



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105378477 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 02

(21) 申请号 201480026770. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 11

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/483(2006. 01)

61/775860 2013. 03. 11 US

C12N 15/11(2006. 01)

61/778727 2013. 03. 13 US

C12Q 1/68(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/022948 2014. 03. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/164594 EN 2014. 10. 09

(71) 申请人 梅索磅秤技术有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 E. N. 格勒策尔 S. 库马

P. 奥贝罗瓦 G. 西加尔

M. 齐安斯基

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 罗文锋 杨思捷

权利要求书7页 说明书52页

序列表13页 附图19页

(54) 发明名称

用于进行多路测定法的改进方法

(57) 摘要

本发明涉及用于进行固相结合测定法的方法。一个实例是具有改进的分析物特异性的测定方法,其中特异性受限于存在的非特异性结合相互作用。

1. 一种对多种目标分析物进行多路结合测定法的方法,所述方法包括
 - (a) 在一个或多个步骤中,将下列成分混合:
 - (i) 包含第一目标分析物和第二目标分析物的样品,
 - (ii) 固定在第一结合域上的第一靶向剂,
 - (iii) 与连接剂连接的第一靶向剂互补物,其中所述第一靶向剂互补物是第一靶向剂的结合配偶体,
 - (iv) 与补充连接剂连接的第一结合试剂,其中所述第一结合试剂是第一分析物的结合配偶体,
 - (v) 固定在第二结合域的第二靶向剂,
 - (vi) 与连接剂连接的第二靶向剂互补物,其中所述第二靶向剂互补物是第二靶向剂的结合配偶体,
 - (vii) 与补充连接剂连接的第二结合试剂,其中所述第二结合试剂是第二分析物的结合配偶体,和
 - (viii) 任选至少两份的桥接剂,其中,
如果桥接剂省略,则各连接剂是补充连接剂的结合配偶体,或
如果包括桥接剂,则桥接剂具有用于连接剂之一的第一结合部位和用于补充连接剂之一的其它结合部位;
 - (b) 形成
 - (i) 在第一结合域上的包含第一靶向剂、第一靶向剂互补物、第一结合试剂和第一分析物的第一结合复合物,和
 - (ii) 在第二结合域上的包含第二靶向剂、第二靶向剂互补物、第二结合试剂和第二分析物的第二结合复合物,和
 - (c) 分别测量第一和第二结合域上的第一和第二分析物的量。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述样品含有一种或多种其它的目标分析物,对于各种其它的目标分析物,混合步骤 (a) 还包括
在一个或多个步骤中,将 (ix) 固定在其它结合域上的其它靶向剂、与连接剂连接的其它靶向剂互补物和与补充连接剂连接的其它结合试剂和 (x) 在其它结合域上的包含其它靶向剂、其它靶向剂互补物、其它结合试剂和其它分析物的其它结合复合物混合;
所述形成步骤 (b) 还包括形成 (iii) 在其它结合域上的包含其它靶向剂、其它靶向剂互补物、其它结合试剂和其它分析物的其它结合复合物;和
步骤 (c) 中的测量还包括测量其它结合域上的其它分析物的量。
3. 权利要求 1 的方法,其中
所述第一靶向剂互补物和所述第一结合试剂作为预先结合的第一靶向复合物提供,所述第一靶向复合物包含通过连接剂和补充连接剂之间的结合相互作用连接的第一靶向剂互补物和第一结合试剂;和
所述第二靶向剂互补物和所述第二结合试剂作为预先结合的第二靶向复合物提供,所述第二靶向复合物包含通过连接剂和补充连接剂之间的结合相互作用连接的第二靶向剂互补物和第二结合试剂。

4. 权利要求 3 的方法,其中

提供与固定在第一结合域上的第一靶向剂预先结合的第一靶向复合物;和
提供与固定在第二结合域上的第二靶向剂预先结合的第二靶向复合物。

5. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (a) 包括以下步骤:

在第一体积的液体中,将所述第一靶向剂互补物、所述第一结合试剂和如使用的话所述桥接试剂混合,并且使所述第一靶向剂互补物和所述第一结合试剂通过它们所连接的连接剂连接,形成第一靶向复合物;和

在第二体积的液体中,将所述第二靶向剂互补物、所述第二结合试剂和如使用的话所述桥接试剂混合,使所述第二靶向剂复合物互补物和所述第二结合试剂通过它们所连接的连接剂连接,形成第二靶向复合物。

6. 权利要求 5 的方法,其中步骤 (a) 还包括以下步骤:

将所述第一和第二靶向复合物混合,

使所述第一和第二靶向复合物的混合物与所述第一和第二结合域接触,和

使所述第一靶向复合物与所述第一结合域上的所述第一靶向剂结合,并使所述第二靶向复合物与所述第二结合域上的所述第二靶向剂结合。

7. 权利要求 3 或 5 中任一项的方法,其中混合步骤 (a) 还包括:

使所述第一和第二靶向复合物与样品混合形成其混合物,

使所述第一分析物与所述第一靶向复合物中的第一结合试剂结合,并使所述第二分析物与所述第二靶向复合物中的第二结合试剂结合,

使分别与第一和第二分析物结合的第一和第二靶向复合物的混合物与第一和第二结合域接触;和

使所述第一靶向复合物与第一结合域上的第一靶向剂结合,并使所述第二靶向复合物与第二结合域上的第二靶向剂结合。

8. 权利要求 7 的方法,其中在使所述第一和第二靶向复合物与所述第一和第二结合域接触之前,使所述第一和第二靶向复合物与所述样品混合。

9. 权利要求 7 的方法,其中在使所述第一和第二靶向复合物与所述第一和第二结合域接触后,使所述第一和第二靶向复合物与所述样品混合。

10. 权利要求 7 的方法,其中使所述第一和第二靶向复合物与所述样品的混合和与所述第一和第二结合域的接触同时进行。

11. 权利要求 4 的方法,其中步骤 (a) 还包括以下步骤:

使在所述第一和第二结合域上的所述第一和第二靶向复合物与所述样品接触,

使所述第一分析物与所述第一靶向复合物中的所述第一结合试剂结合,并使所述第二分析物与所述第二靶向复合物中的所述第二结合试剂结合。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述桥接剂省略,并且所述连接剂通过 (a) 硫醇基和马来酰亚胺基或碘乙酰胺基; (b) 醛和酰肼;或 (c) 炔和叠氮化物之间的结合相互作用与所述补充连接剂结合。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述桥接剂省略,并且 (a) 所述连接剂是生物素,所述补充连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白; (b) 所述连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白,所述补充连接剂是生物素; (c) 所述连接剂是肽,所述补充连接剂是抗肽抗体;或 (d) 所

述连接剂是抗肽抗体,所述补充连接剂是肽。

14. 权利要求 1 的方法,其中包括所述桥接剂,所述桥接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白,所述连接剂和所述补充连接剂各自是生物素。

15. 权利要求 1 的方法,其中所述第一和第二结合试剂各自包含能够分别与所述第一和第二分析物结合的受体、配体、抗体、半抗原、抗原、表位、模拟表位、适体或插入剂。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述第一和第二结合试剂是抗原。

17. 权利要求 1 的方法,其中所述第一和第二结合试剂是抗体。

18. 权利要求 1 的方法,其中所述方法包括进行夹心结合测定法。

19. 权利要求 1 的方法,其中在步骤 (a) 中混合的成分还包含结合所述第一分析物的第一检测试剂和结合所述第二分析物的第二检测试剂,步骤 (b) 中形成的所述第一和第二复合物还分别包含所述第一和第二检测试剂。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述第一和第二检测试剂各自包含可检测标记。

21. 权利要求 19 的方法,其中所述第一和第二结合试剂及所述第一和第二检测试剂是抗体。

22. 权利要求 19 的方法,其中所述第一和第二检测试剂可与所述第一或第二分析物结合。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述第一和第二检测试剂各自包含可检测标记。

24. 权利要求 22 的方法,其中所述第一和第二结合试剂是抗原,所述分析物是针对抗原的抗体,且所述检测试剂包含抗免疫球蛋白抗体、A 蛋白、G 蛋白或 L 蛋白。

25. 权利要求 1 的方法,其中所述方法包括进行竞争结合测定法。

26. 权利要求 1 的方法,其中在步骤 (a) 中混合的成分还包含 (xvi) 与所述第一分析物竞争结合所述第一结合试剂的第一检测试剂,和 (xvii) 与所述第二分析物竞争结合所述第二结合试剂的第二检测试剂。

27. 权利要求 25 的方法,其中所述第一和第二检测试剂包含可检测标记。

28. 权利要求 25 的方法,其中所述第一和第二结合试剂是抗体,所述第一和第二检测试剂是分析物的结构类似物。

29. 权利要求 19 或 25 中任一项的方法,其中所述测量步骤 (c) 还包括通过光学吸光度、荧光、磷光、化学发光、电化学发光、光散射或磁性测量所述第一和第二可检测标记的存在情况。

30. 权利要求 25 的方法,其中所述第一和第二可检测标记是电化学发光标记,所述测量步骤 (c) 还包括测量电化学发光信号,并且使该信号与所述样品中的第一和第二分析物的量关联。

31. 权利要求 23 的方法,其中将所述第一和第二结合域定位于电极上,并且所述测量步骤还包括将电压波形施加于电极上以产生电化学发光。

32. 权利要求 1 的方法,其中所述第一和第二结合域的每一个是结合域阵列的组分。

33. 权利要求 32 的方法,其中所述阵列位于多孔板的孔中。

34. 权利要求 1 的方法,其中所述第一和第二结合域的每一个各自位于一个或多个微粒的表面。

35. 权利要求 34 的方法,其中对所述粒子编码,以允许识别特定粒子并将所述第一和

第二结合域区分开来。

36. 权利要求 1 或 2 中任一项的方法, 其中 (i) 所述第一靶向剂和第一靶向剂互补物和 (ii) 所述第二靶向剂和第二靶向剂互补物各自包含互补寡核苷酸对。

37. 权利要求 36 的方法, 其中所述第一和第二结合试剂各自是抗体。

38. 权利要求 36 的方法, 其中位于所述第一和第二结合域的每一个上的互补寡核苷酸对不同, 并选自:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtettaa (SEQ ID NO: 15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttcacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaaggga (SEQ ID NO: 50) |

39. 权利要求 38 的方法, 其中有至少 7 个结合域。

40. 权利要求 38 的方法, 其中有至少 10 个结合域。

41. 权利要求 38 的方法, 其中有至少 16 个结合域。

42. 权利要求 38 的方法, 其中有至少 25 个结合域。

43. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述第一和第二互补靶向剂的每一个分别与所述第一和第二结合域之一选择性结合。

44. 权利要求 43 的方法, 其中所述互补靶向剂与其它结合域结合的交叉反应性小于与所述结合域之一结合的 5%。

45. 权利要求 43 的方法, 其中各第一和第二互补靶向剂与第三结合域结合的交叉反应性小于与所述结合域之一结合的 1%。

46. 权利要求 43 的方法, 其中各第一和第二互补靶向剂与第三结合域结合的交叉反应性小于与所述结合域之一结合的 0.5%。

47. 权利要求 43 的方法, 其中各第一和第二互补靶向剂与第三结合域结合的交叉反应性小于与所述结合域之一结合的 0.1%。

48. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述第一和第二结合试剂各自结合不同的目标分析物。

49. 权利要求 1 或 2 中任一项的方法, 其中所述第一和第二结合试剂各自对不同的目标分析物有优先的选择性。

50. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述第一和第二结合试剂对不同的目标分析

物在亲和力和 / 或选择性上不同。

51. 权利要求 43 的方法,其中所述第一分析物对所述第二结合试剂的交叉反应性小于与所述第一结合试剂结合的 5%。

52. 权利要求 43 的方法,其中所述第一分析物对所述第二结合试剂的交叉反应性小于与所述第一结合试剂结合的 1%。

53. 权利要求 43 的方法,其中所述第一分析物对所述第二结合试剂的交叉反应性小于与所述第一结合试剂结合的 0.5%。

54. 权利要求 43 的方法,其中所述第一分析物对所述第二结合试剂的交叉反应性小于与所述第一结合试剂结合的 0.1%。

55. 权利要求 43 的方法,其中所观察到的目标分析物对非特异性结合试剂的交叉反应性小于与所选择的用于结合该分析物的结合试剂结合的 5%。

56. 权利要求 43 的方法,其中所观察到的目标分析物对非特异性结合试剂的交叉反应性小于与所选择的用于结合该分析物的结合试剂结合的 1%。

57. 权利要求 43 的方法,其中所观察到的目标分析物对非特异性结合试剂的交叉反应性小于与所选择的用于结合该分析物的结合试剂结合的 0.5%。

58. 权利要求 43 的方法,其中所观察到的目标分析物对非特异性结合试剂的交叉反应性小于与所选择的用于结合该分析物的结合试剂结合的 0.1%。

59. 权利要求 1 或 2 中任一项的方法,其中所述第一和第二靶向剂及所述第一和第二靶向剂互补物分别用来将一组结合试剂对应至一组结合域,且该组结合试剂的每一种与不同的目标分析物结合。

60. 权利要求 59 的方法,其中该组结合试剂的每一种对不同的目标分析物有优先的选择性。

61. 权利要求 59 的方法,其中该组结合试剂的每一种对不同的目标分析物在亲和力和 / 或选择性上不同。

62. 权利要求 43 的方法,其中所述第一分析物与位于所述第二结合域的结合试剂的交叉反应性小于与位于所述第一结合域的结合试剂结合的 5%。

63. 权利要求 43 的方法,其中所述第一分析物与位于所述第二结合域的结合试剂的交叉反应性小于与位于所述第一结合域的结合试剂结合的 1%。

64. 权利要求 43 的方法,其中所述第一分析物与位于所述第二结合域的结合试剂的交叉反应性小于与位于所述第一结合域的结合试剂结合的 0.5%。

65. 权利要求 43 的方法,其中所述第一分析物与位于所述第二结合域的结合试剂的交叉反应性小于与位于所述第一结合域的结合试剂结合的 0.1%。

66. 权利要求 43 的方法,其中所观察到的目标分析物对位于非特异性结合域的结合试剂的交叉反应性小于与分配给该分析物的结合域中的结合试剂结合的 5%。

67. 权利要求 43 的方法,其中所观察到的目标分析物对位于非特异性结合域的结合试剂的交叉反应性小于与分配给该分析物的结合域中的结合试剂结合的 1%。

68. 权利要求 43 的方法,其中所观察到的目标分析物对位于非特异性结合域的结合试剂的交叉反应性小于与分配给该分析物的结合域中的结合试剂结合的 0.5%。

69. 权利要求 43 的方法,其中所观察到的目标分析物对位于非特异性结合域的结合试

剂的交叉反应性小于与分配给该分析物的结合域中的结合试剂结合的 0.1%。

70. 一种寡核苷酸,其选自:

| 序列 | 序列 |
|------------------------------|------------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| ggatctttctt (SEQ ID NO: 6) | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO: 15) | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

71. 一种试剂盒,其在单独的小瓶中包含至少 4 种寡核苷酸,每一种寡核苷酸包含选自以下的不同序列:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatctttctt (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO: 15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

72. 权利要求 71 的试剂盒,其中所述试剂盒包含至少 7 种寡核苷酸。

73. 权利要求 71 的试剂盒,其中所述试剂盒包含至少 10 种寡核苷酸。

74. 权利要求 71 的试剂盒,其中所述试剂盒包含至少 16 种寡核苷酸。

75. 权利要求 71 的试剂盒,其中所述试剂盒包含至少 25 种寡核苷酸。

76. 权利要求 71 的试剂盒,其中所述寡核苷酸的每一种被包含以下的连接剂修饰:生物素、链霉抗生物素、抗生物素蛋白、氨基、硫醇基、醛基、酰肼基、叠氮基、炔基、马来酰亚胺基或碘乙酰胺基。

77. 权利要求 71 的试剂盒,其中所述至少 4 种寡核苷酸的每一种与不同的抗体偶联。

78. 权利要求 71 的试剂盒,其中各个不同的序列不与所述至少 4 种寡核苷酸的其它不同的序列互补。

用于进行多路测定法的改进方法

[0001] 相关申请的交叉引用

分别参照 2013 年 3 月 11 日提交的美国临时申请顺序号 61/775,860 和 2013 年 3 月 13 日提交的 61/778,727, 每一个的公开内容通过引用以其整体结合到本文。

[0002] 有关联邦政府资助的研究的声明

在美国国家癌症研究所 (National Cancer Institute) 授予的 5RCA130391-04 条款的联邦政府支持下, 完成了本发明。美国政府在本发明中享有某些权利。

发明领域

[0003] 提供了用于进行结合测定法的改进方法和产品。这些方法包括使用连接剂复合物使用户能够用一套标准测定材料配置测定法以满足他/她的需要。本发明的产品和方法大大提高测定开发中的产率和灵活性。

[0004] 发明背景

大量文献研发出有关采用例如抗原 - 抗体反应、核酸杂交和受体 - 配体反应等结合反应用于样品中目标分析物的灵敏测量的技术。许多生物化学结合系统中的高特异性导致在包括基础研究、人和兽医学诊断学、环境监测和工业测试在内的许多市场中具有价值的许多测定方法和系统。可通过直接测量结合反应中的分析物的参与, 来测量目标分析物的存在情况。在一些方法中, 可通过测量与结合材料的一种或多种连接的可观测标记来说明这种参与。

[0005] 市购可得的测定法一般以预先设置的配置供应, 对用户评价对他或她可能具有独特价值的靶标提供很小灵活性或没有灵活性。这类商业化面板 (commercial panel) 可包括很少价值或没有价值的目标分析物和 / 或可能不包括所需要的目标分析物。因此, 有需要为用户提供使用一套标准测定材料和方法来配置用户定义的多路测定法 (multiplexed assay) 的灵活方法。

[0006] 发明概述

本发明考虑了以下具体的实施方案。本领域的技术人员可在不偏离本发明的精神和范围的情况下对本文所述实施方案进行各种修改、添加和改变。所述修改、添加和改变欲落入权利要求书的范围内。

[0007] 实施方案 (1): 一种对多种目标分析物进行多路结合测定法的方法, 所述方法包括:

在一个或多个步骤中, 将下列成分混合: 包含第一目标分析物和第二目标分析物的样品、固定在第一结合域的第一靶向剂 (targeting agent)、与连接剂连接的第一靶向剂互补物 (targeting agent complement) (其中第一靶向剂互补物是第一靶向剂的结合配偶体 (binding partner))、与补充连接剂 (supplemental linking agent) 连接的第一结合试剂 (其中第一结合试剂是第一分析物的结合配偶体)、固定在第二结合域的第二靶向剂、与连接剂连接的第二靶向剂互补物 (其中第二靶向剂互补物是第二靶向剂的结合配偶体)、与补充连接剂连接的第二结合试剂 (其中第二结合试剂是第二分析物的结合配偶体) 和任选

至少两份的桥接剂 (bridging agent), 其中如果省略桥接剂, 则各连接剂是补充连接剂的结合配偶体, 或如果包括桥接剂, 则桥接剂具有连接剂之一的第一结合部位和补充连接剂之一的其它结合部位;

在第一结合域上形成包含第一靶向剂、第一靶向剂互补物、第一结合试剂和第一分析物的第一结合复合物, 并在第二结合域上形成包含第二靶向剂、第二靶向剂互补物、第二结合试剂和第二分析物的第二结合复合物, 和

分别测量第一和第二结合域上的第一和第二分析物的量。

[0008] 在实施方案 (1) 的一个实例中, 称为实施方案 (1) (a), 样品含有一种或多种其它的目标分析物, 对于各种其它的目标分析物, 混合步骤还包括在一个或多个步骤中将以下混合: 固定在其它结合域上的其它靶向剂、与连接剂连接的其它靶向剂互补物和与补充连接剂连接的其它结合试剂和包含其它靶向剂、其它靶向剂互补物、其它结合试剂和其它分析物的在其它结合域上的其它结合复合物; 形成步骤还包括其它结合域上形成包含其它靶向剂、其它靶向剂互补物、其它结合试剂和其它分析物的其它结合复合物; 测量步骤还包括测量其它结合域上的其它分析物的量。

[0009] 在实施方案 (1) 的又一个实例中, 称为实施方案 (1) (b), 第一靶向剂互补物和第一结合试剂作为预先结合的第一靶向复合物提供, 所述第一靶向复合物包含通过连接剂和补充连接剂之间的结合相互作用连接的第一靶向剂互补物和第一结合试剂; 第二靶向剂互补物和第二结合试剂作预先结合的第二靶向复合物提供, 所述第二靶向复合物包含通过连接剂和补充连接剂之间的结合相互作用连接的第二靶向剂互补物和第二结合试剂。

[0010] 此外, 在实施方案 (1) 的另一个实例中, 称为实施方案 (1) (c), 提供与固定在第一结合域上的第一靶向剂预先结合的第一靶向复合物; 并提供与固定在第二结合域上的第二靶向剂预先结合的第二靶向复合物。在该实例中, 混合步骤还包括: 使第一和第二靶向复合物与样品混合形成其混合物, 使第一分析物与第一靶向复合物中的第一结合试剂结合并使第二分析物与第二靶向复合物中的第二结合试剂结合, 使分别与第一和第二分析物结合的第一和第二靶向复合物的混合物与第一和第二结合域接触; 使第一靶向复合物与第一结合域上的第一靶向剂结合并使第二靶向复合物与第二结合域上的第二靶向剂结合。

[0011] 在实施方案 (1) 的一个具体实例中, 称为实施方案 (1) (d), 混合步骤还包括在第一体积的液体中, 将所述第一靶向剂互补物、所述第一结合试剂和所述桥接试剂 (bridging reagent) (如使用的话) 混合, 并且使所述第一靶向剂互补物和所述第一结合试剂通过它们所连接的连接剂连接, 形成第一靶向复合物; 在第二体积的液体中, 使所述第二靶向剂互补物、所述第二结合试剂和所述桥接试剂 (如使用的话) 混合, 并且使所述第二靶向剂复合物互补物和所述第二结合试剂通过它们所连接的连接剂连接, 形成第二靶向复合物。

[0012] 在实施方案 (1) 一个具体实例中, 称为实施方案 (1) (e), 混合步骤还包括使所述第一和第二靶向复合物混合, 使所述第一和第二靶向复合物的混合物与所述第一和第二结合域接触, 使所述第一靶向复合物与所述第一结合域上的所述第一靶向剂结合, 并使所述第二靶向复合物与所述第二结合域上的所述第二靶向剂结合。在该实例中, 混合步骤还包括: 使第一和第二靶向复合物与样品混合形成其混合物, 使第一分析物与第一靶向复合物中的第一结合试剂结合并使第二分析物与第二靶向复合物中的第二结合试剂结合, 使分别与第一和第二分析物结合的第一和第二靶向复合物的混合物与第一和第二结合域接触; 使

第一靶向复合物与第一结合域上的第一靶向剂结合并使第二靶向复合物与第二结合域上的第二靶向剂结合。

[0013] 在实施方案 (1) (c) 和 (1) (e) 中,可在使第一和第二靶向复合物与第一和第二结合域接触之前使第一和第二靶向复合物与样品混合。此外,在这些具体的实施方案中,可在使第一和第二靶向复合物与第一和第二结合域接触之后,使第一和第二靶向复合物与样品混合;或可使第一和第二靶向复合物与样品的混合和与第一和第二结合域结合同时进行。

[0014] 在实施方案 (1) (d) 中,混合步骤还可包括以下步骤:使所述第一和第二结合域上的所述第一和第二靶向复合物与所述样品接触,使所述第一分析物与所述第一靶向复合物中的第一结合试剂结合,并使所述第二分析物与所述第二靶向复合物中的所述第二结合试剂结合。

[0015] 在实施方案 (1) 和 (1) (a)-(e) 中,桥接剂可省略且连接剂可通过 (a) 硫醇基和马来酰亚胺基或碘乙酰胺基;(b) 醛和酰肼;或 (c) 炔和叠氮化物之间的结合相互作用与补充连接剂结合。

[0016] 在实施方案 (1) 和 (1) (a)-(e) 中,桥接剂可省略,且 (a) 连接剂是生物素,补充连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白;(b) 连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白,补充连接剂是生物素;(c) 连接剂是肽,补充连接剂是抗肽抗体;或 (d) 连接剂是抗肽抗体,补充连接剂是肽。

[0017] 备选或此外,在实施方案 (1) 和 (1) (a)-(e) 中,可以包括桥接剂,桥接剂可以是链霉抗生物素或抗生物素蛋白,而连接剂和补充连接剂各自可包含生物素。

[0018] 实施方案 (1) 和 (1) (a)-(e) 中提及的第一和第二结合试剂各自可包含能够分别与所述第一和第二分析物结合的受体、配体、抗体、半抗原、抗原、表位、模拟表位(mimotope)、适体或插入剂。例如,第一和第二结合试剂是抗原。备选或此外,第一和第二结合试剂是抗体。

[0019] 在实施方案 (1) 和 (1) (a)-(e) 中,所述方法可包括进行夹心结合测定法。

[0020] 在实施方案 (1) 和 (1) (a)-(e) 的一个具体实例中,在混合步骤中混合的成分还包含结合第一分析物的第一检测试剂和结合第二分析物的第二检测试剂,在第二步骤中形成的第一和第二复合物还分别包含第一和第二检测试剂。例如,第一和第二检测试剂各自包含可检测标记。在该实施方案的另一个实例中,第一和第二结合试剂及第一和第二检测试剂是抗体。此外,第一和第二检测试剂可与第一或第二分析物结合,任选第一和第二检测试剂各自包含可检测标记。在一个具体的实例中,第一和第二结合试剂是抗原,分析物是针对抗原的抗体,且检测试剂包含抗免疫球蛋白抗体、A 蛋白、G 蛋白或 L 蛋白。

[0021] 实施方案 (1) 和 (1) (a)-(e) 的方法可包括进行竞争结合测定法。

[0022] 更进一步,在实施方案 (1) 和 (1) (a)-(e) 中混合的成分还可包含与第一分析物竞争结合第一结合试剂的第一检测试剂和与第二分析物竞争结合第二结合试剂的第二检测试剂。

[0023] 在实施方案 (1) 和 (1) (a)-(e) 中,包括所述方法的下列其它要素的一种或多种:第一和第二检测试剂可包含可检测标记;第一和第二结合试剂是抗体,第一和第二检测试剂是分析物的结构类似物;测量步骤可包括通过光学吸光度、荧光、磷光、化学发光、电化学发光、光散射或磁性,测量第一和第二可检测标记的存在情况;第一和第二可检测标记是电

化学发光标记,测量步骤还包括测量电化学发光信号,并且使信号与样品中的第一和第二分析物的量关联;将第一和第二结合域定位于电极上,并且测量步骤还包括将电压波形施加于电极上以产生电化学发光;第一和第二结合域的每一个是结合域阵列的组分,任选阵列位于多孔板的孔中;第一和第二结合域的每一个各自位于一个或多个微粒的表面,任选对粒子编码以允许识别特定粒子,并将第一结合域和第二结合域区分开来。

[0024] 实施方案(1)(f):包括实施方案(1)的要素和实施方案(1)(a)-(e)的一个或多个其它特征,其中第一靶向剂和第一靶向剂互补物及第二靶向剂和第二靶向剂互补物各自包含互补寡核苷酸对。在这个具体的实例中,第一和第二结合试剂各自可以是抗体。此外,在这个具体的实例中,位于第一和第二结合域的每一个上的互补寡核苷酸对不同,并选自:

| 对 # | 序列 (5' -3') | 对 # | 序列 (5' -3') |
|-----|---------------------------|-----|---------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQIDNO:1) | 13 | cggtttgagata (SEQIDNO:25) |
| | aactaccgatgt (SEQIDNO:2) | | tatctcaaaccg (SEQIDNO:26) |
| 2 | acgtcccagttg (SEQIDNO:3) | 14 | cttacaacgcca (SEQIDNO:27) |
| | caactgggacgt (SEQIDNO:4) | | tggcgttgtaag (SEQIDNO:28) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQIDNO:5) | 15 | ctttctcggcac (SEQIDNO:29) |
| | ggatctttcttct (SEQIDNO:6) | | gtgccgagaaag (SEQIDNO:30) |
| 4 | aggttcagtgc (SEQIDNO:7) | 16 | gacataaagcga (SEQIDNO:31) |
| | tgcactgaacct (SEQIDNO:8) | | tcgctttatgtc (SEQIDNO:32) |
| 5 | atcaggatacgc (SEQIDNO:9) | 17 | gccatagtctct (SEQIDNO:33) |
| | gcgtatctgat (SEQIDNO:10) | | agagactatggc (SEQIDNO:34) |
| 6 | atcattaccacc (SEQIDNO:11) | 18 | gctaattcacca (SEQIDNO:35) |
| | ggtggtaatgat (SEQIDNO:12) | | tggtgaattagc (SEQIDNO:36) |
| 7 | attaacgggagc (SEQIDNO:13) | 19 | ggtcgtgtttca (SEQIDNO:37) |
| | gctcccgttaat (SEQIDNO:14) | | tgaaacacgacc (SEQIDNO:38) |
| 8 | cagaggctctaa (SEQIDNO:15) | 20 | gttgattctgtc (SEQIDNO:39) |
| | ttaagacctctg (SEQIDNO:16) | | gacagaatcaac (SEQIDNO:40) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQIDNO:17) | 21 | taccggaataa (SEQIDNO:41) |
| | aatggacacctg (SEQIDNO:18) | | ttattccgggta (SEQIDNO:42) |
| 10 | catccaatccag (SEQIDNO:19) | 22 | tgcttgacttgg (SEQIDNO:43) |
| | ctggattggatg (SEQIDNO:20) | | ccaagtcaagca (SEQIDNO:44) |
| 11 | cctacgatatac (SEQIDNO:21) | 23 | ttcacttaggg (SEQIDNO:45) |
| | gtatatcgtagg (SEQIDNO:22) | | ccctaagtggaa (SEQIDNO:46) |
| 12 | cgaatgtagagt (SEQIDNO:23) | 24 | ttgtctagcggc (SEQIDNO:47) |
| | actctacattcg (SEQIDNO:24) | | gccgctagacaa (SEQIDNO:48) |
| | | 25 | tttccttgcta (SEQIDNO:49) |
| | | | tagcaaggga (SEQIDNO:50) |

实施方案(1)(g):包括实施方案(1)的要素和实施方案(1)(a)-(e)的一个或多个其它特征,其中第一靶向剂和第一靶向剂互补物及第二靶向剂和第二靶向剂互补物各自包含互补寡核苷酸对。在这个具体的实例中,第一和第二结合试剂各自可以是抗体。此外,在这个具体的实例中,位于第一和第二结合域的每一个上的互补寡核苷酸对不同,并选自:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|---|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatctttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |

| | | | |
|----|------------------------------|----|-------------------------------|
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagaactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO: 15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | ggtgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaaggga (SEQ ID NO: 50) |

在实施方案 (1) (f) 和 / 或 (1) (g) 中, 有至少 7 个结合域或至少 10 个结合域; 或至少 16 个结合域; 或至少 25 个结合域。

[0025] 在实施方案 (1) 和 (1) (a) 中, 第一和第二互补靶向剂的每一个可分别与第一和第二结合域选择性结合。例如, 互补靶向剂与其它结合域结合的交叉反应性小于与所述结合域之一结合的 5%; 或第一和第二互补靶向剂的每一个与第三结合域结合的交叉反应性小于与所述结合域之一结合的 1%; 或第一和第二互补靶向剂的每一个与第三结合域结合的交叉反应性小于与所述结合域之一结合的 0.5%; 或第一和第二互补靶向剂的每一个与第三结合域结合的交叉反应性小于与所述结合域之一结合的 0.1%。

[0026] 在实施方案 (1) 和 (1) (a) 中, 第一和第二结合试剂可各自结合不同的目标分析物; 或第一和第二结合试剂各自对不同的目标分析物有优先的选择性。

[0027] 上述实施方案的任一个的第一和第二结合试剂对于不同的目标分析物在亲和力和 / 或选择性上可不同, 例如, 第一分析物对第二结合试剂的交叉反应性小于与第一结合试剂结合的 5%, 或第一分析物对第二结合试剂的交叉反应性小于与第一结合试剂结合的 1%, 或第一分析物对第二结合试剂的交叉反应性小于与第一结合试剂结合的 0.5%, 或第一分析物对第二结合试剂的交叉反应性小于与第一结合试剂结合的 0.1%, 或所观察到的目标分析物对非特异性结合试剂的交叉反应性小于与所选择的用于结合该分析物的结合试剂结合的 5%, 或所观察到的目标分析物对非特异性结合试剂的交叉反应性小于与所选择的用于结合该分析物的结合试剂结合的 1%, 或所观察到的目标分析物对非特异性结合试剂的交叉反应性小于与所选择的用于结合该分析物的结合试剂结合的 0.5%, 或所观察到的目标分析物对非特异性结合试剂的交叉反应性小于与所选择的用于结合该分析物的结合试剂结合的 0.1%。更进一步地在上述实施方案的这个具体实例中, 第一分析物与位于第二结合域的结合试剂的交叉反应性小于与位于第一结合域的结合试剂结合的 5%, 或第一分析物与位于第二结合域的结合试剂的交叉反应性小于与位于第一结合域的结合试剂结合的 1%, 或第一分析物与位于第二结合域的结合试剂的交叉反应性小于与位于第一结合域的结合试剂结合的 0.5%, 或第一分析物与位于第二结合域的结合试剂的交叉反应性小于与位于第一结合域的结合试剂结合的 0.1%, 或所观察到的目标分析物对位于非特异性结合域的结合试剂的交叉反应性小于与分配给该分析物的结合域中的结合试剂结合的 5%, 或所观察到的目标分析物对位于非特异性结合域的结合试剂的交叉反应性小于与分配给该分析物的结合域中的结合试剂结合的 1%, 或所观察到的目标分析物对位于非特异性结合域的结合试剂的交叉反应性小于与分配给该分析物的结合域中的结合试剂结合的 0.5%, 或所观察到的目标分析物对位于非特异性结合域的结合试剂的交叉反应性小于与分配给该分析物的结合域中

的结合试剂结合的 0.1%。

[0028] 在实施方案 (1) 和 (1) (a) 中, 第一和第二靶向剂及第一和第二靶向剂互补物可分别用来将一组结合试剂对应至一组结合域, 且该组结合试剂的每一种与不同的目标分析物结合。例如, 该组结合试剂的每一种对不同的目标分析物有优先的选择性, 或该组结合试剂的每一种对不同的目标分析物在亲和力和 / 或选择性上不同。

[0029] 实施方案 (2): 寡核苷酸选自:

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO:1) | tatctcaaaccg (SEQ ID NO:26) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO:2) | cttacaacgcca (SEQ ID NO:27) |
| acgtcccagttg (SEQ ID NO:3) | tggcgttgaag (SEQ ID NO:28) |
| caactgggacgt (SEQ ID NO:4) | ctttctcggcac (SEQ ID NO:29) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO:5) | gtgccgagaaag (SEQ ID NO:30) |
| ggatctttcttct (SEQ ID NO:6) | gacataaagcga (SEQ ID NO:31) |
| aggttcagtgca (SEQ ID NO:7) | tcgctttatgtc (SEQ ID NO:32) |
| tgcactgaacct (SEQ ID NO:8) | gccatagtctct (SEQ ID NO:33) |
| atcaggatacgc (SEQ ID NO:9) | agagactatggc (SEQ ID NO:34) |
| gcgtatctgat (SEQ ID NO:10) | gctaattcacca (SEQ ID NO:35) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO:11) | tggtgaattagc (SEQ ID NO:36) |
| ggtggaatgat (SEQ ID NO:12) | ggtcgtgtttca (SEQ ID NO:37) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO:13) | tgaaacacgacc (SEQ ID NO:38) |
| gctcccgttaat (SEQ ID NO:14) | gttgattctgtc (SEQ ID NO:39) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | gacagaatcaac (SEQ ID NO:40) |
| ttaagacctctg (SEQ ID NO:16) | taccgggaataa (SEQ ID NO:41) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO:17) | ttattccgggta (SEQ ID NO:42) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | tgcttgacttgg (SEQ ID NO:43) |
| catccaatccag (SEQ ID NO:19) | ccaagtcaagca (SEQ ID NO:44) |
| ctggattggatg (SEQ ID NO:20) | ttccacttaggg (SEQ ID NO:45) |
| cctacgatatac (SEQ ID NO:21) | ccctaagtggaa (SEQ ID NO:46) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO:22) | ttgtctagcggc (SEQ ID NO:47) |
| cgaatgtagagt (SEQ ID NO:23) | gccgctagacaa (SEQ ID NO:48) |
| actctacattcg (SEQ ID NO:24) | tttcccttgcta (SEQ ID NO:49) |
| cggtttgagata (SEQ ID NO:25) | tagcaagggaaa (SEQ ID NO:50) |

实施方案 (3): 寡核苷酸选自:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatctttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO: 15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

实施方案 (4): 一种试剂盒, 其在单独的小瓶中包含至少 4 种寡核苷酸, 每一种包含选

自以下的不同序列：

| | |
|-----------------------------|------------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO:1) | tatctcaaaccg (SEQ ID NO:26) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO:2) | cttacaacgccca (SEQ ID NO:27) |
| acgtcccagttg (SEQ ID NO:3) | tggcgttgtaag (SEQ ID NO:28) |
| caactgggacgt (SEQ ID NO:4) | ctttctcggcac (SEQ ID NO:29) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO:5) | gtgccgagaaag (SEQ ID NO:30) |
| ggatctttcttct (SEQ ID NO:6) | gacataaagcga (SEQ ID NO:31) |
| aggttcagtga (SEQ ID NO:7) | tcgctttatgtc (SEQ ID NO:32) |
| tgcactgaacct (SEQ ID NO:8) | gccatagtctct (SEQ ID NO:33) |
| atcaggatacgc (SEQ ID NO:9) | agagactatggc (SEQ ID NO:34) |
| gcgtatcctgat (SEQ ID NO:10) | gctaattcacca (SEQ ID NO:35) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO:11) | tggtgaattagc (SEQ ID NO:36) |
| ggtggtaatgat (SEQ ID NO:12) | ggctcgtgtttca (SEQ ID NO:37) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO:13) | tgaaacacgacc (SEQ ID NO:38) |
| gctcccgttaat (SEQ ID NO:14) | gttgattctgtc (SEQ ID NO:39) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | gacagaatcaac (SEQ ID NO:40) |
| ttaagacctctg (SEQ ID NO:16) | taccggaataa (SEQ ID NO:41) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO:17) | ttattccgggta (SEQ ID NO:42) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | tgcttgacttgg (SEQ ID NO:43) |
| catccaatccag (SEQ ID NO:19) | ccaagtcaagca (SEQ ID NO:44) |
| ctggattggatg (SEQ ID NO:20) | ttccacttaggg (SEQ ID NO:45) |
| cctacgatatac (SEQ ID NO:21) | ccctaagtggaa (SEQ ID NO:46) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO:22) | ttgtctagcggc (SEQ ID NO:47) |
| cgaatgtagagt (SEQ ID NO:23) | gccgctagacaa (SEQ ID NO:48) |
| actctacattcg (SEQ ID NO:24) | tttcccttgcta (SEQ ID NO:49) |
| cggtttgagata (SEQ ID NO:25) | tagcaagggaaa (SEQ ID NO:50) |

实施方案 (5)：一种试剂盒，其在单独的小瓶中至少包含 4 种寡核苷酸，每一种包含选自以下的不同序列：

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatctttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

在实施方案 (4) 和 (5) 的试剂盒中，试剂盒可包含至少 7 种寡核苷酸，或至少 10 种寡核苷酸，或至少 16 种寡核苷酸，或至少 25 种寡核苷酸。此外，这些具体实施方案的寡核苷酸的每一种可用包含以下的连接剂修饰：生物素、链霉抗生物素、抗生物素蛋白、氨基、硫醇基、醛基、酰肼基、叠氮基、炔基、马来酰亚胺基或碘乙酰胺基。在实施方案 (4) 和 (5) 的另一个具体实例中，所述至少 4 种寡核苷酸的每一种可与不同的抗体偶联，任选每个不同的

序列不与所述至少 4 种寡核苷酸的其它不同的序列互补。

[0030] 实施方案 (6) :包含至少 4 种寡核苷酸的混合物,所述寡核苷酸各自包含选自以下的不同序列:

| | |
|-----------------------------|------------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO:1) | tatetcaaaccg (SEQ ID NO:26) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO:2) | cttacaacgcc (SEQ ID NO:27) |
| acgtcccagttg (SEQ ID NO:3) | tggcgttgttaag (SEQ ID NO:28) |
| caactgggacgt (SEQ ID NO:4) | ctttctcggcac (SEQ ID NO:29) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO:5) | gtgccgagaaag (SEQ ID NO:30) |
| ggatctttcttct (SEQ ID NO:6) | gacataaagcga (SEQ ID NO:31) |
| aggttcagtgc (SEQ ID NO:7) | tcgctttatgtc (SEQ ID NO:32) |
| tgcactgaacct (SEQ ID NO:8) | gccatagtctct (SEQ ID NO:33) |
| atcaggatacgc (SEQ ID NO:9) | agagactatggc (SEQ ID NO:34) |
| gcgtatcctgat (SEQ ID NO:10) | gctaattcacca (SEQ ID NO:35) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO:11) | tgggtgaattagc (SEQ ID NO:36) |
| ggtggtaatgat (SEQ ID NO:12) | ggtcgtgtttca (SEQ ID NO:37) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO:13) | tgaaacacgacc (SEQ ID NO:38) |
| gctcccgttaat (SEQ ID NO:14) | gttgattctgtc (SEQ ID NO:39) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | gacagaatcaac (SEQ ID NO:40) |
| ttaagacctctg (SEQ ID NO:16) | taccggaataa (SEQ ID NO:41) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO:17) | ttattccgggta (SEQ ID NO:42) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | tgettgacttgg (SEQ ID NO:43) |
| catccaatccag (SEQ ID NO:19) | ccaagtcaagca (SEQ ID NO:44) |
| ctggattggatg (SEQ ID NO:20) | ttccacttaggg (SEQ ID NO:45) |
| cctacgatatac (SEQ ID NO:21) | ccctaagtggaa (SEQ ID NO:46) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO:22) | ttgtctagcggc (SEQ ID NO:47) |
| cgaatgtagagt (SEQ ID NO:23) | gccgctagacaa (SEQ ID NO:48) |
| actctacattcg (SEQ ID NO:24) | tttccttgcta (SEQ ID NO:49) |
| cggtttgagata (SEQ ID NO:25) | tagcaagggaaa (SEQ ID NO:50) |

其中不同序列的每一个与不同的抗体偶联。

[0031] 实施方案 (7) :包含至少 4 种寡核苷酸的混合物,所述寡核苷酸各自包含选自以下的不同序列:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|-------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatctttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatetcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tgggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

其中不同序列的每一个与不同的抗体偶联。

[0032] 在实施方案 (6) 和 (7) 中,混合物可包括至少 7 种寡核苷酸 ;或至少 10 种寡核苷

酸 ;或至少 16 种寡核苷酸 ;或至少 25 种寡核苷酸。此外,在实施方案 (6) 和 (7) 一个具体实例中,每个不同的序列不与所述至少 4 种寡核苷酸的其它不同的序列互补。

[0033] 实施方案 (8) :包含大量至少 4 个结合域的阵列,其中一个或多个、任选每个结合域具有固定在其上的选自以下的不同寡核苷酸序列 :

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO:1) | tatctcaaaccg (SEQ ID NO:26) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO:2) | cttacaacgcc (SEQ ID NO:27) |
| acgtccagttg (SEQ ID NO:3) | tggcgttgtaag (SEQ ID NO:28) |
| caactgggacgt (SEQ ID NO:4) | ctttctcggcac (SEQ ID NO:29) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO:5) | gtgccgagaaag (SEQ ID NO:30) |
| ggatcttcttct (SEQ ID NO:6) | gacataaagcga (SEQ ID NO:31) |
| aggttcagtgc (SEQ ID NO:7) | tcgctttatgtc (SEQ ID NO:32) |
| tgcactgaacct (SEQ ID NO:8) | gccatagtctct (SEQ ID NO:33) |
| atcaggatacgc (SEQ ID NO:9) | agagactatggc (SEQ ID NO:34) |
| gcgtatcctgat (SEQ ID NO:10) | gctaattcacca (SEQ ID NO:35) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO:11) | tggtgaattagc (SEQ ID NO:36) |
| ggtggtaatgat (SEQ ID NO:12) | ggtcgtgtttca (SEQ ID NO:37) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO:13) | tgaacacgacc (SEQ ID NO:38) |
| gtcccgttaat (SEQ ID NO:14) | gttgattctgtc (SEQ ID NO:39) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | gacagaatcaac (SEQ ID NO:40) |
| ttaagacctctg (SEQ ID NO:16) | taccgggaataa (SEQ ID NO:41) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO:17) | ttattccgggta (SEQ ID NO:42) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | tgcttgacttgg (SEQ ID NO:43) |
| catccaatccag (SEQ ID NO:19) | ccaagtcaagca (SEQ ID NO:44) |
| ctggattggatg (SEQ ID NO:20) | ttccacttaggg (SEQ ID NO:45) |
| cctacgatatac (SEQ ID NO:21) | ccctaagtggaa (SEQ ID NO:46) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO:22) | ttgtctagcggc (SEQ ID NO:47) |
| cgaatgtagagt (SEQ ID NO:23) | gccgctagacaa (SEQ ID NO:48) |
| actctacattcg (SEQ ID NO:24) | tttcccttgcta (SEQ ID NO:49) |
| cggtttgagata (SEQ ID NO:25) | tagcaagggaaa (SEQ ID NO:50) |

实施方案 (9) :包含大量至少 4 个结合域的阵列,其中一个或多个、任选每个结合域具有固定在其上的选自以下的不同寡核苷酸序列 :

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gtcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

在实施方案 (8) 和 (9) 中,阵列可包含至少 7 个结合域,或至少 10 个结合域,或至少 16 个结合域,或至少 25 个结合域,任选每个不同的序列不与所述至少 4 种寡核苷酸的其它不

同的序列互补。

[0034] 实施方案 (10) :一种多孔板,其在板的至少一个孔内具有一个或多个拷贝的寡核苷酸阵列,阵列位于多个结合域上,其中一个或多个、任选至少 4 个结合域具有固定在其上的选自以下的不同寡核苷酸序列:

| | |
|-----------------------------|------------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO:1) | tatctcaaaccg (SEQ ID NO:26) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO:2) | cttacaacgccca (SEQ ID NO:27) |
| acgtcccagttg (SEQ ID NO:3) | tggcgttgtaag (SEQ ID NO:28) |
| caactgggacgt (SEQ ID NO:4) | ctttctcggcac (SEQ ID NO:29) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO:5) | gtgccgagaaaag (SEQ ID NO:30) |
| ggatctttcttct (SEQ ID NO:6) | gacataaagcga (SEQ ID NO:31) |
| aggttcagtgca (SEQ ID NO:7) | tcgctttatgtc (SEQ ID NO:32) |
| tgcactgaacct (SEQ ID NO:8) | gccatagtctct (SEQ ID NO:33) |
| atcaggatacgc (SEQ ID NO:9) | agagactatggc (SEQ ID NO:34) |
| gcgtatcctgat (SEQ ID NO:10) | gctaattcacca (SEQ ID NO:35) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO:11) | tggtgaattagc (SEQ ID NO:36) |
| ggtgtaaatgat (SEQ ID NO:12) | ggtcgtgtttca (SEQ ID NO:37) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO:13) | tgaaacacgacc (SEQ ID NO:38) |
| gctcccgttaat (SEQ ID NO:14) | gttgattctgtc (SEQ ID NO:39) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | gacagaatcaac (SEQ ID NO:40) |
| ttaagacctctg (SEQ ID NO:16) | taccgggaataa (SEQ ID NO:41) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO:17) | ttattccgggta (SEQ ID NO:42) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | tgcttgacttgg (SEQ ID NO:43) |
| catccaatccag (SEQ ID NO:19) | ccaagtcaagca (SEQ ID NO:44) |
| ctggattggatg (SEQ ID NO:20) | ttccacttaggg (SEQ ID NO:45) |
| cctacgatatac (SEQ ID NO:21) | ccctaagtggaa (SEQ ID NO:46) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO:22) | ttgtctagcggc (SEQ ID NO:47) |
| cgaatgtagagt (SEQ ID NO:23) | gccgctagacaa (SEQ ID NO:48) |
| actctacattcg (SEQ ID NO:24) | tttcccttgeta (SEQ ID NO:49) |
| cggtttgagata (SEQ ID NO:25) | tagcaagggaaa (SEQ ID NO:50) |

实施方案 (11) :一种多孔板,其在板的至少一个孔内具有一个或多个拷贝的寡核苷酸阵列,阵列位于多个结合域上,其中一个或多个、任选至少 4 个结合域具有固定在其上的选自以下的不同寡核苷酸序列:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatctttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtgtaaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgeta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

实施方案 (10) 和 (11) 的板可包括至少个 24 孔,或至少 96 个孔,或至少 384 个孔,和

/或任选阵列包含至少 7 种寡核苷酸,或至少 10 种寡核苷酸,或至少 16 种寡核苷酸,或至少 25 种寡核苷酸,其中任选每个不同的序列不与所述至少 4 种寡核苷酸的其它不同的序列互补。

[0035] 实施方案 (12):一种试剂盒,其在一个或多个小瓶中包含一组至少 4 种微粒试剂,其中该组的各微粒试剂包含微粒,所述微粒具有固定在其上的选自以下的不同寡核苷酸序列:

| | |
|-----------------------------|------------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO:1) | tatctcaaaccg (SEQ ID NO:26) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO:2) | cttacaacgccca (SEQ ID NO:27) |
| acgtccagttg (SEQ ID NO:3) | tggcgttctaag (SEQ ID NO:28) |
| caactgggacgt (SEQ ID NO:4) | ctttctcggcac (SEQ ID NO:29) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO:5) | gtgccgagaaag (SEQ ID NO:30) |
| ggatctttcttct (SEQ ID NO:6) | gacataaagcga (SEQ ID NO:31) |
| aggttcagtgc (SEQ ID NO:7) | tcgctttatgtc (SEQ ID NO:32) |
| tgcactgaacct (SEQ ID NO:8) | gccatagtctct (SEQ ID NO:33) |
| atcaggatacgc (SEQ ID NO:9) | agagactatggc (SEQ ID NO:34) |
| gcgtatcctgat (SEQ ID NO:10) | gctaattcacca (SEQ ID NO:35) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO:11) | tggtgaattagc (SEQ ID NO:36) |
| ggtgtaaatgat (SEQ ID NO:12) | ggtcgtgtttca (SEQ ID NO:37) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO:13) | tgaaacacgacc (SEQ ID NO:38) |
| gctcccgttaat (SEQ ID NO:14) | gttgattctgtc (SEQ ID NO:39) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | gacagaatcaac (SEQ ID NO:40) |
| ttaagacctctg (SEQ ID NO:16) | tacccggaataa (SEQ ID NO:41) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO:17) | ttattccgggta (SEQ ID NO:42) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | tgcttgacttgg (SEQ ID NO:43) |
| catccaatccag (SEQ ID NO:19) | ccaagtcaagca (SEQ ID NO:44) |
| ctggattggatg (SEQ ID NO:20) | ttccacttaggg (SEQ ID NO:45) |
| cctacgatatac (SEQ ID NO:21) | ccctaagtggaa (SEQ ID NO:46) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO:22) | ttgtctagcggc (SEQ ID NO:47) |
| cgaatgtagagt (SEQ ID NO:23) | gccgctagacaa (SEQ ID NO:48) |
| actetacattcg (SEQ ID NO:24) | tttcccttgcta (SEQ ID NO:49) |
| cggtttgagata (SEQ ID NO:25) | tagcaagggaaa (SEQ ID NO:50) |

实施方案 (13):一种试剂盒,其在一个或多个小瓶中包含一组至少 4 种微粒试剂,其中该组的各微粒试剂包含微粒,所述微粒具有固定在其上的选自以下的不同寡核苷酸序列:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actetacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatctttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtgtaaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

实施方案 (12) 和 (13) 的试剂盒可包括一组至少 7 种微粒, 或一组至少 10 种微粒, 或一组至少 16 种微粒, 或一组至少 25 种微粒, 和 / 或任选每个不同的序列不与所述至少 4 种寡核苷酸的其它不同的序列互补。

[0036] 可对实施方案 (12) 和 (13) 的微粒编码, 不同的微粒试剂可具有不同的识别码。

[0037] 实施方案 (14): 包含多孔板的试剂盒, 所述多孔板在板的至少一个孔内具有一个或多个拷贝的寡核苷酸阵列, 阵列位于多个结合域上, 其中一个或多个、任选至少 4 个结合域具有固定在其上的选自以下的不同寡核苷酸序列:

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO:1) | tatctcaaaccg (SEQ ID NO:26) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO:2) | cttacaacgcca (SEQ ID NO:27) |
| acgtcccagttg (SEQ ID NO:3) | tggcgttgtaag (SEQ ID NO:28) |
| caactgggacgt (SEQ ID NO:4) | ctttctcggcac (SEQ ID NO:29) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO:5) | gtgccgagaaag (SEQ ID NO:30) |
| ggatcttcttct (SEQ ID NO:6) | gacataaagcga (SEQ ID NO:31) |
| aggttcagtgca (SEQ ID NO:7) | tcgctttatgtc (SEQ ID NO:32) |
| tgcactgaacct (SEQ ID NO:8) | gccatagtctct (SEQ ID NO:33) |
| atcaggatacgc (SEQ ID NO:9) | agagactatggc (SEQ ID NO:34) |
| gcgtatcctgat (SEQ ID NO:10) | gctaattcacca (SEQ ID NO:35) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO:11) | tggtgaattagc (SEQ ID NO:36) |
| ggtgtaaatgat (SEQ ID NO:12) | ggtcgtgtttca (SEQ ID NO:37) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO:13) | tgaaacacgacc (SEQ ID NO:38) |
| gctcccgttaat (SEQ ID NO:14) | gttgattctgtc (SEQ ID NO:39) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | gacagaatcaac (SEQ ID NO:40) |
| ttaagacctctg (SEQ ID NO:16) | taccggaataa (SEQ ID NO:41) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO:17) | ttattccgggta (SEQ ID NO:42) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | tgettgacttgg (SEQ ID NO:43) |
| catccaatccag (SEQ ID NO:19) | ccaagtcaagca (SEQ ID NO:44) |
| ctggattggatg (SEQ ID NO:20) | ttccacttaggg (SEQ ID NO:45) |
| cctacgatatac (SEQ ID NO:21) | ccctaagtggaa (SEQ ID NO:46) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO:22) | ttgtctagcggc (SEQ ID NO:47) |
| cgaatgtagagt (SEQ ID NO:23) | gccgctagacaa (SEQ ID NO:48) |
| actetacattcg (SEQ ID NO:24) | tttcccttgeta (SEQ ID NO:49) |
| cggtttgagata (SEQ ID NO:25) | tagcaagggaaa (SEQ ID NO:50) |

和

(i) 包含选自以下的两种或更多种寡核苷酸的一组寡核苷酸:

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO:1) | tatctcaaaccg (SEQ ID NO:26) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO:2) | cttacaacgcca (SEQ ID NO:27) |
| acgtcccagttg (SEQ ID NO:3) | tggcgttgtaag (SEQ ID NO:28) |
| caactgggacgt (SEQ ID NO:4) | ctttctcggcac (SEQ ID NO:29) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO:5) | gtgccgagaaag (SEQ ID NO:30) |
| ggatcttcttct (SEQ ID NO:6) | gacataaagcga (SEQ ID NO:31) |
| aggttcagtgca (SEQ ID NO:7) | tcgctttatgtc (SEQ ID NO:32) |
| tgcactgaacct (SEQ ID NO:8) | gccatagtctct (SEQ ID NO:33) |
| atcaggatacgc (SEQ ID NO:9) | agagactatggc (SEQ ID NO:34) |
| gcgtatcctgat (SEQ ID NO:10) | gctaattcacca (SEQ ID NO:35) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO:11) | tggtgaattagc (SEQ ID NO:36) |
| ggtgtaaatgat (SEQ ID NO:12) | ggtcgtgtttca (SEQ ID NO:37) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO:13) | tgaaacacgacc (SEQ ID NO:38) |
| gctcccgttaat (SEQ ID NO:14) | gttgattctgtc (SEQ ID NO:39) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | gacagaatcaac (SEQ ID NO:40) |

| | |
|-----------------------------|------------------------------|
| ttaagacctctg (SEQ ID NO:16) | taccggaataa (SEQ ID NO:41) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO:17) | ttattccgggta (SEQ ID NO:42) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | tgettgaacttgg (SEQ ID NO:43) |
| catccaatccag (SEQ ID NO:19) | ccaagtcaagca (SEQ ID NO:44) |
| ctggattggatg (SEQ ID NO:20) | ttccacttaggg (SEQ ID NO:45) |
| cctacgatatac (SEQ ID NO:21) | ccctaagtggaa (SEQ ID NO:46) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO:22) | ttgtctagcggc (SEQ ID NO:47) |
| cgaatgtagagt (SEQ ID NO:23) | gccgctagacaa (SEQ ID NO:48) |
| actctacattcg (SEQ ID NO:24) | tttcccttgcta (SEQ ID NO:49) |
| cggtttgagata (SEQ ID NO:25) | tagcaagggaaa (SEQ ID NO:50) |

其中成分 (ii) 中的寡核苷酸与成分 (i) 中的寡核苷酸互补。

[0038] 实施方案 (15): 包含多孔板的试剂盒, 所述多孔板在板的至少一个孔内具有一个或多个拷贝的寡核苷酸阵列, 阵列位于多个结合域上, 其中一个或多个、任选至少 4 个结合域具有固定在其上的选自以下的不同寡核苷酸序列:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO: 15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

和

(i) 包含选自以下的两种或更多种寡核苷酸的一组寡核苷酸:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO: 15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

其中成分 (ii) 中的寡核苷酸与成分 (i) 中的寡核苷酸互补。

[0039] 实施方案 (16) :一种对多种分析物进行结合测定法的方法,所述方法包括:(a) 使样品同与各自分别结合多种分析物的第一和第二分析物的至少第一和第二结合试剂连接的两个或更多个结合域接触形成包含与第一结合试剂结合的第一分析物和与第二结合试剂结合的第二分析物的复合物,其中 (x) 第一结合域包含第一结合试剂复合物,其包含 (i) 与第一结合域和与第一靶向剂互补物结合的第一靶向剂;和 (ii) 通过连接复合物 (linking complex) 与第一靶向剂互补物结合的第一结合试剂;和 (y) 第二结合域包含第二结合试剂复合物,其包含 (i) 与第二结合域和与第二靶向剂互补物结合的第二靶向剂;和 (ii) 通过连接复合物与第二靶向剂互补物结合的第二结合试剂;

(b) 使第一和第二结合试剂复合物与多种检测试剂接触,所述多种检测试剂包含结合第一分析物或含第一分析物的复合物的第一检测试剂和结合第二分析物或含第二分析物的复合物的第二检测试剂;和 (c) 测量与两个或更多个结合域结合的第一和第二分析物的量。

[0040] 在实施方案 (16) 中,可采用下列特征的一个或多个:第一和第二结合试剂各自包含能够分别与第一和第二分析物结合的受体、配体、抗体、半抗原、抗原、表位、模拟表位、适体或插入剂,例如第一和第二结合试剂各自包含能够分别与第一和第二分析物结合的抗体;第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸、受体-配体对、抗原-抗体对、半抗原-抗体对、表位-抗体对、模拟表位-抗体对、适体-靶分子对、杂交配偶体或插入剂-靶分子对;第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸、受体-配体对、抗原-抗体对、半抗原-抗体对、表位-抗体对、模拟表位-抗体对、适体-靶分子对、杂交配偶体或插入剂-靶分子对;第一靶向剂和第一靶向剂互补物分别包含寡核苷酸和互补寡核苷酸;第二靶向剂和第二靶向剂互补物分别包含寡核苷酸和互补寡核苷酸;连接复合物包含连接剂和与之连接的补充连接剂,例如,连接复合物通过 (a) 硫醇基和马来酰亚胺或碘乙酰胺;(b) 醛和酰肼;或 (c) 炔和叠氮化物之间的结合相互作用形成;或 (a) 连接剂是生物素,补充连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白;(b) 连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白,补充连接剂是生物素;(c) 连接剂是肽,补充连接剂是抗肽抗体;或 (d) 连接剂是抗肽抗体,补充连接剂是肽。

[0041] 此外,实施方案 (16) 可任选包括下列特征的一个或多个:所述多种检测试剂的每一种包含可检测标记;所述多种检测试剂的子集包含可检测标记;测量步骤包括通过光学吸光度、荧光、磷光、化学发光、电化学发光、光散射或磁性测量样品中可检测标记的存在情况;可检测标记是电化学发光标记,测量步骤包括测量电化学发光信号,并使信号与样品中分析物的量关联,例如,使两个或更多个结合域位于电极上,测量步骤还包括将电压波形施加于电极上以产生电化学发光,任选使两个或更多个结合域位于多孔板的一个或多个孔内。

[0042] 实施方案 (16) 可包括进行夹心免疫测定法或竞争免疫测定法。

[0043] 在实施方案 (16) 中,第一靶向剂和第一靶向剂互补物可包含寡核苷酸对,其中所述对选自:

| 对 # | 序列 (5'-3') | 对 # | 序列 (5'-3') |
|-----|--------------------------|-----|---------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQIDNO:1) | 13 | cggtttgagata (SEQIDNO:25) |
| | aactaccgatgt (SEQIDNO:2) | | tatctcaaacg (SEQIDNO:26) |

| | | | |
|----|---------------------------|----|----------------------------|
| 2 | acgtcccagttg (SEQIDNO:3) | 14 | cttacaacgcca (SEQIDNO:27) |
| | caactgggacgt (SEQIDNO:4) | | tggcgttgtaag (SEQIDNO:28) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQIDNO:5) | 15 | ctttctcggcac (SEQIDNO:29) |
| | ggatcttcttct (SEQIDNO:6) | | gtgccgagaaag (SEQIDNO:30) |
| 4 | aggttcagtga (SEQIDNO:7) | 16 | gacataaagcga (SEQIDNO:31) |
| | tgcactgaacct (SEQIDNO:8) | | tcgctttatgtc (SEQIDNO:32) |
| 5 | atcaggatacgc (SEQIDNO:9) | 17 | gccatagtctct (SEQIDNO:33) |
| | gcgtatctgat (SEQIDNO:10) | | agagactatggc (SEQIDNO:34) |
| 6 | atcattaccacc (SEQIDNO:11) | 18 | gctaattcacca (SEQIDNO:35) |
| | ggtggtaatgat (SEQIDNO:12) | | tggatgaattagc (SEQIDNO:36) |
| 7 | attaacgggagc (SEQIDNO:13) | 19 | ggctcgtgttca (SEQIDNO:37) |
| | gtcccgttaat (SEQIDNO:14) | | tgaaacacgacc (SEQIDNO:38) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQIDNO:15) | 20 | gttgattctgtc (SEQIDNO:39) |
| | ttaagacctctg (SEQIDNO:16) | | gacagaatcaac (SEQIDNO:40) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQIDNO:17) | 21 | taccgggaataa (SEQIDNO:41) |
| | aatggacacctg (SEQIDNO:18) | | ttattccgggta (SEQIDNO:42) |
| 10 | catccaatccag (SEQIDNO:19) | 22 | tgcttgacttgg (SEQIDNO:43) |
| | ctggattggatg (SEQIDNO:20) | | ccaagtcaagca (SEQIDNO:44) |
| 11 | cctacgatatac (SEQIDNO:21) | 23 | ttccacttaggg (SEQIDNO:45) |
| | gtatatcgtagg (SEQIDNO:22) | | ccctaagtggaa (SEQIDNO:46) |
| 12 | cgaatgtagagt (SEQIDNO:23) | 24 | ttgtctagcggc (SEQIDNO:47) |
| | actctacattcg (SEQIDNO:24) | | gccgctagacaa (SEQIDNO:48) |
| | | 25 | tttccttgcta (SEQIDNO:49) |
| | | | tagcaaggaaa (SEQIDNO:50) |

此外,在实施方案(16)中,第一靶向剂和第一靶向剂互补物可包含寡核苷酸对,其中所述对选自:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|-------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggatgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaaggaaa (SEQ ID NO: 50) |

在实施方案(16)的一个实例中,第二靶向剂和第二靶向剂互补物可包括寡核苷酸对,其中所述对选自:

| 对 # | 序列 (5'-3') | 对 # | 序列 (5'-3') |
|-----|----------------------------|-----|-----------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO:1) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO:25) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO:2) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO:26) |
| 2 | acgtcccagttg (SEQ ID NO:3) | 14 | cttacaacgcca (SEQ ID NO:27) |
| | caactgggacgt (SEQ ID NO:4) | | tggcgttgtaag (SEQ ID NO:28) |

| | | | |
|----|-----------------------------|----|-----------------------------|
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO:5) | 15 | ctttctcggcac (SEQ ID NO:29) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO:6) | | gtgccgagaaag (SEQ ID NO:30) |
| 4 | aggttcagtgea (SEQ ID NO:7) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO:31) |
| | tgcactgaacct (SEQ ID NO:8) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO:32) |
| 5 | atcaggatagcg (SEQ ID NO:9) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO:33) |
| | gcgtatcctgat (SEQ ID NO:10) | | agagactatggc (SEQ ID NO:34) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO:11) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO:35) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO:12) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO:36) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO:13) | 19 | ggtcgtgttca (SEQ ID NO:37) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO:14) | | tgaaacacgacc (SEQ ID NO:38) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO:39) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO:16) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO:40) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO:17) | 21 | tacccggaataa (SEQ ID NO:41) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | ttattccgggta (SEQ ID NO:42) |
| 10 | catccaatccag (SEQ ID NO:19) | 22 | tgcttgacttgg (SEQ ID NO:43) |
| | ctggattggatg (SEQ ID NO:20) | | ccaagtcaagca (SEQ ID NO:44) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO:21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO:45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO:22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO:46) |
| 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO:23) | 24 | ttgtctagcggc (SEQ ID NO:47) |
| | actctacattcg (SEQ ID NO:24) | | gccgctagacaa (SEQ ID NO:48) |
| | | 25 | tttccttgcta (SEQ ID NO:49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO:50) |

在实施方案 (16) 的又一个实例中,第二靶向剂和第二靶向剂互补物可包括寡核苷酸对,其中所述对选自:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

实施方案 (16) 可包括下列要素的一种或多种:第一靶向剂和第一靶向剂互补物分别包含第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸,第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸各自包含约 10-50 个碱基;第一靶向剂和第一靶向剂互补物分别包含第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸,第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸各自包含约 10-25 个碱基;第一结合试剂是包含生物素分子的抗体,第一靶向剂是包含链霉抗生物素分子的第一寡核苷酸,且连接复合物通过生物素和链霉抗生物素分子之间的反应形成;和/或第二结合试剂是包含其它生物素分子的抗体,第二靶向剂是包含其它链霉抗生物素分子的第二寡核苷酸,且连接复合物通过所述其它生物素和所述其它链霉抗生物素分子之间的反应形成。

[0044] 实施方案 (17) :一种对多种分析物进行结合测定法的方法,所述方法包括:(a) 形成包含对多种分析物中的第一分析物有特异性的第一结合试剂和第一靶向剂的第一结合试剂复合物,其中第一结合试剂与连接剂结合,第一靶向剂与补充连接剂结合,其中第一结合试剂复合物通过连接剂和补充连接剂之间的反应形成;(b) 形成包含对多种分析物中的第二分析物有特异性的第二结合试剂和第二靶向剂的第二结合试剂复合物,其中第二结合试剂与第二连接剂结合,第二靶向剂与第二连接剂互补物结合,其中第二结合试剂复合物通过第二连接剂和第二连接剂互补物之间的反应形成;(c) 在足以使第一靶向剂与第一靶向剂互补物结合且使第二靶向剂与第二靶向剂互补物结合的条件下,使第一和第二结合试剂复合物与各自分别与第一靶向剂互补物和第二靶向剂互补物连接的两个或更多个结合域混合;(d) 使包含多种分析物的样品与步骤 (c) 中形成的混合物混合;(e) 将多种其它的结合试剂加入步骤 (d) 中形成的混合物中,其中所述多种其它的结合试剂包括 (i) 对第一分析物有特异性的第一检测试剂和 / 或第一结合试剂 - 第一分析物复合物;和 (ii) 对第二分析物有特异性的第二检测试剂和 / 或第二结合试剂 - 第二分析物复合物;和 (f) 测量与结合域结合的第一和第二分析物的量。

[0045] 实施方案 (17) 可包括下列特征的一个或多个:第一和第二结合试剂各自包含能够分别与第一和第二分析物结合的受体、配体、抗体、半抗原、抗原、表位、模拟表位、适体或插入剂,例如第一和第二结合试剂各自包含能够分别与第一和第二分析物结合的抗体;第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸、受体 - 配体对、抗原 - 抗体对、半抗原 - 抗体对、抗原 - 抗体对、表位 - 抗体对、模拟表位 - 抗体对、适体 - 靶分子对、杂交配偶体或插入剂 - 靶分子对;第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸、受体 - 配体对、抗原 - 抗体对、半抗原 - 抗体对、抗原 - 抗体对、表位 - 抗体对、模拟表位 - 抗体对、适体 - 靶分子对、杂交配偶体或插入剂 - 靶分子对;第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸;第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸;连接复合物包含连接剂和与之连接的补充连接剂,例如,连接复合物通过 (a) 硫醇基和马来酰亚胺或碘乙酰胺;(b) 醛和酰肼;或 (c) 炔和叠氮化物之间的结合相互作用形成;(a) 连接剂是生物素,补充连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白;(b) 连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白,补充连接剂是生物素;(c) 连接剂是肽,补充连接剂是抗肽抗体;或 (d) 连接剂是抗肽抗体,补充连接剂是肽。

[0046] 此外,实施方案 (17) 还可包括下列特征的一个或多个:所述多种检测试剂的每一种包含可检测标记,例如,所述多种检测试剂的子集包含可检测标记;测量步骤包括通过光学吸光度、荧光、磷光、化学发光、电化学发光、光散射或磁性测量样品中可检测标记的存在情况;可检测标记是电化学发光标记,测量步骤包括测量电化学发光信号,并使信号与样品中分析物的量关联;使两个或更多个结合域位于电极上,测量步骤还包括将电压波形施加于电极上以产生电化学发光,例如两个或更多个结合域位于多孔板的一个或多个孔内。

[0047] 实施方案 (17) 可包含进行夹心免疫测定法或竞争免疫测定法。

[0048] 在实施方案 (17) 中,第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸对,其中所述对选自:

| 对 # | 序列 (5' -3') | 对 # | 序列 (5' -3') |
|-----|--------------------------|-----|---------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQIDNO:1) | 13 | cggtttgagata (SEQIDNO:25) |
| | aactaccgatgt (SEQIDNO:2) | | tatctcaaaccg (SEQIDNO:26) |

| | | | |
|----|---------------------------|----|---------------------------|
| 2 | acgtcccagttg (SEQIDNO:3) | 14 | cttacaacgcca (SEQIDNO:27) |
| | caactgggacgt (SEQIDNO:4) | | tggcgttgtaag (SEQIDNO:28) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQIDNO:5) | 15 | ctttctcggcac (SEQIDNO:29) |
| | ggatcttcttct (SEQIDNO:6) | | gtgccgagaaag (SEQIDNO:30) |
| 4 | aggttcagtgca (SEQIDNO:7) | 16 | gacataaagcga (SEQIDNO:31) |
| | tgcactgaacct (SEQIDNO:8) | | tcgctttatgtc (SEQIDNO:32) |
| 5 | atcaggatacgc (SEQIDNO:9) | 17 | gccatagtctct (SEQIDNO:33) |
| | gcgtatcctgat (SEQIDNO:10) | | agagactatggc (SEQIDNO:34) |
| 6 | atcattaccacc (SEQIDNO:11) | 18 | gctaattcacca (SEQIDNO:35) |
| | ggtggtaatgat (SEQIDNO:12) | | tggtgaattagc (SEQIDNO:36) |
| 7 | attaacgggagc (SEQIDNO:13) | 19 | ggtcgtgtttca (SEQIDNO:37) |
| | gctcccgttaat (SEQIDNO:14) | | tgaaacacgacc (SEQIDNO:38) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQIDNO:15) | 20 | gttgattctgtc (SEQIDNO:39) |
| | ttaagacctctg (SEQIDNO:16) | | gacagaatcaac (SEQIDNO:40) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQIDNO:17) | 21 | taccgggaataa (SEQIDNO:41) |
| | aatggacacctg (SEQIDNO:18) | | ttattccgggta (SEQIDNO:42) |
| 10 | catccaatccag (SEQIDNO:19) | 22 | tgcttgacttgg (SEQIDNO:43) |
| | ctggattggatg (SEQIDNO:20) | | ccaagtcaagca (SEQIDNO:44) |
| 11 | cctacgatatac (SEQIDNO:21) | 23 | ttccacttaggg (SEQIDNO:45) |
| | gtatctcgtagg (SEQIDNO:22) | | ccctaagtggaa (SEQIDNO:46) |
| 12 | cgaatgtagagt (SEQIDNO:23) | 24 | ttgtctagcggc (SEQIDNO:47) |
| | actctacattcg (SEQIDNO:24) | | gccgctagacaa (SEQIDNO:48) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQIDNO:49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQIDNO:50) |

在实施方案 (17) 一个具体实例中, 第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸对, 其中所述对选自:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatctcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

在实施方案 (17) 的又一个实例中, 第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸对, 其中所述对选自:

| 对 # | 序列 (5'-3') | 对 # | 序列 (5'-3') |
|-----|--------------------------|-----|---------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQIDNO:1) | 13 | cggtttgagata (SEQIDNO:25) |
| | aactaccgatgt (SEQIDNO:2) | | tatctcaaaccg (SEQIDNO:26) |
| 2 | acgtcccagttg (SEQIDNO:3) | 14 | cttacaacgcca (SEQIDNO:27) |
| | caactgggacgt (SEQIDNO:4) | | tggcgttgtaag (SEQIDNO:28) |

| | | | |
|----|---------------------------|----|----------------------------|
| 3 | agaagaagatcc (SEQIDNO:5) | 15 | ctttctcggcac (SEQIDNO:29) |
| | ggatcttcttct (SEQIDNO:6) | | gtgccgagaaag (SEQIDNO:30) |
| 4 | aggttcagtgca (SEQIDNO:7) | 16 | gacataaagcga (SEQIDNO:31) |
| | tgcactgaacct (SEQIDNO:8) | | tcgctttatgtc (SEQIDNO:32) |
| 5 | atcaggatacgc (SEQIDNO:9) | 17 | gccatagtctct (SEQIDNO:33) |
| | gcgtatcctgat (SEQIDNO:10) | | agagactatggc (SEQIDNO:34) |
| 6 | atcattaccacc (SEQIDNO:11) | 18 | gctaattcacca (SEQIDNO:35) |
| | ggtggaatgat (SEQIDNO:12) | | tggtgaattagc (SEQIDNO:36) |
| 7 | attaacgggagc (SEQIDNO:13) | 19 | ggctcgtgtttca (SEQIDNO:37) |
| | gctcccgttaat (SEQIDNO:14) | | tgaacacagacc (SEQIDNO:38) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQIDNO:15) | 20 | gttgattctgtc (SEQIDNO:39) |
| | ttaagacctctg (SEQIDNO:16) | | gacagaatcaac (SEQIDNO:40) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQIDNO:17) | 21 | tacccggaataa (SEQIDNO:41) |
| | aatggacacctg (SEQIDNO:18) | | ttattccgggta (SEQIDNO:42) |
| 10 | catccaatccag (SEQIDNO:19) | 22 | tgcttgacttgg (SEQIDNO:43) |
| | ctggattggatg (SEQIDNO:20) | | ccaagtcaagca (SEQIDNO:44) |
| 11 | cctacgatatac (SEQIDNO:21) | 23 | ttccacttaggg (SEQIDNO:45) |
| | gtatatcgtagg (SEQIDNO:22) | | ccctaagtggaa (SEQIDNO:46) |
| 12 | cgaatgtagagt (SEQIDNO:23) | 24 | ttgtctagcggc (SEQIDNO:47) |
| | actctacattcg (SEQIDNO:24) | | gccgctagacaa (SEQIDNO:48) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQIDNO:49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQIDNO:50) |

在实施方案 (17) 的另外又一个实例中, 第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸对, 其中所述对选自:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO: 15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

实施方案 (17) 可包括下列要素的一种或多种: 第一靶向剂和第一靶向剂互补物分别包含第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸, 第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸各自包含约 10-50 个碱基; 第一靶向剂和第一靶向剂互补物分别包含第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸, 第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸各自包含约 10-25 个碱基; 第一结合试剂是包含生物素分子的抗体, 第一靶向剂包含包括链霉抗生物素分子的第一寡核苷酸, 且连接复合物通过生物素和链霉抗生物素分子之间的反应形成; 第二结合试剂是包含其它生物素分子的抗体, 第二靶向剂包含包括其它链霉抗生物素分子的第二寡核苷酸, 且连接复合物通过所述其它生物素和所述其它链霉抗生物素分子之间的反应形成; 第二靶向剂和第二靶向剂互

补物分别包含第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸,第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸各自包含约 10-50 个碱基;第二靶向剂和第二靶向剂互补物分别包含第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸,第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸各自包含约 10-25 个碱基;第二结合试剂是包含生物素分子的抗体,第二靶向剂包含包括链霉抗生物素分子的寡核苷酸,且连接复合物通过生物素和链霉抗生物素分子之间的反应形成;和/或所述方法还包括在混合步骤 (d) 之前洗涤步骤 (c) 中形成的混合物的步骤。

[0049] 实施方案 (18):一种对样品中的多种分析物进行结合测定法的方法,所述方法包括:(a) 形成包含对多种分析物中的第一分析物有特异性的第一结合试剂和第一靶向剂的第一结合试剂复合物,其中第一结合试剂与连接剂结合,第一靶向剂与补充连接剂结合,其中第一结合试剂复合物通过连接剂和补充连接剂之间的反应形成;(b) 形成包含对多种分析物中的第二分析物有特异性的第二结合试剂和第二靶向剂的第二结合试剂复合物,其中第二结合试剂与第二连接剂结合,第二靶向剂与第二连接剂互补物结合,其中第二结合试剂复合物通过第二连接剂和第二连接剂互补物之间的反应形成;(c) 在足以使第一靶向剂与第一靶向剂互补物结合且使第二靶向剂与第二靶向剂互补物结合的条件下,使第一和第二结合试剂复合物和样品与各自分别与第一靶向剂互补物和第二靶向剂互补物连接的两个或更多个结合域的混合;(d) 将多种其它的结合试剂加入步骤 (c) 中形成的混合物中,其中所述多种其它的结合试剂包括 (i) 对第一分析物有特异性的第一检测试剂和/或第一结合试剂-第一分析物复合物;和 (ii) 对第二分析物有特异性的第二检测试剂和/或第二结合试剂-第二分析物复合物;和 (e) 测量与结合域结合的第一和第二分析物的量。

[0050] 另外,实施方案 (18) 可包括下列的一种或多种:第一和第二结合试剂各自包含能够分别与第一和第二分析物结合的受体、配体、抗体、半抗原、抗原、表位、模拟表位、适体或插入剂;第一和第二结合试剂各自包含能够分别与第一和第二分析物结合的抗体;第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸、受体-配体对、抗原-抗体对、半抗原-抗体对、抗原-抗体对、表位-抗体对、模拟表位-抗体对、适体-靶分子对、杂交配偶体或插入剂-靶分子对;第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸、受体-配体对、抗原-抗体对、半抗原-抗体对、抗原-抗体对、表位-抗体对、模拟表位-抗体对、适体-靶分子对、杂交配偶体或插入剂-靶分子对;第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸;第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸;连接复合物包含连接剂和与之连接的补充连接剂,例如连接复合物通过 (a) 硫醇基和马来酰亚胺或碘乙酰胺;(b) 醛和酰肼;或 (c) 炔和叠氮化物之间的结合相互作用形成;例如,(a) 连接剂是生物素,补充连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白;(b) 连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白,补充连接剂是生物素;(c) 连接剂是肽,补充连接剂是抗肽抗体;或 (d) 连接剂是抗肽抗体,补充连接剂是肽。

[0051] 更进一步,实施方案 (18) 可包括下列要素的一种或多种:所述多种检测试剂的每一种包含可检测标记;所述多种检测试剂包含可检测标记;测量步骤包括通过光学吸光度、荧光、磷光、化学发光、电化学发光、光散射或磁性测量样品中可检测标记的存在情况;可检测标记是电化学发光标记,测量步骤包括测量电化学发光信号,并使信号与样品中的分析物的量关联;使两个或更多个结合域位于电极上,测量步骤还包括将电压波形施加于电极上以产生电化学发光;和/或两个或更多个结合域位于多孔板的一个或多个孔内。

[0052] 实施方案 (18) 可包括进行夹心免疫测定法或竞争免疫测定法。

[0053] 在实施方案 (18) 的一个具体实例中, 第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸对, 其中所述对选自:

| 对 # | 序列 (5'-3') | 对 # | 序列 (5'-3') |
|-----|---------------------------|-----|---------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQIDNO:1) | 13 | cggtttgagata (SEQIDNO:25) |
| | aactaccgatgt (SEQIDNO:2) | | tatctcaaaccg (SEQIDNO:26) |
| 2 | acgtcccagttg (SEQIDNO:3) | 14 | cttacaacgcca (SEQIDNO:27) |
| | caactgggacgt (SEQIDNO:4) | | tggcgttgtaag (SEQIDNO:28) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQIDNO:5) | 15 | ctttctcggcac (SEQIDNO:29) |
| | ggatcttcttct (SEQIDNO:6) | | gtgccgagaaag (SEQIDNO:30) |
| 4 | aggttcagtgca (SEQIDNO:7) | 16 | gacataaagcga (SEQIDNO:31) |
| | tgcactgaacct (SEQIDNO:8) | | tcgctttatgtc (SEQIDNO:32) |
| 5 | atcaggatacgc (SEQIDNO:9) | 17 | gccatagtctct (SEQIDNO:33) |
| | gcgatcctgat (SEQIDNO:10) | | agagactatggc (SEQIDNO:34) |
| 6 | atcattaccacc (SEQIDNO:11) | 18 | gctaattcacca (SEQIDNO:35) |
| | ggtggtaatgat (SEQIDNO:12) | | tggtgaattagc (SEQIDNO:36) |
| 7 | attaacgggagc (SEQIDNO:13) | 19 | ggctcgtgttca (SEQIDNO:37) |
| | gctcccgttaat (SEQIDNO:14) | | tgaaacacgacc (SEQIDNO:38) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQIDNO:15) | 20 | gttgattctgtc (SEQIDNO:39) |
| | ttaagacctctg (SEQIDNO:16) | | gacagaatcaac (SEQIDNO:40) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQIDNO:17) | 21 | taccgggaataa (SEQIDNO:41) |
| | aatggacacctg (SEQIDNO:18) | | ttattccgggta (SEQIDNO:42) |
| 10 | catccaatccag (SEQIDNO:19) | 22 | tgcttgacttgg (SEQIDNO:43) |
| | ctggattggatg (SEQIDNO:20) | | ccaagtcaagca (SEQIDNO:44) |
| 11 | cctacgatatac (SEQIDNO:21) | 23 | ttccacttaggg (SEQIDNO:45) |
| | gtatatcgtagg (SEQIDNO:22) | | ccctaagtggaa (SEQIDNO:46) |
| 12 | cgaatgtagagt (SEQIDNO:23) | 24 | ttgtctagcggc (SEQIDNO:47) |
| | actctacattcg (SEQIDNO:24) | | gccgctagacaa (SEQIDNO:48) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQIDNO:49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQIDNO:50) |

在实施方案 (18) 的另一个实施中, 第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸对, 其中所述对选自:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO: 15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

在实施方案 (18) 在另外又一个实例中, 第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸对,

酸对,其中所述对选自:

| 对 # | 序列 (5' -3') | 对 # | 序列 (5' -3') |
|-----|---------------------------|-----|----------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQIDNO:1) | 13 | cggtttgagata (SEQIDNO:25) |
| | aactaccgatgt (SEQIDNO:2) | | tatctcaaaccg (SEQIDNO:26) |
| 2 | acgtcccagttg (SEQIDNO:3) | 14 | cttacaacgcca (SEQIDNO:27) |
| | caactgggacgt (SEQIDNO:4) | | tggcgttgtaag (SEQIDNO:28) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQIDNO:5) | 15 | ctttctcggcac (SEQIDNO:29) |
| | ggatcttcttct (SEQIDNO:6) | | gtgccgagaaag (SEQIDNO:30) |
| 4 | aggttcagtga (SEQIDNO:7) | 16 | gacataaagcga (SEQIDNO:31) |
| | tgcactgaacct (SEQIDNO:8) | | tcgctttatgtc (SEQIDNO:32) |
| 5 | atcaggatacgc (SEQIDNO:9) | 17 | gccatagtctct (SEQIDNO:33) |
| | gcgtatcctgat (SEQIDNO:10) | | agagactatggc (SEQIDNO:34) |
| 6 | atcattaccacc (SEQIDNO:11) | 18 | gctaattcacca (SEQIDNO:35) |
| | ggtggtaatgat (SEQIDNO:12) | | tggatgaattagc (SEQIDNO:36) |
| 7 | attaacgggagc (SEQIDNO:13) | 19 | ggtcgtgtttca (SEQIDNO:37) |
| | gctcccgttaat (SEQIDNO:14) | | tgaaacacgacc (SEQIDNO:38) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQIDNO:15) | 20 | gttgattctgtc (SEQIDNO:39) |
| | ttaagacctctg (SEQIDNO:16) | | gacagaatcaac (SEQIDNO:40) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQIDNO:17) | 21 | taccgggaataa (SEQIDNO:41) |
| | aatggacacctg (SEQIDNO:18) | | ttattccgggta (SEQIDNO:42) |
| 10 | catccaatccag (SEQIDNO:19) | 22 | tgcttgacttgg (SEQIDNO:43) |
| | ctggattggatg (SEQIDNO:20) | | ccaagtcaagca (SEQIDNO:44) |
| 11 | cctacgatatac (SEQIDNO:21) | 23 | ttccacttaggg (SEQIDNO:45) |
| | gtatatcgtagg (SEQIDNO:22) | | ccctaagtggaa (SEQIDNO:46) |
| 12 | cgaatgtagagt (SEQIDNO:23) | 24 | ttgtctagcggc (SEQIDNO:47) |
| | actctacattcg (SEQIDNO:24) | | gccgctagacaa (SEQIDNO:48) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQIDNO:49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQIDNO:50) |

在实施方案 (18) 的又一个实例中,第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸对,其中所述对选自:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|-------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggatgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

实施方案 (18) 可包括下列特征的一个或多个:第一靶向剂和第一靶向剂互补物分别包含第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸,第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸各自包含约 10-50 个碱基;第一靶向剂和第一靶向剂互补物分别包含第一寡核苷酸和第一互补寡核苷

酸,第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸各自包含约 10-25 个碱基;第一结合试剂是包含生物素分子的抗体,第一靶向剂包含包括链霉抗生物素分子的第一寡核苷酸,连接复合物通过生物素和链霉抗生物素分子之间的反应形成;第二结合试剂是包含其它生物素分子的抗体,第二靶向剂包含包括其它链霉抗生物素分子的第二寡核苷酸,且连接复合物通过所述其它生物素和所述其它链霉抗生物素分子之间的反应形成;第二靶向剂和第二靶向剂互补物分别包含第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸,第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸各自包含约 10-50 个碱基;第二靶向剂和第二靶向剂互补物分别包含第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸,第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸各自包含约 10-25 个碱基;第二结合试剂是包含生物素分子的抗体,第二靶向剂包含包括链霉抗生物素分子的第二寡核苷酸,且连接复合物通过生物素和链霉抗生物素分子之间的反应形成;和/或所述方法还包括在混合步骤(d)之前洗涤步骤(c)中形成的混合物的步骤。

[0054] 实施方案(19):一种试剂盒,其包含:(a)包含各自分别包含第一和第二寡核苷酸的多个分立结合域的多孔板;(b)在单独的小瓶、容器或区室中,包含与连接剂结合的第一寡核苷酸互补序列和与第二连接剂结合的第二寡核苷酸互补序列的一组靶向试剂,其中(i)第一寡核苷酸和第一寡核苷酸互补序列包含第一寡核苷酸对,和(ii)第二寡核苷酸和第二寡核苷酸互补序列包含第二寡核苷酸对,其中第一和第二寡核苷酸对分别选自:

| 对 # | 序列 (5' -3') | 对 # | 序列 (5' -3') |
|-----|---------------------------|-----|---------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQIDNO:1) | 13 | cggtttgagata (SEQIDNO:25) |
| | aactaccgatgt (SEQIDNO:2) | | tatctcaaaccg (SEQIDNO:26) |
| 2 | acgtccagttg (SEQIDNO:3) | 14 | cttacaacgcca (SEQIDNO:27) |
| | caactgggacgt (SEQIDNO:4) | | tggcgttgaag (SEQIDNO:28) |
| 3 | agaagaagatec (SEQIDNO:5) | 15 | ctttctcggcac (SEQIDNO:29) |
| | ggatcttcttct (SEQIDNO:6) | | gtgccgagaaag (SEQIDNO:30) |
| 4 | aggttcagtgca (SEQIDNO:7) | 16 | gacataaagcga (SEQIDNO:31) |
| | tgcactgaacct (SEQIDNO:8) | | tcgctttatgtc (SEQIDNO:32) |
| 5 | atcaggatacgc (SEQIDNO:9) | 17 | gccatagtctct (SEQIDNO:33) |
| | gcgtatcctgat (SEQIDNO:10) | | agagactatggc (SEQIDNO:34) |
| 6 | atcattaccacc (SEQIDNO:11) | 18 | gctaattcacca (SEQIDNO:35) |
| | ggttggaatgat (SEQIDNO:12) | | tggtgaattagc (SEQIDNO:36) |
| 7 | attaacgggagc (SEQIDNO:13) | 19 | ggtcgtgtttca (SEQIDNO:37) |
| | gctcccgttaat (SEQIDNO:14) | | tgaaacacgacc (SEQIDNO:38) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQIDNO:15) | 20 | gttgattctgtc (SEQIDNO:39) |
| | ttaagacctctg (SEQIDNO:16) | | gacagaatcaac (SEQIDNO:40) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQIDNO:17) | 21 | taccgggaataa (SEQIDNO:41) |
| | aatggacacctg (SEQIDNO:18) | | ttattccgggta (SEQIDNO:42) |
| 10 | catccaatccag (SEQIDNO:19) | 22 | tgcttgacttgg (SEQIDNO:43) |
| | ctggattggatg (SEQIDNO:20) | | ccaagtcaagca (SEQIDNO:44) |
| 11 | cctacgatatac (SEQIDNO:21) | 23 | ttccacttaggg (SEQIDNO:45) |
| | gtatatcgtagg (SEQIDNO:22) | | ccctaagtggaa (SEQIDNO:46) |
| 12 | cgaatgtagagt (SEQIDNO:23) | 24 | ttgtctagcggc (SEQIDNO:47) |
| | actctacattcg (SEQIDNO:24) | | gccgctagacaa (SEQIDNO:48) |
| | | 25 | tttccttgcta (SEQIDNO:49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQIDNO:50) |

实施方案(20):一种试剂盒,其包含:(a)包含各自分别包含第一和第二寡核苷酸的多个分立结合域的多孔板;(b)在单独的小瓶、容器或区室中,包含与连接剂结合的第一寡核苷酸互补序列和与第二连接剂结合的第二寡核苷酸互补序列的一组靶向试剂,其中(i)第

一寡核苷酸和第一寡核苷酸互补序列包含第一寡核苷酸对,和(ii)第二寡核苷酸和第二寡核苷酸互补序列包含第二寡核苷酸对,其中第一和第二寡核苷酸对分别选自:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggctctta (SEQ ID NO: 15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

实施方案(19)和(20)还可包括(b)包含以下的一个或多个的其它容器、器皿或区室:
(i)包含连接剂的第一结合试剂,其中第一结合试剂对样品中的第一分析物有特异性,(ii)包含补充连接剂的第一靶向剂互补物,其在单独的容器、器皿或区室中或作为(b)(i)的成分提供,(iii)包含第二连接剂的第二结合试剂,其中第二结合试剂对样品中的第二分析物有特异性,和(iv)包含第二连接剂互补物的第二靶向剂互补物,其在单独的容器、器皿或区室中或作为(b)(iii)成分提供。

[0055] 实施方案(21):一种用于测量样品中的多种不同分析物的试剂盒,该试剂盒包含:(a)在固相支持体上包含固定在固相支持体的第一区中的第一靶向剂和固定在固相支持体的第二区中的第二靶向剂的容器、器皿或区室;和(b)包含以下的一个或多个的其它容器、器皿或区室:(i)包含连接剂的第一结合试剂,其中第一结合试剂对样品中的第一分析物有特异性,(ii)包含补充连接剂的第一靶向剂互补物,其在单独的容器、器皿或区室中或作为(b)(i)的成分提供,(iii)包含第二连接剂的第二结合试剂,其中第二结合试剂对样品中的第二分析物有特异性,和(iv)包含第二连接剂互补物的第二靶向剂互补物,其在单独的容器、器皿或区室中或作为(b)(iii)成分提供。

[0056] 实施方案(22):一种用于测量样品中的多种不同分析物的试剂盒,该试剂盒包含:(a)容器、器皿或区室,其在固相支持体上包含固定在固相支持体的第一区中的第一靶向剂和固定在固相支持体的第二区中的第二靶向剂;和(b)包含以下的四个或更多个的其它容器、器皿或区室:(i)第一容器,其含有包含第一连接剂的第一结合试剂,其中第一结合试剂对样品中的第一分析物有特异性,(ii)第二容器,其含有在单独的容器、器皿或区室中提供的包含补充连接剂的第一靶向剂互补物,(iii)第三容器,其含有包含第二连接剂的第二结合试剂,其中第二结合试剂对样品中的第二分析物有特异性,和(iv)第四容器,其含有在单独的容器、器皿或区室中提供的包含第二连接剂互补物的第二靶向剂互补物。

[0057] 实施方案(23):一种用于测量样品中的多种不同分析物的试剂盒,该试剂盒包含:(a)容器、器皿或区室,其在固相支持体上包含固定在固相支持体的第一区中的第一靶

向剂和固定在固相支持体的第二区中的第二靶向剂；和 (b) 包含以下的两个或更多个其它的容器、器皿或区室：(i) 第一容器，其含有包含第一连接剂的第一结合试剂（其中第一结合试剂对样品中的第一分析物有特异性）和包含第一连接剂互补物的第一靶向剂互补物，和 (ii) 第二容器，其含有包含第二连接剂的第二结合试剂（其中第二结合试剂对样品中的第二分析物有特异性）和包含第二连接剂互补物的第二靶向剂互补物。

[0058] 实施方案 (24)：一种试剂盒，其包含 (a) 包含各自分别包含第一和第二寡核苷酸的多个分立结合域的多孔板，第一和第二寡核苷酸各自选自：

| 序列 (5'-3') |
|------------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO:1) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO:2) |
| acgtcccagttg (SEQ ID NO:3) |
| caactgggacgt (SEQ ID NO:4) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO:5) |
| ggatctttct (SEQ ID NO:6) |
| aggttcagtgca (SEQ ID NO:7) |
| tgcactgaacct (SEQ ID NO:8) |
| atcaggatacgc (SEQ ID NO:9) |
| gcgtatcctgat (SEQ ID NO:10) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO:11) |
| ggtggtaatgat (SEQ ID NO:12) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO:13) |
| gctcccgttaat (SEQ ID NO:14) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) |
| ttaagacctctg (SEQ ID NO:16) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO:17) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO:18) |
| catccaatccag (SEQ ID NO:19) |
| ctggattggatg (SEQ ID NO:20) |
| cctacgatatac (SEQ ID NO:21) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO:22) |
| cgaatgtagagt (SEQ ID NO:23) |
| actctacattcg (SEQ ID NO:24) |
| cggtttgagata (SEQ ID NO:25) |
| tatctcaaaccg (SEQ ID NO:26) |
| cttacaaccca (SEQ ID NO:27) |
| tggcgttgtaag (SEQ ID NO:28) |
| ctttctcggcac (SEQ ID NO:29) |
| gtgccgagaaag (SEQ ID NO:30) |
| gacataaagcga (SEQ ID NO:31) |
| tcgctttatgtc (SEQ ID NO:32) |
| gccatagtctct (SEQ ID NO:33) |
| agagactatggc (SEQ ID NO:34) |
| gctaattcacca (SEQ ID NO:35) |
| tggatgaattagc (SEQ ID NO:36) |
| ggtcgtgtttca (SEQ ID NO:37) |
| tgaaacacgacc (SEQ ID NO:38) |
| gttgattctgtc (SEQ ID NO:39) |
| gacagaatcaac (SEQ ID NO:40) |
| taccgggaataa (SEQ ID NO:41) |
| ttattccgggta (SEQ ID NO:42) |

| |
|-----------------------------|
| tgcttgacttgg (SEQ ID NO:43) |
| ccaagtcaagca (SEQ ID NO:44) |
| ttccacttaggg (SEQ ID NO:45) |
| ccctaagtggaa (SEQ ID NO:46) |
| ttgtctagcggc (SEQ ID NO:47) |
| gccgctagacaa (SEQ ID NO:48) |
| tttccttgcta (SEQ ID NO:49) |
| tagcaagggaaa (SEQ ID NO:50) |

实施方案的试剂盒 (24) 可包括下列的一个或多个序列：

| 序列 | 序列 |
|------------------------------|------------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | gceatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | tttccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

实施方案 (24) 还可包括在进行用于多种分析物的结合测定法的方法中使用多孔板的说明书,所述方法包括以下步骤:(a) 形成包含对多种分析物中的第一分析物有特异性的第一结合试剂和第一寡核苷酸的第一结合试剂复合物,其中第一结合试剂与连接剂结合且第一寡核苷酸与补充连接剂结合,其中第一结合试剂复合物通过连接剂和补充连接剂之间的反应形成;(b) 形成包含对多种分析物中的第二分析物有特异性的第二结合试剂和第二寡核苷酸的第二结合试剂复合物,其中第二结合试剂与第二连接剂结合且第二寡核苷酸与第二连接剂互补物结合,其中第二结合试剂复合物通过第二连接剂和第二连接剂互补物之间的反应形成;(c) 在足以使第一寡核苷酸与第一寡核苷酸互补序列结合并且使第二寡核苷酸与第二寡核苷酸互补序列结合的条件下,使第一和第二结合试剂复合物与各自分别与第一寡核苷酸互补序列和第二寡核苷酸互补序列连接的两个或更多个结合域混合;(d) 使包含多种分析物的样品与步骤 (c) 中形成的混合物混合;(e) 将多种其它的结合试剂加入步骤 (d) 中形成的混合物中,其中所述多种其它的结合试剂包括 (i) 对第一分析物有特异性的第一检测试剂和 / 或第一结合试剂 - 第一分析物复合物;和 (ii) 对第二分析物有特异性的第二检测试剂和 / 或第二结合试剂 - 第二分析物复合物;和 (f) 测量与结合域结合的第一和第二分析物的量。

[0059] 另外,实施方案 (24) 可包括下列要素的一种或多种:第一和第二结合试剂各自包含能够分别与第一和第二分析物结合的受体、配体、抗体、半抗原、抗原、表位、模拟表位、适体或插入剂,例如第一和第二结合试剂各自包含能够分别与第一和第二分析物结合的抗体;第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸、受体 - 配体对、抗

原-抗体对、半抗原-抗体对、抗原-抗体对、表位-抗体对、模拟表位-抗体对、适体-靶分子对、杂交配偶体或插入剂-靶分子对；第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸、受体-配体对、抗原-抗体对、半抗原-抗体对、抗原-抗体对、表位-抗体对、模拟表位-抗体对、适体-靶分子对、杂交配偶体或插入剂-靶分子对；第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸；第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸和互补寡核苷酸；连接复合物包含连接剂和与之连接的补充连接剂，例如连接复合物通过 (a) 硫醇基和马来酰亚胺或碘乙酰胺；(b) 醛和酰肼；或 (c) 炔和叠氮化物之间的结合相互作用形成；或 (a) 连接剂是生物素，补充连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白；(b) 连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白，补充连接剂是生物素；(c) 连接剂是肽，补充连接剂是抗肽抗体；或 (d) 连接剂是抗肽抗体，补充连接剂是肽。

[0060] 另外，实施方案 (24) 还可在单独的小瓶、容器或区室中包含多种检测试剂。例如所述多种检测试剂可包含可检测标记，例如所述多种检测试剂的子集包含可检测标记。在一个实例中，可检测标记是电化学发光标记。两个或更多个结合域可位于电极上。任选两个或更多个结合域位于多孔板的一个或多个孔内。

[0061] 在实施方案 (24) 一个具体实例中，第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸对，其中所述对选自：

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|-------------------------------|----|-------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatctttcttct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gtccccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO: 15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggatgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatacgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

在实施方案 (24) 中，第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含寡核苷酸对，其中所述对选自：

| 对 # | 序列 (5'-3') |
|-----|---------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQIDNO:1) |
| | aactaccgatgt (SEQIDNO:2) |
| 2 | acgtcccagttg (SEQIDNO:3) |
| | caactgggacgt (SEQIDNO:4) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQIDNO:5) |
| | ggatctttcttct (SEQIDNO:6) |
| 4 | aggttcagtgca (SEQIDNO:7) |
| | tgactgaacct (SEQIDNO:8) |
| 5 | atcaggatagc (SEQIDNO:9) |
| | gcgtatcctgat (SEQIDNO:10) |

| | |
|----|---------------------------|
| 6 | atcattaccacc (SEQIDNO:11) |
| | ggtggtaatgat (SEQIDNO:12) |
| 7 | attaacgggagc (SEQIDNO:13) |
| | gctcccgttaat (SEQIDNO:14) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQIDNO:15) |
| | ttaagacctctg (SEQIDNO:16) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQIDNO:17) |
| | aatggacacctg (SEQIDNO:18) |
| 10 | catccaatccag (SEQIDNO:19) |
| | ctggattggatg (SEQIDNO:20) |
| 11 | cctacgatatac (SEQIDNO:21) |
| | gtatatcgtagg (SEQIDNO:22) |
| 12 | cgaatgtagagt (SEQIDNO:23) |
| | actctacattcg (SEQIDNO:24) |
| 13 | cggtttgagata (SEQIDNO:25) |
| | tatctcaaaccg (SEQIDNO:26) |
| 14 | cttacaacgcca (SEQIDNO:27) |
| | tggcgttgtaag (SEQIDNO:28) |
| 15 | ctttctcggcac (SEQIDNO:29) |
| | gtgccgagaaag (SEQIDNO:30) |
| 16 | gacataaagcga (SEQIDNO:31) |
| | tcgctttatgtc (SEQIDNO:32) |
| 17 | gccatagtctct (SEQIDNO:33) |
| | agagactatggc (SEQIDNO:34) |
| 18 | gctaattacca (SEQIDNO:35) |
| | tggtgaattage (SEQIDNO:36) |
| 19 | ggctgtgttca (SEQIDNO:37) |
| | tgaaacacgacc (SEQIDNO:38) |
| 20 | gttgattctgtc (SEQIDNO:39) |
| | gacagaatcaac (SEQIDNO:40) |
| 21 | taccggaataa (SEQIDNO:41) |
| | ttattccgggta (SEQIDNO:42) |
| 22 | tgcttgacttgg (SEQIDNO:43) |
| | ccaagtcaagca (SEQIDNO:44) |
| 23 | ttccacttaggg (SEQIDNO:45) |
| | ccctaagtggaa (SEQIDNO:46) |
| 24 | ttgtctagcggc (SEQIDNO:47) |
| | gccgctagacaa (SEQIDNO:48) |
| 25 | tttcccttgcta (SEQIDNO:49) |
| | tagcaagggaaa (SEQIDNO:50) |

在实施方案 (24) 的另一个具体实例中, 第一靶向剂和第一靶向剂互补物包含寡核苷酸对, 其中所述对选自:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|---|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatcttctct (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gctcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |

| | | | |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattage (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

实施方案 (24) 还可包括下列的一种或多种:第一靶向剂和第一靶向剂互补物分别包含第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸,第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸各自包含约 10-50 个碱基;第一靶向剂和第一靶向剂互补物分别包含第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸,第一寡核苷酸和第一互补寡核苷酸各自包含约 10-25 个碱基;第一结合试剂是包含生物素分子的抗体,第一靶向剂包含包括链霉抗生物素分子的第一寡核苷酸,连接复合物通过生物素和链霉抗生物素分子之间的反应形成;第二结合试剂是包含其它生物素分子的抗体,第二靶向剂包含包括其它链霉抗生物素分子的第二寡核苷酸,且连接复合物通过所述其它生物素和所述其它链霉抗生物素分子之间的反应形成;第二靶向剂和第二靶向剂互补物分别包含第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸,第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸各自包含约 10-50 个碱基;第二靶向剂和第二靶向剂互补物分别包含第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸,第二寡核苷酸和第二互补寡核苷酸各自包含约 10-25 个碱基;和/或第二结合试剂是包含生物素分子的抗体,第二靶向剂包含包括链霉抗生物素分子的第二寡核苷酸,且连接复合物通过生物素和链霉抗生物素分子之间的反应形成。

[0062] 在前述实施方案的任一个或多个中,第二结合域上的第一结合试剂的量可 <1% 的第一结合域上的第一结合试剂的量。

[0063] 实施方案 (25):一种试剂盒,其包含:多孔板,其在板的至少一个孔内具有一个或多个拷贝的寡核苷酸阵列,阵列位于多个结合域上,其中至少 4 个结合域具有固定在其上的选自以下的不同寡核苷酸序列:

| | |
|-----------------------------|------------------------------|
| acatcggtagtt (SEQ ID NO:1) | tatctcaaaccg (SEQ ID NO:26) |
| aactaccgatgt (SEQ ID NO:2) | cttacaacgccca (SEQ ID NO:27) |
| acgtcccagttg (SEQ ID NO:3) | tggcggttgaag (SEQ ID NO:28) |
| caactgggacgt (SEQ ID NO:4) | ctttctcggcac (SEQ ID NO:29) |
| agaagaagatcc (SEQ ID NO:5) | gtgccgagaaag (SEQ ID NO:30) |
| ggatcttcttct (SEQ ID NO:6) | gacataaagcga (SEQ ID NO:31) |
| aggttcagtgca (SEQ ID NO:7) | tcgctttatgtc (SEQ ID NO:32) |
| tgcactgaacct (SEQ ID NO:8) | gccatagtctct (SEQ ID NO:33) |
| atcaggatacgc (SEQ ID NO:9) | agagactatggc (SEQ ID NO:34) |
| gcgtatcctgat (SEQ ID NO:10) | gctaattcacca (SEQ ID NO:35) |
| atcattaccacc (SEQ ID NO:11) | tggtgaattage (SEQ ID NO:36) |
| ggtggtaatgat (SEQ ID NO:12) | ggtcgtgtttca (SEQ ID NO:37) |
| attaacgggagc (SEQ ID NO:13) | tgaaacacgacc (SEQ ID NO:38) |
| gctcccgttaat (SEQ ID NO:14) | gttgattctgtc (SEQ ID NO:39) |
| cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | gacagaatcaac (SEQ ID NO:40) |
| ttaagacctctg (SEQ ID NO:16) | taccggaataa (SEQ ID NO:41) |
| caggtgtccatt (SEQ ID NO:17) | ttattcgggta (SEQ ID NO:42) |
| aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | tgcttgacttgg (SEQ ID NO:43) |
| catccaatccag (SEQ ID NO:19) | ccaagtcagca (SEQ ID NO:44) |
| ctggattggatg (SEQ ID NO:20) | ttccacttaggg (SEQ ID NO:45) |

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| cctacgatatac (SEQ ID NO:21) | ccctaagtggaa (SEQ ID NO:46) |
| gtatatcgtagg (SEQ ID NO:22) | ttgtctagcggc (SEQ ID NO:47) |
| cgaatgtagagt (SEQ ID NO:23) | gccgctagacaa (SEQ ID NO:48) |
| actctacattcg (SEQ ID NO:24) | tttcccttgcta (SEQ ID NO:49) |
| cggtttgagata (SEQ ID NO:25) | tagcaaggga (SEQ ID NO:50) |

其中不同的寡核苷酸序列各自被连接剂修饰。

[0064] 实施方案 (26) :一种试剂盒,其包含:多孔板,其在板的至少一个孔内具有一个或多个拷贝的寡核苷酸阵列,阵列位于多个结合域上,其中至少 4 个结合域具有固定在其上的选自以下的不同寡核苷酸序列:

| 对 | 序列 | 对 | 序列 |
|----|------------------------------|----|------------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) | 12 | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) | | actctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) | 13 | cggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | ggatctttctt (SEQ ID NO: 6) | | tatctcaaacgg (SEQ ID NO: 26) |
| 6 | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) | 16 | gacataaagcga (SEQ ID NO: 31) |
| | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) | | tcgctttatgtc (SEQ ID NO: 32) |
| 7 | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) | 17 | gccatagtctct (SEQ ID NO: 33) |
| | gtcccgttaat (SEQ ID NO: 14) | | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQ ID NO:15) | 18 | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) | | tggtgaattagc (SEQ ID NO: 36) |
| 9 | cagggttcatt (SEQ ID NO: 17) | 20 | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | aatggacacctg (SEQ ID NO:18) | | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 11 | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) | 23 | ttccacttaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | gtatatcgtagg (SEQ ID NO: 22) | | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| | | 25 | tttcccttgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | | | tagcaaggga (SEQ ID NO: 50) |

实施方案 (25) 和 (26) 可包括下列要素的一种或多种:连接剂包含生物素、链霉抗生物素、抗生物素蛋白、氨基、硫醇基、醛基、酰肼基、叠氨基、炔基、马来酰亚胺基或碘乙酰胺基;连接剂是链霉抗生物素;试剂盒在一个或多个单独的小瓶、容器或区室中还包括:(a) 一组结合试剂对,其中该组的每种结合试剂对包含多种分析物的样品中的分析物有特异性,其中任选该组内的结合试剂对含有包含补充连接剂的第一结合试剂,且更进一步任选试剂盒在一个或多个单独的小瓶、容器或区室中还包括补充连接剂。在一个实例中,结合试剂是抗体。

[0065] 前述实施方案例如实施方案 (25) 和 (26) 的试剂盒,还可在一个或多个单独的小瓶、容器或区室中包括标记试剂盒以及一种或多种其它的试剂,所述试剂包括:测定缓冲液、稀释剂、读取缓冲液或其组合。标记试剂盒可在一个或多个单独的小瓶、容器或区室中包括 SULFO-TAG™ NHS 酯、LC-生物素 NHS 酯、离心柱 (spin column)、标记缓冲溶液、ECL 读取缓冲液、测定缓冲液和抗体缓冲液、测定稀释剂和抗体稀释剂或其组合。

[0066] 在实施方案 (25) 和 (26) 中,阵列包括至少 7 个结合域,或至少 10 个结合域,或至少 16 个结合域,或至少 25 个结合域。此外,板可包括至少 24 个孔,或至少 96 个孔,或至少 384 个孔。阵列还可包括至少 10 种寡核苷酸,或至少 16 种寡核苷酸,或至少 25 种寡核苷酸。

[0067] 在前述实施方案任一个的具体实例中,组中结合试剂对的数目等于阵列中结合域的数目,或组中结合试剂对的数目小于阵列中结合域的数目。

[0068] 附图简述

提供附图以说明而非限制本发明的范围。

[0069] 图 1(a)-(d) 说明包括结合试剂 A'、B' 和 C' 通过靶向剂 A''、B'' 和 C'' 分别与靶向剂互补物 A'''、B''' 和 C''' 之间的反应,分别与多个结合域 X、Y 和 Z 直接缀合的测定形式。使靶向剂在一系列结合域 X、Y 和 Z 上与结合试剂 A'、B' 和 C' 连接,分别形成结合试剂复合物 A_{RC} 、 B_{RC} 和 C_{RC} (图 (b)),其分别与分析物 A、B 和 C 反应。通过加入标记的检测试剂 A*、B* 和 C* 检测固相支持体上分析物 A、B 和 C 的存在情况,所述标记的检测试剂分别与分析物 A、B 和 C 反应 (图 (c))。图 1(d) 是结合域 X、Y 和 Z 上形成的结合试剂复合物的放大图,分别为结合试剂复合物 A_{RC} 、 B_{RC} 和 C_{RC} 。

[0070] 图 2(a)-(d) 说明包括结合试剂例如抗体 A'、B' 和 C' 通过寡核苷酸靶向剂 A''、B'' 分别与 C'' 和寡核苷酸靶向剂互补物 A'''、B''' 和 C''' 之间的反应分别与多个结合域 X、Y 和 Z 直接缀合的测定形式。寡核苷酸靶向剂在一系列结合域 X、Y 和 Z 上与结合试剂 A'、B' 和 C' 连接,分别形成结合试剂复合物 A_{RC} 、 B_{RC} 和 C_{RC} (图 (b)),其分别与分析物 A、B 和 C 反应。通过加入标记的检测试剂 A*、B* 和 C* 检测固相支持体上分析物 A、B 和 C 的存在情况,所述标记的检测试剂分别与分析物 A、B 和 C 反应 (图 (c))。图 2(d) 是分别在结合域 X、Y 和 Z 上形成的结合试剂复合物的放大图,分别为结合试剂复合物 A_{RC} 、 B_{RC} 和 C_{RC} 。

[0071] 图 3(a)-(e) 说明涉及多种结合试剂 A'、B' 和 C' 通过一系列连接复合物分别与多个结合域 X、Y 和 Z 缀合的测定形式。如图 (a) 所示,结合试剂 A'、B' 和 C' 与连接剂 L_A 、 L_B 和 L_C 连接,而靶向剂 A''、B'' 和 C'' 分别与补充连接剂 L_A' 、 L_B' 和 L_C' 连接。结合试剂 A'、B' 和 C' 与靶向剂混合,分别形成结合试剂复合物 A_{RC} 、 B_{RC} 和 C_{RC} 。将图 (a) 中形成的结合试剂复合物与靶向剂互补物 A'''、B''' 和 C''' 与之结合的多个结合域 X、Y 和 Z 混合 (图 (b)) 以使结合试剂复合物附着在结合域上 (参见图 (c))。将包含分析物 A、B 和 C 的样品加入混合物中,同时或依次地还加入一组检测试剂 A*、B* 和 C* 以检测与结合域结合的分析物。图 3(e) 是结合域 X、Y 和 Z 上形成的结合试剂复合物的放大图,分别为结合试剂复合物 A_{RC} 、 B_{RC} 和 C_{RC} 。

[0072] 图 4(a)-(e) 说明涉及多种结合试剂 A'、B' 和 C' 通过一系列连接复合物分别与多个结合域 X、Y 和 Z 缀合的测定形式。如图 (a) 所示,结合试剂 A'、B' 和 C' 与连接剂 L_A 、 L_B 和 L_C 连接,而寡核苷酸靶向剂 A''、B'' 和 C'' 分别与补充连接剂 L_A' 、 L_B' 和 L_C' 连接。使结合试剂 A'、B' 和 C' 与寡核苷酸靶向剂混合,分别形成结合试剂复合物 A_{RC} 、 B_{RC} 和 C_{RC} 。使图 (a) 中形成的结合试剂复合物与寡核苷酸靶向剂互补物 A'''、B''' 和 C''' 与之结合的多个结合域 X、Y 和 Z 混合 (图 (b)) 以使结合试剂复合物附着在结合域上 (参见图 (c))。将包含分析物 A、B 和 C 的样品加入混合物中,同时或依次地还加入一组检测试剂 A*、B* 和 C* 以检测与结合域结合的分析物。图 4(e) 是结合域 X、Y 和 Z 上形成的结合试剂复合物的放大图,分别为结合试剂复合物 A_{RC} 、 B_{RC} 和 C_{RC} 。

[0073] 图 5(a)-(d) 说明可用于本发明的测定形式的试剂的不同组合。在图 5(a) 中,所有试剂在单一步骤中与样品混合,而在图 5(b) 中,将所有试剂混合,然后加到表面上,在 5(c) 中,将修饰的结合试剂和修饰的靶向剂互补物混合,加到带有各自包括靶向剂的多个结合域的表面上,在一个或两个步骤中使表面-混合物与样品和检测试剂混合 (样品和检测试剂的一步添加见图 5(c),样品和检测试剂的依次添加见图 5(d))。

[0074] 图 6(a)-(f) 显示各种修饰的表面,例如携带可用于本发明的测定形式的多个结合域的粒子和基质。

[0075] 图 7 显示用磺基-SMCC 化学修饰抗体以产生可通过寡核苷酸上的硫醇基与寡核苷酸缀合的马来酰亚胺激活抗体的程序。

[0076] 图 8(a)-(g) 显示 7 丛 (plex) 趋化因子面板和 10 丛 TH1/TH2 面板上的直接测定形式的结果。

[0077] 图 9(a)-(c) 显示用于产生和使用利用生物素化俘获抗体和用链霉抗生物素分子修饰的寡核苷酸的间接测定形式中的多孔测定板的程序。

[0078] 图 10(a)-(c) 显示用于产生和使用利用生物素化俘获抗体、净链霉抗生物素和生物素化寡核苷酸的间接测定形式中的多孔测定板的程序。

[0079] 图 11(a)-(g) 显示细胞因子 B 面板的 3 种不同寡核苷酸介导的测定形式的 LOD 值的比较。

[0080] 发明详述

除非本文另有定义,否则与本发明联用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非文中另有要求,否则单数术语应包括复数,复数术语应包括单数。冠词“一”和“一个”在本文使用是指物品的一个或多于一个(即至少一个)的语法对象。举例来说,“一个要素”意指一个要素或多于一个要素。

[0081] 本发明提供灵活的固相结合测定形式,允许用户或生产商根据具体的用户要求配置测定。本文所述方法和试剂盒提供产生用于多种目标分析物的多路结合测定法的灵活平台。在支持体包括携带一系列通用靶向剂互补物的多个结合域的情况下,有可能配置多路测定用于任一组的分析物。只需要选择在哪一个结合域中可评价哪一种分析物,并且将合适的结合试剂和靶向剂与各选择的结合域配对。使用该平台,用户可建构个人化的测定面板 (assay panel)。

[0082] 这类灵活的多路测定形式可使用本文公开的方法和产品实现,例如,进行用于多种目标分析物的多路结合测定法的方法可采用以下步骤实施:

- (a) 在一个或多个步骤中,将下列成分混合:
 - (i) 包含第一目标分析物和第二目标分析物的样品,
 - (ii) 固定在第一结合域上的第一靶向剂,
 - (iii) 与连接剂连接的第一靶向剂互补物,其中第一靶向剂互补物是第一靶向剂的结合配偶体,
 - (iv) 与补充连接剂连接的第一结合试剂,其中第一结合试剂是第一分析物的结合配偶体,
 - (v) 固定在第二结合域的第二靶向剂,
 - (vi) 与连接剂连接的第二靶向剂互补物,其中第二靶向剂互补物是第二靶向剂的结合配偶体,
 - (vii) 与补充连接剂连接的第二结合试剂,其中第二结合试剂是第二分析物的结合配偶体,和
 - (viii) 任选至少两份的桥接剂,
- 其中,如果省略桥接剂,则各连接剂是补充连接剂的结合配偶体,或如果包括桥接剂,

则桥接剂具有用于连接剂之一的第一结合部位和用于补充连接剂之一的其它结合部位；

(b) 形成

(i) 在第一结合域上的包含第一靶向剂、第一靶向剂互补物、第一结合试剂和第一分析物的第一结合复合物,和

(ii) 在第二结合域上的包含第二靶向剂、第二靶向剂互补物、第二结合试剂和第二分析物的第二结合复合物,和

(c) 分别测量第一和第二结合域上的第一和第二分析物的量。

[0083] 在一个实施方案中,如果不使用桥接剂,则所述方法包括(a)在一个或多个步骤中将成分(i)-(vii)混合,(b)分别在第一和第二结合域上形成第一和第二结合复合物,和(c)分别测量第一和第二结合域上的第一和第二分析物的量。例如,第一靶向剂互补物和第一结合试剂可作为预先结合的第一靶向复合物提供,所述第一靶向复合物包括通过连接剂和补充连接剂之间的结合相互作用连接的第一靶向剂互补物和第一结合试剂;同样,第二靶向剂互补物和第二结合试剂可作为预先结合的第二靶向复合物提供,所述第二靶向复合物包含通过连接剂和补充连接剂之间的结合相互作用连接的第二靶向剂互补物和第二结合试剂。在该实施方案中,可提供与固定在第一结合域上的第一靶向剂预先结合的第一靶向复合物;同样,可提供与固定在第二结合域上的第二靶向剂预先结合的第二靶向复合物。当第一和第二结合试剂以预先结合的靶向复合物提供时,混合步骤还可包括使第一和第二靶向复合物与样品混合形成其混合物,使第一分析物与第一靶向复合物中的第一结合试剂结合并使第二分析物与第二靶向复合物中的第二结合试剂结合,使分别与第一和第二分析物结合的第一和第二靶向复合物的混合物与第一和第二结合域接触。通过使第一靶向复合物与第一结合域上的第一靶向剂结合并使第二靶向复合物与第二结合域上的第二靶向剂结合,从而形成第一域和第二域上的结合复合物。此外,混合步骤还可包括使第一和第二靶向复合物与样品混合;使第一分析物与第一靶向复合物中的第一结合试剂结合并使第二分析物与第二靶向复合物中的第二结合试剂结合。

[0084] 在另一个备选的实施方案中,混合步骤(a)包括以下步骤:在第一体积的液体中,将所述第一靶向剂互补物、所述第一结合试剂和所述桥接试剂(如使用的话)混合,并且使所述第一靶向剂互补物和所述第一结合试剂通过它们所连接的连接剂连接,形成第一靶向复合物;在第二体积的液体中,使所述第二靶向剂互补物、所述第二结合试剂和所述桥接试剂(如使用的话)混合,并且使所述第二靶向剂复合物互补物和所述第二结合试剂通过它们所连接的连接剂连接,形成第二靶向复合物。在该实施方案中,混合步骤(a)还可包括以下步骤:使所述第一和第二靶向复合物混合,使所述第一和第二靶向复合物的混合物与所述第一和第二结合域接触,使所述第一靶向复合物与所述第一结合域上的所述第一靶向剂结合,并使所述第二靶向复合物与所述第二结合域上的所述第二靶向剂结合。在该实施方案中,混合步骤还包括使第一和第二靶向复合物的混合物与样品混合,使第一分析物与第一靶向复合物中的第一结合试剂结合并使第二分析物与第二靶向复合物中的第二结合试剂结合。可在使第一和第二靶向复合物与第一和第二结合域接触之前使第一和第二靶向复合物与样品混合;可在使第一和第二靶向复合物与第一和第二结合域接触之后,使第一和第二靶向复合物与样品混合;或可使第一和第二靶向复合物与样品的混合和与第一和第二结合域的接触同时进行。

[0085] 如果在方法中包括桥接剂,则连接剂和补充连接剂各自与桥接剂结合,混合步骤因此使这些要素与连接剂和补充连接剂连接在一起。例如,混合步骤(a)包括在第一体积的液体中,(xi)使第一靶向剂互补物、第一结合试剂和桥接试剂混合,并且还包括经通过桥接复合物连接第一靶向剂互补物和第一结合试剂形成第一靶向复合物,所述桥接复合物包括与补充连接剂与之结合的桥接剂结合的连接剂。混合步骤(a)还包括在第二体积的液体中,(xii)将第二靶向剂互补物、第二结合试剂和桥接试剂混合,并且还包括经通过桥接复合物连接第二靶向剂互补物和第二结合试剂形成第二靶向复合物,所述桥接复合物包括与补充连接剂与之结合的桥接剂结合的连接剂。在该实施方案中,混合步骤(a)还可包括(xiii)使第一和第二靶向复合物混合,并使第一和第二靶向复合物的混合物与第一和第二结合域混合,结合第一结合域上的第一靶向复合物,并结合第二结合域上的第二靶向复合物。在该实施方案中,混合步骤还包括(xiv)使第一和第二靶向复合物与样品混合,使第一分析物与第一靶向复合物中的第一结合试剂结合,并使第二分析物与第二靶向复合物中的第二结合试剂结合。可在使第一和第二靶向复合物与第一和第二结合域接触之前使第一和第二靶向复合物与样品混合;可在使第一和第二靶向复合物与第一和第二结合域接触之后使第一和第二靶向复合物样品混合;或可使第一和第二靶向复合物与样品的混合和与第一和第二结合域的接触同时进行。

[0086] 本文所述方法可用来多路测定样品中的多种目标分析物。在这一方面,样品含有一种或多种其它的目标分析物,对于各种其它的目标分析物,混合步骤(a)还包括在一个或多个步骤中将以下混合:(ix)固定在其它结合域上的其它靶向剂、与连接剂连接的其它靶向剂互补物和与补充连接剂连接的其它结合试剂,和(x)其它结合域上的包含其它靶向剂、其它的靶向剂互补物、其它的结合试剂和其它分析物的其它结合复合物;形成步骤(b)还包括形成(iii)在其它结合域上的包含其它靶向剂、其它靶向剂互补物、其它结合试剂和其它分析物的其它结合复合物;和步骤(c)的测量还包括测量其它结合域上的其它分析物的量。

[0087] 在一个具体的实施方案中,本发明包括进行用于多种分析物的结合测定法的方法,所述方法包括(a)使样品同与各自分别结合多种分析物的第一和第二分析物的至少第一和第二结合试剂连接的两个或更多个结合域接触以形成包含与第一结合试剂结合的第一分析物和与第二结合试剂结合的第二分析物的复合物,其中(x)第一结合域包含第一结合试剂复合物,其包含(i)与第一结合域和与第一靶向剂互补物结合的第一靶向剂;和(ii)通过连接复合物与第一靶向剂互补物结合的第一结合试剂;和(y)第二结合域包含第二结合试剂复合物,其包含(i)与第二结合域和与第二靶向剂互补物结合的第二靶向剂;和(ii)通过连接复合物与第二靶向剂互补物结合的第二结合试剂;(b)使第一和第二结合试剂复合物与多种检测试剂接触,所述检测试剂包含结合第一分析物或包含第一分析物的复合物的第一检测试剂和结合第二分析物或包含第二分析物的复合物的第二检测试剂;和(c)测量与两个或更多个结合域结合的第一和第二分析物的量。

[0088] 在另一个具体的实施方案中,所述方法包括:(a)形成包含对多种分析物中的第一分析物有特异性的第一结合试剂和第一靶向剂的第一结合试剂复合物,其中第一结合试剂与连接剂结合,第一靶向剂与补充连接剂结合,其中第一结合试剂复合物通过连接剂和补充连接剂之间的反应形成;(b)形成包含对多种分析物中的第二分析物有特异性的第二

结合试剂和第二靶向剂的第二结合试剂复合物,其中第二结合试剂与第二连接剂结合,第二靶向剂与第二连接剂互补物结合,其中第二结合试剂复合物通过第二连接剂和第二连接剂互补物之间的反应形成;(c)在足以使第一靶向剂与第一靶向剂互补物结合且使第二靶向剂与第二靶向剂互补物结合的条件下,使第一和第二结合试剂复合物与各自分别与第一靶向剂互补物和第二靶向剂互补物连接的两个或更多个结合域混合;(d)使包含多种分析物的样品与步骤(c)中形成的混合物混合;(e)将多种其它的结合试剂加入步骤(d)中形成的混合物中,其中所述多种其它的结合试剂包括(i)对第一分析物有特异性的第一检测试剂和/或第一结合试剂-第一分析物复合物;和(ii)对第二分析物有特异性的第二检测试剂和/或第二结合试剂-第二分析物复合物;和(f)测量与结合域结合的第一和第二分析物的量。

[0089] 又一个具体的实施方案包括(a)形成包含对多种分析物中的第一分析物有特异性的第一结合试剂和第一靶向剂的第一结合试剂复合物,其中第一结合试剂与连接剂结合,第一靶向剂与补充连接剂结合,其中第一结合试剂复合物通过连接剂和补充连接剂之间的反应形成;(b)形成包含对多种分析物中的第二分析物有特异性的第二结合试剂和第二靶向剂的第二结合试剂复合物,其中第二结合试剂与第二连接剂结合,第二靶向剂与第二连接剂互补物结合,其中第二结合试剂复合物通过第二连接剂和第二连接剂互补物之间的反应形成;(c)在足以使第一靶向剂与第一靶向剂互补物结合且使第二靶向剂与第二靶向剂互补物结合的条件下,使第一和第二结合试剂复合物和样品与各自分别与第一靶向剂互补物和第二靶向剂互补物连接的两个或更多个结合域混合;(d)将多种其它的结合试剂加入步骤(c)中形成的混合物中,其中所述多种其它的结合试剂包括(i)对第一分析物有特异性的第一检测试剂和/或第一结合试剂-第一分析物复合物;和(ii)对第二分析物有特异性的第二检测试剂和/或第二结合试剂-第二分析物复合物;和(e)测量与结合域结合的第一和第二分析物的量。

[0090] 本发明方法的具体实施方案见图3-6。图1和2说明不包括连接复合物的直接测定方法。提供这些图用于比较目的。图1说明用于分析物A、B和C的直接多路测定法。使对这些分析物有特异性的结合试剂A'、B'和C'分别与靶向剂A''、B''和C''连接。将包括与其相应的靶向剂连接的这些结合试剂的溶液与固相混合,靶向剂互补物A'''、B'''和C'''分别与所述固相上的一系列分立结合域结合。结合试剂吸附在表面上形成结合试剂复合物 A_{RC} 、 B_{RC} 和 C_{RC} ,各结合试剂通过靶向剂互补物固定在表面上的分立结合域上。使表面与包含分析物A、B和C的样品以及检测结合试剂A*、B*和C*接触,检测结合试剂A*、B*和C*能够分别与分析物A、B和C和/或包含这些分析物的复合物结合。检测结合试剂包括可检测标记。或者,使表面与包含多种分析物的样品接触,随后与检测结合试剂的混合物接触。一旦检测结合试剂与表面结合,任选洗涤表面以除去未结合的试剂,通过与各分立结合域结合的检测试剂检测各分析物的存在情况。图2说明图1的具体实施方案,其涉及使用抗体作为结合试剂和使用寡核苷酸-互补寡核苷酸对作为靶向剂/靶向剂互补物对。对技术人员显而易见的是,图1和2所示直接方法不是用户可配置的。每个个别的结合域包括预定的靶向剂互补物,使得仅单一结合试剂-靶向剂可与阵列中的单一结合域结合。

[0091] 图3-4说明本发明的具体实施方案,其以用户定义的测定配置提供用户最佳灵活性。图3说明用于分析物A、B和C的间接结合形式,掺入了一系列连接复合物,其允许用户

针对他的 / 她的需要订制测定法。图 3(a)-(b) 说明用于制备本发明的靶向复合物的通用方法:形成包括与连接剂(分别为 L_A 、 L_B 和 L_C) 结合的结合试剂(A'、B' 和 C')之一的一系列溶液。溶液还包括与补充连接剂(分别为 L_A' 、 L_B' 和 L_C') 结合的相应的靶向剂(对于 A' 为 A", 对于 B' 为 B", 对于 C' 为 C")。将溶液混合形成图(b)所示的结合试剂-连接复合物-靶向剂复合物的混合物。该方法的一个优势是其不要求用于各靶向复合物的连接试剂没有交叉反应性,实际上,允许连接剂用于各靶向复合物(即 $L_A = L_B = L_C$ 和 $L_A' = L_B' = L_C'$)。在图 3(c)-(e) 所示的一个实施方案中,使结合试剂-连接复合物-靶向剂复合物的混合物与包含靶向剂互补物 A'''、B''' 和 C''' 与之结合的多个分立结合域的表面混合。结合试剂-连接复合物-靶向剂复合物被吸附形成图(c)所示结合试剂复合物 A_{RC} 、 B_{RC} 和 C_{RC} 。结合试剂复合物的放大图见图 3(e)。使表面与包含分析物 A、B 和 C 的样品以及能够分别与分析物 A、B 和 C 和 / 或包含这些分析物的复合物结合的检测结合试剂 A*、B* 和 C* 接触。检测结合试剂包括可检测标记。或者,使表面与包含多种分析物的样品接触,随后与检测结合试剂的混合物接触。一旦检测结合试剂与表面结合,任选洗涤表面以除去未结合的试剂,通过与各分立结合域结合的检测试剂检测各分析物的存在情况(图 3(d))。图 4 说明图 3 的具体实施方案,其涉及使用抗体作为结合试剂和使用寡核苷酸-互补寡核苷酸对作为靶向剂 / 靶向剂互补物对。如图 3 所示,各结合试剂的连接剂可相同,各靶向剂的连接剂互补物可相同。

[0092] 技术人员将容易地认识到,图 3-4 所述测定形式的各种变更是可能的。图 5(a)-(c) 中描述了某些优选的实施方案。例如,所有的试剂,即通过补充连接剂修饰的结合试剂、通过连接剂修饰的靶向剂互补物、检测试剂和样品可在单一步骤中与携带靶向剂修饰的结合域的表面混合在一起形成图 3(d) 和 4(d) 所示复合物,任选洗涤,并针对与表面结合的分析物 A、B 和 C 的存在情况进行分析(图 5(a))。或者,通过补充连接剂修饰的结合试剂和通过连接剂修饰的靶向剂可在单一步骤中混合,在随后的步骤中加入至具有靶向剂修饰的结合域的表面,加入样品和检测试剂,并在最后步骤中分析(图 5(b))。在另外一个实施方案中,可将通过补充连接剂修饰的结合试剂和通过连接剂修饰的靶向剂互补物混合,加入至在分立结合域携带靶向剂的表面上,与样品混合,然后加入检测试剂(图 5(c))。可将各个分析物溶液依次加入各结合域或以单一混合物同时加入,同样,可将各个检测试剂依次加入各结合域或以单一混合物同时加入。任何表面结合步骤可任选接着洗涤步骤,以在进行到下一步骤前除去测定法的任何未结合的成分。

[0093] 本发明还提供可用于实施本文所述方法的试剂盒、成分和消耗品。本发明使用下列材料 / 方法。

[0094] (i) 样品 / 分析物

可通过本发明的方法分析的样品的实例包括但不限于食物样品(包括食物提取物、食物匀浆、饮料等)、环境样品(例如土壤样品、环境污泥、采集的环境浮粒、环境拭子、水滤液等)、工业样品(例如起始材料、来自工业生产过程中的产品或中间产品)、人类临床样品、兽医样品和生物源的其它样品。可以分析的生物样品包括但不限于粪便、粘膜拭子、生理液体和 / 或含有细胞悬液的样品。生物样品的具体实例包括血液、血清、血浆、粪便、粘膜拭子、组织抽吸物、组织匀浆、细胞培养物和细胞培养物上清液(包括真核和原核细胞的培养物)、尿液、唾液、痰和脑脊液。

[0095] 可采用本发明的方法测量的分析物包括但不限于蛋白质、毒素、核酸、微生物、病毒、细胞、真菌、孢子、碳水化合物、脂质、糖蛋白、脂蛋白、多糖、药物、激素、类固醇类、营养物质、代谢物和上述分子的任何修饰的衍生物或包含一种或多种上述分子或其组合的任何复合物。样品中目标分析物的水平可表明疾病或疾病状况或可只是表示患者是否暴露于该分析物。

[0096] 本发明的测定法可用来测定样品中一种或多种（例如两种或更多种）分析物的浓度。因此，可测量同一样品中的两种或更多种分析物。可在同一样品中测量的分析物组包括例如用于与疾病状态或生理状况有关的分析物或活性的测定的组。某些这类组包括以下物质的组：细胞因子和 / 或其受体（例如 TNF- α 、TNF- β 、IL1- α 、IL1- β 、IL2、IL4、IL6、IL-10、IL-12、IFN- γ 等的一种或多种）、生长因子和 / 或其受体（例如 EGF、VGF、TGF、VEGF 等的一种或多种）、滥用药物、治疗性药物、维生素、病原体特异性抗体、自体抗体（例如针对 Sm、RNP、SS-A、SS- α 、J0-1 和 Scl-70 抗原的一种或多种抗体）、变应原特异性抗体、肿瘤标志物（例如 CEA、PSA、CA-125 II、CA 15-3、CA 19-9、CA 72-4、CYFRA 21-1、NSE、AFP 等的一种或多种）、心脏病包括充血性心脏病和 / 或急性心肌梗死的标志物（例如肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌红蛋白、CKMB、髓过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶、 β -利尿钠蛋白（BNP）、 α -利尿钠蛋白（ANP）、内皮缩血管肽、醛固酮、C-反应蛋白（CRP）等的一种或多种）、与止血有关的标志物（例如血纤蛋白单体、D-二聚体、凝血酶-抗凝血酶复合物、凝血酶原片段 1 和 2、抗因子 Xa 等的一种或多种）、急性病毒性肝炎感染的标志物（例如抗甲型肝炎病毒的 IgM 抗体、抗乙型肝炎核心抗原的 IgM 抗体、乙型肝炎表面抗原、抗丙型肝炎病毒的抗体等的一种或多种）、阿尔茨海默病的标志物（ α -淀粉状蛋白、 β -淀粉状蛋白、A β 42、A β 40、A β 38、A β 39、A β 37、A β 34、 τ -蛋白等）、骨质疏松症的标志物（例如交联的 Nor C-端肽、总脱氧吡啶啉、游离脱氧吡啶啉、骨钙蛋白、碱性磷酸酶、I 型胶原的 C 端前肽、骨特异性碱性磷酸酶等的一种或多种）、生育力状态或生育力相关病症的标志物（例如雌二醇、黄体酮、促卵泡激素（FSH）、促黄体激素（LH）、催乳素、hCG、睾酮等的一种或多种）、甲状腺病症的标志物（例如促甲状腺激素（TSH）、总 T3、游离 T3、总 T4、游离 T4 和反 T3 的一种或多种）和前列腺癌的标志物（例如总 PSA、游离 PSA、复合 PSA、前列腺酸性磷酸酶、肌酸激酶等的一种或多种）。本发明的某些实施方案包括测量例如与具体的疾病状态或生理状况有关的一种或多种、两种或更多种、四种或更多种或 10 种或更多种分析物（例如归集在一组内的分析物，例如上文所列的那样；例如可用于诊断甲状腺病症的组可包括例如促甲状腺激素（TSH）、总 T3、游离 T3、总 T4、游离 T4 和反 T3 的一种或多种）。

[0097] 设计本发明的方法以允许检测上述各种生物作用剂和生物化学作用剂。在一个实施方案中，所述方法可用于检测致病性和 / 或潜在致病性病毒、细菌和毒素，包括各种相关临床和环境基质中的生物战剂（“BWA”），包括而限于血液、痰、粪便、滤纸、试子等。可采用本发明的方法进行分析（单独或组合）的病原体和毒素的非限制性列表为炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）（炭疽）、鼠疫耶尔森氏菌（*Yersinia pestis*）（鼠疫）、霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）（霍乱）、土拉热弗朗西丝氏菌（*Francisella tularensis*）（兔热病）、布鲁氏菌（*Brucella* spp.）（布鲁氏菌病）、伯纳特柯克斯体（*Coxiella burnetii*）（Q 热）、李斯特氏菌（*Listeria*）、沙门氏菌（*Salmonella*）、志贺氏菌（*Shigella*）、霍乱弧菌（*V. cholera*）、沙眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）、类鼻

痘伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、正痘病毒包括天花病毒 (天花)、病毒性脑炎、委内瑞拉马脑炎病毒 (VEE)、西方马脑炎病毒 (WEE)、东方马脑炎病毒 (EEE)、甲病毒属 (Alphavirus)、病毒性出血热、沙粒病毒科 (Arenaviridae)、布尼亚病毒科 (Bunyaviridae)、丝状病毒科 (Filoviridae)、黄病毒科 (Flaviviridae)、依波拉病毒、葡萄球菌肠毒素、蓖麻毒蛋白、肉毒杆菌毒素 (A、B、E)、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*)、真菌毒素、镰孢属 (*Fusarium*)、漆斑菌属 (*Myrothecium*)、头孢霉属 (*Cephalosporium*)、木霉属 (*Trichoderma*)、*Verticimonosporium*、葡萄状穗霉属 (*Stachybotrys*)、鼻疽、小麦真菌、球芽孢杆菌 (*Bacillus globigii*)、粘质沙雷菌 (*Serratia marcescens*)、黄雨 (yellow rain)、单端孢霉烯真菌毒素、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、黄曲霉毒素、东方鼠蚤 (*Xenopsylla cheopis*)、山穿手痒 (*Diamanus montanus*)、类天花、猴痘、沙粒病毒、汉坦病毒、拉沙热、阿根廷出血热、玻利维亚出血热、裂谷热病毒、克里木 - 刚果病毒、汉坦病毒、马尔堡出血热、黄热病病毒、登革热病毒、流感 (包括人和动物毒株包括 H5N1 禽流感、A 型流感、H1 特异性 A 型流感、H3 特异性 A 型流感、H5 特异性 A 型流感、2009-H1N1 特异性 A 型流感、B 型流感)、RSV、人免疫缺陷病毒 I 和 II (HIV I 和 II)、甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、肝炎 (非 A、B 或 C)、肠病毒、EB 病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、沙眼衣原体、淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、人乳头瘤病毒、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、布氏疏螺旋体 (*Borellia burgdorferi*)、流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎枝原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、葡萄球菌肠毒素 B (SEB)、相思豆毒蛋白、志贺菌毒素 1、志贺菌毒素 2、黏膜炎莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、A 组链球菌、大肠杆菌 (*E. Coli*) 0157、冠状病毒、柯萨奇 A 型病毒、鼻病毒、副流感病毒、呼吸道合胞体病毒 (RSV)、偏肺病毒 (metapneumovirus)、痘苗病毒和腺病毒。

[0098] (ii) 结合试剂

结合测定法领域的技术人员应容易地认识到可用于本发明方法的结合剂和配对结合配偶体的范围。所述对的非限制性列表包括 (以任一顺序) 寡核苷酸和互补序列、受体 / 配体对、抗体 / 抗原、天然或合成受体 / 配体对、胺和羰基化合物 (即通过席夫碱形成结合)、半抗原 / 抗体对、抗原 / 抗体对、表位 / 抗体对、模拟表位 / 抗体对、适体 / 靶分子对、杂交配偶体和插入剂 / 靶分子对。

[0099] 在一个优选的实施方案中, 本发明方法的结合测定法使用抗体或其它受体蛋白作为结合试剂。术语“抗体”包括完整抗体分子 (包括抗体亚基的体外重新缔合装配的杂交抗体)、包含抗体的抗原结合域的抗体片段和重组蛋白构建体 (如描述于例如 Porter, R. R. 和 Weir, R. C. *J. Cell Physiol.*, 67 (增刊); 51-64 (1966) 和 Hochman, I. Inbar, D. 和 Givol, D. *Biochemistry* 12: 1130 (1973)) 以及例如通过引入可检测标记经化学修饰的抗体构建体。

[0100] (iii) 靶向剂、连接剂和桥接剂

使结合试剂与能够使之彼此和 / 或与固相直接或间接连接的成分连接。这些成分在本文称为靶向剂和连接剂。本文所用的靶向剂及其互补物用来使结合试剂与表面或支持体附着,而连接剂和补充连接剂用来使结合试剂直接或间接通过桥接剂(如果使用的话)与靶向剂连接。

[0101] 在一个实施方案中,靶向剂及其互补物包含第一寡核苷酸和互补寡核苷酸、受体-配体对、抗原-抗体对、半抗原-抗体对、表位-抗体对、模拟表位-抗体对、适体-靶分子对、杂交配偶体或插入剂-靶分子对。选择用于测定法的靶向剂和互补物使得与通过该测定法测量的分析物(例如第一分析物)的结合试剂缔合的靶向剂和互补物基本上不与同通过该测定法测量的其它分析物(例如第二分析物)的结合试剂缔合的靶向剂和互补物有交叉反应。因此,在本发明的测定法中,结合试剂与其相关结合域(通过其相关的靶向剂和靶向剂互补物)的结合应基本上大于其与同其它分析物缔合(和提供不同靶向剂互补物)的结合域的结合。优选分析物的结合试剂与同其它分析物缔合的结合域的结合相对于与正确结合域的结合的交叉反应性 < 1%,更优选 < 0.1%,更优选 < 0.01%。在一个优选的实施方案中,靶向剂/靶向剂互补物包含包括互补序列的寡核苷酸对,并且在足以使靶向剂与其互补物杂交的条件下使靶向剂与其互补物接触。

[0102] 优选的长度为约 5-100 个碱基,优选约 10-50 个碱基,更优选约 10-25 个碱基。另外,靶向寡核苷酸序列的长度不必相同,在某些实施方案中,提供比其结合配偶体长(例如长多达 25 个碱基、或多达 15 个碱基、或多达 10 个碱基)的一种靶向寡核苷酸序列可能是有益的。寡核苷酸序列及其互补序列可通过用于产生具有类似结合能(或解链温度)和低对内交叉反应性的互补寡核苷酸对的本领域已知技术(例如用于选择多路核酸测定法的探针或引物的商业化软件或公众软件)产生。寡核苷酸序列可包括天然存在的核酸碱基以及非天然存在的和 / 或修饰的碱基。例如,寡核苷酸序列可包括 Iso-dC 和 / 或 Iso-dG,其分别是胞嘧啶和鸟嘌呤的化学变体,可获自 EraGen Biosciences, Inc. (www.eragen.com)。将这类修饰碱基掺入寡核苷酸序列有效地扩充遗传字母表,并允许合成特异性提高和错配杂交可能性降低的寡核苷酸。例如,可以设计含有 Iso-dC 的寡核苷酸,使得它可与含有 Iso-dG 的互补寡核苷酸杂交但不会与任何天然存在的核酸序列杂交。

[0103] 在一种方法中,可根据下列规则的一个或多个、优选所有,使用计算机算法产生寡核苷酸序列对:(i) 介于约 40-60%,例如 40-50% 之间的 GC 含量;(ii) 序列中最大碱基重复序列串不大于 3;(iii) 不同对的序列之间最大碱基对匹配数为 6,一行中不超过 4 个匹配;(iv) 如果在干区具有 4 个或更多个碱基对匹配,预测发夹环大小介于 2-5 个寡核苷酸的序列的排斥(保留 6 个或更多个寡核苷酸的环大小);和 (v) 因 40-60% 或 40-50% GC 含量所致的特异性相互作用的较高自由能 (ΔG°) (ΔG° 取决于温度和盐浓度,且在 23°C 和 200 mM 一价阳离子、pH 7.0 下, ΔG° 优选超过 -15 kcal/mol)。在一个具体的实施方案中,在寡核苷酸选择中考虑了至少相对 GC 含量和 ΔG° ,以及上述一个或多个规则。在一个实施方案中,设计使非特异性结合降到最低的寡核苷酸序列可能是有利的,这可通过各种方法实现。例如,可设计与测定法中使用的其它寡核苷酸形成不超过 3 个连续 G/C 对的寡核苷酸/寡核苷酸对。备选或此外,可避免下列的一种或多种配置:当与测定法中使用的其它寡核苷酸配对时,位于富含 G/C 的序列间的单个核苷酸环或单个核苷酸错配的形成。

[0104] 在一个实施方案中,靶向剂和靶向剂互补物包含寡核苷酸对,其中所述对选自表

1(a) 中以下序列对之一：

| 对 # | 序列 (5' -3') | 对 # | 序列 (5' -3') |
|-----|---------------------------|-----|---------------------------|
| 1 | acatcggtagtt (SEQIDNO:1) | 13 | cggtttgagata (SEQIDNO:25) |
| | aactaccgatgt (SEQIDNO:2) | | tatctcaaaccg (SEQIDNO:26) |
| 2 | acgtcccagttg (SEQIDNO:3) | 14 | cttacaacgcca (SEQIDNO:27) |
| | caactgggacgt (SEQIDNO:4) | | tggcgttgtaag (SEQIDNO:28) |
| 3 | agaagaagatcc (SEQIDNO:5) | 15 | ctttctcggeac (SEQIDNO:29) |
| | ggatcttcttct (SEQIDNO:6) | | gtgccgagaaag (SEQIDNO:30) |
| 4 | aggttcagtgc (SEQIDNO:7) | 16 | gacataaagcga (SEQIDNO:31) |
| | tgcactgaacct (SEQIDNO:8) | | tcgctttatgtc (SEQIDNO:32) |
| 5 | atcaggatacgc (SEQIDNO:9) | 17 | gccatagtctct (SEQIDNO:33) |
| | gcgtatcctgat (SEQIDNO:10) | | agagactatggc (SEQIDNO:34) |
| 6 | atcattaccacc (SEQIDNO:11) | 18 | gctaattcacca (SEQIDNO:35) |
| | ggtggtaatgat (SEQIDNO:12) | | tggngaattage (SEQIDNO:36) |
| 7 | attaacgggagc (SEQIDNO:13) | 19 | ggtcgtgttca (SEQIDNO:37) |
| | gtcccgttaat (SEQIDNO:14) | | tgaaacacgacc (SEQIDNO:38) |
| 8 | cagaggtcttaa (SEQIDNO:15) | 20 | gttgattctgtc (SEQIDNO:39) |
| | ttaagacctctg (SEQIDNO:16) | | gacagaatcaac (SEQIDNO:40) |
| 9 | caggtgtccatt (SEQIDNO:17) | 21 | taccggaataa (SEQIDNO:41) |
| | aatggacacctg (SEQIDNO:18) | | ttattccgggta (SEQIDNO:42) |
| 10 | catccaatccag (SEQIDNO:19) | 22 | tgcttgacttgg (SEQIDNO:43) |
| | ctggattggatg (SEQIDNO:20) | | ccaagtcaagca (SEQIDNO:44) |
| 11 | cctacgatatac (SEQIDNO:21) | 23 | ttcacttaggg (SEQIDNO:45) |
| | gtatatcgtagg (SEQIDNO:22) | | ccctaagtggaa (SEQIDNO:46) |
| 12 | cgaatgtagagt (SEQIDNO:23) | 24 | ttgtctagcgge (SEQIDNO:47) |
| | actctacattcg (SEQIDNO:24) | | gccgctagacaa (SEQIDNO:48) |
| | | 25 | tttccttgcta (SEQIDNO:49) |
| | | | tagcaaggaaa (SEQIDNO:50) |

在一个具体的实施方案中，靶向剂和靶向剂互补物包含寡核苷酸对，其中所述对选自表 1(b) 中的下列序列对之一：

| 对 | 名称 | 修饰 | 序列 |
|---|----------------|------------|-----------------------------|
| 1 | 3'硫醇寡核苷酸12b-1 | 3'-硫醇C3 SS | acatcggtagtt (SEQ ID NO: 1) |
| | 3'生物素寡核苷酸12b-1 | 3'生物素 | aactaccgatgt (SEQ ID NO: 2) |
| 3 | 3'硫醇寡核苷酸12b-5 | 3'-硫醇C3 SS | agaagaagatcc (SEQ ID NO: 5) |
| | 3'生物素寡核苷酸12b-5 | 3'生物素 | ggatcttcttct (SEQ ID NO: 6) |

| | | | |
|----|----------------------|------------|------------------------------|
| 6 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-12 | 3'-硫醇C3 SS | atcattaccacc (SEQ ID NO: 11) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-12 | 3'生物素 | ggtggtaatgat (SEQ ID NO: 12) |
| 7 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-14 | 3'-硫醇C3 SS | attaacgggagc (SEQ ID NO: 13) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-14 | 3'生物素 | gctcccgtaat (SEQ ID NO: 14) |
| 8 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-17 | 3'-硫醇C3 SS | cagaggctctaa (SEQ ID NO: 15) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-17 | 3'生物素 | ttaagacctctg (SEQ ID NO: 16) |
| 9 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-18 | 3'-硫醇C3 SS | caagtgtccatt (SEQ ID NO: 17) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-18 | 3'生物素 | aatggacacctg (SEQ ID NO: 18) |
| 11 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-20 | 3'-硫醇C3 SS | cctacgatatac (SEQ ID NO: 21) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-20 | 3'生物素 | gtatacgttagg (SEQ ID NO: 22) |
| 12 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-21 | 3'-硫醇C3 SS | cgaatgtagagt (SEQ ID NO: 23) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-21 | 3'生物素 | acctacattcg (SEQ ID NO: 24) |
| 13 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-22 | 3'-硫醇C3 SS | eggtttgagata (SEQ ID NO: 25) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-22 | 3'生物素 | tatctcaaaccg (SEQ ID NO: 26) |
| 16 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-26 | 3'-硫醇C3 SS | gacataaagega (SEQ ID NO: 31) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-26 | 3'生物素 | tegettatgtc (SEQ ID NO: 32) |

| | | | |
|----|----------------------|------------|------------------------------|
| 17 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-28 | 3'-硫醇C3 SS | gcatagttctct (SEQ ID NO: 33) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-28 | 3' 生物素 | agagactatggc (SEQ ID NO: 34) |
| 18 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-30 | 3'-硫醇C3 SS | gctaattcacca (SEQ ID NO: 35) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-30 | 3' 生物素 | tggtgaattage (SEQ ID NO: 36) |
| 20 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-33 | 3'-硫醇C3 SS | gttgattctgtc (SEQ ID NO: 39) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-33 | 3' 生物素 | gacagaatcaac (SEQ ID NO: 40) |
| 23 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-41 | 3'-硫醇C3 SS | ttccaactaggg (SEQ ID NO: 45) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-41 | 3' 生物素 | ccctaagtggaa (SEQ ID NO: 46) |
| 25 | 3' 硫醇寡核苷酸 12b-43 | 3'-硫醇C3 SS | tttccettgcta (SEQ ID NO: 49) |
| | 3' 生物素寡核苷酸 12b-43 | 3' 生物素 | tagcaagggaaa (SEQ ID NO: 50) |

靶向剂和靶向剂互补物可以 1:1 比率存在。或者,靶向剂可过量存在,例如 2:1 比率的靶向剂:靶向剂互补物,以提高靶向剂与其互补物结合的可能性。

[0105] 在一个实施方案中,合适的连接剂和补充连接剂包括反应形成连接复合物的化学部分。例如通过存在于连接剂和补充连接剂上的化学部分(例如硫醇基和马来酰亚胺基或碘乙酰胺基、醛和酰肼或炔和叠氮化物)之间的结合相互作用形成连接复合物。

[0106] 或者,连接复合物可通过连接剂和补充连接剂之间的蛋白质-蛋白质结合反应形成。例如,蛋白质-蛋白质结合反应可通过受体/配体对,半抗原/抗体对、抗原/抗体对、表位/抗体对、模拟表位/抗体对、适体/靶分子对、杂交配偶体和插入剂/靶分子对间的结合形成。在一个实施方案中,连接剂是生物素,补充连接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白(或反之亦然);或连接剂是肽,补充连接剂是抗肽抗体(或反之亦然)。

[0107] 本文所述某些实施方案应用与补充连接剂直接结合的连接剂。在这些和其它这类实施方案中,彼此结合的连接剂和补充连接剂可被可与桥接剂同时结合的连接剂和补充连接剂置换。在这些备选的实施方案中,当形成靶向复合物时,桥接剂包括在连接剂和补充连接剂的混合物中。桥接剂(如使用的话)与连接剂和补充连接剂结合。例如,桥接剂包括用于连接剂的结合部位和用于补充连接剂的其它结合部位,且 3 种成分即桥接剂、连接剂和补充连接剂的组合包含桥接复合物。在一个实施方案中,桥接剂是链霉抗生物素或抗生物素蛋白(其每一种是具有生物素的 4 个独立结合部位的四聚体),连接剂和补充连接剂各自是生物素,使得桥接复合物包含(生物素-(链霉抗生物素(或抗生物素蛋白))-生物

素)。

[0108] 在一个优选的实施方案中,连接复合物通过连接剂 L_A 和补充连接剂 $L_{A'}$ 之间的结合反应形成。可配置多路测定形式以检测分析物 A、B 和 C,因此,经设计与所述各个分析物相互作用的试剂复合物可包括选自 L_A 和 $L_{A'}$ 、 L_B 和 $L_{B'}$ 和 L_C 和 $L_{C'}$ 的连接剂和补充连接剂。用于构建结合复合物的连接剂/补充连接剂对的每一个可相同或不同。在一个优选的实施方案中,连接剂/补充连接剂对的每一个包含相同组的试剂。在一个特别优选的实施方案中,连接剂/补充连接剂对的每一个包含例如生物素分子作为结合试剂上的连接剂和靶向剂上的链霉抗生物素或抗生物素蛋白分子作为补充连接剂(或反之亦然)。另外,连接复合物也可通过结合试剂上的生物素分子和靶向剂上的链霉抗生物素或抗生物素蛋白分子之间的结合反应形成,其中链霉抗生物素或抗生物素蛋白分子通过与靶向剂上的生物素分子(用作桥接剂)反应而与靶向剂结合。在一个优选的实施方案中,一旦连接复合物在分别在结合试剂和靶向剂上的生物素和链霉抗生物素分子之间形成(或反之亦然),则可加入过量的游离生物素分子以防止可在溶液中混合的其它的结合试剂和靶向剂之间的交叉反应性。

[0109] (iv) 固相

各种固相适用于本发明的方法,包括来自结合测定领域的常规固相。固相可由多种不同的材料制备,包括聚合物(例如聚苯乙烯和聚丙烯)、陶瓷、玻璃、复合材料(例如碳聚合物复合材料例如碳基油墨)。合适的固相包括宏观物体的表面,例如测定容器(例如试管、比色皿、流动池、筒柱(cartridge)、多孔板中的孔等)的内表面、载玻片、测定芯片(例如用于基因或蛋白质芯片测量的测定芯片)、针(pin)或探针、珠粒、过滤介质、侧向流动介质(例如侧向流动试验片(test strip)的滤膜)等。

[0110] 合适的固相还包括常用于其它类型的基于粒子的测定法的粒子(包括但不限于胶体或珠粒),例如磁性、聚丙烯和乳胶粒子;通常用于固相合成的材料,例如聚苯乙烯和聚丙烯酰胺粒子;和通常用于色谱应用的材料例如二氧化硅、氧化铝、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯。材料还可以是纤维,例如碳纤丝。微粒可以是无生命的,或者可包括有生命的生物实体,例如细胞、病毒、细菌等。用于本发明方法的粒子可由适于与一种或多种结合试剂连接并可通过例如离心、重力、过滤或磁性收集而收集的任何材料组成。可与结合试剂连接的各种不同类型的粒子是市售用于结合测定法的。这些包括无磁性粒子以及包含允许用磁场收集粒子的可磁化材料的粒子。在一个实施方案中,粒子由导电和/或半导体材料(例如胶体金粒子)组成。微粒可具有各种大小和形状。非限制性举例来说,微粒可介于 5 纳米和 100 微米之间。优选微粒的大小介于 20 nm 和 10 微米之间。粒子可为球形、长方形、棒状等,或它们可具有不规则形状。

[0111] 图 6(a)-(c) 说明可用于本发明的不同的粒子组。图 6(a) 显示在一个或多个小瓶、容器或区室中提供的、各自被不同的靶向剂修饰的粒子组。或者,如图 6(b) 所示,粒子组可以是在一个或多个小瓶、容器或区室中提供,其各自被不同的结合试剂修饰,所述结合试剂与靶向复合物中的粒子连接,所述靶向复合物包含与同粒子表面的靶向剂结合的靶向剂互补物结合的结合试剂(通过连接补充连接剂)。更进一步地,图 6(c) 显示又一个实施方案,其中提供混合的粒子组,其中一个子集包括各自被不同的结合试剂修饰的粒子(如图 6(b) 中),且一个子集包括各自被不同的靶向剂修饰的粒子(如图 6(a) 中)。图 6(c) 所示

粒子包括具有用于预定分析物组的结合试剂的预先配置的粒子的子集和可被用户修饰以连接用于其它分析物组的其它的结合试剂组的未配置粒子的子集,即通过使粒子与包含其它结合试剂的其它靶向复合物组结合。这些其它试剂可由用户提供,因此允许用户将一组用户定义的测定法加入预先确定的测定法组中。

[0112] 可对用于本发明方法的粒子编码以允许识别粒子混合物中的特定粒子或粒子亚群。这类编码的粒子的用途已被用于使得能够多重进行应用粒子作为结合测定法的固相支持体的测定法。在一种方法中,制备粒子以包括一种或多种荧光染料,并且根据在一种或多种波长下荧光发射的强度和/或相对强度鉴定特定的粒子群。该方法已用于Luminex xMAP系统(参见例如美国专利号6,939,720)和Becton Dickinson Cytometric Bead Array系统。或者,可通过其它物理性质(例如大小、形状、嵌入的光学图形等)的差异对粒子编码。如图6(a)-(c)中粒子的交叉影线所示,可借助粒子光学性质、大小、形状、嵌入的光学图形等,为混合物或粒子组中提供的一种或多种粒子编码以可与混合物中的其它粒子区分开来。

[0113] 备选或此外,结合试剂可通过结合试剂复合物与一种或多种固相(例如结合阵列中)上的不同的分立结合域结合,使得在各结合域上产生分立的测定信号,因此,可独立地测定与这些域结合的不同分析物。在这类实施方案的一个实例中,通过将靶向剂的分立域固定在一个或多个表面上来制备结合域,将所述靶向剂的分立域通过建立在各个域上的结合试剂复合物配置以结合目标分析物。任选表面可部分界定容纳样品或样品从中通过的容器(例如流动池、孔、比色皿等)的一个或多个边界。在一个优选的实施方案中,在电极上形成各结合域用于电化学或电化学发光测定法。采用电化学发光,在包含多个结合域的表面上进行的分析物的多路测定已用于Meso Scale Diagnostics,LLC,MULTI-ARRAY[®]和SECTOR[®] Imager系列或产品(参见例如美国专利号7,842,246和6,977,722,其公开内容通过引用以其整体结合到本文中)。

[0114] 图6(d)-(f)说明包括可用于本发明的不同结合域的各种备选板形式。图6(d)显示携带各自被不同的靶向剂修饰的多个结合域的表面。或者,如图6(e)所示,可提供携带各自被不同的结合试剂修饰的多个结合域的表面,所述结合试剂与靶向复合物中的结合域连接,所述靶向复合物包含针对与结合域上的靶向剂结合的靶向剂互补物的结合试剂(通过连接补充连接剂)。更进一步地,图6(f)显示又一个实施方案,其中提供表面上的结合域的混合组,其中一个子集包括各自被不同结合试剂修饰的结合域(如图6e中),一个子集包括各自被不同靶向剂修饰的结合域(如图6(d)中)。图6(f)所示结合域包括具有用于预定分析物组的结合试剂的预先配置的结合域的子集和可被用户修饰以连接用于其它分析物组的其它的结合试剂组的未配置结合域子集,即通过这些未配置的结合域与包含其它结合试剂的其它的靶向复合物组结合。这些其它试剂可由用户提供,因此允许用户将一组用户定义的测定法加入预先确定的测定法组中。

[0115] 可通过已知方法,例如用于修饰粒子或用于形成阵列的已确立的方法,使试剂(即靶向剂)与表面结合。使蛋白质或寡核苷酸与表面连接的方法的一个非限制性实例见图7。该方法使用4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC),一种充分确立的异双官能交联剂。SMCC的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基与牛血清白蛋白(BSA)的反应使BSA被硫醇-反应性马来酰亚胺基标记。马来酰亚胺基进而与硫

醇修饰的寡核苷酸反应形成通过稳定的硫醚键连接的 BSA-寡核苷酸缀合物。可通过在吸附蛋白质（例如 BSA）或与蛋白质（例如 BSA）反应的表面上印刷试剂的图案来形成这些试剂的阵列，从而产生相关寡核苷酸的图案化阵列。在一个具体的实例中，通过在石墨碳表面（优选丝网印刷的碳墨电极）上印刷 BSA-寡核苷酸缀合物的阵列来形成阵列。出乎意料的是，我们发现硫醇修饰的试剂（包括硫醇修饰的寡核苷酸）与包括丝网印刷的碳墨电极在内的石墨碳表面不可逆地反应（甚至在不与蛋白质例如 BSA 缀合时）。因此，可通过使碳表面与含有试剂的溶液温育，并使试剂与表面进行不可逆的反应，来将硫醇修饰的试剂（包括硫醇修饰的寡核苷酸和肽）固定在碳表面上。此外，可通过将含有这些试剂的溶液印刷在碳表面上，温育表面上的图案化溶液，并使试剂与表面进行不可逆反应，来形成这类硫醇修饰的试剂的阵列（包括包含硫醇修饰的寡核苷酸和 / 或肽的阵列）。

[0116] (v) 测定装置和补充试剂

本发明的方法可用于各种测定装置和 / 或形式。测定装置可包括例如测定模块，例如测定板、筒柱、多孔测定板、反应容器、试管、比色皿、流动池、测定芯片、侧向流动装置等，所述测定模块具有随着测定进行而加入或预加载在测定模块的孔、室或测定区中的测定试剂（其可包括靶向剂或其它结合试剂）。对于特异性结合测定法，例如免疫测定法或免疫色谱测定法，这些装置可采用各种测定方式。下文描述了说明性测定装置和形式。在某些实施方案中，本发明的方法可采用以干燥状态贮存的测定试剂，且测定装置 / 试剂盒还可包含或提供有用于将测定试剂以干燥状态保持的干燥材料。预加载测定试剂的测定装置可大大提高速度，并降低测定测量的复杂性，同时在贮存期间保持优异的稳定性。干的测定试剂可以是可经干燥的任何测定试剂，之后在用于测定之前复溶。这些包括但不限于可用于结合测定法的结合试剂、酶、酶底物、指示剂染料和可用于检测目标分析物的其它反应性化合物。测定试剂还可包括不直接参与检测机制但在测定中起辅助作用的物质，包括但不限于封闭剂、稳定剂、去污剂、盐、pH 缓冲剂、防腐剂等。试剂可以游离形式存在或被固相支持，所述固相包括测定模块中的区室（例如室、通道、流动池、孔等）表面或胶体、珠粒或其它粒子支持体的表面。

[0117] (vi) 测量方法

本发明的方法可与多种方法一起使用以测量分析物的量，特别是测量与固相结合的分析物的量。可采用的技术包括但不限于本领域已知技术，例如基于细胞培养的测定法、结合测定法（包括凝集试验、免疫测定法、核酸杂交测定法等）、酶测定法、比色测定法等。其它合适的技术对于本领域普通技术人员而言将是极显而易见的。一些测量技术允许测量通过目测进行，其它可能需要或获益于进行测量的仪器的使用。

[0118] 用于测量分析物的量的方法包括无标记技术，其包括但不限于 i) 在分析物与表面结合后，测量表面上的质量或折射率的变化技术（例如表面声波技术、表面等离子共振传感器、椭圆对称技术等），ii) 质谱技术（包括可测量表面上的分析物的技术，像 MALDI、SELDI 等），iii) 色谱或电泳技术，iv) 荧光技术（其可基于分析物的固有荧光）等。

[0119] 用于测量分析物的量的方法还包括通过检测可与分析物直接或间接（例如通过使用分析物的标记的结合配偶体）连接的标记来测量分析物的技术。合适的标记包括可以直接观察的标记（例如目视可观察的粒子和产生可测量信号的标记，所述信号例如光散射、光学吸光度、荧光、化学发光、电化学发光、放射性、磁场等）。可以使用的标记还包括酶

或具有产生可测量信号（例如光散射、吸光度、荧光等）的化学活性的其它化学反应物类。作为标记的酶的使用已在酶联免疫吸附测定法，亦称为 ELISA、酶免疫测定或 EIA 中充分确立。在 ELISA 形式中，将未知量的抗原固定在表面上，然后使特异性抗体在表面上洗涤，使得抗体可与抗原结合。使该抗体与酶连接，在最后一个步骤中，加入物质，酶将该物质转化成提供可检测信号变化的产物。例如由于相对于底物在可测量性质（例如吸光度、荧光、化学发光、光散射等）上的差异，因此产物的形成是可检测的。可与本发明的固相结合方法一起采用的某些（但不是所有）测量方法可获益于或需要洗涤步骤以从固相中除去未结合的成分（例如标记）。因此，本发明的方法可包括这类洗涤步骤。

[0120] 在一个实施方案中，可采用基于电化学发光的测定形式，例如基于电化学发光 (ECL) 的免疫测定法，测量样品中的目标分析物。ECL 的高的灵敏度、宽的动态量程和选择性对于医学诊断是重要因素。市购可获得的 ECL 仪器已显示优异的性能，并且因其包括卓越的灵敏度、动态量程、精确度和复杂样品基质的耐受性在内的原因而被广泛使用。可诱导发射 ECL 的物类 (ECL 活性物类) 已被用作 ECL 标记，例如，i) 其中金属来自例如 VIII 族的贵金属的有机金属化合物，包括含 Ru 和含 Os 的有机金属化合物，例如 tris- 联吡啶基 - 钌 (RuBpy) 部分，和 ii) 鲁米诺和相关化合物。与 ECL 标记一起参与 ECL 过程的物类，在本文称为 ECL 共反应剂。通常使用的共反应剂包括叔胺（例如参见美国专利号 5, 846, 485）、草酸盐和来自 RuBpy 用于 ECL 的过硫酸盐和来自鲁米诺用于 ECL 的过氧化氢（参见例如美国专利号 5, 240, 863）。由 ECL 标记产生的光在诊断程序中可用作报道信号 (Bard 等, 美国专利号 5, 238, 808, 通过引用结合到本文中)。例如，ECL 标记可与结合剂（例如抗体、核酸探针、受体或配体）共价偶联；可通过测量从 ECL 标记发射的 ECL，监测结合试剂在结合相互作用中的参与。或者，来自 ECL 活性化合物的 ECL 信号可表明化学环境（参见例如美国专利号 5, 641, 623, 其描述了监测 ECL 共反应剂的形成或破坏的 ECL 测定法）。对于有关 ECL、ECL 标记、ECL 测定法和进行 ECL 测定法的仪器的更多背景，参见美国专利号 5, 093, 268、5, 147, 806、5, 324, 457、5, 591, 581、5, 597, 910、5, 641, 623、5, 643, 713、5, 679, 519、5, 705, 402、5, 846, 485、5, 866, 434、5, 786, 141、5, 731, 147、6, 066, 448、6, 136, 268、5, 776, 672、5, 308, 754、5, 240, 863、6, 207, 369、6, 214, 552 和 5, 589, 136 及 PCT 公布号 W099/63347、W000/03233、W099/58962、W099/32662、W099/14599、W098/12539、W097/36931 和 W098/57154, 其所有通过引用结合到本文中。

[0121] 本发明的方法可应用于其中在单一样品中进行多重测定法测量的单路或多路形式。可与本发明一起使用的多路测量包括但不限于以下多路测量，其：i) 包括使用多个传感器；ii) 使用根据表面上的位置可区分的表面上的分立测定域（例如阵列）；iii) 包括使用涂覆在根据粒子性质（例如大小、形状、颜色等）可区分的粒子上的试剂；iv) 产生根据光学性质（例如吸光度或发射光谱）可区分的测定信号，或 v) 根据测定信号的临时性质（例如信号的时间、频率或相位）。

[0122] (vii) 试剂盒

在一个实施方案中，本发明提供试剂盒，所述试剂盒包括包含各自包括第一和第二靶向剂（例如第一和第二寡核苷酸）的多个分立结合域的表面（例如多孔板或多个粒子）和在单独的小瓶、容器或区室中的与连接剂结合的第一寡核苷酸互补序列和与第二连接剂结合的第二寡核苷酸互补序列。在一个优选的实施方案中，(i) 第一靶向剂和第一靶向剂互

补物包含第一靶向剂对,和(ii)第二靶向剂和第二靶向剂互补物包含第二靶向剂对。优选第一和第二靶向剂对分别包含选自表1所示列序列对的第一和第二寡核苷酸对。

[0123] 试剂盒在单独的小瓶、容器或区室中还包括包含选自表1(a)和/或表1(b)所列序列的不同序列的至少4种寡核苷酸。这些序列可包括选自不同对的4个序列或可包括一对的不止一个成员。

[0124] 试剂盒可包括至少7、10、16或25种表面结合的寡核苷酸和相应的寡核苷酸互补序列。可提供与结合试剂(例如抗体)预先结合的或可提供被用于由用户连接结合试剂的连接剂修饰的配置用作靶向剂互补物的寡核苷酸。任选试剂盒中的各寡核苷酸互补序列与不同的结合试剂(例如抗体)偶联。表面结合的寡核苷酸可掺入阵列中,所述阵列包括固定在各个结合域上的大量至少5(7、10、16或25)种寡核苷酸,使得不同的寡核苷酸序列固定在分立结合域上。在一个具体的实施方案中,多孔板可在板的至少一个孔内包括一个或多个拷贝的本文所述的寡核苷酸阵列,其中阵列位于多个结合域上。板可包括至少24、96或384个孔,阵列可包括至少7种寡核苷酸,或至少10、16或25种寡核苷酸。

[0125] 在一个具体的实施方案中,试剂盒包括多孔板,其在板的至少一个孔内具有一个或多个拷贝的寡核苷酸阵列,阵列位于多个结合域上,其中结合域的一个或多个、任选至少4个具有固定在其上的选自来自表1(a)所列序列对组的不同序列对的不同寡核苷酸序列。在一个具体的实施方案中,试剂盒包括多孔板,其在板的至少一个孔内具有一个或多个拷贝的寡核苷酸阵列,阵列位于多个结合域上,其中结合域的一个或多个、任选至少4个具有固定在其上的选自来自表1(b)所列序列对组的不同序列对的不同寡核苷酸序列。试剂盒还可包含其它寡核苷酸组,其包含选自表1(a)中和具体实施方案表1(b)中的序列组的两个或更多个寡核苷酸,其中所述其它寡核苷酸与固定的寡核苷酸互补。

[0126] 试剂盒还可包括一种或多种其它的容器、器皿或区室,其包含:(i)包含第一连接剂的第一结合试剂,其中第一结合试剂对样品中的第一分析物有特异性,(ii)包含补充连接剂的第一靶向剂互补物,其在单独的容器、器皿或区室中或作为(i)的成分提供,(iii)包含第二连接剂的第二结合试剂,其中第二结合试剂对样品中的第二分析物有特异性,和(iv)包含第二补充连接剂的第二靶向剂互补物,其在单独的容器、器皿或区室中或作为(iii)的成分提供。

[0127] 或者,本发明提供一种用于测量样品中的多种不同分析物的试剂盒,该试剂盒包含:(a)容器、器皿或区室,其包含包括固定在固相支持体的第一区中的第一靶向剂和固定在所述固相支持体的第二区中的第二靶向剂的固相支持体;和(b)一个或多个其它的容器、器皿或区室,其包含:(i)包含第一连接剂的第一结合试剂,其中所述第一结合试剂对所述样品中的第一分析物有特异性,(ii)包含补充连接剂的第一靶向剂互补物,其在单独的容器、器皿或区室中或作为(b)(i)的成分提供,(iii)包含第二连接剂的第二结合试剂,其中所述第二结合试剂对所述样品中的第二分析物有特异性,和(iv)包含第二连接剂互补物的第二靶向剂互补物,其在单独的容器、器皿或区室中或作为(b)(iii)成分提供。

[0128] 本发明还考虑了用于测量样品中的多种不同分析物的试剂盒,该试剂盒包含:(a)容器、器皿或区室,其在固相支持体上包含固定在所述固相支持体的第一区中的第一靶向剂和固定在所述固相支持体的第二区中的第二靶向剂;和(b)四个或更多个其它的容器、器皿或区室,其包含:(i)第一容器,其含有包含第一连接剂的第一结合试剂,其中所述第

一结合试剂对所述样品中的第一分析物有特异性, (ii) 第二容器, 其含有包含补充连接剂的第一靶向剂互补物 (在单独的容器、器皿或区室中提供), (iii) 第三容器, 其含有包含第二连接剂的第二结合试剂, 其中所述第二结合试剂对所述样品中的第二分析物有特异性, 和 (iv) 第四容器, 其含有包含第二补充连接剂的第二靶向剂互补物 (在单独的容器、器皿或区室中提供)。

[0129] 更进一步, 本发明提供一种用于测量样品中的多种不同分析物的试剂盒, 该试剂盒包含: (a) 容器、器皿或区室, 其在固相支持体上包含固定在所述固相支持体的第一区中的第一靶向剂和固定在所述固相支持体的第二区中的第二靶向剂; 和 (b) 两个或更多个其它的容器、器皿或区室, 其包含: (i) 第一容器, 其含有包含第一连接剂的第一结合试剂和包含补充连接剂的第一靶向剂互补物, 其中所述第一结合试剂对所述样品中的第一分析物有特异性, 和 (ii) 第二容器, 其含有包含第二连接剂的第二结合试剂和包含第二补充连接剂的第二靶向剂互补物, 其中所述第二结合试剂对所述样品中的第二分析物有特异性。

[0130] 在一个具体的实施方案中, 本发明提供一种试剂盒, 其包含: (a) 包含各自分别包含第一和第二寡核苷酸的多个分立结合域的多孔板, 所述第一和第二寡核苷酸各自选自表 1(a) 和 / 或 (b) 所列序列。

[0131] 试剂盒还可包括在进行用于多种分析物的结合测定法的方法中使用多孔板的说明书, 所述所述方法包括以下步骤:

(a) 形成包含对所述多种分析物中的第一分析物有特异性的第一结合试剂和所述第一寡核苷酸的第一结合试剂复合物, 其中所述第一结合试剂与连接剂结合, 所述第一寡核苷酸与补充连接剂结合, 其中所述第一结合试剂复合物通过所述连接剂和所述补充连接剂之间的反应形成;

(b) 形成包含对所述多种分析物中的第二分析物有特异性的第二结合试剂和所述第二寡核苷酸的第二结合试剂复合物, 其中所述第二结合试剂与第二连接剂结合, 所述第二寡核苷酸与第二补充连接剂结合, 其中所述第二结合试剂复合物通过所述第二连接剂和所述第二补充连接剂之间的反应形成;

(c) 在足以使所述第一寡核苷酸与所述第一寡核苷酸互补序列结合和使所述第二寡核苷酸与所述第二寡核苷酸互补序列结合的条件下, 使所述第一和第二结合试剂复合物与各自分别与第一寡核苷酸互补序列和第二寡核苷酸互补序列连接的所述两个或更多个结合域混合;

(d) 使包含所述多种分析物的样品与步骤 (c) 中形成的混合物混合;

(e) 将多种其它的结合试剂加入步骤 (d) 中形成的混合物中, 其中所述多种其它的结合试剂包括 (i) 对所述第一分析物和 / 或第一结合试剂 - 第一分析物复合物有特异性的第一检测试剂; 和 (ii) 对所述第二分析物和 / 或第二结合试剂 - 第二分析物复合物有特异性的第二检测试剂; 和

(f) 测量与所述结合域结合的所述第一和第二分析物的量。

[0132] 在一个具体的实施方案中, 多孔测定板可用于配置终端用户开发的测定面板, 即由终端用户用他 / 她的结合试剂构建以进行利用该板的测定法的测定面板。在该实施方案中, 终端用户指定哪种结合试剂与各结合域结合。提供包括多个分立结合域的多孔测定板, 所述分立结合域包括具有第一靶向剂的第一结合域和具有第二靶向剂的第二结合域和任

选具有其它靶向剂的其它结合域。如本文所述,由用户通过选择可通过结合试剂复合物与多个结合域的每一个连接各结合试剂,使结合域的每一个官能化。在单独的小瓶、容器或区室中,提供包括第一靶向剂互补物、第二靶向剂互补物和任选其它的靶向剂互补物的一组靶向试剂(各自与连接剂连接)。第一靶向剂和第一靶向剂互补物及第二靶向剂和第二靶向剂互补物分别构成第一和第二靶向剂对。同样,任何其它的靶向剂互补物与结合域中的不同的其它靶向剂形成对。在一个优选的实施方案中,靶向剂和靶向剂互补物是寡核苷酸(即寡核苷酸及其互补序列)。在该实施方案中,第一和第二靶向剂对及任何其它靶向剂对选自表 1(a) 和 / 或表 1(b) 提供的序列列表。

[0133] 因此,用户选择哪一种靶向剂 / 靶向剂互补物将与各特定的结合域结合。用户还选择哪一种结合试剂可与各特定的结合域结合并形成包括与指定结合域连接的靶向剂的靶向剂互补物的结合试剂复合物。

[0134] 试剂盒可为用户提供使补充连接剂与用户的结合试剂连接的试剂。当生物素是补充连接剂时,试剂盒可包括用反应官能团(例如 NHS 酯或酰肼或马来酰亚胺)修饰的生物素。靶向试剂的板和 / 或组还可包括用于使可检测标记与测定成分(例如检测试剂)连接的标记试剂盒。例如,如果配置多孔测定板进行电化学发光反应,则标记试剂盒可包括 SULFO-TAG™ NHS 酯、LC-生物素 NHS 酯、任选的离心柱和任选的标记缓冲溶液。还可提供 ECL 读取缓冲液和任选的测定稀释剂和抗体稀释剂。

[0135] 靶向试剂组优选包括与存在于多孔板中的结合域的数目匹配的靶向试剂的数量。例如,如果多孔板包括 10 个分立结合域,则一组 10 种靶向试剂与该多孔板一起使用。

[0136] 靶向剂可与同补充连接剂直接结合的连接剂(例如链霉抗生物素或抗生物素蛋白,当补充连接剂是生物素时)一起提供。当连接剂和补充连接剂配置成通过桥接剂连接时(例如当连接剂和补充连接剂两者为生物素时),试剂盒还可提供可用于使结合试剂与靶向剂互补物连接的桥接试剂溶液(例如链霉抗生物素或抗生物素蛋白的溶液)。试剂盒还可提供为连接 / 桥接反应提供适当条件的反应缓冲液和反应终止溶液。当连接试剂的一种或多种是生物素时,终止溶液可包括游离生物素以封闭作为连接剂、补充连接剂或桥接剂存在的链霉抗生物素或抗生物素蛋白中的任何未使用的生物素结合部位。

[0137] 在该实施方案中,用户提供结合试剂,例如俘获和检测抗体,并指定哪种结合试剂将与各结合域连接。结合试剂(例如俘获抗体)用选择的连接剂(例如生物素)标记,并通过补充连接剂(例如链霉抗生物素)与靶向剂对的一个成员连接。同时,板通过使靶向剂与选择的结合域结合来制备。使经修饰的结合试剂与表面接触形成表面结合的结合试剂复合物,其可用于随后的被结合试剂识别的分析物的结合测定法。通过使结合域与标记的结合试剂接触,并测量存在于该结合域的标记的存在情况,来检测目标分析物。

[0138] 或者,可根据用户的具体要求(例如来自可获得的多路测定面板目录)配置多孔测定板,和 / 或用户可选择一组分析物以配置用于该组分析物的用户定制的多路测定法。应选择并优化多路测定面板,使得各个测定在一起良好地运行。例如,样品在测定前可能需要稀释。对于指定面板,针对特定的目标样品基质优化样品稀释,以使样品基质影响降到最小,并使面板中的所有分析物都将在测定的动态量程内的可能性增至最大。在一个优选的实施方案中,在至少一种样品类型中以相同样品稀释度对面板中的所有分析物进行分析。在另一个优选的实施方案中,对于大多数样品类型使用相同稀释度,测量面板中的所有分

析物。

[0139] 对于指定的免疫测定面板,调整检测抗体浓度和用于检测抗体的每蛋白质的可检测标记的数目(L/P比率),使得在相同的样品稀释度下所有分析物的预期水平处于可定量的范围内。如果需要提高指定分析物的可定量范围的高端,则可降低L/P和/或降低检测抗体浓度。另一方面,如果需要增加可定量范围的下端,则可提高L/P,如果不处于饱和水平,则可提高检测抗体浓度,和/或可降低背景信号。

[0140] 选择与测定面板一起使用的校准标准物以为面板提供具有推荐的样品稀释度的合适的可定量范围。校准标准物具有面板中一种或多种分析物的已知浓度。通过比较这些标准物,测定未知样品中分析物的浓度。在一个实施方案中,校准标准物包含通过测定面板测量的不同分析物的混合物。优选选择组合校准物中的分析物水平,使得各分析物的测定信号是可比较的,例如在2倍、5倍或10倍内。在另一个实施方案中,校准标准物包括来自多个不同测定面板的分析物的混合物。

[0141] 可采用例如本领域已知的曲线拟合例如线性拟合、4参数逻辑斯蒂(4-PL)和5参数(5-PL)拟合,将校正曲线与用校准标准物测量的测定信号拟合。利用这种拟合,可通过使所测量的测定信号与计算的拟合逆向拟合,来测定未知样品中分析物的浓度。用校准标准物的测量还可用于确定测定性质例如检测限(LOD)、定量限(LOQ)、动态量程和线性检测限(limit of linearity, LOL)。

[0142] 作为多路面板开发的一部分,使测定法优化以减少校准物和检测抗体非特异性结合。在夹心免疫测定法中,特异性主要来自俘获抗体结合。评价多路面板的一些考虑因素包括:(a)降低检测抗体与俘获抗体的非特异性结合以减弱面板中测定的背景,这可通过调节检测抗体的浓度和L/P来实现;(b)检测抗体与面板中其它校准物的非特异性结合也是不需要的,应使之降到最低;(c)应使面板中的其它校准物和其它相关分析物的非特异性结合降到最低;如果有校准物非特异性结合,则其可降低面板中测定的总体特异性,并且还可能产生不可靠的结果,因为将会有校准物竞争结合俘获抗体。

[0143] 在一个具体的实施方案中,试剂盒还包括一种或多种试剂以确保遵循测定方案的正确步骤。另外,可独立于测定地测量测定步骤的变化性。在该实施方案中,在试剂盒中提供稀释于用于运行测定的稀释剂中的一系列互补寡核苷酸。当进行正确步骤时,各种稀释剂中的寡核苷酸结合,使链延长。最后的稀释剂可包括最后的具有报道物或标记的互补寡核苷酸以提供测定成功进行的可检测指示物。例如,多孔板的第一结合域用具有序列A的BSA-寡核苷酸包被。测定稀释剂包括与序列A互补的寡核苷酸序列A'和其它的序列B。A和B彼此间不相互作用,且只与其互补序列特异性地相互作用。最终的稀释剂含有包含寡核苷酸B的互补序列B'和可检测标记的补充寡核苷酸。因此,来自第一结合域的可检测信号可用来证实加入了样品或加入了检测部分。所产生的信号还可用于检测是否加入试剂的正确体积和浓度,以及样品处理程序和/或设备中是否有变化性。用于所述方法的寡核苷酸链可包括多个重叠序列。

[0144] 对于最佳性能,面板中不同的测定可能需要不同的温育时间和样品处理要求。因此,目的是选择对面板中的大多数测定是优化的方案。测定方案的优化包括但不限于调节一个或多个下列方案参数:时机(各步骤的温育时间)、制备程序(校准物、样品、对照等)和洗涤步骤的次数。

[0145] 在下列非限制性实施例中说明了本发明的这些和其它实施方案。

实施例

[0146] 实施例 1 - 直接测定形式

用于直接测定法的多孔板的制备和使用的程序见图 2。注释了实验布局,即哪一个寡核苷酸序列位于多孔测定板的哪一个结合域。多孔测定板获自 Meso Scale Discovery, Meso Scale Diagnostics, LLC (Rockville, MD) 的一个部门。通过将序列互补序列的储备溶液在 Diluent 100 中稀释约 50 倍,来制备各个单独的寡核苷酸序列互补序列的工作液 (550 uL) (寡核苷酸序列互补序列的储备溶液和 Diluent 100 可获自 Meso Scale Discovery)。

[0147] 使用双官能偶联试剂 (4-(*N*-马来酰亚胺甲基)-1-环己烷甲酸磺基琥珀酰亚胺酯 (“SMCC”)) 和图 5(d) 所示常规偶联方案,用具有末端硫醇基的寡核苷酸标记各俘获抗体,例如使蛋白质与 SMCC 中的 NHS-酯反应以标记蛋白质,使所得复合物与硫醇化寡核苷酸反应,后者与 SMCC 的马来酰亚胺基反应。然后将一组抗体-寡核苷酸-缀合物的合并溶液 (50 uL) 加入多孔板的各孔的杂交缓冲液中在室温下达 1 小时以使互补寡核苷酸序列杂交,从而将俘获抗体固定在多孔板上形成多种结合试剂复合物。

[0148] 将包括多种分析物的溶液 (25 uL MSD Diluent 2, 具有 MSD Diluent 2 的 25 uL 校准物溶液) 加入制备板的各孔中,在室温下温育 1 小时,洗涤 3x PBS,将一组标记的检测抗体 (50 uL MSD Diluent 3) 加入多孔板的各孔中。在振荡的同时将板温育,将孔用 3x PBS 洗涤,装入 150 uL Read Buffer T (Meso Scale Discovery),并在 SECTOR® Imager 仪器中进行分析。

[0149] 采用该方案进行 7 丛趋化因子面板的测定,结果见图 8(a)-(g)。在该实验中测定的分析物为嗜酸细胞活化趋化因子、MIP-1b、TARC、IL-8、MCP-4、IP-10 和 MCP-1 (均为人的分析物)。另外,采用该方案进行 10 丛 TH1/TH2 面板 (包括 IFN γ 、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-13 和 TNF α (均为人的分析物)) 的测定。将两种测定法的结果与没有寡核苷酸接头的标准直接免疫测定法进行比较。

[0150] 实施例 2—使用寡核苷酸-SA 缀合物的间接测定形式

用于使用寡核苷酸-SA 缀合物的间接测定法的多孔板的制备和使用的程序见图 9(a)-(c)。像实施例 1 那样,注释用于多孔测定板的实验布局。通过将序列互补序列的储备溶液在 Diluent 100 中稀释约 50 倍,来制备与链霉抗生物素 (SA) 结合的各个单独的寡核苷酸序列互补序列的工作液 (550 uL) (寡核苷酸序列互补序列的储备溶液和 Diluent 100 可获自 Meso Scale Discovery)。将生物素化抗体的溶液加入所需的寡核苷酸序列互补序列的工作液中以制备一组各生物素化俘获抗体/寡核苷酸-SA 混合物。混合物中生物素化抗体的浓度的范围为约 5-30 ug/mL。将混合物在室温下轻轻混合 30-45 分钟。将五十 (50) uL 生物素溶液 (Meso Scale Discovery) (约 3 倍过量的生物素) 加入各个单独的生物素化抗体/寡核苷酸互补序列混合物中,将该混合物在室温下轻轻混合 10-15 分钟。将相同体积 (550 uL) 的各个生物素化抗体/寡核苷酸互补序列混合,通过加入 Conjugation Buffer (含 0.1M EDTA 的 PBS,在 pH 7.4 下),调节溶液的总容积至 5500 uL。

[0151] 使多孔板升温至室温 (约 10 分钟)。将五十 (50) uL 生物素化抗体/寡核苷酸互补序列加入板的各孔中。将板用粘合封口覆盖,在板振荡器上在室温下温育 1 小时。将各

孔用磷酸缓冲盐水 (PBS, 3X) 洗涤。

[0152] 将包括多种分析物的溶液 (25 uL 的 MSD Diluent 2, 具有 MSD Diluent 2 的 25 uL 校准物溶液) 加入制备板的各孔中, 在室温下温育 1 小时, 洗涤 3x PBS, 将一组标记的检测抗体 (50 uL 的 MSD Diluent 3) 加入多孔板的各孔中。在振荡的同时将板温育, 将孔用 3x PBS 洗涤, 装入 150 uL 的 Read Buffer T (Meso Scale Discovery), 并在 SECTOR® Imager 仪器中进行分析。

[0153] 实施例 3—使用净 SA/生物素化寡核苷酸的间接测定形式

用于使用生物素化俘获抗体、净链霉抗生物素和生物素化寡核苷酸的间接测定法的多孔板的制备和使用程序见图 10(a)-(c)。像实施例 1 那样, 注释多孔测定板的实验布局。通过将序列互补序列的储备溶液在 Diluent 100 中稀释约 50 倍, 来制备与链霉抗生物素 (SA) 结合的过量的各个单独的寡核苷酸序列互补序列的工作液 (550 uL) (寡核苷酸序列互补序列的储备溶液和 Diluent 100 可获自 Meso Scale Discovery)。将生物素化抗体的溶液加入所需的寡核苷酸序列互补序列的工作液中以制备一组各生物素化俘获抗体 / 寡核苷酸-SA 混合物。混合物中生物素化抗体的浓度的范围为约 5-30 ug/mL。将混合物在室温下轻轻混合 30-45 分钟。将五十 (50) uL 生物素溶液 (Meso Scale Discovery) (约 3 倍过量的生物素) 加入各个单独的生物素化抗体 / 寡核苷酸互补序列混合物中, 将该混合物在室温下轻轻混合 10-15 分钟。将相同体积 (550 uL) 的各生物素化抗体 / 寡核苷酸互补序列混合, 通过加入 Conjugation Buffer (可获自 Meso Scale Discovery) 调节溶液的总积至 5500 uL。

[0154] 使多孔板升温至室温 (约 10 分钟)。将五十 (50) uL 生物素化抗体 / 寡核苷酸互补序列加入板的各孔中。将板用粘合封口覆盖, 在板振荡器上在室温下温育 1 小时。将各孔用磷酸缓冲盐水 (PBS, 3X) 洗涤。

[0155] 包括多种分析物的溶液 (25 uL MSD Diluent 2, 具有 MSD Diluent 2 的 25 uL 校准物溶液) 加入制备板的各孔中, 在室温下温育 1 小时, 洗涤 3x PBS, 将一组标记的检测抗体 (50 uL 的 MSD Diluent 3) 加入多孔板的各孔中。在振荡的同时将板温育, 将孔用 3x PBS 洗涤, 装入 150 uL Read Buffer T (Meso Scale Discovery), 并在 SECTOR® Imager 仪器中进行分析。

[0156] 实施例 4—使用 7 丛细胞因子 B 面板的 3 种测定形式的比较结果

以实施例 1、2 和 3 所述测定形式, 即用寡核苷酸-SA 缀合物直接、间接形式和用净 SA/生物素化寡核苷酸的间接形式, 测试 7 丛细胞因子 B 面板 (IL-8、hTNF-a、hEotaxin-3、h-嗜酸细胞活化趋化因子、hMCP-1、hIP-10 和 hMIP-1a)。从 8 点校正曲线假设 2.5 标准差, 估计测定的 LOD 值。结果见图 11(a)-(g)。对于所有测试的测定, 将直接和间接测定形式的 LOD 值与标准被动吸附和免疫测定方式所观察到的 LOD 值进行了比较。用净 SA 的间接方法显示 LOD 值显著扩宽: 一些测定法 IL-8 和 hIP-10, 显示与其余测定方式相比较高的 LOD 值, 而嗜酸细胞活化趋化因子和 MIP-10 显示较低的 LOD 值。

[0157] ***

本发明不限于本文所述具体实施方案的范围。实际上, 从上述描述和附图来看, 除本文描述的以外, 本方法的各种修改对本领域技术人员而言将变得显而易见。这类修改欲落入权利要求书的范围内。本文引用了各种出版物, 其公开内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0001]

<110> 梅索磅秤技术有限公司

<120> 用于进行多路测定法的改进方法

<130> 29882

<150> 61/775, 860

<151> 2013-03-11

<150> 61/778, 727

<151> 2013-03-13

<160> 50

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 1

acatcggtag tt

12

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 2

aactaccgat gt

12

<210> 3

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0002]

<223> 寡核苷酸

<400> 3

acgtcccagt tg

12

<210> 4

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 4

caactgggac gt

12

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 5

agaagaagat cc

12

<210> 6

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 6

ggatcttctt ct

12

<210> 7

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

[0003]

| | |
|---|----|
| <400> 7 aggttcagtg ca | 12 |
| <210> 8 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 8 tgcaactgaac ct | 12 |
| <210> 9 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 9 atcaggatac gc | 12 |
| <210> 10 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 10 gcgtatcctg at | 12 |
| <210> 11 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| <220> <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 11 atcattacca cc | 12 |

[0004]

| | | |
|-------|---------------|----|
| <210> | 12 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 12 | |
| | ggtggtaatg at | 12 |
| <210> | 13 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 13 | |
| | attaacggga gc | 12 |
| <210> | 14 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 14 | |
| | getccegtta at | 12 |
| <210> | 15 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 15 | |
| | cagaggtctt aa | 12 |

[0005]

<210> 16
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸

<400> 16
 ttaagaacctc tg 12

<210> 17
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸

<400> 17
 caggtgtcca tt 12

<210> 18
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸

<400> 18
 aatggacacc tg 12

<210> 19
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸

<400> 19
 cafccaatcc ag 12

<210> 20
 <211> 12

[0006]

| | |
|---------------|----|
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 20 | |
| ctggattgga tg | 12 |
| <210> 21 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 21 | |
| cetacgatat ac | 12 |
| <210> 22 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 22 | |
| gtatategta gg | 12 |
| <210> 23 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 23 | |
| cgaatgtaga gt | 12 |
| <210> 24 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |

[0007]

| | | |
|-------|---------------|----|
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 24 | |
| | actctacatt cg | 12 |
| <210> | 25 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 25 | |
| | eggtttgaga fa | 12 |
| <210> | 26 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 26 | |
| | tatctcaaac eg | 12 |
| <210> | 27 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 27 | |
| | cttacaacgc ca | 12 |
| <210> | 28 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |

[0008]

<223> 寡核苷酸

<400> 28

tggcgttgta ag

12

<210> 29

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 29

ctttctegge ac

12

<210> 30

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 30

gtgccgagaa ag

12

<210> 31

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 31

gacataaagc ga

12

<210> 32

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

[0009]

| | |
|----------------|----|
| <400> 32 | |
| tegetttatg te | 12 |
| <210> 33 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 33 | |
| gccatagtct ct | 12 |
| <210> 34 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 34 | |
| agagactatg gc | 12 |
| <210> 35 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 35 | |
| gctaatleac ca | 12 |
| <210> 36 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 36 | |
| tggatgaatta gc | 12 |

[0010]

| | | |
|-------|---------------|----|
| <210> | 37 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 37 | |
| | ggtcgtgttt ca | 12 |
| <210> | 38 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 38 | |
| | tgaaacacga cc | 12 |
| <210> | 39 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 39 | |
| | gttgatttg tc | 12 |
| <210> | 40 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 40 | |
| | gacagaatca ac | 12 |

[0011]

<210> 41
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸

<400> 41
 tacccggaat aa 12

<210> 42
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸

<400> 42
 ttattccggg ta 12

<210> 43
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸

<400> 43
 tgcttgactt gg 12

<210> 44
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸

<400> 44
 ccaagtcaag ca 12

<210> 45
 <211> 12

[0012]

| | |
|---------------|----|
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 45 | |
| ttccacttag gg | 12 |
| <210> 46 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 46 | |
| ccctaagtgg aa | 12 |
| <210> 47 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 47 | |
| ttgtctagcg gc | 12 |
| <210> 48 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 寡核苷酸 | |
| <400> 48 | |
| gccgctagac aa | 12 |
| <210> 49 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |

[0013]

| | | |
|---------------|------|----|
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 49 | |
| tttcccttgc ta | | 12 |
| <210> | 50 | |
| <211> | 12 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | 寡核苷酸 | |
| <400> | 50 | |
| tagcaaggga aa | | 12 |

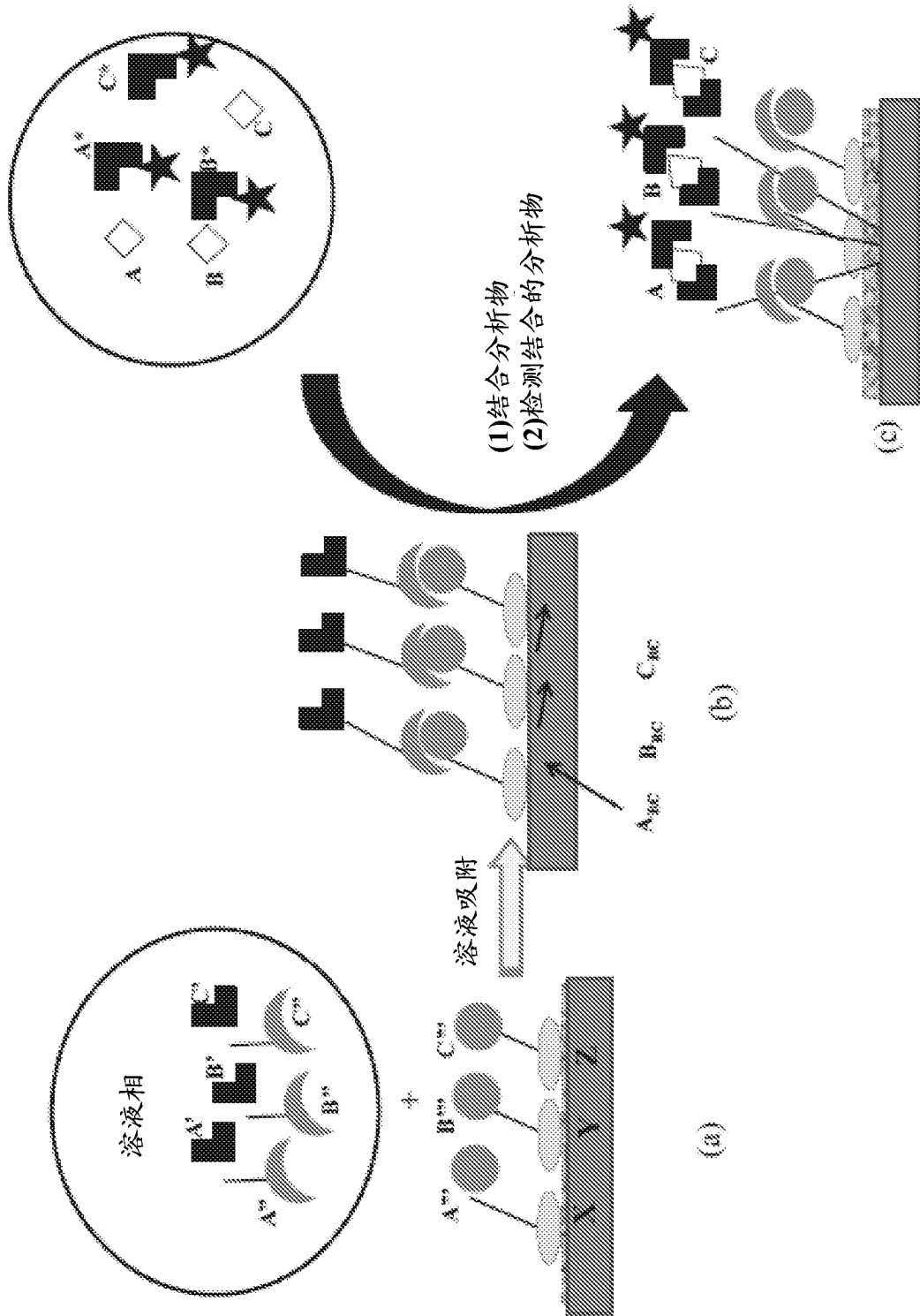


图 1(a)-(c)

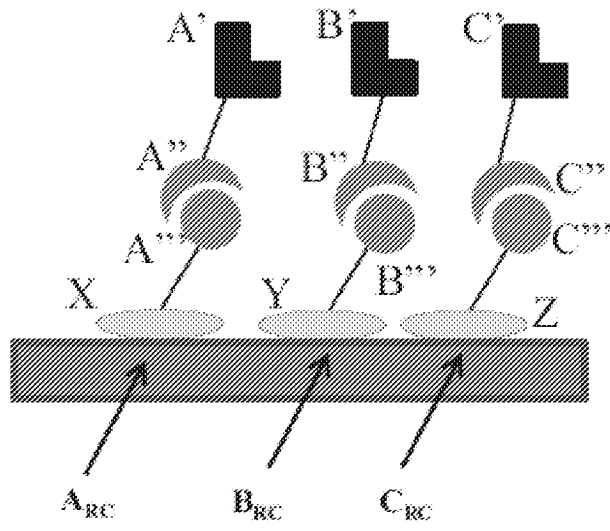


图 1(d)

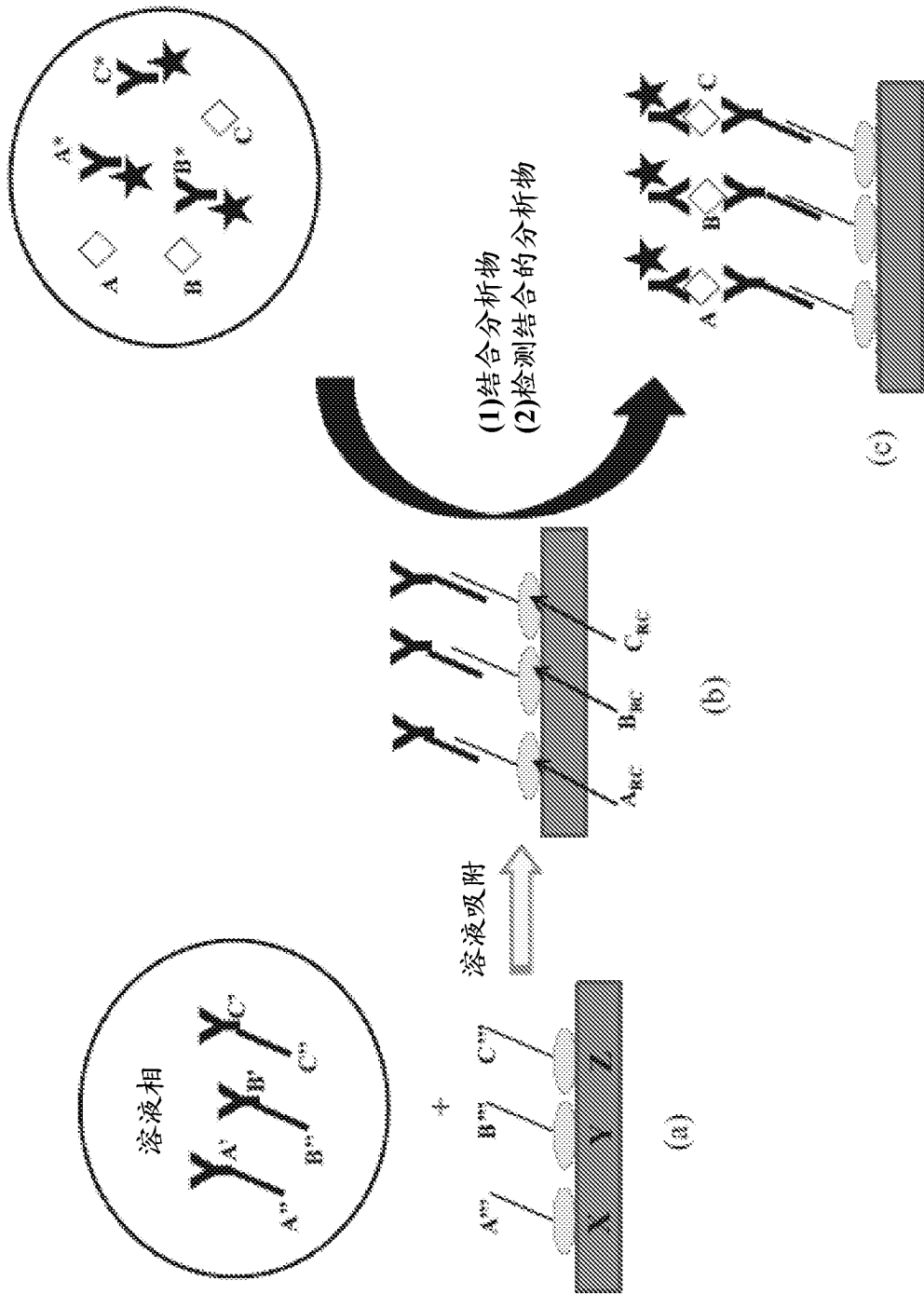


图 2(a)-(c)

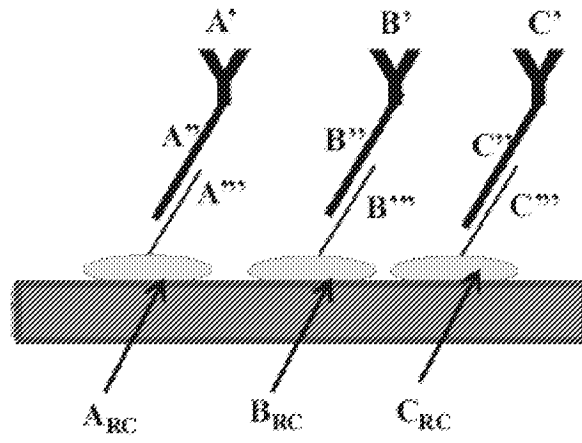


图 2(d)

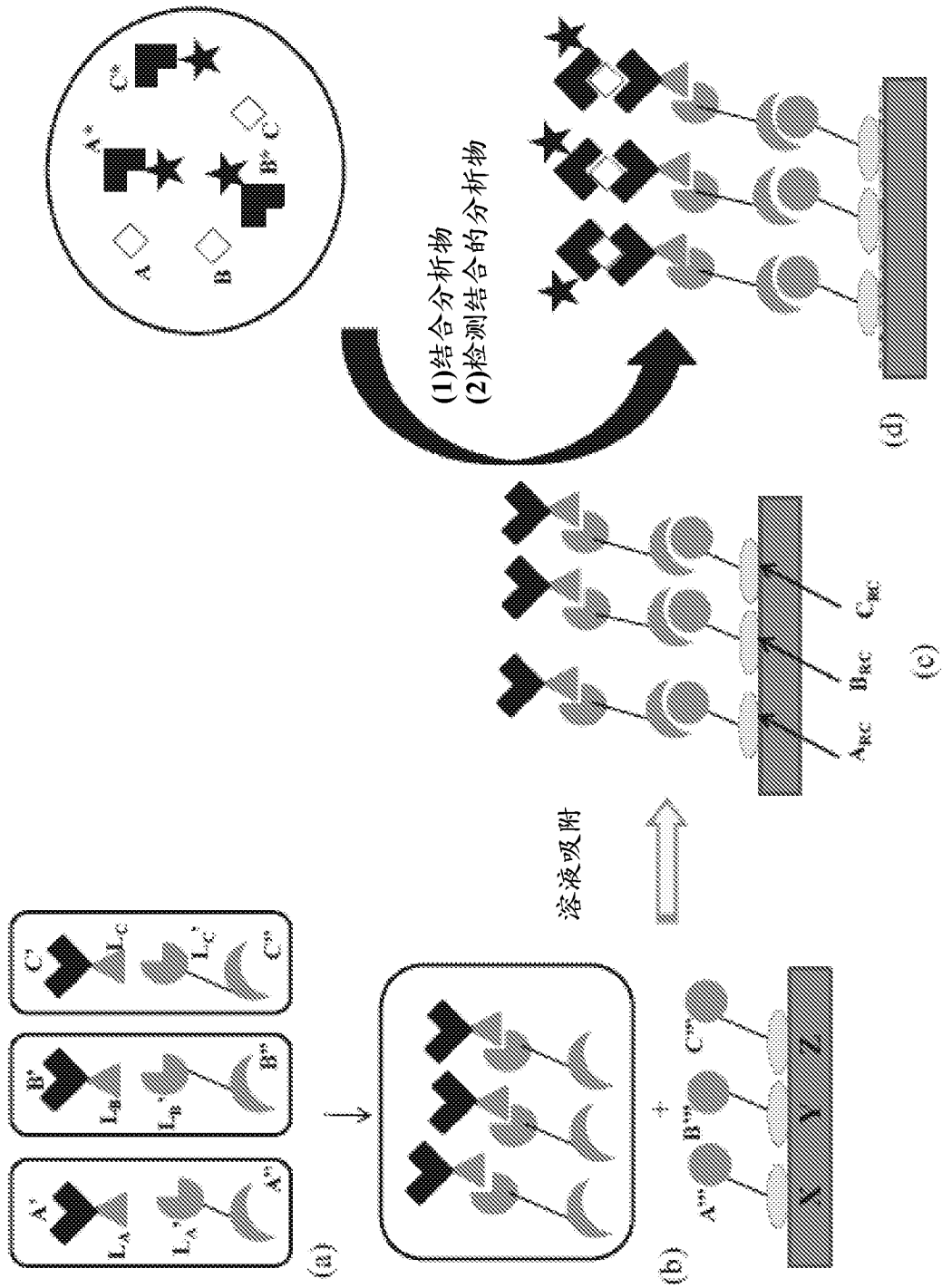


图 3(a)-(d)

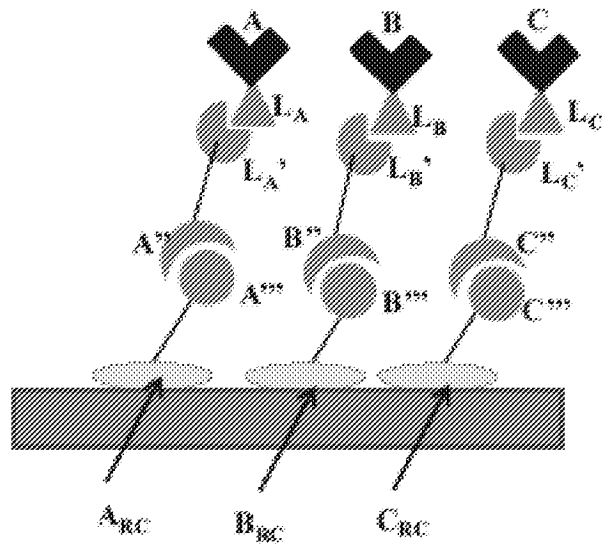


图 3(e)

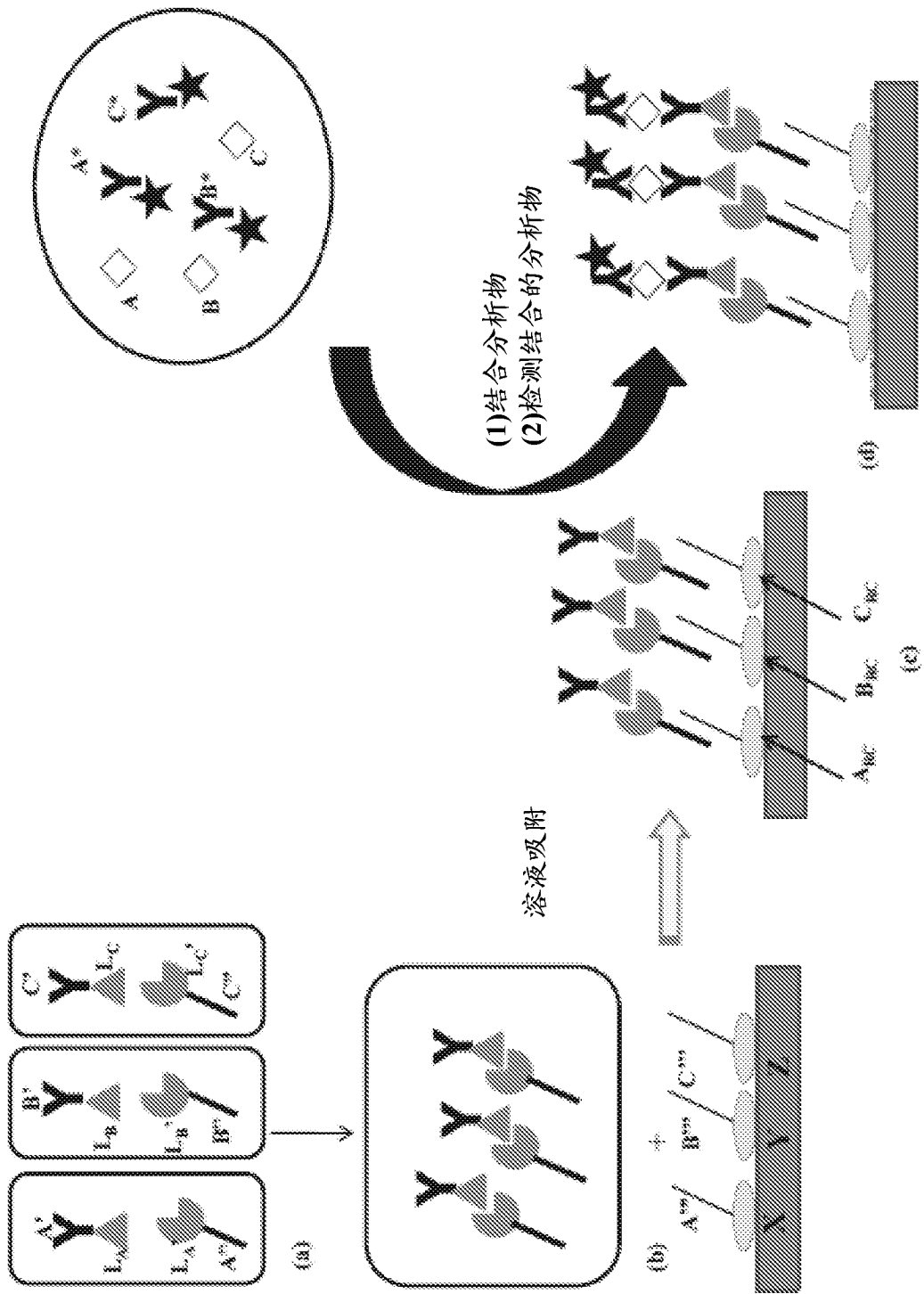


图 4(a)-(d)

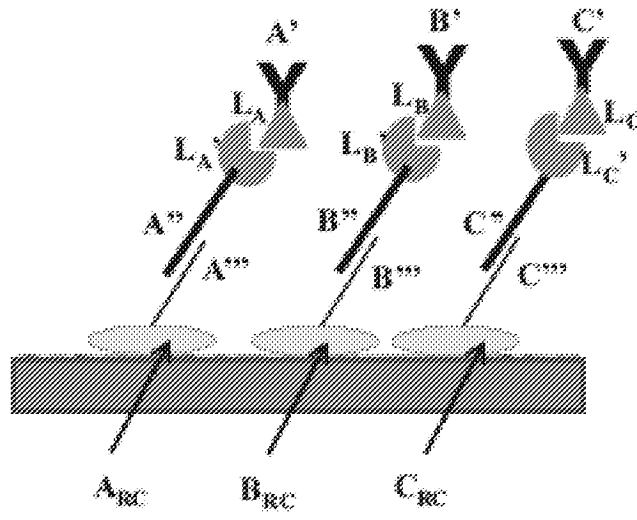


图 4(e)

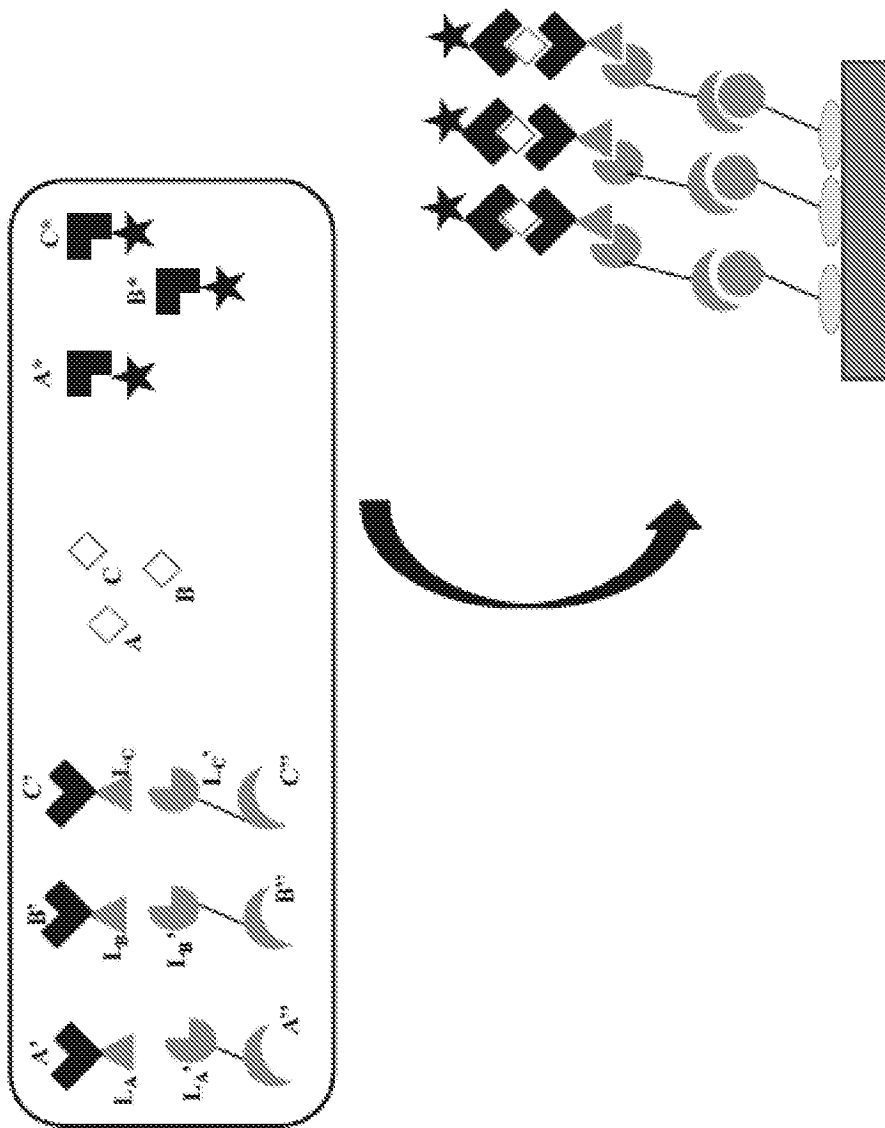


图 5(a)

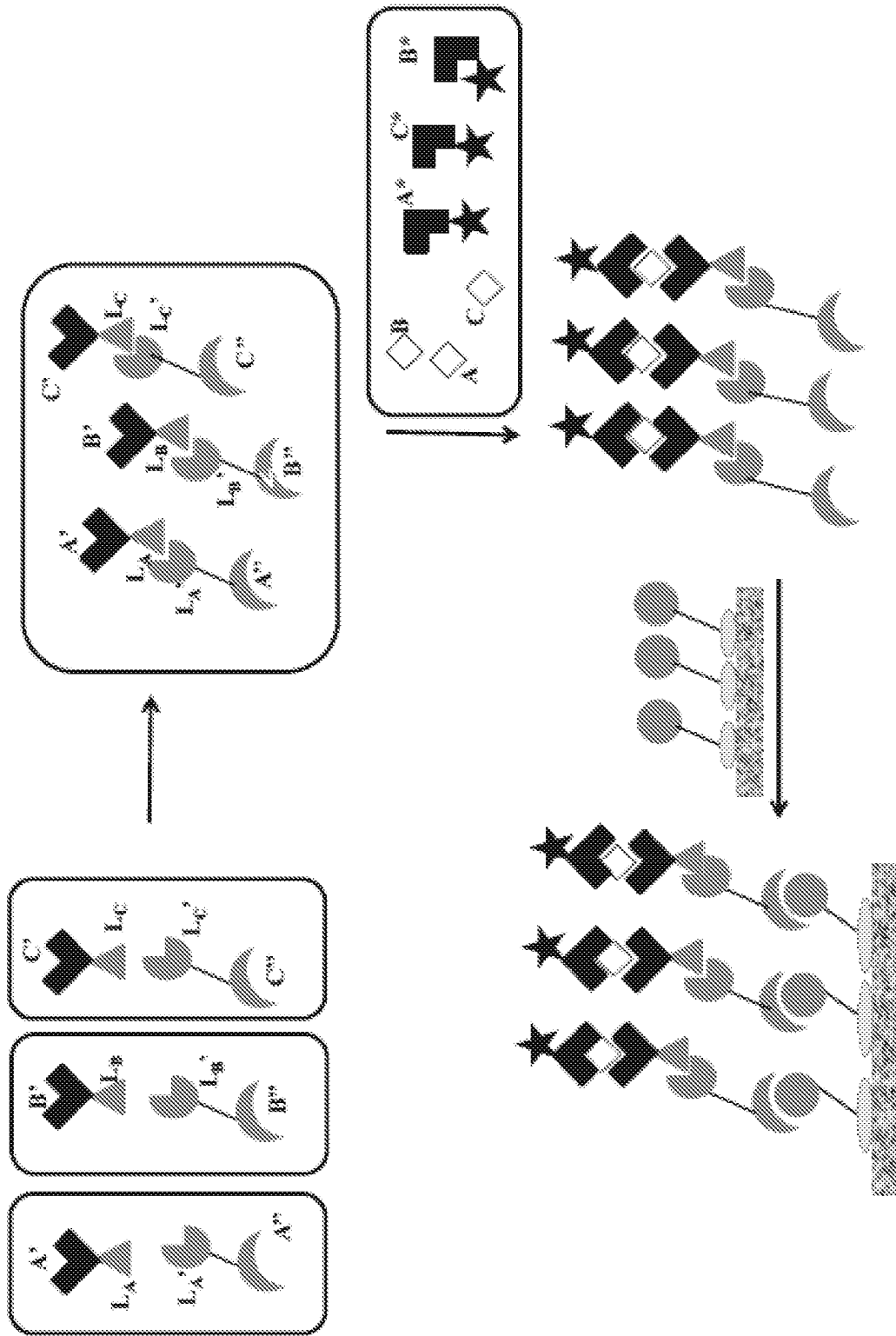


图 5(b)

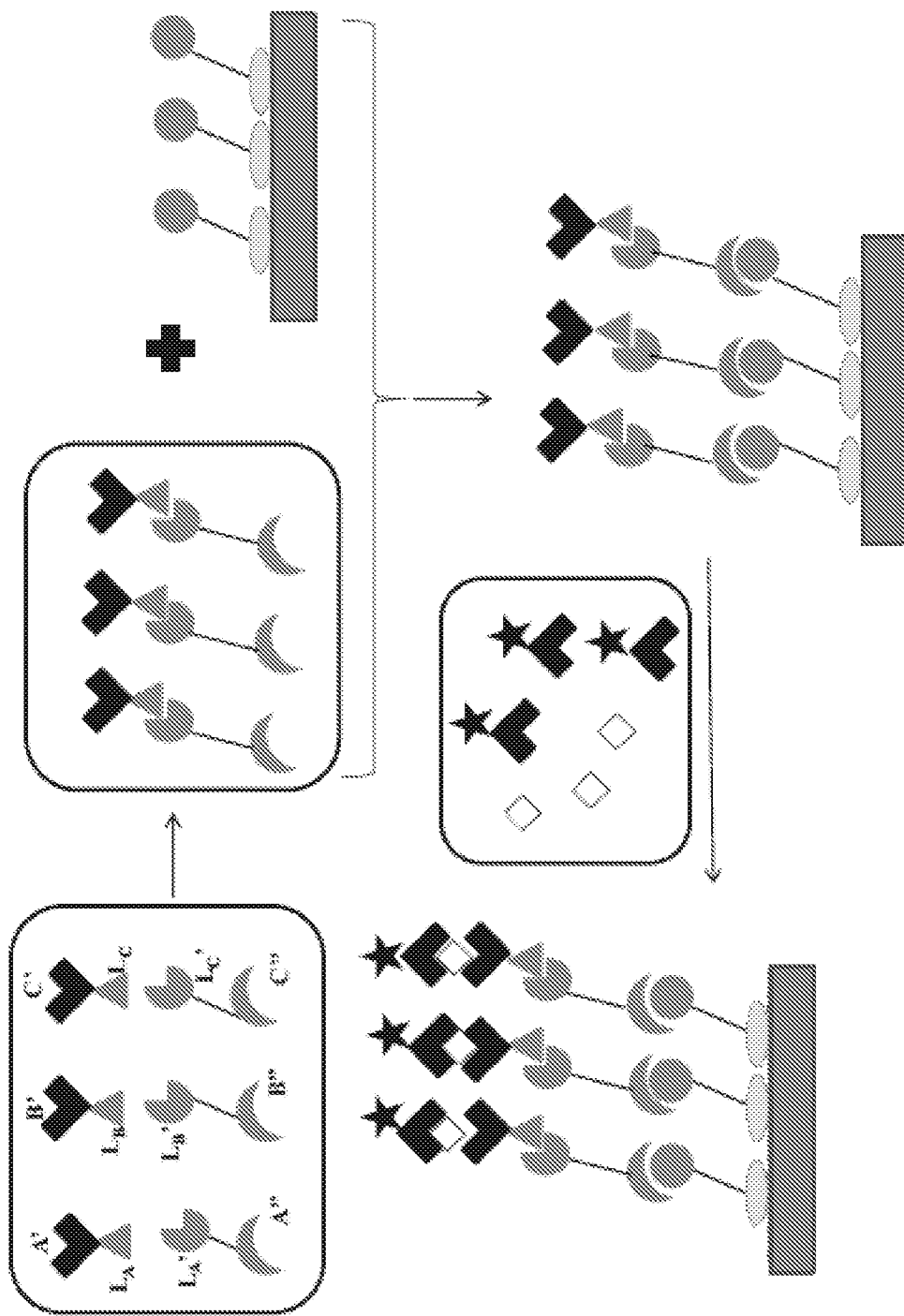


图 5(c)

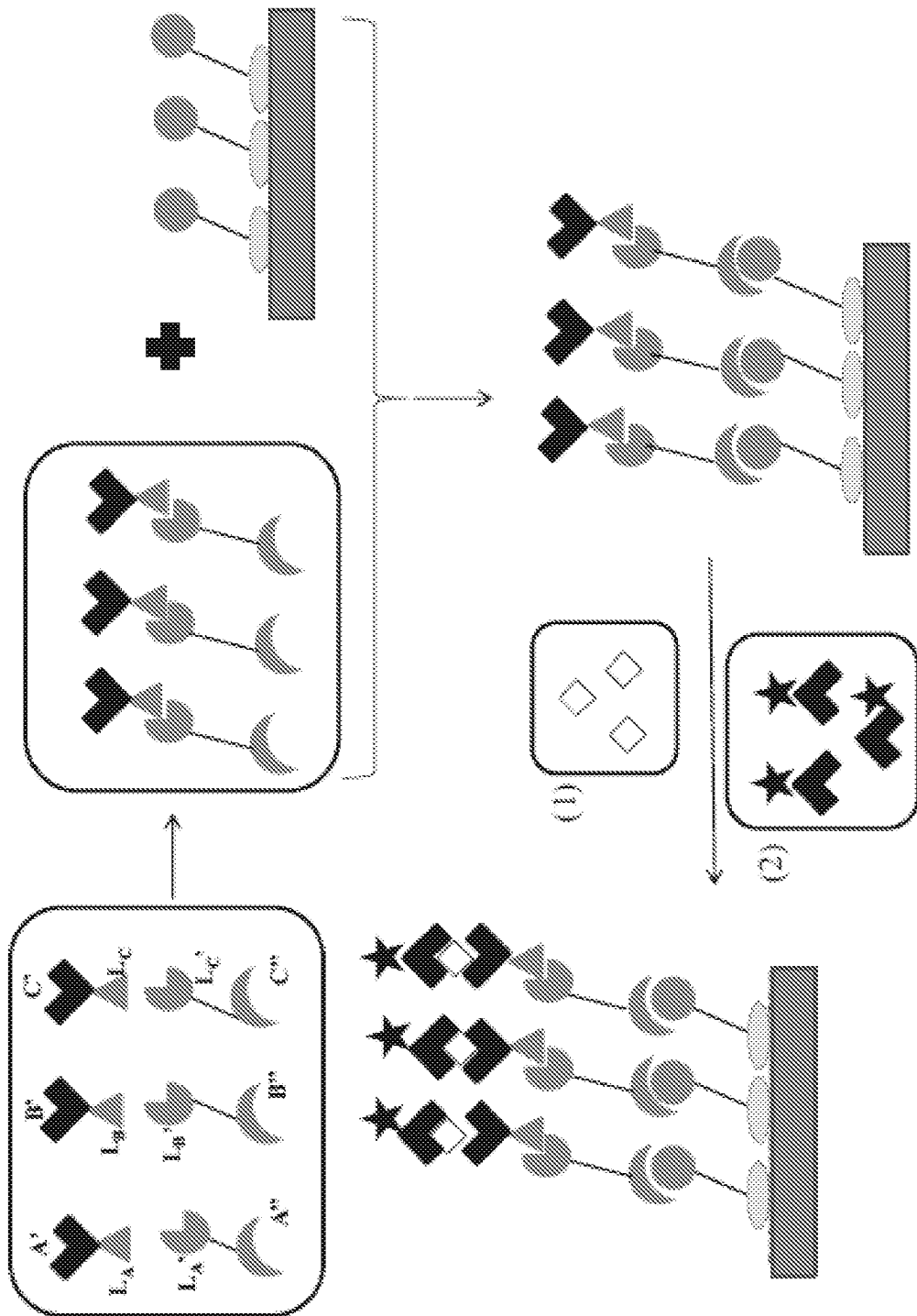


图 5(d)

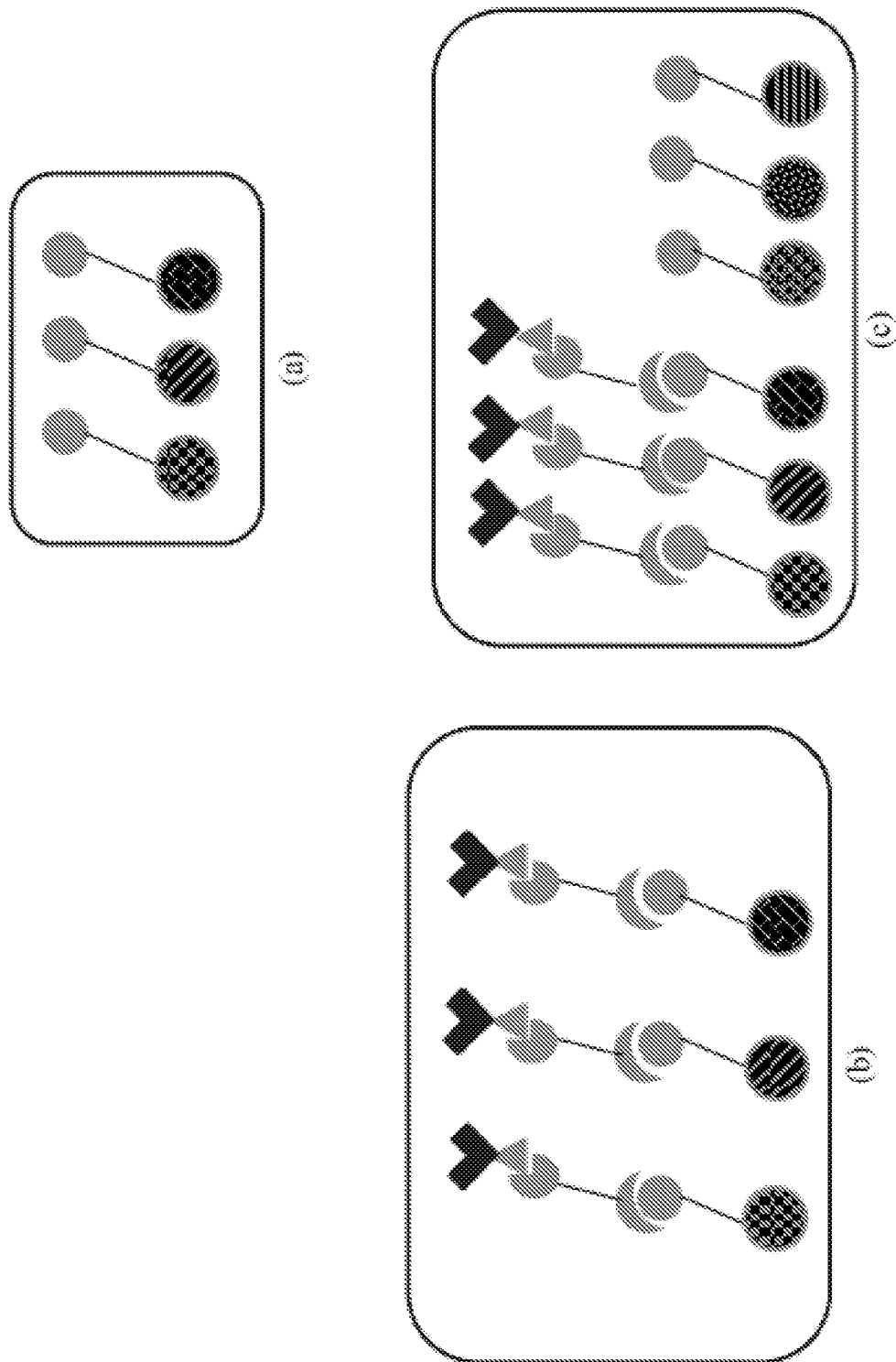


图 6(a)-(c)

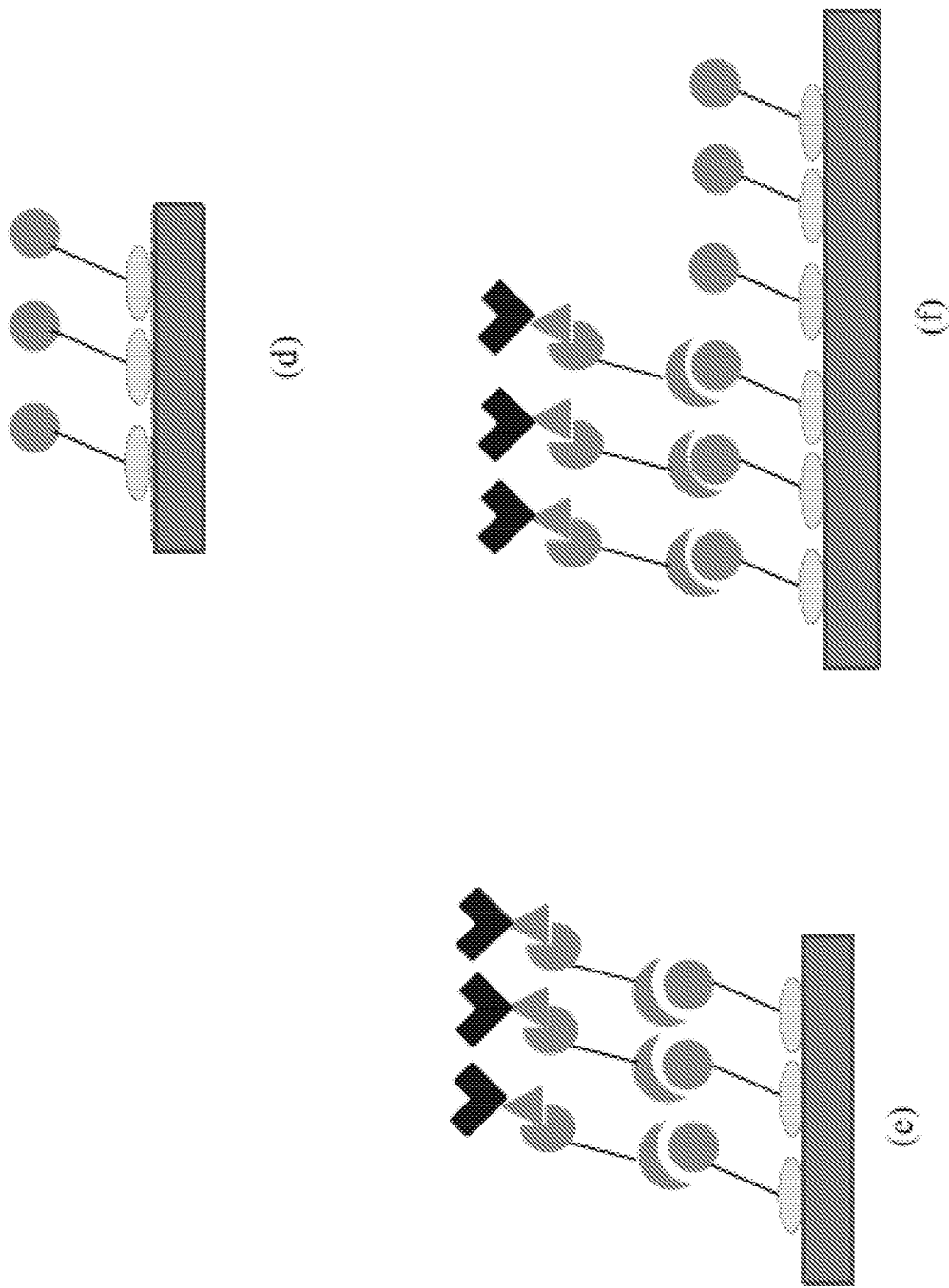


图 6(d)-(f)

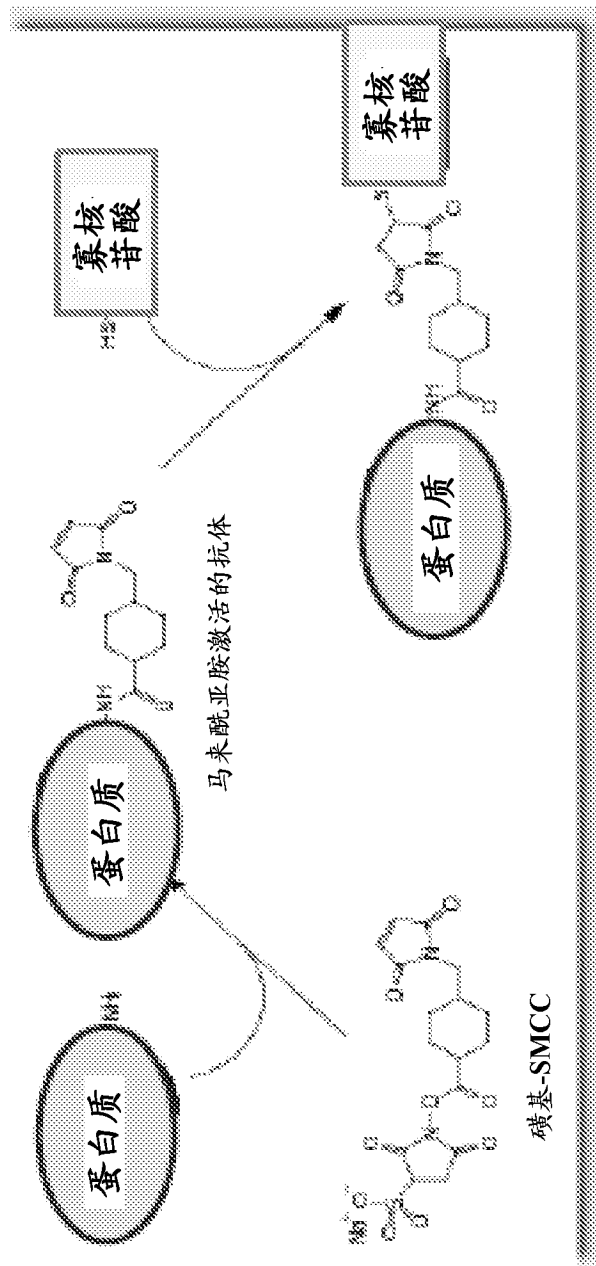
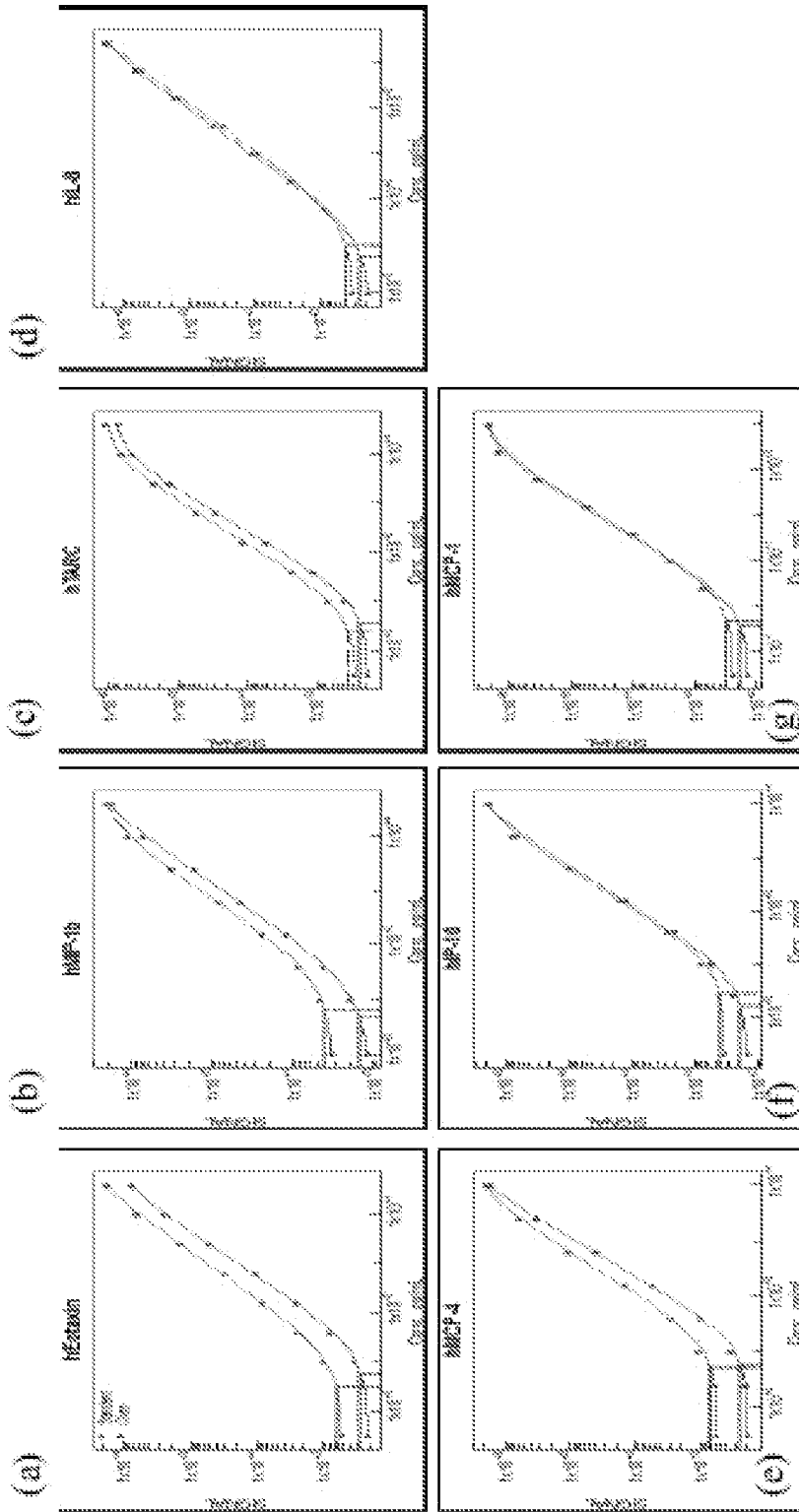


图 7



用于 10 丛 TH1/TH2 的估计的 LOD 值

| LOD, pg/mL | hifng | hIL-1b | hIL-2 | hIL-4 | hIL-5 | hIL-8 | hIL-10 | hIL-12p71 | hIL-13 | hTNFa |
|------------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|--------|-------|
| 标准物 | 0.18 | 0.54 | 0.90 | 0.71 | 0.15 | 0.061 | 0.33 | 1.1 | 2.4 | 0.12 |
| 10 丛寡核苷酸 溶液吸附 | 0.37 | 0.43 | 0.58 | 0.22 | 0.17 | 0.062 | 0.35 | 0.63 | 4.2 | 0.24 |

图 8(a)-(g)

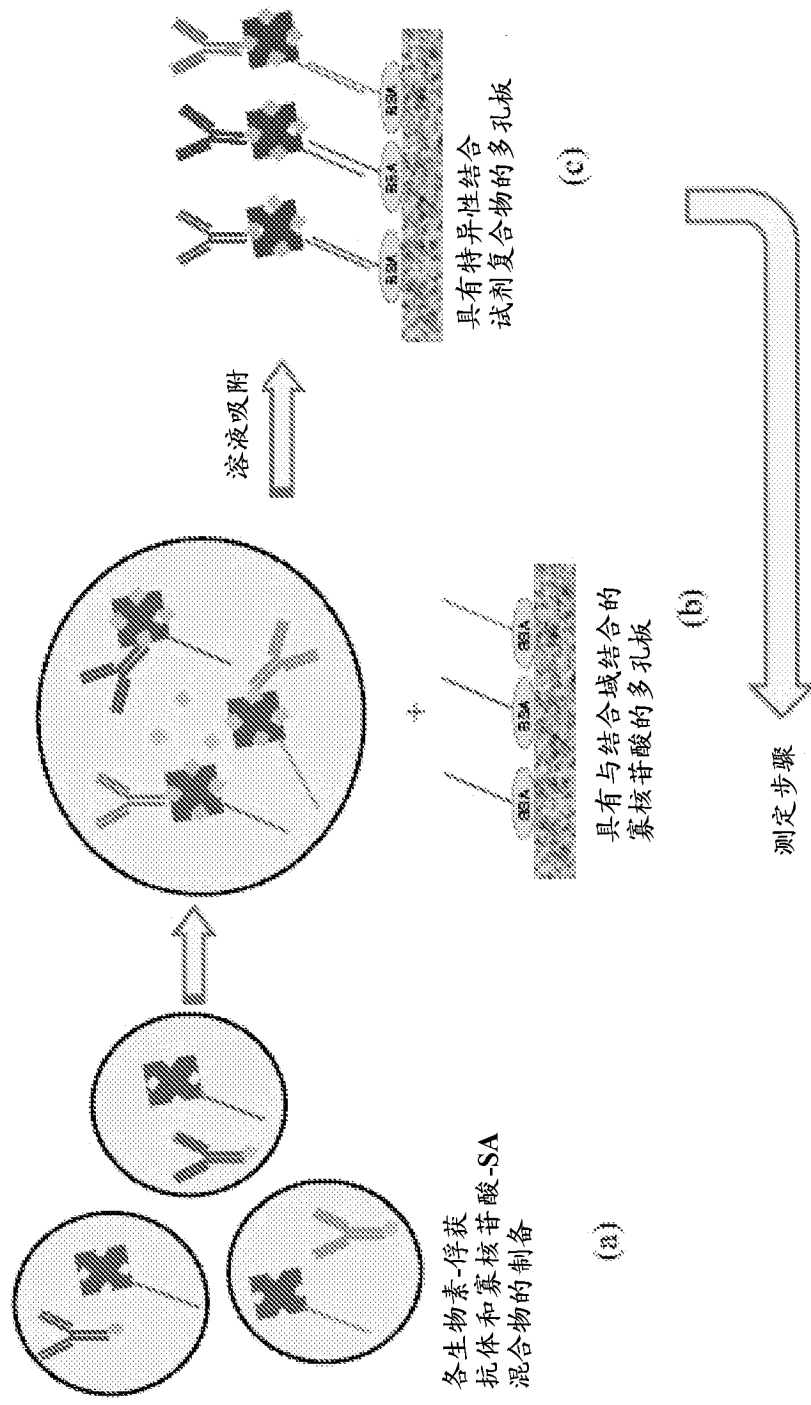


图 9(a)-(c)

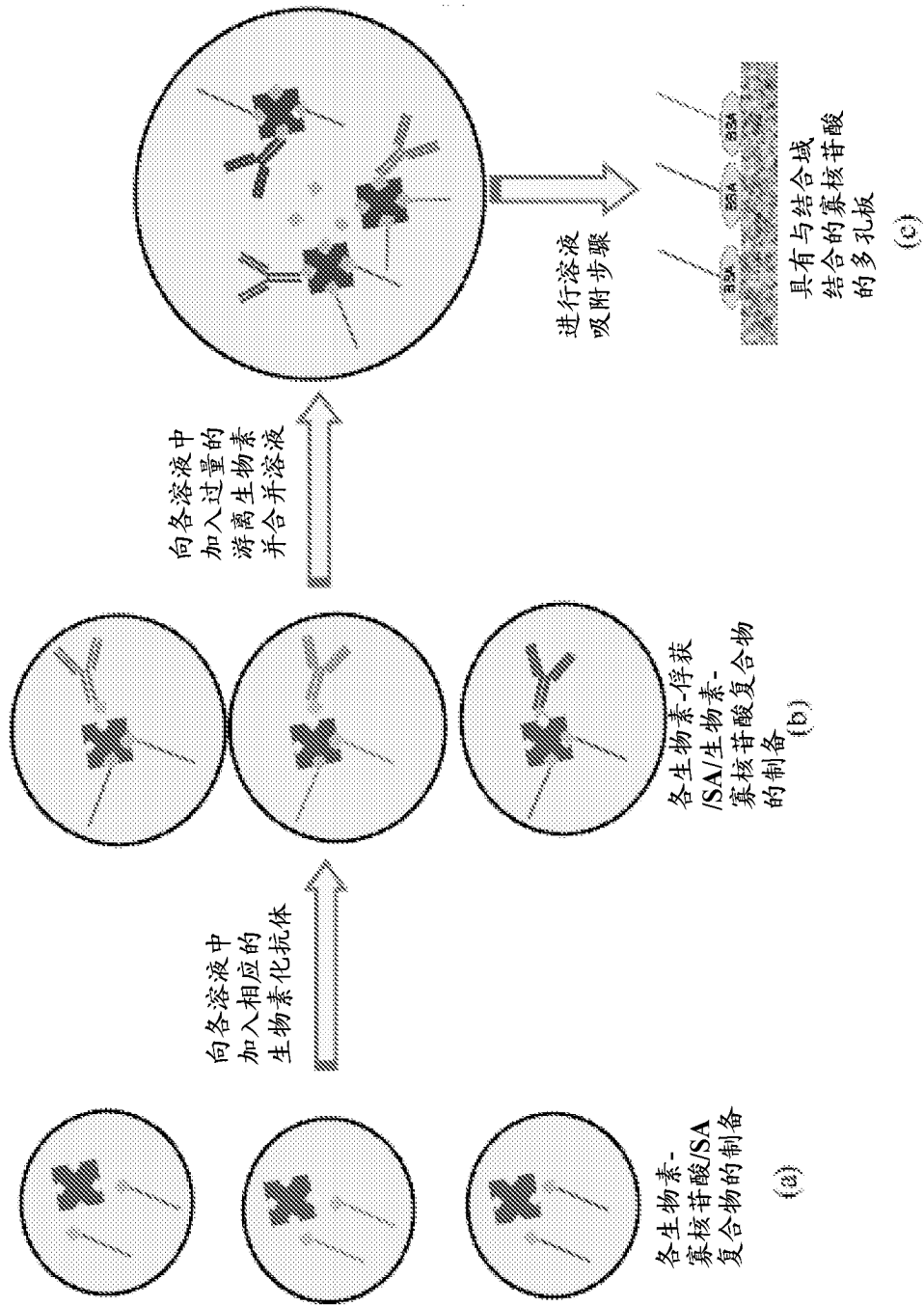


图 10(a)-(c)

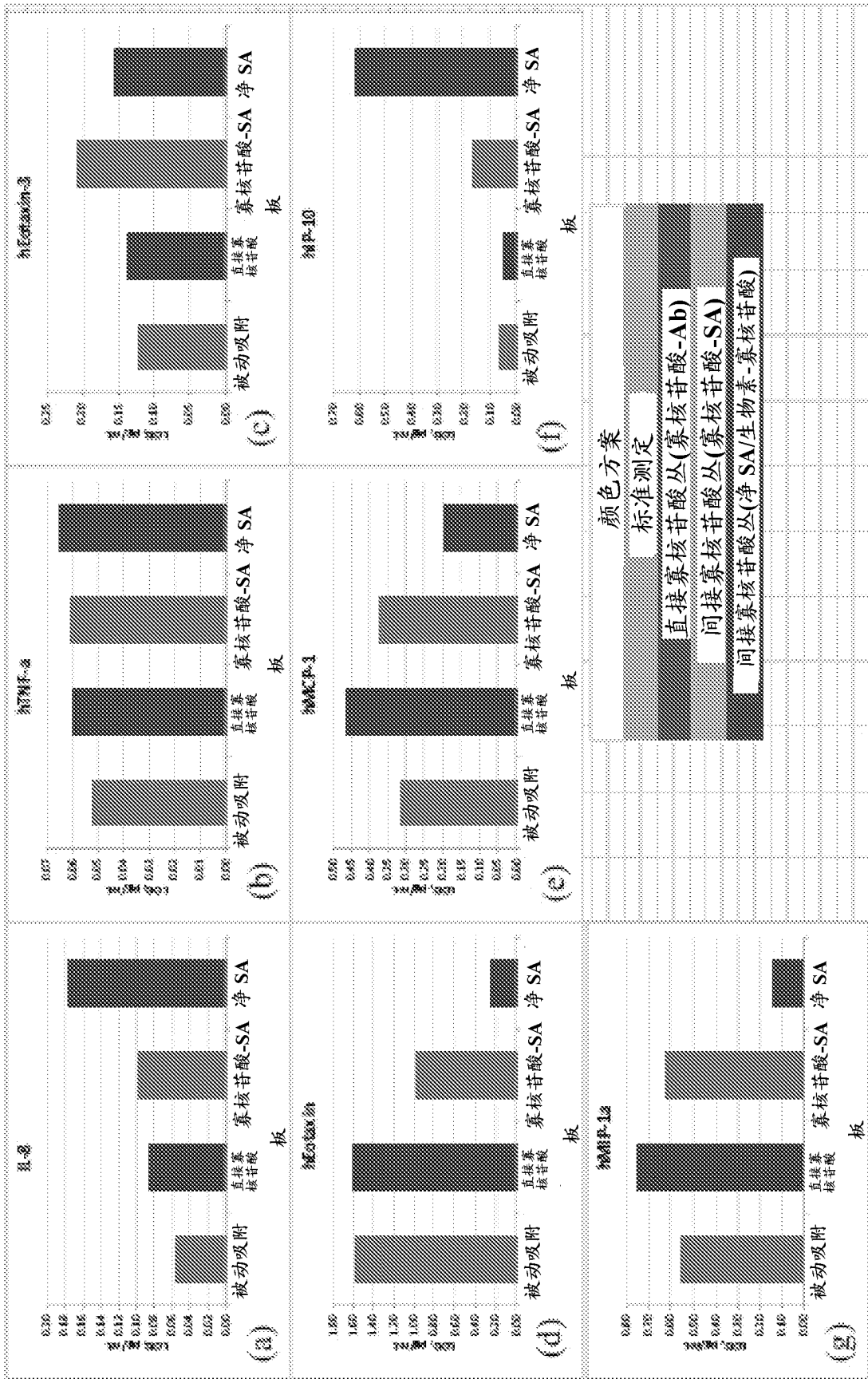
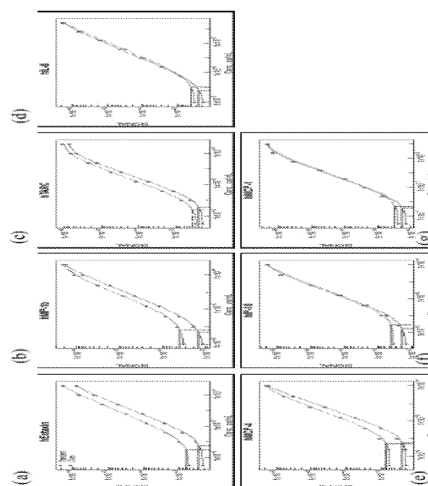


图 11(a)-(g)

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于进行多路测定法的改进方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN105378477A | 公开(公告)日 | 2016-03-02 |
| 申请号 | CN201480026770.1 | 申请日 | 2014-03-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 梅索磅秤技术有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 梅索磅秤技术有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 梅索磅秤技术有限公司 | | |
| [标]发明人 | E N 格勒策尔 S 库马 P 奥贝罗瓦 G 西加尔 M 齐安斯基 | | |
| 发明人 | E.N.格勒策尔 S.库马 P.奥贝罗瓦 G.西加尔 M.齐安斯基 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/483 C12N15/11 C12Q1/68 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6816 G01N33/54306 G01N33/54353 C12Q2563/131 B01L3/50853 B01L2300/021 B01L2300/043 B01L2300/0609 B01L2300/0829 C12Q1/6804 C12Q1/6876 G01N33/6845 G01N2458/10 | | |
| 代理人(译) | 罗文锋 杨思捷 | | |
| 优先权 | 61/775860 2013-03-11 US 61/778727 2013-03-13 US | | |
| 其他公开文献 | CN105378477B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及用于进行固相结合测定法的方法。一个实例是具有改进的分析物特异性的测定方法，其中特异性受限于存在的非特异性结合相互作用。



用于 10 纳 TH1/TH2 的估计的 LOD 值

| LOD ng/mL | hFN6 | hM-1b | hM-2 | hM-4 | hM-8 | hM-10 | hM-120 | hM-13 | hMFA |
|------------------------|------|-------|------|------|------|-------|--------|-------|------|
| 标准物 | 0.18 | 0.54 | 0.90 | 0.71 | 0.15 | 0.081 | 1.1 | 2.4 | 0.12 |
| 10 纳 TH1/TH2 估计的 LOD 值 | 0.37 | 0.49 | 0.58 | 0.22 | 0.17 | 0.082 | 0.63 | 4.2 | 0.24 |