



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115516105 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 23

(21) 申请号 202180033401.5

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

(22) 申请日 2021.03.04

专利代理师 吕艳英 陈艳娟

(30) 优先权数据

62/986,436 2020.03.06 US

(51) Int.Cl.

C12Q 1/682 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12Q 1/6816 (2006.01)

2022.11.04

C12Q 1/686 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/020919 2021.03.04

C12N 15/11 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/221789 EN 2021.11.04

(71) 申请人 加州理工学院

地址 美国加利福尼亚

申请人 默克优勒设备公司

(72) 发明人 N·A·皮尔斯 H·M·T·蔡

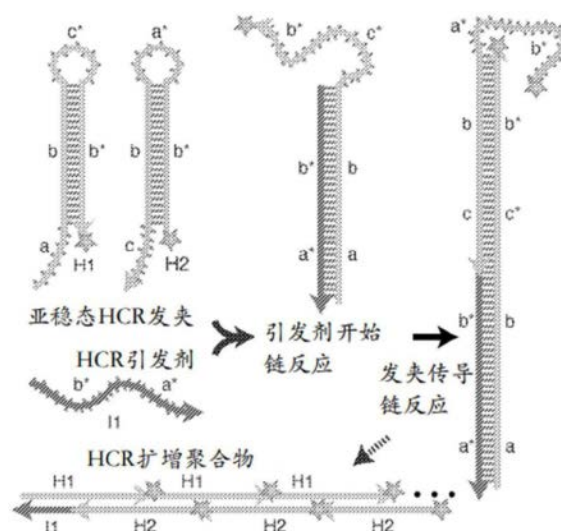
权利要求书12页 说明书112页
序列表2页 附图148页

(54) 发明名称

经由杂交链反应分析样品内的靶分子

(57) 摘要

本文提供了使用杂交链反应 (HCR) 分析样品的方法。一些实施方式涉及以下方面的一个、两个或所有三个: 1) 重复的信号检测, 2) 重叠结合位点, 和 3) 催化报告物沉积 (CARD)。还提供了涉及这些的组合物和试剂盒。还提供了涉及这些的组合物和试剂盒。



1. 一种用于用报告物标记的发夹的重复的信号检测方法,所述方法包括:

a) 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;

b) 提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个探针组包含以下二者其一:i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii) 一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;

c) 任选地洗涤样品;

d) 提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物);

e) 任选地洗涤样品;

f) 检测与M个报告物相对应的M个信号;

g) 从样品中去除M个信号;和

h) 任选地重复步骤b-g的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测;

其中探针组包含以下二者其一:

a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或

b) 一个或多个探针单元,

其中HCR引发剂标记的探针包含:

一个或多个靶结合区和

一个或多个引发剂,

其中探针单元包含:两个或多个HCR分段引发剂探针,

其中HCR分段引发剂探针包含:

靶结合区和

分段引发剂,和

其中HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹,

其中HCR发夹包含输入结构域,所述输入结构域包含:

单链toehold;和

茎段,

其中HCR发夹进一步包含输出结构域,所述输出结构域包含:

单链环;和

茎段的互补物,和

其中HCR发夹进一步包含报告物。

2. 一种用报告物标记的发夹的重复的信号检测方法,所述方法包括:

a) 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;

b) 提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii) 一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;

c) 任选地洗涤样品;

d) 提供一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物);

e) 任选地洗涤样品;

f) 检测来自一个或多个报告物的一个或多个信号;

g) 任选地从样品中去除一个或多个探针组;

- h) 任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器;
 - i) 任选地从样品中去除一个或多个报告物;和
 - j) 任选地从样品中去除一个或多个信号;
- 其中探针组包含以下二者其一:
- a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或
 - b) 一个或多个探针单元,
- 其中HCR引发剂标记的探针包含:
- 一个或多个靶结合区和
 - 一个或多个引发剂,
- 其中探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,
- 其中HCR分段引发剂探针包含:
- 靶结合区和
 - 分段引发剂;
- 其中HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹;
- 其中HCR发夹包含:输入结构域,所述输入结构域包含:
- 单链toehold和
 - 茎段,
- 其中HCR发夹进一步包含输出结构域,所述输出结构域包含:
- 单链环和
 - 茎段的互补物,和
- 其中HCR发夹进一步包含一个或多个报告物。
3. 一种用底物标记的发夹的重复的信号检测方法,所述方法包括:
- a) 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;
 - b) 提供N个探针组,每个包含以下二者其一:i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或
 - ii) 一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;
 - c) 任选地洗涤样品;
 - d) 提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的底物);
 - e) 任选地洗涤样品;
 - f) 提供与N个不同的底物的M个相对应的M个标签探针(对于 $M \leq N$;每个缀合至不同的报告物);
 - g) 任选地洗涤样品;
 - h) 检测与M个不同的报告物相对应的M个信号;
 - i) 从样品中去除M个信号;和
 - j) 任选地重复步骤f-i的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测;
- 其中探针组包含以下二者其一:
- a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或
 - b) 一个或多个探针单元;
- 其中HCR引发剂标记的探针包含:
- 一个或多个靶结合区和

一个或多个引发剂，
其中探针单元包含：两个或多个HCR分段引发剂探针；
其中HCR分段引发剂探针包含：
靶结合区和
分段引发剂；
其中HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹；
其中HCR发夹包含输入结构域，所述输入结构域包含：
单链toehold和
茎段；
其中HCR发夹进一步包含输出结构域，所述输出结构域包含：
单链环和
茎段的互补物；
其中HCR发夹进一步包含底物，和
其中标签探针包含：
底物结合区和
报告物。

4. 一种用底物标记的发夹的重复的信号检测方法，所述方法包括：

- a) 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品；
 - b) 提供一个或多个探针组，每个包含以下二者其一：i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针，或ii) 一个或多个探针单元，每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针；
 - c) 任选地洗涤样品；
 - d) 提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器（每个标记有底物）；
 - e) 任选地洗涤样品；
 - f) 提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针（每个缀合至报告物）；
 - g) 任选地洗涤样品；
 - h) 检测与一个或多个报告物相对应的一个或多个信号；
 - i) 从样品中去除一个或多个信号；和
 - j) 任选地以任意顺序重复步骤b-i的任一个一次或多次；
- 其中探针组包含以下二者其一：
- a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针，或
 - b) 一个或多个探针单元，
- 其中HCR引发剂标记的探针包含：
一个或多个靶结合区和
一个或多个引发剂，
其中探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针，
其中HCR分段引发剂探针包含：
靶结合区和
分段引发剂，
其中HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹，

其中HCR发夹包含输入结构域,所述输入结构域包含:

单链toehold和

茎段,

其中HCR发夹进一步包含输出结构域,所述输出结构域包含:

单链环和

茎段的互补物,

其中HCR发夹进一步包含底物,和

其中标签探针包含:

底物结合区和

报告物。

5. 一种用报告物和/或底物标记的发夹的重复的信号检测方法,所述方法包括:

a) 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;

b) 提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii) 一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;

c) 提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物和/或一个或多个底物);

d) 任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物);

e) 检测一个或多个信号;

f) 任选地洗涤样品;

g) 任选地从样品中去除一个或多个信号;

h) 任选地从样品中去除一个或多个报告物;

i) 任选地从样品中去除一个或多个标签探针;

j) 任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器;

k) 任选地从样品中去除一个或多个探针组;和

l) 任选地以任意顺序重复上述步骤的任一个;

其中探针组包含以下二者其一:

a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或

b) 一个或多个探针单元,

其中HCR引发剂标记的探针包含:

一个或多个靶结合区和

一个或多个引发剂,

其中探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,

其中HCR分段引发剂探针包含:

靶结合区和

分段引发剂,

其中HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹,

其中HCR发夹包含输入结构域,所述输入结构域包含:

单链toehold和

茎段，

其中HCR发夹进一步包含输出结构域，所述输出结构域包含：

单链环和

茎段的互补物，

其中HCR发夹进一步包含：

一个或多个报告物和/或

一个或多个底物，和

其中标签探针包含：

底物结合区和

一个或多个报告物。

6. 一种用报告物和/或底物标记的发夹的重复的信号检测方法，所述方法包括：

a) 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品；

b) 以任意顺序执行步骤c-g的任一个一次或多次；

c) 提供一个或多个HCR探针组，每个包含以下二者其一：i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针，或ii) 一个或多个探针单元，每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针；

d) 提供一个或多个直接或间接地生成一个或多个信号的HCR扩增器；

e) 任选地洗涤样品；

f) 检测一个或多个信号；和

g) 任选地去除一个或多个信号；

其中探针组包含以下二者其一：

a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针，或

b) 一个或多个探针单元；

其中HCR引发剂标记的探针包含：

一个或多个靶结合区和

一个或多个引发剂，

其中探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针，

其中HCR分段引发剂探针包含：

靶结合区和

分段引发剂，

其中HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹，

其中HCR发夹包含输入结构域，所述输入结构域包含：

单链toehold和

茎段，

其中HCR发夹进一步包含输出结构域，所述输出结构域包含：

单链环和

茎段的互补物，和

其中HCR发夹进一步包含：

一个或多个报告物和/或

一个或多个底物。

7. 一种涉及重叠结合位点的HCR方法,所述方法包括:

a) 提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;
b) 提供探针组,其包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点;

c) 任选地洗涤样品;
d) 提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器;
e) 任选地洗涤样品;
f) 任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物);
g) 任选地洗涤样品;和
h) 检测来自报告物的信号。

其中探针组包含一个或多个探针单元,

其中探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,

其中HCR分段引发剂探针包含:

靶结合区和

分段引发剂,

其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点,

其中HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹,

其中HCR发夹包含输入结构域,所述输入结构域包含:

单链toehold和

茎段,

其中HCR发夹进一步包含输出结构域,所述输出结构域包含:

单链环和

茎段的互补物,

其中HCR发夹进一步包含:

报告物和/或

底物;

其中标签探针包含:

底物结合区和

报告物。

8. 一种涉及重叠结合位点的HCR方法,所述方法包括:

a) 提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
b) 提供探针组,其包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点;

c) 任选地洗涤样品;
d) 提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器;
e) 任选地洗涤样品;
f) 任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物);

g) 任选地洗涤样品;和
h) 检测来自报告物的信号;
其中探针组包含一个或多个探针单元;
其中探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,
其中HCR分段引发剂探针包含:
靶结合区和
分段引发剂,
其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点,

其中HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹,
其中HCR发夹包含输入结构域,所述输入结构域包含:
单链toehold和
茎段,
其中HCR发夹进一步包含输出结构域,所述输出结构域包含:
单链环和
茎段的互补物,
其中HCR发夹进一步包含:
报告物和/或
底物,和
其中标签探针包含:
底物结合区和
报告物。

9. 一种用重复的信号检测的涉及重叠结合位点的HCR方法,所述方法包括:

a) 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
b) 提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii) 一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠或非重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠或非重叠结合位点;

c) 任选地洗涤样品;
d) 提供一个或多个HCR扩增器,每个标记有一个或多个报告物和/或底物;
e) 任选地洗涤样品;
f) 任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物);

g) 任选地洗涤样品;
h) 检测来自一个或多个报告物的信号;
i) 任选地从样品中去除一个或多个信号;
j) 任选地从样品中去除一个或多个报告物;
k) 任选地从样品中去除一个或多个标签探针;

- l) 任选地从样品中去除一个或多个扩增器;
 - m) 任选地从样品中去除一个或多个探针组;和
 - n) 任选地以任意顺序重复上述步骤的任一个;
- 其中探针组包含以下二者其一:
- a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或
 - b) 一个或多个探针单元,
- 其中HCR引发剂标记的探针包含:
- 一个或多个靶结合区和
- 一个或多个引发剂,
- 其中探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,
- 其中HCR分段引发剂探针包含:
- 靶结合区和
- 分段引发剂,
- 其中探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠或非重叠结合位点,
- 其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠或非重叠结合位点,
- 其中HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹,
- 其中HCR发夹包含输入结构域,所述输入结构域包含:
- 单链toehold和
- 茎段,
- 其中HCR发夹进一步包含输出结构域,所述输出结构域包含:
- 单链环和
- 茎段的互补物,
- 其中HCR发夹进一步包含:
- 一个或多个报告物和/或
- 一个或多个底物,
- 其中标签探针包含:
- 底物结合区和
- 一个或多个报告物。
10. 根据权利要求1-9的任一项所述的方法,其中靶是核酸序列。
 11. 根据权利要求1或3的任一项所述的方法,其中N是1至1000。
 12. 根据权利要求1或3所述的方法,其中M是2-10,000。
 13. 根据权利要求1-12的任一项所述的方法,其中底物选自由半抗原、地高辛(DIG)、二硝基苯基(DNP)、生物素、荧光团、包含4-50个核苷酸的核酸结构域、募集催化报告物分子沉积的酶的底物、分段底物、直接或间接地介导报告物的定位的核酸结构域组成的组。
 14. 根据权利要求1-13的任一项所述的方法,其中报告物是荧光团、发色团、发光团、磷光体、FRET对、FRET对的成员、淬灭剂、荧光团/淬灭剂对、稀土元素或化合物、放射性分子、磁性分子。
 15. 根据权利要求1-14的任一项所述的方法,进一步包含固定样品。

16. 根据权利要求1-15的任一项所述的方法,进一步包含透化样品。
17. 根据权利要求1-16的任一项所述的方法,进一步包含从样品中去除一个或多个信号。
18. 根据权利要求1-17的任一项所述的方法,进一步包含从样品中去除一个或多个报告物。
19. 根据权利要求1-18的任一项所述的方法,进一步包含从样品中去除一个或多个标签探针。
20. 根据权利要求1-19的任一项所述的方法,进一步包含从样品中去除一个或多个扩增器。
21. 根据权利要求1-20的任一项所述的方法,进一步包含从样品中去除一个或多个探针组。
22. 根据权利要求1-21的任一项所述的方法,进一步包含以任意顺序重复上述步骤的任一个。
23. 根据权利要求1-21的任一项所述的方法,其中以权利要求中字母标注的字母顺序进行。
24. 根据权利要求1-23的任一项所述的方法,其中探针单元每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,并且其中HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。
25. 根据权利要求1-24的任一项所述的方法,其中涉及重叠结合并且其中重叠是至少1、2或3个核苷酸。
26. 一种方法,其包含:
提供:
第一分段引发剂探针,其包含第一分段引发剂;
第二分段引发剂探针,其包含第二分段引发剂;
第一发夹单体,其包含:
第一输入结构域,其包含第一toehold和第一茎段,
第一输出结构域,其包含第一发夹环和第一茎段的互补物,和
第一半抗原分子;
第二发夹单体,其包含:
第二输入结构域,其包含第二toehold和第二茎段,
第二输出结构域,其包含第二发夹环和第二茎段的互补物,和
第二半抗原分子
靶分子;和
将第一分段引发剂探针和第二分段引发剂探针与靶孵育。
27. 根据权利要求26所述的方法,其中孵育将第一分段引发剂探针结合至靶分子,并且将第二分段引发剂探针结合至靶分子。
28. 根据权利要求26-27的任一项所述的方法,进一步包含:
将第一发夹单体结合至第一分段引发剂和第二分段引发剂二者;
将第二发夹单体结合至第一发夹单体;
提供标记有一个或多个报告物实体的抗半抗原分子,其中报告物实体是介导CARD的

酶；

提供一个或多个CARD底物；

测量来自通过介导CARD的酶从CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号。

29. 根据权利要求26-28的任一项所述的方法,其中抗半抗原分子是抗半抗原抗体或抗半抗原纳米抗体。

30. 根据权利要求26-29的任一项所述的方法,其中至少一种靶是核酸。

31. 根据权利要求26-30的任一项所述的方法,其中至少一种靶分子是RNA。

32. 一种方法,其包含:

提供:

包含至少一个引发剂的至少一个引发剂标记的探针;

第一发夹单体,其包含:

第一输入结构域,其包含第一toehold和第一茎段,

第一输出结构域,其包含第一发夹环和第一茎段的互补物,和

第一半抗原分子;

第二发夹单体,其包含:

第二输入结构域,其包含第二toehold和第二茎段,

第二输出结构域,其包含第二发夹环和第二茎段的互补物,和

第二半抗原分子,

靶分子;和

将包含至少一个引发剂的至少一个引发剂标记的探针与靶孵育。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中孵育将包含至少一个引发剂的至少一个引发剂标记的探针结合至靶分子。

34. 根据权利要求32-33的任一项所述的方法,进一步包含:

将第一发夹单体结合至至少一个引发剂;

将第二发夹单体结合至第一发夹单体;

提供标记有一个或多个报告物实体的抗半抗原分子,其中报告物实体是介导CARD的酶;

提供一个或多个CARD底物;

测量来自通过介导CARD的酶从CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号。

35. 根据权利要求32-34的任一项所述的方法,其中靶分子是蛋白质。

36. 根据权利要求32-35的任一项所述的方法,其中抗半抗原分子是抗半抗原抗体或抗半抗原纳米抗体。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中抗半抗原是一抗。

38. 根据权利要求36所述的方法,其中抗半抗原抗体包含结合半抗原的一抗并且方法进一步包含结合一抗的二抗(标记有一个或多个报告物实体)。

39. 一种方法,其包含:

提供:

第一分段引发剂探针,其包含第一分段引发剂;

第二分段引发剂探针,其包含第二分段引发剂

第一发夹单体,其包含:

第一输入结构域,其包含第一toehold和第一茎段,

第一输出结构域,其包含第一发夹环和第一茎段的互补物,和底物;

第二发夹单体,其包含:

第二输入结构域,其包含第二toehold和第二茎段,

第二输出结构域,其包含第二发夹环和第二茎段的互补物,和底物,

靶分子;和

将第一分段引发剂探针和第二分段引发剂探针与靶孵育。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中孵育将第一分段引发剂探针结合至靶分子,并且将第二分段引发剂探针结合至靶分子。

41. 根据权利要求39-40的任一项所述的方法,进一步包含:

将第一发夹单体结合至第一分段引发剂和第二分段引发剂二者;

将第二发夹单体结合至第一发夹单体;

提供标记有一个或多个报告物实体的底物结合区,其中底物结合区结合至底物,并且其中报告物实体是介导CARD的酶;

提供一个或多个CARD底物;

测量来自通过介导CARD的酶从CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号。

42. 根据权利要求39-41的任一项所述的方法,其中至少一种靶是核酸。

43. 根据权利要求39-42的任一项所述的方法,其中至少一种靶分子是RNA。

44. 一种方法,其包含:

提供:

第一分段引发剂探针,其包含第一分段引发剂;

第二分段引发剂探针,其包含第二分段引发剂

第一发夹单体,其包含:

第一输入结构域,其包含第一toehold和第一茎段,

第一输出结构域,其包含第一发夹环和第一茎段的互补物,和第一分段底物;

第二发夹单体,其包含:

第二输入结构域,其包含第二toehold和第二茎段,

第二输出结构域,其包含第二发夹环和第二茎段的互补物,和第二分段底物,

靶分子;和

将第一分段引发剂探针和第二分段引发剂探针与靶分子孵育。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中孵育将第一分段引发剂探针结合至靶分子,并且将第二分段引发剂探针结合至靶分子。

46. 根据权利要求44-45的任一项所述的方法,进一步包含:

将第一发夹单体结合至第一分段引发剂和第二分段引发剂二者;

- 将第二发夹单体结合至第一发夹单体；
获得包含第一和第二分段底物的全底物；
提供标记有一个或多个报告物实体的底物结合区，其中底物结合区结合至全底物，并且其中报告物实体是介导CARD的酶；
提供一个或多个CARD底物；
测量来自通过介导CARD的酶从CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号。
47. 根据权利要求44-46的任一项所述的方法，其中至少一种靶是核酸。
48. 根据权利要求44-47的任一项所述的方法，其中至少一种靶分子是RNA。

经由杂交链反应分析样品内的靶分子

关于联邦资助的R&D的声明

[0001] 本发明是在政府支持下由国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的批准号R01EB006192和来自DARPA的批准HR0011-17-2-0008的资助下完成。政府对本发明具有一定的权利。

优先权和相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求在2020年3月6日提交的美国临时申请62/986436的权益,其在此通过引用以其整体并入。

对电子序列表的引用

[0003] 本申请与电子序列表一起提交。电子序列表以2021年3月4日创建的、名称为MOINS007WOSEQLIST.txt、大小为1,341字节的文件提供。电子序列表中的信息通过引用以其整体并入本文。

背景技术

技术领域

[0004] 本发明总体上涉及与杂交链反应有关的组合物和方法。

相关技术的描述

[0005] 杂交链反应 (HCR) 是用于从亚稳态发夹单体或其他亚稳态核酸结构开始的核酸分子的触发杂交的方法。HCR不需要任何酶并且可等温操作。

[0006] HCR可涉及两种或多种亚稳态发夹单体。发夹单体各自具有至少一个单链toehold、单链环和双链茎。驱动自组装级联的能量被存储在发夹的单链环和toehold片段中。

[0007] 每个单体被捕获在动力学陷阱 (kinetic trap) 中,防止系统快速平衡。也就是说,在不存在引发剂的情况下,单体对不能彼此杂交。引发剂链的引入引起单体经历杂交事件的链反应以形成带切口的双链聚合物。HCR可用于例如通过用携带HCR引发剂的引发剂标记的探针(其又触发HCR信号扩增)检测分析物来检测样品中感兴趣的分析物的存在。HCR信号扩增使得通过在源于样品的背景以上扩增信号来增加分子检测和成像应用的信噪比成为可能。

发明内容

[0008] 本文提供的一些实施方式提供使用包含两个或多个分段引发剂探针的探针单元的甚至更大的信噪比,所述分段引发剂探针各自包含分段引发剂。如果单独的分段引发剂探针在样品中非特异性地结合,则它们不触发HCR。然而,如果它们特异性地结合至它们的同源靶,探针单元内的分段引发剂共定位以形成全HCR引发剂,使能够触发HCR信号扩增。在一些实施方式中,将引发剂分离成两个或多个分段引发剂(其仅在存在靶的情况下有效地共定位),在检测步骤期间提供自动背景抑制。当在扩增期间与由HCR提供的自动背景抑制

结合时,该过程提供整个方案的自动背景抑制(例如,如果试剂(单独的探针或单独的发夹单体二者其一)在样品中结合,它不会导致扩增的背景的生成)。

[0009] 在本文呈现的一些实施方式中,探针单元包含两个分段引发剂探针,每个包含靶结合区和分段引发剂,其中探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶上的邻近结合位点以便共定位全HCR引发剂,并且其中每个探针单元内的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的邻近结合位点以便触发HCR信号扩增。在一些实施方式中,在靶、分段引发剂探针和/或HCR发夹之间的连接是能量上不利的。在一些实施方式中,通过配置探针单元内的靶结合区以结合至靶上的重叠结合位点和/或通过配置探针单元内的分段引发剂以杂交至HCR发夹上的重叠结合位点,连接可松弛为能量上更有利的构象,增加HCR信号扩增的强度。

[0010] 在本文提供的一些实施方式中,样品内的一个或多个靶可通过生成一个或多个HCR信号来分析,检测一个或多个HCR信号,去除一个或多个HCR信号,和重复这些步骤的一个或多个。

[0011] 在本文提供的一些实施方式中,HCR信号扩增用于介导催化报告物沉积(CARD),导致甚至更高的信号增益,和允许染色样品的长期归档储存用于监管目的。

[0012] 在一些实施方式中,提供了用报告物标记的发夹的重复的信号检测方法。在一些实施方式中,所述方法包括提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包含以下二者之一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,任选地洗涤样品,提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物),任选地洗涤样品,检测与M个报告物相对应的M个信号,从样品中去除M个信号;和任选地重复一个或多个以上的步骤,直到已对所有N个靶执行信号检测。探针组包含以下二者其一:一个或多个HCR引发剂标记的探针,或一个或多个探针单元。HCR引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合区和一个或多个引发剂。探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹。HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段(stem section)。HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。HCR发夹进一步包含报告物。

[0013] 在一些实施方式中,提供了一种用于用报告物标记的发夹的重复的信号检测方法。在一些实施方式中,所述方法包括提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品,提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,任选地洗涤样品,提供一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物),任选地洗涤样品,检测来自一个或多个报告物的一个或多个信号,任选地从样品中去除一个或多个探针组,任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器,任选地从样品中去除一个或多个报告物,和任选地从样品中去除一个或多个信号。探针组包含以下二者其一:一个或多个HCR引发剂标记的探针,或一个或多个探针单元。HCR引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合区和一个或多个引发剂。探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹。HCR发夹包含:包含单链toehold和茎段的输入结构域。HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单

链环和茎段的互补物。HCR发夹进一步包含一个或多个报告物。

[0014] 在一些实施方式中,提供了用底物标记的发夹重复的信号检测方法。在一些实施方式中,所述方法包括a)提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供N个探针组,每个包含以下二者其一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,c)任选地洗涤样品,d)提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的底物),e)任选地洗涤样品,f)提供与N个不同的底物的M个相对应的M个标签探针(对于 $M \leq N$;每个缀合至不同的报告物),g)任选地洗涤样品,h)检测与M个不同的报告物相对应的M个信号,i)从样品中去除M个信号,和j)任选地重复步骤f-i的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。探针组包含以下二者其一:一个或多个HCR引发剂标记的探针,或一个或多个探针单元。HCR引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合区和一个或多个引发剂。探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹。HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段。HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。HCR发夹进一步包含底物。标签探针包含底物结合区和报告物。

[0015] 在一些实施方式中,提供了一种用于用底物标记的发夹的重复的信号检测方法。在一些实施方式中,所述方法包括a)提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品,b)提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,c)任选地洗涤样品,d)提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有底物),e)任选地洗涤样品,f)提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至报告物),g)任选地洗涤样品,h)检测与一个或多个报告物相对应的一个或多个信号,i)从样品中去除一个或多个信号,和j)任选地以任意顺序重复步骤b-i的任一个一次或多次。探针组包含以下二者其一:一个或多个HCR引发剂标记的探针,或一个或多个探针单元。HCR引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合区和一个或多个引发剂。探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹。HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段。HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。HCR发夹进一步包含底物。标签探针包含底物结合区和报告物。

[0016] 在一些实施方式中,提供了一种用报告物和/或底物标记的发夹的重复的信号检测方法。在一些实施方式中,所述方法包括提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品,提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物和/或一个或多个底物),任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物),检测一个或多个信号,任选地洗涤样品,任选地从样品中去除一个或多个信号,任选地从样品中去除一个或多个报告物,任选地从样品中去除一个或多个标签探针,任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器,任选地从样品中去除一个或多个探针组,和任选地以任意顺序重复上述步骤的任一个。探针组包含以下二者其

一：一个或多个HCR引发剂标记的探针，或一个或多个探针单元。HCR引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合区和一个或多个引发剂。探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹。HCR发夹包含输入结构域，输入结构域包含单链toehold和茎段。HCR发夹进一步包含输出结构域，输出结构域包含单链环和茎段的互补物。HCR发夹进一步包含一个或多个报告物和/或一个或多个底物。标签探针包含底物结合区和一个或多个报告物。

[0017] 在一些实施方式中，提供了一种用报告物和/或底物标记的发夹的重复的信号检测方法。在一些实施方式中，所述方法包括提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品，以任意顺序执行步骤c-g的任一个一次或多次，提供一个或多个HCR探针组，每个包含以下二者其一：i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针，或ii) 一个或多个探针单元，每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针，提供一个或多个直接或间接地生成一个或多个信号的HCR扩增器，任选地洗涤样品，检测一个或多个信号，和任选地去除一个或多个信号，其中探针组包含以下二者其一：一个或多个HCR引发剂标记的探针，或一个或多个探针单元。HCR引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合区和一个或多个引发剂。探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹。HCR发夹包含输入结构域，输入结构域包含单链toehold和茎段。HCR发夹进一步包含输出结构域，输出结构域包含单链环和茎段的互补物。HCR发夹进一步包含一个或多个报告物和/或一个或多个底物。

[0018] 在一些实施方式中，提供了一种涉及重叠结合位点的HCR方法。在一些实施方式中，所述方法包括提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品，提供包含一个或多个探针单元的探针组，每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针，其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点，任选地洗涤样品，提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器，任选地洗涤样品，任选地提供与底物相对应的标签探针（缀合至报告物），任选地洗涤样品，和检测来自报告物的信号。探针组包含一个或多个探针单元。探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点。HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹。HCR发夹包含输入结构域，输入结构域包含单链toehold和茎段。HCR发夹进一步包含输出结构域，输出结构域包含单链环和茎段的互补物。HCR发夹进一步包含报告物和/或底物。标签探针包含底物结合区和报告物。

[0019] 在一些实施方式中，提供了一种涉及重叠结合位点的HCR方法。在一些实施方式中，所述方法包括提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品，提供包含一个或多个探针单元的探针组，每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针，其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点，任选地洗涤样品，提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器，任选地洗涤样品，任选地提供与底物相对应的标签探针（缀合至报告物），任选地洗涤样品，和检测来自报告物的信号。探针组包含一个或多个探针单元。探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点。HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹。HCR发夹包含输入结构域，输入结构域包含单链toehold和茎段。HCR发夹进一步包含输出结构域，输出结构域包含单链环

和茎段的互补物。HCR发夹进一步包含报告物和/或底物。标签探针包含底物结合区和报告物。

[0020] 在一些实施方式中,提供了一种涉及用重复的信号检测的重叠结合位点的HCR方法。在一些实施方式中,所述方法包括提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品,提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii) 一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠或非重叠结合位点,并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠或非重叠结合位点,任选地洗涤样品,提供一个或多个各自标记有一个或多个报告物和/或底物的HCR扩增器,任选地洗涤样品,任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物),任选地洗涤样品,检测来自一个或多个报告物的信号,任选地从样品中去除一个或多个信号,任选地从样品中去除一个或多个报告物,任选地从样品中去除一个或多个标签探针,任选地从样品中去除一个或多个扩增器,任选地从样品中去除一个或多个探针组,和任选地以任意顺序重复上述步骤的任一个。探针组包含以下二者其一:一个或多个HCR引发剂标记的探针,或一个或多个探针单元。HCR引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合区和一个或多个引发剂。探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠或非重叠结合位点。每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠或非重叠结合位点。HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹。HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段。HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。HCR发夹进一步包含一个或多个报告物和/或一个或多个底物。标签探针包含底物结合区和一个或多个报告物。

[0021] 在一些实施方式中,所述方法包括提供包含第一分段引发剂的第一分段引发剂探针,包含第二分段引发剂的第二分段引发剂探针,包含第一输入结构域(其包含第一toehold和第一茎段)、第一输出结构域(其包含第一发夹环和第一茎段的互补物)和第一半抗原分子的第一发夹单体,包含第二输入结构域(包含第二toehold和第二茎段)、第二输出结构域(其包含第二发夹环和第二茎段的互补物)和第二半抗原分子的第二发夹单体,靶分子,以及将第一分段引发剂探针和第二分段引发剂探针与靶孵育。

[0022] 在一些实施方式中,方法包括提供包含至少一个引发剂的至少一个引发剂标记的探针,包含第一输入结构域(其包含第一toehold和第一茎段)、第一输出结构域(其包含第一发夹环和第一茎段的互补物)和第一半抗原分子的第一发夹单体,包含第二输入结构域(其包含第二toehold和第二茎段)、第二输出结构域(其包含第二发夹环和第二茎段的互补物)和第二半抗原分子的第二发夹单体,靶分子,以及将包含至少一个引发剂的至少一个引发剂标记的探针与靶孵育。

[0023] 在一些实施方式中,方法包括提供包含第一分段引发剂的第一分段引发剂探针,包含第二分段引发剂的第二分段引发剂探针,包含第一输入结构域(其包含第一toehold和第一茎段)、第一输出结构域(其包含第一发夹环和第一茎段的互补物)和底物的第一发夹单体,包含第二输入结构域(其包含第二toehold和第二茎段)、第二输出结构域(其包含第二发夹环和第二茎段的互补物)和底物的第二发夹单体,靶分子,以及将第一分段引发剂探

针和第二分段引发剂探针与靶孵育。

[0024] 在一些实施方式中,方法包括提供包含第一分段引发剂的第一分段引发剂探针,包含第二分段引发剂的第二分段引发剂探针,包含第一输入结构域(其包含第一toehold和第一茎段)、第一输出结构域(其包含第一发夹环和第一茎段的互补物)和第一分段底物的第一发夹单体,包含第二输入结构域(其包含第二toehold和第二茎段、第二输出结构域(其包含第二发夹环和第二茎段的互补物)和第二分段底物的第二发夹单体,靶分子,以及将第一分段引发剂探针和第二分段引发剂探针与靶分子孵育。

附图说明

[0025] 图1A和1B描绘经由杂交链反应(HCR)的原位扩增的一些实施方式。

[0026] 图2A和2B描绘使用两阶段或三阶段方案二者其一的原位HCR的示意图。

[0027] 图3A和3B描绘两个邻近靶区段和两个分段引发剂探针的一些排列,所述分段引发剂与这些邻近的靶区段杂交以共定位两个分段引发剂。

[0028] 图4A-4D描绘通过靶分子共定位的分段引发剂探针的一些实施方式。

[0029] 图5A-5E描绘通过靶复合物共定位的分段引发剂探针的一些实施方式。

[0030] 图6描绘使用未优化的标准探针和分段引发剂探针在整装(whole-mount)鸡胚中成像靶mRNA。

[0031] 图7A-7C描绘通过靶共定位的分段引发剂探针的一些实施方式,并展示试管数据,证明使用通过靶共定位的分段引发剂探针触发HCR。

[0032] 图8A-8B描绘使用分段引发剂探针的原位HCR的一些实施方式。

[0033] 图9A-9D描绘使用标准探针和分段引发剂探针的背景和信噪比。

[0034] 图10A-10D描绘使用分段引发剂探针在无探针组优化的情况下,在固定的整装鸡胚中具有高信噪比的mRNA表达的多重成像。

[0035] 图11A-11B描绘使用分段引发剂探针在固定的整装鸡胚中以亚细胞分辨率对mRNA表达进行定量成像。

[0036] 图12描绘使第一分段引发剂探针和第二分段引发剂探针与靶分子杂交的一些实施方式。

[0037] 图13描绘在通过HCR引发剂引发时从发夹单体触发HCR扩增聚合物自组装的一些实施方式。图13中的1050描绘了来自两个部分的全引发剂。仅描绘了分段引发剂探针的一部分。I1(1050)表示通过靶共定位的两个分段引发剂探针形成的全引发剂。

[0038] 图14描绘使用通过HCR引发剂触发的发夹单体的HCR扩增的一些实施方式。仅描绘了分段引发剂探针的一部分。I1表示通过由靶共定位的两个分段引发剂探针形成的全引发剂。

[0039] 图15描绘使用简化的HCR发夹单体的HCR机制一些实施方式。

[0040] 图16A-16D描绘包含一个或多个探针单元和任选地包含一个或多个辅助探针的探针组的一些实施方式。

[0041] 图17A-17C描绘包含分段引发剂探针的探针单元的一些实施方式。

[0042] 图18A-18F描绘HCR扩增器的一些实施方式。

[0043] 图19A-19B描绘包含四个HCR发夹的HCR扩增器的一些实施方式。

- [0044] 图20A-20F描绘标签探针的一些实施方式。
- [0045] 图21A-21B描绘被设计为与HCR发夹的重叠区互补的分段引发剂探针的一些实施方式。
- [0046] 图22描绘被设计为与靶的重叠区互补的分段引发剂探针的一些实施方式。
- [0047] 图23A-23O描绘用于从样品中去除HCR信号的一些实施方式。在一些实施方式中,过程中的任何一个或多个步骤可与图23A-23O和40A-40N的其他方法组合。在一些实施方式中,图23A-23O的过程中的任何一个或多个步骤可与图26A-26T和40A-40N的其他方法组合。
- [0048] 图24A-24B描绘使用被设计为与HCR发夹的重叠区互补的分段引发剂探针提高HCR信号强度的一些实施方式。
- [0049] 图25A-25B描绘经由重复的报告物检测在培养的人细胞中多重原位杂交的一些实施方式。
- [0050] 图26A-26T描绘使用HCR引发剂标记的探针和/或HCR分段引发剂探针与HCR扩增器组合检测样品中一个或多个靶的各种方法的一些实施方式。在一些实施方式中,过程中的任何一个或多个步骤可与图26A-26T的其它方法组合使用。
- [0051] 图27描绘被设计为与HCR发夹的重叠区互补并被设计为与靶的重叠区互补的分段引发剂探针的一些实施方式。
- [0052] 图28A-28C描绘体外优化协同探针连接以增强分段引发剂HCR抑制(关状态)和转换(开状态)的实例的一些实施方式。
- [0053] 图29A-29D描绘使用引发剂标记的一抗探针对福尔马林固定的石蜡包埋的小鼠脑切片中的蛋白质靶进行成像的多重HCR免疫组织化学的一些实施方式。
- [0054] 图30A-30D描绘使用未标记的一抗探针和引发剂标记的二抗探针对福尔马林固定的石蜡包埋的小鼠脑切片中的蛋白质靶进行成像的多重HCR免疫组织化学的一些实施方式。
- [0055] 图31A-31C描绘福尔马林固定的石蜡包埋的小鼠脑切片中同时进行HCR RNA原位杂交和蛋白质免疫组织化学的一些实施方式,其使用用于mRNA靶的DNA分段引发剂探针和用于蛋白质靶的引发剂标记的一抗探针,同时对所有靶进行HCR信号扩增。
- [0056] 图32A-32C描绘在福尔马林固定的石蜡包埋的小鼠脑切片中同时进行HCR RNA原位杂交和蛋白质免疫组织化学的一些实施方式,其使用用于mRNA靶的DNA分段引发剂探针和用于蛋白质靶的未标记的一抗探针和引发剂标记的二抗探针,同时对所有靶进行HCR信号扩增。
- [0057] 图33A-33E描绘使用HCR介导各种各样的靶类型的CARD信号扩增的一些实施方式。
- [0058] 图34A-34C描绘使用HCR介导通用的靶分子和靶复合物的CARD信号扩增的一些实施方式。
- [0059] 图35描绘用于在HCR CARD信号扩增的背景下放置半抗原的一些实施方式。
- [0060] 图36A-36B描绘使用底物标记的或分段底物HCR发夹的HCR CARD信号扩增的一些实施方式。
- [0061] 图37A-37B描绘使用HCR介导的CARD信号扩增对福尔马林固定的石蜡包埋的人肾脏和肝脏切片中的RNA靶进行成像的一些实施方式。
- [0062] 图38描绘通过靶分子或靶复合物二者其一直接或间接地共定位的分段引发剂探

针的一些实施方式。

[0063] 图39A-39N描绘直接或间接地结合至靶分子或靶复合物二者其一的引发剂标记的探针的一些实施方式。

[0064] 图40A-40N描绘从样品中去除HCR信号的一些实施方式。在一些实施方式中,过程中的任何一个或多个步骤可与图23A-23O和40A-40N的其他方法组合。在一些实施方式中,图40A-40N的过程中的任何一个或多个步骤可与图23A-23O和26A-26T的其他方法组合。

[0065] 图41A-41C描绘使用分段引发剂探针在福尔马林固定的石蜡包埋的小鼠脑切片中以亚细胞分辨率对mRNA表达进行定量成像的一些实施方式。

[0066] 图42A-42F描绘包含一个或多个HCR引发剂的引发剂标记的探针的一些实施方式。

[0067] 图43A-43C描绘使用引发剂标记的探针对整装斑马鱼胚胎中的靶microRNA和mRNA进行成像的一些实施方式。

[0068] 图44A-44Z描绘包含一个或多个被屏蔽的HCR引发剂的被屏蔽的引发剂标记的探针的一些实施方式。

[0069] 图45A-45B描绘使用被屏蔽的引发剂标记的探针以降低背景的实例的一些实施方式。

[0070] 图46A-46M描绘用于被屏蔽的引发剂标记的探针的背景下的被屏蔽的引发剂的一些实施例。

[0071] 图47显示图25A中从HCR聚合物中去杂交HCR发夹的序列的实施方式(表2)。

详细描述

[0072] 杂交链反应(HCR)是用于触发从亚稳态发夹单体或其他亚稳态核酸结构开始的核酸分子的杂交的方法。参见,例如,Dirks,R.和Pierce,N.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(43):15275-15278(2004),和2005年3月22提交的美国专利申请号11/087,937,2012年1月31日提交的美国专利号US 8,105,778,2013年8月13日提交的美国专利号8,507,204;和2017年6月30日提交的美国专利公开号2018/0010166,其每一个通过引用以其整体并入本文。在该过程的简单版本中,亚稳态发夹单体在由核酸引发剂链触发时经历杂交事件的链反应以形成带切口的双链聚合物。发夹单体储存能量以在它们的单链环和toehold中驱动聚合过程。

[0073] HCR可涉及两个或多个亚稳态发夹单体。发夹单体各自具有至少一个单链toehold、单链环和双链茎。驱动自组装级联的能量储存在发夹的单链环和toehold区段中。

[0074] 每个单体被捕获在动力学陷阱(kinetic trap)中,防止系统快速平衡。也就是说,在不存在引发剂的情况下,单体对不能彼此杂交。引发剂链的引入引起单体经历杂交事件的链反应以形成带切口的双链聚合物。HCR可用于例如通过用携带HCR引发剂(其又触发HCR信号扩增)的探针检测分析物来检测样品中感兴趣的分析物的存在。HCR信号扩增使得通过在源于样品的背景以上扩增信号来增加分子检测和成像应用的信噪比成为可能。

[0075] 本文提供的是HCR的实施方式。使用杂交链反应(HCR)分析样品的方法可涉及以下方面的一个、两个或所有三个:1)重复的信号检测,2)重叠结合位点,和3)催化报告物沉积(CARD)。

[0076] 在方法的一些实施方式中,可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品与N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个)组合,每个探针组包含一个或多个探针单

元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。添加与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物)。其后,检测与M个报告物相对应的M个信号。重复方法的步骤,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0077] 在方法的一些实施方式中,可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品,与一个或多个探针组组合,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。添加一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物),和检测来自一个或多个报告物的一个或多个信号。

[0078] 在方法的一些实施方式中,可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品与N个探针组组合,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。添加与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的底物)和与N个不同的底物的M个相对应的M个标签探针(对于 $M \leq N$;每个缀合至不同的报告物)。其后,检测与M个不同的报告物相对应的M个信号。重复方法的步骤,直到已对所有N个靶执行信号检测。在一些实施方式中,提供了重复的信号检测方法。方法包含底物标记的发夹,可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品与一个或多个探针组(每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针)、与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有底物)和与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至报告物)组合。其后,检测与一个或多个报告物相对应的一个或多个信号。以任意顺序重复方法的步骤一次或多次。

[0079] 在用报告物和/或底物标记的发夹的重复的信号检测方法的一些实施方式中,可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品与一个或多个HCR探针组(每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针)、与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物和/或一个或多个底物)和与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物)组合。其后,检测一个或多个信号。以任意顺序重复方法的步骤。

[0080] 在用报告物和/或底物标记的发夹的重复的信号检测方法的一些实施方式中,可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品与一个或多个HCR探针组组合,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。添加一个或多个HCR扩增器,其直接或间接地生成被检测的一个或多个信号。可以任意顺序执行方法的步骤一次或多次。

[0081] 在方法的一些实施方式中,可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品与探针组组合,所述探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点。其后,添加标记有报告物和/或底物的HCR扩增器和任选的与底物相对应的标签探针(缀合至报告物),并且检测来自报告物的信号。在一些实施方式中,扩增器可替代地标记有报告物,使得探针上的标签是任选的。

[0082] 在方法的一些实施方式中,可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品与探针组组合,所述探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点。添加标记有报告物和/或底物HCR扩增器和任选的与底物相对应的标签探针(缀合

至报告物)。其后,检测来自报告物的信号。在一些实施方式中,扩增器可替代地标记有报告物,使得探针上的标签是任选的。

[0083] 在方法的一些实施方式中,可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品与一个或多个探针组组合,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠或非重叠结合位点。每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠或非重叠结合位点。添加每个标记有一个或多个报告物和/或底物的一个或多个HCR扩增器,和(任选地)与一个或多个底物相对应的一个或多个任选的标签探针(每个缀合至一个或多个报告物)。检测来自一个或多个报告物的信号。可以以任意顺序重复方法的步骤。在一些实施方式中,扩增器可替代地标记有报告物,使得探针上的标签是任选的。

[0084] 在方法的一些实施方式中,将包含第一分段引发剂的第一分段引发剂探针,包含第二分段引发剂的第二分段引发剂探针,标记有零个、一个或多个半抗原的第一发夹单体,标记有零个、一个或多个半抗原的第二发夹单体和靶分子进行组合。这导致第一分段引发剂探针结合至靶分子,以及第二分段引发剂探针结合至靶分子。第一发夹单体结合至第一分段引发剂和第二分段引发剂二者,并且第二发夹单体结合至第一发夹单体。提供了标记有一个或多个报告物实体的抗半抗原分子。报告物实体是介导CARD的酶。提供了一个或多个CARD底物并且通过介导CARD的酶测量来自自由CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号。

[0085] 在方法的一些实施方式中,将包含至少一个引发剂的至少一个引发剂标记的探针,标记有零个、一个或多个半抗原的第一发夹单体,标记有零个、一个或多个半抗原的第二发夹单体和零个、一个、或多个靶分子结合。这导致包含至少一个引发剂的引发剂标记的探针结合至零个、一个或多个靶分子。第一发夹单体结合至至少一个引发剂,并且第二发夹单体结合至第一发夹单体。提供了标记有一个或多个报告物实体的抗半抗原分子。报告物实体是介导CARD的酶。提供了一个或多个CARD底物并且通过介导CARD的酶测量来自自由CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号。

[0086] 在方法的一些实施方式中,将包含第一分段引发剂的第一分段引发剂探针,包含第二分段引发剂的第二分段引发剂探针,包含零个、一个或多个底物的第一发夹单体,包含零个、一个或多个底物的第二发夹单体和靶分子进行组合。这导致第一分段引发剂探针结合至靶分子,以及第二分段引发剂探针结合至靶分子。第一发夹单体结合至第一分段引发剂和第二分段引发剂二者,并且第二发夹单体结合至第一发夹单体。提供了标记有一个或多个报告物实体的底物结合区。底物结合区结合至底物。报告物实体是介导CARD的酶。提供一个或多个CARD底物,并且通过介导CARD的酶测量来自自由CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号。

[0087] 在方法的一些实施方式中,将包含第一分段引发剂的第一分段引发剂探针,包含第二分段引发剂的第二分段引发剂探针,包含第一分段底物的第一发夹单体,包含第二分段底物的第二发夹单体和靶分子进行组合。这导致第一分段引发剂探针结合至靶分子,以及第二分段引发剂探针结合至靶分子。第一发夹单体结合至第一分段引发剂和第二分段引发剂二者,并且第二发夹单体结合至第一发夹单体,导致包含第一和第二分段底物的全底

物。添加标记有一个或多个报告物实体的底物结合区。底物结合区结合至全底物。报告物实体是介导CARD的酶。提供一个或多个CARD底物,并且通过介导CARD的酶测量来自CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号。

[0088] 在一些实施方式中,HCR过程可以是分段HCR过程。在一些实施方式中,分段引发剂探针对或组可在它们之间具有少量重叠。在一些实施方式中,引发子比HCR发夹的输入结合域更短或更长,和/或与发夹的输入结构域具有不完全的互补性,但能够与发夹的输入结构域杂交以打开发夹并引发HCR聚合级联。在本文提供的一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂与HCR发夹的重叠区互补(例如,重叠1、2或多个核苷酸的区),或者与HCR发夹基本互补(例如,除了0、1、2、少数或几个错配的互补)。

[0089] 在一些实施方式中,引发剂标记的探针上的引发剂可被屏蔽以增强透化至样品(以提高信号)和/或降低样品内的探针的非特异性结合(以降低背景)。

在一些实施方式中,HCR过程可包含发夹标签,该发夹标签可包含用于募集报告物实体的底物,该报告物实体包括介导催化报告物沉积(CARD)的酶。

[0090] 在一些实施方式中,HCR发夹标签可包含分段底物使得缀合至报告物分子(或至报告物实体)的标签探针不强烈地结合单独的发夹上的分段底物,但使得以下HCR聚合,HCR扩增聚合物中的邻近发夹共定位全底物,使得共定位的全底物强烈地结合缀合至报告物分子(或至包含介导CARD信号扩增的酶的报告物实体)的标签探针。

[0091] 在一些实施方式中,HCR过程可包含一个或多个半抗原(例如参见图33A-33E、34A-34C、35、36A-36B),其用于经由催化报告物沉积(CARD)介导另外层的信号扩增。

[0092] 在一些实施方式中,提供了一种用于用报告物标记的发夹的重复的信号检测方法。在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包含:一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c)任选地洗涤样品;d)提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物);e)任选地洗涤样品;f)检测与M个报告物相对应的M个信号;g)从样品中去除M个信号;和h)任选地重复步骤b-g的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0093] 在一些实施方式中,提供了一种用于用报告物标记的发夹的重复的信号检测方法。在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包含一个或多个引发剂标记的探针,每个引发剂标记的探针包含一个或多个引发剂;c)任选地洗涤样品;d)提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物);e)任选地洗涤样品;f)检测与M个报告物相对应的M个信号;g)从样品中去除M个信号;和h)任选地重复步骤b-g的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0094] 在一些实施方式中,提供了一种用于用报告物标记的发夹的重复的信号检测方法。在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包含:1)一个或多个HCR引发剂标记的探针,每个包含一个或多个引发剂,或2)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c)任选地洗涤样品;d)提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物);e)任选地洗涤样品;f)检测与M个报告

物相对应的M个信号;g)从样品中去除M个信号;和h)任选地重复步骤b-g的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0095] 在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包含:一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c)洗涤样品;d)提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物);e)洗涤样品;f)检测与M个报告物相对应的M个信号;g)从样品中去除M个信号;和h)重复步骤b-g的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0096] 在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供一个或多个探针组,每个包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c)任选地洗涤样品;d)提供一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物);e)任选地洗涤样品;f)检测来自一个或多个报告物的一个或多个信号;g)任选地从样品中去除一个或多个探针组;h)任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器;i)任选地从样品中去除一个或多个报告物;和j)任选地从样品中去除一个或多个信号。过程(所有的步骤或子集)可按需重复。

定义和实施方式

[0097] 本文所用的“核酸”包含某种形式的DNA和/或RNA的寡聚物。核酸还可以包含对碱基或骨架具有修饰的DNA或RNA的类似物。例如,本文所用的核酸包含使用肽核酸(PNA)。术语“核酸”还包含嵌合分子。短语包含人工构建体以及衍生物等。短语包含例如DNA、RNA、2' OMe-RNA、LNA、XNA、合成的核酸类似物和PNA中的任何一个或多个。

[0098] 术语“粘性末端(sticky end)”是指可用于与互补的核酸序列杂交的核酸序列。“粘性末端”的二级结构使得粘性末端可用于在适当的反应条件下与互补的核酸杂交而不经构象变化。典型地,粘性末端是单链核酸。

[0099] “单体”是单独的核酸寡聚物。典型地,在杂交链反应中使用至少两种单体,尽管可以使用三种、四种、五种、六种或更多种单体。典型地,每种单体包含与用于HCR反应的至少一种其他单体互补的至少一个区。

[0100] 组合物可包含(例如,参见图13)第一发夹单体(1510),包含:a)第一输入结构域(1852),其包含第一toehold(1851)和第一茎段,b)第一输出结构域(1854),其包含第一发夹环(1853)和第一茎段的互补物,和c)第一报告物分子(1850)。组合物可进一步包含第二发夹单体(1610),其包含:a)第二输入结构域(1952),其包含第二toehold(1951)和第二茎段,b)第二输出结构域(1954),其包含第二发夹环(1953)和第二茎段的互补物,和c)第二报告物分子(1950)。

[0101] 在一些实施方式中,单体是亚稳态的。也就是说,在不存在引发剂的情况下,它们在动力学上不利于与包含互补区的其他单体缔合(associating)。“HCR”单体是能够在暴露于引发剂核酸时组装形成聚合物的单体。

[0102] 如本文所用,“聚合”是指两种或多种单体形成聚合物的缔合。“聚合物”可包含共价键、非共价键或二者。例如,在一些实施方式中,两种单体能够以交替方式杂交形成包含带切口的双链聚合物的聚合物。聚合物在本文中亦称“HCR产物”。

[0103] “引发剂标记的探针”包含一个或多个靶结合结构域和一个或多个HCR引发剂(例

如,图39A-39N和42A-42F)。

[0104] “分段引发剂探针”包含一个或多个靶结合结构域和一个或多个分段引发剂结构域(例如,图3A-3B、5A-5E和38)。术语“分段引发剂探针”和“分段-引发剂探针”是可互换的,如本文所用。

[0105] “全引发剂”来自两种或多种分段引发剂的组合,当共定位时,两种或多种分段引发剂能够引发HCR聚合。一些引发剂包含与HCR单体的引发剂互补区互补的核酸区。分段引发剂是其自身不足以触发HCR聚合,但当与一个(或多个)其他分段引发剂共定位形成全引发剂时可触发HCR聚合的分段引发剂。

[0106] “探针单元”包含两个或多个分段引发剂探针,使得探针单元内的分段引发剂探针上的分段引发剂结构域可共定位以产生全引发剂。

[0107] 表1中的以下术语被指示为用于本文使用的术语的可选项(其可以根据上下文而在宽度上变化)。最广泛的术语的公开不仅表示最广泛的概念,而且表示本文的较窄概念。该方法和表仅用作用于以更简洁的方式表示两个选项的简略表达。

表1

分裂引发剂探针	分段引发剂探针
靶结合序列	靶结合区段
近端子序列	靶区段
同源近端靶位点	靶区段
靶结合区	靶结合区段
HCR引发剂I1	全HCR引发剂
发夹H1	第一发夹单体
发夹H2	第二发夹单体
HCR发夹	发夹单体
分裂引发剂探针	分段引发剂探针
同源靶位点	靶区段
引发剂I1	全HCR引发剂
探针1	第一分段引发剂探针
探针2	第二分段引发剂探针
自动背景抑制	主动背景抑制
标准探针	引发剂标记的探针

[0108] 如本文所用,“底物”可表示:1)发夹上的底物结构域(例如,图18C、18E和36A中的结构域“e”),其作用于标签探针中的底物结合区的结合位点;2)变成由CARD酶介导的沉积的报告物的CARD底物(例如,图33A-33E、34A-34C、36A-36B)。为了避免混淆,使用(2)底物旨在被表示为“CARD-底物”,使得字CARD在该上下文中与底物相关联。

[0109] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,并且不应被解释为以任何方式限制所描述的主题。在本申请中引用的和/或在本申请中的所有文献和类似材料,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、论文和互联网网页,出于任何目的通过引用以它们整体明确地并入。当并入的参考文献中的术语的定义似乎与本教导中提供的定义不同时,以本教导中提供的定义为主。应当理解,在本教导中讨论的在温度、浓度、次数等之前存在隐含的“约”,使

得在本文教导的范围内存在轻微和非实质的偏差。在本申请中,除非另有特别说明,单数的使用包含复数。此外,使用“包括/包含/含有 (comprise)”、“包括/包含/含有 (comprises)”、“包括/包含/含有 (comprising)”、“包括/包含 (contain)/含有”、“包括/包含 (contains)/含有”、“包括/包含 (containing)/含有”、“包括/包含 (include)/含有”、“包括/包含/含有 (includes)”和“/含有包含/含有 (including)”等不旨在是限制性的。应当理解,前面的一般描述和下面的详细描述二者仅是示例性和解释性的并且不是限制性的。除非另有定义,否则本文中使用的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理解的相同含义。参见,例如Singleton等,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 第二版, J. Wiley&Sons (纽约, N.Y. 1994); Sambrook等, Molecular Cloning, 实验室手册, Cold Springs Harbor出版社 (Cold Springs Harbor, N.Y. 1989)。应当理解,一般描述和详细描述二者仅是示例性和解释性的并且不限制所要求保护的发明。在本申请中,除非另有具体说明,否则单数的使用包含复数。在本申请中,除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括/包含/含有 (including)”的使用,以及其他形式(例如“包括/包含/含有 (includes)”和“包括/包含/含有 (included)”)不是限制性的。除非另有具体说明,术语例如“元件 (element)”或“组件 (component)”还涵盖包含一个单元和元件的元件和组件以及包含包含多于一个子单元的组件。此外,术语“一部分”的使用还可包含部分或整个部分的一部分。

[0110] 在一些实施方式中,本文任何一个或多个图的任何一个或多个任选的元件可与本文任何一个或多个图的任何一个或多个其它任选的步骤组合。

[0111] 在一些实施方式中,不同于本文任何一个或多个图的任何一个或多个元件可与不同于本文任何一个或多个图的任何一个或多个其它步骤组合。

[0112] 在一些实施方式中,不同于本文任何一个或多个图的任何一个或多个任选的元件可与不同于本文任何一个或多个图的任何一个或多个其它任选步骤组合。

[0113] 术语“步骤”表示发生和/或可以执行的动作。应注意的是,多个“步骤”可以一次或在重叠的时间段内和/或顺序地发生。除非另有表示(在本公开的上下文中明确地或隐含地给出),本文考虑了所有选项。此外,除非另有说明,可以以不同的顺序或重复地进行步骤,或者添加另外的介于中间的 (intervening) 步骤或重叠步骤。

[0114] 经由杂交链反应样品内的靶分子分析。在一些实施方式中,使用包含一个或多个引发剂标记的探针(每个包含一个或多个HCR引发剂)的探针组检测靶(例如,图39A-39N、42A-42F和43A)。在一些实施方式中,使用包含一个或多个探针单元的探针组(例如参见图8A-8B和16A-16D的探针组)检测样品内的靶,其中探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如参见图3A-5E和17A-17C的探针单元),其中每个HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂(例如,参见图12和17A-17C的分段引发剂探针)。在一些实施方式中,探针单元内的每个探针与靶上的邻近同源结合位点的结合共定位分段引发剂以形成全HCR引发剂(例如,参见图3A-5E、8A-8B、16A-16D、21A-22、27和38的全HCR引发剂),其能够与HCR发夹杂交以触发HCR信号扩增。

[0115] 在一些实施方式中,HCR信号扩增通过将样品产生的背景上方的信号提高约5、10、15、20、25、30、40、50、75、100、500、1000或2000倍,或具有由任何两个前述值定义的范围的值,从而提高分子检测和成像应用的信噪比。

[0116] 在一些实施方式中,探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶的重叠或非重叠区(例如,参见图8A-8B、21A-21B、22和27)。在一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂被设计为与HCR发夹的重叠或非重叠区杂交(例如,参见图8A-8B、21A-22、27和28)。在样品中非特异性结合的单独的探针不共定位全HCR引发剂,抑制HCR信号扩增。HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹(例如,参见图8A-8B、18A-18F和19A-19B的HCR扩增器)。在一些实施方式中,每个HCR发夹包含具有单链toehold和茎段的输入结构域,和具有单链环和茎段的互补物的输出结构域(例如,参见图8A-8B、13、14、18A-18F和19A-19B的HCR发夹)。在一些实施方式中,引发剂标记的探针上的一个或多个HCR引发剂各自引发聚合步骤的链反应,其中引发剂与第一HCR发夹的输入结构域杂交,打开第一发夹以暴露其输出结构域,其又与第二HCR发夹的输入结构域杂交,打开第二发夹以暴露其输出结构域,以此类推等等,导致链反应,其中发夹聚合以产生拴系至靶的HCR扩增聚合物(例如,参见图13、14、19A-19B、29A、30A、33A、33C-33E、34A和41A的扩增聚合物)。在不存在全HCR引发剂的情况下,HCR发夹被动力学地捕获和不聚合,抑制背景。然而,如果探针单元内的分段引发剂探针结合至靶上的它们的邻近同源结合位点以共定位全HCR引发剂,则全HCR引发剂引发聚合步骤的链反应,其中全引发剂与第一HCR发夹的输入结构域杂交,打开第一发夹以暴露其输出结构域,其又与第二HCR发夹的输入结构域杂交,打开第二发夹以暴露其输出结构域,以此类推等等,导致链反应,其中发夹聚合以产生拴系至靶的HCR扩增聚合物(例如,参见图8A、13、14、18C-18F和19A-19B的扩增聚合物)。在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含一个或多个标签,每个标签包含报告物或包含底物(或分段底物),其募集包含一个或多个报告物的标签探针(例如,参见图18A-18F的报告物标记的、底物标记的和分段-底物标记的HCR发夹)。在一些实施方式中,HCR发夹上的零个、一个或多个底物可包含半抗原(例如参见图35),其用于经由催化报告物沉积(CARD)介导另外层的信号扩增(参见例如,图33A-33E、34A-34D和37)。在一些实施方式中,标签探针包含一个或多个报告物并且进一步包含与HCR发夹上的底物互补或与共定位在HCR扩增聚合物内的全底物互补的底物结合区(例如,参见图20A-20F和36A-36B的标签探针)。在一些实施方式中,信号通过与拴系至样品内的靶的HCR扩增聚合物缔合的一个或多个报告物产生。在一些实施方式中,信号从样品中去除(例如,参见图23)。在一些实施方式中,HCR信号被生成、检测并从同一样品中去除一次或多次(例如,参见图23A-23O和40A-40N)。

[0117] 在一些实施方式中,本文提供的任何附图中提供的任何一个或多个步骤可以组合成本文提供的其他方法之一。如本文所使用的,除非另有表示,对一组图(例如,图18)的一般提及表示包含在该数字内的所有不同图(例如,18A-18F)、每个被组合在一起、它们的一个或多个,或在替代中的每个。

[0118] HCR引发剂。引发剂标记的探针包含一个或多个能够引发HCR聚合级联的HCR引发剂。在一些实施方式中,引发剂是与HCR发夹的输入结构域全互补,使得它与发夹的输入结构域杂交以打开发夹并引发HCR聚合级联。在一些实施方式中,引发剂是与HCR发夹的输入结构域部分互补,但充分地互补使得它与发夹的输入结构域杂交以打开发夹并引发HCR聚合级联。在一些实施方式中,引发剂比HCR发夹的输入结构域更短或更长和/或与发夹的输入结构域不完全互补,但能够与发夹的输入结构域杂交以打开发夹并引发HCR聚合级联。在一些实施方式中,HCR引发剂可与HCR发夹的输入结构域具有60%、70%、80%、90%或100%

互补性,和与发夹的输入结构域杂交以打开发夹并引发HCR聚合级联。在一些情况下,包含一个或多个引发剂的引发剂标记的探针可由于引发剂在样品表面附近非特异性结合而经历降低的至样品中的透化。在一些情况下,包含一个或多个引发剂的引发剂标记的探针可由于引发剂非特异性结合至DNA、RNA、蛋白质或样品内的其他分子而引起增加的背景。在一些实施方式中,引发剂标记的探针上的引发剂通过碱基-配对被屏蔽(参见例如如图44A-44Z、45A-45B和46A-46M)以增强透化至样品中(以增加信号)和/或以降低样品内的探针的非特异性结合(以降低背景)。在一些实施方式中,引发剂可通过发夹结构被屏蔽(例如如图44A-44E、44K-44L、44O-44P、44S-44T、44W-44X、46A-46E和46M)。在一些实施方式中,引发剂可通过一个或多个辅助寡核苷酸被屏蔽(例如如图44F-44J、44M-44N、44Q-44R、44U-44V、44Y-44Z、46F-46J)。在一些实施方式中,引发剂可通过包括引发剂的寡核苷酸内的自互补性和/或对一个或多个辅助链的互补性被屏蔽(例如,图44A-44Z和46A-46M)。

[0119] 用HCR分段引发剂探针的自动背景抑制。在一些实施方式中,分段引发剂探针自动地抑制背景,因为HCR引发剂(I1或I2)在探针对之间分裂(例如,参见图8和12)。在一些实施方式中,如果探针在近端同源结合位点特异性地结合至靶,靶共定位探针对内的两个探针以形成全HCR引发剂。在一些实施方式中,非特异性结合的单独的探针不触发HCR,因为每个探针仅携带HCR引发剂的一部分,并且只要全HCR引发剂是共定位的,则HCR信号扩增被触发。

[0120] 用HCR发夹的自动背景抑制。在一些实施方式中,HCR发夹自动抑制背景,因为HCR发夹被动力学上捕获,因此它们在不存在HCR引发剂(I1或I2)的情况下不聚合。在一些实施方式中,如果分段引发剂探针对内的两个探针特异性地结合至靶上的它们的近端同源结合位点,则所得到的共定位的全HCR引发剂(I1或I2)触发拴系的HCR扩增聚合物的生长(例如,参见图8)。在样品中非特异性结合的单独的HCR发夹不触发HCR,因为它们被动力学地捕获。用HCR发夹自动背景抑制。在一些实施方式中,HCR发夹自动抑制背景,因为HCR发夹被动力学地捕获,因此它们在不存在HCR引发剂(I1或I2)的情况下不聚合。在一些实施方式中,如果分段引发剂探针对内的两个探针特异性地结合它们在靶上的近端同源结合位点,所得到的共定位全HCR引发剂(I1或I2)触发拴系的HCR扩增聚合物的生长(例如,参见图8)。在样品中非特异性地结合的单独的HCR发夹不触发HCR,因为它们是动力学上被捕获。

[0121] 用HCR分段引发剂探针和HCR发夹的自动背景抑制。用于靶检测的HCR分段引发剂探针和用于信号扩增的HCR扩增发夹的组合在整个方案中提供自动背景抑制,确保即使它们在样品内非特异性地结合,试剂不会生成扩增的背景。

[0122] 全HCR引发剂在2个或多个分段引发剂探针之间分开。我们指代生成全HCR引发剂的每组分段引发剂探针作为探针单元(例如,参见图17)。在一些实施方式中,全HCR引发剂(I1或I2)通过一对分段引发剂探针(每个携带全HCR引发剂的一部分,使得它们一起包含全HCR引发剂)生成(探针P1的片段f1和探针P2的片段f2,使得 $f1+f2=1$);在这种情况下,探针单元是两个分段引发剂探针(例如,参见图17A)。与全HCR引发剂相比片段f1和f2足够小(例如, $f1=0.5$ 和 $f2=0.5$;或 $f1=0.45$ 和 $f2=0.55$;或 $f1=0.4$ 和 $f2=0.6$),使得如果全HCR引发剂未通过靶共定位,则HCR信号扩增被抑制。

[0123] 在一些实施方式中,HCR引发剂(I1或I2)在三个分段引发剂探针之间被分裂(探针P1的片段f1,探针P2的片段f2,探针3的片段f3,使得 $f1+f2+f3=1$);在这种情况下,探针单

元由三个分段引发剂探针组成。在一些实施方式中，HCR引发剂(I1或I2)在N个分段引发剂探针之间被分裂(探针P1的片段f1, 探针P2的片段f2, ..., 探针PN的片段fN, 使得 $f_1+f_2+\dots+f_N=1$; 例如, 参见图17B), 其中N=2、3、4或多个; 在这种情况下, 探针单元由N个分段引发剂探针组成。对于N的这些值的任一个, 如果全HCR引发剂未通过靶共定位, 则HCR信号扩增被抑制。

[0124] 在一些实施方式中, 全HCR引发剂通过一对(或组)探针生成, 每个探针携带HCR引发剂的一部分, 使得探针P1的片段f1和探针P2的片段f2的总和(f_1+f_2)足够接近1(例如, $f_1=0.47, f_2=0.47, f_1+f_2=0.94$), 使得HCR信号扩增通过由探针对结合至靶上的它们的邻近同源结合位点引起的共定位的全引发剂触发。在一些实施方式中, 探针单元内的分段引发剂探针生成与HCR引发剂的100%相对应的全HCR引发剂。在一些实施方式中, 探针单元内的分段引发剂生成HCR引发剂的足够部分, 以当没有分段引发剂探针存在时或当单独的分段引发剂探针存在但不通过靶共定位时提供相对于信号扩增率的有效HCR信号扩增。在一些实施方式中, 通过探针单元内的共定位的探针生成的全HCR引发剂的该部分是全HCR引发剂的99%、95%、90%、80%或60%, 包含任何一个的前述值以上的任何范围或任何两个前述值之间定义的任何范围。在一些实施方式中, 探针单元包含2、3、4、5或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中, 当探针单元内的探针通过结合至靶上它们的邻近同源结合位点共定位, 探针单元中的分段引发剂足以作为HCR引发剂起作用。在一些实施方式中, 虽然HCR引发剂可具有特定长度的序列(例如, 15个核苷酸), 探针单元内的分段引发剂不需要是完全相同的长度。例如, 在一些实施方式中, 如果当被共定位, 它们的组合长度可以是14或13个核苷酸, 它们仍作为HCR引发剂起作用。

[0125] 在一些实施方式中, 任何两个或多个分段引发剂可被使用, 只要它们一起提供HCR引发剂的功能。

[0126] 在一些实施方式中, 全HCR引发剂通过各自携带HCR引发剂的一部分(HCR引发剂的一部分进一步包含一个或少数几个或几个序列修饰)的一对探针生成, 使得探针P1的片段f1和探针P2的片段f2(f_1+f_2)总和足够接近1(例如, $f_1=0.45, f_2=0.47, f_1+f_2=0.92$), 使得HCR信号扩增通过由探针对结合至靶上它们的邻近同源结合位点产生的共定位的全引发剂触发。在一些实施方式中, 探针单元内的分段引发剂探针生成与HCR引发剂具有100%序列同一性的全HCR引发剂。在一些实施方式中, 当没有分段引发剂探针存在时或当单独的分段引发剂探针存在但不通过靶共定位时, 探针单元内的分段引发剂探针生成与HCR引发剂的足够序列同一性使相对于信号扩增率能够进行有效的HCR信号扩增。在一些实施方式中, 通过探针单元内的共定位的探针生成的全HCR引发剂与HCR引发剂具有99%、95%、90%、80%或60%序列同一性, 包含任何一个前述值以上的任何范围或在任何两个前述值之间定义的任何范围。

[0127] 大探针组的使用以增强信噪比。信号随着探针单元的数量单调增加, 因此, 在一些实施方式中有利的是当靶长度允许(例如, mRNA、lncRNA、gDNA靶)时使用包含多个探针单元的大探针组, 以便增加每靶分子生成的信号量。自动背景抑制确保仅特异性结合至靶的探针单元触发HCR信号扩增, 因此典型地不需要测试探针组内的单独的探针, 以便去除非特异性结合的那些。因此, 当使用新靶的新探针组时, 通过消除对探针组优化的需要, 自动背景抑制增加易于使用。因为信号随着探针组大小单调增加和对于所有的探针对背景被自动抑

制,增加探针组大小以便增加信噪比一般是有利的。探针组包含1个或多个探针单元,每个包含两个或多个分段引发剂探针(例如,参见图8和图16)。例如,探针组中的探针单元的数量可以是在1至1000或10至100或20至50或30至40的范围内。增加探针组中的探针单元的数量可将信噪比增加为2倍或5倍或10倍或100倍或更多。增加探针组中的探针单元的数量可将信噪比增加为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,这取决于探针组中的探针单元的数量、样品固有的背景水平和样品内的靶的丰度。

[0128] 受样品内的转录组和/或基因组限制的探针组大小。在一些情况下,期望将样品中的一个靶与序列上密切相关的样品中的一个或多个其他靶区分开。例如:1)生物体内的靶mRNA可能与生物体内的另一mRNA具有类似的序列,包括靶mRNA可能是需要与其他剪接变体区分的一种剪接变体的可能性,2)靶mRNA可包含多个区,每个区与生物体的转录组内的一个或多个其他RNA具有序列相似性,3)包含在一个生物体中的靶mRNA可能存在于多种样品中,使得靶mRNA具有与另一种类的转录组内的一个或多个RNA在序列上是相似的区,4)包含在一个生物体中的靶rRNA或gDNA可能与样品中包含的其他生物体中的rRNA或gDNA在序列上相似。一种区别样品中存在的靶核酸和所有其他核酸的方式是设计用于靶核酸的探针组,其仅包含相对于样品中存在的转录组和/或基因组对靶核酸具有选择性的探针对。在一些情况下,对选择性的这种要求可以基本上限制探针组的尺寸。例如,靶核酸的序列可以与样品内的一个或多个其他核酸类似,使得探针组可以仅包含单个分段引发剂探针对。

[0129] 使用包含多个分段引发剂探针对的探针组的协同靶结合。结合靶核酸(例如,RNA或DNA)的探针与靶核酸内的天然二级结构(即,碱基配对)在能量上竞争。例如,单个探针可能无法结合主要与靶内的另一结构域碱基配对的靶核酸内的结构域。给定探针的结合产率是具有结合在同源探针结合位点处的探针的靶分子的部分,取决于靶的该部分的可接近性、探针与其同源探针结合位点之间的亲和力程度以及其他因素在0和1之间变化。使用包含多个分段引发剂探针对的探针组,一个探针与靶的结合可提高一个或多个其他探针与靶的结合产率,从而导致探针组内的探针共同提高探针组内的其他探针的结合产率的协同效应。因此,与具有N个探针的探针组相比,具有N+M个探针的探针组可产生更多的信号,不仅因为M个新探针将产生信号,而且因为N个原探针将具有更高的对靶的结合产率,并且因此平均每靶分子产生更多的信号。

[0130] 使用辅助探针增加信号。为了在样品中存在的一个或多个转录组和/或基因组的情况下保持对靶核酸的选择性,探针组大小有时被约束为不多于1个探针单元,或不多于2个探针单元,或不多于N个探针单元,其中N小于探针单元N+M的数量,N+M基于灵敏度考虑和/或靶核酸的长度将优先使用。在探针组大小受到选择性考虑约束的这种情况下,因为探针组具有产生M个更少的用于触发HCR信号扩增的全引发剂的潜力,并且因为不存在M个另外的探针单元可由于协同效应降低N个剩余探针单元的结合产率,产生的信号的量可相对于使用N+M个探针单元的相同的靶的检测更少。

[0131] 在一些实施方式中,探针携带分段引发剂作为信号探针(例如,参见图16A)。在一些实施方式中,探针不携带分段引发剂作为辅助探针。为了在不降低选择性的情况下增加信号,包含N个探针单元的探针组可以用M个辅助探针增强(augmented)(例如,参见图16D)。

[0132] 例如:1)为了检测具有独特剪接点(splice junction)的靶RNA,探针组可包含结合至跨越剪接点的靶的一个探针单元,并且进一步包含30个(或任何数量的)辅助探针,其

结合至靶RNA的其他部分以协同提高探针单元的结合产率并因此增加信号而不降低选择性;2) 为了检测选择性考虑导致包含5个探针单元的探针组的靶RNA或DNA,探针组可进一步包含45个辅助探针;3) 为了检测选择性考虑导致包含N个探针单元(其中N小于40)的探针组的靶RNA或DNA,探针组可进一步包含40-N个辅助探针;4) 为了检测选择性考虑导致包含N个探针单元的探针组并且靶核酸的长度限制探针的总数为 $2N+M$ 的靶核酸,探针组可进一步包含M个辅助探针。

[0133] 在一些实施方式中,将针对靶核酸设计辅助探针,具有比用于相同靶核酸设计信号探针的选择性要求较不严格的选择性要求。在一些实施方式中,辅助探针将用于靶核酸,即使它们对样品中存在的转录组和/或基因组内的其他脱靶(off-target)核酸同样有选择。在一些实施方式中,信号探针上的靶结合区将与辅助探针上的靶结合区具有相同的长度。在一些实施方式中,信号探针上的靶结合区将比辅助探针上的靶结合区更短或更长。在一些实施方式中,靶结合区可对于不同信号和/或辅助探针跨长度(核苷酸的数量)范围变化。在一些实施方式中,信号探针和靶核酸之间的亲和力将与辅助探针和靶核酸之间的亲和力相当。在一些实施方式中,信号探针和靶核酸之间的亲和力将低于或高于辅助探针和靶核酸之间的亲和力。

[0134] 使用携带一种或两种分段引发剂的信号探针来增加信号。在一些实施方式中,探针单元包含两个分段引发剂探针,其一起生成全HCR引发剂(探针P1的分段f1和探针P2的分段f2,使得 $f1+f2=1$)。在这种情况下,每个探针参与一个探针单元。如果探针单元内的两个探针结合至给定的靶RNA分子,则产生单个全HCR引发剂,触发拴系至探针单元的一种HCR扩增聚合物的生长。考虑靶RNA的长度将探针组大小约束为与 $2N$ 个信号探针相对应的 N 个探针单元的情况。在每个信号探针仅参与一个探针单元的情况下,最大数量的全HCR引发剂将是 N ,与靶mRNA被探针组中的所有信号探针结合的情况相对应。因此,拴系至靶RNA的HCR聚合物的最大数量将是 N 。为了增加每靶分子的信号,现在考虑其中探针可携带有助于两个不同的探针单元的两个分段引发剂的一种情况(例如,参见图16C)。在一些实施方式中,考虑以下三种可能性:

1. 在一个实施方式中,在所有 $2N$ 个信号探针沿着靶RNA与邻近的子序列杂交的情况下,靶的5'和3'端处的信号探针各自具有一个邻近信号探针,并且所有其他介于中间的信号探针具有两个邻近信号探针。在这种情况下,如果除了最5'信号探针和最3'信号探针之外的每个探针携带有助于两个不同探针单元的两个分段引发剂,则探针单元的总数从 N 增加至 $(2N-1)$ 。结果,全HCR引发剂的最大数量从 N 增加至 $(2N-1)$,并且拴系至靶RNA的HCR聚合物的最大数量从 N 增加至 $(2N-1)$ 。因此,相对于每个信号探针携带单个分段引发剂的情况,每靶分子生成的信号增加。

2. 在另一个实施方式中,由样品中存在的转录组和/或基因组产生的选择性考虑可导致包含 $2N$ 个信号探针和 N 个探针单元的探针组,其中没有探针单元是沿着靶核酸在另一个的近端。在这种情况下,每个信号探针仅携带单个分段引发剂,并且有助于仅一个探针单元,因此全HCR引发剂的最大数量是 N ,且拴系的HCR扩增聚合物的最大数量是 N 。

3. 在另一实施方式中,代表中间情况,一些信号探针将在多于一个邻近序列(neighbor)的近端,因此 $2N$ 个信号探针将参与在 N 个和 $2N-1$ 个之间居中(intermediate)的许多探针单元。例如,如果有 $2N$ 个信号探针,其中 M 个探针平铺靶的一部分(其中这些信号探

针中的5'和3'携带一个分段引发剂并贡献给一个探针单元,并且其他M-2个信号探针携带两个分段引发剂并贡献给两个探针单元)并且其他L个探针(其中 $2N=M+L$,L为偶数)每个成对地结合至靶,其中每个信号探针在仅另一个信号探针近端(每个L个信号探针携带一个分段引发剂并贡献给一个探针单元),然后探针单元的总数将为 $M-1+L/2$,其在N和 $2N-1$ 之间居中。例如,如果有40个信号探针(即 $N=20$),并且它们的20个在近端平铺靶(即 $M=20$),以及另外20个在近端成对地(即 $L=20$)结合至靶,探针单元的总数将为 $M-1+L/2=20-1+20/2=29$ 。

[0135] 在探针单元包含多于两个信号探针(例如三个信号探针或四个或多个信号探针)的相关情况下,通过使用包含两个分段引发剂并参与两个探针单元(每探针单元一个分段引发剂)的一些探针,探针单元的数量可再次增加而不增加信号探针的数量。

[0136] 具有2个发夹的HCR扩增器。在一些实施例中,HCR扩增器包含两个发夹(H1和H2;例如,参见图8和18)。在一些实施方式中,每个发夹包含具有单链toehold和茎段的输入结构域,以及具有单链环和茎段的互补物的输出结构域。在不存在HCR引发剂(I1或I2)的情况下,发夹H1和H2亚稳定地共存,即它们动力学上被捕获并且不聚合。

[0137] 用全引发剂I1引发。在一些实施方式中,引发剂I1包含与发夹H1的toehold互补的结构域和与H1的茎段互补的结构域。如果H1发夹遇到全引发剂I1,则全引发剂I1经由toehold介导的链置换与发夹H1的输入结构域杂交,打开发夹H1以暴露发夹H1的输出结构域并形成复合物I1-H1。发夹H1的输出结构域包含与发夹H2的toehold互补的结构域和与H2的茎段互补的结构域。如果H2发夹遇到I1-H1复合物,H1的暴露的输出结构域经由toehold介导的链置换与发夹H2的输入结构域杂交,打开发夹H2以暴露发夹H2的输出结构域并形成复合物I1-H1-H2。发夹H2的输出结构域包含与发夹H1的toehold互补的结构域和与H1的茎段互补的结构域。如果H1发夹遇到I1-H1-H2复合物,H2的暴露的输出结构域经由toehold介导的链置换与发夹H1的输入结构域杂交,打开发夹H1以暴露发夹H1的输出结构域并形成复合物I1-H1-H2-H1。该聚合过程可以以交替的H1和H2聚合步骤重复以生成形式 $I1-H1-H2-H1-H2-H1-H2-\dots$ 的聚合物,其中对并入N个交替拷贝的发夹H1和H2的聚合物我们可表示 $I1-(H1-H2)_N$ 。例如,聚合物可并入若干H1和H2分子、或数十个H1和H2分子、或数百个H1和H2分子、或数千个H1和H2分子、或成千上万个H1和H2分子或更多。聚合物以H1或H2结尾也是可能的,因此 $I1-(H1-H2)_N-H1$ 和 $I1-(H1-H2)_N-H1-H2$ 都是可能的,后者相当于 $I1-(H1-H2)_{N+1}$ 。

[0138] 用全引发剂I2的引发。在一些实施方式中,引发剂I2包含与发夹H2的toehold互补的结构域和与H2的茎段互补的结构域。如果H2发夹遇到全引发剂I2,则全引发剂I2经由toehold介导的链置换与发夹H2的输入结构域杂交,打开发夹H2以暴露发夹H2的输出结构域并形成复合物I2-H2。如果H1发夹遇到I2-H2复合物,则H2的暴露的输出结构域经由toehold介导的链置换与发夹H1的输入结构域杂交,打开发夹H1以暴露发夹H1的输出结构域并形成复合物I2-H2-H1。如果H2发夹遇到I2-H2-H1复合物,H1的暴露的输出结构域经由toehold介导的链置换与发夹H2的输入结构域杂交,打开发夹H2以暴露发夹H2的输出结构域并形成复合物I2-H2-H1-H2。该聚合过程可以以交替的H2和H1聚合步骤重复以生成形式 $I2-H2-H1-H2-H1-H2-H1-\dots$ 的聚合物,其可用 $I2-(H2-H1)_N$ 表示并入H2和H1的N个交替拷贝的聚合物。例如,聚合物可并入几个H1和H2分子,或数十个H1和H2分子,或数百个H1和H2分子,或数千个H1和H2分子,或数十万个H1和H2分子,或更多。聚合物以H1或H2结尾是可能的,

因此 $I2-(H2-H1)_N-H2$ 和 $I2-(H2-H1)_N-H2-H1$ 二者是可能的,后者相当于 $I2-(H2-H1)_{N+1}$ 。

[0139] 具有4个发夹的HCR扩增器。在一些实施方式中,HCR扩增器可包含多于2个发夹。例如,HCR扩增器可包含4个发夹H1、H2、H3、H4(例如,参见图19)。正如对于2-发夹HCR,每个发夹包括包含单链toehold和茎段的输入结构域,和包含单链环和茎段的互补物的输出结构域。在不存在HCR引发剂(I1、I2、I3或I4)的情况下,发夹H1、H2、H3、H4亚稳定地共存,即它们被动力学地捕获并且不聚合。发夹H1的输出结构域包含与发夹H2的toehold互补的结构域和与H2的茎段互补的结构域。发夹H2的输出结构域包含与发夹H3的toehold互补的结构域和与H3的茎段互补的结构域。发夹H3的输出结构域包含与发夹H4的toehold互补的结构域和与H4的茎段互补的结构域。发夹H4的输出结构域包含与发夹H1的toehold互补的结构域和与H1的茎段互补的结构域。引发剂I1包含与发夹H1的toehold互补的结构域和与H1的茎段互补的结构域。引发剂I2包含与发夹H2的toehold互补的结构域和与H2的茎段互补的结构域。引发剂I3包含与发夹H3的toehold互补的结构域和与H3的茎段互补的结构域。引发剂I4包含与发夹H4的toehold互补的结构域和与H4的茎段互补的结构域。类似于2-发夹HCR的情况,如果发夹H1遇到全HCR引发剂I1,则全引发剂I1打开发夹H1以形成具有暴露的H1输出结构域的复合物I1-H1,其又打开发夹H2以形成具有暴露的H2输出结构域的复合物I1-H1-H2,其又打开具有暴露的输出结构域的发夹H3以形成具有暴露的H3输出结构域的复合物I1-H1-H2-H3,其又打开发夹H4以形成具有暴露的H4输出结构域的复合物I1-H1-H2-H3-H4,其又打开发夹H1以形成具有暴露的H1输出结构域的复合物I1-H1-H2-H3-H4-H1,依次类推,导致经由交替的H1、H2、H3和H4聚合步骤的聚合以生成形式 $I1-H1-H2-H3-H4-H1-H2-H3-H4-H1-H2-H3-H4\dots$ 的聚合物,对于并入H1、H2、H3和H4的N个交替拷贝的聚合物其可表示为 $I1-(H1-H2-H3-H4)_N$ 。聚合物以H1、H2、H3或H4结尾是可能的,因此 $I1-(H1-H2-H3-H4)_N-H1$ 、 $I1-(H1-H2-H3-H4)_N-H1-H2$ 、 $I1-(H1-H2-H3-H4)_N-H1-H2-H3$ 和 $I1-(H1-H2-H3-H4)_N-H1-H2-H3-H4$ 都是可能的,后者相当于 $I1-(H1-H2-H3-H4)_{N+1}$ 。HCR聚合通过同源全引发剂(I1、I2、I3或I4)的任一个来触发是可能的。例如,引发剂通过全引发剂I3可生成形式 $I3-(H3-H4-H1-H2)_N$ 的聚合物。具有4个发夹的HCR扩增器便于产生在单体态中不存在而在聚合物态中存在的信号(例如,图19B说明了仅当发夹在扩增聚合物中共定位时才共定位FRET对以产生FRET信号,这为免洗方法提供了基础,因为未从样品中洗涤的未使用的发夹不会参与FRET,并且因此将避免生成背景)。

[0140] 具有2个或多个发夹的HCR扩增器。更一般地,在一些实施方式中,HCR扩增器可包含M个HCR发夹(H1、H2、...、HM),其中M为2或更大的整数。在不存在HCR引发剂(I1、I2、...、IM)的情况下,发夹H1、H2、...、HM亚稳定地共存,即它们被动力学地捕获并且不聚合。在存在同源全HCR引发剂的情况下,聚合经由类似于2-发夹或4-发夹HCR的交替聚合步骤发生。例如,引发剂I1将对于并入H1、H2、...、HM的N个交替拷贝的聚合物导致形式 $I1-(H1-H2-\dots-HM)_N$ 的聚合物生长。聚合物以H1、H2、...、HM的任何一种结尾都是可能的,因此 $I1-(H1-H2-\dots-HM)_N-H1$ 、 $I1-(H1-H2-\dots-HM)_N-H1-H2-\dots$ 和 $I1-(H1-H2-\dots-HM)_N-H1-H2-\dots-HM$ 都是可能的,后者相当于 $I1-(H1-H2-\dots-HM)_{N+1}$ 。通过同源全引发剂(I1、I2、...、IM)的任何一种触发HCR聚合是可能的。例如,引发剂通过全引发剂I3可生成形式 $I3-(H3-\dots-HM-H1-H2)_N$ 的聚合物。

[0141] HCR发夹标签。对于给定的HCR扩增器,每个HCR发夹包含零个、一个或多个标签。扩

扩增器内的不同发夹上的标签可相同或不同。例如,包含发夹H1和H2的扩增器可具有:1)H1和H2上的相同标签,2)H1和H2上的不同标签,3)H1上的标签,但H2上没有标签,4)H2上的标签,但H1上没有标签,5)H1或H2上没有标签,6)H1上的零个、一个或多个标签,它们的零个、一个或多个与H2上的零个、一个或多个标签相同或不同。类似地,对于包含发夹H1、H2、H3、H4的HCR扩增器,每个发夹可包含零个、一个或多个标签(例如,3、5或10个标签),它们的零个、一个或多个可与其他发夹的每个上的零个、一个或多个标签相同。在一些实施方式中,给定发夹的一个或多个标签在发夹和/或发夹标签的混合物内可以是独特的。在一些实施方式中,在混合物内存在1、10、100、1000、10,000、100,000或更多个独特标签(包含在任何两个先前数字之间限定的任何范围)。

[0142] HCR发夹标签作为报告物。在一些实施方式中,HCR发夹标签可包含报告物分子,其例如通过生成信号、通过改变信号或通过消除信号来促进信号的测量。例如,报告物可以是荧光团、发色团、发光团、磷光体、FRET对、FRET对的成员、淬灭剂、荧光团/淬灭剂对、稀土元素或化合物、放射性分子、磁性分子或促进信号测量的任何其他分子。

[0143] HCR发夹标签作为底物。在一些实施方式中,HCR发夹标签可包含底物,所述底物用于募集直接或间接地介导在发夹标签附近的报告物的定位的报告物实体。例如:

- 1.发夹标签可包含募集作为报告物实体的抗DIG抗体的地高辛(digoxigenin (DIG)),其中抗DIG直接地标记有一个或多个报告物、或一个或多个底物或报告物实体,其用于直接或间接地介导在发夹标签的附近的报告物的定位。

- 2.发夹标签可包含核酸结构域,其用作与携带一个或多个报告物的标签探针内的结构域具有完全或部分序列互补性的底物(例如图18C)。

- 3.发夹标签可包含用作底物的核酸结构域,所述底物与携带一个或多个底物(其用于介导在发夹标签的附近的报告物的定位)的标签探针内的结构域具有完全或部分序列互补性。

- 4.发夹标签可包含核酸结构域,其用作直接或间接地介导在发夹标签的附近的报告物的定位的报告物实体的底物。

- 5.发夹标签可包含底物,其用于募集间接地介导在发夹标签的附近的报告物的定位的报告物实体。

- 6.发夹标签可包含用于募集报告物实体的底物,所述报告物实体包含介导在发夹标签的附近的催化报告物沉积(CARD)的酶(例如图36A)。

- 7.发夹标签可包含募集作为报告物实体的链霉亲和素的生物素,其中链霉亲和素直接地标记有一个或多个报告物,或标记有用于直接或间接地介导在发夹标签的附近的报告物的定位的一个或多个底物或报告物实体。

- 8.发夹标签可包含募集抗半抗原抗体或抗半抗原纳米抗体的半抗原,所述抗半抗原抗体或抗半抗原纳米抗体经由CARD信号扩增直接或间接地介导在发夹标签附近的报告物的定位。例如,抗半抗原抗体或纳米抗体可包含报告物实体,其是介导CARD的酶(例如,图33A-33E)。

- 9.发夹标签可包含募集抗半抗原的半抗原,所述抗半抗原直接或间接地介导发夹标签的附近的报告物的定位。例如,抗半抗原可包含报告物实体,其是介导CARD的酶(例如,图34A-34C)。

10. 发夹标签可包含酶,其介导CARD信号扩增以沉积在发夹的附近的报告物分子。

11. 发夹标签可包含直接或间接地介导在半抗原的附近的报告物的定位的零个、一个或多个半抗原(例如图35)。

[0144] 在一些实施方式中,发夹标签可包含募集标记有报告物的抗半抗原(例如,抗体、纳米抗体、链霉亲和素或其他分子)的半抗原。

[0145] 在本文提供的一些实施方式中,HCR信号扩增用于介导催化报告物沉积(CARD),导致甚至更高的信号增益。在一些实施方式中,甚至更高的单个增益为约5、10、15、20、25、30、40、50、75、100、500、1000、2000、5000或10,000倍或具有由前述值中的任意两个限定的范围的值。

[0146] 在一些实施方式中,HCR发夹标签可包含分段底物,使得缀合至报告物分子的标签探针不强烈地结合单独的发夹上的分段底物,但使得在HCR聚合之后,HCR扩增聚合物中的邻近发夹共定位全底物使得共定位的全底物强烈地结合缀合至报告物分子的标签探针(例如图18D)或至包含介导CARD信号扩增的酶的报告物实体(例如图36B)。

[0147] 半抗原和抗半抗原。在一些实施方式中,是包含半抗原的底物的发夹标签可以例如是地高辛(dig)、二硝基苯基(DNP)、荧光团、生物素或可以募集抗半抗原的任何小分子、生物分子或非生物分子。抗半抗原的实例包含抗体、纳米抗体、链霉亲和素、适配体或选择性结合半抗原的任何其他分子或分子复合物。

[0148] 标签探针。在一些实施方式中,标签探针包含底物结合区和一个或多个报告物(例如,参见图18C-E和图20)或报告物实体(例如,参见图33A-33E和34A-34D)。在一些实施方式中,标签探针包含标记有一个报告物分子的非结构化链(例如,参见图20A)。在一些实施方式中,标签探针包含多个报告物分子(例如,参见图20B)。在一些实施方式中,标签探针包含杂交至阻断链(缀合至淬灭剂)的标签链(缀合至报告物)(例如,参见图20C)。在一些实施方式中,标签探针具有发夹结构(例如,参见图20D的标签探针)或其他分子内碱基配对。在一些实施方式中,发夹标签探针缀合至一个或多个报告物、淬灭剂和/或FRET对(例如,参见图20E和20F)。在一些实施方式中,标签探针包含识别HCR发夹上的半抗原标签的抗半抗原抗体或纳米抗体,并且进一步包括包含介导CARD的酶的报告物实体(例如,图33A-33E)。在一些实施方式中,标签探针包含识别HCR发夹上的半抗原标签的抗半抗原实体和进一步包括包含介导CARD的酶的报告物实体(例如,图34A-34D)。在一些实施方式中,标签探针包含识别HCR发夹上的底物标签的底物互补物或识别共定位在HCR扩增聚合物内的全底物的底物互补物,并且进一步包括包含介导CARD的酶的报告物实体(例如,图36A-36B)。

[0149] 用于HCR-介导的催化报告物沉积(CARD)的酶。在一些实施方式中,HCR发夹通过报告物实体经由催化报告物沉积(CARD)介导信号扩增,所述报告物实体包含酶,其催化CARD-底物,导致在发夹的附近的报告物的沉积(参见例如图33A-33E、34A-34C、36A-36B)。例如:

1. 酶可以是辣根过氧化物酶(HRP)(或包含多种HRP酶的聚合物HRP),其作用在CARD底物上,以催化诸如AEC、DAB、TMB或StayYellow的显色报告物的沉积,或者催化CARD底物以催化荧光报告物如荧光团标记的酪酰胺的沉积,或者催化半抗原标记的CARD底物如生物素标记的酪酰胺的沉积,其中半抗原用于介导在发夹标签附近的报告物的定位。

2. 酶可以是碱性磷酸酶(AP)(或包含多个AP酶的聚合物AP),其作用在CARD底物上以催化报告物的沉积,例如显色报告物,诸如但不限于BCIP/NBT、BCIP/TNBT、NaphtholAS-MX

磷酸盐+FastBlue BB、Naphthol AS-MX磷酸盐+FastRed TR、StavGreen。

3. 酶可以是作用在CARD底物上以催化报告物(例如NBT)的沉积的葡萄糖氧化酶。

4. 酶可以是直接或间接地介导在发夹标签附近的报告物的定位的任何分子或复合物。

[0150] 在一些实施方式中,介导CARD的酶在报告物沉积(例如,使用化学或热变性)之后被失活(亦称灭活)。例如,可以使用以下任意组合来去活化介导CARD的酶:

1. 热(例如,65°C或以上)

2. 固定剂(例如4%PFA)

3. 酸(例如,pH 2.2的含1%Tween20的0.1M甘氨酸-HCl、0.2N HCl、10%乙酸、10mM HCl)

4. 其他化学物(例如,过氧化氢(H₂O₂)、过氧化氢+苯酚、叠氮化钠、DEPC、含10mM EDTA的MAB)

[0151] 在一些实施方式中,使用H₂O₂灭活HRP。在一些实施方式中,使用热和酸的组合灭活AP。在一些实施方式中,用固定剂灭活AP。在一些实施方式中,介导CARD的酶的失活使得能够使用相同的酶与用于不同的靶的不同底物组合进行重复的CARD,从而使得能够使用HCR介导的CARD进行多重靶分析。在一些实施方式中,介导CARD的酶的失活使得能够使用不同的酶与用于不同靶的不同底物组合进行重复的CARD,使得能够使用HCR介导的CARD进行多重靶分析。

[0152] 在一些实施方式中,CARD使得染色样品能够储存10或更多年,以使得再成像能够符合生物制药的监管要求。在一些实施方式中,基于CARD的染色样品足够稳定1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多年,并且仍然符合生物制药的监管要求。在一些实施方式中,CARD提供福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)样品储存数十年。在一些实施方式中,CARD提供病理学样品的储存数十年,以提供回顾性科学和医学研究。在一些实施方式中,CARD染色提供归档样品的长期储存。

[0153] 靶类型。在一些实施方式中,引发剂标记的HCR探针包含一个或多个靶结合区并且进一步包含一个或多个HCR引发剂。在一些实施方式中,引发剂标记的探针可检测包含下述的靶:

1. 任何分子,包含但不限于RNA分子(例如,mRNA、rRNA、lncRNA、siRNA、shRNA、microRNA、非编码RNA、合成RNA或修饰RNA)、DNA分子、非天然核酸分子、蛋白质分子、小分子、生物分子、化学修饰的生物分子、非生物分子,

2. 任何分子的复合物,包含RNA、DNA、蛋白质、小分子、生物分子和/或非生物分子的任何组合(例如,RNA/RNA复合物、RNA/蛋白质复合物、DNA/蛋白质复合物和RNA/DNA/蛋白质复合物、蛋白质/蛋白质复合物)。

[0154] 分段引发剂HCR探针包含一个或多个靶结合区并且进一步包含一个或多个分段引发剂区。探针单元包含两个或多个分段引发剂探针,使得分段引发剂探针在探针单元中组合以产生全HCR引发剂。探针单元可检测包含下述的靶:

1. 任何分子,包含但不限于RNA分子(例如,mRNA、rRNA、lncRNA、siRNA、shRNA、microRNA、非编码RNA、合成RNA或修饰RNA)、DNA分子、非天然核酸分子、蛋白质分子、小分子、生物分子、化学修饰的生物分子、非生物分子,

2. 任何分子的复合物,其包含RNA、DNA、蛋白质、小分子、生物分子和/或非生物分子的任何组合(例如,RNA/RNA复合物、RNA/蛋白质复合物、DNA/蛋白质复合物和RNA/DNA/蛋白质复合物、蛋白质/蛋白质复合物),

3. 近端分子或复合物的任何集合,使得当包含探针单元的分段引发剂探针结合至它们在近端分子或复合物的集合内的相应靶点时,探针单元中的分段引发剂可共定位以形成完整的HCR引发剂。

[0155] 在本文提供的任何实施方式中,探针单元内的分段引发剂被设计成(或是)与HCR发夹的非重叠区(例如,由0、1、2或更多核苷酸分开的区)互补,或被设计为(或是)与HCR发夹的重叠区(例如,重叠1、2或更多核苷酸的区)互补,或被设计为(或是)基本上与HCR发夹互补(例如,除了0、1、2、少数几个或几个错配的互补)。

[0156] 在本文提供的任何实施方式中,探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶的非重叠区(例如,由0、1、2或多个核苷酸分开的区或由0、1、2或更多nm分开的区),或被配置为结合至靶的重叠区(例如,重叠1、2或多个核苷酸的区,或重叠1、2或更多nm的区)。

[0157] 信号探针被配置为结合至靶的重叠或非重叠区和/或设计成具有与HCR发夹的重叠或非重叠区杂交的分段引发剂。在一些实施方式中,探针单元包含两个或多个分段引发剂探针,所述两个或多个分段引发剂探针各自包含靶结合区和分段引发剂。在一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂:

1. 被设计为与HCR发夹的邻近区互补,
2. 或被设计为与HCR发夹的非重叠区(例如,通过0、1、2或多个核苷酸分开的区)互补,
3. 或被设计为与HCR发夹的重叠区(例如,重叠1、2或多个核苷酸的区)互补,
4. 或被设计为与HCR发夹基本上互补(例如,除了0、1、2、少数几个或几个错配的互补),
5. 或被设计为与HCR发夹的邻近区杂交,
6. 或被设计为与HCR发夹的非重叠区杂交,
7. 或被设计为与HCR发夹的重叠区杂交,
8. 或被设计为具有与HCR发夹的邻近区互补的序列,
9. 或被设计为具有与HCR发夹的非重叠区互补的序列,
10. 或被设计为具有与HCR发夹的重叠区互补的序列,
11. 或被设计为具有与HCR发夹的邻近区基本上互补的序列,
12. 或被设计为具有与HCR发夹的非重叠区基本上互补的序列,
13. 或被设计为具有与HCR发夹的重叠区基本上互补的序列。

[0158] 在一些实施方式中,探针单元内的靶结合区:

1. 被配置为结合至靶的邻近区,
2. 或被配置为结合至靶的非重叠区(例如,通过0、1、2或多个核苷酸分开的区或通过0、1、2或多个nm分开的区),
3. 或被配置为结合至靶的重叠区(例如,重叠1、2或多个核苷酸的区或重叠1、2或多个nm的区),
4. 被设计为结合至靶的邻近区,

- 5.或被设计为结合至靶的非重叠区,
- 6.或被设计为结合至靶的重叠区,
- 7.或被设计为具有与靶的邻近区杂交的序列,
- 8.或被设计为具有与靶的非重叠区杂交的序列,
- 9.或被设计为具有与靶的重叠区杂交的序列。

[0159] 在一些实施方式中,探针单元包含两个分段引发剂探针。两个分段引发剂探针与同源靶结合以共定位全HCR引发剂。然后,共定位的全HCR引发剂与同源HCR发夹结合以引发HCR聚合,其中一个分段引发剂与发夹杂交以形成第一双链体(duplex),并且另一分段引发剂与发夹杂交以形成第二双链体。在一些实施方式中,在两个双链体之间存在能量不利的连接。在一些实施方式中,通过将分段引发剂配置为结合至发夹的重叠区,沿着发夹的连接的位置和两个探针的三级结构以及在连接附近的发夹可松弛为能量上更有利的构象,增加共定位的全引发剂和HCR发夹之间的亲和力,增加在给定的时间段中生成的扩增的HCR信号的量(例如,图27和28)。在一些实施方式中,可以通过配置两个探针的靶结合区以结合至靶的重叠区来增加两个探针和同源靶之间的亲和力,从而允许分子之间的连接松弛为能量上更有利的构象。

[0160] 在一些实施方式中,探针组被设计用于多重实验,其中2、3、4、5、10、20或100或更多个探针组用于结合至相同样品中的不同靶,其中1、2、3、4、5、10、20或100或更多个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,探针组被设计用于多重实验,其中2、3、4、5、10、20或100或更多个探针组用在相同样品中,其中大于1%、大于2%、大于5%、大于10%、大于30%、大于50%或100%的探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。

[0161] 在一些实施方式中,探针组被设计用于多重实验,其中2、3、4、5、10、20或100或更多个探针组用于结合至相同样品中的不同靶,其中1、2、3、4、5、10、20或100或更多个探针组包含一个或多个探针单元,其包含被设计为与HCR发夹的重叠区杂交的分段引发剂。在一些实施方式中,探针组被设计用于多重实验,其中2、3、4、5、10、20或100或更多个探针组用在相同样品中,其中大于1%、大于2%、大于5%、大于10%、大于30%、大于50%或100%的探针组包含一个或多个探针单元,其包含具有被设计为与HCR发夹的重叠区互补的序列的分段引发剂。

[0162] 在一些实施方式中,探针组被设计用于多重实验,其中2、3、4、5、10、20或100或更多个探针组用于结合至相同样品中的不同靶,其中1、2、3、4、5、10、20或100或更多个探针组包含一个或多个探针单元,其包含被设计为结合至靶的重叠区的靶结合区。在一些实施方式中,探针组被设计用于多重实验,其中,3、4、5、10、20或100或更多个探针组用在相同样品中,其中大于1%、大于2%、大于5%、大于10%、大于30%、大于50%或100%探针组包含一个或多个探针单元,其包含被设计为结合至靶的重叠区的靶结合区。

[0163] 在一些实施方式中,探针组被设计用于多重实验,其中2、3、4、5、10、20或100或更多个探针组用于结合至相同样品中的不同靶,其中1或多个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针和1或多个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,探针组被设计对于多重实验,其中2、3、4、5、10、20或100或更多个探针组用在相同样品中,其中大于0.1%、大于1%、大于2%、大于5%、大于10%、大于30%或大于50%的探针组包含一个或多个引发剂标记的探针、并且其中大于0.1%、大

于1%、大于2%、大于5%、大于10%、大于30%或大于50%的探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。

[0164] 在一些实施方式中,探针单元包含被设计为结合至HCR发夹的重叠区的分段引发剂,其中重叠区重叠1个碱基或2个碱基或3个碱基或4个碱基或5个碱基或更多个碱基。

[0165] 在一些实施方式中,探针单元包含被设计为结合至靶的重叠区的靶结合区,其中重叠区重叠至少0.1nm或至少0.2nm或至少0.3nm或至少0.5nm或至少1nm或至少2nm或至少3nm或至少5nm。在一些实施方式中,探针单元包含靶结合区,其包含被设计为结合至靶的重叠区的序列,其中重叠区重叠至少1个碱基或2个碱基或3个碱基或4个碱基或5个碱基或更多个碱基。

[0166] 引发剂标记的探针的材料和组合物。在一些实施方式中,引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合结构域和一个或多个HCR引发剂(例如,图39A-39N和42A-42F)。每个结构域可包含一种或多种材料,包含DNA、RNA、2' OMe-RNA、PNA、XNA、化学修饰的核酸、合成的核酸类似物、氨基酸、合成的氨基酸类似物和/或适合用于结构域目的的任何其他分子。例如:

1. 引发剂标记的探针可包含由DNA制成的一个或多个引发剂和由DNA制成的靶结合结构域。

2. 引发剂标记的探针可包含由DNA制成的一个或多个引发剂和由氨基酸制成的靶结合结构域(例如,抗体或纳米抗体或抗体片段)。

3. 引发剂标记的探针可包含由合成的核酸类似物制成的引发剂和由DNA和2' OMe-RNA的组合制成的靶结合结构域。

4. 引发剂标记的探针可包含由2' OMe-RNA制成的引发剂和由RNA和蛋白质的组合制成的靶结合结构域。

5. 引发剂标记的探针可包含由DNA制成的引发剂和由PNA制成的靶结合结构域。

6. 引发剂标记的探针可包含由任何核酸或核酸类似物制成的一个或多个引发剂和由适于结合靶分子的材料组合制成的一个或多个靶结合结构域。

[0167] 在一些实施方式中,引发剂标记的探针可包含单个共价连接的分子或可包含非共价相互作用的以形成复合物的两个或多个分子(每个共价连接的)。例如:

1. 引发剂标记的探针可包含由DNA制成的引发剂,其共价连接至由DNA制成的靶结合结构域。

2. 引发剂标记的探针可包含由DNA制成的一个或多个引发剂,所述一个或多个引发剂共价连接至非共价结合至引导RNA(gRNA)的dCas9(或另一Cas),使得靶-结合结构域包含gRNA:dCas9复合物(或使用另一Cas的gRNA:Cas复合物)。

3. 引发剂标记的探针可包含由DNA制成的一个或多个引发剂,所述一个或多个引发剂共价连接至非共价结合至dCas9(或另一Cas)的gRNA,使得靶-结合结构域包含gRNA:dCas9复合物(或使用另一Cas的gRNA:Cas复合物)。

4. 引发剂标记的探针可包含由核酸或核酸类似物制成的引发剂,其共价连接或非共价结合至一个或多个包含靶结合结构域分子。

[0168] 分段引发剂探针的材料和组合物。在一些实施方式中,分段引发剂探针包含一个或多个靶结合结构域和一个或多个分段引发剂结构域(例如,图3A-3B、5A-5E和38)。每个结构域可包含一种或多种材料,包含DNA、RNA、2' OMe-RNA、PNA、XNA、化学修饰的核酸、合成的

核酸类似物、氨基酸、合成的氨基酸类似物和/或适于结构域目的的任何其他分子。例如：

1. 分段引发剂探针可包含由DNA制成的一个或多个分段引发剂结构域和由DNA制成的靶结合结构域。

2. 分段引发剂探针可包含由DNA制成的一个或多个分段引发剂结构域和由氨基酸制成的靶结合结构域(例如,抗体或纳米抗体或抗体片段)。

3. 分段引发剂探针可包含由合成的核酸类似物制成的分段引发剂结构域和由DNA和2' OMe-RNA的组合制成的靶结合结构域。

4. 分段引发剂探针可包含由2' OMe-RNA制成的分段引发剂结构域和由RNA和蛋白质的组合制成的靶结合结构域。

5. 分段引发剂探针可包含由DNA制成的分段引发剂结构域和由PNA制成的靶结合结构域。

6. 分段引发剂探针可包含由任何核酸或核酸类似物制成的一个或多个分段引发剂结构域和由适于结合靶分子的材料任何组合制成的一个或多个靶结合结构域。

[0169] 在一些实施方式中,分段引发剂探针可包含单个共价连接的分子或可包含非共价相互作用以形成复合物的两个或多个分子(每个共价连接的)。例如：

1. 分段引发剂探针可包含由DNA制成的分段引发剂结构域,其共价连接至由DNA制成的靶结合结构域。

2. 分段引发剂探针可包含由DNA制成的一个或多个分段引发剂结构域,其共价连接至非共价结合至引导RNA(gRNA)的dCas9(或另一Cas),使得靶-结合结构域包含gRNA:dCas9复合物(或使用另一Cas的gRNA:Cas复合物)。

3. 分段引发剂探针可包含由DNA制成的一个或多个分段引发剂结构域,其共价连接至非共价结合至dCas9(或另一Cas)的gRNA,使得靶-结合结构域包含gRNA:dCas9复合物(或使用另一Cas的gRNA:Cas复合物)。

4. 分段引发剂探针可包含由核酸或核酸类似物制成的分段引发剂结构域,其共价连接或非共价结合至一个或多个包含靶结合结构域分子。探针单元内的每个分段引发剂探针可具有与探针单元中的其他分段引发剂探针相同或不同的材料组合物。探针单元内的每个分段引发剂探针可具有结合至相同靶分子上的不同检测位点或结合至靶分子复合物内的不同检测位点或结合至近端分子或复合物的靶集合内的不同检测位点的靶结合区。

[0170] 利用分段引发剂探针和HCR信号扩增的免洗信号生成。在一些实施方式中,分段引发剂探针和HCR扩增器用于使用免洗方案生成信号,其中未使用的探针和扩增器未从样品中去除。在一些实施方式中,探针单元内的两个或多个分段引发剂探针每个包含分段引发剂和靶结合区,使得单独的分段引发剂探针不足以有效地触发HCR信号扩增,但使得在每个探针的靶结合结构域结合至靶上的同源检测位点时,分段引发剂共定位以生成全HCR引发剂并触发拴系的HCR扩增聚合物的生长。在一些实施方式中,每个HCR发夹标记有一个或多个报告物和/或一个或多个淬灭剂和/或FRET对的一个或多个组分。在一些实施方式中,HCR扩增器包含两个HCR发夹H1和H2,其经历交替的H1和H2聚合步骤的聚合级联以生长拴系的HCR扩增聚合物。在一些实施方式中,HCR扩增器包含四个HCR发夹H1、H2、H3、H4,其经历交替的H1、H2、H3和H4聚合步骤的聚合级联以生长拴系的HCR扩增聚合物。在一些实施方式中,HCR发夹上的一个或多个报告物在聚合之前处于淬灭状态和在聚合之后处于非淬灭状态。

在一些实施方式中,包含FRET对的两个报告物在HCR聚合之前不足够接近以执行有效的FRET,但在聚合之后足够接近以执行有效的FRET。在一些实施方式中,HCR信号生成是构象依赖的,使得样品中的总HCR信号在HCR聚合之前比HCR聚合之后更低,这是因为:a)当HCR单体打开以加入HCR聚合物时,HCR单体经历的构象改变和/或b)HCR聚合物内的两个或多个HCR发夹的共定位。在一些实施方式中,由于拴系的HCR扩增聚合物的生长,HCR信号集中在靶位点处。在一些实施方式中,分段引发剂探针和HCR扩增器用于使用免疫方案生成信号,其中未使用的探针和扩增器未从样品中去除。在一些实施方式中,分段引发剂探针和HCR扩增器用于对样品使用免洗方案生成信号,所述样品包含以下任一个内的一个或多个靶:活细胞、活生物体、组织部分、脑切片、本体溶液、固定细胞、固定组织、固定胚胎。在一些实施方式中,靶不是交联的和/或不固定在样品内和/或不被捕获到固相支持物。在一些实施方式中,HCR发夹包含是分段底物的标签,使得HCR扩增共定位全底物(例如参见图18F)。在一些实施方式中,标签探针包含与阻断链(缀合至淬灭剂)杂交的标签链(缀合至报告物),使得标签链与HCR扩增聚合物内共定位的全底物的杂交展示将阻断链从标签链置换,将报告物从淬灭剂分离并生成信号。

[0171] 从样品中去除信号。在一些实施方式中,在检测信号之后,从样品中去除HCR信号(例如,参见图23A-23N和图40A-40N)。可通过减少样品中的信号生成报告物的数量的任何方法从样品中去除信号。例如:

- 使用光和/或化学试剂的光漂白荧光报告物分子(例如,参见图23A和40A),
- 化学裂解来自HCR发夹的报告物并将它们从样品中洗涤(例如,TCEP)(例如,参见图23B和40B),
- 化学裂解来自标签探针的报告物并且从样品中洗涤它们(例如,参见图23C和40C),
- 将发夹化学裂解成片段HCR扩增聚合物并从样品中洗涤片段(例如,参见图23D和40D),
- 化学裂解探针以从靶解下(untether)HCR扩增聚合物并从样品中洗涤解下的扩增聚合物(例如,参见图23E和40E),
- 利用辅助链使来自HCR扩增聚合物的发夹去杂交并从样品中洗涤发夹(例如,参见图23F、40F和40N),
- 利用辅助链使来自HCR扩增聚合物的标签探针去杂交并从样品中洗涤标签探针(例如,参见图23G和40G),
- 利用化学变性剂和/或升高的温度使HCR扩增聚合物去稳定,然后从样品中洗涤发夹(例如,参见图23H和40H),
- 利用化学变性剂和/或升高的温度使探针和它们的靶之间的相互作用去稳定和然后从样品中洗涤解下的扩增聚合物(例如,参见图23I和40I),
- 利用化学变性剂和/或升高的温度使标签探针和它们的底物之间的相互作用去稳定,并且然后从样品中洗涤标签探针(例如,参见图23J和40J),
- 利用酶降解扩增聚合物和/或探针并从样品中洗涤降解的分子(例如,参见图23K和40K-40M),
- 利用DNases降解DNA扩增聚合物和/或DNA探针和/或DNA靶并从样品中洗涤所得

分子(例如,参见图23K、40K-40M),

- 利用RNases降解RNA靶并且然后从样品中洗涤解下的扩增聚合物(例如,参见图23L和40K-40M),
- 利用蛋白酶降解蛋白质靶并且然后从样品中洗涤解下的扩增聚合物(例如,参见图23M和40K-40M),
- 利用RNases的组合降解RNA靶和DNases降解DNA扩增聚合物和/或DNA探针并且从样品中洗涤所得分子(例如,参见图23N和40K-40M),
- 利用蛋白酶的组降解蛋白质靶和DNases降解DNA扩增聚合物和/或DNA探针和/或DNA靶并且从样品中洗涤所得分子(例如,参见图23O和40K-40M),
- 在相同时间或在不同时间利用以上方法的两种或多种。

[0172] 测定形式。在一些实施方式中,可以以不同的测定形式测量HCR信号,包括但不限于:印迹、northern印迹、western印迹、southern印迹、斑点印迹、纸张测定(paper assay)、流式细胞术测定、荧光流式细胞术测定、细胞分选测定、荧光活化细胞分选测定、磁激活细胞分选测定、显微测定、光显微测定、落射荧光显微测定、共聚焦显微镜测定、光片显微测定、微阵列测定、基于珠的测定、质谱测定、荧光显微测定、质谱显微测定、质谱流式细胞术测定、荧光测定、化学发光测定、生物发光测定、比色测定、电化学阻抗测定、电化学化学发光测定、能量耗散测定、使用人眼的测定、使用手机照相机的测定法、凝胶电泳测定、原位杂交(ISH)测定、RNA-ISH测定、DNA-ISH测定、免疫组织化学(IHC)测定、放射自显影测定或能够检测由HCR扩增聚合物产生的信号的任何测定。

[0173] 样品类型。在一些实施方式中,HCR引发剂标记的探针和/或HCR分段引发剂探针可与HCR扩增发夹一起使用以检测样品中的靶,所述靶包含分子、复合物或近端分子或复合物的集合。靶分子可以包含在样品内,包含例如:细菌、斑马鱼胚胎、鸡胚、小鼠胚胎、人活检标本、人组织切片、FFPE组织切片、尿液样品、血液样品、粪便样品、小鼠组织切片、脑切片、海胆胚、线虫幼虫、果蝇胚、模型生物、非模型生物、生物体多种类混合物、含有未知生物体的环境样品、生物体的聚生体(例如,另外的生物体的肠内的原生生物和细菌的混合物)、白蚁、微生物组、临床标本、诊断样品、痰样品、肿瘤活检样品、研究样品、包含来自人的材料的样品、包含来自宠物(例如狗、猫、兔、蜥蜴、蛇或鱼)的材料的样品、来自野生动物(例如,猎豹、象、犀牛或黑猩猩)的材料、来自灭绝动物(例如,猛犸象、渡渡鸟、大海雀、三角恐龙或候鸽)的材料、活细胞(例如,细菌或培养的哺乳动物细胞)或活生物体(例如活小鼠或活人)。

[0174] 在一些实施方式中,靶可以游离于样品内的溶液中。例如,靶可以游离于以下内的溶液中:试管、细胞、胚胎、生物体、组织切片、生物样品或其他样品。

[0175] 在一些实施方式中,靶可以共价交联或非共价结合至共价或非共价连接至固相支持体的一个或多个捕获探针。例如,直接或间接地结合至与微阵列或珠共价连接的捕获探针。

[0176] 在一些实施方式中,靶可以直接或间接地固定、共价交联或非共价结合至固相支持体。例如,靶可以结合、固定或共价交联至载玻片、印迹、膜、纸底物或任何其他底物。靶可以固定或共价交联至细胞、胚胎、生物体、组织切片、生物样品或任何其他样品。靶可以在固定和透化、固定但不透化或不固定但透化的样品内共价连接。

[0177] 在一些实施方式中,靶可以不存在于活细胞、活胚、活生物体、活生态系统或生物

体的聚生体(例如哺乳动物的肠道内的微生物组)内。靶可以与细胞或生物体相关联但是外部的,或者它可以包含在细胞或生物体内。靶可以共价交联在活细胞、活胚、活生物体、活生态系统或生物体的聚生体内。靶可以存在于或不存在于样品内的一个或多个细胞类型。靶可以存在于样品内的一个或多个生物体内或不存在于样品内的一个或多个生物体。靶可以存在于包含与靶分子具有不同程度相似性的一个或多个脱靶的样品中。靶可以存在于膨胀(expanded)样品内。靶可以存在于压缩样品内。样品可以在检测靶之前膨胀,以便增加分子之间的空间分隔。样品可以在检测靶之前压缩,以便减小分子之间的空间分隔。靶和/或其他分子可以交联至膨胀样品,以便在样品膨胀时保持样品中的分子之间的相对位置。靶和/或其他分子可以交联至凝胶、基质或引入样品的其他试剂,以便使样品膨胀同时在样品膨胀时保持样品中的分子的相对位置和/或取向。样品可以在样品内的不同组织和/或器官中以不同的膨胀和/或压缩因子区别地膨胀和/或压缩。

[0178] 固定样品。在一些实施方式中,靶分子可交联至样品,使得它们在实验的后续步骤期间被保留。例如,靶分子可以使用化学试剂(例如,甲醛、多聚甲醛、EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺))交联至样品。

[0179] 透化样品。在一些实施方式中,可以处理样品以增强靶分子对HCR探针和扩增器的可接近性。例如,可以使用化学试剂(例如,甲醇、乙醇、洗涤剂)或酶(例如,蛋白酶K)透化样品(例如,细胞、组织切片或整装胚胎(whole-mount embryos))。靶可接近性也可以经由样品均质化、显微解剖、电穿孔、切片、热处理(例如,Smith JJ, Gunasekera TS, Barardi CR, Veal D, Vesey G (2004) *J Appl Microbiol* 96 (2):409-417)和/或微波处理(例如,Lan HY, Mu W, NG YY, Nikolic-Paterson DH, & Atkins RC (1996) *J Histochem Cytochem* 44 (3):281-287)来增强。另一选项是使用化学转染试剂递送HCR探针和扩增器穿过细胞膜。

[0180] 样品洗涤以从样品中去除未结合的试剂。在一些实施方式中,可以通过从样品中洗涤未使用的成像试剂来减少背景。例如,洗涤可用于去除探针、HCR引发剂标记的探针、HCR分段引发剂探针、HCR扩增发夹、扩增试剂、标签探针、抗体和/或来自样品的其他成像试剂。可使用化学试剂在一定温度下进行洗涤,使得特异性结合的成像试剂主要不被去除(保留信号)和非特异性结合的成像试剂被主要去除(减少背景)。例如,洗涤缓冲液可包含变性剂(例如,甲酰胺、尿素)、盐缓冲液(例如,氯化钠柠檬酸钠(SSC)、磷酸盐缓冲盐水(PBS))、酸(例如柠檬酸)、表面活性剂(例如吐温20、Triton-X、SDS)或阻断剂(例如tRNA、鲑鱼精子DNA、BSA、聚蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone)、肝素)。洗涤缓冲液可与洗涤温度(例如25-80°C)组合以优化洗涤严密性(wash stringency)。

[0181] 准确和精确的靶定量。在一些实施方式中,HCR探针和HCR扩增器在解剖情况下提供对靶分子的定量分析,生成与每个成像像素的靶分子数量的近似呈线性变化的信号。该定量性质遵循在成像期间以三个水平发生的信号的总和:1)每个靶分子的一个或多个引发剂标记的探针或每个靶分子的一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)的总和。2)拴系至引发剂标记的探针上或拴系至共定位全引发剂的分段引发剂探针的探针单元的每个扩增聚合物的多个HCR扩增发夹的总和。3)在成像像素中的零个、一个或多个靶分子的总和。通过定义平均邻近像素的强度的成像像素,可以进一步提高定量精度,同时仍然保持亚细胞分辨率。例如,对于图11A-11B中的mRNA靶和图41A-41C中的蛋白质靶,展示了具有亚细胞分辨率的准确且精确的定量成像。HCR信号的定量性质遵循HCR探针的结

合性质、HCR扩增发夹的聚合性质和中心极限定理,其充分利用在图像采集期间和之后的求和以及平均以生成与靶丰度近似呈线性变化的信号。相同的定量性质适用于其他测定形式,其中求和和/或平均在数据采集期间和/或之后发生(例如,通过流式细胞仪或印迹扫描仪)。

[0182] 使用引发剂标记的探针的多重分析。在一些实施方式中,包括引发剂标记的探针和包含HCR发夹的HCR扩增器的HCR探针组可用于多重靶分析(例如,经由成像、印迹、流式细胞术、质谱流式细胞术、凝胶分析或任何其他分析模式的靶分析),其中在相同样品中同时分析多个靶。考虑包含N个感兴趣的靶类型的一些或所有以及零个、一个或多个不感兴趣的额外的脱靶种类的样品。可以使用包含一个或多个引发剂标记的探针(每个包含一个或多个HCR引发剂)的探针组来检测每个靶,所述一个或多个引发剂标记的探针选择性地结合同源靶。在一些实施方式中,用针对不同HCR扩增器的HCR引发剂标记针对N个靶类型的每一个的探针组。例如,可以用标记有用于HCR扩增器1的HCR引发剂的探针组1检测靶1,可以用标记有用于HCR扩增器2的HCR引发剂的探针组2检测靶2,依此类推,其中探针组N标记有用于HCR扩增器N的HCR引发剂。

[0183] 在一些实施方式中,N个探针组正交地操作,使得每个探针组无论样品中是否存在其他探针组和/或靶而选择性地结合其同源靶。在一些实施方式中,N个扩增器正交地操作,使得1)每个扩增器的发夹在不存在同源HCR引发剂的情况下亚稳定地共存,(2)如果每个扩增器的同源引发剂无论样品中是否存在其他扩增器而存在,则每个扩增器被选择性地触发以聚合。

[0184] 在一些实施方式中,由每个HCR扩增器携带的标签是正交的,使得分析方法能够测量由每个HCR扩增器生成的信号,无论其他标签是否存在于样品中(例如,可以使用荧光显微镜来区分的荧光标签,或可以使用质谱;流式细胞术区分的稀土标签)。

[0185] 例如,在图29、30、41和43中示出了使用引发剂标记的探针和用于所有靶的同步HCR信号扩增的多重成像。

[0186] 在一些实施方式中,针对N个靶类型(类型 $j=1, \dots, N$)的多重靶分析可如下实现:

1. 利用N个正交的HCR引发剂标记的探针组同时检测所有靶(其中来自探针组j的引发剂标记的探针结合至靶j,靶类型 $j=1, \dots, N$),
2. 利用N个正交的HCR扩增器同时扩增所有靶类型的信号(其中来自扩增器j的发夹响应于引发剂j聚合以形成拴系至靶类型j的扩增聚合物j, $j=1, \dots, N$),
3. 使用测量装置分析样品以检测由扩增器j的一个或多个发夹直接携带或间接地结合至扩增器j的一个或多个发夹的报告物j,靶类型 $j=1, \dots, N$ 。

[0187] 使用分段引发剂探针的多重分析。在一些实施方式中,包括分段引发剂探针和包含HCR发夹的HCR扩增器的HCR探针组可用于多重靶分析(例如,经由成像、印迹、流式细胞术、质谱流式细胞术、凝胶分析或任何其他分析模式),其中在相同样品中同时分析多个靶。考虑包含N个感兴趣的靶类型的一些或全部以及零个、一个或多个不感兴趣的另外的脱靶种类的样品。可以使用包含一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)的探针组来检测每个靶,所述探针单元选择性地结合同源靶,使得每个结合的探针单元共定位全HCR引发剂。在一些实施方式中,用于N个靶类型中的每一个的探针组共定位用于不同HCR扩增器的全HCR引发剂。例如,可以用共定位用于HCR扩增器1的一个或多个全HCR引发剂

的探针组1检测靶1,可以用共定位用于HCR扩增器2的一个或多个全HCR引发剂的探针组2检测靶2,以此类推,其中探针组N共定位用于HCR扩增器N的一个或多个全HCR引发剂。

[0188] 在一些实施方式中,N个探针组正交地操作,使得每个探针组无论样品中是否存在其他探针组和/或靶而选择性地结合其同源靶。在一些实施方式中,N个扩增器正交地操作,使得1) 每个扩增器的发夹在不存在由同源靶共定位的同源全引发剂的情况下亚稳态地共存,2) 如果每个扩增器的同源全引发剂无论样品中是否存在其他扩增器都被其同源靶共定位,则每个扩增器被选择性触发以聚合。

[0189] 在一些实施方式中,由每个HCR扩增器携带的标签是正交的,使得分析方法能够测量由每个HCR扩增器产生的信号,无论其他标签是否存在于样品中(例如,可以使用荧光显微镜来区分的荧光标记,或可以使用质谱流式细胞术区分的稀土标签)。

[0190] 例如,在图10和11中示出了使用分段引发剂探针和同步HCR信号扩增针对所有靶的多重成像。

[0191] 在一些实施方式中,针对N个靶类型(类型 $j=1, \dots, N$)的多重靶分析可如以下实现:

1. 使用N个正交的HCR分段引发剂探针组以同时检测所有靶(其中来自探针组j的分段引发剂探针结合至靶j以便针对靶类型 $j=1, \dots, N$ 的探针组j中的每个探针单元共定位全HCR引发剂),

2. 利用N个正交的HCR扩增器针对所有靶类型同时扩增信号(其中来自扩增器j的发夹响应于全HCR引发剂j聚合以形成拴系至靶类型j的扩增聚合物j, $j=1, \dots, N$),

3. 使用测量装置分析样品以检测由扩增器j的一个或多个发夹直接携带或间接地结合至扩增器j的一个或多个发夹二者其一的报告物j,靶类型 $j=1, \dots, N$ 。

[0192] 利用引发剂标记的探针和分段引发剂探针的组合的多重分析。在一些实施方式中,使用引发剂标记的探针以检测(可能不同类型的)一个或多个靶和分段引发剂探针以检测(可能不同类型的)一个或多个其他靶在样品中执行多重分析。例如,在相同样品中,一个或多个蛋白质靶和一个或多个小RNA靶可以用正交的引发剂标记的探针检测,一个或多个mRNA靶和/或DNA靶可以用正交的分段引发剂探针检测和一个或多个复合物靶(包含两个或多个非共价连接的分子的复合物)可以用分段引发剂探针检测。在一些实施方式中,用于每个靶的探针组(包含一个或多个引发剂标记的探针或一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针))将触发正交的HCR扩增器,其生成(直接或间接地)正交的信号。在一些实施方式中,针对所有靶类型的HCR信号扩增被同时执行。

[0193] 例如,在图31和32中示出了以针对所有靶的同步HCR信号扩增使用用于一个或多个靶的引发剂标记的探针和用于一个或多个靶的分段引发剂探针进行多重成像。

[0194] 使用光谱成像的多重分析。在一些实施方式中,可以使用光谱分析来增加可以彼此区分的标签的数量。例如,如果两个荧光团具有重叠发射谱,使得使用带通滤波器的发射强度的测量将不能够在两个标签中区分,可以使用光谱成像来区分它们,其中使用不同波长的多个发射测量来在来自两个标签的信号之间区分,即使标签的发射光谱基本上重叠。使用光谱成像,在一些实施方式中,可以光谱区分10种荧光染料,或者可以光谱区分20种荧光染料,或者可以光谱区分30种或更多种荧光染料。

[0195] 使用多报告物聚合物的杂合光谱的多重分析。HCR聚合经由交替的H1和H2聚合步

骤进行,因此所得的HCR扩增聚合物包含:1)相同数量的H1和H2发夹,2)一个或多个H1发夹,3)或一个或多个H2发夹。随着聚合物的长度增加,聚合物中的H1发夹的分数(fraction)接近0.5,并且聚合物中H2发夹的分数也接近0.5。在一些实施方式中,发夹H1标记有报告物R1,并且发夹H2标记有报告物R2。由HCR扩增聚合物产生的信号是由报告物R1和报告物R2产生的信号与新的混合光谱(hybrid spectrum)的1:1共混物。考虑具有不同光谱的N个报告物组。N个报告物可用于产生与可自选N个报告物组的不同报告物对的数量的 $N*(N-1)/2$ 杂合光谱相对应。例如:1)具有6个报告物,有可能产生 $6*5/2=15$ 个杂合报告物光谱,2)具有8个报告物,有可能产生 $8*7/2=28$ 个杂合报告物光谱,3)具有15个报告物,有可能产生 $15*14/2=105$ 个报告物光谱,4)具有50个报告物,有可能产生 $50*49/2=1225$ 个杂合报告物光谱,5)具有100个报告物,有可能产生 $100*99/2=4950$ 个杂合报告物光谱。

[0196] 使用NUPACK的正交HCR扩增器的计算序列设计。在一些实施方式中,使用NUPACK(软件集)内的反应路径设计者设计一组正交HCR扩增器(具有或不具有底物和/或辅助链)^{56,57}。在一些实施方式中,使用一组靶测试管将序列设计制定为多状态优化问题,以表示反应路径中的基本步骤以及对全局串扰进行建模。⁵⁶在一些实施方式中,每个基本间距式电子管(step tube)包含一组所需的靶上复合物(每个具有靶二级结构和靶浓度),与给定步骤的通路(on-pathway)杂交产物相对应,以及一组不需要的脱靶复合物(每个具有渐渐消失(vanishing)的靶浓度),与给定步骤的通路外(off-pathway)杂交串扰相对应。⁵⁶在这种情况下,这些基本步进管促进同源反应物完全转化成同源产物并防止这些相同反应物之间的局部杂交串扰。在一些实施方式中,为了同时设计N个正交系统,为每个正交系统指定基本步进管。在一些实施方式中,为了针对系统之间的通路外相互作用,还指定了单个全局串扰管。⁵⁶在一些实施方式中,在全局串扰管中,靶上复合物与所有系统(例如,已经由聚合打开的HCR发夹的单链输出结构域)的所有基本步骤期间生成的所有反应性物质相对应。在一些实施方式中,在全局串扰管中,脱靶复合物与这些反应性物质之间的非同源相互作用相对应。在一些实施方式中,全局串扰管集成(ensemble)省略了反应性物质旨在形成的同源产物(它们既不表现为在靶上也不表现为脱靶)。在这种情况下,可以迫使全局串扰管中的所有反应性物质不进行反应(剩余为期望的靶上)或经历串扰反应(形成不期望的脱靶)二者其一,提供在序列优化期间最小化全局串扰的基础。在一些实施方式中,序列设计经受与反应途径固有的互补性约束(例如,在图1A中,结构域“a”与结构域“a*”互补,结构域“b”与结构域“b*”互补)。在一些实施方式中,通过减少对多管集成上的不正确配对的核苷酸的平均分数进行定量的集成缺陷来优化序列。⁵⁶在一些实施方式中,在集成缺陷内应用缺陷权重,以优先考虑设计工作。⁵⁶优化集成缺陷实现正设计范例,明确地设计通路上基本步骤,和负设计范例,明确地针对通路外串扰涉及。⁵⁶

[0197] 使用重复的报告物检测的多重分析。在一些实施方式中,可以使用相同的N个标签来增加可以在样品中分析的靶的数量,以检测连续轮分析中的多个靶。例如,可以使用N个标签对N个靶进行成像,并且然后从样品中去除信号,并且使用相同的N个标签检测另一组N个靶。该方法适用于在相同样品中对多个靶类型进行成像:1)不管不同靶类型的表达水平是高、低、每个靶类型内的变量和/或跨不同靶类型的变量,2)不管不同靶类型的表达模式是否在样品内在空间上重叠或不重叠。用于使用重复的报告物检测进行多重分析的示例方法包含但不限于在以下方法A-T中描述的那些。在一些实施方式中,在以下方法A-T的一个、

多个和/或所有步骤中,探针类型的选择对于不同的靶可以是不同的,并且任选地可在任何过程中混合。在方法A-T的一些实施方式中,1)可以用引发剂标记的探针检测所有靶,或2)可以用分段引发剂探针检测所有靶,或3)可以用引发剂标记的探针检测一个或多个靶,并且可以用分段引发剂探针检测其他靶。因此,本文的一个选项的公开内容提供了彼此以及它们的组合的选择。例如,“提供N个探针组,每个包含:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针”的陈述意味着N个探针组的任一个探针组可以是任一类型(a或b),包含所有探针组具有相同类型(所有是类型a或所有是类型b)的可能性,以及一些探针组具有一种类型,并且一些探针组具有其他类型(一些是类型a和一些类型b)的可能性。还应当理解,在本说明书的公开内容中,可以针对其中在该上下文中表示“或者...二者其一”的任何实施方式混合这些类型(除非另有明确说明)。

[0198] 在一些实施方式中,以下方法A-T中的任一个可以与CARD、酶去活化和/或重复的CARD组合。当使用短语“任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰”时,表示所讨论的任何实施方式也可与涉及、酶去活化和/或重复的CARD所讨论的实施方式中的任何一个或多个组合。这明确地允许本文提供的各种方法的进一步组合。类似地,当使用短语“任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除来修饰”时,表示所讨论的任何实施方式也可与涉及多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除所讨论的实施方式中的任何一个或多个组合。这些短语用作速记符号,以通过引用通过依赖其他公开部分而不是重复它们来简化本公开。

[0199] 在一些实施方式中,本文中的任何一个或多个方法的任选步骤的任何一个或多个可与本文的任何一个或多个方法的其他任选步骤的任何一个或多个组合。

[0200] 在一些实施方式中,与本文中的方法中的任何一个或多个不同的步骤的任何一个或多个可以和与对于本文的任何一个或多个方法不同的其他步骤的任何一个或多个组合。

[0201] 在一些实施方式中,与本文的方法的任何一个或多个不同的任选步骤的任何一个或多个可以和与本文的任何一个或多个方法不同的任何其他任选步骤的一个或多个组合。

[0202] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测进行多重分析的方法是方法A(实施例15)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD进行修饰),所述方法包含:

1. 提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品
4. 提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针
5. 任选地洗涤样品
6. 提供标记有报告物的HCR扩增器
7. 任选地洗涤样品
8. 检测来自报告物的信号

[0203] 在一些实施方式中,方法A(实施例15)包含(参见图26A):步骤A1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤A2:任选地固定样品;步骤A3:任选地透化样

品;步骤A4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针)或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤A5:任选地洗涤样品;步骤A6:提供标记有报告物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的报告物标记的扩增器);步骤A7:任选地洗涤样品;步骤A8:检测来自报告物的信号。

[0204] 在一些实施方式中,方法A(例如,实施例15中示出的实例)包含(参见图26A):步骤A1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤A2:固定样品;步骤A3:透化样品;步骤A4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤A5:洗涤样品;步骤A6:提供标记有报告物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的报告物标记的扩增器);步骤A7:洗涤样品;步骤A8:检测来自报告物的信号。

[0205] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测多重分析的方法包含方法B(例如,实施例16)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰),其包含:

1. 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;
2. 任选地固定样品;
3. 任选地透化样品;
4. 提供N个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针;
5. 任选地洗涤样品;
6. 提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的报告物);
7. 任选地洗涤样品;
8. 检测来自N个不同的报告物的N个信号。

[0206] 在一些实施方式中,方法B(例如,实施例16)包含(参见图26B):步骤B1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤B2:任选地固定样品;步骤B3:任选地透化样品;步骤B4:提供N个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤B5:任选地洗涤样品;步骤B6:提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的HCR扩增器);步骤B7:任选地洗涤样品;步骤B8:检测来自N个不同的报告物的N个信号。

[0207] 在一些实施方式中,方法B(例如,实施例16)包含(参见图26B):步骤B1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤B2:固定样品;步骤B3:透化样品;步骤B4:提供N个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针)或b)一个或多个探针单元(例如参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤B5:洗涤样品;步骤B6:提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的HCR扩增器);步骤B7:洗涤样品;步骤B8:检测来自N个不同的报告物的N个信号。

[0208] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法C(例如,实施例17)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰),其包含:

1. 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;
2. 任选地固定样品;
3. 任选地透化样品;
4. 提供探针组(靶向N个靶类型的一个),其包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b) 一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针;
5. 任选地洗涤样品;
6. 提供与提供的探针组相对应的HCR扩增器(标记有报告物);
7. 任选地洗涤样品;
8. 检测来自报告物的信号;
9. 从样品中去除信号;
10. 任选地重复步骤C4-C9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0209] 在一些实施方式中,方法C(例如,实施例17)包含(参见图26C):步骤C1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤C2:任选地固定样品;步骤C3:任选地透化样品,步骤C4:提供探针组(靶向N个靶类型的一个),其包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针)或b) 一个或多个探针单元(例如参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤C5:任选地洗涤样品,步骤C6:提供与提供探针组相对应的HCR扩增器(标记有报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的HCR扩增器);步骤C7:任选地洗涤样品,步骤C8:检测来自报告物的信号;步骤C9:从样品中去除信号(例如,参见图23);步骤C10:任选地重复步骤C4-C9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0210] 在一些实施方式中,方法C(例如,实施例17)包含(参见图26C):步骤C1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤C2:固定样品;步骤C3:透化样品,步骤C4:提供探针组(靶向N个靶类型的一个),其包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针)或b) 一个或多个探针单元(例如参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤C5:洗涤样品,步骤C6:提供与提供的探针组相对应的HCR扩增器(标记有报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的HCR扩增器);步骤C7:洗涤样品,步骤C8:检测来自报告物的信号;步骤C9:从样品中去除信号(例如,参见图23);步骤C10:重复步骤C4-C9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0211] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法D(例如,实施例18)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰),其包含:

1. 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;
2. 任选地固定样品;
3. 任选地透化样品;
4. 提供M个探针组(对于 $M \leq N$;每个靶向M个靶类型的一个),每个包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b) 一个或多个探针单元,每个包含两个或多个

HCR分段引发剂探针；

5. 任选地洗涤样品；
6. 提供与M个探针组相对应的M个HCR扩增器(每个标记有不同的报告物)；
7. 任选地洗涤样品；
8. 检测与M个不同的报告物相对应的M个信号；
9. 从样品中去除M个信号；
10. 任选地重复步骤4-9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0212] 在一些实施方式中,方法D(例如,实施例18)包含(参见图26D):步骤D1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤D2:任选地固定样品;步骤D3:任选地透化样品;步骤D4:提供M个探针组(对于 $M \leq N$;每个靶向M个靶类型的一个),每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针)或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤D5:任选地洗涤样品;步骤D6:提供与M个探针组相对应的M个HCR扩增器(每个标记有不同的报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的HCR扩增器);步骤D7:任选地洗涤样品;步骤D8:检测与M个不同的报告物相对应的M个信号;步骤D9:从样品中去除M个信号(例如,参见图23);步骤D10:任选地重复步骤4-9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0213] 在一些实施方式中,方法D(例如,实施例18)包含(参见图26D):步骤D1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤D2:固定样品;步骤D3:透化样品;步骤D4:提供M个探针组(对于 $M \leq N$;每个靶向M个靶类型的一个),每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤D5:洗涤样品;步骤D6:提供与M个探针组相对应的M个HCR扩增器(每个标记有不同的报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的HCR扩增器);步骤D7:洗涤样品;步骤D8:检测与M个不同的报告物相对应的M个信号;步骤D9:从样品中去除M个信号(例如,参见图23);步骤D10:重复步骤4-9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0214] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法E(例如,实施例19)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰),其包含:

1. 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;
2. 任选地固定样品;
3. 任选地透化样品;
4. 提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针;
5. 任选地洗涤样品;
6. 提供与探针组的一个相对应的HCR扩增器(标记有报告物);
7. 任选地洗涤样品;
8. 检测来自报告物的信号;

9. 从样品中去除信号;

10. 任选地重复步骤6-9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0215] 在一些实施方式中,方法E(例如,实施例19)包含(参见图26E):步骤E1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤E2:任选地固定样品;步骤E3:任选地透化样品;步骤E4:提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤E5:任选地洗涤样品;步骤E6:提供与探针组的一个相对应的HCR扩增器(标记有报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的扩增器);步骤E7:任选地洗涤样品;步骤E8:检测来自报告物的信号;步骤E9:从样品中去除信号(例如,参见图23);步骤E10:任选地重复步骤6-9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0216] 在一些实施方式中,方法E(例如,实施例19)包含(参见图26E):步骤E1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤E2:固定样品;步骤E3:透化样品;步骤E4:提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤E5:洗涤样品;步骤E6:提供与探针组的一个相对应的HCR扩增器(标记有报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的扩增器);步骤E7:洗涤样品;步骤E8:检测来自报告物的信号;步骤E9:从样品中去除信号(例如,参见图23);步骤E10:重复步骤6-9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0217] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法F(例如,实施例20)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰),其包含:

1. 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;

2. 任选地固定样品;

3. 任选地透化样品;

4. 提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针;

5. 任选地洗涤样品;

6. 提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物);

7. 任选地洗涤样品;

8. 检测与M个报告物相对应的M个信号;

9. 从样品中去除M个信号;

10. 任选地重复步骤6-9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0218] 在一些实施方式中,方法F(例如,实施例20)包含(参见图26F):步骤F1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤F2:任选地固定样品;步骤F3:任选地透化样品;步骤F4:提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包括以下二者

其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b) 一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤F5:任选地洗涤样品;步骤F6:提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的扩增器);步骤F7:任选地洗涤样品;步骤F8:检测与M个报告物相对应的M个信号;步骤F9:从样品中去除M个信号(例如,参见图23);步骤F10:任选地重复步骤6-9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0219] 在一些实施方式中,方法F(例如,实施例20)包含(参见图26F):步骤F1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤F2:固定样品;步骤F3:透化样品;步骤F4:提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包括以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b) 一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤F5:洗涤样品;步骤F6:提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的扩增器);步骤F7:洗涤样品;步骤F8:检测与M个报告物相对应的M个信号;步骤F9:从样品中去除M个信号(例如,参见图23);步骤F10:重复步骤6-9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0220] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法G(例如,实施例21)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰),其包含:

1. 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品
4. 提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b) 一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针
5. 任选地洗涤样品
6. 提供一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物)
7. 任选地洗涤样品
8. 检测来自一个或多个报告物的一个或多个信号
9. 任选地从样品中去除一个或多个探针组
10. 任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器
11. 任选地从样品中去除一个或多个报告物
12. 任选地从样品中去除一个或多个信号
13. 任选地以任意顺序重复步骤2-12的任一个一次或多次

[0221] 在一些实施方式中,方法G(例如,实施例21)包含(参见图26G):步骤G1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤G2:任选地固定样品;步骤G3:任选地透化样品;步骤G4:提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b) 一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤G5:任选地洗涤样品;步骤G6:提供一个或多个HCR

扩增器(每个标记有一个或多个报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的HCR扩增器);步骤G7:任选地洗涤样品;步骤G8:检测来自一个或多个报告物的一个或多个信号;步骤G9:任选地从样品中去除一个或多个探针组;步骤G10:任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器;步骤G11:任选地从样品中去除一个或多个报告物;步骤G12:任选地从样品中去除一个或多个信号(例如,参见图23);步骤G13:任选地以任意顺序重复步骤2-12的任一个一次或多次。

[0222] 在一些实施方式中,方法G(例如,实施例21)包含(参见图26G):步骤G1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤G2:固定样品;步骤G3:透化样品;步骤G4:提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤G5:洗涤样品;步骤G6:提供一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的HCR扩增器);步骤G7:洗涤样品;步骤G8:检测来自一个或多个报告物的一个或多个信号;步骤G9:从样品中去除一个或多个探针组;步骤G10:从样品中去除一个或多个HCR扩增器;步骤G11:从样品中去除一个或多个报告物;步骤G12:从样品中去除一个或多个信号(例如,参见图23);步骤G13:以任意顺序重复步骤2-12的任一个一次或多次。

[0223] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法H(例如,实施例22)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰),其包含:

1. 提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品
4. 提供探针组,去包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针
5. 任选地洗涤样品
6. 提供标记有底物的HCR扩增器
7. 任选地洗涤样品
8. 提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)
9. 任选地洗涤样品
10. 检测来自报告物的信号

[0224] 在一些实施方式中,方法H(例如,实施例22)包含(参见图26H):步骤H1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤H2:任选地固定样品;步骤H3:任选地透化样品;步骤H4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤H5:任选地洗涤样品;步骤H6:提供标记有底物的HCR扩增器(例如,参见图18的底物标记的HCR扩增器);步骤H7:任选地洗涤样品;步骤H8:提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤H9:任选地洗涤样品;步骤H10:检测来自报告物的信号。

[0225] 在一些实施方式中,方法H(例如,实施例22)包含(参见图26H):步骤H1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤H2:固定样品;步骤H3:透化样品;步骤H4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤H5:洗涤样品;步骤H6:提供标记有底物的HCR扩增器(例如,参见图18的底物标记的HCR扩增器);步骤H7:洗涤样品;步骤H8:提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤H9:洗涤样品;步骤H10:检测来自报告物的信号。

[0226] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法I(例如,实施例23)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰)包含:

1. 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;
2. 任选地固定样品;
3. 任选地透化样品;
4. 提供N个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针;
5. 任选地洗涤样品;
6. 提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的底物);
7. 任选地洗涤样品;
8. 提供与N个不同的底物相对应的N个标签探针(每个缀合至不同的报告物);
9. 检测来自N个不同的报告物的N个信号。

[0227] 在一些实施方式中,方法I(例如,实施例23)包含(参见图26I):步骤I1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤I2:任选地固定样品;步骤I3:任选地透化样品;步骤I4:提供N个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤I5:任选地洗涤样品;步骤I6:提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的底物)(例如,参见图18的底物标记的HCR扩增器);步骤I7:任选地洗涤样品;步骤I8:提供与N个不同的底物相对应的N个标签探针(每个缀合至不同的报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤I9:检测来自N个不同的报告物的N个信号。

[0228] 在一些实施方式中,方法I(例如,实施例23)包含(参见图26I):步骤I1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤I2:固定样品;步骤I3:透化样品;步骤I4:提供N个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针)或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤I5:洗涤样品;步骤I6:提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的底物)(例如,参见图18的底物标记的HCR扩增器);步骤I7:洗涤样品;步骤I8:提供与N个不同的底物相对应的N个标签探针(每个缀合至不同的报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤I9:检测来自N个不同的报告物的N个信号。

[0229] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法J(例如,实

实施例24) (其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰) 包含:

1. 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;
2. 任选地固定样品;
3. 任选地透化样品;
4. 提供N个探针组, 每个包含以下二者其一: a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针, 或b) 一个或多个探针单元, 每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针;
5. 任选地洗涤样品;
6. 提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器 (每个标记有不同的底物);
7. 任选地洗涤样品;
8. 提供与N个不同的底物的M个相对应的M个标签探针 (对于 $M \leq N$; 每个缀合至不同的报告物);
9. 任选地洗涤样品;
10. 检测与M个不同的报告物相对应的M个信号;
11. 从样品中去除M个信号;
12. 任选地重复步骤8-11的一个或多个, 直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0230] 在一些实施方式中, 方法J (例如, 实施例24) 包含 (参见图26J): 步骤J1: 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品; 步骤J2: 任选地固定样品; 步骤J3: 任选地透化样品; 步骤J4: 提供N个探针组, 每个包含以下二者其一: a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针 (例如, 参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针), 或b) 一个或多个探针单元 (例如, 参见图8和16的探针组), 每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针 (例如, 参见图3、4、5和17的探针单元); 步骤J5: 任选地洗涤样品; 步骤J6: 提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器 (每个标记有不同的底物) (例如, 参见图18的底物标记的HCR扩增器); 步骤J7: 任选地洗涤样品; 步骤J8: 提供与N个不同的底物的M个相对应的M个标签探针 (对于 $M \leq N$; 每个缀合至不同的报告物) (例如, 参见图20的标签探针); 步骤J9: 任选地洗涤样品; 步骤J10: 检测与M个不同的报告物相对应的M个信号; 步骤J11: 从样品中去除M个信号 (例如, 参见图23); 步骤J12: 任选地重复步骤J8-J11的一个或多个, 直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0231] 在一些实施方式中, 方法J (例如, 实施例24) 包含 (参见图26J): 步骤J1: 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品; 步骤J2: 固定样品; 步骤J3: 透化样品; 步骤J4: 提供N个探针组, 每个包含以下二者其一: a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针 (例如, 参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针), 或b) 一个或多个探针单元 (例如, 参见图8和16的探针组), 每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针 (例如, 参见图3、4、5和17的探针单元); 步骤J5: 洗涤样品; 步骤J6: 提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器 (每个标记有不同的底物) (例如, 参见图18的底物标记的HCR扩增器); 步骤J7: 洗涤样品; 步骤J8: 提供与N个不同的底物的M个相对应的M个标签探针 (对于 $M \leq N$; 每个缀合至不同的报告物) (例如, 参见图20的标签探针); 步骤J9: 洗涤样品; 步骤J10: 检测与M个不同的报告物相对应的M个信号; 步骤J11: 从样品中去除M个信号 (例如, 参见图23); 步骤J12: 重复步骤J8-J11的一个或多个, 直到已对所有N个靶执行信号检测。

[0232] 在一些实施方式中, 使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法K (例如, 实施例25) (其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰), 其包含:

1. 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品
4. 提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b) 一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针
5. 任选地洗涤样品
6. 提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有底物)
7. 任选地洗涤样品
8. 提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至报告物)
9. 任选地洗涤样品
10. 检测与一个或多个报告物相对应的一个或多个信号
11. 从样品中去除一个或多个信号
12. 任选地以任意顺序重复步骤4-11的任一个一次或多次

[0233] 在一些实施方式中,方法K(例如,实施例25)包含(参见图26K):步骤K1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤K2:任选地固定样品;步骤K3:任选地透化样品;步骤K4:提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b) 一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤K5:任选地洗涤样品;步骤K6:提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有底物)(例如,参见图18的底物标记的HCR扩增器);步骤K7:任选地洗涤样品;步骤K8:提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤K9:任选地洗涤样品;步骤K10:检测与一个或多个报告物相对应的一个或多个信号;步骤K11:从样品中去除一个或多个信号(例如,参见图23);步骤K12:任选地以任意顺序重复步骤K4-K11的任一个一次或多次。

[0234] 在一些实施方式中,方法K(例如,实施例25)包含(参见图26K):步骤K1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤K2:固定样品;步骤K3:透化样品;步骤K4:提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b) 一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤K5:洗涤样品;步骤K6:提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有底物)(例如,参见图18的底物标记的HCR扩增器);步骤K7:洗涤样品;步骤K8:提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤K9:洗涤样品;步骤K10:检测与一个或多个报告物相对应的一个或多个信号;步骤K11:从样品中去除一个或多个信号(例如,参见图23);步骤K12:以任意顺序重复步骤K4-K11的任一个一次或多次。

[0235] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法L(例如,实施例26)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰)包含:

1. 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品

2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品
4. 提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b) 一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针
5. 提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物和/或一个或多个底物)
6. 任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物)
7. 检测一个或多个信号
8. 任选地洗涤样品
9. 任选地从样品中去除一个或多个信号
10. 任选地从样品中去除一个或多个报告物
11. 任选地从样品中去除一个或多个标签探针
12. 任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器
13. 任选地从样品中去除一个或多个探针组
14. 任选地以任意顺序重复上述步骤的任一个

[0236] 在一些实施方式中,方法L(例如,实施例26)包含(参见图26L):步骤L1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤L2:任选地固定样品;步骤L3:任选地透化样品;步骤L4:提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b) 一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤L5:提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物和/或一个或多个底物)(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤L6:任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤L7:检测一个或多个信号;步骤L8:任选地洗涤样品;步骤L9:任选地从样品中去除一个或多个信号(例如,参见图23);步骤L10:任选地从样品中去除一个或多个报告物;步骤L11:任选地从样品中去除一个或多个标签探针;步骤L12:任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器;步骤L13:任选地从样品中去除一个或多个探针组;步骤L14:任选地以任意顺序重复上述步骤的任一个。

[0237] 在一些实施方式中,方法L(例如,实施例26)包含(参见图26L):步骤L1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤L2:固定样品;步骤L3:透化样品;步骤L4:提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针)或b) 一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤L5:提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物和/或一个或多个底物)(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤L6:提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤L7:检测一个或多个信号;步骤L8:洗涤样品;步骤L9:从样品中去除一个或多个信号(例如,参见图23);步骤L10:从样品中去除一个或多个报

告物;步骤L11:从样品中去除一个或多个标签探针;步骤L12:从样品中去除一个或多个HCR扩增器;步骤L13:从样品中去除一个或多个探针组;步骤L14:以任意顺序重复上述步骤的任一个。

[0238] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法M(例如,实施例27)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰)包含:

1. 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品
4. 以任意顺序执行步骤5-9的任一个一次或多次:
5. 提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针
6. 提供直接或间接地生成一个或多个信号的一个或多个HCR扩增器
7. 任选地洗涤样品
8. 检测一个或多个信号
9. 任选地去除一个或多个信号

[0239] 在一些实施方式中,方法M(例如,实施例27)包含(参见图26M):步骤M1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤M2:任选地固定样品;步骤M3:任选地透化样品;步骤M4:以任意顺序执行步骤M5-M9的任一个一次或多次;步骤M5:提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤M6:提供直接或间接地生成一个或多个信号的一个或多个HCR扩增器(例如,参见图8、18和20);步骤M7:任选地洗涤样品;步骤M8:检测一个或多个信号;步骤M9:任选地去除一个或多个信号(例如,参见图23)。

[0240] 在一些实施方式中,方法M(例如,实施例27)包含(参见图26M):步骤M1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤M2:固定样品;步骤M3:透化样品;步骤M4:以任意顺序执行步骤M5-M9的任一个一次或多次;步骤M5:提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元);步骤M6:提供直接或间接地生成一个或多个信号的一个或多个HCR扩增器(例如,参见图8、18和20);步骤M7:洗涤样品;步骤M8:检测一个或多个信号;步骤M9:去除一个或多个信号(例如,参见图23)。

[0241] 在一些实施方式中,靶分析的方法是方法N(例如,实施例28)(其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除被修饰),其包含:

1. 提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品

4. 提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点

5. 任选地洗涤样品

6. 提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器

7. 任选地洗涤样品

8. 任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)

9. 任选地洗涤样品

10. 检测来自报告物的信号

[0242] 在一些实施方式中,方法N(例如,实施例28)包含(参见图26N):步骤N1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤N2:任选地固定样品;步骤N3:任选地透化样品;步骤N4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点(例如,参见图22的探针单元);步骤N5:任选地洗涤样品;步骤N6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤N7:任选地洗涤样品;步骤N8:任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤N9:任选地洗涤样品;步骤N10:检测来自报告物的信号。

[0243] 在一些实施方式中,方法N(例如,实施例28)包含(参见图26N):步骤N1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤N2:固定样品;步骤N3:透化样品;步骤N4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点(例如,参见图22的探针单元);步骤N5:洗涤样品;步骤N6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤N7:洗涤样品;步骤N8:提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤N9:洗涤样品;步骤N10:检测来自报告物的信号。

[0244] 在一些实施方式中,靶分析方法是方法0(例如,实施例29)(其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除被修饰)包含:

1. 提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品

2. 任选地固定样品

3. 任选地透化样品

4. 提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点

5. 任选地洗涤样品

6. 提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器

7. 任选地洗涤样品
8. 任选地提供与底物相对应的标签探针 (缀合至报告物)
9. 任选地洗涤样品
10. 检测来自报告物的信号

[0245] 在一些实施方式中,方法O (例如,实施例29) 包含 (参见图260):步骤01:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤02:任选地固定样品;步骤03:任选地透化样品;步骤04:提供探针组,其包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针 (例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b) 一个或多个探针单元 (例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点 (例如,参见图21的探针单元);步骤05:任选地洗涤样品;步骤06:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器 (例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤07:任选地洗涤样品;步骤08:任选地提供与底物相对应的标签探针 (缀合至报告物) (例如,参见图20的标签探针);步骤09:任选地洗涤样品;步骤010:检测来自报告物的信号。

[0246] 在一些实施方式中,方法O (例如,实施例29) 包含 (参见图260):步骤01:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤02:固定样品;步骤03:透化样品;步骤04:提供探针组,其包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针 (例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b) 一个或多个探针单元 (例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点 (例如,参见图21的探针单元);步骤05:洗涤样品;步骤06:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器 (例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤07:洗涤样品;步骤08:提供与底物相对应的标签探针 (缀合至报告物) (例如,参见图20的标签探针);步骤09:洗涤样品;步骤010:检测来自报告物的信号。

[0247] 在一些实施方式中,用于靶分析的方法是方法P (例如,实施例30) (其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除被修饰) 包含:

1. 提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品
4. 提供探针组,其包含以下二者其一:a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b) 一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点
5. 任选地洗涤样品
6. 提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器
7. 任选地洗涤样品
8. 任选地提供与底物相对应的标签探针 (缀合至报告物)
9. 任选地洗涤样品
10. 检测来自报告物的信号

[0248] 在一些实施方式中,方法P(例如,实施例30)包含(参见图26P):步骤P1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤P2:任选地固定样品;步骤P3:任选地透化样品;步骤P4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针)或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点(例如,参见图27的探针单元);步骤P5:任选地洗涤样品;步骤P6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤P7:任选地洗涤样品;步骤P8:任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤P9:任选地洗涤样品;步骤P10:检测来自报告物的信号。

[0249] 在一些实施方式中,方法P(例如,实施例30)包含(参见图26P):步骤P1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤P2:固定样品;步骤P3:透化样品;步骤P4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点(例如,参见图27的探针单元);步骤P5:洗涤样品;步骤P6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤P7:洗涤样品;步骤P8:提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤P9:洗涤样品;步骤P10:检测来自报告物的信号。

[0250] 在一些实施方式中,用于靶分析的方法是方法Q(例如,实施例31)(其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除被修饰)包含:

1. 提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品
4. 提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上非重叠结合位点的并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点
5. 任选地洗涤样品
6. 提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器
7. 任选地洗涤样品
8. 任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)
9. 任选地洗涤样品
10. 检测来自报告物的信号

[0251] 在一些实施方式中,方法Q(例如,实施例31)包含(参见图26Q):步骤Q1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤Q2:任选地固定样品;步骤Q3:任选地

透化样品;步骤Q4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的非重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点(例如,参见图21的探针单元);步骤Q5:任选地洗涤样品;步骤Q6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤Q7:任选地洗涤样品;步骤Q8:任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤Q9:任选地洗涤样品;步骤Q10:检测来自报告物的信号。

[0252] 在一些实施方式中,方法Q(例如,实施例31)包含(参见图26Q):步骤Q1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤Q2:固定样品;步骤Q3:透化样品;步骤Q4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的非重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点(例如,参见图21的探针单元);步骤Q5:洗涤样品;步骤Q6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤Q7:洗涤样品;步骤Q8:提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤Q9:洗涤样品;步骤Q10:检测来自报告物的信号。

[0253] 在一些实施方式中,用于靶分析的方法是方法R(例如,实施例32)(其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除被修饰)包含:

1. 提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品
4. 提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的非重叠结合位点
5. 任选地洗涤样品
6. 提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器
7. 任选地洗涤样品
8. 任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)
9. 任选地洗涤样品
10. 检测来自报告物的信号

[0254] 在一些实施方式中,方法R(例如,实施例32)包含(参见图26R):步骤R1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤R2:任选地固定样品;步骤R3:任选地透化样品;步骤R4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至

靶上的重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的非重叠结合位点(例如,参见图22的探针单元);步骤R5:任选地洗涤样品;步骤R6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤R7:任选地洗涤样品;步骤R8:任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤R9:任选地洗涤样品;步骤R10:检测来自报告物的信号。

[0255] 在一些实施方式中,方法R(例如,实施例32)包含(参见图26R):步骤R1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤R2:固定样品;步骤R3:透化样品;步骤R4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的非重叠结合位点(例如,参见图22的探针单元);步骤R5:洗涤样品;步骤R6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤R7:洗涤样品;步骤R8:提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤R9:洗涤样品;步骤R10:检测来自报告物的信号。

[0256] 在一些实施方式中,用于靶分析的方法是方法S(例如,实施例33)(其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除被修饰),其包含:

1. 提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品
4. 提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的非重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的非重叠结合位点上
5. 任选地洗涤样品
6. 提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器
7. 任选地洗涤样品
8. 任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)
9. 任选地洗涤样品
10. 检测来自报告物的信号

[0257] 在一些实施方式中,方法S(例如,实施例33)包含(参见图26S):步骤S1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤S2:任选地固定样品;步骤S3:任选地透化样品;步骤S4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的非重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的非重叠结合位点(例如,参见图3、4、5、17的探针单元);步骤S5:任选地洗涤样品;步骤S6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,

参见图8和18的HCR扩增器);步骤S7:任选地洗涤样品;步骤S8:任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤S9:任选地洗涤样品;步骤S10:检测来自报告物的信号。

[0258] 在一些实施方式中,方法S(例如,实施例33)包含(参见图26S):步骤S1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤2:固定样品;步骤S3:透化样品;步骤S4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的非重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的非重叠结合位点(例如,参见图3、4、5、17的探针单元);步骤S5:洗涤样品;步骤S6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤S7:洗涤样品;步骤S8:提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤S9:洗涤样品;步骤S10:检测来自报告物的信号。

[0259] 在一些实施方式中,使用重复的报告物检测的多重分析的方法是方法T(例如,实施例34)(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD被修饰)包含:

1. 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品
2. 任选地固定样品
3. 任选地透化样品
4. 提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠或非重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠或非重叠结合位点
5. 任选地洗涤样品
6. 提供每个标记有一个或多个报告物和/或底物的一个或多个HCR扩增器
7. 任选地洗涤样品
8. 任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物)
9. 任选地洗涤样品
10. 检测来自一个或多个报告物的信号
11. 任选地从样品中去除一个或多个信号
12. 任选地从样品中去除一个或多个报告物
13. 任选地从样品中去除一个或多个标签探针
14. 任选地从样品中去除一个或多个扩增器
15. 任选地从样品中去除一个或多个探针组
16. 任选地以任意顺序重复上述步骤的任一个

[0260] 在一些实施方式中,方法T(例如,实施例34)包含(参见图26T):步骤T1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤T2:任选地固定样品;步骤T3:任选地透化样品;步骤T4:提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针)或b)一个或多

个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠或非重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠或非重叠结合位点(例如,参见图3、4、5、17、21、22、27的探针单元);步骤T5:任选地洗涤样品;步骤T6:提供每个标记有一个或多个报告物和/或底物的一个或多个HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤T7:任选地洗涤样品;步骤T8:任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤T9:任选地洗涤样品;步骤T10:检测来自一个或多个报告物的信号;步骤T11:任选地从样品中去除一个或多个信号(例如,参见图23);步骤T12:任选地从样品中去除一个或多个报告物;步骤T13:任选地从样品中去除一个或多个标签探针;步骤T14:任选地从样品中去除一个或多个扩增器;步骤T15:任选地从样品中去除一个或多个探针组;步骤T16:任选地以任意顺序重复上述步骤的任一个。

[0261] 在一些实施方式中,方法T(例如,实施例34)包含(参见图26T):步骤T1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;步骤T2:固定样品;步骤T3:透化样品;步骤T4:提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠或非重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠或非重叠结合位点(例如,参见图3、4、5、17、21、22、27的探针单元);步骤T5:洗涤样品;步骤T6:提供每个标记有一个或多个报告物和/或底物的一个或多个HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器);步骤T7:洗涤样品;步骤T8:提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物)(例如,参见图20的标签探针);步骤T9:洗涤样品;步骤T10:检测来自一个或多个报告物的信号;步骤T11:从样品中去除一个或多个信号(例如,参见图23);步骤T12:从样品中去除一个或多个报告物;步骤T13:从样品中去除一个或多个标签探针;步骤T14:从样品中去除一个或多个扩增器;步骤T15:从样品中去除一个或多个探针组;步骤T16:任选地以任意顺序重复上述步骤的任一个。

[0262] 使用单分子条形码的多重分析。在一些实施方式中,可以通过分析多个分析轮中的每个靶分子来增加可以在样品中分析的靶的数量,使得用于不同分析轮中的不同靶类型的标签是多种多样的,以便为每种靶分子产生不同的条形码。然后将用于给定靶分子的条形码作为信号测量的条形码读出。例如,使用单分子成像来读出每个靶分子的信号作为衍射极限点,考虑3轮成像。对于每个给定的靶类型,考虑分配包含一个或多个探针单元的探针组,使得探针组中的每个探针单元共定位与HCR扩增器相对应的全HCR引发剂,该HCR扩增器包含标记有红色或绿色报告物二者其一的HCR发夹,这取决于靶类型和成像轮。然后,例如,可以用条形码(红色、红色、绿色;使用标记有红色报告物的HCR扩增器显示用于轮1的红色点,使用标记有红色报告物的HCR扩增器显示用于轮2的红色点,以及使用标记有绿色报告物的HCR扩增器显示用于轮3的绿色点)读出类型1的靶分子;类型2的靶分子可具有条形码(红色、绿色、红色),类型3的靶分子可具有条形码(红色、红色、红色),类型4的靶分子可具有条形码(绿色、红色、绿色)等。

[0263] 在一些实施方式中,可以通过仅在识别条形码轮的一部分中检测每个靶分子来增

加可以在样品中分析的靶的数量。例如,在具有4轮的实验中,类型1的靶分子可用条形码(红色、---、---、红色;表示轮1的红色点,没有用于轮2的点,没有用于轮3的点,用于轮4的红色点)读出,类型2的靶分子可用条形码(绿色、红色、-、-)等读出。

另外的实施方式

[0264] 本文中提供的实施方式和/或方法中的任一个可与以下任一个一起使用或以其替代形式使用。因此,例如,上述方法可采用以下所述的任何组合物或方法。类似地,上述方法应被理解为还提供采用以下方法或作为以下所述方法的一部分的方法。

[0265] 类似地,本文提供的实施方式和/或方法还应被理解为提供方法中涉及的实施方式,例如,组合物、方法的组分、试剂盒等。在一些实施方式中,本文提供的方法和/或步骤的一个或多个中的任何成分可被提供为包含所述成分的一种或多种(以及任选地靶或靶序列或样品)的试剂盒。

组合物

[0266] 图12和13以及本文提供的其他附图中概述了组合物的一些实施方式。在一些实施方式中,提供了组合物,其包括包含第一分段引发剂(1151)的第一分段引发剂探针(1190)和包含第二分段引发剂(1251)的第二分段引发剂探针(1290)。在一些实施方式中,第一和第二分段引发剂(1151、1251)一起形成全引发剂(1050),经由第一和第二发夹单体(1510、1610),HCR可从该全引发剂(1050)进行。在一些实施方式中,第一分段引发剂探针(1190)进一步包含第一靶结合区段(1141)和第二分段引发剂探针(1290)进一步包含第二靶结合区段(1241),其中第一靶结合区段(1141)被配置为结合至第一靶区段(1100)和第二靶结合区段(1241)被配置为结合至第二靶区段(1200)。这些靶结合区段在靶分子上有效地邻近定位,使得当两个分段引发剂探针结合至两个靶时,第一和第二分段引发剂(分段引发剂探针内的)足够接近以形成全引发剂(1050),HCR可从其发生。在一些实施方式中,这些分段引发剂探针可作为试剂盒,连同用于HCR聚合的发夹单体提供。

[0267] 在一些实施方式中,提供了组合物,其包含第一发夹单体(1510)、第二发夹单体(1610)、包含第一分段引发剂(1151)的第一分段引发剂探针(1190)和包含第二分段引发剂(1251)的第二分段引发剂探针(1290)。在一些实施方式中,第一和第二分段引发剂(1151、1251)一起形成全引发剂(1050),经由第一和第二发夹单体(1510、1610),HCR可从该全引发剂(1050)进行。

[0268] 在一些实施方式中,可同时将分段引发剂探针和发夹单体引入相同样品。在一些实施方式中,可将分段引发剂探针引入样品,接着洗涤,并且然后可将发夹单体引入样品,接着洗涤。在一些实施方式中,可在不同时间将分段引发剂探针和发夹单体引入样品。

[0269] 在一些实施方式中,一个或多个的发夹单体可包含报告物分子,使得发夹单体(第一和第二和任选地更多)的聚合将导致可检测的信号传导事件。在一些实施方式中,报告物分子可与一个或多个发夹单体共价缔合。在一些实施方式中,在聚合之后(例如,在随后的杂交事件中),报告物分子可随后结合至HCR聚合物。在一些实施方式中,第一发夹单体(1510)包含被配置为与标签结合位点(未示出)的互补物杂交的标签结合位点(未示出)。在一些实施方式中,标签结合位点的互补物进一步包含报告物分子。

[0270] 在一些实施方式中,提供了组合物,其包含第一发夹单体(1510),第一发夹单体(1510)包含:a)第一输入结构域(1852),其包含第一toehold(1851)和第一茎段(1755),b)

第一输出结构域(1854),其包含第一发夹环(1853)和第一茎段的互补物(1756),和c)第一报告物分子(1850)。组合物可进一步包含第二发夹单体(1610),第二发夹单体(1610)包含:a)第二输入结构域(1952),其包含第二toehold(1951)和第二茎段(1855),b)第二输出结构域(1954),其包含第二发夹环(1953)和第二茎段的互补物(1856),和c)第二报告物分子(1950)。组合物可进一步包括:a)包含第一分段引发剂(1151)的第一分段引发剂探针(1190)和b)包含第二分段引发剂(1251)的第二分段引发剂探针(1290)。如上所述,第一和第二发夹单体可与第一和第二分段引发剂探针一起引入样品或与第一和第二分段引发剂探针分开引入样品。在一些实施方式中,单体可一起但与第一和第二分段引发剂探针分开提供。在一些实施方式中,发夹单体和分段引发剂探针可同时引入相同样品。在一些实施方式中,发夹单体和分段引发剂探针可引入相同样品,但在不同的非重叠时间(用洗涤去除未结合的分子)。

[0271] 在一些实施方式中,第一茎段具有与第二茎段相同的序列。在一些实施方式中,第一茎段的互补物具有与第二茎段的互补物相同的序列。在一些实施方式中,第一茎段的互补物具有与第二茎段的互补物相同的序列和第一茎段具有与第二茎段相同的序列。在一些实施方式中,两个发夹单体的toehold序列是相同的和两个发夹单体的环序列是相同的(尽管两个发夹单体的极性相反,因此两个发夹单体不相同)。

[0272] 在一些实施方式中,第一toehold(1851)与第二发夹环互补。在一些实施方式中,第二toehold与第一发夹环互补。在一些实施方式中,该环状允许杂交链反应发生。在一些实施方式中,第一toehold不与第二发夹环100%互补,但足以允许杂交。

[0273] 在一些实施方式中,可采用多于两个不同的输入结构域,例如,可采用3、4、5、6、7、8、9、10、100、1000、2000、4000个或更多个输入结构域。在一些实施方式中,可针对每个输入结构域使用相应数量的子部分。

[0274] 在一些实施方式中,本文所述的任何组合物包括包含第一靶区段(1100)和第二靶区段(1200)的靶分子(1020)(例如,如图12所示)。在一些实施方式中,靶分子包含另外的靶区段,例如,三个靶区段、四个靶区段、五个靶区段、六个靶区段、七个靶区段或更多个(例如,10、50、100等)。在一些实施方式中,靶区段的数量将意味着存在相对应数量的靶结合区段(例如,1141、1241)。在一些实施方式中,这允许对全引发剂的初始形成具有更大的特异性/选择性(因为其需要更多靶结合区段以结合至靶区段)。在一些实施方式中,这允许一次并行分析多于一个靶序列(因此允许一起分析多个靶,每个涉及两个或多个靶结合区段/分段引发剂探针)。

[0275] 在一些实施方式中,本文所述的任一个第一分段引发剂探针(1190)进一步包含第一靶结合区段(1141)和本文所述的任一个第二分段引发剂探针(1290)进一步包含第二靶结合区段(1241)。在一些实施方式中,第一靶结合区段(1141)被配置为结合至第一靶区段(1100)。在一些实施方式中,第二靶结合区段(1241)被配置为结合至第二靶区段(1200)。在一些实施方式中,第一和第二分段引发剂探针包含另外的靶结合区段、例如,两个靶结合区段、三个靶结合区段、四个靶结合区段、五个靶结合区段、10、20、30、40、50、100、1000、10,000或更多个。

[0276] 在一些实施方式中,第一靶结合区段被配置为通过选择性蛋白质-蛋白质相互作用(诸如经由作为第一靶结合区段的抗体)结合至第一靶区段。在一些实施方式中,第一靶

结合区段被配置为通过选择性核酸-蛋白质相互作用(诸如作为第一靶结合区段的适配体)结合至第一靶区段。在一些实施方式中,第二靶结合区段被配置为通过选择性蛋白质-蛋白质相互作用(诸如经由作为第二靶结合区段的抗体)结合至第二靶区段。在一些实施方式中,第二靶结合区段被配置为通过选择性核酸-蛋白质相互作用(诸如作为第二靶结合区段的适配体)结合至第二靶区段。在一些实施方式中,第一靶结合区段被配置为通过杂交结合至第一靶区段。在一些实施方式中,第二靶结合区段被配置为通过杂交结合至第二靶区段。在一些实施方式中,第一靶结合区段被配置为通过共价或离子键合结合至第一靶区段。在一些实施方式中,第二靶结合区段被配置为通过共价或离子键合结合至第二靶区段。

[0277] 在一些实施方式中,可采用其存在或不存在可被调控的任何报告物分子。在一些实施方式中,报告物分子包含荧光分子,诸如荧光团或比色化合物,其允许所得聚合物可视化。在一些实施方式中,报告物分子是直接地可观察的。在一些实施方式中,报告物分子是间接地可观察的。在一些实施方式中,报告物分子包含酶或是酶催化和/或在HCR聚合之后可介导酶催化信号传导。在一些实施方式中,报告通过催化的报告物沉积(“CARD”)来实现。在一些实施方式中,每个发夹单体上的标签结合位点可提供与标签结合位点的互补物的结合,其中标签结合位点的互补物携带报告物分子。在一些实施方式中,在HCR聚合之后,通过发夹单体或标签结合位点的互补物携带的一种类型的报告物分子可介导酶催化信号扩增(CARD),使得在HCR聚合物/靶分子的附近沉积的第二类型的报告物分子然后被检测。在一些实施方式中,报告物分子是发光分子、FRET分子、荧光团/淬灭剂分子对或其他可检测的标志物的至少一个。在一些实施方式中,报告物分子可允许采用二级分子(诸如二抗)用于检测聚合事件。在一些实施方式中,发夹单体可用报告物分子(例如,荧光团和淬灭剂)标记,使得发夹单体被淬灭,但是在HCR聚合期间发生的构象变化导致荧光HCR扩增聚合物。

[0278] 在一些实施方式中,本文提供的方法和/或步骤的一个或多个中的任何成分可被提供为包含所述成分的一个或多个(和任选地靶或靶序列或样品)的组合物。在一些实施方式中,在图1A、1B、2A、2B、3A、3B、4A、4B、4C、4D、5A、5B、5C、5D、5E、8A、8B、12、13、14、15、16A、16B、16C、16D、17A、17B、17C、18A、18B、18C、18D、18E、18F、19A、19B、20A、20B、20C、20D、20E、20F、21A、21B、22、23A、23B、23C、23D、23E、23F、23G、23H、23I、23J、23K、23L、23M、23N、23O、27、28A、29A、29B、30A、30B、31A、32A、33A、33B、33C、33D、33E、34A、34B、34C、35、36A、36B、37A、38、39A、39B、39C、39D、39E、39F、39G、39H、39I、39J、39K、39L、39M、39N、40A、40B、40C、40D、40E、40F、40G、40H、40I、40J、40K、40L、40M、40N、41A、42A、42B、42C、42D、42E、42F、43A、44A、44B、44C、44D、44E、44F、44G、44H、44I、44J、44K、44L、44M、44N、44O、44P、44Q、44R、44S、44T、44U、44V、44W、44X、44Y、44Z、46A、46B、46C、46D、46E、46F、46G、46H、46I、46J、46K、46L和/或46M的任何一个或多个中的任何一个或多个分子或分子的组合被设想为它们表示为组合物的结构组分。在一些实施方式中,组合物或组分是添加至样品中的那些。在一些实施方式中,组合物或组分是在图中表示的过程的每个步骤中添加的那些。在一些实施方式中,组合物或组分是最初在反应中添加的那些,和/或在附图中表示的任何反应步骤添加的那些。在一些实施方式中,组合物是包含分子与靶的杂交的一种,如图1A、1B、2A、2B、3A、3B、4A、4B、4C、4D、5A、5B、5C、5D、5E、8A、8B、12、13、14、15、16A、16B、16C、16D、17A、17B、17C、18A、18B、18C、18D、18E、18F、19A、19B、20A、20B、20C、20D、20E、20F、21A、21B、22、23A、23B、23C、23D、23E、23F、23G、23H、23I、23J、23K、23L、23M、23N、23O、27、28A、29A、29B、30A、30B、31A、

32A、33A、33B、33C、33D、33E、34A、34B、34C、35、36A、36B、37A、38、39A、39B、39C、39D、39E、39F、39G、39H、39I、39J、39K、39L、39M、39N、40A、40B、40C、40D、40E、40F、40G、40H、40I、40J、40K、40L、40M、40N、41A、42A、42B、42C、42D、42E、42F、43A、44A、44B、44C、44D、44E、44F、44G、44H、44I、44J、44K、44L、44M、44N、44O、44P、44Q、44R、44S、44T、44U、44V、44W、44X、44Y、44Z、46A、46B、46C、46D、46E、46F、46G、46H、46I、46J、46K、46L和/或46M中任一个所表示的。在一些实施方式中,组合物或组分是过程或方案的最后步骤中的那些,如图1A、1B、2A、2B、3A、3B、4A、4B、4C、4D、5A、5B、5C、5D、5E、8A、8B、12、13、14、15、16A、16B、16C、16D、17A、17B、17C、18A、18B、18C、18D、18E、18F、19A、19B、20A、20B、20C、20D、20E、20F、21A、21B、22、23A、23B、23C、23D、23E、23F、23G、23H、23I、23J、23K、23L、23M、23N、23O、27、28A、29A、29B、30A、30B、31A、32A、33A、33B、33C、33D、33E、34A、34B、34C、35、36A、36B、37A、38、39A、39B、39C、39D、39E、39F、39G、39H、39I、39J、39K、39L、39M、39N、40A、40B、40C、40D、40E、40F、40G、40H、40I、40J、40K、40L、40M、40N、41A、42A、42B、42C、42D、42E、42F、43A、44A、44B、44C、44D、44E、44F、44G、44H、44I、44J、44K、44L、44M、44N、44O、44P、44Q、44R、44S、44T、44U、44V、44W、44X、44Y、44Z、46A、46B、46C、46D、46E、46F、46G、46H、46I、46J、46K、46L和/或46M的任一个所表示的。在一些实施方式中,组合物或组分是具有与靶附接的或与靶缔合的标签的那些,如在适当(具有与靶附接的或与靶缔合的标签的那些)图1A、1B、2A、2B、3A、3B、4A、4B、4C、4D、5A、5B、5C、5D、5E、8A、8B、12、13、14、15、16A、16B、16C、16D、17A、17B、17C、18A、18B、18C、18D、18E、18F、19A、19B、20A、20B、20C、20D、20E、20F、21A、21B、22、23A、23B、23C、23D、23E、23F、23G、23H、23I、23J、23K、23L、23M、23N、23O、27、28A、29A、29B、30A、30B、31A、32A、33A、33B、33C、33D、33E、34A、34B、34C、35、36A、36B、37A、38、39A、39B、39C、39D、39E、39F、39G、39H、39I、39J、39K、39L、39M、39N、40A、40B、40C、40D、40E、40F、40G、40H、40I、40J、40K、40L、40M、40N、41A、42A、42B、42C、42D、42E、42F、43A、44A、44B、44C、44D、44E、44F、44G、44H、44I、44J、44K、44L、44M、44N、44O、44P、44Q、44R、44S、44T、44U、44V、44W、44X、44Y、44Z、46A、46B、46C、46D、46E、46F、46G、46H、46I、46J、46K、46L和/或46M的任一个所表示的。

方法

[0279] 在一些实施方式中,提供了一种方法。方法包含(i)提供第一分段引发剂探针、(1190)第二段引发剂探针(1290)、第一发夹单体(1510)、第二发夹单体(1610)和靶分子(1020), (ii)孵育以允许结合,和(iii)检测信号。

[0280] 在一些实施方式中,提供了执行HCR的方法。方法包含(i)添加第一分段引发剂(1151)和第二段引发剂(1251)至样品,其中第一分段引发剂(1151)和第二段引发剂(1251)一起提供全HCR引发剂,和(ii)添加HCR发夹单体组至样品以便在全HCR引发剂的存在下允许HCR发生。HCR发夹单体组被配置经由HCR以便聚合。

[0281] 在一些实施方式中,提供了一种方法。方法包含(a)提供:I. 包含第一分段引发剂(1151)的第一分段引发剂探针(1190), II. 包含第二段引发剂(1251)的第二分段引发剂探针(1290)。方法可进一步包含提供III. 第一发夹单体(1510), 其包含:a. 第一输入结构域(1852), 其包含第一toehold(1851)和第一茎段(1755), b. 第一输出结构域(1854), 其包含第一发夹环(1853)和第一茎段的互补物(1756), 和c. 第一报告物分子(1850)。进一步提供的是IV. 第二发夹单体(1610), 其包含:a. 第二输入结构域(1952), 其包含第二toehold(1951)和第二茎段(1855), b. 第二输出结构域(1954), 其包含第二发夹环(1953)和第二茎

段的互补物(1856),和c.第二报告物分子(1950)。进一步提供的是V.靶分子(1020)。方法进一步包含(b)将提供的第一分段引发剂探针和第二分段引发剂探针与靶孵育。如本文所述,分段引发剂探针可进一步包含靶结合区段,以便共定位两个分段引发剂从而形成全引发剂。

[0282] 在一些实施方式中,可首先将分段引发剂探针添加至可包含靶的样品,并且然后将本体溶液洗掉,保持结合的分段引发剂探针,并且然后可添加发夹单体,使得特异性结合至靶的分段引发剂探针将共定位分段引发剂并触发HCR,但非特异性结合的单独的分段引发剂探针将不共定位全引发剂并且将不触发HCR。

[0283] 在本文所述的任何方法中,可以检测和/或分析以下的任何一个或多个:分子、DNA分子、RNA分子、蛋白质分子、小分子、合成分子或分子复合物。在一些实施方式中,靶为多于一种靶,例如蛋白质的复合物,或蛋白质和核酸的复合物等。因此,蛋白质的缔合可通过本分段引发剂方法来测定。在一些实施方式中,也可分析无机或非有机材料。在一些实施方式中,可检测任何靶,只要存在可结合至可以由分段引发剂探针部分制成的靶的相对应的靶结合区段。在一些实施方式中,靶是任何核酸分子。在一些实施方式中,靶是蛋白质。在一些实施方式中,靶由以下的至少一种组成:mRNA、miRNA、lncRNA、rRNA、非编码RNA或基因组DNA。在一些实施方式中,靶包括氨基酸序列。在一些实施方式中,靶包括分子的复合物。在一些实施方式中,靶是以下的至少一种:DNA、RNA、蛋白质或小分子靶分子,或体外、原位或体内的复合物。在一些实施方式中,靶是由以下的至少一种构成的分子的复合物:DNA、RNA、蛋白质或小分子靶分子。在一些实施方式中,靶包含体外、原位或体内的分子或复合物。

[0284] 在一些实施方式中,靶分子可以是分子的复合物,使得当分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对内的靶结合位点特异性地结合至它们在复合物内的靶位点时,HCR引发剂的两个半部被拉进,使得全引发剂变得能够引发HCR信号扩增。图5阐明了使用分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针检测靶复合物(图a),使用分段引发剂(亦称分裂引发剂)核酸探针检测核酸的靶复合物(图b),使用分段引发剂(亦称分裂引发剂)抗体探针检测蛋白质的靶复合物(图c),使用一抗探针和分段引发剂(亦称分裂引发剂)二抗探针检测蛋白质的靶复合物(图d),使用分裂引发剂抗体和核酸探针检测靶蛋白/核酸复合物(图e)。

[0285] 在一些实施方式中,本文所述的任何方法可用作原位过程的一部分,以对DNA、RNA、蛋白质或小分子靶成像,包含DNA原位杂交(ISH)、RNA原位杂交(ISH)或蛋白质免疫组织化学(IHC)。

[0286] 在一些实施方式中,本文所述的任何方法进一步包含将一个或多个组分应用至靶。在一些实施方式中,靶是水合的。在一些实施方式中,靶在溶液中,但可固定至固相支持体。在一些实施方式中,靶在溶液中。在一些实施方式中,靶被固定在珠或其他支持体上。在一些实施方式中,支持体是网状物或凝胶或刚性表面。在一些实施方式中,靶不被固定。在一些实施方式中,检测发生在体内、体外或原位。在一些实施方式中,提供了一种HCR方法,其包含体外方法,其中靶被固定在珠或微阵列上。在一些实施方式中,靶被固定在珠上。在一些实施方式中,靶被固定在微阵列上。在一些实施方式中,提供了一种HCR方法,其包含体内或体外方法,其中靶不被固定。在一些实施例中,提供了HCR方法,其包含体内或体外方法,其中靶被固定。

[0287] 在一些实施方式中,孵育导致第一分段引发剂探针(1190)结合至靶分子和第二分

段引发剂探针(1290)结合至靶分子。靶分子可以是单个分子或多个缔合分子。在一些实施方式中,孵育发生在室温。在一些实施方式中,孵育发生在4℃。在一些实施方式中,孵育发生在37℃。在一些实施方式中,孵育发生在45℃。在一些实施方式中,孵育发生在50℃,在一些实施方式中,孵育发生在55℃。在一些实施方式中,孵育发生在60℃。在一些实施方式中,孵育包含至少1分钟的孵育期,例如5分钟、15分钟、30分钟或1小时。在一些实施方式中,孵育期超过1小时,例如2小时、4小时、12小时、16小时或24小时。在一些实施方式中,孵育发生在含有0%甲酰胺的杂交缓冲液中。在一些实施方式中,孵育发生在包含甲酰胺的杂交缓冲液中。在一些实施方式中,甲酰胺的百分比浓度在1%和80%之间,例如10%和70%之间,或30%和60%之间。在一些实施方式中,杂交缓冲液包含柠檬酸。在一些实施方式中,柠檬酸的摩尔浓度在1nM和30nM之间,例如,5nM和15nM之间或8nM和12nM之间。在一些实施方式中,杂交缓冲液包含吐温。在一些实施方式中,吐温的百分比浓度在0%和1.0%之间,例如0.05%和0.5%之间。在一些实施方式中,杂交缓冲液包含肝素。在一些实施方式中,肝素的浓度在20μg/mL和80μg/mL之间,例如,30μg/mL和70μg/mL之间,例如40μg/mL和60μg/mL之间。在一些实施方式中,杂交缓冲液包含Denhardt's溶液。在一些实施方式中,杂交缓冲液包含硫酸葡聚糖。在一些实施方式中,硫酸葡聚糖的百分比浓度在1%和60%之间,例如40%和60%之间。

[0288] 在一些实施方式中,本文所述的任何方法的第一分段引发剂(1151)是第一分段引发剂探针(1190)的一部分,并且第二分段引发剂(1251)是第二分段引发剂探针(1290)的一部分。在一些实施方式中,第一分段引发剂探针(1190)进一步包含第一靶结合区段(1141),并且第二分段引发剂探针(1290)进一步包含第二靶结合区段(1241)。在一些实施方式中,当第一分段引发剂探针(1190)和第二分段引发剂探针(1290)二者被特异性地结合至靶(1020)时,第一靶结合区段(1141)被配置为在靶上邻近第二靶结合区段(1241)结合。

[0289] 虽然术语“邻近”用于第一和第二分段引发剂探针(和/或第一和第二靶结合区段)的结合,但是结合不需要紧密邻近,只要第一和第二引发剂探针彼此足够接近以形成能够触发HCR的全引发剂。在一些实施方式中,第一靶结合区段结合至少在第二靶结合区段的10个氨基酸内,例如在5个氨基酸或1个氨基酸内。在一些实施方式中,第一靶结合区段结合至少在第二靶结合区段的10个核苷酸内,例如在5个核苷酸内或在1个核苷酸内。在一些实施方式中,第一和第二分段引发剂探针(和/或第一和第二靶结合区段)在彼此的2、5、10、50、100、1000埃内。在一些实施方式中,第一和第二分段引发剂探针可包含间隔物,以便允许两个靶区段之间的更多空间。这样的间隔物可包含另外的核酸序列,以提供对第一和第二(或另外的)靶区段的位置的更大的灵活性。在一些实施方式中,靶上的每个靶区段彼此接近足够近,以允许两个或多个分段引发剂以共定位全引发剂。

[0290] 在一些实施方式中,第一分段引发剂探针(1190)包含多于一个靶结合区段,例如,两个靶结合区段、三个靶结合区段、四个靶结合区段或五个靶结合区段。这允许一次分析多个可能的靶。在一些实施方式中,第一分段引发剂探针(1190)包含多于五个靶结合区段。在一些实施方式中,第二分段引发剂探针(1290)包含多于一个靶结合区段,例如,两个靶结合区段、三个靶结合区段、四个靶结合区段或五个靶结合区段。在一些实施方式中,第二分段引发剂探针(1290)包含多于五个靶结合区段。

[0291] 在一些实施方式中,分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对的每一个内的靶结合区

段(例如,区)可由DNA、RNA、2' OMe-RNA、PNA、氨基酸或任何合成核酸类似物或任何合成氨基酸类似物制成。图4阐释了使用分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针检测靶分子(图a),使用分段引发剂(亦称分裂引发剂)核酸探针检测靶mRNA(图b),使用分段引发剂(亦称分裂引发剂)抗体探针检测靶蛋白(图c),以及使用一抗探针和分裂引发剂二抗探针检测靶蛋白(图d)。在每种情况下,探针对与同源靶分子的选择性结合共定位全HCR引发剂的两个半部,触发拴系的HCR扩增聚合物的生长。靶分子可以是蛋白质或小分子,使得当分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对内的靶结合位点特异性地结合它们在蛋白质或小分子上的靶位点时,HCR引发剂的两个半部被拉近,使得全引发剂能够引发HCR信号扩增。

[0292] 在一些实施方式中,HCR发夹单体可以用不是荧光的报告物分子(例如,同位素纯稀土元素、发色团等)标记。

[0293] 对于方案E,分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对内的每个探针包含靶结合位点和HCR引发剂的半部,使得当分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针碱基对特异性地指向其靶区段(例如,同源近端靶位点)时,HCR引发剂的两个半部共定位;该功能可通过在各种构型中将靶结合位点和引发剂片段设置在分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对内来实现(图3)。

[0294] 在一些实施方式中,分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对内的HCR引发剂可在两个探针(不一定各半)之间分裂,使得如果两个探针都是近端的,则仅启动HCR扩增。

[0295] 在一些实施方式中,HCR引发剂可在两个或多个分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针之间分裂。

[0296] 在一些实施方式中,可以使用包含一个或多个分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对的分段引发剂探针组(或探针组)来检测靶mRNA;每个探针对包含寻址靶mRNA的不同子序列的靶结合位点。在分段引发剂探针组内,每个分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对共定位以形成相同的HCR引发剂序列,因此使HCR扩增聚合物能够从结合至相同靶mRNA的多个探针对同时生长。

[0297] 在一些实施方式中,靶分子可以是mRNA、miRNA、lncRNA、rRNA、基因组DNA或任何核酸分子。

[0298] 在一些实施方式中,在一对内的两个分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针之间分裂的引发剂可以由DNA、RNA、2' OMe-RNA、PNA或能够引发HCR扩增的任何合成聚合物制成。

[0299] 在一些实施方式中,本文所述的任何方法包含添加多于第一分段引发剂(1151)和第二分段引发剂(1251),例如,添加10、20、50、100、1000、10,000个等。

[0300] 在一些实施方式中,本文所述的任何方法可包含在每个阶段之后具有洗涤的2-阶段方法。在一些实施方式中,靶被固定和/或样品被固定。在一些实施方式中,第一阶段是检测阶段,其包含将分段引发剂探针结合至靶并且洗掉未结合的分段引发剂探针,并且第二阶段是其中HCR扩增发生的扩增阶段。这可以随后洗掉未聚合的HCR单体(例如发夹单体)。在一些实施方式中,在每个阶段之后存在多于一次洗涤,例如两次洗涤、三次洗涤、四次洗涤或五次洗涤。在一些实施方式中,HCR方法包含没有洗涤的单个阶段。

[0301] 在一些实施方式中,HCR发夹单体包含标签结合位点,而不是将报告物分子直接并入到发夹单体本身上。在一些实施方式中,本文所述的任何方法进一步包含洗涤样品以去除未聚合的HCR发夹单体,添加包含标签结合位点和报告分子的互补物的标签探针;洗掉未

结合的标签探针,并且检测报告物分子的存在或不存在。在一些实施方式中,标签探针是发夹分子,其进一步包含荧光团/淬灭剂对,使得当发夹单体被关闭时荧光团被淬灭,但是当标签探针结合在HCR聚合物上的标签结合位点时,荧光团是未淬灭的。在一些实施方式中,标签探针是具有一条携带荧光团的链和另一条携带淬灭剂的链的双链体,使得当标签探针结合HCR聚合物上的标签结合位点时,淬灭剂标记的链被移位,并且荧光团标记的链与HCR聚合物上的标签结合位点结合。在一些实施方式中,发夹单体携带作为FRET对的一部分的报告物,并且标签探针携带FRET对的另一部分,使得在将标签探针结合至HCR聚合物上的标签结合位点时,FRET对的两个部分被拉近并可经历FRET。在一些实施方式中,通过洗涤去除未聚合的HCR发夹单体导致去除大于50%的未聚合的HCR发夹单体,例如,大于55%、大于60%、大于65%、大于70%、大于75%、大于80%、大于85%、大于90%、大于95%、大于99%,大于99.9%,大于99.99%、大于99.999%或大于99.999999%。

[0302] 在一些实施方式中,本文提供的任何洗涤可导致去除大于50%的分段引发剂(和/或分段引发剂探针)例如,大于55%、大于60%、大于65%、大于70%、大于75%、大于80%、大于85%、大于90%、大于95%、大于99%、大于99.9%、大于99.99%、大于99.999%或大于99.999999%。

[0303] 在一些实施方式中,洗涤导致去除至少50至99%的未特异性地结合至靶的探针。在一些实施方式中,洗涤导致去除大于50%的探针,例如,大于55%、大于60%、大于65%、大于70%、大于75%、大于80%、大于85%、大于90%或大于95%、大于99%、大于99.9%、大于99.99%、大于99.999%或大于99.999999%。

[0304] 本文所述的任何方法可进一步包含第一洗涤。在一些实施方式中,第一洗涤从包含第一靶分子的样品去除未结合的第一分段引发剂探针(1190)和未结合的第二分段引发剂探针(1290)。在一些实施方式中,在第一洗涤后,靶分子上共定位的第一和第二引发剂探针被第一发夹单体(1510)结合,然后被第二发夹单体(1610)结合,导致HCR扩增。在一些实施方式中,在第一洗涤后,未结合的发夹单体被从样品中洗涤。在一些实施方式中,所述方法包括另外的洗涤,例如2次洗涤、3次洗涤、4次洗涤、5次洗涤、6次洗涤或7次洗涤。在一些实施方式中,所述方法包括多于7次洗涤。

[0305] 在一些实施方式中,分段引发剂的长度可以为1-1000个核苷酸例如,长度为10-80、10-60、10-50、20-50、20-30个核苷酸。在一些实施方式中,其可以具有任何功能长度。

[0306] 在一些实施方式中,每个靶区段的长度可以为1-1000个核苷酸,例如,长度可以为10-80、10-60、10-50、20-50、20-30个核苷酸。在一些实施方式中,其可以具有任何功能长度。

[0307] 在一些实施方式中,每个靶结合区段的长度可以为1-1000个核苷酸,例如,长度为10-80、10-60、10-50、20-50、20-30个核苷酸。在一些实施方式中,其可以具有任何功能长度。在一些实施方式中,靶结合区段和/或靶区段不是核酸,并且因此可以是本文所述的蛋白质等。在一些实施方式中,靶结合区段可各自来自高达数百kDa(例如,抗体等)或更大的单独的原子。

[0308] 在一些实施方式中,每个全引发剂可以与形成全引发剂的分段引发剂的总和一样长。在一些实施方式中,每个分段引发剂可以是全引发剂的约1/2的尺寸。在一些实施方式中,分段引发剂的分段大小取决于完成全引发剂分段引发剂的数量。因此,当在单个全引发

剂中采用2、3、4、5个等分段引发剂时,则1/2、1/3、1/4、1/5等的引发剂将存在于每个分段引发剂中。在一些实施方式中,引发剂的尺寸不需要为每个分段引发剂均匀地划分。全引发剂的尺寸足以允许HCR通过全引发剂发生。

[0309] 在一些实施方式中,本文所述的任何方法和/或组合物包含添加至少一个另外的分段引发剂探针,例如,添加三个分段引发剂、添加四个分段引发剂、添加五个分段引发剂、添加六个分段引发剂、添加七个分段引发剂、添加八个分段引发剂、添加九个分段引发剂、添加十个分段引发剂、添加十一个分段引发剂、添加十二个分段引发剂或添加十四个分段引发剂、添加十五个分段引发剂。在一些实施方式中,添加多于15个分段引发剂,例如,在16和100个分段引发剂之间或更多,例如,500、1000个等。

[0310] 在一些实施方式中,靶分子(1020)包含第一靶区段(1100)和第二靶区段(1200)。第一分段引发剂探针(1190)可包含第一靶结合区段(1141)和第二分段引发剂探针(1290)包含第二靶结合区段(1241)。第一靶区段(1100)被配置为结合至第一靶结合区段(1141)(或被第一靶结合区段(1141)结合)和第二靶区段(1200)被配置为结合至第二靶结合区段(1241)(或被第二靶结合区段(1241)结合)。

[0311] 在一些实施方式中,本文所述的任何方法进一步包含:结合第一发夹单体(1510)至第一分段引发剂(1151)和第二分段引发剂(1251)二者,结合第二发夹单体(1610)至第一发夹单体(1510)和检测信号。信号可以经由第一和第二发夹单体通过杂交链反应产生或扩增,从而添加和/或浓缩与第一和第二发夹单体的一个或两个缔合的报告物分子的量。

[0312] 洗涤步骤可以在添加发夹单体和/或检测之前执行。在一些实施方式中,所述方法包括洗涤以从包含靶的样品去除未结合的第一和第二分段引发剂探针。在一些实施方式中,所述方法包括多于一次洗涤,例如2次洗涤、3次洗涤、4次洗涤或5次洗涤。在一些实施方式中,在洗涤之后保留在样品和/或溶液内并且没有特异性地结合至靶的单独的分段引发剂探针不会共定位全引发剂并因此不触发HCR。

[0313] 在一些实施方式中,本文所述的任何方法包含将另外的第一发夹单体(1510)结合至第二发夹单体(1610)(其已结合至第一发夹单体)。因此,可以经由HCR聚合实现单体链的延伸。在一些实施方式中,存在至少10个另外的第一发夹单体。在一些实施方式中,存在至少100个另外的第一发夹单体,例如1000、10000个等。在一些实施方式中,所述方法包括将另外的第二发夹单体结合至另外的第一发夹单体(其已结合至第二发夹单体)。在一些实施方式中,存在至少10个另外的第二发夹单体。在一些实施方式中,存在至少100个另外的第二发夹单体,例如1000、10000个等。本文所述的任何方法包含聚合事件的交替级联,其中全引发剂结合第一发夹单体(1510),第一发夹单体又结合第二发夹单体(1610),第二发夹单体又结合另一第一发夹单体,另一第一发夹单体又结合另一第二发夹单体,以此类推,使得聚合物经由交替加入第一和第二发夹单体而生长。在一些实施方式中,交替级联包含多于两个发夹单体的结合,例如,三个发夹单体、四个发夹单体、五个发夹单体、六个发夹单体、七个发夹单体、八个发夹单体、九个发夹单体、十个发夹单体、100、1000、10000、100000、1000000或更多。

[0314] 在一些实施方式中,在本文所述的任何结合反应中,结合包含杂交。在一些实施方式中,结合包含选择性蛋白质-蛋白质相互作用。在一些实施方式中,结合包含选择性核酸-蛋白质相互作用。在一些实施方式中,结合包含离子结合。在一些实施方式中,结合包含共

价结合。

[0315] 在一些实施方式中,在本文所述的任何方法或组合物中,报告物分子是荧光分子。在一些实施方式中,报告物分子包含淬灭的或FRET设置,其中当通过第一发夹单体和第二发夹单体实现聚合物构型时,发夹单体上的荧光分子被解除淬灭。在一些实施方式中,报告物分子是非荧光分子。在一些实施方式中,报告物分子是稀土元素。

[0316] 在一些实施方式中,当组合为聚合物时,第一和第二发夹单体形成FRET对。在一些实施方式中,FRET对是由于当发夹单体打开和聚合时发生的淬灭或FRET中的改变而形成的。因此,在一些实施方式中,发夹单体被配置为允许FRET(例如,满足用于待监测的FRET的改变的接近要求和报告物分子配对要求)。

[0317] 在一些实施方式中,第一分段引发剂探针(1190)可包含氨基酸序列,且第二分段引发剂探针(1290)可包含氨基酸序列。在一些实施方式中,探针还将包含与靶序列杂交的核酸序列。这些可以是第一靶结合区段和第二靶结合区段。在一些实施方式中,靶结合区段与第一靶区段和第二靶区段(1100和1200)互补。在一些实施方式中,第一和第二分段引发剂探针还将包含第一和第二分段引发剂,其可以包含核苷酸,提供足够长度的核酸序列,当共定位时,形成全引发剂。在一些实施方式中,第一分段引发剂探针(1190)包含核酸序列,并且第二分段引发剂探针(1290)包含核酸序列。在一些实施方式中,第一和第二分段引发剂(1151、1251)可以与第一发夹单体(1510)碱基配对。在一些实施方式中,第一分段引发剂探针包含以下的一个或多个:DNA、RNA、2' Ome-RNA、LNA、合成核酸类似物、氨基酸、合成氨基酸类似物和PNA,并且第二分段引发剂探针包含以下的一个或多个:DNA、RNA、2' Ome-RNA、LNA、合成核酸类似物、氨基酸、合成氨基酸类似物和PNA。

[0318] 在一些实施方式中,本文所述的任何洗涤缓冲液包含甲酰胺。在一些实施方式中,甲酰胺的百分比浓度在0%和80%之间,例如10%和70%之间,或30%和60%之间。在一些实施方式中,洗涤缓冲液包含柠檬酸。在一些实施方式中,柠檬酸的摩尔浓度在1nM和30nM之间,例如,5nM和15nM之间或8nM和12nM之间。在一些实施方式中,洗涤缓冲液包含吐温。在一些实施方式中,吐温的百分比浓度在0%和1.0%之间,例如0.05%和0.5%之间。在一些实施方式中,洗涤缓冲液包含肝素。在一些实施方式中,肝素的浓度在20 μ g/mL和80 μ g/mL之间,例如,30 μ g/mL和70 μ g/mL之间,例如40 μ g/mL和60 μ g/mL之间。

[0319] 分段引发剂不同于其他条件探针。例如,在一些实施方式中,分段引发剂不是构象改变探针(例如,图2中的方案B)。在一些实施方式中,分段引发剂是涉及两个单独的核酸链的分段引发剂。在一些实施方式中,分段引发剂依赖于至少两个单独的结合事件到至少两个不同的靶区段(尽管两个区段可以在单个分子上)。

[0320] 在一些实施方式中,本文提供的方法可用于经由杂交链反应(HCR)提高原位信号扩增的信噪比。

[0321] 图18C描绘了涉及HCR的进一步的实施方式,特别是使用具有携带标记结合位点的发夹单体的分段引发剂探针的三阶段原位HCR方案。检测阶段:将分段引发剂探针对与靶mRNA杂交,并从样品中洗涤未使用的探针。每个分段引发剂探针组包含一个或多个探针对,其选择性地结合沿着靶mRNA的不同子序列。一对中的每个探针携带HCR引发剂I1的一部分(例如,1/2)。在一对中的两个探针对它们的同源靶结合位点的选择性杂交共定位全HCR引发剂I1的两个半部。扩增阶段:全HCR引发剂I1触发拴系的扩增聚合物的自组装,并且从样

品中洗涤未使用的H1和H2发夹单体。每个发夹单体携带标签结合位点。标签结合位点装饰所得的HCR扩增聚合物。标记阶段:标签探针包含标签结合位点的互补物,并且另外地包含荧光团报告物与扩增聚合物杂交,并且然后从样品中洗涤未结合的标签探针。星表示荧光团。可以根据期望的结果重复、组合或分开每个阶段。在一些实施方式中,阶段以所列顺序发生。

[0322] 图15描绘了使用简化的HCR发夹的HCR机制。亚稳态荧光发夹在检测同源引发剂时自组装成荧光扩增聚合物。引发剂I1与发夹H1经由碱基配对成核为单链toehold 'a',介导打开发夹的分支迁移以形成包含单链区段 'a*-b*' 的复合物I1 • H1。该复合物与第二发夹单体(发夹H2)经由碱基配对成核为toehold 'a',介导打开发夹的分支迁移以形成包含单链区段 'b*-a*' 的复合物I1 • H1 • H2。因此,引发剂序列被再生,提供交替H1和H2聚合步骤的链反应的基础。星表示荧光团。箭头表示每条链的3'端。注意,两个发夹具有相同的序列结构域,但是具有相反的链极性(对于运行5'至3'的发夹单体H1的a-b-a*-b*)和(对于运行3'至5'的发夹单体H2的a-b-a*-b*)。

[0323] 在一些实施方式中,“结构域a”与结构域“c”相同(例如,如图13所示)。即,两个发夹使用相同的环和toehold序列。这是标准HCR情况的特殊情况,其使用较少的序列空间来实现相同的功能。

荧光原位杂交(fish)

[0324] 在一些实施方式中,方法是生物技术方案的一部分。在一些实施方式中,方法可以是荧光原位杂交(FISH)的一部分。荧光原位杂交方法通过揭示细胞、组织、器官、生物体和生态系统(1-7)内靶mRNA的表达模式,向内源生物环路的空间组织中提供具有关键窗口的生物记录器(biologist)。如果样品内的自荧光是低的,则可以使用包含一个或多个核酸探针的分段引发剂探针组来产生足够的信号,一个或多个核酸探针每个携带一个或多个荧光报告分子并且每个包含与靶mRNA的一部分互补的靶结合序列(8-14);在许多设置中,包含整装脊椎动物胚胎和厚脑部分,该方法不产生足够的信号,这样探针代替地用于介导原位信号扩增以增加信噪比(3、6、7、11、15-31)。

[0325] 在一些实施方式中,该方法允许人们以高信噪比对样品内的靶mRNA进行映射。在一些实施方式中,FISH方法并入原位信号扩增,在这种情况下,样品内的所有荧光是扩增的信号或某种形式的背景:

[0326] 扩增的信号。当探针特异性地与它们的同源靶杂交,并且然后介导在靶分子的位点处产生荧光扩增产物时,产生扩增的信号。

[0327] 背景。样品中的所有其他荧光是某种形式的背景。

[0328] 自荧光。自荧光是样品固有的背景荧光。

[0329] 扩增的背景。当在方案的任何阶段的试剂的非特异性结合导致在方案的后续阶段中产生扩增产物时,产生扩增的背景。

[0330] 未扩增的背景。如果荧光试剂在样品中非特异性结合,但不导致扩增产物的产生,则产生未扩增的背景。

[0331] 因此,该技术的性能既取决于什么是正确的(产生扩增信号),也取决于什么是错误的(从三个来源中的任何一个产生背景:自荧光、未扩增的背景、扩增的背景)。为了在图像内的体素中获得高信噪比,生成显著高于体素内的总背景的背景信号是有用的。

[0332] 基于杂交链反应(HCR)(32)机制的可编程原位扩增允许直接的(straightforward)多重分析、深样品透化、高信噪比和不同生物体(33-35)中的亚细胞分辨率。HCR扩增器包含两个动力学捕获的核酸发夹分子(H1和H2),其在不存在同源引发剂链的情况下亚稳地共存(I1;图1a)。引发剂的到达触发链反应,其中H1和H2发夹顺序地成核并打开以组装成长的带切口的双链扩增聚合物(32)。使用原位HCR,与mRNA靶互补的DNA探针携带触发链反应的DNA HCR引发剂,其中亚稳态荧光团标记的DNA发夹自组装成拴系的荧光扩增聚合物(图1b)。独立于靶RNA的数量,使用相同的两阶段原位杂交方案(图1c):在检测阶段,所有分段引发剂探针组并行杂交;在扩增阶段,正交的HCR扩增器并行操作。

[0333] HCR利用分子编程和动态核酸纳米技术的学科的原理,以在不同的技术背景中提供等温无酶信号扩增(36-39),并且其特别适合于原位扩增的需求(33、34)。首先,HCR是可编程的,提供使用独立操作并携带光谱上不同的荧光团的正交扩增器的直接的多重分析的基础。独立于靶mRNA的数量的两阶段方案的使用对于任何样品是方便的,但对于精细样品(例如,在串行多重方案期间容易损坏的海胆胚)是必需的。第二,HCR发夹单体不自组装,直到它们遇到携带同源引发剂的探针,能够在靶分子的位点处在有希望的扩增聚合物生长之前进行深样品透化。是具有成对茎的结构化发夹的扩增试剂的使用降低样品内非特异性杂交的可能性,并且还增加了工程化多个正交扩增器的容易性。扩增聚合物可以携带数百个荧光团(34)的事实使得即使当自荧光是高的时候可以实现高的信噪比(例如,在整装的脊椎动物胚胎(34、40、41)中或在环境样品或其他生物体内包含的细菌中(42-44))。第三,HCR扩增聚合物保持拴系至它们的起始探针上,防止信号扩散离开靶,并导致亚细胞分辨率。第四,因为HCR扩增器序列独立于mRNA靶序列,先前经验证的扩增器(34)可用于新的研究而无需修饰。为了映射新的靶mRNA,所有需要的是携带用于现有DNA HCR扩增器的DNA引发剂的新的DNA分段引发剂探针组。总之,原位HCR的性质导致不同生物体中的直接的多重分析、深样品透化、高信噪比和亚细胞分辨率,从而向生物电路的空间组织中提供显著改进的窗口的生物记录器。下面描述了采用不同方法以使用HCR原位信号扩增来优化信噪比的五种方案(A、B、C、D、E)(图2)。图1b(34)中描绘的标准原位HCR方法与方案A相对应。

[0334] 方案A:两阶段方案:用非结构化探针进行靶检测,随后使用HCR发夹单体进行探针检测和HCR扩增。非结构化探针包含靶结合区段(例如,靶结合序列)和非结构化HCR引发剂序列。可接近引发剂以启动HCR,无论探针是否与同源靶mRNA杂交。HCR发夹单体主要不相互作用,除非它们由同源HCR引发剂引发;引发通过顺序发夹成核和打开触发聚合,产生与引发剂碱基配对的HCR扩增聚合物。

[0335] 阶段1:使用非结构化探针的靶检测:探针在固定样品内杂交,并且未使用的探针被洗掉。探针主要与同源靶mRNA结合,但探针的不可忽略的部分结合样品中的其他部分。保留在样品中的探针将在阶段2期间触发扩增,无论它们是否结合至同源靶mRNA。

[0336] 阶段2:使用HCR发夹单体进行探针检测和HCR扩增:将HCR发夹单体在固定样品内杂交,并洗掉未使用的发夹。样品内的探针引发拴系的HCR扩增聚合物的生长,在与靶分子结合的探针的位点处产生扩增的信号和在样品中的其他部分结合的探针的位点处产生扩增的背景。在样品中非特异性结合的HCR发夹单体不触发HCR聚合,并且因此不会有助于产生扩增的背景,而是贡献可忽略量的未扩增的背景。

[0337] 性能含义(Performance Implications):方案A在阶段1期间易受非特异性探针结

合的影响,这导致在阶段2期间产生扩增的背景。因为探针是非结构化的,方案A具有以下益处:靶结合序列和HCR引发剂序列是独立的;结果,验证的HCR引发剂和HCR发夹单体可用于不同的新探针和靶,而不改变HCR引发剂和HCR发夹单体序列。

[0338] 方案B:两阶段方案:使用发夹探针进行靶检测,随后使用HCR发夹单体进行探针检测和HCR扩增。发夹探针包含靶结合区段(例如,靶结合序列)和HCR引发剂序列;HCR引发剂最初由于发夹探针内的碱基配对是难接近的;如果发夹探针与其同源靶mRNA碱基配对,则探针改变构象,并且HCR引发剂变得易接近并且能够引发HCR扩增。HCR发夹单体主要不相互作用,除非它们由同源HCR引发剂引发时;引发通过顺序发夹成核和打开触发聚合,得到与引发剂碱基配对的HCR扩增聚合物。

[0339] 阶段1:使用发夹探针的靶检测:探针在固定样品内杂交,并且未使用的探针被洗掉。探针主要结合至同源靶mRNA,但探针的不可忽略的部分结合样品中的其他部分。与同源靶mRNA杂交的探针改变构象以暴露易接近的HCR引发剂,导致在阶段2中产生扩增的信号。样品中其他部分结合的探针具有难接近的HCR引发剂,并且因此不触发HCR扩增,避免在阶段2中产生扩增的背景。

[0340] 阶段2:使用HCR发夹单体进行探针检测和HCR扩增:HCR发夹单体在固定样品内杂交,并且未使用的发夹被洗掉。与其同源靶杂交的探针触发拴系的HCR扩增聚合物的生长,在靶分子的位点处产生扩增的信号。样品中其他部分结合的探针不触发扩增,避免产生扩增的背景。在样品中非特异性结合的HCR发夹单体不触发HCR聚合,并且因此不会有助于产生扩增的背景,而是贡献可忽略量的未扩增的背景。

[0341] 性能含义:方法B在阶段1期间不易受非特异性探针结合的影响,因为非特异性结合的探针在阶段2期间不触发HCR扩增。因此,方案B具有即使试剂在方案的任何阶段非特异性地结合,扩增的背景将主要不被产生的性质。方案B的缺点是使用发夹探针,在靶结合序列和HCR引发剂序列之间有一定程度的序列互补性。因此,改变靶结合区段(例如,靶结合序列)需要改变HCR引发剂和HCR发夹单体序列,这与方案A的简单性相比是不利的。

[0342] 方案C:三阶段方案:用非结构化探针对进行靶检测,随后使用非结构化桥进行探针对检测,然后使用HCR发夹单体进行桥检测和HCR扩增。非结构化探针成对;每个探针包含靶结合区段(例如,靶结合序列)和非结构化成核序列的半部;对于探针对内的两个探针,两个靶结合区段(例如,靶结合序列)与靶mRNA的靶区段(例如,近端子序列)互补,使得当两个探针特异性结合至它们的靶区段(例如同源靶位点)时,成核序列的两个半部开始接近。非结构化桥链包含与成核序列的两个半部互补的近端结合序列;非结构化桥链还包含HCR引发剂,其易接近以起始HCR,而不管桥链是否与其同源成核位点特异性地碱基配对。HCR发夹单体主要不相互作用,除非它们由同源HCR引发剂引发时;引发经由顺序发夹成核和打开触发聚合,产生与引发剂碱基配对的HCR扩增聚合物。

[0343] 阶段1:使用非结构化探针对的靶检测:探针在固定样品内杂交,并且未使用的探针被洗掉。探针对主要与它们的靶区段(例如,同源靶位点)碱基配对,共定位成核序列的两个半部;探针的不可忽略的部分结合在样品中的其他部分,但是非特异性地结合的探针并不主要共定位成核序列的两个半部。

[0344] 阶段2:使用非结构化桥的探针对检测:在实验条件下非结构化桥链在固定样品内杂交,使得桥链主要与由特异性地与近端靶区段(例如,同源靶位点)碱基配对的同源探针

对产生的全成核序列稳定地碱基配对；此外，实验条件是使得桥链主要不与由不接近其配偶体探针 (partner probe) 的单个探针携带的半成核位点稳定地碱基配对。桥的非可忽略的部分在样品中非特异性结合；非特异性结合的桥将在阶段3期间触发HCR扩增，产生扩增的背景。

[0345] 阶段3：使用HCR发夹单体进行桥检测和HCR扩增：使HCR发夹单体在固定样品内杂交，并且洗掉未使用的发夹。样品内的桥链引发拴系的HCR扩增聚合物的生长；对于与它们的同源成核位点 (其由与近端靶区段 (例如，同源靶位点) 碱基配对的同源探针对形成) 碱基配对的桥链，这些聚合物表示扩增的信号。对于结合样品中其他部分的桥链，这些聚合物与扩增的背景相对应。在样品中非特异性结合的HCR发夹单体不触发HCR聚合，并且因此不会有助于产生扩增的背景，而是贡献可忽略量的未扩增的背景。

[0346] 性能含义：方案C不易受阶段1中的非特异性探针结合的影响，因为在阶段2中桥主要不稳定地与分离的探针碱基配对，然而，方案C易受阶段2中的桥的非特异性结合的影响，这导致阶段3中扩增的背景的生成。注意方案C的阶段2中的非结构化桥经受与方案A的阶段1中的非结构化探针相同的概念性弱点。方案C相对于方案A的益处在于，使用方案C，可以优化桥序列的文库以用于给定种类，并且然后那些桥序列可用于各种新探针和靶，而不改变桥序列。通过比较，使用方案A，每个新探针序列将需要优化以用于给定种类中。然而，即使使用具有方案C的优化的桥序列，桥的不可忽略的部分将在样品中非特异性地结合，在方案的下一阶段中产生扩增的背景。同样，即使利用使用方案A的优化的探针序列，探针的不可忽略的部分将在样品中非特异性地结合，在方案的下一阶段中产生扩增的背景。

[0347] 方案D：三阶段方案：用非结构化探针对进行靶检测，随后使用发夹桥进行探针对检测，然后使用HCR发夹单体进行桥检测和HCR扩增。非结构化探针对成对；每个探针包含靶结合区段 (例如，靶结合序列) 和非结构化成核序列的半部；对于探针对内的两个探针，两个靶结合区段 (例如，靶结合序列) 与靶mRNA的靶区段 (例如，近端子序列) 互补，使得当两个探针特异性结合它们的靶区段 (例如，同源靶位点) 时，成核序列的两个半部被拉近。发夹桥包含与成核序列的两个半部互补的近端结合序列；发夹桥还包含HCR引发剂，其最初由于发夹桥内的碱基配对而不易接近；如果发夹桥与其同源成核序列的两个半部碱基配对，则桥改变构象，并且HCR引发剂变得易接近并且能够引发HCR扩增。HCR发夹单体主要不相互作用，除非它们由同源HCR引发剂引发时；引发剂经由顺序发夹成核和打开触发聚合，产生与引发剂碱基配对的HCR扩增聚合物。

[0348] 阶段1：使用非结构化探针对的靶检测：使探针在固定样品内杂交，并且洗掉未使用的探针。探针对主要碱基与它们的靶区段 (例如，同源靶位点) 碱基配对，共定位成核序列的两个半部；一些探针结合样品中的其他部分，但是非特异性地结合的探针不主要地共定位成核序列的两个半部。

[0349] 阶段2：使用发夹桥进行探针对检测：使发夹桥链在固定样品内杂交，并且洗掉未使用的桥。发夹桥链主要与由与近端靶区段 (例如，同源靶位点) 特异性地碱基配对的同源探针对形成的全成核序列稳定地配对；特异性地结合的发夹桥改变构象以暴露易接近的HCR引发剂，导致阶段3中产生扩增的信号。在样品中其他部分结合的发夹桥具有不易接近的HCR引发剂并且不触发HCR扩增，避免阶段3中产生扩增的背景。

[0350] 阶段3：使用HCR发夹单体进行桥检测和HCR扩增：将HCR发夹单体在固定样品内杂

交,并且洗掉未使用的发夹。具有暴露的HCR引发剂的特异性地结合的发夹桥将触发拴系的荧光扩增聚合物的生长,在靶分子的位点处产生扩增的信号。在样品中非特异性地结合的HCR发夹单体不触发HCR聚合,并且因此不会有助于产生扩增的背景,而是贡献可忽略量的未扩增的背景。

[0351] 性能含义:方案D不易受阶段1中的非特异性探针结合的影响,因为发夹桥主要不与阶段2中分离的探针稳定地碱基配对。此外,方案D不易受阶段2中的非特异性发夹桥结合的影响,因为非特异性结合的发夹桥在阶段3期间不触发扩增。因此,方案D与方案B共享重要特性,即使试剂在方案中的任何阶段非特异性地结合,扩增的背景将主要不会产生。方案D相对于方案B的优点在于桥成核位点,并且因此HCR引发剂和HCR发夹单体序列独立于探针中的靶结合位点;结果,验证的HCR引发剂和扩增器可用于各种新探针和靶,而不改变HCR引发剂和扩增器序列。

[0352] 方案D相对于方案B的缺点是从二到三的阶段数的增加。

[0353] 方案E:两阶段方案:用非结构化分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对进行靶检测,随后使用HCR发夹单体进行探针对检测和HCR扩增。非结构化分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对;每个探针包含靶结合区段(例如,靶结合序列)和非结构化HCR引发剂的半部;对于探针对内的两个探针,两个靶结合区段(例如,靶结合序列)与靶mRNA的靶区段(例如,近端子序列)互补,使得当两个探针特异性地结合它们的靶区段(例如,同源靶位点)时,HCR引发剂的两个半部被拉近。HCR发夹单体主要不相互作用,除非它们由同源HCR引发剂(全引发剂)引发;引发经由顺序发夹成核和打开触发聚合,产生与引发剂(全引发剂)碱基配对的HCR扩增聚合物。

[0354] 阶段1:使用非结构化分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对的靶检测:使探针在固定样品内杂交,并且洗掉未使用的探针。探针对主要与它们的靶区段(例如,同源靶位点)碱基配对,共定位HCR引发剂的两个半部;一些探针结合样品中的其他地方,但是非特异性地结合的探针不与HCR引发剂的两个半部共定位。

[0355] 阶段2:使用HCR发夹单体的探针对检测和HCR扩增:使HCR发夹单体在固定样品内杂交,并且洗掉未使用的发夹。与它们的靶区段(例如,同源靶位点)特异性地杂交的探针对共定位HCR引发剂的两个半部,协同引发拴系的荧光HCR扩增聚合物的生长,在靶分子的位点处产生扩增的信号。非特异性结合的探针不与HCR引发剂的两个半部共定位,不触发HCR扩增,并且因此避免产生扩增的背景。在样品中非特异性结合的HCR发夹单体不触发HCR聚合,并且因此不会有助于产生扩增的背景,而是贡献可忽略量的未扩增的背景。

[0356] 性能含义:方案E不易受阶段1中的非特异性探针结合的影响,同样分离的分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针在阶段2中不引发HCR扩增,因此方案E与方案B和D在方案的任何阶段提供积极的背景抑制方面共享重要特性:即使试剂在方案中的任何阶段非特异性地结合,扩增的背景将主要不会产生。

[0357] 与方案D相比,除了其他优势,方案E具有以下优势:HCR发夹单体起发夹桥的作用,因此消除对单独的发夹桥的需要,并且从三个到两个阶段减少了方案中的阶段数。与方案C相比,除了其他优势,方案D和E具有以下优势:如果桥不特异性地结合则它将不会有助于产生扩增的背景。与方案B相比,除了其他优势,方案E具有以下优势:HCR引发剂和HCR发夹单体序列独立于探针中的靶结合区段(例如,靶结合序列)。因此,验证的HCR引发剂和HCR发夹

单体可用于各种新探针和靶,而不改变HCR引发剂和HCR发夹单体序列。总之,方案E具有所有益处和不具有方案A、B、C、D的缺点:两阶段方案的简单性,重新使用验证的HCR引发剂和HCR发夹单体与新的靶序列的通用性,和即使试剂在方案的任何阶段在样品中非特异性地结合而避免产生扩增的背景的鲁棒性(robustness)。

[0358] 图1描述了经由杂交链反应(HCR)的原位扩增。(a) HCR机制。亚稳的荧光发夹在检测同源引发剂时自组装成荧光扩增聚合物。引发剂I1经由与单链toehold 'a' 碱基配对与第一发夹单体(例如发夹H1)成核,介导打开发夹的分支迁移以形成包含单链段 'c*-b*' 的复合物I1 H1。该复合物通过与toehold 'c' 碱基配对与第二发夹单体(发夹H2)成核,介导打开发夹的分支迁移以形成包含单链段 'b*-a*' 的复合物I1 H2。因此,引发剂序列被再生,提供交替H1和H2聚合步骤的链反应的基础。星表示荧光团。箭头表示每个链的3'端。(b) 原位杂交方案(使用方案A的标准探针)。

[0359] 关于检测阶段:将分段引发剂探针组与mRNA靶杂交,并且从样品中洗涤未使用的探针。关于扩增阶段:引发剂触发拴系的荧光扩增聚合物的自组装和从样品中洗涤未使用的发夹。(c) 实验时间线。独立于靶mRNA的数目使用相同的两阶段方案。对于多重实验(所描绘的三色实例),用于不同靶mRNA的分段引发剂探针组(每组五个所述探针)携带触发由光谱上不同的荧光团标记的正交HCR扩增级联的正交引发剂。

[0360] 图2以概述的形式提供了上述五种方案的示意图。方案A:两阶段方案:用非结构化探针进行靶检测,随后使用HCR发夹单体进行探针检测和HCR扩增。方案B:两阶段方案:使用发夹探针进行靶检测,并且随后使用HCR发夹单体进行探针检测和HCR扩增。方案C:三阶段方案:用非结构化探针对进行靶检测,随后使用非结构化桥进行探针对检测,然后使用HCR发夹单体进行桥检测和HCR扩增。方案D:三阶段方案:用非结构化探针对进行靶检测,随后使用发夹桥进行探针对检测,然后使用HCR发夹单体进行桥检测和HCR扩增。方案E:两阶段方案:用非结构化分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针对进行靶检测,随后使用HCR发夹单体进行探针对检测和HCR扩增。箭头表示每条链的3'端。

[0361] 图3:在分裂引发剂探针对内的两个靶结合位点和两个分段引发剂(HCR引发剂片段)的替代排列。对于每种排列(1、2、3、4、5),探针对内的每个探针携带全HCR引发剂的半部(亦称HCR引发剂I1的半部);一对内的两个探针与同源靶分子的特异性结合导致全HCR引发剂的两个半部(亦称HCR引发剂I1的半部)共定位。箭头表示每条链的3'端。

[0362] 图4提供了另外的实施方式,其中分裂引发剂探针由靶分子共定位。(a) 分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针。第一分段引发剂探针(探针1)和第二分段引发剂探针(探针2)各自携带HCR引发剂I1的半部;第一分段引发剂探针(探针1)和第二分段引发剂探针(探针2)对靶分子的选择性结合将HCR引发剂I1的两个半部共定位。(b) 分段引发剂(亦称分裂引发剂)核酸探针。核酸探针1和核酸探针2各自携带HCR引发剂I1的半部;核酸探针1和核酸探针2与靶mRNA的选择性结合将HCR引发剂I1的两个半部共定位。(c) 分段引发剂(亦称分裂引发剂)抗体探针。抗体探针1和抗体探针2各自携带HCR引发剂I1的半部;抗体探针1和抗体探针2与蛋白质靶的选择性结合使HCR引发剂I1的两个半部共定位。(d) 分裂引发剂二抗探针。一抗探针1选择性地结合蛋白质靶;二抗探针2和二抗探针3各自携带HCR引发剂I1的半部;二抗探针2和二抗探针3与一抗探针1的选择性结合将HCR引发剂I1的两个半部共定位。

[0363] 图5提供了关于由靶复合物共定位的分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针的另外的

实施方式。(a) 分段引发剂(亦称分裂引发剂) 探针。靶复合物包含与分子2结合的分子1; 第一分段引发剂探针(探针1) 和第二分段引发剂探针(探针2) 各自携带HCR引发剂I1的半部; 探针1与靶复合物内的分子1的选择性结合以及探针2与靶复合物内的分子2的选择性结合共定位HCR引发剂I1的两个半部。(b) 分段引发剂(亦称分裂引发剂) 核酸探针。靶复合物包含与核酸靶2结合的核酸靶1; 核酸探针1和核酸探针2各自携带HCR引发剂I1的半部; 核酸探针1与靶复合物内的核酸靶1的选择性结合以及核酸探针2与靶复合物内的核酸靶2的选择性结合共定位HCR引发剂I1的两个半部。(c) 分段引发剂(亦称分裂引发剂) 抗体探针。

[0364] 靶复合物包含与蛋白质靶2结合的蛋白质靶1; 抗体第一分段引发剂探针(探针1) 和抗体第二分段引发剂探针(探针2) 各自携带HCR引发剂I1的半部; 抗体第一分段引发剂探针(探针1) 与靶复合物内的蛋白质靶1的选择性结合, 以及抗体第二分段引发剂探针(探针2) 与靶复合物内的蛋白质靶2的选择性结合共定位HCR引发剂I1的两个半部。(d) 分段引发剂(亦称分裂引发剂) 二抗探针。靶复合物包含与蛋白质靶2结合的蛋白质靶1; 一抗第一分段引发剂探针(探针1) 选择性地结合至靶复合物内的蛋白质靶1, 并且一抗第二分段引发剂探针(探针2) 选择性地结合至靶复合物内的蛋白质靶2; 二抗探针3和二抗探针4各自携带HCR引发剂I1的半部; 二抗探针3与一抗第一分段引发剂探针(探针1) 的选择性结合以及二抗探针4与一抗第二分段引发剂探针(探针2) 的选择性结合共定位HCR引发剂I1的两个半部。(e) 分段引发剂(亦称分裂引发剂) 抗体和核酸探针。靶复合物包含与核酸靶2结合的蛋白质靶1; 抗体探针1和核酸探针2各自携带HCR引发剂I1的半部; 抗体探针1与靶复合物内的蛋白质靶1的结合以及核酸探针2与靶复合物内的核酸靶2的结合共定位HCR引发剂I1的两个半部。

[0365] 图8的示意图总结了使用分段引发剂(亦称分裂引发剂) 核酸探针对核酸靶分子成像的原位HCR(方案E)。使用分段引发剂(亦称分裂引发剂) 探针的原位HCR(方案E)。(a) 两阶段原位HCR方案。检测阶段: 将分段引发剂(亦称分裂引发剂) 探针对与靶mRNA杂交, 并且从样品中洗涤未使用的探针。每个分段引发剂探针组包含选择性地结合沿着靶mRNA的不同子序列的一个或多个探针对。一对中的每个探针携带HCR引发剂I1的一部分。在一对中的两个探针对它们的同源靶结合位点的选择性杂交共定位HCR引发剂I1的两个部分。扩增阶段: 全HCR引发剂I1触发拴系的荧光扩增聚合物的自组装, 并且从样品中洗涤未使用的H1和H2发夹。星表示荧光团。(b) 用于多重实验的实验时间线。独立于靶mRNA的数量使用两阶段方案。

发夹单体

[0366] 两种或更多不同种类的核酸发夹单体优选用于HCR反应中。每个发夹单体种类通常包含与另一发夹单体种类的一部分互补的至少一个区。然而, 单体被设计成使得它们被动力学地捕获, 并且系统在不存在可破坏单体之一的二级结构的引发剂分子的情况下不能平衡。因此, 单体在不存在引发剂的情况下不能聚合。引入全引发剂种类触发通过两种或更多种单体种类的交替动态级联的链反应, 导致形成聚合物。在一些实施方式中, 两个发夹单体在引发剂的存在下聚合以形成带切口的双链聚合物。

[0367] 在一些实施方式中, 采用具有发夹结构的两个或多个发夹单体。发夹单体可以包含受长茎保护的环。在一些实施方式中, 提供具有不同二级结构的单体。然而, 二级结构可以使得在不存在引发剂核酸的情况下, 单体在反应条件下是亚稳态的。在存在全引发剂的情况下, 第一发夹单体的二级结构改变, 使得其能够与第二发夹单体种类的toehold杂交。

这又导致第二发夹单体的二级结构的变化,其然后能够与另外的第一发夹单体杂交并继续该过程。以这种方式,一旦第一发夹单体的单个拷贝与引发剂的单个拷贝相互作用,则产生链反应,使得发夹单体能够组装成包含交替的发夹单体种类的聚合物。

[0368] 可以使用多个标准来设计单体以实现期望的性质。这些包含,例如但不限于序列对称性最小化,在平衡时采用靶二级结构的概率,与相对于靶结构平衡时的不正确配对的核苷酸的平均数目相对应的集成缺陷,与在平衡时不正确配对的核苷酸的浓度相对应的试管集成缺陷,以及杂交动力学。

[0369] 可以使用标准方法合成单体,包含商业可得的核酸合成仪或从商业来源如整合的DNA技术(Coralville,IA)获得的。

[0370] 在一些实施方式中,单体用化合物或分子衍生化以增加从HCR产生的聚合物的分子量。优选地,它们在不干扰它们杂交的能力的位置衍生化。在一些实施方式中,单体用标签结合位点衍生化。在其他实施方式中,单体包含允许所得聚合物可视化的荧光团或比色化合物。

引发剂

[0371] 全引发剂可以是核酸分子。全引发剂与发夹单体的一部分互补,优选地,可用于与全引发剂杂交的发夹单体的一部分,而发夹单体处于其动力学捕获状态。全引发剂还优选包含与邻近粘性末端的发夹单体的一部分互补的序列,使得全引发剂与粘性末端的杂交引起发夹单体的构象变化并开始HCR链反应。例如,如上所述,全引发剂可包含与发夹单体的第一互补区互补的区。

[0372] 在一些实施方式中,全引发剂的序列与第一发夹单体的粘性末端(引发剂互补区)和第一互补区互补。如本文所述,在一些实施方式中,这也将影响第二互补区的序列和第二发夹单体种类的环。

[0373] 在一些实施方式中,全引发剂是待在样品中检测的核酸或待检测的核酸的一部分。在这种情况下,在设计HCR发夹单体时考虑靶核酸的序列。例如,一个发夹单体的引发剂互补区,优选粘性末端被设计成与靶核酸序列的一部分互补。因为第二发夹单体将与第一发夹单体杂交,所以第二发夹单体的序列还将反映靶核酸序列的至少一部分。

[0374] 在一些实施方式中,通过将HCR耦合到核酸适配体触发器来实现各种识别事件的扩增。鉴定能够特异性结合感兴趣的分析物的适配体。分析物不限于核酸,而是可以是例如多肽或小分子。适配体与包含引发剂区的核酸连接,这样引发剂不可用于在不存在与适配体结合的分析物的情况下刺激HCR。

检测HCR

[0375] HCR的产物易于通过本领域技术人员已知的用于检测核酸的方法检测,包含例如琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、毛细管电泳和凝胶填充毛细管电泳。当聚合物包含核酸时,它们可通过标准技术(例如用溴化乙锭染色)可视化。其他方法也是合适的,包括光散射光谱,例如动态光散射(DLS)、粘度测量、比色系统和荧光光谱。如更详细地讨论的,在用于原位成像和检测的一些方法中,HCR产物是荧光标记的。

[0376] 在一些实施方式中,通过荧光共振能量转移(FRET)监测HCR。某些单体用荧光染料标记,使得可以通过检测荧光的变化来监测由HCR产生的构象变化。在一个实施方式中,一对发夹分子中的一个在与引发剂链互补的区和双链体区的连接处用荧光团标记,并且在双

链体区的相对侧标记有淬灭剂分子。一旦聚合,荧光团和淬灭剂在聚集的核酸结构中在空间上分开,从而提供荧光淬灭的缓解。在这种情况下,单一引发剂的存在通过由HCR引起的荧光事件的链进行扩增。在原位成像的上下文中,单个靶分子的存在可通过荧光事件的链进行扩增。另外,为了原位成像,未反应的单体中的荧光淬灭减少了背景噪声。因此,不需要从样品中去除未反应的单体。

[0377] 相对靶丰度可通过固定靶(例如,经由胚胎内固定,或经由与印迹交联,或经由结合至珠粒)来量化不同的样品,并且然后使用由靶共定位的分段引发剂探针以触发HCR来检测靶,生成与靶丰度线性变化的信号。如果一个或多个样品具有已知的靶丰度,则可以对其他样品进行绝对定量。

应用于原位成像

[0378] HCR的一些实施方式提供了用于原位扩增的无酶方法,所述方法可以并行多重分析。此外,由分段引发剂探针触发的HCR扩增提供了用于降低由非特异性探针结合产生的背景信号的手段。分段引发剂探针仅在它们特异性地结合至同源靶的情况下共定位全引发剂。因此,如果并且仅具体地检测到靶,则它们触发HCR,从而导致由HCR单体(优选如上所述的发夹单体)构建的拴系(至靶)的非共价“聚合物”的自组装。HCR单体可以是荧光标记的,使得可以检测聚合物并且确定靶的存在和/或位置。

[0379] HCR发夹单体在本文中也指“扩增器”,因为在由全HCR引发剂触发时单体的聚合产生可检测的信号,与将通过单个探针与靶的结合产生的信号相比所述可检测的信号被扩增。扩增器可各自用相同或不同的荧光团标记。例如,该系统可被设计成每靶使用多于两种单体种类,其中至少一种种类是荧光标记的。包含两种类型的发夹单体的HCR扩增器可具有标记两种发夹单体类型中的每一种的不同的荧光团类型。包含四种发夹单体类型的HCR扩增器可具有四种不同的荧光团,一种用于每种类型的发夹单体。在这种情况下,HCR扩增聚合物将以已知比率(例如,1:1用于由两种交替类型的发夹单体制备的聚合物,或1:1:1:1用于由四种交替类型的发夹单体制备的聚合物)被装饰。荧光标记是本领域技术人员公知的,并且包含例如在第10版“The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies”中的那些。

[0380] 在一些实施方式中,系统内的扩增器用荧光团和淬灭剂二者标记以形成类似于“分子信标(molecular beacon)”的构建体(Tyagi等,Nature Biotechnology 14:303-308, 1996)。例如,发夹单体可包含荧光团和淬灭剂二者,使得当单体处于发夹形式时,淬灭剂减少荧光,但当单体被并入到HCR聚合物中时不会降低荧光。因此,HCR单体的分子信标版本可减少由任何未聚合的单体产生的背景信号,诸如在样品中非特异性地结合或简单地保持未反应的那些。

[0381] 对于生物样品的成像,使用尺寸小的以允许透化到样品中的扩增器组分可以是有利的。例如,在一些实施方式中,使用小于约20纳米的HCR组分,例如小于15nm、10nm以及在约8和16nm之间。在一些实施方式中,HCR发夹单体小于约8nm。用于原位成像的标准程序可用于引起HCR产物进入样品。本领域技术人员将能够选择用于引起HCR组分进入样品的适当方法。

[0382] 用于原位成像的HCR的优势包含但不限于基于存在的少量分析物快速扩增信号的能力和在同一样品中对分析物的多样性进行成像的能力。

[0383] 如本文所述,用于原位检测和成像的HCR的使用提供了许多优点。特异性可以使用共定位两个或多个分段引发剂探针的仅全引发剂的分段引发剂探针特异性结合至它们的靶区段(例如,同源靶位点)来实现。特异性可以通过使用保护引发剂直到探针特异性地结合至靶的触发探针来实现。自淬灭HCR单体可用荧光团/淬灭剂对标记,所述荧光团/淬灭剂对在自组装期间分离成拴系的扩增聚合物。这种自动的背景抑制对于体内应用特别有用,其中未使用的扩增组分不能在成像之前被洗掉。可通过选择结构切换适配体(Ellinton等, Nature 346:818-822,1990和Tuerk等, Science249:505-510,1990)来实现多功能性,所述结构切换适配体概括触发的探针概念以检测蛋白质和小分子。优选具有8-16nm的最大尺寸的小探针和扩增单体促进样品透化。等温条件对于HCR扩增是理想的,避免损坏固定样品或它们的组分的形态并且促进体内成像。多重分析自然地遵循使用独立的HCR扩增器,所述独立的HCR扩增器同时操作,例如使用光谱上不同的荧光团来将独特的组合特征直接编码到每个HCR产物的结构中。灵敏的定量扩增可以使用非线性HCR机制来实现,所述非线性HCR机制将指数增长提供到规定的有限尺寸的拴系的聚合物中。最后,用于体内应用的生物相容性遵循使用核酸扩增器组分。

成像多个分析物

[0384] HCR扩增允许人们同时扩增多个靶。可以同时使用靶向多个分析物(例如,基因转录物或蛋白质)的HCR。在一些实施方式中,用光谱上可区分的染料标记每个HCR系统。因此,分析物的数量等于可用的光谱上可区分的染料的数量。对于许多情况,这将是足够的。

[0385] 为了研究多个mRNA或蛋白质的表达,期望使用正交HCR扩增器同时执行所有识别事件的多重扩增。为了增加可以使用有限供应的光谱上不同的荧光团成像的不同靶的数量,Levsky和同事的未扩增的组合多重方法(Levsky等, Science 297:836-840,2002)可通过用不同的独特染料组合标记每个扩增器的单体来适应HCR扩增。具有最小两种颜色的条形码的使用提供了用于筛选由未特异性地结合的探针产生的单色信号的基础。

[0386] 因此,在一些实施方式中,仅单个探针对用于每个靶,并且通过用不同的独特染料组合标记每个HCR扩增器的单体来执行组合多重分析。

[0387] 如果H1和H2发夹末端标记有不同的染料,则HCR产物将通过构建而携带相等数量的每种染料。通常,可以使用N种光谱上不同的荧光团来获得具有双色扩增器(例如,4个染料用于6个靶,5个染料用于10个靶)的 $T:N!/[(N-2)!2!]$ 靶。然而,由于组合条形码不被用作使用这种方法的背景诊断,通过允许单色扩增器(例如,4个染料用于10个靶、5个染料用于15个靶),靶的数量可以增加至 $T=N![N-2]!2!+N$ 。此外,可以用多于一种染料标记HCR单体以增加可以被寻址达到 $T=\sum_{(i=1,N)}N!/[(N-i)!i!]=2^N-1$ 的靶的数量(例如,4个染料用于15个靶,5个染料用于31个靶)。HCR系统也可被设计成每个扩增器使用M个发夹。

[0388] 在一些实施方式中,本文任何一个或多个方法的任何一个或多个任意的步骤可与本文任何一个或多个方法的任何一个或多个其它任意的步骤组合。

[0389] 在一些实施方式中,对于本文任何一个或多个方法是不同的任何一个或多个步骤可与对于本文任何一个或多个方法是不同的一个或多个其他步骤组合。

[0390] 在一些实施方式中,不同于本文任何一个或多个方法的任何一个或多个任意的步骤可与不同于本文任何一个或多个方法的任何一个或多个其他任意的步骤组合。

[0391] 重复的应用实施方式-方法1

[0392] 在一些实施方式中,提供了用报告物标记的发夹的重复的信号检测方法。

[0393] 在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包括以下二者其一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c)任选地洗涤样品;d)提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物);e)任选地洗涤样品;f)检测与M个报告物相对应的M个信号;g)从样品中去除M个信号;和h)任选地重复步骤b-g的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0394] 在方法的一些实施方式中,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元,每个包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于该靶的细节,针对每个靶独立地选择用于每个靶的探针组的类型。在一些实施例中,HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0395] 在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包括以下二者其一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c)洗涤样品;d)提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物);e)洗涤样品;f)检测与M个报告物相对应的M个信号;g)从样品中去除M个信号;和h)重复步骤b-g的一个或多个直到已对所有N个靶执行信号检测。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0396] 在方法的一些实施方式,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于该靶的细节,针对每个靶独立地选择用于每个靶的探针组的类型。在一些实施例中,HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0397] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,探针组中引发剂标记的探针的数量可以是在1至1000或10至100或20至50或30至40的范围内。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比至2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中引发剂标记的探针的数量、样品固有的背景水平以及样品内靶的丰度。

[0398] 在一些实施方式中,引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合结构域和一个或多个HCR引发剂(例如,图39A-39N和42A-42F)。

[0399] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个探针单元。在一些实施方式中,探针组中探针单元的数量可以是在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或多个。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中探针单元的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0400] 在一些实施方式中,当使用多个探针组时,一起使用选项i) (一个或多个HCR引发剂标记的探针)的一些和选项ii) (一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针)的一些。在一些实施方式中,当使用N个探针组时,所有它们是选项i) 或所有它们是选项ii) 或使用选项i) 和ii) 的混合,以便导致例如1:1000、1:100、1:50、1:25、1:20、1:10、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、10:1、20:1、25:1、50:1、100:1、1000:1的比率或任何两个前述比率之间限定的任何范围。这些混合和比率可应用于本文提供的任何实施方式,其中使用多于一个探针组。

[0401] 在一些实施方式中,探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。在一些实施方式中,探针单元包含两个分段引发剂探针,其一起生成全HCR引发剂(分段f1用于探针P1和分段f2用于探针P2,使得 $f1+f2=1$)。

[0402] 在一些实施方式中,HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。在一些实施方式中,结合探针单元内的每个探针至靶上的邻近同源结合位点,共定位分段引发剂以形成能够与HCR发夹杂交以触发HCR信号扩增的全HCR引发剂(例如,参见图3A-5E、8A-8B、16A-16D、21A-22和27的全HCR引发剂)。在一些实施方式中,探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶的重叠或非重叠区(例如,参见图8A-8B、21A-21B、22和27)。在一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂被设计为与HCR发夹的重叠或非重叠区杂交(例如,参见图8A-8B、21A-22和27)。在样品中非特异性地结合的单独的探针不共定位全HCR引发剂,抑制HCR信号扩增。

[0403] 在一些实施方式中,HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹(例如,参见图8A-8B、18A-18F和19A-19B的HCR扩增器)。

[0404] 在一些实施方式中,HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段。

[0405] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。

[0406] 在一些实施方式中,每个HCR发夹包含具有单链toehold和茎段的输入结构域和具有单链环和茎段的互补物的输出结构域(例如,参见图8A-8B、13、14、18A-18F和19A-19B的HCR发夹)。在不存在全HCR引发剂的情况下,HCR发夹被动力学地捕获并且不聚合,抑制背景。然而,如果探针单元内的分段引发剂探针结合至它们的靶上的邻近同源结合位点以共定位全HCR引发剂,则全HCR引发剂引发聚合步骤的链反应,其中全引发剂与第一HCR发夹的输入结构域杂交,打开第一发夹以暴露其输出结构域,其又与第二HCR发夹的输入结构域杂交,打开第二发夹以暴露其输出结构域,以此类推,导致链反应,其中发夹聚合以产生拴系至靶的HCR扩增聚合物(例如,参见图8A、13、14、18C-18F和19A-19B的扩增聚合物)。在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含一个或多个标签,每个标签包含报告物或包含底物(或分段底物),其募集包含一个或多个报告物的标签探针(例如,参见图18A-18F的报告物-标记

的、底物标记的和分段底物标记的HCR发夹)。

[0407] 在一些实施方式中,标签探针包含一个或多个报告物,并且进一步包含与HCR发夹上的底物互补的或与位于HCR扩增聚合物内共定位的全底物互补的底物结合区(例如,参见图20A-20F的标签探针)。在一些实施方式中,信号由与拴系至样品内的靶的HCR扩增聚合物缔合的一个或多个报告物产生。在一些实施方式中,从样品中去除信号(例如,参见图23A-230和40A-40N)。在一些实施方式中,生成、检测和从同一样品去除HCR信号一次或多次(例如,参见图23A-230、26A-26T和40A-40N)。

[0408] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含报告物。例如,报告物可以是荧光团、发色团、发光团、磷光体、FRET对、FRET对的成员、淬灭剂、荧光团/淬灭剂对、稀土元素或化合物、放射性分子、磁性分子或促进信号的测量的任何其他分子。

方法2

[0409] 在一些实施方式中,提供了用报告物标记的发夹的重复的信号检测方法。

[0410] 在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c)任选地洗涤样品;d)提供一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物);e)任选地洗涤样品;f)检测来自一个或多个报告物的一个或多个信号;g)任选地从样品中去除一个或多个探针组;h)任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器;i)任选地从样品中去除一个或多个报告物;和j)任选地从样品中去除一个或多个信号。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0411] 在方法的一些实施方式,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于该靶的细节,针对每个靶独立地选择用于每个靶的探针组的类型。在一些实施方式中,HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0412] 在一些实施方式,所述方法包括:a)提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c)洗涤样品;d)提供一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告物);e)洗涤样品;f)检测来自一个或多个报告物的一个或多个信号;g)从样品中去除一个或多个探针组;h)从样品中去除一个或多个HCR扩增器;i)任选地从样品中去除一个或多个报告物;和j)从样品中去除一个或多个信号。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0413] 在方法的一些实施方式中,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个

探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于该靶的细节,针对每个靶独立地选择用于每个靶的探针组的类型。在一些实施方式中,HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0414] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,探针组中引发剂标记的探针的数量可以是在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中引发剂标记的探针的数量、样品固有的背景水平以及样品内靶的丰度。

[0415] 在一些实施方式中,引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合结构域和一个或多个HCR引发剂(例如,图39A-39N和42A-42F)。

[0416] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个探针单元。在一些实施方式中,探针组中探针单元的数量可以是在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中探针单元的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0417] 在一些实施方式中,探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。在一些实施方式中,探针单元包含两个分段引发剂探针,其一起生成全HCR引发剂(分段f1用于探针P1和分段f2用于探针P2,使得 $f1+f2=1$)。

[0418] 在一些实施方式中,HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。在一些实施方式中,结合探针单元内的每个探针至靶上的邻近同源结合位点共定位分段引发剂,以形成能够与HCR发夹杂交以触发HCR信号扩增的全HCR引发剂(例如,参见图3A-5E、8A-8B、16A-16D、21A-22和27的全HCR引发剂)。在一些实施方式中,探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶的重叠或非重叠区(例如,参见图8A-8B、21A-21B、22和27)。在一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂被设计为与HCR发夹的重叠或非重叠区杂交(例如,参见图8A-8B、21A-22和27)。在样品中非特异性结合的单独的探针不共定位全HCR引发剂,抑制HCR信号扩增。

[0419] 在一些实施方式中,HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹(例如,参见图8A-8B、18A-18F和19A-19B的HCR扩增器)。

[0420] 在一些实施方式中,HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段。

[0421] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。

[0422] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含一个或多个报告物。在一些实施方式中,一个或多个报告物是荧光团、发色团、发光团、磷光体、FRET对、FRET对的成员、淬灭剂、荧光团/淬灭剂对、稀土元素或化合物、放射性分子、磁性分子或促进信号的测量的任何其他分子。

方法3

[0423] 在一些实施方式中,提供了用底物标记的发夹的重复的信号检测方法。

[0424] 在一些实施方式中,所述方法包括:a) 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是

靶的其他分子的样品;b) 提供N个探针组,每个包含以下二者其一:i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii) 一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c) 任选地洗涤样品;d) 提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的底物);e) 任选地洗涤样品;f) 提供与N不同的底物的M个相对应的M个标签探针(对于 $M \leq N$;每个缀合至不同的报告物);g) 任选地洗涤样品;h) 检测与M不同的报告物相对应的M个信号;i) 从样品中去除M个信号;和j) 任选地重复步骤f-i的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0425] 在方法的一些实施方式中,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于该靶的细节,针对每个靶独立地选择用于每个靶的探针组的类型。在一些实施例中,HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0426] 在一些实施方式中,所述方法包括:a) 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b) 提供N个探针组,每个包含以下二者其一:i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii) 一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c) 洗涤样品;d) 提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的底物);e) 洗涤样品;f) 提供与N个不同的底物的M个相对应的M个标签探针(对于 $M \leq N$;每个缀合至不同的报告物);g) 洗涤样品;h) 检测与M个不同的报告物相对应的M个信号;i) 从样品中去除M个信号;和j) 重复步骤f-i的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0427] 在方法的一些实施方式中,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于该靶的细节,针对每个靶独立地选择用于每个靶的探针组的类型。在一些实施例中,HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0428] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,探针组中的引发剂标记的探针的数量可以是在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中引发剂标记的探针的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0429] 在一些实施方式中,引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合结构域和一个或多个HCR引发剂(例如,图39A-39N和42A-42F)。

[0430] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个探针单元。在一些实施方式中,探针组

中探针单元的数量可以是在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中探针单元的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0431] 在一些实施方式中,探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。在一些实施方式中,探针单元包含两个分段引发剂探针,其一起生成全HCR引发剂(片段f1用于探针P1和片段f2用于探针P2,使得 $f1+f2=1$)。

[0432] 在一些实施方式中,HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。在一些实施方式中,结合探针单元内的每个探针至靶上的邻近同源结合位点共定位分段引发剂,以形成能够与HCR发夹杂交以触发HCR信号扩增的全HCR引发剂(例如,参见图3A-5E、8A-8B、16A-16D、21A-22和27的全HCR引发剂)。在一些实施方式中,探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶的重叠或非重叠区(例如,参见图8A-8B、21A-21B、22和27)。在一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂被设计为与HCR发夹的重叠或非重叠区杂交(例如,参见图8A-8B、21A-22和27)。在样品中非特异性地结合的单独的探针不共定位全HCR引发剂,抑制HCR信号扩增。

[0433] 在一些实施方式中,HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹(例如,参见图8A-8B、18A-18F和19A-19B的HCR扩增器)。

[0434] 在一些实施方式中,HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段。

[0435] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。

[0436] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含底物。在一些实施方式中,底物用于募集直接或间接地介导在发夹标签附近的报告物的定位的报告物实体。

[0437] 在一些实施方式中,发夹标签可包含募集抗DIG抗体作为报告物实体的地高辛(DIG),其中抗DIG直接标记有一个或多个报告物,或标记有一个或多个底物,其用于直接或间接地介导在发夹标签附近的报告物的定位。

[0438] 在一些实施方式中,发夹标签可包含作为底物的核酸结构域,所述底物具有与标签探针内的结构域互补的全部或部分序列,所述标签探针进一步包含一个或多个报告物。

[0439] 在一些实施方式中,发夹标签可包含作为底物的核酸结构域,所述底物具有与标签探针内的结构域互补的全部或部分序列,所述标签探针携带用于介导在发夹标签附近的报告物的定位的一个或多个底物。

[0440] 在一些实施方式中,发夹标签可包含用作报告物实体的底物的核酸结构域,所述报告物实体直接或间接地介导在发夹标签附近的报告物的定位。

[0441] 在一些实施方式中,发夹标签可包含底物,所述底物用于募集报告物实体,所述报告物实体间接介导在发夹标签附近的报告物的定位。

[0442] 在一些实施方式中,发夹标签可包含用于募集报告物实体的底物,所述报告物实体包含催化CARD-底物导致在发夹附近的报告物分子沉积的酶(参见例如,33A-33E、34A-34C、36A-36B)。例如:

1. 酶可以是辣根过氧化物酶(HRP)(或包含多种HRP酶的聚合物HRP),其作用在

CARD底物上,以催化诸如AEC、DAB、TMB或StayYellow的发色报告物的沉积,或者催化CARD底物以催化荧光报告物诸如荧光团标记的酪酰胺的沉积,或者催化半抗原标记的CARD底物诸如生物素标记的酪酰胺的沉积,其中半抗原用于介导在发夹标签附近的报告物的定位。

2. 酶可以是碱性磷酸酶 (AP) (或包含多种AP酶的聚合物AP),其作用在CARD底物上以催化报告物,例如发色报告物的沉积,诸如但不限于BCIP/NBT、BCIP/TNBT、Naphthol AS-MX磷酸盐+FastBlue BB、NaphtholAS-MX磷酸盐+FastRed TR、StayGreen。

3. 酶可以是作用在CARD底物上以催化报告物(例如NBT)的沉积的葡萄糖氧化酶。

4. 酶可以是直接或间接地介导在发夹标签附近的报告物的定位的任何分子或复合物。

[0443] 在一些实施方式中,标签探针包含一个或多个报告物,并且进一步包含与HCR发夹上的底物互补的或与HCR扩增聚合物内共定位的全底物互补的底物结合区(例如,参见图20A-20F的标签探针)。在一些实施方式中,信号由与拴系至样品内的靶的HCR扩增聚合物缔合的一个或多个报告物产生。在一些实施方式中,从样品中去除信号(例如,参见图23A-23O和40A-40N)。在一些实施方式中,生成、检测和从相同样品去除HCR信号一次或多次(例如,参见图23A-23O、26A-26T和40A-40N)。

[0444] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含报告物。例如,报告物可以是荧光团、发色团、发光团、磷光体、FRET对、FRET对的成员、淬灭剂、荧光团/淬灭剂对、稀土元素或化合物、放射性分子、磁性分子或促进信号的测量的任何其他分子。

方法4

[0445] 在一些实施方式中,提供了用底物标记的发夹的重复的信号检测方法。

[0446] 在一些实施方式中,所述方法包括:a) 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b) 提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii) 一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c) 任选地洗涤样品;d) 提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有底物);e) 任选地洗涤样品;f) 提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至报告物);g) 任选地洗涤样品;h) 检测与一个或多个报告物相对应的一个或多个信号;i) 从样品中去除一个或多个信号;和j) 任选地以任意顺序重复步骤b-i的任一个一次或多次。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0447] 在方法的一些实施方式中,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于该靶的细节,针对每个靶独立地选择用于每个靶的探针组的类型。在一些实施例中,HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0448] 在一些实施方式中,提供了用底物标记的发夹的重复的信号检测方法。在一些实施方式中,所述方法包括:a) 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b) 提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:i) 一个或多个HCR引发剂标记

的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;c)洗涤样品;d)提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有底物);e)洗涤样品;f)提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至报告物);g)洗涤样品;h)检测与一个或多个报告物相对应的一个或多个信号;i)从样品中去除一个或多个信号;和j)以任意顺序重复步骤b-i的任一个一次或多次。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0449] 在方法的一些实施方式中,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于该靶的细节,针对每个靶独立地选择用于每个靶的探针组的类型。在一些实施方式中,HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0450] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,探针组中引发剂标记的探针的数量可以是在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中引发剂标记的探针的数量、样品固有的背景水平和样品内的靶的丰度。

[0451] 在一些实施方式中,引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合结构域和一个或多个HCR引发剂(例如,图39A-39N和42A-42F)。

[0452] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个探针单元。在一些实施方式中,探针组中探针单元的数量可以是在范围1至1000或10至100或20至50或30至40。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中探针单元的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0453] 在一些实施方式中,探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。在一些实施方式中,探针单元包含两个分段引发剂探针,其一起生成全HCR引发剂(片段f1用于探针P1和片段f2用于探针P2,使得 $f1+f2=1$)。

[0454] 在一些实施方式中,HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。在一些实施方式中,结合探针单元内的每个探针至靶上的邻近同源结合位点共定位分段引发剂,以形成能够与HCR发夹杂交以触发HCR信号扩增的全HCR引发剂(例如,参见图3A-5E、8A-8B、16A-16D、21A-22和27的全HCR引发剂)。在一些实施方式中,探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶的重叠或非重叠区(例如,参见图8A-8B、21A-21B、22和27)。在一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂被设计为与HCR发夹的重叠或非重叠区杂交(例如,参见图8A-8B、21A-22和27)。在样品中非特异性结合的单独的探针不共定位全HCR引发剂,抑制HCR信号扩增。

[0455] 在一些实施方式中,HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹(例如,参见图8A-8B、18A-18F和19A-19B的HCR扩增器)。

[0456] 在一些实施方式中,HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎

段。

[0457] 在一些实施方式中，HCR发夹进一步包含输出结构域，输出结构域包含单链环和茎段的互补物。

[0458] 在一些实施方式中，HCR发夹进一步包含底物。在一些实施方式中，底物用于募集报告物实体，所述报告物实体直接或间接地介导在发夹标签附近的报告物的定位。

[0459] 在一些实施方式中，标签探针包含底物结合区和报告物（例如，参见图18C-E和20）。例如，报告物可以是荧光团、发色团、发光团、磷光体、FRET对、FRET对的成员、淬灭剂、荧光团/淬灭剂对、稀土元素或化合物、放射性分子、磁性分子或促进信号的测量的任何其他分子。

方法5

[0460] 在一些实施方式中，提供了用报告物和/或底物标记的发夹的重复的信号检测方法。

[0461] 在一些实施方式中，所述方法包括：a) 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品；b) 提供一个或多个HCR探针组，每个包含以下二者其一：i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针，或ii) 一个或多个探针单元，每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针；c) 提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器（每个标记有一个或多个报告物和/或一个或多个底物）；d) 任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针（每个缀合至一个或多个报告物）；e) 检测一个或多个信号；f) 任选地洗涤样品；g) 任选地从样品中去除一个或多个信号；h) 任选地从样品中去除一个或多个报告物；i) 任选地从样品中去除一个或多个标签探针；j) 任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器；k) 任选地从样品中去除一个或多个探针组；和l) 任选地以任意顺序重复上述步骤的任一个。在一些实施方式中，当使用多个探针组时，（关于探针组）使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0462] 在方法的一些实施方式中，用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针和用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元（每个包含两个或多个分段引发剂探针）。在一些实施方式中，每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中，每个探针组包含一个或多个探针单元，每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中，基于该靶的细节，针对每个靶独立地选择用于每个靶的探针组的类型。在一些实施方式中，HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0463] 在一些实施方式中，提供了用报告物和/或底物标记的发夹的重复的信号检测方法。在一些实施方式中，所述方法包括：a) 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品；b) 提供一个或多个HCR探针组，每个包含以下二者其一：i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针，或ii) 一个或多个探针单元，每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针；c) 提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器（每个标记有一个或多个报告物和/或一个或多个底物）；d) 提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针（每个缀合至一个或多个报告物）；e) 检测一个或多个信号；f) 洗涤样品；g) 从样品中去除一个或多个信号；h) 任选地从样品中去除一个或多个报告物；i) 从样品中去除一个或多个标签探针；j) 从样品中去除一个或多个HCR扩增器；k) 从样品中去除一个或多个探针组；

和1)以任意顺序重复上述步骤的任一个。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0464] 在方法的一些实施方式中,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于每个靶的细节,针对该靶独立地选择用于该靶的探针组的类型。在一些实施例, HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0465] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,探针组中引发剂标记的探针的数量可以是在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中引发剂标记的探针的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0466] 在一些实施方式中,引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合结构域和一个或多个HCR引发剂(例如,图39A-39N和42A-42F)。

[0467] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个探针单元。在一些实施方式中,探针组中探针单元的数量可以在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中探针单元的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0468] 在一些实施方式中,探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。在一些实施方式中,探针单元包含两个分段引发剂探针,其一起生成全HCR引发剂(片段f1用于探针P1和片段f2用于探针P2,使得 $f1+f2=1$)。

[0469] 在一些实施方式中,HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。在一些实施方式中,结合探针单元内的每个探针至靶上的邻近同源结合位点共定位分段引发剂,以形成能够与HCR发夹杂交以触发HCR信号扩增的全HCR引发剂(例如,参见图3A-5E、8A-8B、16A-16D、21A-22和27的全HCR引发剂)。在一些实施方式中,探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶的重叠或非重叠区(例如,参见图8A-8B、21A-21B、22和27)。在一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂被设计为与HCR发夹的重叠或非重叠区杂交(例如,参见图8A-8B、21A-22和27)。在样品中非特异性结合的单独的探针不共定位全HCR引发剂,抑制HCR信号扩增。

[0470] 在一些实施方式中,HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹(例如,参见图8A-8B、18A-18F和19A-19B的HCR扩增器)。

[0471] 在一些实施方式中,HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段。

[0472] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。

[0473] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含一个或多个报告物和/或一个或多个底

物。

[0474] 在一些实施方式中,标签探针包含底物结合区和一个或多个报告物。

方法6

[0475] 在一些实施方式中,提供了用报告物和/或底物标记的发夹的重复的信号检测方法。

[0476] 在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)以任意顺序执行步骤c-g的任一个;c)提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;d)提供直接或间接地生成一个或多个信号的一个或多个HCR扩增器;e)任选地洗涤样品;f)检测一个或多个信号;和g)任选地去除一个或多个信号。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0477] 在方法的一些实施方式中,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于每个靶的细节,针对该靶独立地选择用于该靶的探针组的类型。在一些实施例中,HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0478] 在一些实施方式中,提供了用报告物和/或底物标记的发夹的重复的信号检测方法。在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)以任意顺序执行步骤c-g的任一个;c)提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针;d)提供直接或间接地生成一个或多个信号的一个或多个HCR扩增器;e)洗涤样品;f)检测一个或多个信号;和g)去除一个或多个信号。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0479] 在方法的一些实施方式中,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于每个靶的细节,针对该靶独立地选择用于该靶的探针组的类型。在一些实施方式中,HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0480] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,探针组中引发剂标记的探针的数量可以在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中引发剂标记的探针的数量、样品固有的背景水平和样品内靶

的丰度。

[0481] 在一些实施方式中,引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合结构域和一个或多个HCR引发剂(例如,图39A-39N和42A-42F)。

[0482] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个探针单元。在一些实施方式中,探针组中的探针单元的数量可以在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中探针单元的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0483] 在一些实施方式中,探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。在一些实施方式中,探针单元包含两个分段引发剂探针,其一起生成全HCR引发剂(片段f1用于探针P1和片段f2用于探针P2,使得 $f1+f2=1$)。

[0484] 在一些实施方式中,HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。在一些实施方式中,结合探针单元内的每个探针至靶上的邻近同源结合位点共定位分段引发剂,以形成能够与HCR发夹杂交以触发HCR信号扩增的全HCR引发剂(例如,参见图3A-5E、8A-8B、16A-16D、21A-22和27的全HCR引发剂)。在一些实施方式中,探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶的重叠或非重叠区(例如,参见图8A-8B、21A-21B、22和27)。在一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂被设计为与HCR发夹的重叠或非重叠区杂交(例如,参见图8A-8B、21A-22和27)。在样品中非特异性结合的单独的探针不共定位全HCR引发剂,抑制HCR信号扩增。

[0485] 在一些实施方式中,HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹(例如,参见图8A-8B、18A-18F和19A-19B的HCR扩增器)。

[0486] 在一些实施方式中,HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段。

[0487] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。

[0488] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含一个或多个报告物和/或一个或多个底物。

方法7

[0489] 在一些实施方式中,提供了涉及重叠结合位点的HCR方法。

[0490] 在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供包含一个或多个探针单元的探针组,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点;c)任选地洗涤样品;d)提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器;e)任选地洗涤样品;f)任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物);g)任选地洗涤样品;和h)检测来自报告物的信号。

[0491] 在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供包含一个或多个探针单元的探针组,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点;c)洗涤样品;d)提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器;e)洗涤样品;f)提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物);g)洗涤样品;和h)检测来自报告物的信号。在

一些实施方式中,重叠可以是1、2、3、4或5个核苷酸。

[0492] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个探针单元。在一些实施方式中,探针组中探针单元的数量可以在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中探针单元的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0493] 在一些实施方式中,探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。在一些实施方式中,探针单元包含两个分段引发剂探针,其一起生成全HCR引发剂(片段f1用于探针P1和片段f2用于探针P2,使得 $f1+f2=1$)。

[0494] 在一些实施方式中,HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。在一些实施方式中,结合探针单元内的每个探针至靶上的邻近同源结合位点共定位分段引发剂,以形成能够与HCR发夹杂交以触发HCR信号扩增的全HCR引发剂(例如,参见图3A-5E、8A-8B、16A-16D、21A-22和27的全HCR引发剂)。

[0495] 在一些实施方式中,每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶的重叠或非重叠区(例如,参见图8A-8B、21A-21B、22和27)。在一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂被设计为与HCR发夹的重叠或非重叠区杂交(例如,参见图8A-8B、21A-22和27)。在样品中非特异性结合的单独的探针不共定位全HCR引发剂,抑制HCR信号扩增。

[0496] 在一些实施方式中,HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹(例如,参见图8A-8B、18A-18F和19A-19B的HCR扩增器)。

[0497] 在一些实施方式中,HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段。

[0498] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。

[0499] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含报告物和/或底物。

[0500] 在一些实施方式中,标签探针包含底物结合区和报告物。

[0501] 在一些实施方式中,发夹标签可包含用于募集报告物实体的底物,所述报告物实体包含催化CARD底物以在发夹附近沉积报告物分子的酶(参见,例如图33A-33E、34A-34C、36A-36B)。例如:

1. 所述酶可以是辣根过氧化物酶(HRP)(或包含多个HRP酶的聚合物HRP),其作用在CARD底物上,以催化诸如AEC、DAB、TMB、或StayYellow的发色报告物的沉积,或者其催化CARD底物以催化荧光报告物如荧光团标记的酪酰胺的沉积,或者其催化半抗原标记的CARD底物诸如生物素标记的酪酰胺的沉积,其中半抗原用于介导在发夹标签附近的报告物的定位。

2. 酶可以是碱性磷酸酶(AP)(或包含多个AP酶的聚合物AP),其作用在CARD底物上以催化报告物,例如显色报告物的沉积,诸如但不限于BCIP/NBT、BCIP/TNBT、Naphthol AS-MX磷酸盐+FastBlue BB、Naphthol AS-MX磷酸盐+FastRed TR、StayGreen。

3. 酶可以是作用在CARD底物上以催化报告物(例如NBT)的沉积的葡萄糖氧化酶。

4. 酶可以是直接或间接地介导在发夹标签附近的报告物的定位的任何分子或复合物。

方法8

[0502] 在一些实施方式中,提供了涉及重叠结合位点的HCR的方法。

[0503] 在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供包含一个或多个探针单元的探针组,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点;c)任选地洗涤样品;d)提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器;e)任选地洗涤样品;f)任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物);g)任选地洗涤样品;和h)检测来自报告物的信号。

[0504] 在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供包含一个或多个探针单元的探针组,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点;c)洗涤样品;d)提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器;e)洗涤样品;f)提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物);g)洗涤样品;和h)检测来自报告物的信号。

[0505] 在一些实施方式中,探针组包含一个或多个探针单元。在一些实施方式中,探针组中探针单元的数量可以在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多,取决于探针组中的探针单元的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0506] 在一些实施方式中,探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。在一些实施方式中,探针单元包含两个分段引发剂探针,其一起生成全HCR引发剂(片段f1用于探针P1和片段f2用于探针P2,使得 $f1+f2=1$)。

[0507] 在一些实施方式中,HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。在一些实施方式中,结合探针单元内的每个探针至靶上的邻近同源结合位点共定位分段引发剂,以形成能够与HCR发夹杂交以触发HCR信号扩增的全HCR引发剂(例如,参见图3A-5E、8A-8B、16A-16D、21A-22和27的全HCR引发剂)。在一些实施方式中,探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶的重叠或非重叠区(例如,参见图8A-8B、21A-21B、22和27)。在一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂被设计为与HCR发夹的重叠或非重叠区杂交(例如,参见图8A-8B、21A-22和27)。在样品中非特异性结合的单独的探针不共定位全HCR引发剂,抑制HCR信号扩增。

[0508] 在一些实施方式中,HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹(例如,参见图8A-8B、18A-18F和19A-19B的HCR扩增器)。

[0509] 在一些实施方式中,HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段。

[0510] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。

[0511] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含报告物和/或底物。在一些实施方式中,报告物是荧光团、发色团、发光团、磷光体、FRET对、FRET对的成员、淬灭剂、荧光团/淬灭剂对、稀土元素或化合物、放射性分子、磁性分子或促进信号的测量的任何其他分子。在一些实施方式中,底物用于募集报告物实体,所述报告物实体直接或间接地介导在发夹标签附近的

报告物的定位。

[0512] 在一些实施方式中,标签探针包含底物结合区和报告物(例如,参见图18C-E和20)。例如,报告物可以是荧光团、发色团、发光团、磷光体、FRET对、FRET对的成员、淬灭剂、荧光团/淬灭剂对、稀土元素或化合物、放射性分子、磁性分子或促进信号的测量的任何其他分子。

[0513] 在一些实施方式中,发夹标签可包含用于募集报告物实体的底物,所述报告物实体包含催化CARD-底物导致在发夹附近的报告物分子沉积的酶(参见例如,33A-33E、34A-34C、36A-36B)。例如:

1.酶可以是辣根过氧化物酶(HRP)(或包含多个HRP酶的聚合物HRP),其作用在CARD底物上,以催化诸如AEC、DAB、TMB、或StayYellow的发色报告物的沉积,或者其催化CARD底物以催化荧光报告物诸如荧光团标记的酪酰胺的沉积,或者其催化半抗原标记的CARD底物诸如生物素标记的酪酰胺的沉积,其中半抗原用于介导在发夹标签附近的报告物的定位。

2.酶可以是碱性磷酸酶(AP)(或包含多种AP酶的聚合物AP),其作用在CARD底物上以催化报告物,例如发色报告物诸如但不限于BCIP/NBT、BCIP/TNBT、Naphthol AS-MX磷酸盐+FastBlue BB、Naphthol AS-MX磷酸盐+FastRed TR、StayGreen的沉积。

3.酶可以是作用在CARD底物上以催化报告物(例如NBT)的沉积的葡萄糖氧化酶。

4.酶可以是直接或间接地介导在发夹标签附近的报告物的定位的任何分子或复合物。

方法9

[0514] 在一些实施方式中,提供了涉及用重复的信号检测的重叠结合位点的HCR的方法。

[0515] 在一些实施方式中,所述方法包括:a)提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品;b)提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:i)一个或多个HCR引发剂标记的探针,或ii)一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠或非重叠结合位点并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠或非重叠结合位点;c)任选地洗涤样品;d)提供每个标记有一个或多个报告物和/或底物的一个或多个HCR扩增器;e)任选地洗涤样品;f)任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物);g)任选地洗涤样品;h)检测来自一个或多个报告物的信号;i)任选地从样品中去除一个或多个信号;j)任选地从样品中去除一个或多个报告物;k)任选地从样品中去除一个或多个标签探针;l)任选地从样品中去除一个或多个扩增器;m)任选地从样品中去除一个或多个探针组;和n)任选地以任意顺序重复上述步骤的任一个。在一些实施方式中,当使用多个探针组时,(关于探针组)使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0516] 在方法的一些实施方式中,用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针,并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元(每个包含两个或多个分段引发剂探针)。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中,每个探针组包含一个或多个探针单元,每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中,基于每个靶的细节,针对该

靶独立地选择用于该靶的探针组的类型。在一些实施例中，HCR扩增器进一步介导CARD或重复的CARD。

[0517] 在一些实施方式中，所述方法包括：a) 提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品；b) 提供一个或多个探针组，每个包含以下二者其一：i) 一个或多个HCR引发剂标记的探针，或ii) 一个或多个探针单元，每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针，其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠或非重叠结合位点，并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠或非重叠结合位点；c) 洗涤样品；d) 提供每个标记有一个或多个报告物和/或底物的一个或多个HCR扩增器；e) 洗涤样品；f) 提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针（每个缀合至一个或多个报告物）；g) 洗涤样品；h) 检测来自一个或多个报告物的信号；i) 从样品中去除一个或多个信号；j) 从样品中去除一个或多个报告物；k) 从样品中去除一个或多个标签探针；l) 从样品中去除一个或多个扩增器；m) 任选地从样品中去除一个或多个探针组；和n) 以任意顺序重复上述步骤的任一个。在一些实施方式中，当使用多个探针组时，（关于探针组）使用选项i)的一些和选项ii)的一些。

[0518] 在方法的一些实施方式的方法，用于零个、一个或多个靶的探针组每个包含一个或多个引发剂标记的探针，并且用于零个、一个或多个其他靶的探针组每个包含一个或多个探针单元（每个包含两个或多个分段引发剂探针）。在一些实施方式中，每个探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中，每个探针组包含一个或多个探针单元，每个探针单元包含两个或多个分段引发剂探针。在一些实施方式中，基于每个靶的细节，针对该靶独立地选择用于该靶的探针组的类型。在一些实施例中，HCR扩增器进一步介导CARD或重复CARD。

[0519] 在一些实施方式中，探针组包含一个或多个引发剂标记的探针。在一些实施方式中，探针组中引发剂标记的探针的数量可以在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中引发剂标记的探针的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多，取决于探针组中引发剂标记的探针的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0520] 在一些实施方式中，引发剂标记的探针包含一个或多个靶结合结构域和一个或多个HCR引发剂（例如，图39A-39N和42A-42F）。

[0521] 在一些实施方式中，探针组包含一个或多个探针单元。在一些实施方式中，探针组中探针单元的数量可以在范围1至1000或10至100或20至50或30至40内。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比2倍或5倍或10倍或100倍或更多。提高探针组中探针单元的数量可提高信噪比为2或5或10或50或100或200或500或1000或更多，取决于探针组中探针单元的数量、样品固有的背景水平和样品内靶的丰度。

[0522] 在一些实施方式中，探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针。在一些实施方式中，探针单元包含两个分段引发剂探针，其一起生成全HCR引发剂（片段f1用于探针P1和片段f2用于探针P2，使得 $f1+f2=1$ ）。

[0523] 在一些实施方式中，HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。在一些实施方式中，结合探针单元内的每个探针至靶上的邻近同源结合位点共定位分段引发剂，以形

成能够与HCR发夹杂交以触发HCR信号扩增的全HCR引发剂(例如,参见图3A-5E、8A-8B、16A-16D、21A-22和27的全HCR引发剂)。在一些实施方式中,探针单元内的靶结合区被配置为结合至靶的重叠或非重叠区(例如,参见图8A-8B、21A-21B、22和27)。

[0524] 在一些实施方式中,探针单元内的分段引发剂被设计为与HCR发夹的重叠或非重叠区杂交(例如,参见图8A-8B、21A-22和27)。在样品中非特异性结合的单独的探针不共定位全HCR引发剂,抑制HCR信号扩增。

[0525] 在一些实施方式中,HCR扩增器包含两个或多个HCR发夹(例如,参见图8A-8B、18A-18F和19A-19B的HCR扩增器)。

[0526] 在一些实施方式中,HCR发夹包含输入结构域,输入结构域包含单链toehold和茎段。

[0527] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含输出结构域,输出结构域包含单链环和茎段的互补物。

[0528] 在一些实施方式中,HCR发夹进一步包含一个或多个报告物和/或一个或多个底物。

[0529] 在一些实施方式中,标签探针包含底物结合区和一个或多个报告物。

[0530] 在本文方法(例如,方法1-9)的一些实施方式中,靶是核酸序列。非限制性实例是dsDNA、dsRNA、ssDNA和ssRNA。

[0531] 在本文任何方法(例如,方法1或方法3)的一些实施方式中,N是1至1000。在一些实施方式中,N是1至10、1至50、1至100、1至250、1至500或1至750。

[0532] 在本文任何方法(例如,方法1或方法3)的一些实施方式中,M是2-10,000。在一些实施方式中,M是1至10、1至50、1至100、1至250、1至500、1至750、1至1000、1至1250、1至2500、1至3750、1至5000或1至7500。

[0533] 在本文任何方法的一些实施方式,底物选自由半抗原、地高辛(DIG)、二硝基苯基(DNP)、荧光团、生物素、包含4-50核苷酸的核酸结构域、募集催化报告物分子的沉积的酶的底物、分段底物、直接或间接地介导报告物的定位核酸结构域组成的组。

[0534] 在本文任何方法的一些实施方式中,报告物是荧光团、发色团、发光团、磷光体、FRET对、FRET对的成员、淬灭剂、荧光团/淬灭剂对、稀土元素或化合物、放射性分子、磁性分子。

[0535] 在本文的任何方法的一些实施方式中,进一步包含固定样品。

[0536] 在本文的任何方法的一些实施方式中,进一步包含透化样品。

[0537] 在本文的任何方法的一些实施方式中,进一步包含从样品中去除一个或多个信号。

[0538] 在本文的任何方法的一些实施方式中,进一步包含从样品中去除一个或多个报告物。

[0539] 在本文的任何方法的一些实施方式中,进一步包含从样品中去除一个或多个标签探针。

[0540] 在本文的任何方法的一些实施方式中,进一步包含从样品中去除一个或多个扩增器。

[0541] 在本文的任何方法的一些实施方式中,进一步包含从样品中去除一个或多个探针

组。

[0542] 在本文的任何方法的一些实施方式中,进一步包含以任意顺序重复上述步骤的任一个。

[0543] 在本文的任何方法的一些实施方式中,方法以权利要求中字母标注的字母顺序进行。

[0544] 在本文的任何方法的一些实施方式中,探针单元每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,并且其中HCR分段引发剂探针包含靶结合区和分段引发剂。

[0545] 在本文的任何方法的一些实施方式中,涉及重叠结合并且其中重叠是至少1、2或3个核苷酸。

[0546] 在本文的任何方法的一些实施方式中,发夹标签可包含用于募集报告物实体的底物,所述报告物实体包含催化CARD底物导致在发夹附近的报告物分子的沉积的酶(参见例如,33A-33E、34A-34C、36A-36B)。例如:

1. 酶可以是辣根过氧化物酶(HRP)(或包含多个HRP酶的聚合物HRP),其作用在CARD底物上,以催化显色报告物诸如AEC、DAB、TMB或StayYellow的沉积,或者其催化CARD底物以催化荧光报告物如荧光团标记的酪酰胺的沉积,或者其催化半抗原标记的CARD底物如生物素标记的酪酰胺的沉积,其中半抗原用于介导在发夹标签附近的报告物的定位。

2. 酶可以是碱性磷酸酶(AP)(或包含多个AP酶的聚合物AP),其作用在CARD底物上以催化报告物例如显色报告物的沉积,诸如但不限于BCIP/NBT、BCIP/TNBT、Naphthol AS-MX磷酸盐+FastBlue BB、Naphthol AS-MX磷酸盐+FastRed TR、StayGreen。

3. 酶可以是作用在CARD-底物上以催化报告物(例如NBT)的沉积的葡萄糖氧化酶。

4. 酶可以是直接或间接地介导在发夹标签附近的报告物的定位的任何分子或复合物。

[0547] 在本文的任何方法的一些实施方式中,用于介导CARD的酶在报告物沉积之后被灭活(例如,使用化学和/或热变性)。

[0548] 在本文的任何方法的一些实施方式中,发夹标签包含一个或多个半抗原,所述半抗原募集一个或多个抗半抗原一抗,所述抗半抗原一抗进一步募集标记有报告物实体的一个或多个二抗,其中报告物实体是介导CARD的酶。

[0549] 在本文的任何方法的一些实施方式中,发夹标签包含一个或多个第一半抗原,所述一个或多个第一半抗原募集一个或多个抗第一半抗原一抗,所述抗第一半抗原一抗进一步募集一个或多个标记有一个或多个第二半抗原的第一二抗,所述一个或多个第二半抗原进一步募集一个或多个抗第二半抗原一抗,所述一个或多个抗第二半抗原一抗进一步募集一个或多个第二二抗,所述一个或多个第二二抗各自包含一个或多个报告物实体,其中所述报告物实体是介导CARD的酶。

[0550] 在本文的任何方法的一些实施方式中,发夹标签包含一个或多个第一半抗原,所述一个或多个第一半抗原募集一个或多个抗第一半抗原一抗,所述抗第一半抗原一抗进一步募集标记有一个或多个第二半抗原的一个或多个第一二抗,所述一个或多个第二半抗原进一步募集一个或多个抗第二半抗原一抗,所述一个或多个抗第二半抗原一抗进一步募集一个或多个第二二抗,所述一个或多个第二二抗各自包含一个或多个报告物实体,其中报告物实体是介导CARD的酶。在一些实施方式中,第二半抗原也是介导CARD的酶(例如,HRP或

AP)的报告物实体。

方法10

[0551] 在一些实施方式中,方法包括提供包含第一分段引发剂的第一分段引发剂探针、包含第二分段引发剂的第二分段引发剂探针、第一发夹单体、第二发夹单体和靶分子;和将第一分段引发剂探针和第二分段引发剂探针与靶孵育。在一些实施方式中,第一发夹单体包括包含第一toehold和第一茎段的第一输入结构域、包含第一发夹环和第一茎段的互补物的第一输出结构域和第一半抗原分子。在一些实施方式中,第二发夹单体包括包含第二toehold和第二茎段的第二输入结构域、包含第二发夹环和第二茎段的互补物的第二输出结构域和第二半抗原分子(参见例如,图34B)。

[0552] 在方法的一些实施方式中,孵育将第一分段引发剂探针结合至靶分子,并且将第二分段引发剂探针结合至靶分子。

[0553] 在一些实施方式中,方法进一步包含结合第一发夹单体至第一分段引发剂和第二分段引发剂二者,结合第二发夹单体至第一发夹单体,提供标记有一个或多个报告物实体的抗半抗原分子。在一些实施方式中,报告物实体是介导CARD的酶。在一些实施方式中,方法进一步包含提供一个或多个CARD底物和测量来自通过介导CARD的酶从CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号(参见例如,图34B)。

[0554] 在方法的一些实施方式中,抗半抗原分子是抗半抗原抗体。在方法的一些实施方式中,抗半抗原分子是抗半抗原纳米抗体。在方法的一些实施方式中,抗半抗原分子是抗半抗原抗体和抗半抗原纳米抗体的组合。

[0555] 在方法的一些实施方式中,至少一个靶是核酸(参见,例如,图33B、36A和36B)。

[0556] 在方法的一些实施方式中,至少一个靶分子是RNA。在一些实施方式中,RNA是单链的。在一些实施方式中,RNA是双链的。在一些实施方式中,RNA是单链的和双链的二者。

[0557] 在方法的一些实施方式中,至少一个靶分子是DNA。在一些实施方式中,DNA是单链的。在一些实施方式中,DNA是双链的。在一些实施方式中,DNA是单链的和双链的二者。

[0558] 在方法的一些实施方式中,至少一个靶分子是RNA分子(例如核糖体RNA和mRNA)的复合物。在一些实施方式中,RNA是单链的。在一些实施方式中,RNA是双链的。在一些实施方式中,RNA是单链的和双链的二者。

方法11

[0559] 在一些实施方式中,所述方法包括提供至少一个引发剂标记的探针,所述探针包含至少一个引发剂、第一发夹单体、第二发夹单体和一个或多个靶分子,以及将包含至少一个引发剂的至少一个引发剂标记的探针与一个或多个靶分子孵育。在一些实施方式中,第一发夹单体包括包含第一toehold和第一茎段的第一输入结构域、包含第一发夹环和与第一茎段的互补物的第一输出结构域,和第一半抗原分子。在一些实施方式中,第二发夹单体包括包含第二toehold和第二茎段的第二输入结构域,包含第二发夹环和第二茎段的互补物的第二输出结构域,以及第二半抗原分子(参见例如图34A)。任选地,只要至少一个发夹具有至少一个半抗原,每个发夹可以具有零个、一个、两个或多个半抗原。

[0560] 在方法的一些实施方式中,孵育将包含至少一个引发剂的至少一个引发剂标记的探针结合至一个或多个靶分子。

[0561] 在方法的一些实施方式中,方法进一步包含将第一发夹单体结合至至少一个引发

剂,将第二发夹单体结合至第一发夹单体,和提供标记有一个或多个报告物实体的抗半抗原分子。在一些实施方式中,报告物实体是介导CARD的酶。在一些实施方式中,方法进一步包含提供一个或多个CARD底物和测量来自通过介导CARD的酶从CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号(参见例如,图34A)。

[0562] 在方法的一些实施方式中,抗半抗原分子是抗半抗原抗体。在方法的一些实施方式中,抗半抗原分子是抗半抗原纳米抗体。在方法的一些实施方式中,抗半抗原分子是抗半抗原抗体片段。在方法的一些实施方式中,抗半抗原分子是抗半抗原抗体和抗半抗原纳米抗体的组合。

[0563] 在方法的一些实施方式中,一个或多个靶分子是蛋白质(参见例如,图33C和33E)。在方法的一些实施方式中,一个或多个靶分子是microRNA、小RNA或非编码RNA。

[0564] 在方法的一些实施方式中,抗半抗原分子是抗半抗原抗体。在方法的一些实施方式中,抗半抗原分子是抗半抗原纳米抗体。在方法的一些实施方式中,抗半抗原分子是抗半抗原抗体和抗半抗原纳米抗体的组合。

[0565] 在一些实施方式中,抗半抗原是一抗。在一些实施方式中,方法进一步包含或采用二抗。在一些实施方式中,抗半抗原抗体包含结合半抗原的一抗并且方法进一步包含结合一抗的二抗(标记有一个或多个报告物实体)。

方法12

[0566] 在一些实施方式中,方法包括提供包含第一分段引发剂的第一分段引发剂探针、包含第二分段引发剂的第二分段引发剂探针、第一发夹单体、第二发夹单体和靶分子;和将第一分段引发剂探针和第二分段引发剂探针与靶分子孵育。在一些实施方式中,第一发夹单体包括包含第一toehold和第一茎段的第一输入结构域、包含第一发夹环和第一茎段的互补物的第一输出结构域和底物。在一些实施方式中,第二发夹单体包含包含第二toehold和第二茎段的第二输入结构域、包含第二发夹环和第二茎段的互补物的第二输出结构域和底物。

[0567] 在方法的一些实施方式中,孵育将第一分段引发剂探针结合至靶分子,并且将第二分段引发剂探针结合至靶分子。

[0568] 在一些实施方式中,方法进一步包含将第一发夹单体结合至第一分段引发剂和第二分段引发剂二者;将第二发夹单体结合至第一发夹单体;提供标记有一个或多个报告物实体的底物结合区,其中底物结合区结合至底物,并且其中报告物实体是介导CARD的酶;提供一个或多个CARD底物,测量来自通过介导CARD的酶从CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号。

[0569] 在方法的一些实施方式中,至少一个靶是核酸(参见例如,图33B、36A和36B)。

[0570] 在方法的一些实施方式中,至少一个靶分子是RNA。在一些实施方式中,RNA是单链的。在一些实施方式中,RNA是双链的。在一些实施方式中,RNA是单链的和双链的二者。

方法13

[0571] 在一些实施方式中,所述方法包括提供包含第一分段引发剂的第一分段引发剂探针、包含第二分段引发剂的第二分段引发剂探针、第一发夹单体、第二发夹单体和靶分子;以及将第一分段引发剂探针和第二分段引发剂探针与靶孵育。在一些实施方式中,第一发夹单体包括包含第一toehold和第一茎段的第一输入结构域、包含第一发夹环和第一茎段

的互补物的第一输出结构域和第一分段底物。在一些实施方式中,第二发夹单体包含包含第二toehold和第二茎段的第二输入结构域、包含第二发夹环和第二茎段的互补物的第二输出结构域和第二分段底物。

[0572] 在方法的一些实施方式中,孵育将第一分段引发剂探针结合至靶分子,并且将第二分段引发剂探针结合至靶分子。

[0573] 在一些实施方式中,方法进一步包含将第一发夹单体结合至第一分段引发剂和第二分段引发剂二者;将第二发夹单体结合至第一发夹单体;获得包含第一和第二分段底物的全底物;提供标记有一个或多个报告物实体的底物结合区,其中底物结合区结合至全底物,并且其中报告物实体是介导CARD的酶;提供一个或多个CARD底物;测量来自通过介导CARD的酶从CARD底物生成的一个或多个沉积的报告物的信号。

[0574] 在方法的一些实施方式中,至少一个靶是核酸(参见例如,图33B、36A和36B)。

[0575] 在方法的一些实施方式中,至少一个靶分子是RNA。在一些实施方式中,RNA是单链的。在一些实施方式中,RNA是双链的。在一些实施方式中,RNA单链的和双链的二者。

实施例

[0576] 以下实施例是非限制性的,并且在本领域技术人员范围内的其他变体也被预期。

实施例1-使用未优化的探针组对整装鸡胚中的两个靶mRNA进行成像

[0577] 图6证明了使用未优化的探针组对整装鸡胚中的两个靶mRNA进行成像。

[0578] 利用标准探针(亦称引发剂标记的探针)(方案A),非特异性探针结合导致扩增的背景,导致低信噪比。使用分段引发剂(亦称分裂引发剂)探针(SchemeE),方案的两个阶段期间的自动背景抑制确保了非特异性探针结合不导致扩增的背景,导致甚至使用未优化的分段引发剂探针组的高信噪比。分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的自动背景抑制性质(方案E)在映射新的靶mRNA的表达模式时是极其有益的,允许快速生成高质量结果,而不需要繁琐的分段引发剂探针组优化(即,去除观察到的在样品中非特异性结合的不良探针)。

[0579] 在图6中示出了活性背景抑制的益处,描绘了使用具有标准探针(也称为引发剂标记的探针)(方案A)或分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针(方案E)的未优化的探针组对整装鸡胚中的靶mRNA进行成像。靶mRNA Dmbx1:阶段HH 7胚胎;靶mRNA Sox8:阶段HH10胚胎。用标准探针(也称为引发剂标记的探针)(方案A),由于非特异性探针结合,利用未优化的分段引发剂探针组观察到低信噪比,从而导致扩增的背景的产生。用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针(方案E),甚至使用未优化的分段引发剂探针组,也实现了高信噪比;在样品中非特异性结合的探针不共定位HCR引发剂的两个半部,并且因此不触发HCR信号扩增,避免产生扩增的背景。方案A使用包含12个非结构化探针的探针组,每个探针包含用于靶mRNA的不同子序列的靶结合位点。方案E使用包含12个探针对的分段引发剂探针组;这些12对将相同的靶子序列寻址为用于方案A的12个探针。来自GEISHA(Darnell,D.K.,Kaur,S.,Stanislaw,S.,Davey,S.,Konieczka,J.H.,Yatskievych,T.A.和Antin,P.B.(2007)。GEISHA:An In situ hybridization gene expression resource for the chicken embryo.Cytogenet.Genome Res.117:30-35)的参考成像。

实施例2-使用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的HCR的协同引发

[0580] 使用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的HCR的协同引发(方案E)(图7)。(a)靶

介导的分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的共定位(方案E)。分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针P1和P2各自携带HCR引发剂I1的半部。P1和P2对靶mRNA的选择性结合共定位HCR引发剂I1的两个半部,从而允许HCR扩增级联的协同引发。

[0581] (b) 使用分裂引发剂探针P1和P2的HCR的协同引发的体外验证(方案E)。反应条件:各自为0.5 μ M的发夹H1和H2(泳道1-7);各自为5nM的寡核苷酸I1、P1、P2和/或靶(如凝胶上注明的泳道);5SSCT缓冲液;在室温下过夜反应。用Alexa647荧光团标记的发夹H1和H2。用SYBR Gold预染色的dsDNA 1kb梯状条带。泳道1:亚稳态发夹H1和H2在不存在HCR引发剂I1的情况下展现出它们的动力学捕获状态的最小泄漏。泳道2:在存在HCR引发剂I1(I1作为寡核苷酸)的情况下,HCR发夹单体H1和H2全转化为扩增聚合物。泳道3:在存在靶和分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针P1和P2二者的情况下,发夹H1和H2至聚合物的强转化,证明HCR的协同引发。泳道4-6:在存在探针P1、探针P2或探针P1和P2二者的情况下,将HCR发夹单体H1和H2最小转化(minimal conversion)至聚合物,证明活性背景抑制。泳道7:在单独靶的存在下,HCR发夹单体H1和H2最小转化至聚合物。

[0582] (c) 对图c中的聚合物条带的定量。使用Multi Gauge软件(Fuji Photo Film)计算用于泳道1-7的聚合物条带周围的Alexa647强度分布。每个强度分布显示为凝胶迁移距离的 ± 3 mm,其中峰值以0为中心。使用Multi Gauge利用信号和背景的自动检测来计算定量百分比;将计算的数值归一化为泳道2的测量的值。

[0583] 图7b的凝胶研究证明了使用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的HCR的协同引发(方案E)。泳道1显示在不存在HCR引发剂I1的情况下,发夹H1和H2在其动力学捕获状态中存在最小泄漏。作为阳性对照,泳道2证明了在存在全HCR引发剂I1的情况下,亚稳态HCR发夹单体H1和H2至聚合物的转化(其中I1是单寡核苷酸)。

[0584] 利用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针,如果靶与分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针P1和P2一起存在,则观察到亚稳态HCR发夹单体H1和H2至聚合物的强转化。然而,如果单独存在P1或P2(泳道4和5),或者如果P1或P2一起存在但不存在靶(泳道6),则观察到至聚合物的最小转化。

[0585] 这些结果证明了分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的活性背景抑制性质(方案E):不经由选择性杂交共定位至靶的探针主要不触发HCR扩增。在不存在靶的情况下,即使P1和P2二者存在于溶液中(泳道6)它们也不触发HCR的事实,表明即使在不存在洗涤的情况下,分段引发剂探针提供自动的背景抑制。

实施例3-标准探针和分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的性能的比较

[0586] 图9比较了标准探针(也称为引发剂标记的探针)(方案A)和分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针(方案E)的性能,因探针组的尺寸被增加以用于整装鸡胚胎中的mRNA靶的成像。对于具有标准探针的测试,使用5个探针的优化的探针组,并且然后用另外的未优化的探针扩增这些探针以形成10个探针和20个探针的探针组。对于具有分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的测试,探针组与5、10和20个探针对一起使用,其中每个探针对靶向与相对应的标准探针大约相同的结合位点。使用标准探针,增加探针组尺寸导致背景的显著提高(图a),以及由于样品内另外的探针的一些子集非特异性地结合的结果导致的信噪比的相应减小。

[0587] 这些数据说明了使用标准探针(也称为引发剂标记的探针)(方案A)的探针组优化

的重要性,所述标准探针不提供活性背景抑制:如果探针组中存在任何不良探针,它们将通过生成扩增的背景来降低性能。相反,使用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针(方案E),当探针对的数目从5提高至10至20,背景保持大约恒定(图a)并且信噪比单调增加(图b)。

[0588] 这些数据说明了使用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的自动背景抑制的显著益处:即使在分段引发剂探针组中存在不良探针,它们不产生扩增的背景,使其通过提高探针数量而不执行探针组优化,直接提高信噪比。在图c中示出了使用具有20个探针(标准探针)或20个探针对(分段引发剂(分裂引发剂)探针)的探针组的代表性图像。这些图像的代表性像素强度分布在图d中示出。用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针,背景和信号+背景的像素强度分布主要是不重叠的。

[0589] 以下针对图9稍微更详细地提供,图9呈现了使用标准探针(也称为引发剂标记的探针)(方案A)和分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针(方案E)的背景和信噪比。(a)使用具有5、10或20个探针(标准探针)相对5、10或20个探针对(分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针)的探针组的荧光背景。未优化的标准探针导致非特异性探针结合,引起扩增的背景的产生。在样品中非特异性结合的未优化的分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针不共定位HCR引发剂的两个半部,并且因此不触发HCR信号扩增,避免扩增的背景的产生。(b)图a的探针组的信噪比。具有活性背景抑制的分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针在信噪比测量中优于未优化的标准探针。(c)固定的整装鸡胚的神经嵴中的共聚焦显微照片。探针组:用于方案A的标准探针的20个探针,用于方案E的分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的20个探针对。(d)用于信号+背景的像素强度直方图(图c中具有实线边界的像素)和背景(图c中的虚线边界内的像素)。对于每个图像,实线和虚线边界内的像素的总数是相同的。固定的胚胎:阶段HH10。靶:Sox10。

实施例4-使用未优化的分段引发剂探针以高信噪比对整装鸡胚中的四个靶mRNA的成像

[0590] 图10证明了使用未优化的分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针(方案E)以高信噪比对整装鸡胚中的四个靶mRNA成像。

[0591] 由于分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的自动背景抑制性质,对于四个靶mRNA,信噪比在约25至60的范围内,而不执行任何探针组优化。

[0592] 图10.在没有探针组优化的情况下使用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针(方案E)在固定的整装鸡胚中以高信噪比进行mRNA表达的多重成像。(a)四种靶mRNA:FoxD3、EphA4、Sox10、Dmbx1的表达示意图。(b)在头部和神经嵴中的四通道共聚焦显微照片。(c)图b被描绘的区的变焦(zoom)。(b)具有信噪比测量的来自图c的四个单独的通道。探针组:每靶12-20对未优化的分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针。扩增器:携带光谱上不同的荧光团(每靶一个HCR扩增器)的四个正交的HCR扩增器。固定的胚胎:阶段HH10。

实施例5-使用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针用于以亚细胞分辨率定量分析mRNA表达的原位HCR

[0593] 图11证明了使用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的原位HCR允许在整装鸡胚内以亚细胞分辨率定量分析mRNA表达。

[0594] 使用两个分段引发剂探针组冗余检测每个靶mRNA,所述两个分段引发剂探针组各自触发不同的光谱上不同的HCR扩增器。绘制归一化体素强度的2通道散射图导致具有近似

零截距的紧密线性关系,这指示HCR信号与每成像体素的靶mRNA的数量呈线性变化。随着分布变得线性和截距消失,准确度提高;随着散射变得更紧密,精确度提高。 $2 \times 2 \mu\text{m}$ 体素提供亚细胞分辨率。

[0595] 这些结果证明了用分段引发剂(也称为分裂引发剂)探针的原位HCR允许在解剖环境中以亚细胞分辨率准确且精确的相对定量mRNA表达,而无需探针组优化。

[0596] 图11.在固定的整装鸡胚中,以亚细胞分辨率对mRNA表达定量成像。(a)靶mRNA的两通道冗余检测。靶:Dmbx1和EphA4。共聚焦显微镜: $0.2 \times 0.2 \mu\text{m}$ 像素。探针组:对于每个靶每通道20对分段引发剂(也称为分离引发剂)探针。扩增器:两个携带用于每个靶的光谱上不同的荧光团的正交的HCR扩增器。固定的胚胎:阶段HH10。(b)对于图b的所选区中的 $2 \times 2 \mu\text{m}$ 体素高度相关的归一化信号(皮尔逊相关系数,r)。

实施例6-与HCR发夹的重叠区互补的分段引发剂探针同与HCR发夹的非重叠区互补的分段型引发剂探针的性能比较

[0597] 图24的凝胶研究将与HCR发夹H1的重叠区互补的分段引发剂探针(例如,图21)同与HCR发夹H1的非重叠区互补的分段引发剂探针(例如,图7a)的性能进行比较。

[0598] 反应条件:每个为 $0.6 \mu\text{M}$ 的发夹H1和H2(泳道1-11);每个为 6nM 的低聚物I1、P1、P2和/或靶(如在凝胶上所注明的);5SSCT缓冲液;在室温下过夜反应。用Alexa 647荧光团标记的发夹H1和H2。泳道1:在不存在HCR引发剂I1的情况下亚稳态发夹H1和H2展现出它们的动力学捕获状态的最小泄漏;泳道2:在存在HCR引发剂I1的情况下HCR发夹单体H1和H2转化至扩增聚合物;泳道3:在存在单独靶的情况下HCR发夹单体H1和H2最小转化至聚合物。泳道4-6、8-10:在存在探针P1、探针P2或探针P1和P2的情况下,HCR发夹单体H1和H2最小转化至聚合物,证明了使用与HCR发夹H1的非重叠(泳道4-6)或重叠(泳道8-10)区互补的分段引发剂探针的活性背景抑制。泳道7和11:在存在靶和与HCR发夹H1的非重叠(泳道7)或重叠(泳道11)区互补的探针P1和P2二者的情况下发夹H1和H2转化至聚合物。

[0599] 聚合物条带的定量。使用MATLAB计算对于泳道1-11的聚合物条带周围的Alexa 647强度分布。每个强度分布显示为凝胶迁移距离 $\pm 3.3 \text{mm}$,其中峰值以0为中心。以信号和背景的自动检测使用MATLAB计算定量百分比;将所计算的数值归一化为泳道2的测量值。

[0600] 这些结果证明了在存在靶和与HCR发夹H1的重叠区互补的探针P1和P2的情况下发夹H1和H2至聚合物的转化(泳道11;85.6%转化至聚合物),强于在存在与HCR发夹H1的非重叠区互补的探针P1和P2的情况下的转化(泳道7;54.7%转化至聚合物)。分段引发剂探针的活性背景抑制性质对于两种探针类型保持相当。

实施例7-使用辅助链的从HCR扩增聚合物中去杂交HCR发夹

[0601] 图25A描绘了使用辅助链(例如,参见图23F)从HCR扩增聚合物中去杂交HCR发夹的体外验证。反应条件:每个为 $0.6 \mu\text{M}$ 的发夹H1和H2(泳道1-5);为 $0.6 \mu\text{M}$ (泳道2)、 60nM (泳道3)和 6nM (泳道4和5)的HCR引发剂I1;在 $6 \mu\text{M}$ 的辅助链(泳道5);5SSCT缓冲液;在室温下过夜HCR扩增;在室温下1小时辅助链孵育。用Alexa 647荧光团标记的发夹H1和H2。泳道1:亚稳态发夹H1和H2在不存在HCR引发剂I1的情况下表现出最小的泄漏。泳道2:在等摩尔HCR引发剂I1浓度下短HCR扩增聚合物的形成。泳道3和4:在较低的HCR引发剂浓度下更长的HCR扩增聚合物的形成。泳道5:使用辅助链从HCR扩增聚合物中去杂交发夹,得到由H1、H2和辅助链组成的聚合物片段。

[0602] 用于从HCR扩增聚合物去杂交HCR发夹的序列的一些实施方式(例如,图25A)在下表2中示出。该序列可用于本文方法的任何实施方式。

表2

发夹 H1 包含用于辅助链成核的 toehold	5'- CGGGTTAAAGTTGAGTGGAGATATAGAGGCAGGGACAA AGTCTAATCCGTCCTGCCTCTATATCTCCACTCTATCAT- 3' (SEQ ID NO: 1)
发夹 H2	5'- GTCCCTGCCTCTATATCTCCACTCAACTTTAACCCGGAGT GGAGATATAGAGGCAGGGACGGATTAGACTTT-3' (SEQ ID NO: 2)
引发剂 I1	5'-GTCCCTGCCTCTATATCTCCACTCAACTTTAACCCG-3' (SEQ ID NO: 3)
辅助链	5'- ATGATAGAGTGGAGATATAGAGGCAGGGACGGATTAGA CTTT-3' (SEQ ID NO: 4)

[0603] 图25B显示了使用重复的报告物检测在载玻片上的FFPE培养的人细胞(hek 293)小球中的3个靶mRNA的成像(参见图23F和26G)。靶mRNA:GAPDH、ACTB、U6。在检测阶段中同时引入用于所有三个靶的探针组。在第一轮扩增中,使用标记有光谱上不同的荧光团的扩增器仅检测GAPDH和ACTB(扩增器1标记有报告物1(Alexa647)用于GAPDH,扩增器2标记有报告物2(Alexa546)用于ACTB)。仅用于GAPDH的扩增器1包含用于辅助链成核的toehold。在图像采集之后,将样品与扩增器1辅助链在室温下孵育1小时,以使Alexa647标记的发夹从拴系至GAPDH mRNA的扩增聚合物去杂交;将所得聚合物片段从样品中洗涤。在第二轮扩增中,使用标记有与GAPDH相同的报告物的不同HCR扩增器(扩增器3标记有报告物1(Alexa647))用于U6信号扩增。

[0604] 通过添加扩增器1辅助链,随后洗涤并被第二轮成像中的U6的核报告器1(Alexa 647)信号代替,图像证明了用于GAPDH的胞质报告物1(Alexa 647)信号被完全去除。ACTB信号强度在成像轮之间保持相当(扩增器2标记有报告物2(Alexa546))。

实施例8-协同探针连接的优化以增强分段引发剂HCR抑制和转化

[0605] 图28证明了协同探针连接以增强分段引发剂HCR抑制(关状态)和转化(开状态)。在图28A中,分段引发剂探针p1和p2与HCR发夹h1的重叠区互补(每个包含与h1中的结构域u和v互补的结构域u*和v*),以使连接能够松弛为能量上有利的构象。在图28B中,使用具有不同重叠度的探针(u*=0、1或2个核苷酸,v*=0、1或2个核苷酸)通过琼脂糖凝胶分析泄漏(关状态)。关状态的特征在于通过单独的探针p1或p2测试HCR引发(图28B左侧),和定量凝胶中得到的聚合条带(图28B右侧)。在图28C中,使用具有不同程度的重叠(u*=0、1或2个核苷酸,v*=0、1或2个核苷酸)的探针通过琼脂糖凝胶分析转化(开状态)。开状态的特征在于通过探针p1和p2加靶测试HCR引发(图28C左侧),并且定量凝胶中的所得聚合条带(图28C右侧)。图28的反应条件是发夹h1和h2每个为500nM用于关状态,并且每个为60nM用于开状态(所有通道);在0.01x发夹浓度下引发剂i1、探针p1和p2和/DNA靶。

[0606] 测试不同的连接设计,产生具有干净的状态的探针p1和p2(分段引发剂HCR抑制 $\approx 0.5\%$ 的标准引发剂HCR抑制;图28B中的框)和强的开状态(分段引发剂HCR转化 $\approx 99\%$ 的标准引发剂HCR转化;图28C中的框)。这些结果表明用一对分段引发剂探针(v3.0)替换标准探针(v2.0)可设计成在没有显著降低扩增的信号(图28C中的泳道2相对于泳道6)的情况下显著地降低扩增的背景(图28B中的泳道2相对于泳道4和9)。对于该探针连接,结构域尺寸是 $u^*=0$ 个核苷酸和 $v^*=2$ 个核苷酸,对应于与重叠2个核苷酸的HCR发夹h1中的结合位点杂交的探针单元内的分段引发剂。

实施例9-蛋白质靶的多重免疫组织化学(IHC)HCR成像

[0607] 图29和图30证明了在福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)的小鼠脑部片段中蛋白质靶的多重免疫组织化学(IHC)HCR成像。图

[0608] 图29采用引发剂标记的一抗探针。图29A展示由蛋白质检测阶段(引发剂标记的一抗探针结合至蛋白质靶;洗涤)和扩增阶段(引发剂触发荧光团标记的HCR发夹自组装到拴系的荧光扩增聚合物中;洗涤)组成的2阶段IHC方案。图29B展示多重时间线,其中使用相同的2阶段方案,与靶蛋白的数目无关。图29C展示FFPE小鼠脑切片(四个靶蛋白:TH、GFAP、MBP、MAP2)的四通道表观荧光显微照片,并且图29D展示了图29C的描绘的区的变焦。图29的方法优点在于:使用引发剂标记的一抗可实现高水平的多重分析,其中针对不同蛋白质靶的抗体探针同时携带在样品中独立操作的正交的HCR引发剂。不需要将一抗在不同的生物体中升高,为不同靶建立一抗的大文库提供了灵活性。

[0609] 图30采用未标记的一抗探针和引发剂标记的二抗探针。图30A展示由蛋白质检测阶段(未标记的一抗探针结合至蛋白质靶;洗涤;引发剂标记的二抗探针结合至一抗探针;洗涤)和扩增阶段(引发剂触发荧光团标记的HCR发夹自组装到拴系的荧光扩增聚合物中;洗涤)组成的2阶段IHC方案。图30B展示多重时间线,其中使用相同的2阶段方案,与靶蛋白的数目无关。FFPE小鼠脑切片中的4-plex IHC。图30C展示FFPE小鼠脑切片(四个靶蛋白:TH、GFAP、PVALB、MBP)的四通道表观荧光显微照片,并且图30D展示了图30C的描绘的区的变焦。

[0610] 图30的方法具有以下优点:可使用未标记的一抗而无需修饰,使得能够使用验证的引发剂标记的二抗的文库,其中不同的二抗同时携带在样品中独立地操作的正交的HCR引发剂。用该方法,一抗必须在不同的生物体中升高,使得仅一种类型的引发剂标记的二抗检测到每个一抗。

实施例10-以亚细胞分辨率通过HCR IHC的蛋白质表达的定量分析

[0611] 图41表明,HCR IHC允许在解剖学环境中以亚细胞分辨率定量分析蛋白质表达。使用两个引发剂标记的一抗探针冗余地检测每个靶蛋白,所述两个引发剂标记的一抗探针各自触发不同的光谱上不同的HCR扩增器。绘制归一化的体素强度的2通道散射图导致具有近似零的截距的紧密线性关系,指示HCR信号与每个成像体素的靶蛋白的数量呈线性变化。

[0612] 图41A示出了靶蛋白的2通道冗余检测。使用结合不同表位的两个引发剂标记的一抗探针来检测靶蛋白,每个探针引发正交的光谱上不同的HCR扩增器(Ch1:Alexa 546,Ch2:Alexa 647)。图41B展示FFPE小鼠脑切片的表观荧光显微照片。图41C展示图41B的框出的区中的亚细胞 $2 \times 2 \mu\text{m}$ 体素的高度相关的归一化信号(皮尔逊相关系数, r)。在该散射图中,准确度与具有零截距的线性度相对应,并且精确度与围绕线的散射相对应。 $2 \times 2 \mu\text{m}$ 体素提供

亚细胞分辨率。

[0613] 这些结果证明,HCR IHC允许在解剖学环境中以亚细胞分辨率准确且精确的相对定量蛋白表达。

实施例11-同时具有针对所有mRNA和蛋白质靶的HCR信号扩增的多重HCR RNA-ISH和HCR IHC

[0614] 图31和图32展示了具有同时对所有mRNA和蛋白质靶进行的HCR信号扩增的多重HCR RNA-ISH和HCR IHC。

[0615] 图31证明了使用引发剂标记的一抗探针和分段引发剂DNA探针的多重HCR IHC+RNA-ISH。图31A展示由以下组成的3阶段IHC+ISH方案:蛋白质检测阶段(引发剂标记的一抗探针结合至蛋白质靶;洗涤)、RNA检测阶段(分段引发剂DNA探针结合至RNA靶;洗涤)和扩增阶段(引发剂触发荧光团标记的HCR发夹自组装到拴系的荧光扩增聚合物中;洗涤)。独立于靶蛋白和靶RNA的数目使用相同的3阶段方案。图31B展示FFPE小鼠脑切片的四通道表观荧光显微照片(两个靶蛋白(TH、MBP)和两个靶mRNA(Prkca、Slc17a7)),并且图31C展示图31B的描绘的区的变焦。

[0616] 图32证明使用未标记的一抗探针、引发剂标记的二级抗体探针和分段引发剂DNA探针的多重HCR IHC+RNA-ISH。图32A展示由以下组成的3阶段IHC+ISH方案:蛋白质检测级(未标记的一抗探针结合至蛋白质靶;洗涤;引发剂标记的二抗探针结合至一抗探针;洗涤);RNA检测阶段(分段引发剂DNA探针结合至RNA靶;洗涤)和扩增阶段(引发剂触发荧光团标记的HCR发夹自组装到拴系的荧光扩增聚合物中;洗涤)。独立于靶蛋白和靶RNA的数目使用相同的3阶段方案。图32B展示了FFPE小鼠脑切片的四通道表观荧光显微照片(两个靶蛋白(TH、MBP)和两个靶mRNA(Prkca、Slc17a7)),和图32C展示了图32B描绘的区的变焦。

实施例12-HCR介导的CARD RNA-ISH

[0617] 图37展示了FFPE小鼠肝和肾切片中的HCR介导的CARD RNA-ISH。图37A展示了总结HCR介导的CARD RNA-ISH方案的示意图,包含:使用包含多个探针单元(每个探针单元包含两个HCR分段引发剂探针)的探针组检测RNA靶,使用标记有荧光团Alexa488为半抗原的发夹h1和h2的HCR信号扩增,使用标记有聚合物HRP酶的抗Alexa488抗体结合至半抗原,提供通过HRP在HCR扩增聚合物附近催化沉积为报告物的CARD底物DAB。图37B(左图)描绘了FFPE小鼠肾和肝切片中GAPDH mRNA表达的明场显微镜;在不存在探针的情况下,不存在染色(右图)。

实施例13-利用引发剂标记的探针的多重microRNA和mRNA RNA-ISH

[0618] 图43证明了使用引发剂标记的探针的多重microRNA和mRNA RNA-ISH。使用包含2' OMe-RNA靶结合结构域和DNA引发剂的引发剂标记的探针检测microRNA靶(图43A)。使用包含DNA靶结合结构域和两个DNA引发剂(一个位于靶结合结构域每个末端处;图43A)的引发剂标记的探针检测mRNA靶。对两类靶RNA(microRNA和mRNA)同时进行HCR信号扩增,实现整装斑马鱼胚胎的高信噪比。图43B描绘了用于三个靶microRNA(miR-9、miR-96、miR-206)和一个靶mRNA(hbae3)的表达图谱。在受精后72小时将胚胎固定,并通过共聚焦显微镜成像(图43C)。

实施例14-使用屏蔽的引发剂标记的抗体探针降低背景

[0619] 图45证明了在整装斑马鱼胚胎中,与引发剂标记的抗体探针而无对HCR IHC屏蔽

相比,使用屏蔽的引发剂标记的抗体探针的背景的降低。在任一种情况下,用未标记的一抗检测的靶蛋白Desmin,其又与引发剂标记的二抗(图45A)或屏蔽的引发剂标记的二级抗体(图45B)结合,其中引发剂通过与引发剂碱基配对被部分地屏蔽。与引发剂标记的探针相比,使用屏蔽的引发剂标记的探针观察到降低的背景,说明屏蔽探针上的引发剂可用于减少非特异性结合。在受精后27小时后固定胚胎,并通过共焦显微术成像。

实施例15-较用重复的报告物检测(方法A)的多重分析(其可任选地进一步由CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0620] 本实施例概述了图26A中的工艺。步骤A1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤A2:固定样品;步骤A3:任选地透化样品;步骤A4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3,4,5和17的探针单元)。步骤A5:洗涤样品;步骤A6:提供标记有报告物的HCR扩增器(例如,参见图8和图18的报告物标记的扩增器);步骤A7:洗涤样品;步骤A8:检测来自报告物的信号。

实施例16-使用重复的报告物检测(方法B)的多重分析(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD进行修饰)

[0621] 本实施例概述了图26B中的过程。步骤B1:提供可能含有达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤B2:任选地固定样品。步骤B3:任选地透化样品。步骤B4:提供N个探针组,每个探针组包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如参见图8和16的探针组),每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元)。步骤B5:任选地洗涤样品。步骤B6:提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的HCR扩增器)。步骤B7:任选地洗涤样品。步骤B8:检测来自N个不同的报告物的N个信号。

实施例17-使用重复的报告物检测(方法C)的多重分析(其可任选地进一步由CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0622] 本实施例概述了图26C中的工艺。步骤C1:提供可能含有达至N个靶以及可能含有不是靶的其他分子的样品。步骤C2:任选地固定样品。步骤C3:任选地透化样品。步骤C4:提供探针组(靶向N个靶类型的一个),其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如参见图8和16的探针组),每个探针单元包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3,4,5和17的探针单元)。步骤C5:任选地洗涤样品。步骤C6:提供与所提供的探针相对应的HCR扩增器(标记有报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的HCR扩增器)。步骤C7:任选地洗涤样品。步骤C8:检测来自报告物的信号。步骤C9:从样品中去除信号(例如,参见图23)。步骤C10:任选地重复步骤C4-C9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

实施例18-较用重复的报告物检测(方法D)的多重分析(其可任选地进一步由CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0623] 本实施例概述了图26D中的过程。步骤D1:提供可能含有达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤D2:任选地固定样品。步骤D3:任选地透化样品。步骤D4:提

供M个探针组(对于 $M \leq N$;每个靶向M个靶类型的一个),每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元)。步骤D5:任选地洗涤样品。步骤D6:提供与M个探针组相对应的M个HCR扩增器(每个标记有不同的报告物)(例如,参见图8和18的报告标记的HCR扩增器)。步骤D7:任选地洗涤样品。步骤D8:检测与M个不同的报告物相对应的M个信号。步骤D10:从样品中去除M个信号(例如,参见图23)。步骤D11:任选地重复步骤4-9中的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

实施例19-使用重复的报告物检测(方法E)的多重分析(其可任选地进一步由CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0624] 本实施例概述了图26E中的过程。步骤E1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤E2:任选地固定样品。步骤E3:任选地透化样品。步骤E4:提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元)。步骤E5:任选地洗涤样品。步骤E6:提供与探针组的一个相对应的HCR扩增器(标记有报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的扩增器)。步骤E7:任选地洗涤样品。步骤E8:检测来自报告物的信号。步骤E9:从样品中去除信号(例如,参见图23)。步骤E10:任选地重复步骤6-9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

实施例20-使用重复的报告物检测(方法F)的多重分析(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0625] 本实施例概述了图26F中的过程。步骤F1:提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤F2:任选地固定样品。步骤F3:任选地透化样品。步骤F4:提供N个探针组(每个靶向N个靶类型的一个),每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元)。步骤F5:任选地洗涤样品。步骤F6:提供与N个探针组的M个相对应的M个HCR扩增器(对于 $M \leq N$;每个标记有不同的报告物)(例如,参见图8和18的报告物标记的扩增器)。步骤F7:任选地洗涤样品。步骤F8:检测与M个报告物相对应的M个信号。步骤F9:从样品中去除M个信号(例如,参见图23)。步骤F10:任选地重复步骤6-9的一个或多个,直到已对所有N个靶执行信号检测。

实施例21-使用重复的报告物检测(方法G)的多重分析(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0626] 本实施例概述了图26G中的工艺。步骤G1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤G2:任选地固定样品。步骤G3:任选地透化样品。步骤G4:提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元)。步骤G5:任选地洗涤样品。步骤G6:提供一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多

个报告物) (例如, 参见图8和18的报告物标记的HCR扩增器)。步骤G7: 任选地洗涤样品。步骤G8: 检测来自一个或多个报告物的一个或多个信号。步骤G9: 任选地从样品中去除一个或多个探针组。步骤G10: 任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器。步骤G11: 任选地从样品中除去一个或多个报告物。步骤G12: 任选地从样品中去除一个或多个信号(例如, 参见图23)。步骤G13: 任选地以任意顺序重复步骤2-12的任一个一次或多次。

实施例22-使用重复的报告物检测(方法H)进行多重分析(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD进行修饰)

[0627] 本实施例概述了图26H中的过程。步骤H1: 提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤H2: 任选地固定样品。步骤H3: 任选地透化样品。步骤H4: 提供探针组, 其包含以下二者其一: a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如, 参见图39A-39N, 41A, 42A-42F和43A的探针), 或b) 一个或多个探针单元(例如, 参见图8和16的探针组), 每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如, 参见图3、4、5和17的探针单元)。步骤H5: 任选地洗涤样品。步骤H6: 提供标记有底物的HCR扩增器(例如, 参见图18的底物标记的HCR扩增器)。步骤H7: 任选地洗涤样品。步骤H8: 提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如, 参见图20的标签探针)。步骤H9: 任选地洗涤样品。步骤H10: 检测来自报告物的信号。

实施例23-使用重复的报告物检测(方法I)的多重分析(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0628] 本实施例概述了图26I中的过程。步骤I1: 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤I2: 任选地固定样品。步骤I3: 任选地透化样品。步骤I4: 提供N个探针组, 每个包含以下二者其一: a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如, 参见图39A-39N, 41A, 42A-42F和43A的探针), 或b) 一个或多个探针单元(例如, 参见图8和16的探针组), 每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如, 参见图3、4、5和17的探针单元)。步骤I5: 任选地洗涤样品。步骤I6: 提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的底物)(例如, 参见图18的底物标记的HCR扩增器)。步骤I7: 任选地洗涤样品。步骤I8: 提供与N个不同的底物相对应的N个标签探针(每个缀合至不同的报告物)(例如, 参见图20的标签探针)。步骤I9: 检测来自N个不同的报告物的N个信号。

实施例24-使用重复的报告物检测(方法J)进行多重分析(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0629] 本实施例概述了图26j中的工艺。步骤J1: 提供可能包含达至N个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤J2: 任选地固定样品。步骤J3: 任选地透化样品。步骤J4: 提供N个探针组, 每个包含以下二者其一: a) 一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如, 参见图39A-39N, 41A, 42A-42F和43A的探针), 或b) 一个或多个探针单元(例如, 参见图8和16的探针组), 每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如, 参见图3、4、5和17的探针单元)。步骤J5: 任选地洗涤样品。步骤J6: 提供与N个探针组相对应的N个HCR扩增器(每个标记有不同的底物)(例如, 参见图18的底物标记的HCR扩增器)。步骤J7: 任选地洗涤样品。步骤J8: 提供与N个不同的底物的M个相对应的M个标签探针(对于 $M \leq N$; 每个缀合至不同的报告物)(例如, 参见图20的标签探针)。步骤J9: 任选地洗涤样品。步骤J10: 检测与M个不同报告物相对应的M个信号。步骤J11: 从样品中去除M个信号(例如, 参见图23)。步骤J12: 任选地重复步骤J8-J11中的一个或多个, 直到已对所有N个靶执行信号检测。

实施例25-使用重复的报告物检测(方法K)的多重分析(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0630] 本实施例概述了图26K中的工艺。步骤K1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤K2:任选地固定样品。步骤K3:任选地透化样品。步骤K4:提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N,41A,42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元)。步骤K5:任选地洗涤样品。步骤K6:提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有底物)(例如,参见图18的底物标记的HCR扩增器)。步骤K7:任选地洗涤样品。步骤K8:提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针)。步骤K9:任选地洗涤样品。步骤K10:检测与一个或多个报告物相对应的一个或多个信号。步骤K11:从样品中去除一个或多个信号(例如,参见图23)。步骤K12:任选地以任意顺序重复步骤K4-K11中的任一个一次或多次。

实施例26-使用重复的报告物检测(方法L)的多重分析(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0631] 本实施例概述了图26L中的工艺。步骤L1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤L2:任选地固定样品。步骤L3:任选地透化样品。步骤L4:提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N,41A,42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元)。步骤L5:提供与一个或多个探针组相对应的一个或多个HCR扩增器(每个标记有一个或多个报告器和/或一个或多个底物)(例如,参见图8和图18的HCR扩增器)。步骤L6:任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物)(例如,参见图20的标签探针)。步骤L7:检测一个或多个信号。步骤L8:任选地洗涤样品。步骤L9:任选地从样品中去除一个或多个信号(例如,参见图23)。步骤L10:任选地从样品中去除一个或多个报告物。步骤L11:任选地从样品中去除一个或多个标签探针。步骤L12:任选地从样品中去除一个或多个HCR扩增器。步骤L13:任选地从样品中去除一个或多个探针组。步骤L14:任选地以任意顺序重复上述步骤中的任一个。

实施例27-使用重复的报告物检测(方法M)的多重分析(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0632] 本实施例概述了图26M中的工艺。步骤M1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤M2:任选地固定样品。步骤M3:任选地透化样品。步骤M4:以任意顺序执行步骤M5-M9的任一个一次或多次。步骤M5:提供一个或多个HCR探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N,41A,42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针(例如,参见图3、4、5和17的探针单元)。步骤M6:提供直接或间接地生成一个或多个信号的一个或多个HCR扩增器(例如,参见图8、18和20)。步骤M7:任选地洗涤样品。步骤M8:检测一个或多个信号。步骤M9:任选地去除一个或多个信号(例如,参见图23)。

实施例28-靶分析(方法N)(其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复够信号去除修饰)

[0633] 本实施例概述了图26N中的工艺。步骤N1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤N2:任选地固定样品。步骤N3:任选地透化样品。步骤N4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N,41A,42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点(例如,参见图22的探针单元)。步骤N5:任选地洗涤样品。步骤N6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器)。步骤N7:任选地洗涤样品。步骤N8:任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针)。步骤N9:任选地洗涤样品。步骤N10:检测来自报告物的信号。

实施例29-靶分析(方法O)(其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除修饰)

[0634] 本实施例概述了图26O中的方法,步骤O1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤O2:任选地固定样品。步骤O3:任选地透化样品。步骤O4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N,41A,42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点(例如,参见图21的探针单元)。步骤O5:任选地洗涤样品。步骤O6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器)。步骤O7:任选地洗涤样品。步骤O8:任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针)。步骤O9:任选地洗涤样品。步骤O10:检测来自报告物的信号。

实施例30-靶分析(方法P)(其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复报告检测和/或重复信号去除来修饰)

[0635] 本实施例概述了图26P中的工艺。步骤P1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤P2:任选地固定样品。步骤P3:任选地透化样品。步骤P4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N,41A,42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点,并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点(例如,参见图27的探针单元)。步骤P5:任选地洗涤样品。步骤P6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器)。步骤P7:任选地洗涤样品。步骤P8:任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针)。步骤P9:任选地洗涤样品。步骤P10:检测来自报告物的信号。

实施例31-靶分析(方法Q)(其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除修饰)

[0636] 本实施例概述了图26Q中的过程。步骤Q1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤Q2:任选地固定样品。步骤Q3:任选地透化样品。步骤Q4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N,41A、

42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的非重叠结合位点,并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠结合位点(例如,参见图21的探针单元)。步骤Q5:任选地洗涤样品。步骤Q6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器)。步骤Q7:任选地洗涤样品。步骤Q8:任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针)。步骤Q9:任选地洗涤样品。步骤Q10:检测来自报告物的信号。

实施例32-靶分析(方法R)(其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除修饰)

[0637] 本实施例概述了图26R中的工艺。步骤R1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤R2:任选地固定样品。步骤R3:任选地透化样品。步骤R4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的重叠结合位点,并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的非重叠结合位点(例如,参见图22的探针单元)。步骤R5:任选地洗涤样品。步骤R6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器)。步骤R6:任选地洗涤样品。步骤R8:任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针)。步骤R9:任选地洗涤样品。步骤R10:检测来自报告物的信号。

实施例33-靶分析(方法S)(其可任选地进一步通过多重分析、CARD、酶去活化、重复的CARD、重复的报告物检测和/或重复的信号去除修饰)

[0638] 本实施例概述了图26S中的过程。步骤S1:提供可能包含靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤S2:任选地固定样品。步骤S3:任选地透化样品。步骤S4:提供探针组,其包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元(例如,参见图8和16的探针组),每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶上的非重叠结合位点,并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的非重叠结合位点(例如,参见图3、4、5、17的探针单元)。步骤S5:任选地洗涤样品。步骤S6:提供标记有报告物和/或底物的HCR扩增器(例如,参见图8和18的HCR扩增器)。步骤S7:任选地洗涤样品。步骤S8:任选地提供与底物相对应的标签探针(缀合至报告物)(例如,参见图20的标签探针)。步骤S9:任选地洗涤样品。步骤S10:检测来自报告物的信号。

实施例34-使用重复的报告物检测(方法T)的多重分析(其可任选地进一步通过CARD、酶去活化和/或重复的CARD修饰)

[0639] 本实施例概述了图26T中的过程。步骤T1:提供可能包含一个或多个靶以及可能包含不是靶的其他分子的样品。步骤T2:任选地固定样品。步骤T3:任选地透化样品。步骤T4:提供一个或多个探针组,每个包含以下二者其一:a)一个或多个HCR引发剂标记的探针(例如,参见图39A-39N、41A、42A-42F和43A的探针),或b)一个或多个探针单元,每个包含两个或多个HCR分段引发剂探针,其中每个探针单元内的探针上的靶结合区被配置为结合至靶

上的重叠或非重叠结合位点,并且其中每个探针单元内的探针上的分段引发剂被配置为结合至HCR发夹上的重叠或非重叠结合位点(例如,参见图3、4、5、17、21、22、27的探针单元)。步骤T5:任选地洗涤样品。步骤T6:提供一个或多个HCR扩增器,每个HCR扩增器标记有一个或多个报告物和/或底物(例如,参见图8和图18的HCR扩增器)。步骤T7:任选地洗涤样品。步骤T8:任选地提供与一个或多个底物相对应的一个或多个标签探针(每个缀合至一个或多个报告物)(例如,参见图20的标签探针)。步骤T9:任选地洗涤样品。步骤T10:检测来自一个或多个报告物的信号。步骤T11:任选地从样品中去除一个或多个信号(例如,参见图23)。步骤T12:任选地从样品中去除一个或多个报告物。步骤T13:任选地从样品中去除一个或多个标签探针。步骤T14:任选地从样品中去除一个或多个扩增器。步骤T15:任选地从样品中去除一个或多个探针组。步骤T16:任选地以任意顺序重复上述步骤中的任一个。

[0640] 尽管已根据某些优选实施方式描述了前述发明,但是其他实施方式对于本领域普通技术人员而言将是显而易见的。另外,鉴于本文的公开内容,其他组合、省略、替换和修饰对于本领域技术人员而言将是显而易见的。因此,本发明不旨在受优选实施方式的叙述的限制,而是通过提及所附的权利要求来限定。本文引用的所有参考文献以其整体通过引用并入。

[0641] 在本文中呈现的描述中使用的术语不旨在以任何限制或限制性的方式解释,并且除非另有说明,否则是指本领域普通技术人员在考虑说明书时将理解的普通含义。此外,实施方式可包含若干新颖特征、由若干新颖特征组成、基本上由若干新颖特征组成,其中没有单个特征单独负责其期望的属性,或者被认为对实践本文中所描述的实施方式是必不可少的。如本文所用,章节标题仅用于组织目的,并且不应被解释为以任何方式限制所描述的主题。在本申请中引用的所有文献和类似材料,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、论文和互联网网页通过引用以其整体被明确地并入以用于任何目的。当并入的参考文献中的术语的定义似乎与本教导中提供的定义不同时,本教导中提供的定义应为主。应当理解,在本教导中讨论的温度、浓度、时间等之前存在隐含的“约”,使得轻微和非实质的偏差在本文的教导的范围内。

[0642] 尽管本公开在某些实施方式和实施例的上下文中,但是本领域普通技术人员将理解,本公开延伸超过具体公开的实施方式至其他可选实施方式和/或实施方式的用途以及其明显修改和等同物。此外,虽然已详细地示出和描述了实施方式的若干变型,但是基于本公开,在本公开的范围内的其他修饰对于本领域普通技术人员将是显而易见的。还设想,可以进行实施方式的特定特征和方面的各种组合或子组合,并且仍然落入本公开的范围。应当理解,所公开的实施方式的各种特征和方面可彼此组合或替代,以便形成本公开的不同模式或实施方式。因此,本文中公开的本公开的范围旨在不受上述特定公开的实施方式的限制。

REFERENCES

1.Gall JG&Pardue ML(1969)Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations.Proc Natl Acad Sci USA 63:378-383.

2.Cox KH,Deleon DV,Angerer LM,&Angerer RC(1984)Detection of mRNAs in Sea Urchin Embryos by Insitu Hybridization Using Asymmetric RNA Probes.Dev Biol101(2):485-502.

3. Tautz D & Pfeifle C (1989) A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98:81-85.
4. Rosen B & Beddington RSP (1993) Whole-Mount In situ Hybridization in the Mouse Embryo: Gene-Expression in three Dimensions. *Trends Genet* 9 (5):162-166.
5. Wallner G, Amann R, & Beisker W (1993) Optimizing Fluorescent In situ Hybridization with rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms. *Cytometry* 14 (2):136-143.
6. Nieto MA, Patel K, & Wilkinson DG (1996) In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Methods Cell Biol*, (Academic Press), Vol 51, PP 219-235.
7. Thisse C & Thisse B (2008) High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* 3 (1):59-69.
8. Kislauskis EH, Li Z, Singer RH, & Taneja KL (1993) Isoform-Specific 3'-Untranslated Sequences Sort α -Cardiac and β -Cytoplasmic Actin Messenger RNAs to Different Cytoplasmic Compartments. *J Cell Biol* 123 (1):165-172.
9. Femino A, Fay FS, Fogarty K, & Singer RH (1998) Visualization of Single RNA Transcripts In Situ. *Science* 280 (5363):585-590.
10. Levsky JM, Shenoy SM, Pezo RC, & Singer RH (2002) Single-Cell Gene Expression Profiling. *Science* 297:836-840.
11. Kosman D, et al. (2004) Multiplex Detection of RNA Expression in *Drosophila* Embryos. *Science* 305:846.
12. Capodiceci P, et al. (2005) Gene Expression Profiling in Single Cells within Tissue. *Nat Methods* 2 (9):663-665.
13. Chan PM, Yuen T, Ruf F, Gonzalez-Maeso J, & Sealfon SC (2005) Method for Multiplex Cellular Detection of mRNAs Using Quantum Dot Fluorescent In Situ Hybridization. *Nucleic Acids Res* 33 (18):e 161.
14. Raj A, van den Bogaard P, Rifkin SA, van Oudenaarden A, & Tyagi S (2008) Imaging Individual mRNA Molecules Using Multiple Singly Labeled Probes. *Nat Methods* 5 (10):877-879.
15. Harland RM (1991) In Situ Hybridization: An Improved Whole-Mount Method for *Xenopus* Embryos. *Methods Cell Biol* 36:685-695.
16. Lehmann R & Tautz D (1994) In Situ Hybridization to RNA. *Methods Cell Biol*, (Academic Press), Vol 44, pp 575-598.
17. Kerstens HMJ, Poddighe PJ, & Hanselaar AGJM (1995) A Novel in-Situ Hybridization Signal Amplification Method Based on the Deposition of Biotinylated Tyramine. *J Histochem Cytochem* 43 (4):347-352.
18. Wiedorn KH, Kuhl H, Galle J, Caselitz J, & Vollmer E (1999) Comparison of In-Situ Hybridization, Direct and Indirect In-Situ PCR as well as Tyramide

Signal Amplification for the Detection of HPV. *Histochem Cell Biol* 111:89-95.

19. Player AN, Shen LP, Kenny D, Antao VP, & Kolberg JA (2001) Single-Copy Gene Detection Using Branched DNA (bdNA) In Situ Hybridization. *J Histochem Cytochem* 49(5):603-611.

20. Pernthaler A, Pernthaler J, & Amann R (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68(6):3094-3101.

21. Thisse B, et al. (2004) Spatial and Temporal Expression of the Zebrafish Genome by Large-Scale In Situ Hybridization Screening. *The Zebrafish: 2nd Edition Genetics Genomics and Informatics, Methods in Cell Biology*, eds Detrich III HWD, Zon LI, & Westerfield M (Elsevier Academic Press, San Diego, CA), Vol 77, pp 505-519.

22. Denkers N, Garcia-Villalba P, Rodesch CK, Nielson KR, & Mauch TJ (2004) FISHing for Chick Genes: Triple-Label Whole-Mount Fluorescence In Situ Hybridization Detects Simultaneous and Overlapping Gene Expression in Avian Embryos. *Dev Dyn* 229(3):651-657.

23. Zhou H, et al. (2004) Two-Color, Rolling-Circle Amplification on Antibody Microarrays for Sensitive, Multiplexed Serum-Protein Measurements. *Genome Biol* 5(4):R28.

24. Larsson C, et al. (2004) In Situ Genotyping Individual DNA Molecules by Target-Primed Rolling-Circle Amplification of Padlock Probes. *Nat Methods* 1(3):227-232.

25. Clay H & Ramakrishnan L (2005) Multiplex Fluorescent In Situ Hybridization in Zebrafish Embryos Using Tyramide Signal Amplification. *Zebrafish* 2(2):105-111.

26. Barroso-Chinea P, et al. (2007) Detection of Two Different mRNAs in a Single Section by Dual In Situ Hybridization: A Comparison Between Colorimetric and Fluorescent Detection. *J Neurosci Methods* 162(1-2):119-128.

27. Acloque H, Wilkinson DG, & Nieto MA (2008) In Situ Hybridization Analysis of Chick Embryos in Whole-Mount and Tissue Sections. *Avian Embryology*, 2nd Edition, *Methods in Cell Biology*, ed Bronner-Fraser M (Elsevier Academic Press, San Diego, CA), Vol 87, pp 169-185.

28. Piette D, Hendrickx M, Willems E, Kemp CR, & Leyns L (2008) An optimized procedure for whole-mount in situ hybridization on mouse embryos and embryoid bodies. *Nat Protoc* 3(7):1194-1201.

29. Weiszmann R, Hammonds AS, & Celniker SE (2009) Determination of gene expression patterns using high-throughput RNA in situ hybridization to whole-mount *Drosophila* embryos. *Nat Protoc* 4(5):605-618.

30. Larsson C, Gmndberg I, Soderberg O, & Nilsson M (2010) In Situ Detection

and Genotyping of Individual mRNA Molecules. *Nat Methods* 7(5):395-397.

31. Wang F, et al. (2012) RNAscope: A Novel In Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *J Mol Diagn* 14(1):22-29.

32. Dirks RM & Pierce NA (2004) Triggered Amplification by Hybridization Chain Reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(43):15275-15278.

33. Choi HMT, et al. (2010) Programmable in situ amplification for multiplexed imaging of mRNA expression. *Nat Biotechnol* 28(11):1208-1212.

34. Choi HMT, Beck VA, & Pierce NA (2014) Next-generation in situ hybridization chain reaction: higher gain, lower cost, greater durability. *ACS Nano* 8(5):4284-4294.

35. Shah S, et al. (2016) Single-molecule RNA detection at depth via hybridization chain reaction and tissue hydrogel embedding and clearing. *Development*.

36. Zhang HQ, Li F, Dever B, Li XF, & Le XC (2013) DNA-Mediated Homogeneous Binding Assays for Nucleic Acids and Proteins. *Chem Rev* 113(4):2812-2841.

37. Wang F, Lu CH, & Willner I (2014) From Cascade Catalytic Nucleic Acids to Enzyme-DNA Nanostructures: Controlling Reactivity, Sensing, Logic Operations, and Assembly of Complex Structures. *Chem Rev* 114(5):2881-2941.

38. Jung C & Ellington AD (2014) Diagnostic applications of nucleic acid circuits. *Acc Chem Res* 47(6):1825-1835.

39. Ikbali J, Lim GS, & Gao ZQ (2015) The hybridization chain reaction in the development of ultrasensitive nucleic acid assays. *Trends in Analytical Chemistry* 64:86-99.

40. McLennan R, et al. (2015) Neural crest migration is driven by a few trailblazer cells with a unique molecular signature narrowly confined to the invasive front. *Development* 142(11):2014-2025.

41. Huss D, et al. (2015) Combinatorial analysis of mRNA expression patterns in mouse embryos using hybridization chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*.

42. Rosenthal AZ, et al. (2013) Localizing transcripts to single cells suggests an important role of uncultured delta-proteobacteria in the termite gut hydrogen economy. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(40):16163-16168.

43. Yamaguchi T, et al. (2015) In situ DNA-hybridization chain reaction (HCR): a facilitated in situ HCR system for the detection of environmental microorganisms. *Environmental Microbiology* 17(7):2532-2541.

44. Nikolakakis K, Lehnert E, McFall-Ngai MJ, & Ruby EG (2015) Use of Hybridization Chain Reaction-Fluorescent In Situ Hybridization To Track Gene Expression by Both Partners during Initiation of Symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 81(14):4728-4735.

45.Lan HY,Mu W,NG YY,Nikolic-Paterson DH,&Atkins RC(1996)A simple, reliable,and sensitive method for nonradioactive in situ hybridization:use of microwave heating to improve hybridization efficiency and preserve tissue morphology.J Histochem Cytochem 44(3):281-287.

46.Smith JJ,Gunasekera TS,Barardi CR,Veal D,Vesey G(2004) Determination of CryPtosporidium parvum oocyst Viability by fluorescence in situ hybridization using a ribosomal RNA-directed probe.J Appl Microbiol 96 (2):409-417.

47.Hybridization chain reaction methods for in situ molecular detection,Evan R.DAUGHARTHY,George M.Church,<https://patents.google.com/patent/WO2017189525A1/en>

48.Nanoscale imaging of proteins and nucleic acids via expansion microscopy,Asmamaw Wassie,Fei Chen,Edward Stuart Boyden,Shahar Alon,George Church,Evan Daugharthy,<https://patents.google.com/patent/CA2994958A1/en>

49.Chen,F.,A.T.Wassie,A.J.Cote,A.Sinha,S.Alon,S.Asano,E.R.Daugharthy, et al.2016.“Nanoscale Imaging of RNA with Expansion Microscopy.”Nature Methods13(8):679-84.

50.Husain,N.2016.“Mapping mRNA and Protein Expression with High Signal-to-Background in Diverse Organisms.”PhD Thesis,California Institute of Technology.

51.Koos,B.,G.Cane,K.Grannas,L. Löf,L. Amgårdén,J.Heldin,C.M.Clausson, et al.2015.“Proximity-Dependent Initiation of Hybridization Chain Reaction.”Nature Communiications 6:7294.<https://doi.org/ARTN 7294 10.1038/ncomms8294>.

52.Leino,Mattias,Johan Heldin,Marie Rubin Sander,Despoina Kerpatsou, Doroteya Raykova, Björn Koos,and Ola Söderberg. 2019.“Optimization of Proximity-Dependent Initiation of Hybridization Chain Reaction for Improved Performance.”Molecular Systems Design&Engineering 4(5):1058-65.<https://doi.org/10.1039/C9ME00079H>.

53.Lin,R.,Q.Feng,P.Li,P.Zhou,R.Wang,Z.Liu,Z.Wang,et al.2018.“A Hybridization-Chain-Reaction-Based Method for Amplifying Immunosignals.”Nature Methods 15(4):275-78.<https://doi.org/10.1038/nmeth.4611>.

54.Wang,Y.,W.Xie,R.E.Kohman,and G.M.Church.2018.“Multiplexed Imaging Using Same Species Primary Antibodies with Signal Amplification.”BioRxiv, January,274456.<https://doi.org/10.1101/274456>.

55.Wang,Y.,Y.Zeng,S.K.Saka,W.Xie,I.Goldaracena,R.E.Kohman,P.Yin,and G.M.Church.2020.“Multiplexed in Situ Protein Imaging Using DNA-Barcoded Antibodies with Extended Hybridization Chain Reactions.”BioRxiv,January, 274456.<https://doi.org/10.1101/274456>.

56. Wolfe, B.R., N.J. Porubsky, J.N. Zadeh, R.M. Dirks, and N.A. Pierce. 2017. "Constrained Multistate Sequence Design for Nucleic Acid Reaction Pathway Engineering." *Journal of the American Chemical Society* 139 (8): 3134-44.

57. Zadeh, J.N., C.D. Steenberg, J.S. Bois, B.R. Wolfe, M.B. Pierce, A.R. Khan, R.M. Dirks, and N.A. Pierce. 2011. "NUPACK: Analysis and Design of Nucleic Acid Systems." *Journal of Computational Chemistry* 32 (1): 170-73. <https://doi.org/10.1002/jcc.21596>.

58. Acharya, A. 2016. "Multiplexed Analysis of Diverse RNA Classes via Hybridization Chain Reaction." PhD Thesis, California Institute of Technology.

序列表

<110> 加州理工学院

默克优勒设备公司

<120> 经由杂交链反应分析样品内的靶分子

<130> MOINS.007W0

<150> US 62/986436

<151> 2020-03-06

<160> 4

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的;包含用于辅助链成核的toehold的发夹H1

<400> 1

cggggttaaag ttgagtggag atatagaggc aggacaaaag tctaaccgt ccctgcctct 60
atatctccac tctatcat 78

<210> 2

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的;发夹H2

<400> 2

gtccctgcct ctatatctcc actcaacttt aaccggagt ggagatatag aggaggac 60
ggattagact tt 72

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列;引发剂I1

<220>

<223> 合成的;引发剂I1

<400> 3

gtccctgcct ctatatctcc actcaacttt aaccgg 36

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的;辅助链

<400> 4

atgatagagt ggagatatag aggcaggac ggattagact tt 42

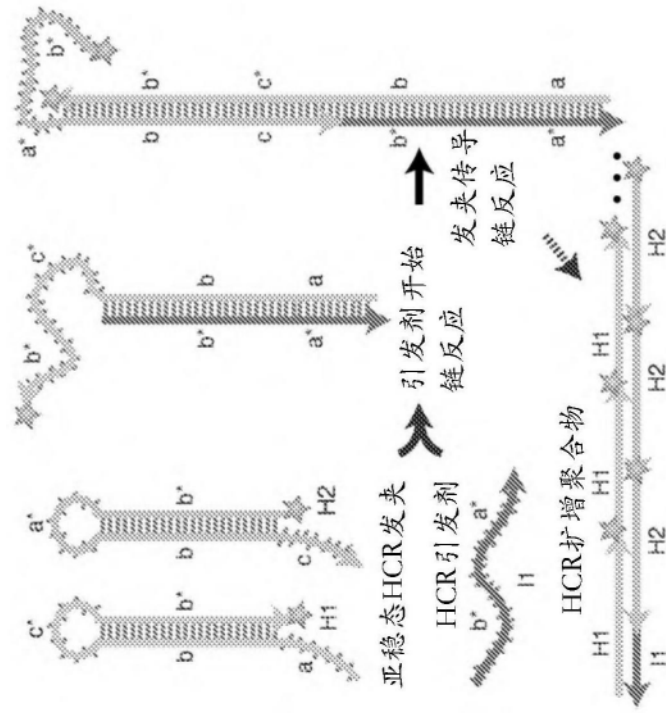


图1A

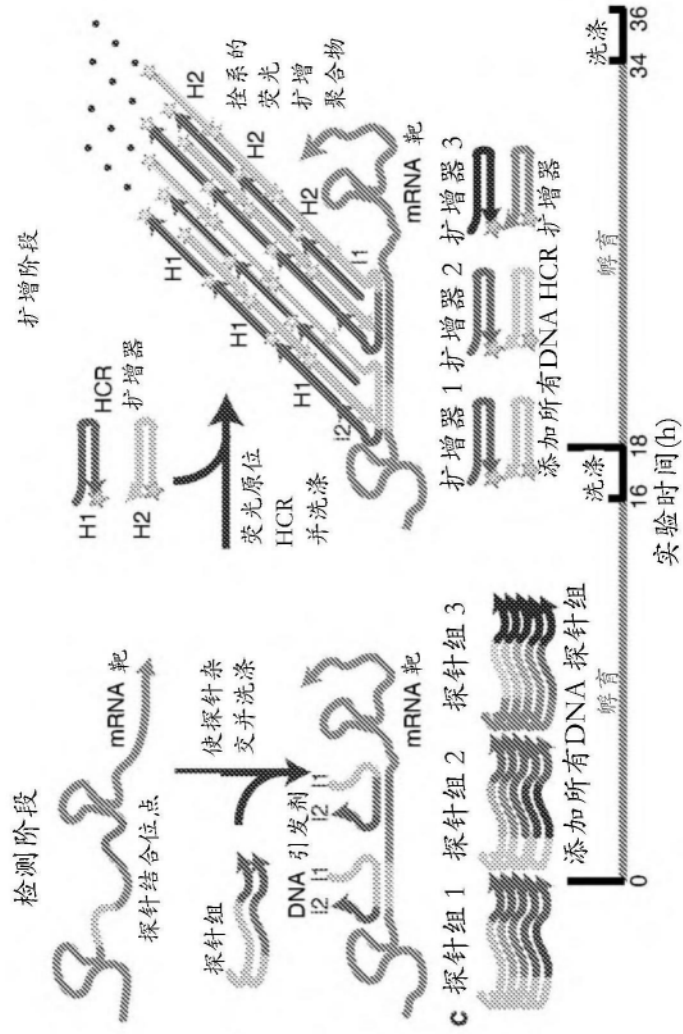
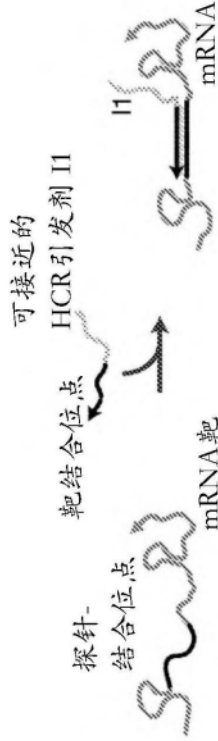


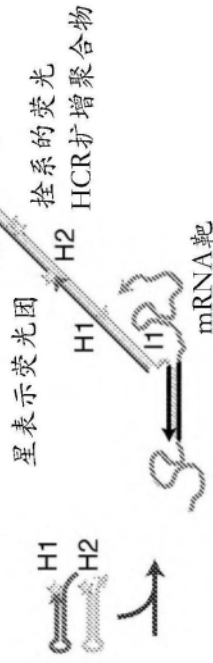
图1B

方案A: 两阶段方案

阶段1: 使用非结构化探针的靶检测



阶段2: 使用HCR发夹的探针检测和HCR扩增

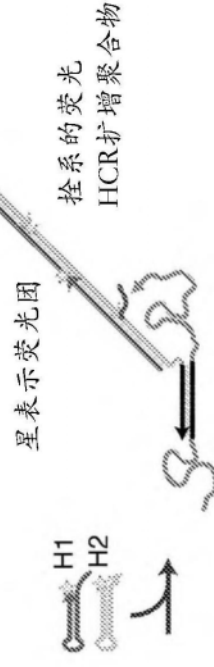


方案B: 两阶段方案

阶段1: 使用发夹探针的靶检测



阶段2: 使用HCR发夹的探针检测和HCR扩增



方案C: 三阶段方案

阶段1: 使用非结构化探针对的靶检测



阶段2: 使用非结构化桥的探针检测



阶段3: 使用HCR发夹的桥检测和HCR扩增

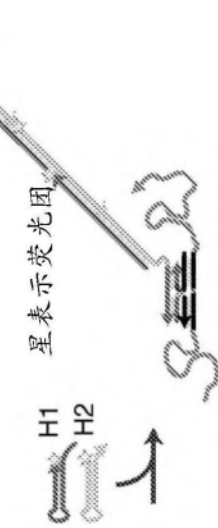
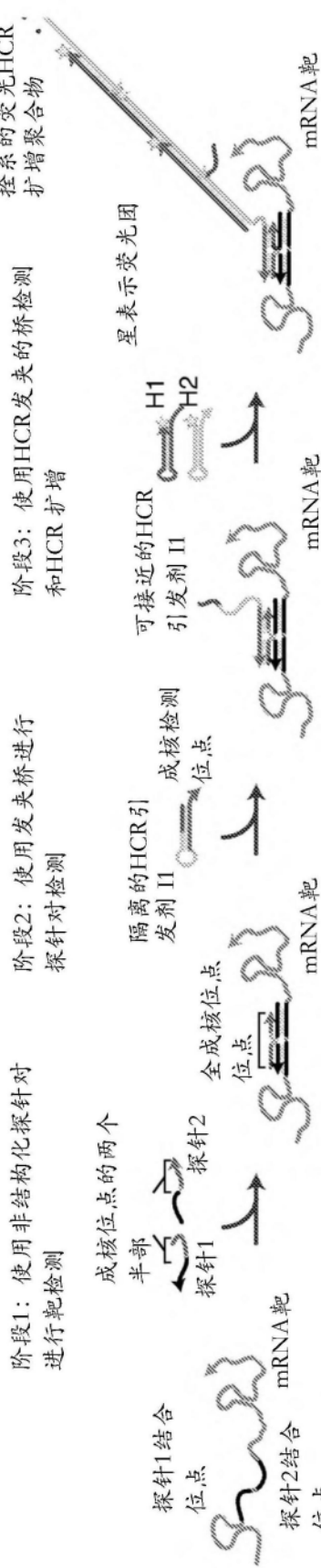


图2A

方案D: 三阶段方案



方案E: 两阶段方案

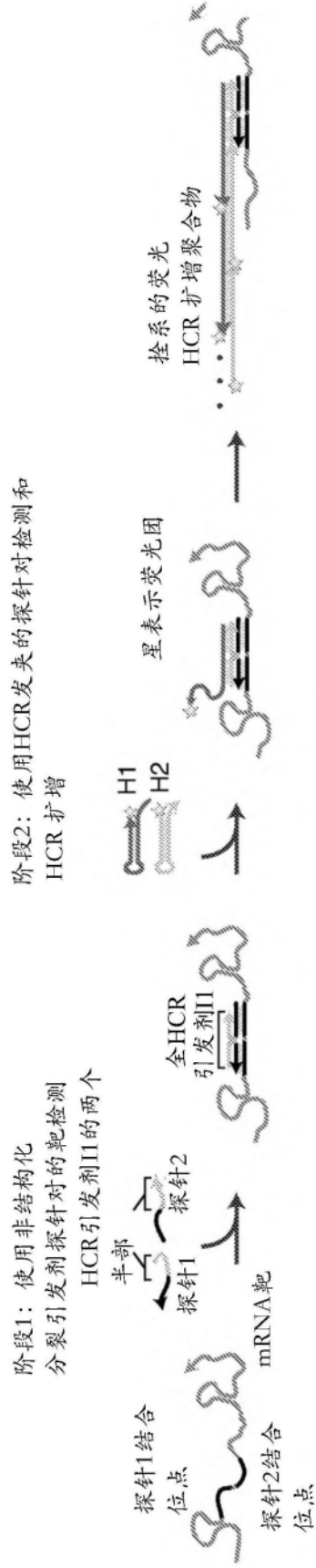
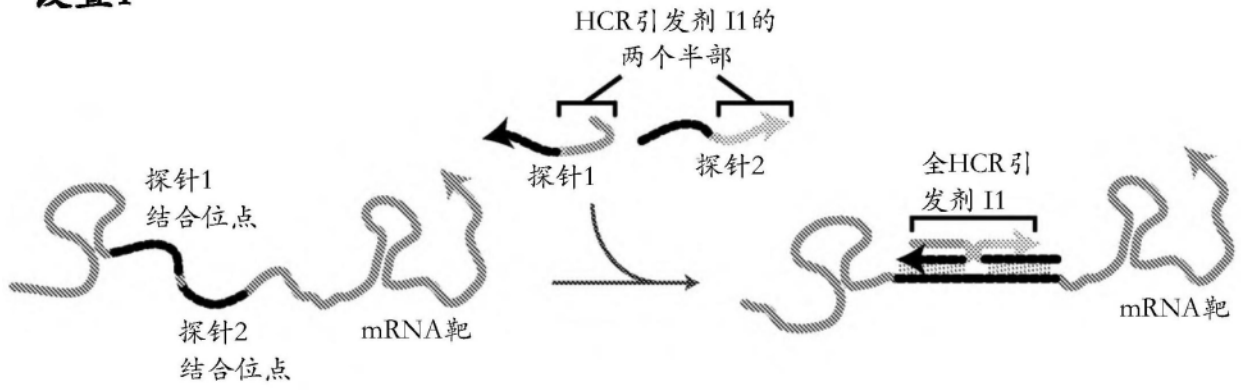
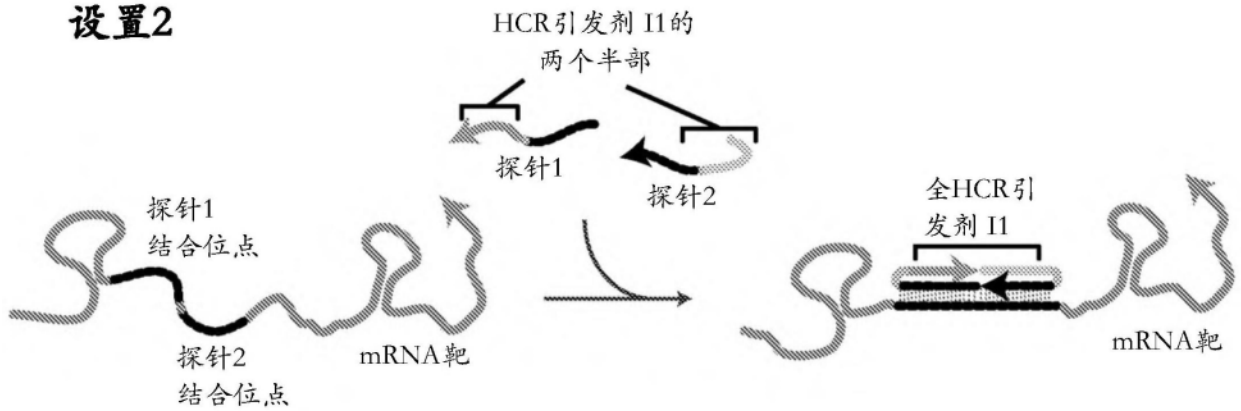


图2B

设置1



设置2



设置3

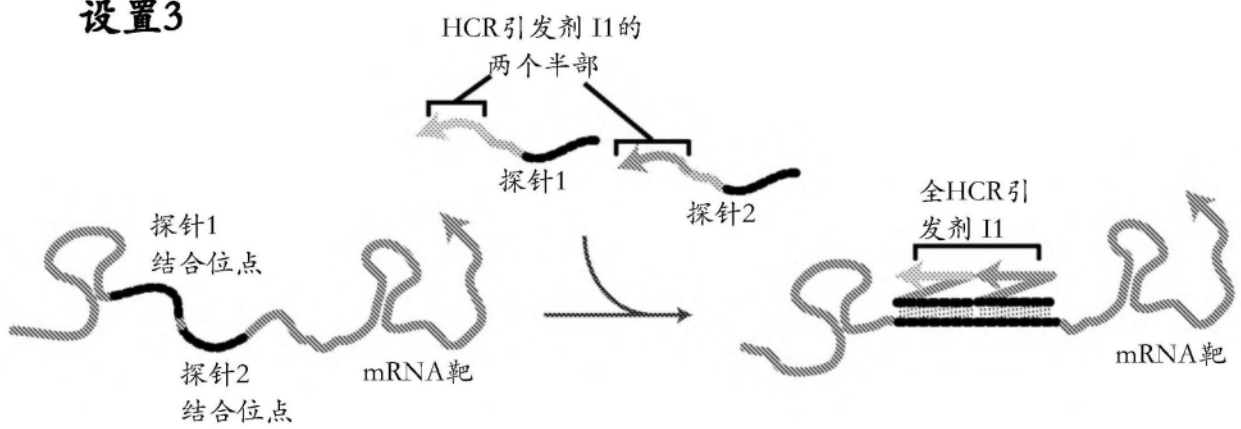
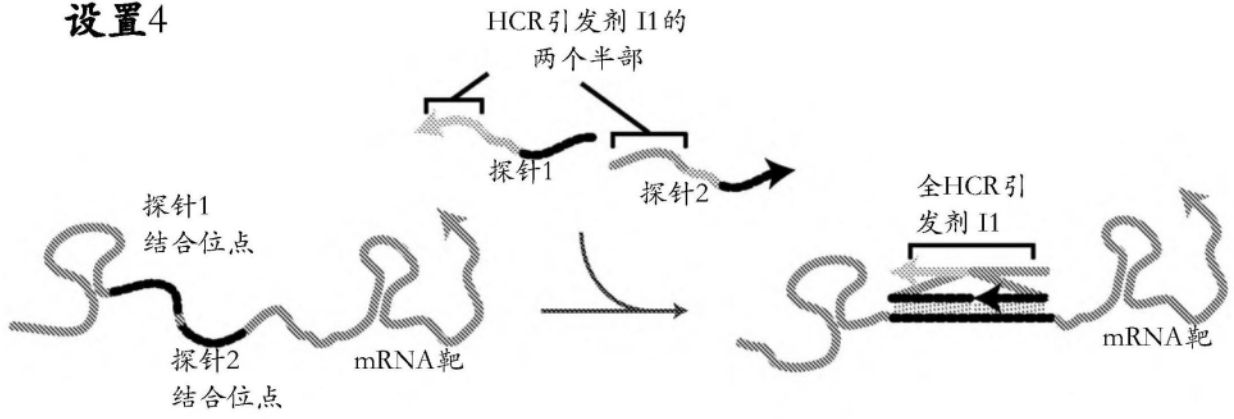


图3A

设置4



设置5

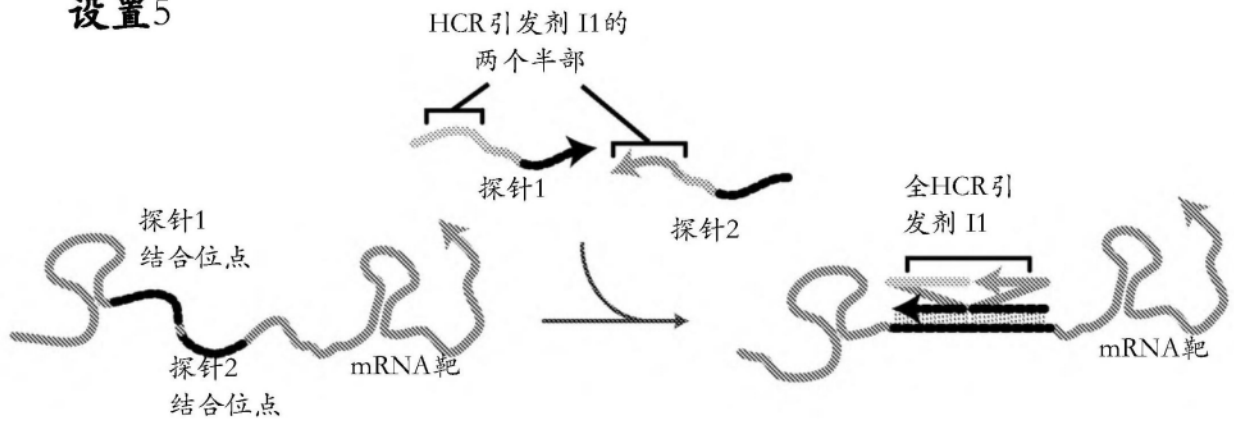


图3B

分裂引发剂探针

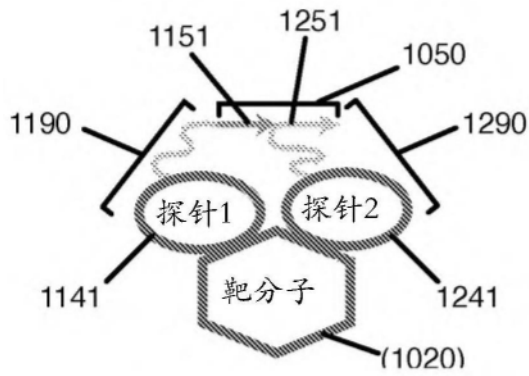


图4A

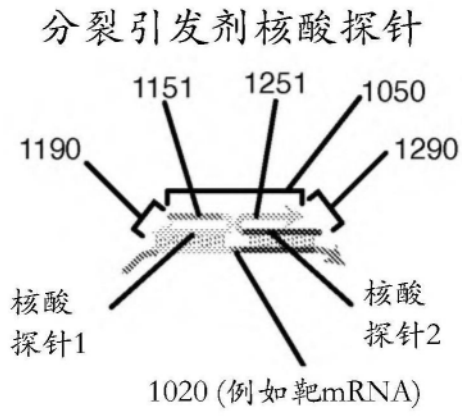


图4B

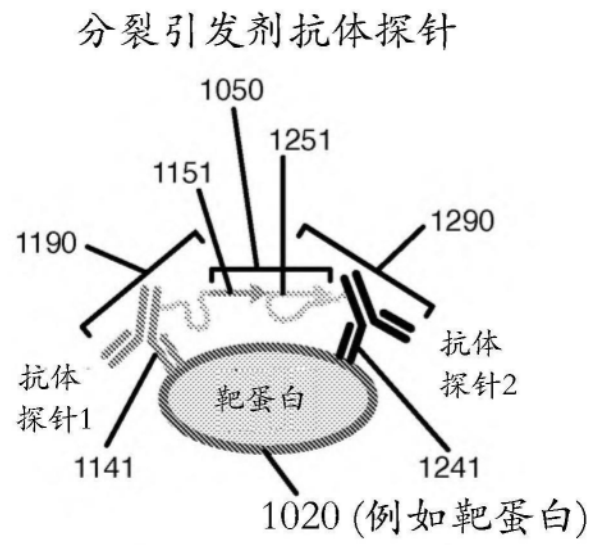


图4C

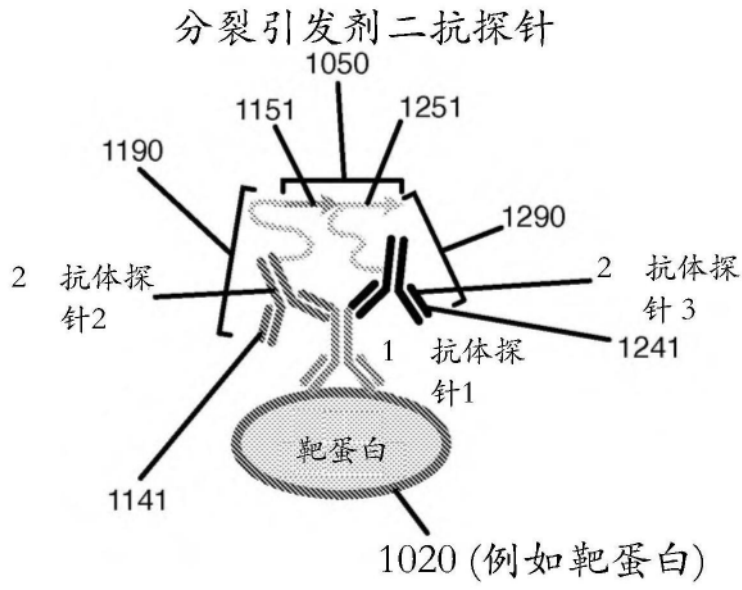


图4D

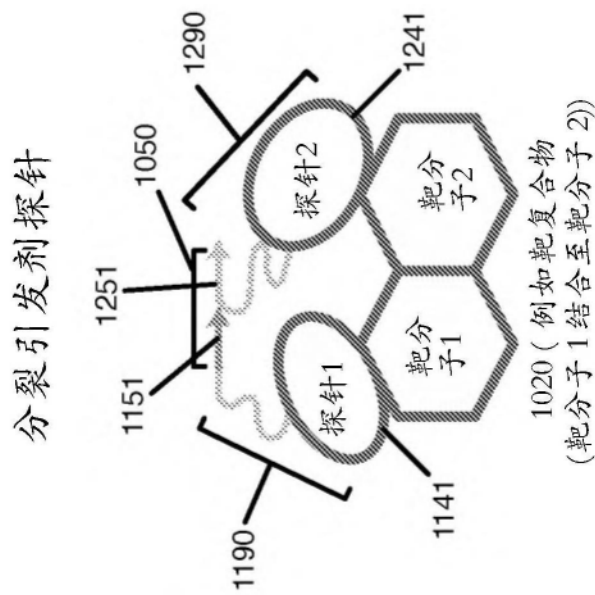


图5A

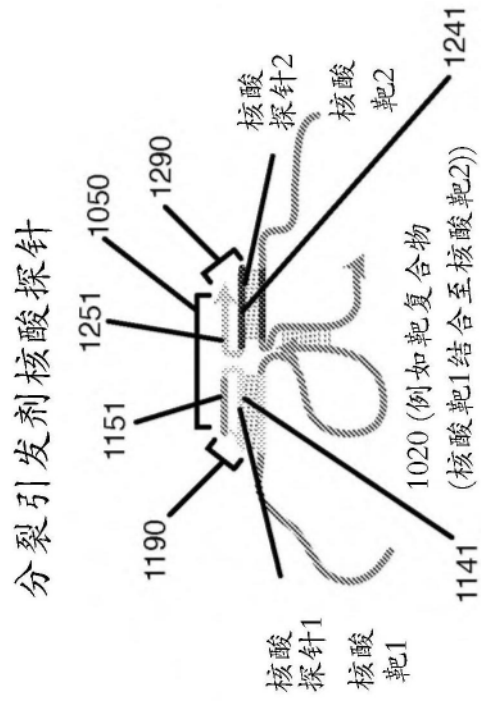


图5B

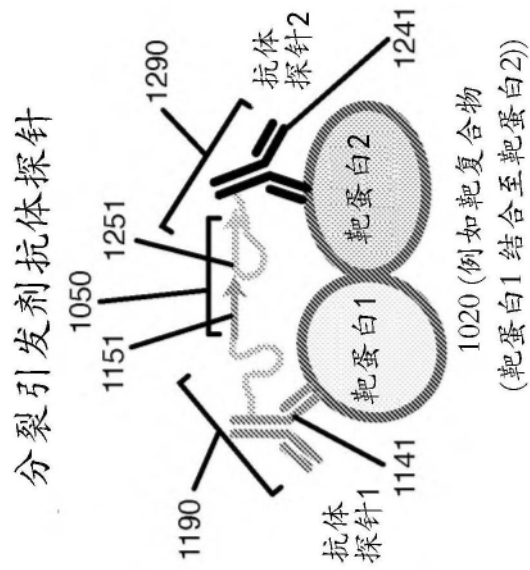


图5C

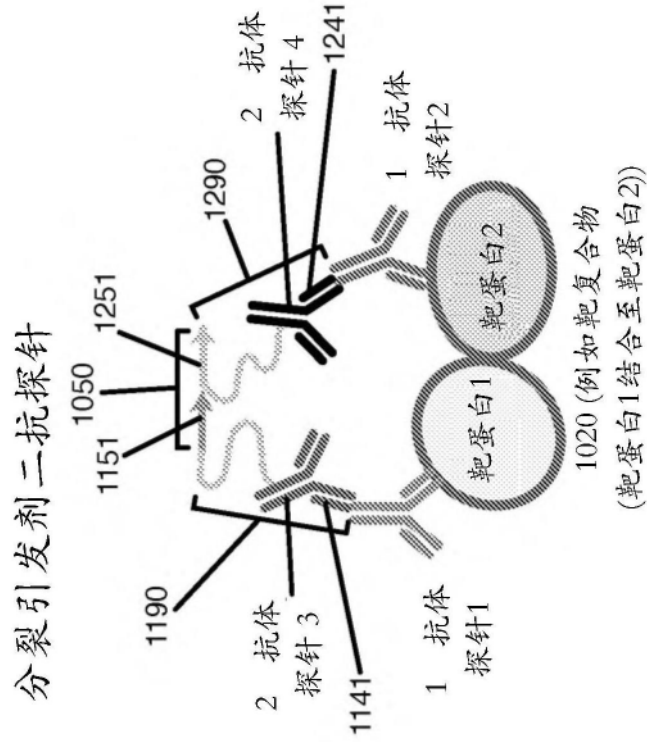


图5D

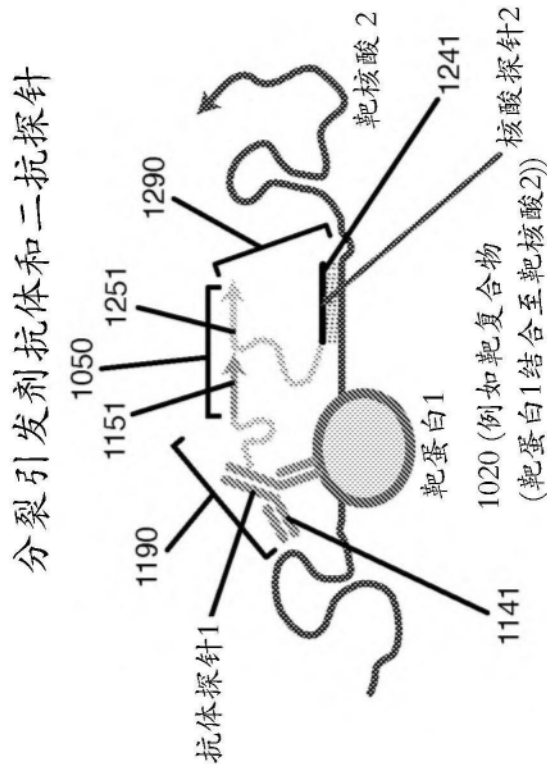


图5E

参考表达模式
(传统原位杂交)

标准探针(方案A)
(未优化的探针组)

分裂引发剂探针(方案E)
(未优化的探针组)

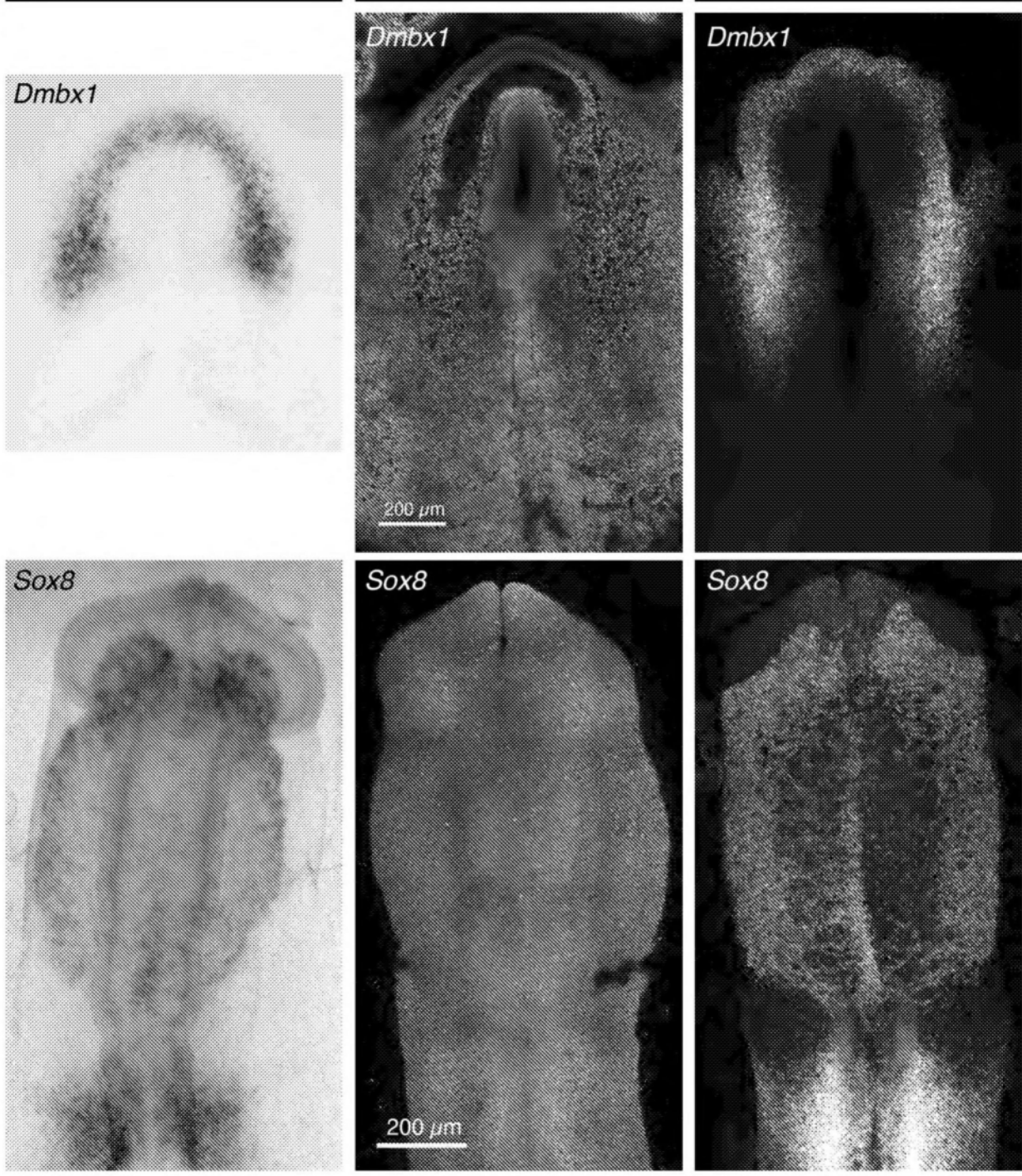
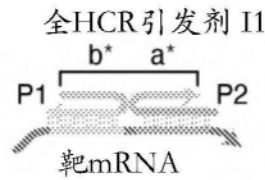


图6



分裂引发剂探针 P1和P2 各自携带
HCR引发剂 I1的一部分；选择性结合探
针 P1和P2 至靶mRNA使全HCR引发剂
I1共定位

图7A

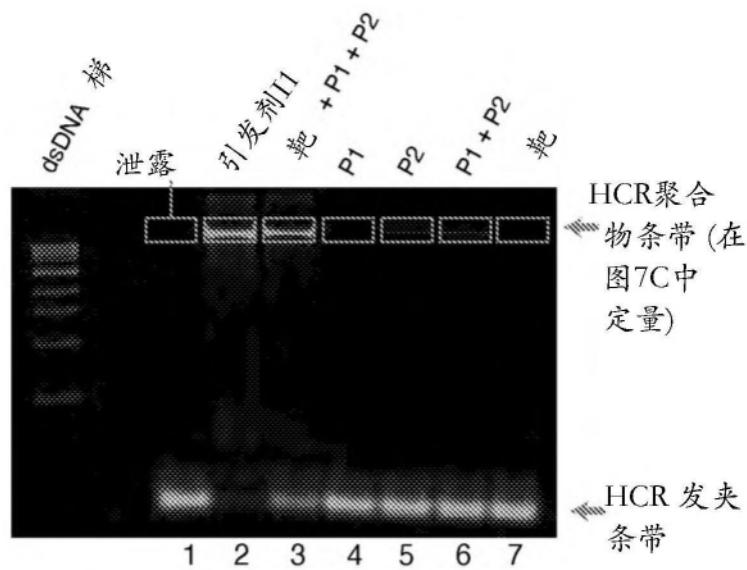


图7B

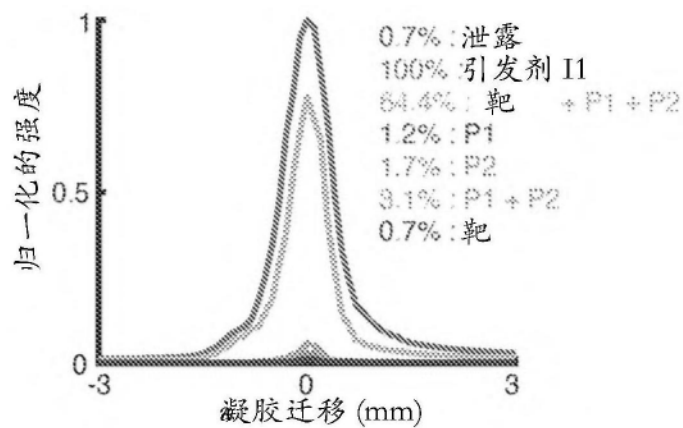


图7C

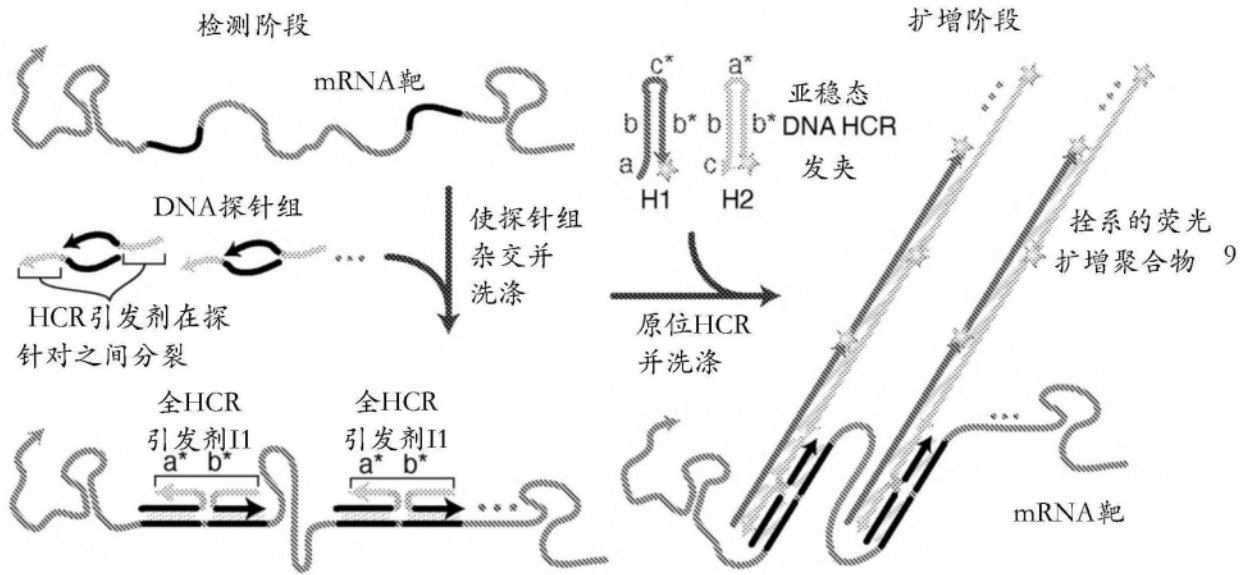


图8A

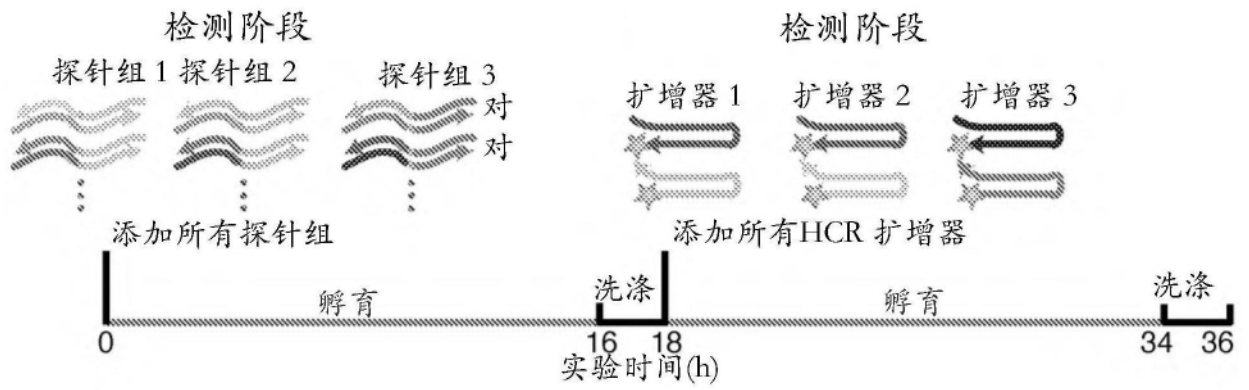


图8B

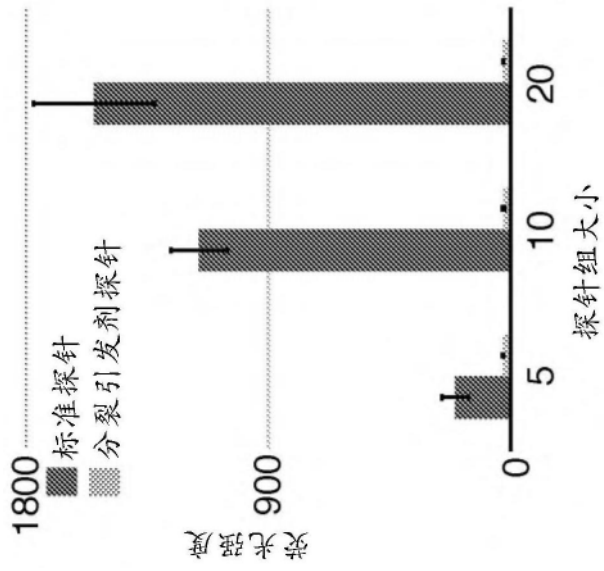


图9A

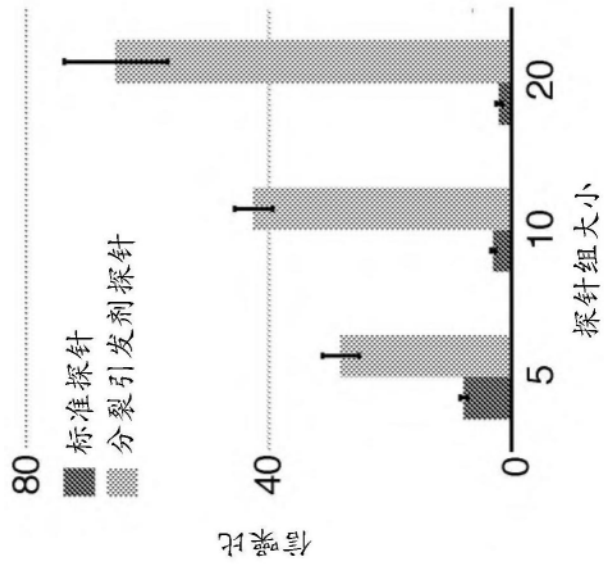


图9B

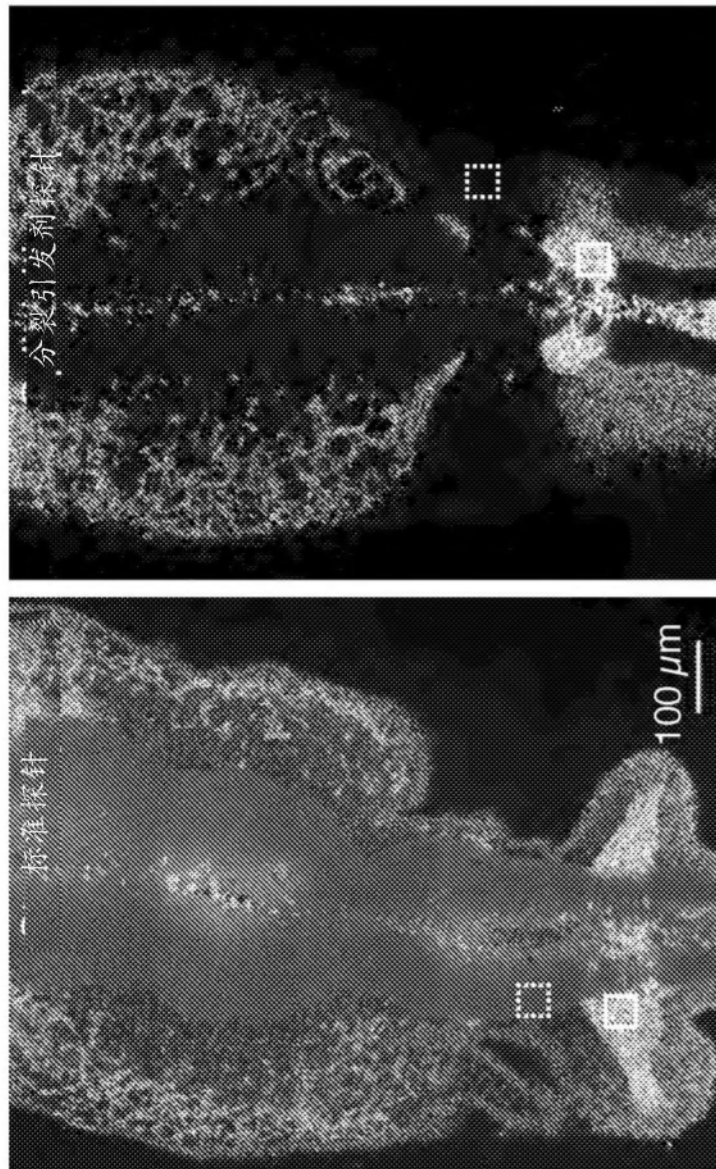


图9C

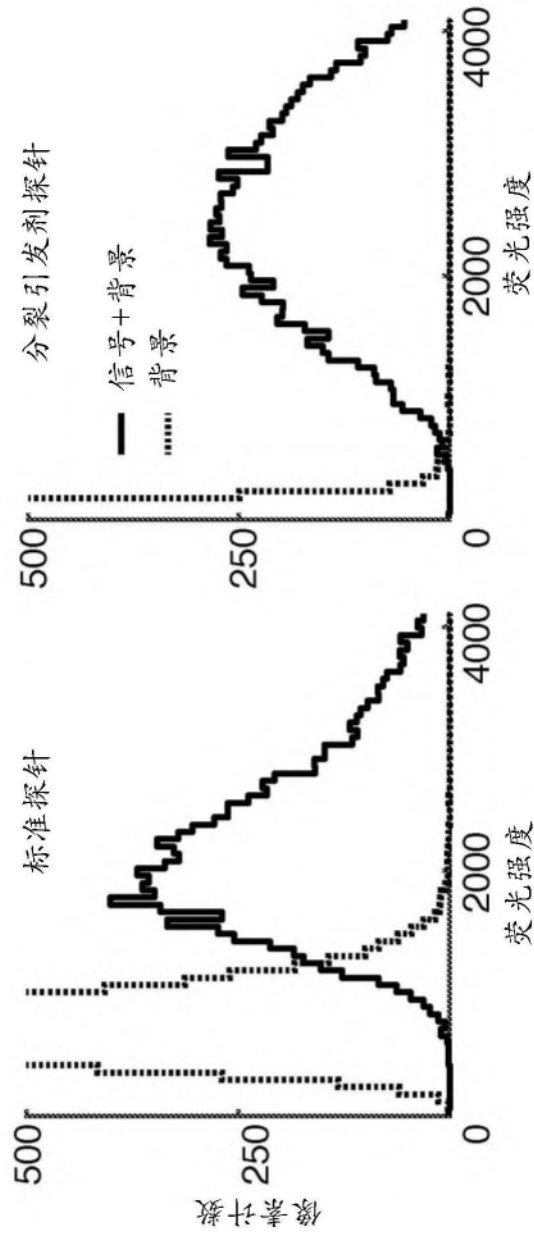


图9D

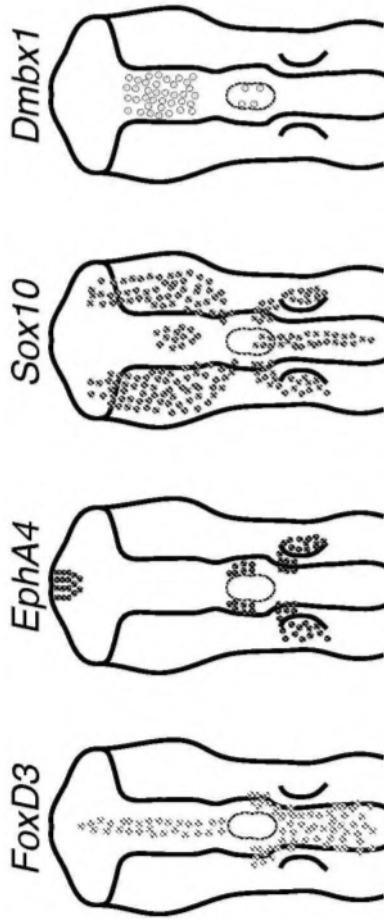


图10A

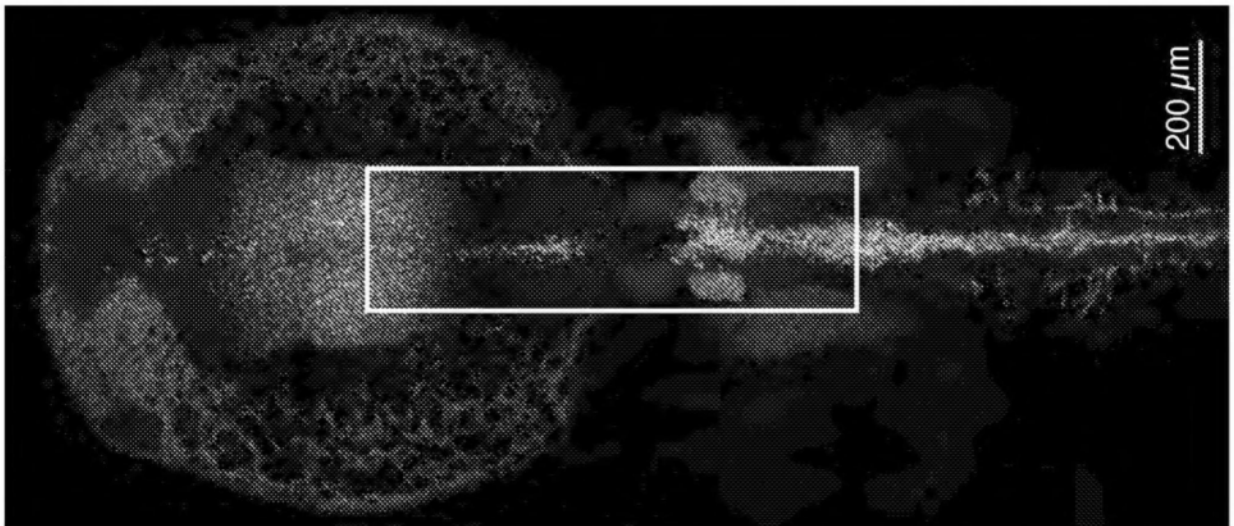


图10B

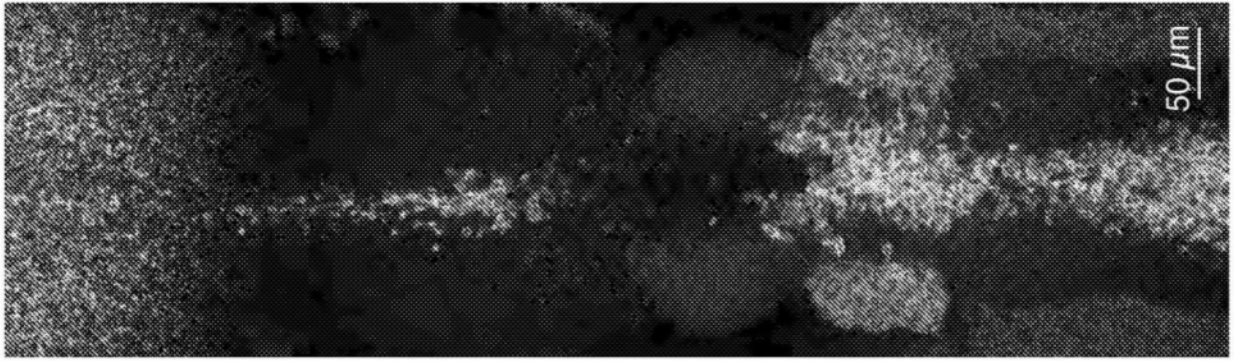


图10C

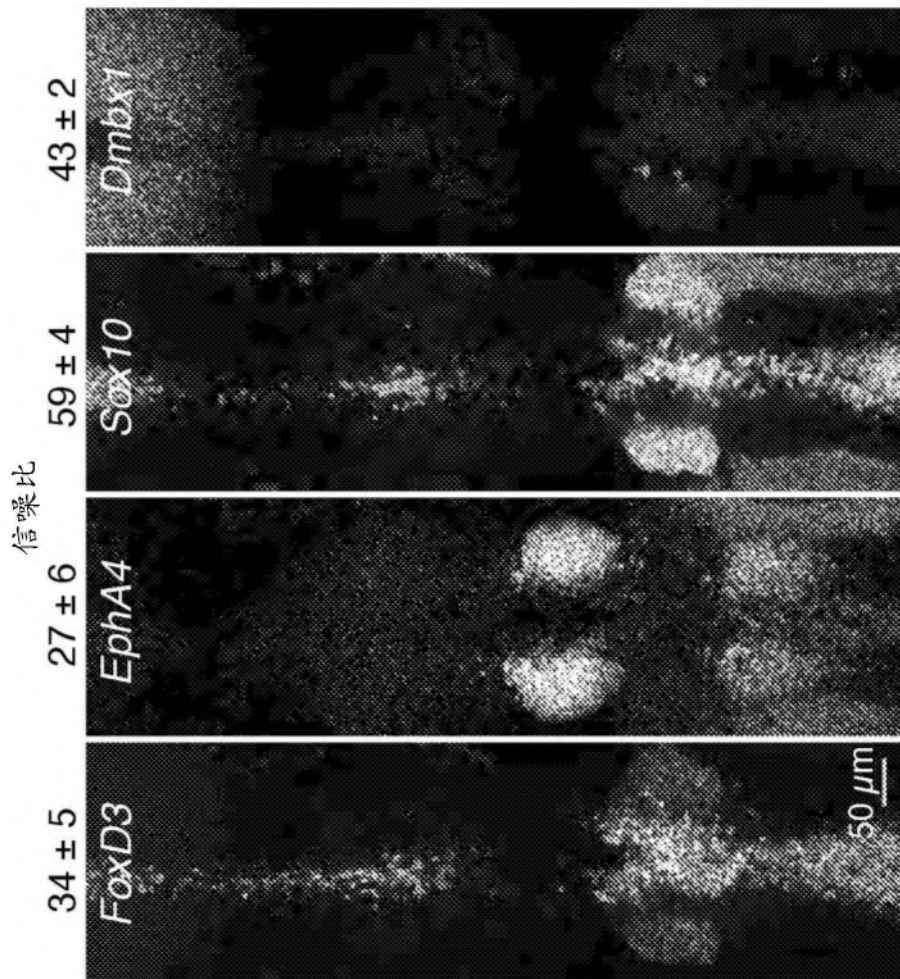


图10D

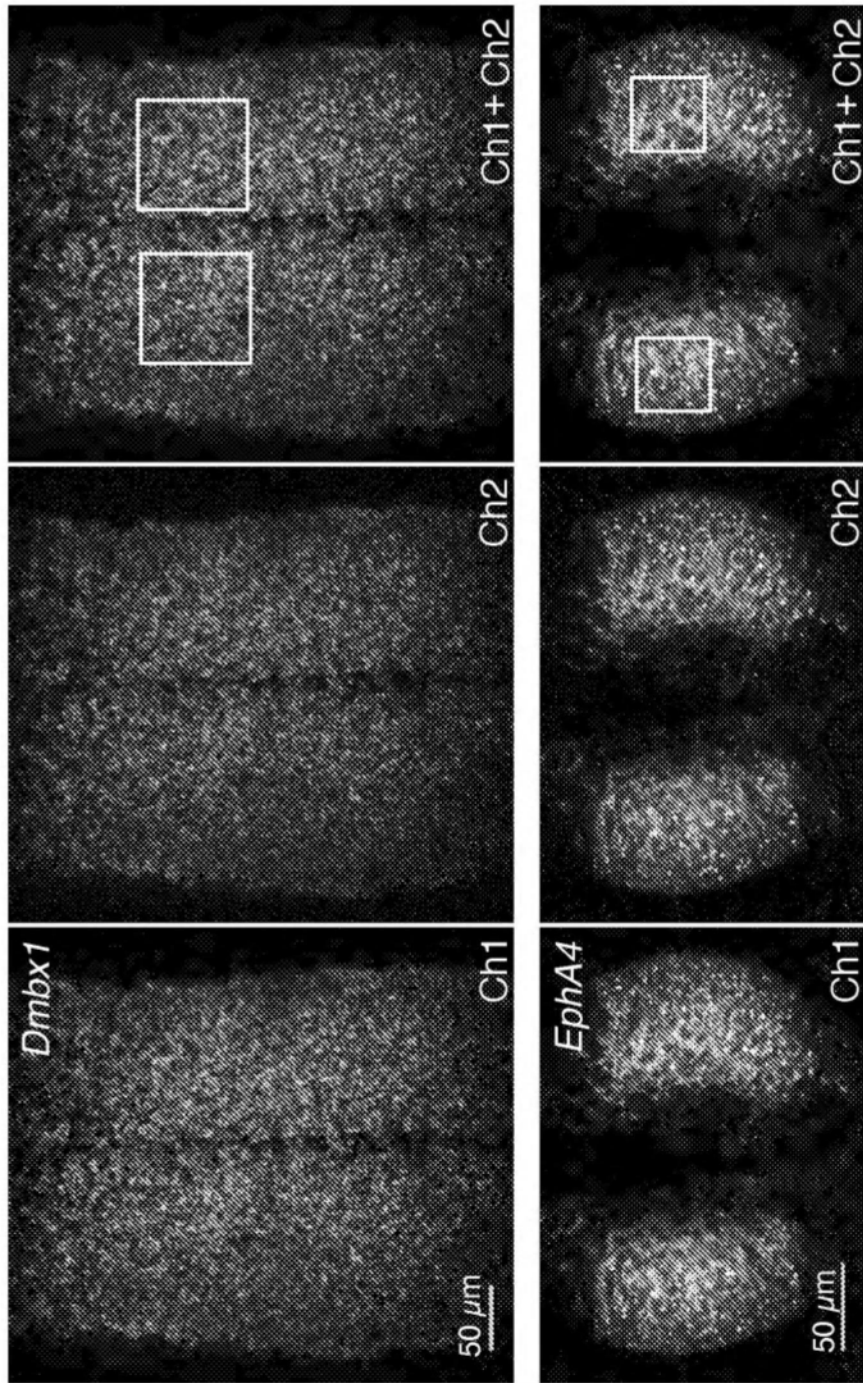


图11A

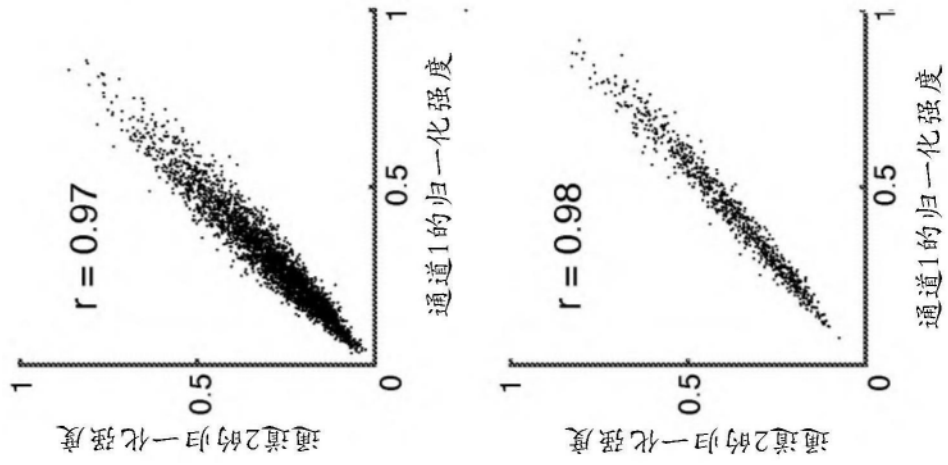


图11B

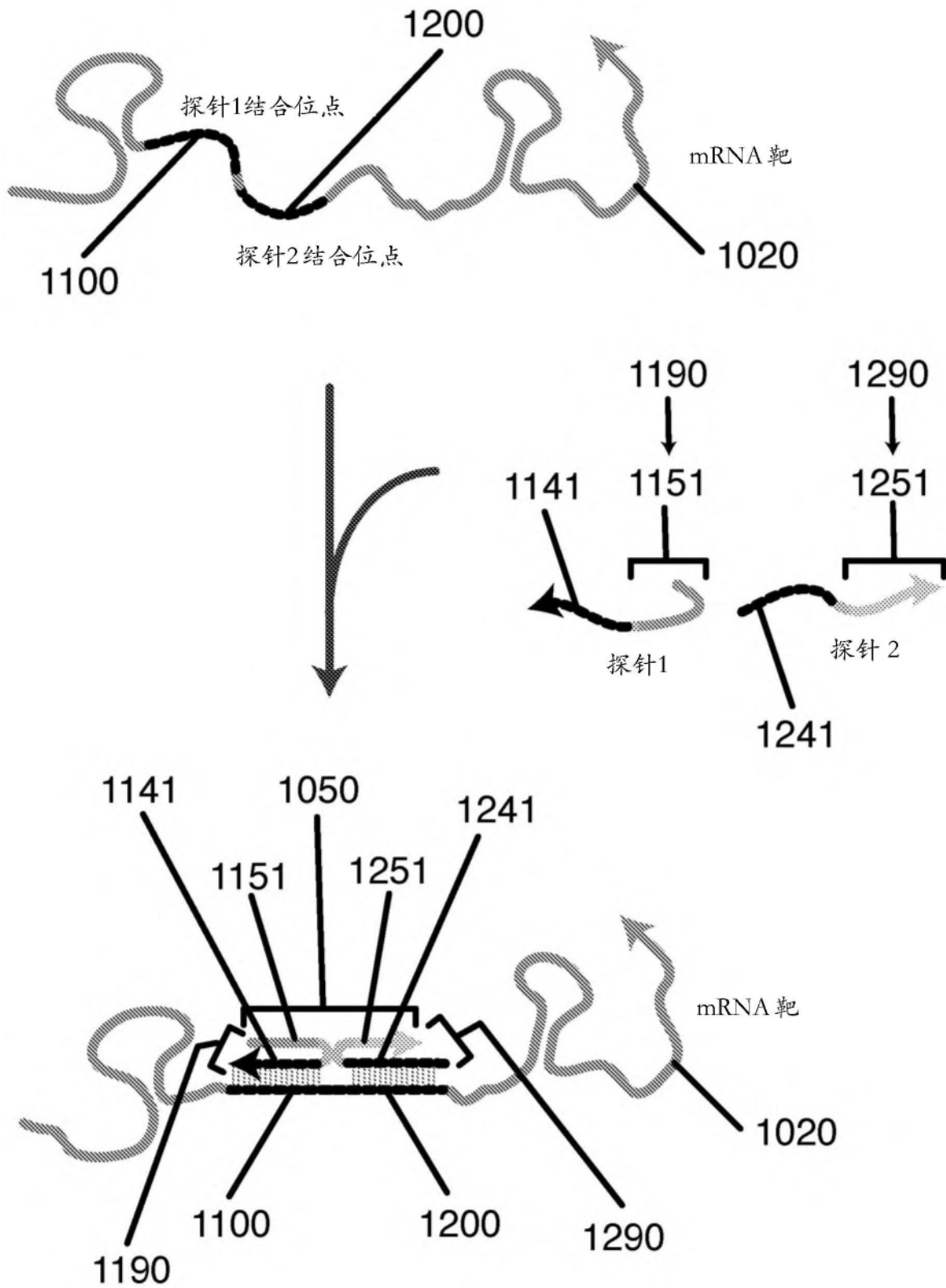


图12

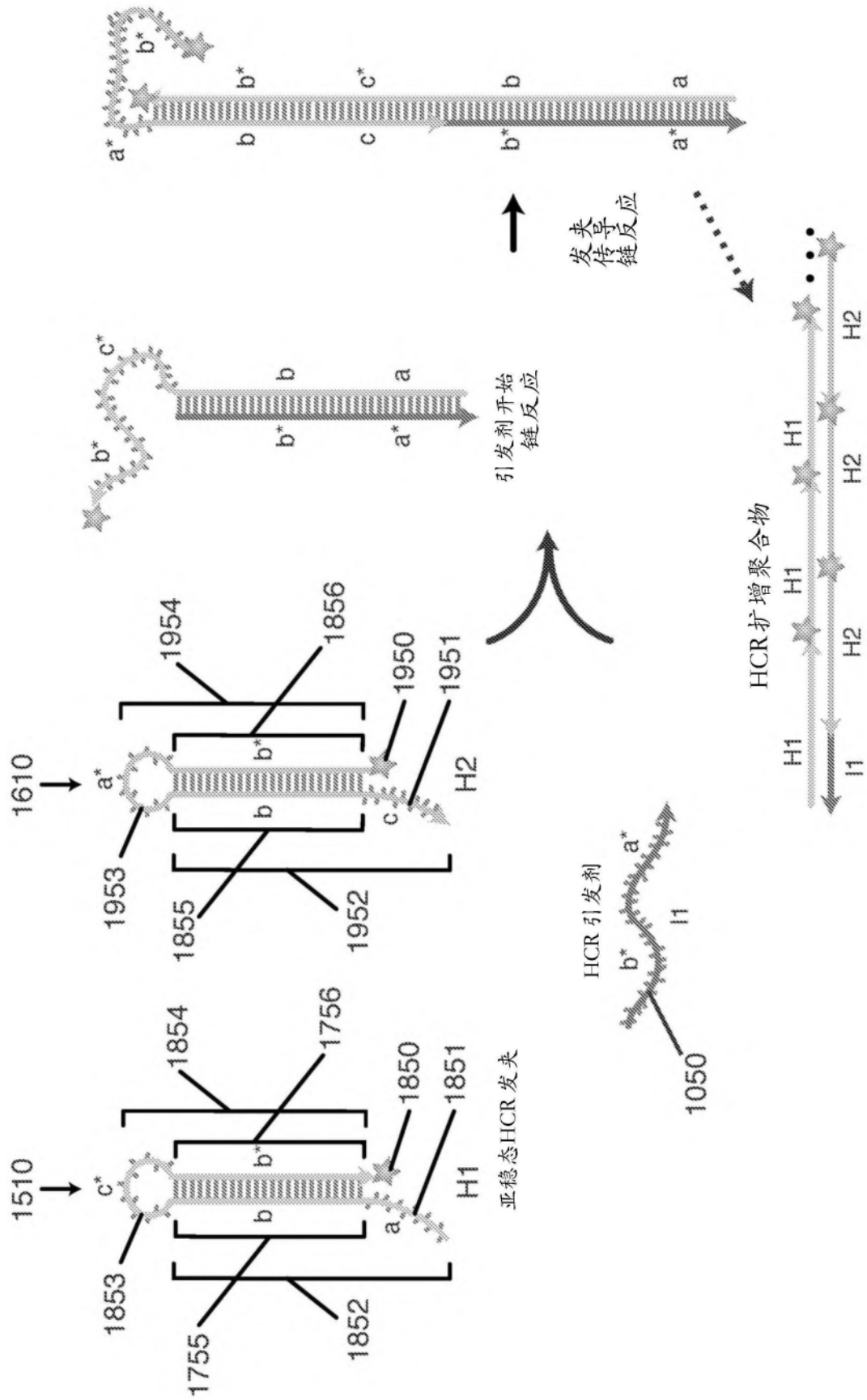
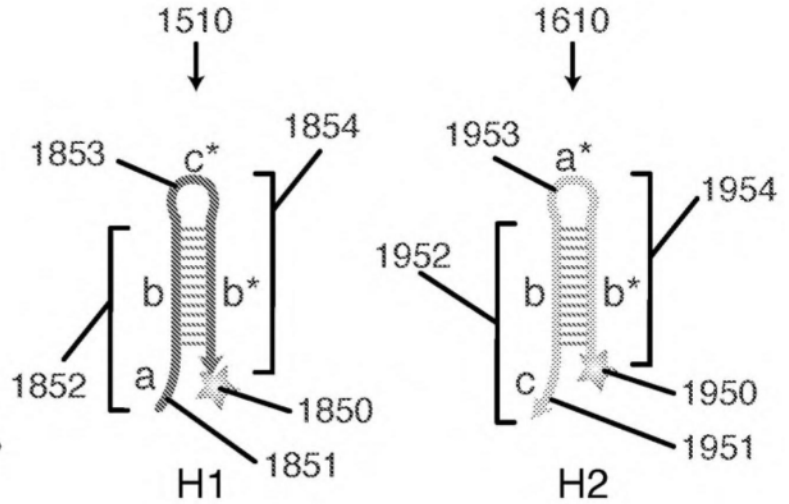
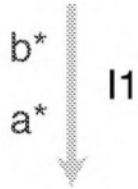


图13

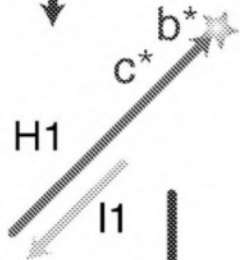
HCR 机制

DNA HCR 引发剂 I

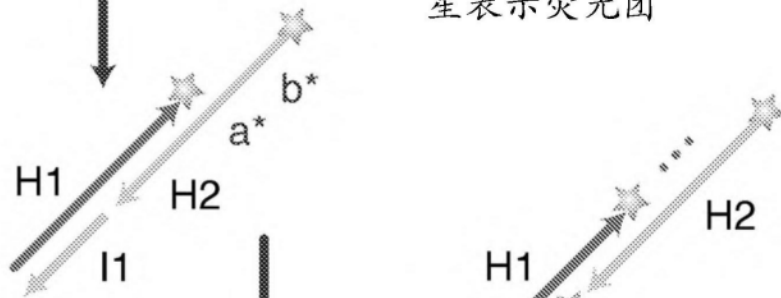


亚稳态 DNA HCR 发夹 H1 和 H2

HCR 引发剂 I 开始链反应



HCR 发夹 H1 和 H2 传导链反应



星表示荧光团

HCR H1 扩增聚合物的条件自组装

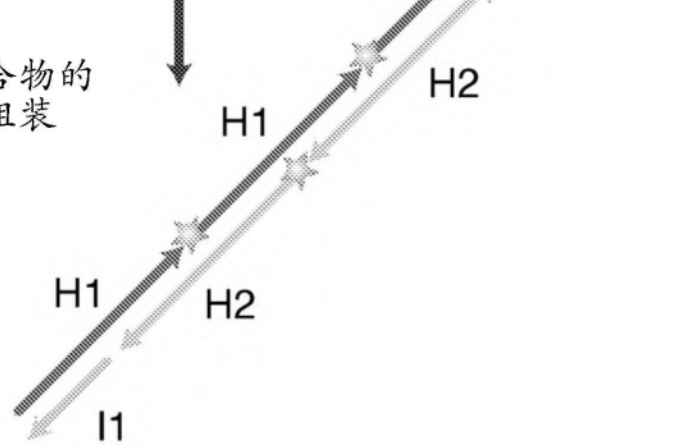


图14

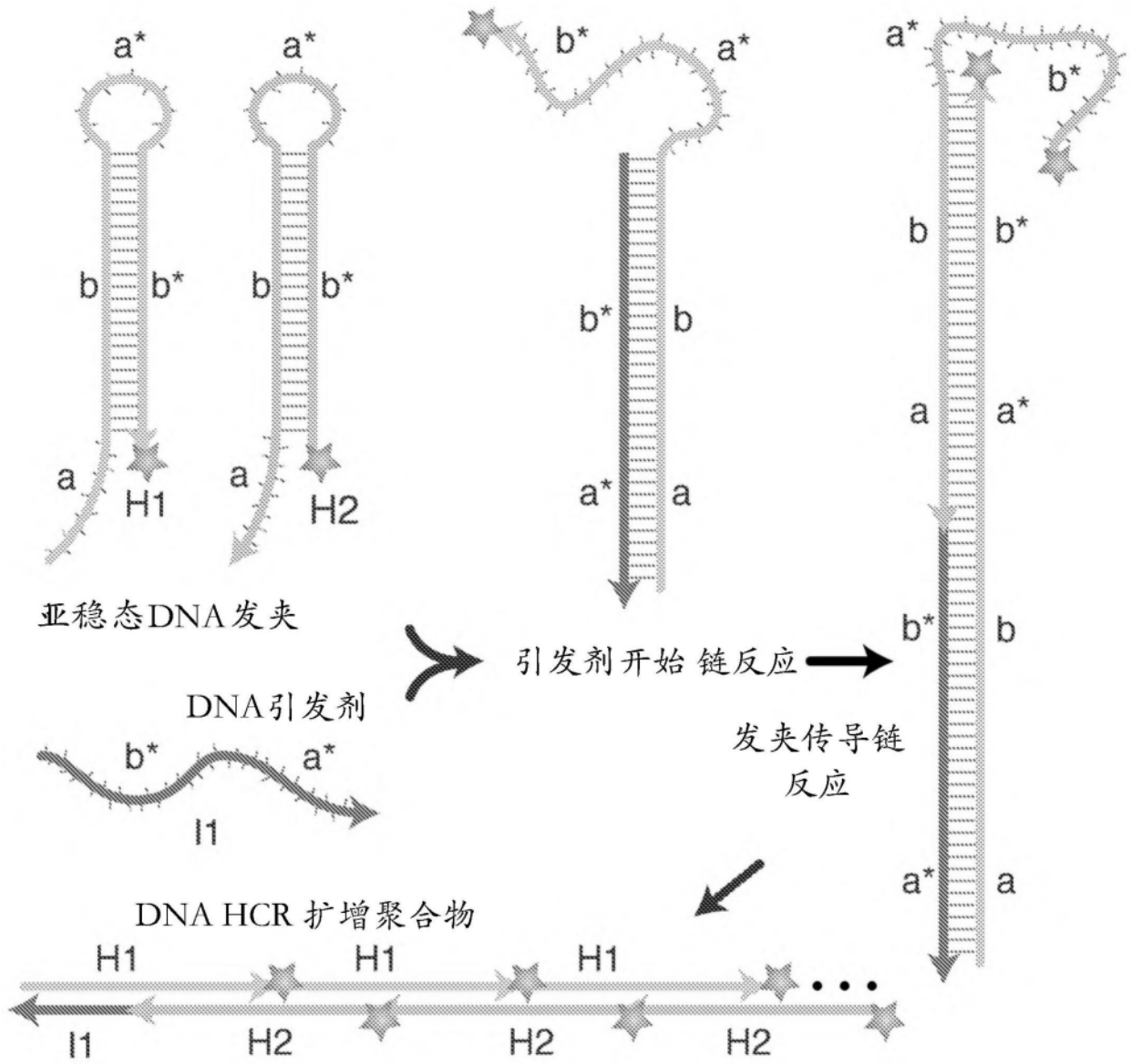


图15

包含一个探针单元的探针组

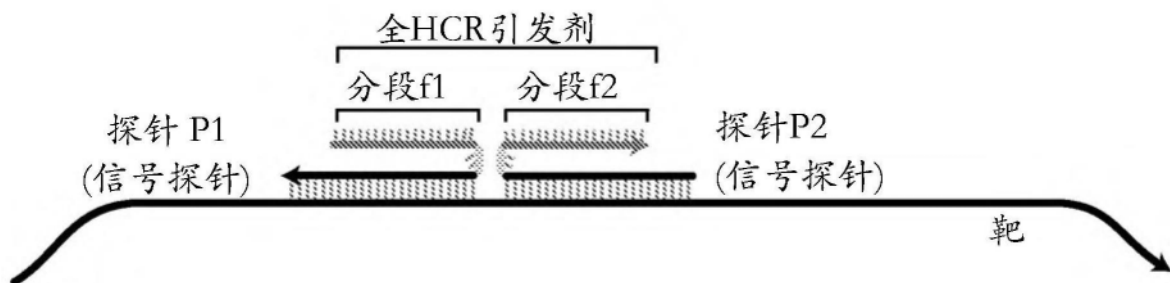


图16A

包含多个探针单元的探针组

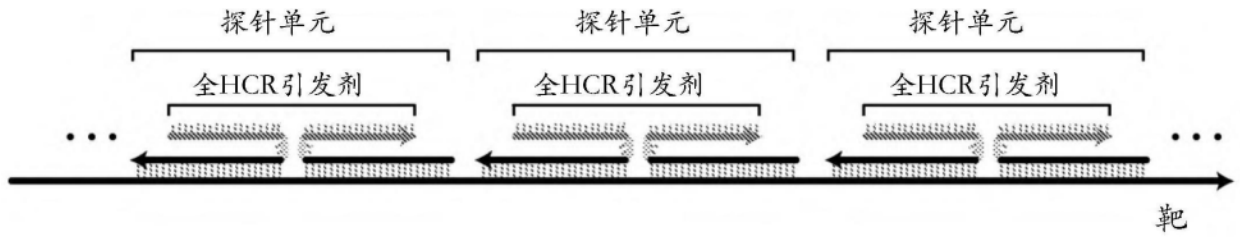


图16B

探针组，其包含多个探针单元，所述探针单元包括一些探针，所述探针包含两个分段引发剂并参与两个探针单元

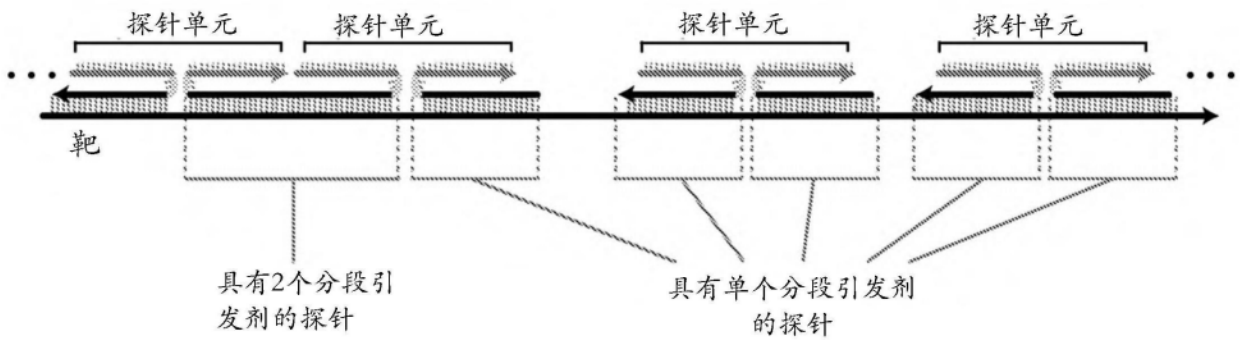


图16C

包含多个探针单元以及辅助探针的探针组

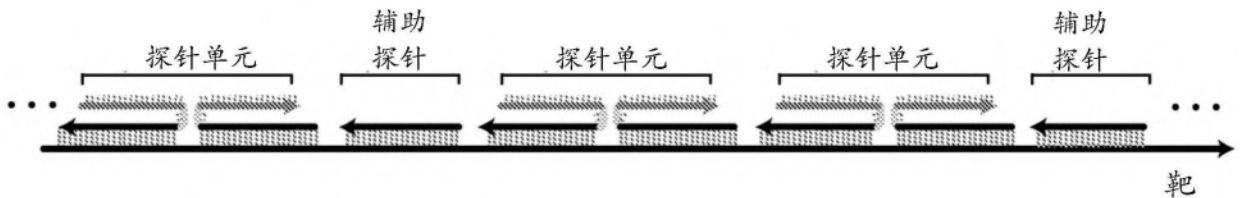


图16D

包含两个分段引发剂探针的探针单元

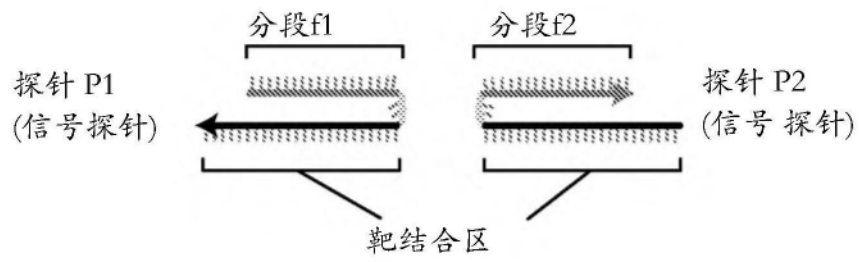


图17A

包含N个分段引发剂探针的探针单元

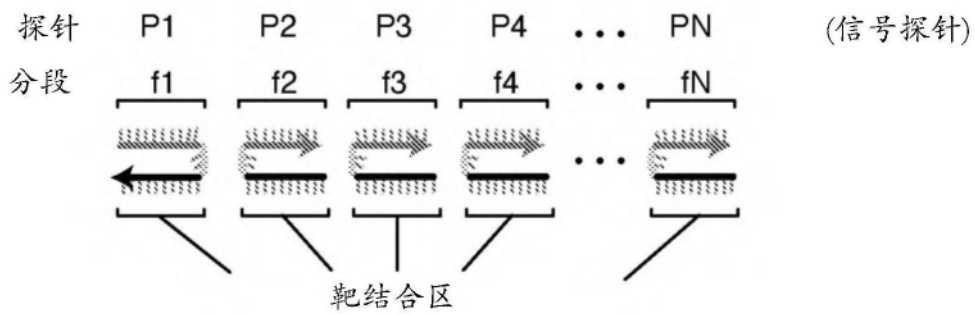


图17B

包含两个分段引发剂并参与两个探针单元的探针
探针单元

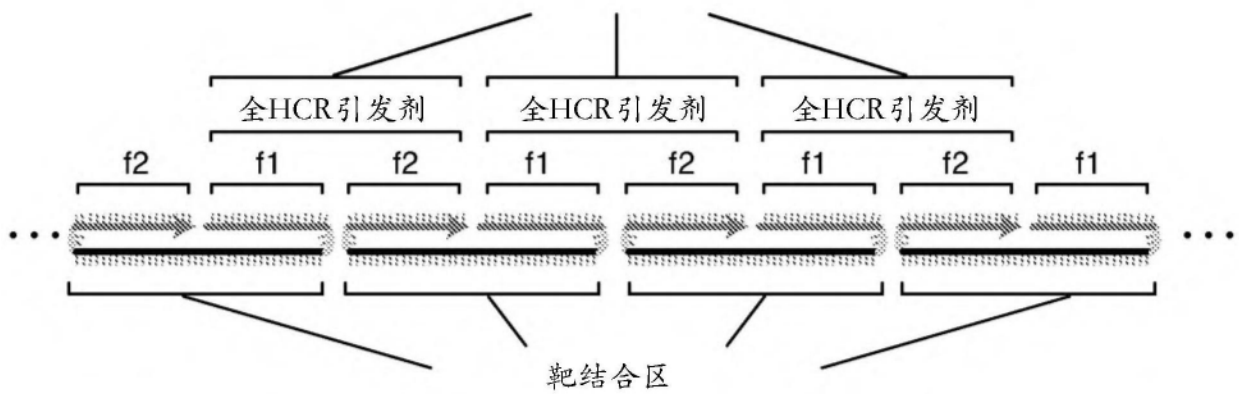


图17C

未标记的HCR 发夹

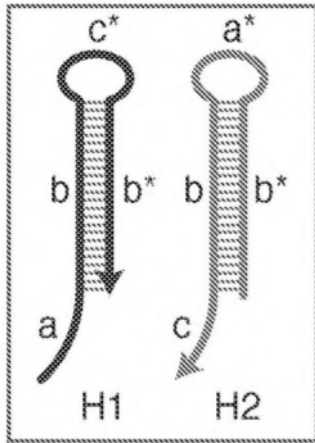


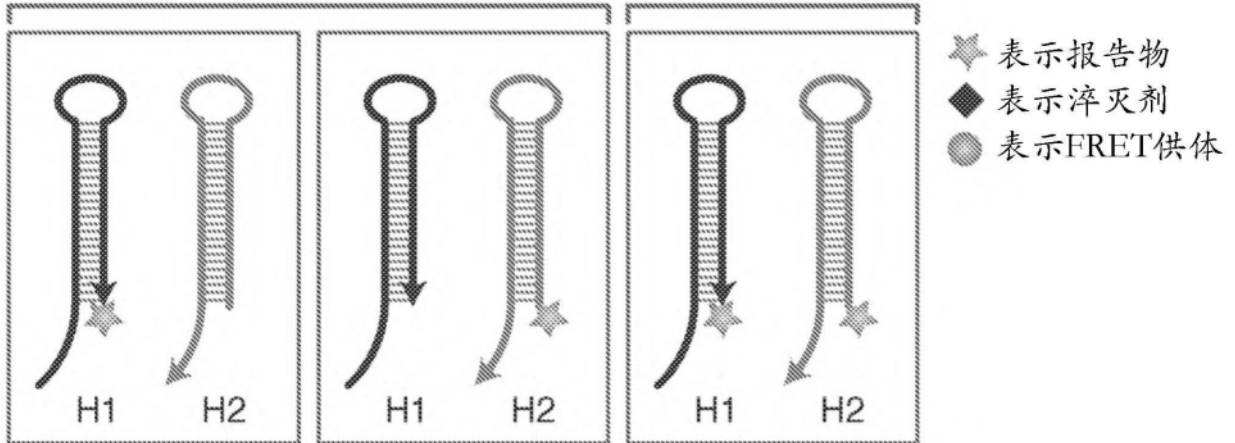
图18A

报告物标记的HCR 发夹

一个发夹是标记的

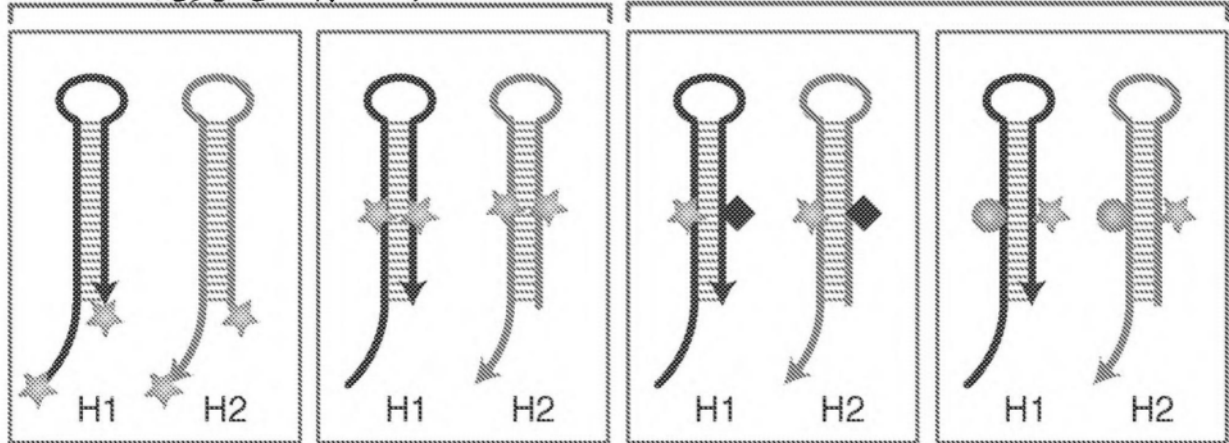
两个发夹是

标记的



发夹是双标记的

内部标记的发夹

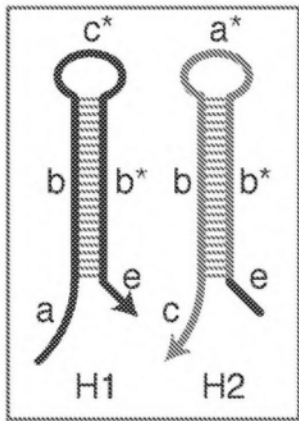


每个发夹标记有报
告物/淬灭剂对

每个发夹标
记有FRET
对

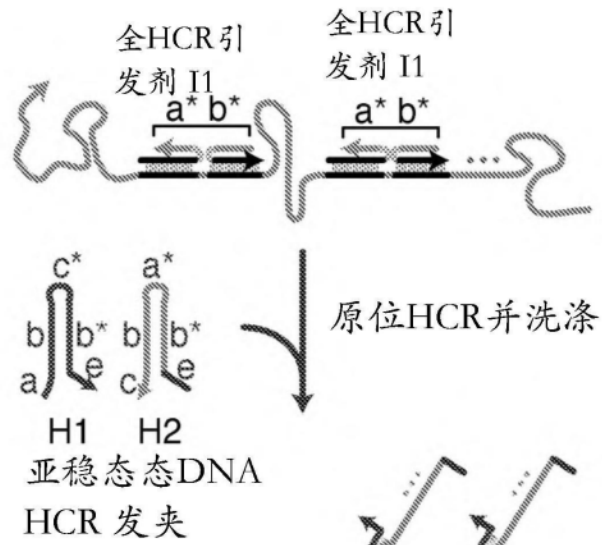
图18B

底物标记的HCR 发夹



区段“e”是底物

扩增



拴系的扩增聚合物

靶

标签探针携带报告物

标记并洗涤

底物结合区

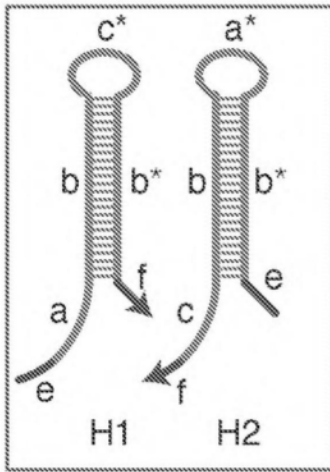
标记

拴系的荧光扩增聚合物

靶

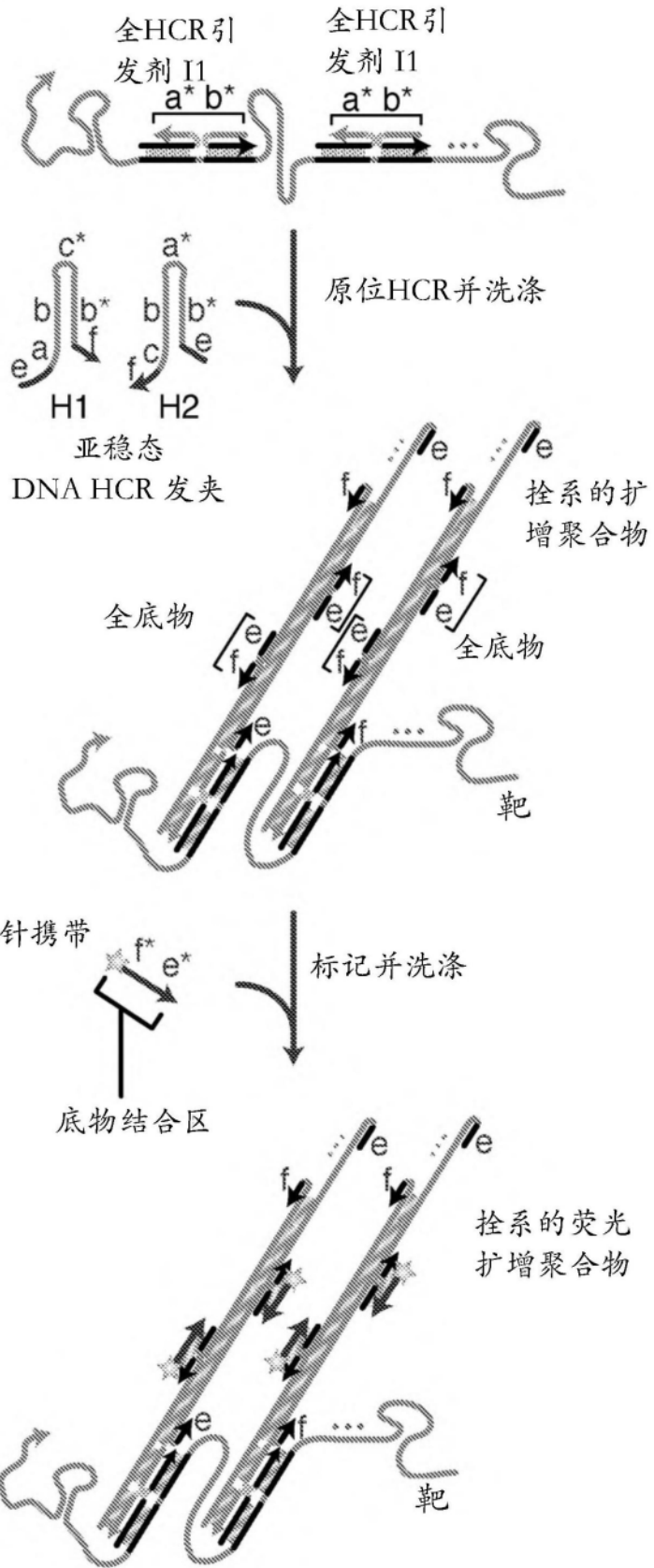
图18C

标记有分段底物的HCR 发夹



区段“e”和“f”是分段底物

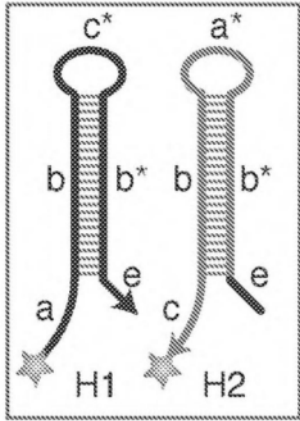
扩增



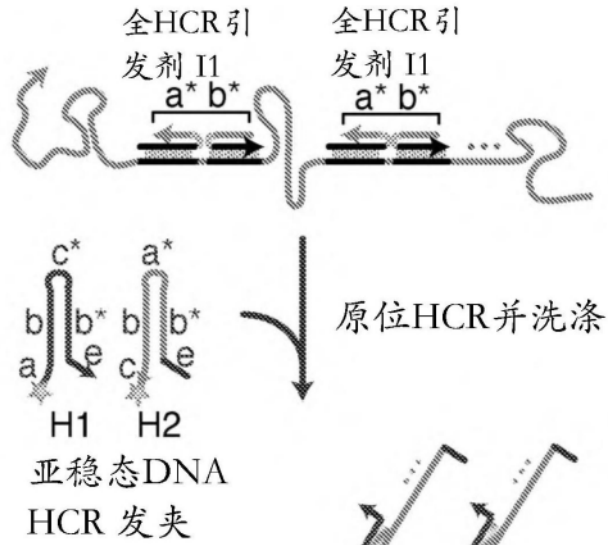
标记

图18D

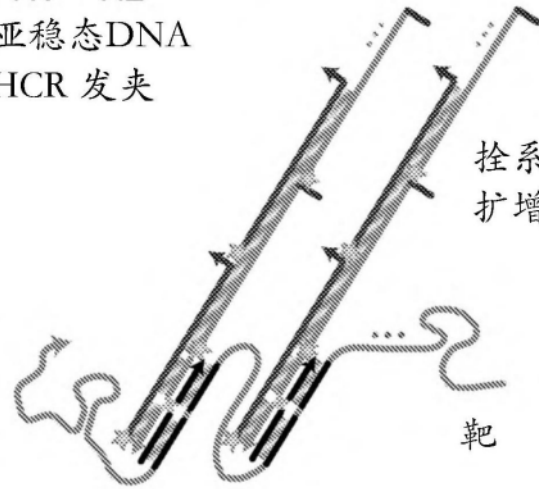
标记有报告物和底物的HCR发夹



扩增



拴系的荧光
扩增聚合物



标签探针携带
报告物

标记并洗涤

底物结
合区

标记

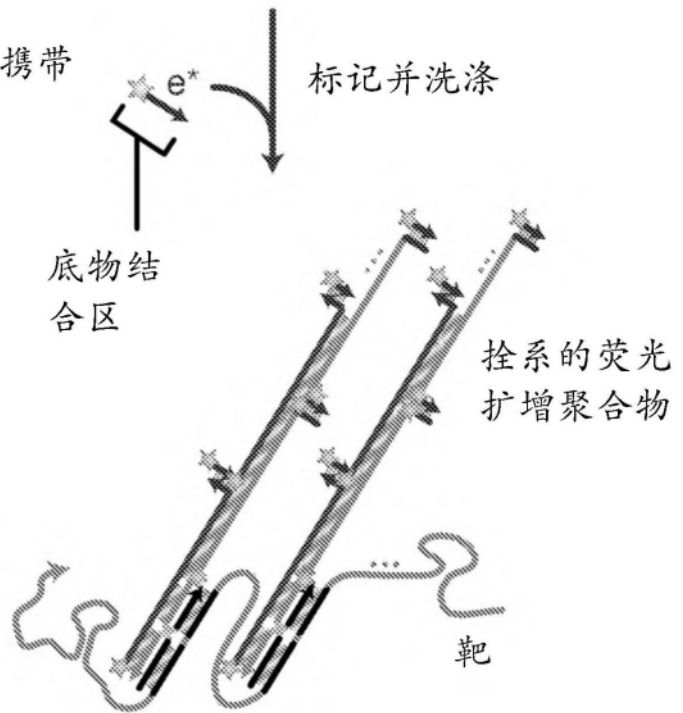
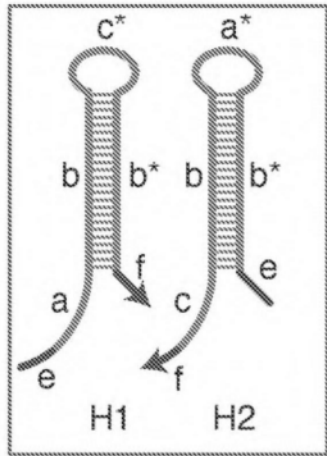


图18E

标记有分段底物的HCR 发夹
用淬灭的标签探针的免洗信号生成



区段“e”和“f”是分段底物

扩增

☆ 表示报告物
◆ 表示淬灭剂

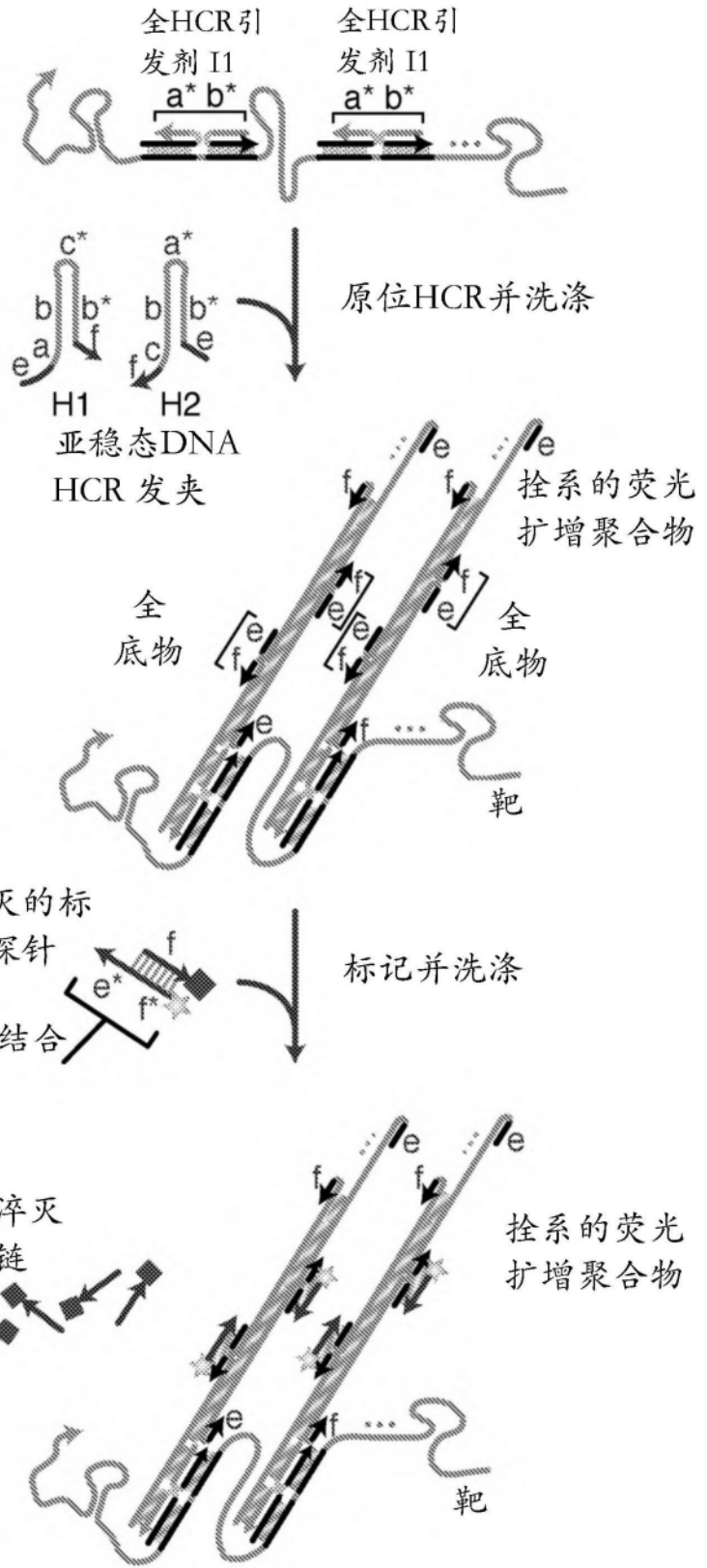


图18F

包含4个报告物标记的HCR发夹的HCR扩增器

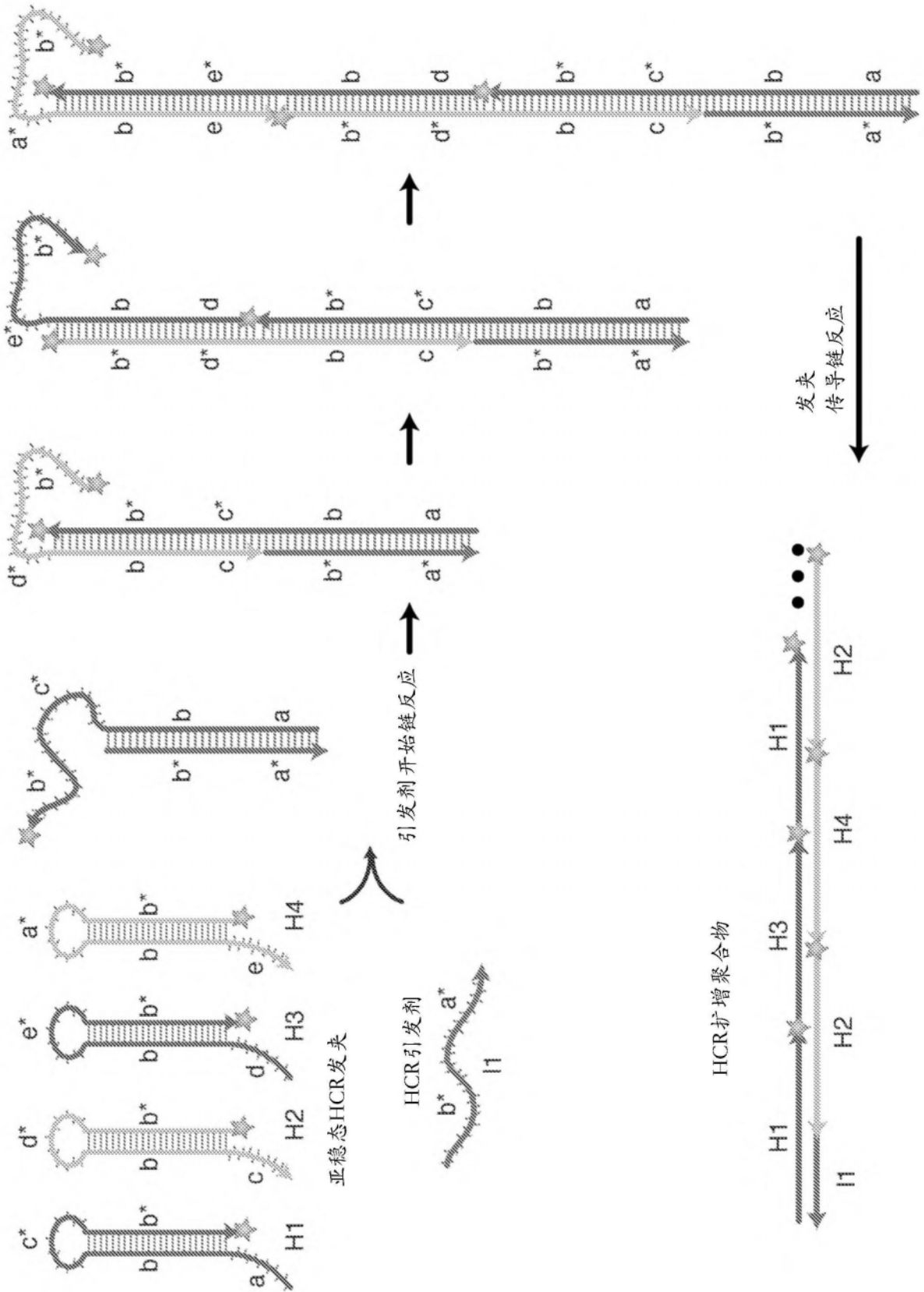


图19A

包含4个标记有FRET供体或受体的HCR发夹的HCR扩增器

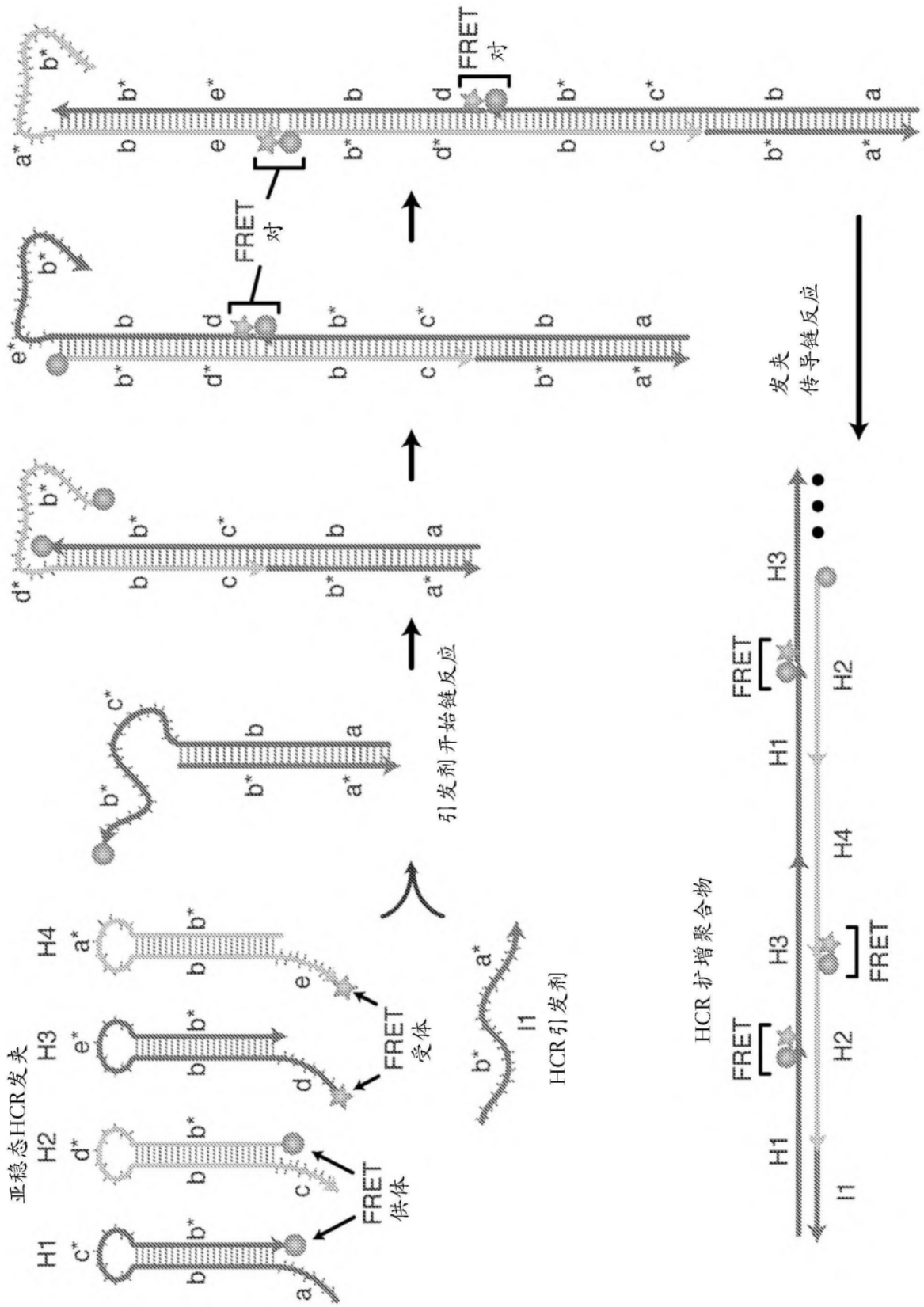


图19B

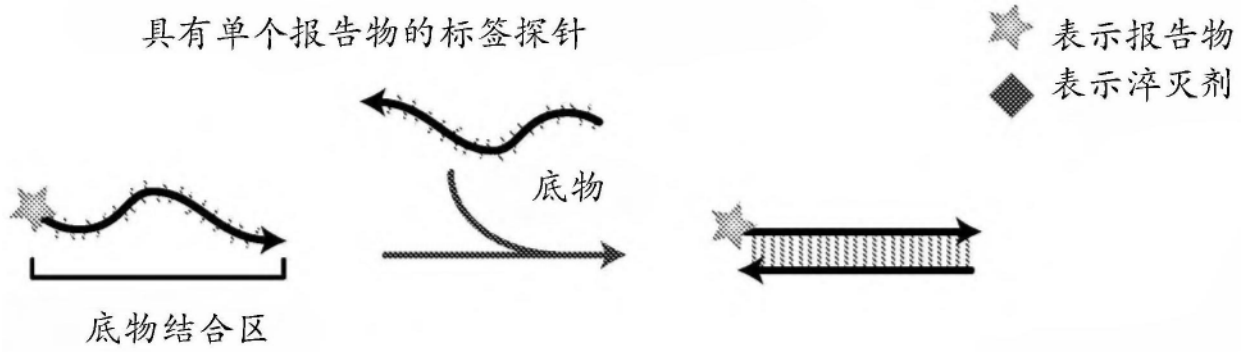


图20A

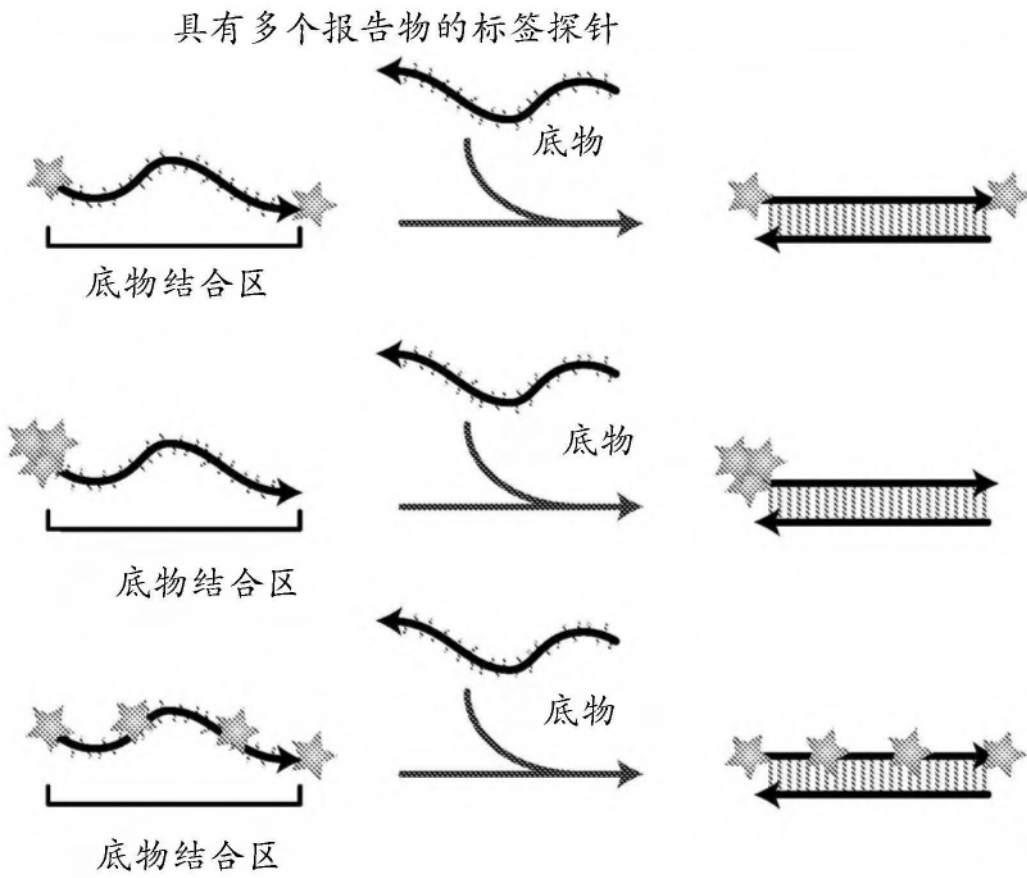


图20B

包含与阻断链(具有淬灭剂)杂交的标签链(具有报告物)的
标签探针

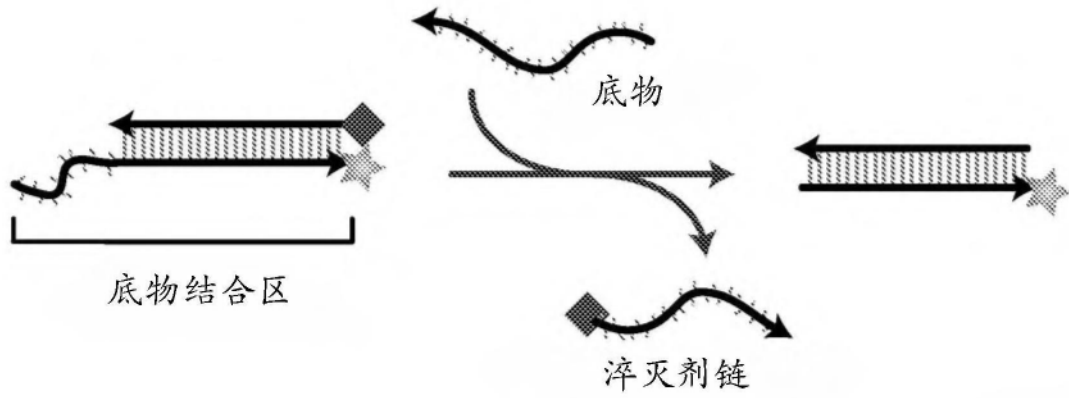


图20C

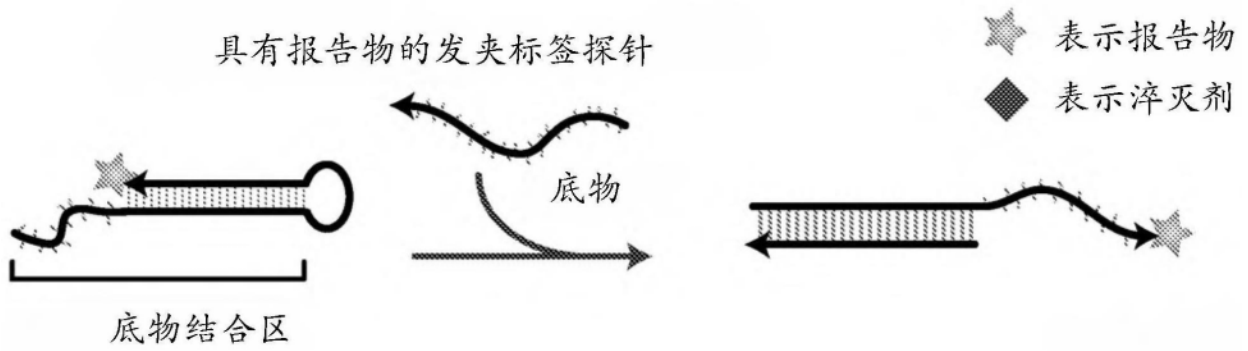


图20D

具有报告物和淬灭剂的发夹标签探针

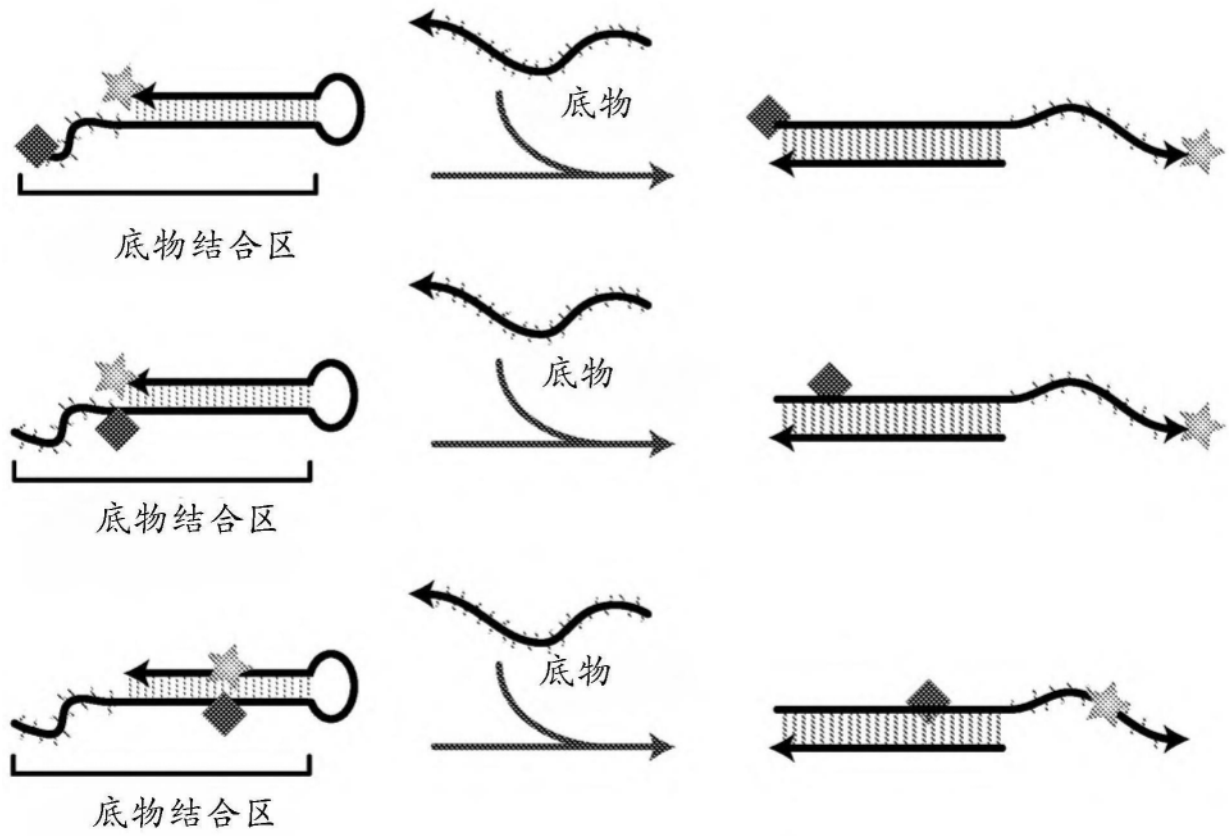


图20E

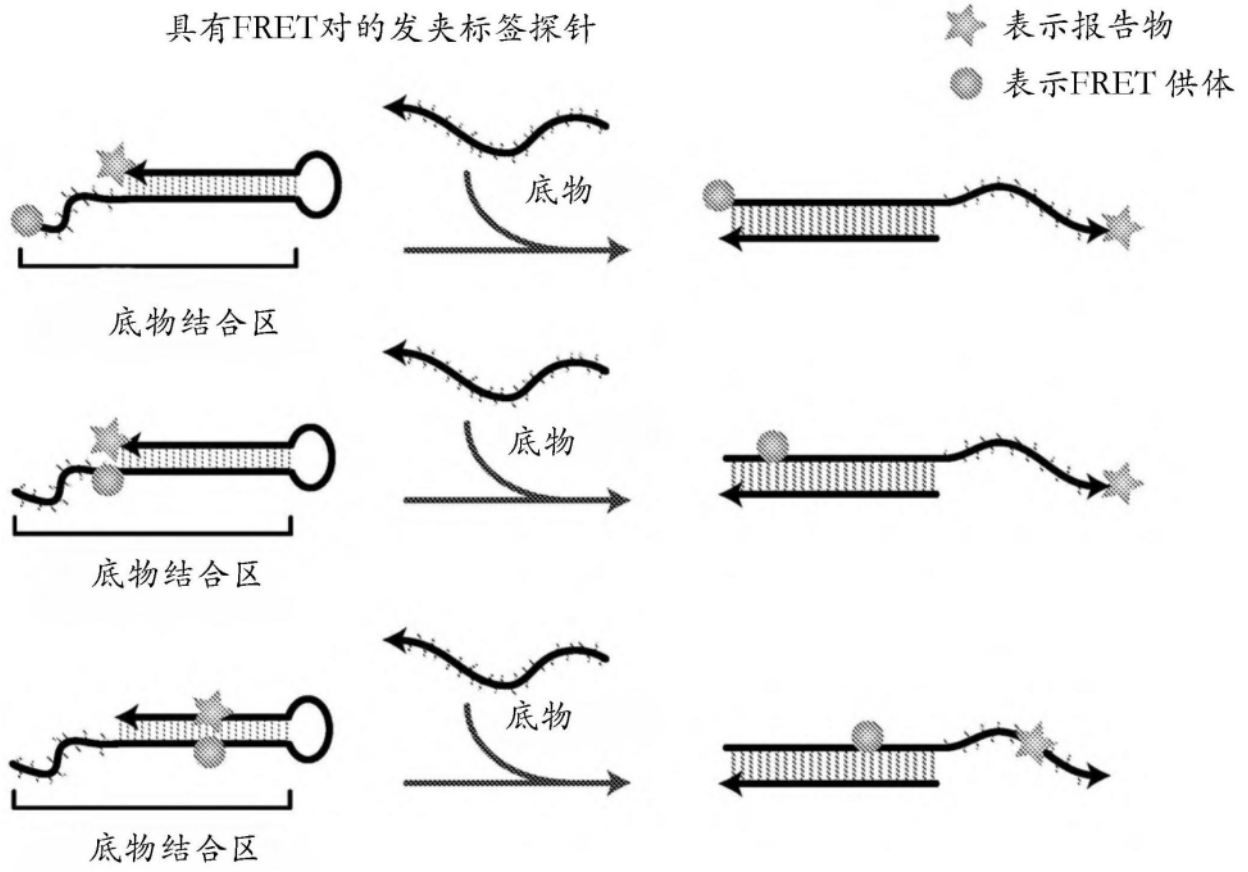


图20F

分段引发剂探针P1和P2各自携带全HCR引发剂I1的一部分，
这样两个探针都不能单独通过打开HCR发夹H1来引发
HCR信号扩增

HCR分段引发剂探针P1和P2与靶上的邻近结
合位点杂交以共定位全HCR引发剂I1

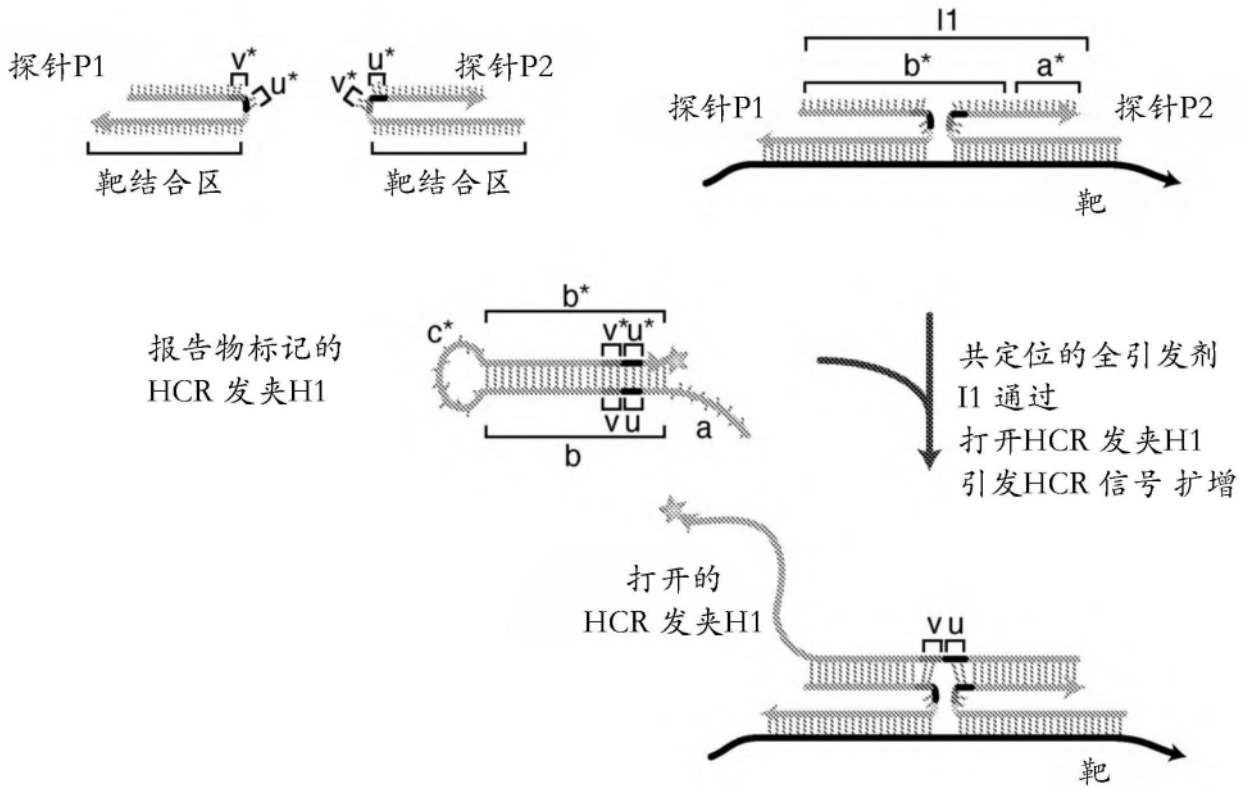


图21A

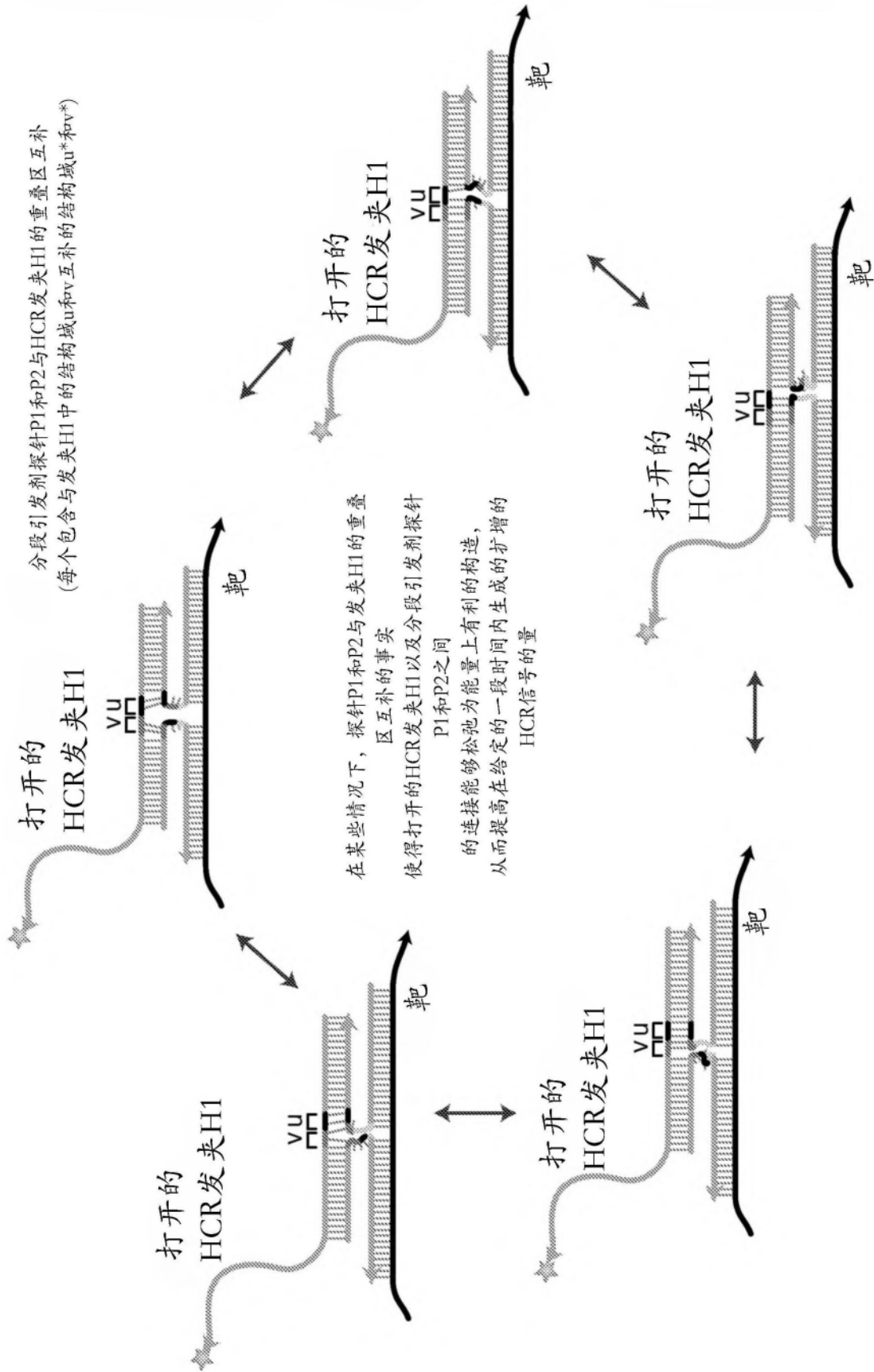


图21B

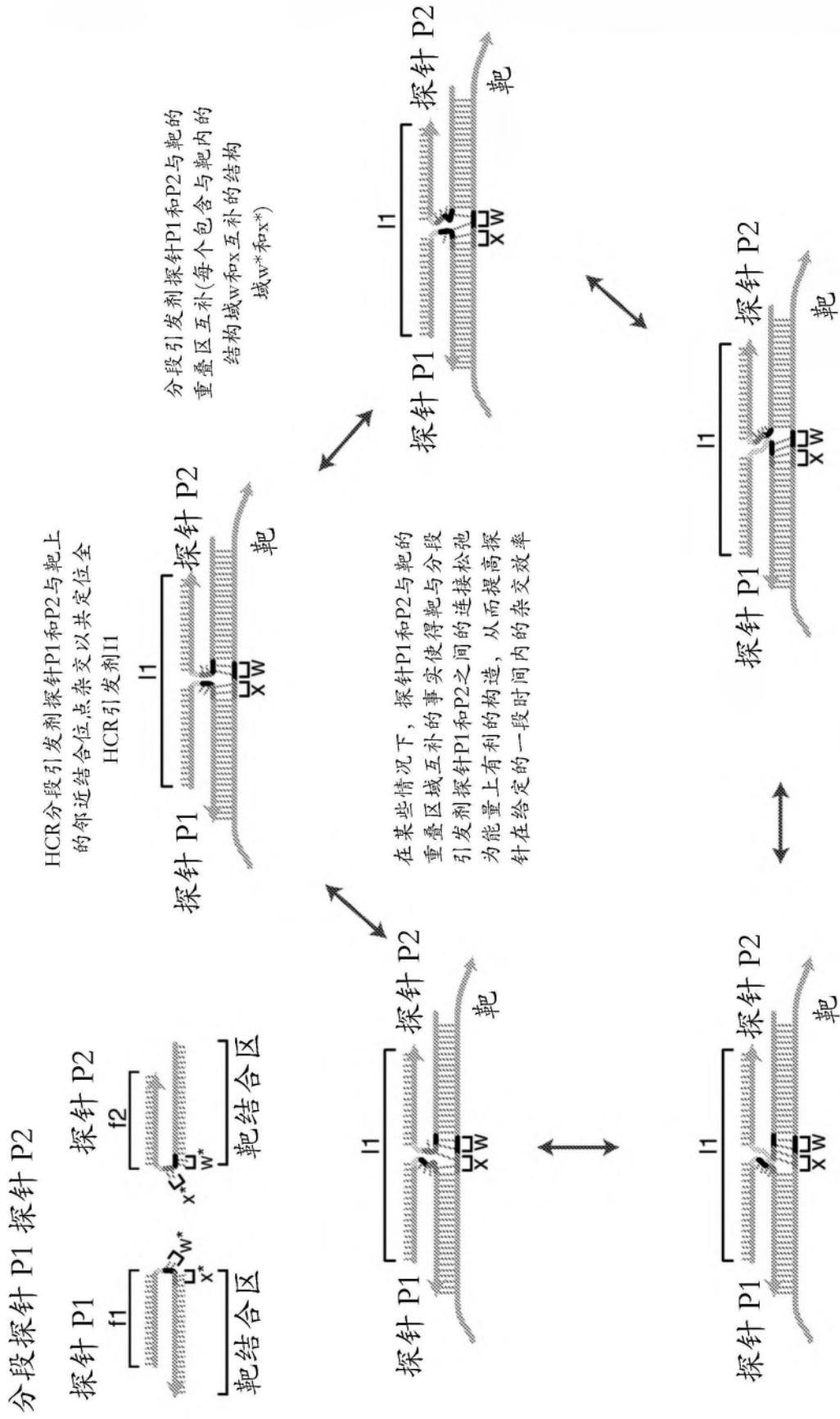


图22

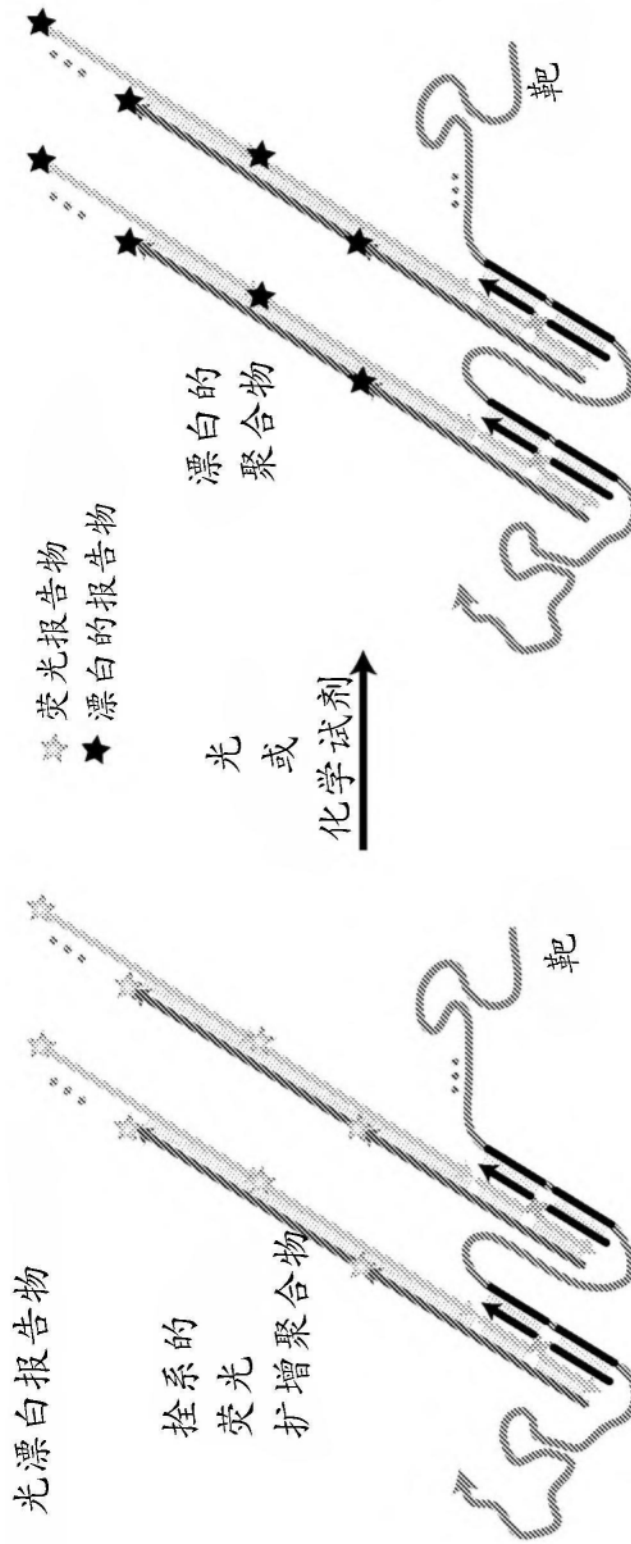


图23A

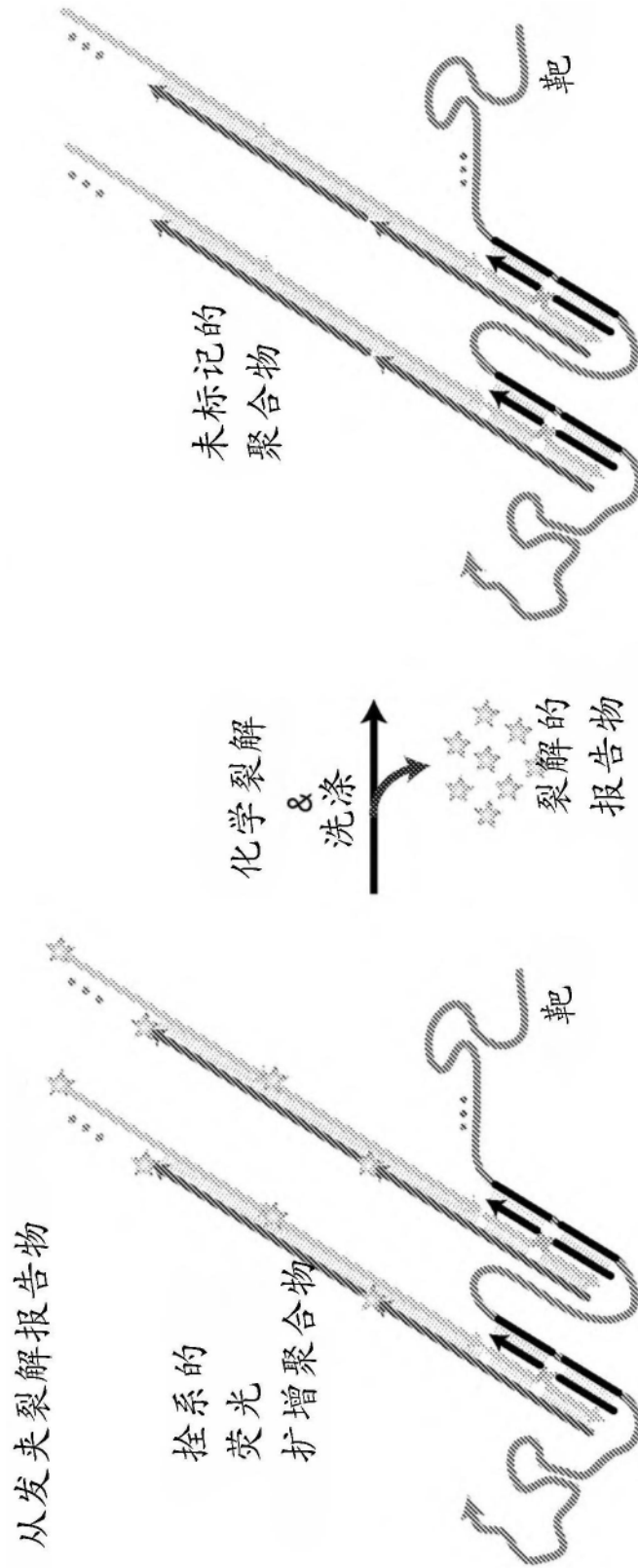


图23B

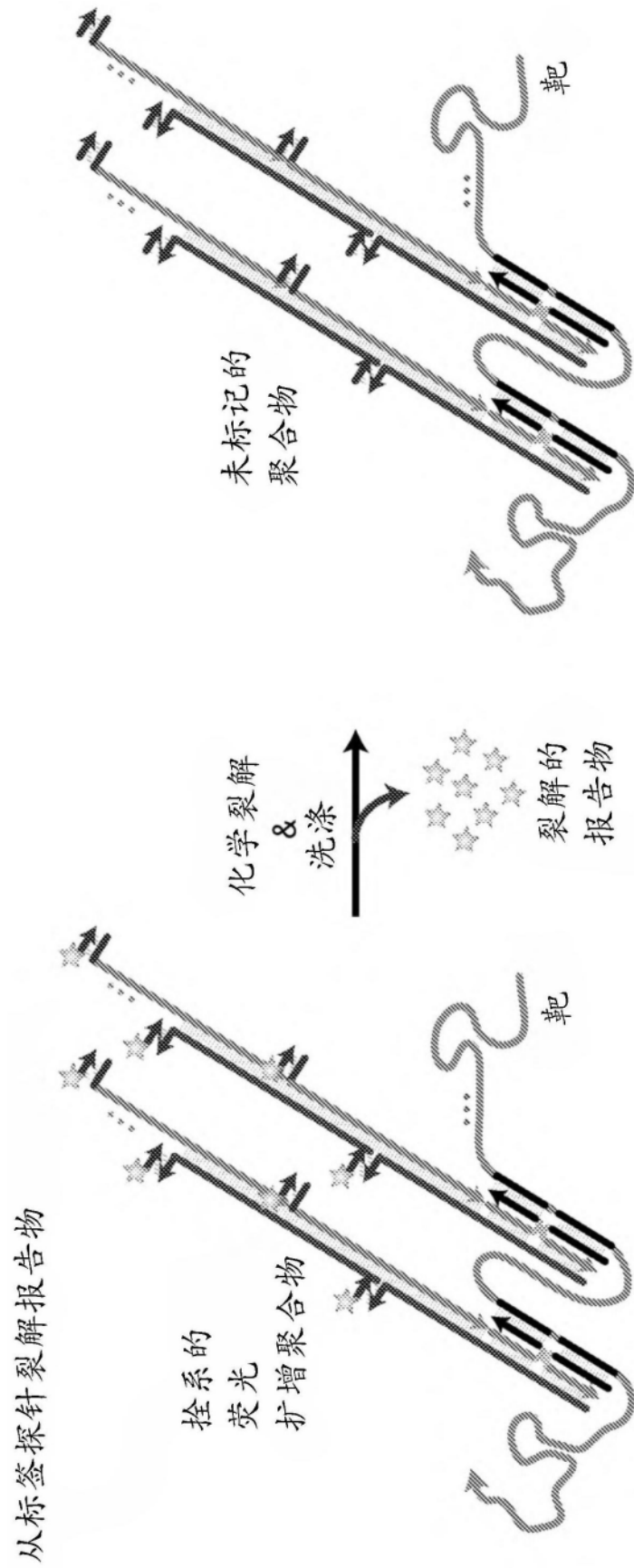


图23C

裂解发夹

每个HCR发夹的输入和输出结
构域之间的可裂解基因

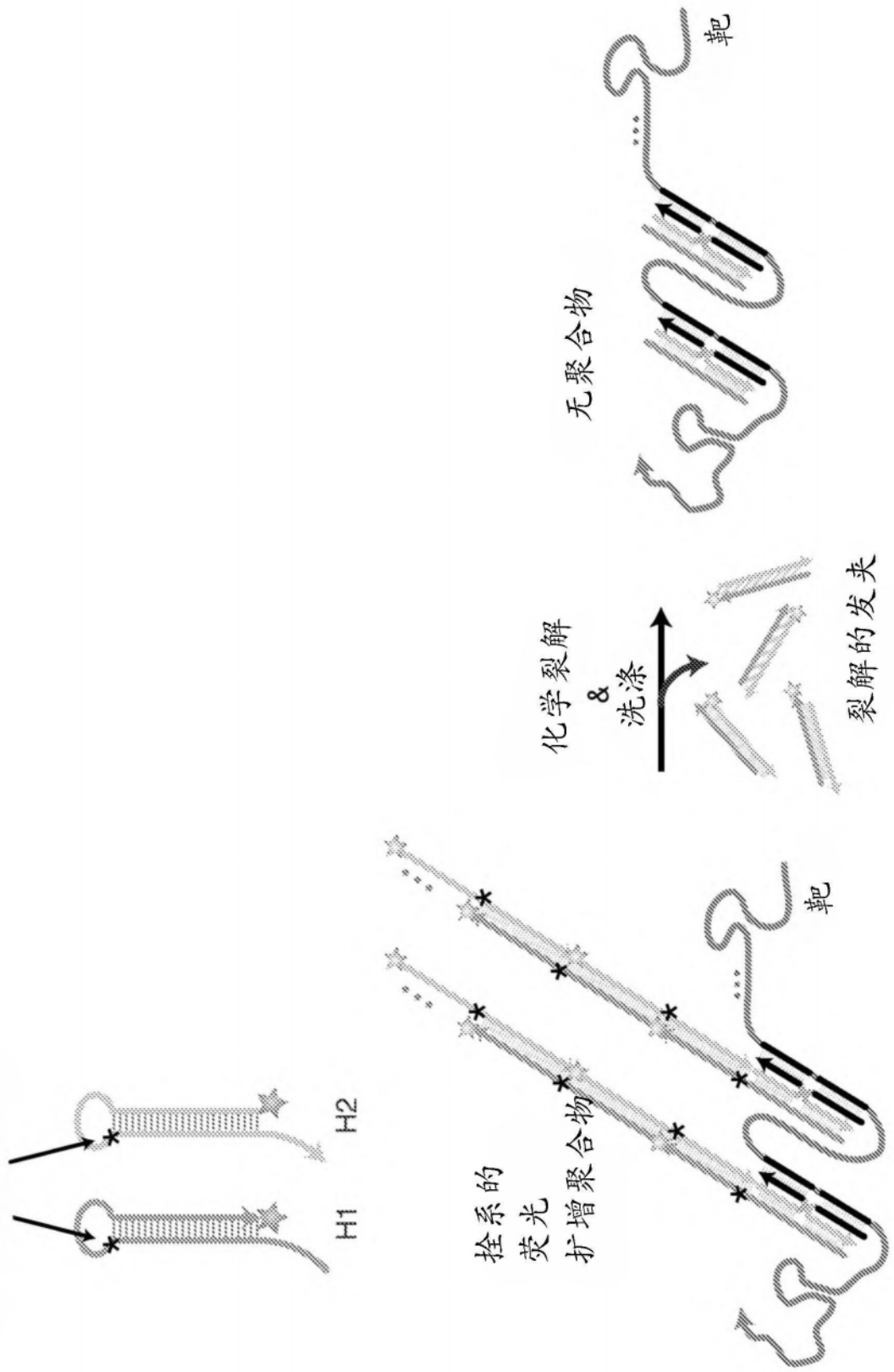
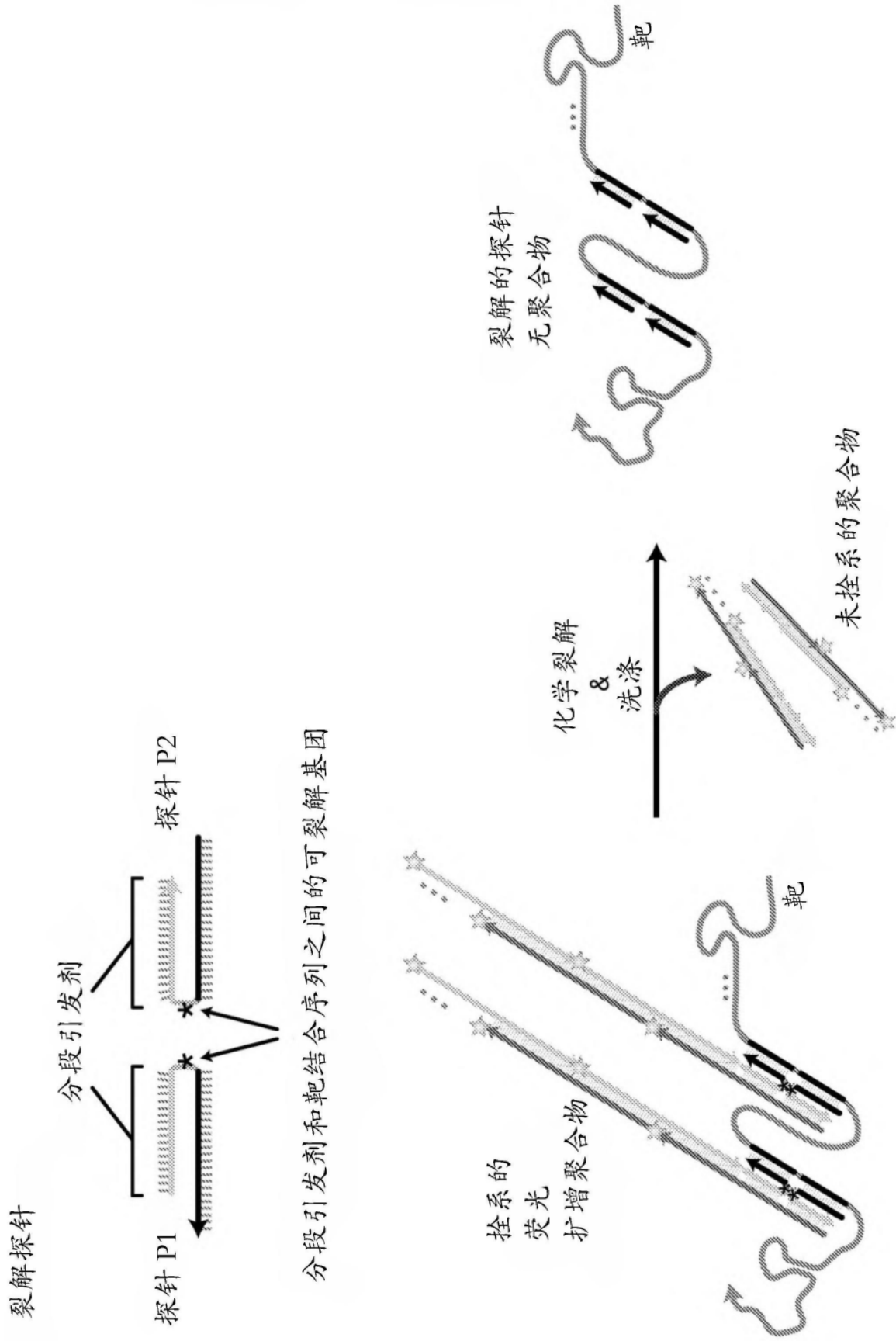


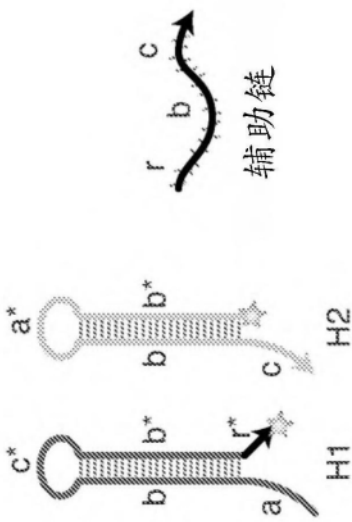
图23D



分段引发剂和靶结合序列之间的可裂解基团

图23E

用辅助链使发夹去杂交



区段“r*”是用于
辅助链成核的toehold

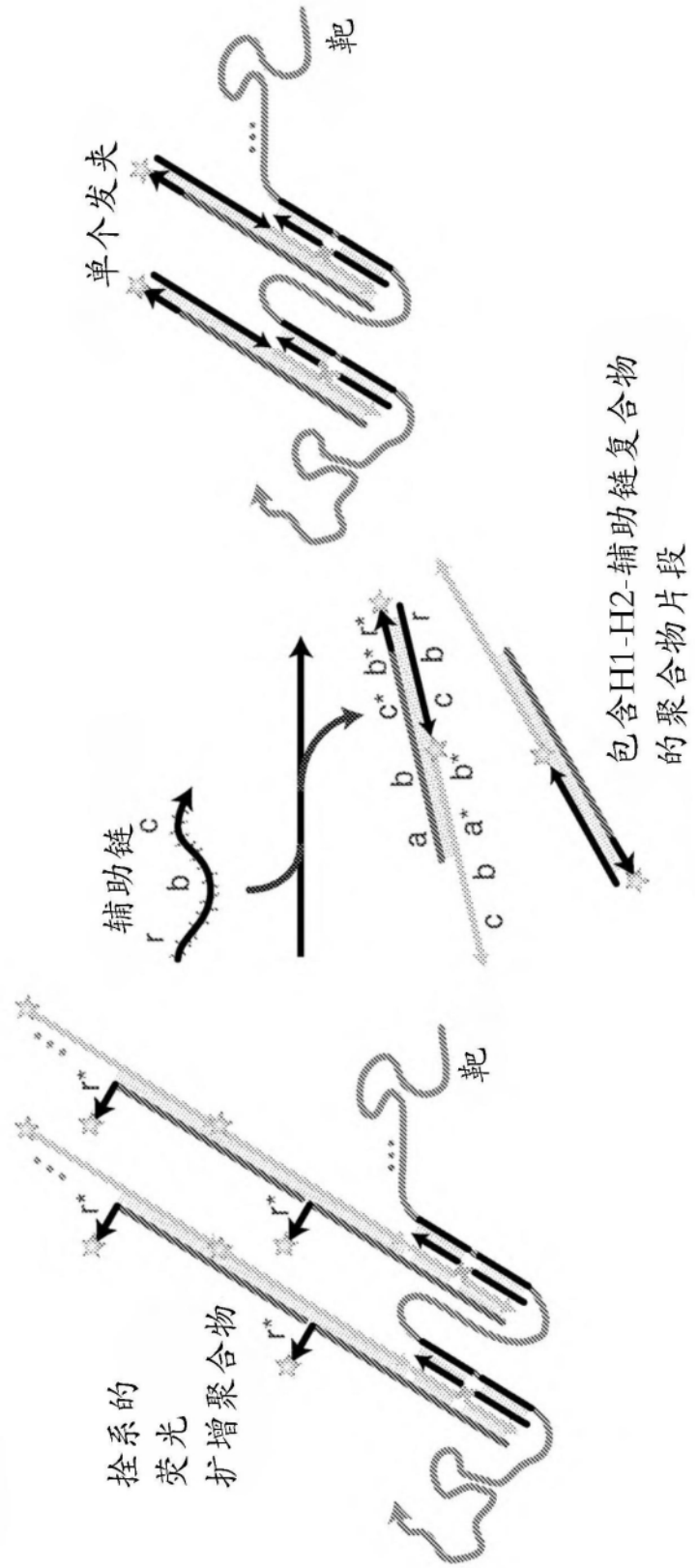


图23F

用辅助链使标签探针去杂交

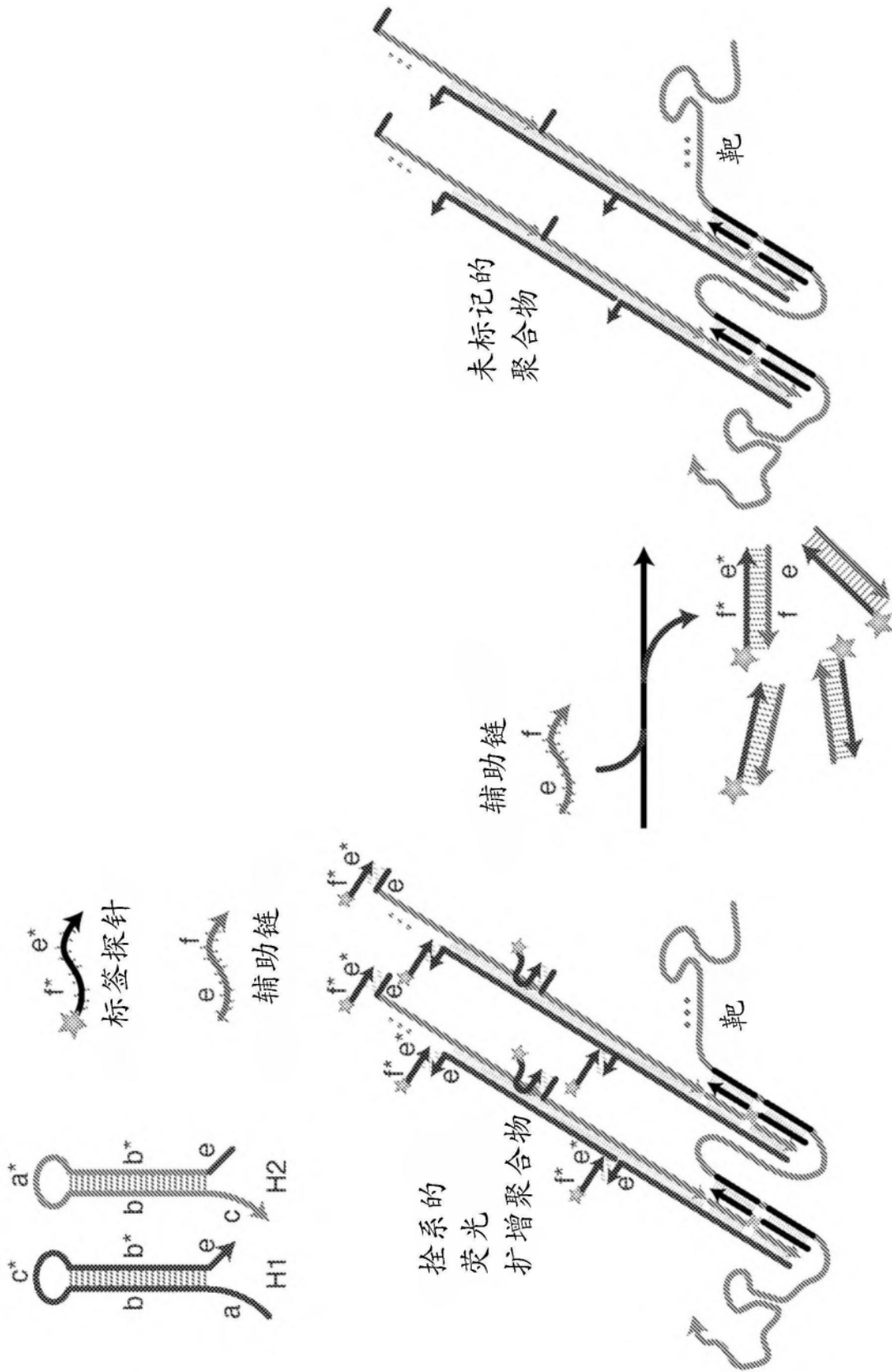


图23G

以化学试剂或升高的温度从聚合物去稳定发夹

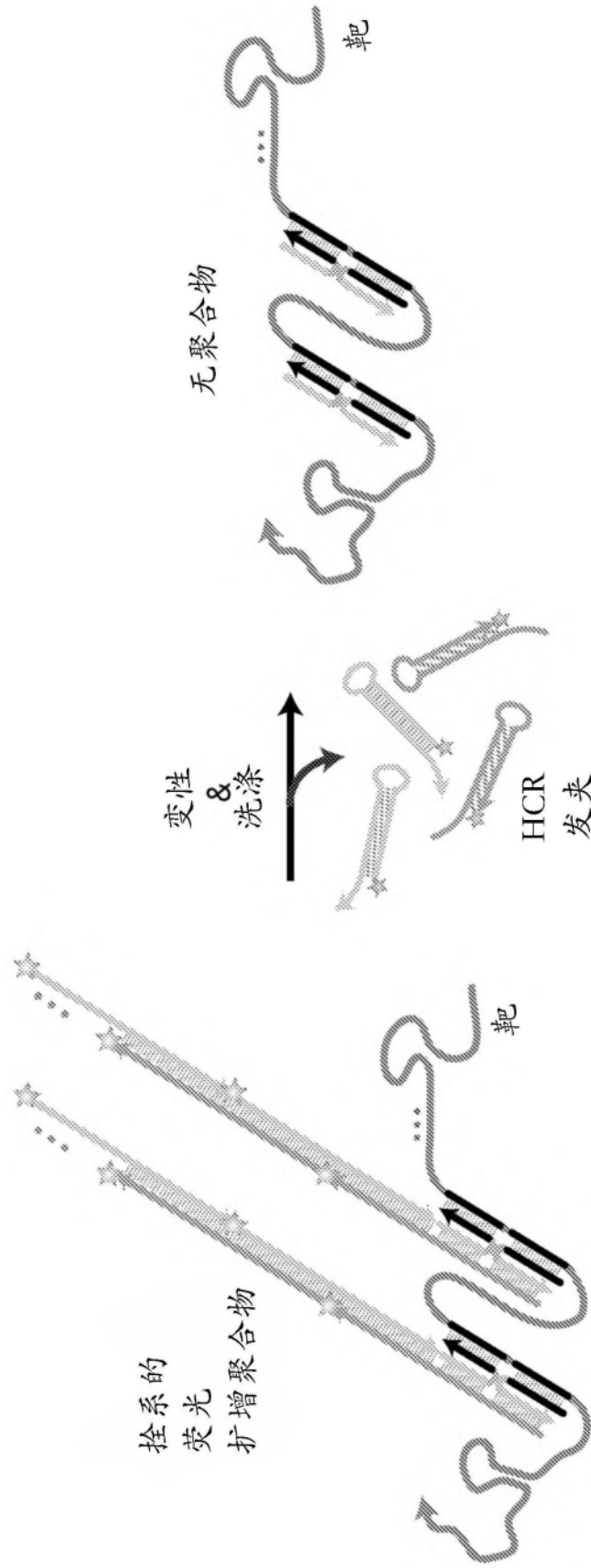


图23H

以化学试剂或升高的温度从靶去稳定探针

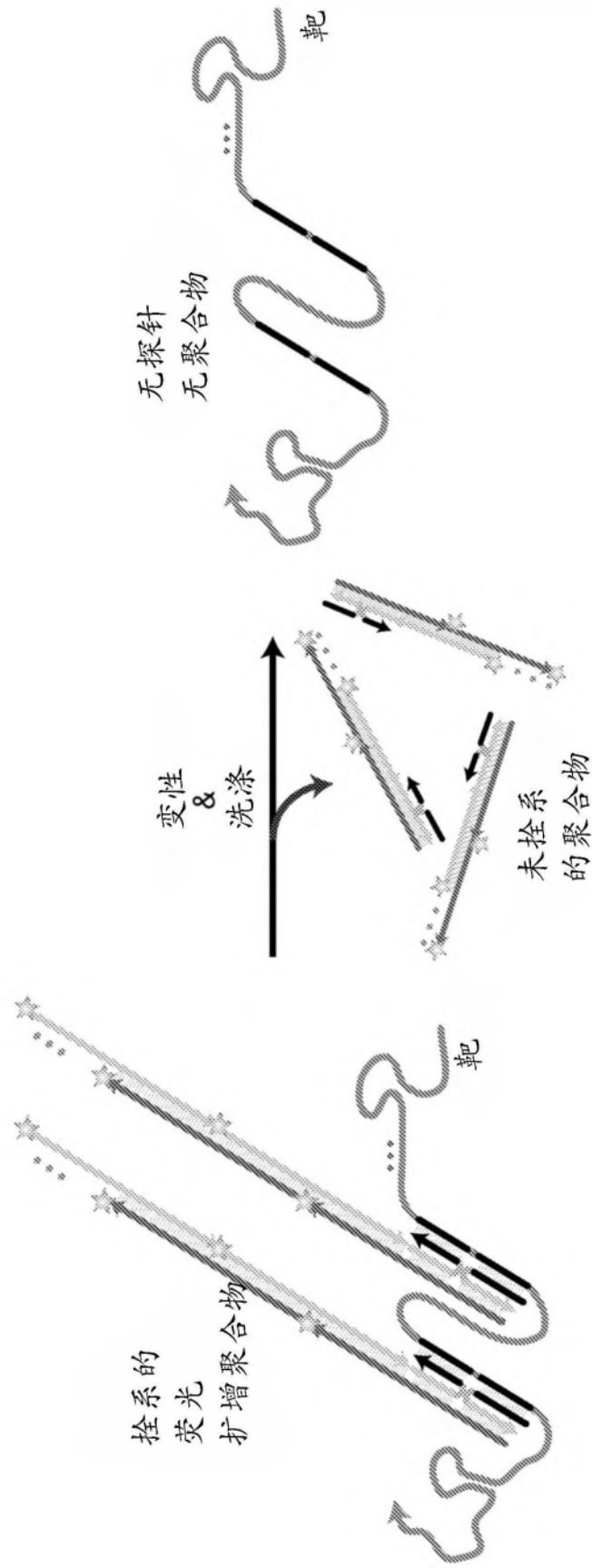


图23I

以化学试剂或升高的温度的底物去稳定标签探针

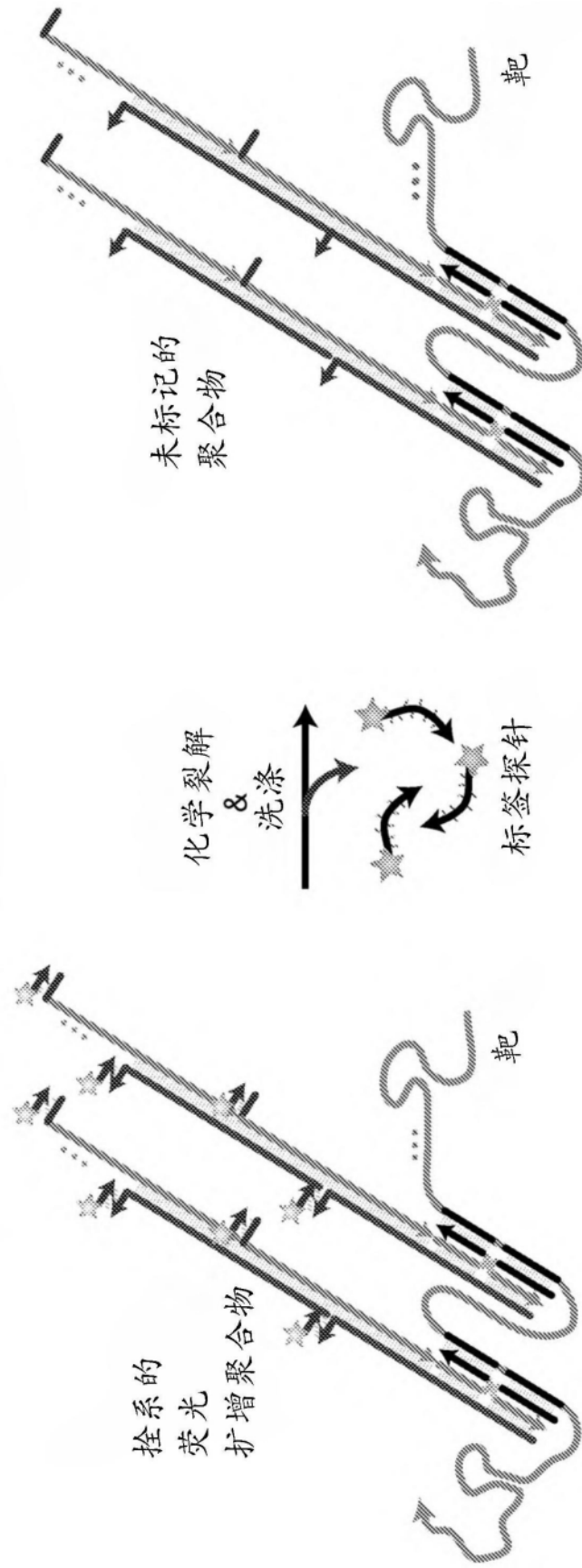
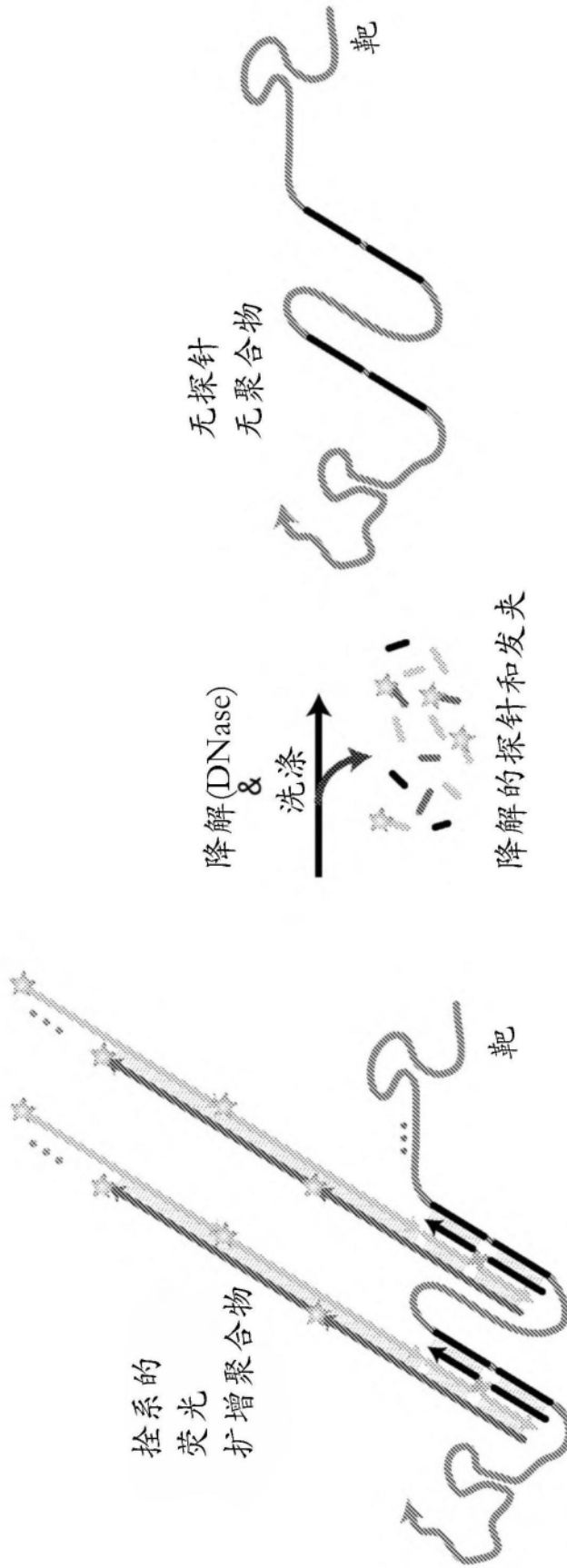


图23J

用酶(例如, DNA酶)降解HCR探针和聚合物



拴系的
荧光
扩增聚合物

无探针
无聚合物

降解(DNase)
&
洗涤

降解的探针和发夹

图23K

用RNA酶降解RNA靶

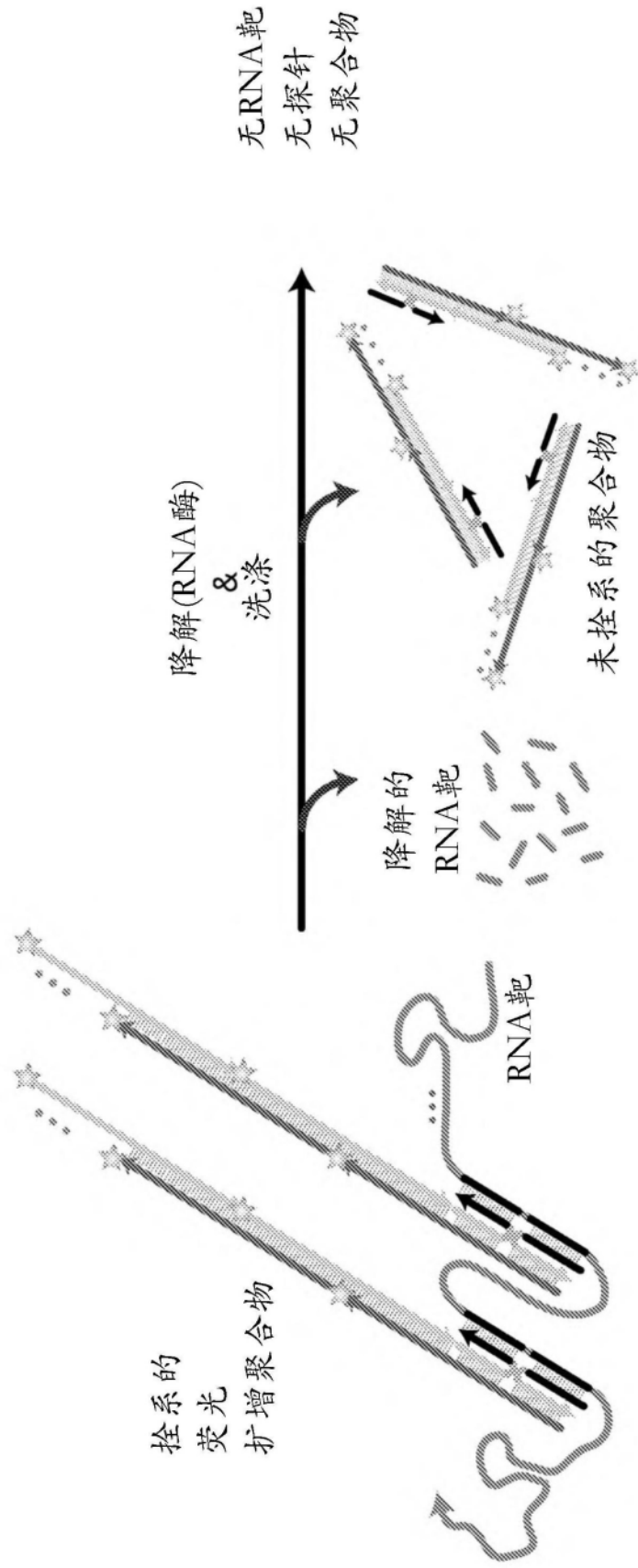


图23L

用蛋白酶降解蛋白质靶和抗体

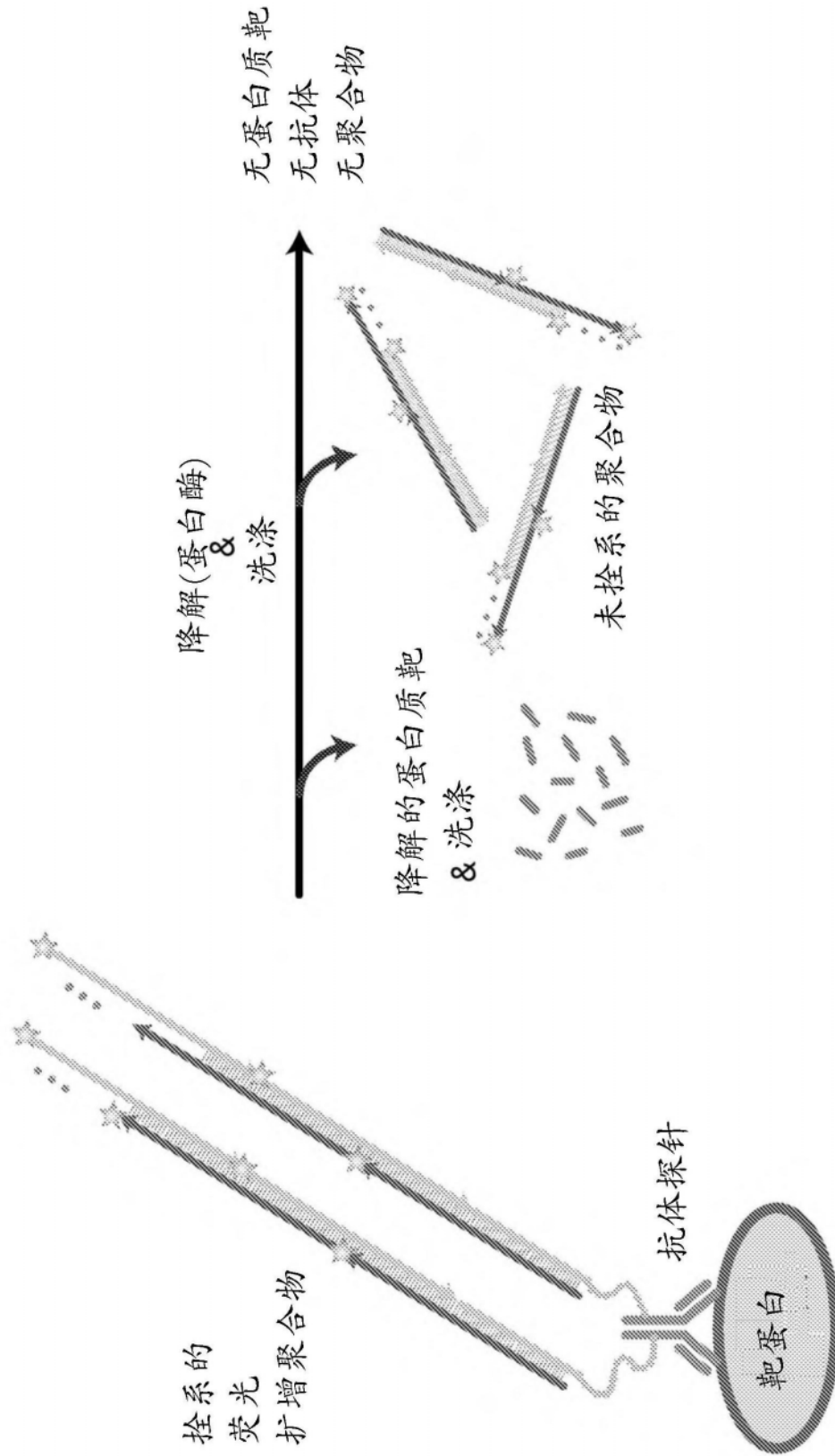


图23M

用RNA酶降解RNA靶以及用DNA酶降解HCR探针和发夹

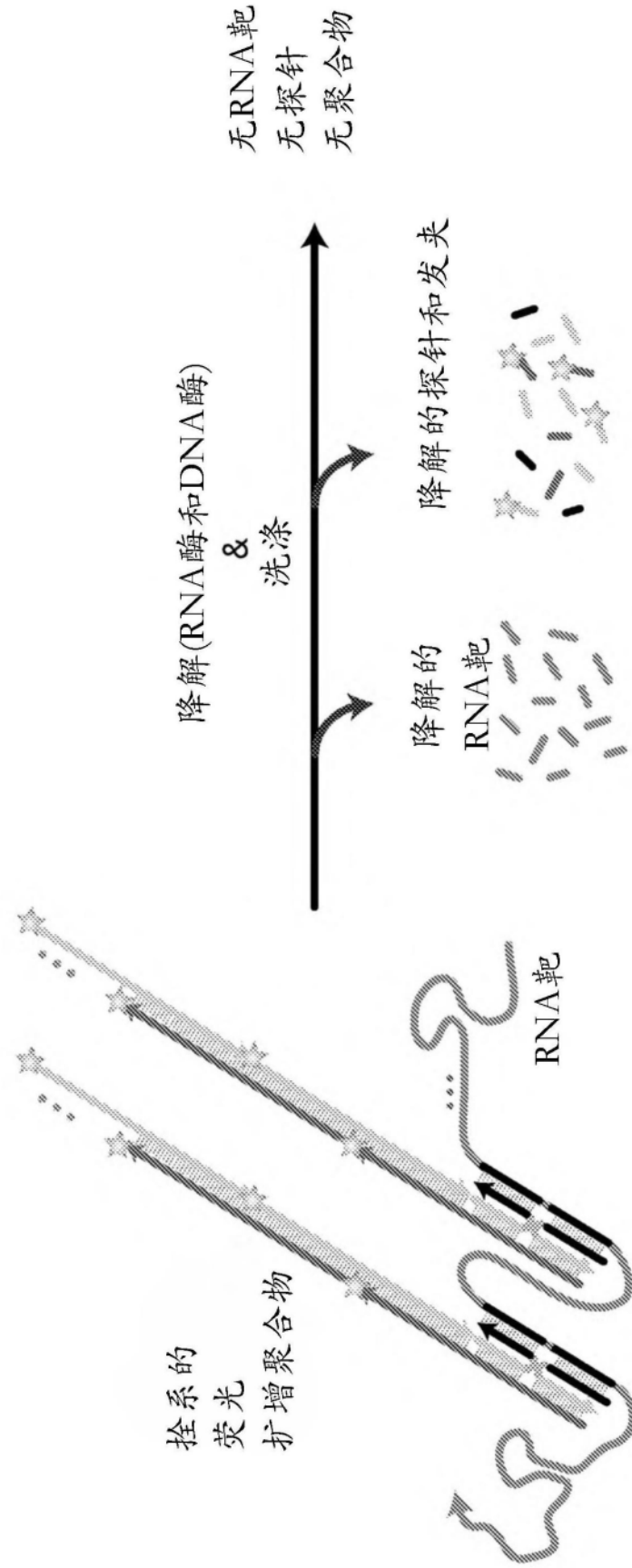


图23N

用蛋白酶降解蛋白质靶和抗体以及用DNA酶降解HCR探针和发夹

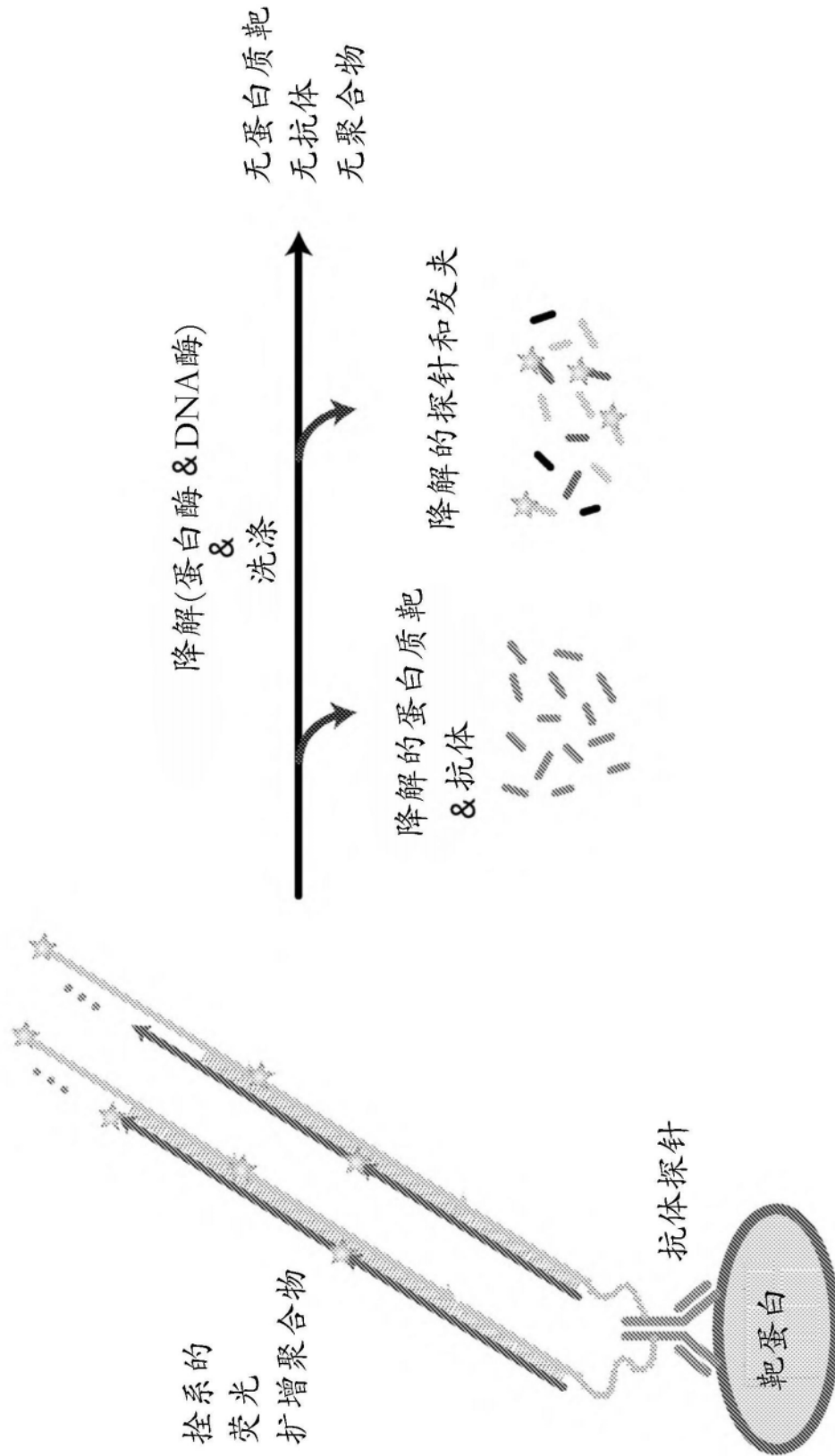


图230

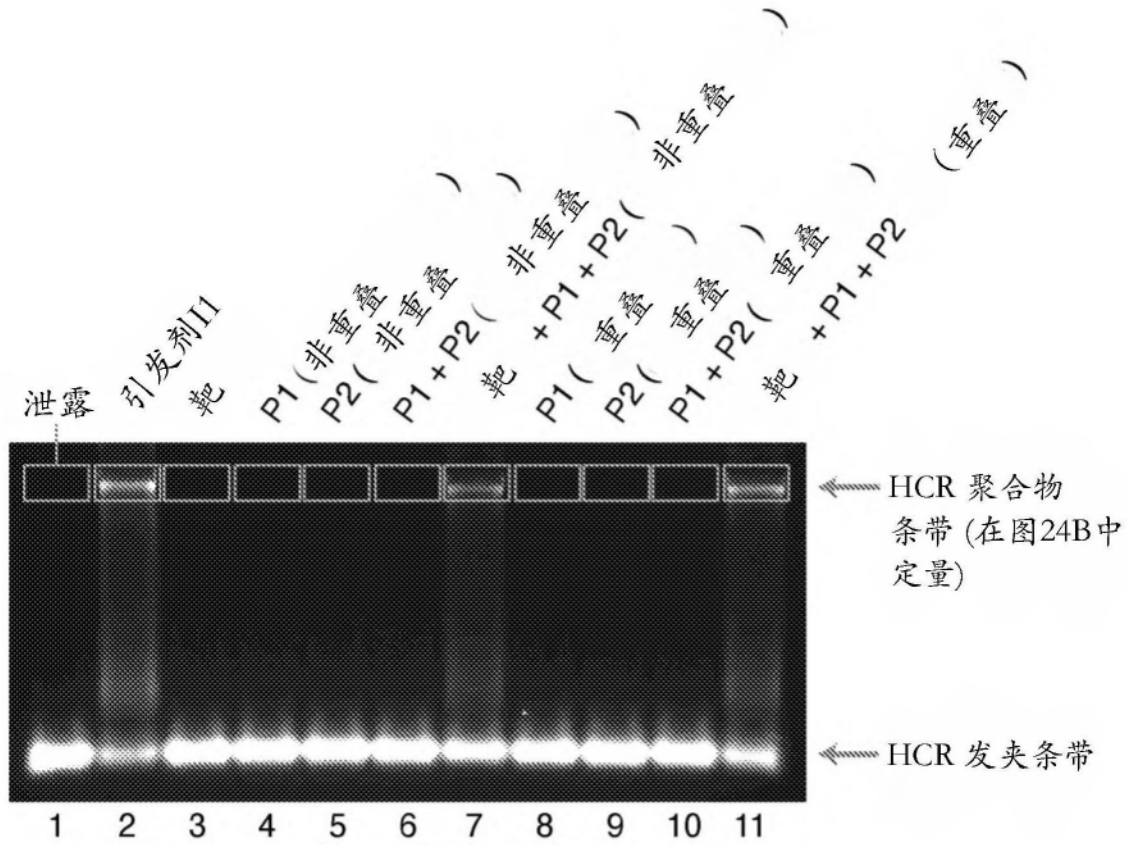


图24A

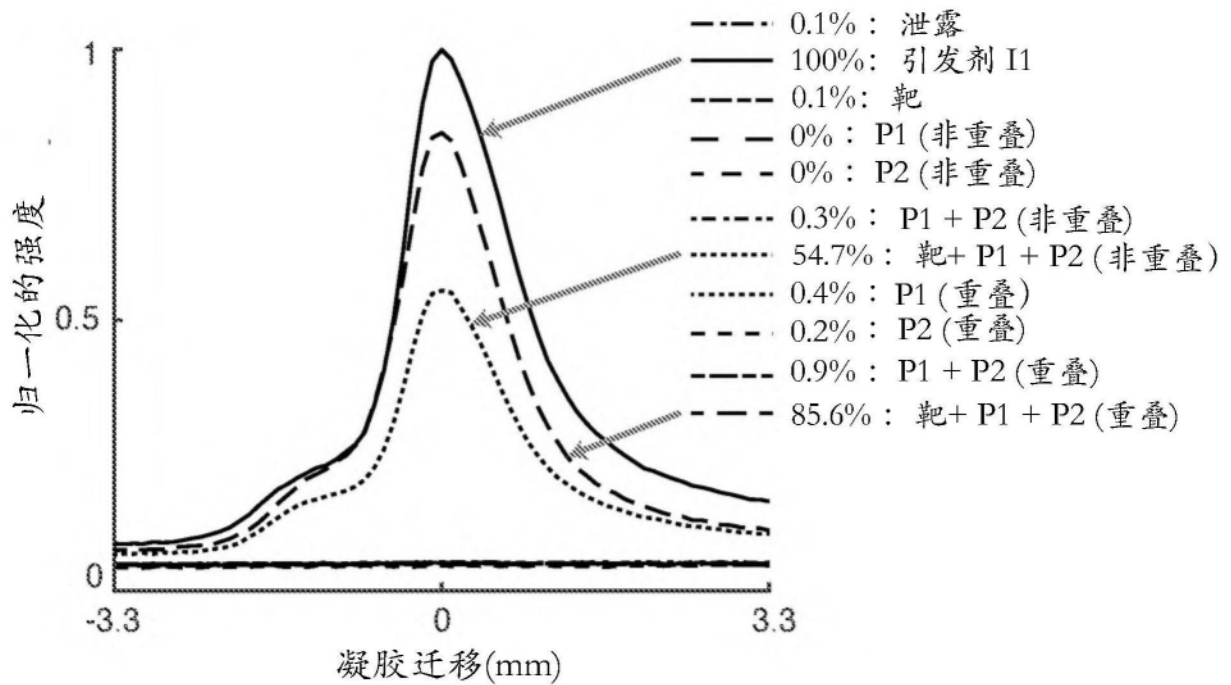


图24B

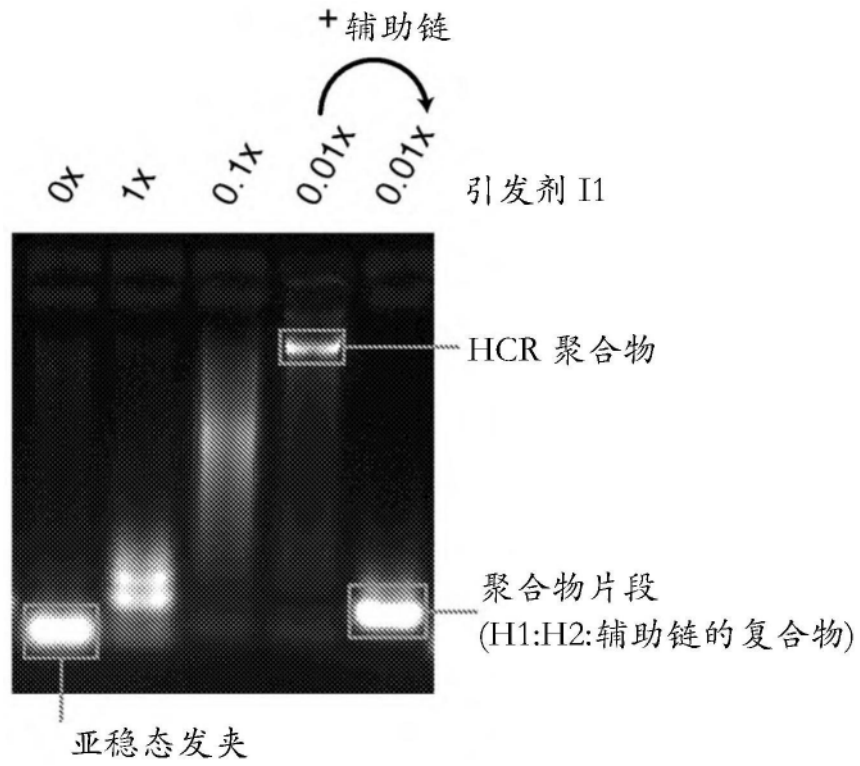


图25A

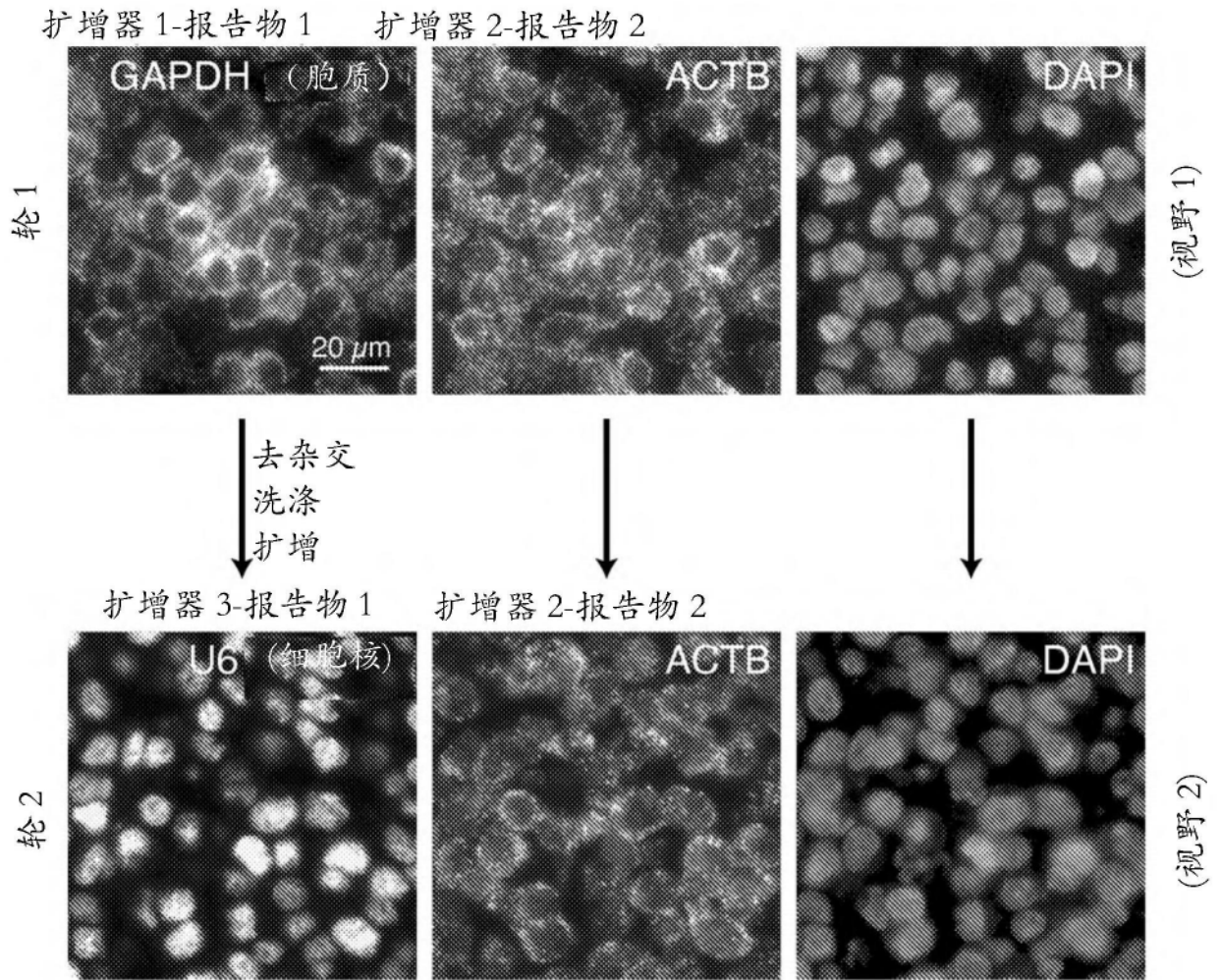


图25B

方法A

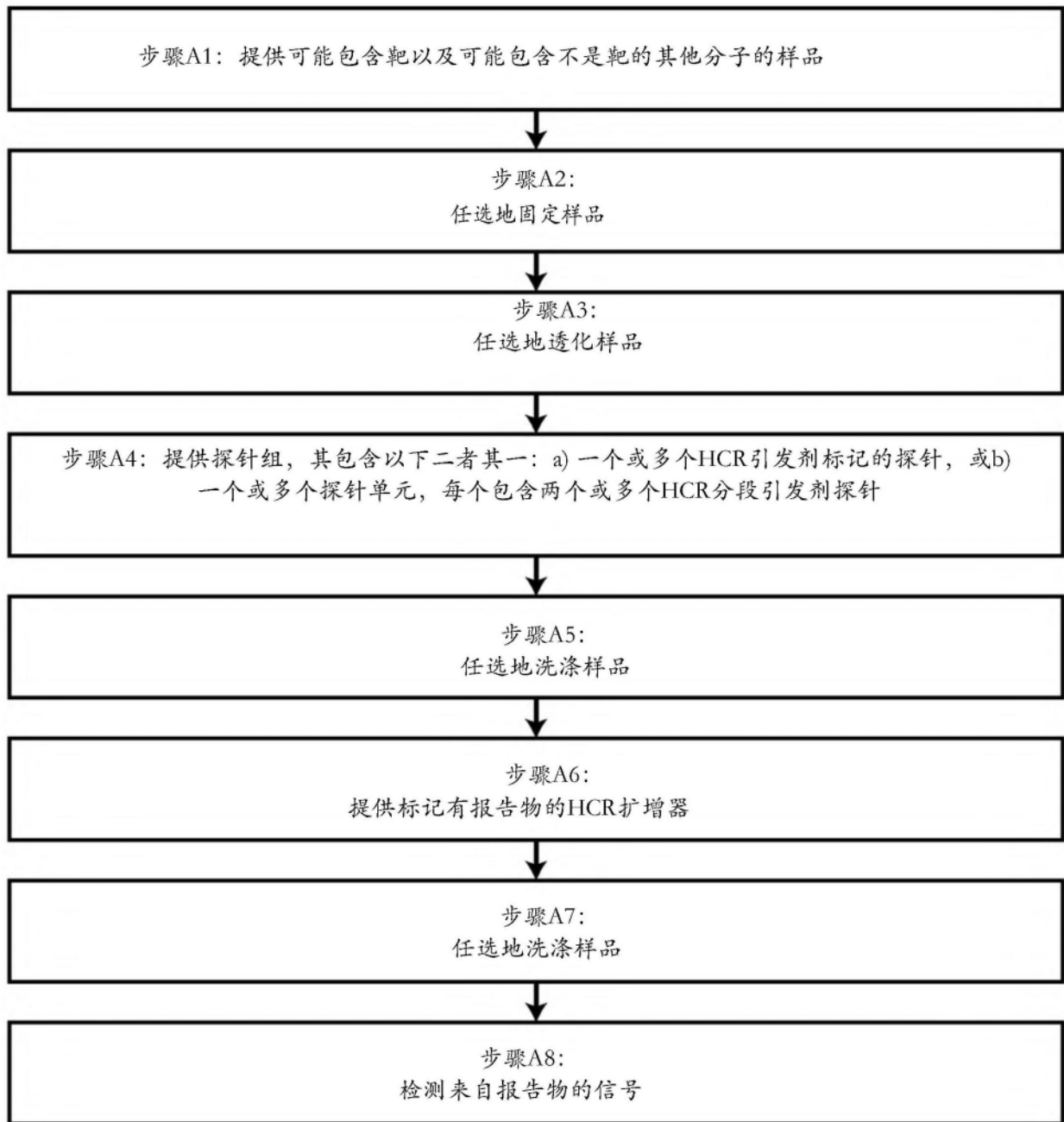


图26A

方法B

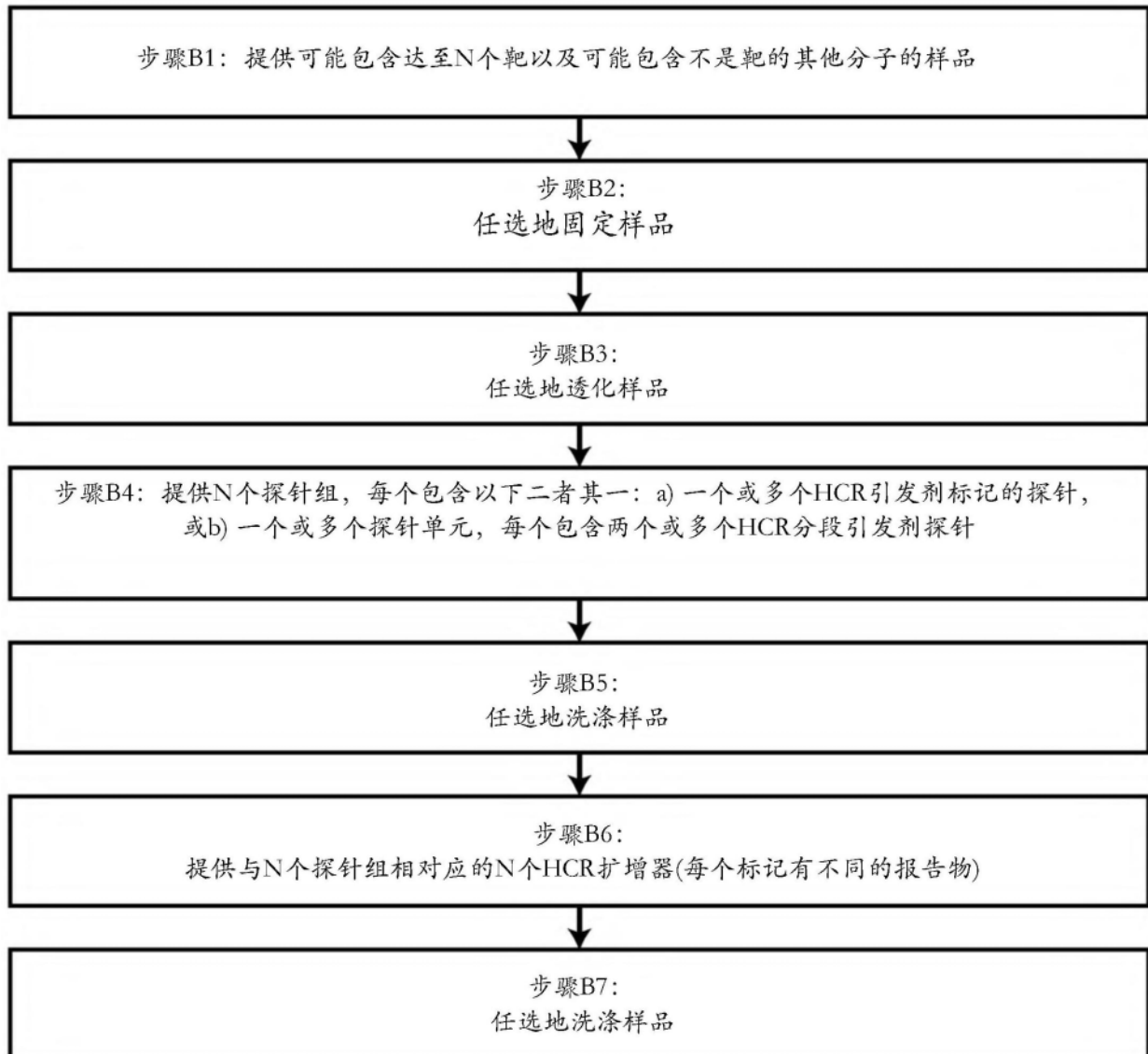


图26B

方法C

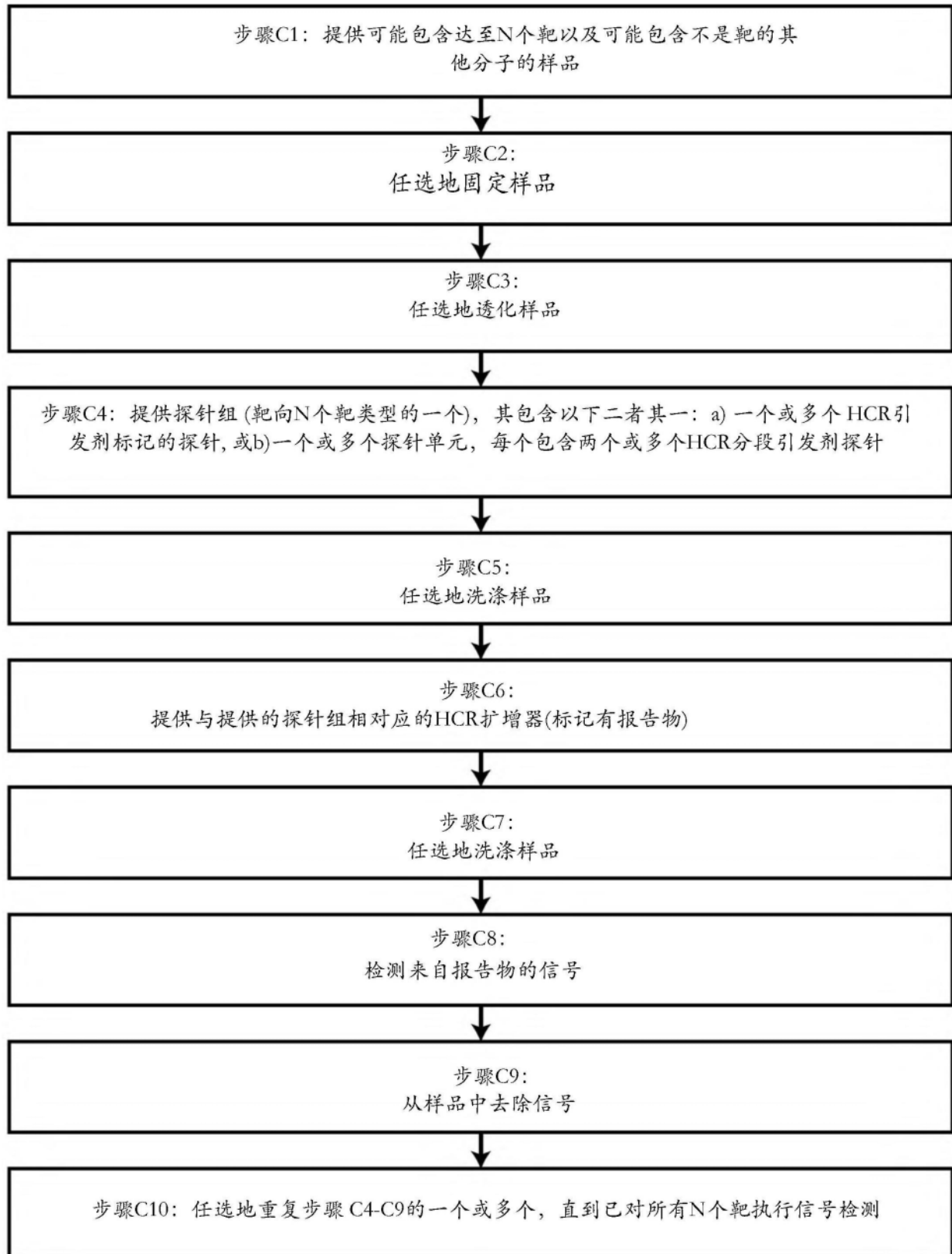


图26C

方法D

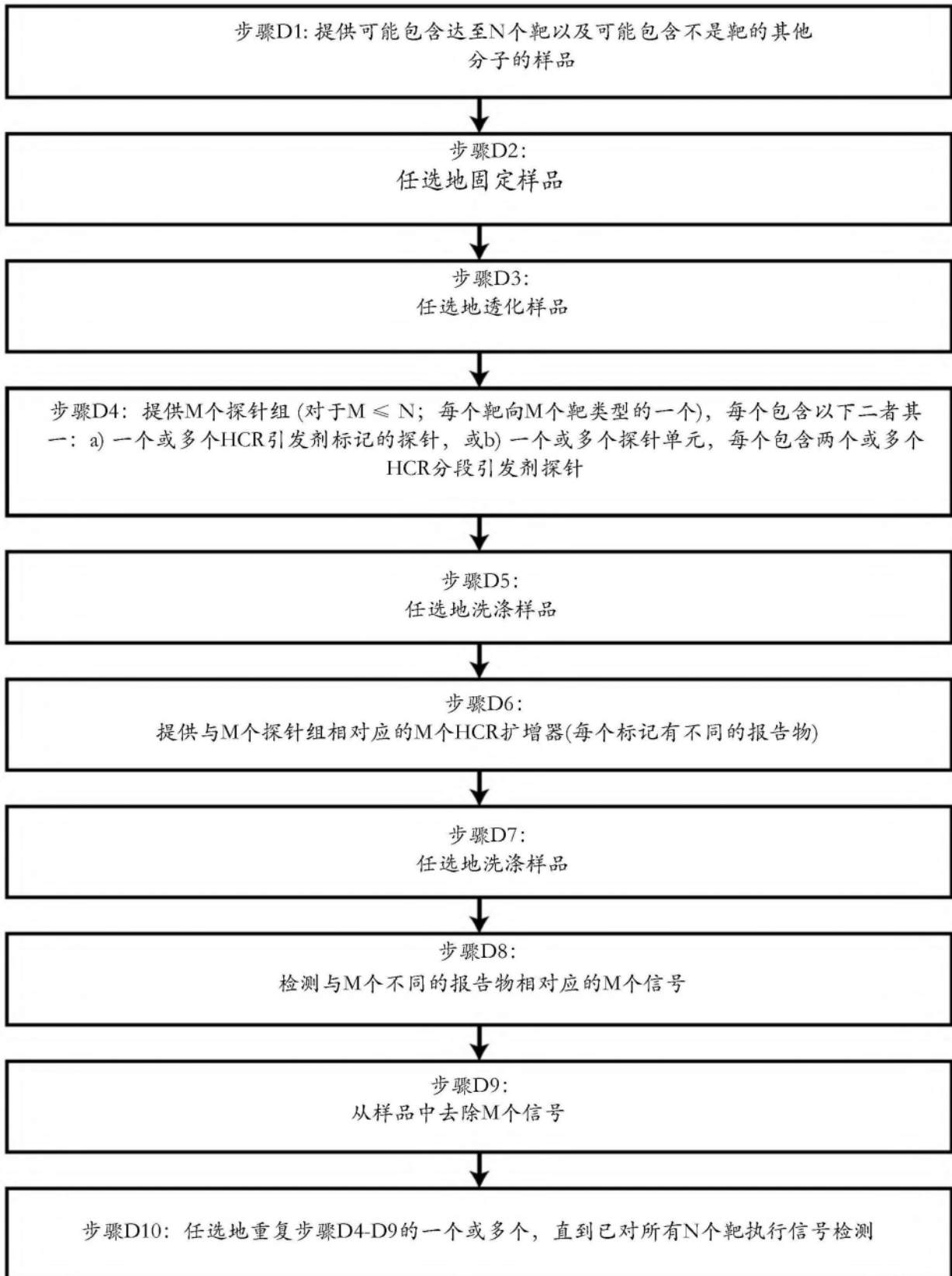


图26D

方法E

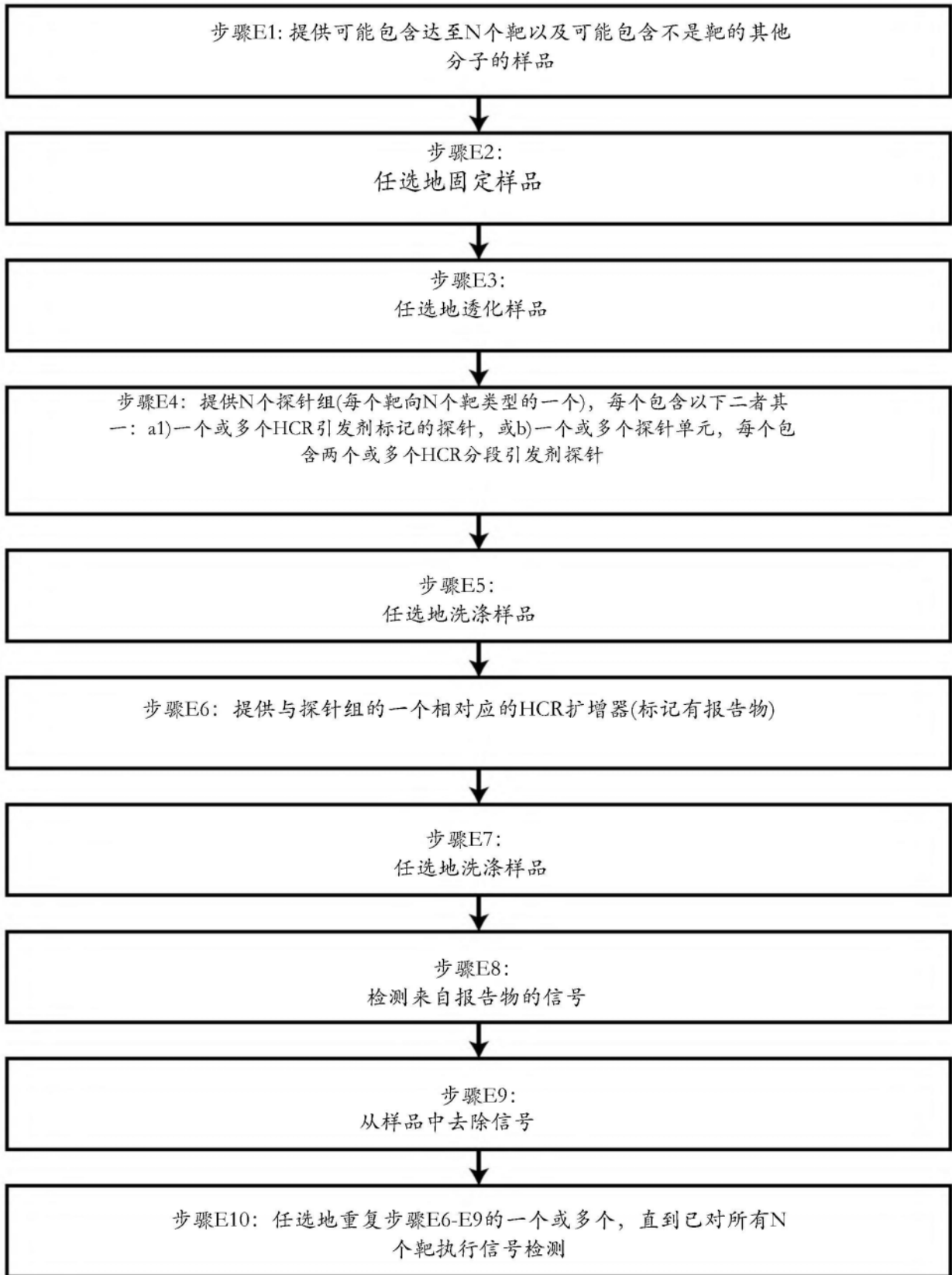


图26E

方法F

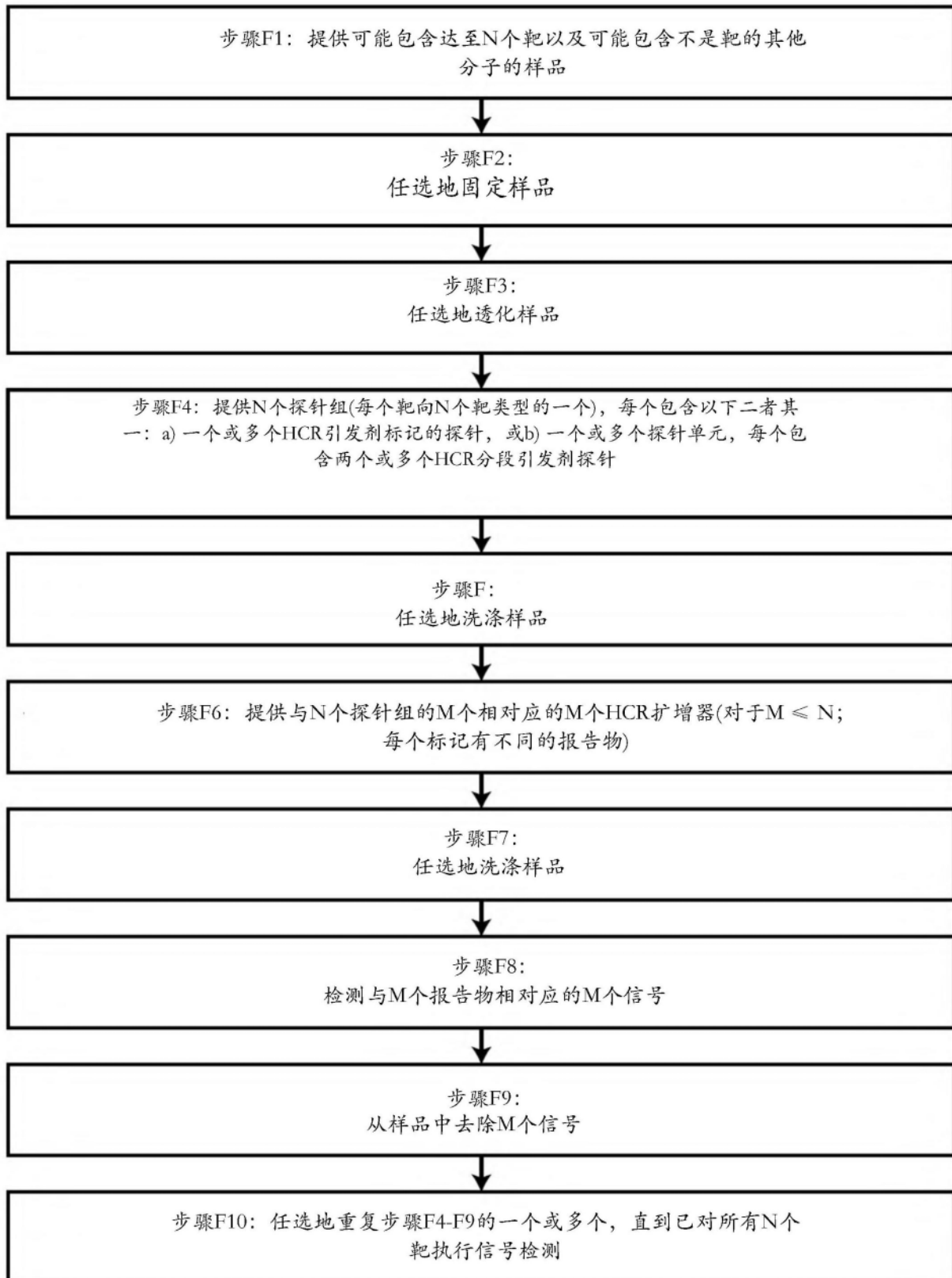


图26F

方法G

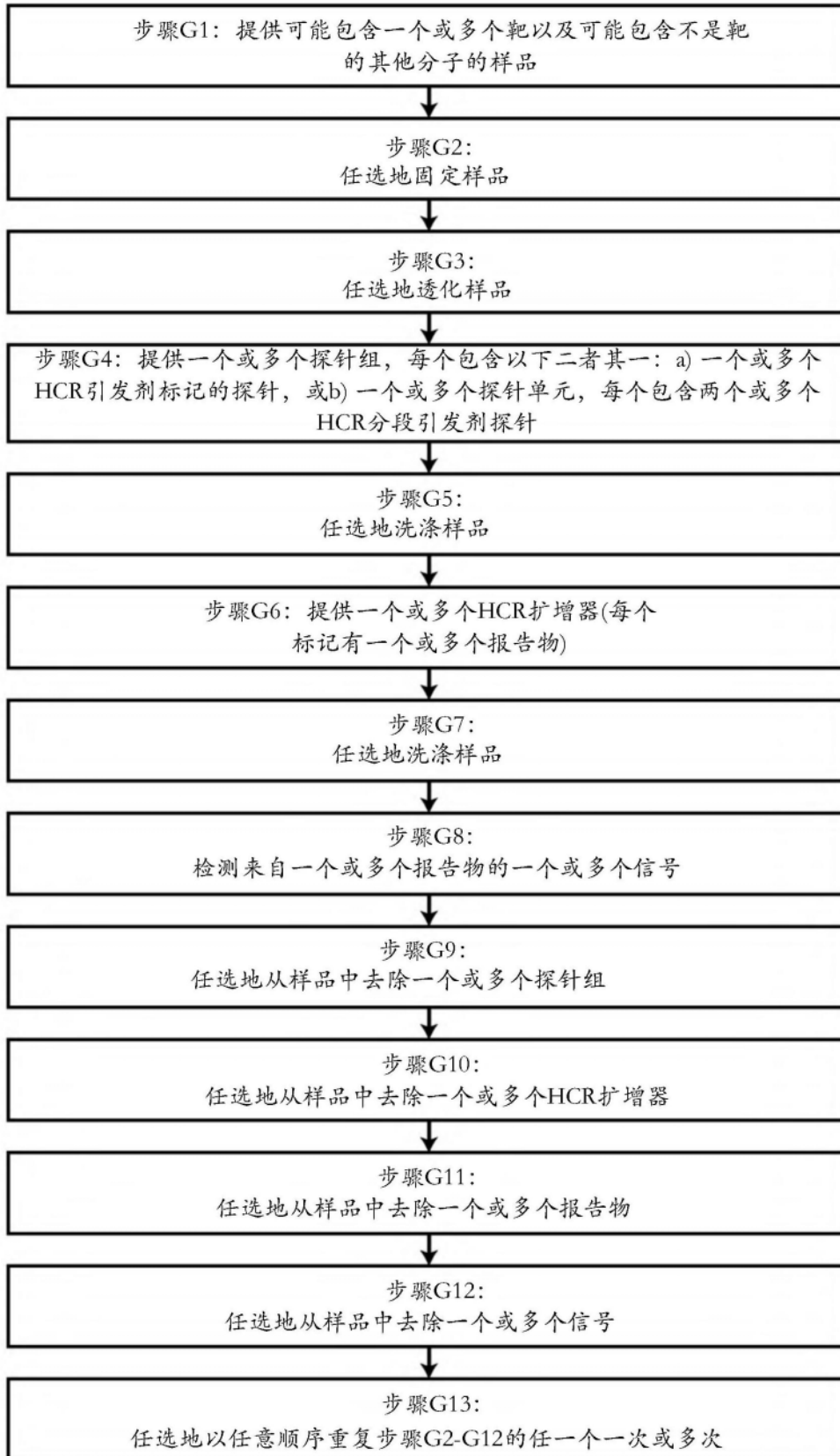


图26G

方法H

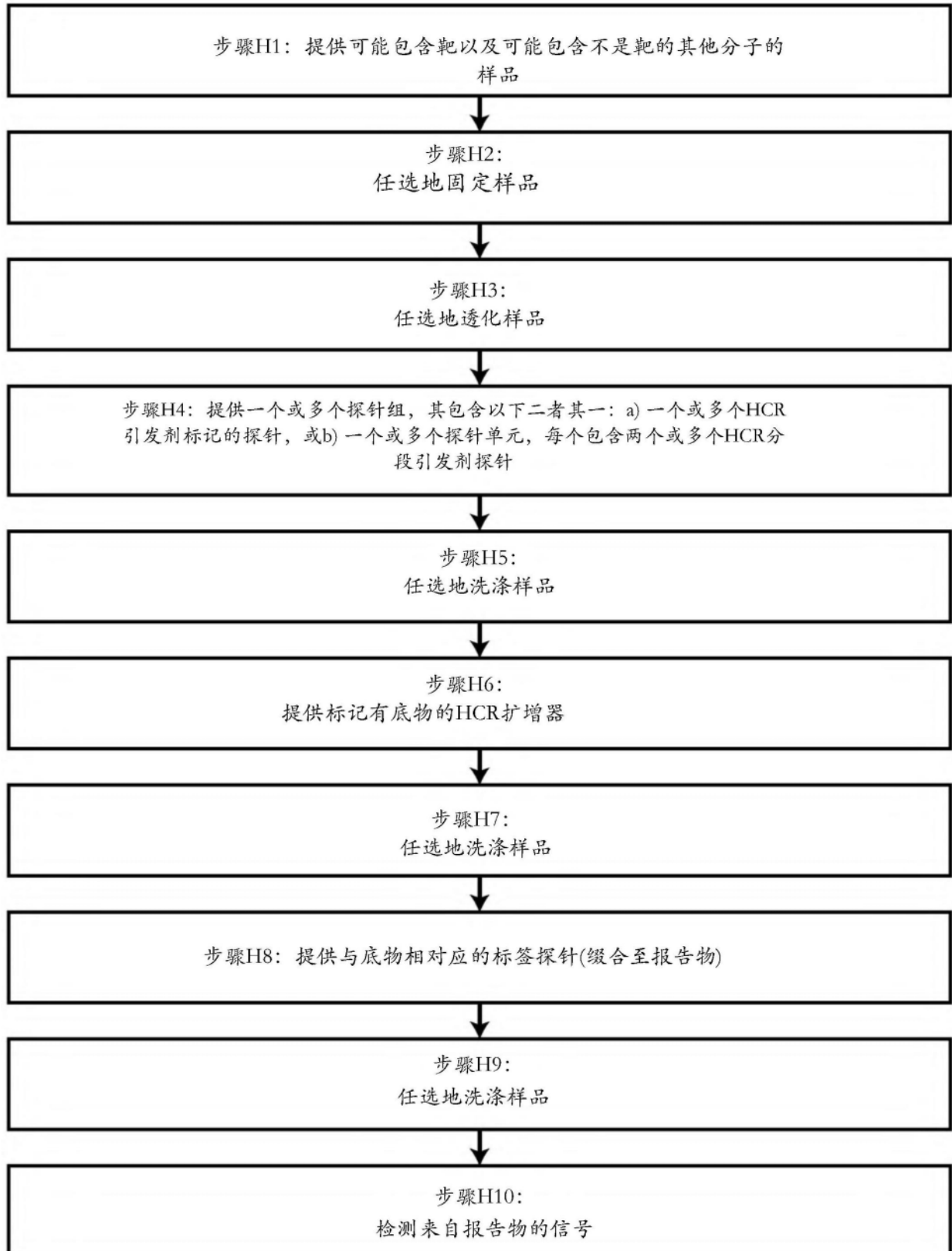


图26H

方法I

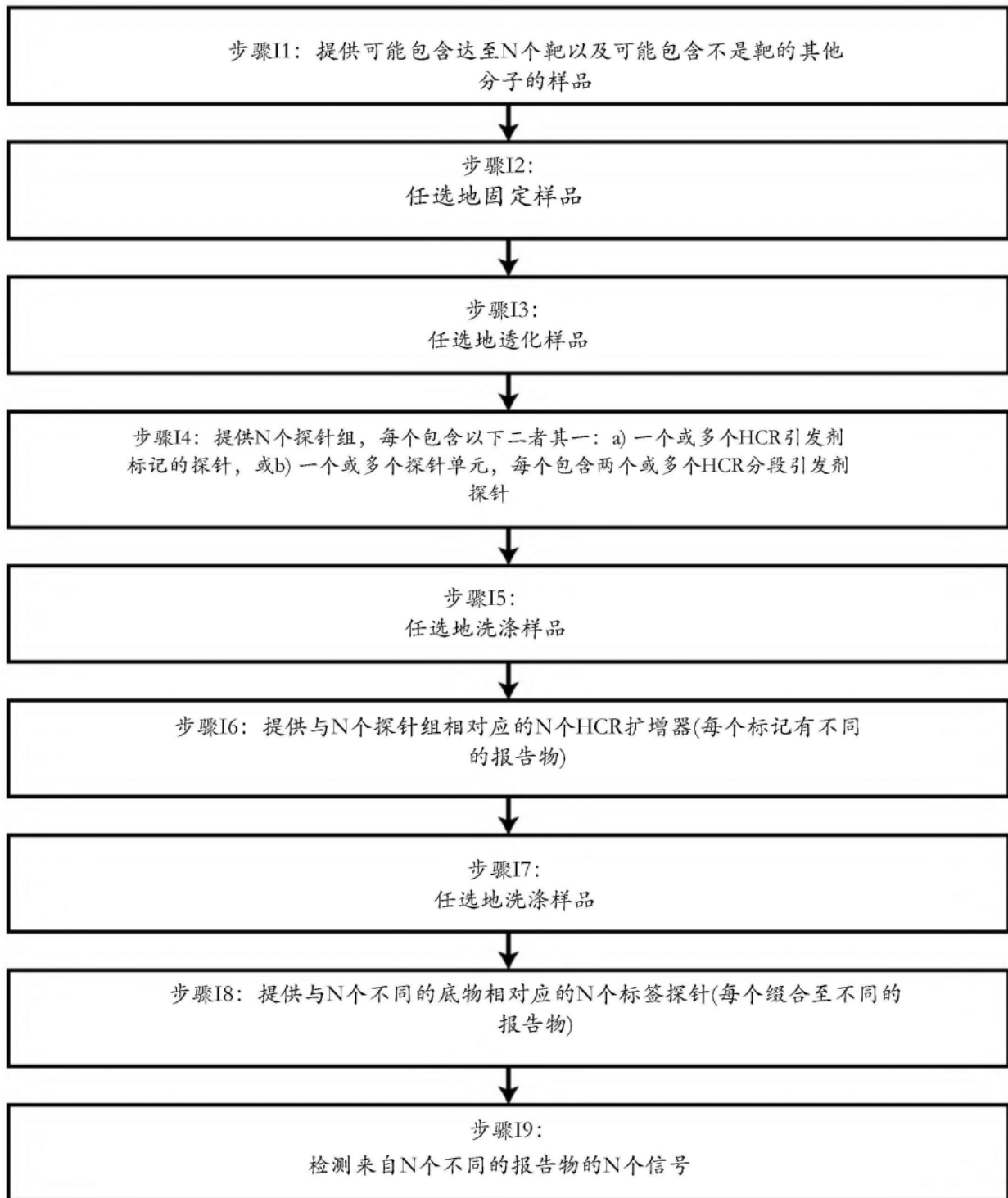


图26I

方法J

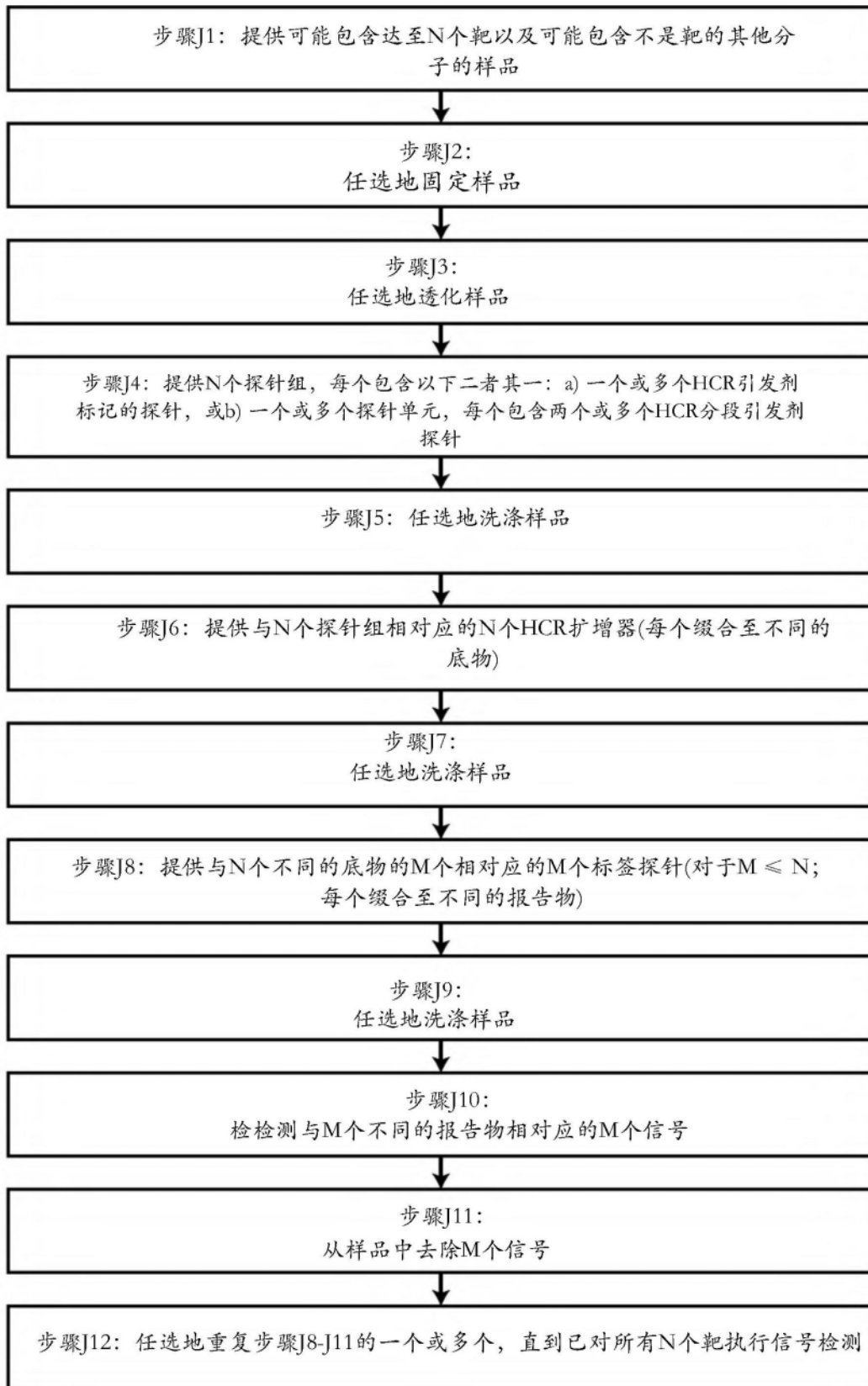


图26J

方法K

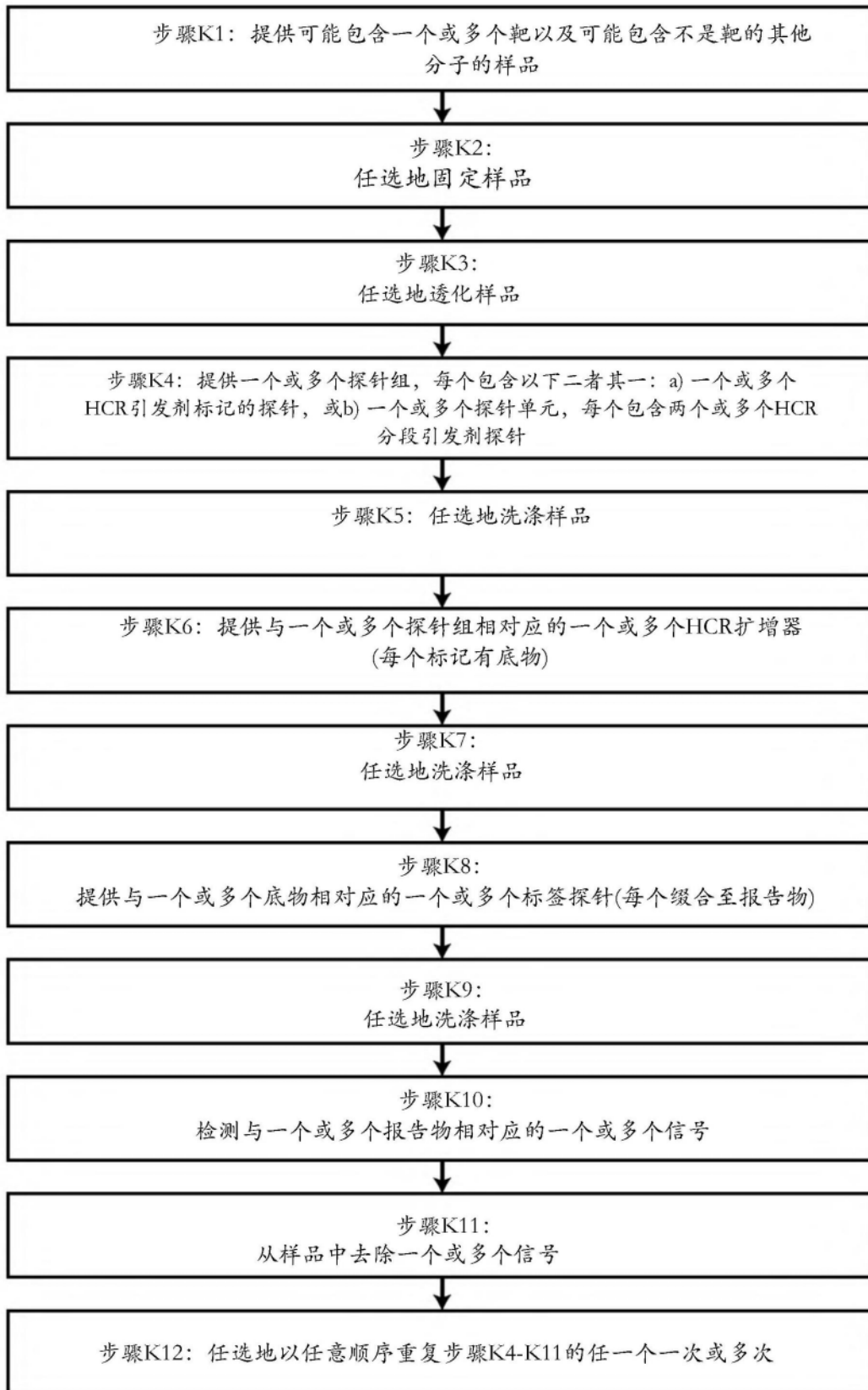


图26K

方法L

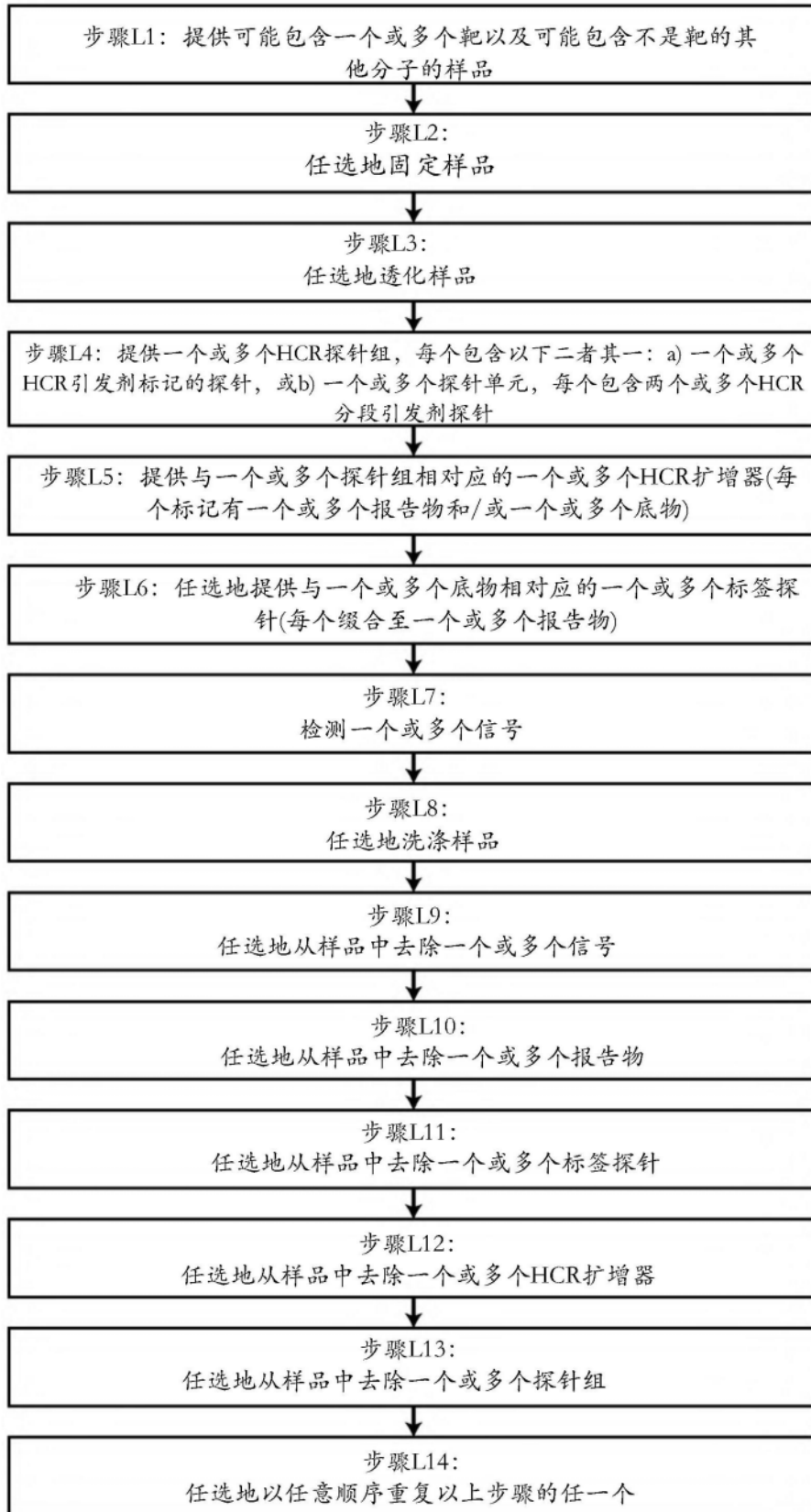


图26L

方法M

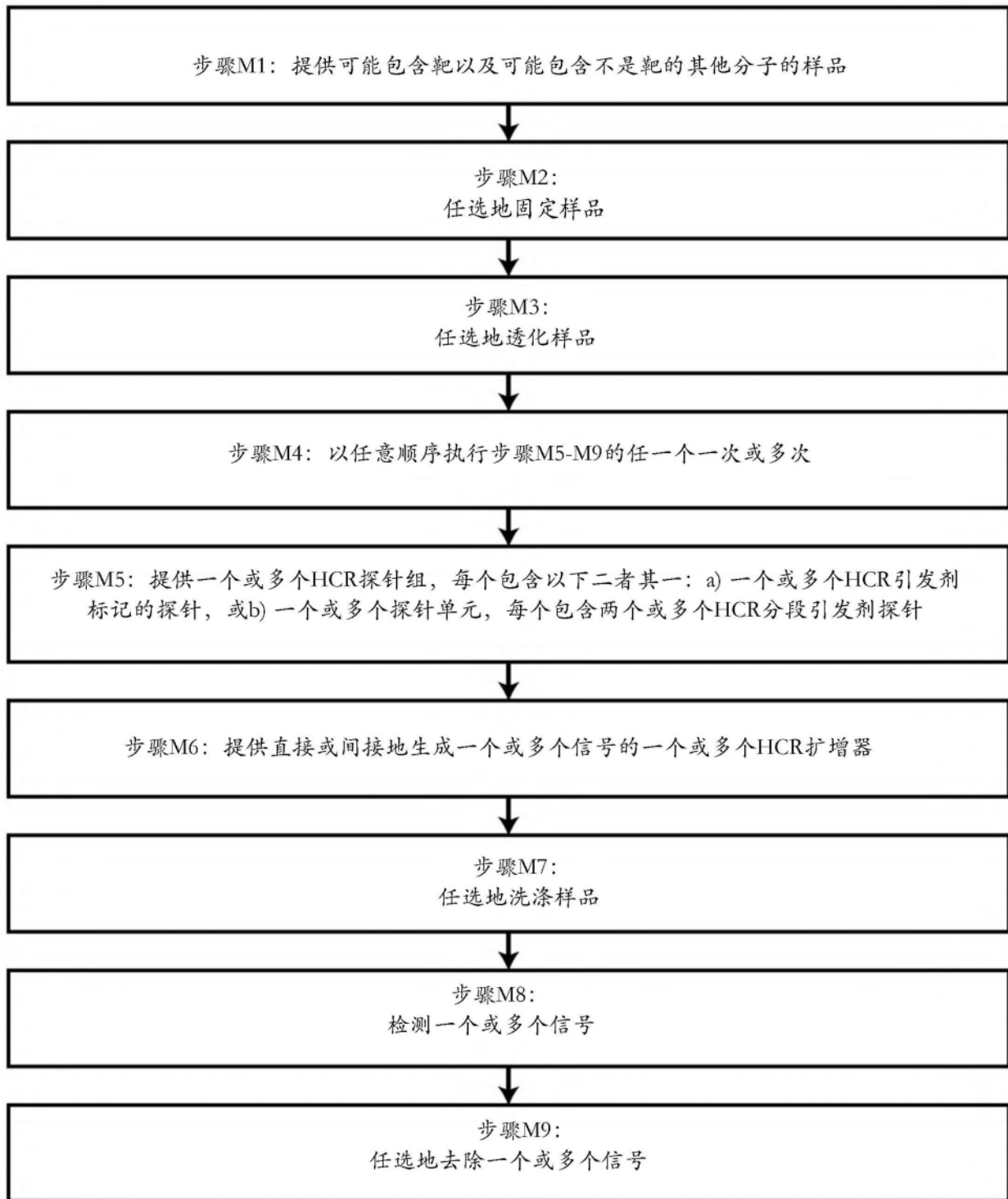


图26M

方法N

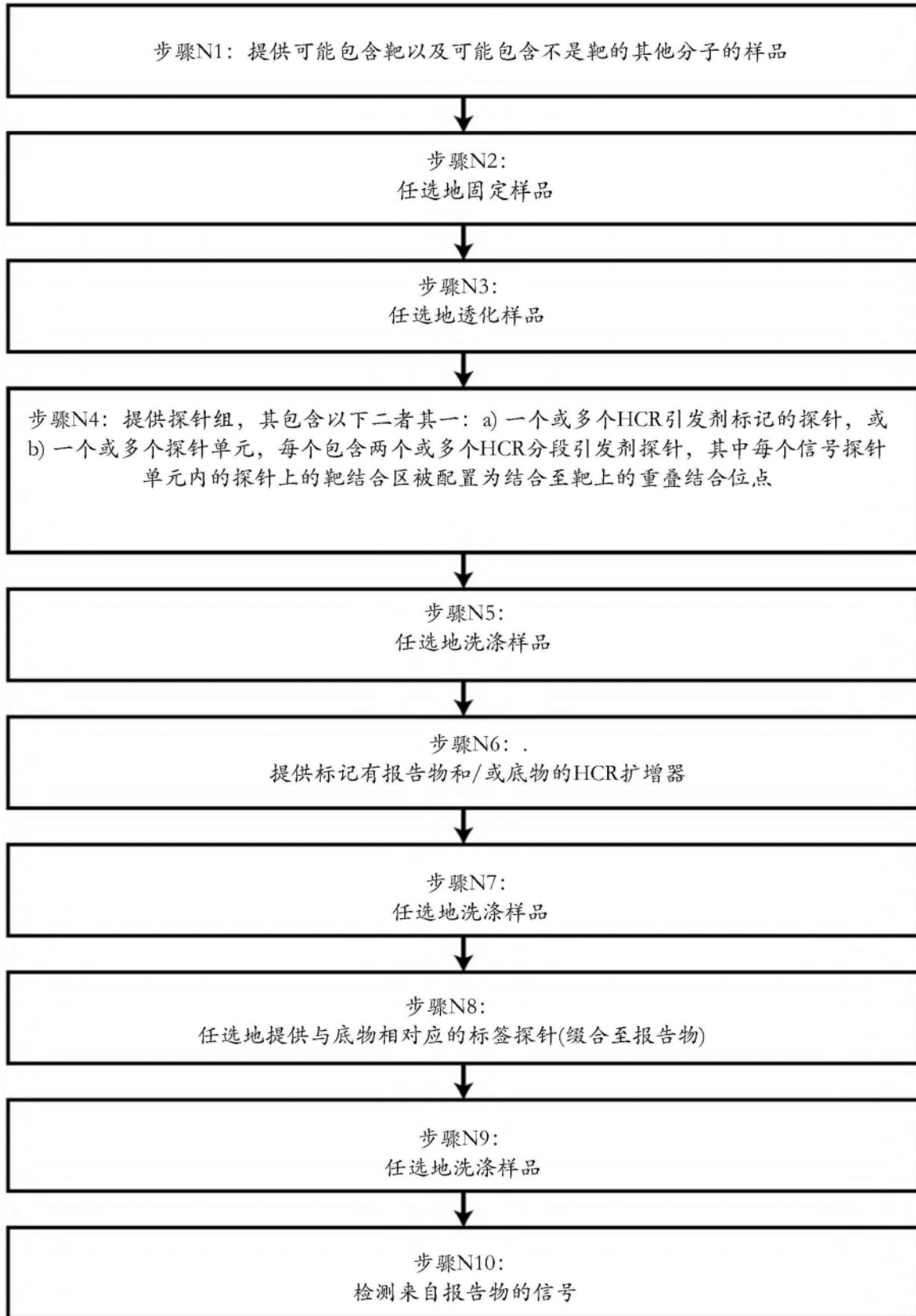


图26N

方法O

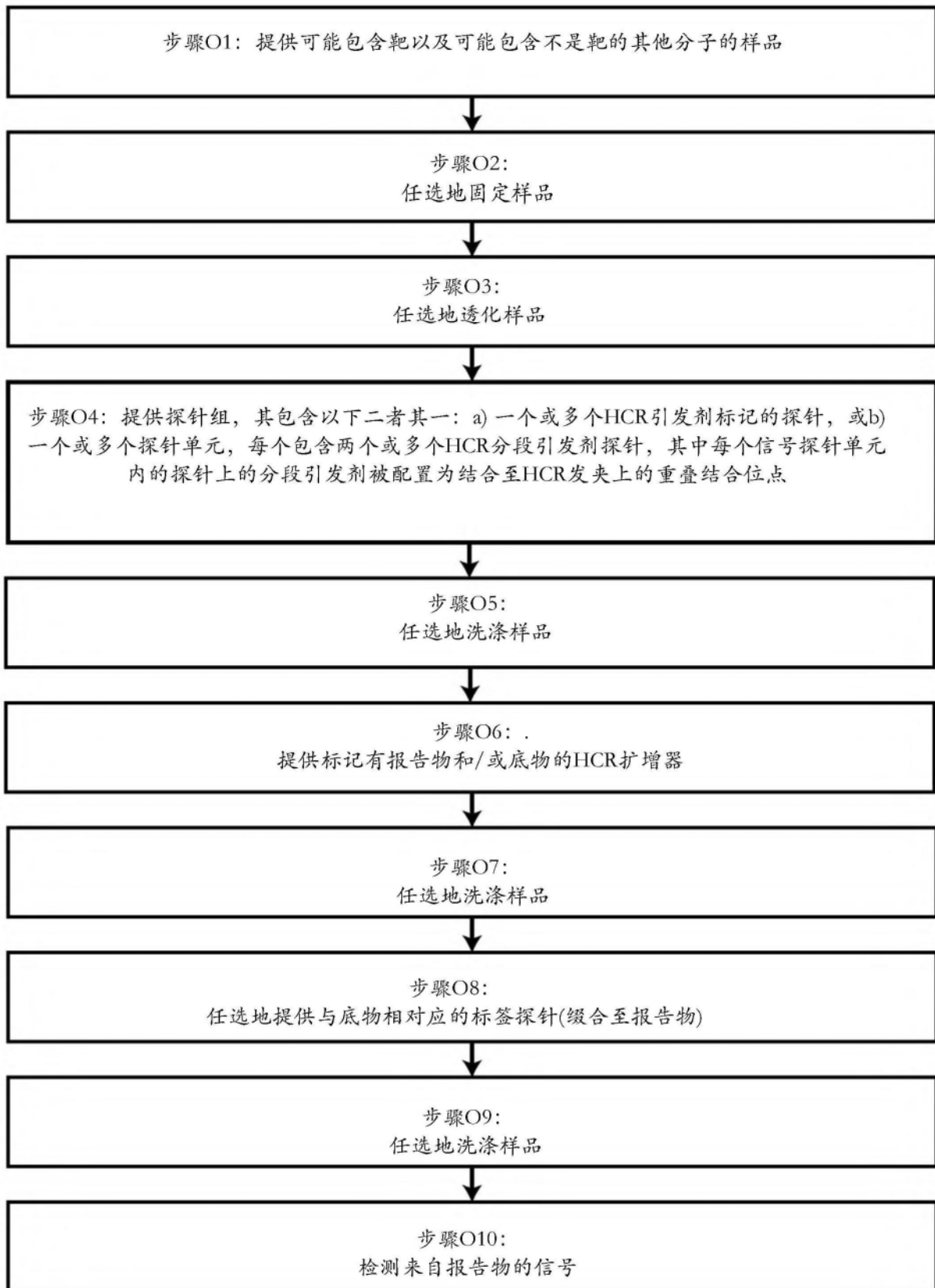


图260

方法P

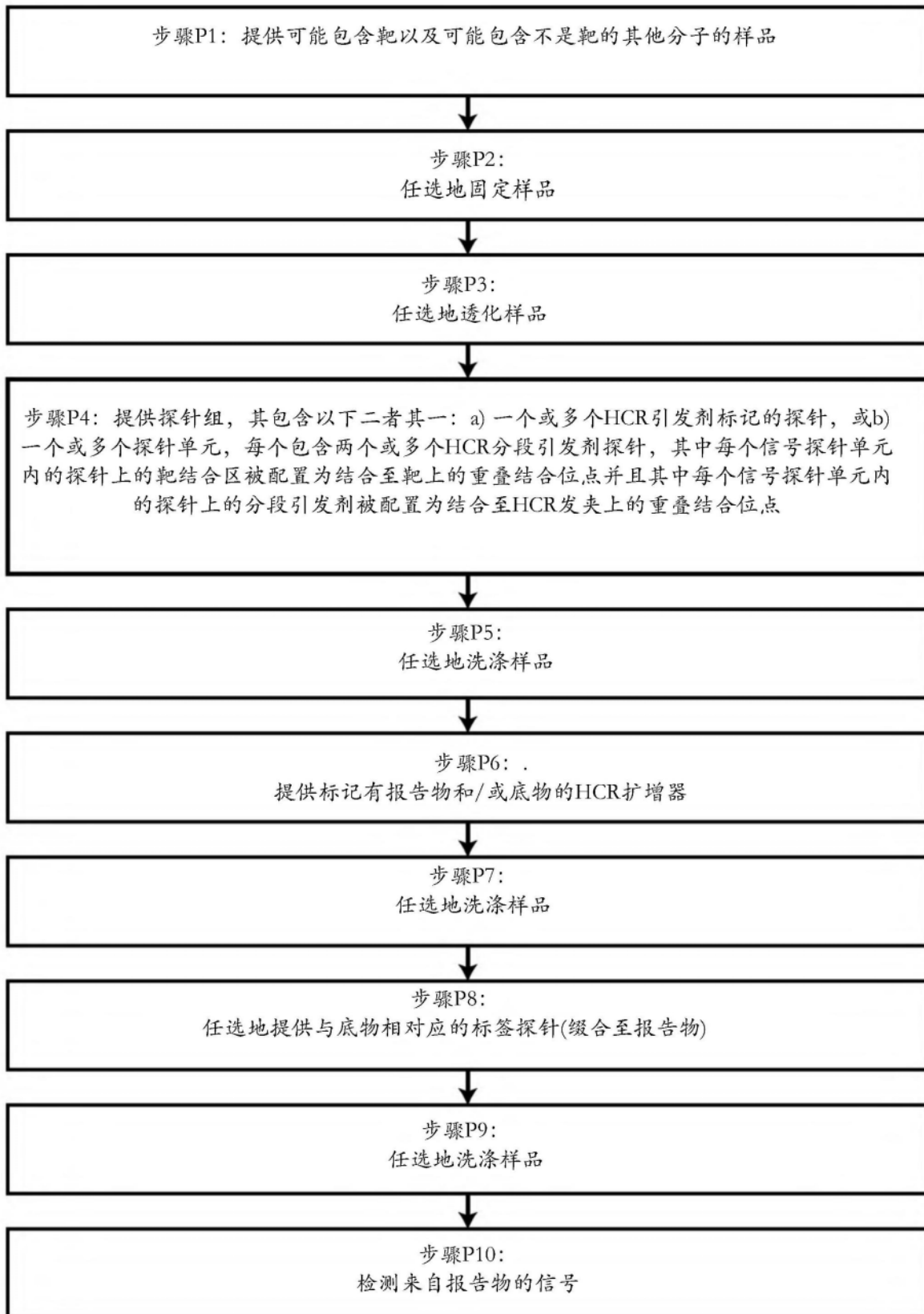


图26P

方法Q

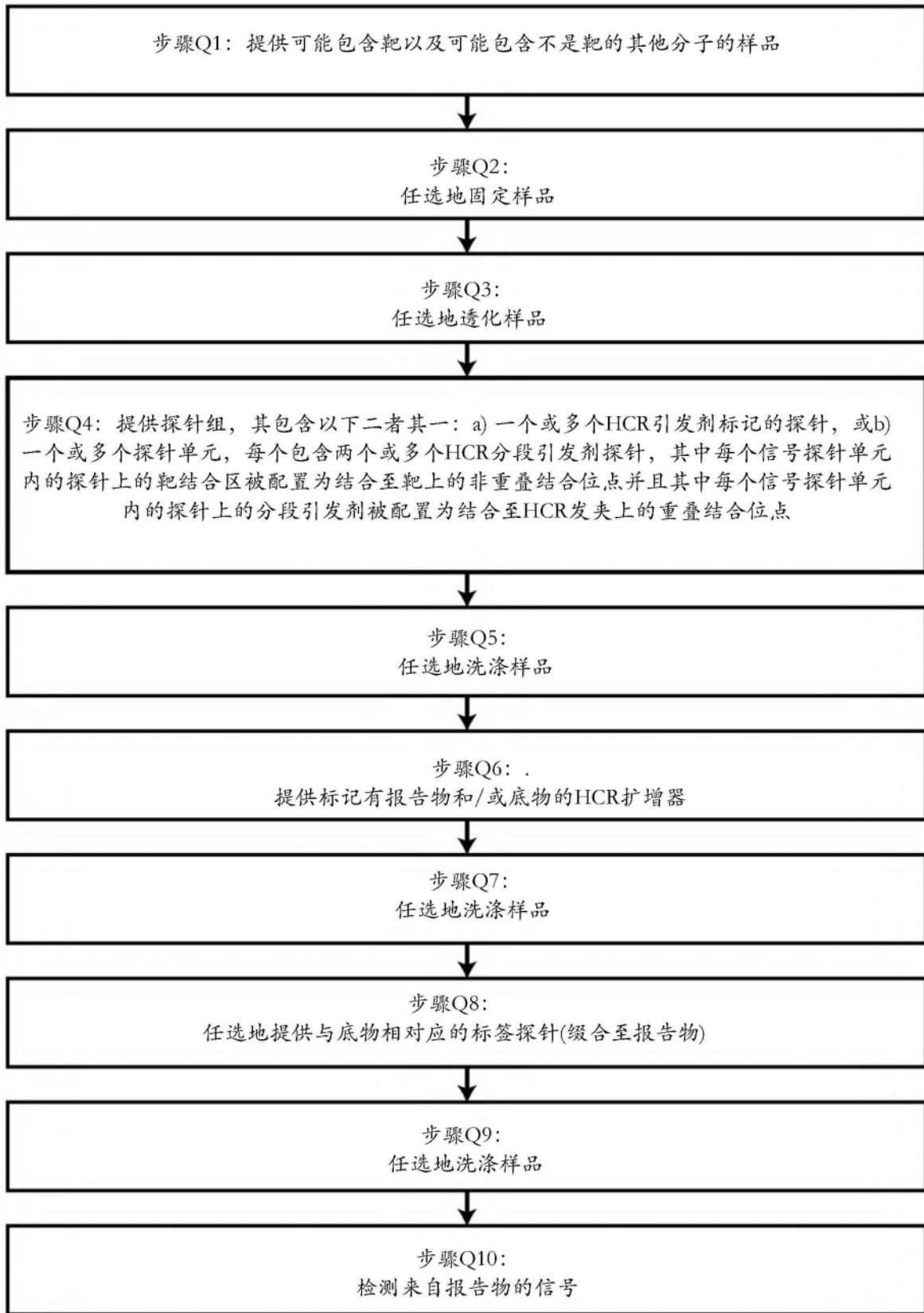


图26Q

方法R

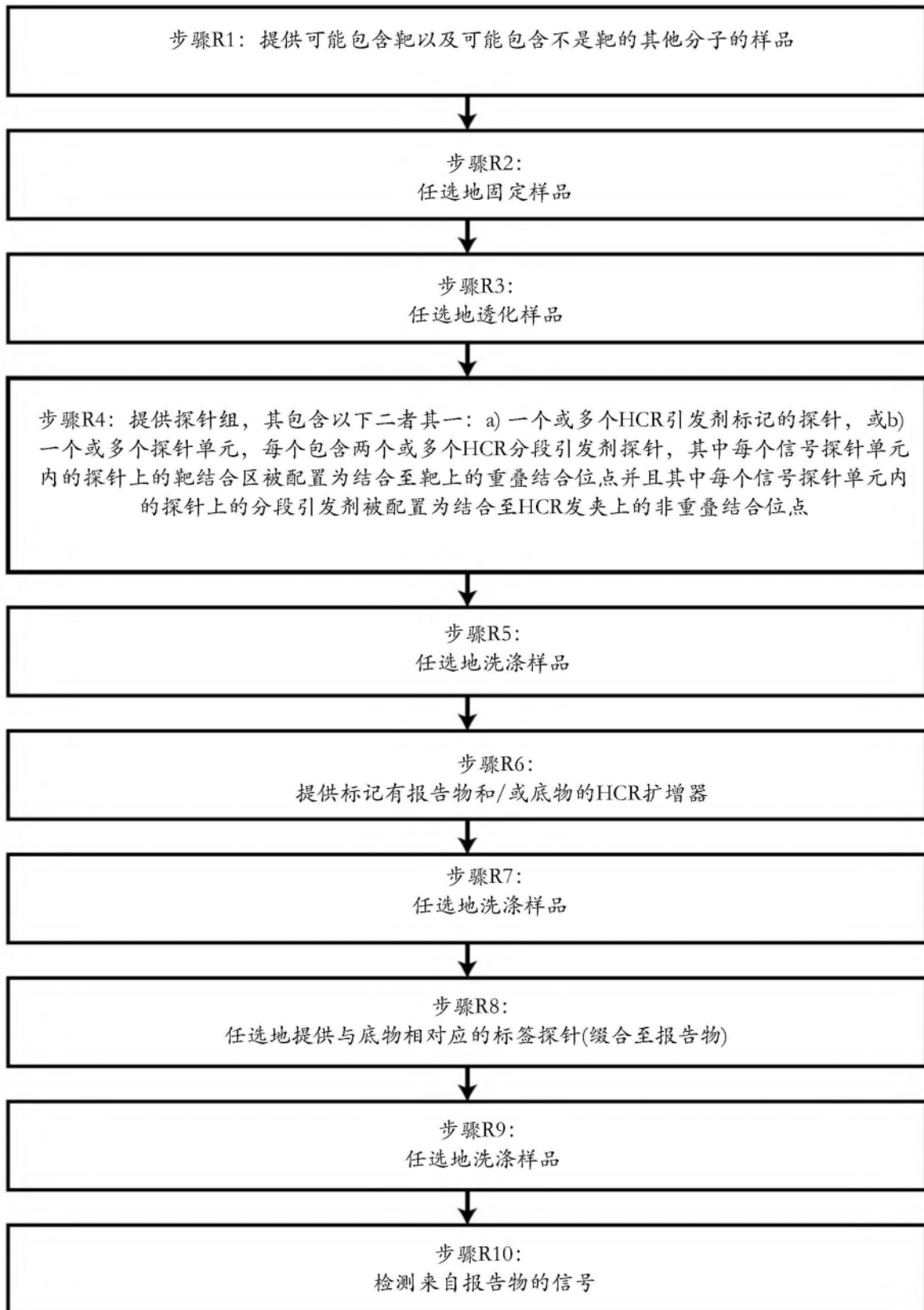


图26R

方法S

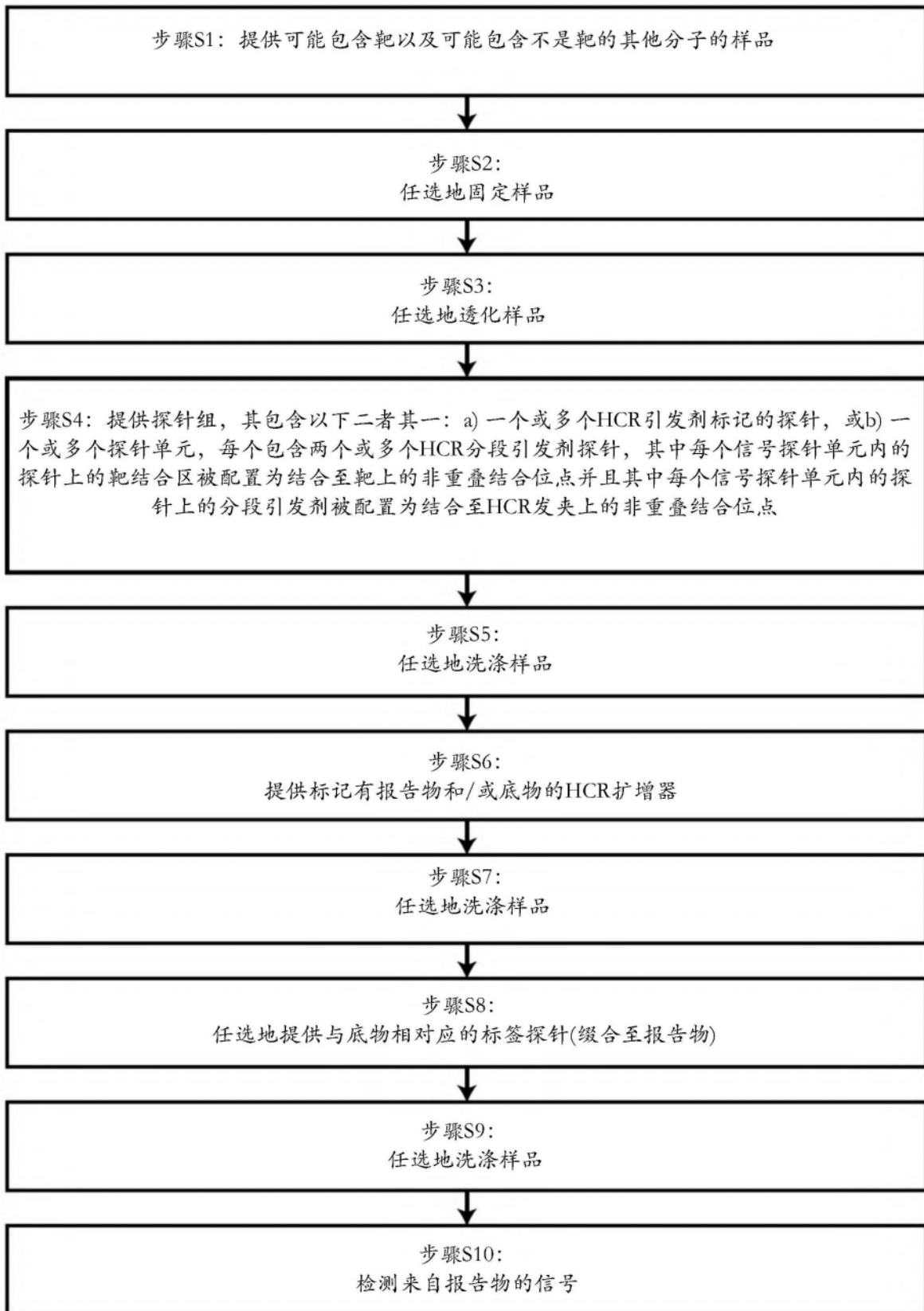


图26S

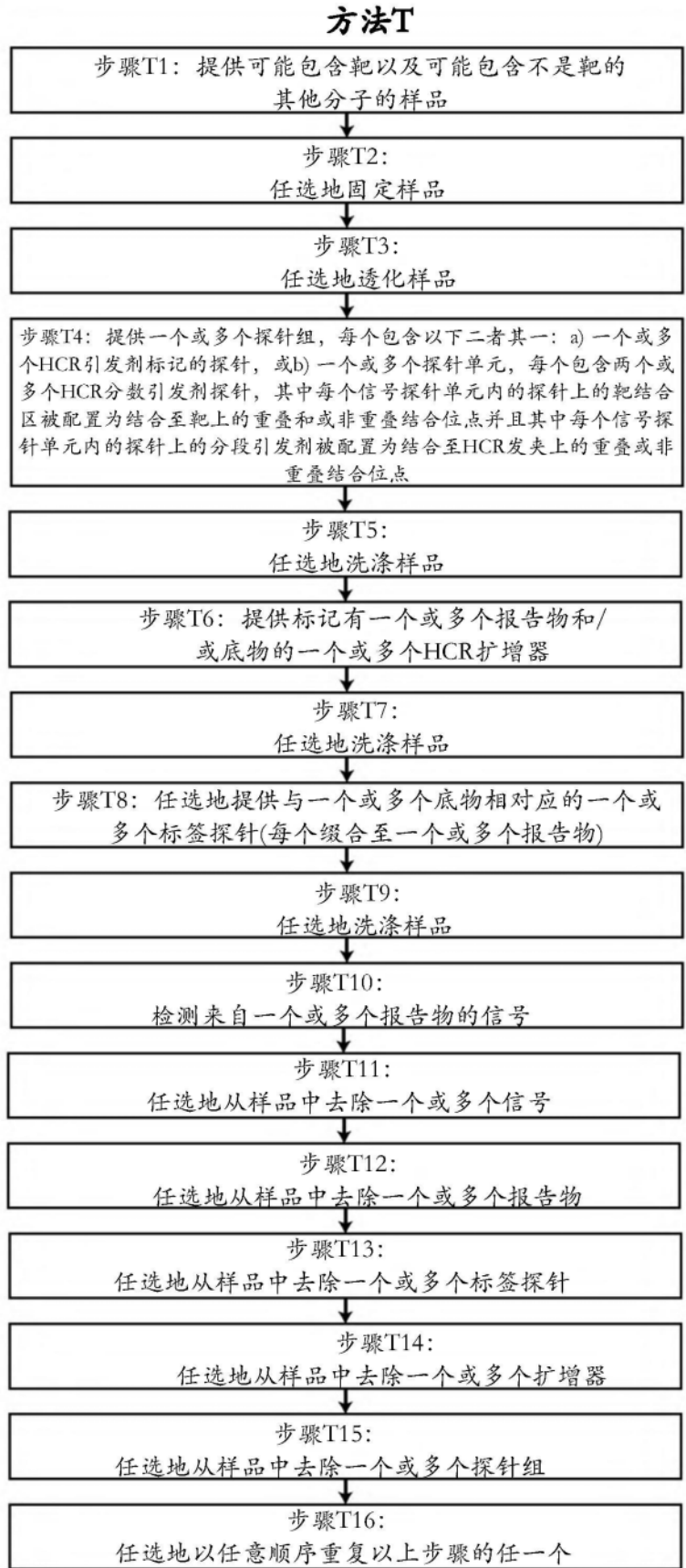


图26T

分裂引发剂探针与靶上的邻近同源结合位点杂交

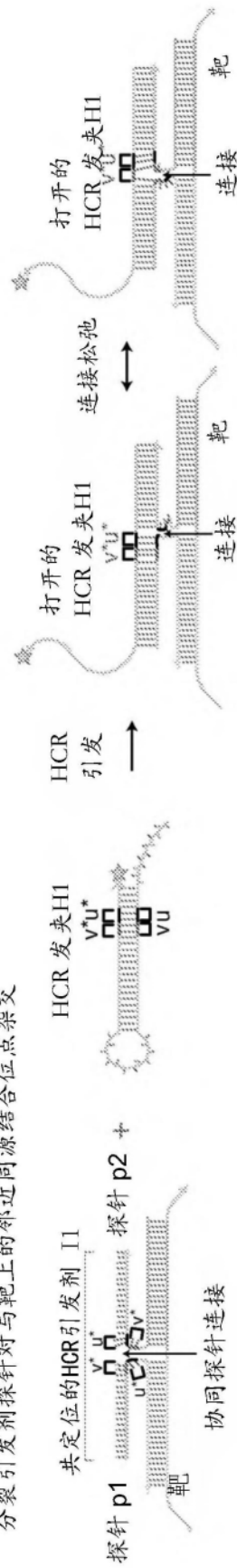


图28A

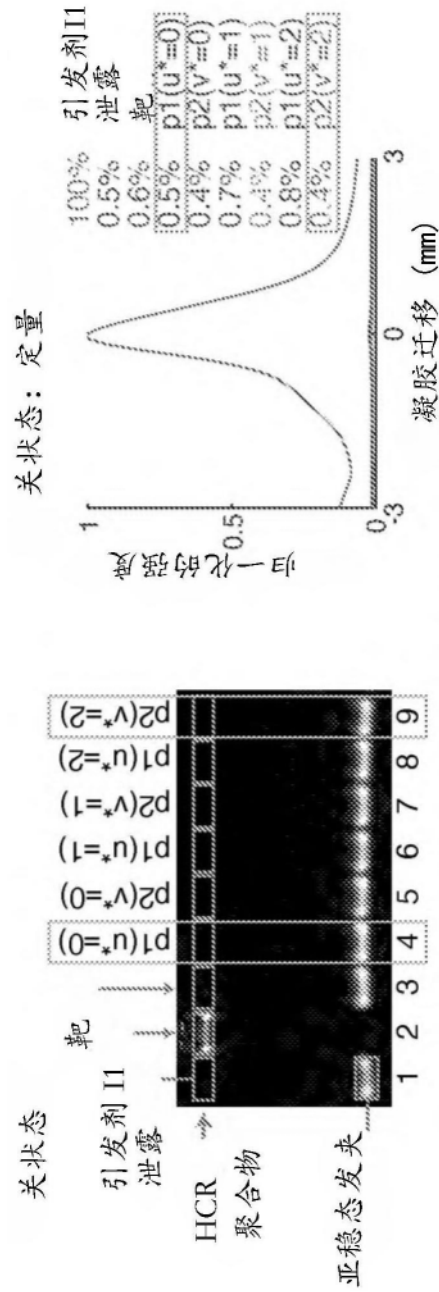


图28B

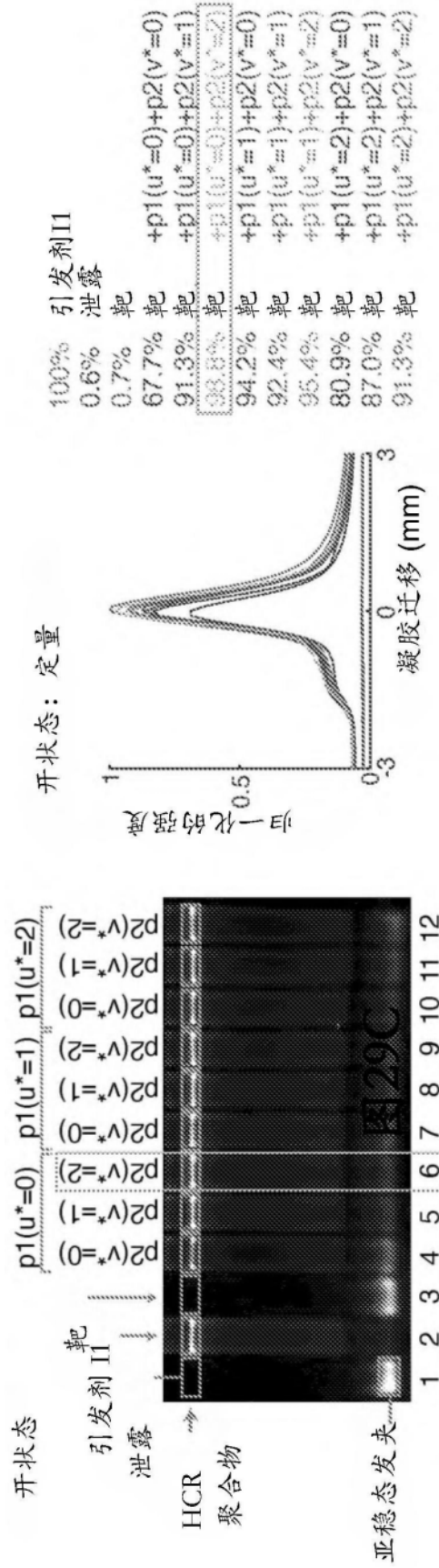


图28C

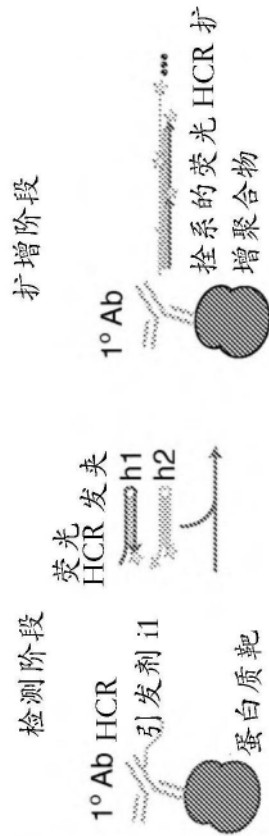


图29A

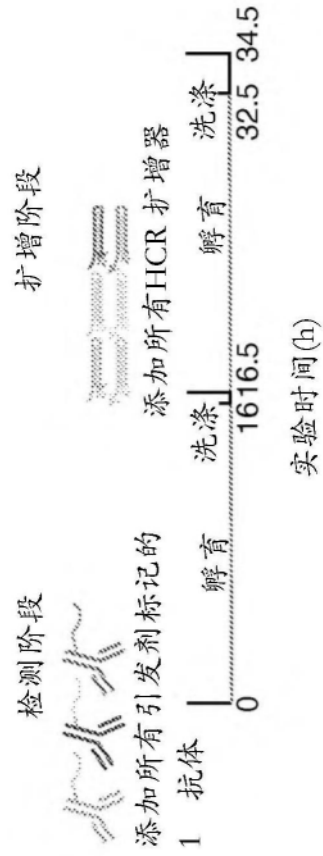


图29B

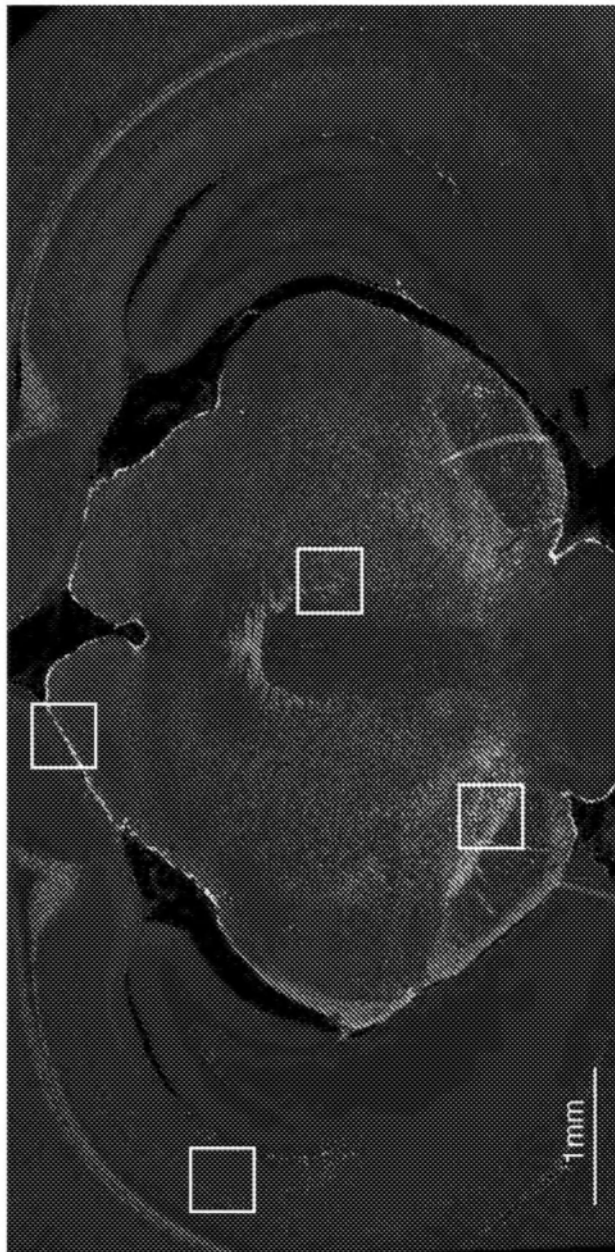


图29C

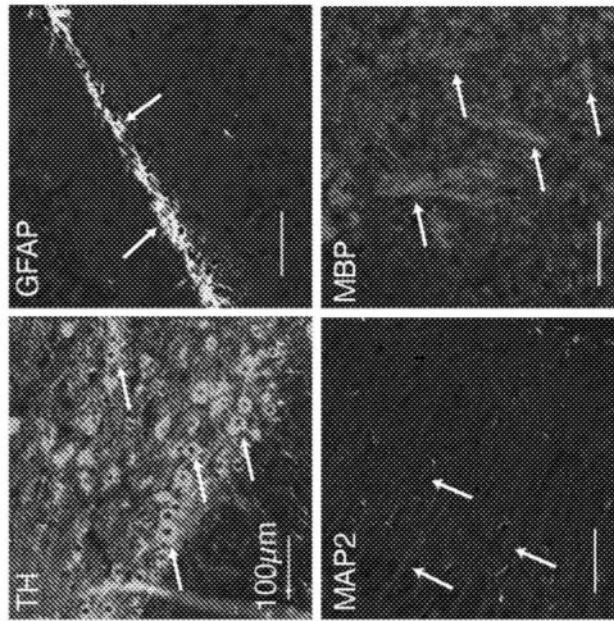


图29D

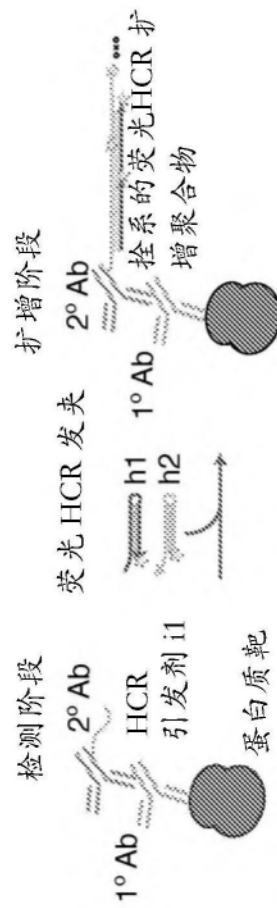


图30A

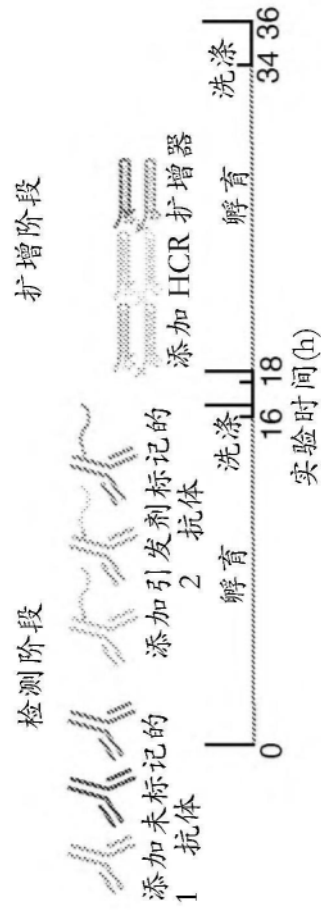


图30B

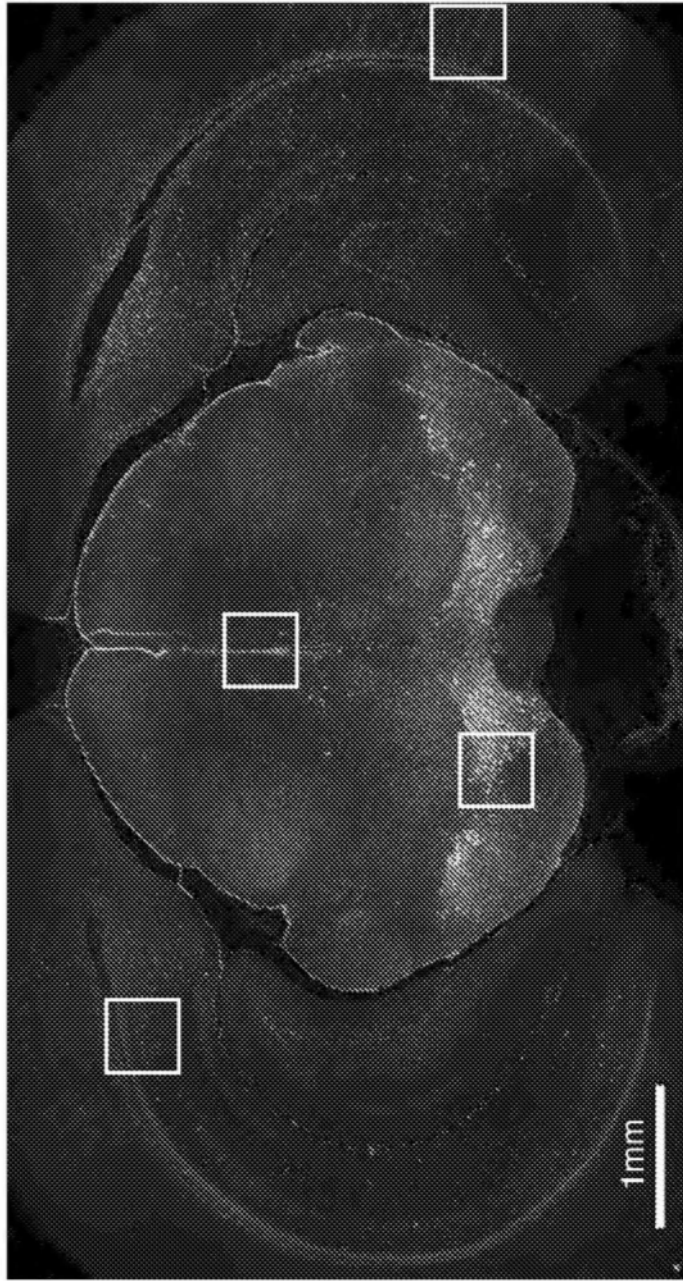


图30C

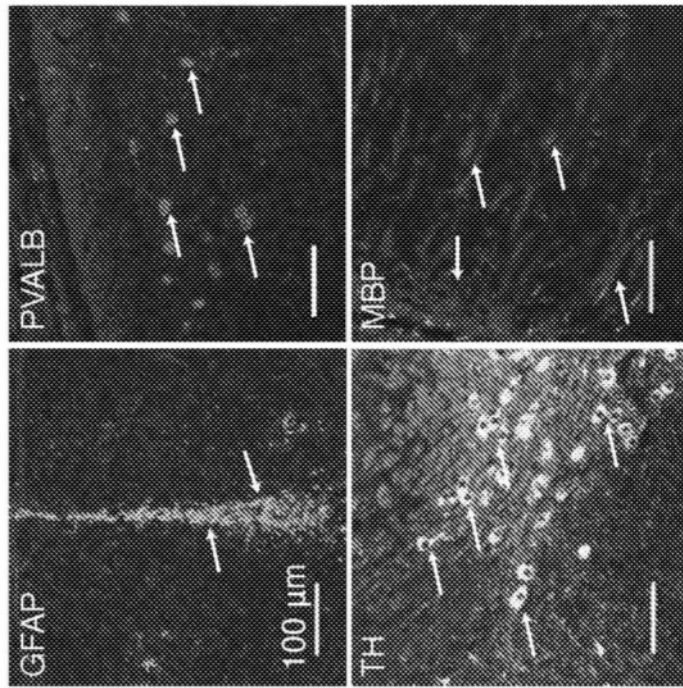


图30D

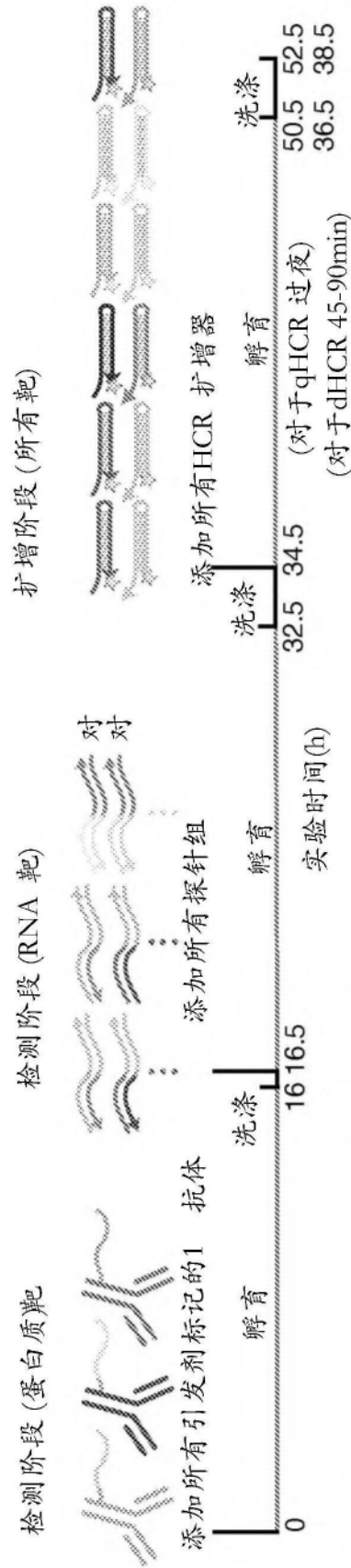


图31A

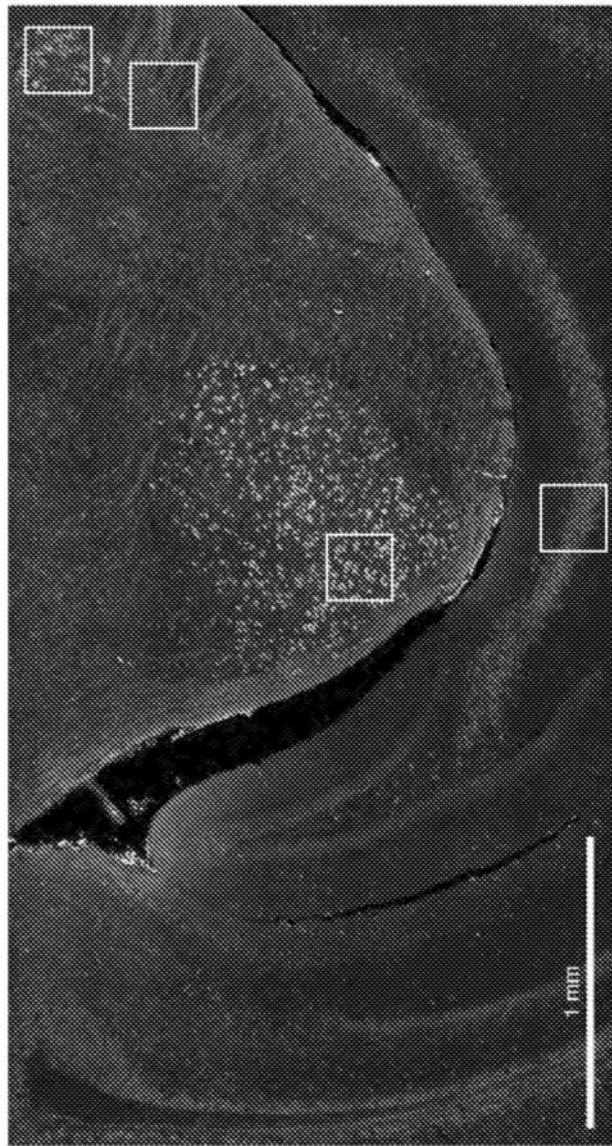


图31B

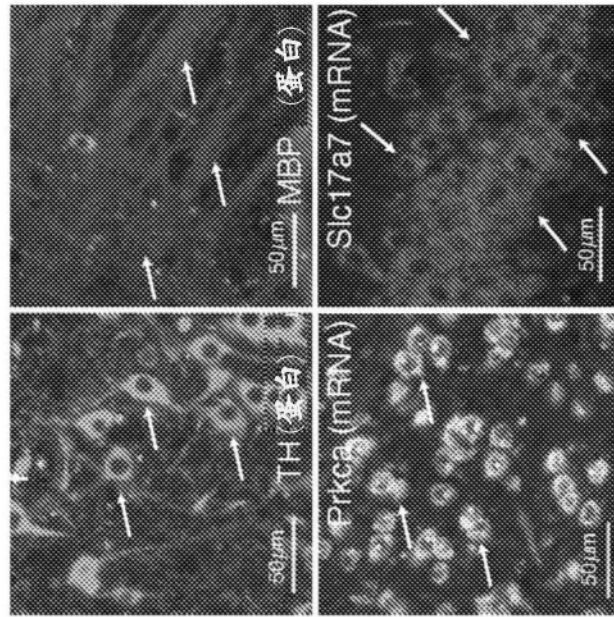


图31C

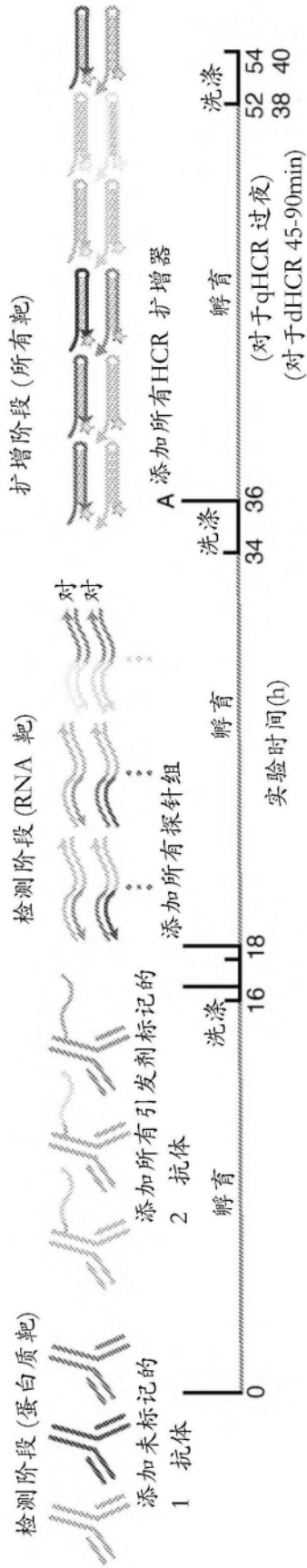


图32A

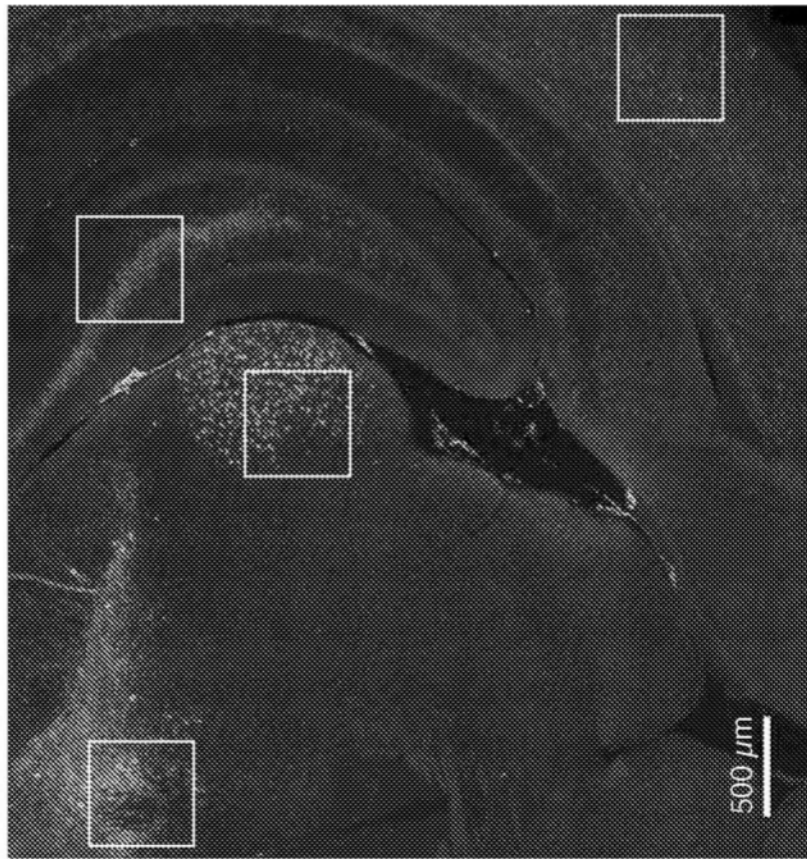


图32B

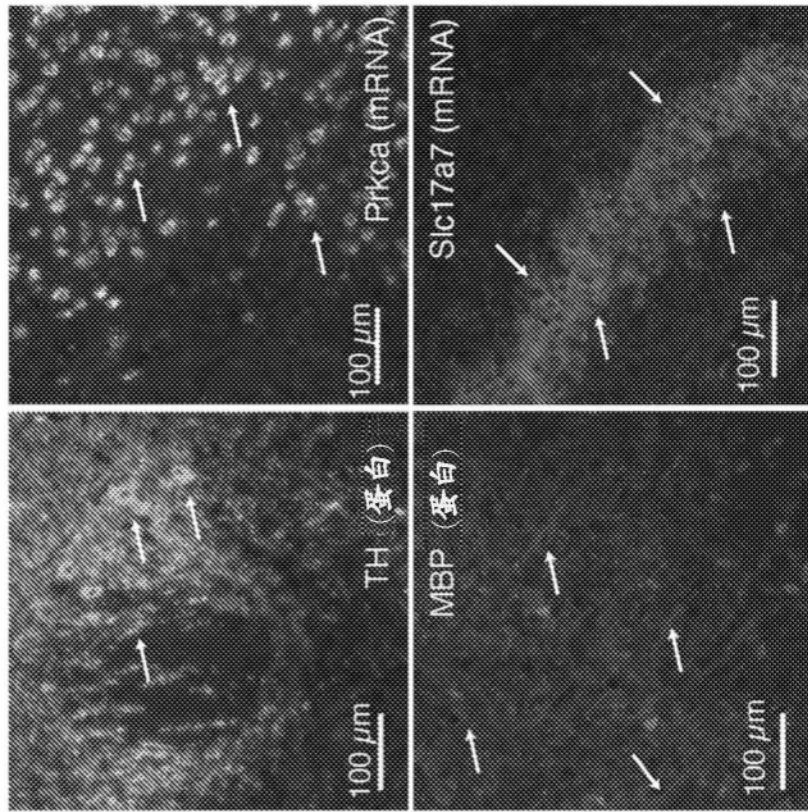


图32C

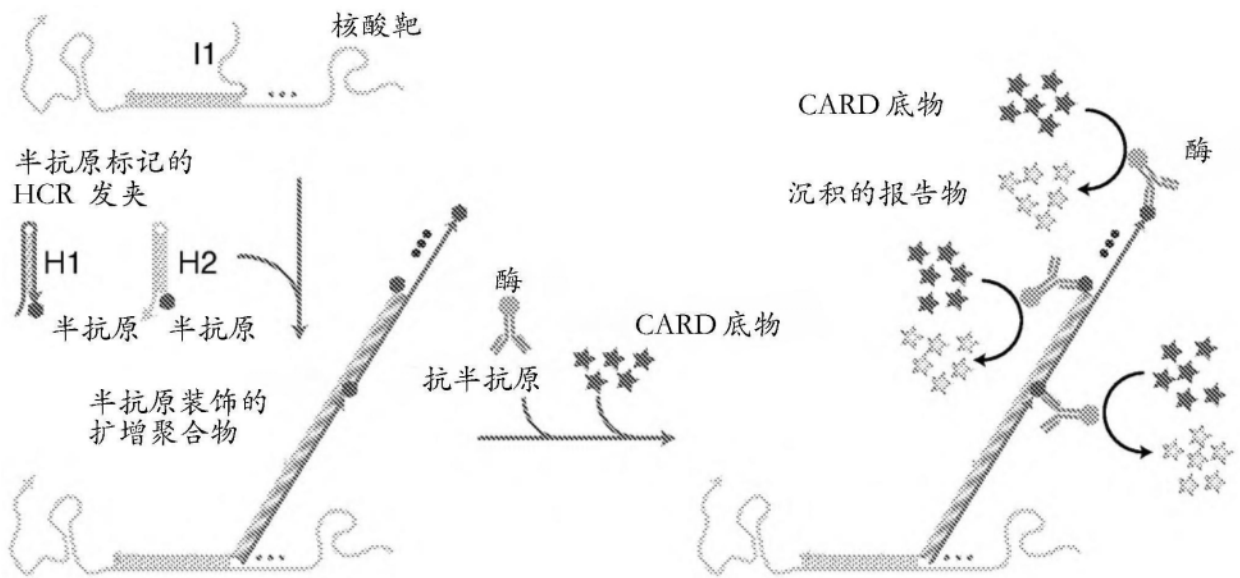


图33A

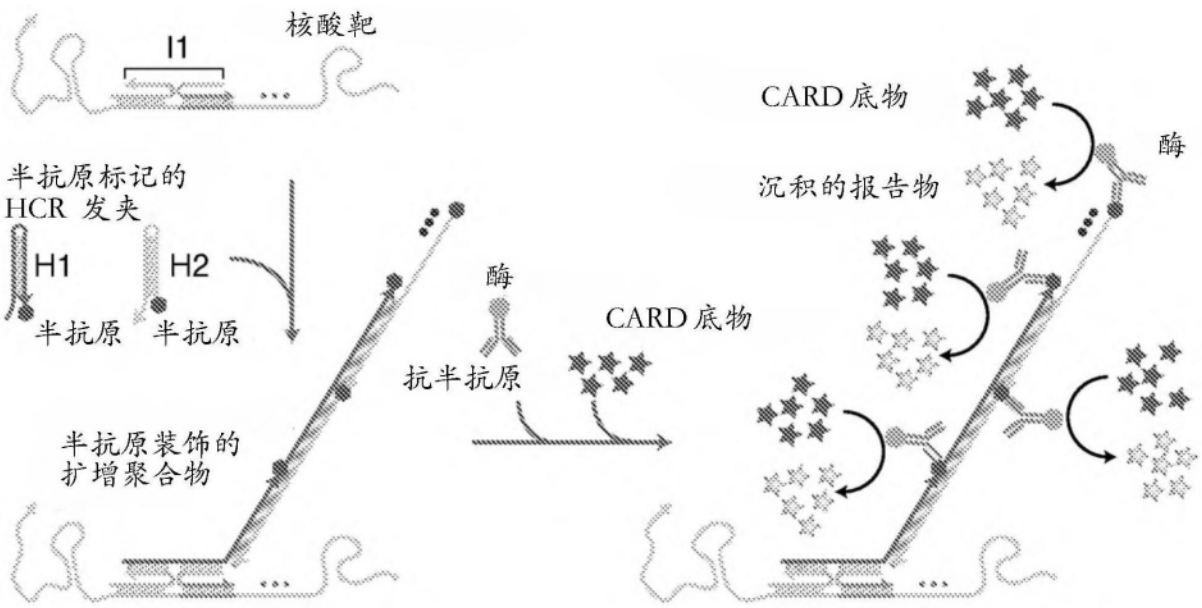


图33B

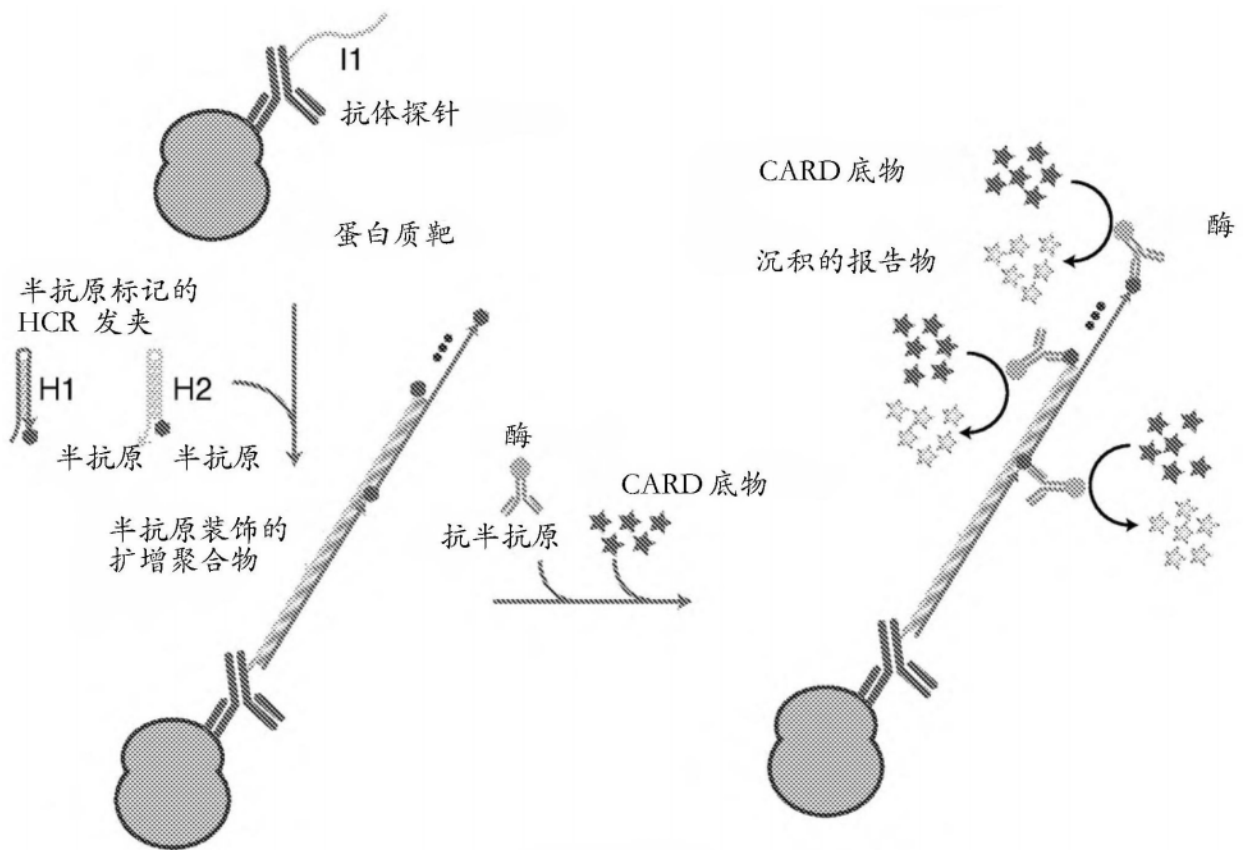


图33C

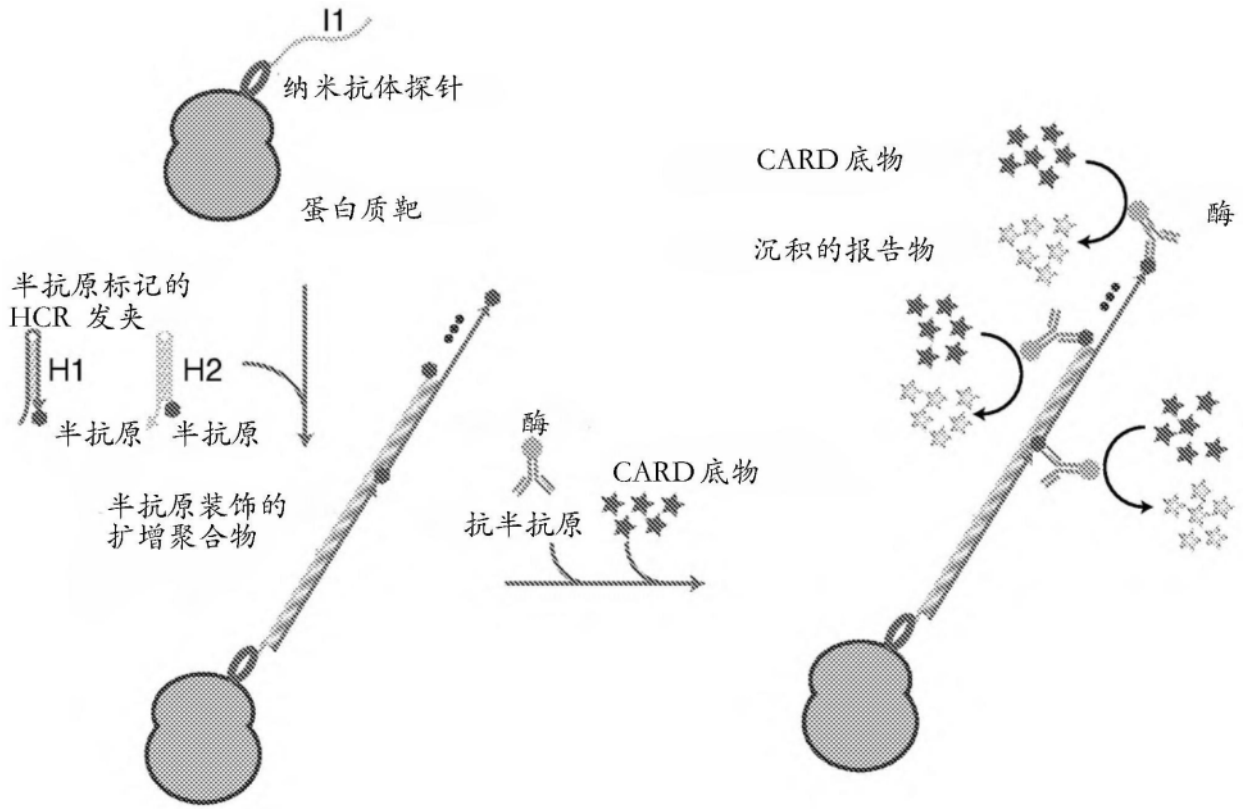


图33D

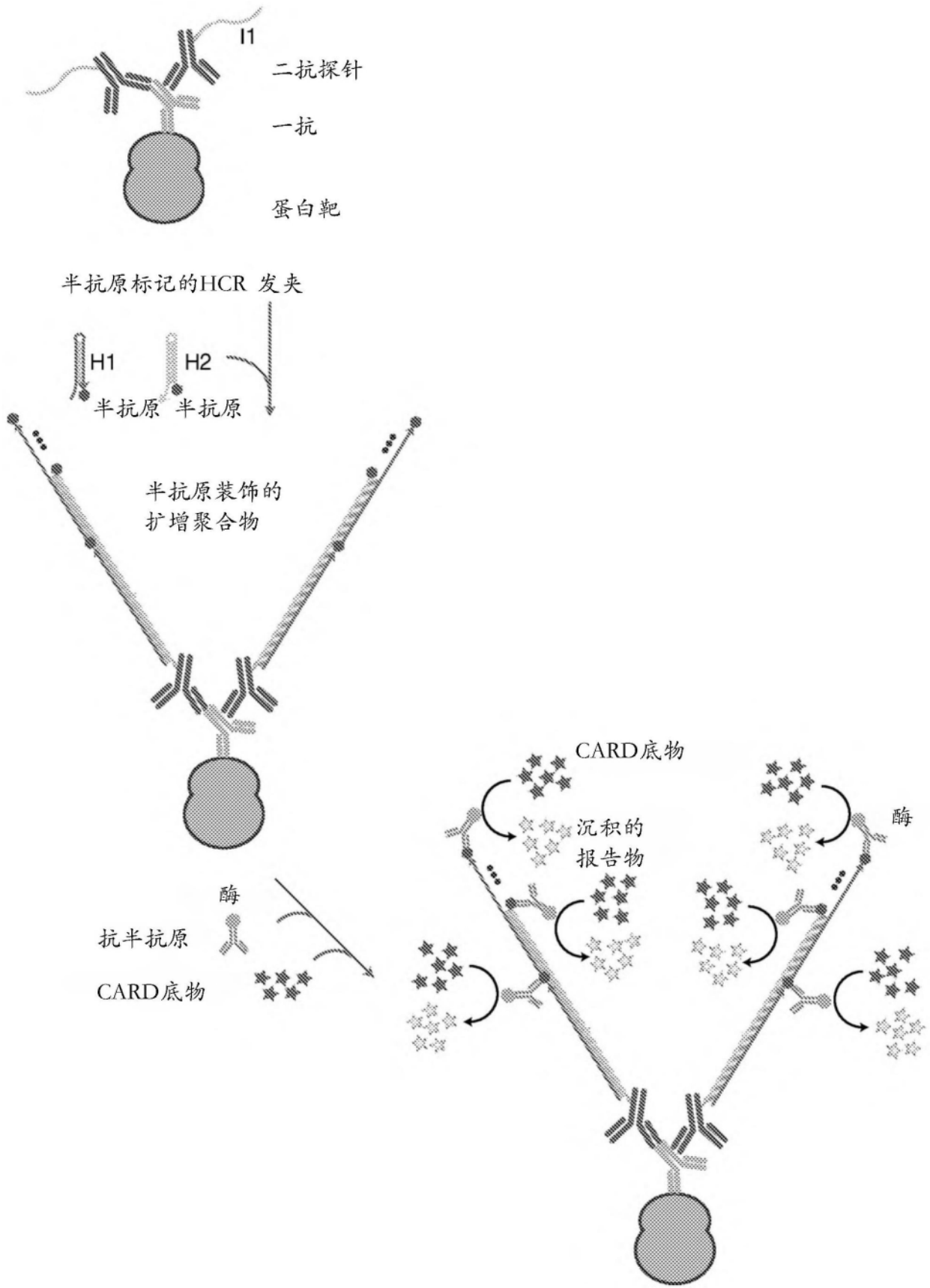


图33E

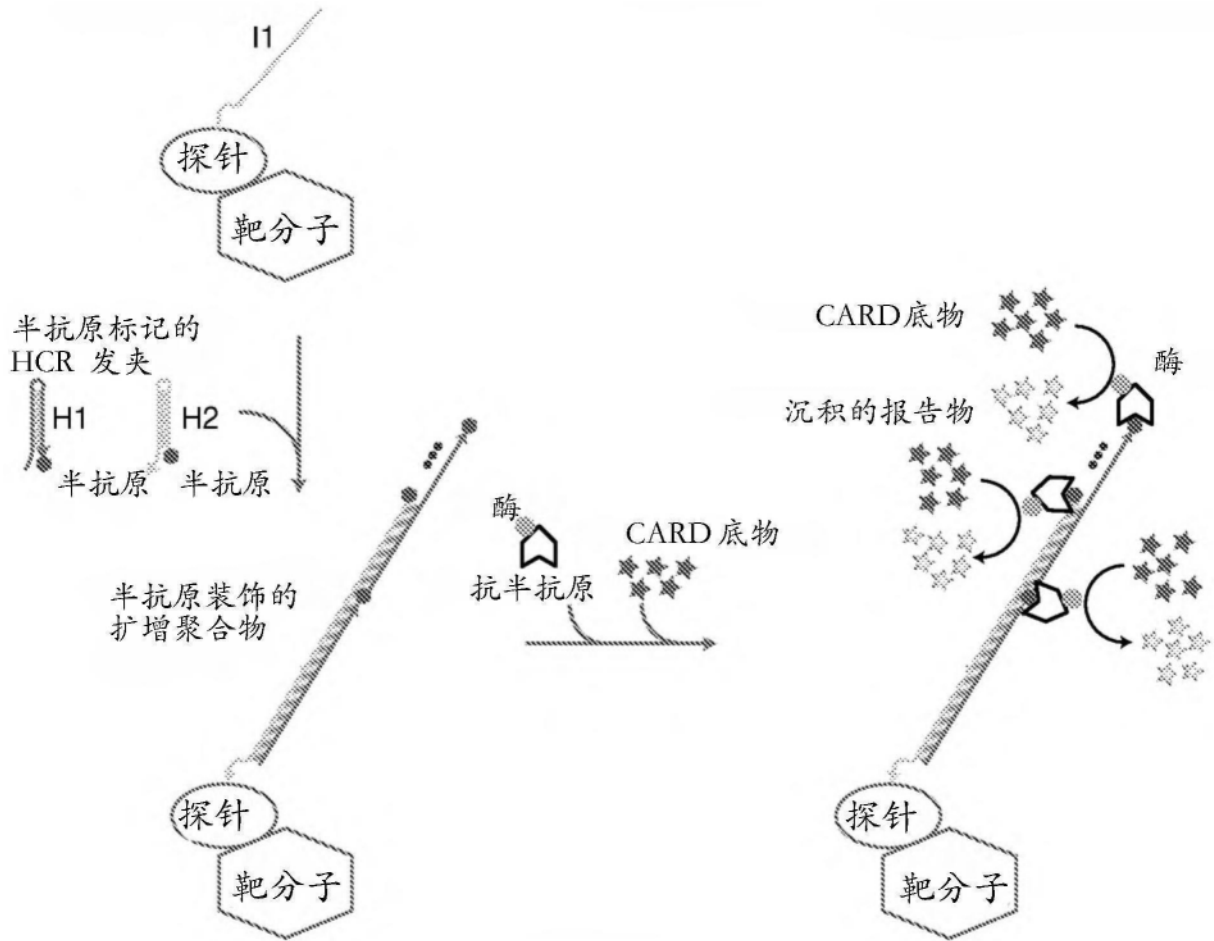


图34A

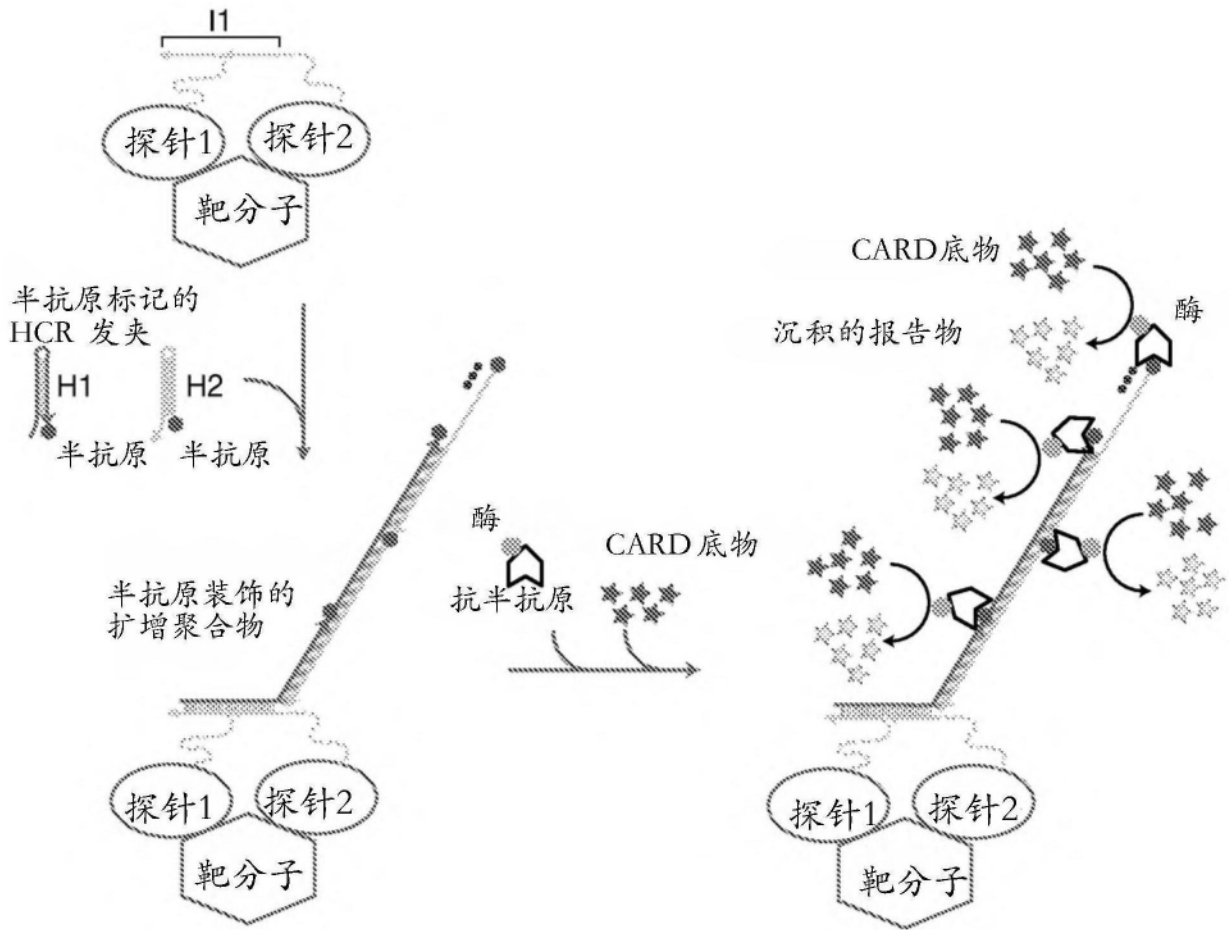


图34B

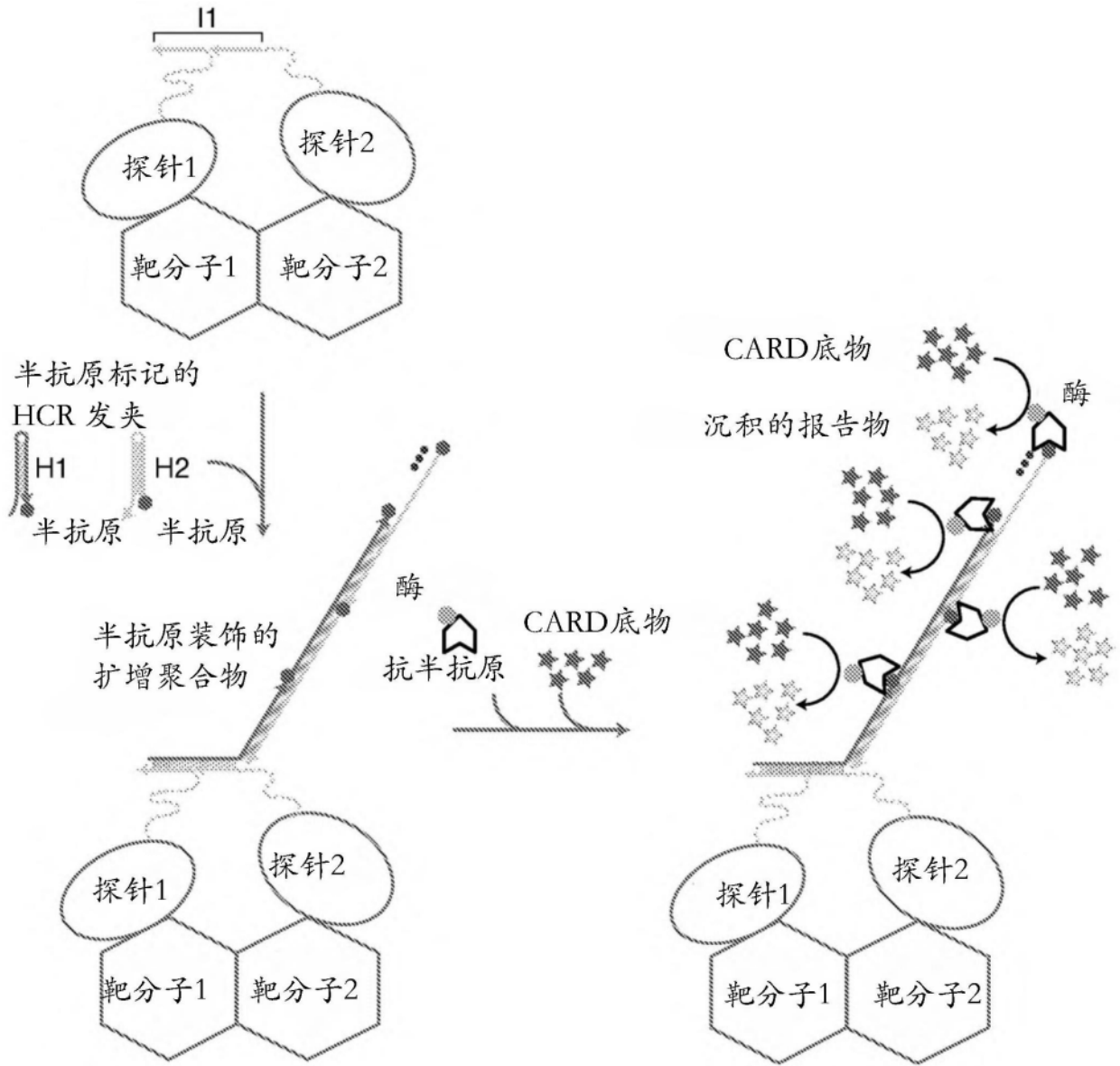
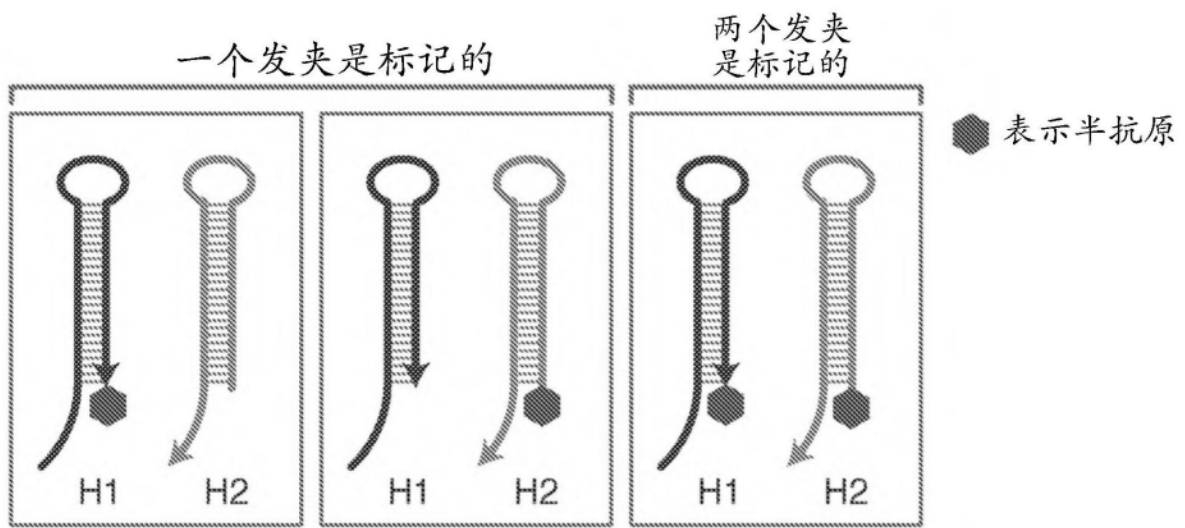
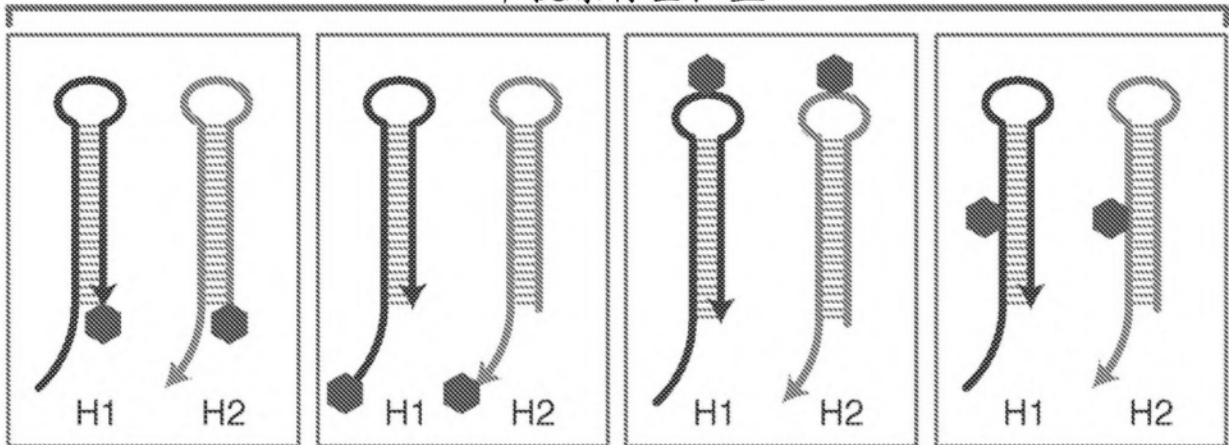


图34C

半抗原标记的HCR 发夹



半抗原标签位置



发夹是多标记的

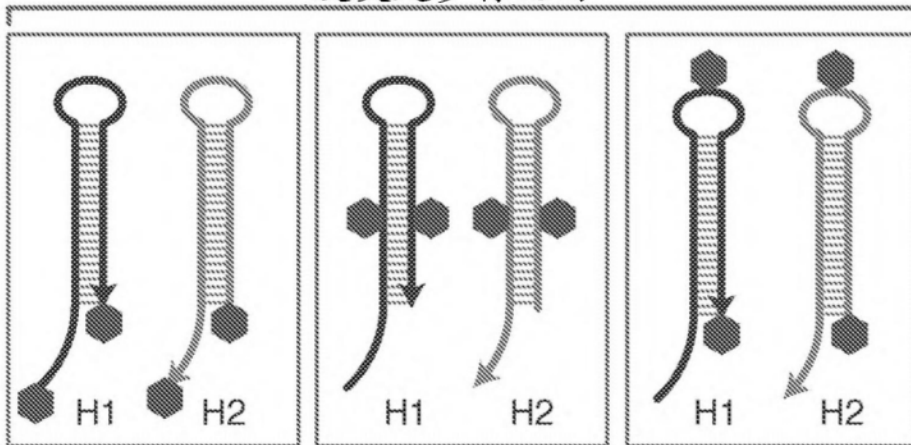


图35

半抗原标记的HCR 发夹

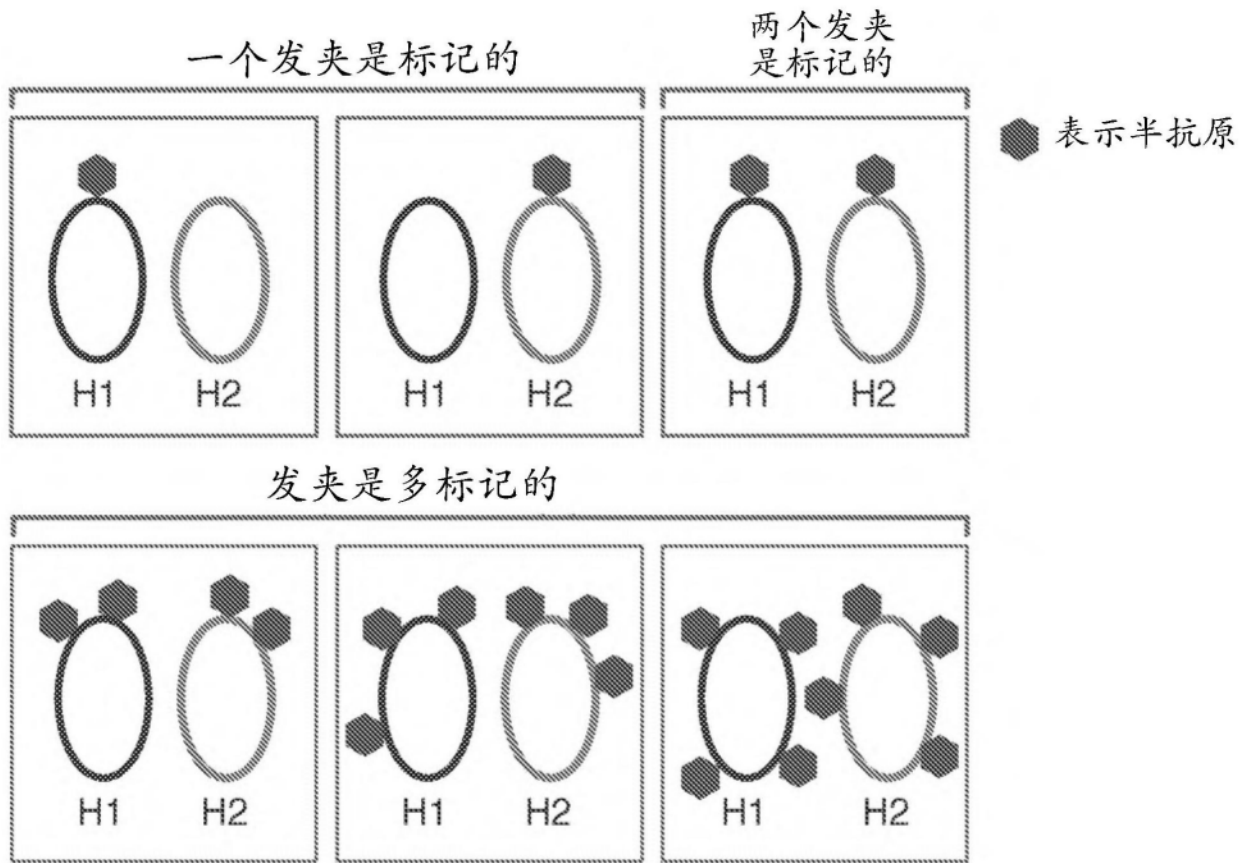
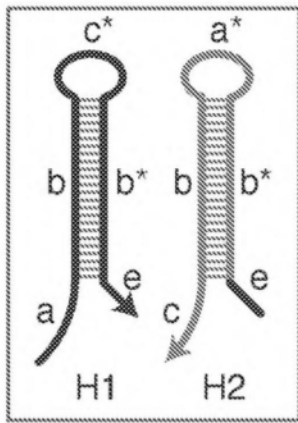


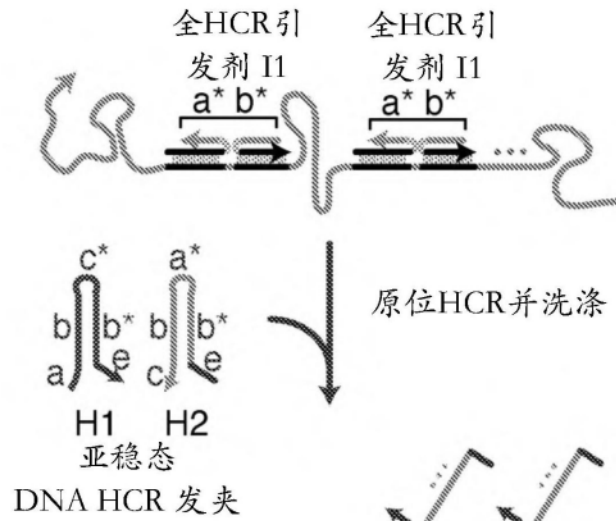
图35 (续)

底物标记的HCR 发夹

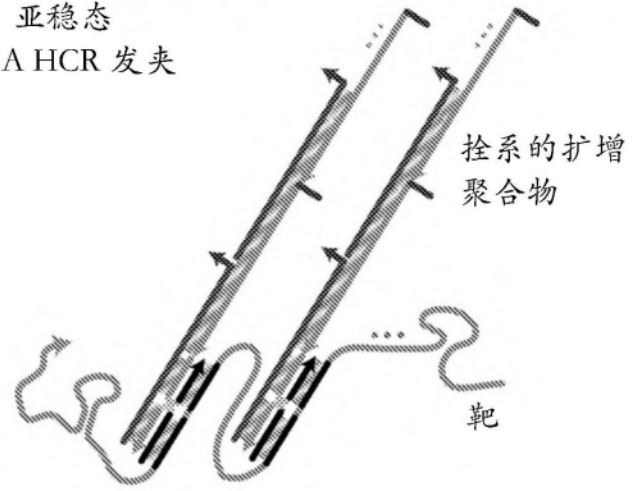


片段“c”是底物

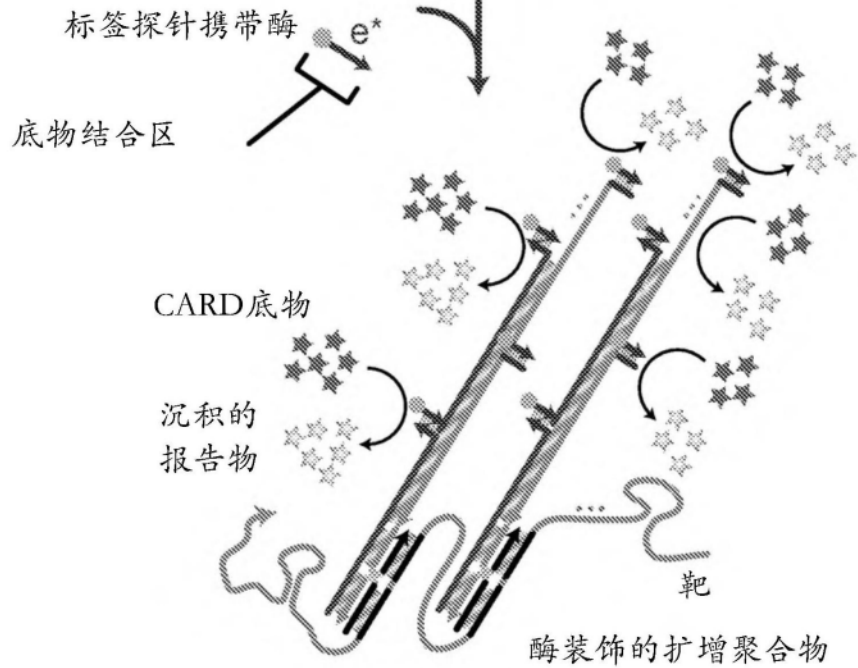
扩增



DNA HCR 发夹



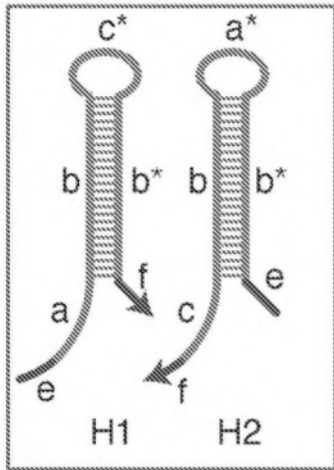
标记并洗涤



标记 & 报告物沉积

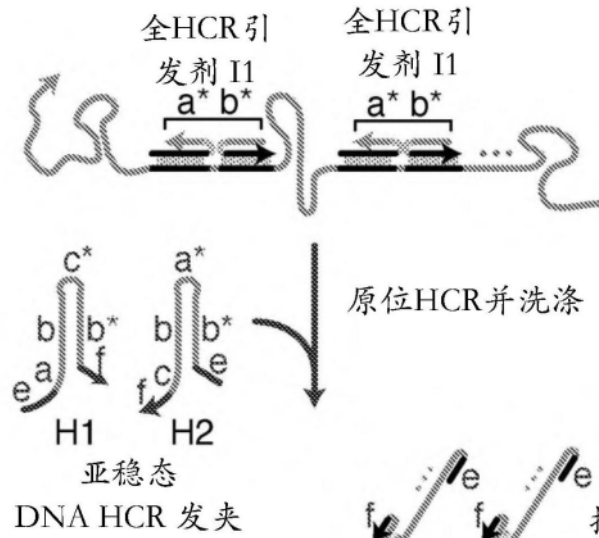
图36A

标记有分段底物的HCR 发夹

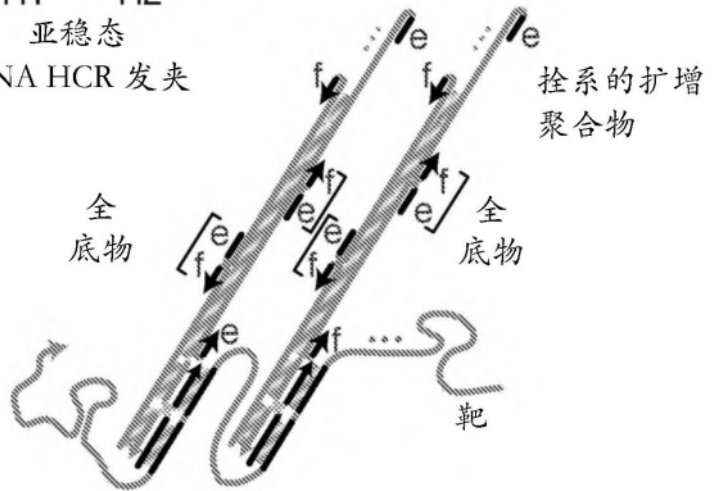


片段“c”和“f”是分段底物

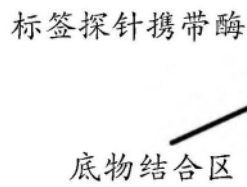
扩增



亚稳态 DNA HCR 发夹

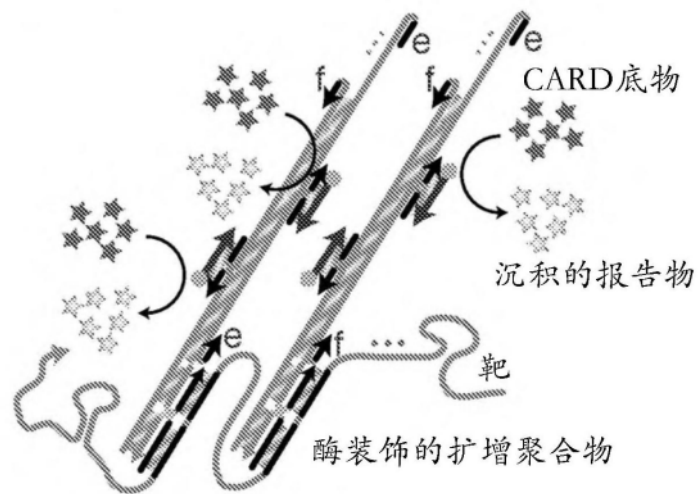


拴系的扩增聚合物



标记并洗涤

标记 & 报告物沉积



沉积的报告物

图36B

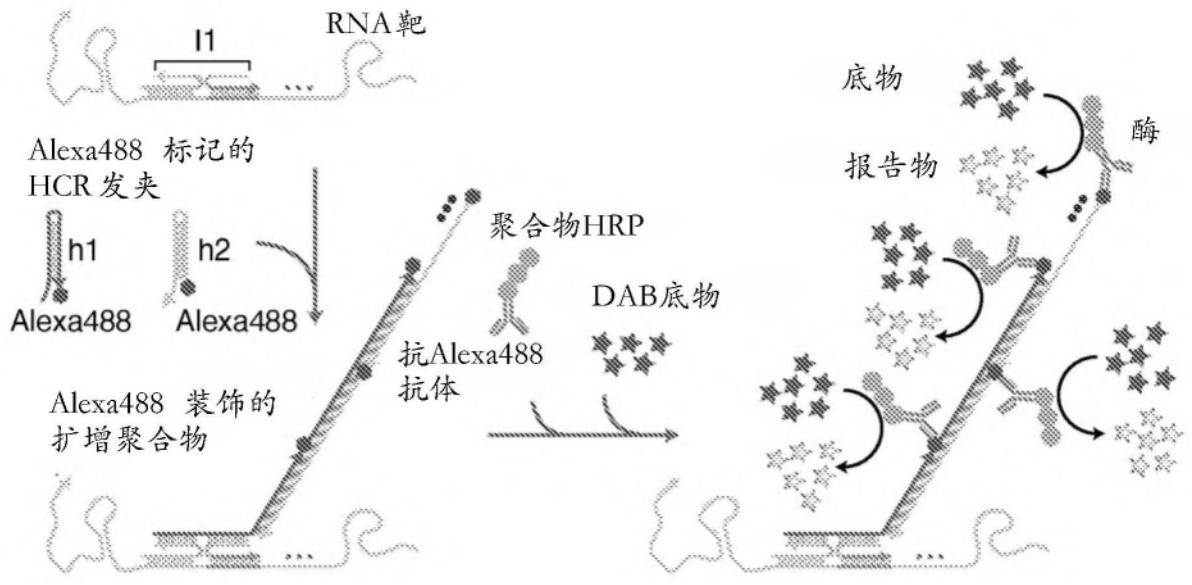


图37A

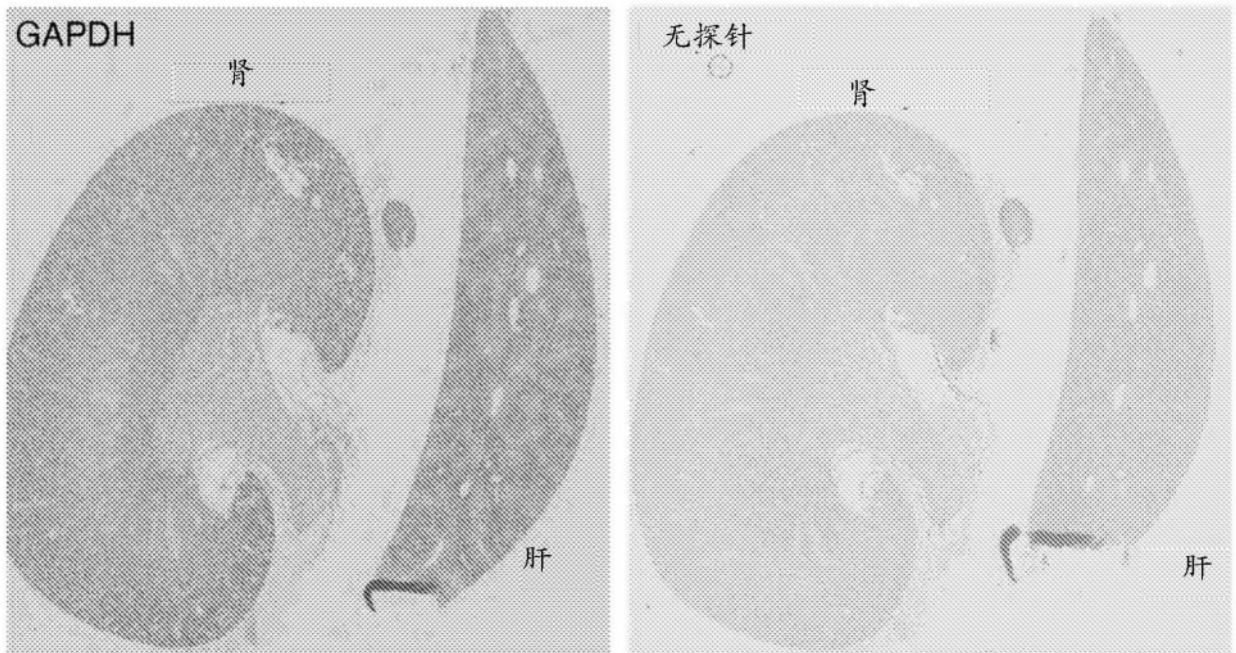


图37B

分裂引发剂探针设置

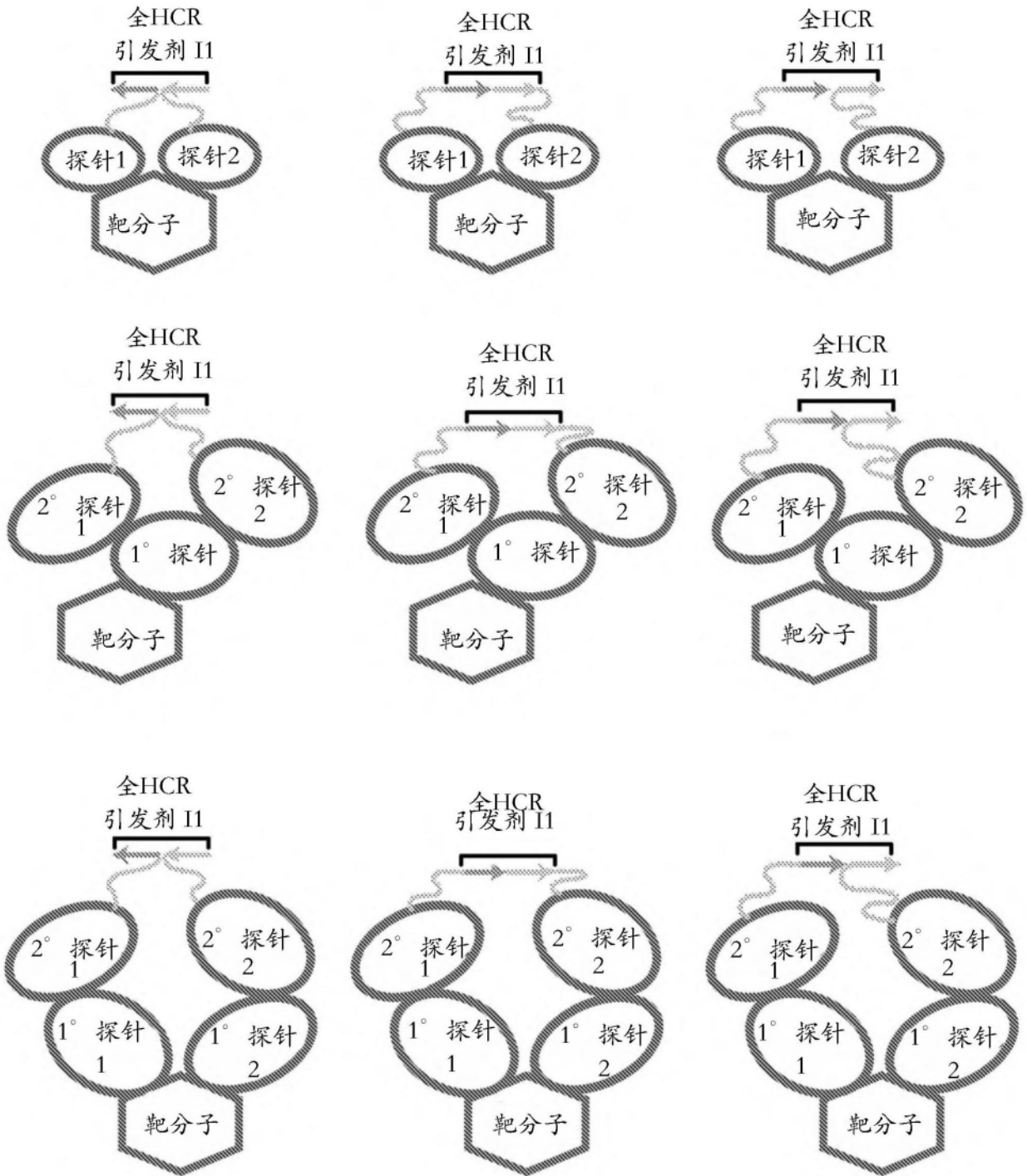


图38

分裂引发剂探针设置

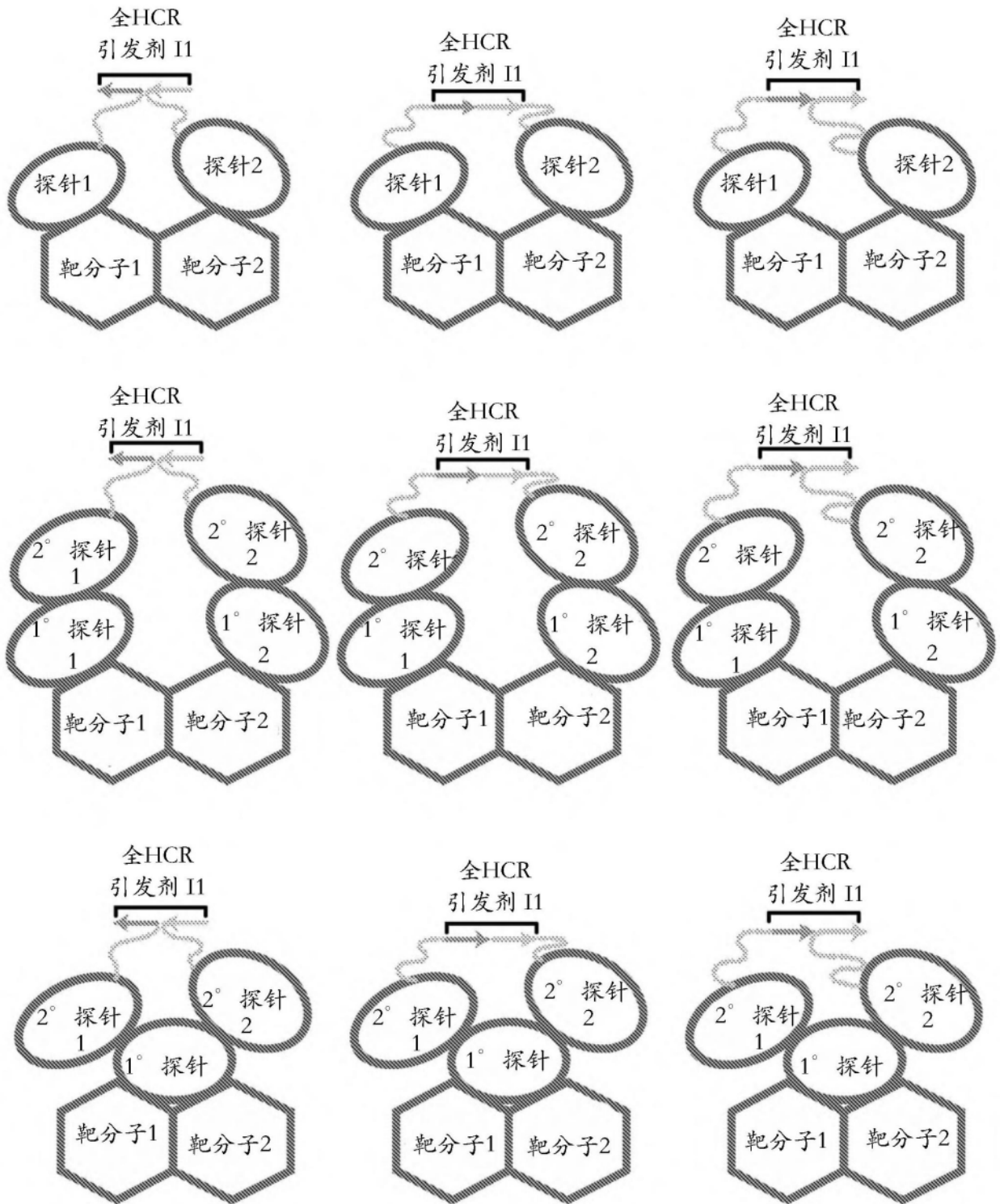


图38(续)

引发剂标记的探针
单个引发剂

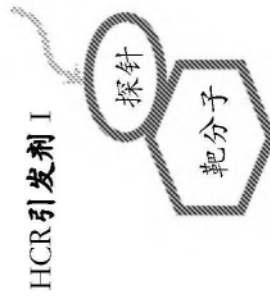


图39A

引发剂标记的探针
多个引发剂

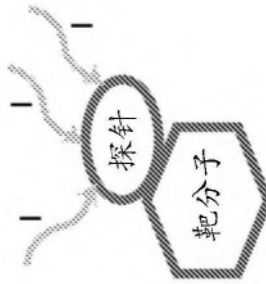


图39B

二级引发剂标记的探针
单个引发剂

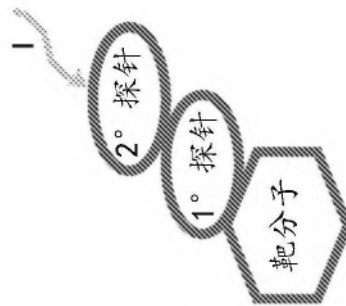


图39C

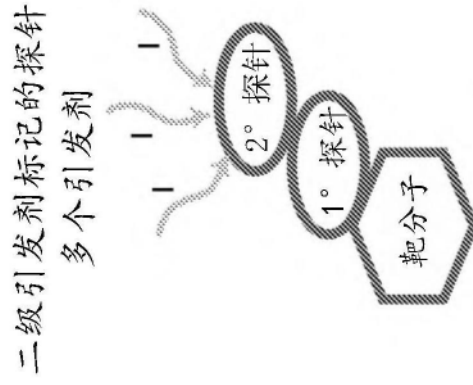


图39D

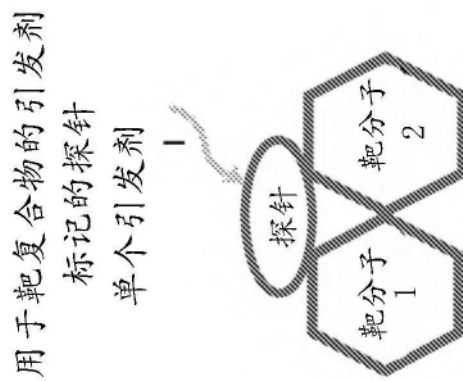


图39E

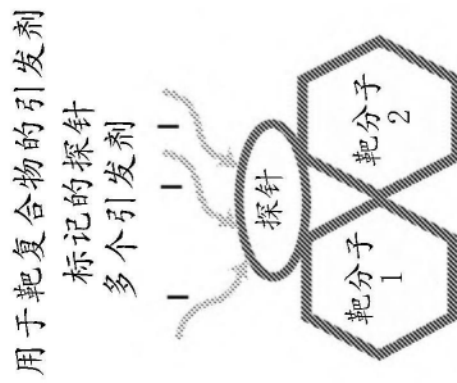


图39F

核酸探针
单个引发剂



图39G

核酸探针
多个引发剂

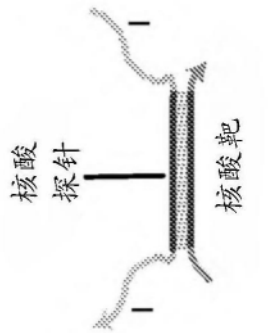


图39H

一抗探针
单个引发剂

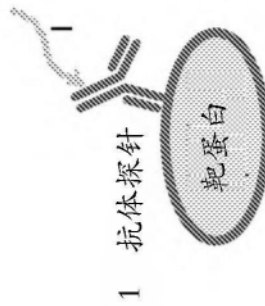


图39I

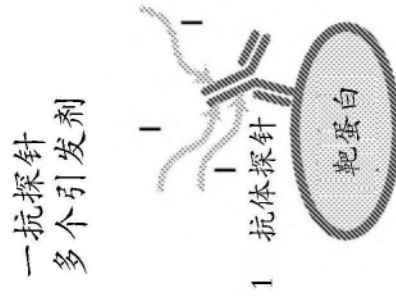


图39J

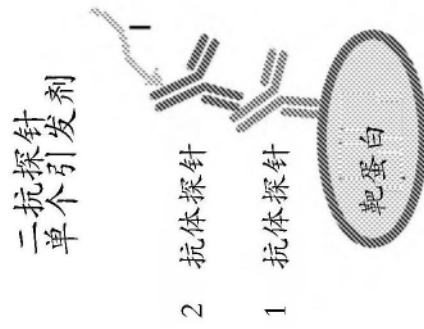


图39K

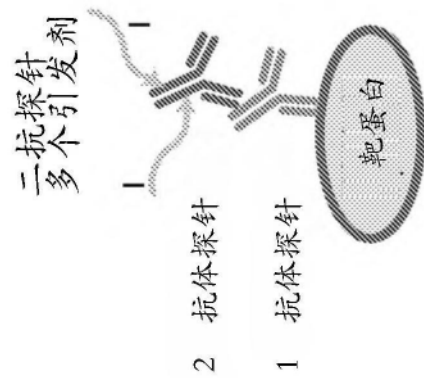


图39L

纳米抗体探针
单个引剂



图39M

纳米抗体探针
多个引剂

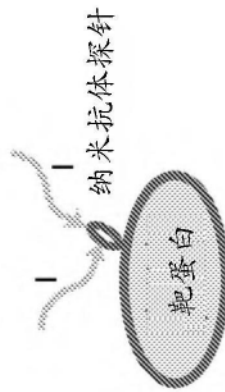


图39N

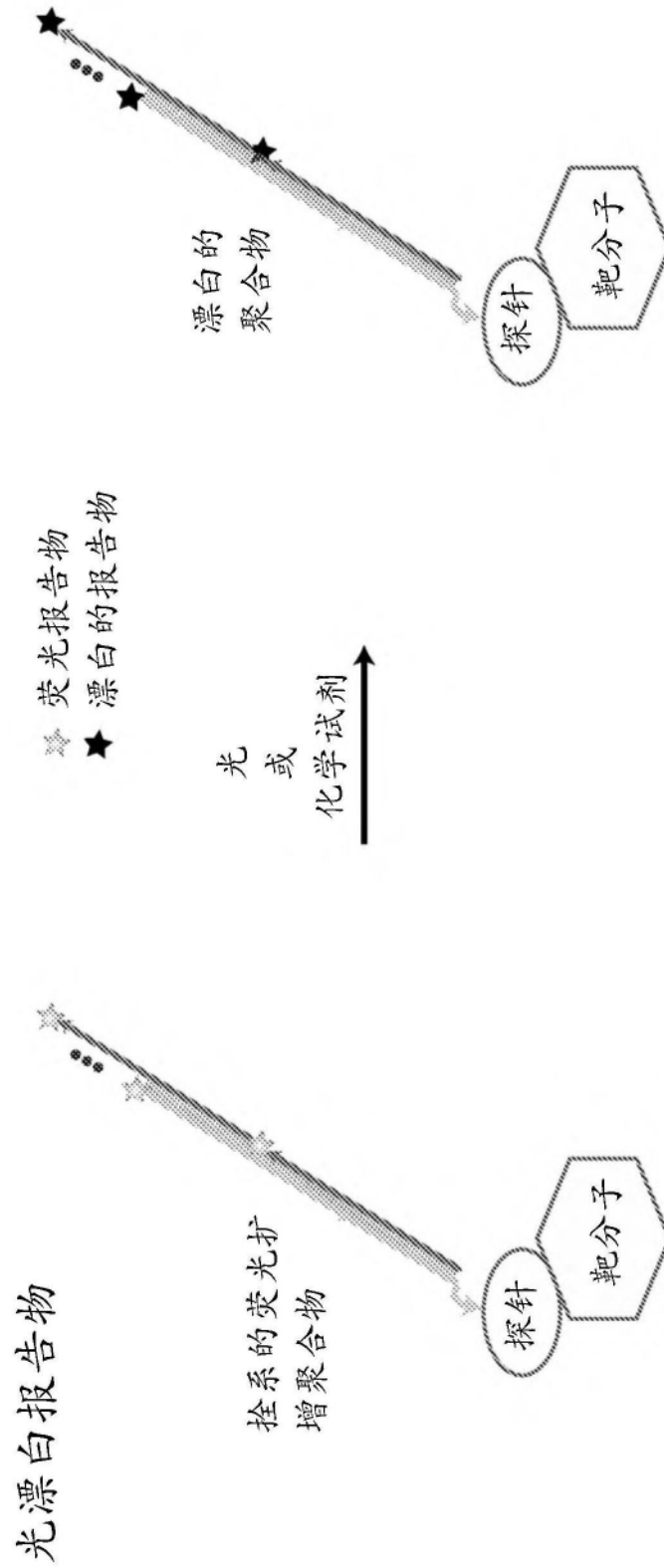


图40A

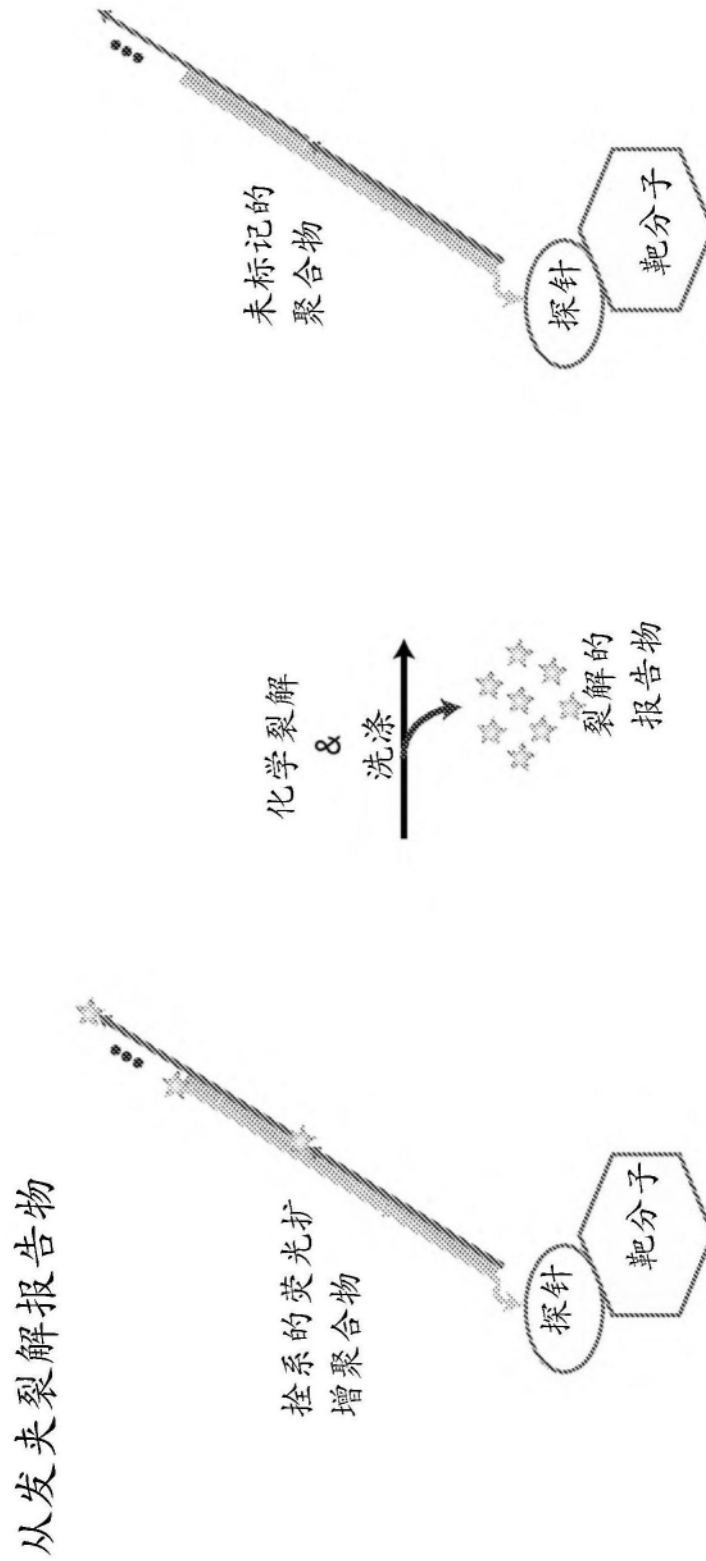


图40B

从标签探针裂解报告物

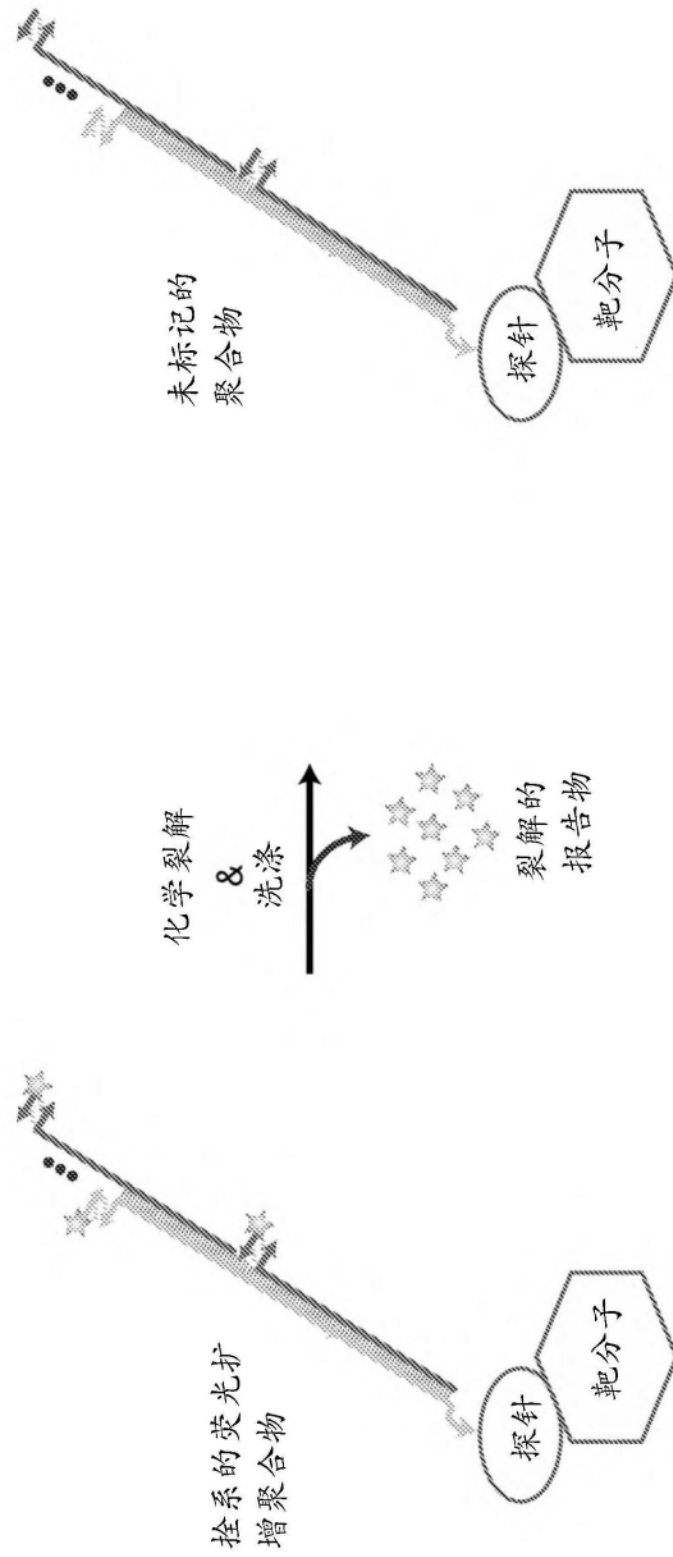


图40C

裂解探针

每个HCR发夹的输入和输出结构域之间的可裂解基团

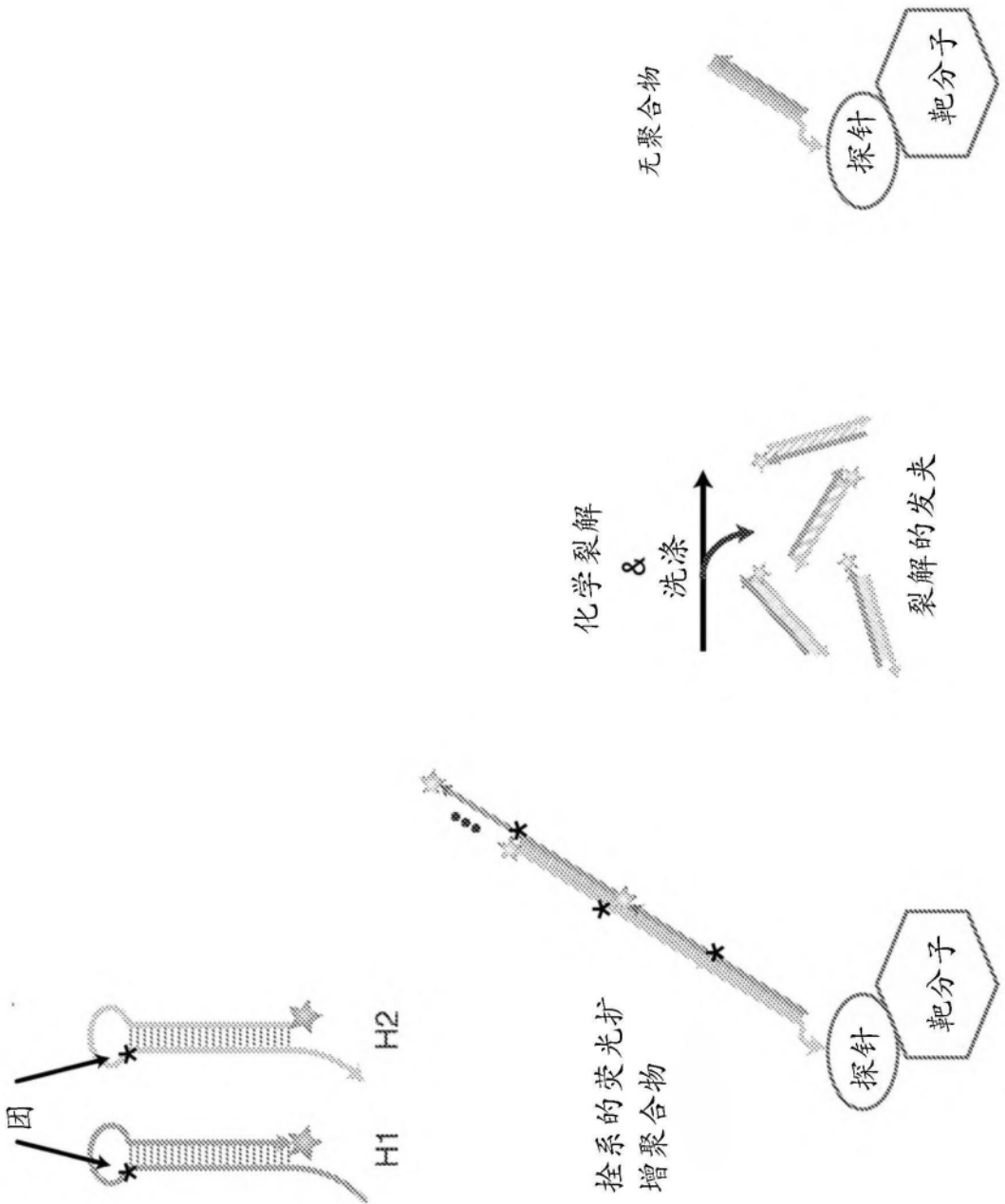


图40D

裂解探针

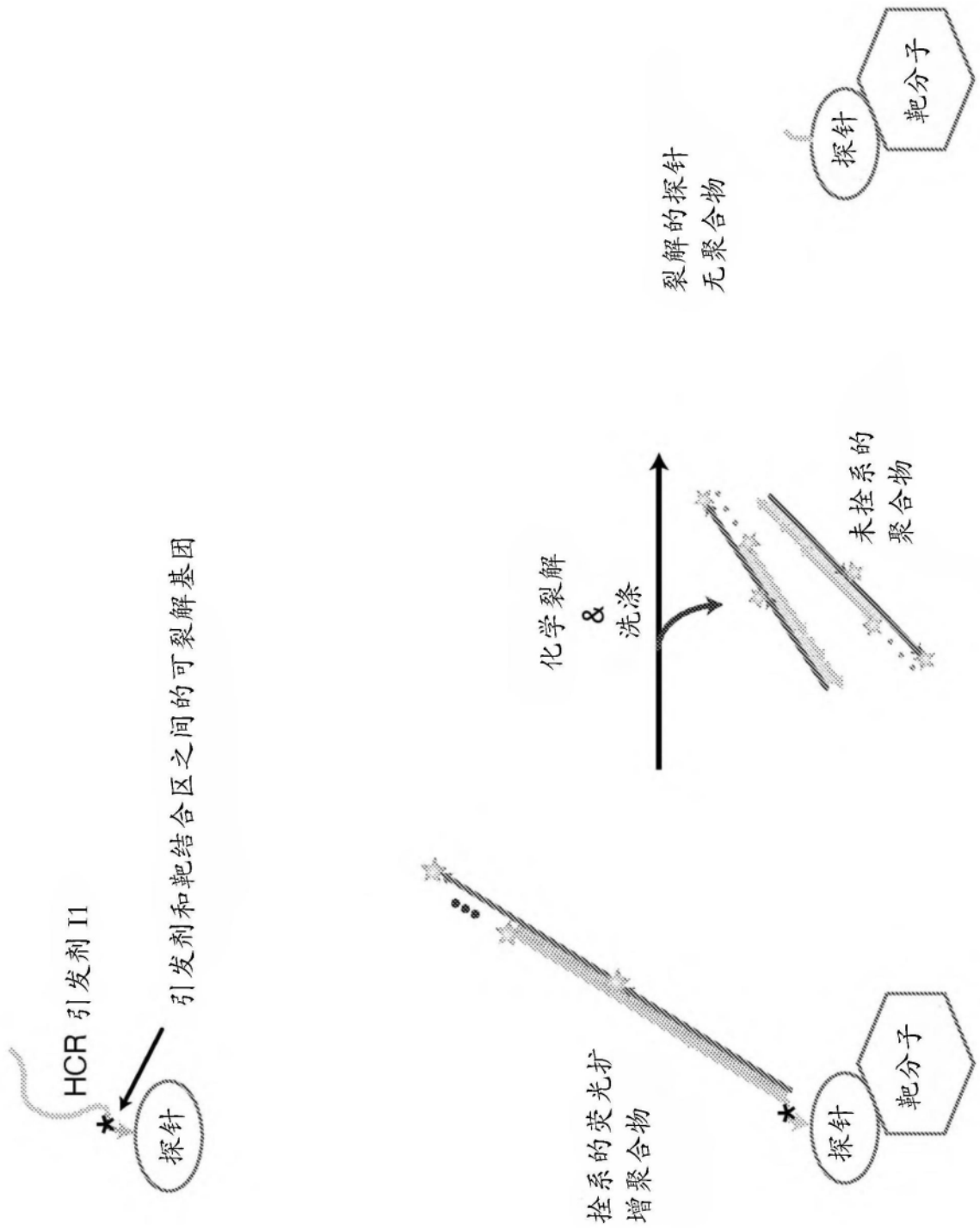
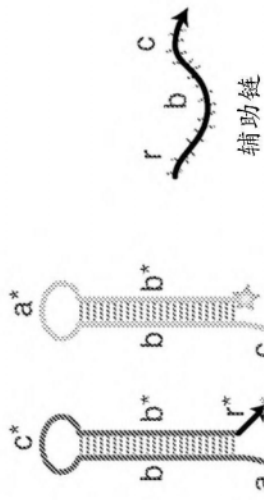


图40E

用辅助链使发夹去杂交



区段“r*”是用于辅助链成核的toehold

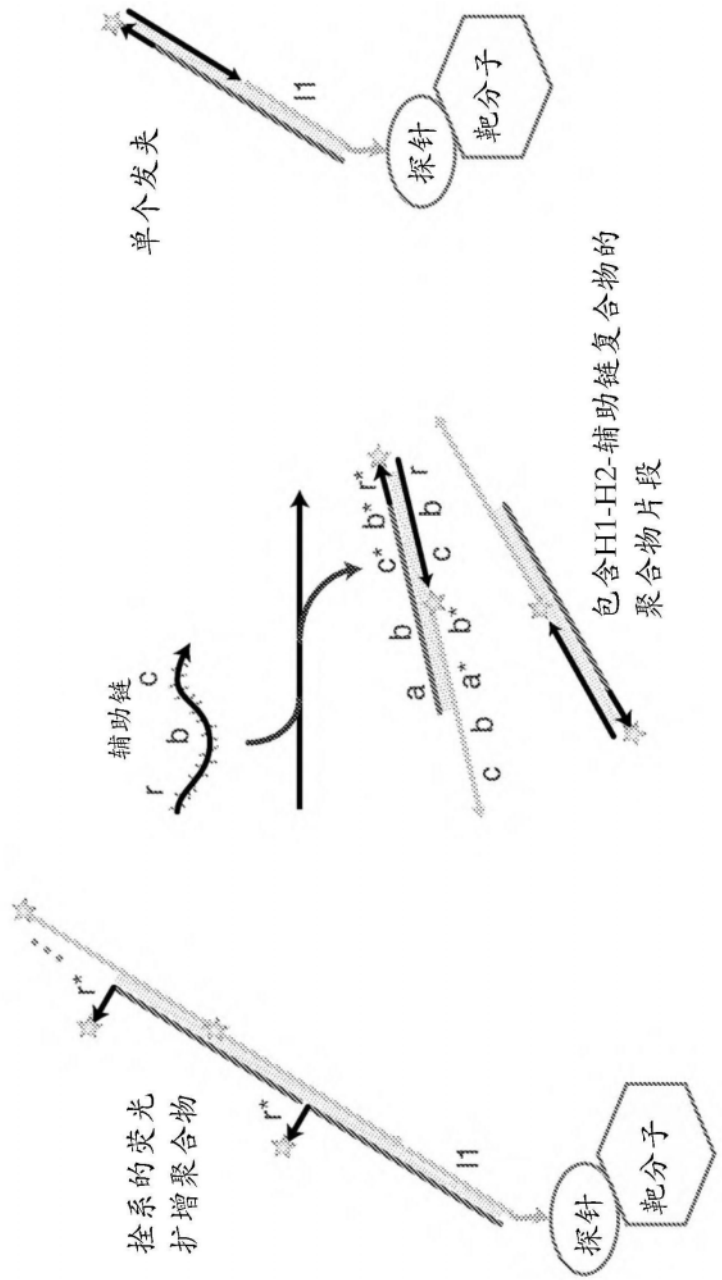


图40F

用辅助链使标签探针去杂交

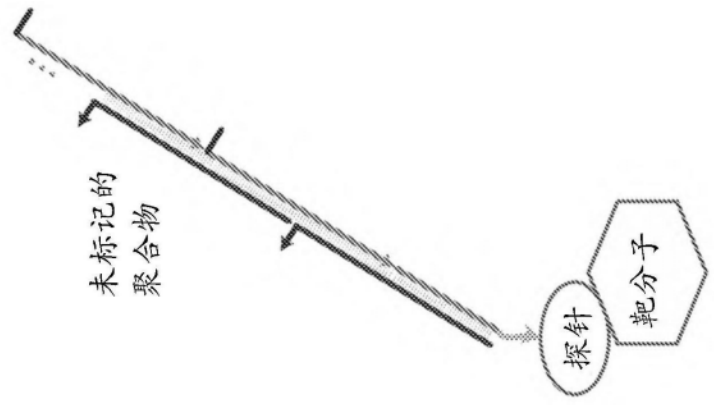
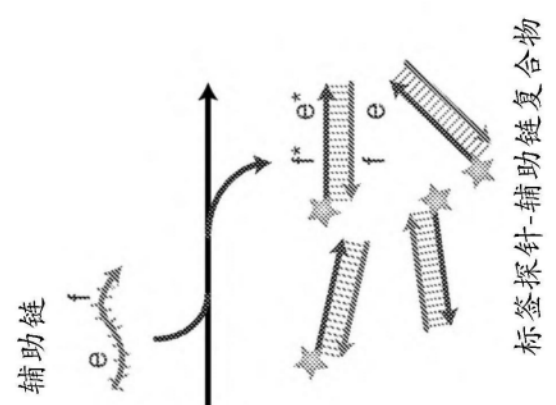
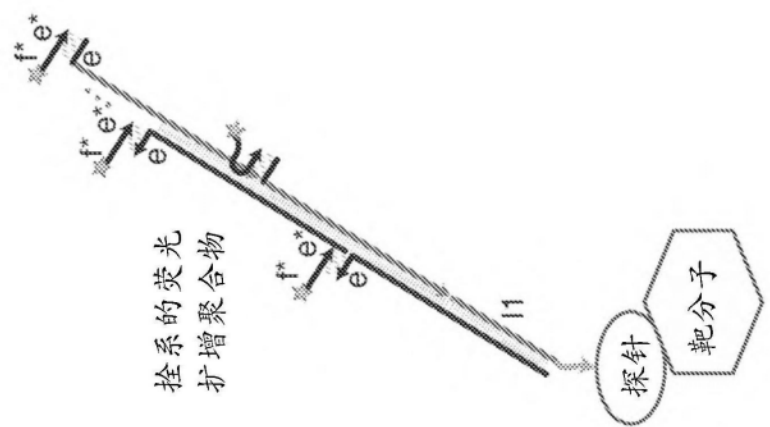
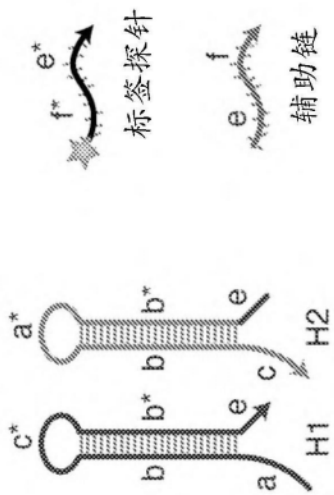


图40G

以化学试剂或升高的温度的去稳定发夹

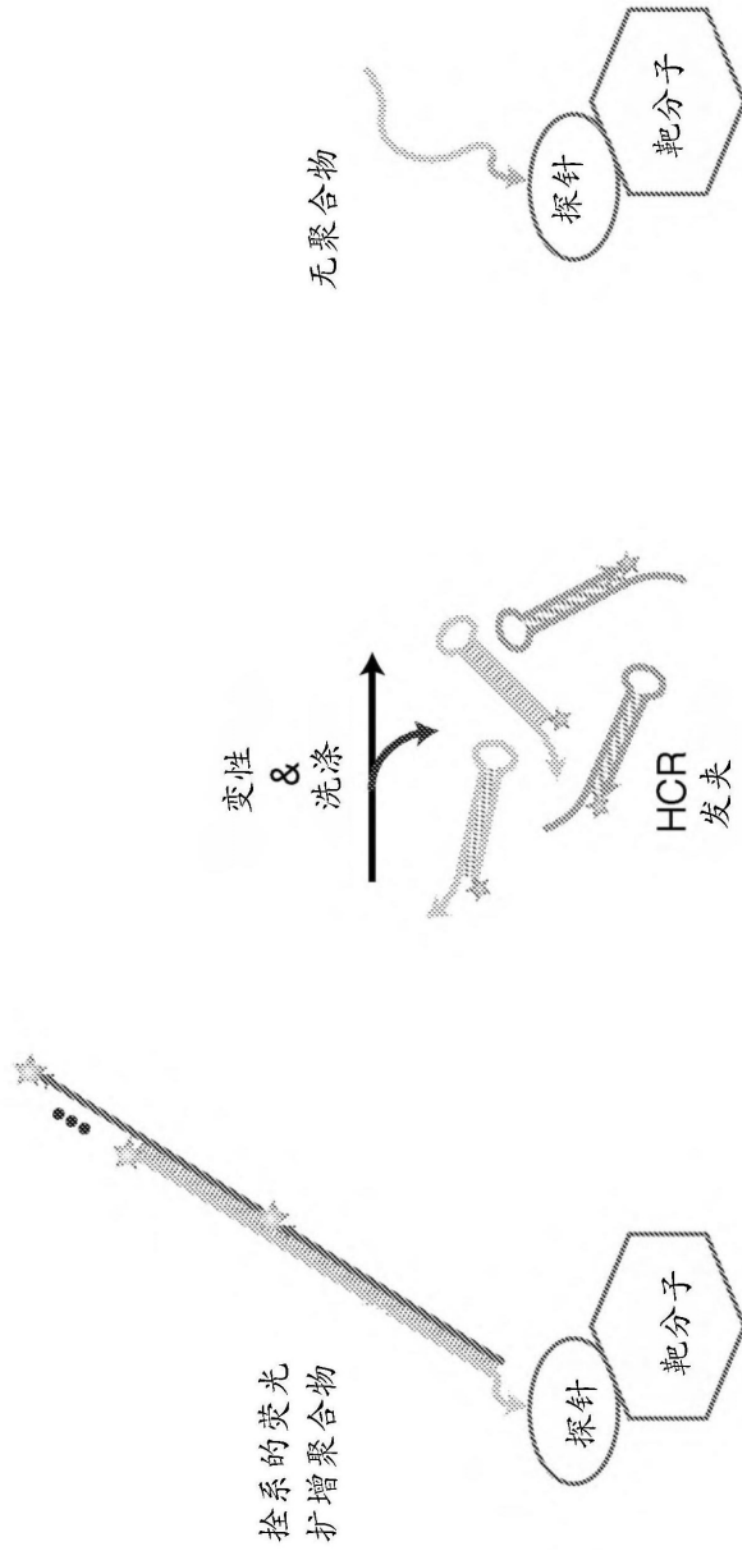


图40H

以化学试剂或升高的温度从靶去稳定探针

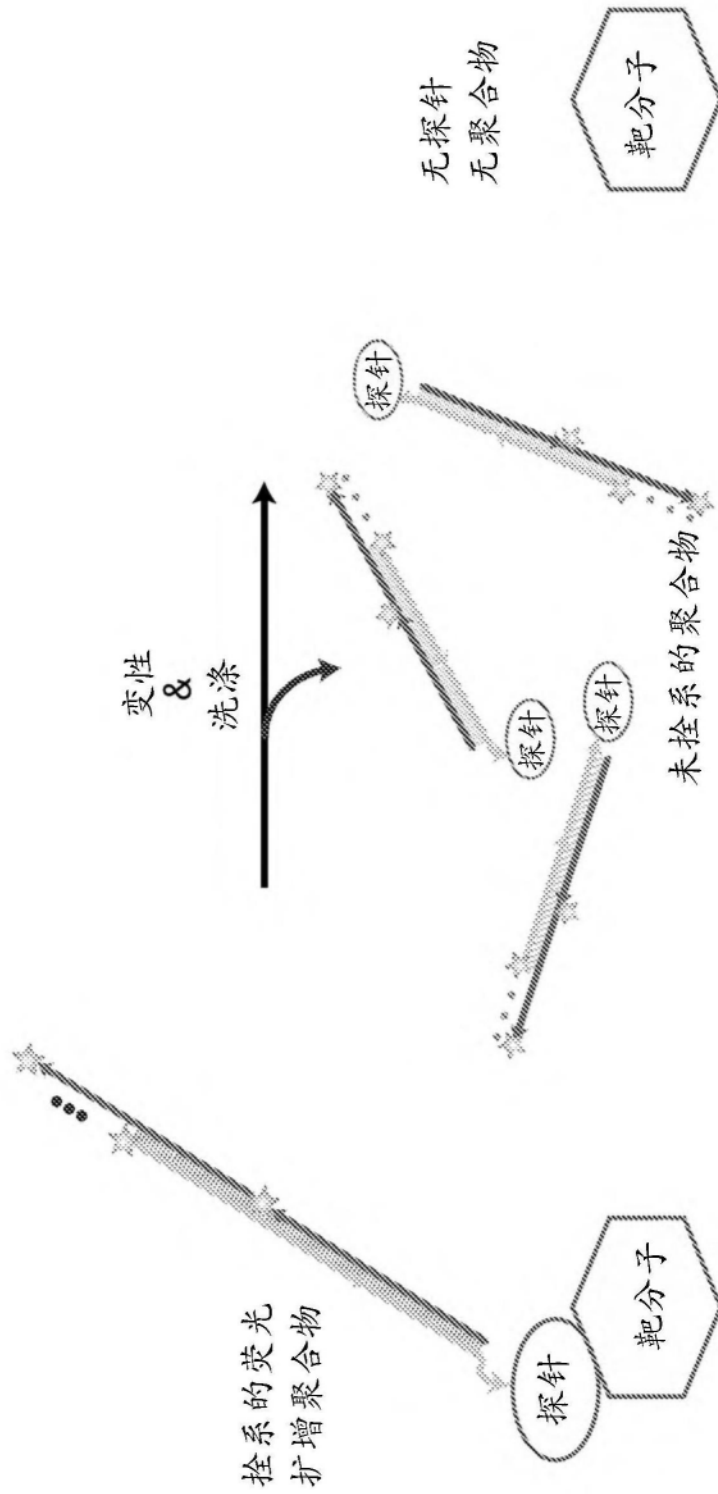


图40I

以化学试剂或升高的温度的底物去稳定标签探针

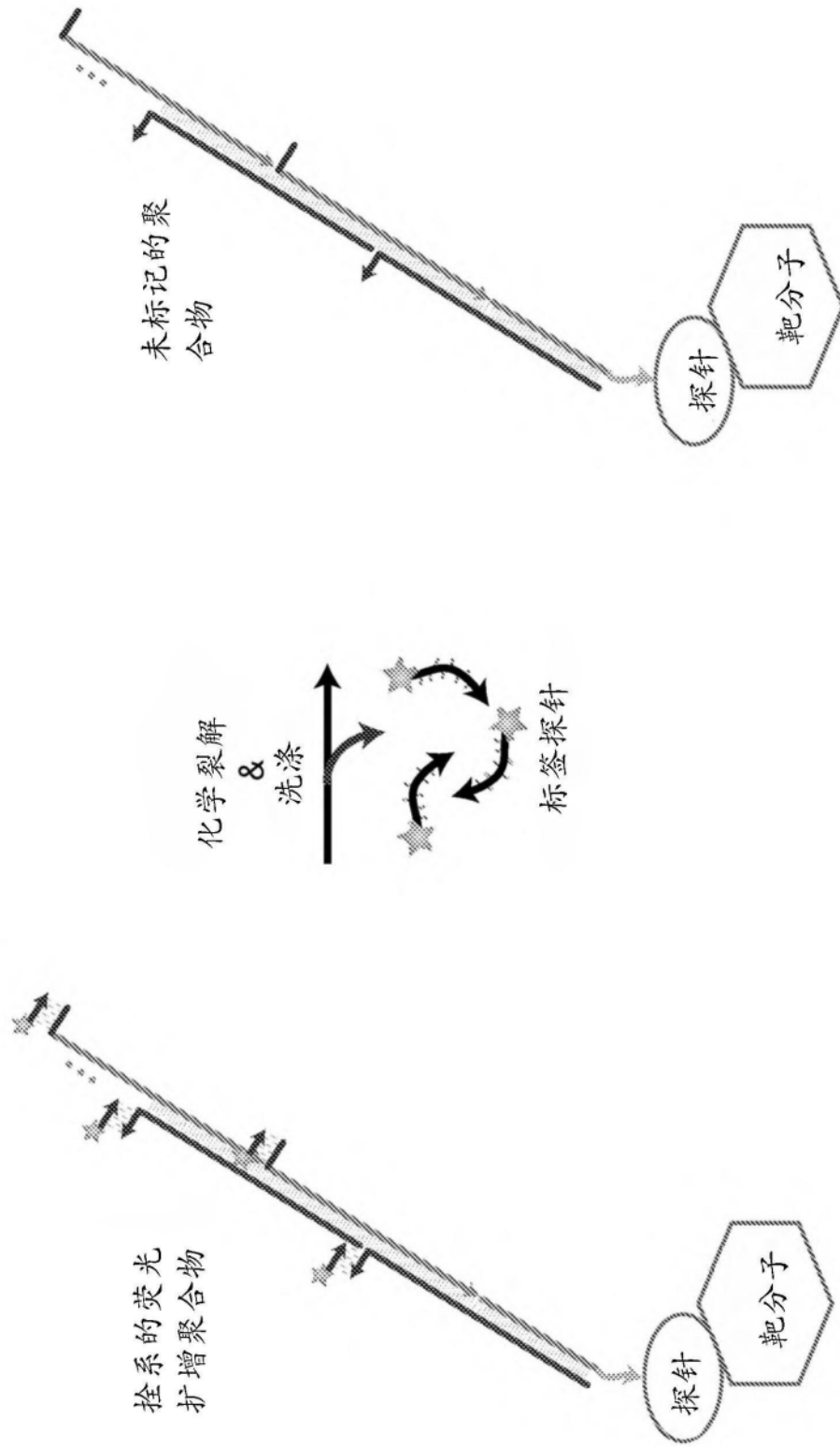


图40J

用酶(例如DNA酶、RNA酶、蛋白酶)降解HCR探针和聚合物

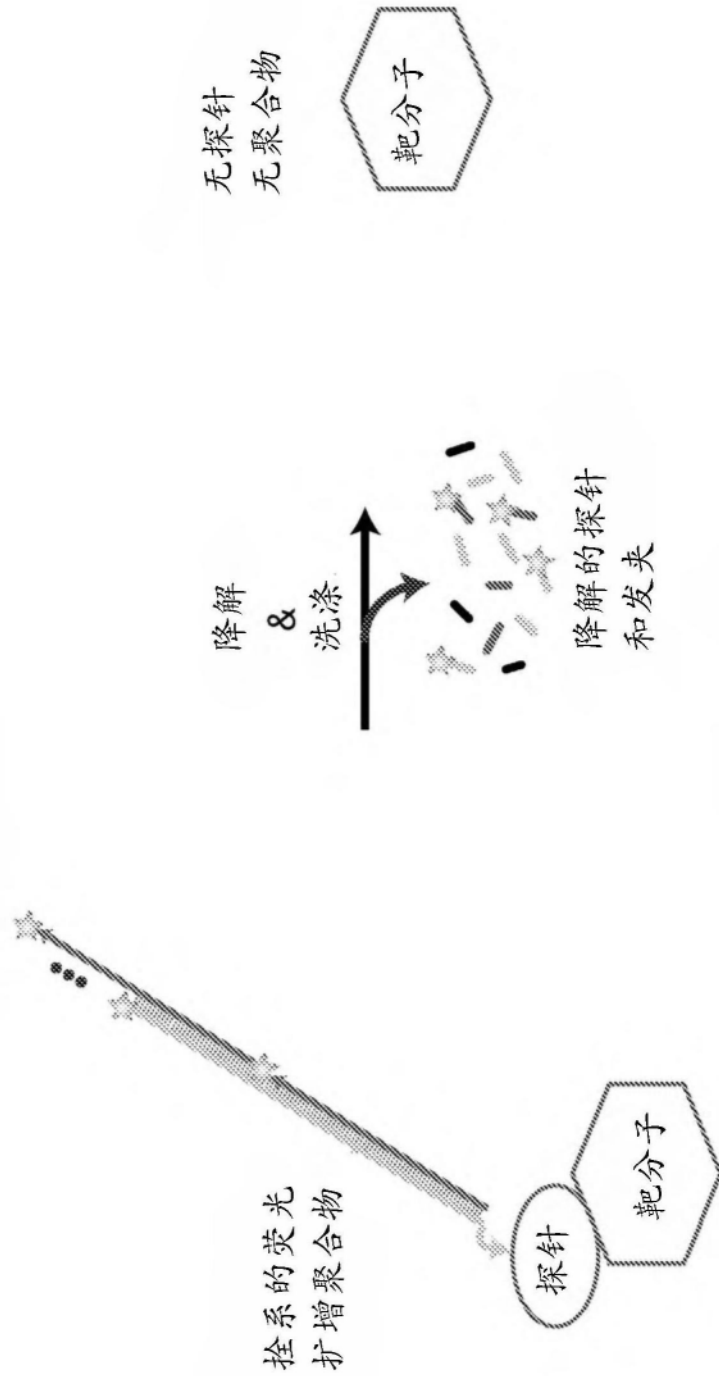


图40K

用酶(例如DNA酶、RNA酶、蛋白酶)降解靶

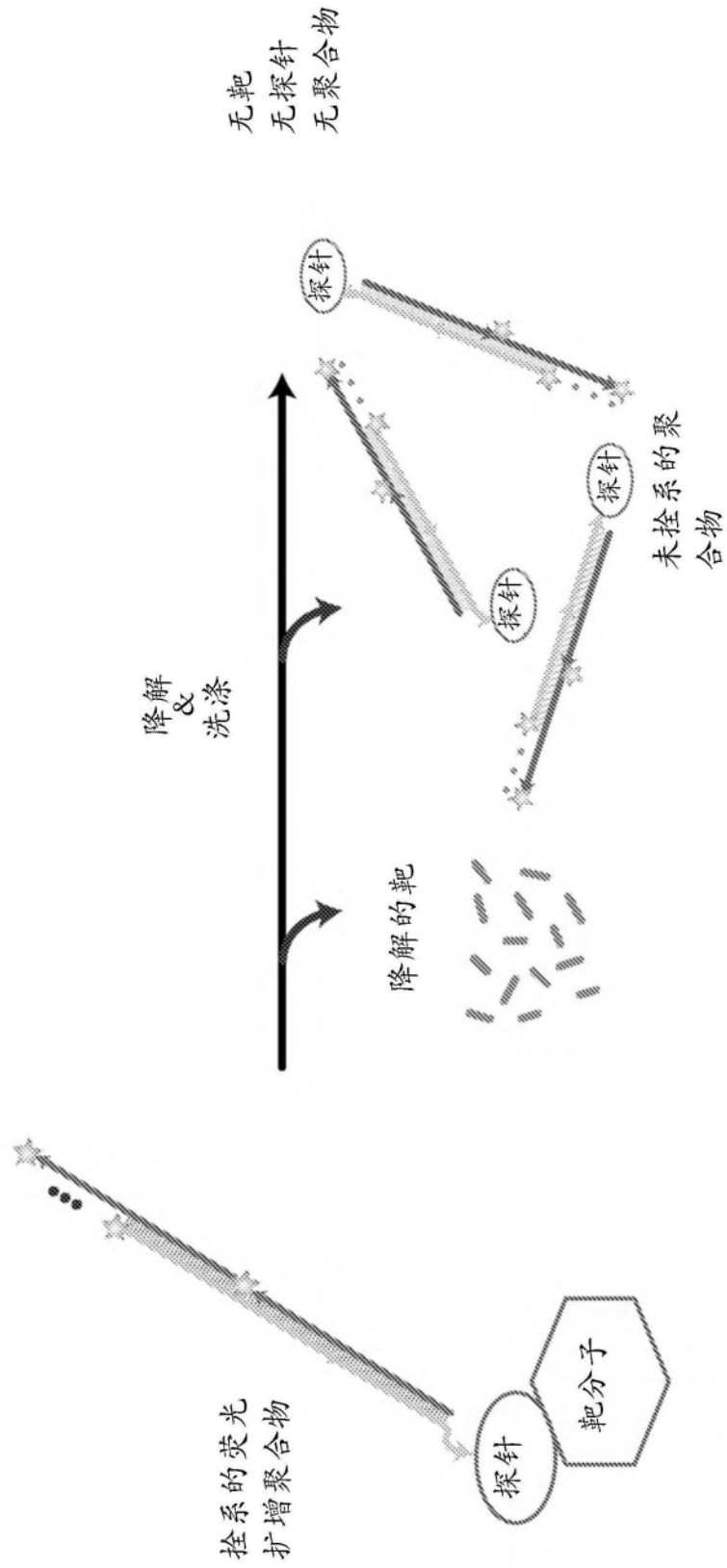


图40L

用酶(例如DNA酶、RNA酶、蛋白酶)降解靶和HCR探针和发夹

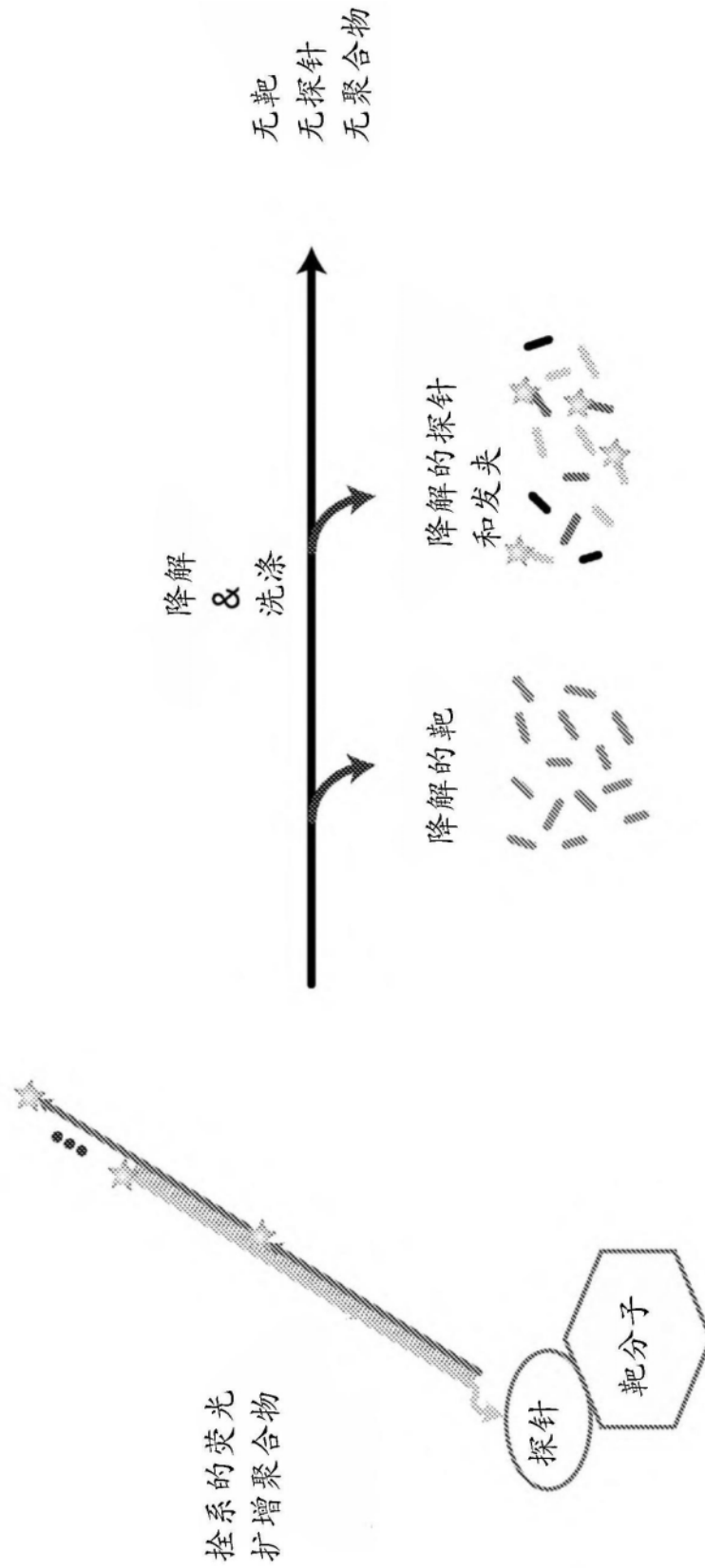


图40M

用辅助链使发夹去杂交

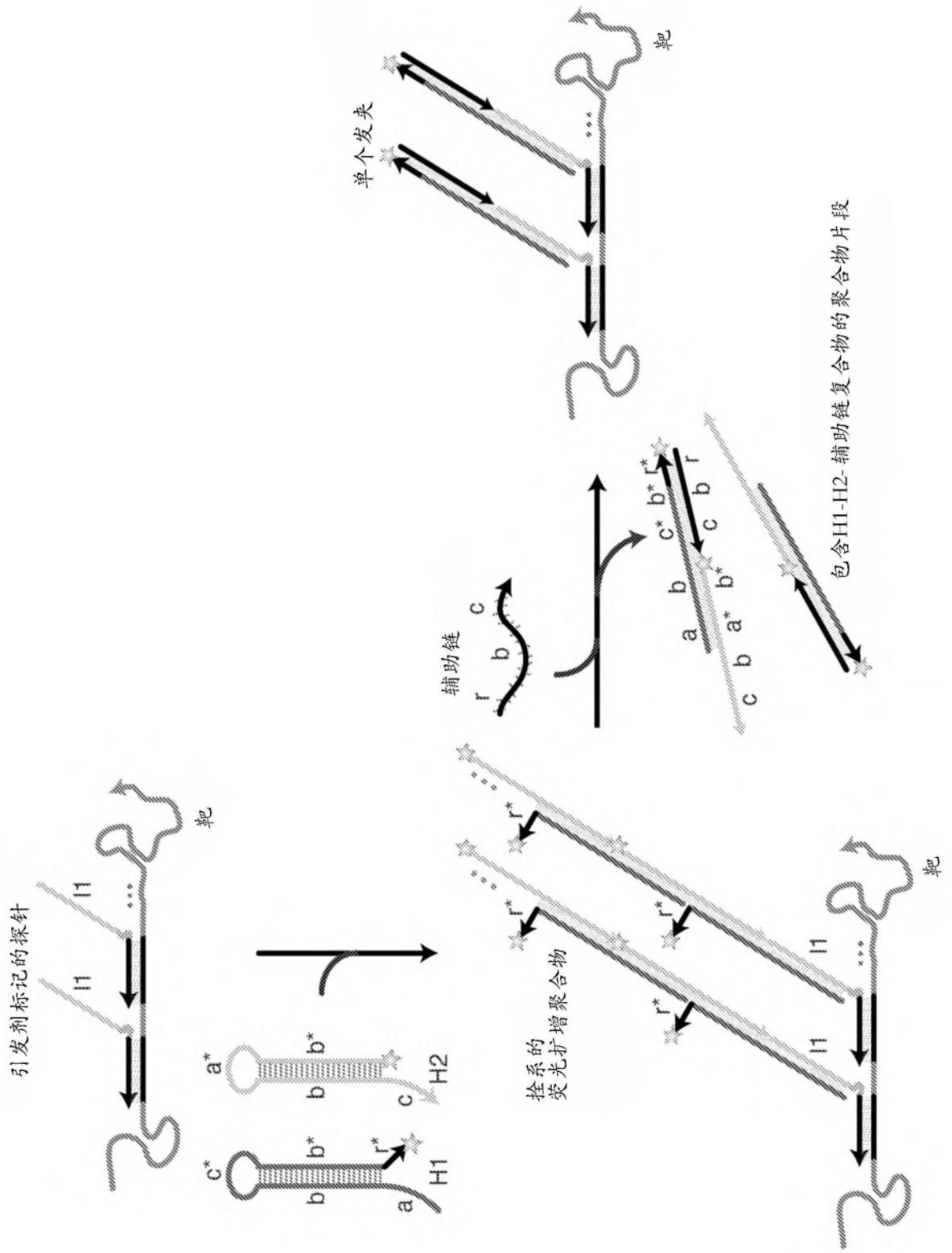


图40N

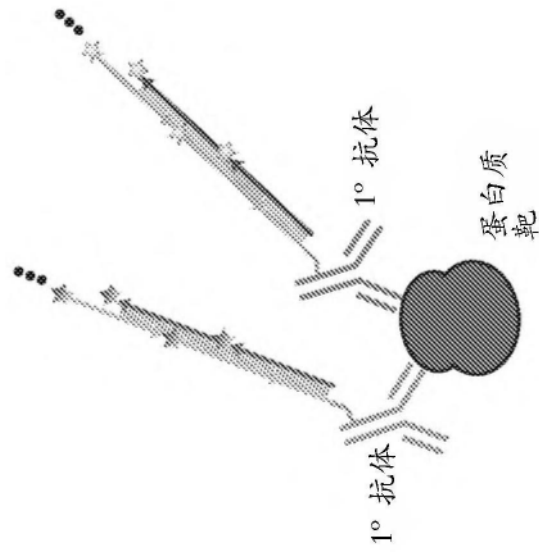


图41A

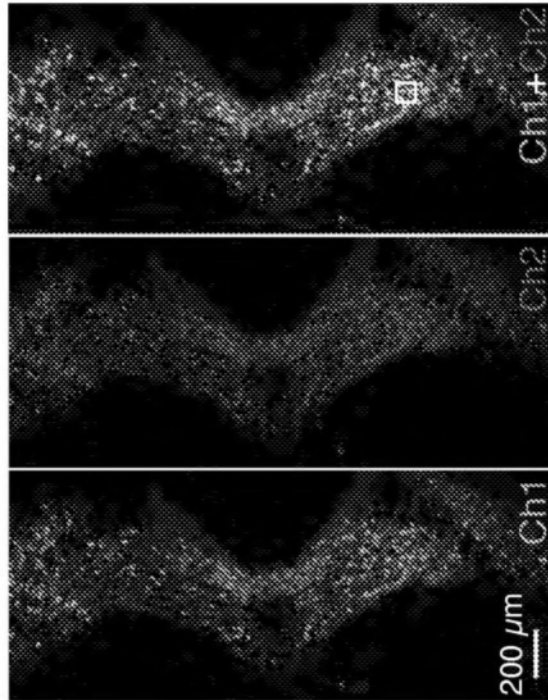


图41B

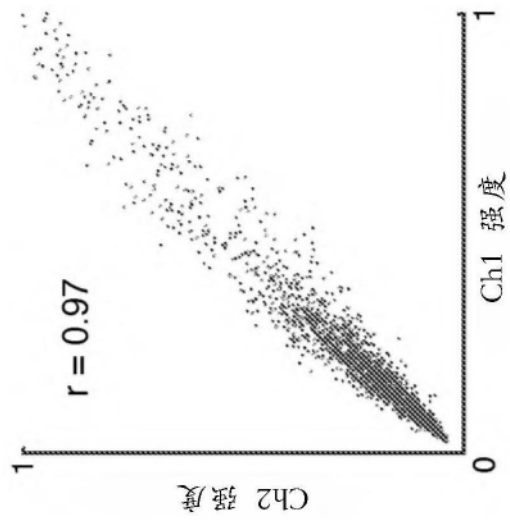


图41C

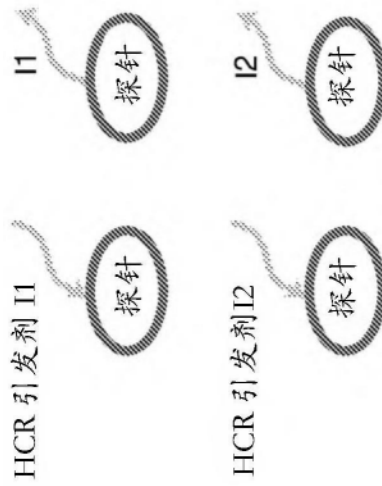


图42A

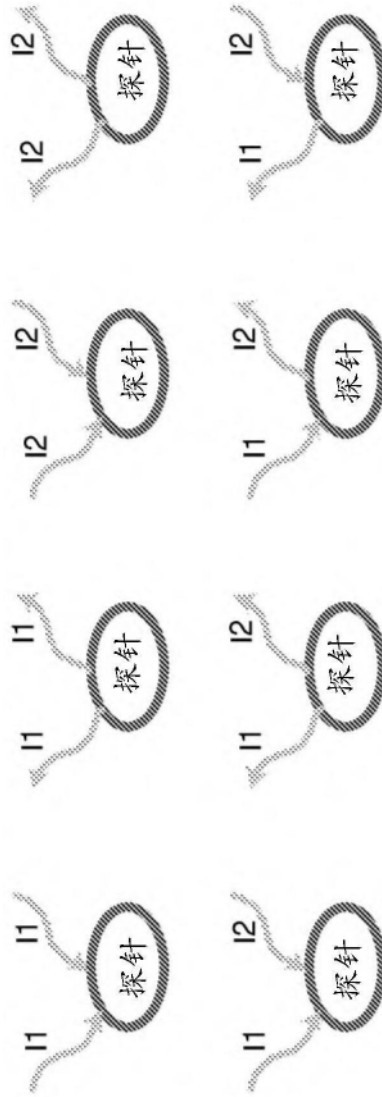


图42B

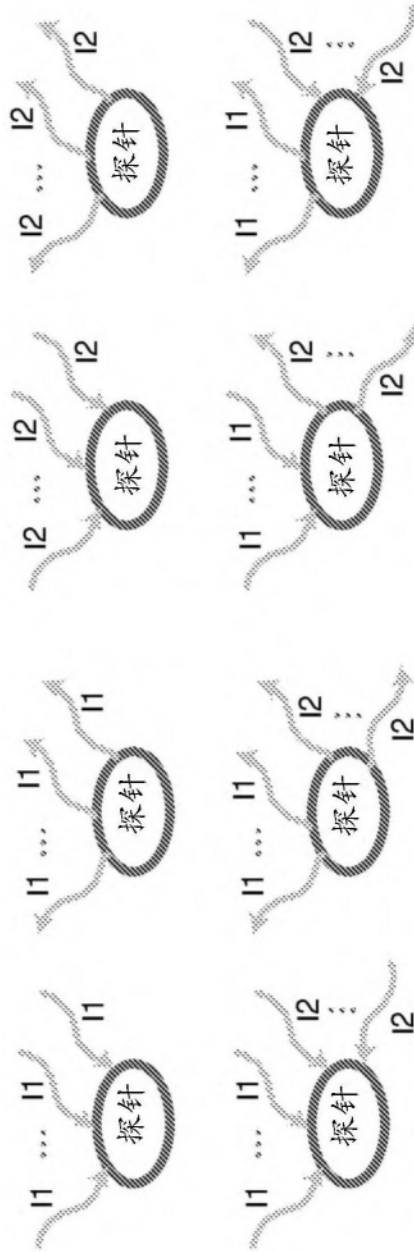


图42C

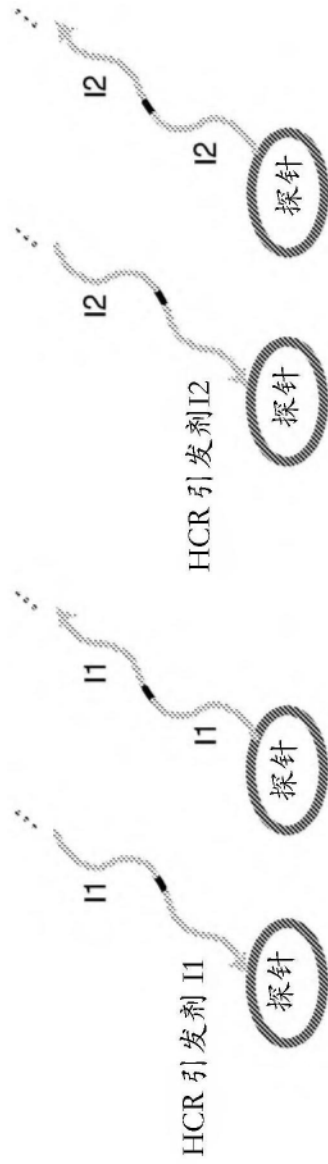


图42D

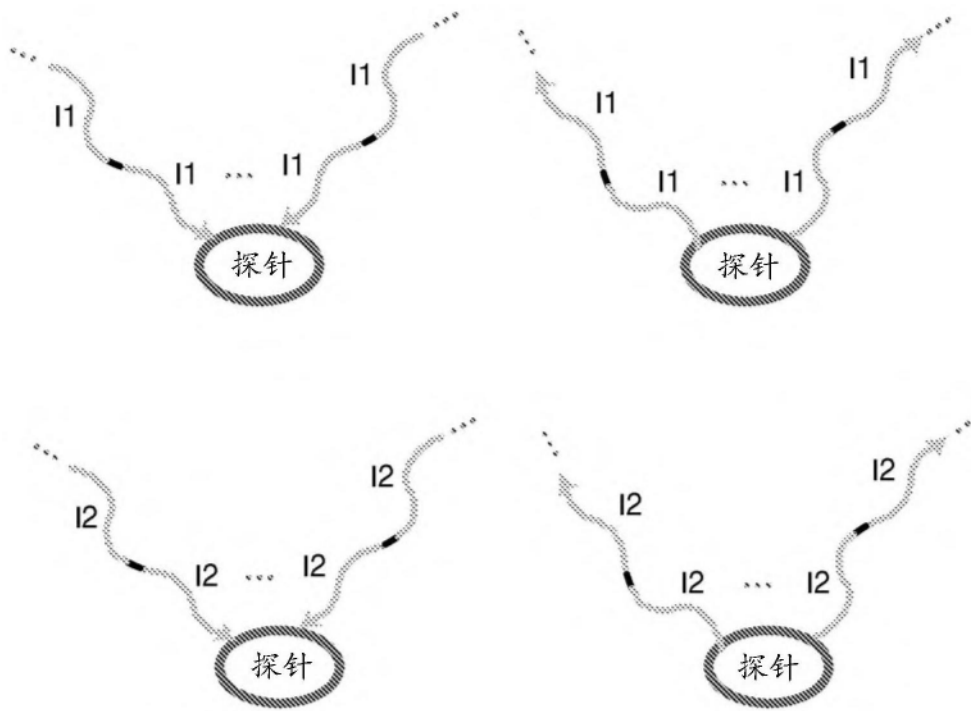


图42E

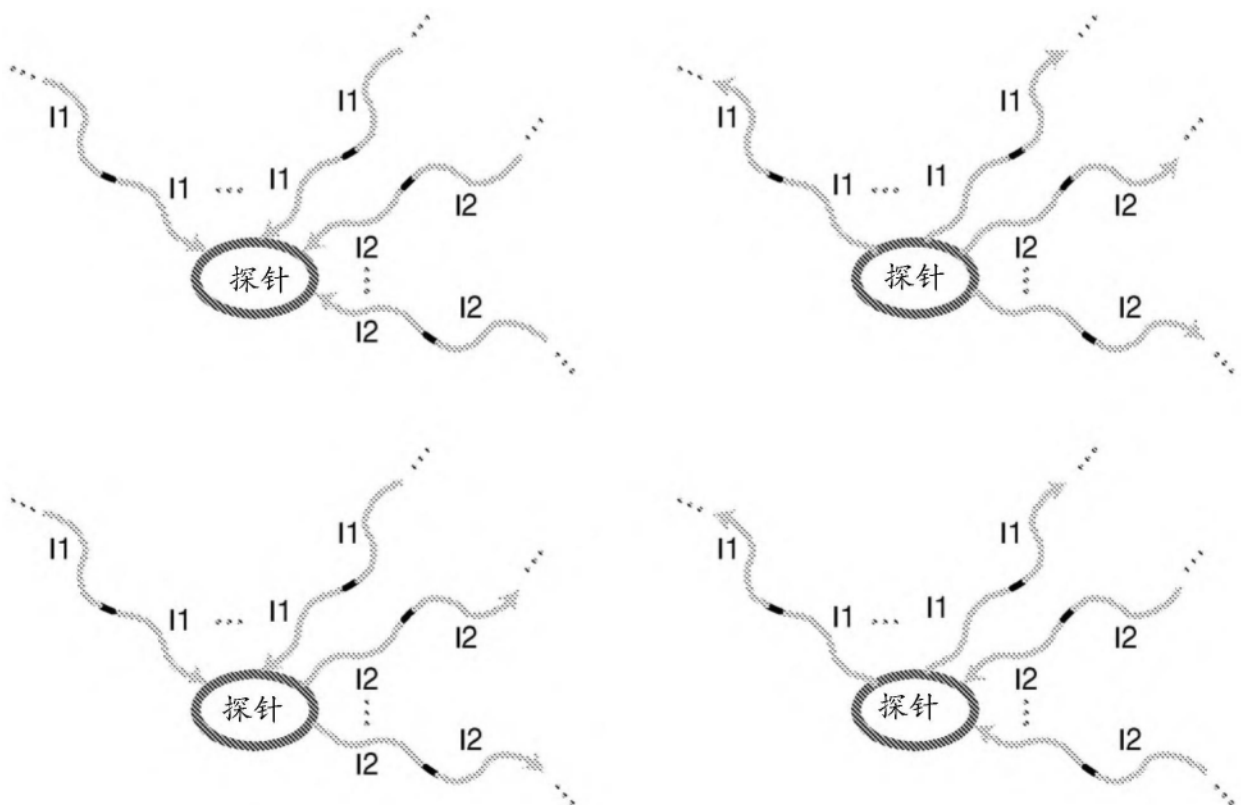


图42F

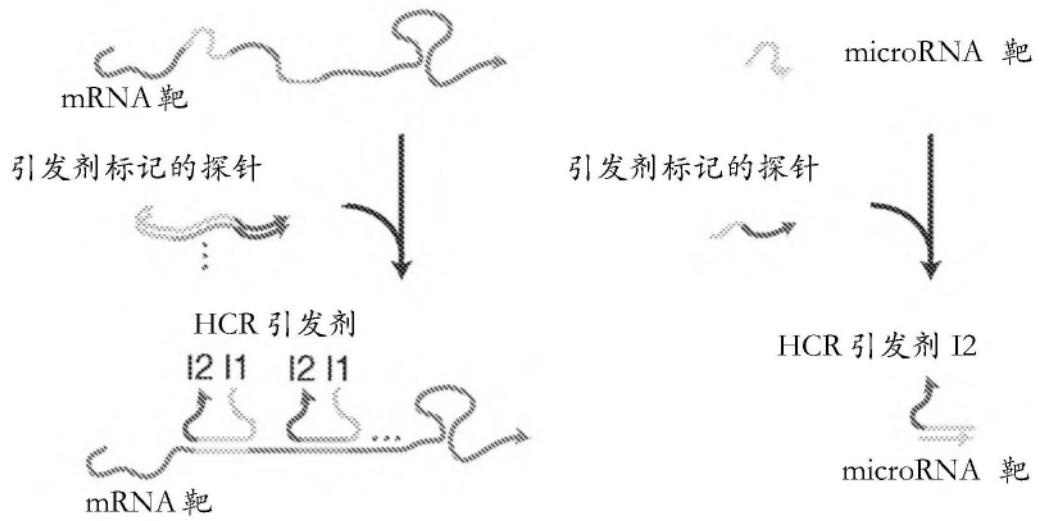


图43A

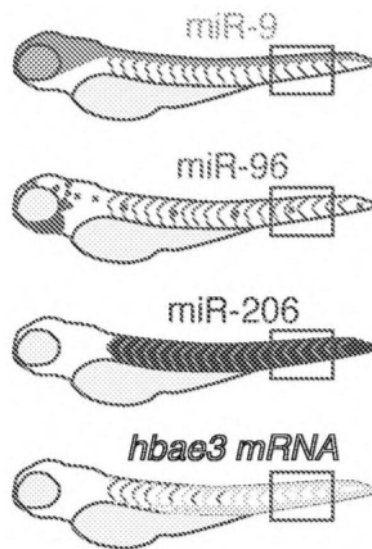


图43B

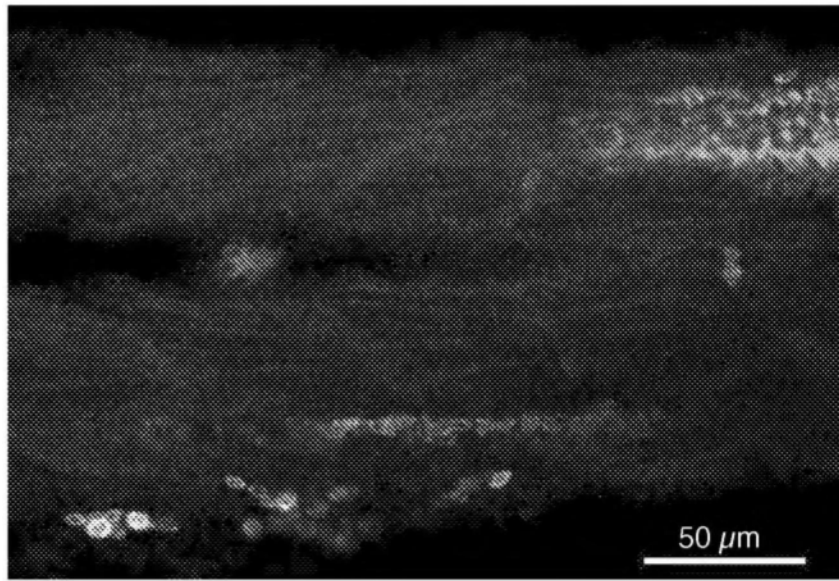


图43C



图44A



图44B

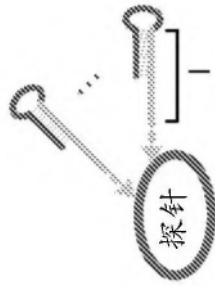


图44C

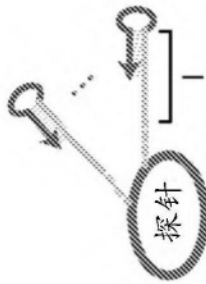


图44D

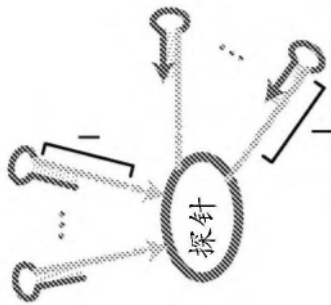


图44E



图44F

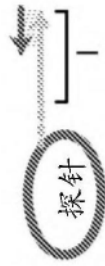


图44G

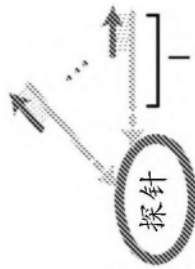


图44H

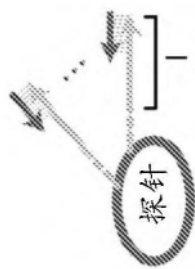


图44I

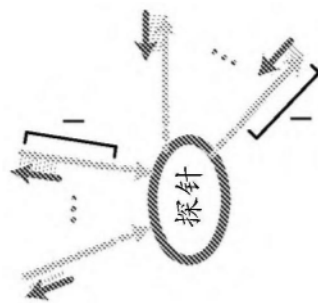


图44J

核酸探针
单个引发剂

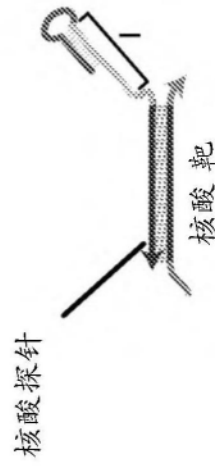


图44K

核酸探针
多个引发剂

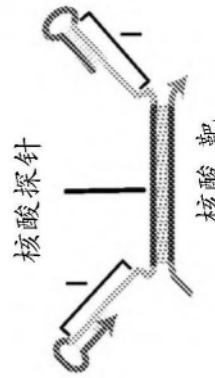


图44L

核酸探针
单个引发剂

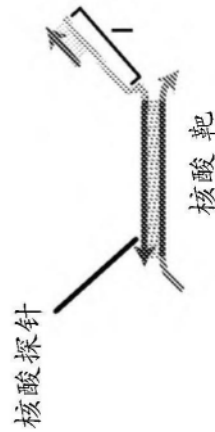


图44M

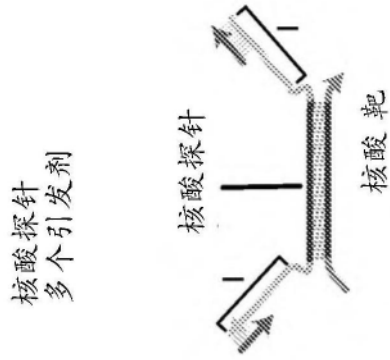


图44N

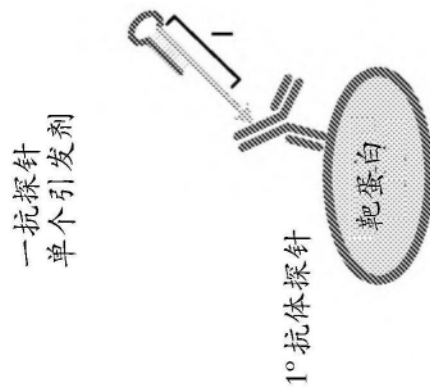


图44O

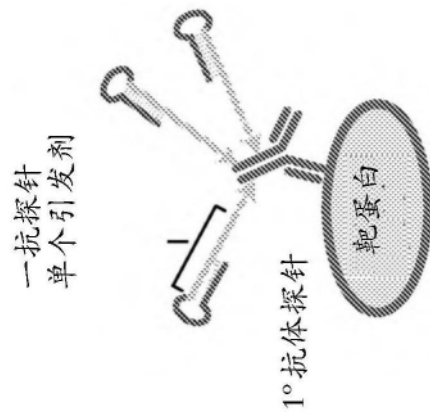


图44P

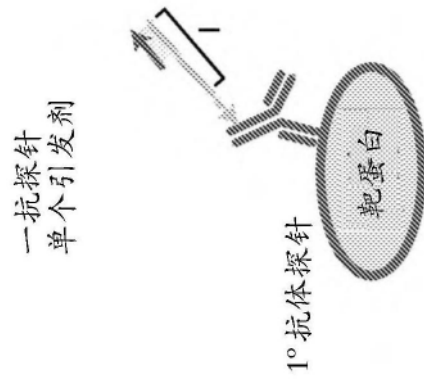


图44Q

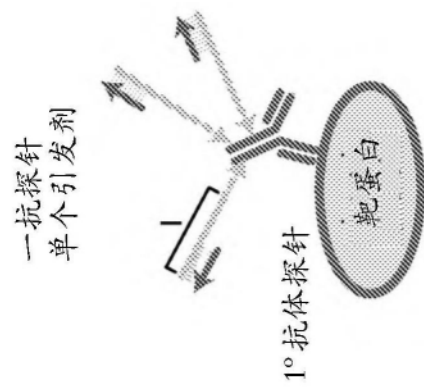


图44R

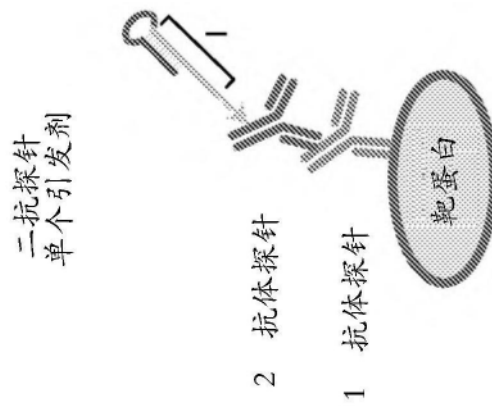


图44S

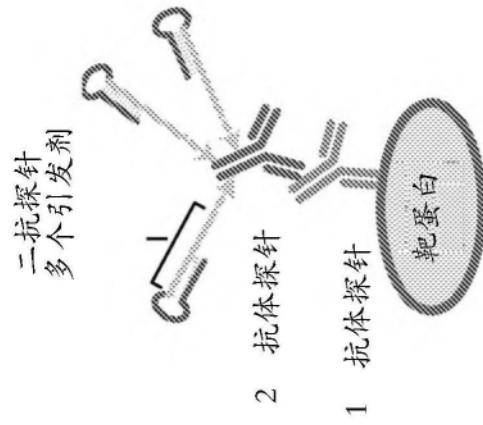


图44T

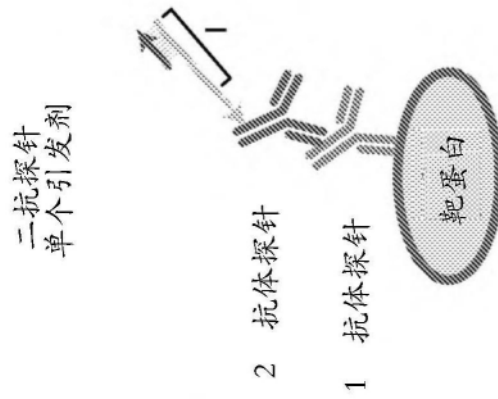


图44U

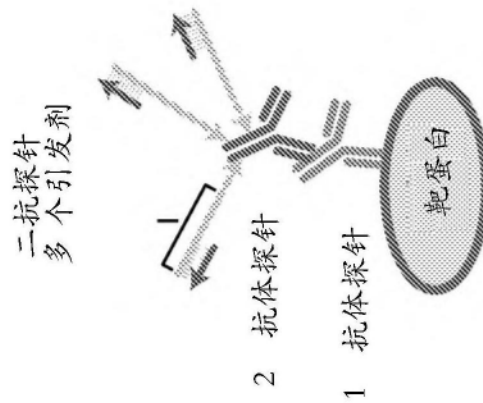


图44V

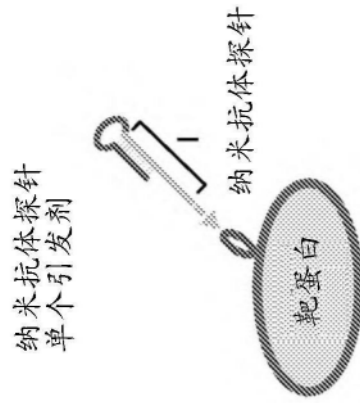


图44W

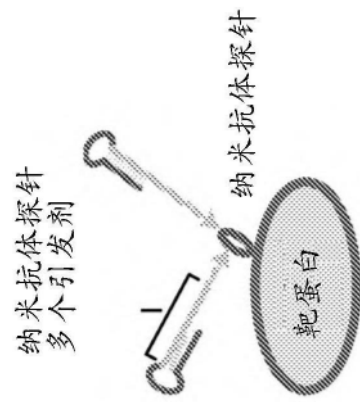


图44X

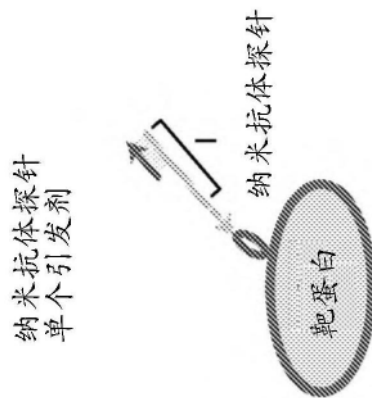


图44Y

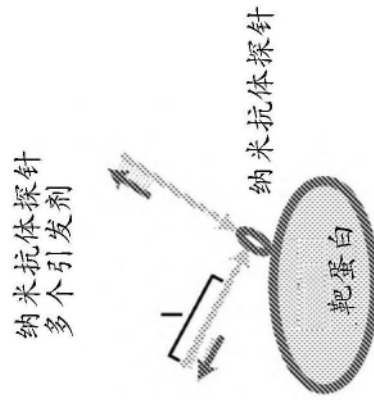


图44Z

引发剂标记的
二抗探针

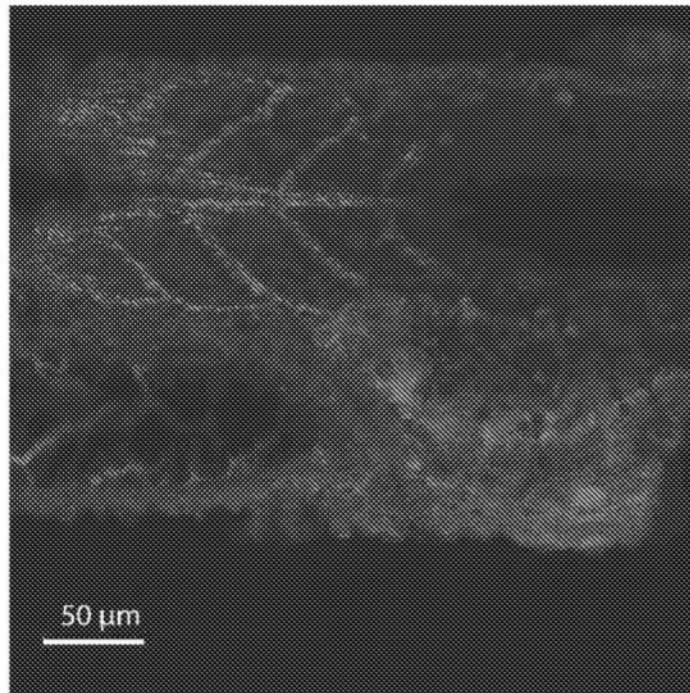


图45A

屏蔽的引发剂标记的
二抗探针

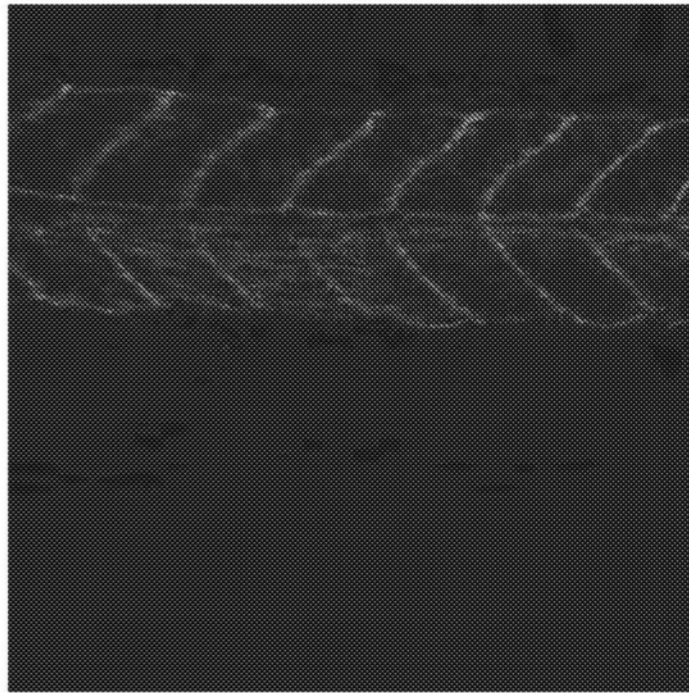


图45B

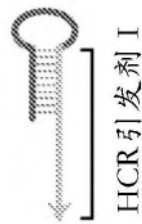


图46A

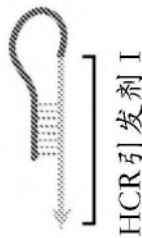


图46B

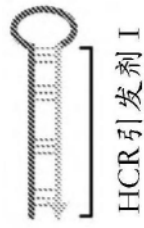


图46C



图46D



图46E

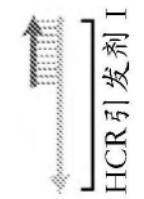


图46F



图46G

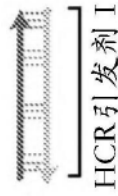


图46H



图46I



图46J



图46K



图46L

<p>包含用于辅助链成核的toehold的发夹H1</p>	<p>5'- CGGGTTAAAGTTGAGTGGAGATATAGAGGCAGGGACA AAGTCTAATCCGTCCTGCCTCTATATCTCCACTCTATC AT-3' (SEQ ID NO: 1)</p>
<p>发夹H2</p>	<p>5'- GTCCCTGCCTCTATATCTCCACTCAACTTTAACCCGGA GTGGAGATATAGAGGCAGGGACGGATTAGACTTT-3' (SEQ ID NO: 2)</p>
<p>引发剂 II</p>	<p>5'-GTCCCTGCCTCTATATCTCCACTCAACTTTAACCCG- 3' (SEQ ID NO: 3)</p>
<p>辅助链</p>	<p>5'- ATGATAGAGTGGAGATATAGAGGCAGGGACGGATTAG ACTTT-3' (SEQ ID NO: 4)</p>

图47



图46M