



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108633304 A

(43)申请公布日 2018.10.09

(21)申请号 201680052539.9

(22)申请日 2016.09.14

(30)优先权数据

62/218,455 2015.09.14 US

62/293,188 2016.02.09 US

62/305,123 2016.03.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.03.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/051794 2016.09.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/048881 EN 2017.03.23

(71)申请人 艾森利克斯公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 S·Y·周 W·丁

(74)专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司 11129

代理人 吴泳历

(51)Int.Cl.

G01N 33/497(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/483(2006.01)

权利要求书9页 说明书89页 附图18页

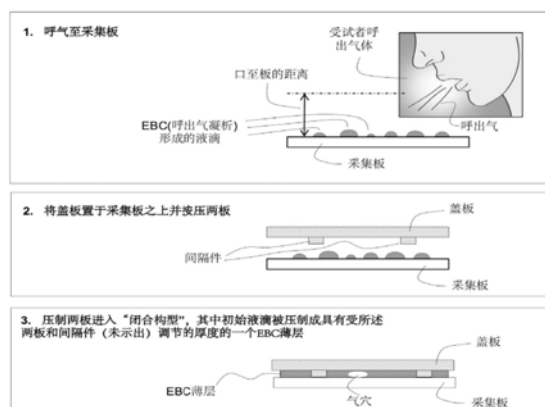
(54)发明名称

采集分析蒸汽凝析,特别是呼出气凝析的装置与系统,以及使用方法

(57)摘要

本发明涉及生物/化学感测,测定和应用领域。特别是,本发明涉及将少量的蒸汽凝析样品(例如,体积为10fL(飞升)的单个液滴的从受试者呼出气采集的呼出气凝析(EBC)),防止或显着减少采集的蒸汽凝析样品的蒸发,分析样品,通过手机分析样品,并进行无需任何专业人员的采集和分析。

使用 SiEBCA(单滴 EBC 采集器/分析器)采集呼出气凝析(EBC)的示例性装置和方法



1. 一种用于采集和分析蒸气凝析 (VC) 样品的装置, 包括:

采集板和盖板, 其中:

i. 所述两板可相对于彼此移动成不同的构型;

ii. 一个或两个板是柔性的;

iii. 所述两板中的每一个在其各自的表面上具有一个接触含有分析物的蒸气凝析 (VC) 样品的样品接触区域;

iv. 一个或两个所述板包含有固定于相应板上的间隔件, 其中所述间隔件具有预定的基本上均匀的高度和预定的恒定的间隔件间距离, 并且其中至少一个间隔件在所述样品接触区域内;

其中所述构型中的一个为开放构型, 其中: 所述两板完全或部分地分开, 所述两板之间的间隔不受所述间隔件调节, 并且所述 VC 样品被放置在所述板中的一个或两个上; 和

其中所述构型中的另一个是在所述开放构型时所述 VC 样品被放置后形成的闭合构型; 并且在闭合构型中: 所述 VC 样品的至少一部分在两个板之间并且与两个板接触, 并且具有由间隔件和所述两板的两个样品表面调节的高度均匀的厚度, 并且等于或小于 $30\mu\text{m}$, 具有微小偏差。

2. 如权利要求 1 所述的装置, 其中所述装置还包括涂覆在所述板中的一个或两个上的干试剂。

3. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述装置还在一个或两个板上包含具有预定面积的干结合位点, 其中所述干结合位点结合并固定所述样品中的分析物。

4. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述装置还在一个或两个板上包含可释放的干试剂和释放时间控制材料, 其中释放时间控制材料延迟可释放干试剂被释放到所述样品中的时间。

5. 根据权利要求 4 所述的装置, 其中所述释放时间控制材料将所述干燥剂开始被释放到所述样品中的时间延迟至少 3 秒。

6. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述装置还在一个或两个板上包含一个或多个干结合位点和/或一个或多个试剂位点。

7. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述样品是呼出气凝析。

8. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述样品是来自生物样品, 环境样品, 化学样品或临床样品的蒸气。

9. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述分析物包含具有不同形状分子 (例如, 蛋白质, 肽, DNA, RNA, 核酸或其它分子), 细胞, 组织, 病毒和纳米颗粒。

10. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述分析物包含挥发性有机化合物 (VOC)。

11. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述分析物包括氮, 氧, CO_2 , 水和惰性气体。

12. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述分析物被染色。

13. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中在所述样品表面中的一个上, 所述装置还包含闭合间隔件, 其包围被放置在所述采集板上的部分或全部 VC 样品。

14. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述高度均匀的厚度具有等于或小于

0.5 μm 的值。

15. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述高度均匀的厚度具有在0.5 μm 至1 μm 的范围内的值。

16. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述高度均匀的厚度具有在1 μm 至2 μm 的范围内的值。

17. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述高度均匀的厚度具有在2 μm 至10 μm 的范围内的值。

18. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述高度均匀的厚度具有在10 μm 至20 μm 的范围内的值。

19. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述高度均匀的厚度具有在20 μm 至30 μm 的范围内的值。

20. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中,在所述闭合构型下所述VC样品的至少一部分的厚度大于在开放构型下被放置在所述采集板上的VC样品的厚度。

21. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中,在所述闭合构型下所述VC样品的至少一部分的厚度小于在开放构型下被放置在所述采集板上的VC样品的厚度。

22. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件通过直接压花所述板或对于所述板的注塑而固定在板上。

23. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述板和所述间隔件的材料选自聚苯乙烯,PMMA,PC,COC,COP或另一种塑料。

24. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件间距离在1 μm 至200 μm 的范围内。

25. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件间距离在200 μm 至1000 μm 的范围内。

26. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述VC样品是来自人或动物的呼出气凝析。

27. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中调节所述均匀厚度层的间隔件具有至少1%的填充系数,其中所述填充系数是同所述均匀厚度层接触的间隔件面积与所述板同均匀厚度层接触的总面积的比值。

28. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中,对于调节所述均匀厚度层的间隔件,间隔件的填充系数的杨氏模量等于或大于10MPa,其中所述填充系数是同所述均匀厚度层接触的间隔件面积与所述板同均匀厚度层接触的总面积的比值。

29. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中对于柔性板,所述柔性板的厚度乘以柔性板的杨氏模量在60至750GPa $\cdot\mu\text{m}$ 的范围内。

30. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中对于柔性板,间隔件间距离(ISD)的四次幂除以所述柔性板的厚度(h)和所述柔性板的杨氏模量(E), $\text{ISD}^4/(hE)$ 等于或小于 $10^6\mu\text{m}^3/\text{GPa}$ 。

31. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述板的一个或两个包含位于板的表面或内部的位置标记,其提供所述板的位置的信息。

32. 如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述板的一个或两个包含位于所述板

的表面或内部的刻度标记,其提供所述样品和/或所述板的结构的横向尺寸的信息。

33.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述板的一个或两个包含位于所述板的表面或内部的成像标记,其有助于所述样品的成像。

34.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件用作位置标记,标度标记,成像标记或其任何组合。

35.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述均匀厚度层的平均厚度大约等于所述样品中分析物的最小尺寸。

36.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件间距离在 $1\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$ 的范围内。

37.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件间距离在 $50\mu\text{m}$ 至 $120\mu\text{m}$ 的范围内。

38.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件间距离在 $120\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$ 的范围内。

39.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件间距离基本上是周期性的。

40.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件是具有选自圆形,多边形,圆形,正方形,矩形,椭圆形,椭圆形或其任何组合的横截面形状的柱。

41.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件是柱形并且具有基本平坦的顶表面,其中,对于每个间隔件,所述间隔件的横向尺寸与其高度的比率至少为1。

42.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中每个所述间隔件的横向尺寸与其高度的比率至少为1。

43.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件的最小横向尺寸小于或基本上等于所述样品中分析物的最小尺寸。

44.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件的最小横向尺寸在 $0.5\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 的范围内。

45.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件的最小横向尺寸在 $0.5\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 的范围内。

46.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件具有至少 $100/\text{mm}^2$ 的密度。

47.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述间隔件具有至少 $1000/\text{mm}^2$ 的密度。

48.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述板中的至少一个是透明的。

49.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述板中的至少一个由柔性聚合物制成。

50.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中,对于压制所述板的压力所述间隔件是不可压缩的,和/或,独立地仅所述板中的一个柔性的。

51.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述柔性板的厚度在 $10\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$ 的范围内。

52.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述偏差小于30%。

53.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述偏差小于10%。

54.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述偏差小于5%。

55.如前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述第一和第二板被连接并且被构造

成通过折叠所述两板而从所述开放构型改变为所述闭合构型。

56. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述第一和第二板通过铰链连接并且被构造成通过沿着所述铰链折叠所述两板而从所述开放构型改变为所述闭合构型。

57. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述第一板和第二板通过铰链连接, 铰链与板为不同材料, 并且被配置为通过沿着铰链折叠板而从开放构型改变到闭合构型。

58. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述第一和第二板被制成单件材料, 被构造成通过折叠所述两板而从所述开放构型改变为所述闭合构型。

59. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述均匀厚度样品层在至少 $100\mu\text{m}^2$ 的横向面积上是均匀的。

60. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述均匀厚度样品层在至少 1mm^2 的横向面积上是均匀的。

61. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述装置被配置为在60秒或更短时间内分析所述样本。

62. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中在所述闭合构型中, 所述最终样品厚度装置被配置为在60秒或更短时间内分析所述样品。

63. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中, 所述装置还在一个或两个板上包括一个或多个扩增位点, 当分析物或标记在距离扩增位点500nm以内时, 每个扩增位点能够扩增来自分析物或分析物的标记物的信号。

64. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中在闭合构型中, 最终样品厚度装置被配置成在10秒或更少时间内分析样品。

65. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述干结合位点包含捕获剂。

66. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述干结合位点包含抗体或核酸。

67. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述可释放的干试剂是被标记的试剂。

68. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述可释放的干试剂是荧光标记的试剂。

69. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述可释放的干试剂是荧光标记的抗体。

70. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述第一板在其表面上还包括第一预定测定位点和第二预定测定位点, 其中测定位点的边缘之间的距离基本上大于当板处于所述闭合构型时均匀厚度层的厚度, 其中所述均匀厚度层的至少一部分在所述预定测定位点上方, 并且其中所述样品具有能够在所述样品中扩散的一种或多种分析物。

71. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述第一板在其表面上具有至少三个分析物测定位点, 并且任何两个相邻测定位点的边缘之间的距离基本上大于当板处于闭合构型时均匀厚度层的厚度, 其中所述均匀厚度层的至少一部分在所述测定位点上方, 并且其中所述样品具有能够在所述样品中扩散的一种或多种分析物。

72. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述第一板在其表面上具有至少两个相邻的分析物分析部位, 它们没有被分开明显大于当板处于闭合构型时均匀厚度层的厚度的距离, 其中在所述均匀厚度层的至少一部分在所述测定位点上方, 并且其中所述样品具有能够在所述样品中扩散的一种或多种分析物。

73. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述可释放的干试剂是细胞染色剂。

74. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述装置还包括作为用于检测光信号的光检测器的检测器。

75. 如前述权利要求中任一项所述的装置, 其中所述装置还包括检测器, 该检测器是用于检测电信号的电检测器。

76. 一种使用移动电话快速分析蒸气凝析的系统, 包括:

(a) 一个任何前述权利要求的装置;

(b) 一个移动通信设备, 其包括:

用于检测和/或成像蒸气凝析样品的一个或多个照相机; 和

电子器件, 信号处理器, 和用于接收和/或处理所检测的信号和/或蒸气凝析样品的图像以及用于远程通信的硬件和软件。

77. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述系统还包括来自移动通信设备或外部源的光源。

78. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述板之一包含能够结合分析物的结合位点, 其中均匀厚度样品层的至少一部分在结合位点上方, 并且显著小于结合位点的平均横向线性尺寸。

79. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 还包括:

(d) 被配置为持有所述样品并可安装到所述移动通信装置的外壳。

80. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述外壳包括用于促进移动通信装置对样本进行成像和/或信号处理的光学器件, 以及被配置为将光学器件保持在移动通信装置上的安装件。

81. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述外壳中的光学器件的元件可相对于外壳移动。

82. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述移动通信设备被配置为向医疗专业人员, 医疗机构或保险公司传送测试结果。

83. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述移动通信设备还被配置为将测试的信息传送到云网络, 所述云网络处理该信息以改进测试结果。

84. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述移动通信设备还被配置为将测试和受试者的信息传送到云网络, 所述云网络处理该信息以改进测试结果, 且所精化的测试结果被发送回受试者。

85. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述移动通信设备还被配置为将测试和受试者的信息传送到云网络, 所述云网络处理该信息以改进测试结果, 且所精化的测试结果被发送回受试者。

86. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述移动通信设备被配置为从医疗专业人员处接收处方, 诊断或医疗建议。

87. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述移动通信设备配置有硬件和软件以:

捕获样品的图像;

分析图像中的测试位置和对照位置; 和

将对测试位置的分析获得的值与表征快速诊断测试的阈值进行比较。

88. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述板的至少一个包括其中存储测定试剂的存储位点。

89. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 所述摄像机中的至少一个从CROF装置读取信号。

90. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述移动通信设备经由WiFi或移动通信网络与远程位置通信。

91. 如前述系统权利要求中任一项所述的系统, 其中所述移动通信设备是移动电话。

92. 一种使用移动电话快速分析样品中的分析物的方法, 包括:

将样品被放置在任一前述系统权利要求的装置上;

测定被放置在所述装置上的样品中的分析物以产生结果; 和

将所述结果从所述移动通信设备传送到远离所述移动通信设备的位置。

93. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中所述分析物包含具有不同形状分子(例如蛋白质, 肽, DNA, RNA, 核酸或其他分子), 细胞, 组织, 病毒和纳米颗粒。

94. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中所述分析物包括白细胞, 红细胞和血小板。

95. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包括:

分析所述远程位置处的结果以提供分析结果; 并将所分析的结果从所述远程位置传送到所述移动通信设备。

96. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中分析由远程位置处的医疗专业人员进行。

97. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中所述移动通信设备从远程位置处的医疗专业人员接收处方, 诊断或建议。

98. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中处于闭合构型的VC样品的至少一部分的厚度大于在开放构型下被放置在采集板上的VC样品的厚度。

99. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中处于闭合构型的VC样品的至少一部分的厚度小于在开放构型处被放置在采集板上的VC样品的厚度。

100. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中所述测定步骤包括检测样品中的分析物。

101. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中所述分析物是生物标志物。

102. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中分析物是蛋白质, 核酸, 细胞或代谢物。

103. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中在步骤(b)中进行的测定是结合测定或生化测定。

104. 一种用于分析蒸气凝析样品中的分析物的方法, 包括:

获得任何现有装置权利要求的装置;

将所述蒸气凝析样品被放置到所述装置的一个或两个板上;

将所述板置于闭合构型中并且在所述两板的至少一部分上施加外力; 和

在板处于闭合构型时分析均匀厚度层中的分析物。

105. 其中所述方法包括:

(a) 获得样品;

(b) 获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板, 其中每个板具有基本上平面的样品接触表面, 一个或两个板是柔性的, 并且所述板中的一个或两个包括间隔件, 其与相应的样品接触表面固定, 并且其中所述间隔件具有:

预定的基本均匀的高度,

具有基本均匀的横截面和顶表面平坦的柱子的形状;

宽度与高度的比等于或大于1;

预定的恒定的间隔件间距离, 其在10 μ m至200 μ m的范围内;

等于1%或更大的填充系数; 和

(c) 当所述板被配置为开放构型时, 将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上, 其中所述开放构型是这样的配置, 其中所述两个板被部分或完全分开并且所述板之间的间隔不由间隔件调节;

(d) 在(c)之后, 使用两个板将样品的至少一部分压制成由板的样品接触表面限制的基本上厚度均匀的层, 其中所述层的均匀厚度由间隔件和所述板调节, 并且具有等于或小于30 μ m的平均值, 其具有小于10%的偏差, 其中所述压制包括:

将两块板放在一起; 和

以平行或顺序的顺应性按压板的至少一个区域将板压在一起以形成闭合构型, 其中顺应性按压是在板的至少一部分上产生基本上均匀的压力, 以及所述按压使所述样品的所述至少一部分在所述板的样品接触表面之间横向扩展, 并且其中所述闭合构型是这样的配置, 其中所述均匀厚度层区域的所述板之间的间隔由所述间隔件调节; 和

(e) 在所述板处于所述闭合构型时分析所述均匀厚度的层;

其中所述填充系数是所述间隔件接触面积与总板面积的比率; 其中适形按压是使得施加在区域上的压力基本上恒定的方法, 而改压力与板的外表面的形状变化无关; 和

其中所述平行按压是对所欲施压区域同时施加压力, 而顺序按压是对所欲施压区域的一部分施加压力并逐渐移动到其其他部分。

106. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包括:

在所述板处于所述闭合构型之后去除所述外力; 以及在所述板处于所述闭合构型时, 在所述均匀厚度层中成像所述分析物; 以及对所述图像的一个区域中的分析物或标记物的数量进行计数。

107. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包括:

在所述板处于所述闭合构型之后去除所述外力; 以及当所述板处于闭合构型时, 测量均匀厚度层中的光信号。

108. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中所述间隔件间距离在20 μ m至200 μ m的范围内。

109. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中所述间隔件间距离在5 μ m至20 μ m的范围内。

110. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法, 其中所述间隔件的填充系数和间隔件的杨氏模量的乘积为2MPa或更大。

111. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,所述表面偏差小于50nm。

112. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,还包括计算相关体量的样品中的分析物的浓度的步骤,其中所述计算基于由存储位点的预定面积限定的相关体量的体积,在闭合构型中的样品均匀厚度,以及检测到的目标实体的数量。

113. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中分析步骤包括计数样品中的分析物。

114. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述成像和计数通过以下步骤完成:

照亮均匀厚度层中的细胞;

使用CCD或CMOS传感器获取所述细胞的一个或多个图像;

使用计算机识别所述图像中的细胞;和

计数图像的一个区域中的细胞的数量。

115. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述外力由人手提供。

116. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中还包括涂覆在一个或两个板上的干试剂。

117. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中均匀厚度样品层具有高达 $\pm 5\%$ 的厚度均匀性。

118. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述间隔件是具有选自圆形,多边形,圆形,正方形,矩形,椭圆形,椭圆形或其任何组合的横截面形状的柱。

119. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述间隔件之间的间距大约是分析物的最小尺寸。

120. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中一个或两个板样品接触表面包括一个或多个扩增位点,当所述分析物或标记在距离扩增位点500nm以内时,每个扩增位点能够扩增来自所述分析物或所述分析物的标记物的信号。

121. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述样品是呼出气凝析。

122. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述样品是来自生物样品,环境样品,化学样品或临床样品的蒸气。

123. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述分析物包含具有不同形状分子(例如,蛋白质,肽,DNA,RNA,核酸或其它分子),细胞,组织,病毒和纳米颗粒。

124. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述分析物包含挥发性有机化合物(VOC)。

125. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述分析物包括氮,氧, CO_2 ,水和惰性气体。

126. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中分析物被染色。

127. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中在所述样品表面之一中,其还包括包围被放置在采集板上的部分或全部VC样品的闭合间隔件。

128. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述高度均匀的厚度具有等于或小于 $0.5\mu\text{m}$ 的值。

129. 如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述高度均匀的厚度具有在 0.5μ

m至1 μ m的范围内的值。

130.如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述高度均匀的厚度具有在1 μ m到2 μ m范围内的值。

131.如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述高度均匀厚度的值在2 μ m至10 μ m的范围内。

132.如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述高度均匀的厚度具有在10 μ m至20 μ m的范围内的值。

133.如前述方法权利要求中任一项所述的方法,其中所述高度均匀的厚度具有在20 μ m至30 μ m范围内的值。

采集分析蒸汽凝析,特别是呼出气凝析的装置与系统,以及使用方法

[0001] 交叉援引

[0002] 本申请要求获得下述专利申请的权益:2015年9月14日提交的临时申请序列号62/218,455,2016年2月9日提交的62/293,188,2016年3月8日提交的62/305,123,2016年7月31日提交的62/369,181,2016年8月20日提交的PCT/US16/46437,其中PCT申请要求获得下述专利申请的权益:2015年8月10日提交的62/202,989,2015年9月14日提交的62/218,455,2016年2月9日提交的62/293,188,2016年3月8日提交的62/305,123和2016年7月31日提交的62/369,181,所有这些申请为了所有目的整体并入本文。

[0003] 领域

[0004] 本发明涉及生物/化学采样、感测、检测和应用等领域。

[0005] 背景

[0006] 在蒸气凝析样品,特别是呼出气凝析的生物/化学分析中,存在对于方法和设备的需求,以能够加快过程进度(例如,结合反应、试剂混合等)同时量化各类参数(例如分析物浓度、样品体积等),能够简化样品采集和测量过程,能够处理小体积的样品,允许在不到一分钟内完成一个完整的测定,允许通过智能手机(如移动电话等)进行化验,允许非专业人士进行自我化验,和允许测试结果以本地通信、远程交流、或无线网络的方法传递给相关各方等。本发明涉及的方法、装置和系统解决了这些需求。

发明内容

[0007] 以下简要概述并不旨在包括本发明的所有的特征和涉及的各方面。本发明涉及有关生物化学感应、测定、和应用的领域。特别是,本发明涉及对于少量蒸气凝析样品的采集(例如单个液滴为10fL(飞升)体积的被试呼出气体凝析),防止或是显著减少所采集蒸汽凝析蒸发,分析样品,利用移动电话分析样品,以及无需专业人士对于以上采集与分析过程的操作。

[0008] 附图的简要说明

[0009] 熟练的技术人员将理解,附图,如下所述,是仅用于说明目的。附图并不意图以任何方式限制本发明的范围。附图可能不是成比例的。在呈现实验数据点的附图中,连接数据点的线仅用于引导观察数据,而没有其它含义。

[0010] 图1.利用SiEBCA(Single-drop EBC Collector/Analyzer,单滴呼出气凝析采集/分析器)进行呼出气凝析(EBC)采集的装置与方法的一个示范性实施方案的某些方面的示意图。

[0011] 图2在SiEBCA的闭合构型中EBC基于不同间隔件高度的不同形态的示意图。在闭合构型-1中:如果间隔件高度小于EBC开放构型下的平均高度,在闭合构型下,EBC变成了一个同时接触采集板与盖板的连续性薄膜,可能含有一些鼓励的气泡。在闭合构型-2中:如果间隔件高度大于EBC开放构型下的平均高度,在闭合构型下,EBC变成了一些同时接触采集板和盖板的相互孤立的液块,其大小较之开放构型下更大,数量更少。

[0012] 图3.SiEBCA (Single-drop EBC Collector/Analyzer, 单滴呼出气凝析采集/分析器) 的装置和方法的一个实施方案的示意图。

[0013] 图4. 同时具有“开放式间隔件”和“闭合式间隔件”的SiEBCA的示意图, 其中开放式间隔件式为柱状物而闭合式间隔件为一环形间隔件 (d) 或一个四腔室网状间隔件 (e)。

[0014] 图5. 采集板未处理表面和已处理 (较之未处理表面具有更好的润湿性) 表面的不同的表面可湿特性。

[0015] 图6. 人手按压SiEBCA板的方法。

[0016] 图7. 在“开放构型”下 (例如没有盖板, 只有采集板的情况) 采集板上EBC液滴大小和密度的实验数据。

[0017] 图8. 在开放构型下表面为已处理的PMMA材料的采集板上的EBC的实验数据。

[0018] 图9. 采集在未处理和已处理的PMMA板上的EBC (被试2s呼气所得) 的测得蒸发时间 (在

[0019] 板开放构型下) 和照片。

[0020] 图10. 间隔件高度 (分别为1 μ m, 2 μ m, 10 μ m, 和30 μ m) 对于利用SiEBCA采集的闭合构型下的EBC的影响的照片。

[0021] 图11. 间隔件高度 (分别为1 μ m, 2 μ m, 10 μ m, 和30 μ m) 对于利用SiEBCA采集的闭合构型下的EBC的影响的实验数据。

[0022] 图12. 利用已处理和未处理的PMMA采集板所得呼出气的照片。

[0023] 图13. (a) 已处理或未处理PMMA采集板和 (b) 合上盖板的时间延迟对于呼出气采集的影响的实验数据。

[0024] 图14. 对于已处理采集板 (相较未处理板更加亲水) 和未处理采集板 (PMMA材料) 两种情况下, 采集板上采集得呼出气 (也就是EBC) 的体积vs. 时间延迟 (从呼气终止至盖板闭合间所测得时间长度) 的实验数据。

[0025] 图15示出通过使用两板, 间隔件, 和压制 (以横截面示出) 减少结合或混匀的时间。小图 (a) 示出减少结合样品中的实体至固体表面上结合位点的时间 (X- (体量到表面))。图 (b) 示出了减少结合存储在一个板的表面的实体 (例如试剂) 至另一个面的表面上的结合位点的时间 (X- (表面到表面))。小图 (c) 示出减少用于将存储在板的一个表面上的试剂加入被夹持在板和另一板 (X- (表面至体量)) 之间的样品的时间。

[0026] 图16示意性示出了本发明的一个示范实施方案, 在单个CROF装置中使用一个板上的一个结合位点和另一板的多个存储位点的多重检测。小图 (a) 和 (b) 是分别是透视图和示例性装置的剖视图。

[0027] 图17示意性示出了本发明的另一个示例性实施方案, 在单个CROF装置中使用一个板上的一个存储位点和另一板的多个结合位点的多重检测。小图 (a) 和 (b) 是分别是透视图和示例性装置的剖视图。

[0028] 图18示意性示出了本发明的进一步示例性实施方案, 在单个CROF装置中使用一个板上的多个结合位点和另一板的多个存储位点的多重检测。小图 (a) 和 (b) 是分别是透视图和示例性装置的剖视图。

[0029] 示例实施方案的详述

[0030] 下面的详细描述说明了本发明的一些实施方案以举例的方式而不是通过限制的

方式。的章节标题和本文所用的所有的副标题仅用于组织目的,并且不应当被解释为以任何方式限制所描述的主题。一个部分的标题和/或小标题下的内容不限于节标题和/或字幕,但适用于本发明的整个描述。

[0031] 任何出版物的引用是为之前的申请日的公开内容,并且不应被解释为是,本权利要求书没有资格由于在先发明而先于这些出版物的承认。此外,所提供的出版物的日期可以是其中可需要被独立地确认实际出版日期不同。

[0032] 本发明涉及有关生物化学感应、测定、和应用的领域。特别是,本发明涉及对于少量蒸气凝析样品的采集(例如单个液滴为10fL(飞升)体积的被试呼出气体凝析),防止或是显著减少所采集蒸汽凝析蒸发,分析样品,利用移动电话分析样品,以及无需专业人士对于以上采集与分析过程的操作。由于呼出气凝析与其它类蒸气凝析共享多种特性,本公开使用EBC作为代表以阐释本发明的某些实施方案,但是这样的介绍不应被理解为对于本发明的任何限制。

[0033] 定义

[0034] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有如本公开所属本领域的普通技术人员所理解的相同的含义。虽然任何类似或等同于本文描述的方法和材料也可以用在实践或本教导的测试中,在此说明一些示例性的方法和材料。

[0035] 术语“多肽”,“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指任何长度的氨基酸的聚合物。该聚合物可以是直链或支链,可以包含修饰的氨基酸,并且可被非氨基酸中断。该术语还包括已被修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成,糖基化,脂质化,乙酰化,磷酸化,或任何其他操作,如与标记组分缀合。如本文所用的术语“氨基酸”指的是天然和/或非天然或合成的氨基酸,包括甘氨酸和D或L光学异构体,以及氨基酸类似物和拟肽。

[0036] 术语“次级捕获剂”,同时也可称为“探测剂”,是指一组具有对抗原具有高度特异性亲和力的生物分子或化学化合物。所述次级捕获剂可以链接上光学检测的标记,例如,酶,荧光标记,或本身可以由通过生物耦合被链接到光学检测标记的另一探测剂检测(赫曼森,“生物结合技术”学术出版社,第2版,2008年)。

[0037] 术语“捕获剂反应性基团”是指在分子中的化学功能的部分,其是与捕获剂反应,也就是说,可与捕获剂的集团反应(如,羟基,巯基,羧基或胺基)以产生一个稳定的强烈的,例如,共价键。

[0038] 术语“特异性结合”和“选择性结合”是指捕获剂优先结合到特定的存在于不同目标分析物的异质混合物中的目标分析物的能力。特定或选择性结合相互作用将样品中的预期的(例如,活动)和不希望的(例如,不活动)的目标分析物区分,通常超过约10至100倍或更多(例如,大于约1000或10,000倍)。

[0039] 术语“分析物”是指分子(例如,蛋白质,肽,DNA,RNA,核酸或其它分子),细胞,组织,病毒和具有不同的形状的纳米颗粒。

[0040] 术语“化验”/“测定”是指测试样品以检测分析物的存在和/或丰度。

[0041] 如本文中所使用的,术语“确定”,“测量”和“评估”和“测定”可互换使用,并包括定量和定性测定。

[0042] 如本文所用,术语“发光标记”指能够在外部激励发光时的标记。这可以是光致发光。荧光标记(其包括染料分子或量子点),和发光标记(例如,电或化学发光标记物)都是不

同类型的发光标记。外部激励对于荧光是光(光子),对于电发光时电流,而对于化学发光时化学反应。外部激励可以是上述的组合。

[0043] “被标记分析物”一词指的是被发光标记可检测地标记地分析物,使得该分析物可通过评估标记的存在来检测标记的分析物。一个标记分析物可以被直接标记(即,分析物本身可直接耦合到一个标签,例如,通过很强的键,例如共价或非共价键),或一个标记的分析物可以被间接标记(即分析物是由被直接标记的次级捕获剂

[0044] 术语“杂交”和“结合”,相对于核酸,可以互换使用。

[0045] 术语“捕获剂/分析物复合物”是指分析物与捕获剂的特定结合产生的复合物。捕获剂和用于捕获剂的分析物通常会在彼此“特异性结合的条件”或“结合适于特定条件”下特异性结合,在这里这样的条件是那些条件(盐浓度,pH值,洗脱剂,蛋白质方面下浓度,温度等),其允许捕获剂和分析物之间地结合在溶液中发生。这种条件,特别是对于抗体及其抗原和核酸杂交的技术,是公知的。(见,例如,Harlow和Lane (Antibodies:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y. (1989) 和Ausubel等,Short Protocols in Molecular Biology,5thed.,Wiley&Sons,2002)。

[0046] 受试者可以是任何人或非人动物。对象可以是执行本方法的人,一个病人,在测试中心的客户等。

[0047] 如本文所使用的,“诊断样品”指的是作为身体副产品的任何生物样品,如已从受试者得到的体液。诊断样品可以直接从液体形式的受试者中获得,或者可以通过首先将身体副产物置于溶液中从受试者得到,例如缓冲液。示例性的诊断的样品包括,但不限于,唾液,血清,血液,痰,尿,汗,泪液,精液,粪便,呼吸,活组织检查,粘液,等等。

[0048] 如本文中所使用的,“环境样品”指的是从环境中获得的任何样品。环境样品包括从河流液体样品,湖泊,池塘,海洋,冰川,冰山,雨,雪,污水,水库,自来水,饮用水等;从土壤,堆肥,沙子,岩石,混凝土,木材,砖,污水等固体样品;和从空气中,水中散热孔,工业废气,汽车废气等气体样品。典型地,不以液体形式的样品在本发明的方法分析前转化为液体形式。

[0049] 如本文所使用的,“食品样品”指的是适于动物食用的,例如,人食用的任何样品。食料样品可以包括原材料,熟食品,食品的植物和动物来源的,预处理食品以及部分或完全加工的食品等。通常,未在液体形式的样品在本发明的方法所述的分析前转化为液体形式的样品。

[0050] 术语“诊断”,如本文所用,是指使用的方法或用于识别分析物的,预测的结果和/或预测疾病或感兴趣的病症的治疗的反应。诊断可包括预测具有疾病或病症的可能性或易感性,估计疾病或病症的严重程度,确定疾病或病症进展的风险,评估对治疗的临床反应,和/或预测对治疗的反应。

[0051] 如本文所使用的“生物标记物”,是感兴趣的样品中找到的任何分子或化合物,并且已知是与该样品所来源的受试者的疾病或感兴趣的状况的诊断或存在或倾向相关联。生物标记物包括,但不限于,已知的与疾病或感兴趣的状况相关联的,多肽或复合物(例如,抗原,抗体),核酸(例如,DNA,miRNA的,mRNA)的,药物的代谢产物,脂质,碳水化合物,激素,维生素等。

[0052] 相对于诊断健康状况中如本文使用的“条件”,是指精神或身体的生理状态,与其

他生理状态区分。一种健康状态在某些情况下,可能不被诊断为一种疾病。感兴趣的示例性健康状况包括,但不限于,营养保健;老化;暴露于环境中的毒素,杀虫剂,除草剂,合成的激素类似物;怀孕;绝经;男性更年期;睡觉;强调;糖尿病前期;行使;疲劳;化学平衡;等。术语“生物素部分”是指包括生物素结构部分结合以在亲和链霉生物素或生物素类似物如脱硫生物素,oxybiotin,2'-亚氨基生物素,diaminobiotin,生物素亚砷,生物胞素等的亲和剂至少10⁻⁸M。生物素亲和剂还可以包括一个连接体,例如,-LC生物素,-LC-LC-生物素,-SLC生物素或-PEG_n生物素,其中n是3-12。

[0053] 术语“实体”是指,但不限于蛋白质,肽,DNA,RNA,核酸,分子(或大或小),细胞,组织,病毒,具有不同形状的纳米颗粒,这将结合于“结合位点”。该实体包括捕获试剂,探测剂和阻断剂。“实体”包括“分析物”,而这两个术语可以互换使用。

[0054] 术语“结合位点”指的是在固体表面上的位置,可以在样品中固定“实体”。

[0055] 术语“实体伙伴”指的是,但不限于蛋白质,肽,DNA,RNA,核酸,分子(或大或小),细胞,组织,病毒,具有不同形状的纳米颗粒,其在“结合位点”上并将结合实体。实体,包括但不限于捕获剂,探测剂,二次探测剂,或“捕获剂/分析物复合物”。

[0056] 术语“智能电话”或“移动电话”,它可以互换使用,是指具有一个照相机和通信硬件和软件,可以使用相机拍摄图像,处理由照相机拍摄的图像,和将数据传输到远处的手机。在一些实施方案中,智能手机有闪光灯。

[0057] 术语一个区域的“平均线性尺寸”被定义为等于该区域面积乘以4再除以该区域的周边的长度。例如,该区域为矩形,具有宽度w和长度L,则该矩形的线性尺寸的平均值为 $4 * W * L / (2 * (L + W))$ (其中“*”表示乘,“/”表示除)。根据这个定义,平均线性尺寸,分别为,w为宽度W的平方,以及d为具有直径d的圆。该区域包括,但不限于,结合位点或存储部位的区域。

[0058] 周期性结构阵列的术语“周期”是指从一个结构的中心到最近的相邻相同结构的中心的距离。

[0059] 术语“存储位点”是指在平板上的区域,其中,所述点包含被加入到样品的试剂,该试剂能够被溶解到与试剂接触的样品中,并在样品中扩散。

[0060] 术语“相关”是指它与分析物检测,样品中或板上分析物或实体的定量和/或控制,被添加到样品或板的试剂的控制或定量或相关。

[0061] 术语表面的“亲水性”,“湿度”或“湿”是指在表面上的样品的接触角小于90度。

[0062] 术语表面的“疏水性”,“非润湿”,或“不湿”意味着表面上的样品的接触角等于或大于90度。

[0063] 术语一个量的“变化”,是指实际值和所需值或数量的平均值之间的差。术语数量的“相对变化”指的是变化到所需的值或量的平均值的比值。例如,如果一个量的理想值是Q,实际值是 $(Q + \Delta)$,则 Δ 是变化和 $\Delta / (Q + \Delta)$ 是相对变化。术语“相对样品厚度的变化”指的是样品厚度变化与平均样品厚度的比率。

[0064] 术语“光学透明”是指一种材料,它允许光信号的传输,其中术语“光信号”指的是,除非另有说明,用于探测样品,板,间隔件,规模的标记,使用的任何结构,或者它们的任意组合中一个属性的光信号。

[0065] 术语“非样品体量”指的是,在一个CROF过程的闭合构型,即不被样品而是由不属于样品的其他对象占据的板之间的容积。这些对象包括,但不限于,间隔件,气泡,粉尘,或

者它们的任意组合。非样品体量常混于样品中。

[0066] 术语“饱和的温育时间”指的是所需要的两种分子之间的结合以达到平衡的时间(例如捕获剂和分析物)。对于表面固定测定中,“饱和的温育时间”是指样品中的目标分析物(实体)和板面上的结合位点之间的结合达到平衡所需的时间,即结合位点所捕获并固定的目标分子(实体)的平均数目在统计学上是几乎不变的之后的时间。

[0067] 在一些情况下,“被分析物”和“结合体”和“实体”是可互换的。

[0068] 术语“第一板”和“采集板”相互可换。术语“第二板”和“gaiban”相互可换。

[0069] “处理器”,“通信装置”,“移动装置”,指的是包含基本的电子元件(包括一个或多个存储器,输入输出接口,中央处理单元,指令,网络接口,电源的计算机系统,等等)来执行计算任务。该计算机系统可以是包含指令以执行特定任务,或者可以是专用计算机的通用计算机。

[0070] “站点”或在描述信号或数据通信中使用的“位置”是指其中一个装置或主体所在的局部区域。一个站点可以指一个房间的建筑结构内,如一个医院,或一个较大的地理限定区域之内的一个较小的地理定义的区域。远程站点或远程位置,说的是该远离第二站点的第一站点,是物理上从第二站点按距离和/或通过物理障碍分离的第一部位。远程站点可以是建筑结构中第二部位不同房间的第一站点,与第二站点在不同的建筑的第一站点,与第二站点在不同城市的第一站点,等等。

[0071] 如本文所用,术语“样品采集站点”指的是在其中样品可以从受试者中获得的位置。样品采集网站可能是,例如,一个零售商位置(例如,连锁店,药店,超市或百货公司),供应商的办公室,医生的办公室,医院,主体的家,一个军事要地,雇主站点或其他网站或网站的组合。如本文所用,术语“样品采集站点”也可指一个业务,服务,或与站点相关联的机构的业主或代表。

[0072] 如本文所用,“原始数据”包括从传感器,摄像机和其它部件和仪器,其检测或测量的属性或样品的特性的信号和直接读取。如本文所用的“过程管理”,是指一系列的用于规划和/或监测过程表现,如样品分析过程,的方法和系统。

[0073] 一个本领域的技术人员将理解的是,本发明并不限于将其应用到布置或列于此的说明书或附图中的构造的细节,元件的安排,类别选择,加权,预先确定的信号,或是这些步骤。本发明能够被以许多不同的方式实施或执行。

[0074] 必须指出,如本文和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一”,“一个”,和“该”包括复数对象,除非上下文另有明确规定,例如,使用单词“单”时。例如,提及“一种分析物”包括单个分析物和多个分析物,提及“一种捕获剂”包括单个捕获剂和多个捕获剂,提及“一种探测剂”包括单个探测剂和多个探测剂和提及“试剂”包括一个试剂和多个试剂。

[0075] 采集分析蒸气凝析,特别是呼出气凝析的装置和系统,以及使用方法

[0076] 这里提供一种采集和分析蒸气凝析(VC)样品的装置,其包括:

[0077] 一个采集板和一个盖板,其中:

[0078] 所述两板可相对于彼此移动进入不同的构型;

[0079] 一个或两个所述板是柔性的;

[0080] 所述两板中每一个在其相应表面上都具有一个样品接触区域以接触包含有分析物的蒸气凝析(VC)样品;

[0081] 一个或两个所述板包含有固定于相应板上的间隔件,其中所述间隔件具有预定的基本均匀的高度和预定的恒定的间隔件间距离,其中至少一个所述间隔件位于所述样品接触区域内,

[0082] 其中,所述构型中的一个是一个开放构型,在开放构型中:所述两板相互分离,板之间的间隔不由间隔件调节,所述VC样品被放置在一个或两个板上;且

[0083] 其中,所述构型的另一个是一个闭合构型,它是在开放构型时VC样品被放置后形成的构型;在闭合构型中:VC样品的至少一部分由两个板按压成一个厚度均匀薄层,其中所述薄层的均匀厚度由所述两板的样品接触表面限定,由间隔件和所述两板的两个样品接触表面所调节,并且等于或小于 $30\mu\text{m}$,具有微小偏差。

[0084] 在一些实施方案中,所述装置在一个或两个所述板上,还包含有一个或多个干结合位点和/或一个或多个试剂位点。在一些实施方案中,所述样品是呼出气凝析。

[0085] 在一些实施方案中,所述样品是来自生物样品、环境样品、化学样品、或是临床样品的蒸发气体。在一些实施方案中,其中所述分析物包括分子(例如蛋白质,多肽,脱氧核糖核酸,核糖核酸,核酸,或是其他分子),细胞,组织,病毒以及不同形状的纳米颗粒。在一些实施方案中,其中所述分析物包括挥发性有机物(VOCs)。在一些实施方案中,其中所述分析物包括氮气,氧气,二氧化碳,水,和惰性气体。在一些实施方案中,其中所述分析物是被染色的。

[0086] 在一些实施方案中,所述装置可以包括涂覆在一个或两个所述板上的干试剂。在一些实施方案中,干试剂可结合血液中的分析物,从而将分析物固定在一个或两个板上的表面上。在这些实施方案中,举例来说,所述试剂可以是抗体或其他特异性结合剂。该干试剂可以具有预定的面积。在其它实施方案中,所述装置可以包括在一个或多个所述板上的可释放的干试剂,例如像细胞染色剂或标记的检测剂例如抗体等标记的试剂。在一些情况下,在板上可以存在含有可延迟干试剂释放的释放时间控制材料,其中释放时间控制材料延迟可释放干试剂释放到血液样品中的时间。

[0087] 在一些情况下,释放时间控制材料将干试剂释放到血液样品中的时间延迟至少3秒,例如至少5秒或至少10秒。在一些实施方案中,所属装置可以含有多个干结合位点和/或多个试剂位点,从而允许进行多重测定。在一些情况下,当所述板处于闭合构型时,干燥结合位点占据的区域可以与试剂位点占据的区域相对。

[0088] 在一些实施方案中,所述试剂包括标记试剂或染色试剂。

[0089] 在一些实施方案中,调节均匀厚度层的间隔件(即在层中将板彼此间隔开的间隔件)具有至少1%,例如至少2%或至少5%,的“填充系数”,其中填充系数是指与均匀厚度层接触的间隔件面积同与均匀厚度层接触的总板面积的比率。在一些实施方案中,对于调节均匀厚度层的间隔件,间隔件的杨氏模量乘以间隔件的填充系数等于或大于10Mpa,例如至少15Mpa或至少20Mpa,其中填充系数是与均匀厚度层接触的间隔件面积同与均匀厚度层接触的总板面积的比率。在一些实施方案中,柔性板的厚度乘以柔性板的杨氏模量在60至750Gpa- μm ,例如100至300Gpa- μm ,300至550Gpa- μm 或550至750Gpa- μm 的范围内。在一些实施方案中,对于柔性板,间隔件间距离(ISD)的四次方除以柔性板的厚度(h)和柔性板的杨氏模量(E) $\text{ISD}^4/(\text{hE})$ 等于或小于 $106\mu\text{m}^3/\text{Gpa}$,例如小于 $105\mu\text{m}^3/\text{Gpa}$,小于 $104\mu\text{m}^3/\text{Gpa}$ 或小于 $103\mu\text{m}^3/\text{Gpa}$ 。

[0090] 在一些实施方案中,一个或两个板在板的表面上或板内部包括位置标记,其提供板的位置的信息,例如将被分析的位置或血液在其上被放置的位置。在一些情况下,一个或两个板可以在板的表面上或板内部包括比例标记,其提供血液样品和/或板的结构的横向尺寸的信息。在一些实施方案中,一个或两个板在板的表面上或在板内部包括辅助样品成像的成像标记。例如,成像标记可以帮助成像装置聚焦或将成像装置引导到装置上的某个位置。在一些实施方案中,所述间隔件可以用作位置标记,比例标记,成像标记或其任何组合。

[0091] 在一些实施方案中,在样品表面之一上,其还包括包围被放置在采集板上的部分或全部VC样品的闭合间隔件。

[0092] 在一些实施方案中,高度均匀的厚度具有等于或小于0.5um的值。在一些实施方案中,高度均匀的厚度具有在0.5um至1um,1um至2um,2um至10um,10um至20um或20um至30um范围内的值。

[0093] 在一些实施方案中,处于闭合构型的VC样品的至少一部分的厚度大于在开放构型下被放置在采集板上的VC样品的厚度。

[0094] 在一些实施方案中,处于闭合构型的VC样品的至少一部分的厚度小于在开放构型下被放置在采集板上的VC样品的厚度。

[0095] 在一些实施方案中,其中通过直接压印板或者注塑板来将间隔件固定在板上。

[0096] 在一些实施方案中,其中板和间隔件的材料选自聚苯乙烯,PMMA,PC,COC,COP或另一种塑料。

[0097] 在一些实施方案中,间隔件间隔在1um至50um,50um至100um,100um至200um或200um至1000um的范围内。

[0098] 在一些实施方案中,VC样品是来自人或动物的呼出气凝析。

[0099] 在一些实施方案中,调节均匀厚度层的间隔件具有至少1%的填充系数,其中填充系数是与均匀厚度层接触的间隔件面积同与厚度均匀层接触的总板面积的比率。

[0100] 在一些实施方案中,对于调节均匀厚度层的间隔件,间隔件的杨氏模量乘以间隔件的填充系数等于或大于10Mpa,其中填充系数是与厚度均匀层接触的间隔件面积同与厚度均匀层接触的总板面积的比率。

[0101] 在一些实施方案中,对于柔性板,柔性板的厚度乘以柔性板的杨氏模量在60至750Gpa-um的范围内。

[0102] 在一些实施方案中,对于柔性板,间隔件间距离 (ISD) 的四次方除以柔性板的厚度 (h) 和柔性板的杨氏模量 (E) $ISD^4 / (hE)$, 等于或小于 $106 \mu m^3 / Gpa$ 。

[0103] 在一些实施方案中,一个或两个板在板的表面上或板内部包括位置标记,其提供板的位置的信息。

[0104] 在一些实施方案中,一个或两个板在板的表面上或板内部包括比例标记,其提供样本和/或板的结构的横向尺寸的信息。

[0105] 在一些实施方案中,一个或两个板在板的表面上或板内部包括辅助成像的成像标记。

[0106] 在一些实施方案中,间隔件用作位置标记,比例标记,成像标记或其任何组合。

[0107] 在一些实施方案中,均匀厚度层的平均厚度约等于样品中分析物的最小尺寸。

- [0108] 在一些实施方案中,间隔件的最小横向尺寸小于或基本上等于样品中分析物的最小尺寸。
- [0109] 在一些实施方案中,间隔件间距离在1um至120um,5um至50um或120um至200um的范围内。
- [0110] 在一些实施方案中,间隔件距离基本上是周期性的。
- [0111] 在一些实施方案中,间隔件是具有选自圆形,多边形,圆形,正方形,矩形,椭圆形,椭圆形或其任何组合的横截面形状的柱子。
- [0112] 在一些实施方案中,间隔件具有柱形形状并且具有基本平坦的顶表面,其中,对于每个间隔件,间隔件的横向尺寸与其高度的比率至少为1。
- [0113] 在一些实施方案中,每个间隔件的横向尺寸与其高度的比率至少为1。
- [0114] 在一些实施方案中,间隔件的最小横向尺寸在0.5um至100um的范围内。
- [0115] 在一些实施方案中,间隔件的最小横向尺寸在0.5um至10um的范围内。
- [0116] 在一些实施方案中,间隔件具有至少100/mm²的密度。
- [0117] 在一些实施方案中,间隔件具有至少1000/mm²的密度。
- [0118] 在一些实施方案中,板中的至少一个是透明的。
- [0119] 在一些实施方案中,至少一个板由柔性聚合物制成。
- [0120] 在一些实施方案中,对于压制板的压力,间隔件是不可压制的和/或仅一个板是独立地柔性的。
- [0121] 在一些实施方案中,柔性板具有在10um至200um(例如,约10um,25um,50um,75um,100um,125um,150um,175um)范围内的厚度。
- [0122] 在一些实施方案中,所述偏差小于30%,10%,5%,3%或1%。
- [0123] 在一些实施方案中,所述第一板和第二板被连接并且被配置为通过折叠板而从开放构型改变到闭合构型。
- [0124] 在一些实施方案中,所述第一和第二板通过铰链连接,并且被配置为通过沿着铰链折叠板而从打开配置改变到闭合构型。
- [0125] 在一些实施方案中,所述第一板和第二板通过铰链连接,铰链与板为不同材料,并且被配置为通过沿着铰链折叠板而从开放构型改变到闭合构型。
- [0126] 在一些实施方案中,所述第一板和第二板由单片材料制成,并且被配置为通过折叠板而从开放构型改变为闭合构型。
- [0127] 在一些实施方案中,厚度均匀的样品层在至少100um²的横向面积上是均匀的。
- [0128] 在一些实施方案中,厚度均匀的样品层在至少1mm²的横向面积上是均匀的。
- [0129] 在一些实施方案中,所述装置被配置为在60秒或更少时间内可分析样品。
- [0130] 在一些实施方案中,在闭合构型下,最终样品厚度装置被配置为在60秒或更少时间内分析样品。
- [0131] 在一些实施方案中,所述装置还在一个或两个板上包括一个或多个扩增位点,当分析物或标记在距离扩增位点500nm以内时,每个扩增位点能够扩增来自分析物或分析物的标记物的信号。
- [0132] 在一些实施方案中,在闭合构型中,最终样品厚度装置被配置成在10秒或更少时间内分析样品。

[0133] 在一些实施方案中,干结合位点包含捕获剂。

[0134] 在一些实施方案中,干结合位点包含抗体或核酸。

[0135] 在一些实施方案中,可释放的干试剂是被标记的试剂。在一些实施方案中,可释放的干试剂是荧光标记的试剂。在一些实施方案中,可释放的干试剂是染料。在一些实施方案中,可释放的干试剂是小珠。在一些实施方案中,可释放的干试剂是量子点。在一些实施方案中,可释放的干试剂是荧光标记的抗体。

[0136] 在一些实施方案中,第一板在其表面上还包括第一预定测定位点和第二预定测定位点,其中测定位点的边缘之间的距离基本上大于当板处于所述闭合构型时均匀厚度层的厚度,其中所述均匀厚度层的至少一部分在所述预定测定位点上方,并且其中所述样品具有能够在所述样品中扩散的一种或多种分析物。

[0137] 在一些实施方案中,第一板在其表面上具有至少三个分析物测定位点,并且任何两个相邻测定位点的边缘之间的距离基本上大于当板处于闭合构型时均匀厚度层的厚度,其中所述均匀厚度层的至少一部分在所述测定位点上方,并且其中所述样品具有能够在所述样品中扩散的一种或多种分析物。

[0138] 在一些实施方案中,第一板在其表面上具有至少两个相邻的分析物分析部位,它们没有被分开明显大于当板处于闭合构型时均匀厚度层的厚度的距离,其中在所述均匀厚度层的至少一部分在所述测定位点上方,并且其中所述样品具有能够在所述样品中扩散的一种或多种分析物。

[0139] 在一些实施方案中,可释放的干试剂是细胞染色剂。在一些实施方案中,所述装置还包括作为用于检测光信号的光检测器的检测器。在一些实施方案中,该装置还包括检测器,该检测器是用于检测电信号的电检测器。

[0140] 一种使用移动电话快速分析蒸气凝析的系统,包括:

[0141] (a) 一个任何前述权利要求的装置;

[0142] (b) 一个移动通信设备,其包括:

[0143] i. 用于检测和/或成像蒸气凝析样品的一个或多个照相机;和

[0144] ii. 电子器件,信号处理器,和用于接收和/或处理所检测的信号和/或蒸气凝析样品的图像以及用于远程通信的硬件和软件。

[0145] 在一些实施方案中,所述系统还包括来自移动通信设备或外部源的光源。

[0146] 在一些实施方案中,所述板之一包含能够结合分析物的结合位点,其中均匀厚度样品层的至少一部分在结合位点上方,并且显著小于结合位点的平均横向线性尺寸。

[0147] 在一些实施方案中,还包括:

[0148] (d) 被配置为持有所述样品并可安装到所述移动通信装置的外壳。

[0149] 在一些实施方案中,所述外壳包括用于促进移动通信装置对样本进行成像和/或信号处理的光学器件,以及被配置为将光学器件保持在移动通信装置上的安装件。

[0150] 在一些实施方案中,所述外壳中的光学器件的元件可相对于外壳移动。

[0151] 在一些实施方案中,所述移动通信设备被配置为向医疗专业人员,医疗机构或保险公司传送测试结果。

[0152] 在一些实施方案中,所述移动通信设备还被配置为与医疗专业人员,医疗机构或保险公司传送关于测试和对象的信息。

[0153] 在一些实施方案中,移动通信设备还被配置为将测试的信息传送到云网络,所述云网络处理该信息以改进测试结果。

[0154] 在一些实施方案中,移动通信设备还被配置为将测试和受试者的信息传送到云网络,所述云网络处理该信息以改进测试结果,且所精化的测试结果被发送回受试者。

[0155] 在一些实施方案中,移动通信设备被配置为从医疗专业人员处接收处方,诊断或医疗建议。

[0156] 在一些实施方案中,所述移动通信设备配置有硬件和软件以:

[0157] a. 捕获样品的图像;

[0158] b. 分析图像中的测试位置 and 对照位置;和

[0159] c. 将从对测试位置的分析获得的值与表征快速诊断测试的阈值进行比较。

[0160] 在一些实施方案中,所述板的至少一个包括其中存储测定试剂的存储位点。在一些实施方案中,至少一个摄像机从CROF装置读取信号。在一些实施方案中,移动通信设备经由WiFi或移动通信网络与远程位置通信。

[0161] 在一些实施方案中,所述移动通信设备是移动电话。

[0162] 一种使用移动电话快速分析样品中的分析物的方法,包括:

[0163] a) 将样品被放置在任何现有系统权利要求的装置上;

[0164] b) 测定被放置在所述装置上的样品中的分析物以产生结果;和

[0165] c) 将所述结果从所述移动通信设备传送到远离所述移动通信设备的位置。

[0166] 在一些实施方案中,所述分析物包含具有不同形状的分子(例如蛋白质,肽,DNA, RNA,核酸或其他分子),细胞,组织,病毒和纳米颗粒。

[0167] 在一些实施方案中,所述分析物包括白细胞,红细胞和血小板。在一些实施方案中,该方法包括:

[0168] a) 分析所述远程位置处的结果以提供分析结果;和

[0169] b) 将所分析的结果从所述远程位置传送到所述移动通信设备。

[0170] 在一些实施方案中,分析由远程位置处的医疗专业人员进行。在一些实施方案中,移动通信设备从远程位置处的医疗专业人员接收处方,诊断或建议。

[0171] 在一些实施方案中,处于闭合构型的VC样品的至少一部分的厚度大于在开放构型下被放置在采集板上的VC样品的厚度。

[0172] 在一些实施方案中,处于闭合构型的VC样品的至少一部分的厚度小于在开放构型处被放置在采集板上的VC样品的厚度。

[0173] 在一些实施方案中,测定步骤包括检测样品中的分析物。

[0174] 在一些实施方案中,分析物是生物标志物。在一些实施方案中,分析物是蛋白质,核酸,细胞或代谢物。在一些实施方案中,步骤(b)中进行的测定是结合测定或生化测定。

[0175] 一种用于分析蒸气凝析样品中的分析物的方法,包括:

[0176] 获得任何现有装置权利要求的装置;

[0177] 将所述蒸气凝析样品被放置到所述装置的一个或两个板上;

[0178] 将所述板置于闭合构型中并且在所述两板的至少一部分上施加外力;和

[0179] 在板处于闭合构型时分析均匀厚度层中的分析物。

[0180] 在一些实施方案中,其中所述方法包括:

- [0181] (a) 获得样品;
- [0182] (b) 获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板,其中每个板具有基本上平面的样品接触表面,一个或两个板是柔性的,并且所述板中的一个或两个包括间隔件,其与相应的样品接触表面固定,并且其中所述间隔件具有:
- [0183] i. 预定的基本均匀的高度,
- [0184] ii. 具有基本均匀的横截面和顶表面平坦的柱子的形状;
- [0185] iii. 宽度与高度的比等于或大于1;
- [0186] iv. 预定的恒定的间隔件间距离,其在10um至200um的范围内;
- [0187] v. 等于1%或更大的填充系数;和
- [0188] (c) 当所述板被配置为开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上,其中所述开放构型是这样的配置,其中所述两个板被部分或完全分开并且所述板之间的间隔不由间隔件调节;
- [0189] (d) 在(c)之后,使用两个板将样品的至少一部分压制成为由板的样品接触表面限制的基本上厚度均匀的层,其中所述层的均匀厚度由间隔件和所述板调节,并且具有等于或小于30um的平均值,其具有小于10%的偏差,其中所述压制包括:
- [0190] 将两块板放在一起;和
- [0191] 以平行或顺序的顺应性按压板的至少一个区域将板压在一起以形成闭合构型,其中顺应性按压是在板的至少一部分上产生基本上均匀的压力,以及所述按压使所述样品的所述至少一部分在所述板的样品接触表面之间横向扩展,并且其中所述闭合构型是这样的配置,其中所述均匀厚度层区域的所述板之间的间隔由所述间隔件调节;和
- [0192] (e) 在所述板处于所述闭合构型时分析所述均匀厚度的层;
- [0193] 其中所述填充系数是所述间隔件接触面积与总板面积的比率;其中适形按压是使得施加在区域上的压力基本上恒定的方法,而改压力与板的外表面的形状变化无关;和
- [0194] 其中所述平行按压是对所欲施压区域同时施加压力,而顺序按压是对所欲施压区域的一部分施加压力并逐渐移动到其其他部分。
- [0195] 在一些实施方案中,其中所述方法包括:
- [0196] 在所述板处于所述闭合构型之后去除所述外力;以及在所述板处于所述闭合构型时,在所述均匀厚度层中成像所述分析物;以及对所述图像的一个区域中的分析物或标记物的数量进行计数。
- [0197] 在一些实施方案中,其中所述方法包括:
- [0198] 在所述板处于所述闭合构型之后去除所述外力;以及当所述板处于闭合构型时,测量均匀厚度层中的光信号。
- [0199] 在一些实施方案中,间隔件间距离在20um至200um的范围内。在一些实施方案中,间隔件间距离在5um至20um的范围内。
- [0200] 在一些实施方案中,填充系数和间隔件的杨氏模量的乘积为2Mpa或更大。
- [0201] 在一些实施方案中,表面偏差小于50nm。
- [0202] 在一些实施方案中,所述方法还包括计算相关体量的样品中的分析物的浓度的步骤,其中所述计算基于由存储位点的预定面积限定的相关体量的体积,在闭合构型中的样品均匀厚度,以及检测到的目标实体的数量。

- [0203] 在一些实施方案中,分析步骤包括计数样品中的分析物。
- [0204] 在一些实施方案中,通过以下步骤进行成像和计数:
- [0205] i. 照亮均匀厚度层中的细胞;
- [0206] ii. 使用CCD或CMOS传感器获取所述细胞的一个或多个图像;
- [0207] iii. 使用计算机识别所述图像中的细胞;和
- [0208] iv. 计数图像的一个区域中的细胞的数量。
- [0209] 在一些实施方案中,外力由人手提供。在一些实施方案中,该方法还包括涂覆在一个或两个板上的干试剂。
- [0210] 在一些实施方案中,厚度均匀的样品层具有高达 $\pm 5\%$ 的厚度均匀性。
- [0211] 在一些实施方案中,间隔件是具有选自圆形,多边形,圆形,正方形,矩形,椭圆形,椭圆形或其任意组合的横截面形状的柱子。
- [0212] 在一些实施方案中,间隔件之间的间隔大约是分析物的最小尺寸。
- [0213] 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中一个或两个板样品接触表面包括一个或多个扩增位点,当所述分析物或标记在距离扩增位点500nm以内时,每个扩增位点能够扩增来自所述分析物或所述分析物的标记物的信号。
- [0214] 在一些实施方案中,样品是呼出气凝析。在一些实施方案中,样品是来自生物样品,环境样品,化学样品或临床样品的蒸气。在一些实施方案中,分析物包括具有不同形状的分子(例如蛋白质,肽,DNA, RNA, 核酸或其他分子),细胞,组织,病毒和纳米颗粒。在一些实施方案中,分析物包括挥发性有机物(VOC)。在一些实施方案中,分析物包括氮气,氧气,CO₂,水和惰性气体。在一些实施方案中,分析物被染色。
- [0215] 在一些实施方案中,在样品表面之一上,其还包括包围被放置在采集板上的部分或全部VC样品的闭合间隔件。在一些实施方案中,高度均匀的厚度具有等于或小于0.5um的值。在一些实施方案中,高度均匀的厚度具有在0.5um至1um范围内的值。在一些实施方案中,高度均匀的厚度具有在1um至2um范围内的值。在一些实施方案中,高度均匀的厚度具有在2um至10um范围内的值。在一些实施方案中,高度均匀的厚度具有在10um至20um范围内的值。在一些实施方案中,高度均匀的厚度具有在20um至30um范围内的值。在一些实施方案中,在样本表面之一上,其还包括包围被放置在采集板上的部分或整个VC样本的闭合间隔件。
- [0216] 实施方案EBC-1.SiEBCA(单滴呼出气凝析采集器/分析器)
- [0217] 呼出气凝析(EBC)分析是一种检测生物标志物的非侵入性方法,其中生物标志物主要来自下呼吸道。EBC在安静呼吸期间被采集,作为呼出气雾冷却和冷凝的产物。
- [0218] 一种使用SiEBCA(单滴EBC采集器/分析器)采集呼出气凝析(EBC)的示例性方法,如图1所示,包括以下基本步骤:
- [0219] (1) 呼气到采集板上(图1-1)。受试者(例如人)呼气到称为“采集板”的板上,且呼出气冷凝成EBC,其根据呼吸时间而形成不同尺寸的液滴。对于短的呼吸时间,大多数液滴彼此分离。采集EBC的采集板的表面称为样品表面;
- [0220] (2) 将盖板放置在采集板上并将它们压在一起(图1-2)。具有间隔件(其用于调节盖板和基板之间的间隔)的盖板放置在样品表面的顶部;和
- [0221] (3) 将板压成“闭合构型”(图1-3)。盖板和基板与板之间的EBC的至少一部分一起

被压制。

[0222] 在图1的方法中,如图1所示,初始液滴被压成具有由板和间隔件(未示出)所调节的厚度的薄层EBC。

[0223] 在SiEBCA中使用“单滴”的措辞的一个原因是原则上,SiEBCA可以检测和分析被放置在板上的单滴EBC。

[0224] 在本发明的描述中,“基板”和“盖板”分别可与“第一板”和“第二板”互换。

[0225] 在一些实施方案中,板被冷却以减少所采集的EBC的蒸发。

[0226] A1一种采集EBC的方法,作为用于从受试者采集EBC的本发明的基本实施方案,如图1所示,包括以下步骤:

[0227] (a) 获得可相对于彼此移动成不同构型的采集板和盖板,其中所述板中的一个或两个包括间隔件(图1中未示出,但在图2中有示),所述间隔件用相应的并且具有100um以下的预定平均高度;

[0228] (b) 当所述板配置成开放构型时,通过由受试者朝向采集板呼出气体被放置EBC样品,其中:

[0229] (i) 呼出气体在采集板的采集表面上冷凝以形成具有不同横向尺寸和不同高度的液滴和/或液块,这取决于采集表面的表面润湿性;和

[0230] (ii) 开放构型是这样的构型,其中两个板部分地或完全地分开并且板之间的间隔不受间隔件调节;和

[0231] (c) 在(b)之后,使所述盖板位于所述采集板的采集表面上,然后通过按压所述两板而使所述两板进入闭合构型,其中:

[0232] (i) 所述闭合构型是这样的构型,其中:所述间隔件的至少一部分在所述盖板和所述采集板之间,并且所述采集板的采集表面的相关区域被所述盖板覆盖,并且由间隔件调节板间距;和

[0233] (ii) 在闭合构型下,在相关区域中,在步骤(b)中形成的开放构型下的大量或全部液滴或液块合并成一个或多个液块,其(1)具有大得多的横向尺寸,但是数量小于开放构型下的液块数量和(2)接触盖板和采集板的两个内表面,由此,液块的厚度由板的内表面限制并且等于内表面之间的间隔,并且暴露于环境的所被放置的EBC的总表面积显著降低;

[0234] 其中所述板间距是所述盖板和所述采集板的两个内表面(彼此面对的两个表面)之间的间隔,所述相关区域是所述采集表面的一部分或整个表面,并且所述采集表面是所述采集表面的一部分或采集板的整个表面。

[0235] 从我们的实验(在实施方案中详细描述)中,我们发现当所述两板处于闭合构型时由SiEBCA采集的EBC的最终形式取决于间隔件高度。实验上(参见图13),我们发现,如图2所示:

[0236] (1) 在SiEBCA的闭合构型下,如果两板的内表面之间的间隔小于在开放构型下的EBC液滴或液块的平均高度,则EBC液滴或液块被采集板和所述盖板压制形成具有比其在所述开放构型下厚度更薄的厚度的连续膜,并且所述膜中可以存在气穴;和

[0237] (2) 否则的话(即如果间隔等于或大于在开放构型下的平均高度),液滴和/或液块自发合并为较之开放构型下数量更少但横向尺寸(面积)更大的离散的液块,其接触盖板和采集板的样品接触(内)表面,并且具有由两板的内表面限定的厚度,其等于内表面之间的

间隔。在这种情况下,在闭合构型下的EBC样品厚度等于或大于在开放构型下的EBC样品平均厚度。如我们在实验中观察到的,在闭合构型下的EBC液块厚度的增加是由于板和EBC样品之间的相互作用导致的。

[0238] EBC-1.2.EBC采集装置

[0239] 图3是SiEBCA(单滴EBC采集器/分析器)的装置和方法的实施方案的图示:(a)其具有第一板和第二板,其中一个或两个所述板具有间隔件(这里示出:只有第一板具有间隔件);(b)在开放构型下在第一板(显示)或第二板(未显示)或两者(未显示)上被放置的样品(仅示出许多EBC液滴中的一个)和(c) (i)使用两个板来延展样品(样品在板之间流动)并降低样品厚度,和(ii)使用间隔件和板来调节处于闭合构型的样品的厚度。

[0240] A2一种采集EBC的装置,作为用于从受试者采集EBC样品的本发明的基本实施方案,如图1所示,包括:

[0241] i.第一板和第二板,其中所述两板可相对于彼此移动成不同的构型,并且一个或两个板是柔性的;

[0242] ii.位于每个板的相应表面上的用于接触EBC样品的样品接触区域,

[0243] iii.在一个或两个板上的间隔件,其中所述间隔件固定于相应的板上,具有30um或更小的预定基本均匀的高度和250um或更小的预定恒定的间隔件间距离,并且其中至少所述间隔件中的一个在所述样品接触区域内;

[0244] 其中所述构型中的一种是开放构型,其中:所述两个板分离,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述EBC样品从受试者被放置在所述板的一个或两个上;并且其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述EBC样品在所述开放构型下被放置之后被配置;并且在闭合构型中:EBC样品的至少一部分被两个板压制厚度高度均匀层,其中所述层与两个板的内表面接触并由其限制,并且其均匀厚度由板和间隔件调节。

[0245] 在段落A1和A2的一些实施方案中,EBC样品的被放置是通过从受试者直接呼出至其中一个板上。

[0246] 在段落A1和A2的一些实施方案中,EBC样品的被放置通过从受试者直接呼出至两个板上。

[0247] “覆盖时间延迟”是指从段落A1的步骤(b)EBC被放置到段落A1的步骤(c)的结束,即使盖板和采集板进入闭合构型,之间的时间差。

[0248] 在段落A1的方法中,覆盖时间延迟应尽可能短以减少被放置的EBC的蒸发。在一个优选实施方案中,覆盖时间延迟等于或小于2秒。在另一个优选实施方案中,覆盖时间延迟等于或小于5秒。在另一个优选实施方案中,覆盖时间延迟等于或小于10秒。在另一个优选实施方案中,覆盖时间延迟等于或小于30秒。在另一个优选实施方案中,覆盖时间延迟在30秒至300秒(例如30至60秒,60秒至120秒或120秒至300秒)的范围内。

[0249] EBC-1.3.EBC蒸发速率的显著降低。段落A1和A2的方法和装置的一个关键优点是,与采集板和盖板的开放构型下相比,所述两板的闭合构型显著地减小了暴露于环境的EBC的表面积,以及因此显著地降低了EBC样品蒸发速率并显著增加了EBC样品处于液体形态(即EBC样品未完全蒸发的时间)的时间。例如,我们已经观察到,干涸时间(EBC样品完全干涸所需的时间)从开放构型下的30秒增加到70分钟,增加倍数为140倍。

[0250] EBC-1.4.保护环(闭合间隔件)。为了进一步降低EBC样品的蒸发速率,闭合的隔离

物或保护环可用于包围样品以将样品与环境隔离。保护环可以围绕于与在开放构型下被放置的EBC样品相同的,或较之更大或更小的区域。保护环可以被配置为其将EBC样品进一步分成多个室(图4)。

[0251] 图4是具有“开放间隔件”和封闭间隔件的SiEBCA的图示,其中开放间隔件为柱子形状,而闭合间隔件为环形。闭合间隔件减少了采集在比和间隔件内的EBC的蒸发,因为在闭合构型下,闭合间隔件,盖板和采集板形成一个封闭腔室。如果只有开放的间隔件而不是闭合的间隔件,在板闭合构型下,采集的EBC仍然从由EBC形成的膜的边缘蒸发,尽管这种蒸发比没有盖板的蒸发慢得多。

[0252] 在段落A1和A2的方法和装置中,间隔件可以是开放间隔件,闭合间隔件或其组合。

[0253] 在本公开的其他部分中给出了保持EBC厚度均匀的装置和方法的细节。

[0254] 实施方案EBC-2.EBC分析

[0255] 本发明的另一个显著优点是,段落A1-2的方法和装置可以单独地或通过某些修改用作EBC分析器。EBC分析器分析EBC中的一个或多个目标分析物。目标分析物在第3节中进一步讨论。

[0256] 对段落1-2的方法和装置进行的修改包括但不限于以下,其可以单独(单独地)或组合使用:

[0257] (1) 结合位点。一个或两个板具有一个或多个结合位点。每种(类型)试剂处于充分区隔开的位置上(充分区隔将在后面定义)。

[0258] (2) 存储位点。一个或两个板具有一个或多个结合位点。每种(类型)试剂处于充分区隔开的位置上(充分区隔将在后面定义)。

[0259] (3) 扩增位点。

[0260] (4) 分析物检测的多路复用。

[0261] 在本公开的其他部分中给出了结合位点,存储位点,扩增位点和多路复用位点的更多细节,以及它们对于VC和EBC分析的用途。

[0262] A-3一种分析来自受试者的EBC的方法,包括:

[0263] (a) 获得可相对于彼此移动成不同构型的采集板和盖板,其中所述两板中的一个或两个包括间隔件(图1未示出,但在图2示出),其固定于相应的板上,并具有100um或更小的预定平均高度;

[0264] (b) 当所述两板被配置成开放构型时,通过从受试者朝向所述采集板呼出气体而被放置EBC样品,其中:

[0265] (i) 呼出气体在采集板的采集表面上冷凝以形成具有不同横向尺寸和不同高度的液滴和/或液块,这取决于采集表面的表面润湿性;和

[0266] (ii) 开放构型是这样的构型,其中两个板部分地或完全地分开并且板之间的间隔不受间隔件调节;

[0267] (c) 在(b)之后,使所述盖板位于所述采集板的采集表面上,然后通过按压所述两板而使所述两板进入闭合构型,其中:

[0268] (i) 所述闭合构型是这样的构型,其中:所述间隔件的至少一部分在所述盖板和所述采集板之间,并且所述采集板的采集表面的相关区域被所述盖板覆盖,并且由间隔件调节板间距;和

[0269] (ii) 在闭合构型下,在相关区域中,在步骤(b)中形成的开放构型下的大量或全部液滴或液块合并成一个或多个液块,其(1)具有大得多的横向尺寸,但是数量小于开放构型下的液块数量和(2)接触盖板和采集板的两个内表面,由此,液块的厚度由板的内表面限制并且等于内表面之间的间隔,并且暴露于环境的所被放置的EBC的总表面积显著降低;和

[0270] (d) 分析所述EBC,

[0271] 其中所述板间隔是所述盖板和所述采集板的两个内表面(所述两个表面彼此面对)之间的间隔,所述相关区域是所述采集表面的一部分或整个表面,并且所述采集表面是所述采集表面的一部分或采集板的整个表面。

[0272] 采集板通常保持在与环境相同的温度,但是在一些实施方案中,取决于采集的目的,温度可以不同于环境,更高或更低。例如,低于环境的温度可以用于减少EBC蒸发;而比环境温度更高的温度可用于使样品比环境温度下蒸发得更多。

[0273] 实施方案EBC-3.应用

[0274] EBC分析可用于检测炎症标志物,其反映慢性呼吸道疾病如慢性阻塞性肺病(COPD),哮喘和囊性纤维化(CF)的状态。EBC分析也可用于鉴定呼吸的代谢,蛋白质组和基因组指纹,旨在对于呼吸系统以及全身性疾病的早期诊断。

[0275] EBC-3.1.EBC分析

[0276] 呼吸检验是可用于临床诊断,疾病状态监测,健康监测和环境暴露评估的最小侵入性方法。

[0277] 来自受试者的呼吸混合物是包含有氮气,氧气,CO₂,H₂O和惰性气体的混合物。剩余的小部分由超过1000个痕量挥发性有机化合物(VOC)组成,其浓度范围为百万分之一(ppm)至每万亿分之一(ppt)。就其来源而言,这些挥发性物质可以在体内产生(内源的)或可以作为污染物从环境中吸收(外源的)。呼吸中的VOC的组成在性质上和数量上各不相同。

[0278] 虽然目前在人类呼吸中发现的VOC的数目超过1000,但是对于所有人来说仅有少数VOC是常见的。这些常见的VOC,包括异戊二烯,丙酮,乙烷和甲醇,是核心代谢过程的产物,对临床诊断非常有信息量。呼出气中的大量混合物和痕量VOC在肺中的血液-气体界面处在血液和肺泡空气之间进行置换。一个例外是NO,其在气道炎症的情况下被释放到气道中。

[0279] 在呼出气凝析中可以测量到人类呼吸气中发现的内源性化合物,例如无机气体(例如NO和CO),VOC(例如异戊二烯,乙烷,戊烷,丙酮)和其它典型的非挥发性物质如异前列烷,过氧亚硝酸盐或细胞因子。内源性化合物的测试可以提供关于可能的疾病状态的有价值的信息。此外,外源分子,特别是卤化有机化合物,可以指示最近暴露于药物或环境污染物。

[0280] 挥发性有机化合物(VOC)是具有高蒸气压并因此在室温下蒸发的有机物质。可以通过本发明提供的方法和装置测定作为目标分析物的VOC,其包括但不限于生物产生的VOC(例如萜烯,异戊二烯,甲烷,绿叶挥发物)和人为产生的VOC(例如,用于油漆和涂料的典型溶剂如乙酸乙酯,乙二醇醚和丙酮,来自粘合剂,油漆,粘合剂去除剂,建筑材料等的蒸气如二氯甲烷,MTBE和甲醛,用于干洗的氯氟烷和全氯乙烯,蒸气和来自化石燃料,如苯和一氧化碳的排放气体)。关于某些生物标志物的详细讨论在表1中给出。

[0281] 表1.某些疾病或应用中的呼吸标记物。

[0282]

	疾病或应用	呼吸标记物
氧化应激	脂质过氧化	戊烷, 乙烷
	哮喘, COPD, 支气管扩张, ARDS	过氧化氢 呼吸甲基化烷烃轮廓
肺部疾病	哮喘	NO, CO, H ₂ O ₂ , 异前列烷, 亚硝酸盐/硝酸盐
	COPD	NO, H ₂ O ₂ , (白三烯, 前列腺素, 异前列烷), 异前列烷
	囊性纤维化	NO, CO, H ₂ O ₂ , 异前列烷, 亚硝酸盐/硝酸盐
	肺同种异体移植功能障碍	盐
代谢疾病	糖尿病	丙酮
胃肠道疾病	消化和吸收障碍 (乳糖酶缺乏, 二糖和单糖吸收障碍, 淀粉吸收不良和小肠细菌过度生长)	氢气
VOCs 暴露评估		氯乙烯和顺式-1,2-二氯乙烯, 氯仿和溴二氯甲烷, 三氯乙烯
其他应用	呼吸监测	CO ₂ /O ₂ 比

[0283] EBC-3.2. 其他蒸气冷凝物的采集和分析

[0284] 本发明的某些实施方案涉及用于采集和分析除EBC之外的蒸气凝析的SiEBCA方法和装置的应用。其它湿气包括但不限于雾, 云, 蒸汽等。这些蒸气凝析的目标分析可以用于不同目的的环境监测, 排放控制等。在一些实施方案中, 样品是来自生物样品, 环境样品, 化学样品或临床样品。

[0285] EBC-3.3. 自动化和高通量。

[0286] 在某些实施方案中, 本发明的装置和方法是自动化的和高速的, 其中所述步骤由机器执行。在一些实施方案中, 所述板为卷轴形式并且由辊控制以将板的某些区域置于开放构型或闭合构型。

[0287] EBC-4. 更多EBC采集和分析实验的例证

[0288] 这里给出了其它的示例性实验测试和观察以及本发明其它的优选实施方案。

[0289] 在第4节中描述的本发明的所有示例性实验测试和论证在以下条件下进行,并且共享以下共同观察。

[0290] 板。SiEBCA器件的两个板中仅一个板(称为“X板”)具有固定在板的样品表面上的间隔件,称为“基板”的另一板具有平坦表面,并且没有间隔件。基板用作采集板,X板用作盖板。这里测试了用于板和各种板厚度的各种材料(包括玻璃,PMMA(聚甲基丙烯酸酯)和PS(聚苯乙烯))。板的平面表面通常具有小于30nm的表面粗糙度。

[0291] 间隔件。在X板上使用的间隔件是具有固定的间隔件间距离(ISD)和均匀的间隔件高度的矩形柱的周期性阵列。柱间隔件具有直的侧壁,其具有从法线小于5度的倾斜角。这里测试了不同的间隔件高度,尺寸,间隔件间距离,形状和材料。

[0292] 间隔件的制造。间隔件通过纳米压印在塑料板上制造,其中模具直接压入板中。通过光刻和蚀刻制造模具。SiEBCA板上的间隔件的实例。间隔件通过使用模具直接压印塑料板表面来制造,并且具有30 μ m,40 μ m和2 μ m的宽度,长度和高度的尺寸。

[0293] EBC样品被放置。所有EBC样品都是通过受试人直接向位于距受试人口部几英寸内的采集板呼气来被放置在采集板上的。

[0294] EBC样品被放置在标准室内条件下进行,没有任何特殊的温度控制或灰尘过滤器。我们发现在我们的实验中,灰尘在大的样品区域上不影响实现预定的最终样品厚度,并且在闭合构型下,在非灰尘区域上的样品厚度由间隔件调节。这证明了我们用于CROF的实施方案实现了本发明的预期结果。

[0295] 板的表面润湿性能。除非特别说明,否则所有板的所有样品表面(即接触样品的内表面)都是未处理的。我们已经通过在板表面上滴置样品液滴和测量样品与板的接触角,测试了作为板材料(玻璃,PMMA和PS),表面结构(平面的或具有间隔件,和样品类型(水,PBS缓冲液和血液))的函数的这些未处理表面的润湿性能。在实验中发现不同样品的不同表面的润湿角如下:对于水,PBS和血液的液体,对于未处理的玻璃接触角约为46度,对于未处理的PMMA表面为60度,对于未处理的PS(聚苯乙烯)表面为60度,对于未处理的PMMA X板约为61度,因此它们都是亲水的。但是这些表面的润湿性能可以通过表面处理改变为亲水的或疏水的。对于良好的蒸气凝析采集,优选亲水表面,其对于给定量的凝析将具有更小的表面积。

[0296] 手压。在该部分的所有实验中,在SiEBCA过程中两板被合在一起并且通过人手压制成板的闭合构型。在大面积的SiEBCA板上的均匀样品厚度的最终压制中,通常拇指按压一个区域并且摩擦到CROF板的不同区域中,如下所述可观察到优异的样品厚度均匀性。使用手将SiEBCA装置(板)挤压成闭合构型的过程被称为“手压”。

[0297] 图5给出了用人手压制SiEBCA板的示例性方法。SiEBCA可以通过(a)将SiEBCA放置在一个表面上并且使用拇指按压SiEBCA的一个位置且继续按压并摩擦到其它位置,或(b)将SiEBCA放置在拇指和另一手指之间并按压和摩擦。在某些情况下,可以使用双手。

[0298] 自保持。自保持意味着在SiEBCA装置(板)通过外力(例如来自手的力)压制成闭合构型之后,在去除外力之后,SiEBCA装置可以自己保持样品厚度不变。我们观察到,在所有的实验中,如实验所示所有的SiEBCA装置和工艺(除非特别指出)都可以自保持。我们的其他实验测试表明,只需其中一个板是亲水的,SiEBCA板便可以自保持。

[0299] EBC-4.1.采集板上的EBC在开放和闭合构型下的成型

[0300] 4.1.1表面未处理和已处理的PMMA采集板上的EBC液滴尺寸

[0301] 图6.在“开放构型”(即仅有采集板没有盖板的情况)下的采集板(未处理的PMMA膜)上的EBC液滴尺寸和密度的实验数据。这些照片显示在受试者以四个不同的呼气时间直接呼气到板上之后,在采集板上采集的EBC:(a) 1秒呼气,(b) 2秒呼气,(c) 5秒呼气,和(d) 10秒呼气。呼气后立即拍摄照片。

[0302] 该表显示了在采集板(PMMA)的 1mm^2 面积上测量的平均液滴尺寸,计算的平均液滴高度,平均液滴体积,测量的液滴密度和总液体表面积。实验数据表明,(1)使用未处理的PMMA膜作为采集板的采集表面,直接来自受试者的EBC形成具有不同尺寸的液滴,并且对于大多数液滴,其彼此充分分离;和(2)在采集板(PMMA)的 1mm^2 面积上测量的平均液滴尺寸,计算的平均液滴高度,平均液滴体积,液滴密度和总液体表面积等参数最初随着呼气时间的延长而增加,但似乎在5秒后饱和。这可能是由于在实验中,呼气5秒后,通过呼气的EBC被放置速率和现有EBC的蒸发速率达到平衡的事实。

[0303] 在上述实验中,平均液滴高度的计算基于水在PMMA上的润湿接触角,并且通过将平均液滴体积与测量的液滴量密度相乘来计算体积密度。

[0304] 该表还显示,每平方毫米采集板面积上的平均EBC体积在呼气时间为1s,2s 5s和10s时分别为 $172\mu\text{L}$, $250\mu\text{L}$, $491\mu\text{L}$ 和 $507\mu\text{L}$ 。

[0305] 图7.在板开放构型下,在采集板上的EBC形成的实验数据,其中采集板是表面处理的PMMA膜(该处理使得其表面比未处理的PMMA膜表面更亲水)。照片显示受试者直接呼气所采集得到的采集板上的EBC,其中受试者以四个不同的时间呼气:(a) 1秒,(b) 2秒,(c) 5秒,和(d) 10秒。呼气后立即拍摄照片。假设在已处理表面的采集板上被放置的EBC具有与在未处理表面的情况下相同的量,那么通过将总体积除以在 1mm^2 采集板上观察所得的液体样品面积可用来计算平均液体厚度。该表示出了在采集板(PMMA)的 1mm^2 面积上的每单位表面积的体积密度,计算所得平均液体厚度和总液体表面积。

[0306] 图7清楚地显示:(1)由于处理的PMMA的接触角较小的亲水表面(图8中给出的细节),直接从受试者被放置到采集板的EBC在开放构型下形成了少数大面积的EBC液块而不是众多的小水滴;和(2)使用具有已处理表面的采集板(因此有更好的润湿性能)采集的EBC在 1mm^2 面积上的总液体表面积是没有表面处理的约4倍。

[0307] 图8.在未处理和已处理的PMMA板上采集的EBC(直接由受试者呼气2秒)的照片和测量所得的蒸发时间(在板开放构型下)。照片显示在未处理的PMMA采集板上采集的EBC形成了许多小的完全分离的液滴(a),而在处理的PMMA采集板上采集的EBC形成了几个薄膜和具有大空隙的大液块(b)。在未处理表面上采集的EBC的计算所得表面积是未处理表面上的EBC的4倍大。并且在未处理表面上采集的EBC具有7s的总蒸发时间,其为在处理表面上采集的30秒的约4倍。图13和图14给出了蒸发时间的更多研究,以下详述。

[0308] 4.1.2当板处于闭合构型时的EBC成型

[0309] 实验上,我们观察到当板处于闭合构型时由SiEBCA采集的EBC的最终成型取决于间隔件高度。

[0310] 图9和图10分别显示了在闭合构型下使用SiEBCA采集的EBC上的间隔件高度效应(分别为 $1\mu\text{m}$, $2\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$ 和 $30\mu\text{m}$)的照片和实验数据。呼气时间为2s,覆盖时间延迟接近0s。间

隔板是具有均匀横截面 ($30\mu\text{m} \times 38\mu\text{m}$) 的柱子,具有平坦的顶部和底部表面以及 $80\mu\text{m}$ 和 $82\mu\text{m}$ (X和Y方向) 的恒定间隔件间距离。盖板是 $175\mu\text{m}$ 厚的 PMMA 膜的未处理 X 板,采集板是平板玻璃板 ($25\text{mm} \times 25\text{mm} \times 1\text{mm}$)。如所计算的,由 2 秒呼气在未处理表面上采集的开放构型下的液滴的平均高度为 $1.7\mu\text{m}$ 。这里,实验表明:

[0311] (1) 对于测试的所有间隔件高度(图9所示),采集板上的 EBC 从当板处于开放构型时形成的液滴合并成当板处于闭合构型时数量较少但横向尺寸大得多的液块。

[0312] (2) $1\mu\text{m}$ 间隙 X-装置采集的具有最佳液体厚度均匀性和连续膜的呼气凝液的量最大。

[0313] (3) 间隙大于 $1\mu\text{m}$ 的 X 装置采集了较少的呼气凝液,并且难以自保持,因此具有较差的液体厚度均匀性和以及柱高度的更大偏差。

[0314] 因此,通过实验,我们证明:

[0315] (1) 在 SiEBCA 的闭合构型下,如果两板的样品表面之间的间距小于在开放构型下的 EBC 液滴或液块的平均高度(例如,间距为 $1\mu\text{m}$,平均高度为 $1.7\mu\text{m}$) 时,EBC 液滴或液块被采集板和盖板压制成具有比开放构型下更薄的厚度的连续膜,并且膜中可能存在气穴;和

[0316] (2) 否则(例如,柱高度分别为 $2\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$ 或 $30\mu\text{m}$,但是在开放配置处的 EBC 仅为 $1.7\mu\text{m}$ 高),液滴和或液块首先升高以接触样品接触(内)表面,然后自发的合并成离散的液块,其较之于开放构型下在数量上较少,但横向尺寸(面积)更大,并且具有由两板内表面限定的厚度并且等于内表面之间的间隔。在这种情况下,在闭合构型下的 EBC 样品厚度等于或大于在开放构型下的 EBC 样品平均厚度。如我们在实验中观察到的,在闭合构型下的 EBC 液块厚度的增加是由于板和 EBC 样品之间的相互作用。

[0317] 4.1.3 作为覆盖延迟时间函数的 EBC 蒸发时间

[0318] 图11和12分别示出了(a)已处理的与未处理的 PMMA 采集板和(b)关闭盖板的时间延迟对于呼气采集的影响的照片和实验数据。在实验中,直接由受试者向采集板(PMMA $25\text{mm} \times 25\text{mm} \times 1\text{mm}$) 上呼气 2s 以采集 EBC;一些采集板未处理,但一些采集板经处理具有比未处理的 PMMA 采集板更好的亲水性;盖板是 $175\mu\text{m}$ 厚的 PMMA 的 X 板,其为具有平顶 ($1\mu\text{m}$ 高, $30\mu\text{m}$ 宽和 $38\mu\text{m}$ 长) 的柱形间隔件放行举证,间隔件间距在 x 和 y 方向分别为 $80\mu\text{m}$ 和 $82\mu\text{m}$;这里测试了用盖板覆盖采集板的两个不同的时间延迟:呼气完成后立即或呼吸完成后 5 秒的两种情况,同时测量了在板闭合构型下液体厚度,采集的呼吸液体体积,液体厚度与柱高度的偏差,液体厚度均匀性和其它参数(例如在 $25\text{mm} \times 25\text{mm}$ 采集板上的液体面积 (mm^2), (液体面积) 与 (总面积-隔板面积) 的比值)。

[0319] 通过实验研究,我们发现:

[0320] (1) 与未处理的 PMMA 采集板相比,经处理的采集板(更好的润湿性能)在“立即按压”和“5s 后按压”的两个延迟时间采集了更多的呼气凝液。

[0321] (2) 使用未处理的采集板(亲水性较小),在 5 秒延迟时间的情况下,几乎一半的液体蒸发。

[0322] (3) 对于所有样品,在手压之后, SiEBCA 中的板可以自保持。

[0323] (4) 在大多数情况下,在闭合构型下,对于大多数延迟时间, EBC 平均厚度与间隔件高度的测量偏差等于或小于 7.4% , 并且测量所得 EBC 的厚度均匀性(即偏差)等于或小于 6.4% 。但是当采集表面未处理时(亲水性较小)并且覆盖板的覆盖时间延迟为 5s 时,平均

EBC厚度偏离间隔件高度(高度 $1.52\mu\text{m}$,相比于 $1\mu\text{m}$ 有52%的相对偏差)厚度均匀性较差:有22%的不同。

[0324] 图13.在表面已处理(亲水的,未处理的)和未处理的采集板(PMMA)的不同情况下,采集板上采集的呼出气凝析的体积(即EBC) vs.时间延迟(从呼吸结束到盖板的覆盖间的间隔时间)的实验数据。在实验中,呼吸时间为2s。所采集的呼出气凝析的体积为在盖板和采集板被压制到闭合构型之后所测得。从实验中,我们发现:

[0325] (1)对于给定的时间延迟,具有已处理表面(比未处理的润湿性更好)的采集板采集了更多的呼气凝液。

[0326] (2)在不覆盖采集板的情况下,来自2s呼吸的EBC对于具有未处理表面的采集板仅持续7秒,而对于具有已处理表面的采集板持续30秒,这是4倍长。

[0327] 发现(2)进一步显示,在采集板上具有更润湿的表面时,被放置在板上的EBC的总表面积具有比被放置在未处理表面上的表面积更小的表面积,因此其干涸时间(完全干涸所需时间)更长。

[0328] 4.1.4板的开放和闭合构型下的EBC蒸发时间

[0329] 我们实验研究了被放置在采集板上的EBC在没有盖板和有盖板放置在EBC的顶部(即处于板的开放构型和闭合构型的蒸发时间)的不同情况下的蒸发时间,。

[0330] EBC在开放构型的采集板上的蒸发速率已经在图8中给出并描述。

[0331] 图14.在表面已处理(亲水的,未处理的)和未处理的采集板(PMMA)的不同情况下,以及在不同的间隔件高度的情况下,在“闭合构型”下由SiEBCA采集的EBC的干涸时间的实验数据。在实验中,呼气时间为2秒,并且在呼气之后立即覆盖盖板。实验显示:具有 $1\mu\text{m}$ 间隔件的已处理的PMMA采集板允许干涸时间为70s,但是如果间隔件为 $10\mu\text{m}$,则干涸时间减少至45s。 $10\mu\text{m}$ 间隔件高度时干涸时间较短的原因是由于在板闭合构型下EBC形成了许多孤立的液块,其具有比 $1\mu\text{m}$ 间隔件高度的SiEBCA中更大的暴露于环境的表面积, $1\mu\text{m}$ 间隔件高度的SiEBCA中EBC具有一个或几个大的EBC区域。

[0332] 我们意识到,除了使用分散的间隔件,通过使用闭合隔离物,我们可以进一步降低在SiEBCA闭合构型下的EBC蒸发速率。

[0333] 已处理和未处理的采集板上的干涸速度。对于使用已处理和未处理的采集板的两个实验,我们还计算了EBC的干涸速度,其被定义为在闭合构型下的X装置中液体样品的边缘的每单位时间的收缩距离。该计算显示,与未处理的PMMA采集板($117\mu\text{m}/\text{min}$)相比,使用处理的PMMA采集板,液体样品以较慢的速度($74\mu\text{m}/\text{min}$)干燥。

[0334] 表面处理。用氧等离子体进行PMMA板的表面处理,随后被放置 10nm 的氧化硅。在一些实施方案中,使用三甲氧基硅烷进行化学处理。

[0335] 受压制受控开放流

[0336] 在测定法中,样品或试剂的操纵可导致测定的改进。这样的操纵包括,但不限于,操纵一个样品和/或试剂的几何形状和位置,样品和试剂的混合或结合,和样品或试剂与板的接触面积。

[0337] 本发明的许多实施方案使用一种方法操纵样品和/或试剂的几何尺寸,位置,接触面积和混合,该方法称为“受压制受控开放流(CROF)”,以及执行CROF的装置。

[0338] “受压制开放流(COF)”一词指的是通过(i)将另一半放置在样品的至少一部分之

上和(ii)然后通过推动两板朝向彼此移动压制两个板间的所述样品;其中所述压制减小至少一部分样品的厚度,使样品流进板之间的开放空间,从而改变被放置在板上的可流动样品的形状。

[0339] 术语“受压制受控开放流”或“CROF”(或“自校准受压制开放流”或“SCOF”或“SCCOF”)是指一种特定类型的COF,其中的一部分或全部样品的最终厚度在压制后是通过间隔件“调节”的,其中,所述间隔件被放置在两个板之间。

[0340] 在CROF中的术语“一部分或全部样品的最终厚度由间隔件调节”是指在CROF期间,一旦达到特定的样品的厚度,两板的相对运动停止,因而样品厚度停止变化,其中特定厚度由间隔件决定。

[0341] CROF的方法的一个实施方案,如图1所示,包括:

[0342] (a) 获得一个可流动的样品;

[0343] (b) 获得一个第一板和一个第二板,两板可相对于彼此移动进入不同形态,其中,每个板具有一个样品接触表面,该面基本上是平整的,一个或两个板包括有间隔件,并且其中所述间隔件具有预定的基本上均匀的高度,间隔件在相应的样品接触表面上;

[0344] (c) 当所述两板处于开放构型时,在一个或两个板上被放置的样品,其中,所述开放构型是其中两个板被部分地或完全分离开的构型,并且板之间的间隔不由间隔件调节;和

[0345] (d) 完成(c)后,通过使所述板到闭合构型,其中,在闭合构型中,板彼此面对,间隔件和样品的一个相关体量在板之间,样品相关体量的厚度由板和间隔件调节,其中,所述相关的相关体量是样品的至少一部分,其中当样品扩展时,样品在两个板之间横向流动。

[0346] 术语“板”指的是,除非被另外指定,在CROF过程中使用的板,即具有可以与另一块板一起使用的表面的固体,以压制位于两个板之间的样品,以减少样品的厚度。

[0347] 术语“板”或“在一对板的”,是指在一个CROF过程的两个板。

[0348] 术语“第一板”或“第二板”是指在一个CROF过程使用的板。

[0349] 术语“板彼此面对的”是指其中一对板的至少部分彼此面对的情况。

[0350] 术语“间隔件”或“止动件”指的是,除非另有说明,被放置在两个板之间,限制两个板压在一起时能得出的两个板之间间距的最小值的机械物件。即,在压制时,间隔件将停止两板的相对运动,以防止板间距变得比预先设定的(即预定的)值还小。有两种类型的间隔件的:“开放间隔件”和“封闭间隔件”。

[0351] 术语“开放间隔件”是指间隔件具有一个形状,其允许液体围绕间隔件的整个周边和通过间隔件流动。例如,立柱是一个开放的间隔件。

[0352] “闭合间隔件”这个术语是指具有一个液体不能围绕间隔件的整个周边流动和不能流过间隔件的形状的间隔件。例如,一个环形间隔件是对于环内的液体的一个封闭的间隔件,其中所述环间隔件内的液体保持在环内并且不能去外侧(外周)。

[0353] 术语“间隔件具有一个预定的高度”及“间隔件具有预定的间隔件间距离”是指,该间隔件的高度的值和间隔件间距离在CROF过程之前时已知的。如果间隔件的高度和间隔件间距离的值在CROF过程之前未知,它就不是预定的。例如,喷洒在板上的珠子作为间隔件,其中,珠粒在板上降落的位置随机,间隔件间距离不是预定的。不规定间间隔件的距离的另一个例子是,间隔件在CROF过程中移动。

[0354] 在一个CROF过程中的术语“间隔件被固定在其相应的板上”，是指所述间隔件附着于板的一个位置和而该附着在CROF期间被保持(即在间隔件上相应的板的位置的确不变)。“间隔件被固定在其相应的板上”的一个例子是，一个间隔件由一块板的材料整体地制成，且相对于板表面的间隔件的位置CROF期间不会改变。“间隔件不固定在其相应的板”的一个例子是，一个间隔件由粘合剂被胶合到板上，而利用该板的过程中，CROF期间，粘合剂不能将间隔件维持在其板表面上的原始位置且间隔件从板表面上的原始位置移动开。

[0355] 术语“间隔件被整体固定到板上”是指间隔件和板在使用类似单件一样活动，间隔件不会移动或从板上其原始位置移开。

[0356] CROF过程中的术语“开放构型”是指一个构型，其中两个板部分或完全分离且板之间的间距不受间隔件调节。

[0357] CROF过程中的术语“闭合构型”是指其中所述板彼此面对的构型，所述间隔件和样品的相关体量在两板之间，样品的相关体量的厚度为由板和间隔件，其中，所述的相关体量至少是样品的全部体量的一部分。

[0358] CROF过程中的术语“样品厚度由板和间隔件调节”是指对所述板，样品，间隔件，以及所述板压制方法的一个给定条件下，在板的闭合构型中至少的一部分样品的厚度可从间隔件和板的特性预定的。

[0359] 术语“内表面”，或在CROF装置的板的“样品面”指的是接触到样品的板的表面，而板的另一表面(即不接触样品)被称为“外表面”。

[0360] CROF装置的术语“X-板”指的是一个板，其包括有在板的样品表面上的间隔件，其中，所述间隔件具有预定的间隔件间距离和间隔件的高度，并且其中，所述间隔件中的至少一个在样品接触区域内。

[0361] 术语“CROF装置”是指执行CROF过程的装置。术语“CROFed”是指一个CROF过程被使用过。例如，“一个样品CROFed”一词意味着样品被放入一个CROF装置内，进行CROF处理，并且样品保持，除非另有说明，在CROF的最终构型。

[0362] 术语“CROF板”指的是在执行CROF过程中使用的两个板。

[0363] 术语“表面平滑度”或平面表面的“表面平滑度变化”是指在比几微米左右或更小的短距离内一个平面与一个完美的平面的平均偏差。表面平滑度与表面平整度变化不同。平面表面可以有一个良好的表面平整度，而且表面平滑度差。

[0364] 术语“表面平整”或平面表面的“表面平整性变化”是指大约或大于10微米的较长距离上一个平面表面与一个完美的平面的平均偏离。表面平整度的变化与表面平滑性的变化不同。平面表面可以有一个良好的表面平滑度，但表面平整度差(即大的表面平整度偏差)。

[0365] 板或样品的术语“相对的表面平整度”是在板表面平整度的变化到最终的样品厚度的比率。

[0366] 在CROF过程中，术语“最终样品厚度”指的是，除非另有说明，样品的在CROF过程中板的闭合构型的厚度。

[0367] CROF术语“压制方法”，是指将两板从开放构型带入闭合构型的方法。

[0368] “感兴趣区域”或板的“感兴趣的区域”这个术语指的是板的某个有关该板执行的功能的区域。

[0369] 术语“至多”是指“等于或小于”。例如,间隔件高度为至多1微米,这意味着该间隔件高度是等于或小于1微米。

[0370] 术语“样品区域”指的是在大致平行于所述板之间空间并垂直于样品厚度的样品的某个区域。

[0371] 术语“样品厚度”指的是在与两板彼此面对的表面(例如,在板之间的间隔的方向上)垂直的方向上的样品尺寸。

[0372] 术语“板间距”指的是两块板的内表面之间的距离。

[0373] CROF术语“最终样品厚度的偏差”是指预定的间隔件的高度(从间隔件的制造测定)和最终样品的厚度之间的差值,其中平均最终样品厚度是在给定区域上的平均值(例如:在超过1.60厘米乘1.6厘米的面积上25个不同点(相隔4毫米)的平均值)。

[0374] CROF过程的术语“测得的最终样品厚度的均匀性”是指测量得到的最终样品的厚度在给定的样品区的标准偏差(例如相对于平均的标准偏差)。

[0375] 术语“样品的相关体量”,和CROF过程中的“样品的相关区域”分别指的是,CROF过程中被放置在板上的试样的整个或部分的体量体积和区域面积,其与通过相应的方法或装置执行的功能是相关的,其中所述功能包括,但不限于,降低分析物或实体结合所需时间,检测分析物,量化体积,浓度的量化,混合试剂,或控制(分析,实体或试剂)的浓度。

[0376] 术语“一些实施方案”,“在一些实施方案中”,“在本发明中,在一些实施方案”,“实施方案”,“一个实施方案”,“另一实施方案”,“某些实施方案”,“多个实施方案中”,或类似的指,除非特别说明,应用到全部公开(即整个发明)的实施方案(多个)。

[0377] 术语“高度”或在CROF处理的对象的“厚度”指的是,除非特别说明,即在垂直于板的表面的方向上物体的尺寸。例如,间隔件的高度是垂直于板的表面的方向上间隔件的尺寸,间隔件高度和间隔件厚度是指同样的事情。

[0378] CROF过程中术语一个物体的“面积”指的是,除非特别说明,该物体平行于板的表面方向上的面积。例如,间隔件面积是平行于板的表面的间隔件的面积。

[0379] CROF过程中术语“横向的”或“横向地”是指,除非特别说明,平行于板的表面的方向。

[0380] CROF过程中术语间隔件的“宽度”指的是,除非特别说明,所述间隔件的横向尺寸。

[0381] 术语“样品内的间隔件”指的是间隔件由样品包围(例如,样品内的支柱间隔件)。

[0382] CROF过程中术语板的“临界弯曲跨距”是指对于给定的柔性板,样品和压制力,在该板的弯曲时,两个支撑件间的板的跨距,等于其被允许的弯曲程度。例如,如果一个给定的柔性板,样品,和压制力时,允许的弯曲是50纳米,而临界弯曲跨度为40微米;即两个相邻的间隔件之间的板的跨距是小于40微米弯曲时,弯曲的程度小于50纳米。

[0383] 术语“可流动”的样品是指当样品的厚度减小时,横向尺寸增大。例如,粪便样品被认为是可流动的。

[0384] 在本发明的一些实施方案,CROF处理的样品并不必需是可流动的,才可从过程中受益,只要样品的厚度可以在CROF过程中被减少。例如,通过把染料放到CROF板的表面上染色一个组织,CROF过程可以减少组织厚度并因此加快染料染色的饱和温育时间。

[0385] f.降低(缩短)绑定或混合时间(X)

[0386] 我们通常期望在进行测定或其他化学反应中减少温育/反应时间。例如,在表面固

定化测定中,其中通过固定在板表面(即固相)上的捕获剂捕获来检测样品中的目标分析物,通常期望具有用于捕获目标分析物的短饱和和温育时间,或将捕获剂和检测剂固定在板表面上的溶液中,或两者。另一个实例是需要缩短将捕获剂涂覆到板表面的时间。另一个例子是需要缩短将试剂混合到样品中的时间。

[0387] 本发明提供了减少(即缩短)将样品中的实体结合到固体表面上的结合位点所需的饱和和温育时间(即,实体从体积到表面的时间)的方法和设计。本发明的另一方面是减少将存储在板表面上的实体结合到另一板表面上的结合位点(即,实体从一个表面到另一个表面的时间)所需的时间。本发明的另一方面是减少将存储在表面上的试剂添加/混合到样品的体积中(即,将试剂从表面添加/混合到样品的体积中的时间)所需的时间。

[0388] 本发明通过使用将样品(或液体)铺展为更薄厚度的装置和方法,从而减少实体在样品厚度上扩散的时间,从而减少了测定中结合和/或混合的饱和和温育时间。实体在材料(例如,液体或固体或半固体)中的扩散时间与扩散距离的平方成比例,因此样品厚度的减小可以减小扩散距离,导致扩散时间的急剧减少,饱和和温育时间。较薄的厚度(例如紧密的限制空间)也增加了实体与材料中的其他实体碰撞的频率,进一步增强了结合和混合。本发明中的主题还使得样品厚度的精确,均匀,快速,简单(更少的操作步骤)的减少,并且适用于将样品厚度减小至微米或纳米厚。本发明在快速,低成本,PoC,诊断和化学/生物分析中具有很大效用。在图1-4中示出了本发明的几个实施方案。

[0389] X1.1通过减少样品厚度,减少将样品中的实体结合到固体表面上的结合位点的饱和和温育时间。

[0390] X1.一种用于减少将样品中的目标实体结合到板表面的结合位点的饱和和温育时间的方法,如图1-2,3a和4a所示,包括:

[0391] (a) 获得可流动的并含有能够在样品中扩散的目标实体的样品;

[0392] (b) 获得可相对于彼此移动成不同构型的两个板,其中所述板中的一个或两个包括间隔件,所述间隔件具有预定的间隔件距离和高度,并且每个所述间隔件固定于相应板上;

[0393] (c) 当所述两板配置成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0394] (d) 在(c)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间;样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于打开构型时样品的最大厚度薄;

[0395] 其中所述相关体量是所述样品的一部分或全部体量;且

[0396] 其中所述减小的样品的厚度减少了用于将相关体量中的目标实体结合到结合位点的饱和和温育时间。

[0397] 对于给定的样品体积,CROF减小样品厚度,但增加样品横向尺寸。本发明利用这样的事实:(a)一部分样品中的局部结合或混合,和(b)多个结合或混合位点的多路复用,而不使用流体屏障以将样品流体分离到不同的隔离液体区块中。

[0398] X2.一种用于减少饱和和温育时间以将样品的相关体积中的目标实体结合到表面的装置,如图1-2,3a和4a所示,包括:

[0399] 第一板和第二板,其(a)可相对于彼此移动成不同的构型,(b)每个板具有用于接触具有目标实体的相关体量的样品的样品接触区域,(c)板中的一个具有结合目标实体的结合位点,以及(d)至少一个板包括具有预定的间隔件间距离和高度并且固定在其相应表面上的间隔件,其中至少一个间隔件在样品接触区域内;

[0400] 其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分地或完全地分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板和盖中的一个或两个上;

[0401] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述样品在所述开放构型下被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件和样品的相关体量位于两板之间,结合位点与相关体量接触,并且样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时的所属样品的最大厚度薄;并且所述相关体量是所属样品的部分或全部体量;并且其中所述减小的样品的厚度减少了所述相关体量中的目标实体与所述结合位点结合的饱和温育时间。

[0402] 1.2减少存储在一个板表面上的实体与另一个板表面上的结合位点的结合的饱和温育时间

[0403] X3.一种减少饱和温育时间以将存储在一个板的存储位点上的实体结合到另一个板上的相关结合位点的方法,如图1,3c和4b所示,包括:

[0404] (a)获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板,其中所述第一板的表面具有结合位点,并且所述第二板的表面具有包含待结合到结合位点的实体的存储位点;其中所述结合位点的面积和所述存储位点的面积小于各个板的面积;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于其相应的板上并且具有预定高度;

[0405] (b)获得转移介质,其中所述实体能够溶解到所述转移介质中并在所述转移介质中扩散;

[0406] (c)当所述两板配置成开放构型时,将所述转移介质被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0407] (d)在(c)之后,通过使所述两板进入闭合构型来铺展所述转移介质,其中在所述闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件,所述结合位点,所述存储位点和至少一部分的转移介质位于两板之间;结合位点和存储位点至少部分地彼此相对,转移介质接触结合位点和存储位点的至少一部分,转移介质的厚度由所述板和所述间隔件调节,其厚度比当所述板处于开放构型时的最大厚度薄;

[0408] 其中所述转移介质的减小的厚度减少了存储在所述第二板上的实体与所述第一板上的结合位置的结合的时间。

[0409] X4.一种用于减少在饱和温育时间的结合存储在盘的一个存储部位的结合位点上的另一个板中,如图1,3c和4b所示,包括:

[0410] 一个第一板和一个第二板,其可彼此相对移动成不同的构型,其中,第一板的一个表面具有结合位点;和第二板的一个表面具有包含待结合至结合位点的实体地存储位点;其中结合位点的面积和存储位点的面积小于相应的板的面积;且其中的一个或两个板包括间隔件和每个间隔件固定于其相应的板上,并具有预定的高度;

[0411] 其中所述构型中的一个为开放构型,其中:所述两个板是部分或完全分离,板之

间的间隔不被间隔件调节,转移介质能够在一个或两个板被放置,其中在存储位点的实体能够溶解到转移介质中并在转移介质中扩散,

[0412] 其中另一构型是一个闭合构型,它是在开放构型下转移介质被放置之后进行配置地;在闭合构型下:所述两板彼此面对,所述间隔件,所述结合位点,所述存储位点和至少转移介质的一部分位于所述两板之间,所述结合位点和存储位点至少部分地彼此相对,转移介质接触至少结合位点和存储部位的一部分,转移介质的厚度是由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型下转移介质的最大厚度更薄;

[0413] 其中转移介质的厚度减小降低了第二板的存储位点的实体结合到第一板的结合位点的饱和和温育时间。

[0414] 在段落X3的方法和段落X4的装置中,在一些实施方案中,转移介质包括液体,允许该实体或试剂或二者的扩散。

[0415] 在段落X3的方法和段落X4的装置中,在一些实施方案中,转移介质是一个样品,其中所述样品含有结合分析物(也称为目标分析物)的结合位点。

[0416] 在段落X3的方法和段落X4的装置中,在一些实施方案中,转移介质是结合到结合位点的样品,其中所述样品包含的分析物(也称为目标分析物)和试剂是可被探测剂结合的分析物。

[0417] 1.3减少将存储在表面上的试剂添加(混合)到液体样品中的时间

[0418] 许多测定需要将试剂加入到样品(包括液体)中。通常,需要控制样品或液体中添加的试剂的浓度。需要用于进行这种试剂添加和浓度控制的简单和/或低成本的新方法。需要添加试剂的两个实例是(a)其中可以将抗凝血剂和/或染色试剂加入血液样品中的血细胞计数,和(b)其中添加检测剂以结合溶液中的目标分析物的免疫测定。

[0419] 本发明的一个方面是使得试剂添加和试剂浓度控制简单和/或低成本的方法,装置和系统。在本发明的一个实施方案中,首先将试剂层(例如干燥的试剂层)放在CROF装置的板表面上,然后将样品被放置到CROF装置中,并且CROF过程使样品与试剂混合,并且样品厚度比CROF板处于打开构型时的样品厚度薄。通过减小样品厚度,将减少试剂从表面扩散到整个样品中的扩散时间,因此减少了试剂与样品混合的时间。

[0420] X4.一种用于减少将存储在板表面上的试剂混合到样品中的时间的方法,如图1,3b和4c所示,包括:

[0421] (a)获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板,其中所述第一板在其表面上具有包含待添加到样品中的试剂的存储位点,并且所述试剂能够溶解到样品中并在样品中扩散;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于其相应的板上并且具有预定高度;

[0422] (b)获得样品;

[0423] (c)当所述两板配置成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0424] (d)在(c)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述关闭构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件,所述存储位点和所述样品的至少一部分位于所述两板之间,样品基础存储位点的至少一部分,存储位点上的样品的厚度由板和间隔件调节,其

比当板处于打开构型时样品的最大厚度薄；

[0425] 其中所述样品的厚度减小减少了将所述存储位点上的试剂与所述样品混合的时间。

[0426] 在段落X5的方法中，其还包括在板处于闭合构型时温育的步骤，其中选择温育时间，以使得溶解在样品中的显著数量的试剂被包含在样品的相关体量中，其中相关体量是位于存储位点上的样品的体量，温育是允许试剂溶解和扩散在样品中的过程。

[0427] 在段落X5的方法中，其还包括以下步骤：在(d)之后并且当板处于闭合构型时，温育一段时间，该时间等于或小于样品中的试剂穿过样品由处于闭合构型的板调节的厚度的扩散时间与一个因子的乘积，然后停止温育；其中所述温育允许所述试剂扩散到所述样品中；并且其中所述因子为0.0001,0.001,0.01,0.1,1,1.1,1.2,1.3,1.5,2,3,4,5,10,100,1000,10,000或介于任何值与所述值之间的范围。例如，如果因子是1.1并且扩散时间是20秒，则温育时间等于或小于22秒。在一个优选实施方案中，因子为0.1,1,1.5或介于任何值与所述值之间的范围。

[0428] X6.一种用于减少将存储在板表面上的试剂添加到样品中的时间的装置，如图1, 3b和4c所示，包括：

[0429] 第一板和第二板，其可彼此相对移动成不同的构型，其中所述第一板在其表面上具有包含待添加到样品中的试剂的存储位点，所述试剂能够溶解到样品在样品中扩散；且其中的一个或两个板包括间隔件和每个间隔件固定于其相应的板上，并具有预定的高度；

[0430] 其中所述构造之一是开放构造，其中：所述两个板部分地或完全地分开，所述板之间的间隔不受所述间隔件调节，并且所述样品能够在一个或两个板被放置，其中在存储位点的实体能够溶解到转移介质中并在转移介质中扩散，

[0431] 其中另一构型是一个闭合构型，它是在开放构型下样品被放置之后进行配置地；在闭合构型下：所述两板彼此面对，所述间隔件，所述存储位点和至少样品的一部分位于所述两板之间，样品接触至少存储位点的一部分，样品的厚度是由板和间隔件调节，其比当板处于开放构型下样品的最大厚度更薄；和

[0432] 其中所述样品的厚度减小降低了将所述存储位点上的试剂与所述样品混合的时间。

[0433] 在段落X1-6中任一段的方法或装置中，在一些实施方案中，样品的相关体量是位于结合位点或存储位点上(即顶部)的样品体量。

[0434] 在段落X1-6中任一段的方法或装置中，在一些实施方案中，样品的相关体量是位于结合位点或存储位点的整个区域或部分区域上(即在其上)的样品的体量。

[0435] 在段落X1-6中任一段的方法或装置中，在一些实施方案中，结合位点或存储位点的横向尺寸与闭合构型下的样品厚度的比率为1.5或更大,3或更大,5或更大,10或更大,20或更大,30或更大,50或更大,100或更大,200或更大,1000或更大,10,000或更大,或任何两个值之间的范围。

[0436] 在段落X1-6中任一段的方法或装置中，在闭合构型下，结合位点或存储位点的横向尺寸与样品厚度的比率在优选实施方案中为3至20，在优选实施方案中为20至100在另一个优选实施方案中为100和1000，在另一个优选实施方案中为1000和10,000。

[0437] 在段落X1和X3中任一段所述的方法中，在一些实施方案中，最终减少的样品厚度

显着小于结合位点的面积,使得样品区域中位于结合位点外部的实体将需较长的时间才能结合到结合位点。通过适当选择温育时间,结合到结合位点的实体将主要是位于结合位点上的样品体量中的实体(即刚好在结合区域上方的样品体积)。然后,样品中实体的浓度的计算将基于样品厚度和结合位点面积。

[0438] 在段落X5的方法中,在一些实施方案中,最终减小的样本厚度显着小于存储位点的区域的厚度,使得在结合位点之外的样品区域中的实体,结合结合位点需要更长的时间。通过适当选择温育时间,结合到结合位点的实体将主要是位于结合位点上的样品体量中的实体(即刚好在结合区域上方的样品体积)。然后,样品中实体的浓度的计算将基于样品厚度和结合位点面积。

[0439] 在段落X2,X4,X6中任一段所述的方法中,其还包括使板从开放构型变为闭合构型的压制装置。在一些实施方案中,压制装置是本公开中描述的实施方案中的一个或任何组合。

[0440] 在段落X2,X4,X6中任一段所述的方法中,其还包括使板从开放构型变为闭合构型的压制装置,和将板保持在于闭合构型的保持装置。在一些实施方案中,保持装置是在公开中描述的实施方案中的一个或任何组合。

[0441] 在段落X2,X4,X6中任一段所述的方法中,其还包括使板从开放构型变为闭合构型的压制装置,和将板保持在于闭合构型的保持装置,其保持时间为0.001秒或更短,0.01秒或更短,0.1秒或更短,1秒或更短,5秒或更短,10秒或更短,20秒或更短,30秒或更短,40秒或更短,2分钟或更短,3分钟或更短,5分钟或更短,10分钟或更短,20分钟或更短,30分钟或更短,60分钟或更短,90分钟或更短,120分钟或更短,250分钟或更短,或这些值中任意两个之间的范围。

[0442] 在段落X2,X4,X6中任一段所述的方法中,其还包括使板从开放构型变为闭合构型的压制装置,和将板保持在于闭合构型的保持装置,其保持时间在优选的实施方案中,为0.001秒或更少,0.01秒或更少,0.1秒或更少,1秒或更少,5秒或更少,10秒或更少,20秒或更少,30秒或更少,40秒1分钟或更短,2分钟或更短,3分钟或更短,或这些值中任何两个之间的范围。

[0443] 最终样品厚度。在闭合构型下的板的最终样品厚度可能是减少饱和温育时间的重要因素。样品厚度减小/变形后的最终样品厚度,取决于实体和样品的性质以及应用,如关于板的调节间隔所讨论的。

[0444] 在一些实施方案中,最终的样品厚度小于约0.5微米(微米),小于约1微米,小于约1.5微米,小于约2微米,小于约4微米,小于约6微米,小于约8微米,小于约10微米,小于约12微米,小于约14微米,小于约16微米,小于约18微米,小于约20微米,小于约25微米,小于约30微米,约小于35微米,小于40微米,小于45微米,小于50微米,小于55微米,小于60微米,小于70微米,小于80微米,小于约90微米,小于约100微米,小于约110微米,小于约120微米,小于约140微米,小于约160微米,小于约180微米,小于约200微米,小于约250微米,小于约300微米,小于约350微米,小于约400微米,小于约450微米,小于约500微米,小于约550微米,小于约600微米,小于约650微米,小于约700微米,小于约800微米,小于约900微米,小于约1000微米(1毫米),小于约1.5mm,小于约2mm,小于约2.5mm,小于约3mm,小于约3.5mm,小于约4毫米,小于约5mm,小于约6mm,小于约7毫米,小于约8mm,小于约9毫米,小于约10毫米,或这些

值的任意两个之间的范围内。

[0445] 温育时间。在段落X1和X3中任一段的方法中,其还包括以下步骤:在(d)之后并且当板处于闭合构型时,温育等于或小于实体在扩散时间所述样品在闭合构型下通过所述板调节的样品厚度扩散,然后停止温育;其中所述温育允许所述实体结合所述结合位点;并且其中所述因子为0.0001,0.001,0.01,0.1,1,1.1,1.2,1.3,1.5,2,3,4,5,10,100,1000,10,000或介于任何值与所述值之间的范围。例如,如果因子是1.1并且扩散时间是20秒,则温育时间等于或小于22秒。在一个优选实施方案中,因子为0.1,1,1.5或介于任何值与所述值之间的范围。

[0446] 在段落X5的方法中,其还包括以下步骤:在(d)之后并且当板处于闭合构型时,温育等于或小于试剂扩散穿过由处于闭合构型的板调节的样品厚度的扩散时间与一个因子的乘积,然后停止温育;其中所述温育允许所述实体结合所述结合位点;并且其中所述因子为0.0001,0.001,0.01,0.1,1,1.1,1.2,1.3,1.5,2,3,4,5,10,100,1000,10,000或介于任何值与所述值之间的范围。例如,如果因子是1.1并且扩散时间是20秒,则温育时间等于或小于22秒。在一个优选实施方案中,因子为0.1,1,1.5或介于任何值与所述值之间的范围。

[0447] 根据X1,X3和X5中任一段所述的方法,或段落X2,X4和X6中任一段所述的装置,其中所述间隔件中的至少一个在所述样品接触区域内。

[0448] 根据X1,X3和X5中任一段所述的方法,或段落X2,X4和X6中任一段所述的装置,其中具有预定的间隔件间距离的间隔件。

[0449] 在段落X1,X3,X5中任一段的方法中,其还包括在板处于闭合构型时温育的步骤,饱和温育时间为0.001秒或更少,0.01秒或更少,0.1秒或更少,15秒或更短,10秒或更短,20秒或更短,30秒或更短,40秒或更短,1分钟或更短,2分钟或更短,3分钟或更短,5分钟或更短,10min或更小,20min或更小,30min或更小,60min或更小,90min或更小,120min或更小,180min或更小,250min或更小,或这些值中任意两个之间的范围。

[0450] 在段落X1,X3,X5中任一项的方法中,在闭合构型下,在减小的样品厚度处的饱和温育时间为0.001秒或更少,0.01秒或更少,0.1秒或更少,1秒或更少,5秒或10秒或更短,20秒或更短,30秒或更短,40秒或更短,1分钟或更短,2分钟或更短,3分钟或更短,5分钟或更短,10分钟或更短,30分钟或更短,60分钟或更短,90分钟或更短,120分钟或更短,180分钟或更短,250分钟或更短,或这些值中任意两个之间的范围。

[0451] 在一些实施方案中,捕获剂首先固定在结合位点,然后样品与结合位点接触,样品中的实体被捕获剂捕获,最后添加检测剂以与捕获的实体结合并且读取来自检测剂的信号(例如通过光学方法或电学方法或组合)。在一些实施方案中,加入除捕获剂和检测剂以外的其他试剂(例如封闭剂)。

[0452] 在许多应用例如PoC中,期望具有简单和/或低成本的装置和方法以将另外的试剂添加到样品中。本发明的一个方面涉及向样品中加入另外的试剂的简单和/或低成本装置和方法。添加的另外的试剂包括检测剂,封闭剂,光信号增强剂,光信号淬灭剂或其它。在本发明的一些实施方案中,其通过使用存储在相同位置的试剂的不同释放时间来控制测定过程。不同的释放时间可以通过添加具有不同溶解速率的其他材料来衔接。

[0453] 在某些实施方案中,可以通过控制样品厚度(例如控制样品厚度与存储位点面积的比例和/或混合时间)来控制混合在样品中的试剂浓度。

[0454] 2.板,间隔件,比例标记,样品厚度调节

[0455] 2.1板的构型和样品厚度调节

[0456] 开放构型。在一些实施方案中,在开放构型中,所述两个板(即第一板和第二板)彼此分离。在某些实施方案中,两个板的一侧在板的所有操作(包括开放和闭合构型)期间连接在一起,两个板类似于书本一样打开和关闭。在一些实施方案中,两个板具有矩形(或正方形)形状,并且在板的所有操作期间矩形的两个侧面连接在一起。

[0457] 在一些实施方案中,开放构型包括一个这样的配置,其中所述两板彼此远离,以使得样品可以被放置在该对板的一个板上,而没有该对板中的另一个板的阻碍。

[0458] 在一些实施方案中,开放构型包括一个这样的配置,其中所述两板彼此远离,以使得样品直接被放置在一个板上,好像另一个板不存在。

[0459] 在一些实施方案中,开放构型包括这样的构型,即该对板间隔开至少10nm,至少100nm,至少1000nm,至少0.01cm,至少0.1cm,至少0.5cm,至少1cm,至少2cm,或至少5cm,或任何两个值的范围。

[0460] 在一些实施方案中,开放构型包括该对板以不同取向定向的构型。在一些实施方案中,开放构型包括这样的构型,其限定该对板之间的间隔以被配置为允许样品添加的间隔。

[0461] 在一些实施方案中,开放构型包括这样的构型,其中每个板具有样品接触表面,并且当两板处于开放构型时,两板的接触表面中的至少一个被暴露在外。

[0462] 闭合构型和样品厚度调节。在本发明中,所述两板的闭合构型是这样的构型,即两个板的内表面之间的间隔(即,距离)由两个板之间的间隔件调节。由于板的内表面(也称为“样品表面”)在CROF过程的压制步骤期间与样品接触,因此在闭合构型下,样品厚度由间隔件调节。

[0463] 在将板从开放构型变为闭合构型的过程中,两板彼此面对(两板的至少一部分彼此面对),且使用一个力量将两个板接合在一起。当两个板从开放构型变为闭合构型时,两个板的内表面压制被放置在板上的样品以降低样品厚度(当样品在板之间横向的开放式流动时),而样品的相关体量的厚度由间隔件,板和所使用的方法以及样品的机械/流体性质确定。对于给定的样品和给定的间隔件,板和板压制方法,可以预定闭合构型下的厚度。

[0464] 术语“通过间隔件调节两板内表面之间的间隔”或“通过两板和间隔件调节样品厚度”,或样品的厚度由间隔件和两板“调节”意味着在CROF过程中,样品的厚度由给定的板,间隔件,样品和压制方法确定。

[0465] 在一些实施方案中,在闭合构型下被调节的样品厚度与间隔件的高度相同;在这种情况下,在闭合构型下,间隔件直接接触两个板(其中一个板含有固定于板的间隔件,而另一个板是被动与间隔件接触的板)。

[0466] 在某些实施方案中,在封闭构下被调节的样品厚度大于间隔件的高度;在这种情况下,在闭合构型下,间隔件仅直接接触具有固定或附接于其表面的间隔件的板,并且间接地接触另一板(即间接接触)。术语与板的“间接接触”意味着间隔件和板被称为“残余样品层”的薄样品层分开,并且其厚度称为“残余厚度”。对于给定的间隔件和板,给定的板压制方法和给定的样品,可以预先确定残余厚度(预先确定是指在形成闭合构型之前),这样即可以预先确定在闭合构型下的样品厚度。这是因为对于给定条件(样品,间隔件,板和压

力),残余样品层厚度是相同的,并且可以被预先校准和/或计算。被调节的样品厚度大约等于间隔件高度加上样品的残余厚度。

[0467] 在许多实施方案中,柱子的尺寸和形状在使用之前被预先表征(即预定)。并且其预定的信息可用于以后的分析测定,例如样品的体积(或相关体量)的确定等。

[0468] 在一些实施方案中,样品厚度的调节包括对两板施加闭合(压制)力以保持板之间的间隔。

[0469] 在一些实施方案中,样品厚度的调节包括利用间隔件,施加到两板的闭合力 and 样品的物理性质,以建立两板之间的间隔,其中可选择地,样品的物理性质包括以下中的至少一种:粘度和压制性。

[0470] 2.2板

[0471] 在本发明中,通常,CROF的板由任何材料制成,其(i)能够用于与间隔件一起调节样品的一部分或全部体量的厚度,且(ii)没有对样品,分析测定或使用板想要完成的目标的显著地不利影响。然而,在某些实施方案中,板需使用特定材料(即有特定特性)用于实现某些目的。

[0472] 在一些实施方案中,两个板对于以下参数中的每一个具有相同或不同的参数:板的材料,厚度,形状,面积,柔性,表面特性和光学透明度。

[0473] 板的材料。板由单一材料,复合材料,多种材料,多层材料,合金或其任意组合制成。用于板的每种材料是无机材料,有机材料或混合物,其中材料的实例在Mat-1和Mat-2的段落中给出。

[0474] Mat-1用于板的无机材料包括但不限于玻璃,石英,氧化物,二氧化硅,氮化硅,氧化钪(HfO),氧化铝(AlO),半导体(如硅,砷化镓,氮化镓等),金属(例如金,银,铜,铝,钛,镍等),陶瓷或其任何组合。

[0475] Mat-2用于间隔件的有机材料包括但不限于聚合物(例如塑料)或无定形有机材料。用于间隔件的聚合物材料包括但不限于丙烯酸酯聚合物,乙烯基聚合物,烯烃聚合物,纤维素聚合物,非纤维素聚合物,聚酯聚合物,尼龙,环烯烃共聚物(COC),聚甲基丙烯酸甲酯(PC),环烯烃聚合物(COP),液晶聚合物(LCP),聚酰胺(PA),聚乙烯(PE),聚酰亚胺(PI),聚丙烯(PP),聚苯醚(PPE)聚甲醛(POM),聚醚醚酮(PEEK),聚醚砜(PES),聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET),聚四氟乙烯(PTFE),聚氯乙烯(PVC),聚偏二氟乙烯,氟化乙烯丙烯(FEP),全氟烷氧基烷烃(PFA),聚二甲基硅氧烷(PDMS),橡胶或其任何组合。

[0476] 在一些实施方案中,两板各自独立地由玻璃,塑料,陶瓷和金属中的至少一种制成。在一些实施方案中,每个板独立地包括玻璃,塑料,陶瓷和金属中的至少一种。

[0477] 在一些实施方案中,一个板在横向面积,厚度,形状,材料或表面处理方面不同于另一个板。在一些实施方案中,一个板在横向面积,厚度,形状,材料或表面处理方面与另一个板相同。

[0478] 用于板的材料是刚性的,柔性的或两者之间的任何柔性。刚性或柔性是相对于在使板进入闭合构型时使用的给定的按压力而言的。

[0479] 在一些实施方案中,刚性或柔性板的选择根据在闭合构型下控制样品厚度的均匀性的要求来确定。

[0480] 在一些实施方案中,两个板中的至少一个是透明的(对于光)。在一些实施方案中,

一个板或两个板的至少一部分或几个部分是透明的。在一些实施方案中,板是不透明的。

[0481] 板的厚度。在一些实施方案中,至少一个板的平均厚度为2nm或更小,10nm或更小,100nm或更小,500nm或更小,1000nm或更小,2 μ m(微米)或更小,10 μ m或更小,20 μ m或更小,50 μ m或更小,100 μ m或更小,150 μ m或更小,200 μ m或更小,300 μ m或更小,500 μ m或更小,800 μ m或更小,1mm(毫米)或更小,2mm或更小,3mm或更小,或任何两个值之间的范围。

[0482] 在一些实施方案中,至少一个板的平均厚度为至多3mm(毫米),至多5mm,至多10mm,至多20mm,至多50mm,至多100mm,至多500mm,或任何两个值之间的范围。

[0483] 在一些实施方案中,板的厚度不是均一的。在板的不同位置使用不同的厚度可以用于控制板的弯曲,折叠,样品厚度调节等方面。

[0484] 板的形状和面积。通常,板可以具有任何形状,只要该形状允许样品的受压制开放式流动和样品厚度的调节。然而,在某些实施方案中,特定形状可能是有利的。板的形状可以是圆形,椭圆形,矩形,三角形,多边形,环形,或这些形状的任何叠加。

[0485] 在一些实施方案中,两个板可以具有相同的尺寸或形状,或是不同的尺寸或形状。板的面积取决于其应用。板的面积为至多1mm²(平方毫米),至多10mm²,至多100mm²,至多1cm²(平方厘米),至多5cm²,至多10cm²,至多100cm²,最多500cm²,至多1000cm²,至多5000cm²,至多10,000cm²或超过10,000cm²,或任何两个值之间的任何排列。板的形状可以是矩形,正方形,圆形或其他形状。

[0486] 在某些实施方案中,板中的至少一个是具有宽度,厚度和长度的带(或条)的形式。宽度为至多0.1cm(厘米),至多0.5cm,至多1cm,至多5cm,至多10cm,至多50cm,至多100cm,至多500cm,至多1000cm,或者任意两个值之间的范围。长度可以是任意需要的长度。带可以卷成卷轴。

[0487] 板的表面平整度。在许多实施方案中,两板的内表面是平坦的或显著平坦的。在某些实施方案中,两个内表面在闭合构型下彼此平行。平坦的内表面可以促进通过简单地在闭合构型下使用预定间隔件高度来进行样品厚度的量化和/或控制。对于板的非平坦内表面,不仅需要知道间隔件高度,而且需要知道内表面的精确拓扑,以在闭合构型下量化和/或控制样品厚度。为了知道表面拓扑,需要额外的测量和/或校正,这可能是复杂,耗时和昂贵的。

[0488] 板表面的平面度相对于最终样品厚度(最终厚度是在闭合构型下的厚度),并且通常由术语“相对表面平坦度”表征,术语“相对表面平坦度”是板表面平坦度变化与最终样品厚度的比值。

[0489] 在一些实施方案中,相对表面平坦度小于0.01%,0.1%,小于0.5%,小于1%,小于2%,小于5%,小于10%,小于20%,小于30%,小于50%,小于70%,小于80%,小于100%或在这些值中任意两个之间的范围。

[0490] 板的表面平行度。在一些实施方案中,板的两个表面彼此显著平行。在某些实施方案中,板的两个表面不彼此平行。

[0491] 板的柔性。在一些实施方案中,一个板在CROF过程的压制下是柔性的。在一些实施方案中,两个板在CROF过程的压制下都是柔性的。在一些实施方案中,一个板是刚性的,而另一板在CROF过程的压制下是柔性的。在一些实施方案中,两个板都是刚性的。在一些实施方案中,两个板都是柔性的,但是具有不同的柔性。

[0492] 板光学透明度。在一些实施方案中,一个板是光学透明的。在一些实施方案中,两个板都是光学透明的。在一些实施方案中,一个板是光学透明的,而另一板是不透明的。在一些实施方案中,两个板都是不透明的。在一些实施方案中,两个板都是光学透明的,但是具有不同的光学透明度。板的光学透明度是针对于板的一部分或整个区域而言的。

[0493] 表面润湿性能。在一些实施方案中,一个板具有润湿(即接触角小于90度)样品,转移液体或两者的内表面。在一些实施方案中,两个板具有润湿样品,转移液体或两者的内表面,其具有相同或不同的润湿性。在一些实施方案中,一个板具有润湿样品,转移液体或两者的内表面;而另一板具有不润湿的内表面(即接触角等于或大于90度)。板内表面的润湿是针对于板的一部分或整个区域而言的。

[0494] 在一些实施方案中,板的内表面具有其它纳米或微结构以在CROF期间控制样品的横向流动。纳米或微结构包括但不限于通道,泵和其它。纳米和微结构也用于控制内表面的润湿性质。

[0495] 2.3间隔件

[0496] 间隔件的功能。在本发明中,间隔件被配置为具有以下功能和性质中的一种或任何组合:间隔件被配置为(1)与板一起控制样品或样品的相关体量的厚度(更优选的是,厚度控制在相关区域上是精确的,或均匀的或兼有两者);(2)允许样品在板表面上具有受压制受调节的开放式流动(CROF);(3)在给定样品面积(体积)中不占有显著的表面积(体积);(4)降低或增加样品中颗粒或分析物的沉降效应;(5)改变和/或控制板的内表面的润湿性能;(6)识别板的位置,尺寸的尺度和/或与板相关的信息,或(7)执行上述的任何组合。

[0497] 间隔件的架构和形状。为了实现期望的样本厚度的降低和控制,在某些实施方案中,间隔件固定于相应的板上。通常,间隔件可以具有任何形状,只要间隔件能够在CROF过程期间调节样品厚度,但是优选某些形状以实现某些功能,例如更好的均匀性,更少的冲压过冲等。

[0498] 间隔件可以是单个间隔件或多个间隔件(例如阵列)。多个间隔件的一些实施方案有间隔件(例如柱)的阵列,其中间隔件间距离是周期性或非周期性的,或者在板的某些区域中是周期性的或非周期性的,或者在板的不同区域中具有不同的距离。

[0499] 存在两种类型的间隔件:开放间隔件和闭合间隔件。开放间隔件是允许样品流过间隔件(即样品流动并穿行间隔件,例如作为间隔件的柱,之间)的间隔件,而封闭的间隔件是能够阻断样品流动的间隔件(即样品不能流过间隔件,例如,对于环形间隔件,样品在环内)。两种类型的间隔件均使用其高度以在闭合构型下限定最终样品厚度。

[0500] 在一些实施方案中,间隔件仅是开放间隔件。在一些实施方案中,间隔件仅为闭合间隔件。在一些实施方案中,间隔件是开放间隔件和封闭间隔件的组合。

[0501] 术语“柱间隔件”是指间隔件具有柱子形状,而柱子形状是指具有高度和横向形状的物体,其允许样品在受压制开放式流动期间围绕其流动。

[0502] 在一些实施方案中,柱间隔件的横向形状是选自(i)圆形,椭圆形,矩形,三角形,多边形,环形,星形,字母形(例如L形,C形状,从A到Z的字母),数字形状(例如,如0,1,2,3,4,...至9的形状);(ii)具有至少一个圆角的组(i)中的形状;(iii)具有锯齿形或粗糙边缘的组(i)的形状;和(iv)组(i),(ii)和(iii)的任何叠加。对于多个间隔件,不同的间隔件可具有不同的横向形状和尺寸以及与相邻间隔件间不同的距离。

[0503] 在一些实施方案中,间隔件可以是和/或可以包括柱,柱,珠,球和/或其它合适的几何形状。间隔件的横向形状和尺寸(即横向于相应的板表面)可以是任何物质,除了在一些实施方案中有以下限制:(i)间隔件几何形状将不会导致测量所得样品厚度和体积的显著偏差;或(ii)间隔件几何形状不会防止样品在板之间流出(即,其不是封闭形式)。但是在一些实施方案中,需要一些间隔件是闭合间隔件以限制样本流动。

[0504] 在一些实施方案中,间隔件的形状具有圆角。例如,矩形间隔件具有圆形(像圆形而不是90度角)的一个,几个或所有拐角。圆角通常使得间隔件的制造更容易,并且在一些情况下对生物材料的损害更小。

[0505] 柱的侧壁可以是直的,弯曲的,倾斜的或在侧壁的不同部分中有不同的形状。在一些实施方案中,间隔件是具有各种横向形状,侧壁和柱高与柱横向面积比的柱。

[0506] 在优选实施方案中,间隔件具有用于允许开放式流动的柱的形状。

[0507] 间隔件材料。在本发明中,间隔件通常由能够用于与两个板一起调节样品的相关体量的厚度的任何材料制成。在一些实施方案中,用于间隔件的材料不同于用于板的材料。在一些实施方案中,用于间隔件的材料至少与用于至少一个板的材料的一部分相同。

[0508] 间隔件由单一材料,复合材料,多种材料,多层材料,合金或其组合制成。用于间隔件的每种材料是无机材料,有机材料或混合物,其中材料的实例在Mat-1和Mat-2的段落中给出。在优选实施方案中,间隔件由与CROF中使用的板相同的材料制成。

[0509] 间隔件的机械强度和柔性。在一些实施方案中,间隔件的机械强度足够强,使得在板的压制和闭合构型期间,间隔件的高度与板处于开放构型时的高度相同或显著相同。在一些实施方案中,可以表征和预定间隔件在开放构型和闭合构型之间的差异。

[0510] 用于间隔件的材料是刚性的,柔性的或两者之间的任何柔性。刚性是相对于用于使板进入闭合构型的给定的按压力而言的:如果间隔件在按压力下在其高度上变形不大于1%,则间隔件材料被认为是刚性的,否则是柔性的。当间隔件由柔性材料制成时,在闭合构型下的最终样本厚度仍然可以从间隔件的按压力和机械性质预先确定。

[0511] 间隔件在样品内。为了实现期望的样品厚度的降低和控制,特别是为了实现良好的样品厚度均匀性,在某些实施方案中,间隔件放置在样品或样品的相关体量内。在一些实施方案中,在样品或样品的相关体量内具有一个或多个间隔件,其具有适当的间隔件间距。在某些实施方案中,至少一个间隔件在样品内部,至少两个间隔件在样品或样品的相关体量内部,或至少“n”个间隔件在样品或样品的相关体量内部,其中“n”可以由CROF期间的样品厚度均匀性或所需的样品流动性质来确定。

[0512] 间隔件高度。在一些实施方案中,所有间隔件具有相同的预定高度。在一些实施方案中,间隔件具有不同的预定高度。在一些实施方案中,间隔件可以分成组或区域,其中每个组或区域具有其各自的间隔件高度。在某些实施方案中,间隔件的预定高度是间隔件的平均高度。在一些实施方案中,间隔件具有大致相同的高度。在一些实施方案中,某一数量百分比的间隔件具有相同的高度。

[0513] 间隔件的高度是通过期望的受调节的最终样品厚度和残余样品厚度来选择的。间隔件高度(预定间隔件高度)和/或样品厚度为3nm或更小,10nm或更小,50nm或更小,100nm或更小,200nm或更小,500nm或更小,800nm或更小,1000nm或更小,1um或更小,2um或更小,3um或更小,5um或更小,10um或更小,20um或更小,30um或更小,50um或更小,100um或更小,

150um或更小,200um或更小,300um或更小,500um或更小,800um或更小,1mm或更小,2mm或更小,4mm或更小,或任意两个值之间的范围。

[0514] 间隔件高度和/或样品厚度在一个优选实施方案中为1nm至100nm,在另一个优选实施方案中为100nm至500nm,在另一优选实施方案中为500nm至1000nm,1um(即1000nm)至2在另一优选实施方案中为2um至3um,在另一优选实施方案中为5um至5um,在另一优选实施方案中为5um至10um,在另一优选实施方案中为10um至50um,在另一的优选实施方案中为50um至100um。

[0515] 在一些实施方案中,间隔件高度和/或样品厚度(i)等于或略大于分析物的最小尺寸,或(ii)等于或略大于分析物的最大尺寸。“略大于”意味着较大于大约1%至5%以及两个值之间的任何数字。

[0516] 在一些实施方案中,间隔件高度和/或样品厚度大于分析物(例如分析物具有各向异性形状)的最小尺寸,但小于分析物的最大尺寸。

[0517] 例如,红细胞具有最小尺寸为2um(盘厚度)和最大尺寸为11um(盘直径)的盘形状。在本发明的一个实施方案中,间隔件被选择为使得在一个实施方案中在相关区域中的板的内表面间隔为2um(等于最小尺寸),在另一个实施方案中为2.2um,或者在另一个实施方案中为3(大于最小尺寸50%),但是小于红细胞的尺寸。这种实施方案在血细胞计数中具有某些优点。在一个实施方案中,对于红细胞计数,通过使内表面间隔为2或3um以及两个值之间的任何数目,未稀释的全血样品被限制在每个红细胞(RBC)不与其他部分重叠,平均来说,从而允许在视觉上准确地计数红细胞。(RBC之间太多的重叠可导致计数中的严重错误)。

[0518] 在本发明中,在一些实施方案中,其使用板和间隔件不仅调节样品的厚度,还调节当板处于闭合时样品中的分析物/实体的取向和/或表面密度。当板处于闭合构型时,样品的较薄厚度使得单位面积内的分析物/实体较少(即较小的表面浓度/密度)。

[0519] 间隔件横向尺寸。对于开放间隔件,横向尺寸可以通过其在x和y两个正交方向上的横向尺寸(有时称为宽度)来表征。在每个方向上间隔件的横向尺寸相同或不同。在一些实施方案中,每个方向(x或y)的横向尺寸是...。

[0520] 在一些实施方案中,x与y方向的横向尺寸的比率为1,1.5,2,5,10,100,500,1000,10,000或该值的任何两个之间的范围。在一些实施方案中,使用不同的比率来调节样品的流动方向;比率越大,流动沿着一个方向(较大尺寸方向)。

[0521] 在一些实施方案中,间隔件在x和y方向上的不同横向尺寸用作(a)使用间隔件作为比例标记以指示板的取向,(b)使用间隔件在优选方向上促成更多的样品流,或两者。

[0522] 在优选实施方案中,周期,宽度和高度。

[0523] 在一些实施方案中,所有间隔件具有相同的形状和尺寸。在一些实施方案中,每个间隔件具有不同的横向尺寸。

[0524] 对于闭合间隔件,在一些实施方案中,基于待由闭合间隔件包封的样品的总体积选择内部横向形状和尺寸,其中体积尺寸已经在本公开中描述;而在某些实施方案中,外部横向形状和尺寸是基于所需支持液体抵靠间隔件的压力和压制板的压制压力的强度来选择的。

[0525] 柱间隔件的高度与平均横向尺寸的高宽比。

[0526] 在某些实施方案中,柱间隔件的高度与平均横向尺寸的纵横比为100,000,10,000,1,000,100,10,1,0.1,0.01,0.001,0.0001,0.00001或任何两个之间的范围的值。

[0527] 间隔件高度的精度。间隔件的高度应精确控制。间隔件的相对精度(即与期望的间隔件高度的偏差比率)为0.001%以下,0.01%以下,0.1%以下,0.5%或更小,1%或更小,2%或更小,5%或更小,8%或更小,10%或更小,15%或更小,20%50%或更小,60%或更小,70%或更小,80%或更小,90%或更小,99.9%或更小,或任何值之间的范围。

[0528] 间隔件间距离。间隔件可以是板上或样品的相关区域中的单个间隔件或多个间隔件。在一些实施方案中,板上的间隔件以阵列形式配置和/或布置,并且阵列是在板的一些位置中的周期性,非周期性阵列或周期性的,而在其它位置是非周期性的。

[0529] 在一些实施方案中,间隔件的周期性阵列具有正方形,矩形,三角形,六边形,多边形或其任何组合的晶格,其中组合意味着板的不同位置具有不同的间隔件晶格。

[0530] 在一些实施方案中,间隔件阵列的间隔件间距离在阵列的至少一个方向上是周期性的(即均匀的间隔件距离)。在一些实施方案中,间隔件间距离被配置为改善处于闭合构型时的板间距之间的均匀性。

[0531] 相邻间隔件之间的距离(即间隔件间距离)为1 μ m或更小,5 μ m或更小,10 μ m或更小,20 μ m或更小,30 μ m或更小,40 μ m或更小,50 μ m或更小,60 μ m或更小50 μ m或更小,70 μ m或更小,80 μ m或更小,90 μ m或更小,100 μ m或更小,200 μ m或更小,300 μ m或更小,400 μ m或更小,或任意两个值之间的范围。

[0532] 在某些实施方案中,间隔件间距离为400 μ m或更小,500 μ m或更小,1mm或更小,2mm或更小,3mm或更小,5mm或更小,7mm或更小,10mm或更小,或在这些值的任何两个之间的范围。在某些实施方案中,间隔件间距离为10mm或更小,20mm或更小,30mm或更小,50mm或更小,70mm或更小,100mm或更小,或这些值之间的任何范围。

[0533] 在一些实施方案中,相邻间隔件之间的距离(即间隔件间距离)可被选择使得,对于给定的板和样品的性质,在板的闭合构型下,两个相邻间隔件之间的样品厚度变化至多0.5%,1%,5%,10%,20%,30%,50%,80%或这些值之间的任何范围;或在某些实施方案中,至多80%,100%,200%,400%或任何两个值之间的范围。

[0534] 显然,为了保持两个相邻间隔件之间的给定样品厚度变化,当使用更柔性的板时,需要更紧密的间隔件距离。

[0535] 在优选的实施方案中,间隔件是周期性方形阵列,其中间隔件是具有2至4 μ m的高度,5至20 μ m的平均横向尺寸和1 μ m至100的间隔件间距的柱子。

[0536] 在优选的实施方案中,间隔件是周期性方形阵列,其中间隔件是具有2至4 μ m的高度,5至20 μ m的平均横向尺寸和100 μ m至250的间隔件间距的柱子。

[0537] 在优选的实施方案中,间隔件是周期性的方形阵列,其中间隔件是具有4至50 μ m的高度,5至20 μ m的平均横向尺寸和1 μ m至100的间隔件间距的柱子。

[0538] 在一个优选的实施方案中,间隔件是周期性方形阵列,其中间隔件是具有4至50 μ m的高度,5至20 μ m的平均横向尺寸和100 μ m至250的间隔件间距的柱子。

[0539] 间隔件阵列的周期在一个优选实施方案中为1nm至100nm,在另一个优选实施方案中为100nm至500nm,在另一优选实施方案中为500nm至1000nm,在另一个优选实施方案中为1 μ m(即1000nm)至2 μ m在另一优选实施方案中为3 μ m至5 μ m,在另一优选实施方案中为5 μ m至

10um,在另一优选实施方案中为10um至50um,在另一优选实施方案中为10um至100um,在另一优选实施方案中为100um至175um,在另一的优选实施方案中为175um至300um。

[0540] 间隔件密度。间隔件以一定表面密度排布,该表面密度大于每平方厘米1个,大于每10微米2个,大于每100微米2个,大于每500微米1个,大于每1000微米1个,大于1个每5000mm²,大于每0.01mm²,大于1每0.1mm²,大于1每1mm²,大于1每5mm²,大于1每10mm²,大于1每100mm²,大于11000mm²,大于每10000mm²,或任何两个值之间的范围。

[0541] (3) 间隔件被配置成在给定样品面积(体积)中不占有显着的表面积(体积);

[0542] 间隔件体积与样品体积的比率。在许多实施方案中,间隔件体积(即间隔件的体积)与样品体积(即样品的体积)的比例和/或在相关体量内的间隔件的体积与样品的相关体量的体积的比例进行控制以实现某些优点。优点包括但不限于样品厚度控制的均匀性,分析物的均匀性,样品流动性质(即流速,流动方向等)。

[0543] 在某些实施方案中,间隔件体积与样品体积的比率和/或在样品的相关体量内部的间隔件的体积与样品的相关体积的比率小于100%,至多99%,至多70%,至多50%,至多30%,至多10%,至多5%,至多3%至多1%,至多0.1%,至多0.01%最多0.001%,或任何值之间的范围。

[0544] 固定于板上的间隔件。在本发明中起关键作用的间隔件间距离和间隔件取向,优选地,在将板从开放构型带到闭合构型的过程中被保持,和/或,优选地,在将板从开放构型带到闭合构型的过程之前预先确定。

[0545] 本发明的一些实施方案是,在使板进入闭合构型之前,间隔件固定于一个板上。术语“间隔件固定于相应的板上”是指间隔件附接在板上,并且在板的使用期间保持附接。“间隔件固定于相应的板上”的一个示例是间隔件与板由一片材料一体制成,并且间隔件相对于板表面的位置不改变。“间隔件不相固定于相应的板上”的一个示例是间隔件通过粘合剂粘合到板,但是在板的使用期间,粘合剂不能将间隔件保持在板表面上的原始位置处(即间隔件从其在板表面上的初始位置移动开)。

[0546] 在一些实施方案中,至少一个间隔件固定于相应的板上。在某些实施方案中,至少两个间隔件固定于相应的板上。在大多数实施方案中,大多数间隔件固定于它们各自的板上。在某些实施方案中,所有间隔件固定于它们各自的板上。

[0547] 在一些实施方案中,间隔件被整体固定于板上。

[0548] 在一些实施方案中,间隔件通过以下方法和/或配置中的一种或任何组合固定于其相应的板上:附接,结合,熔合,印刷和蚀刻。

[0549] 术语“印刷”是指通过压印(即压花)一块材料以在板表面上形成间隔件来整体地将固定物固定于板上。材料可以是单层材料或多层材料。

[0550] 术语“蚀刻”是指通过蚀刻一片材料以在板表面上形成间隔件来整体地将固定物固定于板上。材料可以是单层材料或多层材料。

[0551] 术语“熔合到”是指通过将间隔件和板附接在一起而将间隔件和板一体地固定在一起,间隔件和板的原始材料彼此熔合,并且在两种材料之间存在清楚的材料边界融合。

[0552] 术语“结合到”是指间隔件和板通过粘合而将间隔件和板而整体地固定在一起。

[0553] 术语“附接到”是指间隔件和板连接在一起。

[0554] 在一些实施方案中,间隔件和板由相同的材料制成。在其他实施方案中,间隔件和

板由不同的材料制成。在其他实施方案中,间隔件和板形成为一体。在其它实施方案中,间隔件具有一端固定到其相应板上,且该端敞开以容纳两个板的不同构造。

[0555] 在其它实施方案中,每个间隔件独立地以附接,结合,熔合,印刷和蚀刻等方法的至少一种固定在相应的板上。术语“独立地”是指通过选自附接,结合,熔合,压印和蚀刻的相同或不同的方法固定在其相应的板上。

[0556] 在一些实施方案中,至少两个间隔件之间的距离是预定的(“预定的间隔件间距”意味着当用户使用板时该距离是已知的)。

[0557] 在本文所述的所有方法和装置的一些实施方案中,除了固定间隔件之外还存在附加间隔件。样品的具体厚度。在本发明中,我们观察到通过使用更小的板间隔(对于给定样品区域)或更大的样品面积(对于给定的板间距),或两者,可以实现更大的板保持力(即将两个板保持在一起的力)。

[0558] 在一些实施方案中,两板中的至少一个在包围相关区域的区域中是透明的,每个板具有被配置为在闭合构型中接触样品的内表面;在闭合构型中,所述两板的内表面基本上彼此平行;除了具有间隔件的位置之外,板的内表面基本上是平面的;或它们的任何组合。

[0559] 2.4最终样品厚度和均匀性

[0560] 在一些实施方案中,显著平坦是相对于最终样品厚度而确定的,并且,取决于实施方案和应用,具有小于0.1%,小于0.5%,小于1%,小于2%,小于5%或小于10%,或这些值中任意两个之间的范围。

[0561] 在一些实施方案中,相对于样品厚度的平面度可以小于0.1%,小于0.5%,小于1%,小于2%,小于5%,小于10%,小于20%,小于50%,或小于100%,或这些值中任意两个之间的范围。

[0562] 在一些实施方案中,显著平坦可以是指表面平坦度变化本身(从平均厚度测量)小于0.1%,小于0.5%,小于1%,小于2%,小于5%或小于10%,或这些值中任意两个之间的范围。通常,相对于板厚度的平面度可以小于0.1%,小于0.5%,小于1%,小于2%,小于5%,小于10%,小于20%,小于50%或小于100%,或这些值中任意两个之间的范围。

[0563] 2.5间隔件制造方法。

[0564] 可以使用光刻,蚀刻,压印(纳米压印),被放置,剥离,熔合或其组合,以各种方式在板上制造间隔件。在一些实施方案中,间隔件直接压印或印刷在板上。在一些实施方案中,间隔件压印到被放置在板上的材料(例如塑料)中。在某些实施方案中,间隔件通过直接压印CROF板的表面而制成。纳米压印可以通过使用辊式压印机的辊对辊技术,或辊到平面纳米压印来进行。这种方法具有很大的经济优势,因此降低了成本。

[0565] 在一些实施方案中,间隔件被放置在板上。被放置可以是蒸发,粘贴或剥离。在粘贴时,首先在载体上制造间隔件,然后将间隔件从载体转移到板。在剥离时,可首先将移除材料被放置在板上,并且在材料中产生孔;孔底部暴露板表面,然后将间隔件材料被放置到孔中,之后去除可去除材料,仅在板表面上留下间隔件。在一些实施方案中,被放置在板上的间隔件与板熔合。在一些实施方案中,间隔件和板在单个工艺中制造。单一工艺包括压印(即压花,模制)或合成。

[0566] 在一些实施方案中,间隔件中的至少两个通过不同的制造方法固定到相应的板,

并且可选地,其中不同的制造方法包括被放置,粘结,熔融,印刷和蚀刻中的至少一种。

[0567] 在一些实施方案中,一个或多个间隔件通过被接合,被熔合,被印刷或被蚀刻或其任何组合的制造方法固定到相应的板。

[0568] 在一些实施方案中,用于在板上形成这种整体式间隔件的制造方法包括粘合,熔合,印刷或蚀刻或其任何组合的方法。

[0569] 2.6比例标记

[0570] 术语“比例标记”是指能够辅助样品的相关面积和/或相对体积的定量(即尺寸测量)或控制的标度标记。在一些实施方案中,比例标记物在第一板或第二板上,在两个板上,在板的一个表面上,在板的两个表面上,在板之间,板附近或其任何组合。在一些实施方案中,比例标记被固定在第一板或第二板上,在两个板上,在板的一个表面上,在板的两个表面上,在板之间,板附近或者其任何组合。在一些实施方案中,比例标记被放置在第一板或第二板上,在两个板上,在板的一个表面上,在板的两个表面上,在板之间,板附近,或者其任何组合。在一些实施方案中,一些间隔件是固定的而一些间隔件时被放置的。

[0571] 在一些实施方案中,比例标记是蚀刻的比例标记,被放置的材料或印刷的材料。在某些实施方案中,这些材料吸收光,反射光,发射光或其任何组合。

[0572] 在一些实施方案中,比例标记是具有已知尺寸和/或已知间隔距离的一个或多个物体。该物体的示例包括但不限于矩形,圆柱或圆形。

[0573] 在一些实施方案中,比例标记具有在纳米(nm),微米(um)或毫米(mm)范围内的尺寸或其它尺寸。

[0574] 在一些实施方案中,比例标记是一个尺子,其具有被配置为测量对象的尺寸的比例标记。在一些实施方案中,比例标记是纳米(nm),微米(um)或毫米(mm)或其他尺寸的比例尺。在一些实施方案中,比例标记是蚀刻的比例标记,被放置材料或印刷材料。在一些实施方案中,用于比例标记的材料是吸收光,反射光,散射光,干涉光,衍射光,发射光或其任何组合的材料。

[0575] 在一些实施方案中,该标记是间隔件,其具有“调节样品厚度”和“提供比例标记和/或尺寸比例标志”的双重功能。例如,具有已知尺寸的矩形间隔件或具有已知间隔件间距离的两个间隔件可用于测量与间隔件周围的样品相关的尺寸。从测量的样本尺寸,可以计算样本的相关体量的体积。

[0576] 在一些实施方案中,比例标记被配置为其至少部分地限定样品的相关体量的边界。

[0577] 在一些实施方案中,比例标记中的至少一个比例标记被配置为具有平行于样品的相关体量的横向区域平面的已知尺寸。

[0578] 在一些实施方案中,至少一比例标记被平行于横向区域的平面的已知距离而分开来。

[0579] 在一些实施方案中,比例标记被配置为用于光学检测。

[0580] 在一些实施方案中,每个比例标记独立地是光吸收,光反射,光散射,光衍射和发光中的至少一种。

[0581] 在一些实施方案中,刻度标记被布置成具有已知横向间隔的规则阵列。

[0582] 在一些实施方案中,每个刻度标记独立地具有为正方形,矩形,多边形和圆形中的

至少一个的横向轮廓。

[0583] 在一些实施方案中,刻度标记中的至少一个附接,结合,熔合,压印和蚀刻在板中的一个中。

[0584] 在一些实施方案中,刻度标记中的至少一个是间隔件中的一个。

[0585] 在一些实施方案中,一些间隔件也起到比例标记的作用以量化样品的相关体量。

[0586] 在某些实施方案中,(固定分析物的)结合位点,存储位点等可以用作比例标记。在一个实施方案中,具有已知横向尺寸的位点与产生可检测信号的光相互作用,其确定位点的已知横向尺寸,从而提供一个或多个比例标记。

[0587] 在另一个实施方案中,在CROF过程之前预先确定一些位点的尺寸,并且当板处于闭合构型时,坐落在位点上的部分样品的厚度显着小于位点的横向平均尺寸,然后通过控制温育时间,使得在温育后,(1)结合到结合位点的大多数分析物/实体来自位于结合位点顶部的样品体量,或(2)大多数混合(扩散)到位于结合位点顶部的样品体量中的试剂来自存储位点。在这些情况下,与结合或试剂混合相关的样品相关体量的体积近似等于位点预定面积乘以位点处的样品厚度。这一点称为可能的一个关键原因是,对于给定的温育时间,相关体量之外的样品体量中的分析物/实体没有足够的时间扩散到结合位点,或者存储位点上的试剂不具有足够的时间扩散到相关体量以外的样品体量中。

[0588] 可以说明通过使用具有已知尺寸的位点并通过限制温育时间来测量和/或控制相关面积和体积的方法的一个实例是,一个测定法在CROF过程的第一板上(其具有大于结合位点的表面)具有1000um乘1000um大小的结合位点(即含有捕获剂的区域);在板的闭合构型中,具有分析物的样品在结合位点上方,具有约20um(在结合位点区域中)的厚度和大于结合位点的面积,并温育达等于目标分析物/实体在样品厚度中的扩散时间长度的时间。在这种情况下,结合到结合位点的大多数分析物/实体来自位于结合位点上方的样品体量,其为1,000um乘以1000um乘以20um,等于0.02p,因为在距离结合位点20um之外的样品体量没有时间扩散到结合位点(统计学上)。在这种情况下,由于结合位点捕获的分析物/实体,如果在温育后测量信号,可以从相关面积和相关体积(由结合位点提供)的信息确定样品的相关区域和相关体量中的分析物/实体的浓度。分析物浓度可通过结合位点捕获的分析物的数量除以相关体积来量化。

[0589] 在一些实施方案中,相关体积约等于结合位点面积乘以样品厚度,而样品中的目标分析物浓度近似等于由结合位点捕获的分析物的数目除以相关样品体积。当结合位点尺寸与样品厚度的比值变大时(假定温育时间约为样品中的目标分析物在样品厚度的距离内扩散的时间),目标分析物体积的定量方法的这种精度变得更好。。

[0590] CROF中的扩散时间。在本发明中,在通过两个板铺展样品的所有段落的方法和装置中,在闭合构型下将样品铺展至最终厚度的时间为0.001秒以下,0.01秒,0.1秒,1秒5秒,10秒,20秒,30秒,60秒,90秒,100秒,150秒,200秒,300秒,500秒,1000秒或任意两个值之间的范围。

[0591] 在优选实施方案中,在通过两个板铺展样品的所有段落的方法和装置中,在闭合构型下将样品铺展至最终厚度的时间为0.001秒或更少,0.01秒,0.1秒,1秒,3秒,5秒,10秒,20秒,30秒,60秒,90秒,100秒,150秒或任何两个值之间的范围。

[0592] 在优选实施方案中,在通过两个板铺展样品的所有段落的方法和装置中,在在闭

合构型下将样品铺展至最终厚度的时间为0.001秒或更少,0.01秒,0.1秒,1秒,3秒,5秒,10秒,20秒,30秒,60秒,90秒或任何两个值之间的范围。

[0593] 在优选实施方案中,在通过两个板铺展样品的所有段落的方法和装置中,在闭合构型下将样品铺展至最终厚度的时间为0.001秒或更少,0.01秒,0.1秒,1秒,3秒,5秒,10秒,20秒,30秒,或任何两个值之间的范围。

[0594] 在优选实施方案中,在通过两个板铺展样品的所有段落的方法和装置中,在闭合构型下将样品铺展至最终厚度的时间为0.001秒或更少,0.01秒,0.1秒,1秒,3秒,5秒,10秒,或任何两个值之间的范围。

[0595] 在优选实施方案中,在通过两个板铺展样品的所有段落的方法和装置中,在闭合构型下将样品铺展至最终厚度的时间为0.001秒或更少,0.01秒,0.1秒,1秒,3秒,或任何两个值之间的范围。

[0596] 第3部分中描述的实施方案及其任何组合可应用于(即与之组合)本发明的整个说明书中的其他任何实施方案。

[0597] 在一个优选实施方案中,通过使用模具对薄塑料膜进行压花(例如纳米压印),在X板上整体地制造间隔件,并且间隔件由相同的材料制成。

[0598] 在一个优选实施方案中,通过使用模具压印(例如,纳米压印)薄塑料膜,并且由相同的材料制成,在X板上整体地制造间隔件,并且X板的厚度为50 μ m至500 μ m。

[0599] 在一个优选实施方案中,通过使用模具压印(例如,纳米压印)薄塑料膜,并且由相同的材料制成,在X板上整体地制造间隔件,并且X板的厚度为50 μ m至250 μ m。

[0600] 在一个优选实施方案中,间隔件在X板上单片制成并且由相同的材料制成,并且X板的厚度为50 μ m至500 μ m。

[0601] 在一个优选实施方案中,间隔件使用模具在X板上整体地制造薄塑料膜,并且由相同的材料制成,并且X板的厚度为50 μ m至250 μ m。

[0602] 在一个优选实施方案中,通过使用模具压印(例如纳米压印)薄塑料膜,并且由相同的材料制成,在X板上整体地制造间隔件,其中塑料膜是PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)或PS(聚苯乙烯)。

[0603] 在一个优选实施方案中,通过使用模具压印(例如纳米压印)薄塑料膜,并且由相同的材料制成,在X板上整体地制造间隔件,其中塑料膜是PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)或PS(聚苯乙烯),X板的厚度为50 μ m~500 μ m。

[0604] 在一个优选实施方案中,通过使用模具压印(例如纳米压印)薄塑料膜,并且由相同的材料制成,在X板上整体地制造间隔件,其中塑料膜是PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)或PS(聚苯乙烯),X板的厚度为50 μ m~250 μ m。

[0605] 在一个优选实施方案中,通过使用模具对薄塑料膜进行压花(例如纳米压印)而在X板上整体地制造间隔件,并且间隔件由相同的材料制成,其中塑料膜是PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)或PS(聚苯乙烯),并且间隔件具有正方形或矩形形状,并且具有相同的间隔件高度。

[0606] 在一个优选实施方案中,间隔件具有正方形或矩形形状(具有或不具有圆角)。

[0607] 在一个优选实施方案中,间隔件具有正方形或矩形柱,柱宽度(每个横向方向上的间隔件宽度)在1 μ m至200 μ m之间;柱间隔(即间隔件周期)为2 μ m-2000 μ m,柱高度(即间隔件

高度)为1 μ m-100 μ m。

[0608] 在一个优选实施方案中,由PMMA或PS制成的间隔件具有正方形或矩形柱,柱宽度(每个横向方向上的间隔宽度)在1 μ m至200 μ m之间;柱间隔(即间隔件周期)为2 μ m-2000 μ m,柱高度(即间隔件高度)为1 μ m-100 μ m。

[0609] 在一个优选实施方案中,间隔件在X板上单片制成并且由塑料材料制成,并且间隔件具有正方形或矩形柱,柱宽度(每个横向方向上的间隔件宽度)在1 μ m至200 μ m之间;柱间隔(即间隔件周期)为2 μ m-2000 μ m,柱高度(即间隔件高度)为1 μ m-100 μ m。

[0610] 在一个优选实施方案中,间隔件在X板上单片制成并且由相同的材料制成,并且间隔件具有正方形或矩形柱,柱宽度(每个横向方向上的间隔宽度)在1 μ m至200 μ m之间;(即间隔件周期)为2 μ m-2000 μ m,柱高度(即间隔件高度)为1 μ m-10 μ m。

[0611] 在一个优选实施方案中,间隔件在X板上单片制成,并且由选自PS或PMMA或其它塑料的相同材料制成,并且间隔件具有正方形或矩形柱,柱宽度(每个横向方向上的间隔宽度)在1 μ m至200 μ m之间;(即隔离物周期)为2 μ m-2000 μ m,柱高度(即隔离物高度)为10 μ m-50 μ m。

[0612] 在CROF装置的一个优选实施方案中,一个板是X板,另一个板是平面薄膜,其中至少一个板的厚度在10 μ m至250 μ m的范围内;其中所述间隔件固定在所述X板上,并且其中所述板和所述间隔件可以具有相同的材料或不同的材料,并且由PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯),PS(聚苯乙烯)或具有与PMMA或PS类似的机械性能的材料。

[0613] 在CROF装置的一个优选实施方案中,一个板是X板,另一个板是平面薄膜,其中至少一个板的厚度在250 μ m至500 μ m的范围内;其中所述间隔件固定在所述X板上,并且其中所述板和所述间隔件可以具有相同的材料或不同的材料,并且由PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯),PS(聚苯乙烯)或具有与PMMA或PS类似的机械性能的材料。

[0614] 在CROF装置的一个优选实施方案中,一个板是X板,另一个板是平面薄膜,其中至少一个板的厚度在10 μ m至250 μ m的范围内;其中所述间隔件固定在所述X板上,并且是柱宽度(每个横向方向上的间隔宽度)在1 μ m至200 μ m之间的正方形或矩形柱的阵列;(即间隔件周期)为2 μ m-2000 μ m,柱高度(即间隔件高度)为1 μ m-100 μ m,其中板和间隔件可以具有相同的材料或不同的材料,并且由PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)或PS(聚苯乙烯),或具有与PMMA或PS类似的机械性能的材料。

[0615] 上述“类似”表示其机械性能的差异在60%以内。

[0616] 保护环。一些实施方案具有保护环以防止样品流出板表面。保护环的一些实施方案是围绕样品区域的闭合壁。壁具有等于间隔件高度或不同于间隔件高度的高度。壁可以与样品测量区域相距显著距离。

[0617] CROF过程中的可移动板可以包括铰链,平台或一些其他定位系统,和/或与之相联接,其配置成使板在开放构型和闭合构型之间转变。可移动板可以以一种留下开口以便进入板之间的空间(例如插入和/或移除样品)的方式与一个或多个接头联接在一起,条件是至少一个接头和/或至少所述板中的一个具有足够的柔性以实现所述的开放和闭合构型。膜泵不被认为是可移动板。

[0618] 3. 分析物,实体,绑定站点,存储站点和转移介质

[0619] 在本发明中,所述实体包括但不限于蛋白质,氨基酸,核酸,脂质,碳水化合物,代

谢物,细胞或纳米颗粒中的一种。

[0620] 在一些实施方案中,结合位点包含配置为结合相应实体的结合配偶体。

[0621] 在一些实施方案中,结合位点包含结合到结合位点的实体。

[0622] 在一些实施方案中,放置样品包括将样品放置在结合位点内。

[0623] 在一些实施方案中,试剂包括蛋白质,氨基酸,核酸,脂质,碳水化合物和代谢物中的至少一种。

[0624] 在某些实施方案中,存储位点包含干燥的试剂。

[0625] 在一些实施方案中,存储位点包含配置成在与样品接触时从存储位点释放的试剂。

[0626] 在一些实施方案中,第一存储位点和第二存储位点在一个公共存储位点。

[0627] 在一些实施方案中,转移介质是样品。在一些实施方案中,转移介质是液体,其中试剂或实体可以溶解并扩散其中的液体。

[0628] 在一些实施方案中,板具有多个存储位点。在另一实施方案中,一个存储位点具有多种试剂。

[0629] 不同的释放时间。在一些实施方案中,板在其不同位置上具有多个存储位点,或者一个存储位点存储有多种试剂,并且在通过存储位点与样品接触时,试剂被释放,但在不同时间释放相同的存储位点上的不同试剂或是不同的存储位点上的试剂。

[0630] 在一些实施方案中,第一试剂被配置成在第一平均释放时间与样品接触时从第一存储位点释放,并且第二试剂被配置为在第二平均释放时间与样品接触时从第二存储位点释放平均释放时间,其中所述第一平均释放时间小于所述第二平均释放时间。

[0631] 在一些实施方案中,第一试剂被配置为在与样品接触时从第一存储位点释放,其中第二试剂是被绑定的试剂。

[0632] 在一些实施方案中,被放置包括将至少一种试剂结合到相应的板上。

[0633] 在一些实施方案中,接触包括从相应板释放至少一种试剂。

[0634] 在一些实施方案中,被放置包括被放置第一试剂和第二试剂,其中接触包括在第二试剂之前释放第一试剂。

[0635] 在一些实施方案中,至少一个板包括存储位点,其包括将被添加到样品的相关体量中的试剂。

[0636] 在一些实施方案中,其中所述试剂包括蛋白质,氨基酸,核酸,脂质,碳水化合物和代谢物中的至少一种。

[0637] 在一些实施方案中,存储位点包括干燥的试剂。

[0638] 在一些实施方案中,存储位点包括配置成在与样品接触时从存储位点释放的试剂。

[0639] 在一些实施方案中,所述存储位点是第一存储位点,所述试剂是第一试剂,其中所述装置包括第二存储位点,其包括将被添加到所述样品的相关体量中的第二试剂,其中所述第二存储位点在所述板的其中一个上。

[0640] 在一些实施方案中,第一存储位点和第二存储位点位于一个公共存储位点。

[0641] 在一些实施方案中,第一试剂被配置成在与样品接触时从第一存储位点以第一平均释放时间释放,并且第二试剂被配置为在与样品接触时从第二存储位点以第二平均释放

时间释放,并且其中所述第一平均释放时间小于所述第二平均释放时间。

[0642] 在一些实施方案中,至少一种试剂在相应的板上干燥。

[0643] 在试剂盒的一些实施方案中,至少一种试剂结合到相应的板上。

[0644] 在试剂盒的一些实施方案中,至少一种试剂被配置为在与样品接触时从相应的板释放。

[0645] 在试剂盒的一些实施方案中,第一试剂在一个或两个板上,第二试剂在一个或两个板上,其中第一试剂被配置为在与样品接触时从相应的板以第一平均释放时间释放,第二试剂被配置为在与样品接触时从相应的板以第二平均释放时间释放,并且其中第一平均释放时间小于第二平均释放时间。

[0646] 在所述装置的一些实施方案中,所述存储位点是第一存储位点,所述试剂是第一试剂,其中所述装置包括第二存储位点,所述第二存储位点包括待添加到所述样品的相关体量中的第二试剂,其中第二存储位点在其中一个板上。

[0647] 4. 在部分样品中本地结合或混合 (P)

[0648] 在一些应用中,需要具有一个可仅在样品的一部分中,而不是在整个样品中捕获(即结合)分析物的结合位点。在某些情况下,人们还希望将试剂加入(即混合)到样品的某一端口中,而不是整个样品里。通常人们还希望在样品的一部分和其余部分之间没有流体分离。这种要求在某些多路复用检测中是优选的或必需的。

[0649] 本发明通过使用CROF方法和装置以将样品重塑成具有某一厚度的超薄膜,来提供对上述要求的解决方案,所述厚度小于某一部分样品的横向尺寸,其中只有在该部分样品内部的分析物将被捕获,或者仅将样品的一部分与试剂混合。这种方法的工作原理是当样品的厚度小于一部分样品的横向尺寸时,通过表面捕获分析物或者与放置在表面上的试剂的混合主要受限于分析物和试剂在厚度方向上的扩散,而横向扩散中的扩散相对不显著。例如,如果样品被重新成形为5 μ m厚的薄膜,如果应该捕获分析物的样品部分或应该与试剂混合的样品具有5mm $\times$ 5mm的横向尺寸,并且如果分析物或试剂跨过5 μ m的扩散时间为10秒,则分析物或试剂在5mm距离上的横向扩散时间为1,000,000秒(因为扩散时间与扩散距离的平方成正比)。这意味着通过在某个时间间隔中选择样品的感兴趣部分的横向尺寸与样品厚度的适当比率,捕获的分析物将主要来自感兴趣的样品部分,或者样品主要混合到感兴趣的样品部分。

[0650] 4.1 部分样品中的实体本地结合到表面上 (P: 体量至表面)

[0651] P1. 一种用于将样品的相关体量中的目标实体本地结合到表面上的结合位点的方法,包括:

[0652] f. 在段落X1的方法中执行步骤(a)至(d),其中在闭合构型的样品厚度显着小于结合位点的平均线性尺寸;并且其中所述相关体量是当所述板处于所述闭合构型时位于所述结合位点上的样品的体量;

[0653] (ii) 在(i)之后并且当所述板处于闭合构型时:

[0654] (1) 将样品温育相关时间长度,然后停止温育;或者

[0655] (2) 将样品温育等于或长于相关时间长度的最小值的时间,然后在等于或小于相关时间长度的最大值的时间段内评估目标实体结合到结合位点的情况;

[0656] 其中所述相关时间长度为:

[0657] i. 等于或长于所述目标实体在所述关闭配置下跨越所述均匀厚度层的厚度进行扩散所需时间;和

[0658] ii. 显着短于目标实体横跨结合位点的最小横向尺寸进行扩散所需时间;

[0659] 其中在 (1) 中的温育结束时或在 (2) 中的评估期间, 结合至结合位点的大多数目标实体来自样品的相关体量;

[0660] 其中所述温育允许所述目标实体结合到所述结合位点, 并且其中所述相关体量是所述样品处于所述闭合构型的结合位点之上的部分。

[0661] 段落P1的方法中, 其中术语“样品的相关体量的厚度显着小于结合位点的最小平均尺寸”是指结合位点的最小平均尺寸与样品厚度的比率(称为“长度与厚度比”)为至少3, 至少5, 至少10, 至少20, 至少50, 至少100, 至少500, 至少1,000, 至少10,000, 至少100,000或值之间的任何范围。在优选的实施方案中, 长度与厚度的比为至少3, 至少5, 至少10, 至少20, 至少50, 至少100, 至少500或这些值之间的任何范围。

[0662] 段落P1的方法中, 其中术语“显着短于目标实体横跨结合位点的最小横向尺寸进行扩散所需时间”是指其穿过结合位点的最小横向尺寸扩散所需时间与跨越样品厚度进行扩散所需时间的比率(称为“长度与厚度扩散时间比”)为至少3, 至少10, 至少50, 至少10, 至少100, 至少1,000, 至少10,000, 至少100,000, 至少1,00,000或这些值之间的任何范围。在优选的实施方案中, 长度与厚度的扩散时间比为至少3, 至少10, 至少50, 至少10, 至少100, 至少1,000, 至少10,000或这些值之间的任何范围。

[0663] P2. 一种用于将样品的相关体量中的实体本地结合到表面上的结合位点的装置, 包括:

[0664] 第一板和第二板, 其可相对于彼此移动成不同的构型,

[0665] 其中所述第一板在其表面上具有结合位点, 所述结合位点的面积小于所述板的面积并且被配置为其结合样品中的目标实体, 其中所述目标实体能够在所述样品中扩散, 两个板均包括间隔件, 并且每个间隔件均用固定于其相应的板上并且具有预定高度;

[0666] 其中所述构型之一是开放构型, 其中: 所述两个板部分地或完全地分开, 所述板之间的间隔不受所述间隔件调节, 并且所述样品被放置在所述板中的一个或两个上,

[0667] 其中所述构型中的另一个是闭合构型, 其在所述样品在所述开放构型中被放置之后配置; 并且在闭合构型中: 所述两板彼此面对, 间隔件, 结合位点和样品的至少一部分位于两板之间, 样品接触结合位点的至少一部分, 样品的相关体量的厚度由所述板和所述间隔件调节, 其比当所述板处于开放构型时的样品的最大厚度薄, 其中相关体量是位于结合位点之上的样品的体量;

[0668] 其中选择所述间隔件高度被选择为其可将所述相关体量在所述闭合构型时的厚度调节为薄于所述结合位点的平均线性尺寸的至少3倍。

[0669] 将相关体量的厚度调节至小于结合位点的平均线性尺寸的3倍, 可使得实体跨过样品厚度的扩散时间比跨过一个等于结合位点的平均线性尺寸的距离的扩散时间小9倍。这种厚度调节使得可以选择温育时间, 使得温育导致 (i) 相关体量中的大量目标实体结合到结合位点, 和 (ii) 大量的结合到所述结合位点目标适体来自所述样品的相关体量, 且其中所述温育是允许所述目标实体结合到所述结合位点的过程。

[0670] 例如, 如果温育时间被设置为等于实体穿过样品的相关体量的厚度的扩散所需时

间的时间长度,则在温育之后,相关体量内的大部分实体已经达到并且根据速率方程结合到结合位点上,而相关体量以外的实体最初(即温育之前)只能扩散到相关体量的外围(相对少量),并且当结合位点的平均线性尺寸与相关体量厚度的比率变大,这一体量变得更加不显著。

[0671] 4.2存储在板表面上的实体本地结合至其他板表面上的结合位点(表面至表面)

[0672] P3.一种用于将存储在一个板的存储位点上的实体本地结合到另一个板上的结合位点的方法,包括:

[0673] (a)获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板,其中第一板的表面具有结合位点;并且所述第二板的表面具有包含要结合到所述结合位点的实体的存储位点;其中所述结合位点的面积和所述存储位点的面积小于各个板的面积;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于其相应的板上且具有预定高度;

[0674] (b)获得转移介质,其中所述实体能够溶解到所述转移介质中并在所述转移介质中扩散;

[0675] (c)当所述两板配置成开放构型时,将所述转移介质被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0676] (d)在(c)之后,通过使所述两板进入闭合构型来铺展所述转移介质,其中在所述闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件,所述结合位点,所述存储位点和至少一部分的转移介质位于两板之间;存储位点的至少一部分直接面对结合位点,在它们之间具有转移介质的一部分,并且转移介质的相关体量的厚度由板和间隔件调节,其厚度比当所述板处于开放构型时的最大厚度薄,明显小于所述相关体量在所述板表面方向上的平均线性尺寸;和

[0677] (e)在(d)之后并且当板处于闭合构型时,温育一段时间并停止温育,其中温育时间被选择为使得大量结合于结合位点的实体来自存储位点,其中相关体量是位于结合位点上的转移介质的体量,温育是允许实体结合到结合位点的过程。

[0678] 术语“存储位点的至少一个部分直接面向结合位点”是指从该部分中的一个点到结合位点的最短距离与在板的闭合构型下的相关体量的厚度相同。

[0679] P4.一种用于将存储在一个板的存储位点上的实体结合到另一个板上的相关结合位点上的装置,包括:

[0680] 第一板和第二板,它们可相对于彼此移动成不同的构型,其中第一板的表面具有结合位点;并且所述第二板的表面具有包含要结合到所述结合位点的实体的存储位点;其中所述结合位点的面积和所述存储位点的面积小于各个板的面积;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0681] 其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分地或完全地分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且转移介质被放置在所述板中的一个或两个上,其中所述存储位点上的所述实体能够溶解到所述转移介质中并在所述转移介质中扩散,

[0682] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述转移介质在所述开放构型中被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,间隔件,所述结合位点,所述存储位点和所述转移介质的至少一部分位于两板之间;存储位点的至少一部分直接面向结合位点,

其间具有转移介质的一部分,且转移介质的相关体量的厚度由所述板和所述间隔件调节,其比当所述板处于开放构型时的转移介质的最大厚度薄,其中相关体量是位于结合位点之上的所述转移介质的体量;和

[0683] 其中选择所述间隔件高度被选择为其可将所述相关体量在所述闭合构型时的厚度调节为薄于所述结合位点的平均线性尺寸的至少3倍;和

[0684] 其中所述间隔件中的至少一个在所述样品接触区域内;

[0685] 以及具有预定的间隔件间距离和高度的间隔件。

[0686] 4.3将一个板的多个存储位点上的实体本地结合到另一个板上的多个相应结合位点的方法

[0687] P5.一种用于将存储在一个板的多个存储位点上的实体本地结合到另一个板上的多个对应的结合位点的方法,包括:

[0688] (a) 获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板,其中第一板的表面具有多个结合位点;并且所述第二板的表面具有多个对应的存储位点;其中每个相应的存储位点位于第二板上与结合位点的位置相对应的位置,该位置使得当两个板面对面放置时,每个结合位点仅与一个存储位点重叠;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于其相应的板上且具有预定高度;

[0689] (b) 获得转移介质,其中所述存储位点上的实体能够溶解到所述转移介质中并在所述转移介质中扩散;

[0690] (c) 当所述两板配置成开放构型时,将所述转移介质被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0691] (d) 在(c)之后,通过使所述两板进入闭合构型来铺展所述转移介质,其中在所述闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件,所述结合位点,所述存储位点和至少一部分的转移介质位于两板之间;每个结合位点直接面向仅一个相应的存储位点,转移介质接触每个结合位点的至少一部分和每个存储位点的一部分;并且转移介质的相关体量的厚度由板和间隔件调节,其厚度比当所述板处于开放构型时的最大厚度薄,明显小于所述结合位点的平均线性尺寸;和

[0692] (e) 在(d)之后并且当板处于闭合构型时,温育一段时间并停止温育,其中温育时间被选择为使得大量结合于结合位点的实体来自相应的存储位点,其中相关体量是位于结合位点上的转移介质的体量,温育是允许实体结合到结合位点的过程。

[0693] 在一些实施方案中,间隔限于结合样品区域。

[0694] 在方法P5的一些实施方案中,转移介质是具有目标分析物的样品,结合位点包括捕获剂,并且存储位点中的实体是检测剂,其中目标分析物结合捕获剂和检测剂以形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构。方法P5简化了测定法的步骤,并且可以通过使用更小的间隔件高度,从而更短的样品厚度和更短的分析物和试剂的垂直扩散时间,以获得更短的饱和测定时间,来减少测定时间。

[0695] P6.一种用于将存储在一个板的多个存储位点上的实体本地结合到另一个板上的多个对应的结合位点的装置,包括:

[0696] 第一板和第二板,它们可相对于彼此移动成不同的构型,

[0697] 其中第一板的表面具有多个结合位点;并且所述第二板的表面具有多个对应的存储位点;其中每个相应的存储位点位于第二板上与结合位点的位置相对应的位置,该位置使得当两个板面对面放置时,每个结合位点仅与一个存储位点重叠;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于其相应的板上且具有预定高度;

[0698] 其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分地或完全地分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且转移介质被放置在所述板中的一个或两个上,其中所述存储位点上的所述实体能够溶解到所述转移介质中并在所述转移介质中扩散,

[0699] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述转移介质在所述开放构型中被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,间隔件,所述结合位点,所述存储位点和所述转移介质的至少一部分位于两板之间;每个结合位点直接面向仅一个相应的存储位点,转移介质接触每个结合位点的至少一部分和每个存储位点的至少一部分;并且转移介质的相关体量的厚度由板和间隔件调节,其厚度比当所述板处于开放构型时的最大厚度薄;

[0700] 其中所述相关体量是当所述板处于闭合构型时位于所述存储部位上的所述转移介质的体量;和

[0701] 其中所述预定的间隔件高度被选择为其使得所述相关体量在所述闭合构型下的厚度显著小于所述结合位点的平均线性尺寸。

[0702] 4.4将存储在表面上的试剂本地添加到样品的一部分中(表面至体量)

[0703] P7.一种用于将试剂本地添加到样品的相关体量中的方法,包括:

[0704] (a)获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板,其中所述第一板在其表面上具有包含待添加到样品的相关体量中的试剂的存储位点,该试剂能够溶解到样品中并在样品中扩散,并且存储位点的面积小于板的面积;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0705] (b)获得样品;

[0706] (c)当所述两板配置成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0707] (d)在(c)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件,所述存储位点和所述样品的至少一部分位于所述两板之间;所述样品接触所述存储位点的至少一部分,并在大于所述存储位点的面积上接触所述两板;样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄,并且显著小于板表面方向上所述相关体量的平均线性尺寸;和

[0708] (e)在(d)之后并且在板处于闭合构型时,温育一段时间并停止温育,其中温育时间被选择为其使得(i)大量溶于样品中的试剂包含在样品的相关体量中,和(ii)试剂在相关体量的显着部分中,并且其中相关体量是当板处于闭合构型时位于存储位点上的样品体量,并且温育是允许试剂溶解和扩散在样品中的过程。

[0709] P8.一种用于将存储在板表面上的试剂本地添加到样品的相关体量中的装置,包括:

[0710] 第一板和第二板,其可相对于彼此移动成不同的构型,

[0711] 其中所述第一板在其表面上具有包含待添加到样品的相关体积中的试剂的存储位点,所述试剂能够溶解到所述样品中并在所述样品中扩散;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0712] 其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分地或完全地分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;

[0713] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述样品在所述开放构型中被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,间隔件,所述存储位点和所述样品的至少一部分位于两板之间;样品接触存储位点的至少一部分;并且其至少一部分在板表面所述存储位点以外的部分,所述板和所述间隔件调节所属样品的相关体量的厚度,其厚度比当所述板处于开放构型时的最大厚度薄,且所述相关体量是当所述板处于闭合构型时位于所述存储部位上的样品体量;和

[0714] 其中所述间隔件高度被选择为可将所述相关体量在所述闭合构型时的厚度调节为薄于相关体量在板表面方向上的平均线性尺寸的至少3倍。

[0715] 5在结合位点上形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构(W)

[0716] 本发明的一个方面是通过使用CROF过程以及通过将结合位点置于一个平板上和将存储检测的存储位点放置在另一块板的相应位置上以在单个步骤中在固体表面上的结合位点上形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构。

[0717] 5.1在温育的单个步骤中在结合位点上形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构(全局的)(W)

[0718] W1.一种在板的结合位点上形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的方法,包括:

[0719] (a) 获得含有目标分析物的样品,其中所述目标分析物能够在所述样品中扩散;

[0720] (b) 获得捕获剂和检测剂,其中捕获剂和检测剂(能够)结合目标分析物以形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构;

[0721] (c) 获得能够相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板;其中所述第一板具有结合位点,所述结合位点具有固定在所述位点上的捕获剂,并且所述第二板具有存储所述检测剂的存储位点;其中当所述存储位点与所述样品接触时,所述检测剂能够溶解到所述样品中并在所述样品中扩散;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上并且具有预定高度;

[0722] (d) 当所述两板配置成开放构型时,将所述转移介质被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0723] (e) 在(d)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间;所述样品相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄,并且所属样品与所述结合位点和所述存储位点接触;和

[0724] (f) 在(e)之后并且在板处于闭合构型时,温育一段时间以允许形成捕获剂-目标分析物-检测剂夹心结构;

[0725] 其中所述相关体量是所述样品的至少一部分或整个体量。

[0726] W2. 一种在板的结合位点上形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的装置, 包括:

[0727] 第一板和第二板, 其可相对于彼此移动成不同的构型;

[0728] 其中所述第一板具有结合位点, 所述结合位点具有固定在所述位点上的捕获剂, 并且所述第二板具有存储检测剂的存储位点; 其中捕获剂和检测剂(能够)结合样品中的目标分析物以形成捕获剂-目标分析物-检测剂的三明治夹心结构; 其中当所述存储位点与所述样品接触时, 所述检测剂能够溶解到所述样品中并在所述样品中扩散; 并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件, 并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0729] 其中所述构造之一是开放构造, 其中: 所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节, 并且所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;

[0730] 其中所述构型中的另一个是闭合构型, 其在样品在所述开放构型下被放置之后配置, 在所述闭合构型中: 所述两板彼此面对; 所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间; 所述样品相关体量的厚度由板和间隔件调节, 其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄, 并且所述样品与所述结合位点和所述存储位点接触; 和

[0731] 其中所述相关体量是所述样品的至少一部分或整个体量。

[0732] 5.2 使用来自样品一部分(即局部)的分析物在单步温育中在结合位点上形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构。

[0733] W3. 一种使用来自样品的一部分的分析物在板的结合位点上形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的方法, 包括:

[0734] (a) 获得含有目标分析物的样品, 其中所述目标分析物能够在所述样品中扩散;

[0735] (b) 获得捕获剂和检测剂, 其中捕获剂和检测剂(能够)结合目标分析物以形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构;

[0736] (c) 获得能够相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板; 其中所述第一板具有结合位点, 所述结合位点具有固定在所述位点上的捕获剂, 并且所述第二板具有存储所述检测剂的存储位点; 其中当所述存储位点与所述样品接触时, 所述检测剂能够溶解到所述样品中并在所述样品中扩散; 并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件, 并且每个所述间隔件固定于相应的板上并且具有预定高度;

[0737] (d) 当所述两板配置成开放构型时, 将所述转移介质被放置在所述板中的一个或两个上; 其中所述开放构型是这样的构型, 其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0738] (e) 在(d)之后, 通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品; 其中, 在所述闭合构型中: 所述两板彼此面对; 所述间隔件, 所述结合位点和所述存储位点位于所述两板之间, 结合位点和存储位点同样品的相关体量接触; 所述样品相关体量的厚度由板和间隔件调节, 其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄, 并且显著小于结合位点的平均线性尺寸; 和

[0739] (f) 在(e)之后并且在板处于闭合构型时, 温育一段时间并停止温育, 其中温育时间被选择为其使得大量形成在结合位点上的捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构包含来自样品相关体量的分析物, 其中所述相关体量是位于结合位点上的样品体量, 所述温育是允许形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的过程。

[0740] 在一些实施方案中,间距与所述位点的尺寸的比率可以小于1/5。

[0741] W4.一种用于在板的结合位点上同来自样品的一部分的分析物形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的装置,包括:

[0742] 第一板和第二板,其可相对于彼此移动成不同的构型;

[0743] 其中所述第一板具有结合位点,所述结合位点具有固定在所述位点上的捕获剂,并且所述第二板具有存储检测剂的存储位点;其中捕获剂和检测剂(能够)结合样品中的目标分析物以形成捕获剂-目标分析物-检测剂的三明治夹心结构;其中当所述存储位点与所述样品接触时,所述检测剂能够溶解到所述样品中并在所述样品中扩散;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0744] 其中所述构造之一是开放构造,其中:所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;

[0745] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在样品在所述开放构型下被放置之后配置,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件,结合位点和存储位点位于所述两板之间;结合位点和存储位点同样品的相关体量接触;所述样品相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的厚度薄;并且其中所述相关体量是位于所述位点上的样品体量;

[0746] 和

[0747] 其中所述间隔件高度被选择为其将在所述闭合构型下的相关体量的厚度调节为显着小于所述结合位点的平均线性尺寸。

[0748] 5.3一种通过减少扩散距离来减少在结合位点上形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的时间的方法。(W,X)

[0749] W5.一种用于减少在板的结合位点上形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的时间的方法,包括:

[0750] (a) 获得含有目标分析物的样品,其中所述目标分析物能够在所述样品中扩散;

[0751] (b) 获得捕获剂和检测剂,其中捕获剂和检测剂(能够)结合目标分析物以形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构;

[0752] (c) 获得能够相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板;其中所述第一板具有结合位点,所述结合位点具有固定在所述位点上的捕获剂,并且所述第二板具有存储所述检测剂的存储位点;其中当所述存储位点与所述样品接触时,所述检测剂能够溶解到所述样品中并在所述样品中扩散;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上并且具有预定高度;

[0753] (d) 当所述两板配置成开放构型时,将所述转移介质被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0754] (e) 在(d)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件,所述结合位点和所述存储位点位于所述两板之间,结合位点和存储位点同样品的相关体量接触;所述样品相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄;并且因此样品厚度的减小减少了分析物和检测剂垂直扩散穿过样品厚度的时间,其中相关体量是样品全部体量的至少一部分。

[0755] 其中允许所述相关体量中的目标实体结合到所述结合位点的时间比没有所述闭合构型下的时间要短。

[0756] -所述方法还可包括洗脱步骤以除去两板之间的样品,该洗脱步骤在两板处于闭合构型或开放构型时进行。

[0757] -所述方法还包括读取来自固定在结合位点上的捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的信号的读取步骤。读取在洗脱后或无任何洗脱步骤的情况下进行。

[0758] 该方法还可以被多路复用,如上面或下面所描述的。

[0759] W6.一种用于减少在板的结合位点上形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的时间的装置,包括:

[0760] 第一板和第二板,其可相对于彼此移动成不同的构造;

[0761] 其中所述第一板具有结合位点,所述结合位点具有固定在所述位点上的捕获剂,并且所述第二板具有存储检测剂的存储位点;其中捕获剂和检测剂(能够)结合样品中的目标分析物以形成捕获剂-目标分析物检测剂夹心;其中当所述存储位点与所述样品接触时,所述检测剂能够溶解到所述样品中并在所述样品中扩散;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0762] 其中所述构造之一是开放构造,其中:所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;

[0763] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在样品在所述开放构型下被放置之后配置,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件,结合位点和存储位点位于所述两板之间;结合位点和存储位点重叠,结合位点和存储位点同样品的相关体量接触;所述样品相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的厚度薄;并且因此样品厚度的减小减少了分析物和检测剂垂直扩散穿过样品厚度的时间,其中相关体量是样品的全部体量的至少一部分。

[0764] 在这些实施方案中,所述方法可以包括将捕获剂连接到板上,其中所述连接通过捕获剂与板上的反应性基团的化学反应进行。另一个板可以在一个位置处包含一片干燥的检测试剂,使得在板关闭后,附着的捕获剂和检测试剂彼此面对。接下来,如上所述,该方法可以包括使含有目标分析物的样品与装置接触并闭合两板。检测试剂溶解并扩散到样品中。由于目标分析物在溶液中,所以目标分析物将被捕获剂结合并固定在一个板的表面上。检测剂可以在其结合到捕获剂之前或之后结合到目标分析物上。在一些情况下,所述方法可以包括除去未结合捕获剂的任何目标分析物或任何未结合的检测试剂(例如,通过结合缓冲液洗脱板的表面);检测剂可以与光学可检测标记物缀合,从而提供检测目标分析物的方式。在任选步骤,除去未结合到目标分析物的检测剂之后,可以,例如,使用读取系统以从结合到板上的检测剂读取光信号(例如,在300nm至300nm范围内的波长的光,1200nm)。此外,如上所述,检测剂可以直接标记(在这种情况下,检测剂可以在被放置到一个板上之前与发光标记强烈连接),或间接标记(即通过结合检测剂与第二捕获剂,例如,标记的第二抗体或标记的核酸,其特异性结合检测剂并连接到发光标记物)。在一些实施方案中,所述方法可包括封闭剂,从而防止捕获剂与非目标分析物的非特异性结合。用于目标分析物与其它试剂的特异性结合的合适条件包括合适的温度,时间,溶液pH水平,环境光水平,湿度,化学试剂浓度,抗原-抗体比等,都是众所周知的或可容易地从本公开获得。捕获剂及其结合

配偶体(包括分析物)之间的分子相互作用的方法的一般方法是本领域众所周知的(参见例如Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 第一版(1988) Cold Spring Harbor, NY; Ausubel等人, *Short Protocols in Molecular Biology*, 第3版, Wiley&Sons, 1995)。上文和下文描述的方法是示例性的;本文的方法不是进行测定的唯一方式。

[0765] 在某些实施方案中,核酸捕获剂可用于捕获蛋白质分析物(例如,DNA或RNA结合蛋白)。在可选的实施方案中,蛋白质捕获剂(例如,DNA或RNA结合蛋白)可以用于捕获核酸分析物。

[0766] 样品可以是来源于细胞,组织或体液的临床样品。所关注的体液包括但不限于羊水,房水,玻璃体液,血液(例如全血,分馏血液,血浆,血清等),母乳,脑脊液(CSF),耳垢,乳糜,口哨,内淋巴,外淋巴,粪便,胃酸,胃液,淋巴,粘液(包括鼻引流和痰),心包液,腹膜液,胸膜液,脓,风湿,唾液,皮脂精液,痰,汗,滑液,眼泪,呕吐物,尿和呼出冷凝物。

[0767] 在该测定的一个实施方案中,使板与含有目标分析物(例如,目标蛋白)的样品接触,并闭合平板。样品含有或经修改包含适于特异性结合的所有必需的试剂(例如盐等)条件。捕获剂(例如抗体)和检测剂特异性结合样品中的目标分析物,从而产生一片可以检测到的被标记分析物。

[0768] 如在任何实施方案中,可以测量样品中的目标分析物的量,以提供样品中目标分析物的量的定性或定量测量。在一些实施方案中,信号的幅度可提供样品中目标分析物的定量测定。在一些情况下,可以将评估结果与在某些情况下可能处于已知浓度的标准曲线(例如,第二分析物或掺加分析物的标准曲线)进行比较。可以通过以不同密度(例如不同浓度)被放置的捕获剂并从每个捕获剂块读取信号来促进这种比较。

[0769] 6使用小体积样品和试剂的结合和添加(V)

[0770] 在许多应用中,非常需要使用尽可能小的样品或试剂体积。然而,在微流体通道装置(目前最常用的使用小样品的方法)中,大量样品被浪费在从装置的入口流向测试(检测)区域的过程中,导致样品量需要比测试位点的容积更大。本发明的一个方面是通过在板上被放置微小体量的样品或试剂,然后将该体量重塑成具有较小厚度的薄膜,从而显着减少在测试中使用的样品或试剂的体积,而其面积比以前大。这种重塑还允许反应更快。

[0771] 6-1通过铺展样品将小体积样品中目标实体结合到表面结合位点上。

[0772] V1.一种用于将样品中的目标实体结合到结合位点的方法,包括:

[0773] (a)获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板,其中所述第一板在其表面上具有结合位点,并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且所述间隔件固定于相应的板上并具有预定高度;

[0774] (b)获得含有待结合到所述结合位点的目标实体的样品;

[0775] (c)当所述板构造成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0776] 并且所被放置的样品不覆盖所述结合位点的任何区域或部分区域;

[0777] (d)在(c)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述板彼此面对,;所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间;所述样品接触所述结合位点的面积比当所述板处于开放构型时更大,样品在结合位点上的相关体量

的厚度由板和间隔件调节,其中相关体量是样品的一部分或全部体量。

[0778] V2.一种用于将样品中的目标实体结合到表面结合位点的装置,包括:

[0779] 第一板和第二板,其可相对于彼此移动成不同的构型;

[0780] 其中所述第一板在其表面上具有结合样品中的目标实体的结合位点,并且其中当所述样品仅被放置在所述板之一上时,所述结合位点的面积大于所述样品的接触面积,且所述结合位点不接触另一个板;

[0781] 其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0782] 其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分地或完全地分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板和盖中的一个或两个上,其不覆盖结合位点的任何区域或部分区域;

[0783] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述样品在所述开放构型下被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件和样品位于两板之间,样品接触结合位点的区域比当板处于开放构型时更大,并且样品位于结合位点之上的厚度由板和间隔件调节。

[0784] 6-2通过铺展样品将试剂加入小体积样品中

[0785] V3.一种用于将试剂加入小体积样品的方法,包括:

[0786] (a) 获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板,其中所述第一板在其表面上具有包含待添加到样品中的试剂的存储位点,并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且所述间隔件固定于相应的板上并具有预定高度;

[0787] (b) 当所述板构造成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0788] 并且所被放置的样品不覆盖所述存储位点的任何区域或部分区域;

[0789] (c) 在(b)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述板彼此面对,;所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间;所述样品接触所述存储位点的面积比当所述板处于开放构型时更大,样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节;且其中所述相关体量是在所述存储位点上的部分样品。

[0790] V4.一种用于将试剂加入小体积样品的的装置,包括:

[0791] 第一板和第二板,其可相对于彼此移动成不同的构型,

[0792] 其中所述第一板在其表面上具有包含试剂的存储位点,所述试剂将被添加到所述样品中;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0793] 其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分地或完全地分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板和盖中的一个或两个上,其不覆盖结合位点的任何区域或部分区域;

[0794] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述样品在所述开放构型下被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件和样品的相关体量位于两板之间,样品接触存储位点的区域比当板处于开放构型时更大,并且样品的相关体量的厚度由

板和间隔件调节;并且所述相关体量是在所述存储位点上的部分样品。

[0795] 在段落V1和V2的方法以及V3和V4的装置中,在一些情况下,由于样品的小体积和表面的润湿性质,即使样品被放置在结合位点区域或存储区域中,被放置的样品与板的接触面积将小于结合位点或存储位点的面积。因此,需要铺展,特别是精确铺展。

[0796] 样品的液滴可以是多个液滴,并且在闭合构型下,液滴合并成厚度小于最大厚度的膜。

[0797] 在本发明中,在段落V1至V7的方法和段落V2至V8的装置中,被放置在单个板或两板(“样品体积”)上的样品的体积为至多0.001pL(皮升),至多0.01pL,至多0.1pL,至多1pL,至多10pL,至多100pL,至多1nL(纳升),至多10nL,至多100nL,至多1uL(微升),至多10uL,至多100uL,至多1mL(毫升),至多10mL,或这些值中任意两个的范围内。

[0798] 7使用均匀样品厚度以均匀结合或均匀添加试剂(UAB)

[0799] 对于测定和化学反应,有利的是使薄样品厚度在相当大的面积上均匀。实施方案包括将样品实体结合到表面结合位点,将试剂添加到样品中,定量样品的相关体积,定量分析物和其它。

[0800] 对于使用两个板来减小和调节样品的相关体量(部分或全部体量)的厚度的方法,重要的是精确,均匀和易于使用。

[0801] 本发明的一个方面是通过用两个板来压制样品以促进提高调节样品的相关体量的厚度的方法和/或装置的精度、均匀性或易操作性。

[0802] 7.1一种用于将样品中的实体均匀地结合到板的结合位点上的方法

[0803] UAB1.一种用于将样品中的实体均匀地结合到板的结合位点上的方法,包括:

[0804] (a)获得包含能够在样品中扩散的目标实体的样品;

[0805] (b)获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板,其中所述第一板在其表面上具有被配置为结合所述目标实体的结合位点,其中所述第一板和所述第二板中的一个或两个板包括间隔件,并且每个间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0806] (c)当所述两板配置成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0807] (d)在(c)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间;所述结合位点与相关体量接触;样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄,并且更均匀地位于结合位点之上;和

[0808] 其中所述间隔件和所述板被配置成其使得在所述板闭合构型下的相关体量的受调节的厚度比在所述板的开放构型中的厚度更均匀;并且其中所述相关体量是所述样品的一部分或全部体量。

[0809] -它还含有在板上与结合位点相对的一个存储位点用于形成均匀的三明治状夹心结构。

[0810] UAB2.一种用于将样品中的实体均匀地结合到板的结合位点上的装置,包括:

[0811] 第一板和第二板,其可相对于彼此移动成不同的构型,

[0812] 其中所述第一板在其表面上具有包含试剂的存储位点,所述试剂将被添加到所述

样品中;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0813] 其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分地或完全地分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板和盖中的一个或两个上;

[0814] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述样品在所述开放构型下被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件和样品的相关体量位于两板之间,结合位点与相关体量接触,并且样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,比样品的最大厚度薄并且在结合位点上更均匀;

[0815] 其中所述间隔件和所述板被配置成其使得在所述板闭合构型下的相关体量的受调节的厚度比在所述板的开放构型中的厚度更均匀;并且其中所述相关体量是所述样品的一部分或全部体量。

[0816] 7.2一种将板上的试剂均匀地添加到样品中的方法

[0817] UAB3.一种用于将试剂均匀地添加到样品的相关体量中的方法,包括:

[0818] (a)获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板,其中所述第一板在其表面上具有包含待添加到样品的相关体积中的试剂的存储位点,试剂能够溶解到样品中并在样品中扩散;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上并且具有预定高度;

[0819] (b)获得样品;

[0820] (c)当所述板构造成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0821] (d)在(c)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品,其中在所述闭合构型中:所述板彼此面对,所述间隔件和所述样品的相关体量在所述两板之间,存储位点与相关体量接触,并且样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,且比其当板处于开放构型时的最大厚度薄;

[0822] 其中所述间隔件和所述板被配置成其使得在所述板闭合构型下的相关体量的受调节的厚度比在所述板的开放构型中的厚度更均匀;并且其中所述相关体量是所述样品的一部分或全部体量。

[0823] UAB4.一种用于将试剂均匀地添加到样品的相关体量中的装置,包括:

[0824] 第一板和第二板,其可相对于彼此移动成不同的构造;

[0825] 其中所述第一板在其表面上具有包含待添加到样品的相关体积中的试剂的存储位点,所述试剂能够溶解到所述样品中并在所述样品中扩散;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0826] 其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分地或完全地分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板和盖中的一个或两个上;

[0827] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述样品在所述开放构型下被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件和样品的相关体量位于两板之间,存储位点与相关体量接触,并且样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,且比其当所述板处于开放构型时的最大厚度薄;

[0828] 其中所述间隔件和所述板被配置成其使得在所述板闭合构型下的相关体量的受调节的厚度比在所述板的开放构型中的厚度更均匀;并且其中所述相关体量是所述样品的一部分或全部体量。

[0829] 7.3一种在结合位点均匀形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的方法

[0830] UAB5.1.一种在板的结合位点上均匀地形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的方法,包括:

[0831] (a) 获得含有目标分析物的样品;

[0832] (b) 获得捕获剂和检测剂,其中捕获剂和检测剂(能够)结合目标分析物以形成捕获剂分析物-检测剂三明治夹心结构;

[0833] (c) 获得能够相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板;其中所述第一板具有结合位点,所述结合位点具有固定在所述位点上的捕获剂,并且所述第二板具有存储所述检测剂的存储位点;其中当所述存储位点与所述样品接触时,所述检测剂能够溶解到所述样品中并在所述样品中扩散;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上并且具有预定高度;

[0834] (d) 当所述两板配置成开放构型时,将所述转移介质被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0835] (e) 在(d)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间,所述样品的相关体量的厚度由所述板和所述间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄;并且所述样品与所述结合位点和所述存储位点接触;

[0836] 其中所述间隔件和所述板被配置成其使得在所述板闭合构型下的相关体量的受调节的厚度比在所述板的开放构型中的厚度更均匀;并且其中所述相关体量是所述样品的一部分或全部体量。

[0837] UAB6.一种用于在板的结合位点上均匀地形成捕获剂-分析物-检测剂三明治夹心结构的装置,包括:第一板和第二板,其可相对于彼此移动成不同的构型;

[0838] 其中所述第一板具有结合位点,所述结合位点具有固定在所述位点上的捕获剂,并且所述捕获剂能够结合样品中的目标分析物;

[0839] 其中所述第二板具有存储所述检测剂的存储位点,所述存储位点能够(a)当所述存储位点与所述样品接触时,溶解到所述样品中并在所述样品中扩散;和(b)结合到目标分析物并形成捕获剂-目标分析物-检测剂的三明治夹心结构;

[0840] 其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0841] 其中所述构造之一是开放构造,其中:所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;

[0842] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在样品在所述开放构型下被放置之后配置,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间;所述样品相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄,并且所述样品与所述结合位点和所述存储位点接触;

[0843] 其中所述间隔件和所述板被配置成其使得在所述板闭合构型下的相关体量的受调节的厚度比在所述板的开放构型中的厚度更均匀;并且其中所述相关体量是所述样品的一部分或全部体量。

[0844] 7.4均匀调节两个板之间的样品的相关体量的厚度。

[0845] UAB7.一种用于调节样品的相关体量的厚度的方法,包括:

[0846] (a) 获得样品,其中所述样品的相关相关的厚度要被调节;

[0847] (b) 获得可相对于彼此移动成不同构型的两个板,其中所述板中的一个或两个包括间隔件,所述间隔件具有预定的间隔件距离和高度,并且每个所述间隔件固定于相应板上;

[0848] (c) 当所述两板配置成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0849] (d) 在(c)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间;样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄;

[0850] 其中所述间隔件和所述板被配置成其使得在所述板闭合构型下的相关体量的受调节的厚度比在所述板的开放构型中的厚度更均匀;并且其中所述相关体量是所述样品的一部分或全部体量。

[0851] UAB8.一种用于调节样品的相关体量的厚度的装置,包括:

[0852] 第一板和第二板,其可相对于彼此移动成不同的构型,

[0853] 其中所述板中的一个或两个包括间隔件,所述间隔件具有预定的间隔件距离和高度,并且每个所述间隔件固定于相应的板上且具有预定高度;

[0854] 其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分地或完全地分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板和盖中的一个或两个上;

[0855] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述样品在所述开放构型下被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件和样品的相关体量位于两板之间,样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,且其比当板处于开放构型时的最大值薄;

[0856] 其中所述间隔件和所述板被配置成其使得在所述板闭合构型下的相关体量的受调节的厚度比在所述板的开放构型中的厚度更均匀;并且其中所述相关体量是所述样品的一部分或全部体量。

[0857] 在段落U1至U8中的方法和装置中,使得样品的相关体量的厚度均匀的间隔件和板的配置具有在本公开中描述的实施方案。

[0858] 样品厚度均匀性。在U1至U8的段落中的方法和装置中,样品的相关体量的厚度的均匀性使得处于闭合构型的样品厚度具有的相对变化至多0.001%,至多0.01%,至多0.05%,至多0.1%,至多0.5%,至多1%,至多2%,至多5%,至多10%,至多20%,至多30%,至多50%至多75%,至多90%,小于100%或这些值中任意两个之间的范围内。

[0859] 在U1至U8的段落中的方法和装置的优选实施方案中,样品的相关体积的厚度的均匀性使得处于闭合构型的样品厚度具有的相对变化至多0.1%,至多0.5%,至多1%,至多2%,至多5%,至多10%,至多20%,至多30%,至多50%或任何两个这些值之间的范围内。

[0860] 对于减少饱和温育时间可能重要的另一个参数是样品厚度的均匀性。如果厚度在结合位点上具有大的变化,则饱和温育时间在结合位点中一个位置与另一个位置上不同,迫使使用更长的饱和温育时间以确保结合位点中的所有位置已经达到饱和。

[0861] 8放大表面

[0862] PoC诊断和使用体积小样品的任何测定的当前主要障碍之一是较差的敏感性。非常需要增强测定的信号。本发明的一个方面涉及将结合位点置于信号放大表面(SAS)上以放大信号从而实现更高灵敏度的装置和方法。信号放大表面也可以被称为信号放大层(SAL)。

[0863] SAL的一般结构包括纳米级金属-电介质/半导体-金属结构,其放大局部表面电场和梯度以及光信号。在存在金属结构的尖锐(即大曲率)边缘和两个金属结构的小间隙之间的位置处,放大效果是高的。最高增强区域是具有锐边缘和小间隙的那些。此外,所有金属和非金属微/纳米结构的尺寸通常小于SAL放大的光的波长(即亚波长)。

[0864] 在一些实施方案中,SAL层具有尽可能多的金属尖锐边缘和小间隙。这需要具有密集的金属纳米结构组,在纳米结构之间具有小的间隙。SAL结构可以包括几个不同的层。此外,SAL层本身可以通过进一步覆盖金属材料的不具有尖锐边缘和小间隙的部分的方法进一步改进,如在2013年3月15日提交的美国临时专利申请No.61/801,424和2014年3月15日提交的PCT申请W02014197096(通过引用并入本文),以及PCT/US2014/028417(Chou等,“Analyte Detection Enhancement By Targeted Immobilization, Surface Amplification, and Pixelated Reading And Analysis”),其出于所有目的通过引用并入本文。

[0865] M1. 在一些实施方案中,放大表面是结合位点表面上或附近的金属层。一种用于放大测定样品的相关体量中的目标实体的信号的方法,包括:

[0866] (a) 获得含有目标实体的样品;

[0867] (b) 获得可相对于彼此移动成不同构型的两个板,其中所述板中的一个在其表面上包含一个结合位点,所述结合位点包含信号放大表面,所述信号放大表面被配置为结合所述目标实体并放大在信号放大表面上或附近的光学信号;并且其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件在其相应的板上并且具有预定高度;

[0868] (c) 当所述两板配置成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;

[0869] (d) 在(c)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间;样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄,并且样品的相关体量与结合位点接触;和

[0870] (e) 在(d)之后,在板处于闭合构型时的温育一段时间,以允许样品的相关体量中的目标实体结合到结合位点;

[0871] 其中所述相关体量是当所述板处于所述闭合构型时接触所述结合位点的所述样品的一部分。

[0872] M2. 一种用于在测定样品的相关体积中的目标实体时放大信号的装置,包括:

[0873] 第一板和第二板,其可相对于彼此移动成不同的构型,

[0874] 其中所述第一板在其表面上包含一个结合位点,并且所述结合位点包含信号放大表面,所述信号放大表面被配置为(i)结合样品中的目标实体,和(ii)放大在所述信号放大表面或附近的光信号;

[0875] 其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且每个所述间隔件在其相应的板上并且具有预定高度;

[0876] 其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分地或完全地分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板和盖中的一个或两个上,

[0877] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述样品在所述开放构型下被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件和样品的相关体量位于两板之间,并且样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节;

[0878] 并且所述相关体量是当所述板处于所述闭合构型时接触所述结合位点的所述样品的一部分。

[0879] 在一些实施方案中,信号放大表面包括金属-电介质纳米结构,金属-半导体纳米结构和盘耦合点上支柱天线阵列中的至少一种。

[0880] 在一些实施方案中,信号放大表面包括金属层。

[0881] 9体积和/或浓度的检测和/或定量(Q)

[0882] 样品的相关体量的定量和/或控制可用于样品中化学化合物(包括分析物,实体,试剂等)的浓度的定量和/或控制。

[0883] 用于样品体积定量的常见方法包括使用计量移液管(例如,Eppendorf的“Research plus pipette,adjustable,0.5-10 μ L”,SKU#3120000020)或几何形状。对于PoC(护理点)或家庭使用,这样的计量装置使用不方便和/或昂贵。需要更简单和更便宜的用于样品体积和/或浓度的定量和/或控制的方法和装置。

[0884] 本发明的一个方面涉及在不使用计量移液管和/或固定微流体通道的情况下量化和/或控制被放置在板上的样品的相关体量的方法,装置和系统。相关体量(其可以是样品的一部分或全部体积)与样品中目标分析物和/或实体的浓度的定量和/或控制相关。本发明的方法,装置和系统易于使用和低成本。

[0885] 9.1一种用于定量样品的相关体量的方法

[0886] Q1.一种用于量化样品的相关体量的方法,包括:

[0887] (a)获得样品,其中所述样品的相关体量将被定量;

[0888] (b)获得可相对于彼此移动成不同构型的两个板,其中所述板中的一个或两个包括间隔件,所述间隔件具有预定的间隔件距离和高度,并且每个所述间隔件固定于相应板上;

[0889] (c)当所述两板配置成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;(d)在(c)之后,通过使所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间;样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄;并且所述间隔件中的至少一个在所述样品内;

- [0890] (e) 当所述板处于所述闭合构型时,量化所述样品的相关体量;
- [0891] 其中所述相关体量是所述样品的全部体量的至少一部分。
- [0892] Q2. 在一些实施方案中,一种用于量化样品中的相关体积的方法,包括:
- [0893] (a) 获得第一板和第二板;
- [0894] (b) 使样品在两个板之间定量;
- [0895] (c) 通过压制两个板来使样本的形状变形,这减小了样品厚度并且在板之间横向地铺展样本;和
- [0896] (d) 当所述两板处于所述闭合构型时,量化所述样品的相关体量;
- [0897] 其中所述相关体量是所述样品的全部体量的至少一部分。
- [0898] 9.2 用于定量样品中相关体量的板
- [0899] Q3. 一种用于量化样品中相关体量的板,包括:
- [0900] 一个板,其在其表面上包括 (i) 具有预定的间隔件间距离和高度并固定在表面上的间隔件,和 (ii) 样品接触区域,用于接触具有相关待定量的相关体量的样品,其中所述间隔件中的至少一个在所述样品接触区域内。
- [0901] 9.3 一种用于量化样品中相关体量的装置
- [0902] Q4. 一种用于量化样品中相关体量的装置,包括:
- [0903] 第一板和第二板,其 (a) 能够相对于彼此移动成不同的构型,并且 (b) 每个板具有用于接触具有待定量的相关体量的样品的样品接触区域,
- [0904] 其中所述板中的一个或两个在其表面上包括具有预定的间隔件间距离和高度的间隔件,并且所述间隔件与相应的板固定;
- [0905] 其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分地或完全地分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板和盖中的一个或两个上,
- [0906] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述样品在所述开放构型下被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件和样品的相关体量位于两板之间,样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节;并且比当所述板处于开放构型,并且所述间隔件中的至少一个在所述样品内;和
- [0907] 其中在所述闭合构型中量化所述样品的相关体量,并且所述相关体量是所述样品的全部体量的至少一部分。
- [0908] 9-5. 测量样品的相关体积
- [0909] MS1. 在本发明中,在两板处于闭合构型时对样品的相关体量的量化包括但不限于以下五个实施方案中的每一个:
- [0910] (a) 通过机械,光学,电学或其任何组合的方法测量样品的相关体量;
- [0911] (b) 使用选自机械,光学,电学或其任何组合方法的方法独立地测量与样品的相关体量相关的一个或多个参数;
- [0912] (c) 使用与样品的相关体量相关的预定的一个或多个参数(即在板处于闭合构型之前确定的样品的参数);
- [0913] (d) 通过 (i) 当所述板处于闭合构型时测量与所述相关体量相关的一个或多个参数,以及 (ii) 在所述板处于所述闭合构型之前预先确定与相关体量相关的其他参数,来确定所述样品的相关体量体积;

[0914] (e) 确定非样品体积

[0915] (f) 上述(a,b和c)的任何组合。

[0916] 在段落MS1的方法中,机械方法包括但不限于使用间隔件(即将基板和盖板的内表面之间的间距调节到预定值的机械装置),机械方法探针或标尺,声波(例如反射和/或超声波的干涉以测量间距)或其任何组合。

[0917] 在段落MS1的方法中,光学方法包括但不限于使用光干涉或光学成像(例如获取样品的2D(二维)/3D(三维)图像,光学成像(具有不同的视角,不同的波长,不同的相位和/或不同的偏振),图像处理或其任何组合。

[0918] 电方法包括但不限于电容,或电阻或阻抗测量,或其任何组合。

[0919] 在段落MS1的方法中,在一些实施方案中,样品厚度的测量是测量两个板的内表面之间的间距。

[0920] 在段落MS1的方法中,在一些实施方案中,使用与样本的相关体量相关的预定的一个或多个参数,其中预定参数是当板处于闭合构型时由间隔件调节的预定样本厚度。

[0921] 在段落MS1的方法中,在一些实施方案中,使用与样品的相关体量相关的预定的一个或多个参数,其中预定参数是预定的间隔件高度。

[0922] 在MS1的段落的方法中,在一些实施方案中,与样品的相关体量相关的参数是在闭合构型下的参数,包括但不限于(i)第一板和第二板内表面间间距,(ii)样品厚度,(iii)样品区域的全部或部分,(iv)样品体量的全部或部分,或(v)任何其组合。

[0923] 在段落MS1的方法中,在一些实施方案中,样品体量或相关样品体积的定量包括以下步骤:(i)将样品厚度乘以整个样品面积以获得整个样品体积,(ii)样品厚度乘以相关样品面积以获得相关样品体积,或(iii)将相关样品厚度乘以全部或部分样品面积以获得相关样品体积。

[0924] 在段落MS1的方法中,在一些实施方案中,测量是拍摄相关体积的3D(三维)图像。

[0925] 在段落MS1的方法中,在一些实施方案中,通过测量样本的相关体量的横向面积,然后使用它与相关体量的厚度来确定相关体量的体积,来量化样本的相关体量体积,其中,相关体积的厚度由间隔件的信息确定,而间隔件的信息包括间隔件高度;

[0926] 在段落MS1的方法中,在一些实施方案中,通过测量样品的相关体量和间隔件的侧面积,然后将其与相关体量和间隔件的厚度一起使用,来量化样品的相关体量以确定样品的相关体量的体积,其中相关体量的厚度由间隔件的信息确定;

[0927] 在段落MS1的方法中,在一些实施方案中,通过测量样本的相关体量的横向面积和厚度来量化样本的相关体量;

[0928] 在段落MS1的方法中,在一些实施方案中,通过光学测量样品的相关体量的体积来定量样品的相关体量。

[0929] 在段落MS1的方法中,在一些实施方案中,比例标记用于在板处于闭合构型时辅助样本的相关体量的量化,其中比例标记的一些实施方案,其使用和测量等在第2节中描述。

[0930] 在段落MS1的方法中,在一些实施方案中,样品的相关体量的定量包括减去非样品体积的步骤,其中在一些实施方案中,非样品体积通过在本公开中披露的一些实施方案确定。

[0931] 9-4.一种用于量化样品的相关体量中的分析物浓度的方法

- [0932] Q5.一种用于量化样品的相关体量中的分析物的方法,包括:
- [0933] (a) 执行Q1段落的方法中的步骤;和
- [0934] (b) 在步骤(a)之后,从相关体量测量与分析物相关的信号,
- [0935] 其中所述相关体量是所述样品的全部体量的至少一部分。
- [0936] Q6.一种用于量化样品的相关体量中的分析物的方法,包括:
- [0937] (a) 执行Q2段落方法中的步骤;和
- [0938] (b) 在步骤(a)之后,从相关体量测量与分析物相关的信号,
- [0939] 其中所述相关体量是所述样品的全部体量的至少一部分。
- [0940] 在段落Q5-6中任一段的方法中,在一些实施方案中,其还包括通过将来自样品的相关体量的与分析物相关的信号除以相关体量的体积来计算分析物浓度的步骤。
- [0941] 在段落Q5-6中任一段所述的方法中,一个或两个平板还包含结合位点,存储位点或两者。
- [0942] 在段落Q5-6中任一段的方法中,在一些实施方案中,与分析物相关的信号是直接来自分析物或附着于分析物的标记物的信号。
- [0943] Q7.一种用于量化样品的相关体量中的分析物的方法,包括:
- [0944] (a) 进行段落Q1的方法中的步骤,其中一个或两个板还包含结合位点;和
- [0945] (b) 在步骤(a)之后,从相关体量测量与分析物相关的信号,
- [0946] 其中所述相关体量是所述样品的全部体量的至少一部分。
- [0947] Q8.一种用于量化样品的相关体量中的分析物的方法,包括:
- [0948] (a) 进行段落Q2的方法中的步骤,其中一个或两个板还包含结合位点;和
- [0949] (b) 在步骤(a)之后,从相关体量测量与分析物相关的信号,
- [0950] 其中所述相关体量是所述样品的全部体量的至少一部分。
- [0951] 在段落Q7-8中任一段所述的方法中,在一些实施方案中,与分析物相关的信号是直接来自结合到结合位点的分析物的信号或结合到结合位点的分析物上附着的标记物。
- [0952] 9.5用于定量样品中相关体积中分析物浓度的板
- [0953] Q9.一种用于定量样品中相关体量中的分析物浓度的板,包括:
- [0954] 一个板,其在表面上包括(i)具有预定的间隔件间距离和高度的间隔件,和(ii)样品接触区域,用于接触包含具有待定量的某浓度的分析物的相关体量的样品,其中至少一个间隔件在样品接触区域内。
- [0955] 9.6一种用于量化样品中相关体量中的分析物浓度的装置
- [0956] 如果样品中的目标分析物和/或实体的数量被量化,以及样品的相关体积被定量,则可以量化或控制样品中的目标分析物和/或实体的浓度。
- [0957] Q10.一种用于量化样品中相关体量中的分析物浓度的装置,包括:
- [0958] 第一板和第二板,其(a)能够相对于彼此移动成不同的构型,并且(b)均具有接触区域,,其用于接触包含具有待定量的某浓度的分析物的相关体量的样品,其中,一个或两个所述板在其表面上包括具有预定的间隔件间距离和高度的间隔件,并且每个间隔件都用相应的板固定;
- [0959] 其中所述构型中的一个为开放构型,其中:所述两个板分离,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板中的一个或两个上,

[0960] 其中所述构型中的另一个是闭合构型,其在所述样品在所述开放构型下被放置之后配置;并且在闭合构型中:所述两板彼此面对,所述间隔件和样品的相关体量位于两板之间,并且样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,且比当所述板处于开放构型薄,并且所述间隔件中的至少一个在所述样品内;和

[0961] 其中在所述闭合构型中量化所述样品的相关体量中的分析物浓度,并且所述相关体量是所述样品的全部体量的至少一部分。

[0962] 在段落Q9和Q10中任一段所述的装置中,所述板还包含结合位点或存储位点或两者。结合位点的一个实施方案是可结合样品中的分析物的结合位点。

[0963] 在段落Q9和Q10中任一段所述的装置中,所述板还包括一个或多个比例标记,其中在第2节中描述了比例标记的一些实施方案。

[0964] 在Q1-10任一段的方法或装置中,在一些实施方案中,测量装置包括成像器和相机中的至少一个。

[0965] 在Q1-10任一段的方法或装置中,在一些实施方案中,测量装置被配置为对样品的相关体量的横向面积成像。

[0966] 在Q1-10任一段的方法或装置中,在一些实施方案中,测量装置包括光源以照射样品的相关体量的横向区域。

[0967] 在Q1-10任一段的方法或装置中,在一些实施方案中,计算浓度的步骤是将总目标分析物或实体除以相关样品体积。

[0968] 在Q1-10任一段的方法或装置中,在一些实施方案中,测量信号是使用光学成像器来计数目标分析物或实体的数量。例如,测量可以是使用光学显微镜来测量血液样品中的血细胞(红细胞,白细胞,血小板)。

[0969] 在Q1-10任一段的方法或装置中,在一些实施方案中,测量样品中的目标分析物或实体的数目可以是捕获目标分析物或表面上的实体的表面固定化验的实施方案。

[0970] 在一些实施方案中,用于定量样品的体积或检测/定量样品中的分析物的装置包括段落Q1-10中的任何装置,加上(1)光学成像器,和/或(2)光源和光学成像器等。光学成像器包括光传感器,光学透镜,滤光器,偏振器,波片,分束器,机械安装件或其任何组合。

[0971] 在一些实施方案中,相关样品面积或体积的测量包括(i)在第一板,盖板,它们之间或它们的任何组合之间具有标记,(ii)进行光学成像(例如,二维)/3D(三维)图像可以是具有不同视角,不同波长,不同相位和/或不同偏振的多次)和(iii)基于制造商的图像处理和样本图像。“相关”是指与目标分析物浓度的测定相关。

[0972] 扫描。在一些实施方案中,从样品读取信号使用扫描方法,其中读取器(例如光电检测器或相机)读取样品(或板)的一部分,然后移动到样品(或板)的另一部分,并且这种过程继续,直到某些预先指定的样品(或板)的部分被读取。样品的扫描读取覆盖样品(或板)的所有部分或一部分。在一些实施方案中,扫描读取由指示样品(或板)位置的位置标记辅助。位置标记的一个示例是周期性间隔件,其具有固定的周期和位置,或者用于相关区域的标记,其也具有用于指示样品或板的位置的预定位置和尺寸。

[0973] 10分析物和其他物质的检测和定量(D)

[0974] 在某些实施方案中,通过测量与分析物相关的信号来检测和/或定量(即测定)分析物,其中所述信号是光信号,电信号,机械信号,化学物理信号或其任何组合。在一些实施

方案中,当CROF装置中的两个板彼此靠近时进行分析物测定。在一些实施方案中,当CROF装置中的两个板彼此分离时,进行分析物测定。

[0975] 光信号包括但不限于光反射,散射,透射,吸收,光谱,颜色,发射,强度,波长,位置,极化,发光,荧光,电致发光,化学发光,电致化学发光或其任何组合。光信号是光学图像(即光信号对样品或装置的位置)或来自给定面积或体积的所有光子的一次总和的形式。光的优选波长在400nm至1100nm的范围内,50nm至400nm的范围,1nm至50nm的范围或1100至30,000nm的范围内。另一个优选的波长是太赫兹。

[0976] 电信号包括但不限于电荷,电流,阻抗,电容,电阻或其任何组合。机械信号包括但不限于机械波,声波,冲击波或振动。化学物理信号包括但不限于在反应中产生的PH值,离子,热,气泡,颜色变化。

[0977] 例如,标记是微珠,并且标记通过分析物特异性结合过程附着到标记上(例如使用检测剂将微珠结合到分析物,使用捕获剂来捕获具有微珠的分析物,使用捕获剂来结合分析物,然后使用检测剂附着微珠或其他方法。注意,捕获剂和检测剂特异性结合分析物),然后使用测量方法来鉴定连接到分析物的每个微珠,并对它们计数。

[0978] 在一些实施方案中,通过光学手段(例如(i)光学标记和标记读取,(ii)表面等离子体共振,(iii)光学干扰,(iv)电学方法)来感测和计数每个分析物或微珠(例如电容,电阻,阻抗等)或其他。传感器可以在第一板和/或第二板的表面上。

[0979] 某些实施方案可以包括在(a)表面固定化测定,(b)整体测定(例如,血细胞计数)和(c)其他方法中测定分析物浓度。在一些实施方案中,测定样品体积,样品的相关体量或浓度的方法使用智能电话。

[0980] 在Q1-10任一段的方法或装置中,在一些实施方案中,测量信号是测量样品中分析物的数量,或测量附着到样品中分析物的标记物的数量。在段落Q5的另一个实施方案中,“测量信号”是(a)鉴定每个分析物或连接到每个分析物的标记物,和(b)计数它们的数量。

[0981] 在一些实施方案中,当电极放置在第一和第二板中的一个或两个上时(这适用于使用CROF的任何方法和装置),分析物检测是电学方法。电极测量样品的电荷,电流,电容,阻抗或电阻,或其任何组合。电极测量样品中的电解质。电极具有等于或小于厚度间隔件的厚度。在一些实施方案中,电极用作间隔件的一部分。电极由各种导电材料制成。优选的电极材料是金,银,铝,铜,铂,碳纳米管或其任何组合。

[0982] 在Q1-10任一段落的方法或设备中,在一些实施方案中,测量使用作为照相机或光电检测器的设备加上被配置为进行测量的可选处理器。

[0983] 在Q1-10任一段的方法或装置中,在一些实施方案中,浓度确定装置包括处理器,其配置为从测量结果中(体积,面积,厚度,分析物数量,强度)确定浓度,

[0984] 在Q1-10段落中任一段落的方法或装置中,在一些实施方案中,其还包括浓度确定装置,其被配置为从所测量的横向区域面积,厚度和测得的目标分子的量确定相关体量中的目标分析物的浓度。

[0985] 关于使用像素化读取和分析的信号检测的更多内容

[0986] 在本发明中,在一些实施方案中,来自样品,分析物和实体,结合位点,试剂,CROF板或其任何组合的信号被检测和分析。在本公开中描述了使用像素化读取和分析的信号检测的一些实施方案,而一些其它实施方案描述于公开号:W02014144133A和申请号:PCT/

US2014/028417 (Chou等, “Analyte Detection Enhancement By Targeted Immobilization, Surface Amplification, And Pixelated Reading And Analysis”),其出于所有目的通过引用并入本文。

[0987] 在一些实施方案中,所述信号是电磁信号,包括具有不同频率,光强度,荧光,色度,发光(电和化学发光),拉曼散射,时间分辨信号(包括闪烁)的电信号和光信号。所述信号还可以是由于板和读取装置之间的局部电,局部机械,局部生物或局部光学相互作用产生的力。该信号还包括信号的空间(即位置),时间和频谱分布。检测信号也可以是吸收信号。

[0988] 分析物包括蛋白质,肽,DNA,RNA,核酸,小分子,细胞,具有不同形状的纳米颗粒。目标分析物可以在溶液中或在空气或气相中。感测包括对存在的检测,浓度的量化以及目标分析物的状态的确定。

[0989] 在一些实施方案中,电场用于辅助分子选择性,或键合和检测。

[0990] 检测/读取方法

[0991] 在光学检测(即通过电磁辐射检测)的一些实施方案中,所述方法包括但不限于远场光学方法,近场光学方法,外荧光光谱法,共聚焦显微镜,双光子显微镜和总内反射显微镜,其中目标分析物用电磁辐射发射器标记,并且这些显微镜中的信号可以由CROF板的放大表面放大。

[0992] 在一些实施方案中,信号包括所述信号的位置,局部强度,局部频谱,局部极化,局部相位,局部拉曼特征或其任何组合的信息。

[0993] 在一些实施方案中,信号的检测是测量来自一个区域(即来自该区域的信号,不管区域中的哪个位置)的一次总和信号。

[0994] 在某些实施方案中,信号的检测是测量一个区域(即,信号对位置)的信号图像;即,该区域被划分为像素,并且来自该区域的每个像素的信号被单独地测量,这也被称为“PIX”或“像素化成像检测”。每个像素的单独测量可以并行或顺序或混合。

[0995] 在一些实施方案中,读取使用适当的检测系统来依次或并行地检测信号或其组合。在顺序检测中,一次或多个像素被检测一次,并且扫描器将被用于将检测移动到SAL的其它区域中。在并行检测中,将使用诸如成像相机(例如CCD)的多像素检测器阵列来同时检测来自不同像素的信号。扫描可以是每个路径具有不同像素大小的单路径或多路径。图。PCT/US2014/028417的图2C示意性地示出了x,y,z级上的像素化读取。

[0996] 读取/检测的像素大小将被调整到光学分辨率和总读取时间的平衡。较小的像素大小将需要更长的时间来读取/扫描整个或部分SAL。典型的像素尺寸为1 μ m至10 μ m。像素具有不同的形状:圆形,正方形和矩形。像素尺寸的下限由显微镜系统的光学分辨率确定,并且确定像素尺寸的上限以避免来自成像器的不均匀光学响应的读取误差(光学像差,照明均匀性等)。

[0997] 读取系统

[0998] 参考PCT/US2014/028417的附图,读取系统的实施方案包括(a)用于CROF的一个或多个板;(b)读取装置205,用于产生从所述板的表面发出的信号的图像,其中信号表征单独的目标分析物结合事件;(c)组装板和成像器的装置组件300;(d)电子器件和用于存储所述图像的数据存储器301;和(e)计算机,包括用于识别和计数图像的区域中的各个结合事件

的程序。

[0999] 装置组件300在三个(x,y,z)正交方向中的至少一个方向上控制或改变板和读取装置之间的相对位置,用于读取信号。装置组件的实施方案包括扫描器301。在一些实施方案中,扫描器301在三个(x,y,z)正交方向中的至少一个方向上扫描。

[1000] 在一些实施方案中,读取装置302是CCD相机。在一些实施方案中,读取装置302是包括从光学滤光器303,光谱仪,透镜304,孔径,分束器305,反射镜306,偏振器307,波片和快门中选择一个或多个其他光学装置的光电检测器。在一些实施方案中,读取装置302是智能电话或移动电话,其具有本地和远程通信的能力。读取装置采集所述信号的位置,局部强度,局部光谱,局部拉曼特征或其任何组合。

[1001] 在一些实施方案中,光学滤波器303,光束分离器305,光纤,光电检测器(例如pn结,二极管,PMT(光电倍增管)或APD(Avalanch光电二极管),成像相机(例如CCD或手机相机)和光谱仪与由装置组件301提供的扫描器一起耦合到使用远场共焦设置或宽视场设置的显微镜系统。

[1002] 在一些实施方案中,在共焦设置中,通过记录一个或几个像素的亮度,时间变化和光谱变化以及光栅扫描SAL的整个感兴趣区域来执行读取。在一些实施方案中,在宽视场设置中,使用照相机来记录时间的全部或一部分SAL区域的亮度和时间变化。在一些实施方案中,需要适当的光学滤波器和光束操纵器(偏振器,分束器,光纤等)来确保仅有期望的信号被采集和检测。PCT/US2014/028417的图9示意性地示出了该系统的部件的一种布置。

[1003] 像素化分析(PIX)在PIX的一些实施方案中,以像素化方式检测的信号被分析以确定特定像素或几个像素处的特定分子的数量和/或类型,其又被用于定量分析目标分析物的类型和/或浓度。术语“以像素化方式检测信号”是指将具有信号的区域划分为一定量的像素并且单独测量来自该区域的每个像素的信号的方法,其也被称为“PIX”或“像素化成像检测”。每个像素的单独测量可以并行或顺序或混合。

[1004] 在一些实施方案中,分析包括分析信号的空间,速度,频谱信息。在一些实施方案中,分析包括但不限于统计分析,比较,整合和其他。PCT/US2014/028417的图5示出了该方法的一个实施方案的流程图。

[1005] 分析方法-1。信号分析,分析-1的一个实施方案包括(1)确定局部背景信号强度,(2)确定一个标记物,两个标记物等的局部信号强度,和(3)确定成像区域中的标记物的总数。

[1006] 背景信号是指在与其它样品相同的条件下产生的信号,除了样品不含任何目标分析物。

[1007] 分析-1的一个实施方案使用EM-CCD来记录生物测定信号强度的空间分布。在另一个实施方案中,手提电话(智能电话,移动电话)用于信号的成像。

[1008] 分析-1的一些细节分析是:

[1009] (1)确定局部背景信号强度。为了确定背景信号,可使用参考样品。该参考样品是没有固定任何分析物的板,并且使用在相同的实验条件下在板上进行生物测定的相同的仪器组进行成像。然后将图像的所有像素的强度绘制在直方图中,其给出了某个信号强度下的像素数。然后将具有最相应像素数的信号强度确定为背景信号Background。该背景强度以及它们的标准偏差(s.d.)用于确定被限定为区分局部背景和局部热点的阈值,阈值=背

景+ $n \cdot s.d.$ 。这里, n 是用作调整阈值的参数的整数。通常,在本工作中 n 被设置为等于3,5或7。

[1010] (2) 对于单亮像素 ($I_{x,y} > \text{Threshold}$), 使用两步过程来确定标记物的局部信号强度。首先, 样品的时间演变成像用于发现具有单一标记(分析物)的热点。成像的总时间为10秒的量级, 分辨率为10毫秒的量级。对于单一分析物的热点, 观察到热点荧光强度的清楚的ON/OFF二元行为。显示这种行为的像素首先被计数为单个标签/分析物。因此记录它们对图像和强度的坐标。然后将这些热点的平均强度用作板测定中单一标记的亮度。

[1011] 第二, 不显示这种二元行为的亮像素因此指示多种标记/分析物。然后将它们的信号强度与单个标记物的平均亮度进行比较, 以计算局部热点中的标签数量。或者, 基于泊松统计原理利用另一简化过程。在低浓度的分析物 ($< 1 \mu\text{M}$) 下, 小量分析物固定在高密度等离子体热点 ($\sim 2.5 \times 10^7 \text{mm}^{-2}$) 的概率可观察到泊松分布, 这意味着两个以上分析物位于相同的等离激元热点的概率低。例如, 在1fM的目标分析物, 超过两个标记物位于我们的成像区域内的概率小于0.01% (估计)。因此, 可以假设不显示单个标记行为的所有明亮热点仅包含两个标签。

[1012] (3) 在完成(1)和(2)之后, 可以列出热点像素坐标, 强度和相应的标记物数量的列表。可以通过SUM每个亮像素的标记物数量获得标记物的总数。

[1013] 分析方法-2. 信号分析, 分析-2的一个实施方案包括: (1) 确定局部背景信号频谱; (2) 确定一个标记物, 两个标记物等的局部信号频谱; 和(3) 确定成像区域中的标记物的总数。

[1014] 分析-2基于使用高分辨率光谱仪结合共聚焦显微镜设置来记录生物测定信号光谱的空间分布。Analysis-2的一些细节分析是:

[1015] (1) 为了确定背景信号, 使用参考样品。该参考样品是没有固定任何分析物的传感板, 并且使用在相同实验条件下的相同的仪器组在感测板上进行生物测定来成像。然后使用共聚焦显微镜来测量局部生物测定信号谱。检测面积由高分辨光谱仪之前的针孔尺寸和显微镜物镜的数值孔径确定。共焦显微镜光栅扫描传感板的整个感测位置, 以获得背景信号光谱 $I(x, y, \lambda)$ 的空间分布。然后绘制直方图, 给出具有特定光谱矩 ($\int I(\lambda) d\lambda$) 的像素数。类似于分析-1步骤(1), 具有最大像素的光谱矩被用作背景信号, 并且它们的标准偏差被用于确定阈值: $I(\lambda)_{\text{threshold}} = I(\lambda)_{\text{background}} + n \cdot s.d(\lambda)$ 。这里, n 是用作调整阈值的参数的整数。通常, 在本工作中 n 被设置为等于3,5或7。(2) 为了采集单个明亮像素的光谱, 使用耦合到高分辨率光谱仪的共聚焦显微镜设置。类似于步骤(1)进行读出。因为单个分子的光谱只能使用具有几秒曝光时间的高灵敏度CCD可靠地检测, 这不能提供足够的时间分辨率来确定热点中的单个标记的二元行为。因此, 为了确定明亮像素处的标记物数量, 我们将比较不同亮像素之间的光谱矩。由于感测板的大的放大, 单个或多个标记物可以与背景区分开。因此, 可以确定热点内的分析物的数量。

[1016] (3) 在完成(1)和(2)之后, 可以列出热点像素坐标, 光谱矩和相应的标记物数量的列表。可以通过SUM在每个亮像素的标记物数量获得标记物的总数。

[1017] 分析方法-3 (通过像素化SERS信号的感测)。信号分析, 分析-3的一个实施方案包括(1) 确定“表面增强拉曼散射”(SERS)的局部背景信号, (2) 确定一个标记物, 两个标记物等的局部SERS信号。和(3) 确定成像区域中的标记物总数。

[1018] 分析-3基于使用高分辨率光谱仪结合共聚焦显微镜设置来记录生物测定信号

SERS光谱的空间分布。Analysis-3的一些细节分析是：

[1019] (1) 为了确定背景信号,使用参考样品。该参考样品是没有固定任何分析物的传感板,并且使用在相同实验条件下的相同的仪器组在感测板上进行生物测定来成像。然后使用共聚焦显微镜来测量局部生物测定SERS光谱。检测面积由高分辨光谱仪之前的针孔尺寸和显微镜物镜的数值孔径确定。共焦显微镜光栅扫描发送板的整个感测位点,以获得背景信号光谱 $I(x, y, \text{cm}^{-1})$ 的空间分布。对于某一生物核,然后绘制直方图,其给出具有分子的独特SERS特征强度 $I(\text{cm}^{-1})$ 的像素的数目。类似于分析-1步骤(1),具有最多像素的光谱矩被用作背景信号,并且它们的标准偏差被用于确定阈值: $II(\text{cm}^{-1})_{\text{threshold}} = I(\text{cm}^{-1}) + n * \text{sd}(\text{cm}^{-1})$ 。这里, n 是用作用于调整阈值的参数的整数。通常,在本工作中 n 被设置为等于3,5或7。

[1020] (2) 为了定位局部热点,使用共焦显微镜设置以类似于(1)的方式光栅扫描感测板的整个感测位置。与分析-1或分析-2不同,SERS是无标记检测方法,单分子SERS信号不显示二元行为。因此,为了确定明亮像素处的标记数,我们将比较各个明亮像素之间的SERS标记 $I(\text{cm}^{-1})$ 。由于感测板的大的放大,因此可以将单个或多个分析物与背景区分开。然后可以确定热点内的分析物的数量。

[1021] (3) 在完成(1)和(2)之后,然后可以列出热点像素坐标,SERS签名强度和对应的标记物数量的列表。可以通过SUM在每个亮像素的标记物数量获得标记物的总数。

[1022] 分析方法-4。信号分析,分析-4的一个实施方案包括(1)通过智能电话拍摄板的相关区域的图像(即图片);(2)在本地分析数据(使用相同的智能手机做分析),远程地(将数据传送到远程站点用于分析)或两者;和(3)在有或没有关于数据含义的专家建议的情况下在智能手机上显示数据。在一些实施方案中,分析包括成像处理方法,包括但不限于Open-CV或Image-J中的方法。

[1023] 11标签

[1024] 在整个公开中描述的光学标签的实施方案的一个或任何组合适用于在本发明的整个描述中描述的所有方法和装置。

[1025] 在一些实施方案中,标记物连接到检测剂,分析物或实体(结合物)。在某些实施方案中,标记是光学标记,电标记,可用于产生光学或电信号的酶,或其任何组合。在某些实施方案中,检测剂,分析物或实体(连接)连接有连接分子(例如蛋白质,核酸或其它化合物),其随后连接到标记上。

[1026] 在一些实施方案中,光学标签是可以产生光学信号的物体,其中光学信号的产生包括但不限于光(即光子)反射,散射,透射,吸收,光谱,颜色,发射,强度,波长,位置,极化,发光,荧光,电致发光,光致发光(荧光),化学发光,电化学发光或其任何组合。在一些实施方案中,光信号是光学图像(即光信号v.s.样品或装置的位置)或来自给定面积或体积的所有光子的一次总和的形式。光的优选波长在400nm至1100nm的范围内,50nm至400nm的范围,1nm至50nm的范围或1100至30,000nm的范围内。另一个优选的波长是太赫兹。

[1027] 微珠,纳米颗粒和量子点。在一些实施方案中,光学标记是微珠,纳米颗粒,量子点或其任何组合。

[1028] 在一些实施方案中,微珠,纳米颗粒或量子点的直径为1nm或更小,2nm或更小,5nm或更小,10nm或更小,20nm或更小,30nm或更小,40nm或更小,50nm或更小,60nm或更小,70nm或更小,80nm或更小,100nm或更小,120nm或更小,200nm或更小,300nm或更小,500nm或更

小,800nm或更小,1000nm或更小,1500nm或更小,2000nm或更小,3000nm或更小,5000nm或更小,或任何两个值之间的范围内。

[1029] 在一些实施方案中,微珠或量子点用作标记,它们被预涂在CROF板上,并且两个板之间的内部间隔为1 μ m或更小,10 μ m或更小,50 μ m或更小,任何两个值。

[1030] 在一些实施方案中,溶液中微珠颗粒之间的分离

[1031] -扩散时间。(转移介质的相关体量的厚度导致光学标签在厚度上的扩散时间小于1ms,

[1032] -可控制溶解时间。控制可以使用光,热或其他实例及其组合。在施加激发能量之前,溶解不会开始。

[1033] 在标记的一些实施方案中,使用直径为10nm或更大的纳米颗粒。这种大直径的纳米颗粒具有比小分子(质量<1000Da)和大分子(质量=1,000至1,000,000道尔顿(da))更小的扩散常数,导致给定溶液和距离下更长的扩散时间。减少扩散时间即是要减少扩散距离。

[1034] 根据段落Q1-Q2中任一段所述的方法,其中所述一个或多个开放构型包括两板彼此分离的构型,使得样品直接被放置在一个板上,就好像另一个板不存在一样。

[1035] Q1.段落Q1的方法,其中所述一个或多个开放构型包括板彼此远离的配置,使得样品被放置在所述对的一个板上,而没有所述对中的另一个板的阻碍。

[1036] 当光学标记物是微珠或其它直径大于几纳米的纳米颗粒时,它们相对于现有技术具有特别的优点。这是因为,对于一次近似,物体在液体中的扩散常数与物体的直径成反比(根据爱因斯坦-斯托克斯方程)。

[1037] 例如,直径为20nm,200和2000nm的微珠光学标记物分别具有扩散常数,因此扩散时间比2nm的微珠的扩散时间大10,100和1000倍。对于在当前测定中使用的典型扩散距离,这将导致长的饱和温育时间,其对于PoC(护理点)应用是实际可行的。

[1038] 然而,本发明已经解决了直径大于几纳米的光学标签的长的温育时间问题。本发明具有存储在板表面上的光学标记物,然后将存储表面以亚毫米,微米或甚至纳米尺度的单独距离(二者之间)放置在结合位点旁边,并通过转移介质填充其间隙(其中存储的光学标记物溶解在转移介质中并扩散到结合位点)。本发明还能够在大的结合位点面积上均匀地,且通过使用间隔件技术容易地,控制这样的小距离,。

[1039] 标记分析物可以包括使用例如标记试剂,例如包括可检测标记的分析物特异性结合成员。可检测标记包括但不限于荧光标记,比色标记,化学发光标记,酶联试剂,多色试剂,抗生物素蛋白-链霉亲和素相关的检测试剂等。在某些实施方案中,可检测标记是荧光标记。荧光标记是可通过荧光检测器检测的标记部分。例如,荧光标记物与感兴趣分析物的结合可以允许感兴趣分析物被荧光检测器检测。荧光标记的实例包括但不限于在与试剂接触时发荧光的荧光分子,当用电磁辐射(例如,UV,可见光,x射线等)照射时发荧光的荧光分子等。

[1040] 在某些实施方案中,用于标记的合适的荧光分子(荧光团)包括但不限于IRDye800CW,Alexa 790,Dylight 800,荧光素,异硫氰酸荧光素,羧基荧光素的琥珀酰亚胺酯,荧光素的琥珀酰亚胺酯,荧光素二氯三嗪的5-异构体,笼状羧基荧光素-丙氨酸-甲酰胺,Oregon Green 488,Oregon Green 514;荧光黄,吖啶橙,罗丹明,四甲基罗丹明,德克萨

斯红,碘化丙锭,JC-1 (5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑基碳菁碘化物),四溴罗丹明123,罗丹明6G,TMRM(四甲基罗丹明甲酯),TMRE(四甲基罗丹明乙酯),四甲基罗丹明,罗丹明B和4-二甲基氨基四甲基罗丹明,绿色荧光蛋白,蓝移绿色荧光蛋白,青移绿色荧光蛋白,红移绿色荧光蛋白质,黄色偏移的绿色荧光蛋白,4-乙酰氨基-4'-异硫氰酸苾-2,2'-二磺酸;吖啶和衍生物,例如吖啶,异硫氰酸吖啶;5-(2'-氨基乙基)氨基苾-1-磺酸(EDANS);4-氨基-N-[3-乙烯基磺酰基]苾基]苾-酰亚胺-3,5-二磺酸盐;N-(4-苾胺基-1-苾基)马来酰亚胺;邻氨基苾甲酰胺;4,4-二氟-5-(2-噻吩基)-4-硼-3a,4a-二氮杂-5-引达省-3-丙酸BODIPY;级联蓝亮黄色;香豆素和衍生物:香豆素,7-氨基-4-甲基香豆素(AMC,香豆素120),7-氨基-4-三氟甲基香豆素(香豆素151);花青染料;花青苷4',6-二氨基-2-苾基吖啶(DAPI);5',5"-dibromopyrogallol-sulfonaphthalein(Bromopyrogallol Red);7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酸苾基)-4-甲基香豆素;二乙烯三胺五乙酸酯;4,4'-二异硫氰酸二氢苾-2,2'-二磺酸;4,4'-二异硫氰酸苾-2,2'-二磺酸;(DABITC);曙红及其衍生物:曙红,异硫氰酸曙红,赤藓红及其衍生物:赤藓红B,赤藓红,异硫氰酸酯;乙酰乙酰胆碱;荧光素和衍生物:5-羧基荧光素(FAM),5-(4,6-二氯三嗪-2-基)氨基-荧光素(DTAF),2',7'-二甲氧基-4'5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE),荧光素,荧光素异硫氰酸酯,QFITC,(XFITC);荧光胺;IR144;IR1446;孔雀绿异硫氰酸酯;4-甲基苾并-正卟啉甲酚;硝基酪氨酸;副苾胺苾酚;苾酚红;B-藻红蛋白;邻苾二甲醛;苾和衍生物:苾,丁酸苾,琥珀酰亚胺1-苾;丁酸盐量子点;活性红4(Cibacron TM Brilliant Red 3B-A)罗丹明及衍生物:6-羧基-X-罗丹明(ROX),6-羧基罗丹明罗丹明B磺酰氯罗丹明(Rhod),罗丹明B,罗丹明123,罗丹明X异硫氰酸酯,磺酰罗丹明B,磺酰罗丹明101,磺酰罗丹明101的磺酰氯衍生物(德克萨斯红);N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA);四甲基罗丹明;四甲基异硫氰酸胺(TRITC);核黄素;5-(2'-氨基乙基)氨基苾-1-磺酸(EDANS),4-(4'-二甲基氨基苾基偶氮)苾甲酸(DABCYL),山梨酸;CAL Fluor橙560;铽螯合衍生物;Cy 3;Cy 5;Cy 5.5;Cy 7;IRD 700;IRD 800;拉霍亚蓝;酞菁花青;苾醌染料,氨基邻苾二甲酰肼如鲁米诺和异鲁米诺衍生物,氨基邻苾二甲酰亚胺,氨基苾二甲酰亚胺,氨基苾并咪唑,氨基喹啉,二氰基氢醌,荧光铈和铈络合物;其组合等。合适的荧光蛋白和生色蛋白包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP),包括但不限于来源于Aequoria victoria或其衍生物的GFP,例如“人源化”衍生物,例如增强的GFP;来自另一物种例如Renilla Reniformis, Renilla mulleri或Ptilosarcus guernei的GFP;“humanized” recombinant GFP(hrGFP);来自Anthozoan物种的多种荧光和有色蛋白质中的任一种;其组合;和类似物。

[1041] 在某些实施方案中,标记试剂被配置为其可特异性结合目标分析物。在某些实施方案中,在将样品施用于CROF装置之前,标记试剂可存在于CROF装置中。在其它实施方案中,可以在将样品施加到CROF装置之后,将标记剂施加到CROF装置。在某些实施方案中,在将样品施加到CROF装置之后,可以洗脱CROF装置以除去任何未结合的组分。未结合的分析物和样品中的其他非分析物共聚物,并且标记剂可以在洗脱后施加到CROF装置以标记结合的分析物。在一些实施方案中,可以在标记试剂结合到分析物-捕获剂复合物之后洗脱CROF装置,以从CROF装置去除未与分析物捕获剂复合物结合的任何过量的标记试剂。

[1042] 在某些实施方案中,分析物在分析物与CROF装置结合之后被标记,例如使用可以与分析物同时结合作为CROF装置中分析物结合的捕获剂的标记结合剂,即夹心型测定。在

一些实施方案中,可以在CROF装置上捕获核酸分析物,并且可以与CROF装置中结合核酸分析物的捕获剂同时地捕获能够与分析物杂交的标记的核酸。

[1043] 在某些方面,CROF装置可增强由直接或间接结合到分析物的可检测标记产生的光信号,例如荧光或发光,其中分析物结合在CROF装置上。在某些实施方案中,信号通过信号放大的物理过程增强。在一些实施方案中,光信号通过纳米等离子体效应(例如表面增强拉曼散射)增强。通过纳米等离子体效应的信号增强的实例描述于例如Li等,Optics Express 2011 19:3925-3936和W02012/024006中,其通过引用并入本文。在某些实施方案中,在不使用信号的生物/化学扩增的情况下实现信号增强。信号的生物/化学扩增可以包括信号的酶促扩增(例如,在酶联免疫吸附测定(ELISA)中使用)和信号的聚合酶链反应(PCR)扩增。在其他实施方案中,信号增强可以通过物理过程和生物/化学扩增来实现。

[1044] 在某些实施方案中,CROF装置配置成其可增强来自CROF装置表面近端的可检测标记的信号大 10^3 倍或更多,例如 10^4 倍或更多, 10^5 倍或更多, 10^6 倍或更多, 10^7 倍或更多,包括 10^8 倍或更多,其中与不邻近的可检测标记相比,信号可以被增强 10^3 至 10^9 倍,例如 10^4 至 10^8 倍,或 10^5 至 10^7 倍的范围到CROF装置的表面,即与常规ELISA板上结合到分析物的可检测标记,在常规核酸微阵列上,悬浮在溶液中等相比较。在某些实施方案中,CROF装置配置成增强CROF装置的表面附近的可检测标记的信号的 10^3 倍或更多,例如 10^4 倍或更多, 10^5 倍或更多, 10^6 倍或更多, 10^7 倍或更多,包括 10^8 倍或更多,其中与未配置为使用物理扩增过程增强信号的分析物检测阵列相比,信号可以增强 10^3 至 10^9 倍,例如 10^4 至 10^8 倍或 10^5 至 10^7 倍的范围,如如上所述。

[1045] 灵敏度。在某些实施方案中,CROF装置被配置为具有0.1nM或更小,例如10pM或更小,或1pM或更小,或100fM或更小,例如10fM或更小,包括1fM或更小的检测灵敏度。小于或等于0.5fM,或小于或等于100aM,或小于或等于50aM,或小于或等于20aM。在某些实施方案中,CROF装置被配置为具有10aM至0.1nM,例如20aM至10pM,50aM至1pM,包括100pM至100fM的范围内的检测灵敏度。在一些情况下,CROF装置被配置为能够检测浓度为1ng/mL或更低,例如100pg/mL或更低,包括10pg/mL或更低,1pg/mL或更低,100fg/mL或更小,10fg/mL或更小,或5fg/mL或更小。在一些情况下,CROF装置被配置为能够检测浓度在1fg/mL至1ng/mL,例如5fg/mL至100pg/mL,包括10fg/mL至1μg/10pg/mL。在某些实施方案中,CROF装置被配置为具有5个数量级或更多,例如6个数量级或更多,包括7个数量级或更多的动态范围。

[1046] 读取。在某些情况下,从施加样品到CROF装置到读取CROF装置的时间段可以为1秒至30分钟,例如10秒至20分钟,30秒至10分钟,包括1分钟至5分钟。在一些情况下,从将样品施加到信号增强检测器以产生可由装置接收的输出的时间段可以是1小时或更短,30分钟或更短,15分钟或更短,10分钟或更短,5分钟或更短,3分钟或更短,1分钟或更短,50秒或更短,40秒或更短,30秒或更短,20秒或更短,10秒或更短,5秒或更短,1秒或更短,或甚至更短。在一些情况下,从将样本施加到信号增强检测器到产生可由设备接收的输出的时间段可以是100毫秒或更多,包括200毫秒或更多,诸如500毫秒或更多,1秒或更多,10秒或更多,30秒或更多,1分钟或更多,5分钟或更多,或更长。

[1047] 可以使用任何合适的方法读取CROF装置以获得样品中分析物的量的测量值。在一些实施方案中,读取CROF装置包括从结合到CROF装置中的分析物的可检测标记物获得电磁信号。在某些实施方案中,电磁信号是光信号。获得的光信号可以包括光的强度,光的波长,

光源的位置等。在特定实施方案中,由标记物产生的光信号具有在300nm到900nm范围内的波长。在某些实施方案中,光信号以CROF装置的视觉图像的形式读取。

[1048] 在某些实施方案中,读取CROF装置包括提供电磁辐射源,例如光源,作为与CROF装置中的生物标记物结合的可检测标记的激发源。光源可以是用于激发可检测标记的任何合适的光源。示例性光源包括但不限于太阳光,环境光,UV灯,荧光灯,发光二极管(LED),光电二极管,白炽灯,卤素灯等。

[1049] 读取CROF装置可以通过任何合适的方法来实现,以测量存在于样品中并结合到CROF装置的分析物的量。在某些实施方案中,使用被配置为从结合到CROF装置中的分析物的可检测标记物获取光信号的装置读取CROF装置。在一些情况下,设备是手持设备,诸如移动电话或智能电话。被配置为读取CROF装置的任何合适的手持设备可以用在本发明的设备,系统和方法中。被配置为读取CROF装置的设备例如有于2014年10月21日提交的美国专利临时申请第62/066,777号,其通过引用并入本文。

[1050] 在一些实施方案中,该装置包括光学记录装置,其被配置为从CROF装置获取光信号,例如获取CROF装置的图像。在某些情况下,光学记录装置是相机,例如数字相机。术语“数字照相机”表示包括作为其主要部件的图像获取装置的任何照相机,该图像获取装置设置有用于形成光学图像的图像拍摄镜头系统,用于将光学图像转换为电信号的图像传感器,以及其他部件,这种相机的示例包括数字静态照相机,数字电影摄像机和网络摄像机(即公共或私人地连接到网络以允许图像交换的设备的照相机,包括直接连接到网络以及通过具有信息处理能力的诸如个人计算机的装置连接到网络的那些)。在一个示例中,读取CROF装置包括可以捕获随时间变化的视频成像。例如,可以获取视频以提供对应用于CROF装置的样本中的动态变化的评估。

[1051] 在某些实施方案中,光学记录装置具有的灵敏度低于在研究/临床实验室设置中使用的高灵敏度光学记录装置的灵敏度。在某些情况下,本发明方法中使用的光学记录装置具有低于10倍或更高,例如100倍或更高,包括200倍或更高,500倍或更高,或1000倍或比在研究/临床实验室设置中使用的高灵敏度光学记录装置的灵敏度更高的灵敏度。

[1052] 在某些实施方案中,设备可以具有视频显示器。视频显示器可以包括其上可以以用户可感知的方式显示页面的组件,诸如例如计算机监视器,阴极射线管,液晶显示器,发光二极管显示器,触摸板或触摸屏显示器,以及或本领域已知的用于发出视觉上可感知的输出的其他装置。在某些实施方案中,设备配备有用于显示信息的触摸屏,该信息例如有从检测器获取的图像和/或从处理的数据生成的报告,并允许被检体输入信息。

[1053] 12多路复用

[1054] 在本文所述的任何实施方案中,系统可以设计用于进行多重测定,因此可以包含多个存储位点,多个结合位点或多个存储位点和多个结合位点,使得不同的测定可以在一个板的表面上进行。例如,在一个实施方案中,一个板可以含有多个结合位点,每个结合位点含有不同的捕获剂,从而允许在相同测定中检测样品中的多种分析物。所述位点可以在空间上彼此分离,尽管彼此靠近。

[1055] 图10示意性地示出了本发明的示例性实施方案,使用单个CROF装置中的一个板上的一个结合位点和另一个板上的多个存储位点进行多路复用检测。面板(a)和(b)分别是示例性装置的透视图和横截面图。在示例性情况下,多路CROF装置包括第一板和第二板,其中

第一板的一个表面具有一个结合位点;其中所述第二板的一个表面具有多个存储位点;并且其中不同的存储位点可以具有相同的检测剂但是具有不同的浓度,或者可以具有相同或不同浓度的不同检测剂。在一些实施方案中,结合位点的面积大于每个存储位点的面积。在一些实施方案中,结合位点面积大于所有存储位点的总面积,和/或结合位点面积与存储位点对齐(即,它们彼此重叠,即结合位点和存储位点之间的距离是相同的或几乎相同的)。

[1056] 图11示意性地示出了本发明的另一示例性实施方案,在单个CROF装置中的多路检测,其在一个板上使用一个存储位点,在另一个板上使用多个结合位点。面板(a)和(b)分别是示例性装置的透视图和横截面图。在示例性情况下,多路CROF装置包括第一板和第二板,其中第一板的一个表面具有多个结合位点;其中所述第二板的一个表面具有一个存储位点;并且其中不同的结合位点可以具有相同的捕获剂,但是具有不同的浓度,或者可以具有相同或不同浓度的不同捕获剂。在一些实施方案中,存储位点的面积大于每个结合位点的面积。在一些实施方案中,存储位点面积大于所有结合位点的总面积,和/或与结合位点对齐(即它们彼此重叠)。

[1057] 图12示意性地示出了本发明的另一个示例性实施方案,在单个CROF装置中的多重检测,在一个板上具有多个结合位点,在另一个板上具有多个相应的存储位点。面板(a)和(b)分别是示例性装置的透视图和横截面图。在示例性情况下,多路CROF装置包括第一板和第二板,其中第一板的一个表面具有多个结合位点;其中所述第二板的一个表面具有多个相应的存储位置;其中每个相应的存储位点位于所述第二板上的与所述第一板上的结合位点的位置相对应的位置,使得当所述板面对面放置时,每个结合位点仅与一个存储位点重叠,每个存储站点仅与一个存储站点重叠;其中不同的存储位点可以具有相同的检测剂但具有不同的浓度,或者可以具有相同或不同浓度的不同检测剂;并且其中不同的存储位点可以具有相同的捕获剂,但是具有不同的浓度,或者可以具有相同或不同浓度的不同捕获剂。

[1058] 在某些实施方案中,其中所述第一板在其表面上还包括第一预定测定部位和第二预定测定部位,其中所述相邻多个测定部位的边缘之间的距离显著大于当所述板处于闭合构型时的均匀厚度层的厚度,其中所述样品的所述均匀厚度层的至少一部分在所述预定测定位点上方,并且其中所述样品具有一种或多种分析物,所述分析物能够在所述样品扩散。通过使相邻多个测定位点的边缘之间的距离大于样品厚度,具有多个结合位点而无需将样品的不同部分流体分离成为可能,因为测定的饱和温育可以在两个相邻位点之间显著的相互扩散前完成。通过适当地选择相邻距离与样品厚度的比率,并且适当地选择比测定饱和温育时间长但小于两个相邻位点之间显著的相互扩散的时间的测量时间,可以通过CROF实现多路复用测定而不隔离样品的不同部分。在一些实施方案中,在闭合构型下的相邻距离与样品厚度的比率为1.5或更大,3或更大,5或更大,10或更大,20或更大,30或更大,50或更大,100或更大,200或更大,1000或更大,10,000或更大,或任何两个值之间的范围。该比率对于优选实施方案为3或更大,对于另一个优选实施方案为5或更大,对于某个优选实施方案为10或更大,对于另一个优选实施方案为30或更大,对于另一个优选实施方案为100或更大。

[1059] 在某些实施方案中,其中所述第一板在其表面上具有至少三个分析物测定位点,并且任何两个相邻测定位点的边缘之间的距离显著大于当所述板处于所述闭合构型时的

所述均匀厚度层的厚度,其中所述均匀厚度层的至少一部分在所述测定位点上方,并且其中所述样品具有能够在所述样品中扩散的一种或多种分析物。

[1060] 在某些实施方案中,其中所述第一板在其表面上具有至少两个相邻的分析物分析部位,所述至少两个相邻的分析物分析部位的距离显著大于当所述板处于闭合构型时所述均匀厚度层的厚度位置,其中所述均匀厚度层的至少一部分在所述测定位点上方,并且其中所述样品具有能够在所述样品中扩散的一种或多种分析物。

[1061] 根据U1-6,X-6,P1-8,W1-6,V1-4,UAB1-8,M1-2,S1-2,Q110和H1段落中任一段落的方法或装置,任何组合,其中第一和第二平板还包含结合位点和存储位点,如图10,11,12所示用于多路复用检测。

[1062] 在这些实施方案中,该装置可以用于并行多重地测定液体样品而无需流体分离(即无需测定区之间的物理屏障)。该装置可以包括第一板和第二板,其中:i.所述板可相对于彼此移动成不同的构型;一个或两个板是柔性的;ii.所述板中的一个或两个包括固定于相应板的间隔件;并且所述间隔件具有预定的基本均匀的高度和预定的恒定的间隔件距离;iii.每个板在其各自表面上具有用于接触样品的样品接触区域,所述样品包含含有能够在样品中扩散的一种或多种目标分析物的样品,iii.第一板在其表面上具有一个或多个结合位点,每个结合位点具有包含结合并固定样品的相应目标分析物的捕获剂的预定区域;并且所述第二板在其表面上具有一个或多个相应的存储位点,每个存储位点具有预定的面积并且包含浓度的检测剂,所述检测剂在接触所述样品时溶解到所述样品中并在所述样品中扩散,其中每种捕获剂,目标分析物和相应的检测剂能够在所述第一板的结合位点中形成捕获剂-目标分析物-检测剂三明治夹心结构;其中所述构型之一是开放构型,其中:所述两个板部分或完全分开,所述板之间的间隔不受所述间隔件调节,并且所述样品被放置在所述板中的一个或两个上,以及其中所述构型中的另一个是在所述样品在所述开放构型中被放置之后配置的闭合构型;并且处于闭合构型时:i.至少部分样品被压制成均匀厚度的层,其与两个板的内表面接触并被其限制,并且覆盖一个或多个结合位点和一个或多个存储位点,ii.所述一个或多个相应的存储位点在所述一个或多个结合位点上,以及iii.所述层的均匀厚度由所述间隔件和所述板调节,小于250 μm ,并且基本上小于每个存储位置的预定面积的线性尺寸;和iv.在结合位点和/或存储位点之间没有流体隔离,其中相邻存储位点的边缘之间的间隔和相邻结合位点的边缘之间的间隔大于目标分析物或检测剂可以在相关时间内的扩散距离,并且其中在结合位点和/或存储位点之间没有流体隔离。

[1063] 在一些实施方案中,第一板在其表面上具有多个(至少2个,至少4个或至少16个或更多)结合位点。

[1064] 在一些实施方案中,所述多个结合位点中的每一个结合不同的目标分析物。

[1065] 在一些实施方案中,第二板在其表面上具有多个(至少2个,至少4个或至少16个或更多)相应的存储位点。

[1066] 在一些实施方案中,多个相应的存储位点中的每一个结合不同的目标分析物。

[1067] 在一些实施方案中,第一板在其表面上具有多个所述结合位点,并且第二板在其表面上具有多个所述相应的存储位点,其中当板是平面时,在闭合构型中每个结合位点面向相应的存储位点。

[1068] 在一些实施方案中,第一板在其表面上具有多个所述结合位点,并且第二板在其

表面上具有存储位点,其中板处于闭合构型时至少一些结合位点面向存储位点中的区域。

[1069] 在一些实施方案中,第一板在其表面上具有结合位点,并且第二板在其表面上具有多个存储位点,其中当板在闭合构型中至少一个存储位点时,至少一些存储位点面向结合位点中的区域。

[1070] 在一些实施方案中,第一板在其表面上具有多个结合位点,其中结合位点含有结合并固定相同目标分析物的不同捕获剂。

[1071] 在一些实施方案中,第一板在其表面上具有多个结合位点,其中结合位点含有相同的捕获剂。

[1072] 在一些实施方案中,捕获剂在不同结合位点处具有不同的密度。这些实施方案可用于一种提供定量样品中分析物的量的方法。

[1073] 在一些实施方案中,在两个相邻结合位点或两个相邻存储位点之间存在间隔,在闭合构型中该间隔与样品厚度的比率为至少3,例如至少5,至少10,至少20或至少50。

[1074] 在一些实施方案中,间隔件间距离在 $1\mu\text{m}$ 至 $120\mu\text{m}$ 的范围内。

[1075] 在一些实施方案中,柔性板具有在 $20\mu\text{m}$ 至 $250\mu\text{m}$ 范围内(例如在 $50\mu\text{m}$ 至 $150\mu\text{m}$ 范围内)的厚度和在0.1至5Gpa范围内的杨氏模量(例如在0.5-2Gpa)。

[1076] 在一些实施方案中,柔性板的厚度乘以柔性板的杨氏模量在60至750Gpa-m的范围内。

[1077] 在一些实施方案中,该方法可以包括(a)获得含有一种或多种目标分析物的样品,其能够在样品中扩散;(b)获得可相对于彼此移动成不同构型的第一板和第二板,其中:i.所述板中的一个或两个包括与相应板固定的间隔件,并且一个或两个板是柔性的,ii.所述间隔件具有预定的基本均匀的高度和预定的恒定的间隔件距离。第一板在其表面上具有一个或多个结合位点,每个结合位点具有包含结合并固定(a)的相应目标分析物的捕获剂的预定区域;和iv.第二板在其表面上具有一个或多个相应的存储位点,每个存储位点具有预定的面积并且包含浓度的检测剂,所述检测剂在接触样品时溶解到样品中并在样品中扩散,其中每个捕获剂,目标分析物和相应的检测剂能够在第一板的结合位点中形成捕获剂-目标分析物-检测剂夹心;(c)当所述板被配置为开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上,其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板被部分或完全分开并且所述板之间的间隔不是由间隔件调节;(d)在(c)之后,通过使所述两个板处于闭合构型来压制所述样品,其中所述闭合构型是这样的构型,其中:i.至少部分样品被压制均匀厚度的层,其与两个板的内表面接触并被其限制,并且与一个或多个结合位点接触,并且一个或多个存储位点,ii所述一个或多个相应的存储位点在所述一个或多个结合位点上,以及iii.所述层的均匀厚度由所述间隔件和所述板调节,小于 $250\mu\text{m}$,并且基本上小于每个存储位置的预定面积的线性尺寸;(e)在(d)之后并且当板处于闭合构型时,或者:(1)将样品温育相关的时间长度,然后停止温育;或(2)将样品温育等于或长于相关时间长度的最小值的时间,然后在等于或小于相关时间长度的最大值的时间段内评估每个目标分析物结合到结合位点的情况;其中所述相关时间长度为:i.等于或长于(a)的目标分析物在闭合配置下扩散穿过均匀厚度层的厚度所花费的时间;和ii.显着短于使(a)的目标分析物横向扩散通过存储位点或结合位点的预定区域的最小线性尺寸的时间;从而产生反应,其中在(1)中的温育结束时或在(2)中的评估期间,大部分结合到每个结合位点的大部分捕获剂-目标分析

物-检测试剂三明治夹心结构来自于相应的样品的相关体量;其中所述温育允许每个目标分析物和检测剂结合到结合位点,其中所述相应的相关体量是所述样品的处于所述闭合构型时的相应存储位点上方的部分,其中所述邻近存储位点和相邻结合位点的边缘之间的间隔大于目标分析物或检测剂在相关时间中扩散的距离,并且其中在结合位点位点和/或存储位点之间没有流体隔离。

[1078] 上述多重测定装置的任何实施方案可以用于该方法中。

[1079] 13通过校正非样品体积产生的影响进行精确定量(C)

[1080] 在CROF过程中,样品通常与非样品体量混合在一起,所述非样品体量来自于不是样品的物体,其包括但不限于间隔件,气泡,粉尘或其任何组合。在CROF过程中也可能由于样品被放置或其他步骤引入气泡或灰尘。这些非样本对象占据样本中的体积且位于样品内部,其应当在确定样本的相关体积(感兴趣的体积)时进行校正。本发明的一个方面是校正由两个板之间的样品的相关体量内的非样品体量产生的效应,其中相关体量的厚度由间隔件调节。

[1081] C1.一种用于在确定两个板之间的样品的相关体量时校正由非样品材料产生的效应的方法,包括:

[1082] (a) 获得样品,其中所述样品的相关体量将被定量;

[1083] (b) 获得可相对于彼此移动成不同构型的两个板,其中所述板中的一个或两个包括间隔件,并且所述间隔件具有预定的间隔件距离和高度,并且所述间隔件中的每一个固定于其相应板上;

[1084] (c) 当所述两板配置成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;(d) 在(c)之后,使板进入闭合构型,其中在闭合构型中:两板彼此面对,间隔件和样品的相关体量位于两板之间,样品相关体量的厚度由板和间隔件调节,并且其比当板处于开放构型时比样品的最大厚度薄,并且相关体量可以包含一定体积的非样品材料;

[1085] (e) 当所述板处于闭合构型时,测量(i)样品的相关体量的横向面积和(ii)非样品材料的体积;和

[1086] (f) 通过使用由间隔件调节的相关体量的厚度来计算样品的相关体量体积,并校正非样品材料的影响;

[1087] 其中所述相关体量是所述样品的全部体量的至少一部分,并且所述非样品材料是不来自所述样品的材料。

[1088] -非样品体积的测量是通过在两个板之间的样品的成像实现的。

[1089] 14通过再次检查间隔精确定量

[1090] 在CROF中,对于给定的一系列条件,即使间隔件和板可以在闭合构型下给出预定的样品厚度,在特定CROF期间实际条件可能不同于预期,这导致预定的最终样品厚度会出现误差。为了减少这种误差,本发明的一个方面是在闭合构型下再次检查最终样品厚度。

[1091] C2.一种用于确定和检查两个板之间的样品的相关体量的厚度的方法,包括:

[1092] (a) 获得样品,其中所述样品的相关体量将被定量;

[1093] (b) 获得可相对于彼此移动成不同构型的两个板,其中所述板中的一个或两个包

括间隔件,并且所述间隔件具有预定的间隔件距离和高度,并且所述间隔件中的每一个固定于其相应板上;

[1094] (c) 当所述两板配置成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;(d) 在(c)之后,使板进入闭合构型,其中在闭合构型中:两板彼此面对,间隔件和样品的相关体量位于两板之间,样品相关体量的厚度由板和间隔件调节,并且其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄,并且相关体量可以包含一定体积的非样品材料;

[1095] (e) 当所述板处于闭合构型时,测量(i)样品的相关体量的横向面积和(ii)非样品材料的体积;和

[1096] (f) 通过使用由间隔件调节的相关体量的厚度来计算样品的相关体量体积,并校正非样品材料的影响;

[1097] 其中所述相关体量是所述样品的全部体量的至少一部分,并且所述非样品材料是不来自所述样品的材料。

[1098] 15洗脱(Ws)

[1099] 在本发明中,在本发明的整个说明书中描述的所有方法和装置中使用这里描述的板压制和自保持的实施方案中的一个或任何组合。

[1100] 一种测定中洗脱的方法,包括:

[1101] (a) 执行上述方法之一或任何组合的步骤

[1102] (b) 洗脱两板之间的样品或转移介质。

[1103] 在使用CROF的方法中,通过将板保持在闭合构型中来进行洗脱。

[1104] 在使用CROF的方法中,通过将板从闭合构型分离开来来进行洗脱。

[1105] 海绵

[1106] 16多步骤测定法(MA)

[1107] 在本发明中,通过(a)将一个实施方案与其他实施方案组合,(b)通过使用相同的实施方案多于一次,以及(c) (a)和(b)的任何组合,来组合使用由本公开描述的实施方案(即所有部分),MA1.一种用于测定样品中的分析物的方法,包括:

[1108] (a) 获得具有分析物的样品;

[1109] (b) 执行使用CROF的方法;和

[1110] (c) 分离两板并执行使用CROF的方法。

[1111] 在段落MA1的方法中,在一些实施方案中,在MA1的步骤(c)之后,其还包括重复MA1的方法中的所有步骤的相同步骤至少一次的步骤。

[1112] MA2.一种用于测定样品中的分析物的方法,包括:

[1113] (a) 获得具有分析物的样品;

[1114] (b) 执行使用CROF的方法;

[1115] (c) 分离板并进行使用CROF(洗脱)的方法;和

[1116] (d) 执行使用CROF的方法。

[1117] 在段落MA2的方法中,在一些实施方案中,在MA2中的步骤(d)之后,其还包括重复MA2的方法中的所有步骤的相同步骤至少一次的步骤。

[1118] 在段落MA2的方法中,在一些实施方案中,在MA2中的步骤(c)之后,还包括重复MA1的方法中的所有步骤的相同步骤至少一次的步骤。

[1119] MA3.一种用于测定样品中的分析物的试剂盒,包括:

[1120] 使用CROF的第一CROF装置;和

[1121] 第三板,当第一CROF装置的板分离时,与第一CROF装置的板中的一个结合以形成第二CROF装置。

[1122] MA4.一种用于测定样品中的分析物的试剂盒,包括:

[1123] 使用CROF的第一CROF装置;

[1124] 在CROF装置的板的样品接触区域上的至少一个结合位点或存储位点;和

[1125] 第三板,当所述第一CROF装置的板分离时,与所述第一CROF装置的板中的一个结合以形成第二CROF装置;

[1126] 其中所述结合位点将目标分析物结合到所述板表面,并且所述存储位点具有试剂,所述试剂在与所述样品接触时可以溶解到所述样品中并在所述样品中扩散。

[1127] 成像可以包括智能电话的使用。该部分的方法还可以包括由光源照射的步骤。光源可以是激光器,LED,灯或相机闪光灯。

[1128] 用于执行检测样品中目标实体的测定试剂盒(MQXA)

[1129] 用于测定样品中目标实体的试剂盒可以包括:

[1130] a.第一板,其中所述第一板的一个表面具有可固定目标实体的一个或多个结合位点,并且所述结合位点具有结合所述目标实体的结合配体;

[1131] b.盖板;

[1132] c.在盖板和第一板之间的内部空间中的样品,其中样品包含在样品中可移动的所述目标实体,样品的形状是可变形的,第一板和第二板可相对于彼此移动,样品的形状基本上与内表面共形,样品的至少一部分与结合位点接触,并且在温育期间内部间隔小于一定距离。所述样品与所述结合位点接触;

[1133] d.成像装置,其能够对所述第一板表面和/或所述盖板表面进行成像;和

[1134] e.能够测量内部空间的间距的测量装置。

[1135] 本节的方法可以包括使用智能电话。该部分的方法可以包括使用照明装置的步骤。照明装置可以包括激光器,LED,灯或照相机闪光灯。

[1136] 17压板和保持(H)

[1137] 压制力。在CROF过程中,使用力来压制两个板,以将板从开放构型变为闭合构型。压制力减小了板的内表面之间的间距,并因此减小了板之间的样品的厚度。在本发明中,压制力包括但不限于机械力,毛细管力(由于表面张力),静电力,电磁力(包括光)及其任何组合。

[1138] 在使板从开放构型变为闭合构型的一些实施方案中,施加外力以将第一板和第二板推向彼此。

[1139] 在使板从开放构型变为闭合构型的一些实施方案中,将外部压力施加到第一板和第二板的外部以将板朝向彼此推动,并且该压力高于板内部的压力。使用装置使板外部的压力高于板内部的压力。该装置包括但不限于密封装置。

[1140] 在一些实施方案中,压制力至少部分地由毛细管力提供,毛细管力是由于第一板

和第二板之间的液体以及相应的表面张力和与板的相互作用。在一些实施方案中,液体是样品本身,或样品与液体混合。在某些实施方案中,毛细作用力与其它力一起使用。在许多情况下,样品通常是液体,并且其表面张力适于引入毛细管力。在一些实施方案中,当毛细管力等于使样品变形所需的力时,板使样品产生的形变可以自动停止。

[1141] 在某些实施方案中,通过将第一板和第二板之间的压力(内部压力)与板外部(外部压力)隔离,产生压制力(因此样本变形),然后使内部压力低于外压力。可以使用真空密封或其它装置进行该隔离。

[1142] 一些实施方案是上述方法的组合。

[1143] 渐进压制。在某些实施方案中,用于使板处于闭合构型的压制力在称为“渐进压制”的过程中施加,其包括:首先在板的一处位置施加压力(即施加压制力),然后逐渐施加到样品的其它位置。在逐步压制的一些实施方案中,在一个位置处的压制力(除了样本自身的毛细作用力之外)在将样本变形到该位置处的期望厚度之后,(i)在压制和样品变形的整个过程期间被保持,(ii)在其它位置被挤压时移除,或(iii)对于板的某些部分使用(i),以及对于样品的其它部分使用(ii)。

[1144] 在渐进压制的一个实施方案中,使用辊来将第一板和第二板(样品在板之间,并且板略具微柔性)压抵在另一个辊或平坦表面上。

[1145] 在另一个实施方案中,人手指是压制板(也因此压样品)的工具。按压是人手的一部分压抵人身体的另一部分(包括人手的另一部分)或人手压抵某一物体(例如桌面)的一部分。在一个实施方案中,按压在样本的一个位置开始,并逐渐移动到样本的其他位置。

[1146] 在渐进压制的一个实施方案中,压制空气射流首先被引导到所述板对(其在第一板和第二板之间,板中的一个稍微柔性)的某个位置(例如中心),并且压力逐渐延伸到板对的其他部分。

[1147] 在另一个实施方案中,第一板和第二板中的一个或两个是柔性的并且与样品的一个位置接触,然后在该位置的毛细力将板对拉到一起(朝向彼此)以使样品变形。

[1148] 渐进压制的优点包括:它允许使用较小的力使样品变形(因为对于相同的力,较小的压制面积,压力越大);它有助于样品的运动(变形),和/或减少样品中的气泡。压力越大,样品变形越多。渐进压制可以改善变形样品的厚度均匀性。

[1149] 压制装置。用于在CROF中确保使样本变形的压制力的装置具有若干实现方式。一些实施方案是使用人手按压,例如,通过人手指按压。某些实施方案使用压制装置,其中压制装置包括但不限于人手,机械夹,机械压力机,机械夹具,机械滑动器,机械装置,电磁装置,在表面上滚动的辊,彼此相对的两个辊,流体压机,液压装置或其任何组合。某些实施方案使用加压液体(包括压制空气)来直接或间接地按压第一板和/或第二板。“直接”是指加压液体直接施加在第一板和/或第二板上;而“间接”意味着它通过第三个对象施加。压制中的某些实施方案使用压制装置和方法的上述实施方案的组合。

[1150] 此外,在样品变形的一些实施方案中,可监测按压和样品变形。监测可用于控制压力和样品变形。变形的监测包括但不限于机械方法,电学,光学,化学,磁性以及它们的任何组合。机械方法包括但不限于机械测量,间隔件(机械制动器,下面更详细讨论)和声波。

[1151] 在CROF中,间隔控制装置包括机械压力机,机械平移台,人手指,提供将板朝向彼此拉动的毛细力的液体,在板上施加压力的液体(包括空气)或其组合。

[1152] 在某些实施方案中,机械平台(平移和/或旋转)被用于样品变形和样品厚度的控制,并与监测系统一起工作。

[1153] 在一些实施方案中,压制力至少部分地由压力机(其是使板处于闭合构型的装置)供给,其提供的压力被配置成其可将板压在一起成为闭合构型。

[1154] 在一些实施方案中,压制板是使用人手。人可以是被测试的人或者进行测试的人,或者是采集样本的人。

[1155] 在一些实施方案中,压制板是使用毛细作用力将两个板保持在一起。通过使一个板的内表面的至少一部分或两者亲水而产生毛细力。利用适当的毛细力,两个板能够保持与当板最初处于闭合构型时相同的板间距和相同的样品厚度,甚至当用于将板压制到闭合构型的一部分或全部力(除了毛细力)被移除。

[1156] 在一些实施方案中,在板的外表面上施加压制力以减小板内表面间隔的装置包括适形于板的外表面的一个接触表面,其中该装置的接触表面是该装置接触板外表面的表面,并且“适形于板的外表面”意味着该装置表面可以在压制期间变形,其形状与板外表面的形状相符。在一个示例性实施方案中,压制装置是人手指。在另一示例性实施方案中,压制装置具有由软塑料或橡胶制成的接触表面。

[1157] 自保持(在去除压制力后保持最终样品厚度)。在CROF压制的一些实施方案中,在样本在闭合构型下变形之后,移除一些压制力,并且样本保持与仍然存在压制力时相同的最终样品厚度。这种情况被称为“自保持”。自保持的一个原因是在去除对板对的外部施加的压制力之后,在板的内表面之间存在其它力,例如毛细管力,其将板对保持在一起。毛细管力来自于板上样品的润湿性质。

[1158] 为了具有自保持性,需要控制板表面润湿性质,样品与板的总接触面积,在闭合构型下的最终样品厚度或其组合。

[1159] 在一些实施方案中,为了实现自保持,板的一个或两个内表面是亲水的。即,任一板具有亲水的内表面或两个板具有亲水的内表面。

[1160] 毛细管力取决于液体表面的曲率半径,曲率越小,毛细管力越大。通过使用两个板(即板对)之间的较小间隔并因此获得较小的样本厚度,可以实现较小的曲率。在一些实施方案中,用于实现自保持的最终样品厚度为10nm或更小,100nm或更小,100nm或更小,500nm或更小,1 μ m(微米)或更小,2 μ m或更小,更小,5 μ m或更小,10 μ m或更小,20 μ m或更小,50 μ m或更小,70 μ m或更小,100 μ m或更小,150 μ m或更小,300 μ m或更小,500 μ m或更小,700 μ m或更小,1000 μ m或更小,1200 μ m或更小,或任何两个值之间的范围内。

[1161] 在一些实施方案中,为了自保持样品与的板的接触面积为至多10 μ m²,至多100 μ m²,至多200 μ m²,至多500 μ m²,至多1000 μ m²,至多2000 μ m²,最多5000 μ m²,最多8000 μ m²,最多0.01mm²,最多0.05mm²,最多0.1mm²,最多0.5mm²,最多1mm²,最多2mm²,最多10mm²,最多100mm²,最多500mm²,最多1,000mm²,最多2,000mm²,最多5,000mm²,最多10,000mm²,最多100,000mm²或任何两个值之间的范围。

[1162] 在一些实施方案中,板内表面的润湿性质中的一者或两者被修改以更好地自保持。

[1163] SH.1在一些实施方案中,在CROF过程中,使用装置来施加压制力以使板进入闭合构型,并且在达到闭合构型之后,去除由该装置产生的压制力,并且样品厚度和板的内表面

间隔保持为与去除装置压制力之前的内表面间隔大致相同。在一些实施方案中,在前一段的方法中,其还包括从板或板之间读取信号的步骤,其中信号包括但不限于与分析物,实体,标记,样品体积相关的信号,物质(即化学品)的浓度,或其任何组合。

[1164] 在段落SH.1的方法中,装置是人手,机械夹,机械压力机,机械夹具,机械滑动器,机械装置,电磁装置,在表面上滚动的辊,两个彼此相对的辊,流体压力机,液压装置或其任何组合。

[1165] 在段落SH.1的方法中,在一些实施方案中,“板的样本厚度和内表面间隔保持为去除装置压制力之前的样本厚度和内表面间隔大致相同”意味着样本厚度和板内表面间隔在除去压制力前后的相对差为0.001%以下,0.01%以下,0.1%以下;0.5%或更小,1%或更小,2%或更小,5%或更小,8%或更小,10%或更小,15%或更小,20%50%或更小,60%或更小,70%或更小,80%或更小,90%或更小,99.9%或更小,或任何这些值的两个之间的范围内。

[1166] 在段落SH.1的方法中,在一些实施方案中,在消除装置压制力之后板的样本厚度和内表面间隔关注是预定的,其中预定意味着在去除压制力之后的厚度和间隔是在对于给定的压制条件施加压制力之前已知的。

[1167] H1.一种用于减小样品的相关体量的厚度并保持被减小的厚度的方法,包括:

[1168] (a) 获得样品,其中所述样品的相关体量的厚度要被减小;

[1169] (b) 获得可相对于彼此移动成不同构型的两个板,其中所述板中的一个或两个包括间隔件,所述间隔件具有预定的间隔件距离和高度,并且每个所述间隔件固定于相应板上;

[1170] (c) 当所述两板配置成开放构型时,将所述样品被放置在所述板中的一个或两个上;其中所述开放构型是这样的构型,其中所述两个板部分地或完全地分开并且所述板之间的间隔不受所述间隔件调节;(d) 在(c)之后,通过使用压制装置是所述板进入闭合构型来铺展所述样品;其中,在所述闭合构型中:所述两板彼此面对;所述间隔件和所述样品的相关体量位于所述两板之间;样品的相关体量的厚度由板和间隔件调节,其比当板处于开放构型时样品的最大厚度薄,并且至少一个间隔件在样品内部;和

[1171] (e) 在(d)之后,释放所述装置,其中在释放所述压制装置之后,所述板之间的间隔保持与应用所述装置时的间隔相同或大致相同。

[1172] 其中所述相关体量是所述样品的全部体量的至少一部分。

[1173] 在段落H1的方法中,与板之间的间距大约相同是至多1%,至多2%,至多5%,至多10%,至多20%,至多50%,至多60%,至多70%,至多80%,至多90%或任意两个值之间的范围。

[1174] 例如,在CROF中,使用人手或双手将两个板压制到闭合构型,然后去除手并因此去除手的压制力,但是最终样本厚度仍然与存在手的压制力时相同。

[1175] 18其他组合

[1176] 在本发明中,本公开(即所有部分)中的每个实施方案可(a)单独使用,(b)与其它实施方案组合,(c)多次使用,和(d) (a)~(c)的任意组合。

[1177] 所公开的本发明中的方法和装置可以单独使用或以其任何组合使用。术语“QMAX”方法或设备是指这里描述的实施方案的方法或设备。

[1178] 在一些实施方案中，

[1179] 具体地说，我们使用Q指代第1和2部分中公开的发明，用A指代在第3和5部分中公开的发明，用X指代在第4和5中公开的发明和M指代第6节中公开的发明。因此，本公开的发明中的第1,2,3和5部分的方法和装置可以以Q,X,A,M,QX,QA,QM,XA,XM,AM,QXA,QAM,XAM,和QXAM分别表示。

[1180] 将Q,X,A和M施用于表面固定化测定法的一些实施方案包括：

[1181] a. 获得第一板，其中所述第一板表面具有至少一个具有已知深度和体积的孔，并且所述孔的底表面具有一个或多个能够固定样品中的目标实体的结合位点；

[1182] b. 将与所述孔体积大致相同的体积的样品被放置到所述孔中，其中所述样品包含所述目标实体，所述目标实体在所述样品中是可移动的，所述样品的形状是可变形的，并且所述样品仅覆盖所述孔的一部分（因此具有高于孔深的简单厚度）；

[1183] c. 获得盖板；

[1184] d. 将所述第一板面对所述盖板，其中所述样品在所述第一板和所述第二板的内表面之间；

[1185] e. 通过减小所述第一板和所述第二板的内表面之间的间距来减小所述样本厚度；和

[1186] f. 将样品以降低的样品厚度温育一段时间；

[1187] 这些方法的一种变形是将一个或多个上述步骤应用于96孔板或其它孔板。

[1188] 在第1,2,3和5部分中公开的本发明中的方法和装置可以单独使用或其任何组合使用。具体地说，我们使用Q指代第1和2部分中公开的发明，用A指代在第3和5部分中公开的发明，用X指代在第4和5中公开的发明和M指代第6节中公开的发明。因此，本公开的发明中的第1,2,3和5部分的方法和装置可以以Q,X,A,M,QX,QA,QM,XA,XM,AM,QXA,QAM,XAM,和QXAM分别表示。

[1189] 将Q,X,A和M施用于表面固定化测定法的一些实施方案包括：

[1190] a. 获得第一板，其中所述第一板表面具有至少一个具有已知深度和体积的孔，并且所述孔的底表面具有一个或多个能够固定样品中的目标实体的结合位点；

[1191] b. 将与所述孔体积大致相同的体积的样品被放置到所述孔中，其中所述样品包含所述目标实体，所述目标实体在所述样品中是可移动的，所述样品的形状是可变形的，并且所述样品仅覆盖所述孔的一部分（因此具有高于孔深的简单厚度）；

[1192] c. 获得盖板；

[1193] d. 将所述第一板面对所述盖板，其中所述样品在所述第一板和所述第二板的内表面之间；

[1194] e. 通过减小所述第一板和所述第二板的内表面之间的间距来减小所述样本厚度；和

[1195] f. 将样品以降低的样品厚度温育一段时间；

[1196] 这些方法的一种变化是将一个或多个上述步骤应用于96孔板或其它孔板。

[1197] 所述方法，装置和系统的若干实施方案组合了样本体积量化(Q)，试剂添加(A)和/或试验加速度(X)的一个或多个特征（并且可以被称为相应的首字母缩写词QA,QX,AX和QAX）。下面描述Q,A,X,QA,QX,AX和QAX方法和装置的一些实验演示。

[1198] 19试剂

[1199] 除非另有说明,术语“试剂”是指一种或多种生物试剂,生化试剂和/或化学试剂。例如,试剂可包括捕获剂,检测剂,化学化合物,光学标记,放射性标记,酶,抗体,蛋白质,核酸,DNA,RNA,脂质,碳水化合物,盐,金属,表面活性剂,溶剂或其任何组合。

[1200] 在一些实施方案中,板上的试剂为液体,固体,分子蒸气或其任何组合的形式。试剂的被放置包括但不限于被放置,放置,印刷,冲压,液体分装,蒸发(热蒸发,蒸汽蒸发,人呼气),化学气相被放置和/或溅射。不同的试剂可以被被放置在不同的位置。试剂可以作为小试剂点被印刷和/或被放置。

[1201] 在一些实施方案中,试剂首先以液体或蒸气形式被放置在板上,然后在CROF过程之前在板上干燥成为干试剂。

[1202] 控制试剂释放时间。A-方法可以进一步包括控制试剂释放时间(即描述试剂可以在样品中溶解有多快的时间长度)的步骤。控制试剂的释放时间的一些实施方案包括在顶部混合或涂覆一种试剂或多种“释放控制材料”的步骤。在一些实施方案中,释放控制材料可以是另一种试剂,例如,存在两种试剂A和B(一种或多种),其中一种或多种“释放控制材料”影响试剂的释放,在试剂B的顶部涂覆试剂A,在某些条件下,试剂A将在试剂B之前溶解到样品中。

[1203] 此外,第一板和第二板的表面性质可用于控制试剂释放。一个实例是控制表面润湿性能。对于许多试剂,疏水表面可以很好地结合试剂,因此导致试剂缓慢释放或不被释放到样品中(取决于试剂层的厚度),而亲水表面很难结合试剂,因此导致试剂被快速释放进入样品。

[1204] 用于本发明的试剂可以是测定法所需的任何合适的试剂,例如已标记或未标记的抗体,已标记或未标记的核酸,含有或不含有亲和部分的酶等。在一些实施方案中,如上所述,所存储的试剂可以是设计用于测试血液或其他液体样品中是否存在分析物的测定的组分。例如,可以通过任何以下方案测量氯离子,并且这些测定法的组分可以存在于存储位点中:比色法:氯离子从硫氰酸汞中置换硫氰酸盐。游离硫氰酸盐与铁离子反应以形成有色络合物-硫氰酸铁,其通过光度测量法测量。电量法:在银电极之间通过恒定的直流电流产生银离子,其与氯反应,形成氯化银。在所有氯化物与银离子结合之后,游离的银离子累积,导致跨电极的电流增加并指示反应的终点。测定方法:用标准的汞离子溶液滴定氯化物,并形成 HgCl_2 可溶性复合物。当过量的汞离子与指示剂染料二苯基吡唑结合以形成蓝色时,用比色法检测反应的终点。同样地,镁可以使用calagite测量比色法,其在与镁反应时变成红-紫色;通过甲臞染料试验;在与镁反应时使用600nm发射,或使用与镁结合以形成蓝色络合物的甲基百里酚蓝。同样,可以通过使用O-甲酚酞的比色技术检测钙,其在O-甲酚酞蛋白与钙反应时变成紫色。同样,碳酸氢盐驾驶室测试双色,因为碳酸氢盐(HCO_3)和磷酸烯醇丙酮酸(PEP)在磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(PEPC)催化的反应转换为草酰乙酸和磷酸盐。苹果酸脱氢酶(MD)催化草酰乙酸还原成苹果酸,伴随还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的氧化。NADH的这种氧化导致在380/410nm处测量的与样品的碳酸氢盐含量成比例的反应混合物的吸光度降低。血尿素氮可以在比色测试中检测,其中二乙酰或恐惧用尿素产生黄色色原体,并且可以通过光度法或多重使用尿素酶进行定量,尿素酶将尿素转化为氨和碳酸,例如i)当氨与d-酮戊二酸反应时在340nm处的吸光度降低,ii)测量其中尿素水解的溶液的电导率

的增加速率。。同样地,可以通过比色法测量肌酸酐,通过用碱性苦味酸盐溶液处理样品以产生红色络合物。此外,肌酸可以使用非Jaffe反应测量,其测量当肌酸酐被肌酐亚氨基水解酶水解时产生的氨。葡萄糖可以在测定中测量,其中血液暴露于固定量的葡萄糖氧化酶有限的时间段以估计浓度。在规定时间后,除去过量的血液,并允许显色,其用于估计葡萄糖浓度。例如,葡萄糖氧化酶与葡萄糖的反应形成新生氧,其将碘化钾(在滤纸中)转化为碘,形成棕色。糖化血红蛋白的浓度作为血液中葡萄糖水平的间接读取。当红细胞的溶血产物层析时,称为血红蛋白A1a,A1b和A1c的三个或更多个小峰在主血红蛋白A峰之前洗脱。这些“快速”血红蛋白是通过在两步反应中葡萄糖不可逆地附着于血红蛋白而形成的。己糖激酶可以在其中葡萄糖在三磷酸腺苷(ATP)和镁离子的存在下被己糖激酶(HK)磷酸化以产生葡萄糖-6-磷酸和二磷酸腺苷(ADP)的测定中测量。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6P-DH)特异性地将葡萄糖-6-磷酸氧化成葡萄糖酸-6-磷酸,同时将NAD⁺还原成NADH。在340nm处的吸光度的增加与样品中的葡萄糖浓度成比例。HDL,LDL,甘油三酯可以使用Abell-Kendall方案测量,该方案涉及在水解和提取胆固醇之后在620nm下用Liebermann-Burchard试剂(乙酸酐,冰醋酸和浓硫酸的混合试剂)显色。荧光分析可用于确定甘油三酯参考值。在通过肝素氯化锰在全血浆(LDL和VLDL)中沉淀包含蛋白B的脂蛋白后,通过用于血浆总胆固醇的相同程序测量血浆高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定。这些化合物也可以在基于定量胆固醇酯和游离胆固醇的酶驱动反应的测定中通过比色法检测。胆固醇酯通过胆固醇酯酶水解成胆固醇,然后胆固醇被胆固醇氧化酶氧化成酮胆固醇-4-烯-3-酮加上过氧化氢。然后用高度特异性的比色探针检测过氧化氢。辣根过氧化物酶催化探针和过氧化氢之间的反应,其以1:1的比例结合。样品可以与已知浓度的胆固醇标准品进行比较。

[1205] 试剂干燥。在一些实施方案中,在试剂被放置步骤(c)之后但在样品被放置步骤(d)之前,A-方法还包括干燥步骤(c)中被放置的一些或全部试剂的步骤。

[1206] 试剂位置。试剂可以施加和/或布置在一个或两个板上。试剂可以在板上的存储位点(位置),每个存储位点包括一种或多种试剂。不同的存储位点可以包括不同的试剂,相同的试剂或一种或多种共同的试剂。

[1207] 添加试剂的控制浓度。在一些实施方案中,所述方法还可包括通过控制存储位点(即,具有试剂的表面)上的样品厚度来控制所添加的试剂的浓度的步骤。

[1208] 数据处理。

[1209] 在某些实施方案中,主体装置被配置为处理读取CROF装置时导出的数据。该装置可以以任何合适的方式配置以处理用于主题方法中的数据。在某些实施方案中,该装置具有存储数据和/或存储用于处理数据和/或存储数据库的指令的存储位置。数据可以以任何合适的格式存储在存储器中。

[1210] 在某些实施方案中,该装置具有处理数据的处理器。在某些实施方案中,用于处理数据的指令可以存储在处理器中,或者可以存储在单独的存储器位置。在一些实施方案中,该装置可以包含实现处理的软件。

[1211] 在某些实施方案中,被配置为处理从CROF装置获取的数据的装置包含用于执行处理的软件实现的方法。软件实现的方法可以包括以下中的一个或多个:图像获取算法;图像处理算法;促进用户和计算设备之间的交互并用作数据采集,传输和分析,通信协议的手段的用户界面方法;和数据处理算法。在某些实施方案中,图像处理算法包括以下中的一个或

多个:粒子计数,LUT(查找表)滤波器,粒子滤波器,模式识别,形态学确定,直方图,线轮廓,地形表示,二进制转换或颜色匹配配置文件。

[1212] 在某些实施方案中,该装置被配置为当保存在该装置的存储器中的软件解释显示显示页面时在视频显示器或触摸屏显示器上显示信息。这里描述的显示页面可以使用任何合适的软件语言来创建,例如超文本标记语言(“HTML”),动态超文本标记语言(“DHTML”),可扩展超文本标记语言(“XHTML”),可扩展标记语言(“XML”)或可用于创建可由用户感知的方式在视频或其他显示器上显示的计算机文件的另一软件语言。具有逻辑,代码,数据,指令的任何计算机可读介质可以用于实现任何软件或步骤或方法。在网络包括因特网的情况下,显示页面可以包括适当类型的网页。

[1213] 根据本发明的显示页面可以包括嵌入的功能,包括存储在存储器设备上的软件程序,例如VBScript例程,Jscript例程,JavaScript例程,Java小程序,ActiveX组件,ASP.NET,AJAX,Flash小程序,Silverlight applet或AIR例程。

[1214] 显示页面可以包括图形用户界面技术的公知特征,诸如例如框架,窗口,滚动条,按钮,图标和超链接,以及公知的特征,诸如“点和点击”界面或触摸屏接口。指向并点击图形用户界面按钮,图标,菜单选项或超链接也称为“选择”按钮,选项或超链接。根据本发明的显示页面还可以结合多媒体特征,多触摸,像素感测,基于IR LED的表面,具有或不具有照相机的基于视觉的交互。

[1215] 用户界面可以显示在视频显示器和/或显示页面上。用户界面可以显示基于与样品相关的分析数据生成的报告,如下面进一步描述的。

[1216] 处理器可以被配置为以用于主题方法中的任何合适的方式处理数据。将数据处理为例如合并数据,变换数据(例如,通过傅立叶变换变换到频域的时域数据),或者可以与其他数据组合。该处理可以将数据置于期望的形式,并且可以涉及修改数据的格式。处理可以包括检测来自样品的信号,基于对用于检查样品的装置或试剂特异性的数学操纵或校正和/或校准来校正原始数据;计算值,例如浓度值,比较(例如,与基线,阈值,标准曲线,历史数据或来自其它传感器的数据),确定测试是否准确,突出显示值或结果是异常值或可能是引起关注的原因(例如,高于或低于正常或可接受的范围或指示异常状况)或结合的组合,其一起可指示存在异常条件,曲线拟合,使用数据作为数学或其他分析推理(包括演绎,归纳,贝叶斯或其他推理)和其他合适形式的处理的基础。在某些实施方案中,处理可以涉及将处理的数据与存储在设备中的数据库进行比较,以检索由对象执行的动作过程的指令。

[1217] 在某些实施方案中,该装置可以被配置为通过将输入数据与存储在存储器中的数据库进行比较来处理输入数据,以检索针对由对象执行的动作过程的指令。在一些实施方案中,数据库可以包含存储的信息,其包括感兴趣的分析物的阈值。阈值可用于确定一种或多种分析物的存在或浓度。阈值可以用于检测警报可能有用的情况。数据存储单元可以包括可用于生成与样本有关的报告的记录或其他信息。

[1218] 在某些实施方案中,该装置可以被配置为接收从CROF装置导出的数据。因此,在某些情况下,该装置可以被配置为接收与由受试者提供的样品不相关但仍可能与诊断相关的数据。这样的数据包括但不限于年龄,性别,身高,体重,个体和/或家族病史等。在某些实施方案中,该装置被配置为处理从应用于CROF的样品衍生的或独立于样品的数据设备。

[1219] 20包装

[1220] 本发明的另一方面涉及包装,其将延长所用试剂的寿命并且便于使用。

[1221] 在一些实施方案中,将具有或不具有试剂的CROF中的板置于包装内,每个包装装一个板或每个包装装多于一个板。在一个实施方案中,第一板和第二板在使用前封装在不同的包装中。在一些实施方案中,不同的测定共享共同的第一板或共同的第二板。

[1222] 在一些实施方案中,每个包装被密封。在一些实施方案中,密封包装用于防止来自包装外部的空气,化学品,水分,污染物或它们的任何组合进入包装内部。在一些实施方案中,密封包装是被真空密封或填充有氮气或内部气体。在一些实施方案中,可以将可延长板和/或试剂(包括捕获剂,检测剂等)的保存期限的材料包装在装有板的包装内。

[1223] 在一些实施方案中,包装材料是薄层形式,使得包装可以通过人手容易地撕开。

[1224] 21使用信号放大表面的均相测定

[1225] 在测定的许多应用中,特别是在PoC或其它快速测定中,期望避免洗脱步骤。本发明的一个方面涉及可以避免测定的洗脱的装置,系统和方法。

[1226] 通过结合和/或使用信号放大表面,所公开的装置,系统和方法可以促进在不洗脱的情况下进行测定。放大表面可以仅放大距离表面很小距离(例如20nm,或50nm,或100nm)发射的光。表面放大层的一个实例是D2PA。

[1227] 可以采信以下权利要求特别指出了针对所公开的发明之一并且新颖且不明显的某些组合和子组合。以特征,功能,元件和/或特性的其他组合和子组合体现的发明可以通过修改本权利要求或在本申请或相关申请中提出新的权利要求来主张。无论这些修改或新的权利要求是针对不同的发明还是针对相同的发明,与原始权利要求的范围不同,更宽,更窄或相等,也被认为包括在发明的主题内本公开。

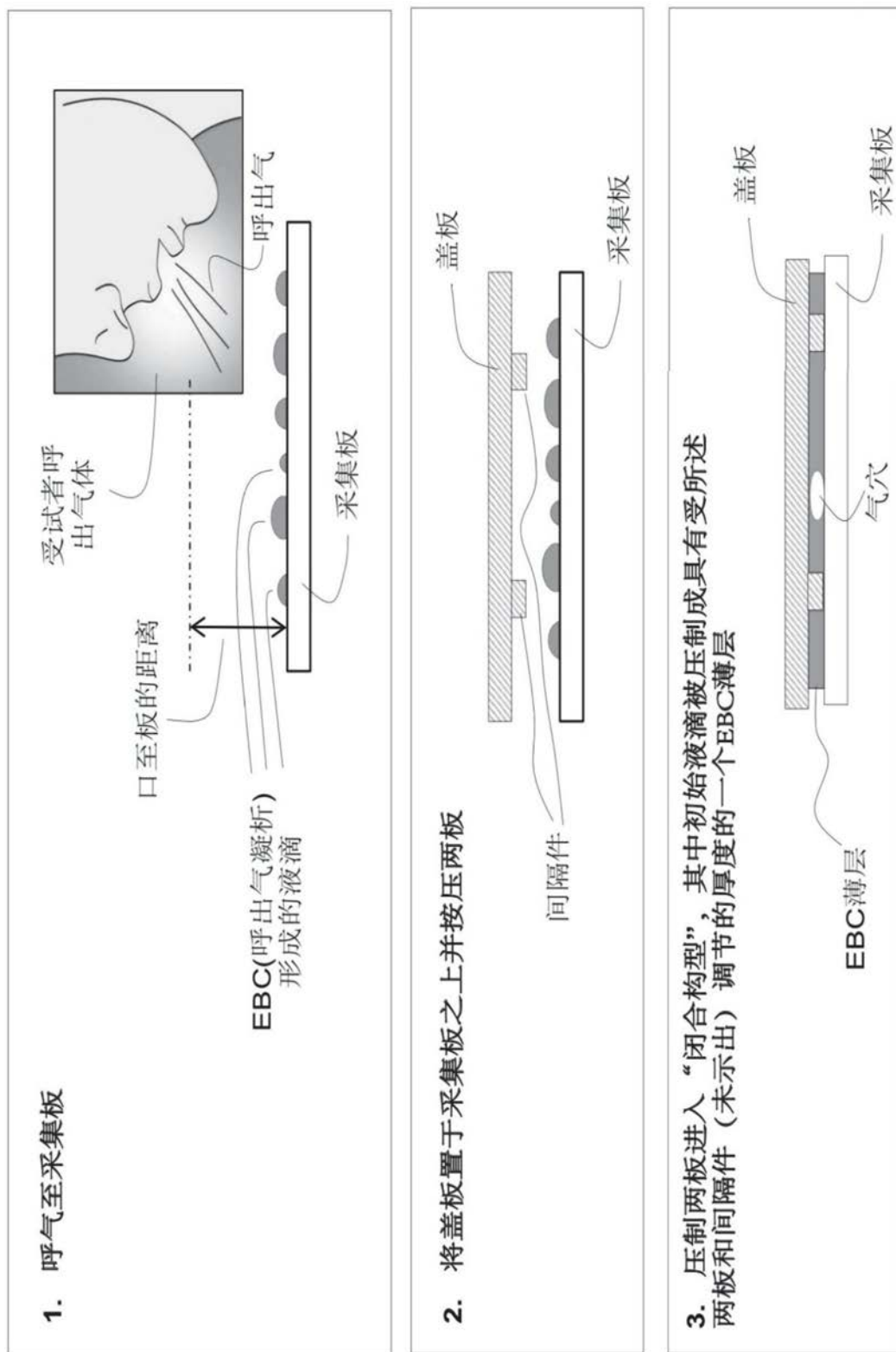


图1.使用SiEBCA(单滴EBC采集器/分析器)采集呼出气凝析(EBC)的示例性装置和方法

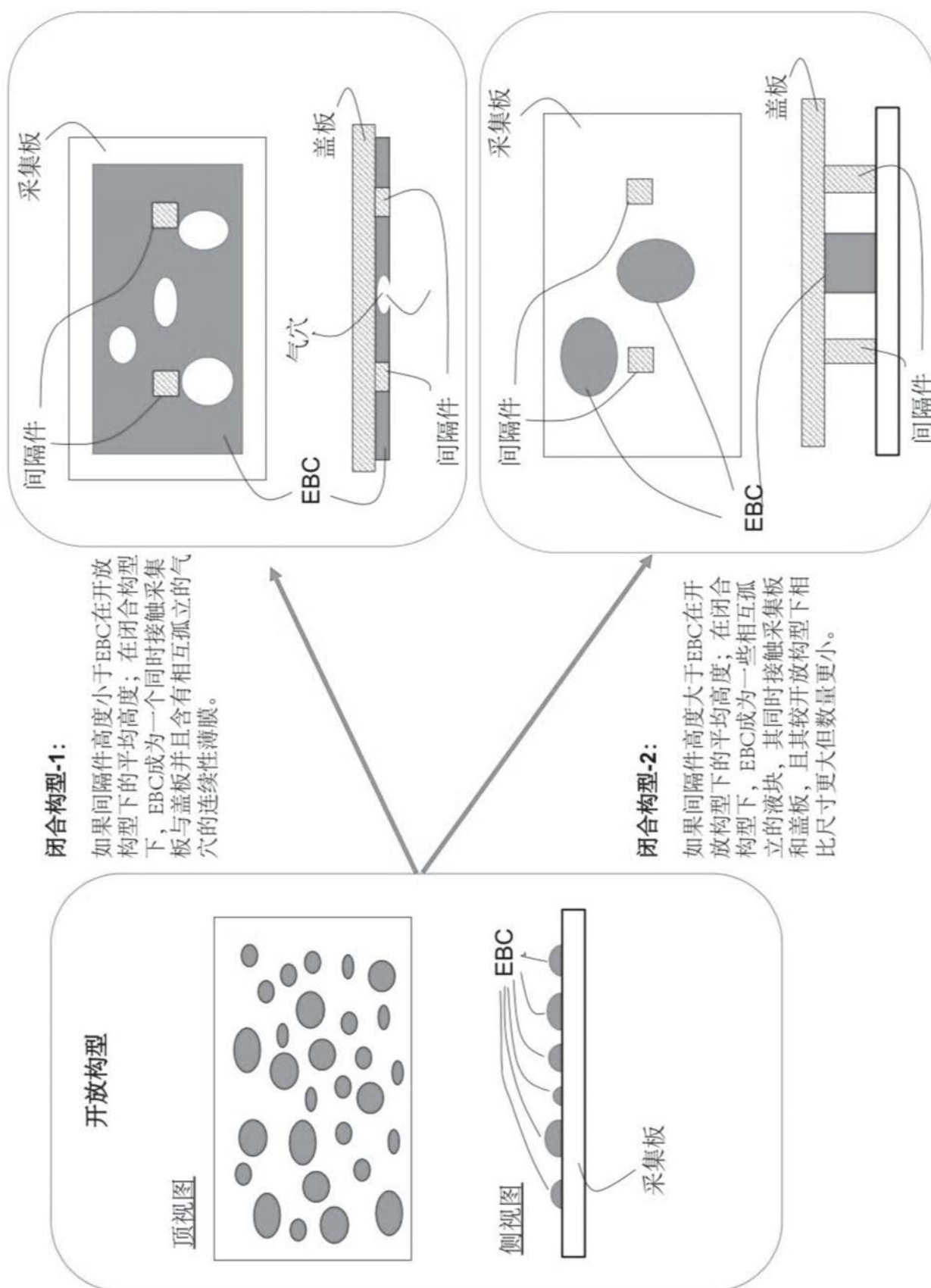
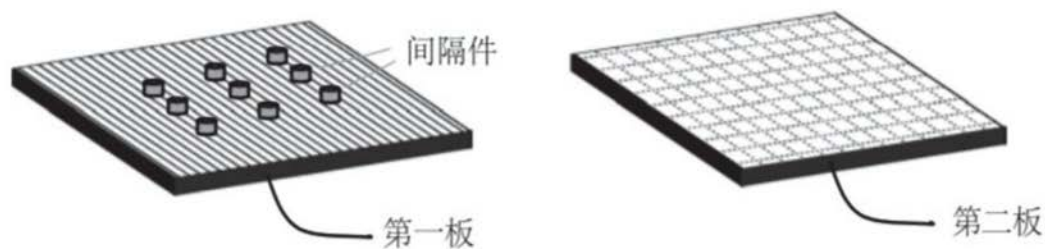
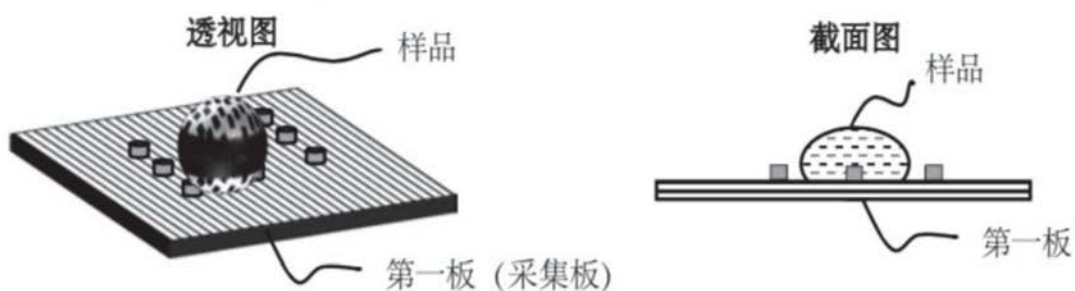


图2. 在SiEBCA的闭合构型中EBC基于不同间隔件高度的不同形态

(a) 获得一个第一板和一个第二板，其中一个或两个板包含间隔件（这里示出：仅所述第一板包含间隔件）



(b) 在开放构型下，沉积样品（仅诸多EBC液滴中的一个在此示出）于第一板（示出），第二板（未示出），或两板（未示出）



(c) (i) 使用两板铺展所述样品（样品在两板间流动）并且降低样品厚度，且(ii) 在闭合构型下使用间隔物和两板调节样品厚度

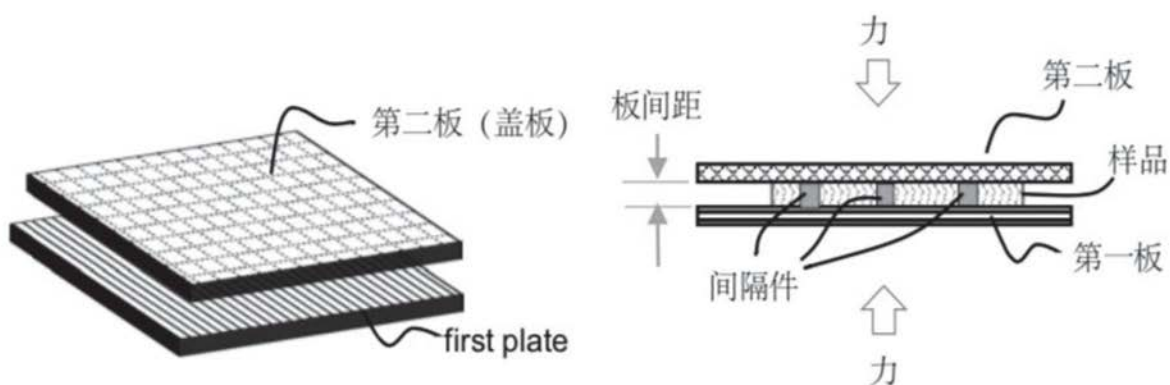


图3.SiEBCA(单滴EBC采集/分析器)的一个具体实施方案

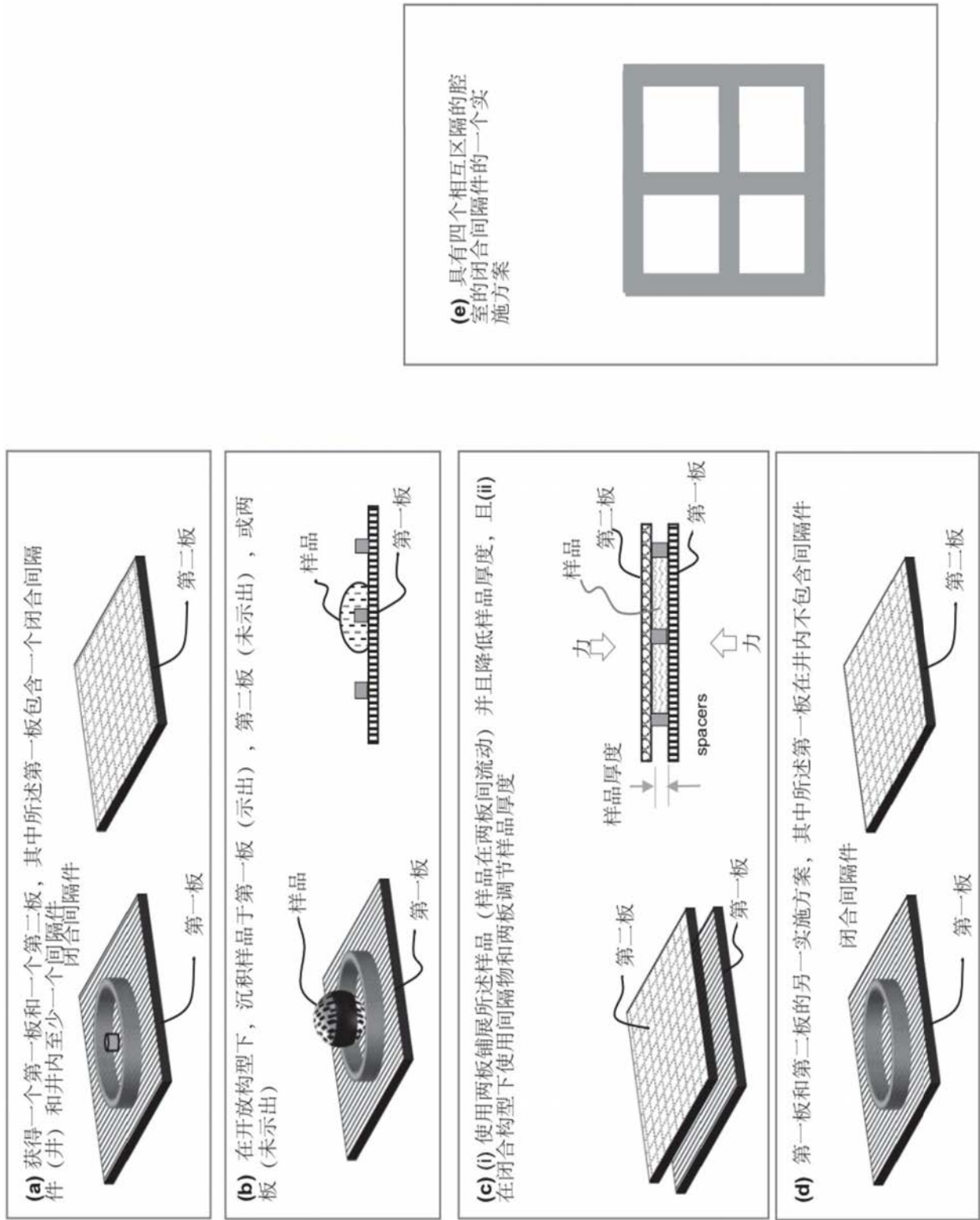


图4

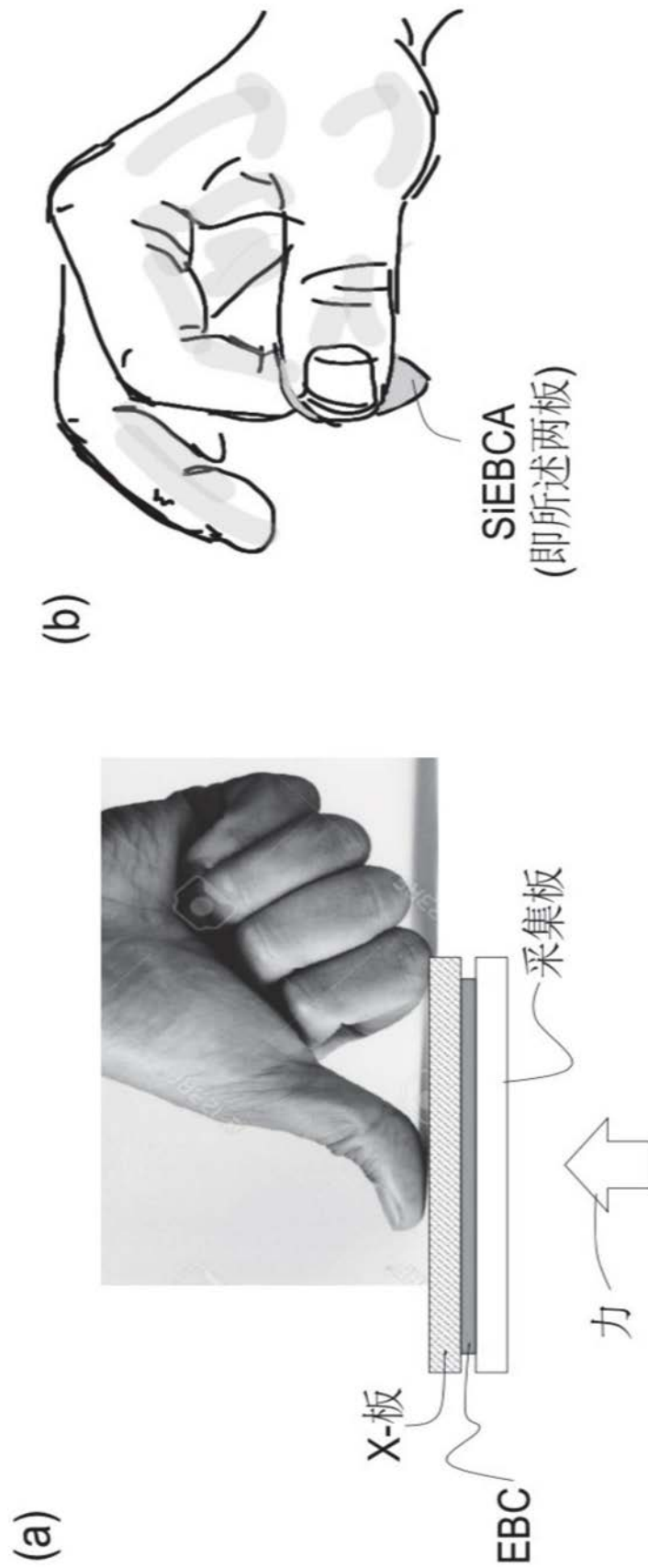


图5.人手按压SiEBCA板的方法

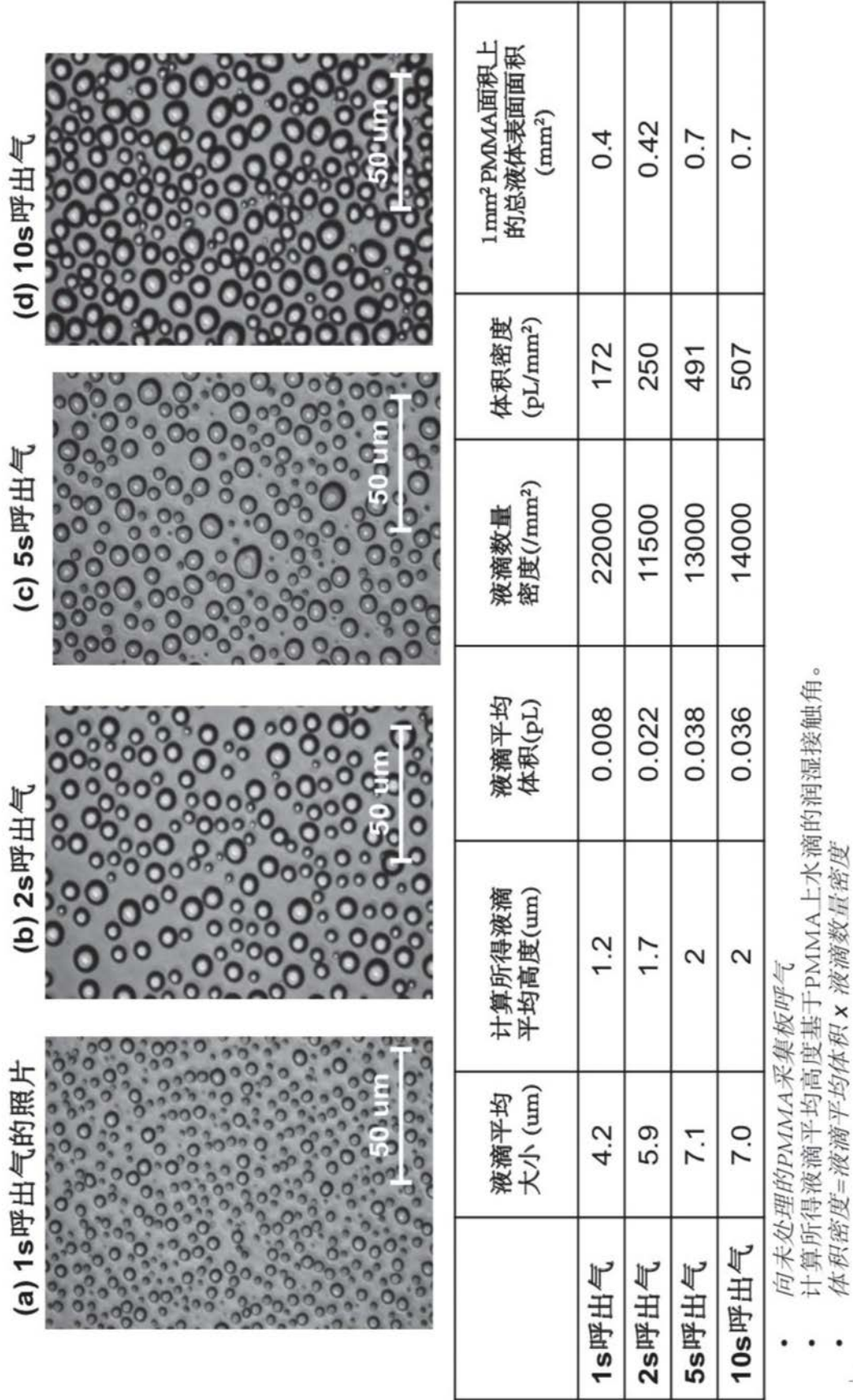


图6. 在“开放构型”下 (未处理PMMA材料) 采集板上EBC液滴大小和密度的实验数据

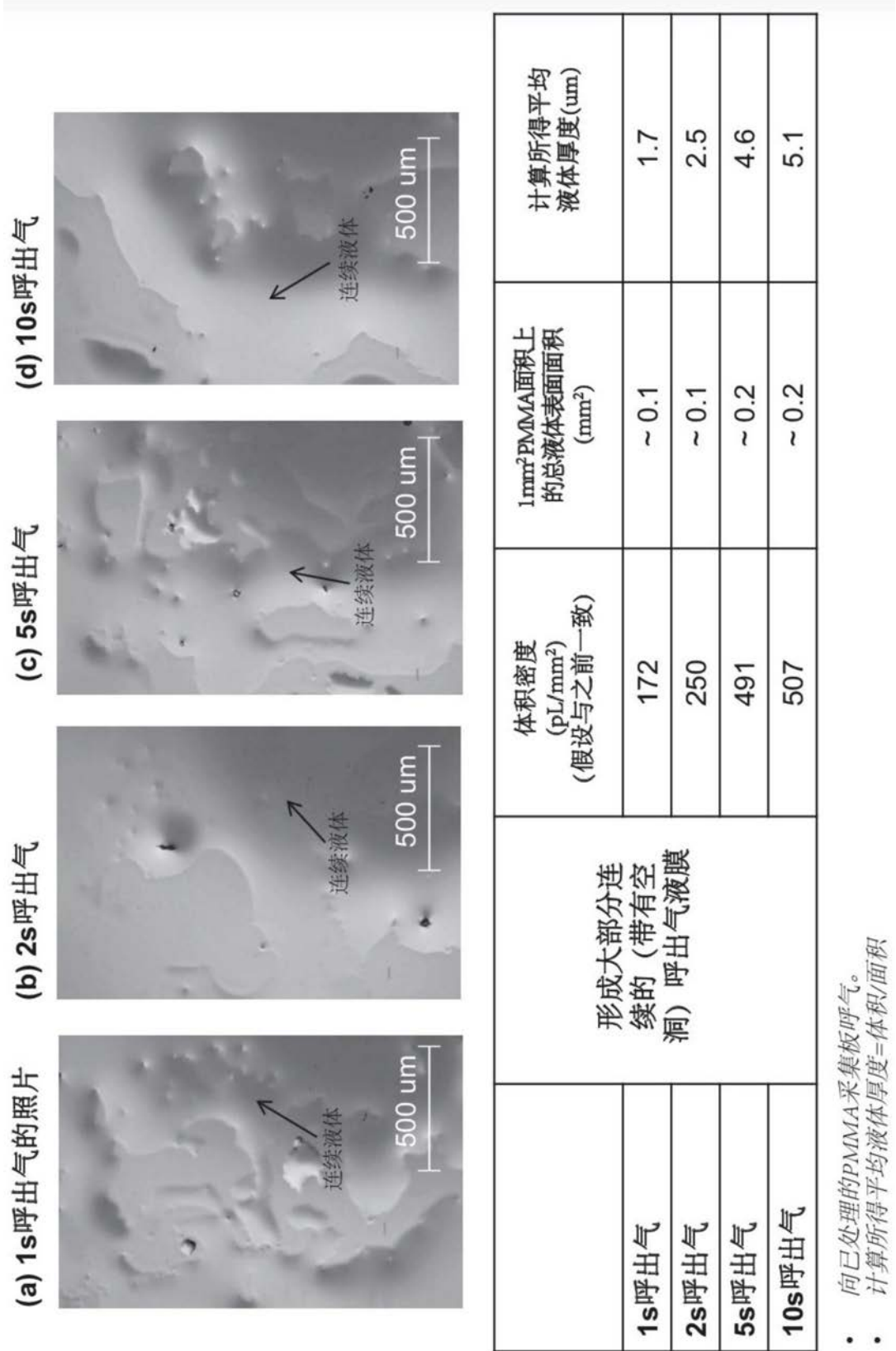
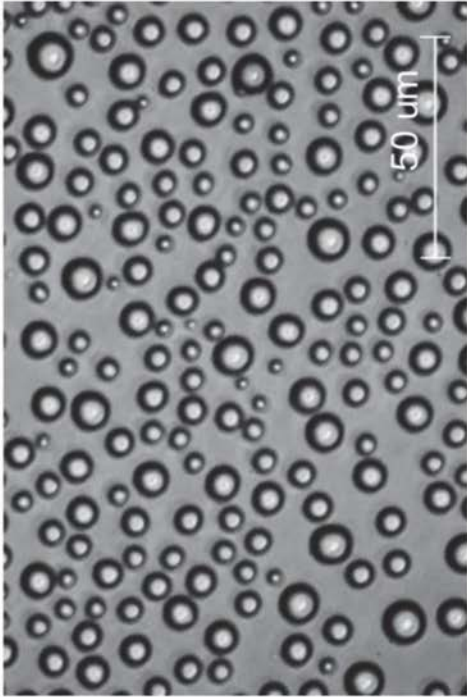


图7. 在开放构型下 (已处理的PMMA材料) 采集板上的EBC液滴大小和密度的实验数据

(b) 已处理的PMMA上的2s呼气

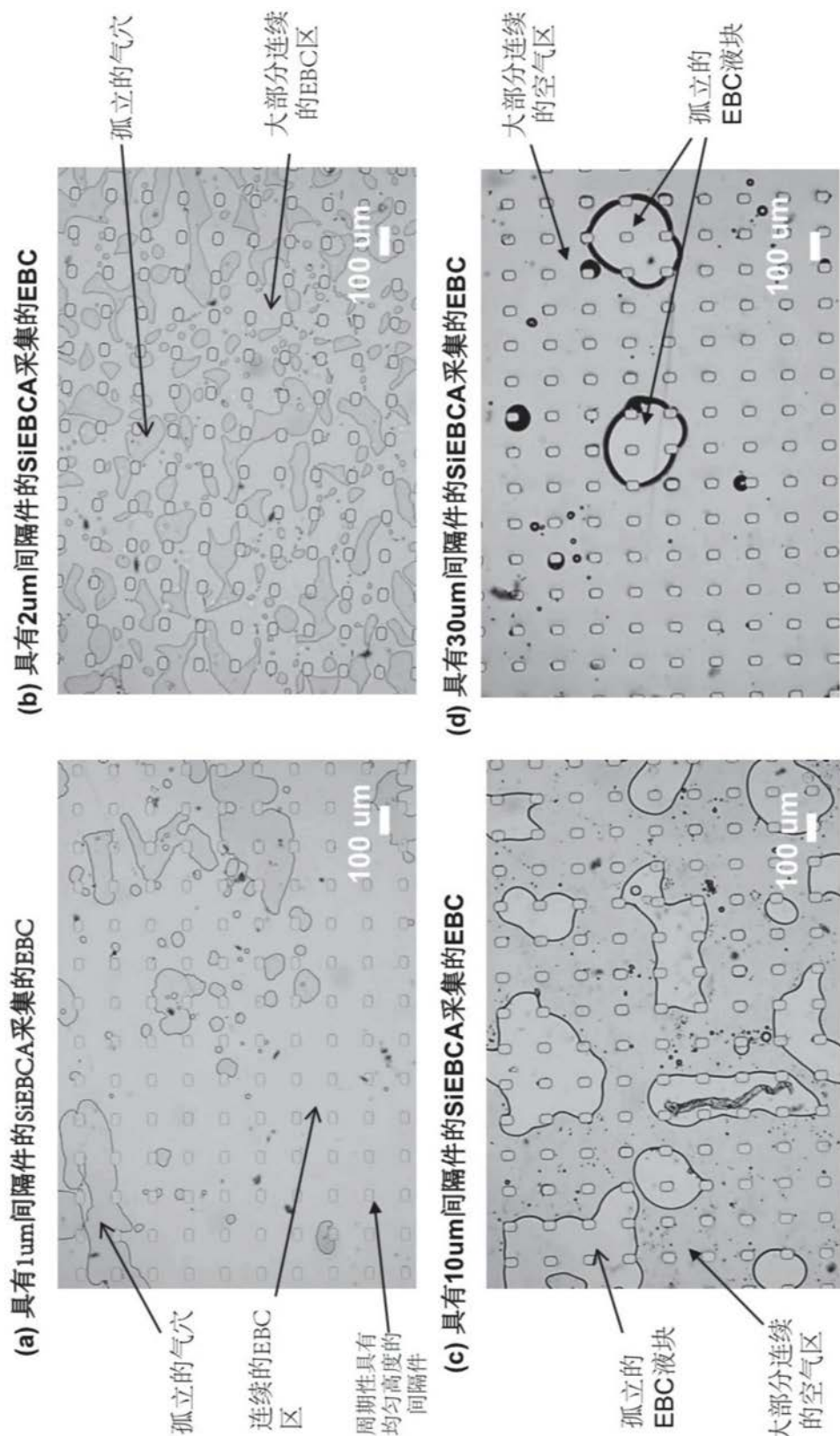


(a) 未处理的PMMA上的2s呼气



2s呼气	呼气状态	1 mm ² 采集面积上的 计算所得液体 表面积(mm ²)	25 mm x 25 mm PMMA上EBC的实 验所得总蒸发时间
未处理的PMMA	液滴	0.42	7 s
已处理的PMMA	连续膜	~ 0.1	30 s

图8.在板开放构型下,采集在未处理和已处理的PMMA板上的EBC(被试2s呼气所得)的测得蒸发时间和照片



观察结果: 1. 具有1μm间距X-板的SiEBCA具有更大的连续的呼出气液体面积。2. 大间距(10μm, 30μm) X-板具有更小的呼出气液体面积。

图9. 在板开放构型下, 被试分别呼气2s, 采集在未处理和已处理的PMMA板上的EBC的测得蒸发时间和照片

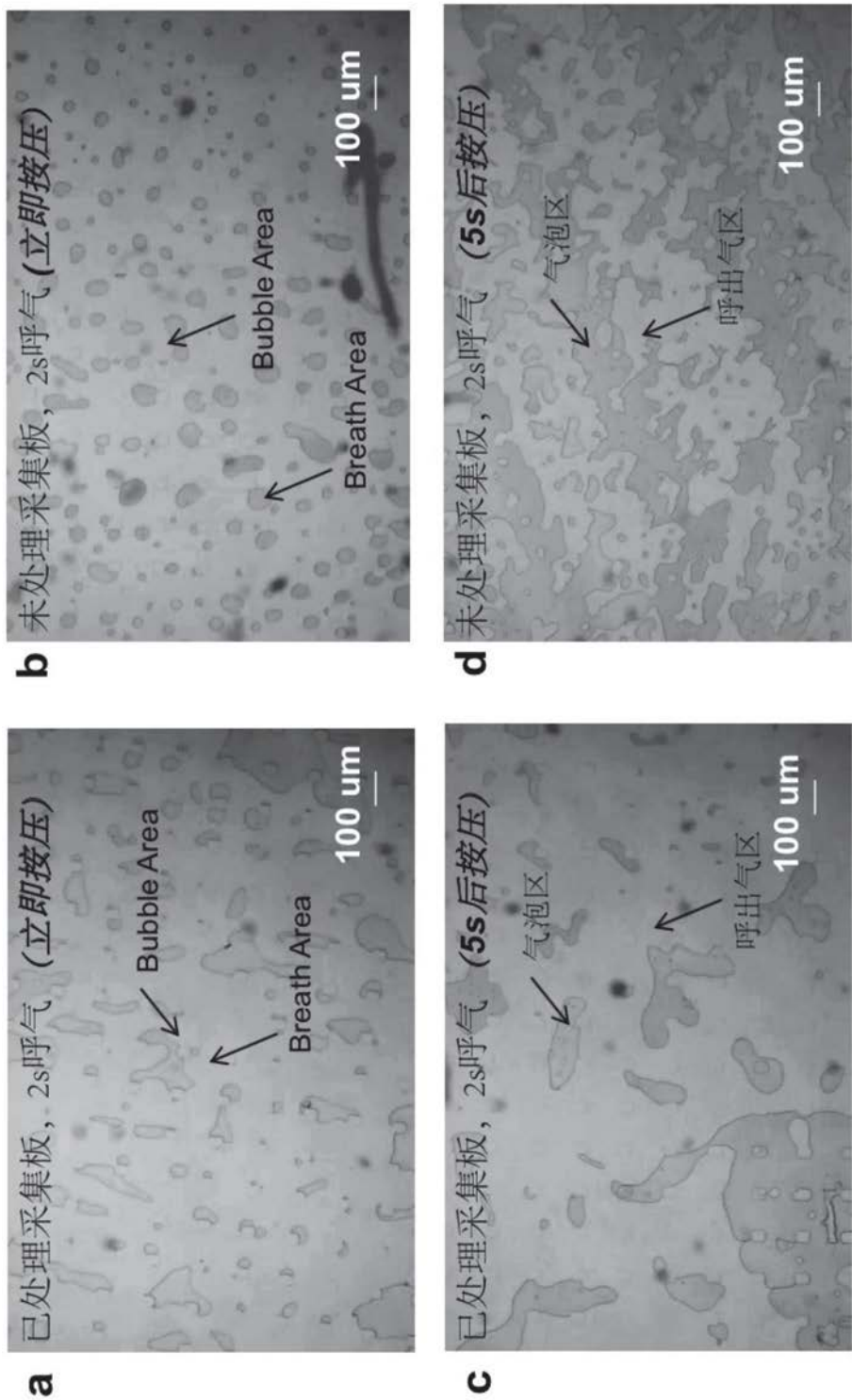
- 向采集板 (玻璃 25mm x 25mm x 1mm) 上呼气(2s)
- X-板参数:

材料	厚度(um)	柱子大小 (W x L) (um)	柱子间距(um)	比例(柱子间 距离/宽度)
PMMA	175	30 x 38	80 / 82	2.7 / 2.2

X-装置表现 (在2 cm X 2 cm 面积上测量)								
	x-板	呼出气 液体 状态	25 mm x 25 mm 采集板上液体 面积(mm ²)	(液体面积) 比 (总面 积-间隔件 面积)	液体厚度 (um)	采集得 液体体 积(uL)	液体厚度 与柱子高 度偏差	液体厚度 均匀性
1	1 um	连续	546	87%	1.05	0.57	5.0%	4.4%
2	2 um	连续	196	31%	2.38	0.47	19%	12%
3	10 um	孤岛	31	5%	13.7	0.42	37%	29%
4	30 um	孤岛	9	1%	45	0.41	50 %	35%

1. 1 um 间距X-装置可以采集具有良好间距均匀性的最大量的呼出气液体。
2. 具有大于1um间距的X-装置采集较少的呼出气液体且难以较好地自保持，因此具有更差地间距偏差和均匀性。

图10.对于利用间隔件高度分别为1um,2um,10um,和30um的SiEBCA采集的EBC实验数据



1. 使用已处理（润湿的）PMMA采集板，可以在“立即按压”和“5s后按压”两种情况下采集更多的呼出气。

图11. 利用已处理和未处理的PMMA采集板所得呼出气的照片

- 向采集板 (PMMA25mm x 25mm x 1mm) 上呼气2s
- X-板参数:

材料	厚度(um)	柱子大小 (W x L) (um)	柱子间距离(um)	柱子高度 (um)	比例(宽度/高度)	比例(柱子间距离/宽度)
PMMA	175	30 x 38	80 / 82	1	30 / 38	2.7 / 2.2

X-装置表现 (在2 cm X 2 cm 面积上测量)						
	采集板	表面处理	按压前等待时间	25 mm x 25 mm 采集板上液体面积(mm²)		
				(液体面积)比 (总面积-间隔件面积)	液体厚度 (um)	采集得液体体积(uL)
1	已处理	立即	405	65%	1.03	0.42
2	已处理	5s后	366	59%	1.07	0.39
3	未处理	立即	370	59%	1.05	0.39
4	未处理	5s后	138	30%	1.52	0.21
					液体厚度与柱子高度偏差	液体厚度均匀性
					3.3%	4.7%
					7.4%	6.4%
					5.2%	5.7%
					52 %	22%

1. 相比于未处理PMMA采集板，已处理（润湿的）PMMA采集板在“立即按压”和“5s后按压”两种情况下采集更多的呼出气。
2. 使用未处理采集板（较低的亲水性），在5s等待时间的情况下，将近一般的液体被蒸发。

图12. (a) 已处理或未处理PMMA采集板和 (b) 合上盖板的时间延迟对于呼出气采集的影响的实验数据

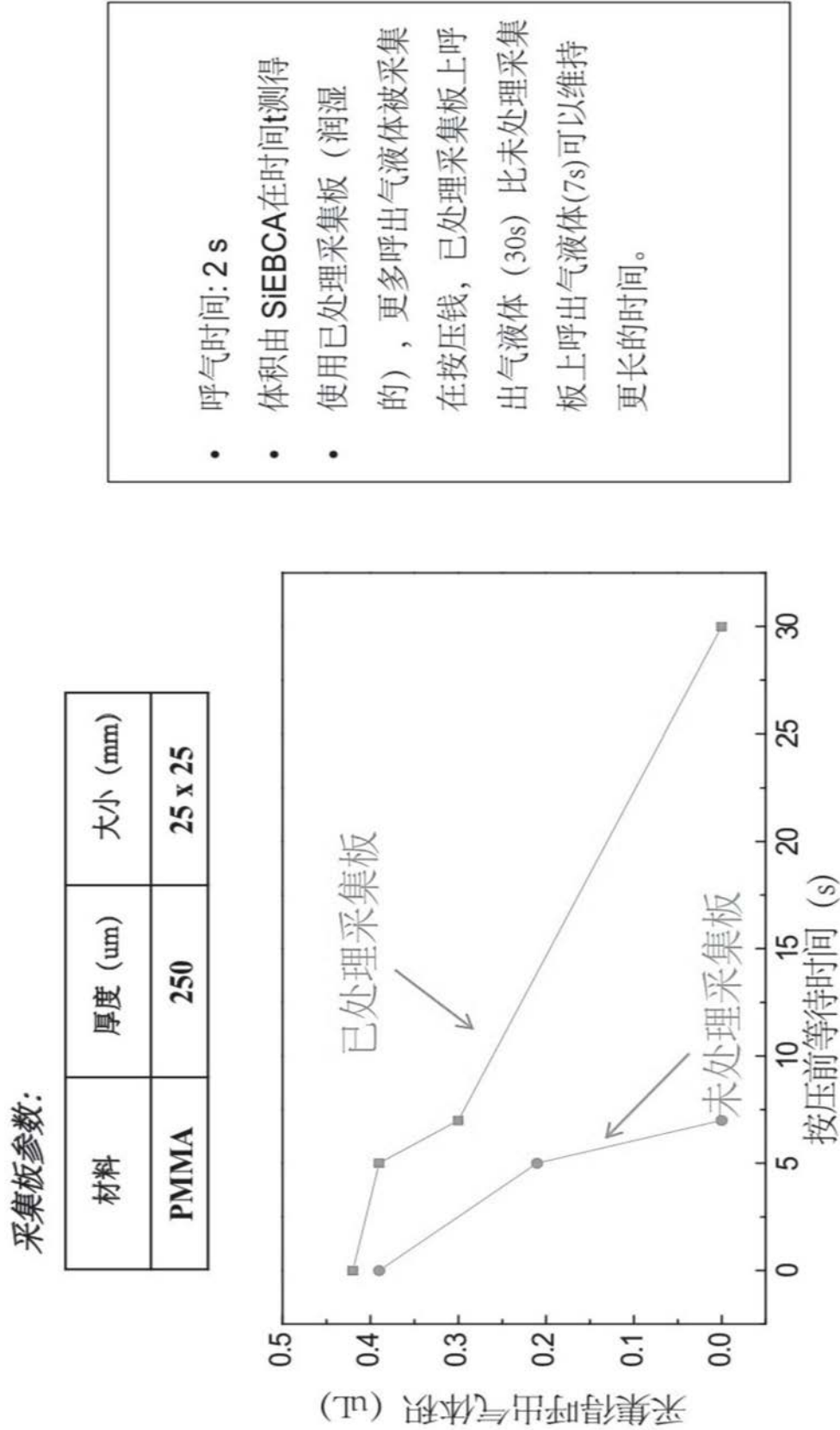


图13.采用已处理采集板和未处理采集板采集所得的呼出气的体积vs.时间延迟的实验数据 (按压前等待不同的时间)

- 向采集板 (PMMA25mm x 25mm x 250um) 上呼气2s
- X-板(25mm x 25mm x 175um)参数:

材料	厚度(um)	柱子大小(W x L) (um)	柱子间距离(um)	比例(宽度/高度)	比例(柱子间距 离/宽度)
PMMA	175	30 x 38	80 / 82	30 / 38	2.7 / 2.2

观察得SiEBCA内EBC干涸时间

采集板	X-板		干涸时间 (min)	平均干涸速度(mm ² / min)
	高度(um)			
已处理	1		70	8.9
已处理	10		45	13.9
未处理	1		40	15.6
未处理	10		10	62.5

图14.采用SiEBCA在闭合构型下采集的EBC干涸时间的实验数据

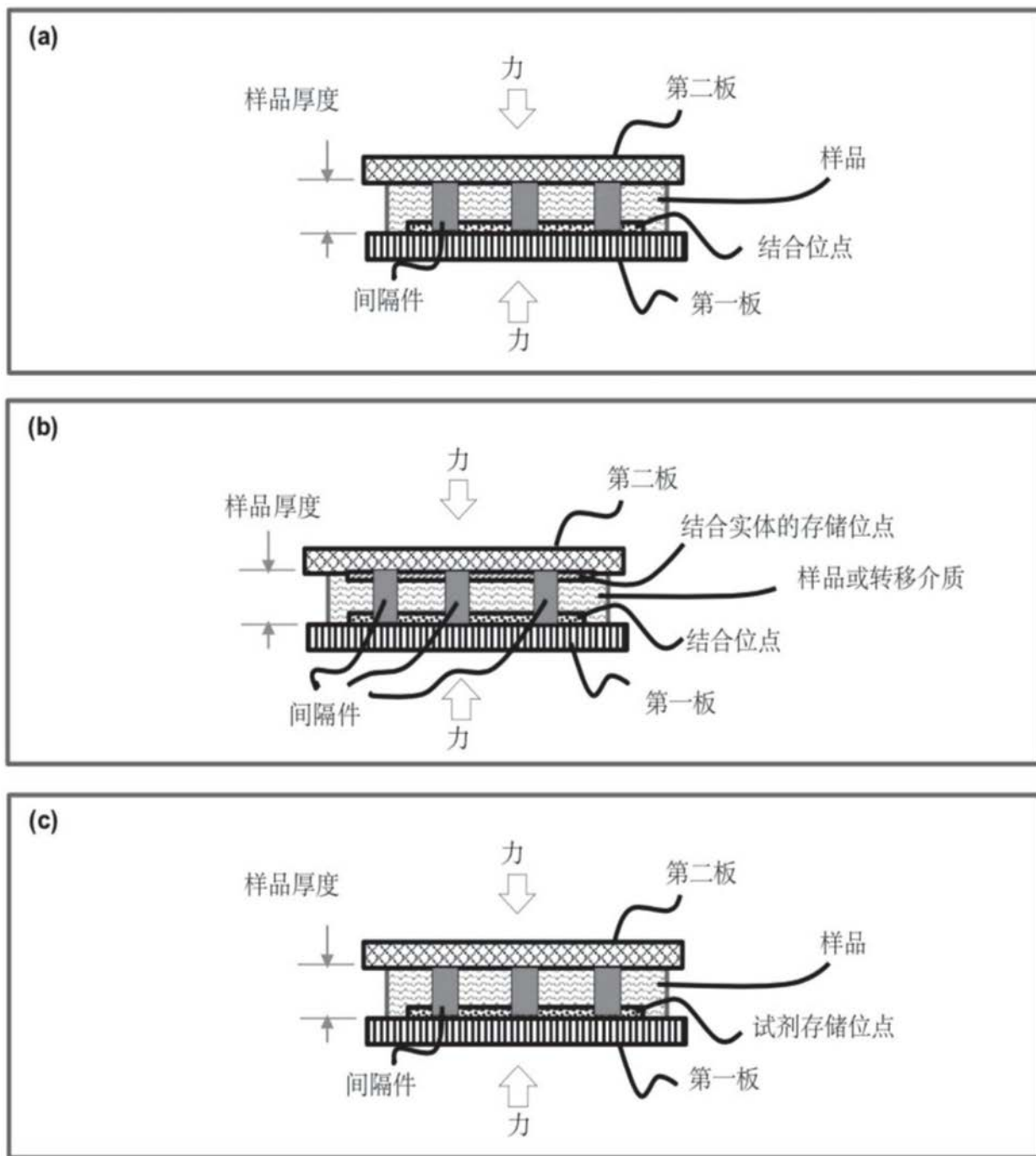


图15

多路复用情况 1. 一个结合位点对应一个或多个存储位点

不同存储位点可以包含有具有不同浓度的相同的检测剂或具有相同或不同浓度的不同的检测剂。

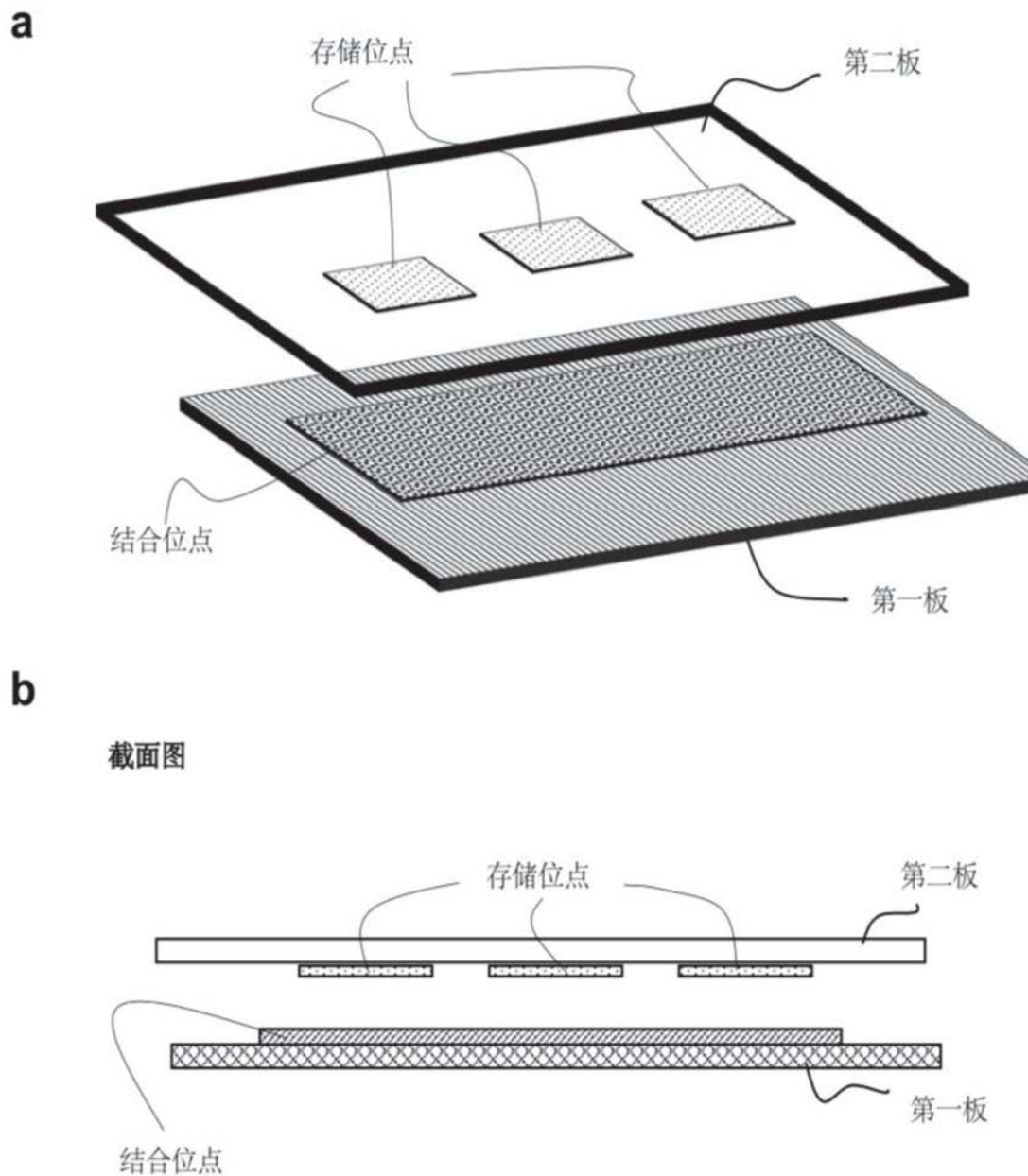


图16

多路复用情况 2, 一个存储位点对应一个或多个结合位点

不同存储位点可以包含有具有不同浓度的相同的检测剂或具有相同或不同浓度的不同的检测剂。

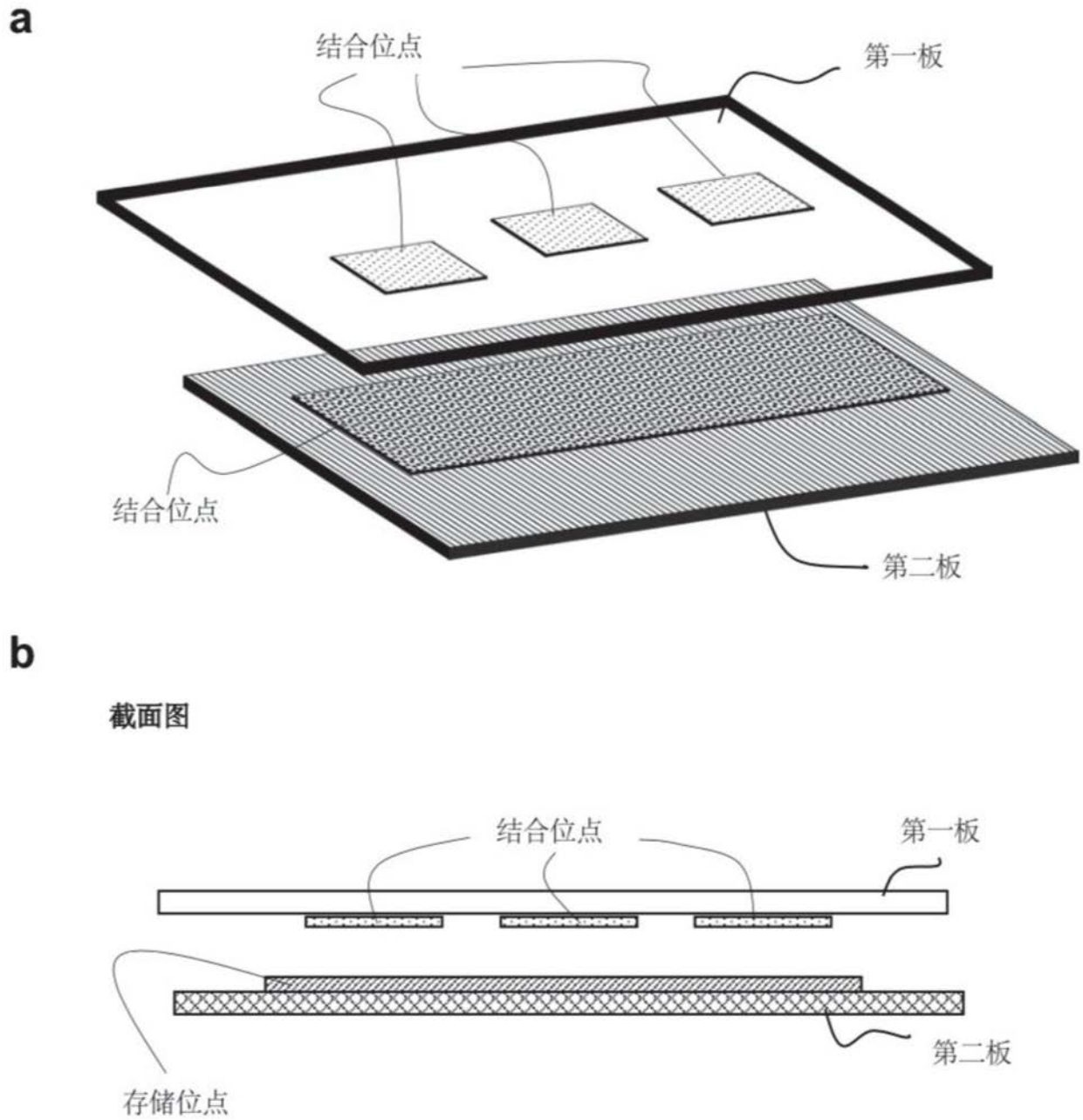


图17

多路复用情况 3 . 多个结合位点与多个对应的存储位点

不同存储位点可以包含有具有不同浓度的相同的检测剂或具有相同或不同浓度的不同的检测剂。

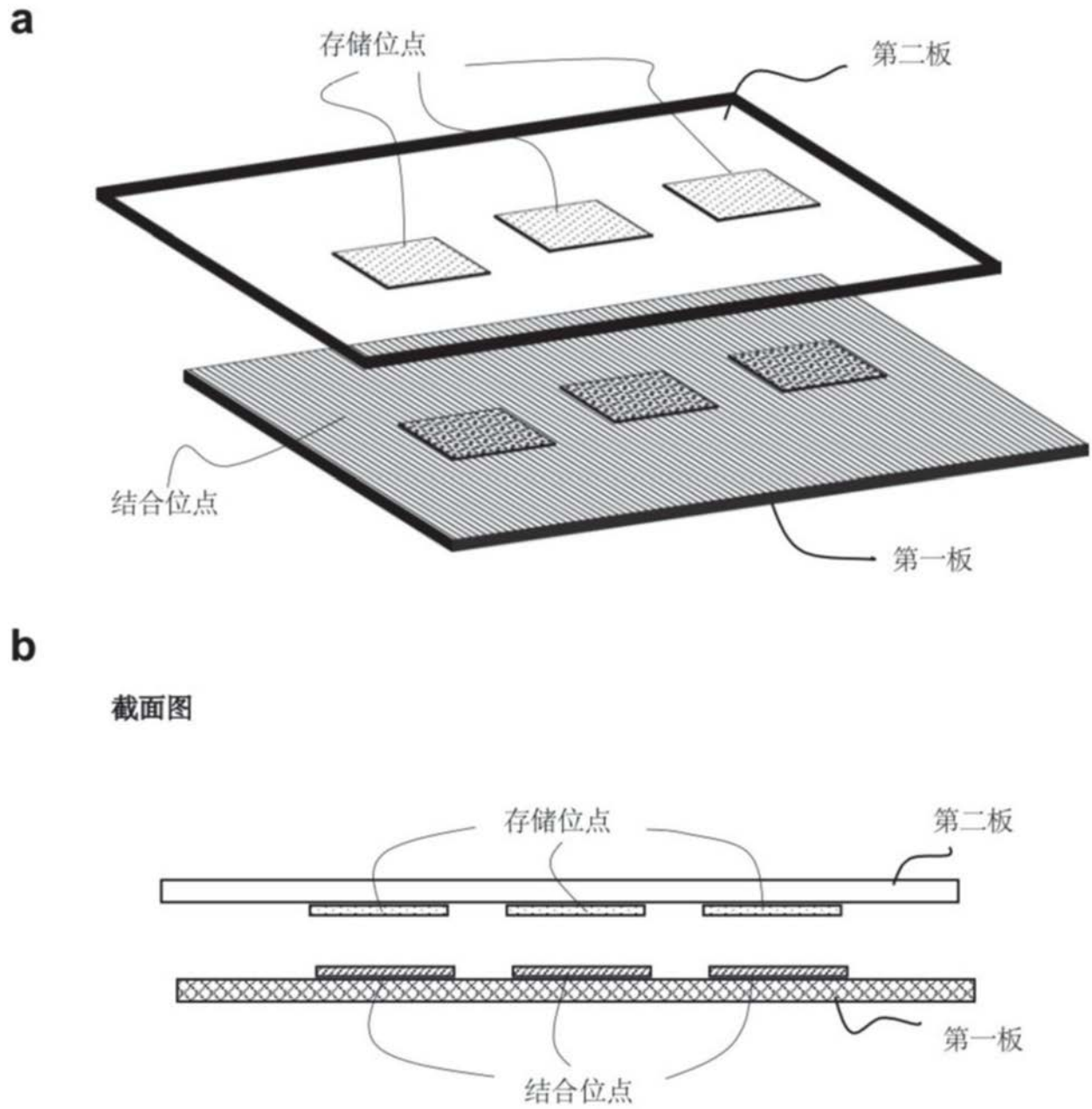


图18

专利名称(译)	采集分析蒸汽凝析，特别是呼出气凝析的装置与系统，以及使用方法		
公开(公告)号	CN108633304A	公开(公告)日	2018-10-09
申请号	CN201680052539.9	申请日	2016-09-14
[标]发明人	SY周 W丁		
发明人	S·Y·周 W·丁		
IPC分类号	G01N33/497 G01N33/58 G01N33/53 G01N33/483		
CPC分类号	B01L3/502 B01L2200/142 B01L2300/046 B01L2300/0636 B01L2300/0816 B01L2400/0481 G01N1/2813 G01N33/497 G01N2001/2244 G01N2001/2276 G01N2033/4975 G01N33/4833 G01N33/53 G01N33/582 A61B5/0836 A61B5/0935 A61B5/097 A61M2205/3569 A61M2230/43 G01N21/01 G01N33/58 G01N2021/0118 G01N2021/0181		
优先权	62/218455 2015-09-14 US 62/293188 2016-02-09 US 62/305123 2016-03-08 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物/化学感测，测定和应用领域。特别是，本发明涉及将少量的蒸汽凝析样品(例如，体积为10fL(飞升)的单个液滴的从受试者呼出气采集的呼出气凝析(EBC))，防止或显著减少采集的蒸汽凝析样品的蒸发，分析样品，通过手机分析样品，并进行无需任何专业人员的采集和分析。

使用 SiEBCA (单滴 EBC 采集器/分析器) 采集呼出气凝析(EBC) 的示例性装置和方法

