



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117288934 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 26

(21) 申请号 202311188817.1

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2014.03.12

G01N 33/53 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/532 (2006.01)

61/779,050 2013.03.13 US

G01N 21/76 (2006.01)

61/919,887 2013.12.23 US

C12Q 1/6804 (2018.01)

(62) 分案原申请数据

201480025989.X 2014.03.12

(71) 申请人 中尺度技术有限责任公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 A·阿格文扬 E·N·格莱泽

J·肯坦 G·西格尔

M·斯滕格林

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 李程达

权利要求书1页 说明书59页

序列表(电子公布) 附图20页

(54) 发明名称

改进的测定方法

(57) 摘要

本发明针对用于改进结合测定法中的测定特异性和性能的方法。

1. 用于检测样品中感兴趣的分析物的试剂盒, 其在一个或多个管形瓶, 容器或隔室中包含:

a. 表面, 所述表面包含 (i) 用于所述分析物的捕捉试剂, 和 (ii) 包含锚定序列的锚定试剂; 和

b. 用于所述分析物的检测试剂, 其中所述检测试剂连接到核酸探针。

2. 权利要求1的试剂盒, 其中所述捕捉试剂, 所述检测试剂或两者包含抗体, 抗原, 配体, 受体, 寡核苷酸, 半抗原, 表位, 模拟位或适体。

3. 权利要求2的试剂盒, 其中所述捕捉试剂包含抗体。

4. 权利要求2的试剂盒, 其中所述检测试剂包含抗体。

5. 权利要求2的试剂盒, 其中所述捕捉试剂和所述检测试剂是针对所述分析物的抗体。

6. 权利要求1的试剂盒, 其中所述表面包含颗粒。

7. 权利要求1的试剂盒, 其中所述表面包含多孔板的孔。

8. 权利要求1的试剂盒, 其中所述表面包含多个不同的结合域且所述捕捉试剂和所述锚定试剂定位在两个不同的结合域上。

9. 权利要求7的试剂盒, 其中所述孔包含多个不同的结合域且所述捕捉试剂和所述锚定试剂定位在两个不同的结合域上。

10. 权利要求1的试剂盒, 其中所述表面包含多个不同的结合域且所述捕捉试剂和所述锚定试剂定位在相同的结合域上。

改进的测定方法

[0001] 本申请是基于申请日为2014年3月12日,优先权日为2013年3月13日,申请号为201910588439.3,发明名称为:“改进的测定方法”的专利申请的分案申请。

[0002] 对相关申请的交叉引用

[0003] 对分别于2013年3月13日提交的美国临时申请系列号61/779,050和2013年12月23日提交的61/919,887进行引用,其各自公开通过引用以其整体并入本文。

发明领域

[0004] 本发明涉及用于进行免疫分析的改进的方法。所述方法经设计以在免疫分析中放大信号并锚定其中采用的免疫分析复合物。

[0005] 发明背景

[0006] 已经开发了大量关于采用结合反应的技术的文献,例如抗原抗体反应,核酸杂交和受体配体反应,用于对样品中感兴趣的分析物的灵敏测量。许多生物化学结合系统的高度特异性导致了在各种市场中许多有价值的分析方法和系统,包括基础研究,人用和兽用诊断,环境监控以及工业测试。可以通过直接测量在结合反应中分析物的参与来测量感兴趣的分析物的存在。在一些方法中,可以通过测量附接到一种或多种结合材料的可观察标记物来指示该参与。

[0007] 虽然夹心法免疫分析(sandwich immunoassay)形式在许多应用中提供了极好的灵敏度和特异性,一些分析物以过低的浓度存在无法通过传统的免疫分析技术检测。夹心法免疫分析的进行也可能因为检测抗体的非特异性结合以及包含高解离率抗体的夹心法混合物的不稳定性而被限制。然而,修改传统方法来改进灵敏度和特异性的努力通常导致更加复杂,劳动密集的方案,其可能由每一步的低效率而被阻碍,可能极大的影响分析的灵敏度和特异性。例如,在要求多个结合事件和/或反映的复杂分析中,如果任意一个事件或反应不太理想,整体分析的灵敏度和特异性可能变差。对于通过改进灵敏度,减少非特异性结合和改进夹心法复合物的稳定性改进夹心法免疫分析表现的新技术有需要。

[0008] 发明简述

[0009] 本发明考虑以下的具体实施方案。不脱离本发明的精神和范围,由本领域的技术人员可以对本文所述的实施方案进行多种修改,增加和改变。这些修改,增加和改变意在落入权利要求的范围内。

[0010] 实施方案(1)一种在样品中检测感兴趣的分析物的方法,包含:使所述分析物结合到:(i)表面上的捕捉试剂,所述表面包含所述用于所述分析物的捕捉试剂,以及锚定试剂;和(ii)用于所述分析物的检测试剂,其与核酸探针相连;从而在所述表面上形成包含所述捕捉试剂,分析物和检测试剂的复合物;延伸所述探针以形成延伸的序列,其包含结合到锚定试剂的锚定区;将所述延伸的序列结合到所述锚定试剂;以及测量结合到所述表面的延伸序列的量。

[0011] 在实施方案(1)中,所述捕捉试剂可以是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位(mimotope),或适体(aptamer)。在具体的实施方案中,所述捕捉试剂是抗

体。所述检测试剂可以是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体。在具体的实施方案中,所述检测试剂是抗体。在实施方案(1)的一个具体实施例中,所述捕捉和检测试剂是针对分析物的抗体。所述锚定试剂可以包括寡核苷酸序列,适体,适体配体,抗体,抗原,配体,受体,半抗原,表位,或模拟位;以及可选的,所述锚定区可以包括适体而所述锚定试剂可以包括适体配体。所述锚定区可以包含核酸序列而所述锚定试剂可以包括DNA结合蛋白。所述锚定试剂可以包括寡核苷酸序列而所述锚定试剂可以包括互补的寡核苷酸序列。所述锚定区可以包括单链寡核苷酸序列或双链寡核苷酸序列。

[0012] 实施方案(1)的结合步骤可以进一步包括所述锚定区和所述锚定试剂之间形成三螺旋。所述方法还可以进一步包含所述锚定区的变性,以在结合步骤之前暴露单链序列;在结合步骤之前将锚定区暴露于螺旋酶活性;和/或在结合步骤之前将所述锚定区暴露于核酸酶处理。在这一实施方案中,所述锚定区可以包含一个或多个半抗原修饰的碱基和所述锚定试剂可以包括一个或多个对于所述半抗原特异性的抗体;和/或所述锚定区可以包括一个或多个修饰的碱基而所述锚定试剂可以包括一个或多个对于所述配体特异性的受体。所述延伸的序列可以进一步包含一个或多个检测序列而测量步骤可以包括使所述延伸的序列与多个标记的探针接触,所述标记的探针与所述一个或多个检测序列互补;所述延伸的序列可以包括一个或多个修饰的碱基而测量步骤可以包括使所述延伸的序列与多个可检测的部分接触,所述可检测的部分能够结合所述一个或多个修饰的碱基;和/或所述延伸的序列可以包含一个或多个标记的碱基而测量步骤可以进一步包括检测所述一个或多个标记的碱基的存在。在这一实施方案中,所述一个或多个修饰的碱基包含适体,适体配体,抗体,抗原,配体,受体,半抗原,表位,或模拟位,而所述多个可检测的部分每一个包含所述一个或多个修饰的碱基的结合伴侣以及可检测标记物。所述一个或多个修饰的碱基可以包含链霉亲和素而所述多个可检测的部分每一个包含生物素和可检测标记物;和/或所述一个或多个修饰的碱基可以包含生物素而所述多个可检测的部分每一个包含链霉亲和素和可检测的标记物;和/或所述一个或多个修饰的碱基可以包含亲合素而所述多个可检测的部分每一个包含生物素和可检测标记物;和/或所述一个或多个修饰的碱基可以包含生物素而所述多个可检测的部分每一个包含亲合素和可检测标记物。

[0013] 实施方案(1)的第一个步骤可以包含使分析物以以下顺序结合到以下种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)用于所述分析物的检测试剂;或实施方案(1)的第一个步骤可以包含使分析物以以下顺序结合到以下种类:(i)用于所述分析物的检测试剂;和(ii)在所述表面上的捕捉试剂;和/或第一个步骤可以包含使分析物同时或基本同时结合到以下种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)用于所述分析物的检测试剂。

[0014] 实施方案(1)的延伸步骤可以包含使探针结合到模板核酸序列,以及通过聚合酶链式反应延伸所述探针;和/或使所述探针结合到模板核酸序列,形成环形核酸模板,并通过滚环扩增延伸所述环形模板。在这一实施方案中,探针延伸后延伸的探针可以仍然定位在所述表面上。因此,在延伸步骤后,复合物可以仍然结合到所述表面,例如,所述延伸的探针在复合物在所述表面上的位置的10-100 μm 之内的位置结合到锚定试剂。

[0015] 实施方案(1)的延伸步骤可以包含PCR(聚合酶链式反应),LCR(连接酶链式反应),SDA(链置换扩增),3SR(自维持合成反应),或等温扩增方法。在一个实施方案中,所述延伸步骤可以包括等温扩增方法,例如螺旋酶依赖的扩增或滚环扩增(RCA)。

[0016] 实施方案(1)中所指的表面可以包含颗粒和/或多孔板的孔。所述表面可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上的两个不同的结合域上。如果所述表面是板的孔,所述孔可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的两个不同的结合域上;和/或所述表面可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上相同的结合域上。在一个实施方案中,所述孔可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的相同的结合域上。捕捉试剂和锚定试剂可以在所述表面上的10-100nm内。所述表面可以包括电极而测量步骤可以进一步包括向所述电极施加电压波形以产生电化学发光信号,以及可选的,所述方法包括收集电极上的颗粒并向所述电极施加电压波形以产生电化学发光信号。

[0017] 实施方案(1)的测量步骤可以进一步包含使延伸的序列结合到具有可检测标记物的检测探针,测量所述可检测标记物,并将所述测量与样品中分析物的量关联,其中所述检测探针包含与延伸序列的区互补的核酸序列。可以通过测量光散射,光吸收,荧光,化学发光,电化学发光,生物发光,磷光,放射性,磁场,或其组合测量所述检测标记物。在实施方案(1)的具体实施例中,所述可检测标记物是ECL标记物而测量步骤可以包括测量ECL信号。

[0018] 实施方案(2):一种用于检测样品中感兴趣的分析物的试剂盒,包含,一个或多个管形瓶(vial),容器,或隔室:(a)包含(i)用于所述分析物的捕捉试剂,和(ii)锚定试剂的表面;和(b)用于所述分析物的检测试剂,其连接到核酸探针。

[0019] 实施方案(2)的锚定试剂可以包含寡核苷酸序列,适体,适体配体,抗体,抗原,配体,受体,半抗原,表位,或模拟位,而捕捉试剂可以包含抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体。在具体的实施方案中,所述捕捉试剂可以包括抗体和/或所述检测试剂可以包括抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体。在所述试剂盒的具体实施方案中,所述检测试剂是抗体。

[0020] 实施方案(2)的试剂盒的表面可以包括颗粒和/或多孔板的孔。所述表面可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上的两个不同的结合域上。如果所述试剂盒的表面是板的孔,所述表面可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的两个不同的结合域上;和/或所述表面可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上相同的结合域上。在所述试剂盒的具体实施例中,所述表面是孔而所述孔包括可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的相同的结合域上。所述捕捉试剂和锚定试剂可以在所述表面上的10-100nm内。此外,所述试剂盒的表面可以包含电极。

[0021] 实施方案(3):一种检测样品中感兴趣的分析物的方法,包含:(a)使所述分析物结合:(i)表面上的捕捉试剂,所述表面包含所述用于所述分析物的捕捉试剂,以及包含锚定核苷酸序列的锚定试剂;和(ii)用于所述分析物的检测试剂,其与核酸探针相连;从而在所述表面上形成包含所述捕捉试剂,分析物和检测试剂的复合物;(b)延伸所述探针以形成延伸的序列,其包含与所述锚定序列互补的锚定序列互补物;(c)使所述锚定序列与所述锚定序列互补物杂交;和(d)测量结合到所述表面的延伸序列的量。

[0022] 在实施方案(3)中,所述捕捉试剂可以是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在具体的实施例中,所述捕捉试剂是抗体。同样的,所述检测试剂是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在实施方案(3)的

具体实施例中,所述捕捉试剂是抗体。在实施方案(3)的一个实施例中,所述捕捉试剂和检测试剂是针对分析物的抗体。锚定寡核苷酸序列可以包含单链寡核苷酸序列或双链寡核苷酸序列。延伸的序列可以进一步包含一个或多个检测序列,而测量步骤可以进一步包含使所述延伸的序列与多个标记的探针接触,所述标记的探针与所述一个或多个检测序列互补;可替换的或另外,所述延伸的序列可以进一步包括一个或多个修饰的碱基而测量步骤可以进一步包括使所述延伸的序列与多个可检测的部分接触,所述可检测的部分能够结合所述一个或多个修饰的碱基。在具体的实施例中,所述延伸的序列可以包含一个或多个标记的碱基而测量步骤可以进一步包括检测所述一个或多个标记的碱基的存在。所述一个或多个修饰的碱基包含适体,适体配体,抗体,抗原,配体,受体,半抗原,表位,或模拟位,而所述多个可检测的部分每一个包含所述一个或多个修饰的碱基的结合伴侣以及可检测标记物。所述一个或多个修饰的碱基可以包含链霉亲和素而所述多个可检测的部分每一个包含生物素和可检测标记物;所述一个或多个修饰的碱基包含生物素而所述多个可检测的部分每一个包含链霉亲和素和可检测的标记物;所述一个或多个修饰的碱基包含亲和素而所述多个可检测的部分每一个包含生物素和可检测标记物;和/或所述一个或多个修饰的碱基包含生物素而所述多个可检测的部分每一个包含亲和素和可检测标记物。

[0023] 实施方案(3)的步骤(a)可以包括使分析物以以下顺序结合到以下种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)用于所述分析物的检测试剂。或者,的步骤(a)可以包括使分析物以以下顺序结合到以下种类:(i)用于所述分析物的检测试剂;和(ii)在所述表面上的捕捉试剂。在另一个实施例中,步骤(a)可以包含使分析物同时或基本同时结合到以下种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)用于所述分析物的检测试剂。

[0024] 实施方案(3)的延伸步骤可以包括可以使探针结合到模板核酸序列,以及通过聚合酶链式反应延伸所述探针。或者,所述延伸步骤可以包括使所述探针结合到模板核酸序列,形成环形核酸模板,并通过滚环扩增延伸所述环形模板。探针延伸后延伸的探针可以仍然定位在所述表面上,例如,在延伸步骤后,复合物可以仍然结合到所述表面,在一个实施例中,,所述延伸的探针在复合物在所述表面上的位置的10-100 μm 之内的位置结合到锚定试剂。在这一具体的实施方案中,所述延伸步骤可以包括PCR(聚合酶链式反应),LCR(连接酶链式反应),SDA(链置换扩增),3SR(自维持合成反应),或等温扩增方法。在一个实施方案中,所述延伸步骤可以包括等温扩增方法,例如螺旋酶依赖的扩增或滚环扩增(RCA)。

[0025] 实施方案(3)的表面可以包含颗粒和/或多孔板的孔。所述表面可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上的两个不同的结合域上。如果所述表面是板的孔,其可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的两个不同的结合域上。所述表面可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上相同的结合域上。如果所述表面是孔,其可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的相同的结合域上。捕捉试剂和锚定试剂可以在所述表面上的10-100nm内。在具体的实施例中,所述表面可以包括电极而测量步骤可以进一步包括向所述电极施加电压波形以产生电化学发光信号,以及可选的,所述方法包括收集电极上的颗粒并向所述电极施加电压波形以产生电化学发光信号。所述测量步骤可以进一步包含使延伸的序列结合到具有可检测标记物的检测探针,测量所述可检测标记物,并将所述测量与样品中分析物的量关联,其中所述检测探针包含与延伸序列的区互补的核酸序列。在这一实施

方案中,可以通过测量光散射,光吸收,荧光,化学发光,电化学发光,生物发光,磷光,放射性,磁场,或其组合测量所述检测标记物。例如,所述可检测标记物是ECL标记物而测量步骤可以包括测量ECL信号。

[0026] 实施方案(4):一种用于检测样品中感兴趣的分析物的试剂盒,包含,一个或多个管形瓶,容器,或隔室:(a)包含(i)用于所述分析物的捕捉试剂,和(ii)锚定试剂的表面;和(b)用于所述分析物的检测试剂,其连接到核酸探针。

[0027] 实施方案(4)的试剂盒包括捕捉试剂,其包含抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体。在具体的实施方案中,所述捕捉试剂可以包括抗体。同样的,检测试剂可以包括抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,且具体的,所述检测试剂可以包括抗体。

[0028] 实施方案(4)的试剂盒包括表面,其包含颗粒和/或多孔板的孔。所述表面可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上的两个不同的结合域上。如果所述试剂盒的表面是孔,所述孔可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的两个不同的结合域上。所述表面可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上相同的结合域上,例如,如果所述表面是孔,所述孔包括可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的相同的结合域上。例如,所述捕捉试剂和锚定试剂可以在所述表面上的10-100nm内。实施方案(4)的表面可以包括电极。

[0029] 实施方案(5):一种检测样品中感兴趣的分析物的方法,包含:(a)使所述分析物结合:(i)表面上的捕捉试剂,所述表面包含所述用于所述分析物的捕捉试剂,以及包含锚定核苷酸序列的锚定试剂;(ii)用于所述分析物的第一检测试剂,其与第一核酸探针相连;和(iii)用于所述分析物的第二检测试剂,其与第二核酸探针相连;从而在所述表面上形成包含所述结合试剂,分析物和第一以及第二检测试剂的复合物;(b)使用要求第一和第二探针接近的延伸步骤,延伸第二探针以形成延伸的序列,其包含与所述锚定序列互补的锚定序列互补物;(c)使所述锚定序列与所述锚定序列互补物杂交;和(d)测量结合到所述表面的延伸的序列的量。

[0030] 实施方案(5)的捕捉试剂可以是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体。在具体的实施例,所述捕捉试剂是抗体。同样的,所述第一检测试剂是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在具体实施例,所述第一检测试剂是抗体。所述第二检测试剂可以是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在具体实施例,所述第二捕捉试剂是抗体。更具体的,所述捕捉试剂和第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0031] 在实施方案(5)中,所述锚定寡核苷酸序列可以包括单链寡核苷酸序列或双链寡核苷酸序列。在这一实施方案中,延伸的序列可以进一步包含一个或多个检测序列,而测量步骤可以进一步包含使所述延伸的序列与多个标记的探针接触,所述标记的探针与所述一个或多个检测序列互补。所述延伸的序列也可以包括一个或多个修饰的碱基而测量步骤可以进一步包括使所述延伸的序列与多个可检测的部分接触,所述可检测的部分能够结合所述一个或多个修饰的碱基。所述延伸的序列可以包含一个或多个标记的碱基而测量步骤可以进一步包括检测所述一个或多个标记的碱基的存在。所述一个或多个修饰的碱基可以包含适体,适体配体,抗体,抗原,配体,受体,半抗原,表位,或模拟位,而所述多个可检测的部

分每一个包含所述一个或多个修饰的碱基的结合伴侣以及可检测标记物。例如,所述一个或多个修饰的碱基可以包含链霉亲和素而所述多个可检测的部分每一个包含生物素和可检测标记物;所述一个或多个修饰的碱基包含生物素而所述多个可检测的部分每一个包含链霉亲和素和可检测的标记物;所述一个或多个修饰的碱基包含亲和素而所述多个可检测的部分每一个包含生物素和可检测标记物;和/或所述一个或多个修饰的碱基包含生物素而所述多个可检测的部分每一个包含亲和素和可检测标记物。

[0032] 实施方案(5)的步骤(a)可以包括使分析物以以下顺序结合到以下种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)用于所述分析物的检测试剂。或者,步骤(a)可以包括使分析物以以下顺序结合到以下种类:(i)用于所述分析物的检测试剂;和(ii)在所述表面上的捕捉试剂;或者步骤(a)可以包含使分析物同时或基本同时结合到以下种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)用于所述分析物的检测试剂。

[0033] 实施方案(5)的延伸步骤可以包括可以使探针结合到模板核酸序列,以及通过聚合酶链式反应延伸所述探针。所述延伸步骤可以进一步包括使所述探针结合到模板核酸序列,形成环形核酸模板,并通过滚环扩增延伸所述环形模板。探针延伸后延伸的探针可以仍然定位在所述表面上,例如,在延伸步骤后,复合物可以仍然结合到所述表面。所述延伸的探针在复合物在所述表面上的位置的10-100 μm 之内的位置结合到锚定试剂。所述延伸步骤可以包括PCR(聚合酶链式反应),LCR(连接酶链式反应),SDA(链置换扩增),3SR(自维持合成反应),或等温扩增方法。在一个实施方案中,所述延伸步骤可以包括等温扩增方法,例如螺旋酶依赖的扩增或滚环扩增(RCA)。

[0034] 实施方案(5)的延伸过程可以包括使步骤(a)中形成的复合物接触连接体序列(connector sequence),所述连接体序列包含(i)与第二探针互补的内部序列和(ii)与第一探针的非重叠区互补的两端序列。所述方法可以进一步包括连接连接体寡核苷酸的两端序列以形成环形靶序列,其与第一和第二探针都杂交。或者,所述延伸过程可以包括使实施方案(5)的步骤(a)中形成的复合物与第一连接体寡核苷酸序列接触,其包括与第一探针的第一区和第二探针的第一区互补的第一连接体探针序列,以及包含第二探针序列的第二连接体寡核苷酸,所述第二探针序列与第一探针的第二非重叠区和第二探针的第二非重叠区互补;以及可选的,连接所述第一和第二连接体寡核苷酸以形成环形靶序列,其与第一和第二探针都杂交。

[0035] 实施方案(5)的表面可以包含颗粒和/或多孔板的孔。所述表面可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上的两个不同的结合域上。如果所述表面是板的孔,所述孔可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的两个不同的结合域上。所述表面也可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上相同的结合域上。如果所述表面是板的孔,所述孔可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的相同的结合域上。捕捉试剂和锚定试剂可以在所述表面上的10-100nm内。在具体的实施例中,所述表面可以包括电极而测量步骤可以进一步包括向所述电极施加电压波形以产生电化学发光信号,以及可选的,实施方案(5)方法进一步包括收集电极上的颗粒并向所述电极施加电压波形以产生电化学发光信号。

[0036] 实施方案(5)的测量步骤可以进一步包括使延伸的序列结合到具有可检测标记物的检测探针,测量所述可检测标记物,并将所述测量与样品中分析物的量关联,其中所述检

测探针包含与延伸序列的区互补的核酸序列可以通过测量光散射,光吸收,荧光,化学发光,电化学发光,生物发光,磷光,放射性,磁场,或其组合测量所述检测标记物。在具体的实施例中,所述可检测标记物是ECL标记物而测量步骤可以包括测量ECL信号。

[0037] 实施方案(6):一种用于检测样品中感兴趣的分析物的试剂盒,包含,一个或多个管形瓶,容器,或隔室:(a)表面,其包含(i)用于所述分析物的捕捉试剂,和(ii)包含锚定寡核苷酸序列的锚定试剂;和(b)用于所述分析物的第一检测试剂,其连接到第一核酸探针;和(c)用于所述分析物的第二检测试剂,其连接到第二核酸探针。

[0038] 实施方案(6)的捕捉试剂可以包括抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在具体的实施例中所述捕捉试剂可以包括抗体。同样的,所述第一检测试剂可以包括抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在具体的实施例中,所述第一检测试剂可以包括抗体。同样的,所述第二检测试剂可以包括抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在具体的实施例中,所述第二检测试剂可以包括抗体。

[0039] 实施方案(6)的表面可以包含颗粒和/或多孔板的孔。所述表面可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上的两个不同的结合域上。如果所述试剂盒的表面是孔,所述孔可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的两个不同的结合域上。所述表面可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上相同的结合域上;和/或如果所述表面是孔,所述孔可以包括可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的相同的结合域上。所述捕捉试剂和锚定试剂可以在所述表面上的10-100nm内。在具体的实施例中,所述表面可以包括电极。

[0040] 实施方案(7):一种检测样品中感兴趣的分析物的方法,包含:(a)使所述分析物结合:(i)表面上的用于所述分析物的捕捉试剂,所述表面包含所述捕捉试剂和锚定试剂;(ii)用于所述分析物的第一检测试剂,包含第一近端探针,和(iii)用于所述分析物的第二检测试剂,包含第二近端探针;从而在所述表面上形成包含所述捕捉试剂,分析物和第一以及第二检测试剂的检测复合物;(b)使(c)中形成的检测复合物与连接体序列接触,所述连接体序列包含(i)与第二近端探针互补的内部序列和(ii)与第一近端探针的非重叠区互补的两端序列;(c)使所述连接体序列与第一和第二近端探针杂交;(d)连接所述连接体寡核苷酸的两端序列以形成环形靶序列,其与第一和第二近端探针都杂交;(e)通过所述靶序列的滚环扩增延伸所述第二近端探针以生成包含结合域的扩增子,所述结合域结合锚定试剂;(f)使所述扩增子结合锚定试剂;和(g)测量所述表面上的扩增子的量。

[0041] 实施方案(8):一种检测样品中感兴趣的分析物的方法,包含:(a)使所述分析物结合:(i)表面上的用于所述分析物的捕捉试剂,所述表面包含所述捕捉试剂和锚定试剂;(ii)用于所述分析物的第一检测试剂,包含第一近端探针,和(iii)用于所述分析物的第二检测试剂,包含第二近端探针;从而在所述表面上形成包含所述捕捉试剂,分析物和第一以及第二检测试剂的检测复合物;(b)使(c)中形成的检测复合物与第一连接体寡核苷酸和第二连接体寡核苷酸接触,其中(i)所述第一连接体的第一端和所述第二连接体的第二端与所述第一近端探针的非重叠区互补;(c)使所述第一和第二连接体寡核苷酸与第一和第二近端探针杂交;(d)连接所述第一和第二连接体寡核苷酸以形成环形靶序列,其与第一和第二近端探针都杂交;(e)通过所述靶序列的滚环扩增延伸所述第二近端探针以生成包含结

合域的扩增子,所述结合域结合锚定试剂;(f)使所述扩增子结合锚定试剂;和(g)测量所述表面上的扩增子的量。

[0042] 实施方案(7)和(8)的捕捉试剂可以是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在具体的实施例中,所述捕捉试剂是抗体。类似的,所述第一检测试剂是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,例如,所述第一检测试剂是抗体。另外,所述第二检测试剂可以是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,例如,所述第二捕捉试剂是抗体。在实施方案(7)和(8)的具体实施例中,所述捕捉试剂和第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0043] 实施方案(7)和(8)的锚定试剂可以包括寡核苷酸序列,适体,适体配体,抗体,抗原,配体,受体,半抗原,表位,或模拟位。在一个实施例中,所述结合域可以包括适体而所述锚定试剂可以包括适体配体。所述结合域可以包括核酸序列而所述锚定试剂可以包括DNA结合蛋白;和/或所述锚定试剂可以包括寡核苷酸序列而所述扩增子可以包括互补的寡核苷酸序列。

[0044] 实施方案(7)和(8)的扩增子可以包含一个或多个检测序列而测量步骤可以进一步包含使所述延伸的序列与多个标记的探针接触,所述标记的探针与所述一个或多个检测序列互补。此外,所述扩增子可以进一步包含一个或多个修饰的碱基而测量步骤可以进一步包括使所述延伸的序列与多个可检测的部分接触,所述可检测的部分能够结合所述一个或多个修饰的碱基。此外,所述扩增子可以进一步包括一个或多个标记的碱基而测量步骤可以进一步包括检测所述一个或多个标记的碱基的存在。所述一个或多个修饰的碱基可以包含适体,适体配体,抗体,抗原,配体,受体,半抗原,表位,或模拟位,而所述多个可检测的部分每一个包含所述一个或多个修饰的碱基的结合伴侣以及可检测标记物。所述一个或多个修饰的碱基可以包含链霉亲和素而所述多个可检测的部分每一个包含生物素和可检测标记物;所述一个或多个修饰的碱基包含生物素而所述多个可检测的部分每一个包含链霉亲和素和可检测的标记物;所述一个或多个修饰的碱基包含亲和素而所述多个可检测的部分每一个包含生物素和可检测标记物;和/或所述一个或多个修饰的碱基包含生物素而所述多个可检测的部分每一个包含亲和素和可检测标记物。

[0045] 实施方案(7)和(8)的步骤(a)可以包含使分析物以以下顺序结合到以下种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)用于所述分析物的第一和第二检测试剂。或者,步骤(a)可以包括使分析物以以下顺序结合到以下种类:(i)用于所述分析物的第一和第二检测试剂;和(ii)在所述表面上的捕捉试剂。此外,步骤(a)可以包括使分析物同时或基本同时结合到以下种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)用于所述分析物的第一和第二检测试剂。

[0046] 实施方案(7)和(8)的扩增子在探针延伸后可以仍然定位在所述表面上。所述复合物可以在延伸步骤后仍然结合到所述表面。例如,所述扩增子在复合物在所述表面上的位置的10-100 μm 之内的位置结合到所述锚定试剂。

[0047] 实施方案(7)和(8)的表面可以包括颗粒和/或多孔板的孔。所述表面可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上的两个不同的结合域上。如果所述表面是板的孔,所述孔可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的两个不同的结合域上。所述表面可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上相同的结合域上。如果所述表面是板的孔,所述孔可以包含多个不同的结

合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的相同的结合域上。在具体的实施例中,捕捉试剂和锚定试剂可以在所述表面上的10-100nm内。

[0048] 此外,所述表面可以包括电极而测量步骤可以包括向所述电极施加电压波形以产生电化学发光信号。在这些实施方案中((7)和(8)),该方法可以进一步包括收集电极上的颗粒并向所述电极施加电压波形以产生电化学发光信号。测量步骤可以包括使扩增子结合到具有可检测标记物的检测探针,测量所述可检测标记物并使所述测量与样品中的分析物的量关联,其中所述检测探针包含与所述扩增子的区互补的核酸序列。可以通过测量光散射,光吸收,荧光,化学发光,电化学发光,生物发光,磷光,放射性,磁场,或其组合测量所述检测标记物。例如,所述可检测标记物是ECL标记物而测量步骤可以包括测量ECL信号。

[0049] 实施例(9):一种用于检测样品中感兴趣的分析物的试剂盒,包含,一个或多个管形瓶,容器,或隔室:(a)表面,其包含(i)用于所述分析物的捕捉试剂,和(ii)锚定试剂;(b)用于所述分析物的第一检测试剂,其包含第一近端探针;(c)用于所述分析物的第二检测试剂,其包含第二近端探针;和(d)连接体序列,其包含(i)与第二近端探针互补的内部序列和(ii)与第一近端探针的非重叠序列互补的两端序列。

[0050] 实施例(10):一种用于检测样品中感兴趣的分析物的试剂盒,包含,一个或多个管形瓶,容器,或隔室:(a)表面,其包含(i)用于所述分析物的捕捉试剂,和(ii)锚定试剂;和(b)用于所述分析物的第一检测试剂,其包含第一近端探针;(c)用于所述分析物的第二检测试剂,其包含第二近端探针;和(d)(i)第一连接体寡核苷酸和(ii)第二连接体寡核苷酸,其中(x)所述第一连接体的第一端和第二连接体的第一端与第一近端探针的两个非重叠区互补和(y)所述第一连接体的第二端和第二连接体的第二端与第一近端探针生的两个非重叠区互补。

[0051] 实施方案(9)和(10)的捕捉试剂可以包括抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体。在具体的实施例中,所述捕捉试剂可以包括抗体。所述第一检测试剂可以包括抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在具体的实施例中,所述第一检测试剂可以包括抗体。所述第二检测试剂可以包括抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在具体的实施例中,所述第二捕捉试剂可以包括抗体。

[0052] 实施方案(9)和(10)的表面可以包括颗粒和/或多孔板的孔。所述表面可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上的两个不同的结合域上。如果所述表面是板的孔,所述孔可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的两个不同的结合域上。所述表面可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上相同的结合域上。如果所述表面是板的孔,所述孔可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的相同的结合域上。在具体的实施例中,捕捉试剂和锚定试剂可以在所述表面上的10-100nm内。

[0053] 实施方案(9)和(10)的表面可以包括电极。

[0054] 实施方案(11):一种检测样品中感兴趣的分析物的方法,包含:(a)使所述分析物结合:(i)表面上的用于所述分析物的捕捉试剂,所述表面包含所述捕捉试剂和锚定试剂,所述锚定试剂包含锚定寡核苷酸序列;(ii)用于所述分析物的第一检测试剂,包含第一近端探针,和(iii)用于所述分析物的第二检测试剂,包含第二近端探针;从而在所述表面上

形成包含所述捕捉试剂,分析物和第一以及第二检测试剂的检测复合物;(b)使(c)中形成的检测复合物与连接体序列接触,所述连接体序列包含(i)与所述第二近端探针互补的内部序列,(ii)与所述第一近端探针的非重叠区互补的两端序列和(iii)与所述锚定序列匹配的序列;(c)使所述连接体序列与第一和第二近端探针杂交;(d)连接所述连接体寡核苷酸的两端序列以形成环形靶序列,其与第一和第二近端探针都杂交;(e)通过所述靶序列的滚环扩增延伸所述第二近端探针以生成扩增子,其包含多个与所述锚定序列互补的锚定序列互补物;(f)使所述互补序列与一个互补序列互补物杂交;和测量所述表面上的扩增子的量。

[0055] 实施方案(12):一种检测样品中感兴趣的分析物的方法,包含:(a)使所述分析物结合:(i)表面上的用于所述分析物的捕捉试剂,所述表面包含所述捕捉试剂和锚定试剂,所述锚定试剂包含锚定寡核苷酸序列;(ii)用于所述分析物的第一检测试剂,包含第一近端探针,和(iii)用于所述分析物的第二检测试剂,包含第二近端探针;从而在所述表面上形成包含所述捕捉试剂,分析物和第一以及第二检测试剂的检测复合物;(b)使(a)中形成的检测复合物与第一连接体寡核苷酸和第二连接体寡核苷酸接触,其中(i)所述第一连接体的第一端和第二连接体的第一端与所述第一近端探针的两个非重叠区互补,(ii)所述第一连接体的第二端和第二连接体的第二端与所述第一近端探针的两个非重叠区互补和(iii)所述第一和/或第二连接体还包含与所述锚定序列匹配的序列;(c)使所述第一和第二连接体寡核苷酸与第一和第二近端探针杂交;(d)连接所述第一和第二连接体寡核苷酸以形成环形靶序列,其与第一和第二近端探针都杂交;(e)通过所述靶序列的滚环扩增延伸所述第二近端探针以生成扩增子,其包含多个与所述锚定序列互补的锚定序列互补物;(f)使所述互补序列与一个互补序列互补物杂交;和测量所述表面上的扩增子的量。

[0056] 实施方案(11)和(12)的捕捉试剂是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体。在具体的实施例中,所述捕捉试剂是抗体。所述第一检测试剂是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在具体的实施例中,所述第一检测试剂是抗体。同样的,所述第二检测试剂是抗体,抗原,配体,受体,寡核苷酸,半抗原,表位,模拟位,或适体,而在具体的实施例中,所述第二捕捉试剂是抗体。在一个实施例中,所述第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0057] 实施方案(11)和(12)的扩增子可以进一步包含一个或多个检测序列而测量步骤可以包括使所述延伸的序列与多个标记的探针接触,所述标记的探针与所述一个或多个检测序列互补。此外,所述扩增子也可以包含一个或多个修饰的碱基而测量步骤可以包括使所述延伸的序列与多个可检测的部分接触,所述可检测的部分能够结合所述一个或多个修饰的碱基。所述扩增子此外包括一个或多个标记的碱基而测量步骤可以包括检测所述一个或多个标记的碱基的存在。所述一个或多个修饰的碱基包含适体,适体配体,抗体,抗原,配体,受体,半抗原,表位,或模拟位,而所述多个可检测的部分每一个包含所述一个或多个修饰的碱基的结合伴侣以及可检测标记物。所述一个或多个修饰的碱基可以包含链霉亲和素而所述多个可检测的部分每一个包含生物素和可检测标记物;所述一个或多个修饰的碱基包含生物素而所述多个可检测的部分每一个包含链霉亲和素和可检测的标记物;所述一个或多个修饰的碱基包含亲和素而所述多个可检测的部分每一个包含生物素和可检测标记物;和/或所述一个或多个修饰的碱基包含生物素而所述多个可检测的部分每一个包含亲

合素和可检测标记物。

[0058] 实施方案(11)和(12)的步骤(a)可以包含使分析物以以下顺序结合到以下种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)用于所述分析物的第一和第二检测试剂。或者,步骤(a)可以包括使分析物以以下顺序结合到以下种类:(i)用于所述分析物的第一和第二检测试剂;和(ii)在所述表面上的捕捉试剂。此外,步骤(a)可以包括使分析物同时或基本同时结合到以下种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)用于所述分析物的第一和第二检测试剂。

[0059] 实施方案(11)和(12)的扩增子在探针延伸后可以仍然定位在所述表面上,以及可选的,所述复合物在延伸步骤后仍然结合到所述表面。例如,所述扩增子在复合物在所述表面上的位置的10-100 μm 之内的位置结合到所述锚定试剂。

[0060] 实施方案(11)和(12)的表面可以包括颗粒和/或多孔板的孔。可选的,所述表面可以包括多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上的两个不同的结合域上。如果所述表面是板的孔,所述孔可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的两个不同的结合域上。所述表面可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述表面上相同的结合域上。如果所述表面是板的孔,所述孔可以包含多个不同的结合域而捕捉试剂和锚定试剂定位在所述孔中的相同的结合域上。所述捕捉试剂和锚定试剂可以在所述表面上的10-100nm内。

[0061] 实施方案(11)和(12)的表面可以包含电极而测量步骤可以包括向所述电极施加电压波形以产生电化学发光信号。可选的,实施方案(11)和(12)进一步包含收集电极上的颗粒并向所述电极施加电压波形以产生电化学发光信号。测量步骤也可以包括使扩增子结合到具有可检测标记物的检测探针,测量所述可检测标记物并使所述测量与样品中的分析物的量关联,其中所述检测探针包含与所述扩增子的区互补的核酸序列。可以通过测量光散射,光吸收,荧光,化学发光,电化学发光,生物发光,磷光,放射性,磁场,或其组合测量所述检测标记物。在一个实施例中,所述可检测标记物是ECL标记物而测量步骤可以包括测量ECL信号。

[0062] 实施方案(11)和(12)的样品可以包含一种或多种分析物分子,而所述表面可以包括用于所述一种或多种分析物分子的多种捕捉试剂,其分布在位于所述表面上的多个可解析结合区(resolvable binding region),而所述方法可以包括:(x)使一种或多种分析物分子结合到所述表面上的一种或多种捕捉试剂;(y)确定每个结合区中分析物分子的存在或不存在;和(z)鉴定含有分析物分子的结合区的数量和/或不含有分析物分子的分析域的数量。测量步骤可以包括来自所述表面的光信号成像以生成包含多个像素点的图像而每个可解析结合区映射到所述图像中的一个或多个像素点。所述可解析结合区可以是矩阵的元素和/或所述可解析结合区配置为分离的单个颗粒。每个可解析结合区可以是具有体积<100nL的单个纳米孔,例如,其中至少99%的结合区含有零或一种分析物分子,其中至少95%的结合区含有零或一种分析物分子,其中至少80%的结合区含有零或一种分析物分子,和/或其中至少50%的结合区含有零或一种分析物分子。在实施方案(11)和(12)中,使用校准曲线,Poisson分布分析和/或Gaussian分布分析含有至少一种或一种分析物分子的结合区的数量,可以至少部分确定样品中分析物分子的浓度。

[0063] 在实施方案(11)和(12)中,样品可以包含一个或多个分析物分子,表面可以包含多个颗粒,每个包含多个针对分析物分子的结合试剂,其中多个颗粒在多个可解析结合区

间分布,并且该方法可以包括:(i)使一个或多个分析物分子结合表面上的一个或多个结合试剂,并且(ii)在可解析结合区的阵列间分布多个颗粒;并(iii)在每个可解析结合区中测定分析物分子的存在或缺乏,从而鉴定含有分析物分子的结合区的数目和/或不含分析物分子的结合区的数目。

[0064] 实施方案(13):用于检测样品中的感兴趣分析物的试剂盒,其在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含:(a)表面,该表面包含(i)针对分析物的捕捉试剂,和(ii)包含锚定寡核苷酸序列的锚定试剂;(b)包含第一邻近探针的针对分析物的第一检测试剂;(c)包含第二邻近探针的针对分析物的第二检测试剂;和(d)连接体序列,其包含(i)与第二邻近探针互补的内部序列和(ii)两个与第一邻近探针的非重叠区互补的末端序列。

[0065] 实施方案(14):用于检测样品中的感兴趣分析物的试剂盒,其在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含:(a)表面,其包含(i)针对分析物的捕捉试剂,和(ii)包含锚定寡核苷酸序列的锚定试剂;和(b)包含第一邻近探针的针对分析物的第一检测试剂;(c)包含第二邻近探针的针对分析物的第二检测试剂;和(d)(i)第一连接体寡核苷酸和(ii)第二连接体寡核苷酸,其中(x)第一连接体的第一末端和第二连接体的第一末端与第一邻近探针的两个非重叠区互补,并且(y)第一连接体的第二末端和第二连接体的第二末端与第一邻近探针的两个非重叠区互补。

[0066] 实施方案(13)和(14)的捕捉试剂可以包含抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如捕捉试剂可以包含抗体。同样地,第一检测试剂可以包含抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第一检测试剂可以包含抗体。类似地,第二检测试剂可以包含抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第二检测试剂可以包含抗体。

[0067] 实施方案(13)和(14)的表面可以包含颗粒和/或多孔板的孔。可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于表面上的两个独特的结合域上。若表面是孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于孔内的两个独特的结合域上。表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于表面上的相同结合域上。若表面是孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于孔内的相同结合域上。捕捉试剂和锚定试剂可以在表面上的10-100nm内,并且任选地,表面可以包含电极。

[0068] 实施方案(15):检测样品中的分析物的方法,其中该方法可以包含:(a)使分析物结合第一和第二检测试剂以形成检测复合物,每个检测复合物包含分析物、第一检测试剂和第二检测试剂,其中所述第一检测试剂具有第一可检测标记物,并且第二检测试剂具有第二可检测标记物,(b)在多个反应容器间分隔分析物,从而大多数反应容器含有一个或更少的分析物;并且(c)通过计算含有第一和第二可检测标记物的反应容器的数目检测分析物分子的数目。在此实施方案(15)中,第一检测试剂可以是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第一检测试剂是抗体。同样地,第二检测试剂可以是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第二检测试剂是抗体。在一个具体的例子中,第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0069] 实施方案(15)的步骤(a)可以进一步包含形成包含所述分析物和所述检测试剂的溶液,并且步骤(b)可以包含在多个反应容器间分隔溶液,从而在同一容器中找到未结合的

第一检测试剂和未结合的第二检测试剂的可能性小于10分之1。或者,实施方案(15)的步骤(a)可以进一步包括形成包含所述分析物和所述检测试剂的溶液,并且步骤(b)可以包含在多个反应容器间分隔溶液,从而在同一容器中找到未结合的第一检测试剂和未结合的第二检测试剂的可能性小于100分之1。此外,实施方案(15)的步骤(a)可以进一步包括形成包含所述分析物和所述检测试剂的溶液,并且步骤(b)可以包含在多个反应容器间分隔溶液,从而在同一容器中找到未结合的第一检测试剂和未结合的第二检测试剂的可能性小于1000分之1。此外,实施方案(15)的步骤(a)可以进一步包括形成包含所述分析物和所述检测试剂的溶液,并且步骤(b)可以包含在多个反应容器间分隔溶液,从而在同一容器中找到未结合的第一检测试剂和未结合的第二检测试剂的可能性小于10000之1。

[0070] 实施方案(16):检测样品中的分析物的方法,该方法包括:(a)使分析物结合捕捉试剂和第一和第二检测试剂以形成检测复合物,每个检测复合物包含捕捉试剂、分析物、第一检测试剂和第二检测试剂,其中(i)第一检测试剂具有第一可检测标记物,并且第二检测试剂具有第二可检测标记物,(ii)捕捉试剂在表面上;(b)在多个反应容器间分隔分析物,从而多个反应容器含有一个或更少分析物;并(c)通过计算含有第一和第二可检测标记物的反应容器的数目检测分析物分子的数目。在此实施方案中,捕捉试剂可以是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如捕捉试剂是抗体。同样地,第一检测试剂可以是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第一检测试剂是抗体。此外,第二检测试剂可以是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第二检测试剂是抗体。例如,捕捉试剂、第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0071] 实施方案(16)的步骤(b)可以进一步包括在多个反应容器间分隔溶液,从而在同一容器中找到未结合的第一检测试剂和未结合的第二检测试剂的可能性小于10分之1。此外,实施方案(16)的步骤(b)可以进一步包括在多个反应容器间分隔溶液,从而在同一容器中找到未结合的第一检测试剂和未结合的第二检测试剂的可能性小于100之1。实施方案(16)的步骤(b)可以进一步包括在多个反应容器间分隔溶液,从而在同一容器中找到未结合的第一检测试剂和未结合的第二检测试剂的可能性小于1000之1。此外,实施方案(16)的步骤(b)可以进一步包括在多个反应容器间分隔溶液,从而在同一容器中找到未结合的第一检测试剂和未结合的第二检测试剂的可能性小于10000之1。

[0072] 在使捕捉试剂结合分析物前,实施方案(16)的检测复合物中的捕捉试剂可以在表面上;或者在表面上固定化捕捉试剂前,检测复合物中的捕捉试剂结合分析物。在一个例子中,捕捉试剂可以包含靶向模块,并且表面可以包含靶向模块互补体。靶向模块和靶向剂结合配偶选自下列结合对:亲合素-生物素、链霉亲合素-生物素、受体-配体、抗体-抗原、核酸-核酸互补体。

[0073] 实施方案(16)的表面是颗粒,并且任选地,捕捉试剂在多个颗粒上固定化,并且通过使分析物结合捕捉试剂,并且将颗粒分隔到多个反应容器中实现分析物的分隔。捕捉试剂可以在多个颗粒上固定化,并且通过将颗粒分隔到多个反应容器中,然后使分析物结合捕捉试剂实现分析物的分隔。

[0074] 实施方案(16)可以进一步包括将多个颗粒分隔到多个反应容器中,其中多个颗粒包含靶向模块,捕捉试剂包含靶向模块互补体,并且通过使靶向模块互补体结合靶向模块

实现分析物的分隔。实施方案(16)还可以包括在分隔步骤之前和/或分隔步骤之后清洗颗粒。

[0075] 实施方案(16)的表面可以是反应容器之一内的位置。在此实施方案中,捕捉试剂可以在多个反应容器的表面上固定化,并且通过使分析物结合捕捉试剂实现分析物的分隔。任选地,反应容器具有其上固定化有靶向模块的表面,捕捉试剂包含靶向模块互补体,并且通过使靶向模块互补体结合靶向模块实现分析物的分隔。在此具体的例子中,该方法可以进一步包括在检测步骤前清洗反应容器。

[0076] 实施方案(16)的多个反应容器可以包含纳米孔的阵列。多个反应容器可以包含至少10,000个反应容器。在一个实施方案中,反应容器具有小于100nL的体积。任选地,小于50%的反应容器在检测时含有分析物,小于10%的反应容器在检测时含有分析物,小于1%的反应容器在检测时含有分析物,和/或小于0.1%的反应容器在检测时含有分析物。

[0077] 在实施方案(16)的一个方面,第一可检测标记物是偶联酶反应系统的第一酶,并且第二可检测标记物是偶联酶反应系统的第二酶,并且步骤(d)可以包含添加反应系统的一种或多种底物,生成酶反应系统的产物,并且计算含有产物的反应容器。在此实施方案中,可以仅在第一酶和第二酶极其接近(例如,第一和第二酶在彼此的200nM内,或者第一和第二酶在彼此的50nM内)时产生产物。例如,第一酶是氧化酶,第二酶是过氧化酶,并且底物包含氧化酶底物和经标记的Amplex Red或鲁米诺衍生物。在此实施方案中,氧化酶可以是葡萄糖氧化酶,并且氧化酶底物是葡萄糖。在一个实施方案中,由检测复合物中的第一和第二酶催化的反应导致经标记的Amplex Red或鲁米诺在表面上的固定化,并且任选地,该方法可以包含测量表面上的经标记的Amplex Red或鲁米诺。经标记的Amplex Red或鲁米诺是任选地生物素-Amplex Red或鲁米诺,并且该方法可以包含添加经标记的链霉亲和素,并且测量链霉亲和素上的标记物。

[0078] 实施方案(16)的步骤(d)可以包含测量在第一和第二可检测标记物与相同分析物分子结合时产生的接近依赖性信号,并计算产生接近依赖性信号的反应容器的数目,例如,通过PLA-RCA产生接近依赖性信号。例如,第一可检测标记物可以是FRET供体,并且可检测标记物是FRET受体,并且通过激发FRET供体,并且测量从FRET受体的发射测量接近依赖性信号。在一个例子中,可以独立测量第一和第二可检测标记物。任选地,第一和第二可检测标记物是就光谱性质而言彼此不同的发光标记物。在一个例子中,第一可检测标记物是与第一底物起反应以产生第一信号的第一酶,并且第二可检测标记物是与第二底物起反应以产生第二信号的第二酶,并且实施方案(16)的步骤(d)可以包含添加第一酶底物和第二酶底物,并且计算产生第一和第二信号的反应容器的数目。第一和第二信号可以是具有不同光谱特性的光学吸光度的变化。任选地,第一和第二信号是具有不同光谱特性的发光信号。第一和第二酶可以是水解酶,例如选自磷酸酶、硫酸酯酶、半乳糖苷酶、葡萄糖醛酸糖苷酶、或其组合,并且第一和第二底物选自磷酸盐、硫酸盐、半乳糖苷和葡萄糖苷酸修饰的稳定化二氧杂环丁烷(dioxetane)、4-甲基伞形基(4-methylumbelliferyl)、荧光素或其组合。在一个具体的例子中,第一和第二酶选自辣根过氧化酶、beta-半乳糖苷酶、和碱性磷酸酶。实施方案(16)的检测步骤可以包括经由光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、发光、放射性、磁场或其组合的检测。

[0079] 实施方案(17):用于检测样品中的分析物的试剂盒,该试剂盒在一个或多个管形

瓶、容器或区室中包含：(a) 包含第一可检测标记物的第一检测试剂；(b) 包含第二可检测标记物的第二检测试剂；(c) 配置为含有一个或更少的分析物分子的多个反应容器。

[0080] 实施方案(18)：用于检测样品中的分析物的试剂盒，该试剂盒在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含：(a) 包含第一可检测标记物的第一检测试剂；(b) 包含第二可检测标记物的第二检测试剂；(c) 包含捕捉试剂的表面；和(d) 配置为含有一个或更少的分析物分子的多个反应容器。

[0081] 实施方案(17)和(18)的第一和第二检测试剂可以包含抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、适体、或其组合。在一个例子中，第一和第二检测试剂包含抗体。捕捉抗体可以包含抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体，例如捕捉抗体可以包含抗体。在一个例子中，捕捉试剂可以包含靶向模块，并且表面可以包含靶向模块互补体，例如靶向模块和靶向剂结合配偶选自下述结合对：亲合素-生物素、链霉亲合素-生物素、受体-配体、抗体-抗原、核酸-核酸互补体。

[0082] 实施方案(17)和(18)的表面可以是颗粒，并且例如，捕捉试剂在多个颗粒上固定化。或者，表面是反应容器之一内的位置，并且例如，捕捉试剂在多个反应容器的表面上固定化。任选地，反应容器具有其上固定化有靶向模块的表面，并且捕捉试剂包含靶向模块互补体。多个反应容器可以包含纳米孔阵列或油包水乳剂中分散的水液滴。多个反应容器可以包含至少10,000个反应容器，并且任选地，所述多个中的反应容器具有小于100nL的体积。

[0083] 在实施方案(17)和(18)的试剂盒中，第一可检测标记物可以是偶联酶反应系统的第一酶，并且第二可检测标记物是偶联酶反应系统的第二酶，并且试剂盒可以在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含包含反应系统的一种或多种底物。例如，第一酶是氧化酶，第二酶是过氧化酶，并且底物包含氧化酶底物和经标记的Amplex Red或鲁米诺衍生物。在一个具体的实施方案中，氧化酶是葡萄糖氧化酶，并且氧化酶底物是葡萄糖。第一和第二可检测标记物可以是接近依赖性系统的组分，例如第一可检测标记物是FRET供体，并且可检测标记物是FRET受体。可以独立测量第一和第二可检测标记物。任选地，第一和第二可检测标记物是就光谱特性而言彼此不同的发光标记物。

[0084] 在实施方案(17)和(18)的试剂盒中，第一可检测标记物是与第一底物起反应以产生第一信号的第一酶，并且第二可检测标记物是与第二底物起反应以产生不同第二信号的第二酶，并且试剂盒可以在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含第一酶底物和第二酶底物。任选地，第一和第二信号是具有不同光谱特性的光吸光度的变化。在一个例子中，第一和第二信号是具有不同光谱特性的发光信号。第一和第二酶可以是水解酶。在一个例子中，第一和第二酶选自磷酸酶、硫酸酯酶、半乳糖苷酶、葡萄糖醛酸糖苷酶或其组合。第一和第二底物可以选自磷酸盐、硫酸盐、半乳糖苷和葡萄糖苷酸修饰的稳定化二氧杂环丁烷、4-甲基伞形基、荧光素或其组合。任选地，第一和第二酶选自辣根过氧化酶、beta-半乳糖苷酶和碱性磷酸酶。

[0085] 实施方案(19)：检测样品中的感兴趣分析物的方法，其包括：(a) 使分析物结合捕捉试剂、具有第一可检测标记物的第一检测试剂和具有第二可检测标记物的第二检测试剂，并形成复合物，其中复合物中的捕捉试剂在表面上固定化；(b) 交联第一和第二检测试剂以形成交联的产物；(c) 将交联的产物从表面释放到洗脱液；(d) 计算包含第一和第二可

检测标记物两者的洗脱液中的个别交联产物。在此例子(19)中,捕捉试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,并且在一个具体的例子中,捕捉试剂是抗体。同样地,第一检测试剂可以是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,并且在一个具体的例子中,第一检测试剂是抗体。此外,第二检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,并且具体地,第二检测试剂可以是抗体。在一个具体的例子中,捕捉试剂和第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0086] 实施方案(19)可以进一步包括添加交联剂以交联第一和第二检测试剂,例如第一和第二检测试剂包含反应性模块,并且交联剂是与反应性模块连接的多功能性交联剂。例如,反应性模块包含胺、硫醇、酰肼、醛、酯、碘乙酰胺、马来酰亚胺、点击化学试剂(click chemistry reagent)和其组合。交联剂可以包含胺、硫醇、酰肼、醛、酯、碘乙酰胺、马来酰亚胺、点击化学试剂、和其组合。第一和第二检测试剂可以包含结合模块,并且交联剂是结合模块的多价结合配偶。在一个例子中,第一和第二检测试剂是动物物种的抗体,并且交联剂是靶向动物物种的抗体的多价抗物种抗体。第一和第二检测试剂可以包含生物素,并且交联剂是链霉亲和素;第一和第二检测试剂包括链霉亲和素,并且交联剂是生物素;第一和第二检测试剂与链霉亲和素连接,并且交联剂是包含多个生物素分子的聚合物;和/或第一和第二检测试剂分别包含第一和第二核酸探针,并且交联剂是寡核苷酸,其可以包含与第一核酸探针互补的序列和与第二核酸探针互补的不同序列。

[0087] 实施方案(19)的表面可以包含颗粒,反应容器,例如管或安瓿,和/或表面可以包含多孔板的孔。实施方案(19)的方法可以进一步包括收集颗粒,并且清洗颗粒以除去杂质,并且任选地,通过测量光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场或其组合测量第一和第二可检测标记物。在一个具体的例子中,第一和第二可检测标记物包含ECL标记物,并且计算步骤可以包含测量ECL信号。

[0088] 实施方案(20):用于检测样品中的感兴趣分析物的试剂盒在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含:(a)包含固定化捕捉试剂的表面;(b)具有第一可检测标记物的第一检测试剂;(c)具有第二可检测标记物的第二检测试剂;和(d)与第一和第二检测试剂反应性的交联剂。

[0089] 实施方案(20)的第一和第二检测试剂可以包含反应性模块,并且交联剂是与反应性模块连接的多功能性交联剂。反应性模块可以包含胺、硫醇、酰肼、醛、酯、碘乙酰胺、马来酰亚胺、点击化学试剂、及其组合;并且交联剂可以包含胺、硫醇、酰肼、醛、酯、碘乙酰胺、马来酰亚胺、点击化学试剂、及其组合。实施方案(20)的第一和第二检测试剂可以包含结合模块,并且交联剂是结合模块的多价结合配偶,例如第一和第二检测试剂是动物物种的抗体,并且靶向动物物种的抗体的交联剂是多价抗物种抗体;并且第一和第二检测试剂包含生物素,并且交联剂是链霉亲和素;第一和第二检测试剂包含链霉亲和素,并且交联剂是生物素;第一和第二检测试剂与链霉亲和素连接,并且交联剂是包含多个生物素分子的聚合物;和/或第一和第二检测试剂分别包含第一和第二核酸探针,并且交联剂是寡核苷酸,其可以包含与第一核酸探针互补的序列和与第二核酸探针互补的不同序列。

[0090] 实施方案(20)的表面可以包含颗粒、多孔板的孔、或反应容器,例如管或安瓿。另外,表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于表面上的独特的结合域上。若表面是孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于孔内的独特的结合域上。表面还

可以包含电极。

[0091] 实施方案(21):检测样品中的感兴趣分析物的方法,其包括:(a)使分析物结合捕捉试剂、第一检测试剂和第二检测试剂以形成复合物,其中第一检测试剂可以包含第一可检测标记物和第一核酸探针,第二检测试剂可以包含第二可检测标记物和第二核酸探针,并且复合物中的捕捉试剂在表面上固定化;(b)如下交联第一和第二检测试剂:(i)杂交第一探针与第二探针,(ii)杂交第一和第二探针与具有与第一和第二探针互补的区域的第三核酸,或者(iii)连接第一和第二探针;(c)将交联的产物从表面释放到洗脱液中;(d)计算包含第一和第二可检测标记物两者的洗脱液中的各个交联产物。

[0092] 实施方案(21)的捕捉试剂可以是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如捕捉试剂是抗体。同样地,第一检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第一检测试剂是抗体;第二检测试剂可以是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第二检测试剂是抗体。在一个具体的例子中,捕捉试剂和第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0093] 实施方案(21)的表面可以包含颗粒、反应容器,例如管或安瓿、或多孔板的孔。实施方案(21)的方法可以进一步包括收集颗粒,并且清洗颗粒以除去杂质。可以通过测量光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场、或其组合测量第一和第二可检测标记物。在一个具体的例子中,第一和第二可检测标记物包含ECL标记物,并且计算步骤可以包含测量ECL信号。

[0094] 实施方案(22):用于检测样品中的感兴趣分析物的试剂盒在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含:(a)包含固定化捕捉试剂的表面;(b)具有第一可检测标记物和第一核酸探针的第一检测试剂;(c)具有第二可检测标记物和第二核酸探针的第二检测试剂;和(d)具有与第一和第二核酸探针互补的区域的第三核酸。

[0095] 实施方案(22)的表面可以包含颗粒、多孔板的孔或反应容器,例如管或安瓿。表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于表面上的独特的结合域上,并且若表面是孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于孔内的独特的结合域上。表面任选地可以包含电极。

[0096] 实施方案(23):检测样品中的感兴趣分析物的方法,其包括:(a)使分析物结合捕捉试剂、第一检测试剂和第二检测试剂以形成复合物,其中第一检测试剂可以包含第一核酸探针,第二检测试剂可以包含第二核酸探针,并且复合物中的捕捉试剂在表面上固定化;(b)延伸第二核酸探针以形成包含可检测标记物的延伸序列,延伸依赖于复合物中的第一和第二核酸探针的共定位;(c)将延伸序列从表面释放到洗脱液中;并且(d)计算洗脱液中的个别延伸序列。在此实施方案中,捕捉试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体。在一个具体的例子中,捕捉试剂是抗体。同样地,第一检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,并且在一个具体的例子中,第一检测试剂是抗体。第二检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,并且具体地,第二检测试剂是抗体。在一个具体的例子中,捕捉试剂和第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0097] 实施方案(23)的表面可以包含颗粒、反应容器,例如管或安瓿;或多孔板的孔。实施方案(23)的方法可以进一步包括收集颗粒并且清洗颗粒以除去杂质。

[0098] 可以通过测量光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场或其组合测量实施方案(23)的标记物。在一个具体的例子中,标记物可以包含ECL标记物,并且计算步骤可以包含测量ECL信号。

[0099] 实施方案(23)的延伸步骤可以包含使探针结合模板核酸序列,并且通过聚合酶链式反应延伸探针。延伸步骤还可以包括使第一探针结合模板核酸序列,形成环状核酸模板,并且通过滚环扩增延伸环状模板。延伸步骤可以包括使第一探针结合模板核酸序列,使第二探针结合模板序列,并连接第一和第二探针。任选地,标记物是荧光标记物,并且计算个别延伸序列可以包含单分子荧光检测,例如可以包含荧光关联光谱学和/或荧光交叉关联光谱学。单分子荧光检测可以包括使洗脱液流过毛细管,使光源聚焦于毛细管内的体积以创建探测区,并且用光检测仪观察探测区以检测荧光分子通过探测区。单分子荧光检测还可以包括使洗脱液流过毛细管,将光源聚焦于毛细管内的体积以创建探测区,并且用光检测仪观察探测区以检测荧光分子通过探测区。

[0100] 实施方案(24):检测样品中的感兴趣分析物的方法,其包括:(a)使分析物结合捕捉试剂、具有第一可检测标记物的第一检测试剂和具有第二可检测标记物的第二检测试剂,并且形成复合物,其中复合物中的捕捉试剂在表面上固定化;(b)通过将固定化捕捉试剂从表面解离到洗脱液中将形成的复合物从表面释放;并(c)计算包含第一和第二可检测标记物两者的洗脱液中的个别产物。在此实施方案中,捕捉试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如捕捉试剂是抗体;第一检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第一检测试剂是抗体;第二检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第二检测试剂是抗体;并且在一个具体的例子中,捕捉试剂和第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0101] 实施方案(24)的表面可以包含颗粒、反应容器,例如管或安瓿,和/或多孔板的孔。实施方案(24)的方法可以包含收集颗粒并且清洗颗粒以除去杂质。可以通过测量光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场或其组合测量第一和第二可检测标记物,并且在一个具体的实施方案中,第一和第二可检测标记物包含ECL标记物,并且计算步骤可以包含测量ECL信号。

[0102] 实施方案(25):检测样品中的感兴趣分析物的方法,其包括:(a)使分析物结合:(i)包含针对分析物的捕捉试剂的表面的捕捉试剂;(ii)与第一核酸探针连接的针对分析物的第一检测试剂;和(iii)与第二核酸探针连接的针对分析物的第二检测试剂;由此在包含结合试剂、分析物和第一和第二检测试剂的表面上形成复合物;(b)使用需要接近的第一和第二探针的延伸过程,延伸第二探针以形成延伸序列;并且(c)测量与表面结合的延伸序列的量。在此实施方案中,捕捉试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如捕捉试剂是抗体;第一检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第一检测试剂是抗体;第二检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体;例如第二检测试剂是抗体;并且在一个具体的例子中,捕捉试剂和第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0103] 实施方案(25)的延伸序列可以包含一种或多种检测序列,并且测量步骤可以包含使延伸序列与多个经标记的与一种或多种检测序列互补的探针接触;延伸序列可以包含一

种或多种经修饰的碱基,并且测量步骤可以包含使延伸序列与能够结合一种或多种经修饰的碱基的多个可检测模块接触;和/或延伸序列可以包含一种或多种经标记的碱基,并且测量步骤可以包含检测一种或多种经标记的碱基的存在。一种或多种经修饰的碱基包含适体、适体配体、抗体、抗原、配体、受体、半抗原、表位、或模拟位,并且多个可检测模块各自包含一种或多种经修饰的碱基的结合配偶和可检测标记物。一种或多种经修饰的碱基可以包含链霉亲和素,并且多个可检测模块各自包含生物素和可检测标记物;一种或多种经修饰的碱基包含生物素,并且多个可检测模块各自包含链霉亲和素和可检测标记物;一种或多种经修饰的碱基包含亲和素,并且多个可检测模块各自包含生物素和可检测标记物;和/或一种或多种经修饰的碱基包含生物素,并且多个可检测模块各自包含亲和素和可检测标记物。

[0104] 实施方案(25)的步骤(a)可以包含以下述次序使分析物结合下述种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)分析物的检测试剂;以下述次序使分析物结合下述种类:(i)分析物的检测试剂;和(ii)表面上的捕捉试剂;或者同时或基本上同时使分析物结合下述种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)分析物的检测试剂。延伸步骤可以包含使探针结合模板核酸序列,并通过聚合酶链式反应延伸探针;或者使探针结合模板核酸序列,形成环状核酸模板,并且通过滚环扩增延伸环状模板。在此实施方案中,延伸探针在探针延伸后可以仍然位于表面上,例如复合物在延伸步骤后可以仍然与表面结合。延伸步骤可以包含PCR(聚合酶链式反应)、LCR(连接酶链式反应)、SDA(链置换扩增)、3SR(自身持续合成反应)、或等温扩增法。在一个具体的例子中,延伸步骤可以包含等温扩增法,例如螺旋酶依赖性扩增或滚环扩增(RCA)。

[0105] 实施方案(25)的延伸过程可以包含使步骤(a)中形成的复合物接触连接体序列,其包含(i)与第二探针互补的内部序列和(ii)与第一探针的非重叠区互补的两个末端序列。该过程可以进一步包括连接连接体寡核苷酸的两个末端序列以形成环状靶序列,其与第一和第二探针两者杂交。实施方案(25)的延伸过程也可以包括使步骤(a)中形成的复合物接触包含与第一探针的第一区和第二探针上的第一区互补的第一连接体探针序列的第一连接体寡核苷酸序列,和包含与第一探针的第二非重叠区和第二探针的第二非重叠区互补的第二探针序列的第二连接体寡核苷酸。该过程还可以包括连接第一和第二连接体寡核苷酸以形成与第一和第二探针两者杂交的环状靶序列。

[0106] 实施方案(25)的表面可以包含颗粒或多孔板的孔。表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于表面上的两个独特的结合域上。若表面是孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于孔内的两个独特的结合域上。表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于表面上的相同结合域内,并且若表面是孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于孔内的相同结合域上。表面可以包含电极,并且测量步骤可以包含对电极应用电压波形以产生电化学发光信号。任选地,方法包括在电极上收集颗粒,并且对电极应用电压波形以产生电化学发光信号。测量步骤可以进一步包括使延伸序列结合具有可检测标记物的检测探针,测量可检测标记物,并且将测量与样品中的分析物的量关联起来,其中检测探针包含与延伸序列的区域互补的核酸序列。可以通过测量光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场、或其组合测量可检测标记物。在一个具体的例子中,可检测标记物是ECL标记物,并且测量步骤可以包含测量ECL信

号。

[0107] 实施方案(26):用于检测样品中的感兴趣分析物的试剂盒,其在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含:(a)包含针对分析物的捕捉试剂的表面;(b)与第一核酸探针连接的针对分析物的第一检测试剂;和(c)与第二核酸探针连接的针对分析物的第二检测试剂。

[0108] 实施方案(26)的捕捉试剂可以包含抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如捕捉试剂可以包含抗体;第一检测试剂可以包含抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第一检测试剂可以包含抗体;第二检测试剂可以包含抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第二检测试剂可以包含抗体;并且表面可以包含颗粒和/或多孔板的孔。表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于表面上的两个独特的结合域上;并且若表面是孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于孔内的两个独特的结合域上。任选地,表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于表面上的相同结合域上,并且若表面是孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂位于孔内的相同结合域上。表面可以包含电极。

[0109] 实施方案1-26的表面可以包含测定容器(例如试管、小杯、流动池、FACS细胞分选仪、筒或多孔板的孔)的内部表面。表面也可以包含载玻片、测定芯片、或测定阵列;针、探针、珠、或过滤介质;侧向流介质,例如滤膜。

[0110] 实施方案(27):检测包含一种或多种分析物分子的样品中的感兴趣分析物的方法,该方法包括:(a)使样品与包含位于表面上的多个可解析结合区的表面接触,每个可解析结合区包含针对样品中的一种或多种分析物分子的多个捕捉试剂;(b)使一种或多种分析物分子结合(i)表面上的一种或多种捕捉试剂;(ii)包含第一可检测标记物的针对分析物的第一检测试剂;和(iii)包含第二可检测标记物的针对分析物的第二检测试剂;由此形成表面上的可解析结合域上的检测复合物,其包含捕捉试剂、分析物和第一和第二检测试剂,其中第一和第二可检测标记物是不同标记物化合物;(c)测定每个结合区中的分析物分子的存在或缺乏;并且(d)鉴定含有分析物分子的结合区的数目和/或不含分析物分子的结合区的数目。鉴定步骤可以包含成像来自表面的光学信号以产生包含多个像素的图像,并且每个可解析结合区定位到图像中的一个或多个像素。可解析结合区可以是阵列的要素和/或配置为分离个别的颗粒。每个可解析结合区可以是具有体积<100nL的个体纳米孔和/或至少99%结合区含有0或1个分析物分子;至少约95%结合区含有0或1个分析物分子;至少约80%结合区含有0或1个分析物分子;或至少约50%结合区含有0或1个分析物分子。可以至少部分使用含有至少1个或1个分析物分子的结合区的数目的校准曲线、泊松分布分析和/或高斯分布分析测定样品中的分析物分子的浓度。

[0111] 实施方案(27)的表面可以包含多个颗粒,每个包含针对分析物分子的多个捕捉试剂,其中多个颗粒在多个可解析结合区间分布,并且该方法可以包括:(i)使一种或多种分析物分子结合表面上的一种或多种捕捉试剂、和针对一种或多种分析物分子中每种的第一和第二检测试剂,其中第一和第二检测试剂分别包含第一和第二可检测标记物;(ii)在可解析结合区的阵列间分布多个颗粒;并且(iii)测定每个可解析结合区中的分析物分子的存在或缺乏,从而鉴定含有分析物分子的结合区的数目和/或不含分析物分子的结合区的数目,其中任选地,每个可解析结合区是具有体积<100nL的个体纳米孔和/或至少99%结合区含有0或1个分析物分子;至少约95%结合区含有0或1个分析物分子;至少约80%结合区

含有0或1个分析物分子;或至少约50%结合区含有0或1个分析物分子。

[0112] 实施方案(27)中的捕捉试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如捕捉试剂是抗体;第一检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第一检测试剂是抗体;第二检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第二检测试剂是抗体。在一个具体的例子中,捕捉试剂和第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0113] 实施方案(27)的步骤(a)可以包含以下下述次序使分析物结合下述种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)针对分析物的第一和第二检测试剂;以下下述次序使分析物结合下述种类:(i)针对分析物的第一和第二检测试剂;和(ii)表面上的捕捉试剂;或者同时或基本上同时使分析物结合下述种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)针对分析物的第一和第二检测试剂。

[0114] The表面of实施方案(27)可以包含颗粒或多孔板的孔。在一个具体的例子中,表面可以包含电极,并且鉴定步骤可以包含对电极应用电压波形以产生电化学发光信号。实施方案(27)的方法可以进一步包括在电极上收集颗粒,并且对电极应用电压波形以产生电化学发光信号。通过测量光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场、或其组合测量第一可检测标记物;和/或通过测量光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场、或其组合测量第二可检测标记物。可以独立测量第一和第二可检测标记物,并且在一个例子中,第一和第二可检测标记物是就光谱特性而言彼此不同的发光标记物。

[0115] 实施方案(27)的表面可以包含测定容器(例如试管、小杯、流动池、FACS细胞分选仪、筒或多孔板的孔)的内部表面。表面也可以包含载玻片、测定芯片、或测定阵列;针、探针、珠、或过滤介质;侧向流介质,例如滤膜。

[0116] 实施方案(28):用于检测包含一种或多种分析物分子的样品中的感兴趣分析物的试剂盒,该试剂盒包含:(a)包含位于表面上的多个可解析结合区的表面,每个可解析结合区包含针对样品中的一种或多种分析物分子的多个捕捉试剂;(b)包含第一可检测标记物的针对分析物的第一检测试剂,和(c)包含第二可检测标记物的针对分析物的第二检测试剂;其中第一和第二可检测标记物是不同标记物化合物。

[0117] 实施方案(28)的可解析结合区可以是阵列要素和/或配制为分离个别的颗粒。任选地,每个可解析结合区是具有体积<100nL的个别的纳米孔。表面可以包含多个颗粒,每个包含针对分析物分子的多个捕捉试剂,其中多个颗粒在多个可解析结合区间分布,并且试剂盒可以包含:针对一种或多种分析物分子中每种的第一和第二检测试剂,其中第一和第二检测试剂分别包含第一和第二可检测标记物。

[0118] 实施方案(28)中的捕捉试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如捕捉试剂是抗体;第一检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第一检测试剂是抗体;第二检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第二检测试剂是抗体。在一个具体的例子中,捕捉试剂和第一和第二检测试剂是针对分析物的抗体。

[0119] 实施方案(28)的表面可以包含颗粒或多孔板的孔。在一个具体的例子中,表面可以包含电极,并且鉴定步骤可以包含对电极应用电压波形以产生电化学发光信号。通过测

量光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场、或其组合测量第一可检测标记物；和/或通过测量光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场、或其组合测量第二可检测标记物。可以独立测量第一和第二可检测标记物，并且在一个例子中，第一和第二可检测标记物是就光谱特性而言彼此不同的发光标记物。

[0120] The表面of实施方案(28)可以包含测定容器(例如试管、小杯、流动池、FACS细胞分选仪、筒或多孔板的孔)的内部表面。表面也可以包含载玻片、测定芯片、或测定阵列；针、探针、珠、或过滤介质；侧向流介质，例如滤膜。

[0121] 实施方案(29)：检测样品中的HIV p24的方法，其包括：(a)使HIV p24结合：(i)表面上的捕捉试剂，所述表面包含针对HIV p24的捕捉试剂和包含锚定寡核苷酸序列的锚定试剂；(ii)与第一核酸探针连接的针对HIV p24的第一检测试剂；和(iii)与第二核酸探针连接的针对HIV p24的第二检测试剂；由此在表面上形成复合物，其包含结合试剂、HIV p24和第一和第二检测试剂；(b)使用需要接近的第一和第二探针的延伸过程，延伸第二探针以形成包含与锚定序列互补的锚定序列互补体的延伸序列；(c)使锚定序列与锚定序列互补体杂交；并且(d)测量与表面结合的延伸序列的量。

[0122] 实施方案(29)的捕捉试剂可以是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体。在一个具体的例子中，捕捉试剂是抗体。同样地，第一检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体，并且在一个具体的例子中，第一检测试剂是抗体。第二检测试剂可以是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体，并且在一个具体的例子中，第二检测试剂是抗体。更具体地，捕捉试剂和第一和第二检测试剂是针对HIV p24的抗体。

[0123] 在实施方案(29)中，锚定寡核苷酸序列可以包含单链寡核苷酸序列或双链寡核苷酸序列。在此实施方案中，延伸序列可以包含一种或多种检测序列，并且测量步骤可以包含使延伸序列接触与一种或多种检测序列互补多个经标记的探针。延伸序列还可以包含一种或多种经修饰的碱基，并且测量步骤可以包含使延伸序列与能够结合一种或多种经修饰的碱基的多个可检测模块接触。延伸序列可以进一步包括一种或多种经标记的碱基，并且测量步骤可以包含检测一种或多种经标记的碱基的存在。一种或多种经修饰的碱基可以包含适体、适体配体、抗体、抗原、配体、受体、半抗原、表位、或模拟位，并且多个可检测模块各自包含一种或多种经修饰的碱基的结合配偶和可检测标记物。例如，一种或多种经修饰的碱基包含链霉亲和素，并且多个可检测模块各自包含生物素和可检测标记物；一种或多种经修饰的碱基包含生物素，并且多个可检测模块各自包含链霉亲和素和可检测标记物；或者一种或多种经修饰的碱基包含亲和素，并且多个可检测模块各自包含生物素和可检测标记物；和/或一种或多种经修饰的碱基包含生物素，并且多个可检测模块各自包含亲和素和可检测标记物。

[0124] 实施方案(29)的步骤(a)可以包含以下述次序使HIV p24结合下述种类：(i)表面上的捕捉试剂；和(ii)针对HIV p24的检测试剂。或者，步骤(a)可以包含以下述次序使HIV p24结合下述种类：(i)针对HIV p24的检测试剂；和(ii)表面上的捕捉试剂；或步骤(a)可以包含同时或基本上同时使HIV p24结合下述种类：(i)表面上的捕捉试剂；和(ii)针对HIV p24的检测试剂。

[0125] 实施方案(29)的延伸步骤可以包含使探针结合模板核酸序列,并且通过聚合酶链式反应延伸探针。延伸步骤可以进一步包括使探针结合模板核酸序列,形成环状核酸模板,并且通过滚环扩增延伸环状模板。延伸探针在探针延伸后可以仍然位于表面上,例如复合物在延伸步骤后仍然与表面结合。延伸探针可以在表面上的复合物位置的10-100um内的位置与锚定试剂结合。延伸步骤可以包含PCR(聚合酶链式反应)、LCR(连接酶链式反应)、SDA(链置换扩增)、3SR(自身持续合成反应)、或等温扩增法。在一个具体的例子中,延伸步骤可以包含等温扩增法,例如螺旋酶依赖性扩增或滚环扩增(RCA)。

[0126] 实施方案(29)的延伸过程可以包含使步骤(a)中形成的复合物接触连接体序列,其包含(i)与第二探针互补的内部序列和(ii)与第一探针的非重叠区互补的两个末端序列。该方法可以进一步包括连接连接体寡核苷酸的两个末端序列以形成环状靶序列,其与第一和第二探针两者杂交。或者,延伸过程可以包含使实施方案(29)的步骤(a)中形成的复合物接触包含与第一探针的第一区和第二探针上的第一区互补的第一连接体探针序列的第一连接体寡核苷酸序列,和包含与第一探针的第二非重叠区和第二探针的第二非重叠区互补的第二探针序列的第二连接体寡核苷酸;并任选地,连接第一和第二连接体寡核苷酸以形成与第一和第二探针两者杂交的环状靶序列。

[0127] 实施方案(29)的表面可以包含颗粒和/或多孔板的孔。表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于表面上的两个独特的结合域上。若表面是板孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于孔内的两个独特的结合域上。表面还可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于表面上的相同结合域上。若表面是板孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于孔内的相同结合域上。捕捉试剂和锚定试剂可以在表面上的10-100nm内。在一个具体的例子中,表面可以包含电极,并且测量步骤可以包含对电极应用电压波形以产生电化学发光信号,并且任选地,实施方案(29)的方法进一步包括在电极上收集颗粒,并且对电极应用电压波形以产生电化学发光信号。

[0128] 实施方案(29)的测量步骤可以包含使延伸序列结合具有可检测标记物的检测探针,测量可检测标记物,并且将测量与样品中的p24量关联起来,其中检测探针包含与延伸序列的区域互补的核酸序列。可以通过测量光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场或其组合测量可检测标记物。在一个具体的实施方案中,可检测标记物是ECL标记物,并且测量步骤可以包含测量ECL信号。

[0129] 实施方案(30):用于检测样品中的HIV p24的试剂盒,其在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含:(a)表面,该表面包含(i)针对HIV p24的捕捉试剂,和(ii)包含锚定寡核苷酸序列的锚定试剂;(b)与第一核酸探针连接的针对HIV p24的第一检测试剂;和(c)与第二核酸探针连接的针对HIV p24的第二检测试剂。

[0130] 实施方案(30)的捕捉试剂可以包含an抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,并且在一个具体的实施方案中,捕捉试剂可以包含抗体。同样地,第一检测试剂可以包含抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,并且在一个具体的例子中,第一检测试剂可以包含抗体。类似地,第二检测试剂可以包含抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,并且在一个具体的例子中,第二检测试剂可以包含抗体。

[0131] 实施方案(30)的表面可以包含颗粒和/或多孔板的孔。表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于表面上的两个独特的结合域上。若表面是孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于孔内的两个独特的结合域上。表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于表面上的相同结合域上;和/或若表面是孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于孔内的相同结合域上。捕捉试剂和锚定试剂可以在表面上的10-100nm内。在一个具体的例子中,表面可以包含电极。

[0132] 实施方案(31):检测样品中的HIV p24的方法,其包括(a)使HIV p24结合:(i)包含捕捉试剂和锚定试剂的表面上的针对HIV p24的捕捉试剂;(ii)包含第一邻近探针的针对HIV p24的第一检测试剂,和(iii)包含第二邻近探针的针对HIV p24的第二检测试剂;由此在表面上形成检测复合物,其包含捕捉试剂、HIV p24和第一和第二检测试剂;(b)使(c)中形成的检测复合物接触连接体序列,其包含(i)与第二邻近探针互补的内部序列和(ii)两个与第一邻近探针的非重叠区互补的末端序列;(c)使连接体序列与第一和第二邻近探针杂交;(d)连接连接体寡核苷酸的两个末端序列以形成环状靶序列,其与第一和第二邻近探针两者杂交;(e)通过靶序列的滚环扩增延伸第二邻近探针以产生含有结合锚定试剂的结合域的扩增子;(f)使扩增子结合锚定试剂;并且(g)测量表面上的扩增子量。

[0133] 实施方案(32):检测样品中的HIV p24的方法,其包括:(a)使HIV p24结合:(i)包含捕捉试剂和锚定试剂的表面上的针对HIV p24的捕捉试剂;(ii)包含第一邻近探针的针对HIV p24的第一检测试剂,和(iii)包含第二邻近探针的针对HIV p24的第二检测试剂;由此在表面上形成检测复合物,其包含捕捉试剂、HIV p24和第一和第二检测试剂;(b)使(c)中形成的检测复合物接触第一连接体寡核苷酸和第二连接体寡核苷酸,其中(i)第一连接体的第一末端和第二连接体的第一末端与第一邻近探针的两个非重叠区互补,并且(ii)第一连接体的第二末端和第二连接体的第二末端与第一邻近探针的两个非重叠区互补;(c)使第一和第二连接体寡核苷酸与第一和第二邻近探针杂交;(d)连接第一和第二连接体寡核苷酸以形成环状靶序列,其与第一和第二邻近探针两者杂交;(e)通过靶序列的滚环扩增延伸第二邻近探针以产生含有结合锚定试剂的结合域的扩增子;(f)使扩增子结合锚定试剂;并且(g)测量表面上的扩增子量。

[0134] 实施方案(31)和(32)的捕捉试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,并且在一个具体的例子中,捕捉试剂是抗体。类似地,第一检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第一检测试剂是抗体。另外,第二检测试剂是抗体、抗原、配体、受体、寡核苷酸、半抗原、表位、模拟位、或适体,例如第二检测试剂是抗体。在实施方案(31)和(32)的具体例子中,捕捉试剂和第一和第二检测试剂是针对HIV p24的抗体。

[0135] 实施方案(31)和(32)的锚定试剂可以包含寡核苷酸序列、适体、适体配体、抗体、抗原、配体、受体、半抗原、表位、或模拟位。在一个例子中,结合域可以包含适体,并且锚定试剂可以包含适体配体。结合域可以包含核酸序列,并且锚定试剂可以包含DNA结合蛋白;和/或锚定试剂可以包含寡核苷酸序列,并且扩增子可以包含互补寡核苷酸序列。

[0136] 实施方案(31)和(32)的扩增子可以包含一种或多种检测序列,并且测量步骤可以包含使延伸序列接触与一种或多种检测序列互补的多个经标记的探针。此外,扩增子可以

进一步包含一种或多种经修饰的碱基,并且测量步骤可以包含使延伸序列接触能够结合一种或多种经修饰的碱基的多个可检测模块。此外,扩增子可以进一步包含一种或多种经标记的碱基,并且测量步骤可以包含检测一种或多种经标记的碱基的存在。一种或多种经修饰的碱基可以包含适体、适体配体、抗体、抗原、配体、受体、半抗原、表位、或模拟位,并且多个可检测模块各自包含一种或多种经修饰的碱基的结合配偶和可检测标记物。一种或多种经修饰的碱基可以包含链霉亲和素,并且多个可检测模块各自包含生物素和可检测标记物;一种或多种经修饰的碱基可以包含生物素,并且多个可检测模块各自包含链霉亲和素和可检测标记物;一种或多种经修饰的碱基可以包含亲和素,并且多个可检测模块各自包含生物素和可检测标记物;和/或一种或多种经修饰的碱基可以包含生物素,并且多个可检测模块各自包含亲和素和可检测标记物。

[0137] 实施方案(31)和(32)的步骤(a)可以包含以下述次序使HIV p24结合下述种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)针对HIV p24的第一和第二检测试剂。或者,步骤(a)可以包含以下述次序使HIV p24结合下述种类:(i)针对HIV p24的第一和第二检测试剂;和(ii)表面上的捕捉试剂。此外,步骤(a)可以包含同时或基本上同时使HIV p24结合下述种类:(i)表面上的捕捉试剂;和(ii)针对HIV p24的第一和第二检测试剂。

[0138] 实施方案(31)和(32)的扩增子在探针延伸后仍然在表面上。复合物在延伸步骤后可以仍然与表面结合。例如,扩增子在表面上的复合物的位置的10-100 μ m内的位置处与锚定试剂结合。

[0139] 实施方案(31)和(32)的表面可以包含颗粒和/或多孔板的孔。表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于表面上的两个独特的结合域上。若表面是板孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于孔内的两个独特的结合域上。表面可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于表面上的相同结合域上。若表面是板孔,则孔可以包含多个独特的结合域,并且捕捉试剂和锚定试剂位于孔内的相同结合域上。在一个具体的例子中,捕捉试剂和锚定试剂在表面上的10-100nm内。

[0140] 此外,表面可以包含电极,并且测量步骤可以包含对电极应用电压波形以产生电化学发光信号。在这些实施方案((31)和(32))中,方法可以进一步包括在电极上收集颗粒,并且对电极应用电压波形以产生电化学发光信号。测量步骤可以包含使扩增子结合具有可检测标记物的检测探针,测量可检测标记物,并且将测量与样品中的分析物量关联起来,其中检测探针包含与扩增子区互补的核酸序列。通过测量光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、生物发光、磷光、放射性、磁场或其组合测量可检测标记物。例如,可检测标记物是ECL标记物,并且测量步骤可以包含测量ECL信号。

附图说明

[0141] 图1(a)-(c)例示了免疫测定法中锚定试剂的使用。图1(a)显示使用锚定试剂结合和稳定化检测复合物,其包含捕捉试剂、目的分析物和包含核酸探针的检测试剂。该核酸探针延伸以结合锚定试剂。在图1(b)中,该锚定试剂包含以下寡核苷酸序列,其包含互补于在检测试剂上形成的延伸序列的一部分的区域。图1(c)显示一个具体的实施方案,其中使用两种检测试剂来结合分析物,每种均包含核酸探针。检测试剂上的探针进行扩增过程,其使得一种延伸探针能与锚定寡核苷酸序列杂交。

[0142] 图2(a)显示一个具体的实施方案,其中对携有锚定试剂的表面上形成的免疫复合物进行PLA-RCA过程以在附接于免疫复合物的延伸序列中掺入多种可检测的种类。图2(b)和2(c)是连接寡核苷酸的两种备选的配置。

[0143] 图3显示将寡核苷酸附接于蛋白质的方法。

[0144] 图4(a)例示了本发明的一个优选的实施方案,其中在捕捉试剂、分析物和两种检测试剂之间形成表面结合复合物,所述检测试剂各分别附接于第一和第二近端探针,其连接于连接体探针以形成环状DNA模板,通过滚环扩增来扩增。Circ-1,SEQ ID NO:4;Circ-2,SEQ ID NO:5;PP1,SEQ ID NO:1(聚A尾部阶段);PP2,SEQ ID NO:2。图4(a)还包括具有锚定寡核苷酸序列的扩增试剂,该锚定寡核苷酸序列互补于当测定方法进展时形成的扩增子的序列。图4(b)显示环状DNA模板Circ-1的例示性序列(SEQ ID NO:4),具有检测寡核苷酸序列、扩增子的无活性区和与第二近端探针杂交的部分PP2。图4(c)描绘了杂交于P1b+P1a(SEQ ID NO:1)和P2a+P2b(SEQ ID NO:2)的Circ-1(SEQ ID NO:4)和Circ-2(SEQ ID NO:5)的实施方案。

[0145] 图5和6(a) - (b)例示了生成可通过滚环扩增来扩增的扩增子的备选方法。

[0146] 图7例示了一个备选的实施方案,其中夹心复合物中的每个近端探针的一部分由杂交于各区段的RNA短链暂时保护。酶法除去那些链以允许近端探针彼此杂交和与要延伸的链杂交。

[0147] 图8显示一个进一步的实施方案,其中近端探针附接于捕捉试剂和检测试剂,且每个近端探针的一部分由与其杂交的RNA短链暂时保护,如上文对图7描述的。

[0148] 图9显示使用实施例1中描述的方法进行的IL-10测定法的校正曲线。

[0149] 图10(a) - (b)显示使用(a)和不使用(b)锚定试剂的荧光显微图像。

[0150] 图11(a)显示单个线性连接体寡核苷酸序列的构造,其包含任一连接位点1或2,和这些连接体在测定法中的使用。Circ-1,SEQ ID NO:4;Circ-2,SEQ ID NO:5;近端探针1,SEQ ID NO:1;近端探针2,SEQ ID NO:2。图11(b)将使用Circ-1和Circ-2的组合与使用具有连接位点1的单一线性连接体寡核苷酸序列,或具有连接位点2的单一线性连接体寡核苷酸序列的测定法进行比较。

[0151] 图12显示使用实施例1和6中描述的方法进行的HIV p24测定法的校正曲线。

[0152] 图13显示使用实施例1和6中描述的方法对血清转化组(panel)的分析的结果。

[0153] 发明详述

[0154] 除非本文中另外定义,关于本发明中使用的技术和科学术语应具有与本领域中的普通技术人员普遍理解的相同的含义。此外,除非上下文另外要求,单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。冠词“一个”和“一种”用于本文指一个/种或超过一个/种(即至少一个/种)的该冠词的语法对象。例如,“一个/种要素”意指一个/种要素或超过一个/种要素。

[0155] 本发明包括改进的免疫测定方法,其包括(i)锚定靶分析物和测定法中使用的一种或多种分析物结合试剂之间形成的检测复合物;和/或(ii)从经标记的检测复合物扩增信号。锚定可用于稳定化牵涉低结合亲和力相互作用和/或一种或多种高分子量标记物或标记位点的复合物。信号扩增可通过将延伸的探针附接于含有多个标记物或检测标记位点的结合复合物,由此对于每个检测复合物扩增可检测信号来实现。在一个优选的实施方案中,所述方法包括将包含多个标记物或检测标记位点的延伸探针附接于检测复合物,并将

该复合物锚定至表面以确保复合物保留在表面上。这种经改良的测定方法可用于检测极低数目的结合事件,甚至单个的分析物-结合试剂复合物。该基础办法不限于免疫测定且可用于实施使用其他结合试剂类别的结合测定法。

[0156] 可用于改进结合测定法的一种方法是使用表面结合的锚定试剂以将包含目的分析物的检测复合物粘附至表面并稳定化该检测复合物。该办法可用于克服形成检测复合物的试剂之间的低结合亲和力和/或预防复合物在随后处理之前从表面解离。锚定试剂在结合测定法中的使用例示于图1(a)。表面(101)包含结合分析物A的捕捉试剂(102)和锚定试剂(103)。在一个或多个步骤中,分析物结合捕捉试剂且检测试剂(104)也结合分析物,,其中所述检测试剂连接于核酸探针(105)。分析物可同时或基本同时地结合捕捉和检测试剂,或分析物可以序贯结合捕捉和检测试剂的每一种(以任一次序)。因此,在表面上形成复合物(106),其包含捕捉试剂、分析物和检测试剂。探针延伸以形成延伸序列(107),其包含结合锚定试剂的锚定区域。延伸序列结合锚定试剂,并测量结合于表面的延伸序列的量。

[0157] 结合测定领域的熟练技术人员将容易地理解可用于所述方法的捕捉试剂和陪伴结合伴侣的范围。这类对的非限制性例子包括(以任一次序)受体/配体对、抗体/抗原、天然或合成受体/配体对、半抗原/抗体对、抗原/抗体对、表位/抗体对、模拟位/抗体对、适体/靶分子对、杂交伴侣、和嵌入物/靶分子对。在一个实施方案中,结合测定法采用抗体或其他受体蛋白质作为目的分析物的捕捉和/或检测试剂。术语“抗体”包括完整的抗体分子(包括通过抗体亚基的体外重联合组装的杂合抗体)、包含抗体的抗原结合域的抗体片段和重组蛋白质构建体(如记载于例如Porter,R.R.和Weir,R.C.J.Cell Physiol.,67(Suppl);51-64(1966)和Hochman,I.Inbar,D.and Givol,D.Biochemistry 12:1130(1973))、以及已经过化学修饰(例如通过引入可检测的标记)的抗体构建体。

[0158] 类似地,锚定试剂和相应的锚定成员或区域可包含任何适宜的结合对,例如受体/配体对、抗体/抗原、天然或合成受体/配体对、半抗原/抗体对、抗原/抗体对、表位/抗体对、模拟位/抗体对、适体/靶分子对、杂交伴侣、和嵌入物/靶分子对,和使用通过静电电荷结合的表面和锚定试剂。例如,锚定试剂可以是寡核苷酸序列、适体、适体配体、抗体、抗原、配体、受体、半抗原、表位、或模拟位,且相应的锚定区域分别包含互补的寡核苷酸序列、适体配体、适体、抗原、抗体、受体、配体、或抗体。在一个具体的实施方案中,锚定区域是寡核苷酸序列且锚定试剂包含DNA结合蛋白质。或者,如果锚定区域是双链寡核苷酸序列,则锚定试剂可包含嵌入剂。在一个另外的实施方案中,锚定区域可包含一个或多个经修饰的寡核苷酸碱基且相应的锚定试剂包含结合锚定区域上经修饰的碱基的一个或多个模块。例如,所述经修饰的碱基可包含半抗原或配体,而相应的锚定试剂包含分别特异于该半抗原或配体的一种或多种抗体或配体。而且,锚定区域可包含多个经标记的核苷酸碱基,其可用于监测检测复合物。

[0159] 在图1(b)中绘出的一个具体的实施方案中,结合表面的锚定试剂包含用于将检测复合物锚定至表面的寡核苷酸。锚定寡核苷酸序列结合附接于检测复合物的互补性寡核苷酸序列。在该实施方案中,表面(108)包含结合分析物A的捕捉试剂(109),和包含锚定寡核苷酸序列(111)的锚定试剂(110)。在一个或多个步骤中,分析物结合于捕捉试剂和也结合分析物的检测试剂(112),其中所述检测试剂连接于核酸探针(113)。如上文对于图1(a)描述的,分析物可以同时或基本同时地结合捕捉和检测试剂,或分析物可以序贯结合捕捉和

检测试剂的每一种(以任一次序)。因此,在表面上形成复合物(114),其包含结合试剂、分析物和检测试剂。探针延伸以形成延伸序列(115),其包含互补于锚定序列的锚定序列互补体。锚定序列杂交于锚定序列互补体,并测量结合于表面的延伸序列的量。

[0160] 所述检测复合物可包含一种或多种检测试剂,例如以增强测定对分析物的特异性。使用多种检测试剂能增强测定的特异性,如果例如测定设计为当每种检测试剂在分析物附近时发出可检测信号,或者来自结合于分析物的单一检测试剂的信号能与从结合于分析物的多种检测试剂发出的信号区分的话。这类测定的一个实施方案显示于图1(c)。表面(116)包含结合分析物A的捕捉试剂(117)和包含锚定寡核苷酸序列(119)的锚定试剂(118)。在一个或多个步骤中,分析物结合于捕捉试剂和结合分析物的两种(或更多种)检测试剂的每一种(分别为120和121),其中所述第一和第二检测试剂的每一种连接于核酸探针(122和123,分别为第一和第二核酸探针)。分析物可以同时或基本同时,或以序贯、逐步的方式结合捕捉和检测试剂。因此,在表面上形成复合物(124),其包含捕捉试剂、分析物和一第二检测试剂。使用需要第一和第二探针彼此接近的延伸过程,第一探针延伸以形成延伸序列(125),其包含互补于锚定序列的锚定序列互补体。在倒数第二步中,锚定序列杂交于锚定序列互补体,并测量结合于表面的延伸序列的量。

[0161] 图1(c)中绘出的方法的一个具体的实施方案显示于图2(a),其中锚定试剂用于将检测复合物粘附于表面且附接于检测复合物的探针延伸以生成结合锚定试剂的延伸区域。在该实施方案中,使用结合于近端探针的两种检测试剂检测复合物。该方法还包括将检测试剂与连接体序列联合,其然后连接以形成环状靶序列,并进行滚环扩增以生成结合锚定试剂的扩增子。表面(201)包含捕捉试剂(202)和锚定试剂(203)。在一个或多个步骤中,分析物结合于捕捉试剂,包含第一近端探针(205)的第一检测试剂(204),和包含第二近端探针(207)的第二检测试剂(206),由此在表面上形成检测复合物(208)。使该检测复合物与两种连接体序列(209a和209b)接触,其各自包含与所述第一近端探针的非重叠性区域互补的端序列和与所述第二近端探针的非重叠性区域互补的端序列。连接体序列与第一和第二近端探针杂交,且连接体寡核苷酸的端序列连接以形成环状靶序列(210),其与第一和第二近端探针两者杂交。第二近端探针通过滚环杂交延伸以生成包含结合锚定试剂的结合试剂的扩增子,并测量结合于表面的扩增子的量。第一近端探针可以加帽或有其他修饰以防止第一探针的延伸。(在一个备选的实施方案中,第一近端探针延伸而第二近端探针可以加帽或有其他修饰以防止延伸)。在图2(a)绘出的实施方案中,扩增子还包含两个或更多个互补于经标记的检测探针的检测序列,所述检测探针与扩增子杂交,用于测量结合于表面的扩增子的量。在一个备选的实施方案中(未在图2(a)绘出),延伸过程将经标记的核苷酸碱基掺入扩增子,其用于直接检测表面上的扩增子而不用添加与扩增子互补的一种或多种经标记的探针。图2(b)是连接体序列组成的示意图,其显示第一和第二连接体寡核苷酸(分别为209a和209b),其中第一连接体的第一端($C_{1(E1)}$)和第二连接体的第一端($C_{2(E1)}$)互补于第一近端探针的两个非重叠性区域,且第一连接体的第二端($C_{1(E2)}$)和第二连接体的第二端($C_{2(E2)}$)互补于第二近端探针的两个非重叠性区域。所述第一和第二连接体与第一和第二近端探针杂交且第一和第二连接体连接以形成环状靶序列,其与第一和第二近端探针两者杂交。

[0162] 图2(c)显示了连接体的一个备选实施方案。连接体序列211包含互补于第二近端

探针的内部序列(C_{IS})和互补于第一近端探针的非重叠性区域的两个端序列(分别为 C_{E1} 和 C_{E2})。在该实施方案中,仅需要一个连接事件来形成环状靶序列用于滚环扩增(即与第一近端探针杂交的端 C_{E1} 和 C_{E2} 的连接),然而,由于引发/延伸来自第二近端探针,仍需要两种近端探针接近。优选地,第一近端探针加帽或有其他修饰以防止第一探针的延伸。

[0163] 其后,第二近端探针通过环状靶序列的滚环扩增延伸以生成扩增子,其包含结合锚定试剂的结合区,并测量结合于表面的扩增子的量。

[0164] 第一和第二近端探针的序列可通过本领域技术人员已知的方法设计。例如,每种探针长度为约20-50个碱基,优选长为25-40个碱基,最优选长为约30-35个碱基。第一和第二近端探针还包含与如本文中描述的过程中使用的一种或多种连接体序列或其部分互补的序列。在一个实施方案中,使检测复合物与两种连接体序列(209a和209b)接触,其各自包含互补于第一近端探针的非重叠性区域的端序列和互补于第二近端探针的非重叠性区域的端序列。因此,在该实施方案中,第一和第二近端探针各自包含互补于连接体的端序列的非重叠性区域。或者,可使用仅一种连接体且该连接体序列(211)包含互补于第二近端探针的内部序列(C_{IS})和互补于第一近端探针的非重叠性区域的两个端序列(分别为 C_{E1} 和 C_{E2})。因此,在该实施方案中,第一近端探针包含分别互补于连接体的两个端序列 C_{E1} 和 C_{E2} 的非重叠性区域,而第二近端探针包含互补于连接体的内部序列(C_{IS})的序列。第一近端探针可以加帽或有其他修饰以防止第一探针的延伸。(在一个备选的实施方案中,第一近端探针延伸而第二近端探针可以加帽或有其他修饰以防止延伸。)

[0165] 因此,图1-2中例示的实施方案显示可改良结合测定法以纳入锚定试剂和/或可以扩增来自检测复合物的信号。在一个优选的实施方案中,在结合测定法中采用锚定试剂和信号扩增方法。或者,仅一种或另一种方法可以用于实现增强的结合测定。本发明因此包括具有如图1-2中描述的信号扩增方法的测定法,省去了锚定试剂。

[0166] 在其中锚定试剂包含直接或间接结合于表面(例如经由结合反应)的锚定序列的那些实施方案中,可以采用本领域中建立的用于固定化寡核苷酸的方法来生成锚定试剂,包括共价和非共价附接方法。在一个实施方案中,所述锚定试剂包含连接或以其他方式结合于锚定序列的蛋白质。在该实施方案中,可以使用能固定化在表面上(共价或非共价)并通过锚定寡核苷酸修饰的任意蛋白质。非限制性例子包括链霉亲和素、亲和素或牛血清清蛋白(BSA)。在一个优选的实施方案中,锚定试剂包含BSA。蛋白质可由锚定寡核苷酸修饰并使用已知的方法附接于表面,例如如图3中例示的,使用磺基琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(Sulfo-SMCC),一种确立的异双功能交联剂。SMCC的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基团与牛血清清蛋白(BSA)的反应将BSA标记有硫醇反应性马来酰亚胺基团。马来酰亚胺基团相应地与硫醇修饰的寡核苷酸反应以形成BSA-寡核苷酸缀合物,其经由稳定的硫醚键连接。在一个具体的例子中,通过将一系列BSA-寡核苷酸缀合物打印到石墨碳表面(优选丝网印刷的碳墨电极(screen printed carbon ink electrode))上来形成阵列。或者,如果蛋白质是亲和素或链霉亲和素,则锚定序列可连接于生物素并经由生物素-亲和素或生物素-链霉亲和素相互作用联合至固定化的亲和素或链霉亲和素。

[0167] 附接于锚定试剂的锚定寡核苷酸可以是将与在延伸过程期间形成的延伸序列(或扩增子)杂交的任意序列。锚定寡核苷酸还可以包含非互补性区域(例如聚(A)序列),其用作表面和互补性(杂交)区域之间的接头序列以将互补性区域伸至离开表面。在一个实施方

案中,杂交序列选择为与结合近端或检测探针无关的扩增子区域(“无活性”区域)。在一个更具体的实施方案中,单独或与聚(A)臂(例如长度多达30个核苷酸)组合地纳入互补于扩增子的全长无活性区域的杂交序列(优选长度约25个核苷酸)。优选地,锚定寡核苷酸选自:(i)(扩增子无活性区域的全长互补体,长度25个核苷酸)-(20个核苷酸聚(A)臂);或(ii)(扩增子无活性区域一部分的互补体,长度15个核苷酸)-(30个核苷酸聚(A)臂)。

[0168] 在一个实施方案中,实施近端连接扩增(PLA)来延伸第二近端探针。如上文对图2(a)-(c)描述的,使包含两种近端探针的复合物与一种或多种连接体寡核苷酸(209a-209b或211)接触,且杂交的连接体序列的连接形成环状寡核苷酸,其然后用于通过环的滚环扩增(RCA)延伸第二近端探针。适宜的探针设计和近端连接扩增的扩增条件是本领域中确立的。本发明的一个独特方面是在连接体之一中纳入与锚定试剂中使用的相同序列。由此在第二近端探针的延伸期间,延伸的区域包含锚定序列的互补体,其与锚定试剂杂交,从而稳定化夹心复合物和防止第二近端探针的解离。延伸的第二近端探针可含有可检测的标记(例如通过在RCA延伸反应期间纳入经标记的核苷酸),可测量该标记来测定表面上分析物的量。或者,添加包含可检测的标记的多种经标记的探针且与延伸的第二近端探针杂交,并测量结合于表面上的分析物的量。

[0169] 可以使用任何适宜的扩增技术来生成延伸序列(或扩增子),包括但不限于,PCR(聚合酶链式反应),LCR(连接酶链式反应),SDA(链置换扩增),3SR(自维持合成反应),和等温扩增方法,例如螺旋酶依赖性扩增和滚环扩增(RCA)。在一个优选的实施方案中,使用RCA因为其就灵敏性、多重性、动态范围和可扩缩性而言具有显著优势。RCA的技术是本领域中已知的(参见例如Baner等,Nucleic Acids Research,26:5073-5078,1998;Lizardi等,Nature Genetics 19:226,1998;Schweitzer等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:10113-10119,2000;Faruqi等,BMC Genomics 2:4,2000;Nallur等,Nucl.Acids Res.29:e118,2001;Dean等Genome Res.11:1095-1099,2001;Schweitzer等,Nature Biotech.20:359-365,2002;U.S.Pat.Nos.6,054,274,6,291,187,6,323,009,6,344,329和6,368,801)。已知RCA的几种不同的变型,包括线性RCA(LRCA)和指数性RCA(ERCA)。RCA生成数以千计的环状模板的拷贝,拷贝的链附接于初始靶DNA,从而允许靶物的空间分辨和信号的快速扩增。RCA促进(i)单一靶分子的检测;(ii)来自蛋白质以及DNA和RNA的信号;的扩增;(iii)鉴定已扩增的分子在固体表面上的位置;(iv)同时测量许多不同的靶物;和(v)分析溶液或固相中的一种或多种靶物。在基于阵列或颗粒的形式中进行多重结合测定法时,RCA产物与检测复合物的空间定位是尤为有利的。

[0170] 本发明的一个具体的实施方案绘于图4(a),其中使用锚定试剂和信号扩增过程两者。图4(a)绘出了在表面(401)上形成的捕捉试剂(402)、分析物(403)和两种检测试剂(304和305)之间的复合物,每种检测试剂分别包含第一近端探针(406)(PP1,SEQ ID NO:1)和第二近端探针(407)(PP2,SEQ ID NO:2)。添加第一和第二连接寡核苷酸Circ-1(408)(SEQ ID NO:4)和Circ-2(409)(SEQ ID NO:5),当两种近端探针均存在于复合物中时,其各自与Circ-1和Circ-2杂交,从而创建两种近端探针之间的桥。结合的连接体探针分别在连接位点1和2(410和411)连接以形成环状DNA模板(412)。环状DNA模板通过滚环扩增来扩增以延伸第二近端探针,由此生成扩增子,其包含一种或多种检测序列s(413)和锚定寡核苷酸序列互补体(414)(包括部分锚定序列互补体(415))。锚定寡核苷酸序列(416)(附接于捕捉模

块(417))与其互补体杂交,多种检测探针与多种检测探针序列杂交,并测量结合于表面的分析物的量(未显示但例示于图1(a))。图4(b)显示第一环状DNA模板Circ-1(408)的例示性序列(SEQ ID NO:4),其具有设计为与第一近端探针(PP1)杂交的部分,检测寡核苷酸序列,扩增子的无活性区域(其可全部或部分使用以结合锚定寡核苷酸序列)和部分PP2(其设计为与第二近端探针杂交)。另外的实施方案绘于图4(c),其中环状DNA模板(包含SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的序列)通过滚环扩增来扩增以生成包含多种检测序列(分别为418和419)的扩增子。应理解如图4(c)中公开的近端探针PP1和PP2的聚A尾部可以在特定显示在图中的丙氨酸重复的数目中相对于公开的PP1和/或PP2序列变化,而不意图改变本文中公开的序列。

[0171] 在绘于图4(a)的本发明的进一步的实施方案中,附接于捕捉模块417的锚定寡核苷酸序列(416)可以充当引物,具有游离的3'端。在该实施方案中,第二近端探针包含互补于检测序列(413)的序列。

[0172] 生成通过RCA或任何适宜的扩增方法扩增的靶序列的另一种办法例示于图5中。在该实施方案中,每种近端探针能折叠成环状发夹结构。这些发夹结构的形成生成单链环和双链部分,其含有重组信号。添加重组酶以驱动两个发夹结构的重组从而形成环状DNA模板,其随后进行如上文描述的RCA。标记扩增子且任选地锚定于锚定试剂,并检测分析物。该实施方案的关键要素是重组酶催化含有序列特异性重组位点的DNA的位点特异性重组的能力。例如,来自噬菌体P1的Cre重组酶在含有loxP位点的位点处催化重组,且其他非限制性例子包括但不限于翻转酶(Flippase)(flp,来自Yeast),Hin(Salmonella)和Tre,Cre的工程化(进化)型式。这种备选的办法不需要添加另外的组分如寡核苷酸模板、ATP和dNTP。在该实施方案中,loxP(重组)位点优选修饰为非对称的,从而产生朝向期望的重组产物形成的正常平衡中的迁移。这在图5中例示,重组位点具有浅/深色阴影。

[0173] 而且,图6(a)又例示了另一种生成靶序列的方法,其通过RCA或任何适宜的扩增方法扩增。附接于检测试剂的每种近端探针包含loxP位点,其使得两个寡核苷酸之间通过Cre重组酶能进行位点特异性重组,导致新寡核苷酸序列的形成,该新寡核苷酸序列包含侧接loxP位点的一种近端探针的5'部分和另一种近端探针的3'部分。新创建的靶序列随后可通过任何适宜的方法扩增、标记、任选地锚定和如上文描述的检测。图6(a)例示了该实施方案,使用T7 RNA聚合酶启动子作为用于扩增的可操作元件。还应理解其他RNA聚合酶位点如在近端探针的3或5'部分的任一处连接的T3和SP6也同样适用于该方法。在该实施方案中,loxP(重组)位点优选修饰为非对称的,从而产生朝向期望的重组产物形成的正常平衡中的迁移。如图6(b)中显示的,该方法还可用于生成可在RCA中使用的环状DNA模板。

[0174] 本发明包括用于检测分析物的方法,包括使分析物结合表面上的捕捉试剂和两种检测试剂以形成检测复合物。该方法包括测量检测复合物,其中相对于仅包含两种检测试剂之一的复合物,测量方法优先测量包含两种检测试剂的复合物。在一个实施方案中,该方法包括形成复合物,然后交联检测试剂并检测交联的试剂。可以使用任何适宜的交联化学来连接检测复合物的组分。例如,第一和第二检测试剂可以包含反应模块,其通过添加连接反应模块的多功能交联剂反应和连接。在该实施方案中,反应模块和交联剂可包含胺、硫醇、酰肼、醛、酯、碘乙酰胺(iodoacetamide)、马来酰亚胺、点击化学试剂及其组合。在另一个实施方案中,第一和第二检测试剂可以包含结合模块且交联剂是该结合模块的多价结合

伴侣。该实施方案的几个非限制性例子包括：(a) 第一和第二检测试剂是动物物种的抗体且交联剂是靶向该动物物种抗体的多价抗物种抗体；(b) 第一和第二检测试剂包含生物素且交联剂是链霉亲和素(或反之)；(c) 第一和第二检测试剂连接于链霉亲和素且交联剂是包含多个生物素分子的聚合物(或反之)；或(d) 第一和第二检测试剂分别包含第一和第二核酸探针且交联剂是寡核苷酸，其包含互补于第一核酸探针的序列和互补于第二核酸探针的另一个序列。

[0175] 在一个具体的实施方案中，可通过使分析物结合固定化的捕捉试剂、第一检测试剂和第二检测试剂以形成复合物来检测样品中的目的分析物，其中所述第一检测试剂包含第一可检测的标记和第一核酸探针，和第二检测试剂包含第二可检测的标记和第二核酸探针。在该实施方案中，第一和第二检测试剂通过以下交联：(i) 将第一探针杂交于第二探针，(ii) 将第一和第二探针杂交于具有互补于第一和第二探针的区域的第三核酸，或(iii) 连接第一和第二探针。

[0176] 一旦交联的产物结合表面就可检测该产物，或任选地，交联的产物可从表面释放到洗脱物中并检测。在此方面，仅计算洗脱物中包含第一和第二可检测的标记两者的那些各个交联的产物。可以采用任何适宜的检测方法来检测洗脱物中标记物的存在。在一个优选的实施方案中，标记物是荧光分子且通过单分子荧光检测，例如荧光相关光谱和/或荧光交互相关光谱，来计算存在于洗脱物中的经标记的交联产物。在该实施方案中，单分子荧光检测包括使洗脱物流经毛细管，将光源聚焦在毛细管内的某体积上以创建探测带(interrogation zone)，并用光检测器观察探测带以检测荧光分子经由探测带的通过。该检测方法可进一步包括检测与第一标记物有关的第一荧光信号和与第二标记物有关的第二荧光信号，并且当从探测带检测出两种信号时对检测事件计数。或者，一种标记物是荧光共振能量转移(FRET)供体而另一种标记物是FRET接受体，且检测方法可进一步包括激发探测带中的FRET供体并检测来自FRET接受体的荧光信号。

[0177] 在一个具体的实施方案中，可通过使分析物结合固定化的捕捉试剂、第一检测试剂和第二检测试剂以形成复合物来检测样品中的分析物，其中所述第一检测试剂包含第一核酸探针，第二检测试剂包含第二核酸探针；延伸第二核酸探针以形成包含可检测的标记的延伸序列，所述延伸依赖于第一和第二核酸探针在复合物中的共定位；从表面释放延伸序列至洗脱物中；并计算洗脱物中的各个延伸序列。延伸步骤可包括使探针结合模板核酸序列并通过聚合酶链式反应延伸探针。或者，延伸步骤包括使第一探针结合模板核酸序列，形成环状核酸模板，并通过滚环扩增延伸该环状模板。延伸步骤还可以包括使第一探针结合模板核酸序列，使第二探针结合该模板序列，并连接第一和第二探针。

[0178] 在采用捕捉试剂的本发明的方法中，捕捉试剂可以直接固定化于固相上或它们可以经由次级结合试剂如下文描述的靶向性试剂间接固定化。例如，捕捉试剂可以连接于或包含靶向性试剂，其结合固相上固定化的靶向性试剂互补体。靶向性试剂对其互补体的结合可以是直接的(例如，靶向性试剂可为链霉亲和素而互补体可为生物素)，或者是经由桥接试剂为间接的(例如靶向性试剂和互补体可为生物素，而桥接试剂可以是多价生物素结合受体如链霉亲和素)。在一个实施方案中，靶向性试剂及其互补体包括第一寡核苷酸和互补性寡核苷酸、受体-配体对、抗原-抗体对、半抗原-抗体对、表位-抗体对、模拟位-抗体对、适体-靶分子对、杂交配偶、或嵌入剂-靶分子对。测定中使用的靶向性试剂和互补体选择为

使得与通过测定测量的一种分析物的捕捉或检测试剂联合的靶向性试剂和互补体与通过测定测量的其他分析物的捕捉或检测试剂联合的靶向性试剂和互补体基本是非交叉反应性的。例如,结合试剂对其联合的结合域的结合(经由其联合的靶向性试剂和靶向性试剂互补体)应实质性大于其对与其他分析物联合的结合域(且呈现不同的靶向性试剂互补体)的结合。优选地,一种分析物的捕捉或检测试剂对与其他分析物有关的结合域的结合相对于对正确结合域的结合的交叉反应性为<1%,更优选<0.1%且更优选<0.01%。在一个优选的实施方案中,所述靶向性试剂/靶向性试剂互补体包含包括互补性序列的一对寡核苷酸且靶向性试剂及其互补体在足以使靶向性试剂杂交于其互补体的条件下接触。

[0179] 当使用靶向性试剂时,就何时将测定法中使用的捕捉试剂固定化于固相上而言有一定灵活性。在一个实施方案中,对使用者提供经由靶向性试剂-靶向性试剂互补体相互作用预固定化于固相上的捕捉试剂。在另一个实施方案中,以分开的组分提供连接于靶向性试剂的捕捉试剂和支持固定化的靶向性试剂互补体的固相。因此,测定方法进一步包括通过使靶向性试剂结合其互补体(直接或经由桥接剂的使用)将捕捉试剂固定化于固相上的步骤。该步骤与形成检测复合物有关的步骤可在前、同时或在后实施。

[0180] 很多种表面适用于本发明的方法,包括结合测定领域中的常规表面。表面可从多种不同材料制备,包括聚合物(例如聚苯乙烯和聚丙烯)、陶瓷、玻璃、复合材料(例如碳聚合物复合材料如基于碳的墨)。合适的表面包括肉眼可见(macroscopic)物体的表面如测定容器(例如试管、小池、流动池、FACS细胞分选器、筒(cartridge)、多孔板中的孔等)的内部表面,载玻片,测定芯片(如在基因或蛋白质芯片测量中使用的那些)、针(pin)或探针、珠、过滤介质、侧向流动介质(例如侧向流动测试条中使用的过滤膜)等。

[0181] 适宜的表面还包括通常用于基于颗粒的其他类型测定法中的颗粒(包括但不限于胶体或珠),例如磁性、聚丙烯和胶乳颗粒,通常用于固相合成中的材料例如聚苯乙烯和聚丙烯酰胺颗粒,和通常用于层析应用中的材料例如硅土、铝、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯。材料还可以是纤维如碳纤丝。微颗粒可以是无生命的或者,可以包含有生命的生物实体如细胞、病毒、细菌等。用于所述方法的颗粒可由适用于附接一种或多种捕捉或检测试剂的任意材料构成,且其可经由例如离心、重力、过滤或磁性收集来收集。可附接于捕捉或检测试剂的很多种不同类型的颗粒是商品化的以用于结合测定法中。这些包括非磁性颗粒以及包含可磁化材料的颗粒,其允许用磁场收集颗粒。在一个实施方案中,颗粒由电导性和/或半导体材料构成,例如胶体金颗粒。微颗粒可以具有很多种大小和形状。例如且不限于,微颗粒可以为5纳米至100纳米。优选地,微颗粒具有20nm至10微米的材料。颗粒可以是球形、长方形、杆状等,或者其可以是形状不规则的。

[0182] 用于所述方法的颗粒可以是带编码的,以允许在颗粒混合物中鉴定特定颗粒或颗粒子群体。这类编码颗粒的使用已被用于实现采用颗粒作为固相支持物进行结合测定的测定法的多重化(multiplexing)。在一个办法中,制造颗粒以纳入一种或多种荧光染料并基于在一个或多个波长处荧光发射的强度和/或相对强度来鉴定特定的颗粒群体。该办法已用在Luminex xMAP系统(参见例如美国专利No.6,939,720)和Becton Dickinson Cytometric Bead Array系统中。或者,颗粒可经由其他物理特性如大小、形状、包埋的光学模式等中的差异编码。通过颗粒光学特性、大小、形状、包埋的光学模式等,可以编码混合物或颗粒集合中提供的一种或多种颗粒以与混合物中的其他颗粒区分。

[0183] 在一个具体的实施方案中,本发明的方法可用在多重形式中,其通过使多种不同的分析物结合多种针对那些分析物的捕捉试剂,捕捉分析物固定化于编码的珠上,从而使得该编码鉴定特定珠的捕捉试剂(和分析物靶物)。该方法进一步包括对具有结合的分析物的珠的数目计数(使用本文中描述的检测办法)。

[0184] 或者/另外,检测复合物和/或捕捉试剂可以直接或间接结合一种或多种固相上的不同的离散的结合域,例如如在结合阵列中,其中所述结合域是各个阵列元件,或者在一组珠中,其中所述结合域是各个珠,从而使得在每个结合域上生成并从其测量离散的测定信号。如果针对不同分析物的捕捉试剂固定化于不同的结合域中,则可以独立测量结合那些域的不同分析物。在这类实施方案的一个例子中,通过在一种或多种表面上固定化结合目的分析物的捕捉试剂的离散域来制备结合域。任选地,所述一种或多种表面可以部分限定保持样品或样品经由其通过的容器(例如流动池、孔、小池等)的一个或多个边界。在一个优选的实施方案中,在电极上形成各个结合域用于电化学或电化学发光测定法中。使用电化学发光在包含多个结合域的表面上对分析物的多重测量已用在Meso Scale Diagnostics, LLC, MULTI-ARRAY[®]和SECTOR[®] Imager产品线(参见例如美国专利Nos. 7,842,246和6,977,722,其公开内容通过提述完整并入本文)。

[0185] 更进一步地,检测复合物和/或捕捉试剂可直接或间接结合于电极表面,其任选地包含如上文描述的不同的离散的结合域。电极表面可以是多孔壁和/或流动池的组分。电极可包含电导材料,例如金属如金、银、铂、镍、钢、铱、铜、铝、允许导电物(conductive allow),等等。它们还可以包含涂布氧化物的金属,例如氧化铝涂布的铝。电极可包括工作电极和对应电极,其可从相同或不同材料制备,例如金属对应电极和碳工作电极。在一个具体的实施方案中,电极包含基于碳的材料如碳、碳黑、石墨碳、碳纳米管、碳纤丝、石墨、石墨烯、碳纤维和其混合物。在一个实施方案中,电极包含元素碳,例如石墨、碳黑、碳纳米管等。有利的是,它们可以包含导电性碳聚合物复合材料、分散在基质中的导电颗粒(例如碳墨、碳胶、金属墨、石墨烯墨(graphene ink)),和/或导电性聚合物。本发明的一个具体的实施方案是测定模块,优选为多孔板,其具有包含碳的电极(例如工作和/或对应电极),例如碳层和/或丝网印刷的碳墨层。

[0186] 本发明包括用于检测和计算各个检测复合物的方法。在一个具体的实施方案中,表面可包含针对存在于样品中的一种或多种分析物的多种捕捉试剂,且多种捕捉试剂分布跨越在位于表面上的多个可解析的结合区域中。在用于实施和分析测量的条件下,“可解析的结合区域”是与单个结合事件有关的最小表面区域,其能够被解析和与发生另外的单个结合事件的另一区域区分开来。因此,所述方法包括使一种或多种分析物分子与表面上的一种或多种捕捉试剂结合,测定分析物分子在表面上的多个可解析结合区域中的存在或缺乏,并鉴定含有分析物分子的可解析结合区域的数目和/或不含分析物分子的分析物域的数目。

[0187] 可解析结合区域可以全部或部分地进行光学探询,即每个可解析结合区域可分别地光学探询和/或包含多个可解析结合区域的整个表面可以成像且可将该图像内的一个或多个像素或像素分组图谱定位(mapped)到各个可解析结合区域。可解析结合区域还可以是多个微颗粒内的微颗粒。可以通过常规的光学检测系统来鉴定在其光学签名(signature)中显示变化的可解析结合区域。根据检测的种类(例如荧光实体的类型等)和操作波长,可

以采用设计用于特定波长的光纤来进行可解析结合区域的光学探询。在其中使用光学探询的实施方案中,系统可包含超过一种光源和/或多种光纤以调整波长和/或光源的强度。在一些实施方案中,使用CCD照相机捕捉来自多个可解析结合区域的光信号。可用于捕捉图像的照相机成像系统的其他非限制性例子包括,电荷注入器件(CID)、互补金属氧化物半导体(CMOS)器件、科学CMOS(sCMOS)器件和延时探询(time delay integration)(TDI)器件,如本领域普通技术人员已知的。在一些实施方案中,可将与光电二极管或光电倍增管(PMT)偶联的扫描镜像系统用于成像。

[0188] 所述方法的测量步骤可包括对来自表面(或其部分)的光信号成像以生成由多个像素组成的图像,其中每个可解析结合区域图谱定位至图像中的一个或多个像素或像素组。可以使用本领域认可的方法完成图像分析以鉴定具有指示结合事件(检测复合物)的信号像素或像素集合,所述方法例如存在的大量图像分析算法和软件以鉴定和计算荧光显微镜图像中经标记的生物结构。在一个实施方案中,在过滤图像以除去大规模信号梯度后,使用分割阈值将图像转化为二进制图像。通过鉴定具有高于阈值强度的连续区域来发现可解析结合区域。如果结合域满足大小和强度要求,则将其归类为结合事件。

[0189] 在一个实施方案中,可解析结合区域是阵列的元件。在一个优选的实施方案中,阵列是微孔或纳米孔的阵列,例如具有单一基底的各个凹坑或孔(individual depressions or wells of a unitary substrate)。优选地,孔的体积低于100nL,优选低于50nL。在一个实施方案中,孔体积的范围为约10aL-100pL。任选地,孔可以配置为存放微颗粒。

[0190] 在一个实施方案中,位于基底上且在测定期间寻址的可解析结合区域的至少50%含有0或1个分析物分子。优选地,至少80%,更优选至少95%,且最优选至少99%的可解析结合区域含有0或更多分析物分子。样品中分析物分子的浓度至少部分使用校正曲线测定,泊松分布分析和/或高斯分布分析含有至少0或1个分析物分子的结合区域的数目。在一个具体的实施方案中,表面包含多个颗粒,其各自包含针对分析物分子的多种捕捉试剂,且多种颗粒分布跨越在多个可解析结合区域(例如微孔或纳米孔的阵列)。因此,所述方法包括:(i)使一种或多种分析物分子与表面上的一种或多种捕捉试剂结合,(ii)将多种颗粒分布跨越在可解析结合区域的阵列上;和(iii)测定每个可解析结合区域中分析物分子的存在或缺乏,从而鉴定含有分析物分子的结合域的数目和/或不含有分析物分子的结合域的数目。

[0191] 使用本发明的一种或多种方法检测在受限体积中的分析物也可能是有利的。在这些实施方案中,样品中的分析物分子结合一对检测试剂,其各自携带可区分的标记物,且分析物在基底(例如板、皿、芯片、光纤等)上的多个位置,例如孔或反应容器(本文中称为“反应容器”)上划分开,从而大多数反应容器含有一个或更少的分析物。该方法允许使用者通过对含有附接于分析物的每种可区分标记物的反应容器的数目计数来检测分析物分子。在一些情况中,寻址(address)的多个反应容器是可能含有至少1个分析物分子(比如与至少一个分析物分子联合或不与任何分析物分子联合)的反应容器总量的一部分或基本全部。提及以下公布的美国专利申请:美国专利申请No.20070259448;美国专利申请No.20070259385;美国专利申请No.20070259381;和国际专利申请No.PCT/US07/019184。通过提述将这些公布内容的每一个并入本文。至少一部分的反应容器可以c且可以进行指示含有至少一个分析物分子或颗粒的反应容器的数目/百分比的测量。在一些情况中,基于数

目/百分比,可以测定流体样品中分析物分子浓度的量度。

[0192] 在实现受限体积中分析物分子检测的一个具体的实施方案,可通过使分析物结合第一和第二检测试剂以形成检测复合物来检测样品中的分析物。每种检测复合物包含分析物、第一检测试剂和第二检测试剂,且第一检测试剂和第二检测试剂分别具有第一和第二可检测的标记。检测复合物可以同时、基本同时或序贯形成。检测复合物跨多个反应容器划分从而使得多数反应容器含有一个或更少的检测复合物,且通过计算含有第一和第二可检测的标记的每种的反应容器的数目来检测分析物分子的数目。优选地,检测复合物跨多个反应容器划分,从而使得在同一容器中检测未结合的第一检测试剂和未结合的第二检测试剂的可能性低于约十分之一,优选低于约百分之一,更优选低于约千分之一,且最优选低于约万分之一。检测复合物跨多个反应容器划分,即分成或分到部分中,例如通过在多个反应容器中等分检测复合物的部分手动分开,和/或通过使包含检测复合物的溶液流过多个反应容器,从而使得检测复合物分到支持物上的各反应容器中。

[0193] 在一个别的实施方案中,可通过以下检测样品中的分析物:(a)使分析物结合表面结合的捕捉试剂和第一和第二检测试剂以形成检测复合物,其中(i)每种检测复合物包含捕捉试剂、分析物、第一检测试剂和第二检测试剂,和(ii)第一检测试剂具有第一可检测的标记物且第二检测试剂具有第二可检测的标记物。检测复合物可通过以任意次序添加组分形成,例如通过同时或基本同时使组分接近到一起,或序贯添加每种组分以逐步方式建立检测复合物。检测复合物跨多个反应容器划分,从而使得多数反应容器含有一个或更少的分析物,且通过对含有第一和第二可检测的标记物的反应容器的数目计数来检测分析物分子的数目。该方法可在每个步骤后和检测步骤之前有或无清洗的情况下进行。

[0194] 表面可以是颗粒和任选地,多种捕捉试剂固定化于颗粒或多个颗粒上。在该实施方案中,划分步骤可以多种方式进行:(i)捕捉试剂固定化于多个颗粒上且通过使分析物结合捕捉试剂和将颗粒划分到多个反应容器中来实现分析物的划分;或(ii)捕捉试剂固定化于多个颗粒上且通过将颗粒划分到多个反应容器中然后使分析物结合捕捉试剂来实现分析物的划分。

[0195] 多个反应容器还可以包含分散在油包水乳液中的水滴。乳液可制备为具有直径高达100 μ m和体积近1nL的液滴。高负载,即乳液中超过 10^{10} 个液滴,制备乳液的容易性和其在大范围条件下的高稳定性使得其成为区室化生物化学测定法的理想手段。每个水滴充当独立的反应容器且任选地附接于颗粒的检测复合物可以跨多个水滴划分。

[0196] 或者,例如如果反应容器是板的孔的话,表面位于反应容器之一中,然后表面可以是板孔之一内的域或区域。在该实施方案中,捕捉试剂可固定化于多个反应容器的域或区域上,且划分步骤通过使分析物分子结合捕捉试剂实现。在另一个实施方案中,多个反应容器包含对其固定化有靶向性模块的区域,捕捉试剂包含靶向性模块互补体,且划分步骤通过使靶向性模块互补体结合位于多个反应容器中的靶向模块来实现。在一个另外的实施方案中,本文中描述的结合测定法还可以包含预浓缩步骤以改进测定性能,例如通过增加样品中分析物的浓度和/或通过降低可能存在于样品中的可能阻碍测定性能的无关材料的浓度。这可以通过(a)使包含目的分析物的样品与连接于结合分析物的第一结合试剂的颗粒接触,由此形成包含结合于所述第一结合试剂的分析物的复合物;(b)收集该复合物;(c)将样品未结合组分从复合物分开;(d)释放该复合物来完成。这种预浓缩方法可在本文中描述

的结合测定法之前进行以除去可能阻碍测定性能的杂质。在此方面,提述美国申请公开 No.US2010/0261292,其公开内容通过提述并入本文。

[0197] 可通过本发明的方法分析的样品的例子包括但不限于,食物样品(包括食物提取物、食物匀浆物、饮料等)、环境样品(例如油样品、环境淤渣(sludges)、收集的环境浮质(aerosol)、环境wipes、水过滤物等)、工业样品(例如起始材料、来自工业生产过程的产物或中间物)、人临床样品、兽医样品和其他具有生物起源的样品。可分析的生物样品包括但不限于,粪、粘膜拭样(swab)、生理学样品和/或含有细胞悬液的样品。生物样品的特定例子包括血液、血清、血浆、粪、粘膜拭样、组织抽吸物、组织匀浆物、细胞培养物和细胞培养上清(包括真核和原核细胞的培养物)、尿、唾液、痰和脑脊髓样品。

[0198] 可使用本发明的方法测量的分析物包括但不限于,蛋白质、毒素、核酸、微生物、病毒、细胞、真菌、孢子、糖类、脂质、糖蛋白、脂蛋白、多糖、药物、激素、类固醇、营养物、代谢物和上述分子的任何经修饰的衍生物,或包含一种或多种上述分子或其组合的任意复合物。样品中目的分析物的水平可以指示疾病或疾病状况,或者其可以简单地指示患者是否暴露于该分析物。

[0199] 本发明的测定法可用于测定样品中一种或多种,例如两种或更多种分析物的浓度。如此,可测量同一样品中两种或更多种分析物。可在同一样品中测量的分析物的组包括,例如与疾病状态或生理学状况有关的分析物或活性的测定的组。某些这类组包括细胞因子和/或其受体(例如TNF- α 、TNF- β 、IL1- α 、IL1- β 、IL2、IL4、IL6、IL-10、IL-12、IFN- γ 等的一种或多种),生长因子和/或其受体(例如EGF、VGF、TGF、VEGF等的一种或多种)、滥用药物,治疗性药物,维生素,病原体特异性抗体,自身抗体(例如针对Sm、RNP、SS-A、SS- α 、JO-1和Scl-70抗原的一种或多种抗体),过敏原特异性抗体,肿瘤标志物(例如CEA、PSA、CA-125II、CA 15-3、CA 19-9、CA 72-4、CYFRA 21-1、NSE、AFP等的一种或多种),心脏病包括充血性心脏病和/或急性心肌梗塞的标志物(例如肌钙蛋白T、肌钙蛋白I、肌钙蛋白C、肌红蛋白、CKMB、髓过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶、 β -利尿钠蛋白(BNP)、 α -利尿钠蛋白质(ANP)、内皮缩血管肽、醛固酮、C-反应性蛋白(CRP)等的一种或多种),与止血有关的标志物(例如Fibrin单体、D-二聚体、凝血酶-抗凝血酶复合物、凝血酶原片段1&2、抗因子Xa等的一种或多种),急性病毒性肝炎感染的标志物(例如针对甲肝病毒的IgM抗体,针对乙肝核心抗原的IgM抗体、乙肝表面抗原、针对丙肝病毒的抗体等的一种或多种),阿耳茨海默病的标志物(α -淀粉样蛋白、 β -淀粉样蛋白、A β 42、A β 40、A β 38、A β 39、A β 37、A β 34、tau-蛋白质等),骨质疏松症的标志物(例如交联的Nor C-端肽(telopeptide)、总脱氧吡啶诺林(deoxypyridinoline)、游离脱氧吡啶诺林、成骨素(osteocalcin)、碱性磷酸酶、I型胶原的C-末端前肽、骨特异性碱性磷酸酶等的一种或多种),生育状态或生育有关的病症的标志物(例如雌二醇、孕酮、促卵泡激素(FSH)、黄体化激素(LH)、促乳素、hCG、睾酮等的一种或多种),甲状腺病症的标志物(例如促甲状腺激素(TSH)、总T3、游离T3、总T4、游离T4和逆T3的一种或多种),和前列腺癌的标志物(例如总PSA、游离PSA、复合PSA、前列腺酸磷酸酶、肌酸激酶等的一种或多种)。本发明的某些实施方案包括测量例如与特定疾病状态或生理学状况有关的一种或多种,两种或更多中,四种或更多种或10种或更多种分析物(例如在组中分组到一起的分析物,如上文列出的那些;例如可用于诊断甲状腺病症的组可以包括例如促甲状腺激素(TSH)、总T3、游离T3、总T4、游离T4和逆T3的一种或多种)。

[0200] 在一个优选的实施方案中,所述组包含传统样品基质中的一种或多种低丰度分析物,例如浓度为低于约100fg/mL,且优选地低于约10fg/mL的分析物。可包括在组中的分析物的非限制性表包含,例如IL-17、IL-21、IL-31、Ab-38、Ab-40、Ab-42、Ab-39、Ab-43、Ab-15、Ab-16、Ab-17、Abeta寡聚体、C-肽、IL-13、IL-17A、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、INF-g、PSA、Tau、磷酸-Tau、TNFa、肌钙蛋白I、心肌钙蛋白T、肌钙蛋白C、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、EPO、LC3B、清蛋白、CHO-P、大肠杆菌HCP、IgA、IgE、IgG、IgG1、IgG4、IgM、NSO-P、Per-C6、剩余蛋白(residual protein)A、IgG2、IgG3、IgG4、AFP、CA125、胱天蛋白酶-3活性、CXCL11/I-TAC、ErbB2/HER2、HGFR/o-MET、IFN-beta、MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、beta-NGF、TFF3、TIMP1、Kim-1、alpha-2巨球蛋白、D-二聚体、ICAM-1、髓过氧化物酶、肌红蛋白、PAI-1、PCSK9、血纤维蛋白溶酶原、肾素/原肾素、tPA、CXCL1/GR0-alpha、CCL2/MCP1、CCL3/MIP-1alpha、CCL4/MIP-1beta、CCL5/Rantes、CRP、CXCL9/MIG、CXCL10/IL-10、G-CSF、GM-CSF、IFN-alpha、IFN-gamma、IL1alpha、IL-1beta、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL12(p70)、IL13、IL15、IL18、IL-22、IL-23、IL-33、c-MET、脂联素(adiponectin)、FGF21、GLP-1、生长激素、IGF1、IGF2、胰岛素、瘦素(leptin)、促乳素、HIV p24、HB-EGF、AKT、磷酸-AKT、及其组合。

[0201] 在具体的实施方案中,所述组包含传统样品基质中的一种或多种低丰度分析物,例如浓度为低于约100fg/mL,且优选地低于约10fg/mL的分析物。所述组优选地包含一种或多种以下分析物:IL-17、IL-21、IL-31、IL-22、IL-23、IL-33、心肌钙蛋白T、及其组合。在具体的实施方案中,在样品中检出的分析物的浓度在0.01fM至100fM、0.03fM-50fM、或0.03fM-10fM的范围内。在一些实施方案中,可以基本准确测定的样品中分析物分子的浓度是低于约100fM、低于约10fM、低于约3fM、低于约1fM、低于约0.3fM、低于约0.1fM、低于约0.03fM、或更低。样品中分析物分子的浓度可视为基本准确测定的,如果测量的样品中分析物分子的浓度在样品分析物分子的实际浓度的约20%内的话。在某些实施方案中,测量的样品中分析物分子的浓度可在样品分析物分子的实际浓度的约10%,约3%或约1%内。该测定的检测限是产生高于背景信号至少2.5标准差的信号的浓度,且优选地该测定可检测样品中约10-10,000个分子,或样品中100-5,000个分子,或样品中100-1000个分子。

[0202] 在一个别的实施方案中,本文描述的方法可用于检测由于最近暴露和/或感染处于低丰度的分析物。由于现有技术如ELISA的检测限(LOD)高于能指示疾病开始的低丰度蛋白质的循环浓度这一事实,对多种疾病或状况的早期诊断受到限制,所述疾病或状况例如癌症,细菌感染,例如炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*) (炭疽),病毒感染,例如HIV、肝炎、HPV等,毒素暴露,例如蓖麻毒蛋白、肉毒杆菌毒素A、B或E等。所述组可包含传统样品基质中的一种或多种低丰度分析物,例如浓度为低于约100fg/mL,且优选地低于约10fg/mL的分析物。可纳入组中的分析物的非限制性表包括,例如HIVgp41、HIVgp120、HIVgp160、HIVp24、HIVp66、HIVp51、HIVp17、HIVp31、Tat、Nef、Vif、肝炎A、B、C、D、或E抗原、HPV型16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73和/或82、HPV-E6和E7蛋白、IL-17、IL-21、IL-31、IL-22、IL-23、IL-33、心肌钙蛋白T、及其组合。仍进一步地,该组还可包含一种或多种以下分析物,其由于最近疾病开始、暴露和/或感染可能处于低丰度:Ab-38、Ab-40、Ab-42、Ab-39、Ab-43、Ab-15、Ab-16、Ab-17、Abeta寡聚体、C-肽、IL-13、IL-17A、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、INF-g、PSA、Tau、磷酸-Tau、TNFa、肌钙蛋白I、心肌钙蛋白T、肌钙蛋白C、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、EPO、LC3B、清蛋白、CHO-P、大肠杆菌HCP、IgA、IgE、IgG、IgG1、IgG4、

IgM、NSO-P、Per-C6、剩余蛋白A、IgG2、IgG3、IgG4、AFP、CA125、胱天蛋白酶-3活性、CXCL11/I-TAC、ErbB2/HER2、HGFR/o-MET、IFN-beta、MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、beta-NGF、TFF3、TIMP1、Kim-1、alpha-2巨球蛋白、D-二聚体、ICAM-1、髓过氧化物酶、肌红蛋白、PAI-1、PCSK9、血纤维蛋白溶酶原、肾素/原肾素、tPA、CXCL1/GRO-alpha、CCL2/MCP1、CCL3/MIP-1alpha、CCL4/MIP-1beta、CCL5/Rantes、CRP、CXCL9/MIG、CXCL10/IL-10、G-CSF、GM-CSF、IFN-alpha、IFN-gamma、IL1alpha、IL-1beta、IL-3、IL-7、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-18、c-MET、脂联素、FGF21、GLP-1、生长激素、IGF1、IGF2、胰岛素、瘦素、促乳素、HB-EGF、AKT、磷酸-AKT、及其组合。

[0203] 本发明的方法设计为允许检测很多种生物学和生化试剂,如上文描述的。在一个实施方案中,该方法可用于检测病原性和/或潜在病原性病毒,细菌和毒素,包括在多种相关临床和环境基质中的生物战剂(“BWA”),包括但不限于,血液、痰、便、过滤物、拭样等。可使用本发明方法分析(单独或组合)的病原体和毒素的非限制性表是炭疽芽孢杆菌(炭疽),鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*) (瘟疫),霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) (霍乱),*Francisella tularensis* (兔热病),布鲁氏菌菌种(布鲁氏菌病(*Brucellosis*)),伯内特考克斯体(*Coxiella burnetii*) (Q热病),利斯特氏菌(*listeria*),沙门氏菌(*salmonella*),志贺氏菌(*shigella*),*V.cholera*,沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*),类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*),属正痘(orthopox)病毒包括天花病毒(smallpox),病毒性脑炎,委内瑞拉马脑炎(Venezuelan equine encephalitis)病毒(VEE),西方马脑炎(western equine encephalitis)病毒(WEE),东方马脑炎(eastern equine encephalitis)病毒(EEE),Alpha病毒,病毒性出血热,沙粒病毒科(Arenaviridae),本雅病毒科(Bunyaviridae),丝状病毒科(Filoviridae),黄病毒科(Flaviviridae),埃博拉(Ebola)病毒,葡萄球菌肠毒素,蓖麻毒蛋白,肉毒杆菌毒素(A,B,E),肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*),真菌毒素,镰孢菌(*Fusarium*),*Myrothecium*,头孢霉菌(*Cephalosporium*),木霉菌(*Trichoderma*),*Verticillium*,葡萄穗霉菌(*Stachybotrys*),鼻疽病(glanders),小麦真菌,球形芽孢杆菌(*Bacillus globigii*),粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),黄雨(yellow rain),单端孢霉烯(trichothecene)真菌毒素,鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*),黄曲霉毒素,*Xenopsylla cheopis*,*Dermanyssus montanus*,类天花(alastrim),猴痘,沙粒病毒,汉坦病毒(Hantavirus),拉沙热(Lassa fever),阿根廷出血热(Argentine hemorrhagic fevers),玻利维亚出血热(Bolivian hemorrhagic fevers),里夫特裂谷热(Rift Valley fever)病毒,克里米亚-刚果病毒,汉坦病毒,马尔堡出血热(Marburg hemorrhagic fevers),黄热病毒,登革热病毒,流感(包括人和动物株,包括H5N1禽流感,流感A,流感A,H1特异性,流感A,H3特异性,流感A,H5特异性,流感A,2009-H1N1特异性,流感B),RSV,人免疫缺陷病毒I和II(HIV I和II),甲肝,乙肝,丙肝,肝炎(非甲、乙或丙肝),肠道病毒,Epstein-Barr病毒,巨细胞病毒,单纯疱疹病毒,沙眼衣原体,淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*),阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*),人乳头状瘤病毒,梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*),肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*),*Borrelia burgdorferi*,流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*),肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*),肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*),嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*

aureus), 葡萄球菌肠毒素B (SEB), 相思豆毒蛋白, 志贺毒素1, 志贺毒素2, 卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*), 酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*), 艰难梭菌 (*Clostridium difficile*), 脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*), 克雷伯氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*), 组A链球菌, 大肠杆菌0157, 冠状病毒, 柯萨奇 (Coxsackie) A病毒, 鼻病毒, 副流感病毒, 呼吸道合胞病毒 (RSV), 偏肺病毒 (metapneumovirus), 牛痘和腺病毒。

[0204] 本文中描述的对结合测定法的改进可用于扩展结合测定的动态范围, 即可通过系统或方法量化而不需稀释或浓缩样品或改变产生类似结果的测定条件 (例如采用的试剂浓度等) 的流体样品中分析物分子的浓度范围, 且其中可以基本准确地测定分析物分子的测量浓度。流体样品中分析物分子的浓度可视为基本准确测定的, 如果测量的流体样品中分析物分子的浓度在流体样品分析物分子的实际 (例如真实) 浓度的约10%以内的话。在某些实施方案中, 测量的流体样品中分析物分子的浓度在实施方案中基本准确地测定, 其中测量的浓度在流体样品分析物分子的实际浓度的约5%以内, 约4%以内, 约3%以内, 约2%以内, 约1%以内, 约0.5%以内, 约0.4%以内, 约0.3%以内, 约0.2%以内, 或约0.1%以内。在一些情况中, 测定的浓度亮度与真实 (例如实际) 浓度相差不超过约20%, 不超过约15%, 不超过约10%, 不超过约5%, 不超过约4%, 不超过约3%, 不超过约2%, 不超过约1%, 或不超过约0.5%。在一些实施方案中, 可以确定测定方法的准确度, 其通过使用选定的测定方法测定已知浓度的流体样品中分析物分子的浓度并将测量浓度与实际浓度比较。

[0205] 在一些实施方案中, 该系统或方法可以能在超过约1000 (3log)、约10,000 (4log)、约100,000 (5log)、约350,000 (5.5log)、1,000,000 (6log)、约3,500,000 (6.5log)、约10,000,000 (7log)、约35,000,000 (7.5log)、约100,000,000 (8log) 或更高的动态范围测量流体样品中分析物分子的浓度。

[0206] 在一些实施方案中, 可以基本准确测定的流体样品中分析物分子的浓度 (例如未知浓度) 为低于约5000fM (飞摩)、低于约3000fM、低于约2000fM、低于约1000fM、低于约500fM、低于约300fM、低于约200fM、低于约100fM、低于约50fM、低于约25fM、低于约10fM、低于约5fM、低于约2fM、低于约1fM、低于约500aM (attomolar)、低于约100aM、低于约10aM、低于约5aM、低于约1aM、低于约0.1aM、低于约500zM (zeptomolar)、低于约100zM、低于约10zM、低于约5zM、低于约1zM、低于约0.1zM, 或更低。在一些情况中, 检测限 (例如可在溶液中测定的分析物分子的最低浓度) 为约100fM、约50fM、约25fM、约10fM、约5fM、约2fM、约1fM、约500aM (attomolar)、约100aM、约50aM、约10aM、约5aM、约1aM、约0.1aM、约500zM (zeptomolar)、约100zM、约50zM、约10zM、约5zM、约1zM、约0.1zM, 或更低。在一些实施方案中, 可以基本准确测定的流体样品中分析物分子或颗粒的浓度为约5000fM至约0.1fM, 约3000fM至约0.1fM, 约1000fM至约0.1fM, 约1000fM至约0.1zM, 约100fM至约1zM, 约100aM至约0.1zM, 或更低。检测上限 (例如可在溶液中测定的分析物分子的上限浓度) 为至少约100fM、至少约1000fM、至少约10pM (皮摩)、至少约100pM、至少约100pM、至少约10nM (纳摩)、至少约100nM、至少约1000nM、至少约10uM、至少约100uM、至少约1000uM、至少约10mM、至少约100mM、至少约1000mM, 或更大。在一些实施方案中, 测定的流体样品中分析物分子或颗粒的浓度为低于约 50×10^{-15} M、或低于约 40×10^{-15} M、或低于约 30×10^{-15} M、或低于约 20×10^{-15} M、或低于约 10×10^{-15} M, 或低于约, 或低于约 1×10^{-15} M。

[0207] 在一些实施方案中,可以基本准确测定的样品中分析物分子的浓度为低于约100fM,低于约10fM,低于约3fM,低于约1fM,低于约0.3fM,低于约0.1fM,低于约0.03fM,或更低。在一些实施方案中,可以基本准确测定的样品中分析物分子的浓度为约5000fM至约0.1fM,约3000fM至约0.1fM,约1000fM至约0.1fM,约1000fM至约1fM,约100fM至约1fM,约100fM至约0.1fM。样品中分析物分子的浓度可视为基本准确测定的,如果测量的样品中分析物分子的浓度在样品分析物分子的实际浓度的约20%以内的话。在某些实施方案中,测量的样品中分析物分子的浓度在样品分析物分子的实际浓度的约10%以内,约3%以内,或约1%以内。在一些实施方案中,可以确定测定方法的准确度,其通过使用选定的测定方法测定已知浓度的样品中分析物分子的浓度。优选地,测定可检测样品中10-10,000个分子,优选地样品中100-5,000个分子,更优选地样品中100-1000个分子。

[0208] 相对于常规的夹心免疫测定技术,如例如使用相同捕捉抗体和两种检测抗体的任一以及相同标记和检测技术测量的,使用本文中描述的测定形式能将检测信号和测定灵敏性改进多达10倍,优选地多达50倍,100倍,或多达1000倍。优选地,使用本文中描述的测定形式能将检测信号和测定灵敏性相对于标准夹心免疫测定法改进多达100倍。

[0209] 本发明方法的一个有利的方面,尤其是当与灵敏光学检测技术偶联时,是信号扩增允许检测单个结合事件为光的亮点。然后,对信号的定量可通过对个体事件计数(其可对低分析物浓度提供更好的灵敏性,通过提供改进的从背景噪音对结合事件区分)或通过对所有结合事件的信号整合(其可提供测量高分析物浓度的更好的动态范围)来实施。

[0210] 本发明的方法可在多种测定装置和/或形式中使用。测定装置可包含,例如测定模块,如测定板、筒、多孔测定板、反应容器、试管、小池、流动池、测定芯片、测流装置等,具有随测定进展添加的或预加载在测定模块的孔、室或测定区域中的测定试剂(其可包含靶向性试剂或其他结合试剂)。这些装置可采用多种测定形式用于特异性结合测定法,例如免疫测定或免疫层析测定。下文中描述了例示性的测定装置和形式。在某些实施方案中,本发明的方法可采用以干态存储的测定试剂且测定装置/试剂盒可进一步包含或与干燥剂材料一起供应以维持测定试剂处于干态。预加载有测定试剂的测定装置可极大地改进速度和降低测定测量的复杂性,而在存储期间保持极好的稳定性。干燥的测定试剂可以是任何能干燥的测定试剂,然后在测定中使用之前重建。这些包括但不限于,可用于结合测定法的结合试剂,酶,酶底物,指示物染料和其他可用于检测目的分析物的反应性化合物。测定试剂还可以包含不直接牵涉检测机制但在测定中起着辅助作用的物质,包括但不限于,封闭剂,稳定剂,去污剂,盐,pH缓冲剂,防腐剂等。试剂可以以游离形式或在固相,包括测定模块中区室(例如室、通道、流动池、孔等)的表面或胶体、珠或其他微粒支持物的表面上支持而存在。

[0211] 本发明的方法可以与多种用于测量分析物的量,特别是测量结合于固相的分析物的量的方法一起使用。可使用的技术包括但不限于,本领域中已知的技术如基于细胞培养的测定法,结合测定法(包括凝集测试、免疫测定、核酸杂交测定等),酶测定法,比色测定法等。其他适宜的技术对于本领域普通技术人员来说将是容易明显的。一些测量技术允许通过肉眼检查进行测量,其他技术可能需要或受益于利用仪器来进行测量。

[0212] 用于测量分析物的量的方法包括无标记物技术,其包括但不限于i) 测量在分析物结合表面后表面的质量(mass)或折射率的变化技术(例如表面声波技术、表面等离子共振传感器、椭圆偏振(ellipsometric)技术等),ii) 质谱技术(包括能测量表面上的分析

物的技术如MALDI, SELDI等), iii) 层析或电泳技术, iv) 荧光技术(其可基于分析物的内在荧光), 等等。

[0213] 用于测量分析物的量的方法还包括经由对可能直接或间接(例如经由使用分析物的经标记的结合伴侣) 附接于分析物的标记物的检测来测量分析物的技术。适宜的标记物包括可直接可视化的标记物(例如可肉眼看到的颗粒和生成可测量信号如光散射、光吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、放射性、磁场等的标记物)。可使用的标记物还包括酶或其他化学反应性种类, 其具有产生可测量信号如光散射、吸光度、荧光等的化学活性。使用酶作为标记物在酶联免疫吸附测定也称为ELISA、酶免疫测定或EIA中是确定的。在ELISA形式中, 未知量的抗原被附接于表面, 然后特异性抗体从表面清洗通过, 从而其可以结合抗原。该抗体连接于酶, 且在最终步骤中添加物质从而酶将其转化成提供可检测信号中变化的产物。产物的形成可以是可检测的, 例如由于在可测量特性如吸光度、荧光、化学发光、光散射等中相对于底物的差异。可与依照本发明的固相结合方法一起使用的某些(但并非所有) 测量方法可能受益于或需要清洗步骤以从固相除去未结合的组分(例如标记物)。因此, 本发明的方法可包含这类清洗步骤。

[0214] 在采用一对可检测的标记物的那些实施方案中, 基于当一对标记物彼此接近, 即各自直接或间接结合检测复合物中的目的分析物时其可被独立检测的能力和/或那些物质协同工作以生成可检测信号的能力来选择那些经标记的物质。在一个实施方案中, 第一可检测的标记物是偶联酶反应系统的第一酶且第二可检测的标记是偶联酶反应系统的第二酶, 且该方法进一步包括添加该反应系统的一种或多种底物的步骤, 由此产生酶反应系统的可检测产物。包含可检测产物的那些反应容器可与不包含的那些反应容器区分。在一个优选的实施方案中, 仅当第一酶和第二酶接近(例如低于200nm, 理想地低于50nm) 时产生可检测的产物。在一个实施方案中, 第一酶是氧化酶, 例如葡萄糖氧化酶, 第二酶是过氧化物酶, 且底物包含氧化酶底物例如葡萄糖, 和经标记的酪胺(tyramide)、Amplex Red(10-乙酰-3,7-二羟基吩噻嗪(dihydroxyphenoxazine))、或鲁米诺衍生物(本文中统称为经标记的反应性衍生物且在一个优选的实施方案中, 经标记的反应性衍生物包含Amplex Red或鲁米诺)。在该实施方案中, 第一酶与底物反应以生成产物, 其与第二酶反应以生成第二产物, 该第二产物与经标记的反应性衍生物反应以生成可检测的种类。优选地, 由检测复合物中第一和第二酶催化的反应导致经标记的反应性衍生物在表面上的固定化, 可对此测量来测定表面上存在的分析物分子的数目。在一个实施方案中, 经标记的反应性衍生物是生物素-酪胺, 其该方法进一步包括添加经标记的链霉亲和素和测量链霉亲和素上的标记物。

[0215] 可用于所述方法的又一个近端依赖性标记系统是FRET对, 例如第一可检测的标记物是FRET供体而可检测的标记物是FRET接受体。荧光共振能量转移(FRET) 是两种染料分子的电子激发态之间的距离依赖性相互作用, 其中激发从供体分子转移至接受体分子而不发射光子。FRET的效率依赖于分子间间隔的倒数六次方, 使得在与生物大分子尺寸可比的距离中可用。在该标记系统中, 近端依赖性信号通过激发FRET供体和测量从FRET接受体的发射来测量。供体和接受体分子优选紧密接近的, 例如约10-100埃, 接受体的吸收光谱优选与供体的荧光发射光谱重叠, 且供体和接受体跃迁偶极(transition dipole) 取向应大致平行。FRET对的非限制性表在下表1中提供。

[0216] 表1.FRET对例子

[0217]	供体	接受体
	荧光素	四甲基罗丹明
	IAEDANS	荧光素
	EDANS	Dabcyl
	荧光素	荧光素
	BODIPY FL	BODIPY FL
	荧光素	QSY 7和QSY 9染料

[0218] 对于光显微术有多种FRET检测方法,例如接受体光漂白、供体光漂白、比率成像、敏化发射和荧光寿命测量。

[0219] 可用在采用一对检测标记物的实施方案中的另一个适宜的标记系统是其中可以独立测量第一和第二可检测的标记物的系统。例如,第一和第二可检测的标记物可以是发标记物,其彼此的光谱特性不同。或者,第一可检测的标记物是与第一底物反应以产生第一信号的第一酶,而第二可检测的标记物是与第二底物反应以产生不同的第二信号的第二酶,且该方法还包括添加第一酶底物和第二酶底物,并计算其中生成第一和第二信号的反应容器的数目。第一和第二信号可以是光吸光度中的变化和/或具有不同光谱特性的发光信号。

[0220] 如果第一和第二可检测的标记物包含第一和第二酶,则它们各自可为水解酶,例如磷酸酶、硫酸酯酶、半乳糖苷酶、葡萄糖醛酸糖苷酶或其组合,且因此,第一和第二底物选自磷酸、硫酸、半乳糖苷和葡萄糖苷酸修饰的稳定化的二氧杂环丁烷、4-甲基伞形基、荧光素或其组合。或者,第一和第二酶选自辣根过氧化物酶、beta-半乳糖苷酶和碱性磷酸酶。

[0221] 或者,用于检测分析物分子的标记物可以是可用于单分子荧光检测,例如荧光相关光谱和/或荧光交互相关光谱中的荧光种类。单分子荧光检测包括使包含可检测的种类的洗脱物流过毛细管,将光源聚焦在毛细管内的某体积上以创建探针带,并用光检测器观察探针带以检测荧光分子经由探针带的通过。

[0222] 在一个实施方案中,可使用基于电化学发光的测定形式来测量样品中的一种或多种目的分析物,例如基于电化学发光(ECL)的免疫测定法。ECL的高灵敏性、较广的动态范围和选择性是用于医学诊断的重要因素。商品化的ECL仪器已显示出优越的性能,且由于其极好的灵敏性、动态范围、精度和对复合物样品基质的容忍性其已被广泛使用。可诱导以发出ECL的种类(ECL活性种类)已被用作ECL标记物,例如i) 有机金属化合物,其中金属来自例如组VIII的贵金属,包括含Ru和含Os有机金属化合物如三-联吡啶-钌(RuBpy)模块和ii) 鲁米诺和相关化合物。在ECL过程中参与ECL标记物的种类在本文中称为ECL共反应物。常见使用的共反应物包括对于来自RuBpy的ECL为叔胺(例如参见美国专利No. 5,846,485)、草酸盐和过硫酸盐,对于来自鲁米诺的ECL为过氧化氢(参见例如美国专利No. 5,240,863)。通过ECL标记物生成的光可用作诊断规程中的报告信号(Bard等,美国专利No. 5,238,808,通过提述并入本文)。例如,ECL标记物可以共价偶联于结合剂如抗体、核酸探针、受体或配体;可以通过测量从ECL标记物发出的ECL来监测结合相互作用中结合试剂的参与。或者,来自ECL活性化合物的ECL信号可以指示化学环境(参见例如美国专利No. 5,641,623,其描述了监测ECL共反应物的形成或破坏的ECL测定)。对于ECL、ECL标记物、ECL测定法和用于进行ECL测定法的仪器的更多背景,参见美国专利Nos. 5,093,268;5,147,806;5,324,457;5,591,581;5,

597,910;5,641,623;5,643,713;5,679,519;5,705,402;5,846,485;5,866,434;5,786,141;5,731,147;6,066,448;6,136,268;5,776,672;5,308,754;5,240,863;6,207,369;6,214,552和5,589,136和公开的PCT Nos.W099/63347;W000/03233;W099/58962;W099/32662;W099/14599;W098/12539;W097/36931和W098/57154,所有均通过提述并入本文。

[0223] 本发明的方法可应用于单路或其中在单一样品中进行多种测定测量的多重形式。可用于本发明的多重测量包括但不限于,以下多重测量i) 牵涉多个传感器的使用;ii) 使用基于表面上位置可区分的表面(例如阵列)上的离散测定域;iii) 牵涉使用在颗粒上包被的试剂,所述颗粒基于颗粒特性如大小、形状和颜色等可区分;iv) 产生基于光学特性(例如吸光度或发射光谱)可区分的测定信号或v) 基于测定信号的时间特性(例如信号的时间、频率或相位)。

[0224] 在一些实施方案中,对样品中分析物分子浓度的量度可至少部分通过比较测量的参数与校正标准来测定。例如,包含分析物分子的结合表面的分数可与校正曲线比较以测定样品中分析物分子浓度的量度。校正曲线可通过在用于分析测试样品的条件下完成对多个已知浓度的标准化样品的测定来产生。对于每份标准化样品可对与分析物分子的检测/定量有关的信号取读数,因此允许形成将分析物分子的检测与已知浓度的分析物分子相关的校正曲线。然后,测定可以在包含未知浓度的分析物分子的样品上完成,并将来自该测定的分析物分子的检测绘制在校正曲线上,因此测定对样品中分析物分子浓度的量度。

[0225] 在使用成像技术以测量光信号(如荧光、化学发光或电化学发光)的一个具体情况中,结合事件可检测为光的亮点源。当点源的表面密度较低时(例如当在RxR(其中R是检测系统的空间分辨率)区域发现点源的概率低于10%时),可能任何观察到的点源是由于单一结合事件。在这些条件下,对事件计数可以提供最灵敏的测量。当表面密度增加时,解析和计数各个结合事件变得逐渐困难的。在这些条件下,整合结合表面上的光信号提供更准确的测量。

[0226] 对于熟练技术人员而言明显的是本文中描述的方法可应用到本领域技术人员已知的大量免疫测定平台。可以调整免疫测定平台的多个特征以适合具体的平台,但那些调整是完全在普通技术人员能力范围内的。例如,本文中描述的方法可应用于使用编码颗粒的基于珠的形式。在这类系统中,使用的珠可以是磁性或非磁性的,且珠的表面经修饰以包含捕捉试剂的一个或多个拷贝。该系统中采用的检测试剂是一对检测试剂。在一个实施方案中,两种检测试剂包含可区分的荧光标记物。或者,两种检测试剂用核酸探针修饰,如本文描述的,在该情况下,免疫测定方法包括延伸过程例如RCA-PLA以生成扩增的产物,其指示可检测的每种检测试剂的存在。如果检测试剂包含两种可区分的荧光标记物,那么测量步骤包括将珠引入流动池,且如果珠是磁性的,就在流动池中捕捉珠。如果检测试剂用核酸探针修饰,则测量步骤包括在珠上形成夹心复合物,实施RCA-PLA和用荧光标记的检测探针标记扩增子。然后,将经标记的珠引入流动池中且如果珠是磁性的,就在流动池中捕捉珠。在每个实施方案中,可以基于对荧光标记的编码珠的鉴定来光谱多重化测定。可以使用激发光源和用于多色检测的发射光检测器来检测每个实施方案中的结合事件,通过对具有两种可检测的标记的珠或包含可检测的经标记延伸产物的那些珠计数来实现定量,且定量还通过整合的强度来实现,例如通过对所有结合事件整合信号检测。因此,可以提供用于上文所述方法的试剂盒,其在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含以下一种或多种:(a) 具有

捕捉试剂的磁性或非磁性珠；(b) 具有可区分荧光标记物的两种检测试剂；和(c) 任选的缓冲剂和/或稀释剂用于测定方案。可用于上文所述方法的另一试剂盒可在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含以下一种或多种：(a) 具有捕捉试剂的磁性或非磁性珠；(b) 用核酸探针修饰的两种检测试剂(任选地, 分别提供检测试剂且另外提供近端探针(1和2), 具有用探针修饰检测试剂的用法说明)；和(c) 荧光标记的探针；任选的用近端探针修饰检测试剂所需的试剂；测定稀释剂、校正物、环化寡核苷酸、连接混合物或其组分, 例如连接缓冲液、ATP、BSA、Tween 20、T4 DNA连接酶；RCA混合物或其组分, 例如BSA、缓冲液、dNTP、Tween 20、Phi29 DNA聚合酶。

[0227] 在另一个实施方案中, 本文中描述的方法可用于流动池分析的基于珠的恶性是。在这类系统中, 使用的珠可以是磁性的且珠表面经修饰以包含捕捉试剂的一个或多个拷贝。该系统中采用的检测试剂是一对用核酸探针修饰的检测试剂, 如本文描述的, 在该情况下, 免疫测定方法包括延伸过程例如RCA-PLA以生成扩增的产物, 其指示可检测的每种检测试剂的存在。测量步骤包括在珠上形成夹心复合物, 实施RCA-PLA和用ECL-标记的检测探针标记扩增子。然后, 将经标记的珠引入流动池中且在流动池中捕捉珠。具体地, 应用磁场以将磁性颗粒例如珠吸引至电极表面, 其可包含多种金属例如铂。使用电压源来对电极应用电压且可以使用发射光检测器来检测结合事件；通过对具有可检测经标记的延伸产物的珠计数来实现定量, 且定量还通过整合的强度来实现, 例如通过对所有结合事件整合信号检测。可用于上文所述方法的试剂盒在一个或多个管形瓶、容器或区室中可包含以下一种或多种：(a) 具有捕捉试剂的磁珠；(b) 用核酸探针修饰的两种检测试剂(任选地, 分别提供检测试剂且另外提供近端探针(1和2), 具有用探针修饰检测试剂的用法说明)；和(c) ECL标记的探针；任选的用近端探针修饰检测试剂所需的试剂；测定稀释剂、校正物、环化寡核苷酸、连接混合物或其组分, 例如连接缓冲液、ATP、BSA、Tween 20、T4 DNA连接酶；RCA混合物或其组分, 例如BSA、缓冲液、dNTP、Tween 20、Phi29 DNA聚合酶。

[0228] 在流动池分析的基于珠的形式的一个具体的实施方案中, 将样品与分析物特异性的生物素化单克隆捕捉抗体和分析物特异性单克隆抗体的混合物温育, 所述单克隆抗体各自缀合寡核苷酸, 其反应以形成夹心复合物。在添加用链霉亲和素包被的微颗粒后, 复合物经由生物素和链霉亲和素之间的相互作用变成结合固相。对该混合物添加连接混合物, 并将该混合物与连接混合物温育, 清洗以除去过量的环状寡核苷酸, 并与RCA混合物温育。清洗混合物并加入生物素-经标记检测探针的混合物。为了掺入适宜的标记物例如发光、化学发光或电化学发光标记物, 例如SULFO-TAG, 合成具有末端生物素标记物的检测探针并与用SULFO-TAG标记的链霉亲和素预结合。将反应混合物抽吸到测量孔, 该处微颗粒被磁性捕捉到电极例如金属电极(如铂电极)的表面上。然后用适宜的清洗缓冲液例如ProCell(含TPA的缓冲液)除去未结合的物质。然后对电极应用电压诱导化学发光发射, 对此通过光电倍增管测量。电压施用和所得发射的测量可在任何适宜的流动池例如Cobas和/或Elecsys仪器(可获自Hoffmann-La Roche LTD.)中完成。

[0229] 在又一个实施方案中, 本文描述的方法可应用于基于珠的形式, 伴有毛细管流动以对个体分子数字计数。在这类系统中, 使用的珠可以是磁性的且珠的表面修饰为包含捕捉试剂的一个或多个拷贝。该系统中采用的检测试剂是一对包含可区分的荧光标记物的检测试剂。测量步骤包括形成包含捕捉试剂、分析物和检测试剂的夹心复合物, 交联检测试

剂,洗脱检测试剂并将珠引入流动池中。可以使用激发光源和用于多色检测的发射光检测器来检测结合事件,通过关联流动池中两种荧光团的检测来实现定量,且定量还通过整合的强度来实现,例如通过对所有结合事件整合信号检测。可用于上文所述方法的试剂盒可在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含以下一种或多种:(a) 具有捕捉试剂的磁珠;(b) 具有可区分的荧光标记物的两种可交联检测试剂;和(c) 任选的缓冲剂和/或稀释剂用于测定方案。

[0230] 而且,本文描述的方法可应用于基于珠的形式,其包含将珠分到各个纳米孔中。在这类系统中,使用的珠可以是磁性的且珠的表面修饰为包含捕捉试剂的一个或多个拷贝。该系统中采用的检测试剂是一对包含可区分的酶标记物的检测试剂。测量步骤包括形成包含捕捉试剂、分析物和检测试剂的夹心复合物,和添加两种酶标记物的底物。然后在各个纳米孔中捕捉珠。基于具有不同光谱特性的酶产物的鉴定,测定可以是光谱多重化的。可以使用激发光源和用于多色检测的发射光检测器来检测结合事件,通过对具有两种酶产物的纳米孔计数来实现定量,且定量还通过整合的强度来实现,例如通过对所有纳米孔整合信号检测。可用于上文所述方法的试剂盒可在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含以下一种或多种:(a) 具有捕捉试剂的磁珠;(b) 各用可区分的酶标记物修饰的两种检测试剂,例如生物素化的检测试剂和用半抗原缀合的检测试剂;(c) 链霉亲和素-beta半乳糖苷酶,用抗-半抗原缀合的酶,试卤灵(resorufin)-beta-d-半乳吡喃糖苷(galactopyranoside);(d) 阵列,例如Quanterix DVD形式阵列;(e) 氟碳油;和(f) 任选的缓冲剂和/或稀释剂用于测定方案。在这种具体的实施方案中,通过将纳米孔高灵敏性系统与基于近端的检测系统组合使用来增强可检测的信号。尽管使用具体的基于近端的检测系统例示了这一具体的实施方案,但熟练技术人员将领会也可以使用本文描述的其他基于近端的检测系统来增强测定中的可检测的信号这一事实,例如FRET供体/接受体系统;就光谱特性而言彼此不同的发光标记物;或使用如上文描述的为水解酶的第一和第二酶,和适宜的伴随底物。

[0231] 仍进一步地,本文描述的方法可应用于基于珠-阵列的平台。在这类系统中,使用的珠可以是非磁性的且珠的表面修饰为包含捕捉试剂的一个或多个拷贝。该系统中采用的检测试剂是包含第一和第二核酸探针的一对检测试剂。测量步骤包括形成包含捕捉试剂、分析物和检测试剂的夹心复合物,延伸一种探针以形成延伸序列,其中该延伸依赖于第一和第二探针在夹心复合物中的共定位,用荧光探针标记延伸序列,并从表面释放延伸序列至洗脱物中。可以使用激发光源和用于多色检测的发射光检测器来检测结合事件,通过对可检测标记的个体延伸产物计数来实现定量,且定量还通过整合的强度来实现,例如通过对所有结合事件整合信号检测。可用于上文所述方法的试剂盒可在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含以下一种或多种:(a) 具有捕捉试剂的非磁性珠;(b) 用核酸探针修饰的两种检测试剂(任选地,分别提供检测试剂且另外提供近端探针(1和2),具有用探针修饰检测试剂的用法说明);和(c) 荧光标记的探针;任选的用近端探针修饰检测试剂所需的试剂;测定稀释剂、校正物、环化寡核苷酸、连接混合物或其组分,例如连接缓冲液、ATP,BSA,Tween 20,T4 DNA连接酶;RCA混合物或其组分,例如BSA,缓冲液,dNTP,Tween 20,Phi29 DNA聚合酶。

[0232] 本文描述的改进的结合测定法可使用包含测定法中采用的一组组分的一种或多种试剂盒实施。例如,在检测样品中分析物中使用的试剂盒在一个或多个管形瓶、容器或区

室中包含,包含针对分析物的捕捉试剂和锚定试剂的表面;针对分析物的检测试剂,其连接于核酸探针。这类试剂盒可包含锚定试剂,其包含锚定寡核苷酸序列。

[0233] 可用于实施本文描述的方法的另一种试剂盒在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含,表面,其包含针对分析物的捕捉试剂和包含锚定寡核苷酸序列的锚定试剂;第一检测试剂,其连接于第一核酸探针;和第二检测试剂,其连接于第二核酸探针。

[0234] 可用于实施本文描述的结合测定法的再一种试剂盒在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含,包含针对分析物的捕捉试剂和锚定试剂的表面;针对分析物的第一检测试剂,其包含第一近端探针;针对分析物的第二检测试剂,其包含第二近端探针;和连接体序列,其包含 (i) 互补于第二近端探针的内部序列,和 (ii) 互补于第一近端探针的非重叠性区域的两个端序列。或者,试剂盒可改为包含,包含针对分析物的捕捉试剂和锚定试剂的表面;针对分析物的第一检测试剂,其包含第一近端探针;针对分析物的第二检测试剂,其包含第二近端探针;和 (i) 第一连接寡核苷酸,和 (ii) 第二连接寡核苷酸,其中 (x) 第一连接体的第一端和第二连接体的第一端互补于第一近端探针的两个非重叠性区域,和 (y) 第一连接体的第二端和第二连接体的第二端互补于第一近端探针的两个非重叠性区域。另外,在这些试剂盒的任一或两者中的锚定试剂可包含锚定寡核苷酸序列。

[0235] 而且,本文描述的方法可使用以下试剂盒实施,其在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含,包含第一可检测的标记的第一检测试剂;包含第二可检测的标记的第二检测试剂;配置为含有一个或更少的分析物分子的多个反应容器;和任选地,包含捕捉试剂的表面。

[0236] 最后,用于使用本文描述的方法检测分析物的试剂盒可在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含,表面,其包含固定化的捕捉试剂;包含第一可检测的标记的第一检测试剂;包含第二可检测的标记的第二检测试剂;和与第一和第二检测试剂反应性的交联剂。交联剂可包括多功能交联剂,其连接附接于检测试剂的反应性模块或附接于检测试剂的结合模块的多价结合伴侣。适宜的多功能交联剂包括但不限于,胺、硫醇、酰肼、醛、酯、碘乙酰胺、马来酰亚胺、点击化学试剂及其组合。类似地,多价结合伴侣的例子是多价抗物种抗体,其靶向作为该动物物种的抗体的检测试剂。当与附接于检测试剂的伴侣结合配偶成对时,交联剂还可包括链霉亲和素、亲和素或生物素。交联剂还可以是寡核苷酸,其包含与直接或间接结合试剂盒组分的核酸探针互补的序列。在一个具体的实施方案中,本文描述的方法中使用的试剂盒在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含,表面,其包含固定化的捕捉试剂;具有第一可检测的标记和第一核酸探针的第一检测试剂,和;具有第二可检测的标记和第二核酸探针的第二检测试剂;和具有互补于第一和第二核酸探针的区域的第三核酸。

[0237] 本文描述的试剂盒的表面可包含针对一种或多种分析物分子的多种捕捉试剂,其中所述捕捉试剂在位于表面上的多个可解析结合区域或反应容器上分配,例如在阵列中、多孔板中或微孔或纳米孔板中。另外,表面还可以包含多个颗粒,其各自包含针对分析物分子的多种捕捉试剂。

[0238] 上文描述的试剂盒可进一步包含一种或多种以下物质:一种或多种另外的试剂、缓冲液、聚合酶、连接酶、和/或dNTP(经标记或未经标记的)。另外,如果一种或多种检测试剂包含可检测的标记,则试剂盒还可包含试剂盒中采用的可检测的标记的共反应物。或者,如果一种或多种检测试剂是偶联的酶反应系统的组分时,则每种检测试剂包含第一和第二

酶且试剂盒还在一个或多个管形瓶、容器或区室中包含,偶联酶反应系统的一种或多种底物,和任选地,配置为结合偶联酶反应系统的产物的经标记组分。例如,第一酶可以是氧化酶,第二酶是过氧化物酶,且试剂盒还包含氧化酶底物和经标记的酪胺衍生物。在另一个实施方案中,第一和第二可检测的试剂可包含近端依赖性检测系统的组分,例如FRET供体和FRET接受体,或彼此就光谱特性而言不同的发光标记物。

[0239] 其他的备选实施方案

[0240] 图7中例示了一个另外的实施方案。小图(a)中夹心免疫测定复合物中每个近端探针的一部分被杂交于各区段的RNA短链暂时保护。酶法除去RNA链从而使得每个近端探针可彼此杂交且使用生物素化的dNTP通过聚合酶延伸来延伸链(小图(b))。掺入链中的每个生物素化的碱基结合于用可检测的标记物标记的链霉亲和素(小图(c))。

[0241] 另一种办法在图8中例示。近端探针可附接于锚定试剂和检测试剂(如小图(a)中显示)或每种近端探针可附接于两种检测试剂,如上文描述的(未显示)。与图7中例示的方法大部分类似,每个近端探针的一部分被杂交于各区段的RNA短链暂时保护。酶法除去RNA链从而使得每个近端探针可彼此杂交且使用生物素化的dNTP通过聚合酶延伸来延伸链(小图(b))。掺入链中的每个生物素化的碱基结合于用可检测的标记物标记的链霉亲和素(小图(c))。

实施例

[0242] 实施例1:用于近端连接和滚环扩增的一般方案

[0243] 通过如下添加近端探针1和2修饰针对靶分析物的一对检测抗体:对100uL缓冲液中的200ug第一检测抗体,添加在150mM磷酸盐缓冲液中稀释的1.74uL 23mM磺基-SMCC,且在室温温育30分钟。通过大小排阻层析除去游离的磺基-SMCC。检测抗体的最终浓度为2mg/mL或稍微更低。将九十五(95)uL的300uM用硫醇修饰的寡核苷酸(近端探针1和2)用5uL的100mM磷酸盐缓冲液中1mM DTT,0.5mM EDTA,pH 8.4在室温还原1小时。近端探针1和2的序列为:

[0244] 硫醇修饰的近端探针1:SH-AAA AAA AGA CGC TAA TAG TTA AGA CGC TTU UU (SEQ ID NO:1;其中3个U残基为2' O-甲基RNA)

[0245] 硫醇修饰的近端探针2:SH-AAAAA AAA ATA TGA CAG AAC TAG ACA CTC TT (SEQ ID NO:2)。

[0246] 除去过量的磺基-SMCC和DTT,例如通过使用三次旋转柱分离,并合并抗体和DNA用于共价缀合。将溶液在室温温育1小时伴随混合。纯化抗体-近端探针缀合物,例如通过大小排阻层析以除去未缀合的抗体和寡核苷酸。

[0247] 将MSD MULTI-SPOT[®]板用适宜的MSD[®]封闭溶液封闭1小时并清洗。板上的每个结合域包含捕捉抗体和锚定模块(固定化为BSA-寡核苷酸缀合物,选择寡核苷酸为特异于滚环扩增子)。本实施例中使用的锚定寡核苷酸的序列为5'-AAGAGAGTAGTACAGCAGCCGTC AAAAAAAAAA-/3ThioMC3-D/-3' (SEQ ID NO:3)。对每个孔添加二十五(25)μl的每种测定稀释剂和校正物,或样品(按适宜的稀释)(产生50uL总体积)。将板伴随振动温育1-3小时并清洗每个孔。将如上文描述制备的用近端探针1和2标记的检测抗体的溶液添加到每个孔(25uL每孔),并伴随振动温育1-2小时(或者,每一种检测抗体可以序贯添加,每次添加后是1小时温育)。对每个孔添加包含以下组分的连接混合物:(i)环化寡核苷酸1(4nM),环化寡核

苷酸2(4nM),连接缓冲液,ATP(1mM),T4 DNA 连接酶(0.15U/μL),其中每种环化寡核苷酸为:

[0248] Circ-1:磷酸根-CTA TTA GCG TCC AGT GAA TGC GAG TCC GTC TAA GAG AGT AGT AGAGCAGCC GTC AAG AGT GTC TA(SEQ ID NO:4)。

[0249] Circ-2:磷酸根-GTT CTG TCATAT TTAAGC GTC TTAA(SEQ ID NO:5)。

[0250] 将板与连接混合物在室温温育30分钟,清洗以除去过量的环化寡核苷酸,并在37C与RCA混合物温育1.5小时,其中所述RCA混合物含有RCA缓冲液,dNTP(各250μM),Phi29 DNA聚合酶(0.125U/ml)。清洗板和添加检测探针的混合物并在37C温育30分钟,其中检测探针混合物包含:20mM Tris,1mM SDTA,250mM NaCl,0.01% Triton,BSA(200ug/ml),Tween 20(0.05%),检测探针(6.25nM)。检测探针为序列CAG TGAATG CGA GTC CGT CT(SEQ ID NO:6)。为了掺入电化学发光标记物SULFO-TAG(Meso Scale Diagnostics),检测探针合成为具有末端生物素标记物且与用SULFO-TAG标记的链霉亲和素预结合。清洗板并用150μl MSD读数缓冲液填充且立即在MSD **SECTOR**[®] 6000读数器上读数(板和读数器由Meso Scale Discovery,Rockville,MD提供)。

[0251] 使用此一般性规程来检测以下分析物:肌钙蛋白I、Akt(总)、磷酸-Akt(473)、磷酸-Akt(308)、流感A核蛋白(NP)、IL-12p40、IL-12p70、Abeta1-42,使用TNFalpha模式系统的桥接和同种型分析(bridging and isotyping)Ig测定,使用乙肝表面抗原的桥接和同种型分析Ig测定,和使用Lyme C6的桥接和同种型分析Ig测定。相对于标准夹心免疫测定在ECL信号和测定灵敏性中的增加在测定法之间变化,但观察到高达100倍的改进。对于测试的某些测定,例如肌钙蛋白-I、Akt(总)、IL-12p40、IL-12p70和Abeta1-42,锚定模块的存在改进了信号和/或稀释线性,其通过防止扩增步骤期间检测复合物的解离。根据上述规程进行的IL-10测定的校正曲线显示于图9。另外,表2(下面)显示根据上述规程进行的一组代表性测定的LOD(第2列,“3-AB RCA/PLA测定”)相对于来自Meso Scale Diagnostics(MSD),Rockville,MD,可在Meso Scale Diagnostics网站获得(第3列,“MSD V-Plex 2-AB免疫测定方案”)的标准两抗体免疫测定方案的LOD。

[0252] 表2.

[0253]	分析物	3-AB RCA/PLA 测定 LOD(fg/mL)	MSD V-Plex 2-AB免疫测定 方案(fg/mL)
	IL-1b	2-5	80
	IL-2	4	180
	IL-4	0.7	40
	IL-6	0.6	120
	IL-10	2	60

[0254] 实施例2.有和无锚定试剂的测定方案

[0255] 如上文实施例1描述的将MSD 7-spot MULTI-SPOT板各用肌钙蛋白I捕捉抗体(220ug/mL)包被。将捕捉抗体在有或无锚定模块BSA的情况下共打点(co-spotted),BSA共价附接有特异于扩增子的寡核苷酸(5ug/mL锚定物,若存在的)。对每个孔添加二十五(25)μ

1的每种测定稀释剂和校正物,或样品(按适宜的稀释)(总共50u1)。将板伴随振动温育2小时并清洗每个孔。将如上文描述制备的用近端探针1和2标记的检测抗体的溶液添加到每个孔(25uL每孔),并伴随振动温育1小时。对每个孔添加如在上文实施例1中描述的连接混合物。将板与连接混合物在室温温育30分钟,清洗以除去过量的环化寡核苷酸,并在37C与RCA混合物温育1.5小时,如在上文实施例1中描述的。清洗板并添加检测探针的混合物且在37C温育30分钟,如在上文实施例1中描述的。清洗板并用150μl MSD读数缓冲液填充且立即在MSD **SECTOR**[®]6000读数器上读数。从板顶部移去MSD电极用于荧光成像并用PBS和盖片保持湿润。使用Zyla照相机观察表面,20x物镜,2x2面元(bin²ing),客户过滤集(customer filter set),具有2二次曝光(second exposure)。

[0256] 如表3(下面)中显示的,ECL值在存在锚定试剂的情况下高4-5倍,且检测限低3倍(更灵敏)。

[0257]

计算浓度 (pg/ml)	+ 锚定	无 锚定
500	134,705	29,818
50	12,713	2,486
5	1,121	270
0.5	150	60
0.05	92	43
0.005	40	86
0.0005	56	30
0	71	37
检测限	0.36	1.16

[0258] 表3

[0259] 图10(a)和(b)显示具有(小图(a))和没有(小图(b)) 5ug/mL锚定试剂的板表面的荧光显微镜图像。该图像显示与个体结合事件有关的亮荧光点,且确认了在存在锚定试剂的情况下RCA扩增对于生成可观察的结合事件更有效率。

[0260] 实施例3.一种相对于两种连接体寡核苷酸的比较

[0261] 使用具有一个连接位点以形成环状模板的单一线性连接体寡核苷酸而不是具有两个分别的连接位点的两种连接体寡核苷酸重复实施例2中描述的测定。如图11(a)中显示的,制备单一线性连接体寡核苷酸,其在连接位点1或连接位点2处打开。使用实施例1和2中使用的寡核苷酸Circ-1和Circ-2的组合,并排测试两种单一线性连接体寡核苷酸。采用实施例2中描述的方案,另外,以三种浓度测试该单一线性连接体寡核苷酸:125nM、62.5nM和31nM,而以125nM测试使用Circ-1和Circ-2寡核苷酸的组合的标准测定。如图11(b)中显示的,将两种单一线性连接体寡核苷酸以大致相同的效率成功地掺入RCA扩增产物中作为两部分连接体寡核苷酸混合物(Circ-1和Circ-2)。基于信号强度、非特异性背景和总体灵敏性,在连接位点1打开的单一线性连接体寡核苷酸具有与两部分连接体混合物可比的性能。如预期的,在连接位点2打开的单一线性连接体寡核苷酸具有更高的非特异性背景和更低的灵敏性。在后一情况中,连接和引发两者均仅依赖于近端探针#1的存在;因此失去了近端扩增办法的一些特异性益处。

[0262] 实施例4.使用备选的近端探针、锚定寡核苷酸和连接体序列进行的三抗体测定

[0263] 使用实施例1中列出的方案进行测定,其使用下列备选的试剂组:

[0264] 表4

序列描述	序列
备选组(a)	
检测寡聚体	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(SEQ ID NO: 7)
近端寡聚体 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaCACTAAGCTGTTAGTCC ATTACCGmUmUmU(SEQ ID NO: 8)
近端寡聚体 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaGCTGGAGGTTTCAGACG ATTTTGCG(SEQ ID NO: 9)
Circ-1a	/5Phos/AACAGCTTAGTGACATCGGTAGTTAACA GATTGATCTTGACACATCGGTAGTT CGCAAATCGTC(SEQ ID NO: 10)
Circ-2a	/5Phos/TGAACCTCCAGCTTTCGGTAATGGACT (SEQ ID NO: 11)
锚定寡聚体	5'ACAGATTGATCTTGAAAA AAA AAA AAA AAA AAAAA/3ThioMC3-D/(SEQ ID NO: 12)
备选组(b)	
检测寡聚体	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(SEQ ID NO: 7)
近端寡聚体 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaAGAGTCCAGAGGCAAA GCGTGAATmUmUmU(SEQ ID NO: 13)
近端寡聚体 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaGATAAGGAAGGGGCCT TAGCGACA(SEQ ID NO: 14)
Circ-1b	/5Phos/CCTCTGGACTCTACATCGGTAGTTTGGA ACATTTTATTCTAACATCGGTAG TTTGTCGCTAAGGC(SEQ ID NO: 15)
Circ-2b	/5Phos/CCCTTCCTTATCTTTATTCACGCTTTG(SE Q ID NO: 16)
锚定寡聚体	5'GGAACATTTTATTCTAAA AAA AAA AAA AAA AAAAA/3ThioMC3-D/(SEQ ID NO: 17)
备选组(c)	

[0266]	检测寡聚体	5'-/5Biosg/ACATCGGTAGTT-3'(SEQ ID NO: 7)
	近端寡聚体 1	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaAACAACCTCCGATTGCTT GCTTCTTmUmUmU(SEQ ID NO: 18)
	近端寡聚体 2	/5ThioMC6-D/aaaaaaaaTAGCCCTACGTGCCCTG CATAGAC(SEQ ID NO: 19)
	Circ-1c	/5Phos/ATCGGAGTTGTTACATCGGTAGTTCGCG CAGGTCGGGAATTACATCGGT AGTTGTCTATGCAGGG(SEQ ID NO: 20)
	Circ-2c	/5Phos/CACGTAGGGCTATTTAAGAAGCAAGCA(SEQ ID NO: 21)
	锚定寡聚体	5'GCGCAGGTCGGGAATAAA AAA AAA AAA AAAAAA/3ThioMC3-D/(SEQ ID NO: 22)

[0267] 下表5中的结果针对肌钙蛋白测定,其中肌钙蛋白的浓度为500pg/mL且MULTI-SPOT板的每个孔包含一个捕捉点,其具有来自表4中列出的组之一的锚定寡核苷酸。测定使用一种近端探针(1)和一种近端探针(2),以与实施例1中描述的相同的浓度。组(a)-(c)的非特异性结合更高,因为它们相比于实施例1中描述的浓度具有高9倍的检测寡核苷酸-SA-STAG浓度。检测寡核苷酸-SA-STAG的更高浓度来自于对预结合的复合物总体的滴定,而非对单独SA-STAG的滴定,如实施例1中的。

[0268] 表5.

[0269]	PLA组	(a)	(b)	(c)	实施例1
	肌钙蛋白	178,560	138,540	189,166	273,261
	无肌钙蛋白	412	314	545	88

[0270] 实施例5.在另外的免疫测定平台上进行的三抗体测定

[0271] (a) 使用编码颗粒的基于珠的免疫测定形式

[0272] 所有测定步骤均在96孔过滤板中进行。用真空歧管(不超过10In.的Hg)从板除去液体。从不翻转板。如果发生堵塞,使用15ml锥形管的尖端以轻柔按压堵塞孔下面的区域,然后使用1ml Pasteur吸耳球(pipette rubber bulb)或将拇指放在堵塞孔上以通过生成压力除去堵塞。在最后吸出步骤后,在一堆纸巾上轻敲板底部,然后用Kimwipe轻擦过滤板底部以除去残余液体/液滴。

[0273] 清洗溶液制备:通过将20x Wash Solution瓶的全部内容物用285ml去离子水稀释来制备1x Working Wash Solution。

[0274] 测定标准制备:在100%测定稀释剂(血清和血浆样品)或50%测定稀释剂/50%组织培养基(组织培养上清)中重建冻干标准;重建体积:(i) 1管形瓶:1ml;(ii) 2管形瓶:0.5ml每管形瓶。在室温再水合8-10分钟。轻柔颠倒管形瓶几次和允许管形瓶再放置3-5分钟以确保完全水合。如果使用超过1种标准,组合等体积的每种标准并轻柔混合。实施重建

标准的3倍系列稀释以制备七点标准曲线。

[0275] 分析物捕捉:

[0276] (1) 旋转 (30sec) 和超声处理 (30sec) 10x捕捉珠储液。在箔包裹的管中,将10x捕捉珠储液 (2.5 μ l每孔) 在Working Wash Solution (25 μ l每孔 ~ 2,000至5,000珠/测定) 中稀释。对于更高的多重化,调整Working Wash Solution的体积以适应保留的10x捕捉珠储液的额外体积。

[0277] (2) 用200 μ l Working Wash Solution预湿润标准和样品孔。

[0278] (3) Vortex (30sec) 和超声处理 (30sec) 稀释的捕捉珠溶液。立即向每个测定孔添加25 μ l,接着是200 μ L的1x Wash Solution。用200 μ L的Working Wash Solution抽吸和重复清洗。按需要轻敲和轻擦过滤板的底部。

[0279] (4) 对所有测定孔添加50 μ l的温育缓冲液。

[0280] (5) 将100 μ l标准添加到指定孔中。对于指定用于样品的孔,添加50 μ l测定稀释剂接着是50 μ l样品。覆盖板和在定轨式板振动器上 (500-600rpm) 室温温育板2小时。在所有温育期间用不透明盖覆盖测定板以避光。根据定轨振动器的半径可能需要调整速度。

[0281] 分析物检测

[0282] (6) 制备荧光标记的检测抗体的1x混合物:在稀释剂 (100 μ l每孔) 中稀释10x检测抗体混合物 (10 μ l每孔)。混合物包含特异于目的分析物的一对检测抗体,一种用Alexa Fluor 350 (蓝色荧光标记物) 标记,另一种用Alexa Fluor594 (红色荧光标记物) 标记 (这些荧光标记物的每种可获自Life Technologies, Grand Island, NY, www.lifetechnologies.com)。对于更高的多重化,调整稀释剂的体积以适应需要的10x抗体混合物储液的额外体积。用200 μ L的Working Wash Solution抽吸和清洗测定孔两次。向每个测定孔添加100 μ l稀释的检测抗体混合物。覆盖板并在板振动器 (500-600rpm) 上温育1小时。

[0283] 测定读数

[0284] (8) 用200 μ l Working Wash Solution抽吸和清洗测定孔3次。用干净纸巾干燥过滤板的底部以完全除去所有残余液滴。向每个测定孔添加100 μ l Working Wash Solution并将板置于板振动器 (500-600rpm) 上2-3分钟。

[0285] (9) 在多色荧光颗粒分析仪 (如FACS系统或改动的xMAP仪) 中分析珠悬液,该分析仪包含针对每种荧光标记物的颜色通道。为了最大灵敏性,测定在以下条件下运行,其中任何颗粒可能具有仅0个或1个结合的分析物且通过对颗粒数目计数来对分析物的量定量,所述颗粒特异于包含两种荧光标记物的给定分析物 (基于颗粒编码)。任选地,可在多重形式中运行测定,其使用编码珠和针对每种分析物的另外的检测抗体对,其中编码指示珠上捕捉抗体的分析物特异性。在确定编码时,如使用掺入珠中的另外荧光色在xMAP中的,分析仪应具有另外的检测通道用于测量另外的颜色并鉴定珠编码。

[0286] (b) 使用包含锚定模块的编码颗粒,使用用核酸探针修饰的两种检测试剂的基于珠的免疫测定形式

[0287] 如实施例5 (a) 中所述的,所有测定步骤在96孔过滤板中进行。清洗溶液和测定标准如实施例5 (a) 中描述的制备,且如实施例1中描述的通过添加近端探针1和2修饰针对靶分析物的一对检测抗体。分析物被捕捉到捕捉珠上,如实施例5 (a) 中描述的。捕捉珠包含锚

定模块,固定化于珠表面为BSA-寡核苷酸缀合物,其中寡核苷酸选择为特异于滚环扩增子。使用的锚定寡核苷酸的序列为SEQ ID NO:3。

[0288] 将二十五(25) μ l的测定稀释剂、校正物、或样品(按适宜的稀释)与捕捉珠的混合物混合。将混合物伴随振动温育1-3小时并清洗。将如上文描述制备的用近端探针1和2标记的检测抗体的溶液添加到混合物,并伴随振动温育1-2小时(或者,每一种检测抗体可以序贯添加,每次添加后是1小时温育)。添加如实施例1中描述的连接混合物。将该混合物与连接混合物在37C温育30分钟,清洗以除去过量的环化寡核苷酸,并在37C与RCA混合物温育1.5小时,其中RCA混合物在上文实施例1中描述。清洗混合物,添加荧光素-经标记检测探针的混合物并在37C温育30分钟,其中所述检测探针混合物在上文描述。清洗混合物并将颗粒抽吸到多通道荧光颗粒分析仪中。

[0289] (c) 基于珠的形式和将捕捉分析物分子分到各个纳米孔中

[0290] 样品在100 μ l 25%牛血清(2-4倍稀释)中制备,且将用捕捉抗体包被的500K珠(顺磁2.7 μ m,任选地荧光编码地)添加到样品中。将样品在23 $^{\circ}$ C温育约2hr。将样品用PBS(5X, 0.1% Tween-20)清洗3次,且添加经标记检测抗体的混合物(包含第一生物素化的检测抗体和缀合有半抗原的抗体的混合物)。将混合物在23 $^{\circ}$ C温育约1hr。将混合物用PBS(5X, 0.1% Tween-20)清洗3次,添加酶标记物,还添加链霉亲和素-beta-半乳糖苷酶(40pM),抗半抗原缀合的酶,并将混合物在23 $^{\circ}$ C温育约30min(或在Simoa analyzer中3min)。将混合物用PBS(5X, 0.1% Tween-20)清洗7次,添加酶底物15 μ l的试卤灵-beta-d-半乳吡喃糖苷(100 μ M,在加载缓冲液中)。

[0291] 引导混合物通过纳米孔的阵列(由Quanterix以DVD形式提供,从cyclic olefin聚合物制备,具有24-样品每盘),允许放置约2分钟。将阵列用缓冲液冲洗,阵列用氟碳油密封,在23 $^{\circ}$ C温育2-5min,并在多色荧光成像仪上读出结果。使用图像分析来对含有两种荧光酶产物的纳米孔的数目计数,由此提供与样品中分析物的浓度相关的值。

[0292] (d) 流动池分析的基于珠的免疫测定形式

[0293] 第一温育:10 μ l样品,生物素化的分析物特异性单克隆捕捉抗体(工作溶液为2.6mg/l),和各缀合于寡核苷酸的分析物特异性单克隆抗体的混合物(工作溶液为0.3mg/l)反应以形成夹心复合物。分析物特异性单克隆抗体的混合物如实施例1中制备,且该混合物包含缀合于近端探针1和2的一对抗体,如上文实施例1中描述的。

[0294] 第二温育:在添加用链霉亲和素包被的微颗粒(Dynal M280,2.8 μ m,0.72mg/ml,对生物素的结合能力470ng/mg)后,复合物经由生物素和链霉亲和素之间的相互作用变得结合于固相。将连接混合物添加到混合物,其中连接混合物依照实施例1中所述方案制备。将该混合物与连接混合物在37C温育30分钟,清洗以除去过量的环化寡核苷酸,并与RCA混合物,如实施例1中描述的。清洗混合物和添加用生物素标记的检测探针的混合物,并在37C温育30分钟,其中检测探针混合物如实施例1中所述制备。为了掺入电化学发光标记物SULFO-TAG(Meso Scale Diagnostics),检测探针合成为具有末端生物素标记物且与用SULFO-TAG标记的链霉亲和素预结合。

[0295] 将反应混合物抽吸到测量孔,该处微颗粒被磁性捕捉到电极的表面上。然后用ProCell(含TPA的缓冲液)除去未结合的物质。然后对电极应用电压诱导化学发光发射,对此通过光电倍增管测量。结果经由仪器特异地由2点校正生成的校正曲线和经由试剂条形

码提供的主曲线(master curve)测定。

[0296] 实施例6.HIV-1P24的检测

[0297] 材料、方法和结果:

[0298] 将实施例1中描述的规程用于检测HIV-1p24。从混合HIV-1的滴定性能组(可获自Seracare Life Sciences, www.seracarecatalog.com)、HIV-1血清转化组(也可获自Seracare Life Sciences)、HIV抗体阳性样品(可获自ProMedDx, LLC, www.promeddx.com)、和正常匹配的样品(可获自Bioreclamation, www.bioreclamation.com)测试约64份血清或血浆样品。依照上文所述规程进行的HIV-1p24测定的校正曲线显示于图12。发现测定的LOD为1.3fg/mL, LL0Q为3.0fg/mL且UL0Q为37,500fg/mL。对于25uL样品1.3fg/mL的检测限对应于约650个p24分子,且每个病毒颗粒(分子)产生约2000个p24蛋白拷贝。

[0299] 混合的滴定性能组PRA204(B)由具有通过商品化测定法(bioMerieux、Perkin Elmer和Zeptometrix)对HIV p24抗原的反应性范围从较弱到较强阳性的10份标本的组组成。将两份阴性的标本包含在该组中。测定的结果显示于下表6:

[0300] 表6.

[0301]	组成员	bioMerieux HIV Ag VIDAS p24(pg/mL)	Perkin Elmer HIV Ag p24(s/co)	Zeptomatrix HIV Ag p24(s/co)	MSD 3AB 形 式 (pg/mL)	MSD 3AB 形 式(ECL)
	PRA204(B)-09	>400	>42	75	>38	1915873
	PRA204(B)-10	<3	1	0	0.0	174
	PRA204(B)-11	85	18	16	>38	1674519
	PRA204(B)-12	60	11	14	>38	1601078
	PRA204(B)-13	170	47	41	>38	1902237
	PRA204(B)-15	192	45	36	>38	1884816
	PRA204(B)-17	>400	42	61	>38	1897359
	PRA204(B)-20	<3	1	0	0.0	150
PRA204(B)-21	68	14	18	>38	1422070	
[0302]	PRA204(B)-22	17	3	1	10	347517
	PRA204(B)-23	14	2	2	7	237726
	PRA204(B)-24	15	3	3	9	306728

[0303] 对于大多数样品,HIV p24水平较高且高于UL0Q。所有10份阳性样品均为可检测的且与商品化的p24试剂盒是可比的,而阴性样品(基于商业测定法,分别为PRA204(B)-10和-20)相当低,分别为约3和2fg/mL。

[0304] 血清转化组的分析结果显示于图13。发现3抗体测定形式与PCR一样灵敏且第一阳性样品的检测前时间中估测的延迟和来自PRB948和PRB962组的两种样品中的p24水平与

PCR试剂盒可比,且比其他商业p24测定性能更好。数据显示于表7。

[0305] 表7.

[0306]

组 & 成员	第 一 次 出 血 后 天数	Abbott BBI(s/co)	Coulter BBI(s/co)	DuPont BBI(s/co)	Inno.(s/co)	MSD 3AB(pg/ mL)	MSD 3AB(EL)	Roche PCR(co/ mL)	
组 I-I, PRB948-01	0	0.4	0	0.1	0.4	0.001	121	BLD	
组 I-I, PRB948-01	18	0.4	0	0.1	0.4	0.001	100	BLD	
组 I-I, PRB948-01	20	0.5	0.2	0.5	1	3	97688	3 x 10 ⁴	
组 I-I, PRB948-01	23	5	23	15	31	>38	1736809	6 x 10 ⁵	
	第 一 次 出 血 后	Coulter(s/co)2	PE(s/co)2	Roche Elecsys(s/co)2	Zepto (s/co)2	MSD 3AB(pg/ mL)	MSD 3AB(EL)	Roche Ultra(co/	Roche stnd

[0307]

	天数							mL)	
组 I-II, PRB962- 01	0	0.3	0.3	0.1	0.1	0.002	149	<50	NT
组 I-II, PRB962- 02	2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.001	120	<50	NT
组 I-II, PRB962- 03	7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.021	778	NT	7.6 x 10 ²
组 I-II, PRB962- 04	9	0.6	0.3	0.3	0.3	0.2	7603	NT	7.7 x 10 ²
组 I-II, PRB962- 05	14	>40	30	23	10	>38	18083 44	NT	7.0 x 10 ³
组 I-II, PRB962- 06	17	>40	>49	155	24	>38	18636 99	NT	1.2 x 10 ⁷

[0308] Abbott BBI指Abbott BBI HIV-1抗原测试。

[0309] Coulter BBI指Coulter BBI HIV-1抗原测试。

[0310] DuPont BBI指DuPont BBI HIV-1抗原测试。

[0311] Inno.指Innogenetics R129 HIV-1抗原测试。

[0312] Roche PCR指Roche PCR HIV RNABBI test。

[0313] Coulter指Coulter ELISA HIV-1抗原测试。

[0314] PE指Perkin Elmer ELISA HIV-1抗原测试。

[0315] Zepto.指Zeptometrix ELISA HIV-1抗原测试。

[0316] Roche Ultra指Roche Ultrasensitive HIV-1RNA测试。Roche standard指the Roche standard HIV-1RNA测试。BLD=低于检测限和NT=未测试。

[0317] 结论：

[0318] 新近感染HIV的患者不成比例地促进该疾病的传播。病毒负载在感染后头几周较高,而且新感染的患者不太可能知晓他们被感染且可能将疾病传给他人。因此,对急性HIV感染的早期检测对于公共健康具有极大重要性。PCR方法就灵敏性而言是金标准;它们能检测少至60个HIV RNA拷贝每mL血清或血浆(30病毒颗粒每mL)。然而,PCR技术是复杂且昂贵的,因此不适用于所有背景。免疫测定法是更简单和便宜的,但目前第4代p24免疫测定法的

检测限仅为约10pg/mL,或约250百万壳体蛋白质每mL。在按病毒的基础上,这些免疫测定法比PCR测试灵敏性低几千倍,尽管事实上有约2,000p24个壳体蛋白质每病毒。

[0319] 如本文描述的,开发了基于MSD的**MULTI-ARRAY**[®]技术的下一代电化学发光测定形式并表征了其性能。这一新的p24免疫测定法的检测限为约1fg/mL,比目前的p24免疫测定法灵敏10,000倍。1fg/mL的灵敏度对应于我们25uL的样品体积中低于1个病毒颗粒。定量的下限和上限分别为3fg/mL和38,000fg/mL。板内CV为7%,且总CV为15%。加标回收(Spike recovery)和稀释线性为80%至120%。p24在32名明显健康的供体的血清或血浆中未检出。混合p24的滴定组显示3-AB HIVp24测定与商业p24免疫测定之间的较好相关性。测试了两个血清转化组:SeraCare PRB948(第0和18天,PCR阴性;第22和23天,PCR阳性)和PRB962(第0和2天,PCR阴性;第7、9、14和17天,PCR阳性)。在两种情况中,3AB HIVp24测定结果对于所有PCR阴性样品为阴性且对于所有PCR阳性样品为阳性,且感染在常规p24免疫测定之前很早就检测到。

[0320] 结论是,本文中描述的3-AB HIVp24免疫测定比目前的p24 ELISA的限度灵敏10,000倍,且与PCR测定的灵敏性是可比的。该测定法不需要专门的设备且可在MESO[™]QuickPlex SQ 120和**SECTOR**[®]成像仪上运行。

[0321] ***

[0322] 本发明在范围上不受本文描述的具体实施方案的限制。事实上,除了本文描述的那些以外的对方法的多种修改将是本领域技术人员从前述说明和所附附图来看明显的。这类修改意图落入权利要求的范围内。本文中引用了多种出版物,其公开内容通过提述完整并入本文。

[0323] 参考文献

[0324] 1.美国专利No.7,306,904

[0325] 2.美国专利No.7,320,860

[0326] 3.美国专利No.7,351,528

[0327] 4.美国专利No.7,192,703

[0328] 5.美国专利No.6,878,515

[0329] 6.Zhou等,Genome Biology(2004),5:R28

[0330] 7.Dean等,Genome Research(2001),11:1095-1099

[0331] 8.Soderberg等,Methods(2008),45:227-232

[0332] 9.Fredriksson等,Nature Biotech(2002),20:473-477

[0333] 10.Fredriksson等,Nature Methods(2007),4(4):327-329

[0334] 11.Vincent等,EMBO Reports(2005),5(8):795-800

[0335] 12.Gajadjar等,Biotechniques(1010),48(22):145-152

[0336] 13.Schallmeiner等,Nature Methods(2007)4(2):135-137

[0337] 14.Ericsson等,Nucl.Acids Research(2008),36(8):e45

[0338] 15.Darmanis等,Biotechniques(2007),43:443-450

[0339] 16.Dahl等,Proc.Natl.Acad.Sci.(2004),101(13):4548-4553

[0340] 17.Weibrecht等,Expert Rev.Proteomics(2010),7(3):401-409

[0341] 18.Spits等,Nature Protocols(2005),1(4):1965-1970

- [0342] 19.Nordengrahn等,Vet.Microbio(2008),127:227-236
- [0343] 20.Vuoriluoto等,Mol.Oncology(2011),5:105-111
- [0344] 21.Zhang等,Clinica Chimica Acta(2006),363:61-70
- [0345] 22.Andras等,Mol.Biotech.(2001),19:29-44
- [0346] 23.Schweltzer等,Proc.Natl.Acad.Sci.(2000),97(18):10113-10119
- [0347] 24.Jeong,等,Cell.Mol.Life Sci.(2009),66:3325-3336
- [0348] 25.Gill等,Nucleosides,Nucleotides,and Nucleic Acids(2008),27:224-245
- 26.Gullberg,等,Current Op.in Biotech.(2003),14:82-86
- [0349] 27.Gustafsdottir,等,Clinical Chemistry(2006),52(6):1152-1160
- [0350] 28.美国专利公开No.20100075862
- [0351] 29.美国专利No.8,222,047
- [0352] 30.美国专利No.8,236,574
- [0353] 31.美国专利No.8,338,776
- [0354] 32.美国专利公开No.20110212537
- [0355] 33.美国专利公开No.20120196774
- [0356] 34.美国专利公开No.20120289428

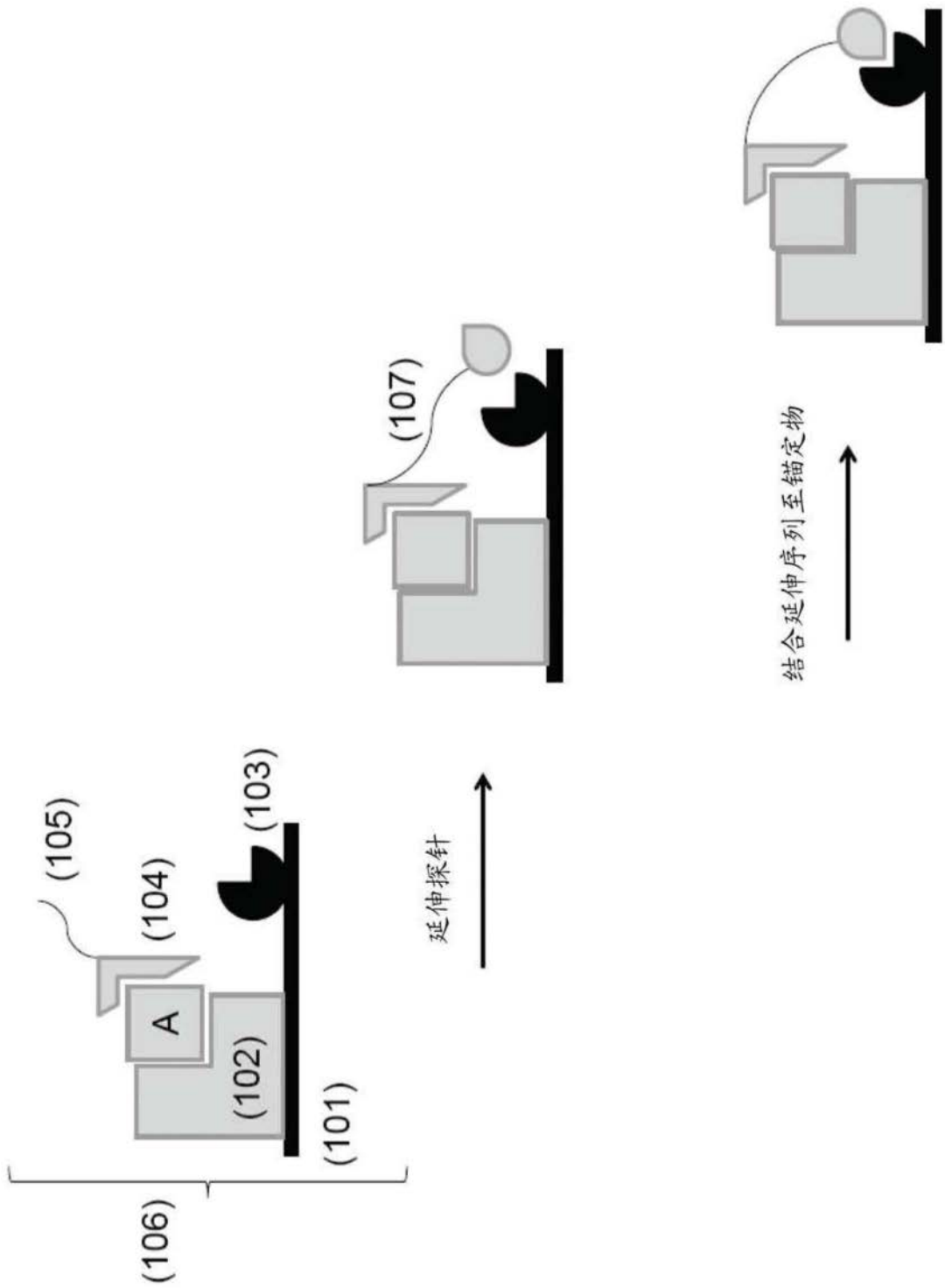


图1(a)

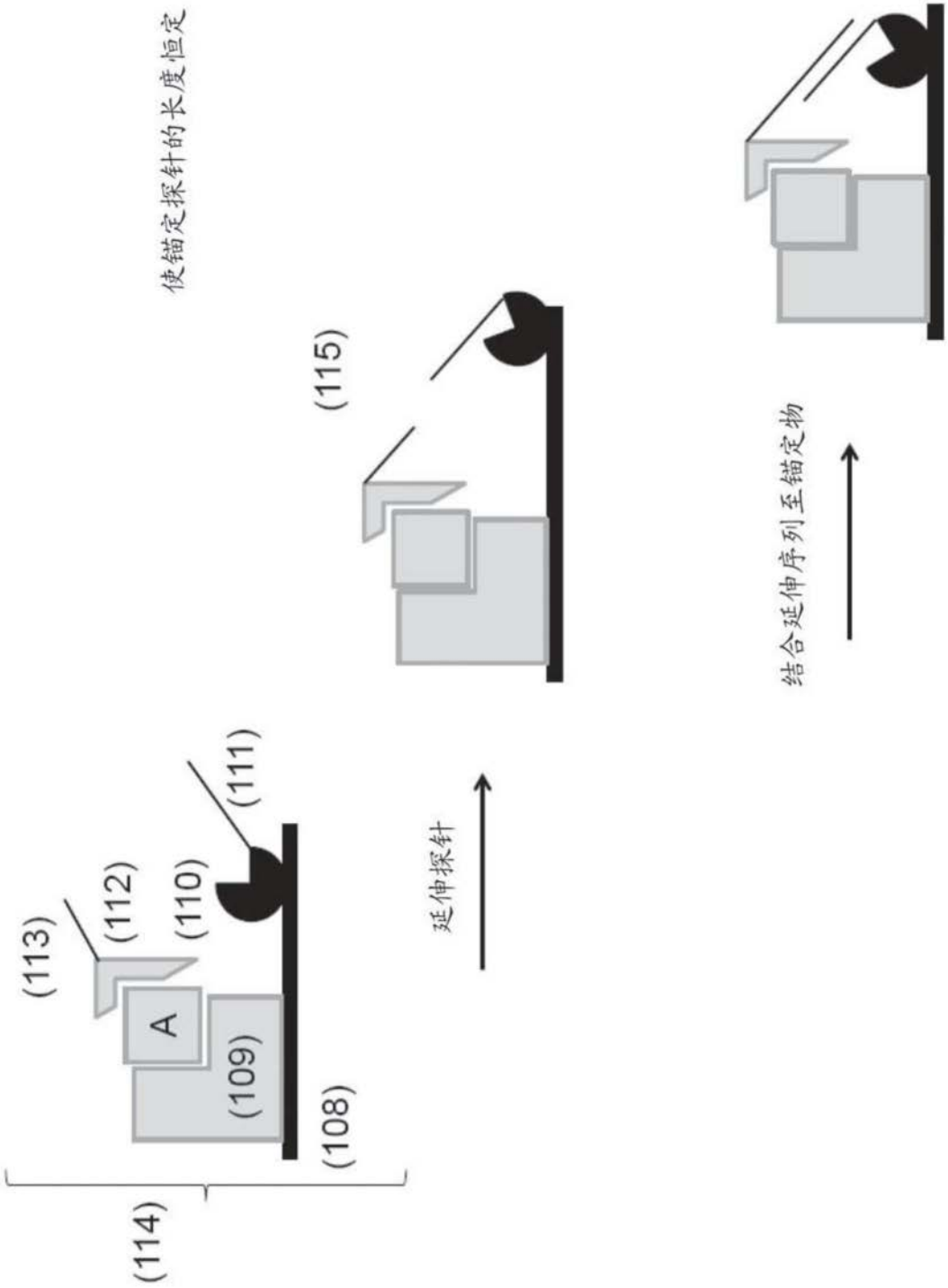


图1(b)

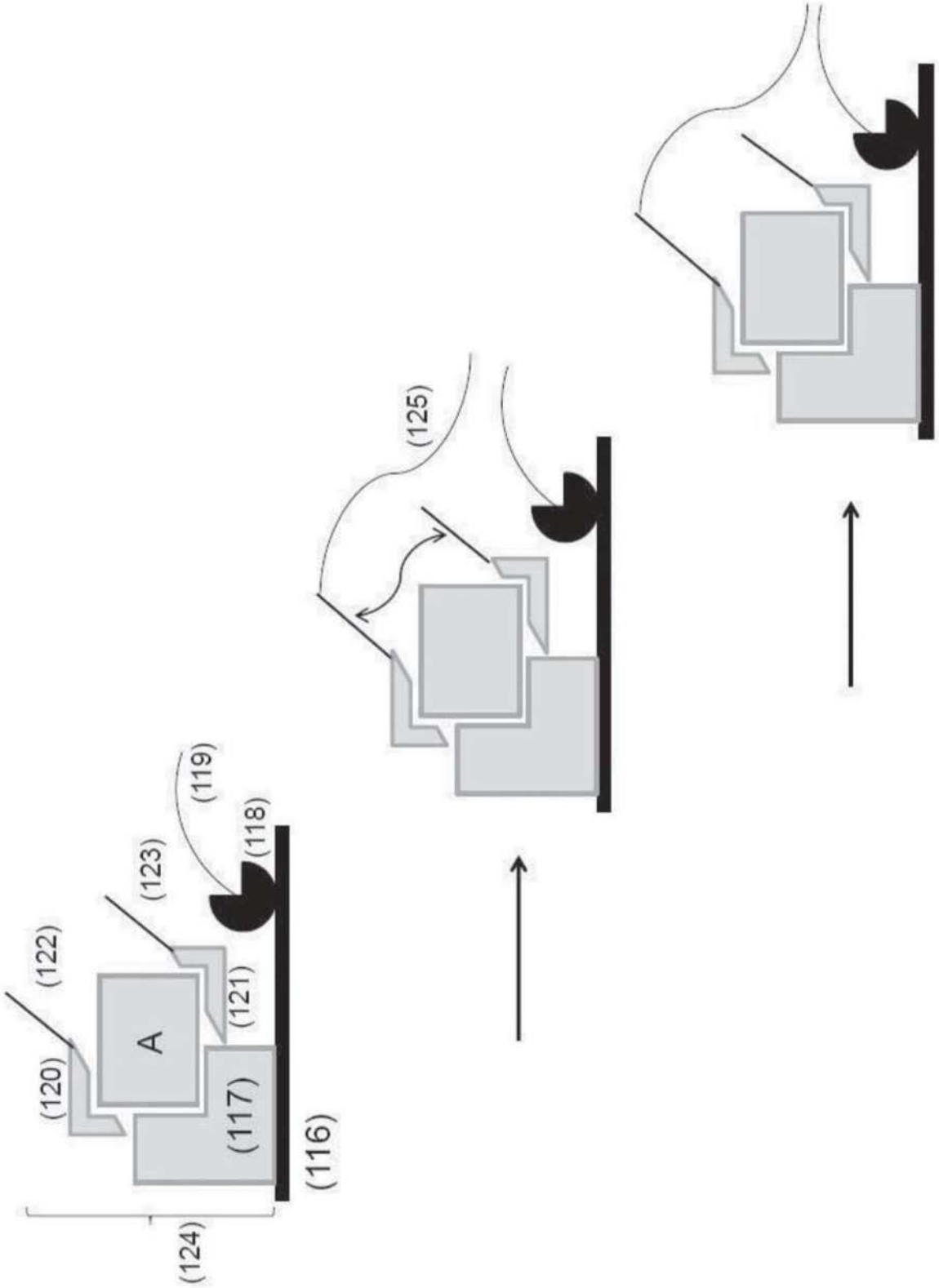


图1(c)

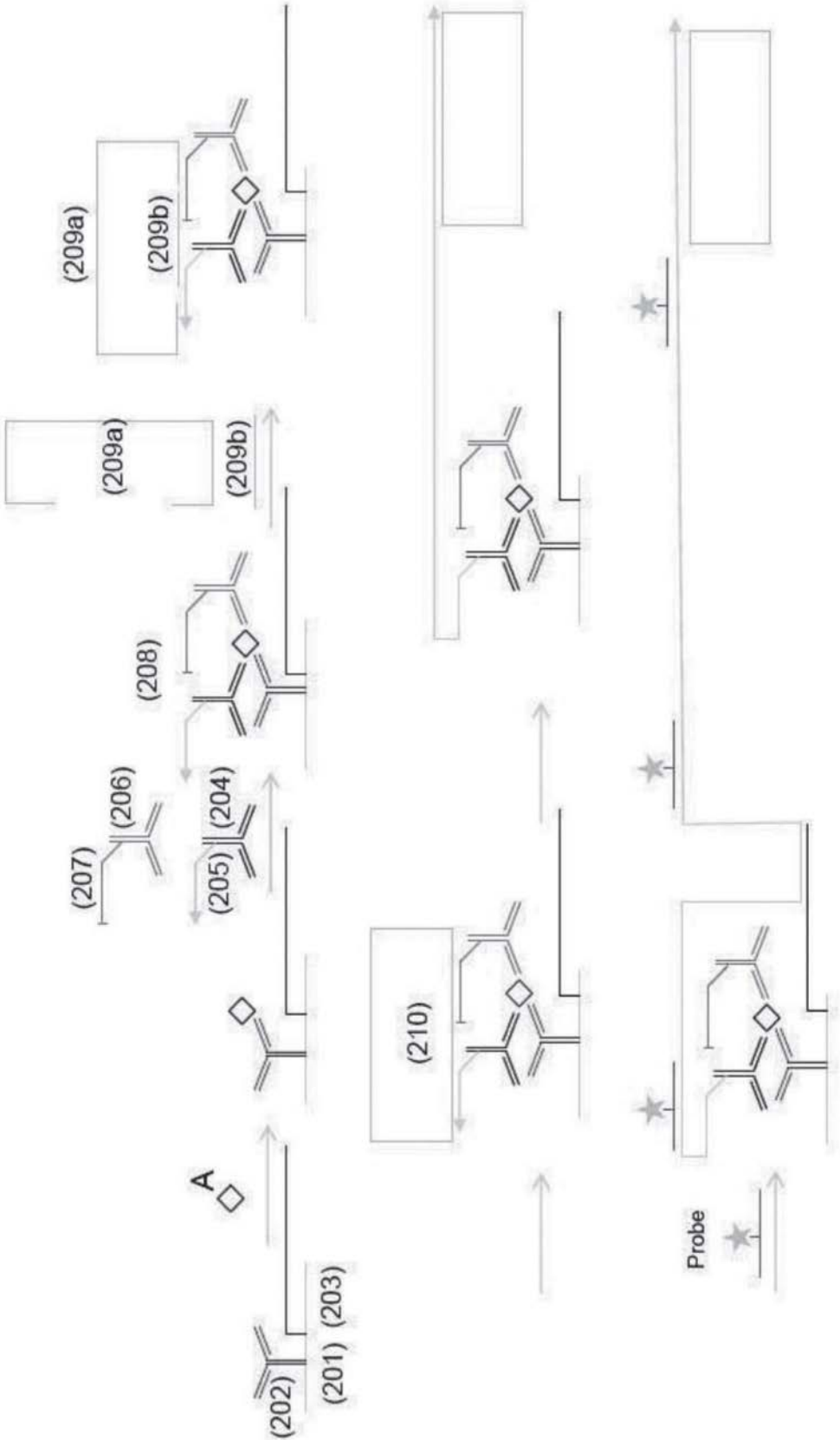


图2(a)

(209a) (209b)

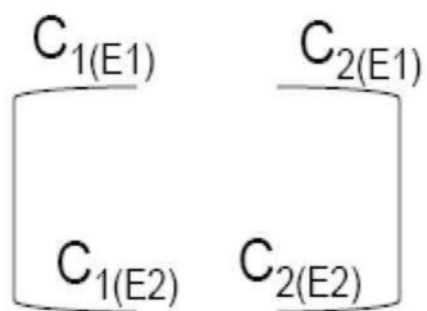


图2(b)

(211)

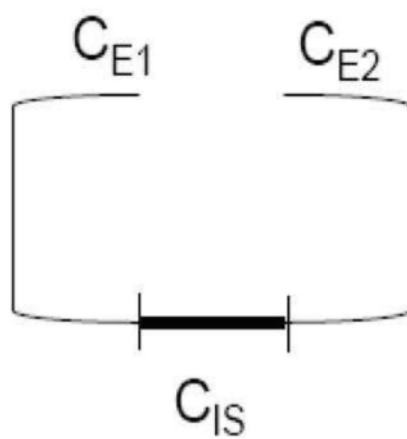


图2(c)

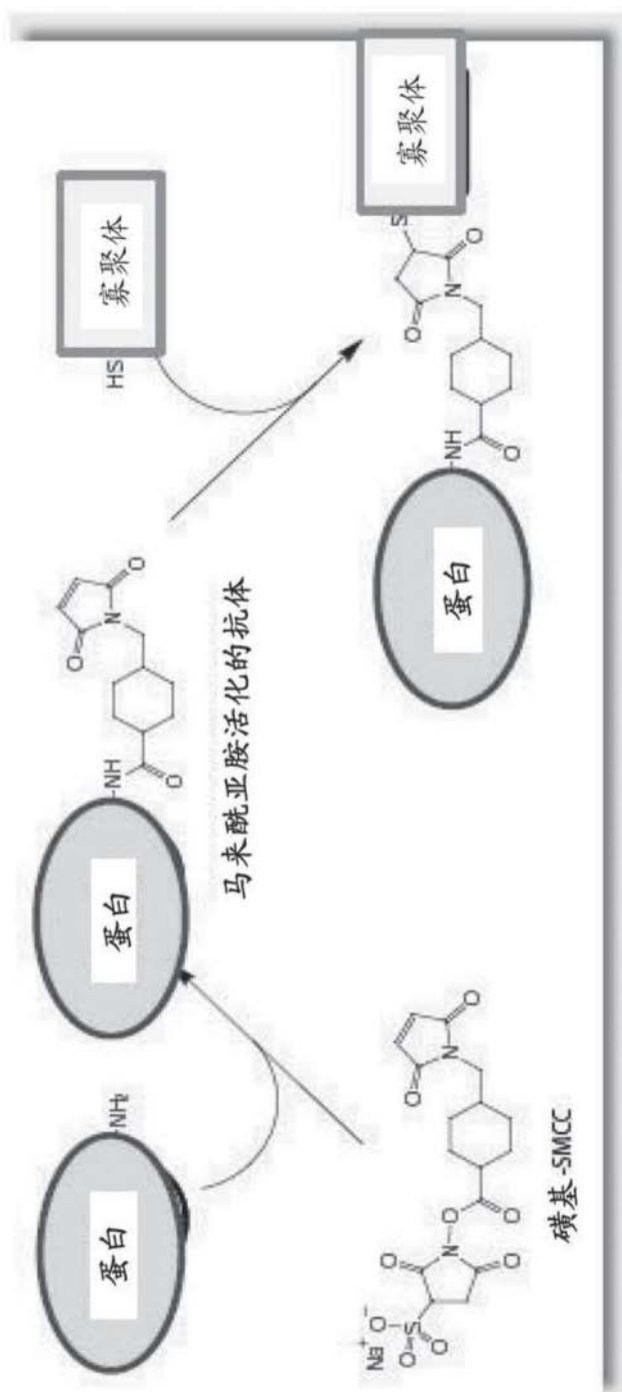


图3

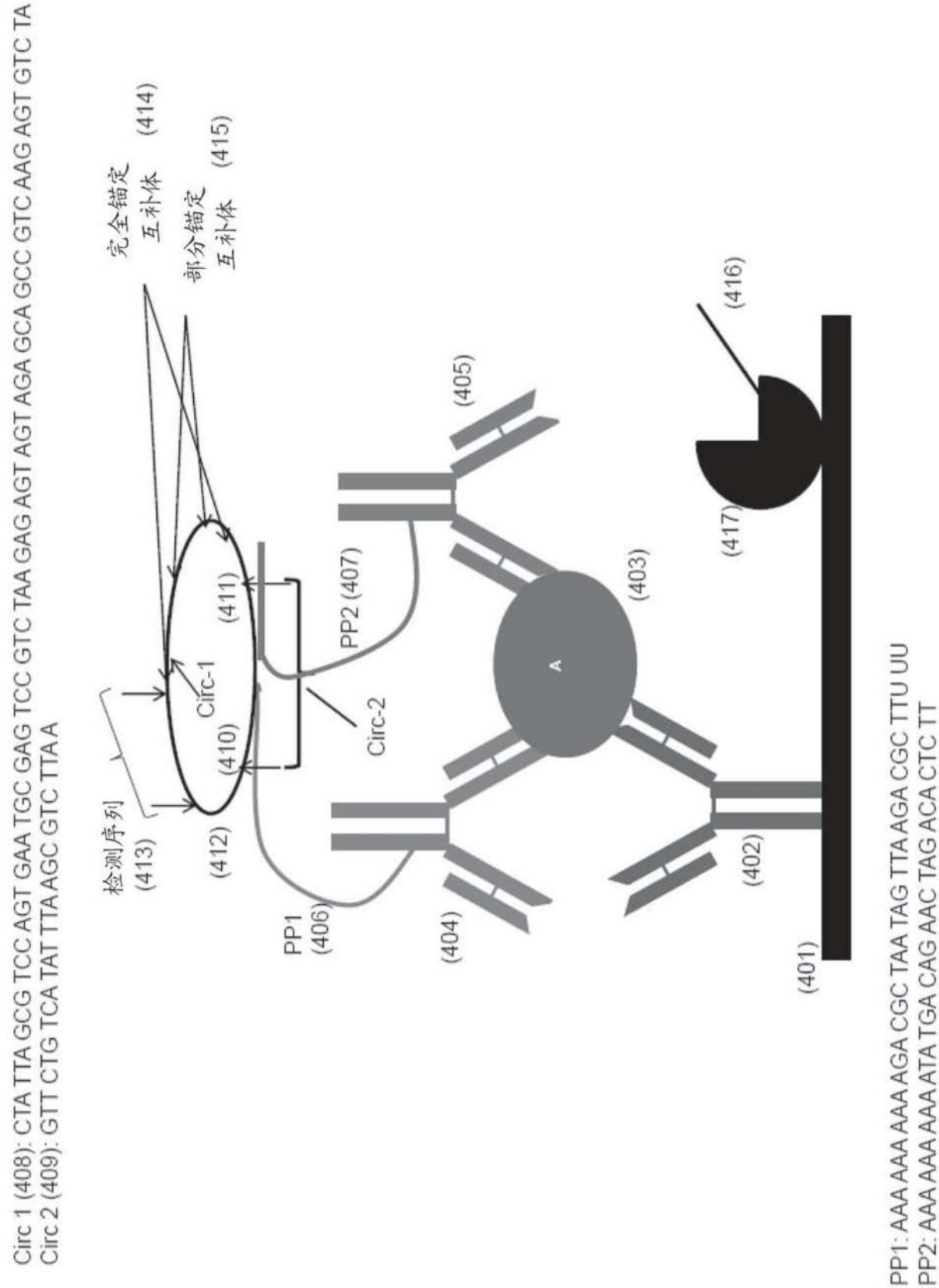


图4(a)

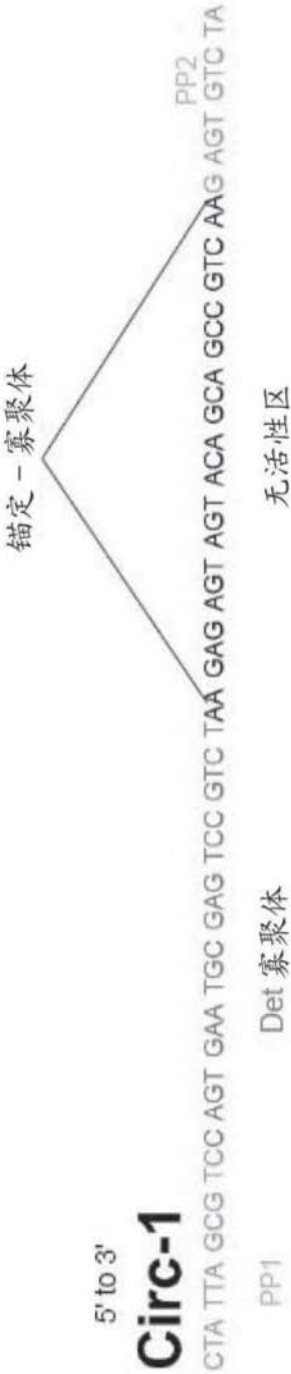


图4(b)

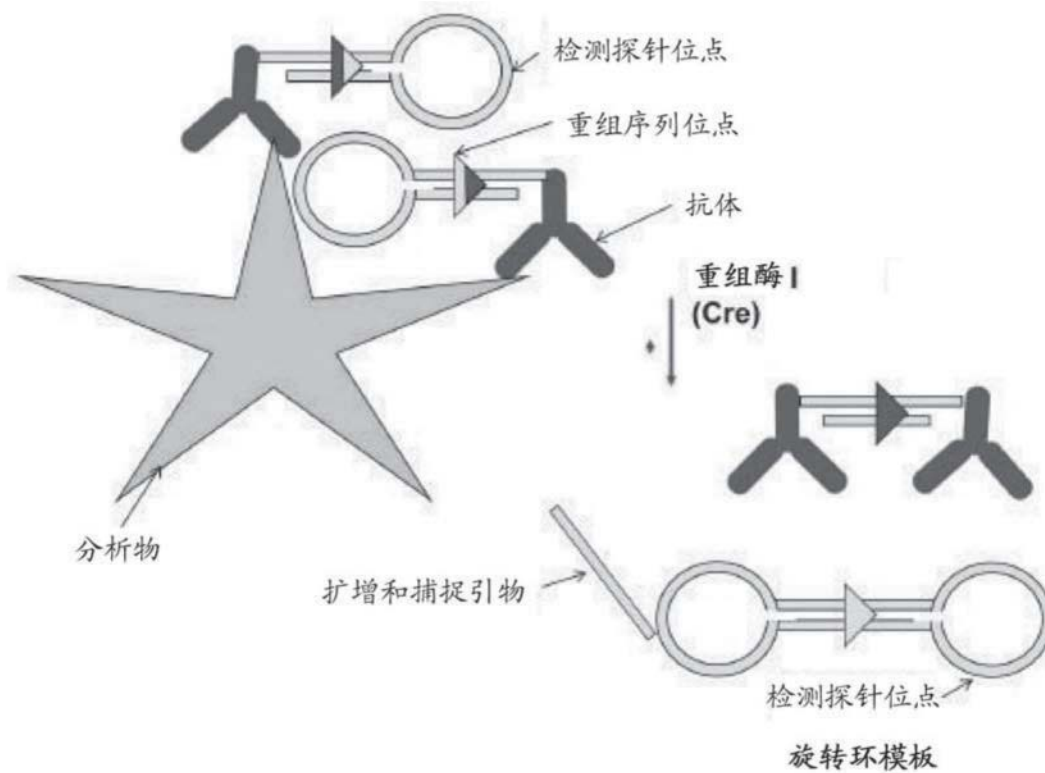


图5

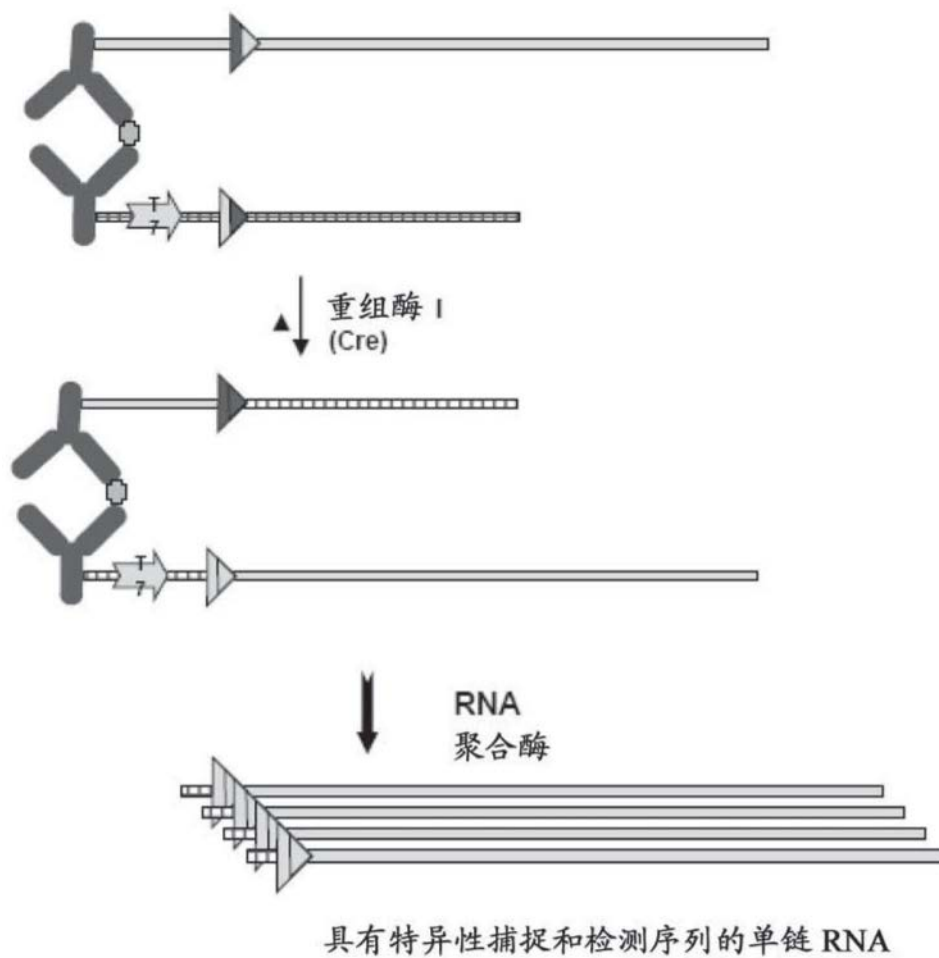


图6(a)

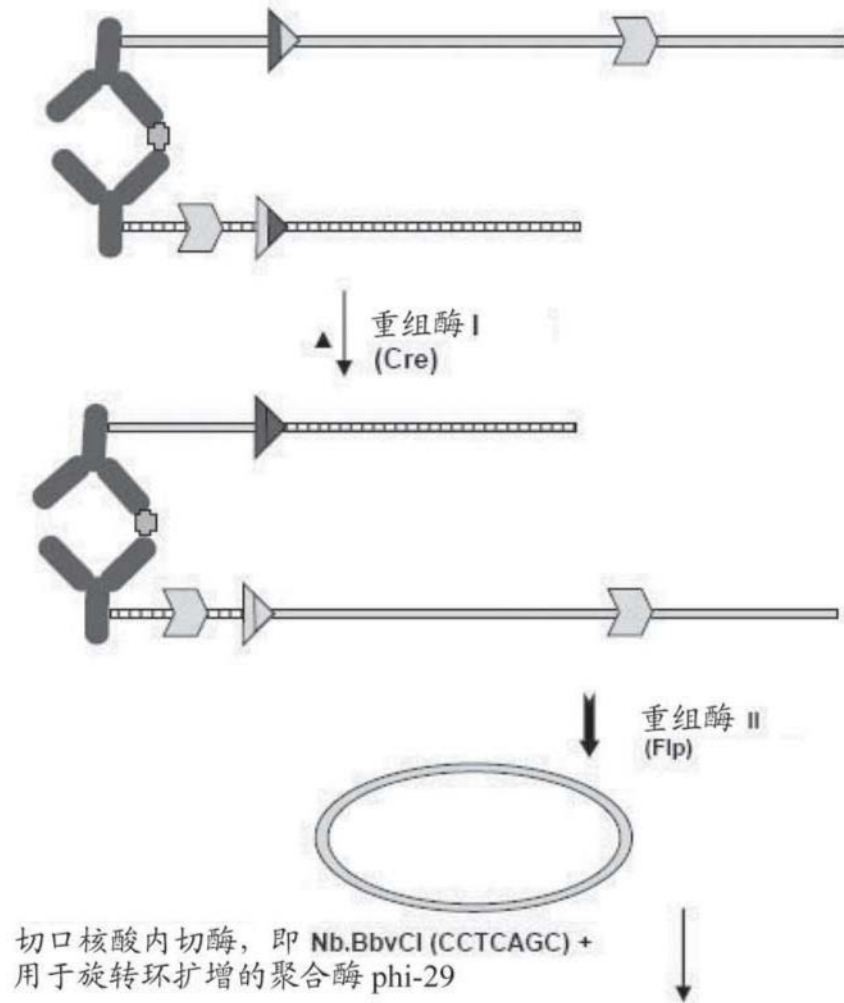


图6(b)

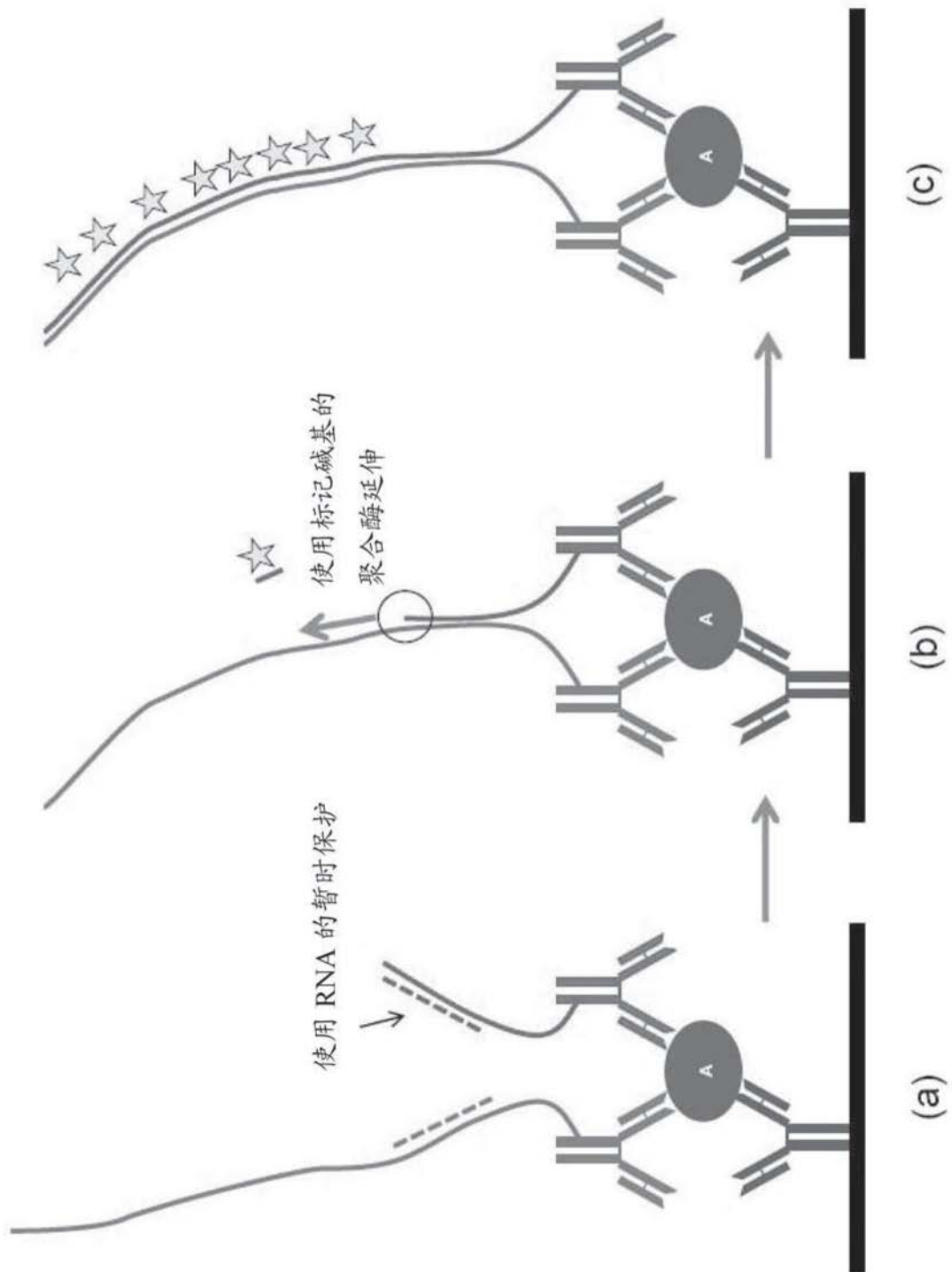


图7

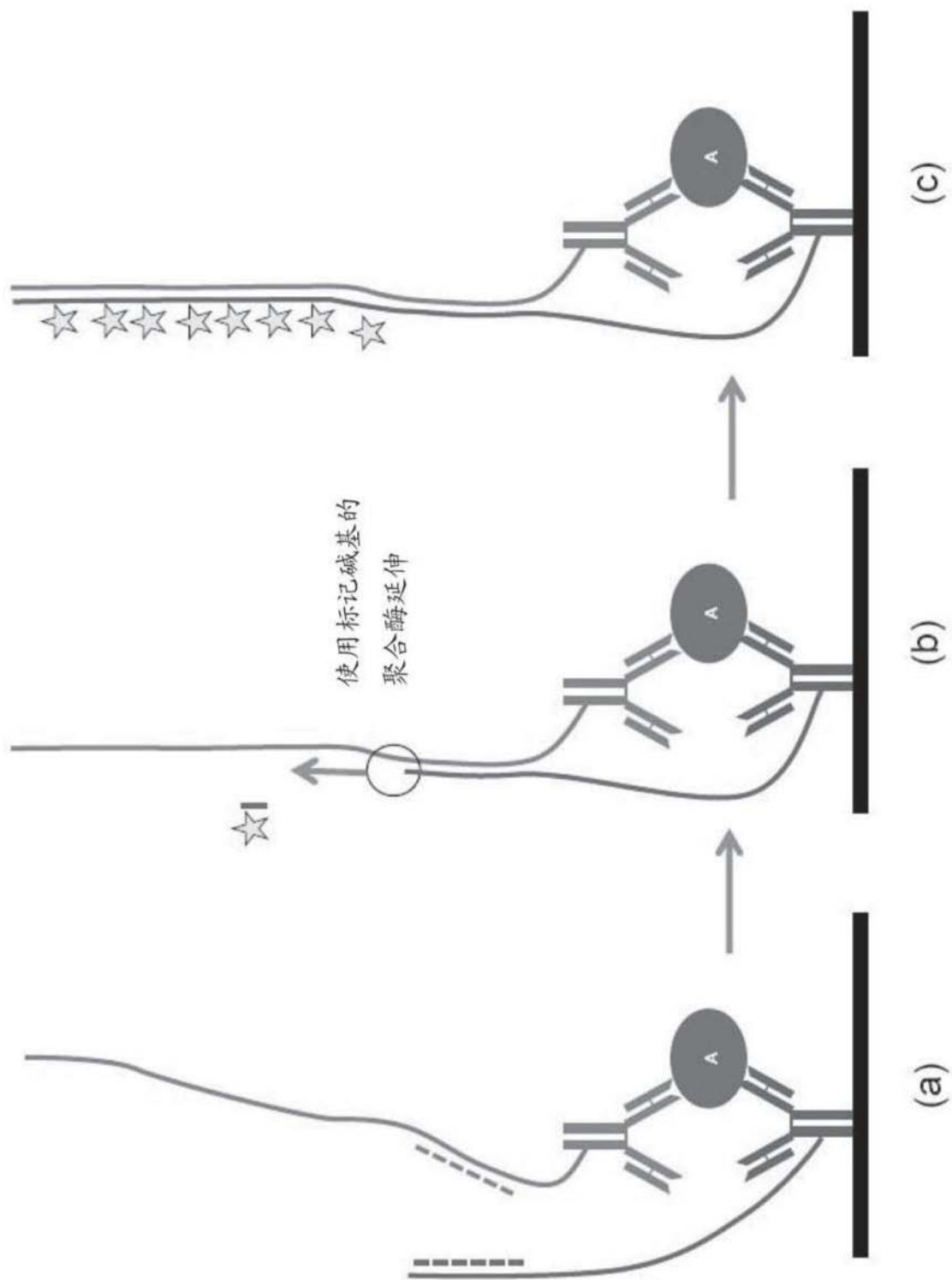


图8

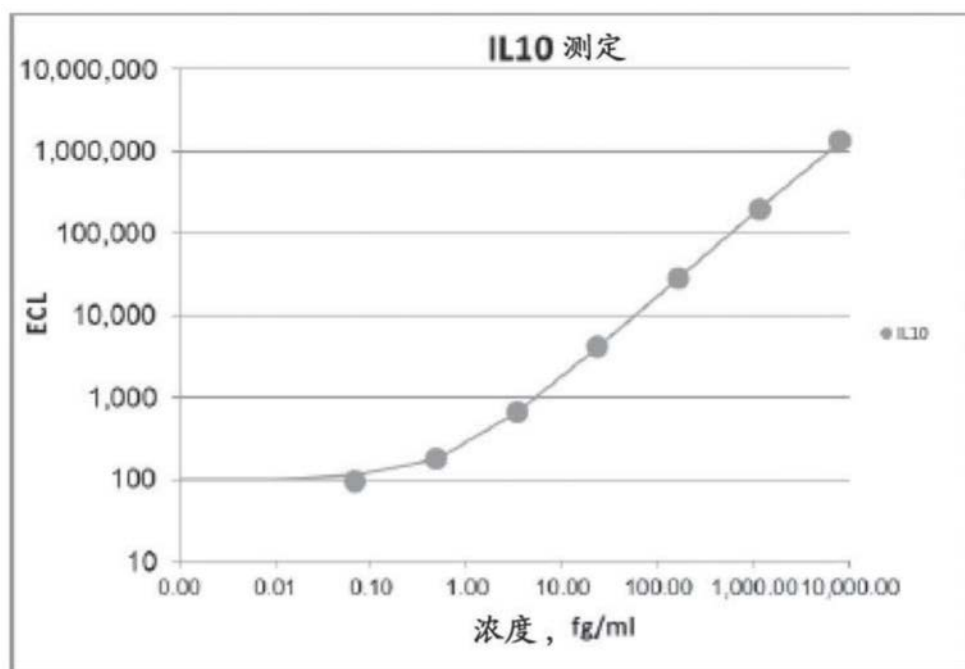


图9

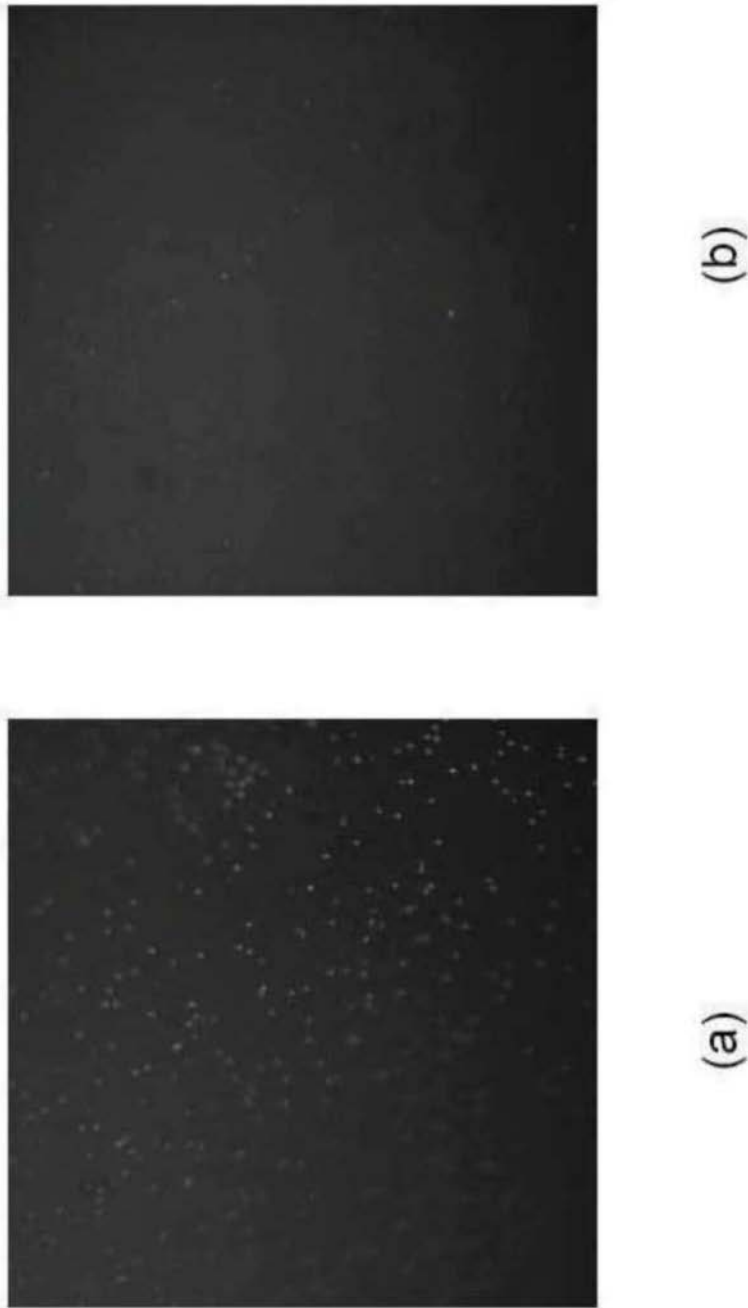


图10(a)-(b)

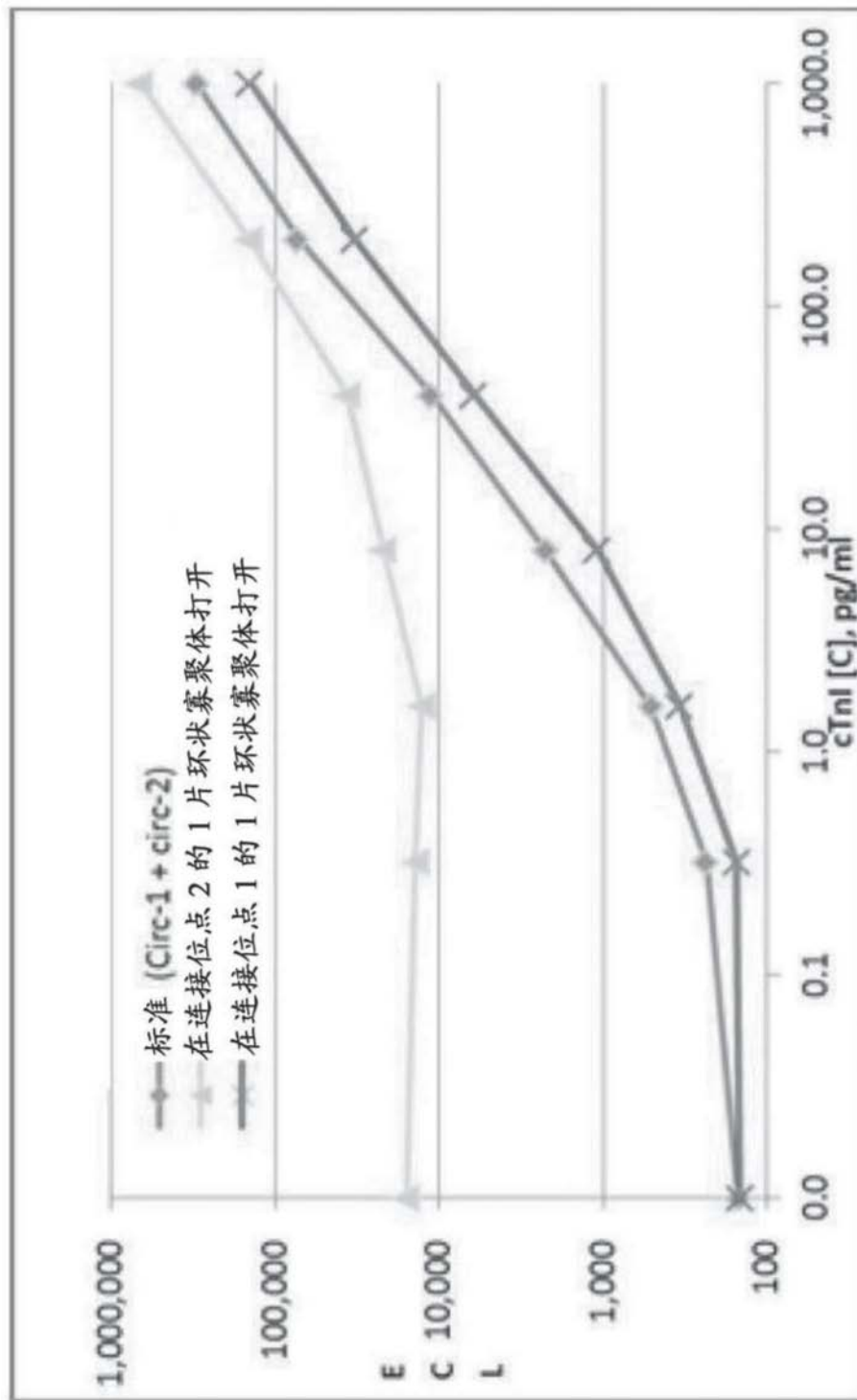


图11(b)

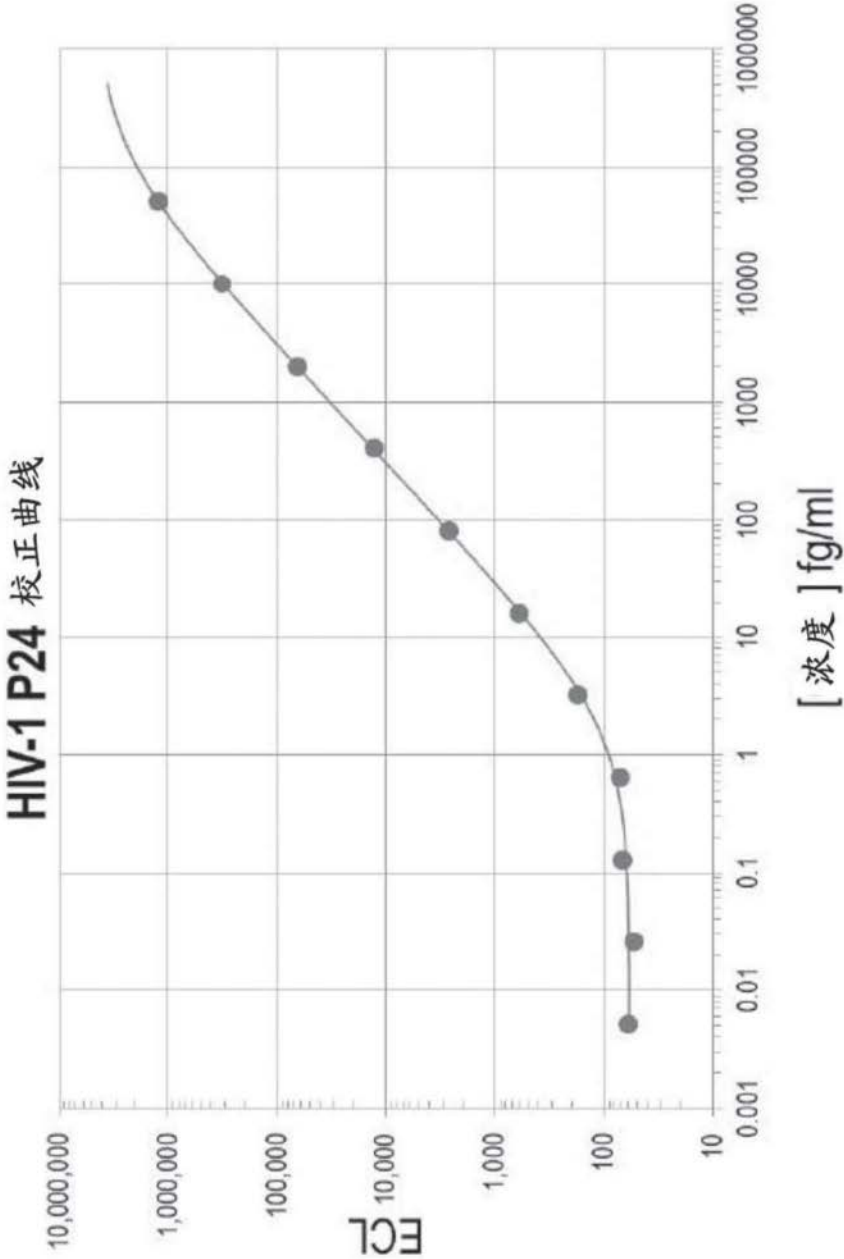


图12

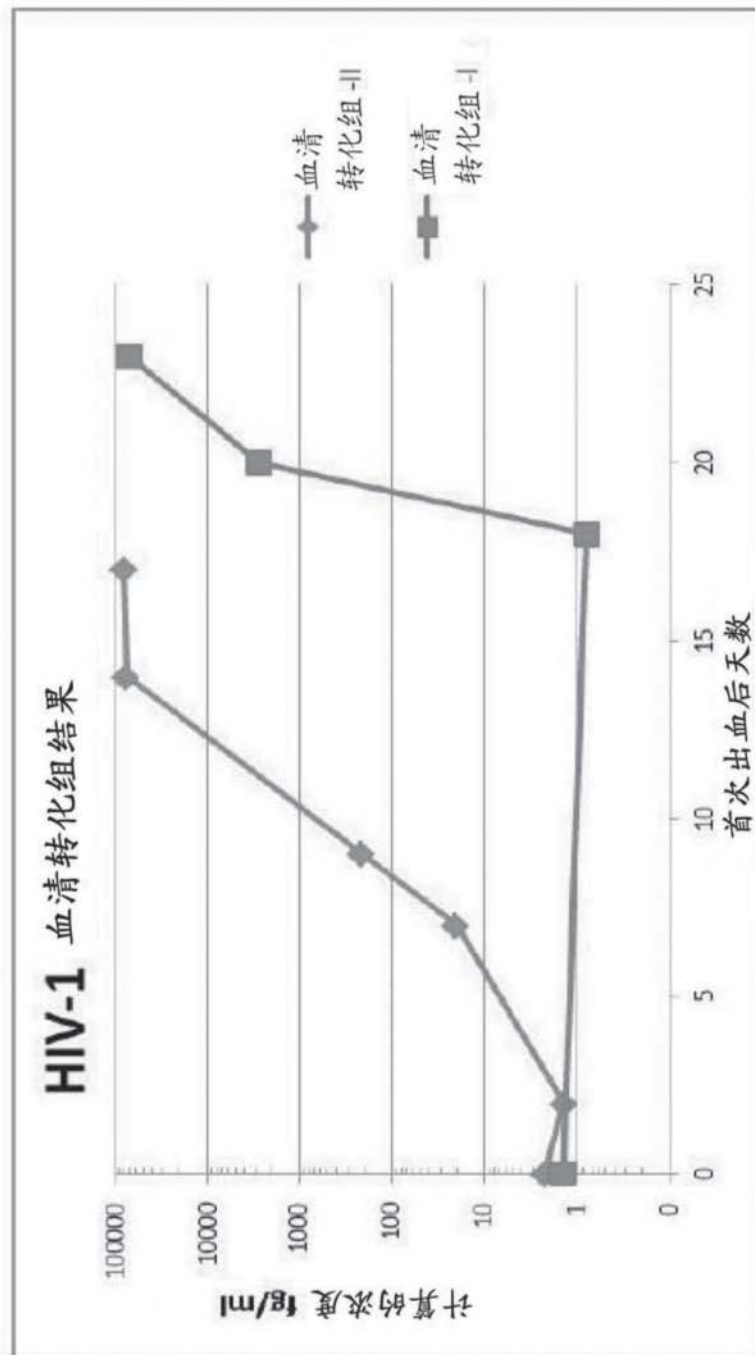


图13