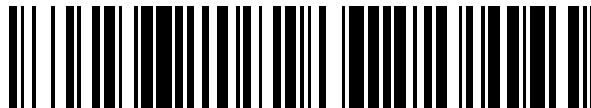


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 635**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 11714445 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2542890**

54 Título: **Métodos para extender el rango dinámico en ensayos para la detección de moléculas o partículas**

30 Prioridad:

24.03.2010 US 731136

01.03.2010 US 309165 P

11.02.2011 US 441894 P

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

02.09.2015

73 Titular/es:

QUANTERIX CORPORATION (100.0%)

113 Hartwell Avenue

Lexington, MA 02421, US

72 Inventor/es:

RISSIN, DAVID M.;

FOURNIER, DAVID y

DUFFY, DAVID C.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 544 635 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

Métodos para extender el rango dinámico en ensayos para la detección de moléculas o partículas

5 En el presente documento se describen sistemas y métodos para extender el rango dinámico de ensayos analíticos y sistemas usados para determinar una concentración de moléculas o partículas de analito en una muestra de líquidos.

Solicitudes relacionadas

10 Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° de Serie 61/441.894, presentada el 11 de febrero, 2011, titulada "Methods and Systems for Extending Dynamic Range in Assays for the Detection of Molecules or Particles", de Rissin *et al.* Esta solicitud también es una continuación en parte de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 12/731.136, presentada el 24 de marzo, 2010, titulada "Methods and Systems for Extending Dynamic Range in Assays for the Detection of Molecules or Particles" de Rissin *et al.*, que reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° de Serie 61/309.165, presentada el 1 de marzo, 2010, titulada "Methods and Systems for Extending Dynamic Range in Assays for the Detection of Molecules or Particles" de Rissin *et al.*

20 Antecedentes de la invención

Los métodos y sistemas que son capaces de detectar de manera rápida y precisa y, en determinados casos, cuantificar una molécula de analito diana en una muestra, son las piedras angulares de las mediciones analíticas modernas. Dichos sistemas y métodos se emplean en muchas áreas, tales como en investigación académica e industrial, evaluación ambiental, seguridad alimentaria, diagnóstico médico y detección de agentes de armamento químico, biológico y radiológico. Las características ventajosas de dichas técnicas pueden incluir, especificidad, velocidad y sensibilidad.

30 Muchos de los métodos y técnicas conocidos están limitados por el rango dinámico de las concentraciones que los métodos y técnicas pueden detectar de manera precisa (por ejemplo, rango dinámico limitado) y/o que no tienen la sensibilidad para detectar moléculas o partículas cuando están presentes a concentraciones muy bajas.

Por consiguiente, se requieren sistemas y métodos mejorados para extender el rango dinámico de ensayos analíticos y sistemas usados para determinar una medida de la concentración de moléculas o partículas en una muestra de líquidos.

40 Los documentos WO 2007/098148 y WO 2009/029073, desvelan un método para detectar un analito diana en una muestra, comprendiendo el método: a) proporcionar una muestra y una matriz, comprendiendo dicha muestra un analito de biomolécula diana, comprendiendo dicha matriz al menos 1000 sitios, teniendo cada sitio un volumen definido entre 10 attolitros y 50 picolitros; b) poner en contacto dicha matriz con dicha muestra de tal manera que la proporción de analito de biomolécula diana con cada sitio de dicha matriz sea menor de 1:1; y c) determinar el número de sitios de dicha matriz que contiene una sola biomolécula; en el que el porcentaje de sitios que contienen una sola molécula proporciona una medida de la concentración de moléculas en dicha muestra.

45 Sumario de la invención

En el presente documento se describen métodos para extender el rango dinámico de métodos analíticos y sistemas usados para determinar la concentración de moléculas o partículas de analito en una muestra de líquidos. La materia objeto de la presente invención implica, en algunos casos, productos interrelacionados, soluciones alternativas a un problema particular, y/o una pluralidad de diferentes usos de uno o más sistemas y/o artículos.

55 En algunas realizaciones, un método para determinar una medida de la concentración de moléculas o partículas de analito en una muestra de líquidos comprende exponer una pluralidad de objetos de captura, incluyendo cada uno una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula o partícula de analito, con una solución que contiene o que se sospecha que contiene al menos un tipo de moléculas o partículas de analito, en el que al menos algunos de los objetos de captura se asocian con al menos una molécula o partícula de analito, segregando espacialmente al menos una parte de los objetos de captura sometidos a la etapa de exposición en una pluralidad de lugares, localizando al menos alguna de la pluralidad de lugares y determinando una medida indicativa del porcentaje de dichas lugares que contienen un objeto de captura asociado con al menos una molécula o partícula de analito, en el que los lugares localizados son lugares que contienen al menos un objeto de captura, y se basan en el porcentaje, bien determinando una medida de la concentración de moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos basada al menos en parte en el número de lugares que contienen un objeto de captura asociado con al menos una molécula o partícula de analito, o determinando una medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos basada al menos en parte en un nivel de intensidad medido de una señal que es indicativa de la presencia de una pluralidad de moléculas o partículas de analito.

Breve descripción de los dibujos

- 5 El ámbito de protección de la presente invención se define en las reivindicaciones que conciernen a un método para determinar una medida de la concentración de moléculas o partículas de analito en una muestra de líquidos. Otros sistemas y métodos que se describen en el presente documento se incluyen con motivos de referencia y no forman parte de la invención reivindicada.
- 10 Otros aspectos, realizaciones y características de la invención resultarán obvios a partir de la siguiente descripción detallada cuando se consideran un conjunto con los dibujos adjuntos. Las figuras que se adjuntan son esquemáticas y no están dibujadas a escala. Para fines de claridad, en cada figura no se marcan todos los componentes, ni se muestra cada componente de cada realización de la invención ya que la ilustración no es necesaria para permitir que los expertos habituales en la técnica comprendan la invención.
- 15 La FIG. 1 muestra una representación gráfica de resultados de un ajuste a la distribución de Poisson, realizada de acuerdo con algunas realizaciones;
- la FIG. 2 muestra un gráfico del número promedio de enzimas unidas por perla frente a la concentración de enzimas en una muestra de líquidos, de acuerdo con una realización;
- 20 la FIG. 3 muestra un gráfico del número promedio de enzimas unidas por perla frente a la concentración de enzimas en una muestra de líquidos, de acuerdo con una realización, en el que el número promedio de enzimas unidas por perla se calcula usando dos métodos analíticos diferentes;
- 25 la FIG. 4A muestra una representación gráfica de la fracción de perlas activas frente a la concentración efectiva de analito, dada por el promedio de moléculas por perla (AMB, *Average Molecule per Bead*) determinado a partir del recuento digital usando la distribución de Poisson, de acuerdo con una realización;
- la FIG. 4B muestra una representación gráfica de la intensidad analógica ($I_{\text{perla}}/I_{\text{sola}}$) como una función de la concentración efectiva, AMB, de acuerdo con una realización;
- 30 la FIG. 4C muestra una representación gráfica de la imprecisión del AMB (% CV) como una función del número de perlas activas de (i) análisis digital y (ii) análisis analógico, de acuerdo con una realización;
- 35 la FIG. 5A muestra un diagrama esquemático de un protocolo de ensayo de una realización de la presente invención, en el que AMB = 0,1 (izquierda), AMB = 0,6 (centro), y AMB = 3;
- las FIGS. 5B-D muestran imágenes de fluorescencia generadas de acuerdo con algunas realizaciones usando un ensayo de perlas individualizadas en pocillos individuales a AMB aproximados de (D) 0,1, (E) 0,6, y (F) 3,0;
- 40 la FIG. 6 muestra una representación gráfica del número de moléculas de resorufina producidas como una función del número de enzimas en una perla, de acuerdo con algunas realizaciones;
- la FIG. 7 muestra un gráfico de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo, que puede usarse para determinar la tasa de fotoblanqueamiento, de acuerdo con algunas realizaciones;
- 45 la FIG. 8 es un diagrama esquemático que representa una realización de una etapa de un método de la invención que emplea un agente marcador precursor;
- 50 las FIGS. 9A y 9B muestran un ejemplo no limitante de un sistema que emplea un sistema de detección óptico;
- la FIG. 10 es un diagrama de bloque esquemático que muestra un sistema que emplea un ensamblaje de fibra óptica con un sistema de detección óptico;
- 55 la FIG. 11 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 haciendo coincidir un sustrato y un componente de sellado e ilustra ejemplos del tamaño (E, F) de un componente de sellado con respecto a un sustrato;
- la FIG. 12A representa una configuración experimental para detección usando luz;
- 60 la FIG. 12B muestra una matriz de fibra óptica que se ha sellado con un componente de sellado;
- la FIG. 13A muestra una representación gráfica de AMB como una función de la concentración enzimática, de acuerdo con una realización;
- 65 la FIG. 13B muestra una tabla que incluye el % de perlas activas y valores AMB como una función de la concentración enzimática, de acuerdo con una realización;

las FIGS. 14A y 14B son representaciones gráficas que muestran un análisis digital y analógico combinado de muestras PSA, de acuerdo con algunas realizaciones;

5 la FIG 15A es una tabla de datos que muestra la transformación del % de perlas activas a AMB_{digital} usando estadística de Poisson, de acuerdo con una realización; y

la FIG. 15B muestra una representación gráfica del % de perlas activas (rombos) y AMB_{digital} (cuadrados) como una función de la concentración enzimática, de acuerdo con algunas realizaciones.

10

Descripción detallada

15 El ámbito de protección de la presente invención se define en las reivindicaciones que conciernen a un método para determinar una medida de la concentración de moléculas o partículas de analito en una muestra de líquidos. Otros sistemas y métodos que se describen en el presente documento se incluyen con motivos de referencia y no forman parte de la invención reivindicada.

20 En el presente documento se describen métodos para extender el rango dinámico de métodos de ensayo analíticos y sistemas usados para determinar una concentración de moléculas o partículas de analito (tales como, por ejemplo, células, orgánulos celulares y otras partículas biológicas o no biológicas) en una muestra de líquidos. La materia objeto de la presente invención implica, en algunos casos, productos interrelacionados, soluciones alternativas a un problema particular, y/o una pluralidad de usos diferentes de uno o más sistemas y/o artículos. Debe entenderse que, aunque mucho de lo tratado a continuación se refiere a moléculas de analito, esto es solo a modo de ejemplo, y pueden detectarse y/o cuantificarse otros materiales, por ejemplo, analitos en forma de partículas. En el presente documento se describen algunos ejemplos de moléculas y partículas de analito ejemplares.

30 Los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles para extender el rango dinámico de métodos analíticos y sistemas usados en determinadas realizaciones empleando dos o más técnicas para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de líquidos. En algunas realizaciones, el rango dinámico puede extenderse combinando tanto un método/sistema de detección/análisis basado en intensidad, analógico como un método/sistema de detección/análisis digital, como se describe en el presente documento. En algunos casos, cuando las moléculas de analito en la muestra de líquidos están presentes a rangos de concentración más bajos, las moléculas de analito individuales pueden detectarse y puede determinarse el número de moléculas de analito. Una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de líquidos puede basarse al menos en parte en estos datos (por ejemplo, el número de moléculas de analito), usando un método/sistema de análisis digital. En algunos casos, los datos pueden manipularse adicionalmente usando un ajuste de distribución de Poisson. A mayores rangos de concentración (por ejemplo, a niveles de concentración en los que el aislamiento/detección/determinación de moléculas de analito individuales puede volverse menos práctico) una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de líquidos puede determinarse usando una técnica analógica, basada en el nivel de intensidad. En un método/sistema de análisis analógico, la medida de la concentración puede basarse al menos en parte en una intensidad de señal relativa medida, en el que la intensidad medida total puede correlacionarse con la presencia y cantidad de moléculas de analito. En determinadas realizaciones, la capacidad tanto analógica como digital pueden combinarse en un solo ensayo/sistema, de tal manera que, por ejemplo, puede desarrollarse un patrón de calibración para una molécula de analito de interés a través de un rango dinámico amplio. En un ejemplo de este tipo, puede generarse una sola curva de calibración usando una técnica de cuantificación tanto digital como analógica, en la que los regímenes digitales y analógicos de la calibración están relacionados usando un factor de calibración, como se describe en el presente documento. La determinación de una concentración desconocida de una molécula de analito en una muestra de líquidos de ensayo puede basarse al menos en parte en la comparación de resultados de ensayo (por ejemplo, número/fracción de lugares que contienen una molécula de analito (digital) y/o nivel de intensidad medido (analógico)) con la curva de calibración.

55 A la expresión "rango dinámico" se la da su significado habitual en la técnica y se refiere al rango de la concentración de moléculas de analito en una muestra de líquidos que puede cuantificarse mediante un sistema o método sin dilución o concentración de la muestra o cambio en las condiciones de ensayo produciendo un resultado similar (por ejemplo, concentración de reactivos empleados, etc.), y en el que la concentración medida de las moléculas de analito puede determinarse sustancialmente de manera exacta. La concentración de moléculas de analito en una muestra de líquidos puede considerarse que se determina sustancialmente de manera exacta si la concentración medida de las moléculas de analito en la muestra de líquidos está dentro de aproximadamente el 10 % de la concentración real (es decir, verdadera) de las moléculas de analito en la muestra de líquidos. En determinadas realizaciones, la concentración medida de las moléculas de analito en la muestra de líquidos se determina sustancialmente de manera exacta en realizaciones en las que la concentración medida está dentro de aproximadamente 5 %, dentro de aproximadamente 4 %, dentro de aproximadamente 3 %, dentro de aproximadamente 2 %, dentro de aproximadamente 1 %, dentro de aproximadamente 0,5 %, dentro de aproximadamente 0,4 %, dentro de aproximadamente 0,3 %, dentro de aproximadamente 0,2 %, o dentro de aproximadamente 0,1 % de la concentración real de las moléculas de analito en la muestra de líquidos. En algunos

65

casos, la medida de la concentración determinada difiere de la concentración verdadera (por ejemplo, real) en no más de aproximadamente 20 %, no más de aproximadamente 15 %, no más de aproximadamente 10 %, no más de aproximadamente 5 %, no más de aproximadamente 4 %, no más de aproximadamente 3 %, no más de aproximadamente 2 %, no más de aproximadamente 1 %, o no más de aproximadamente 0,5 %. La exactitud del método de ensayo puede determinarse, en algunas realizaciones, determinando la concentración de moléculas de analito en una muestra de líquidos de una concentración conocida usando el método de ensayo seleccionado y comparando la concentración medida con la concentración real.

En algunas realizaciones, el sistema o los métodos de la invención pueden medir concentraciones de moléculas de analito en una muestra de líquidos sobre un rango dinámico de más de aproximadamente 1000 (logaritmo de 3), aproximadamente 10.000 (logaritmo de 4), aproximadamente 100.000 (logaritmo de 5), aproximadamente 350.000 (logaritmo de 5,5), 1.000.000 (logaritmo de 6), aproximadamente 3.500.000 (logaritmo de 6,5), aproximadamente 10.000.000 (logaritmo de 7), aproximadamente 35.000.000 (logaritmo de 7,5), aproximadamente 100.000.000 (logaritmo de 8) o más.

En algunas realizaciones, la concentración (por ejemplo, concentración desconocida) de las moléculas de analito en la muestra de líquidos puede determinarse sustancialmente de manera exacta si es menor de aproximadamente 5000 fM (femtomolar), menor de aproximadamente 3000 fM, menor de aproximadamente 2000 fM, menor de aproximadamente 1000 fM, menor de aproximadamente 500 fM, menor de aproximadamente 300 fM, menor de aproximadamente 200 fM, menor de aproximadamente 100 fM, menor de aproximadamente 50 fM, menor de aproximadamente 25 fM, menor de aproximadamente 10 fM, menor de aproximadamente 5 fM, menor de aproximadamente 2 fM, menor de aproximadamente 1 fM, menor de aproximadamente 500 aM (attomolar), menor de aproximadamente 100 aM, menor de aproximadamente 10 aM, menor de aproximadamente 5 aM, menor de aproximadamente 1 aM, menor de aproximadamente 0,1 aM, menor de aproximadamente 500 zM (zeptomolar), menor de aproximadamente 100 zM, menor de aproximadamente 10 zM, menor de aproximadamente 5 zM, menor de aproximadamente 1 zM, menos de aproximadamente 0,1 zM o menor. En algunos casos, el límite de detección (por ejemplo, la concentración más baja de una molécula de analito que puede determinarse en solución) es de aproximadamente 100 fM, de aproximadamente 50 fM, de aproximadamente 25 fM, de aproximadamente 10 fM, de aproximadamente 5 fM, de aproximadamente 2 fM, de aproximadamente 1 fM, de aproximadamente 500 aM (attomolar), de aproximadamente 100 aM, de aproximadamente 50 aM, de aproximadamente 10 aM, de aproximadamente 5 aM, de aproximadamente 1 aM, de aproximadamente 0,1 aM, de aproximadamente 500 zM (zeptomolar), de aproximadamente 100 zM, de aproximadamente 50 zM, de aproximadamente 10 zM, de aproximadamente 5 zM, de aproximadamente 1 zM, de aproximadamente 0,1 zM o menor. En algunas realizaciones, la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos que puede determinarse sustancialmente de manera exacta es entre aproximadamente 5000 fM y aproximadamente 0,1 fM, entre aproximadamente 3000 fM y aproximadamente 0,1 fM, entre aproximadamente 1000 fM y aproximadamente 0,1 fM, entre aproximadamente 1000 fM y aproximadamente 0,1 zM, entre aproximadamente 100 fM y aproximadamente 1 zM, entre aproximadamente 100 aM y aproximadamente 0,1 zM o menor. El límite de detección superior (por ejemplo, la concentración superior de una molécula de analito que puede determinarse en solución) es de al menos aproximadamente 100 fM, al menos aproximadamente 1000 fM, al menos aproximadamente 10 pM (picomolar), al menos aproximadamente 100 pM, al menos aproximadamente 100 pM, al menos aproximadamente 10 nM (nanomolar), al menos aproximadamente 100 nM, al menos aproximadamente 1000 nM, al menos aproximadamente 10 uM, al menos aproximadamente 100 uM, al menos aproximadamente 1000 uM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 100 mM, al menos aproximadamente 1000 mM, o mayor. En algunas realizaciones, la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos determinada es menor de aproximadamente 50×10^{-15} M o menor de aproximadamente 40×10^{-15} M, o menor de aproximadamente 30×10^{-15} M, o menor de aproximadamente 20×10^{-15} M, o menor de aproximadamente 10×10^{-15} M, o menor de aproximadamente 1×10^{-15} M.

50 **Métodos/sistemas de análisis digital/analógico combinados ejemplares**

La sección siguiente describe métodos y sistemas ejemplares para extender el rango dinámico de métodos/sistemas analíticos usados para determinar una medida de concentración de moléculas o partículas de analito en una muestra de líquidos. En algunas realizaciones, el método analítico empleado puede aislar individualmente y detectar moléculas de analito individuales a bajas concentraciones. En algunos casos, el método analítico implica segregar espacialmente una pluralidad de moléculas de analito en una pluralidad de lugares en o sobre una superficie de un sustrato (por ejemplo, placa, microplaca, cara de fibra de óptica, etc.). A rangos de concentración bajos, las moléculas de analito pueden segregarse espacialmente de tal manera que una fracción estadísticamente significativa de dichas lugares no contiene moléculas de analito conteniendo al menos algunos de los lugares al menos una molécula de analito. En el presente documento se describen métodos y sistemas que pueden usarse junto con los métodos/sistemas de la presente invención para extender el rango dinámico.

Como un método ejemplar, y como se describe con más detalle en el presente documento, puede hacerse que una pluralidad de moléculas de analito en una muestra de líquidos se inmovilice con respecto a una pluralidad de objetos de captura (por ejemplo, perlas) incluyendo cada una de ellas una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito (véanse, por ejemplo, los métodos y objetos de captura descritos en la

solicitud de Patente de Estados Unidos de propiedad conjunta N° de Serie 12/731.130, titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects" de Duffy *et al.*, presentada el 24 de marzo, 2010; y en la Solicitud de Patente Internacional N° (aún no determinado), titulada "Ultra-Sensitive Detective of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects" de Duffy *et al.*, presentada el 1 de marzo de 2011 (N° de Expediente del Mandatario N° Q0052.70011WO00)). Al menos algunas de las perlas (por ejemplo, al menos algunas asociadas con al menos una molécula de analito) pueden estar separadas/segregadas espacialmente en una pluralidad de lugares (por ejemplo, recipientes de reacción), y al menos algunos de los recipientes de reacción pueden tratarse/analizarse para detectar la presencia de una perla y una molécula de analito. En algunos casos, la pluralidad de recipientes de reacción tratados es una parte o esencialmente la totalidad de la cantidad total de recipientes de reacción que pueden contener al menos un objeto de captura (por ejemplo, asociado con al menos una molécula de analito o no asociado con ninguna de las moléculas de analito). Debe entenderse que, aunque la mayoría de lo que se trata en el presente documento se centra en métodos que comprenden inmovilizar moléculas de analito con respecto a perlas (u otros objetos de captura) antes de segregar espacialmente la pluralidad de moléculas de analito en una pluralidad de recipientes de reacción, esto no significa que sea limitante, y pueden usarse otros métodos/sistemas para la segregación espacial de las moléculas de analito, (por ejemplo, en el que las moléculas de analito se segregan en una pluralidad de lugares sin inmovilizarse en objetos de captura). Los expertos habituales en la técnica podrán aplicar los métodos, sistemas y análisis descritos en el presente documento a métodos que no emplean objetos de captura (por ejemplo, perlas). Por ejemplo, véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20070259448, titulada "Methods and arrays for target analyte detection and determination of target analyte concentration in solution", de Walt *et al.*, presentada el 16 de febrero, 2007; la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20070259385, titulada "Methods and arrays for detecting cells and cellular components in small defined volumes", de Walt *et al.*, presentada el 16 de febrero, 2007; la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20070259381, titulada "Methods and arrays for target analyte detection and determination of reaction components that affect a reaction" de Walt *et al.*, presentada el 16 de febrero de 2007; la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US07/019184, titulada "Methods for Determining the Concentration of an Analyte in Solution" de Walt *et al.*, presentada el 20 de agosto, 2007; y la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US09/005428, titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Enzymes" de Duffy *et al.*, presentada el 9 de septiembre, 2009.

Después de segregar espacialmente las perlas en los recipientes de reacción, al menos una parte de los recipientes de reacción puede tratarse/analizarse para determinar el número y/o porcentaje de los lugares tratados que contienen una perla asociada con al menos una molécula de analito. En algunos casos, los lugares tratados son al menos una parte de los lugares que contienen al menos una perla (por ejemplo, ya sea asociados con al menos una molécula de analito o no asociados con ninguna molécula de analito). En algunos casos, los lugares tratados son al menos una parte de los lugares que contienen al menos una perla (por ejemplo, asociada con al menos una molécula de analito o no asociado con ninguna de las moléculas de analito). El porcentaje de lugares que contienen una perla asociada con al menos una molécula de analito (el porcentaje de perlas "activas") es el número de perlas asociadas con al menos una molécula de analito dividido entre el número total de perlas tratadas, multiplicado por 100 %. Como alternativa, si se desea, el porcentaje de actividad puede basarse en el número de lugares tratados si contienen o no una perla (es decir, lugares que contienen una perla activa como un porcentaje de lugares tratados). Como entenderán los expertos habituales en la técnica, en las realizaciones en las que no se emplean perlas (u otros objetos de captura), el porcentaje de "perlas activas" en la siguiente discusión puede sustituirse por el porcentaje de lugares que contienen al menos una molécula de analito (por ejemplo, el porcentaje de "lugares activos").

En algunas realizaciones, determinando el número/porcentaje de perlas activas puede determinarse la cantidad de concentración de analito en la muestra de líquidos. Particularmente a niveles más bajos de concentración (por ejemplo, en el rango de concentración digital), puede determinarse una medida de la concentración de las moléculas de analito en una muestra de líquidos al menos en parte contando perlas bien como "on" (por ejemplo, un recipiente de reacción que contiene una perla asociada con al menos una molécula de analito) o como "off" (por ejemplo, un recipiente de reacción que no contiene una perla asociada con ninguna molécula de analito). A proporciones bajas de moléculas de analito con respecto a perlas (por ejemplo, menor de aproximadamente 1:5, menor de aproximadamente 1:10, menos de aproximadamente 1:20, o menor), casi todas las perlas están asociadas con cero moléculas de analito o con una molécula de analito. En este rango, el porcentaje de perlas activas (por ejemplo, recipientes de reacción "on") puede aumentar sustancialmente de modo lineal con el aumento de la concentración de analito, y puede usarse ventajosamente un método de análisis digital para analizar los datos.

Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de analito, una población significativa de las perlas generalmente se asocia con más de una molécula de analito. Esto es, al menos alguna de las perlas se asocia con dos, tres, etc., moléculas de analito. Por lo tanto, a medida que aumenta la concentración de analito, en algún punto el porcentaje de perlas activas en una población generalmente no será lineal con respecto a la concentración de la cantidad de analito dado que una fracción más grande de las perlas puede asociarse con más de una molécula de analito. En estos rangos de concentración, los datos pueden analizarse aun ventajosamente usando un método de análisis digital (por ejemplo, contando perlas "on" y "off"), sin embargo, puede ser posible mejorar la precisión del ensayo aplicando un ajuste a la distribución de Poisson para determinar la probabilidad de unión de una población de moléculas de analito con una población de perlas. Por ejemplo, de acuerdo con el ajuste a la distribución de Poisson, en un ensayo que presente aproximadamente el 1,0 % de perlas activas (por ejemplo, la proporción de

perlas asociadas con al menos una molécula de analito con respecto al número total de perlas es de aproximadamente 1:100), aproximadamente el 99 % de las perlas carece de moléculas de analito, aproximadamente el 0,995 % de las perlas se asocia con una molécula de analito, y aproximadamente el 0,005 % de las perlas se asocia con dos moléculas de analito. Como comparación, en un ensayo que presente aproximadamente el 20,0 % de perlas activas (por ejemplo, la proporción de perlas asociadas con al menos una molécula de analito con respecto al número total de perlas es de aproximadamente 1:5), aproximadamente el 80 % de las perlas carece de moléculas de analito, aproximadamente el 17,85 % de las perlas se asocia con una molécula de analito, aproximadamente el 2,0 % de las perlas se asocia con dos moléculas de analito y aproximadamente el 0,15 % de las perlas se asocia con tres moléculas de analito. El efecto no lineal (por ejemplo, como se observa en el segundo ejemplo comparativo) puede representarse en todo el rango de concentración en el que continúa habiendo una fracción estadísticamente significativa (por ejemplo, como se describe en el presente documento – véase la Ecuación 1 más adelante y análisis asociado) de perlas no asociada con ninguna molécula o partícula de analito en la muestra (por ejemplo, el rango en el que un método/sistema de análisis digital puede ser capaz de determinar exactamente una medida de la concentración, por ejemplo, en algunos casos hasta aproximadamente el 20 % de perlas activas, hasta aproximadamente el 30 % de perlas activas, hasta aproximadamente el 35 % de perlas activas, hasta aproximadamente el 40 % de perlas activas, hasta aproximadamente el 45 % de perlas activas, hasta aproximadamente el 50 % de perlas activas, hasta aproximadamente el 60 % de perlas activas, hasta aproximadamente el 70 % de perlas activas o más) usando un ajuste de distribución de Poisson. Una distribución de Poisson describe la probabilidad de que se produzca un número de eventos si se conoce el número promedio de eventos. Si el número de casos esperado es μ , entonces la probabilidad ($P_{\mu}(v)$) de que haya exactamente v casos (siendo v un número entero no negativo, $v = 0, 1, 2, \dots$) puede determinarse por la Ecuación 1:

$$P_{\mu}(v) = e^{-\mu} \left(\frac{\mu^v}{v!} \right) \quad (\text{Ec. 1})$$

En algunas realizaciones de la presente invención, μ es igual a la proporción del número de moléculas de analito detectadas con respecto al número total de perlas detectado (por ejemplo, asociado o no asociado con ninguna molécula de analito) y v es el número de perlas que contienen un determinado número de moléculas de analito (por ejemplo, el número de perlas asociadas con cualquiera de 0, 1, 2, 3, etc. moléculas de analito). Por tanto, a través de la determinación de μ en un experimento, puede determinarse el número y , a través de otros cálculos, la concentración de moléculas de analito. En el modo digital/binario de mediciones en el que las perlas se asocian con 1, 2, 3, 4, etc. las moléculas de analito son indistinguibles (por ejemplo, donde $v = 1, 2, 3, 4$ son indistinguibles) y la molécula de analito que contiene perlas (o lugares) se caracteriza simplemente como "on". Los casos de $v = 0$ pueden determinarse definitivamente como el número de perlas (o lugares) "off". ($P_{\mu}(0)$) puede calcularse de acuerdo con la Ecuación 2:

$$P_{\mu}(0) = e^{-\mu} \left(\frac{\mu^0}{0!} \right) = e^{-\mu} \quad (\text{Ec. 2})$$

y el número de casos esperadas, μ , puede determinarse basándose en una reestructuración de la Ecuación 2, como se proporciona en la Ecuación 3:

$$\mu = -\ln[P_{\mu}(0)] \quad (\text{Ec. 3})$$

El número de casos de perlas asociadas con moléculas de no analito, ($P_{\mu}(0)$) es igual a 1 menos el número total de perlas con los casos restantes (por ejemplo, perlas asociadas al menos con una molécula de analito) entonces μ se obtiene mediante la Ecuación 4:

$$\mu = \frac{\text{Número de moléculas de analito}}{\text{Número total de perlas}} = -\ln(1 - \text{fracción de perlas "on"}) \quad (\text{Ec. 4})$$

En algunos casos, μ también se denomina en el presente documento "AMB_{digital}". Reestructurando la Ecuación 4, el número total de moléculas de analito en la muestra de líquidos contenida en los lugares contados puede determinarse usando la Ecuación 5:

$$\text{Número de moléculas de analito} = -\ln(1 - \text{fracción de perlas "on"}) \times (\text{número total de perlas}) \quad (\text{Ec. 5})$$

Por lo tanto, el número total de moléculas puede determinarse a partir de la fracción de perlas "on" para un número de perlas determinado, y una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de líquidos puede basarse al menos en parte en este número (así como, por ejemplo, cualquiera de las diluciones de la muestra durante el ensayo, el número y volumen de los pocillos que contienen objetos de captura analizados, etc.). El número de perlas con 1, 2, 3, 4, etc. moléculas de analito asociadas también puede determinarse calculando $P_{\mu}(1)$,

$P_{ii}(2), P_{ii}(3), \text{etc.}$ a partir del valor μ determinado y de la Ecuación 1.

La Tabla 1 demuestra el potencial de utilidad del ajuste de la distribución de Poisson. La columna A muestra el número de moléculas de analito en la muestra calculado a partir de la molaridad y volumen ensayados. La columna B muestra el número de moléculas capturadas en perlas no ajustado, en el que cualquier perla asociada con cualquier número (por ejemplo, uno, dos, tres, etc.) de moléculas de analito se cuenta como que está asociado con una sola molécula de analito. La columna D son los datos ajustados a Poisson, en los que las perlas asociadas con dos moléculas de analito se cuentan como que tienen dos moléculas unidas, y las perlas asociadas con tres moléculas se cuentan como que tienen tres moléculas unidas, etc. La comparación de los datos no ajustados y ajustados puede observarse comparando las columnas C y E. Estas columnas ofrecen las eficiencias de captura del ensayo calculadas a cada concentración, en el que la eficiencia de captura es el número de moléculas de analito capturadas (no ajustado o ajustado a Poisson) determinado dividido entre el número de moléculas de analito proporcionado en la muestra de líquidos, multiplicado por 100 %. La columna C muestra un cálculo de la eficiencia de captura usando datos no ajustados, y se observa una reducción en la eficiencia de captura a medida que aumenta la concentración de moléculas de analito. La columna E muestra un cálculo de la eficiencia de captura usando datos de Poisson ajustados. La FIG. 1 es una representación gráfica de los resultados de un ajuste de distribución a Poisson ejemplar. Los datos no ajustados se desvían de la linealidad con el aumento de la concentración, mientras que los datos que se han sometido a un ajuste de distribución de Poisson son sustancialmente lineales a través de sustancialmente una parte del rango de concentración representado gráficamente. Usando los resultados mostrados en la columna D, puede calcularse el número promedio de moléculas de analito por perla (por ejemplo, el número de moléculas capturadas ajustado a Poisson dividido entre el número total de perlas tratadas). En determinadas realizaciones, el número promedio de moléculas de analito por perla resultante puede usarse para preparar una curva de calibración, como se describe en el presente documento.

Tabla 1. Ajuste de la distribución de Poisson

[SβG] (aM)	Columna A Nº de Moléculas en el sistema	Columna B Nº de Moléculas Capturadas no ajustado	Columna C Lectura digital de la eficiencia de captura no ajustada	Columna D Nº de moléculas capturadas ajustado a Poisson	Columna E Eficiencia de Capturada ajustada a Poisson
0,35	21	28	132 %	28	132 %
0,7	42	33	79 %	33	79 %
3,5	211	159	75 %	159	75 %
7	421	279	66 %	279	66 %
35	2107	1778	84 %	1782	85 %
70	4214	3267	78 %	3280	78 %
350	21070	13514	64 %	13748	65 %
700	42140	30339	72 %	31552	75 %
3500	210700	122585	58 %	146380	69 %
7000	421400	178112	42 %	235716	56 %

Anteriormente un determinado porcentaje de perlas activas (es decir, en el que ya no hay una fracción estadísticamente significativa de perlas presentes en la población que no estén asociadas con ninguna de las moléculas o partículas de analito, o, posiblemente de manera ventajosa, para situaciones en las que puede haber una fracción estadísticamente significativa de perlas presente en la población que no está asociado con ninguna de las moléculas o partículas de analito pero que dé como resultado un porcentaje de perlas activas por encima de un determinado nivel – por ejemplo, mayor de o sustancialmente mayor de aproximadamente 40 %, o aproximadamente 50 %, o aproximadamente 60 %, o aproximadamente 70 % (o porcentaje de lugar activo, en realizaciones en las que no se emplean perlas)) las mejoras en la precisión y/o fiabilidad en la determinación de la concentración de las moléculas de analito puede posiblemente realizarse empleando una medición de intensidad basada en la determinación y análisis analógico en lugar de, o complementario a, un recuento binario/digital/distribución de Poisson, como se ha descrito previamente. A porcentajes más altos de perlas activas, mayor es la probabilidad de que una perla activa (por ejemplo, recipiente de reacción positivo) está rodeada por otras perlas activas (por ejemplo, recipientes de reacción positivos) y, en determinadas configuraciones de ensayo, puede crear determinadas exposiciones prácticas para usar exclusivamente el método de determinación digital/binario. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, en un recipiente de reacción puede producirse la filtración de un componente detectable desde un recipiente de reacción adyacente, hasta cierto punto. En dichas situaciones, el uso de una técnica analógica, basada en el nivel de intensidad, puede posiblemente producir un rendimiento más favorable.

La FIG. 2 ilustra una característica de la técnica de lectura digital ajustada a Poisson que puede observarse, en algunos casos, a medida que aumenta la concentración de analito de tal manera que el número de perlas activas aumenta a niveles más altos. En algún punto, en determinadas realizaciones, la concentración de las moléculas de

analito puede alcanzar un nivel en el que la técnica de lectura digital, con o sin ajuste a la distribución de Poisson, ya no se produce como una relación lineal con respecto a la concentración como puede ser deseable, y la técnica analítica empleada por el sistema/método de la invención puede modificarse de tal manera que se emplee un método/sistema de análisis analógico. En el análisis analógico, la asociación de moléculas de analito múltiples a altas concentraciones con perlas individuales puede cuantificarse de manera más eficaz y/o fiable. La intensidad de al menos una señal de la pluralidad de recipientes de reacción que contienen al menos una molécula de analito puede determinarse. En algunos casos, la intensidad determinada puede ser la intensidad global total determinada de todos los recipientes de reacción analizados 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 que produce una señal puede determinarse y establecerse el promedio, dando lugar a una señal de perla promedio (ABS, *Average Bead Signal*)).

Para extender el rango dinámico de los métodos/sistemas de ensayo de la invención para combinar los dos métodos/sistemas de análisis analógico y digital, puede establecerse una "conexión" que relacione los resultados/parámetros de los dos métodos/sistemas de análisis. Esto puede realizarse, en determinados casos, usando una curva de calibración. En algunas realizaciones, puede determinarse una medida de la concentración desconocida de las moléculas de analito en una muestra de líquidos (por ejemplo, una muestra de ensayo) al menos en parte por comparación de un parámetro medido con respecto a una curva de calibración, en el que la curva de calibración incluye puntos de datos que cubren rangos de concentración tanto digitales como analógicos, y por tanto, tiene un rango dinámico extendido en comparación con un método/sistema de análisis de un solo modo (es decir, solo digital o solo analógico). La curva de calibración puede producirse realizando el ensayo con una pluralidad de muestras estandarizadas de concentración conocida en condiciones sustancialmente similares a las usadas para analizar una muestra de ensayo de concentración desconocida. En un ejemplo, la curva de calibración puede pasar de datos determinados usando una medición analógica a un sistema/método de análisis digital a medida que el porcentaje de perlas activas detectado se reduce hasta, o por debajo de, un valor umbral (por ejemplo, de aproximadamente 40 % de perlas activas, o de aproximadamente 50 % de perlas activas o de aproximadamente 60 % de perlas activas, o de aproximadamente 70 % de perlas activas, etc.).

Para preparar una curva de calibración digital-analógica combinada, en determinadas realizaciones se realiza una conexión entre los resultados obtenidos en los regímenes de baja concentración (digital) y alta concentración (analógico). En determinadas realizaciones, la curva de calibración se refiere a la concentración de la molécula de analito con respecto a un parámetro definido como el número promedio de moléculas de analito por perla, o AMB frente a la concentración de moléculas en solución. Debe entenderse, que aunque la siguiente exposición caracteriza realizaciones ejemplares en las que las moléculas de analito resultan ser una enzima, esto no significa una limitación, y en otras realizaciones, pueden emplearse otros tipos de moléculas o partículas de analito. Por ejemplo, la molécula de analito puede ser una biomolécula, y el ensayo puede implicar el uso de un ligando de unión que comprenda un componente enzimático. El AMB para una muestra con una concentración que se encuentra en un rango en el que se prefiere el análisis digital, puede determinarse usando un ajuste de la distribución de Poisson, como se ha descrito anteriormente. El AMB para una muestra con una concentración que se encuentra en un rango en el que se prefiere el análisis analógico, puede determinarse transformando una señal de intensidad analógica (por ejemplo, una señal de perla promedio) a un AMB usando un factor de conversión, como se trata más adelante.

En una primera realización ejemplar, para preparar una curva de calibración y determinar un factor de conversión apropiada, el ensayo se realiza en una muestra de calibración, en el que el porcentaje de perlas activas (o porcentaje de lugares activos, en realizaciones en las que no se emplean perlas) es entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 50 %, o entre aproximadamente 35 % y aproximadamente 45 %, o en algunos casos aproximadamente 40 %, o en algunos casos mayor del 50 %. El AMB para esta muestra puede calcularse usando un ajuste de la distribución de Poisson, como se ha descrito anteriormente. Para esta muestra, también se determina la señal de perla promedio (ABS). Puede definirse un factor de conversión (FC) que relacione la ABS y el AMB, por ejemplo, según la Ecuación 6:

$$FC = \frac{AMB_{\text{muestra de calibración}}}{ABS_{\text{muestra de calibración}}} \quad (\text{Ec. 6})$$

Por lo tanto, el régimen en el que se prefiere usar una determinación analógica, el AMB para una muestra (por ejemplo, una muestra desconocida, o una muestra de calibración con una concentración que la coloca en la región analógica) puede calcularse de acuerdo con la Ecuación 7:

$$AMB_{\text{muestra}} = FC \times ABS_{\text{muestra}} \quad (\text{Ec. 7})$$

Por ejemplo, en una realización ejemplar, puede determinarse una curva de calibración y un factor de conversión de la siguiente manera. En la Tabla 2 mostrada más abajo, la concentración más alta de moléculas de analito (por ejemplo, enzimas en esta realización ejemplar) determinada usando un protocolo de lectura digital/binario (aproximadamente 7 fM) generó aproximadamente 42,36 % de pocillos activos. Esta señal digital se ajustó usando el

ajuste de la distribución de Poisson para determinar el número total de moléculas unidas, y se determinó que el AMB era 0,551. Los datos recogidos a este nivel de concentración también se analizaron para determinar la señal de perla promedio (la ABS era igual a aproximadamente 1041 unidades de fluorescencia). El factor de conversión de analógico a digital fue, por lo tanto, de 0,000529 AMB/unidades de fluorescencia, calculado usando la Ecuación 6. Para otras muestras con rangos de concentración relativamente altos, el valor AMB puede determinarse aplicando este factor de conversión (por ejemplo, como se describe en la Ecuación 7). La Tabla 2 ilustra la transformación de la señal de perla promedio (por ejemplo, la intensidad promedio de pocillo con perlas en la Tabla 2) a AMB usando un factor de conversión de analógico a digital, así como los valores de AMB determinados digitalmente a algunas concentraciones más bajas. Los datos de calibración digital/analógica combinada pueden representarse gráficamente en una sola curva de calibración de valores AMB frente a la concentración. La FIG. 3 muestra una representación gráfica de datos analógicos transformados representados gráficamente junto con los datos digitales. Los valores analógicos se transforman a AMB (14 puntos de datos) y se representan gráficamente junto con los valores AMB en el rango de lectura digital que se ajustada a Poisson (12 puntos de datos).

Tabla 2. Transformación de la lectura analógica a AMB

	fM	Porcentaje digital "on"	AMB digital ajustado a Poisson	Intensidad promedio de pocillo con perlas (medición analógica)	Valores analógicos transformados a AMB ajustados a Poisson usando factor de conversión	AMB combinado
ANALÓGICA	700	-	-	17243	9,130	9,130
	350	-	-	13996	7,411	7,411
	70	-	-	5178	2,742	2,742
	35	-	-	3279	1,736	1,736
DIGITAL	7	42,36 %	0,551	1041	-	0,551
	3,5	26,21 %	0,304	-	-	0,304
	0,7	5,24 %	0,054	-	-	0,054
	0,35	2,93 %	0,030	-	-	0,030

El rango dinámico demostrado por la estrategia descrita basada en los experimentos indicados en las Tablas 1 y 2 fue mayor de 6 logs. Generalmente, el rango dinámico de un sistema/método de análisis está delimitado por el límite de detección inferior, para la lectura digital (por ejemplo, en el ejemplo específico descrito, aproximadamente 227 zM) y la mayor concentración ensayada y exactamente cuantificable por la lectura analógica (por ejemplo, en este ejemplo, aproximadamente 700 fM), es decir, 6,5 log. Este rango dinámico puede compararse con el rango dinámico de aproximadamente 3 log que puede obtenerse para las mismas muestras de ensayo en un lector de placa que solamente tiene la posibilidad de medir una señal analógica de un conjunto de moléculas.

En una segunda realización ejemplar, a proporciones bajas de moléculas de analito con respecto a perlas, cuando hay un número significativo de perlas que están asociadas con moléculas no analito (perlas "off"), el número de perlas asociadas con moléculas de analito, (u "on") activas, con respecto al número total de perlas detectadas puede usarse para determinar un AMB (es decir, $AMB_{digital}$) mediante estadística de Poisson como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, a proporciones más altas, se extrae una estrategia modificada de la descrita anteriormente en la primera realización ejemplar para preparar una curva de calibración. En esta realización, a proporciones más altas de moléculas de analito con respecto a perlas, cuando la mayoría de las perlas tiene una o más moléculas de analito unidas, y la estrategia de recuento se vuelve menos exacta, se determina un AMB (es decir, $AMB_{analógico}$) a partir de la intensidad de fluorescencia promedio de pocillos que contienen una perla en la matriz (\bar{I}_{perla}). Para transformar \bar{I}_{perla} a AMB en el régimen analógico, pueden usarse imágenes con < 10 % de perlas activas para determinar la intensidad analógica promedio de una sola molécula enzimática \bar{I}_{sola} . La proporción de \bar{I}_{perla} con respecto a \bar{I}_{sola} sobre todas las perlas proporciona un AMB analógico, y puede prepararse una curva de calibración de la siguiente manera. El rango dinámico de un ensayo puede extenderse más allá del régimen digital midiendo la intensidad de fluorescencia promedio de pocillos que contienen perlas para determinar el número de moléculas (por ejemplo, enzimas) asociada con cada perla detectada. En esta realización, el AMB puede determinarse a partir de valor de intensidad de fluorescencia promedio de las perlas activas (\bar{I}_{perla}) y la intensidad de fluorescencia promedio generada por una sola perla (por ejemplo, una sola enzima; (\bar{I}_{sola})). El AMB de una matriz en el rango analógico ($AMB_{analógico}$) se define mediante la Ecuación 8:

$$AMB_{analógico} = \frac{f_{on} \times \bar{I}_{perla}}{\bar{I}_{sola}} \quad (Ec. 8)$$

Para determinar la \bar{I}_{sola} , el $AMB_{digital}$ (por ejemplo, véase la Ecuación 4) y el $AMB_{analógico}$ (Ecuación 8) pueden igualarse en cuanto a fracciones de perlas activas en el que las perlas se asocian predominantemente con cualquiera de una o cero moléculas dominadas, por ejemplo, como se muestra en la Ecuación 9. En algunos casos, estos valores son iguales cuando hay una contribución no significativa del empobrecimiento del sustrato (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En algunos casos, se analiza una matriz y si las fracciones

de perlas “on” son $<0,1$ se considera que la condición cumple estos criterios:

$$\bar{I}_{sola} = \frac{f_{on} \times \bar{I}_{perla}}{-\ln[1-f_{on}]}, \text{ en matrices en las que } f_{on} < 0,1 \quad (\text{Ec. 9})$$

Después el AMB puede representarse gráficamente para rangos tanto digitales ($AMB_{digital}$ (Ecuación 4)) como analógicos ($AMB_{analógico}$ (Ecuación 8)), y las dos curvas pueden combinarse en una curva de calibración.

Cuando se combinan los datos digitales y analógicos en esta segunda realización, puede emplearse un experimento para determinar la \bar{I}_{sola} . El experimento puede emplear una muestra en la que la fracción de perlas activas es menor de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, o más. En algunos casos, la fracción de perlas activas es de aproximadamente 10 %. Esto puede realizarse, como se describe anteriormente, usando puntos de datos de calibración que cubren este rango, o muestras de control específicas que se sabe que tienen una señal digital en este rango. Con dos o tres concentraciones en una curva de calibración con $f_{on} < 0,1$, la intensidad de perlas individuales (por ejemplo, las actividades cinéticas de moléculas enzimáticas individuales) puede promediarse para determinar la \bar{I}_{sola} . En el caso de enzimas, el promedio de la variación intrínseca asociada con velocidades de una sola molécula enzimática (por ejemplo, la tasa de renovación enzimática) puede ser tal que se observa una escala o ninguna variación significativa con respecto a la medición \bar{I}_{sola} . La ambigüedad en la intensidad media de una sola enzima (\bar{I}_{sola}) con una función de N medidas puede proporcionar $\sigma_{I_{sola}} / \sqrt{N}$, en la que $\sigma_{I_{sola}}$ es el parámetro de amplitud de las intensidades de una sola molécula enzimática normalmente distribuida. Por ejemplo, con un parámetro de amplitud del 30 % de las velocidades promedio de una sola enzima, la ambigüedad añadida al valor medio de \bar{I}_{sola} fue del 1 % cuando se promediaba sobre 1000 mediciones de una sola molécula. Cuando la fracción de perlas activas aumenta (por ejemplo, 10 % y mayor), teóricamente tanto las intensidades analógicas como el recuento digital pueden usarse para determinar el AMB. Debajo de un determinado porcentaje de perlas activas (por ejemplo, menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 5 %, o menor), la contribución de perlas asociadas con enzimas múltiples puede ser demasiado pequeña de tal manera que la \bar{I}_{perla} no varía por encima del ruido de medición del % de perlas activas y la estrategia analógica puede no proporcionar resultados precisos.

Como estrategias f_{on} al 100 %, como se describe anteriormente, el recuento de perlas “on” y “off” puede no proporcionar una medición precisa del AMB. A porcentajes intermedios de perlas “on”, pueden considerarse diversos factores para determinar el umbral de la fracción de perlas activas por debajo del cual se usa el $AMB_{digital}$ (Ecuación 4) y por encima del cual se usa el $AMB_{analógico}$ (Ecuación 8). La elección de este umbral puede ilustrarse representando gráficamente la imprecisión en AMB que se genera a partir de la variación en las señales digitales y analógicas.

Por ejemplo, la FIG. 4A muestra una representación gráfica de una fracción de perlas activa frente a la concentración efectiva, dada por el AMB determinada a partir del recuento digital usando la distribución de Poisson (Ecuación 4). A medida que aumenta la concentración, la pendiente del % activo se hace más superficial y la imprecisión de la señal conduce a una mayor imprecisión en la concentración determinada. La FIG. 4B muestra una representación gráfica de una intensidad analógica ($\bar{I}_{perla} / \bar{I}_{sola}$) en función de la concentración efectiva, el AMB (Ecuación 8). A bajas concentraciones, la variación en las mediciones de intensidad puede hacer difícil detectar pequeños aumentos en enzimas múltiples y las CV de los AMB extrapolados son elevadas. La FIG. 4C muestra una representación gráfica de la imprecisión en AMB (% CV) como una función de f_{on} de (i) análisis digital y (ii) analógico asumiendo una señal fija CV de 7,1 % para ambos métodos. En algunos casos, el umbral digital con respecto al analógico (por ejemplo, el umbral en el que hay una transición de la determinación de la concentración entre el uso de un análisis digital (por ejemplo, Ecuación 4) o un análisis analógico (por ejemplo, Ecuación 8) es de aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, o entre aproximadamente 50 % y aproximadamente 80 % o entre aproximadamente 60 % y aproximadamente 80 %, o entre aproximadamente 65 % y aproximadamente 75 %. En una realización particular, el umbral es de aproximadamente 70 %, o entre aproximadamente 75 % y aproximadamente 85 %. Véanse los Ejemplos 8 y 9 para experimentos con muestras.

La FIG. 5 representa un ensayo en el que se realizan determinaciones a diversos AMB. La FIG. 5A (izquierda) muestra un $AMB = 0,1$, en el que cada una de las perlas activas está estadísticamente asociada predominantemente con una sola molécula de analito y pueden realizarse análisis digitales. La FIG. 5A (centro) muestra un $AMB = 0,6$, en el que un número significativo de perlas activas se asocia con más de una molécula de analito, y puede realizarse un análisis analógico digital. Si se realiza un análisis digital, pueden contabilizarse moléculas de analito múltiples por perla para usar un análisis de distribución de Poisson. La FIG. 5A (derecha) muestra un $AMB = 3$, en el que sustancialmente todas las perlas están asociadas con más de una molécula de analito. En este caso, el número promedio de moléculas de analito por perla puede cuantificarse midiendo la intensidad de fluorescencia promedio de las perlas activas y a partir del conocimiento de la intensidad de fluorescencia promedio generada por una sola molécula de analito (por ejemplo, enzima), como se describe en el presente documento. La FIG. 5B-D muestra

imágenes de fluorescencia generadas usando un ensayo como se describe en el presente documento de perlas individualizadas en pocillos individuales a valores AMB de aproximadamente (D) 0,1, (E) 0,6 y (F) 3,0.

5 Se ha desarrollado una curva de calibración que se refiere al AMB para una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de líquidos, usando la curva de calibración puede determinarse una medida de concentración de moléculas de analito en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra desconocida). Puede realizarse un ensayo de una manera similar a la que se realizó para las muestras de calibración (por ejemplo, incluyendo la inmovilización de las moléculas de analito con respecto a una pluralidad de perlas, y segregando espacialmente al menos una parte de la pluralidad de perlas en una pluralidad de recipientes de reacción). Después
10 de la segregación espacial de una pluralidad de perlas en una pluralidad de recipientes de reacción, al menos una parte de la pluralidad de los recipientes de reacción, puede analizarse, en determinadas realizaciones, una pluralidad de veces. Por ejemplo, pueden realizarse al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10 o más análisis, distanciándose los análisis por un periodo de tiempo de, por ejemplo, aproximadamente 1 segundo, aproximadamente 2 segundos, aproximadamente 5 segundos, aproximadamente 10 segundos, aproximadamente 20 segundos, aproximadamente 30 segundos, aproximadamente 40 segundos, aproximadamente 50 segundos, aproximadamente 1 minuto o más. Cada análisis puede producir un conjunto de datos. Los datos pueden analizarse para determinar el porcentaje de perlas asociadas con al menos una molécula de analito (por ejemplo, el porcentaje de perlas activas) (o el porcentaje de lugares activos, por ejemplo, en realizaciones en las que no se emplean perlas).

25 En algunas realizaciones, si el porcentaje de perlas activas (o lugares) es menor de aproximadamente 80 %, menor de aproximadamente 70 %, menor de aproximadamente 60 %, menor de aproximadamente 50 %, menor de aproximadamente 45 %, menor de aproximadamente 40 %, menor de aproximadamente 35 %, menor de aproximadamente 30 %, menor de aproximadamente 25 %, o menor de aproximadamente 20 %, la medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos pueden basarse al menos en parte en el número/porcentaje de lugares determinados que contienen al menos una molécula o partícula de analito. Es decir, puede analizarse al menos un conjunto de datos usando un método de análisis digital (que puede
30 adicionalmente incluir un ajuste mediante un ajuste de distribución de Poisson) como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el AMB puede determinarse como se describe en el presente documento (por ejemplo, usando un ajuste de distribución de Poisson) y la concentración puede determinarse por comparación del AMB con la curva de calibración. En algunos casos, el conjunto de datos usado puede ser un conjunto de datos recogido más tarde en el tiempo (por ejemplo, para garantizar un tiempo suficiente para que un sustrato enzimático se transforme en una entidad detectable). La medición de la concentración de las moléculas de analito en una muestra de líquidos puede basarse al menos en parte en una comparación de un parámetro medido con respecto a una curva de calibración (por ejemplo, formada al menos en parte por la determinación de al menos un factor de calibración).

40 En otras realizaciones, por ejemplo, si el porcentaje de perlas activas es relativamente alto, por ejemplo, mayor de aproximadamente 30 %, mayor de aproximadamente 35 %, mayor de aproximadamente 40 %, mayor de aproximadamente 45 %, mayor de aproximadamente 50 %, mayor de aproximadamente 60 %, mayor de aproximadamente 70 %, mayor de aproximadamente 80 % o más, la medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos puede basarse al menos en parte en la medición de un nivel de intensidad de al menos una señal indicativa de la presencia de una pluralidad de moléculas o partículas de analito.
45 Es decir, los datos pueden analizarse usando uno de los métodos de análisis analógico, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el AMB puede determinarse para la muestra usando la Ecuación 7 o la Ecuación 8. El AMB puede compararse con la curva de calibración para determinar una medida de la concentración de las moléculas de analito en la muestra de líquidos. En algunos casos, el conjunto de datos usado puede ser un conjunto de datos recogido inicialmente en el tiempo (por ejemplo, tal como para limitar dificultades asociadas con el empobrecimiento del sustrato, fotoblanqueamiento, etc., como se describe en el presente documento). La medida de la concentración de las moléculas de analito en una muestra de líquidos puede basarse al menos en parte en la comparación de un parámetro medido con respecto a una curva de calibración (por ejemplo, formado al menos en parte por la determinación de al menos un factor de calibración).

55 En otras realizaciones más, por ejemplo para rangos de concentración intermedios en los que el porcentaje de perlas activas puede ser entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 80 %, o entre aproximadamente 40 % y aproximadamente 70 %, o entre aproximadamente 60 % y aproximadamente 80 %, o entre aproximadamente 65 % y aproximadamente 75 %, o entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 50 %, o entre aproximadamente 35 % y aproximadamente 45 %, o casi 40 %, la medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos puede basarse en el promedio de la medida de la concentración de moléculas o partículas de analito como se determina mediante un método de análisis digital y como se determina mediante un método de análisis analógico. Es decir, al menos un conjunto de datos puede analizarse usando un método de análisis digital y/o uno de los métodos de análisis analógico, como se describe en el presente documento. Después de la determinación del AMB (a partir del método de análisis digital y/o analógico y/o promedio de los dos), el AMB puede compararse con la curva de calibración para determinar una medida de la concentración de las moléculas de analito en la muestra de líquidos.
60
65

- 5 En algunas realizaciones, además de determinar una señal indicativa de la presencia/concentración de moléculas de analito, puede determinarse al menos una señal de fondo. En algunos casos, antes de calcular un AMB de un conjunto de datos, un conjunto de datos de fondo puede sustraerse del conjunto de datos analizado. El conjunto de datos de fondo puede recogerse localizando la matriz de lugares antes de la segregación espacial de la muestra de ensayo (por ejemplo, moléculas de analito que pueden inmovilizarse sobre una pluralidad de perlas) en los lugares y/o después de la separación espacial pero antes de la exposición a una pluralidad de sustratos enzimáticos (u otros agentes de marcaje precursores) para desarrollar la señal.
- 10 En algunas realizaciones, además de una pluralidad de objetos de captura para la captura del analito, también pueden proporcionarse y/o emplearse una pluralidad de objetos de control. Un objeto (u objetos) de control puede ser útil para una variedad de propósitos que incluyen, pero sin limitación, la identificación de la orientación de la pluralidad de lugares (por ejemplo, en el caso en el que la pluralidad de lugares 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 análisis óptico), como se describe más adelante. Debe entenderse, que puede estar presente más de un tipo de objeto de control en cualquier formato de ensayo (por ejemplo, un primer tipo de objeto control para determinar la calidad del ensayo y un segundo tipo de objeto control que actúa como un marcador de lugar), o un solo tipo de objeto de control que puede tener más de una de las funciones descritas anteriormente.
- 15 20 En algunos casos, los objetos de control usados para identificar la orientación de la pluralidad de lugares (por ejemplo, recipientes de reacción, sitios, etc.) en una matriz (por ejemplo, funcionan como marcador (o marcadores) de lugar de una matriz). Por ejemplo, un objeto de control puede distribuirse al azar o específicamente en una matriz, y puede proporcionar uno o más lugares de referencia para determinar la orientación/posición de la matriz. Dicha característica puede ser útil cuando se comparan imágenes múltiples de una parte de la matriz a diferentes intervalos de tiempo. Es decir, las posiciones de los objetos de control en la matriz pueden usarse para registrar las imágenes. En algunos casos, los objetos de control pueden usarse para proporcionar lugares de referencia en realizaciones en las que una pluralidad de imágenes de pequeñas regiones solapantes se combina para formar una imagen más grande.
- 25 30 La presencia de objetos de control en un ensayo puede proporcionar información en lo que respecta a la calidad del ensayo. Por ejemplo, si se encuentra que un lugar contiene un objeto de control que comprende un componente enzimático pero no está presente ningún agente marcador (por ejemplo, cuyo producto estaría presente después de la exposición de un objeto de control que comprende un componente enzimático con un agente marcador precursor), esto proporciona una indicación de que algún aspecto del ensayo puede no funcionar correctamente. Por ejemplo, la calidad de los reactivos puede verse comprometida (por ejemplo, la concentración del agente marcador precursor es demasiado baja, la descomposición del agente marcador precursor, etc.) y/o quizá no todos los lugares estén expuestos al agente marcador precursor.
- 35 40 En algunas realizaciones, los objetos de control pueden usarse para calibrar el sistema de detección. Por ejemplo, los objetos de control pueden producir una señal óptica que puede usarse para calibrar un sistema de detección óptico. En algunas realizaciones, los objetos de control pueden caracterizarse y doparse con una característica particular (por ejemplo, fluorescencia, color, absorbancia, etc.) que puede actuar como una comprobación del control de calidad para el comportamiento del sistema de detección.
- 45 50 En algunos casos, los objetos de control pueden usarse para estandarizar o normalizar el sistema para determinar variaciones del comportamiento y/o características de los diferentes componentes del sistema en diferentes ensayos, a lo largo del transcurso del tiempo, etc. (por ejemplo, sistemas de detección, matrices, reactivos, etc.), entre una parte diferente de una matriz usada en un ensayo y/o entre dos matrices diferentes. Por ejemplo, la configuración, los parámetros y/o las variaciones experimentales pueden conducir a cambios de la intensidad de una señal (por ejemplo, señal fluorescente) producida a partir de una sola matriz a diferentes momentos o entre al menos dos matrices a momentos simultáneos o diferentes. Además, en una sola matriz, diferentes partes de la matriz pueden producir diferentes señales de fondo. Dichas variaciones puede conducir a cambios en las señales de calibración (por ejemplo, determinación de una señal de perla promedio) entre matrices, partes de una matriz o a múltiples tiempos, lo que puede conducir a determinaciones inexactas en algunos casos. Ejemplos no limitantes de parámetros que pueden producir variación incluyen la concentración del agente marcador, temperatura, foco, intensidad de detección de la luz, profundidad y/o tamaño de los lugares en la matriz, etc. Para determinar los efectos de algunas o todas de dichas variaciones, en algunas realizaciones, puede utilizarse una pluralidad de objetos de control. En determinados casos, dichos objetos de control carecen esencialmente de asociación con moléculas o partículas de analito. En determinadas realizaciones, menos de aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 1 %, etc. de los objetos de control están asociados con moléculas o partículas de analito. Los objetos de control pueden diferenciarse de los objetos de captura (por ejemplo, cada uno puede producir una señal diferenciable) y el sistema puede configurarse de tal manera que cualquier molécula de analito asociada con un objeto de control no representa la determinación de la concentración de la moléculas de analito. Las señales de los objetos control pueden usarse para normalizar los valores de interrogación entre las diferentes matrices o en áreas de una sola matriz. Por ejemplo, dado que las
- 55 60 65

señales de los objetos de control deben ser aproximadamente iguales entre matrices y/o sobre una sola matriz, las señales de los objetos de control pueden normalizarse a un valor apropiado y por consiguiente las señales de los objetos de no control (por ejemplo, los objetos de captura asociados con una molécula de analito) pueden ajustarse.

- 5 Como un ejemplo específico, en algunos casos, a la matriz puede proporcionarse un grupo de objetos de control que sea igual a o menor del 10 % activo. La \bar{I}_{sola} de los objetos de captura puede determinarse igualando el AMB digital (por ejemplo, Ecuación 4) y el AMB analógico (por ejemplo, Ecuación 8). A baja concentración de las moléculas de analito en la muestra de líquidos, el porcentaje de objetos de control activo en esta región analógica y el AMB_{analógico} para la muestra de líquidos puede calcularse usando la \bar{I}_{sola} determinada usando los sujetos de control (por ejemplo, no usando una \bar{I}_{sola} calculada usando objeto de captura asociados con las moléculas de analito de la muestra de líquidos). Esta estrategia puede reducir cualquier imprecisión en el AMB_{analógico} causada por la variación de matriz con matriz, intra-matriz y/o día a día en \bar{I}_{sola} y este valor se determina usando los objetos de control (por ejemplo, que pueden calibrarse con otras determinaciones y/o exámenes de objetos de control).
- 10
- 15 Los objetos de control pueden dispersarse a lo largo de la matriz de lugares de ensayo o puede segregarse en un conjunto de lugares separado de los objetos de captura de ensayo. Por ejemplo, puede proporcionarse una parte segregada de los objetos de captura en una región en el sitio del ensayo separada de la región que contiene los objetos de captura, y el valor de \bar{I}_{sola} para estos sitios proporciona un denominador específico para la Ecuación 8 para esta parte particular de una matriz o este conjunto de matrices. En dichos casos, las perlas de captura no requieren necesariamente diferenciarse de los objetos de control dado que los objetos de control están espacialmente separados de los objetos de captura.
- 20

En algunas realizaciones, puede producirse un rango dinámico aumentado o potenciado a través del uso de una cámara de imágenes con una alta resolución. Por ejemplo, las mediciones anteriores (por ejemplo, dadas en la Tabla 2) se obtuvieron usando una cámara de 12 bits. La caracterización "n"-bits de la resolución electrónica de una cámara muestra que pueden determinarse las unidades de intensidad analógicas cuantificadas 2^n . Por tanto para una cámara de 12 bits, pueden diferenciarse 4096 incrementos de intensidad distintos. Por lo tanto, típicamente puede alcanzarse un rango dinámico del orden de 3,6 logs, y aumentando la resolución de la cámara puede expandirse el rango dinámico de concentraciones que pueden medirse de un modo preciso en el régimen de análisis digital, como se describe en el presente documento.

25

30

En general, la realización práctica de la invención no está particularmente limitada a ningún rango dinámico o tipo de cámara específico. En lugar de, o además de, las técnicas tratadas anteriormente, pueden emplearse otros métodos/sistemas para expandir o expandir adicionalmente el rango dinámico. Por ejemplo, la detección de una mayor cantidad de perlas (u otros objetos de captura) puede expandir el rango dinámico. En los ejemplos cuyos resultados se tabulan en las Tablas anteriores, se detectó aproximadamente el 13 % de las perlas que se expusieron a la muestra que comprendía las moléculas de analito. Sin embargo en otras realizaciones, el aumento del número de recipientes de reacción (por ejemplo, lugares) analizados y/o usando cámaras con campos de visión más grandes, puede detectarse hasta el 100 % de las perlas que se exponen a la muestra. Detectando un aumento incrementado de perlas, el rango dinámico puede expandirse en al menos 1 log más en el extremo del recuento digital del rango (por ejemplo, de aproximadamente 4,5 logs a aproximadamente 5,5 logs, extendiendo todo el rango a aproximadamente 7,5 logs). Usando más perlas, el rango dinámico también puede extenderse disminuyendo el límite de detección (LOD) (*Limited Of Detection*) del método/sistema de análisis de lectura digital. Por ejemplo, aumentando el número de perlas, los efectos limitantes del ruido Poisson pueden reducirse porque pueden contarse más eventos. En determinadas realizaciones, puede ser posible, detectar una sola molécula de analito por muestra con una o más de las técnicas de extensión de rango dinámico de la invención descritas. El rango dinámico también puede extenderse en la concentración más alta, rango de análisis analógico. Por ejemplo, aumentando la resolución electrónica de la cámara (por ejemplo, barrido lineal con un tubo fotomultiplicador de 24 bits o el uso de cámaras de formación de imágenes avanzadas de 16 y 18 bits) puede extenderse el rango dinámico de mediciones analógicas.

35

40

45

50

Como se describe más adelante, para realizaciones en las que se usa un agente marcador precursor para facilitar la producción de una señal detectable (por ejemplo, ensayos en los que se usan moléculas de analito marcadas con enzimas o ligandos de unión unidos a moléculas de analito), la adquisición de imágenes a intervalos de tiempo más cortos después de que las moléculas de analito se hayan segregado en la pluralidad de lugares y expuestas a un agente marcador precursor que se transforma mediante un agente marcador detectado (es decir, después de un tiempo de incubación más corto) también se puede extender el rango dinámico ya que pueden detectarse menos moléculas de agente marcador (por ejemplo, moléculas de sustrato enzimático transformadas). Por ejemplo, en los ejemplos cuyos resultados se tabulan en la Tabla 2, la medición analógica más baja fue en 1041 recuentos analógicos (véase la Tabla 2). La cámara de 12 bits usada tiene un rango dinámico de 16 recuentos a 65536 recuentos. En algunas realizaciones, reduciendo el tiempo de incubación, el rango dinámico puede extenderse adquiriendo la medición en el extremo inferior de los recuentos (por ejemplo, la medición analógica más baja puede realizarse posiblemente a 16 recuentos (por ejemplo en lugar de a 1041 recuentos)) y por tanto, el rango dinámico analógico total sería de 3,6 logs, igualándose a un rango dinámico digital + analógico total de aproximadamente 8,1 logs. Puede conseguirse un efecto similar reduciendo el tiempo de adquisición de la imagen (por ejemplo, durante cuánto tiempo se abre el obturador para que la luz incida en la microplaca CCD). De nuevo, este tiempo podría minimizarse para dar la respuesta analógica más baja posible en el punto de intercambio digital a analógico y

55

60

65

maximizar el rango dinámico. Estos cambios pueden conducir posiblemente a un rango dinámico en exceso de 9 logs para una cámara de 12 bits en determinadas realizaciones. Por ejemplo, implementando los cambios a las mediciones digitales y analógicas descritas en el presente documento para una cámara de 12 bits puede obtenerse un rango dinámico total de (5,5 log digital + 3,6 log analógico) 9,1 logs. Usando un sistema de imágenes de 16-, 18- y 24-bits, el rango dinámico puede extenderse a 10,3, 10,9 y 12,7, logs, respectivamente.

En algunos casos, los métodos de transformación digital a analógica descritos en el presente documento pueden incluir técnicas y análisis que representan el empobrecimiento y/o el fotoblanqueamiento del sustrato. El empobrecimiento del sustrato puede producirse en realizaciones en las que el ensayo implica detectar un agente marcador (por ejemplo, un producto enzimático fluorescente) que se forma a partir de un agente marcador precursor (por ejemplo, sustrato enzimático) después de la exposición a una molécula de analito (o ligando de unión asociado con una molécula de analito). Puede ser ventajoso determinar el empobrecimiento del sustrato, por ejemplo, en realizaciones en las que un recipiente de reacción contenga más de una molécula de analito (o ligando de unión). Por ejemplo, en un determinado experimento, se considera que aproximadamente 2,1 millones de moléculas sustrato está disponible para la renovación en un recipiente de reacción. Este ejemplo, el componente enzimático, la beta-galactosidasa tiene una tasa de renovación de 186 s^{-1} a una concentración de sustrato de $100 \mu\text{M}$. Si solo hay un componente o molécula enzimática (o ligando de unión) por perla (por ejemplo, presente en un recipiente de reacción), este componente enzimático conserva el 99 % de su actividad sobre una duración de un experimento de tres minutos. Si, por otro lado, como promedio hay 50 componentes enzimáticos o moléculas por perla (o por recipiente de reacción, como en una muestra de concentración más alta), aproximadamente el 43 % de la actividad total puede perderse de la duración del experimento debido al empobrecimiento del sustrato. Esta pérdida en la actividad de la cámara de reacción total puede dar como resultado un valor de intensidad disminuido que podría esperarse de una cámara que contenga diez componentes enzimáticos o moléculas.

Para mitigar los efectos del empobrecimiento de sustrato sobre la precisión de las mediciones analógicas, en algunas realizaciones, pueden emplearse varias técnicas, dos ejemplos de las cuales se tratan en el presente documento. En primer lugar, la duración del tiempo para recoger el conjunto de datos que se analiza puede reducirse. Por ejemplo, pueden usarse imágenes fluorescentes a $t=0$ y $t=30$ s para calcular el valor de intensidad en lugar de una mayor duración (por ejemplo, $t=0$ y $t=150$ s). Realizando una medición sobre un periodo de tiempo más corto, puede reducirse la cantidad de sustrato que se empobrece, y puede ayudar a mantener una tasa lineal de formación del producto fluorescente. Adicionalmente, exponiendo la cámara de reacción, que contiene producto fluorescente, a una luz de excitación doble (por ejemplo, a $t=0$ y $t=30$) frente a un número de veces más grande (por ejemplo, a $t=0, 30, 60, 90, 120, 150$ s) se pueden reducir los efectos de fotoblanqueamiento. La Tabla 3 ilustra la reducción en la actividad enzimática a lo largo del tiempo debido al empobrecimiento del sustrato para una realización de ensayo ejemplar.

Tabla 3. Reducción en la actividad enzimática a lo largo del tiempo

100 μM RDG			
Disminución de la tasa de renovación a lo largo del tiempo	Nº enz/pocillo con perlas		
t(s)	1	5	10
0	505	505	505
30	504	498	492
60	502	492	478
90	501	485	464
120	500	478	448
150	498	471	432
180	497	464	416
% de actividad restante de t = 0	Nº enz/pocillo con perlas		
t(s)	1	5	10
0	100 %	100 %	100 %
30	100 %	99 %	97 %
60	100 %	97 %	95 %
90	99 %	96 %	92 %
120	99 %	95 %	89 %
150	99 %	93 %	86 %
180	98 %	92 %	82 %

Por ejemplo, la FIG. 6 muestra una curva teórica de la cantidad de RGP transformada en resorufina durante una medición de ensayo de una solución de RPG de $100 \mu\text{M}$ en función del número de moléculas enzimáticas en un pocillo sellado que contiene una perla, teniendo en cuenta el empobrecimiento del sustrato. Suponiendo que el ensayo se realizase usando una cámara con sensibilidad ilimitada (por ejemplo, no limitada por el número de bits) y comenzando la formación de imágenes inmediatamente después del sellado, un ensayo puede seguir siendo aproximadamente lineal sobre un $\text{AMB} = 50$. Específicamente, la FIG. 6 muestra una representación gráfica del número de moléculas de resorufina producido durante un experimento de 150 segundos en función del número de enzimas en una perla en el que es el límite teórico de un modelo en el que (i) la adquisición de imágenes comienza a

$t=0$, inmediatamente cuando se realiza el sellado, y antes de que cualquier REP se transforme en resorufina; y (ii) en el que la adquisición de imágenes comienza a $t=45$ segundos después del sellado.

Otra técnica que puede emplearse para mitigar los efectos del empobrecimiento del sustrato implica el aumento de la concentración del sustrato. La K_m del par enzima/sustrato en el ejemplo anterior era de aproximadamente $62 \mu\text{M}$. La tasa de renovación de una enzima se define por la concentración del sustrato como lo ilustra la ecuación de Michaelis-Menten. A concentraciones de sustrato mucho mayores que la K_m , la tasa de renovación enzimática puede comenzar a estabilizarse. Por ejemplo, a aproximadamente $400 \mu\text{M}$ de sustrato, la tasa de renovación enzimática promedio es aproximadamente 707 s^{-1} , mientras que a aproximadamente $200 \mu\text{M}$ la tasa de renovación es de aproximadamente 624 s^{-1} y a aproximadamente $100 \mu\text{M}$ la renovación promedio es de aproximadamente 504 s^{-1} . La reducción de la concentración del sustrato a la mitad de aproximadamente $400 \mu\text{M}$ a aproximadamente $200 \mu\text{M}$ produce aproximadamente una reducción del 11 % en la tasa de renovación, mientras que la reducción de la concentración del sustrato de aproximadamente $200 \mu\text{M}$ a aproximadamente $100 \mu\text{M}$ produce una reducción de aproximadamente 20 % en la tasa de renovación. En consecuencia, si se produce el empobrecimiento del sustrato durante una medición del ensayo usando al mismo tiempo altas concentraciones de sustrato, el empobrecimiento puede tener un efecto más pequeño sobre la tasa de renovación enzimática en comparación con el empobrecimiento que se produce cuando se usa una concentración de sustrato inferior (por ejemplo, próxima al valor de la K_m). La Tabla 4 ilustra un ejemplo del cambio en los efectos de empobrecimiento a medida que se altera la concentración del sustrato.

Tabla 4. Efectos del empobrecimiento a medida que se altera la actividad enzimática

RDG $100 \mu\text{M}$		RDG $200 \mu\text{M}$	
La tasa de renovación disminuye con el tiempo	Nº enz/pocillo con perlas	la tasa de renovación disminuye con el tiempo	Nº enz/pocillo con perlas
t(s)	10	t(s)	10
0	505	0	624
30	492	30	618
60	478	60	611
90	464	90	605
120	448	120	597
150	432	150	590
180	416	180	582
% de actividad restante de	Nº enz/pocillo con perlas	% de actividad restante de	Nº enz/pocillo con perlas
t(s)	10	t(s)	10
0	100 %	0	100 %
30	97 %	30	99 %
60	95 %	60	98 %
90	92 %	90	97 %
120	89 %	120	96 %
150	86 %	150	95 %
180	82 %	180	93 %

Para mitigar los efectos del fotoblanqueamiento sobre la intensidad de fluorescencia en bruto, en algunas realizaciones, la tasa de fotoblanqueamiento del producto fluorescente puede determinarse. En el ejemplo mostrado en la FIG. 7, la tasa de fotoblanqueamiento se determinó incluyendo en los recipientes de reacción una solución que contenía un producto fluorescente a detectar (resorufina $10 \mu\text{M}$) y monitorizando la disminución de fluorescencia cada 15 s con un tiempo de exposición de 2000 ms durante 50 min. Un ajuste exponencial de los datos produjo una tasa de fotoblanqueamiento, k_f , de $0,0013 \text{ s}^{-1}$ (véase la FIG. 7). En cada configuración del sistema de ensayo puede determinarse una sola k_f para los parámetros ópticos específicos usados en cada configuración del sistema de ensayo y puede usarse para ajustar el conjunto de datos recogidos de los efectos del fotoblanqueamiento en las intensidades de fluorescencia en bruto.

Los siguientes apartados proporcionan descripción, ejemplos y orientación adicional relacionados con los diversos aspectos de los métodos/sistemas de ensayo analito, moléculas de analito, sistemas analizadores, etc., que pueden usarse para llevar a cabo la realización práctica de diversas realizaciones de los métodos/sistemas de análisis de la invención descritos anteriormente. También puede encontrarse información adicional en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 12/731.130, titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects" de Duffy *et al.*, presentada el 24 de marzo de 2010; en la Solicitud de Patente Internacional Nº (sin determinar aún), titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects" de Duffy *et al.*, presentada el 1 de marzo de 2011; (Nº de Expediente del Mandatario Q0052.70011WO00); en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 20070259448, titulada "Methods and arrays for target analyte detection and determination of target analyte concentration in solution" de Walt *et al.*, presentada el 16 de febrero de 2007; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 20070259385, titulada "Methods and arrays for detecting cells

and cellular components in small defined volumes”, de Walt *et al.*, presentada el 16 de febrero de 2007; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20070259381, titulada “Methods and arrays for target analyte detection and determination of reaction components that affect a reaction” de Walt *et al.*, presentada el 16 de febrero de 2007; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 12/731.135, titulada “Ultra-Sensitive Detection of Molecules using Dual Methods” de Duffy *et al.*, presentada el 24 de marzo de 2010; (N° de Expediente del Mandatario Q0052.70012US01); en la Solicitud de Patente Internacional N° (sin determinar aún), titulada “Ultra-Sensitive Detection of Molecules using Dual Detection Methods” de Duffy *et al.*, presentada el 1 de marzo de 2011 (N° de Expediente del Mandatario Q0052.70012WO00); en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US07/019184, titulada “Methods for Determining The Concentration of an Analyte In Solution” de Walt *et al.*, presentada el 20 de agosto de 2007; y en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US09/005428, titulada “Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Enzymes” de Duffy *et al.*, presentada el 9 de septiembre de 2009.

Métodos y sistemas para segregar moléculas de analito en matrices de lugares

En determinadas realizaciones, los métodos y sistemas de ensayo de la presente invención emplean una etapa de segregación espacial de moléculas de analito en la pluralidad de lugares para facilitar la detección/cuantificación, de tal manera que cada lugar comprende/contiene cero o una o más moléculas de analito. Adicionalmente, en algunas realizaciones, el artículo que comprende los lugares se configura de tal manera que cada lugar puede tratarse individualmente. Aunque en el presente documento se describen realizaciones ejemplares para la segregación espacial de una pluralidad de moléculas de analito en una pluralidad de lugares, posiblemente pueden emplearse numerosos métodos distintos.

En algunas realizaciones, un método de la invención para determinar una medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de líquidos comprende detectar moléculas de analito inmovilizadas con respecto a una superficie de unión que tiene afinidad por al menos un tipo de molécula de analito. En determinadas realizaciones la superficie de unión (por ejemplo, una superficie de un pocillo/recipiente de reacción en un sustrato) puede formar o estar contenida dentro (por ejemplo, una superficie de un objeto de captura, tal como una perla, contenida en un pocillo) de una de una pluralidad de lugares (por ejemplo, una pluralidad de pocillos/recipientes de reacción) en un sustrato (por ejemplo, placa, disco, microplaca, extremo de una fibra óptica, etc.). Al menos una parte de los lugares puede tratarse y realizarse una medida indicativa del número/porcentaje de los lugares que contienen al menos una molécula o partícula de analito. En algunos casos, basándose en el número/porcentaje, puede determinarse una medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra líquida. La medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos puede determinarse en un método/sistema de análisis digital opcionalmente empleando el ajuste de la distribución de Poisson y/o basándose al menos en parte en una intensidad medida de una señal, como se ha descrito con detalle anteriormente.

Como se ha descrito anteriormente, en realizaciones en las que las moléculas de analito se inmovilizan con respecto a una pluralidad de objetos de captura, los lugares tratados pueden ser lugares que contienen al menos un objeto de captura (por ejemplo, asociados, o no asociados con ninguna molécula de analito), y por tanto, en estas realizaciones, el porcentaje de lugares que contiene al menos una molécula de analito es también el porcentaje de objetos de captura asociado con al menos una molécula de analito (por ejemplo, el porcentaje de perlas “activas”). Por tanto, en algunas realizaciones, un método para determinar una medición de la concentración de moléculas o partículas de analito en una muestra de líquidos comprende exponer una pluralidad de objetos de captura (por ejemplo, perlas), incluyendo cada una de ellas una superficie de unión que tenga afinidad por al menos un tipo de molécula o partícula de analito (por ejemplo, una pluralidad de componentes de captura), a una solución que contiene o se sospecha que contiene al menos un tipo de moléculas o partículas de analito, en el que al menos algunos de los objetos de captura comienzan a asociarse con al menos una molécula o partícula de analito. Al menos una parte de los objetos de captura (por ejemplo, perlas) puede segregarse espacialmente en una pluralidad de lugares (por ejemplo, recipientes de reacción en una superficie). Al menos una parte de la pluralidad de lugares (por ejemplo, en algunos casos, lugares que contienen al menos un objeto de captura) puede tratarse para determinar una medida indicativa del porcentaje de lugares que contienen al menos una molécula o partícula de analito (por ejemplo, en algunos casos, el porcentaje de objetos de captura asociados con al menos una molécula de analito). Como se ha descrito anteriormente, en algunos casos, basándose en el porcentaje determinado, puede determinarse una medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos basándose, al menos en parte, en el número/porcentaje de objetos de captura que contienen al menos una molécula o partícula de analito y/o basándose, al menos en parte, en una intensidad medida de una señal que es indicativa de la presencia de una pluralidad de moléculas o partículas de analito.

Adicionalmente, en algunos casos, un sistema para determinar una medida de la concentración de moléculas o partículas de analito en una muestra de líquidos comprende un sustrato de ensayo (por ejemplo, una placa, un disco, un portaobjetos, una microplaca, una cara de fibra óptica, etc.) que comprende una pluralidad de lugares (por ejemplo, recipientes de reacción) comprendiendo cada uno de ellos una superficie de unión que forma (por ejemplo, una pluralidad de componentes de captura) o que contiene dicha superficie (por ejemplo, que contiene una perla que comprende una pluralidad de componentes de captura) dentro de dichos lugares, en el que al menos una superficie de unión comprende al menos una molécula o partícula de analito inmovilizada sobre la superficie de unión. El sistema también puede comprender al menos un detector configurado para tratar al menos una parte de la pluralidad

de lugares y permitir producir al menos una señal indicativa de la presencia o ausencia de una molécula o partícula de analito en cada lugar tratado y que tiene la capacidad de medir niveles de intensidad que varían con el número de moléculas o partículas de analito en cada lugar. Adicionalmente, el sistema puede comprender al menos un procesador de señal configurado para determinar, a partir de al menos una señal, el número/porcentaje de los lugares tratados que contienen al menos una molécula o partícula de analito, y adicionalmente configurarse para, basándose en el número/porcentaje, determinar una medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos basándose al menos en parte en el número de lugares que contienen al menos una molécula o partícula de analito (análisis digital/binario), y/o determinar una medida de la concentración de moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos basándose al menos en parte en un nivel de intensidad de la al menos una señal indicativa de la presencia de una pluralidad de moléculas o partículas de analito, usando técnicas descritas previamente.

Los métodos y sistemas de ensayo proporcionados en el presente documento pueden emplear una variedad de diferentes componentes, etapas y aspectos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un método puede comprender adicionalmente determinar al menos una determinación de señal de fondo (por ejemplo, y comprender adicionalmente la sustracción de la señal de fondo de otras determinaciones), etapas de lavado y similares. En algunos casos, los ensayos o sistemas pueden incluir el uso de al menos un ligando de unión, como se describe en el presente documento. En algunos casos, la medida de la concentración de las moléculas de analito en una muestra de líquidos se basa, al menos en parte, en la comparación de un parámetro medido con respecto a una curva de calibración. En algunos casos, la curva de calibración se forma, al menos en parte, por la determinación de al menos un factor de calibración, como se describe anteriormente.

En algunas realizaciones, la pluralidad de moléculas de analito puede ser segregarse espacialmente en una pluralidad de lugares, en el que los lugares comprenden una pluralidad de recipientes de reacción. Las moléculas de analito pueden dividirse a través de la pluralidad de recipientes de reacción de tal manera que al menos algunos de los recipientes de reacción contengan al menos una molécula de analito y una fracción estadísticamente significativa de los recipientes de reacción que no contengan moléculas de analito. Una fracción estadísticamente significativa de recipientes de reacción que contenga al menos una molécula de analito (o no contenga moléculas de analito) típicamente podrá detectarse y cuantificarse de manera reproducible usando un sistema de detección particular y típicamente estará por encima del ruido de fondo (por ejemplo, unión no específica) que se determina cuando se realiza el ensayo con una muestra que no contiene ninguna molécula de analito, dividido entre el número total de lugares tratados. Como se usa en el presente documento, una "fracción estadísticamente significativa" para las presentes realizaciones, puede calcularse de acuerdo con la Ecuación 10:

$$n > 3\sqrt{n} \quad (\text{Ec. 10})$$

en la que n es el número de eventos determinados para una categoría de eventos seleccionada. Es decir, se produce una fracción estadísticamente significativa cuando el número de eventos n es tres veces mayor que la raíz cuadrada del número de eventos. Por ejemplo, para determinar una fracción estadísticamente significativa de los recipientes de reacción que contienen una molécula o partícula de analito, n es el número de recipientes de reacción que contienen una molécula de analito. Como otro ejemplo, para determinar una fracción estadísticamente significativa de los objetos de captura asociados con una sola molécula de analito, n es el número de objetos de captura asociados con una sola molécula de analito.

En algunas realizaciones, la fracción estadísticamente significativa de lugares que contienen al menos una molécula de analito (o una sola molécula de analito en algunos casos en los que la proporción de lugares con respecto a moléculas de analito conduciría, estadísticamente, a esencialmente solo una molécula de analito o cero contenida en cada lugar) con respecto al número total de lugares (u objetos de captura) es menor de aproximadamente 1:2, menor de aproximadamente 1:3, menor de aproximadamente 1:4, menor de aproximadamente 2:5, menor de aproximadamente 1:5, menor de aproximadamente 1:10, menor de aproximadamente 1:20, menor de aproximadamente 1:100, menor de aproximadamente 1:200 o menor aproximadamente 1:500. Por lo tanto, en dichas realizaciones, la fracción de lugares (u objetos de captura) que no contiene ninguna molécula de analito con respecto al número total de lugares (u objetos de captura) es al menos de aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:20, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1 o mayor.

En algunas realizaciones, como se ha indicado anteriormente, el porcentaje de lugares que contienen al menos una molécula de analito es menor de aproximadamente 50 %, menor de aproximadamente 40 %, menor de aproximadamente 30 %, menor de aproximadamente 20 %, menor de aproximadamente 10 %, menor de aproximadamente 5 %, menor de aproximadamente 2 %, menor de aproximadamente 1 %, menor de aproximadamente 0,5 %, menor de aproximadamente 0,01 % o menor, del número total de lugares (u objetos de captura). En algunas realizaciones, el porcentaje de lugares que no contienen ninguna molécula de analito (u objeto de captura asociado con la misma) es de al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos

aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % o mayor, del número total de lugares (u objetos de captura).

Los métodos y técnicas para dividir una pluralidad de moléculas o partículas de analito en una pluralidad de recipientes de reacción se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 12/731.130, titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects" de Duffy *et al.*, presentada el 24 de marzo de 2010 (N° de Expediente del Mandatario Q0052.70011US01); en la Solicitud de Patente Internacional N° (aún no determinado), titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects" de Duffy *et al.*, presentada el 1 de marzo de 2011 (N° de Expediente del Mandatario Q0052.70011WO00); en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20070259448, titulada "Methods and arrays for target analyte detection and determination of target analyte concentration in solution" de Walt *et al.*, presentada el 16 de febrero de 2007; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20070259385, titulada "Methods and arrays for detecting cells and cellular components in small defined volumes", de Walt *et al.*, presentada el 16 de febrero de 2007; en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20070259381, titulada "Methods and arrays for target analyte detection and determination of reaction components that affect a reaction" de Walt *et al.*, presentada el 16 de febrero de 2007; en la Solicitud de Patente de Internacional N° PCT/US07/019184, titulada "Methods for Determining The Concentration of an Analyte In Solution" de Walt *et al.*, presentada el 20 de agosto de 2007; y en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US09/005428, titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Enzymes" de Duffy *et al.*, presentada el 9 de septiembre de 2009.

En algunas realizaciones, los métodos de ensayo pueden comprender el uso de una pluralidad de objetos de captura. La pluralidad de objetos de captura (por ejemplo, perlas) puede configurarse para capturar una molécula o partícula de analito. En algunos casos, la pluralidad de objetos de captura comprende una pluralidad de perlas. Las perlas pueden ser o no magnéticas. Al menos una parte de los objetos de captura puede segregarse espacialmente en una pluralidad de lugares (por ejemplo, recipientes de reacción/pocillos). La pluralidad de moléculas de analito puede exponerse a una pluralidad de tipos de ligandos de unión antes de, simultáneamente con, o después de, la asociación de la pluralidad de las moléculas de analito con respecto a los componentes de captura. Diversos otros aspectos de métodos de ensayo usando dichos componentes de captura se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos del mismo solicitante, con N° de Serie 12/731.130, titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects" de Duffy *et al.*, presentada el 24 de marzo de 2010; y en la Solicitud de Patente Internacional N° (aún no determinado), titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects" de Duffy *et al.*, presentada el 1 de marzo de 2011 (N° de Expediente del Mandatario Q0052.70011WO00). Específicamente, los métodos y sistemas descritos en el presente documento pueden usarse en combinación con, y en contexto con, los métodos y sistemas de moléculas individuales, descritos en las solicitudes mencionadas anteriormente. En algunos casos, los propios objetos de captura pueden ser detectables (por ejemplo, emisión de fluorescencia), y las perlas pueden seleccionarse de tal manera que la detección de las perlas no interfiera o no interfiera sustancialmente con la detección de las moléculas de analito.

En algunas realizaciones, las moléculas de analito pueden detectarse directa o indirectamente. En el caso de detección directa, la molécula de analito puede comprender una molécula o resto que puede tratarse y/o detectarse directamente (por ejemplo, una entidad fluorescente). En el caso de detección indirecta, para determinar la presencia de la molécula de analito se usa un componente adicional. En algunos casos, las moléculas de analito pueden estar compuestas de un agente marcador precursor (por ejemplo, un sustrato enzimático) y el sustrato enzimático puede transformarse en un producto detectable (por ejemplo, una molécula fluorescente) después de la exposición a una molécula de analito. En algunos casos, la pluralidad de moléculas de analito puede exponerse a al menos un componente de reacción adicional antes de, simultáneamente con, y/o después de la separación espacial de al menos alguna de las moléculas de analito en una pluralidad de lugares. En algunos casos, una pluralidad de objetos de captura al menos algunos asociados con al menos una molécula de analito puede exponerse a una pluralidad de ligandos de unión. En determinadas realizaciones, un ligando de unión puede adaptarse para detectarse directamente (por ejemplo, el ligando de unión comprende una molécula o resto detectable) o puede adaptarse para detectarse indirectamente (por ejemplo, incluyendo un componente que pueda transformar un agente marcador precursor en un agente marcador), como se trata más adelante. En cualquier método de ensayo dado puede emplearse más de un tipo de unión, 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 puede asociarse con un primer tipo de molécula de analito y el segundo tipo de ligando de unión puede asociarse con el primer ligando de unión. En otro ejemplo, tanto un primer tipo de ligando de unión como un segundo tipo de ligando de unión pueden asociarse con el mismo o diferentes epítomos de una sola molécula de analito, como se describe en el presente documento.

Determinados ligandos de unión pueden comprender una entidad que puede facilitar la detección bien directa o indirectamente. Puede adaptarse un componente para detectarse 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 detección indirecta, por ejemplo, transformando un agente marcador precursor en un agente marcador (por ejemplo, un agente que se detecta en un ensayo). Un "agente marcador precursor" es cualquier molécula, partícula o similar que puede transformarse en un agente marcador después de la exposición a un agente de transformación adecuado (por ejemplo, un componente enzimático comprendido en un ligando de unión). Un "agente marcador" es cualquier molécula, partícula o similar, que facilite la detección, actuando como la

entidad detectada, usando una técnica de detección seleccionada.

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 transformar un agente marcador precursor (por ejemplo, un sustrato enzimático) en un agente marcador (por ejemplo un producto detectable). Una medida de la concentración de moléculas de analito en la muestra de líquidos puede después determinarse basándose, al menos en parte, en la determinación del número de lugares que contiene un agente marcador (por ejemplo, relacionando el número de lugares que contiene un agente marcador con el número de lugares que contiene una molécula de analito (o número de objetos de captura asociados con al menos una molécula de analito con respecto al número total de objetos de captura)). Como ejemplos no limitantes de enzimas o componentes enzimáticos se incluyen peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina. Otros ejemplos no limitantes de sistemas o métodos para la detección incluyen realizaciones en las que los precursores de ácidos nucleicos se reproducen en copias múltiples o se transforman en un ácido nucleico que puede detectarse fácilmente, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (RCA), ligamiento, Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles (LAMP), etc. Dichos sistemas y métodos serán conocidos por los expertos habituales en la técnica, por ejemplo, como se describe en "DNA Amplification: Current Technologies and Applications", Vadim Demidov *et al.* 2004.

Como un ejemplo de un método de ensayo que comprende el uso de un agente marcador precursor, como se muestra en la FIG. 8, se proporciona un sustrato 100 que comprende una pluralidad de lugares, en el que los lugares comprenden recipientes de reacción. En el recipiente de reacción 101 (por ejemplo, lugar), una molécula de analito 102 se inmoviliza con respecto a una perla 103 (por ejemplo, objeto de captura). El ligando de unión 104 se asocia con una molécula de analito 102. El ligando de unión 104 comprende un componente enzimático (no mostrado). El agente marcador precursor 106 se transforma en agente marcador 108 (después de la exposición al componente enzimático). El agente marcador 108 se detecta usando métodos descritos en el presente documento. Por otro lado, el recipiente de reacción 111 contiene una 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 comprenda un componente enzimático. Por lo tanto, el agente marcador precursor 114 no está transformado en un agente marcador en el recipiente de reacción. Por tanto este recipiente de reacción daría una señal diferente en comparación con el recipiente de reacción 101 en el que el agente marcador precursor se transformó en un agente marcador. En algunos casos, también puede haber recipientes de reacción que contengan una perla no asociada con una molécula de analito, por ejemplo, el recipiente de reacción 121 que contiene la perla 116. De manera adicional, 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 diferentes señales en comparación con el recipiente de reacción 101 ya que no hay ningún agente marcador. Sin embargo, los recipientes de reacción 121 y 123 pueden contener agente marcador precursor 117. En cualquier recipiente de reacción determinado puede haber más de un agente marcador precursor.

En determinadas realizaciones, pueden emplearse agentes marcadores precursores disueltos o suspendidos, en las que los agentes marcadores precursores se transforman en agentes marcadores que son insolubles en el líquido y/o que comienzan a inmovilizarse dentro/cerca del lugar (por ejemplo, dentro del recipiente de reacción en el que se forma el agente marcador). Dichos agentes marcadores precursores y agentes marcadores y su uso se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos del mismo solicitante N° de Serie 12/236.484, presentada el 23 de septiembre de 2008, titulada "High Sensitivity Determination of the Concentration of Analyte molecules in a Fluid Sample", de Duffy *et al.*

En algunas realizaciones, pueden usarse técnicas que impidan o reduzcan la disociación de una molécula de analito de un componente de captura y/u objeto de captura y/o que impidan o reduzcan la disociación de un ligando de unión de una molécula de analito y/u otro ligando de unión. Como sabrán los expertos habituales en la técnica, algunas 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 regidas por termodinámica. Por consiguiente, en algún punto durante determinados métodos de ensayo, puede producirse alguna 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 lugar a una reducción del número de moléculas de analito (por ejemplo, complejos inmunitarios) que se detectan que están realmente presentes. La constante de disociación de un par de componentes en particular (por ejemplo, pares de anticuerpo-antígeno), el lavado y/o la exposición de líquidos, el tiempo entre la exposición y el análisis, y/u otros factores, pueden afectar el grado al cual un evento de disociación altera la determinación de las moléculas y/o partículas de analito. En consecuencia, pueden usarse ciertas técnicas para reducir los efectos de los procesos de disociación.

En una primera realización, la disociación puede reducirse o eliminarse retirando líquido de los lugares del ensayo (por ejemplo, pocillos) después de la segregación espacial de una pluralidad de moléculas de analito (por ejemplo, asociadas con un objeto de captura mediante un componente de captura y/o asociadas con al menos un ligando de unión) en una pluralidad de dichos lugares. Es decir, puede retirarse todo o sustancialmente todo el líquido circundante o sustancialmente contenido dentro de los lugares o en los lugares. Por ejemplo, el líquido puede retirarse con aire y/o con secado al vacío. La retirada de líquido puede reducir o eliminar la disociación.

Inmediatamente antes de analizar los lugares, puede añadirse un líquido en los lugares rehidratando de este modo los complejos para facilitar el análisis usando un detector.

5 En una segunda realización, la disociación puede reducirse o eliminarse entrecruzando una molécula de analito con un componente de captura y/o entrecruzando un ligando de unión con una molécula de analito y/o con un segundo ligando de unión. Por ejemplo, una molécula de analito que comprende un antígeno puede entrecruzarse con un ligando de unión y/o componente de captura que comprende un anticuerpo. Los expertos habituales en la técnica conocen métodos y técnicas de entrecruzamiento que pueden emplearse.

10 En algunas realizaciones, puede tratarse una pluralidad de lugares y/o puede detectarse una pluralidad de objetos y/o especies/moléculas/partículas de captura de interés, sustancialmente de manera simultánea. Cuando en este contexto se usa la frase "sustancialmente de manera simultánea" se refiere al tratamiento/detección de los lugares/objetos /especies/moléculas/partículas de captura de interés aproximadamente al mismo tiempo, de tal manera que se solapan los periodos de tiempo durante los cuales al menos dos lugares/objetos /especies/moléculas/partículas de captura de interés se tratan/detectan, en lugar de tratarse/detectarse secuencialmente, donde no lo harían. El tratamiento/detección simultáneo(a) puede realizarse usando diversas técnicas, incluyendo técnicas ópticas (por ejemplo, detector CCD). La segregación espacial de objetos /especies/moléculas/partículas de captura en una pluralidad de lugares distintos, determinables, de acuerdo con algunas realizaciones, facilita sustancialmente la detección simultánea permitiendo tratar múltiples lugares sustancialmente de manera simultánea. Por ejemplo, para realizaciones en las que especies/moléculas/partículas individuales están asociadas con objetos de captura que están espacialmente segregados con respecto a los otros objetos de captura en una pluralidad de lugares distintos, determinables por separado, durante la detección, el tratamiento sustancialmente de manera simultánea de la pluralidad de lugares distintos, determinables por separado, permite resolver objetos de captura individuales y por tanto especies/moléculas/partículas individuales (por ejemplo, moléculas de analito). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, moléculas/partículas individuales se separan de una pluralidad de moléculas/partículas a través de una pluralidad de recipientes de reacción de tal manera que cada recipiente de reacción no contiene ninguna o solo contiene una especie/molécula/partícula. En algunos casos, durante la detección, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99%, al menos aproximadamente el 99,5% de todas las especies/moléculas/partículas están separadas espacialmente con respecto a las otras especies/moléculas/partículas. Una pluralidad de especies/moléculas/partículas puede detectarse sustancialmente de manera simultánea dentro de un periodo de tiempo de menos de aproximadamente 1 segundo, menos de aproximadamente 500 milisegundos, menos de aproximadamente 100 milisegundos, menos de aproximadamente 50 milisegundos, menos de aproximadamente 10 milisegundos, menos de aproximadamente 1 milisegundo, menos aproximadamente 500 microsegundos, menos de aproximadamente 100 microsegundos, menos de aproximadamente 50 microsegundos, menos de aproximadamente 10 microsegundos, menos de aproximadamente 1 microsegundo, menos de aproximadamente 0,5 microsegundos, menos de aproximadamente 0,1 microsegundos o menos de aproximadamente 0,01 microsegundos, menos de aproximadamente 0,001 microsegundos o menos. En algunas realizaciones, la pluralidad de especies/moléculas/partículas puede detectarse sustancialmente de manera simultánea dentro de un periodo de entre aproximadamente 100 microsegundos y aproximadamente 0,001 microsegundos, entre aproximadamente 10 microsegundos y aproximadamente 0,01 microsegundos o menos.

45 En algunas realizaciones, los lugares se analizan ópticamente. Los lugares que presentan cambios en su firma óptica pueden identificarse mediante un tren óptico convencional y un sistema de detección óptico. Dependiendo de las especies detectadas (por ejemplo, tipo de entidad de fluorescencia, etc.) y de las longitudes de ondas operativas, pueden emplearse filtros ópticos diseñados para una longitud de onda particular para el análisis óptico de los lugares. En realizaciones en las que se usa un análisis óptico, el sistema puede comprender más de una fuente lumínica y/o una pluralidad de filtros para ajustar la longitud de onda y/o la intensidad de la fuente lumínica. En algunas realizaciones, la señal óptica de una pluralidad de lugares se captura usando una cámara CCD.

Otros ejemplos no limitantes de tipos de formación de imágenes con cámaras que pueden usarse para capturar imágenes incluyen dispositivos de inyección de carga (CID), dispositivos semiconductores de óxidos metálicos complementarios (CMOS), dispositivos CMOS científicos (sCMOS) y dispositivos de integración de retraso temporal (TDI) como sabrán los expertos habituales en la técnica. La cámara puede obtenerse de un proveedor comercial. Los CID son dos dispositivos de formación de imágenes multi-píxel dimensionales, en estado sólido, similares a las CCD, pero se diferencian en cómo se capturan y se leen las imágenes. Para ejemplos de CCD, véanse las Patentes de Estados Unidos Nos 3.521.244 y 4.016.550. Los dispositivos CMOS también son dispositivos de formación de imágenes en estado sólido, bidimensionales pero se diferencian de las matrices CCD convencionales en cómo se recoge y se lee la carga. Los píxeles están integradas en una plataforma de tecnología de semiconductores que fabrica transistores CMOS permitiendo así un aumento significativo en la señal de electrónica de lectura sustancial y electrónica de corrección significativa construida en el dispositivo. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.883.83). Los dispositivos sCMOS comprenden tecnología de formación de imágenes CMOS con determinadas mejoras tecnológicas que permiten una sensibilidad y un rango dinámico excelentes. Los dispositivos TDI emplean un dispositivo CCD que permite que las columnas de píxeles se desplacen dentro y adyacentes a una columna y

5 permiten que siga entrando luz. Este tipo de dispositivo se usa típicamente de tal manera que el desplazamiento de la columna de píxeles es sincrónico con el movimiento de la imagen que se introduce de tal manera que puede integrarse una imagen en movimiento durante una cantidad de tiempo significativa y el movimiento relativo de la imagen en la cámara no lo desenfoca. En algunas realizaciones, para la formación de imágenes puede usarse un sistema de espejos de barrido acoplado con un fotodiodo o tubo fotomultiplicador (PMT)

10 En una realización, la pluralidad de lugares se forma directamente como una pluralidad de recipientes de reacción en un extremo de un haz de fibra óptica. De acuerdo con una realización, la matriz de recipientes de reacción para la presente invención puede usarse junto con un sistema de detección óptico tal como el sistema descrito en la Publicación de Estados Unidos N° 20030027126. Por ejemplo, de acuerdo con una realización, la matriz de recipientes de reacción de la presente invención se forma en un extremo de un ensamblaje de fibra óptica que comprende un haz de fibra óptica construido de fibras revestidas de tal manera que la luz no se mezcla entre las fibras.

15 Las FIGS. 9A y 9B muestran ejemplos no limitantes de un sistema de la presente invención de acuerdo con algunas realizaciones. El sistema comprende una fuente lumínica 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 emitida desde la fuente lumínica 452 pasa a través del filtro de excitación 454. La luz que se refleja del espejo dicromático 458, pasa a través del objetivo 470 y brilla en la matriz 472. En algunos casos, la luz dispersa 464 puede reducirse mediante una función reductora de luz dispersa 468, tal como un iris o apertura. La luz 471 emitida de la matriz pasa a través del objetivo 470 y del filtro de emisión 460. La luz 462 se observa. El sistema puede comprender componentes adicionales (por ejemplo, filtros, espejos, dispositivos de aumento, etc. adicionales) según sea necesario para aplicaciones particulares, como entenderán los expertos habituales en la técnica.

25 El sistema mostrado en la FIG. 9A 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, pueden usarse componentes adicionales para determinar el número total de lugares y/o proporcionar información espacial con respecto a la posición de los lugares (por ejemplo, que contengan o que no contengan un objeto de captura), que pueden ayudar a corroborar señales observadas con diferentes regímenes de luz (por ejemplo, fluorescencia, luz blanca) correspondiente con la posición de un lugar (por ejemplo, puede crearse una máscara).

35 En las FIGS. 9A y 9B, la luz de excitación se emite desde la fuente 452 y colima en un haz 453. El filtro de excitación 454 puede configurarse para transmitir únicamente la banda de longitud de onda que excita el fluoróforo (por ejemplo, 575 nm +/- 10 nm para la resorufina). 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 reflejada se recoge por las lentes del objetivo 470, coliman en un haz 471 y se transmiten a través del filtro dicróico 458. Solo la luz reflejada correspondiente a la banda de longitud de onda de fluorescencia (por ejemplo, 670 +/- 30 nm para la resorufina) se transmite a través del filtro de emisión 460. El haz colimado 462 restante solo contiene las longitudes de onda de fluorescencia emitidas que posteriormente formarán la imagen a través del sistema de la cámara.

45 Para determinar el posicionamiento de los lugares que contienen la muestra (por ejemplo, recipientes de reacción) puede usarse el mismo sistema. La matriz que comprende los recipientes de reacción que contiene objetos de captura puede iluminarse con una iluminación de luz blanca de "campo brillante". La matriz puede iluminarse (por ejemplo, usando la fuente lumínica 475 mostrada en la FIG. 9A) dirigiendo una luz blanca pseudo-colimada (por ejemplo, LED de luz blanca) sobre la superficie de la matriz desde un ángulo (por ejemplo, el ángulo θ_1 en la FIG. 9A puede ser de aproximadamente 20 grados, de aproximadamente 25 grados, de aproximadamente 30 grados, de aproximadamente 35 grados, de aproximadamente 40 grados, o más) justo fuera de la apertura numérica del objetivo de recogida. La luz que incide en la superficie de la matriz 472 (por ejemplo, luz 476) se refleja (y se dispersa) fuera de la superficie, colima 471, y la recoge la lente del objetivo (470). Posteriormente, el haz colimado se forma como imagen a través del sistema de cámara.

55 También puede usarse el mismo sistema para determinar qué lugares contienen un objeto de captura (por ejemplo, perla). Cualquier perla particular puede asociarse o no con una molécula de analito y/o ligando de unión. La matriz puede iluminarse (por ejemplo, usando una fuente lumínica 473 como se muestra en la FIG. 9A) con una iluminación de luz blanca de "campo oscuro". La matriz puede iluminarse apuntando una luz blanca pseudo-colimada (por ejemplo, LED de luz blanca 473) sobre la superficie de la matriz desde un ángulo (por ejemplo, el ángulo θ_2 en la FIG. 9A es de aproximadamente 65 grados, de aproximadamente 70 grados, de aproximadamente 75 grados, de aproximadamente 80 grados, de aproximadamente 85 grados) sustancialmente fuera de la apertura numérica del objetivo de recogida. La luz que incide en la superficie de la matriz 472 (por ejemplo, luz 474), se refleja (y se dispersa) fuera de la superficie, colima 471 y la recoge la lente del objetivo 470. Posteriormente el haz colimado se forma como imagen mediante el sistema de cámara.

65 En algunas realizaciones, puede emplearse un sistema de detección óptico, por ejemplo, como se describe en la Publicación de Estados Unidos N° 2003/0027126. En un sistema ejemplar, la luz que regresa desde una matriz de recipientes de reacción formada en el extremo distal de un haz de fibra óptica se altera mediante el uso de un

cambiador de aumento para permitir el ajuste del tamaño de la imagen del extremo proximal o distal de la fibra. La imagen ampliada se obtura después y se filtra mediante una rueda obturadora. Después, la imagen la captura la cámara de dispositivo de carga acoplado (CCD). Puede proporcionarse un ordenador que incluya y ejecute un programa informático de procesamiento de imágenes para procesar la información de la cámara CCD y también puede configurarse ópticamente para controlar las ruedas obturadoras y del filtro. Como se representa en la Publicación de Estados Unidos N° 20030027126, el extremo proximal del haz es recibido por una fase de desplazamiento z y un microposicionador x-y.

Por ejemplo, la FIG. 10 muestra un diagrama de bloques esquemático de un sistema que emplea un ensamblaje 400 de fibra óptica con un sistema de detección óptico. El ensamblaje 400 de fibra óptica que comprende un haz de fibra óptica o matriz 402 se construye a partir de fibras revestidas de tal manera que la luz no se mezcla entre las fibras. Una matriz de recipientes de reacción 401 se forma a/se conecta al extremo distal del haz 412, estando el extremo proximal 414 conectado operativamente con una fase de desplazamiento z 416 y microposicionador x-y 418. Estos dos componentes actúan conjuntamente para colocar adecuadamente el extremo proximal 414 del haz 402 para una lente del objetivo 420 de un microscopio. La luz recogida por la lente del objetivo 420 pasa a una conexión de fluorescencia de luz reflejada con tres deslizadores de puntero de cubo 422. La conexión 422 permite que la luz se dirija desde una lámpara de Xe de 75 Vatios 424 través de la lente del objetivo 420 para acoplarse en el haz de la fibra 402. La luz de la fuente 424 se condensa mediante lentes de condensación 426, después se filtra y/o se dispersa por la rueda de filtro y obturadora 428, y posteriormente pasa a través de un deslizador de filtro ND 430. La luz que regresa desde el extremo distal 412 del haz 402 pasa a través de la conexión 422 a un cambiador de aumento 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 dispersa después y se filtra mediante una segunda rueda 434. La luz se recoge mediante una cámara de dispositivo de carga acoplado (CCD) 436. Un ordenador 438 ejecuta el programa informático de procesamiento de imágenes para procesar la información desde la cámara CCD 436 y también opcionalmente controla otros componentes del sistema, incluyendo pero sin limitación la primera y segunda ruedas obturadora y de filtro 428, 434. Una matriz de recipientes de reacción usada para la realización práctica de algunas realizaciones de la presente invención puede estar integrada con o estar acoplada al extremo distal del haz de fibra óptico usando una diversidad de procesos compatibles. En algunos casos, se forman micro pocillos en el centro de cada fibra individual del haz de fibra óptica y los micropocillos pueden o no sellarse. Cada fibra óptica del haz de fibra óptica puede transmitir la luz desde el único micropocillo formado en el centro del extremo distal de la fibra. Esta característica permite analizar la firma óptica de recipientes de reacción individuales para identificar relaciones/contenidos en cada micropocillo. Por consiguiente, recogiendo la imagen del extremo del haz con la matriz CCD, las firmas ópticas de los recipientes de reacción pueden analizarse individualmente y/o formarse imágenes sustancialmente de manera simultánea.

La pluralidad de lugares puede formarse usando cualquier técnica adecuada. En algunas realizaciones, la pluralidad de lugares comprende una pluralidad de recipientes de reacción/pocillos en un sustrato. Los recipientes de reacción, en determinadas realizaciones, pueden configurarse para recibir y contener únicamente un solo objeto de captura.

En algunas realizaciones de la presente invención, la pluralidad de recipientes de reacción puede sellarse (por ejemplo, después de la introducción de moléculas de analito, ligandos de unión y/o agente marcador precursor), por ejemplo, haciendo coincidir el segundo sustrato y un componente de sellado. El sellado de los recipientes de reacción puede ser tal que el contenido de cada recipiente de reacción no puede salir del recipiente de reacción durante el resto del ensayo. En algunos casos, los recipientes de reacción pueden sellarse después de la adición de las moléculas de analito y, opcionalmente, al menos un tipo de agente marcador precursor para facilitar la detección de las moléculas de analito. Para realizaciones que empleen agentes marcadores precursores, sellando el contenido en algunos o en cada recipiente de reacción, puede realizarse una reacción que produzca los agentes marcadores detectables dentro de los recipientes de reacción sellados, produciendo de este modo una cantidad detectable de agentes marcadores que se retiene en el recipiente de reacción para los propósitos de detección.

La pluralidad de lugares que comprende una pluralidad de recipientes de reacción puede formarse usando una diversidad 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 puede formarse haciendo coincidir un componente de sellado que comprende una pluralidad de depresiones con un sustrato que puede tener una superficie sin características o incluir depresiones alineadas con las del componente de sellado. Cualquiera de los componentes del dispositivo, por ejemplo, el sustrato o componente de sellado, puede fabricarse a partir de un material adaptable, por ejemplo, un material polimérico elastomérico, para ayudar en el sellado. Las superficies pueden ser, o pueden fabricarse para que sean, hidrófobas o para contener regiones hidrófobas que minimicen el filtrado de las muestras acuosas de los micropocillos.

En algunos casos, el componente de sellado puede ser capaz de poner en contacto la superficie exterior de una serie de micropocillos (por ejemplo, el revestimiento de un haz de fibra óptica como se describe con más detalle a continuación) de tal manera que cada recipiente de reacción comienza a sellarse o aislarse de tal manera que los contenidos de cada recipiente de reacción no puede salir del recipiente de reacción. De acuerdo con una realización, el componente de sellado puede ser una junta elastomérica de silicona que puede colocarse contra una matriz de micropocillos con aplicación de presión sustancialmente uniforme a través de todo el sustrato. En algunos casos, los

recipientes de reacción pueden sellarse después de la adición de la pluralidad de objetos de captura usados para la captura del analito y, opcionalmente cualquier molécula de agente marcador precursor que pueda usarse para facilitar la detección de la molécula de analito.

5 Un ejemplo no limitante de la formación de una pluralidad de recipientes de reacción que contenga la solución de ensayo sobre/en un sustrato se representa en la FIG. 11. La FIG. 11, panel (A) muestra una superficie comprende una pluralidad de micropocillos 139, que se ha expuesto a una solución de ensayo 141 (por ejemplo, una solución que contiene las moléculas de analito), y un componente de sellado 143. En este ejemplo, el componente de sellado 143 comprende una superficie inferior sustancialmente plana. La coincidencia de sustrato 139 con el componente de sellado 143 forma una pluralidad de recipientes de reacción sellados 145. Las áreas entre los recipientes de reacción 148 pueden modificarse para ayudar a la formación de un sello hermético entre los recipientes de reacción.

10 En la FIG. 11 se muestra una segunda realización, panel (B), en el que componente de sellado 162 comprende una pluralidad de micro pocillos 163 que coincide con una superficie sustancialmente plana 158 que se ha expuesto a la solución de ensayo 162, formando de este modo una pluralidad de recipientes de reacción 164.

15 En la FIG. 11 se muestra una tercera realización, panel (C), la superficie sustrato 166 que comprende una pluralidad de micropocillos 167 se hace coincidir con el componente de sellado 170 que también comprende una pluralidad de micropocillos 171. En esta realización, los micro pocillos en el sustrato y los micropocillos en los componentes de sellado se alinean sustancialmente de manera que cada recipiente de reacción 172 formado comprende una parte de micropocillo desde el componente de sellado y una parte de un micro pocillo desde el sustrato. En la FIG. 11, panel (D), los micro pocillos no están alineados de tal manera que cada recipiente de reacción comprende un micropocillo del componente de sellado 173 o un micro pocillo del sustrato 175.

20 El componente de sellado puede tener esencialmente el mismo tamaño que el sustrato o puede tener diferente tamaño. En algunos casos, el componente de sellado tiene aproximadamente el mismo tamaño que el sustrato y coincide sustancialmente con toda la superficie del sustrato. En otros casos, como se representa en la FIG. 11, panel (E), el componente de sellado 176 es más pequeño que el del sustrato 174 y el componente de sellado solo coincide con una parte 178 del sustrato. En otra realización adicional, como se representa en la FIG. 11, panel (F), el componente de sellado 182 es más grande que el sustrato 180, y solamente una parte 184 del componente de sellado coincide con el sustrato 180.

25 En algunas realizaciones, todos los recipientes de reacción pueden tener aproximadamente el mismo volumen. En otras realizaciones, los recipientes de reacción pueden tener diferentes volúmenes. El volumen de cada recipiente de reacción individual puede seleccionarse para que sea apropiado para facilitar cualquier protocolo de ensayo particular. Por ejemplo, en un conjunto de realizaciones en el que es deseable limitar el número de objetos de captura usado para la captura del analito contenido en cada recipiente con respecto a un número más pequeño, el volumen de los recipientes de reacción puede variar de atolitros o menor a nanolitros o más dependiendo de la naturaleza de los objetos de captura, de la técnica de detección y del equipo empleados, del número y densidad de los pocillos en el sustrato y de la concentración esperada de los objetos de captura en el líquido aplicado al sustrato que contiene los pocillos. En una realización, el tamaño del recipiente de reacción puede seleccionarse de tal manera que tan solo un único objeto de captura usado para la captura del analito pueda estar completamente contenido dentro del recipiente de reacción (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 12/731.130, titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects" de Duffy *et al.*, presentada el 24 de marzo de 2010; o la Solicitud de Patente Internacional N° (aún no determinado), titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules or Particles using Beads or Other Capture Objects" de Duffy *et al.*, presentada el 1 de marzo de 2011 (N° de Expediente del Mandatario Q0052.70011WO00)).

30 De acuerdo con una realización de la presente invención, los recipientes de reacción pueden tener un volumen entre aproximadamente 1 femtolitro y aproximadamente 1 picolitro, entre aproximadamente 1 femtolitro y aproximadamente 100 femtolitros, entre aproximadamente 10 attolitros y aproximadamente 100 picolitros, entre aproximadamente 1 picolitro y aproximadamente 100 picolitros, entre aproximadamente 1 femtolitro y aproximadamente 1 picolitro, o entre aproximadamente 30 femtolitros y aproximadamente 60 femtolitros. En algunos casos, los recipientes de reacción tienen un volumen de menos de aproximadamente 1 picolitro, menos de aproximadamente 500 femtolitros, menos de aproximadamente 100 femtolitros, menos de aproximadamente 50 femtolitros, o menos de aproximadamente 1 femtolitro. En algunos casos, los recipientes de reacción tienen un volumen de aproximadamente 10 femtolitros, aproximadamente 20 femtolitros, aproximadamente 30 femtolitros, aproximadamente 40 femtolitros, aproximadamente 50 femtolitros, aproximadamente 60 femtolitros, aproximadamente 70 femtolitros, aproximadamente 80 femtolitros, aproximadamente 90 femtolitros o aproximadamente 100 femtolitros.

35 El número total de lugares y/o la densidad de los lugares empleados en un ensayo (por ejemplo, el número/densidad de recipientes de reacción en una matriz) puede depender de la composición y del uso final de la matriz. Por ejemplo, el número de recipientes de reacción empleado puede depender del número de tipos de molécula de analito y/o ligando de unión empleado, del intervalo de concentración que se sospecha del ensayo, del método de detección, del tamaño de los objetos de captura, del tipo de entidad de detección (por ejemplo, agente sin marcador

en solución, agente con marcador de precipitación, etc.). Pueden prepararse matrices que contengan de aproximadamente 2 a muchos billones de recipientes de reacción (o un número total de recipientes de reacción) utilizando una variedad de técnicas y materiales. El aumento del número de recipientes de reacción en la matriz puede usarse para aumentar el intervalo dinámico de un ensayo o para permitir muestras múltiples o tipos múltiples de moléculas analito a ensayar en paralelo. La matriz puede comprender entre un millar 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 aproximadamente 1.000 y aproximadamente 50.000, entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 1.000.000, entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 10.000, entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 100.000, entre aproximadamente 100.000 y aproximadamente 1.000.000, entre aproximadamente 100.000 y aproximadamente 500.000, entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 100.000, entre aproximadamente 50.000 y aproximadamente 100.000, entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 80.000, entre aproximadamente 30.000 y aproximadamente 70.000, entre aproximadamente 40.000 y aproximadamente 60.000 recipientes de reacción. En algunas realizaciones, la matriz puede comprender aproximadamente 10.000, aproximadamente 20.000, aproximadamente 50.000, aproximadamente 100.000, aproximadamente 150.000, aproximadamente 200.000, aproximadamente 300.000, aproximadamente 500.000, aproximadamente 1.000.000 o más, recipientes de reacción.

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

En algunas realizaciones, los recipientes de reacción se forman en un material sólido. Como apreciarán los expertos en la técnica, el número de materiales posiblemente adecuados en los que los recipientes de reacción pueden formarse es muy grande, e incluye, pero sin limitación, vidrio (incluyendo vidrio modificado y/o funcionalizado), plásticos (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, copolímero de olefina cíclica (COC), polímero de olefina cíclica (COP), Teflon[®], polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, etc.), elastómeros (tal como poli(dimetil siloxano) y poliuretanos), materiales compuestos, cerámicas, sílice o materiales basados en sílice (que incluyen sílicona y sílicona modificada), carbono, metales, haces de fibra óptica o similares. En general, el material sustrato puede seleccionarse para permitir la detección óptica sin autofluorescencia apreciable. En determinadas realizaciones, los recipientes de reacción pueden formarse en un material flexible.

Puede formarse un recipiente de reacción en un una superficie (por ejemplo, sustrato o componente de sellado) usando una variedad de técnicas conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitación, fotolitografía, técnicas de estampado, técnicas de moldeado, técnicas de grabado o similar. Como se apreciarán los expertos habituales en la materia, la técnica usada puede depender de la composición y forma del material de soporte y del tamaño y número de los recipientes de reacción.

En una realización particular, se forma una serie de recipientes de reacción creando micropocillos en un extremo de un haz de fibra óptica y utilizando una superficie adaptable plana como componente de sellado. En determinadas de dichas realizaciones, una matriz de recipientes de reacción en el extremo de un haz de fibra óptica puede formarse de la siguiente manera. Primero, se graba una matriz de micropocillos en el extremo de un haz de fibra óptica pulida. Las técnicas y materiales para formar y grabar un haz de fibra óptica son conocidas por los expertos habituales en la materia. Por ejemplo, el diámetro de las fibras ópticas, la presencia, el tamaño y la composición del núcleo y las regiones revestidas de la fibra, y la profundidad y especificidad del grabado pueden variar mediante la técnica de grabado seleccionada de tal manera que pueden formarse micropocillos de un volumen deseado. En determinadas realizaciones, el proceso de grabado crea micro pocillos grabando preferencialmente el material núcleo de las fibras de vidrio individuales en el haz de tal manera que cada pocillo se alinea aproximadamente con una sola fibra y se aísla de pocillos adyacentes mediante el material de revestimiento. Las posibles ventajas del formato de matriz de fibra óptica son que pueden producirse de miles a millones de recipientes de reacción sin procedimientos de microfabricación complicados y que se puede mejorar la capacidad de observar y tratar ópticamente muchos recipientes de reacción de manera simultánea.

Cada micro pocillo puede alinearse con una fibra óptica en el haz de manera que el haz de fibra óptica puede llevar luz tanto de excitación como de emisión y desde los pocillos, permitiendo un análisis remoto del contenido de los pocillos. Adicionalmente, una matriz de fibras ópticas puede proporcionar la capacidad de excitación simultánea o no simultánea de moléculas en recipientes adyacentes, sin señal de "interferencia" entre fibras. Es decir, la luz de excitación transmitida en una fibra no escapa a una fibra colindante.

De manera alternativa, pueden fabricarse estructuras equivalentes de una pluralidad de recipientes de reacción usando otros métodos y materiales que no utilicen los extremos de un haz de fibra óptica como sustrato. Por ejemplo, la matriz puede ser un sustrato, moteado, imprimido o fabricado con fotolitografía producido por técnicas conocidas en la materia, véanse, por ejemplo, los documentos WO95/25116; WO95/35505; PCT US98/09163; Patentes de Estados Unidos N° 5.700.637, 5.807.522, 5.445.934, 6.406.845 y 6.482.593. En algunos casos, la matriz puede producirse usando moldeado, grabado en relieve y/o técnicas de grabado como sabrán los expertos

habituales en la técnica.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un sistema dotado de una plataforma mecánica que aplica un componente de sellado a un sustrato. La plataforma puede colocarse por debajo de un nivel en el sistema. Después de haber añadido los componentes de reacción seleccionados a una matriz de recipientes de reacción, el componente de sellado puede acoplarse con la matriz. Por ejemplo, el componente de sellado puede intercalarse 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.

En la FIG. 12A se ilustra una realización no limitante. Un componente de sellado 300 se coloca en la parte superior de la plataforma mecánica 302. La solución de ensayo 304 se coloca en la parte superior del componente de sellado 300. La plataforma mecánica se mueve hacia arriba contra la matriz 306 (por ejemplo, matriz de fibra óptica) de tal manera que se aplica presión uniforme. Como se observa en la FIG. 12B, el componente de sellado 300 forma un sello hermético con la matriz 306. En otros casos, pueden aplicarse diversas presiones al componente de sellado para formar un sello hermético entre el componente de sellado y la matriz. El sistema también puede comprender componentes adicionales 312 que pueden utilizarse para analizar la matriz (por ejemplo, microscopio, ordenador, etc.) como se trata con más detalle en el presente documento.

En algunas realizaciones, la pluralidad de lugares puede no comprender una pluralidad de recipientes de reacción/pocillos. Por ejemplo, en realizaciones en las que se emplean objetos de captura, puede emplearse una superficie plana sustancialmente modelada y las áreas modeladas forman una pluralidad de lugares. En algunos casos, las áreas modeladas pueden comprender superficies sustancialmente hidrófilas que están sustancialmente rodeadas por superficies sustancialmente hidrófobas. En determinadas realizaciones, una pluralidad de objetos de captura (por ejemplo, perlas) pueden estar sustancialmente rodeadas por un medio sustancialmente hidrófilo (por ejemplo, que comprende agua), y las perlas pueden exponerse a la superficie modelada de tal manera que las perlas se asocian en las áreas modeladas (por ejemplo, los lugares hidrófilos en la superficie), segregando de este modo espacialmente la pluralidad de perlas. Por ejemplo, en una realización de este tipo, un sustrato puede ser o incluir un gel u otro material capaz de proporcionar una barrera suficiente para transportar masa (por ejemplo, una barrera convectiva y/o difusional) para impedir que los objetos de captura usados para la captura del analito y/o del agente marcador precursor y/o agente marcador se desplacen de un lugar sobre o en el material a otro lugar de manera que se produce una interferencia o diafonía entre lugares espaciales que contienen diferentes objetos de captura durante el intervalo de tiempo necesario para tratar los lugares y completar el ensayo. Por ejemplo, en una realización, una pluralidad de objetos de captura se separa espacialmente dispersando los objetos de captura en y/o en un material de hidrogel. En algunos casos, en el hidrogel puede haber ya un agente marcador precursor, facilitando de este modo el desarrollo de una concentración local del agente marcador (por ejemplo, tras la exposición a un agente de unión o molécula de analito que lleva un componente enzimático). Como aún además en otras realizaciones, los objetos de captura pueden confinarse en uno o más capilares. En algunos casos, la pluralidad de objetos de captura puede absorberse o localizarse en un sustrato poroso o fibroso, por ejemplo, papel de filtro. En algunas realizaciones, los objetos de captura pueden segregarse espacialmente sobre una superficie uniforme (por ejemplo, una superficie plana), y los objetos de captura pueden detectarse usando agentes marcadores precursores que se transforman en agentes marcadores sustancialmente insolubles o en precipitación que permanecen localizados en o cerca del lugar en el que se localiza el correspondiente objeto de captura. El uso de dichos agentes marcadores sustancialmente insolubles o en precipitación se describe en el presente documento. En algunos casos, moléculas de analito individuales pueden segregarse espacialmente en una pluralidad de gotitas. Es decir, moléculas de analito individuales pueden estar sustancialmente contenidas en una gotita que contiene un primer líquido. La gotita puede estar sustancialmente rodeada por un segundo líquido, en el que el segundo líquido es sustancialmente inmiscible con el primer líquido.

En algunas realizaciones, durante el ensayo, puede realizarse al menos una etapa de lavado. En determinadas realizaciones, la solución de lavado se selecciona para que no produzca un cambio apreciable en la configuración de los objetos de captura y/o moléculas analito y/o no altere 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 solución de lavado puede ser una solución que se selecciona para que interaccione químicamente con uno o más componentes del ensayo. Como entenderán los expertos habituales en la técnica, puede realizarse una etapa de lavado en cualquier momento apropiado durante los métodos de la invención. Por ejemplo, una pluralidad de objetos de captura puede lavarse después de exponer los objetos de captura a una o más soluciones que comprenden moléculas de analito, ligandos de unión, agentes marcadores precursores o similares. Como otro ejemplo, después de la inmovilización de las moléculas de analito con respecto a una pluralidad de objetos de captura, la pluralidad de objetos de captura puede someterse a una etapa de lavado retirando así cualquier molécula de analito no específicamente inmovilizada con respecto a un objeto de captura.

Sistemas analizadores

La invención también implica un sistema para determinar una medida de la concentración de moléculas o partículas de analito en una muestra líquida configurada para realizar al menos algunas de las etapas del ensayo y/o etapas de procesamiento de señales/datos descritas anteriormente.

Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la invención implica un sistema para determinar una medida de la concentración de moléculas o partículas de analito en una muestra líquida, que comprende un sustrato de ensayo que comprende una pluralidad de lugares, comprendiendo cada uno de ellos, una superficie de unión formando o
 5 conteniendo en el interior dichos lugares, en el que al menos una superficie de unión comprende al menos una molécula o partícula de analito inmovilizada en la superficie de unión, al menos un detector configurado para tratar una pluralidad de los lugares y capaz de producir al menos una señal indicativa de la presencia o ausencia de una molécula o partícula de analito en cada lugar tratado y que tiene una intensidad que varía con el número de moléculas o partículas de analito en cada localización y al menos un procesador de señales configurado para
 10 determinar desde la al menos una señal, el porcentaje de los lugares que contienen al menos una molécula o partícula de analito, y adicionalmente configurado para, basándose en el porcentaje, determinar una medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra líquida basada al menos en parte en el número de lugares que contienen al menos una molécula o partícula de analito, o determinar una medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra líquida basándose al menos en parte en un nivel de intensidad de al menos una señal indicativa de la presencia de una pluralidad de moléculas o partículas de analito.

En determinadas realizaciones de este tipo, el procesador de señales puede comprender o formar parte del ordenador 438 ilustrado en la FIG. 10. El procesador de señales/ordenador pueden formar parte de, o estar acoplados en asociación operativa, con los restantes componentes del sistema y, en algunas realizaciones, configurarse y/o programarse para controlar y ajustar parámetros operativos del sistema así como analizar y calcular valores, como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el procesador de señales/ordenador puede enviar y recibir señales de control para establecer y/o controlar parámetros operativos de los restantes componentes del sistema. En otras realizaciones, el procesador de señales/ordenador puede estar separado de y/o localizarse remotamente con respecto a los restantes componentes del sistema y puede configurarse para recibir datos de uno o más de los restantes componentes del sistema a través de medios indirectos y/o portátiles, tales como dispositivos de almacenamiento de datos electrónicos portátiles, tal como discos magnéticos, o mediante comunicación a través de una red informática, tal como Internet o una intranet local.

El procesador de señales/ordenador puede incluir diversos componentes y circuitos conocidos, incluyendo una unidad de procesamiento (es decir, procesador), un sistema de memoria, dispositivos de entrada y salida e interfaces (por ejemplo, un mecanismo de interconexión), así como otros componentes, tales como circuitos de transporte (por ejemplo uno o más buses), un subsistema de entrada/salida (E/S) de datos de video y audio, un soporte físico (*hardware*) para fines especiales, así como otros componentes y circuitos, como se describe más adelante con más detalle. Además, el procesador de señales/ordenador puede ser un sistema de ordenador multiprocesador o puede incluir ordenadores múltiples conectados sobre una red de ordenador.

El procesador de señales/ordenador puede incluir un procesador, por ejemplo, un procesador disponible en el comercio tal como uno de la serie x86, procesadores Celeron y Pentium, disponibles en Intel, dispositivos similares de AMD y Cyrix, los microprocesadores de la serie 680X0 disponibles en Motorola y el microprocesador PowerPc de IBM. Muchos otros procesadores se encuentran disponibles, y el sistema de ordenador no está limitado a un procesador particular.

Un procesador ejecuta típicamente un programa denominado sistema operativo, del cual, Windows 7, Windows Vista, WindowsNT, Windows 95 ó 98, UNIX, Linux, DOS, VMS, MacOS y OS8 son ejemplos, que controla la ejecución del resto de programas de ordenador y proporciona tareas de planificación, ajustes, control de entrada/salida, contabilidad, compilación, almacenamiento, gestión de datos y memoria, control de comunicación y servicios relacionados. El procesador y el sistema operativo juntos definen una plataforma de ordenador para la cual se escriben programas de aplicación en lenguajes de programación de alto nivel. El procesador de señales/ordenador no está limitado a una plataforma de ordenador particular.

Este procesador de señales/ordenador puede incluir un sistema de memoria, que típicamente incluya un medio de registro no volátil que pueda leer y escribir un ordenador, del cual, un disco magnético, un disco óptico, una memoria flash y una cinta, son ejemplos. Dicho medio de registro puede ser extraíble, por ejemplo, un disquete, un CD de lectura/escritura o una tarjeta de memoria, o puede ser permanente, por ejemplo, un disco duro.

Dicho medio de registro almacena señales, típicamente en forma binaria (es decir, una forma interpretada como una secuencia de uno y ceros). Un disco (por ejemplo, magnético u óptico) tiene un número de pistas, en el que dichas señales pueden almacenarse, típicamente en forma binaria, es decir, una forma interpretada como una secuencia de unos y ceros. Dichas señales pueden definir un programa informático, por ejemplo, un programa de aplicación, a ejecutar mediante el microprocesador, o la información a procesar por el programa de aplicación.

El sistema de memoria del procesador de señales/ordenador también puede incluir un elemento de memoria de circuito integrado, que típicamente es una memoria volátil, de acceso aleatorio, tal como una memoria dinámica de acceso aleatorio (DRAM) o una memoria estática de acceso aleatorio (SRAM). Típicamente, en funcionamiento, el procesador produce programas y datos para leer del medio de registro no volátil en el elemento de memoria de

circuito integrado, que a través del procesador típicamente permite acceder más rápidamente a las instrucciones y datos del programa que el medio de registro no volátil.

5 Generalmente el procesador manipula los datos dentro del elemento de memoria del circuito integrado de acuerdo con las instrucciones del programa y después copia los datos manipulados al medio de registro no volátil tras completar el procesamiento. Se conoce una diversidad de mecanismos para controlar el movimiento de datos entre el medio de registro no volátil y el elemento de memoria de circuito integrado, y el procesador de señales/ordenador que implementa los métodos, etapas, sistemas y elementos del sistema descritos anteriormente no se limita a los mismos. El procesador de señales/ordenador no está limitado a un sistema de memoria particular.

10 Al menos parte de dicho sistema de memoria descrito anteriormente puede usarse para almacenar una o más estructuras de datos (por ejemplo, tablas de consulta) o ecuaciones descritas anteriormente. Por ejemplo, al menos parte del medio de registro no volátil puede almacenarse, al menos parte de una base de datos que incluye una o más de dichas estructuras de datos. Dicha base de datos puede ser cualquiera de una variedad de tipos de base de datos, por ejemplo, un sistema de archivos que incluye una o más estructuras de datos de un solo archivo en el que los datos se organizan en unidades de datos separadas por delimitadores, una base de datos relacional en la que los datos se organizan en unidades de datos almacenadas en tablas, una base de datos orientada a objetos en la que los datos se organizan en unidades de datos almacenados como objetos, otro tipo de base de datos, o cualquier combinación de las mismas.

20 El procesador de señales/ordenador puede incluir un subsistema de E/S de datos de video y audio. Una parte audio del subsistema puede incluir un convertidor de señal analógica a digital (A/D), que recibe información audio analógica y la transforma en información digital. La información digital puede comprimirse usando sistemas de compresión conocidos para almacenar en el disco duro para usar en otro momento. Una parte del video típica del subsistema de E/S puede incluir un compresor/descompresor de imágenes de video muy conocido en la técnica. Dicho compresor/descompresor transforma información de video analógica en información digital comprimida y viceversa. La información digital comprimida puede almacenarse en un disco duro para su uso posterior.

30 El procesador de señales/ordenador puede incluir uno o más dispositivos de salida de datos. Como ejemplos de dispositivos de salida de datos se incluyen, un tubo de rayos catódicos (TRC), pantallas de cristal líquido (PCL) y otros dispositivos de salida de datos de video, impresoras, dispositivos de comunicación tales como un modem o interfaz de red, dispositivos de almacenamiento tales como un disco o cinta, y dispositivos de salida de datos de audio tal como un altavoz.

35 El procesador de señales/ordenador también puede incluir uno o más dispositivos de entrada de datos. Como ejemplos de dispositivos de entrada de datos se incluyen un teclado, un teclado numérico, un puntero de bola, un ratón, un lápiz y una tableta digital, dispositivos de comunicación tales como los descritos anteriormente, y dispositivos de entrada de datos tales como dispositivos de captura de audio y video y sensores. El procesador de señales/ordenador no está limitado a los dispositivos de entrada o salida particulares descritos en el presente documento.

40 El procesador de señales/ordenador puede incluir un hardware (soporte físico) especialmente programado, con fines especiales, por ejemplo, un circuito integrado de aplicación específica (CIAE). Dicho hardware para fines especiales puede configurarse para implementar uno o más de los métodos, etapas, simulaciones, algoritmos, sistemas y elementos del sistema descritos anteriormente. El procesador de señales/ordenador y sus componentes pueden ser programables usando cualquiera de una variedad de uno o más lenguajes de programación informática adecuados. Dichos lenguajes pueden incluir lenguajes de programación procedimental, por ejemplo, C, Pascal, Fortran y BASIC, lenguajes orientados a objetos, por ejemplo, C++, Java y Eiffel y otros lenguajes, tales como lenguaje de secuencias de comandos o incluso lenguaje ensamblador. Los métodos, etapas, simulaciones, algoritmos, sistemas y elementos del sistema pueden implementarse usando cualquiera de una variedad de lenguajes de programación adecuados, incluyendo lenguajes de programación procedimental, lenguajes de programación orientados a objetos, otros lenguajes y combinaciones de los mismos, que pueden ejecutarse mediante dicho sistema informático. Dichos métodos, etapas, simulaciones, algoritmos, sistemas y elementos del sistema pueden implementarse como módulos distintos de un programa informático, o pueden implementarse individualmente como programas informáticos distintos. Dichos módulos y programas pueden ejecutarse en ordenadores distintos.

50 Los métodos, etapas, simulaciones, algoritmos, sistemas y elementos del sistema descritos anteriormente pueden implementarse en software, hardware o firmware, o cualquier combinación de los tres, como parte del sistema de control informático implementado descrito anteriormente o como un componente independiente.

60 Dichos métodos, etapas, simulaciones, algoritmos, sistemas y elementos del sistema, ya sea individualmente o en combinación, pueden implementarse como un producto de programa informático incorporado tangiblemente como señales legibles por ordenador en un medio legible por ordenador, por ejemplo, un medio de registro no volátil, un elemento de memoria de circuito integrado, o una combinación de los mismos. Para cada uno de dicho método, etapa, simulación, algoritmo, sistema o elemento del sistema, dicho producto de programa informático puede comprender señales legibles por ordenador incorporadas tangiblemente en el medio legible por ordenador que

definen instrucciones, por ejemplo, como parte de uno o más programas, que, como resultado de ejecutarse por un ordenador, instruye al ordenador para realizar el método, la etapa, la simulación, el algoritmo, el sistema o elemento del sistema.

5 Analitos diana ejemplares

Como apreciarán los expertos en la técnica, puede detectarse una gran cantidad de moléculas y partículas de analito y, opcionalmente, cuantificarse usando métodos y sistemas de la presente invención; básicamente, cualquier molécula de analito que pueda prepararse para que se inmovilice con respeto a un ligando de unión puede investigarse posiblemente usando la invención. Más adelante se mencionan determinadas dianas más específicas de posible interés que pueden comprender una molécula de analito. La siguiente lista es ejemplar y no limitante.

En algunas realizaciones, la molécula de analito puede ser una biomolécula. Ejemplos no limitantes de biomoléculas incluyen hormonas, anticuerpos, citoquinas, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, lípidos, antígenos y receptores de membrana celular (neuronales, hormonales, nutrientes y receptores de superficie celular) o sus ligandos o combinaciones de los mismos. Realizaciones no limitantes de proteínas incluyen péptidos, polipéptidos, fragmentos de proteína, complejos de proteína, proteínas de fusión, proteínas recombinantes, fosfoproteínas, glucoproteínas, lipoproteínas o similares. Como apreciarán los expertos en la técnica, existe una gran cantidad de posibles moléculas analito proteicas que pueden detectarse o evaluarse por compañeros de unión usando la presente invención. Además de enzimas, como se han indicado anteriormente, las moléculas de analito proteicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, inmunoglobulinas, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas (muchas de las cuales sirven como ligandos para receptores celulares), marcadores de cáncer, etc. Ejemplos no limitantes de biomoléculas incluyen PSA y TNF-alfa.

En determinadas realizaciones, la molécula de analito puede ser una proteína hospedadora modificada traduccionalmente (por ejemplo, fosforilación, metilación, glucosilación) y el componente de captura puede ser un anticuerpo específico contra una modificación post-traducciona. Las proteínas modificadas pueden capturarse con componentes de captura que comprenden una multiplicidad de anticuerpos específicos y después las proteínas capturadas pueden adicionalmente unirse a un ligando de unión que comprenda un anticuerpo secundario con especificidad contra una modificación post-traducciona. Como alternativa, pueden capturarse proteínas modificadas con componentes de captura que comprenden un anticuerpo específico contra una modificación post-traducciona y después las proteínas capturadas pueden adicionalmente unirse a ligandos de unión que comprenden anticuerpos específicos contra cada proteína modificada.

En otra realización, la molécula de analito es un ácido nucleico. Un ácido nucleico puede capturarse con un fragmento de ácido nucleico complementario (por ejemplo, un oligonucleótido) y después opcionalmente marcarse después con un ligando de unión que comprende un oligonucleótido diferente complementario.

Las moléculas y partículas de analito adecuadas incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas (incluyendo compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos), contaminantes ambientales (incluyendo pesticidas, insecticidas, toxinas, etc.), moléculas terapéuticas (incluyendo fármacos terapéuticos, drogas, antibióticos, etc.), biomoléculas (incluyendo hormonas, citoquinas, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, antígenos y receptores de la membrana celular (neuronales, hormonales, nutrientes y receptores de la superficie celular) o sus ligandos, etc.), células enteras (incluyendo células procariontas (tales como bacterias patógenas) y eucariotas, incluyendo células tumorales de mamífero), virus (incluyendo retrovirus, herpesvirus, adenovirus, lentivirus, etc.), esporas, etc.

En algunas realizaciones, la molécula de analito puede ser un enzima. Ejemplos no limitantes de enzimas incluyen, una oxidorreductasa, transferasa, quinasa, hidrolasa, liasa, isomerasa, ligasa y similares. Ejemplos adicionales de enzimas incluyen, pero sin limitación, 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 infartos y similares. Cuando se usa un sistema/método de la presente invención para detectar la presencia de agentes virales o bacterianos, las enzimas diana apropiadas incluyen polimerasas virales o bacterianas y otras enzimas de este tipo, incluyendo proteasas virales 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 tenga una enzima o un componente enzimático presente en su superficie extracelular. Como alternativa, la partícula de analito es una célula que no tiene componente enzimático en su superficie. Dicha célula se identifica típicamente usando un método de ensayo indirecto descrito más adelante. Como ejemplos no limitantes de componentes enzimáticos son la peroxidasa de rábano picante, la beta-galactosidasa y la fosfatasa alcalina.

La muestra de líquidos que contiene, o que se sospecha que contiene, una molécula de analito puede proceder de cualquier fuente adecuada. En algunos casos, la muestra puede comprender un líquido, un sólido fluido de partículas, una suspensión fluida de partículas sólidas, un líquido supercrítico y/o gas. En algunos casos, la molécula de analito puede separarse o purificarse de su fuente antes de la determinación; sin embargo, en determinadas realizaciones, una muestra no tratada que contiene la molécula de analito puede ensayarse directamente. La fuente

de la molécula de analito puede ser sintética (por ejemplo, producida en un laboratorio), medioambiental (por ejemplo, aire, suelo, etc.), un mamífero, un animal, una planta o cualquier 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 líquidos analizada puede ser posiblemente cualquier cantidad dentro de un amplio intervalo de volúmenes, dependiendo del número de factores tales como, por ejemplo, el número de objetos de captura usados/disponibles, el número de lugares usados/disponibles, etc. En algunas realizaciones ejemplares particulares, el volumen de la muestra puede ser de aproximadamente 0,01 ul, de aproximadamente 0,1 ul, de aproximadamente 1 ul, de aproximadamente 5 ul, de aproximadamente 10 ul, de aproximadamente 100 ul, de aproximadamente 1 ml, de aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 10 ml o similar. En algunos casos, el volumen de la muestra de líquidos es entre aproximadamente 0,01 ul y aproximadamente 10 ml, entre aproximadamente 0,01 ul y aproximadamente en 1 ml, entre aproximadamente 0,01 ul y aproximadamente 100 ul, o entre aproximadamente 0,1 ul y aproximadamente 10 ul.

En algunos casos, la muestra de líquidos puede diluirse antes de su uso en un ensayo. Por ejemplo, en realizaciones en las que la fuente de una molécula de analito es un líquido corporal humano (por ejemplo, sangre, suero), el líquido puede diluirse con un disolvente apropiado (por ejemplo, un tampón tal como tampón PBS). Una muestra de líquidos puede diluirse aproximadamente 1 vez, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente en 6 veces, aproximadamente 10 veces, o más antes de su uso. La muestra puede añadirse a una solución que comprenda la pluralidad de objetos de captura, o la pluralidad de objetos de captura puede añadirse directamente a la muestra o añadirse a la misma como una solución.

Componentes de captura

En algunas realizaciones de la presente invención, las moléculas de analito pueden inmovilizarse con respecto a una superficie (por ejemplo, la superficie de un objeto de captura, la superficie de un lugar (por ejemplo, recipiente de reacción), o similar). Las moléculas de analito pueden inmovilizarse con respecto a una superficie antes de, simultáneamente con, o después de, la exposición de una pluralidad de tipos de ligandos de unión. En algunas realizaciones, la inmovilización de las moléculas de analito con respecto a una superficie puede ayudar a retirar cualquier exceso de ligandos de unión de la solución sin preocuparse de desplazar la molécula de analito de la superficie (por ejemplo, del recipiente de reacción). Generalmente, un componente de captura permite la unión de una molécula, partícula o complejo en un soporte sólido (por ejemplo, objeto de captura, lugar, etc.) con fines de inmovilización, detección, cuantificación y/u otros análisis de la molécula, partícula o complejo.

Como apreciarán los expertos 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 pueden encontrarse o desarrollarse fácilmente usando técnicas conocidas. Por ejemplo, cuando la molécula diana es una proteína, los componentes de captura pueden comprender proteínas, particularmente anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno (Fab), 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 moléculas pequeñas. 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 de iones metálicos, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 7.070.921 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20060121544. Además, cuando la molécula diana es un ácido nucleico monocatenario, el componente de captura puede ser un ácido nucleico complementario. De manera similar, la molécula diana puede ser una proteína de unión a ácido nucleico y el componente de captura puede ser un ácido nucleico mono o bicatenario; como alternativa, el componente de captura puede ser una proteína de unión a ácido nucleico cuando la molécula diana es un ácido nucleico mono o bicatenario. Como alternativa, como se describe generalmente en las Patentes de Estados Unidos 5.270.163, 5.475.096, 5.567.588, 5.595.877, 5.637.459, 5.683.867, 5.705.337 y en patentes relacionadas, pueden desarrollarse "aptámeros" de ácido nucleico para capturar prácticamente cualquier molécula diana. Además, por ejemplo, cuando la molécula diana es un hidrato de carbono, posiblemente los componentes de captura adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos, lectinas y selectinas. Como apreciarán los expertos habituales en la técnica, cualquier molécula que pueda asociarse específicamente con una molécula diana de interés puede posiblemente usarse como un componente de captura.

Para determinadas realizaciones, los pares de molécula de analito diana/componente de captura adecuados pueden incluir, pero sin limitación, anticuerpos/antígenos, receptores/ligandos, proteínas/ácido nucleicos, ácidos nucleicos/ácidos nucleicos, enzimas/sustratos y/o inhibidores, hidratos de carbono (incluyendo un glucoproteínas y glucolípidos)/lectinas y/o selectinas, proteínas/proteínas, proteínas/moléculas pequeñas; moléculas pequeñas/moléculas pequeñas, etc. De acuerdo con una realización, los componentes de captura son partes (particularmente las partes extracelulares) de receptores de la superficie celular que se sabe que multimerizan, tales como el receptor de la hormona del crecimiento, transportadores de glucosa (particularmente el receptor de GLUT 4)

y receptores de células T y los analitos diana son uno o más ligandos diana receptores.

En una realización particular, el componente de captura puede unirse a la superficie mediante una conexión, que puede comprender cualquier fracción, funcionalización o modificación de la superficie de unión y/o componente de captura que facilita la unión del componente de captura con la superficie. La conexión entre el componente de
5
captura y la superficie puede comprender uno o más enlaces químicos o físicos (por ejemplo, unión no específica mediante fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas/hidrófilas; etc.) y/o enlazadores químicos que proporcionan dicho enlace (enlaces). En determinadas realizaciones, el componente de captura comprende un componente de captura expansor. En dichas realizaciones, el componente de captura comprende una primera parte que une la molécula de analito y una segunda parte que
10
puede usarse para la conexión con la superficie de unión.

En determinadas realizaciones, una superficie también puede comprender una capa protectora o de pasivación que puede reducir o minimizar la unión no específica de componentes que no son de captura (por ejemplo, moléculas de analito, ligandos de unión) con la superficie de unión durante el ensayo que puede conducir a señales positivas falsas durante la detección o a la pérdida de señal. Ejemplos de materiales que pueden utilizarse en determinadas
15
realizaciones para formar las capas de pasivación incluyen, pero sin limitación: polímeros, tales como poli(etilenglicol), que repelen la unión no específica de proteínas; proteínas de origen natural con esta propiedad, tales como albúmina de suero y caseína; tensioactivos, por ejemplo, tensioactivos zwitteriónicos, tales como sulfobetainas; lípidos de cadena larga de origen natural; y ácidos nucleicos, tales como ADN de esperma de salmón.

Una realización utiliza componentes de captura proteicos. Como se sabe en la técnica, cualquier cantidad de técnicas puede usarse para unir un componente de captura proteico con una amplia variedad de superficies sólidas. En este contexto “proteína” o “proteico” incluye proteínas, polipéptidos, péptidos, incluyendo, por ejemplo, enzimas y anticuerpos. Se conoce una amplia variedad de técnicas para añadir fracciones reactivas a proteínas, por ejemplo, el
20
método indicado en la Patente Estados Unidos N° 5.620.850. La unión de proteínas a superficie se conoce, por ejemplo, véase Heller, Acc. Chem. Res. 23: 128 (1990) y muchas otras referencias similares.

En algunas realizaciones, el componente de captura (o ligando de unión) puede comprender fragmentos Fab'. El uso de fragmentos Fab' en oposición a los anticuerpos completos pueden ayudar a reducir la unión no específica entre el
30
componente de captura y el ligando de unión. En algunos casos, la región Fc de un componente de captura (o ligando de unión) puede retirarse (por ejemplo, proteolíticamente). En algunos casos, puede usarse una enzima para retirar 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 puede unirse a una superficie de unión usando aminos o puede modificarse con biotina (por ejemplo, usando NHS-biotina) para facilitar la unión a una superficie objeto de captura recubierta con avidina o estreptavidina. Los fragmentos F(ab')₂ pueden someterse a un tratamiento de reducción químico (por ejemplo, por exposición a 2-mercaptoetilamina) para, en algunos casos, formar dos fragmentos Fab' portadores de tiol. Estos fragmentos portadores de tiol pueden después unirse mediante reacciones con el aceptor de Michael tal como maleimida. Por ejemplo, los fragmentos Fab' pueden después tratarse con un reactivo (por ejemplo, maleimida-biotina) para unir al menos un resto biotina (es decir, biotinarse) para facilitar la
40
unión a superficies recubiertas con estreptavidina como se ha descrito anteriormente.

Determinadas realizaciones utilizan ácidos nucleicos como componente de captura, por ejemplo, cuando la molécula de analito es un ácido nucleico o una proteína de unión a ácido nucleico, o cuando se desea que el componente de
45
captura sirva como un aptámero para unirse a una proteína, como se conoce en la técnica.

De acuerdo con una realización, cada superficie de unión comprende una pluralidad de componentes de captura. La pluralidad de componentes de captura, en algunos casos, puede distribuirse al azar sobre la superficie de unión como un “césped”. Como alternativa, los componentes de captura pueden segregarse especialmente en una o más regiones distintas y distribuirse de cualquier manera deseada.
50

La unión entre el componente de captura y la molécula de analito, en determinadas 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 determinadas de dichas realizaciones, el componente de captura se une tanto específicamente como directamente con la molécula de analito. Por “se une específicamente” o “especificidad de unión” se entiende que el
55
componente de captura se une a la molécula de analito con 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, de acuerdo con una realización, puede ser un anticuerpo que se une específicamente a alguna parte de una molécula de analito (por ejemplo, un antígeno). El anticuerpo, de acuerdo con una realización, puede ser cualquier anticuerpo capaz de unirse específicamente a una molécula de analito de interés. Por ejemplo, anticuerpos apropiados incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (algunas veces denominados miméticos de anticuerpo), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (algunas veces denominadas “conjugados de anticuerpo”), y fragmentos de cada uno de estos, respectivamente. Como otro ejemplo, la molécula de analito puede ser un anticuerpo y el componente de captura puede ser un antígeno.
60

De acuerdo con una realización en la que una partícula de analito es una célula biológica (por ejemplo, una célula de
65

mamífero, de ave, 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 superficie celular). En una realización, el componente de captura es un receptor de una molécula de adhesión o una parte del mismo, que tiene especificidad de unión por una molécula de adhesión celular expresada en la superficie de un tipo de célula diana. En uso, el receptor de la molécula de adhesión se une con una molécula de adhesión de la superficie extracelular de la célula diana, inmovilizando de este modo o capturando la célula. En una realización en la que la partícula 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 los expertos habituales en la técnica, es posible detectar moléculas de analito usando componentes de captura para los cuales la unión con las moléculas analito no es muy específica. Por ejemplo, dichos sistemas/métodos pueden usar diferentes componentes de captura tales como, por ejemplo, un panel de diferentes ligandos de unión, y la detección de cualquier molécula de analito particular se determina mediante una "firma" de unión a este panel de ligandos de unión, similar a la manera en la que se trabaja con "narices electrónicas". Esto puede encontrar utilidad particular en la detección de determinados analitos de molécula pequeña. En algunas realizaciones, la afinidad de unión entre las moléculas de analito y los componentes de captura debe ser suficiente para permanecer unidos en las condiciones del ensayo, incluyendo etapas de lavado para retirar moléculas o partículas que no están unidas específicamente. En algunos casos, por ejemplo en la detección de determinadas biomoléculas, la constante de unión de la molécula de analito con su componente de captura complementario puede ser entre al menos aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^6 M^{-1} , al menos aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^9 M^{-1} , al menos aproximadamente 10^7 y aproximadamente 10^9 M^{-1} , más de aproximadamente 10^9 M^{-1} , o mayor.

Ligandos de unión y agentes marcadores precursores/agente marcador

En alguna realización, el ensayo puede comprender el uso de al menos un ligando de unión. Los ligandos de unión pueden seleccionarse de cualquier molécula, partícula o similar, adecuada, como se trata más adelante, que pueda asociarse con una molécula de analito y/o asociarse con otro ligando de unión. Determinados ligandos de unión pueden comprender un componente que pueda facilitar la detección, bien directamente (por ejemplo, mediante un resto detectable) o indirectamente. Un componente puede facilitar la detección indirecta, por ejemplo, transformando una molécula de agente marcador precursor en una molécula de agente marcador (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 puede usarse o no junto con ligandos de unión adicionales (por ejemplo, un segundo tipo, etc.), como se trata en el presente documento.

En algunas realizaciones, la pluralidad de moléculas de analito (por ejemplo, en algunos casos, inmovilizadas con respecto a un objeto de captura) puede exponerse a una pluralidad de ligandos de unión de tal manera que un ligando de unión se asocia con al menos alguna de una pluralidad de moléculas analito. En algunos casos, las moléculas de analito se asocian con un ligando de unión más de aproximadamente 80 %, más de aproximadamente 85 %, más de aproximadamente 90 %, más de aproximadamente 95 %, más de aproximadamente 97 %, más de aproximadamente 98 %, más de aproximadamente 99 % o más.

Para la etapa de captura, la elección de la concentración de las perlas puede depender de diversos factores de competencia. Por ejemplo, puede ser ventajoso que haya suficientes perlas para capturar la mayor parte de los analito diana desde una perspectiva termodinámica y cinética. Como una ilustración ejemplar, desde el punto de vista termodinámico, cada una de 200.000 perlas en $100 \mu\text{l}$ puede tener aproximadamente 80.000 componentes de captura (por ejemplo, anticuerpos) unidos para correlacionarse con una concentración de anticuerpos de aproximadamente $0,3 \text{ nM}$, y el equilibrio entre anticuerpo-proteína a esa concentración puede dar lugar a una eficacia de captura relativamente alta de moléculas de analito diana en determinados casos (por ejemplo $>70 \%$). Desde el punto de vista cinético, para 200.000 perlas dispersas en $100 \mu\text{l}$, la distancia promedio entre las perlas puede estimarse que es de aproximadamente $80 \mu\text{m}$. Proteínas del tamaño del TNF- α y del PSA ($17,3$ y 30 kDa , respectivamente), como moléculas de analito ejemplares, por ejemplo, tenderán típicamente a difundir $80 \mu\text{m}$ en menos de 1 min , de tal manera que, durante un tiempo de incubación de 2 horas, la captura de dichas moléculas de analito tenderá a no estar cinéticamente limitada. Además, también puede ser ventajoso proporcionar suficientes perlas cargadas en las matrices para limitar el ruido de Poisson a una cantidad deseada o aceptable. Considerando como un ejemplo una situación en la que en una matriz se cargan 200.000 perlas en un volumen de $10 \mu\text{l}$, típicamente alrededor de 20.000-30.000 perlas pueden quedar atrapadas en pocillos de la matriz de tamaño de femtolitro. Para una señal de fondo típica (por ejemplo debida a una unión no específica, etc.) del 1 % de perlas activas, se esperaría que esta carga produjese 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 %, que puede ser aceptable en realizaciones típicas. Sin embargo, las concentraciones de perlas por encima de determinadas concentraciones puede ser indeseables en determinados casos en los que se puede llegar a: a) aumentar la unión no específica que puede reducir la señal con respecto al fondo; y/o b) proporciones indeseablemente bajas de analito con respecto a perla de tal manera que la fracción de perlas activas es demasiado baja, dando como resultado CV altos del ruido de

Poisson. En determinadas realizaciones, considerando un equilibrio de factores tales como los tratados anteriormente, el suministro de aproximadamente 200.000 a 1.000.000 de perlas por 100 μ l de muestra de ensayo puede ser deseable o, en determinados casos óptimos, para realizar determinados ensayos de la invención.

5 Para realizaciones del ensayo de la invención que emplean uno o más de un ligando (o ligandos) de unión para marcar las moléculas de analito capturadas, puede ser ventajoso, en determinados casos, ajustar las concentraciones usadas para producir un rendimiento deseable u óptimo. Por ejemplo, considerando una realización que implique una molécula de analito que es una proteína (proteína capturada) y empleando un primer ligando de unión que comprenda un anticuerpo de detección y un segundo ligando de unión que comprenda un conjugado enzimático (por ejemplo S β G), las concentraciones del anticuerpo de detección y del conjugado enzimático (S β G) usado para marcar la proteína capturada pueden, en algunos casos, limitarse o minimizarse para producir una señal de fondo aceptable (por ejemplo, del 1% o menor) y un ruido de Poisson. La elección de las contrataciones del anticuerpo de detección y conjugado enzimático (S β G) usadas para marcar la proteína capturada pueden ser factores que mejoran el rendimiento de u optimizan determinados métodos de ensayo de la invención. En determinados casos, puede ser deseable que solamente se marque una fracción de las proteínas de captura para impedir señales de saturación producidas por el ensayo. Por ejemplo, para un ensayo particular en el que los niveles de fondos observados son equivalentes a \sim 1-2 fM de proteína diana, de tal manera que la proporción de analito con respecto a perla puede ser de aproximadamente 0,3-0,6, el número de perlas activas puede estar en el intervalo de aproximadamente 25-40 % si cada proteína se marcó con una enzima, lo que puede ser más que deseable en algunos casos. Para producir señales de fondo que puedan estar más próximas a un extremo inferior del rango dinámico para un ensayo de detección digital - considerando, por ejemplo, que en determinados casos el 1 % de perlas activas puede proporcionar una base de ruido razonable para el fondo en ensayos de detección digital de la invención - marcando apropiadamente la proteína capturada puede posiblemente conseguirse mediante control cinético de las etapas de marcado, 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 las concentraciones del marcador se minimizan, el uso de un tiempo de incubación ELISA estándar puede proporcionar resultados aceptables; por ejemplo usando un tiempo de ensayo total de \sim 6 h. Esta duración de tiempo puede ser aceptable para ensayos que toleran un tiempo de respuesta diario para las muestras. Para tiempos de respuesta más cortos de, por ejemplo, $<$ 1 hora (por ejemplo, para aplicaciones en centros de atención), el ensayo podría realizarse con incubaciones más cortas con mayores concentraciones de marcadores.

En algunas realizaciones, puede usarse más de un tipo de ligando de unión. En algunas realizaciones, puede proporcionarse un primer tipo de ligando de unión y un segundo tipo de ligando de unión. En algunos casos, pueden proporcionarse 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 expone a una pluralidad de tipos de ligando de unión, al menos alguna de la pluralidad de moléculas de analito inmovilizadas puede asociarse con al menos uno de cada tipo de ligando de unión. Los ligandos de unión pueden seleccionarse de tal manera que interaccionen entre sí de diversas maneras diferentes. En un primer ejemplo, el primer tipo de ligando de unión puede asociarse con una molécula de analito y el segundo tipo de ligando de unión puede asociarse con el primer tipo de ligando de unión. En dichas realizaciones, el primer tipo de ligando de unión puede comprender un primer componente que ayude en la asociación de la molécula de analito y un segundo componente que ayude 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 pueden asociarse directamente con una molécula de analito. Sin ceñirse a ninguna teoría o mecanismo particular, la asociación tanto del primer tipo como del segundo tipo de ligando de unión puede proporcionar una especificidad y fiabilidad adicional en el comportamiento de un ensayo, identificando solo lugares que se determina que contienen tanto el primer tipo de ligando de unión y/o como el segundo tipo de ligando de unión (por ejemplo, a través de detección directa o indirecta) como que contenga una molécula de analito. Dichos métodos de ensayo pueden reducir el número de positivos falsos producidos por la unión no específica ya que se encuentra que lugares que solamente tienen un solo tipo de ligando de unión (por ejemplo, solamente el primer tipo de agente marcador o el segundo tipo de agente marcador) no se considerarían o contarían como un lugar que comprenda 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 es diferente del primer tipo de componente enzimático. Un objeto de captura que comprenda una molécula de analito, el primer tipo de ligando de unión, y el segundo tipo de ligando de unión pueden exponerse a un primer tipo de agente marcador precursor que se transforma en un primer tipo de agente marcador (por ejemplo, que comprende una primera propiedad medible) después de exponerse al primer tipo de componente enzimático y un segundo tipo de agente marcador precursor que se transforma en un segundo tipo de agente marcador (por ejemplo, que comprende una propiedad medible que se puede diferenciar de la primera propiedad medible) después de exponerse al segundo tipo de componente enzimático. Por lo tanto, solamente lugares que se determina que contienen el primer tipo de agente marcador y el segundo tipo de agente marcador se determina que contienen una molécula de analito. Como otro ejemplo, cada uno del primer tipo de ligando de unión y del segundo tipo de ligando de unión puede incorporar 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 tercer tipo de ligando de unión también comprende una molécula o resto para la detección directa o indirecta (por ejemplo, se requiere la presencia del tercer tipo de ligando de unión en un recipiente de reacción para determinar la presencia o ausencia de una molécula de analito en una localización). Cuando tanto el primer tipo de ligando de unión como los segundos tipos de ligando de unión están presentes sustancialmente en estrecha proximidad entre sí (por ejemplo, mediante asociación con una molécula de analito) puede producirse la asociación del tercer tipo de ligando de unión, y por lo tanto, para la detección de la molécula de analito. Más información respecto al uso de más de un tipo de ligando de unión de una manera en la que pueden reducirse determinados efectos negativos asociados con la unión no específica, se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos del mismo solicitante N° de Serie 12/731.135, titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules using Dual Detection Methods" de Duffy *et al.*, presentada el 24 de marzo de 2010; y la Solicitud de Patente Internacional N° de Serie (aún no determinado), titulada "Ultra-Sensitive Detection of Molecules using Dual Detection Methods" de Duffy *et al.*, presentada el 1 de marzo de 2011, (N° de Expediente del Mandatario N° Q0052.70012WO00).

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar diversas características de la invención. Los expertos habituales en la técnica deberán, a la luz de la presente divulgación, apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan aunque aún se siga obteniendo un resultado parecido o similar sin alejarse del espíritu de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, los siguientes ejemplos pretenden únicamente ilustrar determinadas características de la presente invención, pero no necesariamente ilustrar todo el ámbito de la invención.

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo describe materiales usados en los Ejemplos 2-10. Se adquirieron haces de fibra óptica de Schott North America (Southbridge, MA). Se obtuvo una lámina de silicona brillante no reforzada de Specialty Manufacturing (Saginaw, MI). El ácido clorhídrico, el etanol anhidro, y el Tween-20 de calidad de biología molecular se adquirieron en Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Las perlas magnéticas de 2,7 μm de diámetro terminadas en carboxilo se adquirieron en Varian, Inc. (Lake Forest, CA). El clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), la N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), y el Tampón de Bloqueo Superblock® T-20 se adquirieron en Thermo Scientific (Rockford, IL). La estreptavidina- β -galactosidasa ($\text{S}\beta\text{G}$) se adquirió en Invitrogen, Sigma-Aldrich o se conjugó en el laboratorio interno usando protocolos convencionales. La resorufina- β -D-galactopiranosido (RGP) se adquirió en Invitrogen (Carlsbad, CA). El pulidor de fibra y los fungibles de pulido se adquirieron en Allied High Tech Products (Rancho Dominguez, CA). El anticuerpo de captura monoclonal contra PSA, el anticuerpo de detección monoclonal contra PSA y el PSA purificado se adquirieron en BiosPacific. El reactivo de biotilación Chromalink™ se adquirió en Solulink, Inc (San Diego, CA). El ADN purificado se adquirió en Integrated DNA Technologies.

Ejemplo 2

A continuación se describe un ejemplo no limitante de la preparación de perlas magnéticas de 2,7 μm de diámetro funcionalizadas con biotina para la captura del analito ejemplar, $\text{S}\beta\text{G}$. Se prepararon perlas funcionalizadas con la sonda de captura de ADN (5'-NH₂/C12-GTT GTC AAG ATG CTA CCG TTC AGA G-3') de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estas perlas se incubaron con 1 μM de ADN complementario biotilado (5'-biotina-C TCT GAA CGG TAG CAT CTT GAC AAC-3') durante una noche (16 h) en tampón TE que contenía NaCl 0,5 M y Tween-20 al 0,01 %. Después de la incubación, las perlas se lavaron tres veces en tampón PBS que contenía Tween-20 al 0,1 %. La reserva de perlas se distribuyó en una placa de microtitulación proporcionando 400.000 perlas por pocillo en 100 μl . El tampón se aspiró de los pocillos de la placa de microtitulación, las perlas se resuspendieron y se incubaron con diversas concentraciones de $\text{S}\beta\text{G}$ en Superblock que contenía Tween-20 al 0,05 % durante 5 h. Después, las perlas se separaron y se lavaron seis veces con tampón PBS 5 x que contenía Tween-20 al 0,1 %.

En una realización alternativa, se usó una concentración de perlas de 200.000 perlas por 100 μl de solución diana $\text{S}\beta\text{G}$. Las perlas se resuspendieron y se incubaron con diversas concentraciones de $\text{S}\beta\text{G}$ en soluciones diana diluidas en SuperblockSuperBlock que contenía Tween-20 al 0,05 % durante 54 h. 100 μl de las diversas soluciones diana se dividieron en alícuotas en una placa de microtitulación. Después, las perlas se separaron con un imán de placa de microtitulación y se lavaron seis veces con tampón PBS 5x que contenía Tween-20 al 0,1 %. Para la detección, las perlas se resuspendieron en 10 μl de PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % y las alícuotas se cargaron en una matriz con pocillos de volumen femtolitro.

Ejemplo 3

A continuación se describe un ejemplo no limitante de la preparación de matrices de micropocillos. Haces de fibra óptica de aproximadamente 5 cm de longitud se pulieron secuencialmente en una pulidora usando películas de

diamante esmerilado de un tamaño de 30-, 9- y 1 micra. Los haces de fibra pulida se grabaron químicamente en una solución de HCl 0,025 M durante 130 segundos e inmediatamente después se sumergieron en agua para desactivar la reacción. Como promedio, los pocillos se grabaron a una velocidad de aproximadamente 1,5 a 1,7 μm por minuto. Por lo tanto, en aproximadamente 115 a 130 s se produjeron pocillos de una profundidad de 3,25 μm . Para retirar las impurezas del grabado, las fibras grabadas se sometieron a ultrasonido durante 5 s y se lavaron en agua durante 5 min. Después las fibras se secaron al vacío y se expusieron a plasma aire durante 5 min para limpiar y activar la superficie de vidrio. Las matrices se silanizaron durante 30 minutos en una solución de silano al 2 % para hacer las superficies hidrófobas. En algunos casos, las dimensiones de los pocillos (por ejemplo, $3,25 \pm 0,5 \mu\text{m}$) se configuraron para guardar perlas individualizadas en los pocillos al mismo tiempo que se mantenían buenos sellados.

Ejemplo 4

A continuación se describe un ejemplo no limitante de la carga de perlas en micropocillos. Antes de cargar las perlas en los pocillos grabados, las perlas pueden exponerse a la muestra de líquidos que comprende las moléculas de analito. Para aplicar la solución de perlas a los pocillos grabados en un haz de fibras, se cortó un tubo de PVC transparente (1/16" I.D. 1/8" O.D) y un tubo termocontraíble transparente (3/16" ID) en aproximadamente 1 cm de longitud. Primero, un trozo de tubo de PVC se colocó en el extremo grabado de un haz de fibras para crear un depósito para guardar la solución de perlas, seguido de la aplicación del tubo termocontraíble alrededor de la interfaz entre el tubo de PVC y el haz de fibras para proporcionar un sellado hermético. 10 μl de la solución de perlas concentrada se transfirieron con una pipeta en el depósito creado por el tubo de PVC. El haz de fibras se centrifugó después a 3000 rpm (~1300 g) durante 10 minutos para hacer pasar las perlas al interior de los pocillos grabados. El ensamblaje de tubo de PVC/tubo termocontraíble se retiró después de la centrifugación. El extremo distal del haz de fibras se sumergió en solución PBS para lavar el exceso de solución de perlas, seguido de aplicación de lavado de la superficie con agua desionizada. En realizaciones en las que las concentraciones de las perlas eran de 200.000 por 10 μl , se producía típicamente un 40-60 % de pocillos en una matriz de 50.000 pocillos de ocupación por solo una perla.

Ejemplo 5

A continuación se describe un ejemplo no limitante de la carga y detección de perlas y de perlas marcadas con enzimas en matrices de micropocillos. Se usó un sistema de formación de imágenes hecho a medida que contenía una fuente de luz de mercurio, cubos de filtro, objetivos y una cámara CCD para adquirir imágenes fluorescentes. Las matrices de haces de fibras se montaron en la platina del microscopio usando una fijación adaptada. Se colocó una gotita de sustrato β -galactosidasa (RPG) en el material de junta de silicona, y se puso en contacto con el extremo distal de la matriz de fibra. La precisión de la plataforma mecánica desplazó la lámina de silicona en contacto con el extremo distal de la matriz de fibra óptica grabada, creando una matriz de recipientes de reacción de femtolitro aislada. Se adquirieron imágenes de fluorescencia a 577 nm con un tiempo de exposición de 1011 ms. Se tomaron cinco marcos (a 30 segundos por marco) para cada matriz de haz de fibra. Las imágenes fluorescentes se analizaron usando un programa informático de análisis de imágenes para determinar la presencia o ausencia de actividad enzimática dentro cada pocillo de la matriz de micropocillos. Los datos se analizaron usando un programa informático de procesamiento de imágenes desarrollado usando MathWorks, MATLAB y MathWorks Imagen Processing toolbox. El programa informático alinea marcos de imágenes adquiridas, identifica posiciones de recipientes de reacción, localiza recipientes de reacción con perlas y mide el cambio de intensidad en el recipiente de reacción durante un periodo de tiempo predefinido. Recipientes de reacción que contienen perlas con un crecimiento suficiente de intensidad sobre todos los marcos de datos se cuentan y el número final de recipientes de reacción activos se presenta como un porcentaje de todos los recipientes de reacción identificados.

Además de fluorescencia, las matrices formaron imágenes con luz blanca para identificar aquellos pocillos que contenían perlas. Después de la adquisición de las imágenes de fluorescencia, el extremo distal (sellado) de las matrices de haz de fibras se iluminó con luz blanca y formaron imágenes en la cámara CCD. Debido a la dispersión de la luz por las perlas, aquellos pocillos que contenían una perla aparecieron más brillantes en la imagen que los pocillos sin perlas. Los pocillos con perlas se identificaron usando este método por ordenador.

Ejemplo 6

El siguiente ejemplo no limitante describe la extensión del rango dinámico de mediciones de una sola molécula. El experimento descrito anteriormente en el Ejemplo 5 se repitió a través de una amplia serie de concentraciones enzimáticas (por ejemplo, véase la Tabla 2 para intervalos de concentraciones). Las imágenes generadas en este experimento se analizaron de diferentes maneras dependiendo de la concentración ensayada. Por ejemplo, como se describe anteriormente en la descripción detallada, cuando el porcentaje de perlas asociadas con al menos una de las moléculas analito (por ejemplo, enzimas) era menor de aproximadamente 50 % (o 45 %, o 40 % o 35 %, etc.) el promedio de molécula por perla se determinó contando el número total de perlas "on". Una perla "on" se identificó como un pocillo que contenía una perla (a partir de la imagen de luz blanca) y cuya fluorescencia aumentó en los cuatro marcos consecutivos después del primer marco, y cuya fluorescencia global aumentó al menos un 20 %

desde el primer marco al último. El número total de perlas “on” puede ajustarse usando un ajuste de distribución de Poisson. A proporciones altas de perlas “on”, la señal de perla promedio se determinó a partir de la intensidad del segundo marco capturado. El factor de conversión de datos analógicos a digitales se determinó usando una muestra de concentración conocida que tenía un porcentaje de perlas “on” entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 50 %. Los resultados para las muestras de concentración conocida se representaron gráficamente en una curva de calibración, usando un factor de calibración. Usando la curva de calibración resultante, puede determinarse la concentración desconocida de las moléculas de analito en una muestra de líquidos. Por ejemplo, tratando al menos algunos de la pluralidad de lugares que contienen al menos una perla y determinando una medida indicativa del porcentaje de dichos lugares que contienen al menos una molécula o partícula de analito (por ejemplo, el porcentaje de perlas “on”). Dependiendo del porcentaje, puede determinarse una medida de la concentración desconocida de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos basándose al menos en parte en el porcentaje o basándose al menos en parte en una intensidad medida de una señal que es indicativa de la presencia de una pluralidad de moléculas o partículas de analito y por comparación del valor con la curva de calibración.

15 Ejemplo 7

El siguiente ejemplo describe la preparación y caracterización de anticuerpos de detección PSA biotinilados y conjugados enzimáticos. Los anticuerpos de detección se biotinilaron usando el reactivo de biotinilación Chromalink™. Este reactivo contiene un grupo succinimidil éster que une grupos de biotina con el anticuerpo mediante restos de lisina, y un cromóforo de bis aril hidrazona que permite cuantificar el número de moléculas de biotina por anticuerpo. El número promedio de grupos de biotina en el anticuerpo anti-PSA variaba de 7,5 a 9,5. La estreptavidina-β-galactosidasa (SβG) se conjugó usando protocolos convencionales. La caracterización por HPLC del conjugado indicó que >80 % de las moléculas conjugadas contenían una molécula de β-galactosidasa, con un promedio de 1,2 enzimas/conjugado. La comparación con patrones de peso molecular indicó que el número promedio de moléculas de estreptavidina conjugadas con cada molécula enzimática era de 2,7. Dado que cada anticuerpo de detección contiene múltiples grupos de biotina, es posible que una sola molécula de proteína unida a un solo anticuerpo de detección pueda estar unida a múltiples conjugados enzimáticos. El análisis de la intensidad de fluorescencia generada por las perlas asociadas a la enzima en el régimen de una sola molécula (AMB < 0,1) sugiere, sin embargo, que los múltiples conjugados enzimáticos no se unen a moléculas de anticuerpo de detección individualizadas: estas intensidades fluorescentes eran coherentes con la cinética previamente conocida de moléculas de β-galactosidasa individualizadas.

30 Ejemplo 8

El siguiente ejemplo describe la captura de PSA en perlas magnéticas y la formación de inmunocomplejos marcados con enzimas. Se prepararon perlas funcionalizadas con un anticuerpo monoclonal contra PSA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las soluciones de ensayo (100 μl) se incubaron con suspensiones de 500.000 perlas magnéticas durante 2 h a 23 °C. Después, las perlas se separaron y se lavaron tres veces en PBS 5 x y Tween-20 0,1 %. Las perlas se resuspendieron y se incubaron con soluciones que contenían anticuerpo de detección (~1 nM) durante 60 min a 23 °C. Después, las perlas se separaron y se lavaron tres veces en PBS 5x y Tween-20 al 0,1 %. Las perlas se incubaron con soluciones que contenían SβG (15 pM) durante 30 min a 23 °C, se separaron y se lavaron siete veces en PBS 5x y Tween-20 al 0,1 %. Después, las perlas se resuspendieron en 25 μl de PBS, y 10 μl de la solución de perlas se cargaron en una matriz de pocillos de volumen femtolitro.

45 Ejemplo 9

El siguiente ejemplo describe un sistema ejemplar en el que se realizó una detección digital y analógica combinada con marcador enzimático usando el análisis descrito anteriormente en el contexto de la realización de segundo análisis analógico (Ecuación 8). El ensayo de unión a SβG descrito anteriormente en el Ejemplo 7 y el uso de los métodos y aparatos descritos en los otros ejemplos demuestran que puede obtenerse un rango dinámico extendido combinando la determinación digital y analógica de AMB. La FIG. 13 muestra el AMB determinado a partir de imágenes de poblaciones de perlas que presentan biotina que se han incubado con concentraciones de SβG que varían de zeptomolar a picomolar. Específicamente, las FIGS. 13A y 13B muestran que combinando mediciones digitales y analógicas se obtiene un rango dinámico amplio. La FIG. 13A muestra una representación gráfica de AMB en función de la concentración enzimática. Las barras de error son desviaciones típicas sobre tres copias. La FIG. 13B muestra una tabla que incluye el % activo y los valores de AMB en función de la concentración enzimática. El AMB se determinó usando la Ecuación 4 para % activo <70 % y el AMB se determinó usando la Ecuación 8 para % activo >70 %. El umbral entre los datos digitales y analógicos en este ejemplo era de entre 10 fM y 31,6 fM.

Para las imágenes con un % de perlas activas < 70 %, se determinó el AMB_{digital} usando la Ecuación 4. Todas las matrices con < 10 % de perlas activas se usaron para determinar la \bar{I}_{sola} , un total de 7566 perlas; la \bar{I}_{sola} era igual a 298 ua. Las intensidades de fluorescencia promedio de las perlas en las imágenes con más del 70 % activo se determinó, y los valores AMB_{analógico} se calcularon usando la Ecuación 8. Dado que la concentración de SβG 0 M no produjo perlas activas, el límite de detección inferior en este experimento no pudo calcularse usando el método s.d. 3 más fondo. Usando un LOD previamente establecido de 220 zM, y la concentración más alta detectada en el rango

lineal de esta curva, 316 fM, se observó un rango dinámico lineal de 6,2 log para detectar el marcador enzimático. El rango dinámico digital lineal fue de 4,7 logs y el rango dinámico lineal analógico fue de 1,5 logs.

Ejemplo 10

Este ejemplo describe un sistema digital y analógico combinado y un método para medir el PSA en suero. La estrategia digital y analógica combinada se usó para determinar la concentración de PSA con un rango dinámico amplio. Clínicamente, el PSA se usa para explorar el cáncer de próstata y para monitorizar la reaparición bioquímica de la enfermedad en pacientes que se han sometido a cirugía para extirpar el cáncer. Se sabe que los niveles de PSA en el suero de pacientes que se han sometido a prostatectomía radical (PR) varían de 0,014 pg/ml a más de 100 pg/ml. Para medir satisfactoriamente los niveles de PSA en la mayoría de los pacientes en un solo ensayo se requiere un ensayo con 4 logs de rango dinámico. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 8. Las FIGS. 14A y 14B muestran que combinando los análisis digital y analógico, el rango de trabajo del ensayo de PSA de la invención variaba de 0,008 pg/ml a 100 pg/ml, lo que permitía realizar una cuantificación exacta de los niveles de PSA en la inmensa mayoría de muestras de pacientes sometidos a PR en un pase. Específicamente, las FIGS. 14A y 14B muestran los resultados del ensayo de PSA digital y analógico combinados con un rango de trabajo de 4 log y un LOD calculado de 0,008 pg/ml. El AMB se representó gráficamente en función de la concentración de PSA en un espacio lineal-lineal (FIG. 14A) y en un espacio log-log (FIG. 14B). Las barras de error se muestran para todos los puntos de datos basándose en mediciones realizadas por cuadruplicado.

El ensayo se usó para medir la concentración de PSA en el suero de 17 pacientes con cáncer de próstata recogido a las 2 a 46 semanas (medio = 13,8 semanas) después de realizarse cirugía de prostatectomía radical. Estas muestras se recogieron próximas a la cirugía para impulsar los límites de detección inferior de ELISA digital. En este caso, para evaluar el rango dinámico del ensayo a través rango clínico previsto, las muestras recogidas más próximas a la cirugía se ensayaron para captar pacientes con PSA más altos cuyo cáncer podría reaparecer. Sin embargo, el PSA no podía detectarse en todas las muestras usando un ensayo de diagnóstico de PSA principal (Siemens). Las muestras de suero se diluyeron a 1:4 en tampón y el AMB se midió usando los métodos descritos en el presente documento. La concentración de PSA en cada muestra se determinó leyendo el AMB off de una curva de calibración adquirida simultáneamente similar a la de la FIG. 14B. La Tabla 4 resume el AMB y las concentraciones de PSA determinadas de estas muestras, junto con la imprecisión para la señal y concentración dada por el % de CV. El PSA se cuantificó en todas las muestras en un experimento. El promedio de la concentración de PSA en estas muestras fue de 33 pg/ml, con un valor alto de 136 pg/ml y un valor bajo de 0,4 pg/ml. Cuando se combinó con mediciones previas de PSA en pacientes que se habían sometido a cirugía de prostatectomía radical (PR), las concentraciones de PSA detectadas en las muestras clínicas varió de 0,46 fM (0,014 pg/ml) a 4,5 pM (136 pg/ml), demostrando la importancia del buen rango dinámico proporcionado por el ensayo de la invención de este ejemplo.

Tabla 4. Resumen de AMB y [PSA] determinado para 17 muestras de suero de pacientes sometidos a prostatectomía radical PR^a

Muestra ID	Media AEB	Desv. típ. AEB	AEB CV %	[PSA] (pg/ml)	desv. típ. [PSA]	[PSA] CV %
S640	8.8	1.2	13	41.0	7.5	18
S641	0.87	0.08	10	4.1	0.4	11
S643	0.23	0.002	1	1.1	0.01	1
S644	15.2	1.0	6	136	13	10
S645	1.5	0.06	4	6.1	0.2	4
S647	11.0	0.1	1	80.4	1.9	2
S648	7.4	0.3	3	32.3	1.6	5
S649	1.5	0.2	11	6.1	0.6	10
S650	0.22	0.008	4	1.2	0.03	2
S651	0.50	0.02	5	2.3	0.1	4
S615	12.6	1.0	8	70.7	8.6	12
S653	1.3	0.2	18	5.0	0.8	16
S616	0.44	0.05	12	1.7	0.2	13
S618	13.6	0.7	5	79.2	6.2	8
S624	14.8	0.5	3	88.9	4.1	5
S627	0.098	0.003	3	0.39	0.01	3
S628	0.92	0.04	5	3.7	0.15	4

^aLas desviaciones típicas y los CV se determinaron sobre ensayos realizados por triplicado.

La muestra S644 tuvo un valor AEB por debajo del rango de la curva de calibración, pero su concentración se determinó por extrapolación.

Ejemplo 11

La FIG. 15 demuestra un ejemplo no limitante de un análisis de distribución de Poisson en el rango digital de una curva de calibración usando un ensayo para estreptavidina-β-galactosidasa (SβG) que dio como resultado perlas que tenían proporciones de enzima/perla bien definidas. En resumen, las perlas se funcionalizaron con una molécula

de captura biotilada, y estas perlas se usaron para captar diversas concentraciones de conjugado enzimático SβG. Las perlas se cargaron en las matrices de femtolitro y, después de sellar una solución de RGP en los pocillos de la matriz, se generó fluorescencia de enzimas unidas acumuladas en las cámaras de reacción durante 2,5 min, con imágenes de fluorescencia adquiridas cada 30 s. Se adquirió una imagen de luz blanca de la matriz al final del experimento. Estas imágenes se analizaron para identificar pocillos que contenían perlas (de la imagen de luz blanca) y determinar cuáles de estas perlas se habían asociado a moléculas enzimáticas unidas (a partir de imágenes de fluorescencia de lapso de tiempo). La FIG. 15B muestra que el $AMB_{digital}$ determinado de la Ecuación 4 mantuvo una respuesta lineal de hasta un 50 % activo, a pesar de la variación no lineal en f_{on} . Específicamente, la FIG. 15 muestra (FIG. 15A) la transformación del % de perlas activas a $AMB_{digital}$ usando estadística de Poisson. La columna del centro es la fracción de perlas activas determinada por recuento digital en función de la concentración enzimática. La columna de la derecha es el promedio de enzimas por perla (AMB) determinado a partir del % de perlas activas usando la Ecuación 4. Esta transformación representa estadísticamente perlas asociadas con múltiples moléculas enzimáticas usando un método de recuento digital; la (FIG. 15B) muestra una representación gráfica del % de perlas activas (rombos) y del $AMB_{digital}$ (cuadrados) en función de la concentración enzimática. El % de perlas activas se desvía de la linealidad con el aumento de la concentración como se esperaba a partir de la distribución de Poisson. En este experimento, el $AMB_{digital}$ fue lineal con concentraciones de hasta aproximadamente 50 % de perlas activas. Las barras de error se determinaron a partir de la desviación típica sobre tres mediciones.

Aunque en el presente documento se han descrito e ilustrado diversas realizaciones de la invención, los expertos habituales en la técnica imaginarán una variedad de otros medios y/o estructuras para realizar las funciones y/u obtener los resultados y/o una o más de las ventajas descritas en el presente documento, y cada una de dichas variaciones y/o modificaciones pretenden estar dentro del alcance de la presente invención. Más generalmente, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que todos los parámetros, dimensiones, materiales y configuraciones descritos en el presente documento pretenden ser ejemplares y que los parámetros, dimensiones, materiales y/o configuraciones reales dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas usadas para las cuales se usan las enseñanzas de la presente invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán considerar usando tan solo experimentación rutinaria, que pueden realizarse muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Por lo tanto, se entiende que en las realizaciones anteriores se presentan solo a modo de ejemplo y que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y de sus equivalentes, la invención puede llevarse a la práctica de otra manera que como se ha descrito y reivindicado específicamente. La presente invención se refiere al método descrito en el presente documento.

Los artículos indefinidos “uno”, “una” y “un”, como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, debe entenderse que significa “al menos uno (a)”.

En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva anterior, debe entenderse que todas las frases conectoras tales como “que comprende”, “que incluye”, “que realiza”, “que tiene”, “que contiene”, “que implica”, “que mantiene” y similares, son abiertas, es decir, significan inclusión pero no limitación. Únicamente las frases conectoras “que consiste en” y “que consiste esencialmente en” serán frases conectoras cerradas o semicerradas, respectivamente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar una medida de la concentración de moléculas o partículas de analito en una muestra de líquidos, que comprende:
- 10 exponer una pluralidad de objetos de captura, incluyendo cada uno de ellos una superficie de unión que tenga afinidad por al menos un tipo de molécula o partícula de analito, con una solución que contenga, o que se sospeche que contenga, el al menos un tipo de moléculas o partículas de analito, en el que al menos algunos de los objetos de captura comienzan a asociarse con al menos una molécula o partícula de analito;
- 15 segregar espacialmente al menos una parte de los objetos de captura sometidos a la etapa de exposición en una pluralidad de lugares;
- 20 tratar al menos algunos de la pluralidad de lugares y determinar una medida indicativa del porcentaje de dichos lugares que contengan un objeto de captura asociado con al menos una molécula o partícula de analito, en el que los lugares tratados son lugares que contienen al menos un objeto de captura; y
- basándose en el porcentaje, determinar una medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos basándose al menos en parte en el número de lugares que contienen un objeto de captura asociado con al menos una molécula o partícula de analito, o determinar una medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos basándose al menos en parte en un nivel de intensidad medido de una señal que es indicativo de la presencia de una pluralidad de moléculas o partículas de analito.
- 25 2. El método la reivindicación 1, en el que cuando el porcentaje de dichos lugares que contienen al menos un objeto de captura que contiene un objeto de captura asociado con al menos una molécula o partícula de analito, es menor de aproximadamente 40 % la medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos se basa, al menos en parte, en el número de lugares que contiene al menos una molécula o partícula de analito.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, en el que cuando el porcentaje de dichos lugares que contienen al menos un objeto de captura que contiene un objeto de captura asociado con al menos una molécula o partícula de analito es mayor de aproximadamente 30 % la medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos se basa al menos en parte en un nivel de intensidad de al menos una señal indicativa de la presencia de una pluralidad de moléculas o partículas de analito.
- 35 4. El método de la reivindicación 1, en el que cuando el porcentaje de dichos lugares que contienen al menos un objeto de captura que contiene un objeto de captura asociado con al menos una molécula o partícula de analito está entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 50 % la medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos es un promedio, la medida de la concentración de moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos se basa al menos en parte en el número de lugares que contienen al menos una molécula o partícula de analito y la medida de la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos se basa al menos en parte en un nivel de intensidad de al menos una señal indicativa de la presencia de una pluralidad de moléculas o partículas de analito.
- 40 45 5. El método de la reivindicación 1, en el que la medida de la concentración de las moléculas de analito en una muestra de líquidos se basa al menos en parte en un ajuste de la distribución de Poisson.
- 50 6. El método de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de objetos de captura comprende una pluralidad de perlas.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la medida de la concentración de moléculas de analito en una muestra de líquidos se basa al menos en parte en la comparación de un parámetro medido con una curva de calibración, o en el que la curva de calibración se forma al menos en parte por la determinación de al menos un factor de calibración, opcionalmente, en el que el factor de calibración se determina usando una muestra de calibración y en el que el porcentaje de lugares que contiene objetos de captura asociados con al menos una molécula de analito es entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 50 %.
- 55 8. El método de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de lugares comprende una pluralidad de recipientes de reacción, preferentemente en el que el volumen promedio de la pluralidad de recipientes de reacción es entre aproximadamente 10 attolitros y aproximadamente 100 picolitros.
- 60 9. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración de las moléculas o partículas de analito en la muestra de líquidos es menor de aproximadamente 50×10^{-15} M.
- 65 10. El método de la reivindicación 1, en el que el porcentaje de lugares tratados en la etapa de tratamiento es al

menos aproximadamente el 5 % del número total de lugares.

11. El método de la reivindicación 1, en el que las moléculas o partículas de analito son proteínas o ácidos nucleicos.
- 5 12. El método de la reivindicación 1, en el que las moléculas de analito se exponen a al menos un ligando de unión en condiciones tales que sustancialmente todas las moléculas de analito se asocian a al menos un ligando de unión.
- 10 13. El método de la reivindicación 12 en el que el al menos un ligando de unión comprende un componente enzimático.
14. El método de la reivindicación 12, que adicionalmente comprende exponer las moléculas o partículas de analito a un agente marcador precursor, preferentemente en el que el agente marcador precursor se transforma en un agente marcador después de la exposición al componente enzimático.
- 15 15. El método de la reivindicación 14, en el que el agente marcador precursor se transforma en un agente marcador después de la exposición al componente enzimático y en el que la presencia de una molécula o partícula de analito en un lugar se determina determinando la presencia de al menos un agente marcador precursor.

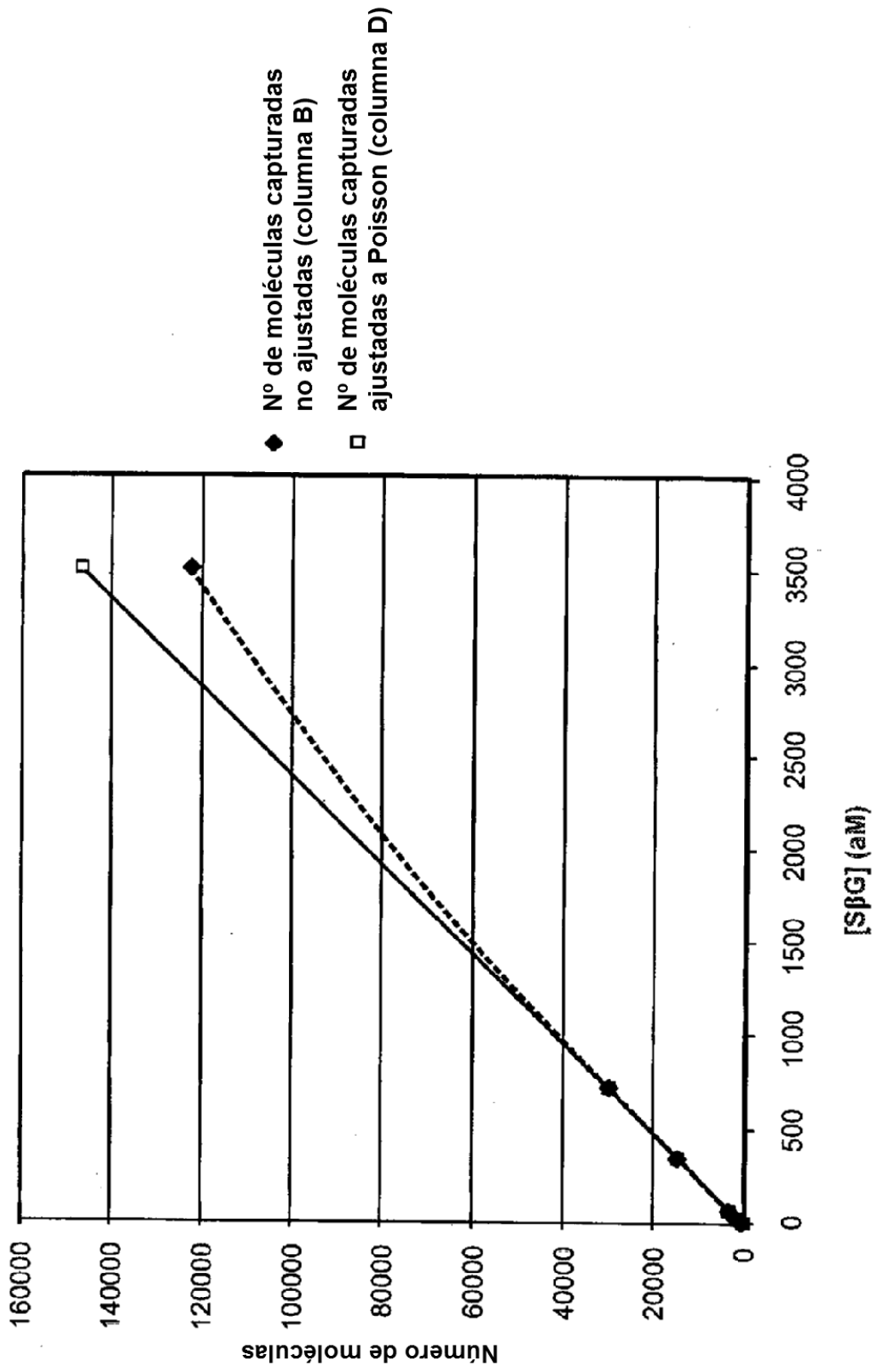


FIG. 1

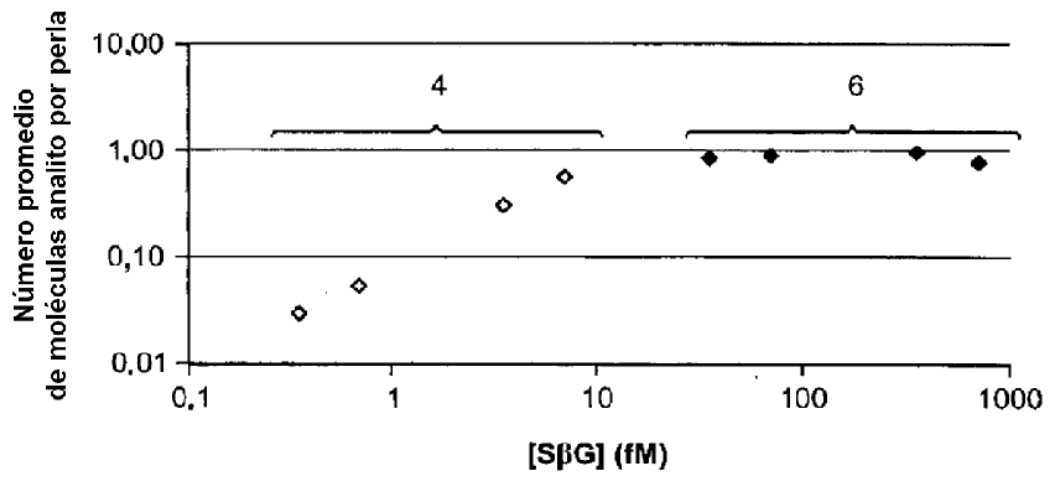


FIG. 2

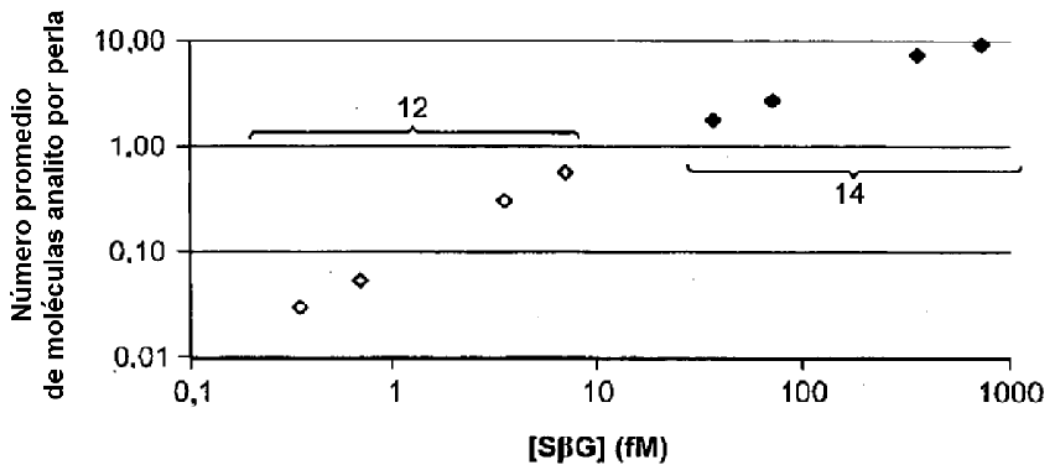
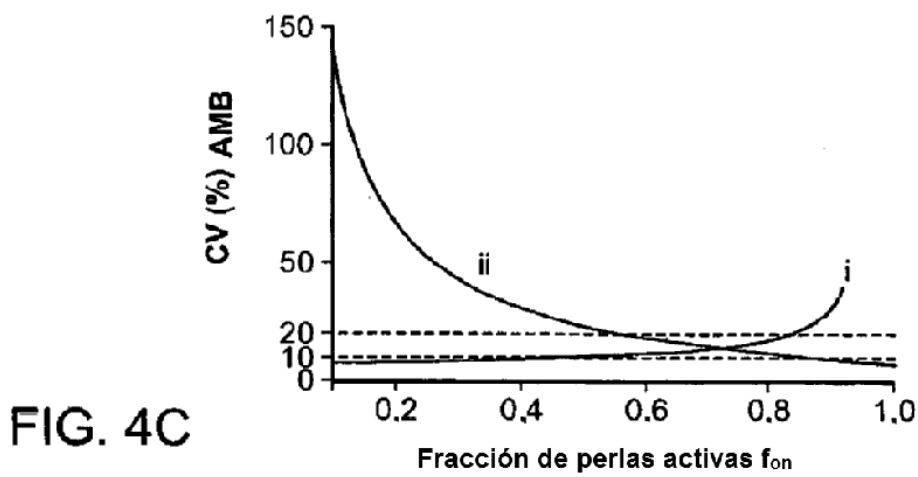
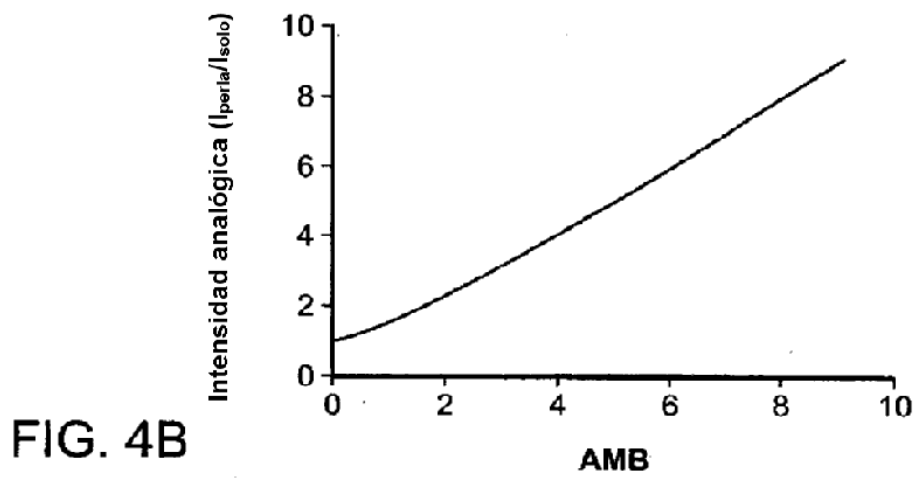
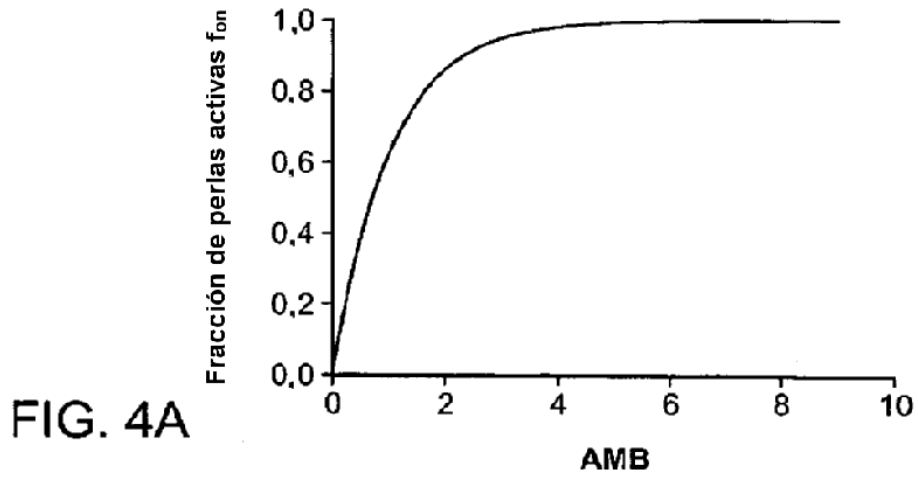


FIG. 3



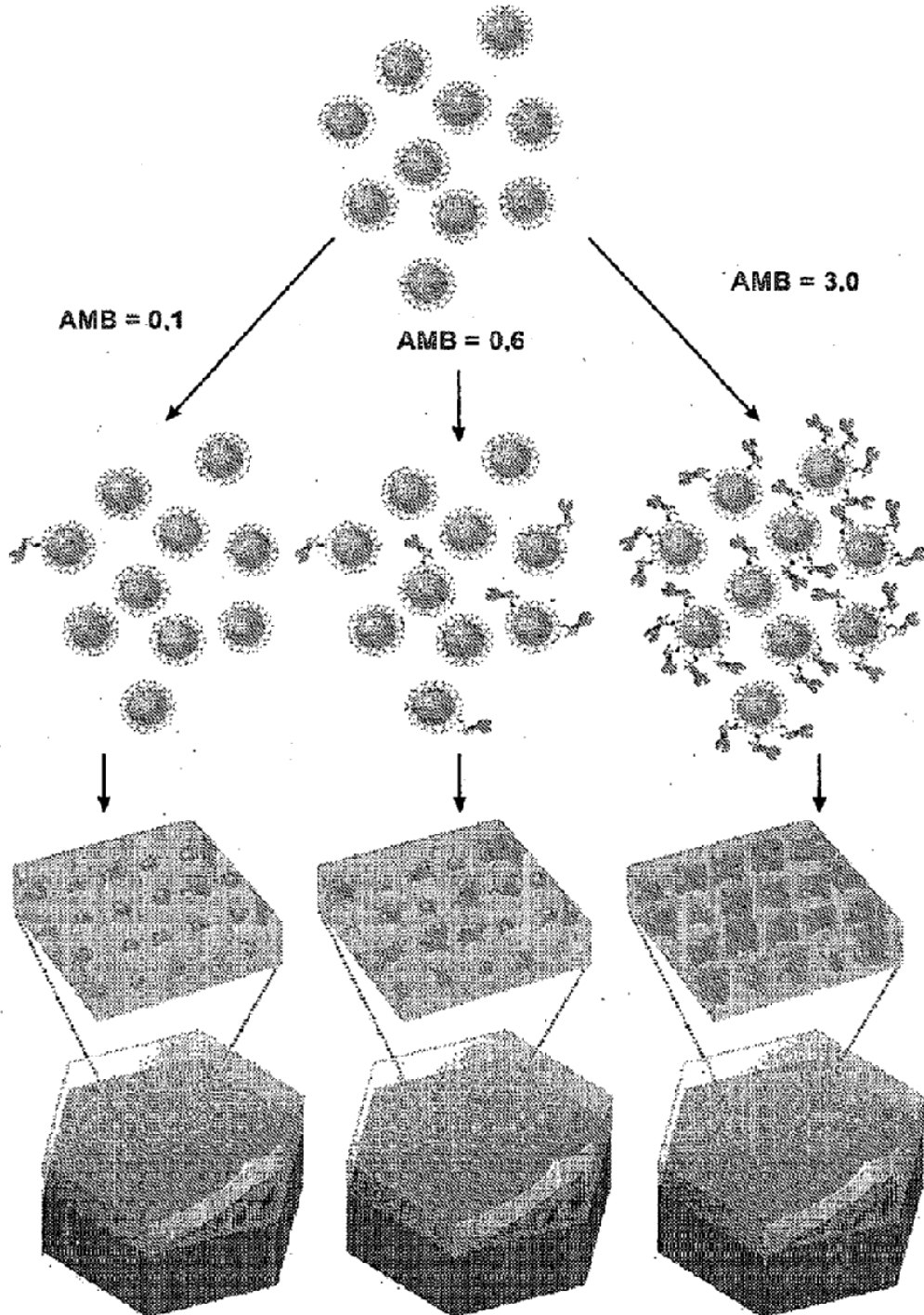


FIG. 5A

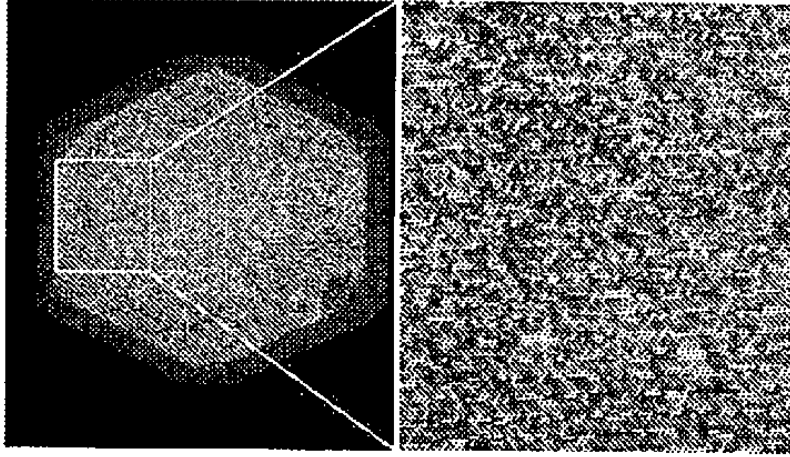


FIG. 5D

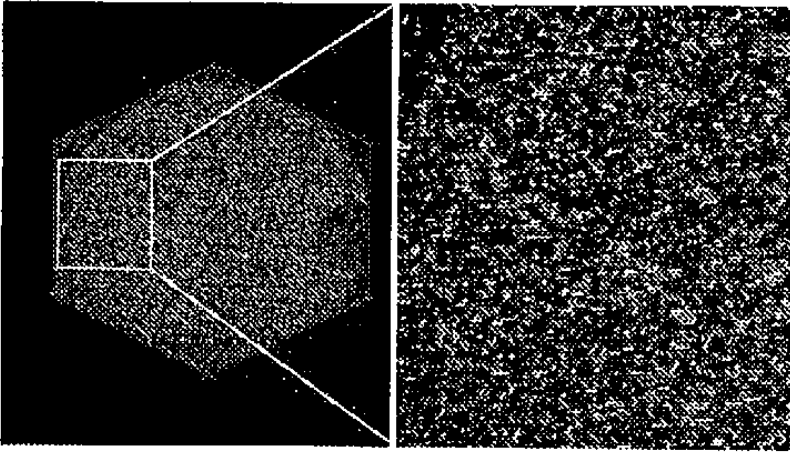


FIG. 5C

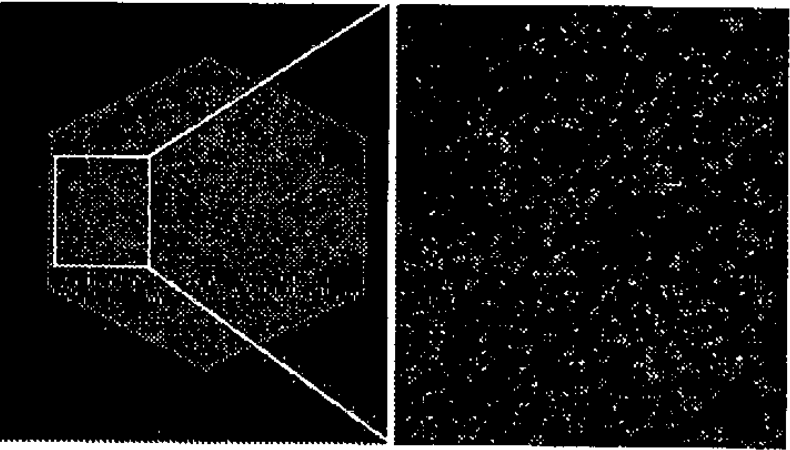


FIG. 5B

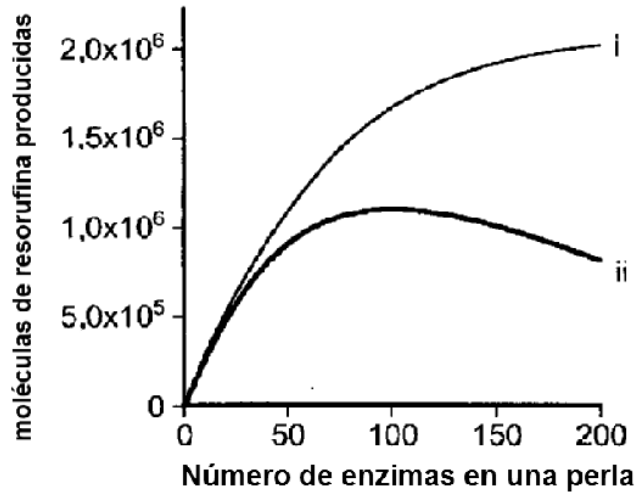


FIG. 6

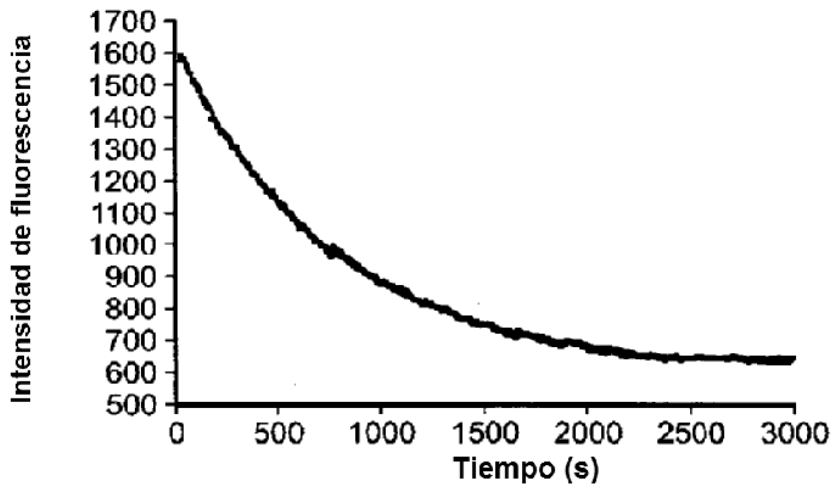


FIG. 7

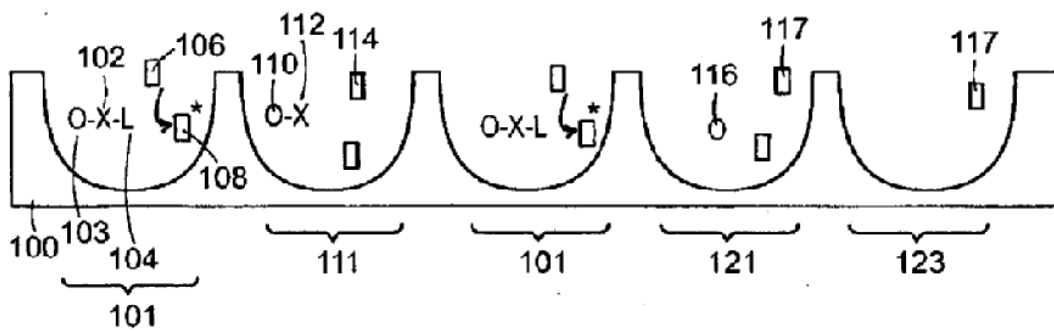


FIG. 8

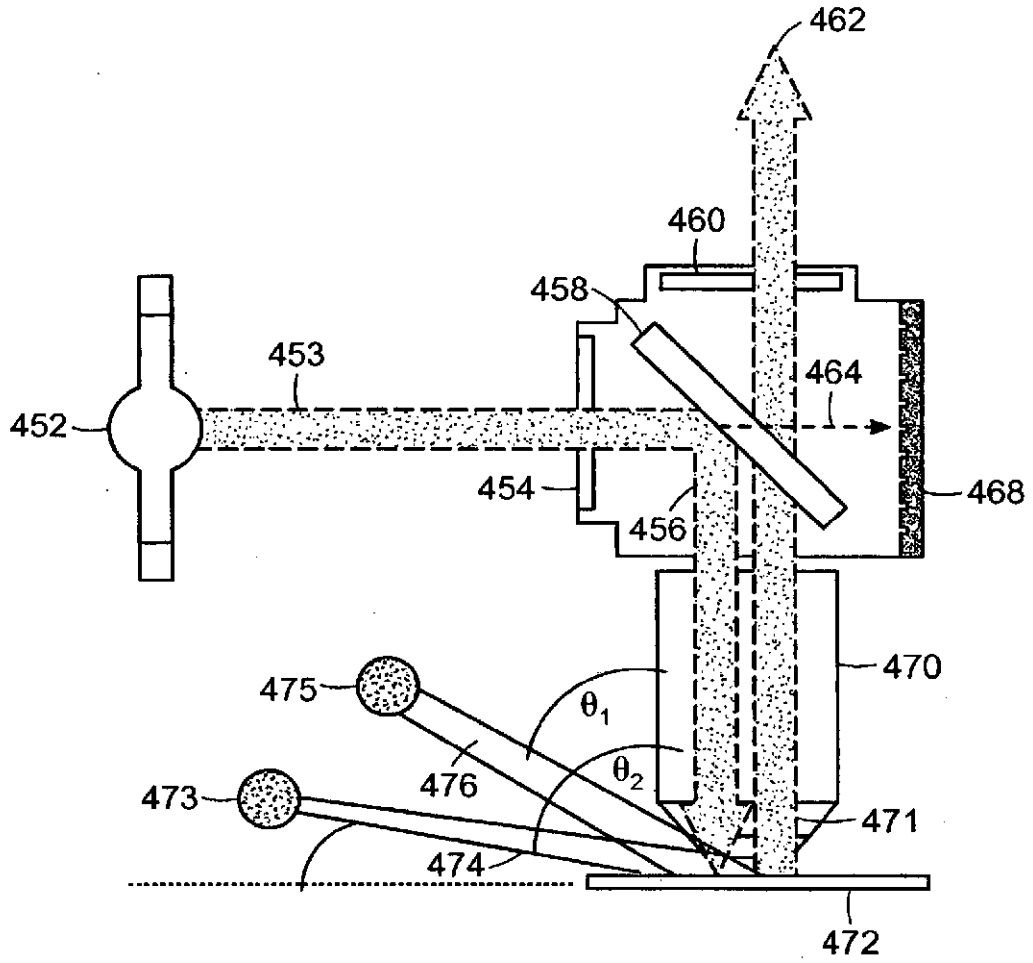


FIG. 9A

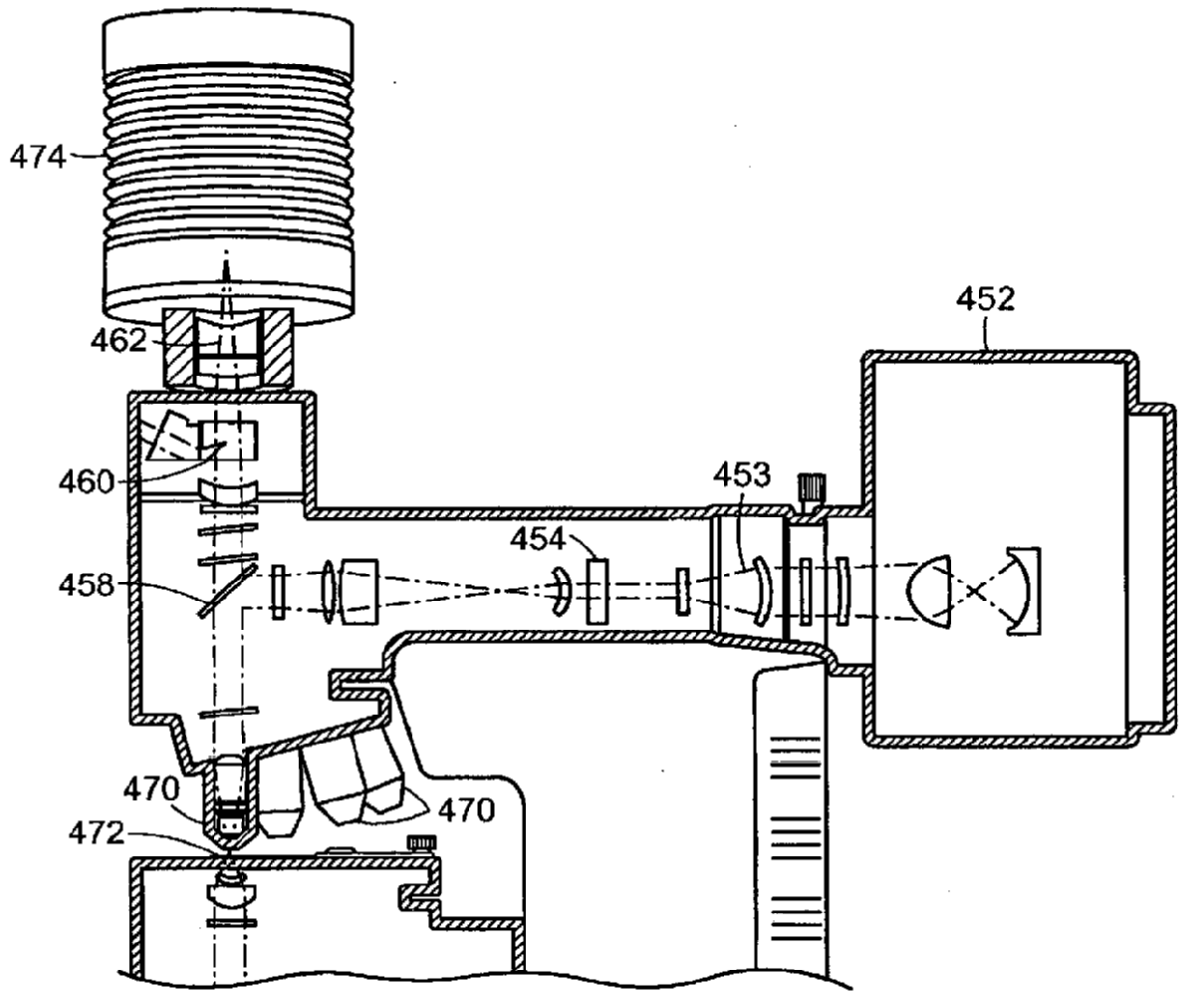


FIG. 9B

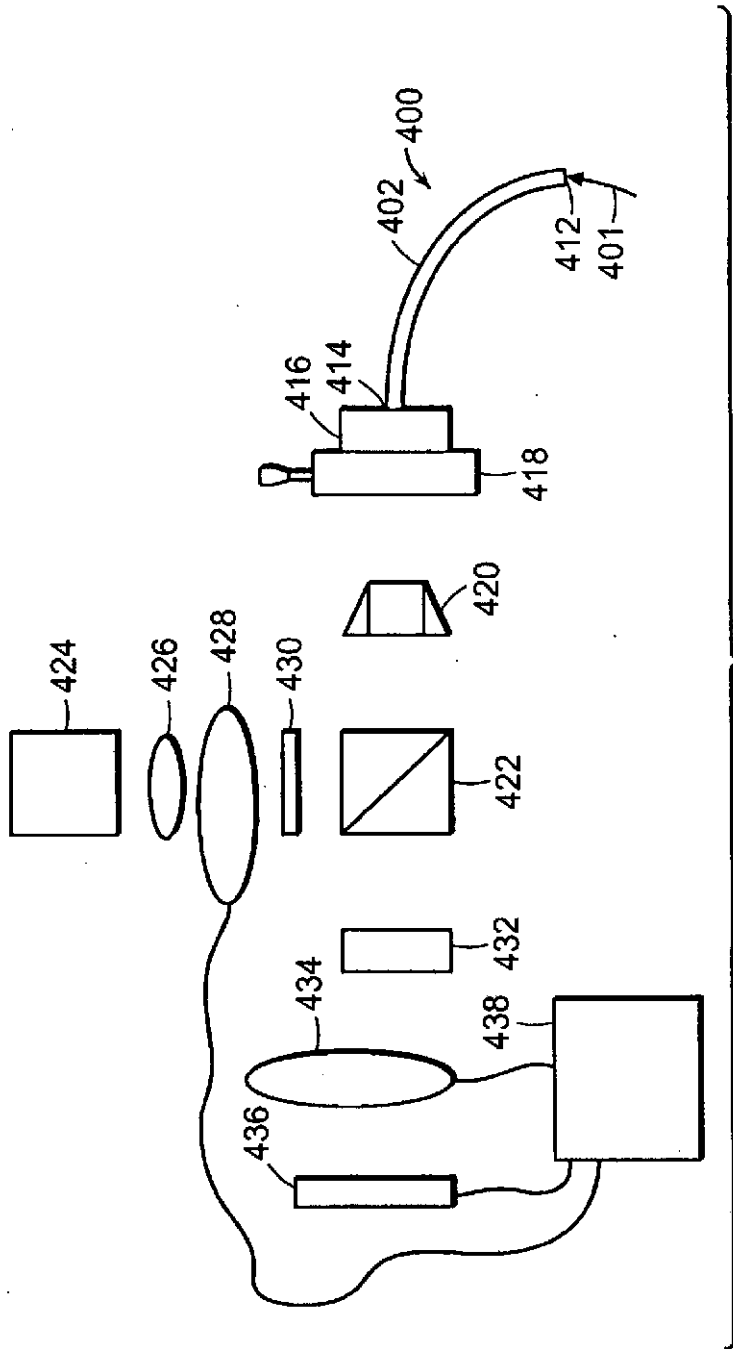


FIG. 10

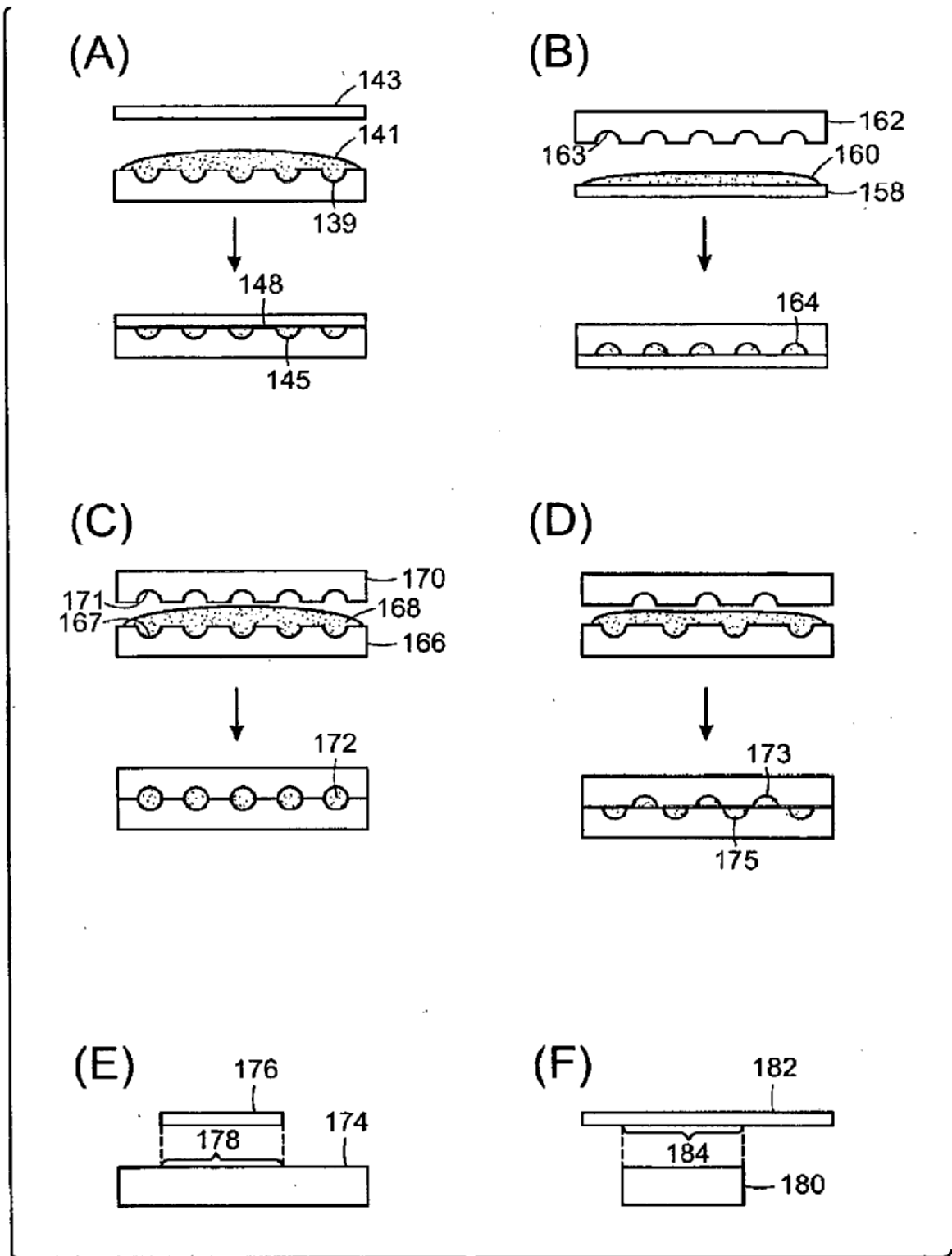


FIG. 11

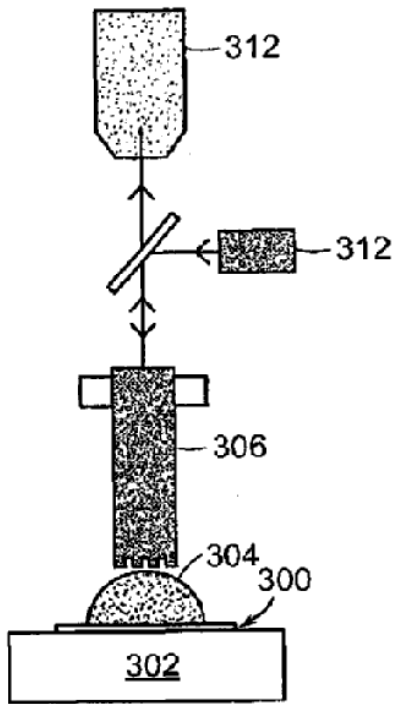


FIG. 12A

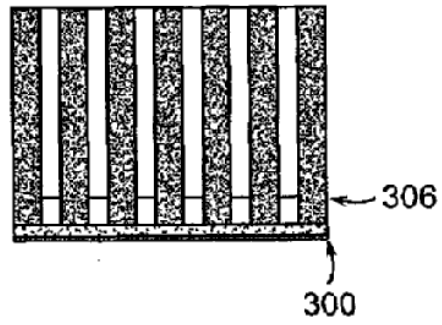


FIG. 12B

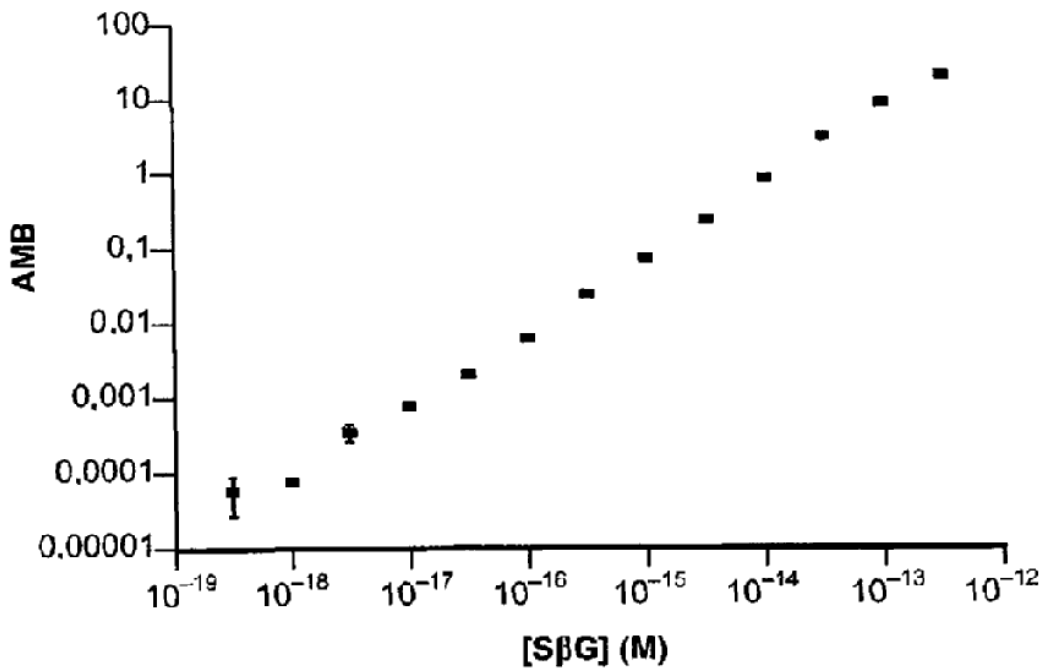


FIG. 13A

[SβG] (M)	f _{on} (% de perlas activas)	AMB		%CV
		AMB _{digital}	AMB _{analógico}	AMB
0	0	0	0	0%
3.16×10^{-19}	0.006	5.5×10^{-5}		54%
1.00×10^{-18}	0.007	7.3×10^{-5}		ND
3.16×10^{-18}	0.03	3.4×10^{-4}		25%
1.00×10^{-17}	0.08	7.7×10^{-4}		11%
3.16×10^{-17}	0.20	2.0×10^{-3}		16%
1.00×10^{-16}	0.62	6.2×10^{-3}		7%
3.16×10^{-16}	2.36	2.39×10^{-2}		5%
1.00×10^{-15}	6.99	7.25×10^{-2}		5%
3.16×10^{-15}	21.89	0.2470		<1%
1.00×10^{-14}	56.16	0.8286		11%
3.16×10^{-14}	96.27	2.902		4%
1.00×10^{-13}	99.06	8.264		12%
3.16×10^{-13}	99.12	19.55		14%

FIG. 13B

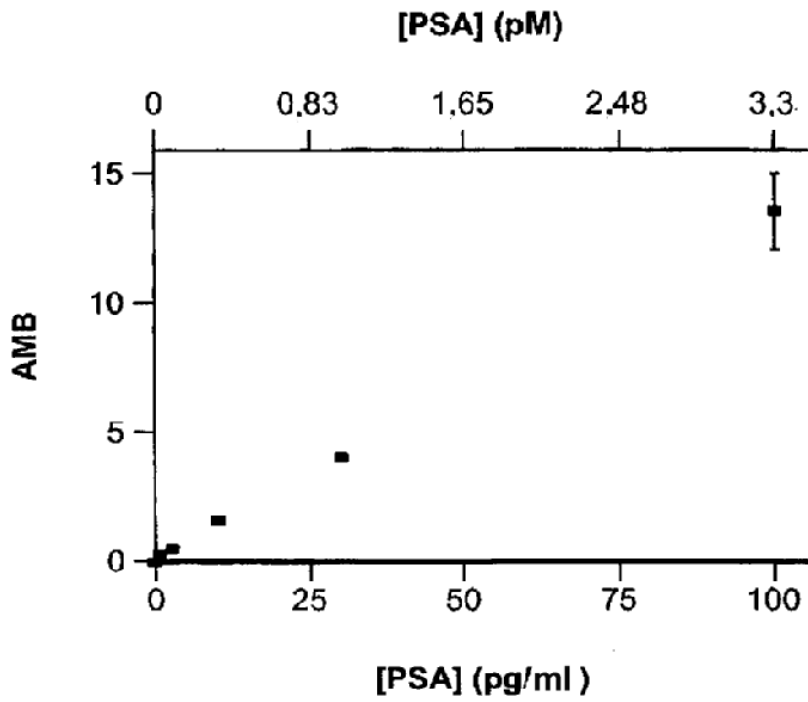


FIG. 14A

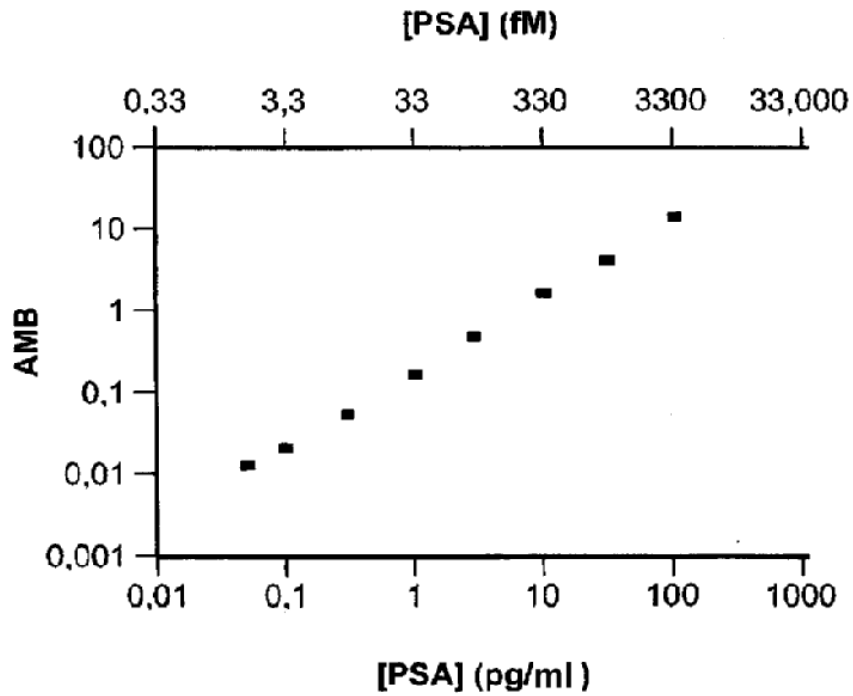


FIG. 14B

$[S\beta G]$ (fM)	f_{on} (% de perlas activas)	$\mu = AMB_{digital}$
0.6	5.07	0.0521
0.8	7.10	0.0736
1	8.89	0.0931
2	16.29	0.1778
4	31.33	0.3759
6	43.84	0.5769
8	53.42	0.7639

FIG. 15A

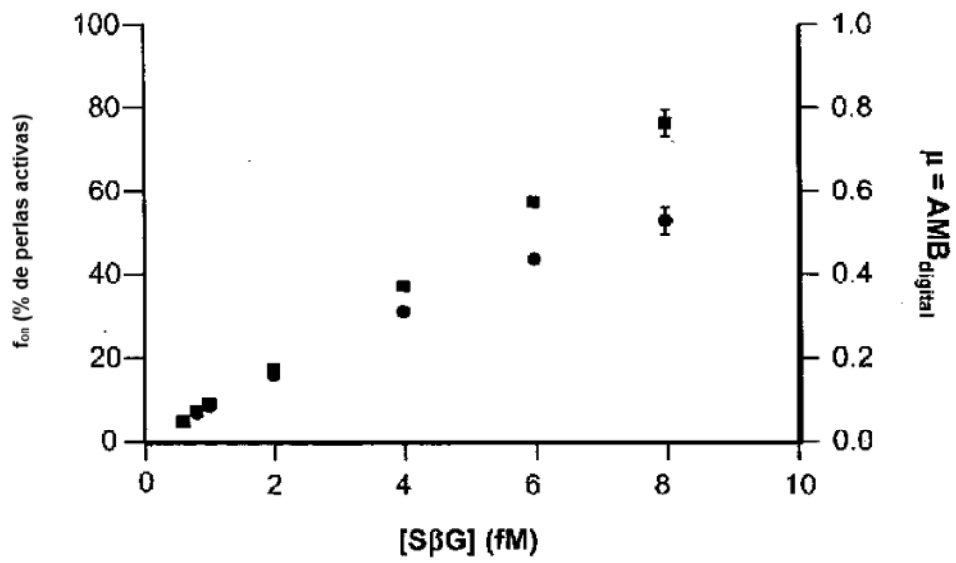


FIG. 15B