



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101432626 B

(45) 授权公告日 2013.06.19

(21) 申请号 200780015772.0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2007.04.04

G01N 33/53 (2006.01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

60/789,304 2006.04.04 US

US 2004219604 A1, 2004.11.04, 全文.

60/793,664 2006.04.19 US

US 6991907 B1, 2006.01.31, 全文.

60/808,662 2006.05.26 US

CN 1470875 A, 2004.01.28, 全文.

60/861,498 2006.11.28 US

OH et al..Use of Dual Monoclonal

60/872,986 2006.12.04 US

Solid phase and a Polyclonal Detector to
Create an Immunoassay for the Detection
of Human Cardiac Troponin I..《Clinical
Biochemistry》.2000, 第33卷 255-262.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.10.31

KATRUKHA et al..Degradation of
cardiac troponin I: implication for
reliable immunodetection..《Clinical
Chemistry》.1998, 第44卷 (第12
期), 2433-2440.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/008506 2007.04.04

(87) PCT申请的公布数据

W02007/114947 EN 2007.10.11

(73) 专利权人 神谷来克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 加利福尼亚大学董事会

审查员 杨冀川

(72) 发明人 P·戈伊克斯 R·普斯卡斯

J·托德 R·利文格斯顿

D·赫尔德 A·吴

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

权利要求书2页 说明书54页 附图10页

(54) 发明名称

用于肌钙蛋白分析的高灵敏系统和方法

(57) 摘要

本发明提供了灵敏检测心肌肌钙蛋白的方法、组合物、试剂盒和系统,这样的方法、组合物、试剂盒和系统可用于对涉及心肌肌钙蛋白释放的状态进行诊断、预后和治疗方法的确定。

1. 测定样品中的心肌肌钙蛋白的方法,包括:

(a) 使样品与特异性结合心肌肌钙蛋白的捕获结合伴侣和特异性结合心肌肌钙蛋白的包含合适的标记物的检测结合伴侣接触以形成复合物;和

(b) 检测与所述复合物结合的单标记物分子,并使标记物的量与样品中心肌肌钙蛋白的浓度相关联,

其中所述检测包括使用能够以低于 10% 的变异系数在与样品中低于 50pg/mL 的心肌肌钙蛋白相关的浓度下检测单标记物分子的单分子分析器。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,在检测步骤 (b) 之前,所述复合物与未结合的心肌肌钙蛋白和未结合的检测结合伴侣分离。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其中,在分离后,所述检测结合伴侣从所述复合物上洗脱。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述捕获结合伴侣和检测结合伴侣中至少一种包括抗体。

5. 测定样品中的心肌肌钙蛋白的方法,包括:

(a) 使以下物质竞争结合固相上的捕获结合伴侣:

i. 样品中的心肌肌钙蛋白,和

ii. 包含可检测标记的标记的心肌肌钙蛋白类似物,及

(b) 检测与固相结合的单标记物分子,并使标记物的量与样品中心肌肌钙蛋白的浓度相关联,

其中所述检测包括使用能够以低于 10% 的变异系数在与样品中低于 50pg/mL 的心肌肌钙蛋白相关的浓度下检测单标记物分子的单分子分析器。

6. 如权利要求 5 所述的方法,其中在检测步骤 (b) 之前,样品中未结合的心肌肌钙蛋白和未结合的标记类似物与所述固相分离。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其中在分离后,所述标记的心肌肌钙蛋白类似物从所述固相洗脱。

8. 如权利要求 5 所述的方法,其中,所述捕获结合伴侣包括抗体。

9. 测定样品中的心肌肌钙蛋白的方法,包括:

(a) 使以下物质竞争结合具有可检测标记的检测结合伴侣:

i. 样品中的心肌肌钙蛋白,和

ii. 固定于固相上的心肌肌钙蛋白的类似物,及

(b) 检测与固相结合的单标记物分子,并使标记物的量与样品中心肌肌钙蛋白的浓度相关联,

其中所述检测包括使用能够以低于 10% 的变异系数在与样品中低于 50pg/mL 的心肌肌钙蛋白相关的浓度下检测单标记物分子的单分子分析器。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其中在检测步骤 (b) 之前,未结合的心肌肌钙蛋白和未结合的心肌肌钙蛋白类似物与所述固相分离。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中在分离后,所述检测结合伴侣从所述固相洗脱。

12. 如权利要求 9 所述的方法,其中,所述捕获结合伴侣包括抗体。

13. 如权利要求 1、5 或 9 所述的方法,其中,所述单分子分析器包括:

- (a) 用于发射电磁辐射的电磁辐射源；
- (b) 定位以接收由所述电磁辐射源发射的电磁辐射的探测空间；
- (c) 可操作地连接于所述探测空间的用于测量单标记物分子的电磁特征。
- 14. 如权利要求 1、5 或 9 所述的方法，其中，所述心肌肌钙蛋白是 cTnI 或 cTnT。
- 15. 如权利要求 14 所述的方法，其中，所述心肌肌钙蛋白是 cTnI。
- 16. 如权利要求 1、5 或 9 所述的方法，其中，心肌肌钙蛋白的检测限低于 20pg/mL。
- 17. 如权利要求 1、5 或 9 所述的方法，其中，心肌肌钙蛋白的检测限低于 10pg/mL。
- 18. 如权利要求 1、5 或 9 所述的方法，其中，所述标记物包含在被以其激发波长发射光的激光器激发时，能够发射至少约 200 个光子的荧光部分，其中激光聚焦于包含荧光部分的直径不小于约 5 微米的点上，而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。
- 19. 如权利要求 1、5 或 9 所述的方法，其中，所述标记物包含在被电磁辐射源以其激发波长激发时，能够发射至少约 200 个光子的荧光部分，且探测空间由来自电磁辐射源的光束聚集点限定，其中该点具有 1-10 微米的直径，且其中电磁辐射源指向该点的总能量最多达 15 微焦耳。
- 20. 如权利要求 18 或 19 所述的方法，其中，所述荧光部分包括含有至少一个取代的吡啶鎓环系统的分子，其中吡啶鎓环 3 位碳上的取代基含有化学反应性的基团或偶联基团。
- 21. 如权利要求 4、8 或 12 所述的方法，其中，所述抗体对于肌钙蛋白分子的特定区域是特异性的。
- 22. 如权利要求 14 所述的方法，其中，所述抗体对于包含心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 27-41 的区域是特异性的。
- 23. 如权利要求 21 所述的方法，其中，所述抗体对于心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 87-91 是特异性的。
- 24. 如权利要求 21 所述的方法，其中，所述抗体对于心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 41-49 是特异性的。
- 25. 如权利要求 4、8 或 12 所述的方法，其中，所述抗体包括多克隆抗体。
- 26. 如权利要求 4、8 或 12 所述的方法，其中，所述抗体是单克隆抗体。
- 27. 如权利要求 1、5 或 9 所述的方法，其中，所述样品是血液、血清或血浆样品。
- 28. 如权利要求 27 所述的方法，其中，所述样品是血清样品。
- 29. 如权利要求 5 或 9 所述的方法，其中，所述固相选自微量滴定板和顺磁性珠。
- 30. 如权利要求 5 所述的方法，其中，所述捕获伴侣与所述固相非共价地连接。
- 31. 如权利要求 5 所述的方法，其中，所述捕获伴侣与所述固相共价地连接。
- 32. 如权利要求 31 所述的方法，其中，所述捕获伴侣的所述共价连接使得所述捕获伴侣以特定取向连接到所述固相上。
- 33. 如权利要求 32 所述的方法，其中，所述的特定取向使得所述肌钙蛋白或肌钙蛋白复合物与所述捕获伴侣的特异性结合最大化。

用于肌钙蛋白分析的高灵敏系统和方法

[0001] 交叉参考

[0002] 该申请基于 35USC § 119 要求以下申请的优先权：2006 年 04 月 04 日提出的美国临时申请 60/789304 号、2006 年 04 月 19 日提出的美国临时申请 60/793664 号、2006 年 05 月 26 日提出的美国临时申请 60/808662 号、2006 年 11 月 28 日提出的美国临时申请 60/861498 号和 2006 年 12 月 04 日提出的美国临时申请 60/872986 号，本文完整引入所有以上专利申请作为参考。

背景技术

[0003] 在美国每年有差不多 600 万人因患有胸痛出现在急诊部门。尽管这些病人中仅有 15%–20% 最终诊断为患有急性冠状动脉综合征 (ACS)，但大约一半的病人被收入院以进行评估。相反，2% 的患有 ACS 的病人被错误地排除了。由于患有 ACS 的病人短期内具有相对高的发生严重的心血管不良事件的风险，显然需要对他们进行识别的精确客观的工具。

[0004] 目前使用的心肌损伤的标志物的缺点在于其临床应用受到了限制。心肌酶分析已经形成确定是否有心肌损伤的基础。遗憾的是，标准的肌酸激酶-MB (CK-MB) 分析在直至胸痛开始后 10–12 小时后才能可靠地排除梗塞形成。更早期的诊断对于纤维蛋白溶解治疗和治疗类选方面将具有非常独特的优势。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明的一方面提供了方法。

[0007] 在某些实施方式中，本发明提供了测定样品中是否存在肌钙蛋白的单一分子或其片段或复合物的方法，包括：i) 用标记物标记可能存在的所述分子、片段或复合物；和 ii) 检测是否存在所述标记物，其中，检测到标记物的存在表明样品中存在肌钙蛋白的单一分子、片段或复合物。在本发明方法的某些实施方式中，肌钙蛋白是肌钙蛋白的心肌异型体。在本发明方法的某些实施方式中，肌钙蛋白可以是心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 或心肌肌钙蛋白 C (cTnC)。在本发明方法的某些实施方式中，肌钙蛋白是 cTnI。在本发明方法的某些实施方式中，肌钙蛋白的单一分子可以以低于约 100pg/ml 的检测限被检测到。在本发明方法的某些实施方式中，肌钙蛋白的单一分子可以以低于约 20pg/ml 的检测限被检测到。在本发明方法的某些实施方式中，标记物包括荧光部分。在某些实施方式中，荧光部分在被以其激发波长发射光的激光器激发时，能够发射至少约 200 个光子，其中激光聚焦于包含荧光部分的直径不小于约 5 微米的点上，而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在本发明方法的某些实施方式中，荧光部分包括含有至少一个取代的吡啶鎓环系统的分子，其中，在吡啶鎓环 3 位碳上的取代基含有化学反应性的基团或偶联物质基团。在本发明方法的某些实施方式中，荧光部分包括染料。染料的例子包括但不限于 AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 647、AlexaFluor 680 及 AlexaFluor 700。在本发明方法的某些实施方式中，荧光部分包括 AlexaFluor 647。在某些实施方式中，荧光部分包括含有至少一个取代的吡啶鎓环系统的分子，其中，在吡啶鎓环 3 位碳上的取代基含有化学反应性的基团或偶联物质基团。在本发明方法的某些实施方式中，标记物进一步包括肌钙蛋白分子、片段或复

合物的结合伴侣 (partner)。在本发明方法的某些实施方式中,结合伴侣包括对肌钙蛋白分子、片段或复合物特异性的抗体。在本发明方法的某些实施方式中,抗体对于肌钙蛋白分子的特定区域是特异性的。在本发明方法的某些实施方式中,抗体对于包含心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 27-41 的区域是特异性的。在本发明方法的某些实施方式中,抗体可以是多克隆抗体。在本发明方法的某些实施方式中,抗体是单克隆抗体。在本发明方法的某些实施方式中,所述方法进一步包括在固体载体上捕获肌钙蛋白或肌钙蛋白复合物。在本发明方法的某些实施方式中,固体载体可以是微量滴定板或顺磁性珠。在本发明方法的某些实施方式中,固体载体包括连接在固体载体上的对于肌钙蛋白或肌钙蛋白复合物特异性的捕获伴侣。在本发明方法的某些实施方式中,捕获伴侣与固体载体的连接是非共价的。在本发明方法的某些实施方式中,捕获伴侣与固体载体的连接是共价的。在本发明方法的某些实施方式中,捕获伴侣的共价连接使得捕获伴侣以特定取向连接到固体载体上。在本发明方法的某些实施方式中,特定取向使得肌钙蛋白或肌钙蛋白复合物和捕获伴侣的特异性结合最大化。在本发明方法的某些实施方式中,捕获伴侣包括抗体。在本发明方法的某些实施方式中,抗体是单克隆抗体。在本发明方法的某些实施方式中,抗体对于心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 87-91 是特异性的。在本发明方法的某些实施方式中,抗体对于心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 41-49 是特异性的。在本发明方法的某些实施方式中,样品是血液、血清或血浆样品。在本发明方法的某些实施方式中,样品是血清样品。在本发明方法的某些实施方式中,标记物包括荧光部分,且步骤 ii) 包括使标记物穿过单分子检测器。在本发明方法的某些实施方式中,单分子检测器包括:a) 激发荧光部分的电磁辐射源;b) 供荧光部分穿过的毛细流动池;c) 用于在毛细流动池中移动荧光部分的动力源;d) 限定在毛细流动池内部的用于接收由电磁源发射的电磁辐射的探测空间;e) 可操作地连接于探测空间的、用于测量激发的荧光部分的电磁特征的电磁辐射检测器;和 f) 位于探测空间和检测器之间的显微镜物镜,其中,该物镜是高数值孔径透镜。

[0008] 在某些实施方式中,本发明提供了确定个体的诊断、预后或治疗方法的方法,包括:i) 测定该个体的样品中的心肌肌钙蛋白浓度,或测定该个体的系列样品中的心肌肌钙蛋白浓度,其中,通过对样品中心肌肌钙蛋白的检测限低于约 50pg/ml 的心肌肌钙蛋白分析方法测定浓度;和 ii) 根据样品的浓度或系列样品的浓度确定个体的诊断、预后或治疗方法。在本发明方法的某些实施方式中,步骤 ii) 包括分析步骤,例如,将所述浓度或系列浓度与浓度的正常值比较,将所述浓度或系列浓度与预定的阈水平比较,将所述浓度或系列浓度与基线值比较,和确定系列浓度的浓度变化率。在本发明方法的某些实施方式中,步骤 ii) 包括比较样品中肌钙蛋白的浓度与预定的阈浓度,并且,如果样品浓度高于阈水平,则确定诊断、预后或治疗方法。在本发明方法的某些实施方式中,通过测定正常个体组中肌钙蛋白的第 99 百分位数 (percentile) 浓度,并设定阈浓度为该第 99 百分位数浓度而确定阈浓度。在本发明方法的某些实施方式中,在心脏应力试验过程中或之后,采集至少一个样品。在本发明方法的某些实施方式中,心肌肌钙蛋白选自心肌肌钙蛋白 I 和心肌肌钙蛋白 T。在本发明方法的某些实施方式中,心肌肌钙蛋白是心肌肌钙蛋白 I。在本发明方法的某些实施方式中,心肌肌钙蛋白的浓度是总心肌肌钙蛋白浓度。在本发明方法的某些实施方式中,心肌肌钙蛋白的浓度是心肌肌钙蛋白复合物、心肌肌钙蛋白片段、磷酸化的心肌肌钙蛋白、氧化的心肌肌钙蛋白或其组合的浓度。在本发明方法的某些实施方式中,心肌肌钙蛋

白的浓度相比于总心肌肌钙蛋白。在本发明方法的某些实施方式中,诊断、预后或治疗方法是心肌梗塞的诊断、预后或治疗方法。在本发明方法的某些实施方式中,诊断、预后或治疗方法包括心肌梗塞风险水平的危险分级。在本发明方法的某些实施方式中,在个体向医疗专业人员呈现一种或多种表明心肌缺血或心肌梗塞或其可能性的症状时或在接近该时间的时刻测定所述浓度或系列浓度。在某些实施方式中,一种或多种症状可以是胸痛、胸闷、臂痛、不正常的 EKG、不正常的酶水平或呼吸短促。在某些实施方式中,通过包括检测肌钙蛋白的单一分子或其复合物或片段的方法测定浓度。在某些实施方式中,本发明的方法包括用包含荧光部分的标记物标记肌钙蛋白或肌钙蛋白复合物。在本发明方法的某些实施方式中,荧光部分在被以其激发波长发射光的激光器激发时,能够发射至少约 200 个光子,其中激光聚焦于包含荧光部分的直径 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在本发明方法的某些实施方式中,荧光部分包括含有至少一个取代的吡啶鎓环系统的分子,其中,在吡啶鎓环 3 位碳上的取代基含有化学反应性的基团或偶联物质基团。在本发明方法的某些实施方式中,荧光部分包括选自 AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 647、AlexaFluor 680 或 AlexaFluor 700 的染料。在本发明方法的某些实施方式中,荧光部分包括 AlexaFluor 647。在本发明方法的某些实施方式中,标记物进一步包括肌钙蛋白的结合伴侣。在某些实施方式中,结合伴侣包括对肌钙蛋白特异性的抗体。在某些实施方式中,该抗体是多克隆抗体。在本发明方法的某些实施方式中,该方法进一步包括在固体载体上捕获肌钙蛋白或肌钙蛋白复合物。在本发明方法的某些实施方式中,固体载体可以是微量滴定板或顺磁性珠。在本发明方法的某些实施方式中,固体载体包括连接在固体载体上的对于肌钙蛋白或肌钙蛋白复合物特异性的捕获伴侣。在本发明方法的某些实施方式中,捕获伴侣与固体载体的连接是非共价的。在本发明方法的某些实施方式中,捕获伴侣与固体载体的连接是共价的。在本发明方法的某些实施方式中,捕获伴侣的共价连接使得捕获伴侣以特定取向连接到固体载体。在本发明方法的某些实施方式中,特定取向使得肌钙蛋白或肌钙蛋白复合物和捕获伴侣的特异性结合最大化。在本发明方法的某些实施方式中,步骤 i) 进一步包括评估个体的另一个指标,且步骤 ii) 包括基于样品中肌钙蛋白的浓度和其它非肌钙蛋白标志物的指标的评估或基于系列样品的浓度确定个体的诊断、预后或治疗方法。在某些实施方式中,其它指标是心肌缺血或心肌梗塞的临床指标。在某些实施方式中,其它指标是样品或系列样品中的一种或多种非肌钙蛋白标志物的浓度。在本发明方法的某些实施方式中,一种或多种标志物是心肌缺血的标志物、或炎症和斑块不稳定性的标志物。在某些实施方式中,一种或多种心肌缺血的标志物可以是肌酸激酶 (CK) 及其心肌部分 CK 心肌带 (MB)、天冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶 (LDH)、 α -羟丁酸脱氢酶、肌红蛋白、谷草转氨酶、糖原磷酸化酶 BB、未结合的游离脂肪酸、心型脂肪酸结合蛋白 (H-FABP)、缺血修饰白蛋白、肌球蛋白轻链 1 或肌球蛋白轻链 2。在本发明方法的某些实施方式中,一种或多种标志物包括一种或多种心肌损伤的特异性的标志物。在本发明方法的某些实施方式中,诊断、预后或治疗方法是非心肌梗塞状态的诊断、预后或治疗方法。在某些实施方式中,所述状态是心脏毒性。在某些实施方式中,心脏毒性与向个体施用药物有关。在本发明方法的某些实施方式中,所述状态选自急性风湿热、淀粉样变性、心脏创伤 (包括挫伤、切除、起搏、放电、心脏复律、导管插入和心脏手术)、再灌注损伤、充血性心力衰竭、末期肾衰竭、II 型糖原贮积病 (庞普病)、心脏移植、具有输血性含铁血黄素沉着的

血红蛋白病 (haemoglobinopathy)、高血压 (包括妊娠期高血压)、低血压 (常伴有心律不齐)、甲状腺功能减退、心肌炎、心包炎、术后非心脏手术、肺栓塞及败血症。

[0009] 本发明的另一方面包括组合物。

[0010] 在某些实施方式中,本发明包括用于检测肌钙蛋白异型体的组合物,该组合物包括连接有荧光部分的肌钙蛋白异型体的结合伴侣,其中,荧光部分在被以其激发波长发射光的激光器激发时,能够发射至少约 200 个光子,其中激光聚焦于包含荧光部分的直径不小于约 5 微米的点,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在本发明组合物的某些实施方式中,结合伴侣包括肌钙蛋白异型体的抗体。在某些实施方式中,抗体是多克隆抗体。在某些实施方式中,抗体是单克隆抗体。在某些实施方式中,肌钙蛋白异型体是心肌异型体。在某些实施方式中,心肌异型体选自 cTnI 和 cTnT。在某些实施方式中,心肌异型体是 cTnI。在某些实施方式中,抗体对于肌钙蛋白分子的特定区域是特异性的。在某些实施方式中,抗体对于包含心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 27-41 的区域是特异性的。在本发明组合物的某些实施方式中,荧光部分包括含有至少一个取代的吡啶鎓环系统的分子,其中在吡啶鎓环 3 位碳上的取代基包含化学反应性的基团或偶联物质基团。在某些实施方式中,荧光部分包括可以是 AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 647、AlexaFluor 680 或 AlexaFluor 700 的染料。在某些实施方式中,荧光部分包括 AlexaFluor647。

[0011] 在某些实施方式中,本发明涉及含有一组用于测定心肌肌钙蛋白浓度的标准物的组合物,其中,所述标准物中的至少一种的心肌肌钙蛋白浓度低于约 10pg/ml。

[0012] 在某些实施方式中,本发明涉及试剂盒,该试剂盒包括含有连接在荧光染料部分上的心肌肌钙蛋白抗体的组合物,其中,荧光染料部分在被以其激发波长发射光的激光器激发时,能够发射至少约 200 个光子,其中激光聚焦于包含荧光部分的直径不小于约 5 微米的点,并且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳,其中,组合物包装于合适的包装中。在本发明的试剂盒的某些实施方式中,心肌肌钙蛋白是心肌肌钙蛋白 I 或心肌肌钙蛋白 T。在某些实施方式中,心肌肌钙蛋白是心肌肌钙蛋白 I。在本发明的试剂盒的某些实施方式中,试剂盒进一步包括说明书。在本发明的试剂盒的某些实施方式中,试剂盒进一步包括含有连接在固体载体上的心肌肌钙蛋白 I 的捕获抗体的组合物。在某些实施方式中,固体载体包括微量滴定板或顺磁性微粒。在本发明的试剂盒的某些实施方式中,试剂盒进一步包括选自洗涤缓冲液、分析缓冲液、洗脱缓冲液和校准物稀释液的成分。在本发明的试剂盒的某些实施方式中,进一步包括心肌肌钙蛋白标准物。

[0013] 参考引用

[0014] 本说明书中提到的所有出版物和专利申请都引入本文作为参考,如同每一单独出版物或专利申请具体且单独地引入作为参考。

[0015] 附图简要说明

[0016] 图 1A 和 1B 单一微粒分析器的组件的排列的示意图。图 1A 显示包括一个电磁源和一个电磁检测器的分析器,图 1B 显示包括两个电磁源和一个电磁检测器的分析器。

[0017] 图 2A 和 2B 单一微粒分析器的毛细流动池的示意图。图 2A 显示包括一个电磁源的分析器的流动池,图 2B 显示包括两个电磁源的分析器的流动池。

[0018] 图 3A 和 3B 显示单一微粒分析器的激光器和检测器光学器件的常规 (A) 和共焦 (B) 定位的示意图。图 3A 显示具有一个电磁源和一个电磁检测器的分析器的排列,图 3B 显

示具有两个电磁源和两个电磁检测器的分析器的排列。

[0019] 图 4cTnI 浓度范围的线性标准曲线。

[0020] 图 5cTnI 的生物学阈（临界浓度）是 7pg/ml 的 cTnI 浓度，其以相应的 10% 的 CV 确定第 99 百分位数浓度。

[0021] 图 6 使用本发明的分析器系统确定的 cTnI 分析结果与由国家标准 和技术研究所 (National Institute of Standards and Technology) 提供的标准测量的相关性 ($R^2 = 0.9999$)。

[0022] 图 7 来自在急诊室出现胸痛的病人的系列血清样品中 cTnI 的检测。使用本发明的分析器系统得到的测量值与使用商用的分析方法得到的测量值进行比较。

[0023] 图 8cTnI 的正常（没有局部缺血）生物学浓度和来自出现胸痛的病人的血清样品中的 cTnI 浓度的分布。

[0024] 在附加的权利要求中详细提出了本发明的新型特征。通过参考以下给出利用了本发明的原理的示例性实施方式的详细说明和其附图可获得对于本发明的特征和优点的更好的理解。

具体实施方式

[0025] 概要

[0026] I. 引言

[0027] II. 心肌肌钙蛋白

[0028] III. 心肌肌钙蛋白的标记物

[0029] A. 肌钙蛋白的结合伴侣

[0030] 1. 抗体

[0031] 2. 交叉反应性抗体

[0032] B. 和结合伴侣一起使用的荧光部分

[0033] 1. 染料

[0034] 2. 量子点

[0035] C. 结合伴侣 - 荧光部分组合物

[0036] IV. 心肌肌钙蛋白的高灵敏分析

[0037] A. 样品

[0038] B. 样品制备

[0039] C. 肌钙蛋白的检测和浓度的测定

[0040] V. 适于肌钙蛋白的高灵敏分析的仪器和系统

[0041] A. 装置 / 系统

[0042] B. 单一微粒分析器

[0043] 1. 电磁辐射源

[0044] 2. 毛细流动池

[0045] 3. 动力

[0046] 4. 检测器

[0047] C. 采样系统

[0048] D. 样品制备系统

[0049] E. 样品回收

[0050] VI. 使用心肌肌钙蛋白的高灵敏分析的方法

[0051] A. 样品

[0052] B. 诊断、预后或治疗方法的确定

[0053] 1. 急性心肌梗塞

[0054] 2. AMI 以外的状态

[0055] a. 心脏毒性

[0056] C. 商业方法

[0057] VII. 组合物

[0058] VIII. 试剂盒

[0059] I. 引言

[0060] 本发明提供了用于高灵敏检测肌钙蛋白如心肌肌钙蛋白的组合物和方法。心肌独有的肌钙蛋白的心肌异型体（心肌肌钙蛋白 I 和 / 或 T）释放进入血液表明心肌损伤，并提供了其用作诊断或预后标志物、或者用于帮助确定治疗的基础。

[0061] 肌肉中的肌钙蛋白复合物由肌钙蛋白 I、C 和 T 组成。肌钙蛋白 C 以两种异型体存在，一种来自心肌和慢缩肌，一种来自快缩肌；因为肌钙蛋白 C 实际上在所有的横纹肌中发现，其作为特异性标志物的用途是有限的。相反，肌钙蛋白 I 和 T 在慢缩肌、快缩肌和心肌中以不同的异型体表达。肌钙蛋白 I 和 T 的独特心肌异型体使得它们在免疫学上与骨骼肌的其它肌钙蛋白相区别。因此，心肌肌钙蛋白 I 和 T 释放进入血液表明心肌损伤，并提供了其用作诊断或预后标志物，或者用于帮助确定治疗的基础。

[0062] 目前使用的心肌损伤的标志物具有限制临床应用的缺点。心肌酶分析已经形成确定是否出现损伤心肌的基础。遗憾的是，标准的肌酸激酶 -MB (CK-MB) 分析在直至胸痛开始后 10-12 小时才能可靠地排除梗塞形成。更早期的诊断对于纤维蛋白溶解治疗和治疗类选方面将具有非常独特的优势。

[0063] 因为在健康个体的循环中发现的肌钙蛋白的水平非常低，且心肌特异性肌钙蛋白不会来自于心脏外的来源，所以肌钙蛋白是非常灵敏且特异性的心脏损伤的标志物。除了心肌梗塞，许多其它状态也能引起心肌损伤，而且这样的损伤的早期检测证明对临床医生是有用的。但是，现有的心肌肌钙蛋白的检测和定量方法没有足够的灵敏度，直至释放进入血液的心肌肌钙蛋白水平达到异常高的浓度时，如 0.1 ng/ml 或更高时，才能检测到。

[0064] 因此，本发明的方法和组合物包括高灵敏检测和定量心肌肌钙蛋白的方法和组合物，和基于这种高灵敏检测和定量的诊断、预后和 / 或确定治疗的组合物和方法。

[0065] II. 心肌肌钙蛋白

[0066] 当心肌肌钙蛋白的两种独特形式，心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 和心肌肌钙蛋白 (cTnT) 从心肌释放进入血液时，在血液中存在各形式的几个类型。其中包括由这两种形式彼此形成的和 / 或与心肌肌钙蛋白 C (cTnC) 形成的各种复合物。而且，这两种形式实际上会发生即时的蛋白水解降解，从而产生多种片段。另外，各种磷酸化和氧化形式的肌钙蛋白也可能存在于血液中。参见，例如，美国专利 6 991 907 号，其在本文完整引入作为参考。除非另有说明，本文使用的“心肌肌钙蛋白”包括所有形式的心肌肌钙蛋白，包括

[0067] 在某些实施方式中,本发明提供了检测和/或测定总心肌肌钙蛋白(即如血液、血清或血浆样品的样品中的所有或主要部分的心心肌肌钙蛋白的总和,不管它是游离的、复合的、蛋白水解(proteolytic)片段、磷酸化的、氧化的还是经其它修饰的)的浓度的方法和组合物。在某些实施方式中,心肌肌钙蛋白是 cTnI,在其它实施方式中,心肌肌钙蛋白是 cTnT,且在另外的其它实施方式中,心肌肌钙蛋白是 cTnI 和 cTnT。可以理解,不需要获得绝对的总测量值,只要确定与总量一致的比例就可以,其可以和标准值比较。也可以理解,如果一种形式的肌钙蛋白是总量中较少的组分,那么该形式检测为不存在或低水平,将不会明显影响肌钙蛋白总量的测量。因此,本文所用的“总心肌肌钙蛋白”,是指计划测量样品中的所有或基本上所有形式的特定的心肌肌钙蛋白,例如,所有的 cTnI 或所有的 cTnT,其中,样品间的一致性使得可以通过样品和标准的比较,或一个样品和另一个样品的比较来得出临床相关的结论。

[0068] 在某些实施方式中,本发明提供了检测和/或测定样品中肌钙蛋白各种形式中的一种或多种作为独立个体的浓度的方法和组合物,例如,复合的 cTnI、游离的 cTnI、混杂的 cTnI(例如,氧化的或磷酸化的),或复合的 cTnT、游离的 cTnT、混杂的 cTnT(例如,氧化的或磷酸化的),且通常能够提供样品中该形式的浓度。在后面的实施方式中,可以确定不同个体的比例或绝对值。因此,在某些实施方式中,本发明提供了检测和通常测定一种或多种形式的复合肌钙蛋白、或一种或多种肌钙蛋白片段、或一种或多种氧化或磷酸化形式的肌钙蛋白的浓度的方法。在某些实施方式中,检测多于一种的形式,且可以测定各种形式的浓度,例如,通过对单一的样品进行不同个体的多元分析,或对相同样品或类似样品的等分试样进行单独的分析。可以获得各种形式的浓度的比例。例如,可以确定特定形式的心心肌肌钙蛋白(例如片段、复合物、或修饰形式)的浓度与总心肌肌钙蛋白浓度的比例。这些比例和/或绝对值能够提供有意义的临床信息。例如,心肌肌钙蛋白的片段的相对比例能够表明自释放进入血液以来的时间长度,从而,间接地表明例如自心肌梗塞以来的时间长度。参见,例如,美国专利 6991907 号,其在本文完整引入作为参考。

[0069] III. 心肌肌钙蛋白标记物

[0070] 在某些实施方式中,本发明提供了包括用于高灵敏检测和定量心肌肌钙蛋白的标记物的方法和组合物。

[0071] 本领域的技术人员可以认识到,许多策略可用于标记靶分子,使其在微粒混合物中能够被检测或区分出来。可以使用任何已知的方法连接标记物,包括利用标记物和靶标之间的非特异性或特异性相互作用。标记物可以提供可检测的信号或影响微粒在电场中的迁移率。而且,可以直接地或通过结合伴侣完成标记。

[0072] 在某些实施方式中,标记物包括连接在荧光部分上的肌钙蛋白的结合伴侣。

[0073] A. 肌钙蛋白的结合伴侣

[0074] 可以使用任何合适的对于要检测的心心肌肌钙蛋白形式具有所需的特异性的结合伴侣。例如,可以使用对于所有或基本上所有 cTnI 形式特异性的结合伴侣,或可以使用对于所有或基本上所有 cTnT 形式特异性的结合伴侣;一般地,这样的结合伴侣结合到很可能在样品中发现的心心肌肌钙蛋白的所有或大部分不同形式所共有的心肌肌钙蛋白的区域。在某些实施方式中,可以使用对一种或多种心肌肌钙蛋白的特定形式特异性的结合伴侣,例如,复合的 cTnI、游离的 cTnI、混杂的 cTnI(例如,氧化的或磷酸化的)的结合伴侣,或复合

的 cTnT、游离的 cTnT、混杂的 cTnT（例如，氧化的或磷酸化的）的结合伴侣。结合伴侣为本领域已知，且包括，例如，适体（aptamer）、凝集素和受体。有用的和通用类型的结合伴侣是抗体。

[0075] 1. 抗体

[0076] 在某些实施方式中，结合伴侣是心肌肌钙蛋白的特异性抗体。本文使用的术语“抗体”是一个广义的术语且在其一般意义上使用，包括但不限于，指天然产生的抗体及非天然产生的抗体，包括，例如，单链抗体、嵌合抗体、双功能抗体和人源化抗体及其抗原结合片段。在某些实施方式中，抗体是 cTnI 特异性的。在某些实施方式中，抗体是 cTnT 特异性的。在某些实施方式中，标记物包括 cTnI 和 cTnT 两者的抗体。抗体可以是对于所有或基本上所有形式的心肌肌钙蛋白特异性的，例如，对于所有或基本上所有形式的 cTnI 或对于所有或基本上所有形式的 cTnT 特异性的。在某些实施方式中，可以使用对于一种或多种特定形式的心肌肌钙蛋白特异性的抗体，例如，复合的 cTnI、游离的 cTnI、混杂的 cTnI（例如，氧化的或磷酸化的）的结合伴侣，或复合的 cTnT、游离的 cTnT、混杂的 cTnT（例如，氧化的或磷酸化的）的结合伴侣。本发明也包括了抗体的混合物，例如，cTnI 和 cTnT 抗体的混合物，或各种形式肌钙蛋白（游离的、复合的，等等）的抗体的混合物，或混合物的混合物。

[0077] 可以理解，对于激起（raise）抗体的肌钙蛋白的表位或区域的选择将决定其特异性，例如，对于全肌钙蛋白、特定片段、复合的肌钙蛋白、修饰的肌钙蛋白等等的特异性。在某些实施方式中，抗体对于心肌肌钙蛋白的特定的氨基酸区域是特异性的。在某些实施方式中，抗体对于人心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 27-41 是特异性的。单克隆抗体和多克隆抗体都可以作为结合伴侣使用。在某些实施方式中，抗体是多克隆抗体。在某些实施方式中，抗体是单克隆抗体。在某些实施方式中，抗体是对于人心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 27-41 特异性的多克隆抗体。在某些实施方式中，这种抗体不受肝素、磷酸化作用、氧化作用和肌钙蛋白复合物形成的影响，且不会与骨骼肌的肌钙蛋白 I 交叉反应。

[0078] 生产抗体的方法早已建立。在 FEBS Lett. 270, 57-61 (1990) 和 Genomics 21, 311-316 (1994) 中描述了肌钙蛋白 I 和肌钙蛋白 T 的心肌特异性序列。本领域的技术人员可以认识到，可使用许多方法生产抗体，例如，在 Antibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow 和 David Lane, ColdSpring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N. Y. 中描述的方法。本领域的技术人员也可以理解，也可以使用各种方法（AntibodyEngineering: A Practical Approach (Borrebaeck, C. 等人), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992)）根据基因信息制备模拟抗体的结合片段或 Fab 片段。在美国专利 5579687、6991907 号及在美国专利申请 20050164317 号中公开了产生针对肌钙蛋白的各种复合物、片段、磷酸化形式和氧化形式的抗体的方法，本文将它们完整引入作为参考。在国际专利申请 PCT/US94/05468 号中描述了模拟肌钙蛋白 I 的心肌特异性序列的包含 14 个氨基酸的合成肽，和用于制备该肽的抗体的方法。也可以商购游离和复合的心肌肌钙蛋白的单克隆抗体和多克隆抗体（HyTest, HyTest Ltd., Turku Finland; Abcam Inc., Cambridge, MA, USA, Life Diagnostics, Inc., West Chester, PA, USA; Fitzgerald Industries International, Inc., Concord, MA 01742-3049 USA; BiosPacific, Emeryville, CA）。

[0079] 在某些实施方式中，抗体是哺乳动物的抗体，例如，山羊多克隆抗 cTnI 抗体。抗

体可以是对于 cTnI 的特定区域特异性的,例如,对于人心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 27-41 特异性的。捕获结合伴侣体和检测结合伴侣体对,例如,捕获和检测抗体对,可用于本发明的某些实施方式中。因此,在某些实施方式中,使用异相分析方案,其中通常使用两种结合伴侣体,例如,两种抗体。一种结合伴侣体是捕获伴侣体,通常固定于固体载体上,另一种结合伴侣体是检测结合伴侣体,一般具有可检测的附加标记物。在某些实施方式中,一对中的捕获结合伴侣体成员是对于所有或基本上所有形式的心肌肌钙蛋白特异性的抗体。举例来说,抗体,例如,对于游离的心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的氨基酸 41-49 和与其它肌钙蛋白成分形成复合物的 cTnI 特异性的单克隆抗体。优选地,这种抗体不受肝素、磷酸化作用、氧化作用和肌钙蛋白复合物形成影响,且不会与骨骼肌的肌钙蛋白 I 交叉反应。因此,据认为抗体结合总 cTnI。另一例子是对于心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的氨基酸 87-91 特异性的且不会与骨骼肌的肌钙蛋白 I 交叉反应的单克隆抗体。这样的抗体可从 BiosPacific, Emeryville, CA 获得,其它的抗体对是已知的或能够设计的。

[0080] 交叉反应性抗体 在某些实施方式中,使用与各种物种交叉反应的抗体作为捕获抗体、检测抗体或作为两者是有利的。这样的实施方式包括通过测定释放进入血液的例如作为心肌损伤标志物的心肌肌钙蛋白测量药物毒性。交叉反应性抗体允许在例如非人类的一个物种上进行毒性研究,并在分析试剂中使用同样的抗体或抗体对将结果直接转到如人类的另一物种的研究或临床观察上,从而减少分析之间的变异性。因此,在某些实施方式中,一种或多种作为标志物(例如,如心肌肌钙蛋白 I 的心肌肌钙蛋白)的结合伴侣体使用的抗体可以是交叉反应性抗体。在某些实施方式中,抗体与来自选自人、猴、狗和小鼠的至少两个物种的标志物(例如,心肌肌钙蛋白)发生交叉反应。在某些实施方式中,抗体与来自人、猴、狗和小鼠的所有种类的标志物(例如,心肌肌钙蛋白)发生交叉反应。

[0081] B. 和结合伴侣体一起使用的荧光部分

[0082] 在某些实施方式中,例如抗体的结合伴侣体连接在荧光部分上。该部分的荧光足够允许在单分子检测器(如本文所述的单分子检测器)中检测。本文使用的术语“荧光部分”包括一种或多种荧光体,其总的荧光使得该部分可以在本文所述的单分子检测器中检测到。因此,荧光部分可以包括单一的个体(例如,量子点或荧光分子)或多个个体(例如,多个荧光分子)。可以理解,本文使用的术语“部分”指一组荧光体,例如,多个荧光染料分子,各单个个体可以单独地连接在结合伴侣体上,或多个个体可以连接在一起,只要作为一组的个体提供足够的检测荧光即可。

[0083] 一般地,所述部分的荧光包括对量子效率和缺乏光漂白性能进行组合以使得该部分足以在单分子检测器中在背景水平之上检测到,并具有达到希望的分析检测水平、准确度及精密度所必需的相容性。例如,在某些实施方式中,荧光部分的荧光使得其允许在本文所述的装置中以低于约 10、5、4、3、2 或 1pg/ml 的检测水平和低于约 20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1% 或更低的变异系数(例如,约 10% 或更低)检测和 / 或定量肌钙蛋白。在某些实施方式中,荧光部分的荧光使得其允许在本文所述的装置中以低于约 5pg/ml 的检测限和低于约 10% 的变异系数检测和 / 或定量肌钙蛋白。本文所用的术语“检测限”包括可以确认样品中含有目标物质分子的最低浓度,例如,第一非零值。它可以通过零点的变异性标准曲线的斜率确定。例如,分析的检测限可以通过建立标准曲线、确定标准曲线零位值并向该值加上 2 个标准差来确定。产生等于该值的信号的目标物质浓度是“检测

下限”的浓度。

[0084] 更进一步,该部分具有与其在选择的分析中的用途一致的性质。在某些实施方式中,分析是免疫分析,其中,荧光部分连接在抗体上;该部分必须具有使得其不与其它抗体或蛋白质聚集,或产生不超过与所需的分析准确度及精密度相容的聚集的性质。在某些实施方式中,优选的荧光部分是具有以下特性的组合的荧光部分,例如染料分子:1) 高的吸收系数;2) 高的量子产额;3) 高的光稳定性(低的光漂白);和4) 与标记目标生物分子(例如,蛋白质)的相容性,从而其可以使用本发明的分析器或系统进行分析(例如,不会导致目标蛋白质沉淀,或荧光部分连接的蛋白质沉淀)。

[0085] 在本发明的某些实施方式中可用的荧光部分(例如,单个荧光染料分子或多个荧光染料分子)可以从其被 EM 辐射激发时光子发射特征方面进行限定。例如,在某些实施方式中,本发明利用了当受到在荧光染料部分的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射平均至少约 10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、350、400、500、600、700、800、900 或 1000 个光子的荧光染料部分(例如,单个荧光染料分子或多个荧光染料分子),其中激光聚焦于包含该荧光染料部分的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。可以理解,总能量可以通过激光器的功率输出和染料部分的暴露时间长度的许多不同组合获得。例如,可以使用功率输出为 1mW 的激光器 3 毫秒,可以使用功率输出为 3mW 的激光 1 毫秒,可以使用功率输出为 6mW 的激光 0.5 毫秒,可以使用功率输出为 12mW 的激光 0.25 毫秒,等等。

[0086] 在某些实施方式中,本发明利用了当被在荧光染料部分的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射平均至少约 50 个光子的荧光染料部分(例如,单个荧光染料分子或多个荧光染料分子),其中激光聚焦于包含该荧光染料部分的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在某些实施方式中,本发明利用了当被在荧光染料部分的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射平均至少约 100 个光子的荧光染料部分(例如,单个荧光染料分子或多个荧光染料分子),其中激光聚焦于包含该荧光染料部分的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在某些实施方式中,本发明利用了当被在荧光染料部分的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射平均至少约 150 个光子的荧光染料部分(例如,单个荧光染料分子或多个荧光染料分子),其中激光聚焦于包含该荧光染料部分的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在某些实施方式中,本发明利用了当被在荧光染料部分的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射平均至少约 200 个光子的荧光染料部分(例如,单个荧光染料分子或多个荧光染料分子),其中激光聚焦于包含该荧光染料部分的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在某些实施方式中,本发明利用了当被在荧光染料部分的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射平均至少约 300 个光子的荧光染料部分(例如,单个荧光染料分子或多个荧光染料分子),其中激光聚焦于包含该荧光染料部分的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在某些实施方式中,本发明利用了当被在荧光染料部分的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射平均至少约 500 个光子的荧光染料部分(例如,单个荧光染料分子或多个荧光染料分子),其中激光聚焦于包含该荧光染料部分的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。

焦耳。

[0087] 在某些实施方式中,荧光部分包括平均至少约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个荧光体(例如荧光分子)。在某些实施方式中,荧光部分包括平均不超过约 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 11 个荧光体,例如荧光分子。在某些实施方式中,荧光部分包括平均约 1-11、或约 2-10、或约 2-8、或约 2-6、或约 2-5、或约 2-4、或约 3-10、或约 3-8、或约 3-6、或约 3-5、或约 4-10、或约 4-8、或约 4-6、或约 2、3、4、5、6 或大于约 6 个荧光体。在某些实施方式中,荧光部分包括平均约 2-8 个连接的荧光部分。在某些实施方式中,平均为约 2-6 个荧光体。在某些实施方式中,荧光部分包括平均约 2-4 个荧光体。在某些实施方式中,荧光部分包括平均约 3-10 个荧光体。在某些实施方式中,荧光部分包括平均约 3-8 个荧光体。在某些实施方式中,荧光部分包括平均约 3-6 个荧光体。“平均”意味着在作为本发明的标记物组的代表性样品的给定样品中(其中,样品包含多个结合伴侣-荧光部分单元),如通过标准分析方法确定的,组成荧光部分的特定荧光体与结合伴侣的摩尔比对应于所给定的数值或数值范围。例如,在其中标记物包括作为抗体的结合伴侣和包括多个具有特定吸收的荧光染料分子的荧光部分的实施方式中,可以使用分光光度分析法,其中,将标记物溶液稀释至合适的水平,并在 280nm 测定吸光度以测定蛋白质(抗体)的摩尔浓度,和在例如 650nm(对于 AlexaFluor647)测定吸光度以测定荧光染料分子的摩尔浓度。后者和前者摩尔浓度的比值代表连接在各个抗体上的荧光部分中荧光体(染料分子)的平均数。

[0088] 1. 染料

[0089] 在某些实施方式中,本发明利用了包括荧光染料分子的荧光部分。在某些实施方式中,本发明利用了被在分子的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射至少约 50 个光子的荧光染料分子,其中激光聚焦于包含该分子的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在某些实施方式中,本发明利用了被在分子的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射至少约 75 个光子的荧光染料分子,其中激光聚焦于包含该分子的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在某些实施方式中,本发明利用了被在分子的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射至少约 100 个光子的荧光染料分子,其中激光聚焦于包含该分子的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在某些实施方式中,本发明利用了被在分子的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射至少约 150 个光子的荧光染料分子,其中激光聚焦于包含该分子的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在某些实施方式中,本发明利用了被在分子的激发波长处发射光的激光器激发时能够发射至少约 200 个光子的荧光染料分子,其中激光聚焦于包含该分子的直径不低于约 5 微米的点上,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。

[0090] 下面的表 1 给出了可用于本发明的荧光部分的荧光体的非穷尽的列表。在某些实施方式中,荧光体选自 Alexa Flour 488、532、647、700、750、荧光素、B-藻红蛋白、别藻蓝蛋白、PBXL-3 及 Qdot 605。

[0091] 表 1 荧光体

[0092] 染料	Ex (nm)	E (M)-1	Em (nm)	Mw
[0093] Bimane	380	5,700	458	282.31

[0094]	Dapoxyl	373	22,000	551	362.83
[0095]	二甲氨基香豆素-4-乙				
[0096]	酸	375	22,000	470	344.32
[0097]	Marina blue	365	19,000	460	367.26
[0098]	8-苯胺基萘-1-磺酸	372		480	
[0099]	Cascade blue	376	23,000	420	607.42
[0100]	Alexa Fluor405	402	35,000	421	1028.26
[0101]	Cascade blue	400	29,000	420	607.42
[0102]	Cascade yellow	402	24,000	545	563.54
[0103]	Pacific blue	410	46,000	455	339.21
[0104]	PyMPO	415	26,000	570	582.41
[0105]	Alexa 430	433	15,000	539	701.75
[0106]	Atto-425	438		486	
[0107]	NBD	465	22,000	535	391.34
[0108]	Alexa 488	495	73,000	519	643.41
[0109]	荧光素	494	79,000	518	376.32
[0110]	Oregon Green 488	496	76,000	524	509.38
[0111]	Atto 95	495		522	
[0112]	Cy2	489	150,000	506	713.78
[0113]	DY-480-XL	500	40,000	630	514.60
[0114]	DY-485-XL	485	20,000	560	502.59
[0115]	DY-490-XL	486	27,000	532	536.58
[0116]	DY-500-XL	505	90,000	555	596.68
[0117]	DY-520-XL	520	40,000	664	514.60
[0118]	Alexa Fluor 532	531	81,000	554	723.77
[0119]	BODIPY530/550	534	77,000	554	513.31
[0120]	6-HEX	535	98,000	556	680.07
[0121]	6-JOE	522	75,000	550	602.34
[0122]	罗丹明 6G	525	108,000	555	555.59
[0123]	Atto-520	520		542	
[0124]	Cy3B	558	130,000	572	658.00
[0125]	Alexa Fluor 610	612	138,000	628	
[0126]	Alexa Fluor 633	632	159,000	647	ca. 1200
[0127]	Alexa Fluor 647	650	250,000	668	ca. 1250
[0128]	BODIPY630/650	625	101,000	640	660.50
[0129]	Cy5	649	250,000	670	791.99
[0130]	Alexa Fluor660	663	110,000	690	
[0131]	Alexa Fluor680	679	184,000	702	
[0132]	Alexa Fluor700	702	192,000	723	

[0133]	Alexa Fluor750	749	240,000	782	
[0134]	B-藻红蛋白	546,565	2,410,000	575	240,000
[0135]		480,546,			
[0136]	R-藻红蛋白	565	1,960,000	578	240,000
[0137]	别藻蓝蛋白	650	700,000	660	700,000
[0138]	PBXL-1	545		666	
[0139]	PBXL-3	614		662	
[0140]	Atto-tec 染料				
[0141]	名称	Ex (nm)	Em (nm)	QY	τ (ns)
[0142]	Atto 425	436	486	0.9	3.5
[0143]	Atto 495	495	522	0.45	2.4
[0144]	Atto 520	520	542	0.9	3.6
[0145]	Atto 560	561	585	0.92	3.4
[0146]	Atto 590	598	634	0.8	3.7
[0147]	Atto 610	605	630	0.7	3.3
[0148]	Atto 655	665	690	0.3	1.9
[0149]	Atto 680	680	702	0.3	1.8
[0150]	Dyomics Fluors				
[0151]		摩尔吸光度*			分子量 #
[0152]	标记物	Ex (nm)	$[1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	Em (nm)	$[\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]$
[0153]	DY-495/5	495	70,000	520	489.47
[0154]	DY-495/6	495	70,000	520	489.47
[0155]	DY-495X/5	495	70,000	520	525.95
[0156]	DY-495X/6	495	70,000	520	525.95
[0157]	DY-505/5	505	85,000	530	485.49
[0158]	DY-505/6	505	85,000	530	485.49
[0159]	DY-505X/5	505	85,000	530	523.97
[0160]	DY-505X/6	505	85,000	530	523.97
[0161]	DY-550	553	122,000	578	667.76
[0162]	DY-555	555	100,000	580	636.18
[0163]	DY-610	609	81,000	629	667.75
[0164]	DY-615	621	200,000	641	578.73
[0165]	DY-630	636	200,000	657	634.84
[0166]	DY-631	637	185,000	658	736.88
[0167]	DY-633	637	180,000	657	751.92
[0168]	DY-635	647	175,000	671	658.86
[0169]	DY-636	645	190,000	671	760.91
[0170]	DY-650	653	170,000	674	686.92
[0171]	DY-651	653	160,000	678	888.96

[0172]	DYQ-660	660	117,000	-	668.86
[0173]	DYQ-661	661	116,000	-	770.90
[0174]	DY-675	674	110.000	699	706.91
[0175]	DY-676	674	145.000	699	807.95
[0176]	DY-680	690	125.000	709	634.84
[0177]	DY-681	691	125.000	708	736.88
[0178]	DY-700	702	96.000	723	668.86
[0179]	DY-701	706	115.000	731	770.90
[0180]	DY-730	734	185.000	750	660.88
[0181]	DY-731	736	225.000	759	762.92
[0182]	DY-750	747	240.000	776	712.96
[0183]	DY-751	751	220.000	779	814.99
[0184]	DY-776	771	147.000	801	834.98
[0185]	DY-780-OH	770	70.000	810	757.34
[0186]	DY-780-P	770	70.000	810	957.55
[0187]	DY-781	783	98.000	800	762.92
[0188]	DY-782	782	102.000	800	660.88
[0189]	EV0blue-10	651	101.440	664	389.88
[0190]	EV0blue-30	652	102.000	672	447.51
[0191]	量子点 :Qdot525,565,585,605,655,705,800				

[0192] 用于本发明的合适的染料包括修饰的羰花青染料。羰花青染料的修饰包括羰花青染料的吡啶鎓环的修饰,以使得 3 号位置具有反应性基团或偶联物质。吡啶鎓环的修饰提供的染料偶联物比用通过 1 位的氮原子结合的具有相似结构的羰花青染料标记的偶联物在蛋白质、核酸和其它生物聚合体上产生均匀的和实质上更高的荧光。除了在实质上相同的波长处比结构类似的染料具有更强烈的荧光发射和在与生物高聚物偶联后在吸收光谱上减少假象外,修饰的羰花青染料在吸收峰比结构类似的染料具有更好的光稳定性和更高的吸收(消光系数)。因此,在使用修饰的染料及其偶联物的分析中修饰的羰花青染料产生了更高的灵敏性。优选的修饰的染料包括含有至少一个取代的吡啶鎓环系统的化合物,其中,在吡啶鎓环 3 位碳上的取代基包含化学反应性的基团或偶联物质。其它染料化合物包括含氮杂吡啶鎓(azabenzazolum)环部分和至少一个磺酸部分的化合物。美国专利 6 977 305 描述了能够在本发明的各种实施方式中用来检测单独的微粒的修饰的羰花青染料,其在本文完整引入作为参考。因此,在某些实施方式中,本发明的标记物利用包括取代的吡啶鎓环系统的荧光染料,其中,在吡啶鎓环 3 位碳上的取代基包含化学反应性的基团或偶联物质基团。

[0193] 在某些实施方式中,标记物包括荧光部分,荧光部分包含一种或多种 Alexa 染料(Molecular Probe,Eugene,OR)。美国专利 6 977 305、6 974874、6 130 101 和 6974305 公开了 Alexa 染料,在本文完整引入作为参考。本发明的某些实施方式利用选自 AlexaFluor 647、AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 555、AlexaFluor 610、AlexaFluor 680、AlexaFluor 700 和 AlexaFluor 750 的染料。本发明的某些实施方式利用选自

AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 647、AlexaFluor 700 和 AlexaFluor 750 的染料。本发明的某些实施方式利用 AlexaFluor 647 分子,其在约 650-660nm 之间具有最大吸收和在约 660-670nm 之间具有最大发射。AlexaFluor 647 染料单独使用或与其它 AlexaFluor 染料组合使用。

[0194] 另外,目前可得到的有机荧光染料可以通过加入诸如聚乙烯的亲水基团使其具有较少的疏水性。可替代地,目前的诸如 AlexaFluor 647 染料的磺酸化有机荧光染料可以通过变为两性离子而使其具有较少的酸性。用修饰的荧光染料标记的微粒(如抗体)在免疫分析中可能会较少地与表面及蛋白质非特异性地结合,从而能够进行具有较高灵敏度和较低背景的分析。为了提高检测单一微粒的系统的灵敏度而修饰和改进荧光染料的方法在本领域内是已知的。优选地,修饰在维持高的量子产额的同时,提高斯托克斯频移。

[0195] 2 量子点

[0196] 在某些实施方式中,用于使用本发明的分析器系统检测样品中的分子的荧光标记部分是量子点。量子点(QDs),也叫半导体纳米晶体或人造原子,是在其中任何地方含有 100-1000 个电子和 2-10nm 的范围的半导体晶体。一些量子点的直径为 10-20nm。量子点具有高的量子产额,这使得其在光学应用中尤其有用。量子点是通过形成激子而发荧光的荧光团,激子被认为是传统荧光团的激发态,但具有高达 200 纳秒的长得多的寿命。这种性质为量子点提供了低的光漂白。量子点的能量水平可以通过改变量子点的大小、形状及量子点电位深度来控制。小的激子量子点的一个光学特征是显色,其通过点的大小来确定。点越大,就越红,或越朝向荧光光谱的红端。点越小,就越蓝,或越朝向荧光光谱的蓝端。决定荧光的能量从而决定荧光的颜色的带隙能量和量子点大小的平方成反比例。较大的量子点具有更密集地区隔的较多的能量水平,从而允许量子点吸收含有较低能量的光子,即,那些比较接近光谱红端的光子。因为点的发射频率取决于带隙,所以可能极为精密地控制点的输出波长。在某些实施方式中,用单一微粒分析器系统检测的蛋白质用量子点标记。在某些实施方式中,单一微粒分析器用来检测用一个量子点标记的蛋白质,并使用滤光器以在不同的波长检测不同的蛋白质。

[0197] 量子点具有宽激发和窄发射的性质,这使得当使用颜色过滤时,对于单一样品中的多重目标的多元分析只需要单一的电磁源以解析个别的信号。因此,在某些实施方式中,分析器系统包括一个连续波激光器和各使用一个量子点标记的微粒。胶态制备的量子点是自由移动的,且可以通过金属配位官能团连接在各种分子上。这些官能团包括但不限于,硫醇、胺、腈、膦、氧化膦、磷酸、羧酸或其它配体。通过将合适的分子与表面键合,量子点能够分散于或溶于几乎任何溶剂中或合并到各种无机和有机膜上。量子点(QDs)可以直接通过马来酰亚胺酯偶联反应结合链霉亲和素或通过马来酰亚胺-硫醇偶联反应结合抗体。这产生了含有共价连接在表面上的生物分子的材料,其产生具有高特异活性的偶联物。在某些实施方式中,用单一微粒分析器检测的蛋白质用一个量子点标记。在某些实施方式中,量子点的直径为 10-20nm。在其它实施方式中,量子点的直径为 2-10nm。有用的量子点包括 QD 605、QD 610、QD 655 和 QD 705。尤其优选的量子点是 QD 605。

[0198] C. 结合伴侣-荧光部分组合物(标记物)

[0199] 本发明的标记物一般包含结合荧光部分以提供在本文所述的仪器中检测和定量所需的荧光的结合伴侣,如抗体。任何适用于在本文所述的单分子检测器中检测的结合

伴体和荧光部分的组合可以作为本发明的标记物使用。在某些实施方式中,本发明提供了用于心肌肌钙蛋白分子或其片段、复合物、磷酸化、或氧化形式的标记物,其中,标记物包括心肌肌钙蛋白的抗体和荧光部分。抗体可以是上述的任何抗体,如 cTnT 或 cTnI 的抗体。在某些实施方式中,抗体是 cTnI 的抗体。在某些实施方式中,抗体对于心肌肌钙蛋白的特定区域是特异性的,例如,对于人 cTnI 的氨基酸 27-41 是特异性的。在某些实施方式中,本发明提供了包括连接在抗 cTnI 抗体(例如,多克隆抗体,如那些来自 BiosPacific, Emeryville 的名称为 G129C 的山羊多克隆抗体)上的荧光部分的组合物。可以连接荧光部分以使得标记物被在该荧光部分的激发波长处发射光的激光器激发时,能够发射平均至少约 50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、350、400、500、600、700、800、900 或 1000 个光子,其中激光聚焦于包含该荧光部分的直径不低于约 5 微米的点,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在某些实施方式中,荧光部分可以是被在荧光部分的激发波长处发射光的激光器激发时,能够发射平均至少约 50、100、150 或 200 个光子的荧光部分,其中激光聚焦于包含荧光部分的直径不低于约 5 微米的点,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。荧光部分可以是包括一个或多个染料分子的荧光部分,染料分子的结构包括一个取代的吡啶鎓环系统,其中,在吡啶鎓环 3 位碳上的取代基包含化学反应性的基团或偶联物质基团。标记组合物可以包括包含一个或多个选自 AlexaFluor 488、532、647、700 或 750 的染料分子的荧光部分。标记组合物可以包括包含一个或多个选自 AlexaFluor 488、532、700 或 750 的染料分子的荧光部分。标记组合物可以包括包含一个或多个 AlexaFluor 488 染料分子的荧光部分。标记组合物可以包括包含一个或多个 AlexaFluor 555 染料分子的荧光部分。标记组合物可以包括包含一个或多个 AlexaFluor 610 染料分子的荧光部分。标记组合物可以包括包含一个或多个 AlexaFluor 647 染料分子的荧光部分。标记组合物可以包括包含一个或多个 AlexaFluor 680 染料分子的荧光部分。标记组合物可以包括包含一个或多个 AlexaFluor 700 染料分子的荧光部分。标记组合物可以包括包含一个或多个 AlexaFluor 750 染料分子的荧光部分。

[0200] 在某些实施方式中,本发明提供了用于检测心肌肌钙蛋白 I 的组合物,其包括连接在对于人 cTnI 的氨基酸 27-41 特异性的抗体(例如,山羊多克隆抗 cTnI 抗体)上的 AlexFluor 分子(例如,选自上述组的 AlexFluor 分子,如 AlexFluor 647 分子)。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测心肌肌钙蛋白 I 的组合物,其包括平均 1-11、或约 2-10、或约 2-8、或约 2-6、或约 2-5、或约 2-4、或约 3-10、或约 3-8、或约 3-6、或约 3-5、或约 4-10、或约 4-8、或约 4-6、或约 2、3、4、5、6、或大于约 6 个连接在对于人 cTnI 的氨基酸 27-41 特异性的抗体(例如,山羊多克隆抗 cTnI 抗体)上的 AlexaFluor 647 分子。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测心肌肌钙蛋白 I 的组合物,其包括平均 1-11、或约 2-10、或约 2-8、或约 2-6、或约 2-5、或约 2-4、或约 3-10、或约 3-8、或约 3-6、或约 3-5、或约 4-10、或约 4-8、或约 4-6、或约 2、3、4、5、6、或大于约 6 个连接在对于人 cTnI 的氨基酸 27-41 特异性的抗体(例如,山羊多克隆抗 cTnI 抗体)上的 AlexaFluor 647 分子。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测心肌肌钙蛋白 I 的组合物,其包括平均约 2-10 个连接在对于人 cTnI 的氨基酸 27-41 特异性的抗体(例如,山羊多克隆抗 cTnI 抗体)上的 AlexaFluor 647 分子。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测心肌肌钙蛋白 I 的组合物,其包括平均约 2-8 个连接在对于人 cTnI 的氨基酸 27-41 特异性的抗体(例如,山羊多克隆抗 cTnI 抗体)

上的 AlexaFluor 647 分子。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测心肌肌钙蛋白 I 的组合物,其包括平均约 2-6 个连接在对于人 cTnI 的氨基酸 27-41 特异性的抗体(例如,山羊多克隆抗 cTnI 抗体)上的 AlexaFluor 647 分子。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测心肌肌钙蛋白 I 的组合物,其包括平均约 2-4 个连接在对于人 cTnI 的氨基酸 27-41 特异性的抗体(例如,山羊多克隆抗 cTnI 抗体)上的 AlexaFluor647 分子。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测心肌肌钙蛋白 I 的组合物,其包括平均约 3-8 个连接在对于人 cTnI 的氨基酸 27-41 特异性的抗体(例如,山羊多克隆抗 cTnI 抗体)上的 AlexaFluor 647 分子。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测心肌肌钙蛋白 I 的组合物,其包括平均约 3-6 个连接在对于人 cTnI 的氨基酸 27-41 特异性的抗体(例如,山羊多克隆抗 cTnI 抗体)上的 AlexaFluor 647 分子。在某些实施方式中,本发明提供了用于检测心肌肌钙蛋白 I 的组合物,其包括平均约 4-8 个连接在对于人 cTnI 的氨基酸 27-41 特异性的抗体(例如,山羊多克隆抗 cTnI 抗体)上的 AlexaFluor 647 分子。

[0201] 荧光部分或组成荧光部分的荧光体与如抗体的结合伴体的连接,可以通过任何合适的方法实现;这类方法是本领域内熟知的,且在实施例给出了示例方法。在某些实施方式中,在荧光部分和结合伴体连接以形成在本发明的方法中使用的标记物之后,及在用标记物标记目标蛋白质之前,进行过滤步骤是有用的。例如,抗体-染料标记物在使用前可以例如,通过 0.2 微米的过滤器或任何合适的过滤器过滤,以除去聚合体。也可以例如,通过 0.2 微米的过滤器,或任何合适的过滤器过滤其它用于本发明的分析的试剂。不受理论的限制,据认为这样的过滤除去了一部分如抗体-染料标记物的聚合体。由于这样的聚合体作为一个单位与目标蛋白质结合,但在洗脱缓冲液中进行释放时很可能解聚,因此可能产生假阳性;即,从仅结合单一目标蛋白质分子的聚合体检测到几个标记物。与理论无关,已经发现过滤减少了后续分析中的假阳性,并提高了准确度和精密度。

[0202] IV. 心肌肌钙蛋白的高灵敏分析

[0203] 一方面,本发明提供了测定样品中是否存在心肌肌钙蛋白的单一分子或其片段或复合物的方法,通过 i) 用标记物标记可能存在的分子、片段或其复合物;和 ii) 检测标记物存在与否,其中,发现标记物的存在表明样品中存在心肌肌钙蛋白的单一分子、片段或复合物。本文使用的“心肌肌钙蛋白分子”包括包含特定种类的心肌肌钙蛋白的基本上天然产生的整个氨基酸序列的分子,包括翻译后修饰的形式,例如,磷酸化形式及氧化形式或其它化学改变形式。本文使用的分子的“片段”,包括含有少于天然存在的整个氨基酸序列的心肌肌钙蛋白分子,包括对于完整分子的修饰。本文使用的心肌肌钙蛋白分子的“复合物”,包括与一个或多个其它分子或物质联合的心肌肌钙蛋白分子或片段,例如,与一个或多个其它心肌肌钙蛋白分子联合。在某些实施方式中,本方法能够以低于约 100、80、60、50、40、30、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2 或 0.1pg/ml 的检测限检测肌钙蛋白。在某些实施方式中,本方法能够以低于约 100pg/ml 的检测限检测肌钙蛋白。在某些实施方式中,本方法能够以低于约 50pg/ml 的检测限检测肌钙蛋白。在某些实施方式中,本方法能够以低于约 20pg/ml 的检测限检测肌钙蛋白。在某些实施方式中,本方法能够以低于约 10pg/ml 的检测限检测肌钙蛋白。在某些实施方式中,本方法能够以低于约 5pg/ml 的检测限检测肌钙蛋白。在某些实施方式中,本方法能够以低于约 3pg/ml 的检测限检测肌钙蛋白。在某些实施方式中,本方法能够以低于约 1pg/ml 的检测限检测肌

钙蛋白。检测限可以通过使用合适的国家标准和技术研究所参考标准物质,如标准 cTnI 来确定。

[0204] 本方法也提供了通过检测样品中肌钙蛋白单一分子来测定样品中的心肌肌钙蛋白浓度的方法。肌钙蛋白单一分子的“检测”包括直接或间接地检测该分子。在间接检测的情况下,可以检测对应于心肌肌钙蛋白单一分子的标记物,例如,已经连接在心肌肌钙蛋白单一分子上的标记物。

[0205] 检测的心肌肌钙蛋白的类型如本文所述,例如, cTnT、cTnI、总心肌肌钙蛋白(例如,总 cTnI 或总 cTnT)或游离的心肌肌钙蛋白、复合的心肌肌钙蛋白、或心肌肌钙蛋白片段。在某些实施方式中,检测和/或定量总心肌肌钙蛋白。在某些实施方式中,检测总 cTnT。在某些实施方式中,检测和/或定量总 cTnI。

[0206] A. 样品

[0207] 样品可以是任何合适的样品。一般地,样品是生物样品,例如,生物流体。这样的流体包括,但不限于:呼出气冷凝液(EBC)、支气管肺泡灌洗液(BAL)、血液、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、胸膜液、滑液、腹膜液、羊水、胃液、淋巴液、间隙液、组织匀浆、细胞提取物、唾液、痰液、粪便、生理分泌液、泪液、粘液、汗液、乳汁、精液、精液液体、阴道分泌物、来自溃疡和其他表面疹、疱和脓肿的液体、和包括正常、恶性及可疑组织活组织检查的组织提取物,或其中可能含有感兴趣的目标微粒的身体的任何其它组分。其它的诸如细胞或组织培养物或肉汤培养物的类似的样本也受到关注。

[0208] 在某些实施方式中,样品是血液样品。在某些实施方式中,样品是血浆样品。在某些实施方式中,样品是血清样品。

[0209] B. 样品制备

[0210] 一般地,可以使用产生对应于要测量的心肌肌钙蛋白分子的标记物的任何样品制备方法,其中,标记物在本文所述的仪器中可检测到。本领域内已知,在其中将标记物加到一种或多种微粒中的样品制备可以以均相或异相形式进行。在某些实施方式中,在均相形式下进行样品制备。在采用均相形式的分析器系统中,未结合的标记物不会从样品中除去。参见,美国专利申请 11/048660 号,在本文完全引入作为参考。在某些实施方式中,通过加入与一种或多种目标微粒结合的经标记的一种或多种抗体来标记一种或多种目标微粒。

[0211] 在某些实施方式中,使用异相的分析形式,其中,一般地,采用去除未结合标记物的步骤。这样的分析形式在本领域内是熟知的。一种尤其有用的分析形式是夹心分析,例如夹心免疫分析。在这种形式中,使用捕获结合伴侣在固体载体上捕获如生物学状态的标志物的目标分子。不想要的分子及其它物质随后可以任选地洗去,接着结合包含检测结合伴侣和如荧光部分的可检测标记的标记物。进一步洗涤除去未结合的标记物,然后释放可检测的标记,其通常(尽管不是必需的)仍连接在检测结合伴侣上。在可选择的实施方式中,向捕获结合伴侣加入样品和标记物,而不在其间(例如,同时)进行洗涤。对于本领域的技术人员来说,其它变化是显而易见的。

[0212] 在某些实施方式中,检测肌钙蛋白微粒的方法使用以抗体(例如单克隆抗体)作为捕获结合伴侣的夹心分析。该方法包括将样品中的肌钙蛋白分子结合到固定在结合表面的捕获抗体上,并将检测抗体结合到肌钙蛋白分子上以形成“夹心”复合物。检测抗体包括可检测的荧光标记,如本文所述,其可使用例如本发明的单分子检测器检测。捕获抗体和检

测抗体两者都特异性地结合肌钙蛋白。已知许多夹心免疫分析的实例,且其中一些在美国专利 4 168 146 号(Grubb 等人)及美国专利 4 366 241 号(Tom 等人)进行了描述,本文引入这两者作为参考。在实施例部分描述了进一步的特别用于心肌肌钙蛋白的例子。

[0213] 捕获结合伴侣体可以连接在例如微量滴定板或顺磁性珠的固体载体上。在某些实施方式中,本发明提供了连接在顺磁性珠上的心肌肌钙蛋白的结合伴侣体。可以使用任何合适的对于将要捕获的心肌肌钙蛋白的类型是特异性的结合伴侣体。结合伴侣体可以是抗体,例如,单克隆抗体。抗体可以对于本文所述的游离的心肌肌钙蛋白(cTnI 或 cTnT)或心肌肌钙蛋白复合物、修饰的心肌肌钙蛋白或心肌肌钙蛋白片段是特异性的,或者,对于可能在感兴趣的样品中发现的所有或基本上所有形式的心肌肌钙蛋白,例如 cTnI 或 cTnT,是特异性的。本文其它地方也描述了心肌肌钙蛋白的抗体的产生和来源。优选的用于测量总肌钙蛋白的抗体是那些基本上不被肝素、磷酸化作用、氧化作用及肌钙蛋白复合物形成影响的,且不会与骨骼肌的肌钙蛋白(例如肌钙蛋白 I)交叉反应的抗体。在某些实施方式中,抗体对于心肌肌钙蛋白的特定区域是特异性的。在某些实施方式中,所述区域包括人心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 41-49。在某些实施方式中,所述区域包括人心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 87-91。这样的抗体在本领域内是熟知的,且可以从例如 BiosPacific, Emeryville, CA 获得。在本发明的实施方式中有用的捕获抗体的示例是和游离的心肌肌钙蛋白 I(cTnI)的氨基酸 41-49 及和 cTnI 与其它肌钙蛋白成分形成的复合物反应的抗体,例如单克隆抗体。优选地,该抗体不会被肝素、磷酸化作用、氧化作用及肌钙蛋白复合物形成影响,且不会与骨骼肌的肌钙蛋白 I 交叉反应。此类型的一个示例性的抗体是可从 BiosPacific, Emeryville, CA 获得的 A34650228P 号单克隆抗体。在本发明的实施方式中有用的捕获抗体的另一个示例是与游离的心肌肌钙蛋白 I(cTnI)的氨基酸 87-91 及和 cTnI 与其它肌钙蛋白成分形成的复合物反应的抗体,例如单克隆抗体。优选地,该抗体不会被肝素、磷酸化作用、氧化作用及肌钙蛋白复合物形成影响,且不会与骨骼肌的肌钙蛋白 I 交叉反应。此类型的一个示例性的抗体是可从 BiosPacific, Emeryville, CA 获得的 A34440228P 号单克隆抗体。可以理解,这里确认为可用作捕获抗体的抗体也可以用作检测抗体,反之亦然。

[0214] 如抗体的结合伴侣体与固体载体的连接可以是共价的或非共价的。在某些实施方式中,连接是非共价的。本领域内熟知的一个非共价连接的示例是生物素-抗生物素蛋白/链霉亲和素相互作用。因此,在某些实施方式中,如微量滴定板或顺磁性珠的固体载体通过例如生物素-抗生物素蛋白/链霉亲和素相互作用的非共价连接与例如抗体的捕获结合伴侣体连接。在某些实施方式中,连接是共价的。因此,在某些实施方式中,如微量滴定板或顺磁性珠的固体载体通过共价连接与例如抗体的捕获结合蛋白连接。其中捕获抗体的取向使得目标分子的捕获最优化的共价连接是尤其有用的。例如,在某些实施方式中,可以使用如微量滴定板或顺磁性珠的固体载体,在使用中,如抗体的结合伴侣体的连接是定向连接,如共价定向连接。

[0215] 抗体和固体载体的定向连接的示例性的方案如下:将 IgG 溶于 pH5.5 的 0.1M 醋酸钠缓冲液至最终浓度为 1mg/ml。加入等体积的冰冷的溶于 pH5.5 的 0.1M 醋酸钠的 20mM 高碘酸钠。使 IgG 在冰上氧化 0.5 小时。通过加入 0.15 体积的 1M 甘油终止过量的高碘酸盐试剂。通过超滤作用去除氧化反应的低分子量的副产物。将氧化的 IgG 成分稀释至合适的浓度(一般为 0.5 微克 IgG/毫升),并在室温下与酰肼活化的多孔板反应至少 2 小时。通

过用硼酸盐缓冲盐水或另一种合适的缓冲液洗涤多孔板来除去未结合的 IgG。如果需要,板可以干燥储存。如果微珠材料适于这样的连接,微珠可以遵循类似的方案。

[0216] 在某些实施方式中,固体载体是微量滴定板。在某些实施方式中,固体载体是顺磁性珠。示例性的顺磁性珠是 Streptavidin C1 (Dyna1, 650.01-03)。其它合适的珠对于本领域的技术人员是显而易见的。连接抗体和顺磁性珠的方法在本领域内是熟知的。实施例部分给出了一个实例。

[0217] 目标心肌肌钙蛋白与固定于固体载体上的如捕获抗体的捕获结合伴侣体接触。可以使用一些样品制备;例如,在样品与捕获抗体接触之前,从血液样品制备血清或浓缩过程。在免疫分析中结合蛋白质的方案在本领域内是公知的,且包括在实施例中。

[0218] 用于结合的时间随条件而变化;很明显,在一些情况中、尤其是临床情况中,需要较短的结合时间。如顺磁性珠的使用可以减少结合所需的时间。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合的时间低于约 12、10、8、6、4、3、2 或 1 小时,或低于约 60、50、40、30、25、20、15、10 或 5 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合的时间低于约 60 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合的时间低于约 40 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合的时间低于约 30 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合的时间低于约 20 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合的时间低于约 15 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合的时间低于约 10 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合的时间低于约 5 分钟。

[0219] 在某些实施方式中,在肌钙蛋白微粒与如捕获抗体的捕获结合伴侣体结合之后,洗去非特异性地结合的微粒及样品中的其它不想要的物质,基本上只留下特异性结合的肌钙蛋白微粒。在其它的实施方式中,在加入样品和加入标记物之间不进行洗涤;可以理解,这更进一步减少了样品制备时间。因此,在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合以及将标记物与目标蛋白质结合的时间低于约 12、10、8、6、4、3、2 或 1 小时,或低于约 60、50、40、30、25、20、15、10 或 5 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合以及将标记物与目标蛋白质结合的时间低于约 60 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合以及将标记物与目标蛋白质结合的时间低于约 40 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合以及将标记物与目标蛋白质结合的时间低于约 30 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合以及将标记物与目标蛋白质结合的时间低于约 20 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合以及将标记物与目标蛋白质结合的时间低于约 15 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合以及将标记物与目标蛋白质结合的时间低于约 10 分钟。在某些实施方式中,用于目标蛋白质与如抗体的捕获结合伴侣体结合以及将标记物与目标蛋白质结合的时间低于约 5 分钟。

[0220] 用于测量目标分析物的包括捕获和信号抗体的一些免疫分析诊断试剂可以源自动物血清。具有结合其它种类的免疫球蛋白的能力的内源性的人类异嗜性抗体或人抗动物抗体存在于超过 10% 的病人血清或血浆中。这些循环的异嗜性抗体可能干扰免疫分析测

量。在夹心免疫分析中,这些异嗜性抗体或者桥连捕获抗体和检测(诊断)抗体,从而产生假阳性信号;或者阻断诊断抗体的结合,从而产生假阴性信号。在竞争免疫分析中,异嗜性抗体可能结合分析抗体,并抑制其结合肌钙蛋白。它们也可能阻断或者增强抗体-肌钙蛋白复合物与游离肌钙蛋白的分离,尤其在分离系统中使用抗种类的抗体时。因此,这些异嗜性抗体的干扰效应难以预测。所以,阻断任何异嗜性抗体的结合是有利的。在本发明的某些实施方式中,免疫分析包括使用一种或多种异嗜性抗体阻断剂耗尽样品中的异嗜性抗体的步骤。从将要在免疫分析中测试的样品中去除异嗜性抗体的方法是已知的,且包括:在 pH5.0 的醋酸钠缓冲液中在 90℃ 加热样本 15 分钟,并在 1200g 下离心 10 分钟,或者使用聚乙二醇(PEG)沉淀异嗜性抗体;使用蛋白 A 或蛋白 G 从样本中免疫提取干扰性的异嗜性免疫球蛋白;或者加入非免疫小鼠 IgG。本发明方法的实施方式预期在使用单分子检测器进行分析之前制备样品。可以确定预处理方法的适用性。用于最小化由异嗜性抗体导致的免疫分析干扰的生化药剂可商购。例如,称为 MAK33 的产品,其是一种抗 h-CK-MM 的 IgG1 单克隆抗体,可从 Boehringer Mannheim 获得。MAK33plus 产品包含 IgG1 和 IgG1-Fab 的组合。聚 MAK33 含有与 IgG1 聚合的 IgG1-Fab,聚 MAC 2b/2a 含有与 IgG2b 聚合的 IgG2a-Fab。用于中和异嗜性抗体的生化药剂的另一种商购来源是由 Bioreclamation Inc, East Meadow, NY 销售的免疫球蛋白抑制剂。该产品是来自多个物种的免疫球蛋白(IgG 和 IgM)的制品,主要是来自 Balb/c 小鼠的鼠 IgG2a、IgG2b 和 IgG3。在某些实施方式中,可以使用本领域已知的方法从样品中免疫提取异嗜性抗体,例如,通过将干扰性抗体结合到蛋白 A 或 G 上耗尽样品中的异嗜性抗体。在某些实施方式中,使用一种或多种异嗜性抗体阻断剂中和异嗜性抗体。异嗜性阻断剂可以选自抗同种型异嗜性抗体阻断剂、抗个体型异嗜性抗体阻断剂和抗-抗个体型异嗜性抗体阻断剂。在某些实施方式中,可以使用异嗜性抗体阻断剂的组合。

[0221] 在加入样品的同时或之后加入标记物并洗涤。将抗体和其它免疫标记与蛋白质和其它分子结合的方案是本领域内熟知的。如果标记物结合步骤与捕获结合是分离的,则用于标记物结合的时间在例如临床情况中是重要的。在某些实施方式中,用于将目标蛋白质与如抗体-染料的标记物结合的时间低于约 12、10、8、6、4、3、2 或 1 小时,或低于约 60、50、40、30、25、20、15、10 或 5 分钟。在某些实施方式中,用于将目标蛋白质与如抗体-染料的标记物结合的时间低于约 60 分钟。在某些实施方式中,用于将目标蛋白质与如抗体-染料的标记物结合的时间低于约 40 分钟。在某些实施方式中,用于将目标蛋白质与如抗体-染料的标记物结合的时间低于约 30 分钟。在某些实施方式中,用于将目标蛋白质与如抗体-染料的标记物结合的时间低于约 20 分钟。在某些实施方式中,用于将目标蛋白质与如抗体-染料的标记物结合的时间低于约 15 分钟。在某些实施方式中,用于将目标蛋白质与如抗体-染料的标记物结合的时间低于约 10 分钟。在某些实施方式中,用于将目标蛋白质与如抗体-染料的标记物结合的时间低于约 5 分钟。通过洗涤去除过量的标记物。

[0222] 然后从目标蛋白质上洗脱标记物。优选的洗脱缓冲液对于释放标记物是有效的而不产生明显的背景。如果洗脱缓冲液是抑菌的,也是有利的。本发明使用的洗脱缓冲液包括离液剂 chaotrope),例如,尿素或胍化合物;缓冲液,例如,硼酸盐缓冲盐水;蛋白质载体,例如,白蛋白,如人、牛或鱼的白蛋白,或 IgG,用来在检测仪器中涂覆毛细管壁;和表面活性剂,例如,离子或非离子去污剂,挑选产生相对低的背景的,例如, Tween 20、Triton

X-100 或 SDS。

[0223] 采集到单分子检测器内的洗脱缓冲液 / 标记物等分试样被称为“处理样品”，以将其与从个体获得的初始样品相区别。

[0224] 在另一实施方式中，固相结合分析可以采用竞争性结合分析形式。一种这样的方法包括：a) 使 i) 样品中的肌钙蛋白微粒和 ii) 包含可检测标记（检测试剂）的肌钙蛋白微粒的经标记类似物竞争性地结合固定于结合表面的捕获抗体，和 b) 使用单微粒分析器测定标记物的量。另一种这样的方法包括：a) 使 i) 样品中的肌钙蛋白微粒和 ii) 固定于结合表面（捕获试剂）的肌钙蛋白微粒类似物竞争性地结合具有可检测标记（检测试剂）的抗体，和 b) 使用单微粒分析器测定标记物的量。本文的“肌钙蛋白类似物”指与肌钙蛋白竞争结合捕获抗体的物质。在美国专利 4235601 号 (Deutsch 等人)、美国专利 4 442 204 号 (Liotta) 和美国专利 5208535 号 (Buechler 等人) 中公开了竞争性免疫分析的示例，本文完整引入作为参考。

[0225] C. 肌钙蛋白的检测和浓度的测定

[0226] 洗脱之后，通过单分子分析器运行例如洗脱缓冲液中的标记物。处理样品可能不包含标记物、包含单个或多个标记物。标记物的数目对应于在捕获步骤中捕获的心肌肌钙蛋白分子的数目或与后者成比例（如果使用样品的稀释液或部分）。

[0227] 可以使用任何合适的能够检测与目标蛋白质一起使用的标记物的单分子检测器。合适的单分子检测器如本文所述。一般地，检测器是系统的一部分，系统包括用于对制备的样品取样的自动取样器，和任选的回收样品的回收系统。

[0228] 在某些实施方式中，处理样品在利用毛细流动系统，并包括毛细流动池、照射处理样品从其中通过的毛细管中的探测空间的激光器、检测从探测空间发射的辐射的检测器、和移动处理样品通过探测空间的动力源的单分子分析器中分析。在某些实施方式中，单分子分析器进一步包括收集处理样品通过探测空间时的发射光的显微镜物镜，例如，高数值孔径的显微镜物镜。在某些实施方式中，激光器和检测器是共焦排列。在某些实施方式中，激光器是连续波激光器。在某些实施方式中，检测器是雪崩光电二极管检测器。在某些实施方式中，动力源是提供压力的泵。在某些实施方式中，本发明提供了分析器系统，其包括能够对多个样品自动取样、在样品容器和探测空间之间提供流体连通的采样系统。在某些实施方式中，探测空间具有的体积为约 0.001-500pL、或约 0.01-100pL、或约 0.01-10pL、或约 0.01-5pL、或约 0.01-0.5pL、或约 0.02- 约 300pL、或约 0.02pL- 约 50pL、或约 0.02- 约 5pL、或约 0.02- 约 0.5pL、或约 0.02- 约 2pL、或约 0.05- 约 50pL、或约 0.05- 约 5pL、或约 0.05- 约 0.5 pL、或约 0.05- 约 0.2pL、或约 0.1- 约 25pL。在某些实施方式中，探测空间具有的体积为约 0.004-100pL。在某些实施方式中，探测空间具有的体积为约 0.02-50pL。在某些实施方式中，探测空间具有的体积为约 0.001-10pL。在某些实施方式中，探测空间具有的体积为约 0.001-10pL。在某些实施方式中，探测空间具有的体积为约 0.01-5pL。在某些实施方式中，探测空间具有的体积为约 0.02- 约 5pL。在某些实施方式中，探测空间具有的体积为约 0.05-5pL。在某些实施方式中，探测空间具有的体积为约 0.05-10pL。在某些实施方式中，探测空间具有的体积为约 0.5- 约 5pL。在某些实施方式中，探测空间具有的体积为约 0.02- 约 0.5pL。

[0229] 在某些实施方式中，用于本发明方法的单分子检测器利用毛细流动系统，且包括

毛细流动池、照射处理样品从其中通过的毛细管中的探针空间的连续波激光器、收集处理样品通过探针空间时发射的光的高数值孔径显微镜物镜、检测从探针空间发射的辐射的雪崩光电二极管检测器、和为移动处理样品通过探针空间提供压力的泵,其中,探针空间为约 0.02–约 50pL。在某些实施方式中,用于本发明方法的单分子检测器利用毛细流动系统,且包括毛细流动池、照射处理样品从其中通过的毛细管中的探针空间的连续波激光器、收集处理样品通过探针空间时发射的光的高数值孔径显微镜物镜(其中,透镜具有至少约 0.8 的数值孔径)、检测从探针空间发射的辐射的雪崩光电二极管检测器、和为移动处理样品通过探针空间提供压力的泵,其中,探针空间为约 0.004–约 100pL。在某些实施方式中,用于本发明方法的单分子检测器利用毛细流动系统,且包括毛细流动池、照射处理样品从其中通过的毛细管中的探针空间的连续波激光器、收集处理样品通过探针空间时发射的光的高数值孔径显微镜物镜(其中,透镜具有至少约 0.8 的数值孔径)、检测从探针空间发射的辐射的雪崩光电二极管检测器、和为移动处理样品通过探针空间提供压力的泵,其中,探针空间为约 0.05–约 10pL。在某些实施方式中,用于本发明方法的单分子检测器利用毛细流动系统,且包括毛细流动池、照射处理样品从其中通过的毛细管中的探针空间的连续波激光器、收集处理样品通过探针空间时发射的光的高数值孔径显微镜物镜(其中,透镜具有至少约 0.8 的数值孔径)、检测从探针空间发射的辐射的雪崩光电二极管检测器、和为移动处理样品通过探针空间提供压力的泵,其中,探针空间为约 0.05–约 5pL。在某些实施方式中,用于本发明方法的单分子检测器利用毛细流动系统,且包括毛细流动池、照射处理样品从其中通过的毛细管中的探针空间的连续波激光器、收集处理样品通过探针空间时发射的光的高数值孔径显微镜物镜(其中,透镜具有至少约 0.8 的数值孔径)、检测从探针空间发射的辐射的雪崩光电二极管检测器、和为移动处理样品通过探针空间提供压力的泵,其中,探针空间为约 0.5–约 5pL。

[0230] 在某些实施方式中,单分子检测器能够测定样品浓度可能在至少约 100 倍、或 1000 倍、或 10000 倍、或 100000 倍、或 30000 倍、或 1000000 倍、或 10000000 倍、或 30000000 倍的范围内的样品中目标分子的浓度。

[0231] 在某些实施方式中,本发明的方法利用能够检测引入检测器的第一样品和第二样品之间分析物浓度低于约 50%、40%、30%、20%、15% 或 10% 的变化的单分子检测器,其中引入分析器的第一样品和所述的第二样品的体积低于约 100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、10、5、4、3、2 或 1 μ l,且其中分析物以低于约 100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、10、5、4、3、2 或 1 飞摩尔的浓度存在。在某些实施方式中,本发明的方法使用能够检测引入检测器的第一样品和第二样品之间分析物浓度低于约 50% 的变化的单分子检测器,其中引入分析器的第一样品和所述的第二样品的体积低于约 100 μ l,且其中分析物以低于约 100 飞摩尔的浓度存在。在某些实施方式中,本发明的方法使用能够检测引入检测器的第一样品和第二样品之间分析物浓度低于约 40% 的变化的单分子检测器,其中引入分析器的第一样品和所述的第二样品的体积低于约 50 μ l,且其中分析物以低于约 50 飞摩尔的浓度存在。在某些实施方式中,本发明的方法使用能够检测引入检测器的第一样品和第二样品之间分析物浓度低于约 20% 的变化的单分子检测器,其中引入分析器的第一样品和所述的第二样品的体积低于约 20 μ l,且其中分析物以低于约 20 飞摩尔的浓度存在。在某些实施方式中,本发明的方法使用能够检测引入检测器的第一样品和第二样品之间分析物浓度低

于约 20% 的差别的单分子检测器, 其中引入分析器的第一样品和所述的第二样品的体积低于约 $10 \mu\text{L}$, 且其中分析物以低于约 10 飞摩尔的浓度存在。在某些实施方式中, 本发明的方法使用能够检测引入检测器的第一样品和第二样品之间分析物浓度低于约 20% 的差别的单分子检测器, 其中引入分析器的第一样品和所述的第二样品的体积低于约 $5 \mu\text{L}$, 且其中分析物以低于约 5 飞摩尔的浓度存在。

[0232] 下面更详细地描述单分子检测器和系统。在本发明的方法中有用的单分子分析器的进一步的实施方式, 如含有多于一个的探测窗口的检测器, 利用电动流或电泳流的检测器, 等等, 可以在美国专利申请 11/048660 号中发现, 在本文完整引入作为参考。

[0233] 在多次运行之间, 可以洗涤仪器。在某些实施方式中可以使用维持样品的盐和表面活性剂浓度的洗涤缓冲液以保持毛细管的条件, 即, 保持毛细管表面在样品之间的相对恒定以减少变异性。

[0234] 对于本发明的方法和仪器的极高灵敏度起贡献作用的一个特征是检测和定量标记物的方法, 在某些实施方式中, 标记物连接在要检测的单分子上, 或更一般地, 对应于要检测的单分子。简单地说, 通过使毛细管的给定的探测空间经受来自以标记物中使用的荧光部分的适当激发波长发射光的激光器的 EM 辐射预定的时间, 并在那个时间内检测发射的光子, 而将流过毛细管的样品有效地分为一系列检测事件。各个预定的时间段是一个“箱元 (bin)”。如果在给定的箱元内检测的光子总数超过了预设的阈值, 就记录该箱元为检测事件, 即, 检测到了标记物。如果光子总数没有达到预设的阈值, 就不记录检测事件。在某些实施方式中, 处理样品的浓度足够稀释, 从而对于大百分比的检测事件, 检测事件代表只有一个标记物通过窗口, 其对应于原始样品中的单个目标分子, 即, 几乎没有检测事件代表在单个箱元中多于一个标记物。在某些实施方式中, 应用进一步的精制以允许处理样品中更大浓度的标记物被精确地检测到, 即, 两个或更多个标记物作为单一检测事件被检测到的可能性不再是无关紧要的浓度。

[0235] 尽管可以使用其它的箱元时间而不背离本发明的范围, 在某些实施方式中, 箱元时间选自约 1 微秒 - 约 5 毫秒的范围。在某些实施方式中, 箱元时间多于约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、250、300、400、500、600、700、750、800、900、1000、2000、3000、4000 或 5000 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间低于约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、250、300、400、500、600、700、750、800、900、1000、2000、3000、4000 或 5000 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-1000 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-750 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-500 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-250 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-100 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-50 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-40 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-30 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-500 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-20 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-10 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-500 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 1-5 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 5-500 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 5-250 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 5-100 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 5-50 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 5-20 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 5-10 微秒。在某些实施方式中, 箱元时间为约 10-500 微秒。在某些

实施方式中,箱元时间为约 10-250 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 10-100 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 10-50 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 10-30 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 10-20 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 5 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 5 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 6 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 7 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 8 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 9 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 10 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 11 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 12 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 13 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 14 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 5 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 15 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 16 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 17 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 18 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 19 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 20 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 25 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 30 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 40 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 50 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 100 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 250 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 500 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 750 微秒。在某些实施方式中,箱元时间为约 1000 微秒。

[0236] 在某些实施方式中,通过平均噪音水平或均方根噪音确定背景噪音水平。在其它情况中,选择代表性的噪音值或统计值。在大多数情况中,预期噪音遵循泊松分布。因此,在某些实施方式中,测定样品中的微粒-标记复合物的浓度包括测定背景噪音水平。

[0237] 因此,随着标记物流经毛细流动池,它被激光束照射以产生光子脉冲。通过只考虑具有高于相当于样品中存在的背景噪音量的预设阈能量水平的光子脉冲,标记物发射的光子区别于背景光或背景噪音发射。背景噪音一般包括例如由样品、在制备用于分析的样品时使用的缓冲液或稀释液中存在的非标记微粒的固有荧光所产生的低频发射、拉曼散射和电子噪音。在某些实施方式中,赋予背景噪音的值以在多个箱元中检测到的平均背景信号噪音计算,这是在预设长度的时间内在探测空间中检测到的光子信号的量度。因此,在某些实施方式中,对于每个样品,背景噪音以该样品特定的数字来计算。

[0238] 给定背景噪音值,就可以指定阈能量水平。如上讨论,确定阈值以区分真实信号(由标记物的荧光产生)和背景噪音。在选择阈值时必须注意使得来自随机噪音的假阳性信号数最小化,而被排除的真实信号数值也最小化。选择阈值的方法包括确定高于噪音水平的固定值,并基于噪音信号的分布计算阈值。在一种实施方式中,阈设定为高于背景水平的标准差的固定数值。假定噪音遵循泊松分布,使用这种方法能够评估实验过程的时间内的假阳性信号数。在某些实施方式中,阈水平计算为比背景噪音高 4 个标准差(sigma)的值。例如,给定 200 个光子的平均背景噪音水平,分析器系统确定阈水平比 200 个光子的平均背景/噪音水平高 $4\sqrt{200}$,为 256 光子。因此,在某些实施方式中,确定样品中的标记物浓度包括建立阈水平,高于阈水平的光子信号代表存在标记物。相反地,具有不高于阈水平的能量水平的光子信号表明不存在标记物。

[0239] 采取多个箱元测量以测定样品浓度,且对于每一个箱元测量确定是否存在标记物。一般地,1 分钟内能够进行 60 000 个或更多的测量(例如,在箱元大小为 1 毫秒的实施方式中,箱元大小越小,测量的数目相对地越大,例如,箱元大小为 10 微秒,则每分钟 6 000

000 个测量)。因此,没有一个测量是关键性的,因而本方法提供了高的误差容限。在测定处理样品中的标记物的浓度时不考虑确定不含标记物的箱元(“无”箱元),只有在确定含有标记物的箱元(“有”箱元)中进行的测量才考虑在内。不考虑在“无”箱元中或缺乏标记物的箱元中进行的测量提高了信噪比和测量的准确性。因此,在某些实施方式中,确定样品中的标记物浓度包括检测反映标记物存在的箱元的测量。

[0240] 通过使检测微粒-标记复合物的箱元测量过程中检测背景噪音的时间最小化,可以提高信噪比或分析器系统的灵敏度。例如,在持续 1 毫秒的箱元测量中,在这一过程中,一个微粒-标记复合物在 250 微秒内经过探测空间而被检测,而 1 毫秒中的 750 微秒则花在检测背景噪音发射上。通过减少箱元时间能够提高信噪比。在某些实施方式中,箱元时间是 1 毫秒。在其它实施方式中,箱元时间是 750、500、250 微秒、100 微秒、50 微秒、25 微秒或 10 微秒。其它的箱元时间如本文所述。

[0241] 影响测量的其它因素是荧光部分的亮度或暗度、流速和激光器的功率。使得能够检测标记物的相关因素的各种组合对于本领域的技术人员是显而易见的。在某些实施方式中,不改变流速而调整箱元时间。本领域的技术人员可以理解,随着箱元时间减少,指向探测空间的激光器的功率输出必须增加,以维持在箱元时间内应用于探测空间的总能量恒定。例如,如果箱元时间从 1000 微秒减少到 250 微秒,作为第一近似值,激光器的功率输出必须增加大约 4 倍。这些设置使得在 250 μ s 内检测到的光子数目与在给定的先前设置下 1000 μ s 内检测的光子数目相同,并使得以较低的背景而因此较高的灵敏度对样品进行较快速的分析。另外,为了加速样品处理,可以调整流速。这些数字仅仅是示例性的,技术人员可以根据需要调整参数以获得预期结果。

[0242] 在某些实施方式中,探测空间涵盖了样品流的整个横截面。当探测空间涵盖样品流的整个横截面时,为了计算处理样品中的标记物的浓度,只需要在设定的长度时间内测定的标记物的数目和经过横截面的样品流的体积。在某些实施方式中,可以例如,通过激光束照射的点的大小对探测空间进行限定而限定探测空间小于样品流的横截面积。在某些实施方式中,通过调整分析器的孔 306(图 1A) 或 358 和 359(图 1B) 及减小物镜向检测器成像的照射体积来限定探测空间。在某些实施方式中,当限定探测空间小于样品流的横截面积时,可以通过复合物发射的信号的内插(interpolation),由使用一种或多种已知浓度的标准样品产生的标准曲线确定标记物的浓度。在再另外的实施方式中,可以通过比较测量的微粒与内标标准来确定标记物的浓度。在分析稀释样品的实施方式中,在计算起始样品中的目标分子浓度时,要将稀释因素考虑在内。

[0243] 如上讨论的,当探测空间涵盖样品流的整个横截面时,为了计算样品的浓度,只需要计算在设定的长度时间(箱元)内经过横截面的计数标记物的数目和在箱元中探测的样品的体积。确定“有”箱元中含有的标记物的总数并与由分析中使用的箱元的总数代表的样品体积相关联以确定处理样品中的标记物浓度。因此,在一个实施方式中,确定处理样品中的标记物的浓度包括确定检测的“有”箱元的标记物总数,并将检测的标记物的总数与分析的总样品体积相关联。分析的总样品体积是在指定的时间间隔内经过毛细流动池且通过探测空间的样品体积。或者,通过在多个箱元中由标记物发射的信号的内插,由标准曲线来确定样品中的标记复合物的浓度,该标准曲线通过用含有已知浓度的标记物的标准样品确定在同样数目的箱元中标记物发射的信号而产生。

[0244] 在某些实施方式中,箱元中检测的单独的标记物的数目与处理样品中的微粒的相对浓度相关。在相对低的浓度时,例如,低于约 10^{-16}M 的浓度时,标记物的数目与在箱元中检测的光子信号成比例。因此,在标记物的低浓度时,光子信号提供作为数字信号。在相对较高的浓度时,例如,高于约 10^{-16}M 的浓度时,由于两个或多个标记物在大约同样的时间越过探测空间并被计为一个的可能性变得明显,失去了光子信号与标记物的比例关系。因此,在某些实施方式中,通过减少箱元测量的时间长度来解析浓度大于约 10^{-16}M 的样品中的单独微粒。

[0245] 或者,在其它实施方式中,可检测由存在于任一个箱元中的多个微粒发射的总光子信号。这些实施方式使得本发明的单分子检测器动态范围是至少 3、3.5、4、4.5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 或大于 8 个数量级 (logs)。

[0246] 本文所用的术语“动态范围”,指无需稀释或其它处理来改变浓度不同的连续样品的浓度即可用仪器定量的样品浓度范围,其中,以适于预期用途的准确度来确定浓度。例如,如果微量滴定板在一个孔中包含 1 飞摩尔浓度目标分析物的样品,在另一个孔中包含 10000 飞摩尔浓度目标分析物的样品,且在第三个孔中包含 100 飞摩尔浓度目标分析物的样品,则具有至少 4 数量级的动态范围和 1 飞摩尔的定量下限的仪器能够准确地定量所有样品的浓度而不需要如稀释的进一步处理以改变浓度。通过标准方法可以确定准确度,例如,使用浓度跨越动态范围的一系列标准物并建立标准曲线。可以使用产生的标准曲线拟合标准测量作为准确度的测量,例如, r^2 大于约 0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98 或 0.99。

[0247] 通过改变分析来自检测器的数据的方式,和/或通过在检测器和探测空间之间使用衰减器来获得增加的动态范围。在范围的低端,其中处理样品足够稀释而使得每一个检测事件,即,箱元中高于阈水平的每一次光子脉冲(“事件光子”),很可能只代表一个标记物,对数据进行分析以将检测事件计数作为单分子。即,如上文所述,每一个箱元分析为代表标记物存在的简单的“有”或“无”。对于更浓缩的处理样品,其中,两个或多个标记物占据单一箱元的可能性变得明显,在相当数目的箱元中的事件光子的数目实质上大于预期的单一标记物数目,例如,相当数目的箱元中事件光子的数目相当于预期的单一标记物数目的 2 倍、3 倍或更多。对于这些样品,仪器将其数据分析方法改变为对于处理样品的箱元的事件光子总数目进行积分。这一总数目与所有箱元中标记物的总数目成比例。对于甚至更浓缩的处理样品,其中大部分箱元中出现许多标记物,背景噪音变为来自每一个箱元中的总信号的无关紧要的一部分,因而仪器将其数据分析方法改变为计算每一箱元的总的光子(包括背景)。当浓度使得到达检测器的光的强度另外超过检测器精确计数光子的能力时,即检测器饱和时,通过在流动池和检测器之间使用衰减器能够获得动态范围更进一步的增加。

[0248] 仪器可以包括数据分析系统,其接受来自检测器的输入,并确定对于运行的样品合适的分析方法,并输出基于这样的分析的值。如果在仪器中包括衰减器,数据分析系统可以进一步输出使用或不使用衰减器的指令。

[0249] 通过利用这样的方法,仪器的动态范围可以急剧增加。因此,在某些实施方式中,仪器能够在高于约 1000 (3 数量级)、10 000 (4 数量级)、100 000 (5 数量级)、350 000 (5.5 数量级)、1000 000 (6 数量级)、3 500 000 (6.5 数量级)、10 000 000 (7 数量级)、35 000

000(7.5 数量级)或 100 000000(8 数量级)的动态范围上测量样品的浓度。在某些实施方式中,仪器能够在高于约 100 000(5 数量级)的动态范围上测量样品的浓度。在某些实施方式中,仪器能够在高于约 1000 000(6 数量级)的动态范围上测量样品的浓度。在某些实施方式中,仪器能够在高于约 1000000(7 数量级)的动态范围上测量样品的浓度。在某些实施方式中,仪器能够在从约 1-10 飞摩尔到至少约 1000、10 000、100 000、350 000、1 000 000、3 500 000、10000000 或 35000000 飞摩尔的动态范围上测量样品的浓度。在某些实施方式中,仪器能够在从约 1-10 飞摩尔到至少约 10 000 飞摩尔的动态范围上测量样品的浓度。在某些实施方式中,仪器能够在从约 1-10 飞摩尔到至少约 100 000 飞摩尔的动态范围上测量样品的浓度。在某些实施方式中,仪器能够在从约 1-10 飞摩尔到至少约 1 000 000 飞摩尔的动态范围上测量样品的浓度。在某些实施方式中,仪器能够在从约 1-10 飞摩尔到至少约 10 000 000 飞摩尔的动态范围上测量样品的浓度。

[0250] 在某些实施方式中,本发明的分析器或分析器系统能够以低于 1 纳摩尔、或 1 皮摩尔、或 1 飞摩尔、或 1 阿托摩尔、或 1 仄摩尔的检测限检测例如生物标志物的分析物。在某些实施方式中,当生物标志物以低于 1 纳摩尔、或 1 皮摩尔、或 1 飞摩尔、或 1 阿托摩尔、或 1 仄摩尔的浓度在样品中存在时,且当各样品的大小为低于约 100、50、40、30、20、10、5、2、1、0.1、0.01、0.001 或 $0.0001 \mu\text{l}$ 时,分析器或分析器系统能够检测从一个样品到另一个样品的一种或多种分析物(例如生物标志物)的低于约 0.1、1、2、5、10、20、30、40、50、60 或 80% 的浓度改变。在某些实施方式中,当分析物以低于约 1 皮摩尔的浓度在样品中存在时,且当各样品的大小为低于约 $50 \mu\text{l}$ 时,分析器或分析器系统能够检测从第一样品到第二样品的分析物的低于约 20% 的浓度改变。在某些实施方式中,当分析物以低于约 100 飞摩尔的浓度在样品中存在时,且当各样品的大小为低于约 $50 \mu\text{l}$ 时,分析器或分析器系统能够检测从第一样品到第二样品的分析物的低于约 20% 的浓度改变。在某些实施方式中,当分析物以低于约 50 飞摩尔的浓度在样品中存在时,且当各样品的大小为低于约 $50 \mu\text{l}$ 时,分析器或分析器系统能够检测从第一样品到第二样品的分析物的低于约 20% 的浓度改变。在某些实施方式中,当分析物以低于约 5 飞摩尔的浓度在样品中存在时,且当各样品的大小为低于约 $5 \mu\text{l}$ 时,分析器或分析器系统能够检测从第一样品到第二样品的分析物的低于约 20% 的浓度改变。

[0251] V. 适于肌钙蛋白的高灵敏分析的仪器和系统

[0252] 本发明的方法利用高灵敏度的分析仪器,例如,单分子检测器。这样的单分子检测器包括如下文描述的实施方式。

[0253] A. 装置 / 系统

[0254] 一方面,本文所述的方法利用能够检测样品中的单一微粒的分析器系统。在一个实施方式中,分析器系统能够进行荧光标记微粒的单一微粒检测,其中,当单一微粒存在于限定在与分析器系统的采样系统流体连接的毛细流动池之内的探测空间中时,分析器系统检测激发的荧光标记物响应电磁辐射源的照射而发射的能量。在分析器系统的进一步的实

施方式中,单一微粒利用动力移动通过毛细流动池的探测空间。在分析器系统的另一实施方式中,分析器系统中可以包括自动采样系统,用来将样品引入分析器系统。在分析器系统的另一实施方式中,分析器系统中可以包括用于制备样品的样品制备系统。在进一步的实施方式中,分析器系统可以含有样品回收系统,用来在分析完成后回收至少一部分样品。

[0255] 一方面,分析器系统包括用来激发用荧光标记物标记的单一微粒的电磁辐射源。在一个实施方式中,分析器系统的电磁辐射源是激光器。在进一步的实施方式中,电磁辐射源是连续波激光器。

[0256] 在一个典型的实施方式中,电磁辐射源在标记物通过毛细流动池的探测空间时激发连接在标记物上的荧光部分。在某些实施方式中,荧光标记部分包括一个或多个荧光染料分子。在某些实施方式中,荧光标记部分是量子点。本文所述的任何荧光部分可用于标记物中。

[0257] 当标记物通过位于毛细流动池之内的探测空间时,标记物暴露于电磁辐射中。探测空间一般与采样系统流体连接。在某些实施方式中,标记物通过毛细流动池的探测空间,是因为动力使得标记物通过分析器系统。探测空间的位置使其接受来自辐射源发射的电磁辐射。在某些实施方式中,采样系统是自动采样系统,能够采集多个样品而不需要操作员的干涉。

[0258] 标记物通过探测空间,且当被电磁辐射源激发时,发射可检测量的能量。在一个实施方式中,电磁辐射检测器可操作地与探测空间连接。电磁辐射检测器能够检测标记物(例如标记物的荧光部分)发射的能量。

[0259] 在分析器系统的进一步的实施方式中,系统进一步包括样品制备机构,其中,样品可以部分地或完全地制备而用于分析器系统的分析。在分析器系统的某些实施方式中,在系统分析样品后可以抛弃样品。在其它实施方式中,分析器系统进一步包括样品回收机构,其中,在分析之后,至少一部分、或可选择地全部或基本上全部的样品可以回收。在这样的一个实施方式中,样品可以返回到样品的来源处。在某些实施方式中,样品可以返回到样品微量滴定板的微量滴定孔中。分析器系统一般进一步包括数据获取系统,用来收集并报告检测到的信号。

[0260] B. 单一微粒分析器

[0261] 如图 1A 所示,这里所述的是分析器系统 300 的一个实施方式。分析器系统 300 包括电磁辐射源 301、镜子 302、透镜 303、毛细流动池 313、显微镜物镜 305、孔 306、检测器透镜 307、检测器滤光器 308、单一光子检测器 309 和可操作地与检测器连接的处理器 310。

[0262] 在运行中,调准电磁辐射源 301 使得它的输出 311 可以在镜子 302 的前表面 312 反射出去。透镜 303 将光束 311 聚焦于毛细流动池 313 中的单一探测空间(图 2A 显示探测空间 314 的一个示例)。显微镜物镜 305 收集来自样品微粒的光,并在孔 306 上形成光线的图像。孔 306 影响毛细流动池 313 的探测空间中的样本发射的光的可以收集的部分。检测器透镜 307 收集经过孔 306 的光,并将经过检测器滤光器 308 之后的光聚焦于检测器 309 的活性区。检测器滤光器 308 在最大化激发的微粒结合荧光部分发射的信号的同时,将由光散射或周围光引起的异常的噪音信号最小化。处理器 310 根据本文所述的方法处理来自微粒的光信号。

[0263] 在一个实施方式中,显微镜物镜 305 是高数值孔径显微镜物镜。本文所用的“高

数值孔径透镜”，包括具有等于或大于 0.6 的数值孔径的透镜。数值孔径是物镜捕获的高度衍射成像光线的数值量度。较大的数值孔径允许逐渐增加的斜射光线进入物镜透镜，从而产生更高分辨率的图像。另外，图像的亮度随较大的数值孔径而增加。高数值孔径透镜可从各种厂商购买，且任一种具有等于或大于大约 0.6 的数值孔径的透镜可以在分析器系统中使用。在某些实施方式中，透镜具有约 0.6–约 1.3 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有约 0.6–约 1.0 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有约 0.7–约 1.2 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有约 0.7–约 1.0 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有约 0.7–约 0.9 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有约 0.8–约 1.3 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有约 0.8–约 1.2 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有约 0.8–约 1.0 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有至少约 0.6 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有至少约 0.7 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有至少约 0.8 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有至少约 0.9 的数值孔径。在某些实施方式中，透镜具有至少约 1.0 的数值孔径。在某些实施方式中，显微镜物镜 305 的孔径为大约 1.25。在使用 0.8 的显微镜物镜 305 的一个实施方式中，可以使用 Nikon 60X/0.8NA Achromat 透镜 (Nikon, Inc., USA)。

[0264] 在某些实施方式中，电磁辐射源 301 是在可见光谱内发射光的激光器。在所有的实施方式中，设定电磁辐射源，使得激光器的波长设定为足以激发连接在微粒上的荧光标记物的波长。在某些实施方式中，激光器是具有 639nm 波长的连续波激光器。在其它实施方式中，激光器是具有 532nm 波长的连续波激光器。在其它实施方式中，激光器是具有 422nm 波长的连续波激光器。在其它实施方式中，激光器是具有 405nm 波长的连续波激光器。可以使用任何具有适于激发本发明的方法和组合物中使用的荧光部分的波长的连续波激光器而不背离本发明的范围。

[0265] 在单微粒分析器系统 300 中，随着每一个微粒通过电磁辐射源的光束 311，微粒进入激发态。当微粒从其激发态弛豫时，发射可检测的光的脉冲。每一个微粒在其通过光束的时间长度中，重复多次激发–发射循环，从而使得分析器系统 300 在每个微粒通过探测空间 314 时对每个颗粒检测几十到几千个光子。荧光微粒发射的光子被具有时间延迟的检测器 309 记录 (图 1A)，时间延迟表明微粒标记复合物通过探测空间的时间。检测器 309 记录光子强度，且采样时间分成箱元，箱元是具有可自由选择的时间道宽的均匀、任意的时间段。确定在每一个箱元获得的信号的数目。为了确定微粒出现的时间，采用几种统计分析方法中的一种或其组合。这样的方法包括确定分析器系统的基线噪音和在基线噪音之上设定统计水平的荧光标记物的信号强度以消除来自检测器的假阳性信号。

[0266] 将电磁辐射源 301 聚焦于分析器系统 300 的毛细流动池 313 上，其中，毛细流动池 313 与采样系统流体连接。探测空间 314 如图 2A 所示。来自图 1A 的连续波电磁辐射源 301 的光束 311 光学聚焦于毛细流动池 313 内的特定深度。光束 311 以垂直于毛细流动池 313 的角度指向填充样品的毛细流动池 313。光束 311 以选择来激发标记目标微粒的特定荧光标记物的预定波长操作。光束 311 的直径和光束 311 聚焦的深度一起确定了探测空间 314 的大小或体积。或者，可以通过在分析器系统中运行已知浓度的校准样品确定探测空间。

[0267] 当在样品浓度中检测单分子时，设定单分子检测所需的光束大小和聚焦的深度，从而限定探测空间 314 的大小。设定探测空间 314 使得在具有合适的样品浓度时在进行观

察的每个时间间隔中只有一个微粒出现于探询空间 314 中。可以理解,由光束限定的检测探询体积不是完美的球形,一般是“领结 (bow-tie)”形状。但是,为了定义的目的,探询空间的“体积”这里定义为直径等于光束的聚焦点直径的球形包围的体积。在不背离本发明范围的情况下,光束 311 的聚焦点可以具有各种直径。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 1–约 5、10、15 或 20 微米,或约 5–约 10、15 或 20 微米,或约 10–约 20 微米,或约 10–约 15 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 5 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 10 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 12 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 13 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 14 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 15 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 16 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 17 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 18 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 19 微米。在某些实施方式中,光束聚焦点的直径是约 20 微米。

[0268] 在单一微粒分析器系统的可代替的实施方式中,可以使用多于一个的电磁辐射源来激发用不同波长的荧光标记物标记的微粒。在另一可代替的实施方式中,可以使用多于一个的毛细流动池中的探询空间。在另一可代替的实施方式中,可采用多重检测器来检测来自荧光标记物的不同的发射波长。图 1B 显示合并分析器系统的这些可代替实施方式中的每一个的图解。这些实施方式从以前的美国专利申请 11/048660 号中引入本文作为参考。

[0269] 在分析器系统 300 的某些实施方式中,需要动力以移动微粒通过分析器系统 300 的毛细流动池 313。在一个实施方式中,动力可以是压力的形式。用来移动微粒通过毛细流动池的压力可由泵产生。在某些实施方式中,可以使用 Scivex, Inc. HPLC 泵。在使用泵作为动力的某些实施方式中,样品可以 1 微升 / 分钟 – 约 20 微升 / 分钟,或约 5 微升 / 分钟 – 约 20 微升 / 分钟的速度通过毛细流动池。在某些实施方式中,样品可以约 5 微升 / 分钟的速度通过毛细流动池。在某些实施方式中,样品可以约 10 微升 / 分钟的速度通过毛细流动池。在某些实施方式中,样品可以约 15 微升 / 分钟的速度通过毛细流动池。在某些实施方式中,样品可以约 20 微升 / 分钟的速度通过毛细流动池。在某些实施方式中,可以使用电动力来移动微粒通过分析器系统。这类方法以前已经公开,从美国专利申请 11/048660 号中引入本文作为参考。

[0270] 在分析器系统 300 的一方面,分析器系统的检测器 309 检测荧光标记物发射的光子。在一个实施方式中,光子检测器是光电二极管。在进一步的实施方式中,检测器是雪崩光电二极管。在某些实施方式中,光电二极管是具有 190nm 和 1100nm 检测波长的硅光电二极管。当使用锗光电二极管时,检测光的波长是 400–1700nm。在其它实施方式中,当使用铟砷化镓光电二极管时,光电二极管检测的光的波长是 800–2600nm。当使用硫化铅光电二极管作为检测器时,检测的光的波长是 1000–3500nm。

[0271] 在某些实施方式中,按常规光学排列来安排电磁辐射源 301 的光学器件和检测器 309 的光学器件。在这样的安排中,电磁辐射源和检测器定位在不同的焦平面。如图 1A 和 1B 所示的分析器系统的激光器和检测器光学器件的安排是常规的光学排列。

[0272] 在某些实施方式中,按共焦光学排列来安排电磁辐射源的光学器件和检测器的光

学器件。在这样的安排中,电磁辐射源 301 和检测器 309 定位在相同的焦平面。共焦安排使得分析器更加耐用,因为如果移动分析器系统,电磁辐射源 301 和检测器的光学器件 309 不需要重新调整。这种安排也使得分析器的使用更加简化,因为它不需重新调整分析器系统的组件。分析器 300(图 1A)和分析器 355(图 1B)的共焦安排分别如图 3A 和 3B 所示。图 3A 显示来自电磁辐射源 301 的光束 311 被显微镜物镜 315 聚焦,以在毛细流动池 313 之内形成一个探测空间 314(图 2A)。分色镜 316,其反射激光而让荧光通过,用来分离荧光和激光。位于检测器之前的滤光器 317 消除了检测器的任何非荧光光线。在某些实施方式中,以共焦排列配置的分析器系统可以包括两个或多个探测空间。以前已经公开了这种方法,从以前的美国专利申请号 11/048 660 中引入本文引入作为参考。

[0273] 激光器可以是可调染料激光器,如氦-氖激光器。可以设置激光器以发射 632.8nm 的波长。或者,可以设置激光器的波长来发射 543.5nm 或 1523nm 的波长。或者,电磁激光器可以是氩离子激光器。在这样的实施方式中,可以操作氩离子激光器作为在可见光谱内的约 25 种不同的波长处的连续气体激光器,波长设置为 408.9-686.1nm,但其最佳操作性能设置为 488-514.5nm。

[0274] 1 电磁辐射源

[0275] 在分析器系统的某些实施方式中,可以使用化学发光标记物。在这样的实施方式中,不必利用 EM 源来检测微粒。在另一实施方式中,外来的标记物或微粒的内在特征是光作用标记或特征,例如,荧光标记物或光散射标记物。在这样的实施方式中,使用 EM 辐射源来照射标记物和 / 或微粒。优选激发荧光标记物的 EM 辐射源。

[0276] 在某些实施方式中,分析器系统包括电磁辐射源 301。在不背离本发明的范围的情况下,在任一种分析器系统 300 中可以使用任何数目的辐射源。以前已经公开了多重电磁辐射源,从以前的美国专利申请 11/048660 号中引入本文作为参考。在某些实施方式中,所有的连续波电磁 (EM) 辐射源在相同的波长处发射电磁辐射。在其它实施方式中,不同的源发射不同波长的 EM 辐射。

[0277] 在一个实施方式中,EM 源 301、351、352 是产生 200-1000nm 波长的连续波激光器。这样的 EM 源优点在于体积小、持久耐用且相对便宜。另外,它们一般具有比其它光源产生更大的荧光信号的能力。合适的连续波 EM 源的具体例子包括但不限于:氩、氦、氦-氖、氦-镉型激光器,以及可调二极管激光器(红-红外区域),每个具有频率加倍的可能性。激光器提供连续照射而不需如光栅的附属的电子或机械装置以干扰其照射。在使用连续波激光器的一个实施方式中,3mW 的电磁辐射源可提供足够的能量来激发荧光标记。来自具有这样的能量输出的连续波激光器的光束可以是直径为 2-5 μm 。为了达到 3mW 的照射,微粒暴露于激光束的时间可以是约 1 毫秒。在可替换的实施方式中,暴露于激光束的时间可以等于或小于约 500 微秒。在可替换的实施方式中,暴露时间可以等于或小于约 100 微秒。在可替换的实施方式中,暴露时间可以等于或小于约 50 微秒。在可替换的实施方式中,暴露时间可以等于或小于约 10 微秒。

[0278] LED 是另一类低成本、高可靠性的照射源。在超高亮 LED 和具有高吸收截面、量子产额的染料方面的最新进展支持 LED 在单微粒检测中的适用性。这样的激光器可以单独使用或联合其它光源使用,如水银弧光灯、元素弧光灯、卤素灯、弧光放电、等离子体放电、发光二极管或这些的组合。

[0279] 在其它实施方式中,EM 源可以是脉冲波激光器的形式。在这样的实施方式中,激光器的脉冲大小是一个重要的因素。在这样的实施方式中,大小、聚焦点及激光器发射的总能量是重要的,且必须具有足够的能量以能够激发荧光标记。当使用脉冲激光器时,需要较长持续时间的脉冲。在某些实施方式中,可以使用 2 纳秒的激光脉冲。在某些实施方式中,可以使用 5 纳秒的激光脉冲。在某些实施方式中,可以使用 2-5 纳秒的激光脉冲。

[0280] 最佳激光强度取决于单染料的光漂白特征和穿过探测空间所需的时间长度(包括微粒的速度,探测空间之间的距离(如果使用多于一个探测空间)和探测空间的大小)。为了获得最大信号,需要以不会导致高百分比的染料产生光漂白的最高强度照射样品。优选的强度是使得不超过 5% 的染料在微粒穿过探测空间的时间内被漂白的强度。

[0281] 根据需要激发的染料分子的类型、染料分子的激发时间和/或染料分子经过毛细流动池的速度,设置激光器的功率。激光器的功率定义为光束传递能量的速度,且以焦耳/秒或瓦特的单位测量。可以理解,为了在微粒经过探测空间时向探测空间提供恒定量的能量,激光器输出功率越大,激光器照射微粒的时间就可以越短。因此,在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量大于约 0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90 或 100 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量小于约 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100 或 110 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 0.1-100 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 1-100 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 1-50 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 2-50 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 3-60 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 3-50 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 3-40 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 3-30 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 1 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 3 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 5 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 10 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 15 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 20 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 30 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 40 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 50 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总

能量约 60 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 70 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 80 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 90 微焦耳。在某些实施方式中,激光器的功率和照射时间的组合使得探测空间在照射时间内接收的总能量约 100 微焦耳。

[0282] 在某些实施方式中,激光器的输出功率设置为至少约 1mW、2mW、3mW、4mW、5mW、6mW、7mW、8mW、9mW、10mW、13mW、15mW、20mW、25mW、30mW、40mW、50mW、60mW、70mW、80mW、90mW、100mW 或大于 100mW。在某些实施方式中,激光器的输出功率设置为至少约 1mW。在某些实施方式中,激光器的输出功率设置为至少约 3mW。在某些实施方式中,激光器的输出功率设置为至少约 5mW。在某些实施方式中,激光器的输出功率设置为至少约 10mW。在某些实施方式中,激光器的输出功率设置为至少约 20mW。在某些实施方式中,激光器的输出功率设置为至少约 30mW。在某些实施方式中,激光器的输出功率设置为至少约 40mW。在某些实施方式中,激光器的输出功率设置为至少约 50mW。在某些实施方式中,激光器的输出功率设置为至少约 60mW。在某些实施方式中,激光器的输出功率设置为至少约 90mW。

[0283] 激光器照射探测空间的时间可以设置为不低于约 1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、350、400、450、500、600、700、800、900 或 1000 微秒。激光器照射探测空间的时间可以设置为不高于约 2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、1500 或 2000 微秒。激光器照射探测空间的时间可以设置为约 1-1000 微秒。激光器照射探测空间的时间可以设置为约 5-500 微秒。激光器照射探测空间的时间可以设置为约 5-100 微秒。激光器照射探测空间的时间可以设置为约 10-100 微秒。激光器照射探测空间的时间可以设置为约 10-50 微秒。激光器照射探测空间的时间可以设置为约 10-20 微秒。激光器照射探测空间的时间可以设置为约 5-50 微秒。激光器照射探测空间的时间可以设置为约 1-100 微秒。在某些实施方式中,激光器照射探测空间的时间可以设置为约 1 微秒。在某些实施方式中,激光器照射探测空间的时间可以设置为约 5 微秒。在某些实施方式中,激光器照射探测空间的时间可以设置为约 10 微秒。在某些实施方式中,激光器照射探测空间的时间可以设置为约 25 微秒。在某些实施方式中,激光器照射探测空间的时间可以设置为约 50 微秒。在某些实施方式中,激光器照射探测空间的时间可以设置为约 100 微秒。在某些实施方式中,激光器照射探测空间的时间可以设置为约 250 微秒。在某些实施方式中,激光器照射探测空间的时间可以设置为约 500 微秒。在某些实施方式中,激光器照射探测空间的时间可以设置为约 1000 微秒。

[0284] 例如,在激光器提供 3mW、4mW、5mW 或超过 5mW 的功率输出的情况下,激光器照射探测空间的时间可以设置为 1 毫秒、250 微秒、100 微秒、50 微秒、25 微秒或 10 微秒。在某些实施方式中,用提供输出功率为 3mW 的激光器照射标记物,且照射标记物约 1000 微秒。在其它实施方式中,用提供输出功率为不高于约 20mW 的激光器照射标记物少于 1000 毫秒。在其它实施方式中,用提供输出功率为 20mW 的激光器照射标记物少于或等于约 250 微秒。在某些实施方式中,用提供输出功率为约 5mW 的激光器照射标记物少于或等于约 1000 微秒。

[0285] 2. 毛细流动池

[0286] 毛细流动池流体连接样品系统。在一个实施方式中,通过相应的光束 311 的横截面积和检测器 309 视野内光束之内的片段来确定分析器系统的探测空间 314。在分析器系统的实施方式中,探测空间 314 具有的如这里定义的体积为约 0.01-500pL、或约 0.01-100pL、或约 0.01-10pL、或约 0.01-1pL、或约 0.01-0.5pL、或约 0.02-约 300pL、或约 0.02pL-约 50pL、或约 0.02pL-约 5pL、或约 0.02-约 0.5pL、或约 0.02-约 2pL、或约 0.05-约 50pL、或约 0.05-约 5pL、或约 0.05-约 0.5pL、或约 0.05pL-约 0.2pL、或约 0.1pL-约 25pL。在某些实施方式中,探测空间具有的体积为约 0.01-10pL。在某些实施方式中,探测空间 314 具有的体积为约 0.01-1pL。在某些实施方式中,探测空间 314 具有的体积为约 0.02-约 5pL。在某些实施方式中,探测空间 314 具有的体积为约 0.02-约 0.5pL。在某些实施方式中,探测空间 314 具有的体积为约 0.05-约 0.2pL。在某些实施方式中,探测空间 314 具有的体积为约 0.1pL。其它有用的探测空间体积如本文所述。本领域的技术人员可以理解,可以为了分析器的最高性能选择探测空间 314。尽管非常小的探测空间显示出最小化的背景噪音,但较大的探测空间具有以下优点:能够在合理的时间分析低浓度样品。在使用两个探测空间 370 和 371 的实施方式中,可以使用如本文所述的那些单一探测空间 314 的体积。

[0287] 在本发明的一个实施方式中,探测空间足够大以能够进行浓度范围为约 1000 飞摩尔 (fM)-约 1 仄摩尔 (zM) 的微粒的检测。在本发明的一个实施方式中,探测空间足够大以能够进行浓度范围为约 1000fM-约 1 阿托摩尔 (aM) 的微粒的检测。在本发明的一个实施方式中,探测空间足够大以能够进行浓度范围为约 10fM-约 1 阿托摩尔 (aM) 的微粒的检测。在许多情况下,大的探测空间使得能够进行浓度为低于约 1fM 的微粒的检测而不需要额外的预浓缩设备或技术。本领域的技术人员公认,最合适的探测空间的大小取决于待检测微粒的亮度、背景信号的水平 and 待分析样品的浓度。

[0288] 可以通过调整分析器的光学器件来限制探测空间 314 的大小。在一个实施方式中,可以调整光束 311 的直径以改变探测空间 314 的体积。在另一实施方式中,检测器 309 的视野可以改变。因此,可以调整源 301 和检测器 309 使得在探测空间 314 之内照射并检测单一微粒。在另一实施方式中,决定检测器 309 的视野的孔 306 (图 1A) 的宽度可以改变。这种构造使得能够接近实时地改变探测空间,以补偿或多或少地浓缩的样品,确保两个或多个微粒同时处于探测空间之内的低概率。可以对两个或多个探测空间 370 和 371 进行类似的改变。

[0289] 在另一实施方式中,可以通过使用已知浓度的校准样品限定探测空间,校准样品在检测真实样品之前经过毛细流动池。当样品经过毛细流动池,每次在校准样品中只检测一个单一微粒时,聚焦的深度连同电磁辐射源的光束的直径决定毛细流动池中的探测空间的大小。

[0290] 对探测空间的物理约束也可以由固体壁来提供。在一个实施方式中,当样品流体包含于毛细管内时,壁是流动池 313 的一个或多个壁 (图 2A)。在一个实施方式中,流动池由玻璃制成,但在不背离本发明的范围的情况下,可以使用其它的可透过约 200-约 1000nm 或更高范围内的光的物质,如石英、熔融石英及有机材料,如特氟纶、尼龙、塑料如聚氯乙烯、聚苯乙烯和聚乙烯,或其任意组合。尽管在不背离本发明的范围的情况下,可以使用其它横截面形状 (例如,矩形、圆柱形),但在一个实施方式中,毛细流动池 313 具有正方形的横截面。在另一实施方式中,可以至少部分地由在芯片 (未示出) 内蚀刻的通道 (未示

出)限定探测空间。同样的考虑应用于使用两个探测空间的实施方式中(370 和 371,在图 2B 中)。

[0291] 探测空间浸浴在流体中。在一个实施方式中,流体是水性的。在其它实施方式中,流体是非水性的或水性和非水性流体的组合。另外,流体可以含有调节 pH 的试剂、离子成分或筛分剂(sieving agents),例如可溶性大粒子或聚合物或胶体。可以预期,在探测空间之间可以存在阀或其它设备,以暂时性地中断流体连接。暂时性地中断的探测空间被认为是通过流体连接的。

[0292] 在本发明的另一实施方式中,探测空间是存在于流动池 313 之内的单一的探测空间,其被稀释体积之内的样品材料的层流(也称为鞘流)的大小所限制。在这些和其它实施方式中,探测空间可以由单独的鞘流限定,也可以由鞘流和照射源尺寸或检测器视野的组合来限定。鞘流可由许多方式形成,包括:样品材料是同中心层流的内部材料,稀释体积在外部;稀释体积是在样品体积的一侧;稀释体积是在样品材料的两侧;稀释体积是在样品材料的多个侧面上,但没有完全围绕样品材料;稀释体积完全围绕样品材料;稀释体积同心地完全围绕样品材料;样品材料是不连续液滴系列中的内部材料,稀释体积完全围绕每一滴样品材料。

[0293] 在某些实施方式中,本发明的单分子检测器包括不超过一个探测空间。在某些实施方式中,使用多个探测空间。多个探测空间已经在以前公开,且从美国专利申请 11/048 660 号中引入本文作为参考。本领域的技术人员可以认识到,在一些情况下,分析器含有 2、3、4、5、6 或更多个独立的探测空间。

[0294] 3. 动力

[0295] 在分析器系统的一个实施方式中,使用动力移动微粒穿过探测空间。在某些实施方式中,移动微粒的动力是压力。在某些实施方式中,由泵和空气压力源、真空源、离心机或其组合供应压力。在某些实施方式中,移动微粒的动力是电动力。以前已经在在先申请中公开了作为动力的电动力的使用,从美国专利申请 11/048 660 号中引入本文作为参考。

[0296] 在一个实施方式中,使用压力作为动力移动微粒通过毛细流动池的探测空间。在进一步的实施方式中,通过泵施加压力来移动样品。合适的泵是本领域内已知的。在一个实施方式中,使用那些由 Scivax, Inc. 为 HPLC 应用而制造的泵来作为动力。在其它实施方式中,当用泵抽取较小体积的样品时,可以使用为微流体应用而制造的泵。在美国专利 5 094 594、5 730 187、6 033 628 和 6 533 553 号中描述了这样的泵,其公开了能够用泵抽取纳升或皮升范围的体积的流体的设备。与样品接触的泵内的所有材料优选地由高度惰性的材料制成,例如,聚醚醚酮(PEEK)、熔融石英或蓝宝石。

[0297] 有必要使用动力以移动样品通过毛细流动池来推动样品通过探测空间从而进行分析。也需要动力以在样品通过之后推动冲洗样品通过毛细流动池。当进行样品回收时,也需要动力以推动样品返回样品回收管。标准泵有各种大小,可以选择合适的大小以适应预期的样品大小和流动需求。在某些实施方式中,使用单独的泵来进行样品分析和系统的洗脱。分析泵可以具有大约 0.000001- 大约 10mL、或大约 0.001- 大约 1mL、或大约 0.01- 大约 0.2mL、或大约 0.005、0.01、0.05、0.1 或 0.5mL 的容积。洗脱泵可以比分析泵具有更大的容积。洗脱泵可以具有约 0.01- 约 20mL、或约 0.1- 约 10mL、或约 0.1- 约 2mL、或约 0.05、0.1、0.5、1、5 或 10mL 的体积。这些泵的大小仅是示例性的,本领域的技术人员可以理解,泵

的大小可以根据应用、样品的大小、用泵抽取的样品的粘性、管的尺寸、流速、温度及其它本领域内熟知的因素来选择。在某些实施方式中,通过步进电机来驱动系统的泵,其易于通过微处理器非常精确地控制。

[0298] 在优选的实施方式中,串联使用洗脱泵和分析泵,具有特定的止回阀以控制流动方向。管件设计为当分析泵抽取最大量的样品时,样品不会到达泵本身。这一点通过选择分析泵和分析毛细管之间的管道的内径和长度,使得管道的体积大于分析泵的行程排量来实现。

[0299] 4. 检测器

[0300] 在一个实施方式中,检测在荧光标记暴露于电磁辐射后发射的光(例如,紫外、可见或红外范围的光)。检测器 309(图 1A)、或检测器(364、365,图 1B)能够捕捉来自荧光标记-部分复合物的光子脉冲的幅度和持续时间,并进一步将光子脉冲的幅度和持续时间转化为电信号。使用诸如 CCD 照相机、视频输入模块照相机及超高速扫描照相机的检测设备来产生具有连续信号的图像。在另一实施方式中,可以使用诸如测辐射热仪、光电二极管、光电二极管阵列、雪崩光电二极管及光电倍增管的设备,其产生序列信号。也可以使用前述检测器的任意组合。在一个实施方式中,使用雪崩光电二极管检测光子。

[0301] 在探测空间 314(图 2A)和其对应的检测器 309(图 1A)之间使用特定的光学器件,可以检测电磁辐射发射的一些独特特征,包括:发射波长、发射强度、脉冲大小、脉冲持续时间和荧光偏振。在某些实施方式中,检测器 309 是在反向偏压中使用的光电二极管。反向偏压中的光电二极管装置通常具有极高的电阻。当合适频率的光照射 P/N 结时,这种电阻减少。因此,通过追踪通过它的电流,可以使用反向偏压二极管作为检测器。基于这种效应的电路比基于零偏压的电路对于光更灵敏。

[0302] 在分析器系统的一个实施方式中,光电二极管可以是雪崩光电二极管,其比起常规的光电二极管,可以以更高的反向偏压操作,因而允许各个光生载体被雪崩击穿放大,在光电二极管内产生内部的增益,其增加了设备的有效响应率(灵敏度)。光电二极管的选择取决于荧光标记的微粒发射的能量或发射波长。在某些实施方式中,光电二极管是硅光电二极管,其检测 190-1100nm 范围的能量;在另一实施方式中,光电二极管是锗光电二极管,其检测 800-1700nm 范围的能量;在另一实施方式中,光电二极管是铟砷化镓光电二极管,其检测 800-2600nm 范围的能量;在其它的实施方式中,光电二极管是硫化铅光电二极管,其检测低于 1000-3500nm 范围的能量。在某些实施方式中,雪崩光电二极管是单一光子检测器,设计为检测 400-1100nm 波长范围的能量。单一光子检测器可商购(例如,Perkin Elmer, Wellesley, MA)。

[0303] 在某些实施方式中,检测器是检测 300-1700nm 的能量的雪崩光电二极管检测器。在一个实施方式中,可以使用硅雪崩光电二极管检测器来检测 300-1100nm 的波长。可以使用铟砷化镓光电二极管检测器来检测 900-1700nm 的波长。在某些实施方式中,分析器系统可以包含至少一个检测器;在其它实施方式中,分析器系统可以包含至少两个检测器,且每一个检测器选择和配置为检测特定波长范围的光能量。例如,可以使用两个单独的检测器来检测已经用不同的标记物标记的微粒,其一经 EM 源激发,就发射具有不同光谱的能量的光子。在一个实施方式中,分析器系统可以包括能够检测如绿色染料(例如, Alexa 546)发射的 450-700nm 范围的荧光能量的第一检测器,和能够检测如远红外染料(例如, Alexa

647) 发射的 620–780nm 范围的荧光能量的第二检测器。也可以使用用来检测如蓝色染料 (例如, Hoechst 33342) 发射的 400–600nm 范围的荧光能量和用来检测如红色染料 (Alexa 546 和 Cy3) 发射的 560–700nm 范围的荧光能量的检测器。

[0304] 可以使用包括两个或多个检测器的系统来检测用两个或多个发射不同光谱的光的标记物标记的单独的微粒。例如, 两个不同的检测器能够检测已经用两个不同的染料标记物标记的抗体。或者, 可以使用包括两个检测器的分析器系统来检测不同类型的微粒, 每一类型用不同的染料分子或用两个或多个染料分子的混合物标记。例如, 两个不同的检测器可以用来检测两个不同类型的识别两种不同的蛋白质的抗体, 每一类型用不同的染料标记或用两种或多种染料标记分子的混合物标记。通过改变两种或多种染料标记分子的比例, 使用两个检测器, 可以单独地检测两个或多个不同的微粒类型。可以理解, 在不背离本发明的范围的情况下, 可以使用三个或多个检测器。

[0305] 本领域的技术人员可以理解, 对每一个探测空间可以配置一个或多个检测器, 不论在流动池之内限定一个或多个探测空间, 且可以配置每一个检测器来检测以上所列的发射的电磁辐射的任一特征。例如用于多探测空间的多检测器的使用, 已经在以前的在先申请中公开, 且从美国 专利申请 11/048 660 号引入本文作为参考。一旦微粒经标记而使其可检测 (或者如果微粒拥有使其可检测的内在特征), 在不背离本发明的范围的情况下, 可以使用本领域内已知的任何合适的检测机构, 例如, CCD 照相机、视频输入模块照相机、超高速扫描照相机、测辐射热仪、光电二极管、光电二极管阵列、雪崩光电二极管和产生序列信号的光电倍增管, 及其组合。可以检测电磁辐射的不同特征, 包括: 发射波长、发射强度、脉冲大小、脉冲持续时间、荧光偏振及其任何组合。

[0306] C. 采样系统

[0307] 在进一步的实施方式中, 分析器系统可能包括准备引入分析器系统的样品的采样系统。包括的采样系统能够自动采集多个样品, 并在样品容器和第一探测空间之间提供流体连接。

[0308] 在某些实施方式中, 本发明的分析器系统包括将样品的等分试样引入单一微粒分析器进行分析的采样系统。可以使用任何能够引入样品的机构。可以使用或者由泵产生的真空吸力, 或者施加到样品上的将液体推向管内的压力, 或者任何一种其它将样品引入采样管的机构来抽取样品。一般地, 但不是必需地, 采样系统将已知样品体积的样品引入单一微粒分析器; 在检测微粒是否存在的某些实施方式中, 样品大小的准确信息不是关键的。在优选的实施方式中, 采样系统提供了单个或多个样品的自动采集。在将已知体积的样品引入系统的实施方式中, 采样系统提供了多于约 0.0001、0.001、0.01、0.1、1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、500、1000、1500 或 2000 μl 的用于分析的样品。在某些实施方式中, 采样系统提供了低于约 2000、1000、500、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5、2、1、0.1、0.01 或 0.001 μl 的用于分析的样品。在某些实施方式中, 采样系统提供了约 0.01–1500 μl 、或约 0.1–1000 μl 、或约 1–500 μl 、或约 1–100 μl 、或约 1–50 μl 、或约 1–20 μl 的用于分析的样品。在某些实施方式中, 采样系统提供了约 5–200 μl 、或约 5–100 μl 、或约 5–50 μl 的用于分析的样品。在某些实施方式中, 采样系统提供了约 10–200 μl 、或约 10–100 μl 、或约 10–50 μl 的用于分析的样品。在某些实施方式中, 采样系统提供了约 0.5–约 50 μl 的用于分析的样品。

[0309] 在某些实施方式中,采样系统提供了样品之间可以改变的样品大小。在这些实施方式中,样品大小可以是本文所述的任一个样品大小,并且如所期望的,可能随着每种样品或样品组而改变。

[0310] 对于即将进行的分析,需要样品体积的准确度和采样系统的样品体积之间的精密度。在某些实施方式中,采样体积的精密度由所用的泵决定,一般地由样品体积的低于约 50、40、30、20、10、5、4、3、2、1、0.5、0.1、0.05 或 0.01% 的变异系数 (CV) 代表。在某些实施方式中,采样系统的样品之间的精密度由低于约 50、40、30、20、10、5、4、3、2、1、0.5、0.1、0.05 或 0.01% 的变异系数 (CV) 代表。在某些实施方式中,采样系统的批内精密度由低于约 10、5、1、0.5 或 0.1% 的变异系数 (CV) 代表。在某些实施方式中,采样系统的批内精密度显示低于约 5% 的变异系数 (CV)。在某些实施方式中,采样系统的批间精密度由低于约 10、5 或 1% 的变异系数 (CV) 代表。在某些实施方式中,采样系统的批间精密度显示低于约 5% 的变异系数 (CV)。

[0311] 在某些实施方式中,采样系统提供了低的样品遗留率,优点在于在样品之间不需要另外的洗涤步骤。因此,在某些实施方式中,样品遗留率低于约 1、0.5、0.1、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01、0.005 或 0.001%。在某些实施方式中,样品遗留率低于约 0.02%。在某些实施方式中,样品遗留率低于约 0.01%。

[0312] 在某些实施方式中,取样器提供了进样环路。在这些实施方式中,顺序将多个样品吸入管路,且每一个被缓冲“塞”与其它分开。一般地相继地读取样品,之间不需要冲洗。在环路末端冲洗一次。在使用缓冲“塞”的实施方式中,将缓冲塞喷射进入微量滴定板的单独的孔中可以回收塞子。

[0313] 采样系统可以适用于标准分析装置,例如,96 孔微量滴定板,或优选 384 孔板。在某些实施方式中,系统包括 96 孔板的定位器和用来将样品管浸到孔内和孔外的机械装置,例如,提供沿 X、Y 和 Z 轴移动的机械装置。在某些实施方式中,采样系统提供了多个采样管,当开始测试时,样品可以储藏在其中并从其中抽取。在某些实施方式中,用一个检测器分析所有的来自多个管的样品。在其它实施方式中,多个单一分子检测器可以连接到样品管上。可以通过包括在使用采样系统采样之前在板孔内对样品进行操作的步骤制备样品,或在分析器系统内制备样品,或两者的一些组合。

[0314] D. 样品制备系统

[0315] 样品制备包括制备用于分析的原始样品的必需的步骤。这些步骤可能包括,例如,一种或多种以下步骤:如离心、过滤、蒸馏、层析的分离步骤,浓缩、细胞裂解、改变 pH、加入缓冲液、加入稀释剂、加入试剂、加热或冷却、加入标记物、结合标记物、通过照射交联、分离未结合的标记物、灭活和 / 或除去干扰化合物,及任何其它制备用于通过单一微粒分析器分析的样品的必需步骤。在某些实施方式中,处理血液以分离血浆或血清。也可以对血清或血浆样品进行另外的标记、去除未结合的标记物和 / 或稀释步骤。

[0316] 在某些实施方式中,分析器系统包括样品制备系统,该样品制备系统进行提供单粒子分析器分析用样品所需的某些或全部步骤。这一系统可以进行任一或全部以上所列的样品制备的步骤。在某些实施方式中,通过分析器系统的样品制备系统部分地处理样品。因此,在某些实施方式中,可以首先在分析器系统之外部分地处理样品。例如,可以首先离心处理样品。然后,可以通过样品制备系统在分析器之内部分地处理样品。在分析器之内处

理样品包括标记样品、将样品和缓冲液混合及其它本领域的技术人员已知的处理步骤。在某些实施方式中,在分析器系统以外处理血液样品以提供血清或血浆样品,血清或血浆样品被引入分析器系统,并被样品制备系统进一步处理以对一种或多种目标微粒标记并任选地除去未结合的标记物。在其它实施方式中,样品的制备可以包括样品的免疫耗尽法,以除去非目标微粒或除去干扰样品分析的微粒。在再另外的实施方式中,可以除去样品中的干扰样品分析的微粒。例如,样品制备可以包括耗尽异嗜性抗体,已知其干扰使用非人类抗体直接地或间接地检测目标微粒的免疫分析。类似地,可以使用识别干扰蛋白质的抗体从样品中除去干扰目标微粒的测量的其它蛋白质。

[0317] 在某些实施方式中,样品在分析之前可以进行固相萃取,然后再进行分析。例如,分析 cAMP 的血清样品可以首先使用与其结合的 c18 柱进行固相萃取。其它的如蛋白酶、脂肪酶和磷酸酶的蛋白质从 c18 柱洗下,且 cAMP 可以洗脱而基本上不含能够降解 cAMP 或干扰 cAMP 测定的蛋白质。固相萃取可以用来除去降低分析灵敏度的样品的基质。在再另外的实施方式中,样品中存在的目标微粒可以通过干燥或冻干样品并将微粒溶于比初始样品更小的体积来浓缩。例如,呼出气冷凝液 (EBC) 样品可以干燥并再悬浮于小体积的合适的缓冲溶液中,以增强目标微粒的检测。

[0318] 在某些实施方式中,分析器系统提供了在系统中对待分析的样品进行完全制备的样品制备系统,例如,对血液样品、唾液样品、尿液样品、脑脊髓液样品、淋巴样品、BAL 样品、呼出气冷凝液 (EBC) 样品、活组织检查样品、法医样品、生物恐怖袭击样品等的完全制备。在某些实施方式中,分析器系统提供进行某些或全部的样品制备的样品制备系统。在某些实施方式中,初始样品是需要分析器系统进一步处理的血液样品。在某些实施方式中,初始样品是需要分析器系统进一步处理的血清或血浆样品。血清或血浆样品可以通过例如与结合一种或多种目标微粒的标记物接触的方式进一步处理,然后在除去或未除去未结合的标记物的情况下使用样品。

[0319] 在某些实施方式中,或者在分析系统之外,或者在分析系统的样品制备组件中,在一种或多种微量滴定板如 96 孔板上进行样品制备。试剂储库、缓冲液,等等,可以与板孔通过本领域内熟知的管件或其它合适的结构间断地流体连接。可以在 96 孔板或管件中单独地制备样品。样品分离、结合标记物和(如果需要的话)分离标记物的步骤可以在一个板上进行。在某些实施方式中,制备的微粒然后从板中释放,并将样品移入管中采样到样品分析系统内。在某些实施方式中,样品制备的所有步骤在一个板上进行,且分析系统直接从板上获得样品。尽管描述了关于 96 孔板的实施方式,但是可以理解,可以使用任何一个用于容纳一种或多种样品和适于制备样品的容器。例如,可以使用 384 或 1536 孔的标准微量滴定板。更一般地,在某些实施方式中,样品制备系统能够容纳并制备多于约 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、500、1000、5000 或 10000 个样品。在某些实施方式中,可以采集多个样品用于在多个分析器系统中分析。因此,在某些实施方式中,可以从样品制备系统采集 2 个样品、或多于约 2、3、4、5、7、10、15、20、50 或 100 个样品,并在多个样品分析器系统中平行运行。

[0320] 微流体系统也可以用于样品制备,且作为是分析器系统的一部分的样品制备系统,尤其是用于怀疑含有足够高的微粒浓度的样品,因而检测需要较小体积的样品。微流体操作的原理和技术是本领域已知的。见美国专利 4 979 824、5 770 029、5 755 942、5 746

901、5 681 751、5 658 413、5 653 939、5 653 859、5 645 702、5 605 662、5 571 410、5 543 838、5 480 614、5 716 825、5 603 351、5 858 195、5 863 801、5 955 028、5 989 402、6 041 515、6 071 478、6 355 420、6 495 104、6 386 219、6 606 609、6 802 342、6 749 734、6 623 613、6 554 744、6 361 671、6 143 152、6 132 580、5 274 240、6 689 323、6 783 992、6 537 437、6 599 436、6 811 668 号和 PCT 专利申请公开 W09955461(A1) 号。可以连续或平行制备样品用于单一或多个分析器系统。

[0321] 优选地,样品包括缓冲液。缓冲液可以在分析器系统外与样品混合,或它可以由样品制备机构提供。尽管能够使用任何合适的缓冲液,但优选的缓冲液具有低的荧光背景、对于可检测标记过的微粒为惰性、能够维持工作 pH、且在动力是电力的实施方式中具有适于电泳的离子强度。缓冲液浓度可以是任何合适的浓度,如约 1-约 200mM 的范围。可以使用任何缓冲液系统,只要它提供了目标分子的溶解性、功能及可检测性 (detectability)。优选地,对于使用泵的应用,缓冲液选自磷酸盐、甘氨酸、醋酸盐、柠檬酸盐、酸化 (acidulate)、碳酸盐 / 碳酸氢盐、咪唑、三乙醇胺、甘氨酸胺、硼酸盐、MES、Bis-Tris、ADA、aces、PIPES、MOPSO、Bis-Tris 丙烷、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、MOBS、TAPSO、氨基丁三醇 (Trizma)、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、三 (羟甲基) 甲基甘氨酸 (Tricine)、Gly-Gly、N- 二 (羟乙基) 甘氨酸 (Bicine)、HEPBS、TAPS、AMPD、TABS、AMPSO、CHES、CAPSO、AMP、CAPS 和 CABS。缓冲液也可以选自 Gly-Gly、N- 二 (羟乙基) 甘氨酸、三 (羟甲基) 甲基甘氨酸、2- 吗啉代乙磺酸 (MES)、4- 吗啉代丙磺酸 (MOPS) 和 2- 氨基 -2- 甲基 -1- 丙醇盐酸盐 (AMP) 缓冲液。有用的缓冲液是 pH8.1 的 2mM Tris/ 硼酸盐,但 Tris/ 甘氨酸和 Tris/HCl 也是可接受的。其它缓冲液如本文所述。

[0322] 用于电泳的缓冲液在在先申请中公开,从美国专利申请 11/048660 号引入本文作为参考。

[0323] E. 样品回收

[0324] 本发明的分析器和分析系统的实施方式的一个非常有用的特征是,不需要消耗样品即可分析。这在样品材料有限时尤其重要。回收样品也使人们能够对其进行另外的分析或再分析。对于样品量有限和 / 或期望能够再分析样品的应用,例如法医、药物筛选和临床诊断应用,这一特征的优点对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0325] 因此,在某些实施方式中,本发明的分析器系统进一步提供了在分析后用于样品回收的样品回收系统。在这些实施方式中,该系统包括将样品吸入分析器内、分析然后返回 (例如通过同一路径) 样品容器 (例如样品管) 的机构和方法。因为样品没有破坏,且样品不会进入任何一个阀或其它管件,样品未被污染。另外,因为样品通路中的所有的材料是非常惰性的,例如,PEEK、熔融石英、或蓝宝石,所以极少有来自样品通路的污染。步进电机控制的泵 (尤其是分析泵) 的使用允许精密控制抽取和推回的体积。这使得能够完全地或几乎完全地回收样品,而很少 (即便有) 被冲洗缓冲液稀释。因此,在某些实施方式中,在分析之后,回收多于约 50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或 99.9% 的样品。在某些实施方式中,回收的样品未稀释。在某些实施方式中,回收的样品被稀释低于约 1.5 倍、1.4 倍、1.3 倍、1.2 倍、1.1 倍、1.05 倍、1.01 倍、1.005 倍、或 1.001 倍。

[0326] 对于采样和 / 或样品回收,可以使用任何将液体样品从样品管转移到分析器的机

构。在某些实施方式中,分析毛细管的进口末端连接有一段短的管件(例如,PEEK 管件),能够浸入样品容器(如测试管或样品孔)或能够保持在废液容器以上。当通过冲洗来清洗装置中原有的样品时,该管位于废物容器之上,吸取冲洗废液。当吸取样品时,该管放进样品孔或测试管中。一般地,快速吸入样品,然后当观察样品中的微粒时缓慢推出。或者,在某些实施方式中,在至少部分吸入循环中,缓慢吸入样品;可以在缓慢吸取的同时分析样品。然后样品快速返回和快速冲洗。在某些实施方式中,可以在内向循环(吸入)和外向循环(抽出)中分析样品,其改善了例如小稀释样品的计数统计学,并确认结果,等等。如果需要保留样品,可以将样品推回到其来自的同样的样品孔,或另一个孔。如果不需要保留样品,将管件安置于废液容器之上。

[0327] VI. 使用心肌肌钙蛋白的高灵敏分析的方法

[0328] 本发明的方法使得远低于以前测量的浓度的心肌肌钙蛋白水平的测量成为可能。尽管心肌肌钙蛋白是公认的心肌损伤标志物,但其实用性受以下事实限制:使用当前的分析方法,只有在心肌损伤已经相当大时才能检测到心肌肌钙蛋白,因为当前方法缺乏灵敏度。对于心肌梗塞重新定义的联合欧洲心脏病协会/美国心脏病学院委员会推荐,心肌肌钙蛋白浓度升高应被定义为超过参照组中心肌肌钙蛋白浓度分布的第 99 百分位数的测量值,一个非常低的阈。推荐在该确定极限下 <10% 的总变异系数(CV)。但是,主要在低浓度范围,对于心肌肌钙蛋白的目前可用的免疫分析获得的分析变异系数不是均匀的。另外,对于检测非临床(正常)受试者的肌钙蛋白水平,目前可用的分析缺乏足够的灵敏度,而且正常人群的肌钙蛋白的真实基线或水平并未定义。本发明的检测器系统显示出能够一贯地以低于 10% 的总变异系数、在低于 10pg/ml 的浓度下检测 cTnI 的水平(见实施例)。因此,本发明提供了基于个体心肌肌钙蛋白的高灵敏度检测确定诊断、预后或治疗方法的方法。

[0329] 在某些实施方式中,本发明提供了确定个体的诊断、预后或治疗方法的方法,包括:i) 测定样品中的心肌肌钙蛋白浓度,或测定个体的系列样品中的心肌肌钙蛋白浓度,其中,通过对所述样品中的心肌肌钙蛋白的检测限低于约 50、40、30、10、5、4、3、2 或 1pg/ml(例如,低于约 20pg/ml)的心肌肌钙蛋白分析确定浓度;和 ii) 根据样品的浓度或系列样品的浓度,确定所述的个体的诊断、预后或治疗方法。测定心肌肌钙蛋白浓度的方法包括任何具有必要灵敏度的合适的方法,例如,本文所述的方法。在某些实施方式中,本方法利用测定样品中心肌肌钙蛋白浓度的方法,其中,该方法包括检测肌钙蛋白的单一分子或其复合物或片段。

[0330] 在某些实施方式中,通过分析来自明显健康的人群的样品,例如,血液、血清或血浆样品中的心肌肌钙蛋白,例如心肌肌钙蛋白 I,并确定高于 80、90、95、96、97、98、99、99.5 或 99.9% 的人群的水平的水平(浓度),从而确定肌钙蛋白的阈浓度。该值是阈值。在某些实施方式中,设定阈值为第 99 百分位数值。在某些实施方式中,使用对心肌肌钙蛋白的检测水平低于约 50、20、10、5 或 1pg/ml(例如,低于约 5pg/ml)的方法进行分析。

[0331] 在某些实施方式中,本发明提供了确定个体的诊断、预后或治疗方法的方法,包括比较来自个体的样品的肌钙蛋白的浓度值与肌钙蛋白的正常值或正常值的范围,其中,通过对所述样品中心肌肌钙蛋白的检测限低于约 50、40、30、10、5、4、3、2 或 1pg/ml(例如,低于约 20pg/ml)的心肌肌钙蛋白分析确定正常值或正常值的范围;和 ii) 根据比较,确定所述个体的诊断、预后或治疗方法。

[0332] 在某些实施方式中,心肌肌钙蛋白是心肌肌钙蛋白 I 或心肌肌钙蛋白 T。在某些实施方式中,心肌肌钙蛋白是心肌肌钙蛋白 T。在某些实施方式中,心肌肌钙蛋白是心肌肌钙蛋白 I。本方法可以在确定诊断、预后或治疗方法中使用本文所述的总肌钙蛋白,例如,总的 cTnI、或 cTnT、或总的 cTnI+cTnT。在某些实施方式中,本方法可以使用游离的心肌肌钙蛋白、复合的心肌肌钙蛋白、或心肌肌钙蛋白片段的浓度,或它们的比较(例如,比例),以确定诊断、预后或治疗方法。

[0333] A. 样品

[0334] 样品或系列样品可以是任何合适的样品;在某些实施方式中,样品是血液、血清或血浆。在某些实施方式中,样品或系列样品是血清样品。个体可以是动物,例如,哺乳动物,例如,人类。

[0335] 可以采集单一样品或系列样品。如果采集系列样品,可以以任何合适的间隔来采集,例如,几分钟、几小时、几天、几周、几个月、或几年的间隔。在急性临床情况中,一般地,在数小时和数天的时间过程中采集系列样品,样品间隔大约数小时。当对个体进行更长时期的处理时,样品间隔可以是几个月或几年。可以从单一样品,或系列样品中的一个或多个,或系列样品的改变来确定诊断、预后或治疗方法,例如,浓度以一定速度增加可能表明严重的状况,反之,以较慢的速度增加或没有增加可能表明相对良性或较不严重的状况。改变的速度可以在几小时、几天、几周、几个月、或几年的过程中测量。在一些情况下,指定的个体的改变速度比绝对值更有意义。在急性情况中,例如“尖峰”的极其快的改变速度表明危急的、进行中的或新近的心脏事件。在其它情况中,个体的值在几天、几周、几个月或几年的时间中提高可能表明心肌损伤正在进行和恶化,例如,由于心脏状态(例如,心脏肥大或充血性心力衰竭)引起的心肌损伤,或由于非心脏状态(例如,药物接触引起的毒性)引起的心肌损伤。

[0336] 在某些实施方式中,在心脏应力试验过程中或之后,至少采集一个样品。例如,可以在心脏应力试验之前采集一个样品,并在心脏应力试验过程中采集一个或多个样品。在试验前或试验过程中采集的样品的肌钙蛋白水平之间的偏差能够提供诊断或预后的信息,例如,表明存在冠心病或其它与心肌相关的病理学的可能性。也可以进行其它的比较,例如,任一个样品与正常水平或阈水平的比较,或样品中的心肌肌钙蛋白浓度的改变速度的确定,所有这些可以产生关于心脏与心血管健康,以及本文所述的其它状况的有用信息。

[0337] 在某些实施方式中,在个体向医疗专业人员呈现一种或多种表明可能涉及心肌损伤的状态的症状时或在接近该时间的时刻,至少采集一个样品。个体呈现给医疗专业人员的情况包括,但不限于:流动诊所、紧急护理、病危护理、重症监护、监护系统、住院病人、门诊病人、医务所、医疗诊所、包括救护车的急症反应情况和健康普查情况。在某些实施方式中,从个体采集一个或多个样品,并就地分析心肌肌钙蛋白,即,在样品采集处或其附近分析心肌肌钙蛋白。例如,可以对出现在医院的个体采集一个或多个样品,并在医院内分析心肌肌钙蛋白。例如,可以对出现在医院的个体采集一个或多个样品,并在医院内分析心肌肌钙蛋白。在某些实施方式中,从个体采集一个或多个样品,并在 CLIA 实验室分析心肌肌钙蛋白。在某些实施方式中,所述个体显示一种或多种符合急性冠状动脉综合征的症状。在某些实施方式中,所述个体显示一种或多种符合 AMI 的症状。这类症状包括但不限于:胸痛、胸闷、臂痛、不正常的 EKG、不正常的酶水平和呼吸短促。

[0338] B. 诊断、预后或治疗方法的确定

[0339] 在某些实施方式中,步骤 ii) 包括比较所述浓度或系列浓度与所述浓度的正常值,比较所述浓度或系列浓度与预设的阈水平,比较所述浓度或系列浓度与基线值,或对于所述系列浓度确定浓度改变的速度。

[0340] 在某些实施方式中,步骤 ii) 包括比较所述样品中的所述肌钙蛋白的浓度与预设的阈浓度,并且如果样品浓度大于阈水平,则确定诊断、预后或治疗方法。例如,可以通过确定一组个体中肌钙蛋白的第 99 百分位数浓度,并设定所述阈浓度在所述第 99 百分位数肌钙蛋白浓度来确定阈浓度。实施例部分给出了这样的一个示例。

[0341] 可以通过本领域内熟知的方法建立正常值、阈值、改变的速度、值的比例及其它有用的诊断和预后指标。例如,可以通过比较病例群体与对照群体的样品来确定这些值,其中,病例群体显示需要诊断、预后或治疗方法的生物学状态,而对照群体则不显示这样的生物学状态。在某些实施方式中,可以进行纵向调查,例如,病例群体可以是随着时间的过去显示生物学状态的对照群体的一部分。可以理解,可以使用来自多个调查的数据来确定正常、预后或诊断水平公认值或值的范围。

[0342] 在发展诊断或预后测试中,可以从受试者组获得一种或多种潜在标志物的数据。受试者组至少分为两小组,且优选第一小组和第二小组的每一组具有大致相等数目的受试者。第一小组包括证实患有疾病,或更一般地,处于第一情况状态的受试者。例如,第一小组的病人可以是那些最近已经发病的受试者,或可以是那些已经具有一类特定的疾病如 AMI 的受试者。通过更严格的和 / 或昂贵的测试如 MRI 或 CT,可以证实情况状态。在下文中,第一小组的受试者称为“患病者”。第二小组的受试者只是那些没有进入第一小组的受试者。第二组的受试者可以是“未患病者”,即,正常受试者。或者,第二小组的受试者可以选自显示一种症状或类似于“患病的”受试者的多种症状。在另一种可选择的方式中,第二小组可以代表那些在不同的时间点发病的受试者。优选地,可以获得每一个病人的同一组标志物的数据。这一组标志物可以包括可能怀疑与特定的疾病或状态的检测相关的所有候选标志物。不需要实际已知的相关性。本文所述的组合物、方法和系统的实施方式可用来确定哪些候选标志物与疾病或状态的诊断最相关。两小组受试者中各标志物的水平可以在宽范围内分布,例如,高斯分布。但是,不需要分布拟合。

[0343] 1. 急性心肌梗塞

[0344] 本发明的方法对于怀疑患有急性心肌梗塞 (AMI) 的病人的诊断、预后和 / 或治疗的选择尤其有用。对于怀疑患有急性心肌梗塞 (AMI) 的病人,单一或系列心肌肌钙蛋白的测量提供了改善预后并表明合适的和早期的治疗介入的逐渐增加的预后信息,以最小化不良后果的风险。

[0345] 因此,本发明通过对来自个体的样品(例如,血液样品、血浆样品和 / 或血清样品)分析例如 cTnI 的心肌肌钙蛋白,并以低于约 50、40、30、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1pg/ml (例如,低于约 20pg/ml) 的检测限检测样品中的心肌肌钙蛋白浓度,来提供诊断、预测和 / 或预防或治疗个体的 AMI 的方法,其中,样品中的心肌肌钙蛋白浓度表明或预测 AMI。心肌肌钙蛋白可以是 cTnI 或 cTnT,且可以是总肌钙蛋白或特定形式的测量,例如,游离的、复合的或片段;在某些实施方式中,使用如本文所述的一种或多种形式的肌钙蛋白的比例。在某些实施方式中,测量样品或系列样品中的总 cTnI。在某些实施方式中,测量样品或系列样

品中的总 cTnT。在某些实施方式中,测量样品或系列样品中的总 cTnI+cTnT。在某些实施方式中,在个体向医疗专业人员呈现表明 AMI 的症状时或在接近该时间的时刻测定心肌肌钙蛋白的水平。这样的症状包括但不限于:胸痛、胸闷、臂痛、不正常的 EKG、不正常的酶水平和呼吸短促。

[0346] 在某些实施方式中,进行系列测量,并且样品中的心肌肌钙蛋白浓度的尖峰信号表明、预测或提供了 AMI 预后的基础。在某些实施方式中,超过基线 50%、100%、150%、200%、250%、300%、400%、500% 的尖峰信号表明、预测或提供了 AMI 预后的基础。在某些实施方式中,如果获得单一样品的心肌肌钙蛋白水平,不管基线水平如何,单一样品中的超过约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45 或 50pg/ml 的心肌肌钙蛋白水平表明、预测或提供了 AMI 预后的基础。在某些实施方式中,约 1-10、或约 5-15、或约 10-50、或约 10-200、或约 10-100、或约 10-40、或约 15-50、或约 15-40、或约 20-200、或约 20-150、或约 20-100、或约 20-50、或约 20-40、或约 20-30pg/ml 的心肌肌钙蛋白水平表明、预测或提供了 AMI 预后的基础。

[0347] 在某些实施方式中,诊断或预后包括根据样品或系列样品中的心肌肌钙蛋白浓度对个体分级。这样的分级可以基于单个样品中的心肌肌钙蛋白的浓度、系列样品中的尖峰信号的存在和 / 或尖峰信号距基线的大小、不同形式的心肌肌钙蛋白的比例、不同形式的心肌肌钙蛋白的绝对值、系列样品中心肌肌钙蛋白或一种或多种形式的心肌肌钙蛋白的浓度改变速度、系列样品中不同形式的心肌肌钙蛋白的比例随时间的改变、和至少部分基于样品或系列样品中的心肌肌钙蛋白浓度的任何其它信息。如本文所述,分级可以基于由正常和患病受试者的群体获得的值。也可以基于个体的分级确定合适的治疗。

[0348] 在某些实施方式中,结合一种或多种其它标志物,例如,心肌缺血、心肌梗塞的标志物,或中风的标志物,确定心肌肌钙蛋白的浓度,且在确定诊断、预后或治疗方法时考虑各标志物的浓度。一般地也考虑其它临床指标,例如, EKG、症状、病史,等等,这对于本领域的技术人员是显而易见的。可以依据这样的标志物与临床指标与肌钙蛋白的水平的结合构建诊断、预后或治疗的合适的规则。

[0349] 本发明方法中可用于与心肌肌钙蛋白结合的标志物包括但不限于肌酸激酶 (CK) 及其心肌部分 CK 心肌带 (MB)、天冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶 (LDH)、 α -羟丁酸脱氢酶、肌红蛋白、谷草转氨酶、糖原磷酸化酶 BB、未结合的游离脂肪酸、心型脂肪酸结合蛋白 (H-FABP)、缺血修饰白蛋白、肌球蛋白轻链 1、肌球蛋白轻链 2。本发明的方法中用于与心肌肌钙蛋白结合的炎症和斑块不稳定性的标志物包括但不限于 C 反应性蛋白、白细胞计数、可溶性 CD40 配体、髓过氧化物酶、单核细胞趋化蛋白 -1、全血胆碱和妊娠相关血浆蛋白 A。其它炎症标志物可被检测,且包括 IL-8、IL-1 β 、IL6、IL10、TNF 和 IL-12p70 的组合,以及其它本领域技术人员明白的细胞因子或标志物。

[0350] 在某些实施方式中,例如 cTnI 的心肌肌钙蛋白在例如同一样品中或在同时或相同时间点前后采自同一个体的多个样品中与选自肌酸激酶 (CK) 及其心肌部分 CK 心肌带 (MB)、天冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶 (LDH)、 α -羟丁酸脱氢酶、肌红蛋白、谷草转氨酶、糖原磷酸化酶 BB、未结合的游离脂肪酸、心型脂肪酸结合蛋白 (H-FABP)、缺血修饰白蛋白、肌球蛋白轻链 1 和肌球蛋白轻链 2 的标志物一起测量。在某些实施方式中,例如 cTnI 的心肌肌钙蛋白例如在同一样品中或在同时或相同时间点前后采自同一个体的样品中与 CK-MB

一起测量。

[0351] 在某些实施方式中,如本文所述测量的心肌肌钙蛋白单独或与其它标志物或临床征兆结合用来确定再梗塞。在某些实施方式中,如本文所述测量的心肌肌钙蛋白单独或与其它标志物或临床征兆结合用来确定梗塞的特征,例如,大小、或出现梗塞以来的持续时间。在后一情况下,血液中由蛋白水解产生的肌钙蛋白的片段可以与总肌钙蛋白相比;片段的比例越大,出现梗塞以来的时间就越长。

[0352] 2. AMI 以外的状态

[0353] 本发明的方法也包括用于 AMI 以外的状态的基于样品中的肌钙蛋白浓度的诊断、预后及治疗方法。

[0354] 许多状态包括潜在的或实际的心肌损伤,因而在本文所述的各种水平测量心肌肌钙蛋白的能力使得能够进行这样的损伤的早期检测和早期介入。通过本发明的方法和组合物测量的心肌肌钙蛋白的浓度的信息对于这样的状态的诊断、预后和治疗的确定是有用的。状态包括经皮的冠状介入、心脏手术、心力衰竭、急性风湿热、淀粉样变性、心脏创伤(包括挫伤、切除、起搏、放电、心脏复律、导管插入和心脏手术)、再灌注损伤、癌症治疗引起的心脏毒性、充血性心力衰竭、末期肾衰竭、II 型糖原贮积病(庞普病)、心脏移植、具有输血性含铁血黄素沉着症的血红蛋白病(haemoglobinopathy)、高血压(包括妊娠期高血压)、低血压(常伴有心律不齐)、甲状腺功能减退、心肌炎、心包炎、术后非心脏手术、肺栓塞及败血症。

[0355] 在这些实施方式中,可以测定肌钙蛋白的水平,同时测定对于所述非心脏疾病特异性的标志物的水平或疾病的其它症状或临床体征;标志物的浓度和/或关于其它症状或临床体征的信息与本文所述测定的关于心肌肌钙蛋白浓度的信息结合用来确定诊断、预后和/或治疗方法。例如,本发明的实施方式除了测定心肌肌钙蛋白的浓度外,还可以测定一种或多种上述的多肽的浓度,或在疾病的诊断、预后或区别中有用的其它蛋白质标志物。在某些实施方式中,提供了疾病的标志物组,其中,该组包括本文所述的心肌肌钙蛋白的浓度和该疾病的至少一种其它标志物。该组可以包括 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或更多的个别标志物,包括一种或多种例如总 cTnI 的心肌肌钙蛋白。可以由本领域的技术人员进行单一标志物或标志物的子集的分析,以优化各种临床情况下的临床灵敏度或特异性。这些包括但不限于:流动诊所、紧急护理、病危护理、重症监护、监护系统、住院病人、门诊病人、医务室、医疗诊所、和健康普查情况。进一步,本领域的技术人员能够在前述的各情况中使用单一标志物或标志物的子集结合诊断阈的调整,以优化临床灵敏度和特异性。

[0356] a. 心脏毒性

[0357] 本发明的组合物和方法在确定和监测由治疗产生的心脏毒性(例如,药物治疗的心脏毒性)方面尤其有用。因此,例如,本发明提供了通过测量个体的心肌肌钙蛋白来评价心脏毒性的方法,包括 i) 测定样品中的心肌肌钙蛋白浓度,或测定来自个体的系列样品中的心肌肌钙蛋白浓度,其中,至少一个样品在个体正接受治疗时或治疗之后从个体采集,其中,通过对所述样品中的心肌肌钙蛋白的检测限低于约 50、40、30、10、5、4、3、2 或 1pg/ml(例如,低于约 20pg/ml)的心肌肌钙蛋白分析测定一个或多个浓度;和 ii) 根据所述的一个或多个浓度,评价治疗的心脏毒性的程度。在某些实施方式中,治疗是药物治疗。在某些实施方式中,治疗是非药物治疗。测定心肌肌钙蛋白浓度的方法包括任何具有需要的灵

敏度的合适的方法,例如,本文所述的方法。在某些实施方式中,本方法利用测定样品中的心肌肌钙蛋白浓度的方法,其中该方法包括检测肌钙蛋白的单一分子或其复合物或片段。

[0358] 利用本文所述的交叉反应性抗体,即,与来自例如人类和另一种诸如大鼠、狗、小鼠或猴的物种的至少两个物种的肌钙蛋白作用的抗体,来确定心脏毒性的方法尤其有用。这样的抗体可用于药物毒性的动物研究,其中,评价毒性的个体是,例如哺乳动物,如大鼠、小鼠、狗、猴,或其它用于这样的研究的动物。当用于分析中的抗体是同样的抗体时,可以直接比较在各种物种中的毒性,从而减少变异性。

[0359] 可以理解,本发明的组合物和方法可以结合副作用包括心脏毒性的特定的药物一起使用,以监测心脏毒性。因此,本发明提供了通过测定一个或多个从接受已知可引起心脏毒性的药物的个体获得的样品中的心肌肌钙蛋白的浓度,来监测个体中的心脏毒性的方法,其中,通过对所述样品中的心肌肌钙蛋白的检测限低于约 50、40、30、10、5、4、3、2 或 1pg/ml (例如,低于约 20pg/ml) 的心肌肌钙蛋白分析测定一个或多个浓度;和 ii) 根据所述的一个或多个浓度分析药物治疗的心脏毒性的程度。在某些实施方式中,该方法进一步包括步骤 iii) 根据步骤 ii) 的评价,确定是否继续药物治疗。副作用包括心脏毒性的药物是本领域内熟知的。

[0360] C. 商业方法

[0361] 本发明涉及用于建立心肌肌钙蛋白标志物的系统和方法(包括商业方法),其可用于生物体的生物学状态或状况的诊断、预后或处理方法的确定、基于这样的标志物制备诊断剂和使诊断剂和利用这样的诊断剂的服务商业化/市场化。生物学状态可以是急性心肌梗塞或由于本文所述的药物毒性或非 AMI 状态引起的心肌损伤。

[0362] 在一个实施方式中,本文的商业方法包括:使用包括以下步骤的方法建立一种或多种心肌肌钙蛋白标志物;通过在低于约 50、20、10、5 或 1pg/ml 的检测水平检测一种或多种标志物的单一分子,测量从第一群体获得的生物样品中的所述一种或多种标志物的浓度从而建立生物样品中的一种或多种标志物的浓度范围;并将在上述步骤建立的一种或多种标志物商业化,例如制成诊断产品。本文的诊断产品包括一种或多种特异性结合心肌肌钙蛋白标志物的抗体,和能够在被以其激发波长发射光的激光器激发时发射至少约 200 个光子的荧光部分,其中激光聚焦于包含荧光部分的直径不小于约 5 微米的点,而且其中激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。

[0363] 在一个实施方式中,本文的商业方法包括:使用一种系统建立心肌肌钙蛋白标志物的正常值的范围,该步骤包括:通过在低于约 50、20、10、5 或 1pg/ml 的检测水平下检测标志物的单一分子测量从第一群体获得的生物样品中的所述心肌肌钙蛋白标志物的浓度,从而建立生物样品中的所述心肌肌钙蛋白标志物的浓度范围;并提供诊断服务以确定生物体是否具有感兴趣的状态或情况,例如,AMI、由于药物治疗引起的心脏毒性或非 AMI 状态。本文的诊断服务可由经营者许可的 CLIA 批准的实验室或经营者本身提供。本文的诊断服务可以直接提供给卫生医疗提供者、卫生医疗保险公司或病人。因此,本文的商业方法能够从销售例如诊断服务或诊断产品中获得收益。

[0364] 本文的商业方法也打算向例如卫生医疗提供者、卫生医疗保险公司或病人等等提供诊断服务。这里的经营者能够通过或者与服务实验室签订合同或者设置服务实验室(遵守临床实验室改进修正法案(Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA))或其

它规范) 来提供诊断服务。然后这样的服务实验室执行本文公开的方法以确认心肌肌钙蛋白标志物是否存在于样品内。

[0365] VII. 组合物

[0366] 本发明提供了用于检测和定量心肌肌钙蛋白的组合物。组合物包括可通过本发明的方法检测的经合适的标记物标记的心肌肌钙蛋白的结合伴侣、其中一个或两个结合伴侣经可通过本发明的方法检测的合适的标记物标记的结合伴侣对、连接有捕获结合伴侣的固体载体,在某些实施方式中,也具有检测结合伴侣。

[0367] 示例的实施方式包括用于检测心肌肌钙蛋白的组合物,其包括连接在荧光部分的心肌肌钙蛋白的结合伴侣,其中,荧光部分在被以其激发波长发射光的激光器激发时,能够发射至少约 200 个光子,其中,激光聚焦于包含荧光部分的直径不小于约 5 微米的点,而且其中,激光指向该点的总能量不超过约 3 微焦耳。在某些实施方式中,结合伴侣包括心肌肌钙蛋白的抗体。在某些实施方式中,该抗体是多克隆抗体。在某些实施方式中,该抗体是单克隆抗体。在某些实施方式中,抗体是交叉反应性抗体,例如,与来自包括人类、猴、狗和小鼠的至少两个物种的心肌肌钙蛋白交叉反应的抗体。在某些实施方式中,抗体与来自人类、猴、狗和小鼠的所有心肌肌钙蛋白交叉反应。在某些实施方式中,心肌肌钙蛋白选自 cTnI 和 cTnT。在某些实施方式中,心肌肌钙蛋白是 cTnI。在某些实施方式中,心肌肌钙蛋白是 cTnT。抗体对于肌钙蛋白分子的特定区域是特异性的,例如,对于包含心肌肌钙蛋白 I 的氨基酸 27-41 的区域是特异性的。荧光部分可以包含一个或多个含有至少一个取代的吡啶鎓环系统的分子,其中,在吡啶鎓环 3 位碳上的取代基包含化学反应性的基团或偶联物质基团。标记组合物可以包括荧光部分,荧光部分包括一个或多个选自 AlexaFluor 488、532、647、700 或 750 的染料分子。标记组合物可以包括荧光部分,荧光部分包括一个或多个选自 AlexaFluor 488、532、700 或 750 的染料分子。标记组合物可以包括荧光部分,荧光部分包括一个或多个 AlexaFluor 488 染料分子。标记组合物可以包括荧光部分,荧光部分包括一个或多个 AlexaFluor 555 染料分子。标记组合物可以包括荧光部分,荧光部分包括一个或多个 AlexaFluor 610 染料分子。标记组合物可以包括荧光部分,荧光部分包括一个或多个 AlexaFluor 647 染料分子。标记组合物可以包括荧光部分,荧光部分包括一个或多个 AlexaFluor 680 染料分子。标记组合物可以包括荧光部分,荧光部分包括一个或多个 AlexaFluor 700 染料分子。标记组合物可以包括荧光部分,荧光部分包括一个或多个 AlexaFluor 750 染料分子。

[0368] 在某些实施方式中,本发明提供了包括用于测定心肌肌钙蛋白浓度的一组标准物的组合物,其中,至少一个标准物的心肌肌钙蛋白浓度低于约 20、15、10、5、4、3、2 或 1pg/ml。在某些实施方式中,本发明提供了包括用于测定心肌肌钙蛋白浓度的一组标准物的组合物,其中,至少一个标准物的心肌肌钙蛋白浓度低于约 20pg/ml。在某些实施方式中,本发明提供了包括用于测定心肌肌钙蛋白浓度的一组标准物的组合物,其中,至少一个标准物的心肌肌钙蛋白浓度低于约 10pg/ml。在某些实施方式中,本发明提供了包括用于测定心肌肌钙蛋白浓度的一组标准物的组合物,其中,至少一个标准物的心肌肌钙蛋白浓度低于约 5pg/ml。在某些实施方式中,本发明提供了包括用于测定心肌肌钙蛋白浓度的一组标准物的组合物,其中,至少一个标准物的心肌肌钙蛋白浓度低于约 1pg/ml。

[0369] 本发明的其它组合物如本文所述。

[0370] VIII. 试剂盒

[0371] 本发明进一步提供了试剂盒。本发明的试剂盒包括一种或多种在合适的包装中用于本文所述的心肌肌钙蛋白灵敏检测的组合物。在某些实施方式中,本发明的试剂盒提供了标记物,例如,诸如心肌肌钙蛋白特异性抗体的结合伴侣,其中,结合伴侣连接在荧光部分上。在某些实施方式中,本发明的试剂盒提供了心肌肌钙蛋白特异性的结合伴侣对,例如,抗体对,其中,至少一个结合伴侣是本文所述的心肌肌钙蛋白的标记物。在某些实施方式中,例如抗体的结合伴侣以单独容器提供。在某些实施方式中,例如抗体的结合伴侣以同一容器提供。在某些实施方式中,一种结合伴侣(例如抗体)固定在例如微量滴定板或顺磁性珠的固体载体上。在某些这样的实施方式中,另一结合伴侣(例如抗体)用如本文所述的荧光部分标记。

[0372] 例如抗体的结合伴侣、固体载体和荧光标记作为试剂盒的组分可以是任何如本所述的这样的组分。

[0373] 试剂盒可以额外地包括在本发明的方法中有用的试剂,例如,用于结合反应的缓冲液和其它试剂、预处理运行分析的仪器的洗液、缓冲液或其它试剂和洗脱缓冲液或通过仪器运行样品的其它试剂。

[0374] 试剂盒可以包括一种或多种标准物,例如,用于本发明分析的标准物(如高度纯化的标准物),例如,重组的人类 cTnI 或人类 cTnT、或它的各种片段、复合物,等等。试剂盒可以进一步包括说明书。

[0375] 实施例

[0376] 以下的实施例是说明性的,而非限制其余的公开内容。

[0377] 除非另有说明,在本文所述的单分子检测器(SMD)中分析实施例的处理样品,使用以下参数:激光器:波长 639nm 的连续波亚砷酸镓二极管激光器(Blue Sky Research, Milpitas, CA),聚焦于大小约为 2 微米的点(本文限定的 0.004pL 的探测空间);通过正内径(ID)为 100 微米和正外径(OD)为 300 微米的熔融石英毛细管的流速=5 微升/分钟;透镜为非共焦排列(见,例如,图 1A);0.8 数值孔径的聚焦透镜(Olympus);硅雪崩光电二极管检测器(Perkin Elmer, Waltham, MA)。

[0378] 实施例 1. 生物标志物的夹心分析:心肌肌钙蛋白 I(cTnI)

[0379] 分析:本分析的目的是为了检测人血清中心肌肌钙蛋白 I(cTnI)的存在。分析形式是基于小鼠单克隆捕获抗体和山羊多克隆检测抗体的两步夹心免疫分析。需要 10 微升样品。分析的工作范围是 0-900pg/ml,典型的分析检测限是 1-3pg/ml。分析需要约 4 小时的工作台时间来完成。

[0380] 材料:在下文所述的方法中使用以下材料:分析板:Nunc Maxisorp,产品 464718, 384 孔,透明,用单克隆抗体 BiosPacific A34440228P Lot#A0316 被动包被(以 5 μg/ml 溶于 pH9.6 的 0.05M 碳酸钠,室温下过夜);用 5%蔗糖、溶于 PBS 的 1% BSA 封闭,并在 4℃下储藏。对于标准曲线,使用人类心肌肌钙蛋白 I(BiosPacific Cat#J34000352)。用于标准浓度的稀释液是经免疫耗尽内源性 cTnI、等分并在 -20℃储藏的人类血清。在 96 孔、圆锥形、聚丙烯板(Nunc 产品 #249944)上进行标准物的稀释。使用下列缓冲液和溶液:(a) 分析缓冲液:含有 1% BSA 和 0.1% TritonX-100 的 BBS;(b) 含有 2mg/ml 小鼠 IgG(EquitechBio)、2mg/ml 山羊 IgG(EquitechBio)及 2mg/ml MAK33poly, Roche# 11939661 的分析缓冲液中

的被动封闭溶液；(c) 检测抗体 (Ab)：亲和纯化的山羊抗肽 3 多克隆抗体，(BiosPacific G129C)，它被荧光染料 AlexaFluor 647 标记，且在 4℃ 下储藏；检测抗体稀释液：50% 分析缓冲液，50% 被动封闭溶液；洗涤缓冲液：硼酸盐缓冲盐水 Triton Buffer (BBST) (1.0M 硼酸盐、15.0M 氯化钠、10% Triton X-100, pH8.3)；洗脱缓冲液：含有 4M 尿素的 BBS、0.02% Triton X-100 及 0.001% BSA。

[0381] AlexaFluor 647 标记抗体的制备：通过以下步骤将检测抗体 G-129-C 与 AlexaFluor 647 偶联：首先将 100 μ g 的 G-129-C 溶解于 400 μ l 的偶联缓冲液 (0.1M NaHCO₃)。然后通过将溶液转移到 YM-30 过滤器内，并将溶液与过滤器进行离心过滤而将抗体溶液浓缩至 50 μ l。然后通过加入 400 μ l 的偶联缓冲液洗涤 YM-30 过滤器和抗体 3 次。通过向过滤器加入 50 μ l、倒置过滤器并以 5000xg 离心 1 分钟来回收抗体。产生的抗体溶液为 1-2 μ g/ μ l。通过向 AlexaFluor647 的一个小瓶中加入 20 μ l DMSO 来重配 AlexaFluor 647NHS 酯，该溶液在 -20℃ 下储藏最长达 1 个月。向抗体溶液中加入 3 μ l AlexaFluor 647 原液，然后混合并在黑暗中温育 1 小时。1 小时后，向抗体 AlexaFluor 647 溶液中加入 7.5 μ l 的 1M tris，并混合。用 YM-30 超滤器过滤溶液以去除低分子量成分。含有结合 AlexaFluor 647 的抗体的渗余物的体积通过加入 PBS 而调整为 200-400 μ l。向溶液中加入 3 μ l 的 10% NaN₃，将产生的溶液转移到 Ultrafree 0.22 离心单元中，并以 12000xg 旋转 2 分钟。收集含有偶联抗体的滤出液，并用于分析。

[0382] 方法：cTnI 标准物和样品的制备和分析：

[0383] 如下制备标准曲线：通过将 cTnI 的原液系列稀释成标准稀释液来制备工作标准物 (0-900pg/ml)，以获得 cTnI 的浓度范围 1.2pg/ml-4.3 μ g/ml。

[0384] 向每孔中加入 10 μ l 的被动封闭溶液和 10 μ l 的标准物或样品。标准物是一式四份的。用 Axyseal 密封膜封闭板，以 3000 转 / 分离心 1 分钟，并在 25℃ 下摇动温育 2 小时。洗涤板 5 次，在纸巾上以倒置位置进行离心直至转子达到 3000 转 / 分。制备 1nM 的检测抗体的工作稀释液，并向每孔中加入 20 μ l 的检测抗体。封闭板、离心，并在 25℃ 下摇动温育分析物 1 小时。向每孔中加入 30 μ l 洗脱缓冲液，封闭板，并在 25℃ 下温育分析物 0.5 小时。或者在分析前在 4℃ 下储藏板最长达 48 小时，或者立即分析样品。

[0385] 为了分析，在 40 微升 / 分下需要 20 微升 / 孔，在 5 微升 / 分下分析 5 微升。基于 4 个标准差 (sigma) 的阈分析数据。绘制原始信号相对于标准物浓度的曲线。在低浓度范围进行线性拟合，并在全部标准曲线进行非线性拟合。以 [LOD = (3x 零点的标准偏差) / 线性拟合的斜率] 来计算检测限 (LoD)。通过适于样品信号的方程 (线性或非线性) 来确定样品的浓度。

[0386] 将等分试样用泵吸入分析器。在毛细流动过程中，通过设定探询体积使得在激光器激发之后的限定的空间内只检测到 1 个荧光标记的发射，来测量单独标记的抗体。各信号代表一个数字事件，这种构造使得实现极高的分析灵敏度。以单独数字事件的总和来确定总的荧光信号。各计数的分子是具有成百上千个 DMC 事件 / 样品的阳性数据点。通过平均值 +3SD 方法确定本发明的 cTnI 分析的检测限。

[0387] 结果：使用分析方案的一式四份的代表性的 cTnI 标准曲线的数据如表 2 所示。

[0388] 表 2cTnI 标准曲线

[0389]

cTnI (pg/ml)	信号	标准差	%变异系数 (CV)
0	233	25	10.8
1.5625	346	31	8.9
3.125	463	35	7.5
6.25	695	39	5.6
12.5	1137	61	5.3
25	1988	139	7.0
50	3654	174	4.8
100	5493	350	6.4
200	8264	267	3.2
400	9702	149	1.5
800	9976	50	0.5

[0390] 在 15 次运行中测试分析器系统的灵敏度,发现分析器系统的灵敏度常规地检测亚飞摩尔 / 升 (fM) 水平的校准物,如表 3 的数据所示。精密度是 10%,在 4 和 12pg/ml cTnI。

[0391] 表 3 仪器的灵敏度

[0392]

校准物 (fM)	信号计数	%变异系数 (CV)
0	11	
12	302	9
60	1341	8
300	4784	7

[0393] [0393] cTnI 的浓度范围的线性标准曲线如图 5 所示。

[0394] 通过 15 个连续分析确定检测的分析限 (LoD)。LoD 是 0 标准的平均值 +3SD (n = 4) 批内测定。平均 LoD 是 1.7pg/ml (0.4-2.8pg/ml 的范围)。

[0395] 通过分析已经被免疫耗尽 cTnI 和具有已知量 cTnI 的尖峰信号的血清样品确定样品的回收率。表 4 表明系统分析的超过 3 天的样品回收率的数据。

[0396] 表 4 样品回收率

[0397]

尖峰信号 (pg/ml)	回收率 (平均)	标准偏差	%变异系数 (CV)
5	5.7	0.9	16
15	13.7	0.2	2
45	43	0.6	2
135	151	6.2	4

[0398] 在具有 cTnI 尖峰信号且被标准稀释液稀释的混合人血清中确定分析的线性。表 6 中的结果显示稀释度及对相应的稀释度预期的信号的百分率。

[0399] 表 5 分析的线性

[0400]

血清稀释度	预期的信号的百分率
1:2	79
1:4	87
1:8	96

[0401] 这些数据表明本发明的分析器系统允许对亚飞摩尔浓度的 cTnI 进行高灵敏度的激光诱导的免疫分析。

[0402] 实施例 2. 对于 TnI 的基于珠的夹心分析

[0403] 上述分析使用同样的微量滴定板形式,其中,使用塑料表面来固定靶分子。为了实

现结合体与未结合体的分离,单一微粒分析器系统也与在溶液中使用微粒或珠进行的分析相容。

[0404] 材料:从 Dynal (650.01-03,10mg/ml 原液) 获得 MyOne Streptavidin C1 微粒 (MP)。在分析中使用的缓冲液包括:10X 硼酸盐缓冲盐水 Triton 缓冲液 (BBST) (1.0M 硼酸盐、15.0M 氯化钠、10% Triton X-100, pH8.3);分析缓冲液(溶于 0.1M Tris(pH8.1)、0.025M EDTA、0.15M NaCl、0.1% BSA、0.1% Triton X-100 和 0.1% NaN_3 的 2mg/ml 正常山羊 IgG、2mg/ml 正常鼠 IgG 及 0.2mg/ml 的 MAB-33-IgG- 聚合物,在 4℃ 储藏);和洗脱缓冲液(含有 4M 尿素、0.02% Triton X-100 和 0.001% BSA 的 BBS,在 2-8℃ 储藏)。在基于珠的夹心分析中使用的抗体包括:Bio-Ab(每个 IgG 具有 1-2 个生物素的 A34650228P(BiosPacific)) 和 Det-Ab(与 A647 偶联的 G-129-C(BiosPacific),每个 IgG 具有 2-4 个荧光染料)。标准物是重组人心肌肌钙蛋白 I(BiosPacific, Cat#J34120352)。校准稀释液是溶于 TBS wEDTA 的 30mg/ml BSA。

[0405] 微粒包被:将 100 μl 的 MP 原液置于 eppendorf 管中。通过应用磁体、除去上清液、除去磁体并在洗涤缓冲液中再悬浮,用 100 μl 的 BBST 洗涤缓冲液洗涤 MP3 次。洗涤之后,MP 再悬浮于 100 μl 的分析缓冲液中,并加入 15 μg 的 Bio-Ab。然后在持续混合下、室温下温育混合物 1 小时。如上所述,用 1ml 的洗涤缓冲液洗涤 MP5 次。洗涤之后,MP 再悬浮于 15ml 的分析缓冲液(或 100 μl 在 4℃ 储藏)中。

[0406] 标准物和样品的制备:用校准稀释液稀释标准物以制备合适的标准曲线(通常为 200pg/ml,下至 0.1pg/ml)。冷冻的血清和血浆需要以 13000 转/分在室温下离心 10 分钟。仔细地除去澄清的血清/血浆以避免带走任何可能的沉淀物或漂浮物,并放入干净的管中。将每份 50 μl 的标准物或样品注入合适的孔中。

[0407] 捕获靶标:向每孔中加入 150 μl 的 MP(在再悬浮于 15ml 的分析缓冲液 +400mM NaCl 之后)。在室温下在 JitterBug,5 上温育混合物 1 小时。

[0408] 洗涤和检测:将板置于磁体上,并在确信所有的 MP 被磁体捕获之后 除去上清液。在从磁体上取下板之后,加入 250 μl 的洗涤缓冲液。然后将板置于磁体上,并在确信所有的 MP 被磁体捕获之后除去上清液。每孔中加入 20 μl Det-Ab(在分析缓冲液 +400mM NaCl 中将 Det-Ab 稀释至 500ng/ml)。在室温下在 JitterBug,5 上温育混合物 30 分钟。

[0409] 洗涤和洗脱:将板置于磁体上,并用洗涤缓冲液洗涤 3 次。在确信所有的 MP 被磁体捕获之后除去上清液,并加入 250 μl 的洗涤缓冲液。在洗涤之后,将样品转移至新的 96 孔板中。然后将新板置于磁体上,并在确信所有的 MP 被磁体捕获之后除去上清液。在从磁体上取下板之后,再加入 250 μl 的洗涤缓冲液。然后将板置于磁体上,并在确信所有的 MP 被磁体捕获之后除去上清液。然后加入 20 μl 的洗脱缓冲液,并在室温下在 JitterBug,5 上温育混合物 30 分钟。

[0410] 过滤出 MP 并转移至 384 孔板:将标准物和样品转移至置于 384 孔分析板顶端的 384 孔过滤板中。然后在室温下在板式旋转器中以 3000 转/分离心板。除去过滤板并加入合适的校准物。覆盖板并准备在 SMD 上运行。

[0411] SMD:将等分试样用泵吸入分析器。在毛细流动过程中,通过设定探测体积使得在激光器激发之后的限定的空间内只检测到 1 个荧光分子的发射,来测量单独标记的抗体。各信号代表一个数字事件,这种构造使得实现极高的分析灵敏度。以单独数字事件的总和

来确定总的荧光信号。各个计数的分子是具有成百上千个 DMC 事件 / 样品的阳性数据点。通过平均值 +3SD 的方法确定本发明的 cTnI 分析的检测限。

[0412] 实施例 3. 在正常非患病受试者群体中的 cTnI 的浓度范围

[0413] 使用来自 88 个明显健康的受试者（非患病者）的血清样品建立人类血清中的 cTnI 浓度的参考范围或正常范围。进行如实施例 1 所述的夹心免疫分析，并如上所述使用本发明的单微粒分析器系统对信号或事件数目进行计数。通过将分析器检测的信号与上述标准曲线相关，确定血清肌钙蛋白 I 的浓度。所有的分析一式四份地进行。

[0414] 按照目前的欧洲与美国心脏病协会 (ESC/ACC) 的建议，为了可靠地区分患有 ACS 的病人与不患有缺血性心脏病的病人，并对不良的心脏病事件危险分级，肌钙蛋白分析的定量应该在具有低于 10% 的变异系数 (CV) 的情况下精确到正常范围的第 99 百分位数。分析表明 TnI 的生物学阈（临界浓度）是 7pg/ml 的 TnI 浓度，其为在具有相应的 10% 的变异系数 (CV) 的情况下建立的第 99 百分位数（图 5）。在 10% 的变异系数水平时，精密度分布指向 4 和 12pg/ml 的 TnI 浓度。

[0415] 另外，该分析良好地与由标准与技术国家研究所 (National Institute of Standards and Technology) 提供的肌钙蛋白 -I 标准测量相关（图 6）。

[0416] 本发明的分析足够灵敏与精确以满足 ESC/ACC 的要求，而且，当与 Koerbin 等人 (Ann Clin Biochem, 42:19-23 (2005)) 描述的分析比较时，本发明的分析对于心肌肌钙蛋白 I 的分析最灵敏。本发明的分析比确定生物阈范围为 111-333pg/ml 的 cTnI 的当前可用的分析的灵敏度高出 10-20 倍。

[0417] 实施例 4. TnI 早期释放进入患有急性心肌梗塞 (AMI) 的病人循环的检测

[0418] 研究 1: 从 18 个由于胸痛而出现在急诊部门 (ED) 的病人连续获得 47 个样品。这些病人都具有非 ST 的 ECG 升高，且被诊断患有 AMI。在进入急诊室时根据商用分析测定来自所有 18 个病人的初始样品中的 cTnI 浓度，测定为 <350pg/ml (10% 临界点)，其中 12 个 <100pg/ml (第 99 百分位数)。后期使用同样的商用分析测试这些样品，且对于 cTnI 测定为测试阳性。根据实施例 1 和实施例 3 所述的本发明的分析，对同样的血清样品也进行 TnI 分析，而且将此结果与使用商用分析获得的结果比较。

[0419] 当病人出现胸痛时第一次取血（样品 1），并以 4-8 小时的间隔随后取血（在 12 小时，样品 2；在 16 小时，样品 3；在 24 小时，样品 4；在 30 小时，样品 5；在 36 小时，样品 6；在 42 小时，样品 7；和在 48 小时，样品 8）。通过本发明的方法和当前的商用方法分析血清，获得的结果如图 7 所示。本发明的分析器在病人出现胸痛时检测到 TnI（样品 1），而商用分析法在迟很多的时刻（在 36 小时，样品 6）第一次检测到 cTnI。样品 3 的 TnI 浓度超过了使用本发明的分析器确定的生物阈水平 (7pg/ml，见图 5)，并说明样品 3 对于 TnI 是阳性的表明心脏事件的发生。商用分析法的生物阈是 111-333pg/ml 的 TnI。因而，样品 3 不会被认为是可能的心脏事件。

[0420] 另外，从病人取得的第一个样品的结果表明，本发明的方法和组合物使得能够基于心肌肌钙蛋白水平（如由从病人取得的第一个样品的结果证明的水平）进行早许多的诊断和可能的介入。在初始商用分析的 cTnI 值为 100-350ng/ml 的 3 个例子中，对于本发明的分析方法的 cTnI 全部为阳性（即，cTnI 超过 7pg/ml）。在初始商用分析的 cTnI 值低于 100pg/ml 的 12 个例子中，根据 cTnI 的本发明的分析方法，确定 5 个心血管事件阳性

(即, cTnI 超过 7pg/ml)。当测试允许入院的样品时, 使用本发明的分析预期将比目前的商用分析法多检测出 53% 的 AMI 案例。

[0421] 研究 2 : 使用本发明的分析器和分析来测试 50 个另外的根据商用分析检测为阴性的血清样品。结果如图 8 所示。在 50 个样品中, 36 个在第 99 百分位数内, 因而确定为在本发明分析确定的正常范围之内。但是, 确定为在商用分析的“正常”或非疾病范围之内的剩余的 14 个样品, 经测试超过本发明确定的生物阈。

[0422] 因此, 当 cTnI 的血清水平低于商用分析技术的阈值时, 本发明的 cTnI 分析的高灵敏度能够对病人的心肌损伤进行检测。本发明的高灵敏、精确的 cTnI 分析的使用, 使得 AMI 的检测早于现有的 cTnI 分析, 从而提供合适的诊断和早期医学介入的机会以改善结果。

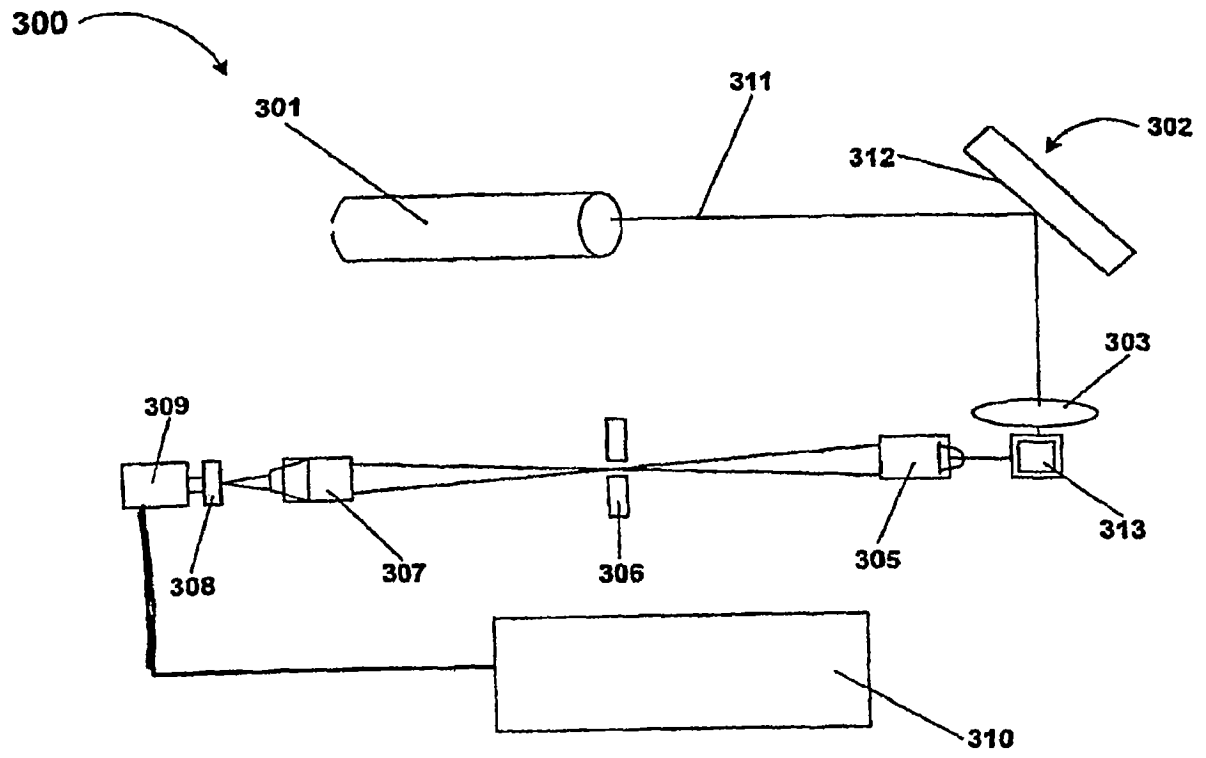


图 1A

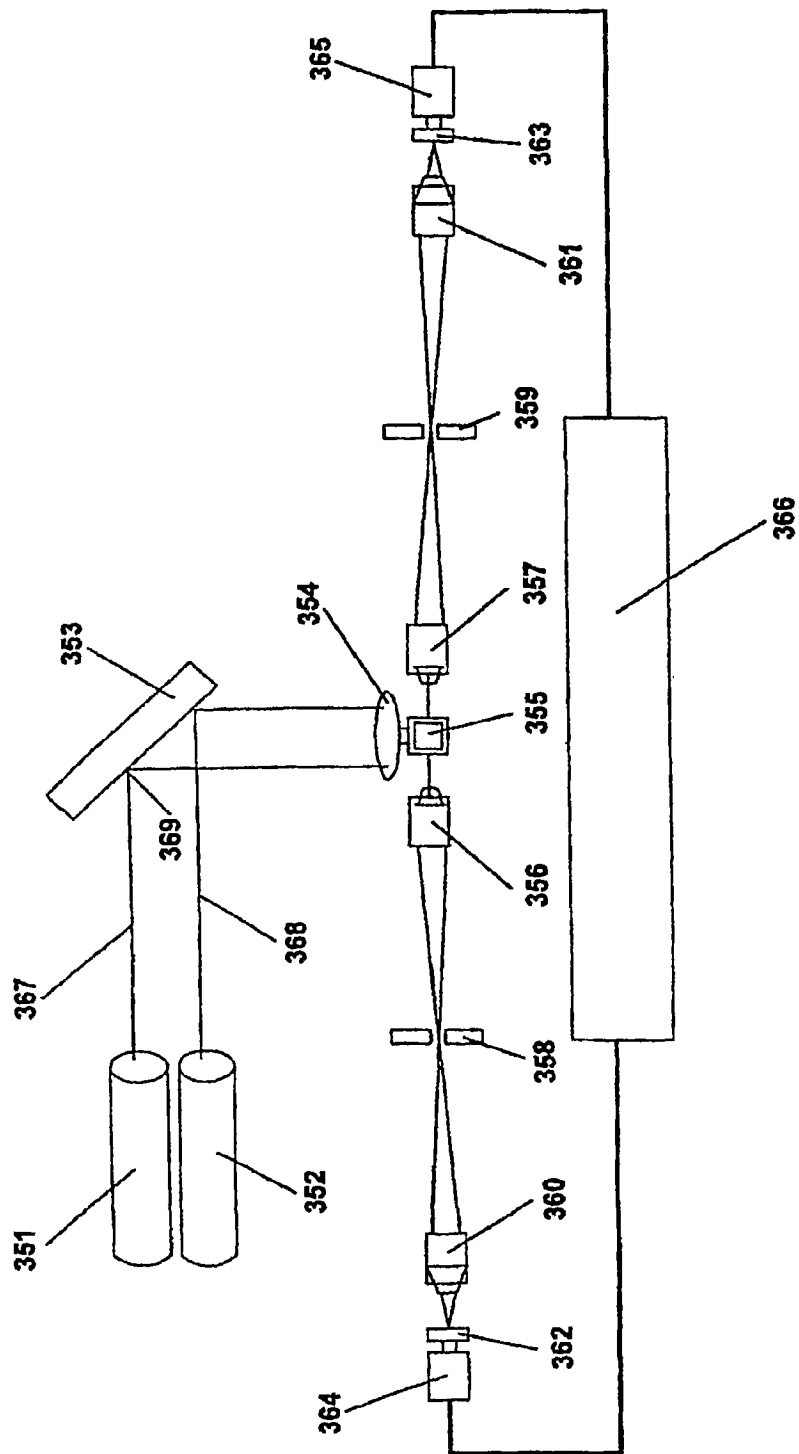


图 1B

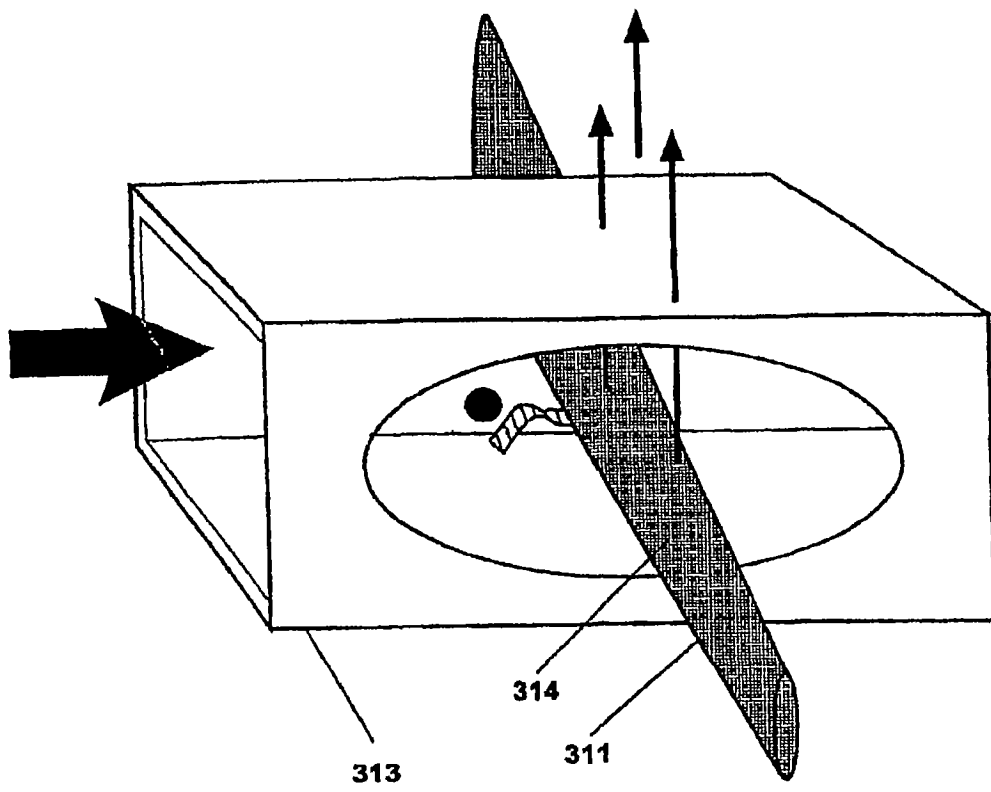


图 2A

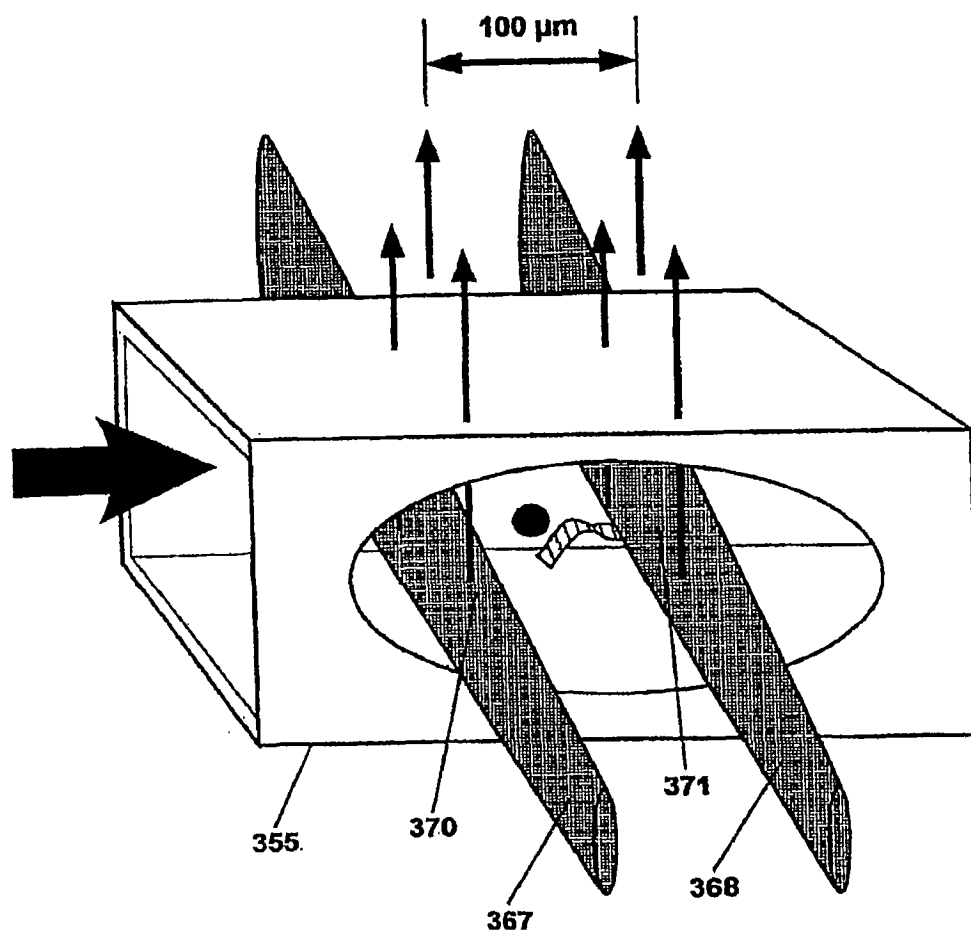


图 2B

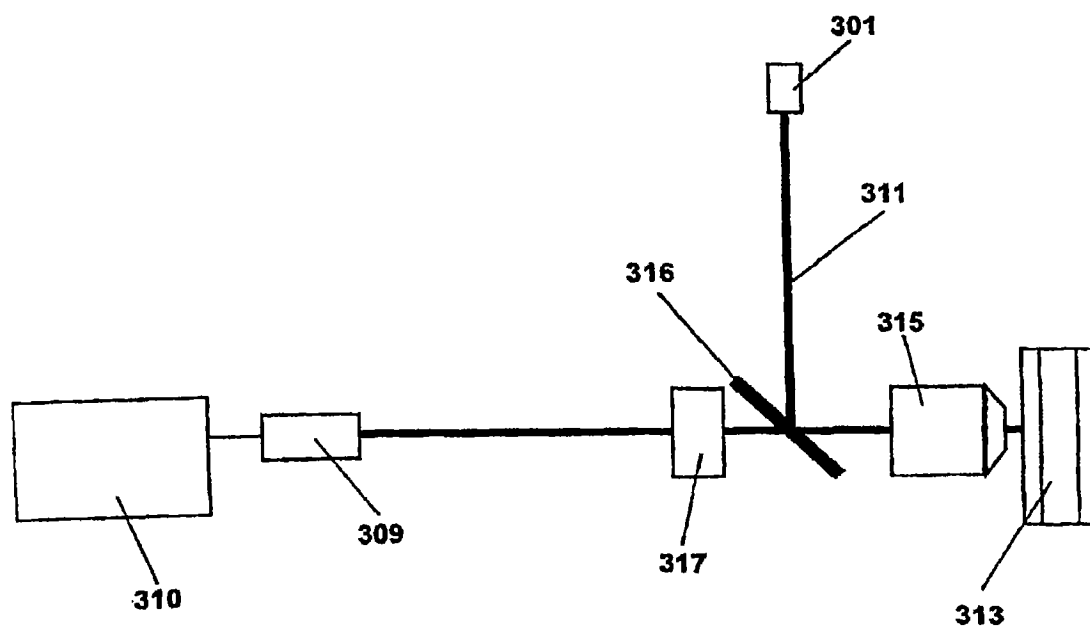


图 3A

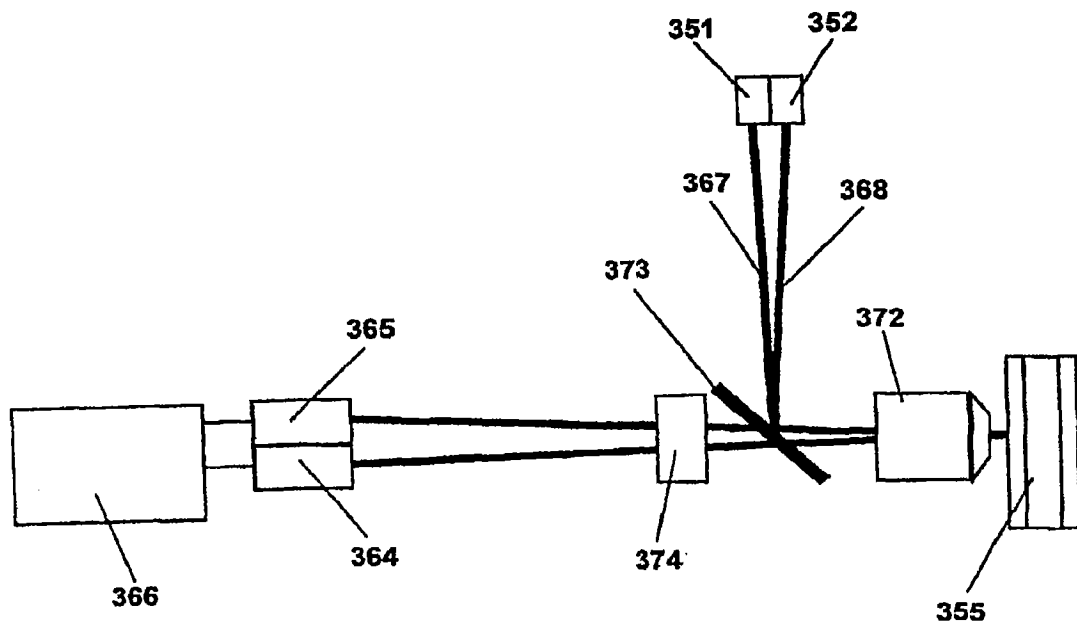


图 3B

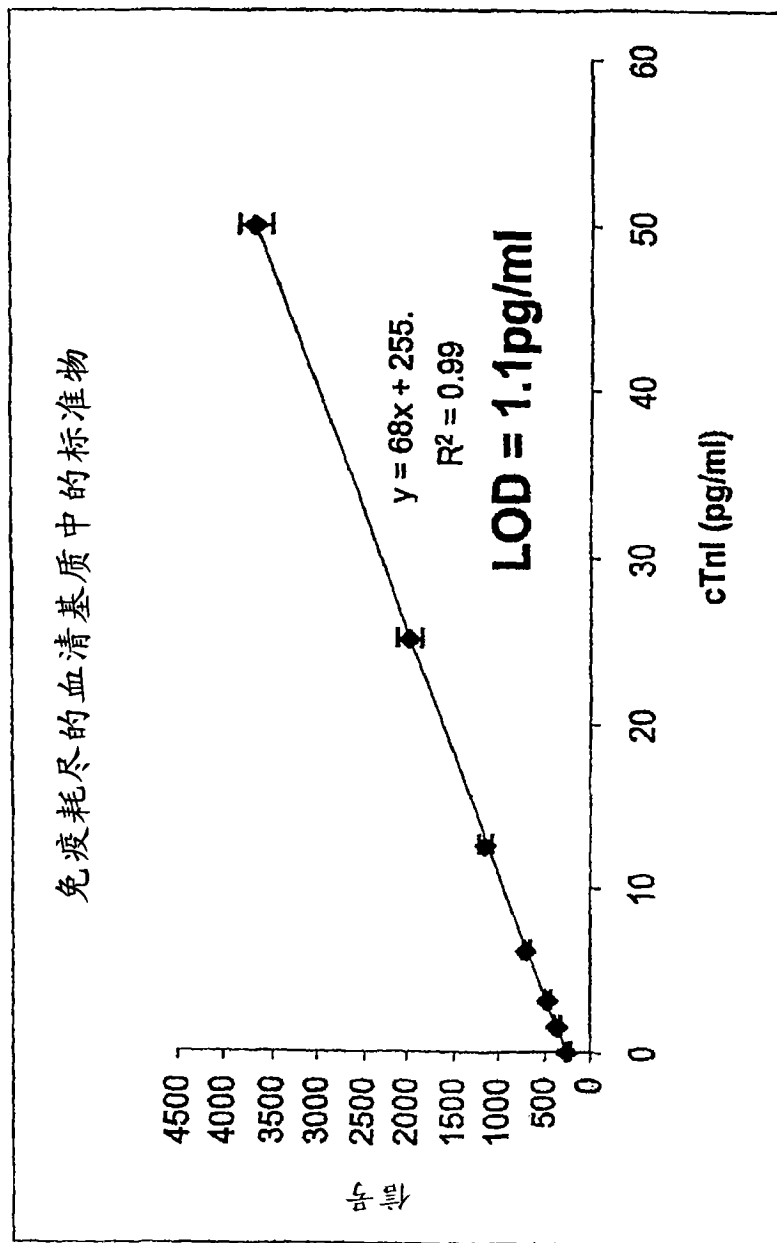


图 4

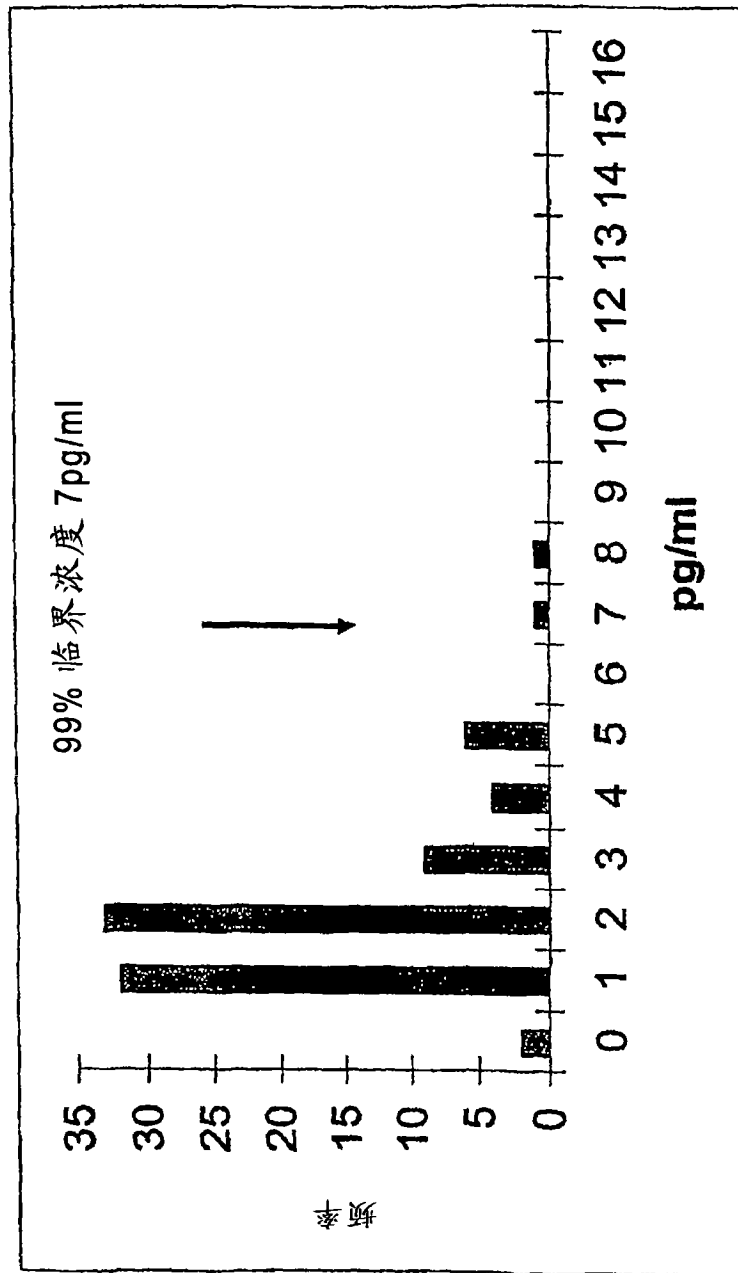


图 5

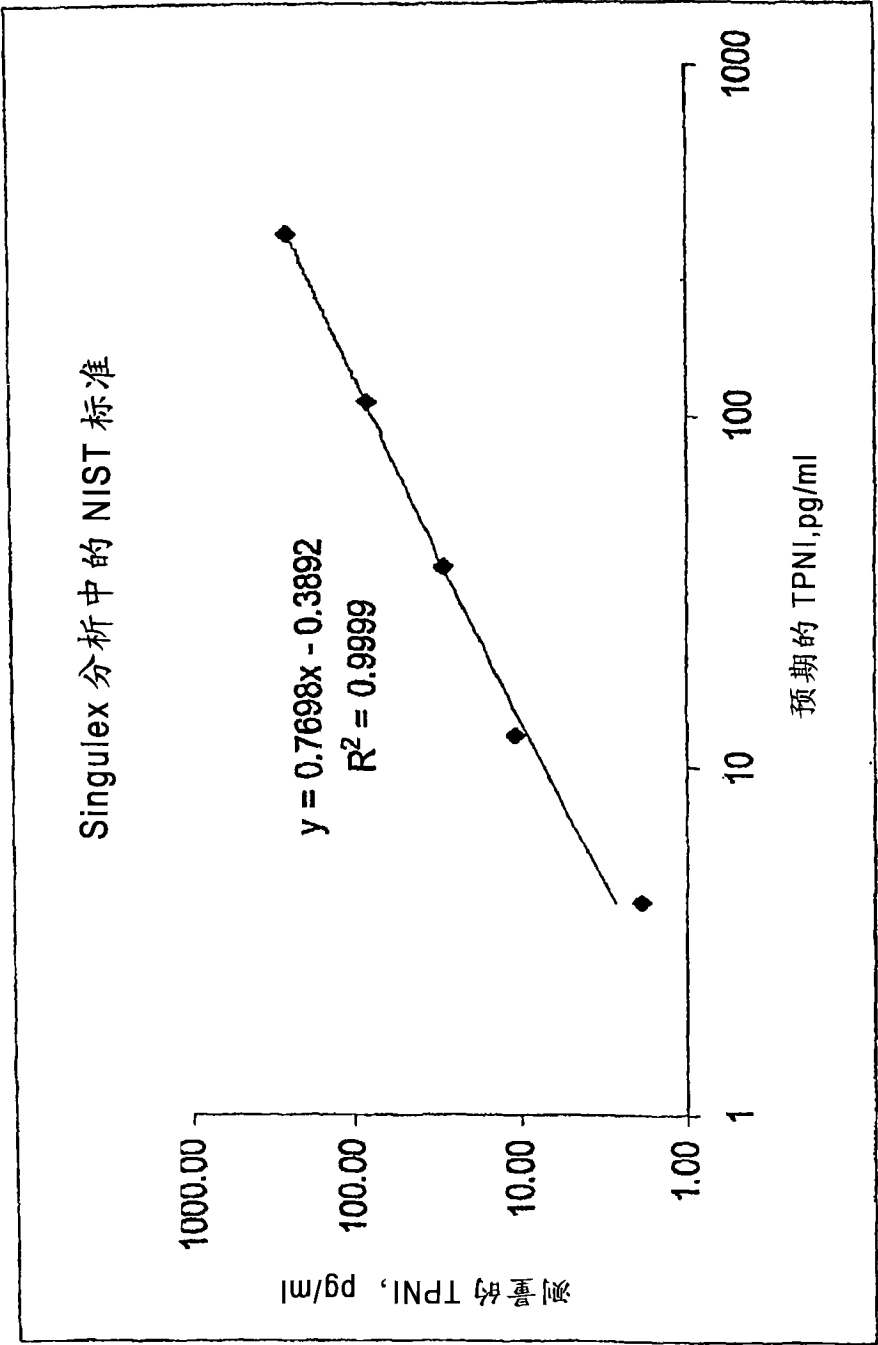


图 6

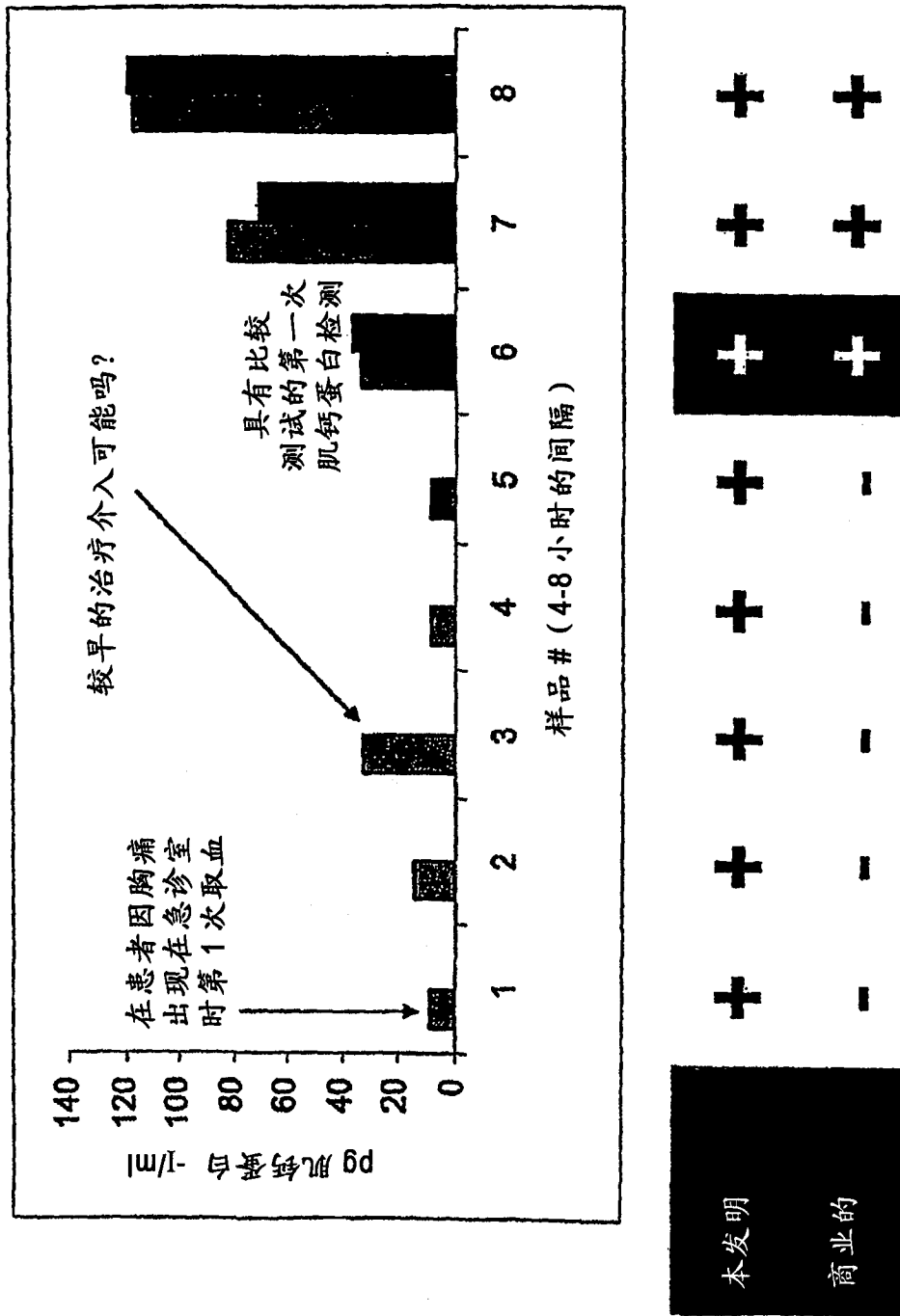


图 7

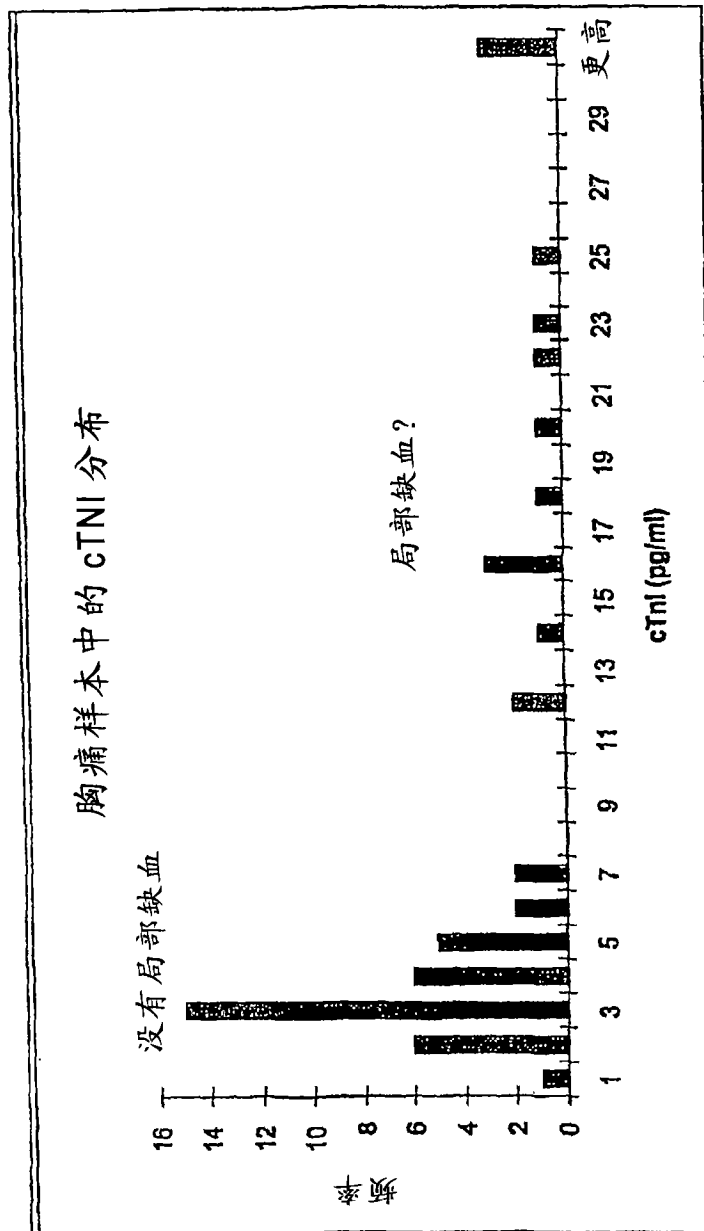
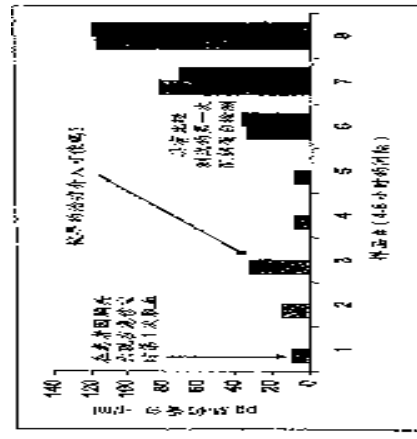


图 8

专利名称(译)	用于肌钙蛋白分析的高灵敏系统和方法		
公开(公告)号	CN101432626B	公开(公告)日	2013-06-19
申请号	CN200780015772.0	申请日	2007-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	神谷来克斯公司		
申请(专利权)人(译)	神谷来克斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	神谷来克斯公司 加利福尼亚大学董事会		
[标]发明人	P戈伊克斯 R普斯卡斯 J托德 R利文格斯顿 D赫尔德 A吴		
发明人	P·戈伊克斯 R·普斯卡斯 J·托德 R·利文格斯顿 D·赫尔德 A·吴		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N15/06 G01N15/1459 G01N21/6428 G01N33/577 G01N33/582 G01N2015/0693 G01N2015/1006 G01N2015/1486 G01N2201/1247 G01N2201/12761 G01N2800/32 G01N2800/324 G01N2800/52 Y10T436/105831		
代理人(译)	陈文平		
优先权	60/861498 2006-11-28 US 60/808662 2006-05-26 US 60/789304 2006-04-04 US 60/793664 2006-04-19 US 60/872986 2006-12-04 US		
其他公开文献	CN101432626A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了灵敏检测心肌肌钙蛋白的方法、组合物、试剂盒和系统，这样的方法、组合物、试剂盒和系统可用于对涉及心肌肌钙蛋白释放的状态进行诊断、预后和治疗方法的确定。



+	+
+	+
+	+
+	.
+	.
+	.
+	.

人教社
育出版社