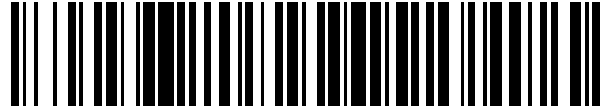


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 440**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 11730109 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2542891**

54 Título: **Detección ultrasensible de moléculas o partículas usando perlas u otros objetos de captura**

30 Prioridad:

24.03.2010 US 731130
01.03.2010 US 309141 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.08.2015

73 Titular/es:

QUANTERIX CORPORATION (100.0%)
113 Hartwell Avenue
Lexington, MA 02421, US

72 Inventor/es:

DUFFY, DAVID C.;
RISSIN, DAVID M.;
WALT, DAVID R.;
FOURNIER, DAVID y
KAN, CHEUK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 544 440 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección ultrasensible de moléculas o partículas usando perlas u otros objetos de captura

Campo de la invención

5 Se describen métodos para detectar moléculas de analitos o partículas en una muestra de fluido y, en algunos casos, determinar una medida de la concentración de las moléculas o partículas en la muestra de fluido.

Antecedentes de la invención

10 Los métodos y sistemas que son capaces de detectar rápida y exactamente y, en ciertos casos, cuantificar una molécula de analito diana en una muestra son las piedras angulares de las medidas analíticas modernas. Tales sistemas y/o métodos se emplean en muchas áreas, tales como investigación académica e industrial, evaluación medioambiental, seguridad alimentaria, diagnóstico médico, y detección de agentes de guerra química, biológica, y/o radiológica. Las características ventajosas de tales técnicas pueden incluir especificidad, velocidad, y sensibilidad.

15 La mayoría de las técnicas actuales para cuantificar niveles bajos de moléculas de analito en una muestra usan procedimientos de amplificación para incrementar el número de moléculas informadoras a fin de ser capaces de proporcionar una señal medible. Por ejemplo, estos procedimientos conocidos incluyen ensayos inmunosorbentes ligados a enzima (ELISA) para amplificar la señal en ensayos a base de anticuerpos, así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar hebras de ADN diana en ensayos a base de ADN. Una técnica de amplificación de la diana proteica más sensible pero indirecta, denominada immunoPCR (véanse Sano, T.; Smith, C. L.; Cantor, C. R. Science 1992, 258, 120-122), hace uso de marcadores oligonucleotídicos, que se pueden amplificar subsiguientemente usando PCR y se pueden detectar usando un ensayo de hibridación de ADN (véanse Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. Science 2003; 301, 1884-1886; Niemeyer, C. M.; Adler, M.; Pignataro, B.; Lenhart, S.; Gao, S.; Chi, L. F.; Fuchs, H.; Blohm, D. Nucleic Acids Research 1999, 27,4553-4561; y Zhou, H.; Fisher, R. J.; Papas, T. S. Nucleic Acids Research 1993, 21, 6038-6039). Mientras que el método de immuno-PCR permite la detección de proteínas a nivel ultra bajo, es un procedimiento de ensayo complejo, y puede ser propenso a la generación de señales positivas falsas (véase Niemeyer, C. M.; Adler, M.; Wacker, R. Trends in Biotechnology 2005, 23,208-216).

20

25

30 El documento WO 2009/029073 A1 fue señalado por la Oficina de Patente Europea como la técnica anterior más cercana durante la consecución de esta patente, y describe un método para medir la concentración de un analito o analitos en una disolución. El método descrito allí se puede llevar a cabo usando un número de diferentes formatos de ensayo, incluyendo en recipientes de reacción definidos, al menos en parte, por los extremos distales de hebras de fibras ópticas.

35 Una característica de los métodos y/o sistemas conocidos típicos para detectar o cuantificar concentraciones bajas de un analito particular en disolución es que se basan en respuestas de conjunto en las que muchas moléculas de analito dan lugar a una señal medida. La mayoría de los esquemas de detección requiere que esté presente un gran número de moléculas en el conjunto para que la señal total esté por encima del umbral de detección. Este requisito limita la sensibilidad de la mayoría de las técnicas de detección y el intervalo dinámico (es decir, el intervalo de concentraciones que se puede detectar). Muchos de los métodos y técnicas conocidos están plagados además de problemas de unión no específica, que es la unión de moléculas de analito o partículas a detectar o especies informadoras no específicamente a sitios distintos de los esperados. Esto conduce a un incremento en la señal de fondo, y por lo tanto limita la concentración más baja que se puede detectar exacta o reproduciblemente.

40 En consecuencia, se necesitan métodos mejorados para detectar y, opcionalmente, cuantificar moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido, especialmente en muestras en las que tales moléculas o partículas están presentes a concentración muy baja.

Sumario de la invención

45 Se describen aquí sistemas y métodos para detectar moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido y, en algunos casos, determinar una medida de la concentración de las moléculas o partículas en la muestra de fluido.

Se describen aquí diversos sistemas, métodos, artículos y kits para proporcionar un marco adecuado para entender la presente invención. No obstante, se entiende que la invención para la que se busca protección es aquella como se define por las reivindicaciones.

50 En una realización de la invención, un método para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido que comprende exponer una pluralidad de objetos de captura que incluyen cada uno una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula, a una disolución que contiene o que se sospecha que contiene el al menos un tipo de moléculas de analito o partículas, inmovilizar las moléculas de analito o partículas con respecto a la pluralidad de objetos de captura de manera que al menos algunos de los objetos de captura se asocian con una única molécula de analito o partícula y

55 una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura no se asocia con ninguna molécula de analito o

partícula, segregar espacialmente al menos una porción de los objetos de captura sometidos a la etapa de inmovilización en una pluralidad de localizaciones separadas, asignar al menos una porción de la pluralidad de localizaciones sometidas a la etapa de segregación espacial y determinar el número de dichas localizaciones que contienen una molécula de analito o partícula, y determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido basándose al menos en parte en el número de localizaciones que se determina que contienen una molécula de analito o partícula.

En una realización adicional de la invención, un método para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido comprende exponer una pluralidad de objetos de captura que incluyen cada uno una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula, a una disolución que contiene o que se sospecha que contiene el al menos un tipo de moléculas de analito o partículas para formar objetos de captura que comprenden al menos una molécula de analito o partícula inmovilizada, mezclar los objetos de captura preparados en la etapa de exposición con una pluralidad de ligandos de unión de manera que al menos algunos de los objetos de captura se asocian con un único ligando de unión y una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura no se asocia con ningún ligando de unión, segregar espacialmente al menos una porción de los objetos de captura sometidos a la etapa de mezclado en una pluralidad de localizaciones, asignar al menos una porción de la pluralidad de localizaciones sometidas a la etapa de segregación espacial y determinar el número de localizaciones que contienen un ligando de unión, y determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido basándose al menos en parte en el número de localizaciones que se determina que contienen un ligando de unión. cada localización asignada la presencia o ausencia de una perla y, si está presente, si la perla comprende cualesquiera moléculas de analito o partículas, y determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido al menos en parte determinando el número de localizaciones asignadas que contienen una perla que comprende al menos una molécula de analito o partícula.

En algunas realizaciones, un método para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido comprende proporcionar un sustrato que comprende una pluralidad de localizaciones, al menos una porción de las cuales contiene una perla, en el que con respecto al número total de perlas presentes en el sustrato, la relación de perlas que comprenden al menos una molécula de analito o partícula asociadas con un ligando de unión a perlas que no comprenden moléculas de analito o partículas asociadas con un ligando de unión está entre alrededor de 8:1 y alrededor de 1:10.000.000, asignar al menos una porción de la pluralidad de localizaciones, en el que durante la etapa de asignación al menos dos de la pluralidad de localizaciones se asignan al menos parcialmente de forma concurrente, detectar en cada localización asignada la presencia o ausencia de una perla y, si está presente, si la perla comprende cualesquiera moléculas de analito o partículas asociadas con un ligando de unión, y determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido al menos en parte determinando el número de localizaciones asignadas que contienen una perla que comprende al menos una molécula de analito o partícula asociada con un ligando de unión.

En algunas realizaciones, un artículo o kit comprende una pluralidad de perlas que tienen un diámetro medio entre alrededor de 0,1 micrómetros y alrededor de 100 micrómetros, y un sustrato que comprende una pluralidad de recipientes de reacción, en el que la profundidad media de los recipientes de reacción está entre alrededor de 1,0 veces y alrededor de 1,5 veces el diámetro medio de las perlas, y el diámetro medio de los recipientes de reacción está entre alrededor de 1,0 veces y alrededor de 1,9 veces el diámetro medio de las perlas.

En algunas realizaciones, un método para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido comprende exponer una pluralidad de objetos de captura que incluyen cada uno una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula, a una disolución que contiene o que se sospecha que contiene el al menos un tipo de moléculas de analito o partículas, en el que al menos algunos de los objetos de captura se asocian con al menos una molécula de analito o partícula, mezclar la pluralidad de objetos de captura preparados en la etapa de exposición con una pluralidad de ligandos de unión que comprenden un componente enzimático de manera que una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura asociados con al menos una molécula de analito o partícula se asocia con un único ligando de unión, segregar espacialmente al menos una porción de los objetos de captura sometidos a la etapa de mezclado en una pluralidad de localizaciones separadas, determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido basándose al menos en parte en la asignación de al menos una porción de la pluralidad de localizaciones sometidas a la etapa de segregación espacial para determinar la presencia del componente enzimático o un producto de una reacción que implica el componente enzimático.

En algunas realizaciones, un método para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido comprende inmovilizar una pluralidad de moléculas de analito o partículas con respecto a una pluralidad de perlas, segregar espacialmente al menos una porción de la pluralidad de perlas en una pluralidad de localizaciones separadas, y asignar al menos algunas de la pluralidad de localizaciones y determinar el número de localizaciones que contienen una perla, y determinar adicionalmente el número de dichas localizaciones que contienen una perla y una molécula de analito o partícula, y determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido basándose al menos en parte en la relación del número de localizaciones que contienen una perla y una molécula de analito o partícula al número de localizaciones que contienen una perla.

5 En algunas realizaciones, un método para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido comprende inmovilizar una pluralidad de moléculas de analito o partículas con respecto a una pluralidad de perlas, segregar espacialmente al menos una porción de la pluralidad de perlas en una pluralidad de localizaciones separadas, asignar al menos algunas de la pluralidad de localizaciones y determinar el número de localizaciones que contienen una perla, determinar además el número de dichas localizaciones que contienen una perla y una molécula de analito o partícula, y determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido basándose al menos en parte en la relación del número de localizaciones que contienen una perla y una molécula de analito o partícula al número de localizaciones que contienen una perla pero que no contienen ninguna molécula de analito o partícula.

10 En algunas realizaciones, un método para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido comprende proporcionar una pluralidad de objetos de captura que están asociados cada uno con una única molécula de analito o partícula o están libres de cualquier molécula de analito o partículas, asignar individualmente al menos una porción de los objetos de captura y determinar el número de dichos objetos de captura asociados con una molécula de analito o partícula, y determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido basándose al menos en parte en el número de

Breve descripción de los dibujos

20 Otros aspectos, realizaciones, y características de la invención serán manifiestos a partir de la siguiente descripción detallada cuando se considera junto con los dibujos que se acompañan. Las figuras que se acompañan son esquemáticas y no pretenden estar dibujadas a escala. Para los fines de claridad, cada componente no está etiquetado en cada figura, ni cada componente de cada realización de la invención se muestra cuando la ilustración no es necesaria para permitir a aquellos de pericia normal en la técnica comprender la invención.

La FIG. 1 es un diagrama de flujo esquemático que representa una realización de las etapas (A-D) para llevar a cabo un método ejemplar de la presente invención;

25 la FIG. 2 es un diagrama de flujo esquemático que representa una realización de las etapas (A-D) para llevar a cabo un método ejemplar de la presente invención;

la FIG. 3 es un diagrama esquemático que representa una realización de una porción de un método de la presente invención;

la FIG. 4A es un diagrama de flujo esquemático que representa una realización de las etapas (A-C) para llevar a cabo un método ejemplar de la presente invención;

30 la FIG. 4B es un diagrama de flujo esquemático que representa una realización de las etapas (A-D) para llevar a cabo un método ejemplar de la presente invención

la FIG. 4C es un diagrama esquemático que representa una realización para llevar a cabo un método ejemplar de la presente invención;

35 la FIG. 5 es un diagrama de flujo esquemático que representa una realización de las etapas (A-C) para llevar a cabo un método ejemplar de la presente invención;

la FIG. 6 es un diagrama de flujo esquemático que representa una realización de un método (etapas A-D) para la formación de una pluralidad de recipientes de reacción a través del emparejamiento de un sustrato y un componente sellante, y que representa ejemplos del tamaño (E, F) de un componente sellante con respecto a un sustrato;

40 la FIG. 7 representa un montaje experimental para la detección usando luz, según una realización de la presente invención;

la FIG. 8 muestra una matriz óptica de fibras que se ha sellado con un componente sellante, según una realización;

45 la FIG. 9A muestra un diagrama esquemático que representa un método para detectar indirectamente una molécula de analito asociada con un objeto de captura, según algunas realizaciones;

la FIG. 9B muestra un diagrama esquemático que representa un método para detectar indirectamente una molécula de analito inmovilizada con respecto a un objeto de captura usando un ligando de unión, según algunas realizaciones;

50 las FIGS. 10A y 10B muestran diagramas esquemáticos que representan algunas realizaciones de etapas para reticular un ligando de unión y una molécula de analito, según algunos métodos de la presente invención;

las FIGS. 11A y 11B muestran ejemplos no limitantes de un sistema que emplea un sistema de detección

óptico de la presente invención según algunas realizaciones;

la FIG. 12 es un diagrama de bloques esquemático que muestra un sistema que emplea un ensamblaje óptico de fibras con un sistema de detección óptico según una realización de la invención;

5 la FIG. 13 muestra una gráfica de una curva de calibración esquemática que se puede usar para determinar la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido, según algunas realizaciones de la presente invención;

la FIG. 14 muestra gráficas de la fracción de objetos de captura que se determina que están asociados con una molécula de analito que comprende A) PSA, B) TNF-alfa, o C) ADN, frente a la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido, según una realización ejemplar;

10 la FIG. 15 muestra una gráfica del logaritmo de la fracción de objetos de captura que se determina que están asociados con una molécula de analito frente al logaritmo de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido, según una realización ejemplar;

la FIG. 16 muestra una gráfica del número de recipientes de reacción que comprenden una perla frente al número total de perlas proporcionadas a los recipientes de reacción, según una realización no limitante;

15 las FIGS. 17A-17C muestran imágenes no limitantes de perlas contenidas en matrices que comprenden una pluralidad de recipientes de reacción;

la FIG. 18A muestra una imagen de fluorescencia no limitante de una matriz que contiene perlas,

la FIG. 18B muestra un aumento de la imagen de la FIG. 18A;

20 las FIGS. 19A y 19B muestran gráficas del número de recipientes de reacción que se determina que contienen una molécula de analito frente a la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido, según ciertas realizaciones;

la FIG. 19C muestra una gráfica de la lectura de fluorescencia total frente a la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido, según una realización ejemplar;

25 la FIG. 20 muestra una gráfica del % de Ruido de Poisson frente a la varianza experimental a lo largo de tres medidas de los datos experimentales mostrados en la FIG. 19B;

la FIG. 21 muestra una gráfica de la fracción de objetos de captura que se determina que están asociados con una molécula de analito frente a la concentración de ligando de unión proporcionado, a dos concentraciones de moléculas de analito, según una realización ejemplar;

30 la FIG. 22 muestra una gráfica de la fracción de objetos de captura que se determina que están asociados con una molécula de analito frente a la concentración de ligando de unión por objeto de captura proporcionado, a dos concentraciones de moléculas de analito, según una realización ejemplar;

la FIG. 23 muestra una gráfica de la fracción de objetos de captura que se determina que están asociados con una molécula de analito frente a la concentración de ligando de unión proporcionado, a dos concentraciones de moléculas de analito, según una realización ejemplar;

35 la FIG. 24 muestra una gráfica de la quimioluminiscencia total frente a la concentración de ligando de unión proporcionado, según una realización ejemplar;

la FIG. 25A y 25B muestran diagramas esquemáticos que representan una realización de etapas para llevar a cabo un método de la presente invención;

40 la FIG. 25C muestra una imagen de perlas contenidas en una pluralidad de recipientes de reacción, según una realización ejemplar;

la FIG. 25D muestra una imagen de fluorescencia de una matriz que comprende una pluralidad de perlas, algunas de las cuales están asociadas con una molécula de analito tras llevar a cabo un método de la presente invención, según una realización ejemplar;

45 la Fig. 26 muestra una gráfica de la densidad óptica frente a la concentración de TNF-alfa, según una realización ejemplar;

la FIG. 27 muestra una gráfica de la concentración de PSA determinada para una pluralidad de sujetos humanos;

la FIG. 28 muestra un histograma de la intensidad de fluorescencia media de recipientes de reacción en un método de ensayo, según una realización de la presente invención;

la FIG. 29A muestra una imagen de fluorescencia tomada a una primera longitud de onda de una porción de una matriz de recipientes de reacción que contienen perlas;

la FIG. 29B es una imagen de fluorescencia tomada a la primera longitud de onda de una porción de una matriz de recipientes de reacción que contienen perlas, en el que las perlas están asociadas con entidades fluorescentes;

la FIG. 29C es una imagen de fluorescencia de una porción de la matriz de la FIG. 29B tomada a una segunda longitud de onda;

la FIG. 29D muestra una gráfica de (i) perlas y (ii) perlas asociadas con entidades fluorescentes, a concentraciones variables de moléculas de analito;

las FIGS. 30A y 30B muestran gráficas de disociación de inmunocomplejos a lo largo del tiempo, según algunas realizaciones;

la FIG. 31 muestra una gráfica de moléculas de analito promedio por perla frente a la concentración de moléculas de analito, según algunas realizaciones.

Descripción detallada

Se describen aquí sistemas y métodos que en ciertas realizaciones se pueden emplear para la detección y/o cuantificación de moléculas de analito, partículas (tales como, por ejemplo, células, orgánulos celulares y otros materiales en partículas biológicos o no biológicos), y similares, en una muestra. Se debería entender que, aunque gran parte de la discusión más abajo se refiere a moléculas de analito, esto es solamente a título de ejemplo, y se pueden detectar y/o cuantificar otros materiales, por ejemplo analitos en forma de partículas. Se describen aquí algunas moléculas de analito y partículas ejemplares.

Los métodos de la presente invención pueden ayudar en ciertos casos a reducir los efectos negativos de la unión no específica sobre la sensibilidad de la detección cuando se comparan con sistemas y métodos convencionales típicos para llevar a cabo ensayos similares. La unión no específica es la unión o asociación de una manera no específica de un componente de un ensayo con otro componente del ensayo con el que no es deseable que interactúe. Por ejemplo, la asociación, unión o inmovilización de un ligando de unión con un sustrato o material de ensayo en oposición a con una molécula de analito o partícula para la que tiene especificidad de unión. La unión no específica puede conducir a señales positivas falsas. La unión no específica puede afectar no solamente a la exactitud de la medición del ensayo, sino también puede limitar el nivel más bajo de detección. Por lo tanto, ciertos métodos de la presente invención que proporcionan mejoras en el nivel de la unión no específica pueden permitir la detección y/o cuantificación de moléculas de analito en una muestra a un límite de detección menor en comparación con tecnologías convencionales típicas. Además, ciertas realizaciones de los métodos de la presente invención pueden permitir también la detección y/o cuantificación de moléculas de analito en ciertas muestras en las que tales moléculas de analito han sido previamente indetectadas y/o no cuantificables debido a la concentración muy baja en la que están presentes.

Ciertos métodos de la presente invención pueden ser útiles para caracterizar moléculas de analito en una muestra. En algunos casos, los métodos pueden ser útiles para detectar y/o cuantificar moléculas de analito en una muestra de fluido que se sospecha que contiene al menos un tipo de molécula de analito, puesto que, como se explica con más detalle más abajo, los ensayos de la invención se pueden diseñar de manera que el número (o equivalentemente fracción) de localizaciones interrogadas (por ejemplo, pocillos, sitios de reacción, áreas sobre una superficie, etc.) que contienen un objeto de captura (por ejemplo, perla, superficie, etc., que proporciona una superficie de captura) que comprende una molécula de analito – o, más generalmente, el número o fracción de objetos de captura interrogados de una población interrogada total que comprende una molécula de analito – se puede correlacionar con la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido. Ciertas realizaciones de la presente invención pueden proporcionar así una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido basándose al menos en parte en el número o fracción de localizaciones, por ejemplo en un sustrato, que contienen un objeto de captura asociado con una molécula de analito. En algunos casos, este número/fracción se puede relacionar con el número total de localizaciones que comprenden un objeto de captura (por ejemplo, con o sin una molécula de analito o agente de marcaje asociado) y/o con el número total de localizaciones interrogadas. Más abajo se discuten métodos específicos y cálculos de cómo cuantificar moléculas de analito en una muestra de fluido usando realizaciones de la invención.

En ciertas realizaciones, un método para detectar y/o cuantificar moléculas de analito (o partículas) en una muestra comprende inmovilizar una pluralidad de moléculas de analito con respecto a una pluralidad de objetos de captura que incluyen cada uno una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito (o partícula). Por ejemplo, los objetos de captura pueden comprender una pluralidad de perlas que comprenden una pluralidad de componentes de captura (por ejemplo, un anticuerpo que tiene afinidad específica por una molécula de analito de interés, etc.). Al menos algunos de los objetos de captura (por ejemplo, al menos algunos asociados con al menos una molécula de analito) se pueden separar/segregar espacialmente en una pluralidad de localizaciones, y al menos algunas de las localizaciones se pueden asignar/interrogar. Una medida de la concentración de moléculas

de analito en la muestra de fluido se puede determinar basándose en la información recibida cuando se asignan las localizaciones. En algunos casos, una medida de la concentración se puede basar al menos en parte en el número de localizaciones que se determina que contienen un objeto de captura que está o estaba asociado con al menos una molécula de analito. En otros casos y/o en condiciones diferentes, una medida de la concentración se puede basar al menos en parte en un nivel de intensidad de al menos una señal indicativa de la presencia de una pluralidad de moléculas de analito y/u objetos de captura asociados con una molécula de analito en una o más de las localizaciones asignadas.

En algunas realizaciones, también se puede determinar el número/fracción de localizaciones que contienen un objeto de captura pero que no contienen una molécula de analito, y/o también se puede determinar el número/fracción de localizaciones que no contienen ningún objeto de captura. En tales realizaciones, una medida de la concentración de molécula de analito en la muestra de fluido se puede basar al menos en parte en la relación del número de localizaciones que se determina que contienen un objeto de captura asociado con una molécula de analito al número total de localizaciones que se determina que contienen un objeto de captura no asociado con una molécula de analito, y/o una medida de la concentración de molécula de analito en la muestra de fluido se puede basar al menos en parte en la relación del número de localizaciones que se determina que contienen un objeto de captura asociado con una molécula de analito al número de localizaciones que se determina que no contienen ningún objeto de captura. En todavía otras realizaciones, una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se puede basar al menos en parte en la relación del número de localizaciones que se determina que contienen un objeto de captura y una molécula de analito al número total de localizaciones asignadas y/o analizadas.

En ciertas realizaciones, al menos algunos de la pluralidad de objetos de captura (por ejemplo, al menos algunos asociados con al menos una molécula de analito) están separados espacialmente en una pluralidad de localizaciones, por ejemplo una pluralidad de vasos de reacción en un formato de matriz. La pluralidad de vasos de reacción se puede formar en, sobre y/o de cualquier material adecuado, y en algunos casos, los vasos de reacción se pueden sellar o se pueden formar al emparejar un sustrato con un componente sellante, como se discute con más detalle más abajo. En ciertas realizaciones, especialmente cuando se desea la cuantificación de los objetos de captura asociados con al menos una molécula de analito, el reparto de los objetos de captura se puede realizar de manera que algunos (por ejemplo, una fracción estadísticamente significativa) de los vasos de reacción comprenden al menos uno o, en ciertos casos, solamente un objeto de captura asociado con al menos una molécula de analito, y al menos algunos (por ejemplo, una fracción estadísticamente significativa) de los vasos de reacción comprendan un objeto de captura no asociado con ninguna molécula de analito. Los objetos de captura asociados con al menos una molécula de analito se pueden cuantificar en ciertas realizaciones, permitiendo de ese modo la detección y/o cuantificación de moléculas de analito en la muestra de fluido mediante técnicas descritas con más detalle aquí.

Una realización ejemplar de un método de ensayo de la invención se ilustra en la FIG. 1. Se proporciona una pluralidad de objetos de captura 2 (etapa (A)). En este ejemplo particular, la pluralidad de objetos de captura comprende una pluralidad de perlas. Las perlas se exponen a una muestra de fluido que contiene una pluralidad de moléculas 3 de analito (por ejemplo, las perlas 2 se incuban con moléculas 3 de analito). Al menos algunas de las moléculas de analito se inmovilizan con respecto a una perla. En este ejemplo, las moléculas de analito se proporcionan de una manera (por ejemplo, a una concentración) de manera que una fracción estadísticamente significativa de las perlas se asocia con una única molécula de analito, y una fracción estadísticamente significativa de las perlas no se asocia con ninguna molécula de analito. Por ejemplo, como se muestra en la etapa (B), la molécula 4 de analito se inmoviliza con respecto a la perla 5, formando de ese modo el complejo 6, mientras que algunas perlas 7 no se asocian con ninguna molécula de analito. Se debería entender que, en algunas realizaciones, más de una molécula de analito se puede asociar con al menos algunas de las perlas, como se describe aquí. Al menos algunas de la pluralidad de perlas (por ejemplo, aquellas asociadas con una única molécula de analito o no asociadas con ninguna molécula de analito) se pueden separar/segregar espacialmente en una pluralidad de localizaciones. Como se muestra en la etapa (C), la pluralidad de localizaciones se ilustra como sustrato 8 que comprende una pluralidad de pocillos/vasos de reacción 9. En este ejemplo, cada vaso de reacción comprende ninguna o una perla. Al menos algunos de los vasos de reacción se pueden asignar (por ejemplo, ópticamente o vía otros medios de detección) para determinar el número de localizaciones que contienen una molécula de analito. Por ejemplo, como se muestra en la etapa (D), la pluralidad de vasos de reacción se interrogan ópticamente usando la fuente de luz 15, en la que cada vaso de reacción se expone a radiación electromagnética (representada por las flechas 10) procedente de la fuente de luz 15. La luz emitida (representada por las flechas 11) procedente de cada vaso de reacción se determina (y/o registra) mediante el detector 15 (en este ejemplo, alojado en el mismo sistema que la fuente de luz 15). El número de vasos de reacción que contienen una molécula de analito (por ejemplo, vasos de reacción 12) se determina en base a la luz detectada procedente de los vasos de reacción. En algunos casos, también se puede determinar el número de vasos de reacción que contienen una perla no asociada con una molécula de analito (por ejemplo, vaso de reacción 13), el número de pocillos que no contienen una perla (por ejemplo, vaso de reacción 14) y/o el número total de pocillos asignados. Tal determinación o determinaciones se pueden usar entonces para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido.

Una fracción estadísticamente significativa de objetos de captura que contienen al menos una molécula de analito (o ninguna molécula de analito) será capaz típicamente de ser detectada de forma reproducible y cuantificada usando

un sistema particular de detección, y estará típicamente por encima del ruido de fondo (por ejemplo, unión no específica) que se determina cuando se lleva a cabo el ensayo con una muestra que no contiene ninguna molécula de analito, dividido entre el número total de objetos (o localizaciones) asignados. Una "fracción estadísticamente significativa", como se usa aquí para las presentes realizaciones, se puede estimar según la Ecuación 1:

$$n \geq 3\sqrt{n} \quad (\text{Ec. 1})$$

5 en la que n es el número de sucesos determinados para una categoría de sucesos asignada. Esto es, una fracción estadísticamente significativa se produce cuando el número de sucesos es mayor que tres veces la raíz cuadrada del número de sucesos. Por ejemplo, para determinar una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura no asociados con ninguna molécula de analito o partícula, n es el número de objetos de captura detectados
10 que no están asociados con ninguna molécula de analito o partícula. Como otro ejemplo, para determinar una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura asociados con al menos una molécula de analito, n es el número de objetos de captura detectados que se determina que están asociados con una molécula de analito.

15 En algunas realizaciones, la fracción estadísticamente significativa de objetos de captura (por ejemplo, perlas) asociados con al menos una molécula de analito (o una única molécula de analito en algunos casos en los que la relación de mezclamiento de objetos de captura a moléculas de analito conduciría, estadísticamente, solamente a
20 cero o una molécula de analito asociada con cada objeto de captura) al número total de objetos de captura (por ejemplo, perlas) es menor que 1:2, menor que alrededor de 1:3, menor que alrededor de 1:4, es menor que alrededor de 2:5, menor que alrededor de 1:5, menor que alrededor de 1:10, menor que alrededor de 1:20, menor que alrededor de 1:100, menor que alrededor de 1:200, o menor que alrededor de 1:500. Por lo tanto, en tales realizaciones, la fracción de objetos de captura (por ejemplo, perlas) no asociados con ninguna molécula de analito al número total de objetos de captura (por ejemplo, perlas) es al menos alrededor de 1:100, alrededor de 1:50, alrededor de 1:20, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 20:1, alrededor de 50:1, alrededor de 100:1, o similar.

25 En algunas realizaciones, el porcentaje de objetos de captura (por ejemplo, perlas) asociados con al menos una molécula de analito (o una única molécula de analito en algunos casos en los que la relación de mezclamiento de objetos de captura a moléculas de analito conduciría, estadísticamente, a solamente cero o una molécula de analito asociada con cada objeto de captura) es menor que alrededor de 50%, menor que alrededor de 40%, menor que
30 alrededor de 30%, menor que alrededor de 20%, menor que alrededor de 10%, menor que alrededor de 5%, menor que alrededor de 2%, menor que alrededor de 1%, menor que alrededor de 0,5%, menor que alrededor de 0,01%, o similar, el número total de objetos de captura. En algunas realizaciones, el porcentaje de objetos de captura (por ejemplo, perlas) no asociados con una molécula de analito al número total de objetos de captura (por ejemplo, perlas) es al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 98%, o similar, el número total de objetos de captura.

35 En algunas realizaciones, antes de separar espacialmente la pluralidad de objetos de captura, los objetos de captura se pueden exponer a una pluralidad de ligandos de unión que tienen una afinidad por al menos un tipo de molécula de analito (o partícula). Un "ligando de unión", como se usa aquí, es cualquier molécula, partícula, o similar, que se une específicamente a o se asocia específicamente de otro modo con una molécula de analito para ayudar en la
40 detección de la molécula de analito. Los ligandos de unión pueden ser particularmente útiles en realizaciones en las que al menos algunos de los objetos de captura están asociados con respecto a más de una molécula de analito (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, o más, moléculas de analito). En algunos casos, el ligando de unión se puede proporcionar de una manera (por ejemplo, a un nivel de concentración) tal que una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura que comprenden al menos una molécula de analito se asocien con al menos
45 un ligando de unión (o en algunos casos, un único ligando de unión), y una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura (por ejemplo, objetos de captura asociados con al menos una molécula de analito o no asociados con ninguna molécula de analito) no se asocien con ningún ligando de unión.

50 Una fracción estadísticamente significativa de las localizaciones que contienen un objeto de captura (por ejemplo, perla) asociado con al menos una molécula de analito y un único ligando de unión es mayor o igual al número mínimo de localizaciones que se puede determinar reproduciblemente que contienen un objeto de captura (por ejemplo, perla) asociado con un único ligando de unión con un sistema particular de detección (es decir, se obtienen resultados sustancialmente similares para múltiples muestras de fluido esencialmente idénticas que comprenden los
55 objetos de captura asociados con una molécula de analito y/o ligando de unión) y que está por encima del ruido de fondo (por ejemplo, unión no específica) que se determina cuando se lleva a cabo el ensayo con una muestra que no contiene ninguna molécula de analito y/o ligandos de unión, dividido entre el número total de localizaciones. La fracción estadísticamente significativa de localizaciones que contienen un objeto de captura asociado con al menos una molécula de analito y un único ligando de unión se puede determinar según la Ecuación 1. La relación del número de objetos de captura a moléculas de analito y/o ligandos de unión que se pueden proporcionar de manera que sustancialmente todos los objetos de captura se asocian con ninguna o con una única molécula de analito se
60 puede calcular usando el ajuste a una distribución de Poisson, como se describe aquí.

En algunas realizaciones, la fracción estadísticamente significativa de objetos de captura (por ejemplo, perlas) asociados con al menos una molécula de analito y al menos un ligando de unión al número total de objetos de captura (por ejemplo, perlas) es menor que alrededor de 1:2, menor que alrededor de 1:3, menor que alrededor de 1:4, es menor que alrededor de 2:5, menor que alrededor de 1:5, menor que alrededor de 1:10, menor que alrededor de 1:20, menor que alrededor de 1:100, menor que alrededor de 1:200, o menor que alrededor de 1:500. En algunos casos, la fracción estadísticamente significativa de objetos de captura (por ejemplo, perlas) no asociados con ningún ligando de unión al número total de objetos de captura es al menos alrededor de 1:100, alrededor de 1:50, alrededor de 1:20, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:4, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, alrededor de 2:1, alrededor de 3:1, alrededor de 4:1, alrededor de 5:1, alrededor de 10:1, alrededor de 20:1, alrededor de 50:1, alrededor de 100:1, o similar.

En algunas realizaciones, el porcentaje de objetos de captura (por ejemplo, perlas) asociados con al menos una molécula de analito y al menos un ligando de unión al número total de objetos de captura (por ejemplo, perlas) es menor que alrededor de 50%, menor que alrededor de 40%, menor que alrededor de 30%, menor que alrededor de 20%, menor que alrededor de 10%, menor que alrededor de 5%, menor que alrededor de 2%, menor que alrededor de 1%, menor que alrededor de 0,5%, menor que alrededor de 0,01%, o menos. En algunas realizaciones, el porcentaje de objetos de captura (por ejemplo, perlas) no asociados con ningún ligando de unión al número total de objetos de captura es al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 98%, o mayor.

Un ejemplo no limitante de una realización en la que un objeto de captura está asociado con más de una molécula de analito se ilustra en la FIG. 2. Se proporciona una pluralidad de objetos de captura 20 (etapa (A)). En este ejemplo, la pluralidad de objetos de captura comprende una pluralidad de perlas. La pluralidad de perlas se expone a una muestra de fluido que contiene una pluralidad de moléculas de analito 21 (por ejemplo, las perlas 20 se incuban con moléculas de analito 21). Al menos algunas de las moléculas de analito se inmovilizan con respecto a una perla. Por ejemplo, como se muestra en la etapa (B), la molécula de analito 22 se inmoviliza con respecto a la perla 24, formando de ese modo el complejo 26. También se ilustra el complejo 30, que comprende una perla inmovilizada con respecto a tres moléculas de analito, y el complejo 32 que comprende una perla inmovilizada con respecto a dos moléculas de analito. Adicionalmente, en algunos casos, algunas de las perlas pueden no asociarse con ninguna molécula de analito (por ejemplo, la perla 28). La pluralidad de perlas de la etapa (B) se expone a una pluralidad de ligandos de unión 31. Como se muestra en la etapa (C), un ligando de unión se asocia con algunas de las moléculas de analito inmovilizadas con respecto a una perla. Por ejemplo, el complejo 40 comprende la perla 34, la molécula de analito 36, y el ligando de unión 38. Los ligandos de unión se proporcionan de manera que una fracción estadísticamente significativa de las perlas que comprenden al menos una molécula de analito se asocia con al menos un ligando de unión (por ejemplo, uno, dos, tres, etc.), y una fracción estadísticamente significativa (es decir, según se determina mediante la Ecuación 1 anterior) de las perlas que comprenden al menos una molécula de analito no se asocia con ningún ligando de unión. Al menos una porción de la pluralidad de perlas de la etapa (C) se separa entonces espacialmente en una pluralidad de localizaciones. Como se muestra en la etapa (D), en este ejemplo, las localizaciones comprenden una pluralidad de recipientes de reacción 41 en un sustrato 42. La pluralidad de recipientes de reacción se puede exponer a la pluralidad de perlas de la etapa (C) de manera que cada recipiente de reacción no contiene ninguna perla o contiene una perla. El sustrato se puede analizar entonces para determinar el número de recipientes de reacción que contienen un ligando de unión (por ejemplo, recipientes de reacción 43), en el que el número se puede relacionar con una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido. En algunos casos, también se puede determinar el número de recipientes de reacción que contienen una perla y que no contienen un ligando de unión (por ejemplo, recipiente de reacción 44), el número de recipientes de reacción que no contienen una perla (por ejemplo, recipiente de reacción 45), y/o el número total de recipientes de reacción asignados/analizados. Tal determinación o determinaciones se pueden usar entonces para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido.

Los métodos ejemplares anteriores se pueden llevar a cabo usando un número de diferentes formatos de ensayo, diferentes condiciones de reacción, y/o sistemas de detección en diferentes realizaciones de la invención, varios de cuyos ejemplos se describen más abajo. Se pueden utilizar componentes adicionales y/o etapas del método como un sustituto para y/o en combinación con los métodos y componentes ejemplares descritos aquí dentro del alcance de la invención. Se debería entender que aunque parte de la discusión aquí se centra en una pluralidad de localizaciones que comprenden una pluralidad de pocillos/recipientes de reacción en un sustrato, esto de ningún modo es limitante, y se pueden usar otros materiales para segregar objetos de captura/moléculas en una pluralidad de localizaciones espacialmente distintas (por ejemplo, regiones en/sobre un hidrogel, puntos/regiones sobre la superficie de un sustrato plano, etc.). Como otro ejemplo, aunque gran parte de la discusión aquí se centra en una pluralidad de objetos de captura que comprenden una pluralidad de perlas, esto de ningún modo es limitante, y en otras realizaciones los objetos de captura pueden tomar otras formas físicas (por ejemplo, nanotubos, discos, anillos, gotitas microfluídicas, etc.).

Formatos de ensayo ejemplares

Los ensayos de la invención se pueden llevar a cabo según una amplia variedad de protocolos y formatos básicos. El formato particular escogido se puede basar en la naturaleza de las moléculas de analito, la naturaleza de la

muestra de fluido que contiene las moléculas de analito, y la disponibilidad y propiedades de parejas de unión del analito, así como otros factores. Previamente se discutieron en el contexto de la discusión de las FIGS. 1-2 varios formatos básicos ejemplares. Como será manifiesto para aquellos expertos en la técnica con el beneficio de las enseñanzas proporcionadas por la presente descripción, la invención se puede llevar a cabo como alternativa según protocolos/formatos no descritos específicamente en las realizaciones ejemplares específicas ilustradas en esta descripción detallada, pero que no requieren experimentación o carga innecesaria para la práctica.

Como se describe anteriormente, un formato/protocolo de ensayo básico ejemplar comprende exponer una pluralidad de objetos de captura (por ejemplo, perlas) configurados para capturar una molécula de analito o partícula a una muestra que contiene o que se sospecha que contiene tales moléculas de analito (o partículas). Al menos algunas de las moléculas de analito se pueden inmovilizar con respecto a un objeto de captura. La pluralidad de objetos de captura pueden incluir cada uno una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito. Al menos una porción de los objetos de captura se puede segregar espacialmente entonces en una pluralidad de localizaciones (por ejemplo, recipientes de reacción/pocillos). Basándose al menos en parte en una determinación del número de localizaciones que comprenden un objeto de captura que comprende al menos una molécula de analito, se puede determinar una medida de la concentración de moléculas de analito. Ahora se discutirán otros diversos aspectos de este formato de ensayo básico, incluyendo numerosas consideraciones con respecto a los materiales, concentraciones, disoluciones, etapas, y similares.

En ciertas realizaciones, una pluralidad de objetos de captura se expone a una muestra que contiene o que se sospecha que contiene al menos un tipo de moléculas de analito, en el que la pluralidad de objetos de captura comprenden una superficie de unión que tiene una afinidad por el al menos un tipo de molécula de analito. En algunos casos, la superficie de unión puede comprender una pluralidad de componentes de captura. Un "componente de captura", como se usa aquí, es cualquier molécula, otra entidad química/biológica, o modificación de soporte sólido dispuesta sobre un soporte sólido que se puede usar para fijar, unir o de otro modo capturar específicamente una molécula o partícula diana (por ejemplo, una molécula de analito), de manera que la molécula/partícula diana se inmoviliza con respecto al componente de captura y el soporte. La inmovilización, como se describe aquí, puede estar causada por la asociación de una molécula de analito con un componente de captura sobre la superficie del objeto de captura. Como se usa aquí, "inmovilizado" significa capturado, fijado, unido, o fijado para evitar la disociación o pérdida de la molécula/partícula diana, pero no requiere la inmovilidad absoluta con respecto al componente de captura o al objeto.

El número de moléculas de analito que se inmoviliza con respecto a un objeto de captura puede depender de la relación del número total de moléculas de analito en la muestra frente a al menos uno del número total, tamaño, y/o densidad superficial de componentes de captura de objetos de captura proporcionados. En algunas realizaciones, el número de moléculas o partículas inmovilizadas con respecto a un único objeto de captura puede seguir una distribución de Poisson estándar. En algunos casos, un número estadísticamente significativo de los objetos de captura se asocia con una única molécula de analito, y un número estadísticamente significativo de objetos de captura no se asocia con ninguna molécula de analito. El número total de objetos de captura proporcionados puede estar entre alrededor de 10.000 y alrededor de 10.000.000, entre alrededor de 50.000 y alrededor de 5.000.000, o entre alrededor de 100.000 y alrededor de 1.000.000. En algunos casos, el número total de objetos de captura proporcionados es al menos alrededor de 10.000, al menos alrededor de 50.000, al menos alrededor de 100.000, al menos alrededor de 1.000.000, al menos alrededor de 5.000.000, o al menos alrededor de 10.000.000. En algunos casos, la relación del número de moléculas de analito en la muestra de fluido a objetos de captura proporcionados está entre alrededor de 10:1 y alrededor de 1:10.000.000, entre alrededor de 8:1 y alrededor de 1:10.000.000, entre alrededor de 10:1 y alrededor de 2:1, entre alrededor de 2:1 y alrededor de 1:10, o menor que alrededor de 1:10 (por ejemplo, alrededor de 1:20, alrededor de 1:30, etc.). La relación de moléculas de analito en la muestra de fluido a objetos de captura proporcionados puede afectar a las etapas de ensayo y/o al análisis llevados a cabo para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido, como se describe aquí en la sección de Cuantificación.

En algunos casos, sustancialmente todas las moléculas de analito proporcionadas en la muestra se pueden inmovilizar con respecto a un objeto de captura. Esto es, más de alrededor de 90%, más de alrededor de 95%, más de alrededor de 97%, más de alrededor de 98%, o más de alrededor de 99% de las moléculas de analito en la muestra se pueden inmovilizar con respecto a un objeto de captura. En algunos casos, sin embargo, solamente una fracción de las moléculas de analito en la muestra se pueden inmovilizar con respecto a un objeto de captura. Esto es, en algunos casos, entre alrededor de 1% y alrededor de 90%, entre alrededor de 10% y alrededor de 90%, entre alrededor de 20% y alrededor de 80%, o entre alrededor de 30% y alrededor de 70% de las moléculas de analito proporcionadas en la muestra se inmovilizan con respecto a un objeto de captura. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70%, alrededor de 80%, o alrededor de 90%, o alrededor de 95% de las moléculas de analito se inmovilizan con respecto a un objeto de captura.

En algunos formatos del ensayo, tras la inmovilización, la pluralidad de objetos de captura (por ejemplo, al menos algunos de los cuales están asociados con al menos una molécula de analito) se puede exponer a una pluralidad de ligandos de unión. Al menos algunas de las moléculas de analito inmovilizadas con respecto a un objeto de captura se pueden asociar con un ligando de unión. El número de ligandos de unión que se asocian con un objeto de

5 captura (por ejemplo, vía una molécula de analito) puede depender de la relación del número total de moléculas de analito inmovilizadas con respecto a un único objeto de captura frente al número total de ligandos de unión expuestos a los objetos de captura. Por ejemplo, en realizaciones en las que sustancialmente todos los objetos de
10 captura están asociados con ninguna o con una molécula de analito, las condiciones se pueden seleccionar de manera que sustancialmente todas las moléculas de analito se asocian con un único ligando de unión, y por lo tanto cada objeto de captura asociado con una única molécula de analito se asocia con un único ligando de unión (por ejemplo, vía la molécula de analito). De este modo, el número de localizaciones (por ejemplo, recipientes de reacción) que contienen una única molécula de analito se puede determinar determinando el número de localizaciones (por ejemplo, recipientes de reacción) que comprenden un ligando de unión. En tales realizaciones
15 (por ejemplo, cuando ninguna o al menos una molécula de analito está asociada con cada objeto de captura, la relación de ligandos de unión proporcionados (por ejemplo, en una etapa de mezclado) al número total de moléculas de analito inmovilizadas con respecto a un objeto de captura puede ser alrededor de 20:1, alrededor de 10:1, alrededor de 5:1, alrededor de 2:1, o alrededor de 1:1.

15 En algunas realizaciones, sin embargo, un único objeto de captura se puede asociar con ninguna, una, o más de una (por ejemplo, dos, tres, cuatro, etc.) moléculas de analito. En tales realizaciones, el ligando de unión se puede proporcionar a una concentración de manera que una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura que comprenden al menos una molécula de analito se asocie con solamente un único ligando de unión, y una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura que comprenden al menos una molécula de analito no se asocie con ningún ligando de unión. En otras realizaciones, sin embargo, los ligandos de unión se pueden proporcionar a una concentración de manera que una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura que comprenden al menos una molécula de analito se asocie con al menos un ligando de unión (por ejemplo, uno, dos, tres, etc.), y una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura que comprenden al menos una molécula de analito no se asocie con ningún ligando de unión. La concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se puede determinar entonces, ya sea con un análisis basado al menos en parte en el
20 número de localizaciones que contienen un objeto de captura asociado con un ligando de unión (por ejemplo, relacionando la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido con el número de localizaciones que comprenden un ligando de unión), y/o con un análisis basado al menos en parte en una lectura de la intensidad de una señal indicativa del número de ligandos de unión en las localizaciones asignadas (por ejemplo, en realizaciones en las que al menos algunos de los objetos de captura comprenden más de una molécula de analito y/o más de un ligando de unión, como se describe aquí). En tales realizaciones (por ejemplo, en las que más de una molécula de analito se puede inmovilizar con respecto a cada objeto de captura), la relación del número de ligandos de unión proporcionados en disolución al número de moléculas de analito inmovilizadas con respecto a un objeto de captura puede ser alrededor de 1:50, alrededor de 1:40, alrededor de 1:30, alrededor de 1:20, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, o similar. En algunos casos, la relación del número de ligandos de unión proporcionados en disolución se puede calcular basándose en el número de objetos de captura proporcionados. En algunos casos, la relación de ligandos de unión proporcionados al número de objetos de captura es alrededor de 1:50, alrededor de 1:40, alrededor de 1:30, alrededor de 1:20, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, alrededor de 1:1, o similar. En otros casos, la relación del número de objetos de captura al número de ligandos de unión proporcionados es alrededor de 1:50, alrededor de 1:40, alrededor de 1:30, alrededor de 1:20, alrededor de 1:10, alrededor de 1:5, alrededor de 1:3, alrededor de 1:2, o similar. En algunas realizaciones, la determinación de la cuantificación puede comprender un ajuste a una distribución de Poisson, como se describe aquí.

45 En algunas realizaciones, la concentración de ligando de unión usada en un ensayo se puede seleccionar para minimizar ciertos sucesos que pueden ocurrir cuando está presente un exceso de ligando de unión, por ejemplo la unión no específica del ligando de unión. En algunos casos, si la concentración de ligando de unión es demasiado elevada, se puede producir un incremento en las lecturas del fondo debido a interacciones no específicas (por ejemplo, con los objetos de captura, recipientes de reacción, etc.). En algunos casos, la concentración de ligando de unión se puede seleccionar (o estimar, en el caso de una concentración desconocida de molécula de analito) de manera que solamente una fracción de las moléculas de analito inmovilizadas con respecto a un objeto de captura se asocie con un ligando de unión (por ejemplo, alrededor de 0,1%, alrededor de 1%, alrededor de 2%, alrededor de 3%, alrededor de 4%, alrededor de 5%, alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, o más). Esto puede ser especialmente útil en realizaciones en las que el porcentaje de objetos de captura que se asocian con al menos una molécula de analito es relativamente elevado (por ejemplo, mayor que alrededor de 20%, mayor que alrededor de 30%, mayor que alrededor de 40%, mayor que alrededor de 50%, mayor que alrededor de 60%, mayor que alrededor de 70%, mayor que alrededor de 80%, mayor que alrededor de 90%, o más). Al proporcionar el ligando de unión a una menor concentración, en algunos casos, no toda molécula de analito inmovilizada con respecto a un objeto de captura se asociará con un ligando de unión, lo que puede ser ventajoso para la cuantificación, por ejemplo cuando se requiere la presencia de un ligando de unión para la detección, y especialmente cuando se use una técnica de lectura digital/binaria. Por ejemplo, si el porcentaje de objetos de captura asociados con una molécula de analito es alrededor de 50% o mayor, se puede proporcionar un número reducido de ligandos de unión de manera que menos de todas las moléculas de analito inmovilizadas se asocian con un ligando de unión. En otros casos, el porcentaje de ligandos de unión que se asocian con una molécula de analito se puede reducir disminuyendo el tiempo de incubación con la molécula de analito (por ejemplo, limitar el tiempo de exposición de manera que solamente una fracción de las moléculas de analito inmovilizadas se asocia con una

molécula de analito).

El número total de moléculas de analito/ligandos de unión/objetos de captura/etc. en una disolución se puede determinar usando cálculos con conocimiento de la concentración de las moléculas de analito/ligandos de unión/objetos de captura/etc. en disolución. Por ejemplo, el número total de ligandos de unión en una disolución se puede determinar según la Ecuación 2:

$$\text{n}^\circ \text{ de ligandos de unión} = N_A \times [\text{ligando de unión}] \times \text{volumen} \quad (\text{Ec. 2})$$

en la que N_A es el número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), [ligando de unión] es la concentración del ligando de unión en disolución en moles por litro, y el volumen es el volumen total de la disolución en litros empleado. Se pueden llevar a cabo cálculos similares para otros componentes (por ejemplo, moléculas de analito (por ejemplo, en una muestra de calibración), objetos de captura, etc.).

Tras la inmovilización de una pluralidad de moléculas de analito con respecto a una pluralidad de objetos de captura y, en algunos casos, la asociación de un ligando de unión a al menos algunas de las moléculas de analito inmovilizadas, al menos una porción de los objetos de captura se puede segregar espacialmente en una pluralidad de localizaciones. El porcentaje de objetos de captura que se segrega espacialmente en la pluralidad de localizaciones puede variar dependiendo de numerosos factores, incluyendo, pero sin limitarse a, la relación del número de objetos de captura frente al número total de localizaciones, el método de segregar espacialmente los objetos de captura, y/o la longitud del tiempo que los objetos de captura están expuestos a las localizaciones. En algunos casos, al menos alrededor de 0,5%, al menos alrededor de 1%, al menos alrededor de 2%, al menos alrededor de 5%, al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 90%, o más, de los objetos de captura se segrega espacialmente en una pluralidad de localizaciones. En algunos casos, entre alrededor de 0,1% y alrededor de 50%, entre alrededor de 0,1% y alrededor de 30%, entre alrededor de 0,5% y alrededor de 20%, entre alrededor de 0,5% y alrededor de 10%, entre alrededor de 0,5% y alrededor de 5%, entre alrededor de 1% y alrededor de 10%, o alrededor de 0,5%, alrededor de 1%, alrededor de 2%, alrededor de 4%, alrededor de 5%, alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 50%, alrededor de 70%, o alrededor de 90% de los objetos de captura se segregan espacialmente en la pluralidad de localizaciones. Tras segregar espacialmente al menos una porción de los objetos de captura en una pluralidad de localizaciones, se puede asignar al menos una porción de las localizaciones. El número de localizaciones asignadas puede ser alrededor de 0,5%, alrededor de 1%, alrededor de 2%, alrededor de 3%, alrededor de 5%, alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70%, alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, o más, del número total de localizaciones.

La porción de localizaciones se puede asignar para determinar el número de localizaciones que contienen una molécula de analito, o en algunos casos, un ligando de unión. En algunos casos, también se puede determinar el número de localizaciones que contienen un objeto de captura no asociado con una molécula de analito (o un ligando de unión), el número de localizaciones que contienen y/o que no contienen un objeto de captura, y/o el número total de localizaciones analizadas/determinadas. Una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se puede determinar al menos en parte en el número de localizaciones que se determina que contienen una molécula de analito (o ligando de unión). En algunos casos, la medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se puede basar al menos en parte en la relación del número de localizaciones que contienen un objeto de captura asociado con una molécula de analito al número total de localizaciones asignadas o el número total de localizaciones asignadas que contienen un objeto de captura. En otros casos, una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se puede basar al menos en parte en la relación del número de localizaciones que contienen un objeto de captura asociado con una molécula de analito al número de localizaciones que contienen un objeto de captura no asociado con una molécula de analito. Los métodos y cálculos específicos que se pueden usar para determinar la medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se discuten con más detalle más abajo.

Las relaciones, porcentajes, y otros parámetros descritos aquí con respecto a la cantidad/calidad/relación de un primer componente a un segundo componente (por ejemplo, moléculas de analito/objetos de captura, ligandos de unión/objetos de captura, ligandos de unión/moléculas de analito, objetos de captura/localizaciones, agentes de marcaje precursores/ligandos de unión, etc.) se pueden ajustar según se desee para producir una relación deseada de moléculas de analito/ligandos de unión capturados por objeto capturado, y/o se pueden controlar o determinar usando una experimentación, cálculos (en algunos casos, incluyendo la contabilización de distribuciones de Poisson), ensayos de cribado, etc., no más allá de los habituales, dada la enseñanza y guía proporcionadas por la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, si el número de objetos de captura proporcionados es conocido (por ejemplo, según se determina usando una fórmula similar como se da en la Ecuación 1), el número de ligandos de unión que es necesario proporcionar se puede determinar basándose en la relación deseada de objetos de captura a ligandos de unión, y por tanto, se puede determinar la cantidad de moles de ligando de unión que se deberían de proporcionar. Como otro ejemplo, en el caso de una concentración conocida de moléculas de analito, si un primer método de ensayo indica que un número significativo de objetos de captura comprenden más de una molécula de analito (por ejemplo, se determina que todas o un número significativo de localizaciones contienen una molécula de

analito, o se determina que hay menos de un número estadísticamente significativo de perlas que están libres de moléculas de analito), la muestra de fluido se puede diluir y/o el número de objetos de captura se puede incrementar de manera que se puede disminuir el número de objetos de captura que comprenden al menos una molécula de analito.

- 5 Otros aspectos del ensayo se discutirán ahora con detalle. Se debería entender que ninguna, una porción o todas las siguientes etapas se pueden llevar a cabo al menos una vez durante los ciertos formatos de ensayo ejemplares descritos aquí. Los ejemplos no limitantes de etapas adicionales no descritas que se pueden realizar incluyen, pero no se limitan a, lavado y/o exposición a ligandos de unión adicionales, agentes de marcaje precursores, y/o agentes de marcaje, etc.
- 10 En algunas realizaciones, la pluralidad de objetos de captura (por ejemplo, al menos algunos de los cuales están asociados con al menos una molécula de analito) se puede exponer a al menos un componente de reacción adicional antes de, concurrentemente con, y/o tras separar espacialmente al menos algunos de la pluralidad de objetos de captura en una pluralidad de localizaciones. En algunos casos, los objetos de captura se pueden exponer a una pluralidad de ligandos de unión. En ciertas realizaciones, un ligando de unión se puede adaptar para ser detectado directamente (por ejemplo, el ligando de unión comprende una molécula o resto detectable), o se puede adaptar para ser detectado indirectamente (por ejemplo, incluyendo un componente que puede convertir un agente de marcaje precursor en un agente de marcaje), como se discute más abajo. Se puede emplear más de un tipo de unión en cualquier método de ensayo dado, por ejemplo un primer tipo de ligando de unión y un segundo tipo de ligando de unión. En un ejemplo, el primer tipo de ligando de unión es capaz de asociarse con un primer tipo de molécula de analito, y el segundo tipo de ligando de unión es capaz de asociarse con el primer ligando de unión. En otro ejemplo, tanto el primer tipo de ligando de unión como el segundo tipo de ligando de unión se pueden asociar con los mismos o diferentes epítomos de una única molécula de analito, como se describe más abajo.

25 Ciertos ligandos de unión pueden comprender un componente que es capaz de facilitar la detección, ya sea directa o indirectamente. Un componente se puede adaptar para ser detectado directamente en realizaciones en las que el componente comprende una propiedad medible (por ejemplo, una emisión de fluorescencia, un color, etc.). Un componente puede facilitar la detección indirecta, por ejemplo convirtiendo un agente de marcaje precursor en un agente de marcaje (por ejemplo, un agente que es detectado en un ensayo). Un "agente de marcaje precursor" es cualquier molécula, partícula o similar, que se puede convertir en un agente de marcaje al exponerlo a un agente de conversión adecuado (por ejemplo, un componente enzimático). Un "agente de marcaje" es cualquier molécula, partícula, o similar, que facilita la detección, actuando como la entidad detectada, usando una técnica de detección escogida.

30 En algunas realizaciones, al menos un ligando de unión comprende un componente enzimático. En algunas realizaciones, la molécula de analito puede comprender un componente enzimático. El componente enzimático puede convertir un agente de marcaje precursor (por ejemplo, un sustrato enzimático) en un agente de marcaje (por ejemplo, un producto detectable). Entonces se puede determinar una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido basándose al menos en parte en la determinación del número de localizaciones que contienen un agente de marcaje (por ejemplo, relacionando el número de localizaciones que contienen un agente de marcaje con el número de localizaciones que contienen una molécula de analito). Los ejemplos no limitantes de enzimas o componentes enzimáticos incluyen peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, y fosfatasa alcalina. Otros ejemplos no limitantes de sistemas o métodos para detección incluyen realizaciones en las que precursores de ácidos nucleicos se replican en múltiples copias o se convierten en un ácido nucleico que se puede detectar fácilmente, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (RCA), ligación, amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), etc. Tales sistemas y métodos serán conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica, por ejemplo como se describe en "DNA Amplification: Current Technologies and Applications", Vadim Demidov et al., 2004.

45 Como ejemplo de un método de ensayo que comprende el uso de un agente de marcaje precursor, como se muestra en la FIG. 3, se proporciona un sustrato 100 que comprende una pluralidad de localizaciones, en el que las localizaciones comprenden recipientes de reacción. En el recipiente de reacción 101 (por ejemplo, localización), la molécula de analito 102 se inmoviliza con respecto a la perla 103 (por ejemplo, objeto de captura). El ligando de unión 104 se asocia con la molécula de analito 102. El ligando de unión 104 comprende un componente enzimático (no mostrado). El agente de marcaje precursor 106 se convierte en el agente de marcaje 108 (al exponerlo al componente enzimático). El agente de marcaje 108 se detecta usando métodos descritos aquí. Por el contrario, el recipiente de reacción 111 contiene la molécula de analito 112 inmovilizada con respecto a la perla 110. En este recipiente de reacción, la molécula de analito 112 no está asociada con un ligando de unión que comprende un componente enzimático. Por lo tanto, el agente de marcaje precursor 114 no se convierte en un agente de marcaje en el recipiente de reacción. De este modo, este recipiente de reacción daría una señal diferente en comparación con el recipiente de reacción 101, en el que el agente de marcaje precursor se convirtió en un agente de marcaje. En algunos casos, también puede haber recipientes de reacción que contienen una perla no asociada con una molécula de analito, por ejemplo el recipiente de reacción 121 contiene la perla 116. Adicionalmente, algunos de los recipientes de reacción pueden no comprender ninguna perla, por ejemplo el recipiente de reacción 123. Los recipientes de reacción 121 y 123 pueden dar señales diferentes en comparación con el recipiente de reacción 101, ya que no habría agente de marcaje presente. Sin embargo, los recipientes de reacción 121 y 123 pueden contener

el agente de marcaje precursor 117. Puede haber más de un agente de marcaje precursor en cualquier recipiente de reacción dado.

En ciertas realizaciones, se pueden emplear agentes de marcaje precursores solubilizados o suspendidos, en el que los agentes de marcaje precursores se convierten en agentes de marcaje que son insolubles en el líquido y/o que se inmovilizan en/cerca de la localización (por ejemplo, en el recipiente de reacción en el que se forma el agente de marcaje). Tales agentes de marcaje precursores y agentes de marcaje, y su uso, se describen en la solicitud de patente U.S. Serie nº 12/236.484, de titularidad compartida, titulada "Determinación por sensibilidad elevada de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido" por Duffy, et al., presentada el 23 de septiembre de 2008, incorporada aquí como referencia.

En algunas realizaciones, durante el ensayo, se puede llevar a cabo al menos una etapa de lavado. En un caso, una pluralidad de objetos de captura se puede lavar tras exponer los objetos de captura a una o más disoluciones que comprenden moléculas de analito, ligandos de unión, agentes de marcaje precursores, o similares. Por ejemplo, tras la inmovilización de las moléculas de analito con respecto a una pluralidad de objetos de captura, la pluralidad de objetos de captura se puede someter a una etapa de lavado eliminando de ese modo cualesquiera moléculas de analito no inmovilizadas específicamente con respecto a un objeto de captura. En ciertas realizaciones, la disolución de lavado se selecciona de manera que no provoque cambio apreciable a la configuración de los objetos de captura y/o moléculas de analito, y/o no perturbe ninguna interacción de unión específica entre al menos dos componentes del ensayo (por ejemplo, un componente de captura y una molécula de analito). En otros casos, la disolución de lavado puede ser una disolución que se selecciona para interaccionar químicamente con uno o más componentes de ensayo. Como se entenderá por los expertos normales en la técnica, una etapa de lavado se puede llevar a cabo en cualquier punto de tiempo apropiado durante los métodos de la invención.

En algunas realizaciones, se pueden llevar a cabo métodos de ensayo que no comprendan el uso de una pluralidad de objetos de captura que comprenden una superficie de unión para al menos un tipo de molécula de analito, y/o una pluralidad de localizaciones para las cuales se pueden separar espacialmente los objetos de captura. Por ejemplo, un ensayo según la invención en ciertas realizaciones puede usar cualquier método adecuado que sea capaz de aislar moléculas de analito individuales y/u objetos de captura asociados con una o más moléculas de analito, de manera que se puedan asignar individualmente para la detección. Por ejemplo, un método de ensayo puede comprender proporcionar una pluralidad de objetos de captura que están asociados cada uno con una única molécula de analito o están libres de cualesquiera moléculas de analito. Al menos una porción de los objetos de captura se puede asignar individualmente para determinar el número de los objetos de captura asociados con una molécula de analito o partícula. Basándose al menos en parte en el número de objetos de captura que se determina que están asociados con una molécula de analito, se puede determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido.

La FIG. 4A ilustra una realización no limitante en la que moléculas de analito individuales se segregan espacialmente en una pluralidad de gotitas. En la FIG. 4A, se proporciona una pluralidad de moléculas de analito 70, como se muestra en la etapa (A). En este ejemplo, las moléculas de analito 70 son capaces de ser detectadas ópticamente (por ejemplo, las moléculas de analito se pueden detectar directamente usando interrogación óptica). Al menos algunas de la pluralidad de moléculas de analito 70 están contenidas en gotitas de líquido 72 (por ejemplo, usando técnicas microfluídicas) que comprenden fluido 71, como se muestra en la etapa (B). Adicionalmente, pueden estar presentes algunas gotitas que no contienen ninguna molécula de analito (por ejemplo, las gotitas 74 que comprenden el fluido 71). La pluralidad de gotitas 75 están sustancialmente rodeadas de fluido 73, que es sustancialmente inmisible con el fluido 71. La pluralidad de gotitas 75 se puede interrogar ópticamente alimentando gotitas en la columna 74 de forma que cada gotita pasa por un sistema de detección óptico (por ejemplo, que comprende una fuente de luz 76 y un detector 78) una sola vez, como se muestra en la etapa (C). Se puede determinar que cada gotita contiene una molécula de analito cuando hay un cambio en la señal óptica (por ejemplo, un cambio en la señal óptica debido a la presencia de una molécula de analito en la gotita).

Como otro ejemplo, como se ilustra en la FIG. 4B, se proporciona una pluralidad de moléculas de analito 80, como se muestra en la etapa (A). En este ejemplo, las moléculas de analito 70 no son capaces de ser detectadas ópticamente, y debe haber una detección indirecta (como se describe aquí). La pluralidad de moléculas de analito 80 se expone a una pluralidad de ligandos de unión 82, de manera que al menos un ligando de unión se asocia con una porción significativa de las moléculas de analito, como se muestra en la etapa (B), para formar el complejo 83, como se muestra en la etapa (B). En este ejemplo, cada ligando de unión 82 comprende componente enzimático 84. Al menos una porción de los complejos 83 puede estar contenida en las gotitas 85 (por ejemplo, usando técnicas microfluídicas), como se muestra en la etapa (C), que comprenden líquido 79. Adicionalmente, puede haber algunas gotitas que no contengan ningún complejo (por ejemplo, gotitas 86 que comprenden el fluido 79). La pluralidad de gotitas 91 están rodeada sustancialmente por el fluido 87, que es sustancialmente inmisible con el fluido 79. Las gotitas 85 y 86 pueden comprender adicionalmente un agente de marcaje precursor 86, que se convierte en un agente de marcaje 88 con la exposición al componente enzimático 84, como se indica por la flecha 87. La pluralidad de gotitas 91 se puede ópticamente alimentando la pluralidad de gotitas en una columna 89 de manera que cada gotita pasa por un sistema de detección óptico (por ejemplo, que comprende una fuente de luz 90 y un detector 92) una sola vez, como se muestra en la etapa (D). Se puede determinar que cada gotita contiene una molécula de analito cuando hay un cambio en la señal óptica (por ejemplo, un cambio en la señal óptica debido a la presencia de

un agente de marcaje en la gotita).

Como todavía otro ejemplo, la FIG. 4C ilustra una realización en la que moléculas de analito individuales 282 se asocian con respecto a objetos 280 vía componentes de captura 274. Adicionalmente, en este ejemplo, las moléculas de analito inmovilizadas se asocian con ligando de unión 284. Las gotitas se pueden interrogar ópticamente alimentando gotitas en una columna 287 de manera que cada gotita se hace pasar por el sistema de detección óptico (por ejemplo, que comprende una fuente de luz 286 y un detector 288) una sola vez. Se puede determinar que cada gotita contiene un ligando de unión cuando hay un cambio en la señal óptica (por ejemplo, un cambio en la señal óptica debido a la presencia de un ligando de unión en la gotita).

Las siguientes secciones proporcionan información adicional con respecto a etapas del método, materiales, y parámetros que se pueden usar para la práctica de los métodos de ensayo descritos anteriormente.

Objetos de captura y localizaciones espaciales para la segregación de objetos de captura

En algunas realizaciones, el método y sistemas de la presente invención utilizan una pluralidad de objetos de captura que incluyen cada uno una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito. La pluralidad de objetos de captura se puede configurar para ser capaces de segregarse espacialmente unos de otros, esto es, los objetos de captura se pueden proporcionar en una forma tal que los objetos de captura son capaces de ser separados espacialmente en una pluralidad de localizaciones. Por ejemplo, la pluralidad de objetos de captura puede comprender una pluralidad de perlas (que pueden tener cualquier forma, por ejemplo semejante a esferas, discos, anillos, semejantes a cubos, etc.), una dispersión o suspensión de materiales en partículas (por ejemplo, una pluralidad de partículas en suspensión en un fluido), nanotubos, o similares. En algunas realizaciones, la pluralidad de objetos de captura es insoluble o sustancialmente insoluble en el disolvente o disolventes o disolución o disoluciones utilizados en el ensayo. En algunos casos, los objetos de captura son sólidos o sustancialmente sólidos (por ejemplo, está esencialmente libre de poros); sin embargo, en algunos casos, la pluralidad de objetos de captura puede ser porosa o sustancialmente porosa, hueca, parcialmente hueca, etc. La pluralidad de objetos de captura puede ser no absorbente, sustancialmente no absorbente, sustancialmente absorbente, o absorbente. En algunos casos, los objetos de captura pueden comprender un material magnético, que como se describe aquí, puede facilitar cierto aspecto del ensayo (por ejemplo, etapa de lavado). En algunos casos, una superficie del objeto de captura también puede comprender una capa protectora o pasivante que puede reducir o minimizar sucesos de unión no específica (por ejemplo, moléculas de analito, ligandos de unión, etc.).

En algunas realizaciones, los objetos de captura incluyen cada uno una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito de interés. La porción del objeto de captura que comprende una superficie de unión se puede seleccionar o configurar basándose en la forma física/características y propiedades de los objetos de captura (por ejemplo, tamaño, forma), y el formato del ensayo. En algunas realizaciones, sustancialmente todas las superficies exteriores de los objetos de captura forman las superficies de unión. Una superficie de unión que tiene una afinidad por al menos un tipo de molécula de analito se puede formar vía la asociación de una pluralidad de componentes de captura con un objeto de captura. En algunos casos, una molécula de analito se puede asociar con un componente de captura (por ejemplo, se puede inmovilizar con respecto a) vía la formación de al menos un enlace químico y/o adsorción física, o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de tipos de enlaces químicos incluyen enlaces iónicos, enlaces covalentes (por ejemplo, enlaces carbono-carbono, carbono-oxígeno, oxígeno-silicio, azufre-azufre, fósforo-nitrógeno, carbono-nitrógeno, metal-oxígeno, y otros enlaces covalentes), enlaces de hidrógeno (por ejemplo, entre grupos hidroxilo, amina, carboxilo, tiol, y/o grupos funcionales similares), enlaces dadores (por ejemplo, complejación o quelación entre iones metálicos y ligandos monodentados o multidentados), interacciones de Van der Waals, o similares. Los componentes de captura que son útiles o potencialmente útiles para practicar ciertos aspectos y realizaciones de la invención se discuten con más detalle más abajo. Al menos algunas de las moléculas de analito, al exponerlas a la pluralidad de objetos de captura que comprenden una pluralidad de componentes de captura, se inmovilizan con respecto a un componente de captura. En ciertas realizaciones, sustancialmente toda la pluralidad de moléculas de analito en la muestra de fluido ensayada se inmoviliza con respecto a los componentes de captura (y por tanto, los objetos de captura).

Sin estar atados por ninguna teoría, el uso en ciertas realizaciones de la invención de una etapa de captura en la que una pluralidad de objetos de captura que tienen una gran superficie específica para la unión se exponen a una muestra de fluido que contiene las moléculas de analito o partículas de manera que las moléculas de analito/partículas se inmovilizan con respecto a los objetos de captura puede facilitar un incremento en la velocidad y/o eficiencia del ensayo para la detección y cuantificación de la concentración del analito en la muestra en comparación con ensayos en los que las propias moléculas de analito se segregan para la detección sin exponerlas a e inmovilizarlas con respecto a un objeto de captura. Este incremento en la velocidad de unión y eficiencia se puede potenciar adicionalmente si la disolución en la que la pluralidad de moléculas de analito y objetos de captura se incuban para la captura se agita (por ejemplo, se agita) para incrementar la frecuencia de conexión y la velocidad de transferencia de masa entre la pluralidad de objetos de captura (por ejemplo, la pluralidad de perlas) y las moléculas de analito (por ejemplo, en contraste con un sustrato que comprende una superficie estacionaria (por ejemplo, una placa de microtitulación)).

La pluralidad de objetos de captura para la captura del analito puede ser de cualquier tamaño o forma adecuada.

Los ejemplos no limitantes de formas adecuadas incluyen esferas, cubos, elipsoides, tubos, láminas, y similares. En ciertas realizaciones, el diámetro medio (si es sustancialmente esférico) o la dimensión de sección transversal máxima media (para otras formas) de un objeto de captura puede ser mayor que alrededor de 0,1 μm (micrómetro), mayor que alrededor de 1 μm , mayor que alrededor de 10 μm , mayor que alrededor de 100 μm , mayor que alrededor de 1 mm, o similar. En otras realizaciones, el diámetro medio de un objeto de captura o la dimensión máximo de un objeto de captura en una dimensión puede estar entre alrededor de 0,1 μm y alrededor de 100 μm , entre alrededor de 1 μm y alrededor de 100 μm , entre alrededor de 10 μm y alrededor de 100 μm , entre alrededor de 0,1 μm y alrededor de 1 mm, entre alrededor de 1 μm y alrededor de 10 mm, entre alrededor de 0,1 μm y alrededor de 10 μm , o similar. El “diámetro medio” o “dimensión de sección transversal máxima media” de una pluralidad de objetos de captura, como se usa aquí, es la media aritmética de los diámetros/dimensiones de sección transversal máximas de los objetos de captura. Los expertos normales en la técnica serán capaces de determinar el diámetro/dimensión de sección transversal máxima media de una población de objetos de captura, por ejemplo, usando dispersión de luz láser, microscopía, análisis de tamices, u otras técnicas conocidas. Por ejemplo, en algunos casos, se puede usar un contador Coulter para determinar el diámetro medio de la pluralidad de perlas.

Los objetos de captura para la captura del analito se pueden fabricar de uno o más materiales adecuados, por ejemplo plásticos o polímeros sintéticos (por ejemplo, polietileno, polipropileno, poliestireno, poliamida, poliuretano, polímeros fenólicos, o nitrocelulosa, etc.), polímeros derivados naturalmente (caucho de látex, polisacáridos, polipéptidos, etc.), materiales compuestos, materiales cerámicos, sílice o materiales a base de sílice, carbón, metales o compuestos metálicos (por ejemplo, que comprenden oro, plata, acero, aluminio, cobre, etc.), vidrios inorgánicos, sílice y una variedad de otros materiales adecuados). Los ejemplos no limitantes de configuraciones potencialmente adecuadas incluyen perlas (por ejemplo, perlas magnéticas), tubos (por ejemplo, nanotubos), placas, discos, tiras reactivas, o similares.

En algunos casos, los objetos de captura se pueden seleccionar de manera que el propio objeto de captura sea detectable por el sistema. Esto puede ser útil en realizaciones en las que la fracción o porcentaje de objetos de captura asociados con una molécula de analito se va a determinar (por ejemplo, cuando el número total de objetos de captura interrogados y detectados se usa para determinar la fracción de objetos de captura asociados con una molécula de analito). Por ejemplo, un objeto de captura se puede caracterizar por tener un espectro de emisión o absorción que se puede aprovechar para la detección de manera que los objetos de captura se pueden interrogar para determinar cuál localización espacial contiene un objeto de captura. Las propiedades del espectro de emisión (por ejemplo, longitud o longitudes de onda, intensidad, etc.) se pueden seleccionar de manera que la emisión producida por los objetos de captura no altere sustancialmente y/o interfiera con ninguna otra emisión de componentes usados en el ensayo (por ejemplo, la emisión de cualesquiera marcadores usados para determinar la presencia o ausencia de una molécula de analito). En algunos casos, las moléculas de colorante se pueden asociar con un objeto de captura usando los ligandos de unión presentes en la superficie del objeto de captura (por ejemplo, una molécula de colorante se puede asociar vía un enlace o interacción con un componente de captura). En algunos casos, entre alrededor de 1 y alrededor de 50.000, o entre alrededor de 1000 y alrededor de 50.000, o entre alrededor de 1000 y alrededor de 20.000, o entre alrededor de 10.000 y alrededor de 20.000, o entre alrededor de 1.000 y alrededor de 10.000, o entre alrededor de 10.000 y alrededor de 30.000, o entre alrededor de 1 y alrededor de 10.000 moléculas de colorante (por ejemplo, moléculas de colorante fluorescente) se asocian con cada objeto de captura. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 21. En algunos casos, las moléculas de colorante se pueden asociar en primer lugar con el objeto de captura, antes de que los ligandos de unión se unan al objeto de captura. Este enfoque reduce las probabilidades de que la afinidad de los ligandos de unión se reduzca por unión de moléculas de colorante. En algunos casos, las moléculas de colorante se unen a una proteína “bloqueante” inerte (por ejemplo, seroalbúmina bovina), y la proteína inerte marcada con el colorante se usa para bloquear las perlas después de que los ligandos de unión se unen al objeto de captura. Se debería entender que, en algunos casos, los objetos de captura se pueden detectar y cuantificar usando luz blanca (por ejemplo, como se describe aquí, por ejemplo usando formación de imágenes mediante campo brillante, campo oscuro y/o contraste de fases).

En algunas realizaciones, se puede emplear más de un tipo de objeto de captura para la captura del analito. En algunos casos, cada tipo de objeto de captura puede incluir una superficie con diferente especificidad de unión. En estas realizaciones, más de un tipo de molécula de analito se puede cuantificar y/o detectar en un único método de ensayo multiplexado. Por ejemplo, la pluralidad de objetos de captura para la captura del analito puede comprender una pluralidad de un primer tipo de objeto de captura que comprende una superficie de unión que tiene una afinidad por un primer tipo de molécula de analito, y una pluralidad de un segundo tipo de objetos de captura que comprenden una superficie de unión que tiene una afinidad por un segundo tipo de molécula de analito. Al exponerlos a una muestra que contiene el primer tipo de molécula de analito y el segundo tipo de molécula de analito, el primer tipo de molécula de analito se inmoviliza con respecto al primer tipo de objeto de captura, y el segundo tipo de molécula de analito se inmoviliza con respecto al segundo tipo de objeto de captura. El primer tipo de objeto de captura y el segundo tipo de objeto de captura se pueden codificar para que sean distinguibles entre sí (por ejemplo, para facilitar la diferenciación al detectarlos) al incluir una propiedad detectable diferente. Por ejemplo, cada tipo de objeto de captura puede tener una emisión de fluorescencia, una reflectividad espectral, una forma, una absorción espectral, o una emisión o absorción de FTIR diferente. En una realización particular, cada tipo de objeto de captura puede comprender uno o más compuestos colorantes (por ejemplo, colorantes fluorescentes) pero a niveles de concentración variables, de manera que cada tipo de objeto de captura tiene una señal distintiva (por

ejemplo, basada en la intensidad de la emisión fluorescente). Al segregar espacialmente los objetos de captura tras la etapa de captura en una pluralidad de localizaciones para la detección, una localización que comprende un primer tipo de objeto de captura asociado con un primer tipo de molécula de analito se puede distinguir de una localización que comprende un segundo tipo de objeto de captura asociado con un segundo tipo de molécula de analito vía la detección de la propiedad diferente. Se puede determinar el número de localizaciones que comprenden cada tipo de objeto de captura y/o el número de objetos de captura asociados con una molécula de analito, permitiendo una determinación de una medida de la concentración tanto del primer tipo de molécula de analito como del segundo tipo de moléculas de analito en la muestra de fluido basado al menos en parte en estos números.

Por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 5, etapa (A), se proporciona una pluralidad del primer tipo de objeto de captura 132 que comprende un primer tipo de componente de captura 134, y una pluralidad del segundo tipo de objeto de captura 136 que comprende un segundo tipo de componente de captura 138. La pluralidad de objetos de captura se expone a una muestra de fluido que comprende una pluralidad de un primer tipo de molécula de analito 140 y un segundo tipo de molécula de analito 142. Como se muestra en la etapa (B), al menos parte del primer tipo de molécula de analito 140 se puede asociar con un objeto de captura del primer tipo 132 vía el componente de captura 134, y al menos parte del segundo tipo de molécula de analito 142 se puede asociar con un objeto de captura del segundo tipo 136 vía el componente de captura 138. Parte del primer tipo de objetos de captura y del segundo tipo de objetos de captura puede no asociarse ni con el primer tipo ni con el segundo tipo de moléculas de analito. Al menos algunos de la pluralidad de objetos de captura de la etapa (B) se pueden segregar espacialmente en una pluralidad de localizaciones (representadas por recipientes de reacción 142 formados en el sustrato 146, como se muestra en la etapa (C)). Algunos de los recipientes de reacción pueden no comprender ningún objeto de captura. La pluralidad de recipientes de reacción se puede analizar entonces (por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 1, etapa (D)) para determinar el número de recipientes de reacción que contienen un primer tipo de objeto de captura asociado con un primer tipo de molécula de analito (por ejemplo, recipiente de reacción 144), y el número de recipientes de reacción que contienen un segundo tipo de objeto de captura asociado con un segundo tipo de molécula de analito (por ejemplo, recipiente de reacción 145). Adicionalmente, también se puede determinar el número de localizaciones que contienen un primer tipo de objeto de captura o un segundo tipo de objeto de captura no asociado con ninguna molécula de analito. Una medida de la concentración del primer tipo (o segundo tipo) de molécula de analito se puede determinar al menos en parte basándose en el número del primer tipo (o segundo tipo) de molécula de analito detectada. Como alternativa, una medida de la concentración del primer tipo (o segundo tipo) de molécula de analito en la muestra de fluido se puede basar en la relación del número de recipientes de reacción que comprenden el primer tipo (o segundo tipo) de objeto de captura asociado con un primer tipo (o segundo tipo) de molécula de analito al número de recipientes de reacción que comprenden el primer tipo (o segundo tipo) de objetos de captura no asociados con ninguna molécula de analito. Se pueden llevar a cabo métodos adicionales para determinar la concentración de los tipos primero y/o segundo de moléculas de analito en la muestra de fluido usando métodos similares a los descritos aquí para muestras que comprenden un único tipo de molécula de analito. Usando detección óptica, el primer tipo de objeto de captura puede tener una longitud de onda máxima de emisión a una primera longitud de onda y el segundo tipo de objeto de captura puede tener una longitud de onda máxima de emisión a una segunda longitud de onda, y por lo tanto, puede permitir que los recipientes de reacción que contienen un primer tipo de objeto de captura se distingan de los recipientes de reacción que contienen un segundo tipo de objeto de captura.

Como alternativa, o en combinación, con el uso de objetos de captura codificados para multiplexación, como se describe anteriormente, en algunos ensayos multiplexados, se pueden emplear tipos de objetos de captura similares que, en ciertos casos, pueden incluir cada uno componentes de captura específicos para múltiples tipos de analitos. En algunos de tales ensayos, un primer tipo de ligando de unión, por ejemplo que tiene afinidad por un primer tipo de molécula de analito, y un segundo, tercer, etc., tipo de ligando de unión que tiene afinidad por un segundo, tercer, etc., tipo respectivamente de tipo de molécula de analito y configurado para ser distinguible de forma detectable uno de otro (por ejemplo, mediante el uso de marcadores detectables diferentes, componentes enzimáticos y/o agentes de marcaje, etc.) se pueden usar conjuntamente con el ensayo, y la detección/cuantificación de los diferentes tipos de ligandos de unión se puede correlacionar con la presencia/concentración de diferentes tipos de moléculas de analito en la muestra de fluido.

En una realización particular, la pluralidad de objetos de captura para captura de analito comprende una pluralidad de perlas. Las perlas pueden comprender cada una una pluralidad de componentes de captura mediante los cuales se puede inmovilizar una pluralidad de moléculas de analito. La pluralidad de componentes de captura puede estar presente sobre la superficie de las perlas. En algunas realizaciones, las perlas pueden ser perlas magnéticas. La propiedad magnética de las perlas puede ayudar a separar las perlas de una disolución (por ejemplo, que comprende una pluralidad de moléculas de analito no unidas) y/o durante la etapa o etapas de lavado (por ejemplo, para eliminar la muestra de fluido en exceso, agentes de marcaje, etc.). Las perlas potencialmente adecuadas, incluyendo perlas magnéticas, están disponibles de un número de proveedores comerciales. Como se señala anteriormente, hay muchos otros ejemplos de objetos de captura potencialmente adecuados para capturar analitos, incluyendo nanotubos (por ejemplo, nanotubos de carbono), gotitas microfluídicas (por ejemplo, gotitas de un primer fluido sustancialmente rodeado por un segundo fluido), etc.

Los expertos normales en la técnica estarán al tanto de los métodos y técnicas para exponer una pluralidad de objetos de captura a una muestra de fluido que contiene o que se sospecha que contiene una molécula de analito o

partícula para la captura de analito inicial. Por ejemplo, la pluralidad de objetos de captura se puede añadir (por ejemplo, como un sólido, como una disolución) directamente a una muestra de fluido. Como otro ejemplo, la muestra de fluido se puede añadir a la pluralidad de objetos de captura (por ejemplo, en disolución, como un sólido). En algunos casos, las disoluciones se pueden agitar (por ejemplo, agitar mecánicamente, agitar manualmente, etc.).

5 Tras la inmovilización de las moléculas de analito con respecto a una pluralidad de objetos de captura, los objetos de captura se pueden someter a al menos una etapa de lavado. La etapa de lavado puede ayudar a eliminar cualesquiera moléculas no unidas (por ejemplo, moléculas de analito, u otros componentes de reacción) de la disolución. Por ejemplo, haciendo referencia a la FIG. 1, tras la inmovilización de moléculas de analito 4 con perlas 6, como se muestra en la etapa (B), se puede llevar a cabo una etapa de lavado para eliminar cualesquiera moléculas de analito no unidas no inmovilizadas con respecto a una molécula de analito. Como otro ejemplo, haciendo referencia a la FIG. 2, tras la asociación de los ligandos de unión 31 con moléculas de analito 36, como se muestra en la etapa (C), se puede llevar a cabo una etapa de lavado para eliminar cualesquiera ligandos de unión no unidos. La etapa de lavado se puede llevar a cabo usando cualquier técnica adecuada conocida por los expertos normales en la técnica, por ejemplo mediante incubación de los objetos de captura con una disolución de lavado seguido de la centrifugación de la disolución que comprende los objetos de captura y la separación del líquido por decantación, o usando técnicas de filtración. En realizaciones en las que la pluralidad de objetos de captura comprende una pluralidad de perlas magnéticas, las perlas se pueden aislar de la disolución a granel con la ayuda de un imán.

20 La pluralidad de objetos de captura, tras la etapa de captura (por ejemplo, al menos algunos asociados con al menos una molécula de analito), se puede exponer a uno o más reactivos adicionales, antes de segregar espacialmente la pluralidad de objetos de captura en una pluralidad de localizaciones para la detección. Por ejemplo, como se señala previamente, los objetos de captura se pueden exponer a una pluralidad de ligandos de unión, al menos algunos de los cuales se pueden asociar con una molécula de analito inmovilizada. Los objetos de captura se pueden exponer a más de un tipo de ligando de unión (por ejemplo, un primer tipo de ligando de unión y un segundo, tercer, etc. tipo de ligando de unión), como se señala anteriormente. La asociación de un ligando de unión con una molécula de analito inmovilizada puede ayudar a la detección de las moléculas de analito, como se describe aquí.

30 En algunas realizaciones, además de una pluralidad de objetos de captura para la captura de analito, también se puede proporcionar y/o emplear una pluralidad de objetos de control. Un objeto u objetos de control pueden ser útiles para una variedad de fines, incluyendo, pero sin limitarse a, la identificación de la orientación de la pluralidad de localizaciones (por ejemplo, en el caso en el que la pluralidad de localizaciones se forma como una matriz de sitios de reacción, recipientes de reacción, etc.), para ayudar a determinar la calidad del ensayo, y/o para ayudar a calibrar el sistema de detección (por ejemplo, sistema de interrogación óptica), como se describe más abajo. Se debería entender que puede estar presente más de un tipo de objeto de control en cualquier formato de ensayo (por ejemplo, un primer tipo de objeto de control para determinar la calidad del ensayo y un segundo tipo de objeto de control para actuar como un marcador de localización), o un único tipo de objeto de control puede tener más de una de las funciones descritas anteriormente.

40 En algunos casos, los objetos de control se usan para identificar la orientación de la pluralidad de localizaciones (por ejemplo, recipientes de reacción, sitios, etc.) en una matriz (por ejemplo, función como marcador o marcadores de localización para una matriz). Por ejemplo, un objeto de control se puede distribuir aleatoriamente o de manera específica en una matriz, y puede proporcionar una o más localizaciones de referencia para determinar la orientación/posición de la matriz. Tal rasgo puede ser útil cuando se comparan múltiples imágenes de una porción de la matriz a intervalos de tiempo diferentes. Esto es, las posiciones de objetos de control en la matriz se pueden usar para registrar las imágenes. En algunos casos, los objetos de control se pueden usar para proporcionar localizaciones de referencia en realizaciones en las que una pluralidad de imágenes de regiones solapantes pequeñas se combinan para formar una imagen más grande.

50 La presencia de objetos de control en un ensayo puede proporcionar información con respecto a la calidad del ensayo. Por ejemplo, si se encuentra que una localización contiene un objeto de control que comprende un componente enzimático pero no está presente ningún agente de marcaje (por ejemplo, cuyo producto estaría presente al exponer un objeto de control que comprende un componente enzimático a un agente de marcaje precursor), esto da una indicación de que cierto aspecto del ensayo puede no estar funcionando apropiadamente. Por ejemplo, la calidad de los reactivos puede verse comprometida (por ejemplo, la concentración de agente de marcaje precursor es demasiado baja, descomposición del agente de marcaje precursor, etc.), y/o quizás no todas las localizaciones se expusieron al agente de marcaje precursor.

55 En algunas realizaciones, los objetos de control se pueden usar para calibrar el sistema de detección. Por ejemplo, los objetos de control pueden producir una señal óptica que se puede usar para calibrar un sistema de detección óptico. En algunas realizaciones, los objetos de control se pueden caracterizar y dopar con una característica particular (por ejemplo, fluorescencia, color, absorbancia, etc.), que puede actuar como chequeo de control de calidad para el comportamiento del sistema de detección.

60 En algunos casos, los objetos de control se pueden usar para estandarizar o normalizar el sistema para dar cuenta de las variaciones del comportamiento y/o características de diferentes componentes del sistema en diferentes

ensayos, durante el transcurso de tiempo, etc. (por ejemplo, sistema de detección, ensayos, reactivos, etc.) entre una porción diferente de una matriz usada en un ensayo, y/o entre dos matrices diferentes. Por ejemplo, el montaje experimental, los parámetros y/o las variaciones pueden conducir a cambios de la intensidad de una señal (por ejemplo, señal fluorescente) producida por una única matriz en diferentes puntos de tiempo, o entre al menos dos matrices en puntos de tiempo simultáneos o diferentes. Además, en una única matriz, diferentes porciones de la matriz pueden producir diferentes señales de fondo. Tales variaciones pueden conducir a cambios en señales de calibración (por ejemplo, determinación de una señal media de las perlas) entre las matrices, porciones de una matriz o en múltiples tiempos, lo que puede conducir a determinaciones inexactas en algunos casos. Los ejemplos no limitantes de parámetros que pueden provocar variación incluyen la concentración del agente de marcaje, temperatura, foco, intensidad de la luz de detección, profundidad y/o tamaño de las localizaciones en una matriz, etc. Para dar cuenta de los efectos de algunas o de todas de las citadas variaciones, en algunas realizaciones se puede usar una pluralidad de objetos de control. En ciertos casos, tales objetos de control están esencialmente libres de asociación con moléculas de analito o partículas. En ciertas realizaciones, menos de alrededor de 20%, alrededor de 10%, alrededor de 5%, alrededor de 1%, etc. de los objetos de control están asociados con moléculas de analito o partículas. Los objetos de control pueden ser distinguibles de los objetos de captura (por ejemplo, cada uno puede producir una señal distinguible), y el sistema se puede configurar de manera que cualesquiera moléculas de analito asociadas con un objeto de control no cuentan en la determinación de la concentración de las moléculas de analito. Las señales procedentes de los objetos de control se pueden usar para normalizar los valores de interrogación entre diferentes matrices, o en áreas de una única matriz. Por ejemplo, debido a que las señales de los objetos de control deberían de ser aproximadamente iguales entre matrices y/o alrededor de una única matriz, las señales de los objetos de control se pueden normalizar hasta un valor apropiado, y las señales de los objetos no de control (por ejemplo, los objetos de captura asociados con una molécula de analito) se pueden ajustar en consecuencia.

El objeto de control se puede proporcionar con una pluralidad de objetos de captura para la captura del analito antes de la exposición a una muestra de fluido que contiene moléculas de analito, o se puede añadir en otro momento en el ensayo (por ejemplo, tras la exposición a la pluralidad de moléculas de analito y/o ligandos de unión, y/o antes de segregar espacialmente la pluralidad de objetos de captura en una pluralidad de localizaciones). Los objetos de control pueden ser distinguibles de los objetos de captura usando técnicas conocidas por los expertos normales en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los objetos de control pueden comprender una única propiedad (por ejemplo, están codificados) en comparación con los objetos de captura que comprenden una superficie de unión para las moléculas de analito. Por ejemplo, el objeto de control puede tener una emisión de fluorescencia diferente, una reflectividad espectral, una forma, una absorción espectral, o una emisión o absorción de FTIR, en comparación con los objetos de captura. El porcentaje de objetos de control al número total de objetos (por ejemplo, objetos de captura y objetos de control) en el ensayo puede ser alrededor de 0,0001%, alrededor de 0,0005%, alrededor de 0,001%, alrededor de 0,005%, alrededor de 0,01%, alrededor de 0,05%, alrededor de 0,1%, alrededor de 0,5%, alrededor de 1%, alrededor de 5%, o similar.

En algunas realizaciones, los objetos de control están configurados como controles de unión negativa, y pueden ser de forma y tamaño similares como los objetos de captura usados para inmovilizar moléculas de analito; sin embargo, los objetos de control pueden carecer de una superficie de unión para las moléculas de analito (por ejemplo, una pluralidad de componentes de captura). Por ejemplo, los objetos de control pueden comprender una pluralidad de perlas, y los objetos de captura para inmovilizar las moléculas de analito pueden comprender las mismas perlas o similares, que comprenden adicionalmente al menos una superficie que comprende una pluralidad de componentes de captura.

En una realización, los objetos de control pueden comprender un control positivo, e incluyen un componente enzimático. Un agente de marcaje precursor se puede convertir en un agente de marcaje con la exposición al componente enzimático. En algunos casos, el componente enzimático puede ser el mismo que el componente enzimático que se usa para detectar las moléculas de analito en la muestra de fluido (por ejemplo, comprendido en otro componente del ensayo, por ejemplo un componente enzimático comprendido en un ligando de unión, una molécula de analito, etc.). En tales realizaciones, el objeto de control puede ser distinguible de los objetos de captura de manera que los recipientes de reacción que tienen una señal positiva se pueden analizar para determinar si el recipiente de reacción comprende un objeto de control (por ejemplo, que tiene una primera señal detectable) o un objeto de captura (por ejemplo, que tiene una segunda señal detectable distinguible de la primera señal detectable). En otros casos, el componente enzimático puede ser diferente de un componente enzimático que se usa para detectar las moléculas de analito en una muestra de fluido (por ejemplo, comprendido en otro componente del ensayo, por ejemplo un componente enzimático comprendido en un ligando de unión, una molécula de analito, etc.). En esta realización, el objeto de control puede ser distinguible o no de los objetos de captura. Se puede proporcionar tanto un primer tipo como un segundo tipo de agente de marcaje precursor a los recipientes de reacción, y el primer tipo de agente de marcaje precursor se puede convertir en un primer tipo de agente de marcaje con la exposición al componente enzimático asociado con las perlas de control, y el segundo tipo de agente de marcaje precursor se puede convertir en un segundo tipo de agente de marcaje con la exposición al otro componente enzimático (por ejemplo, comprendido en el ligando de unión/molécula de analito/etc.). Los recipientes de reacción que contienen el primer tipo de agente de marcaje corresponden a los recipientes de reacción que contienen un objeto de control, y los recipientes de reacción que contienen un segundo tipo de agente de marcaje corresponden a los recipientes de reacción que contienen un ligando de unión/molécula de analito/etc. La pluralidad de localizaciones que contienen

una perla de control se puede observar para analizar, por ejemplo, la eficacia de la reacción de conversión enzimática

Para preparar los objetos de control, se puede usar una variedad de métodos, por ejemplo métodos similares descritos aquí para los objetos de captura (por ejemplo, perlas que comprenden una pluralidad de componentes de captura). En algunos casos, algunos de los objetos de control pueden comprender un componente enzimático. Los objetos de control se pueden preparar de manera que 1) la mayoría de los objetos de control comprendan cada uno al menos un componente enzimático (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, etc.), o 2) algunos de los objetos de control comprendan un único componente enzimático y el resto de los objetos de control no comprendan ningún componente enzimático. En el primer caso, durante la formación de los objetos de control, la relación de componentes enzimáticos proporcionados en disolución a objetos puede ser mayor que 1:1, mayor que alrededor de 2:1, mayor que alrededor de 5:1, mayor que alrededor de 10:1, o similar. En tales casos, sería de esperar que tras repartir los objetos de control sobre un sustrato, cada localización que comprende un objeto de control diese una señal positiva al exponerla a un agente de marcaje precursor. En el segundo caso, durante la formación de los objetos de control, la relación de componentes enzimáticos proporcionados en disolución a objetos puede ser menor que alrededor de 1:5, menor que alrededor de 1:10, menor que alrededor de 1:20, menor que alrededor de 1:50, o similar. En tales casos, sería de esperar que la relación del número de localizaciones que comprenden un objeto de control y que dan una señal positiva al número de localizaciones que comprenden un objeto de control que no dan una señal positiva sería aproximadamente similar a la relación de componentes enzimáticos a objetos durante la formación de los objetos de control, y/o puede seguir una distribución de Poisson.

Como se describe anteriormente, tras la inmovilización de una pluralidad de moléculas de analito con respecto a la pluralidad de objetos de captura en la etapa de captura del analito, al menos una porción de los objetos de captura se puede segregar espacialmente en una pluralidad de localizaciones, por ejemplo sobre un sustrato. Por ejemplo, cada uno de los objetos de captura de la porción de objetos de captura que están segregados espacialmente se pueden situar en y/o asociar con una localización (por ejemplo, un punto, región, pocillo, etc. sobre la superficie y/o en el cuerpo de un sustrato) que es espacialmente distinta de las localizaciones en las que cada uno de los otros objetos de captura están situados, de manera que los objetos de captura y las localizaciones se pueden resolver individualmente mediante un sistema de detección analítico empleado para asignar las localizaciones. Como ejemplo, cada una de una porción de los objetos de captura se puede segregar espacialmente en una matriz de recipientes de reacción sobre un sustrato, de manera que estadísticamente solo ningún o un objeto de captura esté situado en al menos algunos de los recipientes de reacción, y en ciertos casos en esencialmente cada recipiente de reacción. Cada localización puede ser asignable individualmente con respecto a las otras localizaciones. Adicionalmente, las localizaciones se pueden disponer de manera que una pluralidad de localizaciones se puede asignar sustancialmente de forma simultánea, como se describe aquí, a la vez que todavía permite la capacidad de resolver localizaciones individuales y objetos de captura.

Se debería entender que aunque gran parte de la discusión aquí se centra en localizaciones que contienen un único objeto de captura, esto de ningún modo es limitante, y en algunas realizaciones, más de un objeto de captura puede estar contenido en una única localización. En tales realizaciones, la relación de objetos de captura a moléculas de analito puede ser tal que tras la segregación espacial de la pluralidad de objetos de captura en la pluralidad de localizaciones, una fracción estadísticamente significativa de las localizaciones no contiene moléculas de analito, y una fracción estadísticamente significativa de localizaciones contiene al menos una molécula de analito. Esto es, mientras una única localización puede contener una pluralidad de objetos de captura, en algunos casos, ninguno de los objetos de captura están asociados con ninguna molécula de analito, y solamente uno solo de los objetos de captura en una localización asignada está asociado con al menos una molécula de analito.

Como se señala anteriormente, en algunas realizaciones, la pluralidad de localizaciones comprende una pluralidad de recipientes de reacción/pocillos sobre un sustrato. Los recipientes de reacción, en ciertas realizaciones, se pueden configurar para recibir y contener solamente un único objeto de captura usado para la captura del analito. La pluralidad de objetos de captura se puede repartir a lo largo de una pluralidad de tales recipientes de reacción (por ejemplo, configurados como una matriz de recipientes de reacción sobre un sustrato), en algunos casos, para facilitar la determinación de una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido por medios discutidos adicionalmente con detalle más abajo y en los ejemplos.

En la presente invención, la pluralidad de recipientes de reacción se sellan, por ejemplo, tras la introducción de los objetos de captura usados para la captura del analito, por ejemplo a través del emparejamiento del segundo sustrato y un componente sellante. El sellado de los recipientes de reacción puede ser tal que los contenidos de cada recipiente de reacción no pueden escapar del recipiente de reacción durante el resto del ensayo. En algunos casos, los recipientes de reacción se pueden sellar tras la adición de los objetos de captura y, opcionalmente, un agente de marcaje precursor para facilitar la detección de las moléculas de analito. Para realizaciones que emplean agentes de marcaje precursores, al sellar los contenidos en algún o en cada recipiente de reacción, se puede producir dentro de los recipientes de reacción sellados una reacción para producir los agentes de marcaje detectables, produciendo de ese modo una cantidad detectable de agentes de marcaje que es retenida en el recipiente de reacción para fines de detección.

La pluralidad de localizaciones que comprende una pluralidad de recipientes de reacción se puede formar usando

una variedad de métodos y/o materiales. En algunos casos, la pluralidad de recipientes de reacción se forma como una matriz de depresiones en una primera superficie. En otros casos, sin embargo, la pluralidad de recipientes de reacción se puede formar emparejando un componente sellante que comprende una pluralidad de depresiones con un sustrato que puede tener una superficie uniforme o puede incluir depresiones alineadas con aquellas en el componente sellante. Cualquiera de los componentes del dispositivo, por ejemplo el sustrato o componente sellante, se puede fabricar de un material flexible, por ejemplo un material de polímero elastomérico, para ayudar en el sellado. Las superficies pueden ser o están hechas de regiones hidrófobas, o contienen regiones hidrófobas para minimizar la fuga de muestras acuosas de los micropocillos.

En algunos casos, el componente sellante puede ser capaz de entrar en contacto con la superficie exterior de una matriz de micropocillos (por ejemplo, el revestimiento de un haz de fibras ópticas como se describe con más detalle más abajo), de manera que cada recipiente de reacción se sella o se aísla de forma que los contenidos de cada recipiente de reacción no pueden escapar del recipiente de reacción. Según una realización, el componente sellante puede ser un tapón de elastómero de silicona que se puede colocar contra una matriz de micropocillos con aplicación de una presión sustancialmente uniforme en toda la superficie. En algunos casos, los recipientes de reacción se pueden sellar tras la adición de la pluralidad de objetos de captura usados para la captura del analito y, opcionalmente, cualquier molécula de agente de marcaje precursor que se puede usar para facilitar la detección de la molécula de analito.

Un ejemplo no limitante de la formación de una pluralidad de recipientes de reacción que contienen disolución de ensayo sobre/en un sustrato se representa en la FIG. 6. La FIG. 6, panel (A), muestra una superficie que comprende una pluralidad de micropocillos 139, que se han expuesto a una disolución de ensayo 141 (por ejemplo, una disolución que contiene los objetos de captura usados para la captura de analito, y/u objetos de control obtenidos tras la realización de la etapa o etapas de captura de analito y cualquier etapa o etapas de lavado), y un componente sellante 143. El componente sellante 143 en este ejemplo comprende una superficie inferior sustancialmente plana. El emparejamiento del sustrato 139 con el componente sellante 143 forma una pluralidad de recipientes de reacción sellados 145. Las áreas entre los recipientes de reacción 148 se pueden modificar para ayudar en la formación de un cierre hermético entre los recipientes de reacción.

Una segunda realización se muestra en la FIG. 6, panel (B), en la que un componente sellante 162 que comprende una pluralidad de micropocillos 163 se empareja con una superficie 158 sustancialmente plana que se ha expuesto a disolución de ensayo 162, formando de ese modo una pluralidad de recipientes de reacción 164.

En una tercera realización, como se muestra en la FIG. 6, panel (C), la superficie 166 de sustrato que comprende una pluralidad de micropocillos 167 se empareja con un componente sellante 170 que también comprende una pluralidad de micropocillos 171. En esta realización, los micropocillos en el sustrato y los micropocillos en los componentes sellantes se alinean sustancialmente de manera que cada recipiente de reacción 172 formado comprende una porción del micropocillo del componente sellante y una porción de un micropocillo del sustrato. En la FIG. 6, panel (D), los micropocillos no están alineados, de manera que cada recipiente de reacción comprende un micropocillo del componente sellante 173 o un micropocillo del sustrato 175.

El componente sellante puede tener esencialmente el mismo tamaño que el sustrato, o puede ser de un tamaño diferente. En algunos casos, el componente sellante tiene aproximadamente el mismo tamaño que el sustrato, y se empareja con sustancialmente toda la superficie del sustrato. En otros casos, como se representa en la FIG. 6, panel (E), el componente sellante 176 es más pequeño que el sustrato 174, y el componente sellante solo se empareja con una porción 178 del sustrato. En todavía otra realización, como se representa en la FIG. 6, panel (F), el componente sellante 182 es más grande que el sustrato 180, y solo una porción 184 del componente sellante se empareja con el sustrato 180.

En algunas realizaciones, los recipientes de reacción pueden tener todos aproximadamente el mismo volumen. En otras realizaciones, los recipientes de reacción pueden tener volúmenes diferentes. El volumen de cada recipiente de reacción individual se puede seleccionar para que sea apropiado para facilitar cualquier protocolo de ensayo particular. Por ejemplo, en un conjunto de realizaciones en las que es deseable limitar el número de objetos de captura usados para la captura del analito contenidos en cada recipiente hasta un número pequeño, el volumen de los recipientes de reacción puede oscilar desde attolitros o más pequeño hasta nanolitros o más grande, dependiendo de la naturaleza de los objetos de captura, de la técnica de detección y equipo empleado, del número y densidad de los pocillos sobre el sustrato, y de la concentración esperada de objetos de captura en el fluido aplicada al sustrato que contiene los pocillos. En una realización, el tamaño del recipiente de reacción se puede seleccionar de manera que solamente un único objeto de captura usado para la captura del analito pueda estar contenido completamente dentro del recipiente de reacción. Según una realización de la presente invención, los recipientes de reacción pueden tener un volumen entre alrededor de 1 femtolitro y alrededor de 1 picolitro, entre alrededor de 1 femtolitros y alrededor de 100 femtolitros, entre alrededor de 10 attolitros y alrededor de 100 picolitros, entre alrededor de 1 picolitro y alrededor de 100 picolitros, entre alrededor de 1 femtolitro y alrededor de 1 picolitro, o entre alrededor de 30 femtolitros y alrededor de 60 femtolitros. En algunos casos, los recipientes de reacción tienen un volumen menor que alrededor de 1 picolitro, menor que alrededor de 500 femtolitros, menor que alrededor de 100 femtolitros, menor que alrededor de 50 femtolitros, o menor que alrededor de 1 femtolitro. En algunos casos, los recipientes de reacción tienen un volumen de alrededor de 10 femtolitros, alrededor de 20 femtolitros, alrededor de

30 femtolitros, alrededor de 40 femtolitros, alrededor de 50 femtolitros, alrededor de 60 femtolitros, alrededor de 70 femtolitros, alrededor de 80 femtolitros, alrededor de 90 femtolitros, o alrededor de 100 femtolitros.

En realizaciones en las que la pluralidad de objetos de captura usados para la captura del analito comprende una pluralidad de perlas, y la pluralidad de localizaciones comprende una pluralidad de recipientes de reacción que tienen una forma que es esencialmente la de un cilindro circular, el tamaño de los recipientes de reacción se puede basar en el tamaño de las perlas, y se puede diseñar para asegurarse de que el número de pocillos que contienen más de una sola perla es mínimo. En algunos casos, el diámetro permisible máximo del pocillo se puede calcular según la Ecuación 3:

$$2 * \text{Radio de la perla} + \sqrt{(3 * \text{Radio de la perla}^2 - \text{Profundidad del pocillo}^2 + 2 * \text{Profundidad del pocillo} * \text{Radio de la perla})} \quad (\text{Ec. 3})$$

y/o la profundidad permisible máxima del pocillo se puede calcular según la Ecuación 4:

$$\text{Radio de la perla} + \sqrt{(4 * \text{Radio de la perla} * \text{Diámetro del pocillo} - \text{Diámetro del pocillo}^2)} \quad (\text{Ec. 4})$$

La profundidad permisible mínima del pocillo y el diámetro permisible mínimo del pocillo para asegurar de que una única perla puede estar contenida en el pocillo, en la mayoría de las realizaciones, no serán menores que el diámetro medio de la perla. Tener un recipiente de reacción de tamaño apropiado que permite que no esté presente más de una única perla en el recipiente de reacción puede proporcionar una mejor capacidad para resolver perlas individuales, permitiendo una mayor exactitud con respecto a la determinación de una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido por los medios descritos con más detalle más abajo y en los Ejemplos. Por ejemplo, si los recipientes de reacción son demasiado grandes, es posible que más de una perla pueda entrar en el recipiente de reacción, lo que puede conducir a un aumento en el número de recipientes de reacción que contienen múltiples moléculas de analito, lo que puede introducir inexactitud en la determinación de la concentración usando un modelo algorítmico/estadístico basado en la detección de una sola molécula (véase más abajo). En algunos casos, sin embargo, puede ser deseable tener más de una perla que entre en el recipiente de reacción. Por otro lado, si el recipiente de reacción es demasiado pequeño, es posible que una perla no entre en el recipiente de reacción, evitando de ese modo el sellado apropiado del recipiente de reacción (por ejemplo, en realizaciones en las que el recipiente de reacción se sella) y/o puede conducir a dificultades en la asignación de localizaciones individuales (por ejemplo, en realizaciones en las que se produce un agente de marcaje para la detección, el agente de marcaje se puede dispersar del recipiente de reacción en el que se produce). En tales casos, puede haber falsos positivos (por ejemplo, se puede determinar que un recipiente de reacción que no contenga una molécula de analito contenga una molécula de analito basado en el agente de marcaje que se ha difundido desde la localización en la que se produjo), que pueden conducir a una determinación imprecisa de una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido.

En algunas realizaciones, la profundidad media de los recipientes de reacción está entre alrededor de 1,0 y alrededor de 1,7 veces, entre alrededor de 1,0 veces y alrededor de 1,5 veces, entre alrededor de 1,0 veces y alrededor de 1,3 veces, o entre alrededor de 1,1 veces y alrededor de 1,4 veces el diámetro medio de las perlas. En algunas realizaciones, el diámetro medio de los recipientes de reacción está entre alrededor de 1,0 veces y alrededor de 1,9 veces, entre alrededor de 1,2 veces y alrededor de 1,7 veces, entre alrededor de 1,0 veces y alrededor de 1,5 veces, o entre alrededor de 1,3 veces y alrededor de 1,6 veces el diámetro medio de las perlas. En una realización particular, la profundidad media de los recipientes de reacción está entre alrededor de 1,0 veces y alrededor de 1,5 veces el diámetro medio de las perlas, y el diámetro medio de los recipientes de reacción está entre alrededor de 1,0 veces y alrededor de 1,9 veces el diámetro medio de las perlas.

El número total de localizaciones y/o densidad de las localizaciones empleadas en un ensayo (por ejemplo, el número/densidad de recipientes de reacción en una matriz) puede depender de la composición y uso final de la matriz. Por ejemplo, el número de recipientes de reacción empleados puede depender del número de objetos de captura empleados, del intervalo de concentración sospechada del ensayo, del método de detección, del tamaño de los objetos de captura, del tipo de entidad de detección (por ejemplo, agente de marcaje libre en disolución, agente de marcaje precipitante, etc.). Se pueden obtener matrices que contienen de alrededor de 2 a muchos miles de millones de recipientes de reacción (o número total de recipientes de reacción) utilizando una variedad de técnicas y materiales. Se puede usar el incremento del número de recipientes de reacción en la matriz para incrementar el intervalo dinámico de un ensayo o para permitir que se evalúen en paralelo múltiples muestras o múltiples tipos de moléculas de analito. La matriz puede comprender entre mil y un millón de recipientes de reacción por muestra a analizar. En algunos casos, la matriz comprende más de un millón de recipientes de reacción. En algunas realizaciones, la matriz comprende entre alrededor de 1.000 y alrededor de 50.000, entre alrededor de 1.000 y alrededor de 1.000.000, entre alrededor de 1.000 y alrededor de 10.000, entre alrededor de 10.000 y alrededor de 100.000, entre alrededor de 100.000 y alrededor de 1.000.000, entre alrededor de 100.000 y alrededor de 500.000, entre alrededor de 1.000 y alrededor de 100.000, entre alrededor de 50.000 y alrededor de 100.000, entre alrededor de 20.000 y alrededor de 80.000, entre alrededor de 30.000 y alrededor de 70.000, entre alrededor de 40.000 y alrededor de 60.000, o similar, recipientes de reacción. En algunas realizaciones, la matriz comprende alrededor de

10.000, alrededor de 20.000, alrededor de 50.000, alrededor de 100.000, alrededor de 150.000, alrededor de 200.000, alrededor de 300.000, alrededor de 500.000, alrededor de 1.000.000, o más, recipientes de reacción.

5 La matriz de recipientes de reacción se puede disponer sobre una superficie sustancialmente plana, o en una disposición tridimensional no plana. Los recipientes de reacción se pueden disponer matricialmente en un patrón regular, o se pueden distribuir al azar. En una realización específica, la matriz es un patrón regular de sitios sobre una superficie sustancialmente plana que permite que los sitios se asignen en el plano de coordenadas X-Y.

10 En algunas realizaciones, los recipientes de reacción se forman en un material sólido. Como apreciarán los expertos en la técnica, el número de materiales potencialmente adecuados en los que se pueden formar los recipientes de reacción es muy grande, e incluyen, pero no se limitan a, vidrio (incluyendo vidrio modificado y/o funcionalizado), plásticos (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poluretanos, copolímero de olefina cíclico (COC), polímero de olefina cíclico (COP), Teflon®, polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, etc.), elastómeros (tales como poli(dimetilsiloxano) y poliuretanos), materiales compuestos, materiales cerámicos, sílice o materiales a base de sílice (incluyendo silicio y silicio modificado), carbono, metales, haces de fibras ópticas, o similares. En general, el material de sustrato se puede seleccionar para permitir la detección óptica sin autofluorescencia apreciable. En ciertas realizaciones, los recipientes de reacción se pueden formar en un material flexible.

20 Un recipiente de reacción en una superficie (por ejemplo, sustrato o componente sellante) se puede formar usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, fotolitografía, técnicas de estampación, técnicas de moldeo, técnicas de grabado, o similares. Como apreciarán los expertos de pericia normal en la técnica, la técnica usada puede depender de la composición y forma del material de soporte, y del tamaño y número de recipientes de reacción.

25 En una realización particular, una matriz de recipientes de reacción se forma creando micropocillos en un extremo de un haz de fibras ópticas, y utilizando una superficie adaptable plana como componente sellante. En ciertas de tales realizaciones, una matriz de recipientes de reacción en el extremo de un haz de fibras ópticas se puede formar según lo siguiente. En primer lugar, una matriz de micropocillos se graba en el extremo de un haz de fibras ópticas pulido. Las técnicas y materiales para formar y grabar un haz de fibras ópticas son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. Por ejemplo, el diámetro de las fibras ópticas, la presencia, tamaño y composición de regiones centrales y de revestimiento de la fibra, y la profundidad y especificidad del grabado se pueden variar mediante la técnica de grabado escogida de manera que se puedan formar micropocillos del volumen deseado. En ciertas realizaciones, el proceso de grabado crea micropocillos al grabar preferentemente el material central de las fibras de vidrio individuales en el haz, de manera que cada pocillo se alinea aproximadamente con una única fibra y se aísla de pocillos adyacentes mediante el material de revestimiento. Las ventajas potenciales del formato de matriz óptica de fibras es que puede producir miles a millones de recipientes de reacción sin procedimientos de microfabricación complicados, y que puede proporcionar la capacidad para observar y asignar ópticamente muchos recipientes de reacción de manera simultánea.

40 Cada micropocillo se puede alinear con una fibra óptica en el haz, de manera que el haz de fibras ópticas puede llevar tanto luz de excitación como de emisión hacia y desde los pocillos, permitiendo la interrogación remota de los contenidos de los pocillos. Además, una matriz de fibras ópticas puede proporcionar la capacidad para la excitación simultánea o no simultánea de moléculas en recipientes adyacentes, sin "interferencia" de la señal entre las fibras. Esto es, la luz de excitación transmitida en una fibra no escapa a una fibra vecina.

45 Como alternativa, se pueden fabricar estructuras equivalentes de una pluralidad de recipientes de reacción usando otros métodos y materiales que no utilizan como sustrato los extremos de un haz de fibras ópticas. Por ejemplo, la matriz puede ser un sustrato moteado, impreso o fabricado fotolitográficamente, producido mediante técnicas conocidas en la técnica; véanse, por ejemplo, los documentos WO95/25116; WO95/35505; PCT US98/09163; las patentes U.S. n^{os} 5.700.637, 5.807.522, 5.445.934, 6.406.845, y 6.482.593. En algunos casos, la matriz se puede producir usando técnicas de moldeo, de grabado en relieve, y/o de grabado químico, como será conocido por aquellos de pericia normal en la técnica.

50 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un sistema equipado con una plataforma mecánica que aplica un componente sellante a un sustrato. La plataforma se puede colocar debajo de una etapa en el sistema. Después de que los componentes de reacción escogidos se han añadido a una matriz de recipientes de reacción, el componente sellante se puede emparejar con la matriz. Por ejemplo, el componente sellante se puede disponer en forma de sándwich entre una superficie plana (tal como, por ejemplo, un portaobjetos de microscopio) y la matriz de recipientes de reacción usando presión uniforme aplicada por la plataforma mecánica.

55 Una realización no limitante se ilustra en la FIG. 7. Un componente sellante 300 se coloca sobre la plataforma mecánica 302. La disolución de ensayo 304 se coloca sobre el componente sellante 300. La plataforma mecánica se mueve ascendentemente hacia la matriz 306 (por ejemplo, matriz de fibras ópticas) de manera que se aplica una presión uniforme. Como se muestra en la FIG. 8, el componente sellante 300 forma un cierre hermético con la matriz 306. En otros casos, se puede aplicar presión variable al componente sellante para formar un cierre hermético entre el componente sellante y la matriz. El sistema también puede comprender componentes adicionales 312 que se

pueden utilizar para analizar la matriz (por ejemplo, microscopio, ordenador, etc.), como se discute aquí.

La pluralidad de objetos de captura usados para capturar el analito se puede separar espacialmente en una pluralidad de recipientes de reacción usando cualquiera de una amplia variedad de técnicas conocidas por aquellos de pericia normal en la técnica. En algunos casos, la pluralidad de recipientes de reacción se puede exponer a una disolución que contiene la pluralidad de objetos de captura. En algunos casos, se puede aplicar fuerza a la disolución y/o a los objetos de captura, ayudando de ese modo en la separación espacial de los objetos de captura de la fase fluida y/o a la deposición de los objetos de captura en los recipientes. Por ejemplo, tras la aplicación de una disolución de ensayo que contiene los objetos de captura a un sustrato que contiene los recipientes de reacción, el sustrato y la disolución se pueden centrifugar para ayudar a depositar los objetos de captura en los recipientes de reacción. En realizaciones en las que los objetos de captura (por ejemplo, perlas) son magnéticos, se puede usar un imán para ayudar a contener los objetos de captura en los recipientes de reacción. En algunos casos, cuando la pluralidad de recipientes de reacción se forman en el extremo de un haz de fibras ópticas (u otra superficie plana), se puede colocar un material (por ejemplo, tubería) alrededor de los bordes de la superficie de la matriz que comprende la pluralidad de recipientes de reacción para formar un envase para mantener la disolución en el sitio mientras que los objetos de captura sedimentan en los recipientes de reacción o se colocan en los recipientes de reacción (por ejemplo, mientras se centrifuga). Tras la colocación de los objetos de captura en al menos algunos de los recipientes de reacción, el material circundante se puede eliminar, y la superficie de la matriz se puede lavar y/o limpiar para eliminar cualquier exceso de disolución/objetos de captura.

En algunas realizaciones, el sustrato no incluye pocillos o recipientes de reacción que forman la pluralidad de recipientes de reacción, pero usa/proporciona otros medios para segregar espacialmente la pluralidad de objetos de captura usados para la captura del analito. En algunos casos, se puede emplear una superficie en forma de patrón sustancialmente plana, en la que las áreas con el patrón forman una pluralidad de localizaciones. En algunos casos, las áreas con el patrón pueden comprender superficies sustancialmente hidrófilas que están rodeadas sustancialmente de superficies sustancialmente hidrófobas. Una pluralidad de objetos de captura (por ejemplo, perlas) puede estar rodeada sustancialmente por un medio sustancialmente hidrófilo (por ejemplo, que comprende agua), y las perlas se pueden exponer a la superficie de patrón de manera que las perlas se asocien en las áreas con el patrón (por ejemplo, las localizaciones), segregando de ese modo espacialmente la pluralidad de perlas. Por ejemplo, en una de tales realizaciones, un sustrato puede ser o incluir un gel u otro material capaz de proporcionar una barrera suficiente al transporte de masas (por ejemplo, barrera convectiva y/o difusiva) para evitar que los objetos de captura usados para capturar el analito y/o el agente de marcaje precursor y/o el agente de marcaje se muevan desde una localización sobre o en el material a otra localización para provocar interferencia o perturbación entre localizaciones espaciales que contienen diferentes objetos de captura durante el marco de tiempo requerido para asignar las localizaciones y completar el ensayo. Por ejemplo, en una realización, una pluralidad de objetos de captura se separa espacialmente dispersando los objetos de captura sobre y/o en un material de hidrogel. En algunos casos, un agente de marcaje precursor puede estar ya presente en el hidrogel, facilitando de ese modo el desarrollo de una concentración local del agente de marcaje (por ejemplo, con la exposición a un ligando de unión o a una molécula de analito que porta un componente enzimático). Como aún otra realización, los objetos de captura se pueden confinar en uno o más capilares. En algunos casos, la pluralidad de objetos de captura se puede absorber o localizar sobre un sustrato poroso o fibroso, por ejemplo papel de filtro. En algunas realizaciones, los objetos de captura se pueden segregar espacialmente sobre una superficie uniforme (por ejemplo, una superficie plana), y los objetos de captura se pueden detectar usando agentes de marcaje precursores que se convierten en agentes de marcaje sustancialmente insolubles o precipitantes que permanecen localizados en o cerca de la localización donde está localizado el objeto de captura correspondiente. El uso de tales agentes de marcaje sustancialmente insolubles o precipitantes se describe aquí.

Artículos y kits

Aunque no se reivindica, se describe un artículo o kit para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido. El artículo o kit puede comprender una pluralidad de perlas y un sustrato que comprende una pluralidad de recipientes de reacción. Los recipientes de reacción se pueden configurar para recibir y contener los objetos de captura. La pluralidad de perlas, en cierta realización, tiene un diámetro medio entre alrededor de 0,1 micrómetros y alrededor de 100 micrómetros, y el tamaño de los recipientes de reacción se puede seleccionar de manera que solamente ninguna o una perla sea capaz de estar contenida en recipientes de reacción individuales. En algunos casos, la profundidad media de los recipientes de reacción está entre alrededor de 1,0 veces y alrededor de 1,5 veces el diámetro medio de las perlas, y el diámetro medio de los recipientes de reacción está entre alrededor de 1,0 veces y alrededor de 1,9 veces el diámetro medio de las perlas. En ciertas realizaciones, las perlas pueden tener un diámetro medio entre alrededor de 1 micrómetro y alrededor de 10 micrómetros, entre alrededor de 1 micrómetros y alrededor de 5 micrómetros, o cualquier intervalo de tamaños descrito aquí.

La pluralidad de perlas proporcionadas puede tener una variedad de propiedades y parámetros, como se describe aquí. Por ejemplo, las perlas pueden ser magnéticas. La pluralidad de perlas puede comprender una superficie de unión (por ejemplo, una pluralidad de componentes de captura) que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula.

La pluralidad de recipientes de reacción se puede formar en cualquier sustrato adecuado, como se describe aquí. En una realización particular, la pluralidad de recipientes de reacción se forma en el extremo de un haz de fibras ópticas. El haz de fibras ópticas se puede preparar (por ejemplo, grabar) según métodos conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica y/o métodos descritos aquí. En otras realizaciones, la pluralidad de recipientes de reacción se forma en una placa o material sustancialmente plano similar (por ejemplo, usando litografía u otras técnicas conocidas). Se describen aquí materiales adecuados ejemplares.

La profundidad media de la pluralidad de recipientes de reacción puede estar entre alrededor de 1,0 y alrededor de 1,5 veces, o entre alrededor de 1,1 y alrededor de 1,3 veces el diámetro medio de las perlas, o cualquier intervalo descrito aquí. El diámetro medio de la pluralidad de recipientes de reacción puede estar entre alrededor de 1,0 veces y alrededor de 1,9 veces, o entre alrededor de 1,3 veces y alrededor de 1,8 veces el diámetro medio de las perlas, o cualquier intervalo descrito aquí. La profundidad media y/o el diámetro medio de la pluralidad de recipientes de reacción se pueden escoger de manera que no más de una perla sea capaz de estar contenida en los recipientes de reacción. Se describen aquí métodos para calcular profundidades máximas y diámetros máximos para facilitar la carga de una sola perla. El volumen medio de la pluralidad de recipientes de reacción puede estar entre alrededor de 10 attolitros y alrededor de 100 picolitros, entre alrededor de 1 femtolitro y alrededor de 1 picolitro, o cualquier intervalo deseado. El sustrato puede comprender cualquier número de recipientes de reacción, por ejemplo entre alrededor de 1.000 y alrededor de 1.000.000 recipientes de reacción, entre alrededor de 10.000 y alrededor de 100.000 recipientes de reacción, o entre alrededor de 100.000 y alrededor de 300.000 recipientes de reacción, o cualquier otro intervalo deseado.

El artículo o kit puede comprender cualquier número de componentes adicionales, algunos de los cuales se describen con detalle aquí. En algunos casos, el artículo o kit puede comprender además un componente sellante configurado para sellar la pluralidad de recipientes de reacción. En ciertas realizaciones, la pluralidad de recipientes de reacción se puede formar al emparejar al menos una porción de un componente sellante y al menos una porción del segundo sustrato, como se muestra en las FIGS. 7A-7F, y como se discute con más detalle aquí. Como otro ejemplo, el kit también puede proporcionar disoluciones para llevar a cabo un método de ensayo como se describe aquí. El ejemplo no limitante de disoluciones incluye disoluciones que contienen uno o más tipos de ligandos de unión y agentes de marcaje precursores. En algunos casos, el artículo o kit puede comprender al menos un tipo de perla de control.

El kit puede incluir opcionalmente instrucciones para uso de la pluralidad de perlas y la pluralidad de recipientes de reacción (y cualesquiera componentes adicionales proporcionados). Esto es, el kit puede incluir una descripción de uso de las perlas y recipientes de reacción, por ejemplo para uso con un sistema para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito (o partículas) en una muestra de fluido. Como se usa aquí, "instrucciones" puede definir un componente de instrucción y/o promoción, y típicamente implica instrucciones escritas sobre o asociadas con el envasado de la invención. Las instrucciones también pueden incluir cualesquiera instrucciones orales o electrónicas proporcionadas de cualquier manera de manera que un usuario del kit reconocerá claramente que las instrucciones se han de asociar con el kit.

Componentes de captura

En algunas realizaciones de la presente invención, la superficie de los objetos de captura puede proporcionar una superficie de unión que tiene una afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula. En algunas realizaciones, la superficie de unión puede comprender al menos un tipo de componente de captura. Generalmente, el componente de captura permite la fijación de una molécula, partícula, o complejo a un soporte sólido (esto es, una superficie de un objeto de captura) para los fines de inmovilización, detección, cuantificación, y/u otro análisis de la molécula, partícula, o complejo. En la presente invención se usa un componente de captura, en algunos casos, para inmovilizar una molécula de analito con respecto a un objeto de captura (por ejemplo, una perla).

Como apreciarán aquellos en la técnica, la composición del componente de captura dependerá de la composición de la molécula de analito. Se conocen componentes de captura para una amplia variedad de moléculas diana, o se pueden encontrar o desarrollar fácilmente usando técnicas conocidas. Por ejemplo, cuando la molécula diana es una proteína, los componentes de captura pueden comprender proteínas, particularmente anticuerpos o sus fragmentos (por ejemplo, fragmentos que se unen a antígenos (Fabs), fragmentos Fab', fragmentos de pepsina, fragmentos F(ab')₂, anticuerpos policlonales o monoclonales de longitud completa, fragmentos similares a anticuerpos, etc.), otras proteínas, tales como proteínas receptoras, Proteína A, Proteína C, etc., o pequeñas moléculas. En algunos casos, los componentes de captura para proteínas comprenden péptidos. Por ejemplo, cuando la molécula diana es una enzima, los componentes de captura adecuados pueden incluir sustratos enzimáticos y/o inhibidores enzimáticos. En algunos casos, cuando el analito diana es una especie fosforilada, el componente de captura puede comprender un agente de unión a fosfato. Por ejemplo, el agente de unión a fosfato puede comprender medios de afinidad por iones metálicos, tales como los descritos en la patente U.S. n° 7.070.921 y en la Solicitud de Patente U.S. n° 20060121544. Además, cuando la molécula diana es un ácido nucleico monocatenario, el componente de captura puede ser un ácido nucleico complementario. De forma similar, la molécula diana puede ser una proteína que se une al ácido nucleico, y el componente de captura puede ser un ácido nucleico monocatenario o bicatenario; como alternativa, el componente de captura puede ser una proteína que se une a ácido nucleico cuando la molécula diana es un ácido nucleico mono o bicatenario. Como alternativa, como se describe generalmente en las patentes

U.S. 5.270.163, 5.475.096, 5.567.588, 5.595.877, 5.637.459, 5.683.867, 5.705.337, y patentes relacionadas, se pueden desarrollar "aptámeros" de ácidos nucleicos para capturar virtualmente cualquier molécula diana. También, por ejemplo, cuando la molécula diana es un hidrato de carbono, los componentes de captura potencialmente adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos, lectinas, y selectinas. Como apreciarán aquellos de pericia normal en la técnica, potencialmente se puede usar como componente de captura cualquier molécula que se pueda asociar específicamente con una molécula diana de interés.

Para ciertas realizaciones, los pares molécula de analito/componente de captura diana adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos/antígenos, receptores/ligandos, proteínas/ácido nucleico, ácidos nucleicos/ácidos nucleicos, enzimas/sustratos y/o inhibidores, hidratos de carbono (incluyendo glicoproteínas y glicolípidos)/lectinas y/o selectinas, proteínas/proteínas, proteínas/pequeñas moléculas, pequeñas moléculas/pequeñas moléculas, etc. Según una realización, los componentes de captura son porciones (particularmente las porciones extracelulares) de receptores de la superficie celular que se sabe que se multimerizan, tales como el receptor de la hormona del crecimiento, transportadores de glucosa (particularmente el receptor de GLUT 4), y receptores de linfocitos T, y las moléculas de analito diana son uno o más ligandos diana de los receptores.

En una realización particular, el componente de captura se puede fijar a la superficie de un objeto de captura vía un enlazamiento, que puede comprender cualquier resto, funcionalización, o modificación de la superficie de unión y/o componente de captura que facilite la fijación del componente de captura a la superficie. El enlazamiento entre el componente de captura y la superficie puede comprender uno o más enlaces químicos o físicos (por ejemplo, fijación no específica vía fuerzas de van der Waals, enlace de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas/hidrófilas, etc.) y/o ligadores químicos que proporcionan tal enlace o enlaces. En ciertas realizaciones, el componente de captura puede comprender un componente extendedor de captura. En tales realizaciones, el componente de captura comprende una primera porción que se une a la molécula de analito, y una segunda porción que se puede usar para la fijación a la superficie de unión.

En ciertas realizaciones, una superficie del objeto de captura también puede comprender una capa protectora o pasivante que puede reducir o minimizar la fijación no específica de componentes no de captura (por ejemplo, moléculas de analito, ligandos de unión) a la superficie de unión durante el ensayo que puede conducir a señales positivas falsas durante la detección o a pérdida de señal. Los ejemplos de materiales que se pueden utilizar en ciertas realizaciones para formar capas pasivantes incluyen, pero no se limitan a: polímeros, tales como poli(etilenglicol), que repelen la unión no específica de proteínas; proteínas de origen natural con esta propiedad, tal como seroalbúmina y caseína; tensioactivos, por ejemplo tensioactivos bipolares, tales como sulfobetainas; lípidos de cadena larga de origen natural; y ácidos nucleicos, tales como ADN de esperma de salmón.

El método de fijación del componente de captura a una superficie del objeto de captura depende del tipo de enlazamiento empleado, y se puede lograr potencialmente mediante una amplia variedad de químicas/técnicas de acoplamiento adecuadas conocidas por aquellos de pericia normal en la técnica. Los medios particulares de fijación seleccionados dependerán de las características materiales de la superficie del objeto de captura y de la naturaleza del componente de captura. En ciertas realizaciones, los componentes de captura se pueden fijar a la superficie del objeto de captura mediante el uso de grupos funcionales reactivos en cada uno. Según una realización, los grupos funcionales son funcionalidades químicas. Esto es, la superficie de unión se puede derivatizar de manera que esté presente una funcionalidad química en la superficie de unión, que puede reaccionar con una funcionalidad química en el componente de captura que resulta de la fijación. Los ejemplos de grupos funcionales para la fijación que pueden ser útiles incluyen, pero no se limitan a, grupos amino, grupos carboxi, grupos epóxido, grupos maleimida, grupos oxo, y grupos tiol. Los grupos funcionales se pueden fijar, ya sea directamente o a través del uso de un ligador, cuya combinación se denomina algunas veces aquí como un "reticulador". Los reticuladores son conocidos en la técnica; por ejemplo, los reticuladores homo- o heterobifuncionales son bien conocidos (por ejemplo, véase el catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre reticuladores, páginas 155-200, o "Bioconjugate Techniques" por Greg T. Hermanson, Academic Press, 1996). Los ejemplos no limitantes de reticuladores incluyen grupos alquilo (incluyendo grupos alquilo sustituidos y grupos alquilo que contienen restos heteroatómicos), ésteres, amida, amina, grupos epoxi, y etilenglicol y derivados. Un reticulador también puede comprender un grupo sulfona, que forma una sulfonamida.

Según una realización, el grupo funcional es un grupo funcional activado por la luz. Esto es, el grupo funcional se puede activar por la luz para fijar el componente de captura a la superficie del objeto de captura. Un ejemplo es la tecnología PhotoLink™ disponible de SurModics, Inc. en Eden Prairie, MN.

En algunos casos, el objeto de captura puede comprender superficies revestidas con estreptavidina, y el componente de captura puede estar biotinilado. La exposición del componente de captura a las superficies revestidas con estreptavidina puede provocar asociación del componente de captura con la superficie mediante interacción entre el componente de biotina y la estreptavidina.

En ciertas realizaciones, la fijación del componente de captura a la superficie de unión se puede efectuar sin modificar covalentemente la superficie de unión de un objeto de captura. Por ejemplo, la funcionalidad de fijación se puede añadir a la superficie de unión usando un ligador que tiene tanto un grupo funcional reactivo con el componente de captura como un grupo que tiene afinidad de unión por la superficie de unión. En ciertas

realizaciones, un ligador comprende una proteína capaz de unirse o pegarse a la superficie de unión; por ejemplo, en una de tales realizaciones, el ligador es seroalbúmina con grupos amina libres sobre su superficie. Entonces se puede añadir un segundo ligador (reticulador) para fijar los grupos amina de la albúmina al componente de captura (por ejemplo, a grupos carboxi).

5 Según una realización en la que se usa un reticulador químico para fijar los componentes de captura al objeto de captura, la molécula de analito se puede capturar sobre la superficie de unión de un objeto de captura usando un componente de captura fijado vía reticulación química de la siguiente manera. En primer lugar, la superficie de unión se derivatiza con un grupo funcional, tal como un grupo amina. A continuación, un reticulador y el componente de captura se ponen en contacto con la superficie de unión de manera que un extremo del reticulador se fija al grupo amino y el componente de captura se fija al otro extremo del reticulador. De esta manera, se pueden fijar componentes de captura que comprenden proteínas, lectinas, ácidos nucleicos, pequeñas moléculas orgánicas, hidratos de carbono.

10 Una realización utiliza componentes de captura proteínicos. Como es conocido en la técnica, se puede usar cualquier número de técnicas para fijar un componente de captura proteínico a una amplia variedad de superficies sólidas. "Proteína" o "proteínico", en este contexto, incluye proteínas, polipéptidos, péptidos, incluyendo, por ejemplo, enzimas, y anticuerpos. Se conoce una amplia variedad de técnicas que añaden restos reactivos a proteínas, por ejemplo el método descrito en la patente U.S. nº 5.620.850. Se conoce la fijación de proteínas a superficies, por ejemplo véase Heller, Acc. Chem. Res. 23:128 (1990), y muchas otras referencias similares.

15 En algunas realizaciones, el componente de captura (o ligando de unión) puede comprender fragmentos Fab'. El uso de fragmentos Fab', en oposición a anticuerpos completos, puede ayudar a reducir la unión no específica entre el componente de captura y el ligando de unión. En algunos casos, se puede eliminar (por ejemplo, proteolíticamente) la región Fc del componente de captura (o ligando de unión). En algunos casos, se puede usar una enzima para eliminar la región Fc (por ejemplo, pepsina, que puede producir fragmentos F(ab')₂, y papaína, que puede producir fragmentos Fab). En algunos casos, el componente de captura se puede fijar a la superficie de unión usando aminas, o se puede modificar con biotina (por ejemplo, usando NHS-biotina) para facilitar la unión a una superficie de un objeto de captura revestida con avidina o con estreptavidina. Los fragmentos F(ab')₂ se pueden someter a un tratamiento de reducción química (por ejemplo, mediante exposición a 2-mercaptoetilamina) para, en algunos casos, formar dos fragmentos Fab' que poseen tiol. Estos fragmentos que poseen tiol se pueden fijar entonces vía reacción con un aceptor de Michael tal como maleimida. Por ejemplo, los fragmentos Fab' se pueden tratar entonces con un reactivo (por ejemplo, maleimida-biotina) para fijar al menos un resto de biotina (es decir, biotinilado) para facilitar la fijación a superficies revestidas con estreptavidina como se describe anteriormente.

20 Ciertas realizaciones utilizan ácidos nucleicos como el componente de captura, por ejemplo cuando la molécula de analito es un ácido nucleico o una proteína que se une a ácido nucleico, o cuando se desea que el componente de captura sirva como un aptámero para la unión a una proteína, como es bien conocido en la técnica.

25 Según una realización, cada superficie de unión de un objeto de captura comprende una pluralidad de componentes de captura. La pluralidad de componentes de captura, en algunos casos, se puede distribuir aleatoriamente sobre la superficie de unión como un "césped". Como alternativa, los componentes de captura se pueden segregar espacialmente en una región o regiones distintas y se pueden distribuir de cualquier manera deseada.

30 La unión entre el componente de captura y la molécula de analito, en ciertas realizaciones, es específica, por ejemplo como cuando el componente de captura y la molécula de analito son partes complementarias de un par de unión. En ciertas de tales realizaciones, el componente de captura se une tanto específica como directamente a la molécula de analito. Por "unión específica" o "especificidad de unión", se quiere decir que el componente de captura se une a la molécula de analito con la especificidad suficiente para diferenciar entre la molécula de analito y otros componentes o contaminantes de la muestra de ensayo. Por ejemplo, el componente de captura, según una realización, puede ser un anticuerpo que se une específicamente a alguna porción de una molécula de analito (por ejemplo, un antígeno). El anticuerpo, según una realización, puede ser un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una molécula de analito de interés. Por ejemplo, los anticuerpos apropiados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominios, anticuerpos sintéticos (algunas veces denominados miméticos de anticuerpos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (algunas veces denominadas como "conjugados de anticuerpos"), y fragmentos de cada uno, respectivamente. Como otro ejemplo, la molécula de analito puede ser un anticuerpo, y el componente de captura puede ser un antígeno.

35 Según una realización en la que una partícula de analito es una célula biológica (por ejemplo, célula de mamífero, aviar, de reptil, de otro vertebrado, de insecto, de levadura, bacteriana, etc.), el componente de captura puede ser un ligando que tiene afinidad específica por un antígeno de la superficie celular (por ejemplo, un receptor de la superficie celular). En una realización, el componente de captura es un receptor de una molécula de adhesión o una porción del mismo, que tiene especificidad de unión por una molécula de adhesión celular expresada sobre la superficie de un tipo celular diana. En uso, el receptor de la molécula de adhesión se une con una molécula de adhesión sobre la superficie extracelular de la célula diana, inmovilizando o capturando de ese modo la célula. En una realización en la que la partícula de analito es una célula, el componente de captura es fibronectina, que tiene

especificidad, por ejemplo, por partículas de analito que comprenden células neuronales.

En algunas realizaciones, como apreciarán aquellos de pericia normal en la técnica, es posible detectar moléculas de analito usando componentes de captura para los que la unión a moléculas de analito no es muy específica. Por ejemplo, tales sistemas/métodos pueden usar diferentes componentes de captura tales como, por ejemplo, un panel de ligandos de unión diferentes, y la detección de cualquier molécula de analito particular se determina vía una “firma” de unión a este panel de ligandos de unión, similar a la forma en la que trabajan las “narices electrónicas”. Esto puede encontrar utilidad particular en la detección de ciertos analitos de pequeñas moléculas. En algunas realizaciones, la afinidad de unión entre moléculas de analito y componentes de captura debería ser suficiente para permanecer unidos en las condiciones del ensayo, incluyendo etapas de lavado para eliminar moléculas o partículas que no están unidas específicamente. En algunos casos, por ejemplo en la detección de ciertas biomoléculas, la constante de unión de la molécula de analito a su componente de captura complementario puede estar entre al menos alrededor de 10^4 y alrededor de 10^6 M^{-1} , al menos alrededor de 10^5 y alrededor de 10^9 M^{-1} , al menos alrededor de 10^7 y alrededor de 10^9 M^{-1} , mayor que alrededor de 10^9 M^{-1} , o similar. Por ejemplo, las afinidades típicas para anticuerpos IgG por sus antígenos están en el intervalo 10^5 - 10^{10} M^{-1} . La afinidad de la biotina por estreptavidina es 10^{15} M^{-1} .

En ciertas realizaciones, el componente de captura se escoge para que sea capaz de unirse a una pareja de unión correspondiente asociada con o fijada a la molécula de analito. Por ejemplo, el componente de captura según una realización es un reticulador químico como se describe anteriormente capaz de unirse a proteínas generalmente. Según una realización, cada molécula de proteína en una muestra de fluido comprende una molécula de analito que se fija a tal reticulador químico. En otro ejemplo, el componente de captura comprende estreptavidina, que se une con alta afinidad a biotina, y de este modo captura cualesquiera moléculas de analito a las que se ha fijado la biotina. Como alternativa, el componente de captura puede ser biotina, y la estreptavidina se puede fijar o asociar con las moléculas de analito de manera que las moléculas de analito pueden ser capturadas por la biotina.

Según una realización, las superficies de unión de un objeto de captura se pueden funcionalizar con componentes de captura de la siguiente manera. En primer lugar, la superficie de un objeto de captura se prepara para la fijación del componente o componentes de captura modificándola para formar o unirse directamente a los componentes de captura, o se puede añadir un ligador a la superficie de unión del objeto de captura de manera que el componente o componentes de captura se fijan a la superficie de unión del objeto de captura vía el ligador. En una realización, las superficies de unión del objeto de captura se derivatizan con una funcionalidad química como se describe anteriormente. Después, el componente de captura se puede añadir, que se une a y se inmoviliza por la funcionalidad química.

Analitos diana ejemplares

Como apreciarán aquellos en la técnica, un gran número de moléculas de analito y partículas se puede detectar y, opcionalmente cuantificar usando métodos y sistemas de la presente invención; básicamente, cualquier molécula de analito que es capaz de ser inmovilizada con respecto a un objeto de captura (por ejemplo, vía una superficie de unión que comprende una pluralidad de componentes de captura) se puede investigar potencialmente usando la invención. Más abajo se mencionan ciertas dianas más específicas de interés potencial que pueden comprender una molécula de analito. La lista más abajo es ejemplar y no limitante.

En algunas realizaciones, la molécula de analito puede ser una enzima. Los ejemplos no limitantes de enzimas incluyen una oxidoreductasa, transferasa, cinasa, hidrolasa, liasa, isomerasa, ligasa, y similares. Ejemplos adicionales de enzimas incluyen, pero no se limitan a, polimerasas, catepsinas, calpaínas, amino-transferasas tales como, por ejemplo, AST y ALT, proteasas tales como, por ejemplo, caspasas, nucleótido ciclasas, transferasas, lipasas, enzimas asociadas con ataques cardíacos, y similares. Cuando un sistema/método de la presente invención se usa para detectar la presencia de agentes víricos o bacterianos, las enzimas diana apropiadas incluyen polimerasas víricas o bacterianas y otras de tales enzimas, incluyendo proteasas víricas o bacterianas, o similares.

En otras realizaciones, la molécula de analito puede comprender un componente enzimático. Por ejemplo, la partícula de analito puede ser una célula que tiene una enzima o componente enzimático presente sobre su superficie extracelular. Como alternativa, la partícula de analito es una célula que no tiene componente enzimático sobre su superficie. Tal célula se identifica típicamente usando un método de ensayo indirecto descrito más abajo. El ejemplo no limitante de componentes enzimáticos es peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, y fosfatasa alcalina.

En todavía otras realizaciones, la molécula de analito puede ser una biomolécula. Los ejemplos no limitantes de biomoléculas incluyen hormonas, anticuerpos, citocinas, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono, antígenos y receptores de la membrana celular lipídica (receptores neuronales, hormonales, de nutrientes, y de la superficie celular) o sus ligandos, o combinaciones de los mismos. Realizaciones no limitantes de proteínas incluyen péptidos, polipéptidos, fragmentos proteicos, complejos proteicos, proteínas de fusión, proteínas recombinantes, fosfoproteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, o similares. Como apreciarán aquellos en la técnica, hay un gran número de moléculas de analito proteínicas posibles que se pueden detectar o evaluar para la búsqueda de parejas de unión usando la presente invención. Además de enzimas como se discuten anteriormente, las moléculas de

analito proteicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, hormonas, factores de crecimiento, citocinas (muchas de las cuales sirven como ligandos para receptores celulares), marcadores del cáncer, etc. Los ejemplos no limitantes de biomoléculas incluyen PSA y TNF-alfa.

5 En ciertas realizaciones, la molécula de analito puede ser una proteína modificada traduccionalmente por el hospedante (por ejemplo, fosforilación, metilación, glicosilación), y el componente de captura puede ser un anticuerpo específico para una modificación post-traduccional. Las proteínas modificadas se pueden capturar con componentes de captura que comprenden una multiplicidad de anticuerpos específicos, y después las proteínas capturadas se pueden unir adicionalmente a un ligando de unión que comprende un anticuerpo secundario con especificidad por una modificación post-traduccional. Como alternativa, las proteínas modificadas se pueden capturar con componentes de captura que comprenden un anticuerpo específico para una modificación post-traduccional, y después las proteínas capturadas se pueden unir adicionalmente a ligandos de unión que comprenden anticuerpos específicos para cada proteína modificada.

10 En otra realización, la molécula de analito es un ácido nucleico. Un ácido nucleico se puede capturar con un fragmento de ácido nucleico complementario (por ejemplo, un oligonucleótido) y después se puede marcar opcionalmente de forma subsiguiente con un ligando de unión que comprende un oligonucleótido complementario diferente.

15 Las moléculas de analito y partículas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, pequeñas moléculas (incluyendo compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos), contaminantes medioambientales (incluyendo plaguicidas, insecticidas, toxinas, etc.), moléculas terapéuticas (incluyendo drogas terapéuticas y de abuso, antibióticos, etc.), biomoléculas (incluyendo hormonas, citocinas, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono, antígenos y receptores de la membrana celular (receptores neuronales, hormonales, de nutrientes, y de la superficie celular) o sus ligandos, etc.), células completas (incluyendo células procariotas (tales como bacterias patógenas) y eucariotas, incluyendo células tumorales de mamíferos), virus (incluyendo retrovirus, virus del herpes, adenovirus, lentivirus, etc.), esporas, etc.

20 La muestra de fluido que contiene o que se sospecha que contiene una molécula de analito puede derivar de cualquier fuente adecuada. En algunos casos, la muestra puede comprender un fluido, un sólido en partículas que fluye, una suspensión fluida de partículas sólidas, fluido supercrítico, y/o gas. En algunos casos, la molécula de analito se puede separar o purificar de su fuente antes de la determinación; sin embargo, en ciertas realizaciones, una muestra no tratada que contiene la molécula de analito se puede ensayar directamente. La fuente de la molécula de analito puede ser sintética (por ejemplo, producida en un laboratorio), el medio ambiente (por ejemplo, aire, suelo, etc.), un mamífero, un animal, una planta, o una combinación de los mismos. En un ejemplo particular, la fuente de una molécula de analito es una sustancia corporal humana (por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, saliva, tejido, órgano, o similar). El volumen de la muestra de fluido analizada puede ser potencialmente cualquier cantidad en un amplio intervalo de volúmenes, dependiendo de un número de factores tales como, por ejemplo, el número de objetos de captura usados/disponibles, el número de localizaciones usadas/disponibles, etc. En unas pocas realizaciones ejemplares particulares, el volumen de la muestra puede ser alrededor de 0,01 ul, alrededor de 0,1 ul, alrededor de 1 ul, alrededor de 5 ul, alrededor de 10 ul, alrededor de 100 ul, alrededor de 1 ml, alrededor de 5 ml, alrededor de 10 ml, o similar. En algunos casos, el volumen de la muestra de fluido está entre alrededor de 0,01 ul y alrededor de 10 ml, entre alrededor de 0,01 ul y alrededor de 1 ml, entre alrededor de 0,01 ul y alrededor de 100 ul, o entre alrededor de 0,1 ul y alrededor de 10 ul.

25 En algunos casos, la muestra de fluido se puede diluir antes del uso en un ensayo. Por ejemplo, en realizaciones en las que la fuente de una molécula de analito es un fluido corporal humano (por ejemplo, sangre, suero), el fluido se puede diluir con un disolvente apropiado (por ejemplo, un tampón tal como un tampón de PBS). Una muestra de fluido se puede diluir alrededor de 1 vez, alrededor de 2 veces, alrededor de 3 veces, alrededor de 4 veces, alrededor de 5 veces, alrededor de 6 veces, alrededor de 10 veces, o más, antes del uso. La muestra se puede añadir a una disolución que comprende la pluralidad de objetos de captura, o la pluralidad de objetos de captura se puede añadir directamente a o como una disolución a la muestra.

Ligandos de unión y agentes de marcaje precursores/agentes de marcaje

30 Los ligandos de unión se pueden seleccionar de cualquier molécula, partícula, o similar adecuada, como se discute más abajo, capaz de asociarse con una molécula de analito y/o de asociarse con otro ligando de unión. Ciertos ligandos de unión pueden comprender una entidad que es capaz de facilitar la detección, ya sea directamente (por ejemplo, vía un resto detectable) o indirectamente. Un componente puede facilitar la detección indirecta, por ejemplo convirtiendo una molécula del agente de marcaje precursor en una molécula de agente de marcaje (por ejemplo, un agente que se detecta en un ensayo). En algunas realizaciones, el ligando de unión puede comprender un componente enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina, etc.). Un primer tipo de ligando de unión se puede usar o no conjuntamente con ligandos de unión adicionales (por ejemplo, segundo tipo, etc.), como se discute aquí.

35 En algunas realizaciones, la pluralidad de objetos de captura, al menos algunos de los cuales comprenden al menos una molécula de analito, se puede exponer a una pluralidad de ligandos de unión de manera que un ligando de

unión se asocia con al menos algunas de la pluralidad de moléculas de analito. En realizaciones en las que una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura se asocian con una única molécula de analito y una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura no se asocian con ninguna molécula de analito (por ejemplo, cuando el número de moléculas de analito es menor que el número total de objetos de captura), un ligando de unión se puede asociar con sustancialmente todas las moléculas de analito inmovilizadas con respecto a un objeto de captura. En algunos casos, más de alrededor de 80%, más de alrededor de 85%, más de alrededor de 90%, más de alrededor de 95%, más de alrededor de 97%, más de alrededor de 98%, más de alrededor de 99%, o más, moléculas de analito se pueden asociar con un ligando de unión.

En otras realizaciones en las que sustancialmente todos los objetos de captura comprenden al menos una molécula de analito (por ejemplo, en realizaciones en las que el número de moléculas de analito es aproximadamente igual a o mayor que el número de objetos de captura proporcionados), los objetos de captura se pueden exponer al ligando de unión de manera que una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura se asocia con al menos un ligando de unión (o en ciertas realizaciones sustancialmente solo un único ligando de unión) y una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura no se asocia con ningún ligando de unión. En algunos casos, los objetos de captura se pueden exponer a los ligandos de unión de manera que al menos algunos de los objetos de captura se asocian con al menos un ligando de unión, y una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura no se asocia con ningún ligando de unión. Se puede llevar a cabo un ensayo de cribado para determinar una cantidad apropiada de ligando de unión a usar para un grado deseado de carga de ligando de unión (por ejemplo, para facilitar la selección de una cantidad apropiada de ligando de unión a usar para una situación particular), con patrones de calibración que contienen una concentración conocida de molécula de analito y cantidades variables de ligando de unión usando un análisis de Poisson. En ciertas realizaciones, se determina si el analito está esencialmente marcado totalmente o está marcado solo parcialmente con el ligando de unión. El porcentaje de moléculas de analito activas (es decir, aquellas asociadas con ligando de unión) detectado se puede convertir en el porcentaje de moléculas de analito asociadas con ningún, uno, dos, etc., ligandos de unión usando el ajuste por distribución de Poisson como se describe aquí en otra parte.

En algunas realizaciones, se puede usar más de un tipo de ligando de unión. En algunas realizaciones, se puede proporcionar un primer tipo de ligando de unión y un segundo tipo de ligando de unión. En algunos casos, se pueden proporcionar al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos ocho, al menos diez, o más, tipos de ligandos de unión. Cuando una pluralidad de objetos de captura, algunos de los cuales están asociados con al menos una molécula de analito, se exponen a una pluralidad de tipos de ligandos de unión, al menos algunas de la pluralidad de moléculas de analito inmovilizadas se pueden asociar con al menos uno de cada tipo de ligando de unión. Los ligandos de unión se pueden seleccionar de manera que interaccionen entre sí en una variedad de diferentes maneras. En un primer ejemplo, el primer tipo de ligando de unión puede ser capaz de asociarse con una molécula de analito, y el segundo tipo de ligando de unión se puede asociar con el primer tipo de ligando de unión. En tales realizaciones, el primer tipo de ligando de unión puede comprender un primer componente que ayuda en la asociación de la molécula de analito, y un segundo componente que ayuda en la asociación del segundo tipo de ligando de unión con el primer tipo de ligando de unión. En una realización particular, el segundo componente es biotina, y el segundo tipo de ligando de unión comprende una enzima o un componente enzimático que se asocia con la biotina.

Como otro ejemplo, tanto el primer tipo de ligando de unión como el segundo tipo de ligando de unión se pueden asociar directamente con una molécula de analito. Sin estar atados por la teoría o por cualquier mecanismo particular, la asociación tanto del primer tipo como del segundo tipo de ligando de unión puede proporcionar especificidad y fiabilidad adicionales a la hora de llevar a cabo un ensayo, identificando solamente localizaciones que se determina que contienen tanto el primer tipo de ligando de unión y/o el segundo tipo de ligando de unión (por ejemplo, a través de detección directa o indirecta) que contienen una molécula de analito. Tales métodos de ensayo pueden reducir el número de falsos positivos provocados por la unión no específica, ya que las localizaciones que se encuentra que tienen solamente un único tipo de ligando de unión (por ejemplo, solamente el primer tipo de agente de marcaje o el segundo tipo de agente de marcaje) no se considerarían o contarían como una localización que comprende una molécula de analito. El primer tipo de ligando de unión puede comprender un primer tipo de componente enzimático, y el segundo tipo de ligando de unión puede comprender un segundo tipo de componente enzimático que difiere del primer tipo de componente enzimático. Un objeto de captura que comprende una molécula de analito, el primer tipo de ligando de unión, y el segundo tipo de ligando de unión, se puede exponer a un primer tipo de agente de marcaje precursor que se convierte en un primer tipo de agente de marcaje (por ejemplo, que comprende una primera propiedad medible) con la exposición al primer tipo de componente enzimático, y a un segundo tipo de agente de marcaje precursor que se convierte en un segundo tipo de agente de marcaje (por ejemplo, que comprende una propiedad medible que es distinguible de la primera propiedad medible) con la exposiciones al segundo tipo de componente enzimático. Por lo tanto, se determina que solamente las localizaciones que se determina que contienen el primer tipo de agente de marcaje y el segundo tipo de agente de marcaje contienen una molécula de analito. Como otro ejemplo, el primer tipo de ligando de unión y el segundo tipo de ligando de unión pueden incorporar cada uno un componente (por ejemplo, tal como un marcador de ADN), y un tercer tipo de ligando de unión puede comprender dos componentes complementarios a los componentes del primer tipo y segundo tipo de ligandos de unión (por ejemplo, dos tipos de marcadores de ADN complementarios), en el que el tercer tipo de ligando de unión también comprende una molécula o resto para la detección directa o indirecta (por

ejemplo, la presencia del tercer tipo de ligando de unión en un recipiente de reacción es necesaria para determinar la presencia o ausencia de una molécula de analito en una localización). Cuando tanto el primer tipo de ligandos de unión como el segundo tipo de ligandos de unión están presentes en proximidad sustancialmente estrecha entre sí (por ejemplo, vía asociación con una molécula de analito), se puede producir la asociación del tercer tipo de ligando de unión, permitiendo así la detección de la molécula de analito. En la solicitud de patente U.S. Serie nº 12/731.135, de propiedad compartida, titulada "Detección ultrasensible de moléculas usando métodos de detección duales", de Duffy et al., presentada el 24 de marzo de 2010, y en la Solicitud de Patente Internacional nº (todavía no determinado), titulada "Detección ultrasensible de moléculas usando métodos de detección duales", de Duffy et al., presentada el 1 de marzo de 2011, se describe más información con respecto al uso de más de un tipo de ligando de unión en una manera que pueda reducir ciertos efectos negativos asociados con la unión no específica.

Detección

La pluralidad de objetos de captura, algunos de los cuales comprenden al menos una molécula de analito y/o al menos un ligando de unión, se puede detectar y/o cuantificar, y la detección y/o cuantificación se puede relacionar con la presencia y, opcionalmente, la cantidad y/o concentración de moléculas de analito/partículas en la muestra que se ensaya. En algunas realizaciones, la pluralidad de objetos de captura se puede detectar y/o cuantificar segregando espacialmente la pluralidad de objetos de captura en una pluralidad de localizaciones. En algunas realizaciones, la pluralidad de localizaciones comprende una pluralidad de recipientes de reacción (por ejemplo, en una matriz). En algunos casos, un detector se puede configurar para detectar los objetos de captura en una pluralidad de localizaciones (por ejemplo, una matriz de recipientes de reacción). En algunas realizaciones, los objetos de captura pueden producir o se puede hacer que produzcan una señal detectable, por ejemplo emisión de fluorescencia, que puede ayudar en la detección de los objetos de captura. En algunos casos, los objetos de captura se pueden detectar usando técnicas de dispersión, como se describe aquí.

En algunas realizaciones, el número de objetos de captura segregados espacialmente puede ser sustancialmente igual al número de objetos de captura expuestos a una muestra de fluido que contiene o que se sospecha que contiene moléculas de analito. En algunas realizaciones, sin embargo, el número de objetos de captura segregados espacialmente en una pluralidad de localizaciones puede ser sustancialmente menor que el número de objetos de captura expuestos a una muestra de fluido que contiene o que se sospecha que contiene moléculas de analito. En algunos casos, alrededor de 1%, alrededor de 2%, alrededor de 3%, alrededor de 5%, alrededor de 10%, alrededor de 15%, alrededor de 20%, alrededor de 30%, alrededor de 40%, alrededor de 50%, alrededor de 60%, alrededor de 70%, alrededor de 80%, o más, de los objetos de captura expuestos a una muestra de fluido se segregan espacialmente en una pluralidad de localizaciones. En algunos casos, entre alrededor de 1% y alrededor de 99%, entre alrededor de 10% y alrededor de 90%, entre alrededor de 20% y alrededor de 80%, entre alrededor de 30% y alrededor de 70%, entre alrededor de 50% y alrededor de 90%, entre alrededor de 1% y alrededor de 50%, entre alrededor de 5% y alrededor de 40%, o entre alrededor de 10% y alrededor de 30% de los objetos de captura expuestos a una muestra de fluido se segregan espacialmente en una pluralidad de localizaciones.

Las moléculas de analito (o ligandos de unión) que se segregan espacialmente se pueden detectar y/o cuantificar directa o indirectamente. En el caso de detección directa, las moléculas de analito comprenden una molécula o resto que puede ser interrogada y/o detectada directamente, por ejemplo una entidad fluorescente (por ejemplo, un resto fluorescente, perla fluorescente, anticuerpo fluorescente, etc.), una nanopartícula o nanoagrupamiento metálico (por ejemplo, un nanoagrupamiento o nanopartícula de oro, nanoagrupamiento o nanopartícula de plata), un punto cuántico (por ejemplo, punto cuántico de CdSe, punto cuántico de CdTe, etc.), e isótopos radioactivos. En realizaciones en las que el ensayo comprende el uso de uno o más tipos de ligandos de unión, los ligandos de unión pueden comprender una molécula o moléculas o resto o restos que pueden ser interrogados y/o detectados directamente. Se puede hacer que una localización que comprende tal molécula de analito o ligando de unión que comprende un resto que se puede interrogar y/o detectar directamente emita una señal con la interrogación de la localización.

En algunas realizaciones, se pueden emplear métodos de detección no enzimáticos. Los métodos de detección no enzimáticos serán conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen dispersión de Raman, métodos de resonancia de radiación electromagnética (por ejemplo, modos de galería susurrante), espectroscopía (por ejemplo, espectroscopía infrarroja, atómica), absorbancia, transducción piezoeléctrica (por ejemplo, microbalance de cristal de cuarzo (QCM)), dicroísmo circular, microscopios electrónicos (por ejemplo, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)), microscopías de sondas de barrido (por ejemplo, microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía de efecto túnel (STM)), dispersión de la luz; resonancia por plasmones de superficie (SPR), detección de onda evanescente, interferometría óptica y otros métodos basados en la medida de cambios en el índice de refracción, métodos de transducción eléctrica, tales como conducción y capacitancia; efectos de transducción magnética (por ejemplo, efecto magnetorresistivo), calorimetría (por ejemplo, calorimetría de barrido diferencial (DSC)), difracción; resonancia magnética nuclear (RMN), resonancia paramagnética de electrones (EPR), espectroscopía de masas (por ejemplo, desorción e ionización por láser asistida por matriz (MALDI)), tecnologías de fluorescencia (por ejemplo, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF), polarización de la fluorescencia (FP)), y canalización de oxígeno luminiscente (LOCI).

En algunas realizaciones, la pluralidad de moléculas de analito (o ligandos de unión) se detecta indirectamente. El enfoque indirecto incluye exponer una molécula de analito, o un ligando de unión asociado con una molécula de analito, a un agente de marcaje precursor, en el que el agente de marcaje precursor se convierte en un agente de marcaje con la exposición a la molécula de analito o al ligando de unión asociado con una molécula de analito. El agente de marcaje puede comprender una molécula o resto que se puede interrogar y/o detectar. La presencia o ausencia de una molécula de analito o ligando de unión en una localización se puede determinar entonces determinando la presencia o ausencia de un agente de marcaje en la localización. Por ejemplo, la molécula de analito puede comprender un componente enzimático, y la molécula de agente de marcaje precursor puede ser una molécula de agente de marcaje precursor enzimática cromogénica, fluorogénica, o quimioluminiscente, que se convierte en un producto cromogénico, fluorogénico, o quimioluminiscente (cada uno un ejemplo de un agente de marcaje) con la exposición al agente de conversión. En este caso, el agente de marcaje precursor puede ser un marcador enzimático, por ejemplo un agente de marcaje precursor enzimático cromogénico, fluorogénico, o quimioluminiscente, que al contacto con el componente enzimático se convierte en un agente de marcaje, que es detectable. En algunos casos, el agente de marcaje precursor enzimático cromogénico, fluorogénico, o quimioluminiscente se proporciona en una cantidad suficiente para entrar en contacto con cada localización. En algunas realizaciones, cada agente de marcaje precursor electroquimioluminiscente se convierte en un agente de marcaje electroquimioluminiscente. En algunos casos, el componente enzimático puede comprender beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, o fosfatasa alcalina.

Como entenderán los expertos de pericia normal en la técnica, se puede seleccionar una variedad de agentes de marcaje precursores enzimáticos cromogénicos, fluorogénicos o quimioluminiscentes apropiados para la conversión de muchas enzimas diferentes. De este modo, cualquier agente de marcaje precursor enzimático cromogénico, fluorogénico, o quimioluminiscente capaz de producir un agente de marcaje en una reacción con una enzima particular se puede usar potencialmente en la presente invención como el agente de marcaje precursor en realizaciones en las que la molécula de analito o un agente de unión asociado con una molécula de analito comprende un componente enzimático. Por ejemplo, en *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes y Labeling Technologies*, Décima Ed., Capítulo 10, se describen muchos agentes de marcaje precursores cromogénicos, fluorogénicos o quimioluminiscentes, adecuados para uso como una molécula de agente de marcaje precursor enzimático.

En otra realización, la molécula de analito puede ser una proteína, y el ligando de unión puede comprender un componente que es capaz de unirse tanto a la molécula de analito como un componente enzimático. La exposición de la molécula de agente de marcaje precursor al componente enzimático unido al ligando de unión puede convertir la molécula de agente de marcaje precursor en una molécula de agente de marcaje cromogénico, fluorogénico, o quimioluminiscente que se puede detectar.

En las FIGS. 9A y 9B se ilustran dos ejemplos no limitantes de detección indirecta de una molécula de analito. En la FIG. 9A, se proporciona una localización 150 (en esta realización, representada por un recipiente de reacción) que comprende objeto de captura 152 (en esta realización, representado por una perla). La molécula de analito 154 se inmoviliza con respecto al objeto de captura 152 vía el componente de captura 156. El recipiente de reacción se expone a agente de marcaje precursor 158, que con la exposición a la molécula de analito 154 se convierte en la molécula de agente de marcaje 160, como se indica por la flecha 159. Como otro ejemplo, en la FIG. 9B, se proporciona la localización 170 (en esta realización, representada por un recipiente de reacción) que comprende un objeto de captura 172 (en esta realización, representada por una perla). La molécula de analito 174 se inmoviliza con respecto al objeto de captura 172 vía el componente de captura 176, y el ligando de unión 177 se asocia con la molécula de analito 174. El recipiente de reacción se expone a agente de marcaje precursor 158, que con la exposición a ligando de unión 177 se convierte en una molécula de agente de marcaje 180, como se indica por la flecha 179.

En algunas realizaciones, una pluralidad de localizaciones se puede asignar y/o una pluralidad de objetos de captura y/o especies/moléculas/partículas de interés se puede detectar sustancialmente de forma simultánea. "Sustancialmente de forma simultánea", cuando se usa en este contexto, se refiere a la asignación/detección de las localizaciones/objetos de captura/especies/moléculas/partículas de interés en aproximadamente el mismo tiempo, de manera que los períodos de tiempo durante los cuales al menos dos localizaciones/objetos de captura/especies/moléculas/partículas de interés se asignan/se detectan solapan, en oposición a ser asignadas/detectadas secuencialmente, en el que no lo serían. La asignación/detección simultánea se puede lograr usando diversas técnicas, incluyendo técnicas ópticas (por ejemplo, detector CCD). La segregación espacial de objetos de captura/especies/moléculas/partículas en una pluralidad de localizaciones discretas resolvibles, según algunas realizaciones, facilita la detección sustancialmente simultánea al permitir que múltiples localizaciones sean asignadas sustancialmente de forma simultánea. Por ejemplo, para realizaciones en las que especies/moléculas/partículas individuales están asociadas con objetos de captura que se segregan espacialmente con respecto a los otros objetos de captura en una pluralidad de localizaciones discretas, resolvibles separadamente durante la detección, la asignación sustancialmente de forma simultánea de la pluralidad de localizaciones discretas, separadamente resolvibles, permite que se resuelvan los objetos de captura individuales, y de este modo las especies/moléculas/partículas individuales (por ejemplo, moléculas de analito). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las moléculas/partículas individuales de una pluralidad de moléculas/partículas se reparten a lo largo de una pluralidad de recipientes de reacción, de manera que cada recipiente de reacción no contiene ninguna o solamente

5 contiene una especie/molécula/partícula. En algunos casos, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 96%, al menos alrededor de 97%, al menos alrededor de 98%, al menos alrededor de 99%, al menos alrededor de 99,5% de todas las especies/moléculas/partículas están separadas espacialmente con respecto a otras especies/moléculas/partículas durante la detección. Una pluralidad de especies/moléculas/partículas se puede detectar sustancialmente de forma simultánea en un período de tiempo menor que alrededor de 1 segundo, menor que alrededor de 500 milisegundos, menor que alrededor de 100 milisegundos, menor que alrededor de 50 milisegundos, menor que alrededor de 10 milisegundos, menor que alrededor de 1 milisegundo, menor que alrededor de 500 microsegundos, menor que alrededor de 100 microsegundos, menor que alrededor de 50 microsegundos, menor que alrededor de 10 microsegundos, menor que alrededor de 1 microsegundo, menor que alrededor de 0,5 microsegundos, menor que alrededor de 0,1 microsegundos, o menor que alrededor de 0,01 microsegundos, menor que alrededor de 0,001 microsegundos, o menos. En algunas realizaciones, la pluralidad de especies/moléculas/partículas se puede detectar sustancialmente de forma simultánea en un período de tiempo de entre alrededor de 100 microsegundos y alrededor de 0,001 microsegundos, entre alrededor de 10 microsegundos y alrededor de 0,01 microsegundos, o menos.

20 En algunas realizaciones, se pueden usar técnicas para prevenir o reducir la disociación de una molécula de analito de un componente de captura y/u objeto de captura, y/o para prevenir o reducir la disociación de un ligando de unión de una molécula de analito y/u otro ligando de unión. Como conocerán aquellos de pericia normal en la técnica, ciertas interacciones de afinidad reversibles entre moléculas de analito seleccionadas, componentes de captura y/o ligandos de unión (por ejemplo, entre un anticuerpo y un antígeno), están gobernadas por la termodinámica. En consecuencia, en algún punto durante ciertos métodos de ensayo, se puede producir cierta disociación entre una molécula de analito y un componente de captura y/o un ligando de unión, y/o entre un ligando de unión y una molécula de analito y/u otro ligando de unión. Esto puede dar como resultado que se detecte un número reducido de moléculas de analito (por ejemplo, inmunocomplejos) que las que realmente están presentes. La constante de disociación de un par particular de componentes (por ejemplo, par anticuerpo-antígeno), el lavado y/o la exposición al fluido, el tiempo entre la exposición y la interrogación, y/u otros factores, pueden afectar al grado en el que un suceso de disociación altera la determinación de moléculas de analito y/o partículas. En consecuencia, ciertas técnicas se pueden usar para reducir los efectos de los procesos de disociación.

30 En una primera realización, la disociación se puede reducir o eliminar eliminando fluidos de las localizaciones de ensayo (por ejemplo, pocillos) tras la segregación espacial de una pluralidad de moléculas de analito (por ejemplo, asociadas con un objeto de captura vía un componente de captura, y/o asociadas con al menos un ligando de unión) en una pluralidad de tales localizaciones. Esto es, se puede eliminar todo o sustancialmente todo el fluido que rodea o que está sustancialmente contenido en las localizaciones. Por ejemplo, el fluido se puede eliminar mediante secado con aire y/o a vacío. La eliminación del fluido puede reducir o eliminar la disociación. Inmediatamente antes de la interrogación de las localizaciones, se puede añadir un fluido a las localizaciones, rehidratando de ese modo los complejos para facilitar la interrogación usando un detector.

40 En un ejemplo específico, una pluralidad de moléculas de analito se asocia (por ejemplo, vía un objeto de captura) con perlas (una realización de objetos de captura). Las perlas, y de este modo las moléculas de analito, están asociadas opcionalmente con al menos un ligando de unión y/o se exponen a un material (por ejemplo, un tampón) para mantener las moléculas de analito y/o ligandos de unión hidratados (por ejemplo, los inmunocomplejos se pueden exponer a un tampón que contiene ciertos hidratos de carbono). Tras cargar las perlas en una pluralidad de pocillos (por ejemplo, localizaciones), la disolución en exceso (por ejemplo, tampones) se elimina mediante secado por aire y/o a vacío. En esta realización, eliminando el contacto de las perlas con una disolución en bruto, se elimina esencialmente o se reduce sustancialmente la disociación de las moléculas de analito y/o ligandos de unión, en comparación con un sistema similar en el que no se elimina el fluido. En este caso, los pocillos que comprenden las perlas se pueden almacenar (por ejemplo, durante 1 min., 2 min., 5 min., 10 min., 20 min., 30 min., 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, o más) con ninguna o sustancialmente ninguna (por ejemplo, menos de alrededor de 20%, menos de alrededor de 15%, menos de alrededor de 10%, menos de alrededor de 5%, menos de alrededor de 4%, menos de alrededor de 3%, menos de alrededor de 2%, menos de alrededor de 1%, menos de alrededor de 0,5%, menos de alrededor de 0,3%, menos de alrededor de 0,1%, menos de alrededor de 0,01%, o menos) de las moléculas de analito (y/o ligandos de unión) que se disocian. Inmediatamente antes de o próximo en el tiempo al momento cuando se llevan a cabo las interrogaciones de los pocillos (por ejemplo, alrededor de 1 segundo, alrededor de 5 segundos, alrededor de 10 segundos, alrededor de 30 segundos, alrededor de 1 minuto, alrededor de 2 minutos, o alrededor de 5 minutos antes), se puede proporcionar a los pocillos una disolución, opcionalmente seguido del sellado (por ejemplo, antes de la interrogación). Véase, por ejemplo, el Ejemplo 22.

60 En una segunda realización, la disociación se puede reducir o eliminar reticulando una molécula de analito con un componente de captura, y/o reticulando un ligando de unión con una molécula de analito y/o un segundo ligando de unión. Por ejemplo, una molécula de analito que comprende un antígeno se puede reticular con un ligando de unión y/o componente de captura que comprende un anticuerpo. Los métodos y técnicas de reticulación que se pueden emplear son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. En algunos casos, tras la asociación de una molécula de analito con un componente de captura (por ejemplo, asociada con un objeto de captura) y/o la asociación de un ligando de unión con la molécula de analito y/o un segundo ligando de unión, el complejo se puede exponer a un reactivo de reticulación (por ejemplo, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (es decir, EDC),

glutaraldehído, etc.), promoviendo así la reacción de reticulación deseada. El reactivo reticulante se puede seleccionar según las propiedades de los reactivos usados para el ensayo, y se pueden considerar diversos factores, incluyendo la longitud del agente reticulante y/o los grupos funcionales necesarios cuando se selecciona un agente reticulante, como entenderán aquellos expertos en la técnica. El reactivo reticulante en exceso se puede eliminar opcionalmente y/o los grupos reticulantes sin reaccionar se pueden paralizar antes de la interrogación y/o antes de la exposición a un precursor de agente de marcaje u otro reactivo. El ensayo se puede llevar a cabo entonces según los métodos descritos aquí. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 23.

Un ejemplo no limitante de una reacción de reticulación se muestra en la FIG. 10A. En esta figura, la perla 502 que comprende un componente de captura 504 (por ejemplo, anticuerpos de captura) se asocia con la molécula de analito 506. La molécula de analito 506 también se asocia con un ligando de unión 508. El complejo 507 se expone al reactivo de reticulación 510 y se produce una reacción como se indica mediante la flecha 511. El primer reactivo de reticulación 512 forma una reticulación entre la molécula de analito 506 y el componente de captura 504, y el reactivo de reticulación 514 forma una reticulación entre la molécula de analito 506 y el ligando de unión 508.

Como otro ejemplo, el ligando de unión puede comprender un componente de reticulación capaz de formar una reticulación entre dos componentes (por ejemplo, una molécula de analito y un ligando de unión, o un componente de captura y una molécula de analito, o un primer ligando de unión y un segundo ligando de unión), como se muestra en la FIG. 10B. En esta figura, la perla 522 que comprende el componente de captura 524 (por ejemplo, anticuerpo de captura) se asocia con la molécula de analito 526. La molécula de analito 526 también se asocia con el ligando de unión 528 que comprende el componente de reticulación 530. Con la exposición a un estímulo externo (por ejemplo, luz UV, estímulo químico, etc.), como se indica por la flecha 531, se forma una reticulación 532 entre la molécula de analito 526 y el ligando de unión 524. Los ejemplos no limitantes de componentes de reticulación útiles para este fin incluyen 6-[4'-azido-2'-nitrofenilamino]hexanoato de succinimidilo (es decir, SANPAH) y 6-(4,4'-azipentanamido)hexanoato de succinimidilo (es decir, LC-SDA).

Durante la etapa del método en la que se asignan las localizaciones en las que se han segregado los objetos de captura/moléculas de analito, se puede determinar cualquiera de una variedad de parámetros. En algunas realizaciones, se determina el número de localizaciones que comprenden un objeto de captura y una molécula de analito (o ligando de unión). También se puede determinar el número de localizaciones que comprenden un objeto de captura pero que no comprenden una molécula de analito (o ligando de unión). En algunos casos, también se puede determinar el número de localizaciones que son asignadas que no contienen un objeto de captura. En aún otros casos, también se puede determinar el número total de localizaciones asignadas. Se puede realizar una única interrogación o múltiples interrogaciones de cualquier subconjunto o de todas las localizaciones finalmente asignadas en cualquier tiempo dado para facilitar una o todas las determinaciones descritas anteriormente. Por ejemplo, una primera determinación se puede completar bajo un primer intervalo de longitudes de onda (por ejemplo, luz blanca) para determinar el número de localizaciones que comprenden un objeto de captura, en el que las localizaciones no se distinguen en cuanto a si una molécula de analito (o ligando de unión) está asociada con el objeto de captura, y se puede completar una segunda determinación del mismo subconjunto o de algún subconjunto de las localizaciones bajo un segundo intervalo de longitudes de onda (por ejemplo, fluorescencia) para determinar el número de localizaciones que comprenden un objeto de captura asociado con una molécula de analito (o ligando de unión). Más abajo se describen métodos de detección ejemplares.

Métodos de detección

En algunas realizaciones, en los métodos en los que las especies a detectar se reparten a lo largo de una pluralidad de localizaciones, las localizaciones se pueden interrogar usando una variedad de técnicas, incluyendo técnicas conocidas por aquellos de pericia normal en la técnica.

En una realización específica de la presente invención, las localizaciones se interrogan ópticamente. Las localizaciones que muestran cambios en su firma óptica se pueden identificar mediante un tren óptico convencional y un sistema de detección óptico. Dependiendo de la especie detectada (por ejemplo, moléculas de agentes de marcaje, partículas, etc.) y de las longitudes de onda operativas, se pueden emplear para la interrogación óptica de las localizaciones filtros ópticos diseñados para una longitud de onda particular.

En realizaciones en las que se usa la interrogación óptica, el sistema puede comprender más de una fuente de luz y/o una pluralidad de filtros para ajustar la longitud de onda y/o intensidad de la fuente de luz. Por ejemplo, en algunos casos, una primera interrogación de las localizaciones se puede llevar a cabo usando luz de un primer intervalo de longitudes de onda (por ejemplo, luz blanca en realizaciones en las que los objetos de captura no son fluorescentes, o un intervalo de longitudes de onda en el que los objetos de captura fluorescen), mientras que se lleva a cabo una segunda interrogación usando luz de un segundo intervalo diferente de longitudes de onda, de manera que la pluralidad de moléculas detectables fluoresce. Más abajo se proporciona una configuración de un sistema ejemplar (véase la FIG. 11).

En algunas realizaciones, la señal óptica procedente de una pluralidad de localizaciones se captura usando una cámara con CCD. Otros ejemplos no limitantes de tipos de formación de imágenes mediante cámaras que se pueden usar para capturar imágenes incluyen dispositivos de inyección de carga (CIDs), dispositivos de

semiconductores complementarios de óxidos metálicos (CMOSs), dispositivos CMOS científicos (sCMOS), y dispositivos de integración de demora de tiempo (TDI), como serán conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. La cámara se puede obtener de una fuente comercial. CIDs son dispositivos formadores de imágenes de múltiples píxeles bidimensionales, del estado sólido, similares a los CCDs, pero difieren en cómo se captura y se lee la imagen. Para ejemplos de CIDs, véase la patente U.S. nº 3.521.244 y la patente U.S. nº 4.016.550. Los dispositivos CMOS son también dispositivos formadores de imágenes del estado sólido, bidimensionales, pero difieren de matrices de CCD estándar en cómo se recoge y se lee la carga. Los píxeles se construyen en una plataforma de tecnología de semiconductores que fabrica transistores CMOS, permitiendo así una ganancia significativa en la señal a partir de sistemas electrónicos de lectura y sistemas electrónicos de corrección significativa construidos sobre el dispositivo. Por ejemplo, véase la patente U.S. nº 5.883.830. Los dispositivos sCMOS comprenden tecnología de formación de imágenes mediante CMOS con ciertas mejoras tecnológicas que permiten excelente sensibilidad e intervalo de dinámico. Los dispositivos TDI emplean un dispositivo CCD que permite que columnas de píxeles se desplacen a una columna adyacente y permite que continúen reuniendo luz. Este tipo de dispositivo se usa típicamente de una manera tal que el desplazamiento de la columna de píxeles es simultáneo con el movimiento de la imagen que se está recopilando de manera que una imagen en movimiento se puede integrar durante una cantidad significativa de tiempo y no se emborrona por el movimiento relativo de la imagen en la cámara. En algunas realizaciones, para la formación de imágenes se podría usar un sistema de espejos de barrido acoplado a un fotodiodo o tubo fotomultiplicador (PMT).

En una realización, la pluralidad de localizaciones se forma directamente como una pluralidad de recipientes de reacción en un extremo de un haz de fibras ópticas. Según una realización, la matriz de recipientes de reacción para la presente invención se puede usar conjuntamente con un sistema de detección óptico, tal como el sistema descrito en la publicación U.S. nº 2003/0027126. Por ejemplo, según una realización, la matriz de recipientes de reacción de la presente invención se forma en un extremo de un montaje de fibra óptica que comprende un haz de fibras ópticas construido de fibras revestidas de manera que la luz no se mezcla entre las fibras.

Las FIGS. 11A y 11B muestran ejemplos no limitantes de un sistema de la presente invención según algunas realizaciones. El sistema comprende una fuente de luz 452, un filtro de excitación 454, un espejo dicromático 458, un filtro de emisión 460, un objetivo 470, y una matriz 472. La luz 453 que emana de la fuente de luz 452 se hace pasar a través de un filtro de excitación 454. La luz se refleja desde el espejo dicromático 458, pasa a través del objetivo 470 y alumbra sobre la matriz 472. En algunos casos, la luz parásita 464 se puede reducir mediante una función 468 reductora de la luz parásita, tal como un iris o abertura. La luz 471 emitida desde la matriz pasa a través del objetivo 470 y del filtro de emisión 460. Se observa la luz 462. El sistema puede comprender componentes adicionales (por ejemplo, filtros, espejos, dispositivos de aumento, etc., adicionales) según sean necesarios para las aplicaciones particulares, como entenderán aquellos de pericia normal en la técnica.

El sistema mostrado en la FIG. 11A puede comprender adicionalmente componentes que ayudan en la determinación del número de recipientes de reacción que contienen un objeto de captura (por ejemplo, usando luz blanca). Como alternativa, los componentes adicionales se pueden usar para determinar el número total de localizaciones y/o proporcionar información espacial con respecto a la posición de las localizaciones (por ejemplo, que contienen o no contienen un objeto de captura), que puede ayudar a corroborar señales observadas bajo diferentes regímenes de luz (por ejemplo, fluorescencia, luz blanca) correspondiente con la posición de una localización (por ejemplo, se puede crear una máscara).

En las FIGS. 11A y 11B, la luz de excitación se emite desde la fuente 452 y es colimada en un haz 453. El filtro de excitación 454 se puede configurar para transmitir solamente la banda de longitud de onda que excita al fluoróforo (por ejemplo, 575 nm +/- 10 nm para resorrufina). La luz de excitación se refleja hacia abajo mediante el filtro dicróico 458 y excita al sustrato 472 que contiene la muestra, a través de la lente del objetivo 470. La luz de la imagen se recoge mediante la lente del objetivo 470, es colimada en un haz 471 y se transmite a través del filtro dicróico 458. Solamente la luz de la imagen que corresponde a la banda de longitud de onda de fluorescencia (por ejemplo, 670 nm +/- 30 nm para resorrufina) se transmite a través del filtro de emisión 460. El haz 462 colimado restante contiene solamente las longitudes de onda de fluorescencia emitidas que subsiguientemente se formarán en imágenes a través del sistema de la cámara.

Se puede usar el mismo sistema para determinar la posición de localizaciones que contienen la muestra (por ejemplo, recipientes de reacción). La matriz que comprende los recipientes de reacción que contienen objetos de captura se puede iluminar con una iluminación de luz blanca de "campo brillante". La matriz se puede iluminar (por ejemplo, usando fuente de luz 475 mostrada en la FIG. 11A) dirigiendo una luz blanca pseudocolimada (por ejemplo, LED de luz blanca) sobre la superficie de la matriz desde un ángulo (por ejemplo, θ_1 en la FIG. 11A puede ser alrededor de 20 grados, alrededor de 25 grados, alrededor de 30 grados, alrededor de 35 grados, alrededor de 40 grados, o mayor) justo fuera de la abertura numérica del objetivo de colección. La luz que golpea la superficie de la matriz 472 (por ejemplo, luz 476) se refleja (y dispersa) desde la superficie, es colimada 471, y es recogida por la lente del objetivo (470). El haz colimado se forma subsiguientemente en imágenes a través del sistema de la cámara.

También se puede usar el mismo sistema para determinar qué localizaciones contienen un objeto de captura (por ejemplo, perla). Cualquier perla particular puede estar asociada o no con una molécula de analito y/o ligando de

unión. La matriz se puede iluminar (por ejemplo, usando una fuente de luz 473 como se muestra en la FIG. 11 A) con una iluminación de luz blanca de "campo oscuro". La matriz se puede iluminar apuntando una luz blanca pseudocolimada (por ejemplo, LED de luz blanca 473) sobre la superficie de la matriz desde un ángulo (por ejemplo, θ_2 en la FIG. 11A es alrededor de 65 grados, alrededor de 70 grados, alrededor de 75 grados, alrededor de 80 grados, alrededor de 85 grados) sustancialmente fuera de la abertura numérica del objetivo de colección. La luz que golpea la superficie de la matriz 472 (por ejemplo, luz 474) es reflejada (y dispersada) desde la superficie, es colimada 471, y es recogida por la lente del objetivo 470. El haz colimado se forma subsiguientemente en imágenes mediante el sistema de la cámara.

En algunas realizaciones, se puede emplear un sistema de detección óptico, por ejemplo como se describe en la publicación U.S. n° 2003/0027126. En un sistema ejemplar, la luz que vuelve desde una matriz de recipientes de reacción formada en el extremo distal de un haz de fibras ópticas se altera vía el uso de un cambiador de aumentos para permitir el ajuste del tamaño de la imagen del extremo proximal o distal de las fibras. La imagen aumentada se obtura y se filtra mediante una rueda obturadora. La imagen se captura entonces mediante una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD). Se puede proporcionar un ordenador que incluye y ejecuta software de procesamiento de imágenes para procesar la información de la cámara CCD, y también se puede configurar opcionalmente para controlar las ruedas obturadoras y de filtro. Como se representa en la publicación U.S. n° 20030027126, el extremo proximal del haz es recibido por una etapa de traducción z y un microposicionador x-y.

Por ejemplo, la FIG. 12 muestra un diagrama de bloques esquemático de un sistema que emplea un montaje 400 de fibra óptica con un sistema de detección óptico. El montaje 400 de fibra óptica comprende un haz o matriz 402 de fibras ópticas que se construye a partir de fibras revestidas de manera que la luz no se mezcle entre las fibras. Una matriz de recipientes de reacción 401 se forma en/se fija al extremo distal 412 del haz, estando el extremo proximal 414 conectado operativamente con una etapa de traducción z 416 y un microposicionador x-y 418. Estos dos componentes actúan concertadamente para situar apropiadamente el extremo proximal 414 del haz 402 para una lente 420 de objetivo de microscopio. La luz recogida por la lente 420 del objetivo se hace pasar a un dispositivo de fluorescencia de luz reflejada con corredera de cubo de tres punteros 422. El dispositivo 422 permite dirigir la luz desde una lámpara 424 de Xe de 75 vatios a través de la lente 420 del objetivo para que se acople en el haz 402 de fibras. La luz procedente de la fuente 424 se condensa mediante la lente condensadora 426, después se filtra y/o se obtura por el filtro y la rueda obturadora 428, y subsiguientemente pasa a través de una corredera de filtro ND 430. La luz que vuelve desde el extremo distal 412 del haz 402 pasa a través del dispositivo 422 a un cambiador de aumentos 432 que permite el ajuste del tamaño de la imagen del extremo proximal o distal de la fibra. La luz que pasa a través del cambiador de aumento 432 se obtura entonces y se filtra mediante una segunda rueda 434. La luz se recoge mediante una cámara 436 con dispositivo de carga acoplada (CCD). Un ordenador 438 ejecuta el software de procesamiento de imágenes para procesar la información procedente de la cámara CCD 436, y también controla opcionalmente otros componentes del sistema, incluyendo, pero sin limitarse a, las ruedas obturadoras y de filtro primera y segunda 428, 434.

Una matriz de recipientes de reacción usada para poner en práctica algunas realizaciones de la presente invención se puede integrar con o se puede fijar al extremo distal del haz de fibras ópticas usando una variedad de procesos compatibles. En algunos casos, se forman micropocillos en el centro de cada fibra individual del haz de fibras ópticas, y los micropocillos pueden estar cerrados herméticamente o no. Cada fibra óptica del haz de fibras ópticas puede transportar luz desde el único micropocillo formado en el centro del extremo distal de las fibras. Este rasgo permite la interrogación de la firma óptica de recipientes de reacción individuales para identificar reacciones/contenidos en cada micropocillo. Consiguientemente, recogiendo la imagen del extremo del haz con una matriz CCD, las firmas ópticas de los recipientes de reacción se pueden interrogar individualmente y/o se pueden formar imágenes sustancialmente de forma simultánea.

45 Cuantificación

Según algunas realizaciones de la presente invención, los métodos, sistemas y/o dispositivos se usan para determinar la presencia y/o una medida de la concentración de moléculas de analito (o partículas) en una muestra de fluido basándose al menos en parte en la detección y/o cuantificación de al menos algunos de una pluralidad de objetos de captura usados para capturar las moléculas de analito (y opcionalmente al menos un ligando de unión). En ciertas realizaciones en las que se determina la concentración, se emplea una correlación y/o calibración que relaciona el número (o fracción/porcentaje) de localizaciones que contienen un objeto de captura que comprende al menos una molécula de analito (y/o al menos un ligando de unión) con la cantidad/concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido. En algunos casos, la concentración de las moléculas de analito en una muestra de fluido puede ser linealmente proporcional al número/fracción de localizaciones que contienen un objeto de captura que comprende al menos una molécula de analito (y/o al menos un ligando de unión). En otros casos, la medida de la concentración de las moléculas de analito en una muestra de fluido se puede relacionar con el número/fracción de localizaciones que contienen un objeto de captura asociado con al menos una molécula de analito (y/o al menos un ligando de unión) mediante una relación no lineal. En algunas realizaciones, una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido se puede determinar al menos en parte usando una curva de calibración desarrollada usando muestras que contienen concentraciones conocidas de moléculas de analito diana. Más abajo se discuten métodos para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido.

Ciertas realizaciones de la presente invención se distinguen por la capacidad para detectar y/o cuantificar números/concentraciones bajas de objetos de captura que comprenden al menos una molécula de analito (y/o al menos un ligando de unión), y pueden ser muy adecuadas para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido que contiene concentraciones muy bajas de la molécula de analito.

5 Esta capacidad se puede facilitar, en ciertas realizaciones, al menos en parte aislando espacialmente objetos de captura individuales, que incluyen al menos algunos que comprenden al menos una molécula de analito (y/o al menos un ligando de unión), por ejemplo repartiendo una pluralidad de tales objetos de captura a lo largo de una matriz de localizaciones (por ejemplo, recipientes de reacción), y detectando entonces su presencia en los recipientes de reacción. En algunas realizaciones, se puede determinar la presencia de un objeto de captura que
10 comprende al menos una molécula de analito (y/o al menos un ligando de unión) en un recipiente de reacción, y el número de tales recipientes de reacción se puede contar de manera binaria. Esto es, en realizaciones en las que se encuentra que una localización (por ejemplo, un recipiente de reacción) contiene al menos un objeto de captura asociado con al menos una molécula de analito (y/o ligando de unión), la localización se cuenta como una. En realizaciones en las que se encuentra que una localización (por ejemplo, un recipiente de reacción) contiene un
15 objeto de captura, la localización se cuenta como cero. Por ejemplo, los pocillos que se cuentan como "unos" se pueden determinar detectando la presencia de una molécula o partícula detectable en un recipiente de reacción que, como se describe anteriormente, indica la presencia de un objeto de captura que comprende al menos una molécula de analito (y/o al menos un ligando de unión) en el pocillo.

20 En realizaciones en las que una muestra de fluido que contiene o que se sospecha que contiene se pone en contacto con una pluralidad de objetos de captura de manera que cualesquiera moléculas de analito presentes en la muestra se inmovilizan con respecto a la pluralidad de objetos de captura de manera que una fracción estadísticamente significativa (por ejemplo, como se describe anteriormente) de los objetos de captura se asocian con una única molécula de analito, y una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura no se asocian con ninguna molécula de analito (por ejemplo, como se muestra en la FIG. 1, etapa (B)), se puede llevar a
25 cabo una determinación de una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido según lo siguiente. En primer lugar, al menos una porción de los objetos de captura (al menos algunos de los cuales tienen inmovilizada una única molécula de analito) se segrega espacialmente en una pluralidad de localizaciones (por ejemplo, como se muestra en la FIG. 1, etapa (C)). El número de localizaciones que contienen una molécula de analito inmovilizada con respecto a un objeto de captura se determina, ya sea directamente (por ejemplo, mediante
30 detección de la propia molécula de analito (por ejemplo, véase la FIG. 1, etapa (D)) o indirectamente (por ejemplo, mediante detección de un ligando de unión asociado con la molécula de analito, mediante detección de un agente de marcaje (por ejemplo, formado vía conversión de un agente de marcaje precursor con la exposición a una molécula de analito; véase la FIG. 4A), etc.). En algunas realizaciones, una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido se determina al menos en parte sobre la determinación del número de la pluralidad
35 de localizaciones que contienen una molécula de analito (por ejemplo, recipientes de reacción 12 en la FIG. 1, etapa (D)). En ciertas de tales realizaciones, una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se determina al menos en parte mediante comparación de este parámetro medido con un patrón de calibración y/o usando un análisis de distribución de Poisson y/o gaussiana del número de localizaciones que sería de esperar que contengan una molécula de analito.

40 En algunas realizaciones, también se puede determinar el número de localizaciones que comprenden un objeto de captura no asociado con una molécula de analito (por ejemplo, recipiente de reacción 13 en la FIG. 1, etapa (D)). En tales casos, una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido se puede determinar basándose al menos en parte en la relación de localizaciones que comprenden una molécula de analito inmovilizada con respecto a un objeto de captura, al número de localizaciones que comprenden un objeto de captura no asociado
45 con una molécula de analito. En algunos casos, también se puede determinar el número de localizaciones que no comprenden un objeto de captura (por ejemplo, recipiente de reacción 14 en la FIG. 1, etapa (D)). En tales casos, una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido se puede determinar basándose al menos en parte en la relación de localizaciones que comprenden una molécula de analito inmovilizada con respecto a un objeto de captura al número de localizaciones que no comprenden un objeto de captura y/o al número de
50 localizaciones que no comprenden una molécula de analito – tanto si tal localización contiene o no un objeto de captura (en cualquier caso anterior o en cualquier otra parte, el denominador para la relación/fracción puede incluir o no las localizaciones positivas ("on" o "una") añadidas a las localizaciones de nada ("off" o "cero"), dependiendo de la preferencia). En todavía otros casos, se puede determinar el número total de localizaciones asignadas/analizadas (por ejemplo, recipientes de reacción 12, 13, y 14 en la FIG. 1, etapa (D)), y una medida de la concentración de
55 moléculas de analito en una muestra de fluido se puede basar en la relación de las localizaciones que comprenden una molécula de analito inmovilizada con respecto a un objeto de captura al número total de localizaciones asignadas/analizadas.

60 Se debería entender que, en algunos métodos de ensayo, una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido se puede llevar a cabo usando más de un tipo de análisis (por ejemplo, un primer análisis basado en el número de localizaciones que comprenden una molécula de analito inmovilizada con respecto a un objeto de captura, y un segundo análisis basado en la relación de la relación/fracción de localizaciones que comprenden una molécula de analito inmovilizada con respecto a un componente de captura al número total de localizaciones que comprenden un objeto de captura, etc. En tales realizaciones, el segundo análisis se puede usar

como una medida de control de calidad (por ejemplo, para confirmar que el primer análisis proporcionó un resultado razonable), y/o los resultados de los dos análisis se pueden promediar.

En algunas realizaciones, la determinación de una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido que se ensaya se puede llevar a cabo usando un análisis similar como se describe anteriormente, pero determinando el número de recipientes de reacción que comprenden un ligando de unión en oposición al número de recipientes de reacción que comprenden una molécula de analito inmovilizada con respecto a un objeto de captura. Como se describe aquí, en algunos casos, tras la inmovilización de una pluralidad de moléculas de analito a una pluralidad de objetos de captura, la pluralidad de objetos de captura se puede exponer a al menos un tipo de ligando de unión de manera que al menos algunas de las moléculas de analito inmovilizadas se asocian con al menos un ligando de unión (por ejemplo, véase la FIG. 2, etapa (B)). Este método de ensayo puede ser especialmente útil en realizaciones en las que se espera que más de una molécula de analito se asocie con cada objeto de captura, pero todavía se puede desear una cuantificación binaria. En algunos casos, el ligando de unión se puede proporcionar a una concentración de manera que al menos algunos de los objetos de captura que contienen al menos una molécula de analito no se asocien con ningún ligando de unión (por ejemplo, véase la FIG. 2, etapa (C)). En tales realizaciones, el número de localizaciones que contienen un objeto de captura asociado con un ligando de unión (por ejemplo, vía una molécula de analito) puede sustituir al número de localizaciones que contienen un objeto de captura asociado con una molécula de analito en el análisis y métodos descritos anteriormente.

Una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido se puede determinar usando una variedad de técnicas de calibración, y la técnica particular que da como resultado la máxima exactitud y fiabilidad puede depender del número relativo/concentración de moléculas de analito en la muestra al número/concentración de objetos de captura expuestos a la muestra (y o, para realizaciones que usan ligandos de unión, el número relativo/concentración de ligandos de unión al número/concentración de objetos de captura expuestos entre sí durante/después de la captura de las moléculas de analito por los objetos de captura). Los ejemplos no limitantes de métodos de determinación de la concentración que pueden ser útiles en regímenes de concentración de analito particulares incluyen los métodos de lectura binaria descritos anteriormente, y/o métodos en los que se emplea la intensidad de la señal positiva relativa medida para las localizaciones (“métodos de lectura de la intensidad”). Cualquiera o ambos de los métodos anteriores – o métodos alternativos – puede emplear una comparación del parámetro medido con una curva de calibración.

Actualmente se cree que el método más exacto de determinación puede depender al menos en parte de la concentración de moléculas de analito contenidas en la muestra de fluido. Por ejemplo, en realizaciones en las que la concentración de las moléculas de analito en la muestra que se ensaya da como resultado una fracción estadísticamente significativa de localizaciones a las que esos objetos de captura se reparten que comprenden una única molécula de analito o ligando de unión y una fracción estadísticamente significativa de localizaciones que no comprenden ninguna molécula de analito o ligandos de unión (por ejemplo, a o que se aproxima a un régimen en el que esencialmente ninguna localización comprende más de una molécula de analito o ligando de unión), un método de lectura binaria puede ser particularmente útil, y en algunos casos se puede usar conjuntamente con una curva de calibración. En otras realizaciones, cuando un mayor número de localizaciones comprenden más de una molécula de analito y/o más de un ligando de unión, una determinación basada al menos en parte en una lectura de intensidad puede proporcionar una medida más exacta de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido. Tal determinación también se puede usar conjuntamente con una curva de calibración.

En ciertas realizaciones, la fracción de localizaciones (por ejemplo, la fracción estadísticamente significativa) que comprenden al menos un objeto de captura asociado con una molécula de analito y/o ligando de unión es menor que alrededor de 50%, menor que alrededor de 40%, menor que alrededor de 25%, menor que alrededor de 10%, menor que alrededor de 5%, menor que alrededor de 1%, menor que alrededor de 0,5%, o menor que alrededor de 0,1% del número total de localizaciones que contienen un objeto de captura. En tales realizaciones, una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se puede determinar usando un método de lectura binaria. En algunos casos, el porcentaje de localizaciones que no contienen un objeto de captura asociado con una molécula de analito y/o ligando de unión es al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 90%, o al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 99%, al menos alrededor de 99,5%, al menos alrededor de 99,9%, o mayor, del número total de localizaciones.

Mientras que la discusión más abajo se centra principalmente en el uso de un sistema de lectura binaria (por ejemplo, basado en el recuento del número de localizaciones “on” y “off”) para la capacidad de detección de nivel ultra bajo, esto de ningún modo es limitante, y los métodos y ensayos de la invención también pueden emplear en ciertas realizaciones, en lugar de o además de un protocolo de cuantificación binario, uno basado en la medida de la intensidad (es decir, un método de lectura de la intensidad (por ejemplo, para extender el intervalo dinámico)). Como se señala, en algunos casos, los sistemas de detección y métodos de cuantificación se pueden configurar de manera que el sistema puede usar una cualquiera o ambos de una determinación de lectura binaria y una determinación de lectura de la intensidad, dependiendo del formato de ensayo y/o de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido. Por ejemplo, el método y/o sistema puede ser capaz de determinar un parámetro base a partir de una primera medida y decidir usar una determinación de lectura binaria o una determinación de lectura de la intensidad, dependiendo del resultado de la primera determinación, como se describe con más detalle

más abajo y como se describe en la solicitud de patente U.S. de titularidad compartida Serie nº 12/731.136, titulada "Métodos y sistemas para extender el intervalo dinámico en ensayos para la detección de moléculas o partículas" de Rissin et al., presentada el 24 de marzo de 2010, y la solicitud de patente internacional nº (todavía no determinado), titulada "Métodos y sistemas para extender el intervalo dinámico en ensayos para la detección de moléculas o partículas" de Rissin et al., presentada el 1 de marzo de 2011.

Según una realización, el método de cuantificación de la presente invención se puede llevar a cabo según lo siguiente. Una muestra de fluido que contiene o que se sospecha que contiene una molécula de analito de interés se pone en contacto con una pluralidad de objetos de captura y, opcionalmente, uno o más ligandos de unión, y los objetos de captura se reparten a lo largo de una matriz de localizaciones, tal como recipientes de reacción/pocillos (como se describe previamente). En algunas realizaciones, cuando se desea que se use un método de lectura binaria para la determinación, en la etapa de puesta en contacto de la muestra de fluido con los objetos de captura, las cantidades relativas/concentraciones de muestra de fluido y disolución que contiene los objetos de captura se seleccionan (por ejemplo, basándose en un intervalo de concentración aproximada conocido o estimado/sospechado de moléculas de analito en la muestra) de manera que la relación de moléculas de analito en la muestra de fluido al número total de objetos de captura proporcionados a la disolución será menor que alrededor de 1:5, menor que alrededor de 1:10, menor que alrededor de 1:12, menor que alrededor de 1:15, menor que alrededor de 1:20, menor que alrededor de 1:50, menor que alrededor de 1:100, o menos. Con tales relaciones, se espera estadísticamente que al menos algunos de los objetos de captura se asociarán con una molécula de analito individual, y la mayoría del resto de los objetos de captura no se asociarán con ninguna molécula de analito. El número de objetos de captura que se asocian con múltiples moléculas de analito en tales condiciones puede ser suficientemente bajo para ser despreciable, de manera que se puede suponer que el objeto de captura que se determina que comprende una molécula de analito comprende una única molécula de analito. En tales condiciones, se puede usar un sistema de análisis configurado para llevar a cabo una cuantificación de lectura binaria para determinar el número de localizaciones que comprenden un objeto de captura asociado con una molécula de analito mediante cualquier método de detección como se describe aquí. El número de localizaciones que comprenden un objeto de captura asociado con una molécula de analito se cuenta entonces (por ejemplo, en la FIG. 1, etapa (D), el número total de recipientes de reacción que comprenden una molécula de analito es dos, por ejemplo recipientes de reacción 12) y, en algunos casos, se calcula la fracción del número total de localizaciones que contienen un objeto de captura que contiene un objeto de captura asociado con una molécula de analito (por ejemplo, en la FIG. 1, el número total de recipientes de reacción que comprenden un objeto de captura es tres, recipientes de reacción 12 y 13; de este modo, la fracción del número total de localizaciones que comprenden un objeto de captura asociado con una molécula de analito es 2:3). La utilización de ninguna (ninguna molécula de analito detectada) o una (una molécula de analito detectada) respuesta, conjuntamente con el uso de una matriz con un gran número de localizaciones, puede permitir una determinación de concentraciones en bruto de moléculas de analito en la muestra contando el número real de moléculas contenidas en el volumen de muestra repartidas a lo largo y contenidas en las localizaciones. En algunos casos, la molécula de analito se puede detectar indirectamente (por ejemplo, la lectura se logra contando el número de localizaciones que contienen al menos una molécula de agente de marcaje, en el que el agente de marcaje se ha convertido a partir de un agente de marcaje precursor con la exposición a una molécula de analito). En casos en los que se interroga sustancialmente de forma simultánea un gran número de localizaciones (por ejemplo, al menos alrededor de 10.000 localizaciones), la relación de localizaciones que comprenden una molécula de analito asociada con un objeto de captura al número total de localizaciones determinadas (por ejemplo, en algunos casos, las localizaciones que contienen un objeto de captura asociado con o no asociado con cualquier molécula de analito) puede ser al menos alrededor de 1:100, al menos alrededor de 1:1000, al menos alrededor de 1:10,000 o menos. La utilización de una matriz con un gran número de localizaciones (por ejemplo, al menos alrededor de 10.000, al menos alrededor de 50.000, al menos alrededor de 100.000, al menos alrededor de 500.000, etc.) puede proporcionar una señal estadísticamente significativa incluso a esta relación baja.

En algunos ensayos, se puede aplicar un ajuste por distribución de Poisson a números y/o relaciones determinados mediante un método de lectura binaria para facilitar y/o mejorar la exactitud de la determinación de una concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido. Por ejemplo, en realizaciones en las que la relación de moléculas de analito en la muestra de fluido al número total de objetos de captura puestos en contacto con la muestra de fluido es mayor que alrededor de 1:10, mayor que alrededor de 1:5, mayor que alrededor de 1:4, mayor que alrededor de 1:3, o mayor que alrededor de 1:2, o entre alrededor de 1:10 y alrededor de 1:2, entre alrededor de 1:5 y alrededor de 1:2, el número de moléculas de analito inmovilizadas por captura puede ser cero o uno, conteniendo una mayor proporción más de uno que para el régimen descrito en el párrafo anterior. En algunos de tales casos, el comportamiento y exactitud de las determinaciones de la concentración se puede mejorar a lo largo del uso de una suposición de que todas las localizaciones positivas contienen solamente una única molécula de analito (como se describe en el párrafo anterior) empleando un ajuste por distribución de Poisson para predecir el número de localizaciones que se espera que contengan 0, 1, 2, 3, 4, etc., moléculas de analito por objeto de captura.

Una distribución de Poisson describe la probabilidad de que ocurra un número de sucesos si se conoce el número medio de sucesos. Si el número esperado de ocurrencias es μ , entonces la probabilidad ($P_{\mu}(v)$) de que haya exactamente v ocurrencias (siendo v un número entero no negativo, $v = 0, 1, 2, \dots$) se puede determinar mediante la Ecuación 5:

$$P_{\mu}(v) = e^{-\mu} \left(\frac{\mu^v}{v!} \right) \quad (\text{Ec. 5})$$

En algunas realizaciones de la presente invención, μ es igual a la fracción del número de localizaciones que se determina que contienen una molécula de analito asociada con un analito al número total de objetos de captura detectados (por ejemplo, asociados con o no asociados con cualesquiera moléculas de analito), y v es el número de objetos de captura asociados con un cierto número de moléculas de analito (por ejemplo, el número de objetos de captura asociados con 0, 1, 2, 3, etc. moléculas de analito). Determinando μ a partir de la interrogación de la matriz de localizaciones durante un ensayo, se puede determinar la concentración de moléculas de analito en la muestra usando un ajuste por distribución de Poisson. Por ejemplo, en un ensayo que usa el modo binario de medidas en el que los objetos de captura asociados con 1, 2, 3, 4, etc. moléculas de analito no se distinguen entre sí (por ejemplo, cuando $v = 1, 2, 3, 4$ no se diferencian entre sí) y los pocillos (por ejemplo, localizaciones, recipientes de reacción) se caracterizan simplemente como pocillos "on", entonces las ocurrencias de $v = 0$ se pueden determinar definitivamente como el número de pocillos "off". ($P_{\mu}(0)$) se puede calcular según la Ecuación 6:

$$P_{\mu}(0) = e^{-\mu} \left(\frac{\mu^0}{0!} \right) = e^{-\mu} \quad (\text{Ec. 6})$$

y el número de ocurrencias esperadas, μ , se puede determinar en base a un reajuste de la Ecuación 5, como se da en la Ecuación 7:

$$\mu = -\ln[P_{\mu}(0)] \quad (\text{Ec. 7})$$

El número de ocurrencias de objetos de captura asociados con ninguna molécula de analito (o ligandos de unión), $P_{\mu}(0)$, es igual a 1 menos el número total de objetos de captura con todas las otras ocurrencias (por ejemplo, objetos de captura asociados a al menos una molécula de analito o ligando de unión), entonces μ se da mediante la Ecuación 8:

$$\mu = \frac{\text{Número de moléculas de analito}}{\text{Número de objetos de captura}} = -\ln(1 - \text{fracción de pocillos "on"}) \quad \text{Ec. 8}$$

Reordenando la Ecuación 8, el número total de moléculas de analito en la muestra de fluido contenidas en las localizaciones interrogadas que contienen un objeto de captura se puede determinar usando la Ecuación 9:

$$\text{Número de moléculas de analito} = -\ln(1 - \text{fracción de pocillos "on"}) \times \text{Número de objetos de captura} \quad (\text{Ec. 9})$$

Por lo tanto, el número total de moléculas se puede determinar a partir de la fracción de pocillos "on" para un número dado de pocillos que contienen objetos de captura, y una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se puede basar al menos en parte en este número (así como también, por ejemplo, cualesquiera diluciones de la muestra durante el ensayo, el número y volumen de los pocillos que contienen objetos de captura interrogados, etc.). El número de objetos de captura con 1, 2, 3, 4 etc. moléculas de analito asociadas también se puede determinar calculando $P_{\mu}(1)$, $P_{\mu}(2)$, $P_{\mu}(3)$ etc. a partir de μ determinado en la Ecuación 5.

Como ejemplo no limitante de uso de un ajuste por distribución de Poisson, en un ensayo en el que 26% de 50.000 objetos de captura interrogados fueron "on" (es decir, contenían una o más moléculas de analito y/o ligandos de unión), entonces el número total de moléculas de analito presentes se calcula como $-\ln(1-0,26) \times 50.000 = 15.056$ moléculas. De estas 15.056 moléculas, usando $\mu = -\ln(1-0,26) = 0,3011$ en la Ec. 5 para $v = 1$, se calculó que 11.141 objetos de captura tienen 1 molécula de analito, 1.677 objetos de captura tienen 2 moléculas de analito, 168 objetos de captura tienen 3 moléculas de analito, 13 objetos de captura tienen 4 moléculas de analito, y 1 objeto de captura tiene 5 moléculas de analito. Se puede aplicar un análisis similar a realizaciones en las que una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura separados espacialmente están asociados con al menos un ligando de unión, y una fracción estadísticamente significativa de objetos de captura separados espacialmente no están asociados con ningún ligando de unión.

En algunas realizaciones, en las que la relación de localizaciones que comprenden un objeto de captura asociado con al menos una molécula de analito y/o un ligando de unión a localizaciones que contienen un objeto de captura libre de cualquier molécula de analito/ligando de unión es elevada (por ejemplo, mayor que alrededor de 1:2, mayor que alrededor de 1:1, mayor que alrededor de 2:1, mayor que alrededor de 4:1, mayor que alrededor de 8:1, o mayor), la determinación de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se puede basar al menos en parte en una determinación de la lectura de la intensidad. En tal realización, se puede determinar la intensidad total de la matriz (por ejemplo, fluorescencia total), y una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se basa al menos en parte en esta determinación.

En algunas realizaciones, una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido se puede determinar al menos en parte comparando un parámetro medido con un patrón de calibración. En algunos casos, se puede usar una curva de calibración, similar a como se describe aquí, en la que la intensidad total se determina para una pluralidad de muestras que comprenden la molécula de analito a una concentración conocida usando un formato de ensayo sustancialmente similar. Por ejemplo, el número y/o fracciones de localizaciones que comprenden un objeto de captura asociado con una molécula de analito (por ejemplo, basado en una lectura binaria), o como alternativa, la intensidad total de la matriz, se puede comparar con una curva de calibración para determinar una medida de la concentración de la molécula de analito en la muestra de fluido. La curva de calibración se puede producir completando el ensayo con una pluralidad de muestras estandarizadas de concentración conocida en condiciones similares usadas para analizar muestras de ensayo con concentraciones desconocidas. Una curva de calibración puede relacionar la fracción de los objetos de captura que se determina que están asociados con una molécula de analito y/o ligando de unión con una concentración conocida de la molécula de analito. El ensayo se puede completar entonces sobre una muestra que contiene una molécula de analito en una concentración desconocida, y el número/fracción de objetos de captura que se determina que están asociados con una molécula de analito y/o ligando de unión se puede comparar con la curva de calibración (o una ecuación matemática que se ajuste a la misma), para determinar una medida de la concentración de la molécula de analito en la muestra de fluido.

En una realización ejemplar para llevar a cabo una calibración, se usan cuatro muestras de fluido estandarizadas que comprenden una molécula de analito en concentración variable (w , x , y , y z). Para cada muestra de calibración se lleva a cabo un ensayo (por ejemplo, inmovilizando las moléculas de analito con respecto a una pluralidad de objetos de captura, opcionalmente exponiendo los objetos de captura a al menos un tipo de ligando de unión, repartiendo al menos una porción de los objetos de captura en una pluralidad de localizaciones discretas, asignables separadamente, detectando al menos una porción de los objetos de captura, etc.), y se determina el número/fracción de objetos de captura que comprenden una molécula de analito y/o ligando de unión (b , c , d , y e). Se produce una gráfica/ecuación/tabla de consulta, etc., que relaciona los valores b , c , d , y e con concentraciones w , x , y , y z , respectivamente, como se representa en la FIG. 13. El ensayo se puede llevar a cabo entonces en condiciones sustancialmente idénticas sobre una muestra de fluido que contiene una molécula de analito de concentración desconocida, en el que el valor resultante del número/fracción de objetos de captura que comprenden una molécula de analito y/o ligando de unión determinado para la detección de los objetos de captura es f . Este valor (f) se puede representar gráficamente en la gráfica, y se puede determinar una medida de la concentración desconocida del analito diana en la muestra de fluido (t). En algunos casos, la curva de calibración puede tener un límite de detección, en la que el límite de detección es la concentración más baja de moléculas de analito en una muestra de fluido que se puede determinar con exactitud. En algunos casos, el valor r^2 de la curva de calibración puede ser mayor que alrededor de 0,5, mayor que alrededor de 0,75, mayor que alrededor de 0,8, mayor que alrededor de 0,9, mayor que alrededor de 0,95, mayor que alrededor de 0,97, mayor que alrededor de 0,98, mayor que alrededor de 0,99, mayor que alrededor de 0,9999, o alrededor de 1. Los valores b , c , d , y e se pueden basar en el número absoluto de localizaciones/objetos de captura medidos asociados con una molécula de analito (o ligando de unión), o en una relación del número de localizaciones que contienen un objeto de captura asociado con una molécula de analito (o ligando de unión) al número de localizaciones que contienen un objeto de captura no asociado con ninguna molécula de analito, o en una relación del número de localizaciones que contienen un objeto de captura asociado con una molécula de analito (o ligando de unión) al número de localizaciones que contienen un objeto de captura no asociado con una molécula de analito (o ligando de unión) al número de localizaciones que contienen un objeto de captura, o en una relación del número de localizaciones que contienen un objeto de captura asociado con una molécula de analito (o ligando de unión) al número total de localizaciones asignadas, etc. Se puede usar cualquier número de patrones de calibración para desarrollar la curva de calibración (por ejemplo, alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más, patrones de calibración).

En algunas realizaciones, la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido se puede determinar mediante el uso de una curva de calibración que usa un sistema de ensayo que emplea un ordenador. El ordenador puede ejecutar software que puede usar los datos recogidos para producir la curva de calibración y/o para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido de ensayo a partir de tal curva de calibración. Por ejemplo, una imagen de fluorescencia de una matriz que comprende la pluralidad de objetos de captura repartidos a lo largo de la matriz se puede recoger y analizar usando software de análisis de imagen (por ejemplo, IP Lab, BD Biosciences). El software de análisis puede calcular automáticamente el número de localizaciones que tienen intensidad de fluorescencia con respecto a la intensidad de fondo (por ejemplo, un número que se correlaciona con el número de localizaciones que comprenden una molécula de analito. El número de localizaciones que comprenden intensidad de fluorescencia con respecto a la intensidad de fondo se puede dividir entre el número total de localizaciones asignadas, por ejemplo para determinar la fracción de localizaciones que comprenden una molécula de analito. La fracción de localizaciones activas se puede comparar con una curva de calibración para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de fluido.

En ciertas realizaciones, puede ser posible incrementar tanto el intervalo dinámico como la sensibilidad del ensayo expandiendo el número de localizaciones en las que se reparten los objetos de captura y/o ajustando la relación de objetos de captura (por ejemplo perlas) a moléculas de analito en la etapa de captura inicial. En ciertos casos, la disminución o incremento de la relación de analito a perla puede dar como resultado un intervalo más dinámico. En algunos casos, a medida que aumenta el volumen de una muestra, la detección de números pequeños de moléculas

de analito con exactitud puede hacerse, en algunos casos, más desafiante, por ejemplo, debido a limitaciones de equipo, limitaciones de tiempo, etc. Por ejemplo, para lograr las mismas eficiencias en una muestra de mayor volumen (por ejemplo, 1 ml, 10 ml) como se logran con una muestra de menor volumen (por ejemplo, 100 μ l), pueden ser necesarias más perlas (por ejemplo, 10 y 100 veces más perlas, respectivamente), y de este modo, puede ser necesario que las perlas se segreguen espacialmente en un mayor número de localizaciones, en el que el mayor número de localizaciones puede requerir una mayor área de formación de imagen.

Para la etapa de captura, la elección de la concentración de perlas puede depender de varios factores en conflicto. Por ejemplo, puede ser ventajoso si hay suficientes perlas para capturar la mayoría del analito diana desde las perspectivas termodinámica y cinética. Como ilustración ejemplar, termodinámicamente, 200.000 perlas en 100 μ l que cada una tienen unidas a ellas alrededor de 80.000 componentes de captura (por ejemplo anticuerpos) se correlacionan con una concentración de anticuerpo de alrededor de 0,3 nM, y el equilibrio anticuerpo-proteína a esa concentración puede dar lugar a una eficiencia de captura relativamente elevada de moléculas de analito diana en ciertos casos (por ejemplo >70%). Cinéticamente, para 200.000 perlas dispersas en 100 μ l, se puede estimar que la distancia media entre perlas es alrededor de 80 μ m. Las proteínas del tamaño de TNF- α y PSA (17,3 y 30 kDa, respectivamente), como moléculas de analito ejemplares, por ejemplo, tenderán típicamente a difundir 80 μ m en menos de 1 min., de manera que, a lo largo de una incubación de 2 horas, la captura de tales moléculas de analito no tenderá a estar limitada cinéticamente. Además, también puede ser ventajoso proporcionar perlas suficientes cargadas sobre las matrices para limitar el ruido de Poisson hasta una cantidad deseada o aceptable. Considerando como ejemplo una situación en la que 200.000 perlas en un volumen de 10 μ l se cargan sobre una matriz, típicamente alrededor de 20.000-30.000 perlas se verán atrapadas en pocillos del tamaño de femtolitro de la matriz. Para una señal de fondo típica (por ejemplo debida a unión no específica, etc.) de 1% de perlas activas, sería de esperar que esta carga diese como resultado una señal de fondo de 200-300 perlas activas detectadas, que corresponde a un coeficiente de variación (CV) de ruido de Poisson de 6-7%, lo que puede ser aceptable en realizaciones típicas. Sin embargo, las concentraciones de perlas por encima de ciertas concentraciones pueden ser indeseables en ciertos casos por cuanto pueden conducir a: a) incremento en la unión no específica, que puede reducir la señal a fondo; y/o b) relaciones indeseablemente bajas de analito a perla, de manera que la fracción de perlas activas es demasiado baja, dando como resultado CVs elevados de ruido de Poisson. En ciertas realizaciones, considerando un balance de factores tal como los discutidos anteriormente, puede ser deseable, o en ciertos casos óptimo, proporcionar alrededor de 200.000 a 1.000.000 perlas por 100 μ l de muestra de ensayo, para llevar a cabo ciertos ensayos de la invención.

Para realizaciones del ensayo de la invención que emplean uno o más ligandos de unión para marcar las moléculas de analito capturadas, puede ser ventajoso en ciertos casos ajustar las concentraciones usadas para producir un comportamiento deseable u óptimo. Por ejemplo, considerando una realización que implica una molécula de analito que es una proteína (proteína capturada) y que emplea un primer ligando de unión que comprende un anticuerpo de detección y un segundo ligando de unión que comprende un conjugado enzimático (por ejemplo S β G), las concentraciones de anticuerpo de detección y de conjugado enzimático (S β G) usados para marcar la proteína capturada pueden en algunos casos estar limitadas o minimizadas para producir una señal de fondo (por ejemplo 1% o menos) y ruido de Poisson aceptables. La elección de las concentraciones de anticuerpo de detección y conjugado enzimático (S β G) usados para marcar la proteína capturada pueden ser factores en la mejora del comportamiento de o para optimizar algunos de los métodos de ensayo de la invención. En ciertos casos, puede ser deseable que solamente se marque una fracción de las proteínas de captura para evitar señales de saturación producidas por el ensayo. Por ejemplo, para un ensayo particular en el que los niveles de fondo observados son equivalentes a ~1-2 fM de la proteína diana, de manera que la relación de analito a perla puede ser alrededor de 0,3-0,6, el número de perlas activas puede estar en el intervalo de alrededor de 25-40% si cada proteína se marcó con una enzima, que puede ser mayor que lo deseable en algunos casos. Para producir señales de fondo que pueden estar más próximas a un extremo inferior del intervalo dinámico para un ensayo de detección digital – considerando por ejemplo que en ciertos casos 1% de las perlas activas puede proporcionar un suelo de ruido razonable para el fondo en ensayos de detección digital de la invención –, el marcaje apropiado de la proteína capturada se puede lograr potencialmente mediante control cinético de las etapas de marcaje, ya sea limitando o minimizando las concentraciones de ambos reactivos de marcaje o usando tiempos de incubación más cortos. Por ejemplo, en una realización en la que se minimizan las concentraciones del marcador, el uso de un tiempo de incubación de ELISA estándar puede proporcionar resultados aceptables; por ejemplo usando un tiempo de ensayo total de ~6 h. Esta duración del tiempo puede ser aceptable para ensayos que toleran un tiempo de recambio diario para muestras. Para tiempos de recambio más cortos de, por ejemplo, <1 hora (por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico inmediato), el ensayo se podría llevar a cabo con incubaciones más cortas con mayores concentraciones de marcadores.

En algunas realizaciones, la exactitud de un método particular para determinar la concentración con los ensayos de la invención se puede ver comprometida, es decir, tanto por encima como por debajo de los umbrales del intervalo dinámico para el método particular. Por ejemplo, a medida que desciende la concentración de los objetos de captura asociados con una molécula de analito, eventualmente, cuando está por debajo del límite inferior del intervalo dinámico, el número de objetos de captura asociados a una molécula de analito puede ser demasiado bajo para observar un número suficiente de localizaciones ocupadas para obtener una medida fiable y reproducible. En tal situación, el número de localizaciones se podría disminuir a fin de asegurarse de que al menos algunas (por

ejemplo, un número estadísticamente significativo) de ellas estén ocupadas por un objeto de captura asociado con una molécula de analito, y/o la muestra ensayada se podría concentrar y/o el número de objetos de captura incubados con la muestra se podría disminuir, etc., para incrementar el número/fracción de objetos de captura positivos detectados. Por otro lado, un sistema/método de lectura binaria puede estar por encima de su umbral superior de exactitud y/o utilidad cuando, por ejemplo, la carga se aproxima a la saturación con objetos de captura "on", de manera que sustancialmente el 100% de las localizaciones contienen al menos un objeto de captura asociado con una molécula de analito. En este límite, la discriminación entre dos muestras con concentraciones que caen en este intervalo puede no ser factible usando un sistema/método de lectura binaria. En tal situación, para proporcionar un resultado más exacto, se podría usar un número mayor de localizaciones, se podría reducir la concentración de la muestra, por ejemplo a través de diluciones en serie, se podría incrementar el número de objetos de captura incubados con la muestra, etc., para disminuir el número/fracción de objetos de captura positivos detectados, y/o se podría emplear un sistema/método de lectura de la intensidad.

En algunas realizaciones, la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido que se puede determinar sustancialmente de forma exacta es menor que alrededor de 5000 fM, menor que alrededor de 3000 fM, menor que alrededor de 2000 fM, menor que alrededor de 1000 fM, menor que alrededor de 500 fM, menor que alrededor de 300 fM, menor que alrededor de 200 fM, menor que alrededor de 100 fM, menor que alrededor de 50 fM, menor que alrededor de 25 fM, menor que alrededor de 10 fM, menor que alrededor de 5 fM, menor que alrededor de 2 fM, menor que alrededor de 1 fM, menor que alrededor de 500 aM (attomolar), menor que alrededor de 100 aM, menor que alrededor de 10 aM, menor que alrededor de 5 aM, menor que alrededor de 1 aM, menor que alrededor de 0,1 aM, menor que alrededor de 500 zM (zeptomolar), menor que alrededor de 100 zM, menor que alrededor de 10 zM, menor que alrededor de 5 zM, menor que alrededor de 1 zM, menor que alrededor de 0,1 zM, o menos. En algunos casos, el límite de detección (por ejemplo, la concentración más baja de una molécula de analito que se puede determinar en disolución de forma sustancialmente exacta) es alrededor de 100 fM, alrededor de 50 fM, alrededor de 25 fM, alrededor de 10 fM, alrededor de 5 fM, alrededor de 2 fM, alrededor de 1 fM, alrededor de 500 aM (attomolar), alrededor de 100 aM, alrededor de 50 aM, alrededor de 10 aM, alrededor de 5 aM, alrededor de 1 aM, alrededor de 0,1 aM, alrededor de 500 zM (zeptomolar), alrededor de 100 zM, alrededor de 50 zM, alrededor de 10 zM, alrededor de 5 zM, alrededor de 1 zM, alrededor de 0,1 zM, o menos. En algunas realizaciones, la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido que se puede determinar sustancialmente de forma exacta está entre alrededor de 5000 fM y alrededor de 0,1 fM, entre alrededor de 3000 fM y alrededor de 0,1 fM, entre alrededor de 1000 fM y alrededor de 0,1 fM, entre alrededor de 1000 fM y alrededor de 0,1 zM, entre alrededor de 100 fM y alrededor de 1 zM, entre alrededor de 100 aM y alrededor de 0,1 zM. La concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido se puede considerar que se determina sustancialmente de forma exacta si la concentración medida de las moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido está dentro de alrededor de 10% de la concentración real (por ejemplo, verdadera) de las moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido. En ciertas realizaciones, la concentración medida de las moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido puede estar dentro de dentro de alrededor de 5%, dentro de alrededor de 4%, dentro de alrededor de 3%, dentro de alrededor de 2%, dentro de alrededor de 1%, dentro de alrededor de 0,5%, dentro de alrededor de 0,4%, dentro de alrededor de 0,3%, dentro de alrededor de 0,2% o dentro de alrededor de 0,1%, de la concentración real de las moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido. En algunos casos, la medida de la concentración determinada difiere de la concentración verdadera (por ejemplo, real) en no más de alrededor de 20%, no más de alrededor de 15%, no más de 10%, no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, no más de 1%, o no más de 0,5%. La exactitud del método de ensayo se puede determinar, en algunas realizaciones, determinando la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido de una concentración conocida usando el método de ensayo seleccionado.

En algunas realizaciones, más de uno de los tipos descritos anteriormente de métodos de análisis y cuantificación se pueden emplear con el mismo sistema y en un único ensayo. Por ejemplo, en realizaciones en las que las moléculas de analito están presentes a intervalos menores de concentración, las moléculas de analito individuales se pueden detectar, y los datos se pueden analizar, usando un método de análisis digital (cuantificación binaria). En algunos casos que usan cuantificación binaria, como se describió previamente, los datos se pueden procesar usando un ajuste por distribución de Poisson. A intervalos de concentración mayores (por ejemplo, cuando puede ser desafiante o inexacto llevar a cabo la cuantificación binaria), los datos se pueden analizar usando un método de análisis análogo, basado por ejemplo en intensidades de la señal relativas medidas (determinación de la lectura de la intensidad). En ciertas realizaciones, los resultados de los dos métodos de análisis (digital y análogo) se pueden utilizar a la vez por un único sistema/protocolo de ensayo de la invención relacionando los dos métodos usando una única curva de calibración. Por ejemplo, en algunas realizaciones, a niveles de concentración bajos (por ejemplo, en el intervalo de concentración digital/binario), una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de fluido se puede determinar al menos en parte contando perlas como "on" (por ejemplo, determinando si el recipiente de reacción contiene una perla asociada con una molécula de analito) u "off" (por ejemplo, determinando si el recipiente de reacción contiene una perla no asociada con ninguna molécula de analito). A relaciones bajas de moléculas de analito a perlas (por ejemplo, menores que alrededor de 1:5, menores que alrededor de 1:10, menores que alrededor de 1:20, etc.), sustancialmente todas las perlas están asociadas con ninguna o con una única molécula de analito. En este intervalo, el porcentaje de perlas activas (por ejemplo, recipientes de reacción "on") aumenta linealmente al aumentar la concentración de analito, y un método de análisis digital puede ser el más adecuado.

Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de analito, más perlas se asociarán con más de una molécula de analito. Por lo tanto, a medida que aumenta la concentración de analito (pero todavía está en el intervalo digital), el porcentaje de perlas activas en una población generalmente no estará linealmente relacionado con la concentración de analito en bruto, ya que algunas de las perlas se pueden asociar con más de una molécula de analito. En estos intervalos de concentración, los datos se pueden analizar ventajosamente usando un método de análisis digital con el ajuste por distribución de Poisson descrito anteriormente. El efecto no lineal descrito anteriormente se puede representar usando el ajuste por distribución de Poisson a lo largo de sustancialmente el intervalo de concentración en el que permanece una fracción estadísticamente significativa de perlas no asociadas con ninguna molécula de analito o partícula en la muestra. Por ejemplo, los intervalos de porcentaje de perlas activas (es decir, perlas "on" dividido entre perlas totales multiplicado por 100%) para los cuales un método de análisis digital puede ser capaz de determinar con exactitud una medida de la concentración incluyen hasta alrededor de 20% de perlas activas, hasta alrededor de 30% de perlas activas, hasta alrededor de 35% perlas activas, hasta alrededor de 40% perlas activas, hasta alrededor de 45% perlas activas, hasta alrededor de 50% perlas activas, hasta alrededor de 60% perlas activas, hasta alrededor de 70% perlas activas, hasta alrededor de 80% perlas activas, o más. En muchos casos cuando se opera en los intervalos anteriores, el uso de un ajuste por distribución de Poisson mejorará la exactitud.

Por encima de cierto porcentaje de perlas activas (es decir, cuando ya no hay una fracción estadísticamente significativa de perlas presentes en la población que no están asociadas con ninguna molécula de analito o partículas, o, potencialmente de forma ventajosa para situaciones en las que puede haber una fracción estadísticamente significativa de perlas presentes en la población que no están asociadas con ninguna molécula de analito o partículas pero que dan como resultado porcentajes de perlas activas por encima de un cierto nivel - por ejemplo, mayor que o sustancialmente mayor que alrededor de 40%) (o porcentaje de localizaciones activas, en realizaciones en las que no se emplean las perlas)), se pueden alcanzar potencialmente mejoras en la exactitud y/o fiabilidad en la determinación de la concentración de moléculas de analito empleando una determinación y análisis análogos basados en la medida de la intensidad en lugar de o además de un recuento digital/binario/ajuste por distribución de Poisson como se describe previamente. A mayores porcentajes de perlas activas, la probabilidad de que una perla activa (por ejemplo, recipiente de reacción positivo) esté rodeada por otras perlas activas (por ejemplo, recipientes de reacción positivos) es mayor y, en ciertos montajes de ensayo, puede crear ciertos retos prácticos para usar exclusivamente el método de determinación digital/binario. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se puede producir en cierto grado la fuga de un componente detectable a un recipiente de reacción desde un recipiente de reacción adyacente. El uso de una técnica análoga, basada en el nivel de intensidad, en tales situaciones puede producir potencialmente un comportamiento más favorable. En una determinación y análisis análogos basados en la medida de la intensidad, se cuantifica la asociación de múltiples moléculas de analito a concentraciones relativamente elevadas con perlas individuales. Se puede determinar la intensidad de al menos una señal procedente de la pluralidad de recipientes de reacción que contienen al menos una molécula de analito. En algunos casos, la intensidad se determina como la intensidad global total para los recipientes de reacción que contienen al menos una molécula de analito (por ejemplo, la intensidad de los recipientes de reacción se determina como un todo). En otros casos, la intensidad de cada recipiente de reacción con una señal se puede determinar y promediar, dando lugar a una señal de perlas media (ABS).

Según ciertas realizaciones, un sistema de ensayo puede incluir una relación entre los resultados/parámetros de los dos métodos/sistemas de análisis (es decir, digital y análogo), por ejemplo, con la ayuda de una curva de calibración, de manera que el sistema es capaz de operar en múltiples modos de cuantificación dependiendo de la señal que se refiera al número/fracción de perlas "on" detectadas. Tales sistemas pueden tener en ciertos casos intervalos dinámicos sustancialmente expandidos. Una descripción adicional de tales sistemas que pueden combinar y usar más de un método de cuantificación para un único ensayo se proporciona en la Solicitud de Patente U.S. de titularidad compartida Serie nº 12/731.136, titulada "Métodos y sistemas para extender el intervalo dinámico en ensayos para la detección de moléculas o partículas" de Rissin et al., presentada el 24 de marzo de 2010, y en la Solicitud de Patente Internacional nº (todavía no determinado), titulada "Métodos y sistemas para extender el intervalo dinámico en ensayos para la detección de moléculas o partículas", de Rissin et al., presentada el 1 de marzo de 2011.

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo describe materiales usados en los Ejemplos 2-19. Los haces de fibras ópticas se adquirieron de Schott North America (Southbridge, MA). El laminado de silicona de brillo no reforzado se obtuvo de Specialty Manufacturing (Saginaw, MI). El ácido clorhídrico, etanol anhidro, y Tween-20 de grado biología molecular se adquirieron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Las perlas magnéticas activadas con tosilo de 2,8 μm (micrómetros) de diámetro se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las perlas magnéticas terminadas en carboxi de 2,7 μm de diámetro se adquirieron de Varian, Inc. (Lake Forest, CA). El anticuerpo de captura anti-TNF- α humano monoclonal, el anticuerpo de detección anti-TNF- α humano policlonal, y TNF- α humano recombinante se adquirieron de R&D systems (Minneapolis, MN). El anticuerpo de captura monoclonal anti-PSA y el anticuerpo de detección monoclonal se adquirieron de BiosPacfic (Emeryville, CA); el anticuerpo de detección se biotiniló usando métodos estándar. El hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), y el tampón de bloqueo SuperBlock® T-20 se adquirieron de Thermo Scientific (Rockford, IL). El ADN se adquirió de Integrated DNA

Technologies (Coralville, IA), y/o el ADN purificado se solicitó a Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Estreptavidina- β -galactosidasa (S β G) se adquirió de Invitrogen, o se conjugó en nuestro laboratorio usando protocolos estándar. Resorufina- β -D-galactopiranosido (RGP) se adquirió de Invitrogen (Carlsbad, CA). El pulidor de fibras y los consumibles para pulir se adquirieron de Allied High Tech Products (Rancho Dominguez, CA).

5 Ejemplo 2

Lo siguiente describe la preparación de perlas magnéticas de 2,8 μ m de diámetro funcionalizadas con anticuerpo de captura de proteínas. 600 μ l (microlitro) de lote de perlas magnéticas activadas con tosilo de 2,8 μ m de diámetro ($1,2 \times 10^9$ perlas) se lavaron tres veces en tampón de revestimiento de borato de sodio 0,1 M pH 9,5. Se disolvieron 1000 μ g (microgramo) de anticuerpo de captura en 600 μ l de tampón de revestimiento de borato de sodio. A la disolución de anticuerpo se añadieron 300 μ l de sulfato de amonio 3M. Los 600 μ l de disolución de perlas se peletizaron usando un separador magnético, y el sobrenadante se eliminó. La disolución de anticuerpo se añadió a las perlas, y la disolución se dejó mezclar a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación, el sobrenadante se eliminó, y se añadieron a las perlas 1000 μ l de tampón de PBS que contiene 0,5% de suero bovino y 0,05% de Tween-20. Las perlas se bloquearon toda la noche (~8 horas) a 37°C. Las perlas funcionalizadas y bloqueadas se lavaron tres veces con 1 ml de tampón de PBS que contiene 0,1% de suero bovino y 0,05% de Tween-20. Finalmente, se añadió 1 ml de PBS que contiene 0,1% de suero bovino, 0,05% de Tween-20, y 0,02% de azida sódica a las perlas funcionalizadas y bloqueadas. Se almacenaron alícuotas de 50 μ l a 4°C para uso posterior.

Ejemplo 3

Lo siguiente describe la preparación de perlas magnéticas de 2,7 μ m de diámetro funcionalizadas con anticuerpo de captura de proteínas. 500 μ l de lote de perlas magnéticas terminadas con carboxi de 2,7 μ m de diámetro ($1,15 \times 10^9$ perlas) se lavaron dos veces en hidróxido sódico 0,01 M, seguido de tres lavados en agua desionizada. Tras el lavado final, la disolución de perlas se peletizó, y se eliminó la disolución de lavado. Se añadieron 500 μ l de disolución 50 mg/ml recientemente preparada de NHS en MES 25 mM, pH 6,0, al pelete de perlas y se mezclaron. Inmediatamente, se añadieron 500 μ l de una disolución 50 mg/ml recientemente preparada de EDC en MES 25 mM, pH 6,0, a la disolución de perlas y se mezclaron. La disolución se dejó entonces mezclar durante 30 min. a temperatura ambiente. Tras la activación, las perlas se lavaron dos veces con MES 25 mM a pH 5,0. Mientras tanto, se usaron 1000 μ l de MES 25 mM a pH 5,0 para disolver 1000 μ g de anticuerpo de captura. La disolución de anticuerpo se añadió entonces a las perlas activadas, y se dejó que la reacción de acoplamiento transcurriese durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, el sobrenadante se eliminó usando el separador magnético, y se añadieron 1000 μ l de Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) y se dejaron mezclar a temperatura ambiente durante una hora para bloquear cualesquiera sitios reactivos que queden. Finalmente, las perlas funcionalizadas se almacenaron en 1 ml de tampón de bloqueo SuperBlock, y se añadió 0,02% de azida sódica a las perlas funcionalizadas y bloqueadas. Se almacenaron alícuotas de 50 μ l a 4°C para uso posterior.

Ejemplo 4

Lo siguiente describe la preparación de perlas magnéticas de 2,7 μ m de diámetro funcionalizadas con ADN. 120 μ l de perlas magnéticas terminadas con carboxi de 2,7 μ m de diámetro se lavaron tres veces con NaOH 0,01 M, seguido de agua desionizada otras tres veces. Tras el lavado final, al pelete de perlas se añadieron 500 μ l de NHS 50 mg/ml recientemente preparada en MES 25 mM (pH 6) frío, y las perlas se resuspendieron sometiendo brevemente a vórtice. A esta suspensión de perlas se añadieron inmediatamente 500 μ l de disolución 50 mg/ml recientemente preparada de EDC en MES 25 mM (pH 5) frío, y se mezclaron durante 30 min. Tras la activación, las perlas se lavaron tres veces con MES 25 mM (pH 6) frío. La sonda de captura de ADN con modificación amínica en el extremo 5' (5'-NH₂/C12-GTT GTC AAG ATG CTA CCG TTC AGA G-3' (SEC ID NO. 1)) se disolvió en agua libre de nucleasa para obtener una disolución madre 2,6 mM. Se añadieron 60 μ l del lote de ADN a 600 μ l del tampón de acoplamiento que contiene fosfato de sodio 0,1 M y NaCl 0,5 M, pH 8. La disolución de ADN resultante se añadió a las perlas lavadas y se mezclaron durante 3 horas a temperatura ambiente. La suspensión de perlas se sometió a vórtice cada 30 min. durante la reacción. Tras la incubación, el sobrenadante de ADN se eliminó, y se añadió al pelete 1 ml de Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) y se mezclaron durante 1 hora para inactivar los sitios de unión que quedan en las perlas. Finalmente, las perlas se lavaron en tampón de Tris-EDTA (TE) y 0,05% de Tween-20 durante tres veces, y se almacenaron en tampón de TE que contiene 0,05% de Tween-20 y 0,02% de azida sódica a 4°C.

50 Ejemplo 5

Lo siguiente describe la captura de proteínas en perlas magnéticas y la formación de inmunocomplejo marcado con enzima. Disoluciones de ensayo que contienen la proteína de interés se incubaron con suspensiones de perlas magnéticas funcionalizadas con anticuerpo de captura (por ejemplo, véase el Ejemplo 2) durante 1 h a 37°C. Las perlas se separaron entonces y se lavaron tres veces en PBS. Las perlas se resuspendieron e incubaron con disoluciones que contienen anticuerpos de detección durante 30 min. a 37°C. Las perlas se separaron entonces y se lavaron tres veces en PBS. Las perlas se incubaron con disoluciones que contienen S β G (por ejemplo, analito diana) durante 30 min. a 37°C, se separaron, y se lavaron seis veces en PBS y 0,1% de Tween-20. Las perlas se resuspendieron entonces en 10 μ l de PBS a fin de cargarlas en los pocillos de las matrices de haces de fibras.

Ejemplo 6

Lo siguiente describe la captura de ADN sobre perlas magnéticas y la formación de complejo marcado con enzima (FIG. 14). Perlas funcionalizadas con sonda de captura de ADN (por ejemplo, véase el Ejemplo 4) que es específica para el ADN diana complementario de interés se incubaron con disoluciones que contienen el ADN diana (5'-TT GAC GGC GAA GAC CTG GAT GTA TTG CTC C TCT GAA CGG TAG CAT CTT GAC AAC-3' (SEC ID NO. 2)) (por ejemplo, analito diana) durante 2 h. Tras la incubación, la disolución diana de ADN se eliminó, y las perlas se lavaron tres veces en tampón de SSC 0,2x que contiene 0,1% de Tween-20. Las perlas se resuspendieron entonces y se mezclaron con 10 nM de sonda de señal biotinilada (5'-TAC ATC CAG GTC TTC GCC GTC AA/Biotina/-3' (SEC ID NO. 3)) (por ejemplo, primer tipo de ligando de unión) que también es específica para el ADN diana, durante 1 h. Las perlas se lavaron entonces tres veces en tampón de SSC 0,2x que contiene 0,1% de Tween-20 tras eliminar la sonda de señal. Entonces se añadió al pelete de perlas una disolución 10 pM que contiene S β G (por ejemplo, segundo tipo de ligando de unión que comprende un componente enzimático), se resuspendieron, y se mezclaron durante 1 h. Las perlas se separaron entonces y se lavaron seis veces en tampón de PBS 5x que contiene 0,1% de Tween-20. Las perlas se resuspendieron entonces en 10 μ l de PBS y se cargaron sobre una matriz de pocillos de femtolitros.

Ejemplo 7

El siguiente ejemplo describe la captura de ADN marcado con biotina sobre perlas magnéticas y la formación del complejo marcado con enzima (véase la FIG. 15). Perlas funcionalizadas con sonda de captura de ADN que es específica para ADN de interés se incubaron con 1 μ M de ADN diana-biotina (5'-biotina-C TCT GAA CGG TAG CAT CTT GAC AAC-3' (SEC ID NO. 4)) toda la noche (16 h) en tampón de TE que contiene NaCl 0,5 M y 0,01% de Tween-20. Tras la incubación, la disolución diana de ADN se eliminó, y las perlas se lavaron tres veces en tampón de PBS que contiene 0,1% de Tween-20. El lote de perlas se distribuyó en una placa de microtitulación dando 400.000 perlas por pocillo en 100 μ l. El tampón se aspiró de los pocillos de la placa de microtitulación, las perlas se resuspendieron y se incubaron con diversas concentraciones de S β G en Superblock que contiene 0,05% de Tween-20 durante 5 h. En algunos casos, las perlas se resuspendieron cada 30 min. durante la incubación. Las perlas se separaron entonces y se lavaron seis veces con tampón de PBS 5x que contiene 0,1% de Tween-20. Finalmente, las perlas se resuspendieron en 10 μ l de PBS que contiene 0,1% de Tween-20. En algunas realizaciones, las perlas se separaron entonces y se lavaron seis veces con tampón de PBS 5x que contiene 0,1% de Tween-20. Para la detección de la enzima, las perlas: a) se resuspendieron en 20 μ l de PBS que contiene 0,1% de Tween-20, y se cargaron alícuotas de 10 μ l sobre matrices de pocillos de dos femtolitros para la detección, o b) se resuspendieron en 100 μ l de RGP 100 μ M en PBS, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, y se leyeron en un lector de placas de fluorescencia (Infinite M200, Tecan).

Ejemplo 8

Lo siguiente describe la preparación de matrices de micropocillos. Haces de fibras ópticas de aproximadamente 5 cm de longitud se pulieron secuencialmente en una máquina pulidora usando películas de lepeado de diamante de 30, 9 y 1 micrómetros. Los haces de fibras pulidas se grabaron químicamente en una disolución de HCl 0,025 M durante 130 segundos, y entonces se sumergieron inmediatamente en agua para detener la reacción. Para eliminar impurezas procedentes del grabado, las fibras grabadas se sometieron a ultrasonidos durante 5 s y se lavaron en agua durante 5 min. Las fibras se secaron entonces a vacío y se expusieron a plasma de aire durante 5 min. para limpiar y activar la superficie del vidrio. Las matrices se silanizaron durante 30 minutos en una disolución al 2% de silano para hacer hidrófobas a las superficies.

Ejemplo 9

Lo siguiente describe la carga de perlas en micropocillos. Para aplicar la disolución de perlas a los pocillos grabados en un haz de fibras, tubería de PVC transparente (1/16" I.D. 1/8" O.D.) y tubería termocontraíble transparente (3/16" ID) se cortaron en aproximadamente 1 cm de longitud. En primer lugar se colocó un trozo de tubería de PVC sobre el extremo grabado y funcionalizado de un haz de fibras para crear un reservorio para contener la disolución de perlas, seguido de la aplicación de tubería termocontraíble alrededor de la interfaz entre la tubería de PVC y el haz de fibras, para proporcionar un cierre hermético. Se pipetearon 10 μ l de la disolución de perlas concentrada al reservorio creado por la tubería de PVC. El haz de fibras se centrifugó entonces a 3000 rpm (~1333 g) durante 10 minutos para introducir las perlas en los pocillos grabados. El montaje de tubería de PVC/termocontraíble se retiró después de la centrifugación. El extremo distal del haz de fibras se sumergió en disolución de PBS para eliminar por lavado el exceso de disolución de perlas, seguido de la limpieza de la superficie con agua desionizada.

Ejemplo 10

Lo siguiente describe la detección de perlas y perlas marcadas con enzima en matrices de micropocillos. Para adquirir las imágenes de fluorescencia, se usó un sistema de formación de imágenes construido por el usuario que contiene una fuente de luz de mercurio, cubos de filtro, objetivos, y una cámara de CCD. Matrices de haces de fibras se montaron en la etapa de microscopio usando una fijación personalizada. Se colocó una gotita de sustrato de β -galactosidasa (RPG 100 μ M) sobre el material de junta de silicona, y se puso en contacto con el extremo distal de la

matriz de fibras. La plataforma mecánica de precisión movió la lámina de silicona en contacto con el extremo distal de la matriz de fibras ópticas grabada, creando una matriz de recipientes de reacción de femtolitro aislados. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron a 577 nm, con un tiempo de exposición de 1011 ms. Para cada matriz de haces de fibras, se tomaron cinco fotogramas (a 30 segundos por fotograma). Las imágenes fluorescentes se analizaron usando software de análisis de imágenes, para determinar la presencia o ausencia de actividad enzimática en cada pocillo de la matriz de micropocillos. El dato se analizó usando un software de procesamiento de imágenes desarrollado, usando el cuadro de herramientas MathWorks MATLAB y MathWorks Image Processing. El software alineó los fotogramas de imágenes adquiridas, identificó las posiciones de recipientes de reacción, localizó recipientes de reacción con perlas, y midió el cambio en la intensidad de recipientes de reacción a lo largo de un período de tiempo predefinido. Los recipientes de reacción que contienen perlas con crecimiento de intensidad suficiente a lo largo de todos los fotogramas de datos se contaron, y el número final de recipientes de reacción activos se dio como un porcentaje de todos los recipientes de reacción identificados.

Al igual que con fluorescencia, las matrices se formaron en imágenes con luz blanca para identificar aquellos pocillos que contienen perlas. Después de adquirir las imágenes de fluorescencia, el extremo distal (sellado) de las matrices de haces de fibras se iluminó con luz blanca y se formaron imágenes en la cámara de CCD. Debido a la dispersión de la luz por las perlas, aquellos pocillos que contenían una perla parecían más brillantes en la imagen que los pocillos sin perlas. Los pocillos con perlas se identificaron usando este método mediante software.

Ejemplo 11

Lo siguiente describe la carga de perlas en una matriz de micropocillos (FIG. 16). Matrices de 50.000 micropocillos se prepararon como se describió anteriormente. Se prepararon perlas de 2,8 μm como se describió anteriormente. Se prepararon disoluciones de 10 μl que contienen diferentes números de perlas (de 80.000 a 2 millones de perlas) como se describió anteriormente. Las perlas se cargaron en las matrices de micropocillos como se describió anteriormente. La matriz cargada con una disolución que comprende 2 millones de perlas se formó en imágenes usando microscopía electrónica de barrido (SEM). SEM mostró que >99% de los 50.000 pocillos contenían una perla, y cada uno de estos pocillos contenía solamente una única perla. Las matrices cargadas con 80.000 a 200.000 perlas se formaron en imágenes usando microscopía de luz blanca, y se usó análisis de imágenes para identificar pocillos que contenían una perla. El número de perlas por matriz se determinó a lo largo de tres matrices y se representó como una función del número de perlas en disolución (FIG. 16B). A partir de la FIG. 16B, en esta realización, el número de perlas cargadas es una fracción de aquellas proporcionadas en disolución, y no todo pocillo contiene una perla a estas concentraciones de carga de perlas relevantes para el ensayo. En algunos casos, la presencia de una perla en un pocillo (usando imágenes con luz blanca) se puede correlacionar con aquellos pocillos que contienen actividad enzimática. En tales casos, la lectura puede ser ratiométrica (% de perlas activas) y se puede normalizar para la variación en la carga de las perlas.

Ejemplo 12

Lo siguiente describe el llenado de perlas como una función de la profundidad de los pocillos (FIG. 17). En algunas realizaciones, una única perla que contiene una sola molécula de analito se puede suministrar a un micropocillo de manera que se pueden aislar espacialmente y sellar. Para lograr esta situación, la profundidad y anchura de los pocillos se pueden controlar cuidadosamente a parámetros optimizados para un diámetro dado de perlas. Las FIGS. 17A-17C muestran imágenes de SEM de perlas cargadas como se describe anteriormente en matrices de micropocillos en las que la profundidad del pocillo se controló mediante grabado durante diferentes tiempos. De media, los pocillos se grabaron a una velocidad de aproximadamente 1,5 a 1,7 μm por minuto. Por lo tanto, pocillos de 3,25 μm de profundidad se produjeron en alrededor de 115 a 130 s. Para una profundidad de pocillo de 2,5 μm (FIG. 17A), muy pocas perlas son retenidas en los micropocillos ya que son demasiado poco profundos y la detección de analitos individuales puede ser pobre. A una profundidad de 3 μm (FIG. 17B), las imágenes de SEM muestran un llenado bueno de perlas individuales en pocillos individuales, y una baja ocurrencia de dos perlas en un pocillo; esta matriz se puede cerrar herméticamente bien y permite que se interroguen muchos números de perlas individuales en busca de la presencia de un solo analito. Para pocillos de 3,5 μm de profundidad (FIG. 17C), muchos de los pocillos contienen dos perlas, así como también aquellos que contienen una. La presencia de una segunda perla por encima del plano de la matriz puede deteriorar el sellado de la matriz como se describe anteriormente, y puede denigrar la calidad del aislamiento de la perla individual. Estos experimentos indicaron que una profundidad óptima del pocillo para perlas de 2,8 μm de diámetro, en esta realización, está entre alrededor de 3 y alrededor de 3,25 μm . Aunque este intervalo es óptimo, también es posible llevar a cabo las medidas de la invención usando profundidades de pocillo de 3,6 μm , es decir, el límite superior como se indica mediante la Ec. (4).

Ejemplo 13

El siguiente ejemplo describe la comparación de un método de la presente invención frente a un lector de placas convencional para detectar enzima (véanse las FIGS. 18A, 18B, y 19). Las perlas de biotina-ADN se prepararon como se describió anteriormente. Estas perlas se incubaron entonces con una concentración baja de βG , de manera que las perlas contenían estadísticamente ninguna o una enzima. Estas perlas se cargaron en micropocillos, se cerraron herméticamente, y se formaron en imágenes como se describió anteriormente; la FIG. 18A y 18B muestran imágenes representativas. En algunos casos, se observa un incremento en la sensibilidad frente al

5 marcadorez enzimático que procede del aislamiento de perlas individuales, en comparación con las medidas en bruto tradicionales. Las perlas revestidas con ADN se prepararon, se incubaron con ADN biotinilado, y entonces se incubaron con diversas concentraciones de SβG (de 350 aM a 320 fM), como se describió anteriormente. Las enzimas en estas perlas se midieron entonces de dos maneras. En primer lugar, las perlas se cargaron en matrices de micropocillos, se cerraron herméticamente y se formaron en imágenes como se describió anteriormente. La fracción de pocillos activos se determinó como se describió anteriormente, y se representa gráficamente como una función de la concentración de SβG en las FIGS. 19A, el intervalo más pequeño expandido en FIGS. 19B. En segundo lugar, las perlas se incubaron con 100 ul de RPG en una placa de microtitulación durante una hora, y se leyeron en un lector de placas de fluorescencia. La señal de fluorescencia como función de la concentración de SβG se representa en la FIG. 19C. El límite inferior de detección (LOD) del método de la invención (definido como la concentración a la que la señal asciende por encima de tres desviaciones estándar con respecto al fondo) en este experimento fue 384 zM. El LOD de la medida en bruto en el lector de placas fue 14,5 fM. Por lo tanto, el enfoque de matriz de moléculas individuales de la presente invención proporcionó un incremento de 37.760 veces en la sensibilidad al marcadorez enzimático con respecto al lector de placas. Se debería observar que a las concentraciones ensayadas estadísticamente, solamente se deberían de detectar en las perlas ningún o un único analito; por ejemplo, la relación de enzimas a perlas a 350 aM fue $21.070/400.000 = 0,053$.

Ejemplo 14

20 El siguiente ejemplo ilustra la precisión de detección en un método como se describe aquí. La detección de moléculas individuales puede permitir una precisión elevada. En teoría, la varianza más baja en la medida es el ruido de Poisson asociado con el recuento de números pequeños de sucesos. En este ejemplo no limitante, el % de ruido de Poisson se da mediante \sqrt{N}/N , en el que N es el número de perlas activas (asociadas con enzima). La FIG. 20 muestra una gráfica del % de ruido de Poisson frente a la varianza experimental a lo largo de tres medidas (%CV) a partir del dato experimental en la FIG. 19B. Como se puede observar, la imprecisión de la medida (%CV) se corresponde estrechamente con el ruido de Poisson, sugiriendo que el ruido de Poisson puede limitar en algunos casos la precisión de los métodos.

Ejemplo 15

30 El siguiente ejemplo describe la detección de PSA en suero (FIG. 21). Perlas de 2,8 um de diámetro revestidas en anticuerpo anti-PSA se prepararon como se describió anteriormente. Estas perlas se incubaron con 25% de suero bovino o 25% de suero bovino al que se le ha añadido PSA 50 fM. Las perlas se marcaron entonces con anticuerpo de detección anti-PSA y tres concentraciones diferentes de SβG (1, 10, o 100 pM). Las perlas se cargaron entonces en matrices de micropocillos, se cerraron herméticamente y se formaron en imágenes como se describió anteriormente. El análisis de imágenes se usó para determinar la fracción de perlas que contienen una enzima. Estos datos muestran que la invención se puede usar para detectar concentraciones bajas de proteínas en suero al llevar a cabo ELISAs sobre perlas individuales y detectar marcadores enzimáticos individuales. Debido a la eficiencia elevada de la captura de analito usando perlas en esta invención, la concentración del marcadorez enzimático usado se puede variar para marcar solamente una fracción de los analitos capturados sobre las perlas a fin de optimizar la señal a fondo y el intervalo dinámico de la medida. En este conjunto de datos, 1 pM de marcadorez enzimático dio una relación óptima de señal a fondo.

Ejemplo 16

40 El siguiente ejemplo describe la detección de TNF-α (FIG. 22). Perlas de 2,8 um de diámetro revestidas en anticuerpo anti-TNF-α se prepararon como se describió anteriormente. Estas perlas se incubaron con 25% de suero bovino o con 25% de suero bovino al que se le añadió TNF-α 100 fM. Las perlas se marcaron entonces con anticuerpo de detección anti-TNF-α (por ejemplo, primer ligando de unión) y dos concentraciones diferentes de SβG (1 o 100 pM) (por ejemplo, segundo ligando de unión que comprende un componente enzimático). Las perlas se cargaron entonces en matrices de micropocillos, se cerraron herméticamente y se formaron en imágenes como se describió anteriormente. Se usó análisis de imágenes para determinar la fracción de perlas que contenían una enzima. Estos datos muestran que la invención se puede usar para detectar concentraciones bajas de TNF-α en suero al llevar a cabo ELISAs sobre perlas individuales y detectar marcadores enzimáticos individuales. Como en el ejemplo previo, la cantidad de marcadorez enzimático se puede variar para asegurarse de que la medida detecta solamente marcadores enzimáticos individuales en las perlas, y optimizar la relación de señal a fondo. En este ejemplo particular, los fondos son muy bajos, de manera que la relación de señal a fondo es óptima a una concentración de marcadorez enzimático de 1 pM y 100.000 perlas.

Ejemplo 17

55 El siguiente ejemplo describe la detección de ADN en tampón (FIG. 23). Perlas de 2,7 um de diámetro funcionalizadas con una secuencia de captura de ADN se prepararon como se describió anteriormente. Estas perlas se incubaron entonces con diversas concentraciones de ADN diana y después se marcaron con una secuencia de ADN sonda de señal biotinilada como se describe anteriormente. Las perlas se marcaron entonces incubando con diversas concentraciones de SβG (1, 10, o 100 pM). Las perlas se cargaron entonces en matrices de micropocillos, se cerraron herméticamente y se formaron en imágenes como se describió anteriormente. Se usó análisis de

imágenes para determinar la fracción de perlas que contenían una enzima. Estos datos muestran que la invención se puede usar para detectar concentraciones bajas de ADN al formar complejos semejantes a sándwich sobre perlas individuales y detectar marcadores enzimáticos individuales. Como en el caso de la detección de proteínas, la cantidad de marcador enzimático se puede variar para asegurarse de que hay estadísticamente una o ninguna enzima por perla incluso en el caso en el que haya más de una molécula de ADN diana capturada. Esto permite optimizar el intervalo dinámico y la señal a fondo de la medida de moléculas individuales. En este caso, 10 pM de SβG dieron la señal a fondo óptima.

Ejemplo Comparativo 18

El siguiente ejemplo describe un método que usa detección que comprende quimioluminiscencia de fosfatasa alcalina (FIG. 24). Se mezclaron diferentes concentraciones de 10 ul de fosfatasa alcalina con 90 ul de una disolución que contiene el sustrato quimioluminiscente más sensible disponible (APS-5; Lumigen Inc.) en una placa de microtitulación, y se incubaron durante 5 min. La placa de microtitulación se leyó entonces en modo de quimioluminiscencia de un lector de placas. La FIG. 24 muestra una gráfica de quimioluminiscencia como una función de la concentración de fosfatasa alcalina. La concentración más baja de enzima que se pudo detectar por encima del fondo fue 100 aM y el límite de detección fue 50 aM, próximo al valor reportado de 30 aM. La detección de moléculas individuales de β-galactosidasa sobre perlas en esta invención (LOD = 220 zM) es, por lo tanto, más de 100 veces más sensible que la detección quimioluminiscente de fosfatasa alcalina, el sistema de marcador enzimático más sensible que hay comercialmente disponible.

Ejemplo 19

El uso clínico de biomarcadores de proteínas para la diferenciación de estados sanos y mórbidos, y para monitorizar la progresión de la enfermedad, requiere la medida de concentraciones bajas de proteínas en muestras complejas. Algunos inmunoensayos actuales pueden medir proteínas a concentraciones por encima de 10^{-12} M, mientras que se piensa que la concentración de la mayoría de las proteínas importantes en el cáncer, trastornos neurológicos, y las etapas tempranas de infección circulan en el intervalo de 10^{-16} a 10^{-12} M. Por ejemplo: un tumor de 1 mm^3 compuesto de un millón de células que segregan cada una 5000 proteínas en 5 l de sangre circulante se traduce en $\sim 2 \times 10^{-15}$ M (o 2 femtomolar, fM); la infección temprana por VIH con suero que contiene 2-3000 viriones es igual a concentraciones de antígeno p24 que oscilan de 60×10^{-18} M (60 attomolar, aM) a 15×10^{-15} M (15 femtomolar). Los intentos por desarrollar métodos de detección a base de proteínas capaces de detectar estas concentraciones se han centrado en la replicación de marcadores de ácidos nucleicos sobre proteínas, o en la medición de las propiedades de conjunto en bruto de moléculas de proteínas marcadas. Sin embargo, los métodos sensibles para detectar proteínas han decaído por detrás de aquellos para ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), limitando el número de proteínas en el proteoma que se han detectado en la sangre. El aislamiento y detección de moléculas proteicas individuales proporciona el método más directo para medir concentraciones extremadamente bajas de proteínas, aunque la detección sensible y precisa de moléculas de proteínas individuales ha demostrado ser un reto. Lo siguiente describe un método ejemplar para detectar simultáneamente miles de moléculas de proteínas individuales usando los mismos reactivos como el patrón de oro para detectar proteínas, a saber, el ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA). El método puede detectar proteínas en suero en concentraciones attomolar, y puede permitir la medida de una única molécula en sangre.

El método hace uso de matrices de cámaras de reacción de tamaño de femtolitro (FIG. 25) que pueden aislar y detectar moléculas de enzimas individuales. En la primera etapa, se forma un complejo de anticuerpo de tipo sándwich sobre perlas microscópicas, y los complejos unidos se marcan con una molécula informadora de enzima, como en un ELISA a base de perlas convencional. Cuando se evalúan muestras que contienen concentraciones extremadamente bajas de proteína, la relación de moléculas de proteína (y el complejo de marcador enzimático resultante) a perlas es pequeña (típicamente menor que 1:1) y, como tal, el porcentaje de perlas que contienen un inmunocomplejo marcado sigue una distribución de Poisson, conduciendo a inmunocomplejos individuales sobre perlas individuales. Por ejemplo, si 50 aM de una proteína en 0,1 ml (3000 moléculas) se capturó sobre 200.000 perlas, entonces 1,5% de las perlas tendrían una molécula de proteína y 98,5% no tendrían ninguna molécula de proteína (FIG. 25B). Típicamente no es posible detectar estos números bajos de proteínas usando tecnología de detección convencional (por ejemplo, un lector de placas), debido a que los fluoróforos generados por cada enzima se difunden en un volumen de ensayo grande (típicamente 0,1-1 ml), y son necesarios cientos de miles de marcadores enzimáticos para generar una señal de fluorescencia por encima del fondo (FIG. 15A). El método de este Ejemplo permite la detección de concentraciones muy bajas de marcadores enzimáticos confinando los fluoróforos generados por enzimas individuales a volúmenes extremadamente pequeños (~ 50 fl), conduciendo a una concentración local elevada de moléculas de producto fluorescente. Para lograr esta localización en un inmunoensayo, en la segunda etapa del método las perlas del inmunoensayo se cargan en una matriz de pocillos de tamaño de femtolitro (FIG. 25B). La matriz cargada se cierra entonces herméticamente frente a un tapón de caucho en presencia de una gotita de sustrato enzimático fluorogénico, aislando cada perla en una cámara de reacción de femtolitro. Las perlas que poseen un único inmunocomplejo marcado con la enzima generan una concentración localmente elevada de producto fluorescente en las cámaras de reacción de 50 fl. Usando formación de imágenes de fluorescencia estándar en un microscopio, es posible detectar moléculas de enzimas individuales, y obtener imágenes de decenas a centenares de miles de inmunocomplejos de forma sustancialmente simultánea. Aislando

las enzimas asociadas con cada inmunocomplejo, cada complejo da lugar a una señal medible elevada que puede dar como resultado una sensibilidad sustancialmente mejorada con respecto a las medidas en bruto. La concentración de proteína en la muestra de ensayo, en algunos casos, se determina contando simplemente el número de pocillos que contienen tanto una perla como un producto fluorescente con respecto al número total de pocillos que contienen perlas (FIG. 25D). La concentración se determina entonces digitalmente en lugar de usar la señal análoga total.

La FIG. 25A muestra la captura y marcaje de moléculas de proteínas individuales sobre perlas usando reactivos de ELISA estándar. La FIG. 25B muestra la carga de perlas en matrices de micropocillos de femtolitro para la asociación y detección de moléculas individuales. La FIG. 25C muestra una imagen de SEM de una pequeña sección de una matriz de pocillos de femtolitro tras la carga de las perlas. Se cargaron perlas de 2,7 μm de diámetro en una matriz de pocillos con diámetros de 4,5 μm y profundidades de 3,25 μm . La FIG. 25D muestra una imagen de fluorescencia de una pequeña sección de la matriz de pocillos de femtolitro después de que se generan señales a partir de las moléculas individuales. Mientras que la mayoría de las cámaras de femtolitro contienen una perla del ensayo, solo una fracción de esas perlas poseen actividad enzimática catalítica, indicativa de una única proteína unida. La concentración de proteína en disolución en bruto se puede correlacionar con el porcentaje o número de perlas que se han unido a una molécula de proteína. El ensayo ejemplar fue capaz de proporcionar linealidad a lo largo de $\sim 4,5$ logs para 50.000 perlas.

La FIG. 15 muestra que la digitalización de complejos ligados a enzima puede incrementar la sensibilidad sustancialmente en comparación con medidas de conjunto en bruto. La FIG. 15 muestra una gráfica log-log del resultado de la salida de la señal (% de perlas activas para ensayo que comprende el uso de objetos de captura; unidades de fluorescencia relativas (u.f.r.) para lector de placas) como una función de la concentración de S β G. Las concentraciones de S β G para la lectura del conjunto oscilaron de 3 fM a 300 fM, con un límite de detección de 15×10^{-15} M (15 fM; línea (i)). Para el ensayo ejemplar según la actual invención, las concentraciones de S β G oscilaron de 350 zM a 7 fM, demostrando una respuesta lineal a lo largo de 4,5 logs, con un límite de detección de 220×10^{-21} M (220 zM; línea (ii)). Las barras de error se basan en la desviación estándar sobre tres réplicas para ambas tecnologías. Los LODs se determinaron a partir de la señal a tres desviaciones estándar por encima del fondo. La Tabla 1 proporciona información relativa a la imprecisión de este ensayo ejemplar según la actual invención con respecto al ruido de Poisson del recuento de sucesos individuales. La variación intrínseca (ruido de Poisson) del recuento de perlas activas individuales se da mediante \sqrt{n} . La comparación del coeficiente de variación (%CV) asociado con el ruido de Poisson con el %CV para este ensayo ejemplar según la actual invención a lo largo de tres medidas muestra que la imprecisión del ensayo se determina solamente mediante error de recuento. Esta observación sugiere que estos ensayos según la actual invención, en algunos casos, pueden tener imprecisión <20% en tanto que se detecten al menos 25 perlas activas, que es equivalente a una concentración enzimática de 4,5 aM.

Tabla 1.

[S β G] (aM)	Nº medio de complejos individuales	% medio de activas	%CV de la medida	%CV de Poisson
0	1	0,0016%	87%	122%
0,35	3	0,0086%	75%	55%
0,7	5	0,0099%	63%	46%
3,5	22	0,0413%	10%	21%
7	38	0,0713%	15%	16%
35	237	0,4461%	1%	7%
70	385	0,8183%	5%	5%
350	1787	3,3802%	2%	2%
700	4036	7,5865%	5%	2%
3500	15634	30,6479%	3%	1%
7000	24836	44,5296%	1%	1%

Para cuantificar la sensibilidad potencial que se puede lograr singularizando moléculas marcadas con enzima en comparación con medidas de conjunto convencionales, se desarrolló un ensayo modelo de tipo sándwich para

capturar moléculas enzimáticas sobre perlas; la población de perlas se singularizó y se leyó usando métodos de la actual invención, o se leyó como una población de conjunto en un lector de placas convencional. Las perlas se funcionalizaron con moléculas de captura de ADN, y subsiguientemente se saturaron con moléculas diana de ADN complementario biotiniladas en una hibridación de una etapa (véase la sección de Métodos más abajo). Estas perlas se usaron para capturar diversas concentraciones de un conjugado enzimático, estreptavidina- β -galactosidasa (S β G), usado habitualmente como un marcador en ELISA. Aunque las incubaciones del ensayo ejemplar según la actual invención y del ensayo convencional se llevaron a cabo en condiciones sustancialmente similares, en este ejemplo los ensayos divergieron en la etapa de lectura de las perlas. Para el ensayo convencional comparativo, las perlas se leyeron en 100 μ l en un lector de placas de fluorescencia tras 1 h de incubación con resorrufina- β -D-galactopiranosico (RGP) 100 μ M, un sustrato fluorogénico para β -galactosidasa. El límite de detección del ensayo de captura en el lector de placas de microtitulación fue 15 fM de S β G (FIG. 15). Para la detección de moléculas individuales según la presente invención, las perlas se cargaron en los ensayos de femtolitro y, tras cerrar herméticamente una disolución de RGP en los pocillos de las matrices, se generó una señal procedente de enzimas individuales acumuladas en las cámaras de reacción durante 2,5 min., con las imágenes fluorescentes adquiridas cada 30 s. Al final del experimento se adquirió una imagen de luz blanca de la matriz. Estas imágenes se analizaron para identificar pocillos que contenían perlas (procedentes de la imagen de luz blanca) y determinar cuáles de esas perlas tuvieron una molécula enzimática asociada unida (a partir de imágenes fluorescentes con el paso del tiempo). La FIG. 15 muestra una gráfica log-log del porcentaje de perlas que contenían una enzima como una función de la concentración bruta de S β G. El límite de detección (LOD) para el ensayo según la invención fue 220 zeptomolar (13 moléculas en 100 μ l, o 22 yoctomoles), que corresponde a una mejora en la sensibilidad con respecto al lector de placas de un factor de 68.000, mostrando que la singularización puede dar un incremento drástico en la sensibilidad con respecto a medidas de conjunto convencionales. La concentración de S β G detectada usando el ensayo de la presente invención fue un factor de 140 menor que la detección por quimioluminiscencia de fosfatasa alcalina (30 aM), el sistema de ELISA actual más sensible. La elevada eficiencia termodinámica y cinética que se puede lograr para el presente procedimiento (Tabla 2) puede permitir la detección de números muy pequeños de marcadores enzimáticos, e indica que la medida de una única molécula marcada a partir de la sangre es una posibilidad.

Tabla 2. Cálculo de la eficiencia de captura de marcador enzimático de 0,35 aM a 7000 aM para el ensayo llevado a cabo según la invención (FIG. 15).

	Columna A	Columna B	Columna C	Columna D	Columna E	Columna F
[S β G] (aM)	% medio de perlas activas observadas (Figura 2)	Relación de enzima/perla a partir de la distribución de Poisson	Nº total de enzimas sobre 400.000 perlas	Nº de enzimas sobre perlas corregido respecto al fondo	Nº calculado de enzimas en 100 μ l de muestra	Eficiencia de la captura
0	0,0016%	0,000016	7	---	---	---
0,35	0,0086%	0,000086	34	28	21	132%
0,7	0,0099%	0,000099	40	33	42	79%
3,5	0,0413%	0,000413	165	159	211	75%
7	0,0713%	0,000713	285	279	421	66%
35	0,4461%	0,004471	1789	1782	2107	85%
70	0,8183%	0,008217	3287	3280	4214	78%
350	3,3802%	0,034387	13755	13748	21070	65%
700	7,5865%	0,078897	31559	31552	42140	75%
3500	30,6479%	0,365974	146390	146383	210700	69%
7000	44,5296%	0,589320	235728	235722	421400	56%

En la Tabla 2, para los experimentos, se interrogaron de media 50.000 perlas (~12,5%) de las 400.000 incubadas con las disoluciones de enzima. La fracción baja de perlas detectadas estaba limitada por el número de recipientes de reacción usados en este ejemplo (50.000 pocillos). Al representar la pérdida de perlas, el número de perlas activas observadas experimentalmente (Columna A) se puede usar para estimar el número total de perlas activas de las 400.000 usadas (Columna B). Tras restar el fondo (Columna C) y aplicar un ajuste mediante distribución de

Poisson basado en la distribución de 0, 1, 2, 3, 4, etc., moléculas de enzima por perla, se puede determinar el número total de moléculas capturadas sobre perlas (Columna D). La relación de este número al número total de enzimas en 100 ul al comienzo del experimento (Columna E; volumen x concentración x número de Avogadro) produce una eficiencia de captura (Columna F). La eficiencia global de la captura y detección de enzima usando el presente ensayo es elevada (65-85%) y, en algunas realizaciones, puede limitarse mínimamente en este experimento mediante la difusión lenta del gran conjugado de SβG (MW ~ 515 kDa).

Se desarrolló un ensayo a base de sándwich para dos biomarcadores proteicos clínicamente relevantes, a saber, el antígeno específico de la próstata (PSA) y el factor α de necrosis tumoral (TNF-α). Estos ensayos muestran que la elevada sensibilidad del marcador enzimático del ensayo de este Ejemplo se traduce en ensayos muy sensibles (<1 fM) adecuados para detectar proteínas en sangre. También se desarrolló un ensayo para ADN, para mostrar que el ensayo de este Ejemplo se puede usar para detectar directamente moléculas individuales de ácido nucleico sin requerir la replicación de la diana. Todos los ensayos se llevaron a cabo como se esquematiza en las FIG. 25A y FIG. 25B, aparte del ensayo de ADN en el que se usó una secuencia de captura y una secuencia señal biotinilada en lugar de anticuerpos de captura y de detección, respectivamente. Las FIGS. 14A-14C muestran datos de los ensayos para A) PSA, B) TNF-α, y C) ADN. Las formas humanas de las proteínas se aplicaron sobre 25% de suero bovino para que fuesen representativas de muestras de ensayo clínico; se usó un factor de dilución de cuatro veces que puede reducir los efectos de la matriz en inmunoensayos. El ADN se detectó en tampón para que fuese representativo de técnicas de preparación de ácidos nucleicos purificados. Usando detección digital para detectar PSA en 25% de suero, se logró un LOD de 46 aM (1,5 fg/ml), que es equivalente a 184 aM en suero completo. Un ensayo de PSA comercial importante (ADVIA Centaur, Siemens) da un LOD de 3 pM (0,1 ng/ml) en suero humano, y se han dado a conocer ensayos ultrasensibles con LODs en el intervalo de 10-30 fM. Por lo tanto, el ensayo de única molécula del presente Ejemplo fue más sensible que el ensayo comercial por un factor de 15.000, y más sensible que otros métodos ultrasensibles por un factor de al menos 50. El límite de detección en la determinación de TNF-α fue 148 aM (2,5 fg/ml), que corresponde a 590 aM en suero completo. El ELISA comercialmente disponible de sensibilidad más elevada para TNF-α tiene un LOD de 21 fM (0,34 pg/ml) en suero (Tabla 1). Por lo tanto, el ensayo del presente Ejemplo impartió una mejora con respecto al ensayo de TNF-α más sensible de un factor de 35. El LOD del ensayo de sándwich de ADN digital fue 135 aM, que corresponde a alrededor de 8000 copias. La capacidad de ciertos ensayos de la presente invención para medir potencialmente concentraciones mucho menores de proteínas en comparación con técnicas convencionales surge de las señales de fondo extremadamente bajas que se pueden lograr digitalizando la detección de proteínas.

Las FIGS. 14A-14C muestra la detección attomolar de proteínas en suero y ADN en tampón usando detección digital. Gráficas de % de perlas activas frente a la concentración de analito para: (FIG. 14A) PSA humano aplicado en 25% de suero, (FIG. 14B) TNF-α humano aplicado en 25% de suero, y (FIG. 14C) ADN en tampón. La fila inferior de las gráficas muestra el extremo bajo del intervalo de concentraciones. Los ensayos se llevaron a cabo incubando secuencialmente perlas de captura específicas con disolución diana, detector biotinilado, y conjugado de SβG. Tras terminar el ensayo, las perlas se cargaron en matrices de pocillos de femtolitro y se interrogaron para determinar la presencia de inmunocomplejos individuales.

El fondo en los inmunoensayos de detección digital de la invención puede surgir, al menos en parte, de la unión no específica (NSB) del anticuerpo de detección y el conjugado enzimático a la superficie de la perla de captura (Tabla 3). Debido a que los ensayos de la invención pueden proporcionar una sensibilidad del marcador mejorada con respecto a ensayos convencionales (FIG. 15), se puede usar significativamente menos anticuerpo de detección (~1 nM) y conjugado enzimático (1-50 pM) para detectar sucesos de unión en comparación con ensayos convencionales (concentraciones de reactivo de marcaje ~10 nM). La concentración de marcador disminuida puede dar como resultado una NSB sustancialmente reducida a la superficie de captura, dando como resultado señales de fondo más bajas y menores LODs. Por ejemplo, en las determinaciones de TNF-α y PSA como se describen anteriormente, los niveles de NSB fueron equivalentes a la señal producida por 1,8 fM y 1,2 fM de proteína diana, respectivamente. El ensayo de TNF-α comercial con sensibilidad más elevada tiene un nivel de NSB equivalente a 85 fM de TNF-α (FIG. 26), un factor de 50 mayor. La capacidad para reducir fondos en ciertos ensayos de la presente invención reduciendo la concentración de reactivos de marcaje se puede traducir en inmunoensayos con sensibilidad mejorada con respecto a ensayos convencionales.

Tabla 3. Datos de caída de NSB

Experimento de caída de NSB (ensayo de PSA SiMoA)					
	Media	SD	CV	% de NSB	
No dAb; No PSA	0,110%	0,162%	147%	de SbG	20%
No SbG; No PSA	0,000%	0,000%	---	de dAb	80%
NSB	0,541%	0,194%	36%	Total NSB	100%

En la Tabla 3, un experimento de caída aísla las fuentes de NSB en el ensayo digital de PSA. Comparando “NSB sin anticuerpo de detección” (No dAb) y “NSB sin SβG” (No SβG) con el NSB total (NSB), se determinó la contribución de anticuerpo de detección y SβG a la NSB del ensayo.

5 Para demostrar las medidas de diagnóstico únicas que se podrían lograr detectando moléculas individuales de una proteína en muestras clínicas humanas, se midió PSA en muestras de suero procedentes de pacientes que habían sufrido prostatectomía radical (RP). PSA es un biomarcador sérico para el cáncer de próstata usado tanto como herramienta de identificación como para monitorizar la recurrencia bioquímica de pacientes que han sufrido prostatectomía radical. Tras la prostatectomía radical, la inmensa mayoría de PSA se elimina, y los niveles caen por debajo del límite de detección de ensayos comerciales estándar (3 pM o 0,1 ng/ml). La monitorización habitual de estos pacientes para determinar el regreso de PSA puede detectar la recurrencia de cáncer de próstata, pero pueden pasar muchos años tras la cirugía para que se detecte la recurrencia bioquímica mediante inmunoanalizadores actuales. La capacidad para cuantificar con exactitud niveles de PSA en pacientes tras la prostatectomía a concentraciones muy bajas (<3 fM o 100 fg/ml) puede proporcionar una indicación temprana de la recurrencia en caso de que los niveles de PSA aumenten. La FIG. 27 muestra niveles de PSA medidos usando el ensayo de este Ejemplo en el suero de treinta pacientes (edad 60-89) que habían sufrido prostatectomía radical y cuya sangre se recogió al menos 6 semanas después de la cirugía. Los niveles de PSA en los sueros de los 30 pacientes estaban por debajo del límite de detección de los ensayos comerciales. Aquí, muestras de suero completo se diluyeron 1:4 en tampón y se midieron usando el ensayo digital de PSA de este Ejemplo (FIG. 14A). PSA se detectó con éxito en los 30 pacientes usando el presente ensayo. Nueve de las treinta muestras cayeron por debajo del LOD del ensayo de PSA de sensibilidad previamente más elevada. Estos datos demuestran una utilidad clínica potencial de ciertos ensayos de la invención para medir proteínas en suero a concentraciones muy por debajo de la capacidad de la tecnología actual. La Tabla 4 resume los resultados de los pacientes.

La FIG. 27 muestra la detección digital de PSA en muestras séricas de pacientes que habían sufrido prostatectomía radical. Las concentraciones de PSA se determinaron usando el ensayo del presente Ejemplo en muestras de suero procedentes de pacientes con RP (círculos (iv)), muestras de control sanos (círculos (ii)), y muestras de control de PSA Bio-Rad (círculos (i)). Las muestras de pacientes con RP se obtuvieron de SeraCare Life Sciences (Milford, MA), y todas tuvieron niveles de PSA indetectables según se miden mediante un ensayo de diagnóstico clínico destacado (ADVIA Centaur); la línea (iv) representa el límite de detección del ensayo de PSA de ADVIA Centaur (100 pg/ml o 3 pM). Las 30 muestras de pacientes estuvieron por encima del límite de detección del ensayo digital de PSA de la invención, mostrado por la línea (v) (0,00584 pg/ml o 184 aM), con las concentraciones de PSA más bajas de pacientes medidas a 0,014 pg/ml (420 aM) usando el presente ensayo. Las muestras de pacientes con los niveles más bajos de PSA fueron detectables, pero se aproximaron al LOD del ensayo dando un %CV de dosis elevada. El presente ensayo se validó en busca de la especificidad por PSA usando patrones de control (Bio-Rad) y suero procedente de individuos sanos (ProMedDx) que se habían evaluado usando el ensayo de PSA de ADVIA Centaur (véase la Tabla 5).

Tabla 4. Sumario de resultados de pacientes

ID del paciente	[PSA] (pg/ml)	%CV de la dosis	ID del paciente	[PSA] (pg/ml)	%CV de la dosis	ID del paciente	[PSA] (pg/ml)	%CV de la dosis
S600	9,39	6%	S590	0,22	22%	S580	0,30	4%
S599	0,75	10%	S589	0,85	17%	S579	1,22	15%
S598	2,71	12%	S588	2,33	3%	S578	0,090	91%
S597	1,79	12%	S587	1,06	13%	S577	1,92	6%
S596	2,46	17%	S586	1,29	22%	S576	0,014	286%
S595	0,32	21%	S585	0,49	84%	S575	0,79	63%
S594	1,63	15%	S584	0,056	136%	S574	1,62	20%
S593	1,15	12%	S583	1,33	26%	S573	0,22	32%
S592	3,46	9%	S582	4,76	9%	S572	1,04	20%
S591	0,21	25%	S581	1,57	31%	S571	0,24	21%

Tabla 5.

	Centaur (ng/ml)	Método de ensayo de la presente invención (ng/ml)
Bio-Rad Control 1	0,838	1,06 ± 0,21
Bio-Rad Control 2	2,47	2,66 ± 0,36
Normales		
ProMedDx S376	2,1	1,60
ProMedDx S378	2,3	1,70
ProMedDx S381	2,9	2,14
ProMedDx S388	4,1	3,95
ProMedDx S395	0,93	0,63
ProMedDx S396	0,9	0,77
ProMedDx S397	1,2	0,66

La Tabla 5 muestra que la especificidad del presente ensayo se confirmó usando muestras de PSA de Bio-Rad (controles) y ProMedDx (suero de individuos sanos) que se habían ensayado previamente en un inmunoanalizador comercial (ADVIA Centaur, Siemens). Las concentraciones de PSA de las muestras de suero sano determinadas usando el método ejemplar fueron (24 ± 12)% menores que las determinadas originalmente en el ADVIA Centaur. Hay dos posibles explicaciones para este sesgo sistemático entre las dos tecnologías. En primer lugar, los valores de ADVIA Centaur se obtuvieron en suero reciente, mientras que los valores para el presente ensayo se obtuvieron después de que los sueros se habían congelado durante periodos de tiempo prolongados y habían experimentado un ciclo de congelación-descongelación. En segundo lugar, puede haber diferencias entre los calibradores de PSA usados para generar las curvas de calibración, que darían como resultado diferencias en las concentraciones de PSA determinadas. Como calibradores, se usó PSA complejo de la Organización Mundial de la Salud (OMS); el PSA de calibración de ADVIA Centaur es desconocido.

Aislando y detectando inmunocomplejos individuales formados en ELISA, ciertos ensayos de la invención pueden impartir mejoras en la sensibilidad, precisión e intervalo dinámico con respecto a métodos de lectura estándar y otros enfoques ultrasensibles conocidos. Aunque algunos de los ensayos de la invención pueden proporcionar sensibilidad por debajo del límite detectable de formatos de lectura estándar y ultrasensibles en suero, potencialmente puede haber dos logaritmos más de sensibilidad basado en el LOD del marcador enzimático (FIG. 15). La capacidad para aislar e interrogar moléculas individuales sobre perlas individuales según ciertas realizaciones de la invención puede facilitar distinguir sucesos de unión anticuerpo-antígeno verdaderos de complejos no unidos específicamente. La identificación y diferenciación de estas dos poblaciones puede permitir la detección de una única molécula biomarcadora en una muestra de suero humano.

Captura de proteínas sobre perlas magnéticas y formación de inmunocomplejo marcado con enzima (FIG. 14 y 27). Perlas funcionalizadas con un anticuerpo para la proteína diana se prepararon según las instrucciones del fabricante. Se incubaron disoluciones de ensayo que contienen la proteína de interés con suspensiones de 200.000 perlas magnéticas durante 2 h a temperatura ambiente. Las perlas se separaron entonces y se lavaron tres veces en PBS y 0,1% de Tween-20. Las perlas se resuspendieron e incubaron con disoluciones que contienen anticuerpo de detección (típicamente 1-3 nM) durante 45 min. a temperatura ambiente. Las perlas se separaron entonces y se lavaron tres veces en PBS y 0,1% de Tween-20. Las perlas se incubaron con disoluciones que contienen S β G (1-50 pM) durante 30 min. a temperatura ambiente, se separaron, y se lavaron seis veces en PBS y 0,1% de Tween-20. Las perlas se resuspendieron entonces en 10 μ l de PBS y se cargaron en una matriz de pocillos de femtolitro.

Ejemplo 20

La FIG. 28 muestra un histograma de la intensidad de fluorescencia media de recipientes de reacción en un experimento de la presente invención. Se analizó un conjunto representativo de imágenes del experimento para determinar poblaciones de recipientes de reacción que: (i) no contenían perlas; (ii) contenían una perla (procedente de la dispersión de luz blanca) pero nada de enzima (ningún incremento en la intensidad de fluorescencia); y (iii) contenían una perla (procedente de la dispersión de luz blanca) y una enzima (intensidad creciente de la fluorescencia a lo largo de cuatro imágenes consecutivas, y un incremento global en la fluorescencia de al menos 20%). Específicamente, la línea (i) representa datos procedentes de recipientes de reacción vacíos, la línea (ii)

representa recipientes de reacción con una perla pero sin enzima (perlas “off”), y la línea (iii) representa recipientes de reacción tanto con una perla como con actividad enzimática (perlas “on”).

Ejemplo 21

5 El siguiente ejemplo describe la determinación de localizaciones de ensayo que comprenden un objeto de captura usando objetos de captura (por ejemplo, perlas) que son fluorescentes.

10 En algunos casos, puede ser ventajoso determinar la presencia o ausencia de perlas en una localización (por ejemplo, pocillo en este ejemplo) usando métodos distintos de los métodos de detección de campo oscuro. En algunos casos, los métodos de detección de campo oscuro pueden no ser ideales debido a que 1) la fuente de luz de dispersión puede enviar un campo de luz no uniforme a la superficie de la matriz con perlas y de este modo la distribución de intensidades de la luz dispersada producida por pocillos que comprenden perlas puede ser más
15 ancha, y puede no determinarse con exactitud que los pocillos con perlas que están en la región de intensidad extremadamente alta o extremadamente baja de la distribución contienen una perla; 2) pequeñas diferencias en la dispersión de pocillos con perlas y pocillos vacíos pueden dar como resultado algoritmos de detección basados en diferencias locales de pocillo a pocillo en la dispersión que carecen de la exactitud deseada a una ocupación alta de perlas debido a que las diferencias de pocillo a pocillo son demasiado pequeñas para ser detectadas consistentemente; y 3) el uso de dispersión de campo oscuro para detectar perlas se puede eliminar usando diferentes tipos de perlas en la misma matriz con fines de multiplexación.

20 Existen comercialmente microesferas de muchos colores diferentes y longitudes de onda de emisión fluorescente, y algunas se emplearon en un ensayo como se describió aquí. Las longitudes de onda de emisión se escogieron de manera que no hubo solapamiento espectral con longitudes de onda de lectura para detectar el colorante de resorrufina producido por la catálisis de moléculas enzimáticas individuales (excitación/emisión 570/590) que se usaron en este ejemplo como la entidad detectada. En experimentos que investigan perlas fluorescentes comercialmente disponibles (por ejemplo, perlas marcadas con FITC y marcadas con Qdot 525), la cantidad de colorante fluorescente cargada en las perlas, en algunos casos, fue tan alta que la fluorescencia de las perlas
25 interfirió en el canal de resorrufina (570/590). Es importante en algunas realizaciones tener una fluorescencia de fondo baja a lo largo de las longitudes de onda de detección de las moléculas de analito, debido a que la cantidad de producto de fluorescencia en los pocillos (por ejemplo, de las moléculas de analito) puede ser relativamente pequeña.

30 En consecuencia, en este ejemplo, se cargaron perlas (por ejemplo, como se describe más abajo) con cantidades variables de colorantes de manera que las perlas se pudiesen contar fácilmente mediante el sistema de formación de imágenes, a la vez que se mantiene la cantidad de colorante suficientemente baja de manera que no interfiera con el nivel de fondo actual del sistema. En este ejemplo, cada superficie de la perla comprendió alrededor de 100.000 moléculas de anticuerpo (por ejemplo, componentes de captura), y solamente una fracción muy pequeña de estos anticuerpos se usa entonces para asociarse a una molécula de analito o partícula. Por ejemplo, si de media
35 alrededor de 10 moléculas de analito se asocian con una perla, solamente 10 moléculas de anticuerpo de captura (0,01% de componentes de captura) se han unido a una molécula diana, que entonces son detectadas por el sistema. Debido a la gran fracción de anticuerpos no usados dispositivos sobre la superficie de las perlas, el enfoque del marcaje con colorante en este ejemplo empleó la fijación covalente de moléculas de colorante directamente a los anticuerpos sobre la superficie de las perlas.

40 El éster de sulfodiclorofenol de Alexa Fluor® 488 (AF-488 SDP ester) es una molécula colorante reactiva amínica adquirida de Invitrogen que se usó en este ejemplo. Perlas revestidas con anticuerpo se incubaron con diversas relaciones molares del AF-488 SDP ester. Se ensayaron relaciones molares de anticuerpo:AF-488 SDP ester de 1:27 a 1:800, todas las cuales dieron una señal brillante en el canal de Alexa 488. La FIG. 29A muestra las perlas con anticuerpo modificadas a una relación 1:27. Las perlas se observaron en el canal de Alexa 488, mientras que la
45 fluorescencia de fondo del canal de resorrufina de las perlas modificadas con AF-488 parece ser comparable a la de las perlas con anticuerpo no modificadas estándar. Específicamente, la FIG. 29A muestra una imagen de una porción de la matriz estándar que usa el canal de resorrufina; la FIG. 29B una imagen de la porción de las perlas de relación molar 1:27 modificadas con Alexa 488 que usan el canal de resorrufina; y la FIG. 29C una imagen de una porción de las perlas de relación molar 1:27 modificadas con Alexa 488 que usan el canal de Alexa 488.

50 La Tabla 6 muestra las intensidades relativas tanto de las perlas modificadas con Alexa 488 como de las perlas no modificadas estándar, en ambos canales fluorescentes. Las perlas estándar dieron una fluorescencia de fondo similar en ambos canales, y las perlas con Alexa 488 dieron una señal brillante en el canal de Alexa (~400 recuentos) mientras que mantienen una señal de fondo de resorrufina que es comparable a las perlas estándar.

Tabla 6

Resultados del formador de imágenes vertical			
perlas estándar	media	desv. est.	%cv
Intensidad de Alexa con perlas	98,37	8,13	8%
Intensidad de Alexa vacía	52,14	8,22	16%
Señal neta	46,23		
	media	desv. est.	%cv
Intensidad de resorrufina con perlas	134,16	16,28	12%
Intensidad de resorrufina vacía	97,09	3,86	4%
Señal neta	37,08		
Perlas marcadas con Alexa488	media	desv. est.	%cv
Intensidad de Alexa con perlas	469,85	89,04	19%
Intensidad de Alexa vacía	64,53	1,44	2%
Señal neta	405,32		
Intensidad de resorrufina con perlas	114,93	5,45	5%
Intensidad de resorrufina vacía	85,06	3,79	4%
Señal neta	29,86		

5 Comparando la intensidad de las perlas modificadas con una curva de calibración de Alexa-488, se calculó que cada perla tiene unidas aproximadamente 5.000 moléculas de colorante Alexa-488. Con tal número bajo de moléculas de colorante sobre la superficie de las perlas, se llevaron a cabo experimentos para evaluar si el procedimiento de marcaje con Alexa-488 impactó de forma negativa a las perlas con anticuerpo en un ensayo de detección de proteínas. Las perlas con anticuerpo que se marcaron con el colorante Alexa-488 se unen específicamente a la proteína Tau, para una proteína relevante para la enfermedad de Alzheimer. Perlas de control y perlas con Alexa-488 con anticuerpo específico para Tau se compararon en un ensayo similar a los descritos en los Ejemplos 3, 5, 8, 9, y 10 anteriores, pero con anticuerpos anti-Tau. Los resultados mostrados en la FIG. 29D sugieren que la conjugación con Alexa-488 tiene poco o ningún impacto negativo sobre el comportamiento de las perlas en el ensayo. Específicamente, la FIG. 29D muestra resultados que comparan la señal procedente de perlas de control con perlas marcadas con Alexa-488 para el ensayo de Tau.

15 Aunque los resultados del ensayo iniciales muestran que la conjugación con Alexa-488 tiene poco o ningún impacto negativo sobre el comportamiento de las perlas con anticuerpo usadas en el ensayo, también se determinó si el marcaje con Alexa-488 dio como resultado una ventaja del recuento de perlas con respecto a perlas de ensayo sin marcar. Los resultados de esta determinación se resumen en la Tabla 7. Los resultados se determinaron usando dos modos de análisis de una única tira usando perlas conjugadas a Alexa-488 en el ensayo de Tau. Esta tira se analizó usando el método de campo oscuro estándar, y también el método de detección de Alexa-488. Los resultados que comparan el método de campo oscuro con el método de detección de la fluorescencia para el recuento de perlas

revelan una mejora en el método de detección de Alexa-488 con respecto al método del campo oscuro. A lo largo de las matrices, usando formación de imágenes mediante campo oscuro, no se contaron de 1300 a 6500 perlas.

Tabla 7.

Tira 242, perlas contadas usando formación de imágenes mediante campo oscuro					
Conc.	T. Pos. PreMorph	Perlas	% Activas		
0,00 pg/ml	586	25806	2,271		
0,00 pg/ml	532	28584	1,861		
0,00 pg/ml	685	31899	2,147		
6,25 pg/ml	14969	28625	52,293		
6,25 pg/ml	15988	26330	60,722		
6,25 pg/ml	17456	30850	56,583		
25,00 pg/ml	32482	32741	99,209		
25,00 pg/ml	28028	28155	99,549		
Tira 242, perlas contadas usando canal de Alexa					
Conc.	T. Pos. PreMorph	Perlas	% Activas	incremento de perlas	% de incremento
0,00 pg/ml	735	31890	2,305	6084	23,58%
0,00 pg/ml	553	29954	1,846	1370	4,79%
0,00 pg/ml	756	35299	2,142	3400	10,66%
6,25 pg/ml	17277	33045	52,283	4420	15,44%
6,25 pg/ml	19735	32528	60,671	6198	23,54%
6,25 pg/ml	21086	37385	56,402	6535	21,18%
25,00 pg/ml	36222	36497	99,247	3756	11,47%
25,00 pg/ml	33144	33245	99,696	5090	18,08%

5 Ejemplo 22

En ciertas realizaciones de métodos de ensayo de la presente invención, puede haber una variación en el tiempo transcurrido entre la adición de anticuerpo detector y la interrogación de ciertas matrices o regiones de matrices frente a la interrogación de otras matrices o regiones. En ciertos casos, la disociación que se puede producir a lo largo de tales intervalos de tiempo puede dar como resultado inexactitudes en determinaciones realizadas más tarde frente a determinaciones realizadas más temprano de concentraciones de moléculas de analito. Este ejemplo investigó los efectos de las medidas para reducir la disociación en la exactitud variante del tiempo de las determinaciones de los ensayos. En este ejemplo, el ensayo comprendió las siguientes etapas:

1. Se formaron inmunocomplejos de moléculas de PSA marcadas con enzima (anti-PSA de captura, PSA en suero, anti-PSA de detección biotilado, y S β G) sobre perlas magnéticas y se lavaron usando métodos similares a los descritos en los Ejemplos 3 y 5. Las perlas magnéticas que presentan inmunocomplejos se intercambiaron en tampón que contiene un cierto hidrato de carbono (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, etc.), o cualquier otra especie molecular que puede ayudar a mantener el estado de hidratación de las proteínas.
2. Tras cargar las perlas en los micropocillos de matrices de haces de fibras usando métodos similares a los descritos en el Ejemplo 9, el exceso de tampón se eliminó mediante secado con aire/vacío.
3. El haz de fibras con perlas cargadas se almacenó durante diversos períodos de tiempo.

4. Justo antes de la generación de la señal/lectura de la matriz, los haces de fibras secos se sumergieron en tampón de PBS, se lavaron con una torunda, se sumergieron nuevamente en tampón de PBS, y después se sumergieron en una disolución que contiene RGP 100 μM . Las matrices se cerraron entonces herméticamente y se leyeron usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 10.

5 La disociación del anticuerpo de detección biotinilado a partir de la molécula de analito capturada, en particular, puede provocar una caída continua de la señal a lo largo del tiempo. En ciertos casos, la disociación puede dar cuenta de más de un 50% de la caída de la señal durante el transcurso de la interrogación de una matriz o serie de matrices durante la realización de un ensayo (por ejemplo, véase FIG. 30A). La FIG. 30A muestra datos procedentes de los experimentos similares llevados a cabo a lo largo de cuatro días diferentes. En estos experimentos, se prepararon simultáneamente inmunocomplejos de PSA marcado con enzima sobre perlas en 64 pocillos de una placa de 96 pocillos que se dispusieron en columnas de 8 pocillos. Las perlas de cada columna se ensayaron entonces en una tira de 8 matrices usando detección de una sola molécula (Ejemplo 10) a tiempos crecientes (mostrados en el eje x). Cada punto de dato es la concentración media de PSA determinada a partir de la columna de 8 pocillos mediante comparación con una curva de calibración que se obtuvo antes de que se ensayase la primera columna. Esta caída de la señal con el tiempo (que se manifiesta como una caída en la concentración de PSA que se determina) puede ser más pronunciada en ensayos que usan proteínas como reactivos/dianas que en ensayos que implican ácidos nucleicos (por ejemplo ADN). En ciertos casos, la disminución de la señal se ajusta a un modelo de disociación.

20 Al llevar a cabo el secado de los pocillos en el presente ejemplo, se eliminaron y/o se redujeron los efectos de la disociación hasta 90% (por ejemplo, véase la FIG. 30B).

25 Aquellos de pericia normal en la técnica estarán al tanto de que mientras los inmunoensayos tradicionales (por ejemplo, ELISA) pueden sufrir pérdida de señal debido a disociación de entidades de detección, en general no requieren tratamiento especial para la disociación de inmunocomplejo debido a que las placas se leen muy rápidamente. Por ejemplo, en un minuto más o menos, un lector de microplacas puede generar señal para una placa de 96 pocillos llena. La diferencia en la disociación entre el pocillo 1 y el pocillo 96 dentro de este marco de tiempo es insignificante. Sin embargo, para ensayos como los métodos descritos aquí en los que la interrogación de los sitios de ensayo pueden tardar en ciertos casos un período de tiempo más largo, la disociación puede afectar a la precisión y/o exactitud de los métodos. En consecuencia, el proceso de secado de los sitios de ensayo puede evitar la pérdida de una molécula de analito y/o ligando de unión, y puede reducir los efectos de la disociación.

30 En algunas realizaciones, se pueden proporcionar componentes adicionales que mantienen la configuración nativa y/o la actividad biológica de moléculas de analito (por ejemplo, proteínas) en los micropocillos, y que pueden proteger a los inmunocomplejos y/o al agente o agentes de marcaje (por ejemplo, enzima o enzimas) durante el proceso de secado/rehidratación. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de identificación normales para identificar agentes que pueden mantener intacto un complejo de anticuerpo/antígeno/enzima, y/o que pueden mantener la actividad enzimática tras el secado/rehidratación. Sin tales agentes, el secado puede desnaturalizar y/o desactivar enzimas u otros componentes del ensayo. Por ejemplo, la identificación de cosmótopos no iónicos conocidos reveló que los hidratos de carbono ayudan a mantener 90-100% de la señal del inmunocomplejo tras el tratamiento de secado/rehidratación. Los hidratos de carbono y otras moléculas se pueden usar para mantener al anticuerpo activo durante la deshidratación en el ensayo de matrices de proteínas, y/o se pueden usar para mantener la actividad proteica durante la deshidratación/liofilización.

Ejemplo 23

El siguiente ejemplo describe la reticulación de un ligando de unión a una molécula de analito para ayudar en la prevención de la disociación del ligando de unión a partir de la molécula de analito. En este ensayo, se formaron inmunocomplejos de PSA marcados con enzima sobre perlas usando métodos similares a los descritos en los Ejemplos 3, 5, y 22, usando concentraciones de PSA de 0, 0,1, y 1 pg/ml añadidas al suero. Se hizo reaccionar un conjunto de perlas con 10 mg/ml de EDC durante 10 minutos para reticular el anticuerpo de detección a otras proteínas asociadas con las perlas, por ejemplo PSA, anticuerpo de captura y proteínas de bloqueo. Las perlas de control no se hicieron reaccionar con EDC. Las perlas de control se leyeron entonces usando métodos similares a los descritos anteriormente en el Ejemplo 10 a $t = 0$ y después 2 horas más tarde. Las perlas reticuladas también se leyeron usando métodos similares a como se describe en el Ejemplo 10 a alrededor de 2 horas después de la reticulación. El resultado mostró que tras 2 horas el número medio de enzimas por perla en las perlas de control se redujo debido a la disociación del anticuerpo de detección. Sin embargo, las perlas reticuladas mantuvieron el AEB elevado incluso después de 2 horas. Estos datos sugieren que la reticulación del anticuerpo de detección a proteínas asociadas irreversiblemente con las perlas eliminó sustancialmente los efectos de la disociación. Además, la reticulación estimuló la señal, también como se muestra en la FIG. 31 (tratada con EDAC; (ii)) con respecto a la espera de 0 horas (i) presumiblemente debido al tiempo de disociación extra que experimentaron las perlas de control antes de ser leídas.

Se debería de entender que los artículos indefinidos “un” y “una”, como se usan aquí en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, excepto que indiquen claramente lo contrario, significan “al menos un”.

En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva anterior, todas las frases de transición tales como “que comprende”, “que incluye”, “que porta”, “que tiene”, “que contiene”, “que implica”, “que mantiene”, y similares, se han de entender que son de extremos abiertos, es decir, significan que incluyen pero no se limitan a. Solo las frases de transición “que consiste en” y “que consiste esencialmente en” deberán ser frases de transición cerradas o semicerradas, respectivamente.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido, que comprende

5 exponer una pluralidad de objetos de captura que incluyen cada uno una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula, a una disolución que contiene o que se sospecha que contiene el al menos un tipo de moléculas de analito o partículas;

10 inmovilizar las moléculas de analito o partículas con respecto a la pluralidad de objetos de captura de manera que al menos algunos de los objetos de captura se asocian con al menos una molécula de analito o partícula y una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura no se asocia con ninguna molécula de analito o partícula;

15 segregarse espacialmente al menos una porción de los objetos de captura sometidos a la etapa de inmovilización en una pluralidad de localizaciones separadas que comprenden una pluralidad de recipientes de reacción de manera que estadísticamente solo ningún o un objeto de captura está situado en el recipiente de reacción;

20 sellar herméticamente los recipientes de reacción tras la adición de los objetos de captura y del agente de marcaje precursor opcional;

25 asignar al menos una porción de la pluralidad de localizaciones sometidas a la etapa de segregación espacial y determinar el número de dichas localizaciones que contienen al menos una molécula de analito o partícula, en el caso de detección directa interrogando y/o detectando una molécula o resto que está comprendido en la molécula de analito o partícula o, en el caso de detección indirecta, interrogando y/o detectando una molécula o resto que está comprendido en un agente de marcaje que se ha convertido a partir de un agente de marcaje precursor mediante exposición a la molécula o partícula; y

30 determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido basándose al menos en parte en el número de localizaciones que se determina que contienen una molécula de analito o partícula.

2. Un método para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en una muestra de fluido, que comprende

35 exponer una pluralidad de objetos de captura que incluyen cada uno una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula, a una disolución que contiene o que se sospecha que contiene el al menos un tipo de moléculas de analito o partículas para formar objetos de captura que comprenden al menos una molécula de analito o partícula inmovilizada;

mezclar los objetos de captura preparados en la etapa de exposición con una pluralidad de ligandos de unión de manera que al menos algunos de los objetos de captura se asocian con un único ligando de unión y una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura no se asocia con ningún ligando de unión;

40 segregarse espacialmente al menos una porción de los objetos de captura sometidos a la etapa de mezclado en una pluralidad de localizaciones que comprenden una pluralidad de recipientes de reacción de manera que estadísticamente solo ningún o un objeto de captura está situado en un recipiente de reacción;

45 sellar herméticamente los recipientes de reacción tras la adición de los objetos de captura y del agente de marcaje precursor opcional;

50 asignar al menos una porción de la pluralidad de localizaciones sometidas a la etapa de segregación espacial y determinar el número de localizaciones que contienen un ligando de unión, en el caso de detección directa interrogando y/o detectando una molécula o resto que está comprendido en el ligando de unión o, en el caso de detección indirecta, interrogando y/o detectando una molécula o resto que está comprendido en un agente de marcaje que se ha convertido a partir de un agente de marcaje precursor mediante exposición al ligando de unión; y

determinar una medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido basándose al menos en parte en el número de localizaciones que se determina que contienen un ligando de unión.

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el porcentaje de objetos de captura que se asocian con al menos una molécula de analito o ligando de unión es menor que alrededor de 50% del número total de objetos de captura, o en el que el porcentaje de objetos de captura que no se asocian con ninguna molécula de analito o ligando de unión es al menos alrededor de 20% del número total de objetos de captura.

4. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que, en la etapa de asignación, se determina el número de dichas localizaciones que contienen un objeto de captura que incluye una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula que no contiene una molécula de analito o partícula.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la medida de la concentración de la molécula de analito o partículas en la muestra de fluido se basa al menos en parte en la relación del número de localizaciones asignadas en la etapa de asignación que se determina que contienen un objeto de captura que incluye una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula que contiene al menos una molécula de analito o partícula, al número total de localizaciones asignadas en la etapa de asignación que se determina que contienen un objeto de captura que incluye una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula.
6. El método de la reivindicación 4, en el que la medida de la concentración de molécula de analito o partículas en la muestra de fluido se basa al menos en parte en la relación del número de localizaciones asignadas en la etapa de asignación que se determina que contienen un objeto de captura que incluye una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula que contiene al menos una molécula de analito o partícula o un ligando de unión, al número de localizaciones asignadas en la etapa de asignación que se determina que contienen un objeto de captura que incluye una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula pero que no contiene ningún objeto de captura que incluye una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula que contiene al menos una molécula de analito o partícula o un ligando de unión.
7. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la medida de la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido se basa al menos en parte en la relación del número de localizaciones asignadas en la etapa de asignación que se determina que contienen un objeto de captura que incluye una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula que contiene al menos una molécula de analito o partícula o ligando de unión, al número de localizaciones asignadas en la etapa de asignación que no contienen un objeto de captura que incluye una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula.
8. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la pluralidad de objetos de captura que incluyen una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula comprende una pluralidad de perlas.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el diámetro medio de la pluralidad de perlas está entre alrededor de 0,1 micrómetros y alrededor de 100 micrómetros, preferiblemente en el que el diámetro medio de la pluralidad de perlas está entre alrededor de 1 micrómetro y alrededor de 10 micrómetros.
10. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el volumen medio de la pluralidad de recipientes de reacción está entre alrededor de 10 attolitros y alrededor de 100 picolitros, más preferiblemente en el que el volumen medio de la pluralidad de recipientes de reacción está entre alrededor de 1 femtolitro y alrededor de 1 picolitro.
11. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que las moléculas de analito o partículas o ligando de unión comprende un componente enzimático.
12. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la concentración de moléculas de analito o partículas en la muestra de fluido es menor que alrededor de 50×10^{-15} M.
13. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que, durante la etapa de segregación espacial, al menos alrededor de 0,5% de los objetos de captura sometidos a las etapas de inmovilización están separados espacialmente en la pluralidad de localizaciones.
14. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la porción de los objetos de captura que incluyen una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito o partícula se separan espacialmente exponiendo la pluralidad de localizaciones a una disolución que comprenden la pluralidad de objetos de captura.
15. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que las moléculas de analito o partículas son proteínas o ácidos nucleicos.

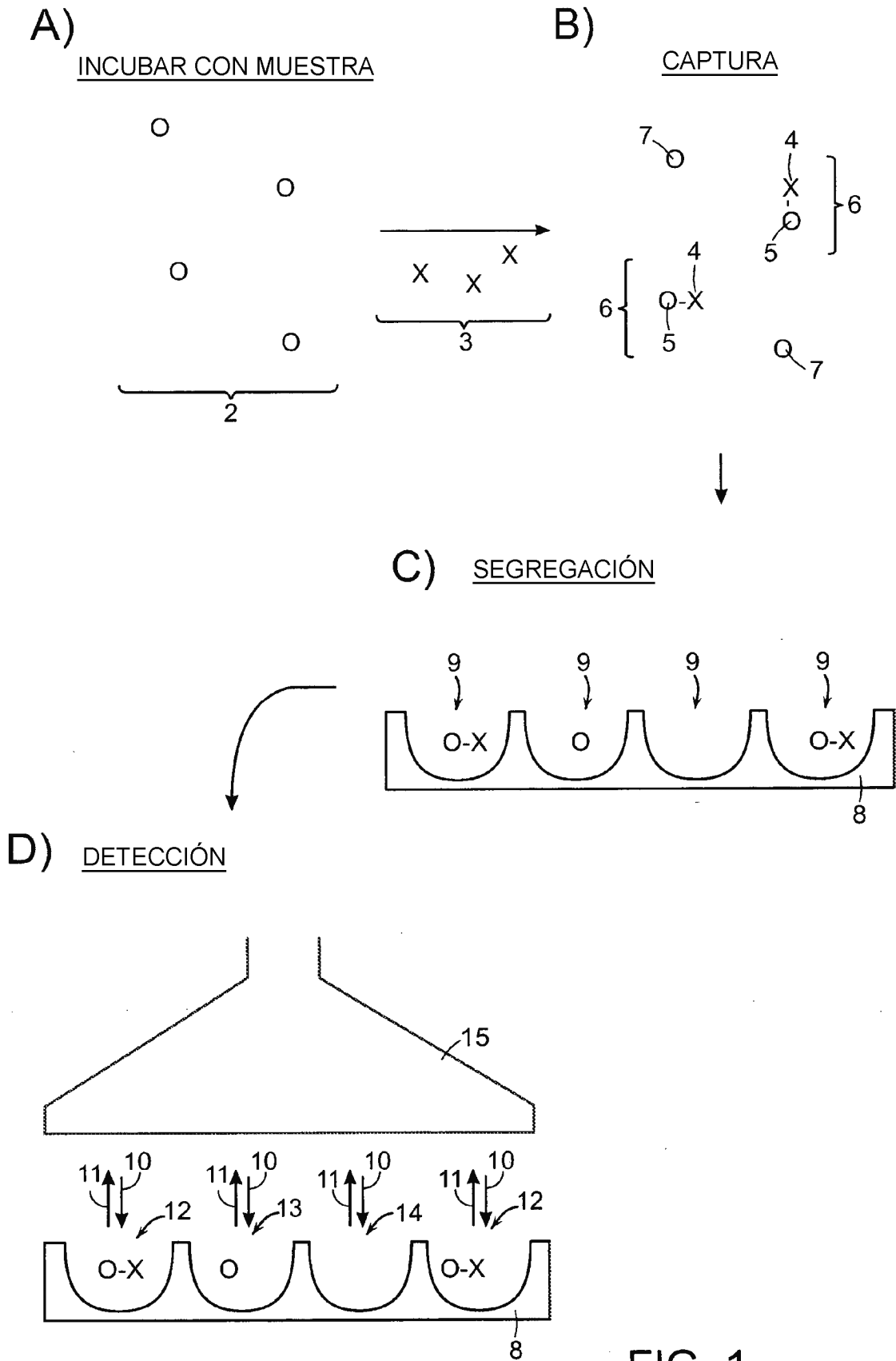


FIG. 1

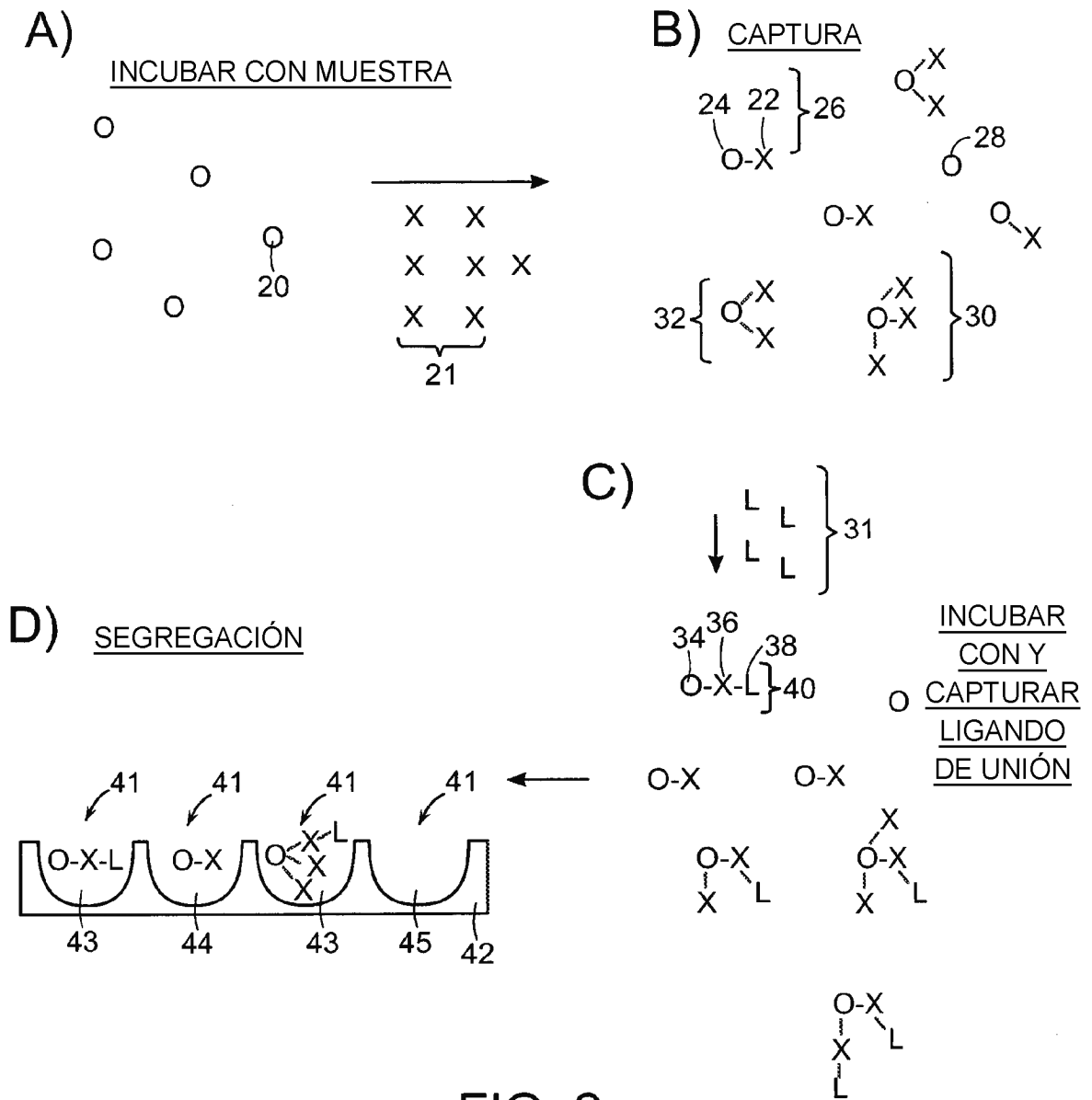


FIG. 2

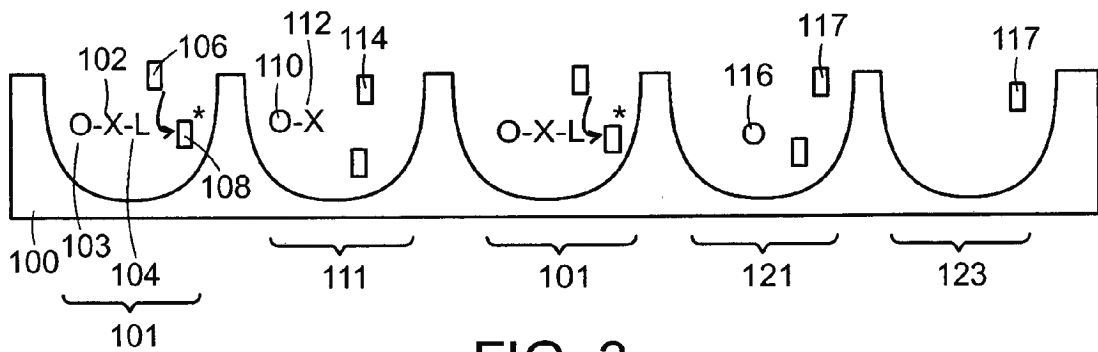


FIG. 3

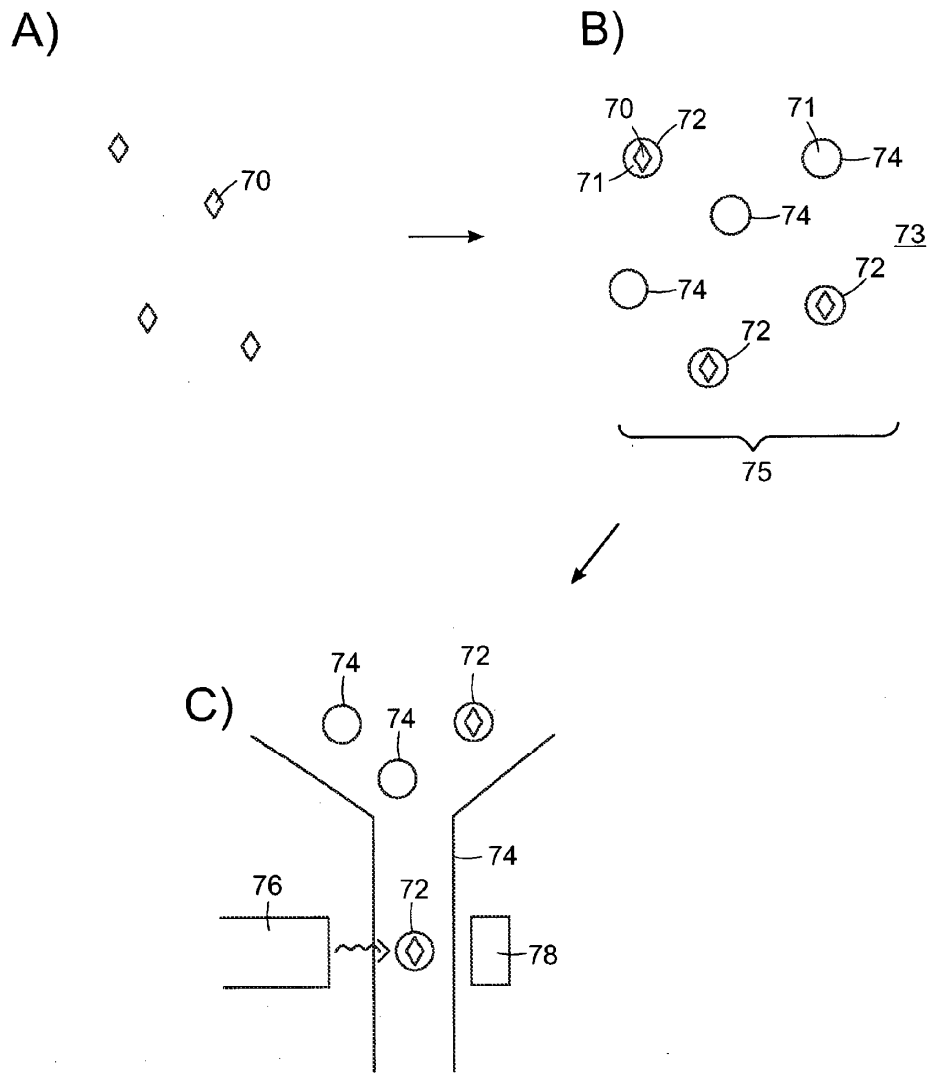


FIG. 4A

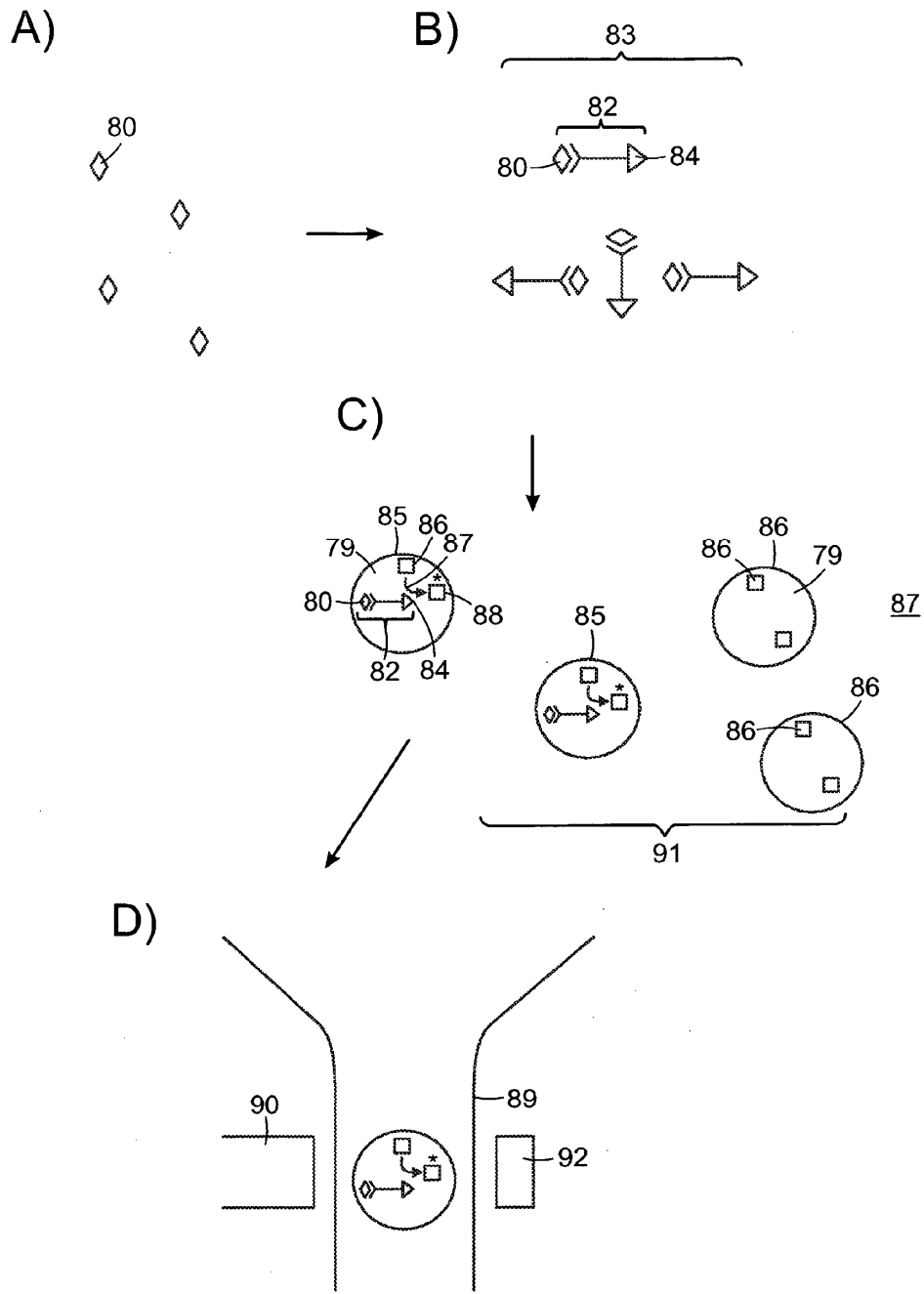


FIG. 4B

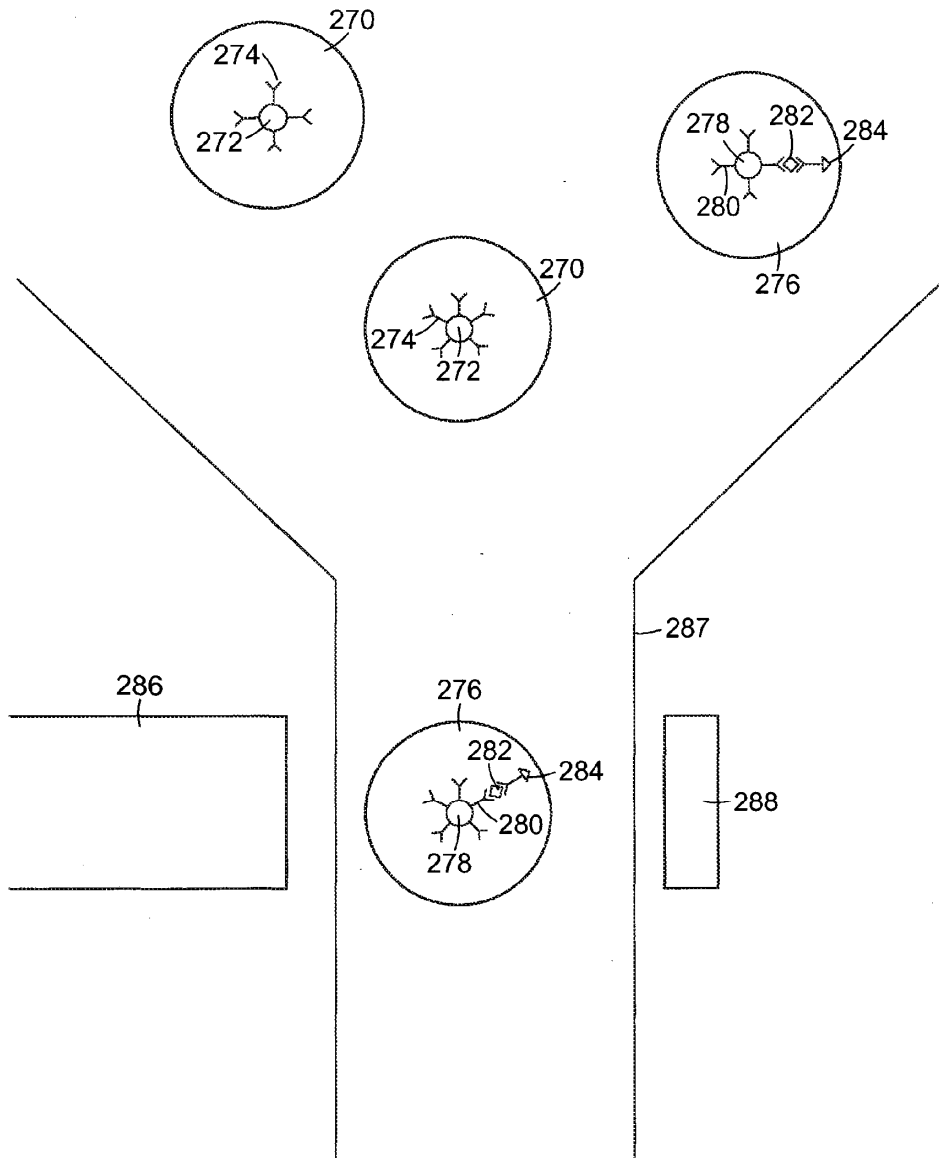


FIG. 4C

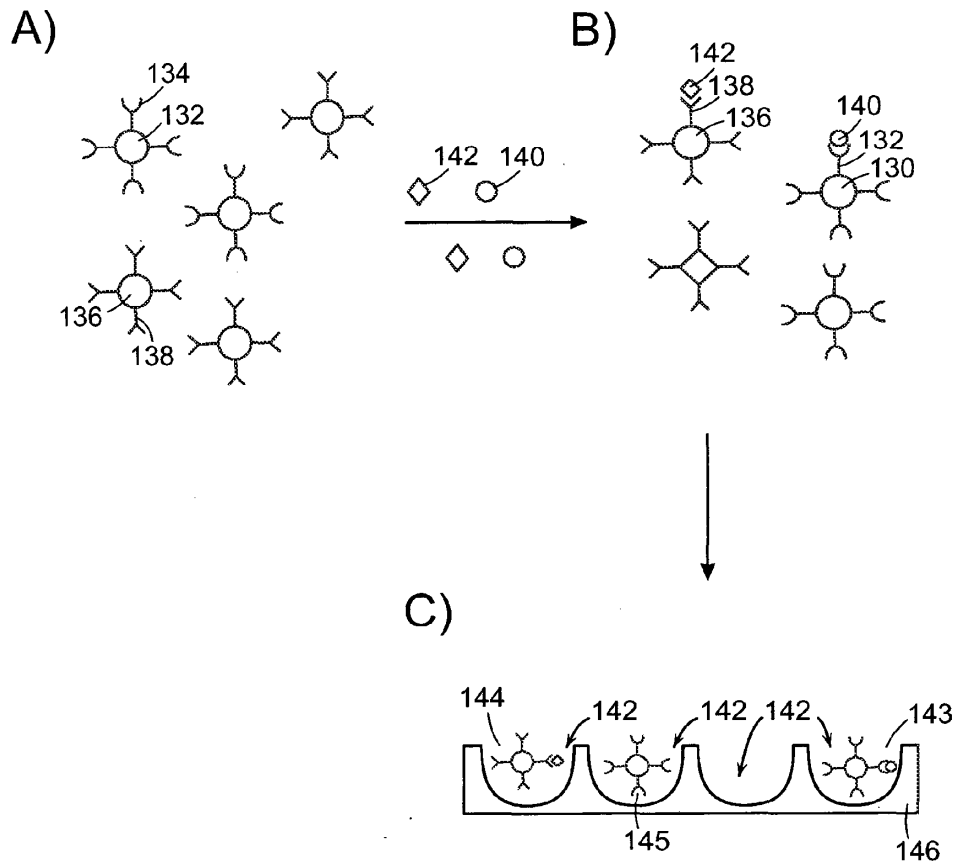


FIG. 5

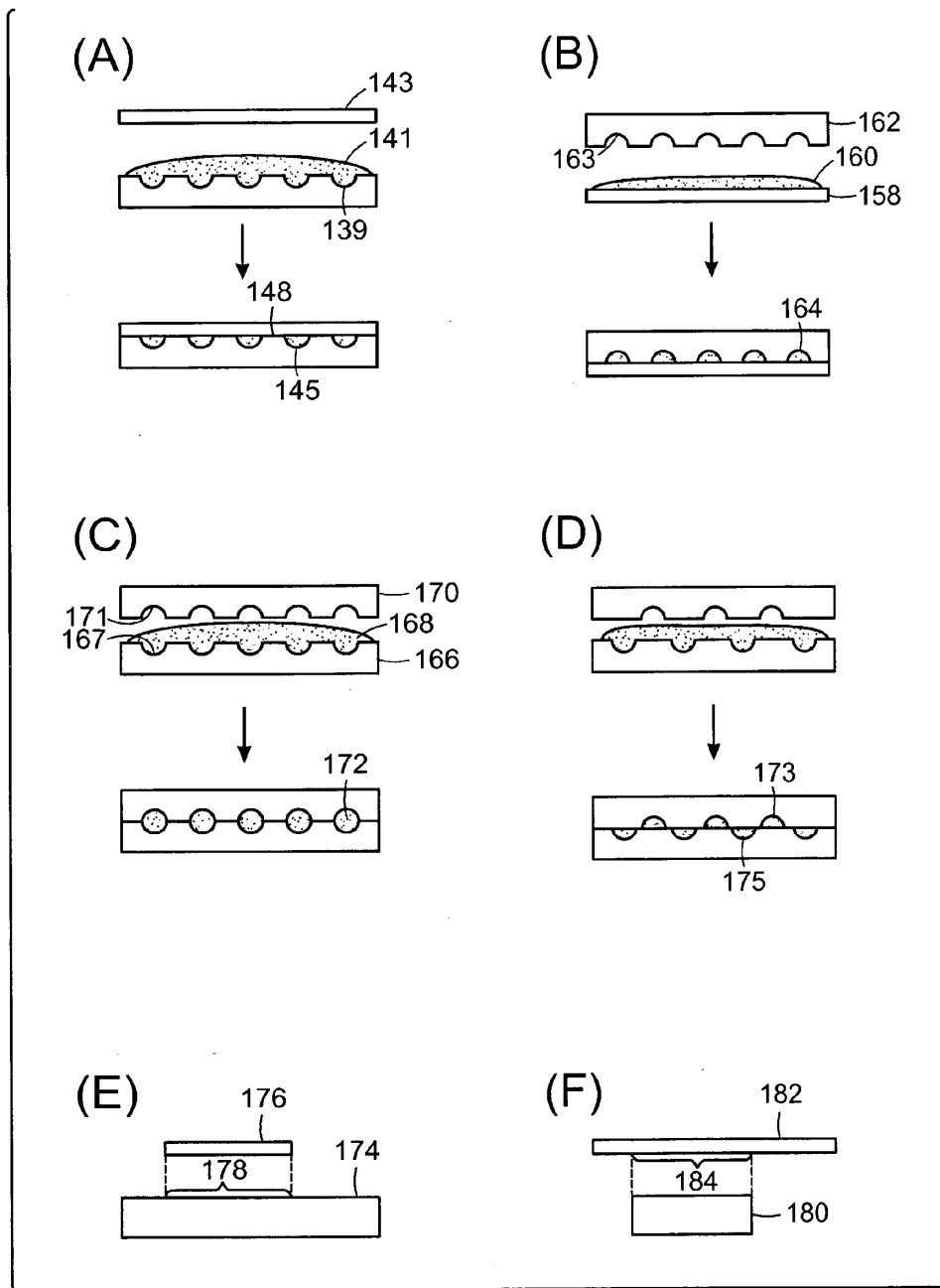


FIG. 6

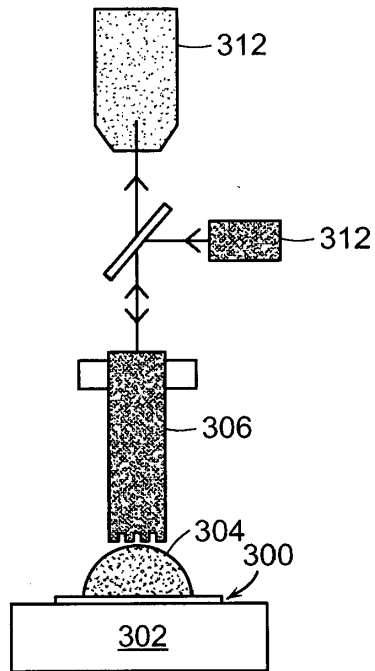


FIG. 7

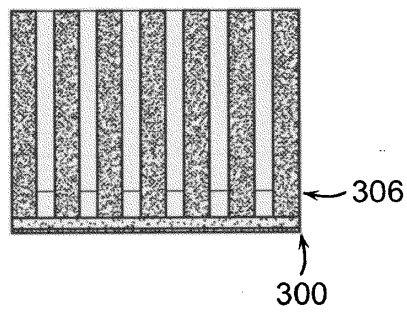


FIG. 8

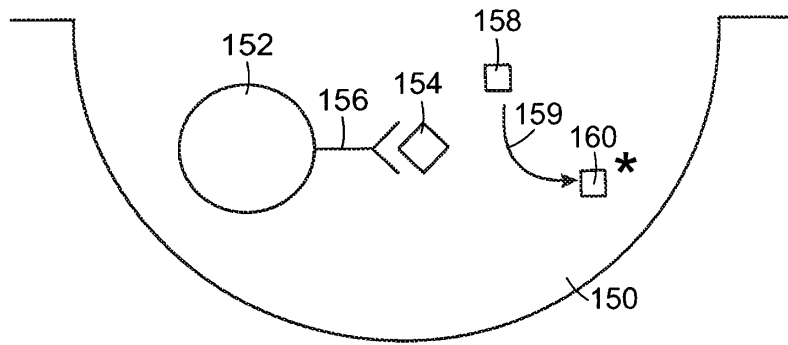


FIG. 9A

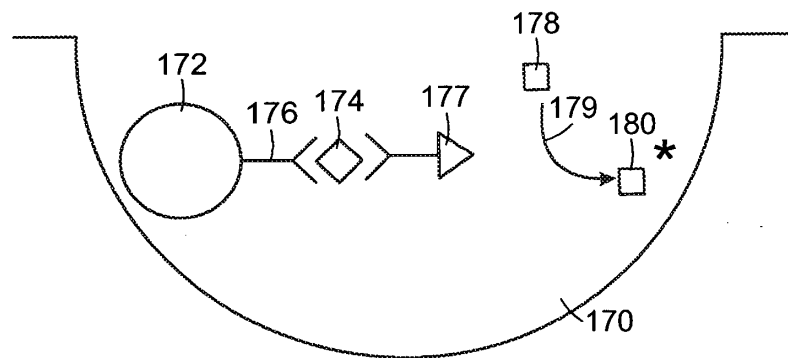


FIG. 9B

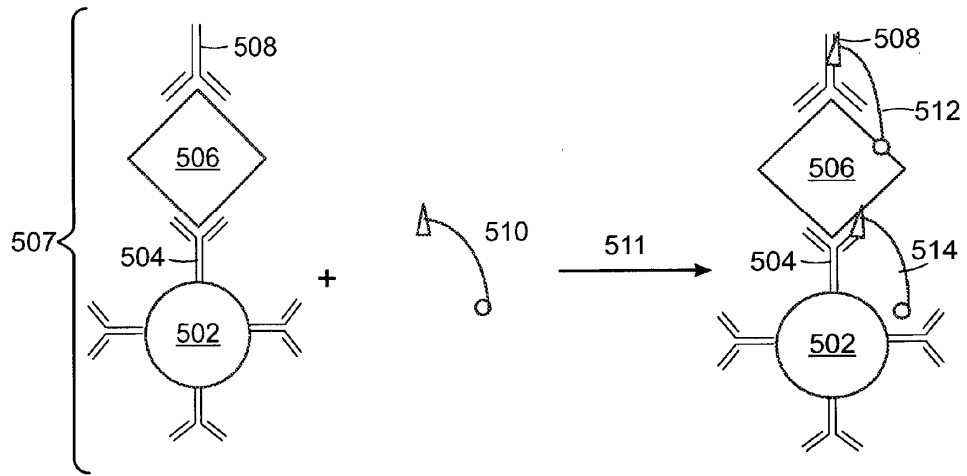


FIG. 10A

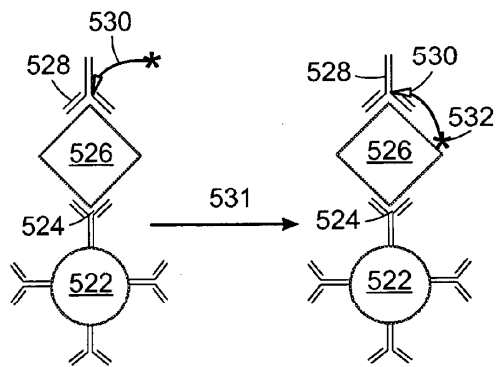


FIG. 10B

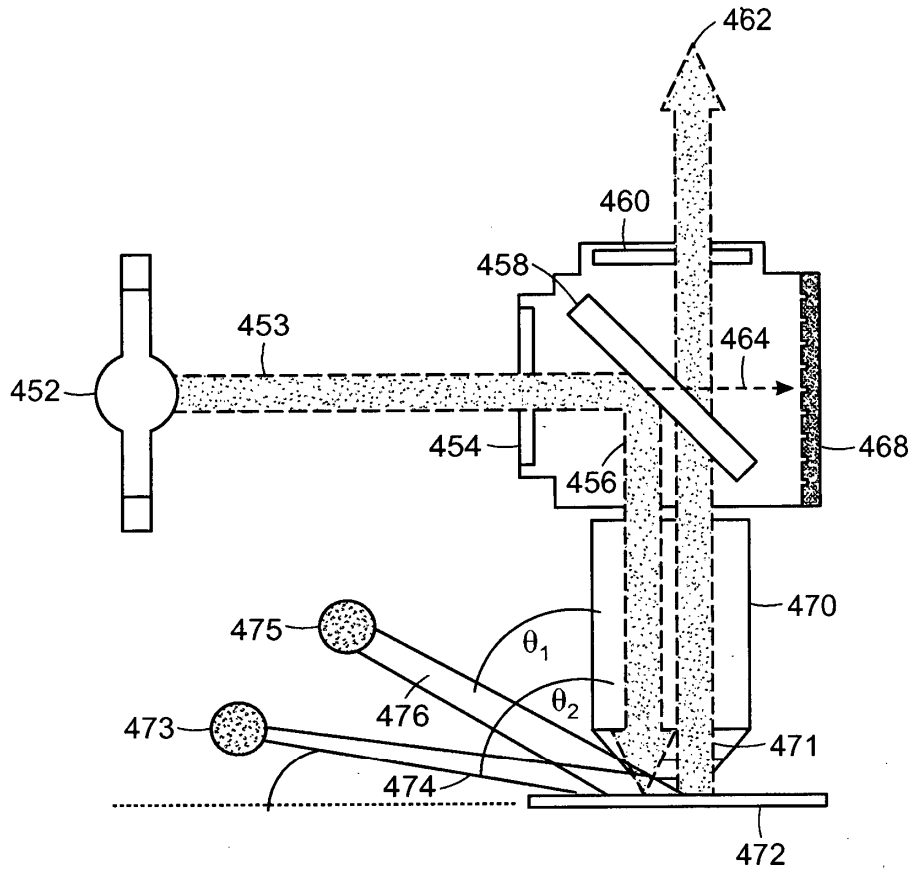


FIG. 11A

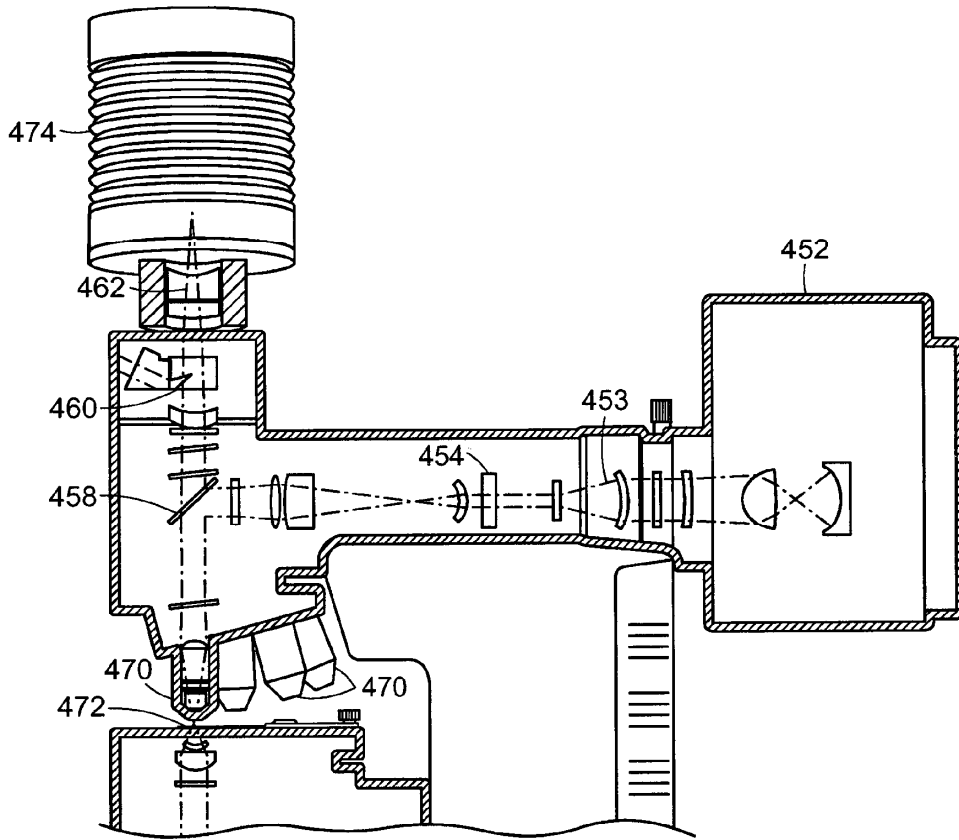


FIG. 11B

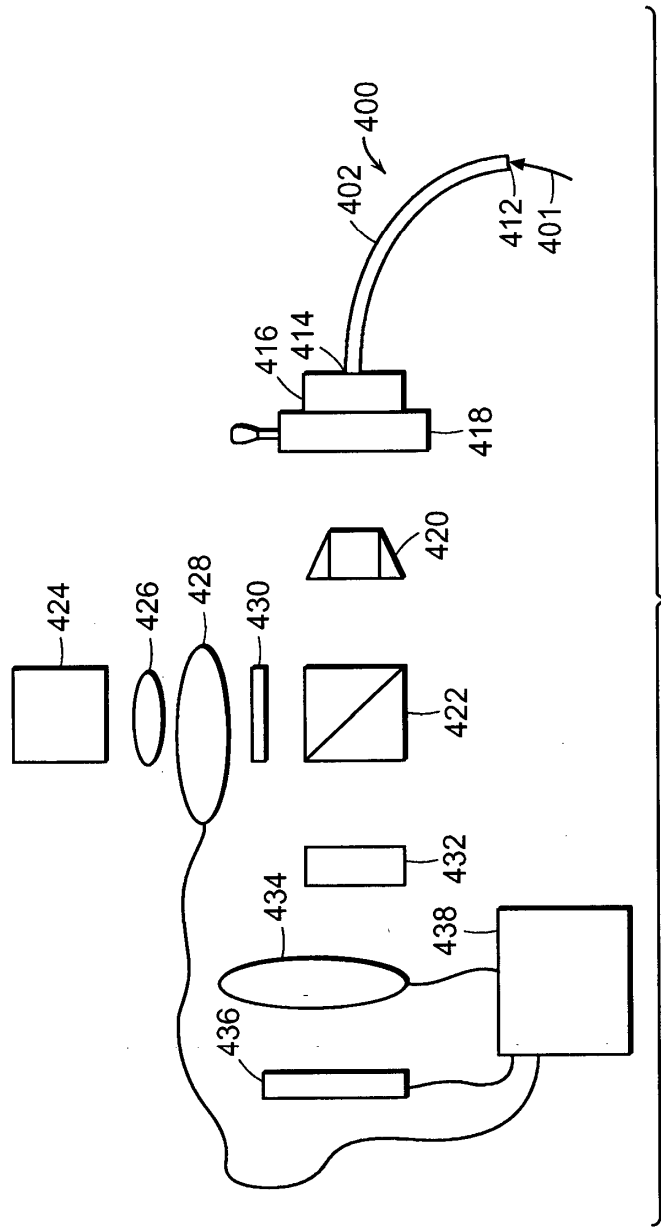


FIG. 12

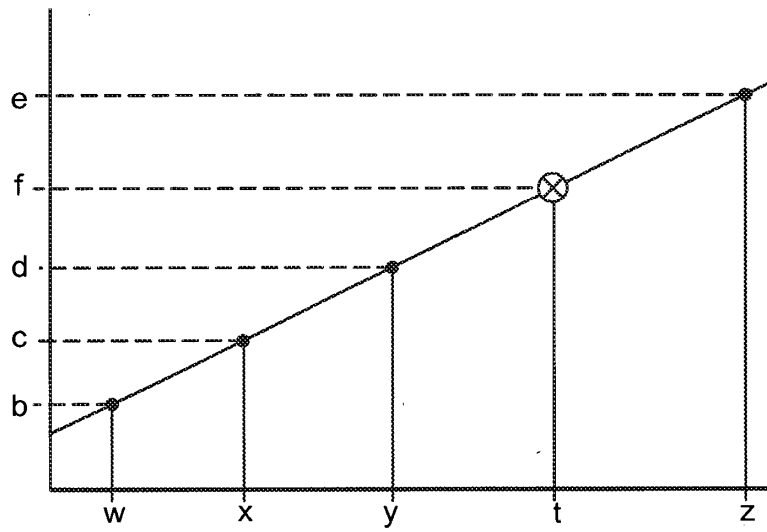


FIG. 13

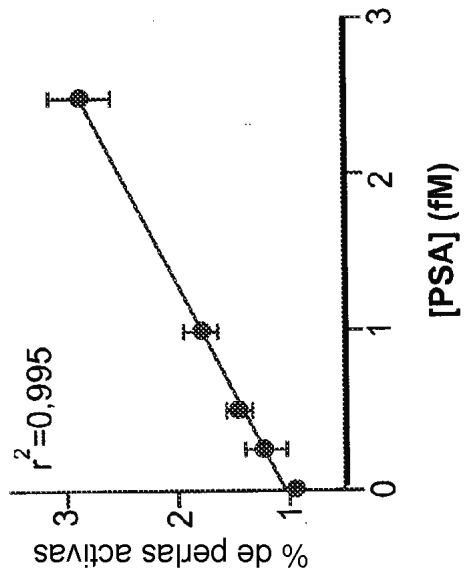
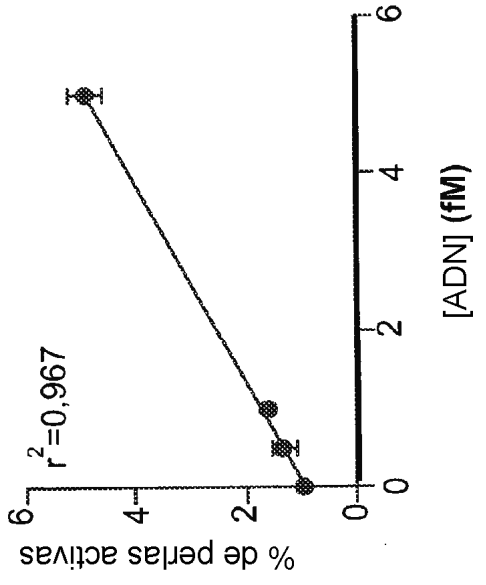
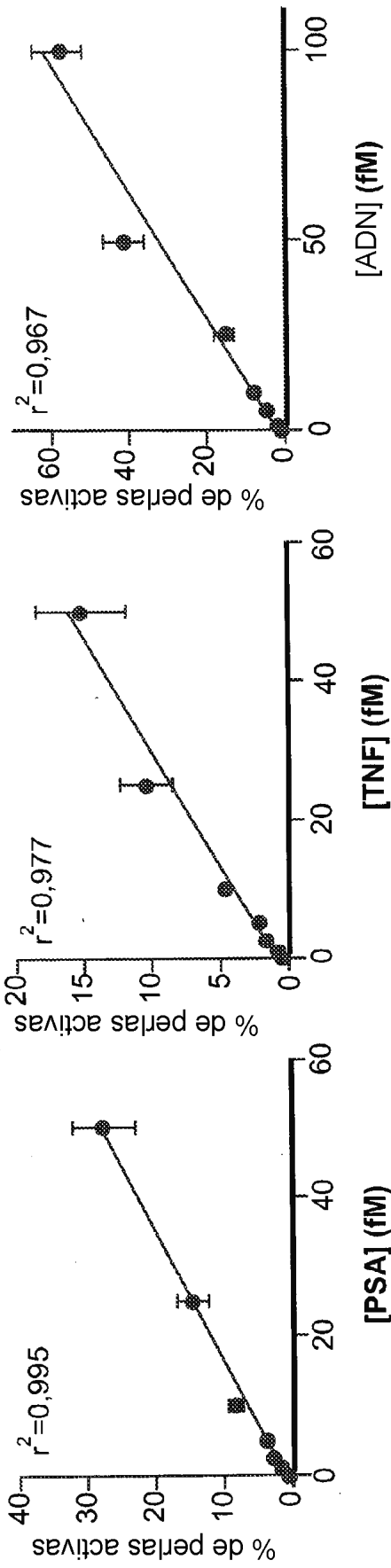


FIG. 14C

FIG. 14B

FIG. 14A

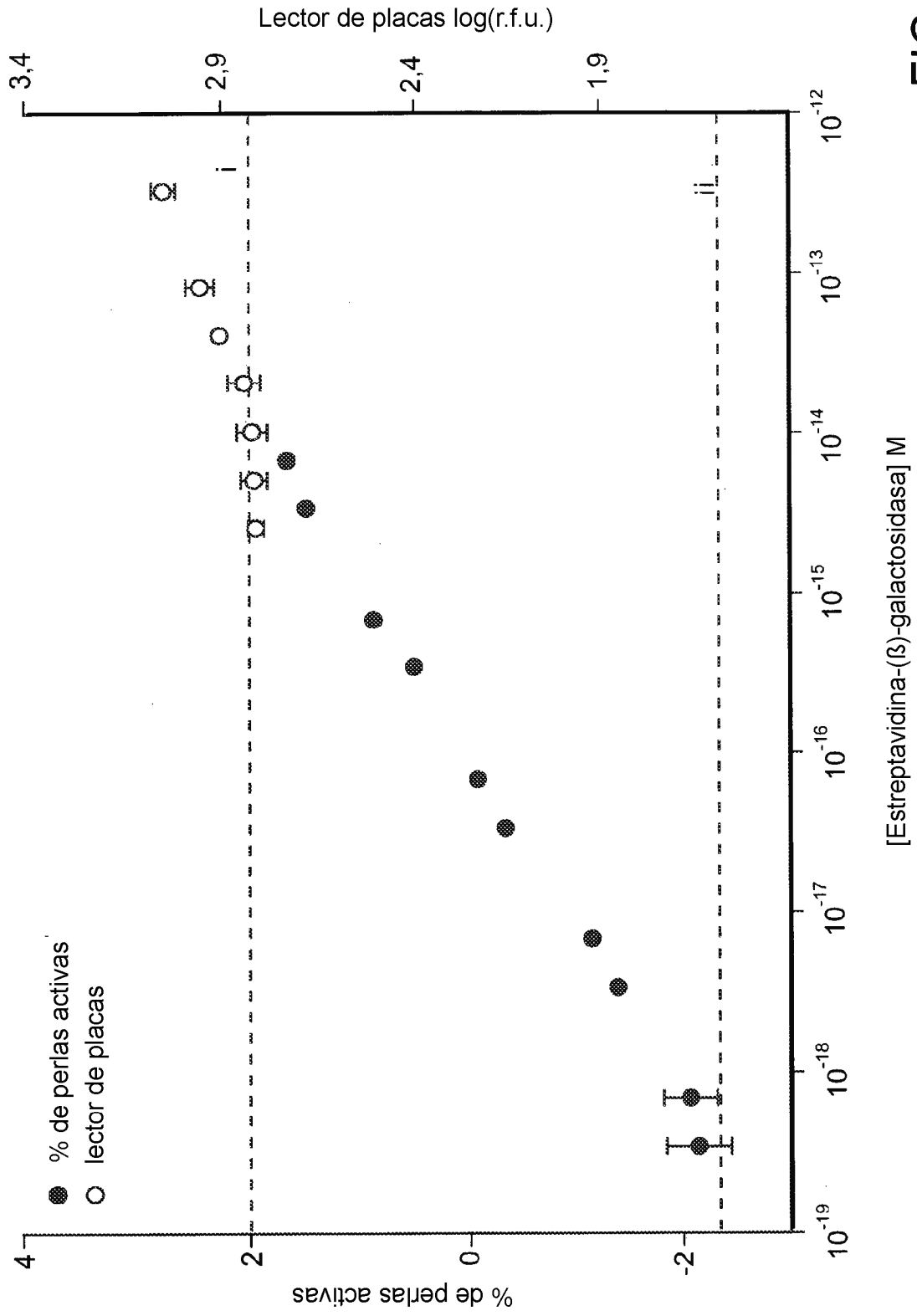


FIG. 15

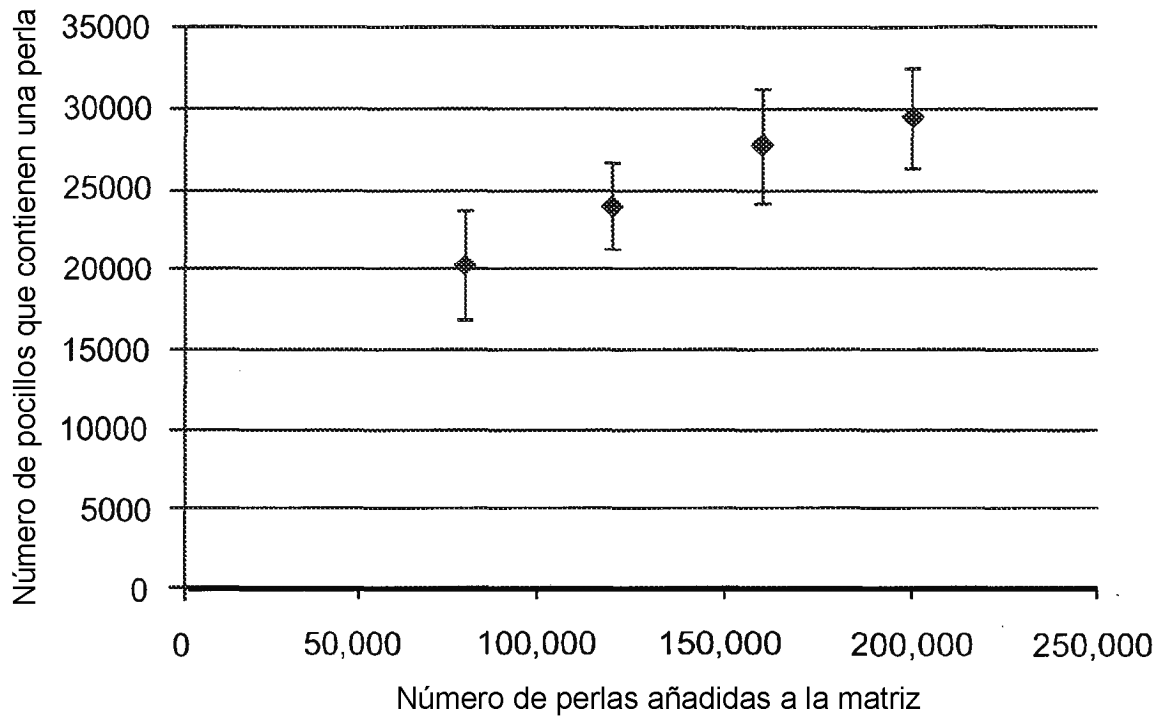


FIG. 16

FIG. 17A

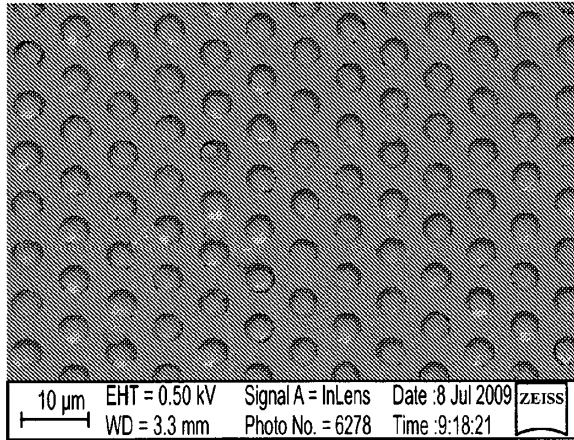


FIG. 17B

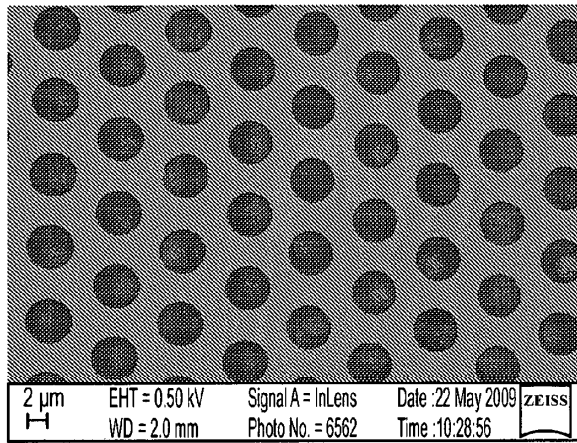
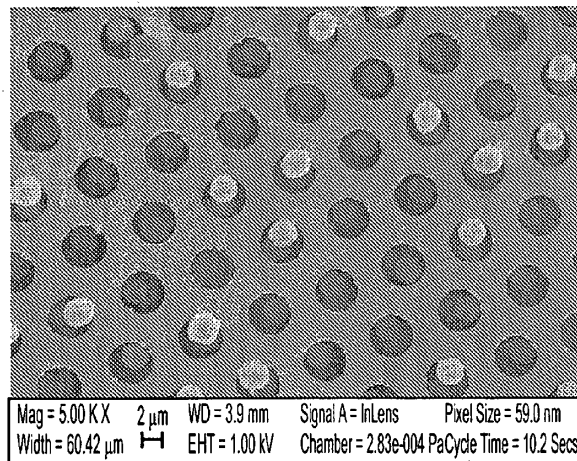


FIG. 17C



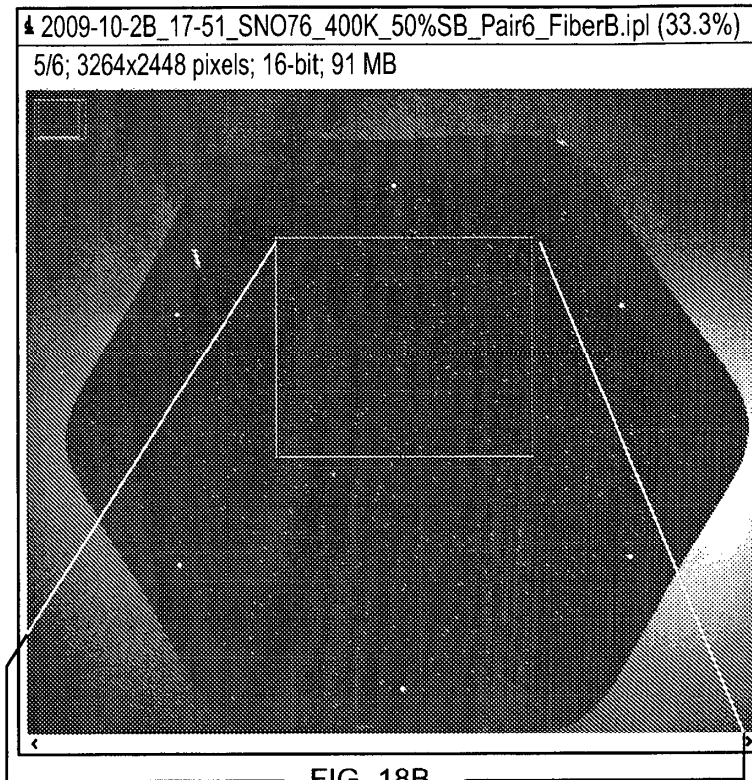


FIG. 18B

FIG. 18A

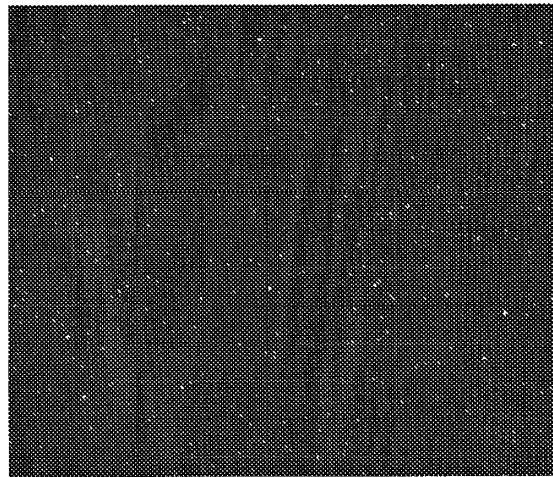


FIG. 18B

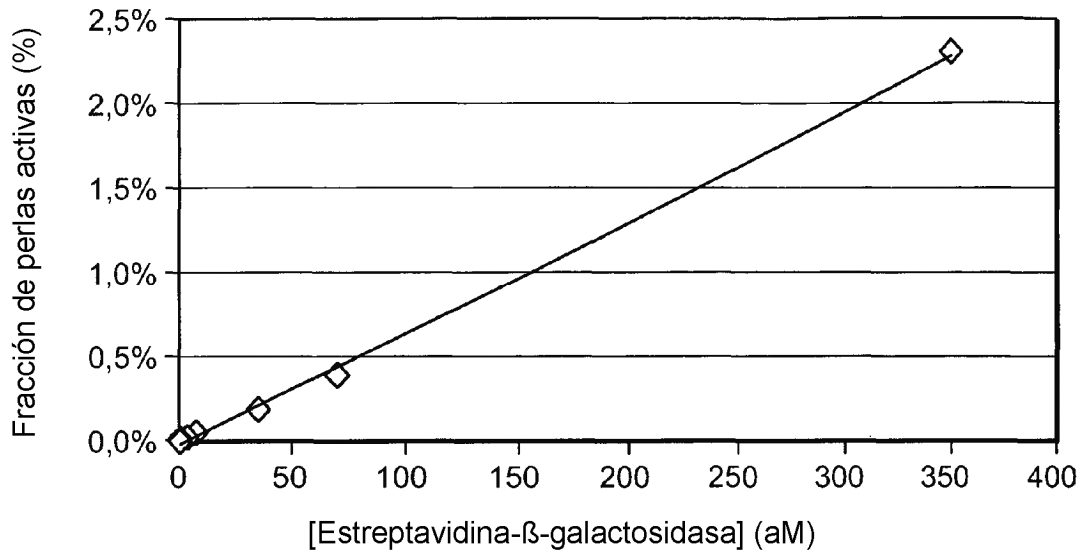


FIG. 19A

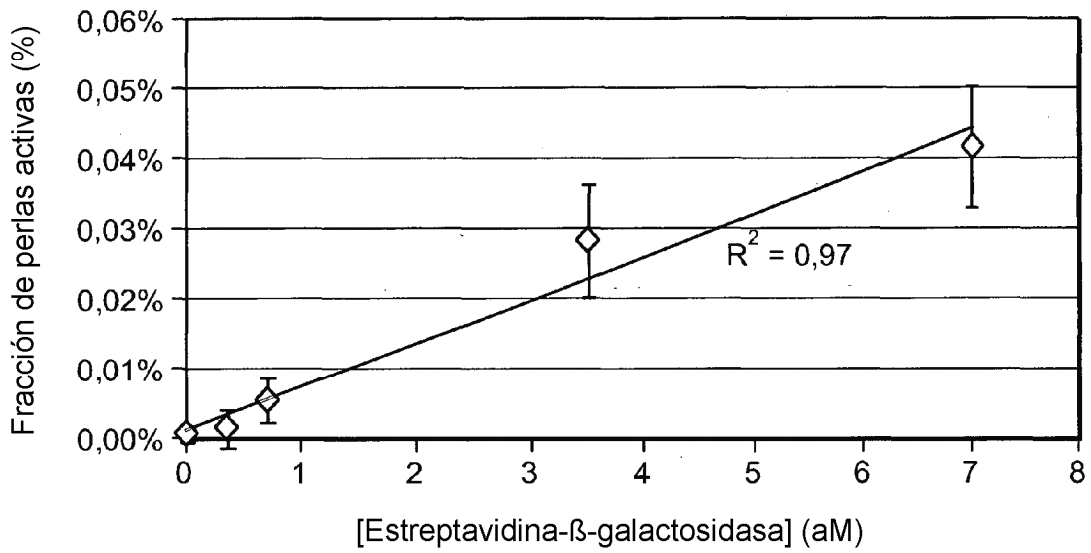


FIG. 19B

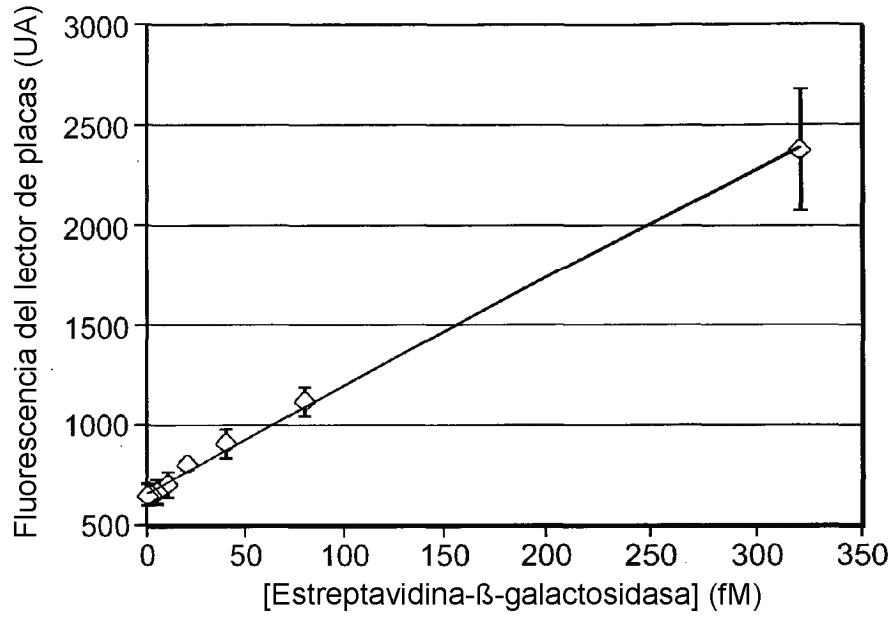


FIG. 19C

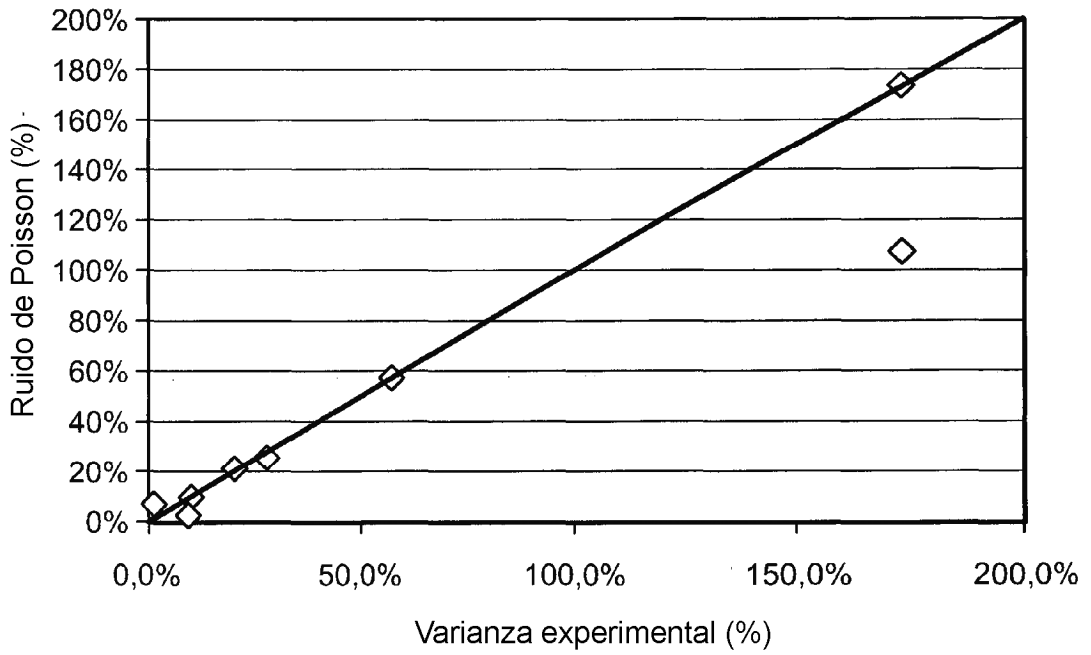


FIG. 20

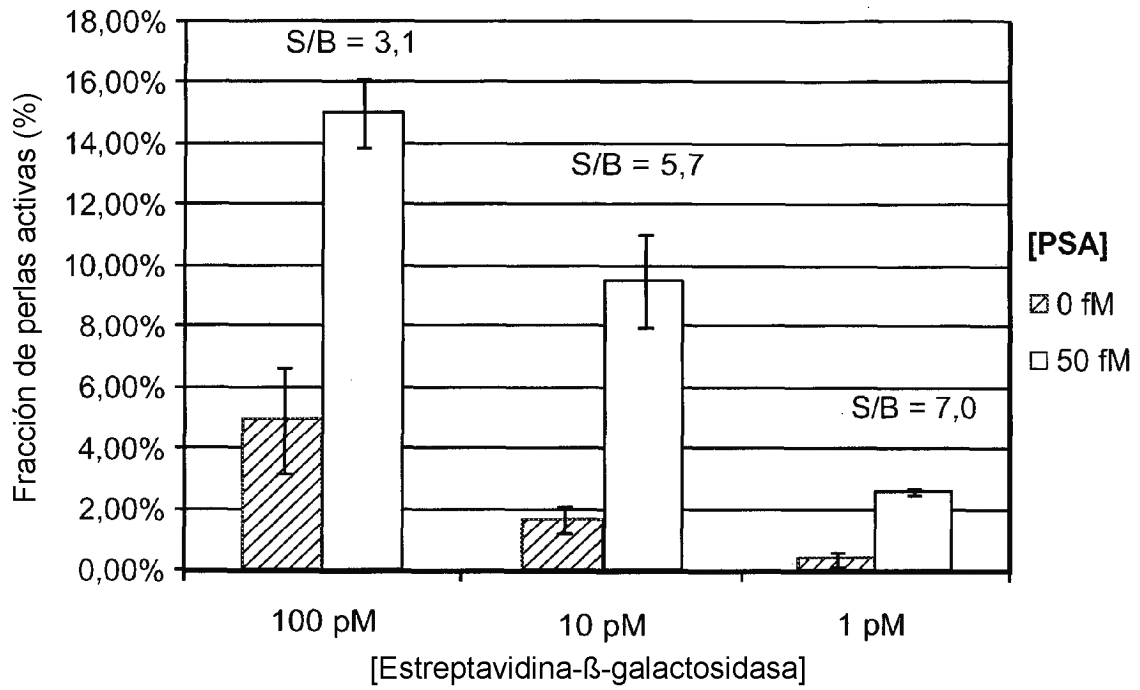


FIG. 21

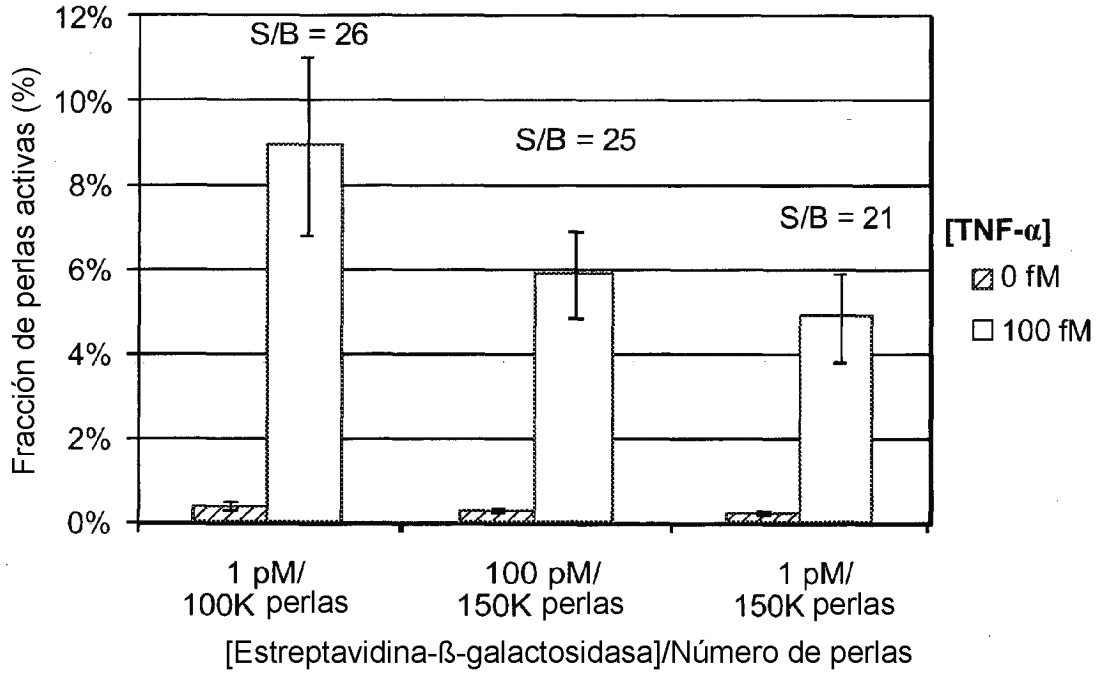


FIG. 22

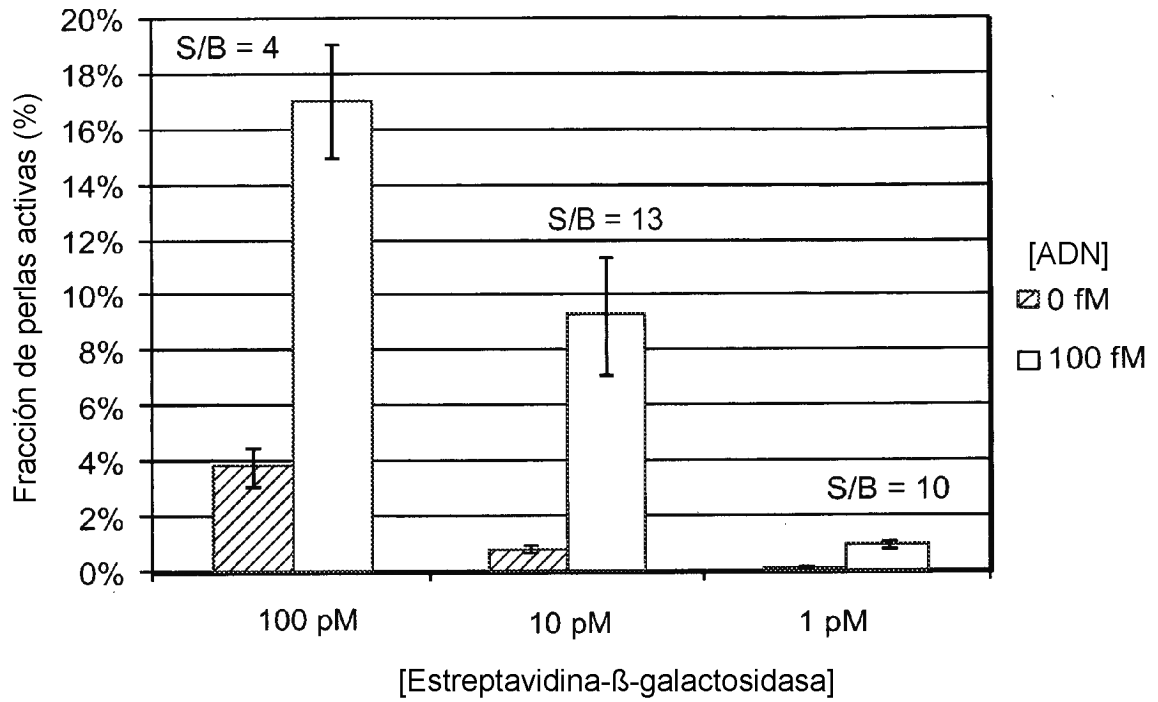


FIG. 23

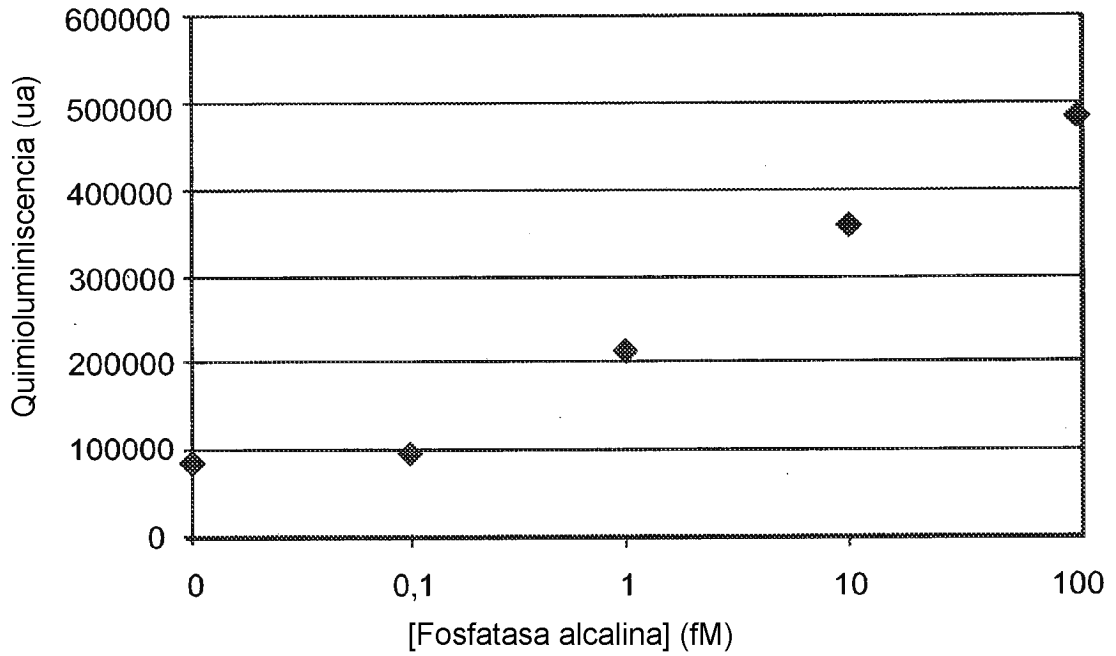


FIG. 24

FIG. 25A

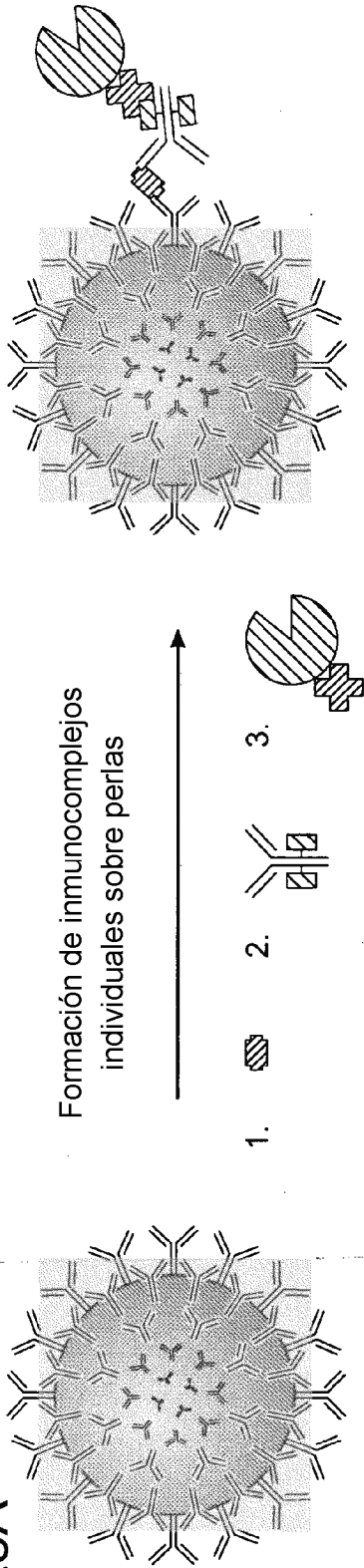
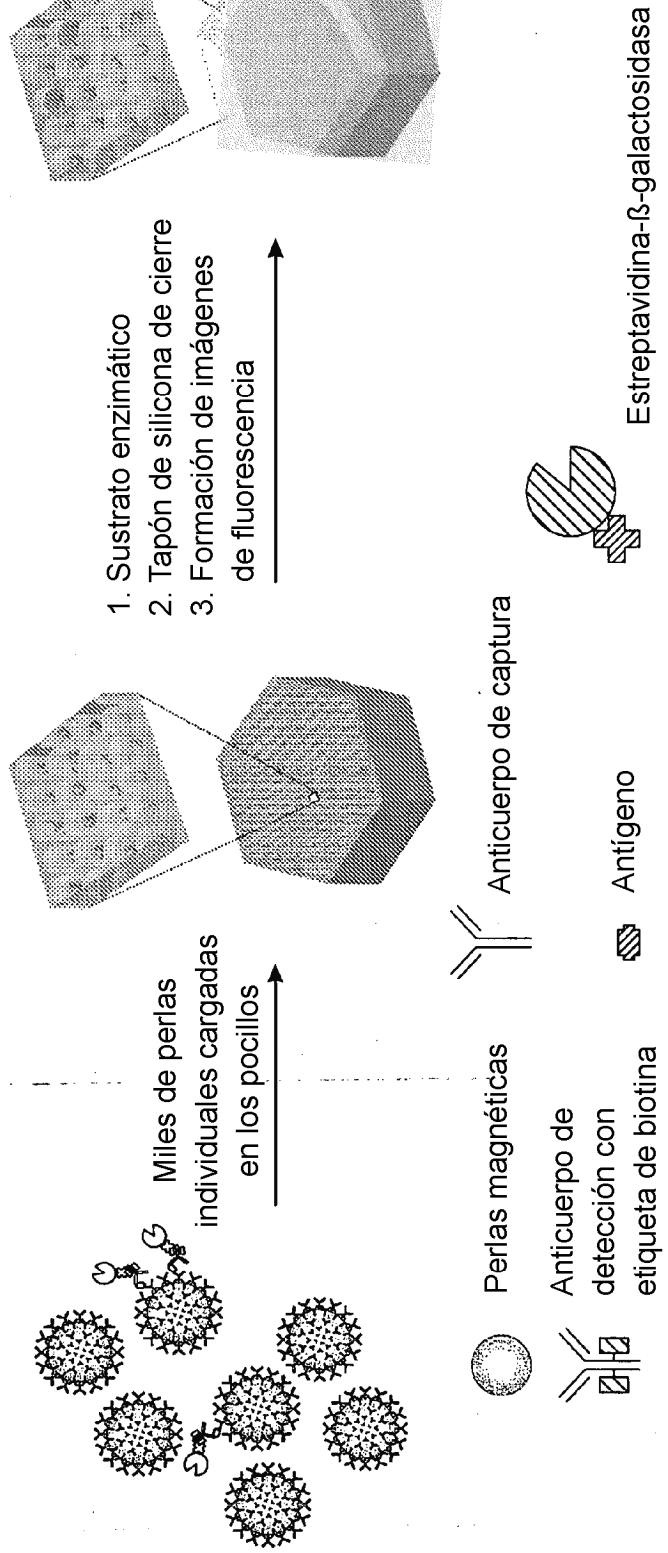


FIG. 25B



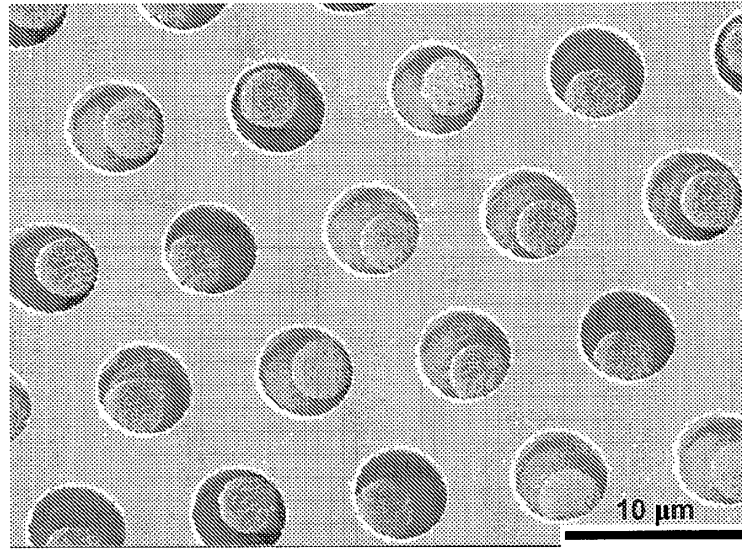


FIG. 25C

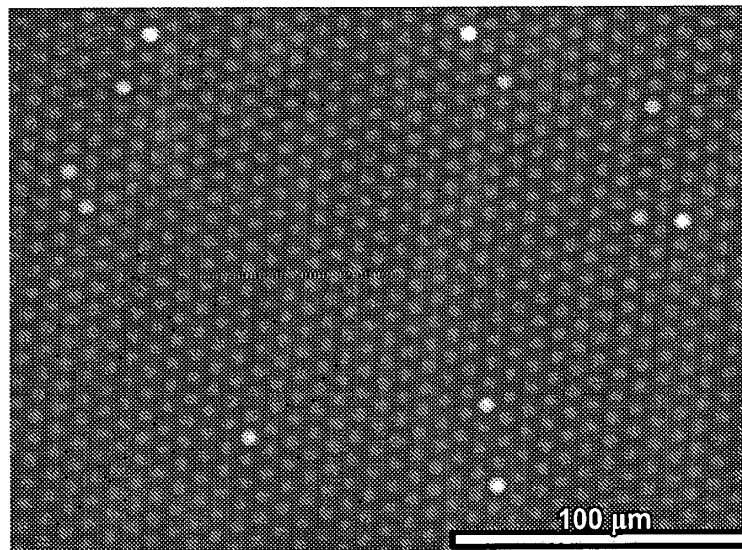


FIG. 25D

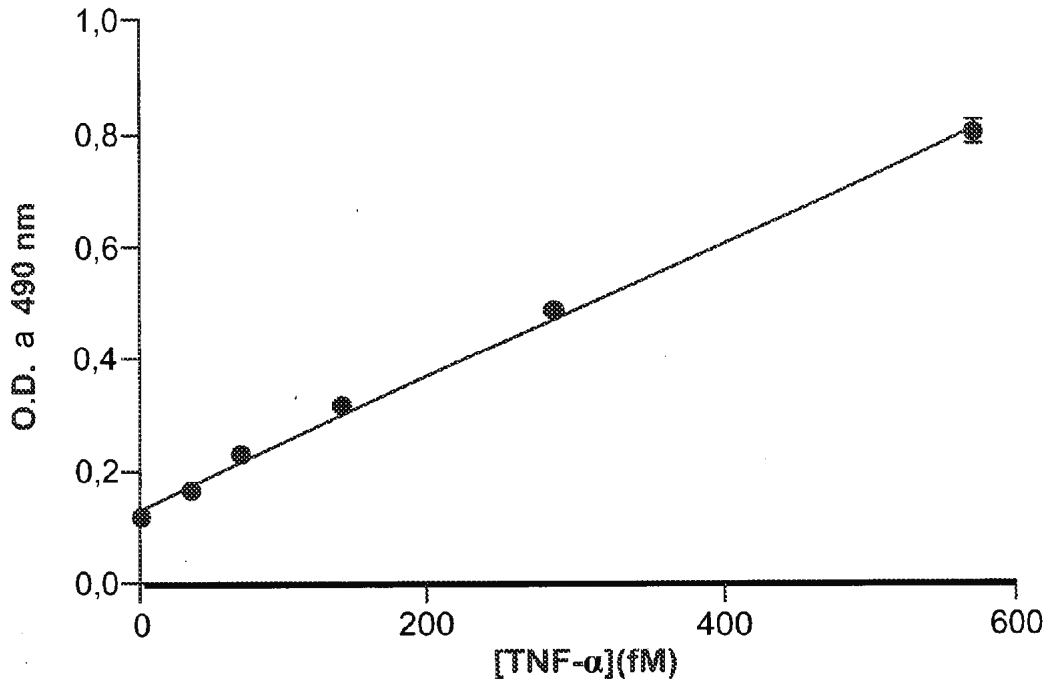


FIG. 26

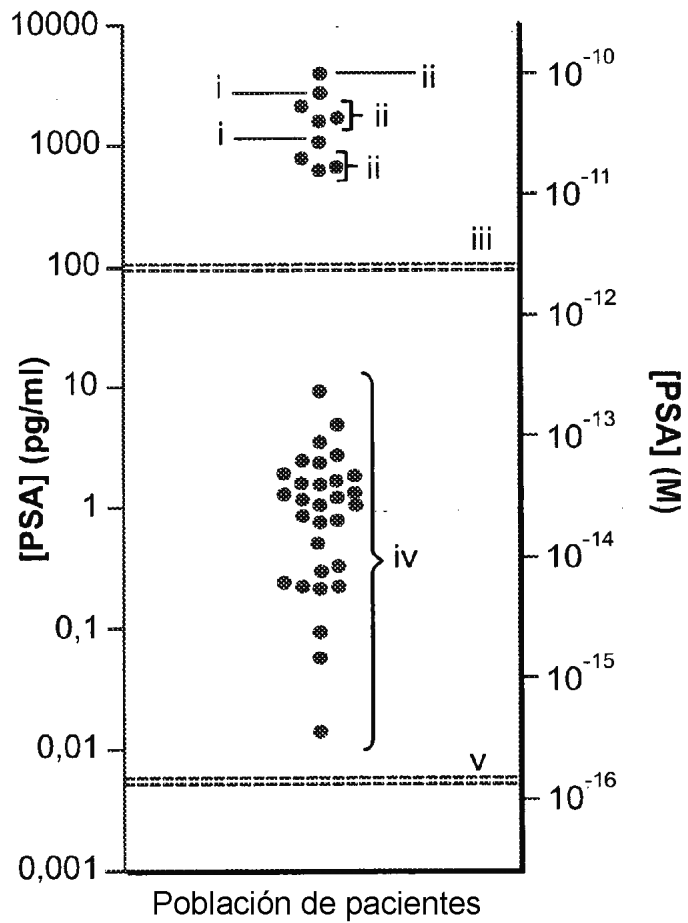


FIG. 27

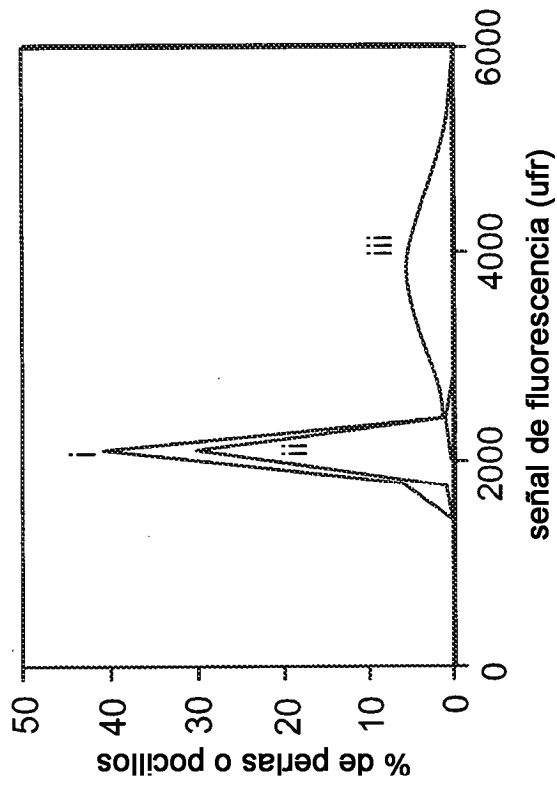


FIG. 28

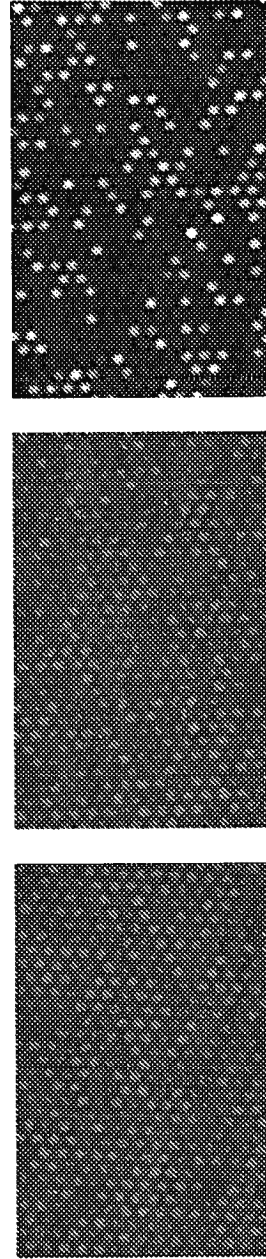


FIG. 29A

FIG. 29B

FIG. 29C

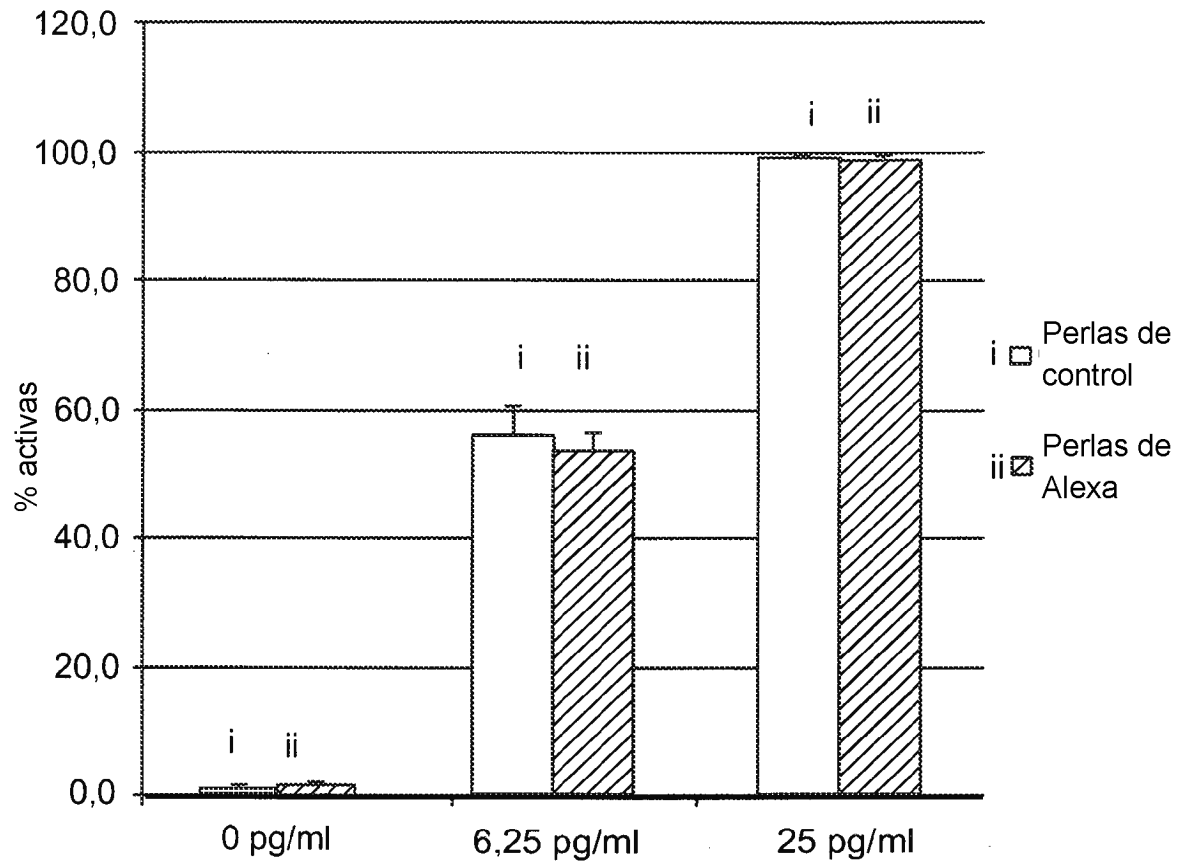


FIG. 29D

Controles de máquina de tiempo* - fila de muestra "húmeda"

*Control de PSA 1 pg/ml en las primeras dos posiciones de cada una de ocho etapas

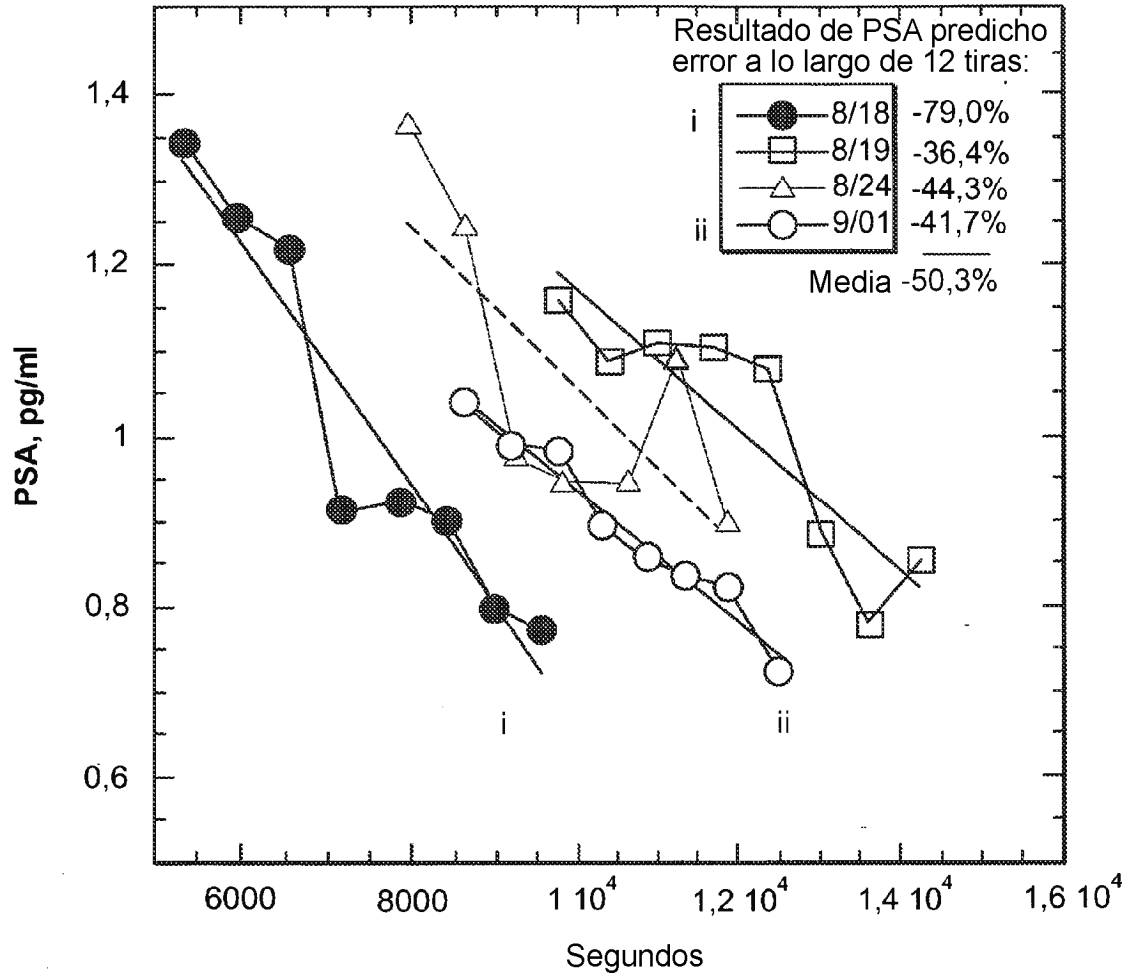


FIG. 30A

Controles de máquina de tiempo* - fila de matriz seca
 10% de estabilizante de sacarosa

*control de PSA 1 pg/ml en las primeras dos posiciones de cada una de ocho tiras

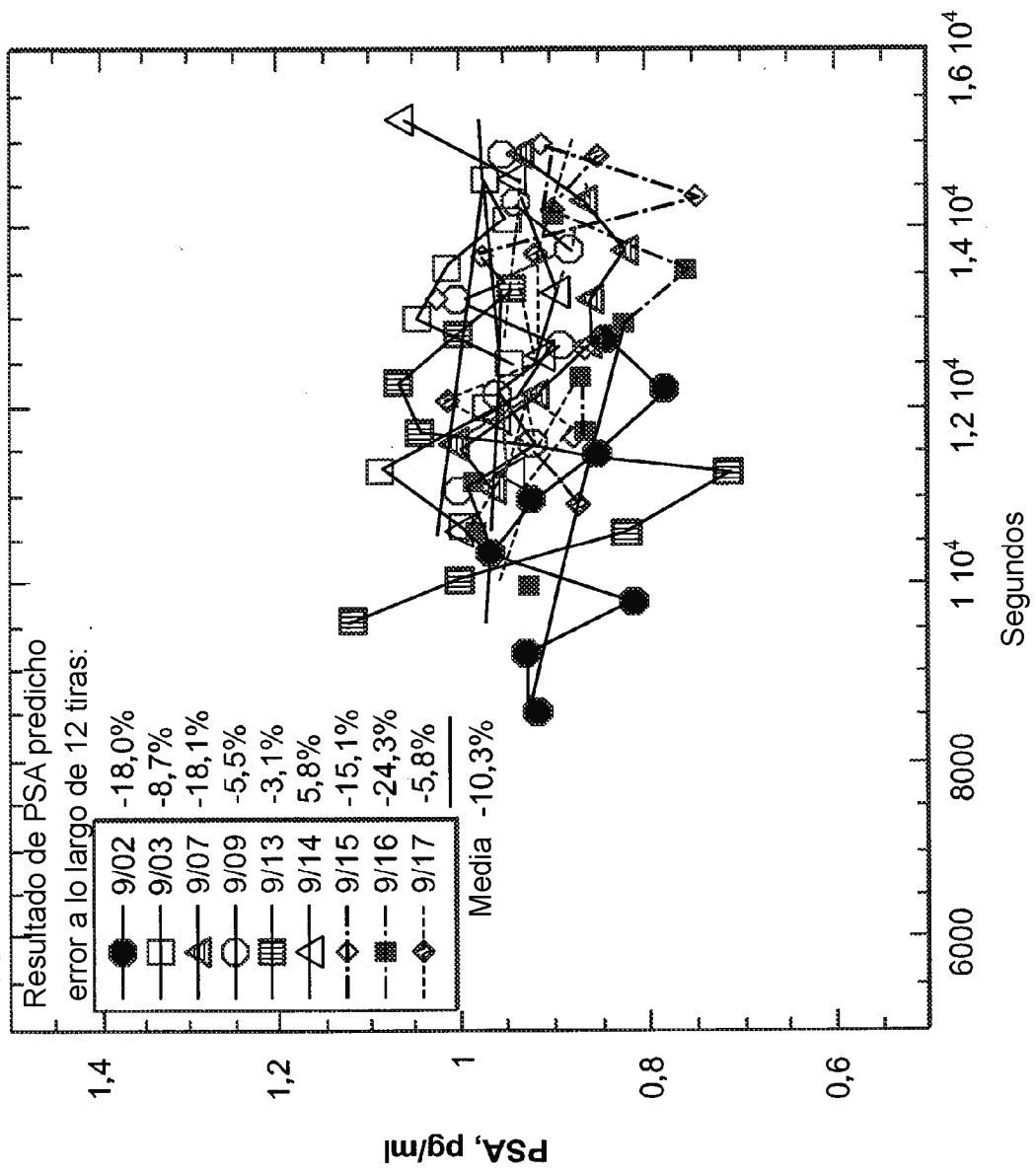


FIG. 30B

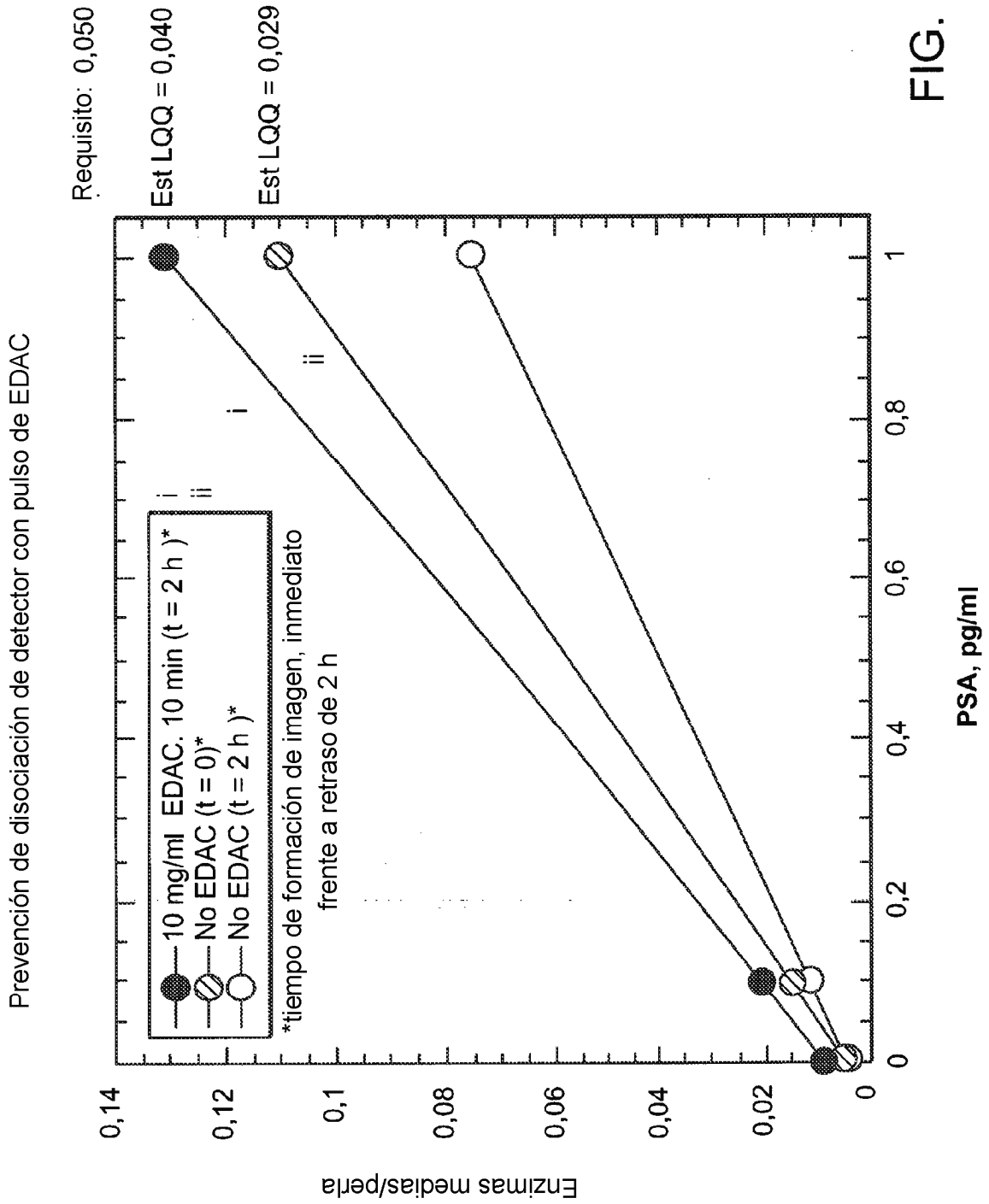


FIG. 31