

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01F 23/04 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01815309.7

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100355905C

[22] 申请日 2001.7.6 [21] 申请号 01815309.7

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 7 [33] GB [31] 0016836.9

[86] 国际申请 PCT/GB2001/003039 2001.7.6

[87] 国际公布 WO2002/004671 英 2002.1.17

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.7

[73] 专利权人 真实世界诊疗有限公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 玛格塔·阿纳斯达索瓦·狄尼瓦

胡香云 海伦·李

[56] 参考文献

WO9527081A 1995.10.12

US5849544A 1998.12.15

DE19910761A 1999.7.1

US5310650A 1994.5.10

EP0152886A 1985.8.28

WO9001564A 1990.2.22

US4868105A 1989.9.19

US5436327A 1995.7.25

US5712383A 1998.1.27

US5283174A 1994.2.1

EP0905258A 1999.3.31

US5695926A 1997.12.9

WO9302213A 1993.2.4

审查员 周洋

[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

代理人 唐伟杰

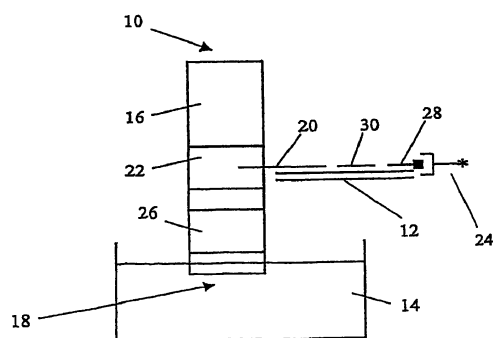
权利要求书 7 页 说明书 34 页 附图 7 页

[54] 发明名称

检棒分析中改良的结合相互作用

[57] 摘要

本发明是说明用于样品溶液中测试目标核酸存在的检棒(dipsticks)的用途。检棒含有接触端用于接触样品溶液,以及远离接触端的捕获区,捕获探针(capture probe)固定于此。捕获探针能杂交目标核酸。以检棒接触端接触样品溶液,后者通过毛细作用移行到捕获区。若样品溶液中存在目标核酸,则可在捕获区被捕获并检测。捕获探针以间隔臂(spacer)固定于捕获区。使用间隔臂可增加捕获探针与目标核酸间相互作用的稳定性,如此改良目标核酸检测的灵敏性。本发明也说明具有间隔臂的检测探针。



1. 测试样品溶液中目标核酸存在的检棒，其包含：

层析片，具有接触端用于接触样品溶液；以及

捕获探针，固定于层析片远离接触端的捕获区上，该捕获探针能杂交目标核酸或已结合目标核酸的吊钩捕获探针(hook capture probe)；其中捕获探针连接捕获探针间隔臂(capture probe spacer)，且捕获探针间隔臂连接捕获区，由此将捕获探针固定于捕获区且将捕获探针与捕获区相间隔，其中：

(i) 捕获探针间隔臂连接于捕获探针的一个末端，且未连接捕获探针间隔臂的捕获探针末端偶联一或多个核苷酸，其当捕获探针已杂交目标核酸时不会杂交目标核酸，或其当捕获探针已杂交吊钩捕获探针时不会杂交吊钩捕获探针；

(ii) 捕获探针间隔臂连接于捕获探针末端间的部分，且捕获探针的一或两个末端偶联一或更多个核苷酸，其当捕获探针已杂交目标核酸时不会杂交目标核酸，或其当捕获探针已杂交吊钩捕获探针时不会杂交吊钩捕获探针；或

(iii) 捕获探针间隔臂含有非蛋白质，此非蛋白质含有核碱基，后者能与在捕获探针已杂交目标核酸或吊钩捕获探针时形成的碱基对形成堆积相互作用。

2. 根据权利要求1的检棒，其中捕获探针间隔臂含有非蛋白质，此非蛋白质含有核碱基，后者能与在捕获探针已杂交目标核酸或吊钩捕获探针时形成的碱基对形成堆积相互作用。

3. 根据权利要求2的检棒，其中捕获探针间隔臂进一步含有蛋白质。

4. 根据权利要求3的检棒，其中捕获探针偶联于非蛋白质，而非蛋白质偶联于所述蛋白质而由此间隔捕获探针与所述蛋白质。

5. 根据权利要求4的检棒，其中非蛋白质通过连接子(linker)偶联于所述蛋白质。

6. 根据权利要求 2 至 5 之任一项的检棒，其中非蛋白质至少长三个核苷酸。

7. 根据权利要求 2 至 5 之任一项的检棒，其中非蛋白质含有核苷酸。

8. 根据权利要求 2 至 5 之任一项的检棒，其中非蛋白质含有 3-羟丙基磷酸。

9. 根据权利要求 2 至 5 之任一项的检棒，其中非蛋白质含有六乙二醇磷酸。

10. 根据权利要求 7 的检棒，其中非蛋白质仅由一或多个核苷酸组成。

11. 根据权利要求 3 至 5 之任一项的检棒，其中所述蛋白质为 BSA、甲状腺球蛋白、或其衍生物。

12. 根据权利要求 1 至 5 之任一项的检棒，其进一步含有检测探针，后者可释放性地固定于层析片接触端与捕获区之间的探针区，该检测探针能杂交目标核酸而允许检测目标核酸。

13. 根据权利要求 12 的检棒，其中检测探针偶联于标记，后者允许当检测探针已杂交目标核酸时直接检测目标核酸。

14. 根据权利要求 12 的检棒，其中检测探针偶联于检测配体，该检测配体能被检测配体结合部分结合，而由此允许当检测探针已杂交目标核酸时间接地检测目标核酸。

15. 根据权利要求 13 或 14 的检棒，其中标记或检测配体与检测探针间隔臂连接，且检测探针间隔臂与检测探针连接，而由此偶联标记或检测配体到检测探针并将标记或检测配体同检测探针相间隔。

16. 测试样品溶液中目标核酸存在的检棒，其包含：

层析片，后者具有接触端，用于接触样品溶液；

捕获部分(capture moiety)，后者固定于远离接触端的捕获区，该捕获部分能直接或间接地结合目标核酸；以及

检测探针，后者可释放性地固定于接触端与捕获区间的探针区，该检测探针能杂交目标核酸且该检测探针与标记偶联从而允许运用检

测探针直接检测目标核酸，或该检测探针与检测配体偶联从而允许运用检测探针间接检测目标核酸；其中标记或检测配体与检测探针间隔臂连接，且检测探针间隔臂与检测探针连接，由此偶联标记或检测配体到检测探针并将标记或检测配体同检测探针相间隔，并且其中：

(i) 检测探针间隔臂连接于检测探针的一个末端，且未连接检测探针间隔臂的检测探针末端偶联一或多个核苷酸，其当检测探针已杂交目标核酸时不会杂交目标核酸；

(ii) 检测探针间隔臂连接于检测探针末端之间的部分，且检测探针的一或两个末端偶联一或更多个核苷酸，其当检测探针已杂交目标核酸时不会杂交目标核酸；或

(iii) 检测探针间隔臂含有非蛋白质，此非蛋白质含有核碱基，后者能与在检测探针已杂交目标核酸时形成的碱基对形成堆积相互作用。

17. 根据权利要求 16 的检棒，其中检测探针间隔臂含有非蛋白质，此非蛋白质含有核碱基，后者能与在检测探针已杂交目标核酸时形成的碱基对形成堆积相互作用。

18. 根据权利要求 17 的检棒，其中检测探针间隔臂进一步含有蛋白质。

19. 根据权利要求 18 的检棒，其中检测探针偶联于非蛋白质，且非蛋白质偶联于蛋白质，而由此间隔检测探针与蛋白质。

20. 根据权利要求 18 的检棒，其中所述蛋白质为 BSA、甲状腺球蛋白、或其衍生物。

21. 根据权利要求 18 的检棒，其中标记或检测配体附着于珠子或属于珠子的一部分，且所述蛋白质直接吸附于该珠子。

22. 根据权利要求 19 的检棒，其中非蛋白质通过连接子偶联蛋白质。

23. 根据权利要求 18 至 22 之任一项的检棒，其中非蛋白质至少长三个核苷酸。

24. 根据权利要求 18 至 22 之任一项的检棒，其中非蛋白质含有核

苷酸。

25. 根据权利要求 17 至 22 之任一项的检棒，其中非蛋白质含有 3-羟丙基磷酸。

26. 根据权利要求 17 至 22 之任一项的检棒，其中非蛋白质含有六乙二醇磷酸。

27. 根据权利要求 24 的检棒，其中非蛋白质仅由一或多个核苷酸组成。

28. 根据权利要求 16 至 22 之任一项的检棒，其中捕获部分含有捕获探针，其能杂交目标核酸或已结合目标核酸的吊钩捕获探针。

29. 根据权利要求 16 至 22 之任一项的检棒，其中捕获部分能结合捕获配体，该捕获配体偶联于已结合目标核酸的捕获探针。

30. 测试样品溶液中目标核酸存在的试剂盒，其包含：

根据权利要求 1 至 11 之任一项的检棒；以及

检测探针，后者能杂交目标核酸而由此允许运用检测探针检测目标核酸。

31. 根据权利要求 30 的试剂盒，其中检测探针偶联标记而允许直接检测已杂交目标核酸的检测探针，或检测探针偶联检测配体而允许通过检测配体结合部分间接检测已杂交目标核酸的检测探针，其中标记或检测配体连接检测探针间隔臂，且检测探针间隔臂连接检测探针，而由此偶联标记或检测配体到检测探针并将标记或检测配体同检测探针相间隔。

32. 测试样品溶液中目标核酸存在的试剂盒，其包含：

根据权利要求 18 的检棒；以及

捕获探针，后者能杂交目标核酸或已结合目标核酸的吊钩捕获探针，其中该捕获探针偶联捕获配体，该捕获配体能被捕获部分结合。

33. 根据权利要求 32 的试剂盒，其中捕获配体连接捕获探针间隔臂，且捕获探针间隔臂连接捕获探针，而由此偶联捕获配体到捕获探针并将捕获配体同捕获探针相间隔。

34. 测试样品溶液中目标核酸存在的试剂盒，其包含：

i) 含有层析片的检棒，所述层析片具有用于接触样品溶液的接触端和捕获探针，捕获探针能杂交目标核酸或已结合目标核酸的吊钩捕获探针，该捕获探针固定于层析片远离接触端的捕获区上；以及

ii) 检测探针，后者能杂交目标核酸，该检测探针偶联于标记而允许运用该检测探针直接检测目标核酸，或检测探针偶联于配体而允许运用该检测探针间接检测目标核酸，其中标记或检测配体连接检测探针间隔臂，且该检测探针间隔臂连接检测探针，而由此偶联标记或检测配体到检测探针并将标记或检测配体同检测探针相间隔，并且其中：

(i) 检测探针间隔臂连接于检测探针的一个末端，且未连接检测探针间隔臂的检测探针末端偶联一或多个核苷酸，其当检测探针已杂交目标核酸时不会杂交目标核酸；

(ii) 检测探针间隔臂连接于检测探针末端之间的部分，且检测探针的一或两个末端偶联一或更多个核苷酸，其当检测探针已杂交目标核酸时不会杂交目标核酸；或

(iii) 检测探针间隔臂含有非蛋白质，非蛋白质含有核碱基，其能与在检测探针已杂交目标核酸时形成的碱基对形成堆积相互作用。

35. 测试样品溶液中目标核酸存在的试剂盒，其包含：

含有层析片的检棒，所述层析片具有用于接触样品溶液的接触端以及捕获部分，捕获部分固定于层析片远离接触端的捕获区，该捕获部分能直接或间接结合目标核酸；

捕获探针，后者能杂交目标核酸或已结合目标核酸的吊钩捕获探针，其中捕获探针偶联能被捕获部分结合的捕获配体；以及

检测探针，后者能杂交目标核酸，该检测探针偶联于标记而允许利用该检测探针直接检测目标核酸，或该检测探针偶联于检测配体而允许利用该检测探针间接检测目标核酸，

其中标记或检测配体连接检测探针间隔臂，而该检测探针间隔臂连接检测探针，由此偶联标记或检测配体到检测探针并将标记或检测配体同检测探针相间隔，并且其中：

(i) 检测探针间隔臂连接于检测探针的一个末端，且未连接检测探

针间隔臂的检测探针末端偶联一或多个核苷酸，其不会杂交目标核酸；

(ii) 检测探针间隔臂连接于检测探针末端之间的部分，且检测探针的一或两个末端偶联一或多个核苷酸，其当检测探针已杂交目标核酸时不会杂交目标核酸；或

(iii) 检测探针间隔臂含有非蛋白质，非蛋白质含有核碱基，其能与在检测探针已杂交目标核酸时形成的碱基对形成堆积相互作用。

36. 测试样品溶液中目标核酸存在的试剂盒，其包含：

含有层析片的检棒，所述层析片具有用于接触样品溶液的接触端以及捕获部分，捕获部分固定于层析片远离接触端的捕获区；

捕获探针，后者能杂交目标核酸或已结合目标核酸的吊钩捕获探针，其中该捕获探针连接捕获探针间隔臂，而该捕获探针间隔臂连接捕获配体，而由此偶联捕获配体到捕获探针并将捕获配体同捕获探针相间隔；以及

检测探针，后者能杂交目标核酸，该检测探针偶联于标记而允许利用该检测探针直接检测目标核酸，或该检测探针偶联于检测配体而允许利用该检测探针间接检测目标核酸；并且其中：

(i) 捕获探针间隔臂连接于捕获探针的一个末端，且未连接捕获探针间隔臂的捕获探针末端偶联一或多个核苷酸，其当捕获探针已杂交目标核酸时不会杂交目标核酸，或其当捕获探针已杂交吊钩捕获探针时不会杂交吊钩捕获探针；

(ii) 捕获探针间隔臂连接于捕获探针末端间的部分，且捕获探针的一或两个末端偶联一或多个核苷酸，其当捕获探针已杂交目标核酸时不会杂交目标核酸，或其当捕获探针已杂交吊钩捕获探针时不会杂交吊钩捕获探针；或

(iii) 捕获探针间隔臂含有非蛋白质，此非蛋白质含有核碱基，后者能与在捕获探针已杂交目标核酸或吊钩捕获探针时形成的碱基对形成堆积相互作用。

37. 用于在检棒试验中检测或捕获目标核酸的检棒试验探针，其包含能杂交目标核酸的核酸或核酸类似物；以及允许运用探针而直接检

测目标核酸的标记，或允许运用探针而捕获或间接检测目标核酸的配体，其中标记或配体连接间隔臂，且该间隔臂连接核酸或核酸类似物，而由此将标记或配体同核酸或核酸类似物相间隔，其中：

(i) 间隔臂与探针的一个末端连接，探针的不与间隔臂连接的末端与一个或者多个在探针已经与靶核酸杂交时不和靶核酸杂交的核苷酸偶联；

(ii) 间隔臂与探针的末端之间的探针部分连接，探针的一个末端或者两个末端与一个或者多个在探针已经与靶核酸杂交时不和靶核酸杂交的核苷酸偶联；或

(iii) 间隔臂包含非蛋白质，该非蛋白质包含能够与在探针与靶核酸杂交时形成的碱基对形成堆积相互作用的核碱基。

38. 根据权利要求 1-29 任意一项的检棒、根据权利要求 30-36 任意一项的试剂盒、或者根据权利要求 37 的探针用于测试样品溶液中靶核酸存在与否的用途。

39. 固定探针到膜上以提供用作权利要求 3 的检棒的经修饰膜的方法，包括提供偶联于蛋白质的探针以及将该蛋白质吸附到膜上。

40. 根据权利要求 39 的方法，其进一步包括偶联探针到蛋白质。

41. 根据权利要求 40 的方法，其进一步包括偶联探针到连接子，以及偶联连接子到蛋白质。

42. 根据权利要求 41 的方法，其中在连接子偶联于蛋白质之前将探针偶联于连接子。

43. 根据权利要求 41 或 42 的方法，其中通过连接子所附亚磷酰胺基与探针的羟基反应，或通过连接子的羟基与探针所附亚磷酰胺基反应而使探针偶联于连接子。

44. 根据权利要求 41 或 42 的方法，其中连接子通过连接子所附伯氨基与蛋白质的羧基反应而偶联于蛋白质。

45. 根据权利要求 41 或 42 的方法，其中连接子偶联于探针的非核碱基部分。

检棒分析中改良的结合相互作用

本发明涉及检棒(dipsticks)增强的核酸检测。本发明的检棒用于检测样品溶液中目标核酸的存在,例如鉴定病人是否感染致病微生物,例如砂眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)。

用于检测样品溶液中目标核酸存在的一些常规测试依赖利用聚合酶链式反应(PCR)扩增目标核酸。此反应可检测小量的目标核酸,然而得到结果前需耗时数小时,但因通常希望可尽快得到结果,例如使病人等待的时间减至最少,故此为其显著缺点。这种方法的进一步缺点是需要昂贵的专家设备进行反应以及相当高成本的试剂。

相反,检棒可检测未扩增的目标核酸,不需任何专家设备且能比基于PCR的方法更快速地得到结果。病人就可于同时接受治疗,故特别有益于不喜欢或不能日后复诊的病人。

US 5,310,650所述的典型常规检棒中,单链DNA捕获探针固定于硝化纤维素过滤器上远离过滤器末端(接触端)的捕获区上。捕获探针的部分序列互补于欲测目标核酸第一区域的序列。标记的单链DNA检测探针固定于硝化纤维素过滤器上捕获区及过滤器接触端之间的探针区上。检测探针含有互补于目标核酸第二区域序列(不同于第一区域)的序列。

在认为含有目标DNA的样品溶液中检测目标DNA时,将硝化纤维素过滤器的接触端接触样品溶液。样品溶液通过毛细作用进入滤纸并经过探针区及捕获区。当样品溶液经过探针区时,可使检测探针移动并使其与样品溶液一起朝向捕获区上升。然后移动的检测探针能杂交到样品溶液中存在的任何目标DNA的第二区域。

当杂交的检测探针及目标DNA到达捕获区时,目标DNA的第一区域能杂交到固定的捕获探针。由此在目标核酸、捕获探针及标记的检测探针之间形成三重复合物。捕获区出现标记时说明样品溶液中存

在目标 DNA。

至于第二类常规检棒, 标记的 DNA 检测探针未固定于硝化纤维素滤器上。而是在允许检测探针杂交样品溶液中任何目标核酸的条件下将检测探针加入到样品溶液中。然后将硝化纤维素滤器的接触端接触样品溶液, 且当样品溶液沿检棒上移时, 杂交到检测探针的目标核酸沿硝化纤维素滤器上升, 并可通过捕获探针在捕获区捕获。

然而发现常规检棒的核酸检测的灵敏性低。若目标核酸为双链时, 核酸检测的灵敏性就特别低。因此, 有时可能样品溶液中存在的目标核酸未被检测到。因此希望改良检棒的核酸检测灵敏性。

根据本发明的第一方面提供用于测试样品溶液中目标核酸的存在的检棒, 该检棒含有:

层析片, 具有接触端用于接触样品溶液; 以及

捕获探针, 固定于层析片远离接触端的捕获区上, 该捕获探针能杂交目标核酸或已结合目标核酸的吊钩捕获探针(hook capture probe); 其中捕获探针连接捕获探针间隔臂(capture probe spacer), 且该捕获探针间隔臂连接捕获区, 由此将捕获探针固定于捕获区且使其与捕获区相间隔。

文中使用的“层析片”术语意指能通过毛细作用传送溶液的任何多孔材料片。

捕获探针间隔臂可包括能从捕获区间隔捕获探针而不妨碍捕获探针杂交目标核酸或吊钩捕获探针的任何成分。优选捕获探针间隔臂包括生物聚合物。

捕获探针间隔臂可包括蛋白质。文中使用的“蛋白质”术语意指任何含有一或多个氨基酸残基的化合物。优选的蛋白质实例为天然产生的蛋白质, 优选牛血清白蛋白(BSA)、甲状腺球蛋白、或其衍生物。衍生物包括由氨基酸取代、添加、或删除、或经翻译后修饰而不同于 BSA 或甲状腺球蛋白的蛋白质。

为将捕获探针连接于蛋白质间隔臂, 通常必需将捕获探针官能化。此情况的实现可通过使用修饰子(modifier), 其含有第一反应基团能与

捕获探针反应，以及第二反应基团能与蛋白质反应。适合的修饰子含有亚磷酰胺(phosphoramidite)基以及伯氨基(或已保护的伯氨基，使用前去保护)。亚磷酰胺基能与羟基反应(当捕获探针为核酸时，通常为捕获探针的 5'-OH 或 3'-OH)，伯氨基能与蛋白质的羧基反应。适合的修饰子例如 6-(三氟乙酰氨基)己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺(C6-TFA)。其它适合的修饰子为本领域技术人员已知。

一旦修饰子与捕获探针和蛋白质反应，而将捕获探针连接到蛋白质则反应后的修饰子在文中称为“连接子(linker)”。

优选蛋白质直接吸附到捕获区。

在常规检棒中，检测探针或捕获探针是使用加热或 UV 交联通过共价附着、吸附而固定于检棒上。然而，发现蛋白质可比捕获探针更快速且有效地固定于检棒。因此，将蛋白质直接吸附到捕获区是比常规固定法更方便且更有效率的将捕获探针固定于检棒上的方法。

捕获探针间隔臂可包括非蛋白质。在优选的安排中，捕获探针间隔臂包括蛋白质及非蛋白质，该捕获探针偶联于非蛋白质且该非蛋白质偶联于蛋白质而由此间隔捕获探针与蛋白质。

为连接非蛋白质同蛋白质，通常需使用修饰子，其含有第一反应基团能与非蛋白质反应，以及第二反应基团能与蛋白质反应。

用于含羟基的非蛋白质的适合的修饰子为 6-(三氟乙酰氨基)己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺(C6-TFA)。其它适合的修饰子为本领域技术人员已知。

一旦修饰子与非蛋白质和蛋白质反应而连接非蛋白质到蛋白质则反应后的修饰子在文中称为“连接子”。

适合的非蛋白质间隔臂成分的实例包括 1',2'-双脱氧核糖磷酸(dS)，3-羟丙基磷酸(S_{c3})，以及六乙二醇磷酸(S)。这些化合物的化学结构如图 1 所示。

然而优选非蛋白质含有核碱基(nucleobase)能与碱基对(形成于捕获探针杂交目标核酸或吊钩捕获探针时)形成堆积相互作用。更优选非蛋白质含有核苷酸。更优选非蛋白质仅由一或多个核苷酸组成。

优选非蛋白质长度为至少 3 核苷酸单体。一个核苷酸单体(N)长度约等于一个 1',2'-双脱氧核糖磷酸(dS)或一个 3-羟丙基磷酸(S_{c3})的长度。3 个核苷酸单体长度约等于一个六乙二醇磷酸(S)的长度。

捕获探针间隔臂可偶联于捕获探针的不会防止捕获探针杂交目标核酸或吊钩的任何部分。若捕获探针间隔臂偶联于捕获探针末端之间的捕获探针部分，捕获探针的一或两个末端可偶联一或更多核苷酸，优选至少三个核苷酸，其当捕获探针杂交目标核酸时不会杂交目标核酸，或当捕获探针杂交吊钩捕获探针时不会杂交吊钩捕获探针。

优选捕获探针间隔臂偶联于捕获探针的一末端。若捕获探针间隔臂偶联于捕获探针的一末端，未偶联捕获探针间隔臂的捕获探针末端可偶联一或更多核苷酸，优选至少三个核苷酸，其当捕获探针杂交目标核酸时不会杂交目标核酸，或当捕获探针杂交吊钩捕获探针时不会杂交吊钩捕获探针。

吊钩捕获探针可含有第一区域能杂交目标核酸，以及第二区域能杂交捕获探针，由此能使捕获探针间接结合到目标核酸。吊钩捕获探针可含有至少一个核苷酸或核苷酸类似物。

本发明的第一方面的检棒可用于测试样品溶液中目标核酸存在的方法中，其中能杂交目标核酸的检测探针在检测探针能杂交目标核酸的条件下与样品溶液孵育。检棒的接触端接触样品溶液，使得样品溶液通过毛细作用沿检棒向上移行。然后在样品溶液中杂交了检测探针的目标核酸能在捕获区被捕获探针捕获。样品溶液中目标核酸的存在就可由捕获区出现检测探针而指示出来。

根据本发明也提供用于测试样品溶液中目标核酸存在的试剂盒，其包括：

本发明的第一方面的检棒；以及

检测探针，能杂交目标核酸而由此允许运用该检测探针检测目标核酸。

不将检测探针与样品溶液孵育，而可将检测探针可释放性地固定于检棒，例如位于层析片接触端与捕获区间的探针区。为测试样品溶

液中目标核酸的存在，检棒接触端可与样品溶液接触以至样品溶液通过毛细作用沿检棒向上移行。当样品溶液通过检棒探针区时使检测探针移动，以至检测探针能杂交样品溶液中的目标核酸并与目标核酸移行到捕获区。当样品溶液经过捕获区时，杂交了检测探针的目标核酸被捕获探针捕获。尔后样品溶液中目标核酸的存在可由捕获区出现检测探针而指示出来。

检测探针可偶联标记而由此允许在捕获区直接检测目标核酸。另外，检测探针可偶联检测配体，允许利用检测配体结合部分间接检测目标核酸。标记或检测配体可连接于检测探针间隔臂，该间隔臂连接于检测探针，而由此偶联标记或检测配体到检测探针并将标记或检测配体同检测探针间隔。

根据本发明的第二方面，也提供用于测试样品溶液中目标核酸存在的检棒，其包括：

层析片，具有接触端，用于接触样品溶液；

捕获部分(capture moiety)，固定于远离接触端的捕获区，该捕获部分能直接或间接结合目标核酸；以及

检测探针，可释放性地固定于接触端与捕获区间的探针区，检测探针能杂交目标核酸且检测探针偶联标记而由此允许直接检测检测探针，或检测探针偶联检测配体而允许间接检测检测探针；

其中标记或检测配体是连接于检测探针间隔臂，且检测探针间隔臂是连接于检测探针，而由此偶联标记或检测配体到检测探针并将标记或检测配体同检测探针间隔。

检测探针间隔臂可包括能从标记或配体间隔检测探针而不妨碍检测探针杂交目标核酸的任何成分。优选检测探针间隔臂包括生物聚合物。

检测探针间隔臂可包括蛋白质。文中使用的“蛋白质”术语意指任何含有一或多个氨基酸残基的化合物。优选的蛋白质实例为天然产生的蛋白质，如牛血清白蛋白(BSA)、甲状腺球蛋白、或其衍生物。衍生物包括经氨基酸取代、添加、或删除、或经翻译后修饰而不同于BSA

或甲状腺球蛋白的蛋白质。

为将检测探针连接于蛋白质间隔臂，必需将检测探针官能化。此情况的实现可通过使用修饰子，其含有第一反应基团能与检测探针反应，以及第二反应基团能与蛋白质反应。

适合的修饰子实例 6-(三氟乙酰氨基)己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺(C6-TFA)。其它适合的修饰子为本领域技术人员已知。

一旦修饰子与检测探针及蛋白质反应而连接检测探针到蛋白质，则反应后的修饰子在文中称为“连接子”。

标记或检测配体可为颗粒例如珠子的一部分，或附着于其上。于此情形，优选蛋白质直接吸附于标记或检测配体。

检测探针间隔臂可包括非蛋白质。在优选的安排中，检测探针间隔臂包括蛋白质及非蛋白质，检测探针偶联于非蛋白质且该非蛋白质偶联于蛋白质而由此间隔检测探针与蛋白质。

为连接非蛋白质到蛋白质，通常需使用修饰子，其含有第一反应基团能与非蛋白质反应，以及第二反应基团能与蛋白质反应。用于含羟基的非蛋白质的适合的修饰子为 6-(三氟乙酰氨基)己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺(C6-TFA)。其它适合的修饰子为本领域技术人员已知。

一旦修饰子与非蛋白质及蛋白质反应而连接非蛋白质到蛋白质，则反应后的修饰子在文中称为“连接子”。

在其它安排中，检测探针间隔臂仅含有非蛋白质。于此安排时通常必需将非蛋白质官能化以使非蛋白质连接于标记或检测配体。此情况的实现可通过使用修饰子，其含有第一反应基团能与非蛋白质反应，以及第二反应基团能与标记或检测配体反应。

如果非蛋白质含有羟基，而标记或检测配体含有羧基，适合的修饰子含有亚磷酰胺基以及伯氨基(或已保护伯氨基，使用前去保护)。适合的修饰子实例为 6-(三氟乙酰氨基)己基-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺(C6-TFA)。其它适合的修饰子为本领域技术人员已知。

适合的非蛋白质检测探针间隔臂成分的实例包括 1',2'-双脱氧核

糖磷酸(dS), 3-羟丙基磷酸(S_{c3}), 以及六乙二醇磷酸(S)。

然而优选非蛋白质含有碱基能与碱基对(形成于检测探针杂交目标核酸时)形成堆积相互作用。更优选非蛋白质含有核苷酸。更优选非蛋白质仅由一或多个核苷酸组成。

优选为非蛋白质长度至少 3 核苷酸单体。

检测探针间隔臂可偶联于检测探针的不会防止检测探针杂交目标核酸的任何部分。若检测探针间隔臂是连接于检测探针末端之间的检测探针部分, 检测探针的一或两末端可偶联一或更多核苷酸, 优选至少三个核苷酸, 其当检测探针杂交目标核酸时不会杂交目标核酸。

优选为检测探针间隔臂连接于检测探针的一末端。若检测探针间隔臂连接于检测探针的一末端, 未连接于检测探针间隔臂的检测探针末端可连接一或更多核苷酸, 优选至少三个核苷酸, 其当检测探针杂交目标核酸时不会杂交目标核酸。

捕获部分可通过碱基配对或非碱基配对相互作用, 直接或间接地结合目标核酸。

举例而言, 捕获部分可含有捕获探针, 其能直接杂交目标核酸。另外, 捕获部分可含有捕获探针, 其能杂交已结合目标核酸的吊钩捕获探针。

捕获部分可能结合到捕获配体, 后者偶联于已结合目标核酸的捕获探针, 而由此允许间接将捕获部分结合到目标核酸。举例而言, 捕获部分可以是抗体或抗体片段。若捕获部分偶联于捕获配体, 捕获探针可连接于一个连接了捕获配体的捕获探针间隔臂, 而将捕获配体与捕获探针间隔。

吊钩捕获探针可加到样品溶液, 以至能结合到样品溶液中的目标核酸, 并当样品溶液通过毛细作用沿检棒向上移行时由捕获探针捕获。

捕获探针, 吊钩捕获探针及检测探针可各含有至少一个核苷酸或核苷酸类似物。当探针含有一个以上核苷酸或核苷酸类似物时, 优选其杂交在一起。

本发明也提供用于测试样品溶液中目标核酸的存在的试剂盒, 其

包含:

根据本发明第二方面的检棒, 其中捕获部分能结合到捕获配体, 后者已偶联于已结合了目标核酸的捕获探针; 以及

捕获探针, 能杂交目标核酸或已结合目标核酸的吊钩捕获探针, 其中捕获探针偶联于能被捕获部分结合的捕获配体。

适合的标记实例包括纺织染料, 金属溶胶如胶体金, 以及着色的颗粒如着色的乳胶颗粒。这种标记能直接偶联检测探针, 或者, 若检测探针偶联一检测配体时, 则直接偶联于检测配体结合部分。

适合的捕获或检测配体实例包括生物素(例如通过抗生物素抗体, 抗生物素蛋白(avidin)、链霉抗生物素蛋白(streptavidin)、或其衍生物捕获或检测), 荧光素(例如通过抗-荧光素抗体捕获或检测)以及 2,4-二硝基苯酚(DNP)(例如通过抗-DNP 抗体捕获或检测)。

检测探针可含有通用检测探针, 其能杂交已结合目标核酸的吊钩检测探针。通用检测探针可连接标记或检测配体而由此允许检测到检测探针。

需知本发明试剂盒和检棒可进一步含有使用试剂盒检测样品溶液的目标核酸所需的任何试剂。例如本发明的试剂盒含有偶联检测配体的检测探针, 可进一步含有检测配体结合部分。这对检棒而言可以是分开的或者可释放性地固定于检棒的接触端和捕获区之间。

检测配体结合部分可含有抗体或抗体片段, 或非抗体。例如, 若检测配体含有生物素, 则检测配体结合部分可含有抗生物素抗体, 链霉抗生物素蛋白, 抗生物素蛋白或其保有生物素结合活性的衍生物。优选检测配体结合部分已标记, 而由此允许运用检测探针及检测配体结合部分间接检测目标核酸。

需知本发明涉及连接间了隔子的检测探针和/或捕获探针的用途, 以及根据目标核酸的检测方法此检测探针或捕获探针可固定于检棒或与样品溶液孵育。

根据本发明, 也提供用于测试样品溶液中目标核酸存在的试剂盒, 其包含:

i) 检棒，其含有的层析片具有接触端用于接触样品溶液，以及捕获探针，能杂交目标核酸或已结合目标核酸的吊钩捕获探针，该捕获探针固定于层析片远离接触端的捕获区上；以及

ii) 检测探针，能杂交目标核酸，该检测探针偶联于标记而允许利用该检测探针直接检测目标核酸，或该检测探针偶联于配体而允许利用该检测探针间接检测目标核酸，其中标记或检测配体连接于检测探针间隔臂，该检测探针间隔臂连接于检测探针，而由此偶联标记或检测配体到检测探针并将标记或检测配体同检测探针间隔。

根据本发明，也提供用于测试样品溶液中目标核酸存在的试剂盒，其包含：

i) 检棒，其含有的层析片具有接触端用于接触样品溶液，以及捕获部分，固定于层析片远离接触端的捕获区，该捕获部分能直接或间接结合目标核酸；

ii) 捕获探针，能杂交目标核酸或已结合目标核酸的吊钩捕获探针，其中捕获探针偶联能被捕获部分结合的捕获配体；以及

iii) 检测探针，能杂交目标核酸，该检测探针偶联于标记而允许利用该检测探针直接检测目标核酸，或该检测探针偶联于检测配体而允许利用该检测探针间接检测目标核酸，其中标记或检测配体连接于检测探针间隔臂，该检测探针间隔臂连接于检测探针，而由此偶联标记或检测配体到检测探针并将标记或检测配体同检测探针间隔。

根据本发明，也提供用于测试样品溶液中目标核酸存在的试剂盒，其包含：

i) 检棒，其含有的层析片具有接触端用于接触样品溶液，以及捕获部分，固定于层析片远离接触端的捕获区；

ii) 捕获探针，能杂交目标核酸或已结合目标核酸的吊钩捕获探针，其中捕获探针连接于捕获探针间隔臂，该捕获探针间隔臂连接于捕获配体，而由此偶联捕获配体到捕获探针并将捕获配体同捕获探针间隔；以及

iii) 检测探针，能杂交目标核酸，该检测探针偶联于标记而允许利

用该检测探针直接检测目标核酸，或该检测探针偶联于检测配体而允许利用该检测探针间接检测目标核酸。

根据本发明进一步的方面，提供将探针固定于固相的方法，其包括提供偶联于蛋白质的探针以及将该蛋白质吸附到固相。

本发明用于固定探针于固相的方法，可进一步包括将探针偶联于蛋白质。

探针优选偶联一连接子，且连接子偶联于蛋白质。优选连接子偶联蛋白质之前将探针偶联于连接子。

探针可有核酸或核酸类似物。

优选连接子偶联探针的非核碱基部分。当探针含有核酸时，优选连接子偶联探针的糖或磷酸基。当探针含有核酸类似物 PNA(蛋白核酸)时，优选连接子偶联探针的氨基。这样使得连接子不干扰核碱基的碱基配对。或者，连接子可以偶联探针的能杂交探针结合伙伴（例如目标核酸）的部分的 5'或 3'末端，而避免连接子干扰探针同其结合伙伴的碱基配对相互作用。

优选以附着连接子的亚磷酰胺基与探针的羟基反应而偶联探针于连接子，或以连接子的羟基与附着探针的亚磷酰胺基反应而偶联探针于连接子。

优选以附着连接子的伯氨基与蛋白质的羧基反应而偶联连接子于蛋白质。

固相可含有膜，优选为硝化纤维素膜。另外，固相可含有颗粒，例如珠子。

根据本发明也提供探针，其是通过将连接探针的蛋白吸附到质固相而固定于固相。

根据本发明也提供本发明的检棒、试剂盒在检棒分析中的用途，来测试样品溶液中目标核酸的存在。

本发明检棒具有捕获探针间隔臂，而认为改良其灵敏性，是因连接捕获探针间隔臂的捕获探针更易杂交目标核酸。本发明检棒或试剂盒中可能因捕获探针以捕获探针间隔臂偶联捕获配体，其灵敏性可能

因而获改善，因为捕获探针由此更易杂交目标核酸并且捕获配体更易被捕获部分结合。

同样地，本发明检棒或试剂盒具有检测探针间隔臂偶联检测探针至一标记，而认为改良其灵敏性，是因检测探针间隔臂使检测探针更易杂交目标核酸。若检测探针以检测探针间隔臂偶联检测配体，则认为更易杂交目标核酸并且检测探针配体可能也更易接近检测配体结合部分。

根据本发明使用含有核碱基的间隔臂被认为特别有效，因为核苷酸或核碱基能与形成于捕获探针或检测探针与目标核酸之间的碱基对形成堆积相互作用。堆积相互作用的形成被认为可增强捕获探针或检测探针杂交目标核酸，由此改良目标核酸在检棒捕获区的捕获或检测效率。

适合情况下，本发明的检棒及试剂盒可用于下列类型的检棒分析，测试样品溶液中目标核酸的存在：

1)提供检棒，其含有的层析片具有接触端及捕获探针固定于远离接触端的捕获区上，该捕获探针能杂交目标核酸。检测探针，检测探针在能杂交目标核酸的条件下接触样品溶液。以检棒的接触端接触样品溶液，使得样品溶液通过毛细作用移行至捕获区，由此使目标核酸及检测探针与样品溶液移行至捕获区，并将目标核酸捕获在捕获区。样品溶液中目标核酸的存在可由捕获区出现检测探针指示出来。

在此分析的变化中，检测探针可以可释放性地固定于检棒接触端与捕获区之间，而不与检棒分开。当检棒接触端与样品溶液接触而使样品溶液通过毛细作用移行至捕获区，检测探针被释放到样品溶液中以至释放的检测探针在其移行至捕获区时能杂交样品溶液中的目标核酸。

此分析的进一步变化中，检测探针可与样品溶液分开并与检棒捕获区接触。这通常在检棒接触端与样品溶液接触之后进行。检测探针可直接接触捕获区，或检测探针在分开的探针溶液中接触检棒接触端而使探针溶液通过毛细作用移行至捕获区。

2)提供检棒,其含有的层析片具有接触端及捕获部分固定于远离接触端的捕获区上,该捕获部分能结合已杂交目标核酸的捕获探针。捕获探针在能杂交目标核酸的条件下接触样品溶液。样品溶液与检棒接触端接触,使得样品溶液通过毛细作用移行至捕获区,由此使目标核酸及捕获探针与样品溶液移行至捕获区,并通过捕获部分结合捕获探针而将目标核酸捕获在捕获区。目标核酸可使用如分析(1)所述的检测探针检测。检测探针可与捕获探针一起或分开加入样品溶液(以任何顺序)。另外,检测探针可以可释放性地固定于检棒接触端与捕获区之间,或如分析(1)所述分别接触捕获区。

在分析(2)的变化中,捕获探针不与样品溶液混合,而可以将捕获探针可释放性地固定于检棒接触端与捕获区之间。当检棒接触端与样品溶液接触形成样品溶液通过毛细作用移行至捕获区时,捕获探针被释放到样品溶液中以至释放的捕获探针在其移行至捕获区时能杂交样品溶液中的目标核酸。目标核酸可使用检测探针检测,后者可接触样品溶液,可释放性地固定于检棒接触端与捕获区之间,或分别接触捕获区。

分析(2)的进一步变化中,在样品溶液通过毛细作用到达捕获区之前(或特别地同时)将捕获探针接触捕获区。如此可使捕获探针通过捕获部分结合在捕获区而使目标核酸被捕获。捕获探针可在分开的捕获探针溶液中,通过直接应用于捕获区而分开接触捕获区,或通过捕获探针溶液接触检棒接触端而使捕获探针通过毛细作用移行至捕获区。接着将检棒接触端与样品溶液接触使目标核酸通过毛细作用到达捕获区而被捕获。再次,目标核酸可使用检测探针检测,后者可接触样品溶液,可释放性地固定于检棒接触端与捕获区的间,或分开接触捕获区。作为在分析(2)中检测探针使用的另一情况,目标核酸可直接于样品溶液中标记,例如标记共价附着于目标核酸。此项的实现可通过将前体标记(precursor label)与样品溶液接触,并在标记可共价附着目标核酸的条件下孵育前体标记与样品溶液。

分析(2)的捕获部分可为能杂交捕获探针的通用捕获探针,或该捕

获部分可通过非碱基配对相互作用结合捕获探针。例如当捕获探针含有一或多个捕获配体时，捕获部分为捕获配体结合部分。

当检棒分析使用一种以上能杂交目标核酸的探针时，优选全部探针加到样品溶液中且于单一步骤中进行杂交。如此简化分析使其操作更容易且更快速。已发现使用单一步骤杂交分析检测目标核酸的灵敏性约相同于多步骤进行杂交的检测灵敏性。多步骤杂交可通过用不同探针对样品溶液中的目标核酸连续杂交而进行，或通过将检棒接触各含有不同探针的不同溶液而进行。通常多步骤杂交的后一种方法在接触每一不同探针溶液之间要清洗检棒。虽然某些情况中优选多步骤杂交，需知更简单及更快速形式的单一步骤杂交通常优选。

优选样品溶液具有适当的组成而使杂交反应一步进行，也允许非碱基配对的相互作用发生(例如检测配体及检测配体结合部分之间，以及捕获配体及捕获配体结合部分之间)并通过毛细作用将含有目标核酸及一种或多种已杂交探针及(可选地)配体结合部分的复合物在层析片上传送。使用如此的样品溶液时，需知在样品溶液直接与检棒接触端接触之前，杂交反应可于单一步骤中进行，并且任何配体-配体结合部分的相互作用可以发生(不需第一次稀释或改变样品溶液)。当样品溶液移行向捕获区时，一旦需要，配体-配体结合部分的相互作用能额外或另外地在检棒上进行。由此促进目标核酸的简单且快速的检棒检测。

我们发现：这种结果是以含具有盐，去污剂及封闭性蛋白质例如 BSA 或奶粉的标准杂交缓冲液(例如 SSPE 缓冲液或 Tris 缓冲液)的样品溶液完成的。使用此种分析检测目标核酸的灵敏性，已知约与其它检棒分析法相当。

以下面实施例并参考附图说明本发明的实施方案，附图中：

图 1 为适用作为本发明捕获探针间隔臂或检测探针间隔臂成分的非蛋白质成分的化学结构；

图 2 为使用本发明具体实施方案检测砂眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)目标核酸；

图 3 为实施例 1 的实验设置;
图 4 为实施例 2 的实验设置;
图 5 为实施例 3 的实验设置;
图 6 为实施例 4 的实验设置;
图 7 为实施例 6 的实验设置;
图 8 为实施例 7 的实验设置;
图 9 为实施例 9 的实验设置;
图 10 为实施例 10 的实验设置;
图 11 为实施例 11 的实验设置; 以及。

图 12 为实施例中使用的偶联生物素检测配体的不同检测探针的结构图式。

实施例涉及检测砂眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*(CT))隐藏性质粒 DNA 的 DNA 片段。CT 是最常见的性传播疾病的诱因之一。CT 感染能引起不孕, 且于怀孕期间乃至出生可造成自发性流产或产后子宫内膜炎。在新生儿, CT 感染能引起失明及慢性呼吸道疾病。接近 10% 受感染男性及高达 70% 受感染女性未表现 CT 感染的症状。因此, CT 感染的正确诊断是重要的, 这样能对此疾病开始早期治疗。

本发明实施例中, 检棒 10 是用于测试样品溶液 14 中是否有单链或双链 CT 目标核酸 12 (参照第 2 图)。检棒 10 含有硝化纤维素片 16, 其具有接触端 18 用于接触样品溶液 14, 以及捕获探针 20 固定于硝化纤维素片 16 远离接触端 18 的捕获区 22。抗-生物素抗体-染料缀合物 24 (或实施例 5 的抗-荧光素抗体-染料缀合物) 可释放性地固定于硝化纤维素层析片接触端 18 与捕获区 22 之间的缀合区 26。捕获探针 20 能杂交目标核酸 12 的一链(第一链)的第一区域。

制备样品溶液 14: 向砂眼衣原体菌中掺入 1 ml 尿液, 然后以 15K rpm 旋转尿液 30 分钟。沉淀再悬浮于 100 μ l 标准杂交缓冲液(包括封闭剂例如酪蛋白或 BSA)。然后加入能杂交目标核酸的检测探针 28 (与帮手探针(helper probe)一起, 若使用, 其能杂交邻近检测探针和/或捕获探针可以辨认区域的目标核酸)。检测探针 28 偶联生物素(或实施例

5的荧光素)(使用本领域技术人员已知方法)。然后样品溶液 14 加热至 100℃ 7 分钟然后冷却。

然后检棒 10 的接触端 18 然后接触样品溶液 14。样品溶液 14 与杂交了检测探针 28 的任何目标核酸 12 通过毛细作用在检棒 10 往上移行。当样品溶液 14 通过缀合区 26 时，带流动抗-生物素抗体-染料缀合物 24。释放的抗-生物素抗体-染料缀合物 24 然后可结合到已杂交了目标核酸 12 的检测探针 28 所偶联的生物素。

然后抗-生物素抗体-染料缀合物 24、检测探针 28 及目标核酸 12 之间形成的复合物在检棒 10 往上移行到捕获区 22，于此处复合物的目标核酸能杂交固定的捕获探针 20。捕获探针 20 因固定于捕获区 22 而无法被样品溶液 14 在其通过捕获区 22 带行。因此，结合到捕获探针的复合物保留在捕获区，并能以存在于捕获区的抗-生物素抗体-染料缀合物中的染料来检测。

假设样品溶液没有 CT 目标核酸，则检测探针 28 不会在捕获区 22 被捕获，且这样捕获区不会看到染料。假设样品溶液中有 CT 目标核酸，但捕获区捕获的目标核酸数量不足时，将无法检测样品溶液中目标核酸的存在。

现已发现：若目标核酸的捕获探针杂交区域与检测探针杂交区域间的距离少于 26 核苷酸时会降低目标核酸的检测灵敏性。因此，优选为这些区域间的距离为至少 26 核苷酸，且优选为至少 200 核苷酸。

上述目标核酸的捕获是指以下列实施例中直接探针捕获。实施例中目标核酸的检测强度以 0 到 5 等级记录，5 代表检测强度最强，以及 0 代表没有检测强度。

下列实施例使用的探针序列如下所示：

SEQ ID NO: 1: 5' TGC AAC TCT TGG TGG TAG ACT TTG C

SEQ ID NO: 2: 5' GCG CAC AGA CGA TCT ATT TTT TGC A

SEQ ID NO: 3: 5' CGG GCG ATT TGC CTT AAC CCC ACC A

SEQ ID NO: 4: 5' CCA AGC TTA AGA CTT CAG AGG AGC G

SEQ ID NO: 5: 5' CAT GCG TTT CCA ATA GGA TTC TTG G

SEQ ID NO: 6: 5' CAC AGT CAG AAA TTG GAG TGC TGG C
 SEQ ID NO: 7: 5' CTT GCT GCT CGA ACT TGT TTA GTA C
 SEQ ID NO: 8: 5' AGA AGT CTT GGC AGA GGA AAC TTT T
 SEQ ID NO: 9: 5' CTA GAA TTA GAT TAT GAT TTA AAA GGG
 SEQ ID NO: 10: 5' TTC ATA TCC AAG GAC AAT AGA CCA A
 SEQ ID NO: 11: 5' TGA TCT ACA AGT ATG TTT GTT GAG T
 SEQ ID NO: 12: 5' TGC ATA ATA ACT TCG AAT AAG GAG AAG
 SEQ ID NO: 13: 5' TCC CTC GTG ATA TAA CCT ATC CG
 SEQ ID NO: 14: 5' CAG GTT GTT AAC AGG ATA GCA CGC
 SEQ ID NO: 15: 5' CTC GTT CCG AAA TAG AAA ATC GCA
 SEQ ID NO: 16: 5' GGT AAA GCT CTG ATA TTT GAA GAC
 SEQ ID NO: 17: 5' CTG AGG CAG CTT GCT AAT TAT GAG T

下述实施例中使用的检测探针的结构图示于图 12。

实施例 1

实验设置

捕获形式: 固定于检棒的直接探针捕获(cp) Seq ID No 14;

检测探针(dp): 以生物素直接偶联于 5'-端, 或通过 3 核苷酸(N₃), 6 核苷酸(N₆), S, 或 SS 间隔臂偶联生物素的 Seq ID No 13 或 Seq ID No 15, 或以生物素直接偶联于 3'-端的 SEQ ID No 13。各 10¹² 拷贝。

检测形式: 抗-生物素抗体-染料缀合物;

目标 DNA: 73 或 76 核苷酸的单链 DNA 片段, 5x10¹¹-10¹⁰ 拷贝。

结果

dp Seq ID No 13

目标的拷贝:	5x10 ¹¹	10 ¹¹	5x10 ¹⁰	10 ¹⁰
<u>检测探针</u>	<u>信号强度</u>			
dp-B ^{5'}	3.5	3.0	2.0	1.0
dp-N ₃ -B ^{5'}	4.5	3.5	3.0	1.5
dp-N ₆ -B ^{5'}	5.0	4.0	3.0	2.0

dp-S-B ^{5'}	4.0	3.0	2.0	1.0
dp-SS-B ^{5'}	4.5	3.5	2.5	1.0
3'-B-dp	5.0	3.5	3.0	2.0

dp Seq ID No 15

目标的拷贝:	5x10 ¹¹	10 ¹¹	5x10 ¹⁰
<u>检测探针</u>	<u>信号强度</u>		
dp-B ^{5'}	3.5	2.0	1.0
dp-N ₃ -B ^{5'}	4.0	3.0	2.0
dp-N ₆ -B ^{5'}	4.5	3.0	2.0
dp-S-B ^{5'}	4.0	2.5	1.5
dp-SS-B ^{5'}	4.0	2.5	1.5

这些结果显示:

使用通过 N₃, N₆, S, 或 SS 间隔臂将生物素偶联于 5'-端的检测探针的目标核酸检测的灵敏性高于使用生物素直接偶联于 5'-端的检测探针的目标核酸检测的灵敏性。

N₃ 及 N₆ 间隔臂比 S 及 SS 间隔臂好。

优选为生物素(或其它检测配体)偶联于检测探针的一端。在捕获区当捕获探针及检测探针杂交目标核酸形成的复合物中,生物素(或其它检测配体)可能位于检测探针的一端,其接近目标核酸杂交捕获探针的区域(内部方位),或优选为在检测探针的远离目标核酸杂交捕获探针区域(外部方位)的一端。若没使用间隔臂偶联检测配体与检测探针,而当检测配体在外部方位时,目标核酸的检测灵敏性通常较高。因此,通常选择检测配体在外部方位的检测探针。

然而,在此实施例中,使用外部方位偶联生物素于检测探针 3'-端的检测探针的检测灵敏性,相同于以内部方位通过六核苷酸间隔臂偶联生物素于检测探针 5'-端的检测探针的检测灵敏性。如此根据本发明使用间隔臂时,不必选择检测探针使检测配体位于捕获于捕获区的

复合物的外部方位。

实施例 2

实验设置

捕获形式：固定于检棒膜的直接探针捕获(cp) Seq ID No 14;

检测探针：通过 3 核苷酸(N₃), 6 核苷酸(N₆), S, 或 SS 间隔臂偶联生物素的检测探针(dp) Seq ID No 13、Seq ID No 15 及 Seq ID No 16 的 5'-端。各 10¹² 拷贝。

检测形式：抗-生物素抗体-染料缀合物;

目标 DNA：214 bp 双链 DNA 片段, 10¹¹-10¹⁰ 拷贝。

结果

目标的拷贝:	10 ¹¹	5x10 ¹⁰	10 ¹⁰
检测探针	信号强度		
dp13-B+dp15-B+dp16-B	1.5	1.0	0.0
dp13-N ₃ -B+dp15-N ₃ -B+dp16-N ₃ -B	3.0	2.0	0.5
dp13-N ₆ -B+dp15-N ₆ -B+dp16-N ₆ -B	4.5	3.0	1.0
dp13-S-B+dp15-S-B+dp16-S-B	3.0	2.0	<0.5
dp13-SS-B+dp15-SS-B+dp16-SS-B	3.5	3.0	0.5
dp13 无标记+dp15-N ₆ -B+dp16-N ₆ -B	2.5	1.5	0.5

这些结果显示:

使用 N₃, N₆, S, 或 SS 间隔臂可改良双链目标核酸的检测灵敏性超过 5 倍。

用 N₆ 及 SS 间隔臂比用 N₃ 及 S 间隔臂具有更高的检测灵敏性, 表明间隔臂长度对于改良检测灵敏性很重要。

带有 N₆ 间隔臂比 SS 间隔臂具有更高的检测灵敏性, 尽管事实上这种间隔臂长度相等, 这表明间隔臂物化性质对于检测灵敏性的改良很重要。

使用仅两种检测探针, 其分别以 N₆ 间隔臂偶联生物素到 5'-端 (dp13 无标记+dp15-N₆-B+dp16-N₆-B, 其中生物素位于以捕获探针捕

获的复合物的内部方位，检测灵敏性大于使用三种检测探针，其分别直接偶联生物素到 5'-端(dp13-B+dp15-B+dp16-B)，其中一检测探针(dp13-B)的生物素位于以捕获探针捕获的复合物的外部方位。

实施例 1 及实施例 2 的结论

目标核酸检测的灵敏性可通过使用间隔臂偶联检测配体到检测探针而增加。

较长的间隔臂比短的间隔臂好。

相同长度但不同物化性质的间隔臂对检测灵敏性有不同的影响。特别是间隔臂中非蛋白质成分仅由核苷酸构成者优于间隔臂中含有非核苷酸成分者。

这种结果的可能解释是：

1.核苷酸间隔臂改良检测灵敏性可能是通过增强检测探针对目标核酸的杂交。当检测探针杂交目标核酸时，不期望这些间隔臂的核苷酸会碱基配对到目标核酸的核苷酸。这些核苷酸的核碱基可与碱基对(形成于检测探针杂交目标核酸时)形成堆积相互作用。这些堆积相互作用可增强目标核酸与检测探针间形成的杂交物(hybrid)的稳定性，由此增强目标核酸的检测灵敏性。

2.核苷酸间隔臂比 S 及 SS 间隔臂更坚硬。相较于 S 及 SS 间隔臂的聚乙二醇基，期望核苷酸间隔臂的核糖环可提供更多坚硬性。较大的坚硬性可能增加用与检测配体结合部分相互作用的已偶联有核苷酸间隔臂的检测配体的可获性。

3.核苷酸与非核苷酸间隔臂之间的极性差异可能导致检测的灵敏性不同。

实施例 3

实验设置

捕获形式：固定于检棒的直接探针捕获(cp) Seq ID No 10;

检测探针：直接或通过 N₆, SS, (dS)₆, (SC₃)₆ 或 SN₃SN₃S 间隔臂偶联生物素到检测探针(dp) Seq ID No 13 的 5'-端。各 10¹² 拷贝。

检测形式：抗-生物素抗体-染料缀合物；

帮手探针(helper probes): SEQ ID No 5 及 SEQ ID No 6 邻近 SEQ ID No 10; SEQ ID No 1 及 SEQ ID No 2 邻近 SEQ ID No 13, 10^{12} 拷贝;

目标 DNA: 872 bp 双链 DNA 片段, 2×10^{11} - 5×10^{10} 拷贝。

结果

目标的拷贝:	2×10^{11}	5×10^{10}
检测探针	信号强度	
dp-B	<1.0	0.0
dp-N ₆ -B	2.0	0.5
dp-SS-B	1.0	0.0
dp-(dS) ₆ -B	1.0	0.0
dp-(SC ₃) ₆ -B	1.0	0.0
dp-SN ₃ SN ₃ S-B	1.5	0.0

这些结果显示:

尽管 SS, (dS)₆ 及 (SC₃)₆ 间隔臂的结构与性质不同, 它们具有相同长度且在增强目标核酸的检测灵敏性上具有类似效应。

N₆ 间隔臂长度相同于 SS, (dS)₆ 及 (SC₃)₆ 间隔臂, 然而 N₆ 间隔臂在改良目标核酸的检测灵敏性上具有最大效应。

使用 N₆ 间隔臂比 SN₃SN₃S 间隔臂(最长的受试间隔臂)具有更大的目标核酸检测灵敏性。此情形的可能解释为: S 单体减少或消除间隔臂 N₃ 成分的核碱基与碱基对(形成于检测探针与目标核酸之间)之间的堆积相互作用。此数据支持本结论, 即间隔臂的未配对核碱基与形成于目标核酸及检测探针之间的双体的堆积相互作用在增强目标核酸的检测灵敏性上很重要。

实施例 4

具有不同物化性质及长度的间隔臂是以检棒测试及点印迹分析法评估。未进行检测探针杂交目标核酸时, 点印迹分析法能使抗生物素

抗体与欲分析的偶联生物素的检测探针的相互作用有效。5x10⁸-5x10¹¹ 拷贝的以不同间隔臂偶联生物素的检测探针，点在带正电的尼龙膜的不同位置，并对膜进行 UV-交联。然后孵育膜与偶联碱性磷酸酶(能转换硝基蓝四氮唑(Nitro Blue Tetrazolium)/5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(NBT/BCIP)生色底物)的抗生物素抗体，清洗，并孵育 NBT/BCIP 生色底物，然后观察膜是否看到任何颜色形成于捕获区。

检棒测试的实验设置

捕获形式：固定于检棒的直接探针捕获(cp) Seq ID No 14;

检测探针：直接或通过核苷酸或非核苷酸间隔臂偶联生物素到检测探针(dp) Seq ID No 13 的 5'-端。各 10¹² 拷贝。

检测形式：抗-生物素抗体-染料缀合物;

帮手探针：SEQ ID No 2 及 SEQ ID No 3 邻近 SEQ ID No 14, 10¹² 拷贝;

目标 DNA：416 bp 双链 DNA 片段，5x10¹⁰-5x10⁹ 拷贝。

结果

目标的拷贝：	5x10 ¹⁰	5x10 ⁹
<u>检测探针</u>	<u>信号强度</u>	
dp-B ^{5'}	3.5	0.5
dp-N ₃ -B ^{5'}	4.5	1.5
dp-N ₄ -B ^{5'}	4.5	1.0
dp-N ₅ -B ^{5'}	4.5	1.0
dp-N ₆ -B ^{5'}	5.0	1.5
dp-(dS) ₆ -B ^{5'}	4.0	0.5
dp-S-B ^{5'}	3.5	0.0
dp-SS-B ^{5'}	4.0	0.0
dp-SSS-B ^{5'}	4.5	0.0
dp-SSSS-B ^{5'}	4.0	0.0
dp-SN ₃ SN ₃ S-B ^{5'}	4.5	0.5

点印迹分析的实验设置

检测探针：直接或通过核苷酸或非核苷酸间隔臂偶联生物素到检测探针(dp) Seq ID No 13 的 5'-端。

检测形式：偶联碱性磷酸酶的抗-生物素抗体，通过 NBT/BCIP 生色底物检测。

结果

间隔臂	检测限
无	5.0 x E11
N ₃	5.0 x E10
N ₄	5.0 x E10
N ₅	5.0 x E10
N ₆	2.5 x E10
(dS) ₆	2.5 x E10
SN ₃ SN ₃ S	2.5 x E9
SSSS	2.5 x E9
SSS	5.0 x E9
SS	2.5 x E10
S	5.0 x E11

检棒测试的结果显示：

使用含有 3, 4 或 5 核苷酸间隔臂的检测探针，于目标核酸的检测灵敏性上无显著不同。

含有 6 核苷酸间隔臂的检测灵敏性稍微优于 3-5 核苷酸的间隔臂。

仅含有核苷酸的间隔臂的检测灵敏性优于含有非核苷酸的间隔臂。例如 N₃ 间隔臂优于最长的 SN₃SN₃S 间隔臂，后者相当于 15 核苷酸长度。

(dS)₆ 间隔臂稍稍好于 SS 间隔臂。

点印迹分析的结果显示：

最长间隔臂(SSSS 及 SN₃SN₃S)的检测灵敏性最高。

使用相同长度、不同物化性质的间隔臂(N_6 , $(dS)_6$ 及 SS)的检测灵敏度则类似。

实施例 3 及 4 的结论

dS 成分具有同核苷酸类似的结构。二者皆有核糖残基, 预测可提供坚硬度。然而, dS 成分不含核苷酸拥有的核碱基。 $(dS)_6$ 间隔臂相较于 N_6 间隔臂在目标核酸检测灵敏性的不同影响, 说明使用核苷酸间隔臂对检测灵敏性的改良影响较大, 主要是因存在不与目标核酸碱基配对的核碱基。

间隔臂的组成比其长度显得更重要(比较实施例 4 的检棒测试中 $dp-N_3-B^{5'}$ 及 $dp-SN_3SN_3S-B^{5'}$ 的结果)。

使用 $(dS)_6$ 间隔臂的检测灵敏度大于使用 SS 间隔臂。这些间隔臂长度相同。就此推测间隔臂的物化性质, 例如坚硬度或极性可能在间隔臂改良检测灵敏度上也有影响。

实施例 4 的点印迹分析显示间隔臂长度对于生物素对抗生物素抗体的可获性很重要。以抗生物素抗体辨认生物素的灵敏度皆类似, 不论生物素是否通过 N_6 , $(dS)_6$ 或 SS 间隔臂偶联于被固定的探针。然而这些间隔臂于实施例 4 的检棒测试中对检测灵敏性的影响不同。就此推测间隔臂的组成在检测探针对目标核酸的杂交中比在抗生物素抗体对生物素的辨认作用中更重要。以抗生物素抗体(或其它检测配体结合部分)辨认生物素(或其它检测配体)时, 间隔臂长度显得更重要于间隔臂的组成物。

实施例 5

实验设置

捕获形式: 直接探针捕获(cp) Seq ID No 14 偶联固定于检棒的 BSA。捕获探针直接或通过 6 核苷酸间隔臂偶联 BSA;

检测探针: 偶联荧光素的检测探针(dp) Seq ID No 13。 10^{12} 拷贝。

检测形式: 抗-生物素抗体-染料缀合物;

目标 DNA: 73 nt 或 76 nt 的单链 DNA 片段, 10^{11} 拷贝。

结果

目标的拷贝:	10^{11}
<u>捕获探针</u>	<u>信号强度</u>
cp-BSA-检棒	4.0
cp-N ₆ -BSA-检棒	5.0

实施例 6

实验设置

捕获形式: 直接探针捕获(cp) Seq ID No 14 在 5'-端偶联固定于检棒的 BSA。捕获探针通过 N₆ 或 SN₃SN₃S 间隔臂连接 BSA;

检测探针: 偶联生物素的检测探针(dp) Seq ID No 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 及 17。各 10^{12} 拷贝;

检测形式: 抗-生物素抗体-染料缀合物;

目标 DNA: 872 bp 的双链 DNA 片段, 10^{11} - 2.5×10^9 拷贝。

结果

目标的拷贝:	10^{11}	2.5×10^{10}	10^{10}	5×10^9	2.5×10^9
<u>捕获探针</u>	<u>信号强度</u>				
cp-SN ₃ SN ₃ S-BSA-检棒	4.0	3.5	2.5	1.0	0.0
cp-N ₆ -BSA-检棒	4.5	4.0	3.0	1.5	0.0

实施例 7

实验设置

捕获形式: 直接探针捕获(cp) Seq ID No 15 偶联固定于检棒的 BSA。捕获探针通过 N₆ 间隔臂偶联 BSA;

帮手探针: SEQ ID No 3 及 SEQ ID No 4 邻近 SEQ ID No 15;

检测探针: 此实施例中检测探针含有吊钩探针及通用探针。吊钩探针具有序列对应于 Seq ID No 17(能杂交目标核酸)以及序列互补于

通用探针的序列。通用探针通过 N_6 或 SN_3SN_6 间隔臂偶联纺织染料。吊钩探针有 10^{12} 拷贝。

目标: 872 bp 双链 DNA 片段, 10^{11} 及 10^{10} 拷贝。

结果

目标的拷贝:	10^{11}	10^{10}
捕获探针	信号强度	
通用探针- SN_3SN_6 -染料	2.0	0.0
通用探针- N_6 -染料	2.0	0.5

实施例 5, 6 及 7 的结论

使用含有固定于检棒的蛋白质以及连接捕获探针至固定的蛋白质的非蛋白质的间隔臂(实施例 5 及 6), 或使用非蛋白质间隔臂偶联标记至检测探针(实施例 7)能改良目标核酸检测的灵敏性。

当间隔臂非蛋白质成分完全由核苷酸构成时, 目标核酸检测的灵敏性最高。

实施例 8

本实施例中比较使用通过蛋白质载体或被动吸附而固定于检棒膜的捕获探针的目标核酸检测灵敏性。

10 纳摩尔捕获探针, 其以伯氨基在 5'-或 3'-端官能化, 与 $1\mu\text{l}$ 的 10% BSA 及 $25\mu\text{l}$ 的 50 mM MES 缓冲液(pH 6.1)混合, 并于 $500\mu\text{l}$ 微量管中以水加至 $49\mu\text{l}$ 。然后加入 $1\mu\text{l}$ 的偶联剂(新鲜制备的 300 mM 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDAC)于水中)并混匀。混合物留置室温过夜使 BSA 偶联于捕获探针, 之后保存在 $2-8^\circ\text{C}$ 。然后将 BSA-捕获探针应用于检棒捕获区并在 80°C 加热检棒 1 小时。

最优化捕获探针对 BSA 的摩尔比以及 EDAC 偶联剂的浓度。研究了捕获探针: BSA 的比例 2.7: 1, 3.2: 1, 4.1: 1, 5.2: 1, 6.6: 1, 10.9: 1。研究了 1, 1.5, 2, 4, 5 及 20 mM EDAC 的浓度。浓度高于 5 mM 使 BSA-捕获探针从溶液中沉淀出。

实验设置

捕获形式：直接探针捕获(cp)，用直接或通过 BSA 蛋白质间隔臂固定于检棒膜的 Seq ID No 14。将捕获探针及捕获探针-BSA 应用于检棒并在 80℃ 加热检棒 1 小时。

检测探针：生物素标记的检测探针(dp) Seq ID No 13, 10^{12} 拷贝。

检测形式：抗-生物素抗体-染料缀合物；

目标 DNA：73 核苷酸的单链 DNA 片段, 1×10^{11} 拷贝。

结果

捕获探针:	信号
捕获探针-BSA	4.0
捕获探针	0.0

结论

使用直接固定于检棒的捕获探针未检测到目标核酸。然而，若捕获探针偶联 BSA 且 BSA 固定于检棒，则可获得强烈信号。

下列实施例是关于使用以蛋白质间隔臂偶联颜色颗粒的探针进行目标核酸的检测。颜料颗粒涂覆有已偶联 BSA 的探针。蛋白质吸附到染料颗粒而由此偶联探针到染料颗粒。使用程序如下：

11 μ l 清洗过的染料($A_{575}=900$)稀释于 434 μ l 的 10 mM 磷酸缓冲液(含 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)中。加入 5 μ l 探针-BSA(2 mg/ml)，混匀并在室温旋转 1 小时；

加入 50 μ l 的 20%经碱处理的酪蛋白。混匀并在室温旋转 1 小时；
在室温于微量管中以 4000 rpm 离心 15 分钟；

移除上清液并于 500 μ l 含有 5%蔗糖、2%经碱处理的酪蛋白及 0.02%叠氮化钠的结合缓冲液中再悬服沉淀。

实施例 9

实验设置

捕获形式：抗-生物素抗体/生物素偶联捕获探针 Seq ID No 13,

No 14, No 15, No 16 及 No 17. 每一测试 10^{12} 拷贝。

另外使用直接探针捕获形式(Seq ID No 14 或 Seq ID No 15)进行对照;

直接检测探针 Seq ID No 10 以 BSA 偶联于染料颗粒;

帮手探针: SEQ ID No 5 及 SEQ ID No 6 邻近 SEQ ID No 10;

目标: 872 bp 双链 DNA 片段, 10^{11} 到 10^8 拷贝。

结果

使用多种探针的信号增幅

捕获探针	Seq ID No 13	Seq ID No 14	Seq ID No 15	Seq ID No 16	Seq ID No 17	全部 5
10^{11} 拷贝目标的信号强度	1	0	1	1	1	5

灵敏性分析

目标拷贝	1×10^{11}	1×10^{10}	5×10^9	1×10^9	5×10^8	1×10^8
抗体捕获(5 探针)	5	4.5	4	2.5	2	0.5
直接探针捕获 (Seq ID No 15)	4.5	3	2.5	1.5	0	0
直接探针捕获 (Seq ID No 14)	3	2	0.5	0	0	0

这些结果显示直接检测探针-染料缀合物与抗体捕获形式及直接探针捕获形式皆可运行。

实施例 10

实验设置

捕获形式: 直接探针捕获(cp) Seq ID No 15 偶联固定于检棒的 BSA。

帮手探针: SEQ ID No 3 及 SEQ ID No 4 邻近 SEQ ID No 15;

检测探针区域 Seq ID No 17。"吊钩探针"于此区域含有序列互补于目标 DNA 及通用探针序列, 每测试使用 10^{12} 拷贝;

检测形式: 以 BSA 偶联纺织染料到通用探针;

目标: 872 bp 双链 DNA 片段, 10^{11} 及 10^{10} 拷贝。

结果:

目标拷贝	10^{11}	10^{10}
信号	2.0	0.0

此种形式相较于直接检测探针染料缀合物形式的优点为：当通用核苷酸序列探针结合到颜色颗粒时，此种形式能应用通用试剂进行核酸的可见检测。

实施例 11

实验设置

捕获形式：直接探针捕获 Seq ID No 15 偶联固定于检棒的 BSA。

帮手探针：SEQ ID No 3 及 SEQ ID No 4 邻近 SEQ ID No 15；

检测探针区域 Seq ID No 17。“吊钩”检测探针 1 于此区域含有序列互补于目标 DNA 及通用探针序列 2，每测试使用 10^{12} 拷贝；

检测形式：吊钩检测探针含有序列互补于目标核酸的序列以及第一通用检测探针序列。第一通用检测探针偶联 BSA，且 BSA 吸附到第一颜色颗粒，由此偶联第一通用检测探针到第一颜色颗粒。数项第二通用检测探针也分别偶联已吸附第一颜色颗粒的 BSA。第二通用检测探针含有序列互补于第三通用检测探针。第三通用检测探针偶联已吸附第二颜色颗粒的 BSA。当使用吊钩检测探针，第一、第二及第三通用检测探针以及第一及第二颜色颗粒检测目标核酸时，单一的第一颜色颗粒在目标核酸上形成第一层，以及数项第二颜色颗粒在目标核酸上形成第二层，如图 11 所示。因为数项颜色颗粒可以这种方式附着于每一目标核酸，因此认为相较于使用吊钩检测探针及偶联颜色颗粒的单一通用检测探针，目标核酸的检测灵敏性已经改良。

目标：872 bp 双链 DNA 片段， 10^{11} 及 10^{10} 拷贝。

结果:

目标拷贝	10^{11}	10^{10}
信号	2.0	0.5

1598 bp 双链 DNA 目标得到类似结果。

实施例 12: 一步核酸检棒分析检测砂眼衣原体

实验设置:

试剂:

捕获形式: 由 BSA 载体固定于检棒膜的寡核苷酸探针捕获;

检测形式: 多生物素标记的检测探针; 抗-生物素-抗体-胶体金缀和物;

样品制备: 在 PBS 缓冲液中制备砂眼衣原体原粒体(EB)细胞为浓度: 10^6 - 10^3 拷贝/ μ l, 并在 100 摄氏度加热 20 分钟。

杂交/检棒工作缓冲液: 含有盐, 去污剂和封闭用蛋白质如 BSA 或奶粉的标准杂交缓冲液。

方法: 在 80 μ l 杂交缓冲液中稀释检测探针, 帮手探针和 5×10^6 - 5×10^3 拷贝的 EB, 并于 100 摄氏度加热 7 分钟。简短离心混合物收集液体并混合 20 μ l 抗生物素抗体胶体金。将全部的 100 μ l 混合物吸入检棒并使其显现信号。

结果和讨论

结果示于表而图 13 显示包括样品制备步骤, 用一步核酸检棒分析可以在少于 1 小时的时间里检测约 10^4 拷贝的砂眼衣原体 EB。

尽管这样出示的检棒检测分析的灵敏性约等于其他夹心式杂交分析, 但是它具有快速和简单的优点。

公开于例如 PCT WO93/1322 的夹心式杂交分析检测砂眼衣原体 EB 是复杂的多成分微量滴定盘式分析, 其不能在 5 小时以内完成。该分析是多步分析, 要求以确定的顺序渐次加入其成分, 而且在加入每种新成分以后需要孵育和洗涤步骤。

本发明的核酸检棒分析主题可以一步完成, 且不需其他步骤来加入成分和洗涤。该夹心式杂交分析不需超过一种的溶液条件来使其利于杂交和其他的亲配形式。同一溶液条件也可以用于各成分在检棒上的自由迁移。

发现检棒的单链及双链目标核酸的检测灵敏性，通过使用根据本发明的间隔臂而显著改良。对双链环状目标核酸的检测灵敏性也能通过使用根据本发明的间隔臂而增加。

已知单链目标核酸可通过分子内碱基配对相互作用形成二级结构。如此二级结构能抑制捕获探针及检测探针对目标核酸的结合。因此，目标核酸结合检测探针及捕获探针的区域，常选为预期基本无二级结构的区域。

使用根据本发明的间隔臂改良双链目标核酸的检测灵敏性，意味着使用捕获探针和/或检测探针(能辨认含有二级结构的目标核酸区域)检测单链目标核酸的检测灵敏性亦获改良。此项优点为捕获探针和/或检测探针的选择不需根据目标核酸形成二级结构的预测，如此简化捕获及检测探针的选择。

检棒检测的常规方法在检测环状双链目标核酸上非常不足。因此，这种目标核酸通常在检测之前用酶将双链目标直线化。使用根据本发明的间隔臂改良环状双链目标核酸的检测意味着不需要目标核酸的直线化作用而简化检测方法。

序列表

<110> Lee, Helen
 <120> **检棒分析中改良的结合相互作用**
 <130> 41742
 <140> PCT/GB01/03039
 <141> 2001-07-06
 <150> GB 0016836.9
 <151> 2000-07-07
 <160> 17
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> **人工序列**
 <220>
 <223> **合成的寡核苷酸**
 <400> 1
 tgcaactcctt ggtgtagac ttgca 25
 <210> 2
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> **人工序列**
 <220>
 <223> **合成的寡核苷酸**
 <400> 2
 gcgcacagac gatctatctt ttgca 25
 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> **人工序列**
 <220>
 <223> **合成的寡核苷酸**
 <400> 3
 cgggcgatctt gccttaaccc cacca 25
 <210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> **人工序列**
 <220>
 <223> **合成的寡核苷酸**

<400> 4
 ccaagcttaa gacttcagag gagcg 25

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 5
 catgcgtttc caataggatt cttgg 25

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 6
 cacagtcaga aattggagtg ctggc 25

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 7
 cttgctgctc gaacttgttt agtac 25

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 8
 agaagtcttg gcagaggaaa ctttt 25

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 9
 ctagaattag attatgattt aaaaggg 27

<210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 10
 ttcatatcca aggacaatag accaa 25

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 11
 tgatctacaa gtatgtttgt tgagt 25

<210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 12
 tgcataataa cttcgaataa ggagaag 27

<210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 13
 tccctcgtga tataacctat ccg 23

<210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的寡核苷酸

<400> 14

caggttgtta acaggatagc acgc 24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 15

ctcgttccga aatagaaaat cgca 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 16

ggtaaagctc tgatatttga agac 24

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 17

ctgaggcagc ttgctaatta tgagt 25

间隔臂的设计

- B^{5'}
- NNNB^{5'}
- NNNNB^{5'}
- NNNNNB^{5'}
- NNNNNNB^{5'}
- (-dS-)₆-B^{5'}
- (-S_{C3}-)₆-B^{5'}
- S-S-B^{5'}
- S-S-S-B^{5'}
- S-S-S-S-B^{5'}
- S-N₃-S-N₃-S-B^{5'}

B=偶联连接子的生物素

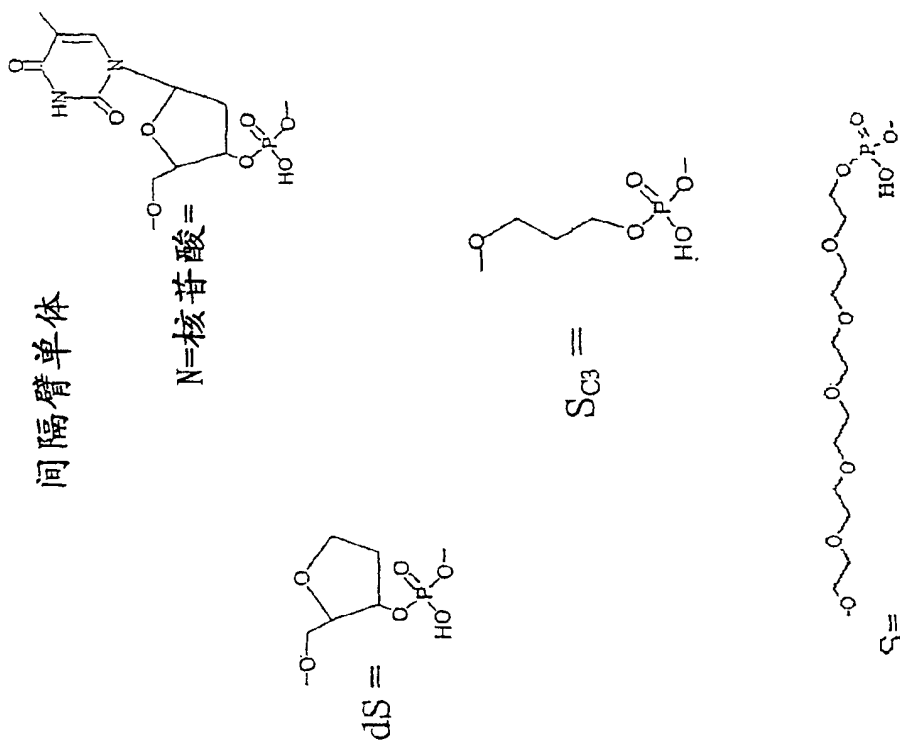


图1

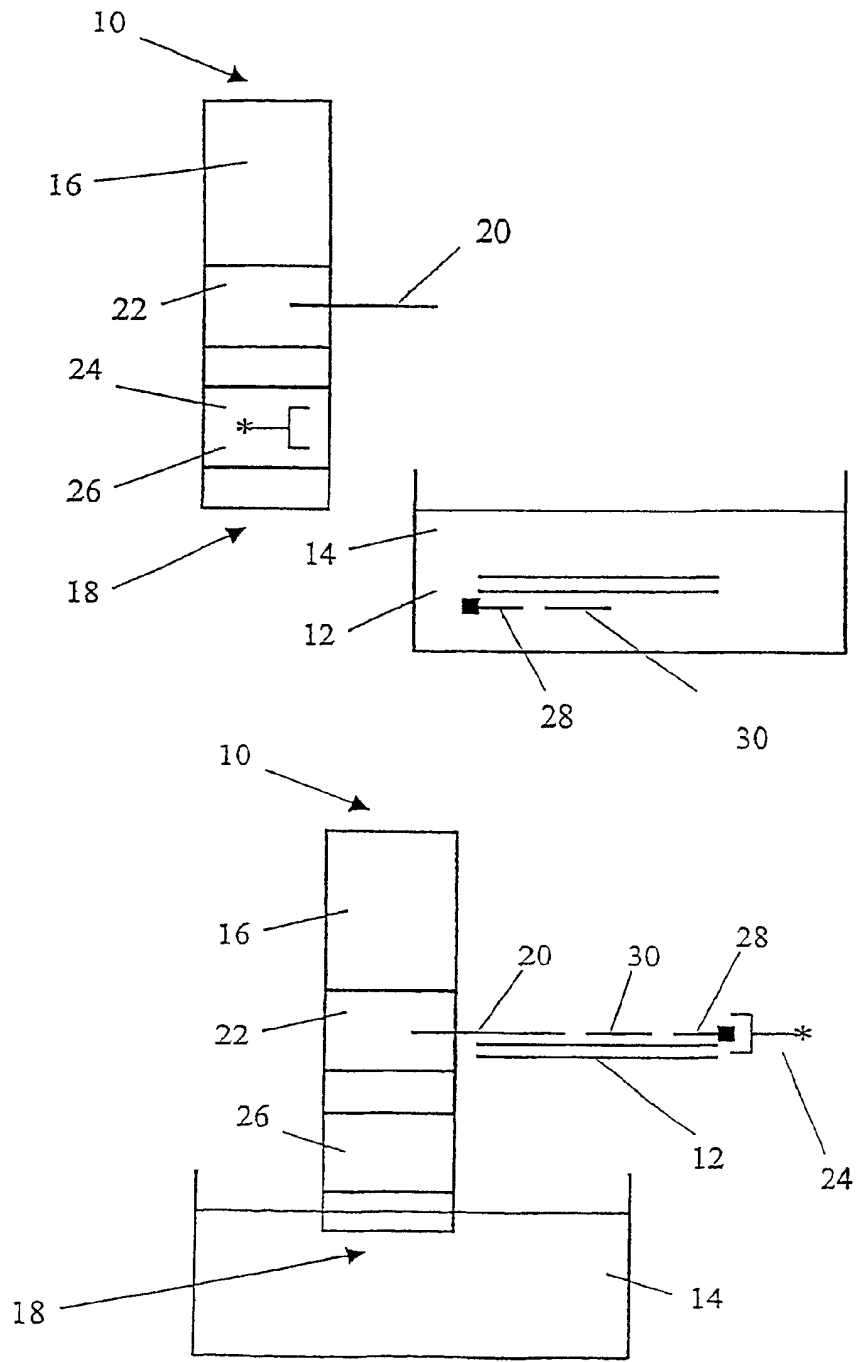


图2

图3

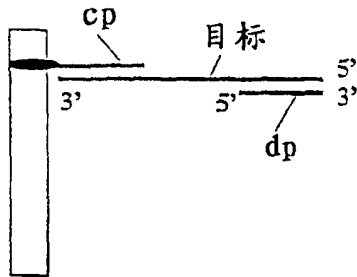


图4

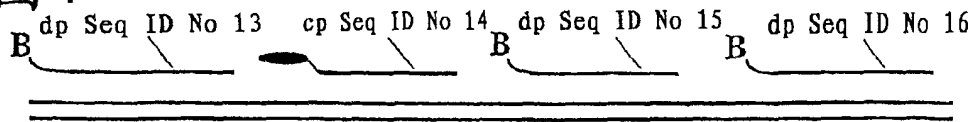


图5

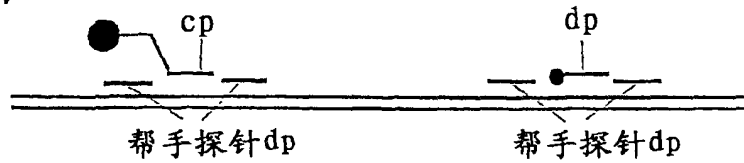


图6



图7

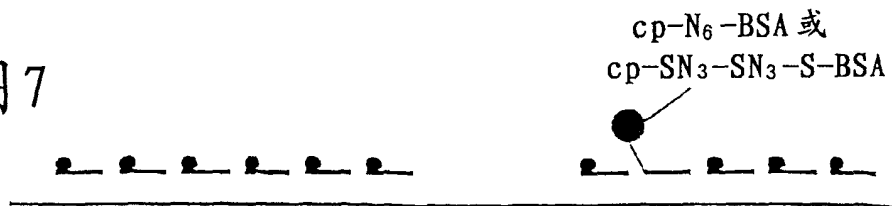


图8

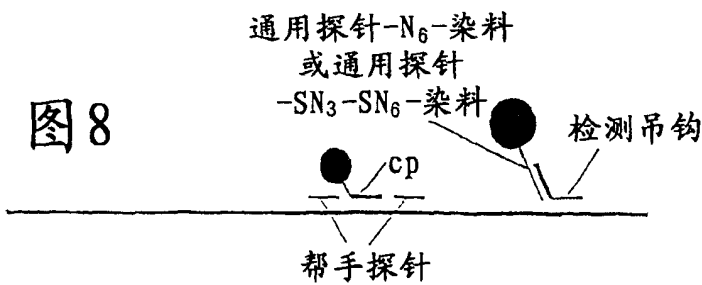


图9

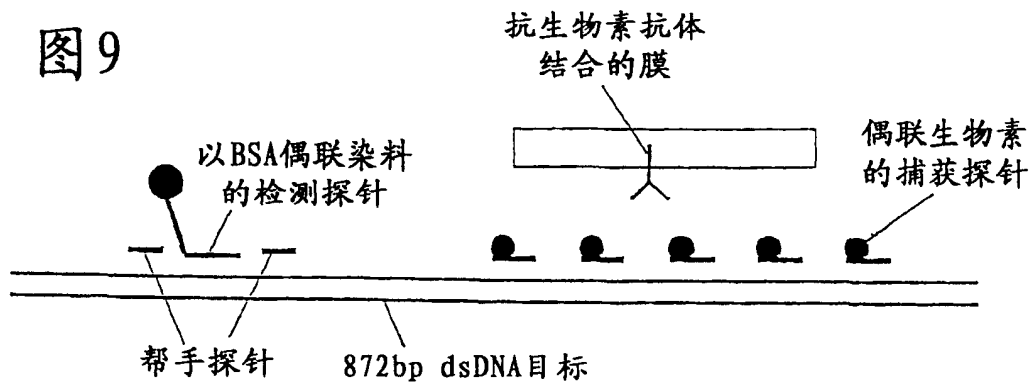


图10

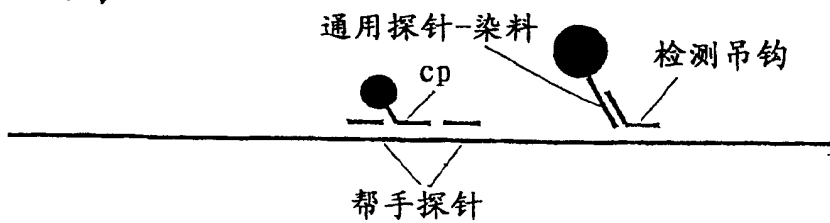


图11

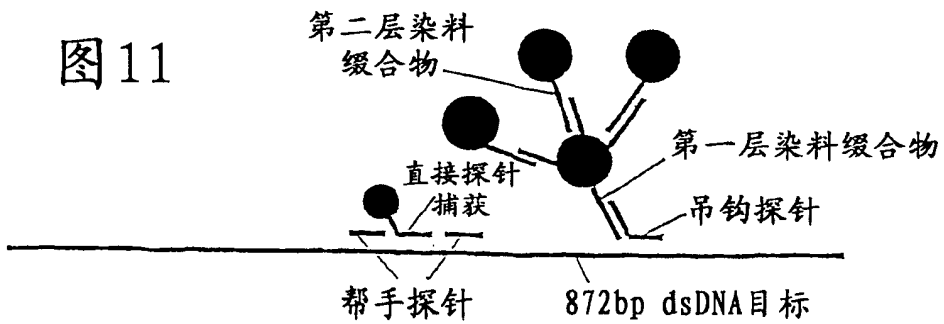


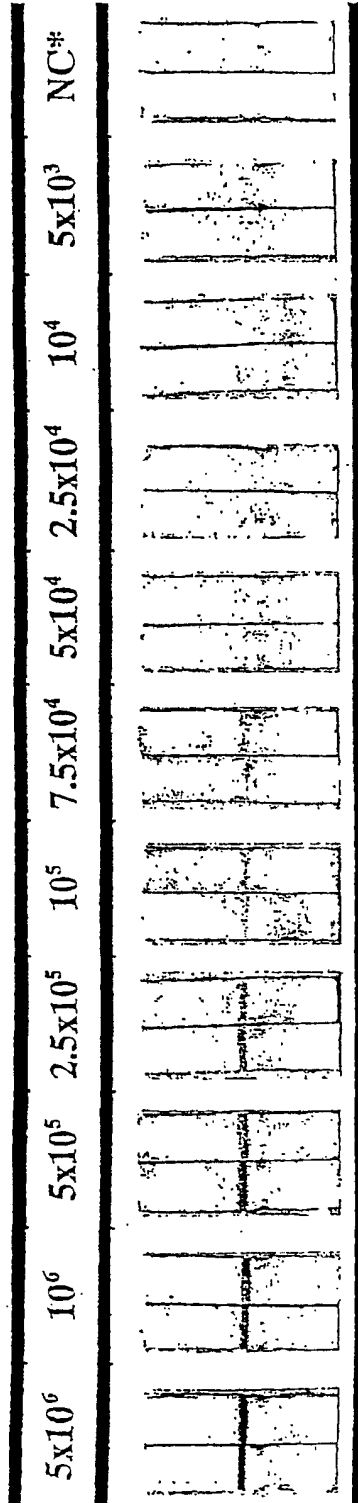
图12

<u>检测探针</u> <u>名称</u>	<u>结构</u>
$dp-B^{5'}$	$ \begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ B & \text{-----} & \end{array} $
$dp-(N)_x-B^{5'}$	$ \begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ B-(N)_x & \text{-----} & \end{array} $
$dp-(S)_y-B^{5'}$	$ \begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ B-(S)_y & \text{-----} & \end{array} $
$3'B-dp$	$ \begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ \text{-----} & & B- \end{array} $
$dp-(dS)_6-B^{5'}$	$ \begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ B-(dS)_6 & \text{-----} & \end{array} $
$dp-(SC_3)_6-B^{5'}$	$ \begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ B-(SC_3)_6 & \text{-----} & \end{array} $
$dp-SN_3SN_3S-B^{5'}$	$ \begin{array}{ccc} & & 5' & & 3' \\ B-S-N-N-N-S-N-N-N-S & \text{-----} & \end{array} $

---- 代表检测探针的核酸
 B 代表偶联连接子的生物素
 X 代表核苷酸数目
 Y 代表六乙二醇磷酸单体的数目

一步核酸检棒分析检测砂眼衣原体

数字指示砂眼衣原体原粒体的数量



*NC: 负对照

图13

图14
一步核酸检棒分析检测砂眼衣原体

No EB*	5x10 ⁶	10 ⁶	5x10 ⁵	2.5x10 ⁵	10 ⁵	7.5x10 ⁴	5x10 ⁴	2.5x10 ⁴	10 ⁴	5x10 ³	NC**
首次信号的时间	2.20'	2.50'	3.30'	4.30'	5.35'	8.10'	8.45'	14.05'	24'	-	-
10分钟时的信号	4	3	2.5	2	1.5	1	1	0.5	0	0	0
20分钟时的信号	5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.25	0	0
30分钟时的信号	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0	0
1小时的信号	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.0	0.5	0	0

*砂眼衣原体的原粒体数量 (EB)

**NC: 负对照