



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109459562 A

(43)申请公布日 2019.03.12

(21)申请号 201811035838.9

(22)申请日 2018.09.06

(30)优先权数据

62/554,889 2017.09.06 US

(71)申请人 阿姆普勒斯生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 Y·宋

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 张全信 董志勇

(51)Int.Cl.

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C12Q 1/6837(2018.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图8页

(54)发明名称

用于提高生物测定动态范围的方法

(57)摘要

本发明的名称为用于提高生物测定动态范围的方法。提供扩展生物测定诸如免疫测定的范围的组合物和方法。在一个实施方式中,使用多个离散测试位点。收集指示存在所关注的分析物的测试位点比例的数据和为由离散测试位点群体生成的信号提供统计值的数据。聚集这些数字和统计方法的结果以提供扩展的动态范围。在另一个实施方式中,以连续方式向单个测试位点或容器提供两次或更多次试剂添加。此类添加呈现相同样品的不同稀释度的不同试剂组,并且允许在单个多重测定中同时表征高丰度分析物和低丰度分析物两者,同时避免在低样品稀释度下观察到高丰度分析物的高剂量钩状效应。可组合这些方法以提供动态范围的进一步提高。

1. 一种量化生物测定结果的方法,所述方法包括:

使用多个第一离散测试位点,进行针对样品上的第一分析物的第一生物测定,其中所述第一生物测定提供指示所述第一分析物存在的第一信号的改变;

导出所述第一信号的多个量,其中所述多个量中的每个与从所述第一离散测试位点的第一群体的单独的第一离散测试位点观察到的所述第一信号相关联;

使用所述多个量中的至少一部分确定第一比例,其中所述第一比例包括指示所述分析物存在的所述第一离散测试位点的列举;

计算从所述第一离散测试位点导出的所述多个量的统计分布,以导出所述第一信号的统计值;以及

当所述第一比例落在所述第一比例的第一截止值范围内时,使用所述第一比例来量化所述样品中的所述第一分析物的质量,并且当所述第一比例落在所述第一比例的所述第一截止值范围之外时,使用所述第一信号的所述统计值来量化所述样品中的所述第一分析物的质量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法进一步包括:

使用多个第二离散测试位点,进行针对所述样品上的第二分析物的第二生物测定,其中所述第二生物测定提供指示所述第二分析物存在的第二信号的改变;

导出所述第二信号的多个量,其中所述多个量中的每个与从所述第二离散测试位点的第二群体的单独的第二离散测试位点观察到的所述第二信号相关联;

使用所述多个量中的至少一部分确定第二比例,其中所述第二比例包括指示所述第二分析物存在的所述第二离散测试位点的列举;

计算从所述第二离散测试位点导出的所述多个量的统计分布,以导出所述第二信号的统计值;以及

当所述第二比例落在所述第二比例的第二截止值范围内时,使用所述第二比例来量化所述样品中的所述第二分析物的质量,并且当所述第二比例落在所述第二比例的所述第一截止值范围之外时,使用所述第二信号的所述统计值来量化所述样品中的所述第二分析物的质量。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述第一离散测试位点和所述第二离散测试位点单独地编码。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一离散测试位点选自平面微阵列的元件、微粒、细胞、微滴、纳滴、飞滴、胶束、分子和分子复合物。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一生物测定选自免疫测定、核酸扩增测定、酶测定和生物活性测定。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一信号选自荧光、酶活性、吸光度、磷光和发光。

7. 根据权利要求2所述的方法,其中所述第一生物测定和所述第二生物测定同时进行。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中选择所述第一截止值范围以划分其中少于90%的所述第一离散测试位点包括所述第一分析物的群体。

9. 根据权利要求2所述的方法,其中选择所述第二截止值范围以划分其中少于90%的所述第二离散测试位点包括所述第二分析物的群体。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中使用流式细胞仪测定结果。

11. 根据权利要求2所述的方法,其中所述第一分析物和所述第二分析物为细胞因子。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中使用微流体装置或微通道装置进行所述第一生物测定。

13. 一种用于提高生物结合测定的动态范围的方法,所述方法包括:

使包含第一捕获分子的第一测试表面与第一体积的样品接触,其中所述样品包含结合所述第一捕获分子的第一靶分子和第二靶分子,并且其中所述第一体积包括第一样品稀释度;

将所述第一测试表面和所述样品温育第一段时间,所述第一段时间足以形成包含所述第一捕获分子和所述第一靶分子的第一复合物;

将包含第二测试表面的第二体积添加到所述第一体积中,从而生成第二样品稀释度,其中所述第二测试表面包含第二捕获分子,并且其中所述第二体积超过所述第一体积;

将所述第二测试表面和所述样品温育第二段时间,所述第二段时间足以形成包含所述第二捕获分子和所述第二靶分子的第二复合物;以及

从所述第一复合物获得第一信号,并且从所述第二复合物获得第二信号。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述第一测试表面包含第一微粒群体,并且所述第二测试表面包含第二微粒群体。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述第二靶分子以超过所述第一靶分子的浓度存在于所述样品中。

16. 根据权利要求13所述的方法,包括在获得所述第一信号和第二信号之前洗涤所述第一测试表面和第二测试表面的附加步骤。

17. 根据权利要求13所述的方法,其中所述第一靶分子和所述第二靶分子是不可区分的,并且其中所述第一捕获分子和所述第二捕获分子具有相同的特异性。

18. 根据权利要求13所述的方法,其中所述第一测试表面包括多个单独的第一离散测试位点,并且其中第一信号的改变指示在所述样品中存在所述第一靶分子,并且包括以下的附加步骤;

导出所述第一信号的多个量,其中所述多个量中的每个与从所述第一离散测试位点的第一群体的单独的第一离散测试位点观察到的所述第一信号相关联;

使用所述多个量中的至少一部分确定第一比例,其中所述第一比例包括指示所述第一靶分子存在的所述第一离散测试位点的列举;

计算从所述第一离散测试位点导出的所述多个量的统计分布,以导出所述第一信号的统计值;以及

当所述第一比例落在所述第一比例的第一截止值范围内时,使用所述第一比例来量化所述样品中的所述第一靶分子的质量,并且当所述第一比例落在所述第一比例的所述第一截止值范围之外时,使用所述第一信号的所述统计值来量化所述样品中的所述第一靶分子的质量。

19. 根据权利要求13所述的方法,其中所述第一测试表面和所述第二测试表面在微流体装置或微通道装置中提供。

用于提高生物测定动态范围的方法

[0001] 本申请要求2017年9月6日提交的美国临时申请No.62/554,889的权益。这些和所有其它参考外来材料通过引用整体并入本文。当通过引用并入的参考文献中术语的定义或使用与在本文中提供的术语的定义不一致或相反时,以在本文中提供的此术语的定义为主。

技术领域

[0002] 本发明的领域是生物测定,特别是免疫测定。

背景技术

[0003] 背景技术描述包括可用于理解本发明的信息。这并非承认本文所提供的任何信息是现有技术或与当前要求保护的发明相关,或者具体地或隐含地引用的任何出版物是现有技术。

[0004] 生物测定,诸如免疫测定(例如,EIA、FIA等)、核酸扩增测定(诸如rtPCR、线性扩增测定等)和基于细胞的测定是现代生物研究和临床实践的支柱。历史上,这些生物测定已经通过用分析物特异性试剂处理样品并且从本体混合物(bulk mixture)获得信号强度(例如,吸光度、荧光强度、发光强度等)的读数来进行。将此信号强度与从由用相同试剂处理的类似样品制备的本体混合物获得的信号强度的标准或剂量/响应曲线进行比较,以便导出所关注的分析物的浓度。在免疫测定的情况下,此类分析物特异性试剂通常包括与所关注的分析物形成特异性、可检测的复合物的抗体或抗体片段。此类免疫测定的动态范围一般限于约两个数量级。然而,在一些应用中,分析物的浓度范围可能扩展超出此范围。类似地,在多重测定中,各分析物的浓度范围可宽泛地变化。

[0005] 已经尝试开发具有扩展的测量或动态范围的生物测定。例如,Bell的美国专利No.6,551,788描述基于荧光的免疫测定,其中不同尺寸的颗粒被用作初始捕获相。该专利陈述,大颗粒比小颗粒在低浓度下提供分析物分子的更有效捕获;遗憾的是,它没有提供理论框架或数据来支持此断言。

[0006] Goix等人的美国专利申请No.2014/0065722描述某种程度类似的方法,其中不同的颗粒群体与针对相同分析物的低亲和力抗体或高亲和力抗体偶联并且被用作捕获相。分开读取不同的颗粒群体以产生可用于提供扩展的测量范围的有区别的剂量/响应曲线。Dowell等人的美国专利申请公开No.2015/0046114描述类似的方法,其中共同捕获抗体与夹心免疫测定中对分析物具有不同亲和力的不同标记抗体组合使用。然而,这些方法需要具有相同特异性和显著不同亲和力的抗体的可用性,这可能不适用于所关注的分析物。

[0007] 在另一种方法中,已经提出使用并入对所关注的分析物具有不同结合亲和力的物理上有区别的区或传感器的测试装置。例如,(Campbell等人的)美国专利No.9,671,398描述使用两种不同的免疫传感器,一种免疫传感器被构建用于展示分析物相对于另一种分析物的结合的减弱,以导出提供有效的扩展测量范围的重叠剂量/响应曲线。然而,此类装置的构建是复杂的,并且在应用于多重测定时变得越来越复杂。

[0008] 在Drukier的美国专利No.7604956中描述的另一种方法中,通过系统地减少在其它常规测定中的背景噪声源来实现扩展的测量范围。这种背景噪声的减少有效地增加测定的灵敏度,而不影响高分析物浓度下的测定性能,从而导致动态范围增加。然而,尚不清楚用于最小化背景噪声源的方法是否适用于宽范围的生物测定。另外,由于最小化背景噪声源的方法对于每种分析物是特定的,所以这种方法似乎不太可能可用于多重测定。

[0009] 在(Talebpour和Leanord的)美国专利No.7723127中描述的又另一种方法中,使用向捕获试剂中多次添加含有所关注的分析物的样品进行免疫测定。后一个添加使用稀释捕获试剂的大体积进行。得到的复合剂量/响应曲线介于使用小的初始样品体积或作为单次推注施加的总样品体积生成的剂量/响应曲线之间。然而,虽然这被定位为提供具有扩展动态范围的剂量/响应曲线,但是所提供的比较数据与由单次添加提供的复合剂量/响应曲线相比示出对更广泛范围的分析物浓度的显著响应。报告的扩展测量范围似乎是使用非常规计算最小可检测剂量的结果,该最小可检测剂量基于为最大观察信号的10%的信号选择此值,而不是区分观察到的信号与用空白样品实现的信号的能力。

[0010] 最近,已经进行各种技术以利用在此类测定中编码单独出现的结果的能力,尤其是在多重测定的情况下。例如,可使用二维表面微阵列(其提供单独的结果的位置编码)或微观珠的悬浮阵列(其可使用与用于提供分析物特异性结果的染料、荧光团等不同的染料、荧光团等编码)进行多重免疫测定。此类方法通常用于多重测定,因为结果的编码提供用于区分在同一样品上同时进行的不同测定的结果的手段。然而,即使没有多重性(multiplexing),从此类编码结果中导出量化结果也是具有挑战性的。为了适当地缩放,通常在相对小且离散的区域——例如单独的微珠的表面或微阵列上的单独的印刷“点”——上提供单独的代码结果。历史上,单一离散编码结果的分析尚未提供足够精确的量化结果。已经对来自多个离散编码结果的聚集数据应用统计方法,以提供量化。

[0011] 在一种方法中,测量来自大量单独的离散测试区域的信号强度并且该信号强度用于生成对强度值的频率分布。通常地,分布的平均值或中值被用作与此样品的分析物浓度相关联的值。例如,(Ruan等人的)美国专利申请No.2012/0308997描述其中使用颗粒群体进行免疫测定的方法。来自测试颗粒的信号强度的分布被用于计算平均信号强度,该平均信号强度继而用于导出测试样品中分析物的浓度。本文中的所有出版物均以相同程度通过引用并入,如同每个单独的出版物或专利申请都具体地并单独地指出通过引用并入一样。当并入的参考文献中术语的定义或用法与在本文中提供的此术语的定义不一致或相反时,应用在本文中提供的此术语的定义,而不应用在参考文献中此术语的定义。然而,在此类方法中,测定灵敏度基本上是在此分布内发现的平均信号强度和变化(即信噪比)两者。由于在低分析物浓度下的信噪比较低,所以使用此方法的测定灵敏度必然受到限制。

[0012] 在另一种方法中,将单独的离散测试区域以二元方式分类为“阳性”(即指示存在分析物)或阴性(即指示不存在分析物)。在此类“数字”方法中,利用阳性测试区域与阴性测试区域的相对比例来导出此样品的分析物浓度,这通常地通过与使用含有已知分析物浓度的样品生成的剂量/响应曲线比较进行。例如,(Shim等人的)英国专利No.2510653描述一种方法,其中基于酶活性,将使用测试样品制备的油:水乳液中的单独的飞滴分类为含有 β -半乳糖苷酶标记或不含有 β -半乳糖苷酶标记。存在于测试样品中的 β -半乳糖苷酶标记的量由从单层此类液滴的图像确定的阳性飞滴和阴性飞滴的比率来确定。类似地,(Shim的)美国

专利申请公开No.2015/0293102描述在飞滴悬浮液中进行的免疫测定中使用荧光或酶标记抗体的各种免疫测定,其中使用阳性液滴和阴性液滴的比例来导出测试样品中分析物的浓度。(Lee和Yanavich的)美国专利申请公开No.2004/0126899描述使用固定量的磁性颗粒,如果存在分析物,则该磁性颗粒与多孔固相形成相对稳定的复合物。通过施加弱磁场除去不与固相形成复合物的阴性颗粒,并且由列举剩余的结合颗粒提供量化。(Duffy等人的)美国专利申请公开No.2010/075862描述使用终止于测试区域的复杂光纤阵列。在纤维的涂覆终端上进行免疫测定,并且基于信号强度确定每种纤维的结果为阳性或阴性。利用阳性纤维的比例来确定测试样品的分析物浓度。(Zur Megede和Karlin-Neumann的)国际专利申请公开No.W02017/034925描述“数字读出测定”,其中鉴定多个“分区”并且将该多个“分区”分类为阳性(含有用于指示存在分析物的标记)或阴性(缺少所述标记)。阳性分区和阴性分区的比例用于导出测试样品中存在的分析物的浓度。不幸的是,利用此类方法的测定的动态范围基本上是所用的离散测试区域的占用率的函数,其中上限达到完全占用或接近完全占用。因此,此类测定的动态范围必然受到限制。

[0013] 因此,仍然需要用于提高生物测定的动态范围的方法。

发明内容

[0014] 本发明主题提供扩展生物测定的动态范围的组合物和方法。

[0015] 本发明构思的一个实施方式是用于通过使用多个第一离散测试位点进行针对样品上的第一分析物的第一生物测定来量化从生物测定(诸如免疫测定、核酸扩增测定、酶测定和/或生物活性测定)导出的结果的方法,其中第一生物测定提供指示第一分析物存在的第一信号(例如荧光、酶活性、吸光度、磷光和/或发光)的改变。获得表示此第一信号的多个量,其中多个量中的每个与从第一离散测试位点中的单独的测试位点观察到的第一信号的值相关联。确定包括具有指示样品中存在分析物的信号的第一离散测试位点的列举的第一比例。另外,使用从第一离散测试位点导出的多个量的统计分布来导出第一信号的总体统计值。当此第一比例落在第一截止范围内时使用第一比例确定样品中的第一分析物的质量,并且当第一比例落在第一截止范围之外时使用第一信号的统计值确定样品中的第一分析物的质量。在一些实施方式中,选择此类截止范围以划分其中少于90%的第一离散测试位点包括第一分析物的群体。

[0016] 在一些实施方式中,与第一生物测定一起进行第二生物测定,以使用第二组离散测试位点以类似方式量化第二分析物。在此类实施方式中,可单独编码第一离散测试位点和第二离散测试位点。合适的测试位点包括平面微阵列、微粒、细胞、微滴、纳滴、飞滴、胶束、分子和分子复合物。

[0017] 本发明构思的另一个实施方式是通过使包括第一捕获分子的第一测试表面与第一体积的样品接触来提高生物结合测定的动态范围的方法,其中样品包含结合第一捕获分子的第一靶分子并且还包括第二靶分子。此第一体积提供第一样品稀释度。将第一测试表面和样品温育第一段时间,该第一段时间足以形成包括第一捕获分子和第一靶分子的第一复合物。然后将包括第二测试表面的第二体积添加到第一体积中,从而生成第二样品稀释度。此第二测试表面包括第二捕获分子,并且在一些实施方式中,第二体积超过第一体积。将第二测试表面和样品(以第二样品稀释度稀释)温育第二段时间,该第二段时间足以形成

包括第二捕获分子和第二靶分子的第二复合物。然后分别从第一复合物获得第一信号和第二信号,并且从第二复合物获得第二信号。在一些实施方式中,第一测试表面包含第一微粒群体,并且第二测试表面包含第二微粒群体。在一些实施方式中,第二靶分子以超过第一靶分子的浓度存在于样品中。在一些实施方式中,第一靶分子和第二靶分子是不可区分的,并且第一捕获分子和第二捕获分子具有相同的特异性。在此类实施方式中,扩展针对单一分析物的测定的动态范围。在一些实施方式中,可使用上述方法量化第一信号和/或第二信号,以便进一步扩展生物测定(一种或多种)的动态范围。

[0018] 从以下优选实施方式的详细描述连同附图,本发明主题的各种目的、特征、方面和优点将变得更加明显,在附图中类似的标号表示类似的部件。

附图说明

[0019] 图1A至1G:图1A至1G示出使用在同一测试孔中以连续方式应用的两种不同的样品稀释度,与C-反应蛋白(CRP)测定一起进行的不同的基于微粒的细胞因子测定的中值荧光强度(MFI)的剂量响应曲线。在低样品稀释度(1:3)下在初始温育中应用细胞因子测定试剂。图1A示出为IL-1 β 产生的剂量/响应曲线。图1B示出为IL-10产生的剂量/响应曲线。图1C示出为IFN- γ 产生的剂量/响应曲线。图1D示出为IL-8产生的剂量/响应曲线。图1E示出为hMCP-1产生的剂量/响应曲线。图1F示出为IL-4产生的剂量/响应曲线。图1G示出为IL-6产生的剂量/响应曲线。

[0020] 图2:图2描绘使用在同一测试孔中以连续方式应用的两种不同的样品稀释度,与多重细胞因子测定一起进行的C-反应蛋白(CRP)测定的中值荧光强度(MFI)的剂量/响应曲线。在添加细胞因子测定试剂之后,以提供第二样品稀释度(1:60)的体积提供CRP测定试剂。

具体实施方式

[0021] 以下描述包括可用于理解本发明的信息。这并非承认本文所提供的任何信息是现有技术或与当前要求保护的发明相关,或者具体地或隐含地引用的任何出版物是现有技术。

[0022] 本发明主题提供设备、系统和方法,其中提供使用多个离散测试区域进行测定。合适的测试区域包括微粒、平面阵列的空间限定部分、乳液和/或悬浮液中的液滴(包括微滴和/或飞滴)、测试区域的数字化图像内的单独的像素、细胞、溶液中的单独的分子和/或以其它方式编码以表示空间的不同区域或体积的结果。可针对源自离散测试区域内所关注的分析物识别的信号强度,单独表征离散测试区域。对于测试样品的测试中的所有或一些离散测试区域进行分析(例如,在流式细胞仪中)以确定分析物特异性信号强度。离散测试区域的分析物特异性信号强度用于进行离散测试区域的测试群体的信号强度的统计分析,以及用于确定所表征的每个离散测试区域是否以二元方式包括分析物(即,阳性的或阴性的“数字”数据)。数字数据可用于导出包括分析物的离散测试区域相对于不包括分析物的离散测试区域的比例。例如,门控信号强度值指示单独的测试区域(例如微粒)存在分析物的阳性结果。

[0023] 满足此准则的颗粒群体的百分比可与分析物浓度相关。例如,在中等分析物浓度

至高分析物浓度下,基本上所有测试区域将指示分析物的存在,对应于100%占用率。随着分析物浓度的降低,增加的单独的测试位点的百分比将提供指示此测试位点未检测到分析物的信号,并且占用率降低。例如,如果表征的单个测试位点中的20%指示它们没有鉴定出分析物的存在,则占用率将被认为是80%。出于数字量化目的,一旦占用率小于100%但高于背景水平,就可在占用率程度和分析物浓度之间建立相关性。例如,低于预定截止值(例如,约90%的占用率),此类数字数据可用于计算测试样品中的分析物的浓度。高于预定截止值,从表征的离散测试区域的群体收集的统计数据可用于确定测试样品中的分析物的浓度。在优选的实施方式中,可规划离散测试区域(例如,通过选择抗体和/或抗体含量),使得这些范围重叠并且提供连续的测量范围。

[0024] 应当了解,所公开的技术提供许多有利的技术效果,包括提供相对于使用来源于本体溶液的信号强度的常规测定具有扩展的动态范围的测定,来自单独测试结果群体的平均信号强度的统计计算,和/或测试结果群体的单独成员的二元分类。

[0025] 以下讨论提供本发明主题的许多实例实施方式。虽然每个实施方式表示发明要素的单一组合,但是本发明主题被认为包括所公开要素的所有可能的组合。因此,如果一个实施方式包括要素A、B和C,并且第二实施方式包括要素B和D,则本发明主题还被认为包括A、B、C或D的其它剩余组合,即使没有明确地公开。

[0026] 如本文所使用,并且除非上下文另有规定,否则术语“偶联到”旨在包括直接偶联(其中彼此偶联的两个元件彼此接触)和间接偶联(其中至少一个附加元件位于两个元件之间)两者。因此,术语“偶联到”和“与……偶联”同义地使用。在一些实施方式中,用于描述和要求保护本发明的某些实施方式的表达成分的量、特性诸如浓度、反应条件等的数字应理解为在某些情况下由术语“约”修饰。因此,在一些实施方式中,书面描述和所附权利要求书中阐述的数值参数是近似值,其可根据具体实施方式寻求获得的期望的特性而变化。在一些实施方式中,数值参数应按照报告的有效数字的数量并且通过应用普通舍入技术来解释。尽管阐述发明的一些实施方式的宽范围的数值范围和参数是近似值,但是在特定实例中阐述的数值尽可能精确地报告。在本发明的一些实施方式中呈现的数值可含有由它们各自的测试测量值中发现的标准偏差必然引起的某些误差。

[0027] 如本文的说明书和贯穿所附权利要求中所使用,除非上下文另有明确规定,否则“一种(a/an)”、“一个(a/an)”以及“该(the)”的含义包括复数参考对象。另外,如在本文的说明书中所使用,除非上下文另有明确规定,否则“在……中”的含义包括“在……中”和“在……上”。

[0028] 本文中值的范围的叙述仅旨在用作单独提及落在该范围内的每个单独值的简写方法。除非本文另有指示,否则将每个单独的值并入到本说明书中,如同其在本文中单独叙述一样。除非本文另有指示或上下文明显矛盾,否则本文所述的所有方法均可以任何合适的次序进行。参照本文的某些实施方式提供的任何和所有实例或示例性语言(例如“诸如”)的使用仅旨在更好地阐明本发明,而不是对以其它方式保护的本发明的范围加以限制。说明书中的任何语言都不应被解释为指示对本发明的实践必不可少的任何非要求保护的要素。

[0029] 本文所公开的本发明的可选要素或实施方式的分组不被解释为限制。每个组成员可单独地或以与该组中的其它成员或本文找到的其它要素组合的形式提及和要求保护。

出于方便和/或可专利性的原因,可将组的一个或多个成员包括在组中或从组中删除。在发生任何此类包括或删除时,本文的说明书被认为含有经修改的组,因此实现所附权利要求中使用的所有马库什组的书面描述。

[0030] 发明人考虑到本文所述的系统和方法适用于各种各样生物测定形式,其可基于特异性配对以充当结合配偶体的多种生物衍生分子的形成。合适的结合配偶体包括免疫球蛋白、凝集素、细胞表面受体、适体和核酸。在一些实施方式中,生物测定可以为免疫测定,例如利用结合(直接地或间接地)所关注的分析物的标记抗体或抗体类似物(例如抗体片段、单链抗体、重组抗体等)和/或从离散测试位点与待测样品中的分析物竞争的所关注的分析物的标记分析物形式的直接(例如“夹心”)或竞争性测定。合适的标记包括荧光分子、发光分子、磷光分子、发色团、微粒、金属颗粒或胶体、酶和核酸。在一些实施方式中,通过共价附接和/或基因操纵直接并入此类标记。在其它实施方式中,通过亲和手段诸如通过使用生物素(或生物素类似物)和抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白、通过使用蛋白A和/或蛋白G和/或通过使用针对测定系统的组分的标记抗体并入此类标记。

[0031] 在其它实施方式中,本发明构思的系统和方法涉及核酸结合和/或扩增测定。此类测定可包括一种或多种多核苷酸,其与表示所关注的核苷酸序列或与所关注的核苷酸序列相关联的核酸序列至少部分互补。在此类实施方式中,指示所关注的多核苷酸存在的可检测信号可通过任何合适的手段——包括携带标记的探针序列的结合或置换、染料和核酸结构之间(例如双螺旋区域)的复合物形成等——生成。合适的标记包括荧光分子、发光分子、磷光分子、发色团、微粒、金属颗粒或胶体、酶、核酸和质量标记(mass label)。在一些实施方式中,通过直接合成、共价附接和/或基因操纵直接并入此类标记。在其它实施方式中,通过亲和手段诸如通过使用生物素(或生物素类似物)和抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白、通过使用蛋白A和/或蛋白G和/或通过使用针对测定系统的组分的标记抗体并入此类标记。

[0032] 可通过任何合适的手段将结合配偶体对的成员定位到测试位点,诸如适合于流式细胞术的编码颗粒或在测试表面上的可区分位点。通常,这可通过非共价结合(例如吸附)、共价偶联(例如通过在结合配偶体分子上的可用的胺、巯基或醛基)或间接偶联(例如通过使用蛋白A/蛋白G、链霉抗生物素蛋白/抗生物素蛋白:生物素对形成等)来实现。众多偶联化学过程和方案在本领域中是已知的。合适的偶联方法的示例包括通过羟基琥珀酰亚胺或N-羟基琥珀酰亚胺酯偶联胺基、通过N-乙基马来酰亚胺基偶联巯基、经由环氧基偶联羟基、胺或巯基,以及经由酰肼基偶联醛基(例如通过糖蛋白的碳水化合物或碳水化合物侧链的氧化产生)。

[0033] 在其它实施方式中,本发明构思的系统和方法涉及基于细胞的测定。此类测定可例如包括在所关注的分析物存在的情况下产生信号强度的可测量的变化的细胞。在此类实施方式中,单独的细胞可充当离散测试位点,其可继而通过鉴定特定的细胞表面标志来鉴定。此类细胞可在悬浮液中或作为表面上的层生长。在一些实施方式中,可对细胞进行遗传修饰以并入生成可检测信号的报告构建体。合适的信号包括荧光、磷光、发光和/或酶活性。在一些实施方式中,悬浮液中的细胞可使用流式细胞仪表征,其中可使用显微镜系统(其可继而提供数字图像)表征呈现为在表面上的层的细胞。

[0034] 如上所述,各种各样的离散测试位点适用于本发明构思的系统和方法。在一些实施方式中,离散测试位点可以为平面微阵列上的单独的反应性位点的集合。此类测试位点

可通过它们在微阵列上的位置单独地鉴定(即编码)。可选地,可通过允许微粒或其它离散体沉淀或组装在平坦的或基本上平坦的表面上来组装此类阵列。在此类实施方式中,微粒或其它离散体可包括鉴定特征。在此类实施方式中,可使用伴随有适当的图像分析软件的数字成像系统来表征结果。

[0035] 在其它实施方式中,离散测试位点可以为保持在悬浮液中的微粒的集合。此类微粒可通过并入一种或多种可检测染料(其被选择,使得它们不干扰分析物特异性信号)、尺寸、密度、衍射图案、对磁场的响应和/或构型来鉴定。可例如使用流式细胞仪表征此类微粒的集合。

[0036] 在其它实施方式中,离散测试位点可以为保持为悬浮液或乳液的胶束或液滴(例如微滴、纳滴和/或飞滴)的集合。此类离散测试位点可通过在胶束或液滴内并入一种或多种可检测标记来鉴定。可例如使用流式细胞仪或使用微通道装置来表征此类胶束或液滴的集合。

[0037] 在仍其它实施方式中,离散测试位点可以为保持在溶液中的单独的分子或分子复合物的集合。此类分子或分子复合物可通过并入与分子或分子复合物相关联的一种或多种可检测标记来鉴定。

[0038] 在仍其它实施方式中,离散测试位点可以为从大量测试位点的数字图像获得的像素的集合。例如,如果在测试表面上进行免疫测定并且该免疫测定产生可见信号,则可获得该测试表面的数字图像,该数字图像包括与所关注分析物的浓度相关的信号强度数据。数字图像包括像素,像素中的每个表示总体测试表面内的离散区域。在本发明构思的一些实施方式中,此类单独的像素(或定义的像素的集合)可被认为是离散测试位点并作为离散测试位点分析,以便取得本发明构思的系统和方法的益处。

[0039] 在优选实施方式中,生物测定为在保持在悬浮液中的微粒集合的表面上进行的免疫测定。免疫测定通过使用标记抗体提供荧光信号,如果存在所关注的分析物,则该荧光信号(在直接测定中)保持在颗粒上。此类微粒可通过整合提供与分析物特异性信号可区分的信号以便鉴定微粒的一种或多种荧光染料来编码。此类微粒也可按尺寸编码。在一些实施方式中,将不同的微粒群体应用到单一样品,以便从单一测定(即多重测定)提供多于一种分析物种类的结果。在此类优选实施方式中,优选地利用流式细胞仪获得结果,该流式细胞仪被配置成在单独的微粒通过仪器时鉴定并且获得来自单独的微粒的分析物特异性信号数据。

[0040] 使分析物特异性信号数据进行至少两种不同的分析操作。在统计操作中,收集的数据被聚集,并且从聚集的数据生成“典型的”离散测试位点数据的估计值。例如,可从离散测试位点的集合生成分析物特异性信号强度的频率分布,并且从此聚集数据确定并且报告平均值或中值。在区分的数字操作中,基于与单独的离散测试位点相关联的分析物特异性信号的测量值,确定单独的离散测试位点包括所关注的分析物(即“阳性”离散测试位点)或缺少所关注的分析物(即“阴性”离散测试位点)。然后确定阳性离散测试位点与阴性离散测试位点的相对量(例如,使用比率)来生成数字结果。

[0041] 在本发明构思的系统和方法中,组合统计和数字结果以提供聚集结果。在低浓度的所关注的分析物下,例如其中阳性离散测试位点的相对量为所表征的总离散测试位点的约90%或更少,聚集结果高度依赖于数字结果。如果阳性离散测试位点的相对量超过此值

(或另一个适用的截止值),则聚集结果高度依赖于统计结果。这有效地增加生物测定的动态范围。在一些实施方式中,动态范围是仅使用统计数据或仅使用数字数据进行的相同生物测定的动态范围的约2倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍或大于100倍。

[0042] 表1示出针对IL-10的基于微粒的免疫测定的典型结果。

[0043]

平均荧光强度 (MFI)	门控阴性 事件%	占用率%	IL-10 的标称 浓度 (pg/mL)
327.81	0%	100%	500.00
151.25	0%	100%	166.67
56.23	0%	100%	55.56
23.93	0%	100%	18.52
7.84	0%	100%	6.17
3.02	38.20%	61.8%	2.06
1.50	62.79%	37.21%	0.69
1.60	69.88%	30.12%	0.00
1.09	89.66%	10.34%	空白

[0044] 表1

[0045] 如所示,源自免疫测定微粒群体的统计数据(中值荧光强度或MFI)无法提供浓度低于2.06pg/mL的浓度标准品之间的区分,以及在2.06pg/mL和6.17pg/mL标准品之间只有微小的差异。然而,数字数据(以微粒的门控%的形式)示出2.06pg/mL和0.69pg/mL标准品之间的大的区别,以及0.69pg/mL和0.00pg/mL标准品之间的明显区别。聚集结果提供从至少0.69pg/mL至500.00pg/mL的连续测量范围。

[0046] 表2示出其中测定TNF α 浓度的类似研究的结果。如所示,统计数据无法提供含有小于2.47pg/mL的标准品之间的区分,而数字数据提供低至0.27pg/mL的浓度标准品之间的明显区别。聚集数据提供从至少0.27pg/mL至200.00pg/mL的连续动态范围,从而表现出相比只使用统计数据或数字数据大约10倍的提高。

[0047]

平均荧光强度	门控阴性	占用率%	TNF- α 的标称
--------	------	------	-------------------

[0048]

(MFI)	事件%		浓度 (pg/mL)
166.98	0%	100%	200.00
85.52	0%	100%	66.67
37.52	0%	100%	22.22
13.34	1.32%	98.68%	7.41
5.19	27.84%	72.16%	2.47
2.31	62.35%	37.65%	0.82
2.19	68.18%	31.82%	0.27
1.45	84.29%	15.71%	0.00
1.24	100.00%	0%	空白

[0049] 表2

[0050] 表3示出利用针对IL-6的测定的另一项研究的结果。如所示,统计数据无法提供含有小于12.35pg/mL的标准品之间的区分,而数字数据提供低至1.37的浓度标准品之间的明显区别。聚集数据提供从至少1.37pg/mL至1,000pg/mL的连续动态范围,从而表现出相比只使用统计数据或数字数据大约10倍至100倍的提高。

[0051]

平均荧光强度 (MFI)	门控阴性 事件%	占用率%	IL-6 的标称 浓度 (pg/mL)
388.91	0%	100%	1000.00
199.89	0%	100%	333.33
87.38	0%	100%	111.11
39.95	0%	100%	37.04
18.11	1.75%	98.25%	12.35
8.43	41.82%	58.18%	4.12
5.23	71.70%	28.30%	1.37
3.92	94.34%	5.66%	0.00
3.82	96.30%	3.70%	空白

[0052] 表3

[0053] 表4示出使用本发明构思的系统和方法的GM-CSF测定的结果;表5示出来自暴露于阴性 (0pg/mL) 对照样品的许多微粒群体的结果。如所示,统计数据确实在具有小于12.35pg/mL GM-CSF的浓度的标准品之间进行区分,而数字数据提供具有低至1.37pg/mL GM-CSF的标准品之间的区分。使用阴性对照的重复测定指示约90%或更高的“阴性”微粒含量可被认为是背景噪声。

[0054]

平均荧光强度 (MFI)	门控阴性 事件%	占用率%	GM-CSF 的标 称 浓 度 (pg/mL)
562.34	0.00%	100.0%	1000.0
406.79	0.00%	100.0%	333.33
191.1	0.00%	100.0%	111.11
83.54	0.00%	100.0%	37.04
36.19	1.65%	98.4%	12.35
20.54	19.72%	80.3%	4.12
14.86	65.00%	35.0%	1.37
12.19	98.48%	1.5%	空白

[0055] 表4

[0056]

平均荧光强度 (MFI)	门控阴性 事件%	占用率%
12.30	86.61%	13.4%
12.86	95.24%	4.8%
12.98	89.15%	10.9%
12.75	94.44%	5.6%
12.19	90.68%	9.3%
12.08	98.11%	1.9%
12.19	92.47%	7.5%
12.30	90.26%	9.7%
12.41	91.6%	8.4%
12.41	88.24%	11.8%
12.41	95.04%	5.0%
12.30	93.75%	6.3%
12.41	91.79%	8.2%
11.76	93.13%	6.9%
12.30	89.78%	10.2%
12.41	91.79%	8.2%
11.76%	93.13%	6.9%

[0057]	12.30	89.78%	10.2%
	11.86	91.89%	8.1%
	11.65	93.28	6.7
	12.41	88.79	11.2
	12.19	92.25%	7.8%

[0058] 表5

[0059] 在本发明构思的分析物混合物的另一个实施方式中,其中一种或多种分析物以大(例如大于5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍或超过1,000倍)的过量存在或一种或多种第二分析物,并且其中两种分析物同时表征。使用相同的测试容器以及用共同的一组试剂等对所有测试的分析物进行此类多重测定。由此,在典型的多重测定中,各种分析物在类似的测量范围内表征。然而,在一些情况下,期望测量同一样品内的不同分析物,其中那些分析物以显著不同的浓度存在。例如,细胞因子通常以小的量(例如约1pg/mL至100pg/mL)存在于人血清中,而C-反应蛋白通常以较大的量(例如ng/mL至μg/mL量)存在。由于C-反应蛋白(CRP)和某些细胞因子也是炎症标志,所以期望从同一样品中,并且优选地从同一测定中量化它们。

[0060] 在如应用于生物结合测定(例如免疫测定、杂交测定等)的本发明构思的此类实施方式中,在试剂混合物中提供对以低浓度存在的第一分析物具有特异性亲和力的第一结合配偶体。此类第一结合配偶体偶联到第一分析物标识符或以其它方式与第一分析物标识符相关联,第一分析物标识符例如为可在第一液体悬浮液中提供的荧光标记的微粒。将第一结合配偶体以相对低的样品体积与第一液体悬浮液比率(例如从2:1至1:5)暴露于含有包括第一分析物的分析物混合物的样品,并且温育足以允许样品中的第一分析物的分子与携带第一结合配偶体的微粒复合的时间段。为此所需的时间是第一结合配偶体的亲合力、第一分析物的浓度、温度等的函数,并且在1℃至50℃或更高范围内的温度下可在约15分钟至24小时的范围内(例如,在核酸结合测定中)。

[0061] 在此初始结合步骤以后,将第二结合配偶体的悬浮液(例如,微粒偶联的第二结合配偶体的微粒悬浮液)以足以提供相对高的样品体积:总试剂体积稀释度(例如从1:10至1:1,000)的体积添加到此混合物中。此步骤有效地将样品中第二丰富分析物的浓度减小到允许通过第二试剂表征的范围内。同时,仅在此较高稀释度下存在第二结合配偶体有效地防止第二结合配偶体的饱和。此饱和的缺乏提供比通过将第二结合配偶体暴露于极高浓度的第二分析物所提供的更线性的剂量/响应曲线,因为它在更宽的第二分析物浓度范围内提供第二结合配偶体的总群体的部分占用率。

[0062] 在适合于在第二丰富分析物和第二结合配偶体之间形成复合物的第二温育期后,可表征第一分析物:第一结合配偶体和第二分析物:第二结合配偶体复合物已经形成的程度,这例如通过添加第二标记抗体或探针核酸序列,然后进行光学表征(例如在荧光激发细胞分选仪或类似装置中)进行。在一些实施方式中,此第二温育期短于第一温育期。在其它实施方式中,第二温育期类似于第一温育期。在仍其它实施方式中,第二温育期长于第一温育期。类似地,第一温育期和第二温育期可在类似的或不同的温度下进行。在一些实施方式中,第二结合配偶体的添加伴随有更改反应混合物的pH、离子强度和/或离子组成的组分。

例如,在核酸结合测定中,在第二次温育期间反应混合物的温度和离子强度可从第一次温育的温度和离子强度更改,以便调节杂交效率和/或保真度。

[0063] 令人惊讶的是,发明人已经发现,在第一次温育中建立的第一分析物:第一结合配偶体复合物中的至少一些在稀释以后不会丢失,尽管期望在添加含有第二结合配偶体的第二体积导致的显著更低的游离第一分析物浓度下重新平衡。这允许生成表示在单一多重测定中的两种不同样品稀释度的按时间顺序分离的剂量/响应曲线。

[0064] 在此类方法中,可将第一体积的一种或多种高灵敏度基于珠粒的捕获试剂(例如,与对以低浓度存在的分析物具有特异性的高亲和力抗体缀合的珠粒)的水性悬浮液添加到测试孔或容器中。在一些实施方式中,可除去分配的悬浮液的液体部分(例如,通过使用过滤器微孔板),以便最小化随后的应用样品的稀释度。然后,可将一定体积的样品与一定体积的测定缓冲液一起添加到高灵敏度基于珠粒的捕获试剂中,并且将最低限度稀释的样品与高灵敏度基于珠粒的试剂一起温育合适的时间段(例如,从15分钟至24小时)和温度(例如,从4℃至50℃或更高)。在此初始捕获温育期间,由高灵敏度基于珠粒的试剂和测定缓冲液表示的体积的样品的典型稀释度可在约10:1至1:10的范围内,并且在一些应用中可在此范围之外。

[0065] 在初始捕获温育以后,将一定体积的含有一种或多种低灵敏度基于珠粒的捕获试剂(例如,与对以高浓度存在于样品中的分析物具有特异性的抗体缀合的珠粒)的悬浮液直接添加到测试孔或容器中,从而导致样品和高灵敏度基于珠粒的试剂两者的稀释液进行第二捕获温育合适的时间段(例如,15分钟至24小时)并且在合适的温度(例如,4℃至50℃或更高)下。在此第二捕获温育期间,样品相对于由测定缓冲液、高灵敏度基于珠粒的试剂和低灵敏度基于珠粒的试剂表示的总体积的稀释度可在约1:10至1:100或更大的范围内。在一些实施方式中,第二捕获温育比第一捕获温育进行更短的时间段。在第二捕获温育以后,可表征结合的低丰度分析物和结合的高丰度分析物的量,这例如通过与缀合有可检测标记(例如生物素、荧光团等)的特异性抗体一起温育进行。令人惊讶的是,虽然用于非共价相互作用的常规稳态平衡模型表明此类稀释应该导致从高灵敏度基于珠粒的试剂中捕获的分析物的损失,但是发明人已经发现此类分析物在稀释以后保持。

[0066] 在此类实施方式的实例中,将45μL与不同细胞因子的特异性抗体缀合的珠粒悬浮液添加到微板的孔中,并且除去悬浮缓冲液。在去除缓冲液以后,将10μL测定缓冲液和5μL血清样品或基于血清的细胞因子校准物添加到孔中,从而在测定缓冲液中提供1:3的样品稀释度。在室温下第一捕获温育1小时后,将285μL与对CRP(高丰度分析物)具有特异性的抗体缀合的珠粒悬浮液添加到孔中,从而在缓冲液+试剂中提供1:60的样品稀释度。在室温下第二温育30分钟后,除去孔的液体内容物,并且使用洗涤缓冲液将珠粒洗涤3次。应当了解,在第一捕获温育和第二捕获温育之间不需要附加步骤。将25μL对细胞因子和CRP具有特异性的生物素化检测抗体溶液添加到每个孔中,并且在室温下温育30分钟。然后除去孔的液体内容物,并且用洗涤缓冲液将珠粒洗涤3次,然后将25μL链霉抗生物素蛋白-PE溶液添加到每个孔中。在室温下温育10分钟后,除去孔的液体内容物,并且用洗涤缓冲液将珠粒洗涤两次,然后在流式细胞仪上分析。

[0067] 来自此类研究的典型结果示出在图1A至图1G(低丰度分析物-细胞因子)和图2(高丰度分析物-CRP)中。图1A示出为IL-1β产生的剂量/响应曲线;背景荧光强度为14.07MFI,

并且LDD为约2pg/mL。图1B示出为IP-10产生的剂量/响应曲线;背景荧光强度为1.86MFI,并且LDD为约2pg/mL至4pg/mL。图1C示出为IFN- γ 产生的剂量/响应曲线;背景荧光强度为5.09MFI,并且LDD为约5pg/mL至10pg/mL。图1D示出为IL-8产生的剂量/响应曲线;背景荧光强度为1.36MFI,并且LDD为约1pg/mL至1.5pg/mL。图1E示出为人MCP-1 (hMCP-1)产生的剂量/响应曲线;背景荧光强度为1.00MFI,并且LDD为约2pg/mL至5pg/mL。图1F示出为IL-4产生的剂量/响应曲线;背景荧光强度为1.45MFI,并且LDD为约5pg/mL至10pg/mL。图1G示出为IL-6产生的剂量/响应曲线;背景荧光强度为1.45MFI,并且LDD为约5pg/mL至10pg/mL。图2示出为CRP产生的剂量/响应曲线;背景荧光强度为4.61MFI,并且LDD为约18pg/mL。图1A至图1G (表示低丰度分析物) 示出动态范围大致为约1pg/mL至500pg/mL或约10pg/mL至1,000pg/mL (取决于测试的细胞因子) 的剂量响应曲线,而图2 (表示高丰度分析物) 示出动态范围大致为18pg/mL至13,000pg/mL的剂量响应曲线。总的来说,在本发明构思的实施方式的此实例中,在单个测试孔中实现超过5个数量级的免疫测定范围 (考虑到血清样品被稀释60倍用于CRP测定) (例如,当考虑到稀释时,5至6个数量级的动态范围,诸如1-1.5pg/mL至780,000pg/mL)。发明人认为,在使用高分辨率流式细胞仪的情况下,使用组合的连续稀释和数字/统计数据分析技术,测定动态范围可扩展到7至8个数量级或更高。

[0068] 应当了解,可利用多于两组的捕获试剂,从而在单个测试孔或容器中以不同稀释度生成三个或更多个样品温育。在一些实施方式中,可利用具有相同特异性但区分标记的捕获相,使不同组的捕获试剂针对相同的分析物。此类实施方式可用于量化或表征在非常宽的浓度范围内出现的单一分析物。例如,可用第一组特异捕获试剂进行小样品稀释度温育,量化小浓度的分析物,而大样品稀释度温育可用具有相同特异性但具有允许与第一捕获试剂区分的不同标记的第二组捕获试剂进行。在低浓度的分析物下,以低稀释度添加的捕获试剂将提供有用的数据,而以高稀释度提供的第二组捕获试剂将示出很小至无信号并且可被忽视。在高浓度的分析物下,以低稀释度提供的第二组捕获试剂将饱和并且无法提供有用的信息 (并且因此被忽视),而以高稀释度提供的第二组捕获试剂将能够提供有用的数据。在一些实施方式中,此类特异性捕获试剂组可针对相同的分析物,但利用具有不同亲和力和/或亲合力的不同结合配偶体。

[0069] 在本发明构思的另一个实施方式中,组合的统计和数字数据分析的使用可与如上所述的逐次样品稀释结合使用,以进一步扩展测定范围。表6至Y中提供此组合方法的实例,其示例性数据使用如上文对图1A至图1G和图2描述的测定方案生成。

[0070] 表6示出对于浓度在0.00至100pg/mL范围内的IL-2,以中值荧光强度 (MFI) 形式的统计数据和以珠粒的门控%形式的数字数据两者。在此逐次样品稀释测定中,通过MFI针对IL-2提供的LDD为约11pg/mL,而在此混合形式中使用门控%提供约1pg/mL的LLD。

[0071]

[IL-2]pg/mL	MFI	门控阴性事件%
100	46.14	0.00%
33.33	23.71	8.15%
11.11	14.07	32.12%
3.70	6.98	71.83%
1.23	6.49	85.71%

0.41	6.21	94.00%
0.14	6.85	93.51%
0.05	6.32	98.61%
0.00	6.32	98.36%

[0072] 表6

[0073] 表7示出对于浓度在0.00至100pg/mL范围内的IL-1 β ,以平均荧光强度(MFI)形式的统计数据和以珠粒的门控%形式的数字数据两者。在此逐次样品稀释测定中通过MFI提供的IL-1 β 的LDD为约1pg/mL(与先前实例一致),而在此混合形式中使用门控%提供约0.1pg/mL的LLD。基于测定方案的复制和使用MFI的LDD结果,发明人认为扩展的剂量/响应曲线将复制图1A中所示的剂量/响应曲线。

[0074]

[IL-1 β]pg/mL	MFI	门控阴性事件%
100	132.16	0.00%
33.33	125.21	0.00%
11.11	57.77	0.00%
3.70	21.29	9.23%
1.23	7.04	36.75%
0.41	3.22	70.00%
0.14	2.71	85.83%
0.05	2.57	88.80%
0.00	2.04	90.68%

[0075] 表7

[0076] 表8示出对于浓度在0.00至100pg/mL范围内的IL-22,以中值荧光强度(MFI)形式的统计数据和以珠粒的门控%形式的数字数据两者。在此逐次样品稀释测定中,通过MFI提供的IL-22的LDD为约1pg/mL,而在此混合形式中使用门控%提供约0.15pg/mL的LLD。

[0077]

[IL-22]pg/mL	MFI	门控阴性事件%
100	491.37	0.00%
33.33	209.08	0.00%
11.11	88.17	9.33%
3.70	41.42	52.08%
1.23	25.95	78.16%
0.41	19.99	88.41%
0.14	15.68	93.08%
0.05	16.55	95.45%
0.00	12.41	96.23%

[0078] 表8

[0079] 表9示出对于浓度在0.00至100pg/mL范围内的IL-6,以中值荧光强度(MFI)形式的统计数据和以珠粒的门控%形式的数字数据两者。在此逐次样品稀释测定中,通过MFI提供

的IL-6的LDD为约11pg/mL(与图1G中示出的发现一致),而在此混合形式中使用门控%提供约0.1pg/mL的LLD。基于测定方案的复制和使用MFI的LDD结果,发明人认为扩展的剂量/响应曲线将复制图1G中所示的剂量/响应曲线。

[0080]

[IL-6] pg/mL	MFI	门控阴性事件%
100	173.09	0.00%
33.33	67.93	2.44%
11.11	24.36	2.53%
3.70	7.43	22.99%
1.23	2.53	72.73%
0.41	2.21	83.76%
0.14	2.04	89.58%
0.05	2.05	93.81%
0.00	12.41	94.89%

[0081] 表9

[0082] 表10示出对于浓度在0.00至13,000pg/mL范围内的CRP,以中值荧光强度(MFI)形式的统计数据。在此逐次样品稀释测定中,通过MFI提供的CRP的LDD为约6pg/mL(与图2中示出的发现一致)。

[0083]

[CRP] pg/mL	MFI
13,000	3,421.60
4,333.33	3,013.50
1,444.44	1,995.68
481.48	821.22
160.49	321.45
53.50	122.98
17.83	57.77
5.94	27.38
0.00	8.51

[0084] 表10

[0085] 应当理解,各种测定形式可利用上述的连续稀释和/或数字/统计分析方法。例如,针对生物分子(例如蛋白质、核酸等)的大多数结合/杂交测定适应于微孔板或其它排列的测试位点形式,其适于向单个离散测试位点多次添加试剂并且随后除去用过的试剂(例如通过过滤、离心、抽吸等)。在一些实施方式中,可使用微流体装置/微通道装置,其中可利用不同尺寸的流动通道来实现连续稀释。在此类实施方式中,测试位点可以为离散的且可悬浮的(即能够在测定条件下且在测定过程中悬浮在流体测试介质中),诸如微粒、胶束、乳液等。例如,初始样品稀释和与第一组测试微粒的相互作用可在提供相对低的样品稀释度的窄的小体积的通道中进行。在流动持续足以使初始复合物组形成的时间段之后,此窄的小体积通道可与宽的大体积通道接合,该宽的大体积通道携带悬浮在一定体积的稀释

剂中的附加组的测试微粒。在共同宽的大体积通道中的后续混合提供可用于量化较高浓度的分析物的相对低的样品稀释度。将此类微流体装置/微通道装置的输出偶联到流式细胞仪允许如上所述的组合的数字/统计量化。在此类实施方式中,微流体装置/微通道装置可以为单次使用装置/一次性装置;在其它实施方式中,微流体装置/微通道装置可以为旨在供两种或更多种不同样品使用的多次使用装置。

[0086] 对本领域技术人员应显而易见的是,在不脱离本文的发明构思的情况下,除已经描述的那些之外的更多修改形式是可能的。因此,除所附权利要求的精神下之外,本发明主题不受限制。此外,在解释说明书和权利要求两者时,所有术语应以与上下文一致的最广泛的方式解释。特别地,术语“包括 (comprises)”和“包括 (comprising)”应该被解释为以非排他的方式指代元件、部件或步骤,从而指示所引用的元件、部件或步骤可以存在、或被利用或与未明确引用的其它元件、部件或步骤组合。当说明书和权利要求书涉及选自A、B、C……和N的某物中的至少一个时,文本应被解释为仅需要该组中的一个要素,而不是A加N或B加N等。

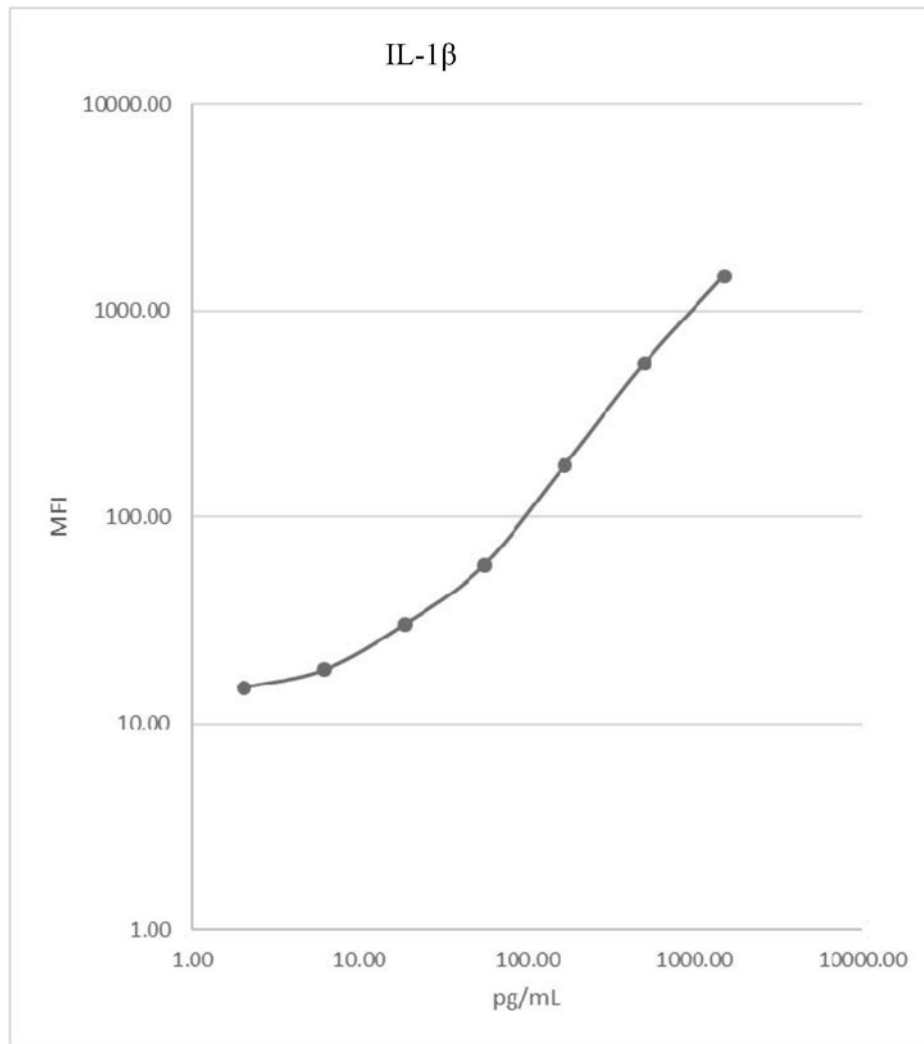
**1A**

图1A

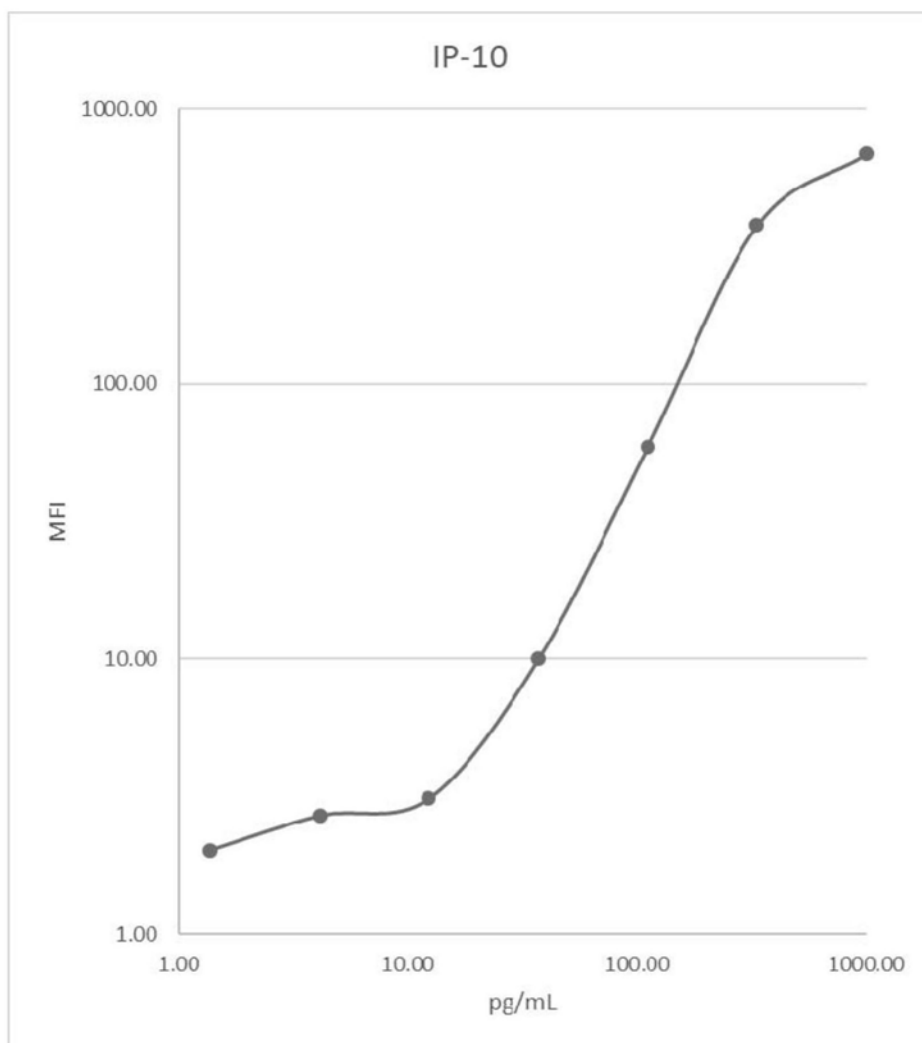


图1B

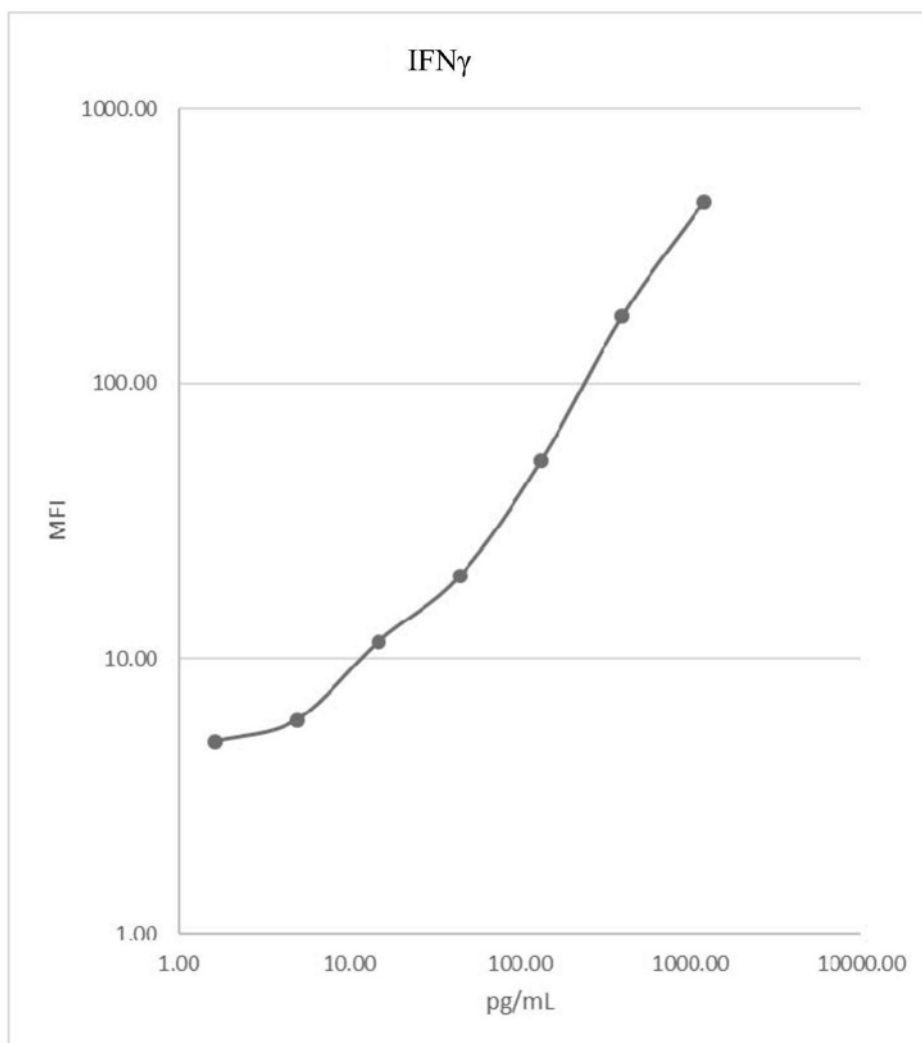


图1C

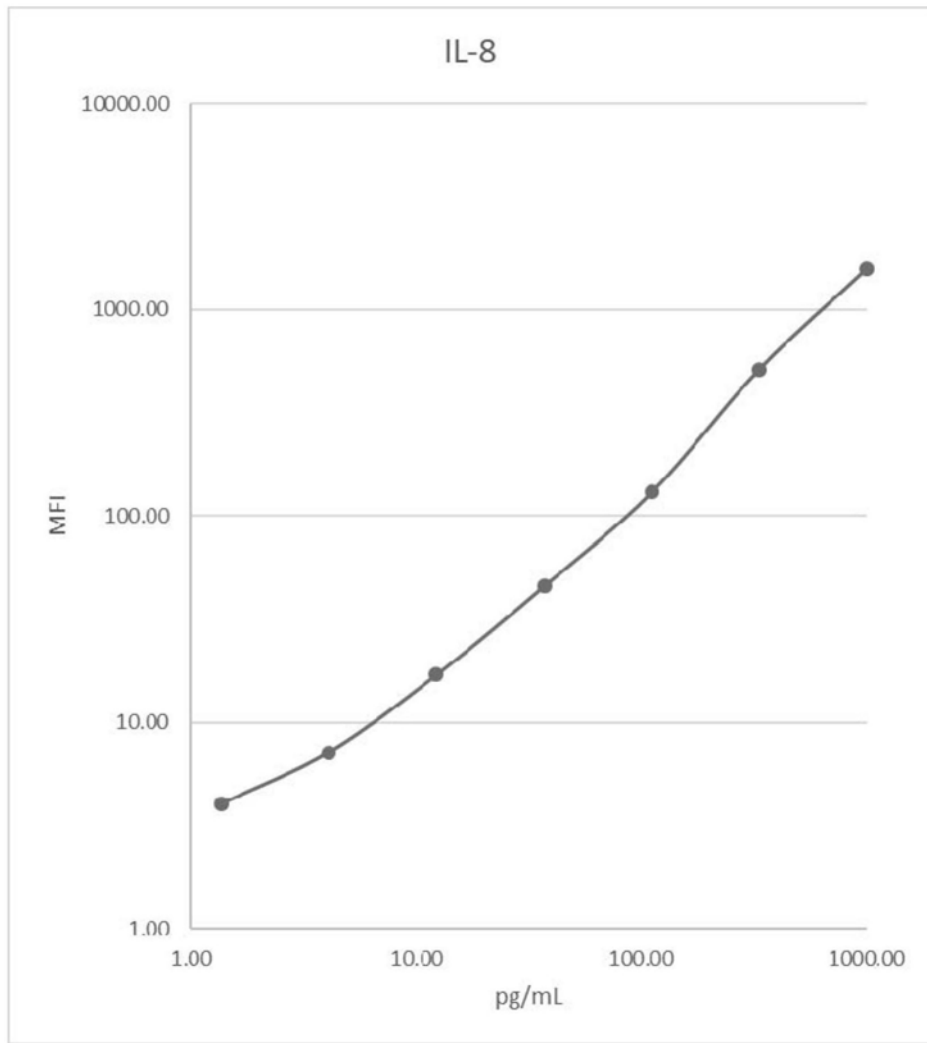


图1D

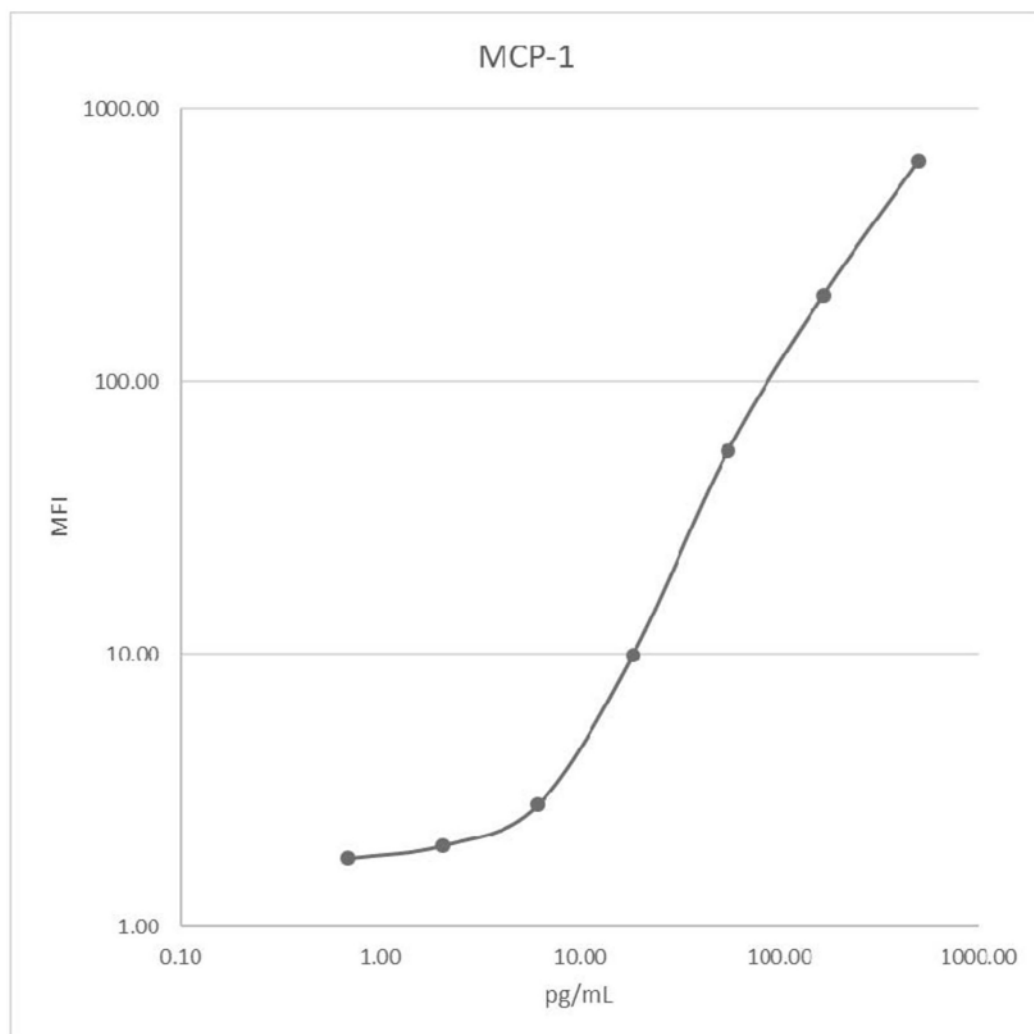


图1E

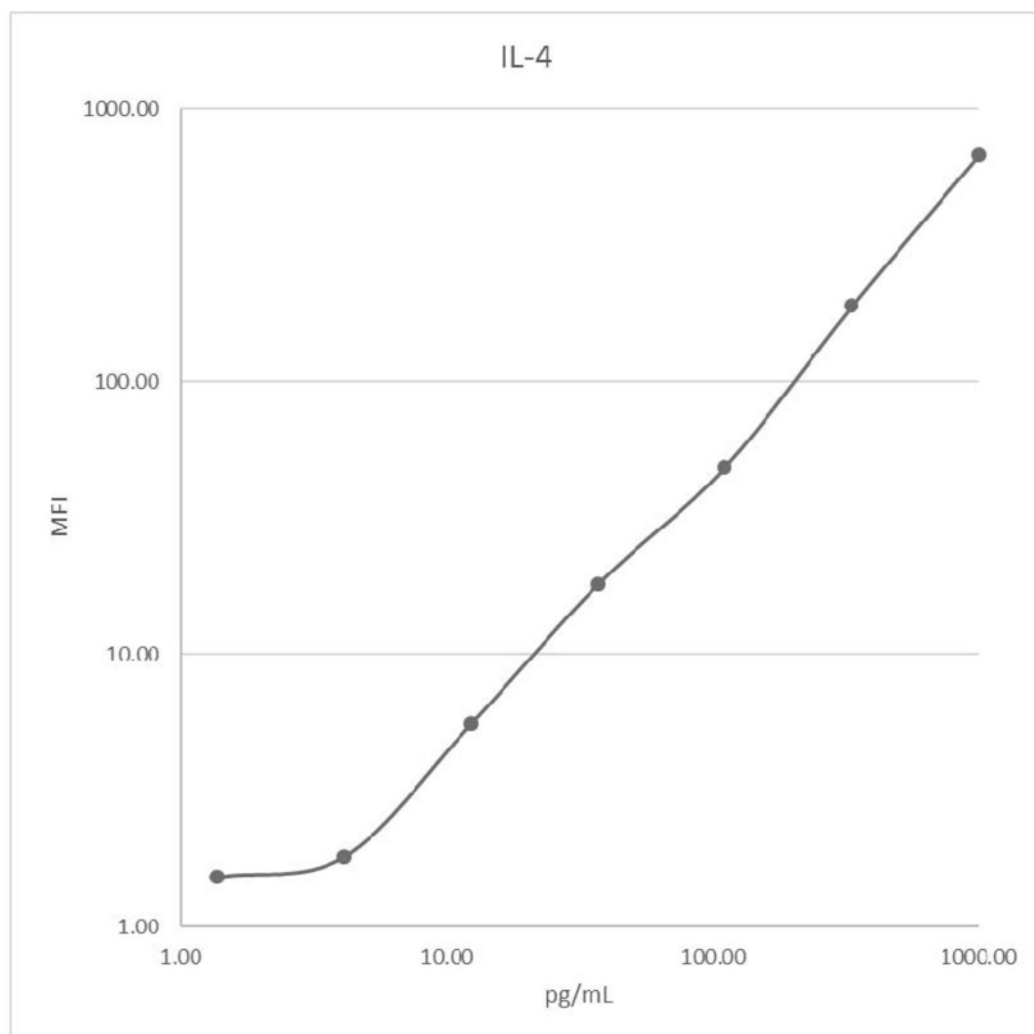


图1F

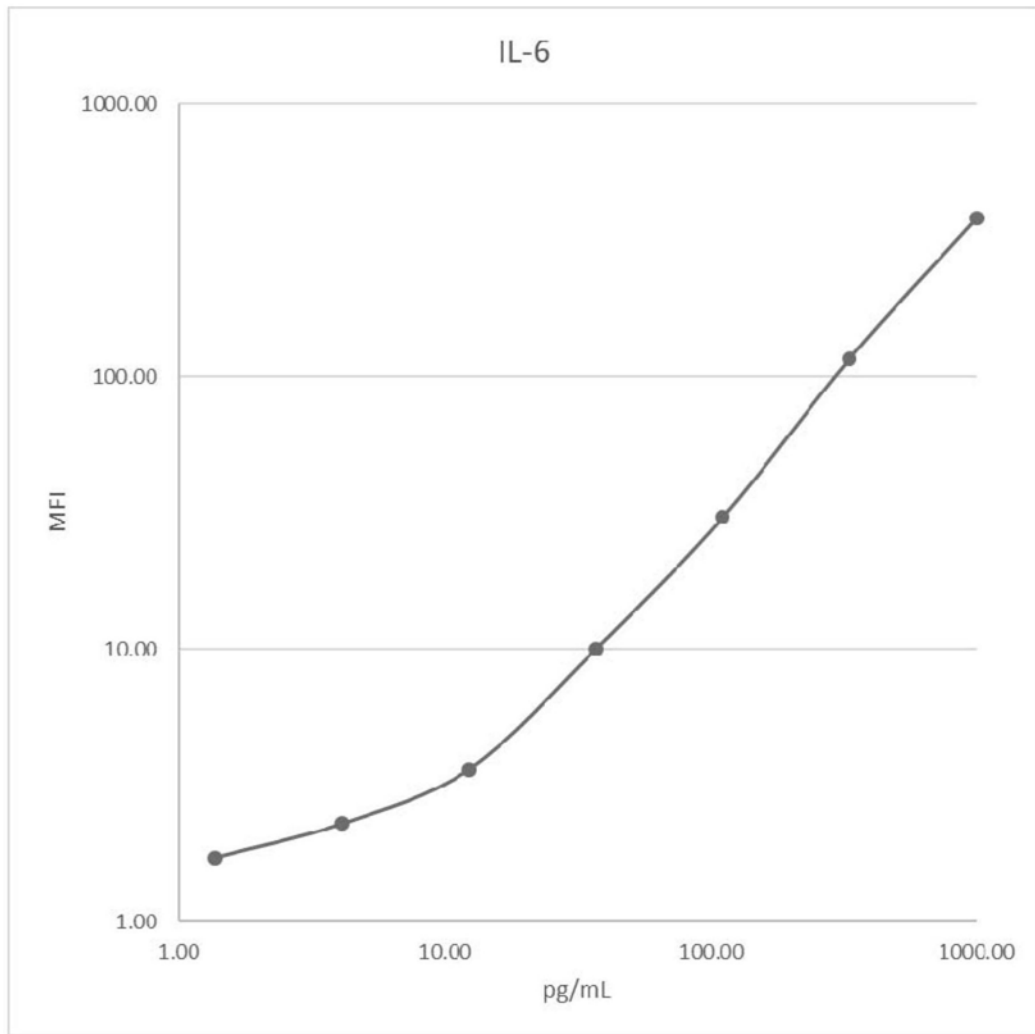


图1G

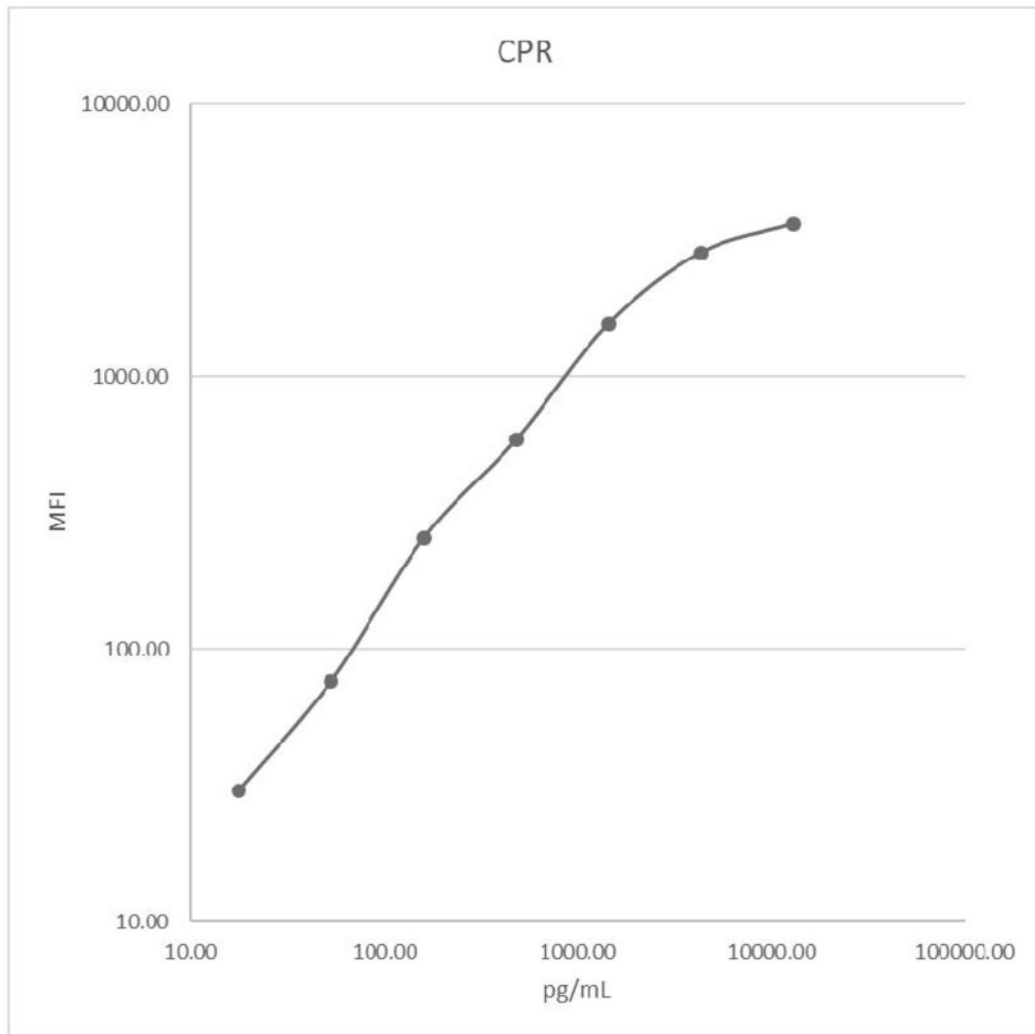


图2

专利名称(译)	用于提高生物测定动态范围的方法		
公开(公告)号	CN109459562A	公开(公告)日	2019-03-12
申请号	CN201811035838.9	申请日	2018-09-06
[标]发明人	Y·宋		
发明人	Y·宋		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 C12Q1/6837		
CPC分类号	G01N33/54386 B01L2200/027 B01L2300/0819 C12M23/16 C12M25/01 G01N33/48 C12Q1/6837 C12Q2565/629 G01N33/53		
代理人(译)	张全信 董志勇		
优先权	62/554889 2017-09-06 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的名称为用于提高生物测定动态范围的方法。提供扩展生物测定诸如免疫测定的范围的组合物和方法。在一个实施方式中，使用多个离散测试位点。收集指示存在所关注的分析物的测试位点比例的数据和为由离散测试位点群体生成的信号提供统计值的数据。聚集这些数字和统计方法的结果以提供扩展的动态范围。在另一个实施方式中，以连续方式向单个测试位点或容器提供两次或更多次试剂添加。此类添加呈现相同样品的不同稀释度的不同试剂组，并且允许在单个多重测定中同时表征高丰度分析物和低丰度分析物两者，同时避免在低样品稀释度下观察到高丰度分析物的高剂量钩状效应。可组合这些方法以提供动态范围的进一步提高。

平均荧光强度 (MFI)	门控阴性 事件%	占用率%	IL-10 的标称 浓度 (pg/mL)
327.81	0%	100%	500.00
151.25	0%	100%	166.67
56.23	0%	100%	55.56
23.93	0%	100%	18.52
7.84	0%	100%	6.17
3.02	38.20%	61.8%	2.06
1.50	62.79%	37.21%	0.69
1.60	69.88%	30.12%	0.00
1.09	89.66%	10.34%	空白