



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112384801 A

(43) 申请公布日 2021.02.19

(21) 申请号 201980044895.X

(22) 申请日 2019.05.03

(30) 优先权数据

62/667,238 2018.05.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/030679 2019.05.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/213583 EN 2019.11.07

(71) 申请人 雅培制药有限公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 S·特丁 J·B·哈夫

J·P·斯金纳 P·麦克唐纳

阮俏俏

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 甘霖 李唐

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书2页 说明书21页

序列表1页 附图7页

(54) 发明名称

用于改进小体积样品的免疫测定灵敏度和动力学的依次采样方法

(57) 摘要

本公开提供了一种用于增强检测生物样品中存在的分析物的方法。在形成分析物/特异性结合成员/可检测标记物复合物之后,洗脱标记物并使洗脱液的第一等分试样与固体支持物接触,其中所述固体支持物包含固定至所述固体支持物的特异性结合所述标记物的特异性结合成员,从固体支持物除去第一等分试样,并使固体支持物与洗脱的标记物的第二等分试样接触,并重复上述步骤,使得标记物在固体支持物上浓缩,用于进一步分析以定量生物样品中的分析物。

1. 用于检测生物样品中存在的分析物的方法,所述方法包括:
 - (a) 提供一定体积的怀疑含有分析物的生物样品;
 - (b) 使固体支持物与所述体积的生物样品的第一等分试样接触,其中所述固体支持物包含固定至所述固体支持物的特异性结合所述分析物的第一特异性结合成员;
 - (c) 从所述固体支持物除去第一等分试样,并使所述固体支持物与所述体积的生物样品的第二等分试样接触;
 - (d) 将步骤(b)和(c)重复5至30次,其中形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物;
 - (e) 使所述固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物与第二特异性结合成员接触,所述第二特异性结合成员特异性结合所述分析物并包含与所述第二特异性结合成员附接的可检测标记物,其中形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员复合物;
 - (f) 除去未与所述分析物结合的任何第二特异性结合成员;和
 - (g) 通过评价由所述可检测标记物产生的信号来检测所述分析物。
2. 用于检测生物样品中存在的分析物的方法,所述方法包括:
 - (a) 提供一定体积的怀疑含有分析物的生物样品;
 - (b) 使固体支持物与一定体积的所述生物样品接触,其中所述固体支持物包含固定至所述固体支持物的特异性结合所述分析物的第一特异性结合成员;
 - (c) 使所述固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物与第二特异性结合成员接触,所述第二特异性结合成员特异性结合所述分析物并包含与所述第二特异性结合成员附接的可分离的可检测标记物,其中形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员复合物;
 - (d) 从与所述固体支持物结合的复合物分离和洗脱所述可检测标记物;
 - (e) 将可检测标记物的等分试样转移至第二固体支持物,所述第二固体支持物包含特异性结合所述可检测标记物的第三特异性结合成员;
 - (f) 从所述固体支持物除去第一等分试样,并使所述固体支持物与洗脱的可检测标记物的第二等分试样接触;
 - (g) 将步骤(e)和(f)重复5至30次,其中形成固体支持物/第三特异性结合成员/可检测标记物复合物;
 - (h) 除去任何未与所述固体支持物结合的可检测标记物;和
 - (i) 通过评价由所述可检测标记物产生的信号来定量所述分析物。
3. 权利要求1或2的方法,其中所述生物样品的体积为约10 μ l至约50 μ l。
4. 权利要求1至3的方法,其中所述第一和第二等分试样包含溶液体积的约1 μ l至约2 μ l。
5. 权利要求4的方法,其中所述第一和第二等分试样包含所述溶液体积的约1 μ l。
6. 权利要求1至5中任一项的方法,其中所述分析物是蛋白、糖蛋白、肽、寡核苷酸、多核苷酸、抗体、抗原、半抗原、激素、药物、酶、脂质、碳水化合物、配体或受体。
7. 权利要求1至6中任一项的方法,其中所述第一和/或第二结合成员是抗体、受体、肽或核酸序列。

8. 权利要求1至7中任一项的方法,其中所述固体支持物是颗粒、微粒、珠粒、电极、载片或多孔板。

9. 权利要求8的方法,其中所述第一固体支持物是微粒,且所述第二固体支持物是载片。

10. 权利要求9的方法,其中所述微粒是磁性的。

11. 权利要求1至10中任一项的方法,其中所述生物样品是血液、血清、血浆、尿液、唾液、汗液、痰液或精液。

12. 权利要求1至11中任一项的方法,其中所述可检测标记物包括色原、荧光化合物、酶、化学发光化合物、核酸分子或放射性化合物。

13. 权利要求1至12中任一项的方法,其中至少步骤(1b)和(1c)或(2e)和(2f)在微流体装置、基于微滴的微流体装置、数字微流体装置(DMF)或基于表面声波的微流体装置(SAW)中实施。

14. 权利要求1至13中任一项的方法,其中使用免疫测定评价由所述可检测标记物产生的信号。

15. 权利要求14的方法,其中所述免疫测定是夹心免疫测定、酶免疫测定(EIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、竞争性抑制免疫测定、酶倍增免疫测定技术(EMIT)、竞争性结合测定、生物发光共振能量转移(BRET)、一步抗体检测测定或均质化学发光测定。

16. 权利要求1至15中任一项的方法,其检测所述分析物的单一分子。

用于改进小体积样品的免疫测定灵敏度和动力学的依次采样方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求2018年5月4日提交的美国临时专利申请号62/667,238的优先权,所述美国临时专利申请的公开内容通过引用并入本文。

[0002] 电子提交的材料通过引用并入

通过引用以其整体并入本文的是与此同时提交并标识如下的计算机可读核苷酸/氨基酸序列表:于2019年5月3日创建的名为“36422-WO-1-ORD_ST25”的一个726字节ASCII (文本) 文件。

[0003] 发明背景

可以准确地分析样品中的目标分析物的方法和装置对于诊断、预测、环境评价、食品安全、化学或生物战剂的检测等是必要的。此类方法和装置需要准确、精确和敏感。如果非常小的样品体积可以用最少的仪器快速分析也是有利的。尽管较新的检测技术(诸如单分子计数)可以检测样品中的非常少量的分析物,但由于上样和采样错误,此类方法经常产生可变的的结果。因此,需要具有小体积的改进的样品分析能力的方法和装置。

[0004] 发明简述

本公开提供了用于检测生物样品中存在的分析物的方法。所述方法包括:(a) 提供一定体积的怀疑含有分析物的生物样品;(b) 使固体支持物与所述体积的生物样品的第一等分试样接触,其中所述固体支持物包含固定至所述固体支持物的特异性结合所述分析物的第一特异性结合成员;(c) 使所述固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物与第二特异性结合成员接触,所述第二特异性结合成员特异性结合所述分析物并包含与所述第二特异性结合成员附接的可分离的可检测标记物,其中形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员复合物;(d) 从与所述固体支持物结合的复合物分离和洗脱所述可检测标记物;(e) 将可检测标记物的等分试样转移至第二固体支持物,所述第二固体支持物包含特异性结合所述可检测标记物的第三特异性结合成员;(f) 从所述固体支持物除去第一等分试样,并使所述固体支持物与洗脱的可检测标记物的第二等分试样接触;(g) 将步骤(e) 和(f) 重复5至30次,其中形成固体支持物/第三特异性结合成员/可检测标记物复合物;(h) 除去任何未与所述固体支持物结合的可检测标记物;和(g) 通过评价由所述可检测标记物产生的信号来定量所述分析物。

[0005] 附图简述

图1A是一系列原始TIRF图像,其显示实施例1中描述的单分子计数灵敏度模型的结果。图1B是举例说明用SM-TIRF和峰发现算法测量的荧光峰/帧的中值数的图。图1B的插图是低浓度范围的扩展。误差条代表三次独立实验间的标准偏差。

[0006] 图2是举例说明实施例2中描述的用SM检测的微粒测定的结果的图。该图绘制峰/帧的数目相比于初始的未浓缩的“分析物”浓度,而插图显示低浓度范围(误差条:标准偏差, $n = 3$)。

[0007] 图3A是举例说明通过泵送空气从固体支持物除去等分试样的程序的图。图3B是举

例说明使用实施例3中所述的重复采样方法的分析物浓度的结果的图。初始背景样品显示在添加任何缀合物之前的测量结果,而第二饱和样品经历与缀合物的60分钟孵育。剩余的样品是从已经上样和再上样至同一孔中的来自一种储备溶液的一系列等分试样。每个孵育期为2分钟,并且在每次测量之前将孔洗涤。所有样品间的背景水平显白色,并且右轴显示重新归零的峰计数。

[0008] 图4A是举例说明对于具有在初始、第10次、第30次和第50次再上样之后采集的SM-TIRF测量值的每份样品从实施例3中描述的相应储备物再上样的样品的结果的图。图4B是这样的图,其针对储备物浓度绘制图4A中的数据,以表明样品之间的相对关系在整个再上样浓缩程序中得以维持。误差条展示给定样本测量内的40次图像采集的标准偏差。

[0009] 图5A和5B是举例说明实施例4中描述的用单分子检测的HIV p24微粒测定的结果的图。图5A显示八种浓度的p24抗原校准物的初始上样的结果。将来自每种洗脱样品的单次2分钟孵育的SM-TIRF检测的峰数针对初始校准物浓度作图。图5B显示在从洗脱的样品再上样九份等分试样(总计= 10)后的结果。将SM峰针对相同的初始p24浓度作图,并且观察到总峰的加强和相对误差的降低。在标准的免疫测定应用中,SM计数达到~80 fM的灵敏度(误差条:标准偏差,帧数= 40)。

[0010] 图6是详述实施例5中描述的实验的输入参数的表。

[0011] 图7A-7C是实施例5中描述的三种不同的样品上样和孵育条件的实时抗原结合曲线的图:1 x 1.1 μ l,持续5分钟(图7A),5.5 μ l,持续5分钟(图7B))和5 x 1.1 μ l,各自持续1分钟(图7C)。

[0012] 发明详述

本公开至少部分基于以下发现:用于小体积样品的免疫测定的样品再上样方法可用于在检测表面上浓缩样品,用于单分子检测的目的。这种重复采样方法提供了最大捕获分析物,因此导致灵敏度提高,和在询问给定样品中的变异量最小,因此导致与不采用重复采样的方法相比改进的变异系数。

[0013] 本公开提供了用于检测生物样品中存在的分析物的方法。所述方法可以涉及单分子检测和计数。在某些实施方案中,公开的方法可以用于确定样品中的一种或多种分析物的存在和/或浓度。

[0014] 生物样品

如本文所用,术语“生物样品”、“样品”和“测试样品”可互换使用,并且是指含有或疑似含有目标分析物的物质。所述生物样品可以源自任何合适的来源。例如,生物样品的来源可以是合成的(例如,在实验室中生产),从环境(例如,空气、土壤、流体样品,例如,水供给等)、动物(例如,哺乳动物)、植物或另一生物体获得或衍生的天然存在的物质。在一个实施方案中,所述生物样品的来源是人体物质(例如,体液、血液、血清、血浆、尿、唾液、汗液、痰、精液、粘液、泪液、淋巴液、羊水、间质液、肺灌洗液、脑脊液、粪便、组织、器官等)。人组织可以包括但不限于骨骼肌组织、肝组织、肺组织、肾组织、心肌组织、脑组织、骨髓、子宫颈组织、皮肤等。在一些情况下,所述样品的来源可以是活组织检查样品,其可以通过组织崩解/细胞裂解而溶解。所述样品可以是液体样品、固体样品的液体提取物、流动的颗粒状固体或固体颗粒的流体悬浮液。

[0015] 公开的方法涉及提供一定体积的怀疑含有分析物的生物样品。可以提供任何合适

体积的样品。应理解,单分子(SM)检测方法通常涉及小样品体积。在这方面,所述生物样品的体积可以是约10 μ l至约50 μ l(例如,10 μ l、15 μ l、20 μ l、25 μ l、30 μ l、35 μ l、40 μ l或50 μ l)。在另一个实施方案中,所述生物样品的体积可以是约10 μ l至约30 μ l(例如,10 μ l、11 μ l、12 μ l、13 μ l、14 μ l、15 μ l、16 μ l、17 μ l、18 μ l、19 μ l、20 μ l、21 μ l、22 μ l、23 μ l、24 μ l、25 μ l、26 μ l、27 μ l、28 μ l、29 μ l、30 μ l或由前述值中的任何两者限定的范围)。

[0016] 公开的方法包括使固体支持物与所述体积的生物样品的第一、第二和随后的等分试样接触。如本文所用的术语“等分试样”是指液体总量或液体体积的一部分。在本公开的上下文中,第一、第二和随后等分试样各自可以具有任何合适的体积。在一个实施方案中,第一、第二和随后等分试样各自包含所述体积的生物样品的约1 nL至约2 μ l(例如,1 nL、10 nL、50 nL、100 nL、200 nL、nL、300 nL、400 nL、500 nL、600 nL、700 nL、800 nL、900 nL、1 μ l、1.5 μ l、2 μ l或由前述值中的任何两者限定的范围)。例如,等分试样可以包含约500 nL至约1 μ l(例如,525 nL、550 nL、575 nL、625 nL、650 nL、675 nL、725 nL、750 nL、775 nL、825 nL、850 nL、875 nL、925 nL、950 nL、or 975 nL)或约1 μ l至约2 μ l(例如,1.1 μ l、1.2 μ l、1.3 μ l、1.4 μ l、1.5 μ l、1.6 μ l、1.7 μ l、1.8 μ l或1.9 μ l)。在一个实施方案中,所述第一、第二和随后等分试样各自包含所述体积的生物样品的约1 μ l。

[0017] 在一些实施方案中,液体生物样品在用于测定中之前可以稀释。例如,在其中生物样品是人体液(例如,血液或血清)的实施方案中,可以用适当的溶剂(例如,PBS缓冲液)稀释所述流体。在使用之前,可以将流体样品稀释约1倍、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约10倍、约100倍或更多倍。

[0018] 在其他实施方案中,所述样品可以经历分析前处理。分析前处理可以提供另外的功能性诸如非特异性的蛋白除去和/或有效的、但经济的可实现的混合功能性。分析前处理的一般方法包括例如使用电动陷俘(electrokinetic trapping)、AC动电学、表面声波、等速电泳、介电泳、电泳和本领域已知的其他预浓缩技术。在一些情况下,在用于测定中之前可以浓缩流体样品。例如,在其中生物样品是人体液(例如,血液、血清)的实施方案中,通过沉淀、蒸发、过滤、离心或它们的组合可以浓缩所述流体。在使用之前,可以将流体样品浓缩约1倍、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约10倍、约100倍或更多倍。

[0019] 分析物

术语“分析物”、“靶标分析物”和“目标分析物”在本文可互换使用,并且是指在公开的方法测量的物质。如本领域技术人员所理解,使用本公开的方法,可以检测并任选地定量可被第一特异性结合成员和第二特异性结合成员特异性结合的任何分析物。

[0020] 在一些实施方案中,所述分析物可以是生物分子。合适的生物分子的实例包括但不限于大分子,例如,蛋白、脂质和碳水化合物。其他生物分子包括例如激素、抗体、生长因子、寡核苷酸、多核苷酸、半抗原、细胞因子、酶、受体(例如,神经、激素、营养物和细胞表面受体)或它们的配体、癌症标志物(例如,PSA、TNF- α)、心肌梗塞的标志物(例如,BNP、肌钙蛋白、肌酸激酶等)、毒素、代谢剂(例如,维生素)等。合适的蛋白分析物包括例如肽、多肽、蛋白片段、蛋白复合物、融合蛋白、重组蛋白、磷蛋白、糖蛋白、脂蛋白等。

[0021] 在某些实施方案中,所述分析物可以是翻译后修饰的蛋白(例如,磷酸化的、甲基化的、糖基化的蛋白),且所述第一或第二特异性结合成员可以是对翻译后修饰特异性的抗

体。修饰的蛋白可以结合至固定在固体支持物上的第一特异性结合成员,其中所述第一特异性结合成员结合修饰的蛋白,但是不结合未修饰的蛋白。在其他实施方案中,所述第一特异性结合成员可以结合未修饰的和修饰的蛋白,且所述第二特异性结合成员可以是对翻译后修饰的蛋白特异性的。

[0022] 可以通过本文公开的方法分析的分析物的一个非限制性列表包括A β 42淀粉样蛋白 β -蛋白、胎球蛋白-A、tau、分泌粒蛋白II、朊病毒蛋白、 α -突触核蛋白、tau蛋白、NSE、S100B、NF-L、ApoA1、BDNF、MBP、肌酸酐钠、BUN、AMPA、朊病毒蛋白、神经丝轻链、parkin、PTEN诱导的假定激酶1、DJ-1、富亮氨酸重复序列激酶2、突变的ATP13A2、Apo H、血浆铜蓝蛋白、过氧化物酶体增殖子活化的受体 γ 共活化剂-1 α (PGC-1 α)、转甲状腺素蛋白、维生素D-结合蛋白、促细胞凋亡的激酶R (PKR) 和它的磷酸化的PKR (pPKR)、CXCL13、IL-12p40、CXCL13、IL-8、Dkk-3 (精液)、p14 endocan片段、血清、ACE2、针对CD25的自身抗体、hTERT、CAI25 (MUC 16)、VEGF、sIL-2、骨桥蛋白、人附睾蛋白4 (HE4)、 α -胎蛋白、白蛋白、白蛋白尿、微白蛋白尿、嗜中性粒细胞明胶酶-相关的脂质运载蛋白 (NGAL)、白介素18 (IL-18)、肾损伤分子-1 (KIM-1)、肝脂肪酸结合蛋白 (L-FABP)、LMP1、BARF1、IL-8、癌胚抗原 (CEA)、BRAF、CCNI、EGFR、FGF19、FRS2、GREB1和LZTS1、 α -淀粉酶、癌胚抗原、CA 125、IL8、硫氧还蛋白、 β -2微球蛋白、肿瘤坏死因子- α 受体、CA15-3、促卵泡激素 (FSH)、黄体化激素 (LH)、T-细胞淋巴瘤侵入和转移1 (TIAM1)、N-钙粘着蛋白、EC39、双调蛋白、脱氧尿苷三磷酸酶、分泌型钙结合微丝蛋白 (pGSN)、前列腺特异性抗原 (PSA)、胸腺素 β 15、胰岛素、血浆C-肽、糖基化的血红蛋白 (HBA1c)、C-反应蛋白 (CRP)、白介素-6 (IL-6)、Rho GDP-解离抑制剂2 (ARHGDI2)、丝切蛋白-1 (CFL1)、profilin-1 (PFN1)、谷胱甘肽S-转移酶P (GSTP1)、蛋白S100-A11 (S100A11)、硫氧还蛋白过氧化物酶-6 (PRDX6)、线粒体的10 kDa热激蛋白 (HSPE1)、溶菌酶C前体 (LYZ)、葡萄糖-6-磷酸异构酶 (GPI)、组蛋白H2A类型2-A (HIST2H2AA)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、基膜-特异性的硫酸肝素蛋白聚糖核心蛋白前体 (HSPG2)、半乳糖凝集素-3-结合蛋白前体 (LGALS3BP)、组织蛋白酶D前体 (CTSD)、载脂蛋白E前体 (APOE)、IQGAP1 Ras GTPase-活化样蛋白 (IQGAP1)、血浆铜蓝蛋白前体 (CP) 和IGLC2、PCDGF/GP88、EGFR、HER2、MUC4、IGF-IR、p27 (kip1)、Akt、HER3、HER4、PTEN、PIK3CA、SHIP、Grb2、Gab2、3-磷酸肌醇磷脂依赖性的蛋白激酶-1 (PKC-1)、TSC1、TSC2、mTOR、ERBB受体反馈抑制剂1 (MIG-6)、S6K、src、KRAS、促分裂原活化蛋白激酶1 (MEK)、cMYC、拓扑异构酶 (DNA) II α 170 kDa、FRAP1、NRG1、ESR1、ESR2、PGR、CDKN1B、MAP2K1、NEDD4-1、FOXO3A、PPP1R1B、PXN、ELA2、CTNNB1、AR、EPHB2、KLF6、ANXA7、NKX3-1、PITX2、MKI67、PHLPP、脂联素 (ADIPOQ)、纤维蛋白原 α 链 (FGA)、瘦素 (LEP)、高级糖基化终产物-特异性的受体 (AGER或RAGE)、 α -2-HS-糖蛋白 (AHSG)、血管生成素 (ANG)、CD14、铁蛋白 (FTH1)、胰岛素-样生长因子结合蛋白1 (IGFBP1)、白介素2受体、 α (IL2RA)、血管细胞粘附分子1 (VCAM1)、Von Willebrand因子 (VWF)、髓过氧化物酶 (MPO)、IL1 α 、TNF α 、核周抗-嗜中性粒细胞胞质抗体 (p-ANCA)、乳铁蛋白、钙卫蛋白、威尔曼瘤-1蛋白、水通道蛋白-1、MLL3、AMBP、VDAC1、大肠杆菌 (*E. coli*) 肠毒素 (热不稳定的外毒素、热稳定的肠毒素)、流感HA抗原、破伤风毒素、白喉毒素、肉毒杆菌毒素、志贺毒素、志贺样毒素I、志贺样毒素II、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 毒素A和B、滥用的药物 (例如可卡因)、蛋白生物标志物 (包括但不限于核仁素、核因子-kB必需调节剂 (NEMO)、CD-30、蛋白酪氨酸激酶7 (PTK7)、MUC1糖型、免疫球蛋白 μ 重链 (IGHM)、免疫球蛋白E、 α v β 3

整联蛋白、 α -凝血酶、HIV gp120、HIV p24、NF- κ B、E2F转录因子、纤溶酶原激活物抑制剂、髓生蛋白C、CXCL12/SDF-1和前列腺特异性膜抗原(PSMA)。

[0023] 所述分析物可以是细胞,诸如例如胃癌细胞(例如,HGC-27细胞);非小细胞肺癌(NSCLC)细胞,结肠直肠癌细胞(例如,DLD-1细胞),H23肺腺癌细胞,Ramos细胞,T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)细胞,CCRF-CEM细胞,急性髓样白血病(AML)细胞(例如,HL60细胞),小细胞肺癌(SCLC)细胞(例如,NCI-H69细胞),人胶质母细胞瘤细胞(例如,U118-MG细胞),前列腺癌细胞(例如,PC-3细胞),过表达HER-2的人乳腺癌细胞(例如,SK-BR-3细胞),胰腺癌细胞(例如,Mia-PaCa-2)。在其他实施方案中,所述分析物可以是感染性病原体,诸如细菌(例如,结核分枝杆菌、金黄色葡萄球菌、痢疾志贺氏菌、大肠杆菌0157:H7、空肠弯曲杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌08和肠炎沙门氏菌)、病毒(例如,逆转录病毒(诸如HIV)、疱疹病毒、腺病毒、慢病毒、丝状病毒(例如,西尼罗河病毒、埃博拉病毒和寨卡病毒)、肝炎病毒(例如,A、B、C、D和E);HPV、细小病毒等)、寄生虫或真菌孢子。

[0024] 特异性结合成员

公开的方法包括使固体支持物与所述体积的生物样品的第一等分试样接触,其中所述固体支持物包含固定至所述固体支持物的特异性结合所述分析物的第一特异性结合成员。术语“特异性结合配偶体”和“特异性结合成员”在本文中可互换使用,并且是指与对其他分子的显著更少的识别相比,特异性识别分子的两种或更多种不同分子之一。所述两种不同分子之一具有在表面上或在内腔中的区域,其特异性结合另一种分子的特定空间和极性构成,并因此被定义为与所述另一种分子的特定空间和极性构成互补。所述分子可以是特异性结合对的成员。例如,特异性结合成员可以包括但不限于蛋白,诸如受体、酶和抗体。

[0025] 应理解的是,结合成员(例如,第一、第二、第三、第四或随后的结合成员)的选择将取决于待分析的一种或多种分析物。各种各样的靶标分子的结合成员是已知的,或可以使用已知技术容易地发现或开发。例如,当靶标分析物是蛋白时,结合成员可以包括肽,蛋白,特别是抗体或其片段(例如,抗原结合片段(Fab)、Fab'片段和F(ab')₂片段)、全长单克隆或多克隆抗体、抗体样片段、重组抗体、嵌合抗体、单链Fv (“scFv”)、单链抗体、单结构域抗体,诸如源自骆驼科动物的可变重链结构域(“VHH”;也被称作“VHH片段”) (参见,例如,Gottlin等人, Journal of Biomolecular Screening, 14:77-85 (2009))、重组VHH单结构域抗体、V_{NAR}片段、二硫键连接的Fv (“sdFv”)、抗-独特型(“抗-Id”)抗体和前述中任一一种的功能上有活性的表位结合片段。所述结合成员可以是其他蛋白,诸如受体蛋白、蛋白A、蛋白C等。当分析物是小分子(诸如,类固醇、后胆色素、维A酸和脂质)时,所述第一和/或第二特异性结合成员可以是支架蛋白(例如,脂质运载蛋白)或受体。在一些实施方案中,蛋白分析物的特异性结合成员可以是肽。在另一个实施方案中,当靶标分析物是酶时,合适的结合成员可以包括酶底物和/或酶抑制剂,诸如肽、小分子等。在一些情况下,当靶标分析物是磷酸化的种类时,所述结合成员可以包含磷酸盐结合剂。例如,所述磷酸盐结合剂可以包含金属离子亲和介质诸如在美国专利7,070,921和美国专利申请公开2006/0121544中描述的那些。

[0026] 当分析物是碳水化合物时,潜在地合适的特异性结合成员(如本文中定义)包括,例如,抗体、凝集素和选择素。本领域普通技术人员明白,可以与目标靶标分析物特异性结合的任何分子可以潜在地用作结合成员。

[0027] 在某些实施方案中,合适的靶标分析物/结合成员复合物可以包括但不限于,抗体/抗原、抗原/抗体、受体/配体、配体/受体、蛋白/核酸、酶/底物和/或抑制剂、碳水化合物(包括糖蛋白和糖脂)/凝集素和/或选择素、蛋白/蛋白、蛋白/小分子等。

[0028] 某些实施方案利用作为蛋白或多肽的结合成员。如本领域已知的,可以使用任何数目的技术将多肽连接至固体支持物。已知各种各样用于将反应性部分添加至蛋白的技术,诸如例如,在美国专利5,620,850中描述的方法。用于将蛋白附接至表面的方法也描述于,例如,Heller, *Acc. Chem. Res.*, 23:128 (1990)。

[0029] 如本文所述,特异性结合成员和分析物之间的结合是特异性的,例如,当结合成员和分析物是结合对的互补部分时。例如,在一个实施方案中,所述结合成员可以是特异性结合分析物上的表位的抗体。根据一个实施方案,所述抗体可以是能够特异性结合目标分析物的任何抗体。例如,适当的抗体包括但不限于,单克隆抗体、双特异性抗体、微体、结构域抗体(dAb)(例如,诸如描述于Holt等人, *Trends in Biotechnology*, 21: 484-490 (2014))、天然存在的单结构域抗体(sdAb)(例如,如在软骨鱼和骆驼科中),或其为合成的(例如,纳米抗体、VHH或其他结构域结构)、合成的抗体(有时被称作抗体模拟物)、嵌合抗体、人源化抗体、抗体融合体(有时被称作“抗体缀合物”)及其片段。作为另一个实例,所述分析物分子可以是抗体,所述第一特异性结合成员可以是抗原且所述第二特异性结合成员可以是特异性结合靶标抗体的第二抗体。或者,所述第一特异性结合成员可以是特异性结合靶标抗体的第二抗体且所述第二特异性结合成员可以是抗原。在其他实施方案中,所述分析物分子可以使抗体,且所述结合成员可以是特异性结合抗体的肽。

[0030] 在一些实施方案中,所述第一或第二结合成员可以是化学编程的抗体(cpAb)(Rader, *Trends in Biotechnology*, 32:186-197 (2014))、双特异性的cpAb、抗体募集分子(ARM)(McEnaney 等人, *ACS Chem. Biol.*, 7: 1139-1151 (2012))、支链的捕获剂诸如三配体捕获剂(Millward 等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 133: 18280-18288 (2011))、从非抗体支架衍生的工程改造的结合蛋白诸如单抗体(源自人纤连蛋白的第十个纤连蛋白III型结构域)、亲和体(源自免疫球蛋白结合蛋白A)、DARPin(基于锚蛋白重复模块)、anticalins(源自脂质运载蛋白后胆色素-结合蛋白和人脂质运载蛋白2)和半胱氨酸结肽(knottin)(Gilbreth and Koide, *Current Opinion in Structural Biology*, 22:1-8 (2012); Banta 等人, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 15: 93-113 (2013))、WW结构域(Patel 等人, *Protein Engineering, Design & Selection*, 26(4): 307-314 (2013))、重新设定目标的受体配体、affitins(Béhar等人, *Protein Engineering, Design & Selection*, 26: 267-275 (2013))和/或Adhirons(Tiede等人, *Protein Engineering, Design & Selection*, 27: 145-155 (2014))。

[0031] 在其中分析物是细胞(例如,哺乳动物、禽类、爬虫类、其他脊椎动物、昆虫、酵母、细菌、细胞等)的实施方案中,所述特异性结合成员可以是对细胞表面抗原(例如,细胞表面受体)具有特异性亲和力的配体。在一个实施方案中,所述特异性结合成员可以是粘附分子受体或其部分,其对在靶标细胞类型的表面上表达的细胞粘附分子具有结合特异性。所述粘附分子受体与在靶标细胞的细胞外表面上的粘附分子结合,由此固定或捕获所述细胞。然后可以使用第二结合成员检测结合的细胞,所述第二结合成员可以与第一结合成员相同或可以结合在细胞的表面上表达的不同分子。

[0032] 在一些实施方案中,分析物分子和特异性结合成员之间的结合亲和力应当在测定的条件下足以保持结合,所述条件包括用于除去非特异性结合的分子或颗粒的洗涤步骤。在一些实施方案中,例如在某些生物分子的检测中,分析物分子与它的互补结合成员的结合常数可以是在至少约 10^4 至约 10^6 M^{-1} 、至少约 10^5 至约 10^9 M^{-1} 、至少约 10^7 至约 10^9 M^{-1} 之间、大于约 10^9 M^{-1} 。

[0033] 具有在其上面固定第一特异性结合试剂的表面的固体支持物可以是呈平面或非平面构象的任何合适的表面,诸如例如微流体芯片的表面、隔室的内表面、珠粒、珠粒的外表面、多孔珠粒的内表面和/或外表面、颗粒、微粒、电极、载片(例如,载玻片)或多孔(例如,96孔)板。在一个实施方案中,所述第一特异性结合成员可以共价地或非共价地连接至珠粒,例如,胶乳、琼脂糖、sepharose、链霉抗生物素蛋白、甲苯磺酰基的(tosylactivated)、环氧树脂、聚苯乙烯、氨基珠粒、胺珠粒、羧基珠粒等。在某些实施方案中,所述珠粒可以是颗粒,例如,微粒(MP)。在一些实施方案中,所述微粒可以是约0.1 nm至约10微米,约50 nm至约5微米,约100 nm至约1微米,约0.1 nm至约700 nm,约500 nm至约10微米,约500 nm至约5微米,约500 nm至约3微米,约100 nm至700 nm,或约500 nm至700 nm。例如,所述微粒可以是约4-6微米、约2-3微米或约0.5-1.5微米。小于约500 nm的颗粒有时被视作纳米颗粒。因而,所述微粒任选地可以是约0.1 nm至约500 nm之间、约10 nm至约500 nm之间、约50 nm至约500 nm之间、约100 nm至约500 nm之间、约100 nm、约150 nm、约200 nm、约250 nm、约300 nm、约350 nm、约400 nm、约450 nm或约500 nm的纳米颗粒。

[0034] 在其他实施方案中,所述珠粒可以是磁珠或磁性颗粒。磁性珠粒/颗粒可以是铁磁性的、亚铁磁性的、顺磁的、超顺磁的或铁磁流体的。示例性的铁磁性材料包括Fe、Co、Ni、Gd、Dy、CrO₂、MnAs、MnBi、EuO、NiO/Fe。亚铁磁性材料的实例包括NiFe₂O₄、CoFe₂O₄、Fe₃O₄(或FeO·Fe₂O₃)。珠粒可以具有固体核心部分,其为磁性的且被一个或多个非磁性层包围。或者,所述磁性部分可以是在非磁性核心周围的层。在其上面固定了第一特异性结合成员的固体支持物可以以干燥形式或以液体形式储存。在使样品与在其上面固定了第一特异性结合成员的磁珠接触之前或之后,可以使磁珠处于磁场中。

[0035] 可以使用任何合适的方法(其中各种是本领域已知的)将特异性结合成员附接至固体支持物。例如,特异性结合成员可以通过连接附接至固体支持物,所述连接可以包含促进结合成员与支持物的连接的、所述支持物和/或结合成员的任何部分、官能化或修饰。结合成员和支持物之间的连接可以包括一个或多个化学或物理键或提供此类键的化学间隔物(例如,经由范德华力、氢键合、静电相互作用、疏水/亲水相互作用等的非特异性连接)。可以使用任何多种技术将多肽附接至各种各样的固体支持物,诸如美国专利5,620,850和Heller, *Acc. Chem. Res.*, 23: 128 (1990)中描述的那些。

[0036] 在某些实施方案中,固体支持物还可以包含保护性的、阻断性的或钝化性的层,该层可以消除或减小在测定过程中非捕获组分(例如,分析物分子、结合成员)与结合表面的非特异性连接,所述非特异性连接可能导致检测过程中的假阳性信号或导致信号的损失。在某些实施方案中可以用于形成钝化层的材料的实例包括但不限于:聚合物,诸如聚乙二醇,其排斥蛋白的非特异性结合;具有该性质的天然存在的蛋白,诸如血清白蛋白和酪蛋白;表面活性剂,例如,两性离子表面活性剂,诸如磺基甜菜碱;天然存在的长链脂质;聚合物刷子,和核酸,诸如鲑鱼精DNA。

[0037] 可以使用本领域中已知的任何合适方法使固体支持物与所述体积的样品的第一等分试样接触。如本文所用的“接触”是指任何类型的组合动作，其使结合成员与样品中的目标分析物足够近，使得如果对所述结合成员特异性的目标分析物存在于所述样品中，则将发生结合相互作用。接触可以以多种不同的方式实现，包括将所述样品与结合成员组合，通过引入结合成员与分析物紧密靠近而将靶标分析物暴露于结合成员等。所述接触可以根据需要重复多次。

[0038] 无论使用哪种方法，在其中第一等分试样中存在的任何分析物结合固定在固体支持物上的第一特异性结合成员的条件下，使固体支持物与所述体积的样品的第一等分试样接触。在一个实施方案中，将固体支持物和第一等分试样之间的接触维持（即孵育）足够的时间段以允许发生第一特异性结合成员和分析物之间的结合相互作用。在一个实施方案中，将第一等分试样在固体支持物上孵育至少30秒且至多10分钟。例如，第一等分试样可以与固体支持物孵育约1、2、3、4、5、6、7、8或9分钟。在一个实施方案中，第一等分试样可以与固体支持物孵育约2分钟。另外，所述孵育可以是在促进特异性结合相互作用的结合缓冲液（诸如例如，白蛋白（例如BSA）、非离子去污剂（Tween-20、Triton X-100）和/或蛋白酶抑制剂（例如PMSF））中。通过改变结合缓冲液，可以在测定中操作或改变特异性结合成员的结合亲和力和/或特异性。在一些实施方案中，通过改变结合缓冲液，可以增加所述结合亲和力和/或特异性。在一些实施方案中，通过改变结合缓冲液，可以降低所述结合亲和力和/或特异性。结合相互作用的其他条件（诸如例如，温度、盐浓度）也可以根据经验确定，或可以基于制造商的说明书。例如，所述接触可以在室温（21℃-28℃，例如，23℃-25℃）、37℃或4℃进行。

[0039] 在固体支持物与所述体积的生物样品的第一等分试样之间孵育足以允许等分试样中的分析物结合第一特异性结合成员的时间后，公开的方法包括从固体支持物除去第一等分试样并使固体支持物与生物样品的第二等分试样接触。可以使用任何合适的方法（诸如，例如，将一定量的空气引入至固体支持物（例如，孔）上），使得空气的力从固体支持物置换第一等分试样，从固体支持物除去第一等分试样。或者，可以通过将第二（或随后）等分试样引入至固体支持物上，使得从固体支持物置换第一等分试样，除去第一等分试样。本文描述的涉及第一等分试样的实施方案也适用于第二等分试样（和如下所述的随后等分试样）的相同方面。

[0040] 公开的方法进一步包括重复以下步骤：(i) 使固体支持物与所述体积的生物样品的等分试样接触；(ii) 从所述固体支持物除去等分试样，并使所述固体支持物与所述体积的生物样品的第二等分试样接触，使得形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物。换言之，使所述固体支持物与所述体积的生物样品的第一、第二和随后等分试样接触，并且从所述固体支持物除去每份等分试样，然后将下一个随后的等分试样应用至所述固体支持物。以这种方式，目标分析物可以以固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物的形式在固体支持物上浓缩，并如本文进一步所述进行检测。如本文所用，术语“复合物”是指至少两个彼此特异性结合的分子。复合物的实例包括但不限于与分析物-结合分子（例如，抗体）结合的分析物，与多个分析物-结合分子结合的分析物，例如，与两个分析物-结合分子结合的分析物，与多个分析物结合的分析物-结合分子，例如，与两个分析物结合的分析物-结合分子。

[0041] 据信本文所述的“重复采样”方法提供了最大量分析物的捕获和浓缩,导致免疫测定灵敏度改进,同时导致询问给定样品中的变异量最小,导致变异系数(CV)改进。本公开尤其表明,公开的“重复采样”方法增强单分子检测系统的灵敏度,诸如本文所述和本领域已知的那些(例如,全内反射荧光(TIRF)显微镜)。此外,重复采样方法允许本领域普通技术人员利用每次添加生物样品体积的新鲜等分试样重新分配分析物平衡。

[0042] 可以将使所述固体支持物与所述体积的生物样品的等分试样接触、从所述固体支持物除去等分试样和使所述固体支持物与所述体积的生物样品的第二等分试样接触的步骤重复任何次数以允许足以形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物。在这方面,所述步骤可以重复至少5次且不超过30次(例如,5、10、15、20、25或30次)。例如,所述步骤可以重复10至20次(例如,10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次)或20至30次(例如,21、22、23、24、25、26、27、28、29或30次)。在一个实施方案中,所述接触和除去步骤重复10次。

[0043] 在足够重复所述接触和除去步骤以形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物并将复合物在固体支持物上浓缩之后,所述方法包括使固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物与第二特异性结合成员接触,所述第二特异性结合成员特异性结合所述分析物并且包含与其附接的可检测标记物,其中形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员复合物。

[0044] 如以上关于使固体支持物与所述生物样品的第一、第二和随后等分试样接触所讨论,可以在分析物和第二结合成员之间足以发生结合相互作用的条件下实施固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物与第二特异性结合成员的接触。在该接触步骤后,可以除去未与分析物结合的任何第二特异性结合成员,随后为任选的洗涤步骤。可以通过任何合适的方式(诸如,例如,微滴驱动、电泳、电润湿、介电泳、静电驱动、电场介导、电极介导、毛细管力、色谱法、离心、抽吸或基于表面声波(SAW)的洗涤方法),将任何未结合的第二特异性结合成员与固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员的复合物分离。

[0045] 公开的方法可以包括质量控制组分。在本文所述的免疫测定和试剂盒的上下文中的“质量控制组分”包括但不限于校准物、对照和灵敏度组。可以使用“校准物”或“标准品”(例如,一种或多种,例如多种)以建立用于内插分析物(诸如抗体)的浓度的校准(标准)曲线。或者,可以使用接近参考水平或控制水平(例如,“低”、“中”或“高”水平)的单一校准物。可以结合使用多种校准物(即,多于一种校准物或各种量的校准物)来构成“灵敏度组”。所述校准物是任选的,并且优选是一系列校准物的一部分,其中每种校准物与该系列中的其他校准物的不同在于,诸如例如浓缩或检测方法(例如,比色或荧光检测)。

[0046] 本文所述的重复采样技术还可以包括也可以重复的洗脱步骤,其用于进一步富集用于检测的分析物。例如,在形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员复合物后,可以洗脱复合物的第一等分试样并将其置于用链霉抗生物素蛋白包被的检测表面(例如,检测载片上的微流体通道)上。然后通过链霉抗生物素蛋白表面捕获与可检测标记物和生物素缀合的分析物分子,从复合物溶液耗竭标记的分析物分子。在短暂的孵育(例如,1-2分钟)后,可以将空气引入检测表面的通道中,以置换“用过的”等分试样。通常将标记的分析物分子的主体在前两分钟内捕获,而100%的标记的分析物分子的捕获通

常在约15分钟后发生。可以将标记的分析物分子的第二“新鲜”等分试样引入通道中并孵育1-2分钟,这允许在链霉抗生物素蛋白表面捕获新的生物素标记的分析物的部分。然后可以如上所讨论用空气清洁通道,并且该过程重复任何合适的次数。在这方面,所述洗脱过程可以重复至少5次且不超过30次(例如,5、10、15、20、25或30次)。例如,所述洗脱过程可以重复10至20次(例如,10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次)或20至30次(例如,21、22、23、24、25、26、27、28、29或30次)。

[0047] 分析物检测和测量

如上所示,所述第二特异性结合成员包含与其附接的可检测标记物。术语“标记物”或“可检测标记物”在本文中可互换使用,并且是指附接至特异性结合成员或分析物,以使得所述特异性结合成员和所述分析物之间的反应可检测的部分,且如此标记的特异性结合成员或分析物被称作“可检测标记的”。标记物可以产生通过视觉装置或仪器装置可检测的信号。所述可检测标记物可以是例如,(i) 通过可切割的接头附接至特异性结合成员或分析物的标签;或(ii) 产生信号的物质,诸如发色团、荧光化合物、酶、化学发光化合物、放射性化合物等。在一个实施方案中,所述可检测标记可以包含产生光的部分(例如,吖啶鎓化合物)或产生荧光的部分(例如,荧光素)。在另一个实施方案中,所述可检测标记物可以包含一个或多个能够产生可检测信号的核酸分子。

[0048] 本领域已知的任何合适的产生信号的物质可以用作可检测标记物。例如,所述可检测标记物可以是放射性标记物(诸如例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 和 ^{153}Sm)、酶促标记物(诸如例如辣根过氧化物酶、碱性过氧化物酶、葡萄糖6-磷酸脱氢酶等)、化学发光标记物(诸如例如吖啶酯、硫酯、磺酰胺、鲁米诺、异鲁米诺、菲啶鎓酯等)、荧光标记物(诸如例如,5-荧光素、6-羧基荧光素、3'6-羧基荧光素、5(6)-羧基荧光素、6-六氯-荧光素、6-四氯荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻胆蛋白和R-藻红蛋白)、量子点(例如,硫化锌加帽的硒化镉)、测温标记物或免疫聚合酶链式反应标记物。荧光标记物可以用于荧光极化免疫测定(FPIA)中(参见,例如,美国专利5,593,896、5,573,904、5,496,925、5,359,093和5,352,803)。所述可检测标记物可以是可通过电子方式检测的分子(例如,改变电响应、诸如电流、电压或电阻的分子)。在一个实施方案中,例如,可以通过改变纳米孔的电输出来检测穿过固态或生物纳米孔的分子。

[0049] 吖啶鎓化合物可以在均相化学发光测定中用作可检测标记物(参见,例如,Adamczyk 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 1324-1328 (2006); Adamczyk 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4: 2313-2317 (2004); Adamczyk 等人, *Biorg., Med., Chem., Lett.*, 14: 3917-3921 (2004); 和Adamczyk 等人, *Org. Lett.*, 5: 3779-3782 (2003))。在一个方面,所述吖啶鎓化合物是吖啶鎓-9-甲酰胺。用于制备吖啶鎓9-甲酰胺的方法描述于例如Mattingly, J., *Biolumin. Chemilumin.*, 6: 107-114 (1991); Adamczyk 等人, *J. Org. Chem.*, 63: 5636-5639 (1998); Adamczyk 等人, *Tetrahedron*, 55: 10899-10914 (1999); Adamczyk 等人, *Org. Lett.*, 1: 779-781 (1999); Adamczyk 等人, *Bioconjugate Chem.*, 11: 714-724 (2000); Mattingly 等人, In: *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*; Dyke, K.V. 编; CRC Press: Boca Raton, pp. 77-105 (2002); Adamczyk 等人, *Org. Lett.*, 5: 3779-3782 (2003); 和美国专利5,468,646、5,543,524和5,783,699。

[0050] 吡啶鎓化合物的另一个实例是吡啶鎓-9-甲酸芳基酯,诸如例如10-甲基-9-(苯氧基羰基)吡啶鎓氟代磺酸盐(可得自Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)。用于制备吡啶鎓-9-甲酸芳基酯的方法描述于例如McCapra 等人, *Photochem. Photobiol.*, 4: 1111-21 (1965); Razavi 等人, *Luminescence*, 15: 245-249 (2000); Razavi 等人, *Luminescence*, 15: 239-244 (2000); 和美国专利5,241,070。在信号的强度和/或信号的迅速方面,此类吡啶鎓-9-甲酸芳基酯是在由至少一种氧化酶对分析物的氧化中产生的过氧化氢的有效化学发光指示剂。

[0051] 可检测标记物、标记程序和标记物的检测描述于Polak和Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 第2版, Springer Verlag, N.Y. (1997)以及Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996), Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon。

[0052] 从固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员的复合物的附近除去任何未结合的第二特异性结合成员后,公开的方法包括通过评价由可检测的标记产生的信号来检测分析物。附接至所述固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员复合物中存在的第二结合成员的可检测标记物可以通过任何合适的方式分离,或者可以使用本领域已知的技术检测。或者,在一些实施方案中,如果所述可检测标记物包含标签,可以从除去未结合的试剂以后保留的复合物切割或分离所述标签。例如,所述标签可以通过可切割的接头(诸如描述于例如国际专利申请公开W0 2016/161402中的那些)附接至第二结合成员。可以使固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员的复合物暴露于介导可切割的接头的切割的切割剂。

[0053] 在检测来自标记物或标签的信号后,可以使用本领域已知的任何合适方法来确定(例如,定量)样品中存在的目标分析物的存在或量。此类方法包括但不限于免疫测定。【可以利用任何合适的免疫测定,诸如例如夹心免疫测定(例如,单克隆-多克隆夹心免疫测定,包括酶检测(酶免疫测定(EIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)、竞争性抑制免疫测定(例如,正向和反向)、酶倍增免疫测定技术(EMIT)、竞争性结合测定、生物发光共振能量转移(BRET)、一步抗体检测测定、均质测定(例如,均质化学发光测定)、异质测定和飞行中捕获(capture on the fly)测定。在一些实施方案中,一个标签附接至捕获抗体和检测抗体。或者,用于捕获的微粒或纳米颗粒也可以发挥功能用于检测(例如,其中通过某种方式将其附接或缔合至可切割接头)。可以在公开的方法中使用的免疫测定组分和技术进一步描述于例如国际专利申请公开号W0 2016/161402和W0 2016/161400。

[0054] 在其他实施方案中,本文所述的方法可以与用于在单分子水平上分析(例如,检测和/或定量)分析物的方法学结合使用。用于分析单分子和单分子相互作用的任何合适的技术可以在本公开的上下文中使用,其中多种是本领域已知的。此类单分子(SM)检测技术包括但不限于单分子荧光共振能量转移(FRET)(参见,例如,Keller 等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 136: 4534-4543 (2014); 和Kobitski 等人, *Nucleic Acids Res.*, 35: 2047-2059, (2007)),实时单分子共免疫沉淀法(参见,例如,Lee 等人, *Nat. Protoc.*, 8: 2045-2060 (2013)),单分子电子转移(参见,例如,Yang 等人, *Science*, 302: 262-266 (2003); 和Min 等人, *Phys. Rev. Lett.*, 94: 198302 (2005));单分子力光谱方法(参见,例如,Capitanio, M. & Pavone, F.S., *Biophys. J.*, 105: 1293-1303 (2013);和

Lang 等人, *Biophys. J.*, 83: 491-501 (2009)), 细胞提取物下拉测定(参见, 例如, Jain 等人, *Nature*, 473: 484-488, (2011); 和Jain 等人, *Nat. Protoc.*, 7: 445-452 (2012)), 使用分子马达(参见, 例如, Yildiz 等人, *Science*, 300 (5628): 2061-2065 (2003)); 和活细胞中的单分子成像(参见, 例如, Sako 等人, *Nat. Cell. Biol.*, 2(3): 168-172 (2000)), 纳米孔技术(参见, 例如, 国际专利申请公开W0 2016/161402), 纳米孔技术(例如, 参见, 参见, 例如, 国际专利申请公开W0 2016/161400)和单分子全内反射荧光(TIRF)显微镜(参见, 例如, Reck-Peterson 等人, *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2010 (3):pdb.top73. doi: 10.1101/pdb.top73 (March 2010); 和Kukalkar 等人, *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2016 (5):pdb.top077800. doi: 10.1101/pdb.top077800 (May 2016))。

[0055] 用于分析物分析的装置

本文所述的方法可以使用适合于分析物分析的任何装置进行, 所述装置中的各种是本领域已知的, 并且包括例如蠕动泵系统(例如, FISHERBRAND™ 可变流蠕动泵, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA; 和可得自MilliporeSigma, Burlington, MA的蠕动泵系统), 自动/机器人样品递送系统(可得自例如Hamilton Robotics, Reno, NV; and ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 微流体装置, 基于微滴的微流体装置, 数字微流体装置(DMF), 基于表面声波的微流体(SAW)装置或电介(EWOD)数字微流体装置上的电润湿(参见, 例如, Peng 等人, *Lab Chip*, 14 (6): 1117-1122 (2014); 和Huang 等人, *PLoS ONE*, 10 (5): e0124196 (2015))。

[0056] 在一个实施方案中, 本文所述的方法可以使用微流体装置、诸如数字微流体(DMF)装置进行。本领域已知的任何合适的微流体装置可以用于进行本文所述的方法。可用于本方法中的示例性微流体装置包括例如国际专利申请公开号W0 2007/136386、W0 2009/111431、W0 2010/040227、W0 2011/137533、W0 2013/066441、W0 2014/062551和W0 2014/066704以及美国专利8,287,808中描述的那些。在某些情况下, 所述装置可以是芯片上实验室装置(lab-on-chip device), 其中分析物分析可以在含有或怀疑含有分析物的样品的微滴中实施。

[0057] 在一个实施方案中, 在数字微流体装置中实施本文所述的方法的至少两个步骤(例如, 2个、3个或所有步骤)。术语“数字微流体(DMF)”、“数字微流体模块(DMF模块)”或“数字微流体装置(DMF装置)”在本文中可互换使用, 并且是指表示利用数字的或基于微滴的微流体技术来提供分散的且小体积的微滴形式的液体的操纵的模块或装置。通过组合微滴形成、易位、分拆和合并的基本操作, 可以将复杂指令程序化。

[0058] 数字微流体操作离散体积的流体, 其可以由二进制电信号操纵。通过使用离散的单位体积微滴, 可以将微流体运行定义为一组重复的基本操作, 即, 使一个单位的流体移动一个单位的距离。可以使用液体的表面张力性质形成微滴。微滴的驱动是基于由电极产生的静电力的存在, 所述电极放在所述微滴所位于的底表面下方。可以使用不同类型的静电力来控制微滴的形状和运动。可以用于建立前述静电力的一种技术是基于介电电泳, 其依赖于微滴和周围介质之间的电容率差异, 且可以利用高频率AC电场。可以用于建立前述静电力的另一种技术是基于电润湿, 其依赖于存在于表面上的液体微滴和所述表面之间的表面张力对施加于所述表面的电场的相依性。

[0059] 在另一个实施方案中,本文所述的方法可以结合基于表面声波(SAW)的微流体装置来实施,作为前端测定处理方法。如本文所用的术语“表面声波(SAW)”通常是指在沿着表面的方向传播声波。“移动表面声波”(TSAW)能够实现表面声波向液体中的耦合。在一些实施方案中,所述耦合可以呈表面声波向液体中的穿透或泄漏的形式。在其他实施方案中,所述表面声波是Rayleigh波(参见,例如,Oliner, A.A.(编), Acoustic Surface Waves. Springer (1978))。表面声波的传播可以以多种不同的方式和通过使用不同的材料,包括由换能器(诸如系列或多个电极)产生电势,或通过使表面声波流过液体来进行。

[0060] 在一些实施方案中,通过基于卷对卷的印刷电子方法来制造DMF装置或SAW装置。此类装置的实例描述于国际专利申请公开号2016/161402和WO 2016/161400中。

[0061] 上述装置中的许多允许检测目标分析物的单一分子。本领域已知的允许单一分子检测一种或多种目标分析物的其他装置和系统也可以用于本文所述的方法中。此类装置和系统包括,例如,Quanterix SIMOA™ (Lexington, MA)技术,Singulex的单分子计数(SMC™)技术(Alameda, CA,参见,例如,美国专利号9,239,284),以及在例如美国专利申请公开号2017/0153248和2018/0017552中描述的装置,或基于纳米孔的单分子检测。

[0062] 试剂盒和筒

本文中还提供了用于进行上述方法的试剂盒。所述试剂盒可以与公开的装置一起使用。在试剂盒中包括的说明书可以附连到包装材料,或可以作为包装插页来包含。所述说明书可以是书写的或印刷的材料,但不限于此。本公开考虑能够存储此类说明书并将它们传递给最终使用者的任何介质。此类介质包括但不限于电子存储介质(例如,磁盘、磁带、盒式磁带、芯片)、光学介质(例如,CD ROM)等。如本文所用,术语“说明书”可以包括提供所述说明书的因特网站点的地址。

[0063] 所述试剂盒可以包括筒,所述筒包括微流体模块。在一些实施方案中,微流体模块可以集成在筒中。所述筒可以是一次用弃的。所述筒可以包括一种或多种可用于实践上面公开的方法的试剂。所述筒可以包括一个或多个容器,所述容器容纳所述试剂作为一种或多种单独的组合物,或者任选地,在试剂的相容性将允许的情况下,作为混合物。所述筒还可以包括从用户观点看可能希望的其他材料,诸如缓冲液、稀释剂、标准品(例如,校准物 and 对照)和/或可用于样品处理、洗涤或进行测定的任意其他步骤的任意其他材料。所述筒可以包括上述的特异性结合成员中的一种或多种。

[0064] 所述试剂盒还可以包含用于定量目标分析物的参比标准品。所述参比标准品可以用于建立标准曲线以插入和/或外推目标分析物浓度。所述试剂盒可以包括在浓度水平方面变化的参比标准品。例如,所述试剂盒可以包括具有高浓度水平、中浓度水平或低浓度水平的一种或多种参比标准品。关于参比标准品的浓度范围,这可以根据测定进行优化。参比标准品的示例性浓度范围包括但不限于,例如:约10 fg/mL、约20 fg/mL、约50 fg/mL、约75 fg/mL、约100 fg/mL、约150 fg/mL、约200 fg/mL、约250 fg/mL、约500 fg/mL、约750 fg/mL、约1000 fg/mL、约10 pg/mL、约20 pg/mL、约50 pg/mL、约75 pg/mL、约100 pg/mL、约150 pg/mL、约200 pg/mL、约250 pg/mL、约500 pg/mL、约750 pg/mL、约1 ng/mL、约5 ng/mL、约10 ng/mL、约12.5 ng/mL、约15 ng/mL、约20 ng/mL、约25 ng/mL、约40 ng/mL、约45 ng/mL、约50 ng/mL、约55 ng/mL、约60 ng/mL、约75 ng/mL、约80 ng/mL、约85 ng/mL、约90 ng/mL、约95 ng/mL、约100 ng/mL、约125 ng/mL、约150 ng/mL、约165 ng/mL、约175 ng/mL、约200

ng/mL、约225 ng/mL、约250 ng/mL、约275 ng/mL、约300 ng/mL、约400 ng/mL、约425 ng/mL、约450 ng/mL、约465 ng/mL、约475 ng/mL、约500 ng/mL、约525 ng/mL、约550 ng/mL、约575 ng/mL、约600 ng/mL、约700 ng/mL、约725 ng/mL、约750 ng/mL、约765 ng/mL、约775 ng/mL、约800 ng/mL、约825 ng/mL、约850 ng/mL、约875 ng/mL、约900 ng/mL、约925 ng/mL、约950 ng/mL、约975 ng/mL、约1000 ng/mL、约2 μ g/mL、约3 μ g/mL、约4 μ g/mL、约5 μ g/mL、约6 μ g/mL、约7 μ g/mL、约8 μ g/mL、约9 μ g/mL、约10 μ g/mL、约20 μ g/mL、约30 μ g/mL、约40 μ g/mL、约50 μ g/mL、约60 μ g/mL、约70 μ g/mL、约80 μ g/mL、约90 μ g/mL、约100 μ g/mL、约200 μ g/mL、约300 μ g/mL、约400 μ g/mL、约500 μ g/mL、约600 μ g/mL、约700 μ g/mL、约800 μ g/mL、约900 μ g/mL、约1000 μ g/mL、约2000 μ g/mL、约3000 μ g/mL、约4000 μ g/mL、约5000 μ g/mL、约6000 μ g/mL、约7000 μ g/mL、约8000 μ g/mL、约9000 μ g/mL或约10000 μ g/mL。

[0065] 所述试剂盒可以包括用于标记特异性结合成员的试剂、用于检测特异性结合成员和/或用于标记分析物的试剂和/或用于检测分析物的试剂。所述试剂盒还可以包括引起标签的切割的组分,诸如介导切割的试剂。例如,介导切割的试剂可以包括还原剂,诸如二硫苏糖醇(DTT)或三(2-羧基乙基)膦(TCEP)。特异性结合成员、校准物和/或对照可以提供在单独容器中或预分配在适当的测定形式或筒中。

[0066] 所述试剂盒还可以包括质量控制组分(例如,灵敏度组、校准物和阳性对照)。质量控制试剂的制备是本领域众所周知的,且描述在多种免疫诊断产品的插页上。灵敏度组成员任选地用于确立测定性能特征,并且是试剂盒试剂的完整性和测定的标准化的有用指示剂。

[0067] 所述试剂盒还可以任选地包括进行诊断测定或促进质量控制评价所需的其他试剂,诸如缓冲液、盐、酶、酶辅因子、底物、检测试剂等。用于分离和/或处理测试样品的其他组分(诸如缓冲液和溶液)(例如,预处理试剂)也可以包括在试剂盒中。所述试剂盒可以另外包括一种或多种其他对照。试剂盒的一种或多种组分可以被冻干,在该情况下,试剂盒可以进一步包含适合用于重构冻干的组分的试剂。所述组分中的一种或多种可以呈液体形式。

[0068] 所述试剂盒的各种组分任选地在必要时提供在合适的容器中。所述试剂盒还可以包括用于容纳或储存样品的容器(例如,用于尿、唾液、血浆、脑脊液或血清样品的容器或筒,或用于储存、运输或处理组织,从而建立组织抽吸物的适当容器)。在适当的情况下,试剂盒任选地可以含有反应容器、混合容器和促进试剂或测试样品的制备的其他组分。所述试剂盒还可以包括一个或多个用于辅助获得测试样品的样品收集/获取器械,诸如各种血液收集/转移装置(例如微取样装置、微针或其他最小侵袭性的无痛血液收集方法;血液收集试管;刺血针;毛细管血液收集试管;其他刺破单个指尖的血液收集方法;口腔拭子,鼻/喉拭子;16-号或其他尺寸的针,用于钻取活组织检查的环形刀片(例如,1-8 mm或其他适当的尺寸),外科手术刀或激光(例如,特别是手持式),注射器,无菌容器,或插管,其用于得到、储存或抽吸组织样品;等)。所述试剂盒可以包括一个或多个用于辅助关节抽吸、锥形活组织检查、钻取活组织检查、细针抽吸活组织检查、图像引导的经皮针吸活组织检查、支气管肺泡灌洗、内窥镜活组织检查和腹腔镜活组织检查的器械。

[0069] 以下实施例进一步举例说明了本发明,但是,当然,不应解释为以任何方式限制其范围。

[0070] 实施例1

本实施例描述了使用全内反射荧光(TIRF)进行单分子计数的方法。

[0071] 通过分别用PEG和PEG/生物素(MicroSurfaces, Inc., Englewood, NJ)包被具有钻孔的载玻片(50 x 75 mm, S&S Optical, New Haven, IN)和盖玻片(25 x 50 mm, Corning, NY)来制备单分子样品载片。将具有锥形末端的矩形通道在切绘机上切成双侧胶带(9500PC, 3M, Maplewood, MN)。将胶带夹在包被的载片和盖片之间(注意防止可能泄漏的气泡),以产生样品孔。每个盖片存在6个通道,样品孔长度为14 mm,且各自容纳近似5.5、7或8 μ L的溶液,这取决于通道的宽度。通过位于末端的载玻片上的孔,将样品溶液吸取至通道中。通过在一端吸取缓冲液并在另一端将溢出物吸收入组织来进行洗涤步骤。

[0072] 将所有样品稀释至HBS-EP缓冲液(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)中并用HBS-EP缓冲液(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)洗涤,并且所有孵育都在室温下进行,除非另有指明。用于灵敏度测量的检测缀合物是Alexa Fluor 647-标记的ssDNA (A647-oligo1-bt),其在3'末端具有生物素标记物(5' - AlexaF647/CCT TAG AGT ACA AAC GGA ACA CGA GAA/Biot (SEQ ID NO: 1); IDT, Coralville, IA)。在使用前,将所有孔与1 μ M链霉抗生物素蛋白孵育20秒。然后将A647-oligo1-bt在各种浓度((0、10、25、50、150、450 fM、1、2和4 pM)下孵育20-30分钟。在链霉抗生物素蛋白包被和样品孵育后、但在成像前,洗涤每个8 μ L孔。

[0073] 单分子全内反射荧光(SM-TIRF)图像是在具有基于物镜的TIRF的附件的Olympus IX81显微镜(Center Valley, PA)上拍摄的。经由光纤连接至显微镜的LIGHTHUB®激光组合器(Omicron, Rodgau, Germany)提供了四种激光波长:405、488、561和638 nm。激发和发射光通过四重滤光立方体(U-N84000v2; Chroma, Bellows Falls, VT),并用100x/1.49油浸TIRF物镜对焦至样品中。在物镜前用近似1 mW的激光功率照射样品,并在iXon Ultra EMCCD相机(Andor, Belfast, UK)上捕获图像。SM-TIRF测量使用METAMORPH® Advanced软件(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)自动化,并且每个样品孔由40张图像组成,其中采集时间为150 ms,且EM增益为300。用638 nm激光线激发Alexa647构建体,并用561 nm线激发Alexa546。此外,在每次图像捕获之前使用Zero Drift自动对焦(Olympus Corp., Shinjuku, Tokyo, Japan)来维持一致的对焦高度。然后使用在IDL 8.5 (Harris Geospatial, Boulder, CO)中编写的程序分析单分子图像数据。简而言之,分析程序从每个图像减去高斯背景,然后定位并计算每个高于阈值的荧光峰。每个峰也可以拟合至高斯,以帮助消除某些类型的背景。使用中值或抗性平均值(resistant mean)计算每次采集的单分子峰的代表性数目。两种方法均提供近乎相同的结果。使用抗性平均值可以拒绝具有异常峰值/帧值的帧(通常为1-4帧),且然后允许从剩余30+帧计算峰的标准偏差。

[0074] 显示峰对应于单一、固定的荧光团。原始的TIRF图像显示于图1A中。从50 fM至2 pM观察到线性剂量响应,如图1B中所示。低于50 fM,将真实的样品峰与自发荧光粉尘颗粒和玻璃杂质的背景噪声区分变得困难(图1A)。高于2 pM,峰的高密度使峰发现算法难以分离紧密间隔的分子,且因此总计数开始饱和。然而,可以通过回复至总强度测量而不是数字计数来测量更高的浓度。对于450 fM样品,假设所有分子都位于检测表面上,则计算的每帧平均分子数的上限为220。从数据可见,181个峰为平均值;减去6.5的背景值,导致174.5,或最大期望值的80%。

[0075] 本实施例的结果证明了单分子TIRF检测系统的灵敏度。

[0076] 实施例2

本实施例描述了用于免疫测定中的单分子检测的模型系统。

[0077] 开发模拟夹心免疫测定的模型系统,以进行具有可以洗脱的检测标记物的基于微粒的实验。具体地,通过从1024 fM 2倍稀释至1 fM制备12份1-mL用DNA oligo2 (5'-TTC TCG TGT TCC GTT TGT ACT CTA AGG TGG ATT TTT TTT TT-氨基修饰剂 (SEQ ID NO: 2); IDT, Coralville, IA) 标记的小鼠IgG (IgG-oligo2) 的样品,其中最终样品为仅缓冲液对照。向每份样品中添加10 μ L 1%-固体磁性微粒 (MP),所述固体磁性微粒 (MP) 直径为5 μ m,其已直接用山羊抗小鼠抗体 (Abbott Laboratories, Lake Bluff, IL) 包被。将样品在室温下旋转孵育30分钟后,使用磁性分离将体积减小至200 μ L,并将浓缩的MP/IgG-oligo2复合物转移至96-孔板。在这里,在磁性颗粒处理器 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 上,将复合物与20 nM A647-oligo1-bt-在室温下混合-孵育20分钟。随后,将MP-夹心复合物在100 μ L ARCHITECT™ 洗涤缓冲液 (Abbott Laboratories, 含有PBS) 中经历5次洗涤,随后进行10分钟85°C洗脱步骤,洗脱至50 μ L HBS-EP中。该程序提供了从1 mL起始样品至50 μ L洗脱液的反应体积的20倍减少。

[0078] MP (~ 5 nM) 上的过量结合位点将允许来自每份样品的所有分析物都与MP结合。使用磁性分离,减小每份样品的体积,并将浓缩的MP复合物转移至96孔板中。然后在微粒处理器上,将样品与过量的检测缀合物A647-oligo1-bt孵育,并洗涤5次。采用10分钟、85°C孵育步骤,以使杂交的DNA解链,并将A647-oligo1-bt洗脱至小体积 (50 μ L) 的缓冲液中,用于转移至单分子检测设置。来自各稀释样品的洗脱液上样至单分子孔,其中A647-oligo1-bt经由生物素标签锚定至链霉抗生物素蛋白表面。如实施例1中所述获取和处理SM-TIRF图像。将所得的SM峰/帧针对来自样品储备物的初始分析物浓度值作图,如图2中所示。观察到线性响应,其中清楚的灵敏度低至近似20-30 fM的原始样品浓度范围。由于从起始样品至洗脱液的体积的20倍减小以及微粒的大致50%的捕获效率,因此实际测量的检测标记物浓度为起始值的约10倍。因此,在两个最高浓度下发生的饱和度落在> 2 pM范围内,与先前的观察一致。

[0079] 实施例3

本实施例表明通过样品再上样浓缩生物样品中存在的分析物的方法。

[0080] 单分子检测方法通常仅需要小样品体积。利用小样品体积需求,开发了一种循环再上样相同样品储备物的新鲜等分试样的策略,以在检测之前浓缩样品并增强测定灵敏度。通过将每个等分试样孵育仅1-2分钟且然后将其用新鲜储备物替换,可以将样品浓缩至载片的表面上。例如,将400 fM A546-oligo1-bt的等分试样上样至SM孔中,进行测量,且然后将等分试样用储备物的新鲜等分试样替换10次,每2分钟孵育后测量。通过在再上样之间将空气泵送通过孔,从孔中清除出先前的等分试样,如图3A的示意图中所示。不允许孔的表面干燥,而是将近似填充样品孔所需空气体积的气隙暂时引入孔中,这中断了液体的连续流动。相反,将新的样品等分试样直接上样至孔中没有推出先前的等分试样,这很可能是由于以下事实:不存在一致的、塞样的层流,使得新鲜储备物与耗竭的等分试样溶液的固定表面层部分混合 - 或者甚至在其上完全通过。然而,在两次再上样之间存在气隙的情况下,观察到显著一致的浓缩结果,如图3B中所示。

[0081] 由于链霉抗生物素蛋白-生物素相互作用的强度和用于这些实验的150 μm 孔高度,大多数可用靶标已扩散至并被捕获在选择的2分钟孵育时段内。然而,鉴于较弱的捕获相互作用或较高的样品隔室,则也可能从样品再循环获得信号,即,移除样品,将其用空气替换,并立即再上样相同的等分试样。在上述实验中,每个再上样步骤均使观察到的SM峰数平均增加43个峰,这是从完全饱和的1小时孵育捕获的峰数的70%。峰数/再上样的变化小于10%,因此,在初始上样之上进行9次上样后,观察到的背景校正峰数的10倍增加。

[0082] 以上结果表明在每个再上样步骤中的特定表面捕获数取决于选择的孵育时间和表面结合动力学两者。

[0083] 为了确定样品再上样方法是否可用于剂量-响应型测定,使用2分钟孵育对四种浓度(10、25、50和100 fM)的A647-oligo1-bt进行相同的再上样步骤,并且测量初始上样、第10次上样、第30次上样和第50次上样后的结果。该实验的结果显示于图4A和4B中,其显示在整个再上样过程中作为浓度的函数的线性关系。为了正确地确定再上样的倍数增强,有必要减去空孔的背景。初始再上样实验用Alexa546-标记的缀合物进行。然而,在没有样品的情况下,绿色通道通常表现出10-20个荧光峰,据信这是盖片玻璃中的杂质和/或粉尘。尽管这对于表明再上样可以如何加强这种类型的背景之外的目标信号是有用的,但对于所有其他实验选择Alexa647,这是由于在红色通道中观察到的背景较低(5-10个峰值)。然而,一旦应用表面背景校正, n 次再上样就使得所有起始样品浓度浓缩非常近乎 n 倍。

[0084] 本实施例的结果表明,公开的样品再上样方法是增强未知、低浓度诊断样品的检测的有效的浓缩方法。

[0085] 实施例4

本实施例描述了单分子检测HIV p24抗原的测定法。

[0086] 进行了全夹心免疫测定以检测p24,在HIV的诊断测定中通常检测的HIV衣壳蛋白。具体地,将8个TIRF载片孔与1 μM 链霉抗生物素蛋白孵育20秒,然后用2 $\times$ 100 μL HBS-EP洗涤。通过用缓冲液对照进行2倍稀释,制备8份200 μL 的p24抗原的样品(Abbott Laboratories, Lake Bluff, IL) (0、40、80、160、320、640 fM, 1.28 pM和2.56 pM)。将样品转移到96孔板中,并向每份样品中添加50 μL 的0.1%固体、抗p24抗体包被的MP(最终体积, 250 μL)。在KINGFISHER[™] 磁性微粒处理器(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)上,将样品混合并在室温下孵育18分钟。这随后用ARCHITECT[™] (Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL) 洗涤缓冲液洗涤,并与检测缀合物孵育18分钟。检测缀合物由0.5 nM的用oligo2标记并与2 nM的A647-oligo1-bt预组装(2小时, 37 $^{\circ}\text{C}$)的Abbott抗p24 Fab组成。完全的MP-结合免疫夹心再通过4次洗涤,且然后通过10分钟、85 $^{\circ}\text{C}$ 洗脱步骤中将A647-oligo1-bt洗脱至250 μL HBS-EP中。将洗脱液上样至SM孔中,孵育2分钟,用HBS-EP洗涤,并用SM-TIRF进行测量。然后再9次每两分钟添加洗脱液溶液的新鲜等分试样,每孔的表面上捕获总共10个样品的等分试样。

[0087] 第一次从微粒结合的SM-TIRF洗脱A647-oligo1-bt后的免疫测定的结果显示于图5A中,其表明线性响应,但峰数少且误差大。再9次再上样来自各洗脱样品的等分试样(总共10次2分钟表面捕获)后,重新测量SM孔表明原始信号大致增加10倍,且相对误差减少3倍,如图5B中所示。

[0088] 本实施例的结果表明,公开的重复采样方法可以应用于检测HIV抗原的免疫测定。

[0089] 实施例5

本实施例表明当使用数字微流体 (DMF) 时, 公开的样品再上样方法增强免疫测定的灵敏度。

[0090] 测试使用3步形式的模型免疫测定法, 所述3步形式由抗原捕获、生物素化的缀合物结合以及用链霉抗生物素蛋白-酶缀合物进行酶标记组成。使用数字微流体 (DMF) 允许操纵小样品体积 (<2 μ l), 当使用固相结合时, 其具有增加抗体-抗原结合的捕获效率的优势。进行以下描述的建模实验以表明使用小体积的基于DMF的免疫测定增加测定灵敏度的优势。

[0091] 建模算法衍生自L. Chang, 等人, *J. Immun. Methods*, 378: 102-115 (2012), 其使用以下方程测定抗体-配体复合物的总体形成速率:

$$\frac{\partial [AbL]}{\partial t} = k_{on}([Ab_{\text{总}}] - [AbL])([L_{\text{总}}] - [AbL]) - k_{off}[AbL]$$

对于特异性抗体-抗原对, 可以使用 k_{on} 和 k_{off} 速率实时绘制复合物形成的速率。对于抗原捕获, 假定抗体共价附接至磁性微粒的表面, 用于抗原的固相捕获。实验的输入参数显示于图6中, 并且实验条件显示于下表1和2中。

[0092] 表1

所有步骤中的液体体积 = 1.1 μ L	
珠粒数 = 约 100 000	
缀合物浓度 = 10 nM	
SBG 浓度 = 150 pM	
孵育时间 TSH = 5 min	
孵育时间缀合物 = 5 min	
孵育时间 SBG = 5 min	

[0093] 表2

重复数	样品体积, μ l	孵育时间, min
1	1.1	5
1	5.5	5
5	1.1	各1

[0094] 在孵育的前五分钟期间, 表2中所示的三种不同条件的实时抗原结合曲线显示于图7A-7C中。

[0095] 微粒上捕获的抗原的标记使用10 nM生物素化的缀合抗体建模5分钟, 随后使用150 pM链霉抗生物素蛋白- β -半乳糖苷酶 (SBG) 进行5分钟酶标记步骤。计算每个珠粒的最终平均酶数 (AEB), 并显示于下表3中。

[0096] 表3

样品条件	AEB
1 x 1.1 μ l, 持续5 min	0.020

5.5μl,持续5 min	0.086
5 x 1.1μl,持续1 min	0.158

[0097] 这些结果显示,样品再上样方案产生的最终AEB信号为单次上样方案的近似两倍(0.158 AEB vs. 0.086 AEB)。使用相同的珠粒数,DMF装置上的较小体积(1.1 μl)允许较高的珠粒:体积比。这增加捕获步骤中的有效捕获抗体浓度,由此增加抗原结合抗体结合的微粒的速率。在1.1μl的5分钟孵育的结合曲线实例中,大多数抗原在孵育的第一分钟内结合。

[0098] 与较高样品体积与较长孵育时间相比,使用较短孵育时间多次再上样样品增加捕获的抗原量,因为由于较低的珠粒:体积比,较大体积中的最大结合花费的时间更长。

[0099] 实施例6

用于检测促甲状腺激素(TSH)的数字测定在2" X 3"数字微流体(DMF)芯片上运行,其使用微孔阵列(32,000个孔)用于数字检测。将含有TSH(缓冲液 = SuperBlock, 1.5% BSA, 0.05% Tween-20, 0.1% F68)的微滴(1.1μl)移至含有近似100K个用TSH捕获抗体(M4, Fitzgerald)标记的珠粒的微粒沉淀物中。将珠粒混合5分钟,随后沉淀。将沉淀物悬浮于洗涤缓冲液(SuperBlock, 1.5% BSA, 0.05% Tween-20, 0.1% F68)中,并通过混合2分钟来洗涤、随后沉淀。将洗涤的沉淀物悬浮于含有1 nM生物素化缀合物抗体(ME-130, Abcam)的1.1 μl缓冲液中,并混合5分钟,随后沉淀。将沉淀物悬浮于洗涤缓冲液(SuperBlock, 1.5% BSA, 0.05% Tween-20, 0.1% F68)中,并通过混合2分钟来洗涤、随后沉淀。将近似1.1 μl微升的150 pM链霉抗生物素蛋白-β-半乳糖苷酶添加至沉淀物中。将珠粒混合5分钟,随后沉淀。将沉淀物悬浮于洗涤缓冲液(SuperBlock, 1.5% BSA, 0.05% Tween-20, 0.1% F68)中,并通过混合2分钟来洗涤、随后沉淀。通过添加1.1 μl接种缓冲液(1X PBS, 0.05% Tween-20)并混合2分钟来制备用于接种的珠粒。将混合物移至微孔阵列,随后在35℃下添加1.1 μl 152 μM试卤灵-D-吡喃半乳糖苷(RGP)酶促底物(1X PBS, 0.05% Tween-20)。将温度降至27.5℃,然后在以微滴在阵列上作圆周运动进行接种。除去RGP微滴,将温度降至~8℃,随后用Krytox 1525油进行油封。酶促转换1小时后进行暗场和荧光成像。

[0100] 对于3次再上样,使用相同的方案,除了在添加缀合物之前将初始样品上样重复3次。通过使用以下转换式,从%活性珠粒(f_{on})计算每个珠粒的平均酶数(AEB): $AEB = -\ln[1-f_{on}]$,并且结果显示于表4中。

[0101] 表4

[TSH], μIU/ml	AEB, 原始	AEB, bkgd sub
0	0.285	0
1X 0.05	0.327	0.042
3X 0.05	0.380	0.095

0.05μIU/ml的3次再上样导致灵敏度增加近似2.3倍。

[0102] 本文引用的所有参考文献、包括出版物、专利申请和专利在此处通过引用并入,其程度等同于每个参考文献单独地或具体地提到通过引用并入并且在本文以其整体记载。

[0103] 在描述本发明的上下文中(尤其是在以下权利要求的上下文中)使用术语“一个/种(a)”和“一个/种(an)”和“该/所述(the)”和“至少一个/种”和类似参考物应被解释为涵

盖单数和复数两者,除非本文以其他方式指明或与上下文明显矛盾。使用术语“至少一个/种”和随后的一个/种或多个/种项目的列表(例如,“A和B中的至少一个/种”)应理解为意指选自所列项目的一个/种项目(A或B)或所列项目中两个/种或更多个/种的任何组合(A和B),除非本文另有指明或与上下文明显矛盾。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应被解释为开放式术语(即,意指“包括,但不限于”),除非另有说明。除非本文另有说明,否则本文的值的范围的记载仅仅意欲充当单独提及落入该范围内的每个单独值的简写方法,且每个单独值如同其在本文中单独记载地并入本说明书。本文描述的所有方法都可以以任何合适的顺序进行,除非本文另有指明或另外与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅仅意欲更好地举例说明本发明,并且不构成对本发明的范围的限制,除非另有请求保护。本说明书中的任何语言都不应解释为指示对实施本发明必不可少的任何未请求保护的要素。

[0104] 本文描述了本发明的优选实施方案,包括本发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。阅读上述描述后,那些优选实施方案的变化对于本领域普通技术人员可变得显而易见。本发明人预期技术人员适当时采用此类变化,且本发明人意欲本发明以本文中具体描述的其他方式实施。因此,如适用法律所允许,本发明包括其随附权利要求中所述的主题的所有修改和等效方案。此外,本发明涵盖其所有可能的变化中的上述要素的任何组合,除非本文另有指明或以其他方式与上下文明显矛盾。

[0105] 为了完整性的原因,在以下编号的条款中阐述了本发明的不同方面:

条款1. 用于检测生物样品中存在的分析物的方法,所述方法包括:

- (a) 提供一定体积的怀疑含有分析物的生物样品;
- (b) 使固体支持物与所述体积的生物样品的第一等分试样接触,其中所述固体支持物包含固定至所述固体支持物的特异性结合所述分析物的第一特异性结合成员;
- (c) 从所述固体支持物除去第一等分试样,并使所述固体支持物与所述体积的生物样品的第二等分试样接触;
- (d) 将步骤(b)和(c)重复5至30次,其中形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物;
- (e) 使所述固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物与第二特异性结合成员接触,所述第二特异性结合成员特异性结合所述分析物并包含与所述第二特异性结合成员附接的可检测标记物,其中形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特异性结合成员复合物;
- (f) 除去未与所述分析物结合的任何第二特异性结合成员;和
- (g) 通过评价由所述可检测标记物产生的信号来检测所述分析物。

[0106] 条款2. 用于检测生物样品中存在的分析物的方法,所述方法包括:

- (a) 提供一定体积的怀疑含有分析物的生物样品;
- (b) 使固体支持物与一定体积的所述生物样品接触,其中所述固体支持物包含固定至所述固体支持物的特异性结合所述分析物的第一特异性结合成员;
- (c) 使所述固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物与第二特异性结合成员接触,所述第二特异性结合成员特异性结合所述分析物并包含与所述第二特异性结合成员附接的可分离的可检测标记物,其中形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物/第二特

异性结合成员复合物；

(d) 从与所述固体支持物结合的复合物分离和洗脱所述可检测标记物；

(e) 将可检测标记物的等分试样转移至第二固体支持物，所述第二固体支持物包含特异性结合所述可检测标记物的第三特异性结合成员；

(f) 从所述固体支持物除去第一等分试样，并使所述固体支持物与洗脱的可检测标记物的第二等分试样接触；

(g) 将步骤 (e) 和 (f) 重复5至30次，其中形成固体支持物/第三特异性结合成员/可检测标记物复合物；

(h) 除去任何未与所述固体支持物结合的可检测标记物；和

(i) 通过评价由所述可检测标记物产生的信号来定量所述分析物。

[0107] 条款3. 条款1或2的方法，其中所述生物样品的体积为约10 μ l至约50 μ l。

[0108] 条款4. 条款1至3的方法，其中所述第一和第二等分试样包含溶液体积的约1 μ l至约2 μ l。

[0109] 条款5. 条款4的方法，其中所述第一和第二等分试样包含所述溶液体积的约1 μ l。

[0110] 条款6. 条款1至5中任一项的方法，其中所述分析物是蛋白、糖蛋白、肽、寡核苷酸、多核苷酸、抗体、抗原、半抗原、激素、药物、酶、脂质、碳水化合物、配体或受体。

[0111] 条款7. 条款1至6中任一项的方法，其中所述第一和/或第二结合成员是抗体、受体、肽或核酸序列。

[0112] 条款8. 条款1至7中任一项的方法，其中所述固体支持物是颗粒、微粒、珠粒、电极、载片或多孔板。

[0113] 条款9. 条款8的方法，其中所述第一固体支持物是微粒，且所述第二固体支持物是载片。

[0114] 条款10. 条款9的方法，其中所述微粒是磁性的。

[0115] 条款11. 条款1至10中任一项的方法，其中所述生物样品是血液、血清、血浆、尿液、唾液、汗液、痰液或精液。

[0116] 条款12. 条款1至11中任一项的方法，其中所述可检测标记物包括色原、荧光化合物、酶、化学发光化合物或放射性化合物。

[0117] 条款13. 条款1至12中任一项的方法，其中至少步骤 (1b) 和 (1c) 或 (2e) 和 (2f) 在微流体装置、基于微滴的微流体装置、数字微流体装置 (DMF) 或基于表面声波的微流体装置 (SAW) 中实施。

[0118] 条款14. 条款1至13中任一项的方法，其中使用免疫测定评价由所述可检测标记物产生的信号。

[0119] 条款15. 条款14的方法，其中所述免疫测定是夹心免疫测定、酶免疫测定 (EIA)、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、竞争性抑制免疫测定、酶倍增免疫测定技术 (EMIT)、竞争性结合测定、生物发光共振能量转移 (BRET)、一步抗体检测测定或均质化学发光测定。

[0120] 条款16. 条款1至15中任一项的方法，其检测所述分析物的单一分子。

序列表

	<110> Abbott Laboratories Tetin, Sergey Huff, Jeffrey B.	
	<120> 用于改进小体积样品的免疫测定灵敏度和动力学的依次采样方法	
	<130> ABBTL-36422/WO-1/ORD	
	<150> US 62/667, 238	
	<151> 2018-05-04	
	<160> 2	
	<170> PatentIn version 3.5	
[0001]	<210> 1	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 1	
	ccttagagta caaacggaac acgagaa	27
	<210> 2	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 2	
	ttctcgtgtt ccgtttgtac tctaaggtgg attttttttt t	41

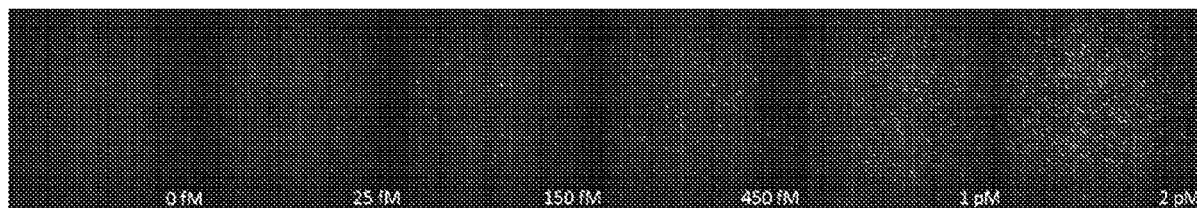


图 1A

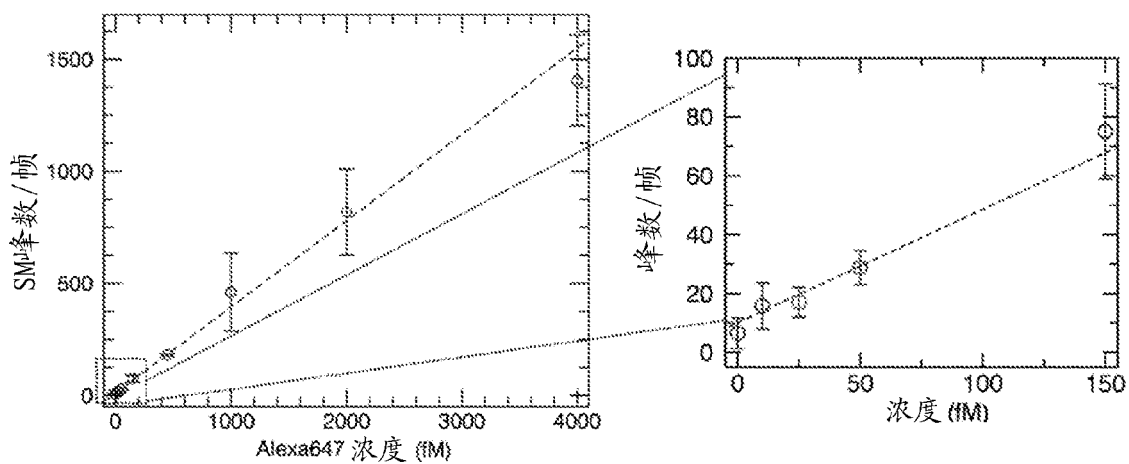


图 1B

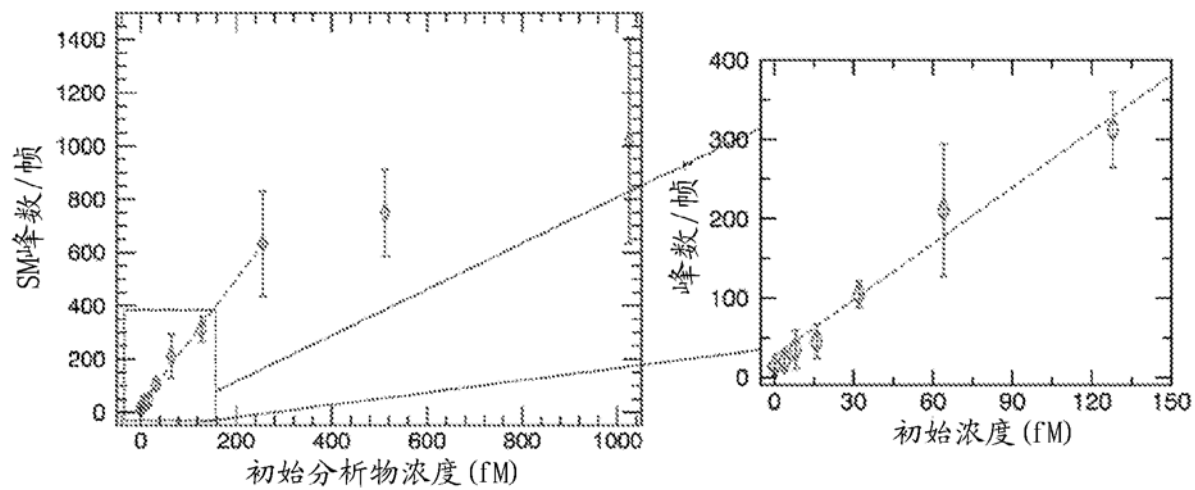


图 2

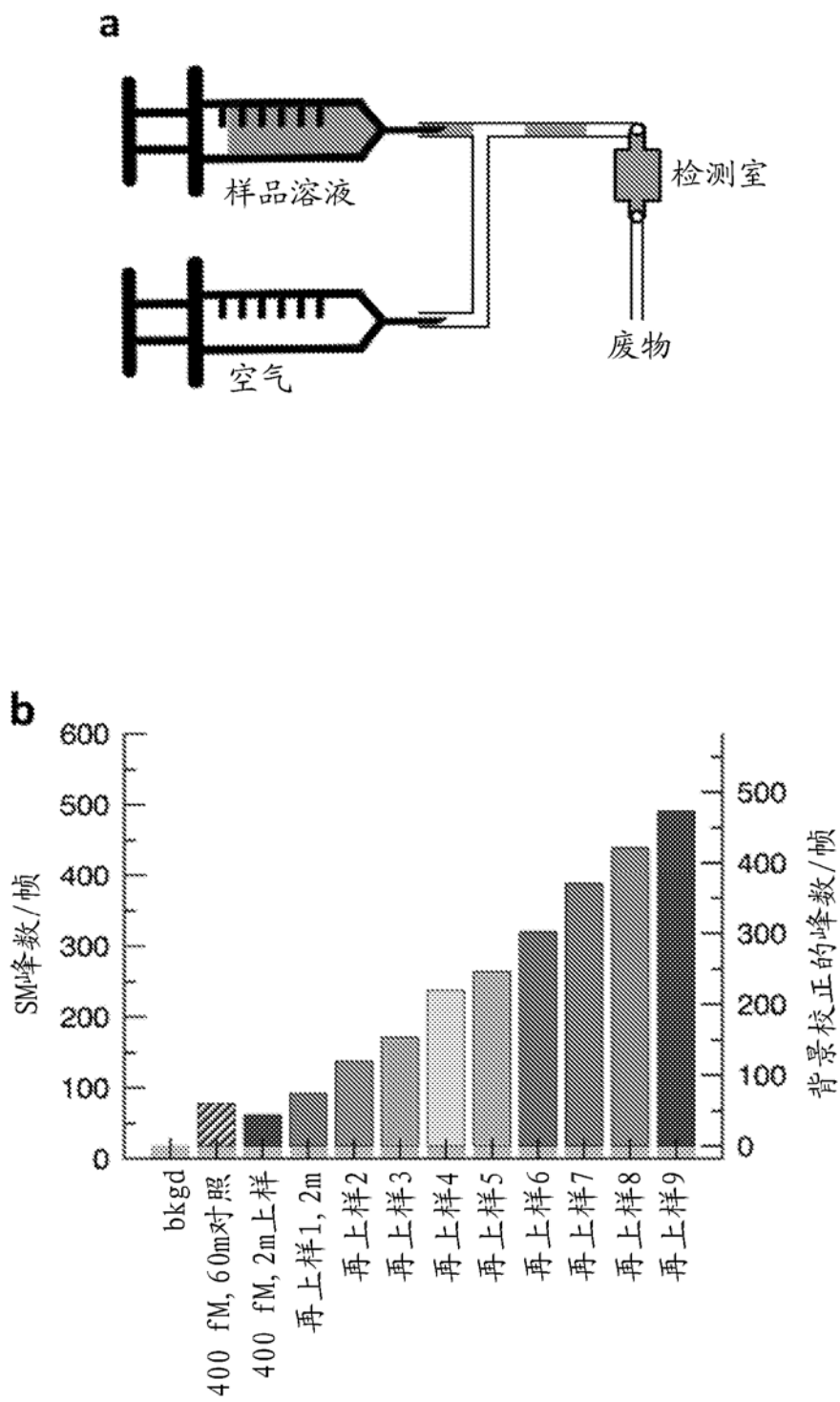


图 3

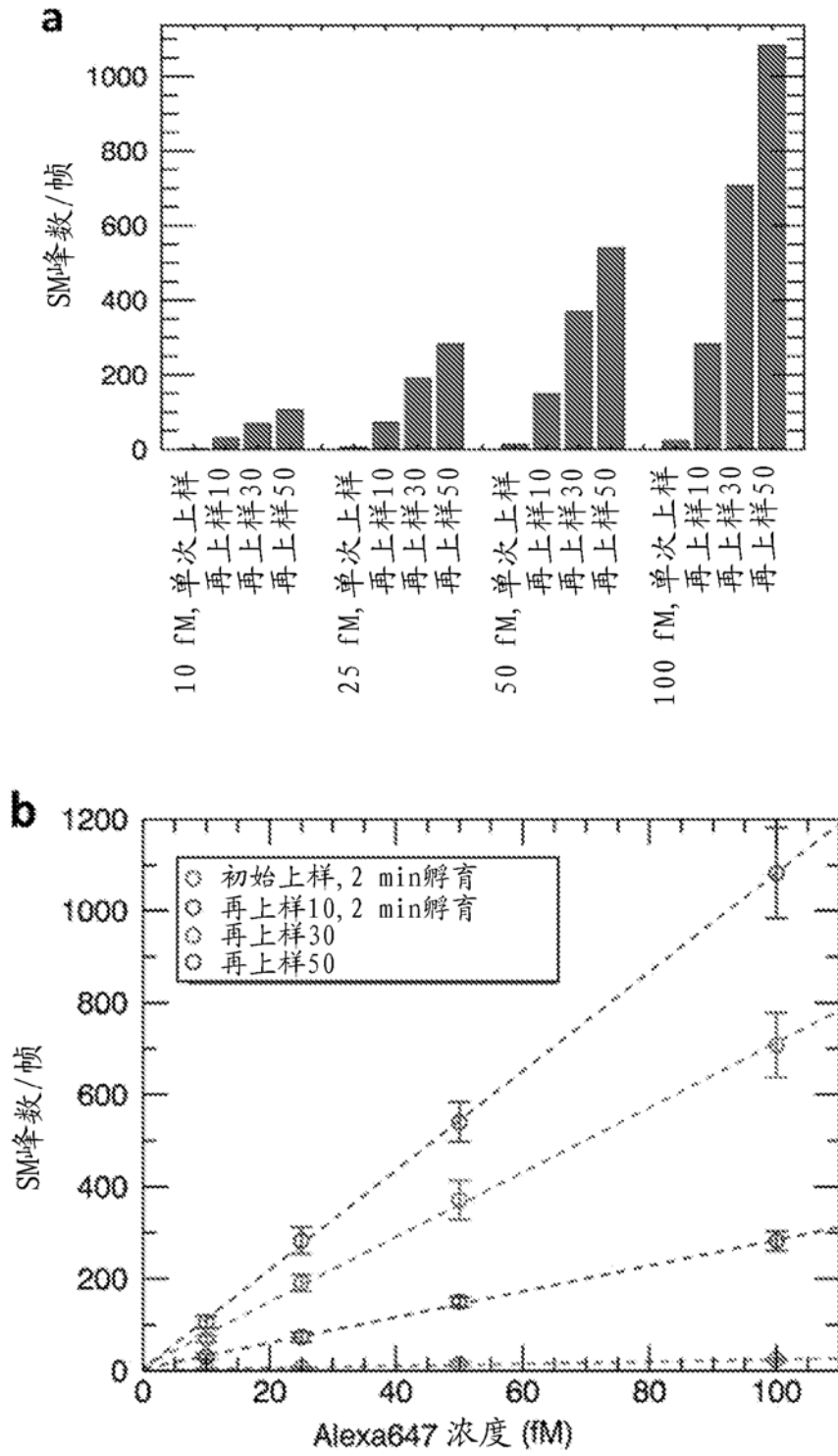


图 4

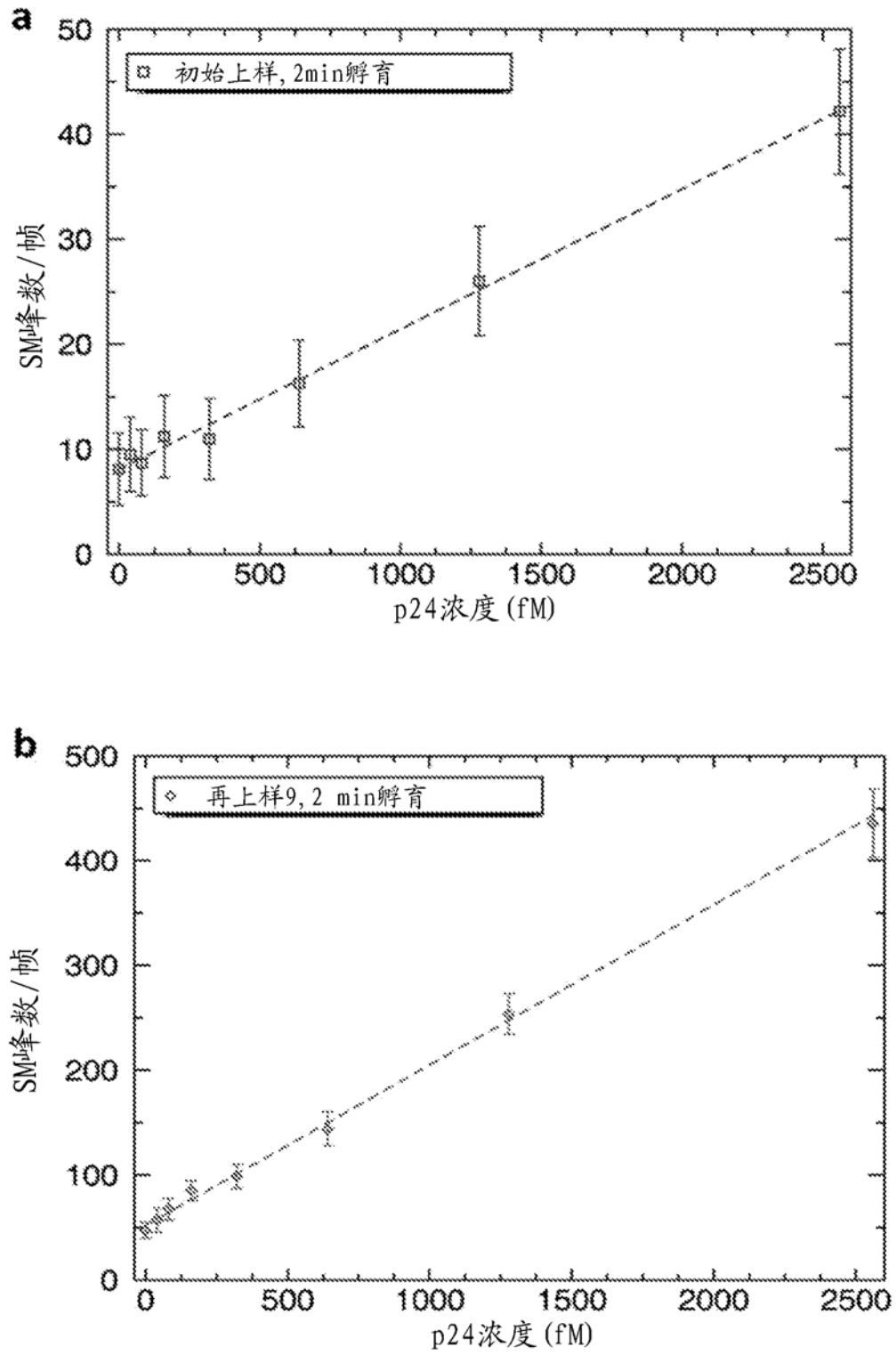


图 5

输入 →	分析物浓度	如预期	uIU/mL
输出	分析物浓度	1720 fM	
输入 →	K _{on}	7.50E+05	1/M/s
输入 →	K _{off}	3.75E-05	1/s
输入 →	K _d	5.00E-11	M
输入 →	缀合物浓度	如预期	nM
输入 →	K _{on}	7.50E+05	1/M/s
输入 →	K _{off}	3.75E-05	1/s
输入 →	K _d	5.00E-11	M
输入 →	酶标记物	如预期	pM
输入 →	K _{on}	5.00E+06	1/M/s
输入 →	K _{off}	1.00E-11	1/s
输入 →	K _d	2.00E-18	M
输入 →	DNA高度	150	um
输入 →	微滴体积	1.1	uL
输入 →	微滴体积	1.1	uL
输入 →	珠粒数	100,000	
输入 →	直径	2.7	um
输入 →	抗体	274000	
输入 →	数目	32,000	
输入 →	百分比	100%	
输入 →	样品体积	1	
输入 →	缀合物的NSB		
输入 →	K _{on}	7.50E+00	1/M/s
输入 →	K _{off}	7.50E-04	1/s
输入 →	K _d	1.00E-04	M
输入 →	N的数目	27400	

图 6

1. 1uL持续5min

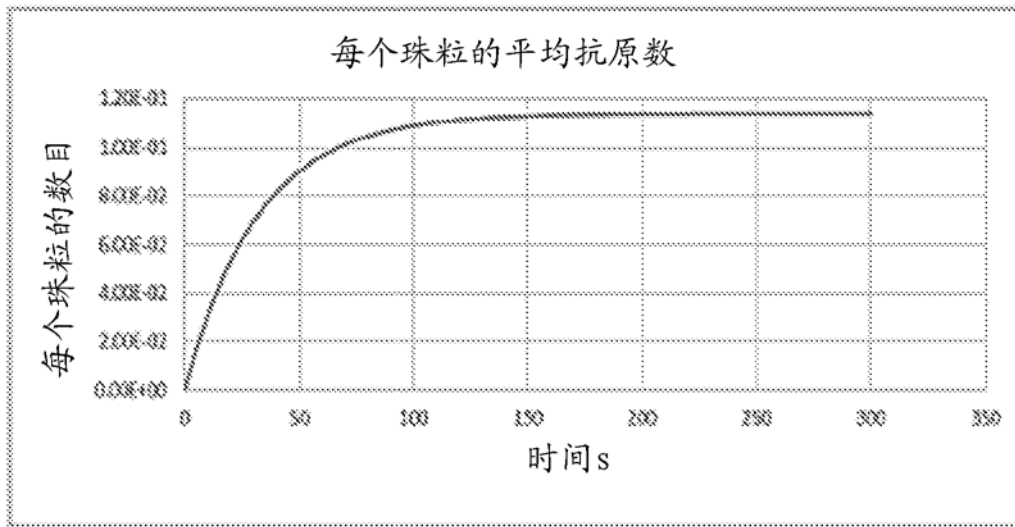


图 7A

5. 5uL持续5min

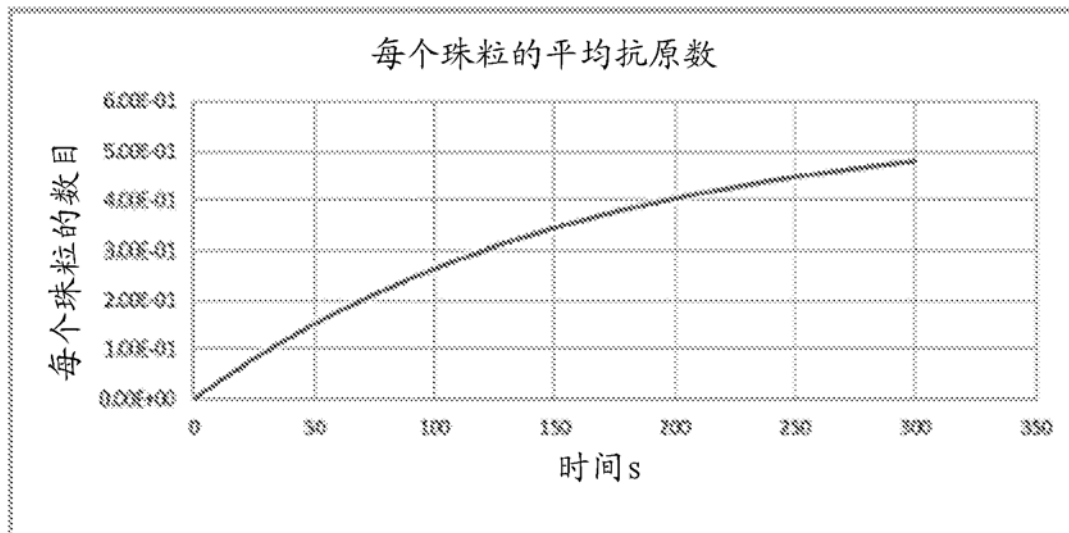


图 7B

5x 1.1uL各自持续1min

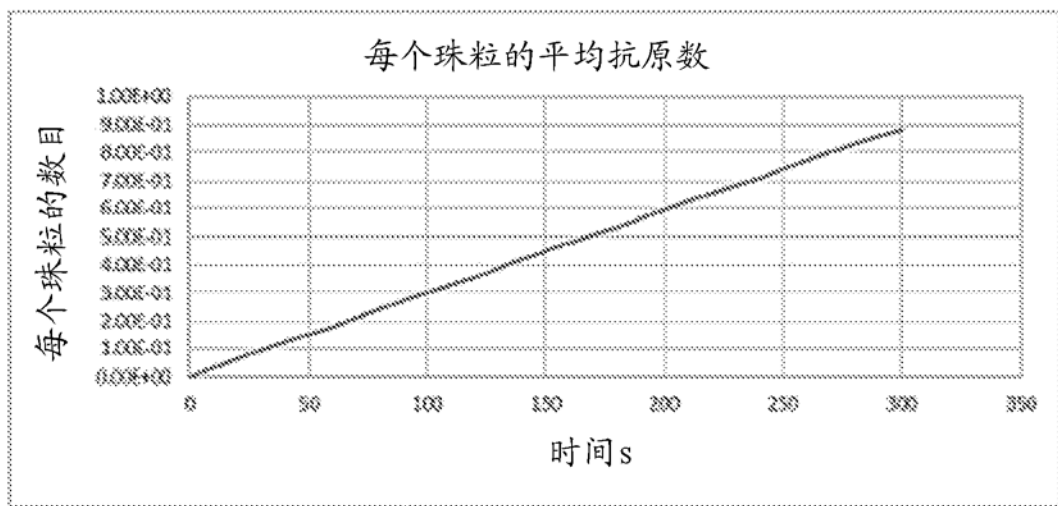


图 7C