(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107923070 A
(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680049482.7

(22)申请日 2016.08.18

(30)优先权数据
62/209,731 2015.08.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.02.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/047574 2016.08.18

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/034925 EN 2017.03.02

(71)申请人 生物辐射实验室股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·泽梅格德 G·卡琳-纽曼

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 陈扬扬 温剑

(51)Int.Cl.
C40B 30/04(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)
G01N 33/542(2006.01)

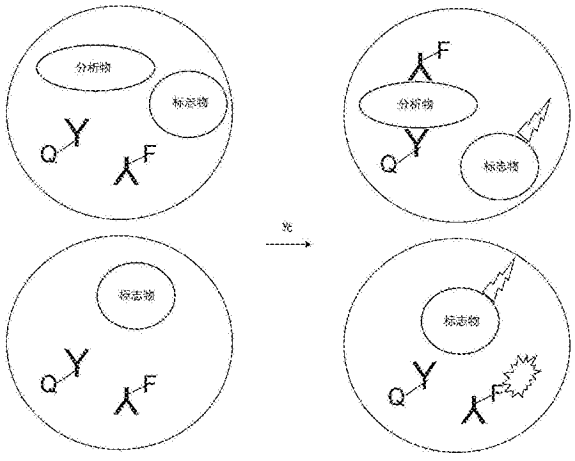
权利要求书3页 说明书18页 附图6页

(54)发明名称

数字式免疫测定

(57)摘要

提供检测样品中的分析物的方法。在一个实施方式中，所述方法包括：形成划分物，该划分物含有样品、与分析物结合时能够发射信号的结合剂以及能够鉴定所述划分物的标志物；使结合剂与可能存在的分析物结合；以及通过检测划分物中的结合剂所发射的信号来检测样品中分析物的存在。



CN 107923070 A

1.检测样品中分析物的方法,所述方法包括:

形成划分物,所述划分物含有样品、与分析物结合时能够发射信号的结合剂、以及能够鉴定所述划分物的标志物;

使所述结合剂与可能存在的分析物结合;以及

通过检测所述划分物中的结合剂所发射的信号来检测所述样品中分析物的存在。

2.如权利要求1所述的方法,其中,还包括通过检测所述标志物来鉴定所述划分物。

3.如权利要求1或2所述的方法,其中,所述结合剂是猝体。

4.如权利要求1、2或3所述的方法,其中,所述划分物还包括底物,所述结合剂是被酶标记的抗体,所述酶能够将底物转化为分子,所述分子在抗体与分析物结合时产生信号。

5.如权利要求4所述的方法,其中,所述酶能够将底物转化为中间体,所述中间体被进一步转化为产生所述信号的分子。

6.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,形成划分物的步骤包括以任意顺序或同时将样品、结合剂和标志物注射入划分物。

7.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,形成划分物的步骤包括形成样品划分物并将结合剂和标志物注射入样品划分物。

8.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,形成划分物的步骤包括形成结合剂划分物并将样品和标志物注射入结合剂划分物。

9.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,形成划分物的步骤包括形成标志物划分物并将样品和结合剂注射入标志物划分物。

10.如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中,所述标志物是荧光团。

11.检测样品中分析物的方法,所述方法包括:

形成划分物,所述划分物包含样品以及与分析物结合时能够发射信号的结合剂;

使结合剂与可能存在的分析物结合;以及

通过检测划分物中的结合剂所发射的信号来检测样品中分析物的存在。

12.如权利要求11所述的方法,其中,形成划分物的步骤包括以任意顺序或同时将样品和结合剂注射入划分物。

13.如权利要求11所述的方法,其中,形成划分物的步骤包括形成样品划分物并在之后将结合剂注射入样品划分物。

14.如权利要求11所述的方法,其中,形成划分物的步骤包括形成结合剂划分物并在之后将样品注射入结合剂划分物。

15.如权利要求11所述的方法,其中还包括:用标志物注射划分物,所述标志物能够鉴定划分物;以及

响应对标志物的检测鉴定所述划分物。

16.如权利要求15所述的方法,其中,在用标志物注射划分物的同时用样品和结合剂注射划分物。

17.如权利要求15所述的方法,其中,在用样品和结合剂注射划分物之后用标志物注射划分物。

18.如权利要求15所述的方法,其中,在用样品和结合剂注射划分物之前用标志物注射划分物。

19.如权利要求15-18中任一项所述的方法，其中，所述标志物是荧光团。

20.检测样品中分析物的方法，所述方法包括：

形成划分物，该划分物含有样品、与分析物结合时能够猝灭信号的结合剂、以及能够鉴定该划分物的标志物；

使结合剂与可能存在的分析物结合；以及

通过检测来自划分物中的结合剂的荧光信号的猝灭来检测样品中分析物的存在。

21.如权利要求20所述的方法，其中，还包括通过检测所述标志物来鉴定所述划分物。

22.如权利要求20或21所述的方法，其中，所述结合剂是分析物特异性抗体对，所述抗体对包含具有荧光标记的第一抗体和具有猝灭剂的第二抗体，其中，当分析物特异性抗体对结合至分析物时，来自第一抗体的荧光信号被第二抗体猝灭。

23.如权利要求20-22中任一项所述的方法，其中，形成划分物的步骤包括以任意顺序或同时将样品、结合剂和标志物注射入划分物。

24.如权利要求20-23中任一项所述的方法，其中，形成划分物的步骤包括形成样品划分物并将结合剂和标志物注射入样品划分物。

25.如权利要求20-24中任一项所述的方法，其中，形成划分物的步骤包括形成结合剂划分物并将样品和标志物注射入结合剂划分物。

26.如权利要求20-25中任一项所述的方法，其中，形成划分物的步骤包括形成标志物划分物并将样品和结合剂注射入标志物划分物。

27.如权利要求20-26中任一项所述的方法，其中，所述标志物是荧光团。

28.检测样品中分析物的方法，所述方法包括：

形成划分物，所述划分物包含样品以及与分析物结合时能够发射荧光信号的猝体；

在使猝体与可能存在的分析物结合；以及

通过检测划分物中的猝体所发射的荧光信号来检测样品中分析物的存在。

29.如权利要求28所述的方法，其中，形成划分物的步骤包括以任意顺序或同时将样品和猝体注射入划分物。

30.如权利要求28所述的方法，其中，形成划分物的步骤包括形成样品划分物并在之后将猝体注射入样品划分物。

31.如权利要求28所述的方法，其中，形成划分物的步骤包括形成猝体划分物并在之后将样品注射入猝体划分物。

32.如权利要求28所述的方法，其中还包括用标志物注射划分物，所述标志物能够鉴定划分物；以及

响应对标志物的检测鉴定划分物。

33.如权利要求32所述的方法，其中，在用标志物注射划分物的同时用样品和猝体注射划分物。

34.如权利要求32所述的方法，其中，在用样品和猝体注射划分物之后用标志物注射划分物。

35.如权利要求32所述的方法，其中，在用样品和猝体注射划分物之前用标志物注射划分物。

36.如权利要求28-35中任一项所述的方法，其中，所述标志物是荧光团。

37.如前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述划分物是被运载体流体包围的液滴。

38.如权利要求37所述的方法，所述运载体流体是油。

39.如前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述分析物选自蛋白质、肽、激素、抗体和抗体片段。

40.如前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述样品选自蛋白质溶液、肽溶液、细胞提取物、全血、血浆、血清、唾液、尿、乳液、卵和水。

数字式免疫测定

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年8月25日提交的美国临时专利申请第62/209,731号的权益,其公开通过引用全文纳入本文。

背景技术

[0003] 样品中抗原的定量可为多种临床应用提供有用的信息。一种检测和定量抗原的方法是通过酶联免疫吸附实验(ELISA)。在ELISA期间,将含有分析物的样品经历在不溶性载体(例如在微升板中的微孔)表面上进行生物化学过程。根据所进行的特定测试,可以将预定的捕获抗体或生物分子(例如,抗原)固定在每个微孔的表面上,并且可以根据包括单独的孵育和洗涤步骤的预定方案将受控量的各种流体(例如封闭溶液,洗涤溶液,测试样品,检测抗体,一抗和二抗和底物)加入到微孔中。可以使用测量吸光度、荧光和/或发光或其他性质的光学检测器来观察生化过程的结果,以提供定性和/或定量测试结果。

[0004] 尽管ELISA可提供有用的信息,但由于每个试验步骤中长时间的孵育时间,该技术是耗时的。另外,该试验规格可实现的检测限和定量精确性无法满足多种应用。另一劣势在于,试验在相同的微孔中多重化时发生的抗体交叉反应性和非特异性吸附使得ELISA难以扩展到高水平多重化。

[0005] 概述

[0006] 本公开为检测样品中的分析物的方法。在一些实施方式中,所述方法包括:形成划分物(partition),该划分物含有样品、与分析物结合时能够发射信号的结合剂(binding agent)以及能够鉴定所述划分物的标志物;使结合剂与可能存在的分析物结合;以及通过检测划分物中的结合剂所发射的信号来检测样品中分析物的存在。在一些实施方式中,所述方法还包括通过检测所述标志物来鉴定所述划分物。在一个实施方式中,所述结合剂是猝体(quenchbody)。在一些实施方式中,所述划分物还包括底物,所述结合剂是被酶标记的抗体,所述酶能够将底物转化为分子,该分子在抗体与分析物结合时产生信号。在一些实施方式中,所述酶能够将底物转化为中间体,该中间体被进一步转化为产生所述信号的分子。

[0007] 在一些实施方式中,所述方法包括:形成划分物,该划分物含有样品、与分析物结合时能够猝灭(quenching)信号的结合剂、以及能够鉴定该划分物的标志物;在分析物存在的情况下使结合剂与分析物结合;以及通过检测来自划分物中的结合剂的荧光信号的猝灭来检测样品中分析物的存在。在一些实施方式中,所述方法还包括通过检测所述标志物来鉴定所述划分物。在一个实施方式中,所述结合剂是分析物特异性抗体对,所述抗体对包含具有荧光标记的第一抗体和具有猝灭剂(quencher)的第二抗体,其中,当分析物特异性抗体对结合至分析物时,来自第一抗体的荧光信号被第二抗体猝灭。

[0008] 在某些实施方式中,形成划分物的步骤包括以任意顺序或同时将样品、结合剂和标志物注射入划分物。在一些实施方式中,形成划分物的步骤包括形成样品划分物并将结合剂和标志物注射入样品划分物。在一些实施方式中,形成划分物的步骤包括形成结合剂划分物并将样品和标志物注射入结合剂划分物。在一些实施方式中,形成划分物的步骤包

括形成标志物划分物并将样品和结合剂注射入标志物划分物。

[0009] 在一些实施方式中，所述方法包括：形成划分物，该划分物包含样品以及与分析物结合时能够发射荧光信号的猝体；使猝体与可能存在的分析物结合；以及通过检测划分物中的猝体所发射的荧光信号来检测样品中分析物的存在。在某些实施方式中，形成划分物的步骤包括以任意顺序或同时将样品和猝体注射入划分物。在一些实施方式中，形成划分物的步骤包括形成样品划分物并在之后将猝体注射入样品划分物。在一些实施方式中，形成划分物的步骤包括形成猝体划分物并在之后将样品注射入猝体划分物。在一些实施方式中，所述方法还包括用标志物注射划分物，该标志物能够鉴定划分物；以及响应对标志物的检测鉴定划分物。在一些实施方式中，在用标志物注射划分物的同时用样品和猝体注射划分物。在一些实施方式中，在用样品和猝体注射划分物之后用标志物注射划分物。在一些实施方式中，在用样品和猝体注射划分物之前用标志物注射划分物。

[0010] 在一些实施方式中，该标志物是荧光团。在一些实施方式中，所述划分物是被运载体流体(例如油)包围的液滴。

[0011] 在一些实施方式中，所述分析物选自蛋白质、肽、激素、抗体和抗体片段。在一些实施方式中，所述样品选自蛋白质溶液、肽溶液、细胞提取物、全血、血浆、血清、唾液、尿、乳液、卵和水。

[0012] 附图的简要说明

[0013] 图1是依据本发明实施方式的检测样品中的分析物的方法的流程图。

[0014] 图2是依据本发明的实施方式的方法中可使用的微流体装置的示意图。储器A容纳划分物及水相试验组分(例如，样品，与分析物结合时能够发射信号的结合剂和/或能够鉴定该划分物的标志物)。注射点B是至少另一试验组分被注射入各划分物的位置。划分物向下游流至点C，该点是划分物暴露至光源的位置，并且是如果划分物中存在感兴趣的分析物则检测器检测到划分物所发射的光学信号的位置。

[0015] 图3描绘了用于检测分析物的“方案1”。根据该方案，形成的划分物含有分析物(或抗原)、与分析物结合时能够发射荧光信号的猝体(QB)、以及能够鉴定该划分物的标志物。该QB能够结合至所述分析物。当划分物暴露至光时，QB发射荧光信号且标志物发射发光信号。通过检测荧光信号来检测分析物的存在。所述划分物还可通过检测发光信号来进行鉴定。

[0016] 图4描绘了用于检测分析物的“方案2。”根据该方案，形成的划分物包含分析物、对分析物具有特异性的抗体对(例如以荧光团F标记的第一抗体和以猝灭剂Q和标志物标记的第二抗体)。该抗体对能够结合至分析物。当划分物暴露至光时，猝灭剂Q对荧光团F发射的荧光信号进行猝灭。猝灭了荧光信号则检测到分析物的存在。检测到荧光信号则分析物不存在。所述划分物还可通过检测发光信号来进行鉴定。

[0017] 图5描绘了用于检测分析物的“方案3”。根据该方案，形成了包含分析物、酶标记的抗体、底物的划分物并形成了标志物。酶标记的抗体能够结合至分析物，酶标记切割底物以释放发射可测量的信号的产物。检测到所发射的信号则检测到分析物的存在。所述划分物还可通过检测发光信号来进行鉴定。

[0018] 图6显示了可用于根据本发明的实施方式的方法和系统的示例性计算机系统的框图。

具体实施方式

[0019] 本发明提供了检测样品中一种或多种分析物(例如抗原)的方法、组合物和试剂盒。多重方法已发现能够同时测试多个样品和/或分析物。如本文所述,在划分物中实施所述方法(例如,在乳液中的液滴中)。

[0020] 在一些实施方式中,所述方法包括形成划分物,该划分物含有样品、结合剂(例如,猝体、用酶标记的抗体或分析物特异性抗体对)和标志物。使结合剂与分析物结合后,例如使用数字式分析对划分物进行了分析,以确认是否存在信号。

[0021] 还提供了划分物的文库以及用于实施这些方法和分析结果的系统。

[0022] 本文所述方法能够提高检测分析物的灵敏度,能精确定量分析物,并能降低样品中分析物的直接检测限。本文描述的均相免疫分析方法还使用液相系统,该系统既不需要固定步骤,也不需要清洗步骤。

[0023] I.定义

[0024] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常所理解的同样含义。参见例如Lackie,DICTIONARY OF CELLAND MOLECULAR BIOLOGY(《细胞和分子生物学词典》),埃尔斯威尔出版社(EIsevier)(第4版2007);Sambrook等,MOLECULAR CLONING,A LABORATORY MANUAL(《分子克隆,实验室手册》),冷泉港实验室出版社(冷泉港,纽约1989)。术语“一个”或“一种”意在表示“一个(种)或多个(种)”。当术语“包含”及其各种变体例如“包括”和“含有”位于叙述步骤或要素之前的时候,是用来表示添加其它的步骤或要素是任选的,并且是非排它性的。本发明的实践中可以使用与本文所述类似或等价的任何方法、装置和材料。本文提供的以下定义是用来帮助理解本文经常用到的某些术语,不对本发明的范围构成限制。

[0025] 术语“结合剂”指特异性结合抗原的分子。示例性结合剂包括但不限于抗体、抗体片段、非抗体蛋白支架、抗体模拟物、适体、Affimer、猝体、酶标记的抗体或分析物特异性抗体对。

[0026] 术语“抗体”指免疫球蛋白家族的多肽或包含能够非共价、可逆并以特定方式结合相应抗原的免疫球蛋白的片段的多肽。该术语包括但不限于:源自人或其它哺乳动物细胞的IgA、IgD、IgE、IgG和IgM同种型类的多克隆或单克隆抗体,包括天然形式或遗传修饰形式,如人源化、人、单链、嵌合、合成、重组、杂合、突变、移接和体外生成的抗体。该术语包括偶联物,包括但不限于含有免疫球蛋白部分的融合蛋白(如嵌合或双特异性抗体或单链Fv's(scFv's))以及片段(如Fab、F(ab')2、Fv、scFv、Fd、dAb和其他组合物)。

[0027] 示范性免疫球蛋白(抗体)的结构单元包含四聚体。各四聚体由相同的两对多肽链组成,每对包含一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD)。每条链的N末端确定约100至110个或更多个氨基酸构成的可变区,所述可变区主要负责抗原识别。术语轻链可变区(V_L)和重链可变区(V_H)分别指这些轻链和重链。可变区含有抗体的抗原结合区(或其功能性等价物)并且对于结合的特异性和亲和性是至关重要的。参见PauI,FundamentaI ImmunoIogy(《基础免疫学》)(2003)。

[0028] 抗体可以完整的免疫球蛋白形式或任何包含特异性抗原结合活性的多种已充分表征片段的形式存在。这样的片段可以通过用多种肽酶消化来产生。胃蛋白酶在铰链区中

的二硫键以下消化抗体，产生Fab的二聚体$F(ab)'_2$，Fab本身是由二硫键连接到V_H-C_H1的轻链。可在温和条件下还原$F(ab')_2$以打断铰链区中的二硫键，从而将$F(ab')_2$二聚体转化为Fab′单体。Fab′单体实质上是具有铰链区部分的Fab。虽然根据对完整抗体的消化定义了多种抗体片段，但是本领域技术人员会理解，这类片段也可用化学方法或重组DNA方法从头合成。因此，本文中所用术语抗体，也包括通过修饰整个抗体而生成的抗体片段，或用重组DNA方法从头合成所产生(例如，scFv)，或使用噬菌体展示文库鉴定的那些抗体片段(参见如McCafferty等，Nature 348:552-554(1990))。制备抗体的方法是本领域已知的；参见例如KohIer和MiIstein，Nature256:495-497(1975)；Kozbor等，ImmunoIogy Today 4:72(1983)；CoIe等，MonocIonaI Antibodies and Cancer Therapy(《单克隆抗体和癌症治疗》)，第77-96页，ARL公司(AIan R.Liss，Inc.)1985。

[0029] 本文中，术语“Fv”指单价或双价可变区片段，并可仅包括可变区(如V_L和/或V_H)，以及较长的片段，如Fab、Fab'或F(ab')2，其还可包含C_L和/或C_H1。除非另有说明，术语“Fc”指包含C_H1和C_H2区的重链单体或二聚体。

[0030] 本文所用术语“抗原”、“免疫原”、“抗体靶标”、“靶标分析物”和类似术语是指由结合剂识别的分子、化合物或复合物，即可被结合剂特异性结合的分子、化合物或复合物。该术语可以指可被结合剂特异性识别的任意分子，例如，蛋白质、多糖、毒素、细胞壁、细胞被囊、病毒被囊、病毒包衣、鞭毛、纤毛或菌毛、微生物、与蛋白质或多糖复合的核酸、与蛋白质或多糖复合的脂质、多核苷酸、多肽、碳水化合物、化学部分或其组合(例如，磷酸化或糖基化的多肽等)。本领域技术人员会理解该术语并不表示该分子在各种情况中是免疫原性的，但仅仅表示其可被抗体靶向。

[0031] 术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”可互换使用以表示一种氨基酸聚合物或一组两种或更多种相互作用或结合的氨基酸聚合物。该术语可应用于某种氨基酸聚合物，在所述氨基酸聚合物中一个或多个氨基酸残基是相应天然产生氨基酸的人工化学模拟物，以及天然产生的氨基酸聚合物(含有经修饰的残基的聚合物)和非天然产生的氨基酸聚合物。

[0032] 抗体结合抗原上的“表位”。表位是抗原上被抗体识别并结合的局部位点。蛋白质表位可包括几个氨基酸或几个氨基酸的部分，例如，5或6个，或更多，例如20个或更多氨基酸，或这些氨基酸的部分。表位也可包括非蛋白质组分，例如核酸(例如，RNA或DNA)，碳水化合物或脂质。表位也可包括这些组分的组合。在一些情况中，表位是三维部分。因此，例如，在靶标是蛋白质标靶的情况中，该表位可由连续氨基酸、或来自蛋白质的不同部分的氨基酸组成，这些部分通过蛋白质折叠靠近(例如，不连续表位)。这对于形成三维结构的其它类型的目标分子(例如dsDNA和染色质)也是一样的。

[0033] 术语“对...有特异性”、“特异性结合”和类似术语指分子(例如，结合剂)与其靶标的结合亲和性比非靶标化合物高至少2倍，例如至少4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、25倍、50倍或100倍中的任意情况。例如，特异性结合特定标靶的结合剂通常以与非标靶相比高至少2倍的亲和性结合标靶。

[0034] 关于靶标(例如，抗原、分析物和表位)的术语“结合”一般表示结合剂与纯群体中的大多数抗体靶标结合(假定结合剂与标靶的合适的摩尔比)。例如，结合给定标靶的结合剂通常结合溶液中至少2/3的目标分子(例如75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)。本领域技术人员应理解，取决于测定结合的方

法和/或阈值，可出现一些变化。

[0035] 术语“标记”和“可检测标记”可互换地指可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理手段检测的组合物。例如，可用的标记包括荧光染料(荧光团)、荧光猝灭剂、发光剂、高电子密度试剂、酶(例如ELISA中常用的酶)、生物素、地高辛、^{32}P和其它同位素、半抗原、蛋白质、核酸或可被检测的其他物质，例如通过将标记整合至与目标分子特异性反应的抗体、肽或寡核苷酸中。该术语包括单一标记试剂的组合，例如，提供独特可检测特征(例如，特定波长或波长组合下)的荧光团的组合。

[0036] “连接”至标记物的分子(例如本文所述经标记抗体)是共价(通过接头或化学键)或非共价(通过离子、范德华力、静电或氢键)地结合标记物的分子，从而可通过检测与该分子结合的标记物来检测是否存在该分子。

[0037] 术语“划分”或“划分的”指将水性溶液样品分隔为多个部分或“划分物(partitions)”，该水性溶液含有一种或多种样品、反应物或标志物(鉴定剂)。划分物可以是固体或流体。在一些实施方式中，划分物是固体划分物，例如微通道。在一些实施方式中，划分物是流体划分物，例如液滴。在一些实施方式中，流体划分物(如液滴)是不互溶的流体(如水和油)的混合物。在一些实施方式中，流体划分物(如液滴)是水性液滴，其被不互溶的运载体流体(如油)包围。

[0038] 在本说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括多个指示物，除非上下文中有明显的表示。因此，例如，引用包含“结合剂”的系统包括包含一种或多种结合剂的系统。同样，对“底物”的引用包括一种或多种底物。

[0039] II.方法

[0040] 参照图1，现在将描述用于检测样品中的分析物的方法100。所述步骤可以任意顺序、任意组合实施，并且可与本公开的任意其他合适的方面进行组合或改进。

[0041] A.划分物形成

[0042] 在示例性步骤110中，形成了划分物。在一些实施方式汇总，划分物包括含有分析物的样品以及与分析物结合时能够发射或猝灭信号的结合剂。在一些实施方式中，划分物还包括能够鉴定划分物的标志物。

[0043] 划分物可包括多种类型的划分物中的任一种，包括固体划分物(如孔或管)和流体划分物(如油相内的水相或液滴)。在一些实施方式中，划分物是液滴。在一些实施方式中，划分物是微通道。用于划分样品的方法和组合物描述于，例如，公开的专利申请WO 2012/135259、WO 2014/117088、WO 2010/036352和US 2010/0173394，其全部内容各自通过引用纳入本文。

[0044] 在一些实施方式中，液滴包含乳液组合物，即不互溶的流体(如水和油)的混合物。在一些实施方式中，液滴是水性液滴，其被不互溶的运载体流体(如油)包围。在一些实施方式中，液滴是油性液滴，其被不互溶的运载体流体(如水性溶液)包围。在一些实施方式中，本文所述液滴是相对稳定的并在两种或更多种液滴之间具有最小聚结。在一些实施方式中，生成的液滴中少于0.0001％、0.0005％、0.001％、0.005％、0.01％、0.05％、0.1％、0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％或10％与其他液滴聚结。

[0045] 在一个实施方式中，使油相流过水相，从而形成液滴。用于油相的油可经合成或天然存在。在一些实施方式中，所述油包括碳和/或硅。在一些实施方式中，所述油包括氢和/

或氟。示例性的油包括但不限于硅油、矿物油、氟碳油、植物油或其组合。

[0046] 该油相可包含氟化基础油，其可通过与氟化表面活性剂(如全氟聚醚)联用而进一步稳定。在一些实施方式中，该基础油包括以下一种或多种：HFE7500、FC-40、FC-43、FC-70或另一种常见氟化油。在一些实施方式中，该油相包含阴离子含氟表面活性剂。在一些实施方式中，该阴离子含氟表面活性剂是Ammonium Krytox(Krytox-AS)、Krytox FSH的铵盐或Krytox FSH的吗啉代衍生物。Krytox-AS的浓度可以是约0.1％、0.2％、0.3％、0.4％、0.5％、0.6％、0.7％、0.8％、0.9％、1.0％、2.0％、3.0％或4.0％(w/w)。在一些实施方式中，Krytox-AS的浓度是约1.8％。在一些实施方式中，Krytox-AS的浓度是约1.62％。Krytox FSH的吗啉基衍生物的浓度可以是约0.1％、0.2％、0.3％、0.4％、0.5％、0.6％、0.7％、0.8％、0.9％、1.0％、2.0％、3.0％或4.0％(w/w)。在一些实施方式中，Krytox FSH的吗啉代衍生物的浓度是约1.8％。在一些实施方式中，Krytox FSH的吗啉代衍生物的浓度是约1.62％。

[0047] 在一些实施方式中，该油相还包含用于调节油性质(如蒸气压、粘度或表面张力)的添加剂。非限制性示例包括全氟辛醇和1H,1H,2H,2H-全氟癸醇。在一些实施方式中，1H,1H,2H,2H-全氟癸醇添加至约0.05％、0.06％、0.07％、0.08％、0.09％、0.1％、0.2％、0.3％、0.4％、0.5％、0.6％、0.7％、0.8％、0.9％、1.0％、1.25％、1.50％、1.75％、2.0％、2.25％、2.5％、2.75％或3.0％(w/w)的浓度。在一些实施方式中，1H,1H,2H,2H-全氟癸醇添加至约0.18％(w/w)的浓度。

[0048] 在一些实施方式中，使油相流过包含样品和/或用于检测样品中分析物的一种或多种组分(例如试剂)的水相，从而形成液滴。在一些实施方式中，用于检测水性液滴中分析物的一种或多种组分可溶于和/或混溶于水，包括但不限于，一种或多种盐、缓冲剂、试剂(例如结合剂和/或标志物)、表面活性剂、和/或可用于在所形成的液滴内发生期望反应所需的任意其他组分。所有这种其他组分可经选择以与所需的反应或待进行的试验相容。

[0049] 参照图2，含有样品和/或一种或多种试验组分的划分物(例如液滴)可在储器A中提供。在提供含缓冲剂的液滴的一些实施方式中，含有分析物的样品、结合剂和/或标志物中的至少一个在注射点B被注射入划分物。样品、结合剂和标志物可以任何顺序或同时注入划分物。在一些实施方式中，样品被注入划分物后注入结合剂，然后注入标志物。在某些实施方式中，结合剂被注入划分物后注入样品，然后注入标志物。在一些实施方式中，标志物被注入划分物后注入样品，然后注入结合剂。

[0050] 在储器A中的划分物由含有样品的水相形成的一些实施方式中，结合剂和标志物以任意顺序或同时在注射点B被注射入划分物中。在储器A中的划分物由含有标志物的水相形成的一些实施方式中，试样和结合剂以任意顺序或同时在注射点B被注射入划分物中。在储器A中的划分物由含有结合剂的水相形成的一些实施方式中，样品和标志物以任意顺序或同时在注射点B被注射入划分物中。

[0051] 向划分物中注射流体的方法描述于，例如，WO2012/135259和US2012/0132288，其各自通过引用其全文纳入本文。

[0052] 在一些实施方式中，样品和/或结合剂在划分物形成前被稀释。稀释或改变反应混合物的一种或多种组分浓度的其他方法是一种改进对分析物浓度估计的方法。稀释可通过将样品物理稀释成不同程度或通过改变各划分物中测试体积的虚拟稀释来实现。在一些实

施方式中，生成了两种或更多种划分物尺寸的划分物。例如，可以使用将样品划分为两种或更多种划分物尺寸的装置，例如生成至少两种不同单分散液滴尺寸的液滴生成器，生成多分散液滴的乳液，或具有至少两种用于划分样品的体积的板。在某些实施方式中，样品在被注射入液滴中后被稀释，例如WO 2014/117088中描述的液滴膨胀，通过引用其全文纳入本文。

[0053] 稀释减少背景，但可影响动态范围，除非划分物的数目也增加。一种解决方法是增加划分物的数目，但也可使用其他方法。考虑使用不同浓度，其可以是全局性的(即稀释所有组分)或稀释反应组分的子集。在一些实施方式中，比较含样品的划分物与无样品的对照划分物，以用于确定背景对比信号。在其他实施方式中，改变了其他组分的浓度。在一些情况下，各结合剂的结合特性将是不同的。在一些实施方式中，在不同样品浓度或一种或多种结合剂的不同浓度下运行相同样品生成特异性对比非特异性结合的不同效果。在一些实施方式下，提高(例如倍增)一种结合剂浓度对于随机分布具有非常特定的效果，导致数目几乎翻倍(其中对于给定的划分物数目，可通过泊松体积预测精确的增加)，但只要结合剂浓度对该目标饱和，其在对特异性结合的作用有限。同样地，在一些实施方式中，降低结合剂浓度对结合剂的非特异性结合产生作用并对结合剂的特异性结合产生不同的作用。

[0054] 在一些实施方式中，形成了至少500个划分物(如液滴)、至少1000个划分物、至少2000个划分物、至少3000个划分物、至少4000个划分物、至少5000个划分物、至少6000个划分物、至少7000个划分物、至少8000个划分物、至少10,000个划分物、至少15,000个划分物、至少20,000个划分物、至少30,000个划分物、至少40,000个划分物、至少50,000个划分物、至少60,000个划分物、至少70,000个划分物、至少80,000个划分物、至少90,000个划分物、至少100,000个划分物、至少200,000个划分物、至少300,000个划分物、至少400,000个划分物、至少500,000个划分物、至少600,000个划分物、至少700,000个划分物、至少800,000个划分物、至少900,000个划分物、至少1,000,000个划分物、至少2,000,000个划分物、至少3,000,000个划分物、至少4,000,000个划分物、至少5,000,000个划分物、至少10,000,000个划分物、至少20,000,000个划分物、至少30,000,000个划分物、至少40,000,000个划分物、至少50,000,000个划分物、至少60,000,000个划分物、至少70,000,000个划分物、至少80,000,000个划分物、至少90,000,000个划分物、至少100,000,000个划分物、至少150,000,000个划分物或至少200,000,000个划分物。

[0055] 在一些实施方式中，生成的液滴在形状和/或尺寸方面基本均匀。例如，在一些实施方式中，这些液滴在平均直径方面基本均匀。在一些实施方式中，生成的液滴的平均直径为约0.001微米、约0.005微米、约0.01微米、约0.05微米、约0.1微米、约0.5微米、约1微米、约5微米、约10微米、约20微米、约30微米、约40微米、约50微米、约60微米、约70微米、约80微米、约90微米、约100微米、约150微米、约200微米、约300微米、约400微米、约500微米、约600微米、约700微米、约800微米、约900微米或约1000微米。在一些实施方式中，生成的液滴的平均直径为小于约1000微米、小于约900微米、小于约800微米、小于约700微米、小于约600微米、小于约500微米、小于约400微米、小于约300微米、小于约200微米、小于约100微米、小于约50微米，或小于约25微米。在一些实施方式中，生成的液滴在形状和/或尺寸方面是不均匀的。

[0056] 在一些实施方式中，生成的液滴在体积上基本均匀。例如，在一些实施方式中，生

成的液滴的平均体积为约0.001nL、约0.005nL、约0.01nL、约0.02nL、约0.03nL、约0.04nL、约0.05nL、约0.06nL、约0.07nL、约0.08nL、约0.09nL、约0.1nL、约0.2nL、约0.3nL、约0.4nL、约0.5nL、约0.6nL、约0.7nL、约0.8nL、约0.9nL、约1nL、约1.5nL、约2nL、约2.5nL、约3nL、约3.5nL、约4nL、约4.5nL、约5nL、约5.5nL、约6nL、约6.5nL、约7nL、约7.5nL、约8nL、约8.5nL、约9nL、约9.5nL、约10nL、约11nL、约12nL、约13nL、约14nL、约15nL、约16nL、约17nL、约18nL、约19nL、约20nL、约25nL、约30nL、约35nL、约40nL、约45nL或约50nL。

[0057] 样品

[0058] 本文所述的方法可用于检测任何类型样品中的一种或多种分析物。在一些实施方式中，该样品是生物样品。生物样品可获自任何生物体，例如动物、植物、真菌、细菌或任何其他有机体。在一些实施方式中，该生物样品来自动物，例如哺乳动物(如人或非人灵长类动物、奶牛、马、猪、绵羊、猫、狗、小鼠或大鼠)、鸟(如鸡)或鱼。生物样品可以是获自生物体的任何组织或体液，例如血液，血液成分或血液产品(如血清、血浆、血小板、血红细胞等)，痰液或唾液，组织(如肾、肺、肝、心、脑、神经组织、甲状腺、眼、骨骼肌、软骨或骨组织)；培养的细胞，例如原代培养物，外植体，和转化的细胞，干细胞，粪便或尿液。

[0059] 在一些实施方式中，待测的一种或多种分析物是肽、蛋白质(如抗体、酶、生长调节剂、凝血因子或磷蛋白)、免疫原、多糖、毒素、细胞壁、细胞被囊、病毒被囊、病毒包衣、鞭毛、纤毛或菌毛、微生物、与蛋白质或多糖复合的核酸、或与蛋白质或多糖复合的脂质。

[0060] 在一些实施方式中，两种、三种、四种、五种或更多种不同分析物待检测。在一些实施方式中，其中两种或更多种不同的分析物待检测，所述两种或更多种不同的分析物是相同类型的分析物(例如复合物中存在的两种或更多种蛋白质)。在一些实施方式中，其中两种或更多种不同的分析物待检测，所述两种或更多种不同的分析物是不同类型的分析物。

[0061] 在一些实施方式中，可制备样品以改进分析物的有效检测。例如，在一些实施方式中，可对样品进行片段化、分馏、匀化或超声。在一些实施方式中，可从样品(如生物样品)中提取或分离感兴趣的分析物或含有感兴趣的分析物的子组分。在一些实施方式中，针对存在的一种或多种分析物富集该样品。在一些实施方式中，通过亲和方法在样品中富集分析物，例如免疫亲和富集。在一些实施方式中，使用尺寸选择(如除去非常小的片段或分子或非常长的片段或分子)在样品中富集分析物。

[0062] 结合剂

[0063] 适用于本发明方法的结合剂是特异性结合感兴趣的分析物(即抗原)的任何分子。

[0064] 在一些实施方式中，本文所述的结合剂连接可检测标记物。该标记物可直接连接至结合剂(例如通过共价键)或可以间接连接(例如使用螯合剂或接头分子)。术语“标记物”和“可检测标记物”在本文中同义使用。

[0065] 可检测标记物的示例包括但不限于：生物素/链霉亲和素标记物、核酸(例如寡核苷酸)标记物、化学反应性标记物、荧光标记物、酶标记物、放射性标记物、量子点、聚合物点、质量标记物及其组合。在一些实施方式中，该标记物可包括光学试剂，如荧光剂、磷光剂、化学发光剂等。多种试剂(如染料、探针或指示剂)是本领域已知的并可用于本发明。(参见例如英杰公司(Invitrogen)，The Handbook--A Guide to FIuorescent Probes and LabeIing TechnoIogies(《手册——荧光探针和标记技术指导》)，第10版(2005))。荧光剂可包括多种有机和/或无机小分子或多种荧光蛋白及其衍生物。例如，荧光剂可包括但不限

于:花青、酞菁、卟啉、吲哚菁、若丹明、吩噁嗪、苯基呫吨、吩噻嗪、吩硒嗪、荧光素(例如FAM、FITC、5-羧基荧光素和6-羧基荧光素)、苯并卟啉、方酸菁、二吡咯并嘧啶酮、并四苯、喹啉、吡嗪、呫啉、克酮酸、吖啶酮、菲啶、若丹明(例如TAMRA、TMR和若丹明红)、吖啶、蒽醌、硫族吡喃鎓(chalcogenopyrylium)类似物、氯、萘菁、次甲基染料、方菁染料、偶氮化合物、甘菊蓝、氮杂甘菊蓝、三苯基甲烷型染料、吲哚、苯并吲哚、吲哚羰花青、苯并吲哚羰花青、BODIPY™和BODIPY™衍生物,及其类似物。在一些实施方式中,荧光剂是AIexa FIuor染料。荧光染料和荧光标记物试剂包括可购自英杰/分子探针公司(Invitrogen/MoIecuIar Probes)(俄勒冈州尤金市)和皮尔斯生物技术公司(Pierce BiotechnoIogy,Inc.)(伊利诺斯州洛克福德)。在一些实施方式中,该光学试剂是插入染料。插入染料包括但不限于SYBR绿和Pico绿(来自分子探针公司(MoIecuIar Probes)(俄勒冈州尤金市))、化乙啶、碘化丙啶、色霉素、吖啶橙、Hoechst 33258、TOTO-I、YOYO-1和DAPI(4′,6-二眯基-2-苯基吲哚盐酸盐)。

[0066] 在一些实施方式中,荧光剂是聚合物点或量子点。使用的特定量子点(QD)对于本发明而言并不重要。量子点是本领域已知的且描述于例如Han等"Quantum-dot-tagged Microbeads for MuItipIexed OpticaI Coding of BiomoIecuIes(用于生物分子的多重光学编码的量子点标记的微珠)",Nat BiotechnoI(2001年7月)第19卷,第631-635页。本领域技术人员应理解存在多种量子点,其可用作荧光标记物并用于本发明的实施方式并可从多个销售商处获得。示例性量子点(QD)包括但不限于以下:硒化镉(CdSe)量子点纳米颗粒(例如CdSe量子点核心,480-640nm发射光谱,西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich®));硫化镉(CdS)量子点纳米颗粒(例如CdS量子点核心,380-480nm发射光谱,西格玛-奥德里奇公司);硫化锌加帽的硒化镉(ZnS加帽的CdSe)纳米晶体(例如CdSe/ZnS Lumidots™和CdSe/ZnS NanoDots™,480-640nm发射光谱,西格玛-奥德里奇公司);以及无镉的量子点(例如CFQD™,400-650nm发射光谱,西格玛-奥德里奇公司)。

[0067] 在一个实施方式中,标记物是荧光团,且荧光团的量使得荧光团足以被检测到。在一个实施方式中,每1纳升体积的划分物中存在至少1-100个荧光团、100-1000个荧光团、1000-10000个荧光团、10000-100000个荧光团、100000-1百万个荧光团、1百万-1千万个荧光团、或至少1千万-1亿个荧光团。在划分物体积小于1纳升的实施方式中,每份划分物中存在更少的荧光团(例如每50毫微微升划分物体积为1-100个荧光团)。

[0068] 结合剂的非限制性示例包括抗体、抗体片段、猝体、分析物特异性抗体对、或被酶标记的抗体。

[0069] 本文所用的"猝体"是指含有(a)抗体轻链可变区多肽(例如V_L多肽)和(b)抗体重链可变区多肽(例如V_H多肽)的分子,其中(a)或(b)被荧光染料标记,且未被荧光染料标记的(a)或(b)在序列位置上含有色氨酸,从而当分子未与分析物(或抗原)结合时,来自分子的荧光信号被猝灭。参照图3,当分子结合至分析物时,在色氨酸和荧光染料之间发生光诱导电子转移(PET),且荧光信号未被猝灭(即,检测到荧光信号)。在一个实施方式中,猝体是5-羧基四甲基若丹明(TAMRA)标记的抗人骨钙素(骨gIa蛋白,BGP)scFv,其中抗-BGP scFv的V_L,多肽或V_H多肽被TAMRA标记。参见例如,Abe等的(2011)J.Am.Chem.Soc.133:17386-17394。

[0070] 在某些实施方式中,分析物特异性抗体对包含具有荧光标记F的第一抗体和具有猝灭剂Q的第二抗体(参见图4)。抗体各自结合至分析物上的不同表位。当分析物特异性抗

体对与分析物结合时，来自第一抗体的荧光信号被第二抗体猝灭。在一些实施方式中，来自第一抗体的荧光信号的至少10％-25％被第二抗体猝灭。不存在分析物时，荧光团发射荧光信号。

[0071] 第一或第二抗体能被本文描述的任意可检测标记物标记。在一些实施方式中，第一抗体被荧光分子标记。产生荧光信号的合适的荧光分子的示例已有描述。在一些实施方式中，第二抗体被非荧光物质(即“猝灭剂”)标记，该非荧光物质将荧光分子产生的荧光信号猝灭。在一些实施方式中，第一抗体被猝灭剂标记，第二抗体被荧光分子标记。在一些实施方式中，当猝灭剂不在荧光分子附近时，由荧光分子产生的荧光信号得到显现或相对增强，并且当猝灭剂在荧光分子附近时(例如，通过使第一和第二抗体结合至目标抗原上的相邻表位)，由荧光分子产生的荧光信号不显现或相对减弱。可用的猝灭剂的非限制性示例包括TAMRA(和其他若丹明)、DABCYL、QSY™猝灭剂(例如QSY7和QSY 21)(来自分子探针公司(MoIecuIar Probes)(俄勒冈州尤金市))、BIackHoIe猝灭剂(Quenchers™)(BHQ)(生物搜索技术公司，加利福尼亚州诺瓦托(Biosearch TechnoIogies，Inc.，Novato，CaIif.))、IowaBIack™(整合DNA技术公司(Integrated DNA TechnoIogies)，爱荷华州克拉威尔)，BIackBerry™猝灭剂650(BBQ-650)(百瑞联合公司(Berry&Assoc.)，密歇根州德克斯特)、顺磁性离子、金纳米颗粒、德克萨斯红、β-藻红蛋白和β-藻红蛋白。合适的荧光供体/猝灭剂对包括但不限于，FAM/DABCLY、FAM/TAMRA、EDANS/DABCYL、德克萨斯红/DABCYL、BODIPY/DABCYL、荧光黄/DABCYL、香豆素/DABCYL、角膜荧光素/QSY 7染料、角膜荧光素/德克萨斯红、丁酸芘/β-藻红蛋白、角膜荧光素/4′，5′-二甲氧基-6-羧基荧光素、以及角膜荧光素/若丹明。

[0072] 在结合剂是具有酶标记的抗体的一个实施方式中，通过检测所述酶和底物生成的产物来检测所述标记物(例如，在分析物-抗体-酶标记物复合物中)的存在(参照图5)。在一些实施方式中，所述酶能够将底物转化为中间体，该中间体被进一步转化为产生所述信号的分子。合适的酶的示例包括但不限于：聚合酶(如DNA聚合酶)、脲酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶(HRP)、葡萄糖氧化酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶和水解二乙酸荧光素的酯酶。例如，辣根过氧化物酶检测系统可与生色底物四甲基联苯胺(TMB)联用，其在过氧化氢存在下产生在450nm处可检测的可溶产物。碱性磷酸酶检测系统可与生色底物对硝基苯基磷酸盐联用，其产生405nm处易测的可溶性产物。β-半乳糖苷酶检测系统可与生色底物邻硝基苯-β-D-半乳糖苷(ONPG)联用，产生在410nm可测的可溶性产物。脲酶检测系统可与底物如脲溴甲酚紫(西格玛免疫化学品公司(Sigma ImmunochemicaIs)，密苏里州圣路易斯)联用。其它酶(例如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖醛酸糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、芳基酯酶、芳基硫酸酯酶、或神经醇胺酶)分别能够被使用化学发光1，2二氧杂环丁烷基底物(密歇根诊断公司(Michigan Diagnostics)，密歇根州罗亚尔奥克)的检测系统检测，各自释放可在450nm下被检测到的可溶产物。

[0073] 连接可检测标记物与结合剂的技术是熟知的。例如，常见蛋白标记技术的综述可参见BiochemicaI Techniques:Theory and Practice(《生物化学技术：理论和实践》)，John F.Robyt和Bernard J.White，维弗兰德出版公司(WaveIand Press，Inc.)(1987)。其他标记技术综述于，例如，R.HaugIand，Excited States of BiopoIymers(《生物聚合物的兴奋状态》)，Steiner编，普莱南出版社(PIenum Press)(1983)；FIuorogenic Probe

Design and Synthesis:A TechnicaI Guide(《荧光探针设计与合成:技术指南》),PE应用生物系统公司(PE AppIied Biosystems)(1996);以及G.T.Herman,Bioconjugate Techniques(《生物偶联技术》),学术出版社(Academic Press)(1996)。所述技术还可作为市售可得试剂盒(例如英国剑桥的银诺瓦生物科学有限公司(Innova Biosciences Ltd.)的Thunder-Link®和Lightning-Link®)的部分获得。在一些实施方式中,可检测标记物通过共价键、离子键、氢键或范德华相互作用与结合剂接合。

[0074] 划分物标志物

[0075] 本发明所述划分物可含有标志物以鉴定特定划分物内的试剂(例如多种结合剂)。例如,在一些实施方式中,可将一种或多种鉴定物(例如染料)插入各不同的引物划分物中,使得各划分物由基于划分物中的一种或多种标志物的预定且已知的独特信号代表。例如,通过以八种不同的染料浓度提供四种不同的染料,可生成8^4(=4096)种不同的独特鉴定物,其各自均可用于鉴定独特的划分物(或划分物组)。

[0076] 在一些实施方式中,标志物包括一种或多种选择性吸收分子。本文所用的"选择性吸收分子"指,在将宽频带光源导向分子时,吸收光的某些特征性颜色或波长同时允许光的其他颜色或波长通过或经由分子传输的分子。本领域技术人员应了解和理解,可以使用的多种选择性吸收分子包括本发明的实施方式的所述选择性吸收物质/组分,包括但不限于可购自艾克斯顿公司(Exciton)(俄亥俄州丹顿)和QCR溶液公司(QCR SoIutions,Corp.)(佛罗里达州圣露西港)的那些。

[0077] 在一些实施方式中,标志物包括一种或多种荧光分子(例如荧光团)。在一个实施方式中,使用两种不同的方形酸染料作为标志物。在一个实施方式中,第一标志物是红色荧光染料(例如,1,3-双[(1,3-二氢-1,3,3-三甲基-2H-吲哚-2-亚基)甲基]-2,4-双环丁烯二基鎓,双(内盐)),第二标记物是橙色荧光染料(例如,2-(3,5-二甲基吡咯-2-基)-4-(3,5-二甲基-2H-吡咯-2-亚基)-3-羟基-2-环丁-1-酮)。染料#1的发射峰为585nm,染料#2的发射峰为630nm。上文描述了合适的荧光团的示例。

[0078] 标记划分物所需的荧光染料的浓度取决于使用的检测系统。例如,一些实施方式中划分物中染料浓度的范围是10nM至1000nM(非蛋白质染料)和0.1ug/mI至50ug/mI(蛋白质染料或与荧光蛋白偶联的染料)。不同的检测系统可能需要较高或较低的染料浓度。

[0079] 表面活性剂

[0080] 本文描述的划分物能够含有一种或多种表面活性剂以减少移动过程中液滴的聚结。本文所用的"表面活性剂"是表面活性物质,能够减少含有该物质的液体的表面张力。表面活性剂,也可以或选择性地描述为洗涤和/或润湿剂,可引入亲水部分和疏水部分,可同时赋予表面活性剂双重的亲水性-疏水性。表面活性剂在一些情况下可通过其亲水性与疏水性之比来表征。在一些实施方式中,水相引入至少一种亲水性表面活性剂。水相可包括至少一种非离子表面活性剂和/或离子表面活性剂。在某些实施方式中,水相包括表面活性剂,该表面活性剂是聚环氧丙烷和聚环氧乙烷的嵌段共聚物。在一些实施方式中,表面活性剂是以商品名PLURONIC及TETRONIC(巴斯夫公司)销售的聚环氧丙烷和聚环氧乙烷的嵌段共聚物。在一些实施方式中,表面活性剂是以商品名PLURONIC F-68销售的聚环氧丙烷和聚环氧乙烷的非离子嵌段共聚物。在一些实施方式中,水相的表面活性剂是水溶性和/或亲水性氟表面活性剂。水相的示例性氟表面活性剂以商品名ZONYL(杜邦公司)销售,例如ZONYL

FSN氟表面活性剂。在一些情况下，表面活性剂可包括聚山梨醇酯20(以商品名TWEEN-20美国ICI公司(ICI Americas,Inc.)销售)。水相中的特定表面活性剂或总表面活性剂浓度可经选择以在加热前使乳液液滴稳定。在一些实施方式中，水相的表面活性剂的浓度以重量计为0.01-10％，0.05-5％，0.1-1％或0.5％。

[0081] B.结合

[0082] 在示例性步骤120中，使结合剂结合至分析物。在一些实施方式中，结合剂与划分物中的样品共同培育约5分钟至约60分钟，以使结合剂结合至分析物。

[0083] C.检测

[0084] 在示例性步骤130中，通过检测划分物所发射的信号或通过猝灭来自划分物的荧光信号来检测分析物的存在(参照图2C)。还检测了划分物中的标志物的水平和种类，从而提供划分物中结合剂(以及分析物)的性质。

[0085] 在某些实施方式中，样品中的分析物通过使用已知量的分析物所产生的标准曲线来定量。使用标准曲线对分析物定量的方法可包括，测定由至少两种已知量的分析物产生的荧光信号强度，然后绘制荧光信号强度作为分析物浓度的函数。然后使用所测定的结合至分析物的结合剂产生的荧光信号强度并从标准曲线获得分析物的浓度，藉此测定了样品中的分析物浓度。

[0086] 在一些实施方式中，可以使用数字读取试验(例如数字分析)通过从所述分离样品划分至少所述标记物(例如抗原-亲和试剂-标记物复合物中的标记物)并鉴定含所述标记物的划分物来检测并定量样品中的一种或多种抗原。通常，数字分析的过程涉及：针对待检测标记物的存在，确定样品的各划分物是阳性还是阴性。对于定量样品中抗原的含量(例如定量样品中抗原的浓度)，检验划分物中各划分物是否存在可检测信号。如果在划分物中检测到信号，则该划分物对抗原存在为“阳性”。在一些实施方式中，划分物中所检测信号通过连接抗原-亲和试剂-标记物复合物中的亲和试剂的标记物(如连接亲和试剂的荧光、化学发光、辐射、或酶标记)生成。若在划分物中未检测到信号，则该划分物对抗原存在为“阴性”。在使用了非终点反应条件的一些实施方式中，划分物之间的信号差异可被检测，并且可用于对划分物进行区分。

[0087] 在一些实施方式中，能够检测单个信号或多个信号的检测器被用于分析各划分物中是否存在抗原。例如，在一些实施方式中，使用双色读取器(荧光检测器)。阳性计数划分物的分数可用于测定待测量抗原的绝对浓度。

[0088] 在一些实施方式中，一旦确定各样品划分物的二态“是-否”结果，即可使用基于泊松统计的算法分析各划分物的数据以定量样品中的抗原含量。定量抗原的浓度或含量的统计学方法描述于例如WO 2010/036352，其通过引用全文纳入本文。

[0089] III.划分物库

[0090] 还提供包括进行本发明方法的多个划分物的划分物库。在一些实施方式中，该划分物库包含两个或更多个划分物，该库的至少一些划分物(例如库中至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％或95％的划分物)包含1、2、3、4、5或更多种结合剂。

[0091] 在一个实施方式中，该划分物库包含至少500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、10,000、15,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,

000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000、2,000,000、3,000,000、4,000,000、5,000,000、10,000,000、20,000,000、30,000,000、40,000,000、50,000,000、60,000,000、70,000,000、80,000,000、90,000,000、100,000,000、150,000,000或200,000,000个划分物。

[0092] 在一些实施方式中,划分物库将还包含一种或多种标志物(或染料)以确定划分物中结合剂的种类。因此例如,如果各划分物中存在n组不同的结合剂,则将存在n种不同的分光光度可区分的特性,各不同的组分配给一种具体特性。如上文所述,可例如通过提供1、2、3、4、5或更多种不同的可检测染料来实现,其各自具有1或2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种浓度,使得各染料的浓度组合提供针对各结合剂划分物组的独特的分光光度上可区分的特性。用于监测分光光度强度组合的方法和系统描述于例如WO 2012/135327。

[0093] 在一些实施方式中,该划分物库包含多个划分物,所述多个划分物是固体划分物(如孔或管)。在一些实施方式中,划分物是微通道。在一些实施方式中,该划分物库包含多个划分物,所述多个划分物是流体划分物(如油相中的水性液滴)。在一些实施方式中,划分物是液滴。在一些实施方式中,划分物是微胶囊。上文描述了合适的划分物和生成划分物的方法的示例。

[0094] 在一些实施方式中,该划分物库包含在形状和/或尺寸方面基本均匀的划分物。例如,在一些实施方式中,这些划分物(如液滴)在平均直径方面基本均匀。在一些实施方式中,这些划分物(如液滴)的平均直径是约0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900或1000微米。在一些实施方式中,这些划分物(如液滴)的平均直径小于约1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50或25微米。在一些实施方式中,该划分物库包含在形状和/或尺寸方面不均匀的划分物(如液滴)。

[0095] 在一些实施方式中,这些划分物(如液滴)在体积上基本均匀。例如,在一些实施方式中,这些划分物(如液滴)的平均体积为约0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45或50nL。

[0096] 在一些实施方式中,这些划分物(如液滴)是稳定的且能够长期储存。在一些实施方式中,这些划分物可在约-70°、-20°、0°、3°、4°、5°、6°、7°、8°、9°、10°、15°、20°、25°、30°、35°或40℃下长时间储存(例如至少30天、至少60天、至少90天或更长)。

[0097] IV.试剂盒

[0098] 在另一方面,提供用于根据本文所述的方法检测分析物的试剂盒。在一些实施方式中,试剂盒包含本文所述一种或多种结合剂,例如本文所述一种或多种猝体、被酶标记的抗体以及/或分析物特异性抗体对。在存在被酶标记的抗体的实施方式中,试剂盒还包含底物。在一些实施方式中,试剂盒还包含试验组分(例如缓冲液、缓冲盐和/或表面活性剂)。在一些实施方式中,用于检测分析物的试剂盒还包括所述结合剂特异性结合的分析物。在一些实施方式中,试剂盒还包括进行本文所述方法的说明。

[0099] V.系统

[0100] 还提供了进行本发明所述方法的系统。在一些实施方式中,这些系统包括一个或

多个储器，其包含本文所述的反应组分或多个划分物(如液滴)(参照例如图2，储器A)。在一些实施方式中，该系统还包含一个或多个微流体通道，该微流体通道提供一个或多个储器和检测器之间的流体连通。在一些实施方式中，所有上述组间都以单个筒匣的一部分提供。在一些实施方式中，该筒匣可继而插入歧管中以接合一个或多个泵，这些泵设置成将推动液滴通过微流体通道。

[0101] 在一些实施方式中，该系统还包含一种或多种液滴注射器(例如注射器B)。在一些实施方式中，该系统包括一个或多个液滴注射器，所述液滴注射器经配置以将样品、结合剂和/或标志物中的一个或多个注射入划分物。液滴注射器描述于，例如，WO2012/135259和US2012/0132288，其各自通过引用其全文纳入本文。

[0102] 示例性系统组件描述于，例如，US2011/0151578、US2011/0218123、US2012/0222748、US2011/0218123、US2012/0222748、WO2012/135201、WO2012/135259、WO2014/043388、WO 2012/135327。

[0103] 本文所述的检测器可检测来自以下的一种或全部两种信号：(i)结合剂标记物和/或(ii)鉴定划分物的标志物。在一些实施方式中，乳液流中的液滴流过微流体通道，其通过测量来自试验的荧光信号的光学检测器。在一些实施方式中，随时间生成和聚集相同靶分子信号的多组测量值。

[0104] 可通过本领域技术人员了解和理解的用于分光光度分析的任何方法来测量标记物和/或标志物的分光光度强度和波长。可用于本发明的分光光度方法包括但不限于：本领域技术人员已知的激光和光检测器对系统或更复杂的光学器件，其中光束的路径与分光光度物质的路径相交且标记物和/或标志物的激发或照射被光程捕捉，所述光程包括一个或多个物镜、反光镜和/或透镜，以将光导向光电倍增管(PMT)或光敏照相机。在一个实施方式中，荧光检测方法使用流式细胞术仪器。分光光度强度测量可包括一种或多种方法，包括但不限于光散射、吸收、化学发光、荧光强度、辐射衰减计数、比色。将待测试样品置于激发能量源(如光源)的路径中，所述光源选自但不限于激光器、发光二极管(LED)、弧光灯、宽频带光源和高强度灯泡。待测试划分物中的标记物和/或标志物以波长基本不同于光源的波长的光的形式散射、吸收、发化学光(chemiluminesce)或发荧光(在本文中也称作“信号”)。随后通过检测器或传感器捕获该来自待测试划分物的光，所述检测器或传感器选自但不限于照相机、电荷偶联装置(CCD)、互补金属氧化物半导体(CMOS)(或者称作互补对称金属氧化物半导体(COS-MOS))、一种或多种单一光电二极管、光电二极管阵列(PDA)、雪崩光电二极管(APD)、雪崩光电二极管阵列、光电倍增管(PMT)或光电倍增管阵列。

[0105] 已知的光学或电子方法可任选地用于扩增来自光源的光和/或来自待测试样品的光和/或将一种或全部两种分离为其组分波长。

[0106] 在一些但不是所有实施方式中，本发明所述系统和方法的所有组件都是微流体的。本文中，“微流体”指含至少一个流体通道的装置、仪器或系统包，该流体通道的截面尺寸小于1mm，且长度与垂直于通道的最大截面尺寸比为至少约3:1。本文所用的“微流体通道”是符合这些标准的通道。

[0107] 可提供能够导致两个或更多个液滴融合或聚结成一个液滴的微流体系统，例如在两个或更多个液滴通常无法融合或聚结的情况中，例如由于组成、表面张力、液滴尺寸等，如本领域普通技术人员已知的那样。可使用任何合适的技术将流体液滴融合在一起，例如，

参见Link等2005年10月7日提交的美国专利申请系列号11/246,911(标题为“Formation and Control of Fluidic Species(流体物质的形成和控制)”),其在2006年7月27日公开为美国专利申请公开号2006/0163385;或Link等2006年2月23日提交的美国专利申请系列号11/360,845(标题为“Electronic Control of Fluidic Species(流体物质的电子控制)”),其在2007年1月4日公开为美国专利申请公开号2007/0003442,其各自通过引用纳入本文。例如,在微流体系统中,相对于液滴尺寸的液滴表面张力可阻止发生液滴的融合或聚结。在一个实施方式中,对两个液滴给予相反的电荷(即正电荷和负电荷,无需相同幅度),其可提高两个液滴的电相互作用从而发生液滴的融合或聚结。通过使用泰勒锥或通过任何其他合适的技术将电荷(正或负)施加到液滴上。例如,可对含有液滴的反应器施加电场,这些液滴可通过电容器,可发生化学反应以导致液滴带电荷,在具有相反湿润性质的区域上流动液滴,等。

[0108] 通道的“截面尺寸”以垂直于流体流动方向测量。在一些实施方式中,流体通道的最大截面尺寸小于约2mm,且在一些情况中小于约1mm。在一组实施方式中,所有流体通道都是微流体或最大截面尺寸不超过约2mm或约1mm。在某些实施方式中,这些流体通道可部分通过单一组件形成(例如蚀刻的底物或模塑单元)。较大的通道、管道、腔体、储器等可用于储存大量流体和将流体递送至本发明的组件。在一些实施方式中,包含本发明的实施方式的通道的最大截面尺寸小于约500微米、小于约200微米、小于约100微米、小于约50微米或小于约25微米。

[0109] 本文中,“通道”指至少部分引导流体流的制品(物质)上方或内部的特征。该通道可具有任何截面形状(圆形、椭圆形、三角形、不规则形状、方形或矩形等)并可以是被覆盖的或未覆盖的。在其被完全覆盖的实施方式中,至少一部分通道可具有完全闭合的截面,或整个通道可沿其整个长度完全闭合(其入口和出口除外)。通道还可具有至少约2:1的纵横比(长度与平均截面尺寸的比率),更通常是至少约3:1、至少约5:1或至少约10:1或更多。开放的通道通常将包括促进对流体运输控制的特性,例如结构特性(延长的压痕)和/或物理或化学特性(疏水性对比亲水性)或可对流体施加作用力(如包含力(containing force))的其他特性。通道内的流体可部分或全部充满通道。在一些情况中,当使用开放的通道时,流体可维持在通道内,例如使用表面张力(即凸形或者凹形弯月面)。

[0110] 该通道可以是任何尺寸,例如,与流体流垂直的最大尺寸小于约5mm或约2mm,或小于约1mm,或小于约500微米,小于约200微米,小于约100微米,小于约60微米,小于约50微米,小于约40微米,小于约30微米,小于约25微米,小于约10微米,小于约3微米,小于约1微米,小于约300nm,小于约100nm,小于约30nm,或小于约10nm。在一些情况中,可选择通道的尺寸使得流体能够自由地流过制品或物质。还可选择通道的尺寸以例如允许通道内流体有特定体积或线性流速。当然,可通过本领域普通技术人员已知的任何方法改变通道的数目和通道的形状。在一些情况中,可以使用超过一条通道或毛细管。例如,可以使用两条或更多条通道,其中其位于彼此内部,彼此相邻,彼此相交等。

[0111] 可用于本发明的微流体系统的非限制性示例公开于:2005年10月7日提交标题为“Formation and Control of Fluidic Species(流体物质的形成和控制)”的美国专利申请系列号11/246,911,其在2006年7月27日公开为美国专利申请公开号2006/0163385;2004年12月28日提交标题为“Method and Apparatus for Fluid Dispersion(流体分散的方法

和设备)”的美国专利申请系列号11/024,228,其在2005年8月11日公开为美国专利申请公开号2005/0172476;2006年2月23日提交标题为“Electronic Control of Fluidic Species(流体物质的电子控制)”的美国专利申请系列号11/360,845,其在2007年1月4日公开为美国专利申请公开号2007/000342;2006年3月3日提交的标题为“Method and Apparatus for Forming Multiple Emulsions(形成多种乳液的方法和设备)”的国际专利申请号PCT/US2006/007772,其在2006年9月14日公开为WO2006/096571;2006年3月3日提交的标题为“System and Method for Forming Particles(形成颗粒的系统和方法)”的美国专利申请系列号11/368,263,其在2007年3月8日公开为美国专利申请公开号2007/0054119;2007年3月28日提交的标题为“Multiple Emulsions and Techniques for Formation(多种乳液及其形成技术)”的美国临时专利申请系列号60/920,574;以及2006年1月20日提交的标题为“Systems and Methods for Forming Fluidic proplets Encapsulated in Particles Such as Colloidal Particles(用于形成包封在诸如胶体颗粒的颗粒中的流体液滴的系统和方法)”的国际专利申请号PCT/US2006/001938,其在2006年7月27日公开为WO 2006/078841,其各自通过引用全文纳入本文。

[0112] 计算机执行的方法和系统

[0113] 本文所述任何方法均可全部或部分地使用包括一个或多个处理器的计算机系统进行,可对其进行配置以完成所述方法的步骤。因此,实施方式可指向被配置以执行本文所述任意方法的步骤的计算机系统,潜在地具有执行相应步骤或相应步骤组合的不同组分。虽然以编号或有序步骤呈现,但本文所述方法的步骤可在同一时间或以不同顺序执行。此外,这些步骤的部分可与来自其他方法的其他步骤的部分联用。同样,步骤的全部或部分可以是任选的。此外,任何方法的任何步骤都可使用模块、循环或用于执行这些步骤的其他手段执行。

[0114] 在一些实施方式中,所述计算机执行方法通过计算机系统执行,该系统与能够检测与例如微流体装置的通道中的分析物或微流体装置中的图像中的分析物结合的光学可检测结合剂。

[0115] 本公开还提供了一种能够执行本文所述的方法的任何一个或所有步骤的计算机产品。因此在一些实施方式中,所述计算机产品包括非瞬时计算机可读介质,其储存用于控制处理器执行本发明所述的一种或多种方法步骤操作的多项指令。

[0116] 图6显示了可用于根据本发明的实施方式的方法和系统的示例性计算机系统600的框图。

[0117] 本发明提及的任何计算机系统都可利用任何适当数目的子系统。这类子系统的示例如图6中计算机设备600所示。在一些实施方式中,计算机系统包括单个计算机设备,其中子系统可以是该计算机设备的组件。在其他实施方式中,计算机系统可包括多个计算机设备,其各是子系统,具有内部组件。

[0118] 图6所示的子系统经由系统总线675互联。显示了其他子系统,如打印机674、键盘678、储存装置679、与显示适配器676偶联的监视器682等。与输入/输出(I/O)控制器671偶联的周边和I/O装置可通过任何数量的本领域已知方式(如串行端口677)连接至计算机系统。例如,串行端口677或外部接口681(例如以太网、Wi-Fi等)可用于将计算机系统600连接至广域网(如因特网)、鼠标输入装置或扫描仪。经由系统总线675的互联允许中央处理器

673与各子系统连通并控制来自系统内存672或储存装置679(例如固定磁盘,如硬盘或光盘)指令的执行以及子系统间信息的交换。系统存储器672和/或储存装置679可包含计算机可读介质。本文所述的任何数据都可从一种组件输出至另一种组件并可输出至用户。

[0119] 计算机系统可包括多种相同的组件或子系统,例如通过外部接口681或通过内部接口连接在一起。在一些实施方式中,计算机系统、子系统或设备可通过网络连通。在这种情况下,可将一台计算机作为客户端并将另一台计算机作为服务器,其中各计算机都可以是同一计算机系统的部分。客户端和服务器可各包括多个系统、子系统或组件。

[0120] 应理解,上述实施方式可使用硬件(例如专用集成电路或现场可编程门阵列)以控制逻辑的形式和/或采用一般可编程的处理器使用计算机软件以模块化或集成化的方式来实施。本文中,处理器包括同一集成芯片上的多核处理器或者单个电路板上或网络连接的多个处理单元。基于本发明的公开和教导,本领域普通技术人员应知晓并理解使用硬件以及硬件和软件的组合来实施本文所述的实施方式的其他方式和/或方法。

[0121] 本申请中描述的任何软件组件或函数都可作为软件代码使用,以由处理器使用任何适当的计算机语言(如Java、C++或Perl)、使用例如常规或面向对象的技术来执行。软件代码可作为一系列指令或命令储存于计算机可读介质上用于储存和/或传输,合适的介质包括随机存取存储器(RAM)、只读存储器(ROM)、磁性介质(如硬盘或软盘)、光学介质(如光盘(CD)或DVD(数字多功能光盘)、闪速存储器等)。计算机可读介质可以是这里储存或传输装置的任意组合。

[0122] 也可使用适用于传输的载波信号经由遵循多种协议的有线、光纤和/或无线网络(包括因特网)编码和传输这类程序。同样地,可使用这类程序编码的数据信号来建立本公开的一个实施方式所述的计算机可读介质。程序代码编码的计算机可读介质可与兼容性装置打包或由其他装置单独提供(例如通过因特网下载)。任何这类计算机可读介质可存在于单个计算机产品(例如硬盘、CD或整个计算机系统)之上或之内,且可存在于系统或网络中不同计算机产品之上或之内。计算机系统可包括监视器、打印机或将本发明所述任何结果提供给用户的其他合适显示装置。

[0123] 实施例

[0124] 仅以说明的形式而非限制的形式提供以下实施例。本领域技术人员不难了解,可改变或调整各种非关键参数而获得基本相同或相似的结果。

[0125] 实施例1

[0126] 检测分析物的方案1

[0127] 该实施例说明了使用特异性结合至分析物的猝体对样品中感兴趣的分析物的检测。在该方案中,形成了具有含骨钙素(一种猝体,即TAMRA标记的抗人骨钙素scFv)的样品的划分物以及两种荧光标志物。所述荧光标志物为:1,3-双[(1,3-二氢-1,3,3-三甲基-2H-吲哚-2-亚基)甲基]-2,4-双环丁烯二基鎓,双(内盐),发射峰585nm;和2-(3,5-二甲基吡咯-2-基)-4-(3,5-二甲基-2H-吡咯-2-亚基)-3-羟基-2-环丁-1-酮,发射峰630nm。使猝体与骨钙素结合,在色氨酸和TAMRA荧光染料之间发生光诱导电子转移。荧光信号未被猝灭,并被本文描述的方法检测到。划分物中骨钙素的存在通过数字式分析确定,或者骨钙素浓度通过标准曲线分析确定,两种方法均在本文中有描述。参见图3。

[0128] 实施例2

[0129] 检测分析物的方案2

[0130] 该实施例说明了使用特异性结合至分析物的抗体对来检测感兴趣的分析物(干扰素γ)(例如,该对中的各抗干扰素γ抗体结合至干扰素γ上的不同表位)。在该方案中,形成了划分物,其具有含干扰素γ的样品、对干扰素γ具有特异性的抗体对(例如以FAM这种荧光团F标记的抗体和以TAMRA这种猝灭剂Q标记的抗体)和实施例1中描述的两种荧光标志物。该抗体对能够结合至干扰素γ,通过荧光信号的猝灭来检测干扰素γ的存在。荧光信号被猝灭至少10%-25%。因此,荧光信号强度与样品中干扰素γ的量呈负相关。划分物中干扰素γ的存在通过数字式分析确定,或者干扰素γ浓度通过标准曲线分析确定,两种方法均在本文中有描述。参见图4。

[0131] 实施例3

[0132] 检测分析物的方案3

[0133] 该实施例说明了使用特异性结合至分析物的酶标记抗体对感兴趣的分析物的检测。在该方案中,形成了划分物,其具有包括含分析物的样品、酶标记抗体(例如由β-半乳糖苷酶标记的抗体)、发色底物(例如邻硝基苯-β-D-半乳糖苷或ONPG)、和实施例1中描述的两种荧光标志物。酶标记的抗体能够结合至分析物,酶切割ONPG以释放黄色的邻硝基苯和半乳糖。在410nm下检测到黄色,与样品中存在的抗原的浓度成比例。另外,划分物中抗原的存在通过采用本文描述的方法的数字式分析来确定。参见图5。

[0134] 本说明书中引用的所有专利、专利申请和其它公开的参考材料都通过引用全文结合入本文中。

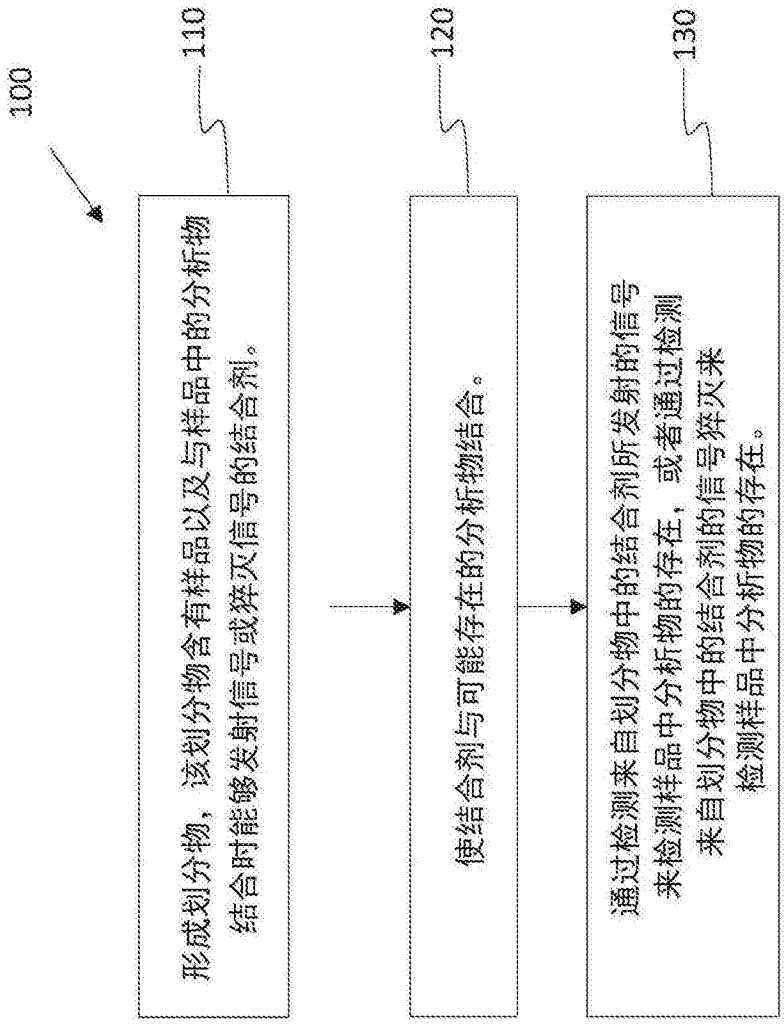

100
110
形成划分物，该划分物含有样品以及与样品中的分析物结合时能够发射信号或猝灭信号的结合剂。
120
使结合剂与可能存在的分析物结合。
130
通过检测来自划分物中的结合剂所发射的信号来检测样品中分析物的存在，或者通过检测来自划分物中的结合剂的信号猝灭来检测样品中分析物的存在。

图1

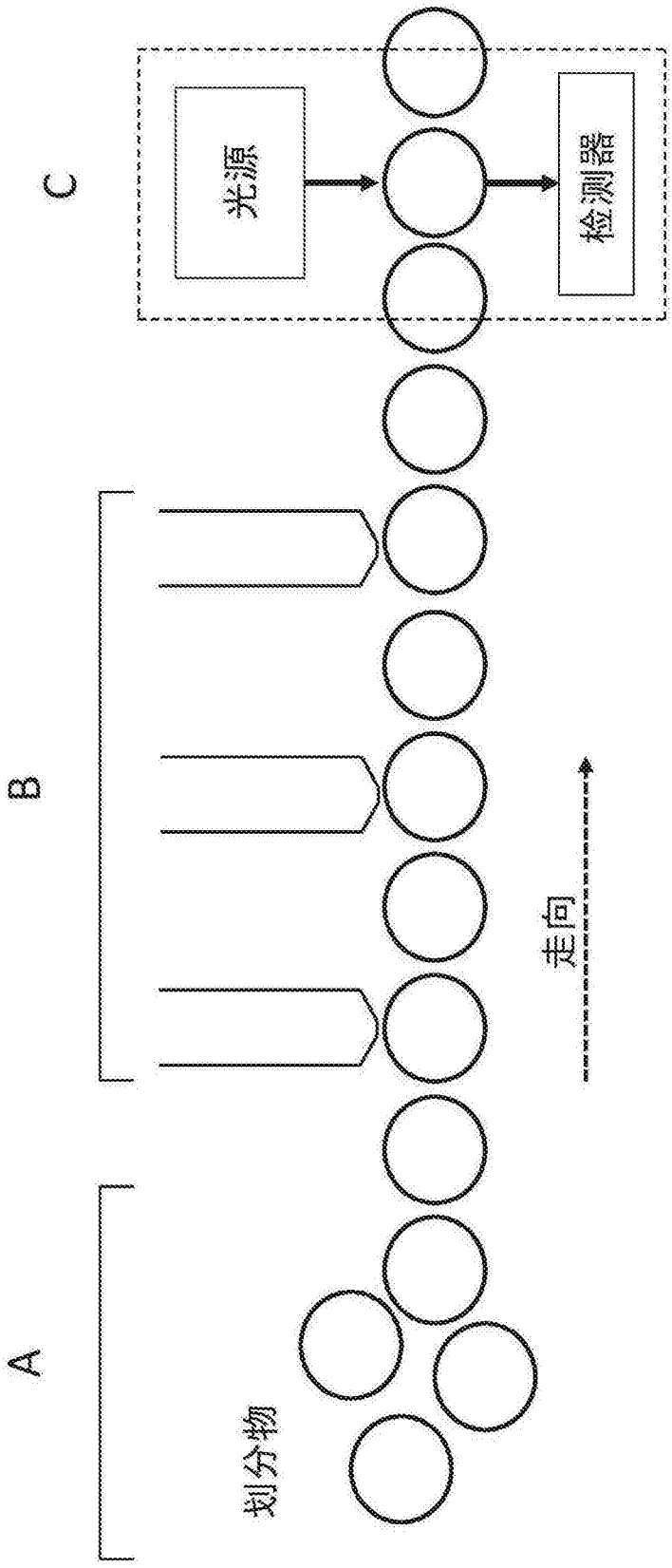


图2

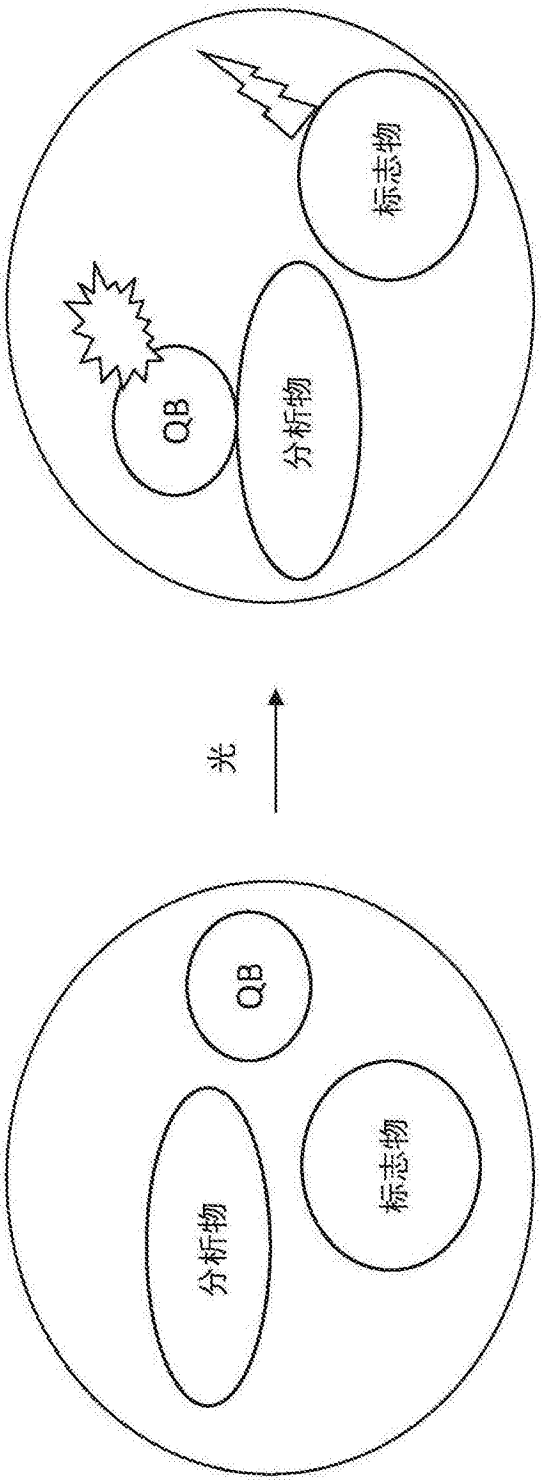


图3

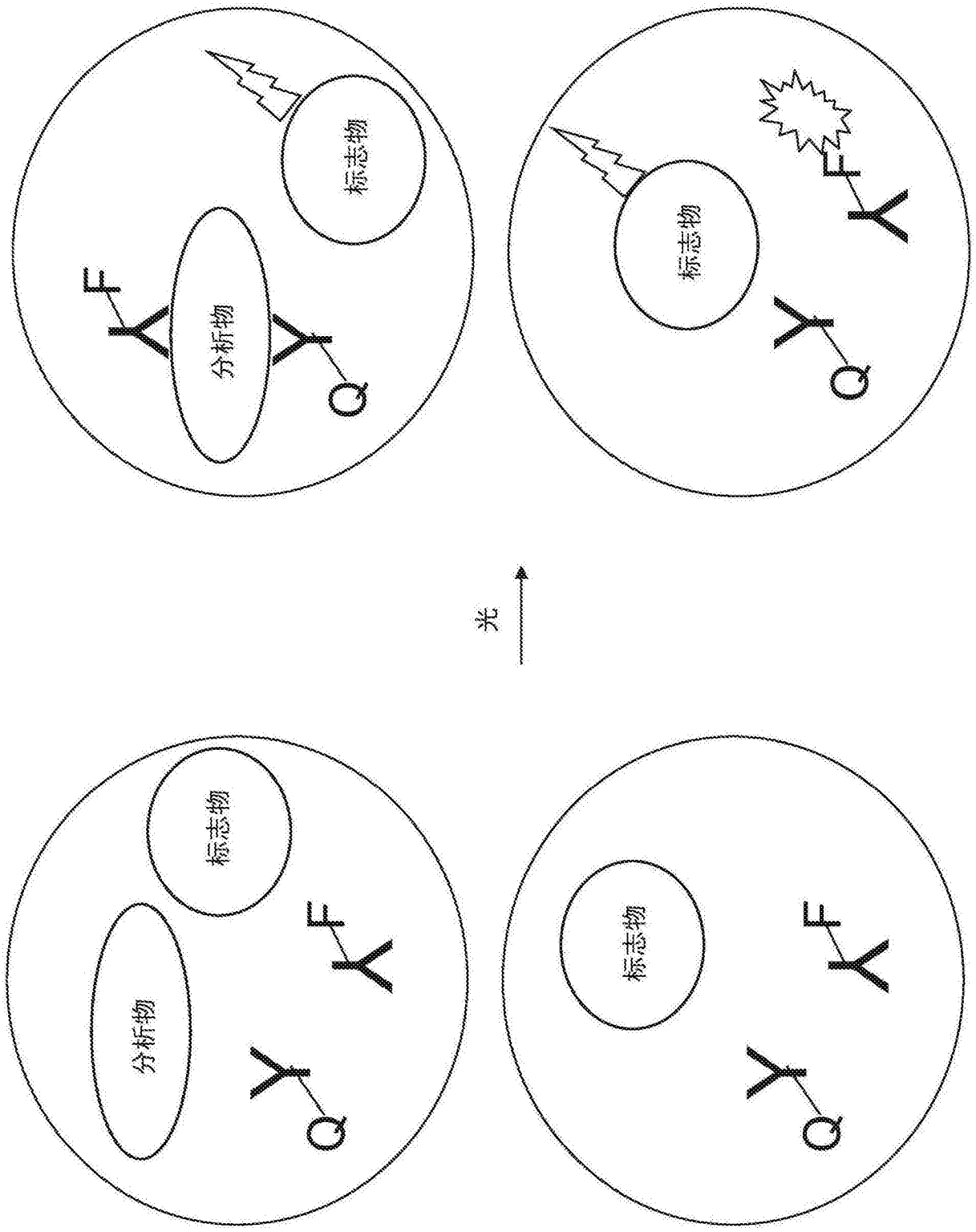


图4

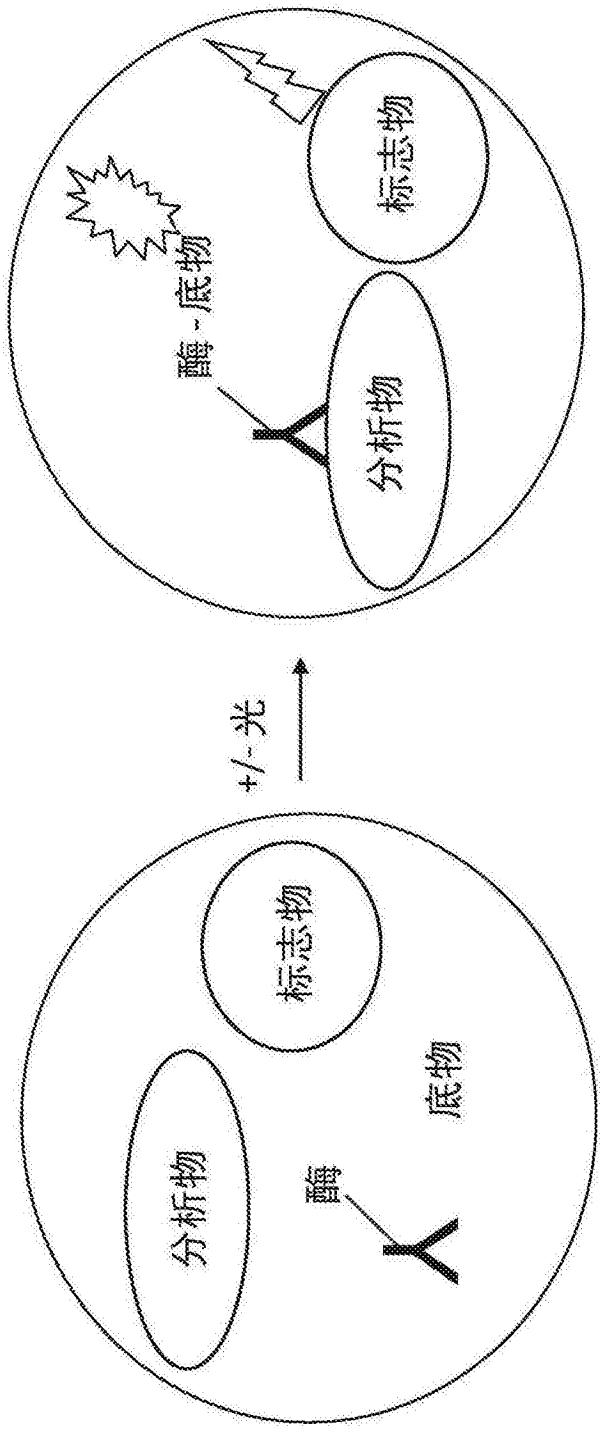


图5

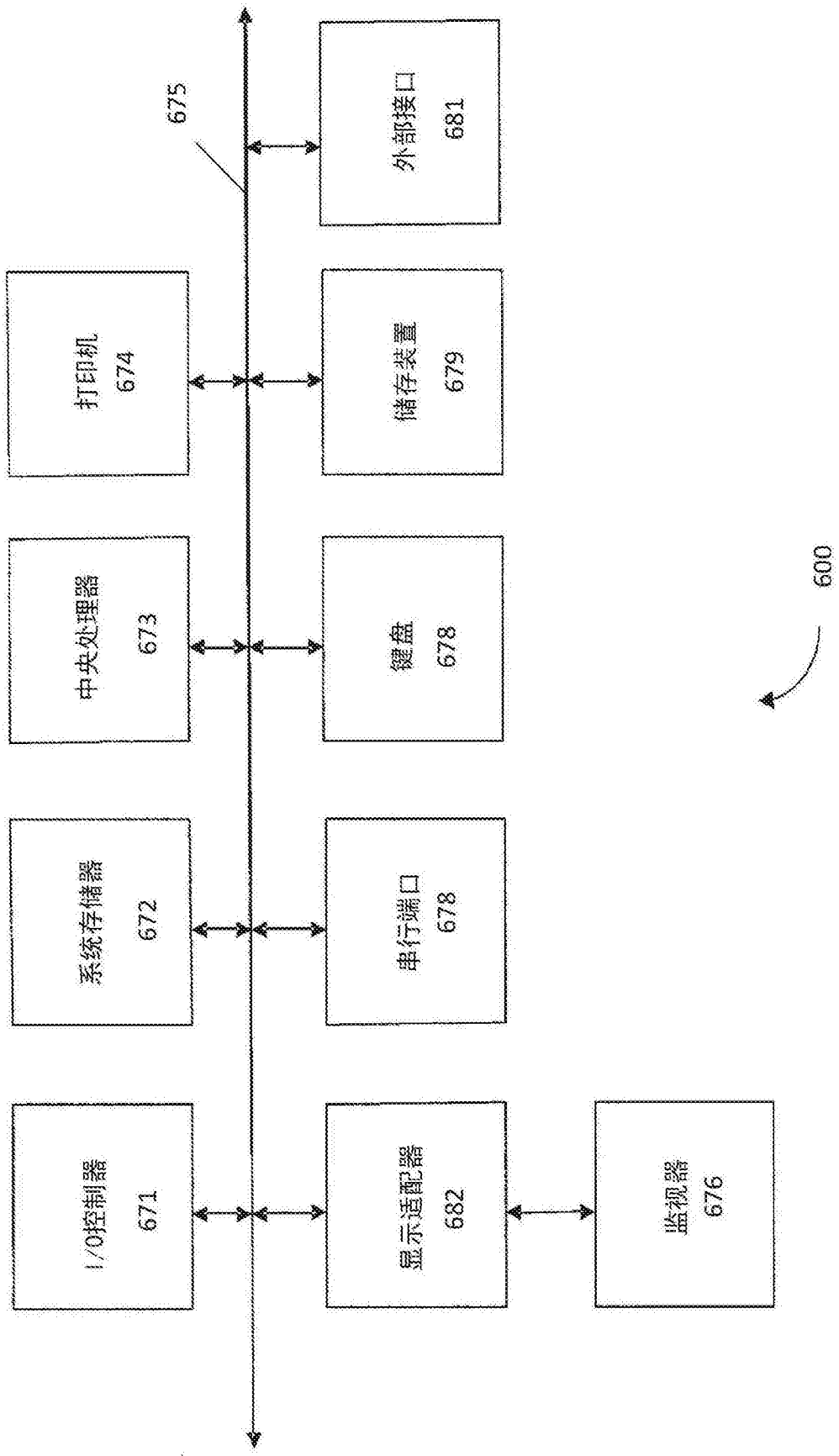
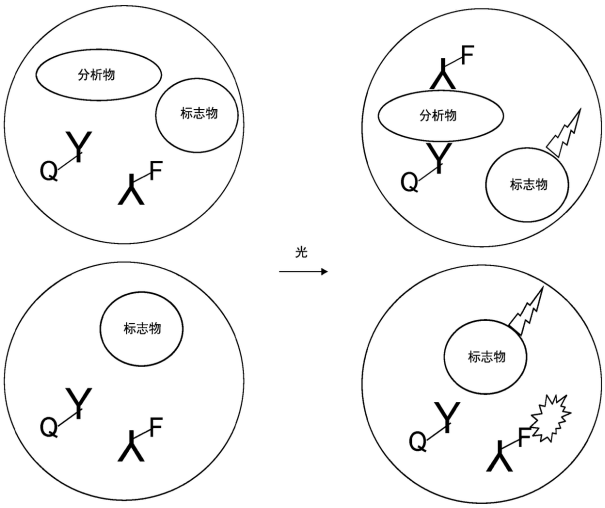

675
外部接口
681
打印机
674
储存装置
679
中央处理器
673
键盘
678
600
系统存储器
672
串行端口
678
I/O控制器
671
显示适配器
682
监视器
676

图6

专利名称(译)	数字式免疫测定		
公开(公告)号	CN107923070A	公开(公告)日	2018-04-17
申请号	CN201680049482.7	申请日	2016-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
[标]发明人	J 泽梅格德 G卡琳 纽曼		
发明人	J·泽梅格德 G·卡琳-纽曼		
IPC分类号	C40B30/04 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/542		
CPC分类号	G01N33/542 G01N33/581 G01N33/582 G01N2333/57 G01N2333/575		
代理人(译)	陈扬扬 温剑		
优先权	62/209731 2015-08-25 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供检测样品中的分析物的方法。在一个实施方式中，所述方法包括：形成划分物，该划分物含有样品、与分析物结合时能够发射信号的结合剂以及能够鉴定所述划分物的标志物；使结合剂与可能存在的分析物结合；以及通过检测划分物中的结合剂所发射的信号来检测样品中分析物的存在。