



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108291909 A

(43)申请公布日 2018.07.17

(21)申请号 201680037683.5

(22)申请日 2016.04.27

(30)优先权数据

62/153,523 2015.04.28 US

62/155,486 2015.05.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/059438 2016.04.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/174106 EN 2016.11.03

(71)申请人 奥菲迪亚有限公司

地址 英国伦敦

(72)发明人 阿伦·拉赫阿米 雅各布·雷比

(74)专利代理机构 北京金信知识产权代理有限公司 11225

代理人 张皓 李维盈

(51)Int.Cl.

G01N 33/537(2006.01)

G01N 15/00(2006.01)

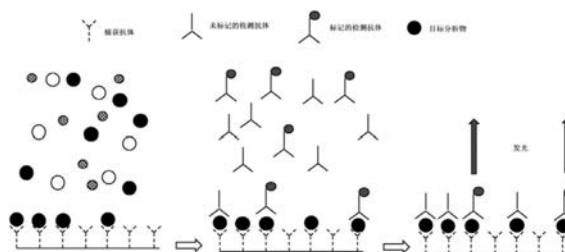
权利要求书5页 说明书19页 附图18页

(54)发明名称

分析物检测及其方法

(57)摘要

本发明公开了用于在样本且更具体地为生物样本中的分析物检测的方法和系统。一些方法和系统特别涉及通过添加对预定CD抗原特异性的抗体来区分和/或识别生物样本(如血液样本)中的细胞类型。其它方法和系统涉及控制分析物检测的测定的动态范围。



1. 一种用于区分生物样本中的细胞的方法,所述方法包括:  
使所述生物样本与针对所述细胞的至少一种表面标记物的标记物特异性分子接触,其中所述标记物特异性分子与第一计数参数有关;  
使所述生物样本中的细胞结合所述标记物特异性分子以产生结合的标记物特异性分子;  
通过从所述生物样本中除去所述细胞和所述结合的标记物特异性分子来过滤所述生物样本,以产生滤液;  
通过传感器或分析器来确定所述滤液中的标记物特异性分子的第二计数参数;以及  
基于所述第一计数参数与所述第二计数参数之间的差值,通过计算装置或所述分析器来计算所述生物样本中的细胞的数量。
2. 权利要求1所述的方法,其中,所述第一计数参数包括所述标记物特异性分子的第一浓度,以及其中,所述第二计数参数包括所述标记物特异性分子的第二浓度。
3. 权利要求1所述的方法,其中,所述第一计数参数包括所述标记物特异性分子的第一计数,以及其中,所述第二计数参数包括所述标记物特异性分子的第二计数。
4. 权利要求1至3中任一项所述的方法,其中,所述标记物特异性分子包括至少一种类型的一种或多种抗体。
5. 权利要求1至3中任一项所述的方法,其中,所述标记物特异性分子包括至少一种类型的一种或多种适配子。
6. 权利要求1至5中任一项所述的方法,其中,所述表面标记物的每一个都与一个不同的分化群有关。
7. 权利要求1至6中任一项所述的方法,所述方法进一步包括基于所述第一计数参数与所述第二计数参数之间的差值来识别一种或多种类型的细胞。
8. 权利要求1至7中任一项所述的方法,所述方法进一步包括使所述滤液转移到分析器结构上,所述分析器结构包含其上结合了所述表面标记物的离散区域。
9. 权利要求8所述的方法,所述方法进一步包括在所述分析器结构中培养所述滤液。
10. 权利要求1至9中任一项所述的方法,其中,所述细胞的至少一种表面标记物包括有助于鉴定所述生物样本中的病原体的一种或多种病原体表面标记物。
11. 权利要求1至10中任一项所述的方法,其中,所述细胞的至少一个表面标记物包括有助于检测细胞系中的支原体生长的一种或多种支原体表面标记物。
12. 权利要求1至11中任一项所述的方法,其中,所述标记物特异性分子的第一计数参数是预定的。
13. 权利要求1至12中任一项所述的方法,所述方法进一步包括在产生所述滤液之前通过所述传感器或所述分析器确定所述标记物特异性分子的第一计数参数。
14. 权利要求1至13任一项所述的方法,所述方法进一步包括基于所述第一计数参数与所述第二计数参数之间的差值,通过所述计算装置或所述分析器来确定个体的疾病。
15. 权利要求1至14中任一项所述的方法,所述方法进一步包括:  
通过所述计算装置或所述分析器维护多个治疗推荐方案;以及  
基于个体疾病的确定,通过所述计算装置或所述分析器提供所述治疗推荐方案中的一个。

16. 一种用于区分生物样本中的细胞的方法,所述方法包括:

使所述生物样本与针对所述细胞的至少一种表面标记物的标记物特异性分子接触,其中所述标记物特异性分子与计数参数有关;

使所述生物样本中的细胞结合所述标记物特异性分子以产生结合的标记物特异性分子;

处理或过滤所述生物样本以从所述生物样本中除去所述细胞和所述结合的标记物特异性分子并产生滤液;

通过传感器或分析器来确定所述结合的标记物特异性分子的计数参数;以及

基于所述标记物特异性分子的计数参数与所述结合的标记物特异性分子的计数参数,通过所述分析器来计算一种或多种类型的细胞的数量。

17. 一种用于区分生物样本中的细胞的系统,所述系统包括:

取样模块,其设置为使所述生物样本与针对所述细胞的至少一种表面标记物的标记物特异性分子接触,并使所述生物样本中的细胞结合所述标记物特异性分子以产生结合的标记物特异性分子,其中所述标记物特异性分子与第一计数参数有关;

过滤器,其设置为通过从所述生物样本中除去所述细胞和所述结合的标记物特异性分子来过滤所述生物样本,以产生滤液;以及

分析器,其设置为确定所述滤液中的标记物特异性分子的第二计数参数,并基于所述第一计数参数与所述第二计数参数之间的差值来计算所述生物样本中的细胞的数量。

18. 权利要求16所述的方法或权利要求17所述的系统,其中,所述分析器包括具有至少一个处理器和存储了处理器可执行指令的存储器的计算装置,所述处理器可执行指令在由所述至少一个处理器执行时,使所述至少一个处理器确定所述滤液中的至少一种标记物特异性分子的第二计数参数,并基于第一计数参数与第二计数参数之间的差值来计算所述生物样本中的细胞的数量。

19. 权利要求16所述的方法或权利要求17所述的系统,其中,所述分析器包括具有至少一个处理器和存储了处理器可执行指令的存储器的计算装置,所述处理器可执行指令在由所述至少一个处理器执行时,使所述至少一个处理器确定所述滤液中的至少一种标记物特异性分子的第二浓度,并基于第一浓度与第二浓度之间的差值来计算所述生物样本中的细胞的数量。

20. 一种用于区分生物样本中的细胞的系统,所述系统包括:

取样模块,其设置为使所述生物样本与针对所述细胞的至少一种表面标记物的标记物特异性分子接触,并使所述生物样本中的细胞结合所述标记物特异性分子以产生结合的标记物特异性分子,其中所述标记物特异性分子与第一计数参数有关;

过滤器,其设置为通过从所述生物样本中除去所述细胞和所述结合的标记物特异性分子来过滤所述生物样本;以及

分析器,其设置为确定与所述细胞结合的标记物特异性分子的第二计数参数,并基于所述第一计数参数与所述第二计数参数之间的差值来计算所述生物样本中的细胞的数量。

21. 一种用于控制测定信号的动态范围的方法,所述方法包括:

提供样本中的一种或多种目标分析物;

使所述一种或多种目标分析物与缀合的结合试剂和未缀合的结合试剂的混合物接触,

其中所述缀合的结合试剂和所述未缀合的结合试剂对所述一种或多种目标分析物是特异性的；

测定所述一种或多种目标分析物与所述缀合的结合试剂和未缀合的结合试剂的混合物之间的相互作用；以及

通过调节所述混合物中缀合的结合试剂与未缀合的结合试剂的比例来控制测定信号的动态范围。

22. 权利要求21所述的方法，所述方法进一步包括确定每个目标分析物的浓度。

23. 权利要求21或22所述的方法，所述方法进一步包括将一种或多种缀合的分析物加入到所述样本中；以及使得所述一种或多种目标分析物稀释。

24. 权利要求21至23中任一项所述的方法，所述方法进一步包括将一种或多种未缀合的分析物加入到所述样本中；以及使得所述一种或多种目标分析物稀释。

25. 权利要求21至24中任一项所述的方法，其中，所述缀合的结合试剂或所述未缀合的结合试剂包括以下中的一种或多种：抗体、抗原、适配子、肽、蛋白质和寡核苷酸。

26. 权利要求21至25中任一项所述的方法，其中，所述缀合的结合试剂包括与选自以下的缀合物偶联的结合试剂：酶、蛋白质、荧光团、链霉亲和素、亲和素、抗体、抗原、适配子和寡核苷酸。

27. 权利要求21至26中任一项所述的方法，其中，所述一种或多种目标分析物包括以下中的一种或多种：抗原、抗体、核酸、糖类、脂质、肽、蛋白质、聚合物，以及它们的任意组合。

28. 权利要求21至27中任一项所述的方法，其中，所述样本包括生物流体样本。

29. 权利要求21至28中任一项所述的方法，所述方法进一步包括，基于所述一种或多种目标分析物与所述混合物之间的相互作用的测量结果以及基于对测定信号的动态范围的控制来定量确定所述样本中的一种或多种目标分析物。

30. 权利要求21至29中任一项所述的方法，其中，调节所述混合物中的一种或多种缀合的分析物的比例通过计算装置来执行。

31. 一种用于控制测定信号的动态范围的方法，所述方法包括：

提供样本中的一种或多种目标分析物；

使所述一种或多种目标分析物与含有至少一种结合试剂的混合物接触，其中所述结合试剂对所述一种或多种目标分析物是特异性的；

测定所述一种或多种目标分析物与所述混合物之间的相互作用；

向所述样本中加入一种或多种缀合的分析物以使得所述一种或多种目标分析物稀释；以及

通过调节所述混合物中的一种或多种缀合的分析物的比例来控制测定信号的动态范围。

32. 权利要求31所述的方法，其中，所述至少一种结合试剂包括未缀合的结合试剂。

33. 权利要求31或32所述的方法，其中，所述至少一种结合试剂包括缀合的结合试剂。

34. 权利要求31至33中任一项所述的方法，所述方法进一步包括基于所述一种或多种目标分析物与所述混合物之间的相互作用的测量结果以及基于对测定信号的动态范围的控制来定量确定所述样本中的一种或多种目标分析物。

35. 权利要求31至34中任一项所述的方法，所述方法进一步包括将一种或多种未缀合

的分析物加入到所述样本中；以及使得所述一种或多种目标分析物稀释。

36. 权利要求31至35中任一项所述的方法，其中，所述缀合的结合试剂或所述未缀合的结合试剂包括以下中的一种或多种：抗体、抗原、适配子、肽、蛋白质和寡核苷酸。

37. 权利要求31至36中任一项所述的方法，其中，所述缀合的结合试剂包括与选自以下的缀合物偶联的结合试剂：酶、蛋白质、荧光团、链霉亲和素、亲和素、抗体、抗原、适配子和寡核苷酸。

38. 权利要求31至37中任一项所述的方法，其中，所述一种或多种目标分析物包括以下中的一种或多种：抗原、抗体、核酸、糖类、脂质、肽、蛋白质、聚合物，以及它们的任意组合。

39. 权利要求31至38中任一项所述的方法，其中，所述样本包括生物流体样本。

40. 权利要求31至39中任一项所述的方法，其中，调节所述混合物中一种或多种缀合的分析物的比例通过计算装置来执行。

41. 一种用于控制测定信号的动态范围的方法，所述方法包括：

提供样本中的一种或多种目标分析物；

使所述一种或多种目标分析物与含有至少一种结合试剂的混合物接触，其中所述结合试剂对所述一种或多种目标分析物是特异性的；

测定所述一种或多种目标分析物与所述混合物之间的相互作用；

向所述样本中加入一种或多种改性的分析物；以及

通过调节所述混合物中一种或多种改性的分析物的比例来控制测定信号的动态范围。

42. 权利要求41所述的方法，其中，所述一种或多种改性的分析物包括具有与所述一种或多种目标分析物内的结构相同的结构的分子。

43. 权利要求42所述的方法，其中，所述一种或多种改性的分析物包括至少一种所述目标分析物的子单元。

44. 权利要求41至43中任一项所述的方法，所述方法进一步包括向所述样本中加入一种或多种缀合的分析物以使得所述一种或多种目标分析物稀释。

45. 权利要求41至44中任一项所述的方法，其中，所述至少一种结合试剂包括未缀合的结合试剂。

46. 权利要求41至45中任一项所述的方法，其中，所述至少一种结合试剂包括缀合的结合试剂。

47. 权利要求41至46中任一项所述的方法，所述方法进一步包括，基于所述一种或多种目标分析物与所述混合物之间的相互作用的测量结果以及基于对测定信号的动态范围的控制来定量确定所述样本中的一种或多种目标分析物。

48. 权利要求41至47中任一项所述的方法，所述方法进一步包括将一种或多种未缀合的分析物加入到所述样本中；以及使得所述一种或多种目标分析物稀释。

49. 权利要求41至48中任一项所述的方法，其中，所述缀合的结合试剂或所述未缀合的结合试剂包括以下中的一种或多种：抗体、抗原、适配子、肽、蛋白质和寡核苷酸。

50. 权利要求41至49中任一项所述的方法，其中，所述缀合的结合试剂包括与选自以下的缀合物偶联的结合试剂：酶、蛋白质、荧光团、链霉亲和素、亲和素、抗体、抗原、适配子和寡核苷酸。

51. 权利要求41至50中任一项所述的方法，其中，所述一种或多种目标分析物包括以下

中的一种或多种:抗原、抗体、核酸、糖类、脂质、肽、蛋白质、聚合物,以及它们的任意组合。

52. 权利要求41至51中任一项所述的方法,其中,所述样本包括生物流体样本。

53. 权利要求41至52中任一项所述的方法,其中,调节所述混合物中一种或多种缀合的分析物的比例通过计算装置来执行。

54. 一种用于控制测定信号的动态范围的系统,所述系统包括:

容器,用于提供样本中的一种或多种目标分析物,并使所述一种或多种目标分析物与缀合的结合试剂和未缀合的结合试剂的混合物接触,其中所述缀合的结合试剂和所述未缀合的结合试剂对所述一种或多种目标分析物是特异性的;

传感器,其设置为测定所述一种或多种目标分析物与所述缀合的结合试剂和未缀合的结合试剂的混合物之间的相互作用;以及

控制器,其设置为通过调节所述混合物中缀合的结合试剂与未缀合的结合试剂的比例来控制测定信号的动态范围。

55. 权利要求54所述的系统,所述系统进一步包括分析器,其设置为确定每个目标分析物的浓度。

56. 权利要求55所述的系统,其中,所述分析器包括操作连接至所述传感器的计算装置。

57. 权利要求54至56中任一项所述的系统,其中,所述传感器包括以下中的一种或多种:比色传感器、荧光传感器、光度传感器和分光光度装置。

58. 权利要求54至57中任一项所述的系统,其中,所述控制器包括具有至少一个处理器和存储了处理器可执行指令的存储器的计算装置,所述处理器可执行指令在由所述至少一个处理器执行时,使所述系统通过所述传感器进行测量,改变所述混合物的比例,以及定量确定所述一种或多种目标分析物。

59. 权利要求54至58中任一项所述的系统,所述系统进一步包括将一种或多种未缀合的分析物加入到所述样本中;以及使得所述一种或多种目标分析物稀释。

60. 权利要求54至59中任一项所述的系统,其中,所述缀合的结合试剂或所述未缀合的结合试剂包括以下中的一种或多种:抗体、抗原、适配子、肽、蛋白质和寡核苷酸。

61. 权利要求54至60中任一项所述的方法,其中,所述缀合的结合试剂包括与选自以下的缀合物偶联的结合试剂:酶、蛋白质、荧光团、链霉亲和素、亲和素、抗体、抗原、适配子和寡核苷酸。

62. 权利要求54至61中任一项所述的方法,其中,所述一种或多种目标分析物可以包括以下中的一种或多种:抗原、抗体、核酸、糖类、脂质、肽、蛋白质、聚合物,以及它们的任意组合。

63. 权利要求54至62中任一项所述的方法,其中,所述样本包括生物流体样本。

## 分析物检测及其方法

### 技术领域

[0001] 本技术涉及分析物检测。更具体地,本技术涉及用于识别样本中的细胞类型的方法和系统。本技术还涉及用于控制分析物检测的定量测定的动态范围的方法和系统。

### [0002] 【相关申请】

[0003] 本申请要求于2015年04月28日提交的标题为“Method and System for Identifying Cells in Blood Samples by Adding Antibodies Specific to Clusters of Differentiation”的美国临时申请第62/153,523号的权益,其主题以整体引用的方式并入本文中。

[0004] 本申请要求于2015年05月01日提交的标题为“Method and System for Controlling Dynamic Range of Assay Quantification for Analyte Detection”的美国临时申请第62/155,486号的权益,其主题以整体引用的方式并入本文中。

### 背景技术

[0005] 分析物检测不仅对于医疗应用,而且广泛而言对于农业和兽医应用仍旧是重要工具。血细胞计数是重要的诊断工具,其提供了关于患者健康的有价值的信息。全血计数测定了每单位体积患者血液的各种类型的血细胞的数量。被计数的一种血细胞是白血细胞(WBC)。血液循环中的高水平的白血细胞代表细菌感染和/或炎症的发展,并且关于血液样本中的白血细胞分化的信息可以给人提供有关某些特定病症(如过敏反应、白血病、人类免疫缺陷病毒(HIV))和免疫系统的一般状态的详细信息。红细胞数量的增加可以代表许多病症(如贫血症和骨髓疾病)的发展。血液循环中的血小板数量的变化可以预示患者出血或血块的风险,并且其还可以代表病毒感染的发生。

[0006] 分化群(CD)抗原是在血细胞表面上表达的膜蛋白,广泛用于鉴定不同类型的白血细胞以及红细胞和血小板。在第一届人类白血细胞分化抗原(HLDA)国际研讨会上已经提出并建立了所述分化群的命名法。免疫学家在全球生产了大量的与白血细胞表面分子反应的单克隆抗体,并且这些抗体中的每一个都与不同的命名相关联。在没有比较研究的情况下,通常不可能说同一分子是否会被多于一种的抗体所识别。研讨会的方法是对抗体进行编码和分类,并将其送到多个参与实验室进行匿名分析,使得一种抗体与多种细胞类型进行比较。所获得的数据通过“聚类分析”的统计程序进行整理和分析。该分析方法识别了具有非常相似的与不同分化阶段的白血细胞结合的图谱的抗体簇:这样,创建了“分化群”(CD)命名法。分化群命名法使科学界能够以通用语言来交流成果。

[0007] 所述分化群命名法定义了识别相同抗原的来自不同来源的不同单克隆抗体。一旦两种特异性单克隆抗体显示出与所提议的表面分子结合,则所述分子被分配一个CD编号。两种常用的CD分子是CD4和CD8,它们通常分别用作T淋巴细胞、T辅助细胞和细胞毒性T细胞的两种不同亚型的标记。CD4被HIV特异性识别和结合,导致CD4+T细胞的病毒感染和破坏。与此同时,在许多情况下,在HIV感染者中观察到了CD8+细胞的比例升高。因此,诊断HIV感染的常规方法包括监测CD4+计数、CD4+的百分比和CD4+/CD8+之比。

[0008] 细胞计数和分化的方法的发展始于一个多世纪之前。血细胞计数最古老的方法之一是使用血细胞计数器 (haemocytometer)。这些血细胞计数器是手动的细胞计数装置,其由具有矩形凹槽的厚的玻璃显微镜载片组成,所述凹槽形成了一个腔室。该腔室刻有正交线的激光蚀刻网格。该装置是精心制作的,使得由所述线限定的面积是已知的,并且所述腔室的深度也是已知的。因此可以计算特定体积的流体(例如,血液)中的细胞或颗粒的数量,以及从而计算整个流体中的细胞浓度。

[0009] 细胞计数的另一种方法称为流式细胞术 (flow cytometry)。它是一种通过将细胞悬浮在流体流中并使其经过电子检测装置的现代的基于激光的生物物理技术,不仅在细胞计数中,还在细胞分选、生物标记物检测和蛋白质工程中应用。它允许每秒多达数千个粒子的物理和化学特性的同时多参数分析。

[0010] 流式细胞术通常用于诊断健康障碍,尤其是血液癌症,但在基础研究、临床实践和临床试验中也存在众多其它的应用。常见的变种为根据粒子属性对其进行物理分类,从而净化目标群体。

[0011] 已知还存在众多的病原体检测和鉴定方法。最古老的方法之一为革兰氏染色。革兰氏染色也称为革兰氏法,是一种将细菌菌种分为两大类(革兰氏阳性和革兰氏阴性)的方法。革兰氏染色通过检测存在于革兰氏阳性细菌的厚层 (thick layer) 中的肽聚糖而由细菌的细胞壁的化学和物理特性来区分细菌。在革兰氏染色试验中,革兰氏阳性菌保留结晶紫染料,而在结晶紫之后加入的复染剂(通常为藏红或品红)则使所有的革兰氏阴性菌呈红色或粉红色。革兰氏染色几乎总是鉴定细菌生物体的第一步。虽然革兰氏染色在临床和研究两种环境下都是一种有价值的诊断工具,但并不是所有的细菌都可以通过这种技术进行明确的分类。

[0012] 聚合酶链式反应 (PCR) 是分子生物学中的另一种技术,用于跨几个数量级扩增脱氧核糖核酸 (DNA) 链的特定区域,产生数千至数百万个特定DNA序列的副本。PCR可以对恶性疾病(如白血病和淋巴瘤)进行早期诊断,其目前是癌症研究中发展最快的,并且已经被常规使用。生物体的培养也已被用于细菌肠道病原体的临床诊断测试中。在培养中,样本通常在对所研究的病原体具有选择性、通常含有对非目标物种的抑制剂的培养基中培养。随后可以目测病原体的生长。这些培养方法包括显微镜观察药物敏感性测定 (MODS)。这是一种展现出比当前用于结核病的基于培养的测试更敏感、更快捷和更便宜测试的培养方法。所述显微镜观察药物敏感性测定涉及直接观察结核分枝杆菌及同时产生的耐药性。

[0013] 免疫磁性分离 (IMS) 是另一种可以有效地从体液或培养细胞中分离出细胞的方法。它也可以被用作量化食物、血液或粪便的致病性的方法。DNA分析支持了该技术与PCR的结合使用。免疫磁性分离方法是基于通过抗体或凝集素将小的可磁化颗粒附着于细胞上。当将混合的细胞群体置于磁场中时,那些附着有珠子的细胞将被吸引到磁体上,从而可以与未标记的细胞分离。有几种类型的珠子可用,其中一些是为细胞分选专门设计的,而另一些则是为了纯化分子(特别是核酸)设计的,但需要时可以适用于细胞分选。不同类型的珠子以相同的原理工作,但是分离细胞所需的磁场强度根据所述珠子的尺寸而不同。

[0014] 抗体包被的顺磁珠将与存在于细胞表面的抗原结合,从而捕获细胞并促进这些附着珠子的细胞的浓集。该浓集过程是由置于试管侧面吸引所述珠子的磁体产生的。抗体包被的磁珠可以被用于靶向对目标病原体特异性的抗原,并从样本中分离病原体。

[0015] 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 是采用抗体与颜色变化来鉴定物质的另一个测定。ELISA 是一种“湿式实验室”型分析生化检测的流行形式,其采用固相酶免疫测定 (EIA) 来检测液体样本或湿样本中的物质 (通常是抗原) 的存在。ELISA 已被用作医学和植物病理学的诊断工具,以及各工业的质量控制检查。进行 ELISA 涉及对特定抗原具有特异性的至少一种抗体。将具有未知量的抗原的样本非特异性地 (通过吸附至表面), 或者特异性地 (通过对相同抗原特异性的另一种抗体捕获, 以“三明治”ELISA 的形式) 固定于固体载体 (通常为聚苯乙烯微量滴定板) 上。将所述抗原固定后, 加入检测抗体, 与所述抗原形成复合物。所述检测抗体可以与酶共价连接, 或者其本身可以通过以生物缀合与酶连接的第二抗体来检测。

[0016] 因此, 本领域已知存在区分血液样本中的细胞类型的许多方法, 然而这些方法并不总是提供令人满意的结果, 并且需要复杂、缓慢且笨重的设备。因此, 本领域仍然需要改进用于区分血液样本中的细胞类型的方法。

[0017] 免疫测定是基于通过抗原-抗体相互作用形成的免疫复合物的原理来用于检测生物样本中的一种或多种目标分析物的存在或数量的生物分析方法。这些测定通常利用抗原-抗体复合物来产生可测量的信号, 该信号指示样本中存在的一种或多种或多种分析物的量。免疫分析已广泛用于疾病诊断、药物发现和药物分析中。

[0018] 不同类型的免疫测定用于分析物的检测和定量, 各自适合于特定的应用。酶免疫测定方法利用酶标记的试剂来特异性结合目标分析物 (抗原或抗体)。将结合的试剂定量为酶活性的量度, 其在加入合适的底物如“显色液”后会产生有色的、荧光的、发光的或其它改性的产物。在竞争性免疫测定中, 酶缀合分析物与存在于样本中的分析物竞争, 以结合包被于载体表面上的捕获抗体上的位点。分析物在样本中的浓度越高, 导致缀合分析物与所述抗体的结合越少。

[0019] 测定的动态范围为可以进行精确测量的目标分析物浓度的范围。样本中的目标分子的浓度在测定的动态范围内是重要的。所述测定的动态范围可受如读取装置的检测限、显色液或其它底物的显色速率、培养时间等因素的影响。例如, 如果来自与高浓度分析物结合的报告分子的荧光信号太高, 则光学传感器 (例如, 光电二极管) 可能会饱和, 故不可能获得实际的光水平的精确读数, 并因此不可能确定所述分析物的浓度。类似地, 如果显色液的显色速率太快, 则显色液在测量完成之前可能会完全显色, 使得不可能准确确定所述显色液的显色有多快, 因此不可能确定确切的分析物浓度。在现有的多重测定方法中, 采用了各种策略来提高检测性能的动态范围, 包括在适当的条件下采用连续稀释法、基于磁珠的流式细胞平台以及试剂和中性试剂与底物的共偶联。其它方法则集中在增加用于检查信号的仪器的动态范围。例如, 基于化学发光的多重测定通过单独分析与包含不同目标物的各个区域结合的抗体发射的光来促进确定不同目标分析物的浓度。然而, 上述方法并不总是提供准确且快捷的分析物检测, 特别是在样本中存在多种分析物的情况下。因此, 本领域仍然需要改进用于分析物检测的方法。

[0020] 将会被理解的是, 此处对“优选的”或“优选地”的提及仅仅是示例性的。

## 发明内容

[0021] 在一个广泛的形式中, 本技术通常涉及通过添加对预定 CD 抗原特异性的抗体来区分和/或识别生物样本 (如血液样本) 中的细胞类型的方法和系统。在一个实施方式中, 在培

养抗体使它们与CD抗原结合之后,可以基于引入的抗体的量和样本体积来计算初始抗体浓度。或者,可以测定血液样本以确定每个抗体的初始浓度。之后,过滤所述血液样本以分离出细胞和结合的抗体。此后再测定滤液或其一部分以确定不与细胞表面结合的每个抗体的最终浓度。在该技术中,在细胞表面上表达特定CD抗原的细胞数量越多,则存留于所述滤液中的抗体浓度越低。然后在计算过滤前和过滤后的抗体浓度的变化的基础上来确定表达每个CD抗原的细胞的数量和/或类型。

[0022] 在其它的实施方式中,与细胞结合的抗体的数量在处于附着于细胞的状态下被直接测定。在另一个实施方式中,与细胞结合的抗体的数量在采取行动以使其从细胞上解连、解联或解离之后被直接测定。在这些实施方式中,在细胞表面上表达特定CD抗原的细胞数量越多,则通过该测定确定的抗体的浓度越大。

[0023] 在各种实施方式中,CD抗原可以用任何其它适宜的细胞表面蛋白,或对特定细胞类型或细胞类型组的细胞表面特异性的其它分子所代替。在再一些实施方式中,CD抗原可以包括如本文所述适于测量抗体浓度的任何天然或合成的蛋白质或被如本文所述适于测量抗体浓度的任何天然或合成的蛋白质所代替。此外,抗体可以用任何仅对一种特定蛋白质具有高亲和力的其它类型的化学分子(例如,适配子)或其它细胞表面分子所代替。

[0024] 根据本公开的一个方面,提供了一种用于区分生物样本中的细胞的方法。所述方法包括以下步骤:(i)使所述生物样本与针对所述细胞的至少一种表面标记物的标记物特异性分子接触,其中所述标记物特异性分子与第一计数参数有关;(ii)使所述生物样本中的细胞结合所述标记物特异性分子以产生结合的标记物特异性分子;(iii)通过从所述生物样本中除去所述细胞和所述结合的标记物特异性分子来过滤所述生物样本,以产生滤液;(iv)通过传感器或分析器来确定所述滤液中的标记物特异性分子的第二计数参数;以及(v)基于所述第一计数参数与所述第二计数参数之间的差值,通过计算装置或所述分析器来计算所述生物样本中的细胞的数量。

[0025] 在一些实施方式中,所述第一计数参数包括所述标记物特异性分子的第一浓度,而所述第二计数参数包括所述标记物特异性分子的第二浓度。在其它的实施方式中,所述第一和第二计数参数可能会涉及计数。

[0026] 在一些实施方式中,所述标记物特异性分子包括至少一种类型和/或特异性的一种或多种抗体。在其它的实施方式中,所述标记物特异性分子包括至少一种类型和/或特异性的一种或多种适配子。

[0027] 在一些实施方式中,所述表面标记物的每一个都与一个不同的分化群有关。

[0028] 在一些实施方式中,所述方法可以进一步包括基于所述第一计数参数与所述第二计数参数之间的差值来识别所述细胞的一种或多种类型的步骤。在再一些实施方式中,所述方法可以进一步包括使所述滤液转移到分析器结构上的步骤,所述分析器结构包含其上结合了所述表面标记物的离散区域。在一些实施方式中,所述方法可以进一步包括包含在所述分析器结构中培养滤液的步骤。

[0029] 在一些实施方式中,所述细胞的至少一种表面标记物包括有助于鉴定所述生物样本中的病原体的一种或多种病原体表面标记物。在一些实施方式中,所述细胞的至少一个表面标记物包括有助于检测细胞系中的支原体生长的一种或多种支原体表面标记物。

[0030] 在一些实施方式中,所述标记物特异性分子的第一计数参数是预定的。在其它的

实施方式中,所述方法可以进一步包括在产生滤液之前通过传感器或分析器确定所述标记物特异性分子的第一计数参数的步骤。在再一些实施方式中,所述方法可以进一步包括基于所述第一计数参数与所述第二计数参数之间的差值,通过计算装置或分析器来确定个体的疾病的步骤。

[0031] 在某些实施方式中,所述方法可以进一步包括以下步骤:通过计算装置或分析器维护多个治疗推荐方案;以及基于个体疾病的确定,通过所述计算装置或所述分析器提供所述治疗推荐方案中的一个。

[0032] 根据本公开的另一个方面,提供了一种用于区分生物样本中的细胞的方法。所述方法包括以下步骤:(i)使所述生物样本与针对所述细胞的至少一种表面标记物的标记物特异性分子接触,其中所述标记物特异性分子与计数参数有关;(ii)使所述生物样本中的细胞结合所述标记物特异性分子以产生结合的标记物特异性分子;(iii)处理或过滤所述生物样本以从所述生物样本中除去所述细胞和所述结合的标记物特异性分子并产生滤液;(iv)通过传感器或分析器来确定所述结合的标记物特异性分子的计数参数;以及(v)基于所述标记物特异性分子的计数参数与所述结合的标记物特异性分子的计数参数,通过所述分析器来计算一种或多种类型细胞的数量。

[0033] 根据本公开的再一个方面,提供了一种用于区分生物样本中的细胞的系统。所述系统包括:(i)取样模块,其设置为使所述生物样本与针对所述细胞的至少一种表面标记物的标记物特异性分子接触,并使所述生物样本中的细胞结合所述标记物特异性分子以产生结合的标记物特异性分子,其中所述标记物特异性分子与第一计数参数有关;(ii)过滤器,其设置为以从所述生物样本中除去所述细胞和所述结合的标记物特异性分子来过滤所述生物样本,以产生滤液;以及(iii)分析器,其设置为确定所述滤液中的标记物特异性分子的第二计数参数,并基于所述第一计数参数与所述第二计数参数之间的差值来计算所述生物样本中的细胞的数量。

[0034] 根据本公开的再一个方面,提供了一种用于区分生物样本中的细胞的系统。所述系统包括:(i)取样模块,其设置为使所述生物样本与针对所述细胞的至少一种表面标记物的标记物特异性分子接触,并使所述生物样本中的细胞结合所述标记物特异性分子以产生结合的标记物特异性分子,其中所述标记物特异性分子与第一计数参数有关;(ii)过滤器,其设置为以从所述生物样本中除去所述细胞和所述结合的标记物特异性分子来过滤所述生物样本;以及(iii)分析器,其设置为确定与所述细胞结合的标记物特异性分子的第二计数参数(或者处于结合状态下或者在采取行动以使其从细胞上解离时),并基于所述第一计数参数与所述第二计数参数之间的差值来计算所述生物样本中的细胞的数量。

[0035] 在一些实施方式中,所述分析器包括具有至少一个处理器和存储了处理器可执行指令的存储器的计算装置,所述处理器可执行指令在由所述至少一个处理器执行时,使所述至少一个处理器确定所述滤液中的至少一种标记物特异性分子的第二浓度,并基于所述第一浓度与所述第二浓度之间的差值来计算所述生物样本中的细胞的数量。

[0036] 在一些实施方式中,可以将所述系统实现为一种便携式和/或一次性系统以提供一种快速的基于现场/即时检验的方法,可用于各种目的的细胞计数和分化,包括但不限于诊断、健康监测、血液分型和HIV进展监测、区分病毒或细菌来源的感染、病原体检测和鉴定、基于生物流体和组织样本的诊断、食品工业中的应用、农业应用、水质检测和/或检测培

养细胞系中的支原体污染。该技术的一个优点在于,相比传统的细胞计数技术(如流式细胞术),其可以更容易地在小型因子微流体系统中实现。因此,其能够在具有许多有益应用的便携系统中进行细胞计数。

[0037] 一般而言,本公开的方法可以在用作商业和非商业应用的任何溶液或悬浮液中用于细胞计数,所述溶液或悬浮液可以含有有机或无机组分。例如,本公开的方法可以用于来自人、动物或与任何生物有机体(包括植物、真菌、细菌或古细菌)有关的任何生物流体。在一些实施方式中,本公开的方法可以用于血细胞计数。

[0038] 根据更多的实施方式,本公开的方法和系统可以用于确定患者是否具有特定的疾病和/或所述患者是否需要相应的治疗。该确定可以基于本文所述的生物样本中细胞的分化/鉴定结果。例如,采用本公开的方法确定白血细胞计数可以用于确定个体是否具有导致用抗生素治疗的感染。在另一个实施方式中,采用本公开的方法确定红血细胞计数可以用于确定个体是否贫血并需要治疗,例如,用铁补充剂治疗。在再一个实施方式中,确定白血细胞或红血细胞计数的降低可能是采用某些药物(例如,氯氮平)治疗的结果。因此,治疗的选择还可取决于细胞计数。因此,可以看出血细胞计数和其它生物样本中的细胞计数的确定对于医疗领域中的治疗决策是非常重要的。

[0039] 本技术还通常涉及通过控制测定信号的动态范围并由此控制原始结果来定量检测生物样本中的一种或多种目标分析物的方法和系统。该技术允许克服现有技术的一个或多个缺点,并提供准确且快捷的分析物检测。

[0040] 根据本技术的一个方面,提供了一种用于控制测定信号的动态范围的方法。所述方法包括以下步骤:(i)提供样本中的一种或多种目标分析物;(ii)使所述一种或多种目标分析物与缀合的结合试剂和非缀合的结合试剂的混合物接触,其中所述缀合的结合试剂和所述非缀合的结合试剂对所述一种或多种目标分析物是特异性的;(iii)测定所述一种或多种目标分析物与所述缀合的结合试剂和非缀合的结合试剂的混合物之间的相互作用;以及(iv)通过调节所述混合物中缀合的结合试剂与非缀合的结合试剂的比例来控制测定信号的动态范围。

[0041] 在一些实施方式中,所述方法可以进一步包括确定每个目标分析物的浓度的步骤。在再一些实施方式中,所述方法可以进一步包括以下步骤:将一种或多种缀合分析物加入到所述样本中;以及使得所述一种或多种目标分析物稀释。在再一些实施方式中,所述方法可以进一步包括以下步骤:将一种或多种非缀合分析物加入到所述样本中;以及使得所述一种或多种目标分析物稀释。

[0042] 在一些实施方式中,所述缀合的结合试剂或所述非缀合的结合试剂包括以下物质中的一种或多种:抗体、抗原、适配子、肽、蛋白质和寡核苷酸,以及它们的任意组合。所述缀合的结合试剂可以包括与缀合物偶联的结合试剂,所述缀合物选自:酶、蛋白质、肽、荧光团、链霉亲和素(streptavidin)、亲和素(avidin)、抗体、抗原、适配子和寡核苷酸,以及它们的任意组合。

[0043] 在一些实施方式中,所述目标分析物可以包括以下物质中的一种或多种:抗原、抗体、核酸、糖类、脂质、肽、蛋白质、聚合物,以及它们的任意组合。在一些实施方式中,所述样本可以包括生物流体。在其它的实施方式中,所述样本可以包括非生物流体。在更多的实施方式中,所述方法可以进一步包括以下步骤:基于所述一种或多种目标分析物与所述混合

物之间的相互作用的测量结果以及基于对测定信号的动态范围的控制来定量确定所述样本中的一种或多种目标分析物。

[0044] 根据本公开的另一个方面,提供了另一种用于控制测定信号的动态范围的方法。所述方法包括以下步骤:(i)提供样本中的一种或多种目标分析物;(ii)使所述一种或多种目标分析物与含有至少一种结合试剂的混合物接触,其中所述结合试剂对所述一种或多种目标分析物是特异性的;(iii)测定所述一种或多种目标分析物与所述混合物之间的相互作用;(iv)向所述样本中加入一种或多种缀合分析物以使得所述一种或多种目标分析物稀释;以及(v)通过调节所述混合物中一种或多种缀合分析物的比例来控制测定信号的动态范围。

[0045] 在一些实施方式中,所述至少一种结合试剂包括非缀合的结合试剂。在某些实施方式中,所述至少一种结合试剂包含缀合的结合试剂。在更多的实施方式中,所述方法可以进一步包括以下步骤:基于所述一种或多种目标分析物与所述混合物之间的相互作用的测量结果以及基于对测定信号的动态范围的控制来定量确定所述样本中的一种或多种目标分析物。

[0046] 根据本公开的另一个方面,提供了另一种用于控制测定信号的动态范围的方法。所述方法包括以下步骤:(i)提供样本中的一种或多种目标分析物;(ii)使所述一种或多种目标分析物与含有至少一种结合试剂的混合物接触,其中所述结合试剂对所述一种或多种目标分析物是特异性的;(iii)测定所述一种或多种目标分析物与所述混合物之间的相互作用;(iv)向所述样本中加入一种或多种改性分析物;以及(v)通过调节所述混合物中一种或多种改性分析物的比例来控制测定信号的动态范围。

[0047] 在一些实施方式中,所述一种或多种改性分析物包括具有与所述一种或多种目标分析物中的结构相同的结构的分子。例如,所述一种或多种改性分析物包括至少一种所述目标分析物的子单元。在其它的实施方式中,所述方法可以进一步包括向所述样本中加入一种或多种缀合分析物以使得所述一种或多种目标分析物稀释的步骤。在某些实施方式中,所述至少一种结合试剂包括非缀合的结合试剂。在一些实施方式中,所述至少一种结合试剂包含缀合的结合试剂。在再一些实施方式中,所述方法可以进一步包括以下步骤:基于所述一种或多种目标分析物与所述混合物之间的相互作用的测量结果以及基于对测定信号的动态范围的控制来定量确定所述样本中的一种或多种目标分析物。

[0048] 根据本公开的再一个方面,提供了一种用于控制测定信号的动态范围的系统。所述系统包括容器,用于提供样本中的一种或多种目标分析物,并使所述一种或多种目标分析物与缀合的结合试剂和非缀合的结合试剂的混合物接触,其中所述缀合的结合试剂和所述非缀合的结合试剂对所述一种或多种目标分析物是特异性的。所述系统进一步包括传感器,其设置为测定所述一种或多种目标分析物与所述缀合的结合试剂和非缀合的结合试剂的混合物之间的相互作用。所述系统进一步包括控制器,其设置为通过调节所述样本中缀合的结合试剂与非缀合的结合试剂的比例来控制测定信号的动态范围。

[0049] 在一些实施方式中,所述系统可以包括分析器,其设置为确定每个目标分析物的浓度。在某些实施方式中,所述传感器可以包括以下事物中的一种或多种:比色传感器、荧光传感器、光度传感器和分光光度计装置。在一些实施方式中,所述分析器可以包括操作地连接至所述传感器的计算装置。在一些实施方式中,所述控制器可以包括具有至少一个处

理器和存储了处理器可执行指令的存储器的计算装置,所述处理器可执行指令在由所述至少一个处理器执行时使所述系统通过所述传感器进行测量,改变所述混合物的比例,以及定量确定所述一种或多种目标分析物。

[0050] 在任意一个上述方面的优选实施方式中,所述比例选自摩尔比、重量比和体积比,以及它们的任意组合。

[0051] 优选地,所述比例为摩尔比。

[0052] 优选地,所述比率为重量比。

[0053] 优选地,所述比例为体积比。

[0054] 根据任意一个上述方面的优选实施方式,所述生物样本为血液样本。

[0055] 冠词“一(a和an)”在本文中用于指代文章的一个或多于一个(即至少一个)的所述冠词的语法对象。举例而言,“一个要素”是指一个要素或多于一个要素。如在本文中使用的,单数的使用包括复数(并且反之亦然),除非另有特别的说明。

[0056] 在整个说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包括或包含”(“comprise,”“comprises”和“comprising”)将被理解为暗示包括所陈述的步骤或要素或步骤或要素的集合,但并不排除任何其它的步骤或要素或步骤或要素的集合。因此,术语“包括”等的使用表示所列出的要素是必需的或强制性的,但是其它的要素是可选的并且可以存在也可以不存在。“由...组成”是指包括并限于短语“由...组成”之间的所有事物。因此,短语“由...组成”表示所列出的要素是必需的或强制性的,并且不存在其它的要素。“基本上由...组成”是指包括所述短语之间所列出的任何要素,并且限于不会干扰或有助于所列出的要素在本公开中指定的活性或作用的其它要素,因此,所述短语“基本上由...组成”表示所列出的要素是必需的或强制性的,但是取决于是否影响所列出的要素的活性或作用,其它要素是可选的并且可以存在也可以不存在。

[0057] 另外的目的、优点和新颖的特征将在以下的详细说明中部分予以阐述,并且对于本领域技术人员而言,在研究以下详细说明和附图时将会变得明白,或者可以通过示例性的实施方式的制备或操作来学习。所述概念的目的和优点可以通过所附权利要求中特别指出的方法、手段和组合来实现和获得。

## 附图说明

[0058] 图1为根据一个实施方式的用于区分和/或识别生物样本中的细胞或其它组分的方法的概略图示。

[0059] 图2A为用于区分和/或识别生物样本中的细胞或其它组分的方法的另一个实施方式的概略图示,所述方法采用了CD4和CD8的抗体以确定样本中的CD4+:CD8+的比例,以评估HIV进展。

[0060] 图2B为图2A中的彩色图像的黑白再现。

[0061] 图3A为用于区分和/或识别生物样本中的细胞或其它组分的方法的另一个实施方式的概略图示,所述方法采用了革兰氏阳性菌表面标记物抗体来确定细菌感染的类型。

[0062] 图3B为图3A中的彩色图像的黑白再现。

[0063] 图4A为样本中的细胞数量如何影响最终信号强度的概略图示。

[0064] 图4B为图4A中的彩色图像的黑白再现。

[0065] 图5A为采用CD分子抗体来确定样本中的细胞数量的方法的概略图示。图5A显示了采用抗-CD4抗体来确定样本中的细胞数量的结果。在该实施例中,采用稳定表达CD表面标记物的VL3细胞系作为测试样本。Y轴为荧光;X轴为细胞计数(倒数) $=1/(\text{细胞计数} \times 10^6)$ 。MFI是指平均荧光强度。

[0066] 图5B显示了采用CD19(VL3细胞系未表达的表面标记物)的抗体来确定图5A中展示效果是否可以归因于抗体与细胞的非特异性结合或抗体团聚的结果。Y轴为荧光;X轴为细胞计数(倒数) $=1/(\text{细胞计数} \times 10^6)$ 。

[0067] 图6A为根据一个实施方式的通过控制测定的动态范围来定量检测一种或多种目标分析物的方法的概略图示。

[0068] 图6B为图6A中的彩色图像的黑白再现。

[0069] 图7A为通过控制测定的动态范围来定量检测一种或多种目标分析物的方法的概略图示,所述方法采用了具有受控比例的标记和未标记的链霉亲和素的100%生物素化的检测抗体。

[0070] 图7B显示了通过采用具有受控比例的标记和未标记的链霉亲和素的生物素化的检测抗体来控制测定的动态范围的定量检测的方法,其中进行了催乳素夹心ELISA,其采用了一系列混合有辣根过氧化物酶(HRP)缀合的链霉亲和素的非缀合的链霉亲和素。在图7B中,将催乳素浓度(X轴)相对于450nm处的吸光度(Y轴)作图。

[0071] 图7C显示了进行催乳素夹心ELISA的结果,所述催乳素夹心ELISA采用了图7B的一系列混合有辣根过氧化物酶(HRP)缀合的链霉亲和素的非缀合的链霉亲和素,其中将非缀合的链霉亲和素的浓度(X轴)相对于450nm处的吸光度(Y轴)作图。

[0072] 图8为通过控制测定的动态范围来定量检测一种或多种目标分析物的示例方法,所述方法采用了含有标记和未标记的二级检测抗体的混合物的未标记的初级检测抗体。

[0073] 图9为本技术的方法的概略图示,通过本技术,调节标记的:未标记的结合试剂的比例调节了信号强度。设定值为标记的与未标记的检测抗体的比例。

[0074] 图10显示了对于图9的方法的实验结果,具体地,采用HRP-TMB的具有缀合的:非缀合的检测抗体的调节比例的人类催乳素标准曲线。X轴为以pg/mL表示的人类催乳素的浓度;Y轴为在450nm处的吸光度。曲线A至F为抗体混合物中的标记的检测抗体的量,如下所示:A=1;B=0.8;C=0.6;D=0.4;E=0.2;F=0。

[0075] 图11为在免疫测定中控制检测信号的水平的方法的概略图示。

[0076] 图11B为图11A中的彩色图像的黑白再现。

[0077] 有些图示包括彩色图像或实体。彩色插图可以依请求从申请人或从适当的专利局获得。从专利局获得时可能会征收费用。

## 具体实施方式

[0078] 除非另有定义,否则本文中所有的技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管在本公开的实践或测试中可以采用与本文所述相似或等同的任意方法和材料,但是描述了优选的方法和材料。出于本公开的目的,以下术语定义如下。

[0079] 本文所述的各个实施方式比照适用于各个且每个实施方式,除非另有特别的说

明。

[0080] 在不脱离要求保护的范围内,可以组合实施方式,可以使用其它的实施方式,或者进行结构、逻辑和操作的变更。因此,以下的详细描述不应被视为具有限制意义,并且所述范围由所附权利要求及其等同物来定义。

[0081] 为了可以使本公开易于理解并付诸实践,可以通过非限制性实施例的方式来描述特定的优选实施方式。

[0082] 以下的详细描述包括对形成了所述详细描述的一部分的附图的参考。所述附图显示了根据示例实施方式的图示。这些在本文中也被称为“实施例”的示例实施方式被足够详细地描述以使得本领域技术人员能够实践本公开的主题。

[0083] 通过添加对分化群特异性的抗体来识别生物样本中的细胞的方法和系统

[0084] 本技术提供了用于区分和/或识别生物样本(如血液样本)中的细胞或其它组分(为了简单起见统称为“细胞”)的方法和系统。具体而言,所述方法包括将所述样本与多种抗体或其它分子如适配子(为了简单起见,统称为“抗体”)培养的步骤,所述抗体或其它分子与所述细胞的某些表面标记物特异性结合。本文所述的方法考虑采用具有一种或多种特异性的一种或多种抗体。可以预选或预定具体的表面标记物的数量和类型,使得所述表面标记物的每一个都与特定的CD相关联。进而,通过计算或测量来确定样本(特别是血液样本)中的抗体浓度。在一些实施方式中,所述抗体浓度可以是预定的或已知的。随后通过从结合的抗体中分离细胞来过滤所述样本,以产生滤液。进而,测量所述滤液中残留的抗体浓度。最后,比较过滤之前和之后的抗体浓度,以确定所述样本中的细胞的数量和/或类型。应当理解的是,滤液包括所述滤液的一部分。

[0085] 图1进一步说明了这个方法。具体而言,其显示了荧光标记的抗体接触样本中不同类型细胞的表面标记物的方法。将已知浓度的对目标细胞上的表面标记物特异性的标记抗体添加到样本中(步骤A)。将所述样本与抗体培养以允许结合(步骤B)。在步骤C中,所述样本或者(i)经过过滤器以除去细胞和结合的抗体,从而产生含有未结合的抗体的滤液;或者(ii)通过沉降或离心从所述样本中除去细胞和结合的抗体,以产生含有未结合的抗体的吸出物。在步骤C之后,将所述滤液导入具有包含固定表面蛋白的区域的表面(步骤D)。培养所述滤液以允许抗体结合固定的抗原(步骤E)。洗涤后,测量来自固定的标记抗体的发光强度,并计算所述滤液中的抗体浓度(步骤F)。最后,由过滤前后抗体浓度的差值来计算每种细胞的数量。

[0086] 图2(A和B)显示了更具体的实施例,其采用了CD4和CD8的抗体以确定样本中的CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>的比例,来评估HIV进展。图3(A和B)显示了另一个实施例,其采用了革兰氏阳性菌表面标记物抗体来确定细菌感染的类型。图4(A和B)显示了所述样本中的细胞数量如何影响最终信号强度。每个图4A和4B的图片A显示了当样本中的目标细胞数量较少时,会导致滤液中的抗体损失较小,并从而导致高信号。图片B显示了当样本中的目标细胞数量较高时,会导致滤液中的抗体损失较高,并从而导致低信号。从图4A和B中整体可以看出,样本中的目标细胞数量越高,在过滤阶段被除去的抗体数量就越高,从而将产生较低的信号。

[0087] 用于区分和/或识别细胞的系统包括三个主要组件:用于接收和培养样本与抗体的取样模块,用于过滤样本的过滤器和用于分析滤液的分析器。所述分析器可以包括一个或多个传感器,所述传感器操作地连接至计算装置,如个人计算机、便携式计算机、服务器

等。所述计算装置包括至少一个处理器和至少一个存储了处理器可执行指令的存储器。当这些指令由所述处理器执行时,其实施本文所述的方法中的一个或多个步骤。

[0088] 根据本公开的一些实施方式,所述过滤器可以包括具有小于2微米的孔径的膜,以从样本,以及更优选地,血液样本中除去全部细胞或基本上全部细胞。在其它的实施方式中,可以采用磁性分离系统来代替从血液样本中除去细胞以及标记物结合的抗体的过滤器或任何其它的装置。在其它的实施方式中,可以通过沉降、离心或通过采用抗体来固定或除去目标细胞以除去细胞。

[0089] 根据本公开的一些实施方式,残留于所述滤液中的未结合的抗体或与细胞结合的抗体(在处于结合状态时或在处理以使其从细胞表面解离之后)可以缀合至一种或多种有助于进一步的分析的分子(如报告分子)。该缀合分子可以包括能够催化显色液中的可测量变化的酶,如辣根过氧化物酶。在其它的实施方式中,所述缀合分子可以包括荧光探针,其可以通过发光来测量。在再其它的实施方式中,所述缀合分子可以包括生物素,其上可采用生物素-链霉亲和素/生物素/亲和素系统通过高亲和力结合过程结合另外的报告分子。在一些实施方式中,可以采用非缀合的抗体。在再一些实施方式中,可以应用二级的报告分子。例如,在采用未缀合的抗体的情况下,使用了用酶或报告分子标记的二抗。

[0090] 术语“报告分子”是指一种分子,其通过其化学性质提供了允许检测预定抗原的分析鉴定信号。检测可以是定性的或定量的。报告分子的一些实例包括酶、荧光团、金或含有放射性核素的分子(即,放射性同位素)。在酶免疫测定的情况下,酶通常借助戊二醛或高碘酸盐与第二或第三免疫球蛋白缀合。可以使用的其它类型的酶包括辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和/或碱性磷酸酶。

[0091] 在本公开的一些实施方式中,将全血样本与预定量的针对一定范围的表面标记物的经标记的抗体的混合物培养以鉴定,例如,红血细胞、血小板和/或分化白血细胞。所述血液样本可以进一步培养以使得所述抗体结合至表面抗原。在其它的实施方式中,可以分析全血的特定部分,如分离的白血细胞。

[0092] 在本公开的一些实施方式中,所述系统可以包括含有结合了表面标记物(已经培养了所述表面标记物的抗体)的离散区域的结构。这种结构的一个非限制性实例为由合适的塑料材料制成的结构,如微量滴定板或试管。在这种情况下,所述滤液可以在所述结构内培养,使得在过滤之前未与细胞结合的剩余的抗体结合至固定的表面标记物。培养后,可以洗涤所述结构以除去所述滤液中所有未结合的组分。如果使用非缀合的抗体,则可能需要进一步与含有二级报告分子(例如,标记的二抗、链霉亲和素缀合酶、或探针)的溶液培养。如果采用酶(如辣根过氧化物酶(HRP))作为标记的二抗,则可能需要将显色液倒入所述结构中。所述显色液可涉及3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),其可以经历可测量的颜色变化,其速率取决于酶的量。因此,可以基于测定的颜色变化的程度来确定结合的抗体的量。在其它的实施方式中,显色液可以包括比色、荧光和/或化学发光溶液。

[0093] 如上所述,过滤前和过滤后的抗体浓度的差异可用于计算原始血液样本中表面标记物的浓度和/或比例。所述表面标记物的浓度和/或比例进而可以用作计算各种类型的细胞(包括分化的白血细胞)的数量的基础。

[0094] 在本技术的另一个实施方式中,病原体表面标记物抗体用于鉴定和量化样本中的病原体。在本公开的又一个实施方式中,支原体细胞的表面标记物可用于检测细胞系中支

原体的生长。

[0095] 在本公开的一些实施方式中,用于鉴定血液样本中的细胞的系统可以包括生物传感器。所述生物传感器是一种可以用于分析物分析的分析装置。所述生物传感器可以包括在研究中与分析物相互作用的敏感生物元件(例如,组织、微生物、细胞器、细胞受体、酶、抗体、核酸、全血或其部分等)、生物衍生材料或仿生组分。生物敏感元件也可以通过生物工程来创建。所述生物传感器进一步包括转换器或检测器(例如,物理化学、光学、压电或电化学装置),其将分析物与生物元件相互作用产生的信号转换为可更易于测量和量化的另一种信号。所述生物传感器进一步包括生物传感器读取装置和主要负责以用户友好的方式显示结果的相关电子装置(例如,计算装置)。

[0096] 在一些实施方式中,可以采用颜色报告方法(如胶体金)将本技术结合到基于膜的装置中,以提供样本(例如,病原体)中一种或多种组分的存在或不存在或样本(例如,CD4+和CD8+细胞)中一种或多种要素的水平(参见图2)的快速测量。

[0097] 根据各种实施方式,还可以将本技术设置为确定受试者、个体或动物的疾病,所述受试者、个体或动物的样本,优选流体样本被测试和分析。而且,本技术可以提供用于治疗所识别疾病的自动推荐方案、建议或计划。治疗方式的非限制性实例包括放射疗法、手术、化疗、激素消融疗法、促凋亡疗法、免疫疗法、光疗法、冷冻疗法、毒素疗法、以抗感染药物或促凋亡治疗的疗法。本领域的技术人员将会知道,这个清单并非全面的治疗方式的类型。如本文所述,可基于样本中细胞的区分/识别结果来确定疾病。例如,采用本公开的方法确定白血细胞计数可以用于确定个体是否具有导致用抗生素治疗的感染。在另一个实施方式中,采用本公开的方法确定红血细胞计数可以用于确定个体是否贫血并需要(例如,用铁补充剂)治疗。在再一个实施方式中,确定白血细胞或红血细胞计数的降低可能是采用某些药物(例如,氯氮平)治疗的结果。因此,治疗的选择还可以取决于细胞计数。因此,可以看出血细胞计数和其它生物样本中的细胞计数的确定对于医疗领域中的治疗决策是非常重要的。在优选的实施方式中,本文所述的方法进一步包括治疗受试者的步骤。

[0098] 本文可互换使用的术语“患者”、“受试者”、“宿主”或“个体”是指期望进行治疗或预防的任何受试者,特别是脊椎动物受试者,甚至更特别是哺乳动物受试者。术语“受试者”包括人类哺乳动物受试者和非人类哺乳动物受试者。

[0099] 如本文所用的,术语“治疗(“treatment”,“treating”)”等是指获得期望的药理学和/或生理学效果。就部分或完全治愈疾病或病症和/或可归因于该疾病或病症的不良反应而言,所述效果可以是治疗性的。这些术语也包括对哺乳动物,特别是人类的病症或疾病的任何治疗,并且包括:(a)抑制所述疾病或病症,即,阻止其发展;或者(b)缓解所述疾病或病症,即,导致所述疾病或病症的消退。

[0100] 图5A和5B显示了采用CD分子抗体来确定样本中的细胞数量。采用了稳定表达CD表面标记物的VL3细胞系以用于实验。将浓度为0.0008mg/ml的荧光标记的抗-CD4抗体与 $4.6 \times 10^6$ 至 $0.009 \times 10^6$ 个细胞/ml的细胞浓度范围的细胞样本一起培养。在培养以使所述抗体结合至细胞表面上的CD4分子后,将样本离心以除去细胞。移出上清液,并测定所述上清液中剩余的抗体的量。这是通过向所述上清液中加入抗体结合磁珠并培养以使得剩余的抗体结合至所述磁珠来完成的。然后使所述磁珠穿过BD FACSDiva流式细胞仪来测量荧光。如图5A所示,存在于所述上清液中的抗体数量与所述样本中的细胞的数量浓度之间存在明显

的反向关系。超出 $1.4 \times 10^5$ 个细胞/ml的下限(箭头所示),在该实验中则不能确定细胞的数量。

[0101] 采用CD19(VL3细胞系未表达的标记物)的抗体重复这个过程,以确定这个效果是否可以归因于抗体与细胞的非特异性结合或抗体的团聚。参照图5B,在非常高的细胞浓度下信号存在少量降低,但不足以影响通过抗体与所表达的CD分子的特异性结合而获得的结果。这个数据证实了所述方法在确定存在于样本中的表达特定标记物的细胞的数量上是有效的,以及所述方法在区分和量化存在于样本中的细胞类型上的适用性。

[0102] 本领域技术人员将会理解的是,本技术允许不仅在血液样本中,还在任何其它的生物流体、组织样本、食物、水和培养细胞中鉴定细胞。所公开的技术提供了快捷且准确的低成本方法和系统,其可以结合到便携式和/或一次性单元中,以提供适用于血细胞计数和分化的快速、基于现场/即时检验的方法,以用于诊断、健康监测、血液分型和HIV进展监测、区分病毒或细菌来源的感染、病原体检测和鉴定、基于生物流体和组织样本的诊断、食品工业中的应用、农业应用、兽医应用、水质检测和/或检测培养细胞系中的支原体污染。

[0103] 将会理解的是,所述生物材料可以是分离的生物材料,其可以或不可以被纯化。“分离的”是指以下材料,其基本上或大致上不含一般在自然状态下伴随其的组分,或者以合成方式纯化或生产时在其生产期间中存在的组分。因此,术语“分离的”在其范围内还包括纯化的或合成的材料。如本文所用的,术语“纯化的”是指基本上不含细胞组分或来自所述材料来源的其它污染物质的材料(例如,血液样本、流体样本)。“基本上不含”是指将材料制备为至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的纯度。

[0104] 用于控制分析物检测的定量测定的动态范围的方法和系统

[0105] 本技术还提供了一种基于免疫测定方法的测定分析,其中样本中的分析物的浓度依赖于检测信号的强度来确定。这些方法通常适用于如生物流体(例如,血液)或非生物流体的样本中的分析物(如抗原、抗体、蛋白质和核酸)的检测和/或定量。所述样本可以是分离的,且可以或不可以被纯化。

[0106] 如本文所用的,术语“测定(assay)”是指分析检测方法,包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、化学发光测定、生物发光测定、荧光免疫测定、蛋白质微阵列、DNA微阵列、RNA微阵列和/或蛋白质生物芯片检测。

[0107] 如本文所用的,术语“目标分析物”是指在生物样本中待检测或定量的生物化学物质,并且可包括以下中的一种或多种:抗原、抗体、蛋白质、脂质、糖类和核酸,以及它们的任意组合。

[0108] 如本文所用的,术语“固相”是指免疫检测方法中使用的平面或非平面固体载体表面,并且可以包括以下中的一种或多种:聚苯乙烯微量滴定板、微球体、珠子、膜、聚合物、共聚物、交联聚合物等。

[0109] 如本文所用的,术语“结合试剂”是指能够与样本中目标分析物反应或用于检测样本中目标分析物的存在的生物化学物质。所述结合试剂可以指抗原、抗体、蛋白质和/或寡核苷酸。

[0110] 如本文所用的,术语“检测信号”或简称“信号”是指由标记的分析物或缀合的分析物或标记的结合试剂或缀合的结合试剂产生的可测量的信号。所述检测信号可以采用,例

如,以下方法中的一种或多种来测量:光度测定法、分光光度测定法、辐射测定法和荧光测定法。本领域的技术人员将会理解的是,也可以采用其它的方法,如质谱法来测量所述检测信号。

[0111] 可以将测定结果(信号)的动态范围(或“检测范围”)定义为可以通过所述测定准确检测的分析物(在本文中也称为“目标分析物”)的最低浓度至最高浓度。所述分析物的浓度通常需要处于所述测定的动态范围或检测范围内以被测量。测定结果的动态范围可以预先确定或动态改变。

[0112] 大体上,本技术涉及一种通过控制测定的动态范围来定量检测一种或多种目标分析物的方法。所述方法包括以下步骤:i) 提供生物样本中的一种或多种目标分析物;ii) 使所述一种或多种目标分析物与至少一种缀合的结合试剂和至少一种未缀合的结合试剂的混合物接触,其中所述至少一种缀合的结合试剂和所述至少一种未缀合的结合试剂对所述一种或多种目标分析物是特异性的;iii) 测定所述一种或多种目标分析物与所述至少一种缀合的结合试剂和所述至少一种未缀合的结合试剂的混合物之间的相互作用;以及(iv) 通过调节所述混合物中至少一种缀合的结合试剂和至少一种未缀合的结合试剂的比例来控制测定信号的动态范围。

[0113] 术语“比例”是指标准意义上的比例;一个要素的数量相对于另一个要素的数量。这可以以摩尔浓度、重量或体积来表示。优选地,所述比例选自摩尔比、重量比和体积比,以及它们的任意组合。在优选的实施方式中,所述比例为摩尔比。在其它的优选实施方式中,所述比例为体积比。在再其它的优选的实施方式中,所述比例为重量比。

[0114] 应当清楚的是,以上方法可以具有如下所述的更多的限制性示例性实施方式。在一些实施方式中,所述方法着重于在具有目标分析物的样本中提供缀合的试剂和未缀合的试剂,以使得这些试剂彼此竞争地结合至所述分析物。因此,提供所述缀合的和未缀合的试剂可以降低测定信号,由此改变所述动态范围。

[0115] 在其它的实施方式中,所述方法着重于使用缀合的和未缀合的分析物,其被添加至样本中以稀释所述目标分析物,这最终导致测定信号的改变。例如,所述缀合的分析物可以结合与固相结合抗体,所述抗体具有通过与所述缀合的分析物结合而淬灭的荧光团。通过具有所述缀合的和未缀合的分析物,可以减少用于猝灭给定浓度或量的分析物的量,从而改变所述动态范围。

[0116] 或者,在其它的实施方式中,仅需要一种或多种缀合的分析物和对所述一种或多种目标分析物特异性的结合试剂。所述缀合的分析物与改性的或以其它方式活化或失活的标记物结合,随着结合的进行,来自所述缀合的分析物的信号(如荧光)增强或降低。随着所述缀合的分析物结合至所述试剂,来自所述缀合的分析物的信号增强或降低。缀合的分析物与未缀合的分析物(样本中的,并且可能还会加入另外的未缀合的分析物)之间的比例决定了信号增强或降低的程度。

[0117] 在其它的实施方式中,不同于缀合的分析物,可以采用一种或多种改性的分析物(其可以简单地含有一些与所述目标分析物相同的结构的分子)。改性的分析物和目标分析物(来自添加或不添加常规分析物的样本)均与一种或多种第一试剂结合。然后可以加入一种或多种第二缀合的试剂,其每一种仅与所述目标分析物中的一种或多种或所述改性的分析物中的一种或多种结合。改性的分析物与目标分析物之间的比例决定了信号增强或降

低的程度。在一些实施方式中,所述一种或多种改性的分析物为含有与所述目标分析物内的结构相同的结构的分子,例如,至少一些所述改性的分析物可以为或者包括至少一种所述目标分析物的子单元。在一些实施方式中,所述目标分析物可以为蛋白质。在一些实施方式中,所述第一试剂可以为与所述目标分析物和改性的分析物缀合试剂均结合的抗体,而所述第二缀合的试剂为仅与所述目标分析物结合但不与所述改性的分析物结合的抗体。在一些实施方式中,所述缀合的试剂缀合有荧光团以用于荧光检测。

[0118] 在其它的实施方式中,存在一种或多种目标分析物和一种或多种改性的分析物,其竞争性地结合至缀合的试剂。只有与目标分析物或改性的分析物的结合才会导致缀合的标记物的活化或失活(例如,荧光团的猝灭)。因此,所述改性的分析物与所述目标分析物之间的比例决定了信号增强或降低的程度。

[0119] 如本文所用的,术语“缀合的”是指与引发传感器可测信号的标记物的连接,所述标记物为直接产生信号的标记物(如荧光团)或是可以用于连接信号生成基团(如生物素或链霉亲和素基团)的化学基团。

[0120] 应当注意的是,分析物与试剂的结合防止或减少了可以结合与所述试剂结合的分析物的数量,因而所述分析物竞争性地与特定的试剂结合。

[0121] 在一个实施方式中,本技术可以包括通过控制测定的动态范围来定量检测一种或多种目标分析物的以下示例性方法。所述方法包括以下步骤:i) 提供固定有一种或多种分子的固相,所述分子与所述目标分析物会特异性地结合;ii) 使所述固相与样本接触,所述样本中的一种或多种目标分析物的浓度或存在是待测量的;iii) 引入含有试剂的混合物的结合试剂,所述试剂会与报告分子(如荧光团)缀合或未缀合;iv) 允许缀合的和未缀合的结合试剂竞争,以与固定的目标分析物结合。荧光团的量可以通过检测发光来测量。此外,目标分析物的浓度可以基于这些测量来计算。所述方法可以进一步包括以下步骤:v) 通过调节缀合的和未缀合的结合试剂的比例来控制信号水平(以及由此控制动态范围)。该过程进一步显示于图6中。具体而言,图6显示了一种夹心ELISA,采用4:6比例的荧光团缀合的:未缀合的检测抗体来减少产生的信号。

[0122] 在一种或多种实施方式中,所述缀合的结合试剂或所述未缀合的结合试剂包括抗体、抗原、适配子,蛋白质和/或寡核苷酸。在某些实施方式中,所述缀合的结合试剂包括与选自以下的缀合物偶联的结合试剂:酶、蛋白质、荧光团、链霉亲和素、亲和素、抗体、抗原、适配子和寡核苷酸。在某些实施方式中,所述缀合的结合试剂与标记物缀合,所述标记物允许检测结合至目标分析物的缀合的结合试剂。标记物可以包括在相应的底物存在下能够产生可测量响应(例如,可视的颜色变化)的酶。所述酶可以包括但不限于辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、萤光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶。用于检测结合试剂的标记物或缀合物还可以包括载体分子,如荧光团、链霉亲和素和亲和素。其它的示例性标记物也可以用于允许检测电子或放射线信号。在各种实施方式中,目标分析物包括以下中的一种或多种:抗原、抗体、核酸、糖类、脂质、蛋白质、聚合物,以及它们的任意组合。

[0123] 在一个实施方式中,所述结合试剂可以包括直接与分析物结合的初级结合分子,如一抗。在另一个实施方式中,所述结合试剂可以包括与初级结合分子结合的二级结合分子,如二抗。该实施方式由图8进一步说明,图8显示了一种示例性方法,其采用了含有标记和未标记的二级检测抗体的混合物的未标记的初级检测抗体。

[0124] 在再一个实施方式中,所述结合试剂能够与允许在测定中进行测量的另一种要素反应。例如,采用结合至与要素缀合的链霉亲和素的生物素化的抗体允许进行测量。该实施方式由图7进一步大体说明。图7A显示了一种示例性方法,其采用了具有受控比例的标记和未标记的链霉亲和素的100%生物素化的检测抗体。在下面描述混合HRP缀合的和未缀合的链霉亲和素以控制测定范围,并显示于图7B和7C中。这个实验的目的是展示将HRP缀合的链霉亲和素与未缀合的链霉亲和素(其将与所述HRP缀合的链霉亲和素竞争与生物素化的检测抗体的结合)混合可以改变信号并因此改变测定范围。并且减少信号的产生,同时保持标准曲线。目标浓度的范围采用一定范围的链霉亲和素:HRP-链霉亲和素的比例来实现。

[0125] 采用人类催乳素在49pg/ml至5 $\mu$ g/ml的宽范围的浓度水平下进行了标准ELISA。采用捕获抗体包被板、作为目标物的重组催乳素、生物素化的检测抗体、HRP缀合的链霉亲和素和作为显色液的TMB来进行该测定,用2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止。所采用的标准方案如下所示:平板用捕获抗体包被,随后用磷酸盐缓冲盐水-吐温20溶液(PBST)洗涤。所述平板与目标物的1%BSA溶液培养2小时,并用PBST洗涤。所述平板与生物素化的检测抗体培养1小时,并用PBST洗涤。所述平板与HRP缀合的链霉亲和素(加入一定范围的未缀合的链霉亲和素)培养,接着是用PBST洗涤的步骤(同上)。加入显色底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),用2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>在10分钟后终止反应,并在450nm处读取吸光度。

[0126] 数据显示,随着未缀合的链霉亲和素的量增加,信号水平降低。如图7B所示,采用0未缀合的链霉亲和素,曲线在1.56ng的催乳素浓度下趋于平稳,只有低于此的浓度才能被区分。随着73ng/ml未缀合的链霉亲和素的加入,降低了所述信号,所述曲线直到催乳素浓度达到1.25 $\mu$ g才会变平缓,现在则可以区分低于此的所有浓度。随着未缀合的链霉亲和素的量增加,所述信号水平进一步降低,推迟了平稳状态,从而提高了可由所述测定来确定的目标物浓度。当未缀合的链霉亲和素的浓度增加到225ng/ml时,显示完全阻止了显色,表明HRP缀合的链霉亲和素不足以结合生物素化的检测抗体。通过将每个目标物浓度对所采用的未缀合的链霉亲和素的浓度作图,可以确定调节特定目标物的测定范围所需的未缀合的链霉亲和素的量(图7C)。

[0127] 如上所述,所述混合物包括对一种或多种预定的目标分析物特异性的缀合的结合试剂和未缀合的结合试剂。可以采用混合物中缀合的和未缀合的结合试剂的不同比例来精确控制固定于固相上的目标分析物的检测范围。例如,图9显示了一种方法,通过所述方法,标记的:未标记的结合试剂的比例的调节调节了信号强度。图10显示了对于图9的方法的实验结果,其显示了信号强度可以通过改变缀合的:未缀合的检测抗体的比例来调节。

[0128] 所述缀合物或标记物在底物存在下提供了可测量的响应或检测信号,由此指示了结合试剂与目标分析物之间的正相互作用。所述检测信号可以包括颜色变化、荧光信号和/或化学发光信号,其可以通过光度计、分光光度计或比色法来测量。所述目标分析物的浓度可以基于检测信号的水平(例如,随酶缀合物变化的颜色水平反映了相应的目标分析物的浓度)而被准确地确定。

[0129] 在一个实施方式中,所述方法包括在免疫测定中使用包括HRP缀合的抗体和未缀合的抗体的结合试剂混合物。所述HRP缀合的抗体与未缀合的抗体竞争,以与固定于固体载体上的目标分析物上的位点结合。所述HRP缀合的抗体与未缀合的抗体的比例的控制允许精确控制检测信号的衰减,这进而允许增强所述测定的动态范围以覆盖可能存在于样本中

或固定于固体载体上的目标分析物的浓度范围(亦参见图10)。

[0130] 所述试剂混合物与所述目标分析物之间的相互作用包括所述缀合和未缀合的结合试剂之间竞争性地结合至固定于所述固相上的目标分析物上的结合位点(亦参见图6)。

[0131] 在再一个示例性实施方式中,所述目标分析物包括固定于固相载体上的抗原。所述混合物可以包括具有能够与所述固定的抗原特异性结合的抗体的未缀合的结合试剂和具有能够与所述固定的抗原结合的酶标记抗体的缀合的结合试剂。一旦将所述混合物加入到包含目标抗原的固相中,所述酶标记抗体与未标记抗体竞争以结合所述目标抗原表面上的位点。

[0132] 生物样本中多种分析物的浓度可能会不同。例如,在生物样本中,促甲状腺激素(TSH)通常以pg/ml的规模存在,而促黄体激素(LH)和促卵泡激素(FSH)则以ng/ml的规模存在。在另一个实施例中,为了测试23-三体唐氏综合征,测量了人绒毛膜促性腺激素(hCG)、雌三醇(E3)和甲胎蛋白(AFP)的浓度。在测试样本中,hCG通常以mg/mL的规模存在,E3以ng/mL的规模存在,AFP以pg/mL的规模存在。样本中不同分析物的浓度范围的变化使得多重测定由于所述测定的动态范围随之而来的变化而更具挑战性。因此,定量测定方法需要平衡的测量以及需要控制结合试剂的反应性,以分析具有较高浓度分析物的样本以及在显著不同的检测范围内分析含有多种分析物的样本。

[0133] 根据更多实施方式,本公开的技术提供了一种用于控制免疫测定中的检测信号水平的方法。来自每个分析物的检测信号的水平可以通过以不同的比例采用已知浓度的缀合和未缀合的结合试剂来精确地控制(参考图11)。所述方法允许准确定量样本中宽范围浓度下的多种目标分析物,并可被用于单重测定以及多重或多重-单重测定。所述方法进一步允许根据样本内每个分析物的标准或预期浓度范围来平衡和/或优化缀合的结合试剂与未缀合的结合试剂的比例(亦参见图11)。将所述样本引入含有用于两种不同浓度的目标分析物的抗体的固相(步骤1)。第一目标分析物处于高浓度,而第二目标分析物处于低浓度。所述目标分析物与抗体结合(步骤2)。将检测抗体引入所述固相,其中25%是用于分析物1缀合的,100%是用于分析物2缀合的(步骤3)。检测抗体与固定的目标分析物结合(步骤4),随后将来自分析物1的信号平衡为来自分析物2的信号以允许同时分析(步骤5)。

[0134] 通过改变测定信号,可以实施对单重或多重测试的读出的更大控制。因此,将本技术原理应用于多重测试,其更易于一次获得多个结果并具有更长的发展期。最终,这导致了对浓度的更精确测量。在一个实施方式中,即使浓度不同,也会允许使各种甲状腺生物标记物TSH、T3和T4的测定信号变得相同(或具有非常相似的范围)。通过了解抗体的缀合对非缀合水平,有可能单独确定所述混合物中每个抗体的浓度。

[0135] 在另一个的实施方式中,本技术涉及一种通过控制检测信号的水平来控制测定的动态范围的方法。所述方法包括以下步骤:i) 提供固定有对目标分析物特异性的结合试剂的固相;ii) 使所述固相与含有目标分析物的样本和缀合的分析物的混合物接触;iii) 在最佳的相互作用条件下培养与所述混合物接触的固相;以及iv) 测量所述固定的结合试剂与所述混合物之间的相互作用,其中通过调节所述混合物中样本分析物与缀合的分析物的比例来控制所述测定的动态范围。存在于所述样本中的目标分析物可以通过控制所述测定的动态范围来定量确定。

[0136] 例如,待测试的目标分析物可以包括蛋白质。此外,所述混合物可以包括含有目标

蛋白质的样本,所述样本混合有已知浓度的缀合有酶(如HRP)的相同蛋白质。在蛋白质-抗体结合的最佳条件下,所述混合物进一步与固定有对所述蛋白质特异性的抗体的固相发生反应。所述酶标记的蛋白质与所述样本中的目标蛋白质竞争以结合至固定化的抗体上的目标位点,并且通过添加合适的底物时由酶产生的检测信号来测量所述混合物中结合所述蛋白质的差异。

[0137] 检测信号的水平可以通过优化所述样本中缀合的分析物与目标分析物的比例来控制。例如,所述样本中缀合的分析物比目标分析物更高的浓度导致了缀合的分析物与固定化的结合试剂的结合的增加,从而增强了检测信号。类似地,含有较高浓度的目标分析物和较低浓度的缀合的分析物的混合物的比例导致了目标分析物与固定化的结合试剂的结合的增加,从而提供了降低的检测信号。例如,所述检测信号可以包括由于缀合物的酶活性而导致的添加底物的颜色变化。颜色强度的变化表示所述目标分析物和缀合的分析物之间与固定的结合试剂或检测试剂结合的差异。

[0138] 在再一个实施方式中,本技术提供了一种通过控制免疫测定的动态范围来定量检测一种或多种分析物的系统。所述系统包括容器或混合器,用于向生物样本提供目标分析物,并使所述目标分析物与缀合的结合试剂和未缀合的结合试剂的混合物接触。在一些实施方式中,所述容器或混合器可允许使具有不同预定比例的缀合的结合试剂和未缀合的结合试剂的混合物与固定于固相上的一种或多种分析物反应。然而,对于本文所述的所有实施方式而言,所述固相对所有实施方式并不是必须的,因此本公开并不限于所述固相的使用。

[0139] 所述系统进一步包括传感器,其设置为测定所述一种或多种目标分析物与所述缀合的结合试剂和未缀合的结合试剂的混合物之间的相互作用。例如,所述传感器可确定与所述固相上的分析物反应的缀合的结合试剂的第一浓度以及与所述固相上的分析物反应的未缀合的结合试剂的第二浓度。

[0140] 所述系统进一步包括控制器,其设置为通过调节所述混合物中缀合的结合试剂与未缀合的结合试剂的比例来控制测定信号的动态范围。所述系统可以进一步包括分析器,其设置为确定每个目标分析物的浓度。例如,所述分析器可以通过对每个混合物比例分析所述结合试剂的第一浓度和第二浓度来定量测定一种或多种目标分析物。

[0141] 所述传感器可以包括适于测量或量化与目标分析物相互作用的结合试剂产生的检测信号的比色、荧光、光度和/或分光光度装置。所述控制器还可以包括操作连接至所述系统的传感器的计算装置。在一些实施方式中,所述计算装置包括至少一个处理器和存储了处理器可执行指令的存储器,所述处理器可执行指令在由所述至少一个处理器执行时,使所述系统通过所述传感器进行测量,改变所述混合物的比例,以及定量确定所述一种或多种目标分析物。在一些实施方式中,所述分析器还包括计算装置,如个人计算机或笔记本电脑。在再一些实施方式中,所述控制器和分析器可以在单个装置中组合在一起。例如,可以使用一个计算装置作为所述控制器和所述分析器。

[0142] 所述容器可以包括微量滴定板、微条(microstrip)、玻璃试管和/或适用于接收或混合试剂与分析物或含有一种或多种分析物的样本的类似装置。

[0143] 在一个实施方式中,针对所述混合物中缀合的和未缀合的结合试剂的不同预定比例,所述分析器基于与所述固相相互作用的结合试剂的多个浓度值之间的差异来确定样本

中的目标分析物的浓度。所述测定的动态范围通过调节含有结合试剂的混合物的比例来控制或改变。因此,控制所述测定的灵敏度以确定所述样本中一种或多种分析物的浓度。

[0144] 涉及通过控制检测信号的水平或控制测定的动态范围来定量确定分析物的本公开的方法和系统可用于各种免疫测定(例如,基于微珠的测定、基于微量滴定板的测定或基于微条的测定)、微阵列(例如,蛋白质微阵列,DNA微阵列,RNA微阵列)、蛋白质生物芯片检测、抗体阵列以及使用微流体装置进行的测定。这些测定可以典型地是生物测定,但并非必须是,因为本公开的原则方法可以应用于任何的分子或其它化学检测。

[0145] 根据某些实施方式,本技术还可以设置为确定受试者的疾病,其流体样本采用本文所述的方法来测试和分析。例如,采用本文公开的方法测量肌钙蛋白和B型钠尿肽(BNP)生物标记物可以导致确定充血性心力衰竭以及随后用华法林(warfarin)治疗。而且,本技术可以提供用于治疗所识别疾病的自动推荐方案、建议或计划。具体而言,可以基于如本文所述的生物样本中的一种或多种目标分析物的定量检测结果来确定各种疾病。

[0146] 因此,已经描述了用于区分和/或识别生物样本中的细胞或其它组分的方法和系统,并且已经描述了通过控制测定信号的动态范围来定量检测生物样本中的一种或多种目标分析物的方法和系统。尽管已经参考具体的示例性实施方式描述了实施方式,但显而易见的是,在不脱离本申请的更广泛的精神和范围的情况下可以对这些示例性实施方式进行各种的修改和改变。因此,说明书和附图应被认为是说明性的而不是限制性的。

[0147] 如本文所用的,“合成”意指不是天然存在的,而是通过人类技术的介入而制成的。在合成蛋白质、肽和核酸的情况下,这包括通过本领域众所周知的重组、化学合成或组合技术而产生的分子。

[0148] 本文中引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容特此以整体引用的方式并入本文中。

[0149] 本文中任何参考文献的引用不应被解读为承认这种参考文献可作为本申请的“现有技术”。

[0150] 整个说明书的目的是为了描述本公开的优选实施方式,而非将本公开限制于任何一个实施方式或特征的特定集合。因此,本领域技术人员将会理解的是,根据本公开,在不脱离本发明的范围的情况下可以在示例的具体实施方式中作出各种修改和改变。所有这样的修改和改变都旨在包括于所附权利要求的范围内。

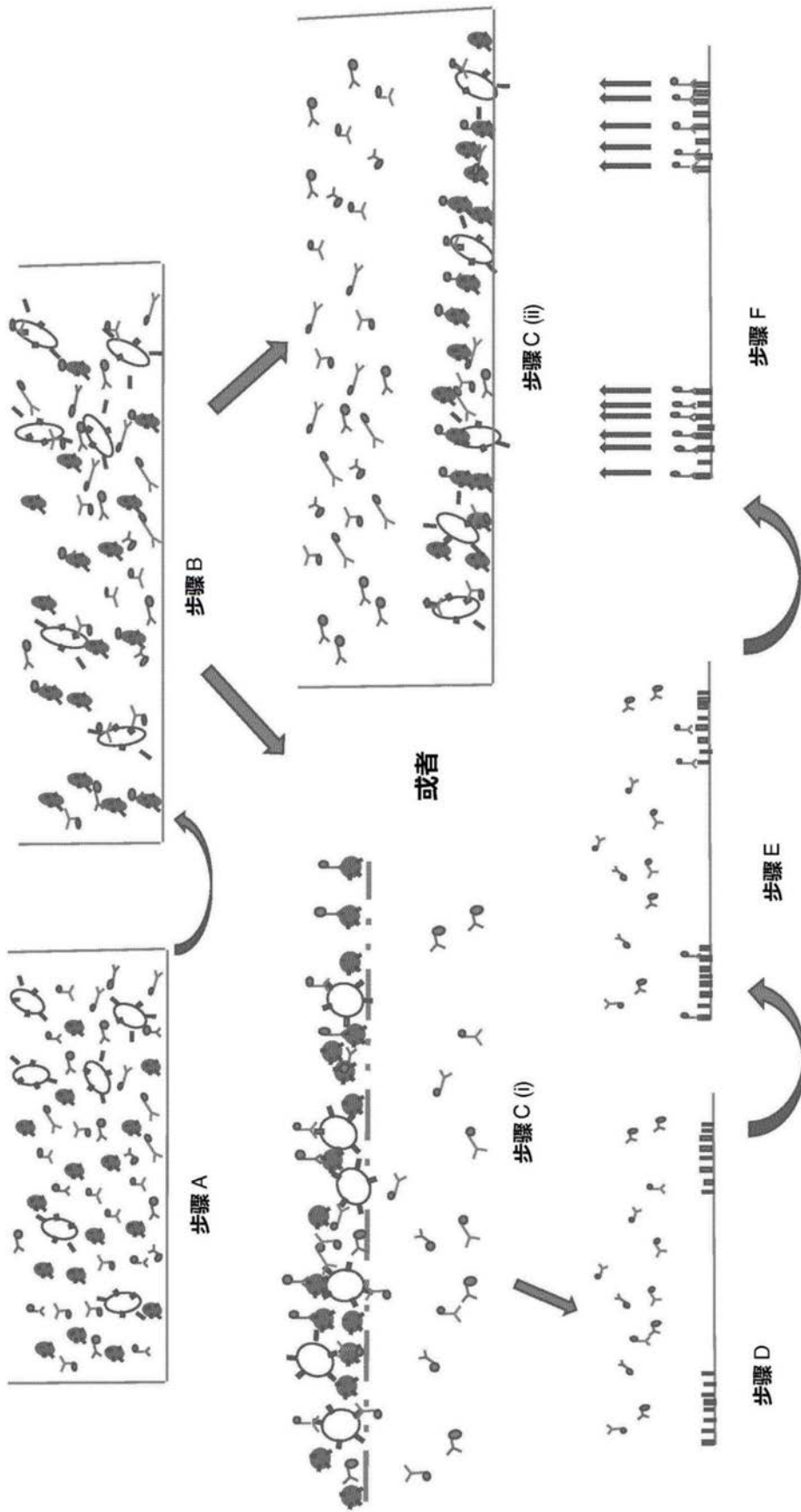


图1

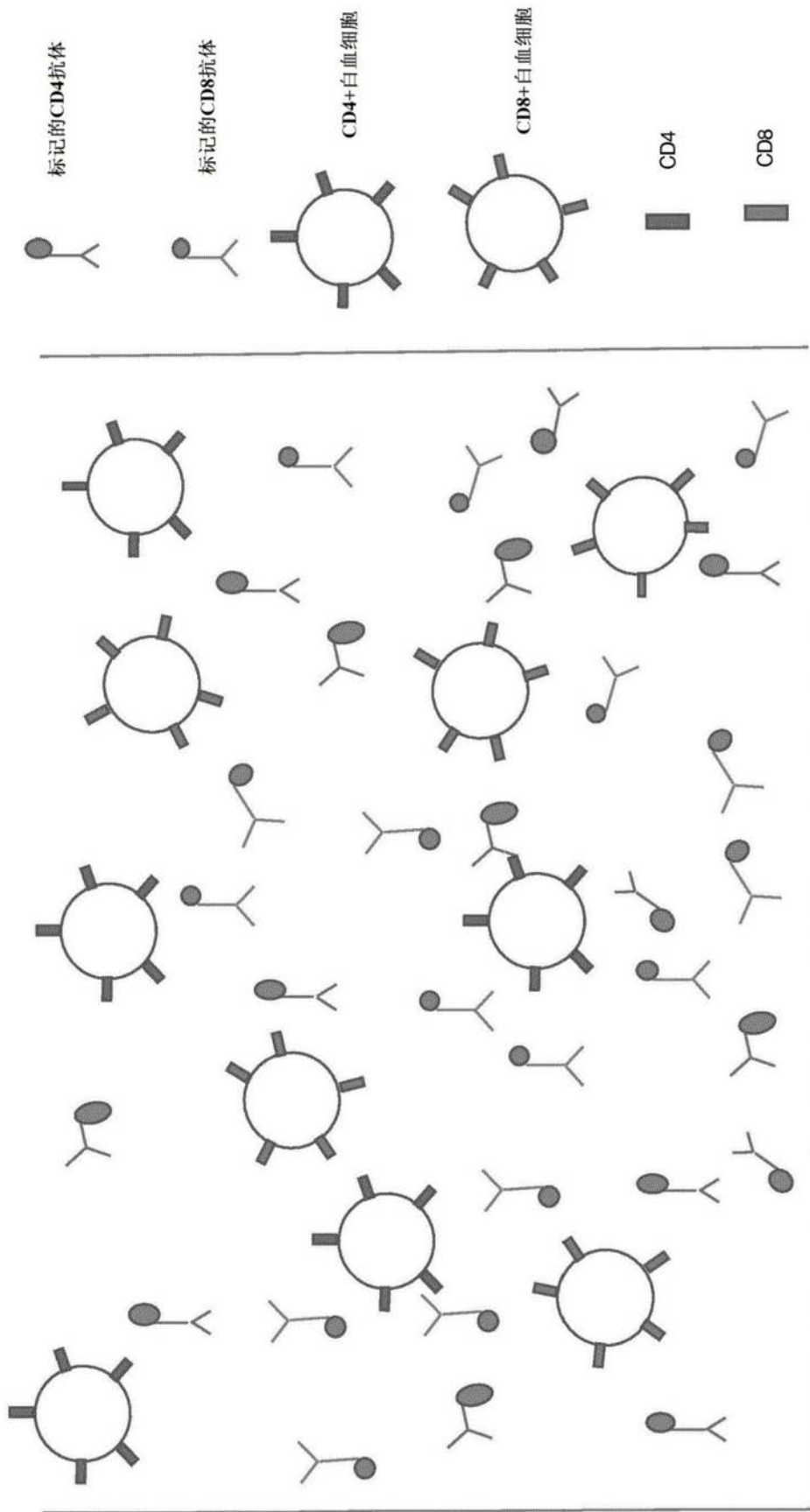


图2A

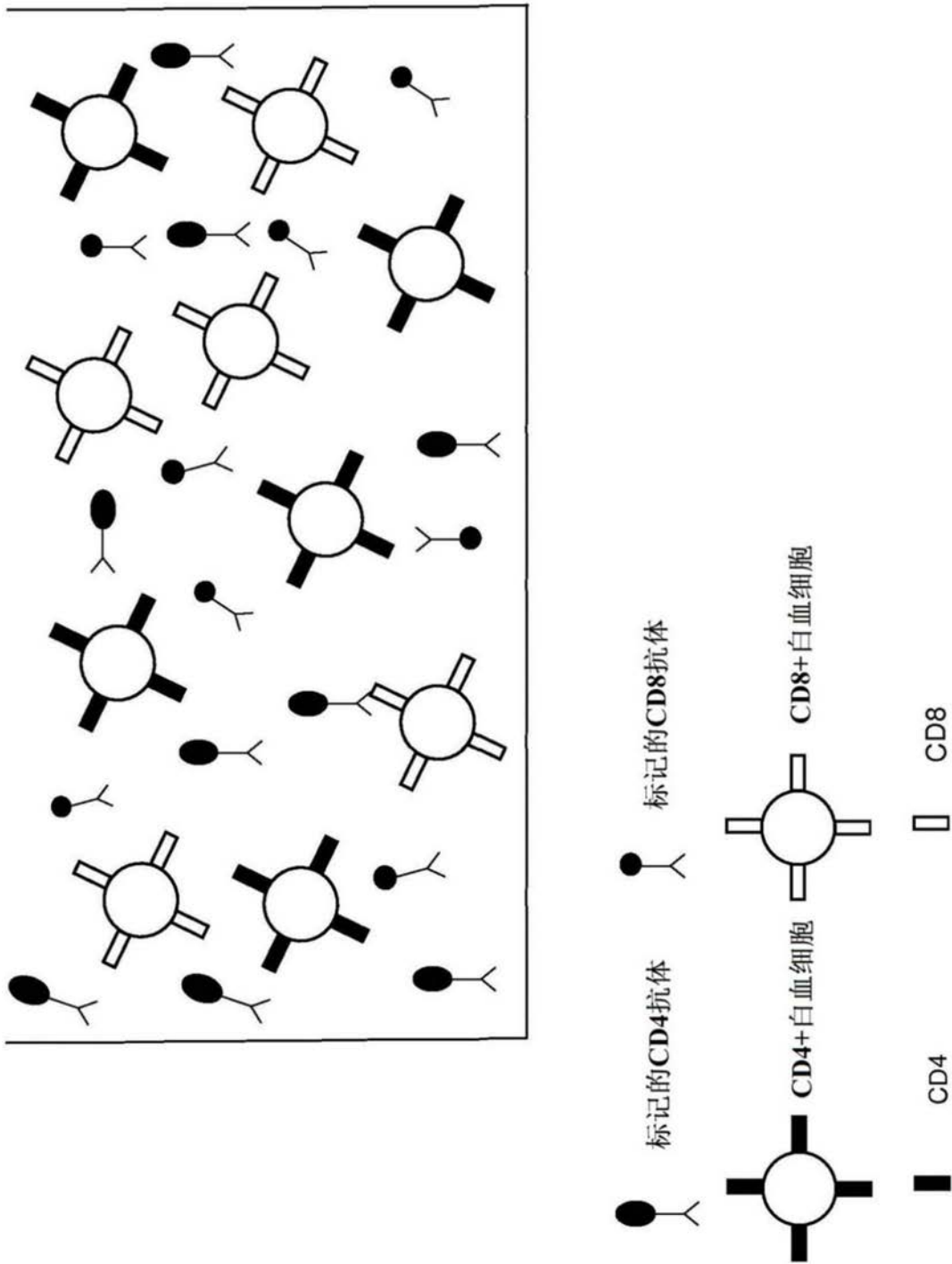


图2B

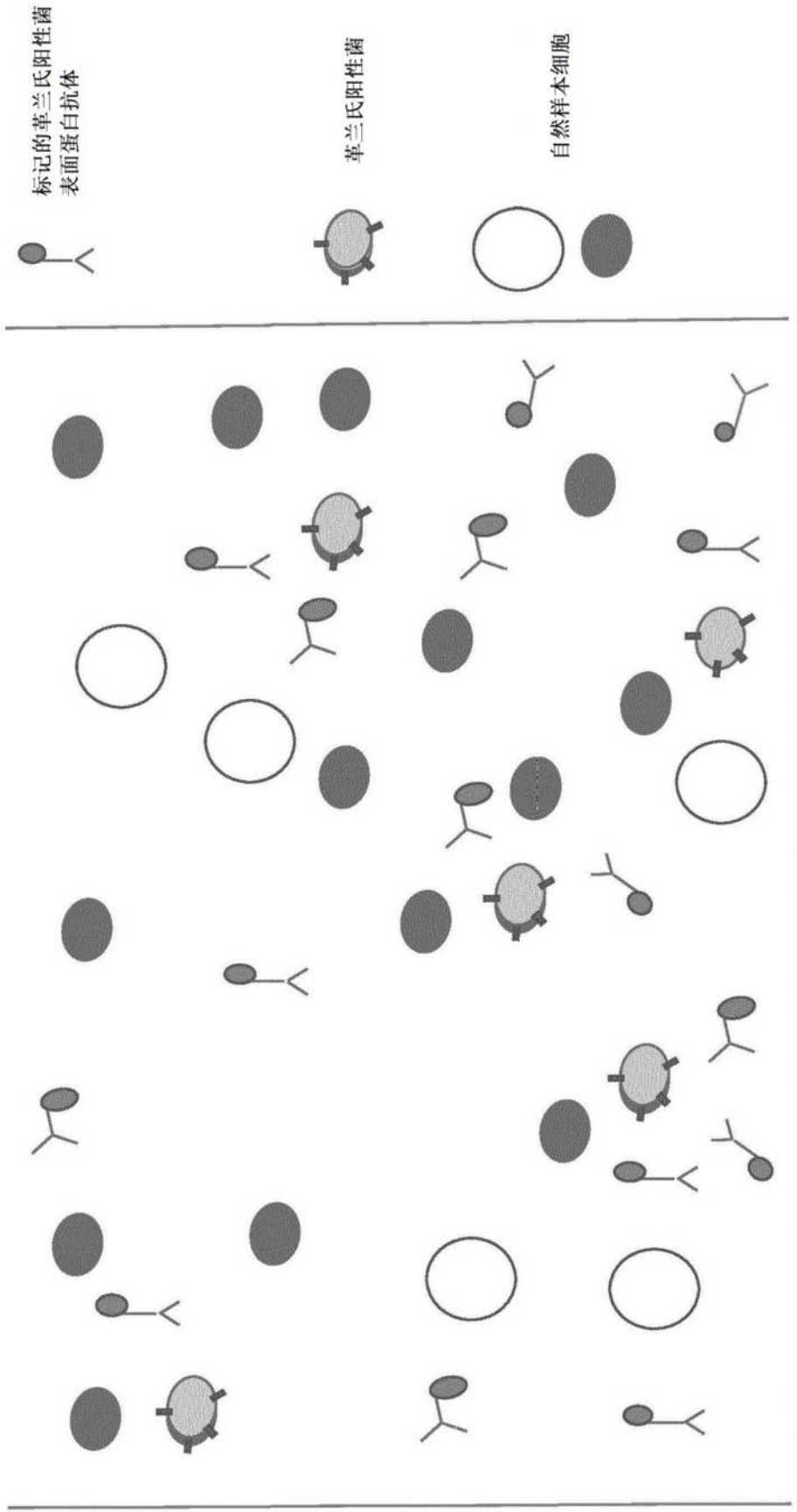


图3A

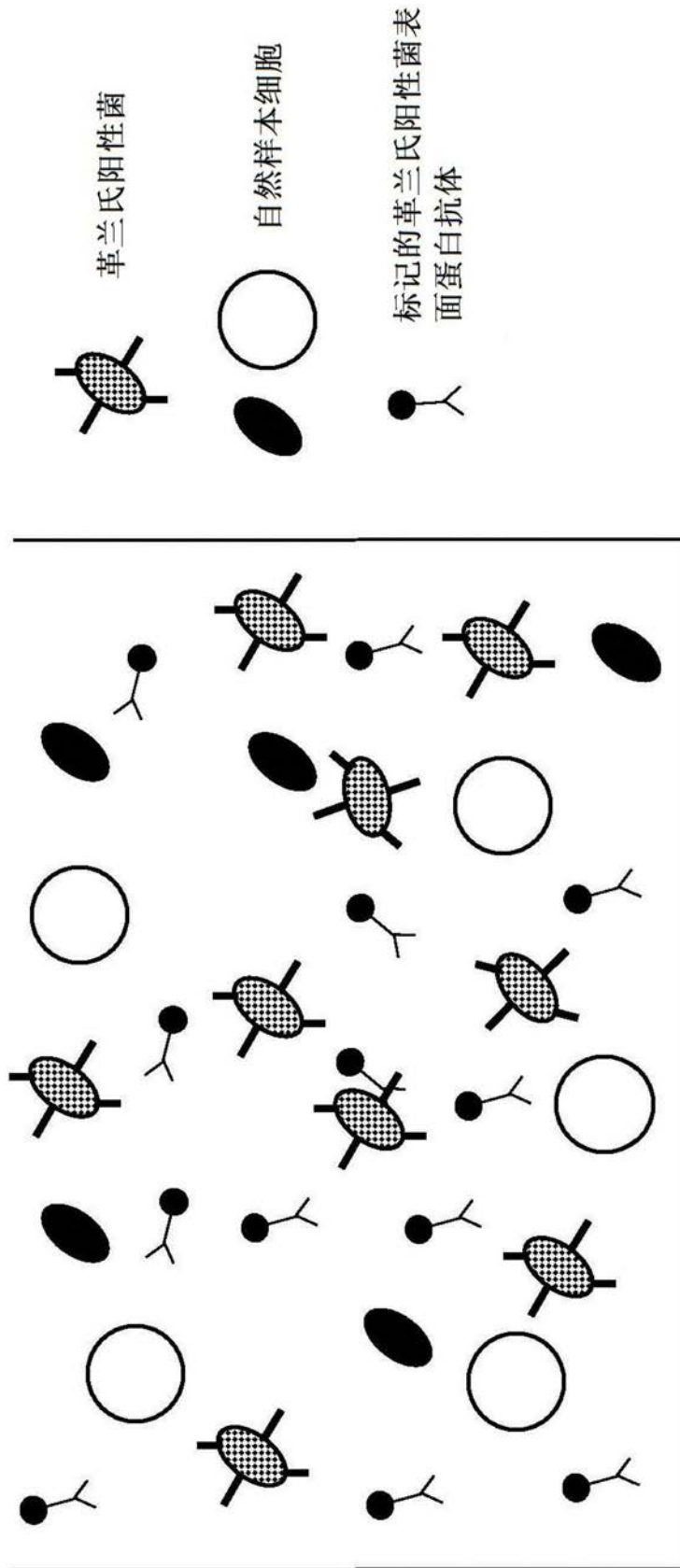


图3B

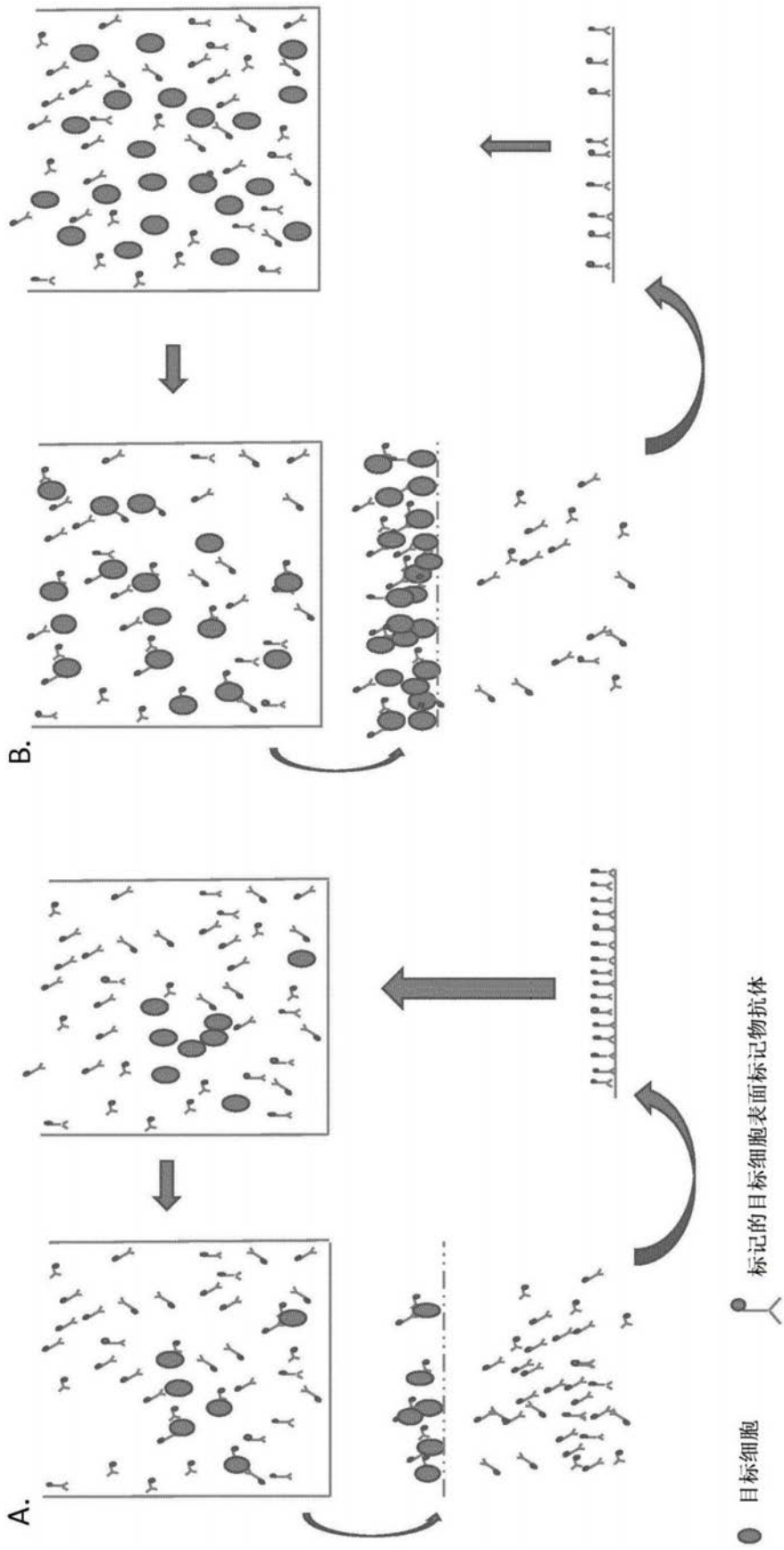


图4A

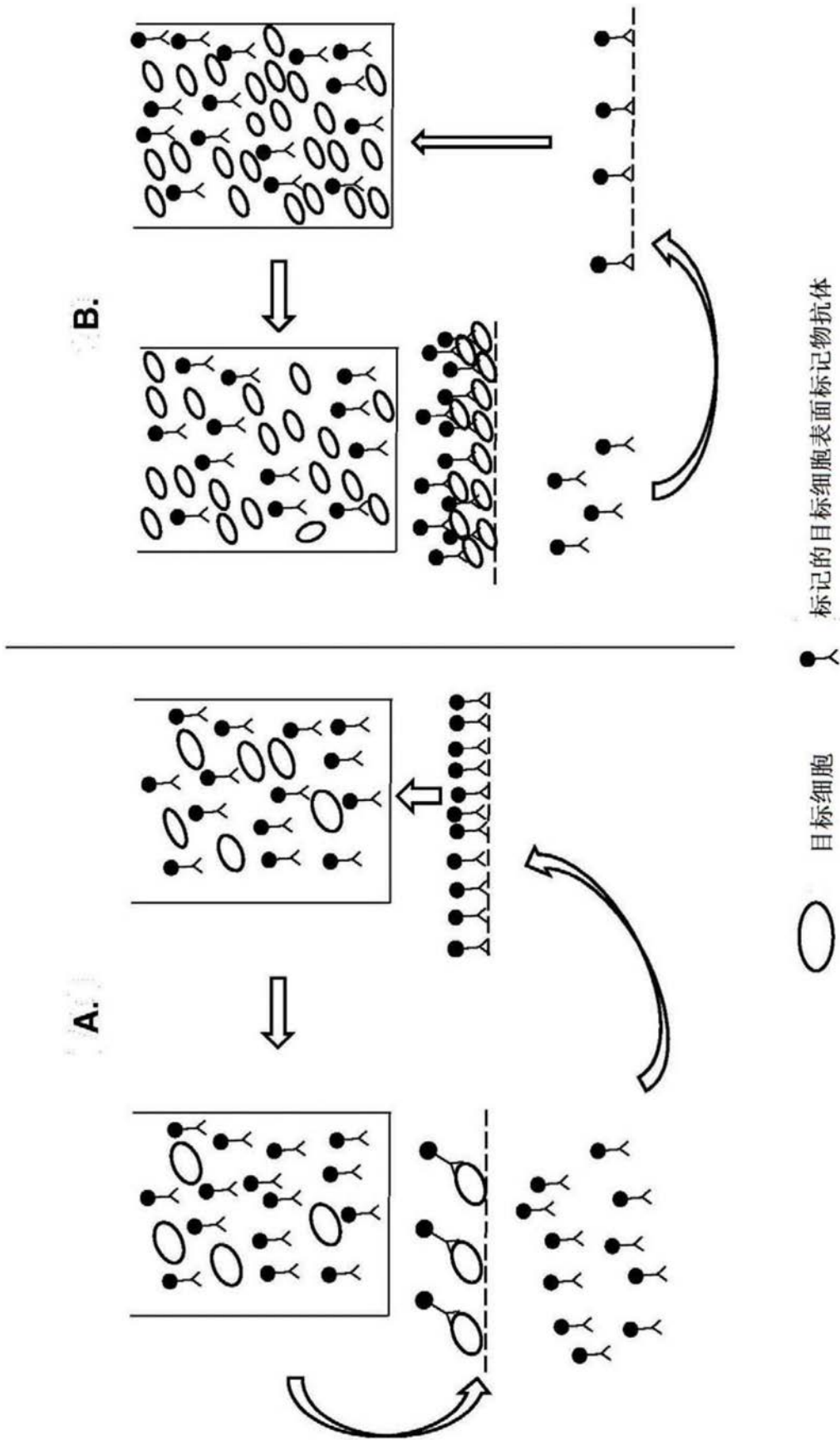


图4B

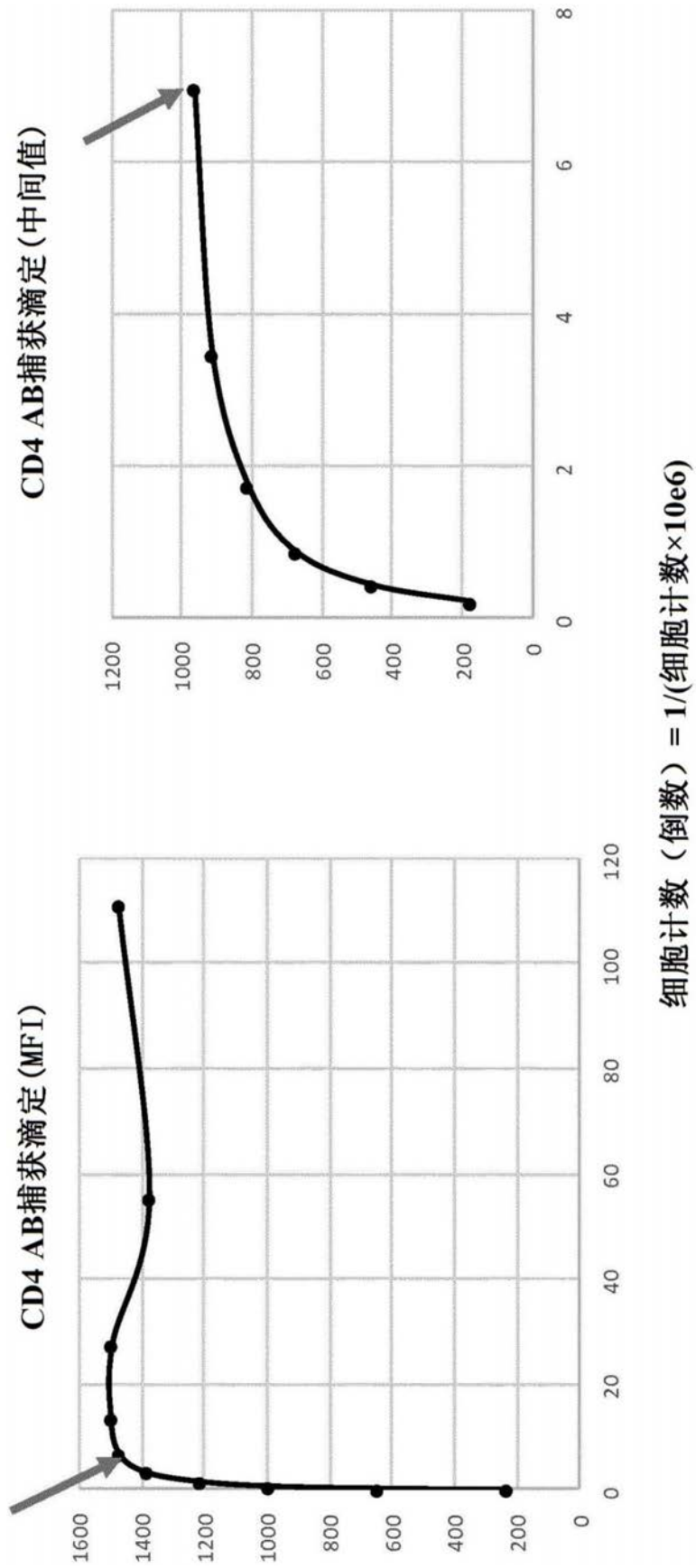


图5A

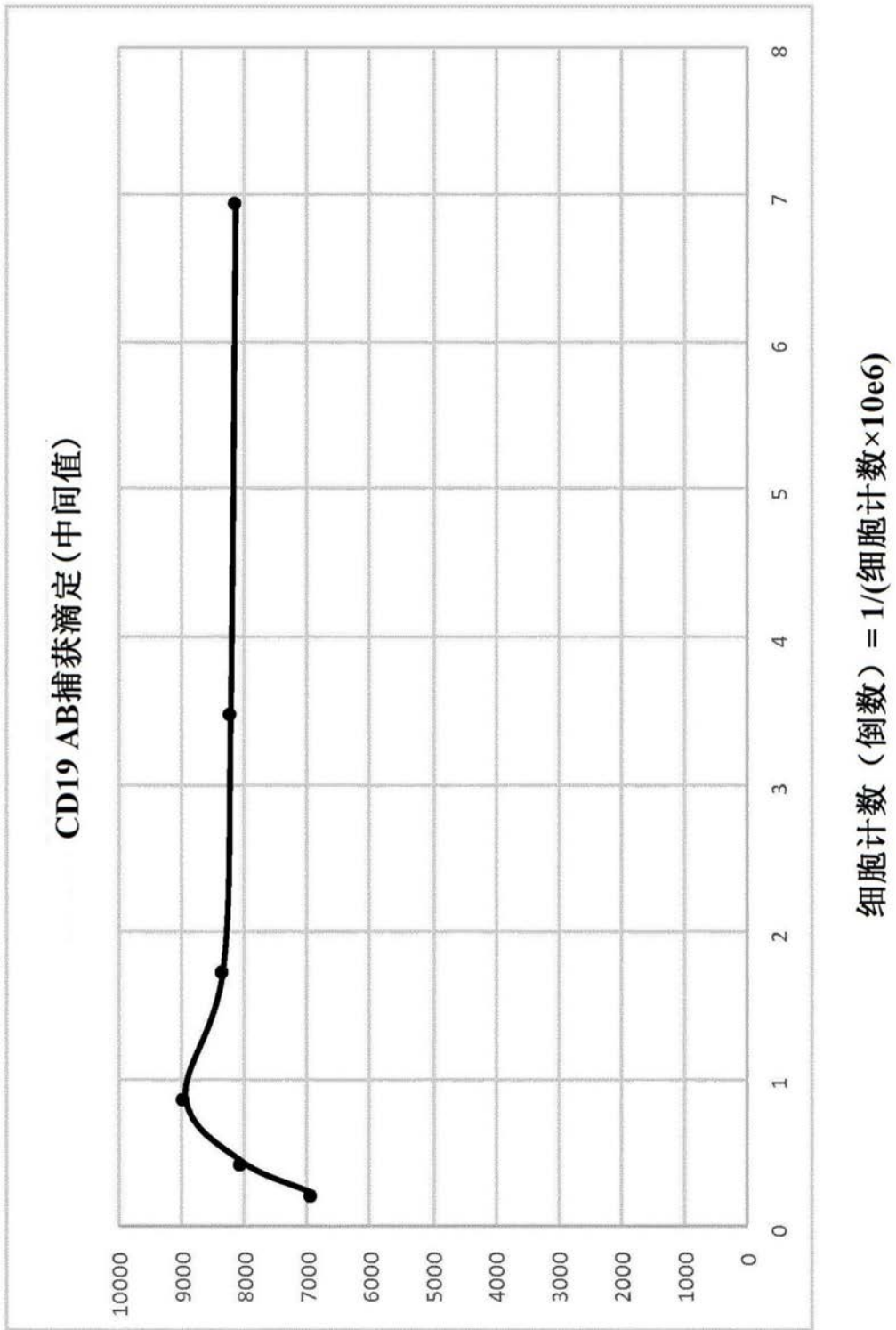


图5B

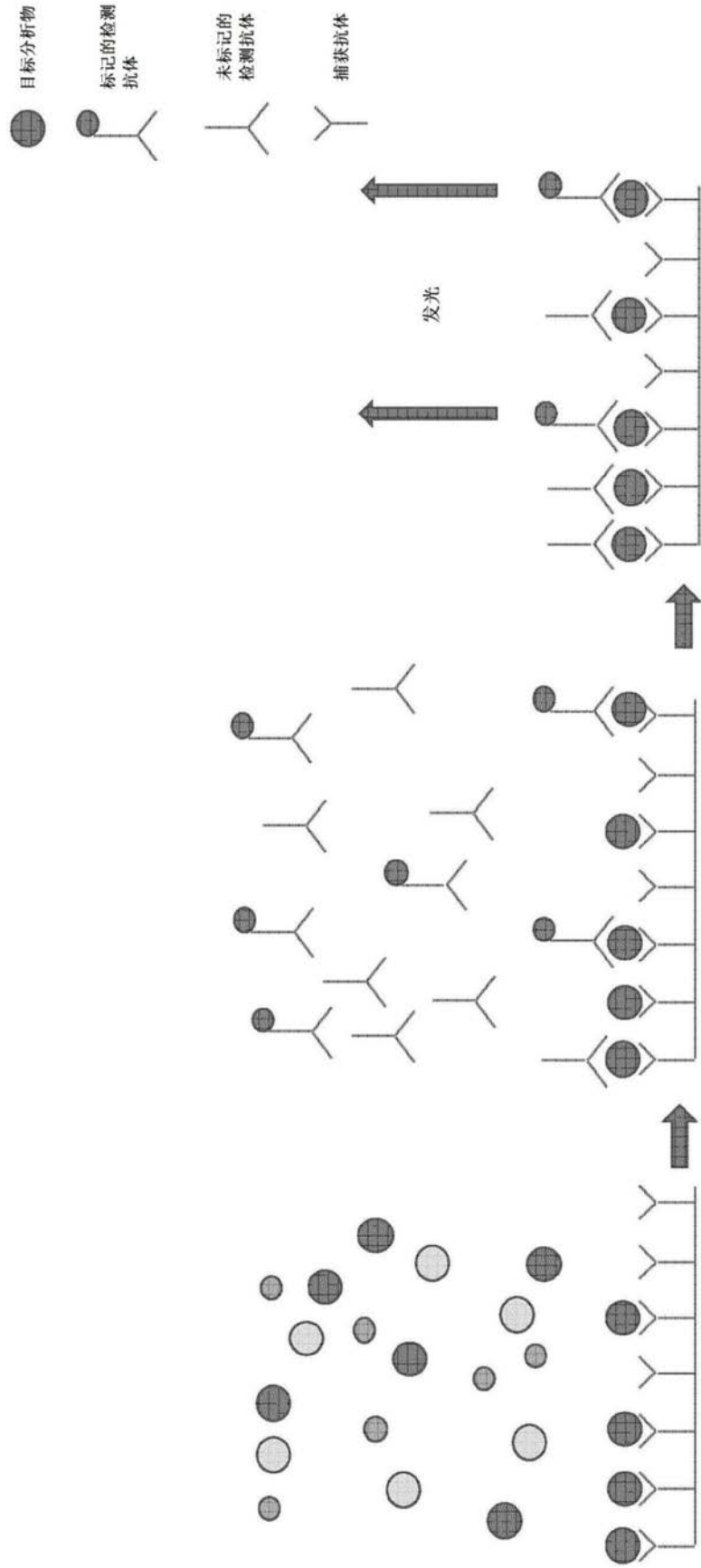


图6A

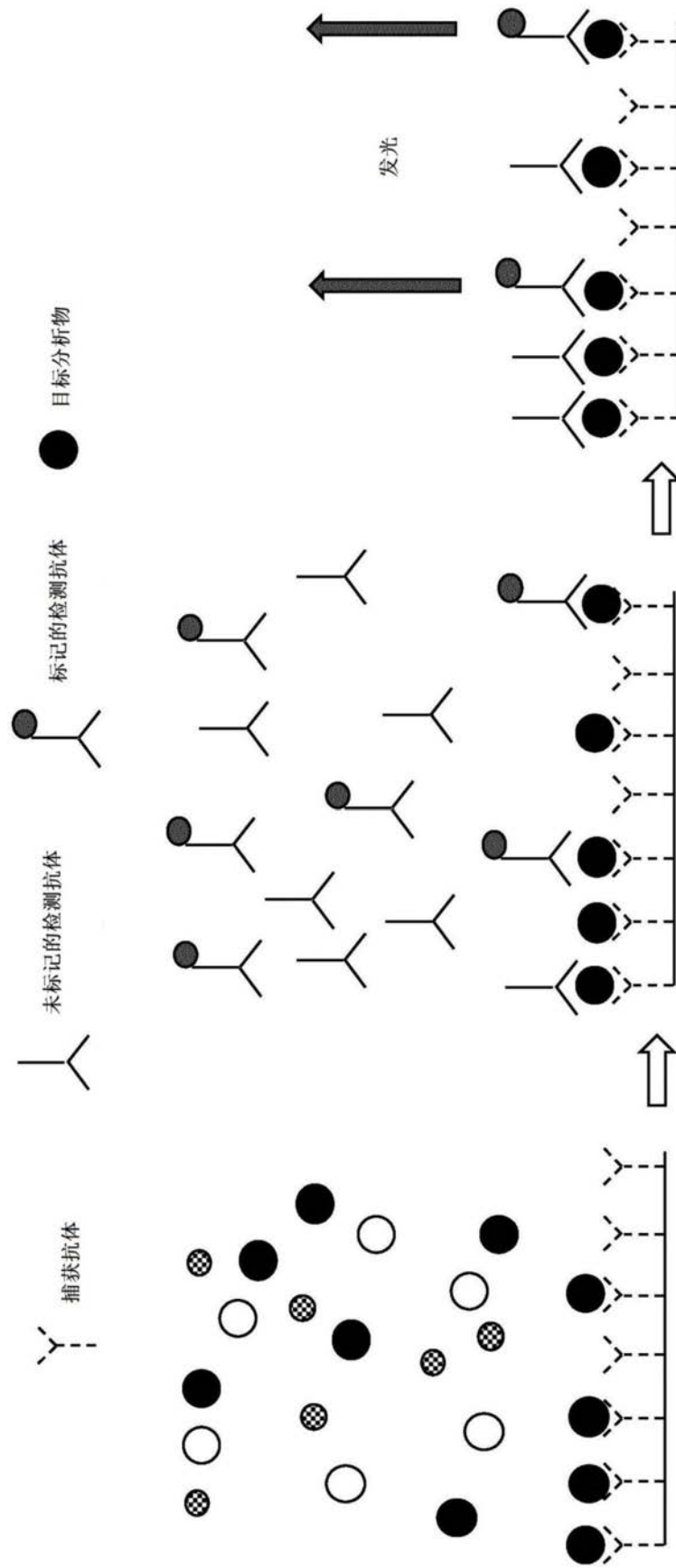


图6B

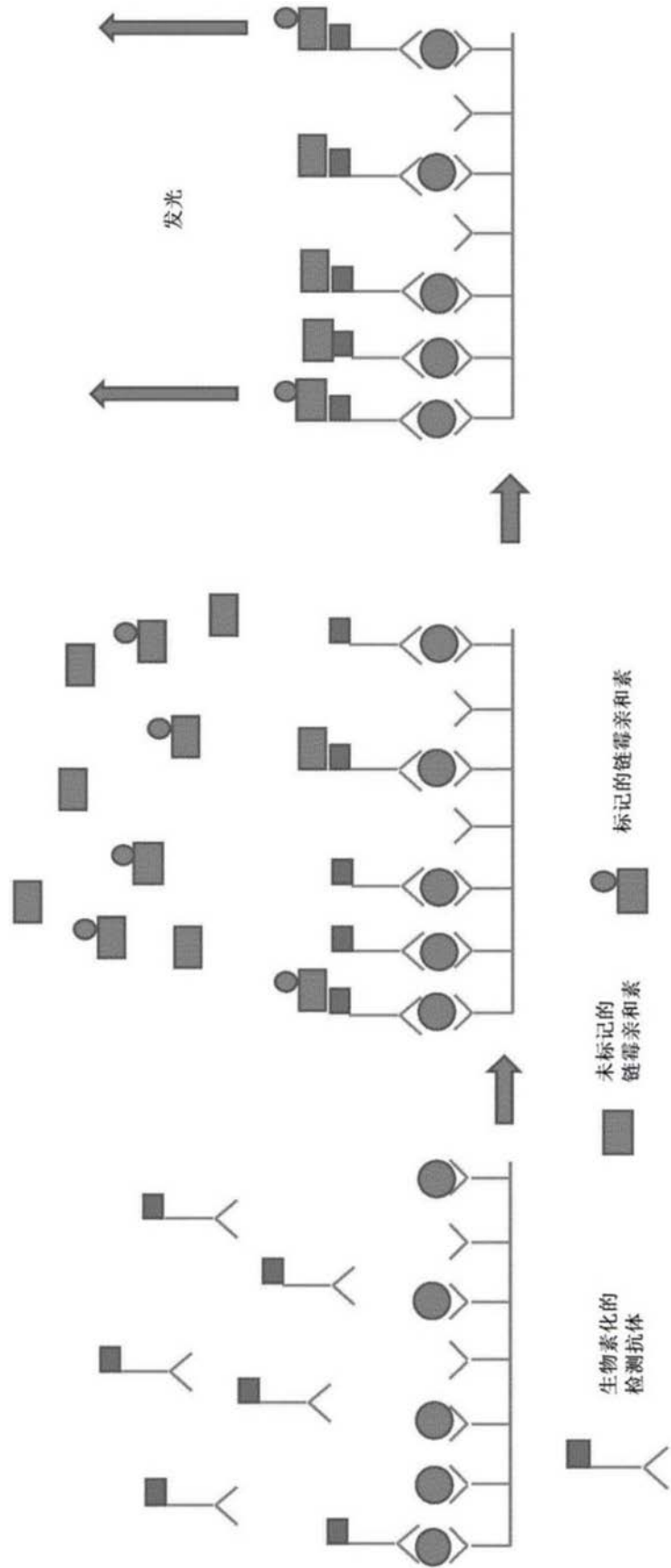


图7A

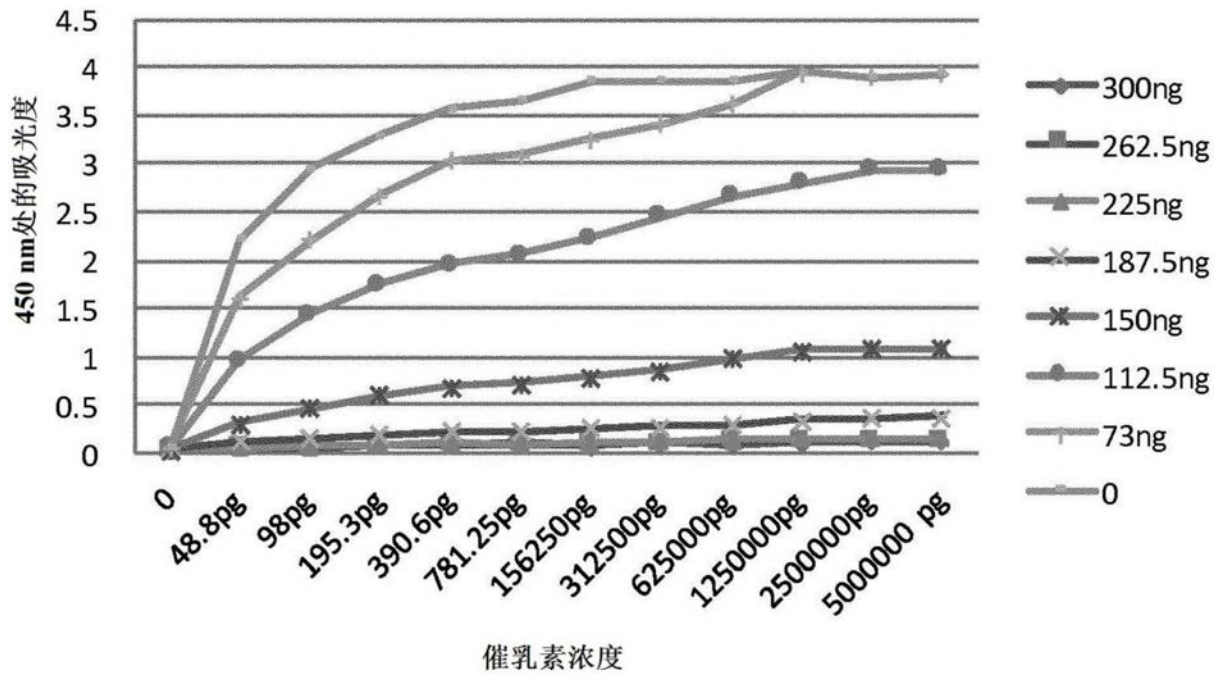


图7B

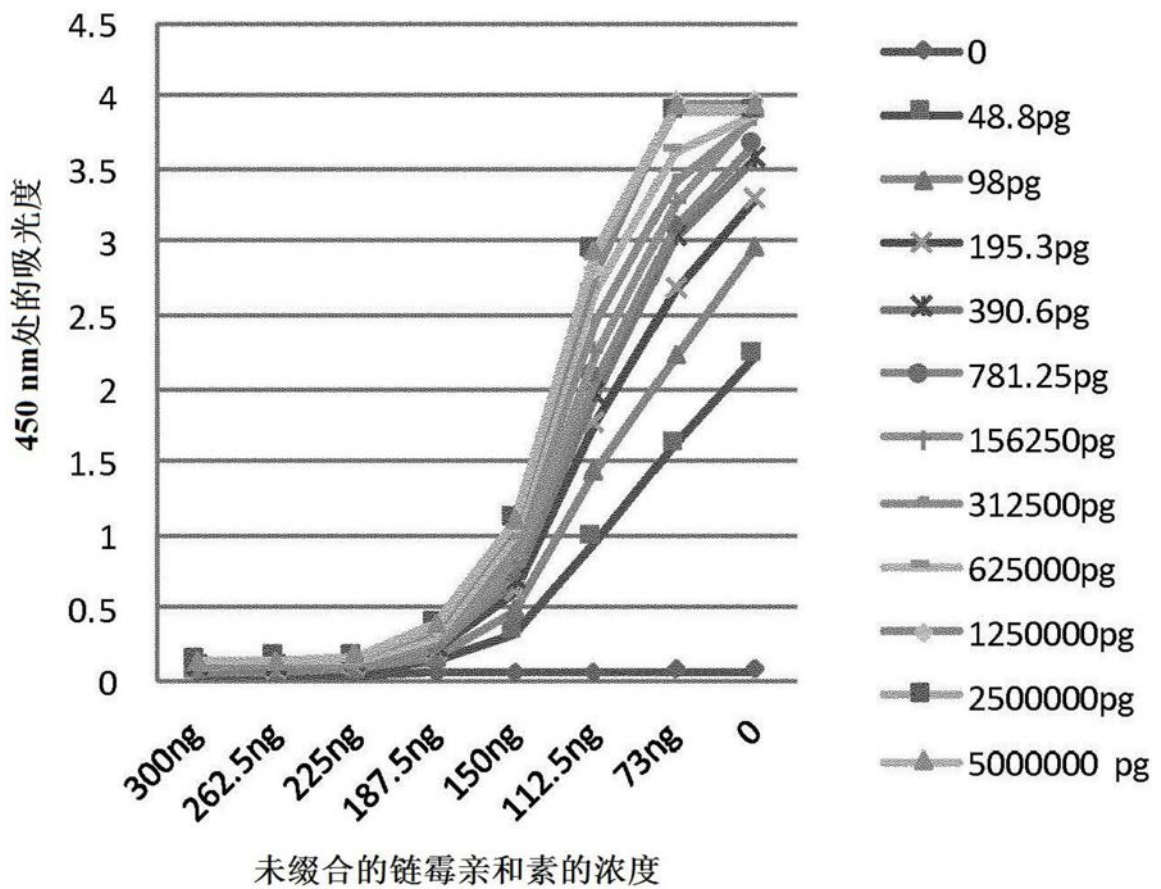


图7C

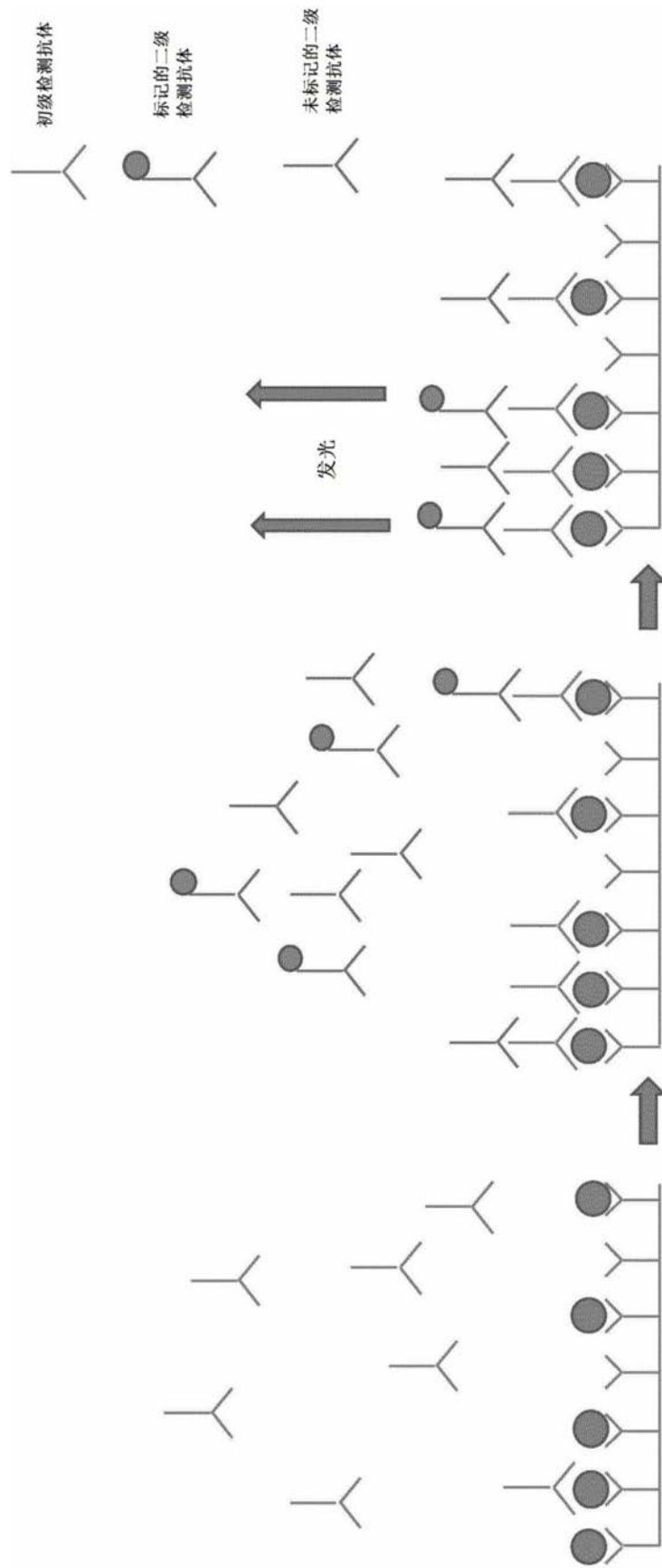


图8

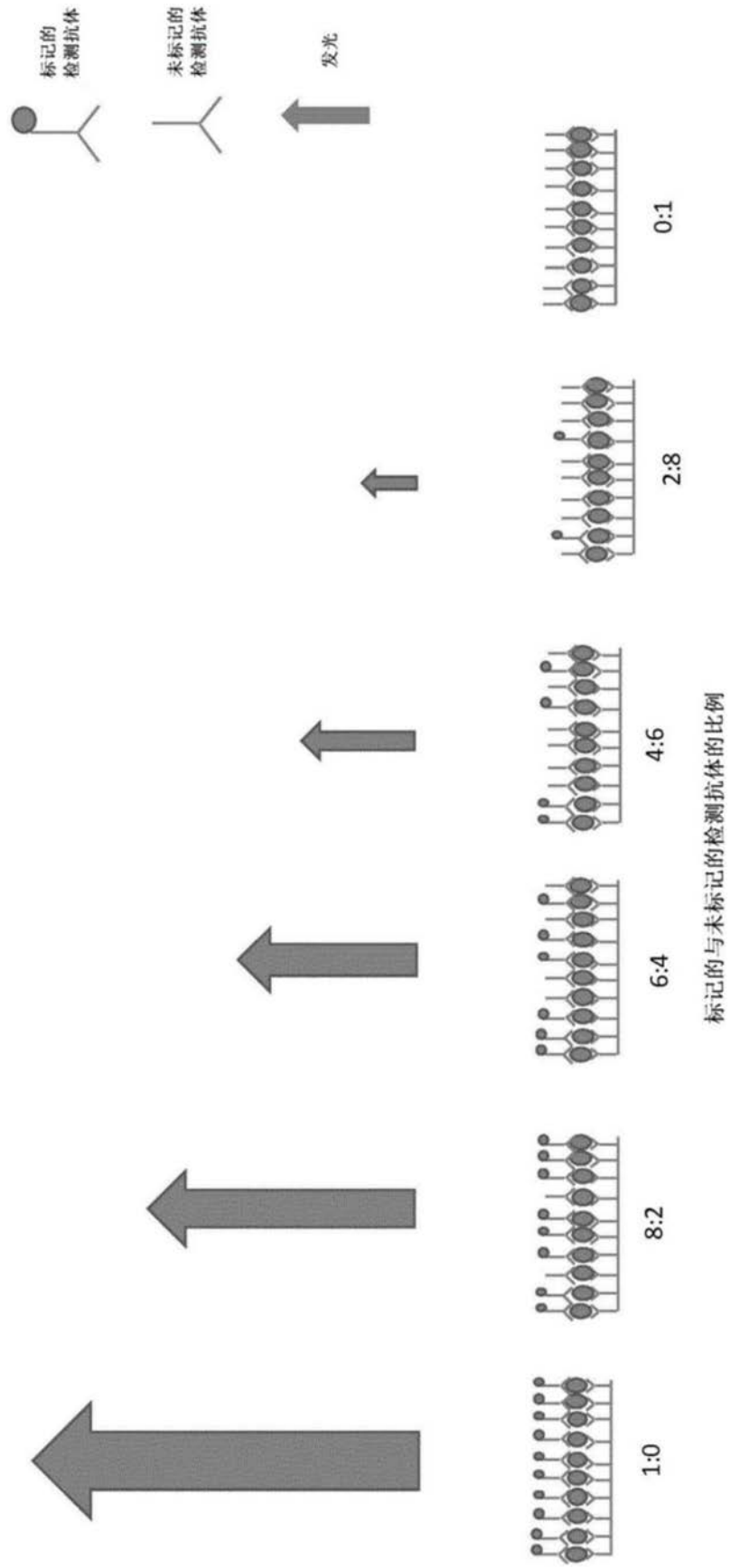


图9

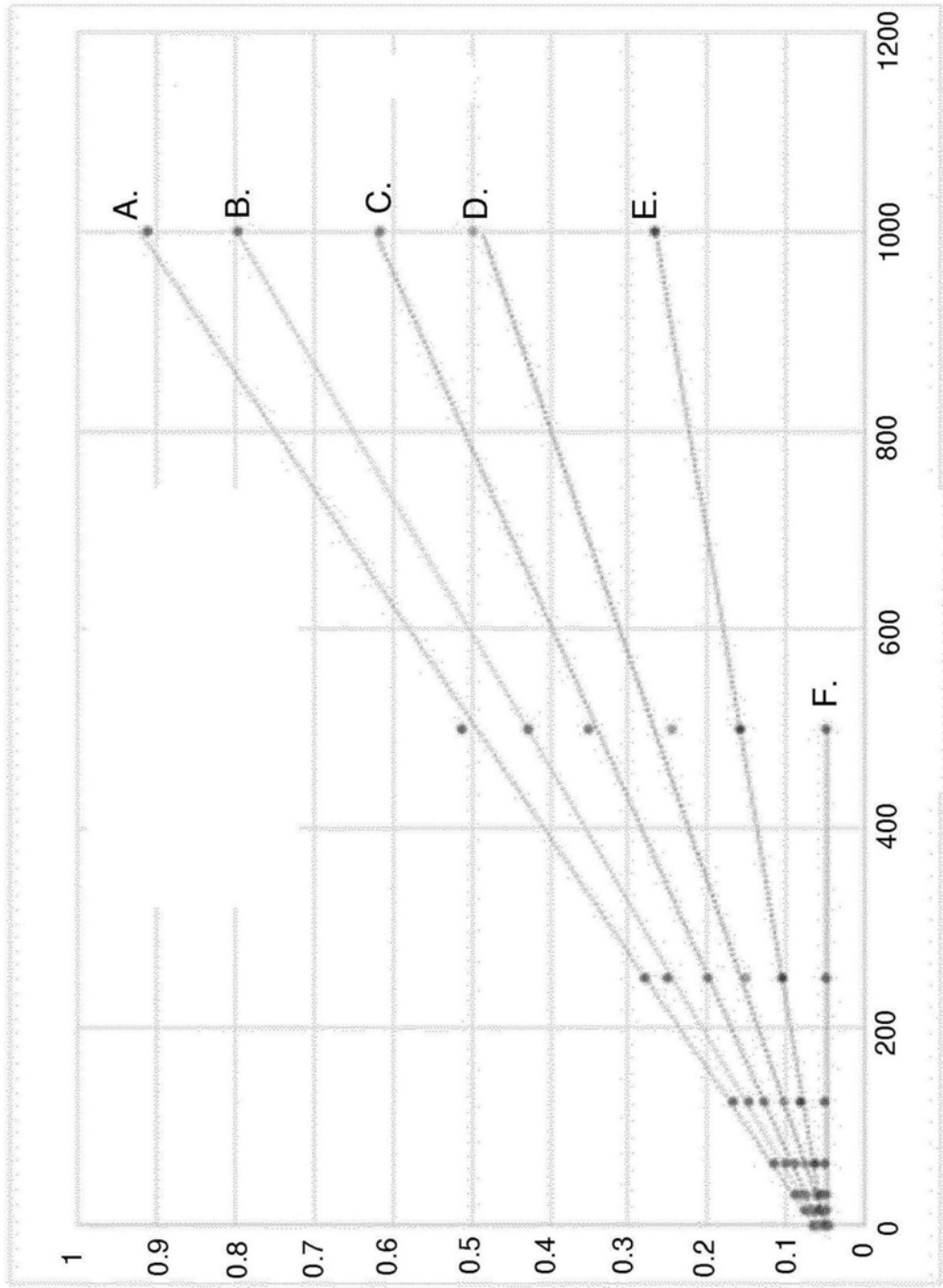


图10

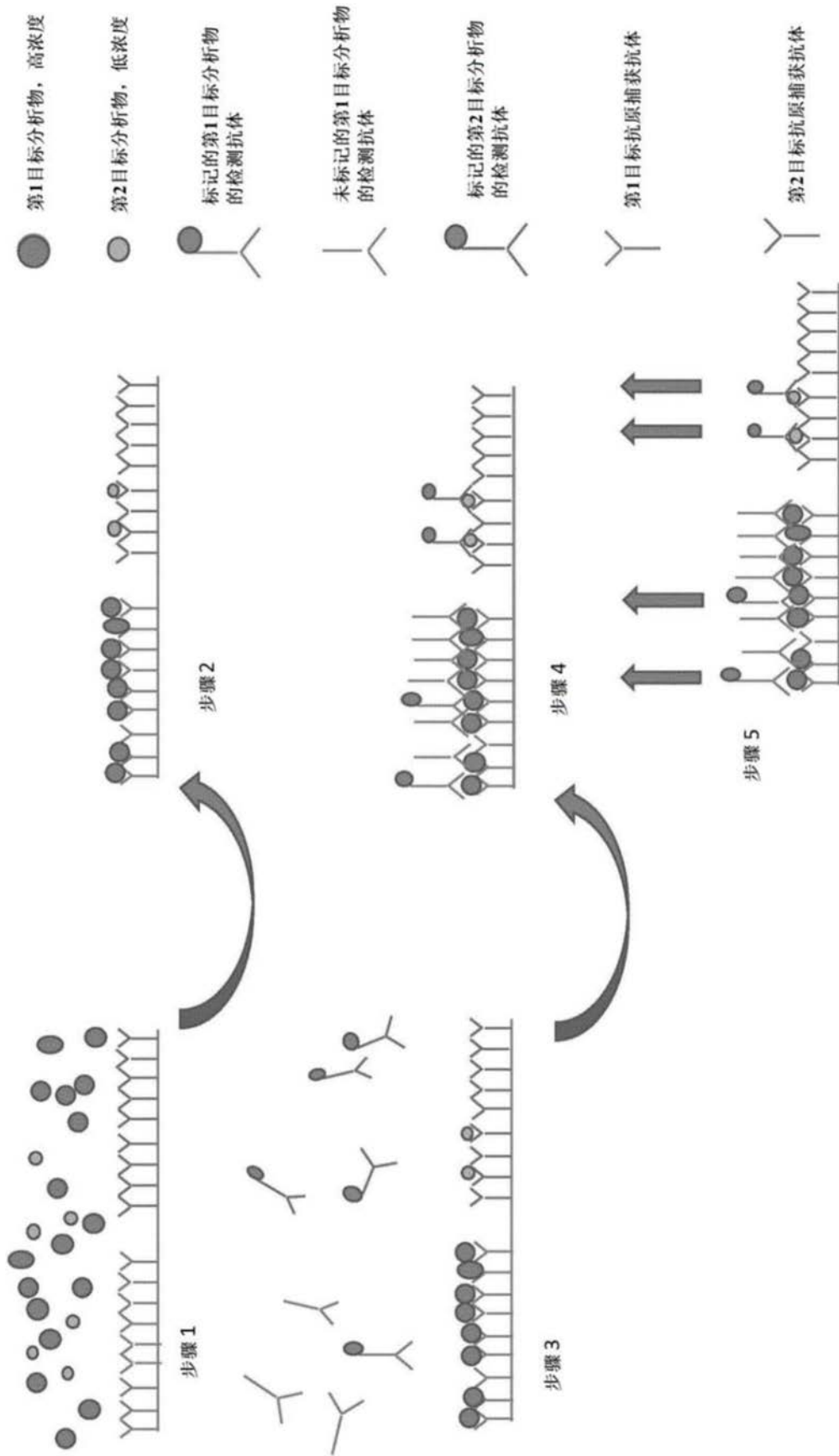


图11A

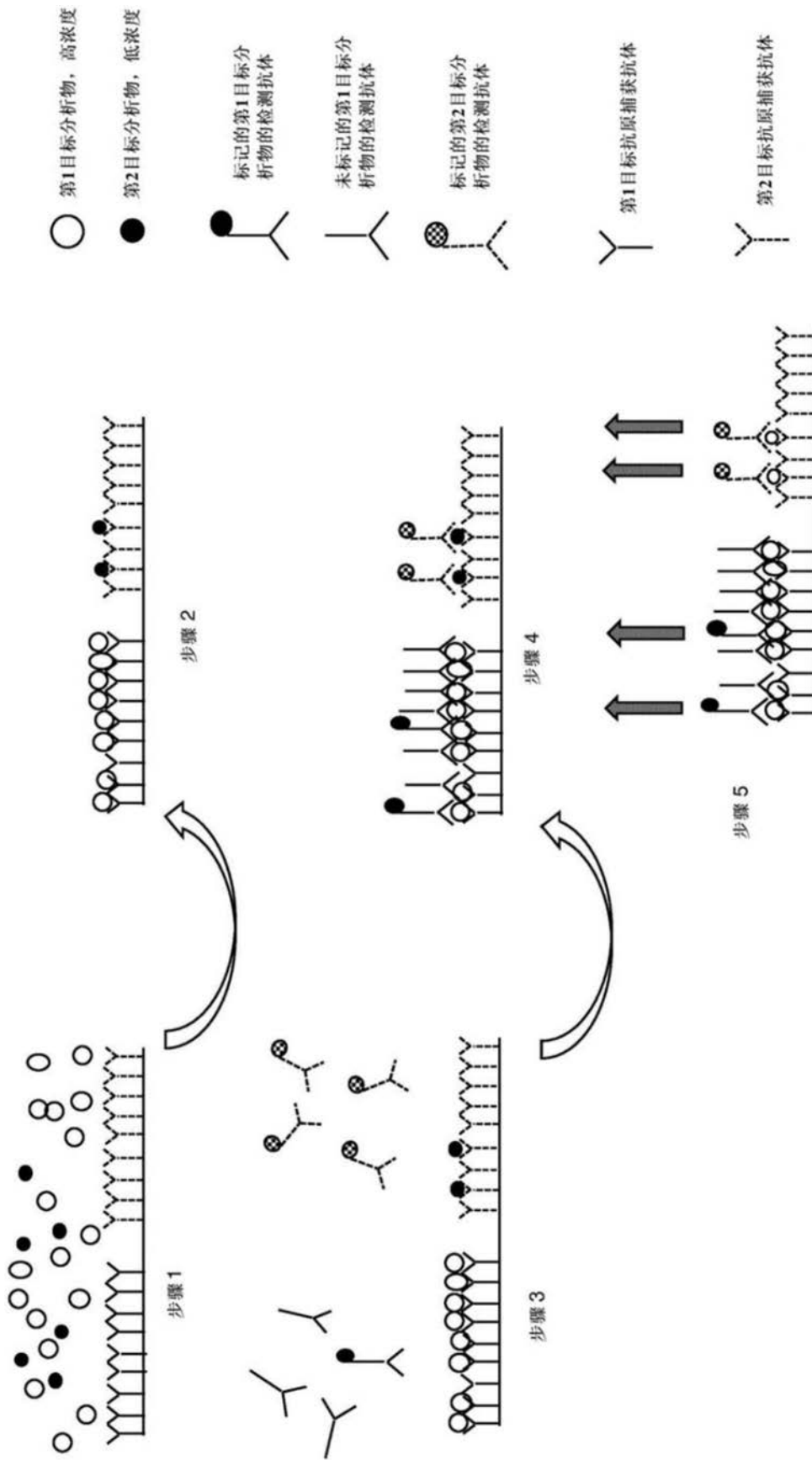


图11B

|         |   |         |            |
|---------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 分析物检测及其方法   |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN108291909A</a>  | 公开(公告)日 | 2018-07-17 |
| 申请号     | CN201680037683.5  | 申请日     | 2016-04-27 |
| [标]发明人  | 阿伦拉赫阿米<br>雅各布雷比   |         |            |
| 发明人     | 阿伦·拉赫阿米<br>雅各布·雷比   |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/537 G01N15/00  |         |            |
| CPC分类号  | G01N15/0618 G01N15/0625 G01N15/1456 G01N33/491 G01N33/537 G01N2015/008 G01N2015/1486 G01N2015/1488 G01N33/5094 G01N33/56933 |         |            |
| 代理人(译)  | 张皓<br>李维盈   |         |            |
| 优先权     | 62/153523 2015-04-28 US<br>62/155486 2015-05-01 US  |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>  |         |            |

摘要(译)

本发明公开了用于在样本且更具体地为生物样本中的分析物检测的方法和系统。一些方法和系统特别涉及通过添加对预定CD抗原特异性的抗体来区分和/或识别生物样本(如血液样本)中的细胞类型。其它方法和系统涉及控制分析物检测的测定的动态范围。

