



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103597356 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201280022792. 1

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 05. 09

G01N 1/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 9/24 (2006. 01)

61/484, 490 2011. 05. 10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 11. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/037036 2012. 05. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/154794 EN 2012. 11. 15

(71) 申请人 先进流体逻辑公司

地址 美国北卡罗莱纳州

(72) 发明人 卡丽·格雷厄姆 艾伦·埃克哈特

利萨·珀金斯

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 高瑜 郑霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

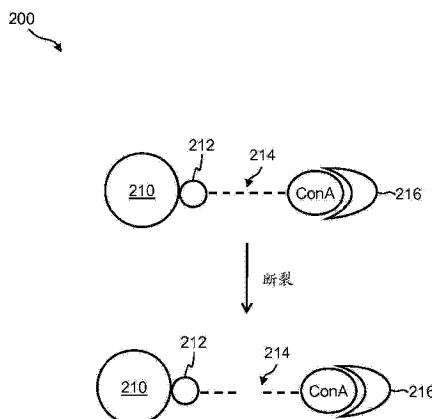
权利要求书2页 说明书30页 附图19页

(54) 发明名称

酶浓缩与分析

(57) 摘要

一种制备用于进行分析的样品的方法,所述方法包括:提供包含糖蛋白的输入样品,将糖蛋白从所述输入样品捕获到固体载体上,且洗涤所述样品载体,以除去所述输入样品的未结合部分。



1. 一种制备用于进行分析的样品的方法,所述方法包括:
 - (a) 提供包含糖蛋白的输入样品;
 - (b) 将糖蛋白从所述输入样品捕获到固体载体上;且
 - (c) 洗涤所述样品载体,以除去所述输入样品的未结合部分。
2. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,还包括从所述固体载体上洗脱糖蛋白以产生输出样品。
3. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中步骤(b)、(c)和(d)是在油中的一个或多个滴中进行的。
4. 如权利要求 2 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述洗脱是通过使所述固体载体与一种或多种糖模拟物接触来完成的。
5. 如权利要求 2 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述洗脱是通过使所述固体载体和捕获的糖蛋白之间的可断裂键断裂来完成的。
6. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述输入样品包含选自以下组成的组的样品物质:血液、血浆、血清、眼泪、唾液及尿。
7. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述输入样品包括新鲜血液。
8. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述输入样品包括重构的干血。
9. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述输入样品主要由血浆组成。
10. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述输入样品包括人的临床样品。
11. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述固体载体包括伴刀豆球蛋白 A。
12. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述固体载体包括磁性响应珠子。
13. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所捕获的糖蛋白包括一种或多种酶。
14. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所捕获的糖蛋白包括一种或多种糖苷酶。
15. 一种进行分析的方法,所述方法包括:
 - (a) 进行如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法;
 - (b) 将来自步骤 1(c)的所述固体载体暴露到底物;且
 - (c) 测量所述底物的酶改性。
16. 一种进行分析的方法,所述方法包括:
 - (a) 进行权利要求 2 及其后权利要求中任一项所述的方法以产生所述输出样品;
 - (b) 将酶底物添加到所述输出样品中;
 - (c) 测量所述底物的酶改性。
17. 如权利要求 15 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述底物的改性与可能

存在于所述输出样品中的酶的存在和或活性有关。

18. 如权利要求 15 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述酶是溶酶体酶。

19. 如权利要求 15 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述酶是糖基化的酶。

20. 如权利要求 15 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法是在样品收集点处进行的。

21. 如权利要求 16 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述底物包括糖苷底物。

22. 如权利要求 16 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中在与感兴趣的酶接触时,所述底物释放可检测物。

23. 如权利要求 16 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述底物包括在与感兴趣的酶接触时释放荧光团的糖苷底物。

24. 如权利要求 16 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述底物包括糖苷底物。

25. 如权利要求 20 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述样品收集点是在受试者在场的情况下。

26. 如权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法,其中所述输入样品是从受试者收集的且立即装载到滴致动器上并立即进行所述方法。

27. 一种计算机可读的介质,其被编程以使滴致动器进行权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法的所述方法步骤中的任一个。

28. 一种系统,所述系统包括滴致动器,所述滴致动器被联接到计算机且受计算机的控制,所述计算机被编程以使所述滴致动器进行权利要求 1 及其后权利要求中任一项所述的方法的所述方法步骤中的任一个。

酶浓缩与分析

[0001] 1 相关申请

[0002] 本专利申请涉及且要求 2011 年 5 月 10 日提交的标题为“Enzyme Concentration in New Born Screening Assays”的美国临时专利申请第 61/484,827 号的优先权,所述临时专利申请的整个公开内容通过引用并入本文。

[0003] 2 发明领域

[0004] 本发明涉及浓缩酶的方法且涉及浓缩的酶在酶法测定中的应用。

[0005] 3 背景

[0006] 滴致动器(droplet actuator)通常包括配置为形成用于进行滴操作的表面或缝隙的一个或多个基片(substrate)。一个或多个基片建立用于进行滴操作的滴操作表面或缝隙,且还可以包括电极排列,以进行滴操作。滴操作基片或在基片之间的缝隙可以被涂覆或填充有不与形成滴的液体相混溶的填充流体。

[0007] 滴致动器被用于各种应用中,包括分子诊断分析,比如酶法测定和免疫分析。在一种应用中,酶法测定和免疫分析被用作常规测试程序的一部分,以测试新生儿的各种遗传性疾病。例如,酶法测定可以被用于测试各种溶酶体贮积病(LSD)。在新生儿测试程序中靶向的许多遗传性疾病与糖蛋白分子(例如溶酶体酶)的缺陷有关,所述糖蛋白分子仅可以代表复杂的生物样品比如血液中的总的大分子的一小部分。用于新生儿测试的样品通常是通过扎新生儿的脚后跟来收集的,以获得少量的血液(通常,两滴至三滴),以填充滤纸卡上的几个圈。从 DBS 样品中穿透(punch)样本(即,使用当前的技术,每进行一次测试就穿透一次)且根据特定的分析操作流程来操纵。由于血液样品被点样到固体介质上且干燥,它们必须在分析之前重构(reconstituted),其是需要将样品稀释到合适的液体介质中的步骤。对增加 NBS 分析中靶标糖蛋白分子的检测灵敏度的改进方法存在需要。

[0008] 4 发明简述

[0009] 一种制备用于进行分析的样品的方法,所述方法包括:提供包含糖蛋白的输入样品;将糖蛋白从所述输入样品捕获到固体载体上;且洗涤所述样品载体,以除去所述输入样品的未结合部分。在某些实施方式中,方法包括从固体载体中洗脱糖蛋白,以产生输出样品。在某些实施方式中,方法步骤是在油中的一个或多个滴中进行的。在某些实施方式中,洗脱是通过固体载体与一种或多种糖模拟物(glycomimetic)接触来完成的。在某些实施方式中,洗脱是通过使固体载体和捕获的糖蛋白之间的可断裂键断裂来完成的。在某些实施方式中,输入样品包括选自以下组成的组的样品物质:血液、血浆、血清、眼泪、唾液和尿。在某些实施方式中,输入样品包括新鲜血液。在某些实施方式中,输入样品包括重构的干血。在某些实施方式中,输入样品主要由血浆组成。在某些实施方式中,输入样品包括人的临床样品。在某些实施方式中,固体载体包括伴刀豆球蛋白 A。在某些实施方式中,固体载体包括磁性响应珠子。在某些实施方式中,捕获的糖蛋白包括一种或多种酶。在某些实施方式中,捕获的糖蛋白包括一种或多种糖苷酶。

[0010] 本发明还提供进行分析的方法,包括:进行酶浓缩方法,将固体载体暴露到底物且测量底物的酶改性。在某些实施方式中,在将酶底物添加到输出样品且测量底物的酶改性

之前,酶被洗脱或以其它方式与固体载体分离。通常,底物的改性与可能存在于输出样品中的酶的存在和/或活性有关。在某些实施方式中,酶是溶酶体酶。在某些实施方式中,酶是糖基化的酶。在某些实施方式中,方法是在样品收集点处进行的。在某些实施方式中,底物包含糖苷底物。在某些实施方式中,底物在接触感兴趣的酶时释放可检测物(detectable)。在某些实施方式中,底物包括在接触感兴趣的酶时释放荧光团的糖苷底物。在某些实施方式中,底物包含糖苷底物。在某些实施方式中,样品收集点是在受试者在场的情况下。在某些实施方式中,输入样品是从受试者收集的且立即装载到滴致动器上并立即进行方法。

[0011] 本发明还提供计算机可读的介质,所述介质被编程以使滴致动器进行方法步骤中任一个。一种系统,所述系统包括滴致动器,所述滴致动器被联接到计算机且受计算机的控制,所述计算机被编程以使滴致动器进行方法的方法步骤中任一个。

[0012] 5 定义

[0013] 如本文所使用的,以下术语具有所说明的意义。

[0014] 关于一个或多个电极的“激活”是指影响在滴的存在下可导致滴操作的一个或多个电极的电气状态的变化。电极的激活可以用交流电或直流电来完成。可以使用任何合适的电压。例如,电极可以用如下电压来激活,所述电压大于约 150V,或大于约 200V,或大于约 250V,或从约 275V 到约 375V,或约 300V。在使用交流电的情况下,可以采用任何合适的频率。例如,电极可以用具有从约 1Hz 到约 100Hz,或从约 10Hz 至约 60Hz,或从约 20Hz 至约 40Hz,或约 30Hz 的频率的交流电来激活。

[0015] 关于滴致动器上的珠子,“珠子”是指能够与滴致动器上或在滴致动器附近的滴相互作用的任何珠子或粒子。珠子可以是许多形状中的任何一种,比如球形、大体球形、蛋形、圆盘形、立方形、无定形及其它三维形状。例如,珠子能够在滴致动器上的滴中经历滴操作,或以允许滴致动器上的滴接触滴致动器上的珠子和/或接触不在滴致动器的珠子的方式,以其它方式关于滴致动器被配置。珠子可以被设置在滴中、在滴操作缝隙中或在滴操作表面上。珠子可以被设置在储存器(reservoir)中,所述存储器在滴操作缝隙的外部或远离滴操作表面被定位,且储存器可以与允许包含珠子的滴被带入到滴操作缝隙中或带入到与滴操作表面接触的流体路径相关联。珠子可以用各种材料制成,包括例如树脂和聚合物。珠子可以是任何合适的尺寸,包括例如微米珠子(microbead)、微米粒子(microparticle)、纳米珠子(nanobead)和纳米粒子(nanoparticle)。在一些情况下,珠子是磁性响应的;在其它情况下,珠子没有显著的磁性响应。对于磁性响应的珠子,磁性响应材料可以构成基本上整个珠子、珠子的一部分或仅珠子的一种组分。除了其他部分,珠子的剩余部分可以包括聚合材料、涂层和允许分析试剂的附着的部分。合适的珠子的实例包括流式细胞仪微米珠子、聚苯乙烯微米粒子和纳米粒子、官能化的聚苯乙烯微米粒子和纳米粒子、涂覆的聚苯乙烯微米粒子和纳米粒子、二氧化硅微米珠子、荧光微米球和纳米球、官能化的荧光微米球和纳米球、涂覆的荧光微米球和纳米球、染颜色的微米粒子和纳米粒子、磁性微米粒子和纳米粒子、超顺磁性微米粒子和纳米粒子(例如,可从 Invitrogen Group, Carlsbad, CA 得到的 DYNABEADS[®] 粒子)、荧光微米粒子和纳米粒子、涂覆的磁性微米粒子和纳米粒子、铁磁性的微米粒子和纳米粒子、涂覆的铁磁性微米粒子和纳米粒子;及在 2005 年 11 月 24 日公布的标题为“Multiplex flow assays preferably with magnetic particles as solid phase”的美国专利公布第 20050260686 号、2003 年 7 月 17

日公布的标题为“Encapsulation of discrete quanta of fluorescent particles”的美国专利公布第 20030132538 号、2005 年 6 月 2 日公布的标题为“Multiplexed Analysis of Clinical Specimens Apparatus and Method”的美国专利公布第 20050118574 号、2005 年 12 月 15 日公布的标题为“Microparticles with Multiple Fluorescent Signals and Methods of Using Same”的美国专利公布第 20050277197 号、2006 年 7 月 20 日公布的标题为“Magnetic Microspheres for use in Fluorescence-based Applications”的美国专利公布第 20060159962 号中所描述的那些；所述专利公布的整个公开内容通过引用并入本文，用于它们关于珠子及磁性响应材料和珠子的教导。珠子可以被预先耦合有能够结合到生物分子上且与生物分子形成复合物的生物分子或其它物质。珠子可以被预先耦合有具有关于期望靶标的亲和力的抗体、蛋白质或抗原、DNA/RNA 探针或任何其它分子。用于固定磁性响应珠子和 / 或非磁性响应珠子和 / 或用珠子进行滴操作操作流程的滴致动器技术的实例被描述在 2006 年 12 月 15 日提交的标题为“Droplet-Based Particle Sorting”的美国专利申请第 11/639,566 号；2008 年 3 月 25 日提交的标题为“Multiplexing Bead Detection in a Single Droplet”的美国专利申请第 61/039,183 号；2008 年 4 月 25 日提交的标题为“Droplet Actuator Devices and Droplet Operations Using Beads”的美国专利申请第 61/047,789 号；2008 年 8 月 5 日提交的标题为“Droplet Actuator Devices and Methods for Manipulating Beads”的美国专利申请第 61/086,183 号；2008 年 2 月 11 日提交的标题为“Droplet Actuator Devices and Methods Employing Magnetic Beads”的国际专利申请第 PCT/US2008/053545 号；2008 年 3 月 24 日提交的标题为“Bead-based Multiplexed Analytical Methods and Instrumentation”的国际专利申请第 PCT/US2008/058018 号；2008 年 3 月 23 日提交的标题为“Bead Sorting on a Droplet Actuator”的国际专利申请第 PCT/US2008/058047 号；及 2006 年 12 月 11 日提交的标题为“Droplet-based Biochemistry”的国际专利申请第 PCT/US2006/047486 号中，所述申请的整个公开内容通过引用并入本文。在本发明的多路复用(multiplexing)方面中，可以采用珠子的特征。具有适合用于多路复用的特征的珠子以及检测且分析从此类珠子射出的信号的方法的实例可以发现于以下：2008 年 12 月 11 日公布的标题为“Systems and Methods for Multiplex Analysis of PCR in Real Time”的美国专利申请第 20080305481 号；2008 年 6 月 26 日公布的标题为“Methods and Systems for Dynamic Range Expansion”的美国专利公布第 20080151240 号；2007 年 9 月 6 日公布的标题为“Methods, Products, and Kits for Identifying an Analyte in a Sample”的美国专利公布第 20070207513 号；2007 年 3 月 22 日公布的标题为“Methods and Systems for Image Data Processing”的美国专利公布第 20070064990 号；2006 年 7 月 20 日公布的标题为“Magnetic Microspheres for use in Fluorescence-based Applications”的美国专利公布第 20060159962 号；2005 年 12 月 15 日公布的标题为“Microparticles with Multiple Fluorescent Signals and Methods of Using Same”的美国专利公布第 20050277197 号；及 2005 年 6 月 2 日公布的标题为“Multiplexed Analysis of Clinical Specimens Apparatus and Method”的美国专利公布第 20050118574 号。

[0016] “滴”是指在滴致动器上的液体体积。通常，滴被填充流体至少部分地限制。例如，滴可以被填充流体完全包围或可以被填充流体和滴致动器的一个或多个表面限制。作为另

外的实例,滴可以被填充流体、滴致动器的一个或多个表面和 / 或大气限制。作为另外的实例,滴可以被填充流体和大气限制。例如,滴可以是含水的或非水的,或可以是包含含水组分和非水组分的混合物或乳液。滴可以采用各种形状 ;非限制性实例包括大体圆盘形、蛞蝓形(slug shaped)、切去顶端的球体、椭圆形、球形、部分压缩的球体、半球形、卵形、圆柱形、此类形状的组合及在滴操作期间形成比如作为此类形状与滴致动器的一个或多个表面接触的结果合并或分裂或形成的各种形状。对于可以经历使用本发明的方法的滴操作的滴流体的实例,参见 2006 年 12 月 11 日提交的标题为“Droplet-Based Biochemistry”的国际专利申请第 PCT/US06/47486 号。在各种实施方式中,滴可以包括生物样品,比如全血、淋巴液、血清、血浆、汗、眼泪、唾液、痰、脑脊液、羊水、精液、阴道分泌物、浆液、滑液、心包液、腹膜液、胸膜液、渗出液、溢泌物、脓囊液、胆汁、尿、胃液、肠液、排泄物样品、包含单个或多个细胞的液体、包含细胞器的液体、流态化的组织(fluidized tissue)、流态化的有机体、包含多细胞化有机体的液体(liquids containing multi-celled organisms)、生物拭子(biological swabs)和生物洗涤物。而且,滴可以包括试剂,比如水、去离子水、盐水溶液、酸性溶液、碱性溶液、洗涤剂溶液和 / 或缓冲液。滴内含物的其它实例包括试剂,比如用于生化操作流程的试剂,生化操作流程比如核酸扩增操作流程、基于亲和力的分析操作流程、酶法测定操作流程、测序操作流程和 / 或用于生物流体的分析操作流程。

[0017] “滴致动器”是指用于操纵滴的装置。关于滴致动器的实例,参见 Pamula 等人 2005 年 6 月 28 日提出的标题为“Apparatus for Manipulating Droplets by Electrowetting-Based Techniques”的美国专利第 6,911,132 号 ;Pamula 等人 2006 年 1 月 30 日提交的标题为“Apparatuses and Methods for Manipulating Droplets on a Printed Circuit Board”的美国专利申请第 11/343,284 号 ;Pollack 等人 2006 年 12 月 11 日提交的标题为“Droplet-Based Biochemistry”的国际专利申请第 PCT/US2006/047486 号 ;Shenderov 的 2004 年 8 月 10 日提出的标题为“Electrostatic Actuators for Microfluidics and Methods for Using Same”的美国专利第 6,773,566 号及 2000 年 1 月 24 日提出的标题为“Actuators for Microfluidics Without Moving Parts”的美国专利第 6,565,727 号 ;Kim 和 / 或 Shah 等人 2003 年 1 月 27 日提交的标题为“Electrowetting-driven Micropumping”的美国专利申请第 10/343,261 号,2006 年 1 月 23 日提交的标题为“Method and Apparatus for Promoting the Complete Transfer of Liquid Drops from a Nozzle”的美国专利申请第 11/275,668 号,2006 年 1 月 23 日提交的标题为“Small Object Moving on Printed Circuit Board”的美国专利申请第 11/460,188 号,2009 年 5 月 14 日提交的标题为“Method for Using Magnetic Particles in Droplet Microfluidics”的美国专利申请第 12/465,935 号及 2009 年 4 月 30 日提交的标题为“Method and Apparatus for Real-time Feedback Control of Electrical Manipulation of Droplets on Chip”的美国专利申请第 12/513,157 号 ;Velev 的 2009 年 6 月 16 日提出的标题为“Droplet Transportation Devices and Methods Having a Fluid Surface”的美国专利 7,547,380 ;Sterling 等人 2007 年 1 月 16 日颁发的标题为“Method, Apparatus and Article for Microfluidic Control via Electrowetting, for Chemical, Biochemical and Biological Assays and the Like”的美国专利第 7,163,612 号 ;Becker 和 Gascoyne 等人 2010 年 1 月 5 日颁发的标题为“Method and Apparatus for

Programmable fluidic Processing”的美国专利第 7,641,779 号,2005 年 12 月 20 日颁发的标题为“Method and Apparatus for Programmable fluidic Processing”的美国专利第 6,977,033 号;Decre 等人 2008 年 2 月 12 日颁发的标题为“System for Manipulation of a Body of Fluid”的美国专利 7,328,979;Yamakawa 等人的 2006 年 2 月 23 日公布的标题为“Chemical Analysis Apparatus”的美国专利公布第 20060039823 号;Wu 的 2008 年 12 月 31 日公布的标题为“Digital Microfluidics Based Apparatus for Heat-exchanging Chemical Processes”的国际专利公布第 WO/2009/003184;Fouillet 等人的 2009 年 7 月 30 日公布的标题为“Electrode Addressing Method”的美国专利公布第 20090192044 号;Fouillet 等人 2006 年 5 月 30 日颁发的标题为“Device for Displacement of Small Liquid Volumes Along a Micro-catenary Line by Electrostatic Forces”的美国专利 7,052,244;Marchand 等人的 2008 年 5 月 29 日公布的标题为“Droplet Microreactor”的美国专利公布第 20080124252 号;Adachi 等人的 2009 年 12 月 31 日公布的标题为“Liquid Transfer Device”的美国专利公布第 20090321262 号;Roux 等人的 2005 年 8 月 18 日公布的标题为“Device for Controlling the Displacement of a Drop Between two or Several Solid Substrates”的美国专利公布第 20050179746 号;Dhindsa 等人的标题为“Virtual Electrowetting Channels:Electronic Liquid Transport with Continuous Channel Functionality”, Lab Chip, 10:832 - 836 (2010);上文文献的整个公开内容及其优先权文献通过引用并入本文。某些滴致动器将包括具有布置在其间的缝隙的一个或多个基片,及与一个或多个基片相关联(例如,放置在,附接到和 / 或嵌入到)且被布置以进行一种或多种滴操作的电极。例如,某些滴致动器将包括基础(或底部)基片、与基片相关联的滴操作电极、在基片和 / 或电极上部的一个或多个介电层及任选地在基片上部的一个或多个疏水层,形成滴操作表面的介电层和 / 或电极。还可以设置顶部基片,其通过缝隙与滴操作表面分离,所述缝隙通常被称为滴操作缝隙。在上文所引用的专利和申请中讨论了在顶部和 / 或底部基片上的各种电极布置,且在本发明的说明书中讨论了应用和某些新的电极布置。在滴操作期间,优选的是,滴保持与地面或参考电极的连续接触或频繁接触。地面或参考电极可以与缝隙中的面向缝隙的顶部基片、面向缝隙的底部基片相关联。在将电极设置在两个基片上时,用于使电极耦合到滴致动器设备上用于控制或监控电极的电接触可以与一个或两个平板相关联。在一些情况下,在一个基片上的电极被电耦合到另一个基片上,使得仅一个基片接触滴致动器。在一个实施方式中,导电材料(例如,环氧树脂,比如可从 Master Bond, Inc., Hackensack, NJ 购得的 MASTER BOND™ 聚合物系统 EP79)提供在一个基片上的电极和在另一个基片上的电气路径之间的电联接,例如在顶部基片上的接地电极可以通过此类导电材料耦合到底部基片上的电气路径上。在使用多个基片的情况下,可以在基片之间设置间隔器,以确定在其间的缝隙的高度且限定分配存储器。例如,间隔器高度可以为从约 5 μm 至约 600 μm , 或约 100 μm 至约 400 μm , 或约 200 μm 至约 350 μm , 或约 250 μm 至约 300 μm , 或约 275 μm 。例如,间隔器可以由来自顶部或底部基片的突出物,和 / 或插入到顶部基片和底部基片之间的材料的层形成。一个或多个开口可以被设置在一个或多个基片中,用于形成液体可以通过其被输送到滴操作缝隙中的流体路径。在一些情况下,一个或多个开口可以对齐,用于与一个或多个电极相互作用,例如,对齐,使得流动通过开口的液体将充分靠近一个或多个滴操作电极,以允许用液体使滴操作受到滴操作电极

的影响。在一些情况下,基础(或底部)基片和顶部基片可以被形成一个整体部件。一个或多个参考电极可以被设置在基础(或底部)基片和 / 或顶部基片上和 / 或被设置在缝隙中。上述参考专利和专利申请提供了参考电极布置的实例。在各种实施方式中,滴通过滴致动器的操纵可以是电极调节的,例如,电湿润调节的或双向电泳调节的或库伦力调节的。用于控制可用于本发明的滴致动器的滴操作的其它技术的实例包括使用诱导水动射流压力(hydrodynamic fluidic pressure)的装置,比如基于机械原理(例如,外部注射器泵、气动膜泵、振动膜泵、真空装置、离心力、压电 / 超声波泵及声力);电气或磁性原理(例如,电渗流、电动泵、铁磁流体塞(ferrofluidic plug)、电液动力泵(electrohydrodynamic pump)、使用磁性力的吸引或排斥及磁流体动力泵(magnetohydrodynamic pump));热力学原理(例如,气泡产生 / 相变诱导的体积膨胀);其它类型的表面湿润原理(例如,电湿润和光电湿润(optoelectrowetting)以及化学、热、结构和放射性地诱导的表面张力梯度);重力;表面张力(例如,毛细管作用);静电力(例如,电渗流);离心流(基片被布置在紧凑的圆盘上且旋转);磁力(例如,振动离子引起流动);磁流体动力;及真空或压力差操作的那些装置。在某些实施方式中,可以采用前述技术中的两种或更多种的组合,以在本发明的滴致动器中进行滴操作。类似地,前述中的一种或多种可以被用于例如,从另外装置中的储存器或从滴致动器的外部储存器(例如与滴致动器基片和从储存器至滴操作缝隙的流体路径相关联的储存器)输送液体至滴操作缝隙。本发明的某些滴致动器的滴操作表面可以由疏水材料形成或可以被涂覆或处理以使它们疏水。例如,在一些情况下,滴操作表面的某一部分或全部可以被衍生化有低表面能材料或化学制品,例如,通过沉积或使用原位合成,所述原位合成使用化合物比如在溶液中的聚氟化或全氟化化合物或可聚合单体。实例包括TEFLON[®] AF(可从DuPont, Wilmington, DE 购得)、氟树脂材料家族的成员(members of the cytop family of materials)、在疏水性和超疏水性涂层的FLUOROPEL[®]家族中的涂层(可从Cytonix Corporation, Beltsville, MD 购得)、硅烷涂层、氟硅烷涂层、疏水性的磷酸酯衍生物(例如,Aculon, Inc 所销售的那些)及NOVEC[™]电子涂层(可从3M Company, St. Paul, MN 购得)以及用于等离子体增强的化学气相沉积(PECVD)的其他氟化单体。在一些情况下,滴操作表面可以包括具有在约10nm至约1,000nm的范围内的厚度的疏水性涂层。而且,在一些实施方式中,滴致动器的顶部基片包括导电的有机聚合物,其然后被涂覆有疏水涂层或以其他方式被处理以使滴操作表面疏水。例如,被沉积在塑料基片上的导电有机聚合物可以是聚(3,4-次乙基二氧噻吩)聚(苯乙烯磺酸酯)(PEDOT:PSS)。导电有机聚合物和可选的传导层的其它实例被描述在Pollack等人的标题为“Droplet Actuator Devices and Methods”的国际专利申请第PCT/US2010/040705号中,所述专利申请的整个公开内容通过引用并入本文。可以用印刷电路板(PCB)、玻璃、铟锡氧化物(ITO)涂覆的玻璃和 / 或半导体材料作为基片来制造一个或两个基片。当基片为ITO涂覆的玻璃时,ITO涂层的厚度优选地在约20至约200nm的范围内,优选地约50至约150nm,或约75至约125nm,或约100nm。在一些情况下,顶部和 / 或底部基片包括涂覆有电介质比如聚酰亚胺电介质的PCB基片,在一些情况下,其还可以被涂覆或以其它方式被处理以使滴操作表面疏水。当基片包括PCB时,以下材料是合适的材料的实例:MITSUI[™] BN-300(可从MITSUI Chemicals America, Inc., San Jose CA 购得);ARLON[™]11N(可从Arlon, Inc, Santa Ana, CA 购得);NELCO[®] N4000-6

和 N5000-30/32 (可从 Park Electrochemical Corp., Melville, NY 购得); ISOLA™ FR406 (可从 Isola Group, Chandler, AZ 购得), 尤其是 IS620; 氟聚合物家族 (由于其具有低的背景荧光, 适合用于荧光检测); 聚酰亚胺家族; 聚酯; 聚萘二甲酸乙二酯; 聚碳酸酯; 聚醚醚酮; 液晶聚合物; 环烯烃共聚物 (COC); 环烯烃聚合物 (COP); 芳香聚酰胺; THERMOUNT® 非纺织芳香聚酰胺增强 (可从 DuPont, Wilmington, DE 购得); NOMEX® 牌的纤维 (可从 DuPont, Wilmington, DE 购得); 及纸。多种材料也适合用作基片的电介质组分。实例包括: 蒸汽沉积的电介质, 比如 PARYLENE™C (尤其是在玻璃上) 和 PARYLENE™ N (可从 Parylene Coating Services, Inc., Katy, TX 购得); TEFLON® AF 涂层; 氟树脂; 焊接掩模 (soldermask), 比如液体可感光的 (liquid photoimageable) 焊接掩模 (例如, 在 PCB 上), 如 TAIYO™ PSR4000 系列, TAIYO™ PSR 和 AUS 系列 (可从 Taiyo America, Inc. Carson City, NV 购得) (用于应用的良好热特征涉及热控制), 及 PROBIMER™8165 (用于应用的良好热特征涉及热控制) (可从 Huntsman Advanced Materials Americas Inc., Los Angeles, CA 购得); 干燥膜焊接掩模, 比如在 VACREL® 干燥膜焊接掩模线上的那些 (可从 DuPont, Wilmington, DE 购得); 膜电介质, 比如聚酰亚胺膜 (例如, KAPTON® 聚酰亚胺膜, 可从 DuPont, Wilmington, DE 购得), 聚乙烯, 及氟聚合物 (例如, FEP), 聚四氟乙烯; 聚酯; 聚萘二甲酸乙二酯; 环烯烃共聚物 (COC); 环烯烃聚合物 (COP); 上文列出的任何其它 PCB 基片材料; 黑矩阵树脂 (black matrix resin); 以及聚丙烯。可以根据用于特定分析操作流程的试剂的性能 (performance) 选择滴运送电压和频率。设计参数可以变化, 例如, 致动器上的储存器的数目和布置、独立电极连接件的数目、不同储存器的尺寸 (体积)、磁铁 / 珠子洗涤区域的布置、电极尺寸、电极间的倾斜及缝隙高度 (在顶部基片和底部基片之间) 可以改变, 用于特定的试剂、操作流程、滴体积等。在一些情况下, 本发明的基片可以衍生化有低表面能的材料或化学制品, 例如使用沉积或原位合成, 所述原位合成使用在溶液中的聚氟化或全氟化合物或可聚合单体。实例包括用于浸渍或喷涂的 TEFLON® AF 涂层和 FLUOROPEL® 涂层, 以及用于等离子体增强的化学气相沉积 (PECVD) 的其它氟化单体。此外, 在一些情况下, 滴操作表面的某一部分或全部可以被涂覆有用于减少背景噪音比如来自 PCB 基片的背景荧光的物质。例如, 减少噪音的涂层可以包括黑矩阵树脂, 比如可从日本的 Toray industries, Inc. 购得的黑矩阵树脂。滴致动器的电极通常是通过控制器或处理器来控制的, 所述控制器或处理器本身作为系统的一部分被设置, 可以包括处理功能以及数据和软件存储及输入能力和输出能力。试剂可以被设置在滴致动器上, 在滴操作缝隙中或在流体联接 (fluidly couple) 到滴操作缝隙的储存器中。试剂可以以液体形式例如滴, 或它们可以以可重构的形式被设置在滴操作缝隙中或在流体联接到滴操作缝隙的储存器中。可重构的试剂通常可与用于重构的液体结合。适合与本发明一起使用的可重构试剂的实例包括在 Meathrel 等人的 2010 年 6 月 1 日授权的标题为 “Disintegratable films for diagnostic devices” 的美国专利 7,727,466 中所描述的那些。

[0018] “滴操作” 是指在滴致动器上的任何滴操纵。例如, 滴操作可以包括: 将滴装载到滴致动器上; 分配来自源滴的一个或多个滴; 使滴分裂、分离或分割成两个或更多个滴; 将滴从一个位置运输到任何方向中的另一位置; 将两个或更多个滴合并或组合成单个滴; 稀

释滴 ;混合滴 ;搅动滴 ;使滴变形 ;将滴保持在位置 ;培养滴 ;加热滴 ;蒸发滴 ;冷却滴 ;处理滴 ;将滴运送出滴致动器 ;本文所描述的其它滴操作 ;和 / 或前述操作的任何组合。术语“合并(merge)”、“合并(merging)”、“组合(combine)”、“组合(combining)”及类似术语被用于描述从两个或更多个滴产生一个滴。应理解的是,当关于两个或更多个滴使用这样的术语时,可以使用足以导致两个或更多个滴组合成一个滴的滴操作的任何组合。例如,“合并滴 A 和滴 B”可以通过运送滴 A 以接触静止的滴 B、运送滴 B 以接触静止的滴 A 或运输滴 A 和 B 以彼此接触来实现。术语“分裂(splitting)”、“分离(separating)”和“分割(dividing)”并非意图指任何关于得到的滴的体积(即,得到的滴的体积可以是相同的或不同的)或得到的滴数目(得到的滴数目可以为 2 个、3 个、4 个、5 个或更多个)的任何特定结果。术语“混合”指的是导致滴内的一种或多种组分的较均匀分布的滴操作。“装载”滴的操作实例包括微量渗透装载、压力辅助的装载、机器人装载、无源装载(passive loading)及移液管装载。滴操作可以是电极调节的。在一些情况下,通过表面上的亲水和 / 或疏水区域,和 / 或通过物理障碍物进一步易化滴操作。对于滴操作的实例,参见上文在“滴致动器”的定义下引用的专利和专利申请。阻抗或电容传感或成像技术有时可以被用于确定或确认滴操作的结果。此类技术的实例被描述在 Sturmer 等人的 2008 年 8 月 21 日公布的标题为“Capacitance Detection in a Droplet Actuator”的国际专利公布第 W0/2008/101194 号中,所述专利公布的整个公开内容通过引用并入本文。一般而言,传感或成像技术可以被用于确认滴在特定电极处的存在或不存在。例如,在滴分配操作后,分配的滴在目标电极处的存在确认了滴分配操作是有效的。类似地,在分析操作流程中的合适的步骤中,滴在检测点(detection spot)处的存在可以证明之前的一组滴操作已经成功地产生了用于检测的滴。滴运输时间可以是非常快的。例如,在各种实施方式中,滴从一个电极至下一个电极的运输可以超过约 1 秒,或约 0.1 秒,或约 0.01 秒,或约 0.001 秒。在一个实施方式中,电极以 AC 模式操作,但转换到用于成像的 DC 模式。对于进行滴操作有用的是,滴足迹面积(footprint area)类似于电湿润面积;换言之,分别用 1 个、2 个和 3 个电极,有用地控制 $1x^-$ 、 $2x^-$ 、 $3x^-$ 滴。如果滴足迹大于可用于在给定的时间下进行滴操作的电极数目,滴尺寸和电极数目之间的差通常应不大于 1;换言之,用 1 个电极来有用地控制 $2x^-$ 滴且用 2 个电极来有用地控制 $3x^-$ 滴。当滴包含珠子时,有用的是滴尺寸等于控制滴例如运输滴的电极的数目。

[0019] “填充流体”是指与滴致动器的滴操作基片相关联的流体,所述流体与滴相充分不相混溶,以使滴相经历电极调节的滴操作。例如,滴致动器的缝隙通常被填充有填充流体。例如,填充流体可以为低粘度的油比如硅油或鲸蜡烷填充流体。填充流体可以填充滴致动器的整个缝隙或可以涂覆滴致动器的一个或多个表面。填充流体可以是传导性的或非传导性的。例如,填充流体可以被掺杂有表面活性剂或其它添加剂。例如,可以选择添加剂,以改进滴操作和 / 或减少试剂或靶标物质从滴的损失、微滴(microdroplet)的形成、滴之间的交叉污染、滴致动器表面的污染、滴致动器材料的降解等。可以根据用于特定分析操作流程的试剂的性能和与滴致动器材料有效相互作用或不与滴致动器材料相互作用来选择包括表面活性剂掺杂的填充流体的组合物。适合用于本发明的填充流体和填充流体制剂的实例被提供在 Srinivasan 等人的 2010 年 3 月 11 日公布的标题为“Droplet Actuators, Modified Fluids and Methods”的国际专利公布第 W0/2010/027894 号和 2009 年 2 月 12 日公布的标题为“Use of Additives for Enhancing Droplet Operations”的

国际专利公布 WO/2009/021173 ;Sista 等人的 2008 年 8 月 14 日公布的标题为“Droplet Actuator Devices and Methods Employing Magnetic Beads”的国际专利公布第 WO/2008/098236 号 ;以及 Monroe 等人的 2007 年 5 月 17 日提交的标题为“Electrowetting Devices”的美国专利公布第 20080283414 号中 ;所述专利以及本文所引用的其它专利和专利申请的整个公开内容通过引用并入本文。

[0020] 关于磁性响应珠子的“固定”是指在滴致动器上的滴或填充流体中,珠子基本上被保持在合适位置中。例如,在一个实施方式中,固定的珠子可以被充分保持在滴中的合适位置中,以允许滴分裂操作的实施,得到具有基本上所有珠子的一个滴和基本上没有珠子的一个滴。

[0021] “磁性响应”是指响应于磁场。“磁性响应珠子”包含磁性响应材料或由磁性响应材料组成。磁性响应材料的实例包括顺磁性材料、铁磁性材料、亚铁磁性材料及变磁性材料。合适的顺磁性材料的实例包括铁、镍和钴,以及金属氧化物,比如 Fe_3O_4 、 $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ 、 CoO 、 NiO 、 Mn_2O_3 、 Cr_2O_3 和 CoMnP 。

[0022] “储存器”是指配置用于保持、储存或供应液体的包围物(enclosure)或部分包围物。本发明的滴致动器系统可以包括在盒子上(on-cartridge)的储存器和 / 或不在盒子上的储存器。在盒子上的储存器可以为(1)在致动器上的储存器,其为在滴操作缝隙中或在滴操作表面上的储存器 ;(2)不在致动器上的储存器,其为在滴致动器盒子上但在滴操作缝隙外且不接触滴操作表面的储存器 ;或(3)混合储存器,其具有在致动器上的区域和不在致动器上的区域。不在致动器上的储存器的实例为在顶部基片中的储存器。不在致动器上的储存器通常与开口或配置用于使液体从不在致动器上的储存器流动到滴操作缝隙中比如到致动器上的储存器中的流体路径流体相通。不在盒子上的储存器可以是完全不是滴致动器盒子的一部分,但使液体流动到滴致动器盒子的某一部分的储存器。例如,不在盒子上的储存器可以是在操作期间滴致动器盒子可以耦合到其上的系统或停靠站(docking station)的一部分。类似地,不在盒子上的储存器可以是试剂储存容器或注射器,所述容器或注射器被用于迫使流体进入盒子上的储存器或进入滴操作缝隙中。使用不在盒子上的储存器的系统通常将包括流体通路方式,因此液体可以从不在盒子上的储存器被运送到在盒子上的储存器或到滴操作缝隙中。

[0023] 如本文用于指滴和 / 或滴内的磁性响应珠子的“运送到磁铁的磁场中”、“朝着磁铁运送”及类似术语意图指运送到大体上能够吸引滴中的磁性响应珠子的磁场区域中。类似地,如本文用于指滴和 / 或滴内的磁性响应珠子的“运送远离磁铁或磁场”、“运送出磁铁的磁场”及类似术语意图指运送远离大体上能够吸引滴中的磁性响应珠子的磁场区域,不管滴或磁性响应珠子是否被完全从磁场中移除。将理解的是,在本文所描述的此类情况中任一种情况下,滴可以朝着或远离期望的磁场区域被运送,和 / 或期望的磁场区域可以朝着或远离滴被移动。提及在磁场“内”或“中”及类似术语的电极、滴或磁性响应珠子,意图描述以下情况 :其中电极以允许电极将滴运送到和 / 或远离期望的磁场区域的方式被定位,或滴或磁性响应珠子被定位在期望的磁场区域中,在每一种情况下,其中在期望的区域中的磁场能够大体上吸引滴中的任何磁性响应珠子。类似地,提及在磁场“外部”或“远离”磁场及类似术语的电极、滴或磁性响应珠子,意图描述以下情况 :其中电极以允许电极将滴运送远离磁场的某一区域的方式被定位,或滴或磁性响应珠子被定位远离磁场的某一区

域,在每一种情况下,其中在这样的区域中的磁场大体上不能吸引滴中的任何磁性响应珠子或其中任何剩下的吸引力不消除在区域中进行的滴操作的有效性。在本发明的各种方面中,系统、滴致动器或系统的其它部件可以包括磁铁,比如一个或多个永久性磁铁(例如,单个圆柱形或条形磁铁或此类磁铁的阵列,比如 Halbach 阵列),或电磁铁,或电磁铁的阵列,以形成磁场,用于与磁性响应珠子或芯片上的其它部件相互作用。例如,这样的相互作用可以包括在储存期间或在滴操作期间的滴中基本上固定或保持磁性响应珠子的运动或流动,或拉动磁性响应珠子离开滴。

[0024] 关于洗涤珠子的“洗涤”是指减少与珠子接触或暴露到珠子的一种或多种物质的量和/或浓度,所述物质来自与珠子接触的滴。物质的量和/或浓度的减少可以是部分的,基本上完全的或甚至完全的。物质可以是各种物质中的任一种;实例包括用于进一步分析的靶标物质,和不想要的物质,比如样品的组分、污染物和/或过量的试剂。在一些实施方式中,洗涤操作开始于初始滴接触磁性响应珠子,其中滴包括物质的初始量和初始浓度。可以用各种滴操作来进行洗涤操作。洗涤操作可以产生包含磁性响应珠子的滴,其中滴具有物质的总量和/或浓度,所述物质的总量和/或浓度小于物质的初始量和/或浓度。合适的洗涤技术的实例描述在 Pamula 等人的 2008 年 10 月 21 日授权的标题为“Droplet-Based Surface Modification and Washing”的美国专利 7,439,014 中,所述专利的整个公开内容通过引用并入本文。

[0025] 术语“上部”、“底部”、“上方”、“下方”和“在...上”在整个说明书中关于滴致动器的部件的相对位置比如滴致动器的顶部基片和底部基片的相对位置使用。将理解的是,滴致动器是功能性的,而不管其空间定向。

[0026] 当以任何形式的液体(例如,滴或连续主体,不管是移动还是静止的)被描述为在电极、阵列、基质或表面“上”、“处”或“上方”时,这样的液体可以直接接触电极/阵列/基质/表面,或可以接触在液体和电极/阵列/基质/表面之间插入的一个或多个层或膜。

[0027] 当滴被描述成“在滴致动器上”或“装载在滴制动器上”时,应理解的是,滴以促进使用滴制动器在滴上进行一种或多种滴操作的方式来布置在滴制动器上;滴以促进滴的属性或来自滴的信号的传感的方式被布置在滴致动器上,和/或滴已经在滴制动器上经历滴操作。

[0028] 6 附图简述

[0029] 图 1 显示为 ConA- 碳水化合物结合的有效抑制剂(竞争剂)的糖模拟物(NSC120634)的实例;

[0030] 图 2 阐述使 ConA 结合的分子从磁性响应珠子上释放的方法的实例;

[0031] 图 3 显示使用 DBS 在用于酸性鞘磷脂酶活性的 Niemann Pick 分析中的提取缓冲液组成和 ConA 珠子体积的效果图的实例;

[0032] 图 4 显示使用 DBS 在用于半乳糖脑苷酯酶活性的 Krabbe 分析中的提取缓冲液组成和 ConA 珠子体积的效果图的实例;

[0033] 图 5A 和图 5B 分别显示使用 DBS 在 Niemann Pick 分析中的洗脱缓冲液组成的效果的图表和图形的实例;

[0034] 图 6 显示使用 DBS 在用于酸性 β -D- 葡糖苷酶活性的 Gaucher 分析中的洗脱缓冲液组成的效果的条形图的实例;

[0035] 图 7A 和图 7B 分别显示在用水, 0.1% Tween® 20 (EXT) 或 PBS pH6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20 在工作台上制备的 DBS 提取物中, α -葡糖苷酶(Pompe) 和 β -半乳糖苷酶(Fabry) 酶活性的图的实例;

[0036] 图 8A 和图 8B 分别显示在用水, 0.1% Tween® 20 (EXT) 或 PBS pH6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20 和用 ConA 珠子的酶浓缩步骤在工作台上制备的 DBS 提取物中, α -葡糖苷酶(Pompe) 和 β -半乳糖苷酶(Fabry) 酶活性的图的实例;

[0037] 图 9A 和图 9B 分别显示在具有或不具有使用 ConA 珠子的酶浓缩步骤的在工作台上制备的 DBS 提取物中, α -葡糖苷酶(Pompe) 和 β -半乳糖苷酶(Fabry) 酶活性的图的实例;

[0038] 图 10A 和图 10B 分别显示在用水, 0.1% Tween® 20 (EXT) 或 PBS pH6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20 在工作台上制备的 DBS 提取物中, 艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter) 和 α -L-艾杜糖醛酸酶(Hurler) 酶活性的图的实例;

[0039] 图 11A 和图 11B 分别显示在用水, 0.1% Tween® 20 (EXT) 或 PBS pH6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20 且用 ConA 珠子的酶浓缩步骤在工作台上制备的 DBS 提取物中, 艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter) 和 α -L-艾杜糖醛酸酶(Hurler) 酶活性的图的实例;

[0040] 图 12A 和图 12B 分别显示在具有或不具有使用 ConA 珠子的酶浓缩步骤在工作台上制备的 DBS 提取物中, 艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter) 和 α -L-艾杜糖醛酸酶(Hurler) 酶活性的图的实例;

[0041] 图 13 显示在血浆的热灭活期间的温度曲线图的实例;

[0042] 图 14 显示在热处理的血浆中的 α -半乳糖苷酶活性(Fabry) 的图的实例;

[0043] 图 15 显示在热处理的血浆中的 β -葡糖苷酶活性(Gaucher) 的图的实例;

[0044] 图 16 显示在热处理的血浆中的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶活性(Hunter) 的图的实例;

[0045] 图 17 显示在热处理的血浆中的酸性鞘磷脂酶活性(Niemann Pick) 的图的实例;

[0046] 图 18 显示在热处理的血浆中的酸性 α -葡糖苷酶活性(Pompe) 的图的实例;

[0047] 图 19 显示用于新生儿测试(例如, 用于 LSD 测试) 的干血斑(DBS) 质量控制(QC) 材料的生产的全血池(pool) 制备操作流程的实例的高度概述的流程图; 以及

[0048] 图 20 显示用于制备用于新生儿测试的 DBS 样品的质量控制血液池组成的实例。

[0049] 7 描述

[0050] 本发明提供浓缩生物样品中的糖蛋白(例如, 酶) 用于新生儿代谢疾病的测试的方法。在各种实施方式中, 在进行一种或多种新生儿筛查分析(例如, 酶法测定) 之前, 固定在固体载体上的伴刀豆球蛋白 A(ConA) 可以被用于浓缩生物样品中的 N-糖基化的蛋白质(例如, 酶)。在一个实施方式中, 在装载到滴致动器上之前, 用于新生儿代谢疾病的测试的样品可以用在工作台上的糖蛋白浓缩操作流程来制备。在另外的实施方式中, 生物样品中的糖蛋白的浓缩可以直接在滴致动器上来进行。在各种实施方式中, 本发明包括用于浓缩生物样品中的酶活性的方法, 比如新鲜血液和 / 或血浆样品和干血和 / 或血浆样品。本发明的方法大体上减少了污染物(例如, 分析抑制物) 且增加了生物样品中的靶标蛋白(例如, 酶)

浓度。本发明的方法提供在新生儿筛查分析(例如,酶法测定)和其它诊断测试中的改进的灵敏度。

[0051] 在一个实例中,本发明的方法可以用于样品制备,所述样品制备用于基于酶-底物的生物分析比如用于溶酶体贮积病(LSD)的NBS分析。在通过特定的天冬酰胺残基处的高的甘露寡糖的合成过程中(N-糖基化),使溶酶体酶改性。由于溶酶体酶是N-糖基化的,使用ConA的固定可以被用于富集且浓缩复杂生物样品中的酶,比如干血斑(DBS)样品。

[0052] 在另外的实例中,本发明的方法可以用于减少,优选地完全消除污染物,所述污染物可以抑制酶活性且在筛查分析(例如,NBS分析)和诊断测试中造成假阳性读数。在各种实施方式中,在进行筛选分析或诊断测试之前,磁性响应的ConA珠子被用于减少,优选地完全消除污染物,且浓缩生物样品中的N-糖基化分子。

[0053] 7.1 酶浓缩

[0054] 伴刀豆球蛋白A(ConA)是特异性结合包含在C3、C4和C6位置处的未改性的羟基残基的葡萄糖和/或甘露糖残基(即高甘露糖类型、杂合类型和双触角(bi-antennary)复合物类型的N-聚糖)的凝集素。在一个实例中,固定在磁性响应珠子上的ConA可以被用于从复杂的生物样品中富集N-糖基化的蛋白质(即,在它们的寡糖侧链中包含甘露糖残基的蛋白质)。N-糖蛋白非共价地结合到ConA上,而没有活性和/或稳定性的损失。非糖基化的分子和O-糖基化的分子没有被ConA结合,且在后续的步骤中从样品中被除去。由于ConA结合的N-糖蛋白是有效的/稳定的,因此可以直接分析珠子结合的酶活性(例如溶酶体酶活性)。可选择地,在分析之前,结合的糖蛋白(例如,溶酶体酶)可以从ConA珠子上被释放。通过ConA固定来富集N-糖基化的蛋白质(例如,溶酶体酶)可以被用于大体上改进复杂生物样品比如DBS样品中的较不丰富的N-糖基化的蛋白质的检测。

[0055] 在一个实施方式中,ConA磁性响应珠子比如SiMAG-ConA珠子(可从chemicell GmbH购得)和洗脱缓冲液化学成分(chemistries)可以被用于富集且纯化N-糖基化的蛋白质。在一个实施方式中,通过与糖(例如,甲基- α -D-吡喃甘露糖苷)竞争,结合到SiMAG-ConA磁性响应珠子上的N-糖基化的蛋白质(例如,溶酶体酶)可以从珠子上被释放(洗脱)。在另外的实例中,糖模拟物可以用于从磁性响应ConA珠子上洗脱N-糖基化的蛋白质(例如,溶酶体酶)。图1显示作为ConA-碳水化合物结合的有效抑制剂(竞争剂)的糖模拟物(NSC120634)的实例的结构100。在抑制ConA-碳水化合物结合的方面,在美国国家癌症研究院多样性集合(National Cancer Institute Diversity Set)中的化合物NSC120634比甲基- α -D-吡喃甘露糖苷要至少有效20倍。糖模拟物比如NSC120634可以被用于有效地洗脱结合到磁性响应ConA珠子上的新生儿筛查酶靶标(例如,溶酶体酶)。

[0056] 在另外的实施方式中,定位在磁性响应珠子和ConA之间的可断裂的键可以被用于从磁性响应珠子上释放(洗脱)ConA结合分子。图2阐述方法200,所述方法是使ConA结合分子从磁性响应珠子上释放的方法的实例。磁性响应珠子210可以被涂覆有锚分子212,所述锚分子与ConA或ConA的改性形式形成可容易地断裂的键214。通过与ConA结合,N-糖基化的蛋白质216可以被锚定在磁性响应珠子210上。N-糖基化的蛋白质216可以是例如溶酶体酶。ConA结合的N-糖基化的蛋白质216复合物可以通过可断裂的键214的断裂(断开)从磁性响应珠子210上被释放。

[0057] 在一个实施方式中,可容易地断裂的键可以用生物素-链霉亲和素偶联来形成。

在一个实例中,锚分子 212 可以是与生物素化的 ConA 形成可断裂的键 214 的链霉亲和素分子。在可断裂的键 214 断开时,释放生物素化的 ConA-糖基化的蛋白质 216 复合物。在另外的实例中,锚分子 212 可以是与链霉亲和素改性的 ConA 形成可断裂的键 214 的生物素分子。在可断裂的键 214 断开时,释放链霉亲和素-ConA-糖基化的蛋白质 216 复合物。ConA-蛋白质复合物(例如, [生物素]-[ConA]-[蛋白质] 或 [链霉亲和素]-[ConA]-[蛋白质])可以与磁性响应珠子分离且用在工作台上或在致动器上的 NBS 分析操作流程来分析。

[0058] 7.1.1 在工作台上的浓缩操作流程

[0059] 在一个实施方式中,用于新生儿代谢疾病的测试的样品可以用磁性响应 ConA 珠子在工作上来制备,以浓缩 N-糖基化的蛋白质。浓缩的样品可以随后从 ConA 珠子上被释放,且用在工作台上的 NBS 分析操作流程来分析或装载到滴致动器的流体储存器上且用数字微流体 NBS 分析操作流程来分析。

[0060] 对于 N-糖基化的蛋白质(例如,酶),使用磁性响应 ConA 珠子(例如, SiMAG-ConA 珠子)和 DBS 提取物的在工作台上的浓缩操作流程的实例可以包括但不限于以下步骤:将 3mm DBS 样品穿透物(sample punch)放入 96 孔的圆底板的一个孔中的 100 μ L 的提取缓冲液(例如 PBSpH6.0, 0.1%w/v Tween® 20)中,且在定轨振荡器(orbital shaker)上室温孵育 30 分钟。可以提取多个 DBS 样品穿透物,以提供用于多个 ConA 珠子结合反应的充足的样品体积。例如,对于 12 个 ConA 珠子结合反应,可以提取 14 个 DBS 穿透物,以提供用于将珠子结合体积调节至 100 μ L 的额外的提取物。在提取结束时,将一小份 100 μ L 的 DBS 提取物添加到包含磁性响应 ConA 珠子的一定量(例如,约 1 μ L 至约 10 μ L 至约 20 μ L)的管中且用翻转式旋转(end-over-end rotation)室温孵育约 30 分钟。用磁铁将磁性响应 ConA 珠子收集到管的底部。从管中用移液管吸取包含未结合的材料的上清液(例如,约 100 μ L)且丢弃。可以直接分析珠子结合的酶活性,或在分析之前可以使结合的糖蛋白(酶)从 ConA 珠子上被释放。为了评估珠子结合的酶活性,将 10 μ L 的包含 0.1%Tween20 的 1mM 乙酸盐缓冲液 pH5.0 添加到管中,到珠子上,且将重新悬浮的珠子转移到 96 孔微量滴定板的单独的孔中。可选择地,可以将重新悬浮的珠子(约 10 μ L)装载到滴致动器的流体储存器上,且用数字微流体 NBS 分析操作流程来分析。在分析之前,为了从 ConA 珠子(例如, SiMAG-ConA 珠子)上释放结合的分子,可以使收集的珠子重新悬浮在例如约 10 μ L 的洗脱缓冲液中,所述洗脱缓冲液包含充足浓度的竞争分子比如糖甲基- α -D-吡喃甘露糖苷,且用偶尔轻弹孵育 10 分钟。在孵育期结束时,可以用磁铁将磁性响应 ConA 珠子收集在管的底部中。可以从管中取出洗脱液(约 10 μ L)且放入 96 孔板的单独的孔中,用于随后的在工作台上的分析。可选择地,可以将洗脱液(约 10 μ L)装载到滴致动器的流体储存器上,且用数字微流体 NBS 分析操作流程来分析。

[0061] 7.1.2 在致动器上的浓缩操作流程

[0062] 在另外的实施方式中,使用在滴致动器上的 ConA 磁性响应珠子,可以浓缩且收集用于新生儿代谢疾病的测试的样品。珠子浓缩操作流程可以用于将样品体积中的 N-糖基化蛋白质浓缩且收集在流体储存器中,所述流体储存器与开口流体相通,用于使液体从储存器流动到滴致动器的滴操作缝隙中。滴致动器的样品输入分配电极和储存器可以被设计,用于较大的样品输入体积(例如,约 80 至约 200 μ L)。一个或多个磁铁可以邻近样品输

入分配电极和储存器被布置,用于磁性响应珠子(例如,磁性响应 ConA 珠子)的一定量的浓缩和收集。磁铁可以是固定的磁铁或可移动的磁铁。

[0063] 在一个实例中,珠子浓缩操作流程可以用于将样品体积中的 N-糖基化的蛋白质浓缩且收集在不在致动器上的样品储存器中。在将样品装载到不在致动器上的样品储存器上之前,磁性响应 ConA 珠子的一定量(例如,约 2 至 3 μ L)可以被添加到大样品体积(例如,约 100 μ L 至约 200 μ L)中,所述不在致动器上的样品储存器与开口流体相通,用于使液体从储存器流动到滴致动器的滴操作缝隙中。然后,可以在致动器上用珠子浓缩操作流程将大体积样品处理成 1X 至 4X 滴(即,约 100nL 至约 1320nL 的滴,取决于滴操作电极的尺寸)。在其它实例中,大的样品体积可以被浓缩在致动器上的样品储存器中。在这个实例中,使用包含磁性响应 ConA 珠子的一定量的单个试剂滴,可以在致动器上的样品储存器中顺序地孵育一系列的样品滴(例如,660nL 样品滴)。可以用专门的混合电极来促进珠子混合。由于数字微流体的灵活性和可编程性,样品处理操作流程可以容易被改编,用于在致动器上的样品处理、不在致动器上的样品处理或样品处理的任何组合。形成浓缩的磁性响应珠子滴后,其可以在滴致动器内经历其它的滴操作(例如,珠子洗涤和珠子结合分子的洗脱;数字微流体 NBS 分析操作流程)。

[0064] 对于 N-糖基化的蛋白质,使用磁性响应 ConA 珠子和 DBS 提取物的不在致动器上的浓缩操作流程的实例包括但不限于以下步骤:将一个 3mm DBS 样品穿透物放入在 96 孔的圆底板中的一个孔中的 100 μ L 的提取缓冲液(例如 PBS pH6.0, 0.1%w/v Tween® 20)中,且在定轨振荡器上室温孵育 30 分钟。提取结束时,将一小份的 100 μ L DBS 提取物添加到包含磁性响应 ConA 珠子的一定量(例如,约 1 至约 20 μ L)的管中,且将包含珠子的样品转移到样品储存器中,所述样品储存器与开口流体相通,用于使液体从储存器流动到滴致动器的滴操作缝隙中。然后,可以在致动器上用珠子浓缩操作流程将大体积样品孵育且处理成较小的样品滴,处理成 1X 至 4X 滴(即,约 100nL 至约 1320nL 的滴,取决于滴操作电极的尺寸)。可以直接分析珠子结合的酶活性,或在分析之前可以使结合的糖蛋白(酶)从 ConA 珠子上被释放,例如使用珠子洗涤和洗脱操作流程。可以将浓缩的样品分配到一个或多个子样品中且用一种或多种数字微流体 NBS 分析操作流程来分析。

[0065] 7.1.3 用于 DBS 样品的珠子结合和洗脱参数

[0066] 在用于使用磁性响应 ConA 比如 SiMAG-ConA 珠子的 DBS 样品的浓缩操作流程中可变化的参数可包括但不限于:DBS 提取缓冲液的组成和体积、DBS 穿透物的数目(例如,1 个、2 个或 3 个穿透物)、磁性响应 ConA 珠子的量(例如,1、5、10 或 20 μ L)、珠子孵育时间(例如,15、30 或 60 分钟)、结合缓冲液的组成(例如,甘露糖;NaCl;EDTA 对螯合金属离子和金属离子比如 ZnCl 的随后添加)以及洗脱缓冲液的组成(例如,10、20、50mM 或更高浓度的甲基- α -D-吡喃甘露糖苷;1mM 乙酸盐 pH5.5)。

[0067] 为了评估提取缓冲液组成和 ConA-珠子体积在 NBS 分析中的影响,从质量控制(QC)的干血斑样品(即,基础池(QC-BP)、低活性样品(QC-低)、中等活性样品(QC-中)及高活性样品(QC-H))制备 DBS 提取物。如参考图 19 所描述地制备 QC 样品。基础池(BP)QC 样品是从用血清调节至 50% 血细胞比容(hematocrit)的去白细胞(leukoreduced)的人红细胞的池中制备的。高(H)活性 QC 样品是从用血清调节至 50% 血细胞比容的汇集(pooled)的脐带血中制备的。BP 样品被用作对全血细胞溶酶体酶无特异性的水解的对照(背景对照)。

将每一个 DBS 样品置于 96 孔板的单独的孔中。用包含 0.1% Tween® 20 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) pH6.0 ; 包含 0.1% Tween® 20 的水 ; 或包含 0.1% Tween® 20 的 1mM 乙酸盐、50mM NaCl pH5.5 作为提取缓冲液来制备 DBS 样品的提取物。DBS 提取物用在工作台上的分析操作流程来进行 Niemann Pick、Gaucher、Krabbe、Pompe、Fabry、Hunter 和 Hurler 疾病的分析。

[0068] 在使用 DBS 样品的 NBS 分析中, 用于评估提取缓冲液组成和 ConA- 珠子体积的效果的在工作台上的分析操作流程包括但不限于以下步骤 : 将 3mm 的 DBS 样品穿透物置于 96 孔圆底板的单独孔中的 100 μ L 提取缓冲液 (例如, PBS pH6.0, 0.1%w/v Tween® 20 ; 水, 0.1% Tween® 20 ; 或 1mM 乙酸盐、50mM NaCl pH5.5, 0.1% Tween® 20) 中, 且在定轨振荡器上室温孵育 30 分钟。在提取结束时, 从每一个孔中将 100 μ L 的 DBS 提取物转移到包含磁性响应 SiMAG-ConA 珠子的一定量 (例如, 20、10、5 或 1 μ L) 的单独的管中且用翻转式旋转室温孵育 25 至 30 分钟。将一小份 10 μ L 的每一提取物上清液从管中转移至 96 孔板的单独的孔中。将每一个管中的剩下的上清液转移至废弃物中。将珠子重新悬浮在 10 μ L 的包含 0.1% Tween20 的 1mM 乙酸盐缓冲液 pH5.0 中且转移至 96 孔板的单独的孔中。将小份的珠子对照 (即, 洗涤且重新悬浮在 10 μ L 的包含 0.1% Tween20 的 1mM 乙酸盐缓冲液 pH5.0 中的仅 20、10、5 或 1 μ L 的 ConA 珠子) 置于 96 孔板的指定孔中。将酶底物 (10 μ L) 添加到每一个样品和对照孔中且在定轨振荡器上混合 20 秒。反应在 37°C 下孵育 20 小时 (过夜)。在孵育期结束时, 将 50 μ L 终止缓冲液添加到所有样品和对照孔中, 并读取荧光。

[0069] 图 3 显示图 300, 图 300 是使用 DBS 在用于酸性鞘磷脂酶活性的 Niemann Pick 分析中的提取缓冲液组成和 ConA 珠子体积的效果图的实例。与图 300 有关的数据显示在表 1 中。在 Niemann Pick 分析中, 终止缓冲液为具有 0.25%w/v Triton X-100 的 0.2M 碳酸氢钠 pH10.1。在 Niemann Pick 分析中, HMU 底物为 6- 十六酰基 -4- 甲基伞形酮 (methylumbelliferyl) - 磷酸胆碱 (HMU-PC ; 可从 Moscerdam Substrates 购得)。5.6mM HMU-PC 储备溶液是在 NP 缓冲液 (具有 0.5% (w/v) 牛磺胆酸钠盐水和 0.25mM 氯化锌的 0.1M 乙酸盐缓冲液, pH5.2) 中制备的。HMU-PC 储备溶液在 60°C 水浴中短暂加热 (直到澄清)、分成小份且在 -80°C 下储存。Niemann Pick 底物的工作液是通过在 60°C 下加热冷冻的小份 HMU-PC 储备溶液直到澄清, 且用 100 μ L NP 缓冲液将 20 μ L 储备底物稀释至 120 μ L 的最终体积来制备的。立即使用 Niemann Pick 底物的工作液。以 75 的增益, 在 400/460 激发 / 发射下读取 HMU 荧光。数据表明, 与 QC-BP 样品 (背景对照) 相比, DBS 穿透物在乙酸盐提取缓冲液 (1mM 乙酸盐、50mM NaCl pH5.5, 0.1% Tween® 20) 中的提取在 QC-H 上清液样品中提供更高水平的酶活性。然而, 与 QC-BP 样品 (背景对照) 相比, DBS 穿透物在 PBS 提取缓冲液 (包含 0.1% Tween® 20 的 PBS pH6.0) 的提取在所有 QC-H 样品 (即 10、5 或 1 μ L ConA 珠子) 中提供更高水平的珠子结合的酶活性。使用 10 μ L ConA 珠子, 在 PBS 缓冲液中提取的 QC-H DBS 样品中观察到最高水平的珠子结合的酶活性。

[0070]

μL 珠子	QC-H			QC-BP			珠子对照
	PBS	水	乙酸盐	PBS	水	乙酸盐	
10 μL 上清液*	7441	10600	12665	6532	6673	5777	
10 μL 珠子†	72208	52870	63019	11126	12916	11839	9336
5 μL 上清液	9427	12076	11241	6133	6495	6444	
5 μL 珠子	43454	34897	42280	9931	10875	13433	9340
1 μL 上清液	93352§	13890	14112	5876	6262	6115	
1 μL 珠子	19422	17297	18483	9587	10433	10171	11119

[0071] * 上清液 : 没有结合到 ConA 珠子上的酶活性 ; † 珠子 : 结合到 ConA 珠子上的酶活性 ; § 数据点与其它试验数据不一致且在确定试验结论时被摒弃。

[0072] 图 4 显示图 400, 图 400 是使用 DBS 在用于半乳糖脑苷酯酶活性的 Krabbe 分析中的提取缓冲液组成和 ConA 珠子体积的效果图的实例。与图 400 有关的数据显示在表 2 中。在 Krabbe 分析中, 终止缓冲液为具有 0.25%w/v Triton X-100 的 0.2M 碳酸氢钠 pH10.1。在 Krabbe 分析中, HMU 底物为 6- 十六酰氨基 -4- 甲基伞形酮 - β -D- 半乳糖苷 (HMU- β Gal ; 可从 Moscerdam Substrates 购得)。HMU- β Gal 储备膜是通过在玻璃小瓶中合并 42 μL 的在 2:1 氯仿 : 甲醇 (v/v) 中的 12.7mM HMU- β Gal 储备溶液和 8.04 μL 纯油酸、200 μL 的在 2:1 氯仿 : 甲醇中的 10%(w/v) 牛磺胆酸钠和 75 μL 的 2:1 氯仿 : 甲醇且激烈涡旋来制备的。将小份样品 (100 μL) 转移到小的玻璃瓶中且在化学通风橱中干燥过夜。在 -80°C 下储存干燥膜, 持续长达 6 个月。Krabbe 底物的工作液是通过以下来制备的 : 将一个膜 (一个小瓶) 重构在 100 μL 0.1M/0.2M 柠檬酸盐 / 磷酸盐缓冲液 pH5.2 中且激烈涡旋 30 至 60 秒, 直到形成胶束, 如通过细的、浑浊的外观所显示的。立即使用 Krabbe 底物的工作液。以 75 的增益, 在 400/460 激发 / 发射下读取 HMU 荧光。数据表明, 相对于在 QC-BP 上清液样品中的酶活性, 添加到在 PBS、水或乙酸盐提取缓冲液中提取的 QC-H DBS 样品中的 20 μL ConA 珠子大体上从上清液中除去了半乳糖脑苷酯酶活性。小份的 10 μL ConA 珠子还可以足以显著地除去样品上清液中的酶。

μL 珠子	QC-H			QC-BP			珠子对照
	PBS	水	乙酸盐	PBS	水	乙酸盐	
10 μL 上清液*	3180	4168	3439	2391	2409	2233	
10 μL 珠子†	15602	19735	15611	3776	3760	2670	4662
20 μL 上清液	2620	2860	2795	2261	2391	2366	
20 μL 珠子	25982	19739	11966	3151	2030	0 (无底物)	3772

[0073] * 上清液 : 没有结合到 ConA 珠子上的酶活性 ; † 珠子 : 结合到 ConA 珠子上的酶活性

[0074] 为了评估 NBS 分析中的洗脱缓冲液组成的影响, 用包含 0.1% Tween® 20 的 PBS pH6.0 作为提取缓冲液来制备 QC-H 和正常的 (没有热变性的) DBS 提取物。图 5A 和图 5B 分

别显示图形 500 和图 550, 它们是使用 DBS 在 Niemann Pick 分析中的洗脱缓冲液组成的效果的图形和图的实例。与图形 500 和图 550 有关的数据显示在表 3 中。在工作台上的分析包括以下步骤: 将一个 3mm DBS 样品穿透物置于在 96 孔圆底板中的单独的孔中的 100 μ L 的 PBS pH6.0, 0.1%w/v Tween® 20 中, 且在定轨振荡器上室温孵育 30 分钟。在提取结束时, 从每一个孔中将 100 μ L 的 DBS 提取物转移至包含 10 μ L 的磁性响应 SiMAG-ConA 珠子的单独管中且用翻转式旋转室温孵育 30 分钟。将管子置于磁铁上且将磁性响应 ConA 珠子收集在管的底部。从管中除去上清液(约 100 μ L)且丢弃。将珠子重新悬浮在 10 μ L 的包含在含有 0.1%w/v Tween20 的 PBS pH6.0 中的 10、20 或 50mM 甲基- α -D-吡喃甘露糖苷的洗脱缓冲液中且用偶尔轻弹孵育 10 分钟。在孵育期结束时, 将管子置于磁铁上且将磁性响应 ConA 珠子收集在管的底部。从每一个管中取出洗脱液(约 10 μ L)且置于 96 孔板的单独的孔中。将 Niemann Pick 酶底物(在 100 μ L Niemann Pick(NP)缓冲液中的 10 μ L; 20 μ L 底物储备)添加到每一个样品孔中且在定轨振荡器上混合 20 秒。反应在 37°C 下孵育 20 小时(过夜)。在孵育期结束时, 将 50 μ L 的终止缓冲液(包含 0.25% Triton X 的 0.2M 碳酸氢钠 pH10.1)添加到所有样品中且以 75 的增益在 400/460 激发/发射下读取 HMU 荧光读数。数据表明, 增加甲基- α -D-吡喃甘露糖苷的浓度使酸性鞘磷脂酶活性从 ConA 珠子释放到样品洗脱液中。数据还表明, 高达 50mM 的甲基- α -D-吡喃甘露糖苷的存在没有抑制酶分析。可以选择更高浓度的甲基- α -D-吡喃甘露糖苷, 以大体上增加结合的酶活性从 ConA 珠子的释放(即, 比 25% 的 QC-H 值大)。

表 3. 洗脱缓冲液组成对 Niemann Pick 分析的影响

正常 (141) 提取	17956, 18785		洗脱液	珠子
QC-H	14568, 13502	无洗脱	9462	58163
		10 mM	13876	50635
正常珠子	68898	20 mM	16486	48916
正常漂浮物	11113	50 mM	20340	44573

[0076]

[0077] 图 6 显示条形图 600, 条形图 600 是使用 DBS 在用于酸性 β -D-葡糖苷酶活性的 Gaucher 分析中的洗脱缓冲液组成的效果条形图的实例。在 Gaucher 分析中, 终止缓冲液为具有 0.01% (w/v) Tween20 的 0.2M 碳酸氢钠 pH10.0。在 Gaucher 分析中, 4-MU 底物为 4-甲基伞形酮- β -D-吡喃葡萄糖苷(4-MU- β -Gluc)。700mM 4-MU- β -Gluc 储备溶液是在 DMSO 中制备的且在 -80°C 下以单用的小份储存。为了制备 Gaucher 酶底物的工作液, 将 4 μ L 的 4-MU- β -Gluc 储备溶液添加到包含 1.5% (w/v) 牛磺胆酸钠和 0.01% (w/v) Tween20 的 0.1M/0.2M 乙酸盐/磷酸盐缓冲液 pH5.2 中。充分混合工作底物溶液且立即使用。对于 Gaucher 分析, 将 3 个 QC-H DBS 样品穿透物置于在 96 孔圆底板中的单独的孔中的 100 μ L 的 PBS pH6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20) 中, 且在定轨振荡器上室温孵育 30 分钟。在提取结束时, 将 QC-H 提取物汇集在单个管中。对于 SiMAG-ConA 珠子结合程序, 将 100 μ L 小份的汇集 QC-H DBS 提取物转移至 2 个单独的管中, 每一个管包含 10 μ L ConA 珠子且用翻转式旋转室温孵育 30 分钟。将包含 100 μ L 的汇集的 QC-H DBS 提取物的第三个管子用作未结合的对照。将包含 ConA 珠子的管子置于磁铁上且将磁性响应 ConA 珠子收集在管的底部。将小份的每一种上清液(约 10 μ L)转移至 96 孔板的指定孔中。丢弃剩下的上清液。将一个管子中的珠子重新悬浮在 10 μ L 的包含 0.1% (w/v) Tween20 的 1mM 乙酸盐缓冲液 pH5.5

中且置于 96 孔板的指定孔中。在第二个管子中的珠子被重新悬浮在 10 μ L 的包含 10mM 甲基 - α -D- 吡喃甘露糖苷的洗脱缓冲液 (PBS pH6.0, 0.1% (w/v) Tween20) 中且在旋转器平台上孵育 10 分钟。在孵育期结束时, 将管子置于磁铁上且将磁性响应 ConA 珠子收集在管的底部。从管中取出洗脱液 (约 10 μ L) 且置于 96 孔板的单独的孔中。将洗脱的珠子重新悬浮在 10 μ L 的包含 0.1% (w/v) Tween20 的 1mM 乙酸盐缓冲液 pH5.5 中且置于 96 孔板的指定孔中。将两小份 (约 10 μ L) 的未结合的汇集的 QC-H DBS 提取物转移至 96 孔板的指定孔中。将酶底物 (10 μ L) 添加到每一个样品和对照孔中且在定轨振荡器上混合 20 秒。反应在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20 小时 (过夜)。在孵育期结束时, 将 50 μ L 终止缓冲液添加到所有样品和对照孔中, 并以 50 的增益在 360/460 激发 / 发射下读取 4-MU 荧光。数据表明, 在 DBS 提取物中的酸性 β -D- 葡萄糖苷酶活性被 SiMAG-ConA 珠子结合, SiMAG-ConA 珠子浓缩酶活性, 使酶活性相对于未结合的汇集的 DBS 提取物增加约 6-7X。对于结合到磁性响应 ConA 珠子的 Gaucher 酶 (酸性 β -D- 葡萄糖苷酶) 的充分洗脱, 可能需要大于 10mM 的甲基 - α -D- 吡喃甘露糖苷。

[0078] 为了评估提取缓冲液和 ConA 珠子结合对 α - 葡萄糖苷酶 (Pompe) 和 β - 半乳糖苷酶 (Fabry) 酶活性的影响, 在 PBS pH6.0, 0.1% w/v Tween[®] 20 或水, 0.1% Tween[®] 20 中提取 QC-BP、QC-低、QC-Med 和 QC-H DBS 样品。在工作台上的分析操作流程包括以下步骤: 对于每一个 DBS QC 样品 (即 QC-BP、QC-低、QC-Med 和 QC-H), 在 96 孔圆底板的单独孔中在 100 μ L 每份水 0.1% Tween[®] 20 中或在 100 μ L 每份 PBS pH6.0, 0.1% (w/v) Tween[®] 20 中提取三个穿透物。在定轨振荡器上室温孵育 DBS 穿透物 30 分钟。在提取结束时, 汇集每一个 QC-BP、QC-低、QC-Med 和 QC-H 样品的提取物。将两小份 10 μ L 的每一个汇集的 DBS 样品转移至 96 孔微量滴定板的单独孔中 (即, 两小份的在提取缓冲液中制备的未结合的提取物和在 PBS pH6.0, 0.1% (w/v) Tween[®] 20 中制备的未结合的提取物)。将第二组的两小份 100 μ L 的每一个汇集的 DBS 样品转移至包含 10 μ L 的磁性响应 SiMAG-ConA 珠子的单独的管中且用翻转式旋转室温孵育 30 分钟。将管子置于磁铁上且将磁性响应 ConA 珠子收集在管子的底部。从管中取出上清液 (约 100 μ L) 且丢弃。将珠子重新悬浮在 10 μ L 的分析缓冲液中且转移至 96 孔微量滴定板的单独的孔中。将酶底物 (10 μ L) 添加到每一个样品孔中且在定轨振荡器上混合 20 秒。对于 α - 葡萄糖苷酶 (Pompe) 分析, 4-MU 底物为 4- 甲基伞形酮 - α -D- 吡喃葡萄糖苷。为了制备 Pompe 酶底物的工作液, 将 30 μ L 的 Pompe 抑制剂 (在 197 μ L 的 Pompe 缓冲液中的 3 μ L 抑制剂储备) 和 21.4 μ L 的 Pompe 酶底物添加到 247.4 μ L 的 Pompe 缓冲液中。对于 β - 半乳糖苷酶 (Fabry) 分析, 4-MU 底物为 4- 甲基伞形酮 - α -D- 吡喃半乳糖苷。为了制备 Fabry 酶底物的工作液, 将 60 μ L 的 Fabry 抑制剂和 3.2 μ L 的 Fabry 酶底物添加到 235.8 μ L 的 Fabry 缓冲液中。反应在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20 小时 (过夜)。在孵育期结束时, 将 50 μ L 终止缓冲液 (具有 0.01% (w/v) Tween20 的 0.2M 碳酸氢钠 pH10.0) 添加到所有样品孔中且以 50 的增益在 360/460 激发 / 发射下读取荧光。

[0079] 图 7A 和图 7B 分别显示图 700 和 750, 它们是在用水, 0.1% Tween[®] 20 (EXT) 或 PBS pH6.0, 0.1% (w/v) Tween[®] 20 在工作台上制备的 DBS 提取物中的 α - 葡萄糖苷酶 (Pompe) 和 β - 半乳糖苷酶 (Fabry) 的酶活性的图的实例。与图 7A 有关的数据显示在表 4 中。与图 7B 有关的数据显示在表 5 中。

[0080] 表 4. DBS 提取缓冲液组成对 Pompe 分析的影响

水, 0.1% Tween® 20 (EXT)				PBS pH 6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20			
QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H	QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H
393	438	1523	2834	293	443	1647	2644
400	455	1518	2863	290	430	1609	2658
Ave*: 397	Ave:447	Ave:1521	Ave:2849	Ave:292	Ave:437	Ave:1628	Ave:2651

[0081] *Ave= 平均

[0082] 表 5. DBS 提取缓冲液组成对 Fabry 分析的影响

水, 0.1% Tween® 20 (EXT)				PBS pH 6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20			
QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H	QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H
408	458	1953	4417	302	471	1887	3805
421	457	2002	5011	305	476	1905	3733
Ave*: 415	Ave:458	Ave:1978	Ave:4714	Ave:304	Ave:474	Ave:1896	Ave:3769

[0083] *Ave= 平均

[0084] 图 8A 和图 8B 分别显示图 800 和 850, 它们是在用水, 0.1% Tween® 20(EXT)或 PBS pH6.0, 0.1%(w/v) Tween® 20 和使用 ConA 珠子的酶浓缩步骤在工作台上制备的 DBS 提取物中的 α -葡糖苷酶(Pompe)和 β -半乳糖苷酶(Fabry)的酶活性的图的实例。与图 8A 有关的数据显示在表 6 中。与图 8B 有关的数据显示在表 7 中。数据表明在 PBS pH6.0, 0.1%(w/v) Tween® 20 中提取的 DBS 样品中, α -糖苷酶(Pompe)和 β -半乳糖苷酶(Fabry)酶与 ConA 珠子的结合增加。

[0085] 表 6. 在 Pompe 分析中, DBS 提取缓冲液组成对 ConA 珠子结合的影响

水, 0.1% Tween® 20 (EXT)				PBS pH 6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20			
QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H	QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H
648	609	3161	7314	835	1421	8136	16785

[0086] 表 7. 在 Fabry 分析中, DBS 提取缓冲液组成对 ConA 珠子结合的影响

水, 0.1% Tween® 20 (EXT)				PBS pH 6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20			
QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H	QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H
6336	3537	16678	30489	2077	5234	20499	47078

[0087] 图 9A 和图 9B 分别显示图 900 和 950, 它们是具有或不具有使用 ConA 珠子的酶浓缩步骤的在工作台上制备的 DBS 提取物中的 α -葡糖苷酶(Pompe)和 β -半乳糖苷酶(Fabry)的酶活性的图的实例。在这个实例中, 用 PBS pH6.0, 0.1%(w/v) Tween® 20 来制备 DBS 提取物。数据表明, 在使用 ConA 珠子结合浓缩步骤来进行的分析中, α -葡糖苷酶(Pompe)和 β -半乳糖苷酶(Fabry)酶活性增加。

[0088] 为了评估提取缓冲液和 ConA 珠子结合对艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter)和 α -L-艾杜糖醛酸酶(Hurler)酶活性的影响, 在 PBS pH6.0, 0.1%w/v Tween® 20 或水, 0.1% Tween® 20 中提取 QC-BP、QC-低、QC-Med 和 QC-H DBS 样品。在工作台上的分析操作流程与参考图 7 至图 9 及表 4 至表 7 所描述的基本相同, 除了以下变化: 在结合 ConA 珠子后, 在 Hunter 反应中的珠子被重新悬浮在 10 μ L 0.1M 乙酸盐 pH5 中且转移至 96 孔板的

指定孔中。在 Hurler 反应中的 ConA 珠子被重新悬浮在 0.04M 乙酸盐 pH3.5 中且转移至 96 孔板的指定孔中。对于艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter)分析,4-MU 底物为 4-甲基伞形酮- α -L-艾杜糖醛酸-2-硫酸酯。对于 α -L-艾杜糖醛酸酶(Hurler)酶分析,4-MU 底物为 4-甲基伞形酮- α -L-艾杜糖醛酸。

[0089] 图 10A 和图 10B 分别显示图 1000 和 1050,它们是在用水,0.1% Tween® 20 (EXT) 或 PBS pH6.0,0.1%(w/v) Tween® 20 在工作台上制备的 DBS 提取物中的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter)和 α -L-艾杜糖醛酸酶(Hurler)酶活性的图的实例。酶分析是在提取缓冲液中进行的。与图 10A 有关的数据显示在表 8 中。与图 10B 有关的数据显示在表 9 中。参考图 10A 和表 8,数据表明,在 PBS pH6.0,0.1%(w/v) Tween® 20 的 DBS 提取缓冲液中进行分析中,艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter)酶活性受到抑制。参考图 10B 和表 9,数据表明,与在水,0.1% Tween® 20 (EXT) 中进行的分析相比,在 PBS pH6.0,0.1%(w/v) Tween® 20 的 DBS 提取缓冲液中进行分析中, α -L-艾杜糖醛酸酶(Hurler)酶活性更高。

水, 0.1% Tween® 20 (EXT)				PBS pH 6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20			
QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H	QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H
359	486	2140	3702	153	135	128	125
351	479	2258	3688	150	135	130	128
Ave*: 355	Ave:483	Ave:2199	Ave:3695	Ave:152	Ave:135	Ave:129	Ave:127

[0091] *Ave= 平均

水, 0.1% Tween® 20 (EXT)				PBS pH 6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20			
QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H	QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H
247	337	1297	2476	338	566	2469	4155
253	330	1311	2491	339	568	2436	4105
Ave*: 250	Ave:334	Ave:1304	Ave:2484	Ave:339	Ave:567	Ave:2453	Ave:4130

[0093] *Ave= 平均

[0094] 图 11A 和图 11B 分别显示图 1100 和 1150,它们是在用水,0.1% Tween® 20 (EXT) 或 PBS pH6.0,0.1%(w/v) Tween® 20 和使用 ConA 珠子的酶浓缩步骤在工作台上制备的 DBS 提取物中的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter)和 α -L-艾杜糖醛酸酶(Hurler)酶活性的图的实例。酶分析是在 0.1M 乙酸盐 pH5 (Hunter 分析)和 0.04M 乙酸盐 pH3.5 (Hurler 分析)中进行的。与图 11A 有关的数据显示在表 10 中。与图 11B 有关的数据显示在表 11 中。参考图 11A 和表 10,数据表明,在 PBS pH6.0,0.1%(w/v) Tween® 20 中制备且在 0.1M 乙酸盐 pH5 中分析前用 ConA 珠子结合步骤浓缩的 DBS 提取物中的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter)酶活性与在水,0.1% Tween® 20 (EXT) 中制备的 DBS 提取物中的酶活性大体相同。参考图 11B 和表 11,数据表明,在 PBS pH6.0,0.1% (w/v) Tween® 20 中制备且在 0.04M 乙酸盐 pH3.5 中分析前用 ConA 珠子结合步骤浓缩的 DBS 提取物中的 α -L-艾杜糖醛酸酶(Hurler)酶活性高于在水,0.1% Tween® 20 (EXT) 中制备的 DBS 提取物中的酶活性。

[0095]		表 10. 在 Hunter 分析中, DBS 提取缓冲液组成对 ConA 珠子结合的影响							
		水, 0.1% Tween® 20 (EXT)				PBS pH 6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20			
QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H	QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H		
1376	1699	9188	14550	1608	2118	8817	16119		

[0096]		表 11. 在 Hurler 分析中, DBS 提取缓冲液组成对 ConA 珠子结合的影响							
		水, 0.1% Tween® 20 (EXT)				PBS pH 6.0, 0.1% (w/v) Tween® 20			
QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H	QC-BP	QC-低	QC-Med	QC-H		
640	1734	11814	24529	1654	3007	15528	31107		

[0097] 图 12A 和图 12B 分别显示图 1200 和 1250, 它们是具有或不具有使用 ConA 珠子的酶浓缩步骤的在工作台上制备的 DBS 提取物中的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter)和 α -L-艾杜糖醛酸酶(Hurler)酶活性的图的实例。在这个实例中, 用 PBS pH6.0, 0.1%(w/v) Tween® 20 来制备 DBS 提取物。数据表明, 在使用 ConA 珠子结合浓缩步骤来进行的分析中, 艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter)和 α -L-艾杜糖醛酸酶(Hurler)酶活性酶活性增加。

[0098] 7.2 分析方法

[0099] 数字微流体 NBS 酶测试是在滴致动器的油填充缝隙内的含水滴中进行。样品和分析试剂是在电极阵列(数字电湿润)上作为离散滴来操纵的。样品滴是血液或血液衍生的样品, 比如血浆、血清、组织、细胞部分及前述的处理、分级、浓缩和 / 或稀释的形式。其它生物流体可以被用作样品。生物流体的非限制性实例包括眼泪、精液、尿、唾液、羊水(amniotic liquid)及脑脊液。在进行一种或多种 NBS 分析之前, 生物流体例如 DBS 提取物可以被富集且浓缩。在一个实施方式中, 用于新生儿测试的样品可以用磁性响应 ConA 珠子在工作上来制备, 以浓缩 N-糖基化的蛋白质。浓缩的样品可以随后被装载到滴致动器的流体储存器上。在另外的实施方式中, 使用 ConA 磁性响应珠子, 可以在滴致动器的流体储存器上浓缩且收集用于新生儿测试的样品。浓缩的样品可以被分配成一个或多个子样品。在一些情况下, 子样品是单位尺寸的(unit-sized)的子样品。子样品可以接触一种或多种填充流体或被一种或多种填充流体包围。对于一种或多种 NBS 分析, 可以用数字微流体操作流程来分析样品。

[0100] 在一个实例中, 用在滴致动器上的基于滴的分析来鉴别溶酶体贮积病(LSD)的酶指示物(enzymatic indicator)。在一个实施方式中, 合适的糖苷酶活性的分析可以被用于检测特定糖苷酶的改变的活性, 其可以是特定的溶酶体贮积病(LSD)的指示物。酶缺陷和 LSD 的实例包括但不限于以下: 艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶的缺陷是 Hunter 疾病的诊断指示物; 酸性 β -D-葡萄糖苷酶或壳三糖酶(chitotriosidase)的缺陷是 Gaucher 疾病的诊断指示物; 酸性鞘磷脂酶或壳三糖酶的缺陷是 Niemann-Pick 疾病的诊断指示物; α -葡萄糖苷酶活性的缺陷是 Pompe 疾病的诊断指示物; α -半乳糖苷酶活性的缺陷是 Fabry 疾病的诊断指示物; α -L-艾杜糖醛酸酶的缺陷是 Hurler 疾病的诊断指示物; 硫酸乙酰肝素硫酸胺酶的缺陷是 Sanfilippo A (MPS IIIA) 的诊断指示物; α -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶的缺陷是 Sanfilippo B (MPS IIIB) 的诊断指示物; 芳基硫酸酯酶 A 的缺陷是异染性脑白质营养不良的诊断指示物; 且半乳糖脑苷酯酶(半乳糖神经酰胺 β -半乳糖苷酶)的缺陷是 Krabbe 疾病的诊断指示物。可以同时单个滴致动器上测试多种疾病和 / 或多个样品。为了增加分

析的灵敏度,在进行分析之前,可以用磁性响应 ConA 珠子来浓缩 N-糖基化的酶。

[0101] 用于在滴致动器上测试溶酶体贮积症病(例如, LSD)的分析试剂可以包括以下中的任何一种或多种:反应缓冲液、4-MU 酶底物、补充的第二种酶、分析特异性的抑制剂及终止缓冲液(例如,具有 0.01% Tween® 20 的 0.2M 碳酸氢钠 pH10.0)。4-MU 底物的实例包括但不限于 4-甲基伞形酮- α -L-艾杜糖(Iduronide)-2-硫酸酯(4-MU- α IdoA-2S), Hunter 底物;4-甲基伞形酮 α -D-吡喃半乳糖苷(4-MU- α Gal), Fabry 底物;4-MU- α -D-吡喃葡萄糖苷(4-MU- α -Gluc), Pompe 底物;4-甲基伞形酮- β -D-吡喃葡萄糖苷(4-MU- β -Gluc), Gaucher 底物;4-甲基伞形酮- α -L-艾杜糖钠盐(4-MU- α -Idu), Hurler 底物;4-三氟甲基伞形酮壳三糖苷(4-Trifluoromethylumbelliferylchitroside), Gaucher 和 Niemann-Pick 底物;4-甲基伞形酮- β -半乳糖(4-MU- β -半乳糖), Morquio B 底物;4-甲基伞形酮- α -N-磺基-D-氨基葡萄糖苷(MU- α GlcNS), Sanfilippo A(MPS IIIA) 底物;4-甲基伞形酮- α -D-N-乙酰氨基葡萄糖, Sanfilippo B(MPS IIIB);3-O-硫酸酯- β -D-半乳糖基-4-甲基伞形酮), 异染性脑白质营养不良(MLD) 底物;以及 6-十六酰氨基-4-甲基伞形酮- β -D-半乳糖苷(HMU- β Gal), Krabbe 底物。

[0102] 在一个实施方式中,本发明提供样品制备操作流程,其中在进行一种或多种 NBS 分析(例如,用于 LSD 的酶分析)之前,磁性响应 ConA 珠子被用于将样品富集且浓缩在滴致动器上。在一个实例中,在将样品装载到滴致动器盒子上的不在致动器上的样品储存器上之前,磁性响应 ConA 珠子的一定量(例如约 1 至约 20 μ L, 优选地约 10 μ L)可以被添加到大的样品体积(例如,约 100 至约 200 μ L)中。然后可以在致动器上使用珠子浓缩操作流程将大体积样品处理成 100 至 1320nL 的滴。在另外的实例中,使用包含磁性响应 ConA 珠子的一定量(例如,约 1 至约 10 μ L)的单个试剂滴,可以在致动器上的样品储存器中顺序地孵育一系列的样品滴(例如,100 至 660nL 样品滴)。浓缩的样品可以被分配成一个或多个子样品中。使用具有在滴操作缝隙中或在滴操作表面上的浓缩的样品滴的滴操作,分配且合并包含分析试剂的滴。用滴操作将合并的反应滴分割两个反应滴。使用滴操作,使一个反应滴与一个终止缓冲液滴合并。测量合并的滴的荧光($t=0h$)。孵育第二反应滴,持续预定的时间,且然后合并反应滴和终止缓冲液滴。测量终点荧光($t=$ 终止时间)。在这个实例中,分配且分析单个样品滴。然而,可以分配且分析任何数目的样品滴。

[0103] 7.3NBS 质量控制血液池和 DBS 样品的制备

[0104] 本发明提供制备用于干血斑(DBS)质量控制(QC)材料的生产的全血池的方法,所述干血斑(DBS)质量控制(QC)材料用于新生儿测试(例如,测试溶酶体贮积病;LSD)。

[0105] 本发明的方法包括一般的实验室安全预防措施的应用。例如,在处理所有的血液产品时,穿戴护目镜、防护手套(例如,橡胶手套)及实验工作服。所有生物样本在生物危害蒸压袋(autoclave bag)中被处置且处理丢弃的且有害的废弃物。例如,液体废弃物可以用漂白剂来处理。

[0106] 本发明的方法还包括标准样本收集、储存和处理流程的应用。例如,在样本收集期间使用抗凝剂比如肝素或 CPDA。立即打开收到的所有血液且在使用前储存在 4°C 至 6°C 下。血液的使用尽可能地接近收到日期。没有将收到时溶血(hemolysed)的任何血液用于制备全血池。血清(例如,冷冻的活性炭处理的人血清)被立即打开且在使用前储存在 -20°C 下。

[0107] 7.3.1 用于 QC-DBS 制备的血清的热处理

[0108] 将热灭活的血清用于血液基础池的制备,如参考图 19 所描述的。进行热灭活,以大体上减少可存在于血清中且干扰 NBS 分析(例如 LSD 分析)的酶活性。例如,艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(Hunter)和酸性鞘磷脂酶(Niemann Pick)活性在血清中是非常普遍的。为了评估热处理对存在于血清中的 LSD 酶活性的影响,热处理一定体积的血清(Sera-Con II)且在不同的时间点下在工作台上进行用于存在于血清中的 Fabry、Gaucher、Hunter、Niemann Pick 和 Pompe 酶活性的分析。在工作台上的分析包括以下步骤:在 4°C 下存储冷冻的 Sera-Con II 血清的 1L 瓶子,过夜。将水浴设为 55°C 且允许平衡。将血清瓶子浸入容器中,在流动的冷水下方,以完全解冻。将血清的解冻瓶子置于 55°C 水浴中且每 15 分钟记录血清的温度,直到血清达到 55°C。在 0、0.5、1、2、3 和 4 小时的时间点处取出小份的 1mL 血清。使用在工作台上的微量滴定板操作流程和合适的酶底物,对来自每一个时间点的血清一式三份地进行分析,分析存在于血清中的 Fabry、Gaucher、Hunter、Niemann Pick 和 Pompe 酶活性。在每一个分析板上的单排仅包含底物且被用作非酶法水解(NEH)的分析对照。反应在 37°C 下孵育 20 小时(过夜)。在孵育期结束时,将 50 μ L 终止缓冲液添加到所有样品中,并测定荧光。运行 4-MU 和 HMU 标准曲线,以计算酶活性。从原始值中减去 NEH 样品值。

[0109] 图 13 显示图 1300,图 1300 是在血清热灭活期间的温度曲线图的实例。将水浴设为 55°C 且允许平衡。将血清的解冻瓶子置于 55°C 水浴中且每 15 分钟记录血清的温度,直到血清达到 55°C。数据表明血清的温度是不稳定的,直到在水浴中孵育约 1 小时后。数据还表明在整个试验过程中瓶子(Nalgene 瓶子)使血清与水浴温度隔热约 2°C。为了补偿血清瓶子的隔热,可以将水浴的温度调整到约 57°C 或约 58°C。

[0110] 图 14 显示图 1400,图 1400 是在热处理的血清中的 α -半乳糖苷酶活性(Fabry)的图的实例。用于 α -半乳糖苷酶活性的酶底物为 4-甲基伞形酮 α -D-吡喃半乳糖苷。终止缓冲液为具有 0.01% (w/v) Tween20 的 0.2M 碳酸氢钠 pH10.1。4-MU 荧光是在 360/460 激发/发射下读取的。数据表明,在孵育 1 小时后,血清中保留的 α -半乳糖苷酶活性约为 30%。在孵育 4 小时后,血清中保留的 α -半乳糖苷酶活性约为 10%。

[0111] 图 15 显示图 1500,图 1500 是在热处理的血清中的 β -葡糖苷酶活性(Gaucher)的图的实例。用于 β -葡糖苷酶活性的酶底物为 4-甲基伞形酮- β -D-吡喃葡萄糖苷。终止缓冲液为具有 0.01% (w/v) Tween20 的 0.2M 碳酸氢钠 pH10.1。4-MU 荧光是在 360/460 激发/发射下读取的。数据表明,在孵育 1 小时后,血清中保留的 β -葡糖苷酶活性被大幅减少(小于约 5%)。

[0112] 图 16 显示图 1600,图 1600 是在热处理的血清中的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶活性(Hunter)的图的实例。用于艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶活性的酶底物为 4-甲基伞形酮 α -L-艾杜糖醛酸-2-硫酸酯。终止缓冲液为具有 0.01% (w/v) Tween20 的 0.2M 碳酸氢钠 pH10.1。4-MU 荧光是在 360/460 激发/发射下读取的。数据表明,在孵育 1 小时后,血清中保留的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶活性约为 90%。在孵育 4 小时后,血清中保留的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶活性约为 10%。可以选择更长的热处理时间例如约 4 小时或更长的时间,以大体上消除(减少)血清中的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶活性。

[0113] 图 17 显示图 1700,图 1700 是在热处理的血清中的酸性鞘磷脂酶活性(Niemann Pick)的图的实例。用于酸性鞘磷脂酶活性的酶底物为 6-十六酰胺-4-甲基伞形酮-磷酸

胆碱。终止缓冲液为具有 0.25% (w/v) TritonX-100 的 0.2M 碳酸氢钠 pH10.1。HMU 荧光是在 400/460 激发 / 发射下读取的。数据表明,在孵育 1 小时后,血清中保留的酸性鞘磷脂酶活性约为 40%。在孵育 4 小时后,血清中保留的酸性鞘磷脂酶活性约为 10%。可以选择更长的热处理时间例如约 4 小时或更长的时间,以大体上消除(减少)血清中的酸性鞘磷脂酶活性。

[0114] 图 18 显示图 1800,图 1800 是在热处理的血清中的酸性 α -葡糖苷酶活性(Pompe)的图的实例。用于酸性 α -葡糖苷酶活性的酶底物为 4-甲基伞形酮 α -D-吡喃葡萄糖苷。终止缓冲液为具有 0.01% (w/v) Tween20 的 0.2M 碳酸氢钠 pH10.1。4-MU 荧光是在 360/460 激发 / 发射下读取的。数据表明,在孵育 4 小时后,血清中保留的酸性 α -葡糖苷酶活性活性约为 40%。

[0115] 分析底物的非酶法水解(NEH)显示在表 12 中。

分析	%增加 NEH
Pompe	12
Fabry	-5
Gaucher	7
Hunter	55
Niemann Pick	23

[0116]

[0117] 7.3. 2NBS QC 血液池

[0118] 图 19 显示用于干血斑(DBS)质量控制(QC)材料的生产的全血池制备操作流程 1900 的实例的高度概述的操作流程图,所述干血斑(DBS)质量控制(QC)材料用于新生儿测试(例如,用于 LSD 测试)。操作流程 1900 可以包括但不限于以下步骤。

[0119] 在步骤 1910 处,洗涤新鲜的、人红细胞浓厚液(即, O^+ 类型),用于 QC 血液基础池(QC-BP)的制备。合并来自相同血液类型(即, O^+ 类型)的几个供体的血液,用于制备 QC-BP。测定洗涤的红细胞池的体积和血细胞比容。血细胞比容应为约 95% 或更高。

[0120] 在步骤 1912,制备热灭活的活性炭处理的人血清。将冷冻的小份活性炭处理的人血清在 4°C 至 6°C 下解冻过夜,且随后在 55°C 水浴中热灭活,持续约 4 小时。

[0121] 在步骤 1914 中,用热灭活的人血清来调整洗涤的红细胞池的血细胞比容,以形成血液基础池(QC-BP)。QC-BP 的血细胞比容为约 50% \pm 1%。

[0122] 在步骤 1916 中,合并未处理的脐带血单元(即, O^+ 类型)且测定池的血细胞比容。离心脐带血池且通过上清液的除去 / 添加将脐带血池(QC-H)的血细胞比容调整至约 50% \pm 1%。

[0123] 在步骤 1918 中,合并小份的 QC-BP 和 QC-H,以形成中等的酶活性池(QC-Med)和低酶活性池(QC-低)。QC-Med 由 50%QC-H 和 50%QC-BP 组成。QC-低由 5%QC-H 和 95%QC-BP 组成。

[0124] 再次参考操作流程 1900 的步骤 1910,用于制备洗涤的红细胞的操作流程的实例包括以下步骤:

[0125] 1. 用两个侧臂烧瓶(例如 1000mL Erlenmeyer 烧瓶)在化学通风橱下建立真空系统。将橡胶软管从一个烧瓶侧臂直接连接到过滤器上,所述过滤器连接到通风橱下的真空连接。将适当地按尺寸制造的具有玻璃管子的橡胶塞置于烧瓶顶部。从第二烧瓶的侧壁将

橡胶管连接到来自第一烧瓶的橡胶塞的玻璃管子上。将玻璃吸管尖端连接到来自第二烧瓶的侧臂的橡胶软管上；

[0126] 2. 将冷冻的大体积离心机(例如, Beckman Coulter centrifuge)冷却至约 6-8°C；

[0127] 3. 用红细胞浓厚液填充约一半的离心瓶(例如, 250mL 或 1L Nalgene Beckman 离心瓶)；

[0128] 4. 添加等体积的盐水(氯化钠 0.9% 注射 USP)至离心瓶中的细胞中。轻轻地反转约 5-10 次, 以确保红细胞和盐水的完全混合, 注意保持红细胞的完整性；

[0129] 5. 在约 6-8°C 下以 3200rpm 离心红细胞和盐水混合物, 持续 10 分钟。如果必要的话, 将离心机上的减速设置(brake setting)调节至低的或关闭, 使得细胞不在离心循环结束时重新混合；

[0130] 6. 从离心机上小心地取出瓶子, 而不干扰细胞层, 且将瓶子转移至化学通风橱中, 在所述化学通风橱中已经建立了真空系统；

[0131] 7. 使用真空系统, 从红细胞中吸出大部分的盐水上清液和血沉棕黄层(buffy coat layer)。留下红细胞上方的少量上清液, 以保留尽可能多的红细胞体积。每次废弃物烧瓶充满时, 将其内容物清空到水槽中且之后将漂白剂倾入水槽中；

[0132] 8. 重复步骤 4、5、6 和 7；

[0133] 9. 在吸出第二次洗涤物后, 将等体积的盐水添加到红细胞中且轻轻地反转 5-10 次, 以确保充分混合。这是最后的洗涤。以 4000rpm 离心最终的洗涤物, 持续 15 分钟；

[0134] 10. 用真空系统小心地除去所有的上清液；

[0135] 11. 将一个 1000mL 的干净烧杯置于磁性搅拌桌上。将搅拌棒置于烧杯中；

[0136] 12. 从离心瓶中将红细胞倾入 250mL 量筒(或 500mL 量筒中, 取决于处理的血液的量), 以测量洗涤的红细胞的量。回收的红细胞的体积将被用于计算如参考图 19 的步骤 3 所描述地制备血液基础池所需要的热灭活的血清的量。将细胞从量筒倾入 1000mL 烧杯中且在自动搅拌器的帮助下缓慢搅拌, 持续 10-15 分钟；

[0137] 13. 测量血细胞比容(hct)：

[0138] i. 用来自烧杯的血液填充 4 个微毛细管(微量血细胞比容)且用粘土密封物(clay sealer)塞住末端。将 4 个塞住的微毛细管放入微型离心机中(例如, IEC Microhematocrit 离心机)且离心 4 分钟；

[0139] ii. 将塑料指示物的凹槽中的离心的微毛细管置于微毛细管读取器上, 使得红细胞的柱形物的底部与塑料指示物上的黑线对齐；

[0140] iii. 旋转底板, 使得 100% 的线正好在塑料指示物上的红线下。将底板保持在这个位置。使用指孔, 旋转上板, 使得螺旋线与血浆 - 空气界面处的微毛细管相交；

[0141] iv. 一起旋转两个圆盘, 直到这个螺旋线与红细胞 / 白细胞界面处的微毛细管相交；

[0142] v. 从正好在塑料指示物的红线下方的刻度点(point on the scale)来读取以百分比计的红细胞体积；

[0143] vi. 对所有四个管子重复这个测量；且

[0144] vii. 取四个单独的 hct 测量值的平均值。平均的 hct 测量值将被用于计算如参考图 19 的步骤 3 的示例性操作流程中所描述地制备血液基础池所需要的热灭活的血清的量。

血细胞比容应为 95% 或更高。如果血细胞比容 <95%，再次离心细胞且除去较多的盐水上清液。再次测量细胞体积和血细胞比容。

[0145] 此时，洗涤的红细胞为血液基础池的制备做好了准备。可选择地，在制备血液基础池之前，洗涤的红细胞可以储存在冰箱中过夜。

[0146] 再次参考操作流程 1900 的步骤 1912，用于制备热灭活的活性炭处理的人血清的操作流程的实例包括以下步骤：

[0147] 1. 从冷冻器中取出活性炭处理的人血清且在 4°C 下储存。这个步骤是进行热灭活的前一天进行的；

[0148] 2. 对于血清的热灭活，打开水浴且将温度设为 55°C。在继续之前，使水浴的温度达到 55°C；

[0149] 3. 从冰箱中取出活性炭处理的人血清。如果没有完全解冻，将瓶子浸入到容器中，在流动的冷水下方，直到其解冻；

[0150] 4. 将解冻的活性炭处理的血清的瓶子放入水浴中且观察水浴的温度；

[0151] 5. 当水浴返回至目标温度 (55°C) 时，将计时器设为 1 小时；

[0152] 6. 在 1 小时孵育期间，轻轻地反转血清瓶子 3 次；

[0153] 7. 对于热灭活，重复步骤 5 和 6 三次，持续总共 4 小时；

[0154] 8. 当孵育完成时，使血清在流动的冷水下方冷却；且

[0155] 9. 用干酪包布 (cheese cloth) 过滤热灭活的血清。

[0156] 再次参考操作流程 1900 的步骤 1914，用于制备血液基础池 (QC-BP) 的操作流程的实例包括以下步骤：

[0157] 1. 洗涤的红细胞池的测量的红细胞体积和平均血细胞比容 (如操作流程 1900 的步骤 1910 的示例性操作流程中所描述的) 被用于如下地确定添加到洗涤的红细胞中以将血细胞比容水平调整至 50% 的热灭活的活性炭处理的人血清的量： $(\text{回收的红细胞的体积}) \times (\text{目前的 hct}) = (\text{期望的 hct}) \times (\text{重构的血液总量})$ ；所需血清的量 = $(\text{重构血液的总量}) - (\text{回收的 RBC 的体积})$ ；

[0158] 2. 用量筒量取热灭活的活性炭处理的人血清的计算量。将血清添加到包含洗涤的红细胞的烧杯中；

[0159] 3. 使用磁性搅拌器，搅拌 5-10 分钟，以确保血清和红细胞的充分混合；且

[0160] 4. 如图 19 的步骤 1 的示例性操作流程中所描述的，测量血细胞比容 (hct)。4 个样品的平均血细胞比容含量应为约 50% ± 1%。如果最后的血细胞比容过高，计算且添加适量的制备血清，来调整。如果最后的血细胞比容过低，允许红细胞沉淀且从混合物中除去一些血清。重复血细胞比容测量。

[0161] 再次参考操作流程 1900 的步骤 1916，用于制备脐带血高酶活性池的操作流程的实例包括以下步骤：

[0162] 1. 将干净烧杯置于磁性搅拌板上。将磁性搅拌棒置于烧杯中；

[0163] 2. 将来自收集袋的脐带血单元倒入烧杯中且搅拌 5-10 分钟；

[0164] 3. 如操作流程 1900 的步骤 1910 的示例性操作流程中所描述的，测量汇集的脐带血的血细胞比容水平。脐带血血细胞比容通常为约 33%；

[0165] 4. 将脐带血转移至 250mL 量筒中 (或 500mL 量筒，取决于待处理的脐带血的体积)

且测量脐带血的量；

[0166] 5. 测量的脐带血体积(步骤 4)和平均的血细胞比容值(步骤 3)被用于如下地计算需要除被去以将血细胞比容调整至 50% 的脐带血上清液的数量:(当前的脐带血的体积)(当前的 hct) = (期望的 hct)(计算的脐带血的量);除去的上清液的数量 = (当前的脐带血的体积) - (计算的脐带血的量);

[0167] 6. 将脐带血从量筒倒入离心瓶(例如, Nalgene Beckman 离心瓶)且在 6-8°C 下在 2500rpm 下离心脐带血 10 分钟;

[0168] 7. 从离心的脐带血中除去计算量的上清液。保留除去的上清液,在需要时用于进一步的调整;

[0169] 8. 将剩下的脐带血从离心瓶倒入烧杯,且用自动搅拌器搅拌 5-10 分钟;且

[0170] 9. 如操作流程 1900 的步骤 1910 的示例性操作流程中所描述的,测量血细胞比容(hct)。4 个样品的平均血细胞比容含量应为约 50%±1%。如果最后的血细胞比容过高,计算且添加适量的保留上清液,来调整。如果最后的血细胞比容过低,允许细胞沉淀且从混合物中除去一些上清液。重复血细胞比容测量。

[0171] 再次参考操作流程 1900 的步骤 1918,用于制备脐带血中等池和低酶活性池的操作流程的实例包括以下步骤:

[0172] 1. 分别记录如操作流程 1900 的步骤 1914 和 1916 的示例性操作流程中所描述地制备的血液基础池和脐带血高酶活性池的体积。血液基础池的量应为脐带血高酶活性池的量的至少 1.7 倍;

[0173] 2. 等体积的血液基础池(QC-BP)和脐带血池(QC-H)(即 50:50 混合物)将被用于形成脐带血中等酶活性池(QC-Med);

[0174] 3. 为了制得脐带血低酶活性池(QC-低),将合并 95% 血液基础池(QC-BP)和 5% 脐带血池(QC-H);

[0175] 4. 使用以下计算,以估计每一种 QC 池的尺寸和所需体积:

[0176] 单个 QC 池的体积 = (脐带血池的量) / 1.6

[0177] 例如:脐带血的量 = 200mL;单个 QC 池的体积 = 200 / 1.6 = 125mL

[0178] 那么, QC 血液基础池 = 125mL

[0179] QC 低池 = (118.75mL 的基础池) + (6.25mL 的脐带血池) = 125mL

[0180] QC Med 池 = (62.5mL 的基础池) + (62.5mL 的脐带血池) = 125mL

[0181] QC 高池 = 125mL

[0182] 因此,所需要的总的血液基础池: 125 + 118.75 + 62.5 = 306.25

[0183] 所需要的总的脐带血池: 125 + 6.25 + 62.5 = 193.75mL;且

[0184] 5. 根据步骤 4 的计算,用 250mL 量筒来量取且混合基础池和脐带血高池,以制备 QC-Med 池和 QC-低池。

[0185] 图 20 显示用于制备用于新生儿测试的 DBS 样品的质量控制血液池组成的实例的图表 2000。QC 血液池包括血液基础池和脐带血池。QC 血液基础池(QC BP)由 100% 血液基础池样品组成。血液基础池的血细胞比容为约 50%±1%。QC 高(QC-H)池由 100% 脐带血样品组成。脐带血池的血细胞比容为约 50%±1%。合并小份的血液基础池和脐带血池,以形成由 50% 脐带血和 50% 基础池组成的 QC 中等(QC-Med)酶活性血液池;及由 5% 脐带血和 95%

血液基础池组成的 QC-低酶活性血液池。

[0186] 7.3.3QC DBS 样品

[0187] 制备的全血池可以用于生产用于新生儿的例如用于溶酶体贮积病的测试的 DBS 质量控制材料。用于制备 DBS QC 材料(例如,滤纸卡)的操作流程的实例包括但不限于以下步骤:

[0188] 1. 获得印有斑点的卡(printed spot cards)(例如,Advanced Liquid Logic15 斑点卡);

[0189] 2. 用池的类型、货号及日期来标记卡;

[0190] 3. 从血液基础池(BP)开始,将 100 μ L 的血液置于卡上的每一个指定的斑点(例如,在 Advanced Liquid Logic15 斑点卡上的 15 个斑点)上。继续点(spot)卡,直到所有制备的血液池已经被使用。将卡置于架(rack)上且允许干燥过夜;

[0191] 4. 对于每一个血液池(即 QC-H、QC-Med 和 QC-低),重复步骤 2 和步骤 3;且

[0192] 5. 在干燥后,按照池将卡分开且将它们放置在具有干燥剂的可密封袋子中。在每一个袋子的外部做标记且在 -80°C 下储存(如果在 -80°C 下储存,斑点在长达一年内是稳定的)。

[0193] 7.4 减少 NBS 分析中的污染

[0194] 用于新生儿筛查分析中的生物样品(例如血液样品)的未知污染物可导致假阳性测试结果。假阳性通常发生在新生儿重症监护室(NICU)中的早产儿身体中,且可能可归因于婴儿在 NICU 中接受的某些药物。假阳性测试结果是有问题的,不管所使用的测试方法学(例如,基于微量滴定板的荧光分析、串联质谱(MS/MS)和数字微流体分析)。

[0195] 本发明提供方法,以大体上消除污染物,所述污染物可以抑制酶活性且在筛查分析(例如,NBS 分析)和诊断测试中造成假阳性读数。在各种实施方式中,在进行筛选分析或诊断测试之前,磁性响应 ConA 珠子被用于消除污染物且浓缩生物样品的 N-糖基化的酶。

[0196] 消除生物样品(例如,血液样品)中的污染物的酶纯化方法的实例可以包括但不限于以下步骤:将磁性响应 ConA 珠子(例如, SiMAG-ConA 珠子或耦合链霉亲和素-生物素的 ConA 珠子)的量添加到生物样品(例如,血液样品)的体积中。在足够 N-糖基化的酶结合到磁性响应 ConA 珠子的一段时间后,用磁铁固定珠子。除去包含未结合的分子(例如,抑制性污染物)的上清液且丢弃。用珠子洗涤操作流程来洗涤其上具有 N-糖基化的酶的磁性响应 ConA 珠子一次或多次,以进一步除去未结合的材料,得到基本上没有未结合的材料洗涤的珠子样品。然后将纯化的结合到磁性响应 ConA 珠子上的 N-糖基化的酶从珠子上洗脱(例如,使用 SiMAG-ConA 珠子的竞争分子或对于链霉亲和素-生物素偶联的 ConA 珠子使用键断裂)。用磁铁固定磁性响应 ConA 珠子且取出洗脱液,用于样品分析(例如,NBS 酶分析)。

[0197] 在一个实施方式中,酶纯化和酶分析是在滴致动器上进行的。在致动器上的纯化操作流程的实例包括但不限于以下步骤:用滴操作,使得样品滴(例如, DBS 提取滴)与包含磁性响应 ConA 珠子的量的试剂滴结合,以产生样品/珠子结合滴。孵育样品/珠子结合滴,持续对于 N-糖基化的酶结合到磁性响应 ConA 珠子而言充足的一段时间。用滴操作将样品/珠子结合滴运输到磁铁的存在中,且用合并-且-分裂(merge-and-split)的洗涤操作流程来洗涤以除去未结合的材料,得到大体上没有未结合的材料洗涤的包含珠子的滴。纯化的糖基化的酶然后从珠子上被洗脱(例如,使用竞争分子或键断裂)。包含在围绕珠子的

上清液滴中的洗脱的酶然后可以被运输远离磁性响应珠子,用于在滴致动器上的进一步处理,例如,用于基于滴的 NBS 分析操作流程的执行。

[0198] 在另外的实施方式中,酶纯化可以在滴致动器上进行且纯化的样品随后从滴致动器上取出,用于不在致动器上的测试。在这个实例中,包含纯化的酶的上清液滴(洗脱液)可以用滴操作来运输,至与滴致动器的顶部基片中的开口流体相通的储存器中。上清液滴可以经由滴致动器的顶部基片中的开口从滴致动器被取出。纯化的样品可以用不在致动器上的方法学来分析,比如 MS/MS 分析和基于微量滴定法的荧光筛选分析。

[0199] 在另外的实施方式中,酶纯化可以在滴致动器上来进行,且在取出用于不在致动器上的分析的准备样品之前,在致动器上进行一种或多种酶分析。在一个实例中,酶纯化和酶处理操作流程可以用于制备用于在质谱平台上进行分析的样品。制备的样品滴可以用滴操作运输至与滴致动器的顶部基片中的开口流体相通的储存器中。制备的样品滴可以经由滴致动器的顶部基片中的开口被标记(stamped)在质谱分析平台上。

[0200] 在另外的实施方式中,酶纯化可以不在致动器上进行,且用不在致动器上的方法学比如质谱和 / 或基于微量滴定板的分析来分析纯化的样品。

[0201] 在另外的实施方式中,酶纯化可以不在致动器上进行且将纯化的样品装载到与开口流体相通的储存器上,用于使液体从储存器流动到滴致动器的滴操作缝隙中。纯化的样品然后可以在致动器上用数字微流体操作流程来分析。

[0202] 7.5 系统

[0203] 将理解的是,本发明的各个方面可以作为方法、系统、计算机可读介质和 / 或计算机程序产品来示例。本发明的方面可以采用硬件实施方式、软件实施方式(包括固件、常驻软件、微-代码等)或结合软件和硬件方面的实施方式的形式,结合软件和硬件方面的实施方式在本文中通常都可以被称为“电路”、“模块”或“系统”。而且本发明的方法可以采用在具有体现在介质中的计算机可用的程序代码的计算机可用的存储介质上的计算机程序产品的形式。

[0204] 对于本发明的软件方面,可以利用任何合适的计算机可用的介质。计算机可用的或计算机可读的介质可以是例如但不限于电子的、磁性的、光学的、电磁的、红外线的或半导体的系统、设备、装置或传播介质。计算机可读介质可以包括暂时和 / 或永久的实施方式。计算机可读的介质的更具体的实例(非排他性列表)可以包括以下中的一些或所有:具有一个或多个电线的电气连接、便携式计算机磁盘、硬盘、随机存取存储器(RAM)、只读存储器(ROM)、可擦除的可编程只读存储器(erasable programmable read-only memor)(EPROM 或闪速存储器)、光导纤维、便携式光盘只读存储器(CD-ROM)、光存储装置、传送介质比如支持互联网或内网的那些,或磁存储装置。注意,计算机可用或计算机可读的介质甚至可以是程序可打印在其上的纸或另外的合适介质,因为程序可以是电子捕获的,例如经由纸或其它介质的光学扫描,然后必要时,以合适的方式编译、解读或以其他适合的方式处理,且然后存储在计算机内存中。在本文件的上下文中,计算机可用或计算机可读的介质可以是可包含、存储、通信、传播或传送程序的任何介质,用于通过或结合指令执行系统、设备或装置来使用。

[0205] 用于进行本发明的操作的程序代码可以被写入到面向编程语言比如 Java、Smalltalk、C++ 或类似物的对象中。然而,用于进行本发明的操作的程序代码还可以以常规

的过程式编程语言(conventional procedural programming language)来书写,比如“C”编程语言或类似的编程语言。程序代码可以通过处理器、专用集成电路(ASIC)或执行程序代码的其它部件来执行。程序代码可以被简称为储存在内存(比如上文所讨论的计算机可读介质)中的软件应用。程序代码可以使处理器(或任何控制处理器的装置)产生图形用户界面(“GUI”)。图形用户界面可以在显示装置上被可视地产生,而图形用户界面还可以具有听得见的特征。然而,程序代码可以在任何控制处理器的装置中操作,比如利用处理器和/或数字信号处理器的计算机、服务器、个人数字助理、电话、电视或任何控制处理器的装置。

[0206] 程序代码可以局部和/或远程地执行。例如,程序代码可以完全或部分地储存在控制处理器的装置的局部内存中。然而,程序代码还可以被至少部分远程地储存、访问且下载至控制处理器的装置中。例如,用户的计算机可以完全执行程序代码或仅部分地执行程序代码。程序代码可以是独立的软件包,所述软件包至少部分地在用户的计算机上和/或部分在远程计算机或完全在远程计算机或服务器上来执行。在后一方案中,远程计算机可以通过通信网络连接到用户的计算机上。

[0207] 本发明可以被应用,而不管网络环境。通信网络可以是在无线电频域和/或互联网协议(IP)领域中操作的电缆网络。然而,通信网络还可以包括分布式计算网络,比如互联网(有时,可选择地称为“万维网”)、内联网、局域网(LAN)和/或广域网(WAN)。通信网络可以包括同轴电缆、铜线、光纤线和/或混杂-同轴线。通信网甚至可以包括利用电磁谱的任何部分及任何信号传导标准(比如标准的 IEEE802 家族、GSM/CDMA/TDMA 或任何移动电话标准,和/或 ISM 波段)的无线部分。通信网甚至可以包括电线部分,其中信号经由电线通信。本发明可以应用到任何的无线/有线通信网络中,而不管物理元件部分、物理配置或通信标准。

[0208] 关于各种方法和方法步骤,描述本发明的某些方面。将理解的是,每一个方法步骤可以通过程序代码和/或通过机器指令来执行。程序代码和/或机器指令可以产生用于执行方法中指定的功能/行为的方式。

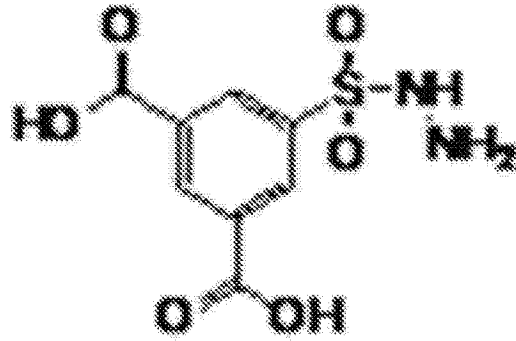
[0209] 程序代码还可以被存储在可指导处理器、计算机、或其它以特定的方式起作用的可编程的数据处理设备的计算机可读的内存中,使得存储在计算机可读的内存中的程序代码产生或改变生产制品,包括执行方法步骤的各种方面的指令方式。

[0210] 程序代码还可以被加载到计算机或其它可编程的数据处理设备,以促使进行一系列可操作步骤产生处理器/计算机执行的程序,使得编程代码提供用于执行在本发明的方法中指定的各种功能/行为的步骤。

[0211] 8 结论

[0212] 实施方式的前述详细描述参考阐述本发明的特定实施方式的附图。具有不同结构和操作的其它实施方式不背离本发明的范围。术语“本发明”,或类似术语关于本说明书中列出的申请人的发明的许多可选方面或实施方式的某些具体实例而使用,且其使用或其缺失并非意图限制申请人的发明范围或权利要求的范围。将本说明书分割几个部分,仅为了方便读者。标题不应被解释成限制本发明的范围。定义意图作为本发明的说明书的一部分。将理解的是,可以改变本发明的各种细节,而不背离本发明的范围。而且,前述描述仅用于阐述的目的,且并非用于限制的目的。

100



NSC 120634

图 1

200

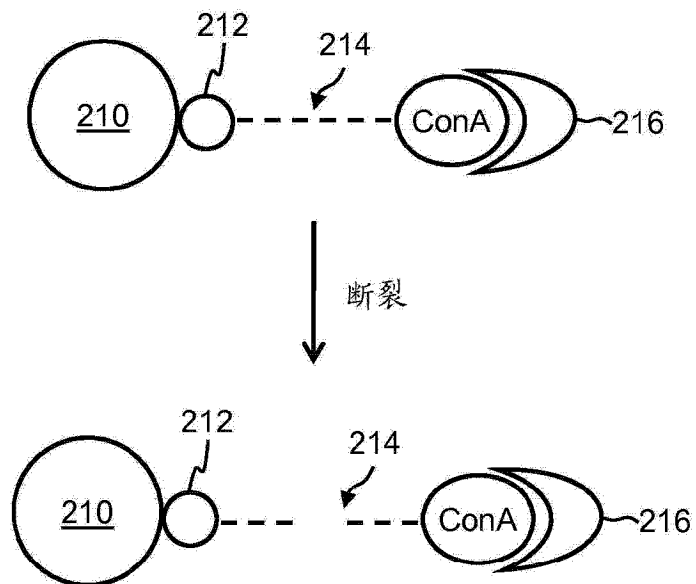


图 2

300

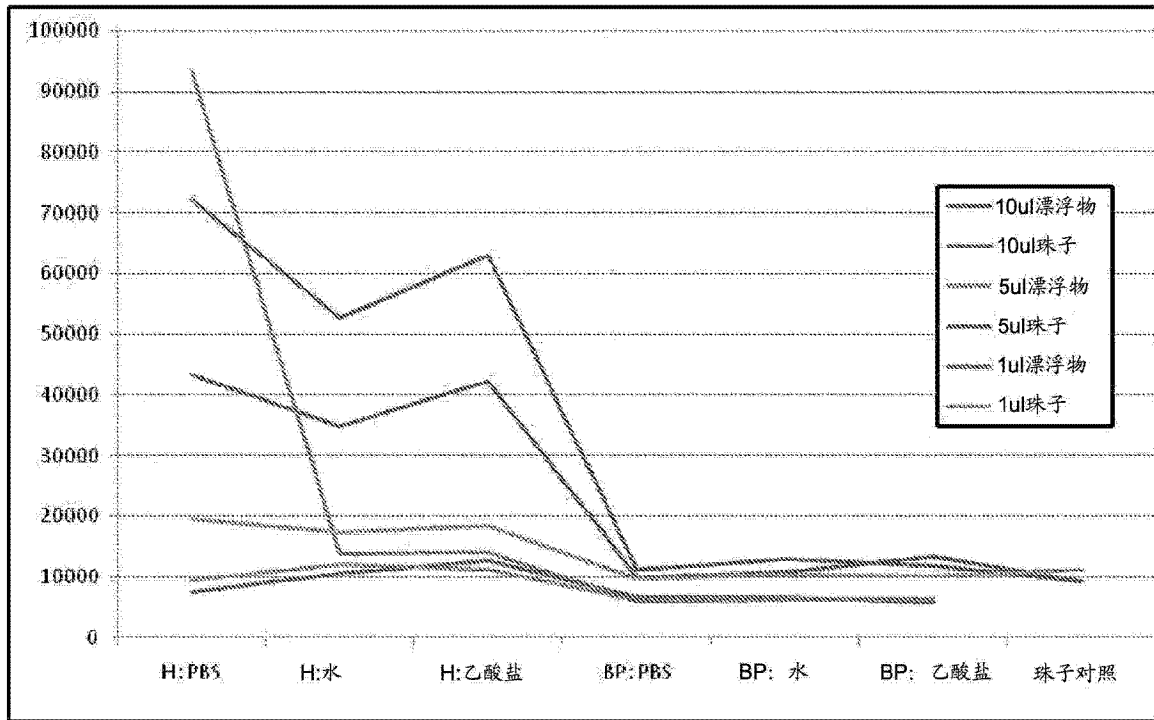


图 3

400

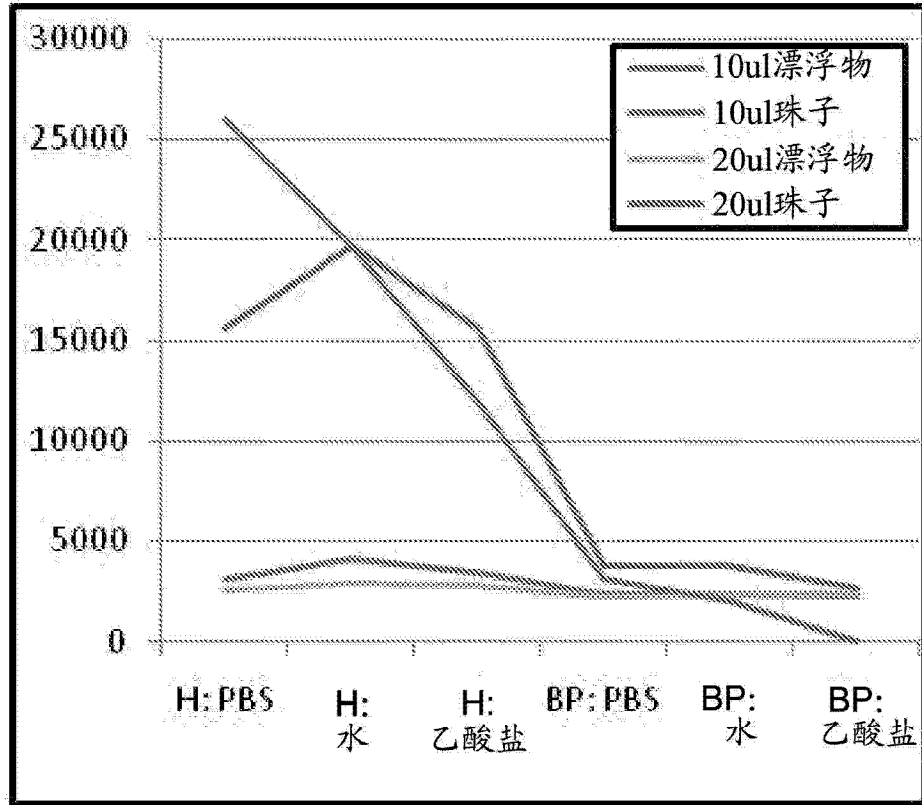


图 4

500

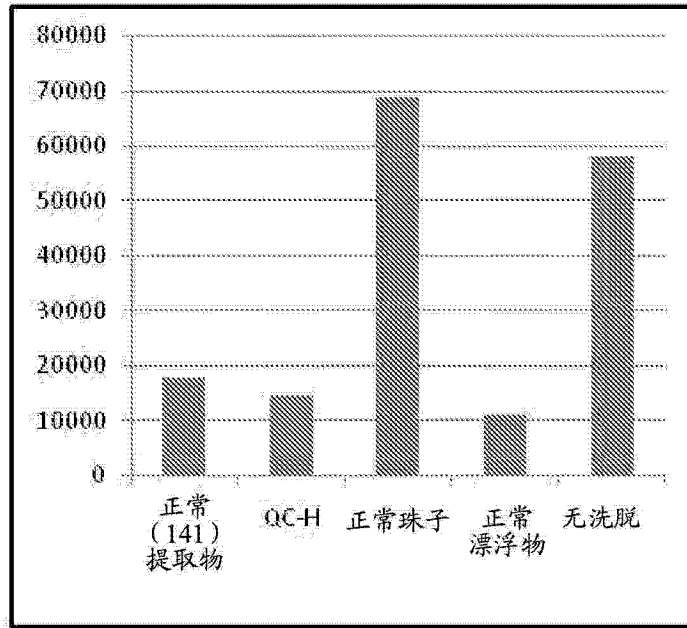


图 5A

550

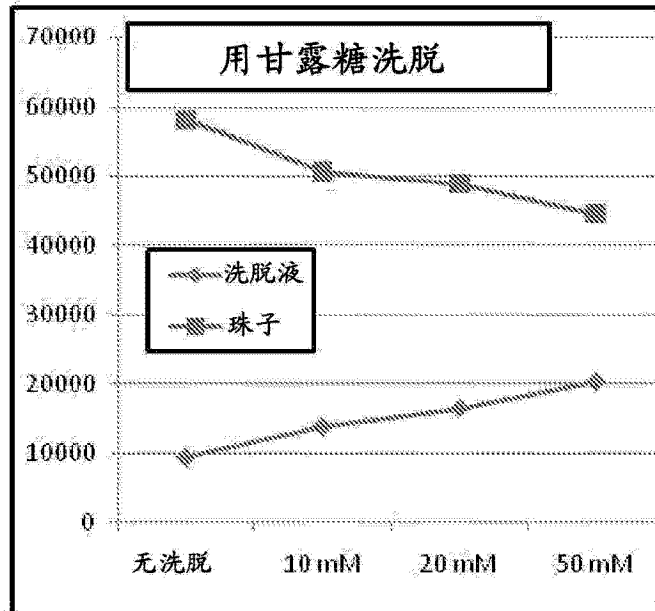


图 5B

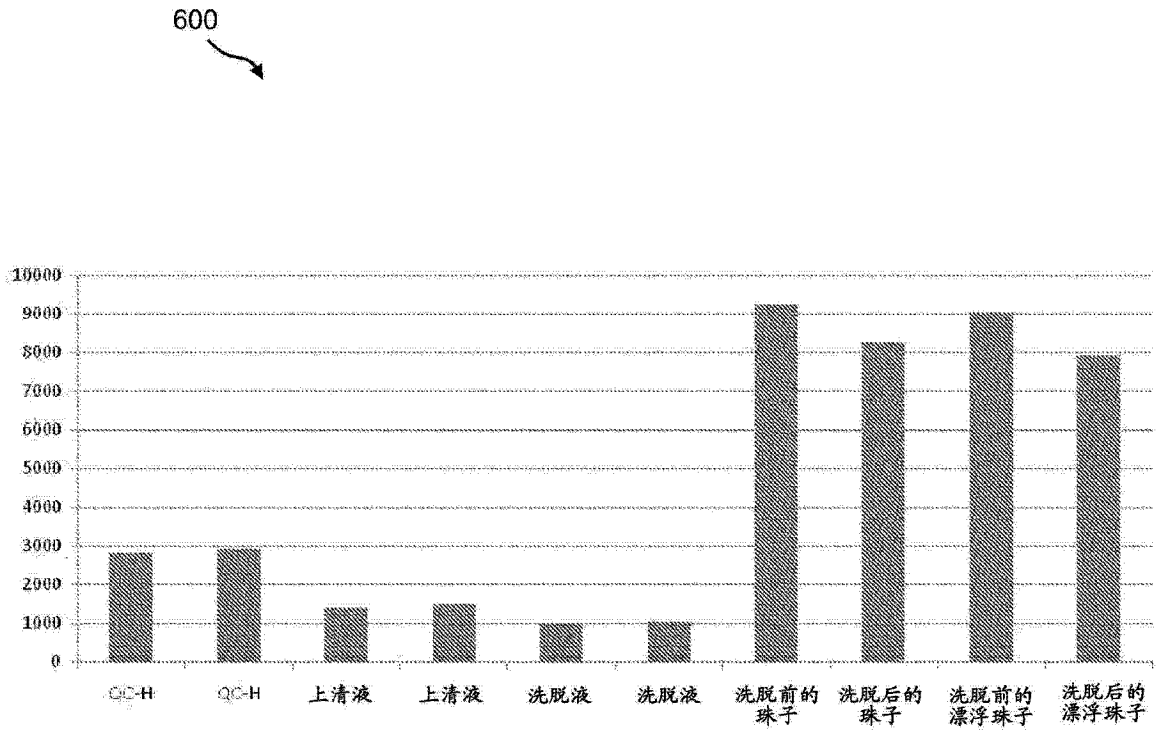


图 6

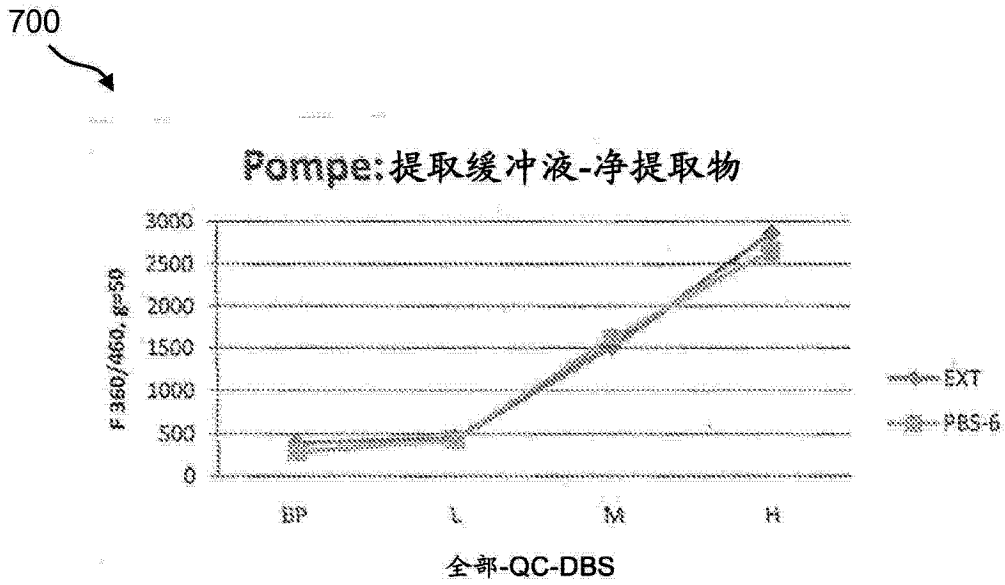


图 7A

750

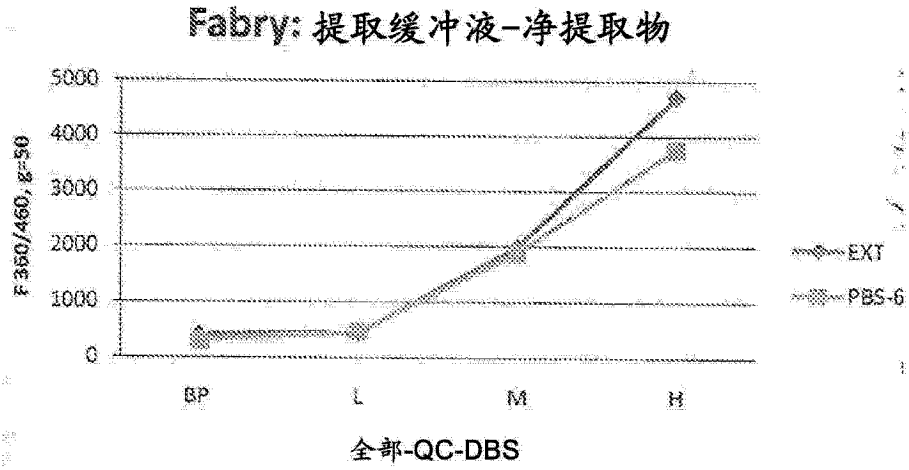


图 7B

800

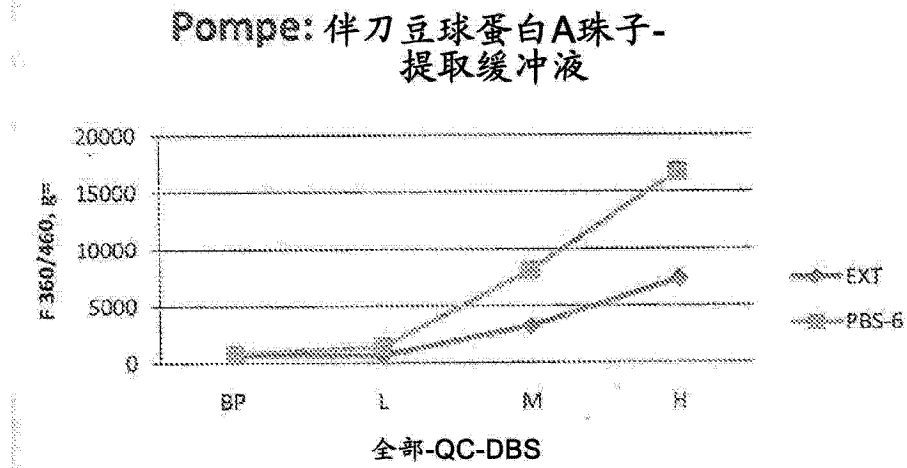


图 8A

850

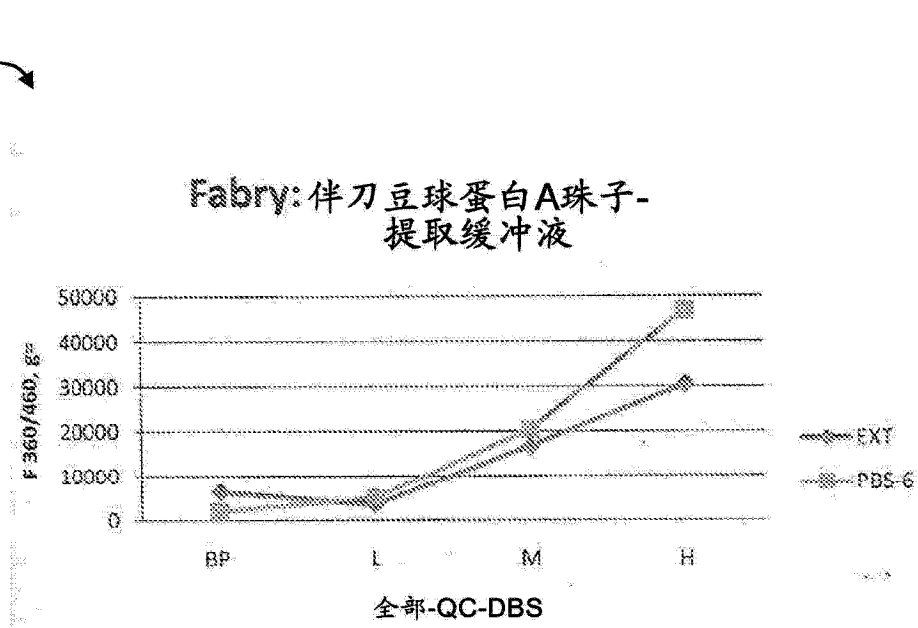


图 8B

900

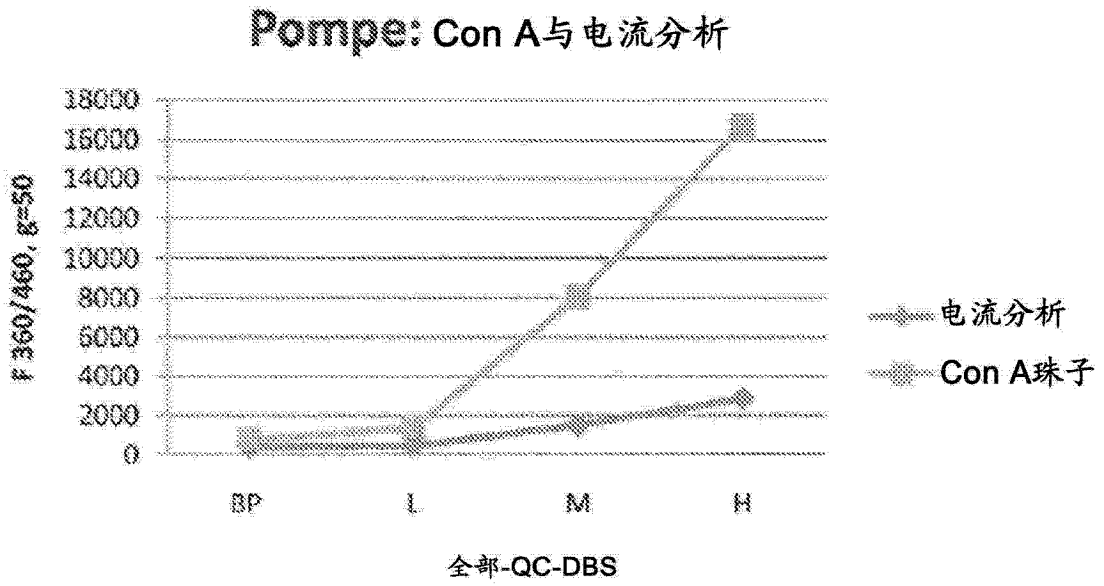


图 9A

950

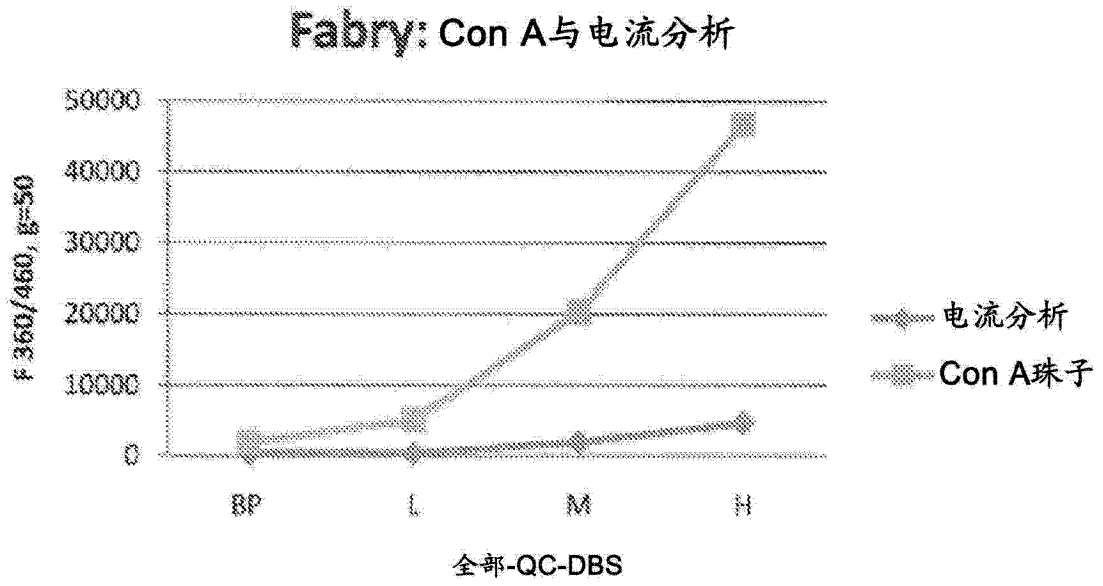


图 9B

1000

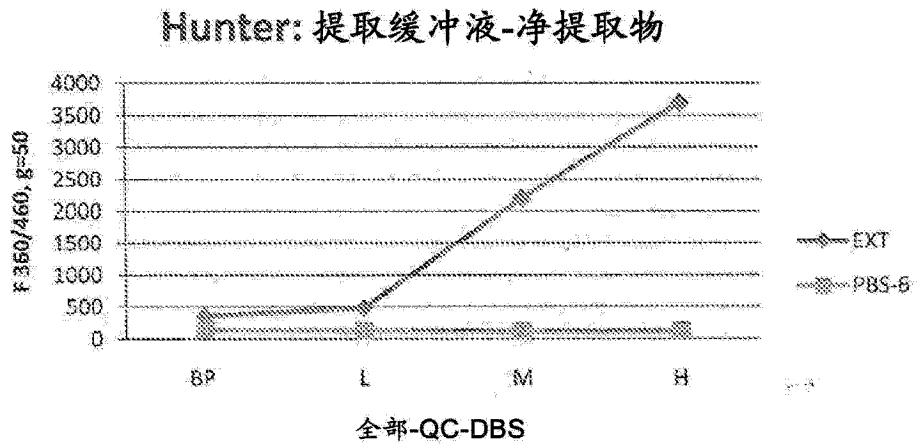


图 10A

1050

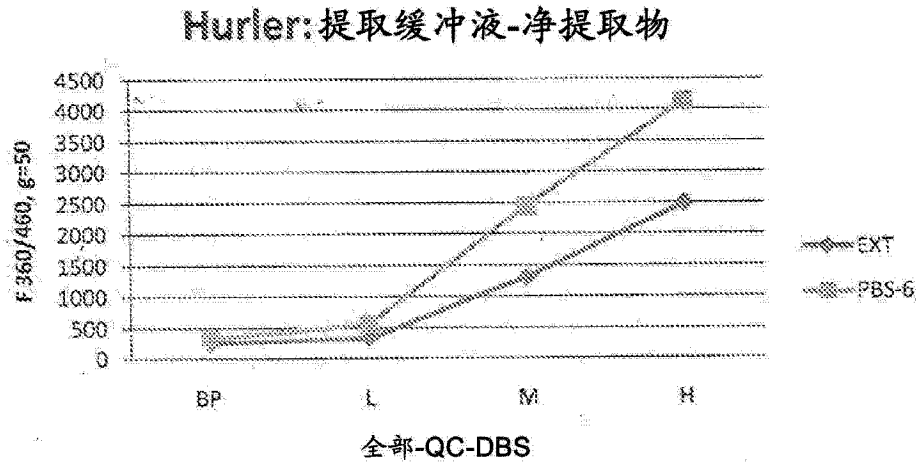


图 10B

1100

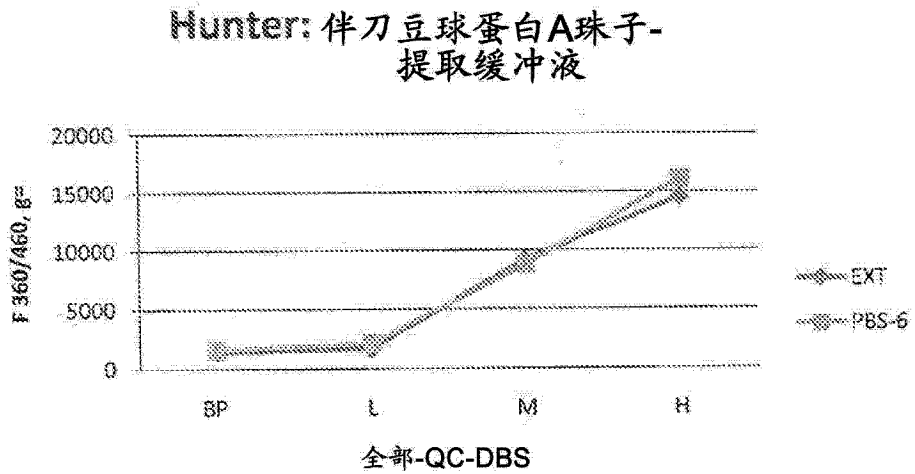


图 11A

1150

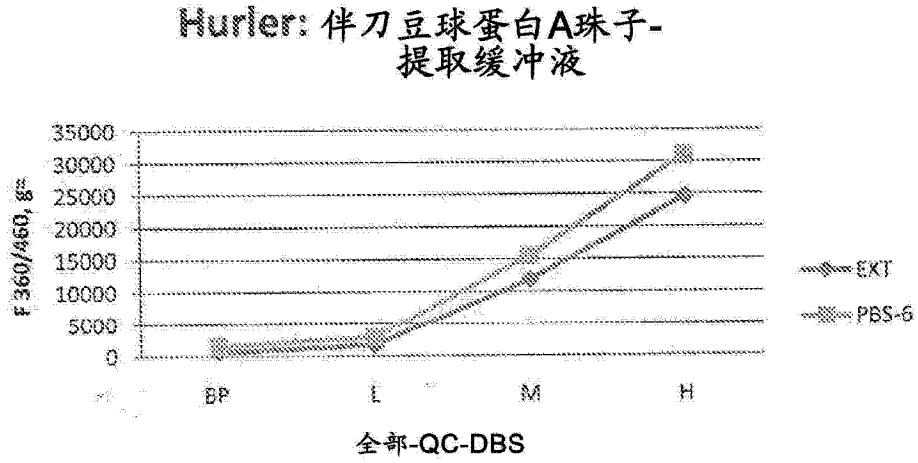


图 11B

1200

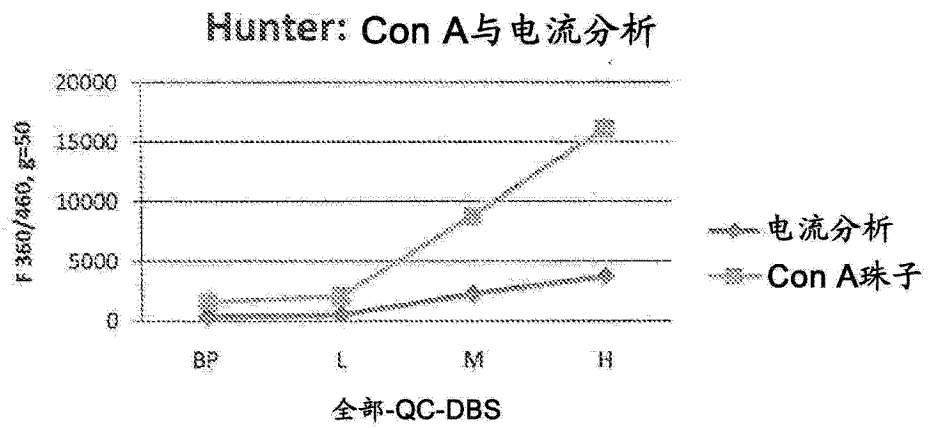


图 12A

1250

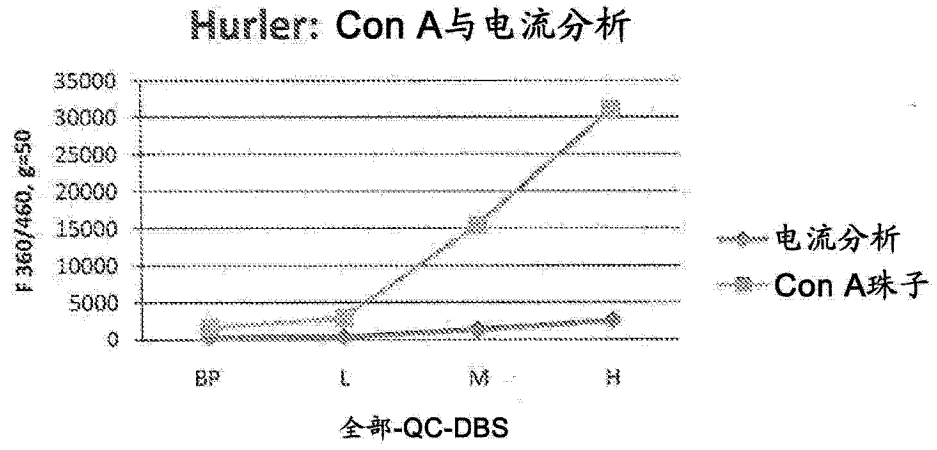


图 12B

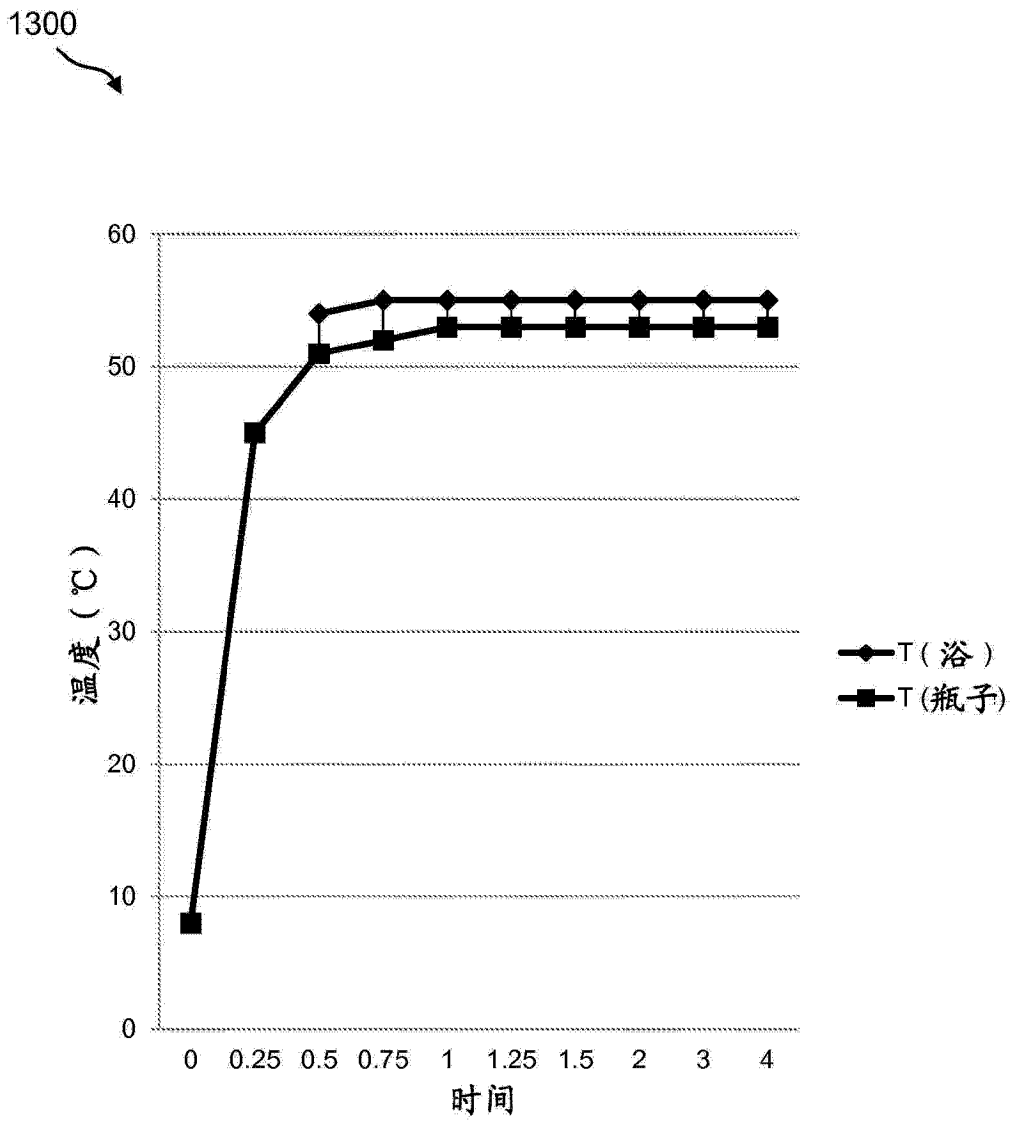


图 13

1400
↘

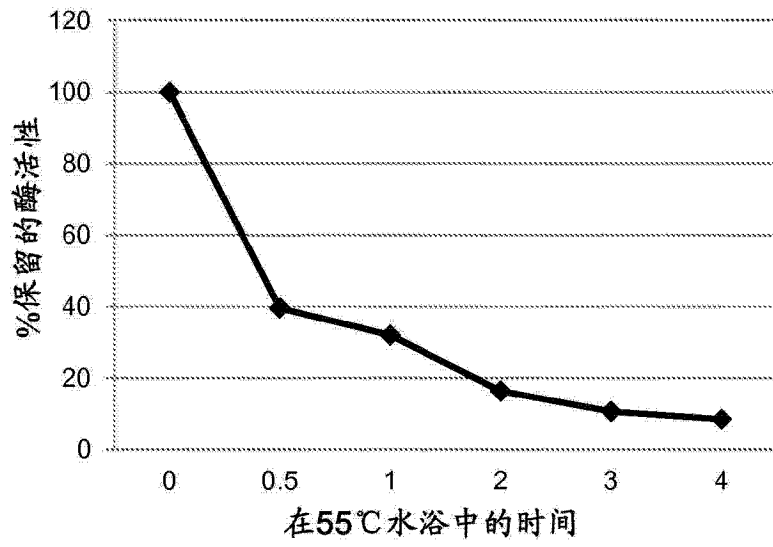


图 14

1500
↘

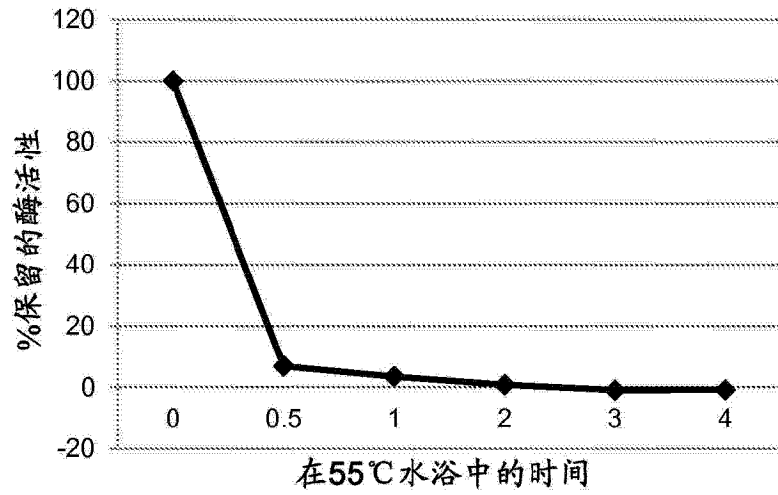


图 15

1600
↘

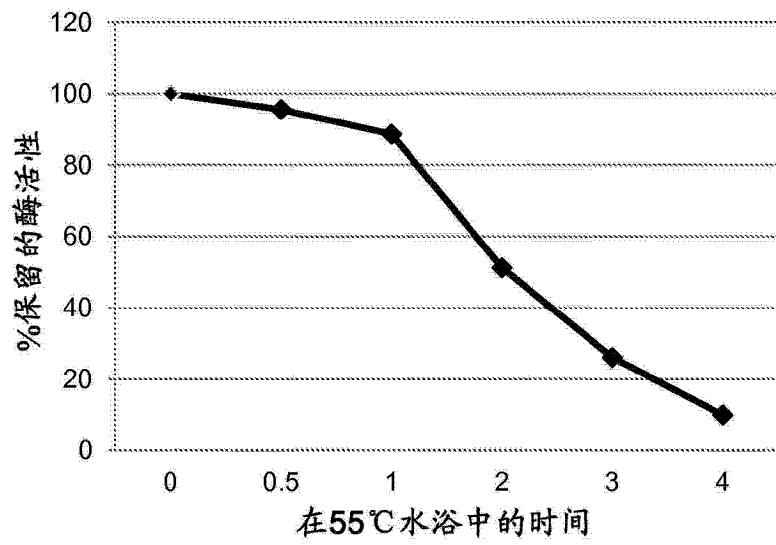


图 16

1700
↘

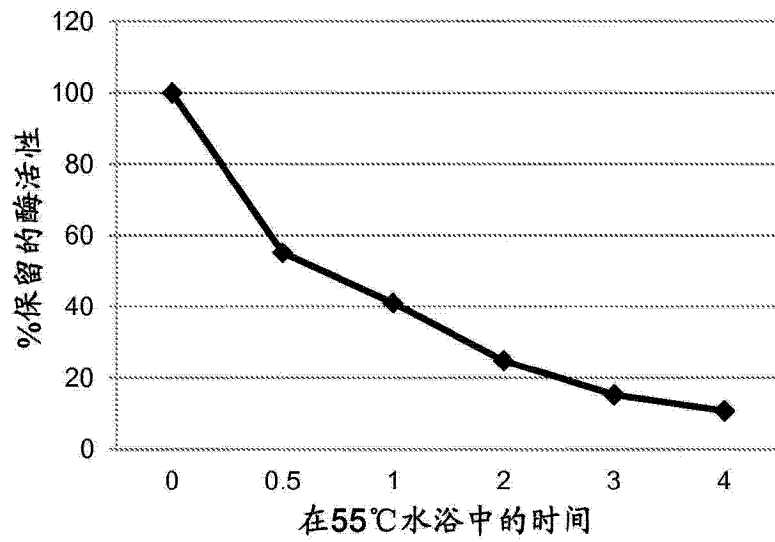


图 17

1800
↘

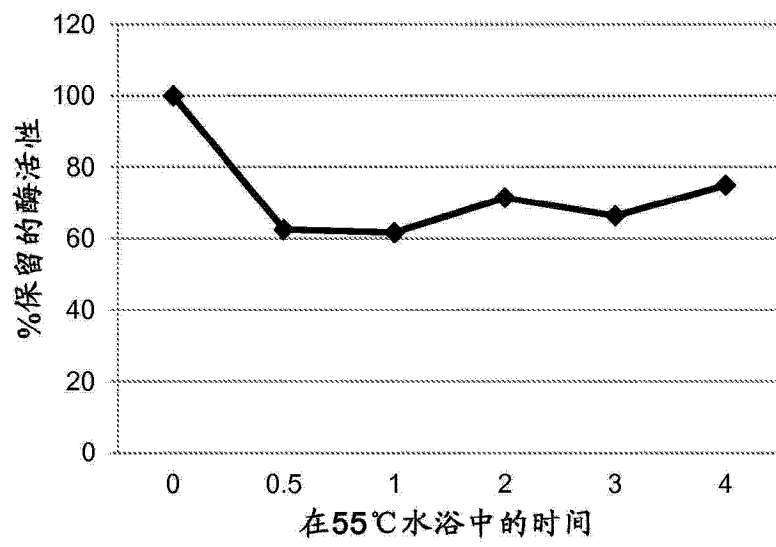


图 18

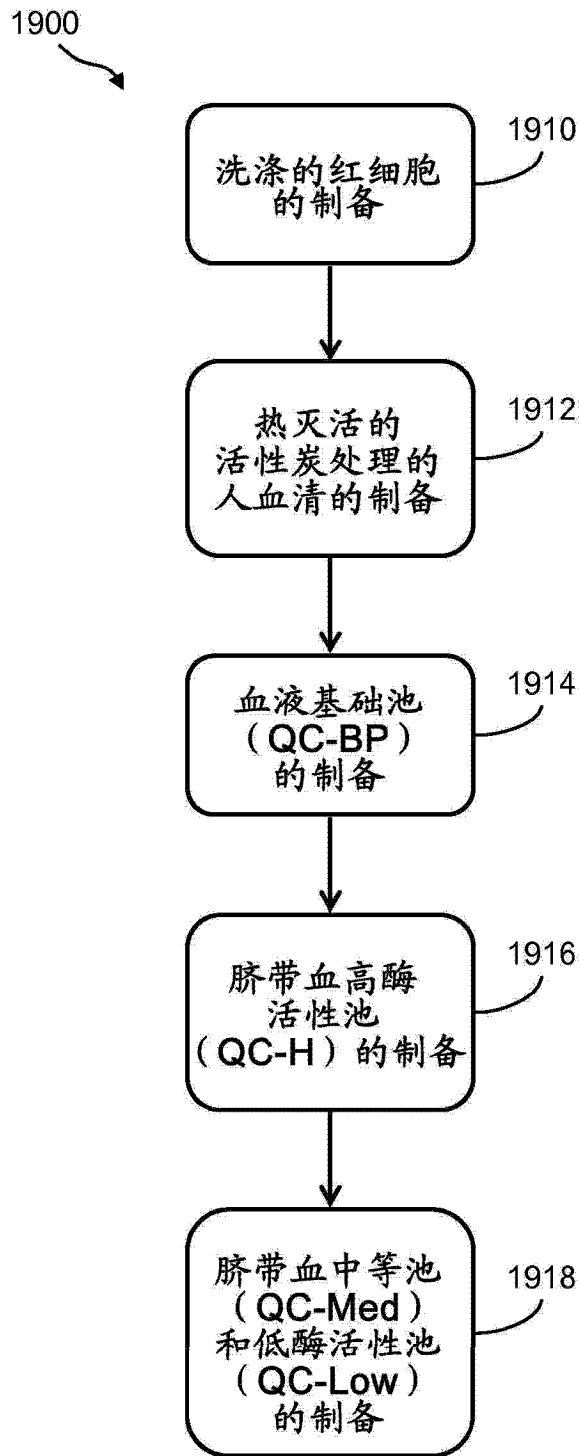


图 19

2000

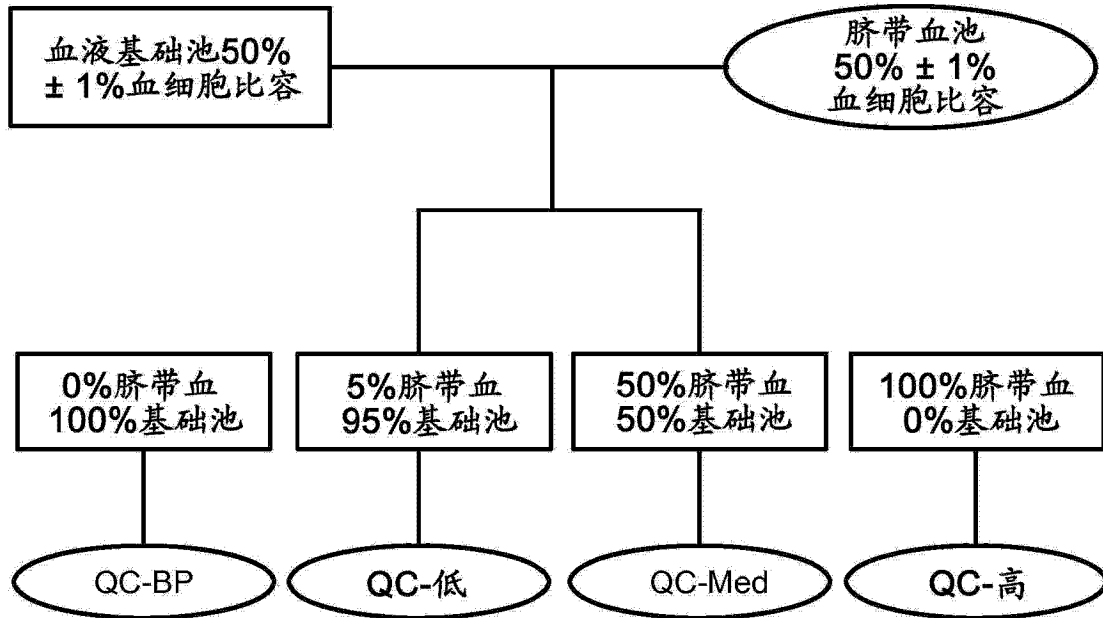


图 20

专利名称(译)	酶浓缩与分析		
公开(公告)号	CN103597356A	公开(公告)日	2014-02-19
申请号	CN201280022792.1	申请日	2012-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	先进流体逻辑公司		
申请(专利权)人(译)	先进流体逻辑公司		
当前申请(专利权)人(译)	先进流体逻辑公司		
[标]发明人	卡丽格雷厄姆 艾伦埃克哈特 利萨珀金斯		
发明人	卡丽·格雷厄姆 艾伦·埃克哈特 利萨·珀金斯		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N1/28 C12N9/24		
CPC分类号	C12Y301/06013 G01N33/573 C12N9/2402 C12N9/2471 C12N9/2408 C12Y302/01076 C12Y302/01023 C12N9/16 G01N1/405 G01N2333/924 G01N2333/928 G01N2333/938 G01N2800/38 G16B99/00 G01N1/40 G01N1/4022		
代理人(译)	高瑜 郑霞		
优先权	61/484490 2011-05-10 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种制备用于进行分析的样品的方法，所述方法包括：提供包含糖蛋白的输入样品，将糖蛋白从所述输入样品捕获到固体载体上，且洗涤所述样品载体，以除去所述输入样品的未结合部分。

200

