Настоящая заявка представляет собой частичное продолжение заявки на патент США серийного № 09/218166, поданной 22 декабря 1998 г., которая включена здесь в полном объеме для соединения в виде библиографической ссылки. Данная заявка сохраняет приоритет предварительной заявки 60/068291, поданной 19 декабря 1997 г., заявки на патент США № 09/109076, поданной 2 июля 1998 г., каждая из которых в полном объеме включена в данный текст в виде библиографической ссылки.

Предпосылки изобретения

Настоящее изобретение касается способов выявления мишеней в образце и наборов для их осуществления, применимых для одновременного проведения множественных биологических или химических тестов с использованием повторяющихся наборов зондов. Каждый из множества участков содержит набор родственных "якорных" молекул. Эти якоря находятся в связи с бифункциональными линкерными молекулами, каждая из которых включает участок, специфичный в отношении по крайней мере одного из якорей, и участок, являющийся зондом, специфичным для интересующей мишени. Полученный в результате набор зондов используют для анализа присутствия одной или большего числа молекул-мишеней, которые специфическим образом взаимодействуют с данными зондами. Настоящее изобретение касается ряда областей знаний, что определяется природой молекулярных взаимодействий, включая, но тем самым не ограничиваясь, разработку новых лекарственных средств, молекулярную биологию, биохимию, фармакологию и методологию медицинской диагностики.

Множественные молекулярные зонды, расположенные на поверхностях или "чипах", используются в различных биологических и химических тестах. Тесты осуществляют с целью определения того, взаимодействуют ли интересующие молекулы с этими зондами. После контакта зондов с молекулами-мишенями в выбранных условиях проводимого теста с помощью детекционных устройств определяют, произошло ли взаимодействие между мишенью и данным зондом.

Такие системы применимы в различных поисковых процедурах с целью получения информации как о самих зондах, так и о молекулах-мишенях. Например, они используются для скрининга пептидов или потенциальных лекарственных средств, которые, помимо прочего, связываются на интересующем рецепторе; для скрининга образцов на присутствие в них, например, генетических мутаций, аллельных вариантов в популяции или для скрининга конкретного патогена или патогенного штамма, помимо многих других путей применения; для изучения экспрессии генов, например, для идентификации видов мРНК, экспрессия которых коррелирует с конкретным физиологическим параметром, стадией онтогенеза или заболеванием, и т.п.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение представляет способы выявления мишеней в образце и наборы для их осуществления, позволяющие одновременное проведение множественных биологических или химических тестов, обеспечивающих высокопроизводительный анализ множественных образцов, например, образцов от группы пациентов, которые необходимо подвергнуть скринингу в диагностическом тесте, или группы потенциальных лекарств или терапевтических средств, предназначенных для тестирования в способе разработки лекарств. Представляется устройство, применимое для детекции одной или большего числа мишеней в одном образце. Это устройство включает поверхность, несущую множество пространственно разобщенных участков, которые могут быть определены как "тест-участки" и которые могут быть планшетными лунками, при том, что по крайней мере два из них существенно идентичны. На каждой такой поверхности находится по крайней мере два, предпочтительно по крайней мере двадцать или более, например, по крайней мере примерно 25, 50, 96, 864 или 1536 и т.п. таких существенно идентичных участков. Каждый "тест-участок" представляет собой пространство для внесения образца, содержащего (или предположительно содержащего) одну или несколько мишеней, при том, что в этом пространстве находится биологический или химический набор. (Такие выражения, как "образец, содержащий мишень" или "детекция мишени в образце" не призваны исключить образцы или определения, т.е. попытки детекции, в которых выявляется отсутствие мишени. В общем смысле, настоящее изобретение включает наборы, предназначенные для поиска мишени в образце вне зависимости от того, имеется она в нем или нет). Данный набор состоит из родственных "якорей", каждый из которых связан с бифункциональной линкерной молекулой, первая часть которой специфична в отношении данного якоря, а вторая ее часть включает зонд, специфичный в отношении по крайней мере одной из мишеней. Устройству по настоящему изобретению обеспечивают контакт с образцом, содержащим одну или большее число мишеней, которое необязательно реагирует с детекторной(ыми) молекулой(ами), после чего оно тестируется детекторным устройством, которое определяет реакции, произошедшие между молекулами и зондами в данных тест-участках, тем самым определяя результаты данного теста.

Настоящее изобретение представляет способы выявления мишеней в образце и наборы для их осуществления, в частности, применимые для высокопроизводительных биологических тестов. В наиболее предпочтительных вариантах настоящее изобретение может быть использовано для высокопроизводительного скрининга, необходимого в разработке новых лекарств. Например, высокопроизводительный тест может быть осуществлен в большом числе (например, в сотне) 96-луночных микропланшетов одновременно. Каждая лунка планшета может, например, соответствовать 36 различным тестам за счет использования набора из примерно 36 пар якорей и линкеров. Это значит, что 100 планшетов о 96 лунках

каждый при 36 тестах в каждой лунке могут позволить провести 345 тысяч тестов: например, 9600 предполагаемых лекарственных средств могут быть одновременно протестированы по 36 различным параметрам или тестам. Высокопроизводительные тесты представляют намного больше информации для каждого предполагаемого лекарства по сравнению с тестами, в которых в данный момент времени тестируется единственный параметр. Например, возможным является в одном одновременно проводимом высокопроизводительном тесте определить, является ли предполагаемое лекарство избирательным, специфичным и/или нетоксичным. В случае применения невысокопроизводительных способов необходимым окажется экстенсивное тестирование таких параметров в отношении каждого из представляющих интерес лекарств. Некоторые варианты высокопроизводительных скрининг-тестов описаны, например, в примерах 15-17. Возможность одновременного осуществления широкого круга биологических тестов и возможность выполнять одновременно множество тестов (т.е. очень высокая производительность, или "пропускная способность") являются двумя важнейшими преимуществами настоящего изобретения.

В одном из вариантов, например, при использовании 96-луночных планшетов DNA Bind (Corning Costar), изготовленных из полистирола с поверхностью, дериватизованной для прикрепления первичных аминов, таких как аминокислоты или модифицированные олигонуклеотиды, набор из 36 различных олигонуклеотидов, выполняющих роль якорей, может быть нанесен на поверхность каждой лунки каждого планшета. Эти якоря могут быть ковалентно присоединены к дериватизованному полистиролу и те же 36 якорей могут быть использованы при проведении скрининг-тестов. Для любого конкретного теста данный набор линкеров может быть использован для "программирования" поверхности каждого планшета таким образом, чтобы он был специфичен в отношении 36 различных мишеней или типов тестов, а различные тестируемые образцы могут быть применены в отношении каждой из 96 лунок каждого планшета. Такой же набор якорей может быть использован многократно для перепрограммирования поверхности лунок для других мишеней или тестов или же он может быть неоднократно вновь использован с тем же самым набором линкеров. Такая пластичность и неоднократная применимость представляют следующие преимущества настоящего изобретения.

Одним из вариантов настоящего изобретения является устройство, применимое для детекции одного или большего числа мишеней в образце, которое до момента добавления упомянутого образца включает

(а) поверхность, несущую множественные пространственно разобщенные участки, при том, что по крайней мере два из них существенно идентичны, а каждый участок включает

(б) по крайней мере восемь различных олигонуклеотидных якорей, каждый из которых связан с

(в) бифункциональным линкером, включающим первую часть специфичную в отношении олигонуклеотидного якоря, и вторую часть в виде зонда, специфичного в отношении упомянутой(ых) мишени(ней).

Другим вариантом настоящего изобретения является устройство, применимое для детекции одной или большего числа мишеней в образце, которое перед добавлением упомянутого образца включает

(а) поверхность, несущую множественные пространственно разобщенные участки, при том, что по крайней мере два из них существенно идентичны, а каждый участок включает

(б) по крайней мере восемь различный якорей, каждый из которых связан с

(в) бифункциональным линкером, включающим первую часть, специфичную в отношении олигонуклеотидного якоря, и вторую часть в виде зонда, специфичного в отношении упомянутой(ых) мишени(ней).

Еще один вариант настоящего изобретения представляет способ детекции по крайней мере одной мишени, который включает контактирование образца, который может содержать мишень (мишени), с упомянутым выше устройством в условиях, обеспечивающих эффективное связывание упомянутой(ых) мишени(ней) с упомянутым устройством. Другой вариант представляет способ определения параметров экспрессии РНК, который включает инкубацию образца, содержащего являющиеся мишенями по крайней мере две молекулы РНК, с устройством, описанным выше, при том, что по крайней мере один зонд в составе данного устройства является нуклеиновой кислотой (например, олигонуклеотидом), которая специфична (т.е. селективна) в отношении по крайней мере одной из РНК-мишеней, в условиях, которые обеспечивают эффективную гибридизацию РНК-мишени (РНК-мишеней) с зондом (зондами). В другом варианте представляется способ идентификации агента (или условий), который модулирует параметры экспрессии РНК, дополнительно включающий сравнение параметров экспрессии РНК, проявленных в присутствии упомянутого агента (или условий), с параметрами экспрессии РНК, проявленными при другом комплексе условий.

В качестве примера фиг. 1 и 2 иллюстрируют устройство по настоящему изобретению и способ его применения для детекции мРНК-мишени. На поверхности в соответствии с настоящим изобретением, показанной на фиг. 2, сформированы 15 идентичных тест-участков: в наиболее предпочтительном варианте настоящего изобретения каждый из этих тест-участков является лункой микротитровального планшета. В каждом из тест-участков имеется шесть различных якорей, которые в данном случае пронумерованы от 1 до 6. На фиг. 1 схематически показан один из таких якорей - якорь 1, который в соответствии с одним из конкретных предпочтительных вариантов изобретения является олигонуклеотидом. К якорю 1

присоединена линкерная молекула - линкер 1, - которая включает две части. Первая ее часть, специфичная в отношении данного якоря, на данной фигуре является олигонуклеотидом, который может гибридизоваться с якорем. Вторая ее часть, которая является зондом, специфичным в отношении интересующей мишени (здесь это мРНК-мишень 1), на данной фигуре является олигонуклеотидом, который способен гибридизоваться с данной мишенью. Хотя это на данной фигуре и не показано, каждый из остальных пяти якорей может гибридизоваться со своим линкером через специфичную в отношении якоря часть; каждый линкер может включать в качестве своей части зонд, специфичный в отношении, например, мРНК, отличной от мРНК 1 (или совпадающей с ней). Описанное иллюстрирует устройство, которое может быть использовано для тестирования по меньшей мере 15 различных образцов одновременно на присутствие мРНК 1 (или одновременно на мРНК-мишени, которые специфичны, будучи запрограммированными, для пяти других зондов данного набора). Для проведения такого теста каждый образец, который в данном примере может представлять собой экстракт РНК, скажем, из 15 независимых клеточных линий, добавляют в небольшом количестве к одному из тест-участков (или лунке) и инкубируют в условиях, эффективных с точки зрения гибридизации зонда и мишени. С целью определения присутствия мРНК 1 в образце, используют детекционное устройство, которое способно распознавать соответствующие параметры и/или может определять конкретные положения в каждом из участков в связи с присутствием сигнала. Если клеточные линии инкубируют в условиях, в которых их мРНК помечены in vivo, и если мРНК 1 присутствует в образце, то детектор должен обнаружить сигнал, создаваемый помеченной мРНК в том месте, которое определяется комплексом "якорь/зонд" 1. С другой стороны мРНК может быть напрямую помечена in vitro - до или после ее добавления к участкам (лункам). С другой стороны, как показано на фиг. 1, мРНК может быть помечена косвенно - до или после того, как она гибридизуется с зондом, например, путем инкубации этой РНК с помеченным "детекторным" олигонуклеотидом (специфичный в отношении мишени репортерный олигонуклеотид), который комплементарен последовательности, отличной от той последовательности, которая распознается данным зондом. В иллюстрируемом примере 15 образцов может быть проанализировано одновременно. Поскольку по крайней мере 20 или больше, например, по меньшей мере 1536 или больше образцов может быть протестировано одновременно в соответствии с настоящим изобретением, то данная система является высокопроизводительной. Используемый в данном тексте термин "мишень" обозначает вещество, присутствие, активность и/или количество которого желательно установить и которое характеризуется аффинностью в отношении данного зонда. Мишенями могут быть "искусственные" или естественно встречающиеся вещества. Также они могут быть прикреплены (ковалентно или нековалентно) к связывающему компоненту - как напрямую, так и опосредованно через специфически связывающее вещество. Примерами мишеней, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, являются, тем самым не исчерпываясь, рецепторы (находящиеся на везикулах, липидах, клеточных мембранах или являющиеся различными иными рецепторами); лиганды, являющиеся агонистами или антагонистами, связывающимися с конкретными рецепторами; поликлональные антитела, моноклональные антитела и антисыворотки, реактивные в отношении специфичных антигенных детерминант (таких как вирусы, клетки или другие материалы); лекарственные средства; нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды (включая мРНК, тРНК, рРНК, олигонуклеотиды, ДНК, вирусные РНК или ДНК, последовательности EST, кДНК, ПЦР-амплифицированные продукты, производные от РНК или ДНК, а также их мутации, варианты или модификации); белки (включая ферменты, такие как ферменты, вовлеченные в процессинг предшественников нейротрансмиттеров, протеазы, киназы и подобное); субстраты для ферментов; пептиды; кофакторы; пектины; углеводы; полисахариды; клетки (которые могут включать поверхностно-клеточные антигены); клеточные мембраны; клеточные органеллы; и т.д., равно как и другие молекулы или другие вещества, которые могут существовать в комплексной, ковалентно связанной сшивками, форме и в других формах. В данном тексте термины "нуклеиновая кислота", "полинуклеотид", "полинуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" взаимозаменяемы. Мишени также могут обозначаться как "антизонды".

Используемый в данном тексте термин "зонд" обозначает вещество, например, молекулу, которая может специфическим образом распознавать конкретную мишень. Примерами возможных партнеров по связыванию "зонд/мишень" или "мишень/зонд" являются пары "рецептор/лиганд"; "лиганд/антилиганд"; взаимодействия нуклеиновых кислот (полинуклеотидов), включая ДНК/ДНК, ДНК/РНК, "РНП (нуклеопротеин)/нуклеиновая кислота"; ферменты или другие катализаторы, или иные вещества и их субстраты, небольшие молекулы или эффекторные молекулы; и т.д. Примерами зондов, которые представляются настоящим изобретением, являются, тем самым не ограничиваясь, органические и неорганические материалы или полимеры, включая металлы, хелатирующие агенты или другие соединения, которые взаимодействуют с металлами специфическим образом, пластмассы, агонисты и антагонисты рецепторов клеточных мембран, токсины и яды, вирусные эпитопы, гормоны (например, опиоидные пептиды, стероиды и т.п.), рецепторы гормонов, липиды (включая фосфолипиды), пептиды, ферменты (такие как протеазы или киназы), субстраты ферментов, кофакторы, лекарственные средства, лектины, углеводы, нуклеиновые кислоты (включая олигонуклеотиды, ДНК, РНК, РНП или модифицированные или замещенные нуклеиновые кислоты), олигосахариды, белки, ферменты, поликлональные и моноклональные антитела, одноцепочечные иммуноглобулины или их фрагменты. Полимерные зонды могут быть как линейными, так

и циклическими. Зонды могут различать фосфорилированные и нефосфорилированные белки за счет как их различной активности, так и по их дифференцированному связыванию. Такие зонды, как лектины, могут распознавать гликозилированные белки.

Используемые в данном тексте термины "нуклеиновая кислота", "полинуклеотид", "полинуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" взаимозаменяемы. Любое из веществ, описанных выше в качестве "зонда", может являться и "мишенью", и наоборот.

В соответствии с настоящим изобретением может быть использована любая совместимая поверхность. Такой поверхностью (обычно твердой) может являться любой из органических или неорганических материалов или их комбинаций, включая, что приводится исключительно в качестве примера, пластики, такие как полипропилен или полистирол; керамику; силикон; кремнезем, кварц или стекло, которые могут иметь толщину как предметного, так и покровного стекла; бумагу, например, фильтровальную бумагу; диазотизированную целлюлозу; нитроцеллюлозные фильтры; нейлоновую мембрану; или подушку полиакриламидного геля или геля иного типа, например, "аэроподушку" или "аэрошарик", изготовленные из аэрогеля, который, например, представляет собой высокопористое твердое вещество, включая пленку, которую приготавливают путем высушивания сырого геля с помощью любого из различных стандартных традиционных способов. Прозрачные для видимого света вещества используют тогда, когда в детекционном способе применяется оптическая детекция. В предпочтительном варианте такой поверхностью является поверхность многолуночного планшета, например, планшета для тканевых культур, например, 24-, 96-, 256-, 384-, 864- или 1536-луночного планшета (например, модифицированного планшета, такого как Corning Costar DNA-Bind). Якоря могут быть связаны, например, соединены, напрямую с поверхностью или могут быть связаны с одним типом поверхности, например, стеклом, которая, в свою очередь, находится в контакте с другой поверхностью, например, с пластиковой "лункой" в микротитровальной кювете. Форма данной поверхности несущественна. Она может быть, например, плоской поверхностью, такой как квадрат, прямоугольник или круг; искривленной поверхностью; или трехмерной поверхностью, такой как шарик, частица, цепочка, преципитат, пробирка, сфера и т.п.

На данной поверхности находятся участки, которые пространственно разобщены и при этом "адресны" или идентифицируемы. В каждом таком участке имеется набор якорей. То, как эти участки разграничены, их физические параметры и их ориентация относительно друг друга не являются существенными параметрами. В одном из вариантов эти участки могут быть отделены друг от друга физическими преградами, которые непреодолимы для жидкостей. Например, в предпочтительном варианте эти участки могут быть лунками многолуночной кюветы (например, предназначенной для тканевых культур), например, 24-, 96-, 256-, 384-, 864- или 1536-луночного планшета. С другой стороны, такая поверхность, как поверхность стекла, может быть вытравлена таким образом, чтобы на ней образовались, например, 864 или 1536 небольших дискретных лунок. С другой стороны, поверхность может включать участки без разделителей или лунок, например, она может быть плоской поверхностью, например, куском пластика, стекла или бумаги, на которой отдельные участки могут определяться перекрыванием структуры (например, куска пластика или стекла), которая определяет отдельные участки на ней. Необязательно на поверхности уже могут находится один или большее число наборов якорей или якорей, связанных с линкерами, перед тем, как будут размечены отдельные ее участки. В другом варианте наборы якорей на каждом из участков могут быть отделены один от другого пустым пространством на данной поверхности, на котором якоря отсутствуют, или химическими разделителями, такими как воск или силикон, что предотвратит растекание капель. Еще в одном варианте эти участки могут быть определены в виде трубок или канальцев, например, предназначенных для тестов по контролю протекающих жидкостей, описанных, например, у Beattie et al., 1995, Clin. Chem., 4, 700-706. Пробирки могут быть любого размера, например, капиллярами или более широкогорлыми пробирками; могут обеспечивать проток жидкостей; или могут быть частично или полностью заполнены гелем, например, агарозным или полиакриламидным, через который соединения могут быть перенесены (пропущены через, элюированы через, прокачаны через), например, с помощью электрофореза. В предпочтительном варианте пробирка заполнена гелем; гель активируют по связыванию с якорями, и различные якоря пропускаются через гель последовательно, что обеспечивает образование линейной матрицы якорей внутри геля; а также линкеры, мишени и т.п. пропускают через гель непрерывно. Участки на поверхности также могут быть размечены путем модифицирования самой поверхности. Например, пластмассовая поверхность может нести участки, изготовленные из модифицированного или дериватизованного пластика, которые могут служить, например, в качестве сайтов для добавления конкретных типов полимеров (например, полиэтиленгликоль может быть нанесен на полистироловую поверхность и затем дериватизован карбоксильными или аминогруппами, двойными связями, альдегидами и подобным). Как альтернатива, пластиковая поверхность может нести формованные участки по типу выступов или выпуклостей, которые могут служить "платформами" для размещения якорей. В другом варианте участки могут представлять собой подушки геля, например, подушки полиакриламидного геля или "аэроподушки", которые выстроены в желательном порядке на поверхности, такой как, например, стекло, или могут быть выстроены в виде "сэндвича" между двумя поверхностями, такими как, например, стеклянная и кварцевая пластинка. Якоря, линкеры и т.п. могут быть иммобилизованы на поверхности таких подушек или могут быть погружены внутрь них.

Различные другие расположения гелевых подушек на поверхности будут ясны специалистам в данной области техники и могут быть сформированы с помощью стандартных традиционных способов. Относительная ориентация тест-участков может принимать любую форму, включая, но тем самым не ограничиваясь, параллельные или перпендикулярные ряды на квадратной или прямоугольной поверхности, радиально расположенные ряды на круглой или иной формы поверхности, или линейные ряды, и т.п.

Пространственно разобщенные участки в соответствии с настоящим изобретением присутствуют во множественных копиях. Т.е. имеется по крайней мере два, предпочтительно по крайней мере двадцать или по крайней мере 24, 50, 96, 256, 384, 864, 1536, 2025 или больше и т.д. существенно идентичных пространственно разобщенных (дискретных) участков. Увеличение числа повторяющихся участков может позволить проводить более высокопроизводительные тесты. Используемое в данном тексте выражение "существенно идентичные участки" определяет участки, которые включают идентичные или существенно идентичные наборы якорей и/или комплексов "якорь/линкер". Термин "существенно идентичные", используемый в данном тексте, обозначает, что набор или участок призван выполнять принципиально такие же функции, что и другой набор или участок, в контексте проведения анализа мишени в соответствии с настоящим изобретением. Различия, которые в существенной степени не обусловливают изменения функций, т.е. выявляемости мишеней, представлены небольшими нуклеотидными дефектами (замены, вставки, делеции) или дефекты олигонуклеотидов (ухудшенное связывание на поверхности) и т.п., которые в объеме точности проводимого теста не приводят к существенному искажению результатов выявления мишени.

Конечно, специалисту в данной области техники будет ясно, что не все участки поверхности должны быть существенно идентичными друг другу. Например, если два разных набора рядов предназначены для параллельного тестирования, то предпочтительным будет размещение обоих наборов на одной и той же поверхности. Например, два разных набора рядов могут быть сформированы в виде перемежающихся полос, что облегчит проведение сравнений между ними. В другом варианте у практика может возникнуть желание включить один или несколько участков, которые бы могли быть обособлены с помощью отличающегося способа от других участков на данной поверхности, тем самым используясь в качестве "регистрационных участков". Например, регистрационный участок может нести олигонуклеотиды или пептиды, которые характеризуются отличающимися свойствами флуоресцирующих молекул, которые могут быть выявлены путем сканирования в качестве "стартовых участков" для сопоставления параметров локализации остальных участков на этой поверхности.

Размер и физическое распределение тест-участков ничем не ограничено. Типичные участки представляют собой область площадью примерно 1-700 мм^2, предпочтительно примерно 1-40 мм^2, которые расположены примерно в 0,5-5 мм друг от друга, а эти величины выбираются стандартным образом в зависимости от используемой площади. В предпочтительном варианте участки удалены друг от друга на 5 мм. Например, каждый участок может нести прямоугольный грид ("сеточку"), например, с 8 рядами и 6 столбцами с приблизительно округлой формы пятнами якорей диаметром примерно 100 мкм, удаленными друг от друга на 500 мкм: такой участок в целом будет покрывать площадь примерно в 20 мм^2. Включаются и большие, и меньшие значения площади и участка и дистанций между ними.

Такие участки также могут быть дополнительно подразделены таким образом, чтобы некоторые или все якоря в пределах одного участка были физически разобщены с соседними якорями за счет, например, углубления или ямки. Например, число подразделений ("суб-участков") в участке может варьироваться от примерно 10 до примерно 100 или больше, или меньше этого. В одном из вариантов участок, являющийся лункой 1536-луночного планшета, может быть дополнительно подразделен на меньшие лунки, например, примерно на 4-900, а предпочтительно на примерно 16-36 лунок, тем самым образуя структуру "лунки-в-лунке": см. фиг. 4. Такая выемчатая поверхность снижает допуски, необходимые для физического размещения отдельного якоря (или группы якорей) в каждый определенный сайт ("локус"), и к тому же размер зон, несущих якоря, становится более однообразным, что облегчает детекцию мишеней, связывающихся с данным зондом.

Термин "якорь", используемый в данном тексте, обозначает любую составляющую или вещество, например, молекулу (или "группу" существенно идентичных подобных веществ - см., например, фиг. 7), которые связаны с поверхностью (например, иммобилизованы на нее или присоединены к ней ковалентным или нековалентным образом) или которые являются частью такой поверхности (например, производной частью пластмассовой поверхности) и которые могут участвовать в специфическом взаимодействии или ассоциировании с линкером или иным веществом в соответствии с описанным в данном тексте. Используемый в данном тексте термин "комплекс якорь/линкер" обозначает тот случай, когда якорь и линкер объединены молекулярными связями по специфическому типу. Такое взаимодействие с линкером может быть как необратимым, например, в результате образования нескольких ковалентных связей, так и обратимым, например, в процессе гибридизации нуклеиновых кислот. В предпочтительном варианте якорем является нуклеиновая кислота, длина которой (например, он является олигонуклеотидом) и тип которой (например, ДНК, РНК, РНП или ПЦР-продукт молекулы РНК или ДНК) могут быть любыми. Нуклеиновая кислота может быть модифицирована или замещена (например, путем включения ненативных нуклеотидов, таких как, например, инозин; скомпонована с использованием различных известных

видов связей, таких как сульфаматная, сульфамидная, фосфотионатная, метилфосфонатная, карбаматная и т.п.; или может быть полусинтетической молекулой, такой как ДНК-стрептавидиновый комплекс и т.п.). Предпочтительными являются одноцепочечные нуклеиновые кислоты. Также якорь может быть белком или пептидом.

Например, он может являться поликлональным или моноклональным антителом или его фрагментом, или одноцепочечным иммуноглобулином или его фрагментом, который специфическим образом связывается с той частью линкера, которая является антигеном или анти-антителом; надо отметить, что якорь может быть пептидом, а та часть линкера, которая с ним связывается, может являться антителом или подобным. В другом варианте якорь может быть лектином (таким как конканавалин-А или агглютинины таких организмов, как слизень Limulus, арахис, фасоль-маш, фасоль рода Phaseolus, зародыши пшеницы и т.п.), которые специфичны в отношении конкретного углевода. В другом варианте якорь может быть органической молекулой, такой как модифицированная или производная полимерная пластмасса, которая может служить, например, в качестве этапа в конкретном твердофазном химическом синтезе олигонуклеотида. В этом случае производный пластик может быть распределен в виде ряда производных разобщенных сайтов, которые вместе друг с другом формируют поверхность пластика, как части устройства, непосредственно при ее производстве. В другом варианте якорь может обеспечивать преимущества специфичного или предпочтительного связывания между ионами металла, например, никеля, цинка, калия, магния и т.п., и конкретными белками или хелатирующими агентами. Например, якорь может являться полигистидином, а специфичной в отношении якоря частью линкера может быть никель, который через никель-хелатирующий агент прикрепляется к специфичному в отношении такой мишени зонду. С другой стороны, хелатирующий агент может быть якорем, а полигистидин - соответствующим ему участком зонда. С другой стороны, якорь может быть неорганическим соединением. Например, он может быть металлом, таким как кальций или магний, а специфичной для якоря частью линкера может быть предпочитаемый хелатирующий агент, такой как EDTA или EGTA, соответственно, который присоединяется к специфичному в отношении мишени зонду. Для специалиста в данной области техники должно быть понятно, что широкий круг других молекул также может выполнять роль якорей, таких как те основные их типы, которые также рассматриваются в связи с обсуждением типов зондов и мишеней.

Количество якорей в тест-участке может составлять по крайней мере два, предпочтительно примерно 8-900 (большие и меньшие значения также включаются), более предпочтительно примерно 8-300 и наиболее предпочтительно примерно 30-100 (например, примерно 64). В некоторых предпочтительных вариантах на поверхности с 96 тест-участками (например, лунками) имеется примерно 16, 36, 45 или 100 якорей в расчете на один тест-участок или на поверхности с 384 тест-участками (например, лунками) имеется примерно 9, 16 или 25 якорей в расчете на один тест-участок. В наиболее предпочтительном варианте каждый якорь в тест-участке характеризуется отличающейся специфичностью по сравнению с каждым из других якорей в данном наборе. Однако, два или большее число якорей могут проявлять одинаковую специфичность или же все якоря набора могут быть идентичными. В одном варианте, в котором устройство по настоящему изобретению включает очень большое число тест-участков (например, примерно 864, 1536 или больше), т.е. одновременно может быть обработано большое количество тестируемых образцов, может быть интересным протестировать эти образцы только по ограниченному числу (например, примерно 2, 4, 6 или 9) параметров. Другими словами, для устройств, включающих очень большое число участков, предпочтительным является наличие лишь примерно 2-9 якорей на одном участке.

Физическое распределение и относительная ориентация якорей в тест-участке (или на нем) ничем не ограничиваются. Обычно расстояние между якорями составляет примерно 0,003-5 мм или меньше, а предпочтительно - примерно 0,03-1 мм. Также включаются большие и меньшие расстояния между якорями (и зонами). Якоря могут быть размещены в любой ориентации по отношению друг к другу и по отношению к границам участка. Например, они могут быть размещены в двумерном распределении, таком как квадрат, прямоугольник, шестиугольник и подобная форма или в круговой форме, в которой якоря располагаются радиально от центра или концентрическими кругами. Также якоря могут быть размещены в одномерной форме - т.е. линейно. Например, олигонуклеотиды могут быть гибридизованы с конкретными положениями вдоль последовательности ДНК или РНК с образованием надмолекулярного ряда или в линейном порядке в прохождении через гель. С другой стороны, якоря могут быть размещены в формате линии кодирования ("штрих-кода") (см. фиг. 6). Например, якоря могут быть размещены в виде длинных линий, параллельных друг другу. Расстояние между линиями или ширина этих линий могут варьироваться регулярным образом с получением простой распознаваемой схемы, напоминающей штрих-код: например, первая и третья линии могут быть вдвое толще остальных, эти линии можно пропускать и т.п. Дополнительная пустая линия может быть помещена после последней линии с целью ограничения тест-участка, и затем набор штрих-кода может быть повторен на последующих тест-участках.

Расположение якорей необязательно должно находиться в жестком соответствии с положениями разграниченных тест-лунок (тест-участков) или отдельных тестируемых капель. Термин "тест-положение" будет использоваться для обозначения положения на тест-поверхности, на которое будут наноситься тестируемые образцы. (Например, это может определяться положением отдельных капель тестируемого образца или положением лунок или сепараторов, определяющих лунки конкретного теста

на многолуночном планшете). Само по себе распределение якорей (например, схема типа штрих-кода в приложении к олигонуклеотидным якорям) используется для того, чтобы определить точное расположение каждого отдельного якоря в данной схеме - т.е. как каждая линия штрих-кода распознается по ее положению относительно остальных линий. Следовательно, первый якорь должен находиться на одном краю или в одном углу каждого тест-положения. Положение первого якоря должно определяться общей схемой в большей степени, нежели расположением по отношению к тест-положению. Поскольку площадь, используемая каждым тест-положением (например, площадь капли или площадь лунки), достаточно велика для того, чтобы содержать по крайней мере одну полную единицу повторяющегося набора якорей, то каждая тест-точка будет обеспечивать тестирование образца по данному тест-положению по всем тем мишеням, которые маркируются данной схемой (данным штрих-кодом) независимо от расположения этой площади в пределах тест-положения.

Отсутствует необходимость в строго постоянном или даже фиксированном расположении якорей в пределах каждого тест-участка. Например, каждый якорь может быть присоединен к частице, шарику или подобному, в результате чего достигается случайное расположение в пределах тест-участка. Локализация каждого якоря может быть определена с использованием, например, выявляемой метки. Например, линкерная молекула, специфичная в отношении каждого типа якоря, может быть помечена с помощью различных флуоресцентных, люминесцентных и т.п. меток, а положение частицы, несущей конкретную пару "линкер/якорь", может быть идентифицировано, исходя из природы сигнала, считываемого с линкера, например, по возбуждаемому или эмитируемому спектру. Специалист в данной области техники может сформировать набор линкеров с различными присоединенными метками, каждая из которых имеет отличающийся спектр. С другой стороны, якоря могут быть помечены напрямую. Например, каждый тип якоря может быть помечен маркером, который флуоресцирует со спектром, отличным от таковых у меток, находящихся на других типах якорей. С другой стороны частицы, шарики или подобное могут быть дифференцированы друг от друга по размеру или по форме. Могут быть использованы любые из описанных в данном тексте методов мечения и детекции. Например, флуоресценция может быть замерена в системе измерений CCD, с помощью флуоресцентного микроскопа или с помощью клеточного сортера с активируемой флуоресценцией (FACS).

Якорь может взаимодействовать или связываться специфическим образом с одной частью (специфичной в отношении якоря частью) линкерной молекулы. Термины "взаимодействует" или "связывается" обозначают здесь то, что два вещества или два соединения (например, якорь и якорь-специфичная часть линкера, зонд и соответствующая ему мишень или мишень и мишень-специфичный репортер) соединяются друг с другом (например, присоединяются, связываются, гибридизуются, отжигаются, связываются ковалентными связями или ассоциируются какими-либо иными путями) настолько существенно, чтобы мог быть проведен заявленный тест. Термины "специфичный" или "специфичным образом" обозначают здесь то, что два компонента (например, якорь и якорь-специфичный участок линкера, зонд и соответствующая ему мишень или мишень и мишень-специфичный репортер) избирательно связываются друг с другом, а без применения любого из методов защиты не связываются в принципе с другими компонентами, непредназначенными для связывания с данными компонентами. Параметры, необходимые для достижения специфичных взаимодействий, могут быть определены стандартными способами, например, с помощью стандартных, известных в данной области техники методов.

Для нуклеиновых кислот, например, специалист в данной области техники сможет определить экспериментальным путем свойства (такие как длина, состав нуклеотидов и степень комплементарности), которые обеспечат нуклеиновой кислоте (например, олигонуклеотидному якорю) способность гибридизоваться с другой нуклеиновой кислотой (например, якорь-специфичной частью линкера) в условиях избирательной жесткости с минимизацией неспецифической гибридизации с другими веществами или молекулами (например, другими олигонуклеотидными линкерами). Обычно ДНК или последовательность другой нуклеиновой кислоты в составе якоря, часть линкера или детекторный олигонуклеотид должны характеризоваться существенным уровнем комплементарности по отношению к партнеру по связыванию с целью обеспечения гибридизации в условиях избирательной жесткости, а величина T_m должна превышать примерно на 10-20°C комнатную температуру (например, примерно 37°C). В целом, олигонуклеотидный якорь может иметь в длину от примерно 8 до примерно 50 нуклеотидов, а предпочтительно - состоять из примерно 15, 20, 25 или 30 нуклеотидов. Используемое в данном тексте выражение "высокий уровень жесткости условий гибридизации" обозначает любые условия, при которых гибридизация будет иметь место в случае, если уровень комплементарности (идентичности) нуклеиновых кислот составляет по крайней мере 95%, предпочтительно примерно 97-100%. Однако, в зависимости от ставящихся задач, условия гибридизации могут выбираться так, чтобы требовался меньший уровень комплементарности, например, примерно 90%, 85%, 75%, 50% и т.п. Среди параметров реакции гибридизации, которые могут варьироваться, - концентрация солей, параметры буфера, величина pH, температура, продолжительность инкубации, количество и тип денатурирующего агента, такого как формамид, и др. (см., например, Sambrook et al., 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2d ed. , Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, NY; Hames et al., 1985, "Nucleic Acid Hybridization", IL Press; Davis et al., 1986, "Basic Methods in Molecular Biology", Elsevir Sci. Publ. Inc., NY). Например, нуклеиновая кислота (например,

линкерные олигонуклеотиды) может быть добавлена на тест-участок (например, лунку многолуночного планшета - в предпочтительном варианте 96- или 384-лучного планшета или планшета с большим количеством лунок) в объеме, варьирующемся от примерно 0,1 до примерно 100 мкл или более (в предпочтительном варианте примерно 1-50 мкл, а наиболее предпочтительно 40 мкл), в диапазоне концентрации от примерно 0,01 до примерно 5 мкМ (в предпочтительном варианте примерно 0,1 мкМ) в буфере, таком как, например, буфер 6xSSPE-T (0,9 М NaCl, 60 мМ NaH_2PO_4, 6 мМ EDTA и 0,05% Тритон X-100) с осуществлением гибридизации с партнером (например, олигонуклеотидным якорем на данной поверхности) в течение от примерно 10 мин до примерно по крайней мере 3 часов (в предпочтительном варианте - по крайней мере в течение примерно 15 мин) при температуре от примерно 4°С до примерно 37°С (в предпочтительном варианте - при примерно комнатной температуре). Условия могут быть выбраны таким образом, чтобы обеспечить высокую производительность. В одном варианте настоящего изобретения условия реакции могут быть приближены к физиологическим параметрам.

Конструирование других типов веществ или молекул (например, полипептидов, лектинов и т.п.), которые могут служить, например, якорями или быть частями линкеров, а также условия реакций, необходимые для обеспечения специфичности взаимодействий с их партнерами по связыванию, являются стандартными и известными в данной области техники (см. описанное у Niemeyer et al., 1994, Nucl. Acids Res., 22, 5530-5539; Fodor et al., 1996, патент США № 5510270; Pirrung et al., 1992, патент США № 5143854). Среди параметров инкубации - тип буфера, концентрация солей, величина pH, температура, время инкубации, присутствие носителя и/или агентов или наличие условий, призванных подавлять неспецифические взаимодействия и др. Например, на тест-участок (например, лунку многолуночного планшета - в предпочтительном варианте 96- или 384-луночного планшета или планшета с большим количеством лунок), который содержит антитела, выполняющие роль якорей, могут быть добавлены антитела к антителам (например, антигены или специфичные по отношению к этим антителам вторичные антитела) в объеме в пределах от примерно 0,1 до примерно 100 мкл и более (в предпочтительном варианте примерно 1-50 мкл, а наиболее предпочтительно - 40 мкл), в диапазоне концентрации от примерно 10 пкМ до примерно 10 нМ (в предпочтительном варианте примерно 1 нМ) в буфере, таком как, например, буфер 6xSSPE-T, фосфатно-солевой буфер или физиологический раствор, с последующей инкубацией с якорями, размещенными на данной поверхности, в течение от примерно 10 мин до примерно по крайней мере 3 ч (в предпочтительном варианте - по крайней мере в течение примерно 15 мин) при температуре от примерно 4 до примерно 45°С (в предпочтительном варианте - при примерно 4°С). Для случая пептидных якорей предпочтительной является длина от примерно 5 до примерно 20 аминокислот.

В некоторых вариантах настоящего изобретения каждый якорь в наборе при выбранных условиях реакции может взаимодействовать с якорь-специфичной частью соответствующего ему линкера с по сути такой же степенью, что и с другими якорями этого набора. Это может обеспечивать то, что якоря составляют по сути однотипный набор линкеров и, следовательно, зондов.

Якоря на тест-участке могут образовывать "родственный набор" - т.е. каждый из якорей такого набора может взаимодействовать с одним или несколькими разными линкерами, в составе каждого из которых имеется часть, специфичная в отношении такого якоря, но при этом - разные "зондовые" части: следовательно, отдельный ряд родственных якорей может быть использован для программирования или определения вариабельного набора зондов. Гибкая природа такого родственного набора якорей может быть проиллюстрирована обращением к фиг. 1 и 2. На фиг. 2 показана поверхность, включающая 15 тест-участков, на каждом из которых находится набор из 6 различных якорей, которые в качестве примера могут являться олигонуклеотидами. На фиг. 1 схематически показан один из таких (олигонуклеотидных) якорей - якорь 1, который находится в контакте с линкером 1, в составе которого имеется первая часть, специфичная в отношении якоря 1, и вторая часть, специфичная в отношении мРНК-мишени 1. С другой стороны, можно провести замену, например, на линкер 2, в составе которого имеется, как и в линкере 1, часть, специфичная в отношении линкера 1, но при этом вторая его часть специфична в отношении мРНК-мишени 2 вместо специфичности по отношению к мРНК-мишени 1. Таким образом, якорь 1 может быть использован для обозначения (или для программирования, или для определения, или для детерминации) зондов либо для двух, либо для большего числа различных мРНК-мишеней. Процесс формирования и сборки высокоразрешающего ряда (схемы) олигонуклеотидов или пептидов мог бы быть затратным, длительным и/или физически трудным. Возможность использования преформированного набора якорей с целью программирования широкого круга различных наборов зондов является одним из преимуществ настоящего изобретения.

Хотя родственные якоря, показанные на фиг. 2, определяют схему олигонуклеотидных зондов, набор идентичных якорей также может быть использован для программирования набора других зондов, например, белков-рецепторов (см., например, фиг. 3). Ясно, что возможным является внесение множественных пермутаций, обеспечивающих широкий круг типов взаимодействий "якорь/линкер", например, даже более сложных слоев зондов, таких как "сэндвич-слои", известные во взаимодействиях "белок/антитело". Следовательно, поверхность якорей в соответствии с настоящим изобретением сама по себе представляет новые преимущества.

В одном из вариантов настоящего изобретения якоря могут взаимодействовать с линкерами обратимым образом: следовательно, родственный набор якорей может быть перепрограммирован в отношении различных наборов зондов. Например, олигонуклеотидный якорь может быть отделен от олигонуклеотидной части линкера, например, путем нагревания, что обусловливает диссоциацию двух олигонуклеотидов с последующей возможностью нового связывания со вторым линкером. Возможность "перенабора" ряда якорей, которое могло бы быть затратным, длительным и/или физически затруднительным, представляет еще одно преимущество настоящего изобретения.

Взаимодействие якоря с линкером не является обязательным. Например, якорь может быть соединен (напрямую или опосредованно) с детекторной молекулой, такой как флуорохром, и тем самым может служить маркером для выявления пятна на сеточке, например, для целей разграничения тест-поверхности и детектора. С другой стороны, якорь может быть помечен известным количеством детекторной молекулы так, чтобы служить в качестве внутреннего количественного эталона, например, для целей проведения калибровки.

Используемый в данном тексте термин "линкер" обозначает бифункциональное вещество, которое включает первую часть (или составляющую, или сегмент), специфичную в отношении выбранного (подобранного) якоря или набора якорей ("якорь-специфичная часть"), и вторую часть, являющуюся зондом, специфичным в отношении интересующей мишени ("мишень-специфичная часть"). Эти две части линкера могут быть соединены друг с другом с помощью ковалентных или нековалентных связей и могут быть соединены друг с другом напрямую или через промежуточное звено.

Химическая природа якорь-специфичной части линкера, понятно, зависит от типа якоря или якорей, с которыми она должна взаимодействовать. Например, если якорь является олигонуклеотидом, то часть линкера, которая с ним взаимодействует, может быть, например, пептидом, который связывается по специфическому типу с этим олигонуклеотидом, или нуклеиновой кислотой, которая может эффективно и специфически гибридизоваться с якорем при соблюдении заданных условий жесткости гибридизации. Нуклеиновая кислота может быть, например, олигонуклеотидом, ДНК, РНК, РНП, ПЦР-продуктом или замещенной или модифицированной нуклеиновой кислотой (например, путем включения ненативных нуклеотидов, таких как, например, инозин; путем сборки с использованием таких известных связей, как сульфаматная, сульфамидная, фосфотионатная, метилфосфонатная, карбаматная; или может являться полусинтетической молекулой, такой как ДНК-стрептавидиновый комплекс и т.п.). Предпочтительными являются одноцепочечные составляющие. Длина линкера, специфичного в отношении олигонуклеотидного якоря, может варьироваться от примерно 8 до примерно 50 нуклеотидов, а предпочтительно состоять примерно из 15, 20, 25 или 30 нуклеотидов. Если якорь является антителом, то часть линкера, которая с ним взаимодействует, может быть, например, анти-антителом, антигеном или меньшим фрагментом одной из таких молекул, которая может специфическим образом взаимодействовать с этим якорем. Вещества или молекулы, которые специфически взаимодействуют с другими типами якорей, описанными выше, и которые могут являться якорь-специфичными частями линкера, хорошо известны в данной области техники и могут быть сформированы с применением стандартных процедур (см., например, выше).

Химическая природа мишень-специфичной части линкера, понятно, зависит от той мишени, с которой зонд должен взаимодействовать. Например, если мишень является конкретным видом мРНК, то мишень-специфичная часть линкера может быть, например, олигонуклеотидом, который связывается специфически с мишенью, но не с какими-либо иными РНК или ДНК, при соблюдении выбранных условий гибридизации. Специалист в данной области техники с использованием соответствующих методов сможет экспериментальным путем определить свойства олигонуклеотида, который будет оптимально гибридизоваться с данной мишенью при минимальном уровне неспецифической гибридизации с посторонними ДНК или РНК (например, см. выше). В целом, длина олигонуклеотидного зонда, используемого для выявления мРНК-мишени, присутствующего "на фоне" большого избытка посторонних РНК, может варьироваться в пределах примерно 8-50 нуклеотидов, а предпочтительно состоит из 18, 20, 22 или 25 нуклеотидов. Олигонуклеотидный зонд, предназначенный для использования в биохимическом тесте, в котором отсутствует значительный "фоновый груз", может быть короче. С применением известных научных методов (например, компьютерной программы BLAST) последовательности олигонуклеотидных зондов могут быть отобраны таким образом, чтобы они были взаимно несовпадающими и отличались от предположительно посторонних последовательностей в соответствии с известными генетическими базами данных. Выбор условий гибридизации, которые будут обеспечивать специфичную гибридизацию олигонуклеотидного зонда с РНК, могут быть определены стандартными путями с использованием известных процедур (например, см. выше). Например, РНК-мишень [например, тотальный пул РНК или мРНК, экстрагированный из тканей или клеток, выращенных (и необязательно обработанных интересующим агентом) в любой емкости, такой как лунка многолуночного микротитровального планшета (например, планшета с 96 или 384, или с большим числом лунок)] может быть добавлена в тест-участок, несущий набор олигонуклеотидных зондов (см. выше) в таком буфере, как 6xSSPE-T или другие буферы, необязательно содержащем агент, обеспечивающий подавление неспецифического связывания (например, примерно 0,5 мг/мл денатурированной ДНК спермы сельди или лосося или дрожжевой РНК), с по-

следующей инкубацией при эмпирически определенной температуре в течение от примерно 10 мин до по крайней мере 18 ч (в предпочтительном варианте - в течение примерно 3 ч).

Жесткость гибридизации может быть такой же (или ниже ее), как жесткость, применяемая для связывания якорей с якорь-специфичными частями линкеров. Конструирование и применение других типов зондов также является рутинным в данной области техники, что, например, обсуждалось выше.

Якорь-специфичные и мишень-специфичные части линкера могут быть соединены друг с другом (связаны, присоединены) с помощью любых связей ковалентного или нековалентного типа, природа которых с точки зрения настоящего изобретения несущественна. Эти две части могут быть соединены напрямую или через промежуточную молекулу. В одном варианте, в котором обе части линкера являются олигонуклеотидами, они могут быть соединены друг с другом ковалентным образом, например, с помощью фосфодиэфирных связей с образованием единой колинеарной молекулы нуклеиновой кислоты. В другом варианте, в котором якорь-специфическая часть является олигонуклеотидом, а мишень-специфичная часть - рецептором, например, рецепторным белком, две эти части могут быть соединены друг с другом за счет взаимодействия молекул биотина и стрептавидина: такой пример показан на фиг. 3. Известны многочисленные вариации таких связей (см., например, Niemeyer et al., 1994, Nucl. Acids Res., 22, 5530-5539). С другой стороны, эти две части могут быть соединены друг с другом напрямую: например, олигонуклеотид может быть амидирован и затем присоединен напрямую (например, путем перекрестной сшивки) к пептиду или белку через амидную связь или присоединен к мембранному компоненту с помощью амидной связи или липидного соединения. Методы формирования таких ковалентных и нековалентных связей являются стандартными и легко могут быть оптимизованы специалистом в данной области техники.

После того, как два вещества оказываются связанными (например, в результате инкубации двух нуклеиновых кислот, двух белков, белка и нуклеиновой кислоты, или другой комбинации) с образованием комплекса (такого как, например, комплекса "якорь/линкер"), полученный в результате комплекс необязательно может быть обработан (например, путем промывки) с целью удаления несвязанных компонентов (например, линкерных) с использованием условий, которые определяют эмпирическим путем так, чтобы сохранить интактными специфические взаимодействия, но удалить материал, связанный по неспецифическому типу. Например, реакционные смеси могут быть промыты примерно от одного до десяти раз или более в тех же или несколько более жестких условиях по сравнению с теми условиями, которые использовались при формировании данного комплекса (например, комплекса "якорь/линкер").

Устройства по настоящему изобретению могут быть сформированы стандартными способами с использованием традиционных технологий.

Некоторые из поверхностей, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, легко доступны на коммерческих условиях. В предпочтительном варианте такой поверхностью является микротитровальный планшет с 96, 384 или 1536 лунками, например, модифицированные планшеты фирмы "Corning Costar". С другой стороны, поверхность, несущая лунки, которые, в свою очередь имеют углубления или "ямки", может быть образована микроманипуляциями с таким веществом, как алюминиевый или стальной порошок, от которого образовываются царапины, которые затем заливают пластиком или сходным материалом, в результате чего получают структуру, проиллюстрированную на фиг. 4. С другой стороны, такая структура, как показанная на фиг. 4, состоящая из стекла, пластмассы, керамики или подобного материала, может быть создана, например, из трех сегментов, например, как показано на фиг. 5: первый сегмент, называемый сепаратором лунок (фиг. 5a), будет обеспечивать границы между лунками для образцов, второй сегмент, называемый субразделителем (фиг. 5b) будет образовывать подразделения или углубления в пределах каждой из тест-лунок, а третий сегмент, называемый основанием (фиг. 5c), будет образовывать основание планшета и нижнюю поверхность тест-лунок. Сепаратор может быть, например, куском материала, например, силикона, со сквозными отверстиями, расположенные таким образом, чтобы каждое такое отверстие образовывало стенки тест-лунки тогда, когда все эти три сегмента объединяются. Субразделитель может быть, например, тонкой пластинкой такого материала, как силикон, имеющей форму экранной сетки или тонкоячеистой пластины. Основание может быть плоским куском такого материала, как стекло, имеющим форму, например, днища обычного микротитровального планшета, применяемого в стандартных биохимических тестах. Верхняя поверхность основания может быть плоской в соответствии с изображенным на фиг. 5c или может быть образована выпуклостями, которые будут совпадать с формой подразделительного сегмента, что обеспечит полную подразделенность зон или лунок в пределах каждой из тест-лунок. Эти три сегмента могут быть объединены с помощью стандартных процедур, например, таких приемов, которые применяются при сборке силиконовых облаток.

Олигонуклеотидные якоря, линкерные составляющие или детекторы могут быть синтезированы с помощью стандартных методов, например, с использованием промышленного синтезатора олигонуклеотидов и/или путем лигирования друг на друга субфрагментов, которые были перед этим синтезированы. В одном из вариантов настоящего изобретения заранее сформированные нуклеотидные якоря, такие как олигонуклеотидные якоря, могут быть размещены на поверхности тест-участка с помощью любой из стандартных процедур, включая фотолитографию или химическое прикрепление к шелковой ткани, раз-

мещение с помощью технологии распыления, в виде капиллярного, сетчатого или жидкого чипа, электрохимического размещения с использованием наборов электродов, контактирования с иглой или птичьим пером, или денатурации с последующим обжигом или облучением ультрафиолетом на фильтрах (см., например, Rava et al., 1996, патент США № 5545531; Fodor et al., 1996, патент США № 5510270; Zanzucchi et al., 1997, патент США № 5643738; Brennan, 1995, патент США № 5474796; международные патентные заявки WO 92/10092 и WO 90/15070). Якоря могут быть размещены на верхней поверхности тест-участка или могут быть, например, в случае использования подушки полиакриламидного геля, погружены в эту поверхность таким образом, чтобы некоторые из якорей пронизывали эту поверхность и были доступными для взаимодействия с линкером. В предпочтительном варианте преформированные олигонуклеотидные якоря дериватизуют по 5'-концу с использованием свободной аминогруппы: растворяют в концентрации, которую определяют обычно эмпирическим путем (например, около 1 мкМ) в буфере, таком как 50 мМ фосфатный буфер, pH=8,5, и 1 мМ EDTA с последующим распределением в капли с использованием разбрызгивателя Pixus (Cartesian Technologies), работающего в нанолитровом диапазоне, при размере капель примерно 10,4 нл, помещая их в конкретные участки тест-лунки, верхняя поверхность которой находится на чистом сухом планшете DNA-Bind (Corning Costar). В зависимости от относительной скорости присоединения и упаривания олигонуклеотидов необходимым может оказаться контроль влажности в лунках в ходе подготовки. В другом варианте олигонуклеотидные якоря могут быть синтезированы непосредственно на поверхности тест-участка с использованием таких стандартных методов, как, например, активируемое светом освобождение от защиты нарастающих олигонуклеотидных цепочек (например, в сочетании с использованием сайт-маркирующей "маски") или путем распределения нанолитровых капель дезактивированного соединения с использованием соответствующего ультрамикрораспылителя. Освобождение от защиты всех растущих нуклеотидных последовательностей, которые должны получать по одному нуклеотиду, может быть осуществлена, например, с тем, чтобы этот нуклеотид был добавлен затем уже на данной поверхности.

Пептиды, белки, лектины, хелатирующие элементы, пластмассы и другие типы якорей или линкерных составляющих также могут быть сформированы стандартными путями и такие якоря могут быть размещены на поверхности или в ее толще с использованием имеющихся методологий (см., например, Fodor et al., 1996, патент США № 5510270; Pirrung et al., 1992, патент США № 5143854; Zanzucchi et al., 1997, патент США № 5643738; Lowe et al., 1985, патент США № 4562157; Niemeyer et al., 1994, Nucl. Acids Res., 22, 5530-5539).

В некоторых вариантах настоящего изобретения заявляемые устройства используются в ряду различных скрининговых процедур и/или для получения информации об уровне, активности или структуре зондов или молекул-мишеней. Такие тесты определяются как методы или тесты MAPS (Multi Array Plate Screen - скрининг на многорядных, или "многонаборных" планшетах): соответственно, поверхности, несущие ряды (наборы) якорей или якорей/зондов для таких тестов, определяются как "MAPS-ряды" или "MAPS-планшеты".

Компоненты реакционной смеси, процедуры тестирования или скрининга могут быть выстроены в любом порядке. Например, якоря, линкеры и мишени могут быть собраны последовательно; или же мишени и линкеры (в присутствии или в отсутствие репортеров) могут быть собраны в растворе и затем проконтактированы с якорями.

Один из вариантов настоящего изобретения касается способа детекции по крайней мере одной мишени, включающего:

(а) контактирование образца, который может включать упомянутую(ые) мишень(и), с бифункциональным линкером, первая часть которого специфична в отношении олигонуклеотидного якоря, а вторая часть включает зонд, который специфичен в отношении упомянутой(ых) мишени(ей), в условиях, эффективных в отношении получения первого гибридизационного продукта, образуемого упомянутой(ыми) мишенью(ями) и упомянутым линкером;

(б) контактирование упомянутого первого гибридизационного продукта с устройством в условиях, эффективных по получению второго гибридизационного продукта, образуемого упомянутым первым гибридизационным продуктом и упомянутым устройством, при том, что упомянутое устройство включает (до добавления упомянутого первого гибридизационного продукта):

(1) поверхность, несущую множественные, пространственно разобщенные участки, по крайней мере два из которых по сути являются идентичными, при том, что каждый такой участок включает:

(2) по крайней мере 8 различных олигонуклеотидных якорей;

(в) контактирование упомянутого первого гибридизационного продукта или упомянутого второго гибридизационного продукта с помеченным детекторным зондом; и

(г) детекция упомянутого детекторного зонда.

Каждый из тестов или каждая из процедур, описанных далее, могут быть осуществлены в высокопроизводительном варианте, в котором большое количество образцов (например, по меньшей мере 864, 1036, 1536, 2025 или больше, что зависит от числа тест-участков в составе сочетания) быстро и одновременно тестируют на каждом планшете или поверхности. Далее в одно и то же время может быть обработано много планшетов или поверхностей. Например, в методах разработки лекарственных средств боль-

шое число образцов, каждый из которых содержит предполагаемое лекарство (например, элемент комбинаторной химической библиотеки, такой как варианты небольших молекул, пептиды, олигонуклеотиды или другие вещества), может быть нанесено на отдельные участки устройства в соответствии с описанным или может быть добавлено к биологическим или биохимическим образцам, которые затем наносят на отдельные тест-участки устройства, с последующей инкубацией с наборами зондов, расположенными в этих участках; и тесты могут быть осуществлены в отношении каждого из образцов. С учетом недавних выполненных и продолжающихся разработок высокоинформативных микропланшетов, приемов раскапывания проб ДНК и таких способов, как лазерные технологии, предназначенных для получения информации с даже еще более плотных микропланшетов, а также робототехники, улучшенных распылителей, высокоточных детекционных систем и программ для обработки данных, способы по настоящему изобретению могут быть использованы для скрининга или анализа тысяч или десятков тысяч, или еще большего количества соединений в день.

Например, варианты, в которых зондами являются олигонуклеотиды, тест может представлять собой диагностический скрининг нуклеиновой кислоты или полинуклеотида (например, в тесте на связывание или ином тесте) в большом числе образцов на присутствие генетических вариантов или дефектов (например, полиморфных вариантов или отдельных мутаций, ассоциированных с заболеваниями, такими как муковисцидоз: см., например, Iitia et al., 1992, Mol. Cell. Probes, 6, 505-512); патогенных организмов (таких как бактерии, вирусы или простейшие, организмами-хозяевами которых являются животные, включая человека, или растения); или параметры транскрипции мРНК, которые являются диагностическими признаками для конкретных физиологических состояний или заболеваний. Наборы нуклеотидных зондов, включающих фрагменты EST (включая их полноразмерные копии), могут быть использованы для оценки параметров транскрипции, проявляемых теми клетками, от которых являются производными эти маркеры EST (или других). Нуклеотидные зонды также могут выявлять пептиды, белки или белковые домены, которые специфическим образом связываются с конкретными нуклеотидными последовательностями (и наоборот).

В другом варианте устройства по настоящему изобретению могут использоваться для контроля за биохимическими реакциями, такими как, например, взаимодействия белков, нуклеиновых кислот, небольших молекул или подобного - например, эффективности или специфичности взаимодействий между антигенами и антителами; или между рецепторами (такими как очищенные рецепторы или рецепторы, связанные на клеточных мембранах) и их лигандами, являющимися агонистами или антагонистами; или между ферментами (такими как протеазы или киназы) и их субстратами, или в связи с увеличением или уменьшением количества субстрата, конвертируемого соответствующим ферментом в продукт; а также во многих других комбинациях. Такие биохимические тесты могут быть использованы для охарактеризования свойств зонда или мишени или служить основой для проведения скрининг-теста. Например, для целей скрининга образцов на присутствие конкретных протеаз (например, протеаз, вовлеченных в свертывание крови, таких как факторы Xa и VIIa) образцы могут быть протестированы в устройствах, в которых зондами являются флуоресцирующие субстраты, специфичные в отношении каждой из представляющих интерес протеаз. Если являющаяся мишенью протеаза связывается с субстратом и расщепляет его, то тогда этот субстрат будет флуоресцировать, что обычно является следствием, например, расщепления и разделения двух пар переноса энергии, в результате чего может быть детектирован такой сигнал. В другом примере для целей скрининга образцов на присутствие конкретных киназ (например, киназа Src, тирозинкиназа или киназа ZAP70) образцы, содержащие одну или несколько представляющих интерес киназ, могут быть протестированы с использованием устройств, в которых зондами являются пептиды, которые могут быть избирательно фосфорилированы под контролем одной из интересующих киназ. С использованием известных в данной области техники стандартным образом определяемых условий образцы могут быть проинкубированы с набором субстратов в подходящем буфере и в присутствии необходимых кофакторов в течение периода времени, определяемого эмпирическим путем. (В некоторых тестах, например, при биохимическом изучении факторов, регулирующих активность интересующих киназ, концентрация каждой из киназ может быть доведена таким образом, чтобы каждый субстрат фосфорилировался с одинаковой скоростью). После обработки (например, промывки) каждой реакции с целью удаления киназ и нежелательных компонентов реакции (что необязательно) в условиях, определяемых эмпирически, полученные фосфорилированные субстраты могут быть выявлены, например, путем их инкубации с детекторными реагентами, такими как, например, помеченные флуоресцеином антифосфотирозиновые или антифосфосериновые антитела (например, в концентрации примерно 10 нМ или больше, или меньше), а полученный сигнал может быть детектирован. В другом примере могут быть проведены тесты на связывание. Например, домены SH2, такие как SH2-домены киназ GRB2 или ZAP70, могут быть протестированы с использованием набора зондов в виде подходящих фосфорилированных пептидов; или же сыворотка крови может быть подвергнута скринингу с набором зондов в виде конкретных рецепторов на существование иммунодефицита. Также связанные с ферментами тесты могут быть осуществлены в таком формате набора зондов. Устройства по настоящему изобретению также могут быть использованы для выявления мутантных ферментов, которые характеризуются либо более высокой,

либо более низкой активностью по сравнению с их вариантами дикого типа, или для скрининга разнообразных агентов, таких как гербициды или пестициды.

Понятно, что MAPS-тесты могут быть использованы для количественной оценки (измерения) содержания активной мишени в образце, для чего зонд не должен быть полностью "занят", т.е. не более чем 90% доступных зондовых сайтов находится в связи с мишенью (или прореагировало или гибридизовалось с ней). При таких условиях мишень может быть оценена количественно на основании того, что чем больше имеется такой мишени, тем большее количество зонда находится в связанном состоянии. С другой стороны, в условиях, когда более 90% доступных зондовых сайтов связаны, увеличение количества мишени не будет обусловливать существенного повышения связывания мишени с зондом. Таким образом количественному анализу могут быть подвергнуты мишени любого из упоминавшихся выше типов. Например, в примере 6 описывается количественный анализ олигонуклеотидных мишеней. Более того, в нем показано, что даже если мишень присутствует с большим избытком (например, если она присутствует в столь большом количестве, что обеспечивает насыщение количества доступного зонда в MAPS-тесте), то путем добавления известного количества непомеченной мишени к связывающейся смеси можно обеспечить "сдвиг чувствительности" данной реакции с целью обеспечения количественного определения даже еще большего количества мишени.

В другом варианте устройства по настоящему изобретению могут быть использованы для скрининга агентов, которые модулируют взаимодействие мишени и данного зонда. Агент может модулировать взаимодействие в паре "мишень/зонд" путем прямого или опосредованного взаимодействия либо с этим зондом, либо с этой мишенью, либо с комплексом, образуемым этими мишенью и зондом. Такая модуляция может происходить в различных формах, что, тем самым не ограничиваясь, включает повышение или снижение аффинности по связыванию мишенью с зондом, увеличение или уменьшение скорости, с которой происходит связывание этой мишени и этого зонда, конкурентное или неконкурентное подавление связывания этого зонда с этой мишенью или повышение или снижение активности этого зонда или этой мишени, что может, по крайней мере в ряде случаев, приводить к усилению или ослаблению взаимодействия "зонд/мишень". Такие агенты могут быть искусственными или естественно встречающимися веществами. Также такие агенты могут быть использованы в своем первозданном виде или в виде смесей с другими компонентами; они могут быть ковалентно или нековалентно присоединены к связывающему компоненту, как напрямую, так и опосредованно через специфичную связывающую составляющую. Например, для идентификации потенциальных "средств разжижения крови" или агентов, которые взаимодействуют с одним из элементов протеазного каскада в процессе свертывания крови, смесь представляющих интерес протеаз может быть протестирована со множеством потенциальных агентов с последующим тестированием на их активность в соответствии с описанным выше. Другие примеры агентов, которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением, весьма многообразны и включают пестициды и гербициды. В примерах 16 и 17 описаны высокопроизводительные тесты для агентов, которые избирательно подавляют конкретные киназы или являются селективными ингибиторами взаимодействия между доменами SH2 и фосфорилированными пептидами.

В другом варианте устройства по настоящему изобретению могут быть использованы для скрининга агентов, которые модулируют параметры экспрессии генов. Наборы олигонуклеотидов могут быть использованы, например, для идентификации видов мРНК, параметры экспрессии которых коррелируют с конкретным физиологическим статусом или стадией онтогенеза, или с заболеванием (т.н. "коррелятивные" гены, РНК или параметры экспрессии). Под терминами "коррелирует" или "коррелятивные" подразумевается, что параметры синтеза РНК ассоциированы с физиологическим статусом клетки, но при этом не является обязательным то, что экспрессия данной РНК является следствием или причиной конкретного физиологического статуса. Например, небольшой набор мРНК может быть идентифицирован в связи с их экспрессией, позитивной и/или негативной конверсией в клетках, которые являются моделью для конкретного заболевания; такой измененный характер экспрессии по сравнению с нормальной клеткой, у которой не выявляется патофенотип, может являться индикатором заболевания ("индикаторные" гены, РНК или параметры экспрессии). Термины "коррелятивный" и "индикаторный" могут быть взаимозаменяемыми. Например, клетки, обработанные опухолеродным фактором, таким как форболмиристат, будут проявлять параметры экспрессии генов, имитирующие таковые, известные на ранних этапах роста опухоли. В другой модели раковой опухоли инсулиномные клетки мыши (например, клеточная линия TGP61) в случае их инфицирования аденовирусом проявляют усиление экспрессии, например, генов c-Jun и MIP-2, в то время как экспрессия генов "домашнего хозяйства", таких как гены GAPDH и L32, остается по сути неизменной.

Агенты, которые после контакта с клеткой, являющейся моделью заболевания, либо напрямую, либо опосредованно, также либо in vivo, либо in vitro (например, в культуре ткани), обеспечивают модуляцию индикаторных параметров экспрессии, могут действовать как терапевтические средства или лекарственные средства для организмов (например, человека или других животных-пациентов, или же растений), страдающих от этого заболевания. Агенты также могут модулировать параметры экспрессии вследствие контакта с нуклеиновой кислотой напрямую, например, в экспрессионной системе in vitro (в тест-пробирке). Используемый в данном тесте термин "модулирует" обозначает обусловливание увели-

чения или уменьшения количества и/или уровня активности молекулы или подобного, которые вовлечены в измеримые реакции. Устройства по настоящему изобретению могут быть использованы для осуществления скрининга таких агентов. Например, серия клеток (например, производных от модели заболевания) может быть проконтактирована с серией агентов (например, в течение периода времени от примерно 10 мин до примерно 48 ч или более), после чего с применением стандартных, известных в данной области техники методов (например, основывающихся на наборах реактивов, доступных на коммерческой основе) могут быть приготовлены экстракты тотальных пулов РНК или мРНК. Если желательным является амплифицирование определенного количества РНК, то могут быть использованы стандартные процедуры, такие как ПЦР с ревертированием (см., например, Innis et al., 1996, "PCR Protocols: A Guide to Methods in Amplification", Acad. Press, NY). Полученные экстракты (или амплифицированные на их основе продукты) могут быть проконтактированы (например, проинкубированы) со множеством по сути идентичных наборов, включающих зонды для подходящих индикаторных РНК, а те агенты, которые ассоциированы с изменением индикаторных параметров экспрессии, могут быть идентифицированы. В примере 15 описан высокопроизводительный тест, предназначенный для скрининга соединений, которые могут изменять экспрессию генов, являющихся индикаторными для заболевания.

Сходным образом могут быть идентифицированы агенты, которые способны модулировать те параметры экспрессии, которые ассоциированы с конкретными физиологическими состояниями или стадиями онтогенеза. Такие агенты могут быть искусственными или естественно встречающимися веществами, включая факторы внешней среды, такие как вещества, вовлеченные в развитие эмбрионов или в регуляцию физиологических процессов, или вещества, важные для сельскохозяйственного производства, например, пестициды или гербициды. Также такие агенты могут быть использованы в первозданном виде или в виде смесей с другими факторами; и они могут быть ковалентно или нековалентно присоединены к связывающему компоненту, как напрямую, так и опосредованного через специфичную связывающую составляющую.

В другом варианте настоящего изобретения представляется набор, применимый для детекции по крайней мере одной мишени в образце, который включает:

(а) поверхность, несущую множественные пространственно разобщенные участки, по крайней мере два из которых существенно идентичны, при том, что каждый такой участок включает по крайней мере восемь различных якорей (олигонуклеотидных или якорей иного типа, описанных в данном тексте), и

(б) емкость, включающую по крайней мере одну бифункциональную линкерную молекулу, которая включает первую часть, специфичную в отношении по крайней мере одного из упомянутых якорей, и вторую часть в виде зонда, специфичного в отношении по крайней мере одной из упомянутых мишеней.

В одном из вариантов представляется такая же как в пункте (а) выше поверхность и набор инструкций по присоединению по крайней мере к одному из упомянутых якорей бифункциональной линкерной молекулы, которая включает первую часть, специфичную в отношении по крайней мере одного из упомянутых якорей, и вторую часть в виде зонда, специфичного в отношении по крайней мере одной мишени. Инструкция может содержать, например (тем самым не ограничиваясь), описание каждого из якорей, размещенных на данной поверхности, указание на общее количество якорей и на их точное расположение, а также пропись для специфического прикрепления (ассоциирования, связывания и т.п.) линкеров к этим якорям. Например, если якоря являются олигонуклеотидами, то в инструкции может содержаться описание нуклеотидной последовательности каждого якоря, на основании которых на практике может быть осуществлено конструирование комплементарных, специфичных для этих якорей линкерных составляющих, специфически взаимодействующих с этими якорями (например, гибридизующимися с ними); если якоря являются пептидами, то в инструкцию может быть включена информация, например, об антителах, которые специфически взаимодействуют с этими пептидами. Инструкция также может содержать пропись для объединения якорей и линкеров, например, описание условий и реагентов для гибридизации (или связывания другого типа), такие как температура и время инкубации, условий и реагентов для удаления непроассоциировавших молекул (например, промывки) и подобное. Более того, инструкция может содержать информации о конструкции и использовании любого из типов обсуждаемых здесь контрольных линкеров, а также методов, например, количественного анализа, калибровки, стандартизации или "точной настройки" тестов, которые предполагается осуществлять с помощью данных устройств. Инструкции могут представлять любые параметры, условия или варианты, включенные в данную заявку, при том, что все они могут быть осуществлены специалистом в данной области техники стандартным образом с помощью стандартных процедур.

Как обсуждается в настоящем изобретении, на практике к поверхности по настоящему изобретению, несущей данный набор (или наборы) якорей, можно присоединить широкий круг типов линкеров, тем самым программируя разнообразные типы наборов зондов. Более того, на практике можно удалить данный набор линкеров с поверхности по настоящему изобретению и добавить на нее другой набор линкеров (как тот же самый, так и отличающийся от предыдущего набора), тем самым обеспечивая возможность повторного многократного использования этой поверхности. Такая гибкость и возможность повторного использования представляет дополнительные преимущества настоящего изобретения.

В другом варианте устройства по настоящему изобретению могут быть использованы для картирования маркеров EST (Expressed Sequence Tags - маркерные экспрессируемые последовательности). В этом случае MAPS-тесты могут быть использованы для определения того, какие (если таковые есть) из группы EST-маркеров происходили от отличающихся (или частично перекрывающихся) участков одного(их) гена(ов), а какие из них (если таковые есть) являются уникальными. На фиг. 18, 19, 20 и 21 проиллюстрирован такой тест: в этом примере тест нацелен на определение того, какие (если таковые есть) из 16 EST-маркеров связаны с общим геном. На первом этапе теста (см. фиг. 18) необходимо сконструировать наборы, в которых каждый из EST, картирование которых осуществляется, представлен по крайней мере одним олигонуклеотидным зондом, ему соответствующим. Серию наборов, равную по числу (или превышающую) число картируемых EST, распределяют по отдельным участкам (например, лункам) поверхности; в иллюстрируемом примере на поверхности данного устройства находится 16 лунок, в каждой из которых находится по 16 различных EST-специфичных олигонуклеотидов, пронумерованных от 1 до 16. Олигонуклеотид "соответствует EST" (т.е. является "EST-специфичным") тогда, когда он в существенной степени комплементарен EST, что определяет гибридизуемость этого олигонуклеотида при жестких условиях гибридизации именно с данным EST, но не с другими EST. EST-соответствующий олигонуклеотид такого типа может специфическим образом связываться (при оптимальных условиях) с кодирующей или транскрибируемой цепью кДНК, синтезированной на матрице гена, от которого данный EST-маркер происходил, или с мРНК, синтезированной на матрице гена, от которого происходил данный EST-маркер. Факторы, которые должны быть приняты во внимание при конструировании олигонуклеотидов и выборе параметров гибридизации, необходимых для оптимизации с целью достижения специфической гибридизации, обсуждаются по ходу данной заявки. С целью конструирования наборов линкерные молекулы приготавливают таким образом, чтобы каждая из них включала составляющую, специфичную для одного из якорей родственного набора, и составляющую в виде олигонуклеотидного зонда, соответствующего одному из маркеров EST, которые предполагается картировать; и эти линкеры присоединяют к данным якорям в соответствии с описанным в данной заявке. На следующем этапе аликвоту образца, включающего смесь нуклеиновых кислот (например, мРНК или одноцепочечных или денатурированных ДНК), которая может включать последовательности, комплементарные одному или большему числу олигонуклеотидных зондов, добавляют на каждый участок (лунку), в которых находится набор зондов; смесь затем инкубируют при стандартным образом установленных оптимальных условиях, тем самым обеспечивая связывание нуклеиновой кислоты с комплементарными зондами. Если некоторые из EST-специфичных зондов комплементарны различным частям одной нуклеиновой кислоты, то такая нуклеиновая кислота будет связываться на каждом сайте набора, на котором находится один из соответствующих зондов.

На следующем этапе дифференцированные детекторные олигонуклеотиды (в иллюстрируемом примере - детекторы от № 1 до № 16) добавляют к каждому участку (лунке) (см. фиг. 19). Детекторный олигонуклеотид создают для каждого из картируемых EST-маркеров. Каждый EST-специфичный детектор соответствует отличающейся части (по крайней мере частично неперекрывающейся) такого EST по сравнению с соответствующим зондом: в результате эти олигонуклеотиды (зонда и детектора) не перекрывают друг друга. См., например, EST, показанный на фиг. 21, который соответствует EST 1, 2 и 6 с фиг. 18-20. На фиг. 21 показаны EST № 1 и № 2: оба они происходят от гена "X" (т.е. они "сцеплены"), в то время как EST № 6 происходит от другого, неродственного гена. Если аликвоты образца, содержащего смесь мРНК, включая происходящую от гена "X", инкубируют с набором зондов, показанных на фиг. 18-20, то мРНК гена "X" при оптимальных условиях будет гибридизоваться по сайтам зондов 1 и 2, но не по сайту зонда 6. (Понятно, что каждая мРНК должна добавляться с молярным избытком по отношению к суммарному количеству зондов, с которыми она может гибридизоваться). Если детекторный олигонуклеотид 1 добавляют к участку (лунке) 1, то он должен гибридизоваться с мРНК гена "X", которая связана на сайтах 1 и 2 набора зондов, но не сайте 6. Сходным образом при добавлении детекторного олигонуклеотида 2 в другую лунку - скажем, лунку № 2 - он также должен гибридизоваться по сайтам 1 и 2, но не по сайту 6. В этом случае быстро можно определить, какие из EST сцеплены, т.е. кодируют разные участки одного и того же гена, а какие EST являются уникальными. В случае гипотетического примера, показанного на фиг. 20, первые три EST-маркера составляют части общего гена, последние пять EST представляют фрагменты другого гена, а остальные EST ни с ними, ни друг с другом не сцеплены. Условия гибридизации, необязательные этапы промывки, способы детекции и подобное обсуждаются по ходу данной заявки в связи с описанием MAPS-тестов. С целью подтверждения данных о сцеплении, полученных в MAPS-тесте, можно провести ПЦР с использованием пар EST-специфичных олигонуклеотидных зондов, берущихся в качестве смысловой и несмысловой затравок. Каждая пара сцепленных EST будет обеспечивать получение ПЦР-продукта. Надо заметить, что такой "попарный ПЦР-тест" может быть проведен с целью установления сцепления напрямую без использования MAPS-теста на сцепление: однако, для этого потребуется проведение множества реакций, а каждая из EST-затравок должна быть синтезирована по обеим цепям - смысловой и антисмысловой. В связи с проиллюстрированным примером потребовалось бы провести 180 таких ПЦР.

В одном из аспектов настоящее изобретение касается способа установления того, какие из множества EST-маркеров комплементарны данной нуклеиновой кислоте, включающего:

(а) инкубацию иммобилизованного набора олигонуклеотидных зондов, по крайней мере один из которых соответствует каждому из упомянутых EST, с тестируемым образцом, который может содержать упомянутую заданную нуклеиновую кислоту, с целью выявления продукта гибридизации, образуемого упомянутыми олигонуклеотидными зондами и упомянутой нуклеиновой кислотой;

(б) инкубацию упомянутого продукта гибридизации с детекторным олигонуклеотидом, который соответствует EST, которому соответствует один из упомянутых олигонуклеотидных зондов, но который специфичен в отношении отличающегося участка этого EST по сравнению с упомянутым олигонуклеотидным зондом; и

(в) детекцию тех олигонуклеотидных зондов из состава упомянутого набора, которые оказались помечены упомянутым детекторным олигонуклеотидом;

при том, что упомянутый набор олигонуклеотидных зондов иммобилизован в участке устройства, при том, что упомянутое устройство включает:

(1) поверхность, несущую серию пространственно разобщенных существенно идентичных участков, число которых равно числу анализируемых EST, при том, что каждый участок включает:

(2) серию различных якорей, число которых равно числу анализируемых EST, при том, что каждый якорь связан с:

(3) бифункциональным линкером, включающим первую часть, специфичную в отношении данного якоря, и вторую часть в виде олигонуклеотидного зонда, специфичную в отношении по крайней мере одного из упомянутых EST-маркеров.

В другом аспекте настоящего изобретения представляется соответствующий вышеописанному способ, при том, что один или несколько упомянутых EST могут быть комплементарны упомянутой нуклеиновой кислоте, и при том, что каждый из упомянутых EST включает по две различающиеся олигонуклеотидные последовательности, первая из которых определяет олигонуклеотидный зонд, соответствующий упомянутому EST, а вторая из которых определяет детекторный олигонуклеотид, соответствующий упомянутому EST, включающий:

(а) контактирование образца, содержащего молекулы упомянутой нуклеиновой кислоты, по крайней мере с одним участком устройства, при том, что упомянутый участок включает набор олигонуклеотидных зондов, по крайней мере один из которых соответствует каждому из упомянутых EST;

(б) инкубацию упомянутого образца на упомянутом участке, тем самым обеспечивая связывание молекул упомянутой нуклеиновой кислоты с упомянутыми EST-соответствующими олигонуклеотидными зондами, которые комплементарны участкам упомянутой нуклеиновой кислоты;

(в) инкубацию упомянутого участка, включающего молекулы упомянутой нуклеиновой кислоты, связанные с одним или несколькими упомянутыми EST-соответствующими олигонуклеотидными зондами, с детекторным олигонуклеотидом, который соответствует тому EST, которому соответствует тот данный олигонуклеотидный зонд из упомянутого набора, в результате чего детекторные олигонуклеотиды связываются с молекулами нуклеиновой кислоты, которые были связаны с упомянутым олигонуклеотидным зондом или с другими олигонуклеотидными зондами, комплементарными упомянутой нуклеиновой кислоте;

(г) детекцию присутствия упомянутых детекторных олигонуклеотидов, а тем самым идентификацию тех EST-соответствующих олигонуклеотидных зондов из состава упомянутого набора, которые комплементарны участкам нуклеиновой кислоты, которая связывается с упомянутым данным EST-соответствующим зондом, тем самым определяя идентификацию EST, которые комплементарны упомянутой данной нуклеиновой кислоте, при том, что упомянутый набор олигонуклеотидных зондов иммобилизован в участке устройства, при том, что упомянутое устройство включает:

(1) поверхность, несущую серию пространственно разобщенных существенно идентичных участков, число которых равно числу анализируемых EST, при том, что каждый участок включает:

(2) серию различных якорей, число которых равно числу анализируемых EST, при том, что каждый якорь связан с

(3) бифункциональным линкером, включающим первую часть, специфичную в отношении данного якоря, и вторую часть в виде олигонуклеотидного зонда, специфичную в отношении по крайней мере одного из упомянутых EST-маркеров.

Компоненты теста на картирование EST-маркеров могут быть собраны следующим образом. Например, якоря, линкеры и EST могут быть собраны последовательно; или линкеры и EST в присутствии или отсутствие репортеров могут быть собраны в растворе и затем добавлены к якорям.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа установления тех из множества EST-маркеров, которые комплементарны данной нуклеиновой кислоте, включающего:

(а) инкубацию коллекции бифункциональных олигонуклеотидных линкерных молекул, каждая из которых включает первую часть в виде зонда, соответствующего по крайней мере одному из упомянутых EST, и вторую часть, специфичную в отношении олигонуклеотида якоря, при том, что тестируемый образец может содержать упомянутую данную нуклеиновую кислоту, с целью получения первого продукта

гибридизации, образуемого упомянутыми олигонуклеотидными зондами и упомянутой нуклеиновой кислотой;

(б) инкубацию упомянутого первого продукта гибридизации с иммобилизованным набором якорных олигонуклеотидов, при том, что каждый якорный олигонуклеотид соответствует якорь-специфичной части по крайней мере одной из упомянутых линкерных молекул, с образованием второго продукта гибридизации, включающего упомянутые якоря, упомянутые олигонуклеотидные зонды и упомянутую нуклеиновую кислоту; и

(в) инкубацию либо первого, либо второго продукта гибридизации с детекторным олигонуклеотидом, который соответствует EST, которому соответствует один из упомянутых олигонуклеотидных зондов, но который специфичен в отношении отличающейся части EST по сравнению с упомянутым олигонуклеотидным зондом; и

(г) детекцию тех олигонуклеотидных зондов упомянутого набора, которые помечены упомянутым детекторным олигонуклеотидом, при том, что упомянутый набор олигонуклеотидных зондов иммобилизован в участке устройства, при том, что упомянутое устройство включает:

(1) поверхность, несущую серию пространственно разобщенных существенно идентичных участков, число которых равно числу анализируемых EST, при том, что каждый участок включает:

(2) серию различных якорей, число которых равно числу изучаемых EST.

Понятно, что описанные выше способы картирования EST-маркеров могут быть использованы для картирования тест-последовательностей (например, полинуклеотидов) на любой интересующей нуклеиновой кислоте. Например, можно установить, картируется ли в общей геномной ДНК два или большее число клонированных фрагментов ДНК или молекул кДНК. Целью такой процедуры может быть, например, расшифровка структуры крупных, сложно устроенных генов. Сходным образом можно установить, картируются в общей геномной ДНК одна или большее число сплайсированных последовательностей или кодирующих последовательностей. Такой подход может быть применен, например, в диагностике при разграничении нормального состояния и заболевания, которые могут различаться по параметрам сплайсинга. Многие другие пути применения способа картирования будут ясны специалисту в данной области техники.

В другом аспекте настоящее изобретение представляет способ установления того, какие из множества полинуклеотидов комплементарны данной нуклеиновой кислоте: при том, что один или несколько упомянутых полинуклеотидов могут быть комплементарны упомянутой нуклеиновой кислоте, и при том, что каждый из упомянутых полинуклеотидов включает по две дифференцированные олигонуклеотидные последовательности, первая из которых определяет олигонуклеотидный зонд, соответствующий упомянутому полинуклеотиду, а вторая из которых определяет детекторный олигонуклеотид, соответствующий упомянутому полинуклеотиду, включающий:

(а) контактирование образца, содержащего молекулы упомянутой нуклеиновой кислоты, по крайней мере с одним участком устройства, при том, что упомянутый участок включает набор олигонуклеотидных зондов, по крайней мере один из которых соответствует каждому из упомянутых полинуклеотидов;

(б) инкубацию упомянутого образца на упомянутом участке, тем самым обеспечивая связывание молекул упомянутой нуклеиновой кислоты с упомянутыми полинуклеотид-соответствующими олигонуклеотидными зондами, которые комплементарны участкам упомянутой нуклеиновой кислоты;

(в) инкубацию упомянутого участка, включающего молекулы упомянутой нуклеиновой кислоты, связанные с одним или несколькими упомянутыми полинуклеотид-соответствующими олигонуклеотидными зондами, с детекторным олигонуклеотидом, который соответствует тому полинуклеотиду, которому соответствует тот данный олигонуклеотидный зонд из упомянутого набора, в результате чего детекторные олигонуклеотиды связываются с молекулами нуклеиновой кислоты, которые были связаны с упомянутым олигонуклеотидным зондом или с другими олигонуклеотидными зондами, комплементарными упомянутой нуклеиновой кислоте;

(г) детекцию присутствия упомянутых детекторных олигонуклеотидов, а тем самым идентификацию тех полинуклеотид-соответствующих олигонуклеотидных зондов из состава упомянутого набора, которые комплементарны участкам нуклеиновой кислоты, которая связывается с упомянутым данным полинуклеотид-соответствующим зондом, тем самым определяя идентификацию полинуклеотидов, которые комплементарны упомянутой данной нуклеиновой кислоте, при том, что упомянутый набор олигонуклеотидных зондов иммобилизован в участке устройства, при том, что упомянутое устройство включает:

(1) поверхность, несущую серию пространственно разобщенных существенно идентичных участков, число которых равно числу изучаемых полинуклеотидов, при том, что каждый участок включает:

(2) серию различных якорей, число которых равно числу изучаемых полинуклеотидов, при том, что каждый якорь связан с:

(3) бифункциональным линкером, включающим первую часть, специфичную в отношении данного якоря, и вторую часть в виде олигонуклеотидного зонда, специфичную в отношении по крайней мере одного из упомянутых полинуклеотидов.

В другом аспекте настоящего изобретения описанные выше способы картирования EST-маркеров или иных полинуклеотидов дополнительно включают удаление несвязанных фрагментов образца, производимое в один или несколько этапов.

В другом варианте настоящего изобретения одна или большее число представляющих интерес РНК-мишеней (например, мРНК или других типов РНК) конвертируют в кДНК с использованием обратной транскриптазы и полученные кДНК затем гибридизуются с набором зондов. Этот вариант теста схематически проиллюстрирован на фиг. 8. Экстракты РНК (или пул очищенных мРНК) приготавливают на материале клеток или тканей в соответствии с описанным в данном тексте. Затем обратную транскриптазу и олигонуклеотидные затравки, специфичные в отношении интересующих РНК, добавляют к образцу РНК и с использованием стандартных условий и процедур, которые могут быть стандартным образом подобраны и оптимизованы, синтезируют первую цепь кДНК. Термин "специфичная затравка" указывает на затравку, которая в существенной степени комплементарна интересующей мРНК так, чтобы связываться с ней при выбранных условиях гибридизации и быть распознаваемой обратной транскриптазой, но которая не связывается с нежелательной нуклеиновой кислотой (см. выше обсуждение подходящих условий реакции с целью достижения специфичности гибридизации). Остающиеся РНК (мРНК, которые не были распознаны специфическими затравками и/или иные типы загрязняющих РНК в составе РНК-экстракта, такие как тРНК или рРНК) могут быть удалены с помощью любой рибонуклеазы или с помощью химических методов, таких как обработка щелочью, после чего остается лишь одноцепочечная кДНК, которую после этого помещают для контактирования с набором зондов в MAPS-тесте. Использование в данном способе обратной транскриптазы минимизует необходимую "ручную работу" с РНК, которая может быть весьма чувствительна к разрушению нуклеазами, тем самым затрудняя проведение анализа. Более того, дополнительная специфичность, задаваемая использованием специфичных обратнотранскрипционных затравок, выводит данный тест на новый уровень специфичности.

Необязательно кДНК, описанные выше, могут быть амплифицированы перед проведением гибридизации с набором зондов с целью повышения интенсивности сигнала. Обратнотранскрипционные олигонуклеотидные затравки, описанные выше, могут включать по их 5'-концам последовательности (длина которых может быть примерно 22-27 нуклеотидов), специфичные в отношении сайтов инициирования, распознаваемые РНК-полимеразой (например, полимеразами T7, T3 или SP2 и подобными). В примере, проиллюстрированном на фиг. 8, T7-промоторная последовательность была добавлена к обратнотранскрипционной затравке. В результате сайт распознавания РНК-полимеразой оказывается включенным в состав кДНК и может служить в качестве распознавательного сайта, необходимого для серии циклов транскрипции, обеспечиваемых подходящей РНК-полимеразой (при транскрипции in vitro). Необязательно сформированные таким образом мРНК могут быть дополнительно амплифицированы с применением ПЦР и с подходящими затравками, или же сама кДНК может быть амплифицирована таким образом. Процедуры проведения транскрипции и ПЦР стандартны и хорошо известны в данной области техники.

Гибкость метода ПЦР обеспечивает существенную вариабельность способов по настоящему изобретению. В одном варианте воплощения один или оба ПЦР-праймера, которые используются для амплификации мишени, могут включать химическую модификацию, которые обеспечивают получаемому в результате ПЦР-продукту специфичное или неспецифичное присоединение к твердой подложке. Такими химическими модификациями являются, например, 5'-амидирование, которое обеспечивает связывание на поверхностях, таких как Costar's DNA Bind Plates (например, такие, которые модифицированы N-оксисукцинимидным сложным эфиром, или планшеты, покрытые малеиновым ангидридом, такие как планшеты Reacti-Bind фирмы Pierce, Rockford, IL). Способы формирования олигонуклеотидов, включающих такие химические модификации, являются стандартными и традиционными для данной области техники. ПЦР-продукт, включающий такой модифицированный праймер, может быть присоединен к любой желательной подложке, включая твердую подложку, например, внутренние стенки микротитровальной лунки, шарик (например, намагниченный или ненамагниченный шарик) или поверхность любого типа, описанного в данном тексте. Понятно, что ПЦР-праймер также может быть присоединен к подложке до инициации реакции ПЦР. Несколько циклов ПЦР могут быть повторены без промывки, но с избытком связанного праймера таким образом, что получаемый в ПЦР продукт остается присоединенным к подложке. Присоединение амплифицированкой последовательности-мишени к подложке может облегчить промывку (или очистку) мишени либо перед ее контактированием (например, гибридизацией) с поверхностью, несущей якоря и/или линкеры, либо после того, как она была приведена в контакт с поверхностью с последующим высвобождением с нее.

В другом варианте воплощения один или оба ПЦР-праймера, использованные для амплификации мишени, могут включать один или большее число рестрикционных сайтов, обеспечивая встраивание рестрикционных сайтов рядом с любым концом интересующей последовательности-мишени или фланкируя ее. Рестрикционные сайты могут быть добавлены в амплифицированную мишень с помощью ПЦР либо до, либо после того, как она была приведена в контакт (например, прогибридизована) с поверхностью, несущей якоря и/или линкеры. Внесенный(ые) таким образом рестрикционный(ые) сайт(ы) могут, например, облегчать клонирование амплифицированной мишени за счет представления сайтов клониро-

вания, которые фланкируют последовательность-мишень. Также рестрикционные сайты могут облегчать очистку амплифицированной последовательности.

Например, один или несколько рестрикционных сайтов могут быть с помощью ПЦР помещены между конкретной последовательностью-мишенью и сайтом химической модификации, который обеспечивает присоединение к подложке. После ПЦР-амплификации мишени с использованием модифицированного ПЦР-праймера и связывания на подложке с помощью химической модификации мишень можно промыть и затем расщепить по рестрикционному(ым) сайту(ам), находящемуся рядом с последовательностью-мишенью, тем самым высвобождая промытую мишень: см., например, фиг. 23.

Понятно, что другие расщепляемые сайты помимо рестрикционных сайтов также могут быть использованы в описанных выше способах, например, пептид, который может быть разрезан специфичной протеазой, или иной компонент, который может быть отщеплен и/или высвобожден с помощью физических, ферментных или других способов.

В другом варианте воплощения один или оба ПЦР-праймера, использованные для амплификации мишени, могут включать последовательность (которая необязательно присутствует в составе мишени), которая специфична для, например, специфичного для мишени репортера или детекционного линкера.

Понятно, что описанные выше модификации праймера могут быть использованы вместе друг с другом в любом желательном сочетании и могут быть добавлены к амплифицированному продукту на любой стадии теста. В примерах 21 и 22 приведены методики, в которых ряд описанных выше модификаций праймеров включен в амплифицированную мишень.

Описанный выше способ, в котором мРНК-мишени конвертируются в кДНК с помощью обратной транскриптазы и/или амплифицируют с помощью ПЦР перед проведением тестирования на MAPS-планшетах, может быть применен вместо стандартного MAPS-теста для любых описанных выше тестов, нацеленных на РНК.

В другом варианте настоящего изобретения одна или большее число представляющих интерес нуклеиновых кислот-мишеней гибридизуются со специфическими полинуклеотид-защитными фрагментами и подвергают процедуре метода защиты от действия нуклеаз, а те защитные фрагменты, которые гибридизовались с интересующей(ими) мишенью(ями), тестируют на MAPS-планшетах. Если представляющей интерес мишенью является РНК, а защитный фрагмент - это ДНК, то комплексный тест "защита от нуклеазы + MAPS" (NPA-MAPS) обусловит снижение уровня "ручной работы" с РНК, которая может быть чувствительна к разрушению загрязняющими нуклеазами, тем самым существенно затрудняя проведение анализа. В таком тесте NPA-MAPS зонды в составе их набора являются олигонуклеотидами о таком же количестве цепей, что и представляющие интерес нуклеиновые кислоты-мишени, помимо того, что они им комплементарны, как это имеет место в стандартном MAPS-тесте. Один из примеров теста NPA-MAPS схематически показан на фиг. 9.

В тесте NPA-MAPS интересующая мишень может являться любой нуклеиновой кислотой, например, геномной ДНК, кДНК, вирусной ДНК или РНК, рРНК, тРНК, мРНК, олигонуклеотидами, нуклеотидными фрагментами, модифицированными нуклеиновыми кислотами, синтетическими нуклеиновыми кислотами или подобным. В предпочтительном варианте настоящего изобретения данная процедура применяется для тестирования одной или нескольких мРНК-мишеней, которые содержатся в тканевом или клеточном экстракте РНК. Образец, который содержит интересующую(ие) мишень(и), вначале гибридизуются в выбранных условиях гибридизации (см. выше обсуждение подходящих условий реакции, необходимых для достижения специфичности гибридизации) с одним или несколькими специфичными защитными фрагментами. Защитный фрагмент - это полинуклеотид, который может являться, например, РНК, ДНК (включая ПЦР-продукт), РНП или модифицированной или замещенной нуклеиновой кислотой, специфичной в отношении части интересующей нуклеиновой кислоты-мишени. Под "специфичным защитным фрагментом" подразумевается полинуклеотид, который в существенной степени комплементарен своему предполагаемому партнеру по связыванию в выбранных условиях жесткости, но который не связывается с другими, "непреднамеренными" нуклеиновыми кислотами. Длина защитного фрагмента составляет по крайней мере 10 нуклеотидов, предпочтительно от 50 до примерно 100 нуклеотидов, или примерно в соответствии с полным размером кДНК. В предпочтительном варианте защитные фрагменты являются одноцепочечными ДНК-олигонуклеотидами. Защитные фрагменты, специфичные в отношении 100 или более мишеней, могут быть включены в одну реакцию гибридизации. После гибридизации образец обрабатывают одной или смесью нескольких нуклеаз с целью разрушения по сути всех нуклеиновых кислот за исключением защитного(ых) фрагмента(ов) , которые гибридизовались с интересующей(ими) нуклеиновой(ыми) кислотой(ами) и, что необязательно, с частью(ями) нуклеиновой кислоты-мишени, которая гибридизовалась и была тем самым защищена от действия нуклеаз в методе защиты от нуклеаз (находясь в составе двухцепочечного гибрида). Например, если образец является клеточным экстрактом, то нежелательные нуклеиновые кислоты, такие как геномная ДНК, тРНК, рРНК и мРНК помимо тех, которые представляют интерес, могут быть на данном этапе в существенной степени разрушены. Может быть использована любая нуклеаза, включая, например, нуклеазу S1, панкреатическую РНКазу, нуклеазу фасоли-маш, РНКазу-А, рибонуклеазу Т1, экзонуклеазу III или подобное, что зависит от природы образовавшихся гибридных комплексов и природы нежелательных нуклеиновых кислот, содержащихся в

данном образце. В частности, РНКаза-Н может быть использована с целью расщепления остаточной РНК, связанной с ДНК-защитным фрагментом. Условия реакции для этих ферментов хорошо известны в данной области техники и могут быть оптимизованы эмпирическим путем. Также могут быть применены химические методы, например, щелочной гидролиз ДНК. По необходимости образцы могут быть дополнительно обработаны с помощью известных методов с целью удаления непрогибридизовавщегося материала и/или инактивации или удаления оставшихся ферментов (например, экстракция фенолом, преципитация, гель-фильтрация и т.п.). Процесс гибридизации, после которой проводится обработка нуклеазой и (необязательно) химическое расщепление, называют "методом защиты от действия нуклеаз": ранее был описан целый ряд вариантов этого метода (см., например, Lee et al., 1987, Meth. Enzymol., 152, 633-648; Zinn et al., 1983, Cell, 34, 865-879). Образцы, обработанные в методе защиты от нуклеаз с последующей (необязательной) процедурой инактивации этих нуклеаз, помещают в контакте в набором зондов MAPS-теста и осуществляют обычные этапы этого теста. Связанные защитные фрагменты могут быть выявлены с помощью гибридизации с помеченными мишень-специфичными репортерами в соответствии с описанным в данной заявке для стандартных MAPS-тестов, или же сами по себе защитные фрагменты могут быть помечены путем ковалентного или нековалентного связывания с маркерной молекулой.

В предпочтительном варианте защитный фрагмент помечают напрямую, например, предпочтительнее путем гибридизации с мишень-специфическим репортером. Например, такой репортер связывают с защитным фрагментом по типу взаимодействия в паре "лиганд/антилиганд", например, стрептавидиновый комплекс присоединяют к биотинилированному олигонуклеотиду. В другом примере защитный фрагмент модифицируют химическими методами (например, путем прямого присоединения пероксидазы хрена или флуоресцентного вещества) и с последующим выявлением такой химической модификации, как в связи с нуклеотидным сегментом данного защитного фрагмента, так и без него (например, после расщепления данного модифицированного варианта, например, каталитическим или химическим путем). В любом из описанных выше способов защитный фрагмент может быть помечен перед тем или после того, как он гибридизуется с соответствующей линкерной молекулой.

С целью контроля за точностью процесса защиты от действия нуклеаз, т.е. за тем, чтобы, как это желаемо, непрогибридизовавшиеся нуклеиновые кислоты были расщеплены, можно сконструировать один или несколько защитных фрагментов так, чтобы они включали выступающие (негибридизующиеся) сегменты, которые бы отщеплялись нуклеазами в случае, если процедура была правильной. Присутствие или отсутствие выступающих сегментов может быть установлено путем гибридизации с комплементарным помеченным детекторным зондом, или же сам по себе "выступ" данного защитного фрагмента может быть помечен путем ковалентного или нековалентного присоединения молекулы-детектора. Такой контроль может быть осуществлен перед тем, как образец будет помещен в контакте с набором зондов, или может сам являться одним из этапов MAPS-теста. Пример теста с таким контролем описан в примере 15. Понятно, что, ввиду возможного использования различных меток, которые могут быть легко различимыми (например, они могут флуоресцировать с различными спектрами поглощения), в один и тот же тест могут быть включены несколько по-разному помеченных олигонуклеотидов. Кроме того, стандартный тест на защиту от действия нуклеаз с анализом методом гель-электрофореза может быть использован в ходе проверки результатов теста на точность процессирования защитных фрагментов.

После выявления мишеней сигнал детекционного зонда (например, помеченный пероксидазой хрена) может быть элиминирован (например, денатурирован, уничтожен, загашен, подавлен, заблокирован), планшеты промыты с целью удаления любых образовавшихся в результате реагентов, агентов или буферов, которые могли бы воспрепятствовать следующей стадии (например, денатурирующий реагент) и затем "выступ" может быть выявлен с помощью другого детекционного зонда (например, также помеченного пероксидазой хрена). Использование сигнала денатурации после добавления отличающегося детекционного зонда с той же сигнальной составляющей может иметь место на различных стадиях теста. Использование двух разных флуоресцентных зондов и двухцветного выявления может быть осуществлено без денатурации или блокирования сигнала.

Тесты NPA-MAPS могут быть использованы для количественного определения содержания мишени в образце. Если защитный фрагмент добавляется со значительным молярным избытком, что необходимо для обеспечения завершения реакции гибридизации, то количество защитного фрагмента, остающееся после этапа защиты от действия нуклеазы будет отражать то, сколько мишени присутствовало в данном образце. Один из примеров такой количественной реакции описан в примерах 12 и 13.

Тесты NPA-MAPS могут быть использованы при реализации любого из описанных здесь способов, базирующихся на стандартных MAPS-тестах.

В предпочтительном варианте полинуклеотидные защитные фрагменты количественно определяют с помощью масс-спектрометра, предпочтительно не на MAPS-планшетах. В наиболее предпочтительном варианте никакой из полинуклеотидов не связан (не присоединен) с твердой поверхностью в процессе гибридизации или защиты от действия нуклеаз. После гибридизации гибридизовавшаяся мишень может быть разрушена, например, путем обработки нуклеазой или химическими методами, ставя тем самым количество защитного фрагмента в прямую зависимость от того, сколько его гибридизовалось с мишенью. С другой стороны, данный образец может быть обработан таким образом, чтобы сохранить гибри-

дизовавшуюся часть (одноцепочечную) мишени или дуплекс, образованный гибридизовавшейся мишенью и защитным фрагментом, которые должны быть проанализированы дополнительно.

Предназначенные для анализа образцы отделяют от остальной гибридизационной и нуклеазной смеси (например, путем этанольной преципитации или адсорбционного отбора, или аффинной хроматографии и т.п.), элюируют или солюбилизуют и впрыскивают в масс-спектрометр с помощью петлевого впрыска. В предпочтительном варианте предназначенные для анализа образцы (например, защитные фрагменты) адсорбируют на поверхности и тестируют с помощью лазерной десорбции на основе применения хорошо известных в данной области техники методов. Для достижения наибольшей чувствительности может быть использована масс-спектрометрия с Фурье-преобразованием (FTMS) (или другие сходные современные методы), с помощью которой могут быть выявлены фемтомолярные или меньшие количества каждого из защитных фрагментов.

Защитные фрагменты, которые должны быть выявлены в составе одного (или большего числа) образцов, могут быть сформированы таким образом, чтобы давать уникальный сигнал в применяемой масс-спектроскопии. В одном из вариантов каждый из защитных фрагментов характеризуется уникальной молекулярной массой после гибридизации и обработки нуклеазой, т.е. их молекулярных масс и характеристик ионизации и фрагментации должно быть достаточно для определения их концентрации. Для достижения более высокой чувствительности или для облегчения анализа сложных по составу смесей защитные фрагменты могут быть модифицированы (например, с получением их производных) химическими составляющими, конструкция которых обеспечит получение отчетливого уникального сигнала. Например, каждый защитный фрагмент может быть дериватизован с помощью отличающейся нативной или ненативной аминокислоты, присоединенной с помощью амидной связи к цепочке олигонуклеотида по одному или нескольким сайтам на гибридизующемся участке этой цепи. При использовании масс-спектрометра с подходящим уровнем энергии фрагментация будет происходить именно по этим амидным связям, высвобождая тем самым характерную долю аминокислот. Такой тип анализа, в котором используются химические составляющие среднего размера (грубо - с молекулярной массой 80-200), применяется тогда, когда желательным является наличие масс-спектрометрических меток, потому что молекулы такого размера обычно легко выявляемы. В другом примере химической модификацией является органическая молекула с определенным масс-спектрометрическим сигналом, такая как тетраалкиламмонийная группа, с помощью которой можно, например, дериватизовать другую молекулу, такую как, например, молекулу аминокислоты. В другом примере сигналы положительных или отрицательных ионов усиливаются за счет реакций с любым агентом. Например, для усиления выявляемости положительных ионов можно осуществить реакцию пирилиевой соли (такой как, например, 2,4-дитенил-6-этилпирилийтетрафторборат или многие другие) с амином с образованием пиридиниевой соли; любой из других усиливающих агентов также может быть использован с целью образования других положительно заряженных функциональных групп (см., например, Quirke et al., 1994, Anal. Chem., 66, 1302-1315). Сходным образом может прореагировать любой из известных в данной области техники агентов с образованием вариантов, усиливающих отрицательно заряженные ионы. Химическая модификация может быть выявлена, понятно, либо после ее отщепления от нуклеиновой кислоты, или же непосредственно в связи с этой нуклеиновой кислотой. За счет обеспечения возможности идентификации каждого защитного фрагмента отдельным способом становится возможным тестировать (например, в форме скрининга) большое число различных мишеней (например, 2, 6, 10, 16 или больше различных мишеней) в ходе одного теста. Многие такие тесты могут быть осуществлены легко и быстро. Такой тест или ряд тестов могут быть проведены, следовательно, высокопроизводительным образом, что и определяется настоящей заявкой.

Независимо от использования прямого мечения олигонуклеотидов по их молекулярным массам или использования меток с уникальной молекулярной массой, сигналы для каждой из молекул, которые должны быть выявлены, могут быть в полном объеме охарактеризованы с помощью чистых препаратов в известной концентрации. Это позволяет количественно оценивать сигнал (измерять) с высокой точностью. Для любой молекулы, выявляемой методом масс-спектрометрии, интенсивность и профиль не могут быть точно предсказаны. Слишком сложны для предсказывания такие признаки, как способность молекулы ионизироваться, чувствительность всех имеющихся в молекуле химических связей к фрагментации и степень, с которой каждый из фрагментов приобретает множественный или единичный заряд. Однако для данного прибора с известной энергией ионизации и известными характеристиками обработки образца величины интенсивности и профиля сигнала характеризуются существенной повторяемостью. Следовательно, для каждого зонда сигнал может быть охарактеризован с помощью чистых стандартов с последующей точной количественной интерпретацией сигналов, получаемых в эксперименте.

В одном из аспектов настоящее изобретение представляет способ детекции одной или большего числа представляющих интерес нуклеиновых кислот, включающий обработку образца, содержащего интересующую(ие) нуклеиновую(ые) кислоту(ы), методом защиты от действия нуклеаз с использованием одного или нескольких защитных фрагментов, и детекцию гибридных дуплексов или защищенной нуклеиновой кислоты, или защитного фрагмента с помощью масс-спектрометрии.

Методы анализа нуклеиновых кислот с помощью масс-спектроскопии хорошо известны в данной области техники: см., например, Alper et al., 1998, Science, 279, 2044-2045 и Koster, патент США № 56057 98.

В дополнение к различным высокопроизводительным тестам, описанным выше, для специалиста в данной области техники будут очевидны и многие другие тесты.

Преимуществом использования многозондовых тестов является возможность включать в состав каждого набора зондов группу "контрольных зондов", которые являются объектом тех же условий реакции, что и реальные экспериментальные зонды. Например, каждый участок в таком наборе может включать позитивные и/или негативные контроли. Используемый в данном тексте термин "позитивный зонд-контроль" обозначает контрольный зонд, для которого известно, например, существенное взаимодействие с данной мишенью или его взаимодействие по известным количественным или качественным характеристикам, т.е. тем самым он действует в качестве (внутреннего) стандарта для оценки взаимодействия в паре "зонд/мишень". Такой зонд может использоваться, например, для контроля эффективности гибридизации. Используемый в данном тексте термин "негативный зонд-контроль" обозначает контрольный зонд, для которого известно отсутствие существенного взаимодействия с данной мишенью. Такой зонд может использоваться для контроля, например, специфичности гибридизации. В качестве примера типов контроля, которые могут быть использованы, приводится тест, в котором набор олигонуклеотидных зондов используется для скрининга агентов, которые модулируют экспрессию ряда коррелятивных генов в связи с заболеванием. В качестве внутреннего стандартизующего контроля, необходимого для оценки таких переменных, как число лизированных в каждом образце клеток, количества выделенной мРНК или эффективность гибридизации, набор зондов может включать зонды, специфичные для одного или большего числа генов, экспрессирующихся на базовом уровне или конститутивно по типу генов "домашнего хозяйства", таких как структурные гены (например, гены актина, тубулина или другие) или гены ДНК-связывающихся белков (например, гены транскрипционных факторов или другие), экспрессия которых не должна модулироваться тестируемыми агентами. Более того, для установления того, не приводят ли тестируемые агенты к проявлению нежелательных побочных эффектов, таких как гибель клеток или токсичность, набор зондов может включать зонды, специфичные в отношении генов, для которых известна индуцибельность в процессе апоптоза (запрограммированной гибели клеток) или которые индуцируются в условиях повреждения клетки (например, гены белков теплового шока - или стрессовых генов), или при цитотоксичности (например, гены цитохромов Р450).

Другие контрольные зонды могут быть включены в набор с целью "точной настройки" чувствительности теста. Примером является тест, предназначенный для агента, который модулирует выработку мРНК, ассоциированных с конкретным заболеванием. Если в предыдущих анализах было показано, что одна из коррелятивных мРНК (скажем, мРНК-А) в данном наборе вырабатывается в таких высоких количествах по сравнению с другими, что соответствующий сигнал закрывает другие мРНК, то линкеры могут быть подвергнуты "точной настройке" таким образом, чтобы обеспечить уравновешенные по силе сигналы. Для этой цели "заблокированные линкеры", включающие якорь-специфичную олигонуклеотидную последовательность, сконструированную в отношении мишени мРНК-А, но не включающие зонд-специфичную последовательность, могут быть добавлены с целью разбавления пула мишень-специфичных линкеров, что тем самым приведет к снижению чувствительности данного теста с данной мРНК. Подходящее соотношение заблокированных и незаблокированных линкеров может быть определено стандартными путями, понятными для специалиста в данной области техники.

"Тонкая настройка" теста по отношению к конкретной мишени за счет разведения активного элемента неактивным элементом также может быть осуществлена на любой стадии теста. Например, она может быть выполнена на уровне выявления путем разведения помеченного, специфичного для мишени репортера "неактивным", специфичным для мишени репортером, например, репортером с такой же специфичной для мишени составляющей (например, олигонуклеотидной последовательностью), но без сигнального компонента или с инактивированной или неактивной формой сигнального компонента. Используемый в данном тексте термин "сигнальный компонент" обозначает метку, молекулу или любое вещество, которые испускают выявляемый сигнал или способны генерировать такой сигнал, например, флуоресцентная молекула, люминесцирующий фермент или любой из различных сигнальных компонентов, которые описаны в данном тексте. В конкретном предпочтительном варианте "тонкая настройка" может быть осуществлена на стадии контакта содержащего мишень комплекса с детекционным линкером с детекционным линкером (детекционные линкеры описаны далее, например, в разделе, посвященном способам выявления комплексов формы "сэндвич": пример 23 и фиг. 24). Набор детекционных линкеров может быть сформирован, например, для тонкой настройки чувствительности каждой отдельной мишени в тесте. Например, если известно, что конкретная мишень присутствует в образце на очень высоком уровне, детекционный линкер к такой мишени может быть разведен в эмпирически определенном количестве "заблокированного детекционного линкера", включающего специфичную для мишени составляющую (например, олигонуклеотидную последовательность), но без составляющей, специфичной для репортерного реагента, или включающего специфичную для мишени составляющую и специфичную для репортерного реагента составляющую, которые предварительно связаны с инактивированным репор-

терным реагентом. Таким образом, вместо включения составляющей, специфичной для репортерного реагента, такая составляющая может отсутствовать или быть закрытой (например, заблокированной) от взаимодействия (например, от гибридизации) с репортерным реагентом. Такая тонкая настройка иногда обозначается в данном тексте как "ослабление" сигнала.

Предназначенные для анализа в тестах по настоящему изобретению образцы могут содержать любые из описанных выше мишеней или какие-либо иные мишени. Жидкие образцы, предназначенные для тестирования, могут характеризоваться любым объемом, подходящим для размера тест-участка, варьируясь от примерно 100 нл до примерно 100 мкл. В предпочтительном варианте жидкие капли объемом примерно 1 мкл наносятся в каждую лунку 1536-луночного микротитровального планшета. Образцы могут быть помечены в контакте с наборами зондов с помощью любого из различных методов, пригодных для высокопроизводительного анализа, например, с помощью пипетки, путем распыления через красковые сопла или с помощью использования игольного устройства. Образцы инкубируют в условиях (например, концентрация солей, величина pH, температура, продолжительность инкубации и т.д., см. выше), эффективных с точки зрения достижения связывания или стабильного взаимодействия иного типа между данным зондом и данной мишенью. Эти условия определяемы с помощью стандартных подходов. После инкубации образцы необязательно могут быть обработаны (например, промыты) с целью удаления несвязанной мишени, для чего применяют определяемые эмпирическим путем условия, обеспечивающие сохранение интактным специфичное взаимодействие, но удаление неспецифически связанного материала. Например, образцы могут быть промыты от одного до десяти раз или больше при одинаковых или в некоторой степени более жестких условиях, чем те, которые использовались для достижения связывания в паре "зонд/мишень".

Образцы, содержащие РНК-мишень, например, мРНК, рРНК, тРНК, вирусную РНК или тотальную РНК, могут быть приготовлены с помощью любой из различных процедур. Например, клеточные культуры in vitro, из которых будут экстрагированы мРНК, могут быть высеяны на участках поверхности, таких как отдельные лунки микротитровального планшета. Необязательно эти клетки после достижения желаемой плотности клеток могут быть обработаны интересующим агентом, таким как стимулирующий агент или потенциальный терапевтический агент, который может быть добавлен к клеткам с помощью любого из способов, например, с помощью многоигольного устройства (такого как 96- или 384-игольный распределитель проб Beekman), путем раскапывания пипеткой или нанесения с помощью диспергирования красковыми соплами, с последующей инкубацией этих клеток в течение любого подходящего периода времени, например, от примерно 15 мин до примерно 48 ч, что зависит от типа конкретного теста. Экстракты тотальной РНК, мРНК и т.п. из тканей или клеток из источников in vitro или in vivo могут быть приготовлены с использованием стандартных, известных в данной области техники методов (например, с использованием наборов реактивов, доступных на коммерческой основе).

Необязательно нуклеиновая кислота, которая должна конкурировать с представляющей интерес РНК за гибридизацию со специфичным зондом (т.е. геномная ДНК, рРНК, тРНК или мРНК, которые характеризуются по крайней мере частичной гомологией с интересующей РНК), может быть по крайней мере частично удалена из образца РНК путем предобработки этого образца в методе защиты от действия нуклеаз перед тем, как провести саму гибридизацию.

Нуклеиновая кислота ("защитный фрагмент", который может быть, например, РНК, ДНК или РНП), комплементарная по крайней мере части интересующей РНК и характеризующаяся нуклеотидной последовательностью, частично или полностью перекрывающейся с последовательностью зонда, специфичного в отношении этой интересующей РНК, вносится в избытке в данный образец и инкубируется с ним при выбранных условиях жесткости, которые обеспечивают специфичную гибридизацию с данной интересующей РНК (см. выше обсуждение подходящих условий реакции). На этом этапе защитные фрагменты, специфичные в отношении любых или всех интересующих РНК в составе образца, могут быть добавлены (например, в числе 100 или более). После гибридизации образец обрабатывают одной или смесью нескольких нуклеаз таким образом, чтобы разрушить в существенной степени все нуклеиновые кислоты, за исключением частей каждой из интересующих РНК, комплементарных защитному(ым) фрагменту(ам) или за исключением дуплексов, образованных защитным(ми) фрагментом(ами) и защищенной РНК. На следующем этапе защитный(ые) фрагмент(ы) могут быть удалены из состава этих дуплексов путем денатурирования этих дуплексов и расщепления подходящим ферментом, который обеспечит разрушение защитного(ых) фрагмента(ов), оставляя защищенную РНК в существенной степени интактной. Любая из широкого круга нуклеаз может быть использована для осуществления обсуждавшихся выше этапов расщепления, включая, например, панкреатическую РНКазу, нуклеазу фасоли-маш, РНКазу-H, нуклеазу S1 (в условиях расщепления при высокой или низкой солевой концентрации), РНКазу-A, рибонуклеазу T1, экзонуклеазу III, экзонуклеазу VII, РНКазу CL3, РНКазу PhyM, РНКазу U2 и подобное, что зависит от природы гибридизовавшихся комплексов и природы нежелательных нуклеиновых кислот, содержащихся в данном образце. Условия реакций для этих ферментов хорошо известны в данной области техники и могут быть оптимизированы эмпирическим путем. По необходимости образцы могут быть обработаны с помощью хорошо известных процедур с целью удаления непрогибридизовавшегося материала и/или с целью инактивации или удаления оставшихся ферментов (например, с помощью экстрак-

ции фенолом, преципитации, гель-фильтрации и т.п.). Обработанные образцы затем помещают в контакте с набором зондов. С целью контроля за специфичностью гибридизации и точностью последующего процесса защиты от действия нуклеазы, т.е. за тем, чтобы, как это желаемо, непрогибридизовавшиеся нуклеиновые кислоты были расщеплены, можно сконструировать один или несколько защитных фрагментов так, чтобы они включали выступающие (негибридизующиеся) сегменты, которые бы отщеплялись нуклеазами в случае, если процедура была правильной. Присутствие или отсутствие выступающих сегментов может быть установлено путем гибридизации с комплементарным помеченным детекторным зондом, или же сам по себе "выступ" данного защитного фрагмента может быть помечен с помощью молекулы-детектора.

В связи с любым из способов в соответствии с настоящим изобретением мишени могут быть помечены (маркированы) с помощью любой из процедур, известных в данной области техники и/или описанных в данном тексте (например, для целей детекции фрагментов при защите от действия нуклеазы). Например, молекулы-мишени могут быть соединены напрямую или опосредованно с химическими группами, которые дают детекционный сигнал, такие как хемолюминесцентные молекулы или ферменты, которые катализируют выработку хемолюминесцентных молекул, или флуоресцирующие молекулы, такие как флуоресцеин или Cy5, или зависящие от времени флуоресцентные молекулы, такие как один из хелатирующих металлов-лантанидов, или радиоактивное соединение. С другой стороны, мишени могут быть помечены после того, как они прореагировали с зондом, с помощью одного или нескольких помеченных мишень-специфичных репортеров (например, антител, олигонуклеотидов в соответствии с показанным на фиг. 1 или любых основных типов молекул, обсуждавшихся выше в связи с описанием зондов и мишеней).

Одним типом флюоресцирующей молекулы может быть "позитивно конвертируемый фосфор (люминофор)", т.е. флуоресцентный компонент, который поглощает и возбуждается при большой длине волны (например, в инфракрасном спектре), затем испускает при меньшей длине волны (например, в видимой части спектра). Поскольку позитивно конвертируемый люминофор поглощает при большей длине волны по сравнению с большинством потенциально создающих помехи материалов, присутствующих в образце, анализ которого должен быть проведен, позитивно конвертируемый люминофор обеспечивает снижение помех, обусловливаемых материалом образца по сравнению с люминофором, который поглощает при меньшей длине волны. Узкий спектр испускания большинства позитивно конвертируемых люминофоров также позволяет одновременно выявлять большое число различных позитивно конвертируемых люминофоров. Позитивно конвертируемые люминофоры хорошо известны и являются стандартными в данной области техники и включают, например, ионы редкоземельных металлов, таких как иттербий (Yb), эрбий (Er), тулий (Tm) и празеодим (Pr), в частности, в форме оксисульфидной соли. Было описано по крайней мере 80 или больше независимо выявляемых позитивно конвертируемых люминофоров (см., например, "Biological Agent Detection and Identification", April 27-30, 1999, DARPA, Biological Warfae Defense, Defense Sciences Office).

Необязательно люминофоры могут быть присоединены к любой поверхности, например, к микросфере или шарику из латекса. Как и другие флуоресцентные метки, позитивно конвертируемые люминофоры могут быть выявлены по переносу энергии на метку (или модуляции меткой), находящуюся на существенно близком линкере, мишени или репортере. Более того, как и в случае с другими сигнальными составляющими, описанными в данном тексте, позитивно конвертируемые люминофоры могут быть использованы для анализа количества мишени и могут быть использованы в любой из различных процедур, описанных в данном тексте, например, для выявления защищенных от действия нуклеазы фрагментов.

Понятно, что позитивно конвертируемые люминофоры также могут быть использованы для выявления мишеней, которые распределены по поверхности в любом ином порядке, например, мишеней (включая защищенные от нуклеазы фрагменты), которые связаны непосредственно на поверхности, связаны прямо с набором различных олигонуклеотидов на поверхности или связаны через бифункциональные линкеры с якорями (отличающимися или существенно идентичными), которые распределены на поверхности существенно равномерно или в любом желательном порядке и виде организации. Может быть использована любая поверхность, например, проточная система или твердая поверхность, такая как, например, шарик. Шарики, использованные в любом из тестов по настоящему изобретению, могут быть любого типа, например, изготовленными из любого материала и быть намагниченными и/или ненамагниченными; и шарики, использованные в одном тесте, могут быть существенно одинакового или разного размера и/или формы.

Также может быть применен круг более сложных процедур "сэндвич"-типа. Например, мишень может быть прогибридизована с бифункциональной молекулой, включающей первую составляющую, специфичную в отношении данной мишени, и вторую составляющую, которая может быть распознана с помощью обычного (т.е. такого же) репортерного реагента, например, помеченного полинуклеотида, антитела или подобного. Бифункциональные молекулы могут быть сконструированы таким образом, чтобы любое желаемое число общих репортеров могло быть использовано в каждом тесте.

Для любого из способов по настоящему изобретению с целью мечения мишеней могут быть использованы различные комплексные процедуры детекции "сэндвич"-типа. Например, мишень может взаимодействовать, например гибридизоваться, с бифункциональной (или многофункциональной) молекулой ("детекционным линкером"), включающей первый компонент, который специфичен в отношении мишени, и второй компонент, который специфичен в отношении "репортерного реагента". Термин "специфичен в отношении", используемый в данном тексте по отношению к взаимодействиям, означает, например, зонды и мишени. Термин "репортерный реагент", используемый здесь, обозначает помеченные полинуклеотид, антитело или молекулы любого другого общего типа, обсуждавшиеся в данном тексте в связи с зондами и мишенями. Указанные два компонента в составе детекционного линкера могут распознавать (взаимодействовать или связываться) соответствующие им партнеры по связыванию любым из обсуждавшихся выше путей, которые обсуждались выше в связи, например, с зондами и мишенями. Детекционный линкер также может включать другие последовательности, например, последовательности, которые специфичны в отношении мишени, но отличаются от (не перекрываются с) специфичного для мишени компонента соответствующего якорь-связывающего линкера. Любая последовательность, присутствующая в детекционном линкере, может выполнять роль в качестве распознавательной последовательности для детекционного зонда или репортерного агента. В предпочтительном варианте воплощения детекционный линкером является полинуклеотид.

Детекционные линкеры могут быть сформированы таким образом, что любое желательное количество обычных репортерных реагентов может быть использовано в тесте. Например, набор детекционных линкеров может быть сформирован так, чтобы каждый детекционный линкер был специфичен для отличающейся мишени, но включает сайт связывания для такого же (обычного) или для одного из ограниченного числа репортерных реагентов. Возможность использования ограниченного числа (например, одного) репортерных реагентов для мечения набора мишеней в едином тесте обеспечивает преимущество сниженной стоимости и сниженных величин фона. Ясно, что сочетания детекционного линкера и репортерного реагента могут быть использованы для выявления мишеней, которые распределены любым путем на поверхности, например, в соответствии с описанным выше, для вариантов размещения мишеней, что может быть выявлено с помощью позитивно конвертируемых люминофоров.

В большинстве предпочтительных вариантов воплощения детекционные линкеры могут быть сформированы для выявления защищенных от действия нуклеазы фрагментов таким образом, что защищенные фрагменты, которые были отщеплены нуклеазой от контрольных "выступающих" последовательностей в ходе теста на защиту от действия нуклеазы (в соответствии с описанным, например, в примере 15), предпочтительно помечены. Данный тип процедуры выявления схематически проиллюстрирован на фиг. 24. В данном варианте воплощения детекционный линкер включает первый компонент, который специфичен в отношении мишени, и второй компонент, который специфичен в отношении обычной контрольной выступающей последовательности, которая в предпочтительном варианте присутствует существенно во всех защищенных от нуклеазы фрагментах в начале теста. Если, по необходимости, контрольная выступающая последовательность была отщеплена от защищенного от нуклеазы фрагмента в процессе реакции зашиты от действия нуклеазы, то специфичный по мишени компонент детекционного линкера будет гибридизоваться с отщепленным защищенным фрагментом, в то время как компонент детекционного линкера, специфичный для контрольного "выступа", останется не связанным и будет оставаться доступным для дальнейшей гибридизации. С другой стороны, если последовательность, специфичная в отношении контрольного "выступа", не отщеплена от защищенного фрагмента, например, вследствие неполного нуклеазного расщепления в ходе реакции зашиты от действия нуклеазы, то компоненты детекционного линкера, специфичные в отношении мишени и контрольного "выступа", будут гибридизоваться с защищенным фрагментом и не будут доступны для дальнейшей гибридизации. В предпочтительном варианте комплексы, включающие защищенные от нуклеазы фрагменты и связанные с детекционными линкерами, затем гибридизуются на следующей стадии с репортерным реагентом, который включает сигнальную составляющую (например, флуорохром, гаптен, фермент или любая иная молекула, несущая выявляемый сигнал или генерирующую сигнал составляющую в соответствии с описанным в данном тексте) или компонент (например, олигонуклеотид), который специфичен в отношении компонента детекционного линкера, специфичного в отношении контрольного "выступа". Репортерный ген предпочтительно должен связываться с и помечать те комплексы, в которых контрольная выступающая последовательность защищенного от действия нуклеазы фрагмента был отщеплен (т.е. комплекс, в котором компонент детекционного линкера, специфичный в отношении контрольного "выступа", доступен для дальнейшей гибридизации с репортерным реагентом).

Другие многочисленные процедуры выявления "сэндвич"-типа будут ясны для специалистов в данной области техники.

Методы, с применением которых мишени могут быть проинкубированы с мишень-специфичным(ми) репортером(ами) в условиях, эффективных с точки зрения достижения связывания или стабильного взаимодействия иного типа, определяются стандартным образом (см. выше). Например, флуоресцентные олигонуклеотидные репортеры (в концентрации от примерно 10 нМ до примерно 1 мкМ или больше, предпочтительно примерно 30 нМ, в буфере, таком как буфер 6xSSPE-T или другие) могут

быть проинкубированы со связанными мишенями в течение от примерно 15 мин до примерно 2 ч или дольше (предпочтительно в течение примерно 30-60 мин) при температуре от примерно 15°C до примерно 45°C (предпочтительно примерно при комнатной температуре). После этой инкубации образцы необязательно могут быть обработаны (например, промыты) с целью удаления несвязанных мишень-специфичных репортеров, для чего применяются условия, которые определяют эмпирическим путем с целью сохранения интактными специфических взаимодействий, но с удалением неспецифически связанного материала. Например, образцы могут быть промыты от одного до десяти и более раз в таких же или несколько более жестких условиях по сравнению с теми условиями, которые использовались при достижении связывания в паре "мишень/репортер".

Мечение мишень-специфичным(ми) репортером(ами) может придать дополнительный уровень специфичности исходной реакции гибридизации, например, в случае, когда мишень-специфичный олигонуклеотидный репортер маркируют отличающимся сегментом последовательности нуклеиновой кислоты-мишени по сравнению с олигонуклеотидным зондом или когда зондовое и репортерное антитела распознают отличающиеся эпитопы в составе антигена-мишени. Более того, мечение мишень-специфичными репортерами может позволить "настроить" чувствительность данной реакции. Например, если мРНК-мишень, являющаяся частью коррелятивных параметров экспрессии, экспрессируется на очень низком уровне, то уровень сигнала может быть усилен ("амплификация сигнала") путем гибридизации связанной мишени с несколькими (например, примерно с двумя-пятью или более) мишень-специфичными олигонуклеотидными репортерами, каждый из которых гибридизуется специфическим образом с отличающейся частью мРНК-мишени.

Способность выявлять два типа меток независимо обеспечивает дополнительный путь контроля в MAPS-тестах. Некоторые линкеры (например, от примерно 10% до примерно 100%), сконструированные в отношении конкретного якорного сайта (на фиг. 7 показаны 3 типичных якорных сайта, каждый из которых включает множество существенно идентичных якорей - A, B или C) может включать метку (например, флуорохром), присоединенную к одному концу. Например, родамин или флуорохром Cy5 могут быть присоединены по 5'-концу линкера. Такие модифицированные линкеры обозначаются как "контрольные линкеры". После того, как смесь линкеров и контрольных линкеров будет ассоциирована с якорями и образец, содержащий мишень, будет проинкубирован с полученным в результате набором зондов, может быть использован мишень-специфичный репортер, несущий отличающуюся флуоресцентную метку (например, флуоресцеин или иную выявляемую метку, такую как хемолюминесцентная метка) (или мишень может быть напрямую помечена флуорохромом или другой выявляемой меткой); после этого может быть определено соотношение двух сигналов. Присутствие контрольных линкеров позволяет калибровать число функциональных якорей (например, способных взаимодействовать с линкерами) в пределах и между тест-участками (т.е. определять способность каждого сайта в составе набора связывать мишень, что нужно для стандартизации наблюдаемых сигналов), служит основой для количественного определения содержания связанной мишени, позволяет определять локализацию якорного сайта и/или представляет позитивный контроль, например, в случае, когда отсутствует экспериментальный сигнал ввиду отсутствия мишени в образце. В одном варианте настоящего изобретения две различные метки (например, флуорофоры) также могут быть использованы для детекции двух различных популяций молекул-мишеней; однако, способность распознавать присутствие мишеней по пространственному разделению сигналов позволяет использовать единственный тип метки для различных молекул-мишеней.

Возможность независимого выявления меток (например, флуоресцентные метки, которые испускают при различимых длинах волн, например, флуоресцеин и родамин, или различные позитивно конвертируемые люминофоры) обеспечивает дополнительную гибкость способам по настоящему изобретению. Например, каждая из двоих или большего числа мишеней может быть помечена напрямую или опосредованно своей меткой, выявляемой уникальным путем. Указанное обеспечивает выявление мишеней на основе свойств, специфичных для меток (например, цвет испускания) в дополнение к (или вместо), например, идентификации положения локализованной на поверхности мишени или идентификации мишени по размеру шарика, на котором она находится. В другом варианте воплощения настоящего изобретения множество мишеней может быть выявлено независимо по единственному сайту в пределах участка. Например, две или большее число (например, 2, 3, 4, 5, 6 или больше) мишеней может быть выявлено по сайту, который определяется единственной группой (существенно идентичных) якорей.

Следовательно, может быть использован набор линкеров, каждый из которых включает часть, специфичную в отношении того же самого якоря, плюс часть, специфичную в отношении другой мишени. Если используется набор, например, из четырех линкеров, то все четыре линкера могут быть связаны с членами группы якорей по единственному сайту, что обеспечивает связывание по этому сайту четырех разных мишеней. Если каждая из этих мишеней помечена (напрямую или косвенно) отличающейся различимой меткой, то можно определить присутствие каждой из четырех мишеней в данном сайте независимо. Следовательно, набор, например, из пяти якорей (групп якорей) в участке может быть использован в схеме, описанной выше, для выявления по крайней мере двадцати разных мишеней. Подобный тест проиллюстрирован в примере 24 и на фиг. 25. Сходным образом множество мишеней, например, по

меньшей мере 80 или больше может быть выявлено независимо, когда единственный тип якоря распределен не в единственном сайте, но равномерно или любым иным способом на твердой поверхности, такой как, например, шарик или проточное устройство; и другие аспекты, как размер или распределение шариков, могут быть использованы для предоставления информации об идентичности мишеней или групп мишеней.

В другом варианте воплощения изобретения "якоря", которые специфичны в отношении интересующей мишени(ей), не связаны с линкерами, но вместо этого связаны непосредственно с мишенью(ями); мишень(и), в свою очередь, необязательно могут взаимодействовать с репортером(ами), специфичным(ми) в отношении мишени. Мишени, как помеченные, так и непомеченные, могут быть выявлены с помощью любого из широкого круга методов, которые являются стандартными для данной области техники (см., например, Fodor et al., 1996, патент США № 5510270; Pirrung et al., 1992, патент США № 5143854; Koster, 1997, патент США № 5605798; Hollis et al., 1997, патент США № 5653939; Heller, 1996, патент США № 5565322; Eggers et al., 1997, патент США № 5670322; Lipshutz et al.$_{г}$ 1995, BioTechniques, 19, 442-447; Southern, 1996, Trends Genet., 12, 110-115). Методы детекции включают ферментативную детекцию, колориметрические методы, SPA, авторадиографию, масс-спектрометрию, электрические методы, измерение поглощения или люминесценции (включая хемолюминесценцию или электролюминесценцию) и детекцию рассеяния света, обусловливаемого, например, микроскопическими частицами, используемыми в качестве меток. Также флуоресцентные метки могут быть выявлены, например, путем представления на "пара-зарядном устройстве" (CCD) или с помощью флуоресцентного микроскопа (например, сканирующего или конфокального флуоресцентного микроскопа) или путем присоединения сканирующей установки к прибору CCD или фотоэлектронному умножителю, или с использованием пошаговой технологии детекции (например, может быть определен поверхностный потенциал каждого 10-микронного шага тест-участка или поверхностный плазмонный резонанс может быть применен в случае, если достаточной является его разрешающая способность). С другой стороны, в составе набора может находиться метка (например, элемент пары зондов с переносом энергии между ними, такие как флуоресцеин и родамин), которая может быть выявлена по переносу энергии (или его модуляции) на метку, находящуюся в составе линкера, мишени или репортера. Среди параметров, присущих основанным на флуоресценции детекционным системам, интенсивность флуоресценции, поляризация флуоресценции, флуоресценция в определенный момент времени, флуоресцентный резонанс переноса энергии и высвобождающаяся равномерно по времени флуоресценция. Анализ повторяющихся признаков по типу "штрих-кодов" может быть осуществлен путем распознавания параметров (нахождения подходящей точки или линии для каждой специфически помеченной мишени по ее положению по отношению к другим точкам или линиям) с последующей количественной оценкой интенсивности этих меток. Устройства для считывания штрих-кодов и компьютерные программы для такого анализа в одно- или двухмерном масштабах создаются обычным путем или доступны на коммерческой основе (см., например, Rava et al., 1996, патент США № 5545531).

Методы формирования и использования наборов в соответствии с настоящим изобретением, включая приготовление таких поверхностей или участков, которые описаны в данном тексте, синтеза или очистки и присоединения или сборки таких веществ, как описанные здесь якоря, линкеры, зонды и детекторные зонды, и детекции и анализа помеченных или маркированных веществ в соответствии с описанным в данном тексте, хорошо известны и представлены стандартными методами. В дополнение к методам, описываемым материалами, цитируемыми в настоящей заявке, см., например, патенты, защищенные фирмами Affymax, Affymetrix, Nanogen, Protogene, Spectragen, Millipore и Beckman (от них доступны материалы, применимые в связи с настоящим изобретением), а также стандартные руководства по молекулярной биологии и изучению белков, включая цитировавшиеся выше, и Cozette et al., 1991, патент США № 5063081; Souther, 1996, Curr. Opinion Biotechnol., 7, 85-88; Chee et al., 1996, Science, 274, 610-614; Fodor et al., 1993, Nature, 364, 555-556.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана схема конструирования олигонуклеотидов, в составе которых линкер 1 включает часть, специфичную в отношении якоря 1 и другую часть (зонд), специфичную в отношении мРНК-мишени 1, и в составе которых помеченный детекторный зонд 1 специфичен в отношении последовательности мРНК-мишени 1, которая не совпадает с той последовательностью, в отношении которой специфична мишень-специфичная часть данного линкера.

На фиг. 2 показана поверхность, несущая 15 тест-участков, в каждом из которых находится набор из 6 олигонуклеотидов-якорей.

На фиг. 3 показана конструкция линкера, предназначенного для теста на рецепторное связывание, в котором якорь-специфичная часть линкера ассоциирована с зондовой частью (белком-рецептором) через молекулы биотина и стрептавидина и в котором специфичный в отношении данного рецептора лиганд помечен флуоресцентной молекулой-меткой. B - биотин. SA - стрептавидин. Rec - белок-рецептор. Лиганд - нативный или синтетический лиганд данного рецептора. * -флуоресцентная молекула-метка присоединена к лиганду.

На фиг. 4 показана поверхность, несущая 21 тест-участок, каждый из которых дополнительно разделен на 16 субучастков (углублений, ямок).

На фиг. 5a, 5b и 5c показаны три "слоя" (пластины) , из которых может быть собрана поверхность, показанная на фиг. 4. На фиг. 5a изображен луночный разделитель; на фиг. 5b - подразделитель; а на фиг. 5c - основание.

На фиг. 6 показаны два тест-участка, в каждом из которых находится линейно расположенный набор зондов (или якорей), которые расположены по типу "штрих-кода".

На фиг. 7 схематически показан тест-участок, несущий 3 якоря (A, B и C) , каждый из которых присутствует во множественных копиях ("группа"). Расположение каждой группы якорей определяется термином "сайт".

На фиг. 8 показан набор, в котором на MAPS-планшетах осуществляется тестирование кДНК, полученных с использованием специфической обратной транскриптазы.

На фиг. 9 показан тест, основанный на использовании метода защиты от действия протеаз (ТЕСТ NPA-MAPS). Образец РНК получают из клеток или тканей: он показан в виде тонких волнистых линий. К образцу РНК добавляют группу полинуклеотидных защитных фрагментов, изображенных в виде толстых темных и светлых линий. Темные области защитных фрагментов соответствуют их сегментам, которые комплементарны специфичным РНК-мишеням и гибридизуются с этими мишенями. Светлые области соответствуют выступающим сегментам: последовательностям, продолжающимся комплементарной последовательностью, но не комплементарной мишени. Защитные фрагменты добавляют в избытке. После гибридизации всех доступных мишеней с защитными фрагментами образцы обрабатывают подходящей смесью нуклеаз и подвергают химической обработке с целью разрушения нежелательных непрогибридизовавшейся РНК и непрогибридизовавшегося полинуклеотида. Например, нуклеаза S1 способна разрушить любую присутствующую одноцепочечную ДНК. Следовательно, избыток защитного фрагмента гидролизуется, как и выступающий непрогибридизовавшийся сегмент связанного защитного фрагмента. РНК может быть гидролизована добавлением рибонуклеаз, включая РНКазу-H, или путем нагревания образца в щелочи. Остается лишь собрать отщепленные защитные фрагменты, количество которых отражает то, сколько каждой РНК-мишени присутствовало в данном образце. Остающиеся защитные фрагменты измеряют путем проведения гибридизационного MAPS-теста.

Фиг. 10 иллюстрирует специфичность гибридизации в MAPS-тесте.

Фиг. 11 показывает кинетику связывания якоря и линкера.

Фиг. 12 иллюстрирует MAPS-тест с двумя олигонуклеотидными мишенями.

На фиг. 13 показан количественный анализ сдвига чувствительности.

На фиг. 14 проиллюстрировано определение температуры диссоциации для четырех олигонуклеотидных пар "линкер/якорь".

Фиг. 15 показывает анализ мРНК в тесте NPA-MAPS.

На фиг. 16 показана кривая разведения в тесте NPA-MAPS.

Фиг. 17 иллюстрирует тест, предназначенный для детекции пептидов, включающих остатки фосфотирозина.

На фиг. 18 показан начальный этап теста по картированию маркеров EST: сборку линкеров, соответствующих каждому из EST, которые предполагается картировать, на наборах родственных якорей, находящихся на MAPS-планшете. К поверхности каждой из 16 лунок микропланшета присоединяют линкеры, включающие 16 различных олигонуклеотидных зондов, формируя матрицу 4x4. Первый сайт содержит олигомер 1, комплементарный участку первой нуклеотидной последовательности EST, и так далее для всех 16 предназначенных к тестированию EST.

Во все 16 лунок добавляют кДНК или мРНК, полученные на матрице тех генов, от которых происходят анализируемые EST-маркеры с последующей гибридизацией в подходящих условиях. Следовательно, любая кДНК или мРНК, включающая одну из 16 EST-последовательностей, будет прикреплена к сайту, в котором находился комплементарный ей зонд.

Фиг. 19 показывает следующий этап теста по картированию EST: добавление детекторных олигонуклеотидов на MAPS-планшет. В каждую лунку данного планшета вносят детекторный олигонуклеотид, который соответствует одному из картируемых EST-маркеров. Каждый детекторный олигонуклеотид - это олигонуклеотид, соединенный с молекулой, используемой для детекции - например, с флуоресцеином в случае, когда методом детекции является оценка параметров флуоресценции. Каждый детекторный олигионуклеотид комплементарен одному из EST, но отличается от EST-специфичного зонда таким образом, что комплементарные одному и тому же EST зонд и детекторный олигонуклеотид могут с ним связываться одновременно.

После промывки отдельный детекторный олигонуклеотид добавляют в каждую лунку в соответствии с нумерацией на данной фигуре. Т.е. детекторный олигонуклеотид, последовательность которого комплементарна первому EST, добавляют в первую лунку и так далее.

На фиг. 20a и 20b приведены результаты теста по картированию EST в соответствии с изображенным на фиг. 18 и 19. После гибридизации с детекторными олигонуклеотидами и промывки в подходящих по уровню жесткости условиях 16 лунок микропланшета оценивают, например, с помощью флуоримет-

рического устройства CCD. На фиг. 20a результаты показаны схематически. Ожидается, что каждый EST-специфичный детекторный олигонуклеотид должен пометить мРНК или кДНК, остающуюся в связи с соответствующим EST-специфичным зондом. Например, зонд 5 присоединяет в данном сайте кДНК или мРНК, включающие последовательность EST 5 - т.е. детекторный олигонуклеотид 5 должен также гибридизоваться с кДНК или мРНК в том же сайте. Этот принцип использован в показанных схематических данных, где каждый детекторный олигонуклеотид помечает соответствующий зонд. Кроме того, каждый из первых трех детекторных олигонуклеотидов помечает кДНК или мРНК, удерживаемые первыми тремя зондами: это указывает на то, что данные последовательности находятся в пределах одного и того же гена. Сходным образом последние пять EST, по-видимому, также сцеплены. Оценка сцепления, полученная в этих данных, графически изображена на фиг. 20b.

Фиг. 21 показывает соотношения зондов, детекторных олигонуклеотидов и EST-маркеров №№ 1, 2 и 6, изображенных на фиг. 18-20.

На фиг. 22 проиллюстрирована схема высокопроизводительного теста.

Фиг. 23 иллюстрирует способ приготовления амплифицированной мишени.

На фиг. 24 представлен тест с детекционными линкерами и репортерными агентами.

На фиг. 25 проиллюстрировано использование множественных флуорофоров.

Пример 1. Специфичность при гибридизации (см. фиг. 10).

"Родственный" MAPS-планшет был сформирован с использованием распылителя для красок Pixus (Cartesian Technologies Inc., Irvine, CA) с целью получения идентичной сетки ДНК в каждой лунке микротитровального планшета. Все олигонуклеотиды были приобретены у Biosource International (Camarillo, CA). На данном планшете семь разных олигонуклеотидных якорей были распределены по каждой лунке по схеме, показанной в виде "ключа" (см. слева на фигуре). Каждый олигонуклеотид вносили каплей объемом 10 нл в две точки из раствора 2 мкМ, содержащего 500 мМ фосфата натрия (pH=8,5) и 1 мМ EDTA, в лунки Corning Costaровского планшета для анализа ДНК (DNA-Bind - Corning Costar) и оставляли высыхать. После прикрепления лунки блокировали добавлением 50 мМ Трис (pH=8,0), и затем олигонуклеотиды, которые не прикрепились ковалентно к данной поверхности, смывали с использованием 0,1% SDS в буфере 5xSSP.

К промытому планшету добавляли флуоресцентно помеченные линкерные олигонуклеотиды и оставляли гибридизоваться в буфере 6xSSPE, содержащем 0,1% Тритон X-100, при комнатной температуре на 30 мин. Эта пропись для прикрепления линкеров является предпочтительной. Эти линкерные олигонуклеотиды в процессе синтеза связывали с Cy5, и они были комплементарны 25-нуклеотидным сегментам специфичных олигонуклеотидных якорей. Нуклеотидные последовательности данных семи якорей и линкеров были следующими (показаны в направлении 5' → 3'):

Якорь № 1*: SEQ ID NO 1

TCCACGTGAGGACCGGACGGCGTCC

Линкер**: SEQ ID NO 2

GTCGTTTCCATCTTTGCAGTCATAGGATACTGAGTGGACGCCGTCCGGTCCTCACGT

GGA

РНК-имитатор (C-jun мыши): SEQ ID NO 3

CTATGACTGCAAAGATGGAAACGACGATACTGAGTTGGACCTAACATTCGATCTCAT

TCA

Детекторный олигонуклеотид***: SEQ ID NO 4

TGAATGAGATCGAATGTTAGGTCCA

Якорь № 2*: SEQ ID NO 5

CACTACGGCTGAGCACGTGCGCTGC

Линкер**: SEQ ID NO 6

CTAGGCTGAAGTGTGGCTGGAGTCTGCAGCGCACGTGCTCAGCCGTAGTG

РНК-имитатор (MIP-2 мыши): SEQ ID NO 7

AGACTCCAGCCACACTTCAGCCTAGGATACTGAGTCTGAACAAAGGCAAGGCTAACT
GAC

Детекторный олигонуклеотид***: SEQ ID NO 8

GTCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTCAG

Якорь № 3*: SEQ ID NO 9

GTCAGTTAGCCTTGCCTTTGTTCAG

Линкер**: SEQ ID NO 10

ACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGGGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG

РНК-имитатор (GAPDH мыши): SEQ ID NO 11

CCTTCATTGACCTCAACTACATGGTGATACTGAGTGGAGAAACCTGCCAAGTATGAT
GAC

Детекторный олигонуклеотид***: SEQ ID NO 12

GTCATCATACTTGGCAGGTTTCTCC

Якорь № 4*: SEQ ID NO 13

GAACCGCTCGCGTGTTCTACAGCCA

Линкер**: SEQ ID NO 14

CTACCGAGCAAACTGGAAATGAAATTGGCTGTAGAACACGCGAGCGGTTC

РНК-имитатор (белок L32 мыши): SEQ ID NO 15

ATTTCATTTCCAGTTTGCTCGGTAGGATACTGAGTGAGTCACCAATCCCAACGCCAG
GCT

Детекторный олигонуклеотид***: SEQ ID NO 16

AGCCTGGCGTTGGGATTGGTGACTC

Якорь № 5*: SEQ ID NO 17

CTCGTTCCGCGTCCGTGGCTGCCAG

Линкер**: SEQ ID NO 18

CTGGCAGCCACGGACGCGGAACGAG

Якорь № 6*: SEQ ID NO 19

CGGTCGGCATGGTACCACAGTCCGC

Линкер**: SEQ ID NO 20

GCGGACTGTGGTACCATGCCGACCG

Якорь № 7*: SEQ ID NO 21

GCGCGCCGCGTTATGCATCTCTTCG

Линкер**: SEQ ID NO 22

CGAAGAGATGCATAACGCGGCGCCG

* - Якоря были синтезированы со спейсером С12 и амидом с 5'-конца;
** - Линкеры были синтезированы с присоединенным по 5'-концу флуорохромом Cy5;
*** - Детекторные олигонуклеотиды были синтезированы с присоединенным по 5'-концу биотином.

К каждой лунке добавляли либо один линкер, либо смесь линкеров (в соответствии с отмеченным на фигуре). (Смесь всех семи линкеров добавляли в лунку, помеченную на фиг. как "все"). После инкубации и трехкратной промывки в буфере 5xSSP картина флуоресценции, показанная на фигуре справа, была получена с помощью сканера Tundra (IRI, St. Catherines, Ontario). Как можно видеть, линкеры претерпевали самосборку на данной поверхности в зависимости от специфичности связи с комплементарными им якорями.

Данный процесс был полностью воспроизведен, за исключением того, что восемь разных якорей были размещены в каждой лунке и после этого отмечено предпочтительное ассоциирование линкеров с ними. Полный процесс был повторен для вариантов с 36, 64 и т.д. якорями, размещаемыми в каждой из лунок 24-, 96-, 384-, 864- или 1536-луночных планшетов.

Пример 2. Кинетика связывания (см. фиг. 11).

Темп гибридизации Cy5-производного линкера номер 1 со своим комплементарным якорем показан для различных концентраций линкера. "Родственный" MAPS-планшет приготавливали в соответствии с изображенным на фиг. 1, за исключением того, что якорь 1 был нанесен в 4 точках каждой лунки. Инкубацию проводили при комнатной температуре в буфере 5x SSP с добавлением 0,1% Твин-20, лунки промывали трижды буфером 5x SSP и измеряли связанную флуоресценцию. Картину флуоресценции планшета считывали с помощью Tundra, вычитали величину фона и интегральную интенсивность каждой точки в каждой лунке подсчитывали с помощью программы, прилагающейся к сканеру Tundra. На график наносили средние величины и стандартные отклонения для признака интегральной интенсивности для четырех точек в пределах каждой из двух дупликатных лунок.

Пример 3. Флуоресцирующий линкер.

"Родственный" MAPS-планшет формировали путем раскапывания якорного олигонуклеотида в 1 точку в каждой лунке (верхние два ряда), в 4 точки в каждой лунке (следующие 4 ряда) или в 16 точек в каждой лунке (нижние два ряда) в соответствии с обсуждавшимися выше способами. К каждой лунке присоединяли комплементарный, флуоресцентно помеченный линкер с использованием предпочтительного протокола, описанного в примере 1. После промывки картину флуоресценции данного планшета считывали с помощью сканера Tundra. Величина флуоресценции в каждой точке указывала на то, сколько функционального линкера способно гибридизоваться с мишенью. Количественные параметры сигналов на одинаковых точках характеризовались высоким уровнем воспроизводимости.

Пример 4. Кривые связывания.

Различные концентрации олигонуклеотида-мишени добавляли к планшету, сформированному в соответствии с описанным в примере 3. Ассоциировавшийся линкер включает 25-нуклеотидную последовательность, комплементарную части данной мишени. Мишень добавляют в буфере 5x SSC, содержащем 0,05% SDS, при общем объеме либо 30, либо 100 мкл, планшет закрывали и инкубировали при 50°C в течение ночи. После гибридизации мишени с линкером эту мишень визуализовали, используя хемолюминесценцию в качестве предпочтительного протокола. Биотинилированный детекторный олигонуклеотид, включающий 25-нуклеотидную последовательность, комплементарную отличающейся части данной мишени (т.е. не той же самой части, которая комплементарна данному линкеру), добавляют в концентрации 30 нМ. Биотинилированный детектор может быть добавлен на 30 мин после смывания избытка неприсоединившейся мишени или он может быть добавлен вместе с мишенью в ходе ночного этапа гибридизации. После присоединения детектора данную поверхность дважды промывают буфером 5x SSC, один раз буфером 1x SSP, содержащем 0,1% Твин-20 и 1% полиэтиленгликоля (SSPTP) и разведение 1/50000 250 мкг/мл пероксидазы хрена, соединенной со стрептавидином (Pierce, Rockford, IL) , добавляют на 5 ч в буфере SSPTP при комнатной температуре. Лунки промывают 4 раза буфером SSPTP, промывают 1 раз и затем инкубируют с реагентом Super Signal Ultra (Pierce). Через несколько минут картины люминесценции анализируют на сканере Tundra, например, такая картина может быть получена с помощью установки CCD в течение 5 мин. Низкие уровни мишени могут быть визуализованы в некоторых лунках при концентрации мишени вплоть до примерно $5x10^{-13}$ М; количество сигнала в принципе становится насыщенным при концентрации мишени примерно 10^{-10} М. Количество сигнала, выявляемого в одинаковых точках, характеризуется высоким уровнем воспроизводимости.

Пример 5. Тест для двух олигонуклеотидов (см. фиг. 12).

Показана кривая связывания, отражающая параметры гибридизационного MAPS-теста, использующего обсуждавшийся выше предпочтительный протокол в отношении двух разных олигонуклеотидов-мишеней. "Родственный" MAPS-планшет был сформирован с четырьмя разными якорными олигонуклеотидами, каждый из которых раскапывали по 4 раза в каждую лунку. Для второго и четвертого якоря комплементарные линкерные олигонуклеотиды проявляли "самособираемость" на данной поверхности в соответствии с описанным. Две мишени добавляли в концентрациях 40 мкл к каждой лунке в соответствии с описанным и инкубировали при 50°C в течение ночи. Количество каждой присоединившейся мишени визуализовывали путем присоединения биотинилированного детекторного олигонуклеотида, специфичного в отношении каждой мишени, с последующим выявлением с помощью пероксидазы хрена со стрептавидином и хемолюминесценции, как было выше описано. На нижней панели показана количественная оценка интенсивности изображения. Компьютерная программа входит в пакет, прила-

гающийся к сканеру Tundra: он был использован для сканирования интенсивности изображений вдоль линий между рядами, показанными на верхней панели. При наименьшей концентрации мишени (1,1 пкМ) сканированные изображения демонстрируют отчетливые гауссовы пики для каждой точки, в то время как отсутствуют отчетливые фоновые пики, видимые в самом левом образце при концентрации мишени, равной 0.

Пример 6. Сдвиг чувствительности (см. фиг. 13).

Гибридизационный MAPS-тест может быть использован для определения концентрации набора нуклеотидов по параметрам их связывания на поверхности и их мечения. Этот тест эффективен в отношении тех олигонуклеотидов, которые находятся в относительно средней или низкой концентрации. Два образца можно различить в этом случае с учетом того, что чем больше один из образцов содержит олигонуклеотида, тем сильнее он будет связываться. С другой стороны, если концентрация олигонуклеотида-мишени является для данной поверхности насыщающей (т.е. если его достаточно для занятия всех сайтов связывания), т.е. концентрация превышает ту, которая может быть далее связана, то такое количество не может быть измерено. Однако кривая связывания мишени может быть сдвинута добавлением непомеченного конкурирующего лиганда.

Данные по связыванию получают для четырех различных олигонуклеотидных мишеней - все они насыщают данную поверхность (т.е. обеспечивают максимальное связывание) при грубо оцениваемой концентрации 3 нМ. Путем добавления непомеченных конкурентных мишеней во все лунки уровень связывания помеченного олигонуклеотида сдвигается таким образом, что его связывается меньше при меньшей концентрации, а уровень, при котором происходит насыщение, сдвигается. Можно добавить конкурентные олигонуклеотиды, скажем, к мишеням 1 и 3, но не к мишеням 2 и 4. Этот "сдвиг чувствительности" теста произойдет только для мишеней 1 и 3. В этом случае олигонуклеотидные мишени могут быть протестированы в широком диапазоне концентраций в пределах одной тест-лунки, если ожидаемое относительно количество олигонуклеотида известно.

Данные могут быть оценены количественно в соответствии с приведенными выше объяснениями для связывания олигонуклеотидных мишеней. На фиг. 13 показана количественная оценка того, что включение конкурентного олигонуклеотида в данном тесте сдвигает кривую связывания, используемую в этом тесте для данной мишени, находящейся в высоких концентрациях.

Пример 7. Температура диссоциации для четырех зондов (см. фиг. 14).

Количество четырех различных флуоресцентно помеченных линкерных олигонуклеотидов, специфически гибридизующихся с якорными олигонуклеотидами в MAPS-тесте, наносят на график в виде величины повышения температуры. Эти четыре олигонуклеотида впервые способны гибридизоваться при 50°C в течение 1 ч в концентрации 300 нМ. После этого лунки промывали буфером SSC в отсутствии зондов и количество связанного материала измеряли в соответствии с описанным выше по уровню флуоресценции (точка 50°C) . Затем эту поверхность инкубировали при 55°C в течение получаса и измеряли связанную флуоресценцию, и так далее для всех приведенных температур.

Пример 8. Методы детекции.

Два метода детекции могут быть подвергнуты прямому сравнению. На MAPS-планшет с четырьмя присоединенными якорными олигонуклеотидами (каждый из них - в 4 точках в каждой лунке) добавляют по два олигонуклеотида в каждую лунку, при том, что оба они включают ковалентно присоединенную составляющую Cy5 или оба они включают группу биотина. Измерение поверхностной флуоресценции осуществляют в соответствии с тем, что было описано в связи с визуализацией и измерением флуоресценции линкера. Измерение хемолюминесценции осуществляют в соответствии с описанным для MAPS-теста с использованием последовательного добавления пероксидазы хрена со стрептавидином и хемолюминесцирующего вещества. Индуцированные сигналы по грубой оценке имеют одинаковый масштаб. Однако в связи с геометрией микропланшетов, имеющих стенки, разделяющие отдельные лунки, и с наличием случайных пузырьков жидкости или мениска на поверхности жидкости, обусловливающих отражение в поверхностных флуоресцентных изображениях, на интерпретацию получаемых данных может влиять интерференция.

Пример 9. Хемолюминесцирующие продукты.

Два продукта, пригодные в качестве хемолюминесцирующих субстратов для пероксидазы хрена, могут быть подвергнуты сравнению с точки зрения детекционных процедур, включаемых в MAPS-тест. MAPS-планшет формируют так, как это было описано в примере 8, и инкубируют с биотинилированными линкерными олигонуклеотидами. Затем добавляют либо соединенную со стрептавидином щелочную фосфатазу, либо пероксидазу хрена со стрептавидином с последующей промывкой и добавлением реактивов либо CDP-Star (Tropix) к лункам с щелочной фосфатазой, либо ECL-Plus к лункам с пероксидазой хрена. Мечение стрептавидином производных ферментов и субстратов осуществляется в соответствии с рекомендациями производителя, данными в связи с их применением для мечения Вестерн-блотов. Эти два субстрата (равно как и другие доступные субстраты) могут быть использованы для оценки гибридизации олигонуклеотидов на MAPS-планшетов.

Пример 10. Разрешение на уровне 0,6 мм.

Разрешающую способность используемой для MAPS-теста системы исследовали путем формирования MAPS-планшета с четырьмя разными олигонуклеотидными якорями в каждой лунке, при том, что каждый из них раскапывали в каждой лунке по 4 раза, при интервале, или шаге (расстояние от центра до центра) в 0,6 мм. Затем либо Cy5-производные линкеры, либо биотинилированные линкеры гибридизовались, детектировали и сканировали так, как это было описано выше. При измерении поверхностной флуоресценции разрешающая способность была выше (и интервал может быть, по-видимому, снижен). При детекции с помощью хемолюминесценции соседние точки полностью не разделены, но даже при таком расстоянии отдельные пики могут быть недвусмысленно идентифицированы с помощью компьютерного представления.

Пример 11. Протокол теста на защиту от действия нуклеаз.

В тесте на определение оптимальных условий гибридизации и обработки нуклеазами для протокола метода защиты от нуклеаз используют набор для этого теста Nuclease Protection Assay kit фирмы Ambion (Austin, TX) с целью определения условий, буферов и ферментов. Восемь образцов приготавливают в одном из трех буферов. Hyb-Buff 1 - 100%-ный гибридизационный буфер (Ambion); Hyb-Buff 2 - 75%-ный гибридизационный буфер + 25%-ный гибридизационно-дилюционный буфер (Ambion); и Hyb-Buff 3 - по 50% каждого из них. Синтезировали 70-мерный олигонуклеотид, включающий 60 нуклеотидов, комплементарных тестируемой мРНК (Biosource Intern., Camarillo, CA): его помечали псорален-флуоресцеином (Schleicher & Schuell, Keene, NH) в соответствии с прописью, рекомендуемой фирмой Ambion для мечения псорален-биотином. Вкратце, защитный фрагмент разводят до 50 мкг/мл в 20 мкл буфера TE (10 мМ Трис, 1 мМ EDTA - pH=8) , кипятят в течение 10 мин и быстро охлаждают на смеси воды и льда. Добавляют 4 мкл 130 мкг/мл псорален-флуоресцеина в DMF и в течение 45 мин при 40°C образец облучают ручной длинноволновой ультрафиолетовой лампой. Несвязавшийся псорален-флуоресцеин удаляют путем экстрагирования насыщенным бутанолом. Используемая в тесте мРНК является антисмысловой мРНК гена GAPDH, приготовленной из антисмысловой плазмиды (pTRI-GAPDH-Mouse antisense Control Template - Ambion) с использованием промотора T7 и реактивов MaxiScript kit (Ambion). Короткий защитный фрагмент - это 60-нуклеотидный комплементарный сегмент, синтезированный отдельно и сходным образом помеченный. Нуклеотидные последовательности защитных фрагментов следующие:

Полноразмерный защитный фрагмент: SEQ ID NO 23

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGC
TTGCTTGTCTAA

Короткий защитный фрагмент: SEQ ID NO 24

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTT

Гибридизацию осуществляют путем смешивания защитных фрагментов в концентрации 20 нМ и мРНК GAPDH в концентрации 60 нМ при конечном объеме 10 мкл в течение 2 ч при 22°C или при 37°C. После гибридизации 200 мкл смеси нуклеаз добавляют в соответствии с инструкциями производителя (Ambion Nuclease Protection kit: разведение смеси нуклеаз - 1:200) и инкубируют снова при тех же температурах в течение получаса. Гидролиз останавливали с помощью гибридизационно-ингибирующего буфера (Ambion) и олигонуклеотиды пеллетировали и промывали этанолом. Добавляли 10 мкл буфера 1xGel Loading (Ambion) и олигонуклеотиды разделяли в 15%-ном TBE-мочевинном геле. Гель вращали в специальном буфере в течение 30 мин, помещали на пластиковый планшет и анализировали сканером Tundra с использованием фильтров для флуоресцеина, позволяющих разделять длины волн возбуждения и эмиссии. Изображение накапливали на устройстве CCD в течение 2 мин. Наилучшими условиями были те, когда образцы инкубировали в буфере Hyb-Buff 2 при 37°C или в буфере Hyb-Buff 3 при 22°C. В этих образцах не выявлено сохранения полноразмерных защитных фрагментов, но выявляется существенное количество части полноразмерного защитного фрагмента, размер которого практически таков же, что и у короткого защитного фрагмента.

Пример 12. Тестирование мРНК с помощью NPA-MAPS (см. фиг. 15).

Был использован протокол полного теста NPA-MAPS, условия гибридизации и обработка нуклеазами были сходными с таковыми, которые описаны в примере 11. Для проведения теста использовали десять образцов. Во всех них содержалось одинаковое количество 70-мерного олигонуклеотидного защитного фрагмента и различные количества мРНК GAPDH. Гибридизационные образцы в объеме 10 мкл в 50%-ном гибридизационном буфере + 50%-ном дилюционном буфере, содержащих 0,08 мг/мл дрожжевой РНК (Ambion), нагревали до 90°C на 6 мин, быстро центрифугировали, нагревали до 70°C на 5 мин и оставляли охлаждаться до 19°C и инкубировали в течение 19 ч. Затем к каждому образцу добавляли 200 мкл смеси нуклеаз на 30 мин при 19°C. От каждого образца отбирали аликвоты по 60 мкл для проведения MAPS-теста. Добавляли 2 мкл 10н. NaOH и 2 мкл 0,5 М EDTA и образец нагревали до 90°C на 15 мин, до 37°C на 15 мин и оставляли при комнатной температуре на 20 мин. Затем образцы нейтрализовали с использованием 2 мкл 10 М HCl и 12 мкл буфера 20xSSC, содержащего 2 М HEPES (pH=7,5) и 200 нМ биотинилированного детекторного олигонуклеотида, специфичного в отношении данного защитного фрагмента, добавляли наряду с 1 мкл 10% SDS. Образцы смешивали, нагревали до 80°C на 5 мин и две аликвоты по 35 мкл от каждого образца раскапывали в две лунки MAPS-планшета (каждый образец разделя-

ли надвое и анализировали в двух повторностях на MAPS-планшете). Этот планшет формировали в соответствии со стандартным MAPS-протоколом, в котором проходит самосборка Cy5-производного линкера, специфичного в отношении защитного фрагмента, который уже присоединен. MAPS-планшет закрывали и инкубировали при 50°C в течение ночи и проводили детекцию и люминесценцию в соответствии с описанным. В последнем образце нуклеазы не добавляли в ходе теста: его использовали в качестве контрольного для визуализации того, как сам по себе защитный фрагмент будет выявляться в MAPS-тесте. В нижней части фигуры показан скан уровней интенсивности (результаты анализа на сканере) верхнего ряда лунок. Количество мРНК GAPDH, содержащегося в образце (а, следовательно, и количество в каждой из дупликатных лунок после разделения на аликвоты с нанесением их на MAPS-планшет), приведено на данной фигуре.

Олигонуклеотиды, использовавшиеся для MAPS-планшетов, были следующими:

Якорь*: SEQ ID NO 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

Линкер**: SEQ ID NO 26

CTTGAGTGAGTTGTCATATTTCTCGGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG

Защитный фрагмент (комплементарный антисмысловой мРНК GAPDH мыши) SEQ ID NO 27

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTG CTTGCTTGTCTAA

Детекторный олигонуклеотид***, помеченный по 5'-концу биотином SEQ ID NO 28

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCAT

* - Якоря были синтезированы со спейсером C12 и амидом с 5'-конца;

** - Линкеры были синтезированы с присоединенным по 5'-концу флуорохромом Cy5;

*** - Детекторные олигонуклеотиды были синтезированы с присоединенным по 5'-концу биотином.

Пример 13. Кривая разведения в тесте NPA-MAPS (см. фиг. 16).

Данные, обсуждавшиеся в примере 12 и показанные на фиг. 15, были подвергнуты количественному анализу и нанесены на кривую разведения. Для каждой концентрации мРНК были построены графики по средним величинам и стандартным отклонениям для всех восьми точек в лунках, соответствующих двум повторностям. Кривая связывания была проведена в форме:

[Связанная фракция] = [максимальное связывание]*1/(1 + $ИК_{50}$/л),

где [максимальное связывание] соответствует максимальному уровню связывания при насыщении, [связанная фракция] - это количество, связанное при концентрации лиганда [л], а $ИК_{50}$ - это концентрация лиганда, при которой [связанная фракция] составляет 50% от [максимального связывания]. Кривая показана в виде черных точек на данной фигуре, составленной по величинам наилучшего соответствия $ИК_{50}$ = 4,2 фемтомолей в соответствии с помеченным на данной фигуре.

Пример 14. Тест NPA-MAPS мРНК GAPDH в общем экстракте РНК печени мыши.

Экстракт тотальной мышиной РНК тестируют на присутствие мРНК гена GAPDH в тесте NPA-MAPS и выводят кривую разведения. Тотальную РНК мышиной печени приготавливают с помощью набора реактивов Qiagen. РНК осаждают в 70% этаноле, содержащем 0,5 М Mg-ацетата и ресуспендируют в 10 мкл буфере 5x SSC, содержащем 0,05% SDS и 1,8 нМ защитного фрагмента. Защитный фрагмент добавляют в виде 70-мерного олигонуклеотида, при том, что 60 нуклеотидов комплементарны последовательности GAPDH мыши.

Используют либо фрагмент, комплементарный мРНК GAPDH мыши ("защитный фрагмент"), либо комплемент последовательности, являющийся негативным контролем ("антисмысловой фрагмент").

Образцы РНК с защитными фрагментами нагревают до 90°C на 5 мин и гибридизацию осуществляют путем перемещения образцов в 70°C и оставления медленно охлаждаться до комнатной температуры в течение ночи. Нуклеазу S1 (Promega) в разведении 1:10 добавляют в количестве 30 мкл в нуклеазном буфере 1x S1 (Promega) на 30 мин при 19°C и реакцию останавливают добавлением 1,6 мкл 10 н. NaOH и 2,7 мкл 0,5 М EDTA. Образцы нагревают до 90°C на 15 мин и затем до 37°C на 15 мин с целью денатурации и разрушения РНК, нейтрализуют 1,6 мкл 10 М HCl и инкубируют на MAPS-планшетах в течение ночи в буфере 5x SSC, содержащем 0,05% SDS, с добавлением 200 мМ HEPES (pH=7,5), к чему добавляют 30 нМ биотинилированного детекторного олигонуклеотида. Промывку и визуализацию с использованием пероксидазы хрена со стрептавидином осуществляют в соответствии с описанным. Количество сигнала снижается параллельно уменьшению количества мышиной РНК (образцы включают 500, 170, 50, 5 или 0,5 мкг тотальной мышиной РНК). Включают два контрольных образца, к которым добавляют нуклеазу S1. Сигнал был визуализован только для комплементарного защитного фрагмента.

Использовавшиеся олигонуклеотиды:

Для антисмыслового контроля (те же олигонуклеотиды, что и в примере 12):

Якорь*: SEQ ID NO 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

Линкер**: SEQ ID NO 26

CTTGAGTGAGTTGTCATATTTCTCGGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCGGCG

Защитный фрагмент (комплементарный мышиной антисмысловой мРНК гена GAPDH): SEQ ID NO 27

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTG CTTGCTTGTCTAA

Детекторный олигонуклеотид***: SEQ ID NO 28

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCAT

Для образцов смысловой мРНК GAPDH:

Якорь*: SEQ ID NO 25

CGCCGGTCGAGCGTTGTGGGAGCGC

Линкер**: SEQ ID NO 29

ATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTGATACTGAGTGCGCTCCCACAACGCTCGACCG GCG

Защитный фрагмент (комплементарный мышиной мРНК гена GAPDH): SEQ ID NO 30

AAGCAGTTGGTGGTGCAGGATGCATTGCTGACAATCTTGAGTGAGTTGTCATATTTC TCGGCTTGTCTAA

Детекторный олигонуклеотид***: SEQ ID NO 31

CGAGAAATATGACAACTCACTCAAG

* - Якоря были синтезированы со спейсером С 12 и амидом с 5'-конца;

** - Линкеры были синтезированы с присоединенным по 5'-концу флуорохромом Cy5;

*** - Зонды были синтезированы с присоединенным по 5'-концу биотином.

Пример 15. MRPS-тест на защиту от нуклеаз с контролями.

Пулы мРНК экстрагируют из печени мышей и тест на защиту от действия нуклеаз проводят в принципиальном соответствии с описанным в примере 14, за исключением того, что специфичные в отношении GAPDH защитные фрагменты включают 60 нуклеотидов, комплементарные гену GAPDH мыши и далее 15 "выступающих" нуклеотидов по 3'-концу этого фрагмента, которые некомплементарны данной мишени. После гибридизации и обработки нуклеазами остаток защитного фрагмента гибридизуются на MAPS-планшете в соответствии с описанным в примере 14, за исключением того, что два разных детекторных олигонуклеотидных фрагмента используются для детекции иммобилизованного защитного фрагмента. Один из детекторных фрагментов комплементарен GAPDH-специфичной части данного защитного фрагмента, а другой, являющийся контролем, комплементарен 15-нуклеотидному выступающему сегменту в составе данного защитного фрагмента. Каждый из детекторных фрагментов используется на разных повторных образцах (т.е. на разных лунках), поэтому оба детекторных фрагмента могут быть помечены с использованием одной и той же детекторной молекулы. В данном примере оба фрагмента помечали пероксидазой хрена. Без добавления нуклеазы выявлялись сигналы на обоих детекторных фрагментах; напротив, в случае когда обработка нуклеазой имела место, сигнал выявлялся только в варианте соответствия GAPDH. Количество GAPDH-специфичного сигнала снижается относительно того, что наблюдается в отсутствие обработки нуклеазой, потому что защитный фрагмент добавляют в избытке по отношению к количеству содержащейся мРНК гена GAPDH. Это позволяет ограничивать количество мРНК GAPDH в реакции гибридизации с защитным фрагментом, поскольку количество образующегося двухцепочечного гибрида (и, следовательно, количество защитного фрагмента, защищенного от действия нуклеазы) отражает количество данной мРНК. Когда в реакционной смеси мРНК отсутствует, при добавлении нуклеаз никакие сигналы не обнаруживаются. Приведенные выше данные показывают, что этапы гибридизации и обработки нуклеазой имеют место, когда это является желательным.

Когда защитные фрагменты, соответствующие различным мишеням, включаются в данный тест, то каждый из защитных фрагментов может включать тот же 15-нуклеотидный "выступающий" сегмент. Это позволяет использовать один и тот же детекторный фрагмент для тестирования остающегося "выступа" во всех образцах.

Пример 16. Транскрипционный скрининг-тест для соединений, которые могут изменять экспрессию генов, являющихся коррелятивными для заболевания.

Используют клеточную линию, производную от опухоли человека. Установлена экспрессия 30 генов, проявлявшаяся на более высоком уровне, чем в нормальных клетках. (Следовательно, эти 30 генов более интенсивно используются этими клетками по сравнению с нормальными клетками в связи с синтезом мРНК и, соответственно, с выработкой белка, который кодируется этими генами. Транскрипционный тест призван измерить количество используемых таким образом генов путем измерения того, как много мРНК для каждого гена присутствует в образце). С использованием теста на защиту от действия нуклеаз на MAPS-планшетах (NPA-MAPS) 8800 химических соединений тестируют с целью определения того, может ли при росте этих клеток в присутствии данных соединений снижаться экспрессия некоторых их этих 30 коррелятивных генов без подавления экспрессии шести "нормальных" генов ("конститутивных генов", "генов домашнего хозяйства"). Любое из соединений, проявляющее искомый эффект, может быть использовано в будущем при разработке новых лекарственных средств, предназначенных, для лечения данного типа опухоли.

Примерно от 10 до 100 тысяч клеток добавляют в каждую лунку ста 96-луночных полистироловых планшетах и клетки культивировали в течение 2 дней до тех пор, пока они не покрывали поверхность

каждой лунки. Для 8 лунок на каждом планшете клетки оставляли расти без каких-либо добавок. К остальным 88 лункам каждого планшета добавляли различные химические соединения таким образом, чтобы мог быть протестирован эффект одного отдельного соединения. При одновременном использовании 100 планшетов могут быть протестированы или подвергнуты скринингу 8800 соединений. Клетки культивируют в течение 24 ч в присутствии данных соединений и затем эти клетки собирают для проведения собственно теста. Клетки на каждом планшете обрабатывают в соответствии с инструкциями по приготовлению пулов РНК в образцах с 96-луночных планшетов (например, в соответствии с описанием к набору реактивов RNeasy 96 kit фирмы Qiagen). После приготовления пула РНК каждую из 36 мРНК определяют количественно с помощью теста NPA-MAPS: они включают транскрипты 30 коррелятивных генов и 6 "нормальных" генов ("домашнего хозяйства"). К каждой лунке добавляют 36 олигонуклеотидных защитных ДНК-фрагментов, каждый из которых соответствует одному или нескольким анализируемым генам, и оставляют гибридизоваться в выбранных условиях жесткости с соответствующими им последовательностями мРНК-мишеней. Затем нуклеазу S1 добавляли с целью разрушения избытка непрогибридизовавшейся ДНК и образцы обрабатывали химически с целью такого же разрушения РНК. Остаток является олигонуклеотидным защитным фрагментом для каждого из 36 генов, который пропорционален количеству мРНК, которое присутствует в обработанных клетках каждого образца.

Сотню 96-луночных планшетов, каждый из которых несет набор из 36 различных якорных олигонуклеотидов в каждой лунке, готовили добавлением в каждую лунку 36 различных линкерных олигонуклеотидов. Эти линкеры "самособираются" на поверхности каждой лунки, конвертируя тем самым "родственные" планшеты в MAPS-планшеты, включающие зонды, специфичные в отношении каждого из 36 олигонуклеотидных защитных фрагментов. Каждый линкер включает часть, специфичную с отношении одного из 36 якорей, и часть, специфичную в отношении сегмента одного из 36 защитных олигонуклеотидов. Образец олигонуклеотидов из каждой лунки из 100 планшетов с образцами добавляют к соответствующей лунке 100 MAPS-планшетов. После гибридизации в выбранных условиях уровня жесткости детекторный олигонуклеотид для каждой мишени с присоединенным хемолюминесцирующим ферментом добавляют таким образом, что каждая специфичная точка каждой лунки светится пропорционально тому, сколько мРНК присутствует в данном образце. Представляют интерес любые лунки, которые проявляют сниженные количества коррелятивных генов без отсутствие эффекта в отношении 6 генов "домашнего хозяйства". Соединения, которые были добавлены к клеткам данных образцов, являются вероятными начальными "точками" для разработки противоопухолевых лекарств.

Пример 17. Индуцибельная и конститутивная экспрессия генов.

РНК готовили по сути так же, как это описано в примере 14, на материале печени мышей, либо не инфицировавшихся ("контроль"), либо через 1 ч после инъекции ("инфицированные") аденовирусом. В каждом образце использовали по 60 мкг печеночной РНК, и эти образцы готовили в двух повторностях. Каждая тест-лунка включала по три набора дуплицированных сайтов, соответствующих описанным выше трем генам. Каждый сайт включал якорь, связанный с линкером, включающим зонд, который был комплементарен защитному фрагменту, соответствующему одному из этих трех генов. MAPS-тест с защитой от нуклеазы осуществляли существенно так же, как это показано на фиг. 12, и изображения получали и сканировали в соответствии с описанным. Показаны параметры необработанных изображений и данные сканирования интенсивности для дупликатных лунок для каждой из трех мРНК-мишеней. Номера над линиями сканирования соответствуют интегральным значениям интенсивности и стандартным отклонениям для каждого условия (n=4). Как ожидается, изменения не затрагивают ген "домашнего хозяйства", коим является ген GAPDH, для которого установлено 1,3-кратное увеличение в инфицированном образце, что не является статистически достоверным. Транскрипция генов MIP-2 и c-jun усиливалась в 4 и 6 раз, соответственно. Эти данные указывают на то, что эти два гена - а именно MIP-2 и c-jun - проявляют усиленную экспрессию в ответ на аденовирусную инфекцию по сравнению с контролем, которым является экспрессируемый по конститутивному типу ген GAPDH.

Пример 18. Ферментный скрининг-тест для соединений, которые избирательно подавляют тирозиновые или сериновые киназы (см. фиг. 17).

Киназами являются ферменты, которые катализируют присоединение фосфатных групп к белкам. Для многих киназ была установлена стимуляция нормального и опухолевого роста клеток. Следовательно, соединения, которые бы подавляли активность отдельных киназ (но не всех киназ), могут быть использованы для тестирования того, вовлечены ли киназы в патогенез, а если это так, - то служить исходным материалом для создания новых лекарственных средств. Например, пять тирозинкиназ, которые участвуют в стимуляции роста клеток или в регуляции воспалительного ответа, - это киназы src, lck, fyn, Zap70 и yes. Для каждой из киназ характерны субстраты, которые отчасти уже идентифицированы как короткие пептиды, включающие тирозин. Некоторые из специфичностей этих киназ перекрываются, поэтому разные киназы могут фосфорилировать некоторые пептиды в равной степени, но другие - предпочтительно. Для этих пяти киназ 36 пептидных субстратов были выбраны так, чтобы продемонстрировать полный спектр их специфичных и перекрывающихся специфичностей.

Использовали сотню 96-луночных планшетов: каждая лунка на них включает 36 родственных олигонуклеотидных якорей. Готовят 36 линкеров с целью конверсии набора родственных олигонуклеотидов

(только с якорями) в наборы, включающие пептидные субстраты. Эти 36 пептидных субстратов синтезировали и каждый из них присоединяли ковалентно по амидной связи, например, к олигонуклеотиду, несущему на 5'-конце амид. Эти олигонуклеотиды включают последовательности, которые гибридизуются с данными якорями специфическим образом. Пептид-олигонуклеотидные линкеры проявляют "самосборку" на поверхности после их внесения во все лунки MAPS-планшетов.

Для проведения скрининга эти пять киназ в подходящих концентрациях (так, чтобы скорость фосфорилирования субстратов оказывалась максимально возможной) добавляют в каждую лунку вместе с одним из 8800 тестируемых соединений. Эти соединения тестируют по их способности напрямую подавлять выделенные ферменты. Уровень фосфорилирования каждого пептида из тест-набора определяли путем добавления помеченных антител, которые связываются только с пептидами, которые были фосфорилированы по остаткам тирозина. Интерес представляют любые лунки, в которых имеет место снижение в некоторых, но не во всех фосфотирозиновых точках. Соединения, которые были добавлены в эти лунки, могут быть дополнительно протестированы в качестве потенциальных селективных ингибиторов некоторых из тестированных киназ.

Схема данного теста показана на верхней части фиг. 17. Химерную линкерную молекулу приготавливали так, чтобы в ее составе 25 нуклеотидов, комплементарных одному из якорей, перекрестно сшивались с пептидным субстратом тирозинфосфокиназы. Химерный олигонуклеотид/пептидный субстрат проявлял "самосборку" на наборе олигонуклеотидных якорей, а киназы использовали для обеспечения фосфорилирования пептидной части данной химеры; после катализируемой этим ферментом реакции уровень фосфорилирования данного пептида определяют с помощью антифосфотирозиновых или антифосфосериновых антител, к которым присоединен детекторный флуорохром или фермент.

Полученные в этом тесте результаты показаны на нижней части фигуры. Бифункциональный кросслинкер DSS (Pierce) был использован для присоединения 5'-аминогруппы олигонуклеотидного линкера к N-концу пептида, синтезированного так, чтобы включать фосфорилируемый тирозин. Последовательность этого пептида путем записи в однобуквенной кодировке такова: TSEPQpYQPGENL (SEQ ID NO 32), где pY представляет фосфотирозин. Данную химеру либо использовали напрямую, либо сначала помечали на 1 ч в среду с pH=14 с целью частичного гидролиза фосфатной группы от остатка тирозина. Фосфорилированные или частично дефосфорилированные химерные молекулы проявляли "самосборку" на комплементарных якорных молекулах на поверхности MAPS-планшета в концентрациях, показанных в течение 1 ч. После промывки и блокирования лунок обработкой 0,3% бычьим сывороточным альбумином в буфере SSPTP добавляли антифосфотирозиновые антитела, сшитые с пероксидазой хрена (антитело 4G10 - Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) , в разведении 1:3000 в буфере SSPTP на 1 ч, после чего количество присоединенного антитела определяли с применением хемолюминесцентного субстрата - Super Signal Blaze. Показанное изображение получено на устройстве CCD при экспозиции 1 мин. Как и ожидалось, различия были выявлены в количестве фосфатов, присоединенных к олигонуклеотид/пептиду. Это различие является основанием для измерения того, насколько активна серия киназ тогда, когда производится обработка различными потенциальными ингибиторами.

Пример 19. Тест на связывание, предназначенный для детекции селективных ингибиторов взаимодействия между доменами SH2 и фосфорилированными пептидами.

Домены SH2 служат в качестве "субъединиц-доков" ("присоединяющих компонентов") в составе некоторых белков-регуляторов роста (факторов роста). Эти домены связываются с белками или пептидами, включающими фосфорилированный тирозин, при широкой специфичности. Следовательно, некоторые фосфорилированные по тирозину пептиды специфически связываются с одним или несколькими SH2-включающими белками, в то время как другие связываются со многими такими белками.

Для данного теста линкерами являются фосфорилированные пептиды, ковалентно присоединенные к олигонуклеотидам. Пептидные составляющие выбирают по их способности связываться с группой отобранных SH2-белков. Эти линкеры превращают "родственные" MAPS-планшеты в планшеты, несущие лиганды, которые специфичны в отношении группы SH2-белков. Формируют сотню 96-луночных MAPS-планшетов, несущих такие лиганды. Белки выделяют и помечают, например, с использованием флуоресцентной молекулы Cy5.

С целью проведения скрининга ингибиторов взаимодействия между SH2-доменом и фосфорилированным пептидом группу помеченных SH2-белков добавляют в каждую лунку сотни 96-луночных MAPS-планшетов, а также в каждую из лунок добавляют отличающееся тестируемое соединение. Следовательно, при этом оценивается влияние каждого соединения на взаимодействие белков SH2 с их фосфопротеиновыми лигандами по отдельности. В этом тесте должна измеряться флуоресценция связанного SH2-белка, ассоциированного с каждым из находящихся на тест-поверхности пептидным линкером. В случае любой лунки, в которой выявляется снижение флуоресценции в некоторых, но не во всех точках, добавленное в них соединение может быть дополнительно протестировано в качестве потенциального селективного ингибитора "присоединяющей" функции домена SH2.

Пример 20. Высокопроизводительный скрининг (см. фиг. 22).

Изображен высокопроизводительный MAPS-планшет, приспособленный для детекции сигнала в 96 лунках в ходе единственного эксперимента. Гибридизацию с одним и тем же олигонуклеотидом измеря-

ли в 16 повторностях в 80 лунках. Как показано, уровень воспроизводимости результатов 1280 гибридизационных тестов была очень высоким. Крайние правая и левая колонки являются контрольными и использованы для стандартизации сигнала для различных концентраций данного олигонуклеотида.

Сходным образом 16 различных олигонуклеотидов могут быть протестированы в каждой лунке, и этот тест повторяли в 80 различных лунках данного планшета. Понятно, что даже большее количество различных олигонуклеотидов или иных по типу зондов (например, 100 нуклеотидных зондов) могут быть протестированы в каждой лунке, и при этом множество таких планшетов может быть протестировано одновременно (например, 100 планшетов, таких как 96-луночные микротитровальные планшеты). Большое число тестов, которые могут быть осуществлены в отношении каждого образца (например, в последнем случае - примерно 100 разных тестов), и большое количество образцов, которое может быть протестировано одновременно (например, в последнем случае - примерно 9600 различных образцов - т.е. 96x100), обеспечивают очень высокий уровень производительности тестов.

Пример 21. Получение амплифицированной мишени (см. фиг. 23).

ПЦР-праймер (праймер один) присоединен к твердой подложке (например, шарику и сосуду для реакций) с помощью химической модификации, которая была внесена по 5'-концу праймерного олигонуклеотида. В направлении 5' → 3' праймер включает химическую модификацию, рестрикционный сайт и последовательность, которая комплементарна интересующей мишени (например, кДНК-копия интересующей мРНК). Мишень амплифицируется в реакции ПЦР с использованием в качестве ПЦР-праймеров присоединенного праймера один плюс праймер два, который в направлении 5' → 3' включает последовательность, которая специфична в отношении детекторного олигонуклеотида, и последовательность, которая комплементарна отличающейся от праймера один части мишени. После ПЦР-амплификации амплифицированную ДНК-мишень промывают с целью удаления избытка реакционного материала и высвобождают с твердой подложки путем отщепления рестриктазой, специфичной в отношении рестрикционного сайта в праймере один. После этого амплифицированный праймер высвобождают в жидкую фазу. Тепловые и/или химические процедуры могут быть использованы для дезактивации рестриктазы и для денатурации двухцепочечного ДНК-продукта. Затем высвобожденные одноцепочечные молекулы ДНК-мишени могут быть приведены в контакт с поверхностью, несущей якоря и/или линкеры, а мишень может быть выявлена с использованием детекторных олигонуклеотидов, комплементарных специфичным в отношении детектора последовательностям праймера два.

Пример 22. Приготовление амплифицированной мишени.

ПЦР-праймер (праймер один) присоединен к твердой подложке (например, шарику и сосуду для реакций) с помощью химической модификации, которая была внесена по 5'-концу праймерного олигонуклеотида. В направлении 5' → 3' праймер включает химическую модификацию, пептидную последовательность, которая может быть отщеплена протеазой, и последовательность, которая комплементарна интересующей мишени (например, ДНК-копии интересующей мРНК). Вместо пептида также может быть использован любой другой элемент, который может быть отщеплен специфическим образом. После ПЦР-амплификации в соответствии с описанным, например, в примере 21, ПЦР-продукт, пока еще присоединенный к твердой подложке, денатурируют и (что необязательно) промывают, оставляя одноцепочечную молекулу, присоединенную к подложке. Затем промытая присоединенная молекула может быть отщеплена и высвобождена (например, путем обработки подходящей протеазой), и проконтактирована с поверхностью, несущей якоря и/или линкеры. Как альтернатива, цепь амплифицированной мишени, которая высвобождена после денатурации, может быть проконтактирована с поверхностью, несущей якоря и/или линкеры. В любом случае только одна цепь амплифицированной мишени контактирует (например, гибридизуется) с линкером, поэтому конкуренция за гибридизацию со стороны противоположной цепи амплифицированной мишени исключается, а фон снижается. Линкеры могут быть сформированы так, чтобы они были специфичными в отношении любой из цепей амплифицированной мишени, либо в отношении их обеих.

Пример 23. Тест с детекционными линкерами и репортерными агентами (см. фиг. 24).

Образец, содержащий интересующую мРНК, подвергают процедуре защиты от действия нуклеазы, с использованием в качестве защищенного фрагмента, олигонуклеотида, который включает специфичный для мишени компонент и компонент в виде контрольного "выступа", который некомплементарен мРНК. После расщепления нуклеазой контрольный "выступ" может быть отщеплен, если это желательно, так, как это показано в левой части фигуры; или "выступ" может не отщепляться, как это проиллюстрировано в правой части фигуры. Полученные защищенные от нуклеазы фрагменты гибридизуются с детекционным линкером, который включает специфичный для мишени компонент и компонент, специфичный в отношении контрольного "выступа". В тесте, изображенном в левой части фигуры, контрольный "выступ" в составе детекционного линкера остается непрогибридизовавшимся; напротив, в тесте, показанном в правой части фигуры, контрольный "выступ" в составе детекционного линкера гибридизуется с оставшейся последовательностью контрольного "выступа" в составе защищенного фрагмента. На последующей стадии теста репортерный реагент, который включает компонент, способный взаимодействовать с компонентом детекционного линкера, специфичным для контрольного "выступа", оставляют взаимодействовать с комплексами. В тесте, показанном в левой части фигуры, репортерный реагент гиб-

ридизуется с компонентом детекционного линкера, специфичным в отношении контрольного "выступа", который остается доступным для гибридизации, а комплекс может быть выявлен с помощью сигнальной составляющей репортерного реагента. Напротив, в тесте, показанном в правой части фигуры, репортерный реагент не способен связываться с комплексом потому, что комплементарные последовательности недоступны для гибридизации, поэтому никакой сигнал не связан с комплексом.

Во многих тестах по настоящему изобретению репортерный реагент способен взаимодействовать с любой последовательностью, присутствующей в составе детекционного линкера, не ограничиваясь последовательностью, специфичной для контрольного "выступа".

Пример 24. Множественные флуорофоры (см. фиг. 25).

Участок, включающий пять сайтов - A-E, - показан на фиг. 25. Каждый сайт включает отличающуюся группу существенно идентичных якорей - якорей A-E. С якорями в сайте A гибридизуются четыре различных типа линкеров, каждый из которых включает компонент, специфичный для якоря A. Однако, каждый из якорей включает отличающийся компонент, специфичный для мишени: для мишеней 1, 2, 3 или 4. Следовательно, после гибридизации мишеней с комплексами якорей/линкеров мишени 1, 2, 3 и 4 могут быть все вместе расположены в сайте A. Сходным образом четыре различных типа линкеров могут гибридизоваться с сайтом B. Каждый линкер включает компонент, специфичный в отношении якоря B, в то время как специфичные для мишеней компоненты специфичны в отношении мишеней 5, 6, 7 или 8. Сходным образом мишени 9-12 могут быть связаны с сайтом C, мишени 13-16 - с сайтом D, а мишени 17-20 - с сайтом E. Если каждая из указанных мишеней помечена либо напрямую, либо опосредованно разными, выявляемыми независимо флуорофорами, такими как, например, позитивно конвертируемым люминофором, можно независимо выявить все 20 мишеней по пяти обозначенным сайтам.

Пример 25. Тест в высокопроизводительном формате.

В данном примере транскрипционный тест по настоящему изобретению используется для выявления количественного анализа изменений в параметрах экспрессии генов в формате, пригодном для высокопроизводительного скрининга. Все стадии теста осуществляют с помощью робота. Стандартные стадии промывки исчерпывающе не описаны. Все реакции осуществляют с помощью стандартных процедур, которые хорошо известны в данной области техники или описаны в данной области техники.

Линию человеческих моноцитов THP-1 культивируют в 96-луночных микротитровальных планшетах с V-образным дном из расчета 50000 или 150000 клеток на лунку. Клетки либо ничем не обрабатывают, либо дифференцируют форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) в течение 48 ч с последующей активацией липополисахаридом (ЛПС) в течение 4 ч. После обработки клетки лизируют гуанидинизоцианатом и замораживают до необходимости. мРНК получают с использованием парамагнитных частиц со стрептавидином, на которых связан биотин-поли-дТ. Как альтернатива, общую РНК получают путем экстракции Tri-реагентом (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Образцы, содержащие либо мРНК, либо тотальную РНК, подвергают процедуре защиты от действия нуклеазы, используя в качестве защищаемых ДНК-фрагментов смесь из тринадцати 60-нуклеотидных одноцепочечных олигонуклеотидов, каждый из которых включает в направлении 5' → 3' 25-нуклеотид, специфичный в отношении одного из тринадцати анализируемых мишеней (GAPDH, IL-1. TNF-α, катепсин-G, cox-2, циклин-2, виментин, LD78-β, HMG-17, остеопонтин, β-тромбоглобин, ангиотензин или актин); 10-нуклеотидный спейсер; 25-нуклеотид, специфичный в отношении общего олигонуклеотидного детекторного зонда; и 15-нуклеотидную общей последовательности контрольного "выступа". В результате мРНК конвертируется в стохиометрическое количество "соответствующего защищаемого ДНК-фрагмента", который выполняет роль мишени в тесте. Контрольные эксперименты, в которых указанные соответствующие защищаемые ДНК-фрагменты инкубируют с зондом, специфичным для последовательности контрольного "выступа", показывают, что существенны только последовательности, специфичные для интересующих мРНК-мишеней, присутствуют в составе соответствующих защищенных фрагментах, как это и ожидается в случае, если нуклеазное расщепление происходит в соответствии с желаемым.

Поверхности приготавливают в соответствии со способами по настоящему изобретению. В каждой лунке 96-луночного планшета для связывания ДНК размещают набор из шестнадцати разных 25-мерных олигонуклеотидных якорей. Используют четырнадцать различных видов якорей. Один вид якоря используют по трем из четырех углов набора, и используют 13 разных видов якорей - по одному в оставшихся сайтах набора. Затем якоря гибридизуются в определенном прямоугольном порядке с 60-мерными олигонуклеотидными линкерами, каждый из которых включает в направлении 5' → 3' 25-нуклеотид, соответствующий одной из тринадцати интересующих мишеней, 10-нуклеотидный спейсер и 25-нуклеотид, специфичный в отношении одного из якорей. Таким образом, в каждом из многократно повторенных 16-точечных наборе каждый из тринадцати специфичных для мишени линкеров расположен в определенном месте (сайте) набора. Такой прямоугольный набор изображен на фиг. 18 (см.). Линкеры, соответствующие GAPDH - конститутивно экспрессированому гену из семейства генов "домашнего хозяйства", - который служит в качестве внутреннего калибровочного контроля, представлен в трех сайтах каждого набора. Контрольные эксперименты показывают, что линкеры, равно как и защищенные фрагменты и детекторные олигонуклеотиды, использованные в эксперименте, проявляют желательную активность.

Образцы, содержащие смеси соответствующих защищаемых фрагментов, приготовленных в соответствии с описанным выше, гибридизуются с наборами якорей/линкеров. Используют образцы, производные либо от необработанных, либо от индуцированных культур. Присутствие и количество гибридизовавшихся защищаемых фрагментов по каждому сайту затем выявляют с помощью гибридизации с помеченными детекторными олигонуклеотидами. С целью стандартизовать количество сигнала в каждом сайте детекторные олигонуклеотиды разводят соответствующими количествами заблокированных олигомеров в соответствии с описанным в данном тексте. Количество сигнала в каждом сайте обрабатывают и стандартизуют отношением к контрольным сигналам для GAPDH. Полученные данные воспроизводимы в восьми повторяющихся образцах, равно как и в образцах, приготовленных на материале трех независимых экспериментов, проведенных в разные дни. Итог относительной представленности тринадцати транскриптов в объеме одного эксперимента показан в таблице ниже.

Относительная интенсивность (10^5 клеток на лунку)

Ген	Контроль Среднее	CV (n=16)	С индукцией Среднее	CV (n=16)	Отношение
GAPDH	10110	7%	9833	9%	0,97
IL-1	527	36%	8124	38%	15,40
TNF	229	35%	2249	36%	9,80
GAPDH	9591	11%	10031	17%	1,05
Катепсин G	10394	31%	19648	46%	1,89
COX-2	415	39%	3557	25%	8,58
Циклин-2	1728	23%	2960	25%	1,71
Виментин	25641	25%	71074	20%	2,77
LD78	1298	39%	13437	20%	10,35
HMG-17	8286	19%	2405	20%	0,29
Остеопонтин	5604	42%	19053	46%	3,40
Тромбо-глобулин	-53	-	31761	23%	> 100
GAPDH	10299	13%	10136	12%	0,98
Ангиотензин	3575	28%	6561	31%	1,84
Актин	12741	27%	21802	23%	1,71
"пустой" вариант	108	-	234	-	

Пример 26. Компьютерный алгоритм для количественного анализа параметров планшета с множественными наборами.

В предпочтительном алгоритме определяется положение всех точек для MAPS-планшета и автоматически подсчитывается величина наилучшего соответствия для амплитуды сигнала для каждой точки. Предпочтительно алгоритм выполняется с помощью компьютерной программы.

1. Выбрать небольшую часть параметров изображения - квадрат 40x40, - включающих значения интенсивности каждого пиксела (элемента картинки) на изображении, которое содержит первую лунку, которую предстоит проанализировать.

2. Определить функцию, которая рассчитывает интенсивность, ожидаемую для положения каждого пиксела, с использованием 16 неизвестных. Неизвестными являются:

- амплитуды каждой из 13 различных точек микронабора (т.е. насколько яркими являются реальные сигналы в каждом положении ДНК-набора). Для случая 4x4 (=16) точек имеется 13 таких неизвестных в пределах каждой лунки, поскольку некоторые из 16 точек являются повторностями одной и той же мишени;

- сдвиг по оси "x" и сдвиг по оси "y", определяющие точное положение набора 4x4 точек в данной конкретной лунке;

- фоновая интенсивность картинки в пределах лунки.

Функция для каждого положения пиксела определяет расстояние между пикселем и каждой точкой и в сумме составляет тот вклад, который каждая точка вносит в интенсивность, выявленная в данном пикселе, за счет умножения амплитуды точки на функцию импульсного ответа для данного расстояния. Для использованных изображений функция импульсного ответа определяется суммой гауссианы и лоренцианы (Gaussian and Lorenzian) соответствующих (константных) радиусов.

3. Начать подбор для анализируемой лунки путем быстрого угадывания параметров. Для осуществления указанного подсчитать среднюю интенсивность изображения для 16 участков картинки, в которых ожидается наличие точек. Вычесть сдвиг указанных 16 средних и промасштабировать разность с помощью постоянного множителя. Сдвиг и константу масштабирования определяют эмпирическим путем. Преобразовать результаты с целью соответствия 16 точек 13 амплитудам. Для фона и сдвигов использовать любые малые значения.

4. Оптимизировать приближенные значения (для 16 неизвестных) с помощью кривой приближения. Конкретно использовать нелинейный алгоритм наименьших квадратов в процедуре Маркадта (Marquadt) для линеаризации функции приближения, приближая 16 неизвестных к 40x40=1600 уравнениям (хотя, понятно, что все уравнения являются линейно независимыми).

5. Применить сдвиг "x, y" для приближения по анализируемой лунке для оценки с повышенной точностью, где координатная сетка должна соответствовать следующей лунке микропланшета. Ожидается, что сдвиг в 9 миллиметров должен составлять по отношению к следующей соседней лунке (с преобразованием по расстоянию в количестве пикселей с использованием множителя системы представления изображения). Поскольку расстояние между лунками мало по отношению к размеру планшета, использование локальных оценок положения является наиболее точным.

6. С улучшенной оценкой положения определить наименьший квадрат изображения для следующей лунки, сдвигая к квадрату пикселей 30x30. Указанное делает процедуру приближения более быстрой.

Вернуться ко 2-му этапу и повторить для каждой лунки.

Исходя из предыдущего описания, специалисту в данной области техники будут очевидны базовые характеристики настоящего изобретения, а без какого-либо отклонения от его духа и буквы могут быть выполнены изменения и модификации настоящего изобретения, призванные адаптировать его к различных путям его использования и для различных условий этого.

Без дополнительных разработок можно считать, что специалист в данной области техники сможет на основании вышеприведенного описания реализовать настоящее изобретение в его наиболее полном объеме. Предшествующие конкретные предпочтительные варианты, следовательно, призваны играть исключительно иллюстративную роль и при этом ни в чем не ограничивают настоящую заявку в какой бы то ни было ее части.

Полное содержание всех заявок, патентов и научных публикаций, цитировавшихся выше и на фигурах, включено в данный текст для сведения в виде библиографии.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выявления по меньшей мере одной мишени, предусматривающий:

(a) обеспечение контакта образца, который может содержать указанную(ые) мишень(и), с устройством, которое содержит перед добавлением указанного образца:

(i) поверхность, имеющую множественные пространственно разобщенные участки, по меньшей мере два из которых существенно идентичны друг другу, а каждый такой участок содержит:

(ii) по меньшей мере восемь различных олигонуклеотидных якорей, каждый из которых связан с

(iii) бифункциональным линкером, содержащим первую часть, специфичную в отношении данного олигонуклеотидного якоря, и вторую часть в виде зонда, специфичного в отношении указанной(ых) мишени(ней),

причем мишень(и) представляет(ют) собой защищенный(е) фрагмент(ы) и амплифицируется(ются) с помощью ПЦР до контакта указанного(ых) образца(ов) с указанным устройством,

в условиях, эффективных для связывания указанной(ых) мишени(ей) с указанным устройством;

(б) обеспечение контакта указанного устройства с любыми связанными с ним мишенями с помеченным детекционным зондом, который связывается с указанной связанной мишенью, и

(в) выявление указанного детекционного зонда.

2. Способ по п.1, согласно которому указанная(ые) мишень(и) амплифицируют с помощью ПЦР с использованием двух ПЦР-праймеров, любой из которых или они оба содержат химическую модификацию, которая обеспечивает присоединение праймера к твердой поверхности.

3. Способ по п.1, согласно которому указанную(ые) мишень(и) амплифицируют с помощью ПЦР с использованием двух ПЦР-праймеров, любой из которых или они оба содержат один или большее число сайтов рестрикции.

4. Способ по п.1, согласно которому указанную(ые) мишень(и) амплифицируют с помощью ПЦР с использованием двух ПЦР-праймеров, любой из которых или они оба содержат одну или большее число пептидных последовательностей, которые могут быть отщеплены с помощью протеазы.

5. Способ по п.1, согласно которому указанную(ые) мишень(и) амплифицируют с помощью ПЦР с использованием двух ПЦР-праймеров, любой из которых или они оба содержат последовательность, специфичную в отношении указанного детекционного зонда.

6. Способ выявления по меньшей мере одной мишени, предусматривающий:

(а) обеспечение контакта образца, который может содержать указанную(ые) мишень(и), с устройством, которое содержит перед добавлением указанного образца:

(i) поверхность, имеющую множественные пространственно разобщенные участки, по меньшей мере два из которых существенно идентичны друг другу, а каждый такой участок содержит:

(ii) по меньшей мере восемь различных олигонуклеотидных якорей, каждый из которых связан с

(iii) бифункциональным линкером, содержащим первую часть, специфичную в отношении данного олигонуклеотидного якоря, и вторую часть в виде зонда, специфичного в отношении указанной(ых) мишени(ней),

в условиях, эффективных для связывания указанной(ых) мишени(ей) с указанным устройством;

(б) обеспечение контакта указанного устройства с любыми связанными с ним мишенями с помеченным детекционным зондом, который связывается с указанной связанной мишенью; и

(в) выявление указанного детекционного зонда, причем указанный помеченный детекционный зонд содержит позитивно конвертируемый люминофор.

7. Способ по п.6, согласно которому обеспечивают контакт указанного устройства и любых связанных мишеней по меньшей мере с двумя различными помеченными детекционными зондами, причем каждый из таких помеченных зондов содержит различный позитивно конвертируемый люминофор.

8. Способ по п.6, согласно которому указанная(ые) мишень(и) является(ются) защищенным от действия нуклеазы фрагментом.

9. Способ по п.8, согласно которому обеспечивают контакт указанного устройства и любых связанных мишеней по меньшей мере с двумя помеченными детекционными зондами, причем каждый из таких помеченных зондов содержит различный позитивно конвертируемый люминофор.

10. Способ выявления по меньшей мере одной мишени, предусматривающий:

(а) обеспечение контакта образца, который может содержать указанную(ые) мишень(и), с устройством, которое содержит перед добавлением указанного образца:

(i) поверхность, имеющую множественные пространственно разобщенные участки, по меньшей мере два из которых существенно идентичны друг другу, а каждый такой участок содержит:

(ii) по меньшей мере восемь различных олигонуклеотидных якорей, каждый из которых связан с

(iii) бифункциональным линкером, содержащим первую часть, специфичную в отношении данного олигонуклеотидного якоря, и вторую часть в виде зонда, специфичного в отношении указанной(ых) мишени(ней), в условиях, эффективных для связывания указанной(ых) мишени(ей) с указанным устройством;

(б) обеспечение контакта указанного устройства с любыми связанными с ним мишенями с детекционным линкером, который содержит составляющую, специфичную в отношении указанной мишени, и составляющую, специфичную в отношении репортерного реагента, который взаимодействует с указанным детекционным линкером и который содержит сигнальную составляющую;

(в) обеспечение контакта указанного детекционного линкера с указанным репортерным реагентом; и

(г) выявление указанной сигнальной составляющей.

11. Способ по п.10, согласно которому указанная(ые) мишень(и) является(ются) защищенным от действия нуклеазы фрагментом.

12. Способ по п.10, в случае выявления по меньшей мере двух мишеней, дополнительно предусматривающий:

(б) обеспечение контакта указанного устройства с любыми связанными с ним мишенями по меньшей мере с двумя детекционными линкерами, каждый из которых содержит составляющую, специфичную в отношении одной из указанных мишеней, и составляющую, специфичную в отношении общего репортерного реагента;

(в) обеспечение контакта указанных детекционных линкеров с указанным общим репортерным реагентом, который взаимодействует с указанными детекционными линкерами и которые содержит сигнальную составляющую; и

(г) выявление указанной сигнальной составляющей.

13. Способ по п.12, согласно которому указанная(ые) мишень(и) является(ются) защищенным от действия нуклеазы фрагментом.

14. Способ по п.12, согласно которому указанная сигнальная составляющая содержит позитивно конвертируемый люминофор.

15. Способ выявления по меньшей мере двух РНК, предусматривающий:

(а) инкубирование образца, который может содержать указанные РНК-мишени, с двумя или большим числом защищенных фрагментов в условиях, которые эффективны для гибридизации указанных защищенных фрагментов с указанными РНК-мишенями, причем каждый из указанных защищенных фрагментов содержит общую 3'-"выступающую" последовательность, которая не специфична для указанных РНК-мишеней;

(б) обработку указанного проинкубированного образца одной или несколькими нуклеазами, эффективно расщепляющими нуклеиновую кислоту за пределами участка указанных защищенных фрагментов, которые гибридизовались с указанными РНК-мишенями, и необязательно участков указанных РНК-мишеней, которые были гибридизованы, если это желательно на этой стадии для получения ранее гибридизованных фрагментов в негибридизованной форме;

(в) удаление нуклеиновой кислоты помимо указанных защищенных фрагментов, которые гибридизовались с указанными РНК-мишенями, с получением образца, содержащего защищенные фрагменты;

(г) обеспечение контакта образца со стадий (а)-(в) с устройством, которое содержит перед добавлением указанного образца:

(i) поверхность, имеющую множественные пространственно разобщенные участки, по меньшей мере два из которых существенно идентичны друг другу, а каждый такой участок содержит:

(ii) по меньшей мере восемь различных олигонуклеотидных якорей, каждый из которых связан с

(iii) бифункциональным линкером, содержащим первую часть, специфичную в отношении данного олигонуклеотидного якоря, и вторую часть в виде зонда, специфичного в отношении по меньшей мере одного из указанных защищенных фрагментов,

в условиях, эффективных для связывания указанных защищенных фрагментов с указанным устройством;

(д) обеспечение контакта указанного устройства с любыми связанными с ним защитными фрагментами по меньшей мере с двумя детекционными линкерами, каждый из которых содержит составляющую, специфичную в отношении одного из указанных защищенных фрагментов, и составляющую, специфичную в отношении указанной общей 3 '-"выступающей" последовательности;

(е) обеспечение контакта указанных детекционных линкеров с репортерным реагентом, который специфичен в отношении указанной общей 3' -"выступающей" последовательности и который содержит сигнальную составляющую; и

(ж) выявление указанной сигнальной составляющей.

16. Способ по п.15, согласно которому указанная сигнальная составляющая содержит позитивно конвертируемый люминофор.

17. Способ по п.15, согласно которому один или большее число указанных детекционных линкеров разведен заблокированным детекционным линкером, который, будучи связан с указанным фрагментом, блокирует детекцию указанного фрагмента, разбавляя таким образом сигнал фрагмента.

18. Способ выявления по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты-мишени, предусматривающий:

а) обеспечение контакта образца, который может содержать указанную мишень(ни) с защищенным от действия нуклеазы фрагментом(ами), специфичными в отношении указанной мишени(ней) и который связывается с указанной мишенью(ями),

б) экспонирование образца с нуклеазой, эффективной для расщепления оставшейся одноцепочечной нуклеиновой кислоты, и

в) обеспечение контакта полученного образца с устройством, которое содержит, перед добавлением указанного образца,

i) поверхность, имеющую множественные пространственно разобщенные участки по меньшей мере два из которых существенно идентичны друг другу, а каждый такой участок содержит

ii) по меньшей мере два различных якоря, каждый из которых связан с

iii) бифункциональным линкером, содержащим первую часть, специфичную в отношении данного якоря, и вторую часть, которая содержит зонд, который специфичен в отношении указанного защищенного от действия нуклеазы фрагмента(ов), в условиях, эффективных для связывания указанного защищенного от действия нуклеазы фрагмента(ов) с указанным устройством,

г) обеспечение контакта указанного устройства с любыми связанными с ним защищенными от действия нуклеазы фрагментами по меньшей мере с одним детекционным линкером, который содержит первый фрагмент, специфичный в отношении одного из указанного связанного защищенного от действия нуклеазы фрагмента(ов), и второй фрагмент, специфичный в отношении репортерного реагента, и

д) выявление указанного детекционного линкера(ов).

19. Способ по п.18, согласно которому указанный репортерный реагент взаимодействует с указанным детекционным линкером(ами) и содержит сигнальную составляющую, дополнительно предусматривающий:

г) обеспечение контакта указанного детекционного линкера(ов) с указанным репортерным реагентом, и

д) выявление указанной сигнальной составляющей.

20. Способ по п.18, согласно которому якоря представляют собой олигонуклеотидные якоря.

21. Способ выявления по меньшей мере двух нуклеиновых кислот-мишеней, предусматривающий:

а) обеспечение контакта образца, который может содержать указанные мишени, с защищенными от действия нуклеазы фрагментами, специфичными в отношении указанных мишеней и которые связываются с указанными мишенями,

б) экспонирование образца с нуклеазой, эффективной для расщепления оставшейся одноцепочечной нуклеиновой кислоты, и

в) обеспечение контакта полученного образца с устройством, которое содержит, перед добавлением указанного образца,

i) поверхность, имеющую множественные пространственно разобщенные участки, по меньшей мере два из которых существенно идентичны друг другу, а каждый такой участок содержит:

ii) по меньшей мере два различных якоря, каждый из которых связан с

iii) бифункциональным линкером, содержащим первую часть, специфичную в отношении данного якоря, и вторую часть, которая содержит зонд, который специфичен в отношении одного из указанных защищенных от действия нуклеазы фрагментов, в условиях, эффективных для связывания указанных защищенных от действия нуклеазы фрагментов с указанным устройством,

г) обеспечение контакта указанного устройства с любыми связанными с ним защищенными от действия нуклеазы фрагментами по меньшей мере с двумя детекционными линкерами, каждый из которых содержит первый фрагмент, специфичный в отношении одного из указанных защищенных от действия нуклеазы фрагментов, и второй фрагмент, специфичный в отношении общего репортерного реагента, и

д) выявление указанных детекционных линкеров.

22. Способ по п.21, согласно которому указанный репортерный реагент взаимодействует с указанным(ыми) детекционным(ыми) линкером(ами) и содержит сигнальную составляющую, дополнительно предусматривающий:

е) обеспечение контакта указанного(ых) детекционного(ых) линкера(ов) с указанным репортерным реагентом и

ж) выявление указанной сигнальной составляющей.

23. Способ по п.21, согласно которому якоря представляют собой олигонуклеотидные якоря.

24. Способ выявления по меньшей мере двух искомых нуклеиновых кислот-мишеней в образце, который может содержать указанные мишени, предусматривающий:

а) инкубирование указанного образца с двумя или более защищенными фрагментами в условиях, эффективных для гибридизации указанных защищенных фрагментов, с указанными искомыми нуклеиновыми кислотами-мишенями в указанном образце, причем каждый из указанных защищенных фрагментов содержит общую 3'-"выступающую" последовательность, которая не является специфичной в отношении указанных искомых нуклеиновых кислот-мишеней,

б) обработку указанного проинкубированного образца одной или несколькими нуклеазами, эффективно расщепляющими нуклеиновую кислоту за пределами участков указанных защищенных фрагментов, которые гибридизовались с искомыми нуклеиновыми кислотами-мишенями, и необязательно участков указанных искомых нуклеиновых кислот-мишеней, которые были гибридизованы,

в) удаление нуклеиновой кислоты помимо указанных защищенных фрагментов, которая гибридизовалась с указанными искомыми нуклеиновыми кислотами-мишенями, с получением образца, содержащего защищенные фрагменты, и затем

г) обеспечение контакта образца со стадий (а)-(в) с устройством, которое содержит перед добавлением указанного образца

i) поверхность, имеющую множественные пространственно разобщенные участки, по меньшей мере два из которых существенно идентичны друг другу, а каждый такой участок содержит:

ii) по меньшей мере два различных якоря, каждый из которых связан с

iii) бифункциональным линкером, содержащим первую часть, специфичную в отношении данного якоря, и вторую часть, которая содержит зонд, специфичный в отношении указанных защищенных фрагментов,

в условиях, эффективных для связывания указанных защищенных фрагментов с указанным устройством, и

д) обеспечение контакта указанного устройства с любыми связанными с ним защищенными фрагментами по меньшей мере с двумя детекционными линкерами, каждый из которых содержит первый фрагмент, специфичный в отношении одного из указанных защищенных фрагментов, и второй фрагмент, специфичный в отношении указанной общей 3'-"выступающей" последовательности.

25. Способ по п.24, дополнительно предусматривающий:

е) обеспечение контакта указанных детекционных линкеров с репортерным реагентом, которые специфичны в отношении указанной общей 3'-"выступающей" последовательности и которые содержат сигнальную составляющую, и

ж) выявление указанной сигнальной составляющей.

26. Способ по п.24, согласно которому якоря представляют собой олигонуклеотидные якоря.

27. Способ по п.26, согласно которому один или большее число указанных детекционных линкеров разбавлен заблокированным детекционным линкером, который, будучи связан с указанным фрагментом, блокирует детекцию указанного фрагмента, разбавляя таким образом сигнал фрагмента.

28. Способ по п.23, согласно которому по меньшей мере один из указанных якорей является ассоциированным со множеством бифункциональных линкеров, каждый из которых содержит первую часть, которая специфична в отношении данного якоря, и вторую часть, которая содержит зонд, специфичный в отношении фрагмента, защищенного от действия различных нуклеаз.

29. Способ по п.18, согласно которому указанные якоря ранее использовались связанными с набором бифункциональных линкеров, имеющих специфичность в отношении различных мишеней, отличную от таковой набора бифункциональных линкеров по указанному способу, и диссоциированы от него.

30. Способ по п.18, согласно которому каждый участок содержит по меньшей мере восемь различных якорей.

31. Способ по п.21, согласно которому каждый участок содержит по меньшей мере восемь различных якорей.

32. Способ по п.24, согласно которому каждый участок содержит по меньшей мере восемь различных якорей.

33. Способ выявления по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты-мишени, предусматривающий:

а) обеспечение контакта образца, который может содержать указанную(ые) мишень(ни) с защищенным(ыми) от действия нуклеазы фрагментом(ами), специфичным(ыми) в отношении указанной(ых) мишени(ей) и который связывается с указанной(ыми) мишенью(ми),

б) экспонирование полученного продукта с нуклеазой, эффективной для расщепления оставшейся одноцепочечной нуклеиновой кислоты, и

в) обеспечение контакта полученного образца с устройством, которое содержит, перед добавлением указанного образца,

i) поверхность, имеющую множественные пространственно разобщенные участки, по меньшей мере два из которых существенно идентичны друг другу, а каждый такой участок содержит:

ii) по меньшей мере два различных якоря, каждый из которых связан с

iii) бифункциональным линкером, содержащим первую часть, специфичную в отношении данного якоря, и вторую часть, которая содержит зонд, который специфичен в отношении частей указанной(ых) нуклеиновой(ых) кислот(ы)-мишени(ней), защищенной(ых) указанными защищенными от действия нуклеазы фрагментами, в условиях, эффективных для связывания указанной(ых) защищенной от действия нуклеазы части(ей) с указанным устройством,

г) обеспечение контакта указанного устройства с любыми связанными с ним защищенными от действия нуклеазы частями по меньшей мере с одним детекционным линкером, который содержит первый фрагмент, специфичный в отношении одной из указанных связанных защищенных от действия нуклеазы частей, и второй фрагмент, специфичный в отношении общего репортерного реагента, и

д) выявление указанного детекционного линкера.

34. Способ по п.33, согласно которому указанный репортерный реагент взаимодействует с указанным(ыми) детекционным(ыми) линкером(ами) и содержит сигнальную составляющую, дополнительно предусматривающий:

е) обеспечение контакта указанного(ых) детекционного(ых) линкера(ов) с указанным репортерным реагентом и

ж) выявление указанной сигнальной составляющей.

35. Способ по п.33, согласно которому каждый участок содержит по меньшей мере восемь различных якорей.

36. Способ выявления по меньшей мере одной мишени, предусматривающий:

а) обеспечение контакта образца, который может содержать указанную(ые) мишень(и), с устройством, которое содержит, перед добавлением указанного образца,

i) поверхность, имеющую множественные пространственно разобщенные участки, по меньшей мере два из которых существенно идентичны друг другу, а каждый такой участок содержит:

ii) по меньшей мере два различных локуса якорей, причем каждый из якорей в каждом из локусов связан с

iii) бифункциональным линкером, который содержит первую часть, специфичную в отношении данного якоря, и вторую часть, которая содержит зонд, специфичный в отношении указанной(ых) мишени(ней), в условиях, эффективных для связывания указанной(ых) мишени(ней) с указанным устройством, и

где два или более из данных якорей, локализованных по меньшей мере в одном из локусов, связаны с различными бифункциональными линкерами, специфичными в отношении различных мишеней.

37. Способ по п.36, дополнительно предусматривающий:

б) обеспечение контакта указанного устройства с любыми связанными с ним мишенями по меньшей мере с одним детекционным линкером, который содержит первый фрагмент, специфичный в отно-

шении одной из указанных связанных мишеней, и второй фрагмент, специфичный в отношении репортерного реагента.

38. Способ по п.36, дополнительно предусматривающий:

в) обеспечение контакта указанного устройства и любых связанных мишеней, по меньшей мере, с одним детекционным зондом.

39. Способ по п.38, согласно которому

первый детекционный зонд связывается с первой мишенью, связанной с устройством у первого локуса,

второй детекционный зонд связывается со второй мишенью, связанной с устройством у того же самого локуса,

и первый, и второй детекционные зонды выявляются одновременно или последовательно.

40. Способ по п.36, согласно которому указанная(ые) мишень(ни) представляет(ют) собой защищенный(ые) от действия нуклеазы фрагмент(ы), специфичный(ые) в отношении искомой(ых) нуклеиновой(ых) кислоты(кислот).

41. Способ по п.37, согласно которому указанная(ые) мишень(и) представляет(ют) собой защищенный(ые) от действия нуклеазы фрагмент(ы), специфичный(ые) в отношении искомой(ых) нуклеиновой(ых) кислоты(кислот).

42. Способ по п.38, согласно которому указанная(ые) мишень(и) представляет(ют) собой защищенный(ые) от действия нуклеазы фрагмент(ы), специфичный(ые) в отношении искомой(ых) нуклеиновой(ых) кислоты(кислот).

43. Способ по п.36, согласно которому каждый участок содержит по меньшей мере восемь различных якорей.

44. Набор, используемый для выявления по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты-мишени в образце по любому из предшествующих пунктов, который содержит:

а) по меньшей мере один защищенный от действия нуклеазы фрагмент, специфичный, по меньшей мере, в отношении одной из указанных мишеней, но не в отношении любого из олигонуклеотидных якорей в указанном наборе,

б) поверхность, имеющую множественные пространственно разобщенные участки, по меньшей мере два из которых существенно идентичны, а каждый такой участок содержит по меньшей мере два различных олигонуклеотидных якоря, и

в) контейнер, содержащий по меньшей мере одну бифункциональную линкерную молекулу, которая содержит первую часть, специфичную в отношении по меньшей мере одного из указанных олигонуклеотидных якорей, и вторую часть, которая содержит зонд, специфичный в отношении - и при указанном выявлении связанный с (ним) - по меньшей мере одного из указанных защищенных от действия нуклеазы фрагментов, и

г) по меньшей мере один детекционный линкер, который содержит первый фрагмент, специфичный в отношении одного из указанных защищенных от действия нуклеазы фрагментов, и второй фрагмент, специфичный в отношении репортерного реагента.

45. Набор, используемый для выявления по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты-мишени в образце по любому из предшествующих пунктов, который содержит:

а) по меньшей мере один защищенный от действия нуклеазы фрагмент, специфичный, по меньшей мере, в отношении одной из указанных мишеней, но не в отношении любого из олигонуклеотидов указанного набора,

б) по меньшей мере один бифункциональный линкер, который содержит первую часть, специфичную в отношении олигонуклеотидного якоря, и вторую часть, специфичную в отношении - и при указанном выявлении связанную с (ним) - по меньшей мере одного из указанных защищенных от действия нуклеазы фрагментов, и

в) по меньшей мере один детекционный линкер, который содержит первый фрагмент, специфичный в отношении одного из указанных защищенных от действия нуклеазы фрагментов, и второй фрагмент, специфичный в отношении репортерного реагента.

46. Набор по п.44, в котором каждый участок содержит по меньшей мере восемь различных якорей.

47. Набор по п.44, дополнительно содержащий:

д) одну или более нуклеаз, эффективно расщепляющих одноцепочечную нуклеиновую кислоту и/или нить РНК в дуплексе ДНК/РНК.

48. Набор, применяемый для выявления по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты-мишени в образце по любому из предшествующих пунктов, содержащий:

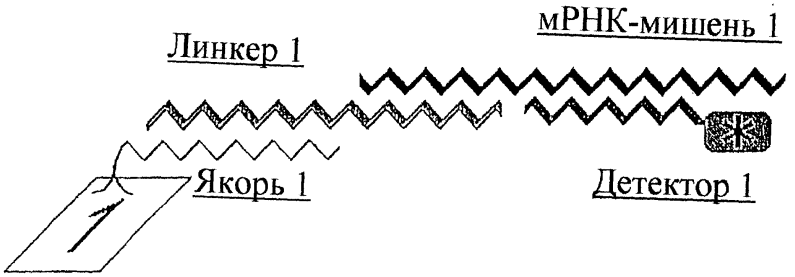
а) по меньшей мере один защищенный от действия нуклеазы фрагмент, специфичный в отношении указанной(ых) мишени(ней), но не в отношении любого из олигонуклеотидных якорей в указанном наборе,

б) поверхность, имеющую множественные пространственно разобщенные участки, по меньшей мере два из которых существенно идентичны друг другу, а каждый такой участок содержит по меньшей мере два различных олигонуклеотидных якоря,

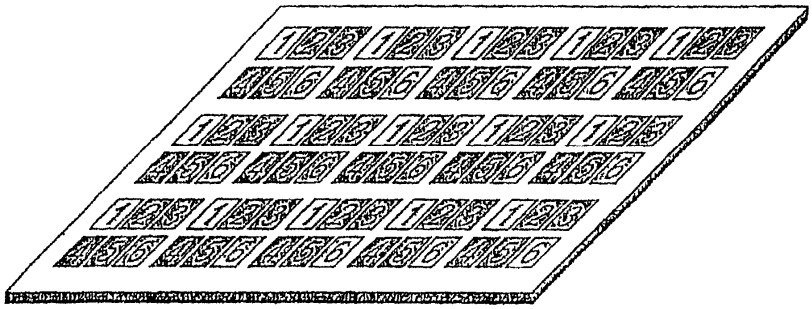
в) контейнер, содержащий по меньшей мере одну бифункциональную линкерную молекулу, которая имеет первую часть, специфичную по меньшей мере в отношении указанных олигонуклеотидных линкеров, и вторую часть, которая содержит зонд, который специфичен в отношении - и при указанном выявлении связанный с (ним) - по меньшей мере одного из указанных защищенных от действия нуклеазы фрагментов,

г) по меньшей мере один детекционный линкер, который содержит первый фрагмент, специфичный в отношении одного из указанных защищенных от действия нуклеазы фрагментов, и второй фрагмент, специфичный в отношении репортерного реагента, и

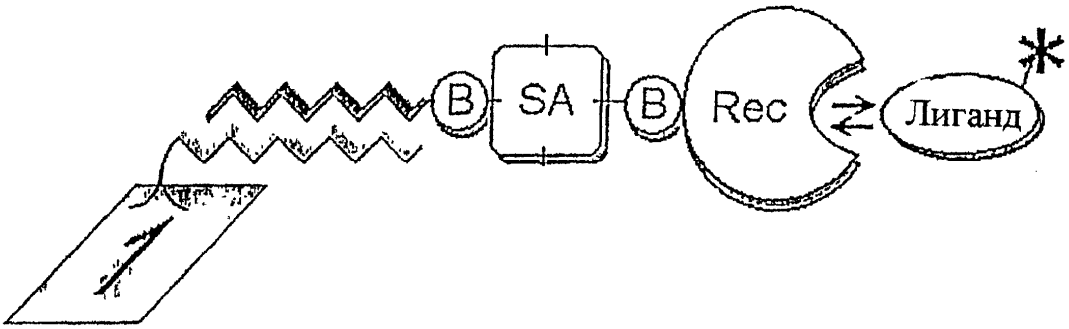
д) одну или более нуклеаз, эффективно расщепляющих одноцепочечную нуклеиновую кислоту и/или нить РНК в дуплексе ДНК/РНК.



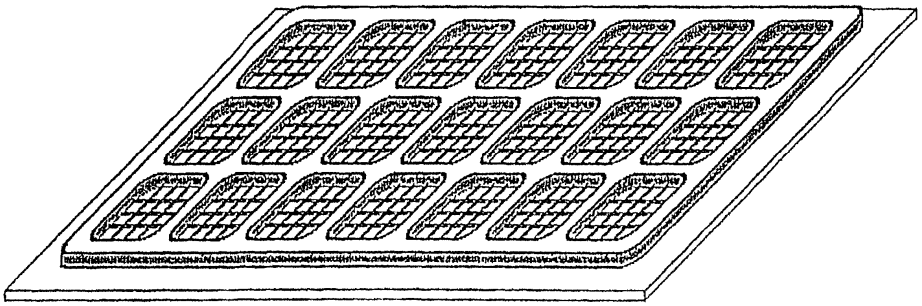
Фиг. 1



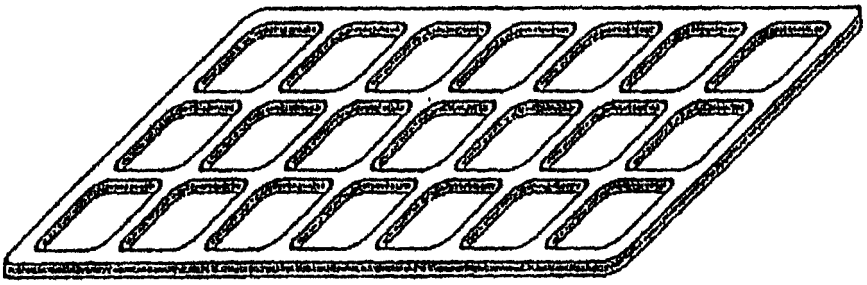
Фиг. 2



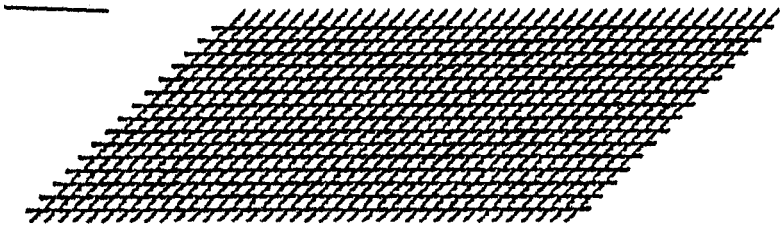
Фиг. 3



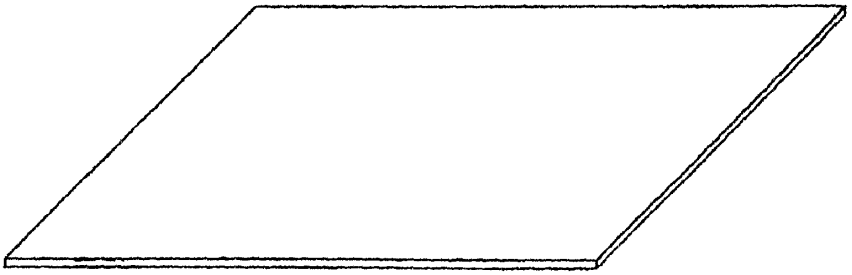
Фиг. 4



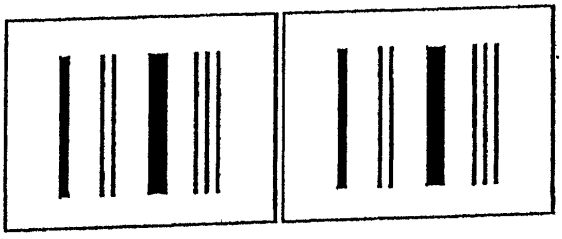
Фиг. 5a



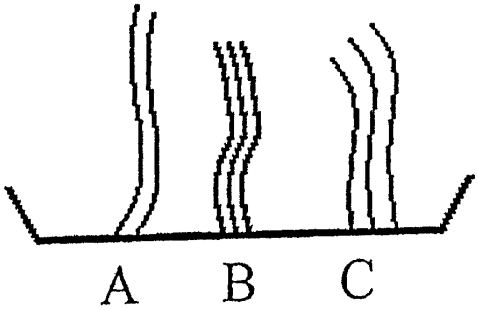
Фиг. 5b



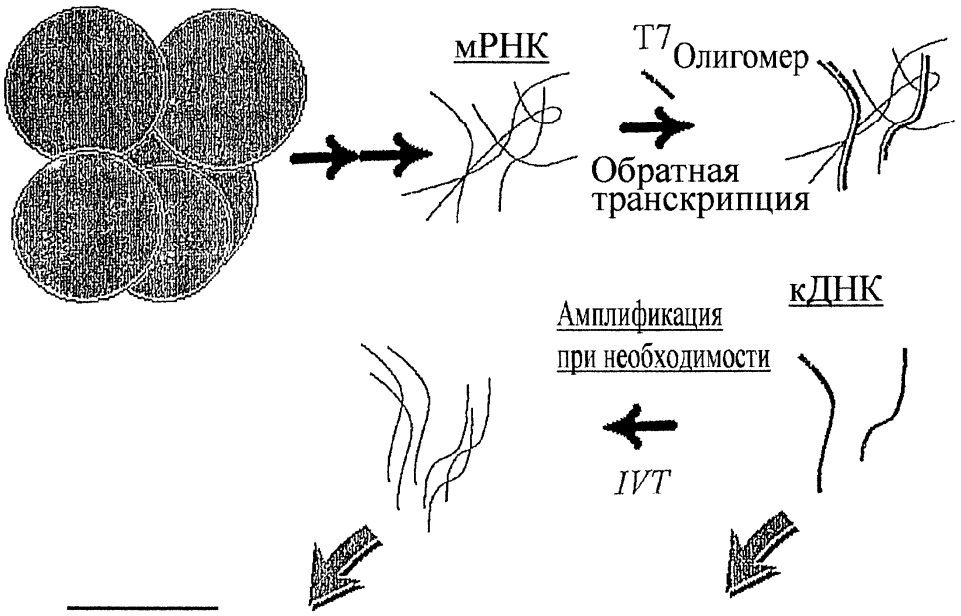
Фиг. 5c



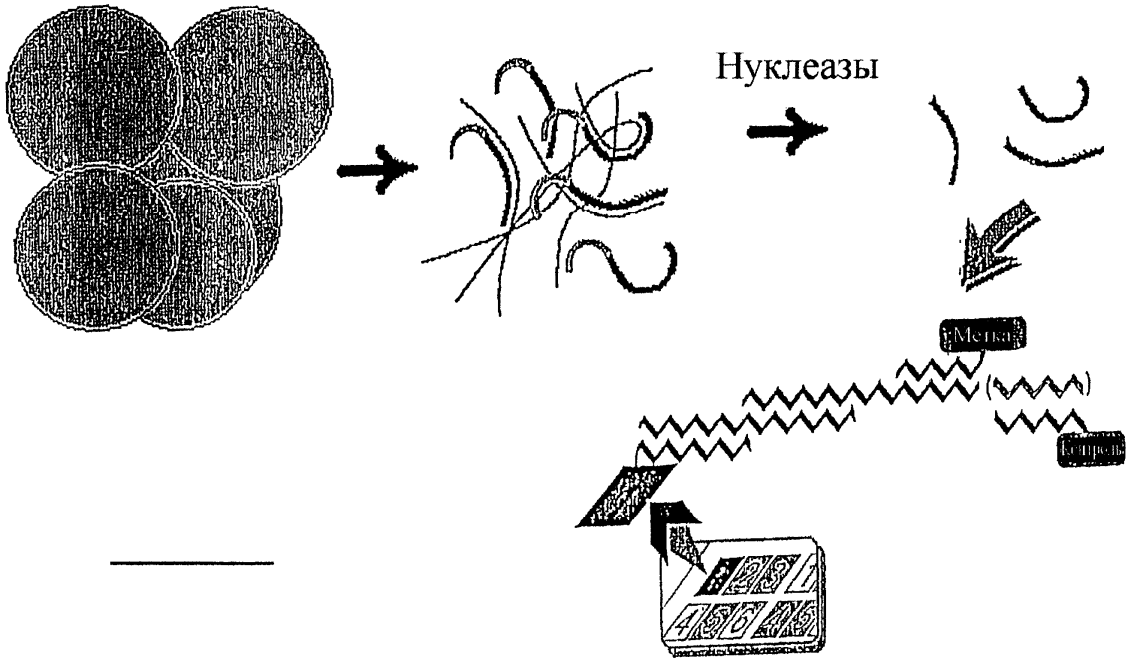
Фиг. 6



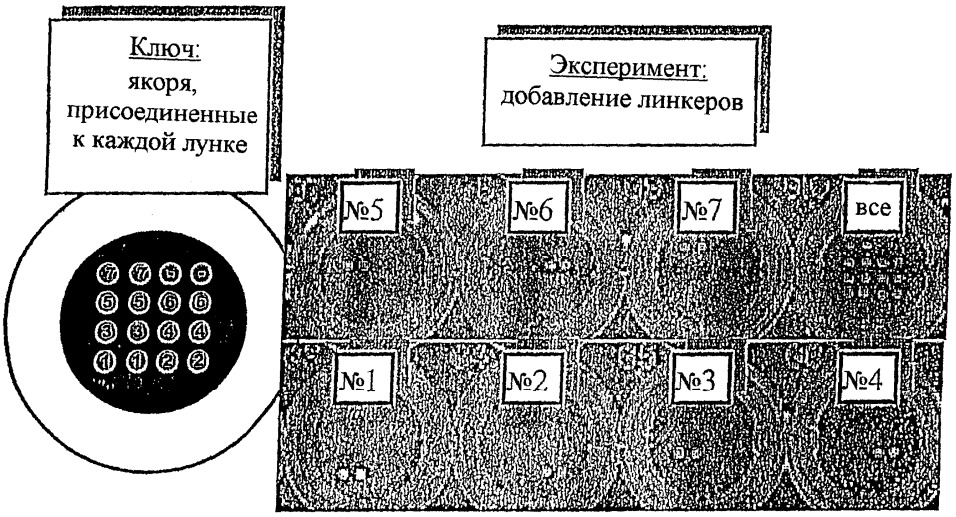
Фиг. 7


мРНК
T7 Олигомер
Обратная транскрипция
кДНК
Амплификация при необходимости
IVT

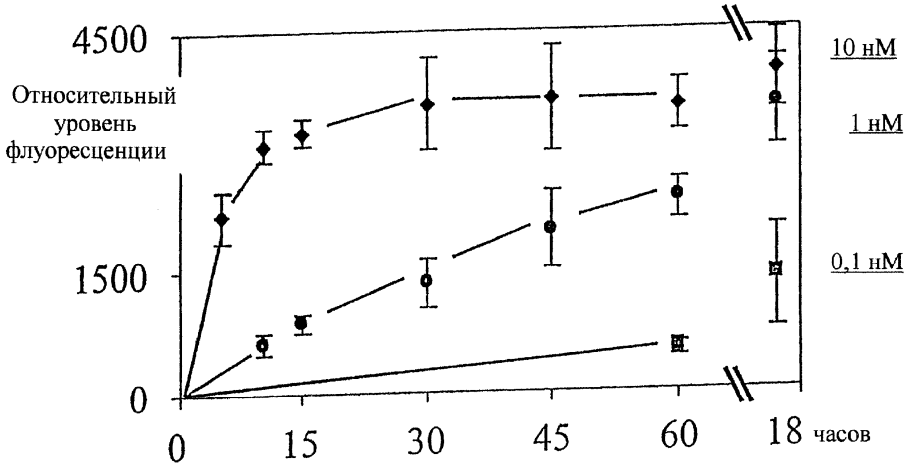
Фиг. 8


Защитные фрагменты в избытке
Нуклеазы
Метка
Гаситель

Фиг. 9

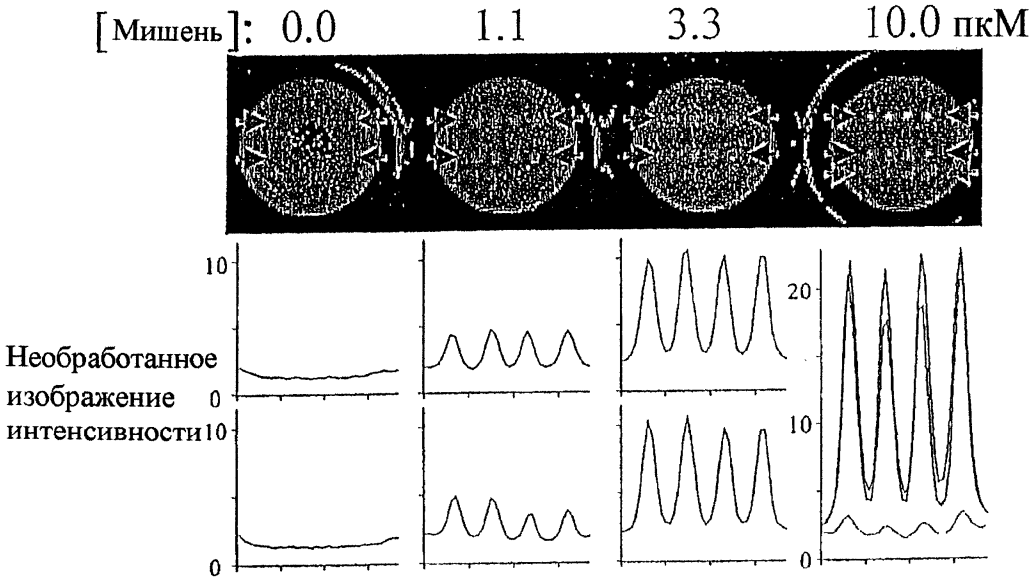


Фиг. 10

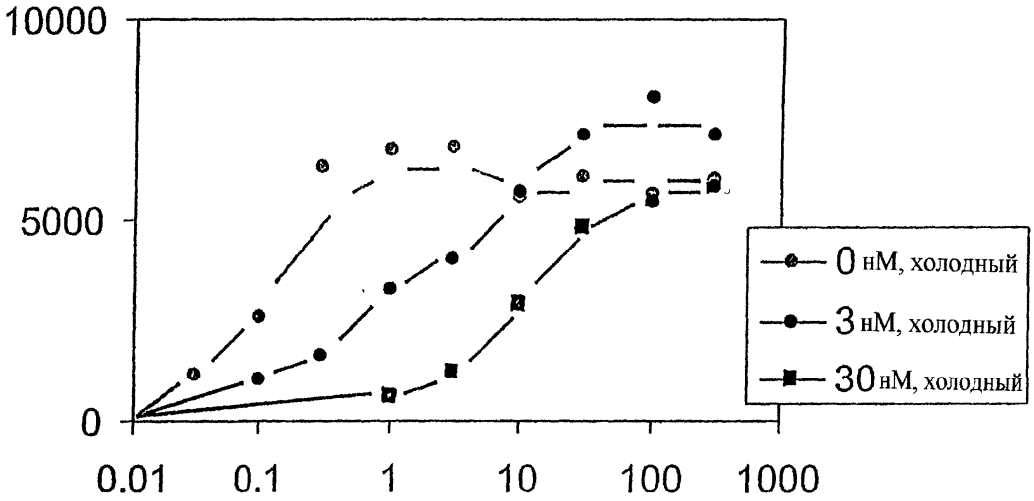


Время (минуты)

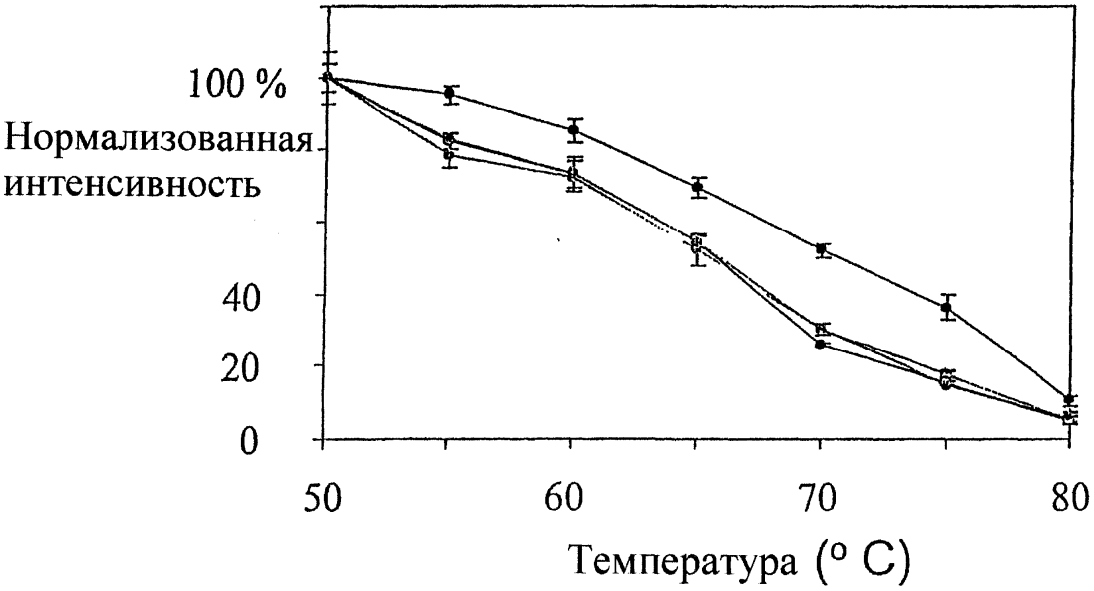
Фиг. 11



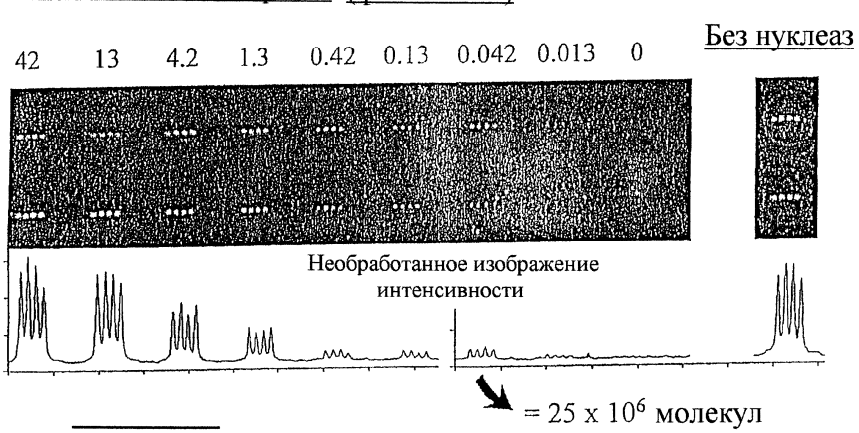
Фиг. 12



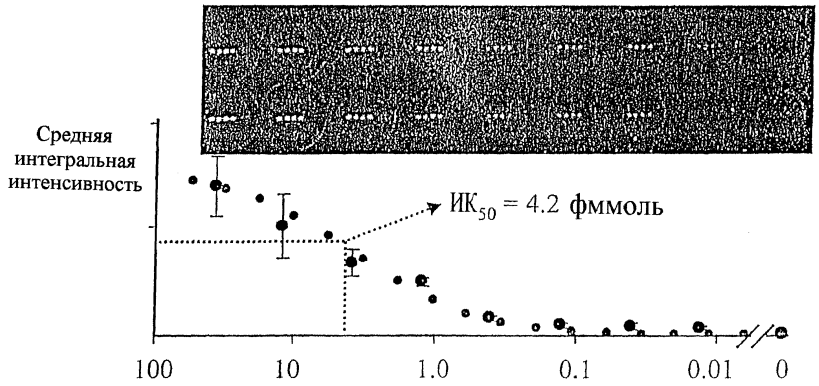
Фиг. 13



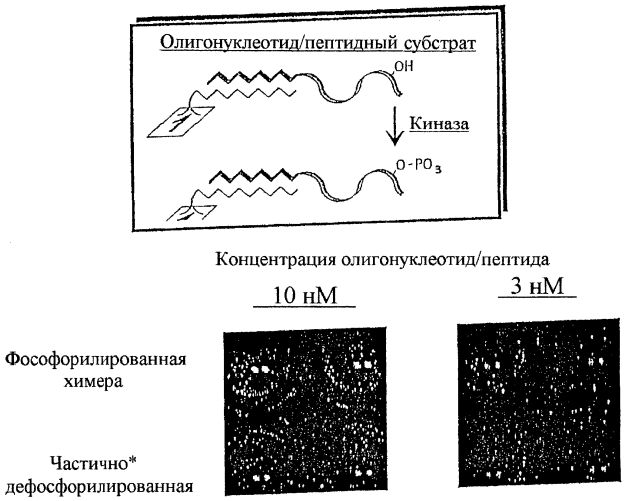
Фиг. 14



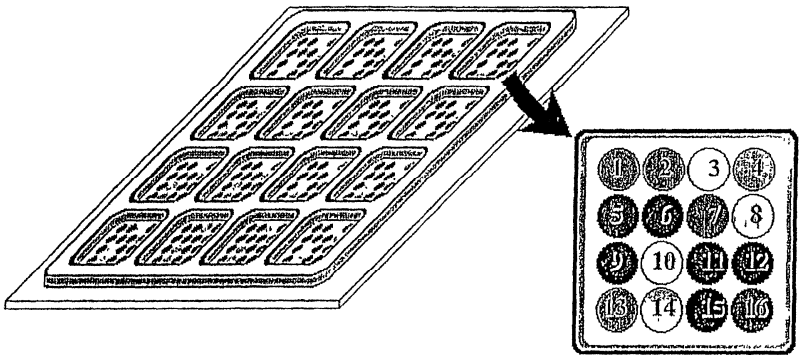
Фиг. 15



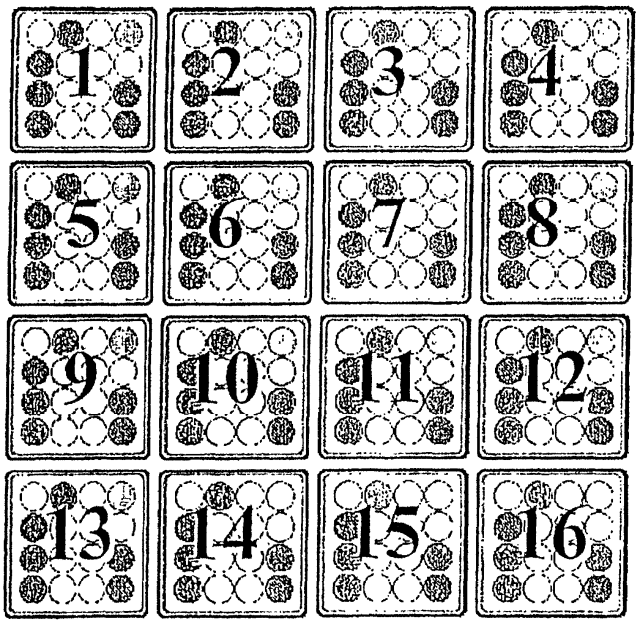
Фиг. 16



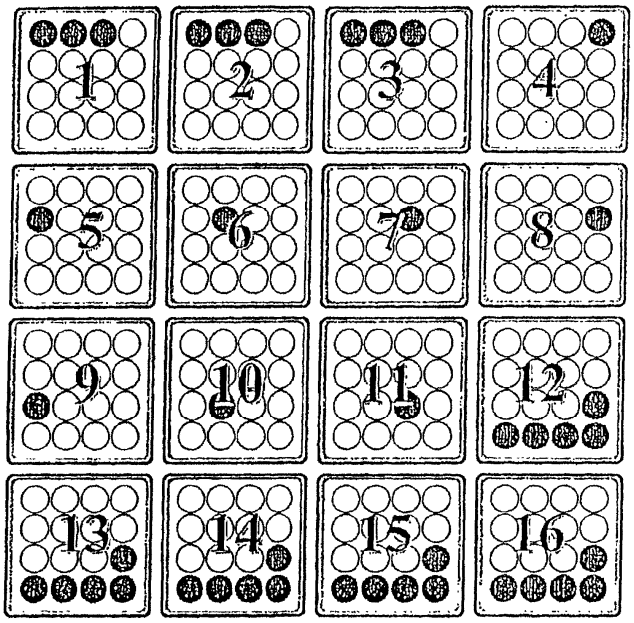
Фиг. 17



Фиг. 18

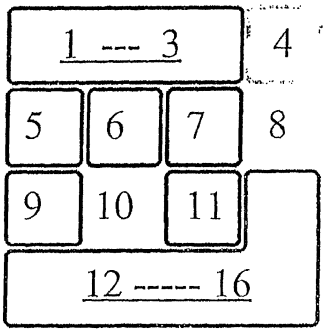


Фиг. 19

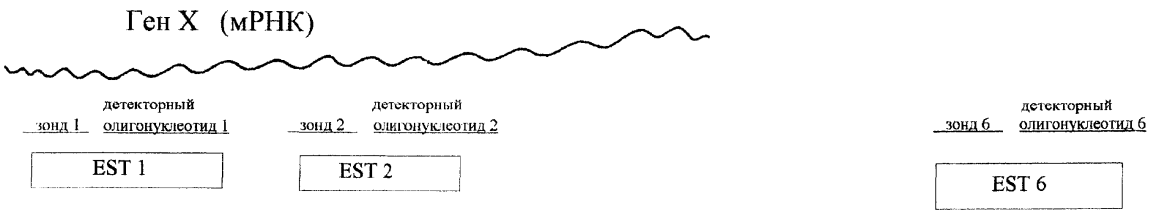


Фиг. 20a

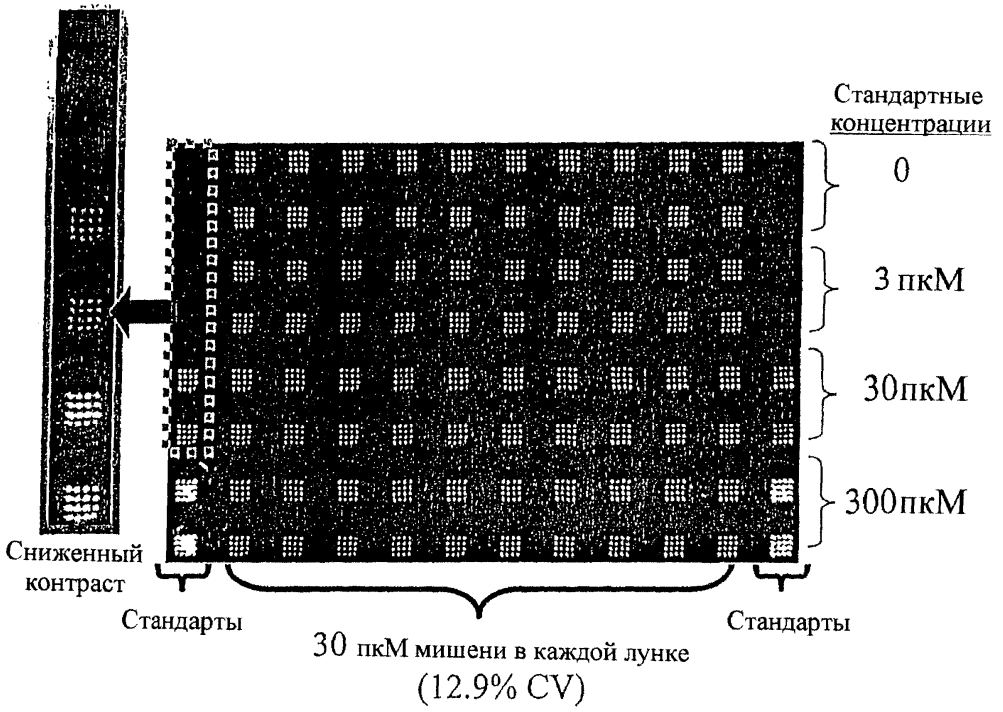
Установленное
сцепление



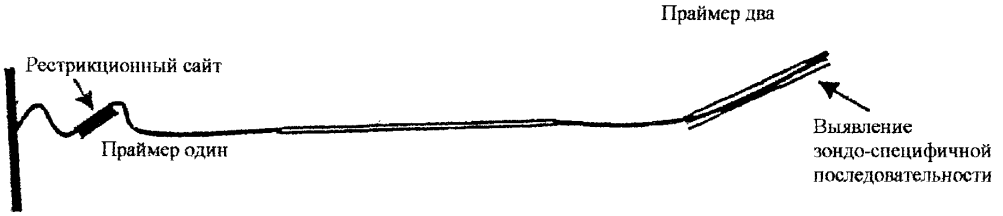
Фиг. 20b



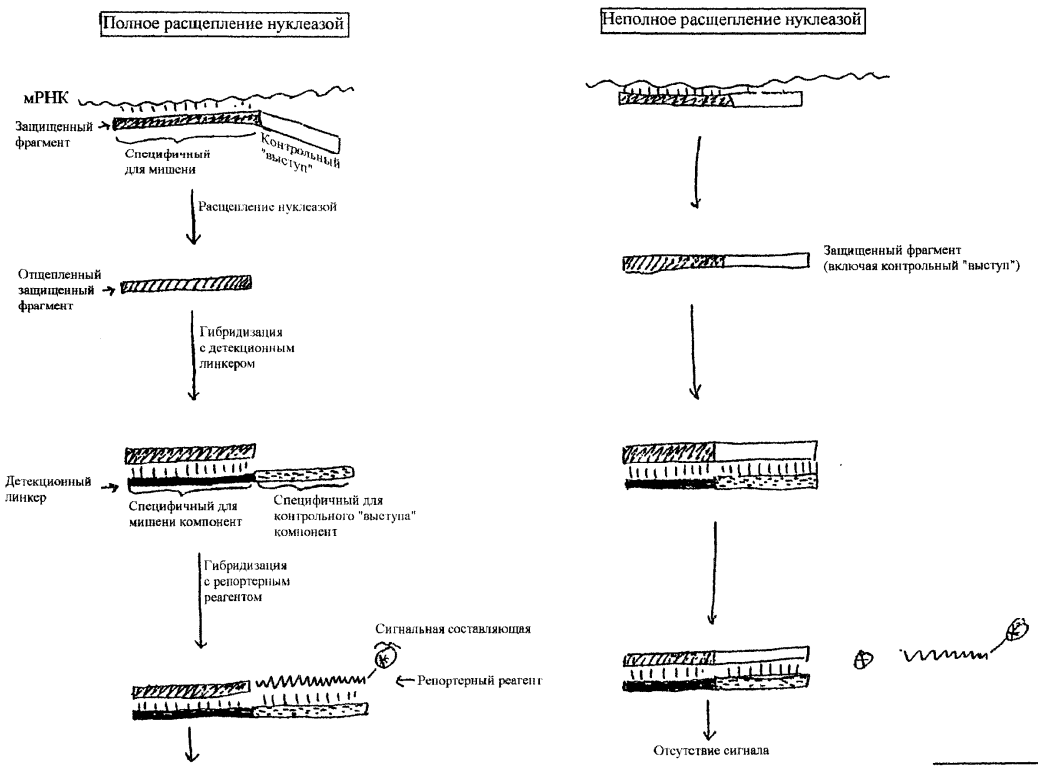
Фиг. 21



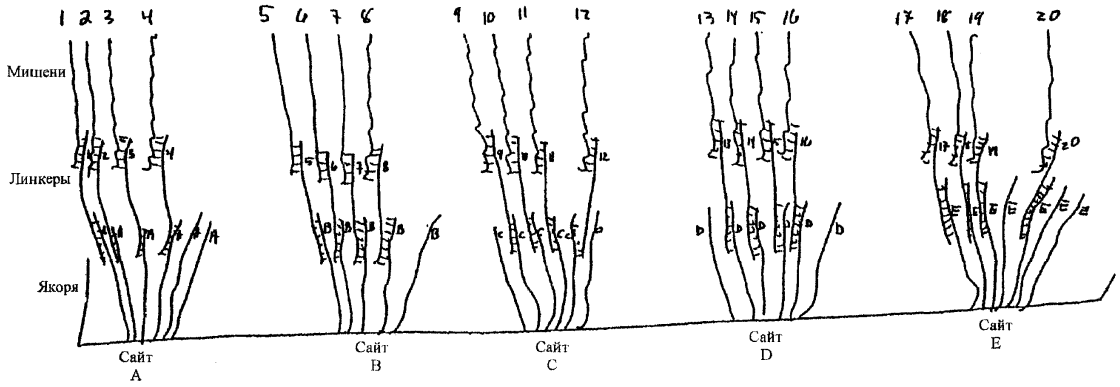
Фиг. 22



Фиг. 23


Полное расщепление нуклеазой
Неполное расщепление нуклеазой
мРНК
Защищенный фрагмент
Специфичный для мишени
Контрольный "выступ"
Расщепление нуклеазой
Отщепленный защищенный фрагмент
Гибридизация с детекционным линкером
Детекционный линкер
Специфичный для мишени компонент
Специфичный для контрольного "выступа" компонент
Гибридизация с репортерным реагентом
Сигнальная составляющая
Репортерный реагент
Защищенный фрагмент (включая контрольный "выступ")
Отсутствие сигнала

Фиг. 24


1 2 3 4
5 6 7 8
9 10 11 12
13 14 15 16
17 18 19 20
Мишени
Линкеры
Якоря
Сайт A
Сайт B
Сайт C
Сайт D
Сайт E

Фиг. 25