

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580052434.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年1月14日

[11] 公开号 CN 101346626A

[22] 申请日 2005.10.29

[21] 申请号 200580052434.5

[86] 国际申请 PCT/EP2005/011607 2005.10.29

[87] 国际公布 WO2007/048436 德 2007.5.3

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.27

[71] 申请人 拜尔技术服务有限责任公司

地址 德国莱沃库森

[72] 发明人 M·波拉克 E·希克 M·文图里

M·埃拉特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 温宏艳 李连涛

权利要求书 10 页 说明书 45 页 附图 11 页

[54] 发明名称

用于测定具有生物来源和复杂组成的样品中
一种或多种分析物的方法及其用途

[57] 摘要

本发明涉及一种用于检测或多个生物来源和复杂组成的样品中一种或多种分析物的方法。本发明还涉及一种用于定量测定生物来源和复杂组成的样品中一种或多种分析物的微阵列，所述样品固定于微阵列的测量区域中，还涉及一种基于其的定量检测方法。

1. 一种用于检测一种或多种生物来源和复杂组成的样品中的一种或多种分析物的方法，包括以下步骤：

(1) 提供一种或多种生物来源和复杂组成的样品，

(2) 提供至少一个固体载体，

(3) 将少量所述生物来源和复杂组成的样品以稀释或未稀释的形式直接施加到所述固体载体上的不连续的位点上，或者在预先施加促粘附层之后施加到固体载体上的所述促粘附层上，从而在所述至少一个固体载体上形成一个或多个不连续测量区域的阵列，

(4) 使至少一个不连续测量区域的阵列与第一溶液相接触，所述第一溶液含有一种或多种作为待测分析物特异性结合配对物的结合试剂和如果需要的话任选地含有一种或多种检测试剂，所述分析物存在于所述不连续测量区域中施加的生物来源和复杂组成的样品中，并且，所述结合试剂和检测试剂可以同时或者顺序施加，

(5) 以空间分辨的方式测量从已在步骤(4)中与第一溶液接触后的一个或多个阵列的不连续测量区域发出的第一光学信号，

(6) 记录所述第一光学信号，

其特征在于，通过进一步进行以下步骤来测定所测得的第一光学信号的比例，所述第一光学信号是由于与加入的结合试剂和任选加入的检测试剂发生非特异性相互作用而产生的：

(7a) 施加第二溶液，所述第二溶液除了在步骤(4)中加入的第一溶液的一种或多种结合试剂和任选的一种或多种检测试剂之外，还含有已知高浓度的化合物，其与待测的并存在于已施加到不连续的测量区域中的生物来源和复杂组成的样品中的分析物种类相同，作为所述待测的并存在于生物来源和复杂组成样品中的分析物的竞争剂，该样品已施加到不连续的测量区域中，以使所述结合试剂和任选另外添加的检测试剂特异性结合到步骤(3)中生成的一个或多个不连续测量区域的阵列上，和/或

(7b) 施加第三溶液，所述第三溶液除了在步骤(4)中加入的第一溶液的所述一种或多种结合试剂和任选的一种或多种检测试剂之外，还含有已知高浓度的物质，该物质与步骤(3)中施加样品的样品基质中存在的物质种类类似，以便与样品基质中的所述物质竞争，所述物质存在于已施加到不连续的测量区域中的生物来源和复杂组成样品中，以使所述结合试剂和任选另外添加的检测试剂非特异

性结合到步骤(3)中生成的一个或多个不连续测量区域的阵列上,

(8)以空间分辨的方式测量从已在步骤(7a)中与第二溶液和/或在步骤(7b)中与第三溶液接触后的一个或多个阵列的不连续测量区域发出的第二和/或第三光学信号,

(9)记录所述第二和/或第三光学信号,以及

(10)比较所述第一和第二和/或第三光学信号。

2. 权利要求1所述的方法,其特征在于,所述生物来源和复杂组成的样品可以选自由以下样品构成的组:细胞群体裂解物、细胞提取物、体液及体液组分,其中:

(1)所述样品可以是分馏或未分馏的样品,

(2)所述生物来源和复杂组成的样品从健康和/或患病和/或受到刺激和/或未经处理的细胞中获得,所述细胞来自包括人、动物、细菌和植物细胞的组,

(3)所述生物来源和复杂组成的样品从动物或人的组织如器官、皮肤、毛发、肌肉、脂肪或骨组织中获得。

3. 权利要求1或2所述的方法,其特征在于,施加到测量区域的生物来源和复杂组成的待分析样品中的物质相当于少于100个细胞的物质,优选相当于少于10个细胞的物质,和/或表示体积小于100nl,优选小于1nl。

4. 权利要求1-3任一项所述的方法,其特征在于,施加到不连续测量区域中的生物来源和复杂组成样品中的待测分析物是蛋白质及其翻译后修饰的蛋白形式,还有人工修饰或表达的蛋白,单或多克隆抗体以及抗体片段、肽、来自完整蛋白质的肽片段、糖肽、外源凝集素、荧光蛋白、亲和素、链亲和素、生物素、生物素化蛋白以及不同缀合的蛋白、寡糖以及核酸。

5. 权利要求4所述的方法,其特征在于,在权利要求1的步骤(4)中,在结合与其接触的作为特异性结合配对物的结合试剂、以及任选的另外的检测试剂之后,被测蛋白质,作为被施加到不连续的测量区域中的生物来源和复杂组成样品中的分析物,根据其在所述施加的生物来源和复杂组成样品中存在的磷酸化和/或糖基化和/或甲基化和/或乙酰化形式来进行区分,并且在如权利要求1中所述的检测步骤(5)中分别检测。

6. 权利要求4所述的方法,其特征在于,在权利要求1的步骤(4)中,在结合与其接触的作为特异性结合配对物的结合试剂、以及任选的另外的检测试剂之后,被测蛋白质作为被施加到不连续的测量区域中的生物来源和复杂组成样品中的分析物,不根据其在所述施加的生物来源和复杂组成样品中存在的磷酸化和/或

糖基化和/或甲基化和/或乙酰化形式来进行区分，并且在权利要求1中所述的检测步骤(5)中不进行分别检测。

7. 权利要求1-6任一项所述的方法，其特征在于，所述结合试剂，作为待测的并存在于不连续测量区域中所施加的生物来源和复杂组成样品中的分析物的特异性结合配对物，可以选自以下组的化合物：蛋白质、肽、酶、酶抑制剂、激酶底物、适配体、合成肽结构、糖肽、激素、辅助因子、低聚糖、外源凝集素、针对抗体或T细胞受体的抗原、生物素、亲和素、链亲和素、具有附加结合位点的官能化蛋白质和/或其复合结合配对物，以及核酸类似物及其具有人工碱基的衍生物。

8. 权利要求1-7任一项所述的方法，其特征在于，所述检测试剂选自：

第一组，包括：多克隆或单克隆抗体以及抗体片段、核酸和核酸衍生物及其具有人工碱基的衍生物、生物素、亲和素、链亲和素和中性亲和素，或者

第二组，包括：质量标记和/或发光标记，所述质量或发光标记结合在结合试剂上，或者附着或连接于其上，或者结合在根据(1)的第一组检测试剂的检测试剂上，或者以特殊的方式结合或附着在根据(1)的第一组检测试剂的所述检测试剂上，或者结合或附着在待测分析物和作为特异性结合配对物与其连接的结合试剂之间形成的络合物上，其中所述待测分析物存在于施加到不连续测量区域中的生物来源和复杂组成的样品中。

9. 权利要求1-8任一项所述的方法，其特征在于，

第一溶液中作为特异性结合配对物的所述结合试剂以及任选的检测试剂，和/或

第二溶液中作为特异性结合配对物的结合试剂、与施加到不连续测量区域的存在于生物来源和复杂组成样品中的待测分析物相同种类的化合物、以及任选的检测试剂，和/或

第三溶液中的作为特异性结合配对物的结合试剂、与存在于在权利要求1所述的步骤(3)中施加的样品的样品基质中物质种类类似的物质、和任选的检测试剂，

在各种情况下预先相互温浴，然后将所述第一、第二或第三溶液在一个添加步骤中与所述测量区域阵列相接触。

10. 权利要求1-9任一项所述的方法，其特征在于，通过向所述阵列添加可区分的检测试剂而在共同的测量区域阵列中检测不同的分析物。

11. 权利要求10所述的方法，其特征在于，不同的待测分析物数量等于可区分的检测试剂的数量。

12. 权利要求 10-11 任一项所述的方法, 其特征在于, 可区分的检测试剂在发光的激发波长和/或发射波长方面有所不同。

13. 权利要求 1-12 任一项所述的方法, 其特征在于, 通过添加用于确定各不连续测量区域阵列上的不同分析物的、作为特异性结合配对物的不同结合试剂, 和/或向所述测量区域阵列添加可区分的检测试剂, 来检测在多个不连续测量区域阵列中的多种不同分析物。

14. 权利要求 1-13 任一项所述的方法, 其特征在于, 不同的结合试剂作为针对不同分析物的特异性结合配对物被施加到用于各不同待测分析物的各个阵列中。

15. 权利要求 1-14 任一项所述的方法, 其特征在于, 含有施加到其中的生物来源和复杂组成样品的测量区域阵列包括, 添加有与待测分析物相同种类的已知浓度化合物的测量区域, 所述化合物作为所施加物质的标准品。

16. 权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 测量区域阵列包括一些这样的测量区域, 其中添加了与待测分析物相同种类的不同的已知浓度化合物作为所施加物质的标准品, 这种测量区域的数量和所述不同的已知浓度水平足以产生用于确定所述阵列中所述未知浓度的待测分析物的校正曲线, 其中所述校正曲线是通过根据权利要求 1 所述的步骤 (4)、以及权利要求 1 所述的后续步骤 (5) 和 (6), 添加含有作为特异性结合配对物的结合试剂以及还任选含有的检测试剂的第一溶液的一个步骤而形成的。

17. 权利要求 1-16 任一项所述的方法, 其特征在于, 在固体载体上设置多个相同种类的测量区域阵列, 其中, 各阵列中就行和列的排列而言相同的测量区域位点表示相同种类的样品施加于此。

18. 权利要求 1-17 任一项所述的方法, 其特征在于, 在各种相同类型的测量区域阵列上, 根据权利要求 1 所述的步骤 (4) 加入第一溶液, 并根据步骤 (5) 和 (6) 测量并记录来自该阵列的测量区域的第一光学信号, 根据权利要求 1 所述的步骤 (7a) 和 (7b) 加入第二和/或第三溶液, 接着根据步骤 (8) 和 (9) 测量并记录目标阵列测量区域中发出的信号, 其中, 在各阵列中就行和列的排列而言相同的测量区域位点表示相同种类的样品施加于此。

19. 权利要求 1-18 任一项所述的方法, 其特征在于, 由于与加入的结合试剂和任选加入的检测试剂的非特异性相互作用产生的光学信号占根据权利要求 1 所测得的第一光学信号的比例是通过在根据步骤 (7a) 加入第二溶液之后根据步骤 (8) 测得的光学信号与根据步骤 (4) 加入第一溶液之后根据步骤 (5) 测得的光

学信号的差异确定的。

20. 权利要求 1-19 任一项所述的方法，其特征在于，由于与加入的结合试剂和任选加入的检测试剂的非特异性相互作用产生的光学信号占根据权利要求 1 所测得的第一光学信号的比例是通过在根据步骤 (7b) 加入第三溶液之后根据步骤 (8) 测得的光学信号与根据步骤 (4) 加入第一溶液之后根据步骤 (5) 测得的光学信号的差异确定的。

21. 权利要求 1-20 任一项所述的方法，其特征在于，通过所述测量区域测得的光学信号与由于与添加的结合试剂和任选添加的检测试剂的非特异性相互作用产生的光学信号比例之间的差异，并将所述差异与目标分析物的校正曲线相比较，来测定施放到测量区域中的、生物来源和复杂组成样品中分析物的浓度或量。

22. 权利要求 1-21 任一项所述的方法，其特征在于，确定施放到各测量区域的各生物来源和复杂组成样品中分析物的浓度或量的差异，优选小于 20%，更优选小于 10%。

23. 权利要求 1-22 任一项所述的方法，其特征在于，根据权利要求 1 所述的步骤 (7b) 施加到一个或多个测量区域阵列的第三溶液包括选自白蛋白，特别是牛血清白蛋白 (BSA)，免疫球蛋白和稀释血清的物质。

24. 权利要求 1-23 任一项所述的方法，其特征在于，向所述固体载体施加的促粘附层包括以下组的化合物：硅烷、官能化硅烷、环氧化物、官能化、带电或极性聚合物以及“自组装钝化或功能化单和多层”、硫醇、磷酸烷基酯和磷酸烷基酯、以及多官能嵌段共聚物，例如聚 (L) 赖氨酸/聚乙二醇。

25. 权利要求 1-24 任一项所述的方法，其特征在于，使不连续测量区域之间的区域“钝化”以最小化施放到空间分隔的测量区域之间的结合或检测试剂，即，将对所述结合试剂和/或检测试剂呈“化学中性”的那些成分，即不与其结合的成分，的非特异性结合。

26. 权利要求 1-25 任一项所述的方法，其特征在于，所述固体载体是基本上平面的和/或非多孔性的和/或至少在入射激发光或测量光的波长下基本上光学透明的。

27. 权利要求 1-26 任一项所述的方法，其特征在于，所述固体载体包括多个不同光学性质的层。

28. 权利要求 1-27 任一项所述的方法，其特征在于，所述固体载体包括金属层，优选包括金、银或铝。

29. 权利要求 1-28 任一项所述的方法，其特征在于，至少所述固体载体层

至少在入射激发光或测量光波长下为基本上光学透明的，其中所述固体载体层与测量区域直接接触或通过促粘附层接触。

30. 权利要求 1-29 任一项所述的方法，其特征在于，所述固体载体包括以下组的元件：显微载波片、微滴定板、纳米滴定板、过滤器、薄膜以及微结构载体。

31. 权利要求 1-30 任一项所述的方法，其特征在于，所述固体载体包括光学波导，其为连续的或者划分成不连续的波导区域并包括一层或多层。

32. 权利要求 1-31 任一项所述的方法，其特征在于，激发光或测量光从一个或多个多色或单色光源传导到一个或多个测量区域阵列的一个或多个测量区域中，并且以空间分辨的方式测量并记录来自所述测量区域的光学信号和/或从所述测量区域发出的光学信号的变化或差异。

33. 权利要求 32 所述的方法，其特征在于，以空间分辨方式测量的光学信号的变化或差异是建立在所述固体载体表面上有效折射率的局部差异基础之上的，其中所述固体载体表面面对测量区域，或者离所述固体载体的所述表面在小于 $1\ \mu\text{m}$ 的距离内，该局部差异是由于与分析物相结合的结合试剂和/或检测试剂造成的，其中所述分析物存在于施加于其中的生物来源和复杂组成样品中的不连续测量区域中。

34. 权利要求 33 所述的方法，其特征在于，以空间分辨方式测量的光学信号中的变化或差异是建立在共振条件下的局部差异基础之上的，所述共振条件用于在作为所述固体载体一部分的薄金属层上产生表面细胞质基因组。

35. 权利要求 31-34 任一项所述的方法，其特征在于，所述固体载体包括光学层波导，其具有第一基本上光学透明的层 (a)，该层 (a) 位于第二基本上光学透明的层 (b) 之上，其中层 (a) 比层 (b) 具有更高的折射率并与测量区域直接接触或者通过促粘附层介导接触。

36. 权利要求 31-34 任一项所述的方法，其特征在于，通过一个或多个光耦合元件将来自一个或多个光源的激发光或测量光耦合到所述固体载体的波导层内，所述光耦合元件选自以下组：棱镜耦合器、具有相互接触的光学波导并具有相重叠的渐逝场的渐逝场耦合器、具有设置在所述波导层的末端前面的聚焦透镜，优选柱面透镜的端面耦合器、以及光栅耦合器，优选利用一个或多个光栅结构 (c) 将所述激发光或测量光耦合到固体载体的波导层中，所述光栅结构设置在所述波导层中作为具有特定光栅周期和光栅深度的表面起伏光栅。

37. 权利要求 34-36 任一项所述的方法，其特征在于，以空间分辨的方式测

量的光学信号中的变化和差异是建立在共振条件的局部差异基础之上的，所述共振条件是由于通过形成在所述波导层中的光栅结构将一个或多个光源的激发光或测量光耦合到所述固体载体的波导层中的。

38. 权利要求 1-37 任一项所述的方法，其特征在于，以空间分辨方式测量的光学信号中的变化或差异是建立在一次或多次发光的局部差异或变化基础之上的，所述发光是由与存在于施加在其中的生物来源和复杂组成样品的不连续测量区域中的分析物相结合的结合试剂和/或检测试剂引起的。

39. 权利要求 32-38 任一项所述的方法，其特征在于，

- 所述固体载体包括光学层波导，其具有至少在入射激发光波长下基本上光学透明的第一层 (a)，所述第一层 (a) 位于至少在入射激发光波长下基本上光学透明的第二层 (b) 之上，所述第二层 (b) 的折射率低于层 (a)，

- 通过形成在所述层 (a) 中的光栅结构 (c) 将光源的激发光耦合到层 (a) 中，

- 所述激发光作为导波被传导到测量区域上，所述测量区域直接位于所述层 (a) 之上或者通过促粘附层介导位于所述层 (a) 之上，以及

- 以空间分辨的方式测量化合物的发光，其中所述化合物能够发光并在所述层 (a) 中传导的光的消逝场内被激发发光。

40. 一种用于定量测定一种或多种生物来源和复杂组成样品中的一种或多种分析物的微阵列，该微阵列包括：

- 固体载体，

- 第一多个不连续测量区域，其中在各种情况下将少量的生物来源和复杂组成的样品以稀释或未稀释的形式直接固定或通过促粘附层介导固定，

其特征在于，

在固体载体上的所述阵列中具有至少第二多个测量区域，该测量区域中以不同的浓度固定有与待测分析物相同种类的物质，该物质适合于针对被定量检测并存在于固定的复杂组成样品中的所述分析物生成校正曲线，所述校正曲线的形成是通过使所述微阵列与第一溶液相接触，该第一溶液包括一种或多种结合试剂以及如果需要的话任选的一种或多种检测试剂，该结合试剂作为存在于所施加的生物来源和复杂组成样品的第一多个不连续测量区域中的待测分析物的特异性结合配对物，并作为与存在于所述第二多个不连续测量区域中的所述待测分析物相同种类的特异性结合配对物；所述结合试剂和检测试剂可以同时或者顺序施加，之后以空间分辨的方式测量从与所述第一溶液接触后的一个或多个阵列的不连续

测量区域发出的第一光学信号，并记录所述第一光学信号。

41. 权利要求40所述的微阵列，其特征在于，在所述固体载体上的所述阵列中具有第三多个测量区域，其中在各种情况下将少量的生物来源和复杂组成的样品以稀释或未稀释的形式固定，此外，还固定有添加于其中的与待测分析物相同种类的已知量的物质。

42. 权利要求40或41所述的微阵列，其特征在于，所述固体载体上的所述阵列中具有第四多个测量区域，其中固定有与施加到第一多个测量区域的样品基质中存在的物质相同种类的物质。

43. 权利要求40-42中任一项所述的微阵列，其特征在于，所述第二多个测量区域的测量区域包括与施加到第一多个测量区域的样品基质中存在的物质种类相似的物质。

44. 权利要求42或43所述的微阵列，其特征在于，与施加到第一多个测量区域的样品基质中存在的物质种类相似的物质可以从以下组的物质中获得：白蛋白，特别是牛血清蛋白，免疫球蛋白，或稀释血清。

45. 权利要求40-44中任一项所述的微阵列，其特征在于，所述固体载体上的所述阵列中具有用于参比目的的第五多个测量区域。

46. 权利要求45所述的微阵列，其特征在于，所述第五多个测量区域的测量区域中包含选自以下组的物质：质量标记和发光标记。

47. 一种用于定量测定生物来源和复杂组成样品中一种或多种分析物的方法，包括以下步骤：

- 提供一种或多种生物来源和复杂组成的样品，
- 提供多种不同浓度的物质溶液，所述物质与复杂组成样品中的待测分析物种类相同，
- 提供至少一个固体载体，
- 通过将少量生物来源和复杂组成的样品以稀释或未稀释的形式施加到不连续的位点从而形成第一多个不连续测量区域作为微阵列的一部分，所述不连续的位点直接位于所述固体载体上或者在先施加促粘附层之后，位于所述固体载体上的所述促粘附层上，
- 在各种情况下通过施加少量的多种不同浓度物质溶液从而形成第二多个不连续测量区域作为所述微阵列的一部分，其中所述物质与复杂组成样品中的待测分析物种类相同，
- 使所述微阵列与以下物质接触：第一溶液，该第一溶液包括一种或多种结

合试剂和如果需要的话任选的一种或多种检测试剂，该结合试剂作为存在于所施加的生物来源和复杂组成样品中的第一多个不连续测量区域中的待测分析物的特异性结合配对物，和作为存在于第二多个不连续测量区域中的与所述待测分析物相同种类的特异性结合配对物，其中所述结合试剂和检测试剂可以同时或顺序施加，

- 以空间分辨的方式测量从微阵列的所述第一和第二多个不连续测量区域发出的第一光学信号，记录来自所述第一多个不连续测量区域的所述第一光学信号作为其接触第一溶液的特征信号，记录来自第二多个不连续测量区域的所述第一光学信号作为其接触第二溶液的特征信号，该信号作为与存在于复杂组成样品中的分析物种类相同的物质浓度的函数，所述物质存在于所述测量区域中，

- 由来自第二多个不连续测量区域的所记录的光学信号生成复杂组成样品中待测分析物的校正曲线，如果需要的话在先去掉背景信号和进行适当的参比之后生成。

通过比较所记录的来自第一多个不连续测量区域的第一光学信号与各种分析物的校正曲线，如果需要的话在先减去背景信号和进行适当的参比之后，定量测定存在于复杂组成样品中的待测分析物。

58. 权利要求 1-39 中任一项所述的方法和/或权利要求 40-46 中任一项所述的微阵列和/或权利要求 47 所述的方法的用途，用于在药物库筛选过程中定量和/或定性分析测定化学、生化或生物分析物，以便在药物研究、组合化学、临床和临床前开发中确定效力，用于识别、证实和监测生物或化学标记物质（“生物标记物”），用于在蛋白质组学研究和系统生物技术中识别和证实信号转导通道，用于亲和性筛选，特别是用于抗体筛选，用于实时结合研究和确定亲和性筛选和研究中的动力学参数，用于定量和定性分析物测定，特别是 DNA 和 RNA 分析和在基因组或蛋白质组中测定基因组或蛋白质组差异，例如单核苷酸多态性，用于测量蛋白质-DNA 相互作用，用于确定 mRNA 表达和蛋白质（生物）合成控制机制，用于产生毒性研究和用于确定表达图谱，特别是用于形成在有或无外部刺激时患病和健康细胞群体的细胞表达图谱并进行比较，用于研究这种表达图谱随着时间段分、小时、天、周、月或年的随时间流逝的发展变化，用于确定生物和化学标记物质，如 mRNA、蛋白质、肽或低分子量有机（信使）物质，还用于在药物产品研发、人类和动物诊断、农用化学产品研发、症状和症状前植物诊断中检测抗体、抗原、

病原体或细菌，用以药物产品开发中的患者分类和治疗药物选择，用以检测病原体、有害物质和病原微生物，特别是沙门氏菌、朊病毒、病毒和细菌，特别是在食品分析和环境分析中。

用于测定具有生物来源和复杂组成的样品中 一种或多种分析物的方法及其用途

本发明涉及用于检测一个或多个生物来源和复杂组成的样品中一种或多种分析物的方法。

发明背景

许多应用领域都需要通过外部作用，例如通过提供生物活性化合物的方式来确定复杂样品中的多种生物相关分析物，例如在用于确定个体健康状况或治疗效果的诊断过程中，或者在用于确定生物系统影响，如有机体及其复杂的作用模式的药物研究开发过程中。

尽管已知的分析分离方法通常进行了优化以根据预定义的理化参数，例如分子量或分子的荷质比来在尽可能短的时间内分离存在于给定样品中的尽可能大量化合物，但生物亲和性检测方法是基于在各种情况下利用一种尽可能高特异性的生物或生化或合成的识别部件，以便以高度选择性的方式来识别和结合复杂组成样品中相应的（单个）分析物。因而检测大量不同化合物需要采用相应数量的不同特异性识别部件。

基于生物亲和性反应的任何检测方法既可以在均匀溶液中进行也可以在固体载体的表面进行。根据所述方法的特殊设计，其需要在分析物与相应的识别部件结合之后并且任选地在进一步与检测物质结合后，并同样任选地，在各方法步骤之间的各种情况下进行洗涤步骤，以分离产生的所述识别部件与待测分析物的复合物，同样任选地从剩余样品中分离其它检测物质以及任选采用的附加试剂。

现在较为广泛使用的是，利用固定于固体载体上的不连续的、空间分隔的测量区域中作为识别部件的相应互补核酸来同时检测样品中大量不同核酸的方法。例如，已经公开了基于简单玻璃载玻片或显微镜载玻片的并具有非常高特征密度（共同固体载体上的测量区域的密度）的作为识别部件的寡核苷酸阵列。例如，美国专利 No. 5445934 (Affymax Technologies) 描述并要求保护一种密度大于每平方厘米 1000 个特征的寡核苷酸阵列。

近年来，更常见的记载是用于同时测定大量蛋白质的阵列以及利用其实施的类似种类的检测方法，例如美国专利 No.6365418 B1，特别是利用固定抗体作为待测分析物的识别部件的阵列。

涉及检测核酸和其它生物高分子如蛋白质的这种“微阵列”的专利文件中记载

了在各种情况下，将多种不同的特异性识别部件固定在不连续的测量区域中以形成用于分析物识别的阵列，然后将含有分析物（任选地在复杂的混合物中）的待研究样品与该“捕获阵列”相接触。根据所公开的说明书，这里不同的特异性识别部件在各种情况下都以最高可能性的纯度存在于不同的不连续测量区域中，这样通常样品中的不同分析物就结合到具有不同识别部件的测量区域。

已知的阵列类型需要通过有时非常复杂的加工步骤来以尽可能高纯的形式纯化和浓缩所述待固定的特异性识别部件。由于不同的识别部件多多少少在理化性质上有所不同（例如其极性），故用于在共同的固定载体上的不连续测量区域中，任选地在施加于其中的促粘附层上，用于优化固定所述识别部件的条件也有相应的不同，例如通过吸附或共价结合的方式。因此，选择固定多种不同识别部件的固定条件（例如，促粘附层的种类）很难同时针对所有的识别部件优化，而仅在不同的识别部件的固定特性之间进行折中。另一个缺点是在各种情况下每个阵列仅有一个施加的样品可以用于在这种捕获阵列中存在的分析物的研究。

因而需要一种改良的阵列设计，其能够针对存在于所述样品中的分析物进行大量样品的分析，可以在一个阵列上或者在共同载体上的多个阵列上同时进行，或者在多个载体上的多个阵列上顺序进行。为此，可以很方便地将被研究的样品本身而不是不同的特异性识别部件施加到一个或多个载体上的一个或多个阵列的不连续测量区域中，这是以直接的方式，即未处理的形式，或者在尽可能少的一些制备步骤之后进行的。这种阵列设计在下文中将称为“反式测试架构”。

为了满足这种需要，例如，最近 Paweletz 等人在 *Oncogene* 2001, Vol. 20, 1981-1989 中基于反式测试架构提出了这种用于蛋白质检测的阵列，命名为“反相蛋白质微阵列”。

这种分析物检测方法，利用微阵列以及甚至更通用的在表面上进行的检测方法，其基于结合试剂作为待测分析物的特异性结合配对物的特异性结合，的一个常见的问题是非特异性结合事件的发生，其并非基于分析物和用于检测分析物的结合试剂之间、以及任选的进一步的检测试剂之间的特异性相互作用。

美国专利 No.5726064 记载了修正背景信号对测试信号干扰的多种方法，例如背景荧光，其尤其可能由非特异性的结合事件产生，以及温度或 pH 值的变化，其可能削弱观察到的测试信号。这些方法基本上是根据在共同的固体载体上，除了指定为产生测试信号的区域之外提供为此修正目的而指定的附加区域。

美国专利申请 2004/0043508 A1 记载了与不同表面的特异性和非特异性结合的程度，所述表面用于制备“捕获阵列”，该捕获阵列用不同的材料进行了处理以

最小化非特异性的结合。在该文中，据说具有静电作用的涂层有利于减少非特异性的结合。

美国专利 No.5677196 也记载了用于最小化非特异性结合的不同表面涂层，特别是包括聚乙烯醇的那些，以及对非特异性结合的绝对和相对比例测量，但同样是以对应于捕获阵列的（传感器）形式。

所述用于最小化测试结果的非特异性结合效应的方法具有共同的特征，即它们基于改变所述载体表面的性质以避免或者最小化在固定有分析物特异性识别部件的测试区域之外结合分析物或该测试中使用的其它结合和检测试剂。同时，其默认所述测量区域中本身不会发生非特异性结合，因为这些效应在所描述的方法中不能加以考虑。此外在捕获阵列的情况下，利用施加到测量区域中的化合物精确限定的组成，即通常称为测量区域内识别部件的一致形式，通过认真选择所述识别部件以及测试中使用的结合和检测试剂可以基本上满足上述需要。

在用于具有反式测试架构的测试阵列的情况下，即利用固定在测量区域中的生物来源和复杂组成的样品，要满足上述前提是困难而不可靠的，因为所施加的样品具有生物样品基质的多种不同化合物的未知组成。因而预计结合试剂和任选使用的检测试剂的非特异性结合会在明显程度上发生，甚至在测量区域内也如此。

本发明的一个目的是为这种测试提供测量区域的阵列，其中固定有含有待测分析物的生物来源和复杂组成的样品，一种能够确定测量区域中发出的、由加入的结合试剂以及任选加入的检测试剂的非特异性相互作用产生的光学信号的比例的方法。

而且，本发明实现了甚至更通用问题，即测定生物来源和复杂组成的固定样品中一种或多种分析物的绝对含量，并校正由于结合到待测分析物上的结合试剂所产生的信号。通过添加适当数量的含有适当浓度的相应分析物的校正溶液，以对存在于所提供样品中的、结合于其固定在“捕获阵列”中的识别部件上的分析物所产生的信号生成校正曲线是公知的。不利的是，该方法需要添加多种溶液到相应的多个彼此同种类型的测量区域阵列中。国际申请 WO 01/092870 和 WO 02/40998 中提出，在各种情况下在一个或多个阵列中，提供多个测量区域，其中以不同的可控密度固定有生物或生化或合成的识别部件，以检测对所述测量区域很常见的分析物。特别优选的是，利用已知的分析物与其生物或生化或合成的识别部件之间的结合信号的浓度依赖性，以及以不同的可控密度固定在一个阵列的多个测量区域中的所述识别部件的足够大“变化”，已经可以通过向所述阵列中添加单个校正溶液来生成所述分析物的校正曲线。然而，用于“捕获阵列”的这些

不同的校正方法总是用于校正由于存在于溶液中的未知浓度分析物与阵列的固定识别部件相结合而产生的信号。相比之下，对于含固定在不连续测量区域中的生物来源和复杂组成的样品阵列而言，目的在于对以未知浓度存在于固定基质中的分析物的校正。根据本发明的测量区域的阵列以及本发明基于此的定量检测方法解决了该任务。通过与本发明的用于区分特异性和非特异性结合所产生信号比例的上述方法相结合，使得能够以可靠的方式确定待测分析物的绝对含量和浓度。

令人惊讶的是，本发明还可以对本文所使用的阵列种类高精度地得到存在于复杂组成的固定样品中的分析物的相对和/或绝对含量或者相对和/或绝对浓度。

附图简要说明

图 1: 用于本发明方法的具有 6 个测量区域阵列的载体。在该阵列的左右表示了用于耦合光进出的光栅结构。放大的细节图描绘了单个阵列中测量区域的几何设置。——测量区域内容的附图标记含义参见表 1。

图 2: 来自测量区域的参比荧光强度 (RFI)，其中所述测量区域具有施加于其中的纯化 Akt，并且固定溶液中另外存在有 0.1 mg/ml BSA 或 0.1 mg/ml 的鼠血清，作为固定溶液的 Akt 浓度的函数。实心标记: 结合试剂溶液中无竞争剂所生成的校正曲线 (“抗 Akt”抗体, 5 nM)。空心标记: 结合试剂溶液中具有 100 nM 的 Akt 作为竞争剂所生成的测量曲线。

图 3: 来自测量区域的参比荧光强度 (RFI)，其中所述测量区域具有施加于其中的纯化 Akt，并且固定溶液中另外存在有 0.1 mg/ml BSA 或 0.1 mg/ml 的鼠血清，作为固定溶液的 Akt 浓度的函数。实心标记: 结合试剂溶液中无竞争剂所生成的校正曲线 (“抗 Akt”抗体, 5 nM)。空心标记: 结合试剂溶液中具有 0.1 mg/ml 的鼠血清作为非特异性结合竞争剂所生成的测量曲线。

图 4: 用于检测由鼠心脏组织中制备的样品中的内源性 Akt 的参比荧光强度，具有 (上曲线) 或不具有 (中曲线) 另外添加的纯化 Akt (1000 ng/ml)，作为固定溶液的总蛋白质浓度的函数 (上横坐标)。还绘制了图 2 的用于检测 Akt 的校正曲线，由另外含有 0.1 mg/ml BSA 的测量区域生成 (作为 Akt 浓度的函数，下横坐标)。

图 5: 用于检测由鼠心脏组织中制备的样品中的内源性 Akt 的参比荧光强度，具有 (上曲线) 或不具有 (中曲线) 另外添加的纯化 Akt (1000 ng/ml)，作为固定溶液的总蛋白质浓度 (上横坐标) 的函数。实心标记: 从结合试剂溶液中无竞争剂的测量过程获得的测量值 (“抗 Akt”抗体, 5 nM); 空心标记: 从结合试剂溶液中具有 100 nM 的纯化 Akt 作为竞争剂的测量过程获得的测量值 (“抗 Akt”抗体,

5 nM)。还绘制了图 2 的用于检测 Akt 的校正曲线, 由另外含有 0.1 mg/ml BSA 的测量区域生成 (实心标记; 作为 Akt 浓度的函数, 下横坐标) 以及相应的校正曲线, 由结合试剂溶液中含有 100 nM Akt 作为竞争剂所生成 (空心标记; 作为 Akt 浓度的函数, 下横坐标)。

图 6: 通过比较溶液中存在和不存在竞争剂时的数据, 确定在 0.1 mg/ml 的蛋白质浓度下图 5 中由特异性结合形成的信号比例 (图 6a), 以及通过比较由特异性结合 (“SB”) 形成的信号比例与校正曲线, 确定内源性 Akt 的含量 (图 6b)。

图 7: 用于检测由鼠心脏组织中制备的样品中的内源性 Akt 的参比荧光强度, 具有 (上曲线) 或不具有 (中曲线) 另外添加的纯化 Akt (1000 ng/ml), 作为固定溶液的总蛋白质浓度 (上横坐标) 的函数。实心标记: 从结合试剂溶液中无竞争剂的测量过程获得的测量值 (“抗 Akt” 抗体, 5 nM); 空心标记: 从结合试剂溶液中具有 0.1 mg/ml 的鼠血清作为非特异性结合的竞争剂的测量过程获得的测量值 (“抗 Akt” 抗体, 5 nM)。还绘制了图 2 用于检测 Akt 的校正曲线, 由另外含有 0.1 mg/ml BSA 的测量区域生成 (实心标记; 作为 Akt 浓度的函数, 下横坐标) 以及相应的校正曲线, 由结合试剂溶液中含有 0.1 mg/ml 的鼠血清作为非特异性结合的竞争剂所生成 (空心标记; 作为 Akt 浓度的函数, 下横坐标)。

图 8: 来自测量区域的参比荧光强度 (RFI), 其中所述测量区域具有施加于其中的纯化 Akt, 并且固定溶液中另外存在有 0.1 mg/ml BSA 或 0.1 mg/ml 的鼠血清, 作为固定溶液的 P-Akt (Ser473) 浓度的函数。实心标记: 结合试剂溶液中无竞争剂所生成的校正曲线 (“抗 P-Akt (Ser473)” 抗体, 5 nM)。空心标记: 结合试剂溶液中具有 100 nM Akt 作为竞争剂所生成的测量曲线。

图 9: 来自测量区域的参比荧光强度 (RFI), 其中所述测量区域具有施加于其中的纯化 Akt, 并且固定溶液中另外存在有 0.1 mg/ml BSA 或 0.1 mg/ml 的鼠血清, 作为固定溶液的 P-Akt (Ser473) 浓度的函数。实心标记: 结合试剂溶液中无竞争剂所生成的校正曲线 (“抗 P-Akt (Ser473)” 抗体, 5 nM)。空心标记: 结合试剂溶液中具有 0.1 mg/ml 的鼠血清作为非特异性结合竞争剂所生成的测量曲线。

图 10: 用于检测由鼠心脏组织中制备的样品中的内源性 P-Akt (Ser473) 的参比荧光强度, 具有 (上曲线) 或不具有 (中曲线) 另外添加的纯化 Akt (1000 ng/ml), 作为固定溶液的总蛋白质浓度 (上横坐标) 的函数。还绘制了图 7 用于检测 P-Akt (Ser473) 的校正曲线, 由另外含有 0.1 mg/ml BSA 的测量区域生成 (作为 P-Akt (Ser473) 浓度的函数, 下横坐标)。

图 11: 用于检测由鼠心脏组织中制备的样品中的内源性 P-Akt (Ser473) 的参

比荧光强度,具有(上曲线)或不具有(中曲线)另外添加的纯化 Akt (1000 ng/ml),作为固定溶液的总蛋白质浓度(上横坐标)的函数。实心标记:从结合试剂溶液中无竞争剂的测量过程获得的测量值(“抗 P-Akt (Ser473)”抗体,5 nM);空心标记:从结合试剂溶液中含有 100 nM 的纯化 Akt 作为竞争剂的测量过程获得的测量值(“抗 P-Akt (Ser473)”抗体,5 nM)。还绘制了图 7 的用于检测 P-Akt (Ser473)的校正曲线,由另外含有 0.1 mg/ml BSA 的测量区域生成(实心标记;作为 P-Akt (Ser473)浓度的函数,下横坐标)以及相应的校正曲线,由结合试剂溶液中含有 100 nM Akt 作为竞争剂所生成(空心标记;作为 Akt 浓度的函数,下横坐标)。

图 12:通过比较溶液中存在和不存在竞争剂时的测量值,确定在 0.1 mg/ml 的蛋白质浓度下图 11 中由特异性结合形成的信号比例(图 12a),以及通过比较由特异性结合(“SB”)形成的信号比例与校正曲线,确定内源性 Akt 的含量(图 12b)。

图 13:用于检测由鼠心脏组织中制备的样品中的内源性 P-Akt (Ser473)的参比荧光强度,具有(上曲线)或不具有(中曲线)另外添加的纯化 Akt (1000 ng/ml),作为固定溶液的总蛋白质浓度(上横坐标)的函数。实心标记:从结合试剂溶液中无竞争剂的测量过程获得的测量值(“抗 P-Akt (Ser473)”抗体,5 nM);空心标记:从结合试剂溶液中含有 0.1 mg/ml 的鼠血清作为非特异性结合的竞争剂的测量过程获得的测量值(“抗 P-Akt (Ser473)”抗体,5 nM)。还绘制了图 8 用于检测 P-Akt (Ser473)的校正曲线,由另外含有 0.1 mg/ml BSA 的测量区域生成(实心标记;作为 P-Akt (Ser473)浓度的函数,下横坐标)以及相应的校正曲线,由结合试剂溶液中含有 0.1 mg/ml 的鼠血清作为非特异性结合的竞争剂所生成(空心标记;作为 P-Akt (Ser473)浓度的函数,下横坐标)。

图 14:来自测量区域的参比荧光强度(RFI),其中所述测量区域具有施加于其中的纯化 Akt,并且固定溶液中另外存在有 0.1 mg/ml BSA 或 0.1 mg/ml 的鼠血清,作为固定溶液的 P-Akt (Thr308)浓度的函数。实心标记:结合试剂溶液中无竞争剂所生成的校正曲线(“抗 P-Akt (Thr308)”抗体,5 nM)。空心标记:结合试剂溶液中含有 100 nM Akt 作为竞争剂所生成的测量曲线。

图 15:来自测量区域的参比荧光强度(RFI),其中所述测量区域具有施加于其中的纯化 Akt,并且固定溶液中另外存在有 0.1 mg/ml BSA 或 0.1 mg/ml 的鼠血清,作为固定溶液的 P-Akt (Thr308)浓度的函数。实心标记:结合试剂溶液中无竞争剂所生成的校正曲线(“抗 P-Akt (Thr308)”抗体,5 nM)。空心标记:结合试剂溶液中含有 0.1 mg/ml 鼠血清作为非特异性结合的竞争剂所生成的测量曲线。

图 16:用于检测由鼠心脏组织中制备的样品中的内源性 P-Akt (Thr308)的参

比荧光强度,具有(上曲线)或不具有(中曲线)另外添加的纯化Akt(1000 ng/ml),作为固定溶液的总蛋白质浓度(上横坐标)的函数。还绘制了图12用于检测P-Akt(Thr308)的校正曲线,由另外含有0.1 mg/ml BSA的测量区域生成(作为假定的P-Akt(Thr308)浓度的函数,下横坐标)。

图17:用于检测由鼠心脏组织中制备的样品中的内源性P-Akt(Thr308)的参比荧光强度,具有(上曲线)或不具有(中曲线)另外添加的纯化Akt(1000 ng/ml),作为固定溶液的总蛋白质浓度(上横坐标)的函数。实心标记:从结合试剂溶液中无竞争剂的测量过程获得的测量值(“抗P-Akt(Thr308)”抗体,5 nM);空心标记:从结合试剂溶液中含有100 nM的纯化Akt作为竞争剂的测量过程获得的测量值(“抗P-Akt(Thr308)”抗体,5 nM)。还绘制了图14用于检测P-Akt(Thr308)的校正曲线,由另外含有0.1 mg/ml BSA的测量区域生成(实心标记;作为P-Akt(Thr308)浓度的函数,下横坐标)以及相应的校正曲线,由结合试剂溶液中含有100 nM Akt作为竞争剂所生成(空心标记;作为假定的P-Akt(Thr308)浓度的函数,下横坐标)。

图18:通过比较溶液中存在和不存在竞争剂时的测量值,确定在0.1 mg/ml的蛋白质浓度下图17中由特异性结合形成的信号比例。

图19:用于检测由鼠心脏组织中制备的样品中的内源性P-Akt(Thr308)的参比荧光强度,具有(上曲线)或不具有(中曲线)另外添加的纯化Akt(1000 ng/ml),作为固定溶液的总蛋白质浓度(上横坐标)的函数。实心标记:从结合试剂溶液中无竞争剂的测量过程获得的测量值(“抗P-Akt(Thr308)”抗体,5 nM);空心标记:从结合试剂溶液中含有0.1 mg/ml的鼠血清作为非特异性结合的竞争剂的测量过程获得的测量值(“抗P-Akt(Thr308)”抗体,5 nM)。还绘制了图12用于检测P-Akt(Thr308)的校正曲线,由另外含有0.1 mg/ml BSA的测量区域生成(实心标记;作为假定的P-Akt(Thr308)浓度的函数,下横坐标)以及相应的校正曲线,由结合试剂溶液中含有0.1 mg/ml的鼠血清作为非特异性结合的竞争剂所生成(空心标记;作为假定的P-Akt(Thr308)浓度的函数,下横坐标)。

发明详细说明

根据本发明,固体载体上空间分隔或不连续的测量区域应当由封闭的区域所限定,其被施加于上面的生物来源和复杂组成的样品或者施加的参比试剂(例如,荧光标记的白蛋白)或校正试剂或者施加的其混和物所占据。所述区域可具有任何几何形状,例如可以是圆形、矩形、三角形、椭圆形等等。

本发明的第一主题是用于检测一种或多种生物来源和复杂组成的样品中的一种或多种分析物的方法，包括以下步骤：

(1) 提供一种或多种生物来源和复杂组成的样品，

(2) 提供至少一个固体载体，

(3) 将少量所述生物来源和复杂组成的样品以稀释或未稀释的形式直接施加到所述固体载体上的不连续的位点上，或者在预先施加促粘附层之后施加到固体载体上的所述促粘附层上，从而在所述至少一个固体载体上形成一个或多个不连续测量区域的阵列，

(4) 使至少一个不连续测量区域的阵列与第一溶液相接触，所述第一溶液含有一种或多种作为待测分析物特异性结合配对物的结合试剂和如果需要的话任选地含有一种或多种检测试剂，所述分析物存在于所述不连续测量区域中施加的生物来源和复杂组成的样品中，并且，所述结合试剂和检测试剂可以同时或者顺序施加，

(5) 以空间分辨的方式测量从已在步骤(4)中与第一溶液接触后的一个或多个阵列的不连续测量区域发出的第一光学信号，

(6) 记录所述第一光学信号，

其特征在于，通过进一步进行以下步骤测定所测得的第一光学信号的比例，所述第一光学信号是由于与加入的结合试剂和任选加入的检测试剂发生非特异性相互作用而产生的：

(7a) 在步骤(4)中加入的第一溶液的一种或多种结合试剂和任选的一种或多种检测试剂之外施加第二溶液，其含有已知高浓度的化合物，其与待测的并存在于生物来源和复杂组成的样品中的分析物种类相同，该样品已施加到不连续的测量区域中，作为所述待测的并存在于生物来源和复杂组成样品中分析物的竞争剂，该样品已施加到不连续的测量区域中，以使所述结合试剂和任选另外添加的检测试剂特异性结合到步骤(3)中生成的一个或多个不连续测量区域的阵列上，和/或

(7b) 施加第三溶液，所述第三溶液除了在步骤(4)中加入的第一溶液的一种或多种结合试剂和任选的一种或多种检测试剂之外，还含有已知高浓度的物质，该物质与步骤(3)中施加样品的样品基质中存在的物质种类类似，以便与样品基质中的所述物质竞争，所述物质存在于已施加到不连续的测量区域中的生物来源和复杂组成样品中，以使所述结合试剂和任选另外添加的检测试剂非特异性结合到步骤(3)中生成的一个或多个不连续测量区域的阵列上，

(8) 以空间分辨的方式测量从已在步骤(7a)中与第二溶液和/或在步骤(7b)中与第三溶液接触后的一个或多个阵列的不连续测量区域发出的第二和/或第三光学信号,

(9) 记录所述第二和/或第三光学信号, 以及

(10) 比较所述第一和第二和/或第三光学信号。

在步骤(7a)和(7b)中, 所述结合试剂和加入用于竞争的物质还有任选的检测试剂在各种情况下可以以这三组分的单独溶液的形式添加。然而, 在另外添加检测试剂的情况下, 优选首先施加结合试剂和用于竞争的物质混合物第二或第三溶液, 随后任选地进行一个或多个洗涤步骤和添加所述检测试剂的后续分离的子步骤。

术语“所述固体载体的”或“固体载体的”在下文中意在还包括“所述至少一个固体载体的”或“至少一个固体载体的”的含义。

术语“第一溶液”、“第二溶液”、“第三溶液”意在还分别包括“多个第一溶液”、“多个第二溶液”和“多个第三溶液”的含义, 其中所述溶液以这种多种溶液形式时在各种情况下可以具有相同或不同的组成。

除非另有说明, 下文中使用的术语“样品”也与“生物来源和复杂组成的样品”有相同含义。除非另有说明, 单数形式的术语“样品”也包括术语“多个样品”。

所述生物来源和复杂组成的样品可以选自由以下样品构成的组: 细胞群体裂解物、细胞提取物、体液及体液组分例如, 血液、血清、血浆、滑液、泪液、尿、唾液、组织液和淋巴, 所述样品是分馏或未分馏的样品。

所述样品可以从健康和/或患病和/或受到刺激和/或未经处理的细胞中获得, 所述细胞来自包括人、动物、细菌和植物细胞的组。更具体来说, 所述生物来源和复杂组成的样品可以从动物或人的组织如器官、皮肤、毛发、肌肉、脂肪或骨组织中获得。

不同的样品可以从相同的生物体或相同的细胞培养物中获得。然后, 例如可以通过分析含有来自相同(或同种类型)生物体或相同细胞培养物(或同种类型的细胞培养物)的多个测量区域来获得在所述测量区域中测定的、所施加的样品的相对分子组成再现性的数据信息。

不同的样品特别是可以从相同生物体的不同部位获得。然后, 可以由相应不连续测量区域上的分析物获得例如, 有关在获得所述样品的所述生物体中待测分析物相对分子组成非同源性的信息。该步骤例如对于检查患癌症的生物体来说非常重要。

然而，不同的样品还可以从不同的生物体或不同的细胞培养物中获得。其可以是例如，来自未经处理的生物体或者经药物活性成分处理后的生物体的样品。然后，可以以类似于核酸分析中表达分析的方式来研究特定活性成分对样品相对分子组成的影响，即特别是通过其来自的细胞群体所表达的多种化合物的组合物。

如果细胞是所述样品的起始材料，那么所述细胞通常在第一个制备步骤中进行裂解。裂解物可以溶解于适当的溶剂中，例如缓冲液，并包括已知的添加混合物，例如稳定剂如蛋白酶抑制剂，以防止存在的生物高分子降解。根据本发明方法的优选实施方案，所述裂解物以这样的方式制备和处理：使从中获得的样品（即生物来源和复杂组成的样品）包括细胞系、细胞培养物或细胞组织的整个蛋白质组。

本发明方法的一个重要应用领域是研究包含细胞裂解物的、或由用于不同条件下分析物细胞表达（即特别是蛋白质表达）的细胞裂解物所制备的样品。根据特殊的研究目的，可以以不同的方式选择要施加到测量区域中的样品。

一种可能的变形方式是基于采用来自彼此独立的细胞群体（即细胞系或细胞培养混合物）的裂解物。在本文中，经彼此独立生长或者彼此独立培养的那些细胞群体（例如“体外细胞培养物”）应当称为“彼此独立的”。因此，该术语应当包括例如，源自各种人、动物、植物或微生物整体和来自各种器官的细胞群体，还有从有机体或器官内的不同部位获得的细胞群体，例如来自同一个器官的癌症和健康组织。该术语还应当包括从相同有机体或器官的在不同时间点获得的细胞群体，和/或在取出后经受不同处理、刺激或其它不同影响的体外培养方法的细胞群体。然后可以利用本发明方法并利用从这种彼此独立的细胞群体中获得的样品，来产生例如差异表达图，以便检测细胞表达和/或细胞信号转导级联活化中的差异，例如在不同有机体之间，在相同种类的健康和患病有机体之间，在各种器官之间等等。这里特别引人关注的是对所述细胞群体的处理或刺激对细胞表达的影响。在本文中，术语“处理”或“刺激”意思是向目的细胞群体添加化学或生化化合物（试剂或“药物”），以及不同外部物理条件的影响，例如以紫外到红外光谱中的光辐射形式，热影响，电磁场影响等等。

本发明的方法还适用于研究不太能精确定义的内部或外部影响因子，如压力、疾病、年龄、营养种类等对细胞表达和/或活化的影响（见下文）。

由于本发明的方法可以获得高精度的测量结果，其尤其也适用于研究在上述条件下，在一段时期内，如数分钟、数小时、数天、数周、数月或数年，细胞表达和/或活性（见下文）随时间流逝而发展。

另一种可能的变形方式是基于采用由各种细胞亚群产生的不同细胞裂解物，该

细胞亚群又是从普通细胞群体中获得的。可以通过例如，在不同时间点从普通细胞群体去除来产生各种细胞亚群。各种细胞群体也可以通过从普通细胞群体中去除以及后续的通过不同试剂处理或刺激和/或在不同外部条件下培养（例如，用于研究UV光辐射、热激等的影响）来产生。

用于应用本发明方法的上述和其它可能的变形方式的处理细胞群体所用的典型试剂包括药物活性化合物、细胞因子、针对细胞刺激的抗原、引起细胞死亡的刺激物、激素等等。

优选在各种情况下将从细胞群体（其表达将利用本发明的方法进行比较）获得的复杂组成的样品施加到共同的测量区域阵列中，以便能够随后在尽可能一致的条件下针对待测分析物研究所述样品。

样品可包括已知浓度的与待测分析物相同种类的化合物添加剂（如标准物），其在色谱分析中的“峰值”与样品的可相比较。这种添加剂可以用于例如校正的目的。而且，所述样品可包括与样品基质类似但不同于待测分析物的化合物添加剂，例如白蛋白（如牛血清白蛋白（BSA））、免疫球蛋白或稀释的血清，其中化合物可用于例如以可控的方式调节测量区域内固定分析物分子的表面密度。存在于样品或其部分中的或者所述样品或其部分的稀释液中的分析物，即特别是生物高分子例如核酸或蛋白质，可以以天然形式或变性形式存在，例如经过尿素或表面活性剂（如SDS）处理后。如果需要的话，可以通过适当的措施，例如在裂解物作为中间材料的情况下通过离心的方式，在提供生物来源和复杂组成的样品之前的多个制备步骤中去除原始材料或中间材料中特别是不溶的成分。优选地，用于制备“生物来源和复杂组成样品”的起始材料不经进一步预处理步骤，除了过滤和/或分馏和/或稀释之外。

存在于样品或其部分或者所述样品或其部分的稀释液中的分析物，即特别是生物高分子例如核酸或蛋白质，优选以变性形式存在，例如经过尿素处理，所述分析物的抗原决定簇能尽可能自由地结合其特定的检测物质，例如抗体。这可以通过例如，用尿素处理后破坏三级或四级结构来实现。而且，变性样品具有这样的优点，即由它形成的阵列非常稳定，并且可以在较长的时间内（长达数年）对延迟分析的分析物进行储存并存档。

分馏的样品可以利用分离方法获得，例如选自包括以下分离方法构成的组：沉淀、过滤、离心、通过正相色谱法、反相色谱、离子交换色谱和疏水作用色谱（HIC）的HPLC和微HPLC（“高压液相色谱”）、排阻色谱、凝胶色谱、电泳、毛细管电泳、电色谱以及自由流动电泳。

更具体来说，所述生物来源和复杂组成的样品可包括去血清（abgereichertes Serum）。“去血清”是指从通过例如亲和层析法高度去除掉诸如白蛋白、免疫球蛋白和载脂蛋白等成分的血清中获得的那些样品。

生物来源和复杂组成的待分析样品中的物质可以通过例如以下去除方法获得：组织切片、活组织检查和激光捕获显微分离。

本发明的方法甚至能够高精度地分析仅仅小体积和少量的样品。样品的量这里是指施加到不连续测量区域中的总量。例如，要施加到测量区域中的样品物质可相当于100个细胞以下的物质。其甚至相当于10个细胞以下的物质。此外还可以使施加到测量区域中的、生物来源和复杂组成的待分析样品物质的体积小于100 nl，优选小于1 nl。

施加到不连续测量区域中的生物来源和复杂组成样品中的被测分析物可以是来自以下组的化合物：蛋白质及其翻译后修饰蛋白形式，如磷酸化、糖基化、甲基化和乙酰化形式的蛋白，特别是涉及并参与细胞信号转导途径的蛋白，例如激酶、激酶底物、受体以及针对肽、激素、辅助因子、膜受体、通道受体、T细胞受体和酶的结合蛋白，还有来自不同细胞区室的蛋白质及其翻译后修饰蛋白形式，例如胞浆蛋白、核内蛋白、膜蛋白、线粒体蛋白以及胞外蛋白，如分泌到体液中的蛋白、特别还有在细胞处理或刺激影响下过表达或表达不足的蛋白，还有人工修饰或表达的蛋白，如具有附加结合位点的功能化蛋白（标签蛋白，如组胺酸标签蛋白）、单或多克隆抗体以及抗体片段、肽、来自完整蛋白质的肽片段、糖肽、外源凝集素、荧光蛋白（如绿色荧光蛋白质、GFP等等）、亲和素、链亲和素、生物素、生物素化蛋白以及不同缀合的蛋白、寡糖以及核酸（例如DNA、RNA）。

本发明范围内的“分析物”是指这样一种分子物质，其区别于被分析样品中存在的其它化合物并结合于为此作为特异性结合配对物的结合试剂以及任选地额外使用的检测试剂。例如，如果适当的结合试剂仅结合磷酸化形式而不结合非磷酸化形式的待测化合物或物质的话，则根据该定义，所述化合物或物质的两种形式表示两种不同的分析物。如果适当的结合试剂识别并结合任何磷酸化的化合物或物质，则因此在该条件下相应的磷酸化化合物或物质在一起表示一种分析物。根据所述定义，作为分析物特异性结合配对物的结合试剂可以通过这样的方式选择，例如其仅识别并结合磷酸化形式或糖基化形式（或相应的非磷酸化或非糖基化形式）的待测化合物。细胞或有机体中的生物信号通道活性可以与控制所述信号通道的磷酸化、甲基化、乙酰化或糖基化化合物的比例相关（取决于信号通道的性质）。样品中磷酸化、甲基化、乙酰化或糖基化形式的总量相对比例，即化合物

以其磷酸化、甲基化、乙酰化或糖基化形式的量与所述化合物以磷酸化和非磷酸化形式或甲基化和非甲基化形式或乙酰化和非乙酰化形式或糖基化和非糖基化形式的总量之商，下文中称为所述样品中所述化合物的磷酸化或甲基化或乙酰化或糖基化程度。磷酸化程度、甲基化程度、乙酰化程度和糖基化程度可以组合成上位概念化合物的活性程度。然而，化合物的活性程度还可以涉及化合物的其它化学修饰形式。本发明的方法还特别适用于测定表达蛋白的活性程度。

作为特异性结合配对物的结合试剂还可以这样选择，即使其只有在待测化合物具有特定的三维结构时才与该待测化合物结合。例如，许多抗体只识别和结合具有特殊三维结构的待测物质的特定亚区域（抗原决定簇）。根据相应的待测化合物的构象状态，所述亚区域（抗原决定簇）可以易于或不易结合相应的结合试剂。然而，所述结合试剂还可以这样选择，使其结合于可结合性独立于待测化合物的三维结构的所述化合物区域。因而利用适当选择的结合试剂能够获得样品中待测化合物总量相对比例，所述化合物具有待测的特定构象状态。

在适当选择了所使用的结合试剂以及任选额外的检测试剂之后，本发明的方法可以使待测蛋白作为被施加到不连续的测量区域中的生物来源和复杂组成样品中的分析物，根据其在所述施加的生物来源和复杂组成样品中存在的磷酸化和/或糖基化和/或甲基化和/或乙酰化形式来进行区分，这种区分是在如权利要求1所述的步骤（4）中进行的，即在结合与其接触的作为特异性结合配对物的结合试剂、以及任选的另外的检测试剂之后，并根据权利要求1中所述的检测步骤（5）中的上述定义作为不同的分析物分别检测。

作为施加到不连续测量区域中的生物来源和复杂组成样品中分析物的待测蛋白质还可以不根据其存在于所述施加的生物来源和复杂组成样品中的磷酸化和/或糖基化和/或甲基化和/或乙酰化形式来区分，这种区分是在如权利要求1所述的步骤（4）中进行的，即在结合与其接触的作为特异性结合配对物的结合试剂、以及任选的另外的检测试剂之后，并且在权利要求1所述的检测步骤（5）中不作为不同的分析物分别检测，而是作为单个分析物一同检测。

本发明的方法能够获得存在于施加的生物来源和复杂组成待测样品中的一种或多种分析物（即，特别是存在的蛋白质）的活性程度（根据上述定义）。更具体来说，所述方法可用于确定存在于所施加样品中的一种或多种分析物（特别是蛋白质）的磷酸化程度和/或甲基化程度和/或乙酰化程度和/或糖基化程度。

用作待测并存在于所施加生物来源和复杂组成样品的不连续测量区域中的分析物的特异性结合配对物的结合试剂可以选自，例如以下组的化合物：蛋白质，

如单或多克隆抗体以及抗体片段, 肽、酶、酶抑制剂、激酶底物、适配体、合成肽结构、糖肽、激素、辅助因子、低聚糖、外源凝集素、针对抗体或T细胞受体的抗原、生物素、亲和素、链亲和素、具有附加结合位点的官能化蛋白质(标签蛋白, 如组胺酸标签蛋白)以及其复合结合配对物, 以及核酸(例如DNA、RNA、寡核苷酸)以及核酸类似物(例如PNA)及其具有人工碱基的衍生物。

使用的检测试剂可以选自包括以下物质的第一组: 多克隆或单克隆抗体以及抗体片段、核酸和核酸衍生物及其具有人工碱基的衍生物、生物素、亲和素、链亲和素和中性亲和素。所述检测试剂还可以选自包括以下物质的第二组: 质量标记, 例如纳米颗粒、小球或胶体形式的, 以及发光标记, 如发光染料或发光纳米颗粒形式的, 如激发和发射波长在200 nm到1000 nm之间的量子点, 从而形成了所述质量或发光标记结合在结合试剂上, 或者附着或连接于其上, 或者结合在上述第一组检测试剂中的检测试剂上, 或者以特殊的方式结合或附着在第一组检测试剂中的所述检测试剂上, 或者连接或附着在待测分析物和作为特异性结合配对物与其连接的结合试剂之间, 其中所述待测分析物存在于施加到不连续测量区域中的生物来源和复杂组成的样品中。所述结合试剂还可以包括检测试剂的功能。

本申请中的术语“发光”是指在光学或非光学的, 如电子或化学或生化或热的激发之后, 在紫外到红外范围内光子的自发发射。该“发光”术语的实例包括化学发光、生物发光、电致发光, 特别是荧光和磷光。

在本发明方法的优选变形方式中, 作为特异性结合配对物的所述结合试剂以及第一溶液中任选的检测试剂, 和/或

作为特异性结合配对物的结合试剂, 也即与待测的和存在于生物来源和复杂组成样品中的分析物相同种类的化合物, 其中所述样品施加到不连续的测量区域, 以及第二溶液中任选的检测试剂, 和/或

作为特异性结合配对物的结合试剂, 也即与存在于生物来源和复杂组成并在步骤(3)中施加到不连续测量区域中的样品的样品基质种类类似的物质, 以及包括第三溶液中的任选的检测试剂,

在各种情况下预先相互温浴, 然后将所述第一、第二或第三溶液在一个添加步骤中与所述测量区域阵列相接触。

本发明方法的一种可能的变形方式特征在于, 通过向所述阵列添加可区分的检测试剂而在共同的测量区域阵列中检测不同的分析物。这里优选不同的待测分析物数量等于所使用的可区分检测试剂的数量。尤其优选可区分的检测试剂在发光性的激发波长和/或发射波长方面有所不同。

本发明方法的另一种变形方式特征在于,通过添加用于确定各不连续测量区域阵列上的不同分析物的、作为特异性结合配对物的不同结合试剂,和/或向所述测量区域阵列添加可区分的检测试剂,来检测在多个不连续测量区域阵列中的多种不同分析物。

另一种可能的变形方式特征在于,不同的结合试剂作为针对不同分析物的特异性结合配对物被施加到用于各不同待测分析物的各个阵列中。

有利的是,含有施加到其中的生物来源和复杂组成样品的测量区域阵列包括,与待测分析物相同种类的已知浓度化合物的测量区域,该化合物作为所施加物质的标准品而添加。这里特别优选测量区域阵列包括一些这样的测量区域,其中添加了与待测分析物相同种类的不同的已知浓度化合物作为所施加物质的标准品,这种测量区域的数量和所述不同的已知浓度水平足以产生用于确定所述阵列中未知浓度的所述待测分析物的校正曲线,其中所述校正曲线是通过根据如本发明方法权利要求1所述的步骤(4)添加含有作为特异性结合配对物的结合试剂和还任选含有的检测试剂的第一溶液,以及如权利要求1所述的后续步骤(5)和(6)而形成的。同样,这里根据本发明方法步骤(4)的结合试剂和任选的检测试剂可以在单个添加步骤中加入,或者在单独的子步骤中加入,在适当的情况下子步骤之间进行洗涤步骤。这里添加了用于分析物测定的标准品的所述物质可以包括例如,仅有所使用的缓冲液成分,添加的类似于样品基质的化合物,如白蛋白(特别是牛血清白蛋白),免疫球蛋白或稀释血清。

优选的是,在固体载体上设置多个相同种类的测量区域阵列,其中,各阵列中相同的测量区域位点表示就行和列的排列而言相同种类的样品施加于此。

有多种将各溶液施加到设置在共同固体载体上的测量区域中的可能的实施方案,即含有结合试剂和任选的另外的检测试剂的第一溶液,含有与待测分析物种类相同的另外化合物作为竞争剂的第二溶液,以及含有存在于施加到测量区域的样品的样品基质中的添加化合物的第三溶液。

第一种优选的可行实施方案特征在于,根据步骤(4)加入第一溶液,并根据如权利要求1所述的步骤(5)和(6)测量和记录来自该阵列的测量区域的第一光学信号,根据步骤(7a)和(7b)加入第二和/或第三溶液,接着根据如权利要求1所述的步骤(8)和(9)测量并记录目标阵列测量区域中发出的信号,其中,在各阵列中相同的测量区域位点表示就行和列的排列而言相同种类的样品施加于此。

然而,也可以顺序将第一、第二和第三溶液施加到测量区域的相同阵列中(或

者相同的多个测量区域中)，各种情况下其是在实施了足够数量的再生和洗涤步骤之后进行的。“再生”这里是指这样一种中间步骤，其中在加入第一溶液、和分别的第二或第三溶液之后，在分析物及其结合试剂、以及任选的另外添加的检测试剂之间形成的复合物通过加入适当的复合物破坏试剂而解离，所述复合物破坏试剂例如，用于解离抗原-抗体复合物的具有高盐含量/高离子强度和/或强酸性的“离液”试剂，或者用于解离杂交核酸链的尿素溶液，从而所述固定的分析物分子在分别添加第二、第三溶液之前，在各种情况下再次可以与结合试剂、以及任选的另外的检测试剂相结合。然而，本发明方法的变形方式优选只有在确保有高度再生性（例如，高于80%，优选高于90%）时才实施。

在待施加的第二溶液中使用的所述化合物的优选浓度取决于预期在测量区域中的所述分析物的表面浓度，和所述分析物及其结合和检测试剂之间分别的结合反应平衡常数，其中所述化合物与待测的和存在于施加到不连续测量区域中生物来源和复杂组成样品中的分析物种类相同，并用作待测的和存在于施加到不连续测量区域中生物来源和复杂组成样品中的分析物的竞争剂，以便特异性结合所述结合试剂和任选的另外添加的检测试剂。所述结合试剂通常要将从供应商处获得的原溶液稀释成百倍到上千倍。在抗体的情况下，这种原溶液的含量通常为0.5-1 mg/ml，相当于1-10 μ M范围的浓度。所述检测试剂以与结合试剂可比较的浓度范围使用，即通常为1-10 nM。在竞争试验的情况下，竞争剂（例如磷酸化肽的抗原决定簇）以超过结合试剂浓度的至少十倍、最好百倍使用。用作非特异性结合的竞争剂的物质通常以这些第三溶液（根据本发明方法的步骤(7b)）的10 μ g/ml到500 μ g/ml的总蛋白质含量使用，其中所述物质与存在于生物来源和复杂组成样品基质中的物质种类相同（例如白蛋白、免疫球蛋白或稀释血清）。

本发明的方法能够以两种方式测定通过非特异性相互作用或者非特异性结合得到的信号占在测量区域测得的基于特异性结合和其它的非特异性结合形成的总信号的比例。

在第一种可行方案中，通过与添加的结合试剂和任选的与添加的检测试剂的非特异性相互作用产生的光学信号占根据权利要求1测得的第一光学信号的比例以如下方式确定：在添加根据步骤(7a)的第二溶液之后根据步骤(8)测得的光学信号和在添加步骤(4)的第一溶液之后根据步骤(5)测得的光学信号的差异。

第二种可行方案的特征在于，通过与添加的结合试剂和任选的与添加的检测试剂的非特异性相互作用产生的光学信号占根据权利要求1测得的第一光学信号的比例以如下方式确定：在添加根据步骤(7b)的第三溶液之后根据步骤(8)测得

的光学信号和在添加步骤(4)的第一溶液之后根据步骤(5)测得的光学信号的差异。

结合上述本发明方法优选的实施方案,根据测量区域阵列包括数个这样的测量区域,其中与待测分析物相同种类的不同的已知浓度化合物被作为标准品加入到所施加物质中,这种测量区域的数量和所述不同的已知浓度水平足以形成用于确定所述阵列中未知浓度的所述待测分析物的校正曲线,其中所述校正曲线是通过根据如本发明方法权利要求1所述的步骤(4)添加含有作为特异性结合配对物的结合试剂的第一溶液和同样任选的检测试剂,以及如权利要求1所述的后续步骤(5)和(6)而形成的,本发明的方法可以测得生物来源和复杂组成样品中分析物的(相对和/或绝对)浓度或(相对和/或绝对)量,其中所述样品已被施加到测量区域中,这是通过所述测量区域测得的光学信号(即测得的第一光学信号)与由于与添加的结合试剂和任选添加的检测试剂的非特异性相互作用产生的光学信号比例之间的差异,并将所述差异与目标分析物的校正曲线相比较而实现的。

所述方法步骤将在示例性的实施方案中更为详细地说明。

由于高灵敏度、高精确度和再现性,特别是由于可以同时或交替使用多个彼此相独立的参比和校正方法,本发明的方法还具有这样的特征:能够确定施加到各测量区域的各生物来源和复杂组成样品中分析物的(相对和/或绝对)浓度或(相对和/或绝对)量的差异,优选小于20%,更优选小于10%。

由于得到的测量结果仅有细微变化,本发明的方法还适用于研究在生物有机体或细胞培养物的疾病影响和/或对有机体或细胞培养的外部影响下,(生物来源和复杂组成样品中待测的)分析物量或浓度方面的时间进程(即变化),其中所述外部影响例如由于用生物活性化合物(药物)处理或刺激产生,或由于外部物理作用产生,例如紫外到红外光谱波长的光照辐射,放射性影响或由于热效应产生。

因而本发明方法的另一种可能的实施方案特征在于,从相同来源位点在不同时间点获得样品和一个或多个比较样品,以及测定所述样品中存在的一种或多种分析物量或浓度随时间的变化。“相同来源位点”这里是指相同的有机体或者相同种类的有机体,或者相同的细胞培养物或相同种类的细胞培养物(在各种情况下,在不同时间的同种类型疾病或者影响作用之后)。优选地,本发明的方法能够检测到所述分析物浓度和量随时间小于20%,优选小于10%的变化。

固定载体上被研究的生物来源和复杂组成样品的最简单固定形式是物理吸附,例如由于与所述固体载体表面的疏水相互作用形成。然而,这些相互作用的程度在很大程度上可以根据所述方法进一步的过程中所施加的溶液的成分及其理化性

质而改变,所述理化性质如极性和离子强度。特别是在多步测定中顺序添加各种试剂的情况下,在纯粹的吸附固定之后,复杂组成的样品或其组分与所述表面的粘附性可能不足。因而优选向所述固体载体施加促粘附层以便提高将施加到不连续测量区域的样品的粘附性,然后将样品施加到该促粘附层上。

所述促粘附层的厚度优选小于200 nm,特别优选小于20 nm。

多种材料适用于制备所述促粘附层。例如,所述促粘附层可包括以下组的化合物:硅烷、官能化硅烷、环氧化物、功能化带电或极性聚合物以及“自组装钝化或功能化单和多层”、硫醇、磷酸烷基酯和膦酸烷基酯、以及多官能嵌段共聚物,例如聚(L)赖氨酸/聚乙二醇。

有利的是,使不连续测量区域之间的区域“钝化”以最小化结合或检测试剂的非特异性结合,即,将对所述结合试剂和/或检测试剂“化学中性”的那些成分,即不与其结合的成分,施加到空间分隔的测量区域之间。

对结合试剂和/或检测试剂“化学中性”,即不与其结合的所述成分可以选自如下组:白蛋白,特别是牛血清白蛋白和人血清白蛋白,酪蛋白,非特异性的、多克隆和单克隆的外源性抗体,以及经验上对待测(特别是免疫测定的)分析物非特异性的抗体,清洁剂例如Tween 20、不与被分析的多聚核苷酸发生杂交的天然和合成DNA片段,例如鲑鱼或鲑鱼精子提取物(特别是用于多聚核苷酸杂交测定的),还有不带电但亲水性的聚合物,例如聚乙二醇或葡聚糖。

多种已知的方法适用于将生物来源和复杂组成的样品直接施加到固体载体上或者在施加到预先施加到所述载体上的促粘附层上,所述方法可以选自例如以下方法的组:喷墨点样法,通过针尖、笔或毛细管的机械点样,微接触印刷,通过将样品加到平行或交叉的微通道中使流体接触测量区域,使其暴露于压力差或电势差或电磁势差,以及光化学和光刻固定方法。

所述测量区域阵列优选是一维或二维的不连续测量区域设置。在测量区域阵列内可达到的测量区域密度以及在共同固体载体上的测量区域数量基本上取决于所采用的施加方法的空间分辨率。一个阵列通常包括50个以上、优选500个以上、特别优选5000个以上的测量区域。这里各个测量区域可以含有与其它测量区域相同或不同的固定样品。阵列的测量区域设置密度为每平方厘米10个以上、优选100个以上、特别优选1000个以上的测量区域。

本发明方法的有利实施方案特征在于,多个测量区域的阵列设置在固体载体上。更具体来说,所述载体上可以设置至少5个,优选至少50个测量区域的阵列。特别有利的是,不同的测量区域阵列设置在不同的样品容器中。例如,国际专利

申请 WO 01/13096 和 WO 01/43875 中记载了这样一种方式：设计成渐逝场传感器平台形式的固体载体作为基板可以与适当的上部组合形成合适的样品容器阵列，在各种情况下用于接收测量区域的阵列。

所述共同的连固体载体上优选设置 2-2000 个、优选 2-400 个、特别优选 2-100 个样品容器。

特别优选所述样品容器设置成格栅形式，即一连串的行和/或列，这与标准微滴定板格栅相适应。这里建立的工业标准为 8 x 12 孔的设置，其中心间隔大约 9 mm。与其相适应的较小阵列包括例如，3、6、12、24 和 48 个样品容器，其具有相同的间距。还可这样组合多个这种较小样品容器阵列：在其组合之后，其整体上以大约 9 mm 的多个所述间隔相隔开。

一段时间以来，还曾经使用过具有 384 和 1536 个孔的板，作为整体的多个 96 孔，在相同的基本区域具有相应减少的孔间距（分别大约 4.5 mm 和 2.25 mm），其同样应当称为标准微滴定板。作为本发明试剂盒一部分的样品容器设置也适用于所述几何形状。

通过使所述样品容器适合于这些标准，可以采用多种市场上获得和存在的实验室移液管和实验室点样机器人来添加所述第一、第二或第三溶液。

用于本发明方法的固体载体的这种实施方案可以使称为“多维”的实验概念成为可能：例如，可将多种样品，如来自不同有机体（例如对应于列）以不同的稀释度（例如对应于行）施加到阵列的行和列中。然后可以使在不同容器中的含有固定样品的不同测量区域阵列与不同的第一和/或第二或第三溶液相接触，所述溶液中含有用于确定不同阵列中不同固定分析物的结合试剂和任选的检测试剂。显然这种载体的变形方式可以用于实施几乎无限种不同的实验。

多种固体载体的实施方案适用于本发明的方法。优选上面生成有不连续测量区域阵列的固体载体为基本上平面的。“基本上平面的”是指除了例如，可能形成于面对测量区域的表面上的结构之外，如用于形成样品容器的装置的凹陷或突起，所述表面的显微不平整度为沿其表面平面任何轴向上小于 100 微米每厘米长度。

对于许多应用而言，还非常有利的是所述固体载体为非多孔性的。“非多孔性的”这里是指所述载体不具有连续的多孔状结构，并且其（显微）表面的粗糙度小于 1 μm 。所述固体载体的表面粗糙度优选小于 20 nm，特别优选小于 2 nm。

对许多应用来说还希望所述光学载体在至少激发光或测量光的波长下是基本上光学透明的，所述光在本发明方法的检测步骤中被导向测量区域的方向。

入射的“激发光”这里是指所述光用作二次发射的能量源（通常称为“发射光”），

例如荧光或普通发光或拉曼辐射，或者例如，用于金属层中表面细胞质基因组的激发光，其可以利用适当的检测器测得。入射的“测量光”是指同样为了分析物检测的目的用于与载体和/或与上面的待测分析物或其结合部分相互作用的光，然而例如，所述测量光或二次发射中没有观察到光谱变化，然而例如，测量了所述光的校正参数（例如，在通过光栅结构耦合到薄膜波导中的共振角中，见下）或传播参数的变化（例如，通过不同光学通路如干涉计测量通路和参考通路的光部分之间的相差，不与样品相互作用）。

在特定波长下一种材料、层或固体载体“基本上光学透明”是指，在所述材料或在所述层或在所述载体或在作为光学波导的载体（高折射率）波导层中传导的光传播路径在目的波长下大于2 mm，如果所述传播路径长度不被结构所限制而改变所述光的传播方向的话。例如，当所述光进入所述材料中时，所述传播路径长度，例如光学可见光的传播路径长度，即所述光在相应材料中的通路上的距离，可以从几厘米（例如薄膜波导中）一直到数米或数公里（在用于光信号传输的光导的情况下）的数量级，直到该光强减小到原始光强的 $1/e$ 。在基于薄膜波导的光栅波导结构的情况下，通过外部耦合折射光栅（设计成波导层形式，见下），在波导层内传导的光的传播矢量长度可以限制在数微米内。然而，传播路径长度的这种限制是由于结构而非所述结构的材料性质造成的。根据本发明，如果在光栅结构区域之外的光的传播路径长度大于2 mm，则这种光栅波导结构应当称为“基本上光学透明的”。

优选地，任选地施加到所述固体载体上的促粘附层的材料至少在入射激发光或测量光的波长下是基本上光学透明的。

所述固体载体的材料优选包括以下组的材料：硅酸盐，如玻璃或石英，陶瓷，金属氧化物，塑料，特别是热塑料，如聚碳酸酯，丙烯酸酯，聚丙烯酸酯，特别是聚甲基丙烯酸甲酯，聚苯乙烯，环烯聚合物，以及环烯共聚物及其组合（混合物和/或层状结构）。优选所述塑料是可模制的，可压纹的、注模的和/或可轧制的以及——用于采用发光检测的应用——具有非常低的本征荧光。优选所述材料满足至少在入射激发光或测量光波长下为基本上光学透明的要求。

本发明方法的各种应用需要所述固体载体实施方案的特征在于，所述载体包括多个具有不同光学特性的层。

一种特别的实施方案的特征在于，所述固体载体具有薄金属层，优选包括金、银或铝。通常，这里还优选的是，所述载体包括另外的不与所述金属层相接触的中间层，其折射率为 < 1.5 ，例如二氧化硅或氟化镁。对该载体的实施方案而言，

还优选这样选择所述金属层和可能的中间层的厚度，即在入射激发光的波长下和/或产生的发光的波长下可以激发表面细胞质基因组。所述金属层的厚度优选在 10 nm 到 1000 nm 之间，特别优选在 30 nm 到 200 nm 之间。

本发明方法的大多数应用需要至少所述固体载体层至少在入射激发光或测量光波长下为基本上光学透明的，其中所述固体载体层与测量区域直接接触或通过促粘附层接触。

所述固体载体可包括以下组的元件：显微载波片、微滴定板、纳米滴定板、过滤器（如包括滤纸）、薄膜（如硝酸纤维素膜）以及微结构载体（如硅制蜂窝结构或穿孔结构）。在类似于所建立的微滴定板（通常含有 96、384 或 1536 个样品容器）的方式中，具有类似的构造设计、但具有较小尺寸（通常在微升的数量级而不是毫升数量级）的开放样品容器这里被称为纳米滴定板。

用于本发明方法的所述固体载体的特别优选的实施方案特征在于，所述固体载体包括光学波导，其为连续的或者划分成不连续的波导区域并包括一层或多层。

对于本发明方法的一个或多个检测步骤而言，优选激发光或测量光从一个或多个多色或单色光源传导到一个或多个测量区域阵列的一个或多个测量区域中，并且以空间分辨的方式测量并记录来自所述测量区域的光学信号和/或从所述测量区域发出的光学信号的变化或差异。

所述激发光或测量光优选波长在 200 nm 到 1200 nm 之间。

优选采用具有窄发射光谱的光源。特别优选的光源为激光二极管和激光。

优选采用用于空间分辨信号检测的空间分辨检测器，其可以选自例如以下组：CCD 照相机、CCD 芯片、光电二极管阵列、雪崩二极管阵列、多通道板和多通道光电倍增管。适用于本发明方法的检测步骤的光学系统及其元件以及光学检测方法记载于例如，国际申请 WO 95/33197、WO 95/33198 和 WO 96/35940 中，这里全文引入其内容作为本发明的一部分。

根据所述固体载体的物理设计，有多种产生用于分析物检测的测量信号的选择。可能的变形方式的特征在于，以空间分辨方式测量的光学信号的变化或差异是建立在所述固体载体表面上有效折射率的局部差异基础之上的，其中所述载体面对测量区域，或者离所述固体载体的所述表面在小于 1 μm 的距离内，该局部差异是由于与分析物相结合的结合试剂和/或检测试剂造成的，其中所述分析物存在于施加于其中的生物来源和复杂组成样品中的不连续测量区域中。

本发明方法的这种实施方案的子变形方式特征在于，以空间分辨方式测量的光学信号中的变化或差异是建立在共振条件下的局部差异基础之上的，所述共振条

件用于在作为所述固体载体一部分的薄金属层上产生表面细胞质基因组。

用于产生表面细胞质基因组共振和用于与发光测量还有波导结构相结合的条件已多次记载于文献中，例如美国专利 US-P 5478755、US-P 5841143、US-P 5006716 和 US-P 4649280 中。

可以测量共振角（具有在入射光恒定波长下的入射角变化）和共振波长（具有恒定入射角和入射激发波长的变化）以便确定共振条件的变化。因此，利用恒定波长的入射光，所述共振条件中的变化可以为，在用于在固体载体的薄金属层中产生表面细胞质基因组的入射激发光的共振角中可测量的变化。相应的，所述共振条件中的变化也可以是用于在作为固体载体一部分的薄金属层中产生表面细胞质基因组的入射激发光的共振波长变化，其中在这种情况下入射角（其应当等于至少在射在载体上的光谱变化入射光的波长下的共振角）优选保持恒定。

特别优选本发明方法的那些变形方式，其特征在于，所述固体载体包括光学层波导，其具有第一基本上光学透明的层（a），该层（a）位于第二基本上光学透明的层（b）之上，其中层（a）比层（b）具有更高的折射率并与测量区域直接接触或者通过促粘附层介导接触。

这里第二基本上光学透明的层（b）可包括以下组的材料：硅酸盐，如玻璃或石英，陶瓷，金属氧化物，塑料，特别是热塑料，如聚碳酸酯，丙烯酸酯，聚丙烯酸酯，特别是聚甲基丙烯酸甲酯，聚苯乙烯，环烯聚合物，以及环烯共聚物及其组合（混合物和/或层状结构）。同样优选所述塑料是可模制的，可压纹的、可注模的和/或可轧制的以及——用于采用发光检测的应用——具有非常低的本征荧光。而且，优选所述材料满足至少在入射激发光或测量光波长下为基本上光学透明的要求。

优选所述第一光学透明层（a）的折射率大于 1.8。还优选所述第一光学透明（a）包括以下组的材料：氮化硅、 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 、和 ZrO_2 ，特别优选 TiO_2 、 Ta_2O_5 或 Nb_2O_5 。

适于用作本发明方法的固体载体的（薄）层波导实施方案记载于例如，国际专利申请 WO 95/33197、WO 95/33198 和 WO96/35940 中。

对于包括光学波导的固体载体的本发明方法实施方案来说，优选通过一个或多个光耦合元件将来自一个或多个光源的激发光或测量光耦合到所述固体载体的波导层内，所述光耦合元件选自以下组：棱镜耦合器、具有相互接触的波导并具有相重叠的渐逝场的渐逝场耦合器、具有设置在所述波导层的末端前面的聚焦透镜，优选柱面透镜的端面耦合器、以及光栅耦合器。

特别优选利用一个或多个光栅结构将所述激发光或测量光耦合到固体载体的波导层中，所述光栅结构设置在所述波导层中作为具有特定光栅周期和光栅深度的表面起伏光栅。

还有利的是，在所述固体载体的波导层中传导的光利用一个或多个光栅结构(c')耦合出去，其中所述光栅结构(c')设计在所述波导层中并具有与光栅结构(c)相同或不同的周期和光栅深度。

本发明方法的另一种变形方式基于折射测量方法，其特征在于，以空间分辨的方式测量的光学信号中的变化和差异是建立在共振条件的局部差异基础之上的，所述共振条件是用于通过设置在所述波导层中的光栅结构将一个或多个光源的激发光或测量光耦合到所述固体载体的波导层中的。

在一种类似于确定产生表面细胞质基因组共振的共振条件变化的方式中，可以测量共振角（具有在入射光恒定波长下的入射角变化）和共振波长（具有恒定入射角和入射激发波长的变化）以确定通过设计在其中的光栅将光耦合到波导层中的共振条件的变化。因此，在入射光的恒定波长下，共振条件的所述变化为，在用于将光耦合到所述固体载体的波导层中的可测量的变化。相应的，所述共振条件中的变化也可以是用于将光耦合到所述固体载体的波导层中的入射激发光的共振波长变化，其中在这种情况下入射角（其应当等于至少在射在载体上的光谱变化入射光的波长下的共振角）优选保持恒定。

国际专利申请 WO 01/88511 详细记载了各种光栅波导结构的实施方案，其适于用作固体载体与本发明的方法相结合。其中记载的检测方法还适用于本发明方法上述利用折射测量方法的变形方式的检测步骤。因此，这里引入 WO 01/88511 的全文作为本说明书的一部分。

至于产生信号的技术，本发明方法优选实施方案的特征在于，以空间分辨方式测量的光学信号中的变化或差异是建立在一个或多个发光事件的局部差异或变化基础之上的，所述发光事件是由与存在于施加在上面的生物来源和复杂组成样品的不连续测量区域中的分析物相结合的结合试剂和/或检测试剂引起的。

特别有利的是采用两种或多种具有不同发射波长和/或不同激发光谱的发光标记，优选对于分析物检测来说具有不同的发射波长和相同的激发波长。如果具有不同光谱性质、特别是不同发射波长的多个发光标记结合于不同的与测量区域相接触的结合和/或检测试剂，则可以例如，在一个检测步骤中确定单个测量区域中的不同分析物，即使所述测量区域接触所述结合/或检测试剂并同步或顺序检测所发生的发光事件。

例如，本发明方法的这种变形方式优选适用于利用两种相应的不同结合试剂，例如直接标记的结合试剂（如具有绿色或红色发光标记的）作为特异性结合配对物，至少同时地检测例如，磷酸化和非磷酸化形式的化合物，特别是在单个（共同的）测量区域内。

在类似的方式中，还可以同时检测单个测量区域内两种或多种不同的分析物，如果将具有不同发射衰减时间的两种或多种发光标记用于所述分析物检测，并利用适当的激发条件（即脉冲或调制光激发）的话，可以时间分辨的方式检测所形成的发光时间，这使得可以区分所述具有不同衰减速度的发光事件。

有利的是，使激发光在持续在 1 fsec 到 10 分钟之间的脉冲内发光，并以时间分辨的方式测量从所述测量区域发出的光。

本发明方法的一个十分特别优选的实施方案特征在于，

- 所述固体载体包括光学层波导，其具有至少在入射激发光波长下基本上光学透明的第一层 (a)，所述第一层 (a) 位于至少在入射激发光波长下基本上光学透明的第二层 (b) 之上，所述第二层 (b) 的折射率低于层 (a)，

- 通过设置在所述层 (a) 中的光栅结构 (c) 将光源的激发光耦合到层 (a) 中，

- 所述激发光作为导波被传导到测量区域上，所述测量区域直接位于所述层 (a) 之上或者通过促粘附层介导在所述层 (a) 之上，以及

- 以空间分辨的方式测量化合物的发光事件，其中所述化合物能够发光并在所述层 (a) 中传导的光的渐渐场内被激发发光。

这里一种特别的变形方式包括，除了确定一种或多个发光时间之外，还确定所述测量区域上有效折射率的变化。

为了进一步提高灵敏度，这里可能有的是，以偏振选择性的方式来实现一个或多个发光事件和/或确定激发波长下的光信号。这里优选利用不同于激发光的偏振性来测量一种或多个发光事件。

本发明的另一主题是一种用于定量测定一种或多种生物来源和复杂组成样品中的一种或多种分析物的微阵列，该微阵列包括：

- 固体载体

- 第一多个不连续测量区域，其中在各种情况下将少量的生物来源和复杂组成的样品以稀释或未稀释的形式直接固定或通过促粘附层介导固定，

其特征在于，

在固体载体上的所述阵列中具有至少第二多个测量区域，该测量区域中以不同

的浓度固定有与待测分析物相同种类的物质，其适合于针对被定量检测并存在于固定的复杂组成样品中的所述分析物生成校正曲线，所述校正曲线的形成是通过使所述微阵列与第一溶液相接触，该第一溶液包括一种或多种结合试剂，作为存在于所施加的生物来源和复杂组成样品的第一多个不连续测量区域中的待测分析物的特异性结合配对物，并作为与存在于所述第二多个不连续测量区域中的所述待测分析物相同种类的特异性结合配对物，以及如果需要的话任选的一种或多种检测试剂，所述结合试剂和检测试剂可以同时或者顺序施加，之后以空间分辨的方式测量从与所述第一溶液接触后的一个或多个阵列的不连续测量区域发出的第一光学信号，并记录所述第一光学信号。

有利的是，在所述固体载体的所述阵列上具有第三多个测量区域，其中在各种情况下将少量的生物来源和复杂组成的样品以稀释或未稀释的形式固定，此外，还固定有添加于其中的与待测分析物相同种类的已知量的物质。所述第三多个测量区域可用于，例如，确定“复原”程度的控制功能，也正如以下示例性实施方案中那样。

在本发明进一步开发的微阵列中，所述固体载体上的所述阵列中具有第四多个测量区域，其中固定有与施加到第一多个测量区域的样品基质中存在的物质类似种类的物质。

优选所述第二多个测量区域的测量区域还包括与施加到第一多个测量区域的样品基质中存在的物质种类相似的物质。

与施加到第一多个测量区域的样品基质中存在的物质种类相似的物质可以从以下组的物质中获得：白蛋白，特别是牛血清蛋白，免疫球蛋白，转铁蛋白和纤维蛋白原。

更为优选的是，所述固体载体上的所述阵列中具有用于参比目的的第五多个测量区域。还优选所述第五多个测量区域的测量区域中包含选自以下组的物质：质量标记，例如纳米颗粒、小球或胶体形式的，以及发光标记，如发光染料或发光纳米颗粒形式的，如激发和发射波长在200 nm到1000 nm之间的量子点。

任何固体载体及其改良形式的实施方案（例如通过施加促粘附层）都适用于本发明的微阵列，如上述的本发明的方法（用于区分观察到的信号的特异性和非特异性的结合部份）。同样可以采用所述与本发明的微阵列结合用于本发明方法的任何复杂组成的样品、结合试剂、检测试剂和测量区域。

本发明还涉及一种用于定量测定生物来源和复杂组成样品中一种或多种分析物的方法，包括以下步骤：

- 提供一种或多种生物来源和复杂组成的样品,
- 提供多种不同浓度的物质溶液, 所述物质与复杂组成样品中的待测分析物种类相同,
 - 提供至少一个固体载体,
 - 通过将少量生物来源和复杂组成的样品以稀释或未稀释的形式施加到不连续的位点从而形成第一多个不连续测量区域作为微阵列的一部分, 其直接位于所述固体载体上或者在先施加促粘附层之后, 位于所述固体载体上的所述促粘附层上,
 - 在各种情况下通过施加少量的多种不同浓度物质溶液从而形成第二多个不连续测量区域作为所述微阵列的一部分, 其中所述物质与复杂组成样品中的待测分析物种类相同,
 - 使所述微阵列与以下物质接触: 第一溶液, 该第一溶液包括一种或多种结合试剂作为存在于所施加的生物来源和复杂组成样品中的第一多个不连续测量区域中的待测分析物的特异性结合配对物, 以及与待测分析物相同种类的物质, 所述物质存在于第二多个不连续测量区域中, 如果需要的话任选的, 一种或多种检测试剂, 其可以结合同时或顺序施加的结合试剂和检测试剂,
 - 以空间分辨的方式测量从微阵列的所述第一和第二多个不连续测量区域发出的第一光学信号, 记录来自所述第一多个不连续测量区域的所述第一光学信号作为其接触第一溶液的特征信号, 记录来自第二多个不连续测量区域的所述第一光学信号作为其接触第二溶液的特征信号, 所述信号作为与存在于复杂组成样品中的分析物种类相同的物质浓度的函数, 所述物质存在于所述测量区域中,
 - 由来自第二多个不连续测量区域的所记录的光学信号生成复杂组成样品中待测分析物的校正曲线, 如果需要的话在先去掉背景信号和进行适当的参比之后生成,

通过比较所记录的来自第一多个不连续测量区域的第一光学信号与所述特定分析物的校正曲线, 如果需要的话在先减去背景信号和进行适当的参比之后, 定量测定存在于复杂组成样品中的待测分析物。

用于定量测定生物来源和复杂组成样品中一种或多种分析物的本发明方法可以与上述本发明方法的实施方案相结合, 如权利要求1及其从属权利要求中所述。所述结合同样是本发明的一部分。

本发明还包括本发明微阵列的应用和/或本发明用于定量测定生物来源和复杂组成样品中一种或多种分析物的方法, 用于在药物库筛选过程中定量和/或定性分

析确定化学、生化或生物分析物，用于在药物研究、组合化学、临床和临床前开发之前有效地确定，用于识别、证实和监测生物或化学标记物质（“生物标记物”），用于在蛋白质组学研究和系统生物技术中识别和证实信号传导通道，用于亲和性筛选，特别是用于抗体筛选，用于实时结合研究和确定亲和性筛选和研究中的动力学参数，用于定量和定性分析物测定，特别是DNA和RNA分析和在基因组或蛋白质组中测定基因组或蛋白质组差异，例如单核苷酸多态性，用于测量蛋白质-DNA相互作用，用于确定mRNA表达和蛋白质（生物）合成控制机制，用于产生毒性研究和用于确定表达图谱，特别是用于形成在有或无外部刺激时患病和健康细胞群体的细胞表达图谱并进行比较，用于研究这种表达图谱随着分、小时、天、周、月或年时间周期的发展变化，用于确定生物和化学标记物质，如mRNA、蛋白质、肽、或低分子量有机（信使）物质，还用于在药物产品研发、人类和动物诊断、农用化学产品研发、症状和症状前植物诊断、药物产品开发中的患者分类和治疗药物选择中检测抗体、抗原、病原体或细菌，用以检测病原体、有害物质和病原微生物，特别是沙门氏菌、朊病毒、病毒和细菌，特别是在食品分析和环境分析中。

由于可以在相同条件下在共同的载体上同时实施大量的研究，本发明的方法特别适用于亲和性筛选，即用于比较针对共同特异性结合配对物的各种结合部分的亲和性，特别是针对共同抗原的各种抗体。

还特别优选利用本发明的方法来产生细胞表达图谱并进行比较。这特别涉及在有或没有刺激的情况下对比患病和健康细胞群体的表达图谱。“刺激”这里是指像所述细胞群体中添加化学或生化化合物以及用不同物理条件，例如辐射、热效应等等处理它们。由于本发明的方法可获得高精确度的测量结果，故该方法也特别适用于研究在上述条件下经时间段，例如数分钟、数小时、数天、数周、数月或数年，细胞表达的随时间发展变化。

本发明的方法还特别适用于发现上述种类的“生物或生化标记物质”，其通过与健康细胞群体相比较、比较突变或改良细胞群体与野生型细胞群体，适合于提供关于患病细胞群体的信息，或者通过对其刺激或处理提供关于影响细胞群体的信息。

本发明的微阵列和本发明的方法通过以下实施例来说明。

实施例:

1. 分析物和样品

在以下示例性的实施方案中，待测分析物是胞内 Akt 信号通道的标记蛋白“Akt”以及两种不同活化（磷酸化）形式的这种蛋白质。Akt 是一种蛋白激酶，在多种生理过程中起着关键的作用，例如在葡萄糖代谢、细胞生长、细胞分化和程序性细胞死亡（细胞凋亡）过程中。Akt 通过不同氨基酸侧链的磷酸化活化，尤其是丝氨酸 473 和苏氨酸 308。其导致的所述 Akt 信号通道的错误调控以及程序性细胞死亡的抑制在癌症发病中起着决定性的作用，因此该表激蛋白在治疗中受到极大的关注。

分析检测 Akt 及其磷酸化形式 P-Akt(Ser473)和 P-Akt (Thr308) 可通过不同的特异性抗体实现，所述抗体要么独立于其磷酸化程度地结合所述蛋白质，要么仅结合于特别的磷酸化形式，例如仅结合于(Ser473) 或仅结合于 P-Akt(Thr308)。因此可以通过施加三种不同的抗体的方式来测量样品，以检测所有的 Akt 含量以及其特定修饰形式的含量。在本示例性实施方案中在未过滤的鼠心脏组织裂解物中进行了 Akt 及其磷酸化形式的检测，该样品是在含有尿素和清洁剂的高度变性裂解缓冲液中制备的，气含有存在于其中的细胞的整个蛋白质组。此外，在裂解缓冲液中制备不含 Akt 的鼠血清。

2. 本发明方法中使用的载体

用于本发明方法的固体载体，在各种情况下尺寸为 14 mm 宽× 57 mm 长× 0.7 mm 厚，设计成薄膜波导的形式，在各种情况下包括玻璃基板（AF 45）作为基本上光学透明的层（b），将厚度 150 nm 的五氧化钽高折射率层施加于其中作为基本上光学透明的层（a）。在所述玻璃基板上与其长度平行的方向上，模制两个表面起伏光栅（光栅周期：318 nm，光栅深度：(12 ± 2) nm），间隔 9 mm。在随后施加的所述高折射率层过程中，这些将用作衍射光栅以将光耦合到高衍射层（a）中的结构将转移到所述五氧化二钽层的表面。

这种薄膜波导特别适用于本发明的方法，因为其能够高测量信号与背景信号比地检测所述表面附近的结合事件，使其可以达到很深的检测极限。然而，理论上任何其它实施方案的固体载体，如上所述，例如显微载玻片或微滴定板，也适用于本发明的方法。

在小心纯化了所述载体之后，通过从水溶液（0.5 mM DDP）中沉淀的方式自发地自组装成促粘附层，在所述金属氧化物层表面上形成单十二烷基磷酸脂（DDP）的单层。之前亲水性的金属氧化物表面的所述表面修饰形成了疏水性的

表面（水的接触角为大约 100° ），含有分析物作为特异性结合配对物的生物来源和复杂组成的样品将施加到上面用于特异性结合反应中进行分析物检测。

3. 试剂和测量区域阵列的形成

对于测定由非特异性结合分析物形成的信号比例的竞争性试验（见下文）来说，用纯化的 Akt（Pharmacia Italia Spa, Milan, Italy）作为存在于生物来源和复杂组成的固定样品中作为分析物的待测 Akt（“内源性 Akt”）溶液中的竞争剂。通过加入不同成分的不同固定溶液（见下文），所述纯化的 Akt 还用于生成校正曲线。

利用改良 Bradford 测定（PIERCE Coomassie Plus Kit (PIERCE # 23238) 确定用于样品（裂解缓冲液中的鼠心脏组织裂解物）的原溶液的总蛋白质浓度以及作为介质的鼠血清分别为 17.3 mg/ml 和 54.0 mg/ml，其中由所述样品原溶液制备要施加到固体载体上的生物来源和复杂组成的样品，所述鼠血清具有与从鼠心脏组织裂解物中制备的样品基质相比较的组份。

用同样含有尿素但不含清洁剂（“点样缓冲液”）的第二缓冲液进一步稀释得到具有不同总蛋白质含量的鼠心脏组织裂解物溶液（0.025 mg/ml, 0.050 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml），以施加到单个测量区域中，而不改变与原溶液相比稀释溶液的蛋白质组合物。所获得的不同总蛋白质浓度的溶液代表要研究的生物来源和复杂组成的样品（未加入其它添加剂）。

此外，制备鼠心脏组织裂解物的溶液，其具有相同的总蛋白质浓度（0.025 mg/ml, 0.050 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml），但在各种情况下另外含有 1000 ng/ml 的 Akt。由这些溶液形成的测量区域用于检测，无论分析物检测（Akt 或其磷酸化形式）是否独立于特定测量区域中的总蛋白质浓度。

而且，为了生成 Akt 及其磷酸化形式的校正曲线，在点样缓冲液中制备纯化 Akt（0 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 1000 ng/ml, 3000 ng/ml），在各种情况下添加 0.1 mg/ml 牛血清白蛋白（BSA）。这里 BSA 用作均匀的无 Akt 的样品基质，其中 Akt 将根据所述不同浓度的固定溶液固定在不连续测量区域的载体上。

同样为了生成所述 Akt 及其磷酸化形式的校正曲线，虽然在不同的样品基质中，在点样缓冲液中制备具有同样纯化的 Akt 成分的溶液（0 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 1000 ng/ml, 3000 ng/ml），但在各种情况下添加 0.1 mg/ml 鼠血清来代替 0.1 mg/ml 的 BSA。这里鼠血清用作非均匀的样品基质，其类似于鼠心脏组织但是无 Akt，并且其中 Akt 将根据所述不同浓度的固定溶液固定在不连续测量区域的载体上。

在各种情况下,利用喷墨点样机(GeSIM, Großberkmannsdorf, Germany)将6个相同的224个测量区域(点)的微阵列(各种情况下依次设置为14行和16列)施加到具有疏水性促粘附层的载体上。每个点是在所述载体表面上施加体积大约400 pl的单个液滴而形成的。在各种情况下,每个溶液形成两个相同的测量区域(两个相同的点)。此外,对于阴性对照来说,还形成了含有点样缓冲液但没有任何蛋白质成分的测量区域。

除了上述“样品点”,在各种情况下所述微阵列还包括“参考点”:在每个微阵列内,用Cy5(Amersham)标记的牛血清白蛋白荧光标记(Cy5-BSA, 标记率:每个BSA分子3个Cy5分子)固定在各224个测量区域中的一部分中。这些测量区域用于参比单个阵列内还有不同阵列之间(“参考点”)及发光强度的局部差异。在各种情况下将含尿素点样缓冲液中的0.5 nM浓度的Cy5-BSA施加到所述测量区域中。

在各种情况下相同阵列中的测量区域几何形状设置描绘于图1中并在表1中详述。

在完成制备测量区域阵列之后,通过填充上牛血清白蛋白(BSA)来封闭所述载体上空余的、未覆盖蛋白质的疏水表面区域,通过用含BSA的缓冲溶液温育所述表面30分钟,作为对使用的结合试剂和/或检测试剂“化学中性”,即不与之结合的元件。用水(18 M Ω ·cm)洗涤上面形成有测量区域的载体,最后在氮气流中干燥并存放于4°C下直到实施本发明的检测方法。

4. 实施本发明方法的阵列设计

为了进一步实施本发明的方法,在各种情况下将具有测量区域阵列的载体与上部部件连接以形成6个测量区域阵列设于其中的样品容器设置(各种情况下内部体积:15 μ l)。这种样品容器设置记载于国际申请WO 01/43875和WO 02/103331中,这里引入其全部内容作为本申请的一部分。

(根据本发明方法步骤(4)的)分析物检测步骤分两个子步骤进行,其中每个子步骤中检测每个测量区域阵列中的一种分析物。

4.1. 使用不添加竞争剂的结合试剂

在第一个子步骤中,用初级抗体作为结合试剂(“抗Akt”(#9272)在样品容器中温育测量区域阵列以检测总Akt(磷酸化合非磷酸化形式之间无区分),用“抗P-Akt (Ser473)”(#9271)检测磷酸化P-Akt (Ser473),用“抗P-Akt (Thr308)”(#9275)检测磷酸化P-Akt (Thr308)(所有抗体来自Cell Signaling Technologies, Beverly, USA),在各种情况下用测试缓冲液稀释到原溶液的500倍(对应于大约5 nM),室温下过夜。

在各种情况下，用 200 μl 测试缓冲液进行洗涤以去除未结合的结合试剂之后，在各种情况下将在第二个子步骤中的测量区域阵列用检测试剂温育，即荧光标记的 Alexa Fluor 647 抗兔 Fab 片段 (Molecular Probes; Eugene, USA)，同样用测试缓冲液稀释到原溶液的 500 倍，在暗处室温下六十分钟。然后在各种情况下将测量区域阵列再次用各 200 μl 的测试缓冲液洗涤以去除未结合的检测试剂。然后，将经过这些处理步骤的载体，其与上部件相连并以这种方式形成填充有缓冲液的样品容器，存放直到检测步骤，该检测步骤是通过在 ZeptoREADER™ 中对所得到的荧光信号进行激发和检测进行的（见下文）。

4.2. 使用添加有 Akt 作为竞争剂的结合试剂

相应地，在与分析物相同种类的竞争剂存在的情况下进行分析物检测，以特异性结合所使用的结合试剂以及，任选另外的检测试剂，同样分成两个子步骤添加到上面具有测量区域阵列的固体载体上：首先，在各种情况下用大约 20 倍过量的 Akt (5 $\mu\text{g/ml}$ 相当于 100 nM) 预先温育结合试剂溶液 (“抗 Akt”，“抗 P-Akt (Ser473)”或 “抗 P-Akt (Thr308)”，各种情况下大约为 5 nM)。这里分析物特异性抗体的所有抗原结合位点被相应的竞争剂所占据，结果不再有可用的结合试剂的特异性结合位点用于与测量区域中分析物分子的反应。然后在各种情况下将这样制备的含 Akt 的溶液以类似于 4.1 中的第一个子步骤的方式引入另一样品容器中，其中具有另一种与 4.1 中使用的测量区域阵列相同的测量区域阵列，并使其温育过夜，之后洗涤，之后添加检测试剂的子步骤和进一步的子步骤如 4.1 中所述。根据该 4.2 节的步骤对应于本发明方法的子步骤 (7a)。

4.3. 使用添加有样品基质样物质作为竞争剂的结合试剂

在类似于 4.1 和 4.2 的方式中，在存在另外添加到结合试剂中的物质情况下进行分析物检测，所述物质与存在于样品基质中的物质相同或尽可能相似并用作固定在测量区域中的样品基质成分的竞争剂以非特异性结合结合试剂。为此，在各种情况下将结合试剂溶液 (“抗 Akt”，“抗 P-Akt (Ser473)”或 “抗 P-Akt (Thr308)”，在各种情况下大约 5 nM) 与 0.1 mg/ml 的鼠血清进行预温育。然后在各种情况下将这样制备的含血清的溶液以类似于 4.1 中的第一个子步骤的方式引入另一样品容器中，其中具有另一种与 4.1 中使用的测量区域阵列相同的测量区域阵列，并使其温育过夜，之后洗涤，之后添加检测试剂的子步骤和进一步的子步骤如 4.1 中所述。根据该 4.3 节的步骤对应于本发明方法的子步骤 (7b)。

5. 激发和检测来自测量区域阵列的荧光信号

利用 ZeptoREADER™ (Zeptosens AG, CH-4108 Witterswil, 瑞士) 顺序自动测量

来自测量区域不同阵列的荧光信号。所述光学系统更详细地记载于国际专利申请 PCT/EP 01/10012 中，这里引入其全文作为本申请的一部分。

6. 图像分析和参比

利用图像分析软件(ZeptoVIEW^{IM}, Pro 2.0 Release 2.0, Zeptosens AG, CH-4108 Witterswil)确定来自测量区域(点)的荧光信号。从而在其临近环境中确定每个点的平均信号强度和平均局部背景信号强度。通过从目标点的平均测得总信号强度中减去平均局部背景信号可确定每个点的背景校正的平均净信号强度。

在各种情况下利用 Cy5-BSA 参比点对所有点进行净信号强度的参比。为此，将“样品点”的净信号强度除以一排中两个最相邻“参比点”的平均信号强度，该信号强度外推到特定“样品点”的位置。所述参比方式弥补了每个测量阵列内以及不同阵列之间存在的激发光强度差异。

最后计算所述点副本(各种情况下两个相同的测量区域)的参比净信号强度平均值并描绘于相应的图像中作为“RFT”数据点(参比荧光强度)，其中表示的误差线条对应于特定的标准偏差。

7. 本发明方法的实施及结果

7.1. 确定总 Akt 含量

7.1.1. 用于检测 Akt 的校正曲线

a) 使用不添加竞争剂的结合试剂

在各种情况下，在相同的测量区域阵列中设置两个测量区域片段用于形成激酶 Akt 的校正曲线(参见图 1)：

片段 1: 阵列的行 I 和 II，具有项目编号 1-9 的测量区域，其中施加了在点样缓冲液中的不同浓度(在 0 ng/ml 到 3000 ng/ml 之间)的纯化 Akt，其另外含有 0.1 mg/ml 的 BSA，

片段 2: 阵列的行 III 和 IV，具有项目编号 13-21 的测量区域，其中施加了在点样缓冲液中的不同浓度(在 0 ng/ml 到 3000 ng/ml 之间)的纯化 Akt，其另外含有 0.1 mg/ml 的鼠血清。

将抗 Akt (5 nM) 溶液添加到包含第一测量区域阵列的第一样品容器中。进一步方法的子步骤之前已记载于 4.1 中。图 2 中描绘了测量区域片段 1 (由加入点样缓冲液中的含有不同浓度 Akt 和 0.1 mg/ml BSA 的溶液生成)(表示为实心方块)和测量区域片段 2 的校正曲线(由加入点样缓冲液中的含有不同浓度 Akt 和 0.1 mg/ml 鼠血清的溶液生成)(表示为实心圆)。

在 30 ng/ml 以上的 Akt 浓度下，同时固定有 BSA 的和同时固定有鼠血清的测

量区域的校正曲线是相同的；在 30 ng/ml 以下的 Akt 浓度下，同时固定有鼠血清的测量区域的校正曲线比同时固定有 BSA 的信号值高。信号差异被认为应归因于结合试剂与固定的鼠血清成分的非特异性结合。当向固定溶液中添加甚至更高浓度的鼠血清时，仅添加了 BSA 来形成固定溶液的测量区域的信号差异甚至更显著。

为了确定从鼠心脏组织制备的样品中未知的 Akt 浓度，可以利用由仅添加了 BSA 的固定溶液生成的校正曲线，因为所述曲线可以在甚至很低的 Akt 浓度下，低于 30 ng/ml，测定浓度。

b) 使用添加有 Akt 作为竞争剂的结合试剂

为了测试非特异性结合于校正曲线的信号比例，其中所述校正曲线是利用不同样品基质的固定溶液建立的，将作为结合试剂的“抗 Akt”抗体与过量 Akt (5 µg/ml 相当于 100 nM 浓度) 的溶液混合物引入另一阵列上的第二样品容器中，所述阵列与最初研究的阵列的测量区域设置相同，并与所述测量区域温育过夜，如 4.2 中所述。在这些条件下，预计由抗体特异性结合到固定 Akt 上形成的信号比例将完全消失，而由非特异性结合形成的信号比例仍然存在。

如预期那样，在用于确定内源性 Akt 的相关浓度范围内，即 100 ng/ml 以下 (图 2 中表示为空心标记)，在测量准确度内观察到完全被抑制的信号 (由特异性结合引起的)。根据预期的与样品基质成分的非特异性结合的不同比例，固定溶液中含有鼠血清的测量区域信号 (表示为空心圆) 高于固定溶液中除限定的 Akt 浓度之外仅含有 BSA 的测量区域信号 (表示为空心方块)。观察到的具有最高 Akt 浓度 (固定溶液中 1000 ng/ml 到 3000 ng/ml) 的信号增幅归因于这些条件下溶液中竞争剂浓度明显不足以完全防止结合试剂与固定 Akt 的特异性结合。

c) 使用添加有样品基质样物质的结合试剂作为竞争剂

为了查看由结合试剂结合样品基质成分形成的非特异性结合的比例，将总蛋白质浓度为 0.1 mg/ml 的鼠血清加入抗体溶液中。然后根据 4.3 节的步骤，将该溶液引入具有第三阵列的第三样品容器，所述阵列同样与上述第一和第二阵列测量区域设置相同。在这些条件下，预计由特异性结合于固定 Akt 所生成的信号比例会保持不变，同时预计由非特异性结合于样品基质所生成的信号比例会大部分消失。

图 3 同样用实心标记描绘了 7.1.1.a) 节中所述的校正曲线，其中采用没有添加结合试剂竞争剂的第一阵列生成。通过加入作为结合试剂的抗体的含鼠血清溶液 (由空心方块表示)，从这些校正曲线中不能测得利用第三阵列获得的信号偏差。

这表明，在存在“抗总 Akt”抗体的情况下，生成的校正曲线高精度地对应于特异性结合事件，而与样品基质非特异性结合仅在很少的程度上发生。

7.1.2. 由鼠心脏组织制备的样品中总 Akt 含量测定

a) 使用不添加竞争剂的结合试剂

在标有测量区域项目编号25到31的测量区域片段上进行由鼠心脏组织中制备的生物来源和复杂组成样品中的总 Akt 含量检测。用于形成所述测量区域的固定溶液来自相同的原溶液,并通过稀释(参见第3节)到不同的总蛋白质浓度(0.025 mg/ml 到 0.5 mg/ml 之间)进行调节。

在测量区域项目标号为37到43的测量区域片段中施加与鼠心脏组织裂解物原溶液具有相同系列稀释度的固定样品,只不过在各种情况下将浓度为 1000 ng/ml 的纯化 Akt 加入该固定样品中。通过比较待测荧光信号与具有相同总蛋白质浓度(0.1 mg/ml)的校正曲线(利用具有同时固定有 BSA 的测量区域建立),利用该片段测得的信号将用于控制是否再次建立所采用的这种高 Akt 浓度(其大大高于预期的天然内源性 Akt 含量)。

结合本发明方法的一部分,如 7.1.1a 所述,通过向含有第一测量区域阵列的第一样品容器中加入“抗 Akt”(5 nM)的方式来进行测量。进一步的方法子步骤已在前面记载于 4.1 中。

图 4 描绘了所述结果(参比荧光强度)。来自测量区域的荧光信号表示成总蛋白质浓度的函数(图 4, 上横坐标),其中所述测量区域施加有由鼠心脏组织制备的固定溶液,具有共同固定的 BSA(蛋白质浓度: 0.1 mg/ml)的校正测量参比荧光信号值表示成用于这些测量区域的固定溶液 Akt 浓度的函数(图 4, 下横坐标)。

来自未添加 Akt 的测量区域(即,具有天然存在于固定样品中的内源性 Akt)的信号最初如所预计那样随蛋白质浓度的增加而增加,并达到最大值,从 0.2 mg/ml 的蛋白质浓度增加到当进一步增加蛋白质浓度时不会观察到近一步的信号增加,类似于饱和效应。

来自含 1000 ng/ml 添加的 Akt(即,具有天然存在于固定样品中的内源性 Akt 和另外的 1000 ng/ml 的纯化 Akt)的测量区域的信号相应地达到非常高得值。通过将所述信号值与同时生成的具有可比较的总蛋白质浓度的校正曲线相比较(0.1 mg/ml, 在 0.1 mg/ml 的蛋白质浓度时表示为虚线,并表示为在校正曲线方向上从该线条与来自含 1000 ng/ml 添加的 Akt 的测量区域信号的测量曲线的交点的虚线),可以回收加入样品的 1000 ng/ml 浓度的 Akt 并确定为 (840 ± 70) ng/ml。所达到的 84% 的回收率或 8% 的精度在通常允许的限度范围内,即在测定中 80%-120% 回收率或高于 20% 的精度。因而该实施例表明,可以以良好的测试准确度和精度进行分析物的测定。所述高回收率值同样证实了在固定溶液(作为蛋白质基质)

中添加有 0.1 mg/ml BSA 的测量区域上生成的测量曲线很适合于校正由含鼠心脏组织裂解物的溶液制备的点样数据。

针对由鼠心脏组织制备的样品测定(20 ± 2) ng/ml 内源性 Akt 含量, 其中通过与校正曲线(在 0.1 mg/ml 的蛋白质浓度时表示为虚线, 并表示为在校正曲线方向上从该线条与来自仅含内源性 Akt 的测量区域信号的测量曲线的交点的虚线)相比较蛋白质含量为 0.1 mg/ml。

b) 使用添加有 Akt 作为竞争剂的结合试剂

为了确定由于非特异性与测量曲线结合的信号比例, 其中所述校正曲线来自利用基于鼠心脏组织作为样品基质的固定溶液的测量区域, 将作为结合试剂的“抗 Akt”抗体与过量 Akt (5 μ g/ml 相当于 100 nM) 的溶液混合物引入另一阵列上的第二样品容器中, 所述阵列与最初研究的阵列的测量区域设置相同, 并与所述测量区域温育过夜, 如 4.2 中所述。在这些条件下, 预计由抗体特异性结合到固定 Akt 上形成的信号比例将完全消失, 而由非特异性结合形成的信号比例仍然存在。

图 5 描绘了溶液中具有鼠血清的竞争性试验的结果, 以及相应的在结合试剂溶液中不存在竞争剂的测量结果, 如上面 7.1.2a) 节所述。实心标记表示在各种情况下不存在竞争剂的结果(在第一阵列上测得), 空心标记表示在竞争剂存在下测得的信号(在第二阵列上测得)。来自测量区域的荧光信号被绘制成固定溶液的蛋白质浓度的函数(图 5, 上横坐标), 其中测量区域的固定溶液由鼠心脏组织裂解物制备(按照图 1, 既用于确定没有另外添加 Akt 时天然存在的内源性 Akt, 其测量区域的项目编号为 25 到 31, 也用于确定另外添加有 1000 ng/ml 的纯化 Akt, 其测量区域的项目编号为 37 到 43)。用于检测 Akt(固定溶液中具有 0.1 mg/ml 的 BSA)的校正曲线, 如 7.1.1 所述, 绘制成 Akt 浓度的函数(图 5, 下横坐标)。

在竞争剂存在的情况下, 用于确定内源性 Akt 的来自测量区域的信号显著降低。在存在和不存在竞争剂的情况下测量曲线之间的差异表示了由特异性结合引起的信号比例。

在固定溶液另外含有过量 Akt (1000 ng/ml) 的测量区域, 观察到参比荧光信号甚至更为显著的降低。在溶液中存在 100 nM Akt 作为竞争剂时, 两个测量区域片段(用于确定内源性 Akt 和在固定溶液中有 1000 ng/ml Akt 用于对照测量)生成的测量曲线非常一致。升高到 0.3 mg/ml 并保持恒定的蛋白质浓度的剩余信号(空心标记)对应于由于非特异性结合(与样品基质的蛋白质)引起的信号增加, 这种增加随着蛋白质表面浓度的增加而增加, 直到测量区域的表面完全被覆盖。

图 6 表示通过比较溶液中存在和不存在竞争剂时的数据, 确定在 0.1 mg/ml 的

蛋白质浓度下由于特异性结合引起的信号比例（图 6a），以及通过比较由特异性结合（“SB”）形成的信号比例与校正曲线，确定内源性 Akt 的含量（图 6b）。在测量精度范围内，由非特异性结合（“NSB”）引起的信号比例（0.20 RFI）等与来自仅含内源性 Akt（0.373 RFI）的测量区域和含另外添加的 1000 ng/ml 纯化 Akt（大约 20 RFI）的信号。通过比较总信号与非特异性引起信号和校正曲线（图 6b）之间的差异，可确定内源性 Akt 的含量为 (8.8 ± 1.3) ng/ml。与 7.1.2.a) 节中测定的 Akt 值相比较，其中由非特异性结合产生的信号比例不显著，表明其中暂时测定的大约 56% 的 Akt 含量必然为非特异性结合所贡献。

c) 使用添加有类似于样品基质的物质作为竞争剂的结合试剂

为了查看由结合试剂结合样品基质成分形成的非特异性结合的部分，将总蛋白质浓度为 0.1 mg/ml 的鼠血清加入抗体溶液中。然后根据 4.3 节的步骤，将该溶液引入具有第三阵列的第三样品容器，所述阵列同样与上述第一和第二阵列测量区域设置相同。在这些条件下，预计由特异性结合于固定 Akt 所生成的信号比例会保持不变，同时预计由非特异性结合于样品基质所生成的信号比例会大部分消失。

图 7 描绘了溶液中具有鼠血清的竞争性试验的结果，以及相应的在结合试剂溶液中不存在竞争剂的测量结果，如上面 7.1.2.a) 节所述。实心标记表示在各种情况下不存在竞争剂的结果（在第一阵列上测得），空心标记表示在竞争剂存在下测得的信号（在第二阵列上测得）。来自测量区域的荧光信号被绘制成固定溶液的蛋白质浓度的函数（图 7，上横坐标），其中测量区域的固定溶液由鼠心脏组织裂解物制备（按照图 1，既用于确定没有另外添加 Akt 时天然存在的内源性 Akt，其测量区域的项目编号为 25 到 31，也用于确定另外添加有 1000 ng/ml 的纯化 Akt，其测量区域的项目编号为 37 到 43）。用于检测 Akt（固定溶液中具有 0.1 mg/ml 的 BSA）的校正曲线，如 7.1.1 所述，绘制成 Akt 浓度的函数（图 7，下横坐标）。

溶液中存在鼠血清作为非特异性结合的竞争剂并不会引起所述测量曲线有任何明显的改变；在测量精度范围内，在鼠血清存在或不存在时测得的参比荧光信号在各种情况下是相同的。

这表明在具有“抗总 Akt”抗体的情况下，没有明显的与样品基质的非特异性结合。

7.2. 测定 P-Akt (Ser473) 含量

7.2.1. 用于测定 P-Akt (Ser473) 的校正曲线

a) 使用不添加竞争剂的结合试剂

采用与上述测定 Akt 中相同的测量区域片段来建立用于测定磷酸化形式的

P-Akt (Ser473)的校正曲线。

片段 1: 阵列的行 I 和 II, 具有项目编号 1-9 的测量区域, 其中施加了在点样缓冲液中的不同浓度 (在 0 ng/ml 到 3000 ng/ml 之间) 的纯化 Akt, 其另外含有 0.1 mg/ml 的 BSA,

片段 2: 阵列的行 III 和 IV, 具有项目编号 13-21 的测量区域, 其中施加了在点样缓冲液中的不同浓度 (在 0 ng/ml 到 3000 ng/ml 之间) 的纯化 Akt, 其另外含有 0.1 mg/ml 的鼠血清。

所述纯化 Akt 假设为完全磷酸化的, 即在 Ser473 和 Thr308 处磷酸化。

将抗 P-Akt (Ser473) (5 nM) 溶液添加到包含第四测量区域阵列的第四样品容器中。其它的方法步骤之前已记载于 4.1 中。图 8 中描绘了测量区域片段 1 (由加入点样缓冲液中的含有不同浓度 Akt 和 0.1 mg/ml BSA 的溶液生成) 和测量区域片段 2 的校正曲线 (由加入点样缓冲液中的含有不同浓度 Akt 和 0.1 mg/ml 鼠血清的溶液生成) (实心标记)。

在 10 ng/ml 以上的 Akt 浓度下, 同时固定有 BSA 的和同时固定有鼠血清的测量区域的校正曲线是相同的; 在 10 ng/ml 以下的 Akt 浓度下, 同时固定有鼠血清的测量区域的校正曲线比同时固定有 BSA 的信号值高。信号差异被认为应归因于结合试剂与固定的鼠血清成分的非特异性结合。当向固定溶液中添加甚至更高浓度的鼠血清时, 仅添加了 BSA 来形成固定溶液的测量区域的信号差异甚至更显著。

为了确定从鼠心脏组织制备的样品中未知的 P-Akt (Ser473) 浓度, 可以利用由仅添加了 BSA 的固定溶液生成的校正曲线, 因为所述曲线可以在甚至很低的 Akt 浓度下, 低于 10 ng/ml, 测定浓度。

b) 使用添加有 Akt 作为竞争剂的结合试剂

为了测试非特异性结合于校正曲线的信号比例, 其中所述校正曲线是利用不同样品基质的固定溶液建立的, 将作为结合试剂的“抗 P-Akt (Ser473)”抗体与过量 Akt (5 μ g/ml 相当于 100 nM) 的溶液混合物引入另一阵列上的第五样品容器中, 所述阵列与前面研究的阵列的测量区域设置相同, 并与所述测量区域温育过夜, 如 4.2 中所述。在这些条件下, 预计由抗体特异性结合到固定 P-Akt (Ser473) 上形成的信号比例将完全消失, 而非特异性结合形成的信号比例仍然存在。

如预期那样, 在用于确定内源性 P-Akt (Ser473) 的相关浓度范围内, 即 100 ng/ml 以下 (图 8 中表示为空心标记), 在测量准确度内观察到完全被抑制的信号 (由特异性结合引起的)。根据预期的与样品基质成分的非特异性结合的不同比例, 固定溶液中含有鼠血清的测量区域信号高于固定溶液中除限定的 Akt 浓度之外仅

含有BSA的测量区域信号。

观察到的具有最高P-Akt(Ser473)浓度(固定溶液中1000 ng/ml到3000 ng/ml)的信号增幅归因于这些条件下溶液中竞争剂浓度明显不足以完全防止结合试剂与固定P-Akt(Ser473)的特异性结合。

c) 使用添加有样品基质样的物质作为竞争剂的结合试剂

为了查看由结合试剂结合样品基质成分形成的非特异性结合的部分,将总蛋白质浓度为0.1 mg/ml的鼠血清加入抗体溶液中。然后根据4.3节的步骤,将该溶液引入具有第六阵列的第六样品容器,所述阵列同样与上述阵列的测量区域设置相同。在这些条件下,预计由特异性结合于固定P-Akt(Ser473)所生成的信号比例会保持不变,同时预计由非特异性结合于样品基质所生成的信号比例会大部分消失。

图9同样用实心标记描绘了7.2.1.a)节中所述的校正曲线,其中采用没有添加结合试剂竞争剂的第四阵列生成。通过加入作为结合试剂的抗体的含鼠血清溶液,从这些校正曲线中不能测得利用第六阵列获得的信号偏差。

这表明,在存在“抗P-Akt(Ser473)”抗体的情况下,生成的校正曲线高精确度地对应于特异性结合事件,而与样品基质非特异性结合仅在很少的程度上发生。

7.2.2. 由鼠心脏组织制备的样品中P-Akt(Ser473)含量测定

a) 使用不添加竞争剂的结合试剂

在标有测量区域项目编号25到31的测量区域片段上进行由鼠心脏组织中制备的生物来源和复杂组成样品中的P-Akt(Ser473)含量检测。用于形成所述测量区域的固定溶液来自相同的原溶液,并通过稀释(参见第3节)到不同的总蛋白质浓度(0.025 mg/ml到0.5 mg/ml之间)进行调节。

在测量区域项目标号为37到43的测量区域片段中施加与鼠心脏组织裂解物原溶液具有相同系列稀释度的固定样品,只不过在各种情况下将浓度为1000 ng/ml的纯化Akt加入该固定样品中。通过比较待测荧光信号与具有相同总蛋白质浓度(0.1 mg/ml)的P-Akt(Ser473)校正曲线(利用具有同时固定有BSA的测量区域建立),利用该片段测得的信号将用于控制是否再次建立所采用的对应于高“总Akt”浓度的高P-Akt(Ser473)含量(其大大高于预期的天然内源性Akt含量)。

结合本发明方法的一部分,如7.2.1a所述,通过向含有第四测量区域阵列的第四样品容器中加入“P-Akt(Ser473)”(5 nM)的方式来进行测量。进一步的方法子步骤已在前面记载于4.1中。

图10描绘了所述结果(参比荧光强度)。来自测量区域的荧光信号表示成总蛋白质浓度的函数(图10,上横坐标),其中所述测量区域施加有由鼠心脏组织

制备的固定溶液，具有共同固定的BSA（蛋白质浓度：0.1 mg/ml）的校正测量参比荧光信号值表示成用于这些测量区域的固定溶液P-Akt (Ser473)浓度的函数（图10，下横坐标）。

来自未添加Akt的测量区域（即，具有天然存在于固定样品中的内源性P-Akt (Ser473)）的P-Akt (Ser473)信号最初如所预计那样随蛋白质浓度的增加而增加，并达到最大值，从0.2 mg/ml的蛋白质浓度增加到当进一步增加蛋白质浓度时不会观察到进一步的信号增加，类似于饱和效应。

来自含1000 ng/ml添加的P-Akt (Ser473)（即，具有天然存在于固定样品中的内源性P-Akt (Ser473)和另外的1000 ng/ml的纯化P-Akt (Ser473)）的测量区域的信号相应地达到非常高得值。这需要用来生成校正曲线的纯化Akt完全磷酸化，即在Ser473和Thr308处磷酸化。通过将所述信号值与同时生成的具有可比较的总蛋白质浓度的校正曲线相比较（0.1 mg/ml，在0.1 mg/ml的蛋白质浓度时表示为虚线，并表示为在校正曲线方向上从该线条与来自含1000 ng/ml添加的P-Akt (Ser473)的测量区域信号的测量曲线的交点的虚线）（参见虚线），可以回收加入样品的1000 ng/ml浓度的P-Akt (Ser473)并测定为 (870 ± 100) ng/ml。达到92%的回收率。所述高回收率值同样证实了在固定溶液（作为蛋白质基质）中添加有0.1 mg/ml BSA的测量区域上生成的测量曲线很适合于校正由含鼠心脏组织裂解物的溶液制备的点样数据。

针对由鼠心脏组织制备的样品测定 (12 ± 2) ng/ml内源性P-Akt (Ser473)含量，其中通过与校正曲线（在0.1 mg/ml的蛋白质浓度时表示为虚线，并表示为在校正曲线方向上从该线条与来自仅含内源性P-Akt (Ser473)的测量区域信号的测量曲线的交点的虚线）相比较蛋白质含量为0.1 mg/ml。这需要用来生成校正曲线的纯化Akt完全磷酸化，即在Ser473和Thr308处磷酸化。如果所述纯化Akt的P-Akt (Ser473)比例小于100%，则由鼠心脏组织制备的样品中的测量值相应减小。

b) 使用添加有Akt作为竞争剂的结合试剂

为了确定由于非特异性于测量曲线结合的信号比例，其中所述校正曲线来自利用基于鼠心脏组织作为样品基质的固定溶液的测量区域，将作为结合试剂的“抗P-Akt (Ser473)”（5 nM）抗体与过量Akt（5 μ g/ml相当于100 nM）的溶液混合物引入另一阵列上的第五样品容器中，所述阵列与最初研究的阵列的测量区域设置相同，并与所述测量区域温育过夜，如4.2中所述。在这些条件下，预计由抗体特异性结合到固定P-Akt (Ser473)上形成的信号比例将完全消失，而非特异性结合形成的信号比例仍然存在。

图 11 描绘了竞争性试验的结果，以及相应的在结合试剂溶液中不存在竞争剂的测量结果，如上面 7.2.2.a) 节所述。实心标记表示在各种情况下不存在竞争剂的结果（在第四阵列上测得），空心标记表示在竞争剂存在下测得的信号（在第二阵列上测得）。来自测量区域的荧光信号被绘制成固定溶液的蛋白质浓度的函数（图 11，上横坐标），其中测量区域的固定溶液由鼠心脏组织裂解物制备（按照图 1，既用于确定没有另外添加 Akt 时天然存在的内源性 P-Akt (Ser473)，其测量区域的项目编号为 25 到 31，也用于确定另外添加有 1000 ng/ml 的纯化 Akt，其测量区域的项目编号为 37 到 43）。用于检测 P-Akt (Ser473)（固定溶液中具有 0.1 mg/ml 的 BSA）的校正曲线，如 7.2.1 所述，绘制成 P-Akt (Ser473) 浓度的函数（图 11，下横坐标）。

在竞争剂存在的情况下，用于确定内源性 p473-Akt 的来自测量区域的信号显著降低。在存在和不存在竞争剂的情况下测量曲线之间的差异表示了由特异性结合引起的信号比例。

在固定溶液另外含有过量 Akt (1000 ng/ml) 的测量区域，观察到参比荧光信号甚至更为显著的降低。在溶液中存在 100 nM Akt 作为竞争剂时，两个测量区域片段（用于确定内源性 Akt 和在固定溶液中有 1000 ng/ml Akt 用于对照测量）生成的测量曲线同样基本上一致。明显升高到 0.3 mg/ml 并且超过它后有微量增加的蛋白质浓度的剩余信号对应于由于非特异性结合（与样品基质的蛋白质）引起的信号增加，这种增加随着蛋白质表面浓度的增加而自然增加，直到测量区域的表面完全被覆盖。

图 12 表示通过比较溶液中存在和不存在竞争剂时的数据，确定在 0.1 mg/ml 的蛋白质浓度下由于特异性结合引起的信号比例（图 12a），以及通过比较由特异性结合（“SB”）形成的信号比例与校正曲线，确定内源性 Akt 的含量（图 12b）。在测量精度范围内，由非特异性结合（“NSB”）引起的信号比例（0.037RFI）等与来自仅含内源性 Akt (0.073 RFI) 的测量区域和含另外添加的 1000 ng/ml 纯化 Akt（大约 10 RFI）的信号。通过比较总信号与非特异性引起信号和校正曲线（图 12b）之间的差异，可确定内源性 P-Akt (Ser473) 的含量为 (5.3 ± 0.5) ng/ml。与 7.1.2.a) 节中测定的 Akt 值相比较，其中由非特异性结合产生的信号比例不显著，表明其中暂时测定的大约 57% 的 P-Akt (Ser473) 含量必然为非特异性结合所贡献。

c) 使用添加有类似于样品基质的物质作为竞争剂的结合试剂

为了查看由结合试剂结合样品基质成分形成的非特异性结合的比例，将总蛋白质浓度为 0.1 mg/ml 的鼠血清加入抗体溶液中。然后根据 4.3 节的步骤，将该溶液

引入具有第六阵列的第六样品容器，所述阵列同样与上述第一和第二阵列测量区域设置相同。在这些条件下，预计由特异性结合于固定 P-Akt (Ser473) 所生成的信号比例会保持不变，同时预计由非特异性结合于样品基质所生成的信号比例会大部分消失。

图 13 描绘了溶液中具有鼠血清的竞争性试验的结果，以及相应的在结合试剂溶液中不存在竞争剂的测量结果，如上面 7.2.2.a) 节所述。实心标记表示在各种情况下不存在竞争剂的结果（在第四阵列上测得），空心标记表示在竞争剂存在下测得的信号（在第六阵列上测得）。来自测量区域的荧光信号被绘制成固定溶液的蛋白质浓度的函数（图 13，上横坐标），其中测量区域的固定溶液由鼠心脏组织裂解物制备（按照图 1，既用于确定没有另外添加 Akt 时天然存在的内源性 P-Akt (Ser473)，其测量区域的项目编号为 25 到 31，也用于确定另外添加有 1000 ng/ml 的纯化 Akt，其测量区域的项目编号为 37 到 43）。用于检测 P-Akt (Ser473)（固定溶液中具有 0.1 mg/ml 的 BSA）的校正曲线，如 7.2.1.a) 所述，绘制成 P-Akt (Ser473) 浓度的函数（图 13，下横坐标）。

溶液中存在鼠血清作为非特异性结合的竞争剂并不会引起所述测量曲线有任何明显的改变；在测量准确度范围内，在鼠血清存在或不存在时测得的参比荧光信号在各种情况下是相同的。

这表明在具有“抗 P-Akt (Ser473)”抗体的情况下，没有明显的与样品基质的非特异性结合。

7.3. 测定 P-Akt (Thr308)含量

7.3.1. 用于测定 P-Akt (Thr308)的校正曲线

a) 使用不添加竞争剂的结合试剂

采用与上述测定 Akt 和 P-Akt (Ser473) 中相同的测量区域片段来建立用于测定磷酸化形式的 P-Akt (Thr308) 的校正曲线。

片段 1: 阵列的行 I 和 II，具有项目编号 1-9 的测量区域，其中施加了在不同浓度（在 0 ng/ml 到 3000 ng/ml 之间）的纯化 Akt，其另外含有 0.1 mg/ml 的 BSA，

片段 2: 阵列的行 III 和 IV，具有项目编号 13-21 的测量区域，其中施加了在不同浓度（在 0 ng/ml 到 3000 ng/ml 之间）的纯化 Akt，其另外含有 0.1 mg/ml 的鼠血清。所述纯化 Akt 假设为完全磷酸化的，即在 Ser473 和 Thr308 处磷酸化。

将抗 P-Akt (Thr308) (5 nM) 溶液添加到包含第七测量区域阵列的第七样品容

器中。其它的方法步骤之前已记载于4.1中。图14中描绘了测量区域片段1(由加入点样缓冲液中的含有不同浓度Akt和0.1 mg/ml BSA的溶液生成)和测量区域片段2的校正曲线(由加入点样缓冲液中的含有不同浓度Akt和0.1 mg/ml 鼠血清的溶液生成)(实心标记)。

在100 ng/ml以上的Akt浓度下,同时固定有BSA的和同时固定有鼠血清的测量区域的校正曲线是相同的;在100 ng/ml以下的Akt浓度下,同时固定有鼠血清的测量区域的校正曲线比同时固定有BSA的信号值高;信号差异被认为应归因于结合试剂与固定的鼠血清成分的非特异性结合。然而,与针对Akt和P-Akt(Ser473)建立校正曲线时测得的荧光信号相比,从所述两种测量区域测得的信号值相对较低。

为了确定从鼠心脏组织制备的样品中未知的P-Akt(Thr308)浓度,可以利用由仅添加了BSA的固定溶液生成的校正曲线。

b) 使用添加有Akt作为竞争剂的结合试剂

为了测试非特异性结合于校正曲线的信号比例,其中所述校正曲线是利用不同样品基质的固定溶液建立的,将作为结合试剂的“抗P-Akt(Thr308)”抗体与过量Akt(5 µg/ml相当于100 nM)的溶液混合物引入另一阵列上的第八样品容器中,所述阵列与前面研究的阵列的测量区域设置相同,并与所述测量区域温育过夜,如4.2中所述。在这些条件下,预计由抗体特异性结合到固定P-Akt(Thr308)上形成的信号比例将完全消失,而非特异性结合形成的信号比例仍然存在。

仅在高浓度(高于30 ng/ml)的固定溶液中,测定到了信号下降(图14中为空心标记),其中来自固定溶液中含鼠血清的测量区域的测量信号高于来自固定溶液中除了限定的Akt浓度之外仅含BSA的测量区域的信号。只有在浓度范围高于大约30 ng/ml时,由于结合实际溶液中存在作为竞争剂的P-Akt(Thr308),信号下降程度超过了实验引起的信号变化。

这样可以推断,抗P-Akt(Thr308)抗体既非特异性地结合于具有同时固定的BSA的测量区域,并且在相当程度上也结合于具有同时固定的血清成分的测量区域。

c) 使用添加有样品基质样的物质作为竞争剂的结合试剂

为了查看由结合试剂结合样品基质成分形成的非特异性结合于荧光信号的比例,将总蛋白质浓度为0.1 mg/ml的鼠血清加入抗体溶液中。然后根据4.3节的步骤,将该溶液引入具有第九阵列的第九样品容器,所述阵列同样与上述阵列的测量区域设置相同。在这些条件下,预计由特异性结合于固定P-Akt(Thr308)所生成

的信号比例会保持不变，同时预计由非特异性结合于样品基质所生成的信号比例会大部分消失。

图 15 同样用实心标记描绘了 7.3.1.a) 节中所述的校正曲线，其中采用没有添加结合试剂竞争剂的第七阵列生成。通过加入作为结合试剂的抗体的含鼠血清溶液，从这些校正曲线中不能测得利用第九阵列获得的信号偏差。仅在高于 30 ng/ml 的浓度下发现固定溶液中明显依赖于假定的 P-Akt (Thr308) 浓度。这与在低浓度下测得的荧光信号可有利于非特异性结合的事实一致。

7.3.2. 由鼠心脏组织制备的样品中 P-Akt (Thr308) 含量测定

a) 使用不添加竞争剂的结合试剂

在标有测量区域项目编号 25 到 31 的测量区域片段上进行由鼠心脏组织中制备的生物来源和复杂组成样品中的 P-Akt (Thr308) 含量检测。用于形成所述测量区域的固定溶液来自相同的原溶液，并通过稀释（参见第 3 节）到不同的总蛋白质浓度（0.025 mg/ml 到 0.5 mg/ml 之间）进行调节。

在测量区域项目标号为 37 到 43 的测量区域片段中施加与鼠心脏组织裂解物原溶液具有相同系列稀释度的固定样品，只不过在各种情况下将浓度为 1000 ng/ml 的纯化 Akt 加入该固定样品中。通过比较待测荧光信号与具有相同总蛋白质浓度（0.1 mg/ml）的 P-Akt (Thr308) 校正曲线（利用具有同时固定有 BSA 的测量区域建立），利用该片段测得的信号将用于控制是否再次建立所采用的对应于高“总 Akt”浓度的高 P-Akt (Thr308) 含量（其大大高于预期的天然内源性 Akt 含量）。

结合本发明方法的一部分，如 7.3.1.a 所述，通过向含有第七测量区域阵列的第七样品容器中加入“抗 P-Akt (Thr308)”（5 nM）的方式进行测量。进一步的方法步骤已在前面记载于 4.1 中。

图 16 描绘了所述结果（参比荧光强度）。来自测量区域的荧光信号表示成总蛋白质浓度的函数（图 16，上横坐标），其中所述测量区域施加有由鼠心脏组织制备的固定溶液，具有共同固定的 BSA（蛋白质浓度：0.1 mg/ml）的校正测量参比荧光信号值表示成用于这些测量区域的固定溶液的假定 P-Akt (Thr308) 浓度的函数（图 16，下横坐标）。

来自未添加 Akt 的测量区域（即，具有天然存在于固定样品中的内源性 P-Akt (Thr308)）的 P-Akt (Thr308) 信号随蛋白质浓度的增加而增加到 0.4 mg/ml，并达到最大值，此时在 0.5 mg/ml 的蛋白质浓度下基本上不会改变。

通过与校正曲线相比较（在 0.1 mg/ml 的蛋白质浓度时表示为虚线，并表示为在校正曲线方向上从该线条与来自仅含内源性 P-Akt (Thr308) 的测量区域信号的测

量曲线的交点的虚线)，可测定（暂时地）从鼠心脏组织制备的样品在0.1mg/ml 蛋白含量时内源性 P-Akt (Thr308)的含量为(130±15) ng/ml。然而，该值必须从一开始就视为不现实的，因为在相同条件下（不考虑非特异性结合效应），之前测定的 20 ng/ml 浓度的“总 Akt”具有相同的总蛋白质浓度。测得的曲线与来自测量区域的信号相比较（在 0.1 mg/ml 的蛋白质浓度时表示为虚线，并表示为在校正曲线方向上从该线条与来自含有 1000 ng/ml 添加的 Akt 的测量区域信号的测量曲线的交点的虚线）测得了 (510±10) ng/ml 的回收率值，其中该测量区域的固定溶液中加入 1000 ng/ml 的纯化 Akt。

b) 使用添加有 Akt 作为竞争剂的结合试剂

为了确定由于非特异性于测量曲线结合的信号比例，其中所述校正曲线来自利用基于鼠心脏组织作为样品基质的固定溶液的测量区域，将作为结合试剂的“抗 P-Akt (Thr308)” (5 nM) 抗体与过量 Akt (5 µg/ml 相当于 100 nM) 的溶液混合物引入另一阵列上的第八样品容器中，所述阵列与最初研究的阵列的测量区域设置相同，并与所述测量区域温育过夜，如 4.3 中所述。在这些条件下，预计由抗体特异性结合到固定 P-Akt (Thr308) 上形成的信号比例将完全消失，而由非特异性结合形成的信号比例仍然存在。

图 17 描绘了竞争性试验的结果，以及相应的在结合试剂溶液中不存在竞争剂的测量结果，如上面 7.3.2.a) 节所述。实心标记表示在各种情况下不存在竞争剂的结果（在第一阵列上测得），空心标记表示在竞争剂存在下测得的信号。来自测量区域的荧光信号被绘制成固定溶液的蛋白质浓度的函数（图 15，上横坐标），其中测量区域的固定溶液由鼠心脏组织裂解物制备（按照图 1，既用于确定没有另外添加 Akt 时天然存在的内源性 P-Akt (Thr308)，其测量区域的项目编号为 25 到 31，也用于确定另外添加有 1000 ng/ml 的纯化 Akt，其测量区域的项目编号为 37 到 43）。用于检测 P-Akt (Thr308)（固定溶液中具有 0.1 mg/ml 的 BSA）的校正曲线，如 7.3.1 所述，绘制成 P-Akt (Thr308) 浓度的函数（图 17，下横坐标）。

在竞争剂存在的情况下，用于确定内源性 P-Akt (Thr308) 的来自测量区域的信号无论怎样也没有表现出降低。在测量准确度范围内，代表由特异性结合引起的信号比例的存在和不存在竞争剂的情况下测量曲线之间的差异为零。

对于固定溶液另外含有过量 Akt (1000 ng/ml) 的测量区域而言，在参比荧光信号中观察到了较微弱的降低，尤其是在低蛋白质浓度范围内。

图 18 表示通过比较溶液中存在和不存在竞争剂时的数据，确定在 0.1 mg/ml 的蛋白质浓度下由于特异性结合引起的信号比例。测定由鼠心脏组织裂解物形成

的测量区域,无竞争剂时的测量信号为 0.068 RFI,具有 100 nM 竞争剂时的测量信号为 0.073 RFI,其中预计存在最多程度的内源性 P-Akt (Thr308)。这两个值之间的差异大致对应于实验引起的信号变化。这证实了在该条件下没有测得由特异性结合引起的信号,从而可以推断 P-Akt (Thr308)含量为零。

c) 使用添加有类似于样品基质的物质作为竞争剂的结合试剂

为了查看由结合试剂结合样品基质成分形成的非特异性结合的比例,将总蛋白质浓度为 0.1 mg/ml 的鼠血清加入抗体溶液中。然后根据 4.3 节的步骤,将该溶液引入具有第九阵列的第九样品容器,所述阵列同样与上述阵列测量区域设置相同。在这些条件下,预计由特异性结合于固定 P-Akt (Thr308)所生成的信号比例会保持不变,同时预计由非特异性结合于样品基质所生成的信号比例会大部分消失。

图 19 描绘了溶液中具有鼠血清的竞争性试验的结果,以及相应的在结合试剂溶液中不存在竞争剂的测量结果,如上面 7.3.2.a) 节所述。实心标记表示在各种情况下不存在竞争剂的结果(在第七阵列上测得),空心标记表示在竞争剂存在下测得的信号。来自测量区域的荧光信号被绘制成固定溶液的蛋白质浓度的函数(图 19,上横坐标),其中测量区域的固定溶液由鼠心脏组织裂解物制备(按照图 1,既用于确定没有另外添加 Akt 时天然存在的内源性 P-Akt (Thr308),其测量区域的项目编号为 25 到 31,也用于确定另外添加有 1000 ng/ml 的纯化 Akt)。用于检测 P-Akt (Thr308)(固定溶液中具有 0.1 mg/ml 的 BSA)的校正曲线,如 7.3.1.a) 所述,绘制成 P-Akt (Thr308)浓度的函数(图 19,下横坐标)。

溶液中存在鼠血清作为非特异性结合的竞争剂导致荧光信号具有可测得的下降,再次证实了非特异性结合的来源。

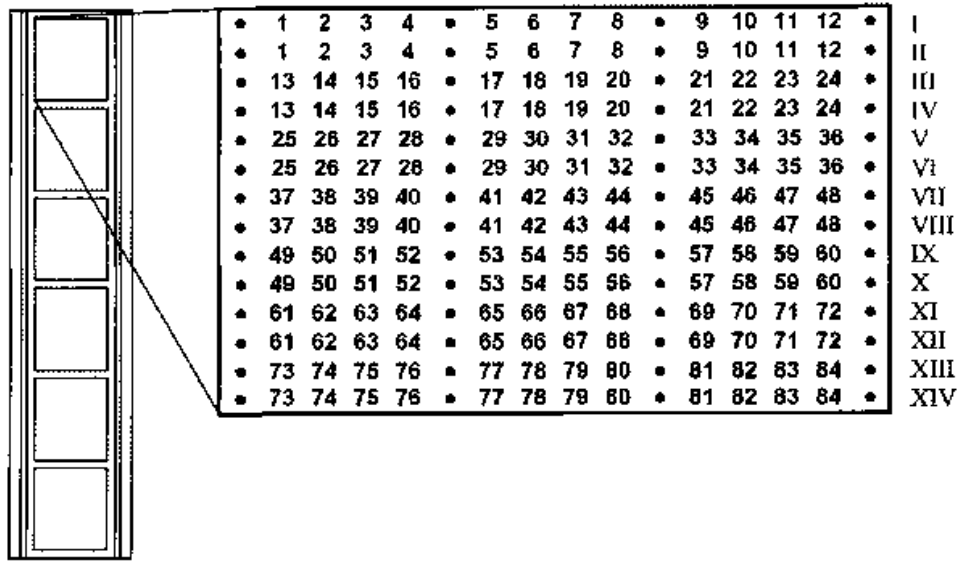


图 1

表 1

测量区域 内容附图标记	施加到不连续测量区域的溶液
1-9	点样缓冲液中的纯化Akt (0ng/ml, 1ng/ml, 3ng/ml, 10ng/ml, 30ng/ml, 100ng/ml, 300 ng/ml, 1000ng/ml, 3000ng/ml), 具有0.1mg/ml BSA
10-12	点样缓冲液
13-21	点样缓冲液中的纯化Akt, (0ng/ml, 1ng/ml, 3ng/ml, 10ng/ml, 30ng/ml, 100ng/ml, 300ng/ml, 1000ng/ml, 3000ng/ml), 具有0.1mg/ml鼠血清
22-24	点样缓冲液
25-31	点样缓冲液中具有不同总蛋白含量(0.025mg/ml, 0.050mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.3mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml)的鼠心脏组织裂解物溶液
32-36	点样缓冲液
37-43	点样缓冲液中具有不同总蛋白含量(0.025mg/ml, 0.050mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.3mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml)的鼠心脏组织裂解物溶液, 在每种情况下另外含有1000ng/ml的纯化Akt

44 - 48	点样缓冲液
49 - 55	在点样缓冲液中具有不同总蛋白含量(0.025mg/ml, 0.050mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.3mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml)的不含Akt鼠血清溶液
56 - 60	点样缓冲液
61 - 67	点样缓冲液中鼠血清的稀释系列, 具有另外加入的纯化Akt(总蛋白质浓度, Akt含量: 0.025mg/ml, 50ng/ml; 0.050mg/ml, 100ng/ml; 0.1mg/ml, 200ng/ml; 0.2mg/ml, 400ng/ml; 0.3mg/ml, 600ng/ml; 0.4mg/ml, 800ng/ml; 0.5mg/ml, 1000ng/ml)。
68 - 72	点样缓冲液
73 - 81	点样缓冲液中的鼠心脏组织裂解物溶液(0.3mg/ml), 具有不同浓度的纯化Akt(0ng/ml; 0.91ng/ml; 2.74ng/ml; 8.2ng/ml; 27.2ng/ml; 74.0ng/ml; 222ng/ml; 667ng/ml; 2000ng/ml)。
82 - 84	点样缓冲液
•	点样缓冲液中的Cy5-BSA(0.5nM)

表 1

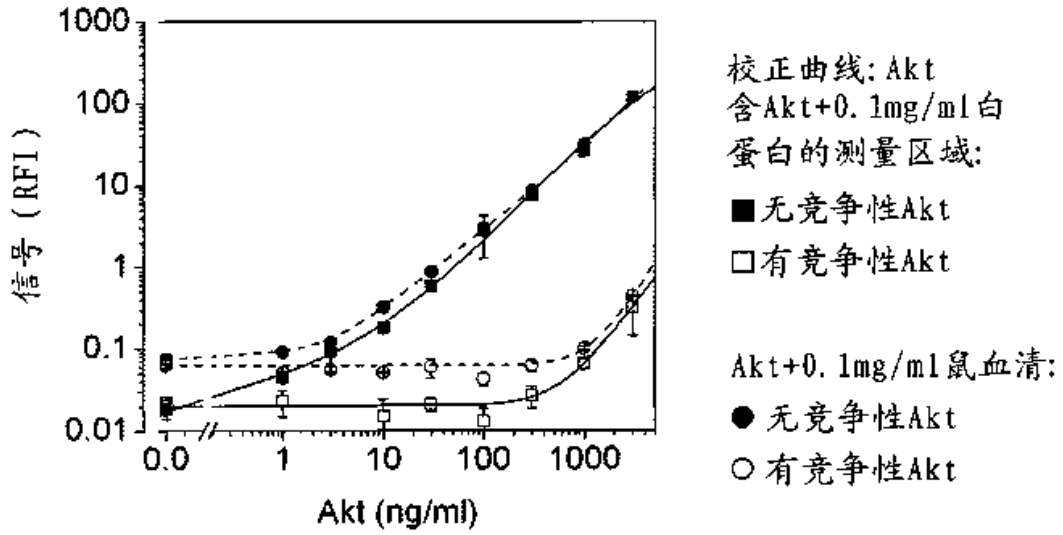


图 2

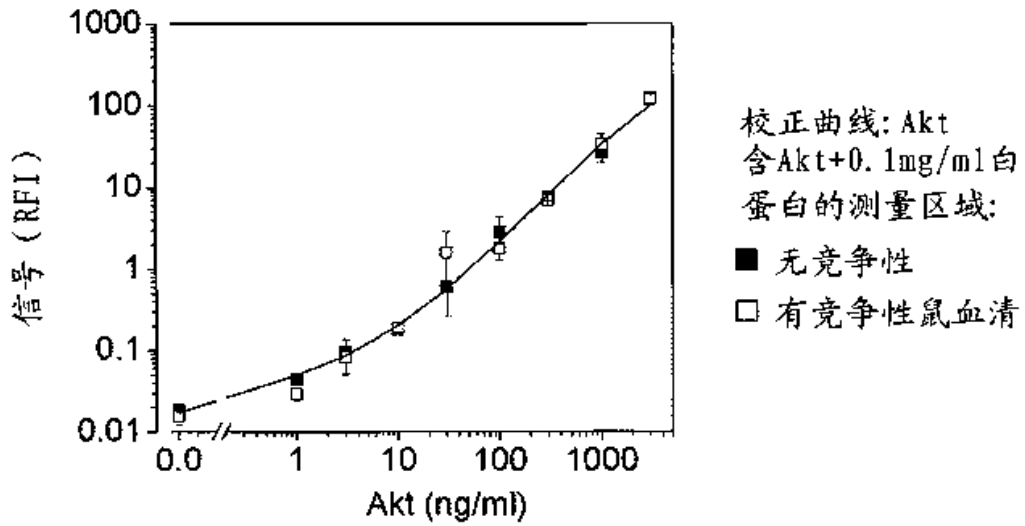


图 3

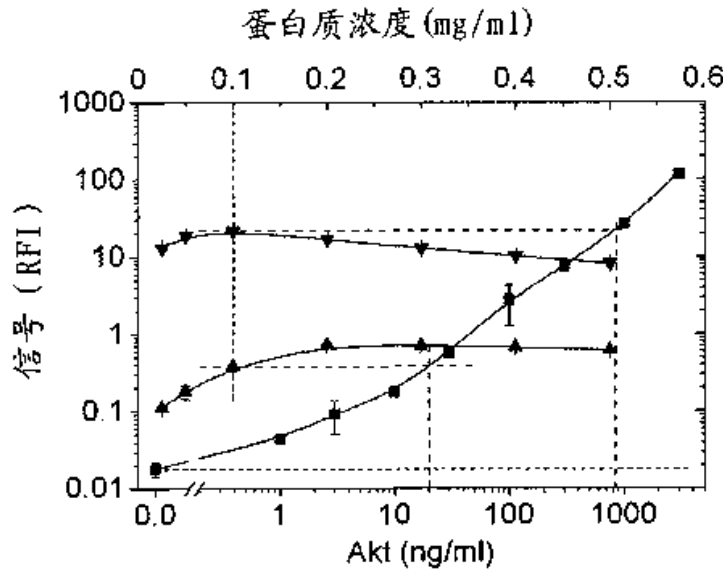


图 4

Akt

含心脏组织样品的
测量区域:

▼ + 1 µg/ml Akt

▲ 内源性Akt

(上横座标)

校正曲线:

■ Akt标准品

(下横座标)

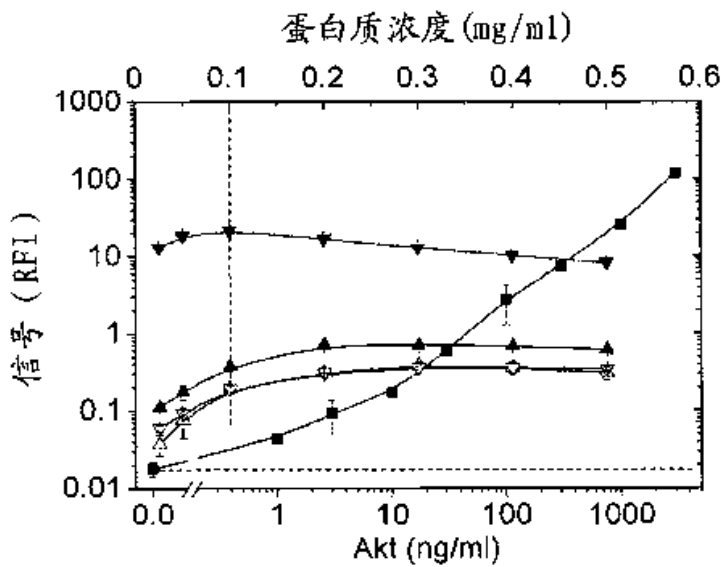


图 5

Akt

含心脏组织样品
的测量区域:

加入1 µg/ml Akt

▼ 无竞争性

▽ 有竞争性Akt

内源性Akt

▲ 无竞争性

△ 有竞争性Akt

(上横座标)

校正曲线:

■ Akt标准品

(下横座标)

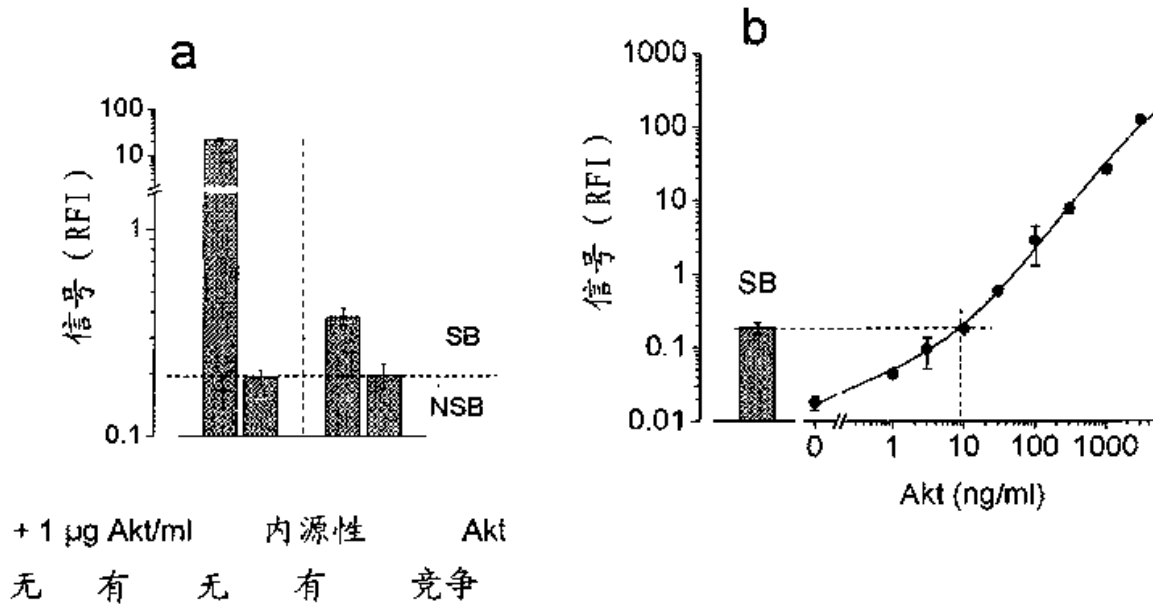


图 6

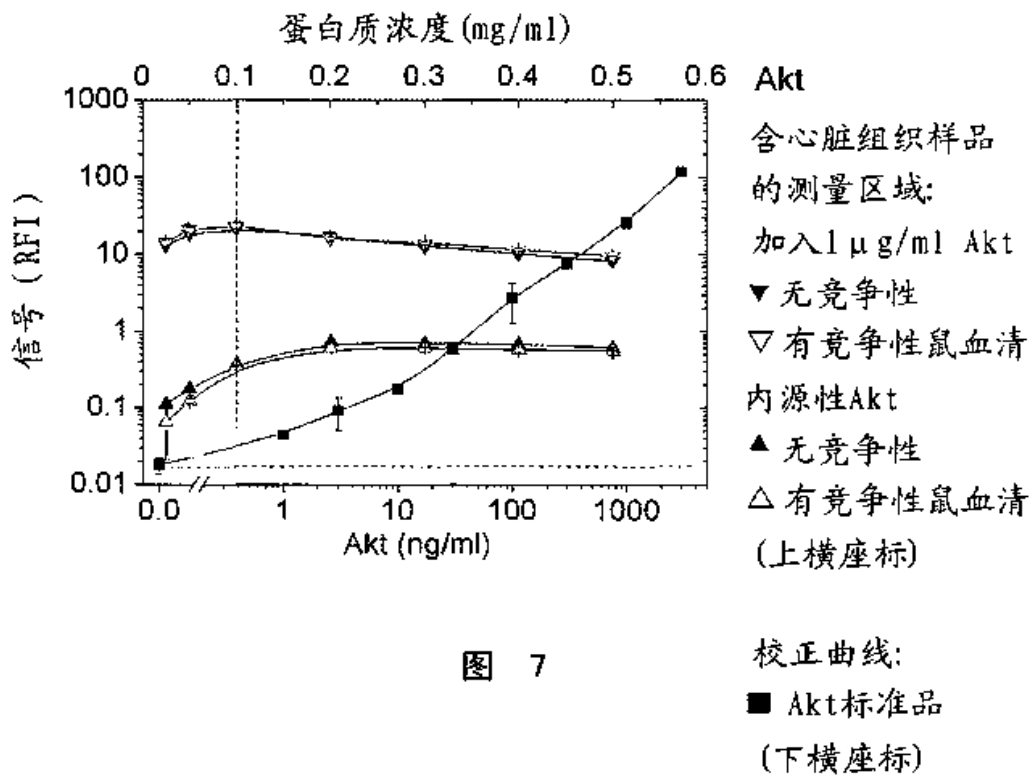


图 7

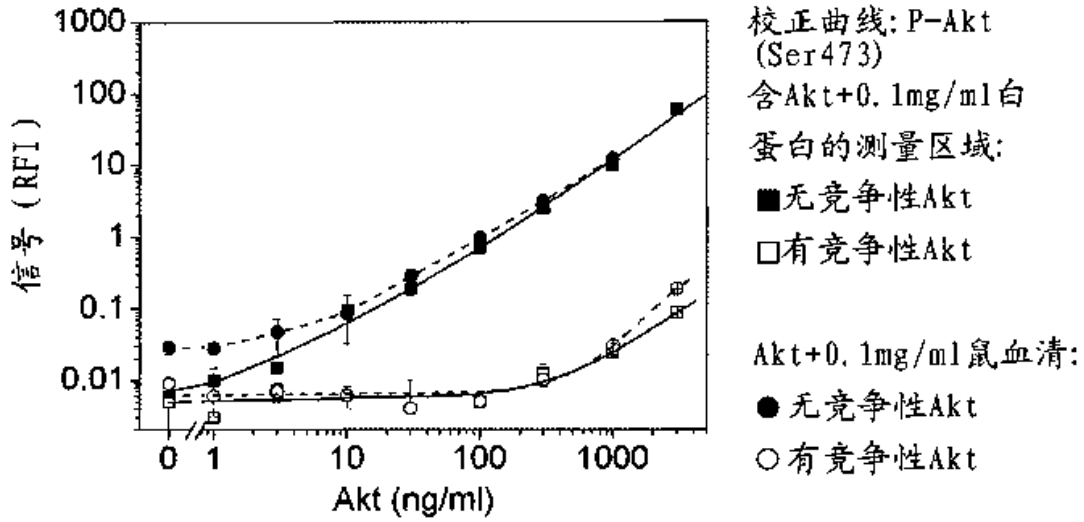


图 8

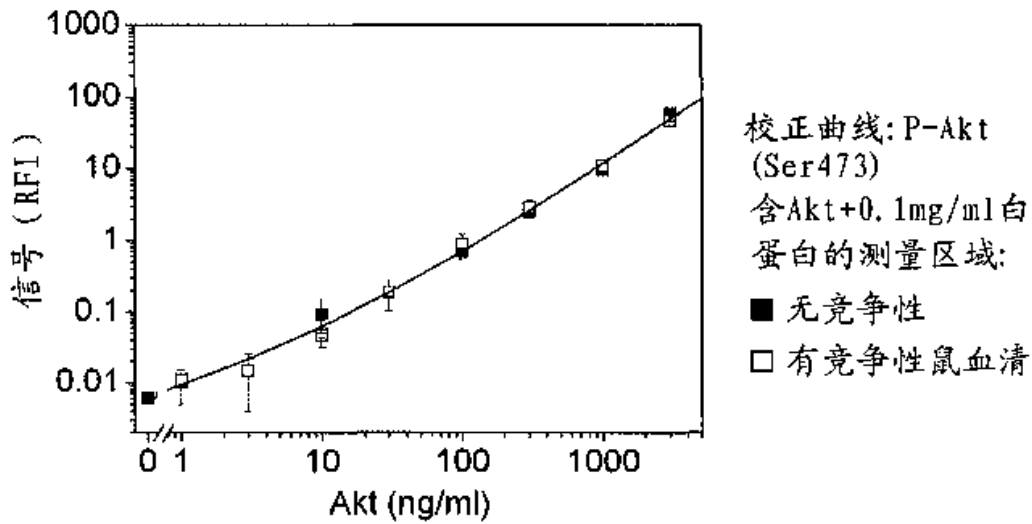


图 9

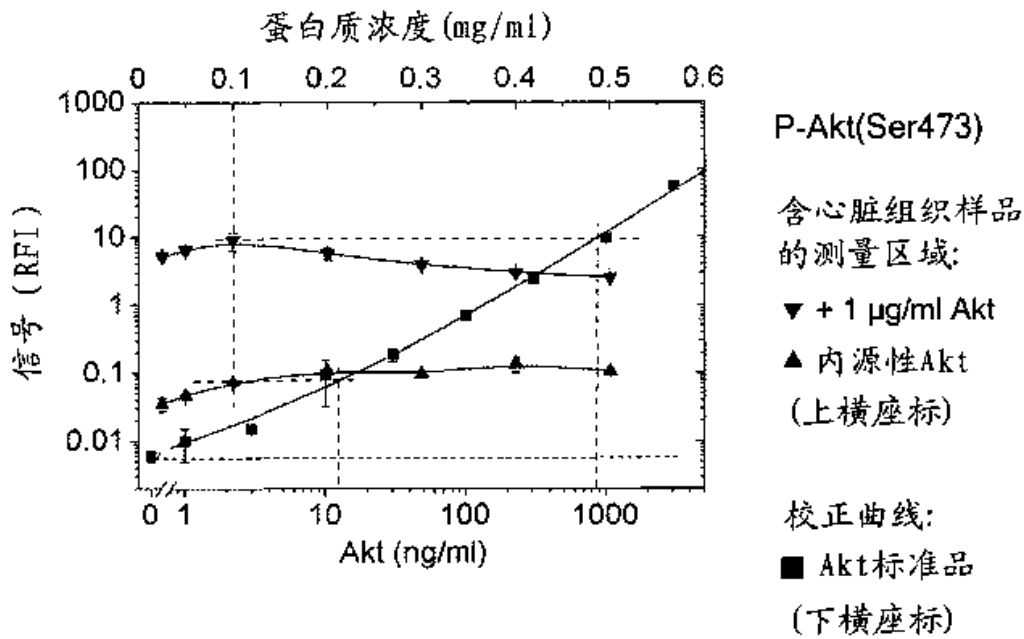


图 10

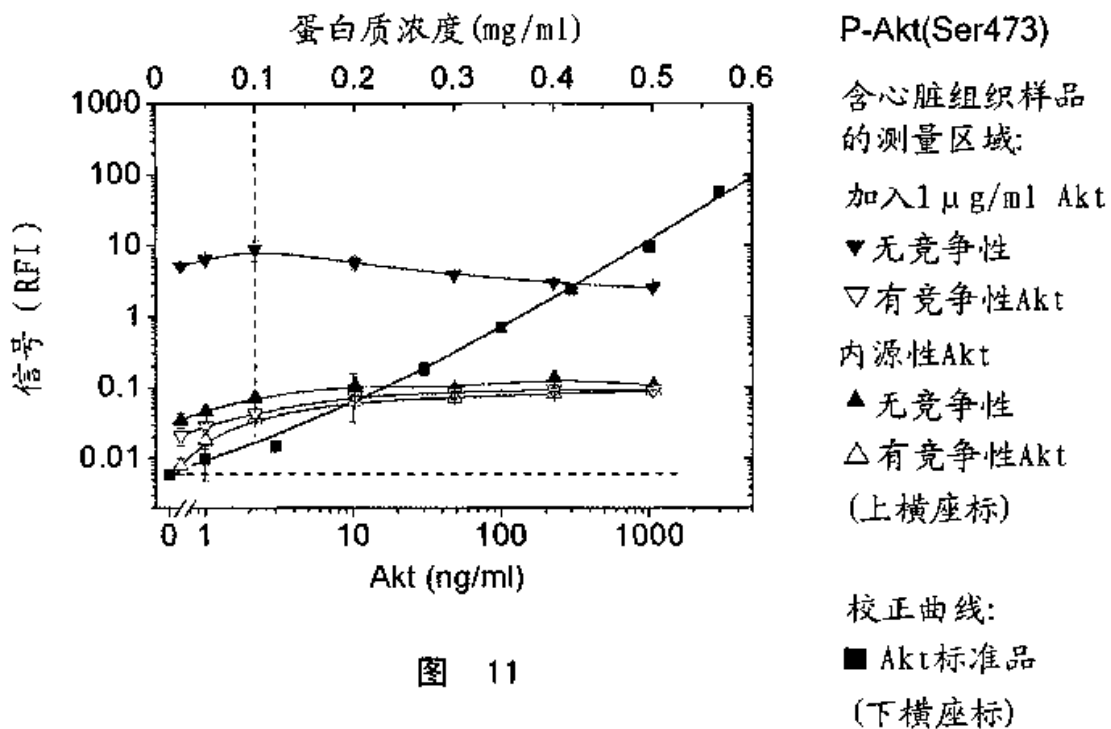


图 11

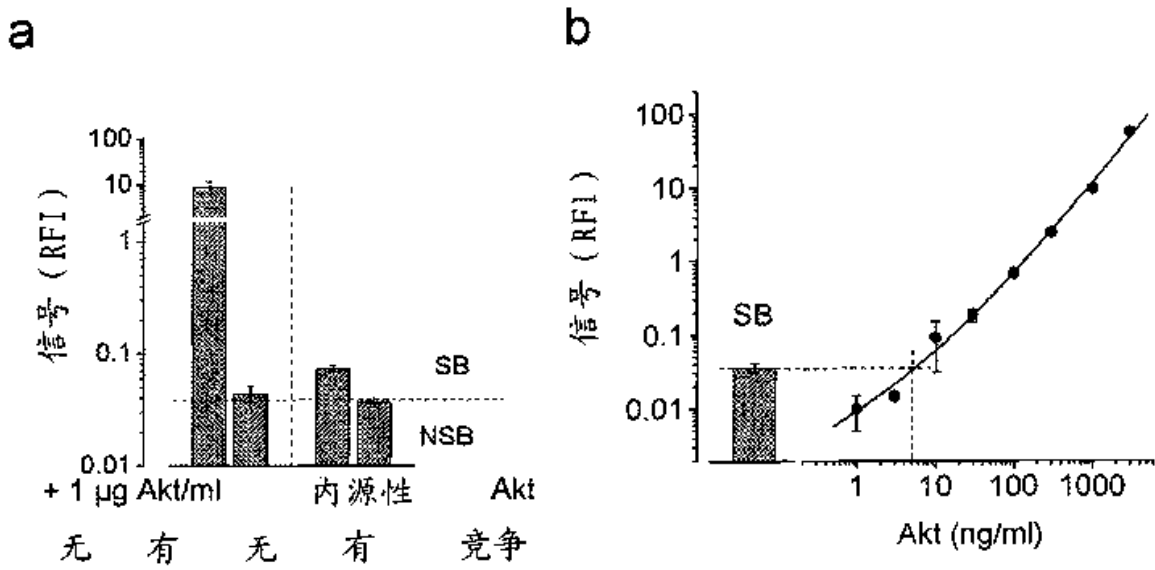


图 12

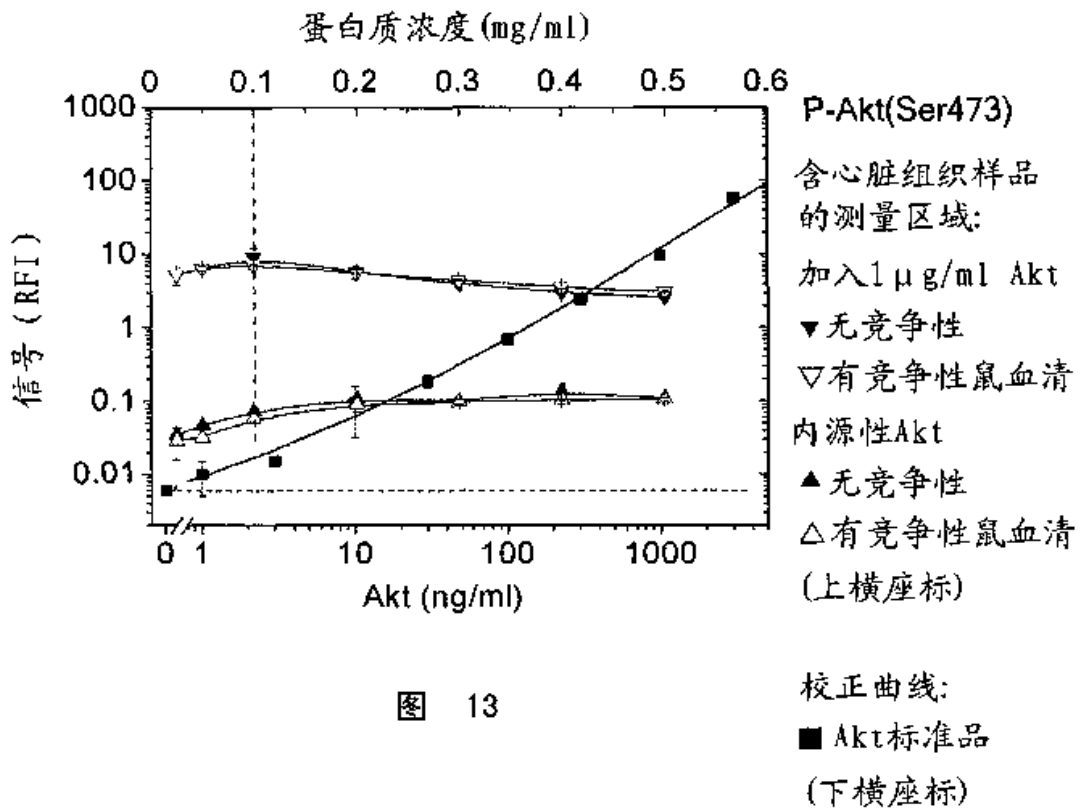


图 13

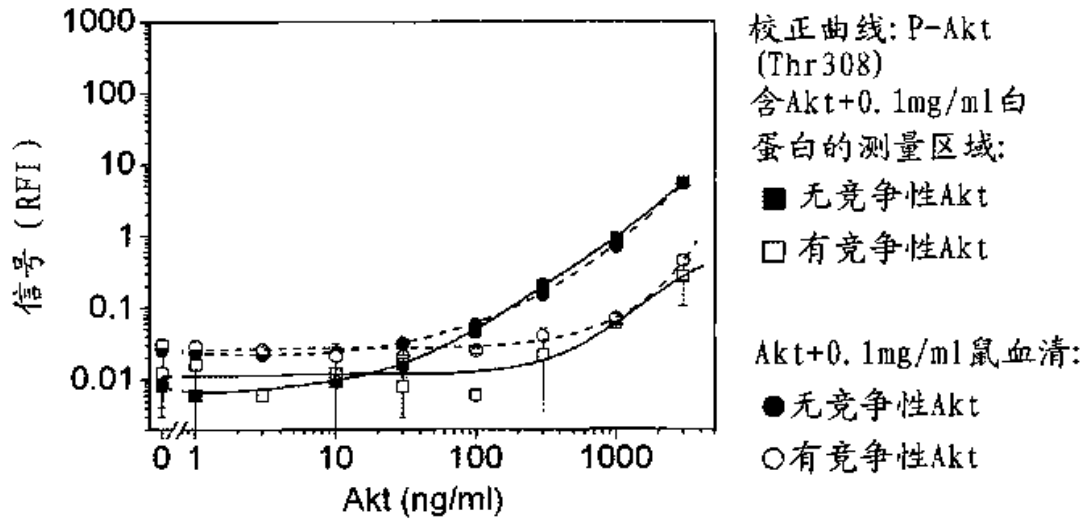


图 14

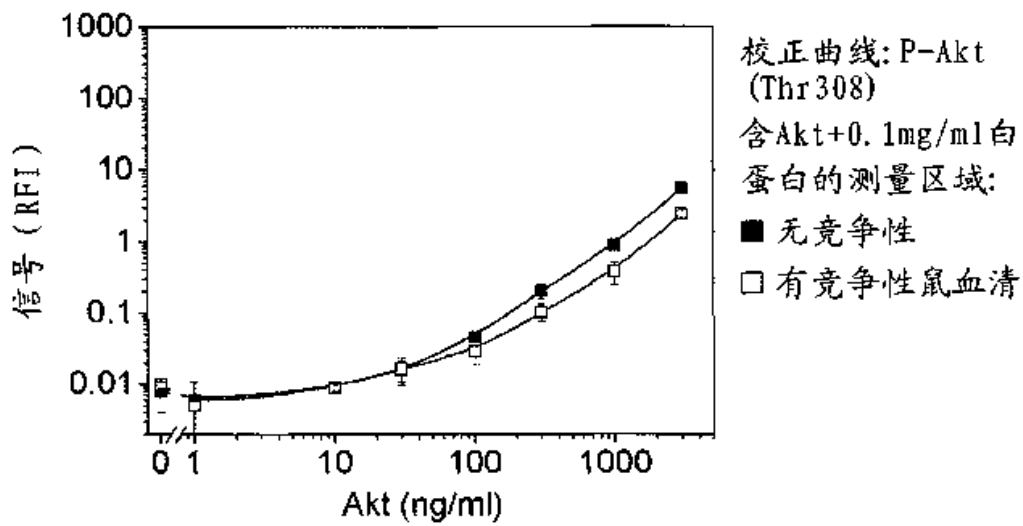


图 15

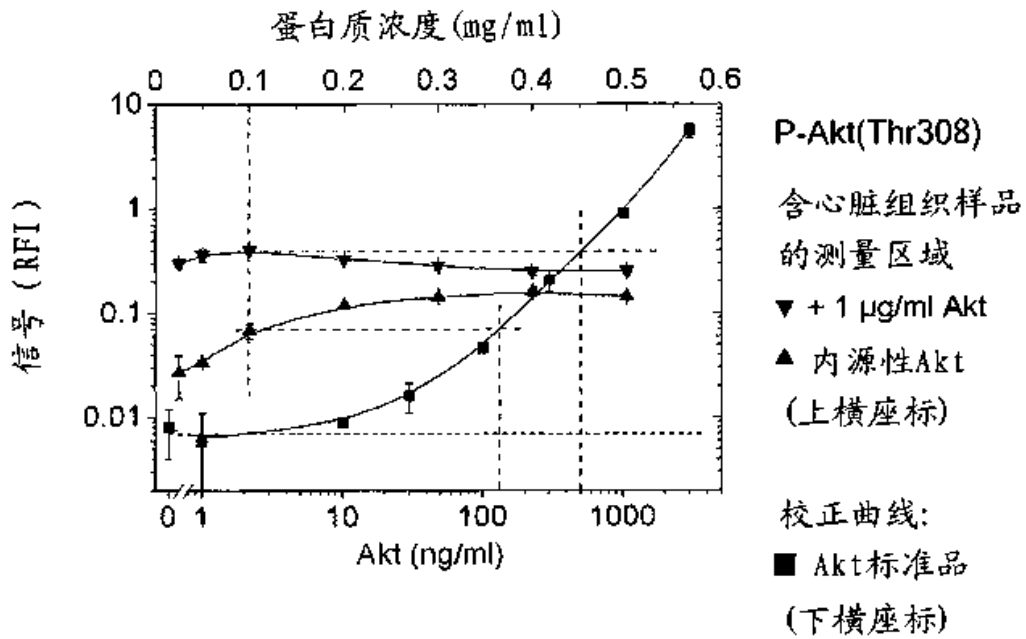


图 16

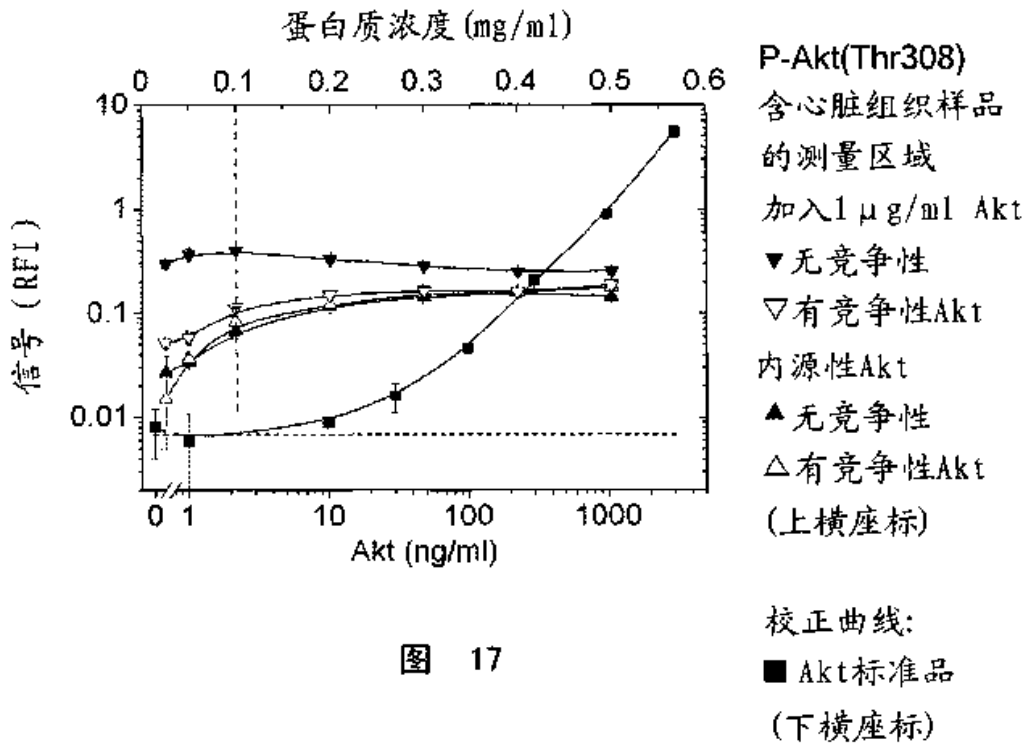


图 17

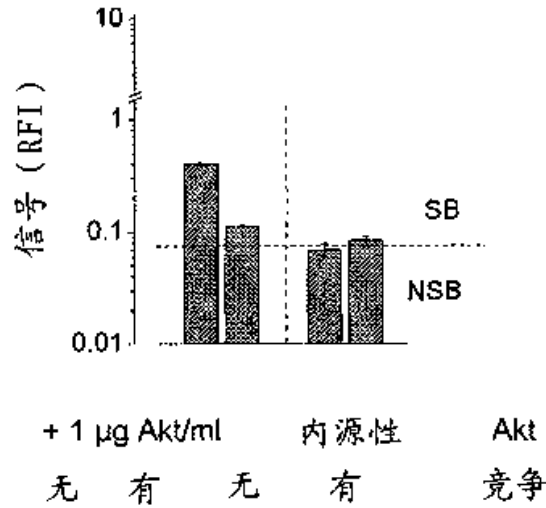


图 18

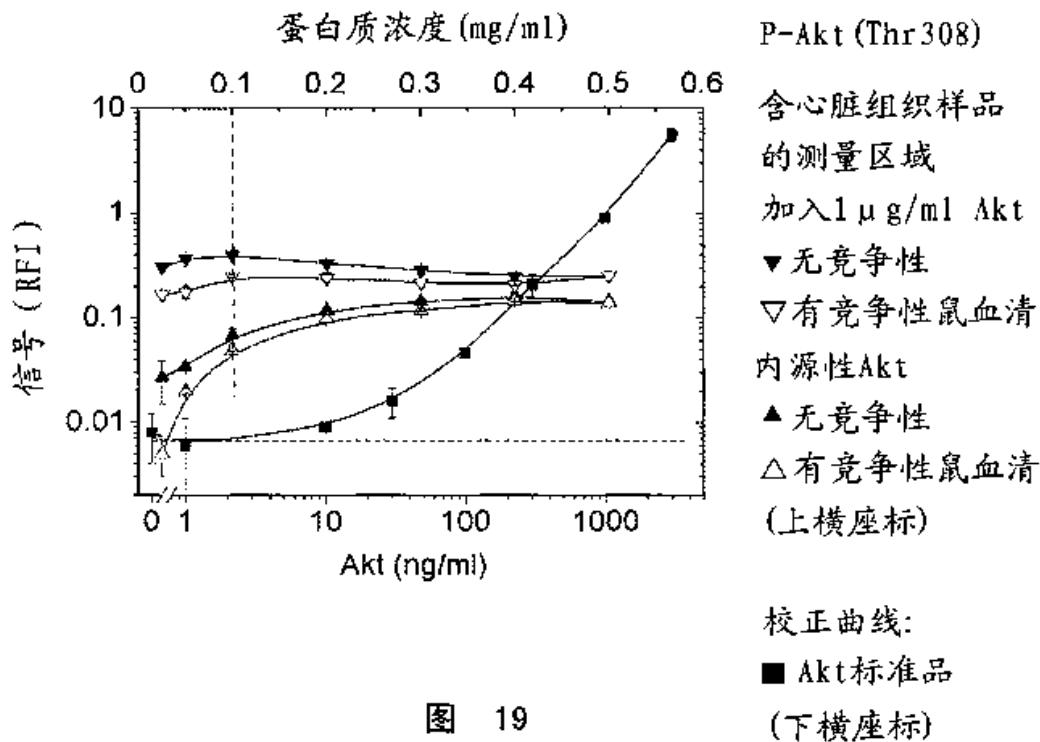


图 19

专利名称(译)	用于测定具有生物来源和复杂组成的样品中一种或多种分析物的方法及其用途		
公开(公告)号	CN101346626A	公开(公告)日	2009-01-14
申请号	CN200580052434.5	申请日	2005-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔技术服务有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	拜尔技术服务有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜尔技术服务有限责任公司		
[标]发明人	M波拉克 E希克 M文图里 M埃拉特		
发明人	M·波拉克 E·希克 M·文图里 M·埃拉特		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 B01J19/00		
CPC分类号	G01N21/648 G01N21/6428 Y10S436/807 G01N33/54373 Y10S436/809 G01N21/6452 G01N33/54306		
代理人(译)	李连涛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测或多个生物来源和复杂组成的样品中一种或多种分析物的方法。本发明还涉及一种用于定量测定生物来源和复杂组成的样品中一种或多种分析物的微阵列，所述样品固定于微阵列的测量区域中，还涉及一种基于其的定量检测方法。

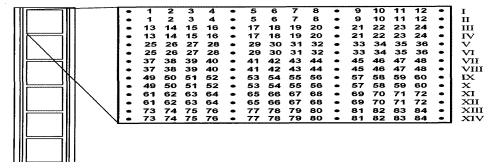


表 1

测量区域 内容附图标记	施加到不连续测量区域的溶液
1 - 9	点样缓冲液中的纯化Akt (0ng/ml, 1ng/nl, 3ng/ml, 10ng/ml, 30ng/ml, 100ng/ml, 300 ng/ml, 1000ng/ml, 3000ng/ml), 具有0.1mg/ml BSA
10 - 12	点样缓冲液
13 - 21	点样缓冲液中的纯化Akt, (0ng/ml, 1ng/nl, 3ng/ml, 10ng/ml, 30ng/ml, 100ng/ml, 300ng/ml, 1000ng/ml, 3000ng/ml), 具有0.1mg/ml 鼠血清
22 - 24	点样缓冲液
25 - 31	点样缓冲液中具有不同总蛋白含量 (0.025mg/ml, 0.050mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.3mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml) 的鼠心脏组织裂解物溶液
32 - 36	点样缓冲液
37 - 43	点样缓冲液中具有不同总蛋白含量 (0.025mg/ml, 0.050mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2mg/ml, 0.3mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml) 的鼠心脏组织裂解物溶液, 在每种情况下另外含有1000ng/ml的纯化Akt