



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104919323 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201380070020. X

代理人 洪俊梅 张淑珍

(22) 申请日 2013. 11. 11

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/725, 403 2012. 11. 12 US

61/783, 942 2013. 03. 14 US

G01N 35/08(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/48(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 07. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/069500 2013. 11. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/075016 EN 2014. 05. 15

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 M·库尔赛德·阿拉兹

阿克瓦西·A·阿波里

艾米·E·赫尔

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

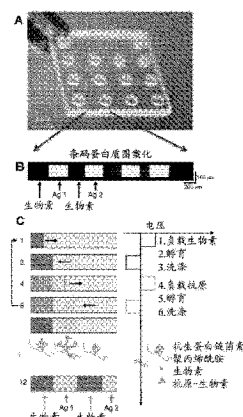
权利要求书2页 说明书33页 附图7页

(54) 发明名称

电泳条码测定装置及其制造和使用方法

(57) 摘要

本发明提供了一种用于确定分析物是否存在于样品中的微流体装置。所述微流体装置包括具有聚合物介质的狭长流动通道,其中所述聚合物介质包括具有特异性结合第一分析物的第一固定捕捉成员的第一分析物检测域和具有特异性结合第二分析物的第二固定捕捉成员的第二分析物检测域。还提供了其中可使用本发明微流体装置的方法、系统和试剂盒,以及其制造方法。



1. 一种微流体装置,其包括:

包括聚合物介质的狭长流动通道,其中所述聚合物介质包括含有特异性结合第一分析物的第一固定捕捉成员的第一分析物检测域和含有特异性结合第二分析物的第二固定捕捉成员的第二分析物检测域。

2. 根据权利要求 1 所述的微流体装置,其中所述聚合物介质包括聚合物凝胶。

3. 根据权利要求 1 所述的微流体装置,其中所述第一固定捕捉成员在所述第一分析物检测域中非共价结合所述聚合物介质。

4. 根据权利要求 3 所述的微流体装置,其中所述第一固定捕捉成员在所述第一分析物检测域中经由特异性结合成员对非共价结合所述聚合物介质。

5. 根据权利要求 4 所述的微流体装置,其中所述特异性结合成员对包括生物素和抗生物素。

6. 根据权利要求 5 所述的微流体装置,其中所述第一固定捕捉成员包括结合所述聚合物介质的抗生物素和结合所述第一分析物的配体的生物素。

7. 根据权利要求 1 所述的微流体装置,其中所述第二固定捕捉成员在所述第二分析物检测域中非共价结合所述聚合物介质。

8. 根据权利要求 7 所述的微流体装置,其中所述第二固定捕捉成员在所述第二分析物检测域中经由特异性结合成员对非共价结合所述聚合物介质。

9. 根据权利要求 8 所述的微流体装置,其中所述特异性结合成员对包括生物素和抗生物素。

10. 根据权利要求 9 所述的微流体装置,其中所述第二固定捕捉成员包括结合所述聚合物介质的抗生物素和结合所述第二分析物的配体的生物素。

11. 一种确定分析物是否存在于样品中的方法,所述方法包括:

将样品引入包括聚合物介质的狭长流动通道中,其中所述聚合物介质包括含有特异性结合第一分析物的第一固定捕捉成员的第一分析物检测域和含有特异性结合第二分析物的第二固定捕捉成员的第二分析物检测域;

以足以移动组分通过所述聚合物介质的方式将定向电场施加于所述狭长流动通道;以及

从所述第一分析物检测域和所述第二分析物检测域获得信号以确定所述第一分析物和所述第二分析物是否存在于所述样品中。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其包括在将所述样品引入所述狭长流动通道中之前标记所述样品。

13. 根据权利要求 11 所述的方法,其包括在所述样品引入所述狭长流动通道中之后将标记引入所述狭长流动通道中。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述标记包括特异性结合分析物的抗体。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述标记包括荧光部分。

16. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述分析物包括抗体。

17. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述样品包括血液、血液制品、尿液或唾液。

18. 一种用于测定流体样品中两种或更多种分析物的存在的系统,所述系统包括:

(a) 根据权利要求 1 到 10 中任一项所述的微流体装置;以及

(b) 检测器。

19. 根据权利要求 18 所述的系统,其还包括配置为引导流体通过所述微流体装置的微流体组件。

20. 一种试剂盒,其包括:

(a) 根据权利要求 1 到 10 中任一项所述的微流体装置;以及

(b) 配置为容纳所述微流体装置的包装。

21. 一种制造微流体测定装置的方法,所述方法包括:

在狭长流动通道中制造前体聚合物介质,其中所述前体聚合物介质包括特异性结合对的第一成员;

以足以制造包括特异性结合所述狭长流动通道中的第一分析物的第一固定捕捉成员的第一分析物检测域的方式,将规定量的包含结合所述特异性结合对的第二成员的第一抗原的第一捕捉成员引入所述狭长流动通道中;

以足以制造间隔域的方式将规定量的所述特异性结合对的所述第二成员引入所述狭长流动通道中;以及

以足以制造包括特异性结合所述狭长流动通道中的第二分析物的第二固定捕捉成员的第二分析物检测域的方式,将规定量的包括结合所述特异性结合对的所述第二成员的第二抗原的第二捕捉成员引入所述狭长流动通道中;

以制造微流体测定装置。

电泳条码测定装置及其制造和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据 35U. S. C. § 119(e), 本申请要求 2012 年 11 月 12 日提交的美国临时专利申请号 61/725, 403 和 2013 年 3 月 14 日提交的美国临时申请号 61/783, 942 的申请日的优先权, 各申请的公开内容以引用的方式并入本文。

背景技术

[0003] 验证性诊断测定适用于消除假阳性筛选结果。举例来说, 在 HCV 或 HIV 诊断中, 美国疾病控制和预防中心 (U. S. Center for Disease Control and Prevention ;CDC) 推荐一种筛选酶免疫测定, 如酶联免疫吸附测定 (ELISA), 其中使用蛋白质印迹或免疫印迹进行阳性结果的后续验证。为了提供高于快速筛选测定的临床灵敏性和特异性, 验证性印迹测定单一样品中的多种生物标志物。然而, 即使在发达国家, 公共卫生中心也提出资金缺乏是可能限制获得 HCV 诊断法的因素。当考虑到欠发达国家时, 获得验证性诊断学甚至具有更多限制。验证性印迹测定的获得性限制可能部分地归因于通常与这些类型的测定相关的高资源消耗。在常规形式中, 所述测定是费时、费力且成本高的, 它们需要实验室基础设施和经过训练的工作人员。举例来说, 验证性诊断学目前由于繁重的、多阶段方案而委托给集中实验室。执行特异性生物标志物的存在的即时验证的能力将积极地影响对于传染性疾病如丙型肝炎 (HCV) 和 HIV 的治疗效力。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种用于确定分析物是否存在于样品中的微流体装置。所述微流体装置包括具有聚合物介质的狭长流动通道, 其中所述聚合物介质包括具有特异性结合于第一分析物的第一固定捕捉成员的第一分析物检测域和具有特异性结合于第二分析物的第二固定捕捉成员的第二分析物检测域。还提供其中可使用本发明微流体装置的方法、系统和试剂盒, 以及其制造方法。

[0005] 本公开的多个方面包括微流体装置。所述微流体装置包括含有聚合物介质的狭长流动通道, 其中所述聚合物介质包括具有特异性结合于第一分析物的第一固定捕捉成员的第一分析物检测域和具有特异性结合于第二分析物的第二固定捕捉成员的第二分析物检测域。

[0006] 在一些实施方案中, 所述聚合物介质包括聚合物凝胶。

[0007] 在一些实施方案中, 所述第一固定捕捉成员在所述第一分析物检测域中非共价结合所述聚合物介质。在一些实施方案中, 所述第一固定捕捉成员在所述第一分析物检测域中经由特异性结合成员对非共价结合所述聚合物介质。在一些实施方案中, 所述特异性结合成员对包括生物素和抗生物素蛋白链菌素。在一些实施方案中, 所述第一固定捕捉成员包括结合所述聚合物介质的抗生物素蛋白链菌素和结合所述第一分析物的配体的生物素。

[0008] 在一些实施方案中, 所述第二固定捕捉成员在所述第二分析物检测域中非共价结合所述聚合物介质。在一些实施方案中, 所述第二固定捕捉成员在所述第二分析物检测域

中经由特异性结合成员对非共价结合所述聚合物介质。在一些实施方案中,所述特异性结合成员对包括生物素和抗生蛋白链菌素。在一些实施方案中,所述第二固定捕捉成员包括结合所述聚合物介质的抗生蛋白链菌素和结合所述第二分析物的配体的生物素。

[0009] 本公开的多个方面包括一种确定分析物是否存在于样品中的方法。所述方法包括将样品引入包括聚合物介质的狭长流动通道中,其中所述聚合物介质包括具有特异性结合第一分析物的第一固定捕捉成员的第一分析物检测域和具有特异性结合第二分析物的第二固定捕捉成员的第二分析物检测域。所述方法还包括以足以移动组分通过所述聚合物介质的方式将定向电场施加于所述狭长流动通道,以及从所述第一分析物检测域和所述第二分析物检测域获得信号以确定所述第一分析物和所述第二分析物是否存在于所述样品中。

[0010] 在一些实施方案中,所述方法包括在将所述样品引入所述狭长流动通道中之前标记所述样品。

[0011] 在一些实施方案中,所述方法包括在所述样品引入所述狭长流动通道中之后将标记引入所述狭长流动通道中。在一些实施方案中,所述标记包括特异性结合分析物的抗体。在一些实施方案中,所述标记包括荧光部分。

[0012] 在一些实施方案中,所述分析物包括抗体。

[0013] 在一些实施方案中,所述样品为生物样品。在一些实施方案中,所述样品包括血液、血液制品、尿液或唾液。

[0014] 本公开的多个方面包括一种用于测定流体样品中两种或更多种分析物的存在的系统。所述系统包括根据本公开实施方案的微流体装置和检测器。

[0015] 在一些实施方案中,所述系统还包括配置为引导流体通过所述微流体装置的微流体组件。

[0016] 本公开的多个方面包括一种试剂盒,其包括根据本公开实施方案的微流体装置和配置为容纳所述微流体装置的包装。

[0017] 本公开的多个方面包括一种制造微流体测定装置的方法。所述方法包括在狭长流动通道中制造前体聚合物介质,其中所述前体聚合物介质包括特异性结合对的第一成员。所述方法还包括以足以制造包括特异性结合所述狭长流动通道中的第一分析物的第一固定捕捉成员的第一分析物检测域的方式,将规定量的具有结合所述特异性结合对的第二成员的第一抗原的第一捕捉成员引入所述狭长流动通道中。所述方法还包括以足以制造间隔域的方式将规定量的所述特异性结合对的所述第二成员引入所述狭长流动通道中,以及以足以制造包括特异性结合所述狭长流动通道中的第二分析物的第二固定捕捉成员的第二分析物检测域的方式将规定量的具有结合所述特异性结合对的所述第二成员的第二抗原的第二捕捉成员引入所述狭长流动通道中,以制造微流体测定装置。

附图说明

[0018] 图 1(a) 示出根据本公开的实施方案在玻璃芯片中的微通道和在通道中的具有生物素阻断的间隔区的 4 个抗原条带(生物素和 AF-488 标记的 c100p) 的图像。图 1(b) 示出图案化步骤的详情:(1) 注射和固定;(2) 孵育;(3) 过量材料的反洗涤;(4) 针对下一个试剂(例如生物素)重复以上步骤。图 1(c) 示出 c100p 抗原和抗体信号(10 分钟测定, 2 μ g/ml, 13nM HCV-c100p 人类 AB) 的图像。图 1(d) 示出由 NS3 和 c100p 抗原捕捉的 HCV

人类 AB ($2 \mu\text{g/ml}$, 13nM 于 2% 血清中) 的测定结果的示意图和曲线图。用 AF-568 标记的二次抗体进行检测 (5min 负载和 5min 洗涤)。所述曲线图比较了 $2 \mu\text{g/ml}$ HCV AB 信号与 2% 健康血清信号 (阴性对照)。多阶段测定总时间为 30 分钟。除了图 1(a) 中的芯片图像, 比例尺均为 $100 \mu\text{m}$ 长。

[0019] 图 2 示出根据本公开的实施方案的用于多重蛋白检测的微流体条码测定。图 2(A) 示出具有 6 条简单笔直 (2.5mm 长) 微通道的 $17.5\text{mm} \times 17.5\text{mm}$ 玻璃芯片的图像, 各微通道容纳抗生蛋白链菌素 -PA 凝胶。图 2(B) 示出四个 c100p-AF488 抗原条带和交错的生物素间隔区的荧光显微照片。图 2(C) 示出电泳图案化工艺的示意图, 所述工艺包括: (步骤 1-3) 生物素阻断以经由电泳负载创建入口区域间隔区、孵育以及反极性场以去除未结合的生物素; 以及 (步骤 4-6) 在经由电泳引入创建间隔区后图案化生物素化抗原、1 分钟孵育以及反极性电泳去除未结合的生物素化抗原。针对各后续试剂 - 间隔区对图案, 重复步骤 1-6。

[0020] 图 3 示出抗体夹心测定的示意图: 血清样品通过其中捕捉对应靶标抗体的涂抹过的抗原区域以电泳方式递送到通道筛中。在下一个步骤中, 用以电泳方式负载的荧光标记的抗人类二次抗体进行检测。底部图像示出根据本公开的实施方案, 来自加入 $1 \mu\text{g/ml}$ HCV-c100p 抗体的 2% 人类血清样品的抗体信号。使用 AF-568 标记的抗人类山羊抗体进行荧光检测。

[0021] 图 4 示出根据本公开的实施方案的电泳条码图案化工艺的特征和优化。图 4(A) 示出用于生物素化 c100p 抗原 (AF-488 标记) 的图案化工艺的慢速拍摄荧光显微照片 ($10\text{s}/\text{帧}$)。区域 (i) 先前用生物素阻断 (间隔区)。区域 (ii) 为用生物素化 c100p 图案化的区域。在 $t = 140\text{s}$ 时, 去除电场并且开始孵育。在反极性电泳洗涤后, 区域 ii 已经用 c100p 图案化并且区域 iii 中的开放抗生蛋白链菌素 -PA 凝胶位点可用于后续用生物素间隔区或生物素化抗原图案化。图 4(B) 示出如通过轴向荧光强度的突破等温线所观察到的图案化过程的曲线图 (生物素化 c100p, AF-488 标记); 从 $t = 0$ 时起采用 5s 增量的前 11 个曲线。图 4(C) 示出荧光显微照片, 所述照片示出在各种 Da 数值下的抗原固定。移动边界的荧光强度曲线和一阶导数示出在图 4(C) 中的荧光显微照片下方。图 4(D) 示出在各种 Da 数值下用于图案化的移动边界的宽度 (4σ) 的曲线图。

[0022] 图 5 示出移动边界的速度的曲线图, 其随电场呈线性增加 ($v_i = \mu_i E/n$), 其中斜率 $2.2 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ 是迁移率 (μ_i) 与增强因子 (n) 的比率。在 $30\text{V}/\text{cm}$ 下, $800 \mu\text{m}$ 长的区域的图案化耗时 160 秒, 而在 $1180\text{V}/\text{cm}$ 下, 图案化耗时约 3 秒。

[0023] 图 6 示出根据本公开的实施方案, 交叉反应性和固定抗原的纯度。图 6(a) 示出的图像展示 HCV c100p 固定于 3 个不同通道中并且注射 HCV NS3、c100p 和 Core 人类抗体 (AF568 标记) (6.65nM , $1\mu\text{g/ml}$)。仅捕捉到 c100p 抗体并且其产生信号。图 6(b) 示出三种 HCV 抗体抗原对的交叉反应性基质。Core 抗原展示所预期的一些非特异性捕捉, 而 NS3 和 c100p 对未展现任何交叉反应性。图 6(c) 示出的图像和曲线图展示, NS3 和 c100p 抗原分别固定于同一通道中。注射至所述通道中的 NS3 抗体通过 c100p 抗原区而未被捕捉并且仅在 NS3 区中被捕捉。注射至同一通道中的 c100p 抗体在 c100p 区中被捕捉。图 6(d) 示出的图像和曲线图类似于图 6(c), 其中固定抗原的顺序和抗体注射顺序颠倒, 其中在 NS3 抗原区中未观察到 c100p 抗体捕捉。各抗体均在其对应抗原区中被捕捉, 而与固定顺序无关。

[0024] 图 7 示出根据本公开的实施方案, 条码测定抗体检测条件的优化。图 7(A) 示出

引入 12 种不同的条码测定（在一系列 Da 数值下操作）中的抗体的荧光显微照片，其展示检测依赖于 Da 数值。将 AF-568 标记的 c100p 抗体的溶液（13.5nM）使用一个范围的电压（10-450V, 10min）电泳至容纳固定的生物素化 c100p 抗原的通道中。图 7(B) 示出来自用于图 7(A) 中的测定的标记的抗体的终点荧光读数的曲线图。图 7(C) 示出加入 2% 人类血清中的未标记的 HCV-c100p 人类抗体的剂量反应曲线。使用 AF-568 标记的山羊抗人类抗体进行夹心检测。检测的下限是 25ng/ml 或 165pM，其中 SNR = 10。

[0025] 图 8 示出根据本公开的实施方案，固定条件对抗体捕捉的作用。其中抗原在不同电场（17V/cm 和 1180V/cm）下固定的通道用来自正确方向的 c100p (AF-568) 抗体负载进行测试。图 8(底部) 示出在两种指定的负载条件下固定的两个不同通道的抗体捕捉轮廓。在两个通道中，抗体负载参数相同（25V）并且捕捉仅发生在抗原固定区 (ii) 中，证实区域 (iii) 在所有情况下均保持抗原游离。类似于固定抗原分布，在其中在 1180V/cm 下进行抗原固定的通道中观察到抗体信号的较平滑边界，其中在边界处的横向信号变化增加。

[0026] 图 9 示出在高电场下凝胶变形的图像。在 450V (1800V/cm) 下针对 c100p 抗原条带负载 AF-568 标记的 c100p 抗体。在所述负载的最初几分钟内，变形是沿负载方向（凸起至左侧）。随着左侧孔中缓冲液的损失，变形朝向右侧改变方向。在左侧孔中缓冲液的损失可归因于在施加高电压后流体从左侧孔通过凝胶基质或凝胶-玻璃壁界面内的变形电渗泵送至右侧孔中。当关闭所施加的电压时，凝胶轮廓恢复其最初形式。

[0027] 图 10 示出根据本公开的实施方案，用于对血清抗体检测 HIV 和 HCV 的多重微流体条码测定。图 10(顶部) 示出通道 1 中的蛋白 L、HCV-c100p 和 HIV-p24 抗原分布。通道 1 针对加入 2 μ g/ml (13.5nM) HCV-c100p 人类和 HVI-24p 小鼠抗体的 2% 血清样品进行测定。类似图案化的通道 2 针对作为对照的非免疫 2% 血清进行测定。使用 AF-568 标记的抗人类抗小鼠抗体的混合物进行检测。蛋白 L 区在两个通道中展示饱和信号，其证实血清中捕捉高度可用的 IgG，从而验证测定成功。HCV-c100p 和 HIV-24 抗体在通道 1 中产生高信号，如荧光强度轮廓所示。抗体显微照片的曝光时间为 100ms。

具体实施方式

[0028] 提供一种用于确定分析物是否存在于样品中的微流体装置。所述微流体装置包括具有聚合物介质的狭长流动通道，其中所述聚合物介质包括具有特异性结合第一分析物的第一固定捕捉成员的第一分析物检测域和具有特异性结合第二分析物的第二固定捕捉成员的第二分析物检测域。还提供其中可使用本发明微流体装置的方法、系统和试剂盒，以及其制造方法。

[0029] 在下文中，首先更详细地描述本发明微流体装置。还公开了检测流体样品中的分析物的方法，其中可使用本发明微流体装置。另外，还描述了包括本发明微流体装置的系统 and 试剂盒。

[0030] 微流体装置

[0031] 本公开的实施方案包括微流体装置。在某些实施方案中，所述微流体装置被配置用于确定分析物是否存在于样品中。“微流体装置”是配置为控制并操纵流体在几何学上限定于小标度（例如，亚毫米）的装置。微流体装置的实施方案包括狭长流动通道和在所述狭长流动通道中的聚合物介质。所述聚合物介质包括具有特异性结合第一分析物的第一固

定捕捉成员的第一分析物检测域和具有特异性结合第二分析物的第二固定捕捉成员的第二分析物检测域。随后可检测到一种或多种特异性结合的分析物。下文讨论了关于聚合物介质的其它细节。

[0032] 聚合物介质

[0033] 在某些实施方案中,所述微流体装置包括聚合物介质。所述聚合物介质可包括一个或多个分析物检测域,各检测域具有特异性结合样品中感兴趣的分析物的对应固定分析物捕捉成员。例如,所述聚合物介质可包括具有特异性结合第一分析物的第一固定分析物捕捉成员的第一分析物检测域和具有特异性结合第二分析物的第二固定分析物捕捉成员的第二分析物检测域。必要时可包括额外分析物检测域和捕捉成员。

[0034] 所述聚合物介质可配置为具有针对各分析物捕捉成员的独立区域或条带。“条带”意指独特的可检测区域,其中成分的浓度显著高于周围的区域。分析物捕捉成员的各条带可包括单一类型的分析物捕捉成员。

[0035] 在某些实施方案中,所述聚合物介质被配置为当样品穿过所述聚合物介质时,结合所述样品中的一种或多种成分。在一些情况下,聚合物介质的分析物捕捉成员被配置为当样品流动通过如上文所述的聚合物介质时,特异性结合所述样品中的成分。聚合物介质的多个方面包括,所述聚合物介质具有定向轴。在一些情况下,所述定向轴在当样品穿过所述聚合物介质时所述样品行进的方向中定向。在一些实施方案中,聚合物介质的定向轴与聚合物介质的长度对准。在这些实施方案中,样品沿聚合物介质的长度穿过聚合物介质。在一些情况下,聚合物介质的长度大于聚合物介质的宽度,如为聚合物介质的宽度的 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、25 倍、50 倍、75 倍、100 倍、125 倍、150 倍、175 倍或 200 倍或更多倍。

[0036] 在一些情况下,聚合物介质由微流体装置中包括所述聚合物介质的区域界定。举例来说,微流体装置可包括如上文所述的狭长流动通道。所述狭长流动通道可包括聚合物介质。例如,微流体装置可包括通道(例如,微流体通道或毛细管通道)。所述通道可包括聚合物介质。聚合物介质可包括于通道中,以使得当样品流动通过所述通道时,样品穿过所述聚合物介质。在一些情况下,狭长流动通道的长度大于狭长流动通道的宽度,如为狭长流动通道的宽度的 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、25 倍、50 倍、75 倍、100 倍、125 倍、150 倍、175 倍或 200 倍或更多倍。

[0037] 在某些实施方案中,所述聚合物介质包括聚合物,如聚合物凝胶。所述聚合物凝胶可为适用于凝胶电泳的凝胶。所述聚合物凝胶可包括但不限于聚丙烯酰胺凝胶(例如甲基丙烯酰胺凝胶)、琼脂糖凝胶等。所述聚合物介质可基于多种因素进行表征,例如但不限于孔径、总聚合物含量(例如,总丙烯酰胺含量)、交联剂浓度等。例如,聚合物介质的孔径可取决于聚合物介质的总聚合物含量和/或聚合物介质中的交联剂浓度。在一些情况下,聚合物介质可包括聚丙烯酰胺凝胶,其具有范围为 1% 至 20%、如 1% 至 15%、包括 1% 至 10% 或 1% 至 5% 的总丙烯酰胺含量 T(T = 丙烯酰胺和双丙烯酰胺单体的总浓度)。在一些情况下,聚合物介质具有 3% 的总丙烯酰胺含量。

[0038] 在某些实施方案中,聚合物介质被配置为由前体部分形成。例如,聚合物介质可为由凝胶前体(例如聚丙烯酰胺凝胶前体,如聚丙烯酰胺凝胶单体)形成的凝胶(例如聚丙烯酰胺凝胶)。所述前体部分可被配置为反应形成所述聚合物介质。例如,凝胶前体可被配置为彼此反应形成聚丙烯酰胺凝胶聚合物介质。凝胶前体之间的反应可通过任何合适的

方案进行活化,例如但不限于化学活化、光活化等。在一些实施方案中,凝胶前体被配置为例如通过使凝胶前体与活化剂(如但不限于过氧化物)接触而以化学方式活化。在一些实施方案中,凝胶前体被配置为例如通过使凝胶前体与光接触来通过光活化(即,光活化)。光可具有适于活化聚合物介质的形成的任何波长,并且在一些情况下可具有与可见光谱中的蓝光有关的波长。例如,用于活化聚合物介质的形成的光可具有范围为400nm至500nm、如410nm至490nm、包括420nm至480nm、或430nm至480nm、或440nm至480nm、或450nm至480nm、或460nm至480nm、或465nm至475nm的波长。在某些情况下,用于活化聚合物介质的形成的光具有范围为465nm至475nm的波长。在一些情况下,用于活化聚合物介质的形成的光具有470nm波长。

[0039] 在某些实施方案中,所述聚合物介质包括缓冲液。所述缓冲液可为用于凝胶电泳的任何常规缓冲液。在某些实施方案中,所述缓冲液为Tris缓冲液。在某些实施方案中,所述聚合物介质包括缓冲液,如Tris-甘氨酸缓冲液(TG缓冲液)。例如,所述缓冲液可包括Tris和甘氨酸的混合物。

[0040] 聚合物介质的至少一部分(例如,分析物检测域)可包括稳定地与其缔合的捕捉成员。“稳定地缔合”意指一个部分在标准条件下非共价结合另一部分或结构或以其它方式与另一部分或结构缔合。在某些情况下,支撑物是如上文所述的聚合物介质(例如,聚合物凝胶)。在某些实施方案中,捕捉成员非共价结合聚合物介质。非共价相互作用可包括但不限于离子键、疏水性相互作用、氢键、范德华力(例如,伦敦分散力)、偶极-偶极相互作用等。在某些实施方案中,捕捉成员经由特异性结合成员对非共价结合支撑物(例如,聚合物介质)。合适的特异性结合对包括但不限于:受体/配体对的成员;受体的配体结合部分;抗体/抗原对的成员;抗体的抗原结合片段;半抗原;凝集素/碳水化合物对的成员;酶/底物对的成员;生物素/抗生物素蛋白;生物素/抗生物素蛋白链菌素;地高辛/抗地高辛;DNA或RNA适体结合对的成员;肽适体结合对的成员;等。

[0041] 在某些实施方案中,捕捉成员可通过特异性结合成员对非共价结合聚合物介质,其中聚合物介质包括所述特异性结合成员对的一个成员并且捕捉成员包括所述特异性结合成员对的互补成员。例如,聚合物介质可包括抗生物素蛋白链菌素。在一些情况下,抗生物素蛋白链菌素可与聚合物介质的聚合物凝胶共聚合。另外,捕捉成员可包括特异性结合成员对的互补成员,如生物素。在这些实施方案中,使生物素化捕捉成员与抗生物素蛋白链菌素-聚合物介质接触可通过所述捕捉成员的生物素与所述聚合物介质的抗生物素蛋白链菌素之间的特异性结合相互作用来使所述捕捉成员非共价结合所述聚合物介质。捕捉成员与聚合物介质的非共价结合也可经由捕捉成员或特异性结合对的光活化(如光活化的抗生物素蛋白链菌素或光活化的生物素)来开始。其它互补结合成员对可如上文所述地用于使捕捉成员非共价结合聚合物介质。

[0042] 在某些实施方案中,第一捕捉成员可在第一分析物检测域中通过特异性结合成员对非共价结合聚合物介质。聚合物介质可包括特异性结合成员对的一个成员并且第一捕捉成员可包括特异性结合成员对的互补成员。例如,聚合物介质可包括抗生物素蛋白链菌素,其可与如上文所述的聚合物介质的聚合物凝胶共聚合。另外,第一捕捉成员可包括特异性结合成员对的互补成员,如生物素。在这些实施方案中,使生物素化第一捕捉成员与抗生物素蛋白链菌素-聚合物介质接触可通过所述第一捕捉成员的生物素与所述聚合物介质的抗生物素蛋白

链菌素之间的特异性结合相互作用来使所述第一捕捉成员非共价结合所述聚合物介质。在一些情况下,聚合物介质被配置为使得第一捕捉成员仅与在第一分析物检测域中的聚合物介质缔合并且基本上不与第一分析物检测域外部的聚合物介质缔合。其它互补结合成员对可如上文所述地用于使第一捕捉成员非共价结合聚合物介质。

[0043] 在某些实施方案中,第二捕捉成员可通过特异性结合成员对非共价结合在第二分析物检测域中的聚合物介质。所述聚合物介质可包括特异性结合成员对的一个成员并且第二捕捉成员可包括特异性结合成员对的互补成员。例如,聚合物介质可包括抗生蛋白链菌素,其可与如上文所述的聚合物介质的聚合物凝胶共聚合。另外,第二捕捉成员可包括特异性结合成员对的互补成员,如生物素。在这些实施方案中,使生物素化第二捕捉成员与抗生蛋白链菌素-聚合物介质接触可通过所述第二捕捉成员的生物素与所述聚合物介质的抗生蛋白链菌素之间的特异性结合相互作用来使所述第二捕捉成员非共价结合所述聚合物介质。在一些情况下,聚合物介质被配置为使得第二捕捉成员仅与在第二分析物检测域中的聚合物介质缔合并且基本上不与第二分析物检测域外部的聚合物介质缔合。其它互补结合成员对可如上文所述地用于使第二捕捉成员非共价结合聚合物介质。必要时可如上文所述地提供额外分析物检测域。例如,聚合物介质可包括一个或多个分析物检测域,如 2 个或更多个、3 个或更多个、4 个或更多个、5 个或更多个、6 个或更多个、7 个或更多个、8 个或更多个、9 个或更多个或者 10 个或更多个分析物检测域。

[0044] 捕捉成员可为特异性结合感兴趣的另一个结合成员的任何分子,例如所靶向的蛋白质或核酸序列或生物大分子(例如,感兴趣的分析物)。在一些实施方案中,当捕捉成员与其特异性结合的其靶标分析物在结合复合物中彼此特异性结合时它们之间的亲和力由 K_d (解离常数)表征,所述 K_d 为 10^{-5}M 或更低、 10^{-6}M 或更低,如 10^{-7}M 或更低,包括 10^{-8}M 或更低,例如 10^{-9}M 或更低、 10^{-10}M 或更低、 10^{-11}M 或更低、 10^{-12}M 或更低、 10^{-13}M 或更低、 10^{-14}M 或更低、 10^{-15}M 或更低,包括 10^{-16}M 或更低。“亲和力”是指结合强度,增加的结合亲和力与较低 K_d 相关。

[0045] 根据感兴趣的分析物的性质,捕捉成员可为但不限于(a)用于检测特异性抗抗原抗体的抗原;(b)用于检测蛋白质和肽的针对肽分析物的表位的抗体;(c)任何识别分子,如特异性结合对的成员。例如,合适的特异性结合对包括但不限于:受体/配体对的成员;受体的配体结合部分;抗体/抗原对的成员;抗体的抗原结合片段;半抗原;凝集素/碳水化合物对的成员;酶/底物对的成员;生物素/抗生物素蛋白;生物素/抗生蛋白链菌素;地高辛/抗地高辛;DNA 或 RNA 适体结合对的成员;肽适体结合对的成员;等。

[0046] 在某些实施方案中,捕捉成员包括分析物的配体,如抗原。捕捉成员抗原可由测定样品中感兴趣的抗体特异性结合。在一些情况下,捕捉成员与如上文所述的支撑物(例如聚合物介质)稳定地缔合(例如非共价结合)。支撑物结合的捕捉成员可配置为与感兴趣的分析物具有特异性结合相互作用。因而,感兴趣的分析物与支撑物结合的捕捉成员的特异性结合可间接地使感兴趣的分析物结合支撑物。感兴趣的分析物与支撑物的结合可使所述分析物与所述支撑物稳定地缔合并且因此有助于检测感兴趣的分析物。

[0047] 在某些实施方案中,两个或更多个不同捕捉成员与聚合物介质稳定地缔合以提供包括所述捕捉成员的独特检测区。在某些情况下,所述独特检测区包括相同捕捉成员。在其它实施方案中,所述独特检测区包括不同捕捉成员。所述两个或更多个不同捕捉成员可

特异性结合相同或不同分析物。在一些情况下,所述两个或更多个不同捕捉成员可特异性结合不同分析物。举例来说,所述两个或更多个捕捉成员可包括特异性结合样品中的不同抗体的不同抗原。在其它情况下,所述两个或更多个不同捕捉成员可特异性结合相同分析物。例如,所述两个或更多个不同捕捉成员可用于检测抗体对不同抗原的交叉反应性。

[0048] 在一些实施方案中,微流体装置在相邻分析物检测域(例如,第一和第二分析物检测域)之间包括间隔域。在一些情况下,间隔域被配置为提供分析物检测域之间的区域,以使得一个分析物检测域可与相邻分析物检测域充分地区隔开。例如,间隔域可包括聚合物介质的区域,所述区域基本上不包括捕捉成员。例如,间隔域可基本上不含捕捉成员。在某些情况下,聚合物介质可如上文所述地包括特异性结合成员对的一个成员,如抗生蛋白链菌素。在一些情况下,所述特异性结合成员对的所述成员与其互补结合成员缔合,其中所述互补结合成员不与捕捉成员缔合。在这些情况下,与聚合物介质缔合的特异性结合成员对的成员可阻止与捕捉成员所缔合的互补成员对缔合。

[0049] 在某些实施方案中,微流体装置包括交替的分析物检测域和间隔域。例如,如上文所述的,微流体装置可包括由间隔域分隔开的第一分析物检测域和第二分析物检测域。必要时微流体装置中可包括额外分析物检测域和/或间隔域。因而,微流体装置可包括散布于如上文所述的间隔域之间的分析物检测域。包括交替的分析物检测域和间隔域的微流体装置的实施方案在一些情况下可称为“条码”测定装置或具有“条码”图案的测定装置。“条码”意指如上文所述的图案,其中可产生可检测信号的分析物检测域散布于间隔域之间,所述间隔域不包括捕捉部分并且因此不产生可检测信号。

[0050] 在某些实施方案中,微流体装置被配置为引导样品通过聚合物介质。在一些情况下,微流体装置被配置为使样品经受流场。“流场”意指一个区域,其中各部分在基本上相同的方向上穿过所述区域。举例来说,流场可包括其中可移动部分在基本上相同的方向上移动通过介质的区域。流场可包括如上文所述的介质,如聚合物介质,其中诸如缓冲液、分析物、试剂等部分在基本上相同的方向上穿过所述介质。流场可通过施加电场、压差、热梯度、电渗等诱导。在一些实施方案中,流场可与聚合物介质的流动通道的定向轴对准。流场可配置为沿着聚合物介质的流动通道(例如,沿着微流体装置的狭长流动通道的流动通道)引导样品和/或分析物通过聚合物介质。

[0051] 电场可有助于样品移动通过微流体装置(例如,样品从微流体装置的一个区域电动转移至微流体装置的另一区域)。举例来说,电场可配置为引导样品中的分析物通过微流体装置的聚合物介质。电场可配置为基于分析物的物理特性促进样品中的分析物移动。例如,电场可配置为基于分析物的电荷(例如,电荷质量比或迁移率)、等电点等促进样品中的分析物移动。在某些情况下,电场被配置为基于分析物的电荷促进样品中的分析物移动。在一些情况下,电场被配置为基于分析物的等电点促进样品中的分析物移动。

[0052] 在一些实施方案中,电场可为定向的。例如,电场可与聚合物介质的流动通道的定向轴对准。电场可配置为沿着聚合物介质的流动通道引导样品和/或分析物通过聚合物介质。

[0053] 在某些实施方案中,微流体装置包括配置为产生电场的个或多个电场发生器。电场发生器可配置为向微流体装置的各个区域(如聚合物介质)施加电场。电场发生器可配置为将样品中的分析物和部分以电动方式输送通过微流体装置中的聚合物介质。在某些

情况下,电场发生器可在微流体装置近端,如配置在微流体装置上。在一些情况下,电场发生器被定位于距微流体装置一定距离处。例如,电场发生器可并入如下文更详细描述的系统。

[0054] 微流体装置可包括一个或多个通道。微流体通道的实施方案可由可与微流体装置相容并且可与用于微流体装置中的样品、缓冲液、试剂等相容的任何合适材料制成。在一些情况下,微流体通道由相对于用于本发明微流体装置和方法中的样品、缓冲液、试剂等呈惰性(例如,不降解或反应)的衬底材料制成。例如,衬底可包括例如但不限于玻璃(钠钙玻璃、石英玻璃等)、石英、硅、聚合物、弹性体、纸、其组合等材料。其它衬底材料是有可能的,例如但不限于聚苯乙烯、聚碳酸酯、PDMS、固化光致抗蚀剂(如SU8)和其它透明塑料或可模制/可固化聚合物、热塑料(如Cyclo Olefin Polymer(COP、Zeonor、Zeonex等))等。

[0055] 在某些实施方案中,微流体通道的宽度范围为 $1\mu\text{m}$ 至 $500\mu\text{m}$,如 $5\mu\text{m}$ 至 $300\mu\text{m}$,包括 $10\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$,例如 $50\mu\text{m}$ 至 $150\mu\text{m}$ 。在一些情况下,微流体通道的宽度为 $120\mu\text{m}$ 。在某些实施方案中,微流体通道的深度范围为 $1\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$,如 $5\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$,包括 $10\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$ 。在一些情况下,微流体通道的深度为 $35\mu\text{m}$ 。在某些实施方案中,微流体通道的长度范围为 $10\mu\text{m}$ 至 5mm ,如 $50\mu\text{m}$ 至 4mm ,包括 $100\mu\text{m}$ 至 3mm ,例如 $500\mu\text{m}$ 至 3mm 或 1mm 至 3mm 。在一些情况下,微流体通道的长度为 2.5mm 。

[0056] 在一些情况下,微流体装置包括一个或多个样品输入口。所述样品输入口可配置为允许将样品引入微流体装置中。样品输入口可与聚合物介质呈流体连通。在一些情况下,样品输入口是与聚合物介质的上游端呈流体连通。样品输入口还可包括配置为防止流体离开样品输入口的结构。例如,样品输入口可包括帽、阀、密封件等,其可例如穿孔或开口以允许将样品引入微流体装置中,并且随后再密封或封闭以实质上防止流体(包括样品和/或缓冲液)离开样品输入口。

[0057] 在某些实施方案中,微流体装置可包括彼此呈流体连通的两个或更多个流体通道。所述流体通道可与本文所述的狭长流动通道呈流体连通。在一些情况下,所述流体通道被配置用于在装置上(例如,在生物芯片上)进行各种样品制备步骤。换言之,在一些情况下,微流体装置可包括连接两个或更多个样品输入口(例如负载孔)与如本文所述的狭长流动通道的较复杂几何结构。

[0058] 在某些实施方案中,聚合物凝胶的宽度范围为 $1\mu\text{m}$ 至 $500\mu\text{m}$,如 $5\mu\text{m}$ 至 $300\mu\text{m}$,包括 $10\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$,例如 $50\mu\text{m}$ 至 $150\mu\text{m}$ 。在一些情况下,聚合物凝胶的宽度为 $120\mu\text{m}$ 。在一些情况下,聚合物凝胶的长度范围为 $10\mu\text{m}$ 至 5mm ,如 $50\mu\text{m}$ 至 4mm ,包括 $100\mu\text{m}$ 至 3mm ,例如 $500\mu\text{m}$ 至 3mm 或者 1mm 至 3mm 。在某些情况下,聚合物凝胶的长度为 2.5mm 。在某些实施方案中,聚合物凝胶的深度范围为 $1\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$,如 $5\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$,包括 $10\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$ 。在一些情况下,聚合物凝胶的深度为 $35\mu\text{m}$ 。

[0059] 在某些实施方案中,聚合物凝胶的分析物检测域的长度范围为 $10\mu\text{m}$ 至 $1000\mu\text{m}$,如 $25\mu\text{m}$ 至 $900\mu\text{m}$,包括 $50\mu\text{m}$ 至 $800\mu\text{m}$,或 $100\mu\text{m}$ 至 $700\mu\text{m}$,或 $200\mu\text{m}$ 至 $600\mu\text{m}$,或 $300\mu\text{m}$ 至 $600\mu\text{m}$,或 $400\mu\text{m}$ 至 $600\mu\text{m}$ 。在一些情况下,聚合物凝胶的分析物检测域的长度为 $500\mu\text{m}$ 。在一些情况下,聚合物凝胶的间隔域的长度范围为 $10\mu\text{m}$ 至 $500\mu\text{m}$,如 $50\mu\text{m}$ 至 $250\mu\text{m}$,包括 $100\mu\text{m}$ 至 $250\mu\text{m}$ 。在某些实施方案中,聚合物凝胶的间隔域的长度为 $200\mu\text{m}$ 。

[0060] 在某些实施方案中,微流体装置的宽度范围为 10cm 至 1mm ,如 5cm 至 5mm ,包括 1cm

至 5mm。在一些情况下,微流体装置的长度范围为 100cm 至 1mm,如 50cm 至 1mm,包括 10cm 至 5mm 或者 1cm 至 5mm。在某些方面,微流体装置的面积为 1000cm^2 或更低,如 100cm^2 或更低,包括 50cm^2 或更低,例如 10cm^2 或更低,或 5cm^2 或更低,或 3cm^2 或更低,或 1cm^2 或更低,或 0.5cm^2 或更低,或 0.25cm^2 或更低,或 0.1cm^2 或更低。

[0061] 在某些实施方案中,微流体装置基本上为透明的。“透明”意指一种物质允许可见光穿过所述物质。在一些实施方案中,透明微流体装置有助于检测与结合介质结合的分析物,例如包括可检测标记(如荧光标记)的分析物。在一些情况下,微流体装置基本上为不透明的。“不透明”意指一种物质不允许可见光穿过所述物质。在某些情况下,不透明微流体装置可有助于分析对光敏感的分析物,如在光存在下反应或降解的分析物。

[0062] 在一些方面,聚合物介质被设置于如上文所述的狭长流动通道中。在这些实施方案中,微流体装置包括通道,如微流体通道。所述通道可包括如上文所述的聚合物介质。在某些实施方案中,狭长流动通道包括由所述狭长流动通道的各侧面界定的内部空间。例如,所述狭长流动通道可为通道(例如,微流体通道),其可界定所述通道的内部空间。在某些情况下,聚合物介质被设置于狭长流动通道的内部空间中。例如,聚合物介质可实质上设置于狭长流动通道的功能区的整个内部空间中。狭长流动通道的功能区为用于测定并检测样品成分的区域并且可能不包括狭长流动通道的其它区域,例如狭长流动通道中用于样品负载、缓冲液储槽、微流体流体导管等的区域不是狭长流动通道的“功能区”的一部分。如上文所述的,聚合物介质可实质上设置于狭长流动通道的功能区的整个内部空间中,以使得聚合物介质基本上填充狭长流动通道的内部空间的宽度。在这些实施方案中,聚合物介质实质上填充狭长流动通道的内部空间,以使得内部空间中并无不包括聚合物介质的大空隙。例如,在这些实施方案中,聚合物介质不是狭长流动通道的内表面上的涂层,而是聚合物介质基本上填充狭长流动通道的内部空间。基本上占据狭长流动通道的整个空间的聚合物介质可针对如上文所述的聚合物介质上的捕捉成员的固定提供增加的表面积。

[0063] 方法

[0064] 所述方法的实施方案涉及确定分析物是否存在于样品中。在所述方法的某些实施方案中,可检测样品中的一种或多种分析物。所述方法包括将流体样品引入包括如上文所述的聚合物介质的微流体装置的狭长流动通道中。将流体样品引入微流体装置的狭长流动通道中可包括使样品与聚合物介质接触,或者在包括负载介质的微流体装置的实施方案中,包括使样品与负载介质接触。所述方法还包括移动样品成分通过聚合物介质。在一些情况下,样品成分的移动通过凝胶电泳、等速电泳、等电聚焦、场放大样品堆积、介电泳或类似电动方法等产生。在某些实施方案中,移动样品成分通过聚合物介质包括以足以移动样品组分通过聚合物介质的方式向狭长流动通道(例如,向狭长流动通道中的聚合物介质)施加定向电场。

[0065] 当样品中的成分移动通过聚合物介质时,感兴趣的特定分析物可通过聚合物介质中的捕捉成员特异性结合。例如,如本文所述的,捕捉成员可包括抗原,并且当样品中的成分移动通过聚合物介质时,感兴趣的特异性抗体可结合所述抗原并且变为与聚合物介质固定(例如,稳定地缔合)。

[0066] 在一些情况下,随后可检测固定的分析物。例如,所述方法可包括从分析物检测域(即,聚合物介质中包括捕捉成员的区域)获得信号以确定分析物是否存在于样品中。在

一些情况下,所述方法包括从第一分析物检测域获得信号以确定第一分析物是否存在于样品中。如上文所述,微流体装置可包括一个或多个(如两个或更多个)分析物检测域,并且因而,所述方法还可包括从第二分析物检测域获得信号以确定第二分析物是否存在于样品中。可检测额外分析物,这取决于在微流体装置中所包括的分析物检测域的数目。

[0067] 在某些实施方案中,所述方法包括确定感兴趣的分析物是否存在于样品中,例如确定样品中一种或多种感兴趣的分析物的存在或不存在。在一些情况下,微流体装置被配置为检测样品中一种或多种分析物的存在。在所述方法的某些实施方案中,样品中一种或多种分析物的存在可定性或定量地确定。定性确定包括其中关于样品中分析物的存在向用户提供简单的是/否结果的确定。定量确定包括半定量确定,其中关于样品中分析物的量向用户提供大致标度的结果,例如低、中等、高;以及精密标度结果,其中向用户提供分析物浓度的测量值。

[0068] 在某些实施方案中,所述方法包括检测结合聚合物介质的感兴趣的分析物。感兴趣的分析物与聚合物介质的可检测的结合指示样品中感兴趣的分析物的存在。在一些情况下,感兴趣的分析物包括可检测标记。可检测标记可包括但不限于荧光标记、比色标记、化学发光标记、多色试剂、酶联试剂、抗生物素蛋白-抗生物素蛋白链菌素缔合的检测试剂、放射性标记、金粒子、磁性标记等。在一些情况下,标记共价结合感兴趣的分析物。

[0069] 在某些实施方案中,检测感兴趣的分析物包括使感兴趣的分析物与配置为特异性结合感兴趣的分析物的标记(例如,特异性结合感兴趣的分析物的标记二次抗体)接触。例如,检测感兴趣的分析物可包括使感兴趣的分析物与特异性结合感兴趣的分析物的标记二次抗体接触。标记二次抗体的检测因此指示感兴趣的分析物与分析物检测域中的捕捉成员的结合。在一些情况下,所述方法包括在将样品引入微流体装置之前标记样品。例如,所述方法可包括在将样品引入微流体装置的狭长流动通道之前使所述样品(例如,感兴趣的分析物,或生物样品或流体中的所有成分分析物)与标记接触。在其它实施方案中,所述方法包括在将样品引入微流体装置之后标记样品。例如,所述方法可包括在样品引入微流体装置的狭长流动通道之后将标记引入微流体装置的狭长流动通道中。

[0070] 在某些实施方案中,所述方法包括增强来自标记的感兴趣分析物的可检测信号。例如,增强来自标记的感兴趣分析物的可检测信号可包括使标记的感兴趣分析物与配置为特异性结合标记的感兴趣分析物的二次标记接触。在某些情况下,所述二次标记为标记的二次抗体,其特异性结合标记的感兴趣分析物。因而,增强来自标记的感兴趣分析物的可检测信号可包括使标记的感兴趣分析物与配置为特异性结合标记的感兴趣分析物的标记的二次抗体接触。使用如上文所述的两种或更多种可检测标记可通过改进信噪比而有助于检测感兴趣的分析物。

[0071] 二次标记可为特异性结合所靶向的蛋白质或核酸序列或生物大分子(例如,感兴趣的分析物)的任何分子。根据分析物的性质,标记可为但不限于:针对肽分析物(例如,抗体)的表位的抗体;或任何识别分子,如特异性结合对的成员。例如,合适的特异性结合对包括但不限于:受体/配体对的成员;受体的配体结合部分;抗体/抗原对的成员;抗体的抗原结合片段;半抗原;凝集素/碳水化合物对的成员;酶/底物对的成员;生物素/抗生物素蛋白;生物素/抗生物素蛋白链菌素;地高辛/抗地高辛;DNA或RNA适体结合对的成员;肽适体结合对的成员;等。在某些实施方案中,所述二次标记包括二次抗体。所述二次抗体

可特异性结合感兴趣的分析物。

[0072] 在某些实施方案中,所述二次标记包括可检测标记。可检测标记包括可使用所述方法和系统检测的任何常规标记,并且可包括但不限于荧光标记、比色标记、化学发光标记、多色试剂、酶联试剂、抗生物素蛋白-抗生物素蛋白链菌素缔合的检测试剂、放射性标记、金粒子、磁性标记等。在某些实施方案中,所述二次标记包括与可检测标记缔合的二次抗体。例如,所述二次标记可包括标记的抗体(例如,荧光标记的抗体),其特异性结合于感兴趣的分析物。

[0073] 在一些实施方案中,可鉴定感兴趣的分析物,以使得随后可检测感兴趣的分析物的存在。例如,所述方法可包括评价聚合物介质中两种或更多种分析物的存在。分析物可通过任何本文所述的方法鉴定。例如,可如上文所述地采用包括可检测标记的标记剂,如分析物特异性结合成员。在某些实施方案中,可检测标记为荧光标记。荧光标记为可通过荧光检测器检测的标记部分。例如,荧光标记与感兴趣的分析物的结合可允许通过荧光检测器检测感兴趣的分析物。荧光标记的实例包括但不限于在与试剂接触后发荧光的荧光分子、当由电磁辐射(例如,UV、可见光、x射线等)照射时发荧光的荧光分子等。

[0074] 合适的荧光分子(荧光团)包括但不限于荧光素、荧光素异硫氰酸酯、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、笼化羧基荧光素-丙氨酸-羧酰胺、俄勒冈绿(Oregon Green)488、俄勒冈绿514;荧光黄(Lucifer Yellow)、吖啶橙(acridine Orange)、若丹明、四甲基若丹明、德克萨斯红(Texas Red)、碘化丙啶、JC-1(碘化5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑基-羰花青)、四溴若丹明123、若丹明6G、TMRM(四甲基若丹明甲酯)、TMRE(四甲基若丹明乙酯)、四甲基若沙明(tetramethylrhodamine)、若丹明B和4-二甲基氨基四甲基若沙明、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、黄移绿色荧光蛋白、4-乙酰胺基-4'-异硫氰酸根合芪-2,2'-二磺酸;吖啶和衍生物,如吖啶、吖啶异硫氰酸酯;5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS);4-氨基-N-[3-乙烯基磺酰基]苯基]萘二甲酰亚胺-3,5-二磺酸酯;N-(4-苯胺基-1-萘基)顺丁烯二酰亚胺;邻氨基苯甲酰胺;4,4-二氟-5-(2-噻吩基)-4-硼杂-3a,4a-二氮杂-5-引达省(indacene)-3-丙酸BODIPY;级联蓝(cascade blue);亮黄(Brilliant Yellow);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;焰红染料(cyanosine);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI);5',5"-二溴连苯三酚-酚磺酞(溴连苯三酚红);7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酸根合苯基)-4-甲基香豆素;二亚乙基三胺五乙酸酯;4,4'-二异硫氰酸根合二氢-芪-2-,2'-二磺酸;4,4'-二异硫氰酸根合芪-2,2'-二磺酸;5-(二甲基氨基]萘-1-磺酰氯(DNS,丹黄酰氯);4-二甲基氨基苯基偶氮苯基-4'-异硫氰酸酯(DABITC);曙红和衍生物:曙红、曙红异硫氰酸酯;赤藓红和衍生物:赤藓红B、赤藓红异硫氰酸酯;乙非啶;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、(XRITC);荧光胺;IR144;IR1446;孔雀绿异硫氰酸酯;4-甲基伞形酮邻甲酚酞;硝基酪氨酸;副品红碱;酚红;B-藻红蛋白;邻苯二甲醛;茈和衍生物:茈、茈丁酸酯、琥珀酰亚胺基1-茈;丁酸酯量子点;活性红4(Cibacron™亮红3B-A)若丹明和衍生物:6-羧基-X-若丹明(ROX)、6-羧基若丹明(R6G)、丽丝胺若丹

明 B、磺酰氯若丹明 (Rhod)、若丹明 B、若丹明 123、若丹明 X 异硫氰酸酯、磺基若丹明 B、磺基若丹明 101、磺基若丹明 101 的磺酰氯衍生物 (德克萨斯红);N,N,N',N'-四甲基-6-羧基若丹明 (TAMRA);四甲基若丹明;四甲基若丹明异硫氰酸酯 (TRITC);核黄素;5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸 (EDANS)、4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯甲酸 (DABCYL)、玫红酸;CAL Fluor Orange 560;铽螯合衍生物;Cy 3;Cy 5;Cy 5.5;Cy 7;IRD 700;IRD 800;拉荷亚蓝 (La Jolla Blue);酞菁;和萘酞菁;香豆素和相关染料;氧杂蒽染料,如对甲氨基酚、试卤灵 (resorufin)、白麦恩 (bimane)、吡啶、异吲哚、丹酰染料;氨基邻苯二甲酰肼,如鲁米诺和异鲁米诺衍生物、氨基邻苯二甲酰亚胺、氨基萘二甲酰亚胺;氨基苯并呋喃;氨基喹啉;二氰基氢醌;荧光铈和铽配合物;其组合等。合适的荧光蛋白和发色蛋白包括但不限于绿色荧光蛋白 (GFP),包括但不限于源于维多利亚多管水母 (*Aequoria victoria*) 的 GFP 或其衍生物 (例如“人源化”衍生物),如增强型 GFP;来自如海肾 (*Renilla reniformis*)、海肾 (*Renilla mulleri*) 或海笔 (*Ptilosarcus guernei*) 的另一物种的 GFP;“人源化”重组 GFP (hrGFP);来自珊瑚虫物种的多种荧光蛋白和有色蛋白中的任一种;其组合;等。

[0075] 在某些实施方案中,所述方法包括将流体样品引入微流体装置中。将流体样品引入微流体装置中可包括引导样品通过聚合物介质。在一些情况下,样品的移动通过凝胶电泳产生,以使得样品穿过如上文所述的聚合物介质。所述样品可包括独特的可检测分析物,其中各分析物结合聚合物介质中的不同捕捉成员。

[0076] 在某些实施方案中,所述方法包括评价聚合物介质中感兴趣的一种或多种分析物 (例如,两种或更多种感兴趣的分析物) 的存在。例如,在一些情况下,所述方法包括检测结合聚合物介质的分析物。感兴趣的分析物与聚合物介质中的捕捉成员的可检测的结合指示样品中感兴趣的一种或多种分析物的存在。穿过聚合物介质并且不结合聚合物介质中的捕捉成员的不感兴趣部分可洗去或转移至第二分析装置,例如但不限于 UV 光谱仪和 IR 光谱仪、质谱仪、HPLC、亲和力测定装置等。

[0077] 在一些实施方案中,所述方法包括单重分析样品中的分析物。“单重分析”意指分析样品以检测样品中一种分析物的存在。例如,样品可包括感兴趣的分析物与不感兴趣的其它分子实体的混合物。在一些情况下,所述方法包括单重分析样品以确定样品混合物中感兴趣的分析物的存在。

[0078] 某些实施方案包括多重分析样品中的两种或更多种分析物。“多重分析”意指确定两种或更多种独特分析物的存在,其中所述两种或更多种分析物彼此不同。例如,不同分析物可由聚合物介质的不同分析物检测域中的不同捕捉成员特异性结合。在一些情况下,分析物的数目大于 2 种,如 4 种或更多种、6 种或更多种、8 种或更多种等,直至 20 种或更多种,例如 50 种或更多种,包括 100 种或更多种独特分析物。在某些实施方案中,所述方法包括多重分析 2 种至 100 种独特分析物,如 4 至 50 种独特分析物,包括 4 至 20 种独特分析物。

[0079] 在某些实施方案中,多重分析还包括使用两种或更多种不同的可检测标记。所述两种或更多种不同的可检测标记可特异性结合相同或不同分析物。在一些情况下,所述两种或更多种不同的可检测标记可特异性结合相同分析物。例如,所述两种或更多种不同的可检测标记可包括对相同分析物上的不同表位具有特异性的不同二次抗体。使用对相同分析物具有特异性的两种或更多种可检测标记可通过改进信噪比而有助于检测所述分析物。在其它情况下,所述两种或更多种不同的可检测标记可特异性结合不同分析物。例如,所述

两种或更多种可检测标记可包括对不同分析物上的表位具有特异性的不同二次抗体。使用各自对不同分析物各具有特异性的两种或更多种可检测标记可有助于在单一测定中检测样品中的两种或更多种相应分析物。

[0080] 在某些实施方案中,所述方法包括由从本公开的条码测定装置检测的信号确定样品中一种或多种分析物的存在。如上文所述,“条码”测定装置为本公开的微流体装置,其包括散布于间隔域之间的分析物检测域(其中可产生可检测信号),所述间隔域不包括捕捉部分并且因此不产生可检测信号。所述方法可包括基于由检测器从条码测定装置的单一分析物检测域或从条码测定装置的两个或更多个分析物检测域检测的信号确定一种或多种分析物的存在。

[0081] 例如,所述方法可包括从单一分析物检测域获得信号以及基于来自所述单一分析物检测域的信号确定分析物的存在。一旦确定分析物存在或不存在,所述方法可包括在不同的分析物检测域处确定另一分析物的存在。在这些实施方案中,所述方法可用于通过依次分析来自条码测定装置中的一系列分析物检测域的信号来依次确定分析物的存在。

[0082] 在其它实施方案中,所述方法可包括基本上同时确定一种或多种分析物的存在。例如,所述方法可包括基本上同时由检测器从多个分析物检测域检测的信号确定各分析物检测域中分析物的存在。在一些情况下,测定装置的条码图案有助于同时从多个分析物检测域获得信号的方法。例如,相邻分析物检测域之间的间隔域可有助于区分来自第一分析物检测域的信号与来自相邻分析物检测域的信号。因而,所述方法可包括以与条码测定装置中的其它分析物检测域的最小信号干扰从分析物检测域获得信号。

[0083] 在某些实施方案中,所述方法为自动化方法。因而,所述方法可包括在将样品引入微流体装置中之后最小的用户与微流体装置和系统的相互作用。例如,引导样品通过聚合物介质的步骤可通过微流体装置和系统进行,以使得用户无需手动进行这一步骤。在一些情况下,所述自动化方法可有助于减少总测定时间。例如,所述方法的实施方案可在 120min 或更短,或 90min 或更短,或 60min 或更短,如 45min 或更短或 30min 或更短,如 20min 或更短,包括 15min 或更短或 10min 或更短或者 5min 或更短内进行。

[0084] 可用本发明方法测定的样品可包括简单样品和复合样品。简单样品为包含感兴趣的分析物的样品,并且可或不包括不感兴趣的一种或多种分子实体,其中这些不感兴趣的分子实体的数目可较低,例如 10 个或更低、5 个或更低等。简单样品可包括已经以某一方式加工过以例如从样品去除潜在干扰性分子实体的初始生物或其它样品。“复合样品”意指可或不具有感兴趣的分析物,但还包括不感兴趣的多种不同蛋白质和其它分子的样品。在一些情况下,在本发明方法中测定的复合样品为包括 10 种或更多,如 20 种或更多,包括 100 种或更多,例如 10^3 种或更多、 10^4 种或更多(如 15,000;20,000 种或 25,000 种或更多)独特(即,不同)分子实体的样品。

[0085] 在某些实施方案中,感兴趣的样品为生物样品,例如但不限于尿液、血液、血清、血浆、唾液、精液、前列腺液、乳头抽吸液、泪液、汗、粪便、颊棉签、脑脊髓液、细胞溶解产物样品、羊水、胃肠液、活检组织(例如,从激光捕捉显微切割(LCM)获得的样品)等。样品可为生物样品,或可使用成功提取 DNA、RNA、蛋白质以及肽的常规方法从源于人类、动物、植物、真菌、酵母、细菌、组织培养物、病毒培养物或其组合的生物样品提取。在某些实施方案中,样品为流体样品,如分析物在流体中的溶液。所述流体可为流体水溶液,例如但不限于水、

缓冲液等。在某些实施方案中,样品为血液或血液制品,例如但不限于血清、血浆等。在某些实施方案中,样品为尿液或唾液。

[0086] 如上文所述的,可在本发明方法中测定的样品可包括一种或多种感兴趣的分析物。可检测分析物的实例包括但不限于具有或不具有修饰的蛋白质和肽,例如抗体、双功能抗体、Fab 片段、DNA 或 RNA 结合蛋白、磷酸化蛋白质(磷酸化蛋白质组学)、肽适体、表位、其组合等。

[0087] 在某些实施方案中,所述方法被配置为检测样品中感兴趣的成分,其中样品尺寸较小。例如,所述方法可配置为检测样品中感兴趣的成分,其中样品尺寸为 1mL 或更小,如 750 μ L 或更小,包括 500 μ L 或更小、或 250 μ L 或更小、或 100 μ L 或更小、或 75 μ L 或更小、或 50 μ L 或更小、或 40 μ L 或更小、或 30 μ L 或更小、或 20 μ L 或更小、或 10 μ L 或更小、或 5 μ L 或更小、或 1 μ L 或更小、或 750nL 或更小、或 500nL 或更小、或 250nL 或更小、或 100nL 或更小、或 75nL 或更小、或 50nL 或更小、或 25nL 或更小、或 10nL 或更小、或 5nL 或更小、或 1nL 或更小。在一些情况下,所述方法被配置为检测样品中感兴趣的成分,其中样品尺寸为 100nL 或更小。

[0088] 在某些实施方案中,所述方法包括在引导样品通过聚合物介质之前浓缩、稀释或缓冲液交换样品。浓缩样品可包括在使样品与聚合物介质接触之前使样品与浓缩介质接触。浓缩介质可包括小孔径聚合物凝胶、膜(例如,尺寸排阻膜)、其组合等。在使样品与聚合物介质接触之前浓缩样品可有助于减少用于测定中的浓缩样品的量,和/或可有助于减少总测定时间。稀释样品可包括在使样品与聚合物介质接触之前使样品与额外缓冲液接触。缓冲液交换样品可包括在使样品与聚合物介质接触之前使样品与缓冲液交换介质接触。缓冲液交换介质可包括与样品缓冲液不同的缓冲液。缓冲液交换介质可包括但不限于分子筛、多孔树脂等。

[0089] 在某些实施方案中,所述方法包括阻断步骤。因而,本公开的方法可包括在检测感兴趣的分析物之前使聚合物介质与阻断试剂接触的步骤,例如在制造聚合物介质的分析物检测域和间隔域期间。在一些情况下,阻断步骤使分析物与聚合物介质的非特异性结合最小化。例如,阻断步骤可包括使间隔域与特异性结合成员对的成员(例如,生物素)接触,所述成员与结合聚合物介质的特异性结合成员对的成员(例如,抗生蛋白链菌素)互补。在这些情况下,特异性结合成员对的成员(例如,生物素)不结合捕捉成员,以使得在间隔域中的聚合物介质不与捕捉成员稳定地缔合。在这些实施方案中,感兴趣的分析物(例如抗体)仅特异性结合聚合物介质中的分析物检测域,其包括感兴趣的分析物所结合的特异性捕捉成员(例如,抗原)。

[0090] 在某些实施方案中,所述方法包括任选的洗涤步骤,其可在所述方法的其它步骤之前、期间和之后的不同时间进行。例如,洗涤步骤可在捕捉成员结合聚合物介质之后、在样品与聚合物介质接触之后、在聚合物介质结合的兴趣的分析物与二次标记接触之后等进行。

[0091] 所述方法的实施方案也可包括释放结合聚合物介质的分析物。所述释放可包括使结合的分析物与释放剂接触。所述释放剂可配置为破坏分析物与聚合物介质之间的结合相互作用。在一些情况下,释放剂为破坏分析物与聚合物介质的捕捉成员之间的结合相互作用的试剂、缓冲液等,这使得捕捉成员释放分析物。在从聚合物介质释放分析物之后,所述

方法可包括从聚合物介质移走分析物。例如,所述方法可包括在聚合物介质的下游引导所释放的分析物以使用二次分析装置进行二次分析,所述二次分析装置例如但不限于 UV 光谱仪和 IR 光谱仪、质谱仪、HPLC、亲和力测定装置、如本文所述的第二微流体装置等。

[0092] 所述方法的实施方案的多个方面还可包括制造微流体测定装置的方法。所述方法可包括在微流体装置的狭长流动通道中制造聚合物介质。在一些实施方案中,所述方法包括在狭长流动通道中制造前体聚合物介质。例如,狭长流动通道可填充有前体部分(例如凝胶前体,如聚丙烯酰胺凝胶前体)。在一些情况下,所述方法包括活化前体部分以形成聚合物介质。例如,活化凝胶前体可包括通过使凝胶前体与活化剂(例如但不限于过氧化物)接触来以化学方式活化凝胶前体。在某些情况下,活化凝胶前体包括通过使凝胶前体与光接触来光活化凝胶前体。如上文所述的,用于活化形成聚合物介质的光可具有在可见光谱内的蓝光波长。例如,用于活化形成聚合物介质的光的波长范围可为 400nm 至 500nm,如 410nm 至 490nm,包括 420nm 至 480nm、或 430nm 至 480nm、或 440nm 至 480nm、或 450nm 至 480nm、或 460nm 至 480nm、或 465nm 至 475nm。在某些情况下,用于活化形成聚合物介质的光的波长范围为 465nm 至 475nm。在一些情况下,用于活化形成聚合物介质的光波长为 470nm。

[0093] 在某些实施方案中,制造微流体测定装置的方法包括在如上文所述的流动通道中制造聚合物介质。聚合物介质可包括特异性结合对的第一成员。所述方法还包括将规定量的特异性结合第一分析物的第一捕捉成员引入狭长流动通道中。第一捕捉成员包括特异性结合对的第二成员,以使得第一捕捉成员非共价结合如本文所述的聚合物介质。在一些情况下,第一捕捉成员为结合特异性结合对的第二成员的第一抗原。第一捕捉成员与聚合物介质通过特异性结合对的成员之间的结合相互作用进行稳定缔合制造了包括非共价结合聚合物介质的第一捕捉成员的第一分析物检测域。捕捉成员与聚合物介质的非共价结合也可通过光活化捕捉成员或特异性结合对(如光活化的抗生蛋白链菌素或光活化的生物素)来开始。第一捕捉成员的规定量为足以制造具有特定需要的长度的第一分析物检测域的量。

[0094] 所述方法的实施方案还包括以足以制造间隔域的方式将规定量的特异性结合对的第二成员引入狭长流动通道中。如上文所述的,间隔域中的特异性结合对的第二成员不与捕捉成员缔合。特异性结合对的第二成员的规定量为足以制造具有特定需要的长度的间隔域的量。

[0095] 所述方法的实施方案还包括将规定量的特异性结合第二分析物的第二捕捉成员引入狭长流动通道中。所述第二捕捉成员包括特异性结合对的第二成员,以使得第二捕捉成员非共价结合如本文所述的聚合物介质。在一些情况下,第二捕捉成员为结合特异性结合对的第二成员的第二抗原。第二捕捉成员与聚合物介质通过特异性结合对的成员之间的结合相互作用进行稳定缔合制造了包括非共价结合聚合物介质的第二捕捉成员的第二分析物检测域。第二捕捉成员的规定量为足以制造具有特定需要的长度的第二分析物检测域的量。

[0096] 系统

[0097] 本公开的多个方面还包括用于测定流体样品中两种或更多种分析物的存在的系统。所述系统包括例如上文所述的微流体装置和检测器。在其它实施方案中,所述系统不包括检测器,例如其中检测通过目视检测由用户观察微流体装置的图像或直接目视微流体

装置来进行。

[0098] 在一些情况下,检测器是被配置为检测可检测标记的检测器。所述检测器可包括配置为检测用于测定中的可检测标记的任何类型的检测器。如上文所述的,可检测标记可为荧光标记、比色标记、化学发光标记、多色试剂、酶联试剂、抗生物素蛋白-抗生物素蛋白链菌素缔合的检测试剂、放射性标记、金粒子、磁性标记等。在一些情况下,可检测标记为荧光标记。在这些情况下,检测器可配置为使荧光标记与电磁辐射(例如,可见光、UV、x射线等)接触,所述电磁辐射激发荧光标记并且使荧光标记发射可检测的电磁辐射(例如,可见光等)。发射的电磁辐射可由检测器检测以确定结合聚合物介质的标记的分析物的存在。

[0099] 在一些情况下,检测器可如上文所述地配置为检测来自荧光标记的发射。在某些情况下,检测器包括光电倍增管(PMT)、电荷耦合装置(CCD)、强化电荷耦合装置(ICCD)、互补金属-氧化物半导体(CMOS)传感器、目视比色读数器、光电二极管等。

[0100] 所述系统还可包括电磁辐射的来源(即,电磁辐射源)。在一些情况下,电磁辐射源为光源。例如,所述光源可包括可见光源、UV光源、红外光源等。在一些情况下,电磁辐射源包括光源,如UV光源。如上文所述的,电磁辐射源可用于向微流体装置中的聚合物介质施加电磁辐射以使捕捉成员在聚合物介质的制造期间共价结合聚合物介质。

[0101] 在一些情况下,所述系统可配置用于非光学检测方法,包括但不限于测量分析物检测域的电阻的增加(或通过分析物检测域的负载电流的减少)以确定在特异性分析物检测域处感兴趣的分析物的捕捉。

[0102] 本公开的系统可包括所需的各种其它组件。例如,所述系统可包括流体处理组件,如微流体的流体处理组件。流体处理组件可配置为引导一种或多种流体通过微流体装置。在一些情况下,流体处理组件被配置为引导流体(例如但不限于流体样品、缓冲液(例如,电泳缓冲液、洗涤缓冲液、释放缓冲液等)等)。在某些实施方案中,微流体的流体处理组件被配置为递送流体至微流体装置的聚合物介质,以使得流体接触聚合物介质。流体处理组件可包括微流体泵。在一些情况下,微流体泵被配置用于压力驱动微流体处理流体并且将其发送通过本文所公开的微流体装置和系统。在某些情况下,微流体的流体处理组件被配置为递送小体积的流体,如1mL或更少,如500 μ L或更少,包括100 μ L或更少,例如50 μ L或更少、或25 μ L或更少、或10 μ L或更少、或5 μ L或更少、或1 μ L或更少。

[0103] 在某些实施方案中,所述系统包括一个或多个电场发生器。电场发生器可配置为向微流体装置的各个区域施加电场。所述系统可配置为施加电场,以使得样品以电动方式输送通过微流体装置。例如,电场发生器可配置为向聚合物介质施加电场。在一些情况下,施加电场可与聚合物介质的定向轴对准。因而,施加电场可配置为将样品中的分析物和组分以电动方式输送通过聚合物介质。在一些情况下,电场发生器被配置为以在10V/cm至1000V/cm,如100V/cm至800V/cm、包括200V/cm至800V/cm、或400V/cm至800V/cm范围内的强度施加电场。

[0104] 在某些实施方案中,所述系统包括电源。电源可为电池,例如但不限于一次性电池或可再充电电池。

[0105] 在某些实施方案中,本发明系统为生物芯片(例如,生物传感器芯片)。“生物芯片”或“生物传感器芯片”意指包括衬底表面的微流体系统,所述系统在衬底表面上呈现两种或更多种独特微流体装置。在某些实施方案中,所述微流体系统包括具有微流体装置阵

列的衬底表面。

[0106] “阵列”包括可寻址区域（例如，空间可寻址区域）的任何二维或基本上二维（以及三维）布置。当阵列具有多个定位在所述阵列上的特定预定位置（例如，“地址”）处的装置时，所述阵列为“可寻址的”。阵列特征（例如，装置）可由介入空间分隔开。任何指定衬底均可携带一个、两个、四个或更多个安置在所述衬底的前表面上的阵列。根据用途，任何或所有阵列均可彼此相同或不同并且各自可含有多个独特微流体装置。阵列可含有一个或多个，包括两个或更多个、四个或更多个、八个或更多个、10 个或多个、25 个或多个、50 个或多个或者 100 个或多个微流体装置。在某些实施方案中，微流体装置可配置于阵列中，其面积为 100cm^2 或更少、 50cm^2 或更少或 25cm^2 或更少、 10cm^2 或更少、 5cm^2 或更少，诸如 1cm^2 或更少，包括 50mm^2 或更少、 20mm^2 或更少，诸如 10mm^2 或更少，或甚至更小。例如，微流体装置的尺寸范围可为 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ 至 $200\text{mm} \times 200\text{mm}$ ，包括 $100\text{mm} \times 100\text{mm}$ 或更小，诸如 $50\text{mm} \times 50\text{mm}$ 或更小，例如 $25\text{mm} \times 25\text{mm}$ 或更小，或 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ 或更小，或 $5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 或更小，例如 $2\text{mm} \times 2\text{mm}$ 或更小的尺寸。

[0107] 微流体装置的阵列可安排用于多重分析样品。例如，多个微流体装置可串联安排，以使得可在一系列微流体装置中分析样品中多种不同分析物的存在。在某些实施方案中，多个微流体装置可并联安排，以使得可基本上同时分析两个或更多个样品。例如，多个微流体装置（各自包括如本文所述的狭长流动通道）可并联安排，以使得可基本上同时分析两个或更多个样品。

[0108] 所述系统的多个方面包括，微流体装置可配置为消耗最少量的样品，同时仍产生可检测的结果。例如，所述系统可配置为使用 $100\text{ }\mu\text{L}$ 或更少，如 $75\text{ }\mu\text{L}$ 或更少，包括 $50\text{ }\mu\text{L}$ 或更少，或 $25\text{ }\mu\text{L}$ 或更少，或 $10\text{ }\mu\text{L}$ 或更少，例如 $5\text{ }\mu\text{L}$ 或更少、 $2\text{ }\mu\text{L}$ 或更少或者 $1\text{ }\mu\text{L}$ 或更少的样品体积，同时仍产生可检测的结果。在某些实施方案中，所述系统被配置为具有 1nM 或更少，如 500pM 或更少，包括 100pM 或更少，例如 1pM 或更少、或 500fM 或更少、或 250fM 或更少，如 100fM 或更少，包括 50fM 或更少、或 25fM 或更少、或 10fM 或更少的检测灵敏度。在一些情况下，所述系统被配置为能够在 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 或更少，如 500ng/mL 或更少，包括 100ng/mL 或更少，例如 10ng/mL 或更少，或 5ng/mL 或更少，如 1ng/mL 或更少、或 0.1ng/mL 或更少、或 0.01ng/mL 或更少，包括 1pg/mL 或更少的浓度下检测分析物。在某些实施方案中，所述系统的动态范围为 10^{-18}M 至 10M ，如 10^{-15}M 至 10^{-3}M ，包括 10^{-12}M 至 10^{-6}M 。

[0109] 在一些情况下，所述系统被配置为具有 10 或更大，如 15 或更大，包括 20 或更大、或 30 或更大、或 40 或更大、或 50 或更大、或 60 或更大、或 70 或更大、或 80 或更大、或 90 或更大、或 100 或更大、或 150 或更大、或 200 或更大、或 500 或更大、或 1,000 或更大、或 2,000 或更大、或 3,000 或更大、或 4,000 或更大、或 5,000 或更大、或 6,000 或更大、或 7,000 或更大、或 8,000 或更大、或 9,000 或更大、或 10,000 或更大的信噪比 (SNR)。在一些情况下，可实现的信噪比取决于测定中所用的检测方法。例如，在某些实施方案中，感兴趣的分析物直接用可检测标记来标记。在这些实施方案中，信噪比可为 10 或更大，如 15 或更大，包括 20 或更大、或 30 或更大、或 40 或更大、或 50 或更大、或 60 或更大、或 70 或更大、或 80 或更大、或 90 或更大、或 100 或更大、或 150 或更大、或 200 或更大。在其它实施方案中，感兴趣的分析物首先由一次标记（例如，一次抗体）来标记并且然后所述一次标记用二次标记（例如，二次抗体）来标记。在这些实施方案中，信噪比可为 100 或更大，如 150 或更大，包

括 200 或更大、或 500 或更大、或 1,000 或更大、或 2,000 或更大、或 3,000 或更大、或 4,000 或更大、或 5,000 或更大、或 6,000 或更大、或 7,000 或更大、或 8,000 或更大、或 9,000 或更大、或 10,000 或更大。

[0110] 在某些实施方案中,微流体装置是在范围为 1℃至 100℃,如 5℃至 75℃,包括 10℃至 50℃或 20℃至 40℃的温度下操作。在一些情况下,微流体装置是在范围为 35℃至 40℃的温度下操作。

[0111] 在某些实施方案中,本公开的系统包括配置为测定样品以产生可检测的信号信号的微流体装置和配置为由检测的信号确定样品中分析物的存在的信号处理模块。如上文所述的,本公开的系统还可包括检测器。在一些情况下,信号处理模块被配置为接收来自检测器的信号并且输出分析物是否存在于样品中的结果。信号处理模块可作为单一装置整合到微流体装置和 / 或检测器中,或者可与微流体装置和 / 或检测器分开,其中信号处理模块和检测器彼此通信,例如经由有线或无线通信方案。

[0112] 在某些实施方案中,信号处理模块被配置为由从本公开的条码测定装置检测的信号确定样品中一种或多种分析物的存在。如上文所述的,“条码”测定装置为本发明的微流体装置,其包括散布于间隔域之间的分析物检测域(其中可产生可检测信号),所述间隔域不包括捕捉部分并且因此不产生可检测信号。信号处理模块可配置为基于由检测器从条码测定装置的单一分析物检测域或从条码测定装置的两个或更多个分析物检测域检测的信号确定一种或多种分析物的存在。

[0113] 例如,信号处理模块可配置为基于由检测器从单一分析物检测域检测的信号确定分析物的存在。一旦确定分析物存在或不存在,信号处理模块可确定另一分析物在不同的分析物检测域处的存在。在这些实施方案中,信号处理模块可配置为通过依次分析来自条码测定装置中的一系列分析物检测域的信号来依次确定分析物的存在。

[0114] 在其它实施方案中,信号处理模块可配置为基本上同时确定一种或多种分析物的存在。例如,信号处理模块可配置为基于基本上同时由检测器从多个分析物检测域检测的信号确定各分析物检测域中分析物的存在。在一些情况下,测定装置的条码图案有助于同时从多个分析物检测域检测信号。例如,相邻分析物检测域之间的间隔域可有助于区分来自第一分析物检测域的信号与来自相邻分析物检测域的信号。因而,信号处理模块可配置为在分析物检测域中以与条码测定装置中的其它分析物检测域的最小信号干扰确定分析物的存在。

[0115] 本公开的多个方面还包括配置为例如上文所述地检测样品中分析物的存在的系统,例如基于计算机的系统。“基于计算机的系统”是指用于分析来自微流体装置的信号数据的硬件、软件和数据存储装置。在一些情况下,本公开的基于计算机的系统的硬件包括中央处理器(CPU)、输入装置、输出装置以及数据存储装置。例如,输入装置可包括配置为允许用户向系统中输入信息和 / 或命令以与系统相互作用或控制系统的装置,例如但不限于键盘、图形界面输入装置(例如,鼠标、触控式输入装置等)等。输出装置可包括配置为向用户显示或以其它方式传达信息(如测定的结果)的装置,并且可包括但不限于如显示器、声音输出装置等装置。数据存储装置可包括计算机可读存储介质,其包括记录如上文所述的数据;或可存取此类计算机可读存储介质的存储器存取装置。

[0116] 为了“记录”数据,计算机可读存储介质上的程序设计或其它信息是指用于在计算

机可读存储介质上存储信息的方法,以使得信息可及时在后续点处取回。基于用于存取所存储的信息的存取装置,可使用任何常规的数据存储结构。多种数据处理器程序和格式可用于存储,例如文字处理文本文件、电子表格格式、数据库格式、其组合等。

[0117] “处理器”是指配置为执行用于操作装置和系统并且执行如本文所公开的方法的程序设计功能的硬件和/或软件。例如,处理器可为可编程序的数字微处理器,如可以电子控制器、主机、服务器或个人计算机(台式或便携式)形式获得。在处理器可编程序的情况下,合适的程序设计可由处理器的远程位置传达,或先前保存于计算机程序产品(如便携式或固定式计算机可读存储介质,无论是基于磁性、光学或固态装置)中。例如,光盘或固态存储器装置可包括其上记录的程序设计,并且可由配置为与处理器通信的合适存取装置读取。

[0118] 在某些实施方案中,本发明系统包括以下组件:(a)配置为在所述系统与一个或多个用户之间传递信息的通信模块,例如经由用户计算机,如下文所述的;以及(b)配置为执行本公开的定性和/或定量分析方法中涉及的一个或多个任务的处理器。在一些情况下,通信模块可配置为使用无线传输装置向一个或多个远程用户传递信息。例如,所述系统可配置为便携式的,以使得微流体装置可在现场或在特定远程位置处使用,并且向处于另一位点的一个或多个用户传输数据,以使得可在使用微流体装置处的远程位置处分析数据。

[0119] 在某些实施方案中,所述系统包括其上存储有控制逻辑(例如,计算机软件程序,包括程序代码)的计算机可读介质。所述控制逻辑在由计算机的处理器执行时使处理器执行本文所述的功能。在其它实施方案中,一些功能主要在硬件中使用例如硬件状态机器实施。由硬件状态机器实施以便执行本文所述的功能可使用任何常规的方法实现。

[0120] 除例如上文所述的检测器和信号处理模块以外,本公开的系统还可包括额外组件,例如但不限于数据输出装置(例如监测器和/或扬声器)、数据输入装置(例如接口端口、键盘等)、流体处理组件、电源等。

[0121] 效用

[0122] 本发明装置、系统和方法可用于多种不同应用,在这些应用中需要确定样品中一种或多种分析物的存在或不存在,和/或定量样品中的一种或多种分析物的。在某些实施方案中,所述方法涉及检测样品中的核酸、蛋白质或其它生物分子。例如,本公开的装置、系统和方法的实施方案可用于测定平台,所述平台可用于鉴定病原体、免疫反应、或生物化学剂的存在、环境和水病原体监测和检测、食品安全以及生物农业分析。界定微流体装置内部的独特分析物检测域的能力用作多种分析平台的基础。例如,包括如本文所述的独特、异质分析物检测域的微流体装置可用于多重测定和实验中。分析物检测域中捕捉成员的局部图案化有助于制造用于这些多重测定和实验中的生物分析装置。

[0123] 本公开的装置、系统和方法可用于检测蛋白质、肽、核酸等。在一些情况下,本发明装置、系统和方法可用于检测蛋白质,例如但不限于抗体。在某些实施方案中,样品中抗体的检测可指示潜在疾病或病况,其中受试者响应于所述疾病或病况而产生此类抗体。因而,本公开的装置、系统和方法可用于通过检测与疾病病况相关的抗体来检测并诊断受试者(例如,人类或动物)中的疾病病况。

[0124] 本公开的装置、系统和方法可用于检测样品中的一组生物标志物,例如两种或更

多种独特的蛋白生物标志物。例如,所述装置、系统和方法可用于快速、临床检测生物样品中两种或更多种疾病生物标志物,例如可用于诊断受试者中的疾病病况,可用于现行管理或治疗受试者中的疾病病况等。另外,本发明装置、系统和方法可用于检测样品中的分析物的方案中,例如但不限于蛋白质印迹、DNA 印迹、RNA 印迹、Eastern、Far-Western 印迹、Southwestern 印迹等。

[0125] 在一些情况下,本发明装置、系统和方法可用于检测特定分析物(在本文中还称为生物标志物)的存在或不存在,以及在血液、血浆、血清或其它体液或分泌物,例如但不限于尿液、血液、血清、血浆、唾液、精液、前列腺液、乳头抽吸液、泪液、汗、粪便、颊棉签、脑脊髓液、细胞溶解产物样品、羊水、胃肠液、生检组织(例如,由激光捕捉显微切割(LCM)获得的样品)等中特定生物标志物浓度的增加或降低。

[0126] 生物标志物的存在或不存在或者生物标志物浓度的显著改变可用于诊断疾病风险、个体中疾病的存在或调适个体中疾病的治疗。例如,特定生物标志物或一组生物标志物的存在可影响给予个体的药物治疗或施用方案的选择。在评价潜在药物治疗时,生物标志物可用作天然终点(如存活或不可逆病状)的代替物。如果治疗改变与改善的健康直接相关的生物标志物,那么所述生物标志物可作用于评价特定治疗或施用方案的临床益处的代替终点。因此,本发明装置、系统和方法推动了基于个体中检测的特定生物标志物或所述组的生物标志物的个性化诊断和治疗。此外,如上文所述的,本发明装置和系统的高灵敏性推动了与疾病相关的生物标志物的早期检测。由于在单一芯片上检测多种生物标志物的能力,以及灵敏性、可扩展性和使用简易性,本发明公开的微流体装置、系统和方法可用于便携式和即时或近患者分子诊断学。

[0127] 在某些实施方案中,本发明装置、系统和方法可用于检测传染性疾病或疾病状态的生物标志物。在一些情况下,生物标志物可为分子生物标志物,例如但不限于蛋白质、核酸、碳水化合物、小分子等。例如,本发明装置、系统和方法可用于通过检测 HIV 衣壳蛋白 p24、糖蛋白 120 和 41、CD4+ 细胞等的抗体来针对 HIV/AIDS 诊断和/或疗法监测 HIV 病毒负荷和患者 CD4 计数。可由本发明装置、系统和方法检测的特定疾病或疾病状态包括但不限于细菌感染、病毒感染、基因表达增加或减少、染色体异常(例如,缺失或插入)等。例如,本发明装置、系统和方法可用于检测胃肠感染,例如但不限于无菌性脑膜炎、肉毒中毒、霍乱、大肠杆菌感染、手足口病、螺杆菌感染、出血性结膜炎、疱疹性咽峡炎、心肌炎、副伤寒、脊髓灰质炎、志贺氏菌病、伤寒、弧菌性败血病、病毒性腹泻等。另外,本发明装置、系统和方法可用于检测呼吸道感染,例如但不限于腺病毒感染、非典型肺炎、禽流感、猪流感、腺鼠疫、白喉、流感、麻疹、脑膜炎球菌性脑膜炎、腮腺炎、副流感、百日咳(pertussis)(即,百日咳(whooping cough))、肺炎、肺鼠疫、呼吸道合胞病毒感染、风疹、猩红热、败血性鼠疫、严重急性呼吸道综合症(SARS)、肺结核等。另外,本发明装置、系统和方法可用于检测神经疾病,例如但不限于库贾氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、牛海绵状脑病(即,疯牛病)、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、狂犬病等。另外,本发明装置、系统和方法可用于检测泌尿生殖疾病,例如但不限于 AIDS、软下疳、衣原体、尖锐湿疣、生殖器疱疹、淋病、性病淋巴肉芽肿、非淋球菌性尿道炎、梅毒等。另外,本发明装置、系统和方法可用于检测病毒性肝炎疾病,例如但不限于甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎等。另外,本发明装置、系统和方法可用于检测出血热疾病,例如但不限于埃博拉出血热、肾综合症出血热(HFRS)、拉沙出

血热 (Lassa hemorrhagic fever)、马尔堡出血热 (Marburg hemorrhagic fever) 等。另外,本发明装置、系统和方法可用于检测人畜共患病,例如但不限于炭疽热、禽流感、布鲁氏菌病、库贾氏病、牛海绵状脑病 (即,疯牛病)、肠病毒性大肠杆菌感染、日本脑炎、钩端螺旋体病、Q 热、狂犬病、严重急性呼吸道综合症 (SARS) 等。另外,本发明装置、系统和方法可用于检测虫媒病毒感染,例如但不限于登革出血热、日本脑炎、蜱媒脑炎、西尼罗河热、黄热病等。另外,本发明装置、系统和方法可用于检测抗生素抗性感染,例如但不限于鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、肠球菌属某种、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌等。另外,本发明装置、系统和方法可用于检测媒介传播感染,例如但不限于猫抓病、地方性斑疹伤寒、流行性斑疹伤寒、人埃立克体病 (*human ehrlichiosis*)、日本红斑热、虱传型回归热、莱姆病、疟疾、战壕热 (*trench fever*)、恙虫病等。类似地,本发明装置、系统和方法可用于检测心血管疾病、中枢神经疾病、肾衰竭、糖尿病、自身免疫性疾病、镰状细胞病、巨细胞病毒、生物流体或肿瘤生检癌症生物标志物 (肿瘤学) 以及许多其它疾病。

[0128] 本发明装置、系统和方法可用于诊断测定,例如但不限于以下:检测和/或定量如上文所述的生物标志物;筛选测定,其中以规则时间间隔测试无症状受试者的样品;预后测定,其中使用生物标志物的存在和或数量来预测可能的疾病过程;分层测定,其中可预测受试者对于不同药物治疗的反应;效力测定,其中监测药物治疗的效力;等。

[0129] 本发明装置、系统和方法还可用于验证测定。例如,可使用验证测定来验证或证实潜在的疾病生物标志物为多名个体中疾病存在或不存在的可靠指示物。用于本发明装置、系统和方法的短测定时间可有助于增加以最小时间量筛选多个样品的通过量。

[0130] 在一些情况下,本发明装置、系统和方法可无需实验室实施设定而使用。与等效的分析研究实验室设备相比,本发明装置和系统在便携式、手持式系统中提供可比较的分析灵敏性。在一些情况下,重量和操作成本低于典型的固定实验室设备。本发明系统和装置可整合至单一仪器中,以使得所有测定步骤均可由单一仪器执行,这些步骤包括分离、传递、标记以及检测感兴趣的分析物。例如,在一些情况下,并无单独仪器用于分离、传递、标记以及检测感兴趣的分析物。另外,本发明系统和装置可在家庭环境中用于由未经医疗训练的人进行非处方药家庭测试以检测样品中的一种或多种分析物。本发明系统和装置还可在临床环境中 (例如在床侧) 用于快速诊断,或用于其中由于成本或其它原因而未提供固定的研究实验室设备的环境中。

[0131] 试剂盒

[0132] 本公开的多个方面另外包括具有如本文所述的微流体装置的试剂盒。所述试剂盒的实施方案还包括配置为容纳所述微流体装置的包装。所述包装可为密封的包装。例如,在某些实施方案中,所述试剂盒包括配置为维持微流体装置的无菌性的密封的包装。所述密封的包装可被密封,以使得基本上没有外部污染物,如灰尘、微生物 (例如,真菌、细菌、病毒、孢子形式等)、液体、气体等能够进入密封的包装。例如,所述密封的包装可被密封,使得所述包装是水密和/或气密的。

[0133] 所述试剂盒可还包括缓冲液。例如,所述试剂盒可包括缓冲液,如电泳缓冲液、样品缓冲液等。所述试剂盒可还包括额外试剂,例如但不限于释放剂、变性剂、重折叠剂、清洁剂、可检测标记 (例如荧光标记、比色标记、化学发光标记、多色试剂、酶联试剂、抗生物素

蛋白-抗生蛋白链菌素缔合的检测试剂、放射性标记、金粒子、磁性标记等)等。在一些情况下,所述试剂盒可包括特异性结合分析物的标记试剂。例如,如上文所述的,标记试剂可用于提供用于由所述装置中的捕捉成员特异性结合的感兴趣的特异性分析物的可检测标记。

[0134] 除以上组分以外,本发明试剂盒还可包括关于实施本发明方法的说明书。这些说明书可以多种形式存在于本发明试剂盒中,所述形式中的一种或多种可存在于所述试剂盒中。其中可存在这些说明书的一种形式为在合适的介质或衬底上(例如上面印刷信息的一张或多张纸)、在试剂盒的包装中、在包装插页等中的印刷信息。另一形式将为上面已经记录或存储信息的计算机可读介质,例如 CD、DVD、Blu-Ray、计算机可读存储器等。可存在的又一形式为网站地址,其可经由互联网用以在移送位点处存取信息。任何常规的方式均可存在于试剂盒中。

[0135] 本公开的多个方面另外包括具有如本文详细描述的微流体装置的试剂盒。所述试剂盒还可包括缓冲液。例如,所述试剂盒可包括缓冲液,如电泳缓冲液、样品缓冲液等。所述试剂盒还可包括额外试剂,例如但不限于释放剂、变性剂、重折叠剂、清洁剂、可检测标记(例如荧光标记、比色标记、化学发光标记、多色试剂、酶联试剂、抗生物素蛋白-抗生蛋白链菌素缔合的检测试剂、放射性标记、金粒子、磁性标记等)等。

[0136] 除以上组分以外,本发明试剂盒还可包括关于实施本发明方法的说明书。这些说明书可以多种形式存在于本发明试剂盒中,所述形式中的一种或多种可存在于所述试剂盒中。其中可存在这些说明书的一种形式为合适的介质或衬底上(例如上面印刷信息的一张或多张纸)、在试剂盒的包装中、在包装插页等中的印刷信息形式。另一方式将为上面已经记录或存储信息的计算机可读介质,例如磁盘、CD、DVD、Blu-Ray、计算机可读存储器等。可存在的又一方式为网站地址,其可经由互联网用以在移送位点处存取信息。任何常规的方式均可存在于试剂盒中。

[0137] 如可由上文所提供的公开内容了解的,本发明的实施方案具有多种应用。因此,本文所提供的实施例为出于说明目的而提供并且不意图以任何方式解释为限制本发明。本领域技术人员将容易地识别多种非关键性参数,所述参数可能发生改变或修改以产生基本上类似的结果。因此,提出以下实施例以便向本领域技术人员提供如何制备和使用本发明的完全公开内容和描述,并且不意图限制本发明人看待其发明的范围,也不意图表示以下试验为所进行的全部或仅有的试验。已经努力确保相对于所用数字(例如量、温度等)的精确性,但一些实验误差和偏差应加以说明。除非另外指示,否则份为重量份,分子量为重均分子量,温度以℃计,并且压力为在大气压下或接近大气压。

[0138] 实施例

[0139] 实施例 1

[0140] I. 概述

[0141] 使用针对病毒感染抗体的即时微流体‘条码’测定进行实验。“条码”意指微流体装置包括如本文所述的多个独特分析物检测域。为了在单一微通道中(没有接点)产生抗原结合位点条码,使用经由有序电泳图案化步骤实现的高密度 3D 抗原固定。以电泳方式引入非共价结合抗生蛋白链菌素丙烯酰胺水凝胶的生物素标记的捕捉抗原。人类血清中的多重抗体检测时间从 4 小时减少为 10 分钟,其中检测下限为 <1 毫微微克分子。

[0142] II. 实验

[0143] A. 使用电泳进行水凝胶的条码图案化：

[0144] 为了建立条码测定, 抗生蛋白链菌素-丙烯酰胺单体经由光图案化进行交联以产生聚丙烯酰胺凝胶, 从而填充玻璃芯片中的微通道(图1(A))。然后通过有序电泳引入生物素化抗原至涂抹有抗生蛋白链菌素(SA)的凝胶中来进行条码抗原图案化(图1(B))。如果在最接近引入孔的位置处的SA位点充分饱和, 那么进入通道的抗原仅进一步电迁移至通道中。固定的抗原区的长度通过注射持续时间和以电泳方式注射的材料的通量进行控制, 其中所述通量取决于迁移率、施加电场和初始浓度。如图1(A)和图1(B)所示, 凝胶中的 $4\mu\text{M}$ SA提供了 $16\mu\text{M}$ 生物素化抗原捕捉位点, 这导致固定期间 $5\mu\text{M}$ HCV-c100p抗原的3.2倍富集。3D水凝胶结构提供比表面图案化方法高100-1000倍的捕捉位点。交叉反应性测试显示, 各抗体在其对应抗原区中被捕捉。笔直通道几何结构允许多重装置布置(6个装置/ cm^2)。定制的抗原图案化和测定步骤通过电压施加进行自动化。使用条码方法, 制造多重测定装置, 所述装置在2.5mm长通道中包括4个独特抗原条带, 在所述结合条带之间具有开放间隔区(图1(A)-1(B))。如所预期的, 在抗原条带的右边缘中捕捉以电泳方式自右侧注射的抗体(图1(C))。

[0145] B. 检测丙型肝炎抗体：

[0146] 两种HCV抗原HCV-NS3和HCV-c100p的图案化允许在人类血清中检测HCV抗体。丙型肝炎抗体在与近患者操作一致的测定时间(30分钟, 与在常规HCV验证诊断学情况下的8小时相比)中在临床相关水平($0.025\text{--}100\mu\text{g/mL}$)下进行检测(图1(D))。对于c100p抗体, 检测下限(LLOD)为 25ng/mL (血清), 与0.75毫微微克分子的所检测的抗体相对应。LLOD值的范围类似于台式蛋白质印迹和免疫印迹技术的范围。

[0147] 实施例2

[0148] 概述

[0149] 使用具有多分析物检测能力的简单的‘单一入口、单一出口’微通道架构进行实验。在简单玻璃微通道中的抗生蛋白链菌素官能化的、通道填充性聚丙烯酰胺凝胶作为用于电泳、异质免疫测定的3D骨架操作。生物素和生物素化捕捉试剂在沿微通道的轴的个别区域中图案化。与生物素阻断区域交替捕捉试剂区域导致沿所述通道的分析物检测域和间隔区的条码样图案。为了优化条码制造, 在电迁移和结合反应时间量程的范围内进行图案化行为的实证研究。使用异质条码免疫测定来检测针对HCV和HIV抗原的人类抗体。使血清经电泳通过条码图案化凝胶, 从而允许捕捉抗体靶标。在达姆科勒数(Damkohler number)范围内分析测定性能。与需要4-10小时样品孵育步骤并伴随8-20小时总测定持续时间的免疫印迹相比, 本发明微流体条码测定中的定向电迁移和反应导致10min样品孵育步骤和30分钟总测定持续时间。此外, 所述条码测定报导了临床相关灵敏性(在2%人类血清中 25ng/mL), 这与标准HCV验证诊断学相当。假定低电压、低功率和自动化操作, 本发明微流体条码测定可用于针对近患者设定的快速验证诊断学。

[0150] 使用‘单一入口、单一出口’电泳制造方法进行实验, 所述方法允许沿一个通道的长度进行多种捕捉抗原的条码图案化。独特的捕捉试剂(抗原)和非反应性间隔区在2.5mm长通道中图案化。所述多重微流体条码测定用于检测对HCV-c100p、HCV-NS3和HIV-I p24抗原(针对具有高协同感染率的疾病的多生物标志物组)具有特异性的免疫球蛋白。所述单一微通道条码测定在30分钟内以相当于6+小时RIBA 3.0测定的分析灵敏性和特异性

完成。测定操作仅在一个入口和一个出口处由电子作用,其中电泳在低施加电压下进行,因此消除对于高电压电源、泵、注射器或阀(使所述装置适用于近患者操作)的依赖性。

[0151] 材料和方法

[0152] 试剂

[0153] 由 Novartis Diagnostics(Emeryville, CA) 提供 HCV 阳性汇集的人类血浆来源的 HCV Core、NS3 和 c100p 抗体 (AF-568 缀合和未缀合的) 以及重组 HCV Core、NS3 和 c100p 抗原以及其生物素和 AF488 缀合的格式。HIV p24 抗原和 HIV p24 小鼠抗体是购自 Prospec-Tany Technogene(Rehovot, Israel)。生物素缀合的蛋白-L 是购自 Thermo Fisher Scientific(Rockford, IL)。生物素和生物素-FITC 是购自 AnaSpec(Fremont, CA)。抗生蛋白链菌素-丙烯酰胺和 AF-568 缀合的抗人类和抗小鼠二次山羊抗体是购自 Invitrogen(Carlsbad, CA)。HCV-HIV 阴性人类血清是购自 SeraCare Life Sciences(Oceanside, CA)。所有抗体、抗原和血清样品均在以 10x 浓度购自 Bio-Rad(Hercules, CA) 的 1x Tris-甘氨酸 (TG) 缓冲液中稀释。VA-086 光引发剂 (2, 2-偶氮双 [2-甲基-N-(2-羟基乙基) 丙酰胺]) 是购自 Wako Chemicals(Richmond, VA)。30:1 丙烯酰胺-双丙烯酰胺单体溶液、冰乙酸、甲醇以及甲基丙烯酸 3-(三甲氧基硅烷基)-丙酯 (硅烷 174) 是购自 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)。

[0154] 成像、数据采集和芯片操作

[0155] 经由附接至 Olympus IX-50 落射荧光显微镜 (Center Valley, PA) 的 Peltier-cooled CCD 照相机 (Cool Snap HQ2, Roper Scientific, Trenton, NJ) 捕捉图像, 所述显微镜配备有 10x 物镜 (UPlanFL, N.A. = 0.3, Olympus, Center Valley, PA) 和 GFP(41017 FL-CUBE ENDOW) 和 DSRED(XF111-2-CSM;OMEGA FL) 滤光镜 (Omega Optical, Battleboro, VT)。100W 汞弧灯用作激发源。半自动化图像捕捉通过安装在 PC(Dell Inc. Round Rock, Texas) 上的 Molecular Devices LLC(Sunnyvale, CA) 的 Metamorph 软件控制。在 4x4 像素面装仓情况下的曝光时间根据实验而在 5ms-400ms 之间变化。图像的后处理和分析用 ImageJ(NIH, Bethesda, CA) 和 Matlab(Mathworks, Natick, MA) 进行。使用定制的、计算机控制的、8 通道电流或电压可编程高电压电源 (HVPS)。

[0156] 芯片和凝胶制造

[0157] 芯片被设计在内部并且由 Caliper Life Sciences(Hopkinton, MA) 利用标准湿式二氧化硅蚀刻方法和热粘合制造在钠钙玻璃衬底中。各芯片上包括 7 条笔直通道 (图 2(A))。通道为 2.5mm 长、35 μ m 深和 120 μ m 宽。用于样品和电连接性的 2 毫米直径、1mm 深的储槽位于各通道末端。

[0158] 在 PA 凝胶制造之前, 通道壁针对增强的凝胶对壁的附着性进行官能化。在官能化步骤前, 通道用 1M NaOH 清洁 10 分钟, 然后为 3 个 DI 水洗涤步骤。为了在通道壁上产生硅烷单层涂层, 通道用 2:3:2 硅烷-水-乙酸的预混合、脱气且搅拌的溶液孵育 30 分钟。在室温下使用搁在具有潮湿组织的加盖皮氏培养皿中的芯片进行孵育以防止孔中的硅烷溶液蒸发。在单层形成后, 用甲醇从通道中洗出硅烷溶液, 持续 5 分钟, 接着进行两轮的甲醇和水依次洗涤。在最后洗涤步骤后, 将通道抽气并且接着用 N_2 气体吹扫。在具有 3% T 丙烯酰胺 / 双丙烯酰胺 (30:1)、4 μ M 抗生蛋白链菌素丙烯酰胺 (SA) 和 2mg/ml VA-086 光引发剂的 1x TG 缓冲液中制备凝胶前体溶液。脱气且搅拌的溶液 (在施加至管的真空下进行

10min 声处理) 在 1-2s 内通过毛细作用被带入微通道中。在 10mW/cm² 功率设定下经由用封闭在空气冷却盒中的 UV 灯 (UVP B100-AP, Upland, CA) 进行整片 UV 曝光来进行抗生蛋白链菌素-PA 凝胶的聚合, 持续 10 分钟。将芯片放在潮湿皮氏培养皿中。在聚合之后, 目视检查芯片的凝胶缺陷。如果检测到凝胶中的缺陷, 那么弃去所述芯片。在聚合之后, 用连接至真空的吸液管尖端去除孔中的过量凝胶。如所述的, 芯片在 4℃ 下存储在潮湿皮氏培养皿中。在实验完成后, 芯片用 5% 漂白剂溶液消毒。使用在适当安全控制下所用的高氯酸-过氧化氢溶液去除凝胶。

[0159] 抗原固定和测定操作

[0160] 在凝胶制备之后, 用生物素化抗原的条码样图案以电泳方式图案化抗生蛋白链菌素-PA 凝胶填充的微通道 (图 2(B))。所述图案化过程的概述详述于图 2(C) 和以下表 1 中。与试剂-间隔区图案化类似的, 测定操作以电泳方式进行并且描述于图 3 和以下表 2 中。在 TG 缓冲液中稀释的人类血清样品以电泳方式递送至固定的抗原区。作为通过试剂图案化凝胶电迁移的靶标抗体, 靶标抗体在对应抗原区中被捕捉。在从通道冲洗抗体后, 针对结合的一次抗体的光学检测引入荧光标记的二次抗人类抗体。

[0161] 表 1. 聚合物介质图案化过程步骤

[0162]

步骤	样品	持续时间 (min)	电压 (V)	电流 (μ A)	能量 (瓦特-时)
1 负载	20 μ M 生物素	1	1.5	0.15	3.75E-09
2 孵育		1	0	0	
3 反洗涤	TG 缓冲液	2	-18	-2	1.20E-06
4 负载	5 μ M c100p-生物素	2	9	1	
5 孵育		1	0	0	
6 反洗涤	TG 缓冲液	2	-18	-2	1.20E-06
...针对接下来的试剂重复 1-6					
49 反向负载	20 μ M 生物素	2	18	2	1.20E-06
50 孵育		1	0	0	
51 最后洗涤	TG 缓冲液	3	18	2.8	2.52E-06
4 个 Ag 区的总持续时间				总能量(瓦特-时)	1.81E-05

[0163] 表 1 示出了通道中的 4 组与生物素间隔区交错的抗原条带的抗原图案化参数。根据迁移率和抗原-生物素的浓度, 负载步骤的持续时间和对应的负载电压针对所需的条带长度来调整。在涉及新溶液的任何步骤之前, 将孔用 TG 缓冲液洗涤 3 次。

[0164] 表 2. 测定操作步骤

[0165]

步骤	样品	持续时间	电压	电流	能量
----	----	------	----	----	----

[0166]

		(min)	(V)	(μ A)	(瓦特-时)
1 样品负载	2%血清样品	5	30	3.5	8.75E-06
样品负载	2%血清样品	5	30	3.5	8.75E-06
2 洗涤	TG 缓冲液	2.5	-30	-2.8	3.50E-06
32 次 AB (AF-568) 负载	40 μ g/ml 在 TG 中	3.5	-40	-5.3	1.24E-05
4 洗涤	TG 缓冲液	2.5	30	2.8	3.50E-06
洗涤	TG 缓冲液	2.5	30	2.8	3.50E-06
总持续时间 21 分钟				总能量 4.04E-05	
				(瓦特时)	

[0167] 表 2 示出了血清学测定参数。30 分钟测定时间中的 21 分钟为自动化的。5-10 分钟的手动干涉包括孔的样品负载和洗涤。在第一个步骤中,在 5 分钟负载结束时更新 3 μ l 样品(加入 TG 缓冲液中的 2%血清中的 HCV-c100p 人类抗体)。类似地,以 2.5 分钟时间间隔更新在最终阶段处(步骤 4)的洗涤缓冲液(TG)。在各洗涤步骤操作和二次抗体负载之前,将孔用 TG 缓冲液清洁 3 次。三个独立测定一起操作。关于检测,使用 AF-568 标记的抗人类山羊抗体。总能量消耗为 4.04×10^{-5} 瓦特-时。3x9V 电池保留 15 瓦特-时的能量,这将提供 3×10^5 种可能的测定。

[0168] 结果和讨论

[0169] 条码测定格式的制造取决于反应与电迁移之间的竞争

[0170] 进行实验以确定在一个入口和一个出口的微通道中完全电泳的异质免疫测定的可行性:微流体“条码”测定(图 2(A))。在这个异质免疫测定中,固定相为用于探测生物样本样品中的抗体的捕捉蛋白。所述制造和测定被设计为仅使用施加的电位来控制(例如,没有泵、阀)。当生物素化蛋白质电迁移通过通道填充性抗生蛋白链菌素-PA 凝胶时,图案化原则取决于存在的两个参数。即,所述生物素化捕捉蛋白将沿通道轴自由地电迁移(例如,在其中抗生蛋白链菌素-PA 凝胶已经用生物素达到饱和的情况下,无捕捉蛋白的图案化),或者所述生物素化捕捉蛋白将结合抗生蛋白链菌素,这导致蛋白质固定(图案化)(图 2(B))。本公开的多重条码图案化策略使用两种方法来建立与非反应性“间隔”区交错的图案化抗原区。间隔区通过抗生蛋白链菌素的生物素饱和来建立以“阻断”生物素化捕捉蛋白的后续固定。

[0171] 定量地,用于制造条码图案的不同行为可通过考虑电迁移与生物素-抗生蛋白链菌素结合之间的竞争来描述,所述竞争产生沿轴的蛋白质迁移(无结合)或凝胶中生物素化蛋白质的固定(结合)。为了描述行为方案,用公式表示达姆科勒数(Da),从而通过关系式 $Da = t_t/t_r = Lk_{on}b_m/\mu E$ 比较反应时间量程($t_r = k_{on}^{-1} * b_m^{-1}$)与电迁移时间量程($t_t = L/u_i$, 其中 $u_i = \mu E$)。此处, k_{on} 为缔合常数, b_m 为可用捕捉位点的浓度, L 为捕捉区的特征长度, u_i 为电迁移速度, μ 为电泳迁移率,并且 E 为电场。

[0172] 当 $Da < 1$ 时,反应比电迁移慢并且结合受到反应速度限制。在这个方案中,蛋白质通过抗生蛋白链菌素-PA 凝胶而电迁移较快(与结合动力学相比),以使得生物素化捕捉蛋白不会在变得固定的抗生蛋白链菌素结合位点附近花费足够时间。或者,可能有少数抗生蛋白链菌素结合位点可用($b_m \rightarrow 0$),以使得生物素化蛋白质沿通道的轴移动而不会变得固定。

[0173] 或者,在 $Da > 10$ 的情况下,结合反应受到质量输送限制,以使得生物素-抗生蛋白

链菌素反应动力学比电迁移时间量程快。因此,在质量输送受限的操作中,固定效率较高。对于条码图案化,在质量输送受限的方案中的操作导致生物素化蛋白质成功固定至抗生蛋白链菌素-PA 凝胶。预期 $1\text{Da}<10$ 的范围为两种方案之间的过渡区。

[0174] 交替的捕捉蛋白和间隔区的图案化

[0175] 单一入口/单一出口通道中的条码图案化使用一系列图案化/阻断步骤来建立间隔区和捕捉蛋白区(图 2(B) 和 2(C))。首先,为了建立间隔区,将抗生蛋白链菌素-PA 凝胶位点用高浓度的游离生物素 ($b_{\text{m}} \rightarrow 0$) (例如,未结合捕捉成员的生物素) 饱和。这些区域因此允许生物素化捕捉蛋白随后电迁移通过非反应性凝胶并且沿着通道轴向下。其次,为了图案化捕捉试剂的区域,所述装置在其中抗生蛋白链菌素过量存在于 PA 凝胶中的条件下操作。生物素化蛋白质电泳至通道中并且在凝胶基质中的开放抗生蛋白链菌素位点处固定。生物素化蛋白质以有序方式非共价结合抗生蛋白链菌素位点,在起点储槽处开始。当局部抗生蛋白链菌素变得饱和时或者当输送比结合反应更快时,生物素化蛋白质沿通道的电迁移(不固定)为可能的。通过交替的间隔区和捕捉蛋白图案化,单一入口/单一出口微通道支持在不同捕捉抗原之间包含间隔区的多重条码测定的制造。

[0176] 为了评定图案化策略,制造包括间隔区和作为捕捉蛋白的生物素化 c100p 的条码测定。图 4(A) 示出图案化时间过程。在引入生物素化 c100p 捕捉蛋白之前,在通道入口处制造小的间隔区,在图 4(A) 中鉴定为区 (i)。在间隔区图案化之后,逆转电位的极性并且将未结合的生物素电泳离开通道。在经由抽气进行储槽冲洗后,捕捉蛋白的图案化在生物素化 c100p 抗原电迁移至通道中的情况下开始。如图 4(A) 中所观察的,生物素化 c100p 迁移通过间隔区 (i),其中 c100p 的固定可忽略。当 c100p 进入未阻断的抗生蛋白链菌素-PA 凝胶区 (iii) 时,生物素化 c100p 捕捉蛋白变得固定并且开始形成区域 (ii)。制造条件据估计为 Da 约 60。

[0177] 如图 4(B) 中所示的,当捕捉蛋白浓度锋面沿通道轴迁移时;观察到在区域 (ii) 与 (iii) 之间的界面处的自锐行为,其中区域 (ii) 中的蛋白质浓度富集。所述自锐行为归因于在快速捕捉动力学下的有利吸附动力学。在可用位点饱和的情况下,预期固定蛋白浓度富集 n 倍,其中 n 为可用捕捉位点的浓度与待固定于凝胶中的生物素化蛋白质的浓度的比率。区域 (ii) 中的荧光信号的 3.4 ± 0.2 倍增加与给定的 $5\text{ }\mu\text{M}$ 生物素化 c100p 蛋白和 $4\text{ }\mu\text{M}$ 抗生蛋白链菌素的富集因子一致(即,提供 $16\text{ }\mu\text{M}$ 生物素捕捉位点, $16/5 = 3.2$)。电泳速度 u_i 为 $u_i = \mu_i E$,其中 μ_i 为蛋白质样品在给定的凝胶介质中的电泳迁移率并且 E 为施加电场。根据质量守恒,预期区域 (ii) 中移动边界的速度 v_i 随富集因子 n 的阶数降低,所得 $v_i = u_i/n = \mu_i E/n$ 。根据图 4(B),发现速度的降低为 3.5 ± 0.5 ,其与荧光信号中所观察到的增加 (3.4 ± 0.2) 一致。

[0178] 随着生物素化 c100p 捕捉蛋白从储槽持续电迁移,固定的捕捉蛋白区的边界沿微通道轴进一步扩散,从而产生固定捕捉蛋白的较长轴向外延 Δx_i (图 4(A))。这个距离 Δx_i 取决于扩张边界的速度 v_i 和注射持续时间 Δt_i ($\Delta x_i = v_i \Delta t_i = \mu_i E \Delta t_i/n$) 并且通过控制负载过程的持续时间或施加电场而针对各捕捉蛋白进行优化。例如,如图 4(A) 中在 10V 驱动 (40V/cm) 下所示的,在 140s 内实现以 $5\text{ }\mu\text{M}$ 负载的 c100p 抗原的 $800\text{ }\mu\text{m}$ 长的区域的图案化。为了进行比较,在 300V (1200V/cm) 驱动下在 3s 内实现相同图案化长度(参见图 4(C) 和图 5)。蛋白质图案化需要 100pg 的生物素化 c100p 蛋白。在图案化捕捉蛋白区之

后,通过施加反极性电场来使未结合的生物素化 c100p 抗原电泳离开微通道。重复所述过程以建立捕捉蛋白和间隔区的条码图案。

[0179] Da 在控制条码区之间的界面中的作用

[0180] 进行实验以研究电迁移与结合反应的相互影响,即在 Da 数值范围内评定最终图案化捕捉蛋白分布(图 4(C) 和 4(D))。使用轴向浓度分布的一阶导数的宽度 (4σ) 检查图案化锋面的锐度(图 4(C))。为了跨越 Da 数值范围(从 183 至 2.6),改变施加的电场 ($E = 17$ 至 1200V/cm),其中所有其它条件保持恒定,假定 $L = 35\text{ }\mu\text{m}$, $b_m = 16\text{ }\mu\text{M}$,并且 $k_{on} = 3 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。观察到轴向和横向抗原浓度分布的 Da 数值相关依赖性,如下文所述的。

[0181] 在其中预期反应动力学比电迁移更快的 $Da > 10$ 的方案 ($E < 140\text{V/cm}$) 中,观察到在浓度锋面的前缘处的尖锐边界。进行实验以测试 $10 > Da > 1$ 过渡方案 ($1200\text{V/cm} > E > 140\text{V/cm}$),其中输送时间变得与反应时间相当。在此过渡方案中,生物素化 c100p 浓度锋面展现比在 $Da > 10$ 方案中观察到的尖锐锋面更宽的轴向浓度分布。在 Da 约为 2.6 的方案中,在最高电场负载条件 (1200V/cm) 下,浓度锋面的宽度扩张到差不多 0.3mm 。在 Da 略大于 1 的情况下,预期所述反应展现质量输送受限的行为。换言之,对于这种系统,捕捉反应的时间量程 ($t_r = k_{on}^{-1} * b_m^{-1}$) 为 0.02s 。在 50V/cm 负载条件 (Da 约为 60) 下,生物素化 c100p 分子在固定之前仅进入抗生蛋白链菌素-PA 凝胶中 $0.6\text{ }\mu\text{m}$,而在 1200V/cm (Da 约为 2.6) 下,相同分子在固定之前迁移 $15\text{ }\mu\text{m}$ 。观察到宽度对于 $Da > 10$ ($E < 140\text{V/cm}$) 保持恒定 ($34 \pm 2\text{ }\mu\text{m}$) 并且随降低的 Da 数值增加。

[0182] 除了(轴向)较宽的前缘行为外,随降低的 Da (即,增加的电场) 还观察到横向抛物线轮廓,如图 4(C) 中所示的。虽然微流体系统由于有利的表面积-体积比而有效地耗散焦耳热量,但在极高电场下,热量产生可升高温度并且在通道中产生温度梯度。

[0183] 在区域 (ii) 的图案化期间,包括 30 秒至 60 秒孵育步骤 ($E = 0\text{V/cm}$, 无电迁移) 在浓度锋面的前缘处增强了在抗生蛋白链菌素-PA 凝胶中的生物素化捕捉蛋白固定。在孵育期过程中,区域 (ii) 中的未结合的生物素化 c100p 扩散至区域 (iii) 中,这导致根据反应与扩散之间的竞争变慢但尖锐的界面扩张。对于包括生物素和生物素化 c100p (2kDa) 的高扩散性物质,前缘扩张导致在 1min 孵育之后图案化区域延伸约 $50\text{ }\mu\text{m}$ 。

[0184] 验证条码免疫测定的选择性

[0185] 在已经确定图案化在仅具有一个入口和出口的单一通道中的捕捉蛋白和间隔区的能力的情况下,进行实验以开发用于针对三种 HCV 抗原 (core、c100p 和 NS3) 的人类血清抗体的条码测定。

[0186] 为了产生选择性测定,各固定抗原区与对应抗体靶标特异性地相互作用,所述对应抗体靶标与脱靶抗体具有最小交叉反应性或非特异性相互作用。为了了解交叉反应性的潜力,表征所述测定的两个特定方面:试剂的交叉反应性和条码测定格式所固有的交叉反应性。

[0187] 首先,进行实验以确定试剂之间非特异性相互作用的可能性。为此,各捕捉蛋白固定于三个不同通道之一中。各固定的捕捉蛋白由三种抗体靶标中的每一者个别地激发(总共 9 个通道)。图 6(A) 示出三个通道中的抗体信号,各通道容纳一个固定 c100p 捕捉蛋白区。靶标抗体之一经电泳负载至各通道中: $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ NS3、C100p、Core (AF568)。

[0188] 如图 6(A) 中所示的,观察到来自脱靶抗体 (NS3、core) 的可忽略的信号,但观察

到来自 C100p 抗体的显著信号 ($\text{SNR} = 70$)。(此数据展示在靶标结合区中的不均匀抗体固定,在下一章节中讨论。)类似地,抵靠着用 NS3 和 core 捕捉蛋白个别地图案化的通道负载所有三种抗体。图 6(B) 示出具有可忽略的脱靶交叉反应性的 c100p 和 NS3 捕捉蛋白。然而,Core 抗原展现 c100p ($\text{SNR} = 38$) 和 NS3 ($\text{SNR} = 12$) 抗体的一些非特异性捕捉连同预期的 core 抗体捕捉 ($\text{SNR} > 200$)。在某些实施方案中,在特定缓冲条件下,Core 抗原展现与来自 Fc γ 片段的一般人类 IgG 的非特异性相互作用。

[0189] 其次,进行实验以确定单一通道条码测定格式所固有的交叉反应性;即,在装置制造期间在各区域中超过一种捕捉蛋白的图案化的可能性。基于图案化原理,最接近入口的通道区域首先用捕捉蛋白图案化,以使得用于图案化下游区域的抗原不会“共同图案化”已经图案化的近入口区域。换言之,新捕捉蛋白可电迁移通过所有先前图案化的区域而不被固定。图案化中的特异性可有助于图案化单一入口/单一出口通道中的多种捕捉蛋白。

[0190] 为了测试图案化特异性,首先在单一通道中固定 NS3,并且然后固定 C100p 抗原(图 6(C))。因而,NS3 位于最接近通道入口处。在这种多重捕捉蛋白测定的图案化之后,NS3Ab 从右侧负载至通道中。观察到 NS3 抗体捕捉 ($\text{SNR} = 30$) 与 NS3 共同定位,这表明 C100p 区域中的所有抗原蛋白链菌素结合位点均在测定开始之前用生物素化 C100p 或生物素饱和。假定这一观察结果,随后将 c100p 抗体负载至通道以确认 C100p 区域的存在和位置。在这种 C100p 测试中,仅在 c100p 区域中观察到抗体捕捉 ($\text{SNR} = 145$)。

[0191] 为了进一步调查捕捉蛋白的不需要的共同图案化的潜力,重复所述测定(在新通道中),但逆转捕捉蛋白的固定顺序以及抗体负载的顺序。当负载 c100p 抗体时,c100p 抗体以可忽略的相互作用穿过 NS3 区域,并且 c100p 抗体结合 C100p 区域 ($\text{SNR} = 172$) 中。类似地,观察到关于 NS3 抗体并无脱靶结合行为,其中捕捉仅定位于 NS3 区域 ($\text{SNR} = 41$)。因此,未观察到非特异性捕捉,从而允许单一、独特捕捉蛋白在单一笔直微通道的空间独特区域中的图案化。

[0192] 关于 NS3 和 c100p 读数观察到不同抗体信号(图 6(C) 和图 6(D))。读数行为的此类差异可起因于多种来源。特异性差异可起因于:(1) 来自生物素化反应的残留的游离生物素,其可降低抗原固定效率。如果未结合的生物素是在溶液中,那么一些位点可由游离生物素填充。此效应可在其中蛋白质迁移率比生物素迁移率更低的情况下变得显著。较低的固定抗原浓度可导致给定的抗原条带中较低且较分散的抗体捕捉;(2) 不同抗体抗原对之间的结合亲和力的固有差异也可促成较低或分散的抗体信号。不是主要在区域入口处捕捉抗体(例如,c100p 情况),而是较低亲和力可导致在整个捕捉区域上方的分散捕捉扩散(例如,NS3 情况);(3) 即使抗原抗体对的亲和力类似,生物素或荧光团缀合也可阻断活性抗原表位,从而导致表观亲和力降低;(4) c100p 为 2kDa 肽,而 NS3 的分子量为 45kDa。NS3 的相对较大尺寸可在抗原蛋白链菌素位点中的固定期间或在靶标抗体-抗原相互作用期间触发位阻。然而,对于所测试的所有抗原抗体对,靶标抗体检测在临床相关范围 ($\text{ng/ml} - \mu\text{g/ml}$) 内为可能的。

[0193] 最大化使用条码免疫测定的抗体检测

[0194] 抗体检测可部分地取决于递送至捕捉蛋白区的抗体的量和所述区域的捕捉效率。一方面,增加施加的电场强度可增加在设定的持续时间内由捕捉蛋白探测的靶标抗体的总质量。另一方面,根据 Da 方案,增加电场可减少捕捉效率。为了评定这种相互影响,表征针

对电场条件范围在设定的 10 分钟长检测步骤内的抗体检测。与图案化方案一样,条码免疫测定中的抗体检测取决于输送和反应(现在为呈抗原-抗体结合形式的反应)。

[0195] 图 7(A) 示出在施加的电场范围内在荧光标记的 c100p 抗体 (AF-568 标记的 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 6.5 nM) 的 10 分钟负载之后的抗体检测信号。此处, c100p 捕捉蛋白固定于 12 个不同通道中 ($1\text{ }\mu\text{A}$, 9 V)。抗体信号随增加的电场而增加直至 500 V/cm (125 V , Da 约为 6.7) 为止, 如图 7(B) 中所示的。在此方案中, 反应受到质量输送限制, 以使得信号受到递送至抗原位点的抗体的速率限制。换言之, 预期几乎所有递送至结合位点的抗体质量均被捕捉。关于我们所估计的参数 ($L = 100\text{ }\mu\text{m}$, $b_m = 16\text{ }\mu\text{M}$, $k_{on} = 2 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$, $\mu_i = 1 \times 10^{-5}\text{ cm}^2\text{ V}^{-1}\text{ s}^{-1}$), 当 $E < 320\text{ V/cm}$ 时, Da 数值保持大于 10。在 $E > 320\text{ V/cm}$ 的情况下, 操作方案跨越 $10 > \text{Da} > 1$, 以使得虽然抗体递送增加, 但捕捉效率的下降限制总抗体捕捉。在这种方案中, 反应时间变得与捕捉区域中花费的时间相当。作为额外的考虑因素, 当负载时间超过约 10min 时, 在检测阶段的早期阶段中捕捉的抗体可与捕捉蛋白分离 (k_{off} 约为 10^{-3} – 10^{-4} s^{-1}) 并且在高场下沿着通道向下电迁移。然而, 即使在 450 V 驱动下在 1800 V/cm 下, 也获得明显的信号 ($\text{SNR} > 1000$)。在此高电压下, 观察到凝胶变形 (图 9)。总之, 即使在高场下 (超出装置的操作限制), 也观察到高效抗体捕捉。

[0196] 在图 7(B) 中观察到的有效抗体捕捉归因于利用抗体靶标通过 3D 凝胶基质的定向电迁移, 所述凝胶基质包括高密度的抗原捕捉位点。首先, 所述凝胶基质支持每个给定长度的微通道区段中比用捕捉蛋白官能化的通道壁多 2–3 个数量级的捕捉试剂。其次, 与通道壁官能化方法相比, 在抗体靶标与固定于 3D 凝胶中的抗原之间的扩散距离显著降低。在图 6(A)、图 6(C) 和图 7(A) 中所示的靶标结合区中由不均匀抗体信号验证高度有效的抗体捕捉。从右侧方向递送, 进入抗原区中的抗体在抗原区开始处立即被捕捉, 从而导致朝向抗原区的边缘的信号峰。

[0197] 针对血清学分析验证的条码免疫测定

[0198] 如图 7(C) 中所示的, 微流体条码免疫测定用于针对单一 HCV 抗原 c100p 血清学检测人类抗体。为了在复合样品上测试微流体测定, 将未标记的针对 HCV-c100p 的人类抗体添加至 2% 健康人类血清 (50 倍稀释于 TG 缓冲液中) 中。例如, 1%–2% 为用于蛋白质印迹和 HCV-RIBA 的典型血清稀释范围。如图 7(C) 中所示的, 使用夹心检测格式, 其中荧光标记 (AF-568) 的抗人类山羊抗体作为读数。总测定运行时间为 30 分钟, 其中进行一式三份测定。以电泳方式进行所有测定步骤 (参见表 2)。图 7(C) 示出来自所分析的临床相关效价 (在 2% 人类血清中的 5 ng/ml – $10\text{ }\mu\text{g/ml}$) 的剂量反应曲线。获得可检测的信号, 直至 5 ng/ml (33 pM)。检测下限 (LOD) 被确定为 25 ng/ml (165 pM), 其中 $\text{SNR} = 10$ 。跨越差不多 3 个数量级的浓度范围, 所述测定的线性动态范围为 33 pM – 13.5 nM (5 ng/ml – $2\text{ }\mu\text{g/ml}$)。就本文而言, 使用 HCV-RIBA 测定时针对 c100p 抗体的 LOD 据报告为 25 ng/ml 。将酶促扩增并入微流体条码测定中可有助于进一步降低 LOD。所述微流体条码测定使用 10min 抗体检测步骤。

[0199] 进行实验以开发用于 HIV 和 HCV 抗体的多重血清学测定。将三种抗原和交错的生物素间隔区图案化: 蛋白 L (负载对照)、HCV-c100p 和 HIV-p24。包括蛋白 L 区以捕捉血清 IgG 并且如果成功负载血清, 那么产生信号。作为模型系统, 将 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ HCV-c100p (人类) 和 HIV-p24 (小鼠) 抗体添加至在 TG 缓冲液中稀释的 2% 人类血清中。检测抗体混合物由 AF-568 标记的抗人类和抗小鼠 IgG 组成。图 10 示出两个微通道 (标记为 Ch1 和 Ch2) 的

荧光显微照片和对应荧光强度轮廓。通道 1 测定 2% 血清中的 HCV-HIV 抗体混合物并且通道 2 测定不含靶标抗体的 2% 人类血清。在通道 1 中, c100p 区域捕捉 HCV-c100p 抗体并且 HIV-p24 区捕捉 HIV-p24 抗体。在两个通道中, 蛋白 L 区均成功地检测 IgG, 这指示成功的血清负载。

[0200] 结论

[0201] 作为快速、低资源验证诊断学的基础, 提供一种容纳多重异质免疫测定格式的简单单一笔直微通道。在上文中讨论了测定设计、测定制造和测定操作说明书。在某些实施方案中, 所述装置包括‘单一入口、单一出口’微通道以简化装置操作。在某些实施方案中, 使用完全电泳方法, 其中不使用泵或阀来提供大部分流体流动。

[0202] 在某些实施方案中, 关于测定制造, 提供一种新电泳图案化策略, 其使用微通道填充性抗生蛋白链菌素涂抹的聚丙烯酰胺凝胶作为固定骨架。游离生物素或生物素化捕捉蛋白的依次引入会在通道中产生“间隔区-捕捉区-间隔区”条码图案。进行实验以确定在 Da 数值的宽范围内的图案化过程。抗体检测通过在 Da 数值范围内检测抗原-抗体相互作用来表征。

[0203] 在测定操作说明书中, 所述格式为由电子作用(单一电极对), 其中在低施加电压下进行电泳。低电压和低功率操作有助于制造便携式装置, 其不会取决于高电压电源、泵、注射器或阀, 因此使得所述装置适合于近患者操作。验证所述多重微流体条码测定以检测对 HCV-c100p、HCV-NS3 和 HIV-I p24 抗原具有特异性的免疫球蛋白。所述测定在 30 分钟内以相当于 6+ 小时 RIBA 3.0 测定的分析灵敏性完成。性能进展可归因于使用通过官能化 3D 聚丙烯酰胺凝胶的定向电迁移。

[0204] 在某些实施方案中, 所述单一通道微流体条码测定可与独立的电子仪器整合以提供自动化且便携式验证诊断平台。所述微流体装置的实施方案具有短测定运行时间和高灵敏性。在某些实施方案中, 大规模多重型式的所述平台可有助于用于血库中和其中需要高通量(快速且多重)读数的医药应用中的筛选。

[0205] 虽然出于清晰理解的目的已经通过说明和实施例详细地描述了以上实施方案, 但本领域的普通技术人员根据本公开的教义显而易见的是, 在不脱离所附权利要求书的精神或范围的情况下可以对以上实施方案做出某些变化和修改。还应理解, 本文所用的术语为出于仅描述特定实施方案的目的, 并且不意图为限制性的, 因为本发明的范围将仅受所附权利要求书限制。

[0206] 在提供值的范围的情况下, 应理解本发明内涵盖这一范围的上限与下限之间的各插入值, 准确到下限的单位的十分之一(除非上下文另外清楚指示), 以及这一所述范围内的任何其它所述值或插入值。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在这些较小范围内并且也涵盖于本发明内, 从属于所述范围内的任何特定排除的极限值。在所述范围包括所述极限值中的一个或两个的情况下, 本发明中还包括排除那些所包括的极限值中的任一个或两个的范围。

[0207] 本说明书中所引用的所有公布和专利均以引用的方式并入本文中, 就如同各个别公布或专利特定地且个别地被指示为以引用的方式并入, 并且以引用的方式并入本文中以公开并且描述引用所述公布时所涉及的方法和/或材料。对任何公布的引用都是针对其在申请日之前的公开内容并且不应被解释为承认本发明由于先前发明而无权先于所述公布。

此外,所提供的公布日期可能不同于可需要独立确认的实际公开日期。

[0208] 应注意,如本文中和所附权利要求书中所用的,除非上下文另外清楚指示,否则单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括多个提及物。此外应注意,可起草权利要求书以排除任何可选要素。因而,对于使用如“唯一”、“仅”等与权利要求书要素的叙述相关的排他性术语或使用“负面”限制来说,这一陈述意图起到前提基础的作用。

[0209] 本领域技术人员在阅读本公开时将显而易见的是,本文所描述且说明的各个个别实施方案具有个别组分和特征,这些组分和特征可容易地与任何其它若干实施方案的特征分离或组合而不偏离本发明的范围或精神。任何所陈述方法均可以所陈述事件的顺序或以逻辑上可能的任何其它顺序进行。

[0210] 因此,以上仅仅说明本发明的原理。应了解,本领域的技术人员将能够设想各种安排,虽然这些安排未在本文中明确地描述或展示,但是它们体现了本发明的原理并且包括在其精神和范围内。此外,本文所引用的所有实施例和条件语言主要意图帮助读者理解本发明的原理和由发明人提供的促进技术的构想,并且应解释为不对此类特别引用的实施例和条件构成限制。此外,本文中引述本发明的原理、方面和实施方案以及其具体实施例的所有陈述均意图涵盖其结构等效物和功能等效物。此外,希望此类等效物包括目前已知的等效物和未来开发出来的等效物,即不管结构如何,所开发的执行相同功能的任何元件。因此,本发明的范围不意图限于本文所展示和描述的示例性实施方案。相反,本发明的范围和精神由所附权利要求书体现。

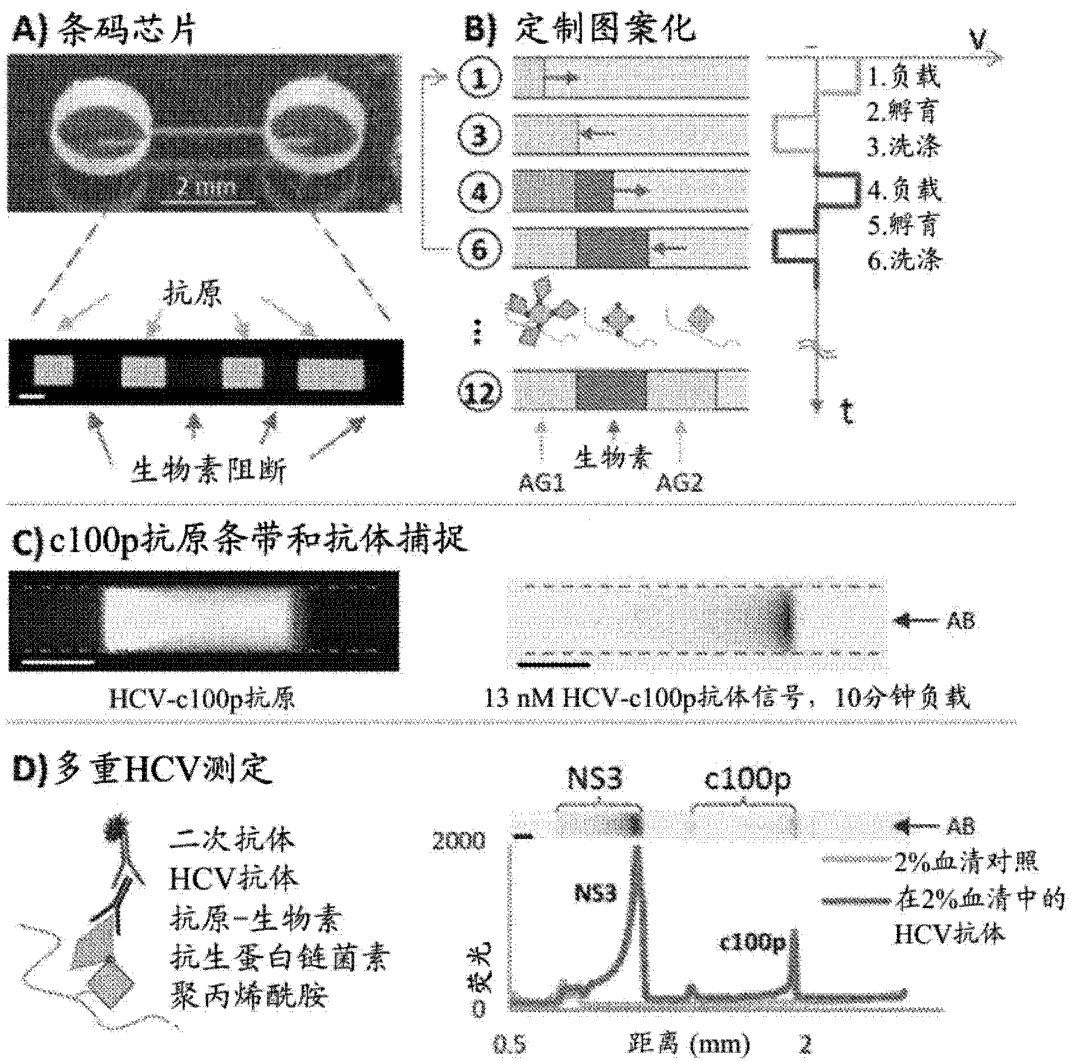


图 1

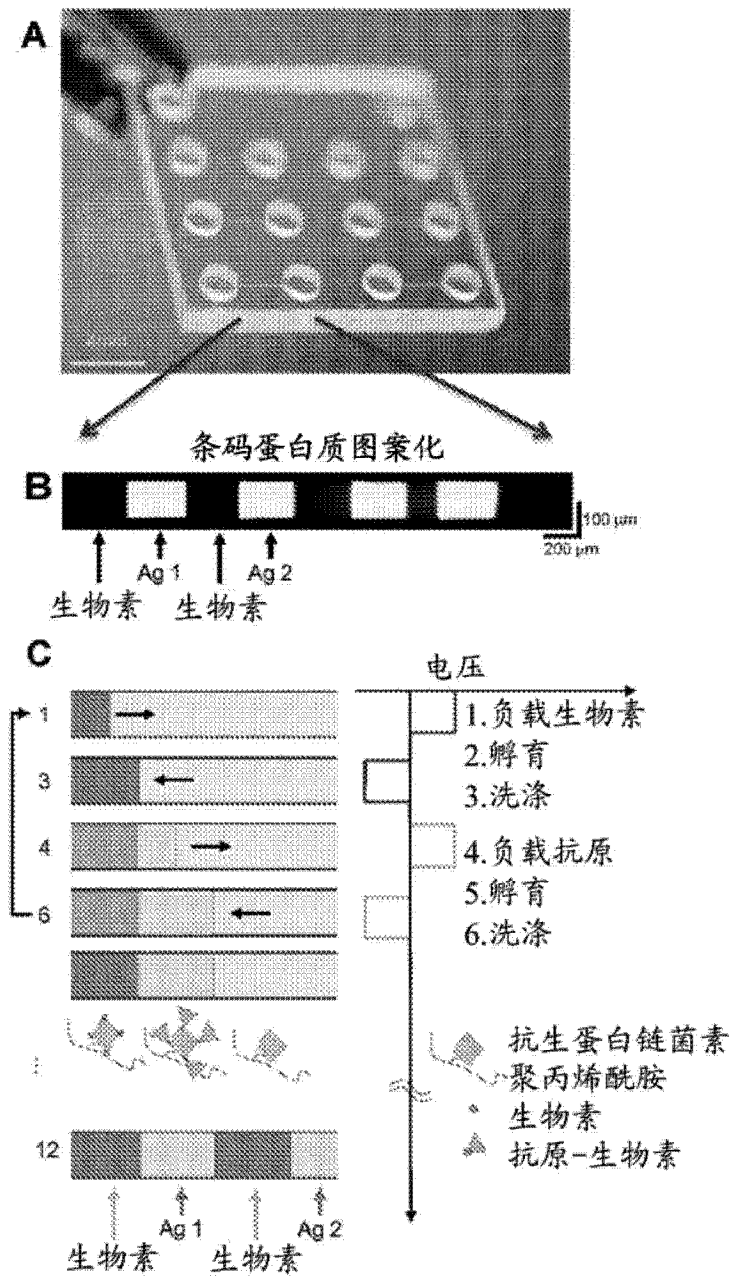


图 2

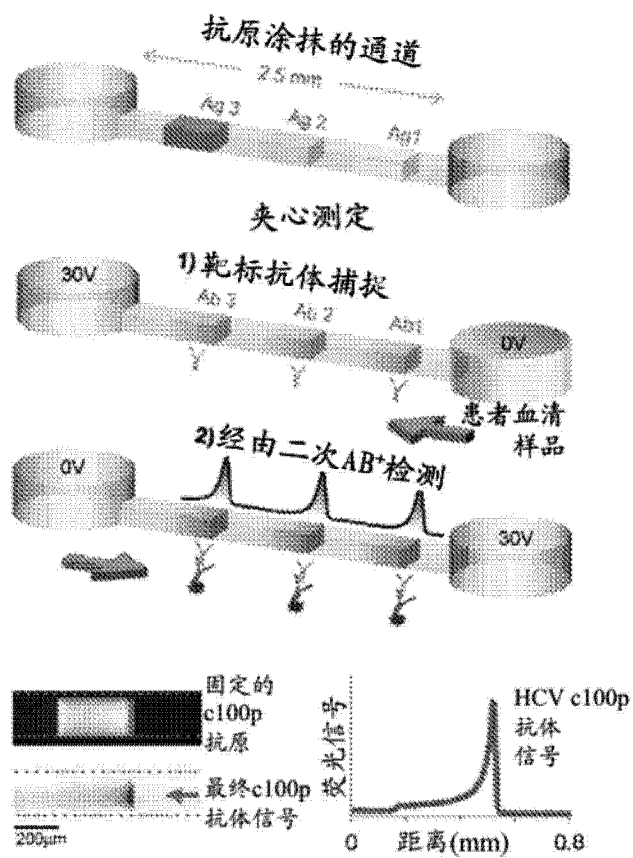


图 3

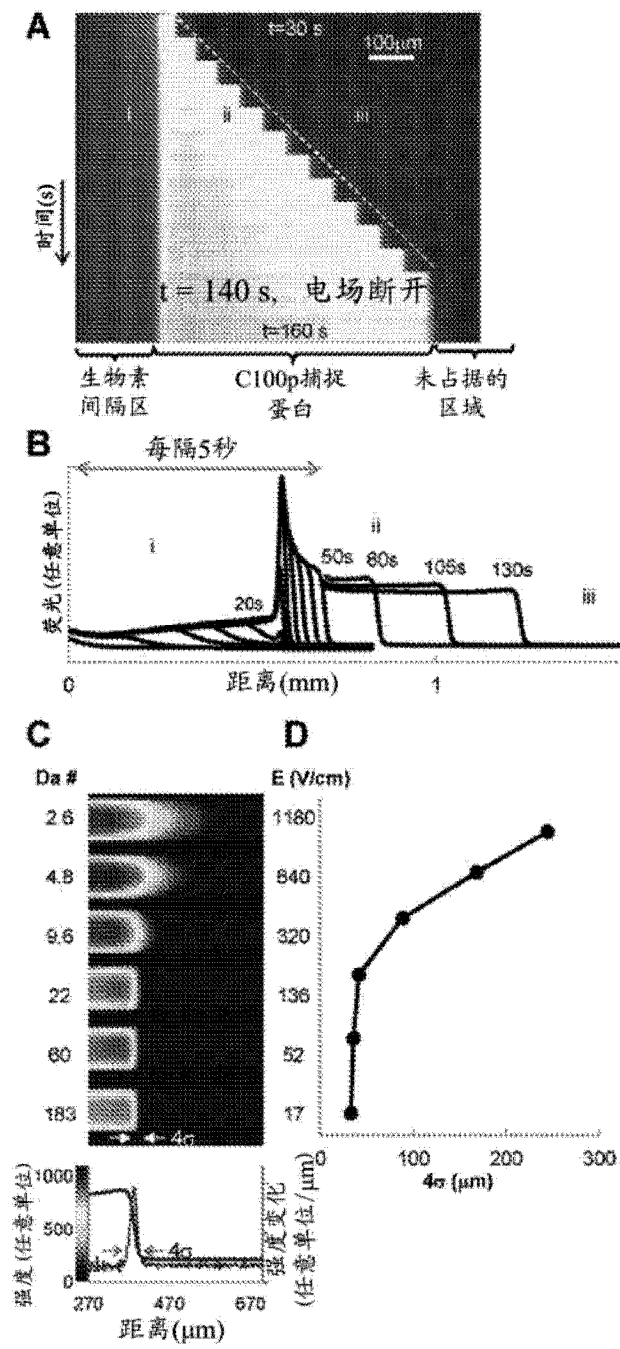


图 4

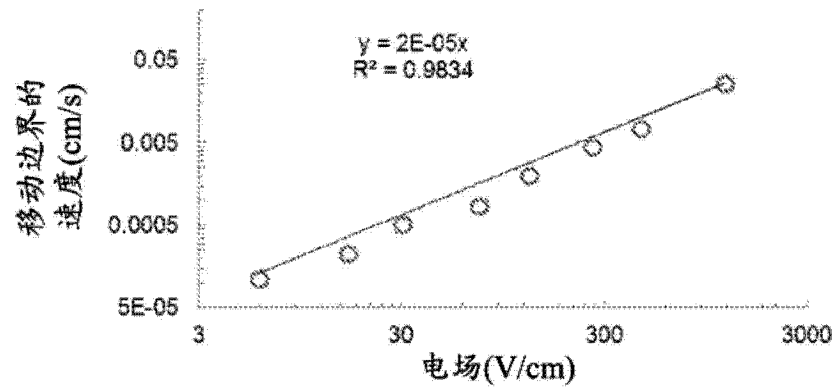


图 5

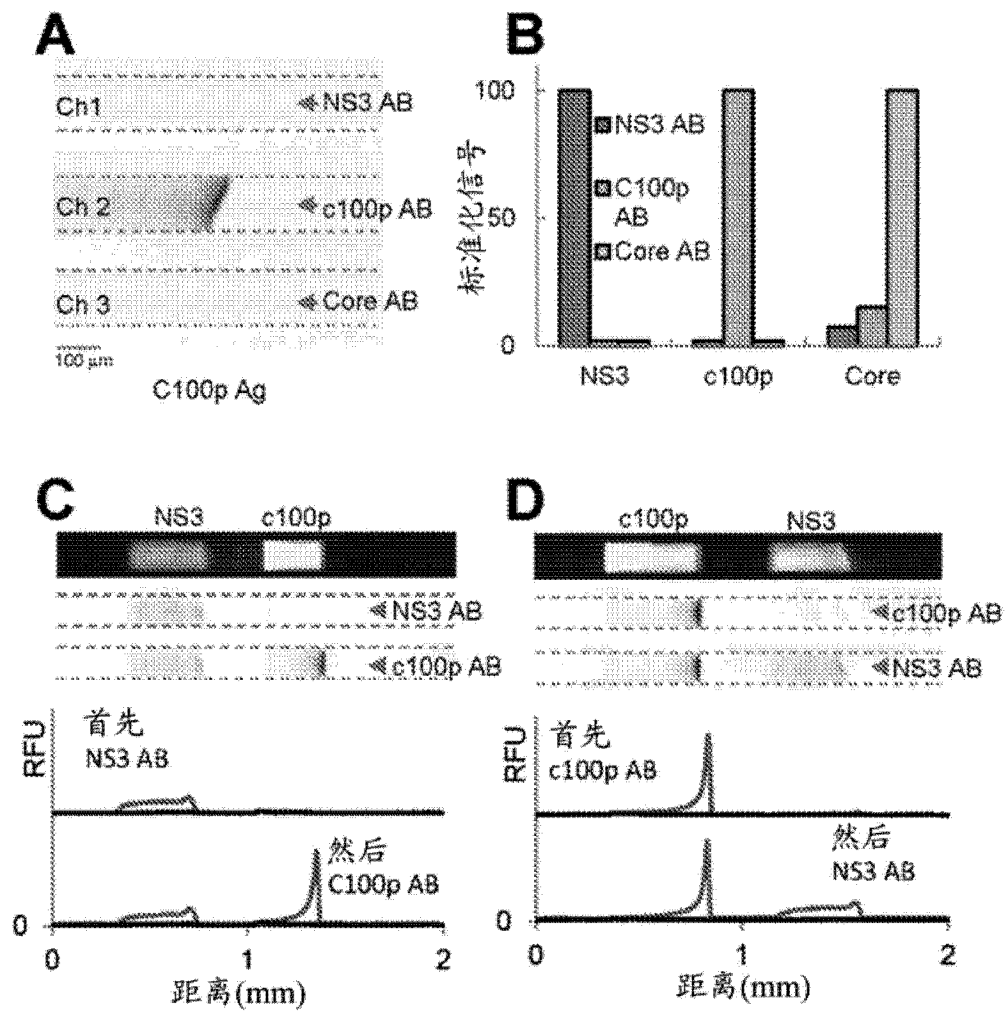


图 6

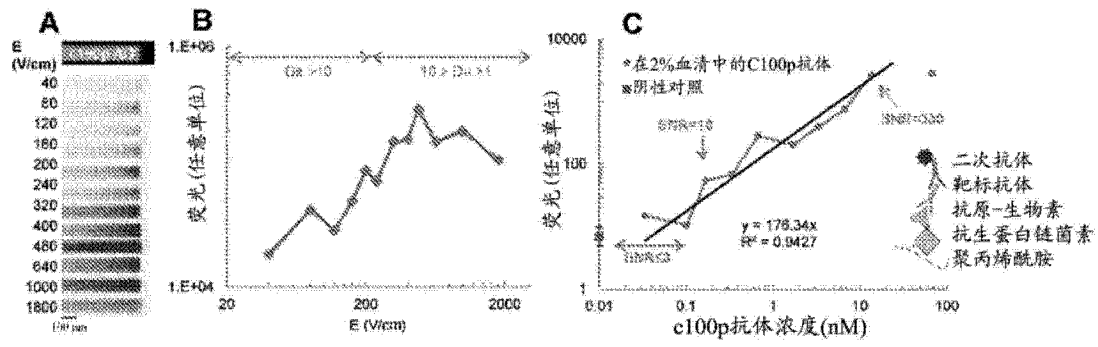


图 7

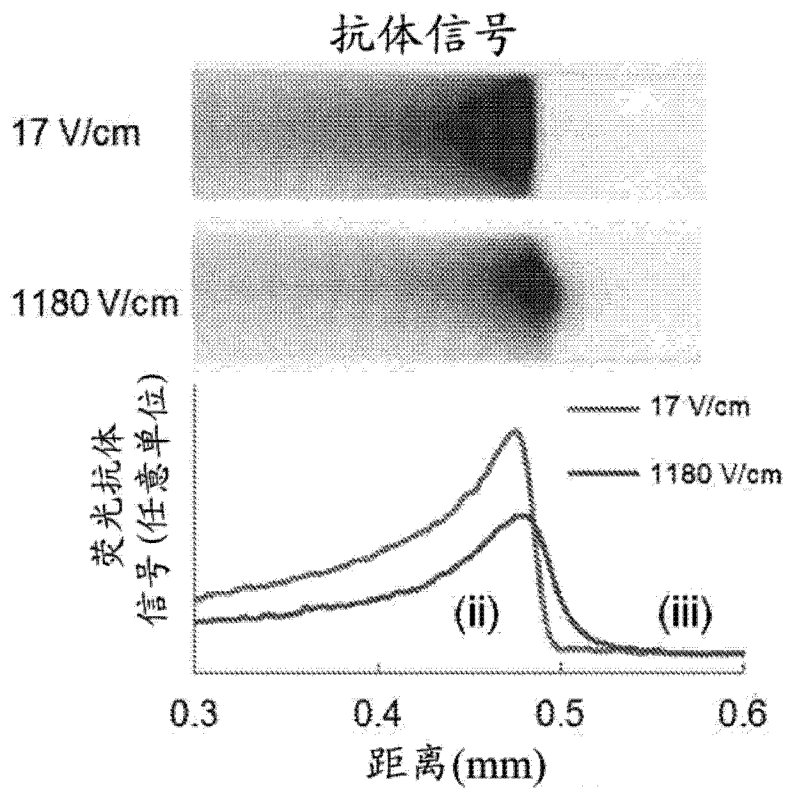


图 8

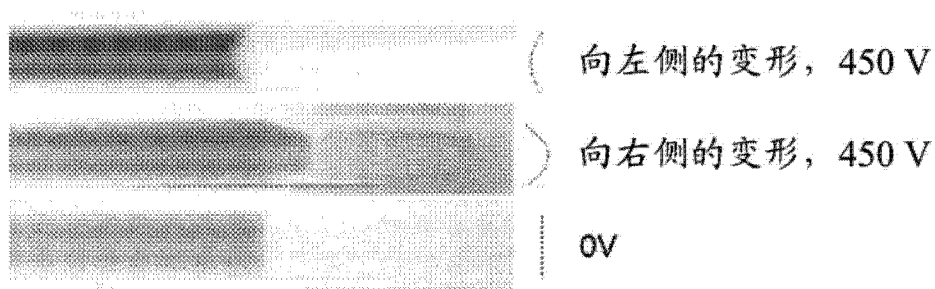


图 9

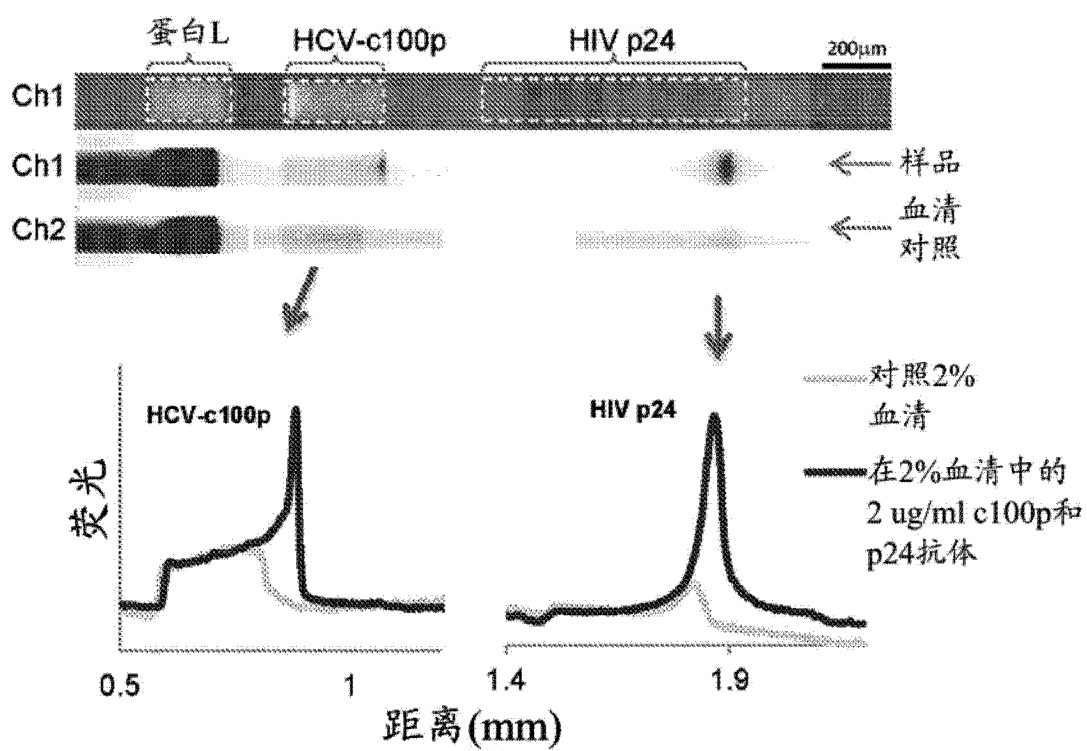


图 10

专利名称(译)	电泳条码测定装置及其制造和使用方法		
公开(公告)号	CN104919323A	公开(公告)日	2015-09-16
申请号	CN201380070020.X	申请日	2013-11-11
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
[标]发明人	M库尔赛德阿拉兹 阿克瓦西A阿波里 艾米E赫尔		
发明人	M·库尔赛德·阿拉兹 阿克瓦西·A·阿波里 艾米·E·赫尔		
IPC分类号	G01N35/08 G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	B01L2300/0825 B01L2300/087 G01N33/558 B01L3/5027 B01L2400/0487 B01L2300/0636 B01L2400/0415 B01L2400/0421 B01L3/502707 G01N33/54366 G01N27/447 G01N33/559 G01N2333/186		
代理人(译)	张淑珍		
优先权	61/725403 2012-11-12 US 61/783942 2013-03-14 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于确定分析物是否存在于样品中的微流体装置。所述微流体装置包括具有聚合物介质的狭长流动通道，其中所述聚合物介质包括具有特异性结合第一分析物的第一固定捕捉成员的第一分析物检测域和具有特异性结合第二分析物的第二固定捕捉成员的第二分析物检测域。还提供了其中可使用本发明微流体装置的方法、系统和试剂盒，以及其制造方法。

