



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101849021 A

(43) 申请公布日 2010. 09. 29

(21) 申请号 200880103613. 0

(22) 申请日 2008. 06. 16

(30) 优先权数据

60/944, 056 2007. 06. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 02. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2008/003959 2008. 06. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02009/109809 EN 2009. 09. 11

(71) 申请人 浦项工科大学校产学协力团

地址 韩国庆尚北道

申请人 POSCO 公司

(72) 发明人 朴准远 洪凤振 权圣弘

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 吴贵明 张英

(51) Int. Cl.

G12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/48 (2006. 01)

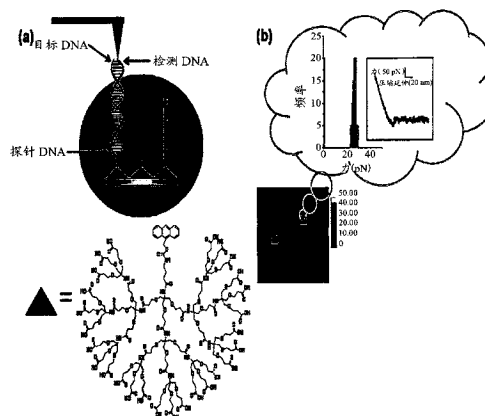
权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 11 页

(54) 发明名称

作为用于生物芯片的分析工具的原子力显微镜

(57) 摘要

本申请披露了一种用于检测在流体介质中目标配体存在的方法,所述方法包括步骤:(i)使流体介质与在其表面上包含树枝状分子阵列的固体底物接触,其中每个树枝状分子包括中心原子、可选地通过连接物连接到中心原子的探针、和连接到中心原子并具有多个连接到固体支持物表面末端的基部;和(ii)通过测量结合配体和连接到原子力显微镜(‘AFM’)尖端的检测分子之间的结合力来确定探针-目标配体复合物的存在,该检测分子对配体具有亲和性,其中通过AFM测量的探针-目标配体复合物和检测分子之间的力增加表明存在探针-目标配体复合物。



1. 一种用于检测流体介质中存在目标配体的方法,包含:
 - (i) 使所述流体介质与固体底物接触,其中所述固体底物包含:
其表面上的树枝状分子阵列,其中每个所述树枝状分子包含:
中心原子;
可选地通过连接物连接到所述中心原子的探针;和
连接到所述中心原子并具有多个连接到固体支持物表面的末端的基部;和
 - (ii) 通过测量结合配体和对所述配体具有亲和性的检测分子之间的结合力来确定探针-目标配体复合物的存在,其中所述检测分子连接到原子力显微镜(“AFM”)尖端的表面,其中所述探针-目标配体复合物和所述检测分子之间的力增加表明存在探针-目标配体复合物。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述探针-目标配体复合物是寡核苷酸-互补的核酸复合物。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中,在至少为约1aM的低浓度的所述目标配体存在下检测所述探针-目标配体复合物。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述目标配体的浓度为约1aM至约1000aM。
5. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述方法能够在寡核苷酸-互补的核酸复合物中分辨出单核苷酸多态性。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述检测分子是检测核酸。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述检测分子由与RNA的poly-dA片段充分互补的poly-dT寡聚物构成。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述固体底物是无孔的固体支持物。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述固体底物是平面无孔固体支持物。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述固体底物是生物芯片。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述原子力显微镜(“AFM”)的尖端涂覆有树枝状分子。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述目标配体没有标记。
13. 根据权利要求1所述的方法,包含进一步地交联所述探针-配体复合物。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述探针-配体复合物共价连接到亲和分子上,并且检测分子特异性地结合到亲和分子上。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中,所述亲和分子是抗原或抗体。
16. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述检测分子是选择性结合于双链DNA的蛋白。
17. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述探针-配体复合物与所述检测分子形成三螺旋结构。
18. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述检测分子是DNA插入试剂。
19. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述检测分子是选择性地结合于双链DNA错配片段的蛋白。
20. 一种检测目标核酸的系统,包含(i)用探针分子固定的生物芯片,和(ii)包含其上连接有检测分子的尖端的原子力显微镜(AFM)。
21. 根据权利要求20所述的系统,其中,所述生物芯片涂覆有树枝状分子,所述树枝状

分子上连接有探针分子。

22. 根据权利要求 21 所述的系统,其中,所述 AFM 的尖端涂覆有树枝状分子,所述树枝状分子上固定有检测分子。

作为用于生物芯片的分析工具的原子力显微镜

[0001] 相关申请的参考

[0002] 本申请要求于 2007 年 6 月 14 日提交的美国临时专利申请第 60/944,056 号的优先权,其全部内容以引用方式结合于本文作为参考。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及原子力显微镜 (AFM),以及使用其来测量芯片上的生物分子之间的分子间相互作用的装置和测量方法。本发明涉及涂覆有树枝状分子的 Bio-AFM 尖端用于测量芯片上的生物分子之间的相互作用力的应用。

背景技术

[0004] 生物分析科学和生物工程学的最新进展导致 DNA 芯片^{1,2}、小型化生物传感器^{3,4}、和微流体设备 (例如微电子机械系统或 bioMEMS)⁵⁻⁷ 的发展。尤其是, DNA 微阵列技术是一种越来越重要的工具,因为其明显加速了基因分析。它已经用于监测基因表达、突变检测、单核苷酸多态性分析、和许多其他的应用。⁸ 然而,传统的微阵列在灵活性、速度、成本、和灵敏度上有局限性。另外,大多数生化分析需要对标记进行二次检测,因为生物分子缺乏对于直接高灵敏度检测有用的本质特征。生物学诊断中最常使用的标记是有机荧光染料。但是有机染料仍具有局限性,例如光漂白 (photobleaching) 和离散的激发波长,这在很多应用领域排除了它们的使用。⁹

[0005] 越来越多的研究表明可以利用超灵敏力的测量方法研究单个分子受体 / 配体对的去结合动力学并探测单个生物聚合分子的机械性能。¹⁰⁻¹³ 这样的研究在包括细胞粘连、蛋白去折叠、和 DNA/RNA 寡核苷酸双螺旋的解离的生物学过程范围内力的作用方面提供了许多观点。¹⁴⁻¹⁶ 然而,许多这些发展目前受阻于可以使用的生物分子表面的连接方法,即产生具有高度限定的表面功能和 / 或均一性的表面和装置并不是不重要的。我们报道了一种基于生成树枝状分子阵列来解决这些问题的新方法。通过用互补 DNA 寡核苷酸官能化的树枝状分子表面之间力的测量,我们观察到通过这种方法修饰的表面的许多独特的性质。¹⁷

[0006] 从核中直接伸展出重复单元的圆锥形分子的树枝状分子是具有均一的大小和分子量以及明确限定的结构的高度分枝的聚合物。因为可以精确控制它们的大小并利用它们的反应末端用于在表面上有效地自组装,它们被认为是可用于在分子级别上产生表面特征精细调控的新材料的理想结构单元 (building block)。¹⁸ 发现由圆锥形提供的中间空间大大改善了 DNA 微阵列的效能,其中为每个表面固定的捕获探针 DNA 提供了广大的空间以用于与进入的目标 DNA 结合,导致类似于在溶液中 (100 : 1) 观察到的增强的动力学和选择性。而且,观测到的高杂交产量表明在杂交期间邻近的分子之间具有足够空间的 DNA 探针受到邻近的探针或目标的极小的空间位阻。

[0007] 在本申请中,申请人描述了一种使用基于力学的以研究基因分型和基因表达的原子力显微镜的创造性的方法,它简单且不用标记并具有高灵敏度。在这项研究中,我们使用基于力学的 AFM 通过测量与树枝状分子修饰的表面上的探针 DNA 杂交的目标 DNA 与 AFM-尖

端上的检测 DNA 之间的力检查了基因分型和基因表达谱 (profiling)。通过使树枝状分子修饰的表面和 AFM 尖端结合的这种检测方法, 它的灵敏度优于需要荧光标记方法的传统 DNA 微阵列。

发明内容

[0008] 一方面, 本发明涉及作为用于不标记过程的基因分型和基因表达谱的分析工具的基于力学的原子力显微镜。本发明还涉及用于固定 DNA 的纳米级工程化的树枝状分子表面, 它提供了与杂交 / 结合事件相关的良好可测量的力。该创造性的方法不用标记且具有 $\leq 10^3$ 可检测的目标 DNA 灵敏度, 达到好于用高密度微阵列系统可实现的 10^5 数量级的水平, 并接近用于基因分型研究时用定量 PCR (qPCR) 通常观察到的 10^3 – 10^4 的水平。BioAFM 检测的灵敏度比用于基因表达谱的传统微阵列高 10^5 倍。树枝状分子修饰的表面的横向空间可以以高度可预测的方式衡量。基于力学的 AFM 很容易适用于其他生物芯片系统。

[0009] 另一方面, 本发明涉及一种用于检测流体介质中目标配体存在的方法, 包括: (i) 使流体介质与固体底物接触, 其中该固体底物包含: 在其表面上的树枝状分子阵列, 其中每个树枝状分子包含: 中心原子; 可选地通过连接物连接于中心原子的探针; 和连接于中心原子并具有许多连接固体支持物表面末端的基部; 和 (ii) 通过测量结合配体和对配体具有亲和性的检测分子之间的结合力确定探针 – 目标配体复合物的存在, 其中该检测分子连接到原子力显微镜 (AFM) 尖端的表面, 其中测量探针 – 目标配体复合物和检测分子之间力的增加表明存在探针 – 目标配体复合物。

[0010] 在一种优选的实施方式中, 该探针 – 目标配体复合物是寡核苷酸 – 互补的核酸复合物。在低浓度的该目标配体存在下, 即在至少约 1aM, 或约 1aM 至约 1000aM 的浓度下, 可以检测出该探针 – 目标配体复合物。上述方法能够在寡核苷酸 – 互补的核酸复合物中分辨出单个核苷酸多态性。

[0011] 检测分子可以是检测核酸。该检测分子可以由与 RNA 的 poly-dA 部分充分互补的 poly-dT 寡聚物构成。该固体底物可以是无孔的固体支持物。它可以是平面无孔固体支持物, 或平面无孔固体支持物, 例如但不限于二氧化硅。该原子力显微镜 (AFM) 的尖端可以用树枝状分子涂覆。在另一种实施方式中, 该目标配体可以不被标记。本方法可以进一步包括使该探针 – 配体复合物发生交联。或者, 该探针 – 配体复合物可以共价连接到亲和分子上, 且检测分子特异性地结合到亲和分子上。该亲和分子可以是抗原或抗体。该检测分子可以是选择性地结合于双链 DNA 的蛋白。或者, 该探针 – 配体复合物可以与检测分子形成三螺旋结构。该检测分子可以是 DNA 插入试剂。该检测分子也可以是选择性地连接于双链 DNA 错配片段的蛋白。并且, 可以在芯片上展示该阵列。

[0012] 本发明也涉及用于检测目标核酸的系统, 包含, (i) 用探针分子固定的芯片, 和 (ii) 包含其上连接有检测分子的尖端的原子力显微镜 (“AFM”)。该芯片可以用其上连接有探针分子的树枝状分子涂覆。而且, AFM 的尖端也可以涂覆有其上固定有检测分子的树枝状分子。

[0013] 从本发明下文的描述、所附附图和所附权利要求将更全面地理解本发明的这些和其他目的。

附图说明

[0014] 从下面给出的详细描述和附图中将能够更全面地理解本发明,给出它们仅用于说明的目的,而不是不限制本发明,并且其中;

[0015] 图 1a- 图 1b 示出了 (a) 用于在本研究中的测量而采用的试验方案图。目标 DNA 与在树枝状分子修饰的表面上固定的探针 DNA 杂交后,通过使 AFM 尖端接触或未接触地连接检测 DNA 和底物来记录力学测量。(b) 对互补的 15-mer 序列记录的粘附力的典型测量(插入:收缩(retract)轨迹(蓝色曲线))和分布。

[0016] 图 2a- 图 2c 示出了 (a) 成熟的真核 mRNA 的结构。完全处理过的 mRNA 包括 5'帽子、5'UTR、编码区、3'UTR、和 poly(A) 尾。(b) 64 种在树枝状分子表面上固定的探针 DNA 和由通用参照全 RNA(universal human reference total RNA, UHRR) 制备的 cDNA 之间杂交后的 DNA 微阵列试验的荧光图象。白色箭头指示第 62 号 DNA 探针。(c) 用 0.62fg/ μ l UHRR 杂交后的力映射图像。

[0017] 图 3a- 图 3b 示出了 DNA 芯片检测。(a) 使用荧光标记的 DNA 芯片检测。(b) 使用 Bio-AFM 的 DNA 芯片检测。

[0018] 图 4a- 图 4b 示出了使用荧光标记的 DNA 芯片检测。(a) 1pM 目标 DNA。(b) 100fM 目标 DNA。

[0019] 图 5a- 图 5b 示出了目标分子和使用 Bio-AFM 的检测 DNA 之间的力图谱。(a) 1pM 目标 DNA。(b) 10fM 目标 DNA。(c) 100aM 目标 DNA。(d) 1aM 目标 DNA。

[0020] 图 6 示出了目标分子和检测 DNA 之间的力-距离测量。

[0021] 图 7 示出了目标 DNA 浓度和检测灵敏度之间的线性关系。

[0022] 图 8 示出了非互补的目标分子和使用 Bio-AFM 的检测 DNA 之间的力的分布。

[0023] 图 9 示出了交联探针和目标 DNA 的 DNA 芯片检测。

[0024] 图 10 示出了链霉亲和素-生物素结合的 DNA 芯片检测。

[0025] 图 11 示出了抗原-抗体结合的 DNA 芯片检测。

[0026] 图 12 示出了蛋白-DNA 结合的 DNA 芯片检测。

[0027] 图 13 示出了三螺旋 DNA 结构的 DNA 芯片检测。

[0028] 图 14 示出了插入 DNA 的 DNA 芯片检测。

[0029] 图 15 示出了使用 MutS 蛋白的单碱基突变的 DNA 芯片检测。

[0030] 图 16 示出了在树枝状分子表面上在 DNA 之间使用力学测量的 DNA 芯片检测。

[0031] 图 17 示出了使用 Bio-AFM 的基因表达测定。

具体实施方式

[0032] 在本申请中,使用的“一个”和“一种”是指单个和多个对象。

[0033] 如本文中使用的,“适体”是指单链的、部分单链的、部分双链的或双链的核苷酸序列,有利地是可复制的核苷酸序列,能够通过除了 Watson-Crick 碱基配对或三螺旋结构之外的机制而特异性地识别所选择的非寡核苷酸分子或分子的基团。

[0034] 如本文中使用的,“亲和分子”是指连接到探针/目标配体复合物上的分子。该亲和分子可以结合到探针、目标配体或二者上,随后通过检测分子来检测用以检测探针/目标配体复合物的存在。该亲和分子可以是任何类型的生物分子。这样的亲和分子的一个实

例是抗原,其结合到该复合物上,通过附于原子力显微镜尖端表面上的检测抗体来检测。另一个实例包括偶联于链霉亲和素的探针/目标配体复合物。用连接到原子力显微镜的尖端表面的“检测生物素”检测链霉亲和素的存在,它间接地表明存在探针/配体复合物。

[0035] 如本文中使用的,“阵列”和“文库”在本文中可以互换使用,并且是指分子、材料、表面、结构形状、表面特征或,可选地且没有限制的,各种化学个体(chemical entity)、单体、聚合物、结构、前体、产物、修饰物、衍生物、底质、构象、形状或特征的随机或非随机混合、收集或分类(assortment)。“阵列”或“固体支持物上的阵列区域”是指优选地离散区域的线性或二维阵列,它们各自具有有限面积,在固体支持物表面上形成。

[0036] 如本文中使用的,“阵列的文库”是指置于固体底物上的在微孔板(多孔板)盘或板中的二维阵列中的单独的探针分子。在板上标记板的特征和克隆位置(行和列)。克隆的阵列文库可以用于许多应用领域,包括筛选特定基因或感兴趣的基因组区域以及用于物理图谱、基因分型、SNP 识别、基因表达谱等。

[0037] 如本文中使用的,当用于涉及合成的聚合物或多价同聚-或杂聚杂交结构时,在这种情况下,“双官能”、“三官能”和“多官能”是指二价、三价或多价,或包含两个、三个、或多个限定序列片段或连接位点的特异性识别元件。

[0038] 如本文中使用的,“生物芯片”或“芯片”是安置于固体底物上并允许同时进行许多测试以实现更高的通量和速度的微型化的试验位点集合(微阵列或纳米阵列)。生物芯片用于将传统的较大的传感工具装入越来越小的空间。这些芯片本质上是进行成百或上千次同时的生化反应的微型化的实验室。生物芯片使研究人员能够快速筛选大量的生物分析物以用于从疾病诊断到检测生物恐怖试剂的各种目的。实际的传感组件(或“芯片”)恰恰是一件完整的分析系统。必须进行转换以将实际感受到的事件(DNA 结合、氧化/还原等)翻译成计算机可识别的格式(力的测量、电压、光强度、质量等),然后使之能够进行另外的分析和处理从而产生最终的人类可阅读的输出。一般地用传统地用于制作集成电路的显微光刻蚀技术来生产所述芯片。

[0039] 如本文中使用的,“仿生的”是指模仿生物分子、分子的基团、结构的分子、分子的基团、多分子结构或方法。

[0040] 如本文中使用的,涉及固定在底物上的探针文库使用的“cDNA 文库”指由可以对目标配体具有特异性的探针分子构成文库。

[0041] 如本文中使用的,“树状分子(dendritic molecule)”是通过向核心或从核心向外顺序地或相继地加入分支层而形成的规则的树状分支的分子。

[0042] 术语“树枝状分子(dendron)”是指具有规则的树状分支的,通过向核心或从核心向外顺序地或相继地加入分支层生成的聚合物。术语树状聚合物包括“树状大分子(dendrimer)”,它的特征是具有核、至少一个内部分支的层、和表面分支层(参见例如 Petar et al.,第 641-645 页 In Chem. In Britain, (1994 年 8 月))。“树枝状分子”是一种具有从焦点或中心原子发出分支的树状大分子,它连接到核或能够连接于核,或者直接形成或通过连接部分生成树状大分子。许多树状大分子包含连接到共同的核的两种或多种树枝状分子。

[0043] 树枝状分子包括但不限于对称和不对称分支树状大分子、级联分子、树状醇(arborol)等。在一些实施方式中,分支臂是等长的。然而,也可以考虑使用不对称树状大

分子。

[0044] 此外,应当认为即使没有通过规则的顺序加入分支层而形成例如超支化多元醇的超支化聚合物,也可以形成等价于分支模式在一定程度上接近于树状大分子的规律性的树状聚合物。

[0045] 如本文中使用的,“检测分子”例如“检测 DNA”、“检测配体”、“检测寡聚物”是指用于确定探针 / 目标复合物中结合力的连接到 AFM 尖端的分子。

[0046] 如本文中使用的,当用于描述大分子或树状结构时,“超分支的”或“分支的”是指具有能够共价地或离子地结合于底物的多个末端的多种聚合物。在一种实施方式中,该包含分支结构或超分支结构的大分子是“预先制备的”并且然后连接于底物。因此,本发明的大分子排除了美国专利第 5,624,711 号中披露的聚合物交联方法 (Sundberg et al.)。

[0047] 如本文中使用的,“固定的”是指不溶的或包含,连接到或可操作地与不溶的、部分不溶的、胶体的、颗粒的、分散的、悬浮的和 / 或脱水的物质或包含或连接到固体支持物的分子或固相。

[0048] 如本文中使用的,“连接分子”和“连接物”用来指将大小可控的大分子 (例如分支 / 线性聚合物) 的分支部分连接于保护基团或配体的分子。连接物可以包括,例如但不限于间隔分子,例如所选择的分子能够将配体连接到树枝状分子。

[0049] 如本文中使用的,本文中使用的检测目标配体所需要的目标配体的“低浓度”是指本发明的目标配体检测方法的灵敏度高。该目标配体可检测量的浓度的下限可以包括 1-10000aM 浓度,1-1000aM、1-100aM、或 1-10aM。

[0050] 如本文中使用的,“低密度”是指约 0.005-约 0.5 个探针 /nm²,优选地为约 0.01-约 0.2 个探针 /nm²,更优选地为约 0.01-约 0.1 个探针 /nm²,且最优选地为约 0.05 个探针 /nm²。

[0051] 如本文中使用的,“微阵列”是指具有离散区域的密度为至少约 100 个 /cm²,且优选地为至少约 1000 个 /cm² 的区域的阵列。微阵列中的区域具有典型的尺寸,例如直径在约 10-250 μm 之间的范围内,并且可以与阵列中的其他区域以大约同样的距离分开。该微阵列可以包含选择的一系列探针分子,它可以用于检测一系列细胞中转录表达或表达的基因谱或检测基因中的突变。

[0052] 如本文中使用的,“纳米阵列”指具有离散区域的密度为至少约 1000 个 /mm² 且优选地至少约 100000 个 /mm² 的阵列区域。纳米阵列中的区域具有典型的尺寸,例如直径为约 10-1000nm 之间的范围内,并且可以与阵列中其他区域以大约相同的距离分隔。所述纳米阵列可以包含选择的一系列探针分子,它们可以用于检测一系列细胞中的转录表达或表达基因的谱或检测基因中的突变。

[0053] 如本文中使用的,“分子模拟物 (mimic)”和“模仿物 (mimetic)”是设计、选择、制备、改造或工程化的与另一个分子或分子基团具有相同的结构或功能或相似的结构或功能的天然的或合成的核苷酸或非核苷酸分子或分子基团,例如天然存在的、生物的或可选择的分子。分子模拟物包括能够对天然的、合成的、可选择的或生物学的分子以取代、替代、升级、改进、结构模拟或功能模拟起作用的分子和多分子结构。

[0054] 如本文中使用的,“核苷酸类似物 (analog)”是指可以用于替代天然存在的、在核酸合成和加工中,优选酶加工以及化学合成和加工中,尤其是能够碱基配对的经修饰的

核苷酸和可选地不包含腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶或小碱基的碱基的分子。该术语包括但不限于修饰的嘌呤和嘧啶、小碱基、可转化的核苷、嘌呤和嘧啶的结构类似物、标记的、衍生的和修饰的核苷和核苷酸、结合的核苷和核苷酸、序列修饰因子、末端修饰因子、间隔修饰因子 (spacer modifier)、和主链修饰的核苷酸,包括但不限于核糖修饰的核苷酸、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、亚磷酸酯、甲基磷酸酯、甲基亚磷酸酯、氨基磷酸甲酯、5'- β -氰乙基亚磷酸酯、亚甲基磷酸酯、二硫代磷酸酯、肽核酸、非手性和中性核苷酸间的连接 (linkage) 以及非核苷酸桥例如聚乙二醇、芳基聚酰胺和脂质。

[0055] 如本文中使用的,“聚合物”或“分支的/线性的聚合物”是指在分子的一端具有分支结构而在另一端具有线性部分的分子,以使得该分支部分结合于底物而线性部分结合于配体、探针或保护基上。

[0056] 如本文中使用的,本文中可以互换使用的“多肽”、“肽”和“蛋白”是指氨基酸残基的聚合物。用于其中一个或多个氨基酸残基的该术语是相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物以及用于自然产生的氨基酸聚合物。该术语也可以包括以常规的肽键连接的氨基酸来制备多肽的变体。

[0057] 如本文中使用的,“保护基团”是指连接到分子上的反应基团(例如羟基或胺)上的基团。在一步或多步化学反应中,选择保护基团以防止特定基团的反应。通常选择特定的保护基团从而以后将其除去以恢复反应活性基团且不改变分子中存在的其他反应基团。保护基团的选择是待保护的特定基团和它将要暴露于其中的化合物的函数。保护基团的选择是本领域技术人员人员已知的。例如参见, Greene et al., Protective Groups in Organic Synthesis, 第2版, John Wiley & Sons, Inc. Somerset, N. J. (1991), 其全文结合于此作为参考。

[0058] 如本文中使用的,“保护的胺”是指已经与氨基保护基反应的胺。在线性端部官能团是氨基基团的情况下,在分支末端连接到固体支持物的过程中,氨基保护基防止酰胺官能团发生反应。氨基保护基团可以在以后除去从而恢复氨基基团而不改变分子中存在的其他反应基团。例如,环外的胺可以与二甲基甲酰胺二乙基缩醛反应形成二甲基氨基亚甲基官能团。氨基保护基团一般包括氨基甲酸酯、苄基基团、亚胺酯(imidate)、以及本领域技术人员人员已知的其他基团。优选的氨基保护基团包括但不限于对-硝基苯基乙氧羰基、或二甲基氨基亚甲基。

[0059] 如本文中使用的,“规则的间隔”是指大小可控的大分子的顶端之间的间隔,距离是约1nm至约100nm从而使得该空间对目标特异性配体与目标之间的相互作用基本上没有空间位阻。因此底物上的该层大分子不太密从而可以发生特异性的分子相互作用。

[0060] 如本文中使用的,“固体支持物”是指含有固定基质的组成例如但不限于不溶性的物质、固相、表面、底物、层、覆盖物、纺织或无纺纤维、基质、晶体、膜、不溶的聚合物、塑料、玻璃、生物的或生物相容的或可生物腐蚀的或可生物降解的聚合物或基质、微粒或纳米颗粒。固体支持物包括例如但不限于单层、双层、商购的膜、树脂、基质、纤维、分离介质、层析支持物、聚合物、塑料、玻璃、云母、金、珠子、微球、纳米球、硅、砷化镓、有机和无机金属、半导体、绝缘体、微结构和纳米结构。微结构和纳米结构可以包括但不限于微型化的、纳米级的和超分子的探针、尖端、杆、钉、塞、棒、套筒、线、丝和管。

[0061] 如本文中使用的,“特异性结合”是指配体与其特异性的结合伴侣之间或所限定的

序列片段与所选择的分子或所选择的核酸序列之间的吸引达到可测量的和可重复的程度。吸引程度不需要最大化以达到最优。弱吸引、中等的吸引或强吸引对于不同的应用可以是适宜的。当合成所限定的序列片段、合成的适体、合成的杂聚物、核苷酸配体、核苷酸受体、形状识别元件、和特异性吸引的表面使用时,这些相互作用中发生的特异性结合是本领域技术人员已知的。术语“特异性结合”可以包括结构形状和表面特征的特异性识别。然而,特异性结合明确地是指与任何特异结合伴侣共有化学特性(例如一个或多个同样的化学基团)或分子识别特性(例如分子结合特异性)的可以被第三个分子(例如竞争分子)竞争性抑制的两个分子之间(例如特异性结合对)特异性的、可饱和的、非共价的相互作用。竞争分子可以是,例如交叉反应物或抗体或其抗原、配体或其受体、或适体或其目标物的类似物。例如,抗体和其抗原之间的特异性结合可以被交叉反应的抗体或被交叉反应的抗原竞争性抑制。术语“特异性结合”可以方便地用于近似或简称一子系列包括特异性结合和结构形状识别的特异性识别。

[0062] 如本文中使用的,当用于涉及物质、结构、表面或材料时,“底物”是指含有此前不知道的包括特异性结合、杂交或催化识别位点或许多不同的识别位点或超过包括表面,结构或材料的不同分子物种数量的许多不同的识别位点的含有非生物的、合成的、无生命的、平面的、球形的或平的表面的组成。该底物可以包括例如但不限于半导体、合成(有机)金属、合成半导体、绝缘体和掺杂剂;金属、合金、元素、化合物、和矿物;合成的、切割的、刻蚀的、光刻的、印刷的、机械加工的和微加工的载片、器件、结构和表面;工业化的聚合物、塑料、膜;硅、硅酸盐、玻璃、金属和陶瓷;木材、纸张、硬纸板、棉花、羊毛、布、纺织或无纺布纤维、材料和织物;未被固定探针分子通过分支/线性聚合物修饰的纳米结构和微米结构。

[0063] 如本文中使用的,在阵列系统上下文中的“目标”或“靶向”是指通过利用探针来检测其同一性或丰度的游离核酸转录本或其 cDNA,并且具体指为它制备探针分子的单独的基因。在上下文的某些部分中,“靶向”是指探针分子连接或引起连接到内源表达的转录本或其 cDNA 上。可以不受任何基因限制地选择靶核苷酸序列。

[0064] 如本文中使用的,关于目标文库使用的“目标 cDNA 文库”是指存在于细胞或有机体中的所有 mRNA 分子,它们全部都用反转录酶转化为 cDNA 分子的集合,从而可以对于感兴趣的特异性 cDNA(以及由此 mRNA)而探查该文库。

[0065] 如本文中使用的,“目标-探针结合”是指两个或多个分子,至少一个是所选择的分子,以特异性的方式彼此连接。一般地,第一个选择的分子可以例如通过干涉间隔臂、基团、分子、桥、载体、或特异性识别伴侣间接地结合到第二个分子上,或例如不需要干涉间隔臂、基团、分子、桥、载体或特异性识别伴侣而直接地结合到第二个分子上。所选择的分子可以通过杂交特异性地结合于核苷酸。用于连接核苷酸和非核苷酸分子的其他非共价的方式包括,例如离子键、疏水相互作用、配体-核苷酸结合、螯合剂/金属离子对或特异性结合对例如亲和素/生物素、链霉亲和素/生物素、抗荧光素/荧光素、抗 2,4-二硝基苯酚(DNP)/DNP、抗过氧化物酶/过氧化物酶、抗地高辛/地高辛、或更一般地为受体/配体。举例来说,受体分子例如是碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、荧光素酶、若丹明、荧光素、藻红蛋白、鲁米诺、异氨基苯二酰肼、吖啶酯或荧光微球而连接到所选择的分子或所选择的核酸序列,可以例如为了标记的目的利用亲和素/生物素、链霉亲和素/生物素、抗荧光素/荧光素、抗过氧化物酶/过氧化物酶、抗 DNP/DNP、抗地高辛/地高辛、或受体/配

体（例如除了直接连接和共价连接）通过特异性的结合对的方法将它们连接到选择的分子或选择的核酸序列。

[0066] 除非上下文中另外指出，术语“配体”是指能够与探针选择性结合的任何物质。配体可以是抗原、抗体、寡核苷酸、寡肽（包括蛋白、激素等）、酶、底物、药物、药物受体、细胞表面、受体激动剂、部分激动剂、混合激动剂、拮抗剂、诱导应答或刺激分子、药品、激素、外激素、递质、内分泌素、生长因子、细胞因子、辅基、辅酶、辅助因子、底物、前体、维生素、毒素、调控因子、抗原、半抗原、碳水化合物、分子模拟物、结构分子、效应分子、可选择的分子、生物素、地高辛、交联反应物、类似物、这些分子的竞争分子或衍生物以及可以特异性地与所选择的目标物结合的从文库选择的非寡核苷酸分子和通过将这些分子中任何一种连接到第二个分子所形成的轭合物 (conjugate)，以及与相应的探针选择性结合的任何其他分子。

[0067] 除非上下文中另外需要，术语“探针”是指结合于底物表面并且能够与相应的配体选择性结合的任何物质。探针可以是抗原、抗体、寡核苷酸、寡肽（包括蛋白、激素等）、酶、底物、药物、药物受体、细胞表面、以及与相应的配体选择性结合的任何其他分子。

[0068] 应当理解，术语“配体”和“探针”不涉及任何具体的物质或大小关系。这些术语仅仅是操作上的术语以用于说明配体和相应的探针之间的选择性结合，其中结合于底物表面的部分被称作探针，而选择性连接到探针上的任何物质被称作配体。因此，如果抗体结合于底物表面，则抗体是探针而对应的抗原是配体。然而，如果抗原结合于底物表面，则抗原探针而对应的抗体是配体。

[0069] 底物表面上探针的浓度是控制固定的探针和它们对应的配体之间相互作用的一个关键因素。尽管有许多优点，高密度固定的探针经常具有与自然环境中存在的同样的探针本质上不同的化学和生物学特性。而且，高密度的非惰性探针可以促进非特异性探针-配体相互作用。需要改变表面结合的探针的密度以缓解表面物质的空间位阻，并且同时还保持用于例如生物传感器和生物芯片的足够信号强度、特异性和表观结合能力。

[0070] 常规地，通常通过惰性吸收物和官能化物质共沉淀来调整薄膜的官能团密度。然而，很难防止发生相分离成具有不同官能团的微米或纳米区域 (domain)，尤其是当存在基团间的强相互作用时。

[0071] 本发明的组成和方法提供显著减少相分离的探针密度。本发明的一些实施方式提供了表面上包含许多圆锥形树状大分子的底物。在这些实施方式中，在一些情况下，每个树状大分子的末端能够结合于底物表面并且每个树状大分子的顶端对固定的探针具有反应活性。

[0072] 使用用于基因分型的 Bio-FAM 检测目标 DNA

[0073] DNA 微阵列是一种用于大量基因的高通量，多路分析的革命性工具。当有时仅可得到少量的遗传物质时，基于微阵列的分析开发出高灵敏度检测方法是很重要的。一般地，通过扩增方法增强信号输出，这可以归类为两类，即目标扩增和信号放大。¹⁹ 最近综述了在基因表达分析中目标扩增的优点和缺点。²⁰ 尽管具有广泛的可应用性，但通过 PCR 的目标扩增仍然具有缺点，例如通过扩增子携带的材料的污染、用于多路的能力有限、扩增效率的变化等。由小拷贝样品的 mRNA 的扩增还具有原始 (pristine) RNA 比和增加的噪声比的失真。

[0074] 另外,因为生物分子缺乏对于直接高灵敏度检测有用的本质特征,大多数生化检测需要对标记进行二次检测。生物学诊断中最常使用的标记物是有机荧光染料。但有机染料也会受到例如光漂白和离散激发波长的限制,从而在许多应用中排除了它们的使用。

[0075] 在前面的研究中,我们展示了包含互补的 DNA 寡核苷酸阵列的纳米尺度工程化树枝状分子表面是如何提供与杂交事件相关的可测量的吸引力和粘附力。重要的是,我们已经能够使用这个系统来检测可分辨出具有 10 个碱基对差异的 DNA 双螺旋之间的吸引力和粘附力,并已经展示了这种测量方法对单个碱基对或双碱基对错配的检测也是敏感的。¹⁷

[0076] 如下实施例 1-4 中所述,当 1aM 目标 DNA (35 寡聚物) 与树枝状分子修饰表面上的探针 DNA (15 寡聚物) 杂交时,测量目标 DNA 和检测 DNA 之间的特异性力(通过柱状图曲线中高斯拟合(Gaussian fitting)为 26 ± 0.6 pN) 的概率是 80%,并且在 20% 的力-距离曲线处则没有观察到力(图 1(b))。本发明的方法具有 $\leq 10^3$ 可检测目标分子的灵敏度而无需进行标记,优于使用高密度微阵列系统可以实现的 10^5 数量的水平,并接近一般地用定量 PCR(qPCR) 观察到的 10^3 - 10^4 水平。

[0077] 因此,由于树枝状分子修饰的表面甚至可以用作检测单碱基突变的平台,本发明的 AFM 系统不仅可以应用于基因分型而且可以用于检测目标 DNA 中单核苷酸多态性(SNP)。对于单碱基错配的目标 DNA,结合于表面上的探针 DNA 上的目标 DNA 的数量小于互补的目标 DNA。因此,我们通过测量表面结合的目标 DNA 数量的减少,就可以从单碱基错配的目标 DNA 中分辨互补的目标 DNA。

[0078] 利用用于基因表达谱研究的 Bio-AFM 的 cDNA 目标检测。

[0079] 一般地,表达谱研究报告了在改变的实验条件下具有统计学显著差异的那些基因。DNA 微阵列和 qPCR 都利用了互补核酸序列的优先结合或“碱基配对”,且都经常以系列的方式用于基因表达谱。而高通量 DNA 微阵列缺少 qPCR 的定量精确性,因此通过 qPCR 检测一些基因的基因表达要花费与使用 DNA 微阵列检测全基因组大体相同的时间。因此,完成半定量 DNA 微阵列分析实验以确认候选基因,然后对一些最感兴趣的候选基因完成 qPCR 以证实微阵列的结果通常是有意义的。然而,本发明的 Bio-AFM 可以将 DNA 微阵列和 qPCR 的许多优点组合在一起。

[0080] DNA 在核中被转录成 RNA 后会发​​生多腺苷酸化。多腺苷酸化信号转录后, mRNA 链通过与 RNA 聚合酶相关的核酸内切酶复合物的作用而被切割。酶切位点的特征是在酶切位点附近存在碱基序列 AAUAAA。mRNA 被切割之后,将 50-250 个腺嘌呤残基加入到酶切位点的游离 3' 端。该反应由多腺苷酸聚合酶催化(图 2(a))。如下实施例 1-4 中所见, Bio-AFM 检测的灵敏度比微阵列高 105 倍(图 2(c))。

[0081] 微阵列系统

[0082] 本发明提供了含有探针分子的各种特异性的阵列类型以识别各种动物、植物、和微生物的细胞或组织中差异表达的基因。这些阵列类型包括但不限于如下:发育阵列;癌症阵列;细胞凋亡阵列;肿瘤基因和肿瘤抑制因子阵列;细胞周期基因阵列;细胞因子和细胞因子受体阵列;生长因子和生长因子受体阵列;神经阵列等。

[0083] 本发明的阵列在其他应用领域中可以用于差异基因表达检测。例如,在差异表达分析中该阵列可以是有用的,包括:(a) 疾病状态,例如肿瘤状态的或正常状态;(b) 不同的组织类型;(c) 发育阶段;(d) 对外部或内部刺激的应答;(e) 对治疗的应答等。该阵列也可

以用于药物研发的大规模表达筛选。另外,通过研究活性试剂在基因表达上特定的细胞类型中的作用,可以得到并分析用于药物毒性、致癌性、环境监测等的信息。

[0084] 一方面,本发明包括在至少约 1cm^2 的面积中具有至少 10^3 个不同探针分子的微阵列的表面的底物。每个不同的探针分子 (i) 置于阵列中的分离的限定的位置,并且 (ii) 以约 0.1 飞摩尔 (femtomoles)-100 纳摩尔之间的确定量存在。

[0085] 获得目标 cDNA 的细胞可以选自感兴趣的细胞例如正常细胞或选自各种类型的癌症细胞,例如肝癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、膀胱癌、直肠癌、结肠癌、前列腺癌、甲状腺癌和皮肤癌以及肥胖症、毛囊细胞、自身免疫性疾病、和代谢疾病的细胞。

[0086] 在一种优选的实施方式中,每个微阵列在每至少约 1cm^2 的面积中含有至少 10^3 个不同的探针分子。该微阵列在约 16mm^2 的面积中可以含有至少约 400 个区域,或 2.5×10^3 个区域/ cm^2 。同样,在一种优选的实施方式中,在聚核苷酸的情况下,每个微阵列区域中的探针分子也可以以约 0.1 飞摩尔-100 纳摩尔之间的确定量存在。

[0087] 同样,在一种优选的实施方式中,探针聚核苷酸也具有至少约 10 个核苷酸的长度,它可以通过各种原位合成方法在高密度阵列中形成。

[0088] 树枝状分子

[0089] 本发明的一些方面提供了树枝状分子阵列。一般地,该阵列包含具有至少一个第一表面和多个连接于该固体支持物第一表面的树枝状分子的固体支持物。每个树枝状分子通常包含中心原子;选择性地通过连接物连接到中心原子上的官能团或官能团的保护形式;和连接到中心原子并具有许多连接到固体支持物第一表面的末端的基部。如本文中使用的,术语“中心原子 (central atom)”是指从它发出分支的焦点原子 (focal point atom)。例如,以下的式 I 中表示的中心原子为 Q^1 。当涉及树枝状分子时,术语“基部”是指包含大量的从中心原子发出的分支的部分。在一些实施方式中,该树枝状分子可以被描述为或图示为用锥体的基部与固体支持物表面连接的圆锥形。

[0090] 官能团 (或部分) 是指负责化学反应的分子中的原子或原子团。一般地,官能团包括杂原子 (例如卤素、氧、氮、硫、磷等) 或不饱和键 (例如碳-碳双键、或三键)。典型的官能团包括但不限于酰基卤、醇、酮、醛、碳酸盐 (包括酯)、羧酸酯 (或盐)、羧酸、醚、过氧化氢、过氧化物、卤化物、烯烃、炔烃、酰胺、胺、亚胺、酰亚胺、叠氮化物、偶氮化物、氰酸盐 (或酯)、异氰酸盐 (或酯)、硝酸盐、腈、亚硝酸盐、硝基、亚硝基、磷、磷酸二酯、磷酸、磷酸酯 (或盐)、硫化物、硫醚、砷、磺酸、亚砷、硫醇、硫氰酸酯 (或盐)、二硫化物、硫代酰胺、硫酯、硫酮。官能团通常经历亲核反应或亲电反应。在一些实施方式中,树枝状分子的官能团能够参与亲核反应。这样,该官能团可以是亲核的或亲电的。该官能团通常适于连接探针。在一种具体的情况中,该官能团能够通过亲核取代反应与探针形成键。

[0091] 官能团用于连接广泛的各种探针,然后可以利用它来检测流体介质中相应的配体的存在。一般地,当官能团连接到探针上时,探针的分辨率 (例如,相对于非特异性连接,目标特异性连接的量) 是至少约 50%,经常地至少约 70%,更经常地至少约 80%,且最经常地至少约 90%。在一种特定的实施方式中,当官能团连接到 15 个核苷酸的寡核苷酸探针上并使用溶液中 15 个核苷酸的寡核苷酸目标时,单核苷酸多态性 (SNP) 分辨率是至少约 80% (1 : 0.2),经常地至少约 90% (1 : 0.1),更经常地至少约 95% (1 : 0.05),以及更经常地至少 99% (1 : 0.01)。

[0092] 通过各种方法中的任意一种,例如在基本上类似的反应条件下通过比较探针-配体复合物生成的效率和/或选择度可以测定探针的分辨率。以类似的方式也可以测定 SNP 的分辨率。测量分辨率的一个典型的方法是比较结合到底物表面的目标特异性探针与结合到底物上的目标非特异性探针的信号强度。例如,如果结合到底物表面上目标特异性探针在 10nM 目标物浓度下产生信号强度 100 而结合到底物表面上的目标非特异性探针在同样目标物浓度下产生的信号强度为 30,则底物表面上的探针的分辨率是 $(100-30)/100$ 或 70% (1 : 0.3)。

[0093] 在一些实施方式中,当官能团连接到 15-21 个核苷酸的寡核苷酸探针上时,结合于底物的目标非特异性寡核苷酸探针(例如具有至少 1 个,经常地至少 2 个,且更经常地至少 3 个与目标特异性寡核苷酸探针不同的核苷酸的寡核苷酸探针)的信号强度比结合于底物的目标特异性寡核苷酸探针(例如与全部或部分目标 DNA 完全互补的寡核苷酸探针)的信号强度减少至少约 70%,经常地至少约 80%,更经常地至少约 95%,且仍更经常地至少约 99%。一般地,不同的寡核苷酸探针可以具有不同的分辨效率。

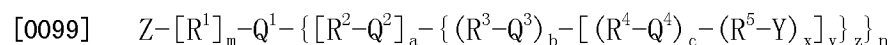
[0094] 在一种特定的实施方式中,当官能团连接到 15 个核苷酸的寡核苷酸探针上时,与结合于非树枝状分子的寡核苷酸探针相比,非特异性结合的相对量比特异性结合的量降低至少约 50%,经常地至少约 60%,更经常地至少 80%,且仍更经常地至少约 90%。并且,测量非特异性结合的一种方法是本文中描述的那些方法,包括实施例部分中的那些方法。一种确定非特异性结合的相对量减少的特定方法由下式给出:

$$[0095] \quad [(A-B)/A] \times 100\%$$

[0096] 其中 A 是利用非树枝状分子(例如 APDES 修饰的表面)的非特异性结合的相对量,而 B 是使用树枝状分子修饰的表面的非特异性结合的相对量。非特异性结合量的相对量可以比 C : T 错配的特异性结合量减少至少 95% $[(0.12-0.006)/0.12 \times 100\% = 95\%]$ 。

[0097] 然而其他的实施方式中,连接到树枝状分子的顶端的官能团或可选择的连接物不形成 α -螺旋。不受任何理论的限制,可以认为 α -螺旋的存在降低了分辨率和/或增加了非特异性结合,因此降低了树枝状分子的有用性。

[0098] 本发明的一些方面中,该树枝状分子是式:



[0100] I

[0101] 其中

[0102] 每个 m、a、b、和 c 独立地是 0 或 1;

[0103] 当 c 是 0 时或当 c 是 1, x 是 $1-Q^4-1$ 的氧化态的整数时, x 是 1;

[0104] 当 b 是 0 时或当 b 是 1, y 是 $1-Q^3-1$ 的氧化态的整数时, y 是 1;

[0105] 当 a 是 0 时或当 a 是 1, z 是 $1-Q^2-1$ 的氧化态的整数时, z 是 1;

[0106] n 是 1 至 Q^1-1 的氧化态的整数;

[0107] Q^1 是具有至少 3 种的氧化态的中心原子;

[0108] 每个 Q^2 , Q^3 和 Q^4 独立地是具有至少 3 种氧化态的分支原子;

[0109] 每个 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , 和 R^5 独立地是连接物; Z 是可选择地保护的官能团; 且

[0110] 每个 Y 独立地是所述基部末端上的官能团,其中大量的 Y 连接到所述固体支持物的所述第一表面上。

[0111] n 、 x 、 y 和 z 提供的产物至少是 3。

[0112] 应当理解当 a 、 b 、或 c 是 1 且相应的 z 、 y 或 x 是分别地小于 Q^2-1 、 Q^3-1 、 Q^4-1 的氧化态时,分别连接到 Q^2 、 Q^3 或 Q^4 上的其余原子是氢。如本文中使用的,“ Q ”指任何一种或所有 Q^1 、 Q^2 、 Q^3 、 Q^4 。一般地, Q 是周期表的 IVA 或 VA 组中的任何原子。对于 Q 的典型的原子包括但不限于 N、P、C、Si、Ge 等。经常地, Q 是 N、P、C 或 Si。

[0113] 如在式 I 中所见, Z 通过连接物 R^1 可选地连接到中心原子。经常地, a 是 1 从而 Z 通过连接物 R^1 连接到中心原子。而且, Z 或其未保护形式(例如当 Z 是保护的官能团时)适于连接探针。在一些实施方式中, Z 是亲核的。亲核试剂是通过提供两个成键电子与它的反应对(例如亲电试剂)形成化学键的原子或原子团。一般地,亲核试剂是杂原子例如是 N、P、O、和 S 或负碳离子,特别是通过共振和 / 或通过存在附近吸电子基团而稳定的负碳离子。有机化学领域的技术人员可以容易地识别用于式 I 的树枝状分子的适宜的亲核试剂。一些代表性的亲核试剂已在以上示例官能团中披露。

[0114] 在另外的实施方式中, Z 是亲电试剂。亲电试剂是吸引电子的原子或原子团并为了连接亲核试剂通过接受电子对参与化学反应。大多数亲电试剂是正电荷的,具有带有部分正电荷的原子或具有不含有八隅电子的原子。一般地,亲电试剂是由于一个或多个电负性原子(例如卤素或其他杂原子)连接或邻近亲电中心而含有至少一个正偶极矩的碳原子。有机化学领域的拘束人员可以容易地识别适于式 I 的树枝状分子的亲电试剂。一些代表性的亲电试剂已在以上的示例性官能团中披露。

[0115] 然而在另外的实施方式中, Z 包含选自由 N、O、S、P、和它们的组合构成的组中的杂原子。

[0116] 每个 Y 可以独立地是官能团。即,每个 Y 可以独立地是另外的 Y 基团。然而,通常所有的 Y 是同样的官能团。然而,一般地 Z 和 Y 是不同的官能团。在一些情况下, Z 和 Y 是同样的官能团,但一个或另外一个处于保护形式。在官能团和 / 或存在保护基团的这种差别使人们可以区别 Z 和 Y 的反应性,因此允许人们通过大量的 Y 将树枝状分子连接到固体支持物上并允许将探针连接到 Z 上。

[0117] 连接物

[0118] 再次涉及式 I,一般地树枝状分子包含各种连接物,例如, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 。每个连接物通过分支原子 Q^2 、 Q^3 、或 Q^4 连接到另一连接物上。末端连接物包括官能团 Y 从而它能够连接到固体支持物上。

[0119] 每个连接物的长度可以被各种因素决定,包括连接到固体支持物的分支官能团的数量、连接到固体支持物的强度、期望的空间等。因此,应当认为连接物不限于任何具体类型的链或任何特定长度的聚合物。然而,作为一般的指导方针,连接物的长度可以是约 0.5nm–约 20nm,一般地约 0.5nm–约 10nm,且经常地约 0.5nm–约 5nm。可替代地,每个连接物独立地是长度为约 1–约 100 个原子,一般地约 1–约 50 个原子,经常地约 1–约 25 个原子,且更经常地约 3 个原子–约 10 个原子的链。连接物的化学构成包括但不限于线性或分支的有机体,例如但不限于取代的或未取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、醚、聚醚、酯、氨基烷基、聚烯基二醇等。

[0120] 连接物 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 可以是相同的或不同的。一般地,每个连接物是重复单元、线性或分支的有机部分。然而,也应当认为不是所有的连接物都必需是相同的重复单元。不

是连接物的所有价态位置需要用重复单元填充。例如,所有的 R^2 可以是相同的重复单元。或一个或两个 R^2 可以是重复单元,而余下的 R^2 可以是H或其他化学个体(chemical entity)。同样地,每个 R^3 、 R^4 或 R^5 中的一个或两个可以独立地是重复单元,H或任何其他化学实体。因此,用这种方法可以制备各种形状的聚合物。相应地,树枝状分子可以具有约3至约81个Y官能团。一般地,树枝状分子具有约6至约81个Y官能团,约6至约54个Y官能团,约6至约27个Y官能团,约8至约27个Y官能团,约9至约27个Y官能团,约9至约18个Y官能团,或约9至约12个Y官能团。

[0121] 官能团Y

[0122] 每个官能团Y具有经历加成或取代反应的足够反应性。官能团(或部分)是指负责化学反应的分子中的原子或原子基团。一般地,官能团包含杂原子(例如卤素、氧、氮、硫、磷等)或不饱和键(例如碳-碳双键或三键)。典型的官能团包括但不限于酰基卤、羟基、酮基、醛基、碳酸盐(包括酯)、羧酸酯(或盐)、羧酸、脲、醚、过氧化氢、过氧化物、环氧乙烷基、卤化物、烯烃、炔烃、酰胺、胺、亚胺、酰亚胺、叠氮化物、吡丙啶基、偶氮化物、氰酸盐(或酯)、异氰酸盐(或酯)、硝酸盐、腈、亚硝酸盐、硝基、亚硝基、噁唑啉基、咪唑啉基、膦、磷酸二酯、磷酸、磷酸酯(或盐)、硫化物、硫醚、砷、磺酸、亚砷、硫醇、硫氰酸酯(或盐)、异硫氰酸酯(或盐)、二硫化物、硫代酰胺、硫酯、硫酮、硅烷基和已知经历化学反应的其他基团。官能团经常经历亲核反应或亲电反应。

[0123] 保护基团

[0124] 当存在保护基团时保护基团,保护基团的选择取决于许多因素。因此,本发明不限于任何特定的保护基团,只要其具有防止官能团与另一化学个体反应的功能,且能够在希望的特定条件下被除去即可。一般地,所使用的保护基团可以被相对容易地除去。

[0125] 适用的典型保护基团包括但不限于以下基团:

[0126] 氨基酸保护基团:甲基、甲酰基、乙基、乙酰基、叔丁基、茴香基、苄基、三氟乙酰基、N-羟基琥珀酰亚胺、叔丁基氧基羰基、苯甲酰基、4-甲基苄基、硫代茴香基、硫代甲酚基、苄基氧基甲基、4-硝基苄基、苄基氧基羰基、2-硝基苯甲酰、2-硝基苯基硫基苯基(2-Nitrophenylsulphenyl)、4-甲苯磺酰基、五氟苄基、二苯基甲基(Dpm)、2-氯苄基氧基羰基、2,4,5-三氯苄基、2-溴苄基氧基羰基、9-苝基甲基氧基羰基(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)、三苯基甲基、2,2,5,7,8-五甲基-色满-6-磺酰基、邻苯二酰基、3-硝基邻苯二酰基、4,5-二氯邻苯二酰基、四溴邻苯二酰基和四氯邻苯二酰基。

[0127] 羟基保护基团:对-茴香基氧基甲基(p-AOM)、苄基氧基甲基(BOM)、叔丁氧基甲基、2-氯四氢呋喃(THF)、愈疮木酚甲基(GUM)、(1R)-薄荷氧基甲基(MM)、对-甲氧基苄基氧基甲基(PMBM)、甲氧基乙氧基甲基(MEM)、甲氧基甲基(MOM)、邻-硝基苄基氧基甲基、(苯基二甲基硅烷基)甲氧基甲基(SMOM),和2-(三甲基硅烷基)乙氧基甲基(SEM)。

[0128] DNA、RNA保护剂:2'-OMe-Ac-C-CE亚磷酰胺、2'-OMe-Ac-RNA CPG、2'-OMe-I-CE亚磷酰胺、2'-OMe-5-Me-C-CE亚磷酰胺、Ac-C-CE-亚磷酰胺、Ac-C-RNA 500、dmf-dG-CE亚磷酰胺、dmf-dG-CPG 500、和2-氨基-dA-CE亚磷酰胺。

[0129] 对于各种官能团的其他适用保护基团是本领域技术人员已知的。参见例如T.W.Greene和P.G.M.Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 第三版, John Wiley&Sons, New York, 1999, 和Harrison和Harrison等人, Compendium of Synthetic

Organic Methods, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996)。

[0130] 以下表 1 中列出各种类型的示例性化合物。然而,应当认为 X、R¹、Q、R 和 Y 中的变化包含在本发明的范围内。

[0131] 表 1- 代表性的和列举的大分子化合物

[0132]

Cpd No.	X	R ¹	Q	R	Y
3-1	A	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
3-2	A	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OMe
3-3	Boc	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
3-4	Boc	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OMe
3-5	A	NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
3-6	A	NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OMe
6-1	A	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
6-2	Boc	NH-(环己基)(CO)CH ₂	C	(CH ₂) ₂ -(环己基)-C(O)	NH ₂
6-3	Boc	NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
6-4	Fmoc	NH-(CH ₂) ₆ NHC(O)NH	C	CH ₂ -C=C-CH ₂ C(O)	OH
6-5	Fmoc	NH-(CH ₂) ₇ C(O)O	C	CH ₂ -C=C-CH ₂ C(O)	OMe
6-6	NS	NH-(环己基)(CO)O	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	NH ₂
6-7	NS	NH-(CH ₂) ₆ NHC(O)NH	C	(CH ₂) ₇	NH ₂
8-1	A	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
8-2	Boc	NH-(CH ₂) ₇ C(O)NH	C	(CH ₂) ₂ C(O)	OH
8-3	NS	NH-(CH ₂) ₆ (CO)NH	C	(CH ₂) ₂ -(环己基)-C(O)	OH
8-4	Fmoc	NH-(CH ₂) ₆ (CO)O	C	CH ₂ -C=C-CH ₂ C(O)	NH ₂
8-5	Fmoc	NH-(CH ₂) ₆ NH(CO)O	C	(CH ₂) ₂ -(环己基)-C(O)	OH
8-6	NS	NH-(环己基)(CO)O	C	CH ₂ OCH(CH ₃)CH ₂ C(O)	NH ₂

Cpd No.	X	R ¹	Q	R	Y
8-7	Boc	NH-(环丙基)(CO)O	C	CH ₂ -C=C-CH ₂ C(O)	NH ₂
9-1	A	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
9-2	A	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OMe
9-3	A	NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
9-4	A	NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OMe
9-5	Fmoc	NH-(CH ₂) ₆ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
9-6	Fmoc	NH-(CH ₂) ₆ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OMe
9-7	Boc	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
9-8	Boc	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OMe
9-9	Ns	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
9-10	Ns	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OMe
9-11	A	NH-(CH ₂) ₆ NHC(O)CH ₂ CH ₂	C	(CH ₂) ₇	OBzl
12-1	A	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
12-2	Fmoc	NH-(CH ₂) ₆ NHC(O)NH	C	(CH ₂) ₂ -(环己基)-C(O)	NH ₂
12-3	Boc	NH-(环己基)(CO)O	C	CH ₂ -C=C-CH ₂ C(O)	OMe
12-4	Boc	NH-(CH ₂) ₅ NH	C	CH ₂ OCH(CH ₃)CH ₂ C(O)	NH ₂
12-5	NS	NH-(环丙基)(CO)CH ₂	C	(CH ₂) ₂	NH ₂
12-6	NS	NH-(CH ₂) ₆ C(O)O	C	CH ₂ OCH ₂ CH(CH ₃)C(O)	NH ₂
12-7	Fmoc	NH-(CH ₂) ₆ NHC(O)O	C	CH ₂ OCH(CH ₃)CH ₂ C(O)	NH ₂
16-1	Boc	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	NH ₂
16-2	Boc	NH-(环己基)(CO)CH ₂	C	(CH ₂) ₂ -(环己基)-C(O)	OH
16-3	Fmoc	NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ C(O)O	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH

Cpd No.	X	R ¹	Q	R	Y
16-4	Fmoc	NH-(CH ₂) ₆ NHC(O)NH	C	(CH ₂) ₂ -(环己基)-C(O)	NH ₂
16-5	NS	NH-(环己基)(CO)NH	C	CH ₂ -C=C-CH ₂ C(O)	OH
16-6	NS	NH-(环丙基)(CO)CH ₂	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OMe
16-7	A	NH-(环丙基)(CO)CH ₂	C	CH ₂ OCH(CH ₃)CH ₂ C(O)	OH
16-8	A	NH-(环丙基)(CO)OH ₂	C	CH ₂ OCH ₂ CH(CH ₃)C(O)	NH ₂
16-9	A	NH-(CH ₂) ₅ O	C	CH ₂ OCH ₂ CH(CH ₃)C(O)	OH
18-1	A	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
18-2	Fmoc	NH-(环己基)(CO)O	C	CH ₂ OCH(CH ₃)CH ₂ C(O)	NH ₂
18-3	Boc	NH-(环丙基)(CO)O	C	CH ₂ OCH ₂ CH(CH ₃)C(O)	NH ₂
18-4	Fmoc	NH-(CH ₂) ₆ NHC(O)CH ₂ NH	C	(CH ₂) ₂ -(环己基)-C(O)	OH
18-5	NS	NH-(CH ₂) ₆ NHC(O)CH ₂	C	CH ₂ -C=C-CH ₂ C(O)	OMe
18-6	Boc	NH-(CH ₂) ₅ O	C	CH ₂ OCH ₂ CH(CH ₃)C(O)	NH ₂
27-1	A	NH-(CH ₂) ₃ C(O)NH	C	CH ₂ O(CH ₂) ₂ C(O)	OH
27-2	A	NH-(CH ₂) ₆ NHC(O)CH ₂ CH ₂	C	(CH ₂) ₇	OH
27-3	Fmoc	NH-(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ C(O)O	C	(CH ₂) ₂ -(环己基)-C(O)	NH ₂
27-4	NS	NH-(环丙基)(CO)NH	C	(CH ₂) ₂ -(环己基)-C(O)	NH ₂
27-5	Boc	NH-(环己基)(CO)CH ₂	C	CH ₂ OCH(CH ₃)CH ₂ C(O)	OMe
27-6	Fmoc	NH-(CH ₂) ₅ O	C	CH ₂ OCH ₂ CH(CH ₃)C(O)	NH ₂

[0133]

[0134] 在本发明的一些方面, 固体支持物是无孔的固体底物。适用的无孔固体底物包括但不限于金属、金属合金、陶瓷、塑料、硅和硅酸盐(或酯)(例如玻璃和半导体晶片)。固体支持物可以是载片、颗粒、珠粒、或微孔板的形式。在一些实施方式中, 该固体支持物是无孔的固体底物。在这些实施方式中, 在一些情况下, 该固体支持物是玻璃。

[0135] 本发明的其他方面, 该固体支持物是多孔的固体底物。典型的多孔材料包括但不限于膜、珠粒(包括控制孔径的珠粒)、凝胶、和水凝胶。

[0136] 本发明的另一方面提供了一种制备其表面上含有许多树枝状分子的固体支持物的方法。该固体支持物包含至少一个第一表面,该第一表面包含用于与树枝状分子形成键的表面官能团。该树枝状分子包含中心原子;可选地通过连接物连接到中心原子的官能团;和连接到中心原子并具有多个末端的基部,其中该基部的每个末端都包含官能团。该方法一般地涉及在足以在固体支持物的第一表面上的表面官能团与底座的末端上的官能团之间形成键的条件下,使大量的树枝状分子与固体支持物表面接触,从而在树枝状分子的基部和固体支持物的第一表面之间形成多个键。

[0137] 在一些实施方式中,固体支持物的第一表面上的表面官能团与基部的末端上的官能团之间形成的键是共价键。

[0138] 然而,在其他的实施方式中,固体支持物的第一表面上的表面官能团和基部的末端上的官能团之间的键通过亲核取代反应形成。适于亲核取代反应的反应条件是本领域普通技术人员已知的。参见例如, Harrison 和 Harrison 等人, *Compendium of Synthetic Organic Methods*, Vol. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996)。

[0139] 本发明的方法中可以使用各种固体支持物。适用的固体支持物在本文中讨论并包括无孔和多孔的固体支持物。可以使用的典型的固体支持物包括上述给出的那些。在一些实施例中,该固体支持物是无孔固体支持物。在这些实施例中,在某些情况下,该固体支持物是无孔固体支持物。在一具体的实施例中,该无孔固体支持物是玻璃。

[0140] 在一些实施例中,可选地通过连接物连接到中心原子的官能团在树枝状分子连接到固体支持物表面之前被保护起来从而减少或防止它的反应性。在这种情况下,连接到中心原子上的官能团(或在树枝状分子的顶端上存在的官能团)在反应条件下保持相对惰性,而基部末端上的官能团经历与固体支持物上的表面官能团的键生成反应。使用保护基团降低或防止特定的官能团的反应性对于本领域普通技能的人员是已知的。例如参见 T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York, 1999, 和 Harrison 和 Harrison 等人, *Compendium of Synthetic Organic Methods*, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996), 其全文结合于此作为参考。代表性的羟基保护基团包括酰基基团、苄基和三苯甲基醚、四氢呋喃醚、三烷基硅烷基醚和烯丙基醚。代表性的氨基保护基团包括甲酰基、乙酰基、三氟乙酰基、苄基、苄基氧基羰基(CBZ)、叔丁氧基羰基(Boc)、三甲基硅烷基(TMS)、2-三甲基硅烷基-乙烷磺酰基(SES)、三苯甲基和取代的三苯甲基基团、烯丙基氧基羰基、9-苄基甲基氧基羰基(FMOC)、硝基-苄基氧基羰基(NVOC)、和类似物。然而,应该理解,在一些情况下基部末端上的官能团的反应性和可选地通过连接物(例如“顶端官能团”)连接到中心原子上的官能团的反应性具有足够的差异以允许将树枝状分子连接到固体底物表面上而不需要保护顶端官能团。

[0141] 树枝状分子连接到固体支持物之后,如果存在保护基团的话,可以从顶端官能团将其除去。然后使用适宜的反应条件可以将理想的探针连接到顶端官能团上。

[0142] 在一些实施方式中,树枝状分子连接到固体支持物的预先得定的区域。精通本领域的人员使用已知的各种方法的任何一种可以实现这种连接,例如通过使用湿法或干法涂覆技术。

[0143] 本发明的其他方面提供了使用表面上包含树枝状分子阵列的固体支持物以用于检测流体介质中配体存在的方法。树枝状分子的基部被连接到固体支持物上且顶端官能团

包含对指定配体具有选择性的探针。该方法一般涉及当流体介质中存在配体时,在足以选择性形成探针-配体复合物的条件下,使流体介质与固体底物接触,并确定期望的探针-配体复合物的存在。期望的探针-配体复合物的存在表明流体介质含有配体。

[0144] 在一些实施方式中,期望的探针-配体复合物是寡核苷酸-互补的寡核苷酸或聚核苷酸复合物、寡肽-连接寡聚肽或多肽的复合物、PNA-互补的寡聚核苷酸或聚核苷酸复合物、LNA-互补的寡核苷酸或聚核苷酸复合物、或受体-底物复合物。在这些实施方式中,在一些情况下,该受体-底物复合物包含药物-药物受体复合物、酶-酶的底物复合物、抗体-抗原复合物、或适体-蛋白复合物。

[0145] 在一些实施方式中,本发明的方法在寡核苷酸探针-互补的 DNA 复合物中能够分辨出单核苷酸多态性,本文中的寡核苷酸探针具有至少约 75 个核苷酸序列,经常地具有至少约 50 个核苷酸序列,更经常地具有至少约 30 个核苷酸序列,且最经常地具有至少约 15 个核苷酸序列。一种确定这样的选择性的方法是用模型系统和/或如实施例部分中披露的 p53 基因中的 7 个热点的密码子 175 的 DNA 微阵列分析。

[0146] 在一些实施方式中,本发明的方法能够在寡聚肽探针-特异性肽目标物复合物中分辨出单氨基酸错配,其中该寡聚肽探针具有至少约 200 个氨基酸,至少约 50 个氨基酸,至少约 20 个氨基酸,或至少约 10 个氨基酸。

[0147] 固体支持物上的大量树枝状分子中的探针之间的距离范围可以是约 0.1nm-约 100nm,约 1nm-约 100nm,约 2nm-约 50nm,约 2nm-约 30nm 或约 2nm-约 10nm。

[0148] 目标-特异性配体或探针

[0149] 可以连接到聚合物的目标-特异性配体,也被称为探针,包括各种化合物,包括化学物质、生物化学物质、生物活性化合物等。在这个方面,该探针可以是核酸、寡核苷酸、RNA、DNA、PNA、LNA、适体、抗原、抗体等。该寡核苷酸可以是天然存在的核酸或其类似物。因此,该探针可以由天然存在的氨基酸或合成的氨基酸构成的多肽。该探针可以是核酸、氨基酸、糖或任何其他化学物的组合物,只要其能够连接到聚合物的官能团上即可。特别地,该探针也可以是化学物质,例如基于三嗪的主链,可以在组合化学文库中尤其是在三嗪标记的文库中作为一种组分使用。

[0150] 固体支持物

[0151] 固体支持物是可以连接聚合物的任何固体材料。一般地,聚合物通过共价键或离子键连接到固体支持物的表面。该固体支持物可以被官能化从,从而与在聚合物基团上存在的官能团发生结合。根据本领域技术人员的需要,该固体支持物表面可以是各种表面。如果期望是微阵列或生物芯片形式,则该底物一般可以为氧化的硅晶片、熔融的二氧化硅、或玻璃。在一些实施方式中,该固体支持物是玻璃载片。其他典型的固体支持物包括膜过滤器,例如但不限于,硝酸纤维素或尼龙。该固体支持物可以是亲水的或极性的,且涂覆前或涂覆后可以带有负电荷或正电荷。

[0152] 微阵列

[0153] 为了提高微阵列的性能,应当考虑各方面的问题,例如探针设计、点样期间的反应条件、杂交和清洗条件、非特异性结合的抑制、生物分子和表面之间的距离、和/或固定的生物分子之间的空间。因为大多数这些因素与微阵列表面的本性相关,因此在微阵列研究中表面的优化成为一个主要目的。本发明的一些方面提供了包含表面结合树枝状分子的

固体支持物。在一些实施方式中,该树枝状分子是锥形的并提供具有单核苷酸多态性(或 SNP)的分辨率接近溶液值(1 : 0.01),减少非特异性结合,或两者兼有的寡核苷酸微阵列。

[0154] 本领域普通人员使用已知的各种方法中的任意一种就能够制备固体支持物表面。例如,通过可以使用 Maskis 等人在 *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 1679-1684 中披露的方法来制备羟基化玻璃表面。可以用(3-缩水甘油醚丙基)甲基二乙氧基硅烷(GPDES)和乙二醇(EG)来修饰包括氧化的硅晶片、熔融的二氧化硅、和玻璃载片的固体支持物。一般地,利用树枝状分子的顶端官能团(例如羧酸基团)和固体支持物表面上的官能团(例如羟基)之间的偶联反应将树枝状分子连接到固体支持物表面,例如,在4-二甲氨基吡啶(DMAP)存在下,通过使用1-[3-(二甲氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)或1,3-二环己基碳二亚胺(DCC)。

[0155] 在一些情况下,连接树枝状分子后,厚度增加 $11\pm2\text{\AA}$,这可以相当于离子键。固定后,在257nm观察到树枝状分子的蒽部分产生的UV吸收峰。在二甲基甲酰胺中搅拌1天后,稳定的分子层足以显示厚度和吸收特征方面没有变化。通过振动模式(tapping mode)原子力显微镜(AFM)得到的拓扑图像也显示所得的层非常光滑且基本上是均匀的,没有任何明显的凝聚或孔洞。可以使用任何常规已知的将化合物连接到固体支持物表面的方法来制备本发明的微阵列。

[0156] 在一些实施方式中,制备寡核苷酸微阵列包括顶端官能团去保护。应当理解,该步骤仅仅在顶端官能团是处于保护状态下是必要的。在顶端官能团没有被保护的情况下,该步骤是不必要的。传统地,对于具有反应活性的胺表面基团的固体支持物,使用连接巯基的寡核苷酸和杂双官能团连接物,例如琥珀酰亚胺基4-马来酰亚胺丁酸酯(SMB)或磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己基-1-羧酸酯(SSMCC)。相反地,本发明的一些实施方式使用例如DSC这样的连接物,它允许连接胺的寡核苷酸点样。因此,本发明的方法和组成的一些优点是具有成本效率,并且避免使用容易氧化的连接巯基的寡核苷酸。然而,应当理解,在某些条件下也可以使用连接巯基的寡核苷酸。

[0157] 本发明不限于本文中描述的具体实施方式的范围。实际上,对于本领域技术人员来说,除了前面的描述和附图之外,本文中描述的那些本发明的各种改进方式也是显而易见的。这些改进包括在所附权利要求的范围内。提供下面的实施例是为了说明本发明,而不是为了限制。

[0158] 实施例

[0159] 实施例1-材料和方法

[0160] 概述。硅烷偶联剂N-(3-(三乙氧基硅烷基)丙基)-O-聚氧乙烯聚氨酯(TPU)购自Gelest Inc.。所有其他化学药品是来自Sigma-Aldrich的试剂级。UV级的熔融二氧化硅板购自CVI LaserCo.。抛光的原始硅(100)晶片(掺杂剂,磷;电阻率,1.5-2.1 $\Omega\cdot\text{cm}$)购自MEMC Electronic Materials Inc.。去离子水(18M $\Omega\cdot\text{cm}$)通过将蒸馏水通过Barnstead E-pure 3-Module系统得到。

[0161] 实施例2-样品制备

[0162] 实施例2.1-清洁底物。硅晶片(和熔融二氧化硅板用于树枝状分子表面覆盖分析;参见支持物信息)在食人鱼洗液(piranha solution)(浓硫酸/30% H_2O_2 = 7 : 3(v/v))中超声4小时(注意:食人鱼洗液可以爆炸性地氧化有机材料。避免与可氧化的材料

接触。)。超声后用去离子水彻底清洗并冲洗该底物。随后,将它们浸于装在特氟隆烧杯中的去离子水、浓氨溶液、和 30%过氧化氢 (5 : 1 : 1(v/v/v)) 的混合物中。该烧杯置于水浴中并在 80℃加热 10 分钟。从溶液中取出底物并用去离子水彻底冲洗。再将底物置于含有去离子水、浓盐酸、和 30%过氧化氢 (6 : 1 : 1(v/v/v)) 的混合物的特氟隆烧杯中。该烧杯在 80℃加热 10 分钟。从溶液中取出该底物并用大量的去离子水彻底清洗和冲洗。干净的底物在真空箱 (30-40mTorr) 中干燥约 20 分钟并立刻用于下个步骤。

[0163] 实施例 2.2-AFM 探针预处理。首先将带有金字塔型尖端 (VeecoInstruments ;k = 10pN/nm) 的标准 V 型硅氮化物悬臂 (MLCT-AUNM) 浸入 10%硝酸并在 80℃下加热 20 分钟氧化。从溶液中取出该悬臂并用大量的去离子水彻底清洗和冲洗。清洁的悬臂在真空箱中 (30-40mTorr) 干燥约 20 分钟并立刻用于下个步骤。

[0164] 实施例 2.3- 硅烷化。将如上述预处理的薄二氧化硅顶层的硅 / 二氧化硅底物和悬臂在氮气氛下浸入含有偶联剂 (0.20mL) 的无水甲苯 (20mL) 中,并置于该溶液中 6 小时。硅烷化后,用甲苯清洗该底物和悬臂,然后在 110℃焙干 30 分钟。以顺序的方式将底物浸入甲苯、甲苯-甲醇 (1 : 1(v/v))、和甲醇中,并将它们在清洗溶液中各超声 3 分钟。悬臂以顺序的方式用甲苯和甲醇彻底冲洗。最后,在真空 (30-40mTorr) 下干燥该底物和悬臂。用 GPDES 硅烷化以及随后用乙二醇使环氧化物开环的实验过程将在别处描述。¹⁸

[0165] 实施例 2.4- 制备树枝状分子修饰的表面。在 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (2.7mM) 存在下,将上述羟基化底物和悬臂浸入带有少量 DMF 溶解的树枝状分子 (1.0mM) 和偶联剂,1,3-二环己基碳二亚胺 (DCC) (27mM) 的二氯甲烷溶液中 4 小时。以这种基团制备在本操作中使用的该树枝状分子,9- 苄基甲基-3-([三([1-([三([2-([三([2- 羧基乙氧基] 甲基) 甲基) 氨基] 羰基) 乙氧基) 甲基] 甲基) 氨基] 羰基]-2- 乙氧基) 甲基) 甲基] 氨基] 羰基) 丙基氨基甲酸酯。反应后,将底物以顺序的方式浸入二氯甲烷、甲醇和水中,并且在各清洗步骤中将它们超声 3 分钟。以顺序的方式用二氯甲烷、甲醇、和水彻底冲洗悬臂。最后,用甲醇清洗该底物和悬臂并在真空 (30-40mTorr) 下干燥。

[0166] 实施例 2.5-9- 苄基甲氧基羰基基团的去保护。将树枝状分子修饰的底物和悬臂浸入 1.0M 三氟乙酸 (TFA) 的二氯甲烷溶液中,并搅拌 2 小时。反应后,将它们在带有 20% (v/v) 二异丙基乙基胺 (DIPEA) 的二氯甲烷溶液中浸泡 10 分钟。底物在二氯甲烷和甲醇中各超声 3 分钟,并以顺序的方式用二氯甲烷和甲醇彻底冲洗悬臂。在真空 (30-40mTorr) 下干燥该底物和悬臂。

[0167] 实施例 2.6- 制备 NHS 修饰的底物。将上述去保护的底物和悬臂在氮气氛下浸入含有二 (N- 琥珀酰亚胺) 碳酸酯 (DSC) (25mM) 和 DIPEA (1.0mM) 的乙腈溶液中 4 小时。反应后,将底物和悬臂置于搅拌的二甲基甲酰胺中 30 分钟并用甲醇清洗。底物和悬臂在真空下 (30-40mTorr) 干燥。

[0168] 实施例 2.7- 探针 / 检测 DNA 的固定。将上述 NHS- 修饰的底物和悬臂在 DNA 溶液中 (20 μ M 含有 5.0mM MgCl₂ 的 25mMNaHCO₃ 缓冲液中 (pH 8.5)) 浸泡 4 小时。反应后,在杂交缓冲溶液中 (含有 7.0mM 十二烷基磺酸钠的 2×SSPE 缓冲液 (pH 7.4)) 在 37℃搅拌底物和悬臂 30 分钟,并在水中搅拌 1 分钟以除去非特异性结合的寡核苷酸。最后,在真空下 (30-40mTorr) 干燥该底物和悬臂。

[0169] 实施例 2.8- 目标 DNA 的杂交。将上述连接底物的探针 DNA 在目标 DNA 溶液 (20 μ M)

中浸泡 1 小时。反应后,底物在 37℃ 下搅拌 30 秒并在杂交缓冲溶液中(含有 7.0mM 十二烷基磺酸钠的 2×SSPE 缓冲液(pH 7.4))浸泡 1 分钟并再次重复。用含有 30mM 氯化钠和 3.0mM 柠檬酸钠的 0.2×SSC 缓冲液清洗底物 1 分钟从而除去非特异性结合的寡核苷酸。

[0170] 实施例 2.9- 固定探针 DNA 用于基因表达谱。作为对照实验,将 96 种 10 μ M 探针 DNA(来自 Operon 公司的人类(人)样品 v4.0.1)在点样缓冲溶液(25mM 含有 5.0mM MgCl₂ 的 NaHCO₃ 缓冲液(pH8.5))中通过微阵列(Genetix 的 QArraymini)在树枝状分子修饰的玻璃载片上固定 4 小时。反应后,在杂交缓冲液溶液中(含有 7.0mM 十二烷基磺酸钠的 2×SSPE 缓冲液(pH 7.4))在 37℃ 下搅拌底物 30 分钟并在水中搅拌 1 分钟从而除去非特异性结合的寡核苷酸。最后在真空下(30-40mTorr)干燥该底物。

[0171] 实施例 2.10- 由参照全 RNA 制备 cDNA。使用 SuperScript™Indirect cDNA Labeling Kit(Invitrogen)通过反转录由 10 μ g/5 μ l 通用参照 RNA(UHRR, Statagene)制备 Cy5 标记的 cDNA。用 QIAGEN 的 MINELute Purification Kit 完成纯化过程。通过 NanoDrop Technologies, Inc. 的 ND-1000 分光光度计利用在 260nm 处的 UV 吸收计算 cDNA 浓度。

[0172] 实施例 2.11-cDNA 杂交/荧光分析。95℃ 淬灭后,使 3.5×SSC 和 0.3% SDS 缓冲液中的 Cy5 标记的 cDNA 与树枝状分子修饰的玻璃载片上的 96 种探针 DNA 在 Agilent hybridization kit 中在 45℃ 下杂交 12 小时。反应后,在 37℃ 下搅拌底物 30 秒并在杂交缓冲液溶液中(含有 7.0mM 十二烷基磺酸钠的 2×SSPE 缓冲液(pH 7.4))浸泡 1 分钟并重复。用含有 30mM 氯化钠和 3.0mM 柠檬酸钠的 0.2×SSC 缓冲液清洗底物 1 分钟,以除去非特异性结合的寡核苷酸。利用 Molecular Devices 的 GenePix® Personal 4100A 测量 cDNA 的荧光强度。

[0173] 实施例 3-AFM 力学测量。用 NanoWizard AFM(JPKInstrument)完成所有力学测量。在每次实验前利用热起伏法(thermalfluctuation method)计算溶液中的每个 AFM 尖端的弹簧指数。使用的悬臂的弹簧指数在 12-15pN/nm 之间变化。在室温下在新鲜的 PBS 缓冲液(pH 7.4)中完成所有测量。在底物上的 10×10 μ m 区域内 100 个像素点的一个位置上总是记录超过 20 次的力学曲线,且在同一表面检测至少三个另外的区域。也应该注意到用不同的尖端和样品重复实验许多次,且报告的力学数据是持续地重现的。

[0174] 实施例 4- 结果

[0175] 基因分型- 我们使用基于力学的 AFM 通过测量表面上与探针 DNA 杂交的目标 DNA 和在 AFM 尖端上的检测 DNA 之间的力来测试灵敏度以检测目标 DNA(图 1(a))。在所有的实验中,将使用前文已述的基于树枝状分子表面官能化的改进方法的 DNA 寡核苷酸共价连接到硅底物或硅氮化物 AFM 尖端上(表 2)。

[0176] 表 2. 用于基因分型实验的 DNA 名称和序列

[0177]

DNA 名称	DNA 序列
探针 DNA	5'-NH ₂ -TC TCT GCG GGA CCT TGC ATC-3'(SEQ ID NO:1)
目标 DNA	5'-CTC GTT GGT GCT ACC GAT GCA AGG TCC CGC AGA GA-3'(SEQ ID NO: 2)
检测 DNA	5'-GGT AGC ACC AAC GAG-H ₂ N-3(SEQ ID NO:3)

[0178] 将 35mer 目标 DNA 与固定于树枝状分子修饰的底物上的 15mer 探针 DNA 杂交后,然后将力对距离的测量值记录为在 AFM 尖端上被官能化的 15mer 检测 DNA 并使不涉及杂交事件表面的剩余 15mer 目标 DNA 发生接触或脱离接触。在 $10 \times 10 \mu\text{m}$ 面积中的 100 个位置完成 AFM 力学实验。每个位置完成 20 次力学测量。当 1aM 目标 DNA 与探针 DNA 杂交时,在目标 DNA 存在的两个位置观察到 DNA 之间的力。测量目标 DNA 和检测 DNA 之间特异的力 ($26 \pm 0.6\text{pN}$ 通过柱状图曲线中高斯拟合) 的概率是 80%,且在发现 DNA 的位置中在 20% 力-距离曲线上没有观察到力。(图 1(b))。在如此极端低量下检测生物样品对临床诊断和检测是很大的挑战。本发明的方法具有 $\leq 10^3$ 可检测目标分子的灵敏度且无需进行标记,这优于用高密度微阵列系统可实现的 10^5 数量的水平,并接近一般地用定量 PCR(qPCR) 观察到的 10^3 - 10^4 的水平。²²

[0179] 该系统不仅可以用于基因分型,而且还可以用于目标 DNA 中的单核苷酸多态性 (SNP)。在以前的工作中,树枝状分子表面显示出检测单碱基突变的高 SNP 能力。在与具有单碱基突变的目标 DNA 杂交情况下,在底物上以双螺旋形式存在的目标 DNA 的数量比与相对更充分互补的目标 DNA,例如完全互补的 DNA 杂交的要少。因此,在含有点突变的目标 DNA 的情况下,观察结合目标 DNA 的概率降低了。该方法可以分辨相对多的互补目标 DNA 的单核苷酸多态性。

[0180] 基因表达谱 - 因为 cDNA 是从 mRNA 通过反转录制备的,因此其 5' 端具有 50-250 个胸腺嘧啶残基。因此,如果使用含有 30 个腺嘌呤残基的检测 DNA,则通过 Bio-AFM 测量可以确认存在 cDNA (表 3)。为了证实使用 Bio-AFM 提高了该方法的检测限,进行 DNA 微阵列实验并选择具有高荧光强度的探针 DNA。基于微阵列实验的标准荧光检测限是 $62\text{pg}/\mu\text{l}$ 。当使用的 cDNA 浓度是 $0.62\text{fg}/\mu\text{l}$ 时,用 Bio-AFM 实验可以发现检测 cDNA 的两个点。换言之, Bio-AFM 检测的灵敏度比微阵列增加了 10^5 倍 (图 2(c))。

[0181] 表 3. 在基因表达谱实验中使用的 DNA 名称和序列

[0182]

DNA 名称	DNA 序列
探针 DNA	5'-NH ₂ -CCC CCA GGA TGG ATA TGA GAT GGG AGA GGT GAG TGG GGG ACC TTC ACT GAT GTG GGC AGG AGG GGT GGT-3'(SEQ ID NO:4)
检测 DNA	5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA -H ₂ N-3 (SEQ ID NO:5)

[0183] 如果用聚胸腺嘧啶残基作为检测 DNA,该系统无需由 mRNA 制备 cDNA 的复杂过程而可以用于直接检测 mRNA。因为大多数 mRNA 在 3' 端具有聚腺嘌呤残基,AFM 尖端无需改变

检测 DNA 的序列可以检测许多目标 mRNA。即, Bio-AFM 方法具有与 qPCR 类似的灵敏度而无需任何标记, 并且可以像 DNA 微阵列一样完成平行检测。

[0184] 通过树枝状分子实现的宽窗口的横向空间是另一个显著的优点。可以考虑比 3nm 更大的空间, 可能高达 10nm。更大的空间对于用最小的横向空间位阻固定更大的生物分子是有效的。因此, 本发明的系统不仅可以适用于基因分型或基因表达谱, 而且还适用于检测 DNA- 蛋白、以及蛋白 - 蛋白相互作用的生物芯片。

[0185] 实施例 5

[0186] 为了确定使用荧光标记的常规 DNA 芯片检测技术的极限, 我们将 20 个碱基的 DNA 探针连接到芯片表面, 并与在 5' 端含有 Cy3 荧光标记的 35 个碱基的目标 DNA 杂交见图 3(a)。

[0187] 当我们用荧光扫描仪对从高水平到低水平不同浓度的目标 DNA 做 DNA 芯片检测时, 如图 4 中所示完成低至 1pM 的 DNA 检测。

[0188] 与荧光方法相比, 使用 Bio-AFM 通过测量目标和检测 DNA 之间的力, 我们可以得到如图 5 中所示在 $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ 面积上具有 100 个点的力映射图 (force map)。调节该检测 DNA 和目标 DNA 使两者都具有 60% GC 含量。我们通过使探针 DNA 比检测 DNA 含有多 5 个碱基而使探针和目标 DNA 之间的相互作用力增加超过检测和目标 DNA 之间的力。因为这防止了目标 DNA 吸引到 AFM 尖端上, 使得可以连续进行力学测量。

[0189] 如图 5 中所示, 在不希望存在目标 DNA 处没有检测到相互作用力, 而在图 6 中目标 DNA 杂交处测量目标和检测 DNA 之间相互作用力是 27pN。另外, 该 Bio-AFM 方法可以检测目标 DNA 低至 1aM, 这比荧光方法有很大的增强。在这个浓度水平可以不用 PCR 完成 DNA 检测, 这是它比光学检测例如荧光检测具有的另一个优点。此外, 图 7 示出了目标 DNA 浓度和检测灵敏度之间的线性关系。

[0190] 如上所述, 由于 Bio-AFM 方法不需要通过 PCR 扩增, 因此无论目标 DNA 是否存在, 都可以不需预先处理而通过简单的 Bio-AFM 实验来检测。过去通过使用纳米颗粒、银液体补充剂和电学特征做了很多努力来降低 DNA 检测限。然而, 因为它们需要复杂的处理过程且具有低的重复性, 因此具有缺陷。Bio-AFM 提供了可重复的数据且不需要对目标 DNA 进行预先处理。

[0191] 实施例 5.1- 非特异性的 DNA 力学测试

[0192] 我们证实了当目标 DNA 不存在时, 检测 DNA 和探针 DNA 之间没有检测到相互作用力。我们将与检测 DNA 结合的目标 DNA 结合的区域修饰为不互补的, 并将与探针 DNA 结合的目标 DNA 设计为互补的。在该实验中, 如图 8 中所示, 我们在目标 DNA 和检测 DNA 之间观察到没有发生非特异性结合。

[0193] 实施例 5.2- 单碱基突变检测试验

[0194] 测定 Bio-AFM 对 DNA 芯片上单碱基突变的检测能力。从这个实验中, 可以发现其中探针 DNA 和目标 DNA 之间单碱基差异的结果。当探针 DNA 和目标 DNA 之间存在单碱基突变时, 杂交速率降低且检测 DNA 和目标 DNA 之间的力测量速率也同样降低。

[0195] 实施例 5.3- 使用探针 DNA 和目标 DNA 交联的 DNA 芯片检测

[0196] 探针 DNA 和目标 DNA 杂交后, 杂交的 DNA 用各种方法交联, 包括但不限于化学方法, 并测量目标 DNA 和检测 DNA 之间的力。如图 9 中所示, 无论探针 DNA 的碱基长度是多少,

都可以检测各种目标 DNA。

[0197] 实施例 5.4- 用链霉亲和素 - 生物素结合来提高检测灵敏度

[0198] 使用前述交联方法连接探针 DNA 和目标 DNA 后, 如果其中的一个在目标 DNA 末端与链霉亲和素形成键, 用连接生物素的 AFM 尖端通过测量链霉亲和素和生物素之间键的强度就可以检测目标 DNA。特别地, 15 个碱基的 DNA 之间杂交强度是约 27pN。它不比实际噪声大很多且很难区别该差异。链霉亲和素和生物素之间的键强度大于 100pN, 因此如图 10 中所示信噪比增强。

[0199] 实施例 5.5- 用抗原 - 抗体结合提高检测灵敏度

[0200] 探针和目标 DNA 交联后, 抗原结合到目标 DNA 末端。通过使用连接到抗体的 AFM 尖端测量抗原 - 抗体结合的强度, 如图 11 中所示可以检测目标 DNA。

[0201] 实施例 5.6- 蛋白 -DNA 结合的 DNA 芯片检测

[0202] 连接单链 DNA 和在 AFM 尖端表面上与 DNA 可以选择性地结合的蛋白后, 可以作 DNA 芯片检测。如果目标 DNA 高浓度存在时, 蛋白和单链 DNA 之间力的测量速率降低。降低目标 DNA 浓度水平到更低的程度, 力的测量速率增加, 然后这可以用作 DNA 芯片检测。优化检测蛋白 -DNA 结合的条件在本领域技术人员的能力范围内。

[0203] 另一方面, 选择性地结合到双链 DNA 上的蛋白连接 AFM 尖端表面。进行 DNA 芯片检测。如果在低浓度目标 DNA 中杂交后完成测量蛋白和目标分子之间力的实验, 双链 DNA 存在的概率将降低。通过增加目标 DNA 浓度, 检测双链 DNA 的概率增加且蛋白和双链 DNA 之间力的测量速率也增加 (图 12)。

[0204] 实施例 5.7- 三螺旋 DNA 结构的 DNA 芯片检测

[0205] 检测 DNA 与 AFM 尖端上特异的碱基序列连接, 并加入诱导三螺旋形成的化学物或蛋白后, 进行 DNA 芯片检测。在目标 DNA 和探针 DNA 杂交的区域, 形成三螺旋 DNA。Bio-AFM 能够测量当三螺旋 DNA 形成时的力并确认存在目标 DNA (图 13)。

[0206] 实施例 5.8- 插入的 DNA 的 DNA 芯片检测

[0207] 将诸如 EtBr (溴化乙锭) 的双链核酸插入剂连接到 AFM 尖端。可以在其中目标 DNA 和探针 DNA 杂交的双链区域通过测量力来实施 DNA 检测 (图 14)。

[0208] 实施例 5.9- 用 MutS 蛋白用于单碱基突变检测的 DNA 检测芯片的开发

[0209] 将 MutS 蛋白选择性地连接到具有单碱基突变而不是完全互补 DNA 的双链 DNA 上。通过把 MutS 蛋白连接到 AFM 尖端上并测量 DNA 和蛋白之间的结合力来进行 DNA 检测。在互补的 DNA 双螺旋存在的区域内没有检测到力。在存在单碱基突变区域内检测到力。通过直接测量力, 而不是作为其中观测所检测速率的非直接方法来实施用于单碱基突变的 DNA 芯片检测。

[0210] 实施例 5.10- 用 DNA 之间的力学测量在树枝状分子表面的 DNA 芯片检测

[0211] 披露了具有可控中间层空间的树枝状分子固体底物。保持表面上的分子种类物质之间的空间从而降低不理想的空间位阻并提供检测分子种类物质间相互作用的环境。该分子种类物质包括但不限于蛋白、抗原、抗体、信号肽、膜蛋白、小分子、类固醇、葡萄糖、DNA、RNA 等。因此, 例如, 与分子种类物质之间的空间不受控制、或当不发生非特异性结合时使用混合的自组装控制空间的情况相比, 通过 Bio-AFM 使用树枝状分子表面测量目标和检测 DNA 之间的力将提高性能。具体地, 通过链霉亲和素 - 生物素或抗原 - 抗体的方法增加检测

灵敏度的该方法涉及比 DNA 更大的蛋白,伸展产生的树枝状分子将解决潜在的空间位阻问题。

[0212] 制备树枝状分子、用树枝状分子涂覆表面或底物、和将分子种类物质连接到树枝状分子末端上的方法在 W0 2005/026191 和 W02006/016787 中描述,其全部内容结合于本文作为参考,以用于制造树枝状分子的方法和在涂覆表面或底物上它们的应用,以及将分子种类物质置于树枝状分子顶端。在预处理的玻璃或硅表面或底物上实施用于纳米或微米水平的探针 DNA 印刷的蘸水笔或微接触印刷技术。连接该分子类物质并做成阵列。然后,使目标 DNA 杂交并使用上述的 Bio-AFM 测量目标 DNA 和检测 DNA 之间的力(图 16)。如上文所讨论的,可以通过各种其他的改进的方法实施该检测,例如使用交联的链霉亲和素-生物素或抗原-抗体力学测量。

[0213] 实施例 5.11-通过测量 DNA 之间力的基因表达研究

[0214] 在 DNA 芯片上的常规基因表达检测中,通过反转录从组织或细胞提取的 mRNA 制备 cDNA,加入荧光染料并在其中连接各种探针 DNA 的芯片上杂交。分析该点的荧光强度。可以监测某些基因的表达水平。通过 Bio-AFM 的力学测量可以用于这个系统从而发现基因表达研究的新概念。通过 Bio-AFM 的力的测量可以是前述的测量 DNA 之间的力或使用交联的链霉亲和素-生物素之间的力或抗原-抗体之间的力的测量方法。

[0215] 使用 Bio-AFM 力学检测方法的基因表达检测的实施例如下。mRNA 的 3'-端具有 20-250 个 poly A,从而当通过反转录制备 cDNA 时,它含有互补的 poly T。使 cDNA 上的 poly T 成为检测 DNA 的连接区域并将 poly A 检测 DNA 序列连接到 AFM 尖端上。然后通过 A-T 杂交测量力。因此,通过测量 cDNA 和各种探针 DNA 之间结合强度的力并确定检测速率,发现相对于其他的更多表达的基因(图 17)。

[0216] 另外,在该基因表达研究中,从 mRNA 反转录制备的 cDNA 的量一般是不够用于基因表达研究的,因为从组织或细胞提取用于检测的 mRNA 的量很少。由于这个原因,通过扩增方法例如线性扩增使 cDNA 的量增加。然而,在 Bio-AFM 实验中检测限可以降低到阿摩尔(attomole)水平。因此,直接使用探针 DNA 而无需反转录或扩增就可以实现 mRNA 表达水平差异的检测。作为一个实施例,连接到 AFM 的 poly T 寡核苷酸检测 DNA 直接结合于 mRNA polyA。测量力从而直接检测 mRNA 而无需任何另外的处理过程。

[0217] 实施例 5.12-DNA 纳米阵列的应用

[0218] 在常规的 DNA 微阵列系统中,用探针阵列点样的底物表面含有约 1mm^2 的面积。相反,纳米阵列包括约 $10\text{-}100\text{nm}^2$ 的面积。这样的纳米阵列在装置的微型化方面是有用的且用于护理产品、MEMS 和 NEMS 的点。通过使用或者蘸水笔技术或者微接触印刷技术在纳米水平制备 DNA 阵列。在溶液中在具有 $1\text{-}10\text{nm}^2$ 面积的底物表面上进行直接的目标 DNA 检测。

[0219] 参考文献

[0220] (1)Fodor, S. P. A. Science 1991,251,767-773.

[0221] (2)Schena, M. ;Shalon, D. ;Davis, R. W. ;Brown, P. O. Science 1995,270,467-470.

[0222] (3)Clark, H. A. ;Hoyer, M. ;Philbert, M. A. ;Kopelman, R. Anal. Chem. 1999,71,4831-4836.

[0223] (4)Dickinson, T. A. ;Michael, K. L. ;Kauer, J. S. ;Walt, D. R. Anal. Chem. 1999,

71, 2192-2198.

[0224] (5) Harrison, D. J. Science 1993, 261, 895-897.

[0225] (6) Ramsey, J. M. ; Jacobson, S. C. ; Knapp, M. R. Nat. Med. 1995, 1, 1093-1096.

[0226] (7) Woolley, A. T. ; Mathies, R. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 113480-11352.

[0227] (8) Christof M. Niemeyer, D. B. Angewandte Chemie International Edition 1999, 38, 2865-2869.

[0228] (9) Gerion, D. ; Chen, F. ; Kannan, B. Fu, A. , Parak, W. J. ; Chen, D. J. ; Majumdar, A. ; Alivisatos, A. P. Anal. Chem. 2003, 75, 4766-4772.

[0229] (10) Allen, S. R. -S. , S. M. Harris, H. ; Davies, M. C. ; O' Shea, P. Biochemical Society Transactions 2003, 31, 1052-1057.

[0230] (11) Clausen-Schaumann, H. ; Seitz, M. ; Krautbauer, R. ; Gaub, H. E. Current Opinion in Chemical Biology 2000, 4, 524-530.

[0231] (12) Kellermayer, M. S. ; Smith, S. B. ; Granzier, H. L. ; Bustamante, C. Science 1997, 276, 1112-1116.

[0232] (13) Hummer, G. ; Szabo, A. Acc. Chem. Res. 2005, 38, 504-513.

[0233] (14) Bayas, M. V. ; Leung, A. ; Evans, E. ; Leckband, D. Biophys. J. 2006, 90, 1385-1395.

[0234] (15) Evans, E. ; Leung, A. ; Heinrich, V. ; Zhu, C. Proceedings of the National Academy of Sciences 2004, 101, 11281-11286.

[0235] (16) Benoit, M. ; Gabriel, D. ; Gerisch, G. ; Gaub, H. E. Nat Cell Biol 2000, 2, 313-317.

[0236] (17) Jung, Y. J. ; Hong, B. J. ; Zhang, W. ; Tendler, S. J. B. ; Williams P. M. ; Allen, S. ; Park, J. W. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 9349-9355.

[0237] (18) Hong, B. J. ; Oh, S. J. ; Youn, T. O. ; Kwon, S. H. ; Park, J. W. Langmuir 2005, 21, 4257-4261.

[0238] (19) Schweitzer, B. ; Kingsmore, S. Current Opinion in Biotechnology 2001, 12, 21-27.

[0239] (20) Zhao, X. ; Tapecc-Dytioco, R. ; Tan, W. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 11474-11475.

[0240] (21) Nygaard, V. ; Holden, M. ; Loland, A. ; Langaas, M. ; Myklebost, O. ; Hovig, E. BMC Genomics 2005, 6

[0241] (22) Eastman, P. S. ; Ruan, W. ; Doctolero, M. ; Nuttall, R. ; deFeo, G. ; Park, J. S. ; Chu, J. S. F. ; Cooke, P. ; Gray, J. W. ; Li, S. ; Chen, F. F. Nano Lett. 2006, 6, 1059-1064.

[0242] 将本文中所提到的所有参考文献整体整合于此作为参考。

[0243] 本领域普通技术人员将意识到或能够确定, 使用不超出常规实验方法就能够实现本文中具体描述的本发明的特定实施例的许多等价实施例。这些等价实施例包括在权利要求的范围内。

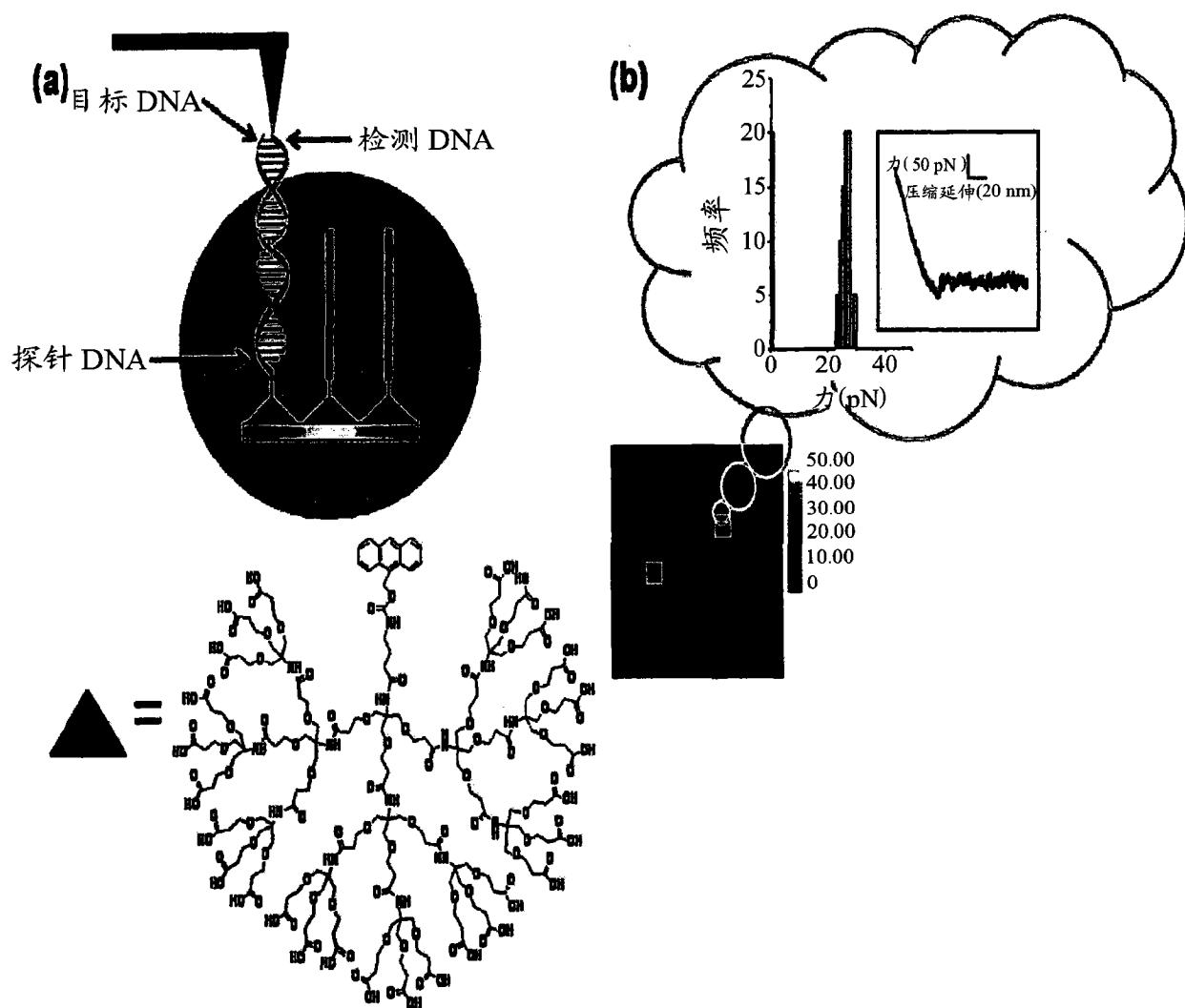


图 1

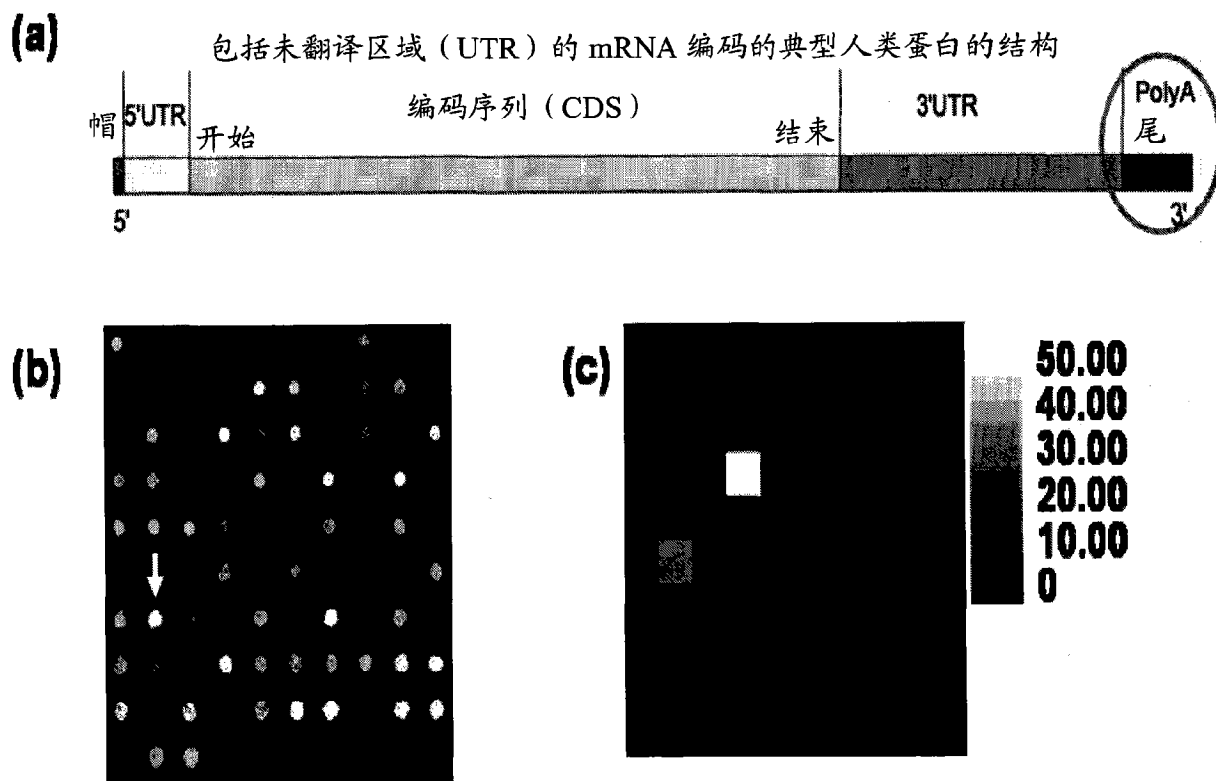


图 2

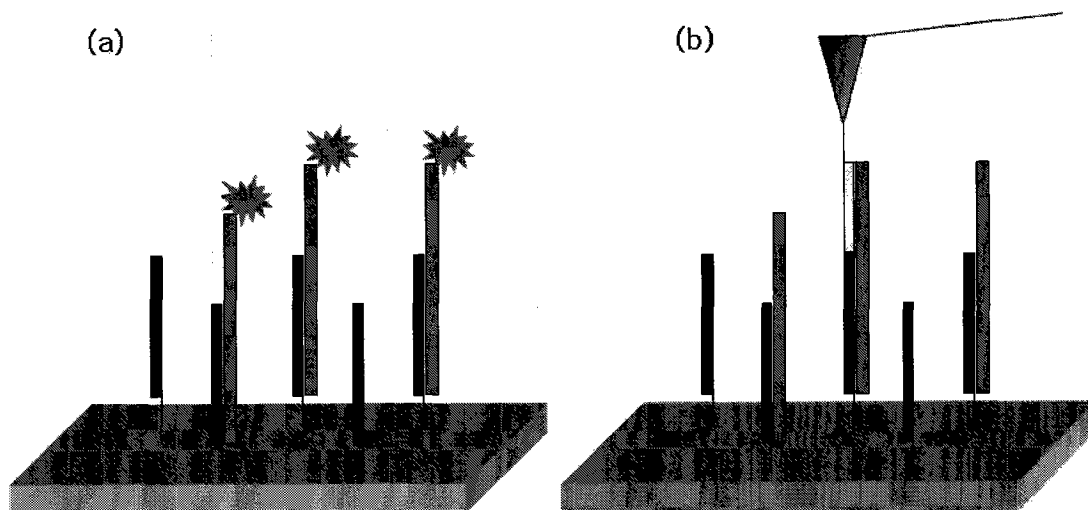


图 3

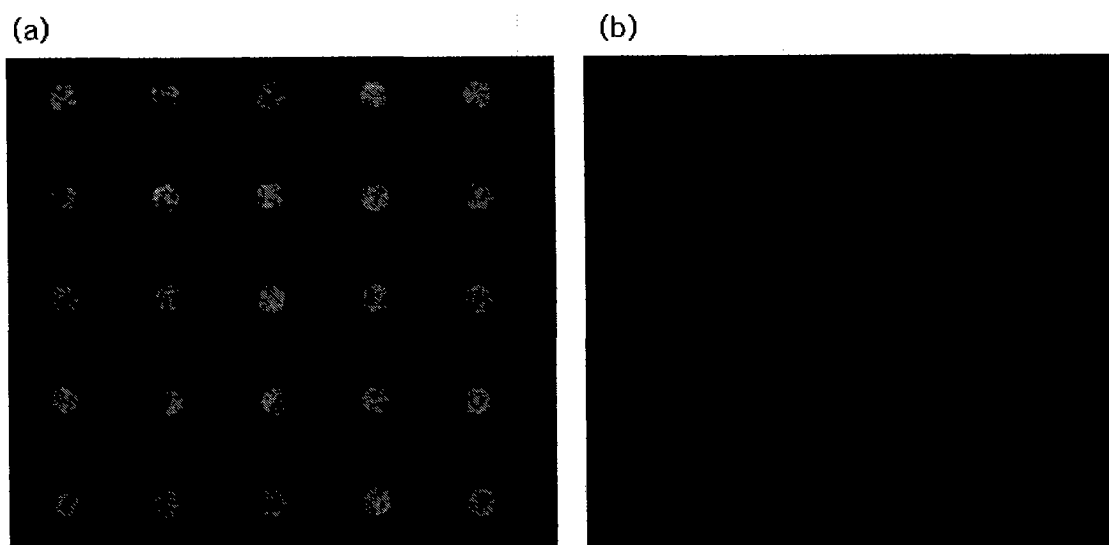


图 4

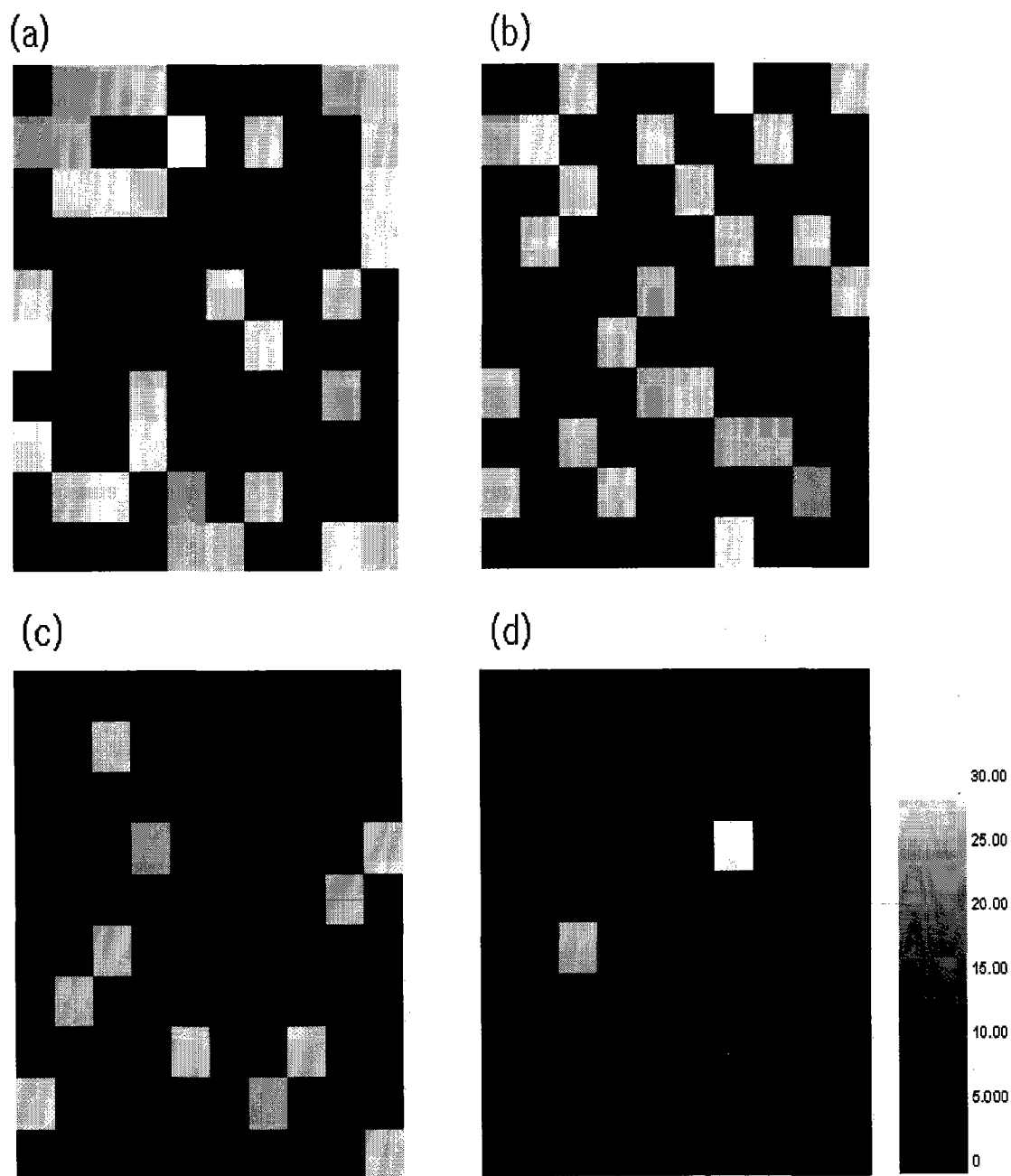


图 5

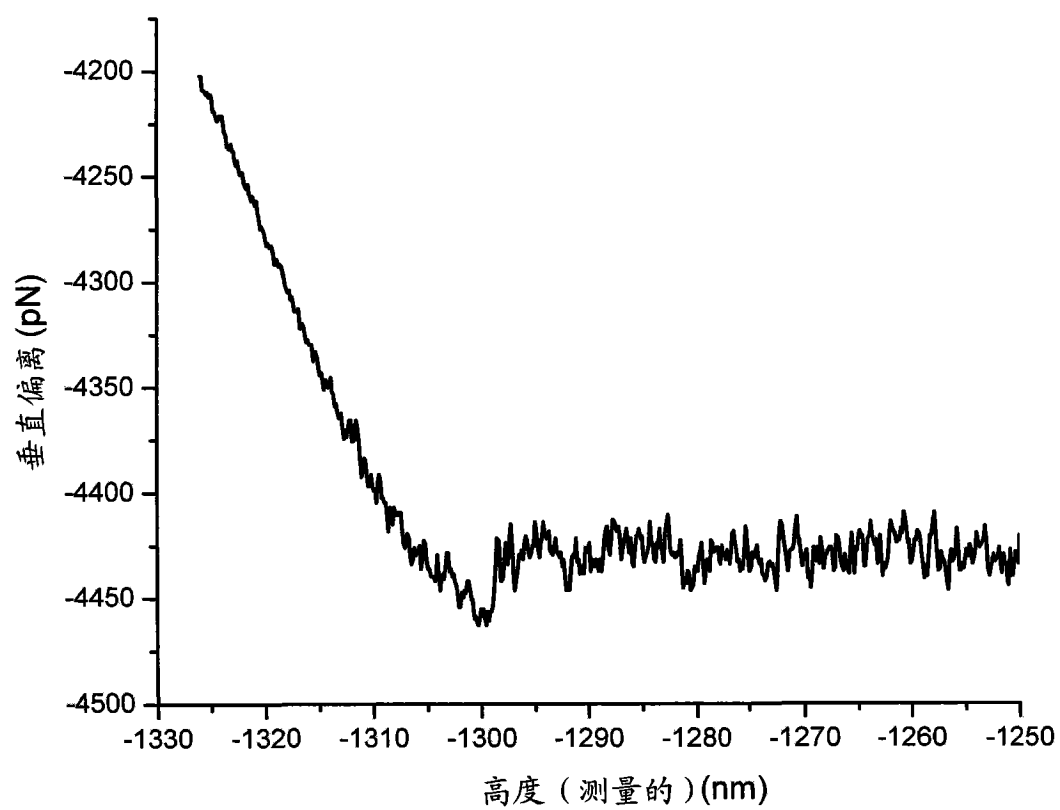


图 6

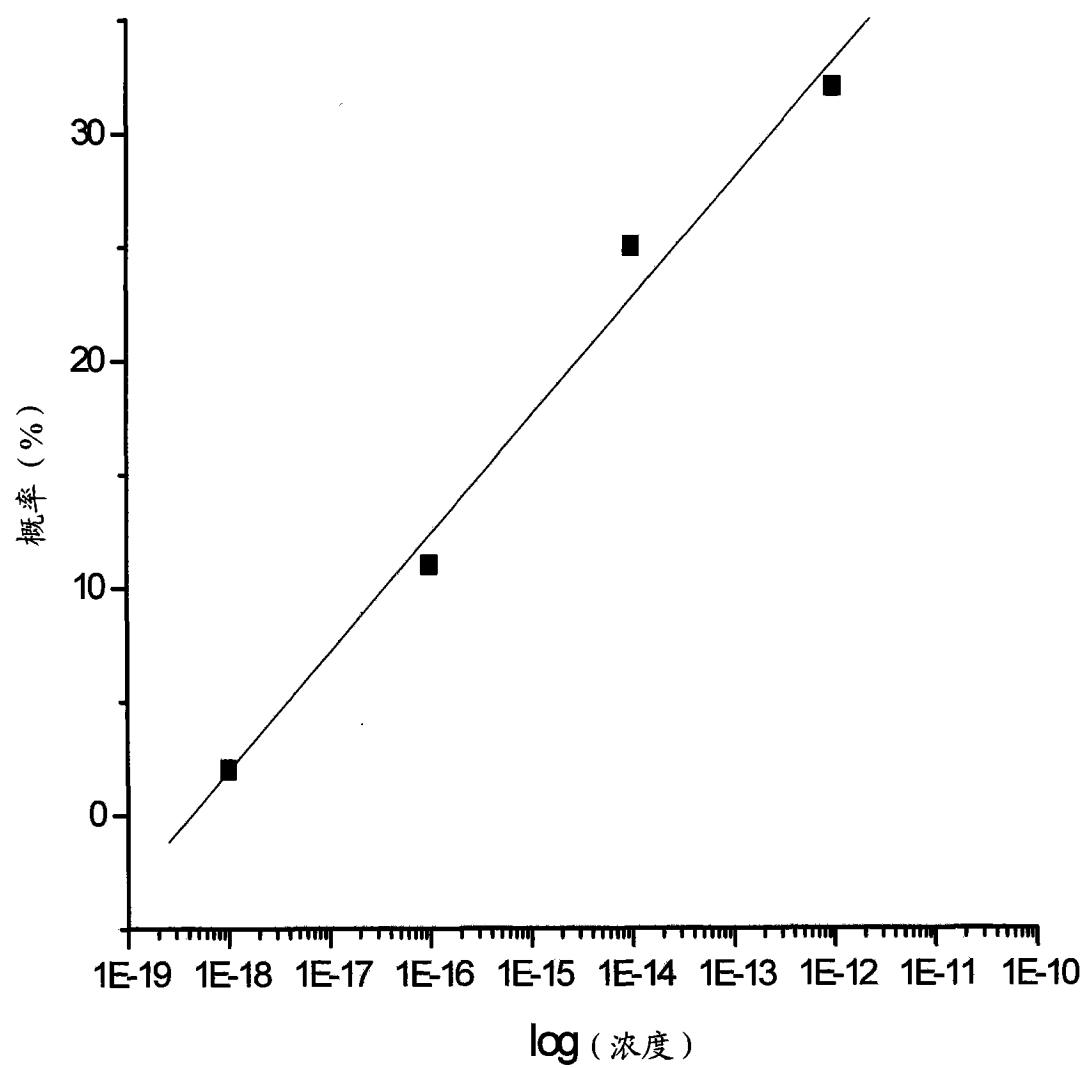


图 7

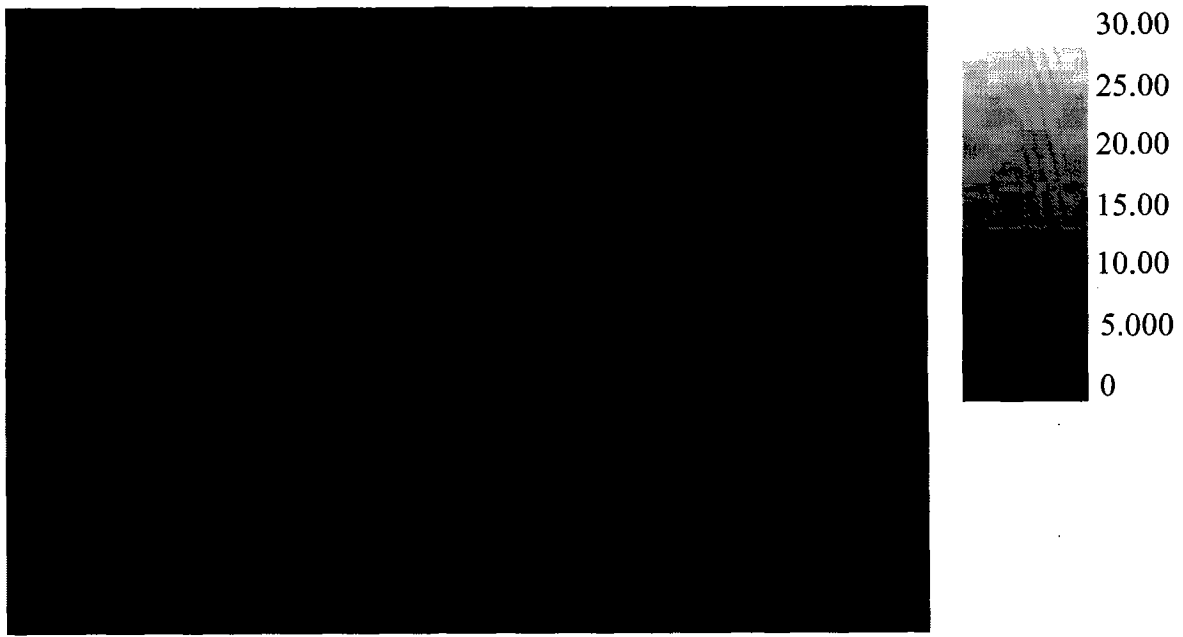


图 8

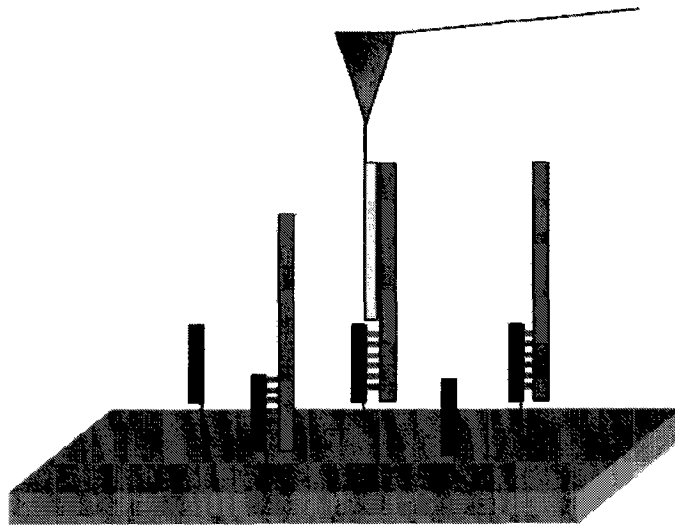


图 9

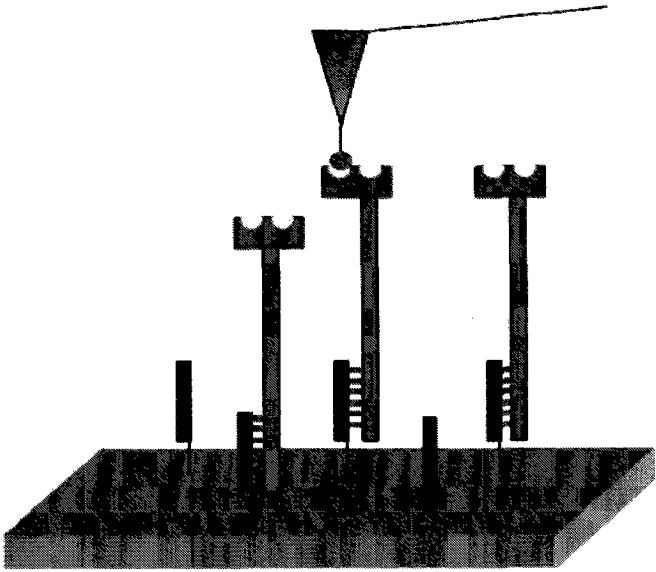


图 10

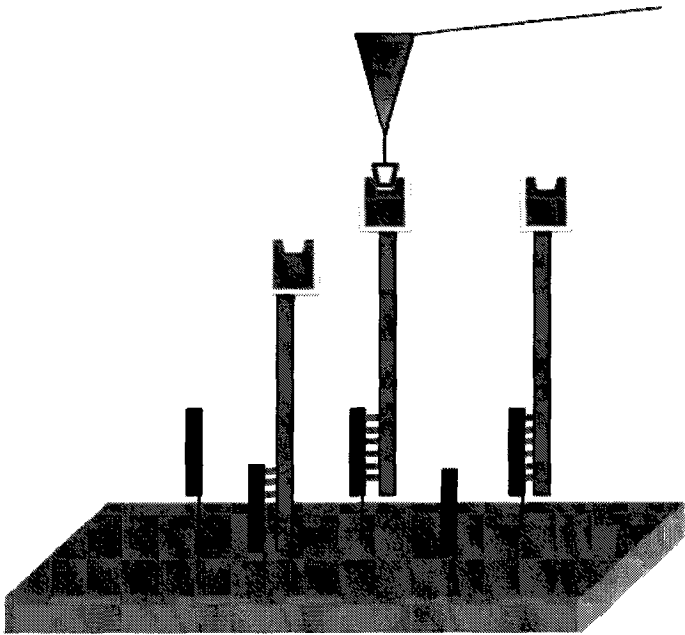


图 11

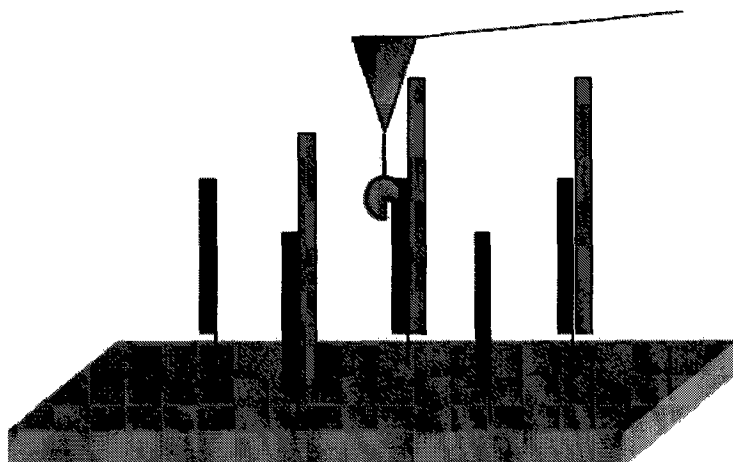


图 12

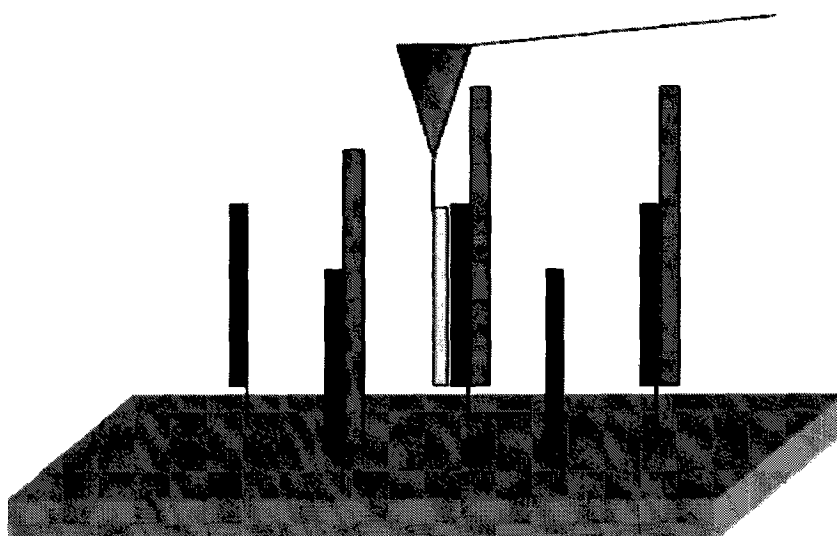


图 13

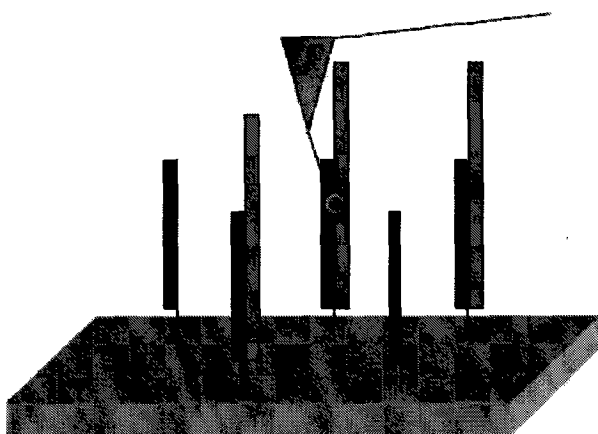


图 14

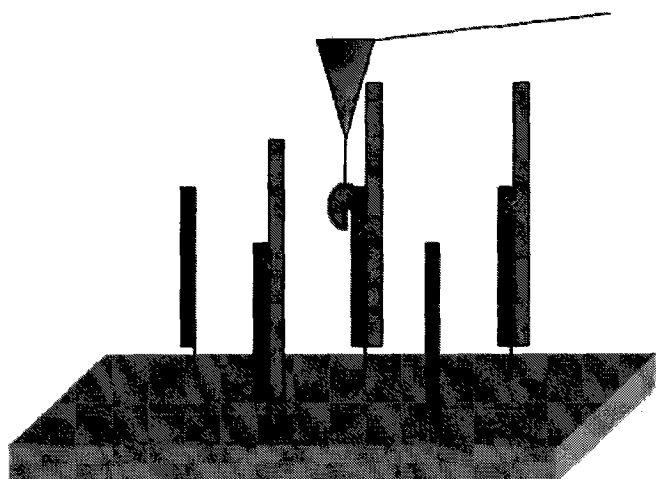


图 15

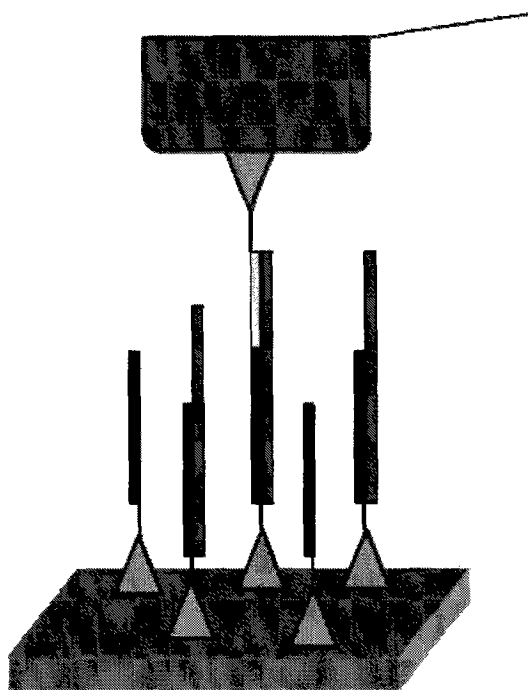


图 16

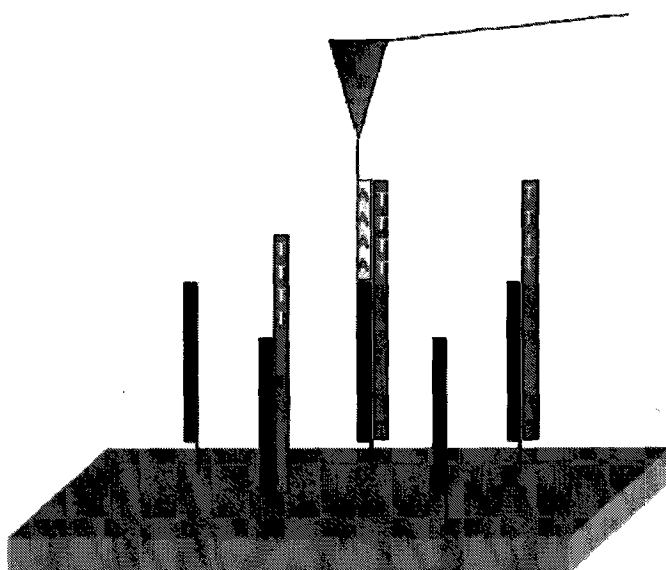


图 17