



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106434871 B

(45)授权公告日 2020.08.18

(21)申请号 201610651714.8

(22)申请日 2012.05.17

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106434871 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(30)优先权数据

61/486,817 2011.05.17 US

(62)分案原申请数据

201280034508.2 2012.05.17

(73)专利权人 德克斯特里蒂诊断公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 R·特布鲁根 Y·刘

J·R·吉尔德斯 C·H·金

M·R·阿比迪

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 张小勇

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6809(2018.01)

C12Q 1/6834(2018.01)

C12Q 1/6855(2018.01)

C12Q 1/6862(2018.01)

(56)对比文件

WO 2010114599 A1,2010.10.07,

Rowena F. Stern等.Multiplex ligation-dependent probe amplification using a completely synthetic probe set.

《BIOTECHNIQUES》.2004,第37卷(第3期),全文.

审查员 刘红霞

权利要求书1页 说明书56页

序列表8页 附图12页

(54)发明名称

用于检测目标核酸的方法与组合物

(57)摘要

本发明提供用于检测存在于样品中的一个或多个核酸目标的组合物、设备和方法。本发明的方法包括利用两个或更多个接合探针,这些接合探针以可逆方式彼此紧密结合目标核酸并且具有互补的反应性接合部分。当这些探针已经按适当定向结合到目标上时,其能够经历自发化学接合反应,得到接合产物,对这种接合产物直接进行检测,或扩增这种接合产物以产生扩增子,然后对这些扩增子进行检测。本发明还提供用以稳定样品RNA以使得降解不会显著影响分析方法。

1. 一种检测包含血液的目标样品中的多个不同目标核酸的方法, 其中每个目标序列核酸包含相邻的第一目标结构域和第二目标结构域以及位于所述第一目标结构域和第二目标结构域上游或下游的第三目标捕获结构域, 所述方法包括:

a) 将含有血液的目标样品收集到稳定缓冲液以形成反应混合物, 所述稳定缓冲液包含2-6摩尔浓度的胍盐;

b) 将所述反应混合物与多个不同探针组接触, 每个探针组包含:

i) 包含以下各项的第一核酸接合探针:

1) 与一个目标核酸的第一目标结构域互补的第一探针结构域;

2) 第一引物序列; 以及

3) 5' 接合部分; 以及

ii) 包含以下各项的第二核酸接合探针:

1) 与所述一个目标核酸的第二目标结构域互补的第二探针结构域;

2) 第二引物序列; 以及

3) 3' 接合部分;

c) 在不存在接合酶的情况下接合所述第一接合探针和第二接合探针以形成多个不同接合产物;

d) 使包含捕获部分的目标捕获探针与所述目标核酸的所述第三目标结构域杂交以形成目标复合物;

e) 使用所述捕获部分在表面上捕获所述目标复合物;

f) 扩增所述不同接合产物以形成多个扩增子; 以及

g) 检测所述扩增子的存在。

2. 权利要求1的方法, 其中所述5' 接合部分是DABSYL部分而所述3' 接合部分是硫代磷酸酯部分。

3. 权利要求1的方法, 其中所述胍盐是盐酸胍。

4. 权利要求1的方法, 其中所述胍盐是异硫氰酸胍。

5. 权利要求1的方法, 其中所述胍盐是3M盐酸胍。

6. 权利要求1的方法, 其中所述收集步骤a) 在不同于所述步骤b) -g) 的地理位置进行。

7. 权利要求1的方法, 其中所述目标样品在所述稳定缓冲液中在室温下能够稳定一天到三个月。

## 用于检测目标核酸的方法与组合物

[0001] 本申请是于2012年5月17日提交的申请人为“德克斯特里蒂诊断公司”、发明名称为“用于检测目标核酸的方法与组合物”的中国专利申请号201280034508.2(国际申请号为PCT/US2012/038436)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2011年5月17日提交的美国临时专利申请第61/486,817号的优先权,并且是2010年3月29日提交的美国专利申请第12/798,108号的部分继续申请,每个申请特此以全文引用的方式并入。

[0004] 关于联邦资助研究的声明

[0005] 本发明在小型企业创新研究(Small Business Innovation Research;SBIR)计划所授予的批准号1R43HG006656-01下通过政府支持而完成。政府对本发明具有某些权利。

[0006] 发明背景

[0007] 特定核酸的检测是一个用于诊断医学和分子生物学研究的重要工具。基因探针试验当前在诊断医学和分子生物学的许多领域中起作用,包括例如识别传染性生物体,如细菌和病毒;探查正常基因和突变基因的表达并识别与疾病或损伤相关的基因,如致癌基因;在组织移植之前针对相容性将组织分型;匹配组织或血液样品以供法医学研究,用于对如核事故或流感大爆发等紧急反应情况作出响应;确定疾病预后或病因;以及探索来自不同物种的基因之间的同源性。

[0008] 理想地,基因探针试验应该是灵敏的、特异性的并且容易自动化的。灵敏度(即,低检测限)的要求已经通过开发可使研究者在分析之前以指数方式扩增特定核酸序列的聚合酶链反应(polymerase chain reaction;PCR)和其他扩增技术而大大减低。举例来说,SNP基因座的多重PCR扩增并且随后与寡核苷酸阵列杂交可以用于同时对几百个SNP进行基因分型。

[0009] 特异性对基因探针试验来说是一项挑战。探针与目标之间的分子互补程度限定相互作用的特异性。杂交反应中探针、目标和盐的组成和浓度以及反应温度和探针长度的变化可能都会改变探针/目标相互作用的特异性。有可能在一些情况下区分完全互补的目标与错配的目标,不过这对于使用传统技术一般较困难,因为反应条件中的较小变化将会改变杂交。用于错配检测的技术包括探针消化试验,其中错配产生探针裂解的位点;以及DNA接合试验,其中单点错配防止接合。

[0010] 多种酶促和非酶促方法可用于检测序列变化。基于酶的方法的实例包括Invader<sup>TM</sup>、寡核苷酸接合试验(oligonucleotide ligation assay;OLA)单碱基延伸法、等位基因PCR以及竞争探针分析(例如通过杂交进行的竞争测序)。酶促DNA接合反应在本领域中众所周知并且已经被广泛用于SNP检测、酶促扩增反应和DNA修复。许多非酶促或模板介导的化学接合方法也可以用于检测序列变化。这些方法包括化学接合方法,其利用偶联试剂,如N-氰基咪唑、溴化氰和1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐。

[0011] 当分析RNA以供遗传研究时的一个广泛公认的问题是RNA本身固有的不稳定性。RNA天然地在活的生物体中具有短寿命,因为生物体调控RNA浓度,由此调控依赖于RNA的下

游过程。还存在许多导致RNA破坏的天然过程。

[0012] 近年来,研究者已耗费相当大的努力来开发用于分析细胞中的基因表达的方法。这一般是通过分析细胞内含物中所存在的特异性mRNA分子的量来实现。基因表达的测量是基于以下潜在假设:所分析的RNA样品与体内许多转录物非常类似。因此,在从细胞中提取之后维持RNA的完整性至关重要。研究者已经认识到,不同基因(mRNA)的转录物具有不同稳定性,这意味着在分离程序期间发生的RNA降解可能不均匀地分布在不同RNA分子当中。具有不同降解程度的RNA样品的一项比较显示,高达75%的基于微阵列的差异基因表达测量可能由于降解偏差而引起。Auer H,Liyanarachchi S,Newsom D,Klisovic MI,Marcucci G,Kornacker K(2003),Nature Genetics 35:292-293。

[0013] 仍然需要用于有效和特异性的核酸检测以及用于在从细胞中提取之后稳定RNA的方法和组合物。

## 发明概要

[0014] 因此,本发明提供用于非酶促化学接合反应的方法和组合物,其提供快速目标检测并且大大简化了检测和测量目标核酸的过程。

[0015] 在一个方面,本发明提供一种检测样品中的多个不同目标核酸的方法,其中每个目标核酸包含与第二目标结构域相邻的第一目标结构域和位于第一目标结构域和第二目标结构域上游或下游的第三目标捕获结构域。这种方法包含以下步骤:(a)提供多个接合衬底,各自包含:目标核酸中的一种;包含以下各项的第一组接合探针:(i)包含与一个目标核酸序列的第一目标结构域杂交的第一探针结构域和5'-接合部分的第一核酸接合探针,以及(ii)包含与一个目标核酸序列的第二目标结构域杂交的第二探针结构域和3'接合部分的第二核酸接合探针;(b)在不使用接合酶的情况下接合第一接合探针和第二接合探针以形成第一个接合产物;(c)使包含捕获部分的目标捕获探针与目标核酸的第三目标结构域杂交以形成目标复合物;(d)使用捕获部分在表面上捕获目标复合物;扩增接合产物以形成扩增子;以及(f)检测扩增子,从而检测目标核酸。

[0016] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案,目标核酸进一步包含与第五目标结构域相邻的第四目标结构域;并且多个接合衬底各自进一步包含第二组接合探针,所述第二组接合探针包含与第四目标结构域杂交的第三核酸接合探针和与第五目标结构域杂交的第四核酸接合探针。在这些实施方案中,这种方法进一步包含在不存在接合酶的情况下接合第三接合探针和第四接合探针以使得一个目标核酸序列包含多个接合产物的步骤,并且检测步骤(f)包含检测由多个接合产物产生的扩增子。

[0017] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,目标核酸进一步包含与第七目标结构域相邻的第六目标结构域;多个接合衬底各自进一步包含第三组接合探针,所述第三组接合探针包含与第六目标结构域杂交的第五核酸接合探针和与第七目标结构域杂交的第六核酸接合探针;并且这种方法进一步包含在不存在接合酶的情况下接合第三接合探针和第四接合探针以使得一个目标核酸序列包含多重接合产物。

[0018] 在又一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,接合探针中的每一个进一步包含引物序列。

[0019] 在又一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,每组接合探针的接合探

针中的至少一个进一步包含可变间隔区序列以使得扩增子具有目标特定长度。

[0020] 在再一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,每组接合探针中仅有一个接合探针包含可变间隔区序列。

[0021] 在再一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,可变间隔区序列含于接合探针的探针结构域与引物之间。

[0022] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,目标捕获探针的捕获部分包含选自以下各项的成员:捕获核酸序列、珠粒和结合搭配物对的结合搭配物。

[0023] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,5'接合部分包含DABSYL并且3'接合部分包含硫代磷酸酯。

[0024] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,3'接合部分包含DABSYL。

[0025] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,样品被收集到包含盐酸胍(guanidinium hydrochloride,GuHCl)的缓冲液中。在一个示例性实施方案中,样品为血液。

[0026] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,目标核酸包含DNA或RNA。

[0027] 在又一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,检测步骤(f)利用选自以下各项组成的组的技术:毛细管电泳、质谱分析、微阵列分析、测序、实时PCR、光学检测、荧光检测、生物发光检测、化学发光检测、电化学检测、电化学发光检测和侧向流检测。

[0028] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,杂交步骤(c)与接合步骤(b)同时进行。

[0029] 在另一个方面并且根据上述实施方案中的任一个,本发明提供一种检测样品中的多个不同目标核酸的方法,其中每个目标序列包含相邻的第一目标结构域和第二目标结构域,这种方法包含(a)提供多个接合衬底,各自包含:不同目标核酸中的一种;包含以下各项的第一核酸接合探针:与一个目标核酸的第一目标结构域互补的第一探针结构域、第一引物序列和5'-接合部分;以及包含以下各项的第二核酸接合探针:与一个目标核酸的第二目标结构域互补的第二探针结构域、第二引物序列和3'接合部分。接合探针中的一个包含可变间隔区序列。这种方法进一步包含以下步骤:(b)在不存在接合酶的情况下接合第一接合探针和第二接合探针以形成多个不同接合产物,其中不同接合产物具有不同目标特定长度;(c)扩增接合产物;以及(d)以不同目标长度为基础检测不同接合产物的存在。

[0030] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,目标核酸序列为RNA或DNA。

[0031] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,样品来源于血液。

[0032] 在又一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,样品来源于石蜡包埋样品。

[0033] 在再一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,检测是通过毛细管电泳或通过质谱分析。

[0034] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,第一引物中的每一个是相同的并且第二引物中的每一个是相同的。

[0035] 在其他方面并且根据上述实施方案中的任一个,本发明提供一种用于检测目标核酸序列的试剂盒,其中目标序列包含相邻的第一目标结构域和第二目标结构域,这种试剂盒包含:(a)包含6M GuHCl的2X裂解缓冲液;(b)包含以下各项的第一接合探针:(i)与第一目标结构域互补的第一探针结构域,(ii)第一引物序列,以及(iii)5'-接合部分;以及(c)包含以下各项的第二核酸接合探针:(i)与第二目标结构域互补的第二探针结构域,(ii)第二引物序列;以及(iii)3'接合部分。

[0036] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,一个或两个接合探针进一步包含可变间隔区序列。

[0037] 在另一个方面并且根据上述实施方案中的任一个,本发明提供一种检测样品中的多个不同目标核酸的方法,其中每个目标序列包含相邻的第一目标结构域和第二目标结构域,这种方法包含:(a)提供包含以下各项的反应混合物:(i)包含血液的目标样品,以及(ii)包含3M GuHCl的1X裂解缓冲液;(b)使反应混合物与多个不同探针组接触,每个探针组包含:(i)包含以下各项的第一接合探针:(1)与一个目标核酸的第一目标结构域互补的第一探针结构域,(2)第一引物序列,以及(3)5'-接合部分;以及(iii)包含以下各项的第二核酸接合探针:(1)与一个目标核酸的第二目标结构域互补的第二探针结构域,(2)第二引物序列,以及(3)3'接合部分;(d)在不存在接合酶的情况下接合第一接合探针和第二接合探针以形成多个不同接合产物;(e)扩增不同接合产物;以及(f)检测接合产物的存在。

[0038] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,接合探针进一步包含可变间隔区序列。

[0039] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,目标核酸为RNA。

[0040] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,第一接合探针和第二接合探针中的一个进一步包含结合搭配物对中的一种,并且在扩增之前,添加包含另一个结合对的珠粒以捕获接合产物。

[0041] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,检测是使用可变间隔区序列来完成。

[0042] 在另一个方面并且根据上述实施方案中的任一个,本发明提供一种检测样品中的多个目标RNA序列的方法,其中每个目标核酸序列包含相邻的第一目标结构域和第二目标结构域以及第三目标结构域。这种方法包括以下步骤:将样品收集到缓冲液中以形成稳定样品;根据上述实施方案中的任一个在稳定样品中进行试验以检测多个目标核酸。

[0043] 在另一个实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,样品在环境室温下稳定至少1周。

[0044] 附图简述

[0045] 图1为CLPA-CE试验的一个实施方案的示意性图示。

[0046] 图2为CLPA-MDM试验的一个实施方案的示意性图示。

[0047] 图3为示出2-探针和3-探针CLPA反应的一个实施方案的示意性图示。

[0048] 图4为可以用于制造具有3'-DABSYL离去基的DNA的DNA合成树脂的示意性图示。

[0049] 图5为CLPA-CE试验的一个实施方案的工艺流程的示意性图示。

[0050] 图6为示出用于CLPA试验的探针设计的示意性图示,其中探针含有尺寸变异性填充序列。

[0051] 图7示出通过CLPA-CE分析的样品的电泳分离轮廓。

[0052] 图8示出CLPA-CE分析中目标浓度与峰高之间的线性关系。

[0053] 图9示出关于FFPE组织样品分析的资料,其比较具有前列腺FFPE组织切片的多种目标(对于每个目标来说的左侧条)与非目标对照(pNTC-对于每个目标来说的右侧条)的Luminex信号。

[0054] 图10为用于将结合的CLPA探针组与溶液相/未结合的CLPA探针组分离的目标捕获方法的示意性图示。

[0055] 图11为与单个目标捕获探针一起结合到样品目标上的多重独特CLPA探针组的示意性图解。

[0056] 图12为本发明的一个实施方案的可能定向的另一个示意性图解,其可以特别用于评估样品完整性。图12A描绘类似于图11的定向,除了其中捕获探针在接合探针组的“下游”。CM为捕获部分。如本领域技术人员应了解,CM可以在捕获探针的3'端或5'端,不过其通常被描绘在3'末端。另外,每个接合探针中不与目标结构域杂交的部分可以含有许多不同功能部分,包括(但不限于)引物结合结构域、尺寸标签、捕获序列等,如图11中所示。图12A示出接合探针组在目标的长度上以约25-30%的增量间隔以供样品完整性评估的情形。如本领域技术人员应了解并且如下文所描述,不同接合探针组的间距可以视需要而变化。图12B描绘另一种定向。图12C描绘可以用于完整性评估或冗余的定向。

[0057] 图13A-C描绘用于SNP检测的本发明实施方案的多个示意图。

[0058] 发明详述

[0059] 除非另有指示,否则本发明的实施可以采用有机化学、聚合物技术、分子生物学(包括重组技术)、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术和描述,这在本领域技术人员的能力范围内。这些常规技术包括聚合物阵列合成、杂交、接合、噬菌体呈现,以及使用标记的杂交检测。可以通过参考下文中的实施例来对适合技术进行具体说明。然而,当然也可以使用其他等效的常规程序。这些常规技术和描述可以见于标准实验手册中,如Genome Analysis:A Laboratory Manual Series(第I-IV卷),Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cells:A Laboratory Manual,PCR Primer:A Laboratory Manual,以及Molecular Cloning:A Laboratory Manual(全部获自Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) Biochemistry (第4版) Freeman, New York, Gait, "Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach" 1984, IRL Press, London, Nelson and Cox (2000), Lehninger, Principles of Biochemistry第3版, W.H. Freeman Pub., New York, N.Y., 以及 Berg等人 (2002) Biochemistry, 第5版, W.H. Freeman Pub., New York, N.Y., 所有这些文献出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0060] 应注意,除非上下文另有明确指示,否则如本文中和随附权利要求书中所用的单数形式“一个(种) (a/an)”和“这个(种)”包括复数个(种)指示物。因此,举例来说,提及“一种聚合酶”是指一种试剂或这些试剂的混合物,并且提及“这种方法”包括提及本领域技术人员已知的等效步骤和方法,等等。

[0061] 除非另有规定,否则本文中所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。本文中所提及的所有公开案都以引用的方式并入本文中,用于达成描述和披露公开案中所描述并且可能与目前描述的本发明结合使用

的装置、组合物、配制品和方法的目的。

[0062] 在提供值的一个范围的情况下,应了解,除非上下文另有明确指示,否则介于那个范围的上限与下限之间的每个居中值到下限单位的十分中的一种以及在那个规定范围内的任何其他规定值或居中值都涵盖于本发明中。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内并且也涵盖于本发明中,条件为在规定范围内有任何特定排除的限值。在规定范围包括一个或两个限值的情况下,排除那些所包括的限值中的两个限值中的任一个的范围也包括在本发明中。

[0063] 在以下描述中,阐述众多具体细节以提供本发明的更充分理解。然而,本领域技术人员应显而易见,本发明可以在没有这些具体细节中的一个或多个细节的情况下实施。在其他情况下,并未描述本领域技术人员所熟知的熟知特征和程序以避免模糊本发明。

[0064] 所有数字标示,例如pH值、温度、时间、浓度和分子量(包括范围),都是以0.1的增量(+)或(-)变化的近似值。应了解,尽管并不总有明确规定,但所有数字标示之前都加上术语“约”。术语“约”除了“X”的微小增量以外也包括精确值“X”,如“X+0.1”或“X-0.1”。还应了解,尽管并不总有明确规定,但本文所描述的试剂仅为示例性的并且这些试剂的等效物在本领域中是已知的。

#### [0065] I. 综述

[0066] 本发明包括用于检测样品中的目标核酸的方法和组合物。一般来说,目标核酸是通过包括化学接合步骤的方法来检测,在这个步骤中,在不使用外源接合酶的情况下接合两个与目标核酸的相邻结构域杂交的接合探针。

[0067] 本发明提供了利用两个或更多个接合探针(在本文中也称为“寡核苷酸探针”)的方法,这些接合探针以可逆方式彼此紧密结合目标核酸并且具有互补的反应性接合部分。在接合反应中,当探针已经按适当定向结合到目标上时,其能够经历自发化学接合反应,得到接合寡核苷酸产物,而不依赖于使用接合酶。然后,可以通过按许多不同方式测量接合寡核苷酸产物(在本文中也称为“接合产物”)的存在或量来确定所关注的目标的存在。如下文所描述,接合探针可以含有多种额外的功能部分,包括(但不限于)用以辅助接合寡核苷酸产物的识别、定量或检测的可检测标记,包括例如直接标记,如光学标记和电化学标记等,如下文更充分描述;包含核酸序列的可变间隔区序列或“尺寸标签”,这些核酸序列经过定尺寸以对特定目标具特异性,以使得检测具有特定尺寸的接合产物(或由这些接合产物产生的扩增子)可以识别特定目标核酸序列的存在和/或量。包括在一个或多个接合探针中的另一种任选的功能部分为被设计成用于在固体支撑物(例如微阵列、微珠粒、纳米粒子等)上进行后续捕获的捕获部分,其包括(但不限于)结合搭配物,如生物素、锚定寡核苷酸序列(在本文中也称为“锚定序列”或“捕获序列”);促进接合产物的浓缩或操作的分子柄(molecular handle)(磁性粒子、寡核苷酸编码序列);以及用以有助于经由如DNA或RNA聚合酶的酶进行接合产物的后续二次扩增的启动子和引物序列。

[0068] 优选地,本发明的接合反应不需要存在外源添加的接合酶,也不需要额外的酶,不过一些二次反应可能依赖于使用酶,如下文所描述的聚合酶。目标的扩增也可以包括接合产物的周转,其中接合产物对模板或目标核酸的亲合力与个别的接合探针相比较低或相当。因此,在接合杂交探针后,接合产物从目标中释放,从而放出目标以充当新的接合反应的模板。或者,可以进行热循环以从目标序列中移出接合产物并且使新的接合探针杂交以



用于另一个接合周期。

[0069] 本发明提供用于检测样品中的一个或多个核酸目标的组合物、设备和方法,包括(但不限于)DNA和RNA目标。使用非酶促方法用于核酸目标检测的优点包括对非天然DNA类似物结构的灵敏度较低、能够使用RNA目标序列和较低成本以及在变化的条件下稳固性较高。具体来说,本文所描述的方法不需要大量样品准备工作;即,接合反应可以在存在会抑制或钝化酶促过程的污染物和缓冲液的情况下进行以供检测。举例来说,可以将血液样品收集到高度变性的稳定缓冲液中,添加探针,并且反应在会使酶促过程变性的条件下发生。这种分析不纯样品中的目标核酸、尤其RNA的能力特别可用于以下应用:如医学诊断(包括基因表达谱分析和SNP检测)、法医学应用,以及对因环境毒素和/或辐射引起的损伤的测试。另外,本发明的方法和组合物适用于检测来自样品的被降解的核酸,包括石蜡包埋样品,其中固定并包埋入石蜡中的过程使得样品的核酸降解。

[0070] 另外,本发明的一个实施方案提供关于目标核酸“完整性”的试验。就是说,如本领域中所知,对于例如mRNA或固定样品中的核酸,核酸随时间而被降解。如图11和图12中所示并且如下文更充分描述,本发明可使用多重接合复合物来评估样品的完整性。类似地,对于每个目标序列使用这些多重接合复合物也可以用于通过冗余实现资料和试验完整性,类似于例如一式两份或一式三份操作样品。

[0071] 在其他方面,本发明提供用以稳定样品中的核酸的缓冲液。这些缓冲液一般包括包含离液阳离子的变性剂,在一个非限制性实施方案中包括盐酸胍。在本发明的特定实施方案中,将样品直接收集到本发明的缓冲液中,然后在无需从样品中纯化核酸的情况下在那个缓冲液中进行接合探针的后续杂交和接合。在某些实施方案中,首先稀释收集到缓冲液中的样品,随后在无需纯化样品中的目标核酸的情况下在那个稀释样品中进行杂交并接合两个或更多个接合探针的本文所描述的方法。

[0072] 如上文所论述,使本发明的接合探针与目标核酸杂交,然后在不使用接合酶的情况下接合。在接合之后,可以任选地通过酶促或化学反应扩增所产生的新产物(“接合产物”)。在优选实施方案中,化学接合反应连接两个上面具有PCR引物(例如通用PCR引物)位点的探针。另外,在本发明的一个实施方案中,一个或两个接合探针含有填充序列或可变间隔区序列,其被设计成对于每个探针组(即每个目标序列)具有不同长度,从而产生具有目标特异性长度的接合产物。在接合之后,现在可以通过PCR以指数方式扩增规定长度的寡核苷酸。根据本发明的一个方面,探针可以具有可检测标记(例如荧光标记、电化学标记、磁性珠粒、纳米粒子、生物素等)以辅助接合寡核苷酸产物的识别、纯化、定量或检测。探针还可以任选地在其结构中包括:被设计成用于在固体支撑物(微阵列、微珠粒、纳米粒子)上进行后续捕获的锚定寡核苷酸序列,促进接合产物的浓缩或操作的分子柄(磁性粒子、寡核苷酸编码序列),以及用以有助于经由如DNA或RNA聚合酶的酶进行接合产物的后续二次扩增的启动子序列。

[0073] 本发明的接合反应快速进行,对所关注的目标具特异性,并且可以产生针对每个目标的多重接合产物拷贝,从而实现可检测信号的扩增(有时在本文中被称作“产物周转”)。本发明的接合反应不需要存在外源添加的接合酶,也不需要额外的酶,不过一些二次反应可能依赖于使用酶,如下文所描述的聚合酶。接合化学部分可以从许多先前所描述的化学部分中选择。优选的化学部分为可以容易地被并入到常规制造技术中,在储存期间稳

定,并且在并入到经过适当设计的接合探针组中时展示出对目标特异性接合的较大偏好的化学部分。另外,对于涉及通过酶进行后续扩增的实施方案,产生可以通过酶有效处理的接合产物的接合化学部分和探针设计(包括非天然核苷酸类似物)是优选的。目标的扩增还可以包括接合产物的周转,例如通过去稳定,其中接合产物对模板或目标核酸的亲合力与个别的接合探针相比较低或相当;或通过存在过量探针的情况下进行标准热循环。因此,在接合杂交探针后,接合产物从目标中释放,从而放出目标以充当新的接合反应的模板。

[0074] 在本发明的其他方面并且如下文进一步详细论述,本发明试验的特异性任选地通过使用目标捕获探针来改善。本发明的目标捕获探针包括与目标核酸上的结构域互补的结构域和捕获部分。目标捕获探针不参与与接合探针的接合反应,而是被设计成与接合探针上游或下游的目标核酸杂交。目标捕获探针与目标核酸的杂交产生目标复合物,其包括目标核酸、目标捕获探针以及在目标核酸上形成的任何接合产物。然后,可以使目标复合物结合到表面或衬底(如珠粒)上,并且可以从结合到表面或衬底上的目标复合物中分离任何未结合的反应物。因此,由于任何后续扩增和/或检测步骤是对与接合探针成功杂交的目标核酸的原始样品的子组进行,故后续试验的特异性得到改善。

[0075] 本发明的上述和其他方面和实施方案进一步详细描述于以下章节中。

## [0076] II. 样品

[0077] 在一个方面,本发明提供用于检测样品中目标核酸(在本文中也称为“目标序列”)的存在或不存在的组合物和方法。如本领域技术人员应了解,样品可以包含许多事物,包括(但不限于)体液(包括(但不限于)实际上任何生物体的血液、尿液、血清、淋巴、唾液、肛门和阴道分泌物、汗液和精液,其中哺乳动物样品是优选的并且人类样品是特别优选的);环境样品(包括(但不限于)空气、农业、水和土壤样品);植物材料;生物战剂样品;研究样品(例如,样品可以是扩增反应(例如基因组DNA的一般扩增)的产物);经过纯化的样品,如经过纯化的基因组DNA、RNA、蛋白质等;原样品(细菌、病毒、基因组DNA等);如本领域技术人员应了解,实际上任何实验操作都可以对样品进行。一些实施方案利用siRNA和微RNA作为目标序列(Zhang等人,J Cell Physiol. (2007) 210 (2):279-89;Osada等人,Carcinogenesis. (2007) 28 (1):2-12;以及Mattes等人,Am J Respir Cell Mol Biol. (2007) 36 (1):8-12,这些文献中的每一个出于所有目的以全文引用的方式并入本文中,并且尤其是关于目标序列的所有教导内容)。

[0078] 本发明的一些实施方案利用来自储存(例如冷冻和/或存档)或新鲜组织的样品。石蜡包埋样品特别用于许多实施方案中,因为这些样品可能非常适用于诊断和预后,这是由于存在与样品相关的额外资料。如本文所描述的固定并石蜡包埋的组织样品是指可储存或存档的组织样品。将大多数来源于患者的病理样品以常规方式固定并石蜡包埋以供组织学分析和后续存档储存。这些样品往往不适用于传统核酸检测方法,因为这些研究需要核酸样品的高度完整性,从而可以进行核酸表达的精确测量。石蜡包埋样品中的基因表达研究往往被限于通过使用免疫组织化学染色进行定性监测以监测蛋白质表达水平。

[0079] 存在许多用于从固定石蜡包埋样品中纯化核酸的技术,如WO 2007/133703中所描述,其全部内容出于所有目的以引用的方式并入本文中并且尤其是关于从石蜡包埋样品中纯化核酸的所有教导内容。Foss等人,Diagnostic Molecular Pathology, (1994) 3:148-155和Paska,C.等人,Diagnostic Molecular Pathology, (2004) 13:234-240所描述的方法

以及可商购的试剂盒,如Ambion的Recoverall总核酸分离试剂盒,都以全文引用的方式包括在内。常用方法以经由用二甲苯或其他有机溶剂萃取从组织中去除石蜡的步骤开始,之后用使组织和蛋白质裂解并且帮助从组织中释放基因组材料的热和蛋白酶(如蛋白酶K)处理。然后,将所释放的核酸捕获于膜上或从溶液中沉淀,洗涤去除杂质,并且对于mRNA分离的情况,有时添加DNase处理步骤以使不合需要的DNA降解。

[0080] 如本文进一步详细论述,目标分析物和用于检测目标分析物的接合探针都可以根据本发明包含核酸。“核酸”或“寡核苷酸”或语法等效物在本文中意指至少两个共价连接在一起的核苷酸。目标核酸可以包含DNA或RNA。本发明的核酸一般将含有磷酸二酯键(例如在目标序列的情况下),不过在一些情况下,如下文所概述,包括可以具有交替骨架的核酸类似物(尤其与接合一起使用的标记或捕获探针),这些骨架包含例如磷酰胺(Beaucage等人, *Tetrahedron* (1993) 49 (10):1925和其中的参考文献; Letsinger, J. *Org. Chem.* (1970) 35:3800; Sprinzl等人, *Eur. J. Biochem.* (1977) 81:579; Letsinger等人, *Nucl. Acids Res.* (1986) 14:3487; Sawai等人, *Chem. Lett.* (1984) 805; Letsinger等人, *J. Am. Chem. Soc.* (1988) 110:4470; 以及 Pauwels 等人, *Chemica Scripta* (1986) 26:141)、硫代磷酸酯(Mag等人, *Nucleic Acids Res.* (1991) 19:1437; 以及美国专利第5,644,048号)、二硫代磷酸酯(Briu等人, *J. Am. Chem. Soc.* (1989) 111:2321)、0-甲基亚磷酰胺键(参看Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), 以及肽核酸骨架和键(参看Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* (1992) 114:1895; Meier等人, *Chem. Int. Ed. Engl.* (1992) 31:1008; Nielsen, *Nature*, (1993) 365:566; Carlsson等人, *Nature* (1996) 380:207,所有这些文献都以全文引用的方式并入本文中)。其他类似物核酸包括具有双环结构的那些核酸,其包括锁核酸(Koshkin等人, *J. Am. Chem. Soc.* (1998) 120:13252-3); 正性骨架(Denpcy等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:6097); 非离子性骨架(美国专利第5,386,023号、第5,637,684号、第5,602,240号、第5,216,141号以及第4,469,863号; Kiedrowski等人, *Angew. Chem. Intl. Ed. English* (1991) 30:423; Letsinger等人, *J. Am. Chem. Soc.* (1988) 110:4470; Letsinger等人, *Nucleoside & Nucleotide* (1994) 13:1597; 第2章和第3章, *ASC Symposium Series 580*, Ed. Y. S. Sanghui和P. Dan Cook编; Mesmaeker等人, *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* (1994) 4:395; Jeffs等人, *J. Biomolecular NMR* (1994) 34:17; Xu等人, *Tetrahedron Lett.* (1996) 37:743); 以及非核糖骨架,包括美国专利第5,235,033号和第5,034,506号以及第6章和第7章, *ASC Symposium Series 580*, Ed. Y. S. Sanghui和P. Dan Cook编所描述的那些骨架。含有一个或多个碳环糖的核酸也包括在核酸定义内(参看Jenkins等人, *Chem. Soc. Rev.* (1995) 第169-176页)。几种核酸类似物描述于Rawls, *C&E News* 1997年6月2日,第35页中。所有这些参考文献都出于所有目的以全文引用的方式明确并入本文中,并且尤其是关于核酸的所有教导内容。可以对核糖-磷酸酯骨架进行这些修饰以有助于添加标记或其他部分,从而提高或降低在生理环境中这些分子的稳定性和半衰期,等等。

[0081] 举例来说,在一些情况下,取决于所利用的化学方法,使用本发明的接合部分可以产生核酸类似物作为接合产物。举例来说,如下文的方案1中所示,使用某些接合部分产生磷酸硫酯键(phosphothioester bond)。

[0082] 如本领域技术人员应了解,所有这些核酸类似物都可以用于本发明。另外,可以制

得天然存在的核酸和类似物的混合物;举例来说,在接合部分的位点处,可以使用类似物结构。或者,可以制得不同核酸类似物的混合物以及天然存在的核酸和类似物的混合物。

[0083] 核酸类似物可以包括(例如)肽核酸(PNA;WO 92/20702,其以全文引用的方式并入本文中)和锁核酸(LNA;Koshkin AA等人Tetrahedron(1998) 54:3607-3630,Koshkin AA等人J. Am. Chem. Soc. (1998) 120:13252-13253,Wahlestedt C等人PNAS(2000) 97:5633-5638,这些文献中的每一个以全文引用的方式并入本文中)。在一些应用中,这种类型的类似物骨架可以展现出改善的杂交动力学、改善的热稳定性以及改善的对错配序列的灵敏度。

[0084] 核酸可以是单链或双链的(如所指定),或含有双链或单链序列的部分。核酸可以是DNA、基因组和cDNA、RNA或杂交体,其中核酸含有脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸的任何组合以及碱基的任何组合,包括天然存在的核碱基(尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤)和非天然存在的核碱基(肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、5-甲基胞嘧啶、假异胞嘧啶、2-硫代尿嘧啶和2-硫代胸腺嘧啶、2-氨基嘌呤、N9-(2-氨基-6-氯嘌呤)、N9-(2,6-二氨基嘌呤)、次黄嘌呤、N9-(7-脱氮-鸟嘌呤)、N9-(7-脱氮-8-氮杂-鸟嘌呤)和N8-(7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤)、5-丙炔基-尿嘧啶、2-硫代-5-丙炔基-尿嘧啶),等等。如本文中所述的术语“核碱基”包含“核苷”和“核苷酸”两者,以及核酸类似物的单体。因此,举例来说,肽核酸中各自含有碱基的个别单元在本文中被称为核碱基。

[0085] 一般促使在单链状态下不存在于目标序列的区域中的核酸样品(例如目标序列)在检测或杂交之前在这(这些)区域中呈单链形式。一般来说,可以使用热或化学变性促使核酸样品在目标序列的区域中呈单链形式。对于经由扩增获得的多核苷酸来说,适合于产生单链扩增产物优选的方法是优选的。适合于产生单链扩增产物多核苷酸的扩增过程的非限制性实例包括(但不限于)T7RNA聚合酶失控转录、RCA、不对称PCR(Bachmann等人,Nucleic Acid Res. (1990) 18:1309),以及异步PCR(WO 01/94638)。也可以使用通常已知的促使双链多核苷酸的区域呈单链形式的方法,如使用PNA启子(美国专利第6,265,166号),从而在多核苷酸上产生单链目标序列。

#### [0086] 目标核酸

[0087] 如本文进一步论述,本发明提供用于检测目标序列的方法和组合物。“目标序列”或“目标核酸”或语法等效物在本文中意指单链核酸上的核酸序列。目标序列可以是基因、调控序列、基因组DNA、cDNA、RNA(包括mRNA、微RNA和rRNA)的一部分,或其他。如本文中所概述,目标序列可以是来自样品或二次目标(如扩增反应的产物)的目标序列,等等。目标序列可以具有任何长度,其条件为较长序列具有较大特异性。如本领域技术人员应了解,互补目标序列可以呈现许多形式。举例来说,目标序列可以含于较大核酸序列内,即,基因或mRNA的全部或一部分、质粒或基因组DNA的限制性片段,以及其他。这些目标序列的任何和所有组合都可以充当特定试验中的目标核酸。在许多情况下,进行多重试验,其中同时检测多个目标序列,例如用于如下文更充分描述的基因表达谱分析。

[0088] 一般来说,每个目标序列包含多个不同目标结构域。每个目标序列具有至少一对用于与一组接合探针杂交的接合结构域,或更多对,如下文所描述。举例来说,样品目标序列的第一目标结构域可以与第一接合探针杂交,并且目标序列中的第二目标结构域可以与第二接合探针杂交,例如以使得化学接合部分在空间上足够接近,从而进行自发化学接合。

[0089] 一般来说,每对目标接合结构域彼此相邻,即,不存在隔开两个结构域结构域的核苷

酸。这可用于目标序列的一般检测(例如使用mRNA作为目标序列的基因表达谱分析)、如下文所论述的转移反应,以及用于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism; SNP)检测。对于SNP检测来说,目标序列包含需要得到序列信息的位置,在本文中一般被称为“检测位置”。在一些实施方案中,检测位置是单个核苷酸;而在一些实施方案中,其可以包含多个彼此相连或与由一个或多个核苷酸隔开的核苷酸。如本文中所用的“多个”意指至少两个。如本文中所用,碱基与杂交体中的检测位置碱基配对的接合探针的碱基被称为“询问位置”。

[0090] 每个样品目标核酸可以另外具有多对接合结构域。就是说,1、2、3或更多组接合探针可以与多重位置处的相同目标序列杂交,如图11或12中一般描绘。如下文更充分概述,针对每个目标核酸使用多重接合结构域可以充当评估样品中目标核酸(和/或原始样品)的完整性的基础。

[0091] 除接合结构域以外,样品目标核酸还可以含有其他结构域。在某些实施方案中,本发明的目标核酸包括目标捕获结构域能够杂交的目标捕获结构域。一般来说,如图11中所描绘并且取决于试验目的,目标捕获结构域可以在目标核酸的一个或多个接合结构域的“上游”、“下游”或“之间”。

[0092] 除非有规定,否则术语“第一”和“第二”并不意味着关于目标序列的5'-3'定向赋予序列的定向。举例来说,假定互补目标序列呈5'-3'定向,那么第一目标结构域可以位于第二结构域的5'处,或位于第二结构域的3'处。为便于提及并且不具限制性,这些结构域有时被称为“上游”和“下游”,通常惯例是目标序列以5'到3'定向显示。然而,应注意,接合结构域具有使得接合探针组的3'和5'接合部分完全相邻地(例如没有介入核碱基)或在连接接合部分的连接子允许接合的一定距离内杂交的定向。

[0093] 在一些实施方案中,可以隔开这对目标接合结构域。举例来说,在一些情况下,当需要接合扩增时,接合探针在由目标序列的一个或多个核碱基杂交时可以利用连接子并且被隔开以赋予接合产物杂交不稳定性。在其他应用中,如下文进一步详细论述,本发明的缓冲液用于稳定样品中的核酸、尤其RNA。在本发明的一些方面,样品被收集到本发明的缓冲液中。在其他实施方案中并且如下文进一步详细论述,这些缓冲液包括变性剂、还原剂、表面活性剂、pH缓冲剂、EDTA中的一种或多种,以及其任何组合。

[0094] III. 缓冲液

[0095] 在一个方面,本发明提供稳定核酸(在本文中也称为“样品核酸”或“目标核酸”)的方法和组合物。如本文中所用的“稳定”意味着样品中的核酸甚至在环境室温或高于环境室温下储存一段时间时对降解具抗性。在一些实施方案中,本发明的缓冲液中所含的核酸在室温或高于室温下稳定约一天到约三个月。稳定性可以使用本领域中已知的任何手段来测量,包括如下文进一步论述的核酸完整性试验。在其他实施方案中,如果储存于缓冲液中的样品中至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%的核酸相比未储存于缓冲液中的样品中的那些核酸显示较少降解,那么包含本发明的缓冲液中所含的核酸的样品就被评估为与未储存于缓冲液中的样品相比具有较高稳定性。在其他实施方案中,如果样品中至少大部分核酸与未储存于缓冲液中的样品相比显示较少降解,那么样品就被认定为由本发明的缓冲液稳定。RNA样品的稳定性常常是通过用来测量核酸样品的平均尺寸的毛细管电泳法来评估。稳定样品将具有长于未稳定样品的平均尺寸。本发明的另一个方

面为与一个或多个目标捕获探针组合的多重接合探针组的用途,其可以用于评估目标核酸的平均尺寸,并且通过相关性来评估目标核酸的降解程度。

[0096] 本发明的缓冲液可以任选地并且以任何组合形式包括变性剂、还原剂、表面活性剂、pH缓冲剂、螯合剂(如EDTA)中的一种或多种,以及其任何组合。如应了解,本发明的缓冲液可以包括属于相同类别的多种类型的组分,例如,本发明的缓冲液可以包括一种或多种不同种类的变性剂与一种或多种类型的表面活性剂的组合,等等。

[0097] 本发明的缓冲液的一个优点在于其可以用于稳定样品中的核酸(如RNA),然后可以根据本文所描述的方法从缓冲溶液中直接分析样品。换句话说,可以对含于本发明的缓冲溶液中的样品进行本文所描述的化学接合和检测方法,而无需分离或纯化RNA。本发明的缓冲液的另一个优点在于在将样品收集到缓冲液中之后发生细胞裂解,由此不需要额外的裂解步骤从样品中释放目标核酸。

[0098] 在一个示例性实施方案中,可以将包含RNA的样品组合于包含盐酸胍、乙二胺四乙酸(EDTA)、二硫苏糖醇(DTT)、Triton X-100和Tris-HCl的缓冲溶液(pH 7.5)中。在另一个实施方案中,可以将包含RNA的样品组合于包含异硫氰酸胍、EDTA、DTT、Triton X-100和Tris-HCl的缓冲溶液(pH 7.5)中。RNA在这些缓冲溶液中稳定并且未必需要将RNA与可能增强RNA降解的其他样品成分分离。

[0099] 在其他实施方案中,本发明的缓冲液优选地包括变性剂、尤其离液阳离子,其通过帮助展开RNA的二级结构而具有提高本文所描述的方法和试验的反应和结合效率的作用。常用离液分子为盐酸胍、异硫氰酸胍、甜菜碱或甘氨酸甜菜碱、脲、硫脲和高氯酸锂。不受理论约束,有效断开核酸中的三级结构的离液剂是优选的,并且还维持核酸目标在溶液中的溶解度的离液剂是特别有利的。本发明的缓冲液、尤其包含离液阳离子的缓冲液的一个优点在于缓冲液使样品的核酸保持于溶液中。这与用于基于血液的测试的运输系统中所用的其他传统缓冲液成对比,这些传统缓冲液倾向于在样品的核酸(尤其RNA)周围沉淀/形成阳离子外壳。因为本发明的缓冲液使核酸保持于溶液中,并且因为本发明试验的化学接合方法不需要酶,所以可以将样品收集到缓冲液中并且可以添加接合探针(并且在许多实施方案中为目标捕获探针)到样品中并且形成接合产物。为改变杂交条件,然后释放接合产物或目标复合物以供进一步分析,可以简单地稀释样品加上缓冲液以稀释变性剂并且从而改变杂交条件,由此允许使用本文所描述和本领域中已知的任何方法分析核酸。

[0100] 在其他实施方案中,本发明的缓冲液具有约5到约8.5的pH值。缓冲溶液更优选地具有约6到8的pH值,并且甚至更优选地具有约7.3或7.5的pH值。

[0101] 以下章节进一步详细论述示例性缓冲液组分。尽管个别地论述这些组分中的每一个,但本发明涵盖以下缓冲液组分以及本领域中已知的任何其他组分的任何组合。

[0102] 变性剂

[0103] 在优选实施方案中,本发明的缓冲液包括一种或多种变性剂。如本文中所用的变性剂意指用以展开核酸的双螺旋体同时损失二级和三级结构的任何物质。在其他实施方案中,变性剂包含离液阳离子,包括(但不限于)盐酸胍(GuHCl)和异硫氰酸胍。

[0104] 在其他实施方案中,变性剂为盐酸胍,其以约1摩尔浓度到约8摩尔浓度的浓度,并且更优选地以约2摩尔浓度到约4摩尔浓度的浓度,并且甚至更优选地以约3摩尔浓度的浓度存在。在其他实施方案中,本发明的缓冲液中GuHCl的浓度在约0.2-10、0.5-9、1-8、1.5-

7、2-6、2.5-5以及3.0-4.0摩尔浓度的范围内。在其他实施方案中，本发明的缓冲液中GuHCl的浓度为约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15摩尔浓度。

[0105] 在其他实施方案中，变性剂为异硫氰酸胍，其以约1摩尔浓度到约8摩尔浓度的浓度，并且更优选地以约2摩尔浓度到约4摩尔浓度的浓度，并且甚至更优选地以约3摩尔浓度的浓度存在。在其他实施方案中，本发明的缓冲液中异硫氰酸胍的浓度在约0.2-10、0.5-9、1-8、1.5-7、2-6、2.5-5以及3.0-4.0摩尔浓度的范围内。在其他实施方案中，本发明的缓冲液中异硫氰酸胍的浓度为约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15摩尔浓度。

[0106] 如应了解，本领域中已知的其他变性剂可以按类似于上文针对盐酸胍和异硫氰酸胍所列出的那些浓度的浓度用于本发明的缓冲液中。

[0107] 在一些实施方案中，例如在使用高浓度的盐(如胍盐)的情况下，这些试剂还充当裂解剂。如本领域技术人员应了解，一般来说，使用还充当细胞裂解剂的变性剂具有特定用途，不过本发明还涵盖使用第一个别裂解步骤，之后添加变性剂。

[0108] 表面活性剂

[0109] 在一些实施方案中，本发明的缓冲液包括一种或多种表面活性剂。在其他实施方案中，表面活性剂包括(但不限于)Triton X-100和N-十二烷基肌氨酸钠。

[0110] 在其他实施方案中，表面活性剂以按重量计约0.1%到约5%的浓度存在于本发明的缓冲液中。在其他实施方案中，表面活性剂以按重量计约0.1%-10%、0.5%-9.5%、1%-9%、1.5%-8.5%、2%-8%、2.5%-7.5%、3%-7%、3.5%-6.5%、4%-6%以及4.5%-5.5%的浓度存在。在优选实施方案中，表面活性剂具有约0.5%到约3%的浓度存在。在另一个实施方案中，表面活性剂具有按重量计约1.5%的浓度。

[0111] pH缓冲剂

[0112] 在一些实施方案中，本发明的缓冲液包括一种或多种pH缓冲剂。这些pH缓冲剂包括(但不限于)Tris。在其他实施方案中，pH缓冲剂可以是本领域技术人员已知的许多pH缓冲剂中的一种。一般来说，本发明中所用的pH缓冲剂包括具有在操作pH的一个pH单位内的pKa的试剂。

[0113] 在一些实施方案中，pH缓冲剂以约10mM到约100mM的浓度存在于本发明的缓冲液中。在优选实施方案中，pH缓冲剂具有约20mM到约50mM的浓度，并且更优选地具有约30mM的浓度。在其他实施方案中，pH缓冲剂具有约5-150、10-140、15-130、20-120、25-110、30-100、35-90、40-80、45-70以及50-60mM的浓度。

[0114] 还原剂

[0115] 在一些实施方案中，本发明的缓冲液包括一种或多种还原剂。这些还原剂可以包括(但不限于)二硫苏糖醇(DTT)和巯基乙醇。

[0116] 在其他实施方案中，还原剂具有约1mM到约100mM的浓度。在优选实施方案中，还原剂具有约4mM到约7mM的浓度，并且甚至更优选地具有约5mM的浓度。在其他实施方案中，还原剂具有约0.5-10、1-9.5、1.5-9、2-8.5、2.5-8、3-7.5、3.5-7、4-6.5mM的浓度。在其他实施方案中，还原剂具有约1-150、10-140、15-130、20-120、25-110、30-100、35-90、40-80、45-70以及50-60mM的浓度。

[0117] EDTA

[0118] 在其他实施方案中，本发明的缓冲液包括浓度为约1mM到约100mM的EDTA。EDTA更



优选地具有约10mM到约50mM的浓度,并且甚至更优选地具有约20mM的浓度。在其他实施方案中,EDTA以约1-150、10-140、15-130、20-120、25-110、30-100、35-90、40-80、45-70以及50-60mM的浓度存在。在其他实施方案中,EDTA具有约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60mM的浓度。

#### [0119] 额外缓冲液组分

[0120] 本发明的缓冲液可以进一步包括本领域中已知的任何额外组分,尤其本领域中已知的用于涉及核酸的反应中的组分。额外组分可以包括(但不限于):佐剂、稀释剂、粘合剂、稳定剂、盐(包括NaCl和MgCl<sub>2</sub>)、亲脂性溶剂、防腐剂等等。缓冲液组分还可以包括药用赋形剂和添加剂、蛋白质、肽、氨基酸、脂质以及碳水化合物(例如糖,包括单糖、二糖、三糖、四糖和寡糖;衍生化糖,如醛醇、醛糖酸、酯化糖等等;以及多糖或糖聚合物),其可以单个地或以组合形式存在,单独或以组合形式占1-99.99%(按重量或体积计)。示例性蛋白质赋形剂包括血清白蛋白,如血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等等。也可以发挥缓冲能力的代表性氨基酸/抗体组分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜(aspartame)等等。碳水化合物赋形剂也预期处于本发明的范围内,其实例包括(但不限于)单糖,如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等等;二糖,如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等等;多糖,如棉子糖、松三糖、麦芽糊精、右旋糖苷、淀粉等等;以及醛醇,如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇(葡萄糖醇)和肌醇。

#### [0121] 本发明的缓冲液的用途

[0122] 本发明的缓冲液可以与本文所论述的样品收集、化学接合或试验中的任一个一起使用。

[0123] 在一些实施方案中,含有目标核酸的样品被收集到本发明的缓冲液中。本发明的缓冲液的优点在于其倾向于稳定样品中所含的核酸。因此,本发明的缓冲液至少在一定程度上阻止了常常在收集后立即开始发生(尤其就RNA来说)的降解,从而提供了一组稳固的目标核酸用于使用本发明的方法进行进一步分析的优点。

[0124] 在其他实施方案中,在样品被收集到本发明的缓冲液中之后,可以将接合探针并且任选地将目标捕获探针(其进一步详细论述于下文中)直接添加到缓冲液中的样品中,而无需纯化目标核酸。在一些实施方案中,首先稀释缓冲液中的样品,随后添加探针(包括接合探针和目标捕获探针)。因为本发明的接合方法并不依赖于酶,所以接合探针的杂交和接合可以在无需从样品中纯化核酸并且不依赖于使用接合酶的情况下发生。这进一步用来限制在样品的核酸中发生的降解。

#### [0125] IV. 接合探针和化学接合方法

[0126] 在一个方面,本发明的接合探针包含任何聚物质,其能够与核酸目标以序列特异性方式相互作用并且具有可使探针经历与具有互补化学部分的另一种聚合物质的自发化学接合反应的化学部分。在一个实施方案中,接合探针可以是DNA、RNA、PNA、LNA、前述物质的修饰型式和/或上述物质的任何杂交体(例如DNA/RNA杂交体、DNA/LNA杂交体、DNA/PNA杂交体)。在一个优选实施方案中,接合探针包含DNA或RNA寡核苷酸。

[0127] 本发明的接合探针经过设计以使得当探针在空间上很接近地结合到目标多核苷酸的一部分上时,化学接合反应在探针之间发生。一般来说,探针包含化学反应性部分(在



本文中一般被称为“接合部分”)并且以特定定向结合到目标多核苷酸上,以使得化学反应性部分在空间上很接近,尤其使得自发接合反应可以在不使用接合酶的情况下发生。

[0128] 在一个实施方案中,本发明提供接合探针组,通常是第一接合探针和第二接合探针,不过如本文所描述,一些实施方案利用多于两个接合探针。另外,如本文中所提到,在一些情况下,完成转移反应而非接合;“接合探针”包括“转移探针”。每个接合探针包含核酸部分,在本文中有时被称为“接合结构域”或“探针结构域”,其实质上与目标结构域中的一种互补。本发明的探针被设计成与目标序列互补,以使得目标序列与本发明探针的杂交发生。如本文所概述,这种互补性不需要是完全的;可能存在许多碱基对错配,其将干扰目标序列与本发明探针之间的杂交。然而,如果突变数如此大以致于在甚至最低严格的杂交条件下也无法发生杂交,那么序列就不是互补序列。因此,“实质上互补”在本文中意味着探针与目标序列充分互补以在正常反应条件下杂交。“一致”序列为在核碱基的较短序列的长度上存在完全互补的那些序列。在本发明中可以使用多种杂交条件,包括高等、中等和低等严格条件;参看例如Maniatis等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,1989,和Ausubel等人,Short Protocols in Molecular Biology,以引用的方式并入本文中。如本领域中已知,当使用非离子性骨架,例如PNA时,杂交条件也可以变化。

[0129] 在本发明的一个方面,探针的长度经过设计以随着目标序列的长度、所需特异性、反应(例如接合或转移)以及杂交和洗涤条件而变化。一般来说,在这个方面,接合探针在约5个到约150个核碱基的范围内,其中约15个到约100个是优选的并且约25个到约75个是尤其优选的。一般来说,这些长度同等适用于接合探针和转移探针。

[0130] 在本发明的另一个实施方案中,在本文中被称作“CLPA-CE”(其更充分地描述于下文中),探针长度经过设计以针对每个所关注的目标而变化,从而产生可以基于长度变化来识别并分析的接合产物。

[0131] 本发明的接合探针被设计成对多核苷酸目标具特异性。这些探针彼此在空间上很接近地结合到目标上并且以化学反应性接合部分在空间上很接近的方式定向。在一个方面,两个或更多个探针经过设计以结合目标多核苷酸上的毗邻位点。在一个优选实施方案中,两个探针结合到目标上以使得一个寡核苷酸探针的5'末端的接合部分能够与另一个探针的3'末端的接合部分相互作用。在优选实施方案中,接合部分之间的接合反应在不使用外源接合酶的情况下发生,在本文中也被称为“化学接合”。应注意,接合探针组由于接合部分的存在而不使用接合酶来接合。

[0132] 在SNP检测的情况下,一组接合探针可能在一些情况下实际上包含三个或四个或五个不同接合探针,其中一些是等位基因特异性的。“等位基因特异性”探针或引物意指与目标序列杂交并且在等位基因之间加以辨别的探针或引物。在这种情况下,举例来说,当SNP为双等位基因(如图13中所描绘)时,使用一组三个接合探针,其中两个在检测位置处含有不同核苷酸。就是说,如本领域中已知,在接合复合物的接点处的错配将导致无接合或接合量减少。因此,取决于探针的定向,检测位置可以为“上游”探针或下游探针的末端位置(如图13A和13C中所描绘)。错配还可以在内部定位到探针上并且基于错配辨别探针的结合强度或 $T_m$ 的差异进行错配辨别(如图13B中所描绘)。在双等位基因SNP的情况下,两个探针具有相同探针结构域,除了其中在对应于目标序列上的询问位置的检测位置处的核苷酸是不同的。因此,取决于患者是纯合的(T/T或C/C)还是杂合的(T/C或C/T),探针之间的接合发

生。此外,在本发明中,一般在错配检测接合探针之间存在额外差异,这能够容易地识别哪个探针被优先接合。举例来说,“A”等位基因探针可以具有15个核苷酸(15聚体)的可变间隔区序列并且“G”等位基因探针可以具有20个核苷酸(20聚体)的可变间隔区序列,探针可以具有不同捕获结构域或标记序列,等等。

[0133] 类似地,如本领域技术人员应了解,三等位基因或四等位基因SNP使用组中的4个(3个探针具有相同目标结构域并且一个具有其他目标结构域)或5个(4个探针具有相同目标结构域并且一个具有其他目标结构域)接合探针。

[0134] 如本领域技术人员应了解,引物和探针核酸的尺寸可能随着探针的每个部分和探针的总长度而变化,长度一般从5个到500个核苷酸之间变化。取决于使用和扩增技术,每个部分优选地介于10与100之间,介于15与50之间是特别优选的,并且10到35是尤其优选的。因此,举例来说,探针的通用引发位点各自优选地具有约15-20个核苷酸长度,其中18是尤其优选的。探针的接头序列优选地具有15-25个核苷酸长度,其中20是尤其优选的。探针的目标特异性部分优选地具有15-50个核苷酸长度。另外,引物可以包括额外的扩增引发位点。在一个优选实施方案中,额外的扩增引发位点是T7RNA聚合酶引发位点。

[0135] 许多非酶促或模板介导的化学接合方法可以根据本发明加以使用。这些方法包括利用偶合试剂的化学接合方法,如N-氰基咪唑、溴化氰以及1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐。参看Metelev, V.G.等人, *Nucleosides & Nucleotides* (1999) 18:2711; Luebke, K.J. 和 Dervan, P.B.J. *Am. Chem. Soc.* (1989) 111:8733; 以及 Shabarova, Z.A. 等人, *Nucleic Acids Research* (1991) 19:4247, 这些文献中的每一个出于所有目的以全文引用的方式并入本文中, 并且尤其是关于化学接合的所有教导内容。Kool (美国专利第7,033,753号, 其以全文引用的方式并入本文中) 描述了使用化学接合和荧光共振能量转移(FRET)来检测遗传多态性。这个过程的读出结果是基于溶液相中荧光强度的变化。Terbruggen (美国专利公开第12008/0124810号, 其以全文引用的方式并入本文中) 描述了使用化学接合方法、组合物和试剂经由微阵列检测来检测核酸。其他化学接合方法使5'-甲苯磺酸酯基或5'-碘基与3'-硫代磷酸酯基反应, 产生硫原子置换桥连磷酸二酯氧原子中的一种的DNA结构。参看Gryanov, S.M. 和 Letsinger, R.L., *Nucleic Acids Research* (1993) 21:1403; Xu, Y. 和 Kool, E.T. *Tetrahedron Letters* (1997) 38:5595; 以及 Xu, Y. 和 Kool, E.T., *Nucleic Acids Research* (1999) 27:875, 这些文献中的每一个以全文引用的方式并入本文中。Letsinger等人(美国专利第5,780,613号, 其以全文引用的方式并入本文中) 先前已经描述了相邻的模板结合寡核苷酸的不可逆、非酶促、共价自接合, 其中一个寡核苷酸具有5'可置换基团并且另一个寡核苷酸具有3'硫代磷酸酯基。描述化学接合方法的这些参考文献中的每一个出于所有目的以全文引用的方式并入本文中, 并且尤其是关于化学接合的所有教导内容。

[0136] 在一个方面, 本发明的接合反应包括转移反应。在这个实施方案中, 探针与目标序列杂交, 而不同于寡核苷酸探针接合在一起形成接合产物, 发生核酸引导的分子实体(包括报道分子, 如荧光团、淬灭剂等等) 从一个寡核苷酸探针转移到另一个寡核苷酸探针。这个转移反应类似于接合反应, 然而, 代替连接两个两个或更多个探针, 一个探针接合到转移分子上并且另一个探针“脱离”化学反应。重要的是, 类似于接合反应, 通过使转移探针很接近地结合到核酸目标上来促进转移反应, 以使得如果探针已经与目标核酸彼此足够接近地

(例如在相邻位点处)杂交以使转移反应发生,那么就检测到明显信号。

[0137] 在一个方面,本发明关于化学接合方法,其包括在使得第一接合探针和第二接合探针的接合部分能够自发反应的条件下使至少第一接合探针和第二接合探针结合到目标核酸上以形成“接合衬底”,在不存在外源接合酶的情况下将探针接合在一起;就是说,不添加外源接合酶到反应中并且取而代之的是反应在不使用接合酶的情况下进行。在转移反应的情况下,这可以被称为“接合衬底”或“转移衬底”。“接合衬底”在本文中意指包含至少一个目标核酸序列和两个或更多个接合探针的化学接合衬底。类似地,在“接合衬底”的定义内包括“转移衬底”,其包含至少一个目标核酸序列和两个或更多个转移探针。一旦化学接合步骤已经发生,反应产物有时即被称为“接合复合物”,其包含接合探针和这些接合探针仍杂交的目标。

[0138] 在本发明的一些实施方案中,举例来说,当需要额外的特异性时,可以使用多于两个接合探针,如图3中一般描绘。在这个实施方案中,“中间”接合探针也可以是相邻的或由目标序列的一个或多个核碱基隔开。在一个优选实施方案中,接合反应不需要存在接合酶并且在不添加任何(例如外源)接合酶的情况下在结合探针之间自发发生。

[0139] 化学接合可以在适当条件下在不添加任何额外的活化试剂或刺激的情况下自发发生。或者,可以使用“活化”剂或外部刺激来促进化学接合反应。活化剂的实例包括(但不限于)碳化二亚胺、溴化氰(BrCN)、咪唑、1-甲基咪唑/碳化二亚胺/脒胺、N-氰基咪唑、二硫苏糖醇(DTT)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)和其他还原剂,以及外部刺激,如紫外光、热和/或压力变化。

[0140] 如本文所概述,本发明的接合部分可以呈现多种构型,这取决于许多因素。本文所描绘的大多数化学部分被用于亚磷酰胺反应中,这些反应一般沿3'到5'方向进行。就是说,树脂含有允许连接分子5'末端的亚磷酰胺的化学部分。然而,如本领域中已知,亚磷酰胺可以用于沿5'到3'方向进行;因此,本发明包括具有与本文所概述的那些部分相反定向的部分。

[0141] 每组接合探针(或转移探针)含有一组第一接合部分和第二接合部分。这些接合部分对的识别取决于有待使用的接合的化学部分。另外,如本文所描述,连接子(包括(但不限于)去稳定连接子)可以存在于一个或两个接合探针的探针结构域与接合部分之间。一般来说,为便于论述,本文中的描述可以使用术语“上游”和“下游”接合探针,不过这并不意味着具限制性。

[0142] 不同组的接合探针可以被设计成用于本文所描述的任何试验和方法中。接合探针组可以经过设计以包括针对目标核酸的一个或多个目标结构域的接合探针,或不同探针组可以经过设计以检测不同目标核酸。举例来说,对于在使用两个接合探针的实施方案中检测特定目标核酸来说,一组接合探针经过设计以使得第一探针(例如“上游探针”)包含针对第一目标结构域的探针结构域。这组还包括针对第二目标结构域的第二接合探针(例如“下游探针”),这个第二目标结构域与第一目标结构域相邻并且在第一目标结构域的下游。在一些实施方案中,第一目标结构域和第二目标结构域可以由一个、两个或三个核苷酸的间隙隔开。这组接合探针由此产生接合产物,这些接合产物可以被检测以识别接合探针所针对的目标核酸的存在。在其他实施方案中,不同组的接合探针可以经过设计以检测不同目标核酸。在其他实施方案中,不同组的接合探针可以经过设计以检测相同目标核酸。在这些

实施方案中,不同组的接合探针针对相同目标核酸的不同结构域,以使得相同目标核酸可以具有多重接合产物,这取决于所使用的不同探针组的数目。如应了解,当设计用于使用多于两个接合探针形成单个接合产物的实施方案中的探针组时,可以使用类似设计。

[0143] 卤基离去基化学部分

[0144] 在本发明的一个实施方案中,化学方法是基于5'卤素离去基技术,如以下文献中一般描述的技术:Gryanov, S.M. 和 Letsinger, R.L., (1993) *Nucleic Acids Research*, 21: 1403; Xu, Y. 和 Kool, E.T. (1997) *Tetrahedron Letters*, 38: 5595; Xu, Y. 和 Kool, E.T., (1999) *Nucleic Acids Research*, 27: 875; Arar 等人, (1995), *BioConj. Chem.*, 6: 573; Kool, E.T. 等人, (2001) *Nature Biotechnol* 19: 148; Kool, E.T. 等人, (1995) *Nucleic Acids Res*, 23 (17): 3547; Letsinger 等人, 美国专利第 5,476,930 号; Shouten 等人, 美国专利第 6,955,901 号; Andersen 等人, 美国专利第 7,153,658 号,所有这些文献都以引用的方式明确并入本文中。在这个实施方案中,第一接合探针在其 5' 末端包括具有 5' 离去基的核苷,并且第二接合探针在其 3' 末端包括具有 3' 亲核基团(如 3' 硫代磷酰基)的核苷。5' 离去基可以包括本领域技术人员已知的许多常见离去基,包括例如卤基种类(I、Br、Cl)以及如 Abe 和 Kool, *J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126: 13980-13986 所描述的那些基团的基团,这个文献以全文引用的方式并入本文中。在本发明的这个方面的一个更优选实施方案中,第一接合探针具有经由柔性连接子连接的 5' 离去基和具有 3' 硫代磷酰基的下游寡核苷酸。这种构型使得反应速率显著增加并且得以针对每个目标产生多重接合产物拷贝。

[0145] 关于多核苷酸模板的 5' 到 3' 方向所定义并且作为在这个模板的“上游”侧(即,左侧或 5' 侧)结合的寡核苷酸的“上游”寡核苷酸包括 5'-离去基作为其 5' 末端。可以利用能够参与 S<sub>N</sub>2 反应的任何离去基,这个反应涉及硫、硒或碲作为亲核试剂。离去基为连接到碳上的原子或基团,以使得在碳原子受到经过修饰的磷酰基的亲核试剂(硫、硒或碲)的亲核攻击时,离去基以阴离子形式离去。适合的离去基包括(但不限于)卤基,如碘基、溴基或氯基;甲苯磺酸酯基、苯磺酸酯基或对硝基苯酯基;以及 RSO<sub>3</sub>, 其中 R 为苯基或被一个到五个包含 F、Cl、Br、I、烷基(C1 到 C6)、硝基、氰基、磺酰基和羰基的原子或基团取代的苯基,或 R 为具有一个到六个碳的烷基。离去基优选地为碘基,并且上游寡核苷酸的 5' 末端的核苷在 DNA 的情况下为 5'-脱氧-5'-碘-2'-脱氧核苷。适合的 5'-脱氧-5'-碘-2'-脱氧核苷的实例包括(但不限于)5'-脱氧-5'-碘胸苷(5'-I-T)、5'-脱氧-5'-碘-2'-脱氧胞苷(5'-I-dC)、5'-脱氧-5'-碘-2'-脱氧腺苷(5'-I-dA)、5'-脱氧-5'-碘-3-脱氮-2'-脱氧腺苷(5'-I-3-脱氮-dA)、5'-脱氧-5'-碘-2'-脱氧鸟苷(5'-I-dG) 和 5'-脱氧-5'-碘-3-脱氮-2'-脱氧鸟苷(5'-I-3-脱氮-dG),以及其亚磷酰胺衍生物(见图2)。在 RNA 寡核苷酸的情况下,适合的 5'-脱氧-5'-碘核苷的类似实例包括(但不限于)5'-脱氧-5'-碘尿嘧啶(5'-I-U)、5'-脱氧-5'-碘胞苷(5'-I-C)、5'-脱氧-5'-碘腺苷(5'-I-A)、5'-脱氧-5'-碘-3-脱氮腺苷(5'-I-3-脱氮-A)、5'-脱氧-5'-碘鸟苷(5'-I-G) 和 5'-脱氧-5'-碘-3-脱氮鸟苷(5'-I-3-脱氮-G),以及其亚磷酰胺衍生物。在一个优选实施方案中,上游接合探针含有 2'-脱氧核糖核苷酸,除了其中包含 5' 离去基的在 5' 末端的经过修饰的核苷酸为核糖核苷酸。上游核苷酸的这个实施方案是有利的,因为倒数第二的 2'-脱氧核糖核苷酸与末端 5' 核糖核苷酸之间的键容易使用碱而裂解。这可得以潜在地再使用例如结合到固体支撑物上的寡核苷酸探针,如下文更详细描述。根据下文更充分描述的 CLPA 试验,“上游”探针的 5' 离去基最优选地为 DABSYL。

[0146] 结合到上游寡核苷酸的“下游”(即,3')的多核苷酸模板上的“下游”寡核苷酸在其3'末端包括具有连接到3'羟基上的硫代磷酸酯基(即,“3'-硫代磷酸酯基”)、硒代磷酸酯基(即,“3'-硒代磷酸酯基”)或碲代磷酸酯基(即,“3'-碲代磷酸酯基”)的核苷。用于自接合的化学部分由此为硫介导、硒介导或碲介导的。自接合得到含有5'桥连磷酸硫酯(--O--P(O)(O<sup>-</sup>)--S--)、磷酸硒酯(--O--P(O)(O<sup>-</sup>)--Se--)或磷酸碲酯(--O--P(O)(O<sup>-</sup>)--Te--)的接合产物,如由构成下游寡核苷酸的3'末端的基团所指示。这种非天然的非手性桥连二酯定位于两个相邻核苷酸之间并且代替了天然存在的5'桥连磷酸二酯。令人惊讶的是,硒介导的接合比硫介导的接合快3到4倍,并且含硒接合产物非常稳定,不过Se--P键的键强度较低。此外,预期桥连磷酸硒酯以及桥连磷酸碲酯可以在非常温和的条件下选择性地被银或汞离子裂解(参看Mag等人,Nucleic Acids Res.(1991)19:1437-1441)。

[0147] 在一个实施方案中,下游寡核苷酸含有2'-脱氧核糖核苷酸,除了其中包含3'硫代磷酸酯、硒代磷酸酯或碲代磷酸酯的在3'末端的经过修饰的核苷酸为核糖核苷酸。上游核苷酸的这个实施方案是有利的,因为倒数第二的2'-脱氧核糖核苷酸与末端核糖核苷酸之间的键容易使用碱而裂解,从而可潜在地再使用例如结合到固体支撑物上的寡核苷酸探针。根据如下文更充分描述的CLPA试验,“下游”探针最优选地在其3'末端包括3'-硫代磷酸酯。

[0148] 应注意,“上游”和“下游”寡核苷酸可以任选地构成单个寡核苷酸的两个末端,在这种情况下,接合得到环形接合产物。线性前体寡核苷酸的5'和3'末端的结合区必须由足以使得5'和3'结合区结合到多核苷酸目标上的许多介入核苷酸连接。

[0149] 本发明所提供的组合物包括5'-脱氧-5'-碘-2'-脱氧核苷,例如5'-脱氧-5'-碘胸苷(5'-I-T)、5'-脱氧-5'-碘-2'-脱氧胞苷(5'-I-dC)、5'-脱氧-5'-碘-2'-脱氧腺苷(5'-I-dA)、5'-脱氧-5'-碘-3-脱氮-2'-脱氧腺苷(5'-I-3-脱氮-dA)、5'-脱氧-5'-碘-2'-脱氧鸟苷(5'-I-dG)和5'-脱氧-5'-碘-3-脱氮-2'-脱氧鸟苷(5'-I-3-脱氮-dG)和其亚磷酸酰胺衍生物,以及在5'末端包含本发明的5'-脱氧-5'-碘-2'-脱氧核苷的寡核苷酸。本发明所提供的组合物进一步包括5'-脱氧-5'-碘核苷,如5'-脱氧-5'-碘尿嘧啶(5'-I-U)、5'-脱氧-5'-碘胞苷(5'-I-C)、5'-脱氧-5'-碘腺苷(5'-I-A)、5'-脱氧-5'-碘-3-脱氮腺苷(5'-I-3-脱氮-A)、5'-脱氧-5'-碘鸟苷(5'-I-G)和5'-脱氧-5'-碘-3-脱氮鸟苷(5'-I-3-脱氮-G)和其亚磷酸酰胺衍生物,以及在5'末端包含本发明的5'-脱氧-5'-碘核苷的寡核苷酸。本发明还包括包含3'-硒代磷酸酯基或3'-碲代磷酸酯基的核苷,以及在3'末端包含含3'-硒代磷酸酯基或3'-碲代磷酸酯基的核苷的寡核苷酸。含有这些类别的经过修饰的核苷中的任一种或两种的寡核苷酸也包括在本发明中,制造各种核苷和寡核苷酸的方法一样包括在内。根据本发明在5'或3'末端的任一个末端或两个末端经过修饰的寡核苷酸任选地(但不必须)包括可检测标记,优选地为放射性标记、荧光能量供体或受体基团、准分子标记或其任何组合。

[0150] 另外,在一些情况下,取代基也可以是保护基(有时在本文中被称为“PG”)。适合的保护基将取决于有待被保护的原子和部分将暴露的条件。已知多种保护基;举例来说,DMT被频繁用作亚磷酸酰胺化学中的保护基(如图中所描绘);然而,在这些实施方案中,DMT可以被其他保护基置换。多种保护基是适合的;参看例如Greene's Protective Groups in Organic Synthesis,关于保护基和相关化学的内容以引用的方式并入本文中。

[0151] “烷基”或语法等效物在本文中意指直链或支链烷基,其中直链烷基是优选的。如

果有分支的话,那么其可以在一个或多个位置处分支,并且除非有规定,否则可以在任何位置处分支。烷基可以在约1个到约30个碳原子(C1-C30)的范围内,其中一个优选实施方案利用约1个到约20个碳原子(C1-C20),其中约C1到约C12到约C15是优选的,并且C1到C5是特别优选的,不过在一些实施方案中,烷基可以大得多。在烷基的定义内还包括环烷基,如C5和C6环,以及具有氮、氧、硫或磷的杂环。烷基还包括杂烷基,其中硫、氧、氮和硅杂原子是优选的。烷基包括经过取代的烷基。“经过取代的烷基”在本文中意指进一步包含一个或多个如上文所定义的取代部分“R”的烷基。

[0152] “氨基”或语法等效物在本文中意指 $\text{NH}_2$ 、 $\text{--NHR}$ 和 $\text{--NR}_2$ 基团,其中R如本文所定义。在一些实施方案中,举例来说,在肽接合反应的情况下,伯胺和仲胺具有特定用途,其中伯胺一般显示出较快的反应速率。

[0153] “硝基”在本文中意指 $\text{--NO}_2$ 基团。

[0154] “含硫部分”在本文中意指含有硫原子的化合物,包括(但不限于)硫杂、硫代和磺基化合物、硫醇( $\text{--SH}$ 和 $\text{--SR}$ )以及硫醚( $\text{--RSR--}$ )。一种特定类型的含硫部分为硫酯( $\text{--(CO)--S--}$ ),通常以经过取代的硫酯( $\text{--(CO)--SR}$ )形式存在。“含磷部分”在本文中意指含有磷的化合物,包括(但不限于)膦和磷酸酯。“含硅部分”在本文中意指含有硅的化合物。

[0155] “醚”在本文中意指 $\text{--O--R}$ 基团。优选的醚包括烷氧基,其中 $\text{--O--(CH}_2)_2\text{CH}_3$ 和 $\text{--O--(CH}_2)_4\text{CH}_3$ 是优选的。

[0156] “酯”在本文中意指 $\text{--COOR}$ 基团。

[0157] “卤素”在本文中意指溴、碘、氯或氟。优选的经过取代的烷基为部分或完全卤化的烷基,如 $\text{CF}_3$ 等等。

[0158] “醛”在本文中意指 $\text{--RCOH}$ 基团。

[0159] “醇”在本文中意指 $\text{--OH}$ 基团和烷醇 $\text{--ROH}$ 。

[0160] “酰氨基”在本文中意指 $\text{--RCONH--}$ 或 $\text{RCONR--}$ 基团。

[0161] “乙二醇”在本文中意指 $\text{--(O--CH}_2\text{--CH}_2)_n\text{--}$ 基团,不过亚乙基的每个碳原子也可以被单取代或双取代,即, $\text{--(O--CR}_2\text{--CR}_2)_n\text{--}$ ,其中R如上文所描述。具有其他代替氧的杂原子的乙二醇衍生物(即, $\text{--(N--CH}_2\text{--CH}_2)_n\text{--}$ 或 $\text{--(S--CH}_2\text{--CH}_2)_n\text{--}$ ,或具有取代基)也是优选的。

[0162] 另外,在一些实施方案中,R基团可以是官能团,包括淬灭剂、去稳定部分和荧光团(如下文所定义)。在这个实施方案中具有特定用途的荧光团包括(但不限于)荧光素和其衍生物、TAMRA(四甲基-6-羧基罗丹明)、Alexa染料和花青染料(例如Cy3和Cy5)。

[0163] 淬灭剂部分或分子在本领域中是已知的,并且一般为芳香族多环化合物,其可以灭活另一个分子的激发态。荧光团-淬灭剂对在本领域中众所周知。适合的淬灭剂部分包括(但不限于)Dabsyl(二甲氨基(偶氮苯)磺酰基)Dabcyl(二甲氨基(偶氮苯)羧基)、Eclipse淬灭剂(Glen Research Catalog),以及获自Biosearch Technologies的黑洞淬灭剂(BHQ-1、BHQ-2和BHQ-3)。

[0164] 制造具有卤基离去基的探针的方法在本领域中是已知的;参看例如Abe等人,Proc Natl Acad Sci U S A(2006)103(2):263-8;Silverman等人,Nucleic Acids Res.(2005)33(15):4978-86;Cuppolletti等人,Bioconj Chem.(2005)16(3):528-34;Sando等人,J Am Chem Soc.(2004)126(4):1081-7;Sando等人,Nucleic Acids Res Suppl.(2002)2:

121-2; Sando等人, J Am Chem Soc. (2002) 124 (10):2096-7; Xu等人, Nat Biotechnol. (2001) 19 (2):148-52; Xu等人, Nucleic Acids Res. (1998) 26 (13):3159-64; Moran等人, Proc Natl Acad Sci U S A (1997) 94 (20):10506-11; Kool, 美国专利第7,033,753号; Kool, 美国专利第6,670,193号; Kool, 美国专利第6,479,650号; Kool, 美国专利第6,218,108号; Kool, 美国专利第6,140,480号; Kool, 美国专利第6,077,668号; Kool, 美国专利第5,808,036号; Kool, 美国专利第5,714,320号; Kool, 美国专利第5,683,874号; Kool, 美国专利第5,674,683号; 以及Kool, 美国专利第5,514,546号, 这些文献中的每一个以全文引用的方式并入本文中。

#### [0165] 亲核试剂接合部分

[0166] 在一些实施方案中, 本发明的接合探针包含亲核试剂(例如胺)的接合部分。包含硫醇和胺的接合部分在某些反应中具有特定用途。一般来说, 亲核试剂接合部分可以包括多种潜在的氨基、硫醇化合物, 只要亲核试剂接合部分含有接近伯氨基或仲氨基的硫醇基并且相对定位使得在S到N酰基转移期间可以实现至少5或6元环过渡态即可。

[0167] 因此, 包含1,2或1,3胺硫醇基的亲核试剂接合分子具有特定用途。伯胺可用于反应时间很重要的一些实施方案中, 因为伯胺的反应时间一般比仲胺快, 不过仲胺可用于有助于如下文所论述的去稳定的酰基转移酶反应中。氨基与硫醇基之间的碳可以被非氢R基团取代, 不过一般每个碳仅利用一个非氢R基团。另外, 相邻的R基团可以连接在一起形成环状结构, 其包括经过取代和未经取代的环烷基和芳基, 包括杂环烷基和杂芳基以及其经过取代和未经取代的衍生物。在使用1,2氨基硫醇基并且连接相邻的R基团的情况下, 一般优选的是, 相邻的R基团形成环烷基(包括杂环烷基和其经过取代的衍生物)而不是芳基。

[0168] 在这个实施方案中, 对于产生链的4个 $\sigma$ 键缩短用于去稳定来说, 置换接合部分依赖于酰基转移酶反应。

#### [0169] 连接子

[0170] 在许多实施方案中, 连接子(有时在本文中被示为“L”或“-(连接子)<sub>n</sub>”) (其中n为0或1) 可以任选地在多个位置处包括于接合探针内。适合的连接子包括烷基和芳基, 包括杂烷基和杂芳基, 以及这些基团的经过取代的衍生物。在一些情况下, 举例来说, 当完成原生肽接合反应时, 连接子可以基于氨基酸和/或含有酰胺键。如本文所描述, 一些连接子可使接合探针由一个或多个核碱基隔开, 从而在接合产物内形成无碱基位点, 其充当如下文所描述的去稳定部分。

#### [0171] 去稳定部分

[0172] 根据本发明的一个方面, 需要在没有酶的辅助下针对每个目标分子产生多重接合产物拷贝。一种实现这个目标的方式涉及在化学接合反应之后接合产物与目标解离以允许新的探针组结合到目标上。为增加接合产物周转, 需要有增加产物与目标分子解离的探针设计、仪器和化学接合反应的化学部分。适合的去稳定部分论述于下文中并且包括(但不限于)使得寡核苷酸与其目标位点的总结合能降低的分子实体。潜在的实例包括(但不限于)烷基链、带电复合物以及环结构。

[0173] 先前的工作已经显示, 一种实现产物解离并且增加产物周转的方式为使反应混合物“热循环”。热循环为改变反应温度以促成所要结果的过程。热循环最常采用以下形式: 短暂地升高反应混合物的温度以使得反应温度高于接合产物的熔化温度持续一段短暂的时间。

间,从而促使产物与目标解离。冷却后,一组新的探针能够结合目标,并且经历另一个接合反应。已经广泛实施这种热循环程序用于酶促反应,如PCR。

[0174] 虽然热循环是一种实现产物周转的方式,但有可能设计探针以使得在没有热循环的情况下存在显著产物周转。帮助降低接合产物的熔化温度的探针设计和接合化学部分通过减少反应周期的产物抑制来增加产物周转。

[0175] 因此,在一个方面,探针经过设计以包括在探针接合之后用以使接合产物与目标序列的杂交失去稳定的要素(例如去稳定部分)。因此,接合衬底在接合之后解离,使得接合产物周转,例如,包含两个接合探针的接合产物与目标序列解除杂交,从而放出目标序列用于与另一个探针组杂交。

[0176] 另外,增加游离(例如未杂交)接合探针的浓度还可以帮助驱使平衡朝向从目标序列释放接合产物(或转移产物)发展。因此,本发明的一些实施方案使用高于目标1,000,000倍的探针浓度,而在其他实施方案中,探针高于目标10,000到100倍。如本领域技术人员应了解,增加游离探针的浓度可以单独使用,或与本文所概述的用以实现产物周转(例如扩增)的任何实施方案一起使用。虽然增加探针浓度可以使得产物周转增加,但其也可能导致显著偏离目标的反应,如探针水解和非目标介导的接合。

[0177] 在一个方面,探针要素包括降低接合产物的熔化温度的结构。在一些实施方案中,探针要素经过设计以与不相邻的目标核碱基杂交,例如,在两个杂交而未接合的探针之间存在“间隙”。一般来说,这是通过使用一个或两个介于探针结构域与接合部分之间的连接子来完成。就是说,在第一探针结构域与第一接合部分之间可能存在连接子,在第二探针结构域与第二接合部分之间可能存在连接子,或这两种情况都有。在一些实施方案中,间隙包含单个核碱基,不过如有需要也可以利用更多个核碱基。如本领域技术人员应了解,在反应动力学与连接子长度之间可能有折衷;如果连接子的长度如此长以致于引起接合的接触在动力学上是不利的,那么可能就需要较短连接子。然而,在一些情况下,当动力学并不重要时,间隙和所得连接子的长度可能较长,以允许跨越1到10个核碱基的间隙。一般来说,在这个实施方案中,重要的是,连接子的长度大致对应于间隙中核碱基的数目。

[0178] 在本发明的这个实施方案的另一个方面,与目标序列相比在接合产物中形成无碱基位点用以使双链体失去稳定。举例来说,Abe和Kool(J. Am. Chem. Soc. (2004) 126:13980-13986)比较了当两种不同8聚体寡核苷酸探针(Bu42和DT40)与相同7聚体探针(Thio 4)接合时的周转。当Thio4与DT40接合时,形成具有接近原生的DNA结构的连续15聚体寡核苷酸探针,其应与DNA目标完全匹配。然而,当Thio4与Bu42接合时,形成15聚体寡核苷酸探针,但当探针结合到目标上时,其在烷烃连接子所跨越的中间部分具有无碱基位点。这两个探针在结合到目标上时的熔化温度( $T_m$ )的比较显示出熔化温度存在约12°C的差异(Bu42的58.5°C对比DT40的70.7°C)。熔化温度的这个12°C的差异使得在25°C下当探针组(10,000倍过量,10 $\mu$ M浓度)与目标(1nM)相比以大过量存在时产物周转增加约10倍(91.6-Bu42对比8.2DT40)。类似地,Dose等人(Dose 2006)显示出对于两个一致序列来说,经过化学接合的PNA探针的 $T_m$ 降低4°C(53°C对比57°C)怎样使得产物周转增加约4倍。

[0179] 近期工作已经展示了使用基于化学接合的淬灭自接合(Quenched Auto-Ligation;QUAL)探针以在细菌和人类细胞内部监测RNA表达并检测单碱基错配(WO 2004/0101011,其以引用的方式并入本文中)。



[0180] 在一个实施方案中,去稳定部分是基于去除稳定化部分。就是说,如果接合探针含有稳定其与目标杂交的部分,那么在接合并释放稳定化部分之后,接合产物的稳定性就下降。因此,一种用于减少产物抑制的一般方案为开发在初始化学接合反应的过程期间或在接合后的二次反应之后释放分子实体(如小沟结合分子)的探针。取决于寡核苷酸序列,小沟结合物,如Kutyavin (Kutyavin 1997和Kutyavin2000)所描述的二氢吡咯并吡啶三肽(DPI<sub>3</sub>),当与寡核苷酸探针的末端结合时可以使双链体核酸的T<sub>m</sub>增加至多40℃。相比之下,DPI<sub>3</sub>的未连接型式仅仅使相同双链体的T<sub>m</sub>增加2℃左右。因此,小沟结合物可以用于产生具有增强的结合强度的探针组,然而,如果在反应过程期间释放小沟结合物,那么结合增强程度受损并且接合产物相对于小沟结合物仍连接的探针将显示出T<sub>m</sub>降低。

[0181] 适合的小沟结合分子包括(但不限于)二氢吡咯并吡啶三肽(DPI<sub>3</sub>)、偏端霉素A和吡咯-咪唑聚酰胺(Gottesfeld,J.M.等人,J.Mol.Biol.(2001)309:615-629)。

[0182] 除了小沟结合分子以外,拴系的嵌入物和相关分子也可以显著增加寡核苷酸双链体的熔化温度,并且这种稳定化在未拴系状态中显著较低(Dogan等人,J.Am.Chem Soc.(2004)126:4762-4763和Narayanan等人,Nucleic Acids Research,(2004)32:2901-2911)。

[0183] 类似地,如本领域技术人员应了解,连接有能够形成三螺旋体的寡核苷酸片段(DNA、PNA、LNA等等)的探针可以充当稳定化部分,其在释放后,使得接合产物与目标序列的稳定性降低(Pooga,M等人,Biomolecular Engineering (2001)17:183-192)。

[0184] 另一种通过降低接合产物的结合强度来减少产物抑制的一般方案为在接合点并入无碱基位点。这种方法先前已经由Abe (J.Am.Chem.Soc.(2004)126:13980-13986)展示,然而,还可能设计出二次探针重排以经由使接合探针与目标之间的对准发生变形来进一步放大T<sub>m</sub>的降低。举例来说,Dose等人(Org.Letters (2005)7:204365-4368)使PNA碱基之间的间距从理想的12个σ键变到13个的接合后重排怎样使得T<sub>m</sub>降低4℃。干扰产物与目标结合或使寡核苷酸碱基损失的较大重排和二次反应可以进一步降低T<sub>m</sub>。

[0185] 本发明提供用于在重排期间使得链缩短至多4个σ键的接合反应的方法和组合物,其与使用Dose所描述的化学方法进行1个碱基扩充相比应对重排后的T<sub>m</sub>具有显著影响。这种化学方法是基于先前已经描述的酰基转移助剂(Offier等人,J Am Chem Soc.(2002)124(17):4642-6)。在完成链缩短之后,产生能够经历与个别分子或与本身进行的另一个反应的游离硫醇。举例来说,这种硫醇可以与内部硫酯反应以使寡核苷酸重度扭结并由此进一步降低接合产物结合到目标上的能力。

[0186] 因此,在这个实施方案中,释放将经历与接合产物进行的第二个反应的官能团的接合反应可以降低接合产物与目标序列杂交的稳定性。

#### [0187] 可变间隔区序列

[0188] 除了目标结构域、接合部分和任选的连接子以外,一个或多个本发明的接合探针可以具有可变间隔区序列(也被称为“填充序列”)。这些可变间隔区序列在本文进一步详细描述CLPA-CE试验中具有特定用途。就是说,可变间隔区序列可以充当一种类型的“标记”或“条码”以当例如使用毛细管电泳(CE)以长度为基础检测产物时识别目标序列。

[0189] 可变间隔区序列为接合探针的可以具有不同长度的结构域。在一些实施方案中,这些不同长度将对接合探针的其他结构域(例如探针结构域)能够杂交的特定目标

序列具特异性,以使得由含有填充序列的接合探针接合产生的接合产物的长度为目标特异性长度。因此,由这些接合产物产生的任何扩增子也将具有目标特异性长度。在其他实施方案中,可变间隔区序列经过设计以促使所有接合产物都具有类似长度,从而有助于后续扩增反应的效率。

[0190] 在一些实施方案中,接合探针对中仅有一个接合探针包含可变间隔区序列。在其他实施方案中,两个接合探针都包含可变间隔区序列。在使用三个或更多个接合探针的实施方案中,一个或多个形成特定接合产物的接合探针可以含有可变间隔区序列,不过在这个实施方案中,一般来说,一个或两个末端探针含有可变间隔区序列。

[0191] 在其他实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个,可变间隔区序列含于接合探针中实质上与目标核酸的任何其他结构域以及样品中的任何目标核酸都不互补的区域内。

[0192] 在其他实施方案中,接合探针(如下文进一步详细论述)含有引物序列。根据上述实施方案中的任一个,可变间隔区序列在一些实施方案中含于探针结构域(接合探针中与目标序列杂交的区域)与引物序列之间,以使得扩增子含有可变间隔区序列。

[0193] 在其他方面,本发明的可变间隔区序列包括核酸,如DNA或RNA。可变间隔区序列还可以包括脱氧核糖核苷酸与核糖核苷酸的组合。可变间隔区序列可以进一步包括核苷酸类似物、连接子,或本文所论述的任选地存在于本发明的接合探针和/或目标捕获探针中的任何额外部分。

[0194] 一般来说,对于同时检测多重目标序列的多重试验来说,可变间隔区序列经过设计以使得接合产物或(在扩增反应在接合步骤之后进行的情况下)由每个接合产物所得的扩增子中的任一个或两者具有与样品中的其他接合产物或扩增子不同的核苷酸长度。就是说,来自一个目标核酸的扩增子将与来自不同目标核酸的扩增子具有不同长度。类似地,当多重接合探针组用于单个目标(如图6和11中所示)时,每个接合产物和/或扩增子将具有不同长度,从而允许检测不同产物。

[0195] 可变间隔区序列的不同长度将取决于检测系统的灵敏度。对于完善的毛细管电泳(CE)系统,如由Life Technologies制造的Genetic Analyzer系统或由Beckman Coulter制造的PACE系统,接合产物和/或扩增子可以加以分离并且由此在其长度差异少到一个核苷酸时也可以被检测出。具有较低尺寸分辨率的其他CE系统可能需要5到100个碱基对的长度差异,这取决于分辨率。一般来说,较高分辨率的CE系统需要较长的分离通道长度并且往往需要较长的分离时间。此外,变性毛细管电泳系统倾向于比非变性系统具有较好分辨率。一般来说,可变间隔区序列经过设计以产生1到100个碱基范围内的核苷酸差异,其中5到20个碱基是优选的。可以使用更大尺寸差异,但往往需要额外成本或减少可以在单个测试中组合的可能接合探针的数目。

[0196] 另外,可变间隔区序列可以与其他标记联合使用以扩充可以使用的不同“条码”的数目。就是说,可变间隔区序列的长度可以通过将其用第二标记编码而进行“再使用”;举例来说,一个含有20个核苷酸的可变间隔区序列的扩增子可以使用具有第一色彩的荧光标记,并且另一个含有20聚体间隔区序列的扩增子可以使用具有不同色彩的荧光标记。这些具有相同尺寸的扩增子可以使用多通道CE仪器同时检测,这个仪器可以识别具有不同波长(色彩)产物的扩增子,如法医学中通常所实施的那样。

[0197] 接合探针的额外功能部分

[0198] 除了目标结构域、接合部分和任选的连接子以外,一个或多个本发明的接合探针可以具有额外的功能部分,包括(但不限于)启动子和引物序列(或其补体,取决于试验)、标记(包括标记探针结合序列)以及捕获或锚定序列。

[0199] 在许多实施方案中,接合探针经过构筑以含有必需的引发位点用于后续扩增方案。在一个优选实施方案中,引发位点为通用引发位点。“通用引发位点”或“通用引发序列”在本文中意指将结合引物用于扩增的探针的序列。

[0200] 在一个优选实施方案中,使用一个通用引发序列或位点。在这个实施方案中,优选的通用引发序列为RNA聚合酶T7序列,其可使T7RNA聚合酶制造接头序列的RNA拷贝,如下文所概述。关于使用T7RNA聚合酶的额外披露见于美国专利第6,291,170号、第5,891,636号、第5,716,785号、第5,545,522号、第5,922,553号、第6,225,060号和第5,514,545号中,所有这些专利都以引用的方式明确并入本文中。

[0201] 在一个优选实施方案中,举例来说,当使用需要两个引物的扩增方法(如PCR)时,每个探针优选地包含上游通用引发位点(UUP)和下游通用引发位点(DUP)。此外,“上游”和“下游”并不意味着传达特定的5'-3'定向,并且将取决于系统的定向。优选地,在探针组中仅仅使用单个UUP序列和单个DUP序列,不过如本领域技术人员应了解,不同试验或不同多路分析可以利用多个通用引发序列。在一些实施方案中,探针组可以包含不同通用引发序列。另外,通用引发位点优选地位于目标探针(或接合探针)的5'端和3'端,因为只有被引发序列侧接的序列才会得到扩增。

[0202] 另外,针对特定试验和宿主基因组一般选择尽可能独特的通用引发序列以确保试验的特异性。然而,如本领域技术人员应了解,可以使用引发序列/引物组;即,一个反应可以利用500个具有第一引发序列或序列组的目标探针和额外的500个具有第二序列或序列组的探针。

[0203] 如本领域技术人员应了解,当使用两个引发序列时,两个引发位点的定向一般是不同的。就是说,一个PCR引物将与第一引发位点直接杂交,而另一个PCR引物将与第二引发位点的补体杂交。换句话说,第一引发位点呈有义定向,并且第二引发位点呈反义定向。

[0204] 如本领域技术人员应了解,一般来说,可以进行高度多重性的反应,其中所有通用引发位点对于所有反应都是相同的。或者,可以同时或依序使用通用引发位点和相应探针“组”。通用引发位点用于扩增经过修饰的探针以形成多个扩增子,然后按本文所概述的多种方式检测这些扩增子。在优选实施方案中,一个通用引发位点为T7位点。在一些实施方案中,这个引发位点充当RNA分析的模板。

[0205] 在一个优选实施方案中,当同时检测多重目标时,反应中的所有寡核苷酸接合探针组都经过设计以含有一致的启动子或引物对结合位点,以使得在接合和纯化之后,在适当情况下,可以使用相同酶和/或相同引物同时扩增所有接合产物。换句话说,在涉及检测多重目标核酸的实施方案中,含有针对不同目标核酸序列的接合探针的不同接合探针组在一些实施方案中可以具有一致的启动子或引物对结合位点(例如“通用”引物结合位点),以便可以使用相同酶和/或引物扩增由这些接合探针的杂交和接合产生的接合产物。

[0206] 在一个实施方案中,一个或多个接合探针包含启动子序列。在采用启动子序列的实施方案中,启动子序列或其补体将具有足够长度以允许适当聚合酶与其相互作用。具有

足够长度供聚合酶相互作用的序列的详细描述可以见于Sambrook and Russell以及其他文献中,这个文献出于所有目的特此以引用的方式并入,并且尤其是关于聚合酶的启动子序列的教导内容。在某些实施方案中,扩增方法包含至少一个扩增周期,例如(但不限于)以下连续程序:聚合酶与启动子相互作用;按模板依赖性方式使用聚合酶合成一条核苷酸链;以及使新形成的核酸双链体变性以分离这些链。

[0207] 在另一个实施方案中,一个或两个接合探针包含引物序列。如下文所概述,本发明的接合产物可以用于额外的反应中,如酶促扩增反应。在一个实施方案中,接合探针包括引物序列,其经过设计以允许一定水平的额外扩增。如本文中所用的术语“引物”是指天然存在的呈经过纯化的限制性消化形式或以合成方式产生的核苷酸序列,其在置于一定条件下时能够用作核酸序列合成的起始点,在这些条件下诱导与核酸链互补的引物延伸产物的合成,即,在不同三磷酸核苷酸和聚合酶存在下、在适当缓冲液中(“缓冲液”包括pH、离子强度、辅因子等等)以及在适合温度下。可以例如通过添加甲基、生物素或地高辛(digoxigenin)部分、荧光标签或通过使用放射性核苷酸来修饰引物的一个或多个核苷酸。引物序列不需要反映模板的精确序列。举例来说,非互补核苷酸片段可以连接到引物的5'末端,而引物序列的其余部分实质上与目标链互补。

[0208] 通过使用几个引发序列和引物,第一接合产物可以充当额外接合产物的模板。这些引物序列可以充当PCR反应的引发位点,这些PCR反应可以用于扩增接合产物。除了PCR反应以外,其他扩增方法也可以利用引发序列,包括(但不限于)接合酶链反应、Invader™、通过切口平移(nick translation;NICK)进行的位置扩增、引物延伸/切口平移,以及本领域中已知的其他方法。如本文中所用的“扩增”是指特定核酸的拷贝数增加。在扩增反应中体外制造的特定核酸的拷贝被称为“扩增子”或“扩增产物”。

[0209] 扩增还可以通过第二接合反应发生,其中引物位点充当一组新的接合探针的杂交位点,这组新的接合探针可能包含或可能不包含与产生原始接合产物的第一组接合探针一致的序列。目标序列由此通过在后续扩增周期中扩增接合产物而以指数方式扩增。

[0210] 在本发明的这个方面的另一个实施方案中,引物序列用于嵌套接合反应。在这些嵌套接合反应中,使用本文所描述的方法来完成第一接合反应,以使得接合产物可以例如通过使用生物素化引物捕获到所需链上并且捕获到涂有抗生物素蛋白链菌素的珠粒(尤其磁性珠粒)上。在捕获接合产物之后,通过在从连接到捕获珠粒、探针等等的接合产物末端(即,下游)部分去除的接合产物段内接合探针与引物序列杂交来完成第二接合反应。至少一个用于二次接合反应的引物序列将位于与接合探针互补的接合产物区域内,这个接合探针不是包括锚定或捕获序列的接合探针。来自这个第二接合反应的接合产物将由此必定仅由从第一化学结合成功形成的那些序列产生,由此去除了来自扩增反应的任何“假阳性”。在另一个实施方案中,二次反应中所用的引物序列可以是其他类型的扩增反应(如PCR)的引物位点。

[0211] 在一个实施方案中,一个或多个接合探针包含锚定序列。“锚定序列”在本文中意指接合探针中允许接合产物连接到支撑物上以达成检测目的的组分。适合的检测手段包括连接有适当捕获部分的支撑物。一般来说,这种连接将经由锚定序列与捕获探针杂交而发生,这个捕获探针实质上与锚定序列互补。

[0212] 在一个优选实施方案中,一个探针进一步包含“锚定”序列(有时在本领域中和本

文中被称为“邮码”或“条码”或“接头”)。接头有助于探针固定以允许使用“通用阵列”。就是说,产生含有捕获探针的阵列(固相或液相阵列),这些捕获探针对目标不具特异性,而是对个别(优选地)人工接头序列具特异性。

[0213] 因此,“接头序列”为一般不是原产自目标序列(即,是外源的),但添加或连接到目标序列上的核酸。应注意,在这个背景下,“目标序列”可以包括初级样品目标序列,或可以为衍生目标,如本文所概述的的反应的反应物或产物;因此,举例来说,目标序列可以是PCR产物、OLA反应中的第一接合探针或接合探针,等等。术语“条码”、“接头”、“地址”、“标签”和“邮码”已经全部被用于描述添加到扩增子中以允许分离核酸片段库的人工序列。接头的一个优选形式为杂交接头。在这个实施方案中,选择接头以允许与阵列表面上的互补捕获探针杂交。接头充当探针的独特识别符并由此充当目标序列的独特识别符。一般来说,阵列上的接头和相应捕获探针组经过开发以使得与彼此和反应混合物的其他组分的交叉杂交减到最少,这些其他组分包括目标序列和在目标序列外部的较大核酸序列上的序列(例如,基因组DNA内的序列)。接头的其他形式为可以使用质谱法分离的质量标签、可以基于电泳迁移率分离的电泳标签,等等。一些接头序列概述于2001年8月27日提交的美国专利序号09/940,185中,这个专利特此以全文引用的方式并入。优选的接头为满足以下标准的那些接头。这些接头并不存在于基因组(优选地为人类基因组)中,并且其不具有不合需要的结构,如发夹环。

[0214] 在一个实施方案中,使用接头序列得以产生更“通用”的表面;即,可以制造一个包含一组有限的捕获探针的标准阵列并且被用于任何应用中。最终用户可以通过设计不同的可溶目标探针来定制这个阵列,如本领域技术人员应了解,这个设计一般较简单并且成本较低。在一个优选实施方案中,制造不同并且通常是人工的捕获探针的阵列;即,捕获探针不与已知目标序列具有互补性。然后,可以将锚定序列并入到目标探针中。

[0215] 如本领域技术人员应了解,取决于所需的结合“强度”和所需不同锚定的数目,锚定序列的长度将变化。在一个优选实施方案中,接头序列在约6个到约500个碱基对长度的范围内,其中约8到约100是优选的,并且约10到约25是特别优选的。

[0216] 在一个优选实施方案中,接头序列独特地识别目标探针所结合的目标分析物。就是说,虽然接头序列不需要本身结合到目标分析物上,但系统可以通过检测接头的存在来识别目标分析物。因此,在结合或杂交试验和洗涤之后,扩增包括接头的探针,然后,对接头的检测充当目标核酸的存在的指示。

[0217] 在一个实施方案中,接头包括识别符区域和与如上文所描述的通用阵列上的捕获探针互补的区域。在这个实施方案中,扩增子与通用阵列上的捕获探针杂交。在与接头序列所互补的探针杂交之后完成接头的检测。优选地,探针如本文所描述加标记。

[0218] 一般来说,类似于可变间隔区序列,独特接头序列被用于每个独特目标分析物。就是说,特定接头序列的解析或检测得以识别含有那个接头序列的目标探针所结合的目标分析物。然而,如本文所论述,在一些情况下,有可能“再使用”接头序列并且多于一个目标分析物共享接头序列。

[0219] 在一个优选实施方案中,接头含有指示特定目标分子的不同序列或特性。就是说,每个接头独特地识别目标序列。如上文所描述,扩增接头以形成扩增子。检测接头作为目标分析物(即,特定目标核酸)的存在的指示。

[0220] 在本发明的这个方面的一个实施方案中,上游寡核苷酸经过设计以具有额外的核苷酸区段,这个核苷酸区段并不结合到所关注的目标上,但将被用于随后在某种适合的固体支撑物或装置上捕获接合产物。在本发明的这个方面的一个优选实施方案中,下游寡核苷酸具有连接到其上的可检测标记,以使得在接合之后,所得产物将在其3'末端含有用于固体支撑物的捕获序列并且在其5'末端含有可检测标记,并且只有接合产物才会含有捕获序列和标记。

[0221] 在尤其关于多重目标检测的本发明的另一个方面,探针组的每个上游探针可以经过设计以在其3'末端具有对应于DNA阵列上的不同位置的独特序列(在本文中也称为“锚定序列”)。探针组的每个下游探针可以任选地含有与其他下游探针一致的可检测标记,但含有对应于其相应的目标的独特目标结合序列。在与DNA阵列杂交之后,将仅可观测到具有地址序列(上游探针)和标记(下游探针)的接合探针。在本发明的另一个方面,可检测标记可以连接到上游探针上并且捕获序列可以为下游探针的一部分,以使得接合产物将具有更多地朝向接合产物的3'末端的可检测标记和朝向接合产物的5'末端的捕获序列。经由考虑合成的简易性以及将用于随后检测接合反应产物的装置的特征来最佳地确定精确构型。

[0222] 锚定序列可以具有核酸和非核酸部分。因此,举例来说,柔性连接子(如烷基),包括聚乙二醇连接子,可以用于提供锚定序列的核酸部分与支撑物表面之间的空间。这在接合产物很大时可能尤其适用。

[0223] 另外,在一些情况下,可以使用对应于“通用阵列”的捕获探针的锚定序列组。如本领域中已知,阵列可以用作为捕获探针的一般合成序列制成,这些捕获探针被设计成与所分析的样品的目标序列不互补,而与接合探针组的阵列结合序列互补。这些“通用阵列”可以用于多种类型的样品和诊断测试,因为探针的相同阵列结合序列可以被再使用/与不同目标识别序列配对。

[0224] 在一个实施方案中,一个或多个接合探针包含标记。“标记”或“加标记”在本文中意味着化合物具有至少一个所连接的要素、同位素或化学化合物以能够检测这种化合物,例如促使接合探针或接合或转移产物可使用已知检测方法检测,例如电子、光谱、光化学或电化学发光方法。一般来说,标记属于以下三类:a) 同位素标记,其可以是放射性同位素或重同位素;b) 磁性、电性、热标记;以及c) 有色或发光染料;不过标记同样包括酶和粒子,如磁性粒子。染料可以是发色团或磷,但优选地为荧光染料,这些荧光染料由于其强信号而提供良好的信噪比。用于本发明的适合染料包括(但不限于)荧光稀土配合物(包括铕和铽的那些配合物)、荧光素、异硫氰酸荧光素、羧基荧光素(FAM)、二氯三嗪胺荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、伞形酮、曙红、赤藓红、香豆素、甲基-香豆素、苝、孔雀石绿、Cy3、Cy5、芪、荧光黄、瀑布蓝.TM.、德克萨斯红、alexa染料、丹磺酰氯、藻红蛋白、绿色荧光蛋白和其波长偏移变体、氟硼吡咯(bodipy),以及本领域中已知的其他染料,如Haugland, Molecular Probes Handbook, (Eugene, Oreg.) 第6版; The Synthesgen catalog (Houston, Tex.), Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 第2版, Plenum Press New York (1999) 中所描述的那些染料, 以及Richard P. Haugland所编的第6版Molecular Probes Handbook中所描述的其他染料, 这些文献以引用的方式明确并入本文中。额外的标记包括如美国专利序号09/315,584中所描述的纳米晶体或Q点, 这个专利以引用的方式明确并入本文中。

[0225] 在一个优选实施方案中,标记为作为结合搭配物对的一部分的次级标记。举例来说,标记可以是半抗原或抗原,其将结合其结合搭配物。在一个优选实施方案中,结合搭配物可以连接到固体支撑物上以允许分离延伸的引物和非延伸的引物。举例来说,适合结合搭配物对包括(但不限于):抗原(如蛋白质(包括肽))和抗体(包括其片段(FAb等等));蛋白质和小分子,包括生物素/抗生物素;酶和衬底或抑制剂;其他蛋白质-蛋白质相互作用对;受体-配体;以及碳水化合物和其结合搭配物。核酸-核酸结合蛋白对也适用。一般来说,较小的对连接到NTP上以供并入到引物中。优选的结合搭配物对包括(但不限于)生物素(或亚氨基-生物素)和抗生物素、地高辛和Ab,以及Prolinx™试剂。

[0226] 在一个优选实施方案中,结合搭配物对包含生物素或亚氨基-生物素和抗生物素。亚氨基-生物素特别优选地作为来自pH 4.0缓冲液中的抗生物素的亚氨基-生物素解离物,而生物素需要苛刻的变性剂(例如pH 1.5的6M盐酸胍或95℃下的90%甲酰胺)。

[0227] 在一个优选实施方案中,结合搭配物对包含初级检测标记(例如,连接到接合探针上)和将特异性地结合到初级检测标记上的抗体。“特异性地结合”在本文中意味着搭配物以足以区分这个对与系统的其他组分或污染物的特异性进行结合。结合应足以在试验条件下保持结合状态,包括用以去除非特异性结合的洗涤步骤。在一些实施方案中,这个对的解离常数将小于约 $10^{-4}$ 到 $10^{-6}\text{M}^{-1}$ ,其中小于约 $10^{-5}$ 到 $10^{-9}\text{M}^{-1}$ 是优选的并且 $10^{-9}\text{M}^{-1}$ 是特别优选的。

[0228] 在一个优选实施方案中,次级标记为可化学修饰的部分。在这个实施方案中,将包含反应性官能团的标记并入到核酸中。然后,可以将官能团随后用初级标记加标记。适合的官能团包括(但不限于)氨基、羧基、马来酰亚胺基、桥氧基和硫醇基,其中氨基和硫醇基是特别优选的。举例来说,可以例如使用如本领域中已知的连接子将含有氨基的初级标记连接到包含氨基的次级标记上;例如,如众所周知的同双功能或异双功能连接子(参看1994Pierce Chemical Company catalog,technical section on cross-linkers,第155-200页,其以引用的方式并入本文中)。

[0229] 在这个实施方案中,标记还可以是标记探针结合序列或其补体。“标记探针”在本文中意指实质上与结合序列互补并且一般直接加标记的核酸。

[0230] 本发明的组合物一般使用已知合成技术制得。一般来说,基于标准亚磷酰胺化学的方法在本发明的一个方面具有特定用途,不过如本领域技术人员所了解,多种核酸合成反应是已知的。添加荧光团和淬灭剂的间隔同样众所周知。

#### [0231] VI. 目标捕获探针

[0232] 在某些方面并且根据本文所论述的接合探针的任何描述,本发明进一步包括目标捕获探针的用途。这些目标捕获探针一般不参与接合探针的化学接合反应,并且适用于增加试验的特异性。如本文进一步描述,目标捕获探针与如本文所描述由接合探针形成的接合产物上游或下游的目标核酸杂交。目标捕获探针与目标核酸杂交形成包含目标核酸、一个或多个接合产物和目标捕获探针的目标复合物。目标捕获探针含有可以用于在固体支撑物或珠粒上捕获目标复合物的捕获部分。在捕获于支撑物或珠粒上之后,去除未结合的物质。然后,对目标复合物(在本文中也称为“捕获复合物”)和/或接合产物进行分析或进行扩增(如PCR)。



[0233] 一般来说,本发明的目标捕获探针含有与捕获部分杂交的结构域以及可以用于选择性地捕获通过杂交或其他相互作用结合到目标捕获物上的复合物/分子的额外捕获部分。在一些实施方案中,捕获部分可以是捕获核酸序列、珠粒,或结合搭配物对的结合搭配物(如生物素,然后可以用其结合搭配物抗生蛋白链菌素加以捕获)。

[0234] 目标捕获探针经过设计以在与核酸的目标结构域杂交的接合探针上游或下游杂交。在某些实施方案中,目标捕获探针将在距接合探针预定距离内杂交。

[0235] 如本文所论述,本发明的方法包括两个或更多个接合探针与目标核酸的目标结构域在使得接合探针在不添加接合酶的情况下自发经历化学接合的条件下杂交。在使用目标捕获探针连同接合探针的本发明的实施方案中,应了解,目标捕获探针可以在一个或多个接合探针的杂交之前、之后或同时与目标核酸杂交。类似地,目标捕获探针的杂交还可以在接合探针的自发接合之前、之后或同时发生。

[0236] 在某些实施方案中,多重目标捕获探针被应用于目标核酸。如应了解,这些多重捕获探针可以经过设计以与沿着目标长度的任何点杂交。在目标核酸上形成单个接合产物的实施方案中,多重接合探针可以用于侧接任一侧上的接合产物。这个实施方案在质量控制或核酸完整性评估方面具有特定用途,因为在使用多重目标捕获探针时甚至会捕获降解的目标核酸的可能性增加。

[0237] 在目标核酸上形成多重接合产物的实施方案中,多重目标捕获探针也可以与目标核酸杂交。如上文所论述,这些多重目标捕获探针可以经过设计以在沿着目标核酸长度的不同点处杂交。在一些实施方案中,目标捕获探针经过设计以在目标核酸的3'、5'末端处或接近3'、5'末端处或在3'和5'末端处杂交。在其他实施方案中,目标捕获探针经过设计以与在目标核酸上形成的不同接合产物上游、下游和/或之间插入的区域杂交。

#### [0238] VII. 试验和检测方法

[0239] 在示例性方面,本发明提供检测样品中的多个不同目标核酸的方法。这些目标核酸包括至少第一目标结构域和第二目标结构域,其中第一目标结构域和第二目标结构域彼此相邻。目标核酸还可以包括作为目标捕获结构域的第三结构域,并且那个目标捕获结构域位于第一目标结构域和第二目标结构域上游或下游(即,5'或3')。

[0240] 在优选实施方案中,本发明的试验包括提供接合衬底的步骤,这些接合衬底包括上文所论述的包含目标结构域和目标捕获结构域的目标核酸。这些接合衬底各自进一步包括包含第一核酸接合探针和第二核酸接合探针的第一组接合探针。第一核酸接合探针与目标核酸序列的第一目标结构域杂交,并且第二核酸接合探针与目标核酸序列的第二目标结构域杂交。在这些实施方案中,第一目标结构域在第二目标结构域上游。第一核酸接合探针进一步包括5'接合部分并且第二核酸接合探针进一步包括3'接合部分。由于第一目标结构域和第二目标结构域彼此相邻,因此两个与目标结构域杂交的接合探针的接合部分彼此相邻并且能够在不使用接合酶的情况下经历接合以形成接合产物。

[0241] 本发明的实施方案进一步包括使目标捕获探针与目标核酸的第三目标捕获结构域杂交形成目标复合物。目标复合物由此包含目标核酸、与第一目标结构域杂交的第一接合探针、与第二接合结构域杂交的第二接合探针,以及与第三目标捕获结构域杂交的目标捕获探针。目标捕获探针包含捕获部分,其能够将目标复合物捕获于表面或衬底(如珠粒)上。捕获目标复合物可以用于分离目标复合物与未结合的目标核酸和接合探针,换句话说,



目标捕获探针的使用提供一种分离在上面已经成功形成接合产物的那些目标核酸的方式。

[0242] 本发明的试验可以进一步包括扩增由不同接合衬底形成的接合产物以形成扩增子,然后检测这些扩增子以检测目标核酸。

[0243] 如应了解,本发明的试验可以利用针对多重目标结构域的多组接合探针。举例来说,核酸可以进一步包括与第五目标结构域相邻的第四目标结构域,并且接合衬底进一步包括第二组接合探针,这第二组接合探针包括与第四目标结构域杂交的第三接合探针和与第五目标结构域杂交的第四接合探针。如同上文所论述的第一接合探针和第二接合探针一样,第三接合探针和第四接合探针在不使用接合酶的情况下接合,并且由此目标核酸包含多重接合产物。目标捕获探针可以再次与目标核酸杂交以形成包含多重接合产物、目标核酸和目标捕获探针的目标复合物。如上文所论述,可以在表面上捕获这些目标复合物,并且在一些实施方案中可以扩增多重接合产物以形成扩增子,然后可以对这些扩增子进行检测。

[0244] 类似地,目标核酸可以进一步包括与第七目标结构域相邻的第六目标结构域,并且含有第五接合探针和第六接合探针的第三组接合探针可以分别与第六目标结构域和第七目标结构域杂交。如同本文所论述的任何接合探针一样,第五接合探针和第六接合探针在不使用接合酶的情况下接合,由此产生包含多重接合产物(即,由第一接合探针和第二接合探针接合形成的接合产物和/或由第三接合探针和第四接合探针形成的接合产物)的目标核酸。如应了解,目标核酸可以含有许多目标结构域,并且由此许多接合探针组可以用于根据本发明在那个目标核酸上形成接合产物。

[0245] 包含多重接合产物的上述目标核酸中的任一个可以进一步与一个或多个目标捕获探针杂交形成目标复合物。然后,可以在衬底上捕获那些目标复合物。然后,使用本领域中已知和本文所论述的方法扩增目标复合物的接合产物以形成扩增子,然后对那些扩增子进行检测以识别和/或定量目标核酸的存在。

[0246] 在某些实施方案中,根据本文所描述的任何方法形成的接合产物并未经过扩增,取而代之的是使用本文所描述的任何方法直接进行检测。

[0247] 在检测接合或转移反应产物之前,可能存在额外的扩增反应。可以使用二次扩增反应来增强目标序列检测的信号;例如,通过增加针对每个目标拷贝所产生的接合产物的数目。在一个实施方案中,可以对接合产物进行许多标准扩增反应,包括(但不限于)链置换扩增(SDA)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、接合扩增和聚合酶链反应(PCR);包括许多PCR变化形式,包括“定量竞争PCR”或“QC-PCR”、“任意引物PCR”或“AP-PCR”、“免疫-PCR”、“Alu-PCR”、“PCR单链构象多态性”或“PCR-SSCP”、“反转录酶PCR”或“RT-PCR”、“生物素捕获PCR”、“小载体(vectorette)PCR”、“锅柄PCR”和“PCR选择性cDNA消减”,以及其他。在一个实施方案中,扩增技术不是PCR。根据某些实施方案,可以使用接合技术,如间隙填充接合,包括(但不限于)间隙填充OLA和LCR、桥连寡核苷酸接合、FEN-LCR和修正接合(correction ligation)。这些技术的描述可以见于美国专利第5,185,243号、公开欧洲专利申请EP 320308和EP 439182、公开PCT专利申请WO 90/01069、公开PCT专利申请案WO 02/02823和美国专利申请案序号09/898,323以及其他文献中。

[0248] 除了标准酶促扩增反应以外,还有可能设计出最初产生的接合产物本身可以作为二次化学接合反应的目标的探针方案。

[0249] 此外,可以对起始样品核酸进行“预扩增反应”以产生更多目标序列用于化学反应接合。举例来说,可以进行全基因组扩增。

[0250] 如本领域技术人员应了解,利用本发明的方法和组合物的试验取决于所需应用可以采用多种配置,并且可以包括原位试验(类似于FISH)、基于溶液的试验(例如转移/去除荧光团和/或淬灭剂)以及异相试验(例如利用固体支撑物进行操作、去除和/或检测,如使用高密度阵列)。另外,试验可以包括额外的反应,如目标序列的预扩增和在接合已经发生之后的二次扩增反应,如本文所概述。

[0251] 如本文所描述,关于本发明的这个方面的试验可能依赖于信号的增强,例如荧光或化学发光的产生。然而,如本领域技术人员应了解,依赖于这些信号的降低的试验也是有可能的。

[0252] 在一个实施方案中,类似于FISH反应,试验反应“原位”进行(在各种试验格局中也被称为“体外”和/或“离体”,这取决于样品)。由于不需要添加外源酶,因此可以将试剂添加到细胞(活的、电穿孔的、固定的,等等)中,如组织学样品中,用于确定目标序列,尤其与疾病状态或其他病状相关的那些目标序列的存在。

[0253] 另外,可以进行“体外”试验,其中从样品中提取目标序列。可以处理样品(例如对于石蜡包埋样品来说,可以制备这种样品),添加试剂并且使反应进行,其中检测是遵循本领域中所做的那样。

[0254] 在一些实施方案中,使用固体支撑物检测接合产物(在本文中也称为“接合的产物”)。举例来说,使用锚定探针/捕获探针杂交或其他结合技术,例如使用结合搭配物对(例如生物素和抗生物素蛋白链菌素)使接合产物连接到珠粒中。在一个实施方案中,转移反应使得生物素部分从第一接合探针转移到包含标记的第二接合探针。使包含抗生物素蛋白链菌素的珠粒与样品接触,并且例如使用FACS技术检查珠粒中标记的存在。

[0255] 在其他实施方案中,使用异相试验检测接合产物。就是说,反应在溶液中完成并且将产物添加到固体支撑物(如阵列或珠粒)上。一般来说,一个接合探针包含锚定序列或结合对搭配物(例如生物素、半抗原等等),并且另一个包含标记(例如荧光团、标记探针结合序列等等)。将接合产物添加到固体支撑物上,并且任选地洗涤这个支撑物。在这个实施方案中,只有接合产物才会被捕获并加标记。

[0256] 在本发明的另一个方面,一个寡核苷酸探针连接有磁性珠粒或某种其他标记(生物素),这可使接合产物的操作变容易。磁性珠粒或标记可以连接到如本文所概述使用许多构型的上游或下游探针上。

[0257] 如本文所描述,还可以进行二次反应,其中添加额外的功能部分(例如锚定序列、引物、标记等等)。类似地,如本文所描述可以进行二次扩增反应。

[0258] 检测系统在本领域中是已知的,并且包括光学试验(包括荧光和化学发光试验)、酶促试验、加放射性标记、表面等离子共振、磁阻、悬臂偏转、测序、表面等离子共振等等。在一些实施方案中,接合产物可以用于额外的试验技术中,举例来说,如2006/0068378(特此以引用的方式并入)中所描述,接合产物可以充当光散射粒子(如胶体)之间的连接子,从而在接合产物存在下引起色彩变化。

[0259] 在一些实施方案中,检测系统可以包括在样品收集管内;举例来说,血液收集装置可以具有并入到管或装置中的试验以允许检测病原体或疾病。

[0260] PCT申请WO 95/15971、PCT/US96/09769、PCT/US97/09739、PCT US99/01705、W096/40712和W098/20162 (所有这些文献都以全文引用的方式明确并入本文中) 描述了包含含有电子转移部分(包括电极)的核酸的新颖组合物,由此允许进行核酸杂交的新颖检测方法。

[0261] 一种较为突出的技术涉及使用DNA阵列(Marshall等人,Nat Biotechnol. (1998) 16 (1) :27-31),尤其对于涉及同时测量众多核酸目标的应用。DNA阵列最常用于基因表达监测,其中同时测量1到100,000个核酸目标(mRNA)的相对浓度。DNA阵列是小型装置,其中核酸锚定探针在制造时以独特而已知的模式连接到表面上(Marshall等人,Nat Biotechnol. (1998) 16 (1) :27-31)或可以在较晚的时间(例如,在珠粒阵列的情况下)被精确译解(Steemers等人,Nat Biotechnol. (2000) 18 (1) :91-4;以及Yang等人,Genome Res. (2001) 11 (11) :1888-98)。在一系列上游处理步骤之后,使所关注的样品与DNA阵列接触,样品中的核酸目标与表面上的锚定寡核苷酸杂交,并且确定样品中目标核酸的身份并常常确定其浓度。

[0262] 当前使用的许多核酸检测方法具有阻碍其广泛应用的特征和/或局限性。举例来说,在DNA微阵列的情况下,在使样品与微阵列接触之前,通常必须对样品进行一系列处理步骤。虽然这些步骤取决于阵列制造商和/或用于读取阵列的技术(荧光、电化学、化学发光、磁阻、悬臂偏转、表面等离子共振)而变化,但这些处理步骤通常属于一些一般类别:核酸分离和纯化、酶促扩增、可检测标记并入以及扩增后清除。其他常用步骤为样品浓缩、扩增目标片段化以减小核酸目标的平均尺寸,以及核酸外切酶消化以使PCR扩增目标转化成单链物质。

[0263] 在使DNA阵列与样品接触之前对许多上游处理步骤的需要可能显著增加通过这些方法检测核酸目标的时间和成本。这还可能显著牵涉到所获资料的质量。举例来说,一些扩增程序对目标降解非常敏感并且在输入核酸材料未被完好保存的情况下表现不佳(Foss等人,Diagn Mol Pathol. (1994) 3 (3) :148-55)。可以消除或减小上游处理步骤的数目和/或复杂性的技术可以显著降低成本并且改善由DNA阵列测试获得的结果的质量。一种减少上游处理步骤的方法涉及使用接合反应来增加信号强度并改善特异性。

[0264] 如上文所概述,试验可以按多种方式运作。在利用在固体支撑物上进行检测的试验中,存在多种可用于本发明的固体支撑物,包括阵列。

[0265] 在一些实施方案中,固体支撑物(如珠粒)可用于本发明。举例来说,如上文所概述可以使用结合搭配物对(一个在接合产物上并且一个在珠粒上)来去除未接合的反应物。在这个实施方案中,磁性珠粒是特别优选的。

[0266] 在本发明的一些实施方案中,捕获探针连接到固体支撑物上以供检测。举例来说,捕获探针可以连接到珠粒上以供使用任何适合技术(例如FACS)进行后续分析。类似地,可以使用如下文所描述的珠粒阵列。

[0267] 在一个实施方案中,本发明提供阵列,每个阵列位置至少包含共价连接的核酸探针,一般被称为“捕获探针”。“阵列”在本文中意指在阵列格局中的多个核酸探针;阵列的尺寸将取决于组合物和阵列的最终用途。可以制造含有约2个到成千个不同捕获配体的阵列。一般来说,对于基于电极的试验来说,取决于电极的尺寸以及阵列的最终用途,阵列将包含2个到多达100,000个或更多个。优选范围是约2到约10,000,其中约5到约1000是优选的,并且约10到约100是特别优选的。在一些实施方案中,本发明的组合物可以不呈阵列格局;就

是说,对于一些实施方案来说,同样可以制得包含单个捕获探针的组合物。另外,在一些阵列中,可以使用不同或相同组合物的多重衬底。因此,举例来说,大阵列可以包含多个较小衬底。核酸阵列在本领域中是已知的,并且可以按许多方式分类;包括有序阵列(例如能够在离散位点处解析化学)和随机阵列(例如珠粒阵列)。有序阵列包括(但不限于)使用光刻技术(例如Affymetrix **GeneChip®**)、点样技术(Synteni和其他)、印刷技术(Hewlett Packard和Rosetta)、电极阵列、三维“凝胶垫”阵列以及液体阵列制造的那些。

[0268] 在一个优选实施方案中,阵列存在于衬底上。“衬底”或“固体支撑物”或其他语法等效物在本文中意指可以经过修饰以含有适于连接或缔合核酸的离散个别位点的任何材料。衬底可以包含多种材料,如本领域技术人员应了解,包括(但不限于)玻璃、塑料、聚合物、金属、非金属、陶瓷和有机物。当固体支撑物为珠粒时,可能存在多种衬底,包括(但不限于)磁性材料、玻璃、硅、右旋糖苷和塑料。

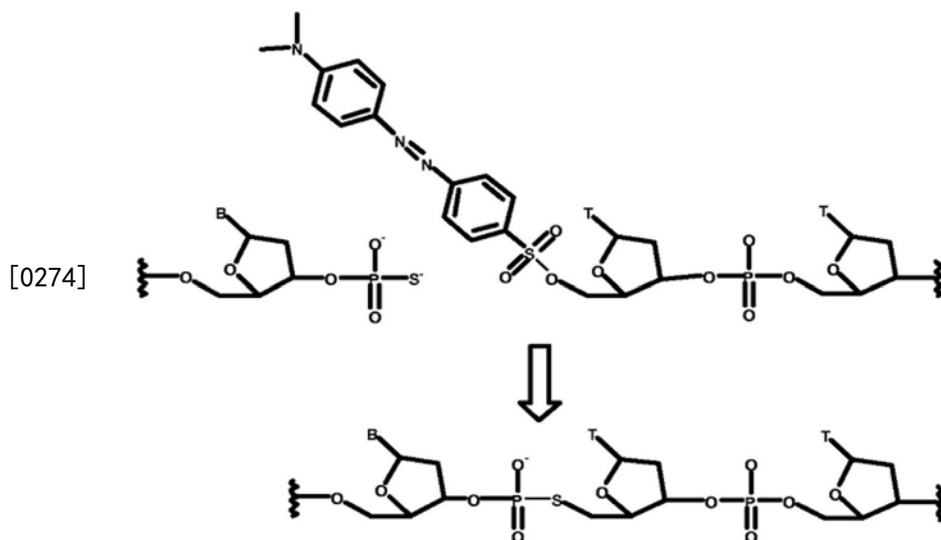
[0269] 如应了解并且也如上文所述,可以使用许多检测方法来检测根据本发明形成的接合产物(或接合产物的扩增子)的存在并对其定量。这些检测方法可以用于本文所论述的任何试验中的任何接合产物(或其扩增子)。这些检测方法包括(但不限于):毛细管电泳、质谱分析、微阵列分析、测序、实时PCR、光学检测、荧光检测、生物发光检测、化学发光检测、电化学检测、电化学发光检测和侧向流检测。

[0270] 除了上文所描述的试验以外,用于本发明的特异性试验包括化学接合依赖性探针扩增(CLPA)试验,其进一步详细论述于下文中。

#### [0271] 化学接合依赖性探针扩增(CLPA)

[0272] 在一些方面,本发明关于化学接合依赖性探针扩增(CLPA)技术。CLPA基于目标特异性接合探针的化学接合以形成接合产物。这种接合产物随后充当酶促扩增反应的模板以产生扩增子,随后使用任何适合手段分析这些扩增子,这些手段包括(但不限于)如上文所述的那些检测方法:毛细管电泳、质谱分析、微阵列分析、测序、实时PCR、光学检测、荧光检测、生物发光检测、化学发光检测、电化学检测、电化学发光检测和侧向流检测。CLPA可以用于达成多种目的,包括(但不限于)分析复杂基因标志图案。与利用酶促接合反应的其他技术,如DASL(Bibikova, M.等人, American Journal of Pathology, (2004), 165:5, 1799-1807)和MLPA(Schouten, 美国专利6,955,901)不同,CLPA使用化学接合反应。

[0273] 在一个实施方案中,CLPA试验包含使用两个或更多个并有反应性部分的接合探针,这些反应性部分在适当定位于目标序列上时可以自接合。在一个优选实施方案中,第一探针上的3'-硫代磷酸酯部分与第二探针上的5'-DABSYL离去基反应(见以下方案I)。



[0275] 方案1:3'硫代磷酸酯寡核苷酸(S-探针)与5'DABSYL修饰的寡核苷酸(L-探针)之间的化学接合反应

[0276] 5'-DABSYL基团比其他部分(例如碘)反应约快四倍,并且还简化了在合成期间探针的纯化。

[0277] CLPA具有优于其他基于序列的杂交技术的几个独特优点。第一,CLPA可以直接应用于RNA分析而无需预先制造DNA拷贝。第二,CLPA对样品污染物相对不太敏感并且可以直接应用于不纯样品,包括身体的样品,如血液、尿液、唾液和粪便。第三,CLPA相比其他已知方法涉及较少步骤,从而减少获得结果所需的时间。此外,CLPA探针可以干式储存,并且经过适当设计的系统将自发反应以在互补目标序列存在下连接两个或更多个寡核苷酸。化学接合反应显示出极佳的序列选择性并且可以用于辨别单核苷酸多态性。

[0278] 与酶促接合方法显著不同,CLPA显示出对DNA和RNA目标几乎相同的反应性,如下文更充分描述,这促使CLPA比其他已知系统更有效,并且扩大了可以利用CLPA的应用范围。

[0279] 有利地,CLPA试验减少了检测目标核酸所需的步骤的数目,这提供了实现时间段显著缩短的结果的可能性。举例来说,标准反转录酶(RT)-多重接合酶依赖性探针接合(MLPA)的一般工艺流程涉及以下步骤:

[0280] 1.分离总RNA。

[0281] 2.使用反转录酶制造cDNA拷贝。

[0282] 3.使MLPA探针组与cDNA目标杂交整夜。

[0283] 4.添加DNA接合酶以连接目标结合的探针。

[0284] 5.扩增接合探针,例如使用Taq聚合酶进行PCR扩增,并且对PCR引物加荧光标记。

[0285] 6.分析样品,例如通过CE。

[0286] 与标准RT-MLPA不同,CLPA能够直接对细胞和血液裂解物以及RNA目标进行分析,而不需要涉及分离RNA并进行反转录反应以在接合前制造cDNA拷贝的步骤。这缩短了获得结果的时间并且提供了一种实现更快分析的手段。

[0287] 在其他实施方案中,本发明的CLPA方法是对福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)组织进行。在其他实施方案中,首先使FFPE组织经受化学变性剂处理以使组织裂解,然后对其进行本文所描述的任何CLPA方法。在其他实施方案中,在应用CLPA方法之前,使用蛋白酶K和/

或超声处理来进一步处理FFPE组织。

[0288] 在本发明的其他实施方案中,通过用较高探针浓度推动杂交反应来进一步促进较快反应时间。因此,举例来说,可以将输入探针组以相对高的浓度并入到CLPA反应中,例如,比MLPA反应中典型使用的那些浓度约高100倍。提高探针浓度显著减少杂交步骤所需的时间,典型地从整夜减到约15分钟到约1小时之间。

[0289] 一般将CLPA探针以对于每个探针250纳摩尔浓度(nM)到0.01pM(皮摩尔浓度)的浓度并入到反应中。一般来说,浓度介于约1nM到约1pM之间。在选择探针浓度时应考虑的因素包括特定试验和所分析的目标。S-探针或硫代磷酸酯或亲核试剂探针以及L-探针或含离去基或DABSYL的探针以等于或超过目标浓度的浓度并入。S-探针和L-探针的总浓度可以达到高达10微摩尔浓度(uM)。作为一个非限制性实例,对于每个S和L探针的1nM $\times$ 250个CLPA探针将等于500nM(每个探针1nM $\times$ 每对2个探针 $\times$ 250个目标),对于每个探针的10nM将意味着5uM的总浓度。

[0290] 目标浓度通常在约10微克总RNA到约10纳克的范围内,但其可以少到单个基因拷贝。

[0291] 当使用较高探针浓度时,一般优选地在扩增之前并入纯化步骤,尤其对于高度多重性的分析(例如大于约5个目标)来说。在本发明的这个方面的一个实施方案中,可以采用基于固体支撑物的捕获方法,包括膜捕获、磁性珠粒捕获和/或粒子捕获。在一个优选实施方案中,在接合之后并且在酶促扩增之前采用生物素/抗生蛋白链菌素磁性珠粒纯化方案。在一些情况下,可以将磁性粒子直接添加到扩增主混合物中,而不干扰后续扩增反应。在其他情况下,优选地从珠粒中释放被捕获的寡核苷酸,并且随后在不存在捕获粒子或表面的情况下扩增所释放的寡核苷酸溶液。

[0292] 在一个优选实施方案中,CLPA涉及一组探针与核酸目标序列杂交,以使得这些探针可以在不添加接合酶的情况下经历自接合。在产生接合产物之后,一般使用扩增以有助于产物的检测和分析。出于这个目的,探针经过设计以并有PCR引物,例如通用PCR引物。在一个优选实施方案中,直到反应的接合部分完成之后才添加通用引物,并且在表面捕获纯化(例如,借助于目标捕获探针,其进一步详细描述于本文中)之后添加引物连同聚合酶,常常作为PCR主混合物的一部分。

[0293] CLPA探针具有反应性部分,其经过定位以使得当CLPA探针结合到核酸目标上时,这些反应性部分处于紧密空间定向中并且能够在不添加接合酶的情况下经历接合反应。在一个优选实施方案中,选择化学接合部分以得到可以通过扩增酶有效扩增的接合反应产物,在优选实施方案中,扩增酶为DNA聚合酶,但还可以包括其他酶,如RNA聚合酶。不受理论约束,产生更接近类似于据知能够通过DNA和RNA聚合酶扩增的衬底的反应产物的化学接合化学部分和探针组设计更有可能得到可以用于CLPA试验中的有效探针组。尤其优选的反应化学部分为得到如方案1中所说明的接近类似于原生DNA的反应产物的化学部分,方案1涉及3'-硫代磷酸酯与5'DABSYL离去基之间的反应。在另一个优选实施方案中,探针组包含3'-二硫代磷酸酯(Miller,G.P.等人,Bioorganic and Medicinal Chemistry, (2008) 16: 56-64,其特此以全文引用的方式并入并且尤其是关于探针和3'-二硫代磷酸酯化学部分的所有教导内容)和5'-DABSYL离去基。

[0294] 本发明的CLPA探针还可以并有填充序列(在本文中也被称为可变间隔区序列)以

调整接合产物的长度。填充序列的长度可以对接合探针所针对的目标序列具特异性,由此提供一种有助于分析接合产物的便利手段。填充序列可以位于任一个或两个探针上。在利用3'-硫代磷酸酯探针的实施方案中,填充序列在优选实施方案中被并入到这个探针(在本文中也称为“S探针”)上。也如上文所论述,填充序列可以位于接合探针中与目标核酸不互补的区域中,或填充序列可以位于至少部分重叠与目标核酸的结构域互补的区域中。在其他实施方案中,填充序列位于引物序列与探针结构域之间。

[0295] 在本发明的其他实施方案 (CLPA-CE) 中,填充序列的长度有变化以产生一个或多个可变长度接合产物,其提供了基于长度变化检测和识别特异性目标序列的基础。在一个优选实施方案中,通过毛细管电泳 (CE) 分析可变长度接合产物。一般来说,填充序列被包括在内以使得不同接合产物的长度在至少1个碱基对到约10个碱基对的范围内变化;优选地为1个碱基对到4个碱基对。在一个优选实施方案中,不同接合产物的长度从约80bp到约400bp之间变化;优选地在约100bp到约300bp的范围内;更优选地在约100bp到约200bp的范围内。在其他实施方案中,填充序列具有一定长度以使得接合产物的长度为约5-1000、10-950、15-900、20-850、25-800、30-750、35-700、40-650、50-600、55-550、60-500、65-450、70-400、75-350、80-300、85-250、90-200、95-150个碱基对。

[0296] 在一些实施方案中,CLPA探针可以进一步含有其他任选的要素以有助于分析和检测接合产物。这些要素包括上文在关于接合探针的章节中所论述的任何要素。举例来说,对于在本文中被称作CLPA-MDM(并且进一步详细论述于下文中)的实施方案,至少一个用于并入阵列结合序列的接合探针优选地结合到微阵列平台上的适当捕获序列上。对于CLPA-MDM来说,不同CLPA反应产物不是通过尺寸差异,而是通过阵列结合序列中的差异来分离。在这个实施方案中,阵列结合序列的序列有变化以使得每个CLPA探针将结合到DNA微阵列上的独特位点上。CLPA-MDM中阵列结合序列的长度通常从15个到150个碱基之间变化,更特别地为20到80个碱基,并且最特别地为25到50个碱基。

[0297] 在其他实施方案中,CLPA探针优选地还包括有助于纯化和/或分析的其他要素,包括(但不限于)标记,如荧光标记,和半抗原部分,例如用于纯化或检测接合产物的生物素。举例来说,并有生物素的探针和/或接合产物可以在包括珠粒的任何适合的抗生蛋白/抗生蛋白链菌素平台上进行纯化。虽然生物素/抗生蛋白捕获系统是优选的,但还可以使用其他半抗原系统(例如地高辛 (DIG) 加标记),杂交/寡核苷酸捕获一样可以。当需要在较晚的阶段从珠粒中释放捕获产物时,杂交/寡核苷酸捕获是一种优选的方法。除了磁性珠粒以外,还可以使用抗半抗原标记的支撑物(滤纸、多孔过滤器、表面捕获)。

[0298] CLPA探针加标记可以在任一个探针上的末端或内部进行。优选地,将生物素并入到硫代磷酸酯(S-探针)上的5'末端。

[0299] 在一个优选实施方案中,CLPA探针组由2个具有互补的反应性基团的寡核苷酸探针组成(图1和2)。在另一个实施方案中,CLPA探针组可以由3个或更多个彼此相邻地结合到目标上的探针组成。在3-探针CLPA反应的一个优选实施方案中,外部探针经过设计以含有酶促扩增引物结合位点,并且内部探针经过设计以跨越其他探针之间的目标区域。在一个更优选的实施方案中,外部探针具有不互补的反应性基团,以使得其在不存在内部(中间)探针的情况下不能彼此反应(图3)。在一些情况下,两个外部探针可以具有类似的反应性部分,除了其中一个基团在一个探针的5'末端和另一个探针的3'末端,并且L-探针化学部分

除了在探针上的定位外也可比彼此类似。如本领域技术人员已知,与用于2-探针CLPA系统的探针相比,可能需要不同化学试剂和过程来制造用于3-探针CLPA反应的探针。

[0300] 在3-探针CLPA系统的一个优选实施方案中,一个外部探针含有3'-硫代磷酸酯(3'-S-探针),另一个外部探针含有5'-硫代磷酸酯(5'-S-探针),并且中心探针含有3'-DABSYL和5'-DABSYL离去基。5'-DABSYL离去基探针的制造先前已有报道(Sando等人, J. Am. Chem. Soc., (2002), 124 (10) 2096-2097)。我们最近开发了一种新的DNA合成试剂,其允许常规并入3'-DABSYL离去基(见图4)。

[0301] 在其他实施方案中并且根据本文所描述的任何CLPA方法,试验可以在本发明的缓冲液存在下进行。这些缓冲液详细描述于上文中,并且缓冲液组分的任何组合都可以用于本发明的CLPA方法中。在优选实施方案中,本发明的CLPA方法,包括下文所描述的目标捕获CLPA、CLPA-CE和CLPA-MDM方法,是在本发明的缓冲液中进行,包括包含含离液阳离子(如盐酸胍)的变性剂的缓冲液。

#### [0302] 目标捕获CLPA

[0303] 在其他实施方案中,利用两个或更多个接合探针的CLPA试验可以与在上游或下游结合到相同核酸目标上的CLPA探针组上的目标捕获探针组合。这个目标捕获探针含有捕获部分(其可以包括(但不限于)半抗原、珠粒、寡核苷酸捕获序列等等),这个捕获部分可以用于选择性地捕获通过杂交或其他相互作用结合到目标捕获物上的复合物/分子(图10)。

[0304] 目标捕获探针可以与本文所论述的CLPA的任何实施方案一起使用。

[0305] 也如上文进一步详细论述,多于一个目标捕获探针可以应用于目标核酸。这些多重目标捕获探针可以经过设计以通过在目标核酸的3'和5'末端处或接近3'和5'末端处结合或通过目标捕获探针插入多重接合产物之间来侧接一个或多个接合产物。如下文进一步详细论述,多重目标捕获探针可以用于评估目标核酸(尤其RNA)的质量/完整性的方法中。

#### [0306] CLPA-CE

[0307] 在一个方面,本发明提供了使用含有可变间隔区序列的接合探针产生接合产物的方法,并且然后使用毛细管电泳检测那些接合产物。

[0308] 在某些实施方案中,首先使用本领域中已知的任何方法(包括PCR)扩增接合产物以产生扩增子,然后使用毛细管电泳检测这些扩增子。在其他实施方案中,通过在筛分介质上进行尺寸差异毛细管电泳(CE)或通过平板凝胶电泳来检测接合产物和/或扩增子。

[0309] 图1中提供CLPA-CE的示意性图示。在这个图中所描绘的实施方案中,通过任何适当手段使血液样品经受细胞裂解,这些手段包括(但不限于)化学、机械或渗透性细胞裂解。优选地使用化学裂解。

[0310] 在化学裂解之后,应用针对目标核酸的探针。图6提供了用于CLPA-CE分析的探针组设计的一般示意性图示。在这个实例中,S探针经过设计以包括用于接合产物的后续扩增的通用PCR引物。S探针还包括被设计成具有与特异性目标序列相关联的长度的填充序列。S探针还包括与目标核酸的目标结构域互补的目标结合序列(在本文中也称为“探针结构域”),这个目标核酸包含与填充序列相关联的目标序列。如应了解,一组探针可以含有多个全部针对相同目标结构域的S探针,或这组可以含有针对不同目标结构域的S探针的混合物。同样地,L-探针包括与目标结构域互补的目标结合序列,这个目标结构域与S探针所结



合的目标结构域相邻。在这个实施方案中，L-探针还包括通用引物。在其他实施方案中，一个或两个探针用荧光团 (FAM、Cy3、Cy5 等等) 加标记，然而，其也可以在不加荧光标记的情况下进行检测。在一些实施方案中，加标记是通过使用加荧光标记的PCR引物来实现。

[0311] 在图6中所描绘的CLPA-CE探针的实施方案中，S探针还包括在5'末端的生物素部分以有助于未接合探针的纯化和去除。

[0312] 如图1中所示，在S-探针和L-探针与目标核酸杂交之后，探针经历自发化学接合以产生接合产物。在根据图1的一些实施方案中，使用珠粒纯化步骤来去除未接合探针，不过未接合探针的去除并不是CLPA-CE方法的所有实施方案的必需步骤。在接合和任选地去除未接合探针之后，扩增接合产物。在接合探针含有通用引物序列的实施方案中，通用PCR引物对用于产生扩增子。在利用其他类型的引物序列的实施方案中，互补引物对可以用于产生扩增子。

[0313] 由于一个(或在一些实施方案中为两个)接合探针中可变间隔区序列的存在，扩增子具有对应于特异性目标核酸的独特长度。然后，使用毛细管电泳分析来分析那些扩增子，并且每个峰的相对强度对应于相对表达(图1和图7)。在替代实施方案中，其他适合的尺寸分离技术可以用于确定样品中的目标核酸表达。

[0314] 在其他实施方案中并且根据上述实施方案中的任一个，CLPA-CE方法包括使目标捕获探针与目标核酸杂交的步骤。然后，在接合产物扩增之前，通过目标捕获探针的捕获部分在表面或衬底上捕获包含目标捕获探针、目标核酸和接合产物的所得目标复合物。在其他实施方案中，去除未结合的目标核酸和接合探针，只留下目标复合物和接合产物。然后，根据本文所描述的任何方法扩增并分析接合产物。在一些实施方案中，在使用本领域中已知的方法扩增之前，从目标复合物中移出接合产物，包括加热和添加变性剂或其他试剂来改变杂交条件。

#### [0315] CLPA-MDM

[0316] 在本发明的这个方面的另一个实施方案中，通过微阵列分析 (CLPA-MDM) 分析/检测CLPA接合产物。图2中提供CLPA-MDM的示意性图示。CLPA-MDM与CLPA-CE的不同之处至少有以下方面。首先，探针组的设计不同。举例来说，图2中描绘CLPA-MDM探针组的一般图示。如同CLPA-CE探针一样，CLPA-MDM探针组可以包括用于接合产物扩增的通用引物。其还包括目标特异性序列，以及用于酶依赖性接合的接合部分。另外，CLPA-MDM探针还可以包括填充序列，然而，这个填充序列的目的在于将CLPA-MDM的尺寸调整到相同长度以为了使酶促扩增效率标准化。扩增子尺寸的规格化并不是必需的，但可以提供关于扩增效率的优点。CLPA-CE与CLPA-MDM探针组的设计之间的第二个差异在于后者包括用于与适当微阵列平台一起使用的独特阵列结合序列。

[0317] 关于本发明的CLPA-MDM方面，微阵列结合位点 (ABS序列) 被并入到探针设计中用于与“通用”微阵列平台一起使用以供检测。与CLPA-CE系统类似，探针优选地用荧光团加标记，例如通过使用加荧光标记的PCR引物。或者，举例来说，夹心试验加标记技术可以用于最后读出。夹心试验涉及设计出具有代替填充序列或除填充序列以外的常见(一般)标记结合位点 (LBS) 的探针并且使用将在阵列杂交步骤期间结合到这个位点上的二次探针。这种方法在需要用化学发光系统(如辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的寡核苷酸) 或用电化学检测系统标记阵列时尤其适用。一般来说，采用平面微阵列(例如点样于玻璃载片或电路板上的微阵

列)用于读出。然而,还可以使用珠粒微阵列,例如可获自Luminex和Illumina的那些珠粒微阵列(例如Luminex xMAP/xtag)。

#### [0318] 核酸质量评估

[0319] 在某些方面,在用以评估核酸质量的方法中使用相对于目标捕获探针在核酸目标上的结合位置不同的多重CLPA探针组(图11)。在图11中所描绘的实施方案中,目标捕获探针与目标核酸的一个末端杂交,并且使用由针对目标核酸的不同目标结构域的不同探针组产生的多重接合产物来产生包含目标捕获探针和多重接合产物的目标复合物。

[0320] 在这些方面,由不同接合产物得到的信号的差异提供核酸目标的质量评估。举例来说,通过测量与距目标捕获探针较远(例如300-1000bp远)的CLPA探针组相比,由位于目标捕获探针最近处(例如距目标捕获探针1-100bp远)的独特CLPA探针组得到的捕获效率/信号的差异,有可能推断出核酸目标的片段化或降解程度。在其他示例性实施方案中,对于不同CLPA探针组所产生的信号的相对比提供一种关于特定核酸目标的降解程度的量度。在其他实施方案中,接合探针组经过设计以使得其针对与目标捕获探针所杂交的结构域相距已知距离的目标结构域。在这些实施方案中,通过目标捕获探针上的捕获部分在表面或衬底上捕获包含目标捕获探针、接合产物和目标核酸的目标复合物,并且使未结合的目标核酸和接合探针与被捕获的目标复合物分离。然后,与多重不同探针组相关的信号的相对比提供了样品中的目标核酸中所存在的降解量的指示,并且接合产物与目标捕获探针之间的已知距离提供了一种用于定量目标核酸中的降解的“分子尺”。举例来说,关于图11,如果在一个示例性实施方案中,样品中的大多数目标核酸在位于CLPA组2和CLPA组3所杂交的结构域之间的结构域中降解,那么由CLPA组1和2得到的信号将相对大于由CLPA组3得到的信号。信号之间的这种相对比提供了样品中目标核酸的长度和完整性的指示。

[0321] 如本领域技术人员应了解,不同探针组的间距将取决于原始目标的尺寸和希望得到的信息。间距可以是相对等距的(例如3个探针组的使用大致相隔总长度的30%),或可以根据需要聚集成群。

[0322] 在其他实施方案中,多重目标捕获探针用于核酸目标的质量评估。如本文进一步论述,不同目标捕获探针可以经过设计以在接近目标核酸的末端处或在目标核酸的末端处杂交,并且还可以或替代地经过设计以在不同接合产物之间杂交。在一些实施方案中,两个目标捕获探针经过设计以与一个或多个接合产物上游和下游的结构域杂交。两个不同捕获探针的使用可以帮助确保甚至在高度降解的样品中,包含接合产物的所有目标复合物都被有效捕获于表面或衬底上并且在接合产物扩增之前与未结合的目标核酸和接合探针分离。

[0323] 关于降解的信息适用于评估样品中所含的核酸并且更具体地说是RNA的质量。这种技术尤其适用于评估福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)组织样品和样品降解的风险较高的其他样品中的RNA的质量。

[0324] 如上文所论述,捕获效率的差异可以通过测量信号的相对比来间接确定。这种方法可以与微阵列、CE、测序、实时PCR和其他核酸分析方法组合以根据上文所描述的任何方法进一步评估目标核酸。

#### [0325] VIII. 硬件

[0326] 在本发明的一个方面,与Liu(2006)所描述的那些类似的流体装置用于使本发明

中所描述的方法自动化。参看例如美国专利第6,942,771号,其关于组件的内容以引用的方式并入本文中,包括(但不限于)筒、装置、泵、孔、反应室和检测室。流体装置还可以包括磁性粒子捕获区、分离过滤器和树脂,包括细胞分离膜(即,获自Pall的Leukotrap™)。这个装置可以包括用于在实时PCR扩增期间产生的荧光信号的筒内成像的检测室(即,SYBR green, Taqman, Molecular Beacons),以及用于反应产物(扩增子和接合产物)的装置上分离和检测的毛细管电泳通道。在一个优选实施方案中,毛细管电泳通道可以在塑料衬底上模制并且填充有筛分聚合物介质(获自Applied Biosystems的POP-7™)。含有非筛分介质的通道也可以与经过适当设计的探针组一起使用。

[0327] 在一个优选实施方案中,本发明的装置包含液体处理组件,包括用于在每个工作站或工作站组上加载和卸载流体的组件。液体处理系统可以包括包含许多组件的机器人系统。另外,本文所概述的任何或所有步骤都可以被自动化;因此,举例来说,系统可以被完全或部分自动化。

[0328] 如本领域技术人员应了解,存在多种可以使用的组件,包括(但不限于)一个或多个机器人臂;用于定位微量板的板处理机;具有筒和/或帽的固持器;用以移走并替换非交叉污染板上的孔的盖子的自动化盖或帽处理机;用于使用一次性吸头进行样品分配的吸头总成;用于样品分配的可洗吸头总成;96孔加载块;经过冷却的试剂架;微量滴定板移液管位置(任选地经过冷却);板和尖端的堆叠塔;以及计算机系统。

[0329] 完全机器人或微流体系统包括自动化液体、粒子、细胞和生物体处理,包括高通量移液以进行筛选应用的所有步骤。这包括液体、粒子、细胞和生物体操作,如抽吸、分配、混合、稀释、洗涤、精确体积转移;回收和弃去移液管吸头;以及从单次样品抽吸中反复吸移相同体积用于多次递送。这些操作是无交叉污染的液体、粒子、细胞和生物体转移。这个仪器执行微量板样品到过滤器、膜和/或子板的自动复制、高密度转移、全板连续稀释以及大容量操作。

[0330] 在一个优选实施方案中,使用对试验组分具特异性的化学衍生的粒子、板、筒、管、磁性粒子或其他固相基质。微量板、管或任何固相基质的结合表面包括非极性表面、高极性表面、用以促进共价结合的修饰右旋糖苷涂层、抗体涂层、用以结合融合蛋白或肽的亲介质、表面固定蛋白(如重组蛋白A或G)、核苷酸树脂或涂层,并且其他亲和基质适用于本发明。

[0331] 在一个优选实施方案中,用于多孔板、多管、固持器、筒、小型管、深孔板、微量离心管(microfuge tube)、冷冻小瓶、方孔板、过滤器、芯片、光纤、珠粒以及其他固相基质的平台或具有多种容积的平台被容纳于可升级模块化平台上以为实现额外容量。这个模块化平台包括变速定轨振荡器,以及用于源样品的多位置工作台、样品和试剂稀释、试验板、样品和试剂储罐、移液管吸头以及活性洗涤工作站。

[0332] 在一个优选实施方案中,温度循环器和温度调节系统用于稳定热交换器(如控制块或平台)的温度以提供从0℃到100℃孵育样品的精确温度控制;这和工作站温度控制器一起或代替工作站温度控制器。

[0333] 在一个优选实施方案中,具有单个或多个磁性探针、亲和探针或移液管的可拆卸移液头(单通道或多通道)自动操作液体、粒子、细胞和生物体。多孔或多管磁性分离器或平台以单个或多个样品格局操作液体、粒子、细胞和生物体。

[0334] 在一些实施方案中,仪器将包括检测器,其可以是多种不同检测器,这取决于标记和试验。在一个优选实施方案中,适用的检测器包括具有多重荧光通道的显微镜;用以提供荧光、电化学和/或电性阻抗分析仪、具有单波长和双波长端点以及动力学性能的紫外和可见分光光度检测、荧光共振能量转移(FRET)、发光、淬灭、双光子激发和强度重新分布的板读取器;用以捕获资料和图像并将其转换成可定量格式的CCD相机;毛细管电泳系统;质谱仪;以及计算机工作台。

[0335] 这些仪器可以在无菌层流或通风橱中装配,或被密封于自备式系统中,用于在多孔板或管中进行细胞培养物生长和转化以及用于危险操作。活细胞可以在受控生长条件下生长,对于活细胞试验的时序,温度、湿度和气体受控制。细胞的自动转化和自动集落采集器可以有助于所需细胞的快速筛选。

[0336] 流式细胞测量术或毛细管电泳格局可以用于磁性珠粒和其他珠粒、粒子、细胞和生物体的个别捕获。

[0337] 灵活的硬件和软件可使仪器适用于多重应用。软件程序模块可以进行方法的创建、修改和运行。系统诊断模块可以进行仪器对准、正确连接和电动机操作。定制工具、实验室器皿以及液体、粒子、细胞和生物体转移模式可使不同应用得以进行。资料库可以进行方法和参数储存。机器人和计算机介面可使仪器之间通信。

[0338] 在一个优选实施方案中,机器人设备包括与存储器和一组输入/输出装置(例如键盘、鼠标、监控器、打印机等等)通过汇流排通信的中央处理单元。此外,如下文所概述,这个中央处理单元可以和本发明的多路装置的CPU一起或代替本发明的多路装置的CPU。中央处理单元、存储器、输入/输出装置和汇流排之间的一般交互在本领域中是已知的。因此,取决于将要运作的实验,将多种不同程序储存于CPU存储器中。

[0339] 这些机器人流体处理系统可以利用许多不同试剂,包括缓冲剂、试剂、样品、洗涤剂、试验组分(如标记探针)等等。

#### [0340] IX. 全过程

[0341] 本发明方面的一个独特优点为将样品(尤其用于RNA检测)收集到稳定缓冲液中的能力,这种稳定缓冲液允许a)在测试之前的较长时间样品不会降解(特别用于RNA的试验中,因为RNA在传统条件下非常快速地降解),以及b)能够在收集缓冲液中运作试验而不需要其他纯化步骤从混合物中去除妨碍酶促试验运作的组分,如高变性盐浓度。将如血液等样品直接收集到同时使细胞裂解并使RNA稳定较长时间(例如几天到几周或更长时间)的缓冲液中的能力允许在试验处理之前进行远程收集和时间延迟。另外,这些方法由此避免了处理的任何特殊条件,例如避免热暴露和/或冷链处理。举例来说,可以收集样品并使用普通邮件邮寄,并且在无需额外步骤的情况下进行测试。

[0342] 此外,在所收集的样品中直接试验的能力为优于使用样品准备步骤来纯化用于传统的基于酶的试验的样品的一个明显益处。

[0343] 在其他实施方案中,在一个地理位置将样品收集到稳定缓冲液中,然后可以运输到不同地理位置,之后根据本文所论述的本发明的任何方面和实施方案对样品进行试验。换句话说,如上文所论述,本发明提供得到稳定样品的方法和组合物,可以在一个地理位置收集这种稳定样品,然后在不同地理位置对其进行如本文所论述的化学接合方法和试验。

#### [0344] X. 试剂盒

[0345] 在本发明的另一个方面,产生一种用于常规检测一组预定核酸目标的试剂盒,其利用如本文所描述的探针、技术、方法和化学接合反应作为检测过程的一部分。这种试剂盒可以包含探针、目标序列、说明书、缓冲液和/或其他试验组分。

[0346] 在另一个方面,本发明提供用于稳定和检测或定量样品中的RNA的试剂盒,其包含含变性剂的缓冲溶液、第一接合探针和第二接合探针。在一个优选实施方案中,变性剂选自以下各项组成的组:盐酸胍和异硫氰酸胍。在一个更优选的实施方案中,缓冲溶液进一步包含EDTA、还原剂、表面活性剂和pH缓冲剂。在特别优选的实施方案中,还原剂选自以下各项组成的组:DTT和巯基乙醇。在另一个特别优选的实施方案中,表面活性剂选自以下各项组成的组:Triton X-100和N-十二烷基肌氨酸钠。

[0347] 在其他方面,本发明提供用于检测目标核酸序列的试剂盒,其中那个目标序列包含相邻的第一目标结构域和第二目标结构域。这些试剂盒可以包括:包含6M GuHCl的2x裂解缓冲液和至少一组接合探针,其中那个至少一组接合探针包括:包括与目标核酸序列的第一目标结构域互补的第一探针结构域的第一接合探针和包括与目标核酸序列的第二目标结构域互补的第二探针结构域的第二接合探针。如上文进一步论述,本发明的试剂盒中所包括的接合探针可以包括其他功能部分,包括填充序列、引物序列和锚定序列,以及其任何组合。

## 实施例

[0348] 实施例1:五个目标的定量多重检测

[0349] 使用组合于一个反应中的五(5)个DNA目标模拟物(对应于MOAP1 (SEQ ID NO:5)、PCNA (SEQ ID NO:9)、DDB2 (SEQ ID NO:12)、BBC3 (SEQ ID NO:16)和BAX (SEQ ID NO:19)基因的部分)在其相应的CLPA探针(表1)(S探针和L探针,各自为1nM)存在下进行多重CLPA反应。如表2中所示汇集不同浓度的目标模拟物。在50°C下将目标模拟物、S探针和L探针于PCR缓冲液(1X PCR缓冲液为1.5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、10mM Tris-HCl pH 8.3)中孵育1小时。将每个反应混合物的1μl等分试样用作模板以使用Dynamo SYBR green PCR混合物在通用引物(SEQ ID NO 1和2,300nM)存在下进行PCR扩增。对样品进行PCR循环,持续27个周期(95°C 15分钟,继之以95°C (10秒)、60°C (24秒)、72°C (10秒)的27个周期)。在PCR扩增之后,使样品变性且注射到ABI 3130DNA测序仪(毛细管电泳仪器)中。由ABI得到的对于3个样品的CE迹线以及PCNA的峰值对比目标模拟物浓度的绘图示于图7中,并且PCNA信号的线性反应随输入浓度而变的绘图示于图8中。

[0350] 表1. 探针和目标序列信息

[0351]

SEQ ID	名称	序列细节	扩增子尺寸
1	正向PCR引物	FAM-GGGTTCCTAAGGGTTGGA	
2	反向PCR引物	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA	
3	MOAP1-L	LTACATCCTTCCTAGTCAATTACACTCT AGATTGGATCTTGCTGGCAC	47
4	MOAP1-S	5'-生物素 -GGGTTCCTAAGGGTTGGATAGGTAAA TGGCAGTGTAGAACS	41
		接合MOAP1扩增子	88
5	MOAP1-目标模拟物	GTGTAATTGACTAGGAAGGATGTAGTTC TACACTGCCATTTACCTA	
6	MOAP1-RNA目标模拟物	GUGUAAUUGACUAGGAAGGAUGUAGUU CUACACUGCCAUUUACCUA	
7	PCNA-L	LTGGTTTGGTGCTTCAAATACTCTCTAG ATTGGATCTTGCTGGCAC	45
8	PCNA-S	生物素 -GGGTTCCTAAGGGTTGGATCGAGTCT ACAGATCCCCAACTTTCATAGTCTGAAA CTTCTCCS	63
		接合PCNA扩增子	108
9	PCNA-目标模拟物	AGTATTTGAAGCACCAAACCAGGAGAAA GTTTCAGACTATGA	
10	DDB2-L	LTAGCAGACACATCCAGGCTCTAGATTG GATCTTGCTGGCAC	51
11	DDB2-S	生物素 -GGGTTCCTAAGGGTTGGATCGAGTCT ACTCCAACCTTGACCACCATTTCGGCTAC S	49
		接合DDB2扩增子	96
12	DDB2-目标模拟物	GCCTGGATGTGTCTGCTAGTAGCCGAAT GGTGGTCA	
13	DDB2-RNA目标模拟物	GCCUGGAUGUGUCUGCUAGUAGCCGAA UGGUGGUCA	
14	BBC3-L	LTCCGAGATTTCCCCCTCTAGATTGGAT CTTGCTGGCAC	38
15	BBC3-S	生物素 -GGGTTCCTAAGGGTTGGATCCCAGAC TCCTCCCTCTS	37
		接合BBC3扩增子	75
16	BBC3-目标模拟物	GGG GGA AAT CTC GGA AGA GGG AGG AGT CTG GG	
17	BAX-L	LTCACGGTCTGCCACGCTCTAGATTGGA TCTTGCTGGCAC	39

[0352]

18	BAX-S	生物素-GGGTTCCTAAGGGTTGGA TGA GTC TAC ATGA TC CT TCCCGCCACAAAGATGGS	53
		接合BAX扩增子	92
19	BAX-目标模拟物	CGTGGCAGACCGTGACCATCTTTGTGGC GGGA	
20	3-硫代磷酸酯 GAPDH	生物素 -GGGTTCCTAAGGGTTGGACGGACGCC TGCTTCACCACCTTCTTGATGTCAS	51
21	中间2L探针 GAPDH	LTCATATTTGGCAGGTTTTTCTAGACGG CAGGTL	32
22	5'-硫代磷酸酯 GAPDH	SCAGGTCCACCACTGACACGTTGGCAGT TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	50
		接合3-探针扩增子	133
23	反向引物 A3632-p	生物素-ATTAACCCTCACTAAAGGGA	
24	GAPDH 目标 模拟物	ACT GCC AAC GTG TCA GTG GTG GAC CTG ACC TGC CGT CTA GAA AAA CCT GCC AAA TAT GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG AAG CAG GCG TC	
25	GAPDH 3-L	LTTTCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC AGATGATCGACGAGACACTCTCGCCATC TAGATTGGATCTTGCTGGCAC	
26	GAPDH 3-S	GGGTTCCTAAGGGTTGGACGGACCAA CTCCTCGCCATATCATCTGTACACCTTC TTGATGTCATCATATTTGGCAGGTS	
27	GAPDH-3-FA M/BHQ-1 Taqman探针	(FAM)ccaactcctgcccatacatctgtacaccttcttg(BHQ -1)	
28	GAPDH 4-L	LTGCTGATGATCTTGAGGCTGTTGTCAT ACTGATGATCGACGAGACACTCTCGCCA TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	
29	GAPDH-4-S	GGGTTCCTAAGGGTTGGACGATGGAG TTGATGCTGACGGAAGTCATAGTAAGCA GTTGGTGGTGCAGGAGGCATS	
30	GAPDH-4-QU ASAR 670/BHQ-2 Taqman探针	(Quasar 670)tgctgacggaagtcataagcagttggt(BHQ-2)	
31	PCNA 2-L	LTCCTTGAGTGCCTCCAACACCTTCTTG AGGATGATCGACGAGACACTCTCGCCAT CTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	
32	PCNA 2-S	GGGTTCCTAAGGGTTGGACGGTACAA CAAGACCCAGCTGACGACTCTTAATATC CCAGCAGGCCTCGTTGATGAGGS	
33	PCNA 2-Cal Fluor Orange 560/BHQ-1	(CAL Red 610)ctgacgactcttaatatcccagcaggcctcggt(BHQ-2)	

[0353]

34	DDB2-2-L	LTTAGTTCCAAGATAACCTTGGTTCCAG GCTGATGATCGACGAGACACTCTCGCCA TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	
35	DDB2-2-S	生物素GGGTTCCTAAGGGTTGGA CGTTAGACGCCAATAGGAGTTTCACTGG TGGCTACCACCCACTGAGAGGAGAAAA GTCATS	
36	DDB2-2-(CAL Fluor Orange 560/BHQ-1	(Cal Orange 560) cgccaataggagtttactggtggtacca(BHQ-2)	
37	MRPS5-TC	[生物素]GCCAGAGAGGTTACGTGGC GGCTCTCTTCA	30
38	MRPS5-S	GGATGCTATGAGCGATCTGCAGCGTGC AGTCTTCACATCTTCCCAGTCCAGTTTG ACGS	58
39	MRPS5-L	LTCTGGAACCTCATCTTCTGGCTCTGGA TCCTTCCTAAGTGAATGTTGACAGGATG CTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	79
		接合MRPS5扩增子	137
40	PCNA-TC	[生物素]TCTTCATCCTCGATCTTGGG AGCCAAGTAG	30
41	PCNA-S	GGATGCTATGAGCGATCTGCAGCCACTA TACATCTTACTATACTTTACTCTACAACA AGGGGTACATCTGCAGACAS	76
42	PCNA-L	LTACTGAGTGTACCCGTTGAAGAGAGTG GAGTGGCTTTTGTAAAGTCTTCTAGATT GGATCTTGCTGGCAC	70
		接合PCNA扩增子	146
43	CDR2-TC	[生物素]AGAGTGATCGGTATTTTGTT CTCTGTTCA	29
44	CDR2-S	GGATGCTATGAGCGATCTGCAGCGCAA TTCATTTTCATTCAATCAATCTAAAGA TCTCCTTAAACAACGCTTTGTATTCTGG AGGS	86
45	CDR2-L	LTGTTGTAGGGGAACCTCACGGGCTCTG GGTTGACAGAGGCCAGTTAGGATGTTA CCACCAGTGAATGTTGACAGGATCCTCT AGATTGGATCTTGCTGGCAC	101
		接合CDR2扩增子	187
			* Lumin ex珠粒 #
46	GAPDH-L	LTCCATTGATGACAAGCTTCCCGTTCTC AGCTCGCGTTCTAAGCTTCCCTTTAGTG AGGGTTAAT	
47	GAPDH-S	生物素- TAATACGACTCACTATAGGGCGAGTAGA	12



[0354]

		AAGTTGAAATTGATTATGATCTCGCTCC TGGAAGATGGTGATGGGATTS	
48	ACTG2-L	LTTCTCCCAGTGACTGAGGGCTGGTGTG TCTTTGGCTCCCTTTAGTGAGGGTTAAT	
49	ACTG2-S	生物素- TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGA GAAAGAGATAAATGATAGGGACTGGAG CACCGAGGGTATGAGAGGTTCS	72
50	ACPP-L	LTTCAACTCCTTGGCTAGTACACTTCGG TCTAGCGCTCCCTTTAGTGAGGGTTAAT	
51	ACPP-S	生物素- TAATACGACTCACTATAGGGCGGTAAGA GTATTGAAATTAGTAAGAGGTCTCCATG CCGAAACACCAAAGTCACAAACS	66
52	RDH11-L	LTGTGCATCTCAAAGCCATCTGCTGTCT TCGGCTCCCTTTAGTGAGGGTTAAT	
53	RDH11-S	生物素- TAATACGACTCACTATAGGGCGTTTGTG GTAAAGTATGTGATTTAGGGAGGAAGTG ACCCAAGTGGTTGACTCCTAS	63
54	DES-L	LTGTTCTCTGCTTCTTCCTTCAACTGAAT CTCCTCCTGCTTCCCTTTAGTGAGGGTT AAT	
55	DES-S	生物素- TAATACGACTCACTATAGGGTATTTGAT AAGAGAATGAAGAAGTATCCACGTCCG CTCGGAAGGCAGCCAAATS	68
56	引物A3534-p	p-TAATACGACTCACTATAGGG	

[0355] \*Luminex产品插页MagTAG-Plex微球体

[0356] L=DABSYL接合部分

[0357] S=硫代磷酸酯部分

[0358] 表2. 样品浓度

[0359]

样品	目标模拟物浓度
1	所有目标模拟物的最终浓度为10pM
2	MOAP1、DDB2和BBC3为10pM, PCNA为5pM, 并且BAX为2pM
3	MOAP1、DDB2和BBC3为10pM, PCNA为1pM, 并且BAX为0.5pM

[0360] 实施例2: 使用MOAP1和DDB2 DNA和RNA目标模拟物的CLPA反应

[0361] 如表3中所呈现, 使用MOAP1和DDB2基因的DNA或RNA目标模拟物以及被设计成以序列为目标的CLPA探针组一式两份制备反应物。探针编号指的是表1中的SEQ ID NO。以表4中所示的浓度和体积添加试剂。在0.2mL PCR管中将个别的S-探针、L-探针和目标模拟物加热到50℃维持60分钟, 之后使用2.5μl CLPA反应物作为具有40个扩增周期的实时PCR反应中的模板。将实时PCR数据对一式两份样品取平均值并且呈现于表3中 (Ct值栏)。观测到RNA与DNA目标模拟物之间的Ct值的差异最小, 从而指示在RNA和DNA衬底上具有类似探针接合效率。

[0362] 表3. CLPA探针组

样品	识别符	L-探针 (1 nM) SEQ ID NO	S-探针(1 nM) SEQ ID NO	目标模拟物 (10 pM) SEQ ID NO	Ct值
[0363]	1MOAP-1 DNA	3	4	5	19.5
	2MOAP-1 RNA	3	4	6	20
	3DDB2 DNA	10	11	12	21
	4DDB2 RNA	10	11	13	21

[0364] 表4. 试剂表-实施例1

[0365]	1X PCR缓冲液*	12.5 ul
	S-探针 (1 nM) 和L-探针 (1 nM)	各2.5 ul
	目标模拟物 (100 pM)	2.5 ul
	水	5.0 ul
	在50C下加热1小时	

[0366] \*1X PCR缓冲液为1.5mM MgCL<sub>2</sub>、50mM KCl、10mM Tris-HCl pH 8.3

[0367] 实施例3:在裂解缓冲液和裂解的血液中对DDB2 RNA转录物的直接分析

[0368] 使用获自Ambion的体外转录试剂盒和获自Origene的cDNA载体质粒(SC122547)制备DDB2信使RNA(mRNA)。使用获自Invitrogen的PicoGreen RNA试验试剂盒测定mRNA的浓度。用加入到水中或全血中的不同浓度的DDB2mRNA转录物测试DDB2探针组(表5)。反应混合物组分列于表5中。样品1-4由在水中的10ng、1ng、0.1ng和0.01ng DDB2转录物组成,并且样品5-8由加入到全血中的相同浓度范围组成。遵循类似反应方案,除了其中添加蛋白酶K到血液样品中以减少蛋白质凝固。程序如下:以表5和表6中的浓度和体积添加试剂。

[0369] RNA转录物在后续加热步骤之前一旦与缓冲液组合即稳定,并且可以在这个缓冲溶液中储存几天,而不会观测到RNA的任何显著降解。将S-探针、mRNA转录物、盐酸胍裂解缓冲液和水(样品1-4)或全血(样品5-8)加热到80℃维持5分钟,然后将其移到55℃加热块上。添加L-探针、洗涤缓冲液、抗生蛋白链菌素珠粒和蛋白酶K,并且在55℃下孵育反应物60分钟。从加热块上移走样品,并且使用dyna1 MPC 96S磁性捕获板捕获磁性珠粒。去除上清液并且用洗涤缓冲液洗涤珠粒3次。将DyNamo SYBR green PCR主混合物(25ul,1x)和通用引物(SEQ ID NO 1和2,300nM)添加到珠粒中,并且使用Stratagene MX4000实时PCR仪器对样品进行热循环,持续30个周期(95℃维持15分钟,95℃(10秒)、60℃(24秒)、72℃(10秒)的30个周期)。记录Ct值并且将扩增的样品注射到Agilent Bioanalyzer 2100中以校验扩增子的长度。所有扩增子都显示出正确的尺寸(约96bp)并且性能对于血液和水样品来说是相当的,从而展示了在裂解的血液中直接分析RNA的能力。结果概述于下表7中。在额外实验中显示,RNA转录物在初始加热步骤之前储存于缓冲溶液中的时间长度(从几分钟到几小时并且甚至长达几天)不会显著改变表7中所概述的结果。

[0370] 表5.CLPA探针组。

[0371]	样品	识别符	L-探针(1nM)	S-探针(1nM)	RNA转录物
	1-8	DDB2	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	Origene质粒SC122547

[0372] 表6.DDB2反应混合物。

[0373]

样品	1-4	5-8
GuHCL裂解缓冲液 (2X)	12.5 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l
S-探针 (5 nM)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
RNA转录物 (10 ng/ $\mu$ l至0.01ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
全血	0 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l
水	12.5 $\mu$ l	0 $\mu$ l
在80℃下加热5分钟, 在冰上冷却		
洗涤缓冲液	20 $\mu$ l	15 $\mu$ l
L-探针 (5 nM)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Dynal M-270珠粒	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
蛋白酶K (10 mg/ml)	0 $\mu$ l	5 $\mu$ l
总计	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
在55℃下孵育60分钟		

[0374] a) GuHCL裂解缓冲液 (1X) 为3M GUHCL、20mM EDTA、5mM DTT、1.5% Triton、30mM Tris pH 7.2)。

[0375] b) 洗涤缓冲液为100mM Tris (pH 7.4)、0.01% Triton。

[0376] 表7. 水对比血液的结果概述

[0377]

试验	DDB2浓度	Ct值	样品
1	10ng	13.5	水
2	1ng	17	水
3	0.1ng	20.2	水
4	0.01ng	24	水
5	10ng	13.5	血液
6	1ng	16	血液
7	0.1ng	19.2	血液
8	0.01ng	23.5	血液

[0378] 实施例4: 3-探针CLPA-CE试验

[0379] 如表8中所呈现, 使用DNA目标模拟物探针SEQ ID NO 24和3-探针CLPA探针组 (SEQ ID NO 20、21和22) 一式两份制备反应物。探针编号指的是表1中的SEQ ID NO。以表9中的浓度和体积添加试剂。在0.2mL PCR管中将S-探针、L-探针和目标模拟物立即加热到50℃维持60分钟, 之后使用2.5 $\mu$ l CLPA反应物作为具有25个扩增周期的Dynamo SYBR green PCR反应中的模板。将实时PCR数据对一式两份样品取平均值并且呈现于表8中 (Ct值栏)。然后, 经由Agilent Bioanalyzer 2100分析每个反应的1 $\mu$ l样品以确定反应产物的尺寸。

[0380] 表8. CLPA探针组

[0381]	样品	识别符	3'-S探针 SEQ ID NO	2L-探针 SEQ ID NO	5'-S探针 SEQ ID NO	目标模拟物 SEQ ID NO	扩增子尺寸	Ct值
	1和2	GAPDH	20	21	22	24	约135 bp	16.3
	3和4	阴性	20	21	22	24	未观测到	无CT

[0382] 探针浓度为1nM;目标模拟物浓度为10pM。

[0383] 表9. 试剂表-实施例4

[0384]	1X PCR缓冲液*	12.5 $\mu$ l
	3和5' S-探针 (10 nM) 以及2L-探针 (10 nM)	各2.5 $\mu$ l
	目标模拟物 (1 nM)	2.5 $\mu$ l
	水	2.5 $\mu$ l
	在50℃下加热1小时	

[0385] \*1X PCR缓冲液为1.5mM MgCL<sub>2</sub>、50mM KCl、10mM Tris-HCl pH 8.3

[0386] 实施例5:mRNA的多重实时CLPA检测

[0387] 向0.2ml PCR管中添加4组CLPA试剂,其经过工程改造以对于不同色彩双重标记的探针具有独特结合位点。如表10和表11所指示制备反应物。CLPA探针组和双重标记的探针对应于表1中的SEQ ID NO 25到36。将S和失控转录物mRNA (GAPDH、PCNA和DDB2) 添加到2X裂解缓冲液中 (GuHCL裂解缓冲液 (1X) 为3M GUHCL、20mM EDTA、5mM DTT、1.5% Triton、30mM Tris pH 7.2)。mRNA转录物在后续加热步骤之前一旦与缓冲液组合即稳定,并且可以在这个缓冲溶液中储存几天,而不会观测到RNA的任何显著降解。然后,将溶液加热到80℃维持5分钟。在冰上冷却样品,并且添加抗生蛋白链菌素涂布的磁性珠粒 (DYNAL M-270) 和L-探针。在50℃下加热样品1小时。在DYNAL MPC板上捕获磁性珠粒并且用洗涤缓冲液洗涤两次。再捕获珠粒,并且添加dynamo PCR 1x主混合物与4个不同双重标记的探针和通用PCR引物 (25ul总体积)。使用Stratagene MX4000实时PCR仪器对样品进行热循环,持续30个周期 (95℃维持15分钟,95℃ (10秒)、60℃ (24秒)、72℃ (10秒) 的30个周期),使用适当滤波器监测FAM、Cal Fluor orange 560、Cal Fluor Red 610和Quasar 670通道中的荧光。记录针对每个通道所观测到的Ct值并且在表10中指示。

[0388] 表10. 实施例5中所使用的多重试剂。

样品	S探针(25pM)SEQ ID NO	L探针(25pM)SEQ ID NO	目标	Ct(FAM)-GAPDH3	Ct(560)-DDB2	Ct(610)-PCNA	Ct(670)-GAPDH4
1和2	26、29、32、35	25、28、31、34	250 ng酵母tRNA; 40 pg GAPDH(Origene SC118869); 40 pg PCNA(SC118528); 40 pg DDB2(SC122547)mRNA	25.5	24.5	24.8	25.8
[0389] 3和4	26、29、32、35	25、28、31、34	250 ng酵母tRNA(阴性)	无Ct	无Ct	无Ct	无Ct
5和6	26、29、32、35	25、28、31、34	250 ng酵母tRNA; 40 pg GAPDH(Origene SC118869); 40 pg PCNA(SC118528); 40 pg DDB2(SC122547)mRNA	22.1	24.5	22.1	22.2
7和8	26、29、32、35	25、28、31、34	250 ng酵母tRNA(阴性)	无Ct	无Ct	无Ct	无Ct

[0390] 表11. 实施例5中所使用的额外试剂

[0391]	GuHCl裂解缓冲液 (2X)	12.5μl
	S-探针 (各0.25nM储备液)	5μl
	mRNA (250ng tRNA+/-mRNA)	5μl
	水	2.5μl
	在80℃下加热5分钟,在冰上冷却	
	水	18μl
	L-探针 (各0.25nm储备液)	5μl
	珠粒	2μl
	总计	50μl

[0392] 在50℃下孵育1小时

[0393] 实施例6: 福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) CLPA试验

[0394] 方案:

[0395] 1. 将含有400pM每个S探针 (序列ID 47、49、51、53和55) 和25ul TE缓冲液的25ul CLPA裂解缓冲液 (6M GuHCl、40mM EDTA、10mM DTT、3% Triton X-100、100mM Tris pH 7.5) 添加到200ul PCR管中。

[0396] 2. 使用切片刀 (Leica, RM 2155) 将福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 组织块切成5微米的厚度并且固定在病理学玻璃载片上。从玻璃载片上刮下具有2mm×5mm×5μm的适当尺寸的FFPE样品并且添加到PCR管中。

[0397] 3. 在55℃下在水浴超声发生器 (Branson Ultrasonics) 中于50Hz下对含有FFPE样品和裂解缓冲液的PCR管超声处理5分钟。

[0398] 4. 从超声处理浴中移出管, 并且在混合下添加40ul蛋白酶K溶液 (2.5mg/ml) 和10ul L-探针溶液 (每个探针1nM, 序列ID 46、48、50、52和54)。

[0399] 5. 在55℃下将管孵育3小时。

[0400] 6. 从加热块上移走样品, 并且使用台式摇摆转子离心机使样品以3000rpm离心1分钟。

[0401] 7. 仅仅将上清液转移到新的PCR管中。

[0402] 8.添加2.0ul Invitrogen/Dynal M-270抗生蛋白链菌素涂布的磁性珠粒,混合并孵育样品5分钟。

[0403] 9.使用Dynal MPC 96-S磁性板捕获珠粒,并且去除上清液。

[0404] 10.用200ul洗涤缓冲液(100mM tris缓冲液,pH 7.0)洗涤珠粒2次。

[0405] 11.弃去最终洗涤液,并且使珠粒再悬浮于10ul Dynamo F-450Taq聚合酶主混合物(Finnzymes)和10ul PCR引物组(各600nM,序列ID 56和23)中。

[0406] 12.然后,根据以下方案对样品进行热循环:95℃10分钟匀变;28个PCR周期:94℃维持10秒;60℃维持20秒;72℃维持20秒。

[0407] 13.在热循环完成时,将1ul核酸外切酶添加到每个PCR反应管中,并且在37℃下孵育样品20分钟,之后在95℃下孵育2分钟。

[0408] 14.从每个孔中移出2.5ul PCR反应物并且添加到22.5ul Luminex珠粒混合物中。Luminex珠粒混合物制备如下。针对每个反应组合每组2500个微球体(珠粒66、63、68、12和72)。在1.1x T<sub>m</sub>杂交缓冲液中通过涡旋和超声处理约20秒将MagPlex-TAG微球体混合物稀释/浓缩到每ul每个微球体组有111个。

[0409] 15.然后使用热混合器于搅拌下在95℃下孵育样品1.5分钟,然后在37℃下孵育1小时。

[0410] 16.通过在1x T<sub>m</sub>缓冲液(0.2M NaCl、0.1M Tris、0.08%Triton X-100,pH 8.0)中将SAPE稀释到10ug/mL来制备报道体混合物。

[0411] 17.添加100ul报道体混合物到每个孔中。缓缓混合。

[0412] 18.在37℃下孵育15分钟。

[0413] 19.然后,根据制造商的方案在Luminex仪器上运作MagTag试验。

[0414] 结果示于图9中。

[0415] 实施例7:目标捕获CLPA血液试验

[0416] 在0.2ml PCR管中,将25ul全血与25ul 2x GuHCl裂解缓冲液混合。使样品短暂涡旋。向这个管中添加25ul含有2.0nM目标捕获探针(TC)和2.0nM S-探针的溶液。将溶液混合并加热到80℃维持5分钟,然后冷却到55℃。在55℃下,添加50ul含有1.0nM L-探针和2mg/ml蛋白酶K的溶液。S-探针、L-探针和TC探针序列列于表1中,序列ID 37-45。将溶液混合并加热到55℃维持30分钟。30分钟后,添加2ul M-270抗生蛋白链菌素涂布的磁性珠粒。通过缓缓移液将样品混合,之后在55℃下孵育5分钟以上。从热血中移出样品并且立即放置到96孔磁选机板(Dynal)上。15秒后,完全去除上清液。用180ul洗涤缓冲液(100mM tris缓冲液,pH 7.4,0.01%triton)洗涤珠粒3次。去除缓冲液,并且添加含有300nM引物1和2中的每一个的PCR混合物。对样品进行热循环,持续28个周期(95℃2分钟,94℃(10秒)、60℃(20秒)和72℃(20秒)的28个周期)。在热循环之后,将2.0ul PCR产物与1ul ABI Genescan 600V2尺寸标准物和17ul甲酰胺混合。将样品加热到95℃维持5分钟,然后放置在ABI 3500毛细管电泳仪器上以供分析。在CE迹线上在110-200个碱基对范围内仅仅观测到3个峰。

[0417]

基因	尺寸	峰高(RFU)
MRPS5	137	30000
PCNA	146	28000
CDR2	187	4000

[0418] 表13:实施例7的结果

[0419] 本说明书提供了本发明所描述的技术的示例性方面的方法、系统和/或结构以及其用途的全面描述。尽管上文已经在某种程度上具体地描述或参考一个或多个个别方面描述这种技术的多个方面,但本领域技术人员在不背离其技术的精神或范围的情况下可以对所披露的方面作出众多变更。因为在不背离本发明所描述的技术的精神和范围的情况下可以获得许多方面,所以适当范围处于上文所附的权利要求书中。因此涵盖其他方面。此外,应了解,除非另有明确要求或权利要求书的语言固有地必需要有特定顺序,否则任何操作都可以按任何顺序进行。上述描述中所含和随附图式中所示的所有事项都打算被解释为只是特定方面的说明并且不限于所示出的实施方案。除非上下文另外明确表明或有明确规定,否则本文所提供的任何浓度值一般都按照混合值或百分比给出,而不考虑在添加混合物的特定组分之时或之后发生的任何转化。对于尚未明确并入本文中来说,本披露中所提到的所有公开参考文献和专利文献都出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。在不背离如以上权利要求书中所定义的本发明技术的基本要素的情况下可以作出细节或结构的改变。

[0420] 本发明的实施方案如下:

[0421] 实施方案1.一种检测样品中的多个不同目标核酸的方法,其中每个目标核酸包含与第二目标结构域相邻的第一目标结构域和位于所述第一目标结构域和第二目标结构域上游或下游的第三目标捕获结构域,所述方法包含:

[0422] (a) 提供多个接合衬底,各自包含:

[0423] (i) 所述目标核酸中的一种;

[0424] (ii) 第一组接合探针,包含:

[0425] (A) 第一核酸接合探针,包含:

[0426] (1) 与所述一个目标核酸序列的第一目标结构域杂交的第一探针结构域;

[0427] (2) 5'-接合部分;以及

[0428] (B) 第二核酸接合探针,包含:

[0429] (1) 与所述一个目标核酸序列的第二目标结构域杂交的第二探针结构域;以及

[0430] (2) 3'接合部分;

[0431] (b) 在不使用接合酶的情况下接合所述第一接合探针和第二接合探针以形成第一多个接合产物;

[0432] (c) 使包含捕获部分的目标捕获探针与所述目标核酸的所述第三目标结构域杂交以形成目标复合物;

[0433] (d) 使用所述捕获部分在表面上捕获所述目标复合物;

[0434] (e) 扩增所述接合产物以形成扩增子;

[0435] (f) 检测所述扩增子,

[0436] 从而检测所述目标核酸。

[0437] 实施方案2.根据实施方案1所述的方法,其中:

[0438] 所述目标核酸进一步包含与第五目标结构域相邻的第四目标结构域;

[0439] 所述多个接合衬底各自进一步包含第二组接合探针,所述第二组接合探针包含与所述第四目标结构域杂交的第三核酸接合探针和与所述第五目标结构域杂交的第四核酸

接合探针；

[0440] 所述方法进一步包含在不存在接合酶的情况下接合所述第三接合探针和第四接合探针以使得所述一个目标核酸序列包含多重接合产物；

[0441] 并且所述检测步骤(f)包含检测由所述多重接合产物产生的扩增子。

[0442] 实施方案3.根据实施方案2所述的方法,其中所述目标核酸进一步包含与第七目标结构域相邻的第六目标结构域；

[0443] 所述多个接合衬底各自进一步包含第三组接合探针,所述第三组接合探针包含与所述第六目标结构域杂交的第五核酸接合探针和与所述第七目标结构域杂交的第六核酸接合探针；

[0444] 所述方法进一步包含在不存在接合酶的情况下接合所述第三接合探针和第四接合探针以使得所述一个目标核酸序列包含多重接合产物。

[0445] 实施方案4.根据实施方案1至3所述的方法,其中所述接合探针中的每一个进一步包含引物序列。

[0446] 实施方案5.根据实施方案1至4所述的方法,其中每组接合探针的所述接合探针中的至少一个进一步包含可变间隔区序列以使得所述扩增子具有目标特定长度。

[0447] 实施方案6.根据实施方案1至5所述的方法,其中每组接合探针中仅有一个接合探针包含所述可变间隔区序列。

[0448] 实施方案7.根据实施方案5至6所述的方法,其中所述可变间隔区序列含于所述接合探针的所述探针结构域与所述引物之间。

[0449] 实施方案8.根据实施方案1至7所述的方法,其中所述目标捕获探针的所述捕获部分包含选自以下各项的成员:捕获核酸序列、珠粒和结合搭配物对的结合搭配物。

[0450] 实施方案9.根据实施方案1至8所述的方法,其中所述5'接合部分包含DABSYL并且所述3'接合部分包含硫代磷酸酯。

[0451] 实施方案10.根据实施方案1至9所述的方法,其中所述3'接合部分包含DABSYL。

[0452] 实施方案11.根据实施方案1至10所述的方法,其中所述样品被收集到包含盐酸胍(GuHCl)的缓冲液中。

[0453] 实施方案12.根据实施方案11所述的方法,其中所述样品为血液。

[0454] 实施方案13.根据实施方案1至12所述的方法,其中所述目标核酸包含DNA或RNA。

[0455] 实施方案14.根据实施方案1至13所述的方法,其中所述检测步骤(f)利用选自以下各项组成的组的技术:毛细管电泳、质谱分析、微阵列分析、测序、实时PCR、光学检测、荧光检测、生物发光检测、化学发光检测、电化学检测、电化学发光检测和侧向流检测。

[0456] 实施方案15.根据实施方案1至14所述的方法,其中所述杂交步骤(c)与所述接合步骤(b)同时进行。

[0457] 实施方案16.一种检测样品中的多个不同目标核酸的方法,其中每个目标序列包含相邻的第一目标结构域和第二目标结构域,所述方法包含:

[0458] a) 提供多个接合衬底,各自包含:

[0459] i) 所述不同目标核酸中的一种;

[0460] ii) 第一核酸接合探针,包含:

[0461] 1) 与所述一个目标核酸的第一目标结构域互补的第一探针结构域;



- [0462] 2) 第一引物序列;以及
- [0463] 3) 5'-接合部分;以及
- [0464] iii) 第二核酸接合探针,包含:
- [0465] 1) 与所述一个目标核酸的第二目标结构域互补的第二探针结构域;
- [0466] 2) 第二引物序列;以及
- [0467] 3) 3'接合部分;
- [0468] 其中所述接合探针中的一个包含可变间隔区序列;以及
- [0469] b) 在不存在接合酶的情况下接合所述第一接合探针和第二接合探针以形成多个不同接合产物,其中不同接合产物具有不同目标特定长度;
- [0470] c) 扩增所述接合产物;以及
- [0471] d) 以所述不同目标长度为基础检测所述不同接合产物的存在。
- [0472] 实施方案17.根据实施方案16所述的方法,其中所述目标核酸序列为RNA。
- [0473] 实施方案18.根据实施方案16所述的方法,其中所述核酸目标序列为DNA。
- [0474] 实施方案19.根据实施方案16、17或18所述的方法,其中所述样品来源于血液。
- [0475] 实施方案20.根据实施方案16、17或18所述的方法,其中所述样品来源于石蜡包埋样品。
- [0476] 实施方案21.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述检测是通过毛细管电泳。
- [0477] 实施方案22.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述检测是通过质谱分析。
- [0478] 实施方案23.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述第一引物中的每一个是相同的并且所述第二引物中的每一个是相同的。
- [0479] 实施方案24.一种用于检测目标核酸序列的试剂盒,其中所述目标序列包含相邻的第一目标结构域和第二目标结构域,所述试剂盒包含:
- [0480] a) 包含6M GuHCl的2X裂解缓冲液;
- [0481] b) 第一接合探针,包含:
- [0482] i) 与所述第一目标结构域互补的第一探针结构域;
- [0483] ii) 第一引物序列;以及
- [0484] III) 5'-接合部分;以及
- [0485] c) 第二核酸接合探针,包含:
- [0486] i) 与所述第二目标结构域互补的第二探针结构域;
- [0487] ii) 第二引物序列;以及
- [0488] iii) 3'接合部分。
- [0489] 实施方案25.根据实施方案24所述的试剂盒,其中所述接合探针中的一个进一步包含可变间隔区序列。
- [0490] 实施方案26.一种检测样品中的多个不同目标核酸的方法,其中每个目标序列包含相邻的第一目标结构域和第二目标结构域,所述方法包含:
- [0491] a) 提供包含以下各项的反应混合物:
- [0492] i) 包含血液的目标样品;以及

- [0493] ii) 包含3M GuHCl的1X裂解缓冲液;
- [0494] b) 使所述反应混合物与多个不同探针组接触,每个探针组包含:
- [0495] i) 第一接合探针,包含:
- [0496] 1) 与所述一个目标核酸的第一目标结构域互补的第一探针结构域;
- [0497] 2) 第一引物序列;以及
- [0498] 3) 5'-接合部分;以及
- [0499] iii) 第二核酸接合探针,包含:
- [0500] 1) 与所述一个目标核酸的第二目标结构域互补的第二探针结构域;
- [0501] 2) 第二引物序列;以及
- [0502] 3) 3'接合部分;
- [0503] c) 在不存在接合酶的情况下接合所述第一接合探针和第二接合探针以形成多个不同接合产物;
- [0504] d) 扩增所述不同接合产物;以及
- [0505] e) 检测所述接合产物的存在。
- [0506] 实施方案27.根据实施方案26所述的方法,其中所述接合探针中的一个进一步包含可变间隔区序列。
- [0507] 实施方案28.根据实施方案26或27所述的方法,其中所述目标核酸为RNA。
- [0508] 实施方案29.根据实施方案27或28所述的方法,其中所述第一接合探针和第二接合探针中的一个进一步包含结合搭配物对中的一种,并且在所述扩增之前,添加包含另一个结合对的珠粒以捕获所述接合产物。
- [0509] 实施方案30.根据实施方案27、28或29所述的方法,其中所述检测是使用所述可变间隔区序列来完成。
- [0510] 实施方案31.一种检测样品中的多个目标RNA序列的方法,其中每个目标核酸序列包含相邻的第一目标结构域和第二目标结构域以及第三目标结构域,所述方法包含:
- [0511] (a) 将样品收集到缓冲液中以形成稳定样品;
- [0512] (b) 根据实施方案1在所述稳定样品中进行试验以检测所述多个目标核酸。
- [0513] 实施方案32.根据实施方案31所述的方法,其中所述样品在环境室温下稳定至少1周。

## 序列表

[0001]	<110>	DXTERITY DIAGNOSTICS INCORPORATED	
		Terbrueggen, Robert	
	<120>	用于检测目标核酸的方法与组合物	
	<130>	068433-5003-W0	
	<140>	PCT/US2012/038436	
	<141>	2012-06-15	
	<150>	61/486,817	
	<151>	2011-05-17	
	<160>	56	
	<170>	PatentIn 3.5版	
	<210>	1	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	1	
		gggttccta aggttgga	19
	<210>	2	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	2	
		gtgccagcaa gatccaatct aga	23
	<210>	3	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	3	
		tacatccttc ctagtcaatt acactctaga ttggatcttg ctggcac	47
	<210>	4	
	<211>	41	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	4	
		gggttccta aggttgat aggtaaatgg cagtgtagaa c	41
	<210>	5	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成寡核苷酸	
	<400>	5	
		gtgtaattga ctaggaagga ttagttcta cactgccatt taccta	46
	<210>	6	
	<211>	46	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	6	
		guguaauuga cuaggaagga uguaguucua cacugccauu uaccua	46
	<210>	7	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	7	
		tggtttggtg cticaaatac tcctagatt ggatcttgct ggcac	45

	<210> 8	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成探针	
	<400> 8	
	gggttccta agggttggat cgagtctaca gatccccaac ttcatagtc tgaaactttc	60
	tcc	63
	<210> 9	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 9	
	agtatttgaa gcaccaaacc aggagaaagt ttcagactat ga	42
	<210> 10	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成探针	
	<400> 10	
	tagcagacac atccaggtc tagattggat ctgtctggca c	41
	<210> 11	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成探针	
	<400> 11	
	gggttccta agggttggat cgagtctact ccaactttga ccaccattcg gctac	55
[0002]	<210> 12	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 12	
	gcctggatgt gtctgctagt agccgaatgg tggcca	36
	<210> 13	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 13	
	gccuggaugu gucugcuagu agccgaaugg ugguca	36
	<210> 14	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成探针	
	<400> 14	
	tccgagatit cccctctag attggatctt gctggcac	38
	<210> 15	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成探针	
	<400> 15	
	gggttccta agggttggat ccagactcc tccctct	37
	<210> 16	
	<211> 32	

[0003]	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成寡核苷酸		
	<400>	16		
		gggggaaatc tcggaagagg gaggagtctg gg	32	
	<210>	17		
	<211>	39		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成探针		
	<400>	17		
		tcacgggtctg ccacgctcta gattggatct tgctggcac	39	
	<210>	18		
	<211>	53		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成探针		
	<400>	18		
		gggttccta agggttggat gagtctacat gatccttccc gccacaaaga tgg	53	
[0003]	<210>	19		
	<211>	32		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成寡核苷酸		
	<400>	19		
		cgtggcagac cgtgaccatc tttgtggcgg ga	32	
	<210>	20		
	<211>	51		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成探针		
	<400>	20		
		gggttccta agggttggac ggacgcctgc ttcaccacct tcttgatgta a	51	
[0003]	<210>	21		
	<211>	32		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成探针		
	<400>	21		
		tcataatttg caggtttttc tagacggcag gt	32	
	<210>	22		
	<211>	50		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成探针		
	<400>	22		
		caggtccacc actgacacgt tggcagttct agattggatc ttgctggcac	50	
[0003]	<210>	23		
	<211>	20		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成引物		
	<400>	23		
		attaaccctc actaaaggga	20	
	<210>	24		
	<211>	89		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	合成寡核苷酸		

[0004]	<400> 24		
	actgccaacg tgtcagtggt ggacctgacc tgccgtctag aaaaacctgc caaatatgat	60	
	gacatcaaga aggtggtgaa gcaggcgctc	89	
	<210> 25		
	<211> 76		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 25		
	ttttctagac ggcaggctcag gtccaccaga tgatcgacga gacactctcg ccatctagat	60	
	tgatcttgc tggcac	76	
	<210> 26		
	<211> 79		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 26		
	gggttcccta agggttggac ggaccaactc ctcgcatat catctgtaca cttctttgat	60	
	gtcatcatat ttggcaggt	79	
	<210> 27		
	<211> 35		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 27		
	ccaactcttc gccatatcat ctgtacacct tcttg	35	
	<210> 28		
	<211> 78		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 28		
	tgctgatgat cttgaggctg ttgtcactat gatgatcgac gagacactct cgccatctag	60	
	attggatctt gctggcac	78	
	<210> 29		
	<211> 75		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 29		
	gggttcccta agggttggac gatggagttg atgctgacgg aagtcatagt aagcagttgg	60	
	tggtgcagga ggcat	75	
	<210> 30		
	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 30		
	tgctgacgga agtcatagta agcagttggt	30	
	<210> 31		
	<211> 77		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 31		
	tccttgagtg cctccaacac cttcttgagg atgatcgacg agacactctc gccatctaga	60	
	ttggatcttg ctggcac	77	
	<210> 32		
	<211> 77		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		

<220>  
 <223> 合成探针  
 <400> 32  
 tccttgagtg cctccaacac cttcttgagg atgatcgacg agacactctc gccatctaga  
 ttggatcttg ctggcac 60  
 77  
  
 <210> 33  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成探针  
 <400> 33  
 ctgacgactc ttaatatccc agcaggcctc gtt 33  
  
 <210> 34  
 <211> 78  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成探针  
 <400> 34  
 ttagttccaa gataaccttg gttccaggct gatgatcgac gagacactct cgccatctag  
 attggatctt gctggcac 60  
 78  
  
 <210> 35  
 <211> 79  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成探针  
 <400> 35  
 gggttccta agggttggac gttagacgcc aataggagtt tcaactggtgg ctaccacca  
 ctgagaggag aaaagtcatt 60  
 79  
  
 <210> 36  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成探针  
 <400> 36  
 cgccaatagg agtttactg gtggetacca 30  
  
 <210> 37  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成探针  
 <400> 37  
 gccagagagg ttacgtggcg gctctcttca 30  
  
 <210> 38  
 <211> 58  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成探针  
 <400> 38  
 ggatgctatg agcgatctgc agcgtgcagt cttcacatct tcccagtcca gtttgacg 58  
  
 <210> 39  
 <211> 79  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成探针  
 <400> 39  
 tctggaacct catcttcttg ctctggatcc ttccctaagt aatgttgaca ggatgctcta  
 gattggatct tgctggcac 60  
 79  
  
 <210> 40  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	40	
	tcttcatcct	cgatcttggg	agccaagtag
			30
	<210>	41	
	<211>	76	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	41	
	ggatgctatg	agcgatctgc	agccactata catcttacta tactttactc tacaacaagg
	ggtacatctg	cagaca	60
			76
	<210>	42	
	<211>	70	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	42	
	tactgagtgt	caccgttgaa	gagagtggag tggcttttgt aaagtcttct agattggatc
	ttgctggcac		60
			70
	<210>	43	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	43	
	agagtgatcg	gtatittgtt	ctctgttca
			29
	<210>	44	
	<211>	86	
	<212>	DNA	
[0006]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	44	
	ggatgctatg	agcgatctgc	agcgcaattc atttcattca caatcaatct aaagatctcc
	ttaaacaacg	cttigtattc	tgagg
			60
			86
	<210>	45	
	<211>	101	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	45	
	tgttgtaggg	gaactcacgg	gctctgggtt gacagaggcc agttaggatg ttaccaccag
	tgaatgttga	caggatcctc	tagattggat cttgctggca c
			60
			101
	<210>	46	
	<211>	64	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	46	
	tccattgatg	acaagcttcc	cgttctcagc tcgcttcta agcttccett tagtgagggt
	taat		60
			64
	<210>	47	
	<211>	76	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成探针	
	<400>	47	
	taatacgact	cactataggg	cgagtagaaa gttgaaattg attatgatct cgctcctgga
	agatggtgat	gggatt	60
			76
	<210>	48	
	<211>	55	



[0007]	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 48		
	ttctccagct gactgagggc tgggtgtgtct ttggctccct ttagtgaggg ttaat	55	
	<210> 49		
	<211> 76		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 49		
	taatacgact cactataggg cgaattgaga aagagataaa tgatagggac tggagcaccg	60	
	agggtatgag aggttc	76	
	<210> 50		
	<211> 55		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 50		
	ttcaactcct tggctagtac acttcgggtct agcgctccct ttagtgaggg ttaat	55	
	<210> 51		
	<211> 78		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 51		
	taatacgact cactataggg cggtaaagagt attgaaatta gtaagaggtc tccatgccga	60	
	aacaccaaag tcacaaac	78	
	<210> 52		
	<211> 52		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 52		
	tgtgcattct aaagccatct gctgtcttcg gtcctcttta gtgagggtta at	52	
	<210> 53		
	<211> 76		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 53		
	taatacgact cactataggg cgtttgttgt taagtatgtg atttagggag gaagtgacct	60	
	aagtgttga ctctca	76	
	<210> 54		
	<211> 59		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 54		
	tgttctctgc ttcttcttc aactgaatct cctcctgctt cccttttagtg agggttaat	59	
	<210> 55		
	<211> 73		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成探针		
	<400> 55		
	taatacgact cactataggg tatttgataa gagaatgaag aagtatccac gtccgctcgg	60	
	aaggcagcca aat	73	
	<210> 56		
	<211> 20		

---

[0008]	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	56	
	taatacgact cactataggg		20

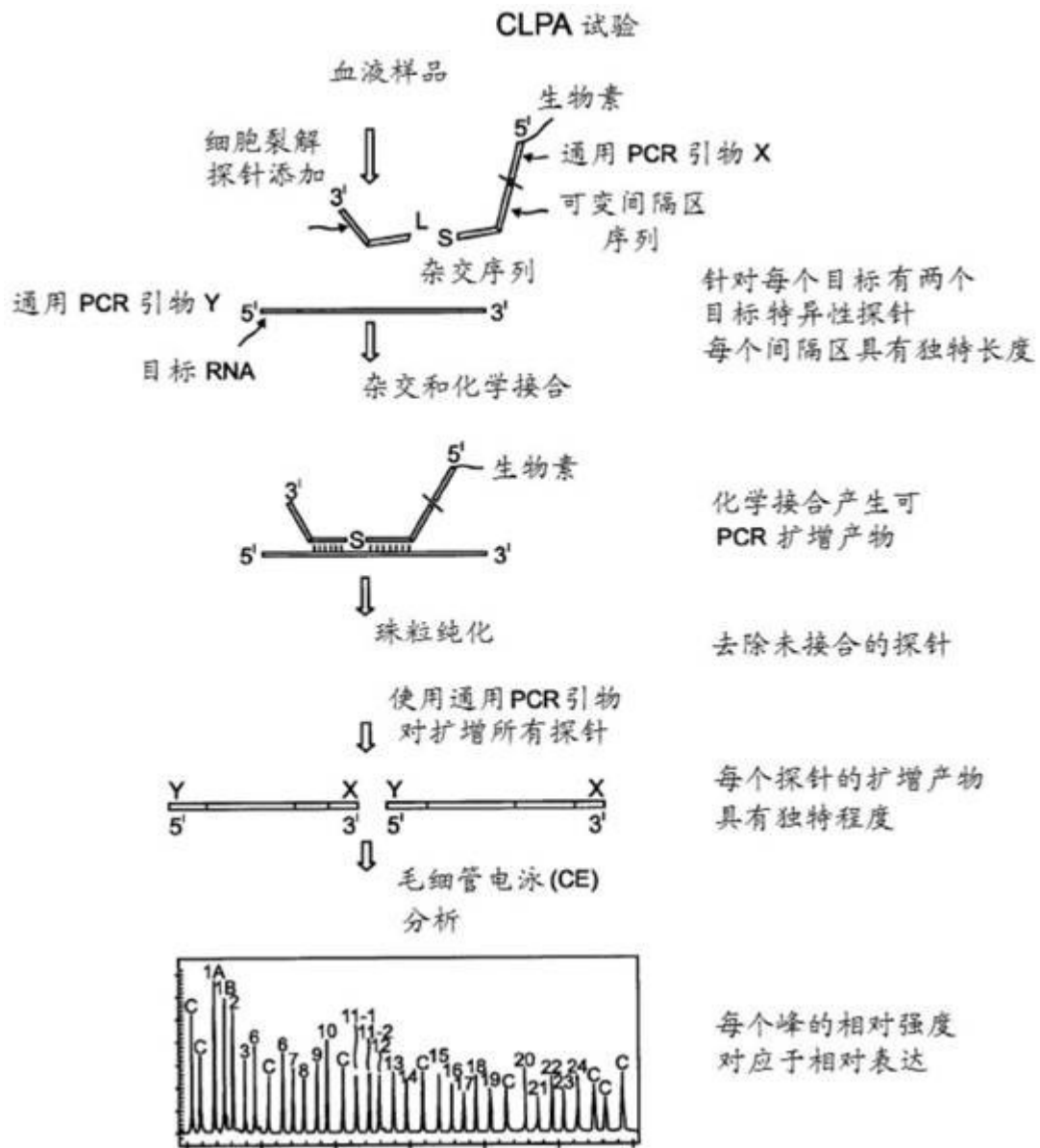


图1

## CLPA-MDM 试验

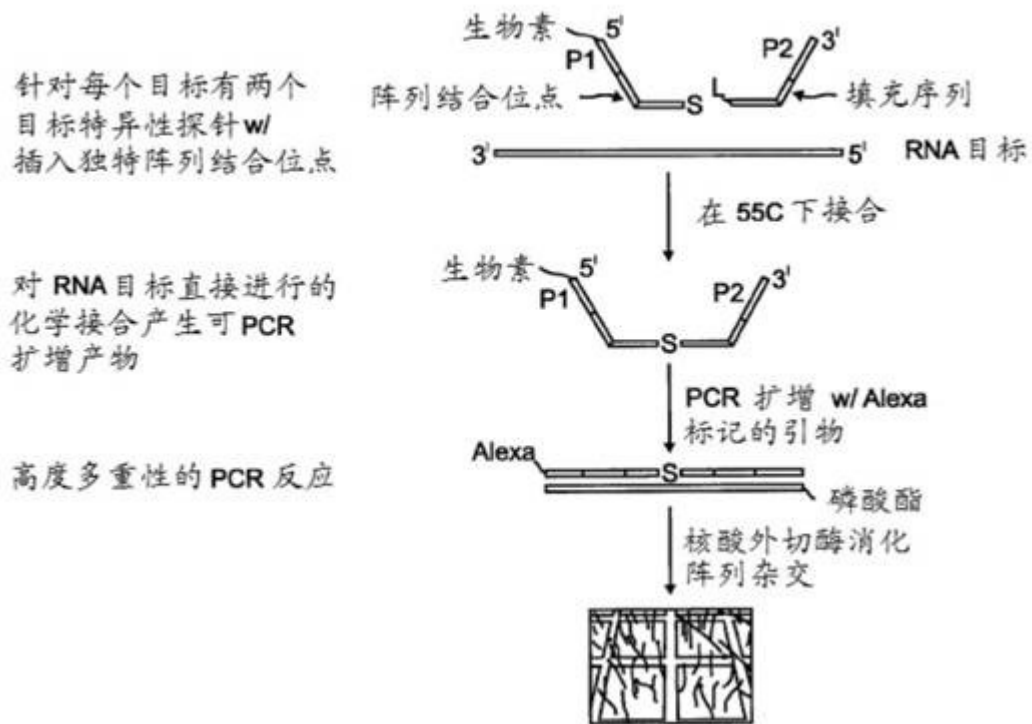


图2

## 2- 探针系统



## 3- 探针系统



图3

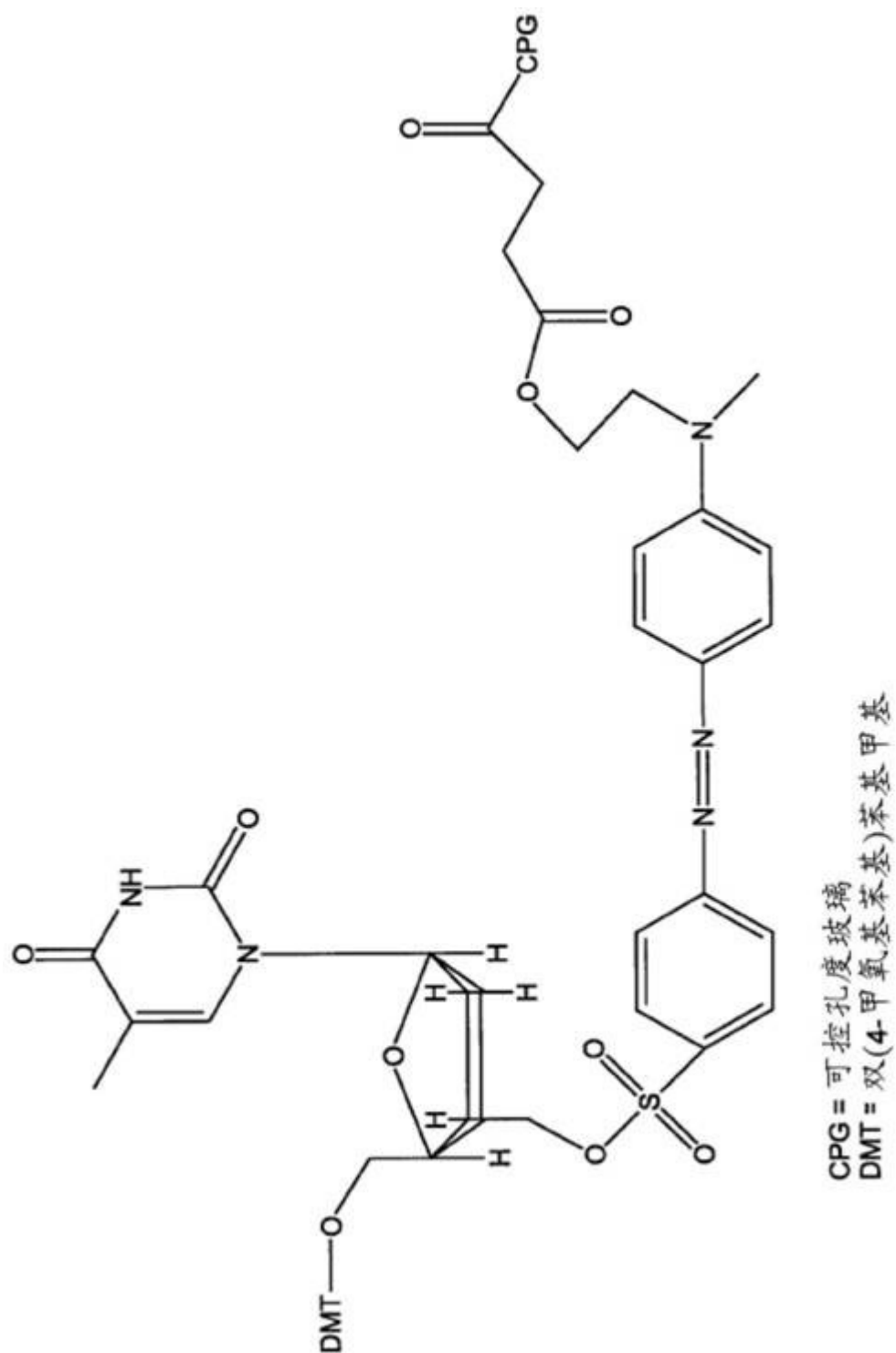


图4

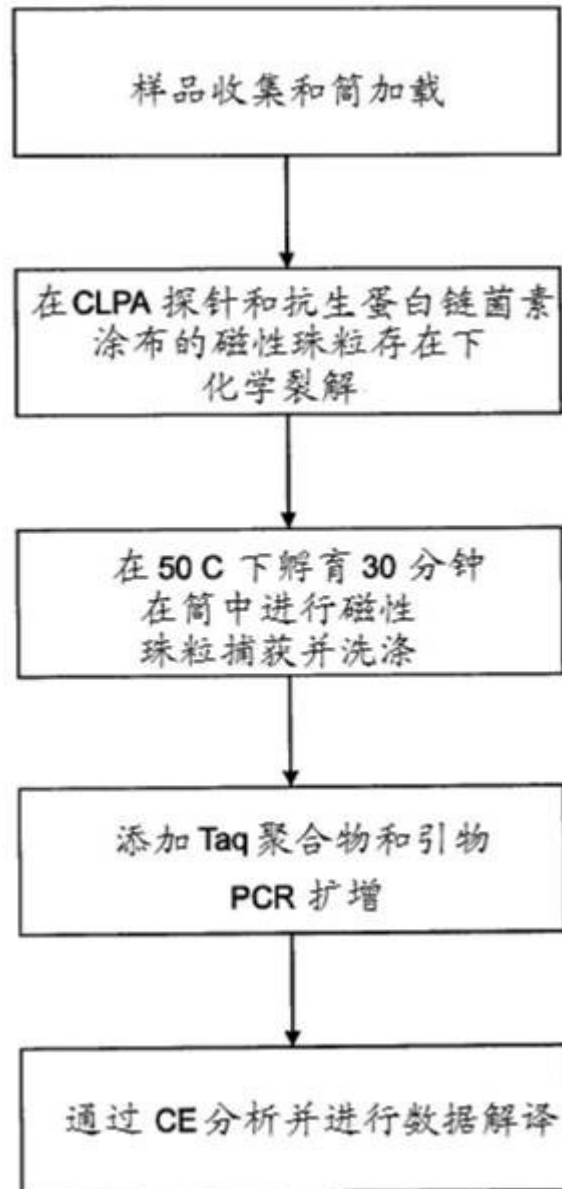


图5

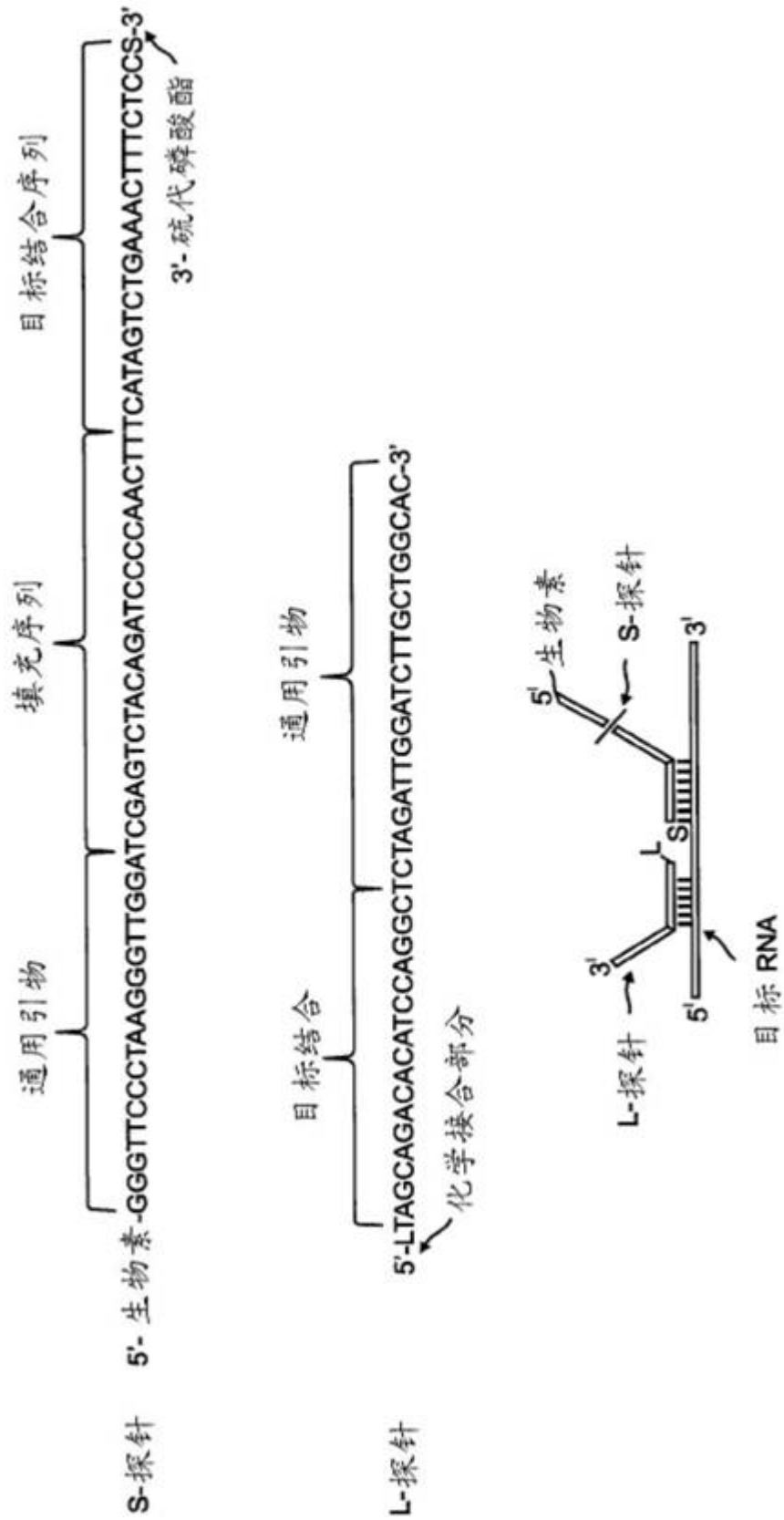


图6

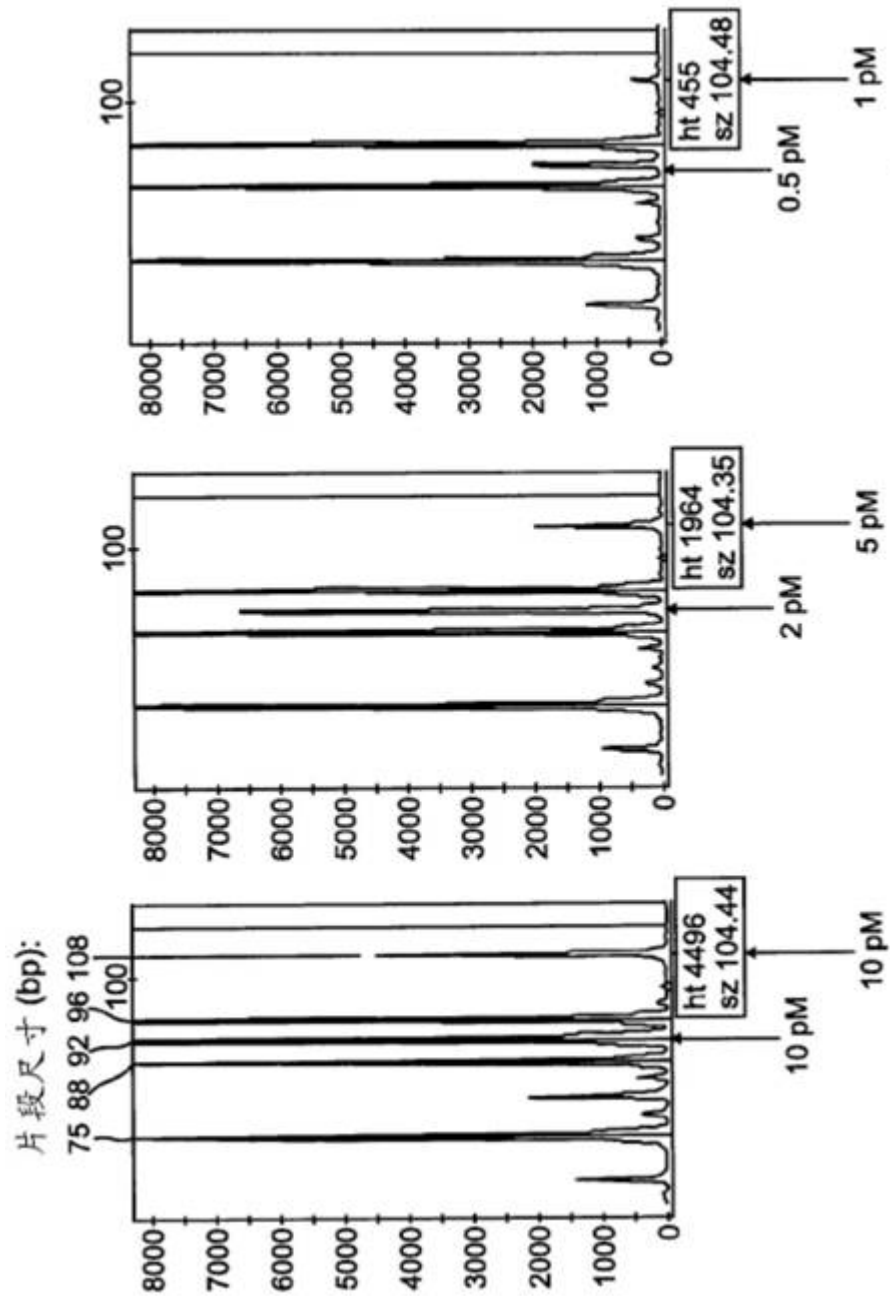


图7



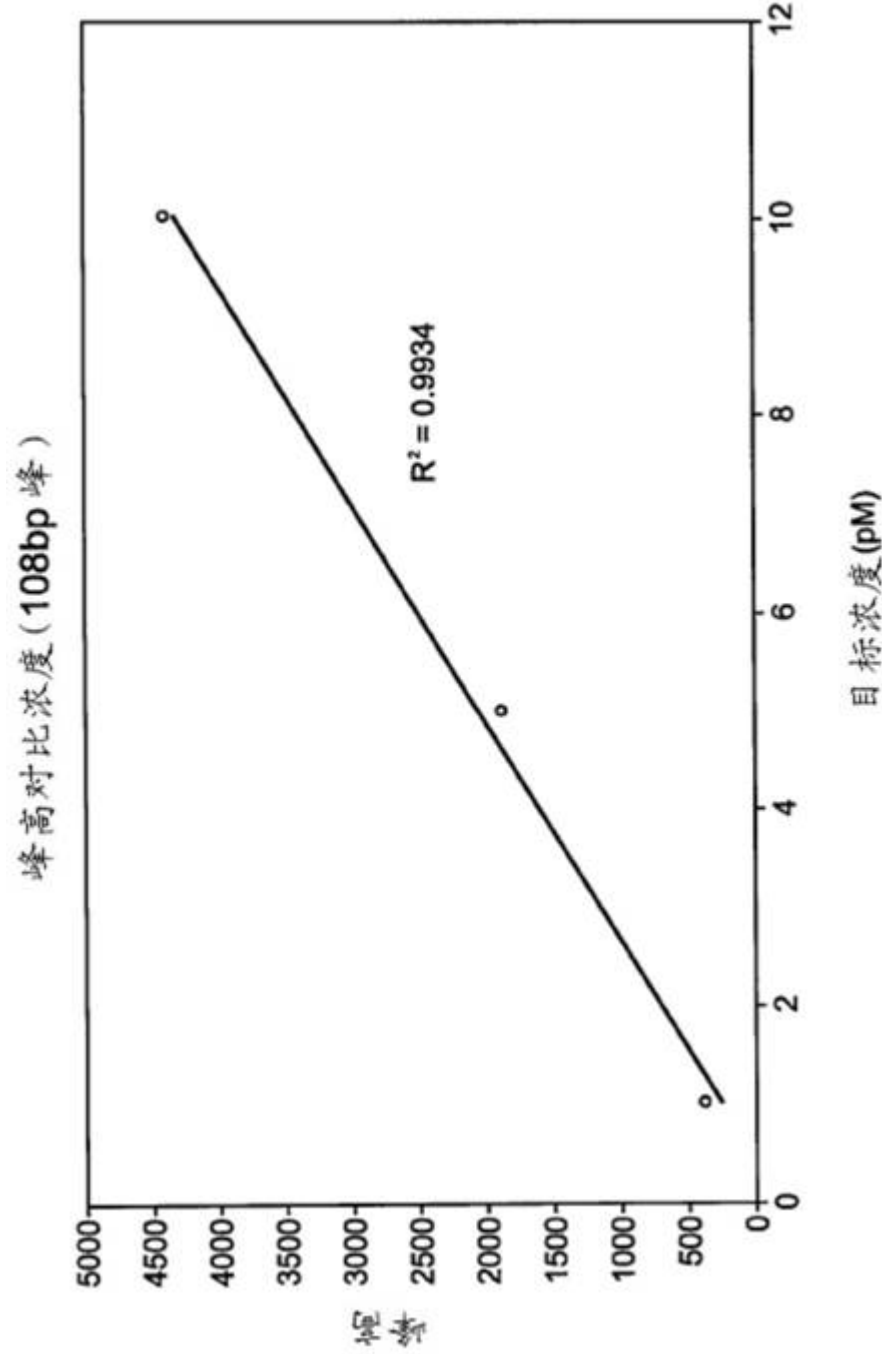


图8

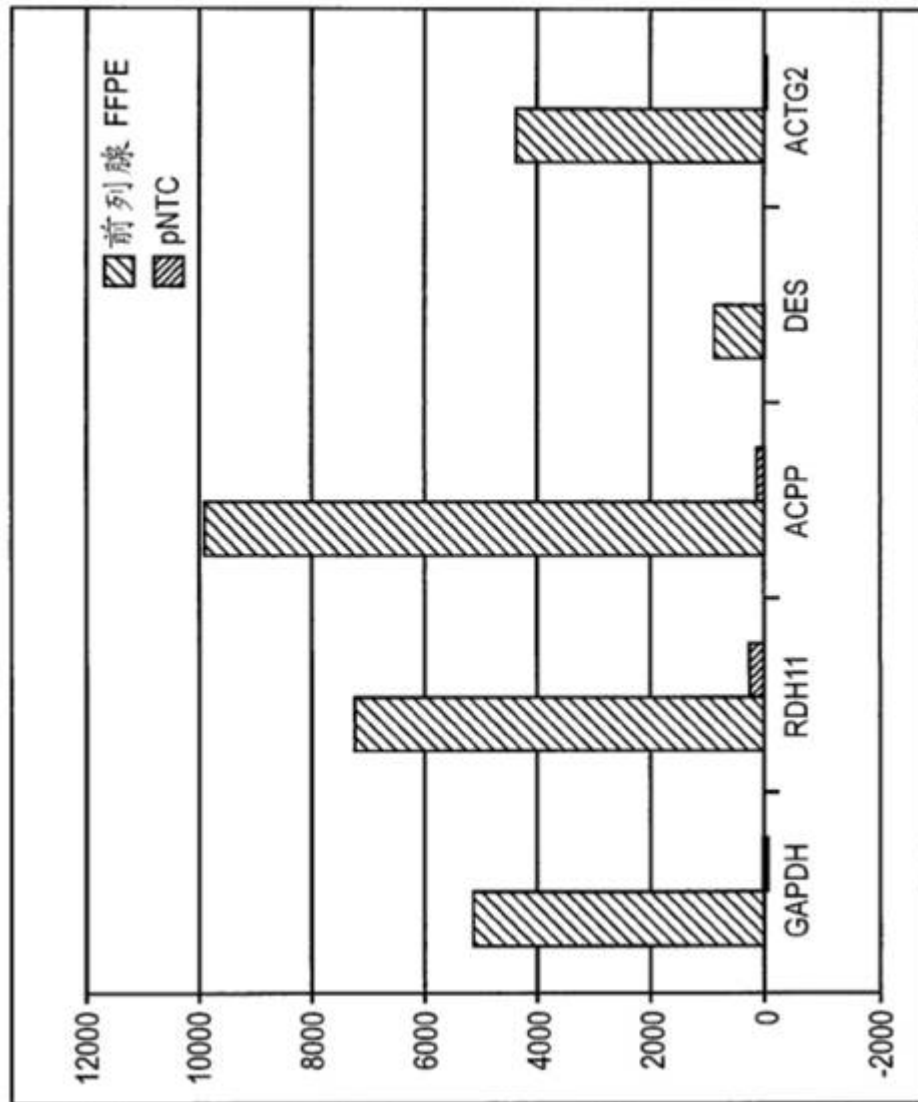


图9

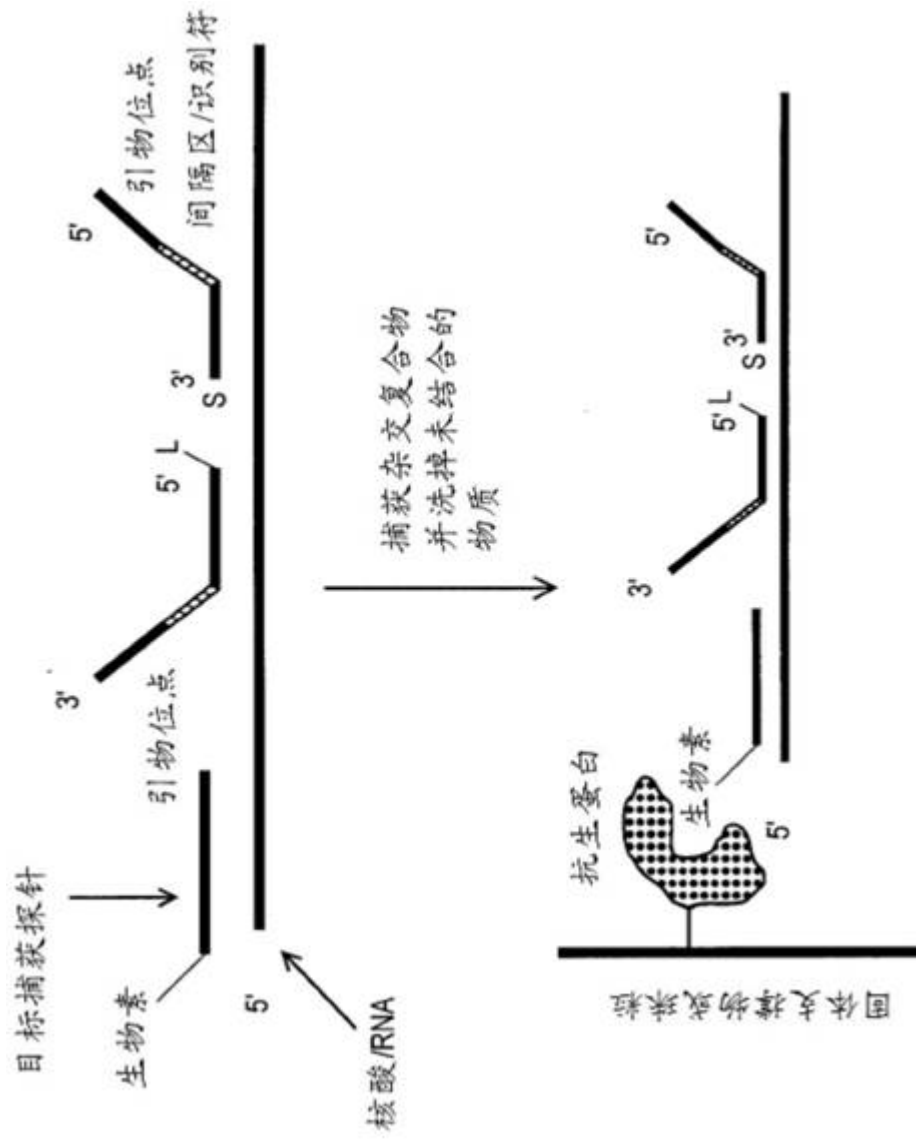


图10

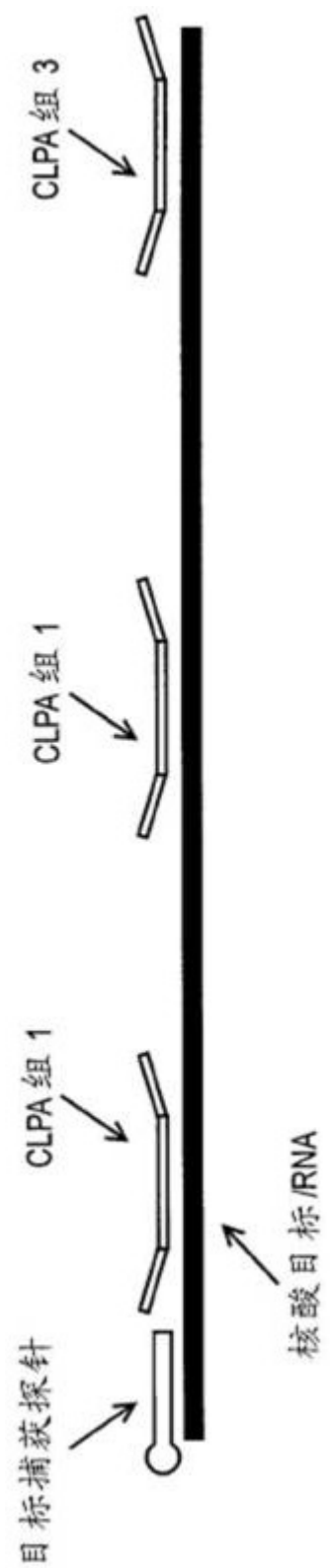


图11

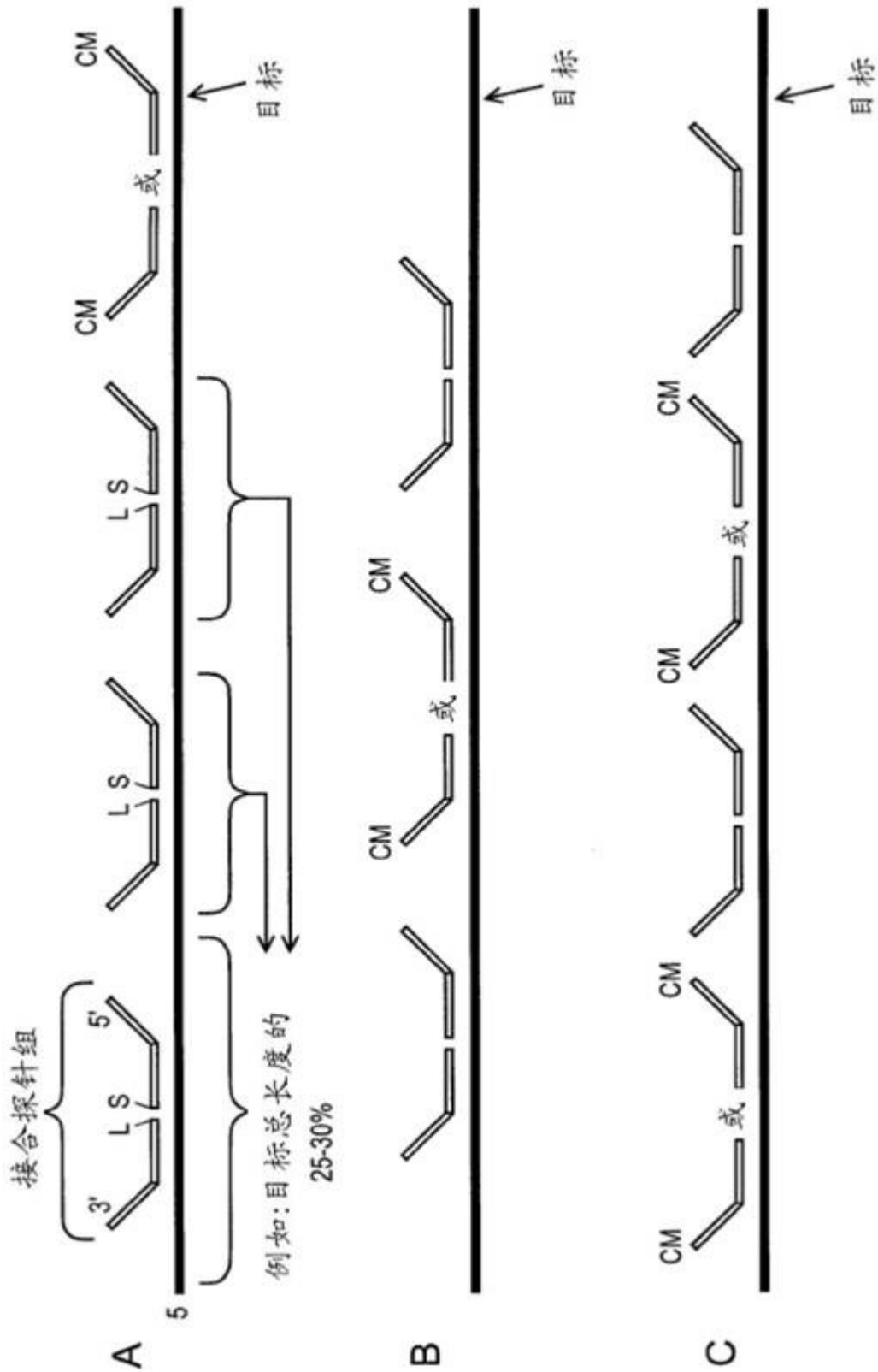


图12

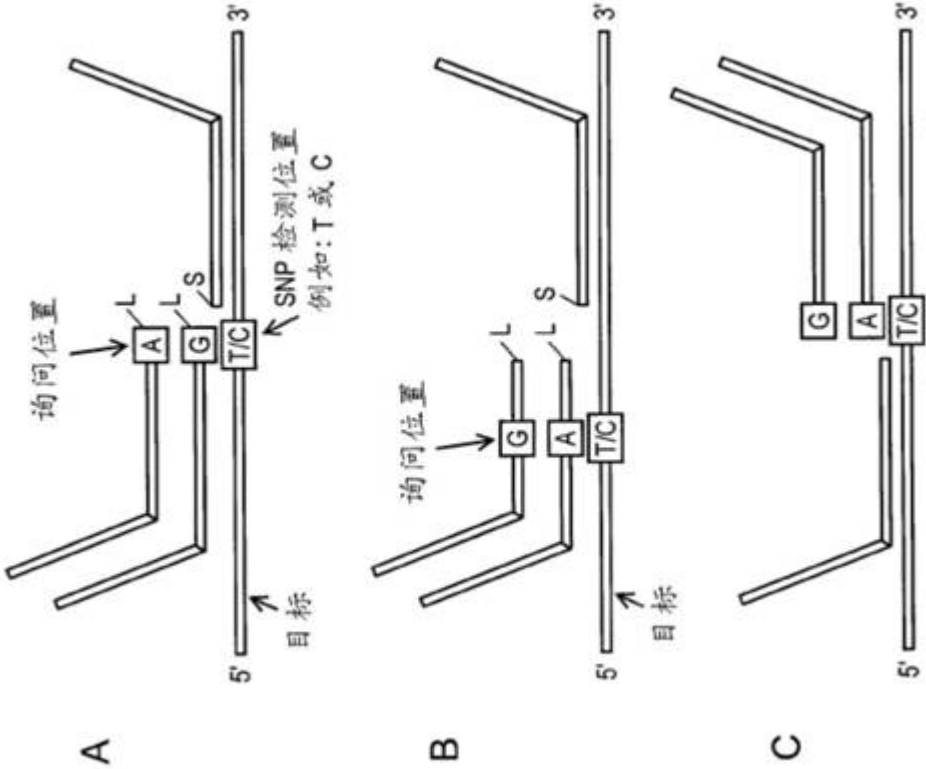


图13