记物分析组中且可用于本发明的方法和组合物的示例性细胞因子包括但不限于：BDNF、CREBpS133、总 CREB(CREB Total)、DR-5、EGF、ENA-78、Eotaxin、脂肪酸结合蛋白、碱性 FGF、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、GCP-2、粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF(GM-CSF)、生长相关癌基因角质形成细胞 (GRO-KC)、HGF、ICAM-1、IFN- α 、IFN- γ 、白细胞介素 (IL-10、IL-11、IL-12、IL-12 p40、IL-12 p40/p70、IL-12 p70、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-1ra/IL-1F3、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9)、干扰素诱导型蛋白 (10 IP-10)、JE/MCP-1、角质形成细胞 (KC)、KC/GROa、LIF、淋巴细胞趋化因子 (lymphotactin)、M-CSF、单核细胞趋化蛋白 (MCP-1)、MCP-1(MCAF)、MCP-3、MCP-5、MDC、MIG、巨噬细胞炎性 (MIP-1 α)、MIP-1 β 、MIP-1 γ 、MIP-2、

MIP-3β、OSM、PDGF-BB、激活时受调节的、正常 T 细胞表达和分泌的 (RANTES)、Rb(pT821)、Rb(总)、Rb pSpT249/252、Tau(pS214)、Tau(pS396)、Tau(总)、组织因子、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、TNF-β、TNF-RI、TNF-RII、VCAM-I 和 VEGF。在某些实施方式中，细胞因子是 IL-12p70、IL-10、IL-1α、IL-3、IL-12 p40、IL-1ra、IL-12、IL-6、IL-4、IL-18、IL-10、IL-5、eotaxin、IL-16、MIG、IL-8、IL-17、IL-7、IL-15、IL-13、IL-2R(可溶性)、IL-2、LIF/HILDA、IL-1β、Fas/CD95/Apo-1 和 MCP-1。

[0132] 2. 生长因子

[0133] 生长因子包括：EGF 配体，例如，双向调节蛋白、LRIG3、β 动物纤维素、神经调节蛋白 1/NRG1、EGF、神经调节蛋白 3/NRG3、Epigen、TGF-α、表皮调节素、TMEFF1/Tomoregulin-1、HB-EGF、TMEFF2、LRIG1；EGF R/ErbB 受体家族，例如，EGF R、ErbB3、ErbB2、ErbB4；FGF 家族，例如，FGF 配体(酸性 FGF、FGF-12、碱性 FGF、FGF-13、FGF-3、FGF-16、FGF-4、FGF-17、FGF-5、FGF-19、FGF-6、FGF-20、FGF-8、FGF-21、FGF-9、FGF-22、FGF-10、FGF-23、FGF-11、KGF/FGF-7)、FGF 受体 (FGF R1 ～ 4、FGF R3、FGFR1、FGF R4、FGF R2、FGF R5)、FGF 调节剂 (FGF-BP)；刺猬因子 (Hedgehog) 家族，沙漠刺猬因子 (Desert Hedgehog)、声波刺猬因子 (Sonic Hedgehog)、印度刺猬因子 (Indian Hedgehog)；刺猬因子相关分子和调节剂 BOC、GLI-3、CDO、GSK-3α/β、DISP1、GSK-3α、Gas1、GSK-3β、GLI-1、Hip、GLI-2；IGF 家族，IGF 配体 (IGF-I、IGF-II)、IGF-I 受体 (CD221) IGF-I R，和 IGF 结合蛋白 (IGFBP) 家族 (ALS、IGFBP-5、CTGF/CCN2、IGFBP-6、Cyr61/CCN1、IGFBP-L1、Endocan、IGFBP-rp1/IGFBP-7、IGFBP-1、IGFBP-rP10、IGFBP-2、NOV/CCN3、IGFBP-3、WISP-1/CCN4、IGFBP-4)；受体酪氨酸激酶 Ax1、FGF R4、C1q R1/CD93、FGF R5、DDR1、Flt-3、DDR2、HGF R、Dtk、IGF-I R、EGF、R IGF-II R、Eph、INSRR、EphA1、胰岛素 R/CD220、EphA2、M-CSF R、EphA3、Mer、EphA4、MSPR/Ron、EphA5、MuSK、EphA6、PDGF Rα、EphA7、PDGF Rβ、EphA8、Ret、EphB 1、RTK 样孤儿受体 1/ROR1、EphB2、RTK 样孤儿受体 2/ROR2、EphB3、SCF R/c-kit、EphB4、Tie-1、EphB6、Tie-2、ErbB2、TrkA、ErbB3、TrkB、ErbB4、TrkC、FGF、R1-4 VEGFR、FGF R1、VEGF R1/Flt-1、FGF R2、VEGF R2/KDR/Flk-1、FGFR3、VEGF R3/FU-4；蛋白多糖和调节蛋白多糖，聚集蛋白聚糖 (Aggrecan)、Mimecan、Agrin、NG2/MCSP、双糖链蛋白聚糖 (Biglycan)、骨粘附蛋白聚糖 (Osteoadherin)、核心蛋白聚糖 (Decorin)、Podocan、DSPG3、δ-肌聚糖 (Sarcoglycan)、Endocan、粘结蛋白聚糖 (Syndecan)-1/CD138、Endoglycan、粘结蛋白聚糖 -2、Endorepellin/ 基底膜蛋白聚糖 (Perlecan)、粘结蛋白聚糖 -3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 (Glypican)2、粘结蛋白聚糖 -4、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、睾丸蛋白聚糖 (Testican)1/SPOCK1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 5、睾丸蛋白聚糖 2/SPOCK2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 6、睾丸蛋白聚糖 3/SPOCK3、人基膜聚糖 (Lumican)、多功能蛋白聚糖 (Versican)、蛋白聚糖调节剂、芳基硫酸酯酶 A/ARSA、氨基葡萄糖 (N- 乙酰基)-6- 硫酸酯酶 /GNS、Exostosin 样 2/EXTL2、HS6ST2、Exostosin 样 3/EXTL3、艾杜糖 -2- 硫酸酯酶 /IDS、GalNAc4S-6ST；SCF、Flt-3 配体和 M-CSF Flt-3、M-CSF R、Flt-3 配体、SCF、

M-CSF、SCF R/c-kit；TGF-β 超家族（与炎症标记物所列相同）；VEGF/PDGF 家族，神经纤毛蛋白 (Neuropilin)-1、P1GF、神经纤毛蛋白 -2、P1GF-2、PDGF、VEGF、PDGF Rα、VEGF-B、PDGF Rβ、VEGF-C、PDGF-A、VEGF-D、PDGF-AB、VEGF R、PDGF-B、VEGF R1/FIt-1、PDGF-C、VEGF R2/KDR/Flk-1、PDGF-D、VEGF R3/FH-4；Wnt 相关分子 Dickkopf 蛋白和 Wnt 抑制剂、Dkk-1、Dkk-4、Dkk-2、Soggy-1、Dkk-3、WIF-1 Frizzled 及相关蛋白，Frizzled-1、Frizzled-8、Frizzled-2、Frizzled-9、Frizzled-3、sFRP-1、Frizzled-4、sFRP-2、Frizzled-5、sFRP-3、Frizzled-6、sFRP-4、Frizzled-7、MFRP Wnt 配体，Wnt-1、Wnt-8a、Wnt-2b、Wnt-8b、Wnt-3a、Wnt-9a、Wnt-4、Wnt-9b、Wnt-5a、Wnt-10a、Wnt-5b、Wnt-10b、Wnt-7a、Wnt-11、Wnt-7b；其它 Wnt 相关分子，如 APC、Kremen-2、Axin-1、LRP-I、β- 连环蛋白、LRP-6、蓬乱蛋白 -1、Norrin、蓬乱蛋白 -3、PKC β1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、Pygopus-1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 5、Pygopus-2、GSK-3α/β、R- 脊椎蛋白 (Spondin)1、GSK-3α、R- 脊椎蛋白 2、GSK-3β、R- 脊椎蛋白 3、ICAT、RTK 样孤儿受体 1/ROR1、Kremen-1、RTK 样孤儿受体 2/ROR，以及其它生长因子，CTGF/CCN2、β-NGF、Cyr61/CCN1、Norrin、DANCE、NOV/CCN3、EG-VEGF/PK1、骨织素 (Osteocrin)、Hepassocin、PD-ECGF、HGF、前颗粒蛋白 (Progranulin)、LECT2、血小板生成素、LEDGF 和 WISP-1/CCN4。

[0134] 炎症标记物

[0135] 炎症标记物包括 ICAM-1、RANTES、MIP-2、MIP-1β、MIP-1-α 和 MMP-3。其它炎症标记物包括：粘附分子，例如，整合蛋白 (integrin) α1β1、α2β1、α3β1、α4β1、α5β1、α6β1、α7β1、α8β1、α9β1、αVβ1、α4β7、α6β4、αDβ2、α1β2、αMβ2、αVβ3、αVβ5、αVβ6、αVβ8、αXβ2、αIIbβ3、αIELbβ7、β-2 整合素、β-3 整合素、β-2 整合素、β-4 整合素、β-5 整合素、β-6 整合素、β-7 整合素、β-8 整合素、α-1 整合素、α-2 整合素、α-3 整合素、α-4 整合素、α-5 整合素、α-6 整合素、α-7 整合素、α-8 整合素、α-9 整合素、α-D 整合素、α-L 整合素、α-M 整合素、α-V 整合素、α-X 整合素、α-IIb 整合素、α IELb 整合素；整合素相关分子，例如，β IG-H3、Melusin、CD47、MEPE、CD151、骨桥蛋白、IBSP/ 骨唾液酸糖蛋白 II、RAGE、IGSF8；选择蛋白，例如，E- 选择蛋白、P- 选择蛋白、L- 选择蛋白；和配体，例如，CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、PSGL-1、玻连蛋白 (vitronectin)、玻连蛋白受体、纤连蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白、层粘连蛋白、ICAM-1、ICAM-3、BL-CAM、LFA-2、VCAM-1、NCAM 和 PECAM。其它炎症标记物包括细胞因子，例如，IFN-α、IFN-β、IFN-ε、-κ、-τ 及 -ζ、IFN-ω、IFN-γ、IL29、IL28A 和 IL28B、IL-1、IL-1α 和 β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30 和 TCCR/WSX-1。其它炎症标记物包括细胞因子受体，例如，普通 β 链、IL-3 Rα、IL-3 Rβ、GM-CSF R、IL-5 Rα、普通 γ 链 /IL-2 Rγ、IL-2 Rα、IL-9 R、IL-2 Rβ、IL-4 R、IL-21 R、IL-15Rα、IL-7 Rα/CD127、IL-1ra/IL-1F3、IL-1 R8、IL-1 RI、IL-1 R9、IL-1 RII、IL-18 Rα/IL-1 R5、

IL-1 R3/IL-1 R AcP、IL-18 Rβ/IL-1 R7、IL-1R4/ST2 SIGIRR、IL-1 R6/IL-1 R rp2、IL-11 Rα、IL-31 RA、CNTFRα、瘦素 R、G-CSF R、LIF Rα、IL-6R、OSM Rβ、IFN-α/β R1、IFN-α/β R2、IFN-γR1、IFN-γR2、IL-10 Rα、IL-10 Rβ、IL-20 Rα、IL-20 Rβ、IL-22 R、IL-17 R、IL-17 RD、IL-17 RC、IL-17B R、IL-13 Rα2、IL-23 R、IL-12R β1、IL-12R β2、TCCR/WSX-1 和 IL-13R α1。其它炎症标记物包括趋化因子，例如，CCL-1、CCL-2、CCL-3、CCL-4、CCL-5、CCL-6、CCL-7、CCL-8、CCL-9、CCL-10、CC-11、CCL-12、CCL-13、CCL-14、CCL-15、CCL-16、CCL-17、CCL-18、CCL-19、CCL-20、CCL-21、CCL-22、CCL-23、CCL-24、CCL-25、CCL-26、CCL-27、CCL-28、MCK-2、MIP-2、CINC-1、CINC-2、KC、CINC-3、LIX、GRO、胸腺趋化因子 -1、CXCL-1、CXCL-2、CXCL-3、CXCL-4、CXCL-5、CXCL-6、CXCL-7、CXCL-8、CXCL-9、CXCL-10、CXCL-11、CXCL-12、CXCL-13、CXCL-14、CXCL-15、CXCL-16、CXCL-17、XCL1、XCL2 和脂肪细胞因子 (Chemerin)。其它炎症标记物包括趋化因子受体，例如，CCR-1、CCR-2、CCR-3、CCR-4、CCR-5、CCR-6、CCR-7、CCR-8、CCR-9、CCR-10、CXCR3、CXCR6、CXCR4、CXCR1、CXCR5、CXCR2、Chem R23。其它炎症标记物包括肿瘤坏死因子 (TNF)，例如，TNFα、4-1BB 配体 /TNFSF9、LIGHT/TNFSF14、APRIL/TNFSF13、淋巴毒素、BAFF/TNFSF13B、淋巴毒素 β/TNFSF3、CD27 配体 /TNFSF7、OX40 配体 /TNFSF4、CD30 配体 /TNFSF8、TL1A/TNFSF15、CD40 配体 /TNFSF5、TNF-α/TNFSF1A、EDA、TNF-β/TNFSF1B、EDA-A2、TRAIL/TNFSF10、Fas 配体 /TNFSF6、TRANCE/TNFSF11、GITR 配体 /TNFSF18 和 TWEAK/TNFSF 12。其它炎症标记物包括 TNF 超家族受体，例如，4-1BB/TNFRSF9、NGF R/TNFRSF16、BAFF R/TNFRSF13C、骨保护素 /TNFRSF11B、BCMA/TNFRSF17、OX40/TNFRSF4、CD27/TNFRSF7、RANK/TNFRSF11A、CD30/TNFRSF8、RELT/TNFRSF19L、CD40/TNFRSF5、TACI/TNFRSF13B、DcR3/TNFRSF6B、TNF RI/TNFRSF1A、DcTRAIL R1/TNFRSF23、TNF RII/TNFRSFIB、DcTRAIL R2/TNFRSF22、TRAILR1/TNFRSF10A、DR3/TNFRSF25、TRAIL R2/TNFRSF10B、DR6/TNFRSF21、TRAIL R3/TNFRSF10C、EDAR、TRAILR4/TNFRSF10D、Fas/TNFRSF6、TROY/TNFRSF19、GITR/TNFRSF18、TWEAK R/TNFRSF12、HVEM/TNFRSF14 和 XEDAR。其它炎症标记物包括 TNF 超家族调节剂，例如，FADD、TRAF-2、RIP1、TRAF-3、TRADD、TRAF-4、TRAF-1 和 TRAF-6。其它炎症标记物包括急性期反应物和急性期蛋白。其它炎症标记物包括 TGF-β 超家族配体，例如，激活素 (激活素 A、激活素 B、激活素 AB、激活素 C)、BMP(骨形态生成蛋白)(BMP-2、BMP-7、BMP-3、BMP-8、BMP-3b/GDF-10、BMP-9、BMP-4、BMP-10、BMP-5、BMP-15/GDF-9B、BMP-6)、Decapentaplegic、生长 / 分化因子 (GDF)(GDF-1、GDF-8、GDF-3、GDF-9 GDF-5、GDF-11、GDF-6、GDF-15、GDF-7)、GDNF 家族配体、Artemin、神经营养因子 (Neurturin)、GDNF、Persephin、TGF-β、TGF-β、TGF-β3、TGF-β1、TGF-β5、LAP(TGF-β1)、潜 TGF-β bp1、潜 TGF-β1、潜 TGF-β bp2、TGF-β1.2、潜 TGF-β bp4、TGF-β2、Lefty、MIS/AMH、Lefty-1、Nodal、Lefty-A、激活素 RIA/ALK-2、GFR α-1/GDNF R α-1、激活素 RIB/ALK-4、GFR α-2/GDNF R α-2、激

活素 RIIA、GFR α-3/GDNF Rα-3、激活素 RIIB、GFR α-4/GDNF R α-4、ALK-1、MIS RII、ALK-7、Ret、BMPR-IA/ALK-3、TGF-β RI/ALK-5、BMPR-IB/ALK-6、TGF-β RII、BMPR-II、TGF-β RIIb、Endoglin/CD105 和 TGF-β RIII。其它炎症标记物包括 TGF-β 超家族调节剂，例如，Amnionless、NCAM-1/CD56、BAMBI/NMA、Noggin、BMP-1/PCP、NOMO、Caronte、PRDC、Cerberus 1、SKI、Chordin、Smad1、Chordin 样 1、Smad2、Chordin 样 2、Smad3、COCO、Smad4、CRIM1、Smad5、Cripto、Smad7、Crossveinless-2、Smad8、Cryptic、SOST、DAN、潜 TGF-β bp1、核心蛋白聚糖、潜 TGF-β bp2、FLRG、潜 TGF-β bp4、卵泡抑素、TMEFF1/Tomoregulin-1、卵泡抑素样 1、TMEFF2、GASP-1/WFIKKNRP、TSG、GASP-2/WFIKKN、TSK、Gremlin 和 Vasorin。其它炎症标记物包括 EGF 配体，例如，双向调节蛋白、LRIG3、β-动物纤维素、神经调节蛋白 1/NRG1、EGF、神经调节蛋白 3/NRG3、Epigen、TGF-α、表皮调节素、TMEFF1/Tomoregulin-1、HB-EGF、TMEFF2 和 LRIG1。其它炎症标记物包括 EGF R/ErbB 受体家族，例如，EGF R、ErbB3、ErbB2 和 ErbB4。其它炎症标记物包括纤维蛋白原。其它炎症标记物包括 SAA。其它炎症标记物包括神经胶质标记物，例如，α1-抗胰蛋白酶、C-反应性蛋白 (CRP)、α2-巨球蛋白、神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、Mac-1 和 F4/80。其它炎症标记物包括髓过氧化物酶。其它炎症标记物包括补体标记物，例如，C3d、C1q、C5、C4d、C4bp 和 C5a-C9。其它炎症标记物包括主要组织相容性复合体 (MHC) 糖蛋白，例如，HLA-DR 和 HLA-A、D、C。其它炎症标记物包括小神经胶质标记物，例如，CR3 受体、MHC I、MHC II、CD 31、CD11a、CD11b、CD11c、CD68、CD45RO、CD45RD、CD18、CD59、CR4、CD45、CD64 和 CD44。其它炎症标记物包括 α2 巨球蛋白受体、成纤维细胞生长因子、Fc γRI、Fc γRII、CD8、LCA(CD45)、CD 18、CD59、Apo J、簇蛋白、2 型纤溶酶原激活剂抑制剂、CD44、巨噬细胞集落刺激因子受体、MRP14、27E10、4-羟基壬烯酸蛋白缀合物、I.κ.B、NF.κ.B、cPLA.sub.2、COX-2、基质金属蛋白酶、膜脂质过氧化反应和 ATP 酶活性。HSPC228、EMP1、CDC42、TLE3、SPRY2、p40BBP、HSPC060 和 NAB2，或 HSPA1A、HSPA1B、MAPRE2 和 OAS1 表达的下调、TACE/ADAM17、α-1-酸性糖蛋白、促血管生成素 1、MIF、促血管生成素 2、CD14、β-防御素 2、MMP-2、ECF-L/CHI3L3、MMP-7、EGF、MMP-9、EMAP-II、MSP、EN-RAGE、一氧化氮、内皮素 1、骨活素 (Osteoactivin)/GPNMB、FPR1、PDGF、FPRL1、穿透素 3/TSG-14、FPRL2、Gas6、PLUNC、GM-CSF、RAGE、S100A10、S100A8、S100A9、HIF-1α、P 物质 (Substance P)、TFPI、TGF-β1、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4、TLR4、LBP、TREM-1、白细胞三烯 A4、水解酶 TSG-6、脂质运载蛋白 (Lipocalin)-1、uPA、M-CSF 和 VEGF。

[0136] 其它标记物

[0137] 肿瘤学标记物包括 EGF、TNF-α、PSA、VEGF、TGF-β1、FGFb、TRAIL 和 TNF-RI(p55)。

[0138] 内分泌功能标记物包括 17β-雌二醇 (E2)、DHEA、ACTH、胃泌素和生长激素 (hGH)。

[0139] 自身免疫标记物包括 GM-CSF、C 反应性蛋白和 G-CSF。

[0140] 甲状腺功能标记物包括环 AMP、降钙素和甲状旁腺素。

[0141] 心血管标记物包括心脏肌钙蛋白 I、心脏肌钙蛋白 T、B- 利钠肽、NT-proBNP、C 反应性蛋白 HS 和 β - 血小板球蛋白。

[0142] 糖尿病标记物包括 C 肽和瘦素。

[0143] 传染病标记物包括 IFN- γ 和 IFN- α 。

[0144] 代谢标记物包括生物无损 PTH(1 ～ 84) 和 PTH。

[0145] 生物学状态标记物

[0146] 标记物能指示所关注的特定表型状态的存在。 表型状态的实例包括由改变的环境、药物治疗、基因操控或突变、损伤、饮食改变、老化或任何其它的单个生物体或者生物体类别或子类的特征产生的表型。

[0147] 在某些实施方式中，所关注的表型状态是经临床诊断的疾病状态。 此类疾病状态包括例如癌症、心血管病、炎性疾病、自身免疫疾病、神经性疾病、传染病和妊娠相关病症。 替代性地，可以使用标记物检测健康状态。

[0148] 本发明的某些方面中包括癌症表型。 癌症的实例包括但不限于：乳腺癌、皮肤癌、骨癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、脑癌、喉癌、胆囊癌、胰腺癌、直肠癌、甲状旁腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、神经组织癌、头颈癌、结肠癌、胃癌、支气管癌、肾癌、基底细胞癌、溃疡型和乳突型鳞状细胞癌、转移性皮肤癌、骨肉瘤、尤因氏肉瘤、网状细胞肉瘤、骨髓瘤、巨细胞肿瘤、小细胞肺肿瘤、非小细胞肺癌、胆石、胰岛细胞肿瘤、原发性脑肿瘤、急性和慢性淋巴细胞和粒细胞肿瘤、多毛细胞肿瘤、腺瘤、增生、髓样癌、嗜铬细胞瘤、粘膜神经瘤、肠神经节细胞瘤、增生性角膜神经肿瘤、类马氏综合征肿瘤 (marfanoid habitus tumor)、威尔姆氏肿瘤、精原细胞瘤、卵巢肿瘤、平滑肌肿瘤、宫颈非典型增生和原位癌、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、软组织肉瘤、恶性类癌、局部皮肤损伤、蕈样肉芽肿、横纹肌肉瘤、卡波西氏肉瘤、骨源性肉瘤和其他肉瘤、恶性高钙血症、肾细胞瘤、真性红细胞增多症、腺癌、多形胶质母细胞瘤、白血病、淋巴瘤、恶性黑色素瘤、表皮样癌以及其他癌和肉瘤。

[0149] 本发明提供了检测癌症的方法。 在某些实施方式中，癌症包括急性淋巴细胞性白血病。 在其它实施方式中，癌症包括急性髓系白血病。 在其它实施方式中，癌症包括肾上腺皮质癌。 在其它实施方式中，癌症包括 AIDS 相关癌。 在其它实施方式中，癌症包括 AIDS 相关淋巴瘤。 在其它实施方式中，癌症包括肛门癌。 在其它实施方式中，癌症包括阑尾癌。 在其它实施方式中，癌症包括儿童小脑星形细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括儿童脑星形细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括中枢神经系统非典型畸胎样 / 横纹肌样肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括基底细胞癌或其他皮肤癌（非黑色素瘤）。 在其它实施方式中，癌症包括肝外导管癌。 在其它实施方式中，癌症包括膀胱癌。 在其它实施方式中，癌症包括骨癌，例如骨肉瘤或恶性纤维组织细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括脑干胶质瘤。 在其它实施方式中，癌症包括成年脑肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括包含中枢神经系统非典型畸胎样 / 横纹肌样肿瘤的脑肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括包含脑星形细胞瘤 / 恶性胶质瘤的脑肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括颅咽管瘤脑肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括室管膜母细胞瘤脑肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括室管膜瘤脑肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括髓母细胞瘤脑

肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括髓上皮瘤脑肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括包含中度分化的松果体实质肿瘤的脑肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括包含脑幕上原始神经外胚层肿瘤和松果体母细胞瘤的脑肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括包含视觉通路和下丘脑胶质瘤的脑肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括脑和脊髓肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括乳腺癌。 在其它实施方式中，癌症包括支气管肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括伯基特淋巴瘤。 在其它实施方式中，癌症包括类癌性肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括胃肠道类癌性肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括未知原发性起源的癌。 在其它实施方式中，癌症包括中枢神经系统非典型畸胎 / 横纹肌样瘤。 在其它实施方式中，癌症包括中枢神经系统胚胎性肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括原发性中枢神经系统淋巴瘤。 在其它实施方式中，癌症包括小脑星形细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括脑星形细胞瘤 / 恶性胶质瘤。 在其它实施方式中，癌症包括子宫颈癌。 在其它实施方式中，癌症包括儿童癌症。 在其它实施方式中，癌症包括脊索瘤。 在其它实施方式中，癌症包括慢性淋巴细胞白血病。 在其它实施方式中，癌症包括慢性粒细胞性白血病。 在其它实施方式中，癌症包括慢性骨髓增生性病症。 在其它实施方式中，癌症包括结肠癌。 在其它实施方式中，癌症包括结肠直肠癌。 在其它实施方式中，癌症包括颅咽管瘤。 在其它实施方式中，癌症包括皮肤 T 细胞淋巴瘤，包括蕈样肉芽肿和 Sézary 综合征。 在其它实施方式中，癌症包括中枢神经系统胚胎性肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括子宫内膜癌。 在其它实施方式中，癌症包括室管膜母细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括室管膜瘤。 在其它实施方式中，癌症包括食道癌。 在其它实施方式中，癌症包括 Ewing 肿瘤家族。 在其它实施方式中，癌症包括颅外生殖细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括性腺外生殖细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括肝外胆管癌。 在其它实施方式中，癌症包括眼内黑色素瘤眼癌。 在其它实施方式中，癌症包括视网膜母细胞瘤眼癌。 在其它实施方式中，癌症包括胆囊癌。 在其它实施方式中，癌症包括胃癌。 在其它实施方式中，癌症包括胃肠道类癌性肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括胃肠道间质瘤 (GIST)。 在其它实施方式中，癌症包括胃肠道基质细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括颅外生殖细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括性腺外生殖细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括卵巢生殖细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括妊娠滋养细胞肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括胶质瘤。 在其它实施方式中，癌症包括脑干胶质瘤。 在其它实施方式中，癌症包括脑星形细胞胶质瘤。 在其它实施方式中，癌症包括视觉通路或下丘脑胶质瘤。 在其它实施方式中，癌症包括毛细胞白血病。 在其它实施方式中，癌症包括头颈癌。 在其它实施方式中，癌症包括肝癌。 在其它实施方式中，癌症包括霍奇金淋巴瘤。 在其它实施方式中，癌症包括下咽癌。 在其它实施方式中，癌症包括眼内黑色素瘤。 在其它实施方式中，癌症包括胰岛细胞瘤（内分泌胰腺）。 在其它实施方式中，癌症包括卡波西氏肉瘤。 在其它实施方式中，癌症包括肾癌（肾细胞癌）。 在其它实施方式中，癌症包括喉癌。 在其它实施方式中，癌症包括急性淋巴细胞性白血病。 在其它实施方式中，癌症包括急性髓细胞性白血病。 在其它实施方式中，癌症包括慢性淋巴细胞性白血病。 在其它实施方式中，癌症包括慢性粒细胞性白血病。 在其它实施方式中，癌症包括毛细胞白血病。 在其它实施方式中，癌症包括唇癌。 在其它实施方式中，癌症包括口腔癌。 在其它实施方式中，癌症包括原发性肝癌。 在其它实施方式中，癌症包括非

小细胞肺癌。 在其它实施方式中，癌症包括小细胞肺癌。 在其它实施方式中，癌症包括 AIDS 相关淋巴瘤。在其它实施方式中，癌症包括伯基特淋巴瘤。在其它实施方式中，癌症包括皮肤 T 细胞淋巴瘤。 在其它实施方式中，癌症包括蕈样肉芽肿和 Sézary 综合征。在其它实施方式中，癌症包括霍奇金淋巴瘤。 在其它实施方式中，癌症包括非霍奇金淋巴瘤。 在其它实施方式中，癌症包括原发性中枢神经系统淋巴瘤。 在其它实施方式中，癌症包括瓦尔登斯特巨球蛋白血症（Waldenström Macroglobulinemia）。 在其它实施方式中，癌症包括恶性骨纤维组织细胞瘤或骨肉瘤。 在其它实施方式中，癌症包括髓上皮瘤。 在其它实施方式中，癌症包括黑色素瘤。 在其它实施方式中，癌症包括眼内（眼）黑色素瘤。 在其它实施方式中，癌症包括 Merkel 细胞癌。 在其它实施方式中，癌症包括间皮瘤。 在其它实施方式中，癌症包括潜伏原发性的转移性鳞状颈癌。 在其它实施方式中，癌症包括口癌。 在其它实施方式中，癌症包括多发性内分泌瘤综合征。 在其它实施方式中，癌症包括多发性骨髓瘤 / 浆细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括蕈样肉芽肿。 在其它实施方式中，癌症包括骨髓增生异常综合征。 在其它实施方式中，癌症包括骨髓增生异常或骨髓增生性疾病。 在其它实施方式中，癌症包括慢性粒细胞性白血病。在其它实施方式中，癌症包括急性髓细胞性白血病。 在其它实施方式中，癌症包括多发性骨髓瘤。 在其它实施方式中，癌症包括慢性骨髓增生性疾病。 在其它实施方式中，癌症包括鼻腔或鼻窦癌。 在其它实施方式中，癌症包括鼻咽癌。 在其它实施方式中，癌症包括鼻咽癌。 在其它实施方式中，癌症包括神经母细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括非霍奇金淋巴瘤。 在其它实施方式中，癌症包括非小细胞肺癌。 在其它实施方式中，癌症包括口癌。 在其它实施方式中，癌症包括口腔癌。 在其它实施方式中，癌症包括口咽癌。 在其它实施方式中，癌症包括骨肉瘤。 在其它实施方式中，癌症包括恶性骨纤维组织细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括卵巢癌。 在其它实施方式中，癌症包括卵巢上皮癌。 在其它实施方式中，癌症包括卵巢生殖细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括低度恶性卵巢肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括胰脏癌。 在其它实施方式中，癌症包括胰岛细胞瘤胰腺癌。 在其它实施方式中，癌症包括乳头状瘤。 在其它实施方式中，癌症包括鼻窦癌。 在其它实施方式中，癌症包括鼻腔癌。 在其它实施方式中，癌症包括甲状旁腺癌。 在其它实施方式中，癌症包括阴茎癌。 在其它实施方式中，癌症包括咽癌。在其它实施方式中，癌症包括嗜铬细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括中度分化的松果体实质肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括松果体母细胞瘤或幕上原始神经外胚层肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括垂体瘤。 在其它实施方式中，癌症包括浆细胞肿瘤 / 多发性骨髓瘤。 在其它实施方式中，癌症包括胸膜肺母细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括原发性中枢神经系统淋巴瘤。 在其它实施方式中，癌症包括前列腺癌。 在其它实施方式中，癌症包括直肠癌。 在其它实施方式中，癌症包括肾细胞（肾）癌。 在其它实施方式中，癌症包括肾盂和输尿管移行细胞癌。 在其它实施方式中，癌症包括涉及染色体 15 上的 NUT 基因的呼吸道癌。 在其它实施方式中，癌症包括视网膜母细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括横纹肌肉瘤。 在其它实施方式中，癌症包括唾液腺肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括 Ewing 肿瘤家族肉瘤。 在其它实施方式中，癌症包括卡波西氏肉瘤。 在其它实施方式中，癌症包括软组织肉瘤。 在其它实施方式中，癌症包括子宫肉瘤。 在其它实施方式中，癌症包括 Sézary 综合征。 在其它实施方式中，癌症包括非黑色

素瘤皮肤癌。 在其它实施方式中，癌症包括黑色素瘤皮肤癌。 在其它实施方式中，癌症包括 Merkel 细胞皮肤癌。 在其它实施方式中，癌症包括小细胞肺癌。 在其它实施方式中，癌症包括小肠癌。 在其它实施方式中，癌症包括鳞状细胞癌，例如，非黑色素瘤皮肤癌。 在其它实施方式中，癌症包括潜在原发性转移性鳞状颈癌。 在其它实施方式中，癌症包括胃癌。 在其它实施方式中，癌症包括幕上原始神经外胚层肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括皮肤 T 细胞淋巴瘤，例如，蕈样肉芽肿和 Sézary 综合征。 在其它实施方式中，癌症包括睾丸癌。 在其它实施方式中，癌症包括咽喉癌。 在其它实施方式中，癌症包括胸腺瘤或胸腺癌。 在其它实施方式中，癌症包括甲状腺癌。 在其它实施方式中，癌症包括肾盂和输尿管移行细胞癌。 在其它实施方式中，癌症包括妊娠滋养细胞肿瘤。 在其它实施方式中，癌症包括未知原发位点的癌。 在其它实施方式中，癌症包括非寻常儿童癌症。 在其它实施方式中，癌症包括输尿管及肾盂移行细胞癌。 在其它实施方式中，癌症包括尿道癌。 在其它实施方式中，癌症包括子宫内膜子宫癌。 在其它实施方式中，癌症包括子宫肉瘤。 在其它实施方式中，癌症包括阴道癌。 在其它实施方式中，癌症包括视觉通路和下丘脑胶质瘤。 在其它实施方式中，癌症包括外阴癌。 在其它实施方式中，癌症包括瓦尔登斯特巨球蛋白血症。 在其它实施方式中，癌症包括肾母细胞瘤。 在其它实施方式中，癌症包括女性癌症。

[0150] 在本发明的其它应用中可以包括心血管病。 心血管病的实例包括但不限于：充血性心力衰竭、高血压、心律失常、动脉粥样硬化、胆固醇、预激综合征 (Wolff-Parkinson-White Syndrome)、长 QT 综合征、心绞痛、心动过速、心动过缓、房颤、心室颤动、心肌缺血、心肌梗死、心包填塞、心肌炎、心包炎、致心律失常性右心室发育不良、肥厚性心肌病、威廉斯综合征、心脏瓣膜疾病、心内膜炎、细菌性疾病、肺动脉闭锁、主动脉瓣狭窄、雷诺氏病、胆固醇栓塞、瓦伦贝格氏综合征、Hippel-Lindau 病和毛细血管扩张症。

[0151] 本发明的其它实施方式中可以包括炎症性疾病和自身免疫疾病。 炎症性疾病和自身免疫疾病包括但不限于：类风湿性关节炎、非特异性关节炎、喉炎症性疾病、炎症性肠道疾病、牛皮癣、甲状腺功能低下（例如，桥本甲亢）、结肠炎、1 型糖尿病、盆腔炎疾病、中枢神经系统炎症性疾病、颞动脉炎、风湿性多肌痛、僵直性脊椎炎、结节性多动脉炎、瑞特综合征、硬皮病、系统性红斑狼疮和红斑狼疮。

[0152] 本发明的方法和组合物还可以提供有关传染病标记物的实验室信息，所述传染病标记物包括：腺病毒、百日咳杆菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、霍乱毒素、霍乱毒素 β、空肠弯曲菌、巨细胞病毒、白喉毒素、Epstein-Barr NA、Epstein-Barr EA、Epstein-Barr VCA、幽门螺旋杆菌、乙型肝炎病毒 (HBV) 核、乙型肝炎病毒 (HBV) 包膜、乙型肝炎病毒 (HBV) 表面 (Ay)、丙型肝炎病毒 (HCV) 核、丙型肝炎病毒 (HCV) NS3、丙型肝炎病毒 (HCV) NS4、丙型肝炎病毒 (HCV) NS5、甲型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒 (HEV) orf2 3KD、戊型肝炎病毒 (HEV) orf2 6KD、戊型肝炎病毒 (HEV) orf3 3KD、人类免疫缺陷病毒 (HIV)-1 p24、人类免疫缺陷病毒 (HIV)-1 gp41、人类免疫缺陷病毒 (HIV)-1 gp120、人类乳头瘤病毒 (HPV)、单纯疱疹病毒 HSV-1/2、单纯疱疹病毒 HSV-1 gD、单纯疱疹病毒 HSV-2 gG、人类 T 细胞白血病病毒 (HTLV)-1/2、甲型流感、甲型流感 H3N2、乙型流感、杜氏利什曼原虫、莱姆病、流行性腮腺炎、肺炎

支原体、结核分枝杆菌、副流感 1、副流感 2、副流感 3、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒 (RSV)、风疹、麻疹、链球菌溶血素 O、破伤风毒素、梅毒螺旋体 15kd、梅毒螺旋体 p47、克氏锥虫、弓形虫和水痘带状疱疹的标记物。

[0153] III. 标记

[0154] 在某些实施方式中，本发明提供了包括用于高度灵敏地检测和定量如标记物等分子的标记的方法和组合物。

[0155] 本领域技术人员可以认识到，可以使用许多策略来标记靶标分子，以使得能够在颗粒的混合物中对其进行检测和辨别。 可以通过任何已知方法来连接标记，包括利用标记与靶标的非特异性或特异性相互作用的方法。 标记能在电场中提供可检测的信号或影响颗粒的移动性。 另外，可以直接地或通过结合伴侣来完成标记。

[0156] 在某些实施方式中，标记包含所关注分子的结合伴侣，其中该结合伴侣与荧光部分相连。 本发明的组合物和方法可以使用高荧光部分，例如，能在受到在该荧光部分的激发波长处发光的激光的刺激时发出至少约 200 个光子的荧光部分，其中所述激光聚焦于包含该荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向该光斑的总能量不多于 3 微焦。 下文对适用于本发明的组合物和方法的荧光部分进行更详细的描述。

[0157] 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物分子的标记，该生物分子包含与荧光部分相连的该生物分子的结合伴侣，其中所述荧光部分在受到在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出至少约 200 个光子，其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，所述荧光部分包含多个荧光体，例如，约 2 ～ 4、2 ～ 5、2 ～ 6、2 ～ 7、2 ～ 8、2 ～ 9、2 ～ 10 或者约 3 ～ 5、3 ～ 6、3 ～ 7、3 ～ 8、3 ～ 9 或 3 ～ 10 个荧光体。 在某些实施方式中，荧光部分包含约 2 ～ 4 个荧光体。 在某些实施方式中，所述生物分子是蛋白或小分子。 在某些实施方式中，所述生物分子是蛋白。 荧光体可以是荧光染料分子。 在某些实施方式中，荧光染料分子包含至少一个取代的吲哚鎓环体系，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或共轭的物质。 在某些实施方式中，染料分子是选自 Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 680 或 Alexa Fluor 700 的 Alexa Fluor 分子。 在某些实施方式中，染料分子是选自 Alexa Fluor 488、 Alexa Fluor 532、 Alexa Fluor 680 或 Alexa Fluor 700 的 Alexa Fluor 分子。 在某些实施方式中，染料分子是 Alexa Fluor 647 染料分子。 在某些实施方式中，染料分子含有第一类染料分子和第二类染料分子（例如，两种不同的 Alexa Fluor 染料分子），例如其中第一类和第二类染料分子具有不同的发射光谱。 第一类与第二类染料分子的数目比可以为例如 4 ： 1、3 ： 1、2 ： 1、1 ： 1、1 ： 2、1 ： 3 或 1 ： 4。 结合伴侣可以为例如抗体。

[0158] 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测标记物的标记，其中所述标记包含所述标记物的结合伴侣和荧光部分，其中所述荧光部分在受到在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出至少约 200 个光子，其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，所述荧光部分包含荧光分子。 在某些实施方式中，所述荧光部分包含多个荧光分子，例如，约 2 ～ 10、2 ～ 8、2 ～ 6、2 ～ 4、3 ～ 10、3 ～ 8 或 3 ～ 6 个荧

光分子。 在某些实施方式中，所述标记包含约 2 ～ 4 个荧光分子。 在某些实施方式中，荧光染料分子包含至少一个取代的吲哚鎓环体系，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或共轭的物质。 在某些实施方式中，荧光分子选自 Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、 Alexa Fluor 647、 Alexa Fluor 680 或 Alexa Fluor 700。 在某些实施方式中，荧光分子选自 Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 680 或 Alexa Fluor700。在某些实施方式中，荧光分子是 Alexa Fluor 647 分子。 在某些实施方式中，所述结合伴侣包含抗体。 在某些实施方式中，所述抗体是单克隆抗体。 在其它实施方式中，所述抗体是多克隆抗体。

[0159] 所述抗体可以对于任何合适的标记物具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于选自以下的标记物具有特异性：细胞因子、生长因子、肿瘤学标记物、炎症标记物、内分泌标记物、自身免疫标记物、甲状腺标记物、心血管标记物、糖尿病标记物、传染病标记物、神经学标记物、呼吸道标记物、胃肠道标记物、肌肉骨骼标记物、皮肤病学病症和代谢标记物。

[0160] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为细胞因子的标记物具有特异性。 在某些实施方式中，所述细胞因子选自 BDNF、 CREBpS133、总 CREB(CREB Total)、DR-5、 EGF、 ENA-78、 Eotaxin、脂肪酸结合蛋白、碱性 FGF、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、 GCP-2、粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF(GM-CSF)、生长相关癌基因角质形成细胞 (GRO-KC)、 HGF、 ICAM-1、 IFN-α 、 IFN-γ 、白细胞介素 (IL-10、IL-11、IL-12、IL-12 p40、IL-12 p40/p70、IL-12 p70、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1α 、IL-1β 、IL-1ra、IL-1ra/IL-1F3、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、 IL-7、 IL-8、 IL-9)、干扰素诱导型蛋白 (10IP-10)、 JE/MCP-1、角质形成细胞 (KC)、 KC/GROa、 LIF、淋巴细胞趋化因子、 M-CSF、单核细胞趋化蛋白 (MCP-1)、MCP-1(MCAF)、 MCP-3、 MCP-5、 MDC、 MIG、 巨噬细胞炎性 (MIP-1α)、MIP-1β 、 MIP-1γ 、 MIP-2、 MIP-3β 、 OSM、 PDGF-BB、激活时受调节的、正常 T 细胞表达和分泌的 (RANTES)、Rb(pT821)、Rb(总)、RbpSpT249/252、Tau(pS214)、Tau(pS396)、 Tau(总)、组织因子、肿瘤坏死因子 -α (TNF-α)、 TNF-β 、 TNF-RI、TNF-RII、VCAM-I 和 VEGF。

[0161] 在某些实施方式中，所述细胞因子选自 IL-12p70、 IL-10、 IL-1α 、 IL-3、IL-12 p40、IL-1ra、IL-12、IL-6、IL-4、IL-18、IL-10、IL-5、Eotaxin、IL-16、MIG、IL-8、IL-17、IL-7、IL-15、IL-13、IL-2R(可溶性)、IL-2、LIF/HILDA、IL-1β 、Fas/CD95/Apo-1 和 MCP-1。

[0162] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为生长因子 (GF) 的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于作为生长因子 TGF-β 的标记物具有特异性。 在某些实施方式中，所述生长因子是：EGF 配体，例如，双向调节蛋白、 LRIG3、 β 动物纤维素、神经调节蛋白 1/NRG1、 EGF、神经调节蛋白 3/NRG3、 Epigen、 TGF-α 、表皮调节素、 TMEFF1/Tomoregulin-1、 HB-EGF、 TMEFF2、 LRIG1 ; EGFR/ErbB 受体家族，例如， EGF R、 ErbB3、 ErbB2、 ErbB4 ; FGF 家族，例如， FGF 配体 (酸性 FGF、 FGF-12、碱性 FGF、 FGF-13、 FGF-3、 FGF-16、 FGF-4、 FGF-17、 FGF-5、FGF-19、FGF-6、FGF-20、FGF-8、FGF-21、FGF-9、FGF-22、FGF-10、FGF-23、

FGF-11、KGF/FGF-7)、FGF 受体 (FGF R1 ～ 4、FGF R3、FGF R1、FGF R4、FGF R2、FGF R5)、FGF 调节剂 (FGF-BP)；刺猬因子家族，沙漠刺猬因子、声波刺猬因子、印度刺猬因子；刺猬因子相关分子和调节剂 BOC、GLI-3、CDO、GSK-3α/β、DISP1、GSK-3α、Gas1、GSK-3β、GLI-1、Hip、GLI-2；IGF 家族，IGF 配体 (IGF-I、IGF-II)、IGF-I 受体 (CD221)IGF-I R，和 IGF 结合蛋白 (IGFBP) 家族 (ALS、IGFBP-5、CTGF/CCN2、IGFBP-6、Cyr61/CCN1、IGFBP-L1、Endocan、IGFBP-rp1/IGFBP-7、IGFBP-1、IGFBP-rP10、IGFBP-2、NOV/CCN3、IGFBP-3、WISP-1/CCN4、IGFBP-4)；受体酪氨酸激酶 Ax1、FGFR4、C1q R1/CD93、FGF R5、DDR1、Flt-3、DDR2、HGF R、Dtk、IGF-I R、EGF、R IGF-II R、Eph、INSRR、EphA1、胰岛素 R/CD220、EphA2、M-CSF R、EphA3、Mer、EphA4、MSP R/Ron、EphA5、MuSK、EphA6、PDGF Rα、EphA7、PDGF Rβ、EphA8、Ret、EphB 1、RTK 样孤儿受体 1/ROR1、EphB2、RTK 样孤儿受体 2/ROR2、EphB3、SCF R/c-kit、EphB4、Tie-1、EphB6、Tie-2、ErbB2、TrkA、ErbB3、TrkB、ErbB4、TrkC、FGF、R1-4 VEGF R、FGF R1、VEGF R1/Flt-1、FGF R2、VEGF R2/KDR/Flk-1、FGF R3、VEGF R3/FU-4；蛋白多糖和调节蛋白多糖，聚集蛋白聚糖、Mimecan、Agrin、NG2/MCSP、双糖链蛋白聚糖、骨粘附蛋白聚糖、核心蛋白聚糖、Podocan、DSPG3、δ-肌聚糖、Endocan、粘结蛋白聚糖 -1/CD138、Endoglycan、粘结蛋白聚糖 -2、Endorepellin/ 基底膜蛋白聚糖、粘结蛋白聚糖 -3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 2、粘结蛋白聚糖 -4、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、睾丸蛋白聚糖 1/SPOCK1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 5、睾丸蛋白聚糖 2/SPOCK2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 6、睾丸蛋白聚糖 3/SPOCK3、人基膜聚糖、多功能蛋白聚糖、蛋白聚糖调节剂、芳基硫酸酯酶 A/ARSA、氨基葡萄糖 (N- 乙酰基)-6- 硫酸酯酶 /GNS、Exostosin 样 2/EXTL2、HS6ST2、Exostosin 样 3/EXTL3、艾杜糖 -2- 硫酸酯酶 /IDS、GalNAc4S-6ST；SCF、Flt-3 配体和 M-CSF Flt-3、M-CSF R、Flt-3 配体、SCF、M-CSF、SCF R/c-kit；TGF-β 超家族 (与炎症标记物所列相同)；VEGF/PDGF 家族，神经纤毛蛋白 1、PlGF、神经纤毛蛋白 -2、P1GF-2、PDGF、VEGF、PDGF Rα、VEGF-B、PDGFR β、VEGF-C、PDGF-A、VEGF-D、PDGF-AB、VEGF R、PDGF-B、VEGF R1/FIt-1、PDGF-C、VEGF R2/KDR/Flk-1、PDGF-D、VEGF R3/FH-4；Wnt 相关分子 Dickkopf 蛋白和 Wnt 抑制剂、Dkk-1、Dkk-4、Dkk-2、Soggy-1、Dkk-3、WIF-1 Frizzled 及相关蛋白，Frizzled-1、Frizzled-8、Frizzled-2、Frizzled-9、Frizzled-3、sFRP-1、Frizzled-4、sFRP-2、Frizzled-5、sFRP-3、Frizzled-6、sFRP-4、Frizzled-7、MFRP Wnt 配体，Wnt-1、Wnt-8a、Wnt-2b、Wnt-8b、Wnt-3a、Wnt-9a、Wnt-4、Wnt-9b、Wnt-5a、Wnt-10a、Wnt-5b、Wnt-10b、Wnt-7a、Wnt-11、Wnt-7b；其它 Wnt 相关分子，如 APC、Kremen-2、Axin-1、LRP-I、β- 连环蛋白、LRP-6、蓬乱蛋白 -1、Norrin、蓬乱蛋白 -3、PKC β1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3、Pygopus-1、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 5、Pygopus-2、GSK-3α/β、R- 脊椎蛋白 1、GSK-3α、R- 脊椎蛋白 2、GSK-3β、R- 脊椎蛋白 3、ICAT、RTK 样孤儿受体 1/ROR1、Kremen-1、RTK 样孤儿受体 2/ROR，以及其它生长因子，CTGF/CCN2、β-NGF、Cyr61/CCN1、Norrin、DANCE、NOV/CCN3、EG-VEGF/PK1、骨织素、Hepassocin、PD-ECGF、HGF、前颗粒蛋白、LECT2、血小板生成素、LEDGF 或 WISP-1/CCN4。

[0163] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为癌症标记物（肿瘤学标记物）的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述标记物对于作为癌症标记物 EGF 的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述标记物对于作为癌症标记物 TNF-α 的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述标记物对于作为癌症标记物 PSA 的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述标记物对于作为癌症标记物 VEGF 的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述标记物对于作为癌症标记物 TGF-β 的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述标记物对于作为癌症标记物 FGFb 的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述标记物对于作为癌症标记物 TRAIL 的标记物具有特异性。在某些实施方式中，所述标记物对于作为癌症标记物 TNF-RI(p55) 的标记物具有特异性。

[0164] 在其它实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 α-胎蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 ER β/NR3 A2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 ErbB2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物激肽释放酶 3/PSA 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 ERα/NR3A1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物孕酮 R/NR3C3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 A33 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 MIA 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 Aurora A 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 MMP-2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 Bcl-2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 MMP-3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物钙粘蛋白 -13 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 MMP-9 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 E-钙粘蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 NEK2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物碳酸酐酶 IX 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物神经巢蛋白 (Nestin) 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 β-连环蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 NG2/MCSP 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物组织蛋白酶 D 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物骨桥蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 CD44 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 p21/CIP1/CDKN1A 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 CEACAM-6 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 p27/Kip1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 Cornulin 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 p53 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 DPP A4 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物催乳素具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 ECM-1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 PSP94 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 EGF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 S100B 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 EGF R 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 S100P 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 EMMPRIN/CD147 具有特异性。在

某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 SCF R/c-kit 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物成纤维细胞活化蛋白 α /FAP 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物丝氨酸蛋白酶抑制蛋白 E1/PAI-1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物酸性 FGF 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物血清淀粉样蛋白 A4 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物碱性 FGF 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物存活素具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物半乳糖凝集素 -3 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TEM8 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TIMP-1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 HIN-1/Secretoglobulin 3A1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TIMP-2 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 IGF-I 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TIMP-3 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 IGFBP-3 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TIMP-4 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 IL-6 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TNF-α /TNFSF1A 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物激肽释放酶 6/ 神经脉蛋白具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 TRAF-4 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 M-CSF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 uPA 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物蛋白裂解酶 (Matriptase)/ST14 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 uPAR 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物间皮素 (Mesothelin) 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 VCAM-1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物甲硫氨酸氨肽酶具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物 VEGF 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于癌症标记物甲硫氨酸氨肽酶 2 具有特异性。

[0165] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为炎症标记物的标记物具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 ICAM-1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 RANTES 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 MIP-2 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 MIP-1β 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 MIP-1α 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于炎症标记物 MMP-3 具有特异性。

[0166] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为内分泌功能标记物的标记物具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于内分泌功能标记物 17β- 雌二醇 (E2) 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于内分泌功能标记物 DHEA 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于内分泌功能标记物 ACTH 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于内分泌功能标记物胃泌素具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于内分泌功能标记物生长激素具有特异性。

[0167] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为自身免疫疾病标记物的标记物具有特异

性。 在某些实施方式中，所述抗体对于自身免疫疾病标记物 GM-CSF 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于自身免疫疾病标记物 C 反应性蛋白（CRP）具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于自身免疫疾病标记物 G-CSF 具有特异性。

[0168] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为甲状腺功能标记物的标记物具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于甲状腺功能标记物环 AMP 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于甲状腺功能标记物具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于甲状腺功能标记物降钙素具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于甲状腺功能标记物具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于甲状腺功能标记物甲状旁腺素具有特异性。

[0169] 在某些实施方式中，所述抗体对于作为心血管功能标记物的标记物具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物 B- 利钠肽具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物 NT-proBNP 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物 C 反应性蛋白 HS 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物 β- 血小板球蛋白具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物心肌肌钙蛋白具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物心肌肌钙蛋白 I 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于心血管功能标记物心肌肌钙蛋白 T 具有特异性。

[0170] 在某些实施方式中，所述抗体对于糖尿病标记物具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于糖尿病标记物 C 肽具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于糖尿病标记物瘦素具有特异性。

[0171] 在某些实施方式中，所述抗体对于传染病标记物具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于传染病标记物 IFN-γ 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于传染病标记物 IFN-α 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于传染病标记物 TREM-1 具有特异性。

[0172] 在某些实施方式中，所述抗体对于代谢标记物生物无损 PTH(1 ～ 84) 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于代谢标记物 PTH 具有特异性。

[0173] 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-1β 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TNF-α 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-6 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TnI（心脏肌钙蛋白 I）具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-8 具有特异性。

[0174] 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 Abeta 40 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 Abeta 42 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 cAMP 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 FAS 配体具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物碱性 FGF 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 GM-CSF 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IFN-α 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IFN-γ 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-1a 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-2 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-4 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-5 具有特异性。 在某些实施方式中，

所述抗体对于标记物 IL-7 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-12 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-13 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物IL-17 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 MCP-1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 MIP-1a 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 RANTES 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 VEGF 具有特异性。

[0175] 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 ACE 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物激活素 A 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物脂肪细胞因子具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物抑渴蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 AgRP 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 AKT1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物白蛋白具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 β 动物纤维素具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物韩蛙皮素 (bombesin) 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物CD14 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 CD-26 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 CD-38 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 CD-40L 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物CD-40s 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物CDK5 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物补体 C3 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物补体C4 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 C 肽具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 CRP 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 EGF 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 E- 选择蛋白具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 FAS 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 FASLG 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物胎球蛋白 A 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物纤维蛋白原具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物胃促生长素 (ghrelin) 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物高血糖素具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物生长激素具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物结合球蛋白具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物肝细胞生长因子具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 HGF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 ICAM1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IFNG 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IGF1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-1RA 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物Il-6sr 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-8 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-10 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-18 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 ILGFBP1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 ILGFBP3 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物胰岛素样生长因子 1 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 LEP 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 M-CSF 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 MMP2 具

有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 MMP9 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 NGF 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 PAI-1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 RAGE 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 RSP4 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物抵抗素具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物性激素结合球蛋白具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 SOCX3 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TGF β 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物促凝血酶原激酶具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TNF R1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 VCAM-1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 VWF 具有特异性。在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TSH 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 EPITOME 具有特异性。

[0176] 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物心脏肌钙蛋白 I 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TREM-1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-6 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 IL-8 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物白细胞三烯 T4 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 Akt1 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 TGF-β 具有特异性。 在某些实施方式中，所述抗体对于标记物 Fas 配体具有特异性。

[0177] 在某些实施方式中，荧光部分包含荧光分子。 在某些实施方式中，所述荧光部分包含多个荧光分子，例如，约 2 ～ 10、2 ～ 8、2 ～ 6、2 ～ 4、3 ～ 10、3 ～ 8 或 3 ～ 6 个荧光分子。 在某些实施方式中，所述标记包含约 2 ～ 4 个荧光分子。 在某些实施方式中，荧光染料分子包含至少一个取代的吲哚鎓环体系，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或共轭的物质。 在某些实施方式中，荧光分子选自 Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor680 或 Alexa Fluor 700。 在某些实施方式中，荧光分子选自 Alexa Fluor 488、 Alexa Fluor 532、 Alexa Fluor 680 或 Alexa Fluor 700。 在某些实施方式中，荧光分子是 Alexa Fluor 647 分子。

[0178] A. 结合伴侣

[0179] 可以使用对于待检测的分子（如标记物）的形式具有必需的特异性的任何合适的结合伴侣。 如果所述分子（如标记物）具有几种不同形式，则可以存在不同特异性的结合伴侣。 合适的结合伴侣是本领域中已知的，并且包括抗体、适体、凝集素和受体。 一类可用且多用途的结合伴侣是抗体。

[0180] 1. 抗体

[0181] 在某些实施方式中，结合伴侣是对于待检测分子具有特异性的抗体。 本文所用术语 “抗体” 是宽泛术语，且在普通意义上用于包括但不限于指代天然存在的抗体以及非天然存在的抗体，包括例如单链抗体、嵌合抗体、双功能抗体和人源化抗体及其抗体结合片段。 可以理解，对于产生抗体的分子的表位或区域的选择将决定其特异性，例如，对于分子的不同形式（如果存在时）的特异性或对于全部形式（例如，分子的全部或基本全部形式）的特异性。

[0182] 抗体制备方法已得到良好建立。 本领域技术人员可以认识到，可以利用许多程

序来制备抗体，例如，如 Antibodies， A Laboratory Manual， Ed Harlow 和 David Lane，Cold Spring Harbor Laboratory(1988)， Cold Spring Harbor， N.Y. 中所述。 本领域技术人员还可以认识到，可以通过各种程序从遗传信息制备模拟抗体的结合片段或 Fab 片段（Antibody Engineering：A Practical Approach(Borrebaeck， C. 编)，1995， Oxford University Press， Oxford；J.Immunol.149，3914-3920(1992)）。 分子（如蛋白）和标记物的单克隆和多克隆抗体也可商购（R&D Systems， Minneapolis， Minnesota；HyTest，HyTest Ltd.， Turku Finland；Abeam Inc.， Cambridge， MA，美国；Life Diagnostics，Inc.， West Chester， PA，美国；Fitzgerald Industries International， Inc.， Concord， MA 01742-3049 美国；BiosPacific，Emeryville，CA）。

[0183] 在某些实施方式中，抗体是多克隆抗体。 在其他实施方式中，抗体是单克隆抗体。

[0184] 捕获结合伴侣和检测结合伴侣对（例如，捕获和检测抗体对）可以用于本发明的实施方式中。 因此，在某些实施方式中，施用异源性测试方案，其中通常施用两种结合伴侣（例如两种抗体）。 一个结合伴侣是通常固定于固体支持体上的捕获伴侣，而另一个结合伴侣是通常带有相连的可检测标记的检测结合伴侣。 此类抗体对可获自上述资源，例如， BiosPacific， Emeryville， CA。 也可通过本领域内公知的方法来设计和制备抗体对。 本发明的组合物包含抗体对，其中该抗体对的一者是如本文所述的标记，而另一者是捕获抗体。

[0185] 在某些实施方式中，有用的是施用与作为捕获抗体和 / 或检测抗体的多种物种交叉反应的抗体。 此类实施方式包括通过确定例如作为心脏损伤标记物的心脏肌钙蛋白向血液中的释放而测定药物毒性。 交叉反应性抗体使得能够研究将作用于一个物种（例如，非人类物种）的毒性，并且能将结果直接转移至在测试试剂中使用相同抗体或抗体对的对于另一个物种（例如，人类）的研究或临床观察中，由此减小不同测试之间的可变性。 因此，在某些实施方式中，用作所关注分子的标记物（例如，心脏肌钙蛋白，如心脏肌钙蛋白 I）的结合伴侣的一种或多重抗体可以是交叉反应性抗体。 在某些实施方式中，抗体与来自选自人类、猴、狗和小鼠的至少两个物种的标记物（如心脏肌钙蛋白）交叉反应。 在某些实施方式中，抗体与来自由人类、猴、狗和小鼠组成的整个组的标记物（如心脏肌钙蛋白）交叉反应。

[0186] B. 荧光部分

[0187] 在本发明所用标记的某些实施方式中，结合伴侣（例如抗体）与荧光部分相连。该荧光部分的荧光可足以使得能够在单分子检测器（如本文所述的单分子检测器）中进行检测。

[0188] 本文所用术语“荧光部分”包括一种或多种荧光体，所述荧光体的总荧光使得能在本文所述的单分子检测器中检测到所述荧光部分。 因此，荧光部分可以包含单个荧光体（例如，量子点或荧光分子）或多个荧光体（例如，多个荧光分子）。 可以理解，当本文所用术语“部分 (moiety)”指代荧光体（例如，多个荧光分子）的基团，每个单独荧光体可以分别与结合伴侣相连，或者荧光体可以连接在一起，条件是荧光体作为一个基团而提供足以被检测的荧光。

[0189] 通常，荧光部分的荧光与以下因素的组合有关：量子效率、足以使所述荧光部

分能在单分子检测器中高于背景水平而可被检测的光漂白的缺乏、以及测试的所需检出限、准确度和精度所必需的一致性。 例如，在某些实施方式中，荧光部分的荧光使得能够在本文所述的仪器中对分子（如标记物）以小于约 10pg/ml、5pg/ml、4pg/ml、3pg/ml、2pg/ml、1pg/ml、0.1pg/ml、0.01pg/ml、0.001pg/ml、0.00001pg/ml 或 0.000001pg/ml 的检出限以及小于约 20％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或 1％以下（例如约 10％以下）的变差系数进行检测和 / 或定量。 在某些实施方式中，荧光部分的荧光使得能够在本文所述的仪器中对分子（如标记物）以小于约 5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml 或 0.001pg/ml 的检出限以及小于约 10％的变差系数进行检测和 / 或定量。

[0190] 本文所用的术语“检出限”包括能将样品鉴定为包含所关注物质的分子的最低浓度，例如，第一个非零值。 其可由零的可变性和标准曲线的斜率来定义。 例如，可以通过运行标准曲线、确定标准曲线的零值并对该值添加两个标准偏差来确定测试的检出限。 产生信号的关注分子的浓度等于作为“检出低限”浓度的值。

[0191] 此外，荧光部分具有与其在所选测试中的用途相一致的性质。 在某些实施方式中，测试为免疫测试，其中荧光部分与抗体相连；该荧光部分不必与企图抗体或蛋白聚集，也不必进行与该测试的所需准确性和精度相一致的任何进一步聚集。 在某些实施方式中，优选的荧光部分是具有以下组合的荧光部分（例如，染料分子）：1) 高吸收系数；2) 高量子产率；3) 高光稳定性（低光漂白性）；和 4) 与所关注分子（例如，蛋白）的标记的相容性，从而可以施用本发明的分析器和系统对其进行分析（例如，不会造成所关注蛋白的沉淀，或者已与所述荧光部分相连的蛋白的沉淀）。

[0192] 可用于本发明的某些实施方式中的荧光部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子）可以根据其在受 EM 辐射刺激时的光子发射特征来进行限定。 例如，在某些实施方式中，本发明利用在受到在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、350、400、500、600、700、800、900 或 1000 个光子的荧光部分（例如，包含单个荧光染料分子或多个荧光染料分子的荧光部分），其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。可以理解，通过激光输出功率和染料部分的曝光时长的许多不同组合可以获得所述总能量。例如，可以将输出功率 1mW 的激光使用 3ms，3mW 的激光使用 1ms，6mW 的激光使用 0.5ms，12mW 的激光使用 0.25ms 等等。

[0193] 在某些实施方式中，本发明利用能够在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 50 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，本发明利用能够在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 100 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，本发明利用能够在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 150 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料

分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，本发明利用能够在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 200 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，本发明利用能够在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 300 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，本发明利用能够在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 500 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。

[0194] 在某些实施方式中，荧光部分包含平均至少约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个荧光体（如荧光分子）。 在某些实施方式中，荧光部分包含平均不多于约 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 11 个荧光体（如荧光分子）。 在某些实施方式中，荧光部分包含平均约 1 ～ 11、约 2 ～ 10、约 2 ～ 8、约 2 ～ 6、约 2 ～ 5、约 2 ～ 4、约 3 ～ 10、约 3 ～ 8、约 3 ～ 6、约 3 ～ 5、约 4 ～ 10、约 4 ～ 8、约 4 ～ 6、约 2、3、4、5、6 个或大于约 6 个荧光体。 在某些实施方式中，荧光部分包含平均约 2 ～ 8 个荧光体。 在某些实施方式中，荧光部分包含平均约 2 ～ 6 个荧光体。 在某些实施方式中，荧光部分包含平均约 2 ～ 4 个荧光体。 在某些实施方式中，荧光部分包含平均约 3 ～ 10 个荧光体。 在某些实施方式中，荧光部分包含平均约 3 ～ 8 个荧光体。在某些实施方式中，荧光部分包含平均约 3 ～ 6 个荧光体。 “平均”是指在代表一组本发明的标记的给定样品中（其中该样品含有多个结合伴侣 - 荧光部分单元），特定的荧光体与结合伴侣的摩尔比（由标准分析方法确定）对应于所指定的数目或数目范围。 例如，在其中所述标记包含作为抗体的结合伴侣且荧光部分包含多个具有特定吸收的荧光染料分子的实施方式中，可以使用分光光度测试，其中将所述标记的溶液稀释至适当水平，取 280nm 处的吸收来确定蛋白（抗体）摩尔浓度，并取例如 650nm（对于 Alexa Fluor 647 而言）的吸收来确定荧光染料分子的摩尔浓度。 后者的摩尔浓度与前者之比代表与每个抗体相连的荧光部分中的荧光体（染料分子）的平均数。

[0195] 1. 染料

[0196] 在某些实施方式中，本发明使用包含荧光染料分子的荧光部分。 在某些实施方式中，本发明使用在受到在该分子的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 50 个光子的荧光染料分子，其中所述激光聚焦于含有所述分子的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 本发明使用在受到在该分子的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 75 个光子的荧光染料分子，其中所述激光聚焦于含有所述分子的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 本发明使用在受到在该分子的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 100 个光子的荧光染料分子，其中所述激光聚焦于含有所述分子的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。本发明使用在受

到在该分子的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 150 个光子的荧光染料分子，其中所述激光聚焦于含有所述分子的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 本发明使用在受到在该分子的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 200 个光子的荧光染料分子，其中所述激光聚焦于含有所述分子的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。

[0197] 在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 50 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 100 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 150 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 200 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 300 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，本发明使用在受到在该荧光染料部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出平均至少约 500 个光子的荧光染料部分（例如，单个荧光染料分子或多个荧光染料分子），其中所述激光聚焦于含有所述荧光染料部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。

[0198] 下表 2 中给出了可用于本发明的荧光部分中的有用荧光体的非囊括性列表。 在某些实施方式中，荧光染料选自 Alexa Fluor 488、 Alexa Fluor 532、 Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 700、 Alexa Fluor750、荧光素、 B- 藻红蛋白、别藻蓝蛋白、 PBXL-3 和 Qdot 605。 在某些实施方式中，荧光染料选自 Alexa Fluor 488、 Alexa Fluor 532、 Alexa Fluor 700、 Alexa Fluor 750、荧光素、 B- 藻红蛋白、别藻蓝蛋白、 PBXL-3 和 Qdot 605。

[0199] 表 2. 荧光体

[0200]

染料	E Ex (nm)	E (M)-1	Em (nm)	MMw
Bimane	380	5,700	458	282.31

Dapoxyl	373	22,000	551	362.83
二甲基氨基香豆素 -4- 乙酸	375	22,000	470	344.32
Marina blue	365	19,000	460	367.26
8- 苯胺基萘 -1- 磺酸	372		480	
瀑布蓝	376	23,000	420	607.42
Alexa Fluor 405	402	35,000	421	1028.26
瀑布蓝	400	29,000	420	607.42
瀑布黄	402	24,000	545	563.54
太平洋蓝	410	46,000	455	339.21
PyMPO	415	26,000	570	582.41
Alexa Fluor 430	433	15,000	539	701.75
Atto-425	438		486	
NBD	465	22,000	535	391.34
Alexa Fluor 488	495	73,000	519	643.41
荧光素	494	79,000	518	376.32
俄勒冈绿 488	496	76,000	524	509.38
Atto 495	495		522	
Cy2	489	150,000	506	713.78
DY-480-XL	500	40,000	630	514.60
DY-485-XL	485	20,000	560	502.59
DY-490-XL	486	27,000	532	536.58

DY-500-XL	505	90,000	555	596.68
DY-520-XL	520	40,000	664	514.60
Alexa Fluor 532	531	81,000	554	723.77
BODIPY 530/550	534	77,000	554	513.31
6-HEX	535	98,000	556	680.07
6-JOE	522	75,000	550	602.34
罗丹明 6G	525	108,000	555	555.59
染料	E Ex(nm)	E(M)-1	Em(nm)	MMw
Atto-520	520		542	
Cy3B	558	130,000	572	658.00
Alexa Fluor 610	612	138,000	628	
Alexa Fluor 633	632	159,000	647	ca.1200
Alexa Fluor 647	650	250,000	668	ca.1250
BODIPY 630/650	625	101,000	640	660.50
Cy5	649	250,000	670	791.99
Alexa Fluor 660	663	110,000	690	
Alexa Fluor 680	679	184,000	702	
Alexa Fluor 700	702	192,000	723	
Alexa Fluor 750	749	240,000	782	
B- 藻红蛋白	546，565	2,410,000	575	240,000
R- 藻红蛋白	480，546，565	1,960,000	578	240,000

别藻蓝蛋白	650	700,000	660	700,000
PBXL-1	545		666	
PBXL-3	614		662	

[0201]

[0202] Atto-tec 染料

[0203]

名称	Ex (nm)	Em (nm)	QY	τ (ns)
Atto 425	436	486	0.9	3.5
Atto 495	495	522	0.45	2.4
Atto 520	520	542	0.9	3.6
Atto 560	561	585	0.92	3.4
Atto 590	598	634	0.8	3.7
Atto 610	605	630	0.7	3.3
Atto 655	665	690	0.3	1.9
Atto 680	680	702	0.3	1.8

[0204] Dyomics Fluors

[0205]

标记	Ex (nm)	分子吸收* [l·mol-1·cm-1]	Em (nm)	分子量# [g·mol-1]
DY-495/5	495	70,000	520	489.47
DY-495/6	495	70,000	520	489.47
DY-495X/5	495	70,000	520	525.95
DY-495X/6	495	70,000	520	525.95
DY-505/5	505	85,000	530	485.49
DY-505/6	505	85,000	530	485.49

[0206]

标记	Ex (nm)	分子吸收* [l·mol-1·cm-1]	Em (nm)	分子量# [g·mol-1]
DY-505X/5	505	85,000	530	523.97
DY-505X/6	505	85,000	530	523.97
DY-550	553	122,000	578	667.76
DY-555	555	100.000	580	636.18
DY-610	609	81.000	629	667.75
DY-615	621	200.000	641	578.73
DY-630	636	200.000	657	634.84
DY-631	637	185.000	658	736.88
DY-633	637	180.000	657	751.92
DY-635	647	175.000	671	658.86
DY-636	645	190.000	671	760.91
DY-650	653	170.000	674	686.92
DY-651	653	160.000	678	888.96
DYQ-660	660	117,000	-	668.86
DYQ-661	661	116,000	-	770.90
DY-675	674	110.000	699	706.91
DY-676	674	145.000	699	807.95
DY-680	690	125.000	709	634.84
DY-681	691	125.000	708	736.88
DY-700	702	96.000	723	668.86
DY-701	706	115.000	731	770.90
DY-730	734	185.000	750	660.88
DY-731	736	225.000	759	762.92
DY-750	747	240.000	776	712.96
DY-751	751	220.000	779	814.99
DY-776	771	147.000	801	834.98
DY-780-OH	770	70.000	810	757.34
DY-780-P	770	70.000	810	957.55
DY-781	783	98.000	800	762.92
DY-782	782	102.000	800	660.88
EVOblue-10	651	101.440	664	389.88
EVOblue-30	652	102.000	672	447.51

[0207] 量子点：Qdot 525、QD 565、QD 585、QD 605、QD 655、QD 705、QD 800

[0208] 可用于本发明的合适染料包括经修饰的羰花青染料。此类修饰包括羰花青染料的吲哚鎓环的修饰，该修饰使得在 3 位存在反应性基团或缀合的物质。与用结构相似的羰花青染料标记（通过 1 位的氮原子结合）的缀合物相比，吲哚鎓环的所述修饰提供的缀

合物在蛋白、核酸和其它生物高分子上具有均匀且显著更强的荧光。 除相比于结构相似的染料在基本相同的波长处具有更强的荧光发射、以及在与生物高分子聚合时其吸收光谱中的伪像 (artifact) 减少以外，修饰的羰花青染料比结构相似的染料在峰值吸收波长处具有更大的光稳定性和更高的吸收（消光系数）。 因此，修饰的羰花青染料在使用修饰染料及其缀合物的测试中产生了更高的灵敏度。 优选的修饰染料包括具有至少一个取代的吲哚鎓环体系的化合物，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或缀合的物质。 其它染料化合物包括并入有氮杂氮茚鎓 (azabenzazolium) 环部分和至少一个磺酸酯部分的化合物。 美国专利 6,977,305 中描述了可用于检测本发明的各种实施方式中的各分子的修饰的羰花青染料，本文通过参考并入其全部内容。 因此，在某些实施方式中，本发明的标记利用包含取代的吲哚鎓环体系的荧光染料，其中所述吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或缀合物基团。

[0209] 在某些实施方式中，标记包含荧光部分，该荧光部分包含一种或多种 Alexa Fluor 染料 (Molecular Probes， Eugene， OR)。 Alexa Fluor 染料公开于美国专利 Patent 6,977,305、6,974,874、6,130,101 和 6,974,305 中，本文通过参考并入其全部内容。 本发明的某些实施方式利用选自 Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、 Alexa Fluor 610、 Alexa Fluor 680、 Alexa Fluor 700 和 Alexa Fluor 750 的染料。 本发明的某些实施方式利用选自 Alexa Fluor 488、 Alexa Fluor 532、 Alexa Fluor 647、 Alexa Fluor 700 和 Alexa Fluor 750 的染料。 本发明的某些实施方式利用选自 Alexa Fluor488、 Alexa Fluor 532、 Alexa Fluor 555、 Alexa Fluor 610、 Alexa Fluor680、 Alexa Fluor 700 和 Alexa Fluor 750 的染料。 本发明的某些实施方式利用 Alexa Fluor 647 分子，该分子在约 650nm ～ 660nm 具有最大吸收且在约 660nm ～ 670nm 具有最大发射。 Alexa Fluor 647 染料单独使用或与其它 Alexa Fluor 染料组合使用。

[0210] 通过添加入聚乙烯等疏水性基团来使目前可获取的有机荧光物 (fluor) 的疏水性降低，从而可以改进此类有机荧光物。 替代性地，可以通过使当前磺化的有机荧光物具有两性离子性而使该当前磺化的有机荧光物（如 Alexa Fluor 647 染料）的酸性降低。 用修饰的荧光物标记的颗粒（如抗体）较不易与免疫测试中的表面和蛋白非特异性地结合，由此使得能够产生具有更高灵敏度和更低背景的测试。 用于出于增加单分子检测系统的灵敏度的目的而修饰和改进荧光染料的性质的方法是本领域内已知的。 优选的是，所述修饰改善了斯托克斯位移而同时保持了高量子产率。

[0211] 2. 量子点

[0212] 在某些实施方式中，用于使用本发明的分析器系统来检测样品中的分子的荧光标记部分是量子点。 量子点 (QD) 也称为半导体纳米晶体或人工原子，是含有 100 ～ 1,000 中的任何数目电子的半导体晶体，其直径为 2nm ～ 10nm。 某些 QD 的直径为 10nm ～ 20nm。 QD 具有高量子产率，这使其对于光学应用特别有用。 QD 是通过形成激子而发荧光的荧光团，激子与传统荧光团的激发态相似，但具有多达 200 纳秒的长得多的寿命。 该性质为 QD 提供了低光漂白性。 可以通过改变 QD 的尺寸和形状以及 QD 电势的深度来控制 QD 的能级。 小的激子 QD 的一个光学特征是显色，而这由该量子点的尺寸所决定。 量子点越大则越红，或更偏向荧光光谱的红端。 量子点越小则越蓝，或者更偏向蓝端。 决定能量并因而决定荧光颜色的带隙能 (bandgap energy) 与 QD 的尺寸

的平方成反比。 更大 QD 具有更多能级，且这些能级间隔更近，由此使得 QD 能吸收含更少能量的光子（即更靠近光谱的红端的那些光子）。 由于量子点的发射率取决于带隙，因而可以以极大的精度来控制量子点的输出波长。 在某些实施方式中，用单分子分析器系统检测的蛋白以 QD 进行标记。 在某些实施方式中，将单分子分析器用于检测以一个 QD 标记的蛋白，并使用滤光器以允许在不同波长检测不同蛋白。

[0213] QD 具有较宽激发和窄发射的性质，这在与滤色共同使用时仅需要单个电磁辐射源以在对单个样品中的多个靶标的多重分析期间分辨个别信号。 因此，在某些实施方式中，所述分析器系统包含一个连续波激光和各自以一个 QD 标记的颗粒。 经胶体制备的 QD 是自由漂浮的，并且能经由金属配位官能团与多种分子相连。 这些官能团包括但不限于硫醇、胺、腈、膦、氧化膦、膦酸、羧酸或其它配体。 通过使合适的分子与表面建和，可以将量子点分散或溶解于几乎任何溶剂中或者并入多种无机和有机膜中。 可以直接通过马来酰亚胺脂偶联反应将量子点 (QD) 与抗生物素链霉亲和蛋白偶合，或者通过马来酰亚胺 - 硫醇偶合反应将 QD 与抗体偶合。 这产生具有共价连接于表面上的生物分子的材料，从而产生具有高度特异性活性的缀合物。 在某些实施方式中，将用单分子分析器检测的蛋白用一个量子点标记。 在某些实施方式中，所述量子点的直径是 10nm ～ 20nm。 在其它实施方式中，所述量子点的直径是 2nm ～ 10nm。 在其它实施方式中，所述量子点的直径是约 2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、11nm、12nm、13nm、14nm、15nm、16nm、17nm、18nm、19nm 或 20nm。 可用的量子点包括 QD605、QD 610、QD 655 和 QD 705。 优选的量子点是 QD 605。

[0214] C. 结合伴侣 - 荧光部分组合物

[0215] 本发明的标记通常含有结合伴侣（例如抗体），该结合伴侣与荧光部分结合以便为本文所述的仪器中的检测和定量所需的荧光。 结合伴侣和用于本文所述单分子检测器中的检测的荧光部分的任何合适的组合都能用作本发明中的标记。 在某些实施方式中，本发明提供了用于生物状态标记物的标记，其中该标记包含所述标记物的抗体和荧光部分。 所述标记物可以是上述任何标记物。 所述抗体可以是上述任何抗体。 荧光部分可以连接来使得所述标记能够在受到在所述荧光部分的激发波长发光的激光的刺激而发出平均至少约 50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、350、400、500、600、700、800、900 或 1000 个光子，其中所述激光聚焦于含有所述标记的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，所述荧光部分可以是能够在受到在所述荧光部分的激发波长发光的激光的刺激而发出平均至少约 50、100、150 或 200 个光子，其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。所述荧光部分可以包含一个或多个染料分子，该染料分子的结构包含取代的吲哚鎓环体系，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或缀合物基团。 所述标记组合物可以包含荧光部分，该荧光部分包含选自 Alexa Fluor488，Alexa Fluor 532，Alexa Fluor 647，Alexa Fluor 700 或 Alexa Fluor750 的一个或多个染料分子。 所述标记组合物可以包含荧光部分，该荧光部分包含选自 Alexa Fluor 488，Alexa Fluor 532，Alexa Fluor 700 或 Alexa Fluor 750 的一个或多个染料分子。 所述标记组合物可以包含荧光部分，该荧光部分包含作为 Alexa Fluor 488 的一个或多个染料分子。 所述标记组合物可以包含荧光部分，该荧

光部分包含作为 Alexa Fluor 555 的一个或多个染料分子。 所述标记组合物可以包含荧光部分，该荧光部分包含作为 Alexa Fluor 610 的一个或多个染料分子。 所述标记组合物可以包含荧光部分，该荧光部分包含作为 Alexa Fluor647 的一个或多个染料分子。所述标记组合物可以包含荧光部分，该荧光部分包含作为 Alexa Fluor 680 的一个或多个染料分子。所述标记组合物可以包含荧光部分，该荧光部分包含作为 Alexa Fluor 700 的一个或多个染料分子。 所述标记组合物可以包含荧光部分，该荧光部分包含作为 Alexa Fluor 750 的一个或多个染料分子。

[0216] 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物，所述组合物包含 Alexa Fluor 分子，例如选自上述组的 Alexa Fluor 分子，如与对所述标记物特异的抗体相连的 Alexa Fluor647 分子。 在某些实施方式中，所述组合物包含平均约 1 to 11、约 2to 10、约 2 to 8、约 2 to 6、约 2 to 5、约 2 to 4、约 3 to 10、约 3 to8、约 3 to 6、约 3 to 5、约 4 to 10、约 4 to 8、约 4 to 6、约 2、3、4、5、6 个或多于约 6 个 Alexa Fluor 647 分子，该 Alexa Fluor 647 分子与可检测所述标记物的抗体相连。 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物，所述组合物包含平均约 1 ～ 11、约 2 ～ 10、约 2 ～ 8、约 2 ～ 6、约 2 ～ 5、约 2 ～ 4、约 3 ～ 10、约 3 ～ 8、约 3 ～ 6、约 3 ～ 5、约 4 ～ 10、约 4 ～ 8、约 4 ～ 6、约 2、3、4、5、6 个或多于 6 个 Alexa Fluor 647 分子，该Alexa Fluor 647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物，所述组合物包含平均约 2 ～ 10 个 Alexa Fluor 647 分子，该 Alexa Fluor 647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物，所述组合物包含平均约 2 ～ 8 个 Alexa Fluor 647 分子，该 Alexa Fluor 647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物，所述组合物包含平均约 2 ～ 6 个 Alexa Fluor 647 分子，该 Alexa Fluor647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物，所述组合物包含平均约 2 ～ 4 个 Alexa Fluor 647 分子，该 Alexa Fluor 647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物，所述组合物包含平均约 3 ～ 8 个 Alexa Fluor 647 分子，该 Alexa Fluor 647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物，所述组合物包含平均约 3 ～ 6 个 Alexa Fluor 647 分子，该 Alexa Fluor 647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物状态标记物的组合物，所述组合物包含平均约 4 ～ 8 个 Alexa Fluor 647 分子，该 Alexa Fluor 647 分子与对所述标记物特异的抗体相连。

[0217] 可以通过任何合适的方法来将荧光部分或构成荧光部分的荧光体与结合伴侣（如抗体）相连；此类方法是本领域内公知的，且示例性方法在实施例中给出。在某些实施方式中，在将荧光部分与结合伴侣连接而形成用于本发明的方法中的标记之后，并在使用该标记对所关注的标记物进行标记之前，可以使用所述标记执行过滤步骤。 例如，可以将抗体－染料标记在使用前过滤例如通过 0.2 微米过滤器或任何合适的用于除去聚集物的过滤器。用于本发明的测试中的其它试剂也能例如通过 0.2 微米过滤器或任何合适的过滤器而过滤掉。 不受限于理论，据认为这种过滤除去了例如抗体－染料标记的一部分

聚集体。 此类聚集体能作为一个单元与所关注的蛋白结合，但在洗脱缓冲液中释放时，所述聚集物很可能崩解。 因此，当从仅与单个所关注蛋白分子结合的聚集物检测到数个标记时，可能产生假阳性结果。 不论理论如何，已发现过滤可减少后续测试中的假阳性并改善准确性和精度。

[0218] 可以理解，免疫测试常常采用夹心形式，其中使用对于相同分子（如标记物）的结合伴侣对（如抗体）。 本发明还涵盖了结合伴侣对（如抗体），其中两个抗体对于相同分子（如相同标记物）都具有特异性，且其中至少所述结合伴侣对中的一者是本文所述的标记。 因此，对于包含结合伴侣和荧光部分的任何标记而言，本发明还涵盖了如下的一对结合伴侣：其中第一结合伴侣（如抗体）是所述标记的一部分，而第二结合伴侣（如抗体）通常未经标记且充当捕获结合伴侣。 另外，结合伴侣对常用于 FRET 测试。 可用于本发明的 FRET 测试公开于美国专利申请第 11/048,660 中，本文通过参考并入其全部内容，且本发明还涵盖了其中每个结合伴侣都包含 FRET 标记的结合伴侣对。

[0219] IV. 高灵敏的分子分析

[0220] 在一方面，本发明提供了用于确定样品中单分子（如生物学状态标记物分子）的存在或缺失的方法，所述方法包括：i) 将所述分子如果存在时用标记进行标记；和 ii) 检测所述标记的存在或缺失，其中检测到标记存在表明样品中存在所述单分子。 在某些实施方式中，所述方法能以小于约 100、80、60、50、40、30、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.01、0.005 或 0.001 飞摩尔的检出限检测分子。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100 飞摩尔的检出限检测分子。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10 飞摩尔的检出限检测分子。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1 飞摩尔的检出限检测分子。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1 飞摩尔的检出限检测分子。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01 飞摩尔的检出限检测分子。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001 飞摩尔的检出限检测分子。 可以通过使用适当的标准物（例如，国家标准和技术研究所的参照标准材料）来确定检出限。

[0221] 所述方法还提供了通过检测样品中分子的单分子来确定样品中分子（例如，表明生物学状态的标记物）的浓度的方法。 单分子的“检测”包括直接和间接检测分子。 在间接检测的情形中，可以检测对应于单分子的标记，例如与所述单分子相连的标记。

[0222] 在某些实施方式中，本发明提供了用于确定生物样品中蛋白的单分子的存在或缺失的方法，所述方法包括用标记对所述分子进行标记和在单分子检测器中检测所述标记的存在或缺失，其中所述标记包含荧光部分，该荧光部分能够在受到在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出至少约 200 个光子，其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，单分子检测器可以包含不多于一个询查空间。 样品中的单分子的检出限可以小于约 10、1、0.1、0.01 或 0.001 飞摩尔。 在某些实施方式中，检出限小于约 1 飞摩尔。 检测可以包括对荧光部分所发出的电磁辐射的检测。 所述方法还可以包括将荧光部分暴露于电磁辐射中，例如，激光提供的电磁辐射，所述激光如具有约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20mW 的输出功率的激光。 在某些实施方式中，激光刺激为询查空间提供了约 10 微秒～ 1000 微秒或者约

1000、250、100、50、25 或 10 微秒的光。 在某些实施方式中，所述标记还包含对于与所述分子的结合具有特异性的结合伴侣，例如抗体。 在某些实施方式中，所述荧光部分包含荧光染料分子，例如包含至少一个取代的吲哚鎓环体系的染料分子，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或缀合物质。 在某些实施方式中，所述染料分子是选自 Alexa Fluor 488、Alexa Fluor532、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 680 或 Alexa Fluor 700 的 Alexa Fluor 分子。 在某些实施方式中，所述染料分子是 Alexa Fluor 647 染料分子。 在某些实施方式中，荧光部分包含多个 Alexa Fluor 647 染料分子。 在某些实施方式中，所述多个 Alexa Fluor 647 染料分子包含约 2 ～ 4 个 Alexa Fluor 647 染料分子，或约 3 ～ 6 个 Alexa Fluor 647 染料分子。 在某些实施方式中，荧光部分是量子点。 所述方法还可以包括测定样品中蛋白的浓度。

[0223] 在某些实施方式中，检测所述标记的存在或缺失包括 ：(i) 使所述样品的一部分通过询查空间 ；(ii) 使所述询查空间暴露于电磁辐射，所述电磁辐射足以在存在所述标记时刺激所述荧光部分发射光子 ；和 (iii) 检测步骤 (ii) 的所述曝光期间发出的光子。 所述方法还可以包括确定所述询查空间中的背景光子水平，其中所述背景水平表示在以与步骤 (ii) 中相同的方式受到电磁辐射但在询查空间中没有标记时询查空间的平均光子发射。 所述方法还可以包括将步骤 (iii) 中检测到的光子量与阈值光子水平进行比较，其中所述阈值光子水平是所述背景光子水平的函数，其中步骤 (iii) 中检测到的光子量大于阈值水平则表明所述标记存在，而步骤 (iii) 中检测到的光子量小于或等于阈值水平则表明所述标记不存在。

[0224] A. 样品

[0225] 样品可以为任何合适的样品。 通常，样品为生物样品，例如生物流体。 此类流体包括但不限于支气管肺泡灌洗液 (BALF)、血液、血清、血浆、尿液、鼻拭子、脑脊液、胸膜液、关节液、腹膜液、羊水、胃液、淋巴液、组织间液、组织匀浆、细胞提取物、唾液、痰、粪便、生理分泌物、泪液、粘液、汗液、奶、精、精液、阴道分泌物、溃疡和其它表面皮疹、水泡液和脓液以及组织（包括正常组织、恶性组织和疑似组织或者任何其它的可能含有所关注的靶标颗粒的身体组成部分的活组织检查）提取物。 其它类似的样本（例如、细胞后组织培养物或者培养液）也是所关注的。

[0226] 在某些实施方式中，所述样品是血液样品。 在某些实施方式中，所述样品是血浆样品。 在某些实施方式中，所述样品是血清样品。 在某些实施方式中，所述样品是尿液样品。 在某些实施方式中，所述样品是鼻拭子。 在某些实施方式中，所述样品是细胞裂解物。 在某些实施方式中，所述样品是组织样品。

[0227] B. 样品制备

[0228] 通常，可以使用可产生对应于所关注分子（如待测定的生物状态标记物）的标记的任何样品制备方法，其中所述标记可在本发明的仪器中检测。 如本领域中已知，可以以同源性或异源性方式进行其中将标记添加至一个或多个分子的样品制备。 在某些实施方式中，以同源性方式形成样品制剂。 在采取同源性方式的分析器系统中，不将未结合的标记从样品中除去。 参见例如，美国专利申请第 11/048,660 号。 在某些实施方式中，通过添加与所关注的一个或多个颗粒结合的一个或多个经标记的抗体来对所述一个或多个颗粒进行标记。

[0229] 在某些实施方式中，使用异源性测试方式，其中通常采用一个除去未结合标记的步骤。 此类测试方式是本领域中公知的。 一个特别有用的测试方式是夹心测试，例如夹心免疫测试。 在这种方式中，使用捕获结合伴侣将所关注的分子（如生物状态标记物）捕获于例如固体支持体上。 然后必要时将不合需要的分子和其它物质洗涤除去，接着结合包含检测结合伴侣和可检测标记（如荧光部分）的标记。 进一步的冲洗除去未结合的标记，然后将可检测标记释放，其通常但不是必然仍与检测结合伴侣相连。 在替代性实施方式中，将样品和标记添加至捕获结合伴侣而不在其间进行洗涤，例如同时添加。 其它变化形式对于本领域技术人员是显而易见的。

[0230] 在某些实施方式中，用于检测所关注分子（如生物状态标记物）的方法使用带有作为捕获结合伴侣的抗体（如单克隆抗体）的夹心测试。 所述方法包括将样品中的分子与固定于结合表面上的捕获抗体结合，和将包含检测抗体的标记与形成“夹心”复合物的分子结合。 如本文所述，所述标记包含检测抗体和荧光部分，后者使用例如本发明的单分子分析器进行检测。 已知有许多夹心免疫测试的实例，一些实例如 Grubb 等的美国专利第 4,168,146 号和 Tom 等的美国专利第 4,366,241 中所述，本文通过参考并入两者的全部内容。 对于特定标记物的进一步具体实例描述于实施例中。

[0231] 捕获结合伴侣可以与固体支持物相连，例如，微滴定板或顺磁珠。 在某些实施方式中，本发明提供了所关注分子（如生物状态标记物）的结合伴侣，其与顺磁珠相连。可以使用对于期望捕获的分子特异的任何合适的结合伴侣。 结合伴侣可以是抗体，如单克隆抗体。 抗体的制备和来源如本文其它部分所述。 可以理解，本文鉴定为可用作捕获抗体的抗体也可用作检测抗体，反之亦然。

[0232] 结合伴侣（如抗体）与固体支持物的连接可以是共价或非共价的。 在某些实施方式中，所述连接是非共价的。 本领域内公知的非共价连接的实例是生物素 - 抗生物素蛋白 / 抗生物素链霉亲和蛋白相互作用。 因此，在某些实施方式中，如微滴定板或顺磁珠等固体支持物与捕获结合伴侣（如抗体）通过非共价连接（例如，生物素 - 抗生物素蛋白 / 抗生物素链霉亲和蛋白相互作用）而相连。 在某些实施方式中，所述连接是共价连接。 因此，在某些实施方式中，如微滴定板或顺磁珠等固体支持物与捕获结合伴侣（如抗体）通过共价连接而相连。

[0233] 捕获抗体可以以优化对所关注分子的捕获的取向而共价连接。 例如，在某些实施方式中，结合伴侣（如抗体）以定向方式与固体支持物（如微滴定板或顺磁珠）相连。

[0234] 用于定向连接抗体与固体支持物的示例性方案如下。 将 IgG 溶解于 pH 5.5 的 0.1M 醋酸钠缓冲液中至最终浓度为 1mg/ml。 添加等体积的冰冷的 20mM 高碘酸钠在 0.1M 醋酸钠 (pH 5.5) 中的溶液。 使 IgG 在冰上氧化半小时。 添加 0.5 体积的 1M 甘油来淬灭过量的高碘酸盐试剂。 通过超滤除去氧化反应的低分子量副产物。 将氧化的 IgG 组分稀释至合适的浓度（通常为 0.5mg IgG/ml）并与酰肼活化的多孔板在室温反应至少 2 小时。 通过用硼酸盐缓冲盐水或其它合适的缓冲液洗涤多孔板来除去未结合的 IgG。 然后在必要时将板干燥保存。 如果微珠材料适于此类连接，则可以对于微珠遵循类似方案。

[0235] 在某些实施方式中，固体支持体是微滴定板。 在某些实施方式中，固体支持体是顺磁珠。 顺磁珠的实例是抗生物素链霉亲和蛋白 C1(Dynal，650.01-03)。 其它合适的珠对于本领域技术人员显而易见。 用于将抗体与顺磁珠连接的方法在本领域内公知。 一

个实例给出于实施例 2 中。

[0236] 所关注的分子与固定于固体支持物上的捕获结合伴侣（如捕获抗体）相接触。在样品与捕获抗体接触之前，可以使用某些样品制剂，例如来自血液样品或浓缩程序的血清制剂。 在免疫测试中结合蛋白的方案是本领域内公知的，并且包括在实施例中。

[0237] 结合所允许的时间将根据条件而有所不同；显而易见，在某些设定、尤其是临床设定中，更短的结合时间更为理想。 例如顺磁珠的使用可以减少结合所需时间。 在某些实施方式中，将所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）结合所允许的时间小于约 12、10、8、6、4、3、2 或 1 小时，或者小于约 60、50、40、30、25、20、15、10 或 5 分钟。在某些实施方式中，将所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）结合所允许的时间小于 60 分钟。在某些实施方式中，将所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）结合所允许的时间小于 50 分钟。 在某些实施方式中，将所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）结合所允许的时间小于 40 分钟。 在某些实施方式中，将所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）结合所允许的时间小于 30 分钟。 在某些实施方式中，将所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）结合所允许的时间小于 20 分钟。 在某些实施方式中，将所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）结合所允许的时间小于 15 分钟。 在某些实施方式中，将所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）结合所允许的时间小于 10 分钟。 在某些实施方式中，将所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）结合所允许的时间小于 5 分钟。

[0238] 在某些实施方式中，在所关注的分子颗粒与捕获结合伴侣（如捕获抗体）结合之后，样品中非特异性结合的颗粒以及其它不合需要的物质被洗涤除去，从而基本仅留下特异性结合的所关注分子的颗粒。 在其它实施方式中，在添加样品和标记之间没有采用洗涤，这可减少样品制备时间。 因此，在某些实施方式中，结合所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）以及结合标记与所关注分子所允许的时间均小于约 12、10、8、6、4、3、2 或 1 小时，或者小于约 60、50、40、30、25、20、15、10 或 5 分钟。 在某些实施方式中，结合所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）以及结合标记与所关注分子所允许的时间均小于约 60 分钟。 在某些实施方式中，结合所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）以及结合标记与所关注分子所允许的时间均小于约 40 分钟。 在某些实施方式中，结合所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）以及结合标记与所关注分子所允许的时间均小于约 30 分钟。在某些实施方式中，结合所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）以及结合标记与所关注分子所允许的时间均小于约 20 分钟。 在某些实施方式中，结合所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）以及结合标记与所关注分子所允许的时间均小于约 15 分钟。 在某些实施方式中，结合所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）以及结合标记与所关注分子所允许的时间均小于约 10 分钟。 在某些实施方式中，结合所关注分子与捕获结合伴侣（如抗体）以及结合标记与所关注分子所允许的时间均小于约 5 分钟。

[0239] 某些免疫测试诊断试剂、包括用于测定所关注分子的捕获和信号抗体可以源自动物血清。 能够结合其它物种的免疫球蛋白的内源性人类嗜异性抗体或人类抗动物抗体存在于大于 10％的患者的血清或血浆中。 这些循环性嗜异性抗体可能干扰免疫测试的测定。 在夹心免疫测试中，这些嗜异性抗体能将捕获和检测（诊断）抗体桥连，由此产生假阳性信号，或者其能阻断诊断抗体的结合，由此产生假阴性信号。 在竞争性免疫测试中，嗜异性抗体能与分析抗体结合并抑制其与所关注分子的结合。 嗜异性抗体还能阻

断或促进抗体 - 关注分子复合物从游离的关注分子的分离，尤其是当在分离系统中使用抗物种抗体时。 因此，这些嗜异性抗体干扰的影响难以预测，且若能阻断嗜异性抗体的结合则是有利的。 在本发明的某些实施方式中，免疫测试包括使用一种或多种嗜异性抗体阻断剂来耗尽样品的嗜异性抗体的步骤。 待于免疫测试中进行试验的从样品中除去嗜异性抗体的方法是已知的，且包括：将样本在 90℃于 pH5.0 的醋酸钠缓冲液中加热 15 分钟，并在 1200g 离心 10 分钟；使用聚乙二醇 (PEG) 使嗜异性免疫球蛋白沉淀；使用蛋白 A 或蛋白 G 将干扰性的嗜异性免疫球蛋白从样本中免疫提取出；或添加非免疫小鼠 IgG。 本发明的方法的实施方式考虑到在用单分子检测器分析之前制备样品。 可以确定预处理法的适当性。 可减小因嗜异性抗体造成的免疫测试干扰的生物化学品可商购。 例如，称为 MAK33 的产品是 h-CK-MM 的 IgG1 单克隆抗体，可获自 Boehringer Mannheim。 MAK33 plus 产品含有 IgG1 和 IgG1-Fab 的组合。 polyMAK33 含有与 IgG1 聚合的 IgG1-Fab，而 polyMAC 2b/2a 含有与 IgG2b 聚合的 IgG2a-Fab。 Bioreclamation Inc.，East Meadow，NY. 销售称为免疫球蛋白抑制试剂的第二种可中和嗜异性抗体的商购生物化学品。该产品时来自多个物种的免疫球蛋白 (IgG 和 IgM) 制剂，主要为来自 Balb/c 小鼠的小鼠 IgG2a，IgG2b 和 IgG3。 在某些实施方式中，可以使用本领域已知方法将嗜异性抗体从样品中免疫提取出，例如通过将干扰性抗体与蛋白 A 或蛋白 G 结合来耗尽样品中的嗜异性抗体。 在某些实施方式中，可以使用一种或多种嗜异性抗体阻断剂来中和嗜异性抗体。 嗜异性抗体阻断剂可选自抗同种型嗜异性抗体阻断剂、抗独特型嗜异性抗体阻断剂和抗 - 抗独特性嗜异性抗体阻断剂。 在某些实施方式中，可以使用嗜异性抗体阻断剂的组合。

[0240] 将标记在添加样品的同时添加，或在添加样品和洗涤之后添加。 用于将抗体和其它免疫标记与蛋白结合的方案是本领域公知的。 如果标记结合步骤与捕获结合步骤分开，标记结合所允许的时间可能很重要，例如，临床应用或其它对时间敏感的设定中。在某些实施方式中，将关注分子与标记（例如抗体 - 染料）结合所允许的时间小于 12、10、8、6、4、3、2 或 1 小时，或者小于约 60、50、40、30、25、20、15、10 或 5 分钟。在某些实施方式中，将关注分子与标记（例如抗体 - 染料）结合所允许的时间小于 60 分钟。 在某些实施方式中，将关注分子与标记（例如抗体 - 染料）结合所允许的时间小于 50 分钟。 在某些实施方式中，将关注分子与标记（例如抗体 - 染料）结合所允许的时间小于 40 分钟。 在某些实施方式中，将关注分子与标记（例如抗体 - 染料）结合所允许的时间小于 30 分钟。 在某些实施方式中，将关注分子与标记（例如抗体 - 染料）结合所允许的时间小于 20 分钟。 在某些实施方式中，将关注分子与标记（例如抗体 - 染料）结合所允许的时间小于 15 分钟。 在某些实施方式中，将关注分子与标记（例如抗体 - 染料）结合所允许的时间小于 10 分钟。 在某些实施方式中，将关注分子与标记（例如抗体 - 染料）结合所允许的时间小于 5 分钟。 过量标记通过洗涤除去。

[0241] 在某些实施方式中，不将标记从所关注的蛋白洗脱。 在其它实施方式中，将标记从所关注的蛋白洗脱。 优选的洗脱缓冲液可有效释放标记而不会产生显著的背景。 有用的是如果洗脱缓冲液是抑菌性的情形。 本发明所用洗脱缓冲液可以包含离液剂 (chaotrope)、缓冲液、涂布微滴定板表面的白蛋白和选择用于产生相对较低的背景的表面活性剂。 离液剂可以包括脲、胍盐化合物或其它可用离液剂。 缓冲液可以包括硼酸盐

缓冲盐水或其它可用缓冲液。蛋白载体可以包括例如白蛋白（如人、牛或鱼的白蛋白）、IgG 或其它可用载体。表面活性剂可以包括离子型或非离子型洗涤剂，包括 Tween 20、TritonX-100 和十二烷基硫酸钠（SDS）等。

[0242] 在另一个实施方式中，固相结合测试可以为竞争性结合测试。一种此类方法如下。首先，将固定于结合表面上的捕获抗体与以下物质竞争性结合：i）样品中的所关注分子（生物状态标记物），和 ii）包含可检测标记（检测试剂）的分子的标记类似物。其次，使用单分子分析器测定标记的量。另一种此类方法如下。首先，将具有可检测标记（检测试剂）的抗体与以下物质竞争性结合：i）样品中的所关注分子（生物状态标记物），和 ii）固定于结合表面上的分子类似物（捕获试剂）。其次，使用单分子分析器测定标记的量。“分子类似物”在本文中是指与分子竞争对捕获抗体的结合的物种。竞争性免疫测试的实例公开于 Deutsch 等的美国专利 4,235,601 号、Liotta 的美国专利第 4,442,204 号和 Buechler 等的美国专利第 5,208,535 号，本文通过参考并入其全部内容。

[0243] C. 关注分子的检测和浓度确定

[0244] 洗脱后，使标记例如在洗脱缓冲液中运行通过单分子检测器。处理中样品可以不含标记、含单个标记或含多个标记。标记的数目对应于在捕获步骤期间捕获的所关注分子（如生物状态标记物）的分子数或与其成正比（如果采用样品的稀释液或部分）。

[0245] 可以使用任何合适的能检测与所关注分子共同使用的标记的单分子检测器。合适的单分子检测器如本文所述。通常，检测器是系统的一部分，该系统包含用于采样制备好的样品的自动进样器和可选的回收样品的回收系统。

[0246] 在某些实施方式中，在单分子分析器中分析处理中样品，该单分子分析器使用包含毛细管流动池的毛细管流动系统，使用激光来照射处理中样品所通过的毛细管中的询查空间，使用检测器来检测从询查空间发出的辐射，使用驱动力源来使处理中样品迁移通过询查空间。在某些实施方式中，单分子分析器还包含显微镜物镜，该显微镜物镜随着处理中样品迁移通过询查空间样品而收集由其发出的光，例如，高数值孔径显微镜物镜。在某些实施方式中，将激光和检测器设置为共焦排列。在某些实施方式中，激光是连续波激光。在某些实施方式中，检测器是雪崩式光电二极管检测器。在某些实施方式中，驱动力源是提供压力的泵。在某些实施方式中，本发明提供了分析器系统，该分析器系统包含能自动对多个样品进行自动采样从而在样品容器与询查空间之间提供流体传播（fluid communication）的采样系统。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 0.001pL ～ 500pL、约 0.01pL ～ 100pL、约 0.01pL ～ 10pL、约 0.01pL ～ 5pL、约 0.01pL ～ 0.5pL、约 0.02pL ～约 300pL、约 0.02pL ～约 50pL、约 0.02pL ～约 5pL、约 0.02pL ～约 2pL、约 0.05pL ～约 50pL、约 0.05pL ～约 5pL、约 0.05pL ～约 0.5pL、约 0.05pL ～约 0.2pL 或约 0.1pL ～约 25pL。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 0.004pL ～ 100pL。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 0.02pL ～ 50pL。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 0.001pL ～ 10pL。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 0.01pL ～ 5pL。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 0.02pL ～ 5pL。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 0.05pL ～ 5pL。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 0.05pL ～ 10pL。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 0.5pL ～约 5pL。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 0.02pL ～约 0.5pL。

[0247] 在某些实施方式中，询查空间的体积为大于约 1μm³、大于约 2μm³、大于约 3μm³、大于约 4μm³、大于约 5μm³、大于约 10μm³、大于约 15μm³、大于约 30μm³、大于约 50μm³、大于约 75μm³、大于约 100μm³、大于约 150μm³、大于约 200μm³、大于约 250μm³、大于约 300μm³、大于约 400μm³、大于约 500μm³、大于约 550μm³、大于约 600μm³、大于约 750μm³、大于约 1000μm³、大于约 2000μm³、大于约 4000μm³、大于约 6000μm³、大于约 8000μm³、大于约 10000μm³、大于约 12000μm³、大于约 13000μm³、大于约 14000μm³、大于约 15000μm³、大于约 20000μm³、大于约 30000μm³、大于约 40000μm³ 或大于约 50000μm³。 在某些实施方式中，询查空间的体积小于约 50000μm³、小于约 40000μm³、小于约 30000μm³、小于约 20000μm³、小于约 15000μm³、小于约 14000μm³、小于约 13000μm³、小于约 12000μm³、小于约 11000μm³、小于约 9500μm³、小于约 8000μm³、小于约 6500μm³、小于约 6000μm³、小于约 5000μm³、小于约 4000μm³、小于约 3000μm³、小于约 2500μm³、小于约 2000μm³、小于约 1500μm³、小于约 1000μm³、小于约 800μm³、小于约 600μm³、小于约 400μm³、小于约 200μm³、小于约 100μm³、小于约 75μm³、小于约 50μm³、小于约 25μm³、小于约 20μm³、小于约 15μm³、小于约 14μm³、小于约 13μm³、小于约 12μm³、小于约 11μm³、小于约 10μm³、小于约 5μm³、小于约 4μm³、小于约 3μm³、小于约 2μm³ 或小于约 1μm³。 在某些实施方式中，询查空间的体积为约 1μm³～约 10000μm³。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 1μm³～约 1000μm³。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 1μm³～约 100μm³。在某些实施方式中，询查空间的体积为约 1μm³～约 50μm³。 在某些实施方式中，询查空间的体积为约 1μm³～约 10μm³。 在某些实施方式中，询查空间的体积为约 2μm³～约 10μm³。 在某些实施方式中，询查空间的体积为约 3μm³～约 7μm³。

[0248] 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用毛细管流动系统，并且包含：毛细管流动池、对处理中样品所穿过的毛细管中的询查空间进行照射的连续波激光、随着处理中样品迁移通过询查空间而收集由其发出的光的高数值孔径显微镜物镜、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和提供压力以使处理中样品迁移通过询查空间的泵，其中询查空间为约 0.02pL～约 50pL。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用毛细管流动系统，并且包含：毛细管流动池、对处理中样品所穿过的毛细管中的询查空间进行照射的连续波激光、随着处理中样品迁移通过询查空间而收集由其发出的光的高数值孔径显微镜物镜（其中该透镜的数值空隙小于约 0.8）、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和提供压力以使处理中样品迁移通过询查空间的泵，其中询查空间为约 0.004pL～约 100pL。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用毛细管流动系统，并且包含：毛细管流动池、对处理中样品所穿过的毛细管中的询查空间进行照射的连续波激光、随着处理中样品迁移通过询查空间而收集由其发出的光的高数值孔径显微镜物镜（其中该透镜的数值空隙小于约 0.8）、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和提供压力以使处理中样品迁移通过询查空间的泵，其中询查空间为约 0.05pL～约 10pL。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用毛细管流动系统，并且包含：毛细管流动池、对处理中样品所穿过的毛细管中的询查空间进行照射的连续波激光、随着处理

中样品迁移通过询查空间而收集由其发出的光的高数值孔径显微镜物镜（其中该透镜的数值空隙小于约 0.8）、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和提供压力以使处理中样品迁移通过询查空间的泵，其中询查空间为约 0.05pL ～约 5pL。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用毛细管流动系统，并且包含：毛细管流动池、对处理中样品所穿过的毛细管中的询查空间进行照射的连续波激光、随着处理中样品迁移通过询查空间而收集由其发出的光的高数值孔径显微镜物镜（其中该透镜的数值空隙小于约 0.8）、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和提供压力以使处理中样品迁移通过询查空间的泵，其中询查空间为约 0.5pL ～约 5pL。 在这些实施方式中的任何一个中，分析器可以含有不超过一个询查空间。

[0249] 在某些实施方式中，单分子检测器包含扫描分析器系统，如提交于 2008 年 12 月 18 日的题为“单分子检测用扫描分析器和使用方法”的美国专利申请第 12/338,955 号所公开。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 $1\ \mu m^3$ ～约 $10000\ \mu m^3$。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 $1\ \mu m^3$ ～约 $1000\ \mu m^3$。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 $1\ \mu m^3$ ～约 $100\ \mu m^3$。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 $1\ \mu m^3$ ～约 $10\ \mu m^3$。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 $2\ \mu m^3$ ～约 $10\ \mu m^3$。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 $2\ \mu m^3$ ～约 $8\ \mu m^3$。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用

单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜（其中透镜的数值孔径至少为约 0.8）、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 3μm^3 ～约 7μm^3。

[0250] 在其它实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 1μm^3 ～约 10000μm^3。在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 1μm^3 ～约 1000μm^3。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 1μm^3 ～约 100μm^3。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 1μm^3 ～约 10μm^3。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 2μm^3 ～约 10μm^3。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 2μm^3 ～约 8μm^3。 在某些实施方式中，本发明的方法中所用单分子检测器使用了以下部件：样品板、导向其中含有样品的样品板的连续波激光、随着询查空间迁移通过样品而收集从样品发出的光的高数值孔径显微镜物镜、检测从询查空间发射的辐射的雪崩式光电二极管检测器、和使询查空间迁移通过样品的带有可移动反射镜的扫描电机，其中询查空间为约 3μm^3 人～约 7μm^3。 在这些实施方式中的任何一个中，所述分析器可以仅含一个询查空间。

[0251] 在某些实施方式中，单分子检测器能确定样品中所关注分子的浓度，其中样品的浓度范围可以跨越至少约 100 倍、1000 倍、10,000 倍、100,000 倍、300,000 倍、1,000,000 倍、10,000,000 倍或 30,000,000 倍。

[0252] 在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 50％、40％、30％、20％、15％或 10％的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约 100μl、90μl、80μl、70μl、60μl、50μl、40μl、30μl、20μl、15μl、10μl、5μl、4μl、3μl、2μl 或 1μl，且其中所述分析物以小于约 100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、10、5、4、3、2 或 1 飞摩尔的浓度存在。 在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 50％的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约 100μl，且其中所述分析物以小于约 100 飞摩尔的浓度存在。 在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 40％的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约 50μl，且其中所述分析物以小于约 50 飞摩尔的浓度存在。 在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 20％的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约 20μl，且其中所述分析物以小于约 20 飞摩尔的浓度存在。 在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 20％的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约 10μl，且其中所述分析物以小于约 10 飞摩尔的浓度存在。在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 20％的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约 5μl，且其中所述分析物以小于约 5 飞摩尔的浓度存在。 在某些实施方式中，本发明的方法使用能够检测到引入检测器的第一样品和第二样品之间的小于约 20％的分析物浓度差异的单分子检测器，其中引入分析器的第一样品和第二样品的体积小于约 5μl，且其中所述分析物以小于约 50 飞摩尔的浓度存在。

[0253] 下文对单分子检测器和系统进行更详细的描述。 可用于本发明的方法中的单分子分析器的其它实施方式（例如具有多于一个询查窗口的检测器以及利用电动流或电泳流的检测器等）可见于美国专利申请第 11/048,660 号，本文通过参考并入其全部内容。

[0254] 在不同运行之间可以洗涤仪器。 在某些实施方式中，可以施用维持样品的盐浓度和表面活性剂浓度的洗涤缓冲液来维持毛细管的调节状况 (conditioning)，即，保持毛细管表面在不同样品之间相对恒定以便减小变化性。

[0255] 对本发明的仪器和方法的极高灵敏度作出贡献的特点在于检测标记和对其计数的方法，所述标记在某些实施方式中与待检测的单分子相连或更通常的是对应于待检测的单分子。 简言之，通过使毛细管的给定询查空间受到预定的时间段的来自激光的 EM 辐射（所述激光在标记中所用荧光部分的适当激发波长处发光），流经毛细管或容纳于样品板上的处理中样品被有效划分为一系列检测事件，其中来自具有适当的标记中所用荧光部分的激发波长的激光的 EM 辐射在预定的时间段被导向所述波长，并检测在该时段发出的光子。 每个预定时段是一个“面元”。 过给定面元中检测到的光子总数超过预定阈值水平，则对该面元登记检测事件，即已检测到标记。 如果光子总是未达预定阈值水平，不记录检测时间。 在某些实施方式中，处理中的样品浓度稀至足以使得对于较大百分比的检测事件而言检测事件表示仅有一个标记通过窗口，这对应于原始样品中的所关

注的单分子，即，很少有检测时间表示错与一个标记存在于单一面元中。 在某些实施方式中，施行进一步的细条以使得在处理中样品中的更大的标记浓度能被准确检测，即两个或多个标记作为单个检测事件被检测到的概率不再无关紧要时的浓度。

[0256] 在不脱离本发明的范围的情况下，虽然可以使用其它面元时间，但在某些实施方式中，将面元时间选择为约 1 微秒～约 5 毫秒。 在某些实施方式中，面元时间大于约 1 微秒、2 微秒、3 微秒、4 微秒、5 微秒、6 微秒、7 微秒、8 微秒、9 微秒、10 微秒、15 微秒、20 微秒、30 微秒、40 微秒、50 微秒、60 微秒、70 微秒、80 微秒、90 微秒、100 微秒、200 微秒、250 微秒、300 微秒、400 微秒、500 微秒、600 微秒、700 微秒、750 微秒、800 微秒、900 微秒、1000 微秒、2000 微秒、3000 微秒、4000 微秒或 5000 微秒。 在某些实施方式中，面元时间小于约 2 微秒、3 微秒、4 微秒、5 微秒、6 微秒、7 微秒、8 微秒、9 微秒、10 微秒、15 微秒、20 微秒、30 微秒、40 微秒、50 微秒、60 微秒、70 微秒、80 微秒、90 微秒、100 微秒、200 微秒、250 微秒、300 微秒、400 微秒、500 微秒、600 微秒、700 微秒、750 微秒、800 微秒、900 微秒、1000 微秒、2000 微秒、3000 微秒、4000 微秒或 5000 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 1000 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 750 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 500 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 250 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 100 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 50 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 40 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 30 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 25 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 20 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 10 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 7.5 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒～ 5 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 5 微秒～ 500 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 5 微秒～ 250 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 5 微秒～ 100 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 5 微秒～ 50 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 5 微秒～ 20 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 5 微秒～ 10 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 10 微秒～ 500 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 10 微秒～ 250 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 10 微秒～ 100 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 10 微秒～ 50 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 10 微秒～ 30 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 10 微秒～ 20 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 2 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 3 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 4 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 5 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 6 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 7 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 8 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 9 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 10 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 11 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 12 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 13 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 14 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 5 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 15 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 16 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 17 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 18 微秒。 在某些实施方式中，面元时

间约为 19 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 20 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 25 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 30 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 40 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 50 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 100 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 250 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 500 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 750 微秒。 在某些实施方式中，面元时间约为 1000 微秒。

[0257] 在某些实施方式中，确定样品中颗粒 - 标记复合物的浓度包括确定背景噪声水平。 在某些实施方式中，从平均噪声水平或均方根噪声确定背景噪声水平。 在其它情况下，选择典型的噪声值或统计值。 在大多数情况下，预计噪声会遵循泊松分布。

[0258] 因此，当标记在询查空间中被遇到时，其受到激光束照射而产生光子激发。 通过仅考虑具有高于预定阈值能级的能量的光子激发，将有标记发射的光子与背景光或背景噪声发射区分开，这解释了样品中存在的背景噪声的量。 背景噪声通常包含例如由样品中存在的未标记颗粒的内在荧光产生的低频发射、分析用样品制备中所用缓冲液或稀释剂、拉曼散射和电子噪声。 因此，在某些实施方式中，指定给背景噪声的值作为多个面元中检测到的平均背景信号噪声而计算，是在预定时长中在询查空间中检测到的光子信号的测定。 在某些实施方式中，对于每个样品作为对该样品特异性的数字来计算背景噪声。

[0259] 在给出背景噪声的值后，可以指定阈值能级。 如上所述，阈值被确定来区分真实信号（由于标记的荧光而产生）与背景噪声。 在选择阈值时必须谨慎，以使得来自随机噪声的假阳性信号的数目最小化而同时也使被舍弃的真实信号的数目最小化。 用于选择阈值的方法包括确定高于噪声水平的固定值并给予噪声信号的分布计算阈值。 在一个实施方式中，将阈值设定为高于背景信号的标准偏差的固定值。 假设噪声为泊松分布，使用此方法可以估计在整个实验进程中的假阳性信号的数目。 在某些实施方式中，阈值水平作为高于背景噪声的 4σ 的值而计算。 例如，假设平均背景噪声水平为 200 光子，分析器系统确立了 4 √ 200 的高于 200 光子的平均背景 / 噪声水平的阈值水平为 256 光子。 因此，在某些实施方式中，确定样品中标记的浓度包括确立阈值水平，高于该阈值水平的光子信号表示存在标记。 相反，其能级不大于阈值水平的能级的光子信号表明标记的缺失。

[0260] 进行许多次面元测量以确定样品浓度，且对于每次面元测量均确定标记的存在或缺失。 通常，在 1 分钟内可以进行 60,000 次测量（例如在面元尺寸为 1ms 的实施方式中，而对于更小的面元尺寸，进行的测量次数相应地更大，例如，对于 10 微秒的面元尺寸每分钟进行 6,000,000 次测量）。 因此，没有任何单次测量是至关重要的，且所述方法提供了较高的误差界限。 在确定处理中的样品中的标记浓度时，确定不含标记的面元（“否”面元）不被计数，而仅对确定含有标记（“是”面元）进行计数。 在“否”面元或缺乏标记的面元中进行的不计数测量增加了信噪比和测量精度。 由此，在某些实施方式中，确定样品中标记的浓度包括对反映出存在标记的面元测量的检测。

[0261] 通过减少在其中检测到颗粒 - 标记复合物的面元测量期间检测背景噪声的时间，可以增加分析系统的信噪比或灵敏度。 例如，在持续 1 毫秒的面元测量中，其间在一个颗粒 - 标记复合物在于 250 微秒内穿过询查空间时被检测到，所述 1 毫秒中的 750 微

秒用于检测背景噪声发射。 通过减少面元时间可以改善信噪比。 在某些实施方式中，面元时间是 1 毫秒。 在其它实施方式中，面元时间是 750 毫秒、500 毫秒、250 毫秒、100 毫秒、50 毫秒、25 毫秒或 10 毫秒。 其它面元时间如本文所述。

[0262] 影响测量的其它因素为荧光部分的亮度或暗度、流动速率和激光的功率。 允许检测标记的相关因素的各种组合对于本领域技术人员是显而易见的。 在某些实施方式中，调节面元时间而不改变流动速率。 本领域技术人员可以理解，随这面元时间减少，导向询查空间的激光输出功率必须增加，以维持在所述面元时间期间对询查空间施加的恒定总能量。 例如，如果面元时间从 1000 微秒减少至 250 微秒，作为第一近似，激光输出功率必须增加大约 4 倍。 这些设定使得在 250μs 中能检测到与在此前设定的 1000μs 期间计数的光子数相同的光子数，并允许以更低的背景和更大的灵敏度进行更快的样品分析。 另外，可以调节流动速率以便加速样品处理。 这些数字仅为示例性，本领域技术人员可以根据需要调节参数以获得所需结果。

[0263] 在某些实施方式中，巡查空间包含样品流的整个截面。 当巡查空间包含样品流的整个截面时，仅需要经计数的标记的数目和在设定的时长中通过样品流的截面的体积来计算处理中样品中的标记的浓度。 在某些实施方式中，通过例如使询查空间受激光束所照射的光斑的尺寸所限定，可以将询查空间限定为小于样品流的截面积。 在某些实施方式中，可以通过调节分析器的孔径 306（图 1A）或 358 和 359（图 1B）和减小物镜成像至检测器的受照射体积来限定询查空间。 在其中询查空间被限定为小于样品的横截面积的实施方式中，可以通过由复合物发出的信号对标准曲线的插值来确定标记浓度，所述标准曲线是施用一个或多个已知标准浓度的样品而产生。 在其它实施方式中，可以通过比较测定的颗粒与内标标准物 (internal label standard) 来确定标记浓度。 在其中对稀释样品进行分析的实施方式中，在计算起始样品中的关注分子的浓度时，考虑稀释因子。

[0264] 如上所述，当巡查空间包含样品流的整个截面时，仅需要经计数的在设定的时长中通过样品流的截面的标记的数目和在面元中经询查的样品体积来计算样品浓度。 确定了“是”面元中所含标记的总数并将其与分析中所用的面元总数所表示的样品体积相关，以确定处理中样品中的标记浓度。 因此，在一个实施方式中，确定处理中样品中的标记浓度包括确定检测为“是”面元的标记的总数并将检测到标记的总数与所分析的总样品体积相关联。 所分析的总样品体积是在指定时间间隔中通过毛细管流动池并穿过巡查空间的样品体积。 替代性地，样品中的标记复合物的浓度由多个面元中的标记发出的信号对标准曲线的插值而确定，所述标准曲线通过确定相同数目的面元中由标记产生的信号而从含有已知浓度的所述标记的标准样品产生。

[0265] 在某些实施方式中，将在面元中检测到的各个标记的数目与处理中样品中的颗粒的相对浓度进行关联。 在相对较低浓度，例如在低于约 10^{-16}M 浓度，标记的数目与面元中检测到的光子信号成正比。 因此，在较低标记浓度，光子信号被提供作为数字信号。 在相对更高的浓度，例如在高于约 10^{-16}M 浓度，光子信号与标记的成比例性 (proportionality) 丧失，这是因为两个或多个标记几乎同时穿越询查空间并被计数为一个的可能性变得显著。 因此，在某些实施方式中，通过减小面元测量的时长来对在浓度大于约 10^{-16}M 的样品中的个体颗粒进行分辨。

[0266] 替代性地，在其它实施方式中，对任何一个面元中存在的多个颗粒发出的总光

子信号进行检测。 这些实施方式允许如下的本发明的单分子检测器：其中的动态范围为至少 3、3.5、4、4.5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 或大于 8 的对数值 (log)。

[0267] 本文所用术语“动态范围”是指可以无须进行稀释或其它处理来改变不同浓度的连续样品的浓度而由仪器定量的样品浓度范围，其中以对预期用途适当的准确度来确定浓度。 例如，如果微滴定板在一个孔中含有浓度为 1 飞摩尔的所关注分析物的样品，在另一个孔中含有浓度为 10,000 飞摩尔的所关注分析物的样品，而在第三个孔中含有浓度为 100 飞摩尔的所关注分析物的样品，则具有至少 4log 的动态范围和 1 飞摩尔的定量下限的仪器能对所有样品的浓度进行准确定量而不用进行进一步处理以调节浓度（例如稀释）。准确性可以通过标准方法而确定，例如使用浓度跨越动态范围的一系列标准物并构建标准曲线。 所得标准曲线的拟合的标准量度可以用作准确性的量度，例如大于约 0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98 或 0.99 的 r2。

[0268] 通过改变对来自检测器的数据的分析方式，和 / 或通过在检测器和询查空间之间使用衰减器，可以实现动态范围的增大。 在所述动态范围的低端，其中处理中的样品足够稀，以致每个检测事件（即，每次高出面元中的阈值水平的光子激发（“事件光子 (event phton)”））可能仅代表一个标记，对数据进行分析以将检测事件计为单分子。 由此，将每个面元分析为如上所述的对于标记的存在的简单“是”或“否”。 对于更浓的处理中样品，其中两个或多个标记占据一个面元的可能性变得显著，据发现相当多的面元中的事件光子数明显大于预期的单个标记的数目。 例如，相当多的面元中的事件光子数对应于预期的单个标记的数目的 2 倍、3 倍或者比其更大。对于这些样品，仪器将其数据分析方法改变为将事件光子总数对处理中样品的面元进行积分的方法。 该总数将与所有面元中的标记总数成正比。 对于浓度甚至更大的处理中样品，其中在大多数面元中存在许多标记，背景噪声成为来自每个面元的总信号中无足轻重的部分，而仪器将其数据分析方法改变为对每个面元中的总光子进行计数（包括背景）的方法。 当浓度使得到达检测器的光强度超出检测器对光子准确计数的能力（即，使检测器饱和）时通过在流动池与检测器之间使用衰减器可以实现动态范围的进一步增加。

[0269] 仪器可以包含数据分析系统，该数据分析系统接收来自检测器的输入数据并确定对运行中的样品的适当分析方法，并基于该分析输出数值。 如果仪器包含衰减器，数据分析系统还可以输出使用或不使用衰减器的指示。

[0270] 通过利用所述方法，所述仪器的动态范围可以极大地增加。 因此，在某些实施方式中，所述仪器能测定大于约 1000(3log)、10,000(4log)、100,000(5log)、350,000(5.5log)、1,000,000(6log)、3,500,000(6.5log)、10,000,000(7log)、35,000,000(7.5log) 或 100,000,000(8log) 的动态范围中的样品浓度。 在某些实施方式中，所述仪器能测定大于约 100,000(5log) 的动态范围中的样品浓度。 在某些实施方式中，所述仪器能测定大于约 1,000,000(6log) 的动态范围中的样品浓度。 在某些实施方式中，所述仪器能测定大于约 10,000,000(7log) 的动态范围中的样品浓度。 在某些实施方式中，所述仪器能测定在约 1 ～ 10 飞摩尔到至少约 1000 飞摩尔、10,000 飞摩尔、100,000 飞摩尔、350,000 飞摩尔、1,000,000 飞摩尔、3,500,000 飞摩尔或 35,000,000 飞摩尔的动态范围中的样品浓度。 在某些实施方式中，所述仪器能测定在约 1 ～ 10 飞摩尔到至少约 10,000 飞摩尔的动态范围中的样品浓度。 在某些实施方式中，所述仪器能测定在约 1 ～ 10 飞摩

尔到至少约 100,000 飞摩尔的动态范围中的样品浓度。在某些实施方式中，所述仪器能测定在约 1 ～ 10 飞摩尔到至少约 1,000,000 飞摩尔的动态范围中的样品浓度。 在某些实施方式中，所述仪器能测定在约 1 ～ 10 飞摩尔到至少约 10,000,000 飞摩尔的动态范围中的样品浓度。

[0271] 在某些实施方式中，本发明的分析器或分析器系统能以小于 1 纳摩尔、1 皮摩尔、1 飞摩尔、1 渺摩尔 (attomolar) 或 1zeptomolar 的检出限检测分析物（如生物标记物）。 在某些实施方式中，当分析物（生物标记物）在样品中以小于 1 纳摩尔、1 皮摩尔、1 飞摩尔、1 渺摩尔 (attomolar) 或 1zeptomolar 的浓度存在时，且当每个样品的尺寸小于 约 100μl、50μl、40μl、30μl、20μl、10μl、5μl、2μl、1μl、0.1μl、0.01μl、0.001μl 或 0.0001μl 时，所述分析器或分析器系统能够检测到一个样品与另一个样品之间小于约 0.1％、1％、2％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％或 80％的分析物或多个分析物（例如，一个或多个生物标记物）的浓度改变。 在某些实施方式中，当分析物在样品中以小于约 1 皮摩尔的浓度存在时，且当每个样品的尺寸小于约 50μl 时，所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20％的分析物的浓度改变。 在某些实施方式中，当分析物在样品中以小于约 100 飞摩尔的浓度存在时，且当每个样品的尺寸小于约 50μl 时，所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20％的分析物的浓度改变。 在某些实施方式中，当分析物在样品中以小于约 50 飞摩尔的浓度存在时，且当每个样品的尺寸小于约 50μl 时，所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20％的分析物的浓度改变。在某些实施方式中，当分析物在样品中以小于约 5 飞摩尔的浓度存在时，且当每个样品的尺寸小于约 50μl 时，所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20％的分析物的浓度改变。 在某些实施方式中，当分析物在样品中以小于约 5 飞摩尔的浓度存在时，且当每个样品的尺寸小于约 5μl 时，所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20％的分析物的浓度改变。 在某些实施方式中，当分析物在样品中以小于约 1 飞摩尔的浓度存在时，且当每个样品的尺寸小于约 5μl 时，所述分析器或分析器系统能够检测到第一样品与第二样品之间小于约 20％的分析物的浓度改变。

[0272] 本发明的单分子检测器能够以具有极低变差系数的高灵敏方式检测所关注分子。 在某些实施方式中，CV 小于约 50％、40％、30％、25％、20％、15％、10％、5％或小于约 1％。 在某些实施方式中， CV 小于约 50％。 在某些实施方式中， CV 小于约 40％。 在某些实施方式中， CV 小于约 30％。 在某些实施方式中， CV 小于约 25％。在某些实施方式中， CV 小于约 20％。 在某些实施方式中， CV 小于约 15％。 在某些实施方式中， CV 小于约 10％。 在某些实施方式中， CV 小于约 5％。 在某些实施方式中，CV 小于约 1％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 100pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 50pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 40pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 30pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 20pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 15pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 10pg/ml 且 CV 小于约

10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 5pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 1pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 0.05pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 0.01pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 10pg/ml 且 CV 小于约 50％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 10pg/ml 且 CV 小于约 25％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 10pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 10pg/ml 且 CV 小于约 5％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 10pg/ml 且 CV 小于约 1％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 5pg/ml 且 CV 小于约 100％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 5pg/ml 且 CV 小于约 50％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 5pg/ml 且 CV 小于约 25％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 5pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 5pg/ml 且 CV 小于约 5％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 5pg/ml 且 CV 小于约 1％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 1pg/ml 且 CV 小于约 100％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 1pg/ml 且 CV 小于约 50％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 1pg/ml 且 CV 小于约 25％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 1pg/ml 且 CV 小于约 10％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 1pg/ml 且 CV 小于约 5％。 在某些实施方式中，检出限 (LOD) 小于约 1pg/ml 且 CV 小于约 1％。

[0273] V. 适于高灵敏分子分析的仪器和系统

[0274] 本发明的方法采用高灵敏分析仪器，例如，单分子检测器。 此类单分子检测器包括下文所述的实施方式。

[0275] 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测样品中的单个蛋白分子的分析器系统试剂盒，所述系统包含用于检测样品中的单个蛋白分子的分析器系统和至少一个包含荧光部分及所述蛋白分子的结合伴侣的标记，其中所述分析器包含：用于检测样品中的单个蛋白分子和至少一个标记的分析器系统，所述标记包含荧光部分和所述蛋白分子的结合伴侣，其中所述分析器包含用于刺激所述荧光部分的电磁辐射源；用于使标记通过的毛细管流动池；用于使标记在毛细管流动池中移动的动力来源；在毛细管流动池内限定的询查空间，该询查空间用于接收由电磁源发出的电磁辐射；和与询查空间可操作地连接的电磁辐射检测器，其中所述荧光部分在受到在所述荧光部分的激发波长处发光的激光刺激时能够发射至少约 200 个光子，其中所述激光聚焦于包含所述荧光部分的直径不小于约 5 微米的光斑上，并且其中由所述激光导向该光斑的总能量不大于约 3 微焦。

[0276] 本发明的分析器试剂盒的一个实施方式如图 15 所示。 所述试剂盒包含蛋白分子标记，该标记包含所述蛋白分子的结合伴侣和荧光部分。 所述试剂盒还包含用于检测单个蛋白分子的分析器系统 (300)，该系统包含：用于刺激所述荧光部分的电磁辐射源 301；用于使标记通过的毛细管流动池 313；用于使标记在毛细管流动池中移动的动力来源（未显示）；在毛细管流动池内限定的询查空间 314，该询查空间用于接收由电磁源发出的电磁辐射（图 2A）；和与询查空间可操作地连接的电磁辐射检测器 309，其中所述荧光部分在受到在所述荧光部分的激发波长处发光的激光刺激时能够发射至少约 200 个光子，其中所述激光聚焦于包含所述荧光部分的直径不小于约 5 微米的光斑上，并且其中

由所述激光导向该光斑的总能量不大于约 3 微焦。在某些实施方式中，显微镜物镜 315 将来自电磁辐射源 301 的光束 311 聚焦以在毛细管流动池 313 内形成一个询查空间 314（图 2A）。在某些实施方式中，显微镜物镜的数值孔径可以等于或大于 0.7、0.8、0.9 或 1.0。

[0277] 在某些分析器系统试剂盒的实施方式中，所述分析器包含不超过一个询查空间。在某些实施方式中，电磁辐射源是输出功率至少为约 3mW、5mW、10mW 或 20mW 的激光。在某些实施方式中，荧光部分包含荧光分子。在某些实施方式中，荧光部分是染料分子，例如包含至少一个取代吲哚鎓环体系的染料分子，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或缀合的物质。在某些实施方式中，荧光部分是量子点。在某些实施方式中，电磁辐射源是连续波电磁辐射源，例如发光二极管或连续波激光。在某些实施方式中，驱动力是压力。在某些实施方式中，所述检测器是雪崩式光电二极管检测器。在某些实施方式中，所述分析器采用共聚焦光学布置，以便将激光束反射至所述询查空间上兵用于使所述受刺激的染料分子成像（如图 1、3 所示），其中所述共聚焦光学布置包括数值孔径至少为约 0.8 的物镜透镜。在某些实施方式中，所述分析器还包含能自动采用多个样品并在样品容器与所述询查空间之间提供流体传播的采样系统。在某些实施方式中，所述分析器系统还包含处于与所述询查空间的流体传播中的样品回收系统，其中所述回收系统能够回收基本所有的所述样品。在某些实施方式中，所述试剂盒还包含所述系统的使用说明。

[0278] A. 设备 / 系统

[0279] 在一方面，本文所述方法采用能够检测样品中的单分子的分析器系统。在一个实施方式中，所述分析器系统能够进行经荧光标记的颗粒的单分子检测，其中所述分析器系统检测由荧光标记发出的能量，所述荧光标记在限定于毛细管流动池内的询查空间中存在单颗粒时响应于电磁辐射源的曝光而受到激发，所述毛细管流动池与分析器系统的采样系统流体连接。在分析器系统的其它实施方式中，单颗粒借助于驱动力移动通过毛细管流动池的询查空间。在分析器系统的另一个实施方式中，在该分析器系统中可以包含自动采样系统以便将样品引入分析器系统。在分析器系统的另一个实施方式中，在该分析器系统中可以包含样品制备系统以便制备样品。在另一个实施方式中，所述分析器系统可以包含样品回收系统，以便在分析完成后回收至少一部分样品。

[0280] 在一方面，分析器系统由电磁辐射源构成，该电磁辐射源用于激发以荧光标记标记的单颗粒。在一个实施方式中，分析器系统的电磁辐射源是激光。在另一个实施方式中，电磁辐射源是连续波激光。

[0281] 在一个典型实施方式中，随着标记穿过毛细管流动池的询查空间，电磁辐射源激发与所述标记相连的荧光部分。在某些实施方式中，荧光标记部分包含一个或多个荧光染料分子。在某些实施方式中，荧光标记部分是量子点。在标记中可以使用本文所述的任何荧光部分。

[0282] 当标记穿过位于毛细管流动池内的询查空间时，该标记暴露于电磁辐射中。询查空间通常与采样系统流体连接。在某些实施方式中，标记因驱使标记穿过分析器系统的驱动力而通过毛细管流动池的询查空间。询查空间被设置来使得其接收从辐射源发出的电磁辐射。在某些实施方式中，采样系统是自动化采样系统，其能够在没有操作人员干涉的情况下进行多个样品的采样。

[0283] 标记通过询查空间并且在受电磁辐射源激发时发出可检测量的能量。 在一个实施方式中，电磁辐射检测器与询查空间可操作地相连。 电磁辐射检测器能够检测由标记（例如标记的荧光部分）发出的能量。

[0284] 在分析器系统的另一个实施方式中，所述系统还包含其中可以部分地火完全地制备样品以用于分析器系统的分析的样品制备机制。 在分析器系统的某些实施方式中，样品在经系统分析后被弃去。 在其他实施方式中，分析器系统还包含样品回收机制，由此可以在分析后回收至少一部分或者所有或基本所有的样品。 在这种实施方式中，可以将样品返回样品来源。 在某些实施方式中，样品可以返回样品微滴板上的微滴孔中。 分析器系统通常还包含用于收集和报告所检测的信号的数据采集系统。

[0285] B. 单颗粒分析器

[0286] 如图 1A 所示，本文描述了分析器系统 300 的一个实施方式。 分析器系统 300 包含电磁辐射源 301、反射镜 302、透镜 303、毛细管流动池 313、显微镜物镜透镜 305、孔径 306、检测器透镜 307、检测器滤光器 308、单光子检测器 309 和与检测器可操作地连接的处理器 310。

[0287] 在操作时，将电磁辐射源 301 对准从而使其输出光 311 从反射镜 302 的前表面反射出。 透镜 303 将光束 311 聚焦至毛细管流动池 313 的单个询查空间上（询查空间 314 的一个说明性实例如图 2A 所示）。 显微镜物镜透镜 305 收集来自样品颗粒的光并将光束图像形成于孔径 306 上。 孔径 306 影响着由毛细管流动池的询查空间中的样品所发射的光的可被收集的分量。 检测器透镜 307 收集通过孔径 306 的光并将所述光在其穿过检测器滤光器 308 后聚焦于检测器 309 的活跃区域上。 检测器滤光器 308 使因光散射或环境光引起的异常噪声信号最小化，同时使与颗粒结合的受激发的荧光部分所发出的信号最大化。 处理器 310 根据本文所述的方法处理来自颗粒的光信号。

[0288] 在一个实施方式中，显微镜物镜透镜 305 是高数值孔径显微镜透镜。 如本文所用，“高数值孔径透镜”包括具有大于或等于 0.6 的数值孔径的透镜。 数值孔径是对由物镜捕获的经高度衍射的成像光线的数目的量度。 较高的数值孔径使得不透明度渐增的光线能够进入物镜并由此产生更高分辨的图像。 另外，图像亮度也随更高的数值孔径而增加。 高数值孔径透镜可商购自许多供应商，并且在所述分析器系统中可以使用任何一种具有大于或等于约 0.6 的数值孔径的透镜。高数值孔径透镜可商购自许多供应商，并且在所述分析器系统中可以使用任何一种具有大于或等于约 0.6 的数值孔径的透镜。在某些实施方式中，透镜的数值孔径为约 0.6 ～约 1.3。 在某些实施方式中，透镜的数值孔径为约 0.6 ～约 1.0。 在某些实施方式中，透镜的数值孔径为约 0.7 ～约 1.2。 在某些实施方式中，透镜的数值孔径为约 0.7 ～约 1.0。 在某些实施方式中，透镜的数值孔径为约 0.7 ～约 0.9。 在某些实施方式中，透镜的数值孔径为约 0.8 ～约 1.3。 在某些实施方式中，透镜的数值孔径为约 0.8 ～约 1.2。 在某些实施方式中，透镜的数值孔径为约 0.8 ～约 1.0。在某些实施方式中，透镜的数值孔径为至少约 0.6。 在某些实施方式中，透镜的数值孔径为至少约 0.7。 在某些实施方式中，透镜的数值孔径为至少约 0.8。 在某些实施方式中，透镜的数值孔径为至少约 0.9。 在某些实施方式中，透镜的数值孔径为至少约 1.0。 在某些实施方式中，显微镜物镜的孔径约为 1.25。 在其中使用数值孔径为 0.8 的显微镜物镜透镜的实施方式中，可以使用 Nikon 60X/0.8NA Achromat 透镜（Nikon， Inc.，美国）。

[0289] 在某些实施方式中，电磁辐射源 110 是发射可见光谱中的光的激光器。 在所有实施方式中，将电磁辐射源设定来使得激光器波长足以激发与颗粒相连的荧光标记。 在某些实施方式中，该激光器是波长为 639nm 的连续波激光器。 在其它实施方式中，该激光器是波长为 532nm 的连续波激光器。 在其它实施方式中，该激光器是波长为 422nm 的连续波激光器。 在其它实施方式中，该激光器是波长为 405nm 的连续波激光器。 在不脱离本发明的范围的情况下，可以使用任何具有适于激发本发明的方法和组合物中所用荧光部分的波长的连续波激光器。

[0290] 在单分子分析器系统 300 中，随着颗粒经过电磁辐射源的光束 311，该标记进入激发态。 当颗粒从其激发态弛豫时，发射出可检测的突发光。 在颗粒通过光束所需的时长中，该激发 - 发射循环被每个颗粒反复许多次，从而使得分析器系统 300 能在颗粒经过询查空间 314 时对每个颗粒检测到数十至数千个光子。 检测器 309（图 1A）记录由荧光颗粒发射的光子，并具有时滞，该时滞表明颗粒标记复合物通过询查空间的时间。 光子强度由检测器 309 记录，而采样时间被分为多个面元，其中面元是具有可自由选择的时间通道宽度的均一的任意时间段。 对每个面元中所含的信号数进行评估。 为确定颗粒何时存在，可以使用数种统计分析方法中的一种或多种。 这些方法包括确定分析器系统的基线噪声和确定处于高于基线噪声的统计水平的荧光标记的信号强度以便减轻来自检测器的错误正信号。

[0291] 电磁辐射源 301 聚焦于分析器系统 300 的毛细管流动池 313 上，其中该毛细管流动池与样品系统流体连接。 询查空间 314 如图 2A 所示。 来自图 1A 的连续波电磁辐射源 301 的光束 311 被光学聚焦于毛细管流动池 313 内的指定深度。 光束 311 被以垂直于毛细管流动池 313 的角度导向填充有样品的毛细管流动池 313。 光束 311 在选定用以激发用于标记所关注的颗粒的特定荧光标记的预定波长处工作。 询查空间 314 的尺寸或体积由光束 311 的直径和光束 311 所聚焦的深度共同决定。 替代性地，可以通过将已知浓度的校准样品运行通过分析器系统来确定询查空间

[0292] 当在样品浓度中检测到单分子时，单分子检测所需的光束尺寸和聚焦深度被设定，并由此限定了询查空间 314 的尺寸。 询查空间 314 被设定来使得在合适的样品浓度下，在每个进行观察的时间间隔期间仅有一个颗粒存在于询查空间 314 中。

[0293] 可以理解，由光束所限定的检测询查体积不是完全球形的，通常为“蝴蝶结”形。 然而，出于定义的目的，本文将询查空间的“体积”定义为由直径等于光束的聚焦点直径的球所涵盖的体积。 在不背离本发明的范围的情况下，光束 311 的聚焦点可以具有各种直径。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为约 1 微米～约 5、10、15 或 20 微米，约 5 微米～约 10、15 或 20 微米，约 10 微米～约 20 微米，或约 10 微米～约 15 微米。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为约 1 微米、2 微米、3 微米、4 微米、5 微米、6 微米、7 微米、8 微米、9 微米、10 微米、11 微米、12 微米、13 微米、14 微米、15 微米、16 微米、17 微米、18 微米、19 微米或 20 微米。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为 5 微米。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为 10 微米。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为 12 微米。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为 13 微米。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为 14 微米。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为 15 微米。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为 16 微米。 在

某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为 17 微米。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为 18 微米。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为 19 微米。 在某些实施方式中，光束的聚焦点的直径为 20 微米。

[0294] 在所述单颗粒分析器系统的一个替代性实施方式中，可以使用多于一个电磁辐射源来激发用不同波长的荧光标记进行标记的颗粒。 在另一个替代性实施方式中，可以在毛细管流动池中使用多于一个询查空间。 在另一个替代性实施方式中，可以采用多个检测器来检测来自荧光标记的不同发射波长。 包含分析器系统的这些替代性实施方式的图示如图 1B 所示。 参考此前的美国专利申请第 11/048,660 号将这些实施方式并入。

[0295] 在分析器系统 300 的某些实施方式中，需要驱动力来将颗粒移动通过分析器系统 300 的毛细管流动池 313。 在一个实施方式中，驱动力可以是压力形式。 用于将颗粒移动通过毛细管流动池的压力可以由泵产生。 在某些实施方式中，可以使用 Scivex，Inc. HPLC 泵。 在某些用泵作为驱动力的实施方式中，样品可以以 1μL/ 分钟～约 20μL/ 分钟、或者 5μL/ 分钟～约 20μL/ 分钟的速率通过毛细管流动池。 在某些实施方式中，样品可以以约 5μL/ 分钟的速率通过毛细管流动池。 在某些实施方式中，样品可以以约 10μL/ 分钟的速率通过毛细管流动池。 在某些实施方式中，样品可以以约 15μL/ 分钟的速率通过毛细管流动池。在某些实施方式中，样品可以以约 20μL/ 分钟的速率通过毛细管流动池。 在某些实施方式中，可以使用电动力来将颗粒移动通过分析器系统。 此类方法此前已有公开，本文通过参考从此前的美国专利第 11/048,660 号将其并入。

[0296] 在分析器系统 300 的一个方面，分析器系统的检测器 309 检测由荧光标记发出的光子。 在一个实施方式中，光子检测器是光电二极管。 在另一个实施方式中，所述检测器是雪崩式光电二极管。 在某些实施方式中，光电二极管可以是检测波长为 190nm ～ 1100nm 的硅光电二极管。 当使用锗光电二极管时，所检测的光的波长为 400nm ～ 1700nm。 在其它实施方式中，当使用砷化铟镓光电二极管时，由光电二极管检测的光的波长为 800nm ～ 2600nm。 当将硫化铅光电二极管用作检测器时，所检测的光的波长为 1000nm ～ 3500nm。

[0297] 在某些实施方式中，电磁辐射源 301 的光学器件和检测器 309 的光学器件以常规光学排列方式排列。 在这种排列中，将电磁辐射源和检测器排列在不同的焦面上。 如图 1A 和 1B 所示的分析器系统的激光器和检测器光学器件的排列是常规光学排列。

[0298] 在某些实施方式中，电磁辐射源的光学器件和检测器的光学器件以共聚焦光学排列方式排列。 在这种排列中，电磁辐射源 301 和检测器 309 被排列在同一焦面上。 共聚焦排列使得分析器更加稳健，这是因为如果分析器系统被移动时，无须将电磁辐射源 301 和检测器光学器件 309 重新排列。 这种排列还使得所述分析器的使用更为简化，因为其消除了对分析器系统的组件重新排列的需要。 分析器 300（图 1A）和分析器 355（图 1B）的共聚焦排列分别如图 3A 和 3B 所示。 图 3A 显示出来自电磁辐射源 301 的光束 311 由显微镜物镜 315 聚焦，从而在毛细管流动池 313 内形成一个询查空间 314（图 2A）。 使用反射激光但使荧光通过的二向色镜 316 来将荧光与激光分离。 位于检测器前端的滤光器 317 在检测器中消除了任何非荧光。 在某些实施方式中，以共聚焦排列设置的分析器系统可以包含两个或多个询查空间。 此类方法此前已有公开，本文通过参考从此前的美国专利第 11/048,660 号将其并入。

[0299] 激光器可以为可调谐染料激光器，例如氦 - 氖激光器。 可以将激光器设定为发射 632.8nm 的波长。 替代性地，可以将激光器的波长设定为发射 543.5nm 或 1523nm 的波长。 替代性地，电磁激光器可以为氩离子激光器。 在这种实施方式中，氩离子激光器可以作为连续气体激光器在可见光谱中的 25 个不同波长处工作，波长设定在 408.9nm ～ 686.1nm，但其最佳性能设定在 488nm ～ 514.5nm。

[0300] 1. 电磁辐射源

[0301] 在分析器系统的某些实施方式中，可以采用化学发光标记。 在这些实施方式中，可能不需要使用 EM 源来进行颗粒检测。 在另一个实施方式中，外在标记或颗粒的内在特征是与光相互作用的标记或特征，例如，荧光标记或光散射标记。 在此类实施方式中，使用 EM 辐射源来照射标记和 / 或颗粒。 优选用于激发荧光标记的 EM 辐射源。

[0302] 在某些实施方式中，分析器系统由电磁辐射源 301 组成。 在不脱离本发明的范围的情况下，可以在任一个扫描分析器系统 300 中使用任何数目的辐射源。 此前的美国专利申请第 11/048,660 号已经公开了多种电磁辐射源，本文通过参考将其并入。 在某些实施方式中，所有连续波电磁 (EM) 辐射源发射处于相同波长的电磁辐射。 在其它实施方式中，不同的源发射不同波长的 EM 辐射。

[0303] 在一个实施方式中， EM 源 301、351、352 是产生 200nm ～ 1000nm 的波长的连续波激光。 此类 EM 源的优点是小、耐用和相对廉价。 另外，它们通常能够产生比其它光源更大的荧光信号。 适合的连续波 EM 源的具体实例包括但不限于 ：氩气型、氪气型、氦氖型、氦镉型激光以及可调谐二极管激光 (红光至红外区)，每种都具有倍频的可能性。 激光提供连续照射而不采用辅助的中断其照射的电子或机械装置 (例如，快门)。 在使用连续波激光的实施方式中，3mW 的电磁辐射源可以具有足以激发荧光标记的能量。 具有这种能量输出的来自连续波激光的光束的直径可以为 2μm ～ 5μm。 为曝光于 3mW 而使颗粒受到激光束的曝光时间可以为约 1 毫秒的时段。 在替代性实施方式中，受激光束曝光的时间等于或小于约 500 微秒。 在一个替代性实施方式中，曝光时间可以小于或等于约 100 微秒。 在一个替代性实施方式中，曝光时间可以小于或等于约 50 微秒。 在一个替代性实施方式中，曝光时间可以小于或等于约 10 微秒。

[0304] 发光二极管 (LED) 是另一种低成本、高度耐用的照射源。 超亮 LED 和具有高吸收截面和量子产率的染料的近期进展支持了 LED 对于单分子检测的应用性。 此类激光可单独地或与其它光源组合用于颗粒检测，所述其它光源例如汞弧灯、元素弧光灯、卤素灯、电弧放电、等离子放电、发光二极管及其任意组合。

[0305] 在其它实施方式中， EM 源的形式可以为脉冲波激光。 在此类实施方式中，激光的脉冲尺寸是重要因素。 在此类实施方式中，可能需要较长的持续时间的脉冲。 在某些实施方式中，可以用 2 纳秒的激光脉冲。 在某些实施方式中，可以用 5 纳秒的激光脉冲。 在某些实施方式中，可以用 2 纳秒～ 5 纳秒的脉冲。

[0306] 最佳激光强度取决于单染料的光漂白特性和横穿询查空间所需的时长 (包括颗粒速度、如果使用多于一个询查空间时的询查空间之间的距离，以及询查空间的尺寸)。为获取最大信号，理想的是在不会致使较大百分比的染料光漂白的最高强度对样品进行照射。 优选的是使得在颗粒横穿询查空间后不超过 5％的染料被漂白的强度。

[0307] 根据需要被刺激的染料分子的类型、染料分子被刺激的时长和 / 或染料分子通

过毛细管流动池的速度来设定激光功率。 激光功率被定义为由光束所输送的能量的速率，以焦 / 秒或瓦为单位。 可以理解，激光的输出功率越大，激光在颗粒通过询查空间时对该询查空间提供恒定量的能量的同时照射颗粒的时间可以越短。 因此，在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量大于约 0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90 或 100 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 0.1 微焦～ 100 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 1 微焦～ 100 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 1 微焦～ 50 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 2 微焦～ 50 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 3 微焦～ 60 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 3 微焦～ 50 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 3 微焦～ 40 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 3 微焦～ 30 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 1 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 3 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 5 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 10 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 15 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 20 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 30 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 40 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 50 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 60 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 70 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 80 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 90 微焦。 在某些实施方式中，激光功率和照射时间的组合使得在照射期间由询查空间接收的总能量为约 100 微焦。

[0308] 在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 1mW、2mW、3mW、4mW、5mW、6mW、7mW、8mW、9mW、10mW、13mW、15mW、20mW、25mW、30mW、40mW、50mW、60mW、70mW、80mW、90mW、100mW 或大于 100mW。 在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 1mW。 在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 3mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 5mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 10mW。 在某些实施方式中，激光输出功

率被设定为至少约15mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约20mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 30mW。 在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约40mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约50mW。在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 60mW。 在某些实施方式中，激光输出功率被设定为至少约 90mW。

[0309] 激光照射询查空间的时间可以被设定为不少于约 1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900 或 1000 毫秒。 激光照射询查空间的时间可以被设定为不大于约 2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、1500 或 2000 毫秒。激光照射询查空间的时间可以被设定为约 1 毫秒～ 1000 毫秒。 激光照射询查空间的时间可以被设定为约 5 毫秒～ 500 毫秒。 激光照射询查空间的时间可以被设定为约 5 毫秒～ 100 毫秒。 激光照射询查空间的时间可以被设定为约 10 毫秒～ 100 毫秒。 激光照射询查空间的时间可以被设定为约 10 毫秒～ 50 毫秒。 激光照射询查空间的时间可以被设定为约 10 毫秒～ 20 毫秒。 激光照射询查空间的时间可以被设定为约 5 毫秒～ 50 毫秒。 激光照射询查空间的时间可以被设定为约 1 毫秒～ 100 毫秒。 在某些实施方式中，激光照射询查空间的时间为约 1 毫秒。 在某些实施方式中，激光照射询查空间的时间为约 5 毫秒。 在某些实施方式中，激光照射询查空间的时间为约 10 毫秒。 在某些实施方式中，激光照射询查空间的时间为约 25 毫秒。 在某些实施方式中，激光照射询查空间的时间为约 50 毫秒。 在某些实施方式中，激光照射询查空间的时间为约 100 毫秒。 在某些实施方式中，激光照射询查空间的时间为约 250 毫秒。 在某些实施方式中，激光照射询查空间的时间为约 500 毫秒。 在某些实施方式中，激光照射询查空间的时间为约 1000 毫秒。

[0310] 例如，可以将激光照射询查空间的时间设定为使用提供 3mW、4mW、5mW 或大于 5mW 的输出功率的激光 1 毫秒、250 毫秒、100 毫秒、50 毫秒、25 毫秒或 10 毫秒。在某些实施方式中，用提供 3mW 的输出功率的激光照射标记，并照射标记约 1000 毫秒。在其他实施方式中，用提供不超过约 20mW 的输出功率的激光照射标记少于 1000 毫秒。在其它实施方式中，用 20mW 输出功率的激光对标记照射少于或等于约 250 毫秒。 在某些实施方式中，用约 5mW 输出功率的激光对标记照射少于或等于约 1000 毫秒。

[0311] 2. 毛细管流动池

[0312] 毛细管流动池与样品系统流体连接。在一个实施方式中，分析器的询查空间 314 由对应的光束 311 的横截面积和由检测器的视野内的光束部分所确定。 在分析器系统的一个实施方式中，如本文所定义，询查空间 314 的体积为约 0.01pL ～ 500pL、约 0.01pL ～ 100pL、约 0.01pL ～ 10pL、约 0.01pL ～ 1pL、约 0.01pL ～ 0.5pL、约 0.02pL ～约 300pL、约 0.02pL ～约 50pL、约 0.02pL ～约 5pL、约 0.02pL ～约 0.5pL、约 0.02pL ～约 2pL、约 0.05pL ～约 50pL、约 0.05pL ～约 5pL、约 0.05pL ～约 0.5pL、约 0.05pL ～约 0.2pL 或约 0.1pL ～约 25pL。 在某些实施方式中，询查空间的体积为约 0.01pL ～ 10pL。 在某些实施方式中，询查空间 314 的体积为约 0.01pL ～ 1pL。 在某些实施方式中，询查空间 314 的体积为约 0.02pL ～约 5pL。 在某些实施方式中，询查空间 314 的体积为约 0.02pL ～约 0.5pL。 在某些实施方式中，询查空间 314 的体积为约 0.05pL ～约 0.2pL。 在某些实施

方式中，询查空间 314 的体积为约 0.1pL。 其它可用的询查空间体积如本文所述。 本领域技术人员应该理解，为获得分析器的最佳性能可以对询查空间 314 进行选择。 尽管据显示极小的询查空间会使背景噪声最小化，但较大的询查空间的优点在于可以在合理的时间量中对低浓度样品进行分析。 在使用两个询查空间 370 和 371 的实施方式中，可以使用如本文对于单个询查空间 314 所述的体积。

[0313] 在本发明的一个实施方式中，询查空间大至足以使得能够检测浓度为约 100 飞摩尔 (fM) ～约 1zeptomolar(zM) 的颗粒。 在本发明的一个实施方式中，询查空间大至足以使得能够检测浓度为约 1000fM ～约 1 渺摩尔 (aM) 的颗粒。 在本发明的一个实施方式中，询查空间大至足以使得能够检测浓度为约 10fM ～约 1 渺摩尔 (aM) 的颗粒。 在许多情形中，较大的询查空间使得无需额外的预浓缩装置或技术即可检测浓度小于约 1fM 的颗粒。 本领域技术人员可以理解，大多数合适的询查空间尺寸取决于待检测的颗粒的亮度、背景信号的水平和待分析的样品的浓度。

[0314] 可以通过调节分析器的光学器件来对询查空间 314 的尺寸进行限制。 在一个实施方式中，可以调节光束 311 的直径以改变询查空间 314 的体积。在另一个实施方式中，可以改变检测器 309 的视野。 因此，可以调节源 301 和检测器 309 以便使单颗粒能在询查空间 314 内被照射和检测。 在另一个实施方式中，决定检测器 309 的视野的孔径 306（图 1A）的宽度是可变的。 这中设置使得能够接近实时地改变询查空间，以补偿更浓或更稀的样品，从而使得同时有两个以上的颗粒处在询查空间内的可能性较低。 可以对两个以上的询查空间 (370 和 371) 进行相似的改变。

[0315] 在另一个实施方式中，可以通过使用浓度已知的校准样品来限定询查空间，所述校准样品在对实际样品进行检测之前通过毛细管流动池。 当校准样品通过毛细管流动池时仅在该样品中检测到一个单颗粒时，景深与电磁辐射源的光束直径共同决定了毛细管流动池中的询查空间的尺寸。

[0316] 此外，也可通过实体壁来对询查空间提供物理限制。 在一个实施方式中，所述壁是在毛细管内容有样品流体时流动池 313（图 2A）的一个或多个壁。 在一个实施方式中，所述流动池由玻璃制成，但在不背离本发明的范围的情况下，可以使用其他对于约 200nm ～约 1,000nm 以上的光透明的物质，例如，石英、熔融二氧化硅、如特氟龙、尼龙、塑料（如聚氯乙烯、聚苯乙烯和聚乙烯）有机材料及其任意组合。 虽然在不背离本发明的范围的情况下可以使用其他横截面形状（例如，矩形、圆柱形），在一个实施方式中，毛细管流动池具有正方形截面。 在另一个实施方式中，询查空间可以至少部分地由蚀刻入芯片（未显示）内的通道（未显示）所限定。 类似的考量也可应用于其中使用两个询查空间（图 2B 中的 370 和 371）的实施方式。

[0317] 询查空间浸于流体中。 在一个实施方式中，该流体为水性。 在其他实施方式中，所述流体为非水性流体或水性和非水性流体的组合。 另外，所述流体可以含有调节 pH、离子组成的试剂或者筛分剂，如可溶性大颗粒、聚合物或凝胶。 据考量，在询查空间之间可以存在阀门或其它装置以便临时中断流体连接。 临时中断的询查空间被认为是由流体连接。

[0318] 在本发明的另一个实施方式中，询查空间时存在于流动池 313 内的单个询查空间，其受到稀释剂体积内的样品材料的层流 (laminar flow)（也称鞘流）的尺寸所限制。在

这些及其他实施方式中，询查空间可仅由鞘流所限定，或由鞘流与照明源的尺寸或检测器的视野的组合所限定。 可以以多种方式设置鞘流，包括：样品材料作为同轴层流的内部材料，而稀释剂体积在外部；稀释剂体积在样品材料的两侧；稀释剂体积在样品材料的多侧，但不将样品材料完全包封；稀释剂体积完全围绕样品材料；稀释剂体积同轴地完全围绕样品材料；样品材料是不连续的系列液滴中的内部材料，而稀释剂体积完全围绕每个样品材料液滴。

[0319] 在某些实施方式中，本发明的单分子检测器包含不超过一个询查空间。 在某些实施方式中，可以使用多个询查空间。 此前已经公开过多个询查空间，通过参考从美国专利申请第 11/048,660 号并入。 本领域技术人员可以理解，在某些实施方式中，分析器将含有多个不同的询查空间。 在某些实施方式中，分析器含有 2、3、4、5 或 6 个以上的不同询查空间。

[0320] 3. 驱动力

[0321] 在分析器系统的一个实施方式中，颗粒由驱动力移动通过询查空间。 在某些实施方式中，移动颗粒的驱动力是压力。 在某些实施方式中，压力由泵、空气压力源、真空源、离心机或其组合所供给。 在某些实施方式中，移动颗粒的驱动力是电动力。此前已经在现有申请中公开过作为驱动力的电动力的使用，通过参考从美国专利申请第 11/048,660 号并入。

[0322] 在一个实施方式中，可以使用压力作为驱动力来使颗粒移动通过毛细管流动池的询查空间。 在另一个实施方式中，供给压力以便借助泵来移动样品。 合适的泵如本领域中所已知。 在一个实施方式中，可以使用制造用于 HPLC 应用的泵（如由 Scivax，Inc. 制造的泵）作为驱动力。 在其它实施方式中，当泵吸较小体积的样品时，可以使用制造用于微流体应用的泵。 此类泵如美国专利第 5,094,594 号、第 5,730,187 号、第 6,033,628 号和第 6,533,553 号中所述，其公开了可以泵吸纳升 (nanoliter) 或皮升 (picoliter) 范围内的流体体积的装置。 优选的是，泵内所有与样品接触的材料由高度惰性材料（例如，聚醚醚酮 (PEEK)、熔融二氧化硅或蓝宝石）制成。

[0323] 驱动力对于移动样品通过毛细管流动池从而推送样品通过询查空间以进行分析是必要的。 在已使样品通过后，也需要驱动力来推送冲洗样品通过毛细管流动池。 当采用样品回收时，也需要驱动力来推送样品回到样品回收容器中。 标准泵具有各种尺寸，并且可以选择适当的尺寸来配合预期样品尺寸和流动需要。 在某些实施方式中，使用不同的泵用于样品分析和冲洗系统。 分析泵的容积为约 0.000001mL ～约 10mL、约 0.001mL ～约 1mL、约 0.01mL ～约 0.2mL、或约 0.005mL、0.01mL、0.05mL、0.1mL 或 0.5mL。 冲洗泵的容积可以大于分析泵容积。 冲洗泵的体积可为约 0.01mL ～约 20mL、约 0.1mL ～约 10mL、约 0.1mL ～约 2mL、或约 0.05mL、0.1mL、0.5mL、1mL、5mL 或 10mL。 这些泵尺寸仅为说明性，且本领域技术人员将会理解，可以根据应用、样品尺寸、待泵吸的流体的粘度、管道尺寸、流速、温度和其他本领域内公知的因素来选择泵的尺寸。 在某些实施方式中，所述系统的泵由易于用微处理器极为精确地控制的步进电动机驱动。

[0324] 在优选实施方式中，将冲洗泵和分析泵串联使用，并采用特殊控制阀来控制流体的方向。 将管道设计来使得在分析泵抽吸最大样品时，样品不会到达泵自身。 这通过

选择分析泵与分析毛细管之间的管道的 ID 和长度以使得管道体积大于分析泵的抽动体积来实现。

[0325] 4. 检测器

[0326] 在一个实施方式中，对在暴露于电磁辐射之后由荧光标记发出的光（例如，紫外、可见或红外范围内的光）进行检测。 检测器 309（图 1A）或检测器（364、365，图 1B）能捕获来自荧光部分的光子突发 (photo burst) 的振幅和持续时间，并进而将光子突发的振幅和持续时间转化为电信号。 可以使用如 CCD 相机、视频输入模块相机和条纹相机 (streak camera) 等检测装置来产生具有连续信号的图像。在另一个实施方式中，可以使用如辐射热计、光电二极管、光电二极管阵列、雪崩式光电二极管和产生连续信号的光电倍增管等装置。 也可以使用前述检测器的任何组合。 在一个实施方式中，使用雪崩式光电二极管来检测光子。

[0327] 使用处于询查空间 314（图 2A）与其对应检测器 309（图 1A）之间的特定光学器件，可以对发射的电磁辐射的数种明显特性进行检测，这些特性包括：发射波长、发射强度、突发尺寸、突发持续时间和荧光偏振。 在某些实施方式中，检测器 309 是在反向偏压中使用的光电二极管。 设定于反向偏压中的光电二极管组通常具有极高的电阻。 该电阻在适当频率的光照射于 P/N 结上时减小。 因此，受到反向偏压的二极管可以通过检测流经其的电流而被用作检测器。 基于该效应的电流比基于零偏压的电流对光更为敏感。

[0328] 在所述分析器系统的一个实施方式中，光电二极管可以是雪崩式光电二极管，其能在比常规光电二极管高得多的反向偏压下工作，由此使得每个由光产生的载体被雪崩式击穿 (avalanche breakdown) 倍增，从而导致光电二极管内的内部增益，这增加了装置的有效响应性（灵敏度）。 光电二极管的选择由荧光标记的颗粒所发出的能量或发射波长决定。 在某些实施方式中，光电二极管是检测 190nm ～ 1100nm 的能量的硅光电二极管；在另一个实施方式中，光电二极管是检测 800nm ～ 1700nm 的能量的锗光电二极管；在另一个实施方式中，光电二极管是检测 800nm ～ 2600nm 的能量的砷化铟镓光电二极管；而在其它实施方式中，光电二极管是检测 1000nm ～ 3500nm 的能量的硫化铅光电二极管。 在某些实施方式中，雪崩式光电二极管是设计来检测波长为 400nm ～ 1100nm 的能量的单光子检测器。 单光子检测器可商购（例如，Perkin Elmer，Wellesley，MA）。

[0329] 在某些实施方式中，检测器是检测 300nm ～ 1700nm 的能量的雪崩式光电二极管检测器。 在一个实施方式中，可以使用硅雪崩式光电二极管来检测 300nm ～ 1100nm 的波长。 可以使用铟镓砷光电二极管来检测 900nm ～ 1700nm 的波长。 在某些实施方式中，分析器系统可以包含至少一个检测器；在其它实施方式中，分析器系统可以包含至少两个检测器，且每个检测器可以被选择和设置来检测处于特定波长范围的光的能量。例如，可以使用两个分开的检测器来检测已用不同标记进行标记的颗粒，所述不同标记在受 EM 源激发后发出具有不同光谱的能量的光子。 在一个实施方式中，分析器系统可以包含能检测 450nm ～ 700nm 的荧光能量（例如，绿色染料（例如，Alexa Fluor 546）发出的荧光能量）的第一检测器；和能检测 620nm ～ 780nm 的荧光能量（例如，深红色染料（例如，Alexa Fluor647）发出的荧光能量）的第二检测器。 也可以使用检测 400nm ～ 600nm 的荧光能量（例如，蓝色染料（例如， Hoechst 33342）发出的荧光能量）的检测

器，和检测 560nm ～ 700nm 的能量（例如，红色染料（例如，Alexa Fluor 546 和 Cy3）发出的能量）的检测器。

[0330] 可以使用包含两个或多个检测器的系统来检测个体颗粒，所述颗粒各自由发射不同光谱的光的两个或多个标记所标记。 例如，两个不同检测器能检测已用两种染料标记进行标记的抗体。 替代性地，可以将包含两个检测器的分析器系统用于检测不同类型的颗粒，每种类型的颗粒各自由不同的染料分子或者由两种或多种染料分子的混合物进行标记。 例如，可以使用两个不同检测器来检测识别两种不同蛋白的两种不同类型的抗体，每种类型的抗体由不同染料标记或者由两种或多种染料标记分子的混合物进行标记。 通过改变两种或多种染料标记分子的比例，可以用两个检测器对两种或多种不同颗粒类型进行分别检测。 可以理解，在不脱离本发明的范围的情况下，可以使用三个或多个检测器。

[0331] 本领域技术人员应该理解，可以在每个询查空间配置一个或多个检测器，是否有一个或多个询查空间被限制于流动池内，和可以将每个检测器设置来检测上文所列出的发射电磁辐射的任何特性。 多检测器的使用（例如，用于多个询查空间）已于此前的在先申请中公开，本文通过参考从美国专利申请第 11/048,660 号并入。 一旦将颗粒标记来使其可被检测（或者如果颗粒拥有使其可被检测的固有特性），则可以在不脱离本发明的范围的情况下使用本领域中已知的任何合适的检测机制，例如， CCD 相机、视频输入模块相机、条纹相机、辐射热计、光电二极管、光电二极管阵列、雪崩式光电二极管和产生连续信号的光电倍增管及其组合。 可以被检测的电磁辐射的不同特性包括：发射波长、发射强度、突发尺寸、突发持续时间、荧光偏振及其任意组合。

[0332] A. 采样系统

[0333] 在另一个实施方式中，分析器系统可以包含采样系统以便制备用于引入该分析器系统的样品。 所包含的采样系统能自动采样多个样品并且提供样品容器与第一询查空间之间的流体连接。

[0334] 在某些实施方式中，本发明的分析器系统包含用于将样品的等分试样引入单颗粒分析器以进行分析的采样系统。 可以使用能引入样品的任何机制。 样品可以使用由泵创建的真空抽吸来抽取，或由施加于样品的会将流体推送至管内的压力来抽取，或者通过任何其它的起到降样品引入采样管的作用的机制来抽取。 通常但并非必须的是，采样系统将已知样品体积的样品引入单颗粒分析器；在其中对一个或多个颗粒的存在或缺失进行检测的某些实施方式中，对样品尺寸的精确了解并非至关重要。 在优选实施方式中，采样系统提供对单个样品或多个样品的自动化采样。 在其中将已知体积的样品引入系统的实施方式中，采样系统提供了大于 0.0001 μl、0.001 μl、0.01 μl、0.1 μl、1 μl、2 μl、5 μl、10 μl、20 μl、30 μl、40 μl、50 μl、60 μl、70 μl、80 μl、90 μl、100 μl、150 μl、200 μl、500 μl、1000 μl、1500 μl 或 2000 μl 的分析用样品。 在某些实施方式中，采样系统提供小于约 2000 μl、1000 μl、500 μl、200 μl、100 μl、90 μl、80 μl、70 μl、60 μl、50 μl、40 μl、30 μl、20 μl、10 μl、5 μl、2 μl、1 μl、0.1 μl、0.01 μl 或 0.001 μl 的分析用样品。 在某些实施方式中，采样系统提供的分析用样品为约 0.01 μl ～ 1500 μl、约 0.1 μl ～ 1000 μl、约 1 μl ～ 500 μl、约 1 μl ～ 100 μl、约 1 μl ～ 50 μl 或约 1 μl ～ 20 μl。 在某些实施方式中，采样系统提供的分析用样品为约 5 μl ～

200μl、约 5μl～约 100μl 或约 5μl～ 50μl。 在某些实施方式中，采样系统提供的分析用样品为约 10μl～ 200μl、约 10μl～ 100μl 或约 10μl～ 50μl。 在某些实施方式中，采样系统提供的分析用样品为约 0.5μl～约 50μl。

[0335] 由于本发明的方法的灵敏度，可以采用极小的样品体积。 例如，本文的方法可以用于测定与 100μl 的标准样品体积相比较小的样品体积，例如 10μl 以下。 与其它方法相比，本发明使得更大量的样品能够以小体积样品提供可定量结果。 例如，从典型的 1mm 针尖活组织检查物制备的溶解产物的体积可以小于等于 10μl。 使用本发明可以对此类样品进行测试。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 100μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 90μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 80μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 70μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 60μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 50μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 40μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 30μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 25μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 20μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 15μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 10μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 5μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 1μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.05μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.01μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.005μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.001μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.0005μl 的样品体积。 在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.0001μl 的样品体积。

[0336] 在某些实施方式中，采样系统所提供的样品尺寸可以对于不同样品有所不同。在这些实施方式中，样品尺寸可以是本文所述的样品尺寸中的任何一个，并且根据需要可以随着每个样品或随着样品组而变化。

[0337] 对于即将进行的分析需要采样系统具有样品体积的准确性和不同样品间的体积精度。 在某些实施方式中，采样体积精度由所用的泵所确定，通过以 CV 表示，CV 小于约 50％、40％、30％、20％、10％、5％、4％、3％、2％、1％、0.5％、0.1％、0.05％或 0.01％的样品体积。 在某些实施方式中，采样系统的不同样品间精度由小于约 50％、40％、30％、20％、10％、5％、4％、3％、2％、1％、0.5％、0.1％、0.05％或 0.01％的 CV 表示。 在某些实施方式中，采样系统的测试内精度由小于约 10％、5％、1％、0.5％或 0.1％的 CV 表示。 在某些实施方式中，采样系统的测试内精度显示出小于约 10％的 CV。 在某些实施方式中，采样系统的测试内精度由小于约 5％的 CV 表示。 在某些实施方式中，采样系统的测试内精度显示出小于约 1％的 CV。 在某些实施方式中，采样系统的测试内精度由小于约 0.5％的 CV 表示。 在某些实施方式中，采样系统的测试内精度显示出小于约 0.1％的 CV。

[0338] 在某些实施方式中，采样系统提供较低的样品夹带，其优点在于在样品与样品之间无需额外的洗涤步骤。 因此，在某些实施方式中，样品夹带少于约 1％、0.5％、0.1％、0.05％、0.04％、0.03％、0.02％、0.01％、0.005％或 0.001％。 在某些实施方式

中，样品夹带少于约 0.02％。 在某些实施方式中，样品夹带少于约 0.01％。

[0339] 在某些实施方式中，采样器提供样品环。 在这些实施方式中，多个样品被依次吸取至管道内并且彼此被缓冲“塞”所分隔开。 样品通常先后被读取，而在其间不进行冲洗。 在环结束时进行一次冲洗。 在使用缓冲“塞”的实施方式中，通过将缓冲塞排至微滴定板的单独板孔内可以回收所述缓冲塞。

[0340] 可以将采样系统改造以便与标准测试装置（例如，96 孔微滴定板，或更优选为 384 孔板）一同使用。 在某些实施方式中，系统包含 96 孔板定位器和使样品管浸入和浸出板孔的机械装置，例如，提供沿着 X、Y 和 Z 轴移动的机械装置。在某些实施方式中，采样系统提供多个采样管，样品可以储存于所述采样管中并在开始测试时从采样管中取出。 在某些实施方式中，来自多个管的所有样品在一个检测器上进行分析。 在其他实施方式中，可以将多个单分子检测器与样品管相连。 样品可以通过包括在由采样系统进行采样前在板孔中的样品上执行操作的步骤来制备，或者样品可在分析器系统内制备，或者两者的某种组合。

[0341] B. 样品制备系统

[0342] 样品制备包括制备分析用原始样品所必需的步骤。 举例而言，这些步骤可以涉及以下一步或多步：如离心、过滤、蒸馏、色谱分离等分离步骤；浓缩、细胞裂解、改变 pH、添加缓冲液、添加稀释剂、添加试剂、加热或冷却、添加标记、使标记结合、利用照射进行交联、分离未结合标记、使干扰化合物失活和 / 或将其除去、以及任何其它对于拟制备用于单颗粒分析器的分析的样品所必需的步骤。 在某些实施方式中，对血液进行处理以分离出血浆或血清。 在血清或血浆样品上也可以执行额外的标记、除去未结合标记和 / 或稀释步骤。

[0343] 在某些实施方式中，分析器系统包含样品制备系统，该样品制备系统执行提供准备用于单颗粒分析器的分析的样品所必需的某些或所有过程。 该系统可以执行上文所列的用于样品制备的任何或所有步骤。 在某些实施方式中，样品部分地由分析器系统的样品制备系统进行处理。 因此，在某些实施方式中，可以首先在分析器系统之外对样品进行部分处理。 例如，可以将样品事先离心。 然后可以将样品在分析器内部由样品制备系统进行部分处理。 分析器内部处理包括标记样品、将样品与缓冲液混合以及其它本领域技术人员所已知的处理步骤。 在某些实施方式中，将血液样品在分析器系统外部进行处理以提供血清或血浆样品，然后将所述血清或血浆样品导入分析器系统并进一步有样品制备系统进行处理以对所关注的颗粒进行标记和必要时除去未结合标记。 在其它实施方式中，样品的制备可以包括将样品免疫耗竭以便除去不受关注的颗粒或除去可能干扰样品分析的颗粒。 在其它实施方式中，可以耗竭样品中的可能干扰样品分析的颗粒。 例如，样品制备可以包括耗竭异嗜性抗体，已知这种抗体会干扰使用非人类抗体来直接或间接检测关注颗粒的免疫测试。 类似地，可以使用识别干扰蛋白的抗体来将其它会干扰关注颗粒的测定的蛋白从样品中除去。

[0344] 在某些实施方式中，可以在测试和分析样品之前对样品进行固相萃取。 例如，可以对针对 cAMP 测试的血清样品首先使用与之结合的 c18 柱进行固相萃取。如蛋白酶、脂酶和磷酸酶等其它酶被从柱上洗去，并将 cAMP 洗脱，其基本不带能降解 cAMP 或干扰 cAMP 的测定的蛋白。 可以使用固相萃取来除去样品的可能减弱测试灵敏度的基础基

质。 在其它实施方式中，可以通过干燥或冻干样品并将颗粒溶解于比原始样品更小的体积中来浓缩样品中存在的关注颗粒。

[0345] 在某些实施方式中，分析器系统提供了样品制备系统，该样品制备系统提供对拟在所述分析器系统上进行分析的样品的完全制备，例如，血液样品、唾液样品、尿液样品、脑脊液样品、淋巴样品、 BAL 样品、活体检测样品、法医样品和生物恐怖样品等。 在某些其它实施方式中，分析器系统提供了样品制备系统，该样品制备系统提供某些或所有样品制备。 在某些实施方式中，初始样品是血液样品，其再由分析器系统处理。 在某些实施方式中，样品是血清或血浆样品，其再由分析器系统处理。 血清或血浆样品可以进一步通过例如与结合所关注颗粒的标记接触来进行进一步处理；然后可以在除去或不除去未结合标记的情况下使用样品。

[0346] 在某些实施方式中，在分析器系统之外或在分析器系统的样品制备组件中在一个或多个微滴定板（例如 96 孔板）上进行样品制备。 如本领域中所公知，试剂和缓冲液等的贮存器可以借助管道或其它适当结构体与板孔处于间断性流体接触中。 可以在 96 孔板或管道中分别制备样品。 可以在一个板上进行样品分离、标记结合和必要时的标记分离步骤。 在某些实施方式中，制备的颗粒之后被从板释放并且样品被移送至管中以便采样至样品分析系统。 在某些实施方式中，所有的样品制备步骤都在一个板上完成，且分析系统从该板直接获取样品。 虽然依据 96 孔板来描述该实施方式，但可以理解，可以使用任何用于容纳一个或多个样品并且适于样品制备的容器。 更一般而言，在某些实施方式中，样品制备系统能够容纳和制备大于约 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、500、1000、5000 或 10,000 个样品。 在某些实施方式中，可以采样多个样品以在多个分析器系统中进行分析。 因此，在某些实施方式中，从样品制备系统中采样 2 个样品或大于约 2、3、4、5、7、10、15、20、50 或 100 个样品并在多个样品分析器系统上并行运行。

[0347] 也可以将微流体系统用于样品制备和用作作为分析器系统的一部分的样品制备系统，尤其是对于怀疑包含浓度高至足以使检测需要较小的样品的颗粒的样品而言。 微流体操作的原理和技术在本领域中已知。 参见例如美国专利第 4,979,824 号、第 5,770,029 号、第 5,755,942 号、第 5,746,901 号、第 5,681,751 号、第 5,658,413 号、第 5,653,939 号、第 5,653,859 号、第 5,645,702 号、第 5,605,662 号、第 5,571,410 号、第 5,543,838 号、第 5,480,614 号、第 5,716,825 号、第 5,603,351 号、第 5,858,195 号、第 5,863,801 号、第 5,955,028 号、第 5,989,402 号、第 6,041,515 号、第 6,071,478 号、第 6,355,420 号、第 6,495,104 号、第 6,386,219 号、第 6,606,609 号、第 6,802,342 号、第 6,749,734 号、第 6,623,613 号、第 6,554,744 号、第 6,361,671 号、第 6,143,152 号、第 6,132,580 号、第 5,274,240 号、第 6,689,323 号、第 6,783,992 号、第 6,537,437 号、第 6,599,436 号、第 6,811,668 号和已公布的 PCT 专利申请第 WO9955461(A1) 号。 样品可以连续制备或平行制备，以用于单个或多个分析器系统中。

[0348] 在某些实施方式中，样品包含缓冲剂。 缓冲剂可以与样品在分析器系统之外进行混合，或者其可由样品制备装置提供。 虽然可以使用任何合适的缓冲剂，优选的缓冲剂具有较低的荧光背景、对于经可检测标记的颗粒具有惰性、能够保持工作 pH、并且在其中的驱动力为电动力的实施方式中具有合适的离子强度以用于电泳。 缓冲剂浓度可以

为任何合适的浓度，例如，约 1mM ～约 200mM。 可以使用任何缓冲体系，条件是其提供了所关注的分子的溶解性、功能和可检测性。 在某些实施方式中，例如，对于采用泵吸的应用，缓冲剂选自磷酸盐、甘氨酸、醋酸盐、柠檬酸盐、 acidulate、碳酸盐 / 碳酸氢盐、咪唑、三乙醇胺、甘氨酸酰胺、硼酸盐、MES、Bis-Tris、ADA、aces、PIPES、MOPSO、1，3- 二 [三（羟甲基）甲氨基] 丙烷 (Bis-Tris Propane)、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、MOBS、TAPSO、Trizma、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、N- 三（羟乙基）甘氨酸 (Tricine)、 Gly-Gly、 N- 二（羟乙基）甘氨酸 (Bicine)、 HEPBS、TAPS、 AMPD、 TABS、 AMPSO、 CHES、 CAPSO、 AMP、 CAPS 和 CABS。 缓冲剂还可选自 Gly-Gly、 N- 二（羟乙基）甘氨酸、 N- 三（羟乙基）甘氨酸、2- 吗啉乙磺酸 (MES)、4- 吗啉丙磺酸 (MOPS) 和 2- 氨基 -2- 甲基 -1- 丙醇盐酸盐 (AMP)。 可用缓冲剂为 pH 8.1 的 2mM Tris/ 硼酸盐，但 Tris/ 甘氨酸和 Tris/HCl 也可接受。 其它缓冲剂如本文所述。

[0349] 可用于电泳的缓冲剂已公开于在先申请中，本文通过参考从美国专利申请第 11/048,660 号并入。

[0350] C. 样品回收

[0351] 本发明的分析器和分析系统的实施方式的一个极为有用的特点在于可以不用消耗样品而对其进行分析。 这在样品材料有限的情况下尤其重要。 回收样品也使得可以对其进行其它分析或再分析。 对于其中样品尺寸有限和 / 或其中需要对样品再分析的能力的应用（例如，法医应用、药物筛选和临床诊断应用），这一特点的优点对于本领域技术人员是显而易见的。

[0352] 因此，在某些实施方式中，本发明的分析器系统还提供了用于在分析后回收样品的样品回收系统。 在这些实施方式中，所述系统包含如下装置和方法：借助其可以将样品抽取至分析器中、进行分析然后例如通过相同路径送回样品保持器（例如，样品管）。由于没有摧毁任何样品，且由于样品没有进入任何阀门或其它管道，其保持不受污染。 另外，由于样品路径中的所有材料（例如，PEEK、熔融二氧化硅或蓝宝石）都是高度惰性的，极少会从样品路径受到污染。 受步进式电动机控制的泵（特别是分析泵）的使用使得能够精确控制抽取和推送回去的体积。 这允许对样品完全或近于完全回收，而几乎没有（即使有）受冲洗缓冲液的稀释。 因此，在某些实施方式中，在分析后回收了大于 50％、60％、70％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或 99.9％的样品。 在某些实施方式中，回收的样品未被稀释。 在某些实施方式中，回收的样品被稀释了小于约 1.5 倍、1.4 倍、1.3 倍、1.2 倍、1.1 倍、1.05 倍、1.01 倍、1.005 倍或 1.001 倍。

[0353] 对于采样和 / 或样品回收而言，可以使用将液体样品从样品容器运送至分析器的任何机械装置。 在某些实施方式中，分析毛细管的入口端具有相连的能浸入样品容器（例如，试管或样品孔）或能保持在废液容器上方的长度较短的管道（例如 PEEK 管道）。当冲洗时，为将此前的样品从设备中清洁除去，将所述管道置于废液容器上方以便接住冲洗废液。 当抽取样品时，将所述管道置于样品孔或试管内。 通常，快速抽取样品，然后在观察样品内颗粒的同时缓慢将其推送出。 替代性地，在某些实施方式中，至少在部分抽取循环期间缓慢地抽取样品；可以在缓慢抽取样品时对其进行分析。 在这之后可以

将样品快速送回并快速冲洗。 在某些实施方式中，既可以在进入（抽进）循环也可以在离开（推出）循环中分析样品，这改善了例如对较小和稀释的样品的计数统计，还改善了对结果的确证等等。 如果需要保留样品，可以将其推送回其所来自的相同样品孔，或推送至另一样品孔。 如果不需要保留样品，则将管道置于废液容器之上。

[0354] VI. 使用高灵敏分子分析的方法

[0355] 本发明的系统、系统试剂盒和方法使得可以在浓度远低于此前测定浓度的样品中进行分子测定。 本发明的仪器、试剂盒和方法的高灵敏度使得能够进行此前由于缺乏检测灵敏度而不可能实现的标记物（如生物学标记物）确立。 本发明也包括使用本文所述的组合物和方法来发现新标记物。

[0356] 目前存在大量可利用的标记物，其虽然有可能用于确定生物学状态但在目前由于其低限未知而没有实际使用。 在某些情形中，通过目前的方法可以检测标记物的异常高水平，但正常范围尚未被确立。 在某些情形中，可以检测标记物的较高的正常范围，但较低正常范围或低于正常的水平无法检测。 在某些情形中，例如，对肿瘤特异的标记物或感染标记物，标记物的任何水平都指示着潜在的生物学状态的存在，且提高的检测灵敏度有利于早期诊断。 在某些情形中，在多个时间点上的标记物浓度的变化速率或缺乏变化提供了最有用的信息，但目前的分析方法不允许在病况的早期阶段（此时通常最可治疗）的采样时间点进行标记物水平的确定。 在许多情况下，仅可通过使用在临床设定中不实际或无用的繁琐方法（例如，需要复杂样品处理和耗时的分析的方法）来在临床可用水平对标记物进行检测。

[0357] 另外，存在这样的潜在生物学标记物：其以足够低的浓度存在以致其存在仍极难或无法通过目前的方法检测。 本发明的分析方法和组合物提供了使得能够检测处于此前无法检测的标记物浓度的生物状态标记物的灵敏度和精度水平，由此使得能将此类标记物从确认性标记物或仅可用于有限的研究设定中的标记物“重新利用”为可用于临床设定和/或大规模临床设定（包括临床试验）中的诊断性、预后性、治疗针对性或其它类型的标记物。 这类方法允许例如确定此类标记物的正常和非正常范围。

[0358] 如此重新利用的标记物可以用于例如：检测正常状态（正常范围）、检测（例如对于治疗、如药物使用的）响应物/非响应物；检测早期疾病或病变发生（例如，癌症早期检测、心肌缺血的早期检测）；疾病分期（例如，癌症）；疾病监测（例如，糖尿病监测、对治疗后癌症复发的监测）；疾病机制研究；和治疗毒性（例如，药物治疗的毒性）的研究。

[0359] A. 方法

[0360] 由此，本发明提供了用于灵敏检测标记物的方法和组合物，以及确立标记物的正常和非正常水平的值的进一步方法。 在其它实施方式中，本发明提供了基于对于标记物所确立的值的诊断、预后和/或治疗选择的方法。 本发明还提供了用于此类方法中的组合物，例如，用于超灵敏检测标记物的检测试剂。

[0361] 在某些实施方式中，本发明提供了通过确立从第一集群获得的生物样品中的标记物的浓度范围来确立用于生物学状态的标记物的方法，这通过检测标记物的单分子（例如，检测已与标记物的单分子相连的标记）以测定生物样品中的标记物浓度来实现。在某些实施方式中，标记物是多肽或小分子。 样品可以是本文所述的任何样品类型，例

如，血液、血浆、血清或尿液。

[0362] 所述方法可以利用来自第一集群的样品，其中所述集群是未展示出所述生物学状态的集群。 在所述生物学状态是疾病状态的情形中，第一集群可以是不展示该疾病的集群，例如，“正常”集群。 在某些实施方式中，所述方法还可以包括确立获自第二集群的生物样品中的标记物水平范围，其中所述第二集群的成员展示出所述生物学状态，这通过检测标记物单分子以测定生物样品中的标记物浓度来实现。 在某些实施方式中，例如，在横向研究中，第一集群与第二集群不同。 在某些实施方式中，第二集群的至少一个成员是第一集群的成员，或所述第一集群的至少一个成员是第二集群的成员。 在某些实施方式中，例如，在纵向研究中，第二集群的几乎所有成员都是第一集集群的已发展出生物学状态（例如，疾病或病理学状态）的成员。

[0363] 标记物单分子的检测使用本文所述的方法进行，例如，通过检测标记物单分子对所述标记物的检出限小于约 1000 飞摩尔、100 飞摩尔、50 飞摩尔、20 飞摩尔、10 飞摩尔、5 飞摩尔、1 飞摩尔、0.5 飞摩尔、0.1 飞摩尔、0.05 飞摩尔、0.01 飞摩尔、0.005 飞摩尔或 0.001 飞摩尔的样品中标记物的方法。 在某些实施方式中，通过检测标记物单分子的所述标记物的检出限小于约 100pg/ml、50pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml 或 0.001pg/ml。

[0364] 生物学状态可以为：表型状态；影响生物体的状况；发育阶段；年龄；健康情况；病理学；疾病；疾病过程；疾病分期；感染；毒性；或对于化学因素、环境因素或药物因素的响应（例如，药物响应分型、药物毒性分型或药物有效性分型）。

[0365] 在某些实施方式中，生物学状态是包括但不限于炎症、异常细胞生长和异常代谢状态的病理学状态。 在某些实施方式中，生物学状态是疾病状态。 疾病状态包括但不限于癌症、心血管疾病、炎性疾病、自身免疫疾病、神经疾病、传染病和妊娠相关病症。 在某些实施方式中，所述状态是疾病分期状态，例如，癌症疾病分期状态。

[0366] 本发明也可用于确定治疗响应状态。 在某些实施方式中，所述治疗为药物治疗。 所述响应可以是治疗性效果或副效果，例如，副作用。 治疗性效果的标记物可基于药物所治疗的疾病或病况。 副作用标记物通常基于药物分类和具体结构以及作用与代谢的机制。 常见副作用是药物毒性。 一个实例是心脏毒性，这可由标记物心脏肌钙蛋白来监测。 在某些实施方式中，通常在接受药物的集群中对疾病状态的一个或多个标记物以及药物的一个或多个副作用的一个或多个标记物进行监测。 可以每隔一段时间取样，并可以随时间进行而评估样品中标记物的对应值。

[0367] 标记物单分子的检测可以包括用包含荧光部分的标记对标记物进行标记，所述荧光部分在受到在该荧光部分的激发波长发光的激光的刺激时能发出至少约 200 个光子，其中所述激光聚焦于含有所述荧光部分的直径不小于 5 微米的光斑上，且其中由激光导向所述光斑的总能量不高于 3 微焦。 在某些实施方式中，荧光染料分子包含至少一个取代的吲哚鎓环体系，其中吲哚鎓环的 3 位碳上的取代基含有化学反应性基团或共轭的物质。 在某些实施方式中，所述荧光部分可以包含选自 Alexa Fluor 488、 Alexa Fluor 532、 Alexa Fluor647、 Alexa Fluor 680 或 Alexa Fluor 700 的染料。 在某些实施方式中，所述荧光部分包含 Alexa Fluor 647。 在某些实施方式中，所述标记还包含所述标记物的结合伴侣，例如对所述标记物特异的抗体（如多克隆抗体或单颗粒抗体）。 各种标记物的

结合伴侣如本文所述。

[0368] 所述方法还可包括基于第一范围或第一和第二范围来确立标记物的阈值水平，其中在来自个体的生物样品中标记物以高于或低于该阈值水平的水平存在表明所述个体中存在生物学状态的可能性增加。 对于正常集群所确定的阈值的实例是在正常集群中大于 99％的百分比值的建议心脏肌钙蛋白阈值（参见实施例 3）。 其它阈值水平可以通过经验确定，即基于来自第一和第二集群的与标记水平以及所监测的生物学状态的存在、缺失、严重性、进展速率、退行速率等有关的数据而确定。 可以理解，可以在范围的任一端点确立阈值水平，例如，样品中标记物浓度的最小值低于阈值水平则表明生物学状态的可能性增加，和 / 或样品中标记物浓度的最大值高于阈值水平则表明生物学状态的可能性增加。 在某些实施方式中，可能产生风险分层，其中两个或多个标记物浓度范围对应于两个或多个风险水平。 其它分析来自两个集群的针对标记物的数据和产生供例如医师和其它医疗保健专业人员使用的临床相关值的方法如本领域所公知。

[0369] 对于某些生物学标记物，任何标记物只要存在即指示疾病或病理学状态，且阈值基本为零。 一个实例是在移除前列腺后检测癌症复发的前列腺特异性抗原 (PSA) 的使用。 由于 PSA 仅由前列腺产生，且由于前列腺和所有肿瘤理应被移除，移除后的 PSA 为零。 任何水平的 PSA 的出现都标示着可能的癌症复发，例如在癌转移位点。 因此，检测方法越灵敏，则如果发生此类复发可以更早地进行干预。

[0370] 此外，还可以进行对标记物浓度的其它评估，例如在系列样品中进行评估，其中值的改变、变化速率、突然变化 (spike) 和减少等均可为确定生物学状态提供有用信息。 另外，如果发现多于一种标记物提供有关生物学状态的信息，则可以使用标记物分析组。 如果使用标记物分析组，则可以对标记物在不同样品（例如，普通样品的等分试样）中分开测定或通过多路复用 (multiplexing) 同时进行测定。 标记物分析组和多路复用的实例如美国专利申请第 11/048,660 号中给出。

[0371] 此类标记物以及例如对于正常和 / 或异常状态的参考范围的确立使得能够对生物体的生物学状态进行灵敏和精确的确定。 因此，在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物体中生物学状态的存在或缺失的方法，所述方法包括：i) 测定来自生物体的生物样品中的标记物浓度，其中所述标记物是通过确立获自第一集群的生物样品中的所述标记物的浓度范围而确立的标记物，所述浓度范围的确立通过检测标记物单分子以测定生物样品中标记物的浓度而实现；和 ii) 基于所述生物体中所述标记物的所述浓度确定所述生物学状态的存在或缺失。

[0372] 在某些实施方式中，本发明提供了用于检测生物体中生物学状态的存在或缺失的方法，所述方法包括：i) 测定来自所述生物体的多个生物学样品中的标记物浓度，其中所述标记物是是通过确立获自第一集群的生物样品中的所述标记物的浓度范围而确立的标记物，所述浓度范围的确立通过检测标记物单分子以测定生物样品中标记物的浓度而实现；和 ii) 基于所述多个样品中所述标记物的所述浓度确定所述生物学状态的存在或缺失。 在某些实施方式中，样品为不同类型，例如，来自不同组织类型的样品。 在此情况下，所述确定基于对所述不同类型样品中所述标记物的浓度的比较。 更一般而言，样品为相同类型，且每隔一段时间取样。 样品可以为本文所述的任何样品类型，例如，血液、血浆或血清；或者尿液。 样品间的时间间隔可以为分钟、小时、日、周、月或年。

在急性临床设定中，时间间隔可以为分钟或小时。 在涉及对个体的监测的设定中，时间间隔可以为日、周、月或年。

[0373] 在许多情况下，其存在或缺失待检测的生物学状态是疾病表型。 因此，在一个实施方式中，所关注的表型状态是经临床诊断的疾病状态。 此类疾病状态包括例如，癌症、心血管疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病、神经疾病、呼吸道疾病、传染病和妊娠相关病症。

[0374] 本发明的某些方面包括癌症表型。 本文中癌症的实例包括但不限于：乳腺癌、皮肤癌、骨癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、脑癌、喉癌、胆囊癌、胰腺癌、直肠癌、甲状旁腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、神经组织癌、头颈癌、结肠癌、胃癌、支气管癌、肾癌、基底细胞癌、溃疡型和乳突型鳞状细胞癌、转移性皮肤癌、骨肉瘤、尤因氏肉瘤、网状细胞肉瘤、骨髓瘤、巨细胞肿瘤、小细胞肺肿瘤、非小细胞肺癌、胆石、胰岛细胞肿瘤、原发性脑肿瘤、急性和慢性淋巴细胞和粒细胞肿瘤、多毛细胞肿瘤、腺瘤、增生、髓样癌、嗜铬细胞瘤、粘膜神经瘤、肠神经节细胞瘤、增生性角膜神经肿瘤、类马氏综合征肿瘤、威尔姆氏肿瘤、精原细胞瘤、卵巢肿瘤、平滑肌肿瘤、宫颈非典型增生和原位癌、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、软组织肉瘤、恶性类癌、局部皮肤损伤、蕈样肉芽肿、横纹肌肉瘤、卡波西氏肉瘤、骨源性肉瘤和其他肉瘤、恶性高钙血症、肾细胞瘤、真性红细胞增多症、腺癌、多形胶质母细胞瘤、白血病、淋巴瘤、恶性黑色素瘤、表皮样癌以及其他癌和肉瘤。

[0375] 在本发明的其它应用中可以包括心血管病。 心血管病的实例包括但不限于：充血性心力衰竭、高血压、心律失常、动脉粥样硬化、胆固醇、预激综合征、长 QT 综合征、心绞痛、心动过速、心动过缓、房颤、心室颤动、充血性心力衰竭、心肌缺血、心肌梗死、心包填塞、心肌炎、心包炎、致心律失常性右心室发育不良、肥厚性心肌病、威廉斯综合征、心脏瓣膜疾病、心内膜炎、细菌性疾病、肺动脉闭锁、主动脉瓣狭窄、雷诺氏病、胆固醇栓塞、瓦伦贝格氏综合征、Hippel-Lindau 病和毛细血管扩张症。

[0376] 本发明的其它实施方式中可以包括炎症性疾病和自身免疫疾病。 炎症性疾病和自身免疫疾病包括但不限于：类风湿性关节炎、非特异性关节炎、喉炎性疾病、炎性肠道疾病、牛皮癣、甲状腺功能低下（例如，桥本甲亢）、结肠炎、1 型糖尿病、盆腔炎疾病、中枢神经系统炎性疾病、颞动脉炎、风湿性多肌痛、僵直性脊椎炎、结节性多动脉炎、瑞特综合征、硬皮病、系统性红斑狼疮和红斑狼疮。

[0377] 本发明的方法和组合物还可以提供有关传染病标记物的实验室信息，所述传染病标记物包括：腺病毒、百日咳杆菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、霍乱毒素、霍乱毒素 β、空肠弯曲菌、巨细胞病毒、白喉毒素、Epstein-Barr NA、Epstein-Barr EA、Epstein-Barr VCA、幽门螺旋杆菌、乙型肝炎病毒（HBV）核、乙型肝炎病毒（HBV）包膜、乙型肝炎病毒（HBV）表面（Ay）、丙型肝炎病毒（HCV）核、丙型肝炎病毒（HCV）NS3、丙型肝炎病毒（HCV）NS4、丙型肝炎病毒（HCV）NS5、甲型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒（HEV）orf2 3KD、戊型肝炎病毒（HEV）orf2 6KD、戊型肝炎病毒（HEV）orf3 3KD、人类免疫缺陷病毒（HIV）-1 p24、人类免疫缺陷病毒（HIV）-1 gp41、人类免疫缺陷病毒（HIV）-1 gp120、人类乳头瘤病毒（HPV）、单纯疱疹病毒 HSV-1/2、单纯疱疹病毒 HSV-1 gD、单纯疱疹病毒 HSV-2 gG、人类 T 细胞白血病病毒（HTLV）-1/2、

甲型流感、甲型流感 H3N2、乙型流感、杜氏利什曼原虫、莱姆病、流行性腮腺炎、肺炎支原体、结核分枝杆菌、副流感 1、副流感 2、副流感 3、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒 (RSV)、风疹、麻疹、链球菌溶血素 O、破伤风毒素、梅毒螺旋体 15kd、梅毒螺旋体 p47、克氏锥虫、弓形虫和水痘带状疱疹的标记物。

[0378] 癌症的检测和监测通常依赖于对肿瘤生长的粗略测定的使用，例如对肿瘤本身的直观观察，这种粗略测定不准确，或是必须在肿瘤可在例如实际临床设定中由现有方法检测前达到较高水平。 在检测时，肿瘤往往已经生长至足以使得不太可能在肿瘤转移前进行干预的尺寸。 例如，通过 X 射线对肺癌的检测需要直径＞ 1cm 的肿瘤，而通过 CT 扫描的检测需要＞ 2cm ～ 3cm。 替代性地，可以使用肿瘤生长生物标记物，但是往往在该生物标记物处于可由目前的临床计数获取的水平而可被检测时，肿瘤仍已得到了充分发展。 此外，在干预后（例如，外科手术、化学治疗或放射以缩小或移除肿瘤），通常不可能以足够的灵敏度测定肿瘤标记物，以确定是否存在癌症的复发，直到残余疾病已进展至不可能成功施行进一步干预的程度。 使用本发明的分析器、系统和方法，可以在干预较可能成功（例如由于较低的肿瘤转移可能性）的时候既检测肿瘤生长的发生也检测肿瘤生长的复生。 可在此前未经显示的水平被检测的癌症标记物包括本文公开的标记物。 可重新利用为诊断性标记物的标记物检测用测试的实例包括如本文所述的 TGFβ、Akt1、Fas 配体和 IL-6。

[0379] B. 示例性标记物

[0380] 本发明的仪器、标记和方法已被用于在比此前的水平低 10 倍或 100 倍甚至更低的水平确立例如血清和尿液中的标记物范围。 所述标记物指示了各种各样的生物学状态，例如，心脏病和心脏毒性（肌钙蛋白）、感染 (TREM-1)、炎症和其它病况 (IL-6 和 IL-8)、哮喘 (LTE4)、癌症 (Akt1、TGF-β、Fas 配体）和异体移植物排斥以及退行性疾病 (Fas 配体）。

[0381] 标记物包括蛋白和非蛋白标记物。 此处对标记物进行简单描述，而步骤和结果给出于实施例中。

[0382] 1. 心脏损伤

[0383] 心脏肌钙蛋白是此前仅可在异常高的量被检测的标记物的实例。 心脏肌钙蛋白是心脏损伤的标记物，其可用在许多疾病和病况（例如，急性心肌梗死 (AMI)）的诊断、预后和治疗方法的确定中。 另外，心脏肌钙蛋白是有用的因治疗（如药物治疗）引起的心脏毒性的标记物。

[0384] 肌肉中的肌钙蛋白复合物由肌钙蛋白 I、C 和 T 构成。 肌钙蛋白 C 以两种亚型存在，一种来自心肌和慢肌，而一种来自快肌；由于其见于几乎所有横纹肌中，其作为特异性标记物的用途受到限制。 相反，肌钙蛋白 I 和 T 在慢肌、快肌和心肌中作为不同亚型表达。 肌钙蛋白 I 和 T 的独特心肌亚型使其能在免疫学上与骨骼肌的其它肌钙蛋白区分开。 因此，心脏肌钙蛋白 I 和 T 在血液中的释放表明心肌受到损害，并且为其作为诊断性或预后性标记物或用以辅助治疗的确定的用途提供了基础。

[0385] 目前用于心脏损伤的标记物所遭受的确定限制了其临床应用性。 心肌酶测试已为确定是否存在对心肌的损害形成了基础。不幸的是，在胸痛发作后 10 ～ 12 小时之前，标准肌酸激酶 -MB(CK-MB) 测试对于排除梗死是不可靠的。 更早期的诊断对于纤溶治

疗和分拣 (triage) 将具有极为特异性的优点。

[0386] 由于在健康个体的循环系统中发现的肌钙蛋白的水平非常低，且心肌特异性肌钙蛋白不会从心肌外来源产生，因而肌钙蛋白是心脏损伤的极为灵敏和特异性的标记物。 除心肌梗死以外，许多其它病况可能造成对心脏肌肉的损害，而对此类损害的早期检测将证明对于临床医师是有用的。 然而，当前的心脏肌钙蛋白的检测和定量方法不具有足以检测心脏肌钙蛋白在血液中的释放的灵敏度，直到其水平已达到异常高的浓度，例如，0.1ng/ml 以上。

[0387] 因此，本发明的方法和组合物包含用于高度灵敏地检测和定量心脏肌钙蛋白的方法和组合物，以及基于此类高度灵敏的检测和定量的诊断、预后和 / 或确定治疗的组合物和方法。 以小于约 1pg/ml 的检出限确立了心脏肌钙蛋白 I 的标准曲线 (实施例 1)。 在正常个体中确立了心脏肌钙蛋白 I 的水平并确立了正常值的 99％处的阈值 (实施例 3)。 对来自罹患急性心肌梗死的个体的系列样品进行分析，并确定了心脏肌钙蛋白 I 浓度的时间曲线 (包括从基线的偏差)(实施例 4)。 因此，心脏肌钙蛋白 I 充当了能在可提供用于临床和研究设定中的诊断和预后信息的水平被本发明的系统和方法检测的标记物的实例。 也见提交于 2008 年 3 月 5 日的题为 “高度灵敏的肌钙蛋白分析系统和方法” 的美国专利申请第 11/784,213 号，本文通过参考并入其全部内容。

[0388] 心脏肌钙蛋白 I(cTnI) 对于心肌细胞具有特异性，并在心脏损伤后释放至血液中。 大量研究已表明，cTnI 从受损心肌细胞缓慢释放，且常常需要在创伤后 4 ～ 8 小时而可被检测。 血浆 / 血清中 cTnI 浓度的测定对于诊断非 STEMI 极性心肌梗死 (AMI) 是标准护理手段。 另外，该生物标记物已在临床前期和临床药物开发设定中作为心肌损害和由此引起的心脏损伤的指示物而被广泛接受。TnI 已被接受作为评估实验性疗法的潜在心脏毒性的生物标记物。 其在临床前期设定中已被深入研究，且在临床前期数据表明可能存在心肌相关不良事件时被包括在临床药物开发程序中。

[0389] 虽然 cTnI 被用作诊断 AMI 的标准护理手段以及用在临床前期和临床开发中，迄今为止其在显著健康的人和前期临床动物模型的血浆中的浓度尚未有报道。 因此，不可能在跟定的动物或人中设定 “正常” 水平的基准并测定可能与轻微心脏损伤相关的 cTnI 的较小增加 (速度)。 此外，许多测试无法再不同的物种之间对 cTnI 进行等同地定量，并且需要较大的血浆样品体积，从而限制其在临床前期设定中的使用，尤其是在啮齿类模型系统中。 使用本发明的方法，可以对人、大鼠、狗和猴中的内源性 cTnI 的正常水平和血浆 cTnI 的较小变化进行定量，从而提供关于心肌细胞病理生理学的此前难以治疗的答案。 参见实施例 1 ～ 4。

[0390] 在某些实施方式中，本发明的 cTnI 测试被用于 ：(1) 限定健康的人、大鼠、狗和猴中的血浆和血清 cTnI 的浓度 ；(2) 更早地鉴定 AMI ；(3) 在身体紧张或一致的心脏毒素下更早地测定心脏损伤 ；和 / 或 (4) 仅使用 10μL 血浆在单个大鼠中研究 cTnI 浓度。 在其他实施方式中，本发明的 cTnI 测试被用于 ：(1) 在临床前期和临床设定中测定疗法的潜在的心脏安全性和剂量 ；(2) 在样品体积较为重要时，使用个体小动物或珍贵样品进行研究 ；(3) 在将从基线正常水平的 cTnI 浓度变化速度用作端点时，涉及更稳健的临床和临床前期研究 ；(4) 理解在各种心肌有关疾病中 cTnI 水平如何从正常水平变化 ；和 / 或 (5) 理解作为生物标记物的 cTnI 充当临床事件的代理终点的用途。

[0391] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml（例如，小于约 100pg/ml）的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 cTnI。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 cTnI。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 cTnI。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 cTnI。

[0392] 2. 感染

[0393] 近期报道已将 TREM-1 确立作为细菌或真菌感染的生物标记物。 参见例如，Bouchon 等，(2000)J.Immunol.164 ：4991-95 ；Colonna(2003)Nat.Rev.Immunol.3 ：445-53 ；Gibot 等，(2004)N.Engl.J.Med.350 ：451-58 ；Gibot 等，(2004)Ann.Intern.Med.141 ：9-15。 本发明的测试表明，可以在 100fM 以下的浓度对 TREM-1 进行常规测定。 参见实施例 9。

[0394] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml（例如，小于约 100pg/ml）的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 TREM-1。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 TREM-1。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/

ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 TREM-1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 TREM-1。

[0395] 3. 细胞因子

[0396] 许多细胞因子、趋化因子和生长因子的正常水平是未知的，这主要是由于现有技术无法检测比在来自患病患者的样品中所发现的水平更低的水平。 例如，如 IL-10、TNF-α、IL-4、IL-1β、IL-2、IL-12 和 IFN-γ 等其它细胞因子的基础水平无法通过在临床设定中进行的常规测试来检测，而本发明的分析器系统能容易地确定这些细胞因子和其它细胞因子的水平。 对细胞因子和生长因子的水平的认知能协助临床医师对包括癌症以及呼吸道疾病、传染病和心血管病的各种疾病的诊断、预后和治疗。 使用本发明的分析器系统来分析如血浆、血清和尿液等样品以及其他液体样品可以实现早期细胞因子检测以便监测临床样本中的正常和疾病状态，从而提供更好的转化医学。 例如，正常浓度范围未知的细胞因子水平的确定会帮助临床医师诊断和治疗以下病况和疾病。骨形态生产蛋白可用于监测骨折、脊柱融合术、矫形外科和口腔外科的治疗；白细胞介素 10(IL-10) 可用于检测和监测包括非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、黑色素瘤和卵巢癌的癌症的存在，以及用于检测和检测抗炎症治疗、器官移植、免疫缺陷和寄生物感染的影响；白细胞介素 11(IL-11) 可用于检测和监测如乳腺癌等癌症的存在；细胞介素 12(IL-12) 用于癌症和 HIV 感染；炎性细胞因子 TNFα 可以单独或与 IL-6 一起用作脓毒症、极性胰腺炎、结核和自身免疫疾病（如类风湿性关节炎和狼疮）的良好预测物。

[0397] 替代性地，可以已存在正常值和异常值的数据库，但当前方法可能无法实际用于在常规基础上对个体进行筛选以便以足够的灵敏度确定标记物的个体值是否落在正常范围内。例如，最近的确定样品中 IL-6 浓度的方法仅能检测浓度低至约 5pg/ml 的 IL-6；IL-6 值的正常范围是约 1pg/ml ～约 10pg/ml；因此，当前方法仅能在正常范围的上半部分检测 IL-6。 相反，本发明的分析器和分析器系统允许检测浓度低至低于约 0.01pg/ml（或小于正常范围值的 1/10 ～ 1/100）的 IL-6。 因此，本发明的分析器和分析器系统允许为生物标记物（如 IL-6）产生更宽且更细微的数据库，并且还允许在正常范围之内和之外筛选该生物标记物，以允许早期检测。 因此，本发明的分析器和分析器系统为生物标记物（如 IL-6）产生更宽且更细微的数据库，并且还允许在正常范围之内和之外筛选该生物标记物，以允许其中涉及所述生物标记物（如 IL-6）的病况的早期检测。

[0398] a. 白细胞介素 1

[0399] IL-1α 和 IL-1β 是参与抵抗感染的免疫防御的促炎性细胞因子，并且是细胞因子的 IL-1 超家族的一部分。 IL-1α 和 IL-1β 均由巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞产生。 IL-1 参与各种免疫响应并在炎症中起着主要作用，使得 IL-1 成为类风湿性关节炎 (RA) 的靶标。 IL-1α 和 IL-1β 由在响应于细胞损害时经蛋白水解处理并释放的前体肽产生，并因而诱导细胞凋亡。 周边组织中的 IL-1β 的产生也已被与和发烧相关的痛觉过敏（对疼痛的敏感性增加）相关联。

[0400] Amgen 目前在销售 Kineret（阿那白滞素），其为人白细胞介素 1 受体拮抗剂

(IL-1Ra) 的合成形式。IL-1Ra 通过竞争性抑制 IL-1 与白细胞介素 1 的 I 型受体 (IL1-RI) 相结合而阻断 IL-1α 和 IL-1β 的生物活性，IL1-RI 在各种组织和器官中都有表达。IL-1Ra 在体外和体内均抑制 IL-1 的生物活性，且已据显示其在感染性休克、类风湿性关节炎、移植物抗宿主疾病、脑卒中和心肌缺血的动物模型中有效。此外，Amgen 的生产线中还有 AMG 108，这是一种靶向抑制白细胞介素 (IL-1) 的作用的完全人单克隆抗体。目前正在进行二期临床研究以评估用 AMG 108 治疗类风湿性关节炎的长期安全性。

[0401] i. 白细胞介素 1α (IL-1α)

[0402] 炎症在人类疾病中的广泛参与确保这种蛋白将一直作为一种吸引人的诊断性靶标存在。IL-1α 的水平的升高将继续作为如类风湿性关节炎等炎性疾病的诊断性靶标。因此，需要开发具有可定量较低的正常 IL-1α 水平的灵敏度的测试，以便区分指示疾病的 IL-1α 的低水平和高水平。此外，需要评估 IL-1α 作为使升高的 IL-1α 水平降低而治疗 IL-1α 相关疾病的治疗性药物的靶标的潜力。这提出了检测 IL-1α 水平的降低速度以评估治疗的效力和剂量的需求。这可以避免在与靶向炎性细胞因子途径的药物共同施用（例如，Kineret(IL-1Ra 拮抗剂）和 enteracept(TNF-α 拮抗剂)）后发展的不良事件（如肺炎）。为达到这些目标，关键是需要能检测低于人血浆中正常水平的 IL-1α 的测试。

[0403] 本发明提供了一种 IL-1α 测试，其灵敏度足以以此前无法获得的准确性和精度水平来对来自健康的正常人类受试对象的血浆中的 IL-1α 浓度进行定量。参见实施例 23。这使得可以区分健康状态和患病状态中的 IL-1α 浓度，从而允许进行有效的临床前期和临床研究设计。通过允许在极低水平进行定量和区分较小的浓度变化（这可以提供对于药物效力或疾病进展的认知），IL-1α 测试增加了 IL-1α 的功用。IL-1α 测试使得能以较宽的动态范围对人血浆中的 IL-1α 进行定量。在各种实施方式中，所述测试使得研究者可以：(1) 测定设计来干扰 IL-1 介导的炎性响应的治疗（如 Kineret) 的效力和剂量；(2) 在可以将 IL-1α 浓度用作治疗端点时设计更加稳健的临床和临床前期研究，如在 AMG 108 的临床试验中；和 / 或 (3) 理解在患者从健康状态向患病状态转变时患者中的 IL-1α 水平如何变化。

[0404] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml（例如，小于约 100pg/ml) 的检出限检测 IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml 的检出限检测 IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 IL-1α。

在某些实施方式中，所述方法能够以小于约0.05pg/ml的检出限检测IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约0.01pg/ml的检出限检测IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约0.005pg/ml的检出限检测IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约0.001pg/ml的检出限检测IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约0.0005pg/ml的检出限检测IL-1α。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约0.0001pg/ml的检出限检测IL-1α。

[0405] ii. 白细胞介素1β(IL-1β)

[0406] 与IL-1α相似，炎症在人类疾病中的广泛参与确保IL-1β将一直作为一种吸引人的诊断性靶标存在。IL-1β的水平的升高将继续作为如类风湿性关节炎等炎性疾病的诊断性靶标。因此，需要开发具有可定量较低的正常IL-1β水平的灵敏度的测试，以便区分指示疾病的IL-1β的低水平和高水平。此外，需要评估IL-1β作为使升高的IL-1β水平降低而治疗IL-1β相关疾病的治疗性药物的靶标的潜力。这提出了检测IL-1β水平的降低速度以评估治疗的效力和剂量的需求。这可以避免在与靶向炎性细胞因子途径的药物共同施用（例如，Kineret(IL-1Ra拮抗剂）和enteracept(TNF-α拮抗剂））后发展的不良事件（如肺炎）。为达到这些目标，关键是需要能检测低于人血浆中正常水平的IL-1β的测试。

[0407] 本发明提供了一种IL-1β测试，其通过允许在极低水平进行定量和区分较小的浓度变化（这可以提供对于药物效力或疾病进展的认知）而增加了IL-1β的功用。参见实施例24。该IL-1β测试的灵敏度足以以此前无法获得的准确性和精度水平来对来自健康的正常人类受试对象的血浆中的IL-1β浓度进行定量。IL-1β测试使得能以较宽的动态范围对人血浆中的IL-1β进行定量。在各种实施方式中，所述测试使得研究者可以：(1)测定设计来干扰IL-1介导的炎性响应的治疗（如Kineret)的效力和剂量；(2)在可以将IL-1β浓度用作治疗端点时设计更加稳健的临床和临床前期研究，如在AMG 108的临床试验中；和/或(3)理解在患者从健康状态向患病状态转变时患者中的IL-1β水平如何变化。

[0408] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml或0.0001pg/ml(例如，小于约100pg/ml)的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约100pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约80pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约60pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约50pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约30pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约25pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约10pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约5pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约1pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约0.5pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约0.1pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约0.05pg/ml的检出限检测IL-1β。在某些实施

方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 IL-1β。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 IL-1β。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 IL-1β。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 IL-1β。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 IL-1β。

[0409] b. 白细胞介素 4(IL-4)

[0410] 白细胞介素 4(IL-4) 是作为体液免疫和适应性免疫中的关键调节物的细胞因子。 IL-4 诱导幼稚性辅助 T 细胞 (Th0 细胞) 向 Th2 细胞的分化。 其具有许多生物学作用，包括刺激激活的 B 细胞和 T 细胞增殖，以及将 CD4+T 细胞分化为 Th2 细胞。 IL-4 在过敏性炎性响应的发展中起着重要作用。 IL-4 控制 IgE 的产生、扩增 IL-4 生成 T 细胞亚群并稳定效应子细胞功能。

[0411] 由于 IL-4 在过敏性炎性响应的发展中的作用，其具有治疗性潜力。 此外，还显示出 IL-4 在靶向癌症的药物中具有前景。 例如，PRX321(Protox) 是一种定向治疗毒素，其中 IL-4 与假单胞菌属外毒素相连，后者是一种能破坏癌细胞的强力物质。 出脑癌、肾癌和肺癌外， PRX321 还在许多过表达 IL-4 受体的癌症中展示出有希望的临床前期结果，这些癌症包括胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、头颈癌、黑色素瘤、前列腺癌和血癌 (如慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 和霍奇金淋巴瘤)。

[0412] 健康人类受试对象中的血浆 IL-4 浓度尚未得到限定。 因此，难以理解 IL-4 浓度的差异在疾病状态和健康状态之间所起的作用。 另外，通过测定 IL-4 的降低速度而对针对降低 IL-4 的实验性治疗的效力的测定受到测试灵敏度的缺乏的阻碍。 此外，最灵敏的 ELISA 的读数范围限于小于两个对数值，这迫使对样品重新测试和浪费。 因此，需要能检测细微的浓度变化的速度并且能测定正常受试对象中的 IL-4 基线浓度的高度灵敏的测试。

[0413] 本发明提供了 IL-4 测试，其灵敏度足以以此前无法使用其它高灵敏测试获得的准确性和精度水平来对来自健康的正常人类受试对象的血浆中的 IL-4 浓度进行定量。 参见实施例 25。 该测试使得能对极低的血浆 IL-4 水平进行定量。 在某些实施方式中，该测试允许对较小的 IL-4 水平的变化的测定，这提供了对治疗效力的认知。 在各种实施方式中，该测试使得研究者可以 :(1) 测定设计来干扰一般炎性响应和过敏性响应的治疗的效力和剂量 ;(2) 在可以将 IL-4 浓度用作治疗端点时设计更加稳健的临床和临床前期研究 ; 和 / 或 (3) 理解在患者从健康状态向患病状态转变时患者中的 IL-4 水平如何变化。

[0414] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml(例如，小于约 100pg/ml) 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约

10pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 IL-4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 IL-4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 IL-4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 IL-4。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 IL-4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 IL-4。

[0415] c. 白细胞介素 6(IL-6)

[0416] 白细胞介素 6(IL-6) 是由 T 细胞和巨噬细胞分泌来刺激对于创伤、特别是烧伤或其它导致炎症的组织损伤的免疫响应的促炎性细胞因子。 此外，IL-6 还由巨噬细胞在响应于称作病原体相关分子模式 (PAMP) 的特定微生物分子时分泌， PAMP 引发天然免疫响应并且启动炎性细胞因子的生成。 IL-6 是发烧和急性期响应的最重要的介导物之一。IL-6 也称 “肌因子 (myokine)”，一种由肌肉产生的细胞因子，并且其响应于肌肉收缩而升高。 另外，成骨细胞分泌 IL-6 以刺激破骨细胞的形成。

[0417] IL-6 相关病症包括但不限于败血症、周边动脉疾病和慢性阻塞性肺病。 白细胞介素 6 介导的炎症也是动脉粥样硬化性血管疾病和年龄相关病症（包括骨质疏松和 2 型糖尿病）的通常病因和治疗靶标。 另外， IL-6 可以与其它细胞因子（例如 TNF α）联合测定，以诊断如感染性休克等其它疾病。 IL-6 具有作为会导致抗炎症和对急性期响应的抑制的药物靶标的治疗潜力。 就对于外来病原体的宿主响应而言，已据显示在大鼠中需要 IL-6 来抵抗细菌肺炎链球菌 (Streptococcus pneumoniae)。 IL-6 对于癌症也具有治疗潜力，因为 IL-6 对于杂交瘤的生长至关重要，并且见于如 briclone 等许多补充性克隆培养基中。

[0418] IL-6 在健康受试对象的血浆中的循环水平难以用许多当前可用的测试确定，因此难以将疾病与健康状态区分。 此外，当用作治疗靶标时，希望能在 IL-6 降低至低于正常状态水平时通过测定 IL-6 水平来测定治疗效力。 这用目前可利用的测试无法实现。 一种 IL-6 测试目前在美国以外可用于诊断用途，和在美国 (RUO) 和日本仅用作研究用途。

[0419] 本发明提供了 IL-6 测试，其能对极低的血浆 IL-6 水平进行定量，并且允许对因疾病进展或治疗干预而引起的 IL-6 水平的较小变化进行准确测定。 参见实施例 26。 这种高水平灵敏度可以提供对治疗效力的认知。 在各种实施方式中，该测试使得研究者可以：(1) 测定设计来干扰炎性响应的治疗的效力和剂量；(2) 在可以将 IL-6 浓度用作治疗端点时设计更加稳健的临床和临床前期研究；和 / 或 (3) 理解在患者从健康状态向患病状态转变时患者中的 IL-6 水平如何变化。

[0420] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml（例如，小于约 100pg/ml) 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检

测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 IL-6。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 IL-6。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 IL-6。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 IL-6。

[0421] d. 白细胞介素 8(IL-8)

[0422] 与 IL-6 类似，本发明提供了白细胞介素 8(IL-8) 测试，其能对极低的血浆 IL-8 水平进行定量，并且允许对因疾病进展或治疗干预而引起的 IL-8 水平的较小变化进行准确测定。 参见图 17。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml(例如，小于约 100pg/ml) 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 IL-8。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 IL-8。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 IL-8。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 IL-8。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 IL-8。

[0423] 4. 炎性标记物

[0424] 可用于检测炎性疾病的早期发作的其它细胞因子包括本文所述的标记物和标记物组。 可用于检测炎性病症的细胞因子的实例是可作为早期哮喘标记物的白细胞三烯 4(LTE4) 和可用于检测和监测包括纤维化和硬化的炎性病症的状态的 TGF β 。 某些标记物可以用于检测多于一种病症，例如，TGF β，还可用于检测癌症的存在。

[0425] a. 白细胞三烯 E4

[0426] 半胱氨酰白细胞三烯 (LTC4、LTD4、LTE4) 在哮喘的发病机制中起着重要作用。白细胞三烯由肥大细胞、嗜酸性粒细胞和其它气道炎性细胞产生，并且增加血管的渗透性、收缩支气管平滑肌并介导支气管高反应性 (hyperresponsiveness)。在患有哮喘的儿童和成人中（与健康对照相比）以及在用抗原进行支气管激发后的哮喘患者中、在用阿司匹林进行口腔激发的阿司匹林敏感型哮喘受试对象中和在运动诱导的支气管痉挛期间，尿 LTE4(LTC4 和 LTD4 的稳定代谢物）水平增加。在大型临床试验中用阻断白细胞三烯作用的试剂进一步证明了白细胞三烯在哮喘的病理学中的重要性。例如，一种每日口服一次的白细胞三烯受体拮抗剂孟鲁司特 (montelukast) 显著改善了儿童（年龄 2 ～ 14 周岁）和成人中的哮喘控制，并减轻了运动诱导的支气管收缩。

[0427] 白细胞三烯途径的激活伴随着 LTE4 的尿水平的升高，且急性哮喘加剧伴随着尿中 LTE4 水平的增加和随后在消退期间的显著减少。对气流的限制程度与加剧和后续阶段期间的尿 LTE4 水平相关，由此表明白细胞三烯途径在急性哮喘期间得到激活。另外，吸入支气管收缩剂量的 LTC4 或 LTE4 以剂量依赖性方式改变尿 LTE4 分泌，由此表明 LTE4 可以在患有哮喘的患者的肺中用作硫醚肽白细胞三烯合成的标记物。

[0428] 本发明的方法可以用于检测如尿样等生物样品中的 LTE4 的变化。参见实施例 5。亚纳克级的 LTE4 的测定可以用作对患有慢性或急性哮喘的患者的肺中的硫醚肽白细胞三烯合成的检测和监测的参照。

[0429] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml（例如，小于约 100pg/ml) 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 LTE4。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 LTE4。

[0430] b.TGF β

[0431] 此外，也可执行本发明的方法来检测以 TGF β 为标记物的疾病的早期发作。

TGFβ 相关疾病的实例包括纤维化疾病。 纤维化是指瘢痕组织的过度和持续的形成，这是与影响肺、肾、眼、心脏、肝和皮肤的各种慢性疾病中的器官衰竭有关的发病和死亡的成因。 TGFβ 作为慢性纤维化效应的介导物的作用众所周知。 例如， TGFβ 参与促进成纤维细胞增殖和纤维化肺病中的基质累积。 已提出将对 TGFβ 的抑制作为管理肺纤维化的可能治疗途径。 TGFβ 不仅刺激许多细胞外基质分子（包括纤连蛋白和 I 型胶原蛋白及其受体）的合成，还减少经由在蛋白酶及其抑制剂的表达上的分化效应引起的基质降解，从而强力促进细胞外基质的产生。 因此，本发明的分析器系统能检测与例如纤维化疾病相关的 TGFβ 的异常水平，所述纤维化疾病包括但不限于特发性肺纤维化、糖尿病性肾病，包括肾小球硬化和 IgA 肾病（肾衰竭以及对透析和再次移植的需要的原因）的进行性肾病、糖尿病性视网膜病变和晚期黄斑变性（眼部纤维化疾病，和失明的主要原因）、肝硬化和胆道闭锁（肝纤维化和肝衰竭的主要原因）；充血性心力衰竭；与查格斯病中的进行性纤维化相关的心肌病；肺纤维化；和硬皮病。

[0432] TGFβ 也是包括前列腺癌、宫颈癌、肺癌和霍奇金病的癌症的标记物。 患肺癌的患者中 TGFβ 血浆水平往往会升高。 已据显示，在诊断时具有升高的血浆 TGFβ1 水平的患者中，对该水平的监测将可用于检测在放射治疗后疾病的持久性和复发。

[0433] 转化生长因子 β（TGFβ）还是影响发育、动态平衡和组织修复的多能生长因子。 已报导了在不同恶性肿瘤中的 TGFβ 表达的增加，表明该生长因子在肿瘤发生中的作用。 特别地，已据证实 TGFβ 在骨肉瘤的肿瘤间质中的小血管的内皮层和血管周围层中的存在表明该生长因子的血管生成活性，并且已据表明 TGFβ 同种型表达的增加在骨肉瘤的进展中起作用（Kloen 等， Cancer，80：2230-39(1997)）。 TGFβ 是少数已知的能已知细胞生长的蛋白之一。 然而，虽然该观点有争议，某些研究者相信一些人类肿瘤（如乳腺癌）出于其自身目的而破坏 TGFβ。 在一种尚未理解的悖论中，这些癌症制造 TGFβ 并稳定地增加其表达，直到其成为进展中的肿瘤转移和减低的存活率的标记物。例如，在患有转移至局部淋巴结和骨的前列腺癌的男性中血浆 TGFβ 的水平显著升高。在没有肿瘤转移的临床或病理证据的男性中，手术前血浆 TGFβ 水平是收税后的生化进展的强预测物，据推测是由于其与在进行根治性前列腺切除术时存在的隐性转移性疾病的关联。

[0434] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml（例 如，小于约 100pg/ml）的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 TGFβ。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检

测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 TGFβ。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 TGFβ。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 TGFβ。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 TGFβ。

[0435] 其它由本发明的方法检测的异常细胞生长的标记物包括如本文所述的 Akt1、Fas 配体、VEGF、Aβ-40、Aβ-42、cTnI、IL-1α、IL-1β、IL-4 和 IL-6。

[0436] 5.Akt1

[0437] Akt1 是 v-akt 小鼠胸腺瘤病毒癌基因同系物 1，并且是由 AKT1 基因编码的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶。 Akt 激酶参与本质不同的细胞响应，包括对细胞凋亡的已知和对细胞增殖、血管生成和肿瘤细胞侵袭性的促进。

[0438] Akt 最为人熟知的是其已知凋亡性和非凋亡性细胞死亡的能力，可以对 Akt 进行检测以预测肿瘤对抗癌治疗的响应。 通过评估细胞凋亡和非凋亡性细胞死亡的影响来预测肿瘤响应使得可以开发更有效的策略以提高抗癌治疗的治疗效果。 抗癌治疗诱导的凋亡受促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的平衡经由线粒体调节，并且对凋亡的抵抗由 Akt 依赖性和 Bcl-2 依赖性途径介导。 Bcl-2 部分地抑制了非凋亡性细胞死亡以及细胞凋亡，而 Akt 通过几种靶标蛋白同时抑制凋亡性和非凋亡性细胞死亡。 由于药物敏感性很可能与凋亡性和非凋亡性细胞死亡的累积相关，这可能影响抗癌治疗中的总体肿瘤响应。 来自几种重要的细胞死亡相关蛋白的调节的预测总体肿瘤响应的能力可能导致更有效的策略以便改善治疗效果。

[0439] Akt1 也参与上皮-间质转换 (EMT)，这是发育和肿瘤发生期间的重要过程，通过该过程上皮细胞获取成纤维细胞样性质并且显示出降低的细胞间粘附和增加的运动性。 AKT 在许多人类癌中被激活，且 AKT 驱动的 EMT 可能带来组织侵袭和肿瘤转移所需的运动性。 因此，未来基于 AKT 抑制的治疗可以通过控制肿瘤细胞侵袭和肿瘤转移来对传统治疗进行补充。Akt 在许多黑色素瘤细胞系和不同进展期的肿瘤样品中被组成型激活，且已将 AKT 的激活与侵袭 / 转移相关的黑色素瘤细胞粘附分子 (MelCAM) 的表达联系起来，后者又与通过人类黑色素瘤的恶性肿瘤获取密切相关。 Akt1 还在胰腺癌中被激活，且已据显示 AKT 激活与更高的组织肿瘤分级 (tumor grade) 相关。 因此，AKT 激活与肿瘤分级相关，肿瘤分级是重要的预后因素。 Akt1 还在前列腺癌中上调，且表达与肿瘤进程相关。 因此，可以靶向 Akt1 以对癌症在其最早阶段进行治疗性干预。 在某些实施方式中，本发明的分析器系统提供了在 Akt1 水平小于约 100pg/ml、50pg/ml 或 25pg/ml 时通过确定来自患者的样品中 Akt1 的存在或浓度来提供早期癌症诊断的方法。 参见实施例 6。

[0440] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml(例如，小于约 100pg/ml) 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/

ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 Akt1。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 Akt1。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 Akt1。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 Akt1。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 Akt1。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 Akt1。

[0441] 6.Fas 配体

[0442] Fas 配体 (FasL) 也称作 CD95L，是 TNF 家族的成员并且经由与 Fas(CD95) 的结合而诱导细胞凋亡。 该蛋白以两种形式存在；膜 FasL 或可溶性 FasL，两者分别在 45kDa 和 26kDa 的分子量迁移。 FasL 在包括激活的淋巴细胞、天然杀伤细胞和单核细胞等多种细胞上表达。 FasL 和 Fas 的相互作用在生理学凋亡过程中起作用。 Fas-FasL 系统的故障导致周围淋巴样器官的增生并且加速自身免疫疾病进程和肿瘤发生。 存在着有限的有关一般而言的可溶性凋亡因子的水平以及更具体地有关其受治疗方案的调节的数据。

[0443] 本发明的系统和方法可以检测低至 2.4pg/ml 的 Fas 配体的浓度。 因此，在某些实施方式中，本发明的分析器系统和方法提供了对 Fas 配体的检测以鉴定如异常细胞凋亡水平等病理性状况。 可以将在患者样品中对 Fas 的测定用于诊断如多囊卵巢综合征等病况、肿瘤（如睾丸精细胞肿瘤）、膀胱癌、肺癌以及如卵泡树突状细胞肿瘤等罕见肿瘤。另外，可以将对 Fas 配体的 Fas 测定用于诊断异体移植排斥和如骨关节炎等退行性疾病。因此，在某些实施方式中，本发明的分析器系统和方法可以用于确定来自疑似罹患 Fas 配体相关病症的样品中的 Fas 配体浓度以诊断所述病症，或者可以利用 Fas 配体浓度来监测正在经受 Fas 配体相关病症的治疗的患者中该病症的进展或状态。 在某些实施方式中，所述测试能确定样品中浓度小于约 100pg/ml、50pg/ml、25pg/ml、10pg/ml 或 5pg/ml 的 Fas 配体的水平。 参见实施例 8。

[0444] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml（例如，小于约 100pg/ml) 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法

能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 FasL。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 FasL。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 FasL。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 FasL。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 FasL。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 FasL。

[0445] 7.VEGF

[0446] 血管内皮生长因子 -A(VEGF-A) 通常称为 VEGF，是分泌的糖蛋白的家族成员，所述糖蛋白促进内皮细胞生长、存活、迁移和血管渗透性，这些均有助于血管生成。 VEGF 与其受体的结合引发对于血管从事先存在的脉管结构生长至关重要的细胞信号途径的激活。 VEGF 涉及各种疾病，包括癌症、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变和类风湿性关节炎。 因此，它是对于开发对这些疾病尤其是癌症的治疗的有吸引力的候选物。

[0447] 单克隆抗体阿瓦斯汀 (Avastin) 作为第一种抗 VEGF 药物于 2004 年由 FDA 批准，并经批准用以治疗转移性结肠癌和非小细胞肺癌。 正在研究将该药物用于治疗许多其它癌症。 靶向 VEGF 介导的细胞信号转导的其它混合物包括单克隆抗体片段 Lucentis（经批准用于治疗年龄相关性黄斑变性）和靶向受体酪氨酸激酶（包括 VEGF 受体）的两种小分子舒尼替尼 (Sutent) 和多吉美 (Nexavar)。 其它靶向该途径的药物候选物尚在开发中。

[0448] 就以靶向 VEGF 及其途径的药物所见的效力而言， VEGF 是有吸引力的开发靶标。 另外，随着研究人员对各种癌症和其它涉及 VEGF 信号转导的疾病的研究，对较小的 VEGF 水平的变化的测量将帮助他们理解疾病进展时的生物学变化。 然而，目前可商购的免疫测试仅能测定升高的 VEGF 浓度。 它们的灵敏度不足以测定获自健康受试对象的血浆中的 VEGF 或检测可能指示早期疾病状态的 VEGF 水平的较小变化。 然而，本发明的血浆 VEGF 测试提供了使用 VEGF 作为疾病的生物标记物所需的能力，还提供了对健康人类受试对象以及那些正在经受抗 VEGF 治疗的受试对象中的 VEGF 进行定量的灵敏度。 在某些实施方式中，人 VEGF 测试的 LOD 约为 0.1pg/ml，定量低限 (LLOQ) 为 0.3pg/ml，使其比常用 ELISA 测试灵敏 90 倍。 参见实施例 11 ～ 21。

[0449] 本发明通过允许科学家检测极低水平的 VEGF 并测定能提供对药物效力或疾病进展的认知的较小的 VEGF 水平变化而增加了 VEGF 的临床功用。 在其它改善中，所述测试使得研究者可以：(1) 测定设计来降低 VEGF 水平的治疗的效力和剂量，特别是在 VEGF 水平会大大低于在常规状态下所见的水平时；(2) 在可将 VEGF 浓度用作治疗端点时设计更稳健的临床和临床前期研究；和 (3) 理解在患有癌症或其它涉及血管生成的疾病的患者从健康状态向患病状态转变时所述患者中 VEGF 水平如何变化。

[0450] 在某些实施方式中，本发明提供了对正常 VEGF 水平进行定量以及鉴定指示着早期癌症 / 肿瘤存在的异常升高的 VEGF 水平的方法。 人中典型 VEGF 的健康水平为

小于 50pg/mL，并且在患有癌症的受试对象中显著升高（＞ 100pg/mL，常常为 200pg/mL ～ 500pg/mL）。在其它实施方式中，本文所述的方法可以用于指示如前列腺癌和淋巴瘤等其它癌症的存在。 所述方法可以用于指示正在经历血管化的实体瘤（其会具有升高的 VEGF 水平）的存在。

[0451] 在某些实施方式中，本发明提供了对正常 VEGF 水平进行定量以及鉴定指示着血管炎症的异常升高的 VEGF 水平的方法。 该测定可以通过在健康个体中对其它炎性细胞因子的共同测定而得到增强，其中升高的水表明炎症。在某些实施方式中，由于 VEGF 在血管生成和动脉粥样硬化中的作用，本发明还可用于对异常升高的 VEGF 水平进行定量，所述异常升高的 VEGF 水平与作为检测心肌梗死的黄金标准的升高的 cTnI 水平联合指示心脏疾病。 该测定可以通过对健康个体中的其它心脏标记物（即，促 BNP）或炎性标记物（即，hsCRP、细胞因子）的共同测定而得到增强，其中升高的水平指示心脏疾病。在某些实施方式中，所述方法可以用于对正常 VEGF 水平进行定量并鉴定指示着患有糖尿病的受试对象中动脉粥样硬化存在的异常升高的 VEGF 水平。 该测定可以通过对其它的糖尿病标记物（即，胰岛素）和代谢疾病标记物（即，胰高血糖素样肽 1(GLP-1)）的共同测定来得到增强。

[0452] 本发明提供了在小于 100μl 标准样品体积的极小样品体积中测定 VEGF 的方法。 所述测试的灵敏度使得所述方法成为可能，并且所述方法与其它方法相比可使在绩效体积样品中能以大量样品提供可定量结果。 在一个实施方式中，所述方法测定小于或等于 10μl 的人或小鼠血浆样品中的 VEGF。 在另一个实施方式中，所述方法测定来自小于或等于 10μl 的人或小鼠血浆样品的组织溶解产物中的 VEGF。 已经在来自人乳腺癌的活组织检查物的溶解产物中以及在来自数个小鼠种系的小鼠组织溶解产物中对这些方法进行了测试。 在另一个实施方式中，所述方法测定了由健康和患病个体中的活组织检查物制备的溶解产物中的 VEGF。 基于典型的 1mm 针尖活组织检查物，且所得溶解产物体积小于或等于 10μl，本发明使得能对来自针尖活组织检查物的 VEGF 进行定量。 对本发明的其它标记物也设置了小体积样品尺寸。

[0453] 在一方面，本发明提供了确定样品中 VEGF 单分子或其片段或复合物的存在或缺失的方法，所述方法包括：i) 用标记对所述分子、片段或复合物（如果存在）进行标记；和 ii) 检测所述标记的存在或缺失，其中检测到标记存在则表明样品中 VEGF 的单分子、片段或复合物的存在。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 115pg/ml、100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml（例如，小于约 115pg/ml）的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 115pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述

方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 VEGF。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 VEGF。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 VEGF。

[0454] 8.Aβ-40 和 Aβ-42

[0455] 淀粉样 β 蛋白（40 和 42 个氨基酸）随阿尔茨海默病（AD）患者的脑中的淀粉样斑块的主要成分。 在健康和患病状态中， Aβ-40 在脑脊液（CSF）和血浆中是这两者中更为常见的形式（比 Aβ-42 高出 10 ～ 20 倍）。 在患 AD 的患者中， Aβ-42 主要聚集并沉积在脑形成斑块中。 因此，Aβ-42 的浓度在许多 AD 患者的 CSF 中下降。 近期研究表明，CSF 和血浆中 Aβ-42 浓度的下降（伴有平行的 Aβ-40/Aβ-42 比例的变化）可预测 AD 的发作。

[0456] 尚未有对阿尔茨海默病的治愈方法，而目前可用的治疗使与 AD 相关的某些症状最小化但并未减缓疾病进程。 许多实验性方法集中在通过防止产生 Aβ-42 或降低 Aβ-42 浓度、刺激免疫系统攻击 Aβ 蛋白以及防止 Aβ 蛋白聚集和形成斑块来使 Aβ-42 水平最小化。 在涉及治疗性试验中的一个重要组成部分是鉴定处于发展出 AD 的风险中的患者，从而可以以低成本且及时的方式来进行研究。 因此，生物标记物对于理解 Aβ 水平作为替代终点以及在有效的研究设计中都是非常有价值的。

[0457] 预防性治疗是作为管理 AD 的最佳方式的主要焦点。 准则描述了对能用于预测和诊断 AD 形成的非侵袭性生物标记物的需求。 此类信息对于临床研究设计以及对治疗有效性的评估是非常有价值的。 对血浆中 Aβ-40 和 Aβ-42 浓度的测定为此类信息提供了保证。 在健康正常人类中，血浆浓度范围为 200pg/ml ～ 400pg/ml(Aβ-40) 和 15pg/ml ～ 30pg/ml(Aβ-42)。 但在患 AD 时， Aβ-42 水平下降，且往往无法通过现有可用的 EIA 技术检测。 此外，基于耗尽 Aβ-42 形成的干预性策略需要测定 Aβ-42 的下降的方法。 因此，需要对血浆中的低浓度淀粉样蛋白进行准确和精确地定量。

[0458] 本发明的 Aβ-40 和 Aβ-42 测试允许以极好的灵敏度对来自人血浆的淀粉样 β 蛋白进行定量，使得可以施用 Aβ-40/Aβ-42 作为阿尔茨海默病研究中的速度生物标记物并且用于评估治疗性干预。 参见实施例 22。 在其它优点中，本测试使得研究者可以：(1) 鉴定具有发展出 AD 的潜在高风险的受试对象，并因此设计包括疾病发展的高风险的干预性研究；(2) 设计在可将 Aβ 蛋白浓度用作治疗终点的更稳健的临床和临床前期研究；和 (3) 理解在人从健康状态向患病状态转变时其 Aβ 蛋白水平如何变化。

[0459] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml（例如，小于约 100pg/ml）的检出限检测 Aβ-40。 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约

100pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 Aβ-40。

[0460] 在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 250pg/ml、200pg/ml、150pg/ml、100pg/ml、80pg/ml、60pg/ml、50pg/ml、30pg/ml、20pg/ml、10pg/ml、5pg/ml、1pg/ml、0.5pg/ml、0.1pg/ml、0.05pg/ml、0.01pg/ml、0.005pg/ml、0.001pg/ml、0.0005pg/ml 或 0.0001pg/ml（例如，小于约 200pg/ml）的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 200pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 150pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 100pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 80pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 60pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 50pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 30pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 25pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 10pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 5pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 1pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.5pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.1pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.05pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.01pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.005pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.001pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0005pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。在某些实施方式中，所述方法能够以小于约 0.0001pg/ml 的检出限检测 Aβ-42。

[0461] C. 多标记物分析组

[0462] 医学诊断在传统上依赖于单分子标记物（例如，基因突变、升高的 PSA 水平）的检测。不幸的是，单标记物法对于检测或区分许多生物学状态或疾病（如癌症）并非最

优的。 因此，在某些情形中，仅能识别单个标记物的测试具有有限的预测价值。 根据本发明的方法，施用多个标记物来对此类生物学状态（如疾病）进行筛分、诊断和治疗监测能提供对使用单标记物分析的方法的显著改善。 这种多路复用方法特别适于癌症诊断，因为癌症是高度复杂的疾病，这种多因子“分析组”方法在细胞学和临床上都与癌症的异源性性质相一致。

[0463] 针对医学测试的分析组方法的成功实施的关键在于设计和开发优化的能表征和区分生物学状态的标记物分析组。 任何医学筛选或诊断测试的两个关键评估性量度是其灵敏度和特异性，其量度准确而没有特例地检测所有受影响个体且没有错误地包括未患靶标疾病（预测值）的所述测试的执行的良好程度。 在过去，已有许多诊断性测试由于较差的灵敏度和特异性而受诟病。

[0464] 真阳性 (TP) 结果是其中测试为阳性且病况存在的结果。 假阳性 (FP) 结果是其中测试为阳性而病况不存在的结果。 真阴性 (TN) 结果是其中测试为阴性且病况不存在的结果。 假阴性 (FN) 结果是其中测试为阴性但病况存在的结果。 在本文中：灵敏度＝ TP/(TP+FN)；特异性＝ TN/(FP+TN)；且预测值＝ TP/(TP+FP)。

[0465] 灵敏度是对测试的正确检测受测个体中的靶标疾病的能力的亮度。 灵敏度较差的测试产生高比例的假阴性，即，患有疾病但被错误地鉴定为未患该特定疾病的个体。假阴性的潜在危险在于，患病个体将在一段时间中仍保持未经诊断和未经治疗，在这段时间疾病可能进展至更晚的时期，此时治疗（如果有）有效性可能更差。 具有低灵敏度的测试的实例是基于蛋白的 HIV 血液测试。 该类测试展示出较差的灵敏度，这是因为其在疾病完全确立且病毒已大量侵入血流之前未能检测出病毒的存在。 相反，具有高灵敏度的测试的实例是使用聚合酶链式反应 (PCR) 的病毒负荷检测。 由于该类测试能检测极少量的病毒因而获得了高灵敏度。 高灵敏度在误诊的后果很严重时特别重要。

[0466] 另一方面，特异性是对测试的准确鉴定不具有疾病状态的患者的能力的亮度。特异性较差的测试产生高比率的假阳性，即被错误地鉴定为患有疾病的个体。 假阳性的弊端在于，其迫使患者经历不必要的医学程序治疗并带有其参与风险、情绪和经济压力，并且这可能对患者的健康产生副作用。 使得难以开发具有高特异性的诊断测试的疾病的特点是疾病（特别是癌症）的机理往往涉及多种基因和蛋白。 另外，某些蛋白可能出于与疾病状态无关的原因而增加。 具有高特异性的测试的实例是能检测 p53 突变的基于基因的测试。 特异性在于进一步的诊断程序或进一步医学干预相关的成本或风险很高时较为重要。

[0467] 本领域技术人员可以理解，已经发展了统计方法来将来自多个标记物的数据合并并且提供生物学状态的存在（例如，如癌症等疾病的存在）的统计学可能性。 此类方法的实例公开于美国专利申请第 11/934,008 号、第 11/939,484 号和第 11/640,511 号中。在一个实施方式中，可以使用对数回归来将患者样品中的分析组成员的浓度合并，并可使用接受者工作特性 (ROC) 分析来确定受试对象的疾病状态。 参见例如，美国专利申请第 11/934,008 号、第 11/939,484 号和第 11/640,511 号。 在其它方法中，可以使用统计方法基于对标记物分析组的检测来将样品分类。 例如，可以使用标记物测试的结果来将样品划分为患病的或健康的。 这种分类（模式识别）方法包括例如，贝叶斯分类器、概况相似性、人工神经网络、支持向量机 (SVM)、对数或逻辑回归、线性或二次判别分析、

决策树、聚类、主成分分析、菲舍尔判别分析或最近邻点分类器分析。 机器学习分类方法包括例如，加权表决、k- 最近邻点、决策树归纳、支持向量机 (SVM) 和前馈式神经网络。 这些方法是本领域技术人员所已知的。

[0468] 在其它实施方式中，可以使用更简单的方案。 例如，在一个实施方式中，两种标记物的浓度的升高可能表明如疾病等生物学状态的存在。 在另一个实施方式中，两种标记物的浓度的降低可能表明如疾病等生物学状态的存在。 在另一个实施方式中，一种标记物的浓度升高而另一种标记物的浓度降低可能表明如疾病等生物学状态的存在。 使用这类方法，第二标记物的结果为医学从业人员提供了在诊断、预后和治疗疗程中的更大的信心。 多种标记物可以提供验证性检测、诊断或预后等。 可以理解，上述方法中的任何方法都可以用于三种标记物、四种标记物等等。

[0469] 1. 多生物标记物分析组

[0470] 本发明所述用于定量测定生物标记物（例如， cTnI、细胞因子或 VEGF）的方法可以与其它利用相同技术进行定量的生物标记物的测定相结合。 参见图 4。 这些多标记物测试能改善对受试对象中的病况的检测和监测的灵敏度和特异性。 此类测试在正常的健康参照范围内保持高度灵敏并且能够准确地对每个分析物进行定量。 如本文所公开，本发明的标记物包括例如，与生物体的生物学状态（例如，如疾病等状况或非疾病状态）相关的任何组合物和 / 或分子或者组合物和 / 或分子的复合物。

[0471] 在一个实施方式中，本发明提供了检测或监测受试对象中病况的方法，所述方法包括检测来自该受试对象的第一样品中的第一标记物并检测第二标记物，其中所述第一标记物包含心脏肌钙蛋白 I(cTnI) 或血管内皮生长因子 (VEGF)，且其中第一标记物的检出限小于约 10pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 100pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 50pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 5pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 1pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 0.5pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 0.1pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 0.05pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 0.005pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 0.001pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 0.0005pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限小于约 0.0001pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限为约 10pg/ml ～约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限为约 5pg/ml ～约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限为约 1pg/ml ～约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限为约 10pg/ml ～约 0.001pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限为约 5pg/ml ～约 0.001pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限为约 1pg/ml ～约 0.001pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限为约 10pg/ml ～约 0.0001pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限为约 5pg/ml ～约 0.0001pg/ml。 在某些实施方式中，第一标记物的检出限为约 1pg/ml ～约 0.0001pg/ml。

[0472] 在某些实施方式中，样品包括血浆、血清、细胞裂解物或本文所公开的其它样品。 例如，如本文所公开，本发明可以用于测定人和小鼠的血浆中的 VEGF。

[0473] 本发明的一个优点在于其稳健性。再现性水平使得能在较宽的检测范围内进行更灵敏的检测。本发明即使在检出限低于给定标记物的典型的或预期的水平时也能提供优点，这是因为可以减小较高水平时的变差。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 100％～约 1％。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 90％～约 1％。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 80％～约 1％。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 70％～约 1％。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 60％～约 1％。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 50％～约 1％。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 40％～约 1％。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 30％～约 1％。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 20％～约 1％。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 15％～约 1％。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 10％～约 1％。在某些实施方式中，检出限变差系数 (CV) 为约 5％～约 1％。

[0474] 由于本发明的方法的灵敏度，可以使用极小的样品体积。例如，与 100μl 的标准样品体积相比，本文的方法可以用于测定较小样品体积（例如，10μl 以下）中的 VEGF。与其它方法相比，本发明使得能够在小体积样品中以更大数目的样品来提供可定量结果。例如，从典型的 1mm 针尖活组织检查物制备的溶解产物的体积可以小于或等于 10μl。使用本发明，可以对这类样品进行测试。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 100μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 90μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 80μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 70μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 60μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 50μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 40μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 30μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 25μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 20μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 15μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 10μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 5μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 1μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.05μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.01μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.005μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.001μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.0005μl 的样品体积。在某些实施方式中，本发明允许使用低于 0.0001μl 的样品体积。在某些实施方式中，样品尺寸范围为约 10μl～约 0.1μl。在某些实施方式中，样品尺寸范围为约 10μl～约 1μl。在某些实施方式中，样品尺寸范围为约 5μl～约 1μl。在某些实施方式中，样品尺寸范围为约 5μl～约 0.1μl。

[0475] 在某些实施方式中，第二标记物包含生物标记物，例如，蛋白或核酸。如本文所公开，当第一标记物或第二标记物是蛋白时，可以理解其涵盖了蛋白或多肽的片段或复合物。在其中第二标记物是这类蛋白的实施方式中，第二标记物的检出限可以为约 10pg/ml～约 0.1pg/ml。在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 100pg/ml。在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 10pg/ml。在某些实施方式中，第二标记

物的检出限小于约 5pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 1pg/ml。在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.5pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.1pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.05pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.005pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.001pg/ml。在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.0005pg/ml。在某些实施方式中，第二标记物的检出限小于约 0.0001pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限为约 10pg/ml ～约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限为约 5pg/ml ～约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限为约 1pg/ml ～约 0.01pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限为约 10pg/ml ～约 0.001pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限为约 5pg/ml ～约 0.001pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限为约 1pg/ml ～约 0.001pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限为约 10pg/ml ～约 0.0001pg/ml。在某些实施方式中，第二标记物的检出限为约 5pg/ml ～约 0.0001pg/ml。 在某些实施方式中，第二标记物的检出限为约 1pg/ml ～约 0.0001pg/ml。

[0476] 第二标记物可以是任何指示生物学状态的生物标记物。 本文公开了多种此类生物标记物。 第二标记物可以通过本发明的方法测定，或可通过替代性的现有方法测定。在某些实施方式中，第二标记物使用本发明的方法进行检测。 在某些实施方式中，第二标记为使用来自各个供应商的商购试剂盒进行检测。 这包括可以用于检测第二标记为的包含亲核纯化抗体和缀合物的商购试剂盒、蛋白印迹试剂盒和试剂、重组蛋白检测和分析、 ELISA 试剂盒和试剂、免疫组织学试剂盒和试剂、样品制备和蛋白纯化以及蛋白标记试剂盒和试剂。 提供此类试剂盒的公司包括 Invitrogen、 Millipore、 R&D Systems、Cogent Diagnostics、Bühlmann Laboratories AG、Quidel 和 Scimedx Corporation。 事实上，可以将本发明的方法与任何方法组合来检测另一种标记物。

[0477] 在某些实施方式中，第二标记物是包含 proBNP、 IL-1α、 IL-1β、 IL-6、IL-8、IL-10、 TNF-α、IFN-γ、cTnI、VEGF、胰岛素、GLP-1、TREM1、白细胞三烯 E4、 Akt1、 Aβ-40、 Aβ-42 或 Fas 配体的生物标记物。 在某些实施方式中，第二标记物是细胞因子。 如本文所公开，目前超过 100 个其协调或不协调的调节受到临床关注的细胞因子 / 趋化因子可以用本发明的方法进行检测。 在某些实施方式中，细胞因子是 G-CSF、 MIP-1α、 IL-10、 IL-22、 IL-8、 IL-5、 IL-21、 INF-γ、 IL-15、 IL-6、TNF-α、 IL-7、 GM-CSF、 IL-2、 IL-4、 IL-1α、 IL-12、 IL-17α、 IL-1β、 MCP、IL-32 或 RANTES。 在某些实施方式中，细胞因子是 IL-10、 IL-8、 INF-γ、 IL-6、TNF-α、 IL-7、 IL-1α 或 IL-1β。 在其他实施方式中，第二标记物是高丰度蛋白。在此类实施方式中，第二标记物可以是载脂蛋白、缺血修饰白蛋白 (IMA)、纤连蛋白、C 反应蛋白 (CRP)、 B 型利钠肽 (包括 BNP、 proBNP 和 NT-proBNP) 或髓过氧化物酶 (MPO)。

[0478] 在某些实施方式中，所提供的方法包括确定第一标记物 (即，cTnI 或 VEGF) 的浓度和确定第二标记物浓度 (如果第二标记物是如蛋白等生物标记物)。 在某些实施方式中，所提供的方法包括确定第一标记物浓度相比于第二标记物浓度的比值。 本文公开了

使用本发明的装置和方法来确定浓度的方法。 也可以使用商业试剂盒（例如，ELISA 试剂盒）来确定蛋白浓度，例如通过针对标准曲线比较受检测的生物标记物的水平。

[0479] 2. 混合标记物分析组

[0480] 本发明的方法也可以与充当期望生物学状态（例如，疾病状态）的度量的其它类型标记物。 参见图 4。 实例包括生理学标记物（压力测试、胰岛素耐受、BMI、血压、睡眠窒息）、分子标记物（胆固醇、LDL/HDL、维生素 D）、高丰度蛋白（载脂蛋白、IMA、纤连蛋白）和疾病用遗传标记物。 在某些实施方式中，第二标记物是生理学标记物。 在某些实施方式中，第二标记物是分子标记物。 在某些实施方式中，第二标记物是遗传标记物。

[0481] 在一个实施方式中，本发明提供了检测或监测受试对象的病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品中的第一标记物和检测第二标记物，其中第一标记物包括心脏肌钙蛋白 I(cTnI) 或血管内皮生长因子 (VEGF)，且第二标记物包括生理学标记物。 生理学标记物的实例包括心电图 (EKG)、压力测试、核成像、超声波、胰岛素耐受、体重指标、骨量、血压、年龄、性别、睡眠窒息、医学史或其它生理学状况。在一个实施方式中，第二标记物包括确定受试对象是否患有冠状动脉疾病或处于经历冠状动脉疾病的并发症的风险中的医学程序，所述医学程序包括但不限于冠状动脉造影、冠状动脉血管内超声波 (IVUS)、压力测试（成像或不成像）、颈动脉内膜中层增厚评估、施行或不施行虚拟组织学技术的颈动脉超声研究、冠状动脉电子束计算机断层扫描 (EBCT)、心脏计算机断层 (CT) 扫描、CT 血管造影、心脏磁共振成像 (MRI) 和磁共振血管造影 (MRA)。 本方法也可用于监测处于罹患心血管疾病的风险的受试对象，其中第二标记物是风险因子。 心脏疾病的风险因子包括循环 MPO 的水平升高、高血压、早期 CVD、吸烟、高总胆固醇、低 HDL 胆固醇、肥胖、糖尿病等。 由于通常心血管病不限于受试对象的血管系统的一个区域，还认为经诊断患有冠状动脉疾病或处于罹患冠状动脉疾病的风险的受试对象处于发展或患有其他形式的 CVD（例如，脑血管病、主髂动脉病和周围动脉疾病）的风险。 处于罹患心血管病的风险的受试对象也处于具有异常压力测试结果或异常心导管检查结果的风险。 处于罹患 CVD 的风险的受试对象也处于展示出颈动脉内膜中层厚度增加和冠状动脉钙化（这些特征可以使用非侵袭性成像技术评估）的风险。 处于罹患 CVD 的风险的受试对象也处于患有动脉粥样硬化斑块负荷增加的风险，该特征可使用血管内超声进行检查。

[0482] 筛分测试对于具有缺血性心脏病 (IHD) 的风险因子的患者特别重要。 通常的初始 IHD 筛分测试是测定一定时段内的电活动，其再现为通常称为心电图 (ECG 或 EKG) 的重复波图案显示出心肌的去极化和再极化。 对去极化和再极化的各种波和法向矢量的分析产生重要的诊断信息。 然而 ECG 测定不是特别敏感，且数据对于检测心血管异常或功能障碍不是很有用。 因此，下一步往往但并非总是使心脏在受控条件下受到压力并测定 ECG 数据的变化。 压力测试有时称为平板运动测试或运动测试，其能显示是否缺乏经由通向心脏的动脉的供血。 在压力测试中，患者在受控条件下运动，同时监测各种参数，包括脉搏、EKG、血压和疲劳度。 可以通过进行体育运动来施加压力，或替代性地，可以通过施用模拟运动的生理学影响的药物混合物（如多巴酚丁胺）来施加压力。 另一种用于 IED 筛分测试的压力测试包括放射核苷酸（核）压力测试，其涉及将放射活性同位素

（通常为铊或Cardiolyte）注射至患者血流内，然后使放射核苷酸在整个脉管系统中的散布以及其在心脏肌肉组织内的吸收可视化。 然后患者进行一段时间体育运动，其后重复进行成像，以使放射核苷酸在这个脉管系统和心脏中的分布的变化可视化。 压力超声心动描记法涉及在体育运动之前、期间和之后的心脏的超声可视化。 放射核苷酸压力测试和压力超声心动描记法常常与ECG测定组合使用，以便获得对个体的心血管健康状态的更明确的了解。

[0483] 在一个实施方式中，由本发明的装置检测的标记物（cTnI或VEGF）水平的升高和生理学标记物的存在指示着生物学状态，例如疾病。 例如，可以通过第一标记物水平的升高和不规则的EKG或压力测试结果来检测受试对象中的病况。

[0484] 在一个实施方式中，本发明提供了检测或监测受试对象中的病况的方法，所述方法包括监测来自受试对象的第一样品中的第一标记物和检测第二标记物，其中第一标记物包含心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子（VEGF），且第二标记物包含分子标记物。 分子标记物包括其存在指示着生物学状态的任何物质。 生物体天生的分子标记物的实例包括总胆固醇、高密度脂蛋白（HDL）、低密度脂蛋白（LDL）、LDL/HDL比、甘油三酯、尿酸或肌酐。 在某些实施方式中，分子标记物包括总胆固醇、高密度脂蛋白（HDL）、低密度脂蛋白（LDL）、LDL/HDL比、甘油三酯、尿酸或肌酐。 在某些实施方式中，分子标记物包括LDL/HDL/Q-LDL、甘油三酯的亚组分。 美国心脏协会提供了以下对于血脂谱（lipid profile）测量值的推荐：

[0485] HDL：“正常”读数对于男性在40mg/dL～50mg/dL变化，对于女性在50mg/dL～60mg/dL变化；高于60mg/dL的测定值被认为是“保护性”的；

[0486] LDL：小于130mg/dL认为良好；小于100mg/dL认为“最佳”；

[0487] 甘油三酯：小于150mg/dL认为是“正常”；

[0488] 总胆固醇（将1/5甘油三酯测量值与LDL和HDL数字相加）：低于200mg/dL认为“理想”；

[0489] 0.3～0.4以上的HDL/LDL比值通常看做理想的。

[0490] 也可以将分子标记物引入受试对象，例如，氯化铷被用作评估心肌的灌注的放射活性同位素。 其它分子标记物包括血糖（例如，血葡萄糖）和维生素D。

[0491] 在一个实施方式中，由本发明的装置检测的标记物（cTnI或VEGF）的水平的升高和分子标记物的存在指示着生物学状态，例如疾病。 例如，可以通过第一标记为水平的升高和低HDL/HDL度数来检测受试对象中的病况。

[0492] 在一个实施方式中，本发明提供了检测或监测受试对象中的病况的方法，所述方法包括监测来自受试对象的第一样品中的第一标记物和检测第二标记物，其中第一标记物包含心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子（VEGF），而第二标记物包含遗传标记物。遗传标记物包括其遗传规律可被跟踪的具有可鉴定的物理位置的DNA片段。遗传标记物包括限制性片段长度多态性（RFLP）、扩增片段长度多态性（AFLP）、多态性DNA随机扩增（RAPD）、可变数目串联重复序列（VNTR）、微卫星多态性、小卫星、单核苷酸多态性（SNP）、短串联重复序列（STR）和单特征多态性（SFP）。 许多遗传标记物（如SNP）已被关联为多种疾病的风险因子。 例如，与阿尔茨海默病相关的基因之一载脂蛋白E(ApoE)含有两个SNP，其产生3种可能的该基因的等位基因：E2、E3和E4。每个等位

基因的差别为一个 DNA 碱基，且每个基因的蛋白产物的差别为一个氨基酸。 至少遗传一个 E4 等位基因的人将具有更大的发展阿尔茨海默病的机会，而遗传 E2 等位基因似乎表示着更小的发展阿尔茨海默病的可能性。 由 HapMap 项目维护的 SNP 数据库可获自 http://www.hapmap.org/。 与心血管病况相关的 SNP 的实例公开于美国专利申请第 12/109,137 号、第 12/139,139 号、第 12/151,275 号、第 12/077,935 号和第 12/019,651 号中。 遗传标记物还包括突变，包括插入、缺失或融合。 遗传标记物还包括表遗传标记物，例如，DNA 甲基化，如在 CpG 序列的环境中的胞嘧啶的甲基化。 DNA 甲基化模式可以在细胞中响应于特定的病况而改变。 例如，异常 DNA 甲基化是癌症的标志。 通过例如一个等位基因的 DNA 甲基化沉默的包含基因基因的等位基因特异性表达的印记也可以指示病况，例如，如癌症等病况的风险的增加。 本领域技术人员非常了解此类标记物。 参见例如， Laird， Cancer epigenetics， Hum Mol Genet.2005Apr 15 ； 14 Spec No 1 ： R65-76 ； Tang 和 Ho， Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease.Rev Endocr Metab Disord.2007Jun ； 8(2) ： 173-82。

[0493] 在一个实施方式中，由本发明的装置检测的标记物 (cTnI 或 VEGF) 水平的升高和遗传标记物的存在指示着生物学状态，例如疾病。 例如，受试对象中的病况可以通过第一标记物水平的升高和该病况的 SNP 相关性进行检测。 例如，受试对象中的病况可以通过第一标记物水平的升高和发现的与该病况相关的 DNA 甲基化模式来进行检测。

[0494] A. 检测和监测

[0495] 本发明的方法可以在限定的时段中对生物标记物 (例如， VEGF) 水平在从个体收集纵向样品的时间内的微小变化进行定量。 对微小变化定量的能力由使用所述方法时造成的测量灵敏度和精度的组合而实现。

[0496] 本文所述的方法可以用于监测健康个体中的生物标记物 (例如， VEGF、细胞因子、cTnI) 水平，并且能够检测指示早期疾病的疾病风险的分析物的水平的微小升高。 可以在从个体收集常规纵向样品的时间内来对这种高于正常值的升高进行定量。 监测微小变化的能力由使用所述方法时造成的测量灵敏度和精度的组合而实现。

[0497] 所述方法可以用于在其升高的生物标记物 (例如， VEGF、细胞因子、 cTnI) 水平已被观察到的个体中监测生物标记物水平，并且能够检测指示返回健康状态的分析物水平的微小降低。 可以在从个体收集常规纵向样品的时间内来对这种降低进行定量并与健康范围进行比较。 该信息可以用于确定治疗性干预的成功或者向正常健康状态的回归。 监测微小变化的能力由根据本发明进行的测量的灵敏度和精度的组合而实现。

[0498] 所述方法可以在限定的时段中对分析物 (例如， VEGF、细胞因子、 cTnI) 水平在从个体收集纵向样品的时间内的微小变化进行定量。 监测微小变化的能力由根据本发明进行的测量的灵敏度和精度的组合而实现。

[0499] 在一个实施方式中，本发明提供了检测或监测受试对象中病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品的第一标记物并检测第二标记物，其中确定了第一标记物的浓度并确定第二标记物的浓度，所述方法还包括测定来自受试对象的第一样品与第二样品之间的标记物浓度的变化。 在某些实施方式中，第一标记物包括心脏肌钙蛋白 I(cTnI) 或血管内皮生长因子 (VEGF)。 根据所述方法，将所述变化用于检测或监测病况。

[0500] 在一个实施方式中，本发明提供了检测或监测受试对象中病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品的第一标记物并检测第二标记物，其中确定了第一标记物的浓度并确定第二标记物的浓度，所述方法还包括确定来自受试对象的第一样品与第二样品之间的第一标记物和第二标记物的比值的变化，从而将该变化用于检测或监测病况。在某些实施方式中，第一标记物包括心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)。

[0501] 在某些实施方式中，在从受试对象获取第一样品和第二样品之间执行医学程序。在某些实施方式中，医学程序包括外科手术程序、压力测试、放射核苷酸压力测试或治疗干预。在某些实施方式中，本发明提供了检测或监测受试对象中病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品的第一标记物并检测第二标记物、执行外科手术程序、并在该程序后检测第一和第二标记物，从而将所述程序之前和之后的标记物的变化用于检测或监测病况。在某些实施方式中，第一标记物包括心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)。在某些实施方式中，本发明提供了检测或监测受试对象中病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品的第一标记物并检测第二标记物、对受试对象执行压力测试、并在压力测试后检测第一和第二标记物，从而将所述程序之前和之后的标记物的变化用于检测或监测病况。在某些实施方式中，第一标记物包括心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)。在某些实施方式中，本发明提供了检测或监测受试对象中病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品的第一标记物并检测第二标记物(其中第一标记物包含心脏肌钙蛋白I(cTnI))、对受试对象执行压力测试、并在压力测试后检测第一和第二标记物，其中将所述程序之前和之后的标记物的变化用于检测或监测病况。在某些实施方式中，本发明提供了检测或监测受试对象中病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品的第一标记物并检测第二标记物(其中第一标记物包含血管内皮生长因子(VEGF))、对受试对象执行压力测试、并在压力测试后检测第一和第二标记物，其中将所述程序之前和之后的标记物的变化用于检测或监测病况。在某些实施方式中，本发明提供了检测或监测受试对象中病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品的第一标记物并检测第二标记物、对受试对象执行治疗干预、并在压力测试后检测第一和第二标记物，其中将所述程序之前和之后的标记物的变化用于检测或监测病况。在某些实施方式中，第一标记物包括心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)。

[0502] 在一个实施方式中，本发明提供了监测受试对象的病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品中的第一标记物和检测第二标记物，其中所述监测包括监测疾病进展、疾病复发、风险评估、治疗效力或手术效力。在某些实施方式中，第一标记物包括心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)。在某些实施方式中，监测包括检测来自受试对象的一系列样品(例如，两个以上的样品)中的标记物。在某些实施方式中，如本文所公开，所述系列样品在一段时间内以不同时间间隔进行收集。在某些实施方式中，本发明包括比较来自所述系列样品的每个样品的标记物水平与取自第一样品的样品中的标记物水平。在某些实施方式中，所述系列样品采集自不同的体液、组织或其它生物来源。此类样品可以在相同或相似的时间点采集，和/或在如上所述的时间段内进行采集。系列样品中标记物的变化或标记物没有变化可用于监测生物学状态，

例如，疾病进展、治疗效力、疾病复发、风险评估或手术效力。 在某些实施方式中，所述方法包括选自以下的分析：将一种或多种标记物的浓度或系列浓度与所述标记物的浓度的正常值进行比较、将浓度或系列浓度与基线值进行比较、和确定系列浓度的浓度变化速率。 在某些实施方式中，所述方法包括将样品中标记物浓度与预定阈值浓度进行比较，并在样品浓度大于阈值水平的情况下确定诊断、预后或治疗方法。

[0503] 在一个实施方式中，本发明提供了监测受试对象的病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品中的第一标记物和检测第二标记物，其中所述监测包括监测疾病进展。在某些实施方式中，第一标记物包括心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)。 在一个实施方式中，标记物的增加表明疾病进展。 在一个实施方式中，标记物的减少表明疾病进展。 在一个实施方式中，标记物没有变化表明疾病进展。 例如，标记物的增加可能表明表达该标记物的细胞的生长，例如，标记物的增加可以表明肿瘤细胞的生长。 在某些实施方式中，医学测试或治疗响应于对标记物的检测而改变。在某些实施方式中，可以对受试对象制定额外测试。 例如，本发明的测试的结果可能表明心血管病的进展并可以相应地指定压力测试等。 在另一个实例中，本发明的测试结果可能表明癌症的进展，并可相应地指定成像技术等。 在某些实施方式中，如果测试表明疾病进展，可以对受试对象施用治疗剂或手术程序。 本领域技术人员可以理解，此类医学测试或治疗将取决于标记物、病况和受试对象病史等。

[0504] 在一个实施方式中，本发明提供了监测受试对象的病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品中的第一标记物和检测第二标记物，其中所述监测包括监测疾病复发。在某些实施方式中，第一标记物包括心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)。 在一个实施方式中，标记物的增加表明疾病复发。 在一个实施方式中，标记物的减少表明疾病复发。 在一个实施方式中，标记物没有变化表明疾病复发。 例如，标记物的增加可能表明表达该标记物的细胞（例如，肿瘤细胞）的存在，由此表明如癌症等病况的复发。 在某些实施方式中，可以相应于对标记物的监测来指定医学测试或治疗。 例如，如果测试表明疾病复发则可以施用治疗剂或施行手术程序。 本领域技术人员可以理解，此类医学测试或治疗将取决于标记物、病况和受试对象病史等。

[0505] 在一个实施方式中，本发明提供了监测受试对象的病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品中的第一标记物和检测第二标记物，其中所述监测包括监测风险评估。 在某些实施方式中，第一标记物包括心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)。 在一个实施方式中，标记物的增加表明疾病复发。 在一个实施方式中，标记物的减少表明疾病复发。 在一个实施方式中，标记物没有变化表明疾病复发。例如，标记物的增加可能表明心血管并发症（如心脏病突发）的风险、风险的增加或风险的减小。 在某些实施方式中，可以响应于对标记物的监测来指定医学测试或治疗。 例如，如果测试表明风险或风险增加则可以施用治疗剂或施行手术程序。 本领域技术人员可以理解，此类医学测试或治疗将取决于标记物、病况和受试对象病史等。 类似地，如果风险下降（例如，响应于患者生活方式的变化或治疗效力而下降），则可以减少治疗性治疗。 本领域技术人员可以理解，此类医学测试或治疗将取决于标记物、病况和受试对象病史等。

[0506] 在一个实施方式中，本发明提供了监测受试对象的病况的方法，所述方法包括

检测来自受试对象的第一样品中的第一标记物和检测第二标记物，其中所述监测包括监测治疗效力。在某些实施方式中，第一标记物包括心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)。在一个实施方式中，标记物的增加表明次优的治疗效力。在一个实施方式中，标记物的减少表明次优的治疗效力。在一个实施方式中，标记物没有变化表明次优的治疗效力。例如，标记物的增加或没有变化表明治疗因例如未能有效停止肿瘤生长而未能减缓疾病进展。在某些实施方式中，本发明提供了监测在个体中的治疗性治疗的有效性的方法，所述方法包括测定来自个体的第一样品中的标记物浓度（其中第一样品在施用治疗性治疗之前获取），还包括测定在开始治疗性治疗之后的不同时间点获取的系列样品中的标记物浓度，此外还包括比较治疗性治疗之前的标记物浓度与治疗性治疗之后的标记物水平，以便确定治疗性治疗的有效性。如本文所公开，可以对额外的标记物进行评估以提供确证性或补充性结果。在某些实施方式中，治疗性治疗响应于对标记物的监测而改变。在某些实施方式中，治疗剂（例如，药物或生物学试剂）的剂量可能响应于所述结果而变化。在某些实施方式中，采用治疗剂（例如，药物或生物学试剂）的治疗可能响应于所述结果而停止。在某些实施方式中，响应于所述结果可以施用额外的治疗剂（例如，药物或生物学试剂）来补充或替代第一试剂。

[0507] 在一个实施方式中，本发明提供了监测受试对象的病况的方法，所述方法包括检测来自受试对象的第一样品中的第一标记物和检测第二标记物，其中第一标记物包括心脏肌钙蛋白I(cTnI)或血管内皮生长因子(VEGF)，其中所述监测包括监测手术效力。在一个实施方式中，标记物的增加表明次优的手术效力。在一个实施方式中，标记物的减少表明次优的手术效力。在一个实施方式中，标记物没有变化表明次优的手术效力。例如，标记物的增加或没有变化可能表明手术未能除去所有患病组织，例如源自肿瘤的组织。在某些实施方式中，对受试对象的治疗受到测试结果的影响。例如，如果测试结果表明手术切除未能成功从受试对象除去所有癌症，可以用化学治疗来治疗受试对象。类似地，如果测试结果表明手术切除成功，则可以避免额外的治疗。本领域技术人员可以理解，此类医学测试或治疗将取决于标记物、病况和受试对象病史等。

[0508] B. 临床方法

[0509] 本发明涉及确立用于诊断生物学状态或生物体的病况的标记物、基于此类标记物准备诊断程序、并且利用此类诊断程序来商品化/市场化诊断程序和服务的系统和方法（包括临床方法）。

[0510] 在一个实施方式中，本文的临床方法包括使用以下方法确立一种或多种标记物，所述方法包括：通过检测标记物单分子来测定获自第一集群的生物学样品中的标记物浓度，从而确立所述生物学样品中的所述标记物的浓度范围；和使在上述步骤中间的的一种或多种标记物商品化，例如，在诊断产品中。所鉴定的生物标记物优选为多肽或小分子。此类多肽可以是此前已知的，或是未知的。本文的诊断产品可以包含一种或多种与所述标记物（例如，多肽）特异性结合的抗体。

[0511] 在一个实施方式中，本文的临床方法包括使用以下系统确立一种或多种标记物，所述系统包括：通过检测标记物单分子来测定获自第一集群的生物学样品中的标记物浓度，从而确立所述生物学样品中的所述标记物的浓度范围；和提供诊断服务以确定生物体是否具有或不具有所关注的生物学状态或病况。本文的诊断服务可由在该商务下

许可或由该商务本身许可的 CLIA 认证实验室提供。 本文的诊断服务可直接提供给卫生保健供应商、卫生保健承保人或患者。 因此，本文的临床方法可以从销售例如诊断服务或诊断产品而获取收益。

[0512] 本文的临床方法也考虑到为例如卫生保健供应商、卫生保健承保人或患者等提供诊断服务。 本文的商务可以通过由服务实验室承包或建立服务实验室（经临床实验室改进法案修正案（CLIA）或其它监管机构审批）来提供诊断服务。 此类服务实验室可执行本文公开的方法来鉴定样品内是否具有特定标记物或标记物模式。

[0513] 所述一个或多个标记物是多肽或小分子或者新型化学实体。

[0514] 在其他实施方式中，获取使用本发明的方法收集的数据并提交给医学实践人员以指导医学治疗。 在一个示例性实施方式中，来自受试对象的样品被送至实验室，在该实验室中使用本发明的方法对样品进行测试。 然后将测试结果传递给医学专业人员，例如医生。 然后医学专业人员可以基于测试结果来指导受试对象的治疗疗程。 在一个实施方式中，所述测试提供了来自受试对象的样品中的 cTnI 或 VEGF 水平的升高。 然后将测试结果例如通过电子通讯或通过标准纸质邮件提交给医学专业人员。 医学专业人员可以为患者建议治疗疗程，例如，预防心脏病的药物。 在确定行动方案时，医学专业人员也可以将测试结果与其它医学标记物（例如，医学史、吸烟、年龄、体重、种族、压力测试、血压等）结合。

[0515] 在某些实施方式中，使用计算机系统来进行本发明的各种逻辑运算。 计算机系统可以包括一个或多个电脑、数据库、存储系统和系统输出设备（例如，计算机显示屏或打印机）。 在某些实施方式中，将计算机可执行逻辑或程序代码存储在存储介质中，载入计算机和 / 或由计算机执行，或者在某些传输介质（例如，电线或电缆、通过光纤或经由电磁辐射（如无线））上传输。 当在通用微处理器上实施时，计算机可执行逻辑运算可以将微处理器设置来创建特定的逻辑电路。 在某些实施方式中，可以使用多个计算机系统。 在一个实施方式中，患者或组织可以通过将这些数据上传安全服务器（满足工业安全要求）或者通过将信息以高密度便携形式（例如 CDROM、DVD）输送来提供测试数据。 然后可以在远程地点对数据进行分析。

[0516] 在某些实施方式中，计算机系统包含计算机可读取介质，例如，软盘、CD-ROM、硬盘、闪存、磁带或其它数字存储介质，其具有包含一组或多组执行多种逻辑运算的指令的程序代码。 在某些实施方式中，计算机系统用于分析测试数据。 在某些实施方式中，计算机系统用于将来自多个标记物的数据合并，由此协助检测或监测生物学状态，例如疾病。

[0517] 在某些实施方式中，可以将相关信息的数据库存储在数字存储介质上，例如，软盘、CD-ROM、硬盘、闪存、磁带或其它数字存储介质。 这类数据可以存储在本地或者相对于其它计算机系统（例如，用于执行逻辑运算或将数据送至医学实践人员的那些计算机系统）远程存储。 参见图 5

[0518] VII. 试剂盒

[0519] 本发明还提供试剂盒。 在某些实施方式中，如前文所述，试剂盒包含分析器系统和标记。 本发明的试剂盒包含在合适包装中的一种或多种可用于对如标记物等分子进行灵敏检测的组合物。 在某些实施方式中，如本文所述，本发明的试剂盒提供标记以及

其它组成部分，例如使用说明、试剂或其它成分。 在某些实施方式中，本发明将标记作为单独的组成部分在单独的容器中提供，例如抗体或荧光部分，以便在使用前由消费者结合。 在某些实施方式中，如本文所述，本发明的试剂盒提供对于如标记物等分子具有特意性的结合伴侣对（例如，抗体对），其中至少一个结合伴侣是所述标记物的标记。在某些实施方式中，如抗体等结合伴侣在不同容器中提供。 在某些实施方式中，如抗体等结合伴侣在相同容器中提供。 如抗体等结合伴侣在不同容器中提供。 如抗体等结合伴侣中的一个被固定在固体承载物上，例如微滴定板或顺磁珠。 在这些实施方式中的一些中，另一个结合伴侣（如抗体）如本文所述由荧光部分标记。

[0520] 用于所述试剂盒的组成部分的结合伴侣（如抗体）、固体承载物和荧光标记可以为本文所述的任何合适的此类成分。

[0521] 试剂盒可以额外包含可用于本发明的方法中的试剂，例如，用于结合反应中的缓冲剂和其它试剂、用于对将要在其上运行测试的仪器进行预处理的洗涤剂、缓冲剂或其它试剂、用于过滤试剂的过滤器和用于使样品运行通过仪器的洗脱缓冲剂或其它试剂。

[0522] 试剂盒可以包含一种或多种标准物，例如，用于本发明的测试中的标准物，如高度纯化的标准物，例如，重组物、蛋白标记物或其各种片段和复合物等。 试剂盒还可以包含使用说明。

[0523] VIII. 实施例

[0524] 通过说明而非对其它公开的限制的方式提供以下实施例。

[0525] 除非另外指明，实施例中的处理中样品是在本文所述的单分子检测器 (SMD) 中分析，并使用如下参数：激光器：波长为 639nm 的连续波砷化镓二极管激光器 (Blue Sky Research，Milpitas，CA)，聚焦点尺寸为约 2 微米（询查空间如本文所述为 0.004pL）；流速＝ 5 微升 / 分钟，通过 100 平方微米 ID 和 300 平方微米 OD 的熔融二氧化硅毛细管；非共聚焦透镜排列（参见例如图 1A）；数值孔径为 0.8 的聚焦透镜 (Olympus)；硅雪崩式光电二极管检测器 (Perkin Elmer， Waltham， MA)。

[0526] 实施例 1. 生物标记物夹心测试：肌钙蛋白 I(cTnI)

[0527] 测试：该测试的目的在于检测人血清中心脏肌钙蛋白 I(cTnI) 的存在。 测试形式为基于小鼠单克隆捕获抗体和山羊多克隆检测抗体的两步夹心免疫测试。 需要 10 微升样品。 测试的工作范围为 0 ～ 900pg/ml，典型分析检出限为 1pg/ml ～ 3pg/ml。 测试需要约 4 小时的实验台时间来完成。

[0528] 材料：在下文所述的程序中使用以下材料：测试板：Nunc Maxisorp，产品 464718，384 孔，干净，用单克隆抗体 BiosPacificA34440228P 批号 A0316 被动涂布（在 0.05M 碳酸钠中 5μg/ml，pH9.6，室温过夜）；用 PBS 中的 5％蔗糖、1％ BSA 阻断并在 4℃储存。 将人心脏肌钙蛋白 I(BiosPacific 目录号 J34000352) 用于标识曲线。 标准浓度用稀释剂是经免疫耗竭内源性 cTnI、等分并于 -20℃储存的人血清。 在 96 孔锥形聚丙烯板 (Nunc 产品号 249944) 中进行稀释。 使用以下缓冲液和溶液：(a) 测试缓冲液：带 1％ BSA 和 0.1％ TritonX-100 的 BBS；(b) 含 2mg/ml 小鼠 IgG(Equitech Bio)、2mg/ml 山羊 IgG(Equitech Bio) 和 2mg/ml MAK33 poly(Roche#11939661) 的测试缓冲液中的被动阻断溶液；(c) 检测抗体 (Ab)：针对肽 3 亲和纯化的山羊多克隆抗体 (BiosPacific G129C)，

用荧光染料 Alexa Fluor 647 标记，并于 4℃储存；检测抗体稀释剂：50％测试缓冲液、50％被动阻断溶液；洗涤缓冲液：硼酸盐缓冲盐水 Triton 缓冲液 (BBST)(1.0M 硼酸盐、15.0M氯化钠、10％ Triton X-100，pH 8.3)；洗脱缓冲液：带4M脲、0.02％ Triton X-100 和 0.001％ BSA 的 BBS。

[0529] Alexa Fluor 647 标记的抗体的制备：通过首先将 100μg 的 G-129-C 溶于 400μl 的偶联缓冲液 (0.1M $NaHCO_3$) 中来将检测抗体 G-129-C 与 Alexa Fluor 647 缀合。通过将溶液转移至 YM-30 过滤器并让溶液和过滤器进行离心而将抗体溶液浓缩至 50μl。通过添加 400μl 偶联缓冲液来将 YM-30 过滤器和抗体洗涤 3 次。通过向过滤器中添加 50μl 偶联缓冲液、翻转过滤器并在 5,000×g 离心 1 分钟来回收抗体。所得抗体溶液的浓度约为 1μg/μl～2μg/μl。通过向一瓶 Alexa Fluor 647 添加 20μl DMSO 来重建 Alexa Fluor 647 NHS 酯储备溶液，将该溶液在 -20℃储存至多 1 个月。将 3μl Alexa Fluor 647 储备溶液添加至抗体溶液，然后在黑暗中混合并温育 1 小时。1 小时后，向抗体 Alexa Fluor 647 溶液添加 7.5μl 的 1M Tris 并混合。将该溶液用 YM-30 超滤以除去低分子量组分。通过添加 PBS 将含有与 Alexa Fluor 647 缀合的抗体的保留物的体积调节至 200μl～400μl。向溶液中添加 3μl 10％ NaN_3，将所得溶液转移至 Ultrafree 0.22 离心单元并在 12,000×g 旋转 2 分钟。收集含有缀合抗体的滤液并用于测试中。

[0530] 程序：cTnI 标准物和样品制备及分析：

[0531] 如下制备标准曲线：通过将 cTnI 储备溶液在标准物稀释剂中连续稀释或者获得 1.2pg/ml～4.3μg/ml 的 cTnI 浓度来制备工作标准物 (0～900pg/ml)。

[0532] 向各孔内添加 10μl 被动阻断溶液和 10μl 标准物或样品。将标准物以四等分试样运行。优选用 Axyseal 封口膜将板密封、在 3000RPM 离心 1 分钟并在 25℃振荡时温育 2h。将板洗涤 5 次，并在纸巾上进行离心直至电机在反转位置达到 3000RPM。制备检测抗体的 1nM 工作稀释液，并向各孔添加 20μl 检测抗体。将板密封并离心，然后在振荡时将测试在 25℃温育 1h。向各孔添加 30μl 洗脱缓冲液，然后将板密封并将测试在 25℃温育半小时。可以将板在 4℃储存至多 48h 然后进行分析，或立即对样品进行分析。

[0533] 为进行分析，以 40μl/ 分钟对每孔采集 20μl，并以 5μl/ 分钟对 5μl 进行分析。基于 4σ 来分析数据。将原始信号对标准物浓度作图。对于较低浓度范围进行线性拟合，而对于整个标准曲线进行非线性拟合。检出限 (LOD) 经计算为 LOD = (3×(零值样品的标准偏差))/ 线性拟合斜率。由适于样品信号的线性或非线性等式确定样品浓度。

[0534] 将等分试样泵入分析器中。通过设定询查空间体积在毛细管流动期间测定单独标记的抗体，询查空间体积被设定来使得在激光激发后来自仅一个荧光标记的发射在受限空间中被检测到。每个信号表示一个数字事件，该设置实现极高的分析灵敏度。总荧光信号是如上所述的个体荧光信号的总和。经计数的每个分子是具有数百至数千的 DMC 事件 / 样品的正数据点。本发明的 cTnI 测试的检出限由平均值 +3SD 法确定。

[0535] 结果：使用测试方案在四等分试样中测定的典型 cTnI 标准曲线的数据如表 3 所示。

[0536] 表 3

[0537] cTnI 标准曲线

[0538]

cTnI(pg/ml)	信号	标准偏差	% CV
0	233	25	10.8
1.5625	346	31	8.9
3.125	463	35	7.5
6.25	695	39	5.6
12.5	1137	61	5.3
25	1988	139	7.0
50	3654	174	4.8
100	5493	350	6.4
200	8264	267	3.2
400	9702	149	1.5
800	9976	50	0.5

[0539] 分析器系统的灵敏度在 15 次运行中进行测试，并常规地发现可检测亚飞摩尔 (fM) 水平的校准物，如表 4 中数据所示。 精度在 4pg/ml ～ 12pg/ml cTnI 时为 10%。

[0540] 表 4

[0541] 仪器灵敏度

[0542]

校 准 物 (fM)	**信号计数**	***CV***
0	11	
12	302	*9*
60	1341	*8*
300	*4784*	*7*

[0543] cTnI 范围浓度的线性化标准曲线如图 6 所示。

[0544] 在 15 次连续测试中确定分析检出限 (LoD)。 LoD 是 0std+3SD(n = 4) 测试内确定值的平均值。 平均 LoD 为 1.7pg/ml(范围是 0.4pg/ml ～ 2.8pg/ml)。

[0545] 通过分析已经免疫耗竭 cTnI 并用已知量的 cTnI 进行标准添加 (spike) 的血清样

品来确定样品的回收率。 表 5 显示了由在 3 天内分析的系统进行样品回收的数据。

[0546] 表 5

[0547] 样品回收

[0548]

标准添加 (pg/ml)	回收(平均值)	标准偏差	% CV
5	5.7	0.9	*16*
15	13.7	0.2	*2*
45	43	0.6	*2*
135	*151*	*6.2*	*4*

[0549] 通过分析已经免疫耗竭 cTnI 并用已知量的 cTnI 进行标准添加 (spike) 的血清样品来确定样品的回收率。 表 5 显示了由在 3 天内分析的系统进行样品回收的数据。

[0550] 在用 cTnI 进行标准添加并用标准物稀释剂进行稀释的汇集的人血清中确定了测试的线性。 表 6 中的结果显示稀释和对于相应稀释的期望信号的%。

[0551] 表 6

[0552] 测试的线性

[0553]

血清稀释	期望信号%
1 ： 2	79
1 ： 4	87
1 ： 8	96

[0554] 在进一步试验中，本发明提供了对正常水平的 cTnI 定量，例如，在 CV 为 10% 以下时为 0.8pg/ml。 cTnI 用测试系统的分析灵敏度如图 7A 所图示。 LoD 为 0.1pg/ml ～ 0.2pg/ml。 对于 100μl 样品， LoD 为 0.117pg/ml。 对于 50μl 样品， LoD 为 0.232pg/ml。 低端标准曲线信号如图 7B 中所示。

[0555] 这些数据显示，本发明的分析器系统允许对亚飞摩尔级 cTnI 浓度进行灵敏的激光诱导的免疫测试。 所述测试可以用于对人、大鼠、狗和猴的 cTnI 进行等边定量。

[0556] 实施例 2.TnI 用夹心珠基测试

[0557] 上文所述测试使用相同的微滴定板形式，其中使用塑料表明来固定靶标分子。单颗粒分析器系统还与在使用微粒或珠在溶液中进行以实现结合实体与未结合实体的分离的测试相容。

[0558] 材料：MyOne 抗生物素链霉亲和蛋白 C1 微粒 (MP) 获自 Dynal(650.01-03，10mg/ml 储备液)。 测试中所用缓冲液包括：10× 硼酸盐缓冲盐水 Triton 缓冲液 (BBST)(1.0M 硼酸盐，15.0M 氯化钠，10% Triton X-100，pH 8.3)；测试缓冲液 (2mg/ml 正常山羊 IgG，2mg/ml 正常小鼠 IgG，和在 0.1M Tris(pH 8.1) 中的 0.2mg/ml MAB-33-IgG- 聚

合物，0.025M EDTA，0.15M NaCl，0.1％ BSA，0.1％ Triton X-100，以及 0.1％ NaN_3，储存于 4℃）；和洗脱缓冲液（带有 4M 脲、0.02％ Triton X-100 和 0.001％ BSA 的 BBS，储存于 2℃～ 8℃）。 用于夹心珠基测试的抗体包括：Bio-Ab（A34650228P（BiosPacific），带有 1 ～ 2 个生物素 /IgG）和 Det-Ab（缀合有 A647 的 G-129-C（BiosPacific），2 ～ 4 个荧光体 /IgG）。 校准物稀释剂是在 TBS wEDTA 中的 30mg/mlBSA。

[0559] 微粒涂布：将 100μl MP 储备液置于 eppendorf 管内。 通过应用磁体、除去上清液、移除磁体和在洗涤缓冲液中重悬，从而将 MP 用 100μl BBST 洗涤缓冲液洗涤 3 次。洗涤后将 MP 重悬在 100μl 测试缓冲液中并添加 15μg Bio-Ab。 然后将混合物在持续混合下在室温温育 1 小时。 用 1ml 洗涤缓冲液如上所述将 MP 洗涤 5 次。 洗涤后将 MP 重悬在 15ml 测试缓冲液中（或重悬于 100μl 中以便在 4℃储存）。

[0560] 标准物和样品的制备：用校准物稀释剂稀释标准物以制备正确的标准曲线（通常从 200pg/ml 降至 0.1pg/ml）。 冷冻血清和血浆样品需要在室温于 13K rpm 离心 10 分钟。 小心移除经澄清的血清 / 血浆以避免取走任何可能的颗粒或漂浮物，并置于新管内。 将 50μl 的各标准物或样品移取至适当的孔内。

[0561] 捕获靶标：向各孔添加 150μl MP（在重悬于 15ml 的测试缓冲液 +400mM NaCl 后）。 将混合物在 JitterBug，5 上于室温温育 1 小时。

[0562] 洗涤和检测：将板置于磁体上，并在确保所有 MP 已由磁体捕获后除去上清液。 在从磁体移除板后添加 250μl 洗涤缓冲液。 然后将板置于磁体上并在确保所有 MP 已由磁体捕获后除去上清液。 每孔添加 20μl Det-Ab（在测试缓冲液 +400mM NaCl 中将 Det-Ab 稀释至 500ng/ml）。 将混合物在 JitterBug，5 上于室温温育 30 分钟。

[0563] 洗涤和洗脱：将板置于磁体上并用洗涤缓冲液洗涤 3 次。 在确保所有 MP 已由磁体捕获后除去上清液，并添加 250μl 洗涤缓冲液。 洗涤后将样品转移至新的 96 孔板中。 然后将新板置于磁体上，并在确保所有 MP 已由磁体捕获后除去上清液。 在从磁体移除板后添加 250μl 洗涤缓冲液。 然后将板置于磁体上并在确保所有 MP 已由磁体捕获后除去上清液。 然后添加 20μl 洗脱缓冲液，并将混合物在 JitterBug，5 上于室温温育 30 分钟。

[0564] 滤出 MP 并转移至 384 孔板：将标准物和样品转移至置于 384 孔测试板之上的 384 孔过滤板内。 然后用平板转子将板在 300rpm 于室温离心。 移除过滤板并添加合适的校准物。 将板覆盖并准备在 SMD 上运行。

[0565] SMD：将一个等分试样泵入分析器。 通过设定询查空间体积在毛细管流动期间测定单独标记的抗体，询查空间体积被设定来使得在激光激发后来自仅一个荧光标记的发射在受限空间中被检测到。 每个信号表示一个数字事件，该设置实现极高的分析灵敏度。 总荧光信号是如上所述的个体荧光信号的总和。 经计数的每个分子是具有数百至数千的 DMC 事件 / 样品的正数据点。 本发明的 cTnI 测试的检出限由平均值 +3SD 法确定。

[0566] 实施例 3. 正常非患病受试对象群体中的 cTnI 浓度范围

[0567] 用来自 88 个显著健康的受试对象（非患病）的血清样品确立人血清中的 cTnI 浓度的参照范围或正常范围。 进行如实施例 1 所述的夹心免疫测试，并使用本发明的单颗粒分析系统如上所述对信号或事件的数目进行计数。 通过将由分析器检测的信号与上文所述标准曲线相关来确定血清肌钙蛋白 I 的浓度。 所有测试以四等分试样进行。

[0568] 根据目前的欧洲与美国心脏学协会 (ESC/ACC) 的推荐，肌钙蛋白测试应准确地对正常范围的 99％进行定量，且测试不精确性 (CV) 小于 10％，以便可靠地区分患有 ACS 的患者与未患缺血性心脏病的患者，以及对不良心脏事件进行风险分层。 测试显示， TnI 的生物学阈值（截留浓度）为 7pg/ml 的 TnI 浓度，其在 99％百分数确立并且相应的 CV 为 10％（图 8)。 在 10％ CV 水平，精确度图指向 4pg/ml 和 12pg/ml 的 TnI 浓度。

[0569] 另外，所述测试与由国家标准与技术研究所提供的肌钙蛋白标准测定很好地相关联（图 9)。

[0570] 本发明的测试足够灵敏和精确以满足 ESC/ACC 的要求，并且与诸如 Koerbin 等， Ann Clin Biochem，42 ：19-23(2005) 所述的那些测试等测试相比是最灵敏的心脏肌钙蛋白 I 测试。 本发明的测试比目前可用的测试的灵敏度高 10 ～ 20 倍，其将 cTnI 的生物学阈值范围确定为 111pg/ml ～ 333pg/ml。

[0571] 实施例 4. 对 TnI 在患有剂型心肌梗死 (AMI) 的患者的循环系统中的早期释放的检测

[0572] 研究 1 ：从在急诊科 (ED) 表现出胸痛的 18 个患者连续获取 47 个样品。 这些患者均具有非 ST 升高的 ECG，且经诊断为患有 AMI。 来自所有 18 个患者的初始样品中的 cTnI 浓度根据商用测试在急诊室收诊时被确定为＜ 350pg/ml(10％截点），且 12 个为＜ 100pg/ml(99％）。 在更晚些的时间对这些样品使用相同商用测试进行测试，并且确定为对 cTnI 测试呈阳性。 将相同的血清样品也根据本发明的测试如实施例 1 和 3 所述进行测试，并将结果与用所述商用测试所获结果进行比较。

[0573] 在患者表现出胸痛时首次进行抽血（样品 1)，并随后以 4 ～ 8 小时的间隔进行抽血（在 12 小时取样品 2 ；在 16 小时取样品 3 ；在 24 小时取样品 4 ；在 30 小时取样品 5 ；在 36 小时取样品 6 ；在 42 小时取样品 7 ；在 48 小时取样品 8)。 通过本发明的方法和通过目前的商用方法对血清进行分析，且所获结果如图 10 所示。 本发明的分析器在患者表现出胸痛时检测到 TnI（样品 1)，而所述商用测试在晚的多的时间首次检测到 cTnI（在 36 小时的样品 6)。 样品 3 的 TnI 浓度超出了使用本发明的分析器确立的生物学阈值水平 (7pg/ml，见图 8)，并且表明样品 3 对 TnI 为样品，从而表明心脏时间的发生。 所述商用测试的生物学阈值处在 111pg/ml TnI ～ 333pg/ml TnI。 因此，样品 3 不会被认为是表明可能的心脏事件。

[0574] 另外，如由取自患者的第一样品的结果所证明，本发明的方法和组合物使得能基于心脏肌钙蛋白水平进行早得多的诊断和可能的干预。 在初始商用测试 cTnI 值在 100ng/ml ～ 350ng/ml 的 3 个案例中，其根据本发明的方法均为 cTnI 阳性（即， cTnI 大于 7pg/ml)。 在初始商用测试 cTnI 值小于 100pg/ml 的 12 个案例中，5 个根据本发明的测试被确定为对于心血管事件为阳性（即， cTnI 大于 7pg/ml)。 将来的本发明的测试的使用在对收诊样品进行测试时将会检测出比目前的商用测试多 53％的 AMI 案例。

[0575] 研究 2 ：将 50 个额外的根据商用测试被测试为阴性的血清样品用本发明的分析器和测试进行测试。 结果如图 11 所示。 在 50 个样品中，36 个处在 99％以内并被确定为处于本发明的测试所确立的正常范围之内。 然而，剩下的 14 个被确定为处于商用测试的“正常”或非患病范围内的样品经测试高于本发明所确立的生物学阈值。

[0576] 因此，本发明的 cTnI 测试的高灵敏度允许在 cTnI 血清水平低于商购技术的阈值时检测患者中的心肌损害。本发明的高灵敏和精确 cTnI 测试的使用使得能比现有 cTnI 测试更早地检测 AMI，由此为适当的诊断和早期医学干预提供了机会以便改善结果。

[0577] 实施例 5. 白细胞三烯 T4(LTE4) 的检测

[0578] 开发了对缓冲液中的白细胞三烯 E_4(LTE$_4$) 进行定量的测试作为使用如尿液样本的测试的初步测试。测试格式为一步单抗体竞争性免疫测试。需要 50 微升样品。该测试的典型工作范围为 0 ～ 300pg/ml，典型分析检出限为 2pg/ml ～ 3pg/ml(0.1pg/ 样品～ 0.15pg/ 样品)。测试需要约 4 小时的实验台时间来完成。

[0579] 在下文所述的程序中制备和使用以下材料：提供在 Cayman Chemical 白细胞三烯 E_4 中的小鼠抗兔 IgG 涂布板 (EIA 试剂盒，目录号 520411)；储备 LTE$_4$ 标准物 (在乙醇中的 100ng/ml 纯化 LTE4(Cayman Chemical 白细胞三烯 E_4 EIA 试剂盒，目录号 520411))；与 90ml Nanopure 水以 1 ：10 稀释的测试缓冲液 (10×EIA 缓冲浓缩液 (Cayman Chemical 白细胞三烯 E_4 EIA 试剂盒，目录号 520411))；标准物稀释用缓冲液 (3％乙醇)；用 30ml EIA 缓冲液稀释的抗 LTE$_4$ 抗体 (白细胞三烯 E_4 EIA 抗血清 (Cayman Chemical 白细胞三烯 E_4 EIA 试剂盒，目录号 520411))；31μM 抗生物素链霉亲和蛋白 -Alexa 检测试剂储备溶液 (以 Alexa Fluor™ 647 标记的抗生物素链霉亲和蛋白)；与分析器检测相容的示踪物 (LTE$_4$- 生物素缀合物)；稀释为 1 ：40 的洗涤缓冲液 (400× 浓缩液 (Cayman Chemical 白细胞三烯 E_4 EIA 试剂盒，目录号 520411))；洗脱缓冲液 (带有 4M 脲、0.02％ Triton X-100 和 0.001％ BSA 的硼酸盐缓冲盐水，pH 8.3)。对示踪物的基质和抗血清浓度进行测试以便鉴定最灵敏的测试条件。

[0580] 如下制备标准曲线：通过在测试缓冲液中对 100ng/ml 的储备液进行连续稀释来制备工作标准物，以获得 0.005pg/ml ～ 3000pg/ml 的浓度范围。向测试板的各孔内添加 50μl 标准物 (或样品)。所有标准物以两等分试样运行。通过将示踪物储备液用测试缓冲液稀释至 1pg/ml 来制备工作示踪物。向测试板的各孔内添加 50μl 示踪物 (或缓冲液)。通过将 100％储备液 (根据试剂盒说明书制备) 稀释至测试缓冲液内来制备 10％工作抗血清溶液。向测试板的各孔内添加 50μl 抗血清 (或缓冲液)；将板密封并在振荡下于 25℃温育过夜。通过用测试缓冲液将储备液稀释至 140pM 来制备工作抗生物素链霉亲和蛋白 -Alexa 检测试剂。向各孔添加 15μl 检测试剂，并将板在振荡下于 25℃温育 30 分钟。然后将板洗涤 5 次。向各孔添加 50μl 洗脱缓冲液，将板在振荡下于 25℃温育半小时。将板立即使用，或在分析前于 4℃储存至多 48 小时。

[0581] 将 20μl 以 40μl/ 分钟的速率泵入分析器，并以 5μl/ 分钟对 5μl 样品进行分析。使用阈值＝ 4σ 和交叉相关性为 0 ～ 8 毫秒来对数据文件进行分析。将标准物的原始信号对浓度作图，并使用低范围标准物进行线性拟合，而对于整个标准曲线进行非线性拟合。检出限计算为 LOD ＝最大信号的 80％ (无靶标对照)(B/B$_0$ ＝ 80％时的浓度)。由适于样品信号的等式 (线性或非线性) 计算样品浓度。

[0582] LTE4 的竞争曲线如图 12 所示。LOD 计算为 80％ B/Bo ＝ 1.5pg/ml(约 5pM)。使用商购试剂盒进行的 LTE4 测试仅能在 LTE4 以至少 30pg/ml 的浓度存在时检测 LTE4。

[0583] 因此，所述分析器系统可以用于检测表明存在着 LTE4 相关病症 (例如，疾病发作时的哮喘) 的 LTE4 水平，并且在疾病早期提醒临床医护人员对于治疗干预的需要以便

改善临床结果。

[0584] 实施例 6. 人 Akt1 的检测

[0585] 开发了夹心免疫测试来对血清样品中的低 Akt1 水平进行定量。 通过将浓缩标准物在缓冲蛋白溶液中稀释来生成标准曲线。 在已涂布有对于 Akt1 特异的抗体的 384 孔板的各孔中添加 10 微升（μl）测试缓冲液和 10μl 样品或标准物，并温育 2 小时。 更具体而言，将抗体 841660(R&D Systems) 以 2.5 微克 /ml 涂布在 Nunc Maxisorp 板上。 将板洗涤并向各孔添加 20μl 经标记的对 Akt1 特异的检测抗体 AF1775(R&D Systems)，其以 2 ～ 4 个荧光体 /IgG 的 Alexa Fluor 647 标记。 温育 1 小时后将板洗涤以除去未结合的检测抗体。 将结合的检测抗体洗脱并在分析器仪器中进行测定。

[0586] 在下文所述的测试程序中使用以下材料。 涂布的 384 孔板；测试缓冲液；重悬缓冲液；稀释缓冲液；标准物稀释剂；Akt1 标准物；Akt1 用检测抗体试剂；洗涤缓冲液 (10mM 硼酸盐，150mMNaCl，0.1％ TritonX-100，pH 8.3)；洗脱缓冲液（带有 0.02％ Triton X-100 和 0.001％ BSA 的 4M 脲），设定于“7”的微孔板振荡器，微孔板洗涤器，平板离心机，Axyseal 封口膜 (Axygen 产品 321-31-051)，Nunc 可穿孔封口带 (Nunc 产品 235306)。

[0587] 材料：

[0588] 所提供试剂

[0589] 捕获抗体 841660(R&D Systems)，以 2.5 微克 /ml 涂布在 Nunc Maxisorp 板 (834 孔板）上

[0590] 测试缓冲液

[0591] 重悬缓冲液

[0592] 稀释缓冲液

[0593] 标准物稀释剂

[0594] Akt1 标准物

[0595] Akt1 用检测抗体试剂：AF1775(R&D Systems)，其以 2 ～ 4 个荧光体 /IgG 的 Alexa Fluor 647 标记

[0596] 其它必需试剂

[0597] Triton X-100 洗涤缓冲液 (10mM 硼酸盐，150mM NaCl，0.1％ TritonX-100，pH 8.3)

[0598] 洗脱缓冲液（带有 0.02％ Triton X-100 和 0.001％ BSA 的 4M 脲）

[0599] 微孔板振荡器，设定于 “7”

[0600] 微孔板洗涤器

[0601] 平板离心机

[0602] Axyseal 封口膜， Axygen 产品 321-31-051

[0603] Nunc 可穿孔封口带， Nunc 产品 235306

[0604] 程序：

[0605] Akt1 标准物制备

[0606] 将标准物重悬于 0.5ml 重悬缓冲液中，最终浓度＝ 170ng/ml

[0607] 在稀释缓冲液中以 1 ： 3 稀释标准物＝ 57ng/ml

[0608] 在标准物稀释剂中以 1 ： 19 稀释标准物＝ 3ng/ml

[0609] 在标准物稀释剂中进行 3 倍系列稀释直至 4.1pg/ml

[0610] 每孔添加 10μl 测试缓冲液

[0611] 每孔添加 10μl 标准物或样品

[0612] 用 Axyseal 封口膜将板密封

[0613] 在振荡下于 25℃温育 2 小时

[0614] 洗涤板 5 次

[0615] 将反转于纸巾上的板在 3000RPM 旋转 1 分钟

[0616] 每孔添加 20μl 检测抗体

[0617] 用 Axyseal 封口膜将板密封

[0618] 将反转于纸巾上的板在 3000RPM 旋转 1 分钟

[0619] 在振荡下于 25℃温育 1 小时

[0620] 洗涤板 5 次

[0621] 将反转于纸巾上的板在 3000RPM 旋转 1 分钟

[0622] 每孔添加 30μl 洗脱缓冲液

[0623] 在 3000RPM 旋转 1 分钟

[0624] 用 Nunc 可穿孔封口带密封，用辊将封口密实

[0625] 在振荡下于 25℃温育半小时

[0626] 可以在分析前将板在 4℃储存至多 48 小时

[0627] 在 ZeptX 仪器上分析

[0628] 如下生成 Akt1 标准曲线。 制备 Akt1 标准物以获得 4.1pg/ml ～ 170ng/ml 的 Akt1。 向测试板孔内添加 10μl 的每种标准物稀释溶液（或样品）。 将板密封并在振荡下于 25℃温育 2 小时。 洗涤板并离心干燥。 向各孔添加 20μl 检测抗体试剂，并在振荡下于 25℃温育 1 小时。 通过在各孔添加 30μl 洗脱缓冲液并在振荡下于 25℃温育半小时来破坏抗体 -Akt1 复合物。 将板立即使用，或在分析前于 4℃储存至多 48 小时。 将洗出液泵入分析器。

[0629] 使用所述测试方案以四等分试样测定的典型 Akt1 标准曲线的数据如表 7 中给出，且图形化的数据如图 13 所示。

[0630] 表 7

[0631] Akt1 标准曲线

[0632]

浓度 Akt1 标准物 (pg/ml)	平均信号	标准偏差	%CV
0	113	16	14
4.1	126	10	8
12.4	133	1	0
37	151	34	22
111	173	15	8
333	350	74	21
1000	733	136	19
3000	1822	243	13

[0633] 通过在单一板上测试样品用 36 个 1000pg/ml 标准物的复制样品来测试测试内精度。平均信号为 1822±243，且% CV = 13。将 2 个标准偏差添加至 36 个零标准物复制物的平均信号中并从标准曲线计算相应的 Akt1 浓度，从而确定测试检出限 (LoD)。LoD 经计算为 25pg/ml。

[0634] 因此，所述分析器系统能用于检测 Akt1 水平，以便确定 Akt1 相关病症（如癌症）的存在或缺失。

[0635] 实施例 7.TGF-β 的检测

[0636] 开发了夹心免疫测试来对血清中的低 TGFβ 水平进行定量。通过将浓缩标准物在缓冲蛋白溶液中稀释来生成标准曲线。在已涂布有对于 TGFβ 特异的抗体的 384 孔板的各孔中添加 10 微升（μl）测试缓冲液和 10μl 样品或标准物，并温育 2 小时。将板洗涤并向各孔添加 20μl 经标记的对 TGFβ 特异的检测抗体。温育 1 小时后将板洗涤以除去未结合的检测抗体。将结合的检测抗体洗脱并在分析仪器中进行测定。

[0637] 在下文所述的测试程序中使用以下材料。涂布的 384 孔板；测试缓冲液；标准物稀释剂；10μg/ml 的 TGFβ 标准物储备溶液；TGFβ 用检测抗体试剂；TritonX-100 洗涤缓冲液 (10mM 硼酸盐，150mM NaCl，0.1% TritonX-100，pH 8.3)；洗脱缓冲液（带有 0.02% Triton X-100 和 0.001% BSA 的 4M 脲）。

[0638] 如下生成 TGFβ 标准曲线。制备 TGFβ 标准物以获得 100ng/ml ～ 4.1pg/ml 的 TGFβ。向各孔内添加 10μl 测试缓冲液和 10μl 标准物（或样品）。将板密封并在振荡下于 25℃温育 2 小时。洗涤板并离心干燥。向各孔添加 20μl 检测抗体试剂，并在振荡下于 25℃温育 1 小时。通过在各孔添加 30μl 洗脱缓冲液并在振荡下于 25℃温育半小时来破坏抗体 -TGFβ 复合物。将板立即使用，或在分析前于 4℃储存至多 48 小时。将洗出液泵入分析器。

[0639] 使用所述测试方案以四等分试样测定的典型 TGFβ 标准曲线的数据如表 8 中给出，且图形化的数据如图 14 所示。

[0640] 表 8

[0641] TGFβ 标准曲线

[0642]

浓度 (pg/ml)	平均信号	标准偏差	% CV
0	1230	114	9
4	1190	68	6
12	1261	132	10
37	1170	158	14
111	1242	103	8
333	1364	135	10
1000	1939	100	5
3000	3604	497	14

[0643]

[0644] 将 2 个标准偏差添加至 20 个零标准物复制物的平均信号中并从标准曲线计算相应的 TGF β 浓度，从而确定测试检出限 (LoD)。 LoD = 350pg/ml。

[0645] 因此，所述分析器系统能用于检测 TGF β 水平，以便确定 TGF β 相关病症（如癌症）的存在或缺失。

[0646] 实施例 8.Fas 配体的检测

[0647] 开发了夹心免疫测试来对血清中的低 Fas 配体水平进行定量。通过将浓缩标准物在缓冲蛋白溶液中稀释来生成标准曲线。 在已涂布有对于 Fas 配体特异的抗体的 384 孔板的各孔中添加 10 微升（μl）测试缓冲液和 10μl 样品或标准物，并温育 2 小时。 将板洗涤并向各孔添加 20μl 经标记的对 Fas 配体特异的检测抗体。 温育 1 小时后将板洗涤以除去未结合的检测抗体。 将结合的检测抗体洗脱并在 ZeptX™ 仪器中进行测定。

[0648] 如下生成 Fas 配体标准曲线。 制备 Fas 配体标准物以获得 100ng/ml ～ 4.1pg/ml 的 Fas 配体。 向各孔内添加 10μl 测试缓冲液和 10μl 标准物或样品。 将板密封并在振荡下于 25℃温育 2 小时。 洗涤板并离心干燥。 向各孔添加 20μl 检测抗体试剂，并在振荡下于 25℃温育 1 小时。 通过在各孔添加 30μl 洗脱缓冲液并在振荡下于 25℃温育半小时来破坏抗体 -Fas 配体复合物。 将板立即使用，或在分析前于 4℃储存至多 48 小时。

[0649] 使用所述测试方案以四等分试样测定的典型 Fas 配体标准曲线的数据如表 9 中给出。

[0650] 表 9

[0651] Fas 配体标准曲线

[0652]

浓度 Fas 配体标准物 (pg/ml)	平均信号	标准偏差	%CV
0	935	82	9
1.2	1007	44	4
3.4	1222	56	5
11	1587	70	4
33	2869	52	2
100	5939	141	2
300	9276	165	2
900	11086	75	1

[0653] 通过在单一板上测试样品用 3 个标准浓度的 12 个复制样品来测试测试内精度。对于三点的每一点的 12 个值的平均值、标准偏差和 CV 如表 10 所示。

[0654] 表 10

[0655] Fas 配体的测试内精度

[0656]

浓度 (pg/ml)	平均信号	标准偏差	% CV
11	1717	128	7
33	3031	262	9
100	6025	257	4

[0657] 将 2 个标准偏差添加至 20 个零标准物复制物的平均信号中并从标准曲线计算相应的 Fas 配体浓度，从而确定测试检出限 (LoD)。 LoD 经计算为 2.4pg/ml。

[0658] 因此，本发明的分析器系统能用于检测 Fas 配体水平，其表明 Fas 配体相关病症（例如，癌症、异体移植排斥和如骨关节炎等退行性疾病）的存在或缺失。

[0659] 实施例 9. 生物标记物 TREM-1 的夹心测试

[0660] 使用夹心测试格式（个体分子检测用夹心测试，美国临时专利申请第 60/624,785 号）来开发 TREM-1 测试。 TREM-1 检测用测试试剂可商购 (R&D Systems, Minneapolis, MN)。 测试在 96 孔板内进行。 使用单颗粒抗体作为捕获试剂，并使用另一种单克隆抗体或多克隆抗体进行检测。 检测抗体以 Alexa Fluor 647 ®标记。

[0661] 测试方案如下：

[0662] 1. 用捕获抗体涂布板，洗涤 5 次，

[0663] 2. 在 PBS 中的 1% BSA、5%蔗糖中阻断，

[0664] 3. 添加在血清中稀释的靶标，温育，洗涤 5 次，

[0665] 4. 添加检测抗体，温育，洗涤 5 次，

[0666] 5. 添加 0.1M 甘氨酸 (pH 2.8) 以将结合的测试组分从板释放，

[0667] 6. 将样品从处理板转移至检测板，将样品 pH 调至中型并在单颗粒分析器系统上运行。

[0668] 图 16 显示了使用该测试生成的 TREM-1 标准曲线。该测试在 100 飞摩尔～ 1500 飞摩尔的测定范围内是线性的。近来引入了一种来自 R&D Systems 的 ELISA 测试。对他们的 ELISA 测试报道的标准曲线为 60pg/ml ～ 4000pg/ml。本实施例表明，可以在标准曲线中常规测定 100fM(4.7pg/ml)，从而允许进行大约灵敏 10 倍的测量。另外，也已生成了趋化因子、细胞激活分子、细胞粘附分子和信号转导分子的标准曲线。参见图 18。结果显示，通过使用单颗粒分析器检测分析物的检测一致地比使用 ELISA 测试的检测更灵敏 10 倍～ 100 倍。

[0669] 实施例 10. 生物标记物：血清中 IL-6 和 IL-8 水平的夹心测试

[0670] 测试：该方案描述了使用本发明的单颗粒分析器系统对血清中的低 IL-6 水平进行定量的夹心免疫测试。通过将浓缩标准物在缓冲蛋白溶液中稀释来生成标准曲线。在已涂布有对 IL-6 特异的抗体的 384 孔板的各孔中添加 10 微升（μl）测试缓冲液和 10μl 样品或标准物，并温育 2 小时。将板洗涤并向各孔添加 20μl 经标记的对 IL-6 特异的检测抗体。温育 1 小时后将板洗涤以除去未结合的检测抗体。将结合的检测抗体洗脱并在单颗粒分析器仪器中进行测定。

[0671] 材料：在下文所述的测试程序中使用以下材料。涂布的 384 孔板；测试缓冲液；标准物稀释剂；100ng/ml 的 IL-6 标准物储备溶液；用 Alexa Fluor 647 染料标记的 IL-6 用检测抗体 (R&D Systems)；TritonX-100 洗涤缓冲液 (10mM 硼酸盐，150mM NaCl，0.1％ TritonX-100，pH 8.3)；洗脱缓冲液 (带有 0.02％ Triton X-100 和 0.001％ BSA 的 4M 脲)；设定于 “7” 的微孔板振荡器；微孔板洗涤器；平板离心机；Axyseal 封口膜 (Axygen 产品 321-31-051)；和 Nunc 可穿孔封口带 (Nunc 产品 235306)。

[0672] 程序：

[0673] 如下制备 IL-6 标准曲线：将 100ng/ml 储备溶液融化并在标准物稀释剂中以 1 ：1000 稀释为 100pg/ml，并通过进行 6 次连续的 3 倍稀释来获得最低标准浓度为 0.14pg/ml 的一系列浓度。向涂布的 384 孔板的每孔添加 10μl 测试缓冲液和 10μl 标准物或样品。用 Axyseal 封口膜将板密封，并在 3000RPM 离心 1 分钟。将测试板在振荡下于 25℃温育 2 小时；洗涤 5 次；在反转于纸巾上的同时在 3000RPM 离心 1 分钟。向每孔添加 20μl 检测抗体试剂；用 Axyseal 封口膜将板密封并在 3000RPM 离心 1 分钟。将测试板在振荡下于 25℃温育 1 小时，洗涤 5 次，并在反转于纸巾上的同时在 3000RPM 离心 1 分钟。向每孔添加 30μl 洗脱缓冲液；将板用 Nunc 可穿孔封口带密封，用辊将封口密实。将测试板在 3000RPM 离心 1 分钟，并在振荡下于 25℃温育半小时。可以立即进行测试的分析。替代性地，可以在分析前将板在 4℃储存至多 48 小时。

[0674] 分析了来自 32 个血库捐献者的经 EDTA 处理的全血的血清样品的 IL-6。

[0675] 结果：使用所述测试方案以四等分试样测定的典型 IL-6 标准曲线的数据如表 11 中给出。

[0676] 表 11

[0677] IL-6 的标准曲线

[0678]

浓度 (pg/ml)	平均信号	标准偏差	CV
370	11035	206	2%
125	9983	207	2%
41	8522	95	1%
14	5023	108	2%
4.5	2577	124	5%
1.7	1178	114	10%
0.5	577	36	6%
0	106	15	14%

[0679] 针对较高 IL-6 范围浓度和较低范围浓度的线性化标准曲线分别如图 17A ～ B 所示。 所示测试允许检测小于 0.5pg/ml 的 IL-6(图 17A ～ B)。 检出限 (LoD) 经计算为 0.06pg/ml。 将 2 个标准偏差添加至零标准物复制物的平均信号中并从标准曲线计算相应的 IL-6 浓度，从而确定测试检出限 (LoD)。 该灵敏度水平对于检测即使处于 0.5pg/ml ～ 10pg/ml 的正常 IL-6 水平也很优异。

[0680] 进行检测来自血库捐献者的血样的血清中的 IL-6 和 IL-8 的测试，分析结果如图 17C ～ D 所示。 在 100％的样品中 (32/32) 对 IL-6 进行定量。 IL-6 的平均浓度为 2.3pg/ml，且浓度范围为 0.2pg/ml ～＞ 26pg/ml(图 17C)。 基本使用对 IL-6 所述的程序来测试相同样品的 IL-8。 确立 IL-8 标准曲线 (未示出) 并将其用于确定样品中的 IL-8 的浓度 (图 17D)。 在 100％ (32/32) 的样品中对 IL-8 进行定量。 IL-8 的平均浓度为 7.3pg/ml，且浓度范围是 1.2pg/ml ～＞ 26pg/ml。

[0681] 通过将分析器的检测从对分子计数 (数字信号) 转换为检测在较高分析物浓度时产生的光子总和 (模拟信号)，可以在较低和较高浓度进行 IL-6 测定或测定任何关注的颗粒 (图 17A 和 B)。 这以一般性方式显示于图 17E 中。 单颗粒分析器的扩展线性动态范围是 6 个对数值。 增加检测样品中的颗粒浓度的动态范围的能力使得能够针对正常水平 (较低浓度范围) 和疾病水平 (较高浓度范围) 来确定颗粒浓度。 针对 IL-6 的正常和疾病水平的检测范围如图 17F 所示。

[0682] 实施例 11. 血管内皮生长因子 A(VEGF-A) 测试

[0683] 针对人 VEGF 和小鼠 VEGF 都开发了检测 VEGF 的测试。 人 VEGF 测试的 LOD 为约 0.1pg/ml 且 LLOQ 为 0.3pg/ml，使其比常用 ELISA 测试灵敏 90 倍。 与小鼠 VEGF 的交叉反应性在所有受测样品类型中最小。所述测试能够测定 100％的受测血浆、细胞裂解物和使用后的培养基样品中的 VEGF 浓度。 相反， ELISA 通常仅能在 6％的健康血浆

样品和 10％的健康细胞裂解物样品中准确地检测人 VEGF。 当两种测试均测定样品中的 VEGF 浓度时，所确定的水平对于两种测试相当，例外的是使用后的培养基，其中 ELISA 检测到显著更多的 VEGF。 这一矛盾很可能是由于 ELISA 测定总 VEGF，而本发明的测试测定游离 VEGF。 释放至使用后的培养基的可溶性 VEGF 受体会显著减少。 对于大多数血浆样品测试内变化性＜ 10％，而对于具有高 VEGF 浓度的血浆样品＜ 15％。 血浆样品分析的测试间 CV ＜ 10％。

[0684] 实施例 12. 用于检测小鼠和人 VEGF 的夹心免疫测试

[0685] 抗体和抗原试剂的制备：

[0686] 开发小鼠 VEGF 生物测试需要产生必需的抗体和抗原试剂。 为鉴定最佳的小鼠 VEGF 测试用试剂，测试了重组小鼠 VEGF 蛋白（来自 R&D Systems 和 Sigma）和抗小鼠 VEGF 抗体（来自 R&D Systems、Abcam 和 Sigma）的合适性。 对于人 VEGF 测试，获取重组 VEGF 蛋白（来自 R&D Systems 和 Abcam）和抗人 VEGF 抗体（来自 R&D Systems 和 Abcam）并进行测试。 用抗 VEGF 抗体涂布磁性颗粒以用于夹心免疫测试格式的捕获步骤中。 将潜在检测抗体与 Alexa Fluor®染料缀合。 作为测试优化过程的一部分，使用基础的初始测试条件组来筛选用于两种测试的抗体。

[0687] 夹心 VEGF 免疫测试的制备：

[0688] 使用在抗体和抗原试剂的制备中制备的最佳抗体对，运行测试以便优化对于捕获抗体、检测抗体和磁性颗粒的浓度。 另外，对各种测试组分进行测试以设计对每种测试最佳的测试缓冲液。 这包括鉴定最佳阻断剂和洗涤剂，然后优化每种组分的浓度。

[0689] 执行人 VEGF 测试的方法：

[0690] 将浓度为 1ng/ml 的重组人 VEGF 蛋白标准物溶液进行系列稀释。 制备三等分样品。 使用 VEGF 测试来测定这些样品的浓度。 将使用所述测试确定的浓度对预期 VEGF 浓度作图。

[0691] 结果：

[0692] 所述测试的性能得到展示，且发现其可提供与用作标准物的输入重组 VEGF 的浓度高度线性的相关性。 人 VEGF 测试的 LOD 为 0.1pg/ml 且 LLOQ 为 0.3pg/ml（表 12 和图 19A ～ B）。 表 12 显示出人 VEGF 测试的性能数据，其中所述测试展示出 CV ＜ 10％，且回收率为 84％～ 107％。

[0693] 表 12

[0694]

hVEGF (pg/ml)	受测事件(平均值)	标 准 偏差	CV	回收率

[0695]

0.24	197	8	4%	95%
0.48	311	11	3%	100%
0.98	484	27	6%	89%
1.95	885	40	5%	93%
3.9	1537	57	4%	90%
7.8	2975	225	8%	116%
15.6	4972	110	2%	114%
31.3	7349	70	1%	111%
62.5	9401	95	1%	114%
125	10023	96	1%	100%
250	10091	160	2%	84%
500	10236	99	1%	95%
1000	10029	34	<1%	107%

[0696] 表 13 显示人 VEGF 测试的性能数据，其中所述测试展示出 0.07pg/ml 的 LOD。

[0697] 表 13

[0698]

背景 (受测事件)	斜率 [(受测事件)/(PG/ML)]	LOD [PG/ML]
81	202	0.07

[0699] 表 12 和表 13 中所呈现的数据如图 19A ～ B 中所图示。

[0700] 相似地，小鼠 VEGF 测试的 LOD 为 2pg/ml 且 LLOQ 为 3pg/ml（表 14 和 15）。

[0701] 表 14

[0702]

mVEGF [pg/ml]	观测到的 mVEGF	标准偏差	% CV	回收%
1000	982	106	11	98
250	256	12	5	102
63	62	4	7	99
16	15	3	19	94
3.9	7.7	3	36	197

[0703] 表 15

[0704]

[0705]

斜率	背景	背景标准偏差	LoD 10% [pg/ml]	LoD [pg/ml]
12	217	30	3.6	4.9

[0706] 表 14 和表 15 中所呈现的数据如图 20A ～ B 中所图示。

[0707] 所述数据表明，与对应的基准 R&D Systems VEGF ELISA 测试试剂盒（mVEGF 测试灵敏度为 9pg/ml ；人 VEGF 测试灵敏度为 32pg/ml）相比，小鼠 VEGF 测试的灵敏

度要高 3 倍，人 VEGF 的灵敏度高 90 倍。 [注意， R&D Systems 声明，6.8pg/ml 的人 VEGF 测试 LOD 必须乘以 5 以便准确限定该测试的 LOD。 需要进行该调整以便说明对样品的 1 ： 5 稀释（该测试中的标准物未经稀释，且未将样品的 1 ： 5 稀释包括在其灵敏度计算的一部分内)]。 对于实施例的人 VEGF 测试，涂布有单克隆抗体的磁性颗粒用于捕获步骤，而将 Alexa 标记的多克隆抗体用于检测步骤。 对于小鼠 VEGF 测试，与 R&D Systems ELISA 试剂盒类似，将多克隆抗体用于捕获和检测步骤。

[0708] 为保证在本发明与 ELISA 测试之间进行平等比较，在用于数值分配的标准分析物浓度之间进行比较。 作为该信息的结果，根据来自 ELISA 标准物的测试的结果来对本发明的标准物重新评估。 当将本数据针对该标准物重新评估进行调整后，使用两种测试确定的 VEGF 浓度相似。 原始数据和重新评估后的数据如下表 16 所示。

[0709] 实施例 13. 血浆中人和小鼠 VEGF 生物标记物的重现性、可变性和准确性的确定

[0710] 人血浆分析的比较 ：

[0711] 使用本发明的测试分析来自 24 个个体小鼠的血浆样品 ；此外还使用 R&D Systems ELISA（所声明的血清 / 血浆中的 LoD 灵敏度 = 31.2pg/mL）对这些样品中的 12 个进行测试。 本发明的测试确定了所有 12 个样品的 VEGF 浓度，而 ELISA 测试仅对受测样品的 1/12(8.3％) 进行了定量（表 16 和图 21)。 表 16 显示了用于血浆分析的所述测试和 ELISA 人 VEGF 测试之间的比较。

[0712] 表 16

[0713]

	本发明测试						R&D ELISA			
批号	原 始 hVEGF	标准	%CV	N	重新评估的	标准	测定的 hVEGF	标准	%CV	N

[0714]

	[pg/ml] 平均值	偏差			hVEGF [pg/ml] 平均值	偏差	[pg/ml] 平均值	偏差		
10947388	60	2.1	**3**	3	**19**	0.64	**8**	1.0	**13**	3
10947393	43	4.0	**9**	3	**13**	1.23	**5**	0.4	**8**	3
10947392	38	4.1	**11**	3	**12**	1.27	**11**	0.7	**6**	3
6110053	81	1.0	**1**	3	**25**	0.31	**44**	1.8	**4**	3
6110054	30	4.2	**14**	3	**9**	1.31	**ND**			3
6110050	45	7.4	**16**	3	**14**	2.30	**5**	0.8	**17**	3
6110051	26	2.1	**8**	3	**8**	0.65	**ND**			3
6110055	49	3.5	**7**	3	**15**	1.09	**8**	0.4	**5**	3
10852081	45	1.8	**4**	3	**14**	0.57	**NT**			
10852068	27	1.7	**6**	3	**8**	0.54	**NT**			
10852072	27	0.4	**2**	3	**8**	0.13	**NT**			
10852059	21	2.4	**11**	3	**7**	0.73	**NT**			
10590341	16	1.9	**12**	3	**5**	0.60	**ND**			3
10590346	35	1.2	**3**	3	**11**	0.37	**16**	0.7	**4**	3
10590343	14	1.8	**13**	3	**4**	0.57	**7**	0.4	**5**	3
10590348	18	1.6	**9**	3	**6**	0.50	**6**	0.7	**11**	3
1012990	142	2.8	**2**	3	**44**	0.86	**NT**			
1012996	122	4.7	**4**	3	**38**	1.46	**NT**			
101292	106	3.6	**3**	3	**33**	1.12	**NT**			
1012998	81	3.7	**5**	3	**25**	1.16	**NT**			
1013057	56	4.6	**8**	3	**17**	1.44	**NT**			
1013186	44	3.4	**8**	3	**14**	1.05	**NT**			
1012930	114	2.7	**2**	3	**35**	0.83	**NT**			
1012938	78	3.4	**4**	3	**24**	1.06	**NT**			
ND = 未检测到 **阴影** = **在两种测试中均受测** **NT** = 未经测试										

[0715] 选出的表 16 中所示的数据在图 21 中图示作为人血浆 Singulex 和 ELISA 测试之间的比较。 ELISA 测试检测了一个样品（16 个受测样品中的 1 个）中的 VEGF；其他血浆样品的 VEGF 值低于 ELISA 标准曲线的最低点，因此无法被可靠地确定。 Singulex 测试的 CV 平均＜ 20％。

[0716] 不同细胞系中的细胞裂解物和培养基中的 hVEGF 水平的确定：

[0717] 生长并收集两种不同人类细胞系。根据 NCI SOP#340506 将细胞裂解，不同之处在于使用更低的 SDS 浓度并且未将样品煮沸。 所用细胞系为人细胞系 MDA-MB-231 乳腺癌和 HT-29 结肠腺癌。

[0718] 样品以等分试样在本发明的测试和R&D ELISA测试中运行。首先将溶解产物以1：8稀释，然后进行(3)系列1：2稀释。对纯培养基、稀释1：4、1：16和1：64后的培养基进行分析。测试每个样品的等分试样。来自两个测试的值的比较如图21所示。两个测试检测了细胞提取物和使用后的培养基中的VEGF(图22A～B)。测试结果大致一致，在细胞提取物中检测到的VEGF少于在使用后的培养基中检测到的VEGF。总体VEGF水平在MDA-MD231样品中明显更低，这由两个测试均得到确认。

[0719] 小鼠血浆样品的分析比较：

[0720] 使用本发明的测试和R&D Systems ELISA对来自个体小鼠的8个小鼠血浆样品进行分析。在两个测试中观察到相当的值(图23)。

[0721] 细胞裂解物和培养基中mVEGF水平的确定：

[0722] 生长并收集3种不同小鼠细胞系。如上所述将细胞裂解。所用细胞系是小鼠细胞系：B16黑色素瘤、4T1乳腺癌和CT26结肠癌。

[0723] 样品以等分试样在本发明的测试和R&D ELISA测试中运行。首先将溶解产物以1：8稀释，然后进行(3)系列1：2稀释。对纯培养基、稀释1：4、1：16和1：64后的培养基进行分析。测试每个样品的等分试样。来自两个测试的值的比较如图24所示。两个测试检测了细胞提取物和使用后的培养基中的VEGF。测试结果对于每个细胞系都处在相似范围内，如图24A～C所示。如图中所见，4T1乳腺细胞系具有最低水平；B16黑色素瘤样品具有约为4T1的4倍的水平，而CT26结肠样品为B16的约2倍。在两个测试之间存在一致的差异。本测试在细胞裂解物中检测到更多VEGF，而在使用后的培养基中检测到较少的VEGF。另外，细胞VEGF与释放的VEGF之比对于Singulex测试恒定地为约5：1，而对于ELISA测试结果而言细胞内VEGF与细胞外VEGF之比有相当大的变化。

[0724] 实施例14.VEGF测试内和测试间性能

[0725] 人VEGF(hVEGF)测试内再现性：

[0726] 样品制备：

[0727] 使用单微阵列板对两种不同正常人血浆样品进行多次测试。将P1血浆样品原样测试和作为1：8稀释进行测试。稀释的血浆提供了在低hVEGF浓度确定测试内的样品源。样品以18、21和18个复制样品进行测试。

[0728] 结果：

[0729] 人血浆样品的测试内再现性的总结如表17所示。表17中的数据总结表明在7％、12％和9％的样品复制物的CV。表17中的最后一列显示了基于相对于ELISA测试中所用标准物对测试标准物浓度的基准化的校正后的测定VEGF浓度。低于2pg/ml的VEGF浓度以CV＜10％测定。

[0730] 表17

[0731]

血浆样品	检测到的事件(平均值)	标准偏差	CV	N	测定的 hVEGF [pg/ml]平均值	标准偏差	CV	校正后的 hVEGF [pg/ml]
稀释的 P1	933	53	6%	21	6	0.4	**7%**	**1.9**
P1	4692	395	8%	21	41	5.0	**12%**	**12.6**
P2	4502	626	14%	21	40	3.4	**9%**	**12.3**

[0732] 人 VEGF(hVEGF) 测试间再现性：

[0733] 样品制备：

[0734] 为测试人血浆样品的标准曲线和值的测试间再现性，由不同人员在 3 天中对每个样品使用 3 个复制样品将测试独立运行 7 次。

[0735] 结果：

[0736] 人血浆样品间的测试间可变性如表 18 所示。 血浆测试的变差系数 (CV) 低于 10%（表 18)。 类似地，血浆分析的 CV 也低于 10%，例外的是测试运行第 6 号的血浆 P2 结果（表 18)。 在该测试中，3 个值中的 2 个较为一致，而一个值明显更低。 如果将该复制样品从系列中除去，则 VEGF 血浆样品分析的总体 CV 将＜ 10%。

[0737] 表 18

[0738]

	测定的 HVEGF [PG/ML]							测试间计算				测试间计算(N=7)			
血浆样品	运行 1	运行 2	运行 3	运行 4	运行 5	运行 6	Barb 运行	测定的 hVEGF 平均值 [pg/ml]	标准偏差	测试间样品 CV	N	测定的 hVEGF 平均值 [pg/ml]	标准偏差	测试间样品 CV	N
P1	26	23	23	20	23	22	20	23	2	9%	6	22	2	9%	7
P2	16	16	17	18	16	10	16	16	3	**19%**	6	16	3	**17%**	7
P3	26	29	28	24	29	27	26	27	2	7%	6	27	2	6%	7
P4	8	9	10	9	9	10	9	9	1	7%	6	9	1	6%	7

[0739]

[0740] 小鼠 VEGF 测试内再现性：

[0741] 样品制备：

[0742] 在单个微滴定板上对来自 3 个不同的 EDTA 小鼠血浆的复制样品根据本发明进行测试。

[0743] 结果：

[0744] 小鼠血浆样品的测试内再现性如表 19 所示。 来自每个血浆样品的 18 ～ 21 个单独复制物的数据如表 19 中所示。 三个血浆样品的复制物的 CV 为 14%～ 16%（表 19)。

[0745] 表 19

[0746]

小鼠血浆	检测的事件平均值	标准偏差	CV	测定的 MVEGF [PG/ML] 平均值	标准偏差	CV
M1	3979	525	13%	485	78	16%
M2	2682	349	13%	300	43	14%
M3	4838	516	11%	635	91	14%

[0747] Singulex 测试间再现性——小鼠血浆样品

[0748] 样品制备：

[0749] 通过在 13,000×g 离心 10 分钟来使 4 个不同的小鼠 EDTA 血浆样品澄清。 然后将样品以三等分在不同的 6 天进行测试。

[0750] 结果：

[0751] 小鼠血浆 VEGF 测试的测试间再现性的总结如表 20 和 21 所示。 在 6 个测试中，小鼠血浆样品的 CV ＜ 25%（表 20 和 21）。

[0752] 表 20

[0753]

小鼠血浆	测定的 MVEGF [PG/ML] 平均值	标准偏差	CV
M1	825.5	159.2	19%
M2	2107.0	422.8	20%
M3	1342.4	341.2	25%
M4	2582.8	398.7	15%

[0754] 表 21

[0755]

	后插值所得值 – mVEGF [pg/ml]					
小鼠血浆	运行 1	运行 2	运行 3	运行 4	运行 5	运行 6
M1	1134	756	704	758	745	857
M2	2044	2591	1785	1730	1814	2677
M3	1282	908	1027	1738	1705	1394
M4	2760	2361	3044	2550	2853	1929

[0756] 实施例 15. 异种移植小鼠中的 VEGF

[0757] 来自小鼠乳腺癌异种移植物的样品获自 Washington University 的 Matthew Ellis 博士实验室。 血浆和乳腺癌组织获自 5 个不同的异种移植系。 使用来自 SCID 小鼠的血浆和小鼠乳腺组织作为对照。 在正常小鼠血浆中小鼠 VEGF 为 86pg/ml ～ 109pg/ml。 异种移植小鼠中的 3 只的 VEGF 水平是正常水平的两倍，而其它两个一种移植样品的 VEGF

水平在表观正常范围 (80pg/ml ～ 86pg/ml) 的低侧。 数据如表 22 所示。

[0758] 表 22

[0759]

mVEGF 测试	检测到的事件(DE)				后插值		
小鼠血浆	**检测到的事件平均值**	**标准偏差**	**CV**	**N**	**测定的 mVEGF [pg/ml]平均值**	**标准偏差**	**CV**
N1	1029	91	9%	3	**100**	14	**14%**
N2	882	152	17%	3	**92**	21	**22%**
N3	1046	146	14%	3	**107**	17	**16%**
N4	867	150	17%	3	**86**	18	**21%**
N5	1066	116	11%	3	**109**	14	**13%**
T1	1733	64	4%	3	**191**	8	**4%**
T2	1875	168	9%	3	**210**	22	**10%**
T3	2022	194	10%	3	228	25	11%
T4	822	61	7%	3	80	7	9%
T5	886	114	13%	3	88	13	15%
N = 正常小鼠肝素血浆 T = 小鼠(异种移植)肝素血浆							

[0760]

[0761] 实施例 16. 用于定量确定血浆和细胞裂解物中的人 VEGF 的免疫测试试剂盒

[0762] Erenna™ 人 VEGF 免疫测试使用定量荧光夹心免疫测试技术来测定人血浆和细胞裂解物中的血管内皮生长因子 (VEGF)。 对人 VEGF 特异的捕获抗体已被预先涂布在顺磁微粒 (MP) 上。 使用者将 MP、标准物和样品用移液管加入未经涂布的微板孔内。 在温育期间，样品中存在的游离 VEGF 与经涂布的 MP 上的捕获抗体结合。 在后续的缓冲液交换和洗涤步骤中将未结合的 VEGF 分子洗去。 向各孔添加对 VEGF 特异的荧光标记染料检测抗体。 该检测抗体会识别已被捕获在 MP 上的 VEGF 并与之结合。 在后续洗涤步骤中，MP 被转移至干净板。 然后添加洗脱缓冲液并温育。 洗脱缓冲液使结合的蛋白夹心物从 MP 表面解离。 荧光抗体此时在板孔内自由漂浮。 在转移至最终微孔板期间将这些抗体分离除去，并将板加载至对荧光分子计数的 Erenna 系统中。 所计得的荧光标记的检测抗体的数目与捕获时样品中存在的游离 VEGF 的量直接成正比。 将未知样品中的游离 VEGF 的量对标准曲线插值。

[0763] 提供的试剂

[0764] 表 23. 试剂数据

[0765]

项目编号	说明	运输条件	储存条件	组成部分编号
1.	人 VEGF 标准物稀释剂	带冰袋	2℃-8℃	02-0182-00
2.	人 VEGF 捕获试剂	带冰袋	2℃-8℃	02-0187-00
3.	人 VEGF 检测试剂	带冰袋	2℃-8℃	02-0188-00
4.	Erenna™ VEGF 人免疫测试试剂盒说明书	无	常温	
5.	人 VEGF 标准物 (冷冻，在单独的盒中运送)	置于干冰上	≤-70℃	02-0180-00
6.	10×洗涤缓冲液	带冰袋	2℃-8℃	02-0180-00
7.	洗脱缓冲液	带冰袋	2℃-8℃	02-0002-02

[0766]

[0767] 1. 储存说明和稳定性

[0768] Erenna VEGF 试剂盒应储存于 2℃ -8℃。 标准物在单独容器中在干冰上运送，且应储存于 ≤-70℃。 重要的是标准物在试剂盒到达时保持冷冻。 仅在组分被正确储存并且每个组分使用一次的情况下才能保证试剂盒组分的保质期。 组分以合适的保质期标明。

[0769] 2. 额外 / 其它供应商

[0770] 表 24. 消耗品和供应商

[0771]

项目编号	说明	MFR 供应商	组成部分编号	产品用途	包装详情
1.	Erenna™ 10×系统缓冲液	Singulex	02-0111-00, 02-0111-01	系统(分析)缓冲液，用于运行Erenna系统的流体	1L (10L混合) 2L (20L混合)
2.	12 通道移液枪用贮存器	VWR	80092-466	转移试剂	10/包
3.	96 孔 V 底 PP 板, 500 µL	Axygen	P-96-450V-C 或 P-96-450V-C-S	额外测试板，稀释	10 板/件，5 件/箱
4.	96 孔深孔 PP 板(2.2 mL、1.64 mL 或 1.09 mL)	Axygen	P-2ML-SQ-C, P-DW-20-C 或 P-DW-11-C	制备标准曲线(选择尺寸)	可变
5.	384 孔圆底 PP, 120 µL	Nunc	264573	接收器/分析板	20/包或 120/箱
6.	AcroPrep™ 384-过滤板，100 µL，用于样品制备和检测	Pall	5070	从测试除去 MP	10/包
7.	高级可穿孔密封带，	Nunc	235306	将分析板永久密	100 件/
	聚乙烯			封，用于 Erenna 运行前	包，100 包/箱
8.	AxySeal—PCRSP 板封口膜系列	Axygen	PCR-SP	在温育/混合/储存期间密封板	100 张膜/箱

[0772]

[0773] 3. 微粒部件和供应商

[0774] 表 25. 微粒硬件

[0775]

项目编号	说明	MFR 供应商	组成部分编号	产品用途	包装详情
1.	Dynal MPC® - 96S	Dynal™	120.27	稀土磁体，在洗涤期间捕获MP	1板
2.	微孔板洗涤站	---	---	在捕获至磁体上之后洗涤MP	---
3.	带板转子的离心机	---	---	在≥ 3000 RPM通过过滤板除去MP	1
4.	离心机适配器卡圈	Pall	5225	使384孔过滤板与384孔测试板之间适配	2/包
5.	真空泵	Welch	2511B-01	将系统缓冲液除气	1
6.	微孔板保温箱/振荡器	Boekel Scientific	# 130000，Jitterbug™	温育板	1
7.	板密封辊，VWR板辊，膜 + 箔 CS1#	VWR	60941-118	固定板密封物 永久板密封物	1

[0776] 4. 其它有用供给（未指定）

[0777] • 去离子水或蒸馏水

[0778] • 能转移或添加 20μL、100μL 和 250μL 的多通道移液枪

[0779] • 微离心管

[0780] • 微型离心机

[0781] • 250mL 容器

[0782] • 250mL 量筒

[0783] 注意事项

[0784] • 保持谨慎，在操作任何生物样品时穿着保护性衣服和手套

[0785] • 该试剂盒的组分含有约 0.1％叠氮化钠作为防腐剂。 叠氮化钠在与酸或金属混合时有毒并且是危险化合物。 含叠氮化钠的溶液应该正确地处理。

[0786] 出于测试的高灵敏度的技术建议

[0787] 将实验台和移液枪在使用前用 70％异丙醇擦拭。

[0788] 在开瓶前将浓缩标准物和初始标准物稀释液快速旋转。

[0789] 使用无菌移液枪头和试剂托盘以帮助避免交叉污染。

[0790] 在转移浓缩标准物时使用过滤器头。

[0791] 推荐使用 96 孔 1mL 聚丙烯稀释板以制备标准物和样品。

[0792] 推荐从稀释板转移每个标准物点的 3 个复制样，再转移至 96 孔 VEGF 测试板

中。

[0793] 在每次转移前将枪尖预先润湿（在板孔内吸入并释放）两次。

[0794] 试剂制备

[0795] 1. 将所有试剂在使用前升温至室温。

[0796] 2. 如下制备 1× 洗涤缓冲液（从 10× 洗涤缓冲液）：

[0797] a. 将一瓶 25mL 的 10× 洗涤缓冲液倒入 250mL 容器内。

[0798] b. 添加 225mL 去离子水。

[0799] c. 通过温和翻转以充分混合。

[0800] 3. 在即将使用前，通过旋转器翻转样品管来将 MP 重悬，以有助于确保 MP 在管内均匀分布。

[0801] 测试制备

[0802] 标准物——初始标准物稀释指南

[0803] 1. 在打开标准物管前将管在微型离心机中涡旋和快速旋转。 在打开该浓缩标准物管时应小心，以避免损失材料或者对样本或板的气溶胶污染。

[0804] 2.VEGF 标准物的浓度可参考标准物分析证书。 用标准物稀释剂将储备液稀释至 10ng/mL。

[0805] 5. 血浆样品标准曲线

[0806] 在 96 孔 1ml 深稀释板上的一列制备标准曲线。进行 1 ：2 系列稀释以获得 200pg/ml ～ 0.05pg/ml 的曲线。 以三等分试样运行标准物。

[0807] C. 细胞裂解物和培养基标准曲线

[0808] 在 96 孔 1ml 深稀释板上的一列制备标准曲线。 进行 1 ： 2 系列稀释以获得 4000pg/ml ～ 0.24pg/ml 的曲线。 以三等分试样运行标准物。

[0809] D. 样品制备

[0810] 重要的是，在即将使用前，将血浆样品在 15,800×g 离心 10 分钟。 小心进行移液，避开颗粒物；在脂层之下缓慢吸入。 避免反复的冷冻 - 融化循环。 向 96 孔板添加样品以便于转移。

[0811] 在即将使用前，应将裂解物在 4,600×g 离心 5 分钟。 小心移取上清液。 避免冷冻 - 融化循环。

[0812] 在加载至测试之前，将裂解物在标准稀释剂中稀释至少 10 倍。

[0813] 人 VEGF 测试程序

[0814] 测试设置

[0815] 根据试剂盒和主要试剂包装插页中包括的说明书进行试剂制备。 如上所述制备标准曲线和样品。

[0816] 靶标捕获

[0817] 在将微粒 (MP) 重悬后，将 100μL 的 VEGF 捕获试剂添加至 96 孔聚丙烯板 (PPP)。 向 96 孔 PPP 移取 100μL/ 孔的标准物 / 样品。 用临时板密封物 (AxySeal，PCRSP 板封口膜）或等同物将板密封。 在培养基环境下于室温 (RT) 温育 / 振荡 2 小时。小心移除临时板密封物以避免溅洒。 将板置于磁体 (Dynal MPC ® -96S) 上，等待 2 分钟让 MP 沉降（确保所有 MP 都被磁体聚积为沉淀颗粒），然后吸出上清液 (MP 保持可

见）。 在 MP 被固定时，向每孔添加 250μL 洗涤缓冲液。 等待 2 分钟（MP 保持聚积）并吸出缓冲液。

[0818] 检测

[0819] 将板从磁体移走并向各孔添加 20μL 的 VEGF 检测试剂。 用临时封口物将板密封。 在离心机中以高达 100×g 进行脉冲振荡。 将板从离心机移走，并在室温温育 / 振荡 1 小时。 除去板封口物并将板置于磁体上。 等待 2 分钟并吸出上清液。 在 MP 被磁化 / 聚积时，分 3 次（3×）添加 250μL 洗涤缓冲液然后除去。 在每次缓冲液添加后暂停 2 分钟。 勿使 MP 悬浮或从磁体移走。 将板从磁体移走并向各孔添加 250μL 洗涤缓冲液。 将板振荡 10 秒以使 MP 重悬。 将各孔的内容物转移至新的 96 孔 PPP。 将新 96 孔板置于磁体上并等待 2 分钟以让 MP 聚积 / 沉降。 除去洗涤缓冲液。 将板从磁体移除，添加 250μL 洗涤缓冲液并振荡 10 秒。 将板加载于磁体上，等待 2 分钟，然后吸出缓冲液。 重复该循环，磁化的 MP 应可见。

[0820] 洗脱

[0821] 将板从磁体移走并添加 20μL/ 孔的洗脱缓冲液。 用临时封口物将板密封并在离心机中以高达 100×g 进行脉冲振荡。 在室温温育 / 振荡 30 分钟。 单独使用离心机适配柱将 384 孔过滤板置于 384 孔聚丙烯板上，以制成过滤板 - 底板。 从 96 孔板除去封口物，在磁体上使 MP 聚积 2 分钟，然后将样本转移至 834 孔过滤板 - 底板。 用临时板封口物覆盖过滤板 - 底板的顶部，并将板置于离心机内。 在室温于 850×g 旋转板 1 分钟。除去过滤板并弃用，用可穿孔（永久性）板封口物 (Nunc，235306) 覆盖测试板。 为保证良好密封，使用板密封辊 (VWR#60941-118)。 将完成的测试板加载于 Erenna 免疫测试系统上。

[0822] 人 VEGF 快速测试指南

[0823] 1. 根据指引制备所有试剂、标准曲线和样品。

[0824] 2. 向 96 孔聚丙烯板的各孔内添加 100μL 捕获试剂，接着添加 100μL 标准物 / 样品。

[0825] 3. 覆盖并在室温温育 / 振荡 2 小时。

[0826] 4. 除去覆盖物，将板置于磁体上，让 MP 沉降 / 聚积 2 分钟并除去上清液。

[0827] 5. 当板置于磁体上时，添加 250μL 洗涤缓冲液。 等待 2 分钟并除去缓冲液。

[0828] 6. 从磁体移走，添加 20μL VEGF 检测试剂 / 孔。 在 100×g 脉冲离心。

[0829] 7. 覆盖并在室温温育 / 振荡 1 小时。

[0830] 8. 将板置于磁体上并等待 2 分钟让 MP 聚积。 除去上清液。

[0831] 9. 在 MP 磁性聚积于磁体附近时，分 3 次（3×）添加 250μL 洗涤缓冲液然后除去。 在每次循环期间在吸出缓冲液前等待 2 分钟。

[0832] 10. 从磁体移除，添加 250μL 洗涤缓冲液并将板振荡 10 秒以使 MP 重悬。 将全部内容物转移至新的 96 孔板中。

[0833] 11. 将板置于磁体上，等待 2 分钟。 除去上清液。

[0834] 12. 从磁体移除，添加 250μL 洗涤缓冲液并将板振荡 10 秒。

[0835] 13. 分别重复步骤 11 和 12。

[0836] 14. 从磁体移除，并向各孔添加 20μL 洗脱缓冲液。 在 100×g 脉冲离心。

[0837] 15. 覆盖并在室温温育 / 振荡 30 分钟。

[0838] 16. 将过滤板置于 384 孔板（测试板）上方。

[0839] 17. 将 96 孔板的内容物转移至 384 孔过滤板 / 测试板组合。

[0840] 18. 覆盖过滤板组合，在 850×g 离心 1 分钟。

[0841] 19. 除去顶部过滤板并弃用。 用可穿孔板密封覆盖物将 384 孔板覆盖。

[0842] 20. 将板加载至 Erenna 系统。

[0843] 其它样品信息

[0844] 该测试可用于测试各种类型血浆和血清。

[0845] 性能特性

[0846] 典型标准曲线

[0847] 出于信息性目的提供了表 26 所示的标准曲线。 应对所测试的每组样品都生成标准曲线。

[0848] 表 26. 标准曲线

[0849]

Expected hVEGF [pg/ml]	DE mean	std dev	cv	EP mean	std dev	cv	TP mean	std dev	cv
0.0	153	18	12%	17199	2170	13%	6615461	28222	0%
0.6	418	12	3%	41438	3697	9%	6663194	13673	0%
1.2	636	8	1%	59525	2384	4%	6692487	124775	2%
2.4	1153	76	7%	112940	13057	12%	6842728	106599	2%
4.8	1885	192	10%	183411	16850	9%	6974526	119540	2%
9.7	3263	212	6%	366427	18106	5%	7541609	60299	1%
19.5	5552	112	2%	778196	35582	5%	8686751	29150	0%
39.0	7342	213	3%	1323456	45408	3%	10765907	264979	2%
78.3	8803	258	3%	2168907	90905	4%	14280963	82371	1%
156.3	9371	170	2%	3233333	71024	2%	22666397	1186338	5%
312.5	9683	179	2%	4813765	103021	2%	37355527	1599907	4%
625.0	9691	268	3%	6064170	88983	1%	63385314	816036	1%
1,250.0	9607	11	0%	7597939	35178	0%	107624478	4993201	5%
2,500.0	9203	149	2%	8444198	467406	6%	168143795	7431591	4%

[0850] 图例：检测的事件（DE），事件光子（EP），总光子（TP）

[0851] 实施例 17. 用于定量确定血浆和细胞裂解物中的小鼠 VEGF 的免疫测试试剂盒

[0852] Erenna™ 小鼠 VEGF 免疫测试使用定量荧光夹心免疫测试技术来测定小鼠血浆和细胞裂解物中的血管内皮生长因子（VEGF）。对小鼠 VEGF 特异的捕获抗体已被预先涂布在顺磁微粒（MP）上。 使用者将 MP、标准物和样品用移液管加入未经涂布的微板孔内。在温育期间，样品中存在的 VEGF 与经涂布的 MP 上的捕获抗体结合。 在后续的缓冲液交换和洗涤步骤中将未结合的 VEGF 分子洗去。 向各孔添加荧光标记染料检测抗体。 该检测抗体会识别已被捕获在 MP 上的 VEGF 并与之结合。 在后续洗涤步骤中，MP 被转移至干净板。 然后添加洗脱缓冲液并温育。 洗脱缓冲液使结合的蛋白夹心物从 MP 表面解离。 荧光抗体此时在板孔内自由漂浮。 在转移至最终微孔板期间将这些抗体分离除去，并将板加载至对荧光分子计数的 Erenna 系统中。 所计得的荧光标记的检测抗体的数目与捕获时样品中存在的 VEGF 的量直接成正比。 将未知样品中的 VEGF 的量对标准曲线插值。

[0853] 提供的试剂

[0854] 表 27. 试剂数据

[0855]

项目编号	说明	运输条件	储存条件	组成部分编号
8.	小鼠 VEGF 标准物稀释剂	带冰袋	2℃-8℃	02-0207-00
9.	小鼠 VEGF 捕获试剂	带冰袋	2℃-8℃	02-0201-00
10.	小鼠 VEGF 检测试剂	带冰袋	2℃-8℃	02-0205-00
11.	Erenna™ VEGF 小鼠免疫测试试剂盒说明书	无	常温	
12.	小鼠 VEGF 标准物 (冷冻，在单独的盒中运送)	置于干冰上	≤-70℃	02-0200-00
13.	10×洗涤缓冲液	带冰袋	2℃-8℃	02-0179-00
14.	洗脱缓冲液	带冰袋	2℃-8℃	02-0002-02

[0856] 储存说明和稳定性

[0857] Erenna VEGF 试剂盒应储存于 2℃ -8℃。 标准物在单独容器中在干冰上运送，且应储存于 ≤-70℃。 重要的是标准物在试剂盒到达时保持冷冻。 仅在组分被正确储存并且每个组分使用一次的情况下才能保证试剂盒组分的保质期。 组分以合适的保质期标明。

[0858] 额外 / 其它供应商

[0859] 表 28. 消耗品和供应商

[0860]

项目编号	说明	MFR 供应商	组成部分编号	产品用途	包装详情
1.	Erenna™ 10×系统缓冲液	Singulex	02-0111-00, 02-0111-01	系统(分析)缓冲液，用于运行 Erenna 系统的流体	1L (10L 混合) 2L (20L 混合)
2.	12 通道移液枪用贮存器	VWR	80092-466	转移试剂	10/包
3.	96 孔 V 底 PP 板, 500 µL	Axygen	P-96-450V-C 或 P-96-450V-C-S	额外测试板，稀释	10 板/件，5 件/箱
4.	96 孔深孔 PP 板(2.2 mL、1.64 mL 或 1.09 mL)	Axygen	P-2ML-SQ-C, P-DW-20-C 或 P-DW-11-C	制备标准曲线(选择尺寸)	可变
5.	384 孔圆底 PP, 120 µL	Nunc	264573	接收器/分析板	20/包或 120/箱
6.	AcroPrep™ 384-过滤板，100 µL，用于样品制备和检测	Pall	5070	从测试除去 MP	10/包
7.	高级可穿孔密封带，聚乙烯	Nunc	235306	将分析板永久密封，用于 Erenna 运行前	100 件/包，100 包/箱
8.	AxySeal—PCRSP 板封口膜系列	Axygen	PCR-SP	在温育/混合/储存期间密封板	100 张膜/箱

[0861] 微粒部件和供应商

[0862] 表 29. 微粒硬件

[0863]

项目编号	说明	MFR 供应商	组成部分编号	产品用途	包装详情
1.	Dynal MPC® - 96S	Dynal™	120.27	稀土磁体，在洗涤期间捕获MP	1板
2.	微孔板洗涤站	---	---	在捕获至磁体上之后洗涤MP	---
3.	带板转子的离心机	---	---	在> 3000 RPM通过过滤板除去MP	1
4.	离心机适配器卡圈	Pall	5225	使384孔过滤板与384孔测试板之间适配	2/包
5.	真空泵	Welch	2511B-01	将系统缓冲液除气	1
6.	微孔板保温箱/振荡器	Boekel Scientific	# 130000，Jitterbug™	温育板	1
7.	板密封辊，VWR板辊，膜 + 箔 CS1#	VWR	60941-118	固定板密封物 永久板密封物	1

[0864] 其它有用供给（未指定）

[0865] • 去离子水或蒸馏水

[0866] • 能转移或添加 20μL、100μL 和 250μL 的多通道移液枪

[0867] • 微离心管

[0868] • 微型离心机

[0869] • 250mL 容器

[0870] • 250mL 量筒

[0871] 注意事项

[0872] 保持谨慎，在操作任何生物样品时穿着保护性衣服和手套。 该试剂盒的组分含有约 0.1%叠氮化钠作为防腐剂。 叠氮化钠在与酸或金属混合时有毒并且是危险化合物。含叠氮化钠的溶液应该正确地处理。

[0873] 出于测试的高灵敏度的技术建议

[0874] 将实验台和移液枪在使用前用 70%异丙醇擦拭。

[0875] 在开瓶前将浓缩标准物和初始标准物稀释液快速旋转。

[0876] 使用无菌移液枪头和试剂托盘以帮助避免交叉污染。

[0877] 在转移浓缩标准物时使用过滤器头。

[0878] 推荐使用 96 孔 1mL 聚丙烯稀释板以制备标准物和样品。

[0879] 推荐从稀释板转移每个标准物点的 3 个复制样，再转移至 96 孔 VEGF 测试板

中。

[0880] 在每次转移前将枪尖预先润湿（在板孔内吸入并释放）两次。

[0881] 试剂制备

[0882] 将所有试剂在使用前升温至室温。 如下制备 1× 洗涤缓冲液（从 10× 洗涤缓冲液）：将一瓶 25mL 的 10× 洗涤缓冲液倒入 250mL 容器内；添加 225mL 去离子水；通过温和翻转以充分混合。 在使用前，通过旋转器翻转样品管来将 MP 重悬，以确保 MP 在管内均匀分布。

[0883] 测试制备

[0884] 标准物——初始标准物稀释指南

[0885] 在打开标准物管前将管在微型离心机中涡旋和快速旋转。 在打开该浓缩标准物管时应小心，以避免损失材料或者对样本或板的气溶胶污染。 VEGF 标准物的浓度可参考标准物分析证书。 用标准物稀释剂将储备液稀释至 10ng/mL。

[0886] 标准曲线

[0887] 在 96 孔 1ml 深稀释板上的一列制备标准曲线。 进行 1 ： 2 系列稀释以获得 4000pg/ml ～ 3.9pg/ml 的曲线。 以三等分试样运行标准物。

[0888] 样品制备

[0889] 在即将使用前，将血浆样品在 15,800×g 离心 10 分钟。 小心进行移液，避开颗粒物；在脂层之下缓慢吸入。 避免反复的冷冻 - 融化循环。 向 96 孔板添加样品以便于转移。 在即将使用前，应将裂解物在 4,600×g 离心 5 分钟。 小心移取上清液。 避免冷冻 - 融化循环。 在加载至测试之前，将裂解物在标准稀释剂中稀释至少 10 倍。

[0890] 小鼠 VEGF 测试程序

[0891] 测试设置

[0892] 根据试剂盒和主要试剂包装插页中包括的说明书进行试剂制备。 如上所述制备标准曲线和样品。

[0893] 靶标捕获

[0894] 在将微粒 (MP) 重悬后，将 50μL/ 孔的 VEGF 捕获试剂添加至 96 孔聚丙烯板 (PPP)。 向 96 孔 PPP 移取 10μL/ 孔的标准物 / 样品。 将板脉冲旋转至高达 100×g 以确保所有样品都在 MP 混合物中。 用临时板密封物 (AxySeal，PCRSP 板封口膜）或等同物将板密封。 在培养基环境下于室温 (RT) 温育 / 振荡 2 小时。 小心移除临时板密封物以避免溅洒。 将板置于磁体 (Dynal MPC ® -96S) 上，等待 2 分钟让 MP 沉降（确保所有 MP 都被磁体聚积为沉淀颗粒），然后吸出上清液 (MP 保持可见）。 在 MP 被固定时，添加 250μL 洗涤缓冲液。 等待 2 分钟 (MP 保持聚积）并吸出缓冲液。

[0895] 检测

[0896] 将板从磁体移走并向各孔添加 20μL 的 VEGF 检测试剂。 用临时封口物将板密封。 在离心机中以高达 100×g 进行脉冲振荡。 将板从离心机移走，并在室温温育 / 振荡 2 小时。 除去板封口物并将板置于磁体上。 等待 2 分钟并吸出上清液。 在 MP 被磁化 / 聚积时，分 3 次 (3×) 添加 250μL 洗涤缓冲液然后除去。 在每次缓冲液添加后暂停 2 分钟。 勿使 MP 悬浮或从磁体移走。 将板从磁体移走并向各孔添加 250μL 洗涤缓冲液。 将板振荡 10 秒以使 MP 重悬。 将各孔的内容物转移至新的 96 孔 PPP。 将新 96 孔

板置于磁体上并等待 2 分钟以让 MP 聚积 / 沉降。 除去洗涤缓冲液。 将板从磁体移除，添加 250 μ L 洗涤缓冲液并振荡 10 秒。 将板加载于磁体上，等待 2 分钟，然后吸出缓冲液。 重复该循环，磁化的 MP 应可见。

[0897] 洗脱

[0898] 将板从磁体移走并添加 20 μ L/ 孔的洗脱缓冲液。 用临时封口物将板密封并在离心机中以高达 100×g 进行脉冲振荡。 在室温温育 / 振荡 30 分钟。 单独将 384 孔过滤板置于 384 孔 PPP 测试板上，以制成过滤板 - 底板。 从 96 孔板除去封口物，然后将样本转移至 834 孔过滤板 - 底板。 用临时板封口物覆盖过滤板 - 底板的顶部，并将板置于离心机内。 在室温于 850×g 旋转板 1 分钟。 除去过滤板并弃用，用可穿孔（永久性）板封口物 (Nunc，235306) 覆盖测试板。 为保证良好密封，使用板密封辊 (VWR#60941-118)。将完成的测试板加载于 Erenna 免疫测试系统上。

[0899] 小鼠 VEGF 快速测试指南

[0900] 1. 根据指引制备所有试剂、标准曲线和样品。

[0901] 2. 向 96 孔聚丙烯板的各孔内添加 50 μ L 捕获试剂，接着添加 10 μ L 标准物 / 样品。

[0902] 3. 将板脉冲旋转至高达 100×g 以确保所有样品都在 MP 混合物中。

[0903] 4. 覆盖并在室温温育 / 振荡 2 小时。

[0904] 5. 除去覆盖物，将板置于磁体上，让 MP 沉降 / 聚积 2 分钟并除去上清液。

[0905] 6. 当板置于磁体上时，添加 250 μ L 洗涤缓冲液。 等待 2 分钟并除去缓冲液。

[0906] 7. 从磁体移走，添加 20 μ L VEGF 检测试剂 / 孔。 在 1000RPM 脉冲离心。

[0907] 8. 覆盖并在室温温育 / 振荡 2 小时。

[0908] 9. 将板置于磁体上并等待 2 分钟让 MP 聚积。 除去上清液。

[0909] 10. 在 MP 磁性聚积于磁体附近时，分 3 次 (3×) 添加 250 μ L 洗涤缓冲液然后除去。 在每次循环期间在吸出缓冲液前等待 2 分钟。

[0910] 11. 从磁体移除，添加 250 μ L 洗涤缓冲液并将板振荡 10 秒以使 MP 重悬。 将全部内容物转移至新的 96 孔板中。

[0911] 12. 将板置于磁体上，等待 2 分钟。 除去上清液。

[0912] 13. 从磁体移除，添加 250 μ L 洗涤缓冲液并将板振荡 10 秒。

[0913] 14. 分别重复步骤 11、12 和 13。

[0914] 15. 从磁体移除，并向各孔添加 20 μ L 洗脱缓冲液。 在 100×g 脉冲离心。

[0915] 16. 覆盖并在室温温育 / 振荡 30 分钟。

[0916] 17. 将过滤板置于 384 孔板（测试板）上方。

[0917] 18. 将 96 孔板的内容物转移至 384 孔过滤板 / 测试板组合。

[0918] 19. 覆盖过滤板组合，在 850×g 离心 1 分钟。

[0919] 20. 除去顶部过滤板并弃用。 用可穿孔板密封覆盖物将 384 孔板覆盖。

[0920] 21. 将板加载至 Erenna 系统。

[0921] 其它样品信息

[0922] 该测试可用于测试各种类型血浆和细胞裂解物。

[0923] 性能特性

[0924] 典型标准曲线

[0925] 出于信息性目的提供了表 30 所示的标准曲线。 应对所测试的每组样品都生成标准曲线。

[0926] 表 30. 标准曲线

[0927]

Expected mVEGF [pg/ml]	DE mean	std dev	cv	EP mean	std dev	cv	TP mean	std dev	cv
0.0	168	28	17%	15207	2114	14%	6163670	87902	1%
3.9	177	27	15%	15807	1406	9%	6239587	98719	2%
7.8	242	26	11%	21854	2342	11%	6360689	80386	1%
15.6	302	11	4%	28145	1949	7%	6429962	44791	1%
31.3	418	42	10%	38805	3818	10%	6370440	101262	2%
62.5	652	6	1%	62375	2971	5%	6533290	50260	1%
125.0	1112	127	11%	118599	15256	13%	7141792	531505	7%
250.0	2104	123	6%	225687	13232	6%	7071139	80642	1%
500.0	3871	865	22%	491548	94923	19%	8753982	1946419	22%
1000.0	6693	399	6%	1078600	94079	9%	9319958	293189	3%
2000.0	9292	298	3%	2142047	11297	1%	12032097	166349	1%
4000.0	10193	58	1%	3719950	81130	2%	18770298	660699	4%

[0928] 图例：检测的事件（DE），事件光子（EP），总光子（TP）

[0929] 实施例 18.VEGF 的高灵敏检测

[0930] 针对血浆中不同浓度的 VEGF 的系统灵敏度如表 31 所示。 数据如表 25A 中所图示。

[0931] 表 31

[0932] VEGF-A 曲线拟合数据

[0933]

预期 hVEGF[pg/ml]	测定的 hVEGF[pg/ml]	标准偏差	CV	回收率
0.00	ND	-	-	-
0.06	0.08	0.03	41%	127%
0.12	0.12	0.02	14%	104%
0.24	0.26	0.03	10%	107%
0.48	0.52	0.04	8%	108%
0.98	0.96	0.19	20%	97%
1.95	1.86	0.09	5%	96%

3.90	3.96	0.15%	4%	101%
8	9	1.27	15%	111%
16	17	2.09	12%	109%
31	31	2.96	10%	99%
63	62	1.50	2%	99%
125	123	3.79	3%	98%
250	227	11.61	5%	91%
500	500	18.06	4%	100%
1000	1175	191.67	16%	118%

[0934]

[0935] 在 VEGF-A 标准曲线的下端，所检测的 VEGF-A 的浓度如表 32 所示。

[0936] 表 32

[0937] 下端 VEGF-A 标准曲线数据

[0938]

预期 hVEGF [pg/ml]	**平 均 DE**	**标 准 偏 差**	**CV**	***N***
0.00	99	11.4	11%	*3*
0.06	161	29.3	18%	*3*
0.12	207	17.3	8%	*3*
0.24	335	26.6	8%	*3*
0.48	595	43.5	7%	*3*
0.98	1006	152.6	15%	*3*
1.95	1771	52.9	3%	*3*
3.90	3167	101.7	3%	*3*
7.80	5311	476.3	9%	*3*
15.60	*7591*	*362.1*	*5%*	*3*

[0939] 该数据对应于图 25B 所示的图。

[0940] 实施例 19.VEGF 的测定值与预期值的关系

[0941] 图 26 显示了在 3 种不同测试格式中的 VEGF 的测定值与预期值的关系。 在一组普通的系列稀释的校准物组上运行使用不同固相免疫测试格式的 3 种人 VEGF 测试的标准校正曲线。 基于 MP 的 hVEGF 测试使用涂布有作为固相捕获形式的检测抗体和经荧光标

记的检测抗体的顺磁微粒。基于板的 hVEGF 测试使用 384 孔板，其中已将板孔用作为固相捕获形式的检测抗体和经荧光标记的检测抗体涂布。hVEGF HRP-ELISA 测试是来自 R&D Systems 的由 96 孔固相捕获格式组成的商购 ELISA 测试 (LoD = 31.2pg/mL)，并且使用酶促缀合的检测抗体。

[0942] 实施例 20. 血浆和细胞裂解物小体积样品中的 VEGF 检测

[0943] 比较了来自健康人和乳腺癌患者的 10μl 样品中检测到的人 VEGF 水平。显示了使用本发明的方法的检出限 (LOD) (Errena ; LOD = 3.5pg/ml) 与标准 ELISA 格式 (LOD = 31.2pg/ml) 的比较。用 Errena hVEGF-A 免疫测试对人血浆 (图 27A) 和组织 (图 27B) 样品进行测试。(图 27A) 在来自健康捐血者 (n = 24) 和患乳腺癌的受试对象 (n = 15) 的血浆样品中确定了 hVEGF-A 的循环浓度。计算了血浆 VEGF 水平的中位数范围和四分位数范围，并在健康捐血者和患乳腺癌的受试对象之间进行比较。(图 27B) 比较了来自患乳腺癌的受试对象 (n = 10) 的匹配的恶性与非恶性组织活检样品的中位数范围和四分位数范围。组织样品在手术后被指认为正常或恶性，且结果以 pg VEGF 蛋白 /mg 总蛋白 / 样品显示。采用本发明对血浆样品进行的定量包括了所有来自健康和癌症受试对象的受测样品，而使用标准 ELISA 测试进行的定量显示出较差的对健康样品的定量。与血浆的情形相似，采用本发明对组织样品进行的定量包括了所有来自健康和癌症受试对象的受测样品，而使用标准 ELISA 测试进行的定量显示出较差的对健康样品的定量。

[0944] 实施例 21.VEGF 模拟和数字组合测定

[0945] 图 28 显示了本发明的读数方法的相关性。针对 hVEGF 分析物生成标准曲线并用 Erenna 系统进行测定。显示了 3 种不同读数方法的每一种的结果 : (a) 总光子 (TP)，其类似于标准 ELISA 平板读数计数 ; (b) 检测到的事件 (DE)，其对通过询查区域的单分子作为离散事件进行计数 ; 和 (c) 使用合并了将总光子和检测到的事件的处理算法。(图 28A) 和 (图 28B) 使用平均值的两个标准偏差除以斜率从而使用每种方法 (DE 和 TP) 的结果计算 LoD。使用 4 参数曲线分析了图 28A 和图 28B 中的数据。使用线性回归分析图 28C 中的数据，显示了所得等式和相关性统计。

[0946] 实施例 22.Aβ-40 和 Aβ-42(淀粉样 β 蛋白 40 和 42) 测试

[0947] 本发明提供了 Aβ-40 和 Aβ-42 测试。用于样品中的 Aβ-40 和 Aβ-42 的体系的规格说明如表 33 所示。

[0948] 表 33

[0949] Singulex Aβ-40 和 Aβ-42 测试的规格说明

[0950]

属性	Aβ-40	*Aβ-42*
LoD	0.2 pg/ml	*0.1 pg/ml*
LLoQ	0.8 pg/ml	*0.5 pg/ml*
范围	0.2 pg/ml~100 pg/ml	*0.1 pg/ml~250 pg/ml*
人血浆中的水平: 平均值 (范围)	*8.1 pg/ml (4.9 pg/ml~11.6 pg/ml)*	*30.7 pg/ml (18.5 pg/ml~351 pg/ml)*

[0951] 与 Aβ-40 和 Aβ-42 的分析物浓度相关的由系统检测到的事件如图 29A 所示。图 29B 显示了 Aβ-42 测试的特异性和线性。

[0952] 实施例 23. 白细胞介素 1α (IL-1α) 测试

[0953] 本发明提供的测试在检测 IL-1α 时的灵敏度如表 34 所示。LoD 通常为约 0.1pg/ml 以下。 图 30A 显示了对应于表 34 所示数据的图。

[0954] 表 34

[0955] IL-1α 曲线拟合数据

[0956]

预期 IL-1α [pg/ml]	测定的 IL-1α [pg/ml]	标准偏差	CV	回收率
2000	2019	104	5%	101%
1000	976	54	6%	98%
500	516	18	4%	103%
250	256	17	7%	102%
125	120	2	2%	96%
63	63	5	7%	100%
31	31	0.5	1%	100%
16	17	3.42	21%	106%
7.8	8.4	0.40	5%	107%
3.9	3.9	0.19	5%	100%
1.95	1.94	0.06	3%	99%
0.98	0.98	0.03	3%	98%
0.49	0.5	0.08	16%	100%
0.24	0.27	0.02	9%	103%

[0957] 曲线的下端如表 35 所示，且如图 30B 所图示。

[0958] 表 35

[0959] 下端 IL-1α 标准曲线数据

[0960]

IL-1α [pg/ml]	检测到的事件	标准偏差	CV
0.98	1123	22	2%
0.49	832	46	6%
0.24	703	12	2%
0.12	628	9	1%
0.00	572	28	5%

[0961] 实施例 24. 白细胞介素 1β (IL-1β) 测试

[0962] 针对不同 IL-1β 浓度的一个实施方式的灵敏度如下表 36 所示。 LoD 通常为 0.02pg/ml 以下。 IL-1β 的预期浓度与测定或计算的浓度的关系如图 31A 所图示。

[0963] 表 36

[0964] IL-1β 曲线拟合数据

[0965]

预期 IL-1β [pg/ml]	测定的 IL-1β [pg/ml]	标准偏差	CV	回收率
2000	2019	104	5%	101%
1000	976	54	6%	98%
500	516	18	4%	103%
250	256	17	7%	102%
125	120	2	2%	96%
63	63	5	7%	100%
31	31	0.5	1%	100%
16	17	3.42	21%	106%
7.8	8.4	0.40	5%	107%
3.9	3.9	0.19	5%	100%
1.95	1.94	0.06	3%	99%

0.98	0.98	0.03	3%	98%
0.49	0.5	0.08	16%	100%
0.24	0.27	0.02	9%	103%

[0966] 下端 IL-1β 标准曲线数据如下表 37 所示。 这些值图示于图 31B 中。

[0967] 表 37

[0968] 下端 IL-1β 标准曲线数据

[0969]

IL-1β [pg/ml]	检测到的事件	标准偏差	CV
3.13	3282	19	0%
1.56	1968	93	1%
0.78	1300	56	5%
0.39	936	45	4%
0.20	745	36	5%
0.10	691	18	5%
0.05	631	48	3%
0.02	616	19	8%
0.01	583	14	3%
0.00	590	45	2%

[0970]

[0971] 实施例 25. 白细胞介素 4(IL-4) 测试

[0972] 本发明提供的 IL-4 测试的灵敏度如表 38 所示。 IL-4 的预期浓度水平与测定或计算的 IL-4 水平的关系如图 32A 所图示。

[0973] 表 38

[0974] IL-4 曲线拟合数据

[0975]

预期 IL-4[pg/ml]	测定的 IL-4[pg/ml]	标准偏差	CV	回收率
2000	2063	71	3%	103%
1000	1023	50	5%	102%
500	482	18	4%	96%
250	252	45	18%	101%
125	147	5	3%	117%
63	73	0	1%	117%
31	29	3	11%	94%
16	13	2	14%	84%
7.8	6.8	1.3	19%	87%
3.9	3.6	0.1	3%	92%
1.95	1.83	0.10	6%	94%
0.98	1.01	0.11	11%	103%
0.49	0.58	0.20	3%	118%
0.24	0.36	0.10	28%	146%

[0976] IL-4 测试以 CV ＜ 20％对低至 0.04pg/ml 的血浆 IL-4 进行定量。 在某些实施方式中， LoD 为 0.04pg/ml。 表 39 列出在下端 IL-4 标准曲线数据上的检测到的 IL-4 浓度。 图 32B 对应于表 39 中所示数据。

[0977] 表 39

[0978] 下端 IL-4 标准曲线数据

[0979]

IL-4[pg/ml]	检测到的事件	标准偏差	CV
3.91	1761	44	3%
1.95	1042	50	5%
0.98	674	46	7%
0.49	488	7	1%
0.24	392	41	11%
0.12	300	35	12%
0.00	245	8	3%

[0980] 实施例 26. 白细胞介素 6(IL-6) 测试

[0981] 本发明提供的 IL-6 测试的一个实施方式的灵敏度和准确性如表 40 所示。 IL-6 的预期浓度与由所述测试测定或计算的浓度的关系如图 33A 所图示。

[0982] 表 40

[0983] IL-6 曲线拟合数据

[0984]

预期 IL-6[pg/ml]	测定的 IL-6[pg/ml]	标准偏差	CV	回收率
100	119	32.76	28%	119%
50	49	6.99	14%	98%
25	22	2.39	11%	90%
12.5	12.8	0.57	4%	102%
6.3	6.9	1.17	17%	111%
3.1	3.2	0.21	7%	102%
1.56	1.47	0.03	2%	94%
0.78	0.73	0.04	6%	94%
0.39	0.39	0.02	5%	100%

0.20	0.21	0.02	12%	107%
0.10	0.10	0.02	18%	100%
0.05	0.06	0.01	24%	114%

[0985] 下端 IL-6 标准曲线数据如表 41 所示且如图 33B 所图示。

[0986] 表 41

[0987] 下端 IL-6 标准曲线数据

[0988]

IL-6[pg/ml]	检测到的事件	标准偏差	CV
1.56	3067	47	2%
0.78	1728	97	6%
0.39	1002	38	4%
0.20	589	58	10%
0.10	338	41	12%
0.05	247	30	12%
0.02	168	18	10%
0.01	137	6	4%
0	127	8	6%

[0989]

[0990] IL-6 测试以 CV ＜ 20％对低至 0.01pg/ml 的血浆 IL-6 进行定量。 LoD 为 0.01pg/ml 以下。 这使得能够对获自健康受试对象的人血浆中范围为 0.36pg/ml ～ 1.17pg/ml 以下的 IL-6 进行准确定量。

[0991] 实施例 27. 生物标记物测试

[0992] 根据本发明对本文所公开的各种标记物的检出限 (LOD) 进行测试。 测试结果如表 42 和 43 所示。 在表 42、43 和 44 中指出了各种标记物的应用。

[0993] 表 42. 各种生物标记物的检出限

[0994]

生物标记物	类别	指征	LoD
cTnI	心脏	坏死	0.01
proBNP	心脏	心脏技能受损	0.03
IL-1α	炎症		0.07
IL-1β	炎症	不稳定性心绞痛(UAP)	0.01
IL-6	炎症	斑块、心力衰竭(HF)、冠状动脉疾病(CAD)、心肌梗死(MI)	0.01
IL-8	炎症	UAP	0.36
IL-10	炎症	抗炎性	0.46
TNF-α	炎症	UAP、CAD、HF、充血性心力衰竭(CHF)、MI	0.01
IFN-γ	炎症	风湿性心脏病(RHD)、自身免疫	0.14
VEGF	癌症	血管生成	0.10
胰岛素	代谢	代谢综合征	12
GLP-1 (T&A)	炎症	代谢综合征	0.01

[0995] 表 43. 各种细胞因子的检出限

[0996]

生物标记物	指征	LoD
IL-1 α	炎症	0.07
IL-1β	UAP	0.01
IL-6	斑块、HF、CAD、MI	0.01
IL-8	UAP	0.36
IL-10	抗炎性	0.46
IL-17		
IL-21		
IFN-γ	RA、系统性红斑狼疮(SLE)、RHD、自身免疫	0.14
Mip1-α		
RANTES		
TNF-α	癌症、阿尔茨海默病(AD)、UAP、CAD、HF、CHF、MI	0.01
VEGF	癌症、血管生成、动脉粥样硬化、糖尿病	0.10

[0997]

[0998] 表 44. 示例性标记物指征

[0999]

测试	神经性	代谢性	肿瘤学	炎性
IL-1a				×
IL-1b				×
IL-4			×	×
IL-6		×	×	×
IL-8			×	×
IL-17	×	×		×
IFN-g				×
催产素		×		
cAMP	×	×	×	×
VEGF			×	
TNF-a			×	×
总 PSA			×	
游离 PSA			×	
Ab-40	×			
Ab-42	×			
胰岛素		×		
GLP-1		×		
肌钙蛋白 -1	×	×	×	×
TGFb-1	×	×	×	×

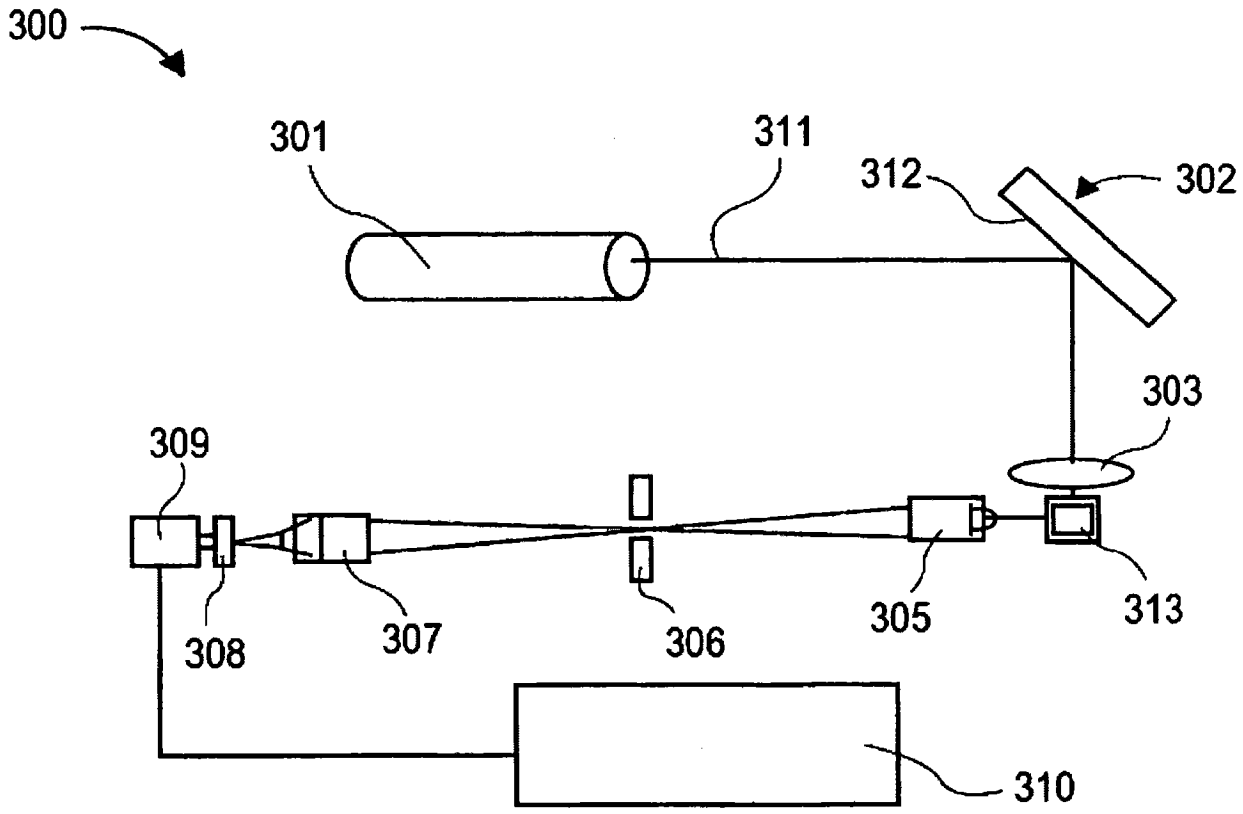


图 1A

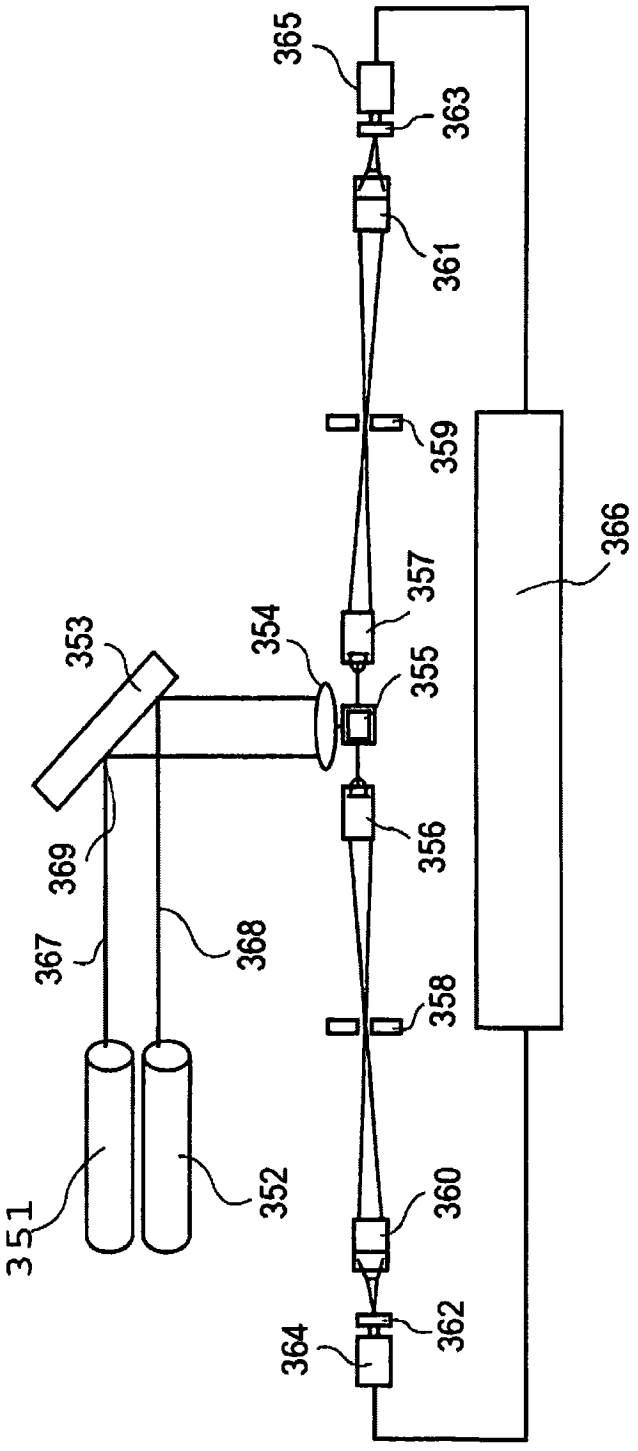

365
363
361
359
366
357
354
353
355
356
369
367
368
358
351
352
360
362
364

图 1B

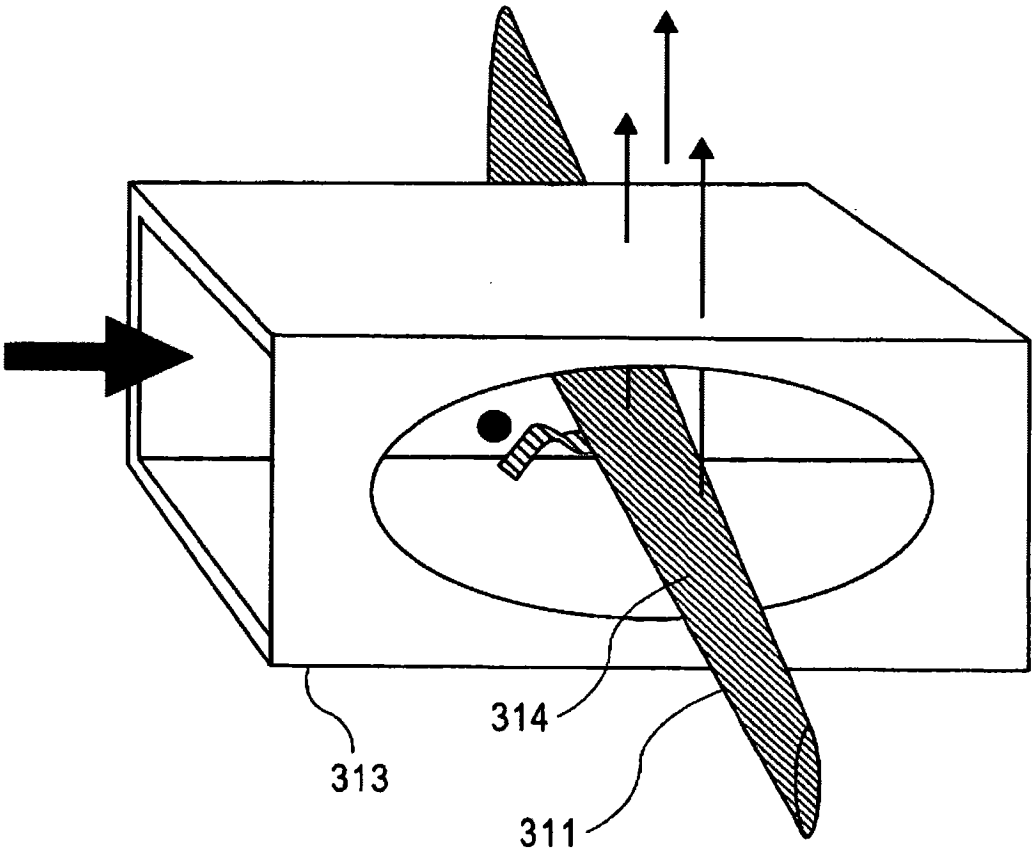


图 2A

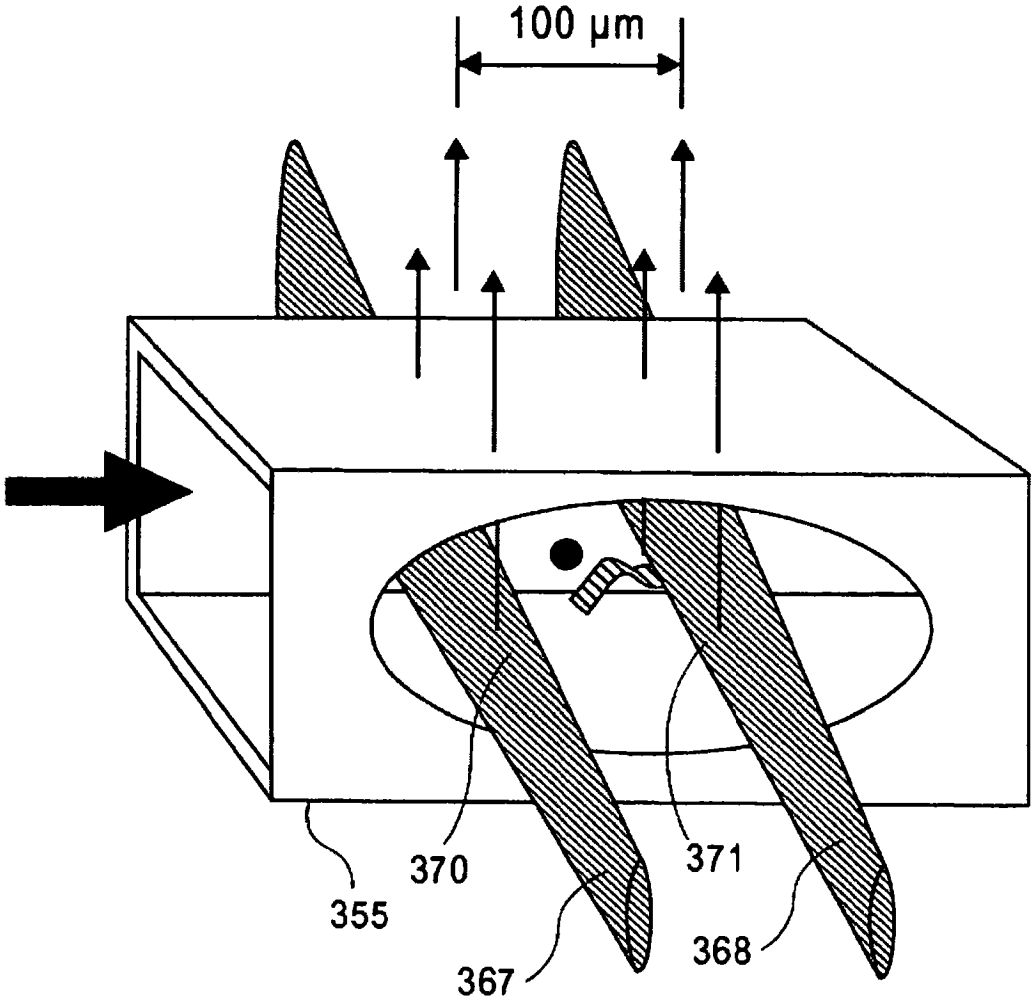


图 2B

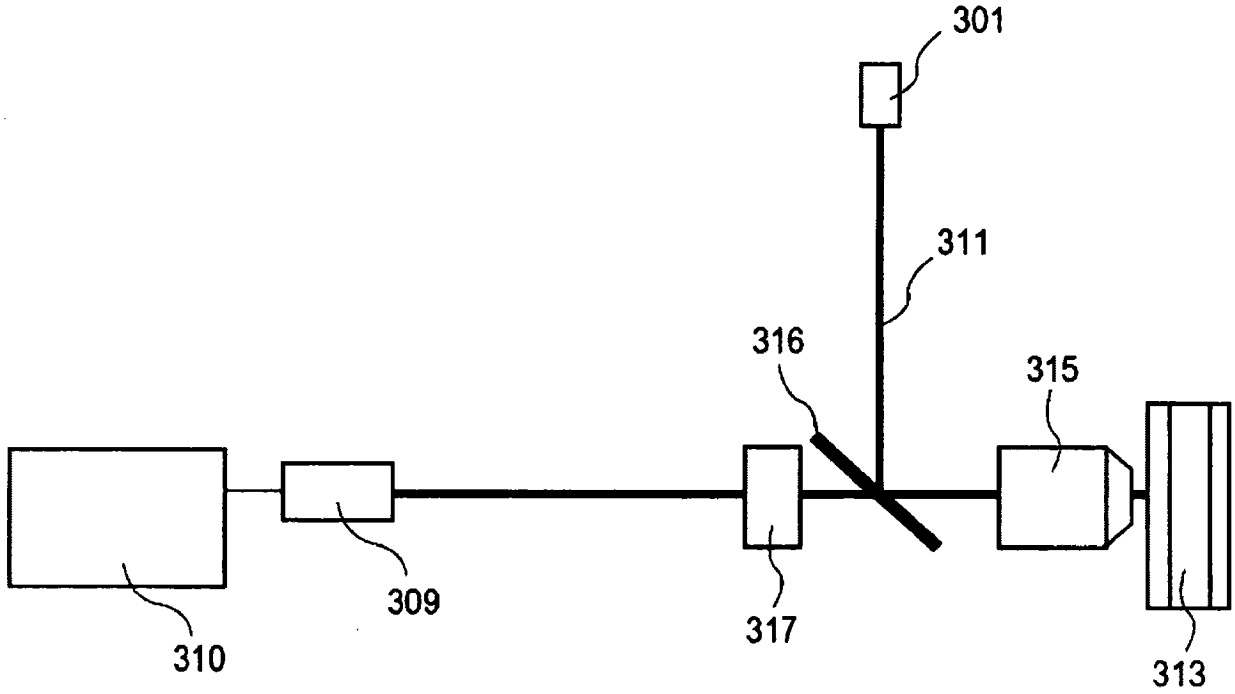

301
311
316
315
309
317
310
313

图 3A

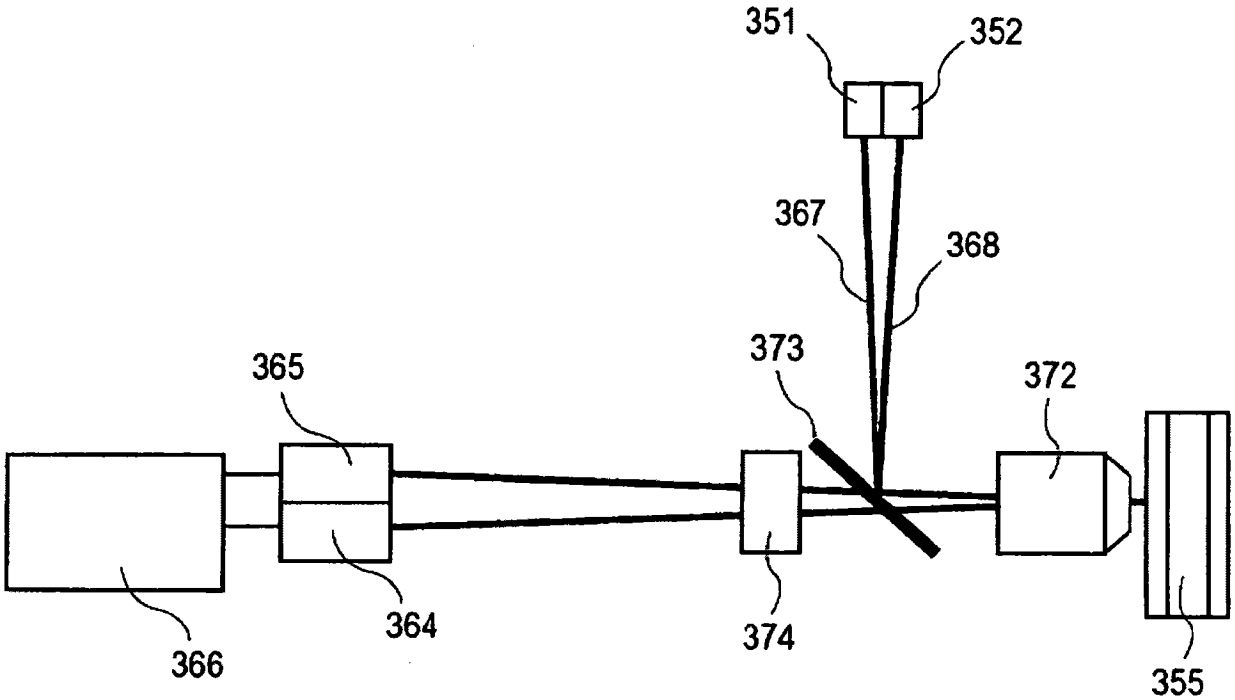

351
352
367
368
373
365
372
364
374
366
355

图 3B

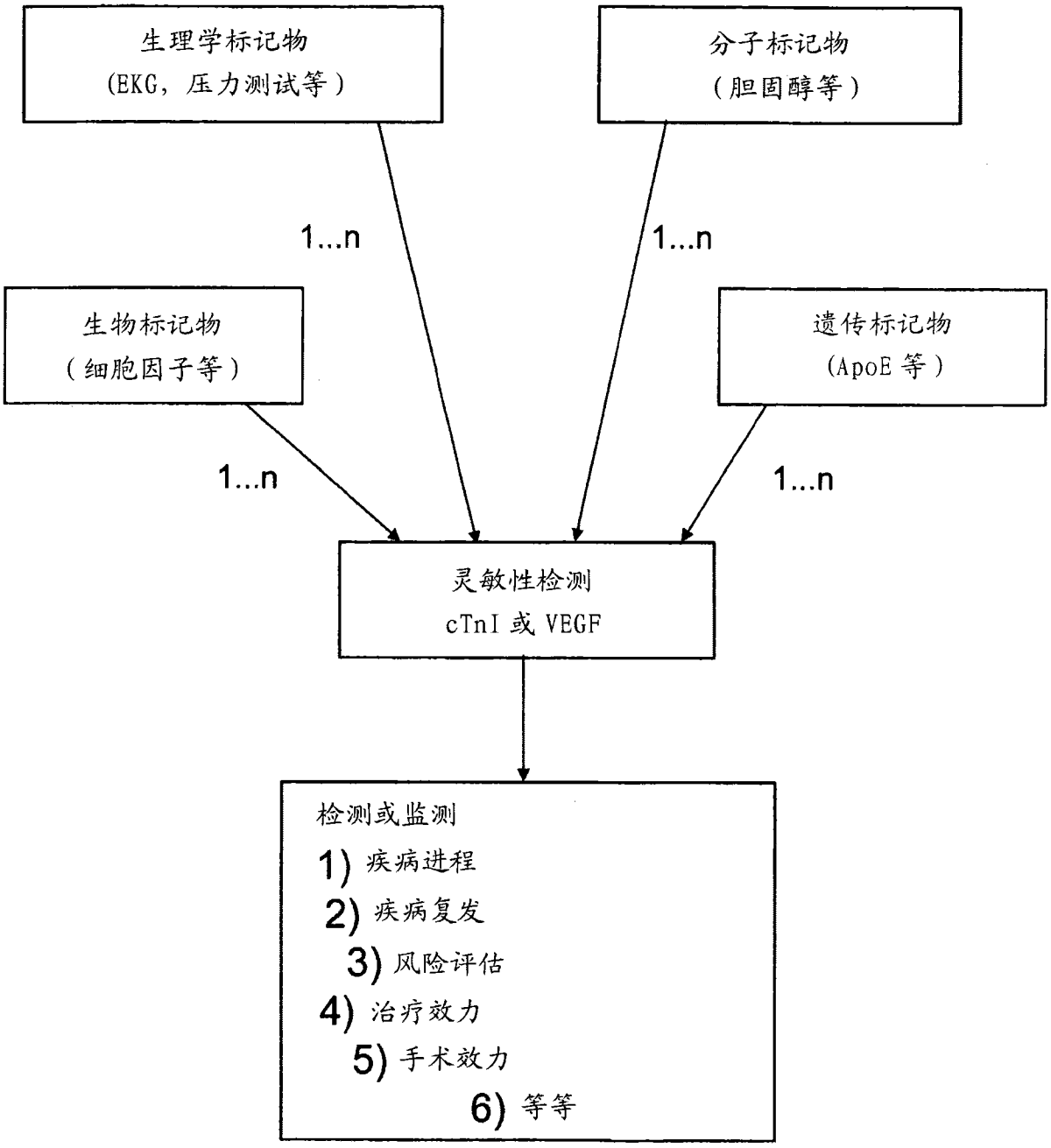

生理学标记物
(EKG，压力测试等)
分子标记物
(胆固醇等)
1...n
1...n
生物标记物
(细胞因子等)
遗传标记物
(ApoE 等)
1...n
1...n
灵敏性检测
cTnI 或 VEGF
检测或监测
1) 疾病进程
2) 疾病复发
3) 风险评估
4) 治疗效力
5) 手术效力
6) 等等

图 4

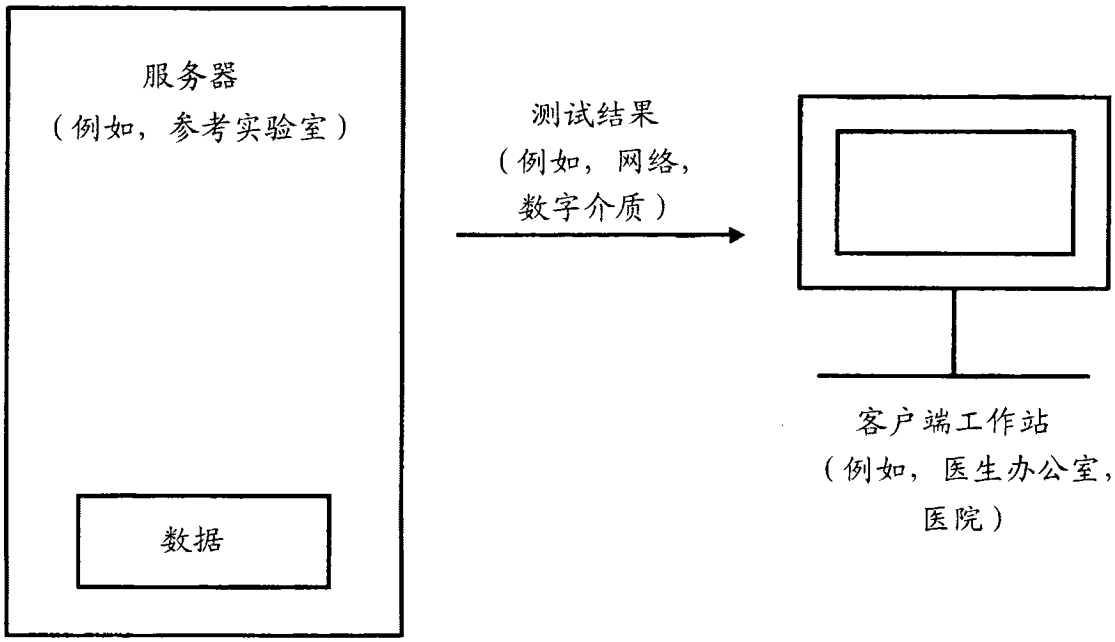


图 5

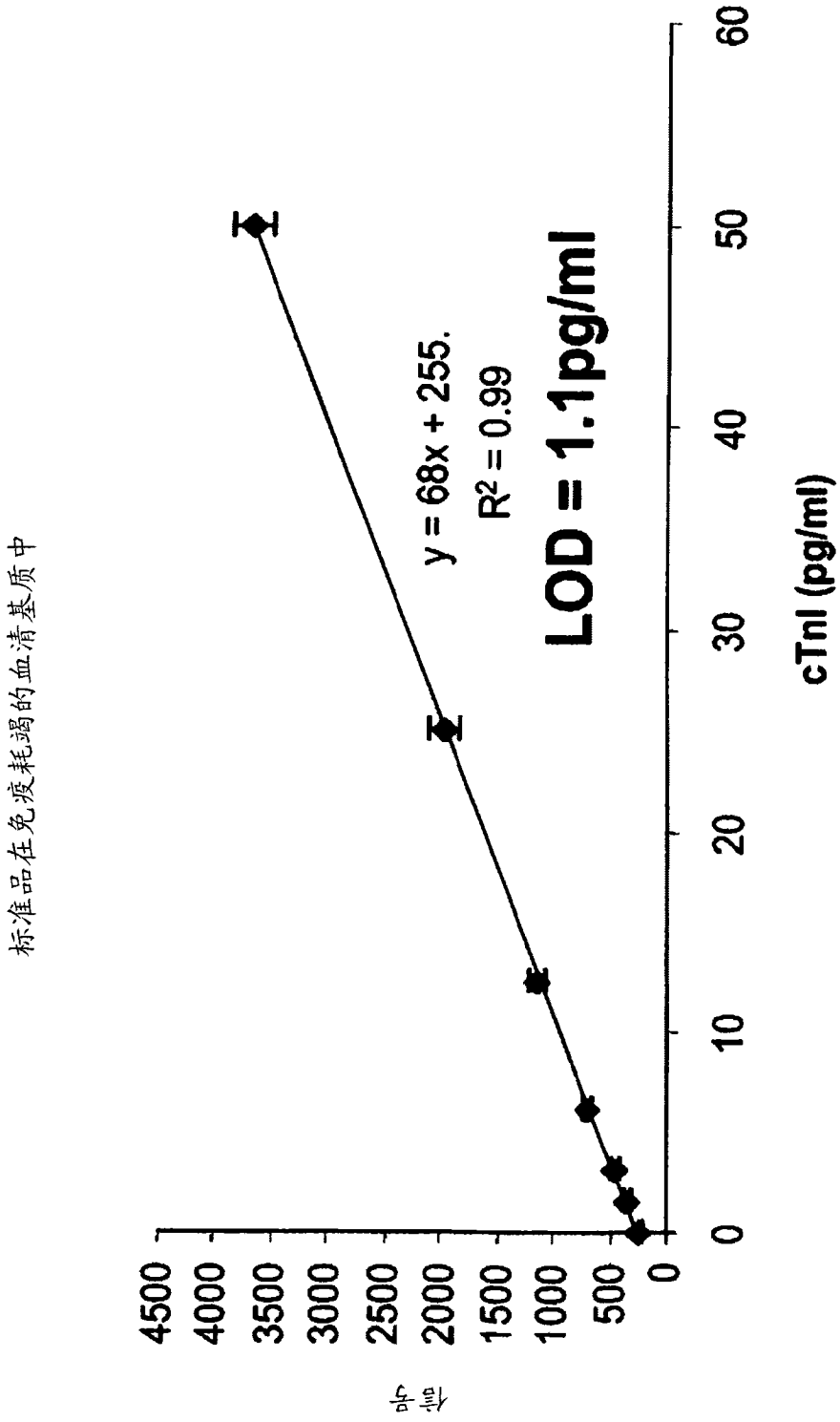

标准品在免疫耗竭的血清基质中
信号
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
cTnI (pg/ml)
y = 68x + 255.
R² = 0.99
LOD = 1.1pg/ml

图 6

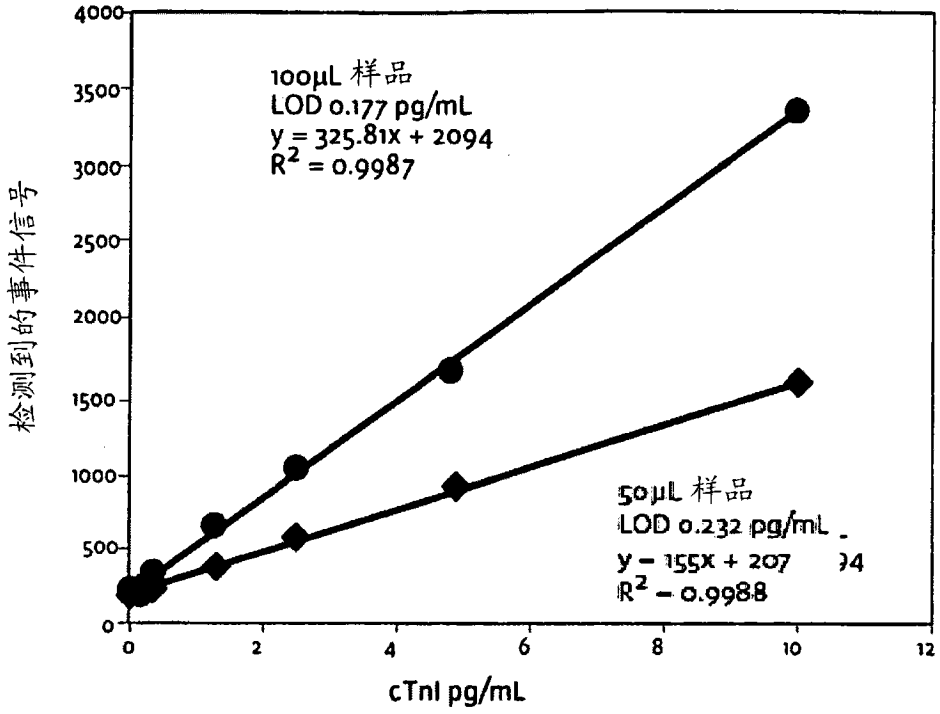

100μL 样品
LOD 0.177 pg/mL
y = 325.81x + 2094
R2 = 0.9987
50μL 样品
LOD 0.232 pg/mL
y = 155x + 207
R2 = 0.9988
检测到的事件信号
cTnI pg/mL
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
0
2
4
6
8
10
12

图 7A

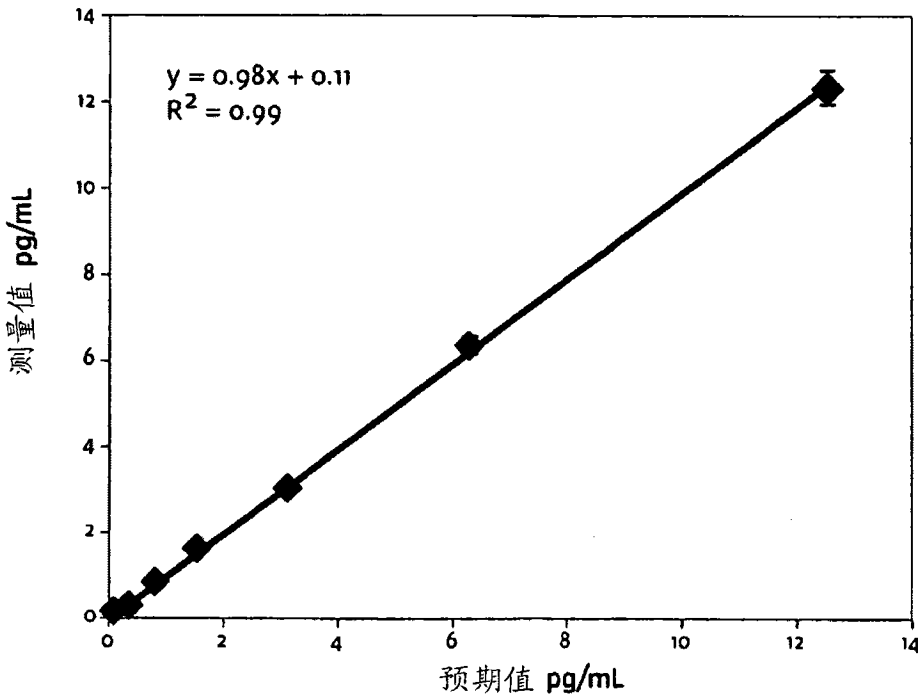

y = 0.98x + 0.11
R2 = 0.99
测量值 pg/mL
预期值 pg/mL
0
2
4
6
8
10
12
14

图 7B

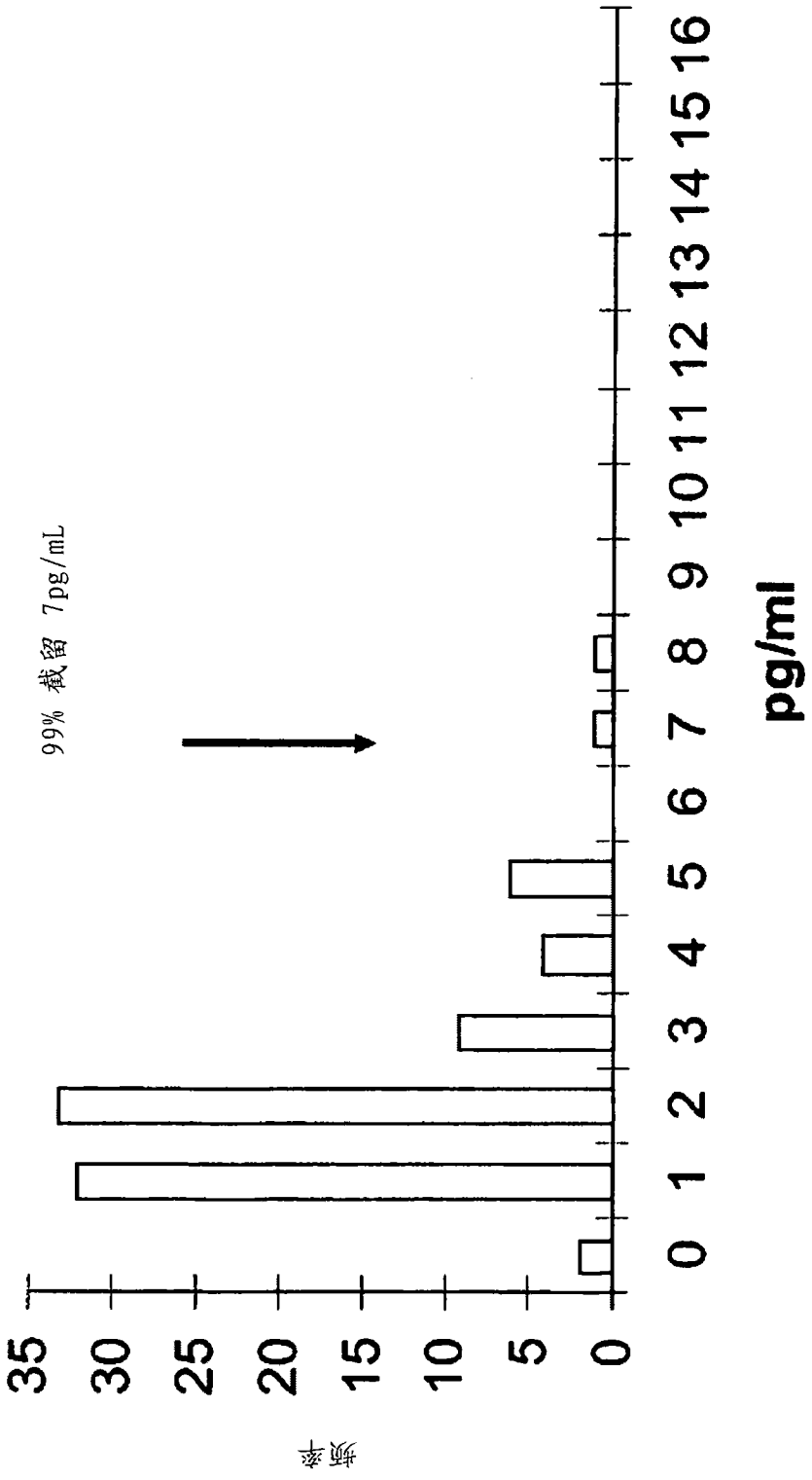

99% 截留 7pg/mL
频率
35
30
25
20
15
10
5
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
pg/ml

图 8

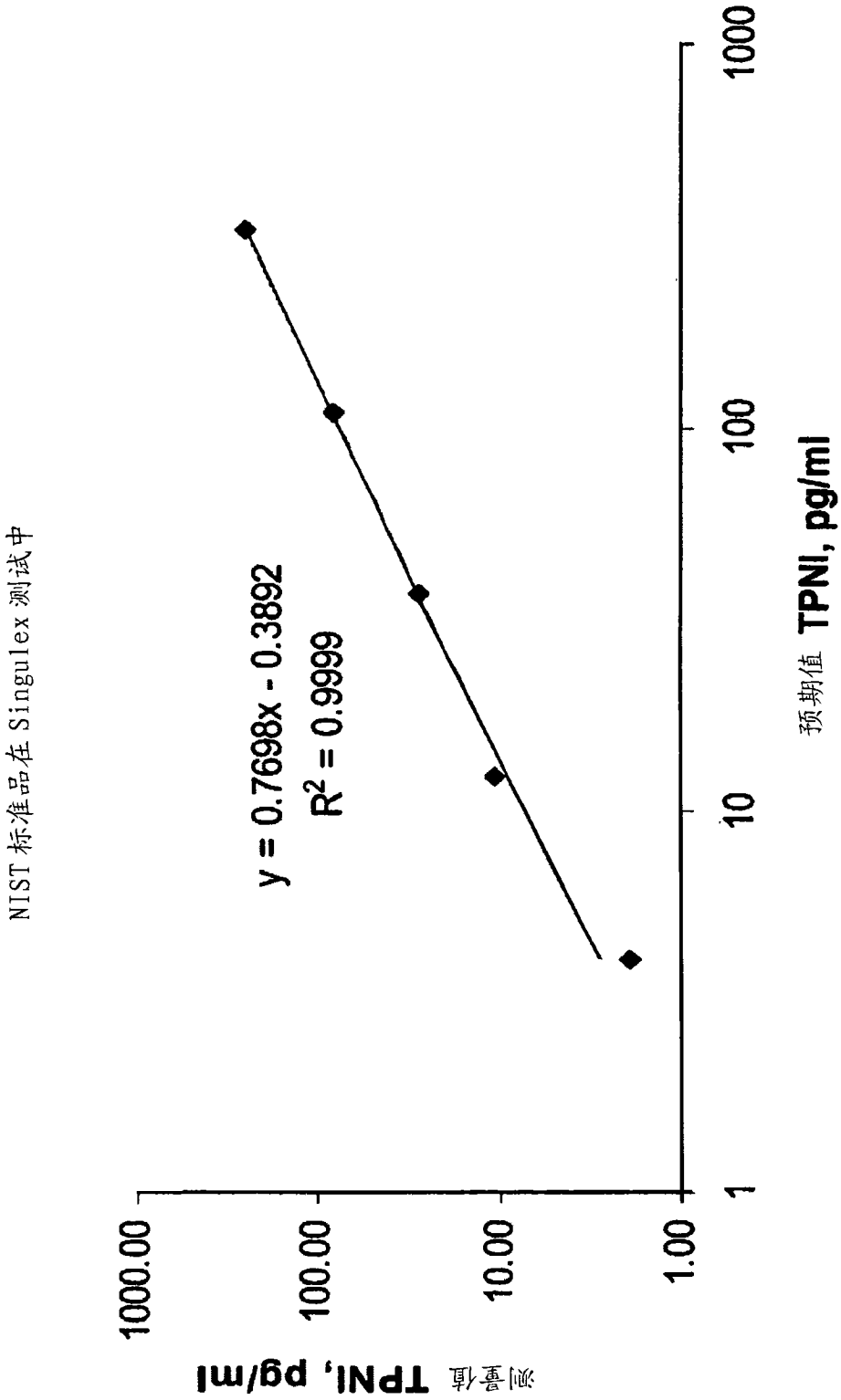

NIST 标准品在 Singulex 测试中
y = 0.7698x - 0.3892
R² = 0.9999
测量值 TPNI, pg/ml
预期值 TPNI, pg/ml
1000.00
100.00
10.00
1.00
1000
100
10
1

图 9

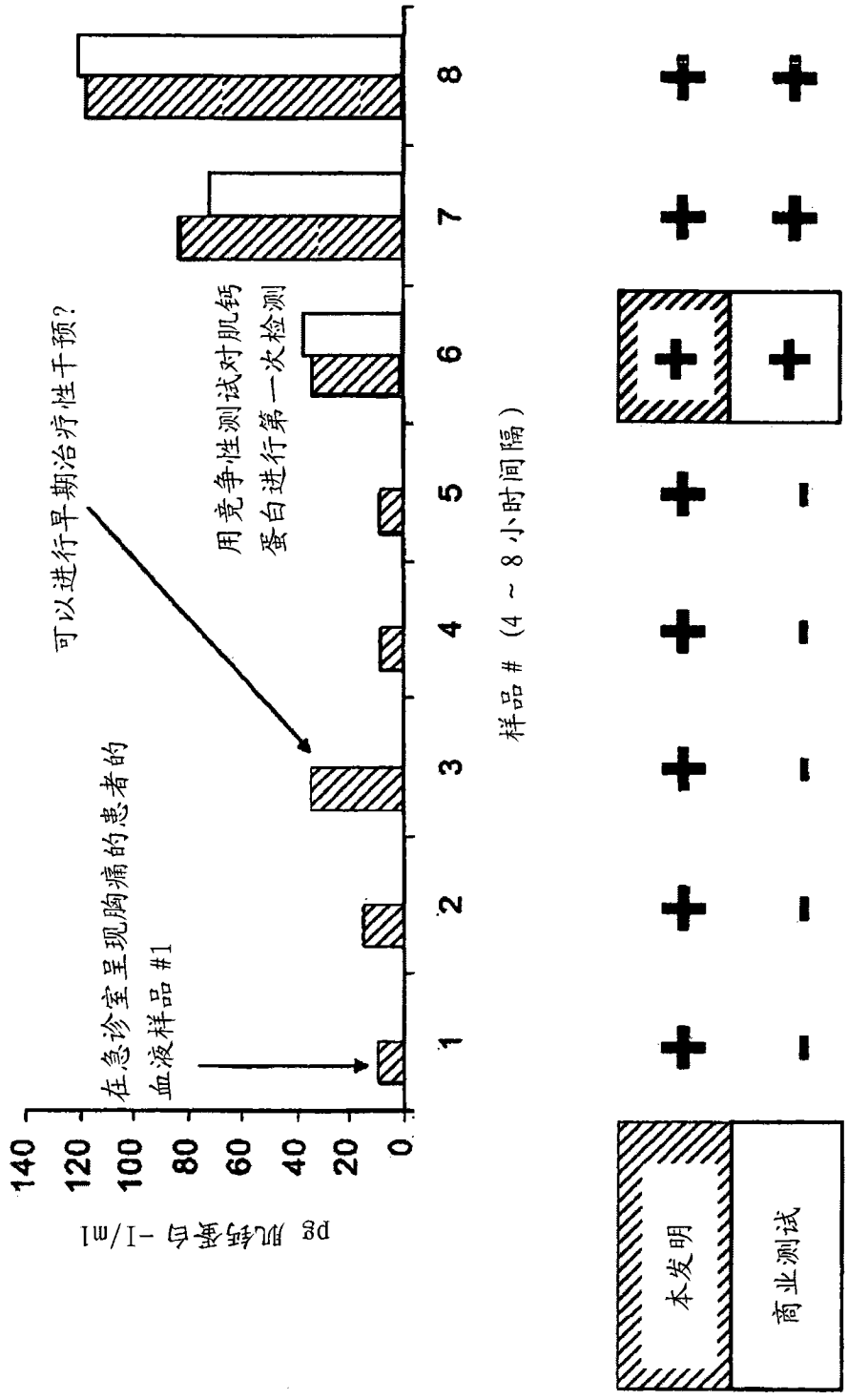

pg 肌钙蛋白 -I/ml
140
120
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8
样品 # （4 ~ 8 小时间隔）
在急诊室呈现胸痛的患者的血液样品 #1
可以进行早期治疗性干预?
用竞争性测试对肌钙蛋白进行第一次检测
本发明
商业测试

图 10

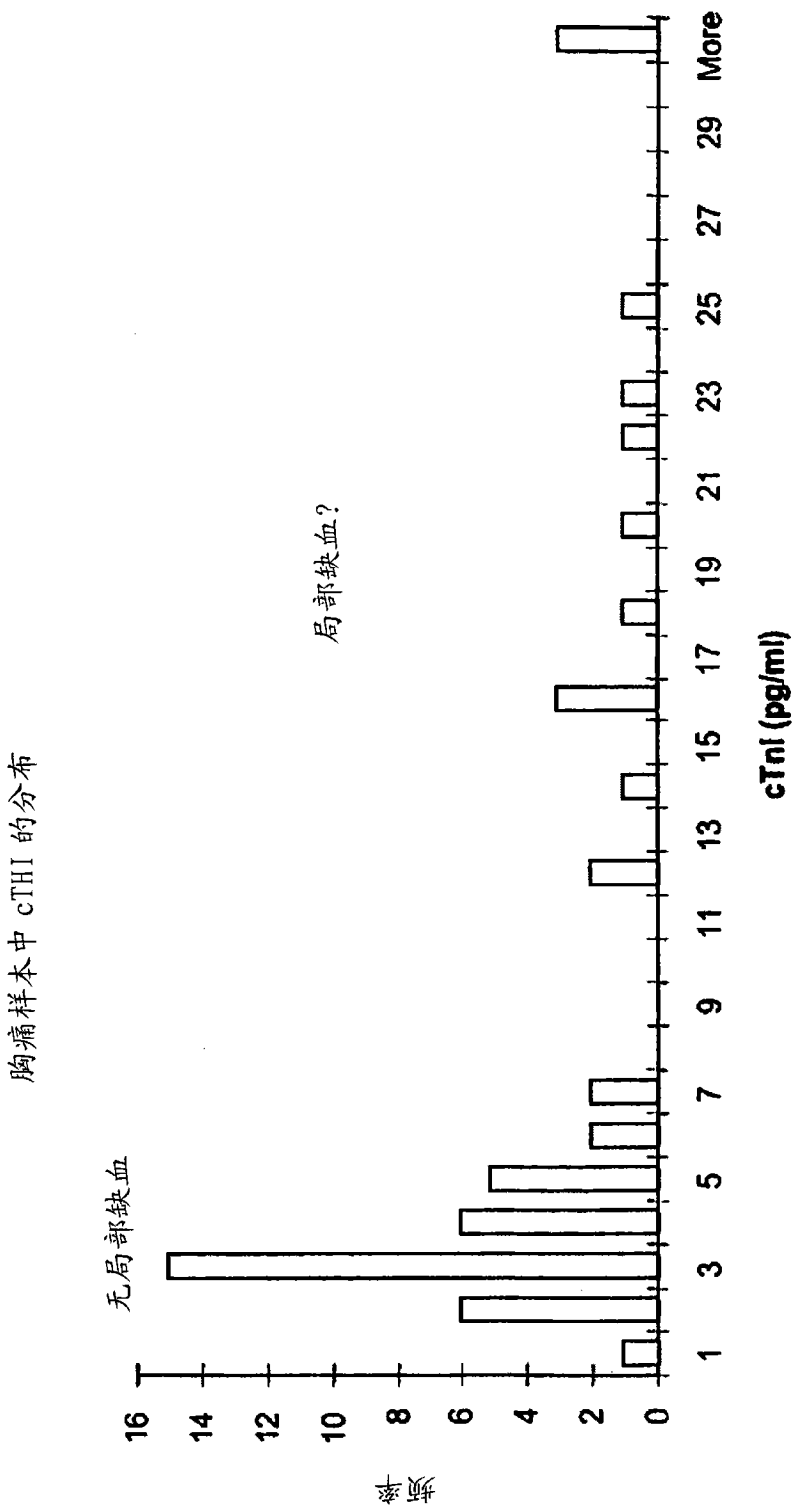

胸痛样本中 cTHI 的分布
无局部缺血
局部缺血?
频率
0
2
4
6
8
10
12
14
16
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
More
cTnI (pg/ml)

图 11

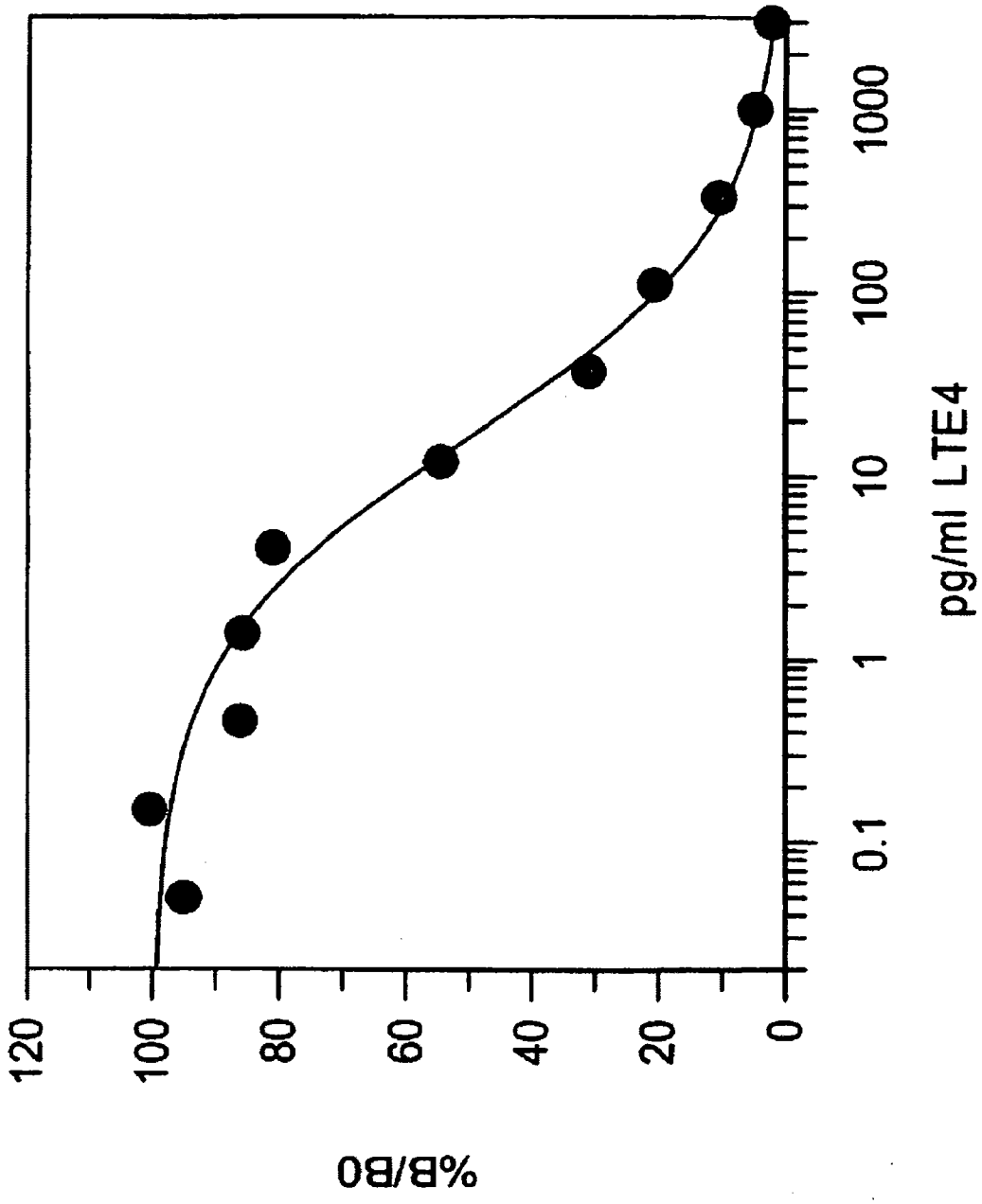


图 12

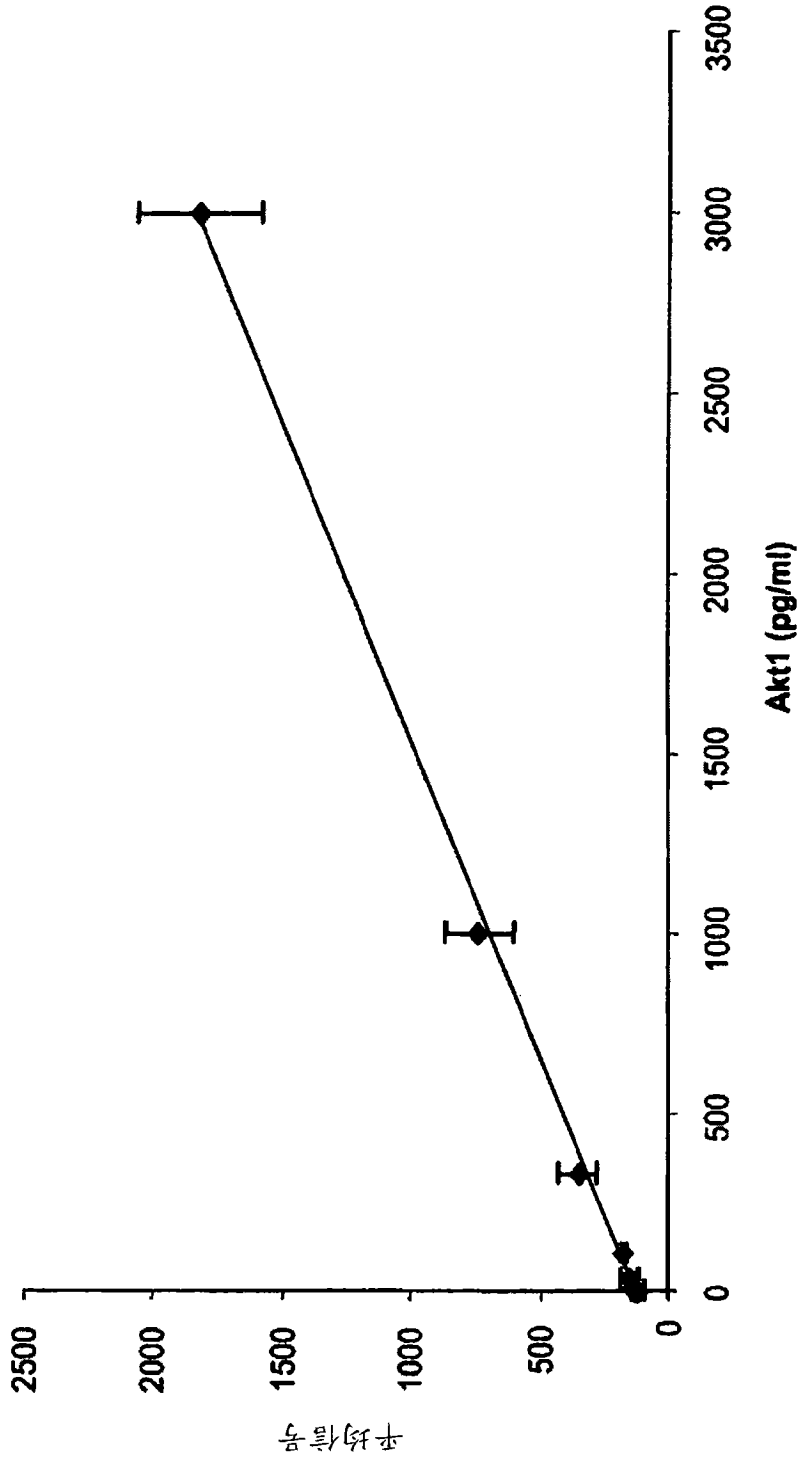

平均信号
2500
2000
1500
1000
500
0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
Akt1 (pg/ml)

图 13

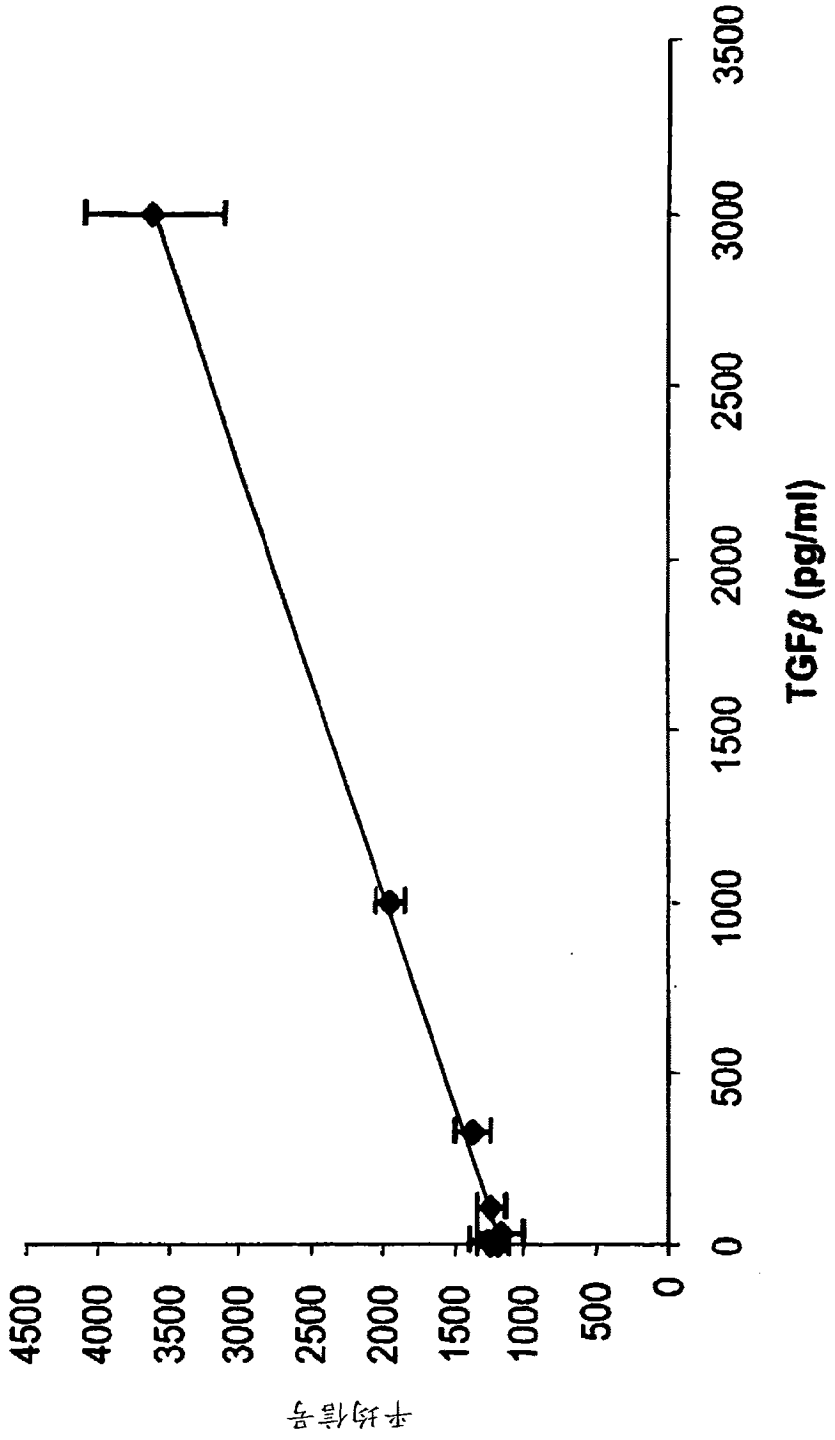

TGFβ (pg/ml)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
平均信号
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0

图 14

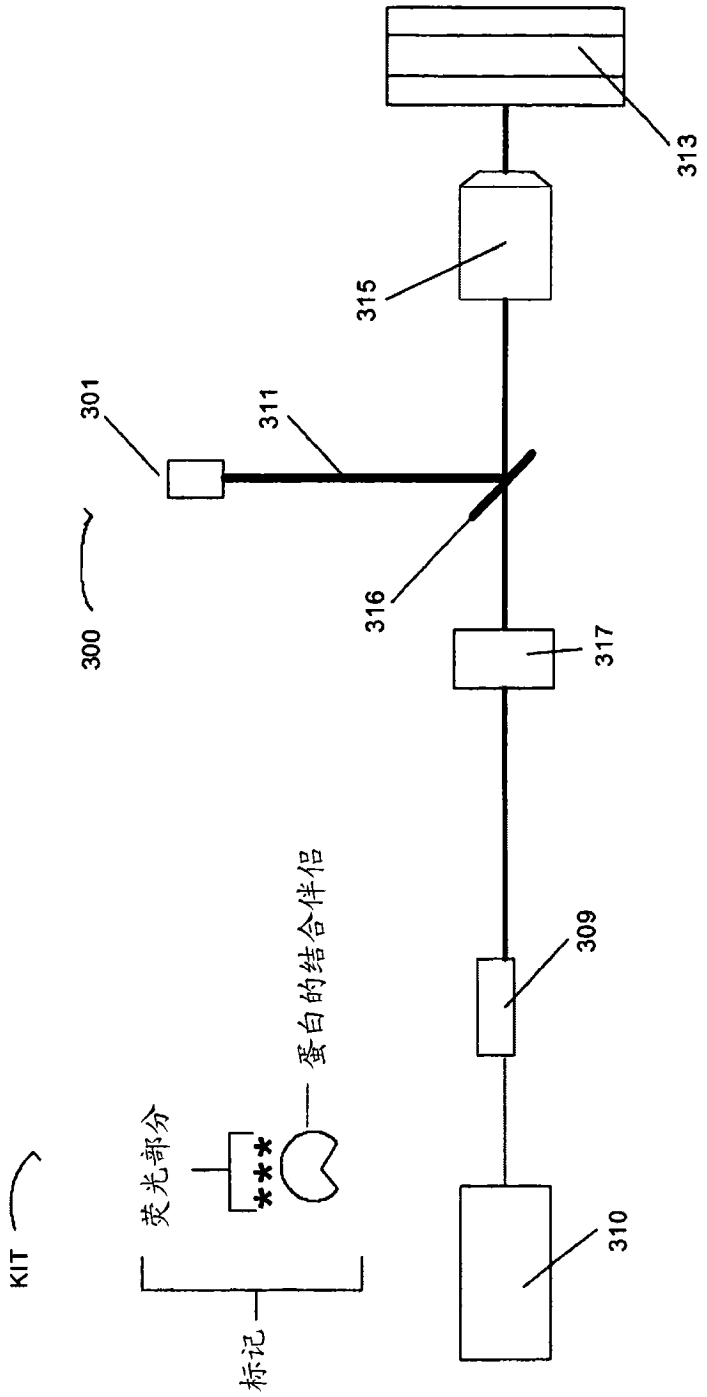


图 15

TREM-1 标准曲线

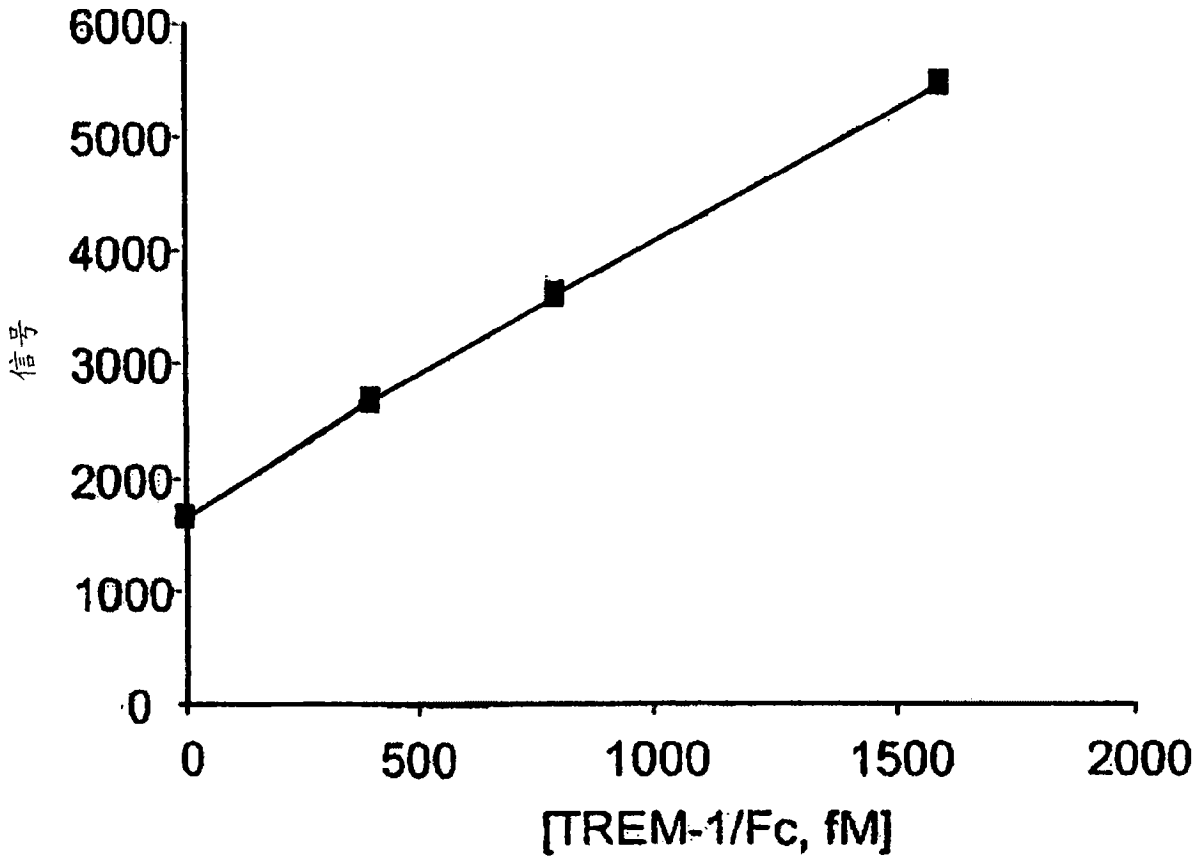


图 16

L-6 标准曲线

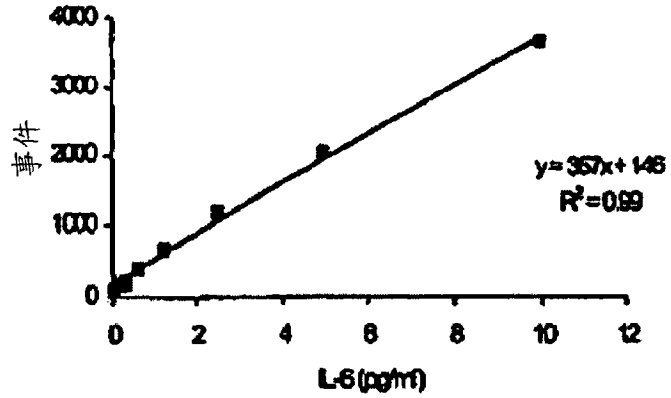


图 17A

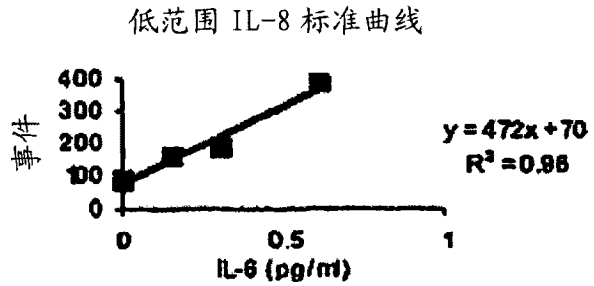

低范围 IL-8 标准曲线
事件
400
300
200
100
0
0
0.5
1
IL-6 (pg/ml)
y = 472x + 70
R² = 0.98

图 17B

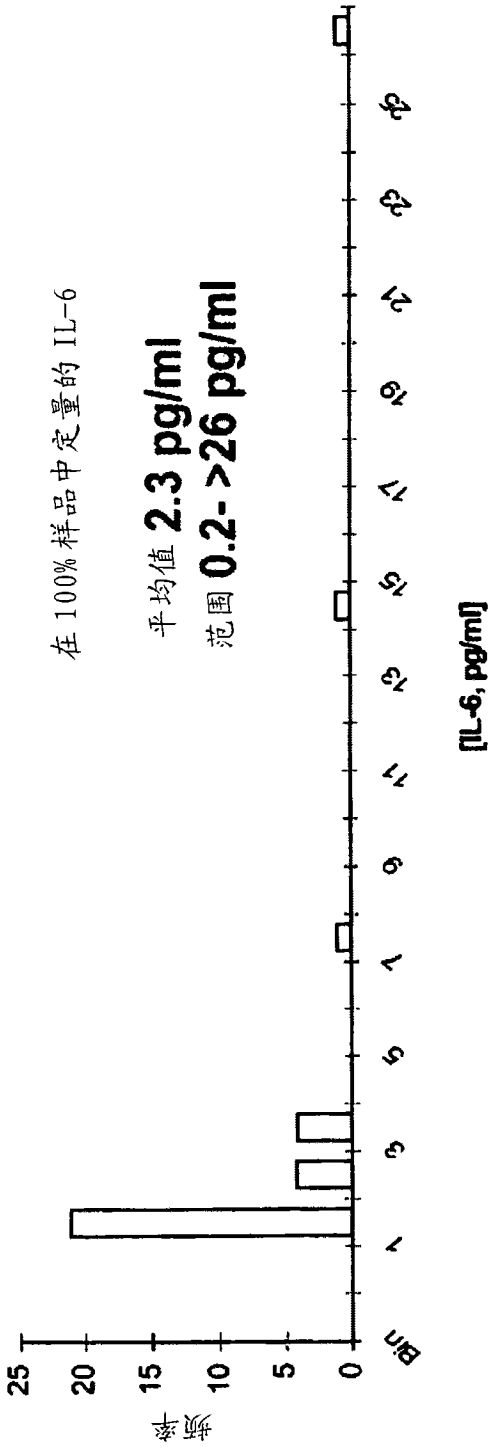

在 100% 样品中定量的 IL-6
平均值 2.3 pg/ml
范围 0.2- >26 pg/ml
频率
25
20
15
10
5
0
Bin
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
[IL-6, pg/ml]

图 17C

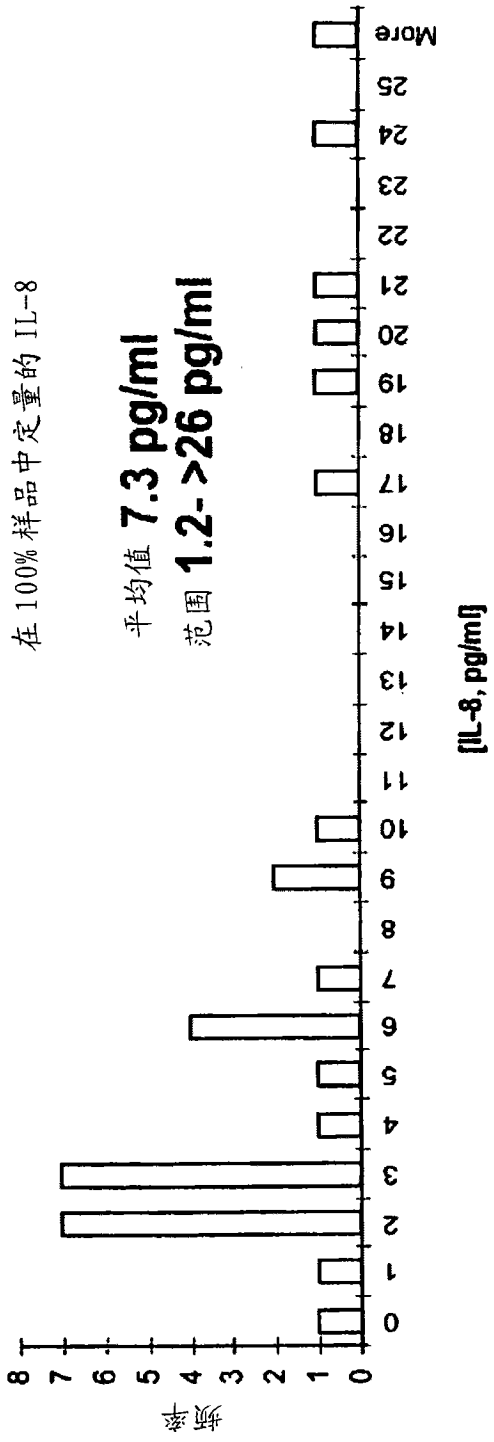


图 17D

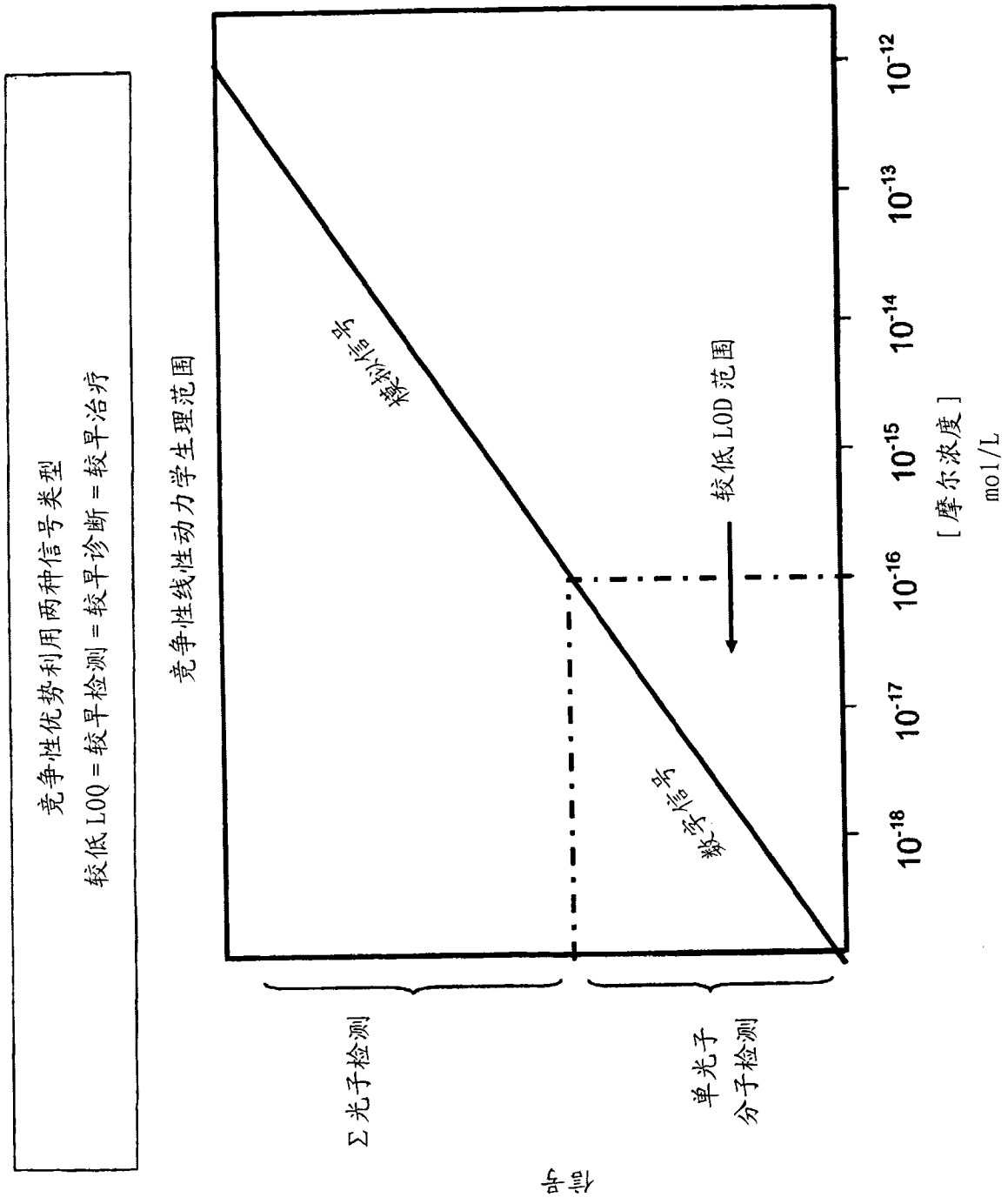

竞争性优势利用两种信号类型
较低 LOQ = 较早检测 = 较早诊断 = 较早治疗
竞争性线性动力学生理范围
模拟信号
数字信号
较低 LOD 范围
10^{-12}
10^{-13}
10^{-14}
10^{-15}
10^{-16}
10^{-17}
10^{-18}
[摩尔浓度]
mol/L
Σ 光子检测
单光子
分子检测
信号

图 17E

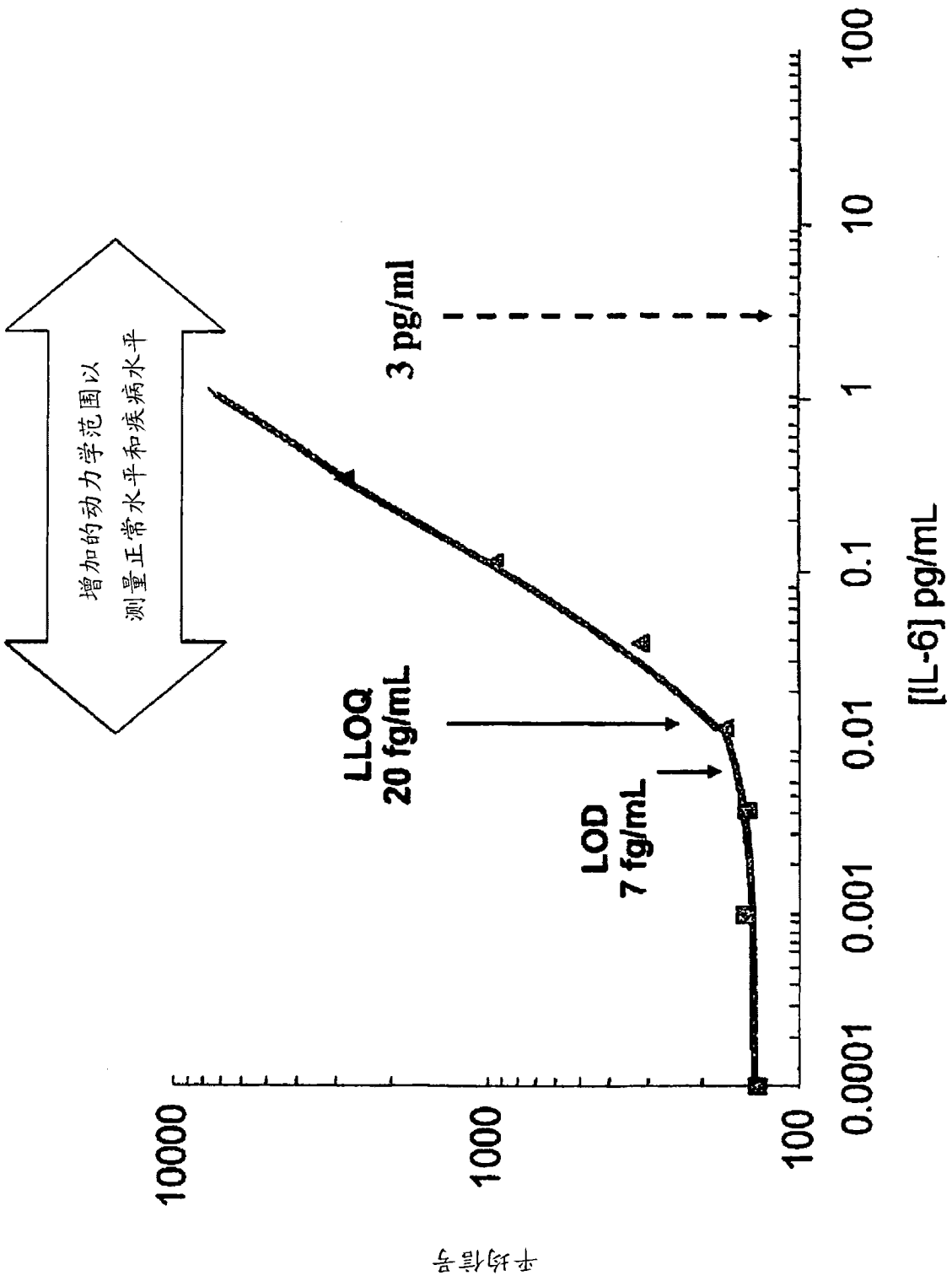

增加的动力学范围以
测量正常水平和疾病水平
3 pg/ml
LLOQ
20 fg/mL
LOD
7 fg/mL
10000
1000
100
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[IL-6] pg/mL
平均信号

图 17F

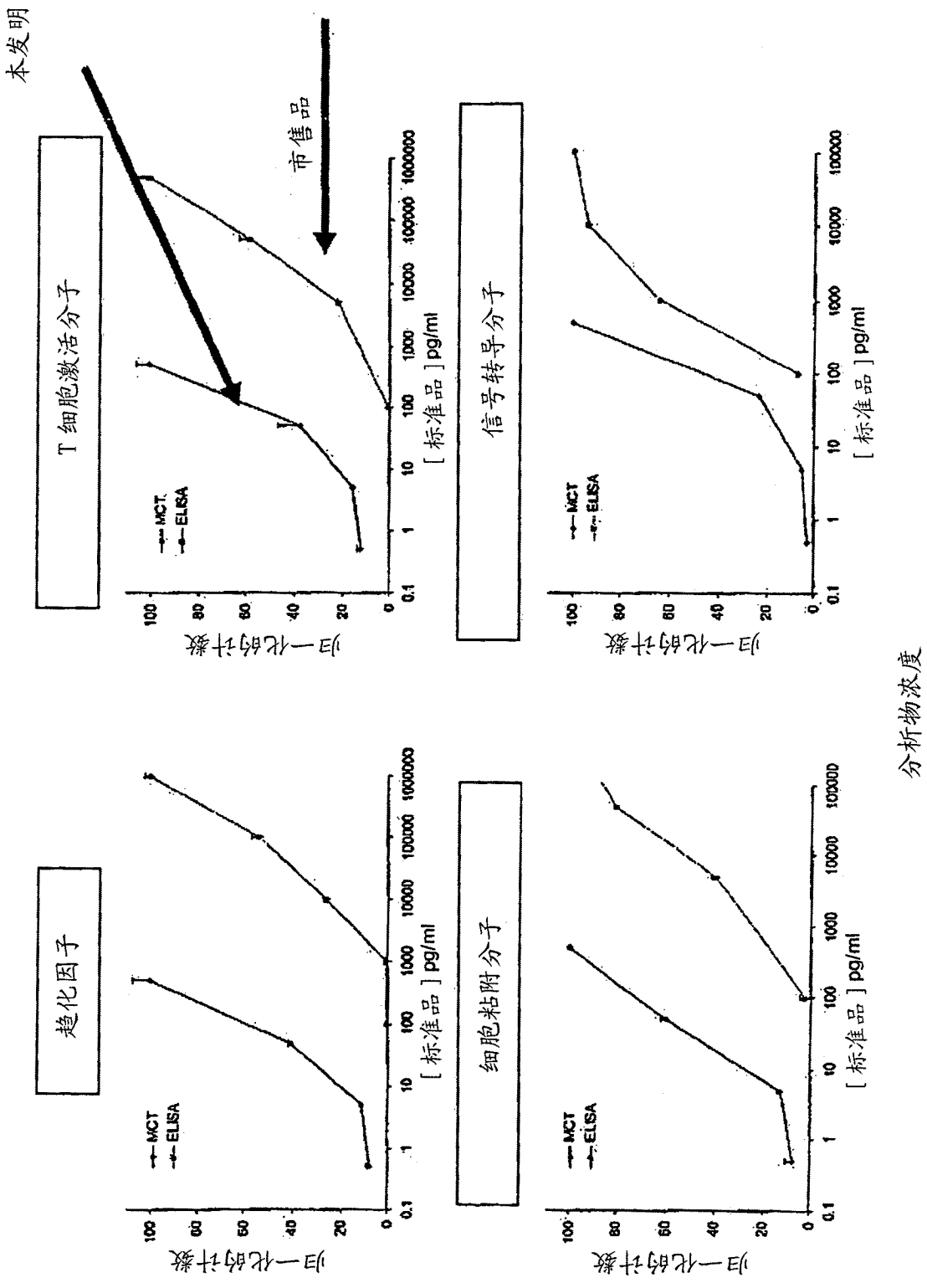

本发明
T 细胞激活分子
市售品
信号转导分子
趋化因子
细胞粘附分子
MCT
ELISA
归一化的计数
[标准品] pg/ml
分析物浓度

图 18

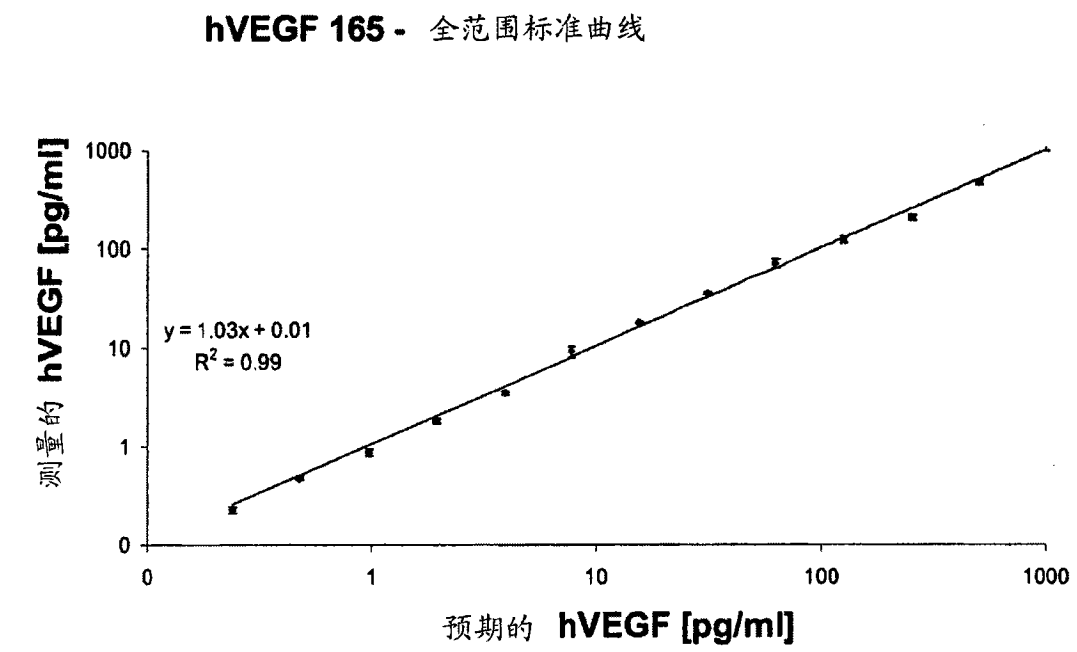

hVEGF 165 - 全范围标准曲线
测量的 hVEGF [pg/ml]
1000
100
10
1
0
y = 1.03x + 0.01
R2 = 0.99
0
1
10
100
1000
预期的 hVEGF [pg/ml]

图 19A

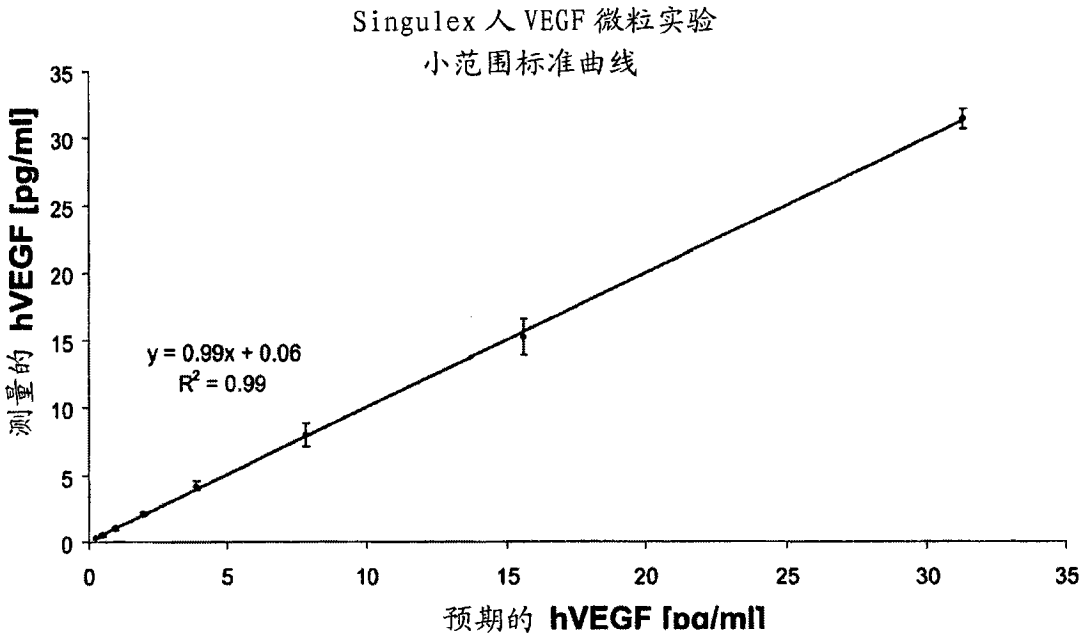

Singulex 人 VEGF 微粒实验
小范围标准曲线
测量的 hVEGF [pg/ml]
35
30
25
20
15
10
5
0
y = 0.99x + 0.06
R2 = 0.99
0
5
10
15
20
25
30
35
预期的 hVEGF [pg/ml]

图 19B

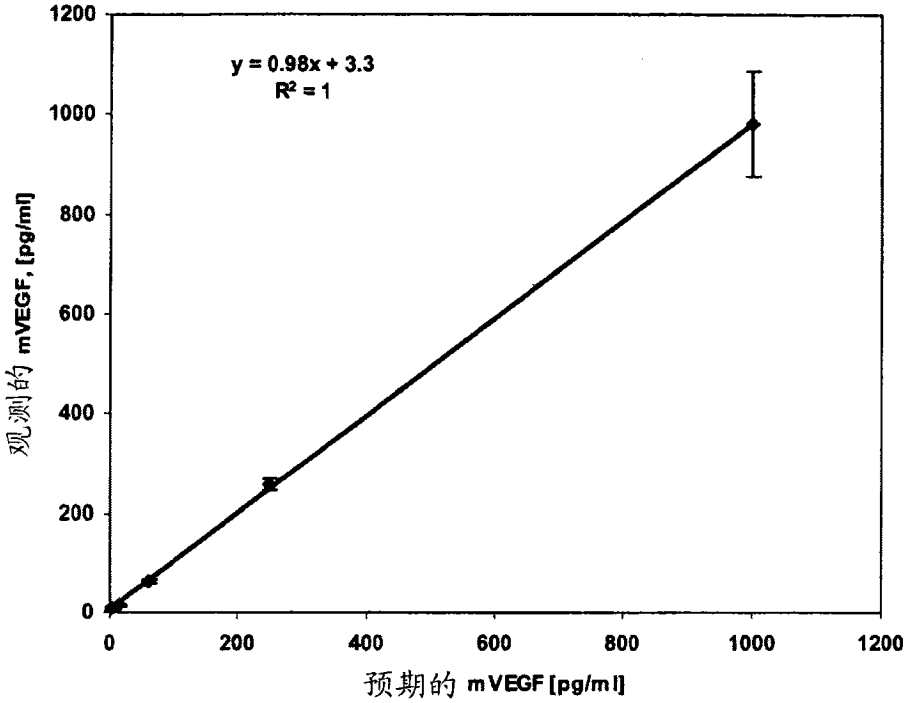

y = 0.98x + 3.3
R² = 1
观测的 mVEGF, [pg/ml]
预期的 mVEGF [pg/ml]
0
200
400
600
800
1000
1200

图 20A

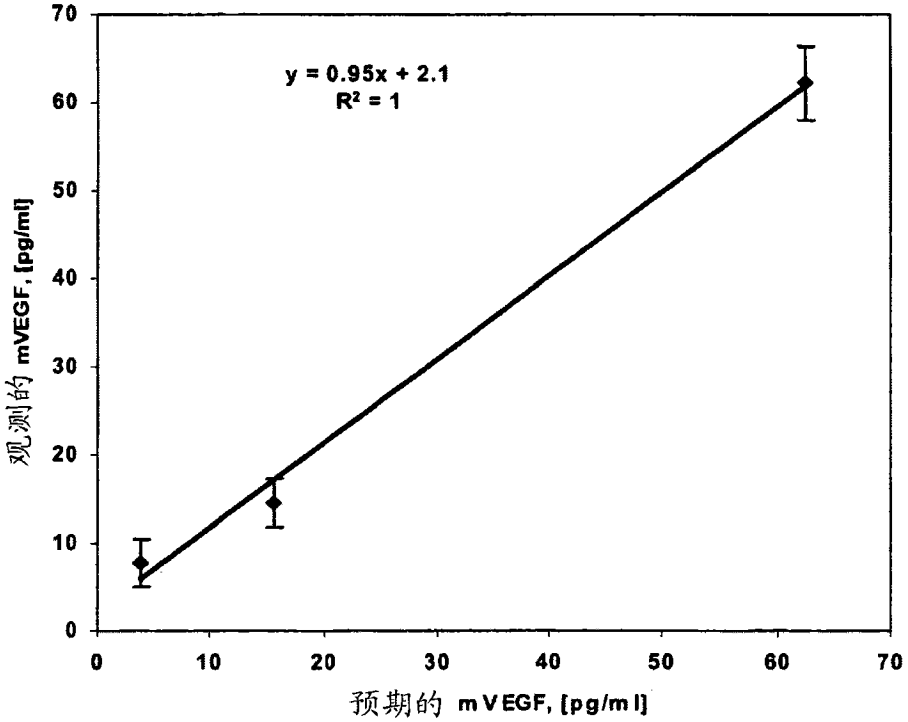

y = 0.95x + 2.1
R² = 1
观测的 mVEGF, [pg/ml]
预期的 mVEGF, [pg/ml]
0
10
20
30
40
50
60
70

图 20B

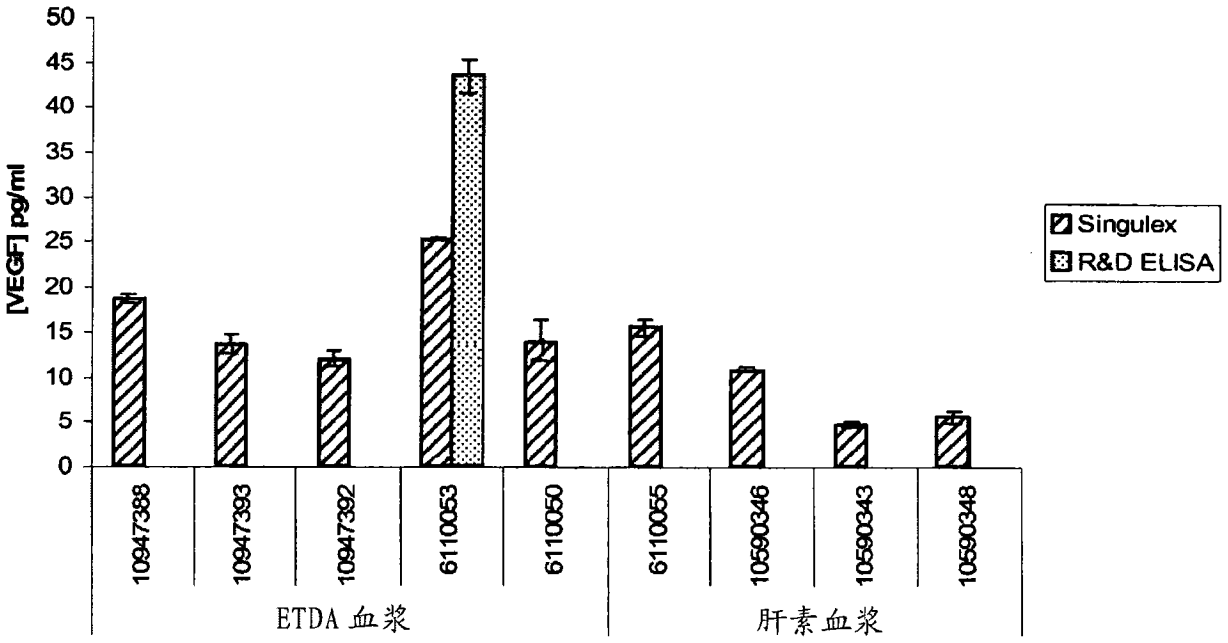

50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
[VEGF] pg/ml
Singulex
R&D ELISA
10947388
10947393
10947392
6110053
6110050
6110055
10590346
10590343
10590348
ETDA 血浆
肝素血浆

图 21

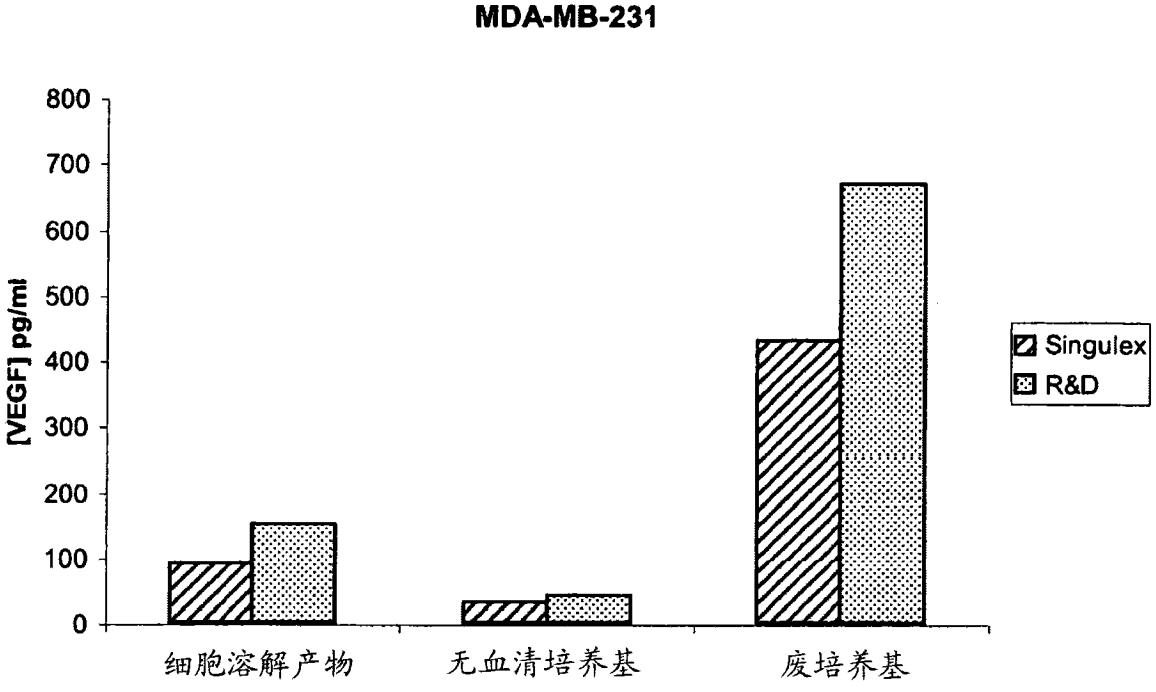

MDA-MB-231
800
700
600
500
400
300
200
100
0
[VEGF] pg/ml
Singulex
R&D
细胞溶解产物
无血清培养基
废培养基

图 22A

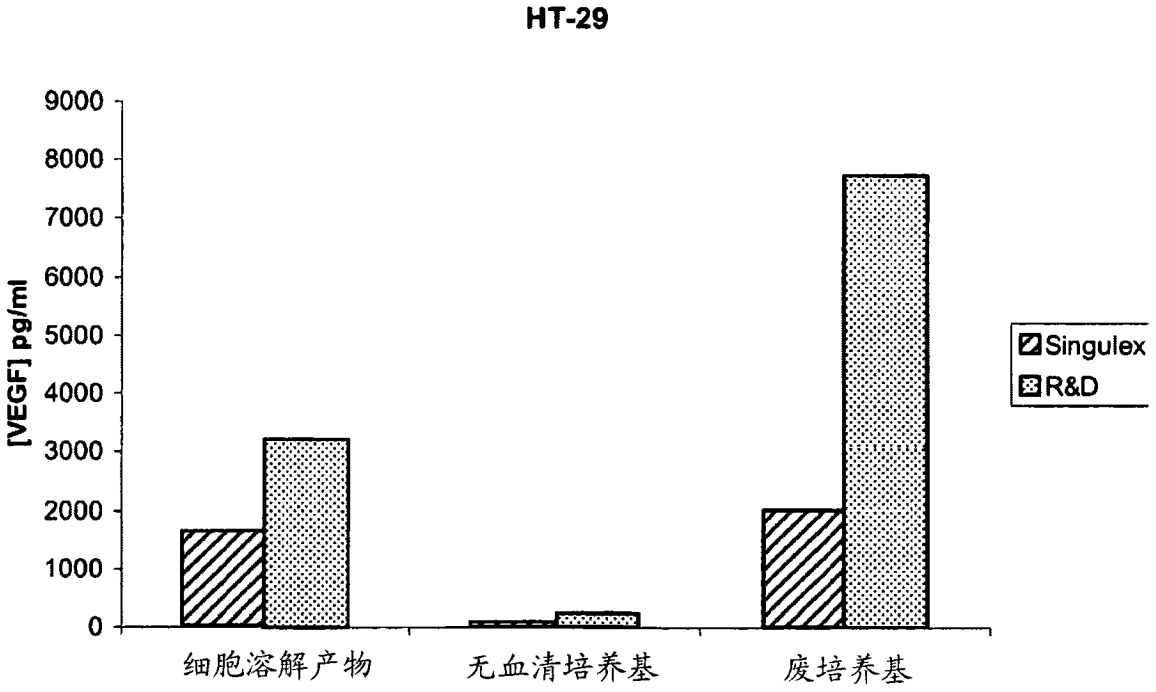

HT-29
[VEGF] pg/ml
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
细胞溶解产物
无血清培养基
废培养基
Singulex
R&D

图 22B

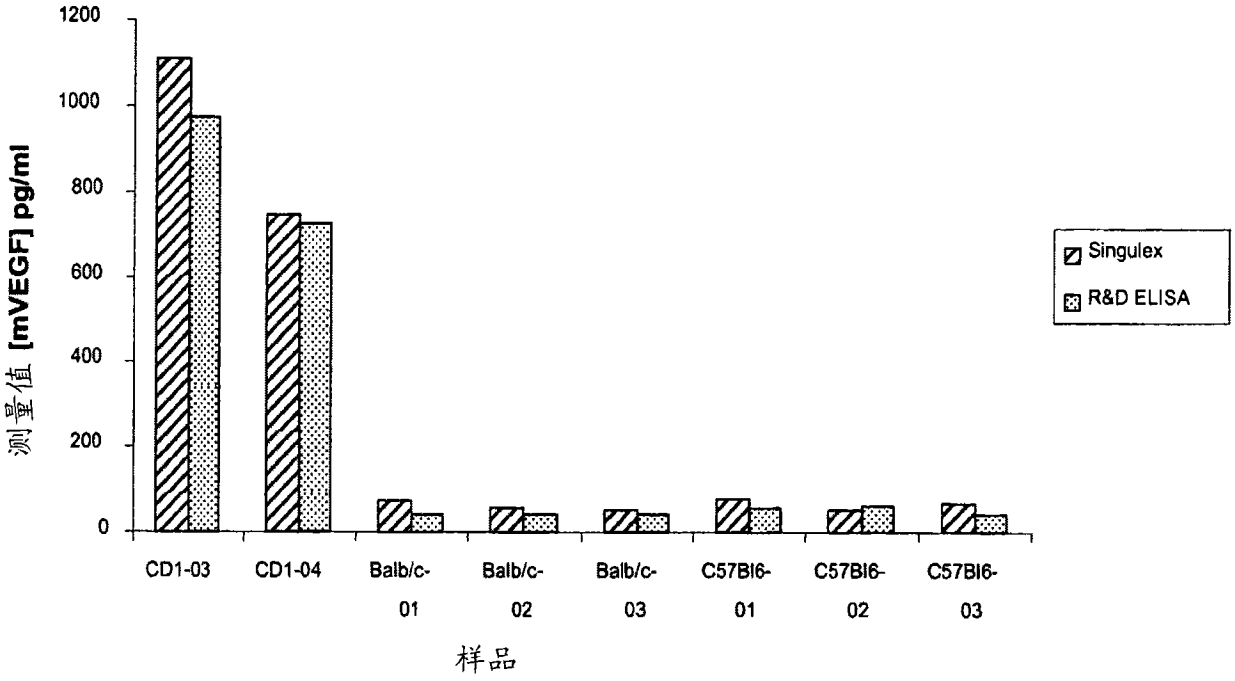

测量值 [mVEGF] pg/ml
1200
1000
800
600
400
200
0
CD1-03
CD1-04
Balb/c-01
Balb/c-02
Balb/c-03
C57Bl6-01
C57Bl6-02
C57Bl6-03
样品
Singulex
R&D ELISA

图 23

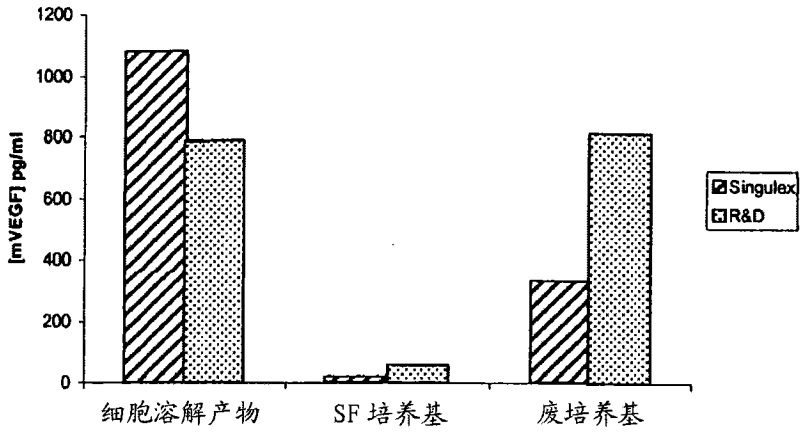


图 24A

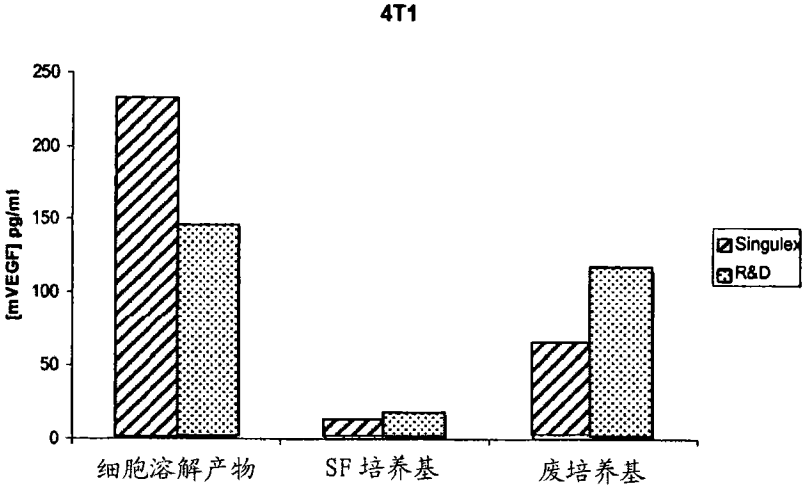


图 24B

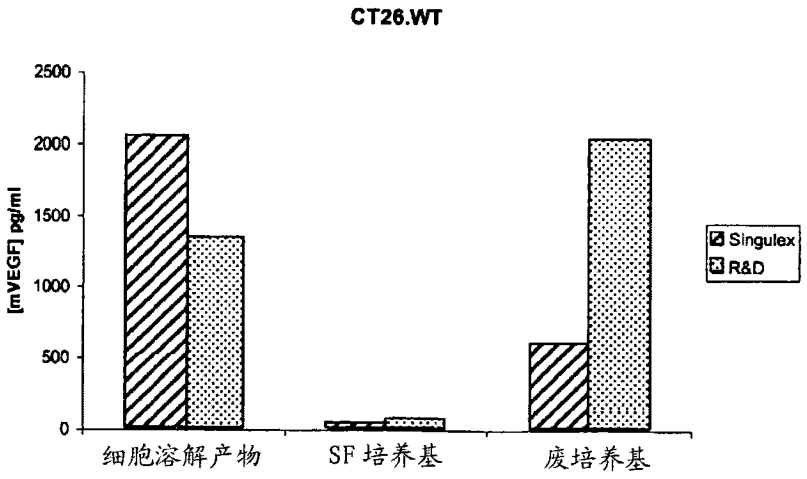


图 24C

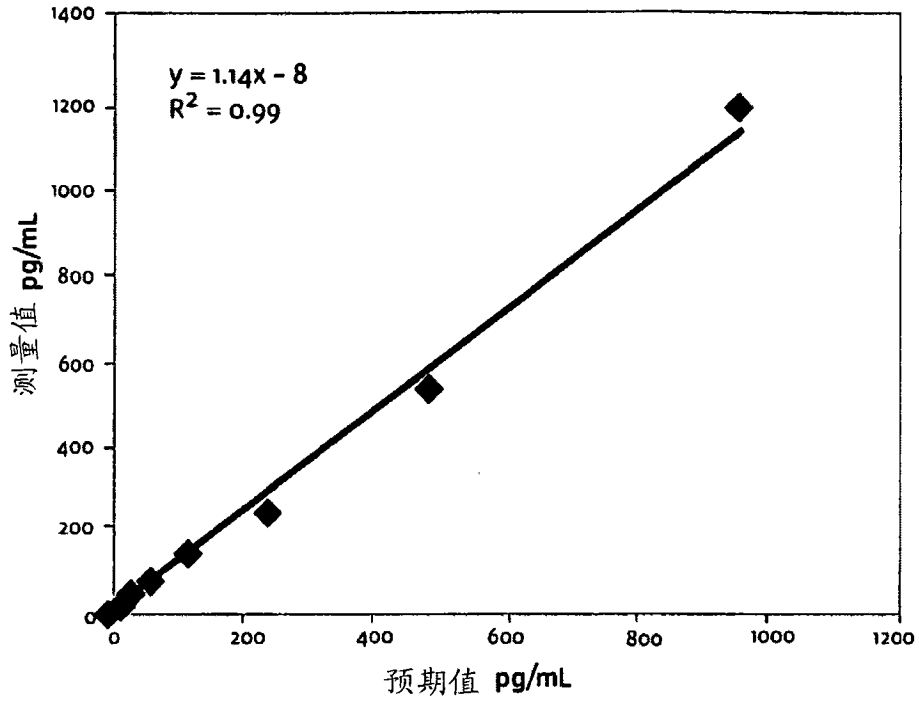

y = 1.14x - 8
R2 = 0.99
测量值 pg/mL
预期值 pg/mL
0
200
400
600
800
1000
1200
1400

图 25A

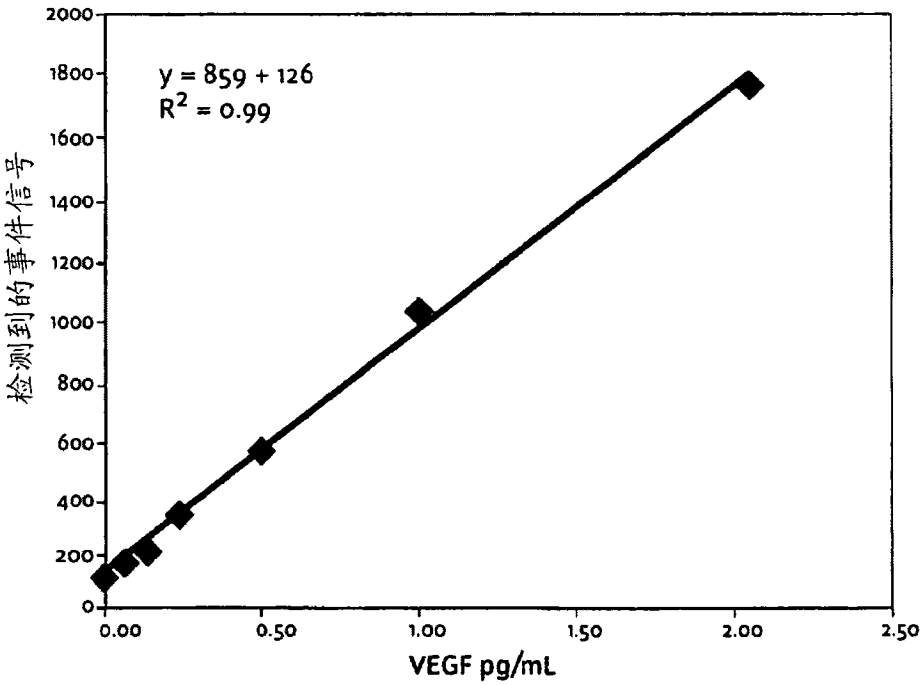

y = 859 + 126
R2 = 0.99
检测到的事件信号
VEGF pg/mL
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50

图 25B

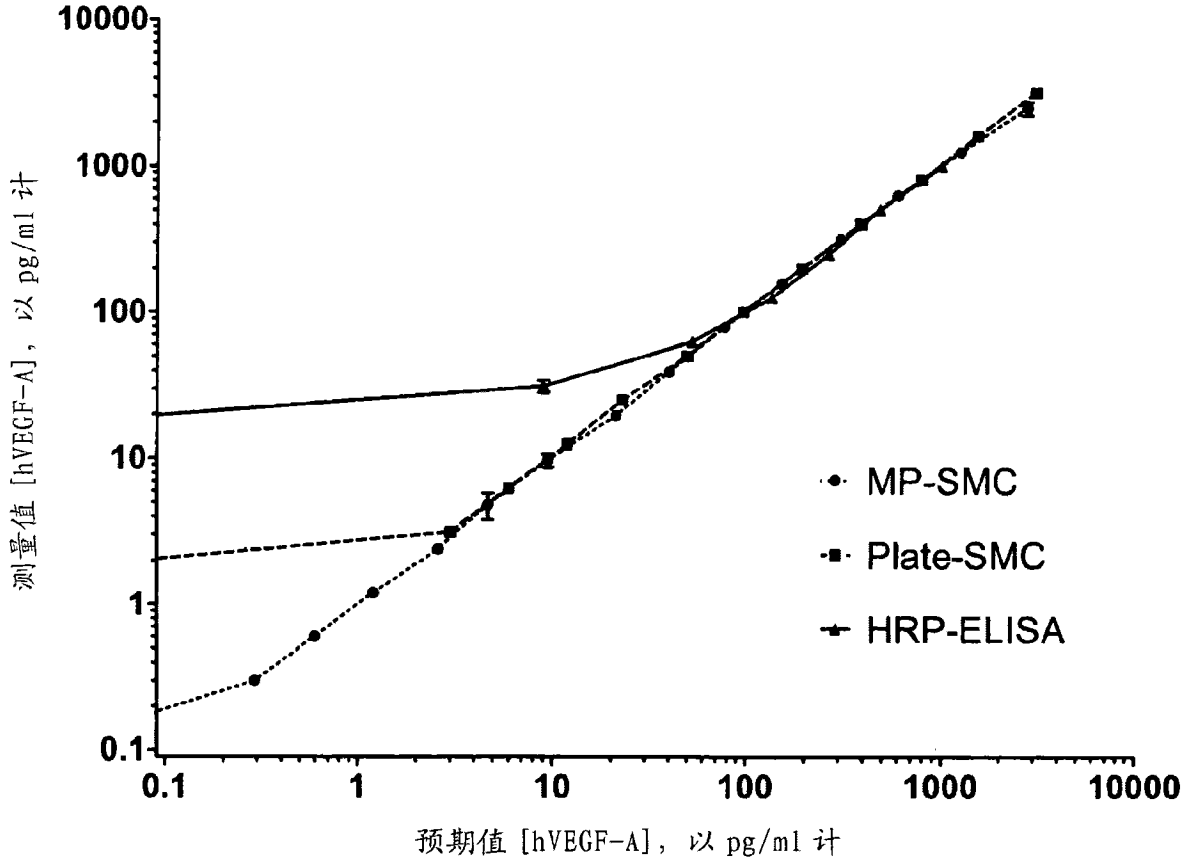
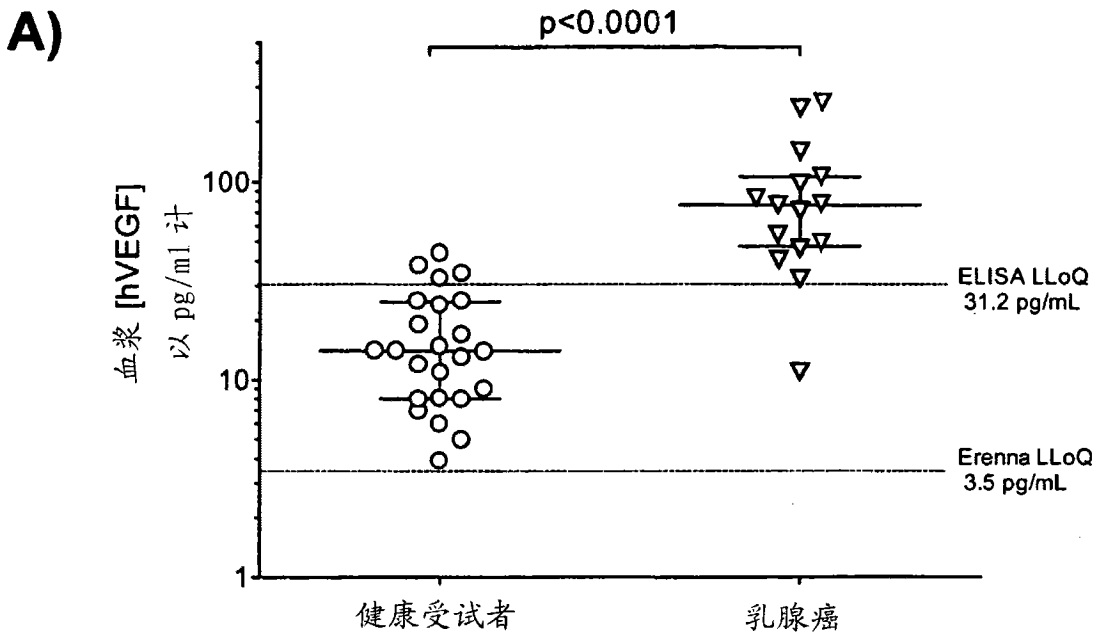
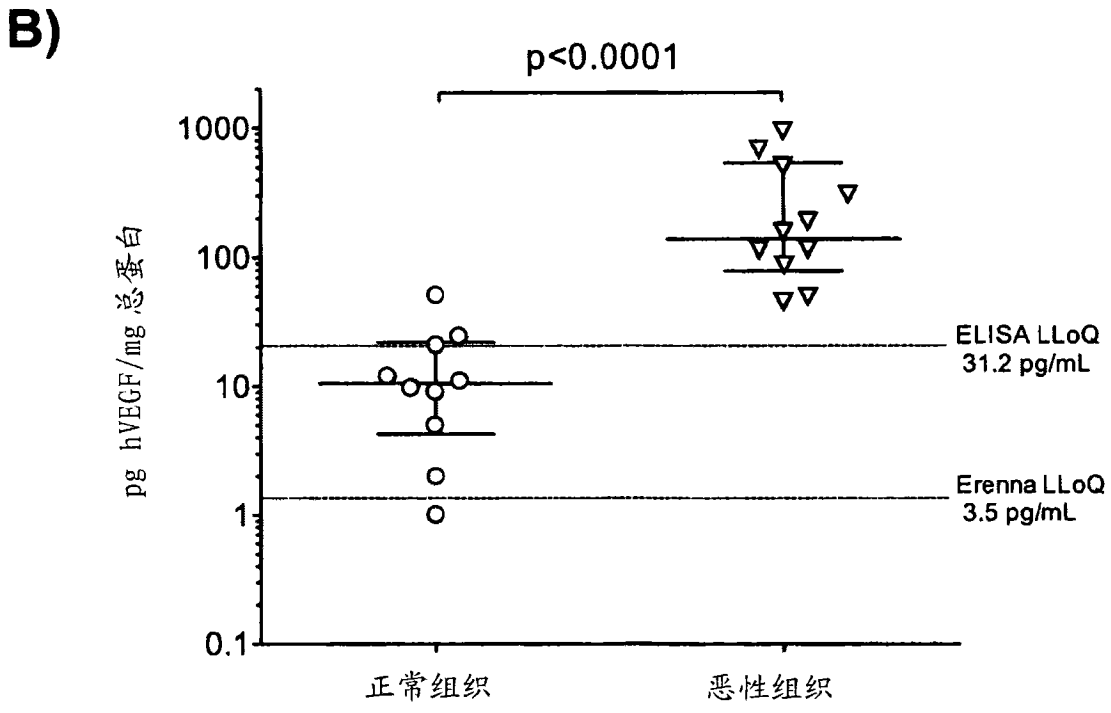

10000
1000
100
10
1
0.1
0.1
1
10
100
1000
10000
测量值 [hVEGF-A]，以 pg/ml 计
预期值 [hVEGF-A]，以 pg/ml 计
MP-SMC
Plate-SMC
HRP-ELISA

图 26



样品体积 = 10 μL 血浆



样品体积 = 10 μL 溶解产物

图 27

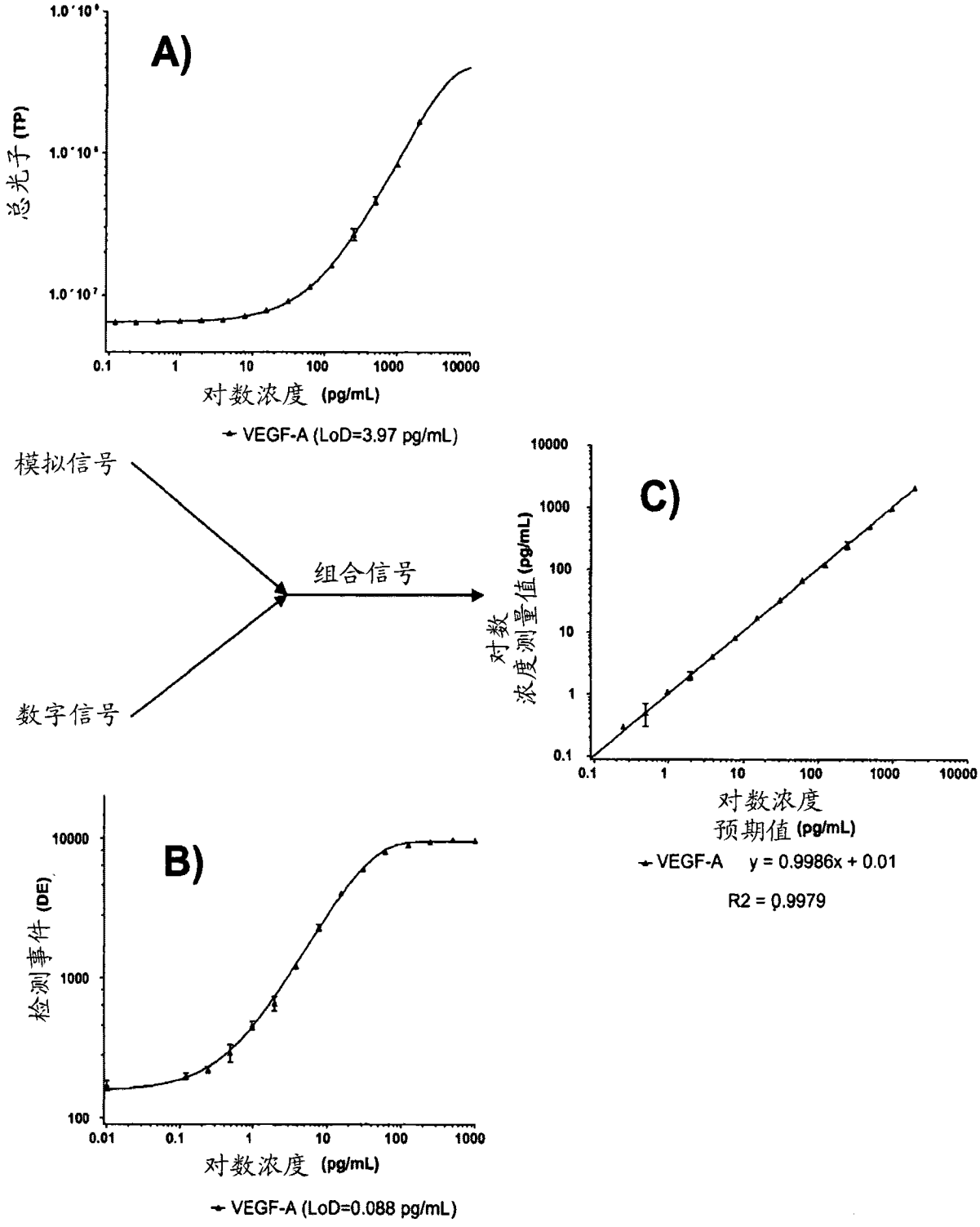

A)
总光子 (TP)
1.0'10⁸
1.0'10⁸
1.0'10⁷
0.1
1
10
100
1000
10000
对数浓度 (pg/mL)
VEGF-A (LoD=3.97 pg/mL)
模拟信号
组合信号
数字信号
C)
对数浓度测量值 (pg/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
对数浓度
预期值 (pg/mL)
VEGF-A y = 0.9986x + 0.01
R2 = 0.9979
B)
检测事件 (DE)
10000
1000
100
0.01
0.1
1
10
100
1000
对数浓度 (pg/mL)
VEGF-A (LoD=0.088 pg/mL)

图 28

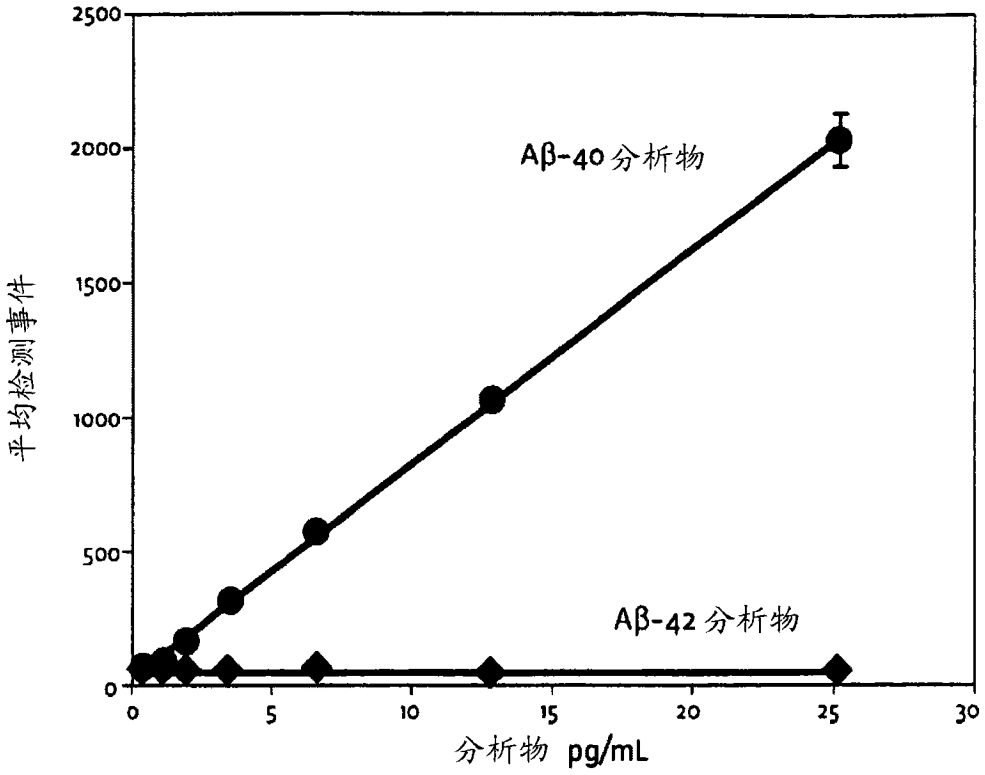

2500
2000
1500
1000
500
0
平均检测事件
Aβ-40 分析物
Aβ-42 分析物
0
5
10
15
20
25
30
分析物 pg/mL

图 29A

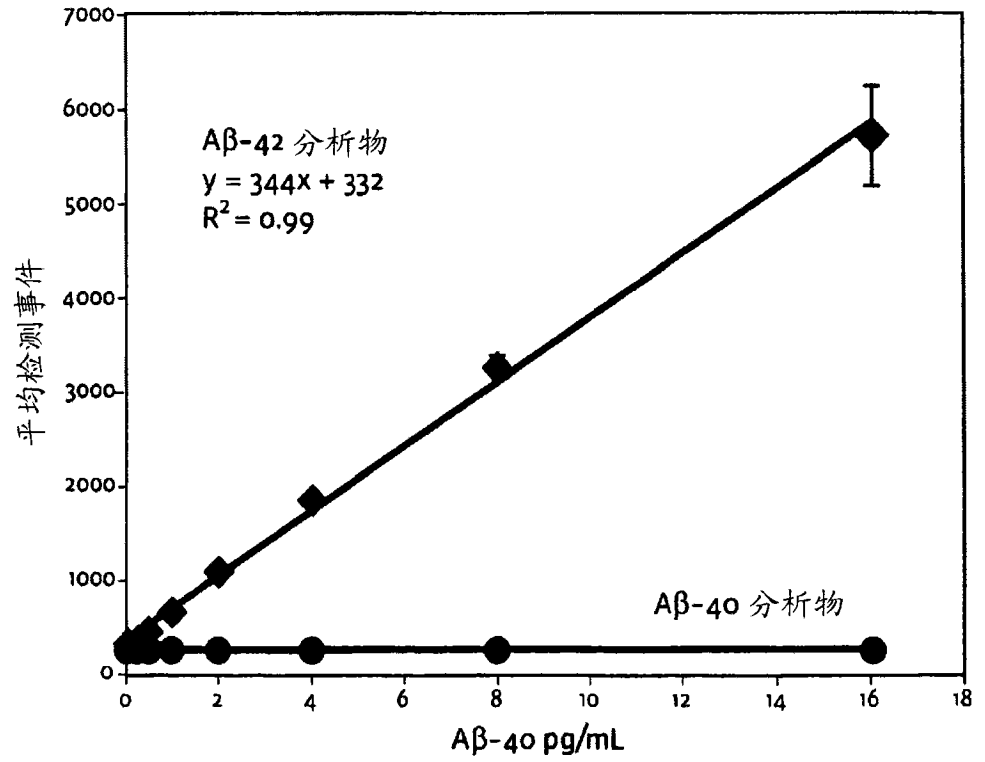

7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
平均检测事件
Aβ-42 分析物
y = 344x + 332
R2 = 0.99
Aβ-40 分析物
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Aβ-40 pg/mL

图 29B

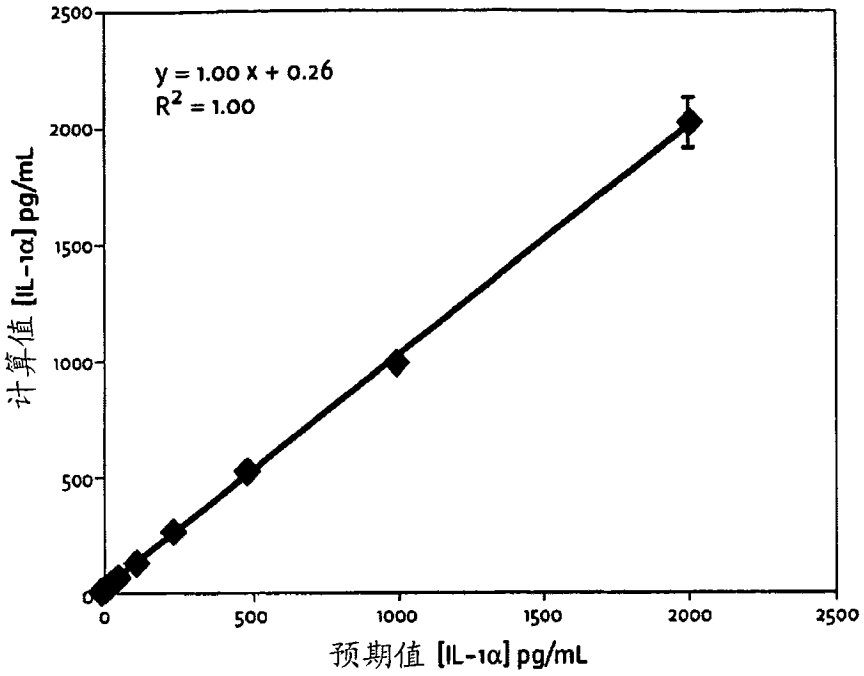

y = 1.00 x + 0.26
R2 = 1.00
计算值 [IL-1α] pg/mL
预期值 [IL-1α] pg/mL
0
500
1000
1500
2000
2500

图 30A

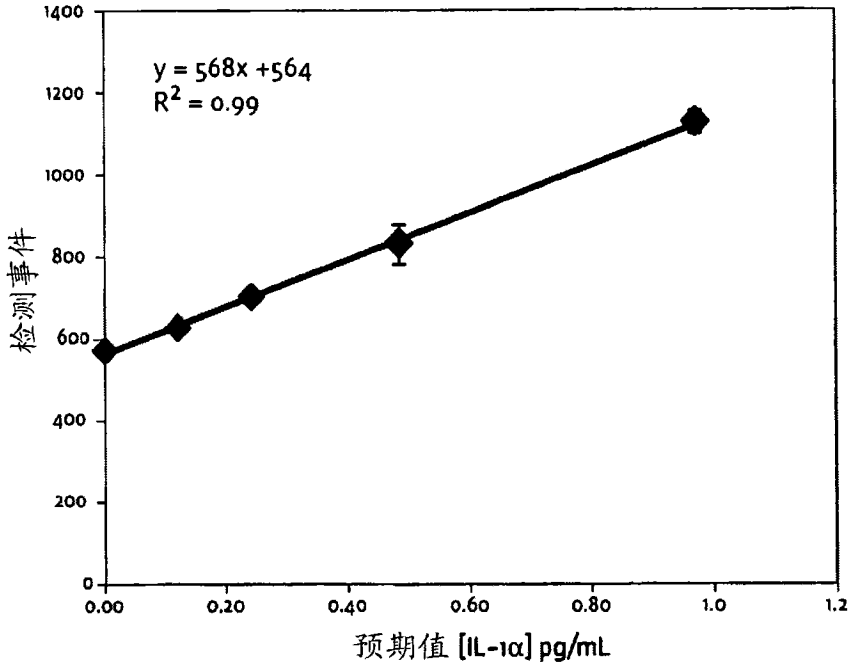

y = 568x +564
R2 = 0.99
检测事件
预期值 [IL-1α] pg/mL
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.0
1.2

图 30B

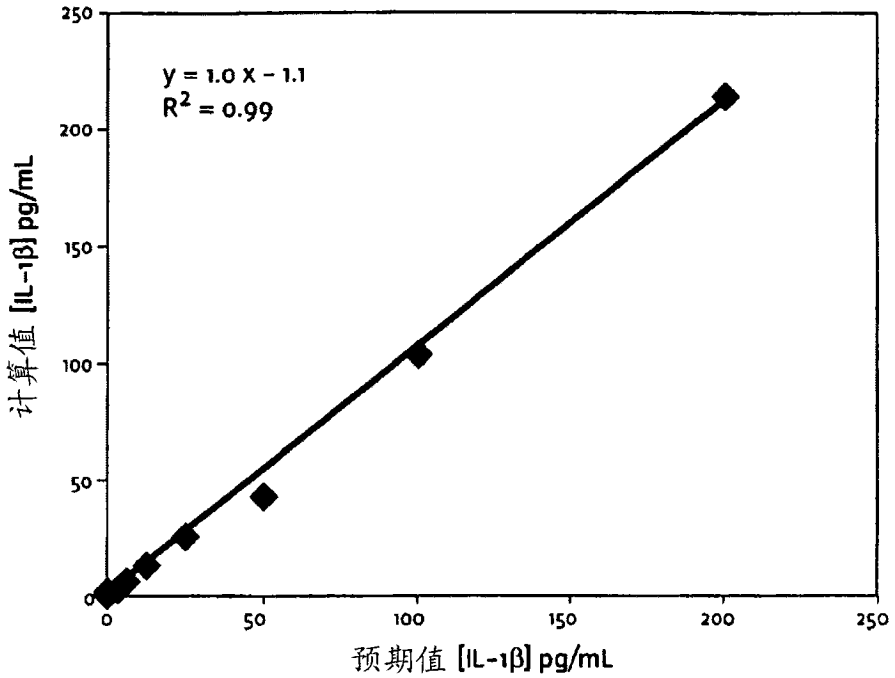

y = 1.0 x - 1.1
R2 = 0.99
计算值 [IL-1β] pg/mL
预期值 [IL-1β] pg/mL
0
50
100
150
200
250

图 31A

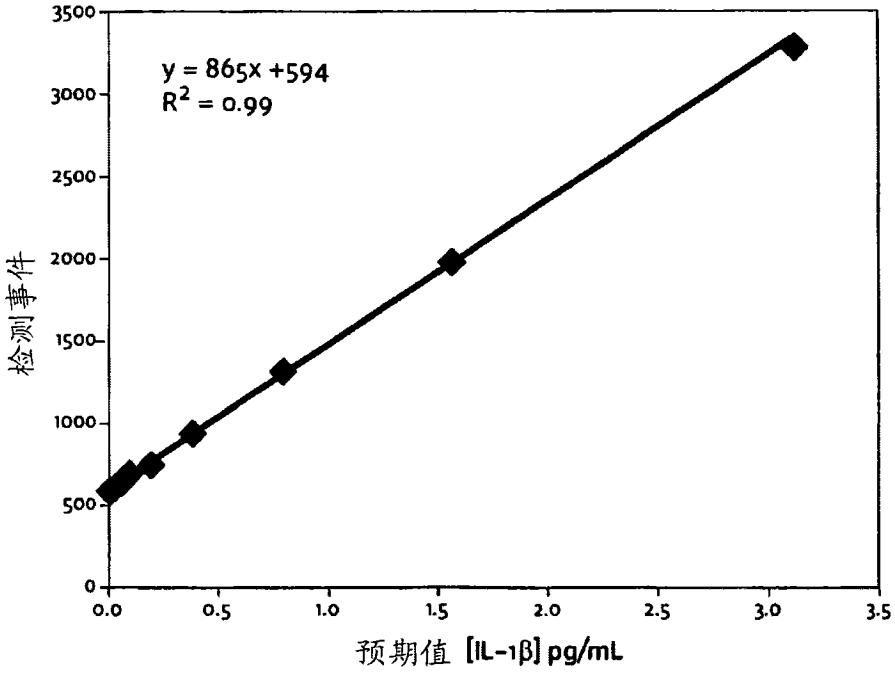

y = 865x +594
R2 = 0.99
检测事件
预期值 [IL-1β] pg/mL
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5

图 31B

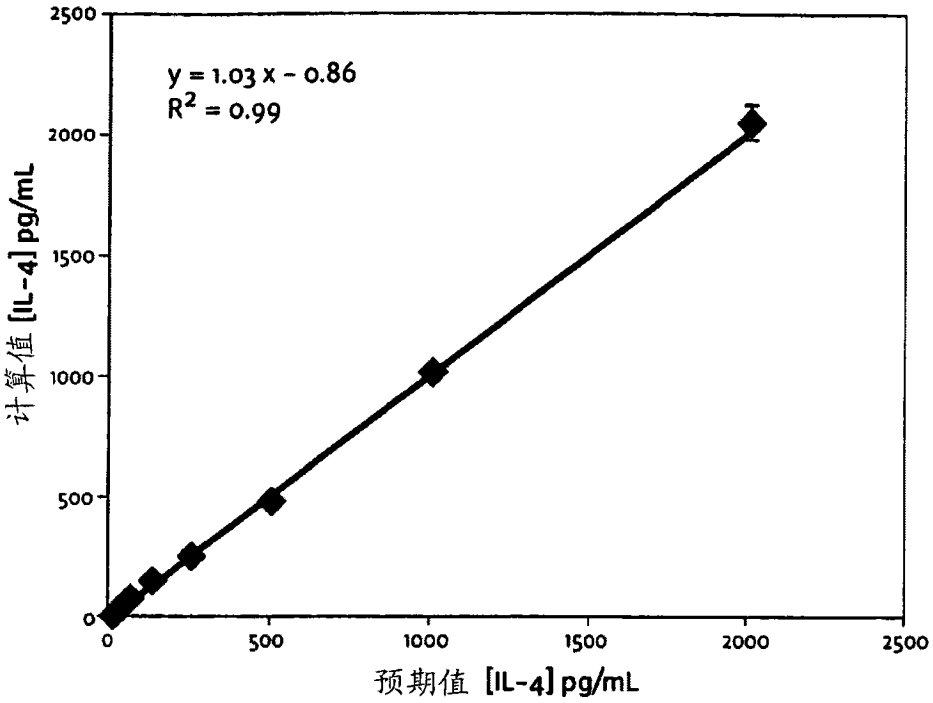

y = 1.03 x - 0.86
R2 = 0.99
计算值 [IL-4] pg/mL
预期值 [IL-4] pg/mL
0
500
1000
1500
2000
2500

图 32A

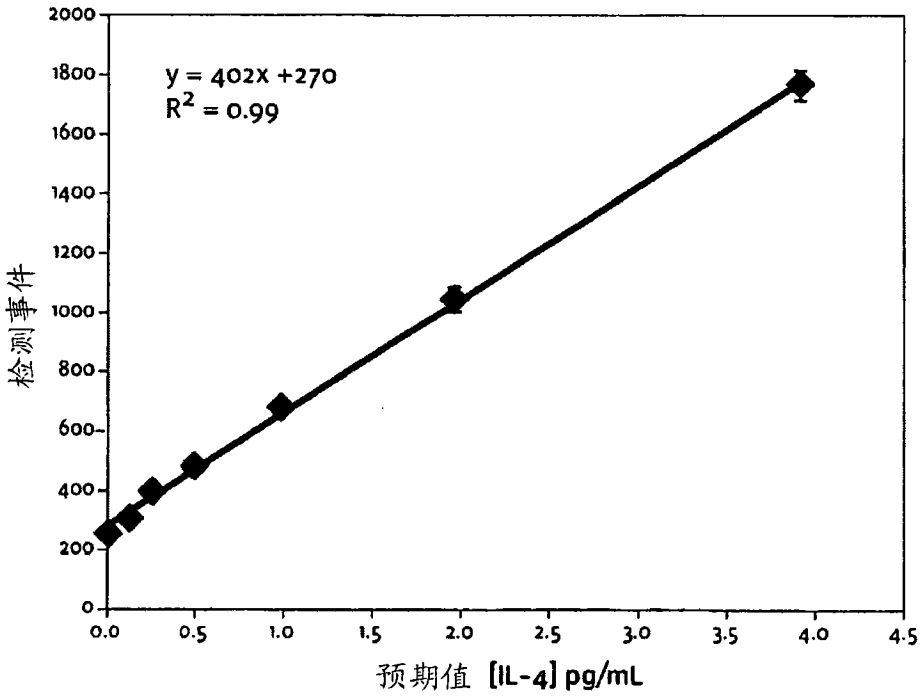

y = 402x +270
R2 = 0.99
检测事件
预期值 [IL-4] pg/mL
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5

图 32B

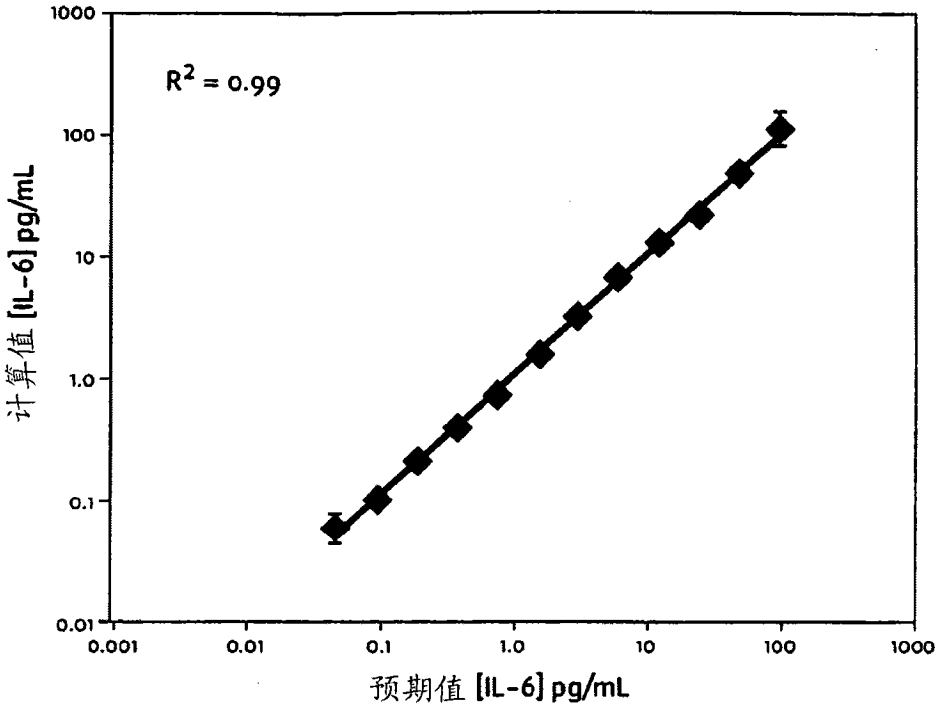

R^2 = 0.99
计算值 [IL-6] pg/mL
预期值 [IL-6] pg/mL
1000
100
10
1.0
0.1
0.01
0.001
0.01
0.1
1.0
10
100
1000

图 33A

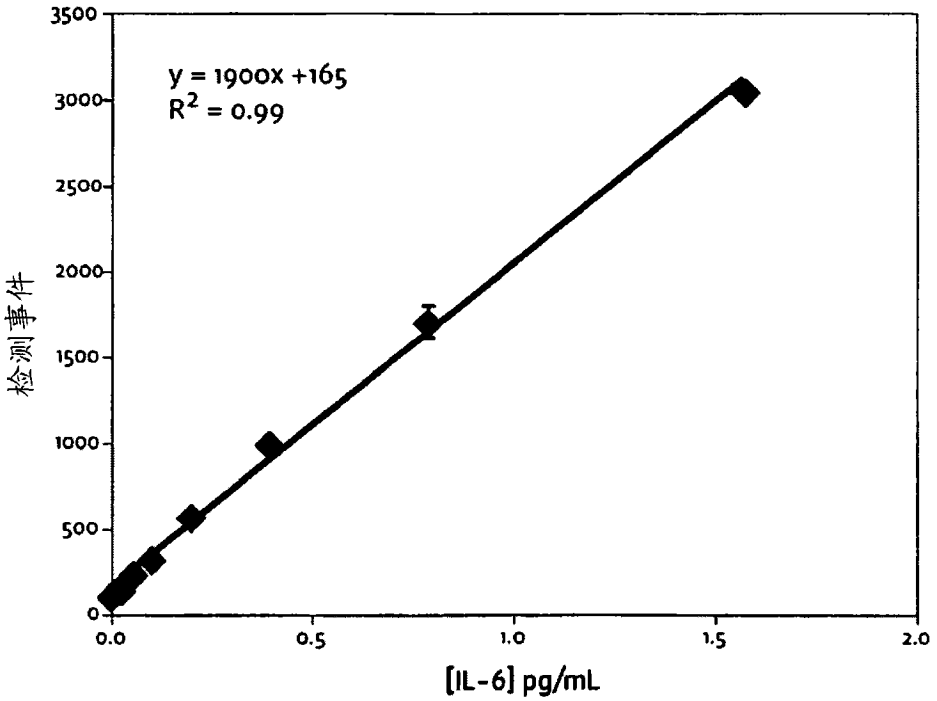

y = 1900x +165
R^2 = 0.99
检测事件
[IL-6] pg/mL
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0

图 33B