

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780042357.4

[51] Int. Cl.

C07H 21/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101679473A

[22] 申请日 2007.9.14

[21] 申请号 200780042357.4

[30] 优先权

[32] 2006.9.14 [33] US [31] 60/844,991

[86] 国际申请 PCT/US2007/020026 2007.9.14

[87] 国际公布 WO2008/073175 英 2008.6.19

[85] 进入国家阶段日期 2009.5.14

[71] 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 陈帆青 刘刚 卢克·P·李

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 闵丹

权利要求书9页 说明书38页 附图23页

[54] 发明名称

用于核酸酶活性和 DNA 足迹法的等离子分子标尺

[57] 摘要

本发明提供纳米等离子分子标尺，其可无标记地实时监控核酸(例如 DNA)长度变化，并进行核酸足迹法。在各种实施方式中，所述标尺包含附着于纳米颗粒的核酸，使得核酸长度变化可利用表面等离子共振检测出来。所述纳米等离子标尺提供快速和便利的平台，用于核酸-蛋白质相互作用作图、用于核酸酶活性监测和用于其它与足迹法有关的方法。

1. 一种用于在等离子共振系统中测量核酸长度变化的纳米等离子共振标尺，所述标尺包含：纳米颗粒，所述纳米颗粒上附有核酸，以形成纳米颗粒-核酸偶联物，其中所述核酸包含至少两个限制性位点，这些位点的位置使得所述偶联物在其中一个限制性位点处被切割所产生的等离子共振信号能与所述核酸偶联物在其它限制性位点处被切割所产生的等离子共振信号区别开，和/或与完整偶联物所产生的等离子共振信号区别开。

2. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸是双链DNA或双链RNA。

3. 权利要求2的纳米等离子标尺，其中所述核酸是双链核酸，其包含附着于所述纳米颗粒的第一链，以及与所述第一链杂交、但不附着于所述纳米颗粒的第二链。

4. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸包含至少三个不同的限制性位点。

5. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸进一步包含蛋白结合位点。

6. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸包含至少两个或更多不同的蛋白结合位点。

7. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸长度范围从3个核苷酸到大约500个核苷酸。

8. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸长度范围从大约5个核苷酸到大约200个核苷酸。

9. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸的长度范围从大约10个核苷酸到大约100个核苷酸。

10. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述纳米颗粒选自下组：纳米球、纳米月牙体、纳米线、纳米角状物、纳米管、纳米棱锥、纳米棒、纳米四脚锥体、单层或多层的纳米盘、和纳米角状物。

11. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述纳米颗粒包含金属或半导体材料。

12. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述纳米颗粒包含选自下

组的材料：贵金属、贵金属合金、贵金属复合物。

13. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述纳米颗粒包含选自下组的材料：金、金合金、银、银合金、铜、铜合金、铂、铂合金、CdSe半导体、CdS半导体、涂布有ZnS的CdSe、磁性胶体材料、ZnS、ZnO、TiO<sub>2</sub>、AgI、AgBr、HgI<sub>2</sub>、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In<sub>2</sub>S<sub>3</sub>、In<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>、Cd<sub>3</sub>P<sub>2</sub>、Cd<sub>3</sub>As<sub>2</sub>、InAs、和GaAs。

14. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述纳米颗粒包含金和/或银。

15. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中纳米颗粒粒度范围从大约5 nm到大约150 nm。

16. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中纳米颗粒粒度范围从大约10 nm到大约50 nm。

17. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述纳米颗粒的表面被功能化，以用于附着核酸。

18. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述纳米颗粒的表面用膦层功能化。

19. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述纳米颗粒的表面用二氧化硅涂覆，并使用氨基硅烷分子进行功能化。

20. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述偶联物在每个纳米颗粒上包含大约10到大约10,000个核酸分子。

21. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述偶联物在每个纳米颗粒上包含大约100个核酸分子。

22. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸长度大约50-60 bp，在一端上具有反应基团，以将核酸系到所述纳米颗粒上。

23. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸包含选自下组的识别位点：转录因子结合位点、蛋白结合位点、和酶结合位点。

24. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述偶联物被固定在适于进行表面等离子共振的底层上。

25. 权利要求1的纳米等离子共振标尺，其中所述偶联物被静电固定在玻璃、石英、或陶瓷表面上。

26. 用于鉴定与核酸结合的分子的结合位点的底层，所述底层包含：

适合于进行表面等离子共振测量的底层，所述底层携带有一组附着于其上的纳米等离子共振标尺，每个标尺包含纳米颗粒，核酸附着于纳米颗粒上形成纳米颗粒-核酸偶联物，从而所述核酸尺寸的变化能通过所述偶联物等离子共振信号的变化检测出来，并且其中所述标尺各自包含不同类型的纳米偶联物，并且所述标尺都被标注。

27. 权利要求26的底层，其中所述偶联物从空间上被标注。

28. 权利要求26的底层，其中所述底层携带至少三个不同的纳米偶联物种类。

29. 权利要求26的底层，其中所述底层携带至少十种不同的偶联物。

30. 权利要求26的底层，其中所述核酸选自下组：单链DNA、双链DNA、单链RNA、和双链RNA。

31. 权利要求26的底层，其中所述核酸是双链核酸，其包含附着于所述纳米颗粒的第一链，以及与所述第一链杂交、但不附着于所述纳米颗粒的第二链。

32. 权利要求26的底层，其中所述核酸包含蛋白结合位点和/或至少一个限制性位点。

33. 权利要求26的底层，其中所述核酸包含蛋白结合位点和多个限制性位点。

34. 权利要求26的底层，其中所述核酸长度为3个核苷酸至500个核苷酸。

35. 权利要求26的底层，其中所述核酸长度为10个核苷酸至200个核苷酸。

36. 权利要求26的底层，其中所述核酸长度为10个核苷酸至100个核苷酸。

37. 权利要求26的底层，其中所述纳米颗粒选自下组：纳米球、纳米月牙体、纳米线、纳米角状物、纳米管、纳米棱锥、纳米棒、纳米四脚锥体、单层或多层的纳米盘、和纳米角状物。

38. 权利要求26的底层，其中所述纳米颗粒包含金属或半导体材料。

39. 权利要求26的底层，其中所述纳米颗粒包含选自下组的材料：贵金属、贵金属合金、贵金属复合物。

40. 权利要求26的底层，其中所述纳米颗粒包含选自下组的材料：

金、金合金、银、银合金、铜、铜合金、铂、铂合金、CdSe半导体、CdS半导体、涂布有ZnS的CdSe、磁性胶体材料、ZnS、ZnO、TiO<sub>2</sub>、AgI、AgBr、HgI<sub>2</sub>、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In<sub>2</sub>S<sub>3</sub>、In<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>、Cd<sub>3</sub>P<sub>2</sub>、Cd<sub>3</sub>As<sub>2</sub>、InAs、和GaAs。

41. 权利要求26的底层，其中所述纳米颗粒包含金和/或银。

42. 权利要求26的底层，其中纳米颗粒粒度范围从大约5nm到大约150nm。

43. 权利要求26的底层，其中纳米颗粒粒度范围从大约10nm到大约50nm。

44. 权利要求26的底层，其中所述纳米颗粒的表面被功能化，以用于附着核酸。

45. 权利要求26的底层，其中所述纳米颗粒的表面用膦层功能化。

46. 权利要求26的底层，其中所述纳米颗粒的表面用二氧化硅涂覆，并使用氨基硅烷分子进行功能化。

47. 权利要求26的底层，其中所述偶联物在每个纳米颗粒上包含大约10到大约10,000个核酸分子。

48. 权利要求26的底层，其中所述偶联物在每个纳米颗粒上包含大约100个核酸分子。

49. 权利要求26的底层，其中所述核酸长度大约50-60 bp，在一端上具有反应基团，以将核酸系到所述纳米颗粒上。

50. 权利要求26的底层，其中所述核酸包含SEQ ID NO:15的双链DNA寡核苷酸，其中SEQ ID 15中的X是插入的长度范围从大约3到大约50个核苷酸的任何DNA序列或部件。

51. 权利要求50的纳米等离子共振标尺，其中X包含选自下组的序列：转录因子结合位点、错配序列、单核苷酸多态性、外遗传改变的序列、蛋白结合位点和酶结合位点。

52. 一种纳米等离子共振标尺，所述标尺包含：

纳米颗粒，所述纳米颗粒上附着有核酸，从而形成纳米颗粒-核酸偶联物，因此核酸尺寸的变化能通过所述偶联物等离子共振信号的变化检测出来。

53. 权利要求52的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸选自下组：单链

DNA、双链DNA、单链RNA、和双链RNA。

54. 权利要求53的纳米等离子标尺，其中所述核酸是双链核酸，其包含附着于所述纳米颗粒的第一链，以及与所述第一链杂交、但不附着于所述纳米颗粒的第二链。

55. 权利要求52的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸是双链的RNA或DNA或DNA/RNA嵌合体。

56. 权利要求55的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸包含蛋白结合位点和至少一个限制性位点。

57. 权利要求55的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸包含蛋白结合位点和多个限制性位点。

58. 权利要求55的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸包含两个或更多不同的蛋白结合位点和多个限制性位点。

59. 权利要求52的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸长度范围为从3个核苷酸到大约500个核苷酸。

60. 权利要求52的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸长度范围为从大约5个核苷酸到大约200个核苷酸。

61. 权利要求52的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸的长度范围从大约10个核苷酸到大约100个核苷酸。

62. 权利要求52的纳米等离子共振标尺，其中所述纳米颗粒选自下组：纳米球、纳米月牙体、纳米线、纳米角状物、纳米管、纳米棱锥、纳米棒、纳米四脚锥体、单层或多层纳米盘、和纳米角状物。

63. 权利要求52的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸长度大约50-60 bp，在一端上具有反应基团，以将核酸系到所述纳米颗粒上。

64. 权利要求52的纳米等离子共振标尺，其中所述核酸是SEQ ID NO:15的双链DNA寡核苷酸，其中SEQ ID 15中的X是任何插入的长度范围从大约3到大约50个核苷酸的DNA序列或部件。

65. 权利要求64的纳米等离子共振标尺，其中X选自下组：转录因子结合位点、错配序列、单核苷酸多态性、外遗传改变的序列、蛋白结合位点和酶结合位点。

66. 权利要求52的纳米等离子共振标尺，其中所述偶联物被固定在适合于进行表面等离子共振的底层上。

67. 权利要求52的纳米等离子共振标尺,其中所述偶联物被静电固定在玻璃、石英、或陶瓷表面上。

68. 权利要求52的纳米等离子共振标尺,其中所述偶联物被磁性地固定在表面上。

69. 一种鉴定是否存在与核酸结合的分子的结合位点和/或确定所述结合位点位置的方法,所述方法包含:

提供偶联物,所述偶联物包含附着于核酸上的纳米颗粒,所述核酸包含所述分子的结合位点;

将所述偶联物标尺与预期包含所述分子的组合物在使得所述分子与所述核酸结合、以形成结合的偶联物的条件下接触;

用非特异性核酸外切酶消化所述核酸,并检测由所述消化引起的纳米等离子共振的变化,其中纳米等离子共振的变化指示所述分子的存在和所述分子结合所述核酸的结合位点的位置。

70. 权利要求69的方法,其中所述分子是蛋白质。

71. 权利要求69的方法,其中所述分子是转录因子。

72. 权利要求69的方法,其中所述分子是酶。

73. 一种鉴定分子的结合位点的存在和/或表征所述结合位点的方法,所述方法包含:

提供一组纳米等离子共振标尺,其中每个标尺包含纳米颗粒,所述纳米颗粒上附着有核酸以形成纳米颗粒-核酸偶联物,从而能通过所述偶联物等离子共振信号的变化检测所述核酸尺寸的变化,并且其中所述标尺各自包含不同的核酸,并且所述标尺被标注位置;

在使得所述分子与所述标尺的一个或多个核酸结合以形成结合偶联物的条件下,将所述一组标尺与所述分子接触;

用非特异性核酸外切酶消化所述核酸,并且检测由所述消化引起的纳米等离子共振的变化,其中纳米等离子共振的变化指示在所述标尺中被所述分子结合的纳米偶联物、以及指示所述分子在所述核酸上的结合位点的位置。

74. 权利要求73的方法,其中所述纳米偶联物附着于适于进行等离子共振检测的底层。

75. 权利要求74的方法,其中所述偶联物从空间上标注位置。

76. 权利要求73的方法，其中所述组包含至少三种不同的偶联物。

77. 权利要求73的方法，其中所述组包含至少十种不同的偶联物。

78. 权利要求73的方法，其中所述分子是蛋白质。

79. 权利要求73的方法，其中所述分子是转录因子。

80. 权利要求73的方法，其中所述分子是酶。

81. 检测核酸杂交中错配的方法，所述方法包含：

提供偶联物，所述偶联物包含纳米颗粒，所述纳米颗粒上附着有单链核酸探针；

在尽管存在错配、但被试核酸仍能杂交到所述探针核酸上、并且形成双链核酸的条件下，将所述核酸探针与被试核酸接触；

将所述核酸探针与结合所述错配的分子相接触；

用非特异性核酸外切酶消化所述双链核酸，并且检测由所述消化引起的纳米等离子共振的变化，其中纳米等离子共振的变化指示所述错配的存在和位置。

82. 权利要求81的方法，其中所述结合错配的分子选自下组：结合单个碱基错配的蛋白质、结合鼓泡的蛋白质、结合环的蛋白质、结合切口的蛋白质、结合单链DNA-双链DNA转换的蛋白质、结合瓣的蛋白质、结合Y形交叉的蛋白质。

83. 权利要求81的方法，其中所述错配是多态性或突变的结果。

84. 权利要求81的方法，其中所述错配是对应于SNP的单碱基错配。

85. 权利要求81的方法，其中所述错配与野生型序列相比是插入的结果。

86. 权利要求81的方法，其中所述错配与野生型序列相比是缺失的结果。

87. 权利要求81的方法，其中所述错配指示被试核酸的来源生物的种类或品系。

88. 权利要求81的方法，其中所述被试核酸包含基因组DNA。

89. 权利要求81的方法，其中所述被试核酸包含cDNA。

90. 权利要求81的方法，其中所述被试核酸包含mRNA。

91. 检测核酸杂交中错配的方法，所述方法包含：

提供偶联物，所述偶联物包含纳米颗粒，所述纳米颗粒上附着有单链



核酸探针;

在尽管存在错配并且所述错配导致部分链远离有纳米颗粒的单链、但被试核酸仍与探针核酸杂交的情况下,将所述核酸探针与被试核酸接触;并且

用单链特异性核酸外切酶消化所述末端单链核酸,并且检测由所述消化引起的纳米等离子共振的变化,其中纳米等离子共振的变化指示所述错配的存在和位置。

92. 权利要求91的方法,其中所述错配是移码突变。

93. 权利要求69、73、81或91任一项的方法,其中所述核酸长度范围从3个核苷酸到大约500个核苷酸。

94. 权利要求93的纳米等离子共振标尺,其中所述纳米颗粒选自下组:纳米球、纳米月牙体、纳米线、纳米角状物、纳米管、纳米棱锥、纳米棒、纳米四脚锥体、单层或多层的纳米盘、和纳米角状物。

95. 权利要求93的纳米等离子共振标尺,其中所述纳米颗粒包含金属或半导体材料。

96. 权利要求93的纳米等离子共振标尺,其中所述纳米颗粒包含选自下组的材料:贵金属、贵金属合金、贵金属复合物。

97. 权利要求93的纳米等离子共振标尺,其中所述纳米颗粒包含选自下组的材料:金、金合金、银、银合金、铜、铜合金、铂、铂合金、CdSe半导体、CdS半导体、涂布有ZnS的CdSe、磁性胶体材料、ZnS、ZnO、TiO<sub>2</sub>、AgI、AgBr、HgI<sub>2</sub>、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In<sub>2</sub>S<sub>3</sub>、In<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>、Cd<sub>3</sub>P<sub>2</sub>、Cd<sub>3</sub>As<sub>2</sub>、InAs、和GaAs。

98. 权利要求93的纳米等离子共振标尺,其中所述纳米颗粒包含金和/或银。

99. 权利要求93的纳米等离子共振标尺,其中纳米颗粒粒度范围从大约5 nm到大约150nm。

100. 权利要求93的纳米等离子共振标尺,其中所述纳米颗粒的表面被功能化,以用于附着核酸。

101. 权利要求93的纳米等离子共振标尺,其中所述纳米颗粒的表面用膦层功能化。

102. 权利要求93的纳米等离子共振标尺,其中所述纳米颗粒的表面用

二氧化硅涂覆，并使用氨基硅烷分子进行功能化。

103. 权利要求93的纳米进行离子共振标尺，其中所述偶联物在每个纳米颗粒上包含大约10到大约10,000个核酸分子。

104. 权利要求93的纳米等离子共振标尺，其中所述偶联物在每个纳米颗粒上包含大约100个核酸分子。

105. 一种使用纳米等离子共振标尺检测靶特征或定量结合事件的方法，包含：

提供金-DNA 纳米颗粒偶联物，所述偶联物包含纳米颗粒，所述纳米颗粒具有系于其上的单链DNA寡核苷酸，其中所述寡核苷酸包含限制性位点；

将互补的寡核苷酸与所述单链DNA寡核苷酸杂交，其中所述互补寡核苷酸包含靶特征，或者待检测序列被插入到所述限制性位点中；

让蛋白质结合到所述靶特征或序列；

利用核酸外切酶在所述纳米偶联物上进行DNA消化；

观察表面等离子共振随时间推移的散射谱，其中金-DNA 纳米颗粒偶联物的等离子共振波长作为核酸外切酶反应中时间的函数被测量，借此通过测量不同时间的纳米等离子共振谱，检测出纳米偶联物的尺寸和结合事件。

## 用于核酸酶活性和DNA足迹法的等离子分子标尺

### 与相关申请的交叉引用

本申请要求2006年9月14日提交的USSN 60/844,991的利益和优先权,其在此通过针对所有用途全文参考而并入本文。

### 关于在联邦政府赞助的研究和开发下进行的发明的声明

本发明是在DARPA、NIH拨款R21CA95393、和美国能源部(合同号DE-AC02-05CH11231)支持下完成的。美国政府拥有本发明的一些权利。

### 发明领域

本发明涉及利用表面等离子共振(surface plasmon resonance)进行核酸检测和足迹法。

### 发明背景

在遗传信息加工的许多方面,诸如复制、转录、剪接、翻译、重组、DNA/RNA降解、基因扩增/缺失/重排、DNA修复、转座、逆转录病毒整合、和基因失活/沉默等中,靶向核酸的蛋白质和酶都是必不可少的。检测核酸大小变化在各种研究领域,诸如核酸-蛋白质交互作用作图、核酸酶抑制剂药物筛选、和基于寡核苷酸的治疗的开发都是关键的。这些检测方案通常需要合成许多特异性寡核苷酸底物,并且用荧光的、电化学的或放射性的探针标记寡核苷酸(参见,例如Behrens等(2004) Syst. Appl. Microbiol., 27: 565-572; Smith and Anslyn (1994) Anal. Biochem., 220: 53-57; Hillier等(2004) Bioelectrochemistry 63: 307-310),尤其对于基于核酸酶的方法来说更是如此。在小体积内和实时进行检测仍然是一个挑战,随着微阵列和微量分析装置的出现以及伴随而来测定体积前所未有地降至纳升乃至皮升范围,这个问题变得更加突出。

作为测量微小改变的有前途的技术平台之一,表面等离子共振(SPR)谱学是一种超灵敏的光学方法,其测量与金属薄膜表面接触的液体或介质的

折射率(refractive index)或介电常数(dielectric constant)。传统的大规模表面等离子共振传感器已经证明能测量例如绝缘体厚度、薄电介质的折射率、检测小分子、分析物浓度、蛋白质-蛋白质/抗体-抗原交互作用、以及解离动力学、DNA杂交、和混合物比例等性质。

### 发明概述

本发明涉及开发一种平台，其能够在单个纳米颗粒上以高速传感等离子共振，用于检测核酸长度变化。所述体系为许多的方法提供了一项快速、容易和灵活的手段，能在无限小体积(<fL)内表征核酸和/或核酸/蛋白质(或其他的分子)交互作用。

相应地，在一些实施方式中，提供了一种纳米等离子共振标尺(nanoplasmon resonance ruler)，用于标定在等离子共振体系中的核酸长度变化。所述标尺通常包含纳米颗粒，该颗粒上附着核酸(例如，单或双链DNA、RNA、DNA/RNA嵌合体等等)，以形成纳米颗粒-核酸偶联物，其中所述核酸包含至少两个限制性位点，所述限制性位点的位置被安置成使得所述偶联物在每一限制性位点被酶切，提供等离子共振信号，该信号与所述核酸偶联物在其它限制性位点被切割所产生的和/或由完整偶联物所产生的等离子共振信号能区别开。在一些实施方式中，所述核酸是双链核酸，其包含附着于纳米颗粒的第一链，和与第一链杂交、但不附着于所述纳米颗粒的第二链。在一些实施方式中，所述核酸包含至少三个、优选至少四个、更优选至少五个、六个、或七个不同的限制性位点。在一些实施方式中，所述核酸进一步地包含至少一个蛋白结合位点，在一些实施方式中，至少两个、三个、或至少四个蛋白结合位点。在一些实施方式中，核酸的长度范围从3个核苷酸(bp)到大约500个核苷酸(或bp)，优选大约5个核苷酸(或bp)到大约200个核苷酸(或bp)，更加优选从大约10、20、30、或40个核苷酸(或bp)到大约60、70、80、或100个核苷酸(bp)。在各个实施方式中，所述纳米颗粒选自下组：纳米球、纳米月牙体、纳米线、纳米角状物、纳米管、纳米棱锥、纳米棒、纳米四脚锥体、单层或多层的纳米盘、和纳米角状物。在一些实施方式中，所述纳米颗粒包含金属或半导体材料。在一些实施方式中，所述纳米颗粒包含选自下组的材料：贵金属、贵金属合金、贵金属复合物。在一些实施方式中，所述纳米颗粒包含选自下组的材料：金、金合

金、银、银合金、铜、铜合金、铂、铂合金、CdSe半导体、CdS半导体、涂布有ZnS的CdSe、磁性胶体材料、ZnS、ZnO、TiO<sub>2</sub>、AgI、AgBr、HgI<sub>2</sub>、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In<sub>2</sub>S<sub>3</sub>、In<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>、Cd<sub>3</sub>P<sub>2</sub>、Cd<sub>3</sub>As<sub>2</sub>、InAs、和GaAs。在一些实施方式中，所述纳米颗粒包含金和/或银。在一些实施方式中，所述纳米颗粒的粒度范围从大约5nm到大约300、200、或150 nm，优选从大约5 nm或10 nm到大约30、40、50、80、或100 nm。在一些实施方式中，所述纳米颗粒表面被功能化，以用于附着所述核酸。在一些实施方式中，所述纳米颗粒表面用膦层和/或利用氨基硅烷分子功能化。在一些实施方式中，所述偶联物在每个纳米颗粒上包含大约10到大约10,000个核酸分子，优选从大约50到大约500、或1,000个分子，更加优选每个纳米颗粒从大约80到大约150个分子，最优选在每纳米颗粒上大约100个核酸分子。在一些实施方式中，所述核酸长度大约50-60 bp，在一端上具有反应基团，以将核酸系到所述纳米颗粒上。在一些实施方式中，所述核酸包含选自下组的识别位点：转录因子结合位点、蛋白结合位点、和酶结合位点。在一些实施方式中，所述偶联物固定在(例如以化学方法固定、静电固定、吸附、磁性固定等等)适合于进行表面等离子共振的底层上。在一些实施方式中，所述偶联物被静电固定在玻璃、石英、或陶瓷表面。

本发明还提供一种底层，其用于鉴定与核酸结合的分子的结合位点，和/或用于检测和/或定量例如在样品中的这种分子。所述底物典型地包含适合于进行表面等离子共振测量的底层，所述底层携带有附着于其上的一组纳米等离子共振标尺，每个标尺包含纳米颗粒并在该颗粒上附着核酸以形成纳米颗粒-核酸偶联物，如此一来，通过偶联物等离子共振信号的变化可检测出核酸尺寸的变化，这些标尺各自包含不同的纳米偶联物，且每一标尺的位置都被标注。在一些实施方式中，所述偶联物有三维地址。在一些实施方式中，所述底层带有三种、优选至少5或至少10种不同的纳米偶联物种类。在一些实施方式中，所述核酸选自下组：单链DNA、双链DNA、单链RNA、和双链RNA。在一些实施方式中，所述核酸为双链，其包含附着于纳米颗粒的第一链，和与第一链杂交、但不附着于所述纳米颗粒的第二链。在一些实施方式中，所述核酸包含所述分子的一或多个结合位点(例如蛋白结合位点)和/或至少一个限制性位点。在一些实施方式中，所述核酸包含一个或一个以上蛋白结合位点和多个限制性位点。在一些实施方式中，

所述核酸的长度范围从3个核苷酸(bp)到大约500个核苷酸(或bp), 优选大约5个核苷酸(或bp)到大约200个核苷酸(或bp), 更加优选从大约10、20、30、或40个核苷酸(或bp)到大约60、70、80、或100个核苷酸(bp)。在各个实施方式中, 所述纳米颗粒选自下组: 纳米球、纳米月牙体、纳米线、纳米角状物、纳米管、纳米棱锥、纳米棒、纳米四脚锥体、单层或多层的纳米盘、和纳米角状物。在一些实施方式中, 所述纳米颗粒包含金属或半导体材料。在一些实施方式中, 所述纳米颗粒包含选自下组的材料: 贵金属、贵金属合金、贵金属复合物。在一些实施方式中, 所述纳米颗粒包含选自下组的材料: 金、金合金、银、银合金、铜、铜合金、铂、铂合金、CdSe半导体、CdS半导体、涂布有ZnS的CdSe、磁性胶体材料、ZnS、ZnO、TiO<sub>2</sub>、AgI、AgBr、HgI<sub>2</sub>、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In<sub>2</sub>S<sub>3</sub>、In<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>、Cd<sub>3</sub>P<sub>2</sub>、Cd<sub>3</sub>As<sub>2</sub>、InAs、和GaAs。在一些实施方式中, 所述纳米颗粒包含金和/或银。在一些实施方式中, 所述纳米颗粒的粒径范围从大约5 nm到大约300、200、或150 nm, 优选从大约5 nm或10 nm到大约30、40、50、80、或100 nm。在一些实施方式中, 所述纳米颗粒表面被功能化, 以用于附着所述核酸。在一些实施方式中, 所述纳米颗粒表面用膦层和/或利用氨基硅烷分子功能化。在一些实施方式中, 所述纳米偶联物在每个纳米颗粒上包含大约10到大约10,000个核酸分子, 优选在每个纳米颗粒上从大约50到大约500、或1,000个分子, 更加优选在每个纳米颗粒上从大约80到大约150个分子, 最优选在每个纳米颗粒上大约100个核酸分子。在一些实施方式中, 所述核酸长度大约50-60 bp, 在一端上具有反应基团, 以将核酸系到所述纳米颗粒上。在一些实施方式中, 所述核酸包含选自下组的识别位点: 转录因子结合位点、蛋白结合位点、和酶结合位点。在一些实施方式中, 所述偶联物固定在(例如以化学方法固定、静电固定、吸附、磁性固定等等)底层上。在一些实施方式中, 所述偶联物被静电固定在玻璃、石英、或陶瓷表面。

本发明还提供一种纳米等离子共振标尺, 其包含纳米颗粒, 所述纳米颗粒具有附着于其上的核酸以形成纳米颗粒-核酸偶联物, 借此通过偶联物等离子共振信号的变化检测出核酸尺寸的变化。在一些实施方式中, 所述核酸选自下组: 单链DNA、双链DNA、单链RNA、和双链RNA。在一些实施方式中, 所述核酸为双链核酸, 其包含附着于纳米颗粒的第一链, 和与第一链杂交、但不附着于所述纳米颗粒的第二链。在一些实施方式中, 所

述核酸包含至少三个、优选至少四个、更加优选至少五个、六个、或七个不同的限制性位点和/或至少一个蛋白位点，在一些实施方式中至少两个、三个、或至少四个蛋白结合位点。在一些实施方式中，所述核酸的长度范围从3个核苷酸(bp)到大约500个核苷酸(或bp)，优选大约5个核苷酸(或bp)到大约200个核苷酸(或bp)，更加优选从大约10、20、30、或40个核苷酸(或bp)到大约60、70、80、或100个核苷酸(bp)。在各个实施方式中，所述纳米颗粒选自下组：纳米球、纳米月牙体、纳米线、纳米角状物、纳米管、纳米棱锥、纳米棒、纳米四脚锥体、单层或多层的纳米盘、和纳米角状物。在一些实施方式中，所述纳米颗粒包含金属或半导体材料。在一些实施方式中，所述纳米颗粒包含选自下组的材料：贵金属、贵金属合金、贵金属复合物。在一些实施方式中，所述纳米颗粒包含选自下组的材料：金、金合金、银、银合金、铜、铜合金、铂、铂合金、CdSe半导体、CdS半导体、涂布有ZnS的CdSe、磁性胶体材料、ZnS、ZnO、TiO<sub>2</sub>、AgI、AgBr、HgI<sub>2</sub>、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In<sub>2</sub>S<sub>3</sub>、In<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>、Cd<sub>3</sub>P<sub>2</sub>、Cd<sub>3</sub>As<sub>2</sub>、InAs、和GaAs。在一些实施方式中，所述纳米颗粒包含金和/或银。在一些实施方式中，所述纳米颗粒的粒度范围从大约5 nm到大约300、200、或150 nm，优选从大约5 nm或10 nm到大约30、40、50、80、或100 nm。在一些实施方式中，所述纳米颗粒表面被功能化，以用于附着所述核酸。在一些实施方式中，所述纳米颗粒表面用膦层和/或利用氨基硅烷分子功能化。在一些实施方式中，所述偶联物在每个纳米颗粒上包含大约10到大约10,000个核酸分子，优选在每个纳米颗粒上从大约50到大约500或1,000个分子，更加优选在每个纳米颗粒上从大约80到大约150个分子，最优选在每个纳米颗粒上大约100个核酸分子。在一些实施方式中，所述核酸长度大约50-60 bp，在一端上具有反应基团，以将核酸系到所述纳米颗粒上。在一些实施方式中，所述核酸长度大约50-60 bp，在一端上具有反应基团，以将核酸系到所述纳米颗粒上。在一些实施方式中，所述核酸是SEQ ID NO :11的双链DNA，其中SEQ ID NO :11中的X是任何插入的DNA序列或特征，长度从大约3到大约50个核苷酸。在一些实施方式中，X选自下组：转录因子结合位点、错配序列、单核苷酸多态性、外遗传改变的序列、蛋白结合位点、和酶结合位点。在一些实施方式中，所述核酸包含选自下组的识别位点：转录因子结合位点、蛋白结合位点、和酶结合位点。在一些实施方式中，所述偶联物固定在(例如，以化学方法

固定、静电固定、吸附、磁性固定，等等)适于进行表面等离子共振的底层上。在一些实施方式中，所述纳米偶联物被静电固定在玻璃、石英、或陶瓷表面。

在一些实施方式中，提供了鉴定与核酸结合的一或多个分子的结合位点是否存在和/或决定所述结合位点位置的方法。所述方法典型地涉及提供一种偶联物，其包含附着于核酸上的纳米颗粒，所述核酸包含所述分子的结合位点，例如在此所描述的；将所述偶联物标尺与预期包含所述分子的组合物在使得所述分子与所述核酸结合、以形成结合偶联物的条件下接触；用非特异性核酸外切酶(或特异性核酸外切酶，此酶在被所述分子结合的位点裂解、但是这种活性却被所述分子的结合所阻断)消化所述核酸，并且检测由所述消化引起的纳米等离子共振方面的变化，其中纳米等离子共振变化指示所述分子的存在和所述分子结合所述核酸的结合位点的位置。在一些实施方式中，所述分子是蛋白质、转录因子、或酶。

在各个实施方式中，提供了鉴定分子的结合位点的存在和/或表征所述结合位点的方法，其中所述方法涉及提供一组纳米等离子共振标尺(例如在此描述的)，其中每一标尺包含纳米颗粒并在该颗粒上附着核酸以形成纳米颗粒-核酸偶联物，借此通过偶联物等离子共振信号的变化可检测出核酸尺寸的变化，这些标尺各自包含不同的核酸，且每一标尺的位置都被标注；将这组标尺与所述分子在使得所述分子与包含不同偶联物的一个或多个核酸结合成偶联物的条件下接触；用非特异性核酸外切酶(或特异性核酸外切酶，在被所述分子结合的位点处裂解、但是这种活性在所述分子结合时被阻断)消化所述核酸；并且检测由所述消化引起的纳米等离子共振方面的变化，其中纳米等离子共振方面的变化指示这组标尺中被所述分子结合的纳米偶联物，以及所述分子在所述核酸上的结合位点。在各个实施方式中，所述偶联物附着于与等离子共振检测相适合的底层，以形成如上所述的底层。在一些实施方式中，所述分子是蛋白质、转录因子、或酶。

本发明还提供了检测核酸杂交中错配的方法。所述方法典型地涉及提供一种偶联物，其包含附着于单链核酸探针(例如在此所描述的)上的纳米颗粒；在被试核酸可以与所述探针核酸杂交、并且尽管存在错配但仍能形成双链核酸的条件下将所述核酸探针与被试核酸接触；将所述核酸探针与结合所述错配分子相接触；以及用非特异性核酸外切酶(或用特异于错配结



构域、但被所述错配结合蛋白阻断的核酸酶)消化所述双链核酸,并且检测由所述消化引起的纳米等离子共振变化,其中纳米等离子共振变化指示所述错配的存在以及位置。在一些实施方式中,结合所述错配分子选自下组:结合单个碱基错配的蛋白质、结合鼓泡(bubble)的蛋白质、结合环的蛋白质、结合切口的蛋白质、结合单链DNA-双链DNA转换的蛋白质、结合瓣(flap)的蛋白质、结合Y形叉的蛋白质。在一些实施方式中,所述错配是多态性或突变的结果。在一些实施方式中,所述错配是对应于SNP的单碱基错配。在一些实施方式中,所述错配是在野生型序列中插入和/或缺失的结果。在一些实施方式中,错配指示被试核酸的来源生物的物种或品系。在一些实施方式中,被试核酸包含基因组DNA、cDNA、和/或mRNA。

本发明提供了检测核酸杂交中错配的方法,其中所述方法涉及提供偶联物,所述偶联物包含附着于单链核酸探针(例如在此所描述的)上的纳米颗粒;在尽管存在错配、并且所述错配导致部分链远离带有纳米颗粒的单链、但被试核酸仍可以与探针核酸杂交的情况下,将所述核酸探针与被试核酸接触;用单链特异性核酸外切酶消化所述末端单链核酸,并且检测由所述消化引起的纳米等离子共振变化,其中纳米等离子共振变化指示所述错配的存在和位置。在一些实施方式中,所述错配是移码突变。

在一些实施方式中,提供利用纳米等离子共振标尺检测靶特征或定量结合事件的方法,其中所述方法涉及提供金-DNA纳米颗粒偶联物,所述偶联物包含与单链DNA寡核苷酸连接的纳米颗粒,其中所述寡核苷酸包含限制性位点;将互补的寡核苷酸与所述单链DNA寡核苷酸杂交,其中所述互补寡核苷酸包含靶特征或待检测序列被插入到所述限制性位点;让蛋白质结合到所述靶特征或序列;利用核酸外切酶在所述纳米偶联物上进行DNA消化;以及利用表面等离子共振观察随时间推移的(time-lapse)散射谱,其中金-DNA纳米颗粒偶联物的等离子共振波长作为核酸外切酶反应时间的函数来测量,借此通过测量不同时间的不同的纳米等离子共振谱,检测出纳米偶联物的尺寸和结合事件。

## 定义

术语“核酸”或“寡核苷酸”指的是共价连接的至少两个核苷酸。本发明的核酸优选是单链或双链的,并且通常包含磷酸二酯键,虽然有时如

下面所概括的包括核酸模拟物，该模拟物具有别的骨架，例如磷酰胺 (Beaucage等. (1993) *Tetrahedron* 49 (10): 1925)和其中的参考文献; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 579; Letsinger et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14 : 3487; Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805, Letsinger et al. 1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110 : 4470; 和Pauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26 : 141 9), 硫代磷酸酯( Mag et al. ( 1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437;和美国专利号5,644,048), 二硫代磷酸酯( Briu et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 2321, O-methylphosphoroamidite连接(参见Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues : A Practical Approach*, Oxford University Press), 和肽核酸骨架和连接(参见Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1895; Meier et al. ( 1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365: 566; Carlsson et al. (1996) *Nature* 380: 207)。其他的核酸模拟物包括具有阳性骨架(Denpcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097; 非离子骨架(美国专利号5,386,023、5,637,684、5,602,240、5,216,141和4,469,863; *Angew.* (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger et al. ( 1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; Chapters 2 and 3, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"* , Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4 : 395; Jeffs et al. (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996))和非核糖骨架，包括在美国专利号5,235,033和5,034,506和第6和7章 *ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook中描述的那些。包含一或多个碳环糖的核酸也包括在核酸的定义之内(参见Jenkins et al.( 1995), *Chem. Soc. Rev.* pp169- 176)。若干核酸模拟物在Rawls, C & E News June 2、1997 page 35中描述。可以对核糖-磷酸酯骨架进行这些修饰，以帮助添加附加部分例如标记物,或提高这种分子在生理环境中的稳定性和半衰期。核酸包括单或双链核酸，包括但不限于单或双链DNA或RNA或DNA / RNA杂合体(嵌合体)。在各个的实施方式中，所述核酸的长度范围从5个到大约500个核苷酸(对于双链分子而言是碱基对)，优选大约从5个到大约400、300、或200个核苷酸(或碱基对),更加优选从大约10、5、20、25、30、或40个核苷酸(或碱基对)到大约150、100、80、或60个核苷酸

(或碱基对)。

术语“纳米颗粒”指一种颗粒，其具有小于大约500 nm的特征性尺寸，优选小于大约400nm，更优选小于大约300 nm，更优选小于大约200或100纳米，和最优选小于大约80、50、40、或30 nm。在一些实施方式中，所述纳米颗粒具有大约20 nm的特征性尺寸(例如直径)。

纳米颗粒的“大小”指由“特征长度”所决定的纳米颗粒的尺寸，例如，球体的直径，或线，棒的宽度，椭圆体的短轴长度，通常指较短主轴的长度，等等。在纳米颗粒群体中，大小指平均“特征长度”。

如在此使用的，“纳米等离子标尺”或“纳米偶联物”指包含一或多个纳米颗粒的结构，其中核酸(单或双链)附着于纳米颗粒上。

“一组纳米偶联物”指由所附着的核酸性质而区别开来的许多种类的纳米偶联物组成的组。在各个实施方式中，所述组包含至少2个、优选至少5或10个、更加优选至少20、50、或100个、和最优选至少200、500、1,000、或10,000个不同的纳米偶联物。

当纳米偶联物包含不同的纳米颗粒或不同的核酸(即核酸在骨架和/或序列和/或碱基修饰方面不同)时，纳米偶联物被认为是“不同种类的”。

当纳米偶联物被称为“被标注位置”(例如在一组纳米偶联物中)时，它指不同种类的纳米颗粒可以被彼此区分开来(例如每个种类可以被唯一地鉴定)。在各种实施方式中，所述纳米偶联物可以通过将不同种类定位在底层的不同位置而从空间上被标注位置，从而形成纳米偶联物“阵列”。在一些实施方式中，所述纳米偶联物被标注位置可以是提供每种纳米偶联物独特的信号或可鉴别的相关信号。在各个实施方式中，所述信号可通过附着的标记物而提供。在各个实施方式中，所述信号可以通过包含纳米偶联物的所述核酸序列的一部分而提供(例如允许例如标记的互补解码探针杂交)。在各个实施方式中，所述信号可以通过选择包含纳米偶联物的纳米颗粒的一种或多种材料而提供。

“DNA结构结合蛋白”指一种蛋白质，其通常不依赖于DNA结构的序列组成而结合所述DNA结构。DNA结构结合蛋白包括、但是不限于与下列结构结合的蛋白质，例如发夹、环、鼓泡、切口、单链DNA-双链DNA转换、单链RNA-双链RNA转换、RNA-DNA转换、瓣、Y形叉，等等。

术语“特定地杂交到”和“特异性杂交”和“有选择地杂交到”如在

此所使用指的是核酸分子在严格条件下优先地结合到一特定核苷酸序列上、与该核苷酸序列成双链、或杂交到该核苷酸序列上。所述术语“严格条件”指其中探针优先杂交到其靶序列、而较少或根本不杂交到其他序列的条件。严格杂交以及严格杂交洗涤条件在核酸杂交的情况中是序列依赖的，并且在不同的环境参数下有所不同。核酸杂交的详尽指导在例如 Tijssen(1993)Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes part I, chapt 2, Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays, Elsevier, NY (Tijssen)中找到。通常，高度严格杂交和洗涤条件被选择成比在给定离子强度和pH下指定序列的热解链温度( $T_m$ )低大约 $5^{\circ}\text{C}$ 。 $T_m$ 是(在给定离子强度和pH下) 50%的目标序列杂交到完美匹配的探针时的温度。非常严格条件被选择成等于特定的探针的 $T_m$ 。与在Southern或Northern印迹的阵列或滤膜上有超过100个互补残基的互补核酸杂交的严格杂交条件的例子为： $42^{\circ}\text{C}$ 使用标准杂交溶液(参见例如 Sambrook (1989) Molecular Cloning : A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1 - 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY、以及以下的详细讨论)，过夜进行杂交。高度严格洗涤条件的一个例子是 $0.15\text{ M NaCl } 72^{\circ}\text{C}$ 大约15分钟。严格洗涤条件的一个例子是 $0.2\times\text{ SSC } 65^{\circ}\text{C}$  洗涤15分钟(参见，例如 Sambrook见上，对于SSC缓冲液的描述)。常常在高严格洗涤之前进行低严格洗涤以除去背景探针信号。对例如超过100个核苷酸的双链的中等严格洗涤的例子为 $1\times\text{SSC } 45^{\circ}\text{C}$  15分钟。对例如超过100个核苷酸的双链的低严格洗涤的例子为 $4\times$ 到 $6\times\text{ SSC } 40^{\circ}\text{C}$  15分钟。

“放宽的杂交条件”指的是尽管存在一定错配、但仍允许杂交的杂交条件。在各个实施方式中，错配可以是单个碱基错配。在各个实施方式中，错配可以是包含至多2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、或50、或更多个碱基对(bp)的错配。

### 附图简述

图1A和1B说明金-DNA纳米等离子分子标尺的设计。

图1A：单个金-DNA纳米偶联物的合成过程。用膦单层修饰的20 nm金纳米颗粒用合成的54-bp双链DNA层包裹。分别在双链DNA两端合成硫醇基

和FITC荧光团。通过硫醇-金化学作用,双链DNA被系在20nm金纳米颗粒上。所述双链DNA可以用四种核酸内切酶消化: *KpnI*, *SalI*, *XhoI*,和*HindIII*,它们切出不同长度。

图1B显示所述双链DNA的序列(SEQ ID NO:1上方链和SEQ ID NO:2下方链)。酶切割位点标注在双链DNA的对应位置上。所述双链DNA包含核酸内切酶*HindIII*、*XhoI*、*SalI*、和*KpnI*的限制性位点,它们的切割位置中央分别距离系缚金纳米颗粒那一端12、24、36和48bp。荧光标记(FITC)只是用于进一步确认核酸酶反应,因此对于等离子体共振测量不是必需的。核酸内切酶对合成的双链DNA的消化通过凝胶电泳来确认(参见,例如图6)。

图2A-2D显示DNA偶联使分子标尺的等离子共振峰红移(red-shifted)。

图2A显示纳米偶联物的透射电子显微镜(TEM)图像: 图片a: 金(Au); 图片b: 金(Au)-DNA; 图片c: 金(Au)-DNA, 其中DNA用醋酸双氧铀(uranyl acetate, UA)染色, 从而进一步增加了复合物的直径(不均匀的DNA密度是由于固定引起的); 图片d, 金纳米颗粒之间的距离。误差线表示测量50个纳米颗粒的标准偏差。

图2B显示纳米偶联物的电泳: 图片a: 金-DNA纳米偶联物(Au-ph是膦包被的金纳米颗粒); 图片b: 用四种核酸内切酶切割的金-DNA纳米偶联物, 导致双链DNA丢掉42、30、18和6 bp, 显示依赖于DNA大小的迁移率。

图2C暗视野散射图像: 图片a: 在金-DNA纳米颗粒视野中锁定并隔离单个纳米颗粒供光谱分析; 图片b和c: 金(图片b)(540 nm峰)和金-DNA(图片c)(607 nm峰)的真实色彩图像。

图2D显示金和金-DNA的散射谱。

图3A和3B显示用标尺测量核酸内切酶活性。

图3A: 用多个纳米偶联物传感等离子共振: 图片a-c显示用核酸内切酶*XhoI*切割的金-DNA纳米偶联物的暗视野散射图像(图片a, 切割之前; 图片b, 反应1小时, 超过90%被切割; 图片c, 反应16小时, 100%切割。也参见图8来证实切割)。图片d显示图3A图片a-c中单个金纳米偶联物的等离子共振波长。误差线表示测量20个纳米颗粒时的标准偏差。

图3B图片a-c显示核酸内切酶反应的实时等离子共振传感: 图片a: 核酸内切酶反应中单个金-DNA纳米偶联物在不同时间分辨出的原始散射光谱数据; 图片b: 等离子共振峰波长; 图片c: 用1: 1 *XhoI*(3.5 nM, 圆圈)、1:

10 *XhoI* (350 pM、三角形)、对照缓冲液单独(菱形)和抑制剂/螯合剂EDTA (正方形)反应30分钟的金-DNA纳米偶联物散射峰强度。等离子共振波长数据显示一阶(first-order)指数式衰减(红色和橙色曲线)。

图4A和4B显示多种酶的纳米等离子共振传感的标定曲线的生成。

图4A显示典型的散射谱。

图4B显示用四种核酸内切酶切割反应之后金-DNA纳米偶联物的等离子共振峰波长, 以及作为切割后仍与所述金纳米颗粒附着的碱基对数目的函数。红色曲线是使用折射率的Langevin型依赖关系相对于双链DNA长度, 从半经验模型进行拟合(fit)而成(参见图9以及表1)。误差线表示测量20个纳米颗粒的标准偏差。

图5A-5D说明受EcoRI (Q111)蛋白质阻碍的Bal31核酸外切酶的DNA足迹分析。

图5A显示Bal31以及被结合DNA的EcoRI(Q111)蛋白所妨碍的Bal31水解的足迹分析的示意图。EcoRI(Q111)阻止Bal31除去单个Au-DNA纳米偶联物上的核苷酸(全长上方链(SEQ ID NO:3), 全长下方链(SEQ ID NO:4), 被消化的上方链(SEQ ID NO: 5), 被消化的下方链(SEQ ID NO: 6))。

图5B和5C显示不存在EcoRI(Q111)(图5B)以及存在EcoRI(Q111)(图5C)时, 单个金-DNA纳米偶联物在核酸外切酶Bal31水解过程中随时间推移的散射谱。

图5D显示在核酸外切酶反应中金-DNA纳米偶联物等离子共振波长作为时间的函数, 其中的波长改变显示于右侧纵轴, 双链DNA被除去的碱基对显示于左侧纵轴。误差线表示测量10个纳米颗粒的标准偏差。

图6说明DNA用核酸内切酶切割。按照厂家说明书(New England Biolab, Beverly, MA)测试用限制性核酸内切酶*HindIII*、*KpnI*、*XhoI*、和*SalI*消化54bp双链DNA的产物。各个酶的切割位点显示于图1B。1 $\mu$ L的每一种酶各与适当的缓冲液和水混合, 终反应体积100 $\mu$ L。反应物37 $^{\circ}$ C保温过夜。然后在5% NuSieve琼脂糖凝胶上在1X TBE中进行凝胶电泳来验证消化产物, 用10 bp序列梯作为分子量标准(Invitrogen, Carlsbad, CA)。注意所述凝胶中显示的DNA不是系在金纳米颗粒上的。

图7显示纳米偶联物的凝胶电泳。其中:(1)不同磷/金比例的金-磷(Au-ph)纳米偶联物。通过与双(对磺酰苯基)苯基磷(Bis(p-sulfonatophenyl)

phenylphosphine, 膦(phosphine))进行表面交换来稳定金纳米颗粒以防止聚集。左侧泳道为没有膦表面活性剂的金纳米颗粒对照。为简化起见,金-膦在实施例1中被称作金,因为用于该研究的全部金纳米颗粒都包被有膦表面活性剂。

图8图片1-4显示确认核酸内切酶切割产物。与图3A进行一样的反应,用荧光图像成像。其中:用酶XhoI进行切割反应之前(图片1)、反应1小时(图片2)和16小时(图片3)的金-DNA纳米偶联物荧光图像。测量每种情况下四个不同区域(正方形)的荧光强度,荧光强度的统计数值显示于(图片4),其中有上述三种情况下的单个金纳米偶联物的平均荧光强度。注意完整双链DNA的全长( $\sim 20$  nm)比有效Forster传递距离( $<10$  nm)长得多,因此DNA远端的FITC荧光团没有猝灭。在DNA切割之后,FITC荧光团与金纳米颗粒脱离,扩散入缓冲溶液中,因此在平面图中(金纳米颗粒所处位置处)总荧光强度显著减少。

图9显示用不同的核酸内切酶切割之后金-DNA纳米偶联物的模拟散射谱。金的波长依赖性介电常数内插自Johnson和Christy (1972) Phys. Rev. B 6, 4370-4379的表报数据。模拟码改编自Bohren和Huffman,(1983) Absorption and scattering of light by small particles (John Wiley & Sons, Inc., New York)的BHCOAT。

图10A和10B显示在纳米等离子标尺上进行足迹法以检测转录因子(例如E2F1)的结合的示意图。没有E2F1(或其他结合蛋白)结合时,BAL31核酸外切酶实质上完全消化核酸(图10A)。当该转录因子存在时,BAL31核酸外切酶对分子标尺核酸的消化被妨碍,从而提供指示所述转录因子存在和结合位置的信号(图10B)。

图11A和11B说明使用甲基结合蛋白例如MeCP2(图11A)或错配结合蛋白例如MutS(图11B)检测单核苷酸多态性(SNP)。当甲基结合蛋白或错配结合蛋白存在时,核酸外切酶(例如BAL31)对分子标尺核酸的消化被妨碍,从而提供了指示SNP存在和位置的信号。

图12说明使用纳米等离子标尺足迹法来鉴定DNA上外遗传改变。

图13说明足迹法,其使用纳米等离子标尺以检测特异性结合核酸结构(例如由XPG蛋白结合的DNA鼓泡结构)的蛋白,并对其进行足迹分析。在此实例中,XPG不与5个碱基对的鼓泡结合,而与10-15bp的鼓泡结合。因此,

如图片A所示, XPG不与标尺结合, 核酸被完全消化。在图片B中, 存在较大鼓泡。当结构结合蛋白(例如XPG)存在时, 核酸外切酶(例如BAL31)对分子标尺核酸的消化被妨碍, 从而提供信号, 指示所述结构的存在和位置。

图14说明不利用结合蛋白时对错配突变的检测。包含移码突变的基因组DNA、mRNA、或cDNA(例如RTcDNA)与包含野生型核酸探针的纳米等离子标尺杂交。由于有错配, 杂交产生Y形(分裂的)DNA, 终止于两条单链。使用单链特异的核酸外切酶消化单链, 在移码位置核酸外切酶的消化停止。当靶核酸不包含移码时, 整个探针都能杂交上, 导致没有单链生成, 也没有酶导致的消化。对杂交的核酸单链部分的消化(例如使用S1核酸酶)提供信号, 指示错配的存在和位置。

图15A-15D说明针对在此所描述的各种应用而设计的DNA序列的实例, 例如用于检测和识别:

(图15A) 转录因子(SEQ ID NO:7上方链、SEQ ID NO:8下方链)、

(图15B)SNP(SEQ ID NO:9上方链, SEQ ID NO:10下方链)、

(图15D)错配DNA(SEQ ID NO:11上方链、SEQ ID NO:12下方链)、

(图15E) 与CYCD1基因启动子结合位点结合的转录因子E2F1(SEQ ID NO:13上方链、SEQ ID NO:14下方链)。

## 发明详述

本发明提供新的组合物和方法, 用于研究/表征核酸和其它与核酸结合的分子之间的相互作用。尤其是, 在一些实施方式中, 本发明提供一种纳米等离子分子标尺, 其能对核酸(例如DNA)长度变化进行无标记地实时监测, 并且进行核酸足迹分析。所述标尺是通过将单或双链核酸系于单个纳米颗粒(例如金纳米颗粒)以形成核酸纳米偶联物来形成的。纳米偶联物散射谱显示出依赖于核酸长度的、红移的等离子共振波长峰值, 其可以通过亚纳米级(sub-nanometer)轴向分辨率来测量, 该分辨率就DNA来说为每个DNA碱基对平均峰值波长移动~1.24 nm。单个纳米偶联物的波谱在有核酸酶的情况下显示出随时间推移而依赖于反应动力学进行分辨的特征, 从而能进行核酸酶活性的定量、动态和实时测量。

所述标尺提供一种定量测量长度的方法, 以在长度变化和等离子共振峰移动之间建立关联性。此种测量长度的方法可以被用于提供纳米偶联物



核酸长度和/或长度变化（例如响应核酸酶切割）的精确实时测量。

在一些使用这种长度测量方法的实施方式中，所述纳米等离子标尺可用于检测和表征另一种分子（例如蛋白质、转录因子、酶等等）对纳米偶联物核酸的结合（例如鉴定结合结构域）。所述体系可以类似地用于检测和/或定位核酸杂交反应中的错配，从而鉴定核酸性质，包括但不限于多态性、突变等等。

本发明因此提供非常快速和便利的平台，用于对核酸-蛋白质相互作用作图、用于监测核酸酶活性、和用于其它基于核酸大小的方法。在各种实施方式中，提供了利用例如在此所描述的纳米等离子分子标尺，通过表面等离子共振（SPR），检测样品DNA的特定序列、碱基对改变、突变、大小、结构、或特征。

## I. 纳米等离子标尺以及其用途。

### A) 检测和定量核酸大小以及大小变化。

本发明的纳米等离子标尺（核酸纳米偶联物）提供一种等离子共振信号（例如纳米等离子共振峰）信号，其对核酸长度的改变高度敏感。因此，在一些实施方式中，提供了标定（calibrate）信号和核酸长度变化之间关系的方法和组合物。

在一些实施方式中，这通过提供附着于纳米颗粒的双链核酸而实现，所述双链核酸被设计成包含多个核酸内切酶限制性位点，因此对纳米偶联物进行DNA消化后，利用相应核酸内切酶，可通过在不同时间测量纳米等离子共振信号检测出纳米偶联物的尺寸。不同的核酸内切酶消化位点可以通过所导致的等离子共振波长变化彼此区分开来，所述变化对应于在消化之后尚附着于纳米颗粒上的DNA的不同的长度。在各种实施方式中，在利用双链DNA的情况下，这提供了每个DNA碱基对平均1.24纳米波长位移的分辨率。

用图1A和1B举例说明，在一些实施方式中，酶切割位点被设计/选择，使得它们位于双链DNA的不同位置，来生成标准曲线。因此，限制性位点通常位于使核酸内切酶消化后产生不同的可区分的信号的位置，并且提供足够多的限制性位点以产生具有所需分辨率和/或准确度的标准曲线。利用纳米等离子共振标尺生成标准曲线的方法在实施例描述。

例如，在一个实施方式中，当寡核苷酸长54 bp时，双链DNA包含核酸

内切酶*HindIII*、*XhoI*、*SalI*、和*KpnI*的限制性位点，它们的中央切割位置距金纳米颗粒所系的一端分别为12、24、36、和48 bp。因此，所述寡核苷酸用四种核酸内切酶、例如*KpnI*、*SalI*、*XhoI*和*HindIII*消化时，其在纳米偶联物上产生多个具有不同切割长度的寡核苷酸。

而在一些实施方式中，可以加上荧光标记(FITC)，用于进一步证实核酸酶反应。不需要进行等离子共振测量。核酸内切酶对合成的双链DNA的消化可以通过凝胶电泳确认。

只要在包含于纳米偶联物中的核酸中存在作为靶的限制性序列，在本发明的方法中适合使用任何核酸(例如DNA)限制性位点和相应的酶。用于进行核酸内切酶消化反应的方法为本领域技术人员所熟知。因此，例如，在实施例中，按照厂家的说明书(New England Biolab)用限制性核酸内切酶*HindIII*、*KpnI*、*XhoI*和*SalI*限制性消化DNA，对厂家方案进行改进的目的只是为从反应缓冲液和酶中除去还原剂，以免硫醇化DNA从金纳米颗粒上脱离。

虽然在实施例中使用双链DNA来举例说明标定方法，类似的标定可以使用双链RNA、DNA/RNA杂交体等等进行。

此外，所述方法不限于利用限制性核酸内切酶。可以利用任何便利的方法将单或双链核酸消化(水解)成具体的(例如预先确定的)长度。

因此，例如，在一些实施方式中，将单链核酸附着于纳米偶联物。单链与不同长度的互补链杂交，从而形成纳米偶联物，该纳米偶联物包含终止于不同的长度的单链核酸的双链核酸。纳米偶联物用特异于单链核酸的核酸外切酶(例如核酸外切酶I)消化，反应到达双链部分时反应停止。可以确定等离子共振信号方面的变化，并计算标定曲线。反之，可以使用特异于双链核酸的核酸外切酶进行所述反应。

或者，所述单或双链核酸可以用任何适当试剂或酶水解、测定等离子共振信号的变化，随后测定(例如通过质谱测定法、电泳、测序，等等)所产生的核酸的长度。

这些方法是说明性的而非限制性的。使用在此描述的方法，生成标定标准和/或标定曲线的其它方法将为本领域技术人员所认识。

## **B) 例证性应用。**

通过用所述纳米等离子共振标尺生成标准标定曲线,该标尺然后提供一种核酸足迹法平台,其分辨率比得上传统的放射性方法。然后可以使用纳米等离子共振标尺检测核酸样品中特定特征(即序列、突变、结构或特征)或与靶序列或特征结合的蛋白质的存在。此外,使用阵列格式的核酸-纳米颗粒偶联物提供允许同时检测样品中多个特征的平台。

因此,在一些实施方式中,纳米偶联物中的核酸包含蛋白质结合位点。在各种实施方式中,寡核苷酸包含待检测的特异性序列。

### 1) 结合蛋白的检测和/或足迹分析。

在一些实施方式中,本发明的纳米等离子标尺可用于DNA结合蛋白的检测和/或足迹分析。这种DNA结合蛋白包括但不限于转录因子、核酸酶、组蛋白等等。

例如,在一个实施方式中,显示切割缺陷型EcoRI(Q111)突变体在DNA上的足迹。实施例1描述了核酸外切酶的DNA足迹分析被EcoRI(Q111)蛋白妨碍的情形。切割缺陷型EcoRI(Q111)与DNA上的GAATTC(SEQ ID NO:16)位点结合,并阻碍BAL31在单个金DNA纳米偶联物上除去核苷酸。没有切割缺陷型EcoRI(Q111)突变体存在时,双链DNA被BAL31酶完全消化。然而,在EcoRI(Q111)突变体结合后,核酸外切酶消化在结合位置被阻止,产生图5C,这是有EcoRI(Q111)突变体时单个金-DNA纳米偶联物在核酸外切酶BAL31消化期间随时间推移的散射波谱,而图5B是在无EcoRI(Q111)突变体时单个金-DNA纳米偶联物在核酸外切酶BAL31消化期间随时间推移的散射波谱。

在消化反应过程中监测这两个样品各自的单个纳米偶联物等离子共振波长。金-DNA纳米偶联物的等离子共振波长作为核酸外切酶反应中时间的函数来测出,波长移动显示在右侧Y轴上。左侧Y轴上显示在核酸外切酶反应中被消化的双链DNA碱基对作为时间的函数。Bal31将DNA足迹的远端边界定位于距离该DNA的远端~25bp之处。可以使用其它具有双链DNA消化活性的核酸外切酶以代替BAL31。

虽然实施例1以简单的双链DNA纳米颗粒偶联物为例证实了本发明的概念,但实际上本发明对可以被偶联的核酸底物的序列或结构没有限制。在各种的实施方式中,所述纳米偶联物可以包括许多不同的DNA结构,包

括但不限于茎-环、切口、单链DNA-双链DNA转换(transition)、瓣、Y形叉、双链RNA等等。能够快速分辨单个纳米颗粒的能力使得能够在微阵列格式或在微流体装置中进行高通量筛选。

## 2) 转录因子的检测和/或足迹分析。

图10显示转录因子的检测以及足迹法。类似于EcoRI(Q111)的例子，转录因子在转录因子结合位点处结合DNA。结合的转录因子在该点阻碍BAL31核酸外切酶消化反应。相反，没有转录因子时，双链DNA被BAL31酶完全消化。将核酸外切酶BAL31消化期间有转录因子结合的单个DNA-纳米颗粒纳米偶联物的随时间推移的散射波谱，与没有所述转录因子结合时单个DNA-纳米颗粒纳米偶联物随时间推移的散射波谱进行比较。这样，纳米等离子标尺可用于检测和定量序列特异性结合至DNA的转录因子的活性。

当转录因子的结合位点未知时，可使用带有不同核酸序列的一组纳米等离子标尺(核酸纳米偶联物)。那些具有结合位点的纳米偶联物将妨碍BAL31的消化，而那些缺乏结合位点的纳米偶联物将要被完全消化。这样就可以检测和鉴定结合位点。

## 3) 检测和/或定量DNA碱基修饰。

图11A和11B示意地说明使用本发明的纳米等离子标尺进行足迹法，以检测和定量存在于DNA上的DNA碱基修饰和单核苷酸多态性(SNP)，或当一个以上核苷酸被突变时DNA中的错配位点。在一个实施方式中，如图11A所示，甲基结合蛋白，例如MeCP2，与DNA上的甲基化DNA核苷酸碱基结合，阻碍例如BAL31在单个DNA-纳米颗粒纳米偶联物上除去核苷酸，从而妨碍核酸外切酶在所述结合位置的消化。比较在核酸外切酶BAL31消化期间有甲基结合蛋白结合的单个DNA-纳米颗粒纳米偶联物的随时间推移的散射波谱，和没有甲基结合蛋白时所述单个DNA-纳米颗粒纳米偶联物随时间推移的散射波谱，以鉴定甲基化的存在和/或位点，从而鉴定碱基修饰(例如甲基化)。

## 4) 检测和/或鉴定/定位错配或SNP。

在另一个实施方式中，如图11B所举例说明的，错配结合蛋白，例如MutS，与DNA上的错配位点(例如因单核苷酸多态性(SNP)致使互补被破坏之处)结合。结合的MutS妨碍BAL31除去(消化)DNA-纳米颗粒纳米偶联物上的核苷酸。相反，没有错配的纳米偶联物不被MutS结合，于是被完全消化。因此，纳米等离子标尺可以利用对DNA的序列特异性结合来检测和定量单核苷酸多态性。

在一些实施方式中，纳米偶联物包含互补于野生型序列的核酸。它们与样品中的基因组DNA、mRNA、或cDNA杂交。杂交条件充分放宽，以允许单碱基错配。所杂交的纳米偶联物与MutS接触。如果存在错配，例如由于样品中SNP的存在所致错配，则MutS与错配位点结合。在这些包含错配的纳米偶联物上，用例如BAL31进行的消化将被妨碍，从而指示错配的存在和位置。

在一些实施方式中，在此描述的方法可用于检测例如来自病人的DNA样品中SNP和/或外遗传甲基化碱基，如例如在图11B和12中所示的。此外也涉及通过将例如病人的DNA与一组或一个阵列的纳米偶联物杂交而一次检验多种SNP，在该组或该阵列的纳米偶联物中，具有多种SNP的野生型序列的寡核苷酸被系于纳米颗粒上。杂交后，加入错配结合蛋白(例如MutS、或其它错配结合蛋白)以鉴定任何SNP和与其结合。在添加单链DNA核酸外切酶消化DNA之后，进行等离子共振，通过观察SNP位点处的峰来检测突变。

### 5) 对疾病及其他状态中的外遗传改变进行足迹分析

参照图12，其示意性地显示使用纳米等离子标尺对基因组DNA的外遗传变化进行足迹法。在癌症及其他疾病中，许多调节基因，例如p53和BRCA1/BRCA2，都被外遗传地(epigenetically)改变。这类可被本发明纳米偶联物检测和定量的外遗传改变包括但不限于甲基化、乙酰化、泛素化(ubiquitylation)等等。在一些实施方式中，提供来自病人样品的基因组单链DNA，并将其杂交到纳米等离子标尺上。然后提供特异性结合蛋白，将其与DNA上的被修饰位点结合，阻碍BAL31对单个金-DNA纳米偶联物上核苷酸的去除。在没有蛋白质与外遗传变化结合的情况下，双链DNA被BAL31酶完全消化。然而在该蛋白质结合后，核酸外切酶消化在结合位置被停顿。在核酸外切酶BAL31消化期间有该蛋白质结合的单个DNA-纳米颗粒纳米

偶联物的随时间推移的散射波谱与没有蛋白质结合时单个DNA-纳米颗粒纳米偶联物随时间推移的散射波谱作比较。因此，所述纳米等离子标尺可以利用对DNA的序列特异性结合检测和定量外遗传的改变。

### **6) 检测和/或定位核酸结构**

图13显示示意图，举例说明使用本发明的纳米等离子标尺进行足迹法，来检测特异性结合(而不是序列特异性结合)于DNA的结构(例如被XPG蛋白质结合的DNA鼓泡结构)的那些蛋白质，并对这些结构进行足迹分析。可以被识别的DNA结构包括但不限于5 bp鼓泡、10 bp鼓泡、茎环和突出(ovehang)。在一个实施方式中，如图13所示，DNA结构结合蛋白，例如XPG，与DNA上被识别的结构结合，阻碍核酸酶例如BAL31在单个DNA-纳米颗粒纳米偶联物上除去核苷酸。在XPG不存在的情况下，双链DNA被BAL31酶完全消化。然而，在该结构结合蛋白结合之后，核酸外切酶消化在结合位置被停顿。比较核酸外切酶BAL31消化期间有DNA结构结合蛋白结合的单个DNA-纳米颗粒纳米偶联物随时间推移的散射波谱，和没有所述结构结合蛋白结合时单个DNA-纳米颗粒纳米偶联物随时间推移的散射波谱。

### **7) 不使用结合蛋白时检测和/或定位核酸结构**

在各种实施方式中，一些核酸结构可以不使用结构结合蛋白就加以检测和/或定位。这例如在图14中加以举例说明，其中显示不利用结合蛋白就能检测移码突变。包含移码突变的基因组DNA、mRNA、或cDNA(例如RTcDNA)与包含野生型核酸探针的纳米等离子标尺杂交。由于有错配，杂交产生Y形(裂开的)DNA，终止于两个单链。使用单链特异性核酸外切酶消化所述单链，核酸外切酶的消化在移码位置停止。当靶核酸不包含移码时，整个探针都被杂交，不产生单链，不被所述酶消化。对杂交的核酸单链部分的消化(例如使用S1核酸酶)提供信号，指示错配的存在和位置。

虽然上述实例参照特定核酸内切酶、核酸外切酶(例如Bal31)、单链特异的核酸外切酶(例如S1)、结构特异的结合蛋白(例如XPG)、错配特异的结合蛋白(例如MutS)、和修饰特异的结合蛋白(例如MeCP2)加以描述，其它种类的这类蛋白质为本领域技术人员所熟知，并且可用于在此描述的方法。

图15A-15D举例说明各种用于本发明的纳米等离子标尺的核酸序列。

### **8) 其它示例性应用。**

在各种研究和应用领域都有许许多多潜在的核酸酶靶标,例如HIV整合酶(Caumont et al. (1999) FEBS Lett 455 : 154 - 158; Rumbaugh et al. (1988) J Biol Chem 273 : 28740 - 28745; Nair ( 2002) Rev Med Virol 12 : 179 - 193) (HIV药物), 凋亡活化的DNases ( Counis and Torriglia ( 2000) Biochem Cell Biol 78 : 405 - 414; Fan (2003) Cell 112 (5) : 659 - 672) (抗凋亡药物)、和加工微小RNA/siRNA的RNases(Moss (2001) Curr Biol 11 : R772-775; Tijsterman and Plasterk ( 2004) Cell 117: 1-3) ( siRNA稳定性)或WRN (Kamath - Loeb et al. ( 1998) J Biol Chem 273 : 34145 - 34150; Shen et al. (1998) J Biol Chem 273 : 34139 - 34144)和V(D)J-再连接酶RAG重组酶(Roth (2003) Nat Rev Immunol 3 : 656 - 666; Shockett and Schatz ( 1999) Mol Cell Biol 19 : 4159 - 4166) (放射致敏剂药物)。

还可以体内追踪纳米颗粒偶联物, 并且可以实时原位跟踪反义寡核苷酸和siRNA的结局。因为可以将多个纳米颗粒排成阵列以较好地将信号值平均化和扩展不断变化的范围, 可以从所述足迹法数据得出与DNA序列特异性结合的蛋白质的量。这随后可以允许测量转录组图谱和转录因子结合活性, 所有测量都以高通量和多路方式进行。还可以扩展这里的这个平台, 以研究不同的DNA结构和监测DNA结构变化动力学(Sonnichsen et al.(2005) Nat Biotechnol 23:741-745(2005)。)。在此开发和描述的新技术能被用于其它水解酶, 例如蛋白酶或糖基化酶的检测; 或其它改变生物分子长度或电荷的那些酶, 例如连接酶或激酶的检测。此外它还提供一种高灵敏度、高特异性的酶学研究方法, 而不需要放射性或荧光标记。单个纳米偶联物无限小的尺寸也暗示一种潜在的大规模检测器阵列, 用于高通量核酸酶检测, 其中可在小于毫微微升的体积中检测每个单独的反应。

上述应用只是说明性而非限制性的。利用在此提供的教导, 本领域技术人员能认识到许多用于“足迹法”用途的实施方式。

### **C) 等离子共振标尺组。**

在各种的实施方式中, 本发明涉及一组纳米等离子标尺, 其能被用于, 例如, 高通量测定、宽范围的筛选系统、微流体应用等等。所述组通常包

含多个纳米偶联物，其中不同偶联物带有不同的核酸。不同的纳米偶联物被标注位置，因此它们可以在如本文描述的等离子共振测量之前和/或期间和/或之后被区别开。

在一些实施方式中，例如，不同的纳米偶联物附着于或定位在底层的不同区域，因此它们被“标注空间位置”。或者，纳米等离子偶联物可携带不同的标签，以鉴别或区别不同种类。标签可以包含不同的纳米颗粒形状和/或材料，或不同的共振信号，或可以通过附着的标记来提供标签等等。为由许多部分组成的集合加标签的方法为本领域技术人员所熟知。

在不同的实施方式中，这种集合包含至少3个、优选至少5个、更加优选至少10、20、25、或50、和最优选至少100、500、1000、5,000、或10,000个不同种类。

用举例说明的方法，在一个实施方式中，预期提供一个平台，其包含本发明的纳米偶联物的阵列，用于平行和多重检测和定量。在一个实施方式中，提供阵列格式的靶序列文库，使用户能同时作图和定量多个靶序列。例如，单链DNA形式的转录因子结合序列的寡核苷酸文库可以与纳米颗粒结合以包含纳米偶联物文库，其中结合相同转录因子的序列存在内在冗余。提供一种转录因子，让其结合于纳米偶联物文库中的靶序列，借此可以利用本文的SPR检测方法测量上游转录因子活性和DNA序列对其的调节。这对于研究人员而言通常比观察下游mRNA表达的终点读数更有意义。

## **II. 等离子共振标尺(纳米偶联物)组成和构建。**

在各种实施方式中，等离子共振标尺(纳米颗粒偶联物)包含偶联于纳米颗粒的单或双链核酸。在各种实施方式中，核酸直接附着于纳米颗粒(例如通过共价键)，而在其它实施方式中，核酸通过接头附着于纳米颗粒。

在各个实施方式中，纳米颗粒由金属或半导体材料组成。对本发明的实施有用的纳米颗粒包括，但是不限于包含下列的纳米颗粒：金属(例如金、银、铜、钨、铂、钛、铁、锰等等，或其氧化物或合金)、半导体材料(例如，CdSe、CdS、和包被有ZnS的CdS或CdSe等等)、多层金属和/或金属合金、和/或金属氧化物或氮化物、聚合物、碳纳米材料、磁性的(例如铁磁体)胶体材料等等。在一些实施方式中，纳米颗粒包含下列中的一种或多种：钨、钽、铌、Ga、Au、Ag、Cu、Al、Ta、Ti、Ru、Ir、Pt、Pd、Os、Mn、Hf、



Zr、V、Nb、La、Y、Gd、Sr、Ba、Cs、Cr、Co、Ni、Zn、Ga、In、Cd、Rh、Re、W、Mo、和其氧化物、合金、混合物、和/或氮化物。其它对本发明的实施有用的纳米颗粒包括但是不限于ZnS、ZnO、TiO<sub>2</sub>、AgI、AgBr、HgI<sub>2</sub>、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In<sub>2</sub>S<sub>3</sub>、In<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>、Cd<sub>3</sub>P<sub>2</sub>、Cd<sub>3</sub>As<sub>2</sub>、InAs、和GaAs。

在一些实施方式中，纳米颗粒的尺寸优选从大约5nm至大约300nm(平均直径)，优选从大约5至150nm(平均直径)，更加优选从大约10至50nm，最优选从大约20至大约30 nm。纳米颗粒的尺寸可以按照它们的具体用途或应用的需要而变化。

适当的纳米颗粒包括但是不限于纳米球(nanosphere)、纳米棒(nanorod)、纳米月牙体(nanos crescent)、纳米管(nanotube)、纳米棱锥(nanopyramid)、纳米线(nanowire)、纳米角状物(nanohorn)、纳米管、纳米棱锥、纳米四脚锥体、单或多层纳米盘(nanodisk)、纳米角状物等等。实质上任何形状的纳米颗粒都可被用于一些实施方式。纳米颗粒可以是固体、单层、或多层、或芯-壳结构。

在一些实施方式中，所述纳米颗粒是金和/或银纳米颗粒，因为等离子共振波长移动响应于紧邻这些纳米颗粒的周围环境的变化而发生移动，从而有利于利用散射或吸收光谱法检测它们。

在一些实施方式中，本发明涉及利用多聚体纳米颗粒(例如金和/或银纳米颗粒二聚体)。这种多聚体纳米颗粒为本领域技术人员所知(参见例如Sonnichsen et al. (2005) Nat Biotechnol 23, 741 – 745，其通过参考被并入本文)。

制造纳米颗粒的方法为本领域技术人员所熟知。这种方法包括但不限于燃烧合成(例如在氧化还原反应中使用氧化剂(例如金属盐)和燃料(例如有机化合物))、蒸发/凝聚(evaporation/condensation, EC)发生器、喷雾热解作用(例如等离子处理和粉末喷雾)、利用溶液化学例如超临界流体进行的液相方法、化学还原、或化学氧化、机械混合(mechanically alloying)、模板法(例如在模板材料(例如沸石、柱状粘土、纳米多孔膜、反向胶束等等)的小空间或区域内形成纳米颗粒)(参见例如美国专利号7,212,284、7,204,999、7,147,712、7,128,891、6,972,046、6,688,494、5,665,277，其通过参考全文引入，和PCT专利申请号WO/2007/024323，其通过参考全文引入)。纳米角

状物的生产由例如 Berber et al. 2000) *Physical Review B*, 62 (4): R2291-2294 描述, 而纳米纤维的生产由例如美国专利 6,706,248、6,485,858 描述, 其通过参考被并入本文。也参见 Fedlheim and Colby(2001) *Metal Nanoparticle: Synthesis Characterization & Applications*, Marcel Dekker, Inc., N.Y.; Baraton (2002) *Synthesis, Functionalization and Surface Treatment of Nanoparticle*, American Scientific Publishers; Fendler (1998) *Nanoparticle and nanostructured Films: Preparation, Characterization and Applications*, Wiley - VCH, N.Y.等等。

在一些实施方式中, 纳米颗粒在表面活性剂体系中合成。这种基于表面活性剂的方法为本领域技术人员所熟知。

更一般地说, 在一些实施方式中, 可以通过用有机溶剂(例如乙醇)还原金属盐类以形成金属胶体来形成纳米颗粒(参见例如 Hirai et al. (1979) *J. Macromol. Sci. Chem.*, A13 : 727; Hirai et al. (1976) *Chem. Lett.*, 905; Toshima and Yonezawa (1992) *Makromol. Chem., Macromol. Symp.*, 59 : 281; Wang and Toshima (1997) *J. Phys. Chem.*, 97 : 11542 等等)。一个示例性的方法由 Pastoriza - Santos and Liz - Marzan (2000) *Pure Appl. Chem.*, 72 (1- 2) : 83 - 90 描述。在它们的方法中, 在稳定剂存在或不存在的条件下,  $\text{Ag}^+$  离子被 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)还原。所述反应导致形成静电附着在表面上的银纳米颗粒薄膜, 或者银纳米颗粒的稳定分散体。

在另一个示例性的方法中, 通过在有机溶剂中将铁盐与醇、羧酸和胺混合, 并且加热所述混合物至 200 - 360°C 制备磁性纳米颗粒。颗粒尺寸可以通过改变铁盐与酸/胺比例或者通过用更多氧化铁包被小纳米颗粒加以控制。可以容易地获得具有窄粒径分布的尺寸 2 nm 到 20 nm 的磁性纳米颗粒。所述方法可以容易地延至其他基于氧化铁的纳米颗粒材料, 包括  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (其中 M 为例如 Co、Ni、Cu、Zn、Cr、Ti、Ba、Mg 等等) 纳米材料, 和延伸至氧化铁包被的纳米颗粒材料。通过在反应混合物中用硫醇代替乙醇, 所述方法也导致合成基于硫化铁的纳米颗粒材料。磁性纳米颗粒可以氧化成  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  或  $\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , 或可以被还原为 bcc-Fe 纳米颗粒, 而基于氧化铁的材料可用于制备基于二价铁的金属纳米颗粒, 例如 CoFe、NiFe、和 FeCoSmx 纳米颗粒(参见例如美国专利 7,128,891, 其通过参考在此并入)。

一种产生金纳米颗粒的方法涉及混合金盐溶液与吸附剂。复合物形式的金被吸附到该吸附剂的表面。负荷了金的吸附剂, 在通过筛选、过滤、

静置(settling)或其它方法与所述溶液分离之后,被灰化以形成灰。灰包含金纳米颗粒以及杂质,例如钠、钾和钙的氧化物。杂质可以通过用稀酸溶解来除去。在杂质被除去之后,获得相对纯的金纳米颗粒。活性碳或金吸附性树脂也能被用作吸附剂。通过这种方法还可以容易地产生银或铂族金属纳米颗粒(参见例如美国专利号7,060,121,其通过参考合并在此)。

在另一方法中,可以使用激光热解形成纳米颗粒。传统的激光热解工艺,常常被称为光热工艺,为本领域技术人员所熟知(参见例如美国专利5,958,348、3,941,567、6,254,928,其通过参考并入本文,等等)。在此工艺中,辐射吸收剂或其它前体气态物质吸收能量(例如激光),导致反应区中材料的加热,引起反应区中化学成分之间热驱动的化学反应。典型地,激光热解工艺使用例如由穿过化学蒸汽带的激光束生成的精确确定的高温带(典型地为1000~1500°C),其中气体在高温发生反应,以形成所需的纳米级微粒材料。由于没有壁与所述高温带接触,因此消除了任何污染。

热解反应过程中形成的材料通常在重力或气流推动下离开高温带。材料被迅速地冷却/淬火(quench),从而形成具有非常均匀分布的大小和形状的纳米颗粒。典型的实施方式中,用二氧化碳(CO<sub>2</sub>)激光来直接通过光吸收加热气体分子。使用激光的另一个优点是它的谱宽较窄,能使光和具有正确吸收波长的分子前体之间进行有效偶联(超过15%的激光能量被消耗)。所述技术已经被用于从金属、金属碳化物、金属氮化物和金属氧化物中生产各种纳米大小的材料(参见例如Haggerty et al. (1981) pp165-241在Laser Induced Chemical Processes, edited by J. J. Steinfeld中; Bi et al. (1993) J. Mater. Res., 8 (7): 1666 -1674; Bi et al. (1995) J. Mater. Res. 10 (11): 2875 - 2884; Curcio et al. (1990) Applied Surface Science, 46 : 225-229; Danen et al. (1984) SPIE, 458: 124-130; Gupta et al. (1984) SPIE, 458 : 131-139; 美国专利5,958,348、6,225,007、6,200,674、6,080,337等等)。

具有各种粒度范围的多种纳米颗粒也是市场上可买到的(参见例如Sun Nano, Fremont, CA; Northern nanotechnologies, Toronto, Canada等等)。

在一些实施方式中,纳米颗粒被修饰以改进在例如水溶液中的溶解度、分散性。因此,例如,在一些实施方式中,纳米颗粒用膦层或其它层修饰。

在各种的实施方式中,纳米颗粒或核酸,或这两者,可被功能化以促进核酸附着至纳米颗粒。这种方法在本领域已知。例如,在其3'端或5'

端用烷烃硫醇功能(alkanethiol)化的核酸(例如寡核苷酸)能轻易地附着于金纳米颗粒上(参见例如Whitesides (1995) Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research nanophase Chemistry, Houston, Tex., 109 - 121页)。Mucic et al. (1996) Chem. Commun. 555 - 557描述了一种将3' 硫醇DNA附着至平坦的金表面的方法,此方法可以容易地用来将核酸附着至纳米颗粒。

在一些实施方式中,可以使用以下描述的功能化纳米颗粒的方法以功能化纳米颗粒。在一个实施方式中,用氨基硅烷(amino-silane)分子对涂敷了二氧化硅(silica)的颗粒进行功能化,以用胺使二氧化硅表面功能化。在一些实施方式中,纳米颗粒是如本文实施例所描述的用膦功能化的。在另一实施方式中,利用基于硫的官能基团将核酸结合于纳米颗粒上。美国专利申请系列号 09/760,500 和 09/ 820,279 和国际申请号 PCT/US01/01190 和 PCT/US01/10071描述了用环二硫化物功能化的寡核苷酸,其可用于实施本发明,在此通过参考并入。所述环二硫化物优选在它们的环中具有5或6个原子,包括两个硫原子。适当的环二硫化物商业上可得到,或可通过已知方法合成。也可使用还原形式的环二硫化物。

在一个实施方式中,寡核苷酸共价结合至包含官能团的部分(moiety),所述部分可以与纳米颗粒结合。所述部分和官能团是那些能使核酸结合至纳米颗粒(例如通过化学吸附、共价或离子键合)的部分和官能团。例如,有烷烃硫醇、烷烃二硫化物或环二硫化物共价结合于其5' 或3' 末端的寡核苷酸可用于将所述寡核苷酸结合至多种的纳米颗粒,包括但不限于金纳米颗粒。将寡核苷酸附着至纳米颗粒的方法进一步地在美国专利申请系列号10/877,750、公布号US20050037397中描述,其也通过参考并入本文。

所述烷烃硫醇方法还可以用来将核酸附着至金属、半导体和磁性胶体以及上面所列的其它纳米颗粒上。用于将寡核苷酸附着到固体表面的其它官能团包括但不限于硫代磷酸基团(phosphorothioate group)(参见例如美国专利号5,472,881,用于将寡核苷酸-硫代磷酸根结合至金表面),取代的烷基硅氧烷(参见例如Burwell (1974) Chemical Technology, 4: 370 377以及Matteucci和Caruthers (1981) J. Am. Chem. Soc., 103 : 3185-3191,用于将寡核苷酸结合至二氧化硅和玻璃表面,以及Grabar et al. (1995) Anal. Chem., 67 : 735 - 743,用于结合氨基烷基硅氧烷和用于类似结合巯基烷基硅氧烷)。

终止于5' 硫代核苷或3' 硫代核苷的核酸(例如寡核苷酸)也可以附着于固体表面。下列参考文献描述了其它可用来将寡核苷酸附着至纳米颗粒的方法: Nuzzo et al., (1987) *J. Am. Chem. Soc.*, 109 : 2358 (在金上的二硫化物); Allara and Nuzzo, (1985) *Langmuir*, 1: 45 (在铝上的羧酸); Allara和Tompkins (1974) *J. Colloid Interface Sci.*, 49:410-421(在铜上的羧酸); Iler ( 1979) *The Chemistry Of Silica*, 第6章(Wiley)(在二氧化硅上的羧酸); Timmons and Zisman ( 1965) *J. Phys. Chem.*, 69: 984-990 (在铂上的羧酸); Soriaga and Hubbard (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, 104: 3937(在铂上的芳环化合物); Hubbard ( 1980) *Acc. Chem. Res.*, 13 : 177 (在铂上的环丁砜、亚砷及其他功能化的溶剂); Hickman et al. ( 1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 7271 (在铂上的异腈); Maoz and Sagiv ( 1987) *Langmuir*, 3: 1045 (在二氧化硅上的硅烷); Maoz and Sagiv (1987) *Langmuir*, 3: 1034 (在二氧化硅上的硅烷); Wasserman et al. (1989) *Langmuir*, 5: 1074 (在二氧化硅上的硅烷); Eltekova and Eltekov (1987) *Langmuir*, 3: 951 (在二氧化钛和二氧化硅上的芳香族羧酸、醛、醇和甲基); Lec et al. (1988) *J. Phys. Chem.*, 92: 2597 (在金属上的硬质磷酸酯)。

在一个实施方式中, 可以使用Alivisatos et al. (1996) *Nature* 382 : 609 - 611 ( 1996); Zanchet et al. ( 2001) *纳米 Lett* 1 : 32 - 35 ( 2001); Taton et al. ( 2000) *Science* 289 : 1757 - 1760和Storhoff et al. ( 1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120 : 1959 - 1964描述的方法将反应基团系于所述纳米颗粒, 上述所有文件通过参考并入本文。在一个优选实施方案中, 反应基团是硫醇基。

在一些实施方式中, 纳米偶联物包含系于纳米颗粒的1、10、100、1000、10,000、最多100,000个寡核苷酸。在一些优选实施方案中, 纳米偶联物在每个颗粒上包含大约100个寡核苷酸。

实质上任何核酸(单或双链)可被用于本发明的纳米偶联物。在各种实施方式中, 所述核酸的长度范围从5个到大约500个核苷酸(对于双链分子而言是碱基对), 优选大约从5个到大约400、300、或200个核苷酸(或碱基对), 更加优选从大约10、5、20、25、30、或40个核苷酸(或碱基对)到大约150、100、80、或60个核苷酸(或碱基对)。

核酸可以是天然存在的(例如分离的片段)、扩增的(例如PCR扩增的)、重组表达的、或化学合成的。在一些实施方式中, 核酸包含合成寡核苷酸, 长度从大约20至大约200个核苷酸(bp), 优选长度大约40至大约100个核苷酸

(bp), 更优选长度大约50至大约60bp, 任选在一端具有活性基团, 以将寡核苷酸系到纳米颗粒上。

在一个优选实施方案中, 寡核苷酸序列可以是任何序列。在一个实施方式中, 所述序列是硫醇- AAAGGATCCA AGCTTGAATT CCTCG - X - AGAGATCTGTCGACGATATCGGTACCAAA (SEQ ID NO:15), 其中X是插入的任何靶DNA序列或特征。所述寡核苷酸在大约10、20、25、30、40、和/或50 bp处有限制性位点, 因而能够每隔10 bp的距离设立插入和消化位点。在一个实施方式中, 靶结合序列从寡核苷酸长度的大约一半处开始。例如, 在图15B中, 在54 bp寡核苷酸中, 转录因子序列从25 bp处开始。

具有指定序列的核酸(例如寡核苷酸)可在本发明实践中用于多种用途, 例如上述用途。制备具有预先确定的序列的核酸(例如寡核苷酸)的方法为本领域技术人员所熟知(参见例如Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2<sup>nd</sup> ed.) 和 Eckstein(ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues*, 1st Ed. (Oxford University Press, New York)。在一些实施方式中, 固相合成法对于寡核糖核苷酸和寡脱氧核糖核苷酸来说都是优选的(众所周知的合成DNA的方法也用于合成RNA)。在一些实施方式中, 寡核糖核苷酸和寡脱氧核糖核苷酸还可以用酶法制备(例如在体外、在重组表达体系中, 在扩增系统中, 等等)。核酸可以是双链(ds)或单链(ss)DNA、RNA、或DNA/RNA杂合体。

### **III. 检测**

在各种实施方式中, 纳米偶联物等离子共振信号使用表面等离子共振 (SPR)方法检测。典型地, 所述核酸纳米偶联物物固定在(例如, 以磁性固定、静电固定、化学方法固定、吸附等等)适合于进行SPR的底层上。一种示例性的底层是超洁净薄载玻片, 但是底层不必因此受限。

在一些实施方式中, 使用带有真彩色成像照相机和光谱仪的暗视野显微镜系统获得纳米偶联物的散射图像和波谱。在一个说明性的实施方式中, 显微镜系统由下列组成: 装备暗视野聚光镜( $1.2 < NA < 1.4$ )的 Carl Zeiss Axiovert 200倒置显微镜(Carl Zeiss, 德国)、真彩色数码相机(CoolSNAP cf, Roper Scientific, NJ)、和带有1024x256像素冷型光谱仪CCD照相机(Roper Scientific, NJ)的300 mm焦距、300个凹槽/毫米的单色器( Acton Research,

MA)。2 $\mu$ m宽的开口被置于单色器入口狭缝的前面，以使得目标区域中只有单个纳米颗粒。光学漂白荧光后，用100W卤素灯进行白光照明，使用60X物镜(NA=0.8)和真彩色照相机获得金-DNA纳米偶联物的真彩色散射图像。

金DNA纳米偶联物的散射波谱使用同样的光学装置获得，但是它们被发送至单色器和光谱仪CCD。扣除本底之后，将原始波谱中非共振纳米颗粒(即聚苯乙烯)的波谱归一化。在实时波谱学实验中，固定有纳米颗粒的载玻片被装配在带有外部恒温器的透明ITO加热器上。被固定的纳米颗粒浸于缓冲液滴中，所述缓冲液也充当暗视野聚光镜的接触液体。冷凝器和纳米颗粒之间的距离为1~2 mm。通过移液管将核酸内切酶和缓冲溶液加入接触液体中，同时开始获得连续光谱。显微镜系统完全用暗色护罩遮蔽，以防止环境光干扰和缓冲溶液的严重蒸发。

在一个示例性的实施方式中，如本文实施例中描述的进行DNA纳米颗粒纳米偶联物核酸内切酶反应的实时等离子共振传感。

#### IV. 试剂盒

在另一实施方式中，本发明提供用于实施本发明方法的试剂盒。在一些实施方式中，所述试剂盒包含容器，所述容器包含本发明的纳米等离子标尺。所述标尺包含许多限制性位点，可用于对测量核酸长度变化的检测系统进行标定。在一些实施方式中，所述试剂盒包含包括纳米等离子标尺的容器，所述标尺包含核酸，所述核酸设计有位点，所述位点用于插入例如在此描述的具体核酸序列、或用于探测核酸样品的具体性质(例如多态性、插入、缺失等等)和/或用于检测一种或多种核酸结合蛋白(例如转录因子、酶等等)的存在和/或对所述蛋白定位。在一些实施方式中，所述纳米偶联物包含一组纳米偶联物，这些纳米偶联物或者在底层上被化学标注或从空间上被标注，或者将不同的种类分隔在不同的容器中。

试剂盒任选包括在此描述的核酸结合蛋白、和/或核酸内切酶和/或核酸外切酶。

另外，所述试剂盒任选包括标记和/或为实施在此描述的方法提供指导的指导材料。优选的指导材料描述了在此描述的一种或多种纳米偶联物用于标定SPR系统以测量核酸长度变化和/或进行在此描述的任何方法的用途。

尽管指导材料典型地包含书面的或印刷的材料，它们不局限于此。任何能存储这种指令并将它们交给终端用户的媒介都在本发明之列。这种媒介包括但不局限于电子存储媒体(例如磁盘、信息带(tape)、盒式磁盘(cartridge)、芯片)、光学介质(例如CD ROM)等等。这种媒介可以包括提供这种指导材料的因特网站点网址。

## 实施例

下列实施例用来举例说明、但并非限制所要求保护的发明。

### 实施例1

#### 用于测量核酸酶活性和DNA足迹法的纳米等离子分子标尺

在本实施例中，我们设计了一种纳米等离子分子标尺，其带有连接至20-nm金纳米颗粒的、作为酶底物和标定标准的54 bp双链DNA(dsDNA)(图1A、1B，图2A的图a-c)。双链DNA包括核酸内切酶*Hind*III、*Xho*I、*Sal*I和*Kpn*I的切割位点，这些切割位点的中心分别在核苷酸位点12、24、36和48位上(图1B)。双链DNA在所述金纳米颗粒上的表面密度通过在固定期间它们的浓度比来控制。我们发现，DNA/金比例为100:1时最好地兼顾了保留双链DNA的自然延伸的要求(图2A)，和允许核酸酶接近的要求(Parak et al. (2003) Nano Lett. 3:33-36)(图2B)。通过透射电子显微镜(TEM)(图2A)和电泳(图2B,图片a)确认带有双链DNA的金纳米颗粒的表面修饰。

使用暗视野显微镜系统获得单个纳米偶联物的散射图像和波谱，该暗视野显微镜系统带有真彩色成像(true color imaging)的电荷耦合器件(CCD)照相机和光谱仪(图2C,图片a)。有趣的是，不携带DNA而携带膦表面活性剂(参见图7)的金(图2C、图片b)与金-DNA(图2C,图片c)呈现不同的颜色，分别为黄色和红色。DNA的附着看来将金纳米颗粒的等离子共振波长峰红移(red-shift) 67nm(图2C, 图片d)。该标尺提供了研究核酸酶酶促反应动力学的一种新手段(means)。一种模式核酸内切酶—*Xho*I—的核酸内切酶活性和动力学的实时测量得到证实，*Xho*I核酸内切酶反应后，由于损失30 bp的双链DNA，平均等离子共振波长下降(图3A, 3B,和8)。还可以观察到EDTA诱导的对*Xho*I反应的抑制(图3B)。盐浓度变化可以被忽略，因为所有成分用相同的反应缓冲液温育(图3B)。

我们然后集中于附着的DNA的大小所带来的影响。为了研究金DNA纳



米偶联物的纳米等离子共振频率移动是否可以精确地反映DNA大小的变化, 我们通过核酸内切酶切割人工地产生DNA大小的标准品。在暗视野下用光谱学检测来自每个样品的大约10个纳米偶联物, 平均纳米等离子共振波长显示于图4A和4B。金-DNA纳米偶联物与*KpnI*、*Sall*、*XhoI*和*HindIII*反应, 它们分别切割从全长双链DNA远端起算的前6、18、30和42 bp。图4A显示了1小时切割反应后, 金DNA纳米偶联物的典型散射波谱和等离子共振波长。图4B显示了系有0、12、24、36、48和54bp双链DNA的单个金纳米颗粒的等离子共振谱。平均波长从金-DNA分别蓝移大约67 nm、62 nm、45 nm、28 nm、10 nm和0 nm。纳米颗粒等离子共振的移动对应于纳米颗粒周围介电层的变化, 与被消化的双链DNA的长度有关。对被涂覆的金纳米颗粒进行米氏散射(Mie scattering)计算( Bohren and Huffman(1983)Absorption and Scattering of Light by Small Particles(Wiley, New York), 获得生物聚合物壳(双链DNA+磷)的等效介电常数(the equivalent dielectric constant)或折射率(refractive index)(参见图4B、图9和下面的表1)。

表 1. 基于 SPR 波长的试验结果, 反算(back-calculate)金- DNA 纳米偶联物的生物聚合物壳的介电常数和折射率。对于第一组  $\lambda$  和  $n$  计算值, 金的介电常数由 Johnson 和 Christy (1972) Phys. Rev. B6 :4370 -4379 提供, Mulvaney (1996) Langmuir 12 :788 -800 的逼近方程(approximation equation)\* 被用于计算。对于第二组  $\lambda$  和  $n$  计算值, 金的介电常数也由 Johnson and Christy 提供(见上), 使用来源于 BHCOAT (Bohren and Huffman (1983) Absorption and scattering of light by small particles. (John Wiley & Sons, Inc., New York)的模拟程序(simulation code)。对于第三组  $\lambda$  和  $n$  计算值, 介电常数由 Weaver et al. (1981) Optical properties of metals (Fachinformationszentrum, Karlsruhe, Germany) 提供, Mulvaney (见上)的逼近方程被用于计算。

\* $\lambda = \lambda_p^2 (\epsilon^\infty + 2 \epsilon_m)$ , 其中  $\lambda$  是波长,  $\lambda_p$  是金的主等离子体(bulk plasma)波长,  $\epsilon^\infty$  是超高频时金的介电常数,  $\epsilon_m$  是壳层的介电常数。

样品	碱基对	壳厚度 [nm]	SPR 波长 [nm]	Johnson & Christy 多晶金		Bohren & Huffman 涂覆的金颗粒		Weaver <i>et al</i> 单晶金	
				介电常数 $\epsilon (n^2)$	折射率 n	介电常数 $\epsilon (n^2)$	折射率 n	介电常数 $\epsilon (n^2)$	折射率 n
金-磷-DNA	54	20.36	607	5.3467	2.3123	4.41	2.1	3.8552	1.9635
+ <i>KpnI</i>	48	18.32	600	5.0315	2.2431	4.2025	2.05	3.6996	1.9234
+ <i>SalI</i>	36	14.24	582	4.2382	2.0587	3.61	1.9	3.3078	1.8187
+ <i>XhoI</i>	24	10.16	565	3.5108	1.8737	3.0625	1.75	2.9487	1.7172
+ <i>HinDIII</i>	12	6.08	548	2.8053	1.6749	2.6244	1.62	2.6002	1.6125
金-磷	0	2	542	2.56	1.6	2.56	1.6	2.4798	1.5747

双链DNA长度和等效折射率之间的关系显示与二次Langevin模型很好地拟合(Mazur and Jernigan, (1991) Biopolymers 31 : 1615 - 1629) (图4B中的拟合曲线)。观察到平均波长移动为1.24 nm/bp (Parak *et al.* (2003) Nano Lett. 3: 33 - 36)。请注意,完整双链DNA的全长( $\sim 20$  nm)比有效Förster传递距离(effective Förster transfer distance)( $< 10$  nm)长得多,因此所述标尺比Förster共振能量传递的检测范围长。

根据在等离子波长移动和DNA大小之间建立的关联曲线(图4B),可以确定核酸酶反应中DNA的长度,这允许我们测量DNA-结合蛋白的足迹。*EcoRI*(Q111)蛋白质被用作基于核酸外切酶的DNA足迹法中的模式蛋白。*EcoRI*(Q111)为*EcoRI*蛋白质的切割缺陷型变体,氨基酸残基111突变成谷氨酰胺(Q)。*EcoRI*(Q111)仍然保持对双链DNA上的序列GAATTC(SEQ ID NO:16)的特异结合活性,但是不切割DNA(King *et al.* (1989) Biol. Chem. 264 : 11807 - 11815; Pavco and Steege (1990) Biol. Chem. 265 : 9960 - 9969)。*EcoRI*(Q111)先前被用来阻断转录延长复合物(Jett *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91 : 6870 - 6874)。如图5A所描绘的,*EcoRI*(Q111)与金-DNA纳米偶联物上的GAATTC(SEQ ID NO:16)序列结合。随后,引入核酸外切酶*Bal31*,以便从没有系着纳米颗粒的那一端非特异性降解双链DNA。*Bal31*核酸外切酶对双链DNA的3'和5'末端都降解(Legerski *et al.*(1978) Nucleic Acids Res. 5:1445-1464)。图5B和5C分别显示在没有*EcoRI*(Q111)结合和有*EcoRI*(Q111)结合的情况下,*Bal31*消化金-DNA纳米偶联物的散射波谱。对于未被结合的DNA,*Bal31*使纳米偶联物的等离子共振波长在20分钟内蓝移 $\sim 52$ nm,之后稳定(图5D中的正方形);然而,对于有*EcoRI*(Q111)结合的

DNA, 纳米偶联物的等离子共振波长在稳定之前最多移动25 nm(图5D, 圆圈)。根据拟合的二次Langevin模型, 计算被降解的双链DNA的相应碱基对长度(参见下面的方法)。Bal31核酸外切酶消化掉54 bp双链DNA的几乎全部(~90%), 但是有EcoRI(Q111)阻断Bal31核酸外切酶的行进时, Bal31只消化掉~25 bp。核酸外切酶的受阻点距离该DNA的远端大约 $25\pm 3$ bp, 距离GAATTC(SEQ ID NO:16)位点大约7bp, 与早先使用传统放射性同位素标记所进行的测量( $7\pm 3$ bp) (Pavco and Steege (1990) Biol. Chem. 265 : 9960 - 9969)完全符合。早先的作图指示EcoRI(Q111)结合位于GAATTC(SEQ ID NO:16)序列3'边界侧翼的3bp双链DNA, 另外的4 bp由EcoRI(Q111)和核酸外切酶间空间排斥造成。不切割双链DNA的对照核酸外切酶Exo-1显示对标尺波谱没有影响(图5D)。

我们实验中的等离子共振位移的程度大于早先对其它生化反应例如蛋白结合的报告。我们把相对较大的波长移动归因于双链DNA的轴向刚性、和其介电常数对其长度的独特依赖。加之, 蛋白质与DNA有不同的电子密度, 看来DNA散射能力比蛋白质高一个数量级。所以, 与由盘绕的蛋白质结合或分离事件所诱导的变化相比, 双链DNA的部分缩短或加长会导致金表面周围相应较大的变化。此外, DNA长度的缩短也伴随着DNA折射率的大大减少(表1, 见上)。由Doron-Mor和同事们所进行的一项独立研究显示, 基于配位作用的自我组装的多层可以在1-15nm范围内为金纳米颗粒SPR波谱提供厚度微调(thickness tuning)(Doron-Mor et al. (2005) Chem. Eur. J. 11:5555-5562; Wanunu et al.(2005) Am. Chem. Soc. 127:17877-17887), 进一步地证实了我们的观察, 即: 纳米等离子波谱移动可以与DNA长度相关联。金纳米颗粒在大小和形状上的不规则性也许是导致波谱变宽、以及由此引起的标准差的一个因素。通过使用具有更好形状和大小控制的纳米颗粒, 可以进一步改进我们测量的准确度和光谱分辨率。

通过利用瑞利散射(Rayleigh scattering)相比于荧光或拉曼散射(Raman scattering)的高量子效率(high quantum efficiency), 纳米等离子分子标尺的时间分辨率可以高达每秒一个波谱(one spectrum); 因此, 以秒为时间等级的生物分子反应也可以被测量。虽然这里仅使用简单的双链DNA底物, 对寡核苷酸底物的序列或结构没有限制。不需要放射性或荧光标记就能够分辨单个纳米颗粒的能力也使得在高密度微阵列或在微流体装置中进行高通

量筛选成为可能。所述技术还可以用于检测诱导长度变化的其它酶。

## 方法

### 合成DNA寡核苷酸和制备硫醇化的、FITC标记的双链DNA。

合成两条互补DNA链，每条长54个核苷酸(Operon, Alameda, CA)。它们是：(1)在寡核苷酸5'端带有双硫醇修饰的寡核苷酸SprAuFor (二硫醇-5'-AAA GGA TCC AAG CTT GAA TTC CTC GAG AGA TCT GTC GAC GAT CTC GGT ACC AAA -3', SEQ ID NO:17)，和(2)反向互补链，称为SprAuRev (FITC-5' TTT CCT AGG TTC GAA CTT AAG GA - GCT CTC TAG ACA GCT GCT ATA GCC ATG GTT T - 3', SEQ ID NO:18)。为了制备双链DNA，在100 $\mu$ L终体积中以摩尔比1:1混合5'-硫醇化SprAuFor和5'- FITC-标记的SprAuRev。混合物首先通过加热至95 $^{\circ}$ C 10分钟而变性，然后DNA链通过缓慢冷却至室温来再退火。通过凝胶电泳检查DNA的质量。根据厂家说明书(New England Biolab, Beverly, MA)用限制性内切核酸酶HindIII、KpnI、XhoI、和SalI对DNA进行测试性消化(图6)。显示了各个酶的切割位点(图1B)。1 $\mu$ L的每一种酶各与适当量的缓冲液和水混合，终反应体积100 $\mu$ L。反应37 $^{\circ}$ C过夜保温。消化然后在5%NuSieve琼脂糖凝胶、1X TBE中加以证实，用10 bp序列梯作为分子量标准(Invitrogen, Carlsbad, CA)(图6)。

### 膦表面活性剂对金纳米颗粒的增溶作用

为了增加金纳米颗粒的稳定性以适合于进一步操作，如先前所描述的(Parak et al. (2003) Nano Lett. 3 : 33 - 36)略加改变，将20nm金胶体的表面结构(surface capping)用膦(双(对磺酰苯基)苯基膦(Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine), STREM Chemicals, Newburyport, MA)修饰，以增溶20nm金纳米晶体(Ted Pella, Inc, Redding, CA)。超速离心(14,000 RPM, 20分钟)使纳米颗粒沉淀，10 mL的20 nm纳米颗粒溶液(2.32 nM)被浓缩200倍。沉淀重悬在50 $\mu$ L的膦缓冲液中(DEPC处理过的水中的0.3 $\mu$ M- 4mM膦)。混合物在摇床上室温过夜，以有足够的时间使表面活性剂交换。膦涂覆的金颗粒的最终浓度为 $\sim$ 0.46 $\mu$ M。我们在1%琼脂糖凝胶上对金纳米颗粒进行电泳，观察到成功的表面活性剂交换。可以看出1 $\mu$ L浓缩的膦涂覆的金颗粒就足以在凝胶上显示金纳米颗粒。

### 制备双链DNA偶联的金纳米颗粒

双链DNA(图1B)以摩尔比200:1、100:1、50:1和20:1在室温与浓缩的膦涂覆的金纳米颗粒(参见图7)混合大约12小时,然后存储在-20°C。用电泳来证实DNA附着(图2B,图片a)。清楚地观察到DNA偶联的金颗粒迁移率降低,指示DNA成功附着至金纳米颗粒。DNA的存在可以在有或者没有醋酸双氧铀染色的情况下通过透射电子显微镜成像证实,额外的着色剂进一步增加整个复合物的有效直径(图2A)。

### 单个金-DNA纳米偶联物的散射成像和波谱学

显微镜系统由下列组成: 装备暗视野聚光镜(1.2, (数值孔径), 1.4)的Carl Zeiss Axiovert 200倒置显微镜(Carl Zeiss, 德国), 真彩色数码相机(CoolSNAPcf, Roper Scientific), 和焦距300mm、每毫米300个凹槽的单色仪(Acton Research, MA), 其配有1024x256像素的冷型光谱仪CCD照相机(Roper Scientific, NJ)。单色仪入口狭缝的前面置有2 $\mu$ m宽的开口, 以使得目标区域中只有单个纳米颗粒。在光学漂白荧光之后, 使用60X物镜(数值孔径=0.8)和真彩色照相机, 用100W卤素灯进行白光照明, 获得金DNA纳米偶联物的真彩色散射图像。金DNA纳米偶联物的散射波谱传送至单色仪和光谱仪CCD。扣除本底之后, 原始波谱相对于非共振纳米颗粒(聚苯乙烯)的波谱归一化。在实时波谱学实验中, 固定有纳米颗粒的载玻片被装配在带有外部恒温器的透明氧化铟锡(ITO)加热器上, 被加热到37°C或25°C。被固定的纳米颗粒浸于缓冲液滴中, 所述缓冲液也充当暗视野聚光镜的接触液体。用移液管向接触液体中加入核酸内切酶或核酸外切酶和缓冲溶液, 于此同时开始连续获得光谱。显微镜系统用暗色护罩完全覆盖, 以防止环境光干扰和过度蒸发。

### 金-DNA纳米颗粒偶联物上双链DNA的切割反应

我们将金-DNA纳米偶联物静电固定在超净的薄玻璃载玻片上。如上所述(图6), 在100 $\mu$ l终体积中用内切核酸酶HindIII、KpnI、XhoI和SalI(图2B, 图片b)和1 $\mu$ l Au-DNA颗粒进行DNA切割反应, 改变之处仅在于从反应缓冲液和酶中除去还原剂, 以防止硫醇化DNA从金纳米颗粒上脱离。

### 通过荧光成像证实核酸内切酶切割

为了证实金DNA纳米偶联物等离子共振频率移动是由于核酸内切酶的作用，而且纳米等离子移动可以精确地反映DNA切割诱导的大小改变，我们将有核酸酶时的金DNA纳米偶联物的暗视野图像(图3A, 图片b-c)和FITC荧光图像(图8, 图片2和3)与无核酸酶时的金DNA 纳米偶联物(图3A, 图片1, 和图8, 图片1)比较。XhoI核酸内切酶反应1小时(图3A, 图片b和图8, 图片2)和16小时(图3A, 图片c和图8, 图片3)。切割前，金DNA纳米偶联物中的荧光强。注意完整双链DNA的全长(~20 nm)比有效Förster传递距离(<10 nm)长很多，因而FITC荧光团不被淬灭。DNA切割之后，FITC荧光团与金纳米颗粒脱离，扩散入缓冲溶液中，因此在图象平面处(金纳米颗粒所处的位置)总荧光强度显著减少。FITC标记去除实验的目的完全是为了证实酶切割。荧光标记对等离子共振测量没有影响。光学漂白荧光后测量纳米偶联物的散射波谱。在最初3分钟内，等离子共振波长暂时红移、散射强度增加、波谱变平。短暂的波动很可能是由于切割前一开始将酶分子加载到双链DNA上所致。

### 核酸内切酶活性的实时测量、核酸内切酶活性的动力学和核酸内切酶活性的抑制

使用XhoI作为模式酶进行动力学测量。也通过FITC荧光成像证实切割(参见例如图8)。FITC标记去除实验的目的完全是为了证实酶切割。金DNA纳米偶联物用白光源照射20分钟，以在光谱测定之前使荧光被彻底地光学漂白。荧光标记对等离子共振测量没有影响。引入XhoI后，立即同步开始连续获得所选择的纳米颗粒的散射波谱。对于实时动力学测量，每分钟获得积分时间(integration time)为10秒的一个波谱。前10分钟内观察到等离子共振波长显著蓝移(blue shift)，并与强度降低相关联(图3B)。

Au-DNA纳米偶联物上的核酸内切酶反应速率显示出浓度依赖，并确定为遵从米-曼氏酶动力学(Mizu et al. (2004) Biomaterials 25 : 3109 3116) (图3B)。速率常数为 $5.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (3.5 nM)和 $1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (350 pM)。同时添加10 mM EDTA和3.5-nM XhoI酶使得金-DNA纳米偶联物上的核酸内切酶反应被抑制；EDTA可以整合XhoI活性所需的反应缓冲液中的 $\text{Mg}^{2+}$ 。

### 与双链DNA-金结合的EcoRI(Q111)的Bal-31足迹分析

根据早先的描述(King et al. (1989) J. Biol. Chem. 264 : 11807- 11815; Pavco et al. (1990) J. Biol. Chem. 265 : 9960 - 9969; Jett and Bear (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91: 6870 - 6874)纯化切割缺陷型EcoRI(Q111), 并以100nM的终浓度与固定化的金-DNA纳米偶联物(在本实验中不使用FITC部分, 使得核酸外切酶切割不会被影响)一起37°C在80 $\mu$ l反应缓冲液中保温10分钟。然后, 将20 $\mu$ l Bal31酶(Clontech)添加入包含固定化金-DNA纳米偶联物的反应缓冲液中, 最终容积100 $\mu$ l, Bal31终浓度为100nM。结合缓冲液包含50mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、0.025% Triton X-100和100mM Tris-HCl 25°C pH 7.5。

### 扩散速率的评估

我们所观察到的DNA切割不是受扩散限制的过程。核酸内切酶的扩散速率(每单位时间扩散到单个纳米偶联物上的酶分子的数目)可以评估为 $\Delta N/\Delta t=4\pi DrC$ , 其中 $D=5\times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/秒是水中酶的扩散常数,  $r=28$  nm是单个纳米偶联物的半径,  $C=3.5$  nM是酶的摩尔浓度。扩散速率被评估为37个分子/秒。因此我们观察到的DNA消化不是受扩散限制的过程(否则单个纳米偶联物上~100个双链DNA的消化在数秒内便会结束)。另一方面, 纳米偶联物上核酸酶反应的速率常数(对于较高浓度的XhoI而言为 $5.8\times 10^{-3}$  s<sup>-1</sup>)与游离溶液中的速率常数 (Frye and Royer (1997) Biophys. J. 72 : Th399-Th399)相当。这意味着金纳米颗粒对酶活性仅有极小影响, 仅仅起高度敏感的传感器的作用。

### 计算不同长度的双链DNA的折射率

可以使用米氏散射理论计算金-DNA纳米偶联物的等离子共振波长。相关变量包括金的介电常数、生物聚合物壳(磷+双链DNA)的有效厚度和折射率。我们使用了由Johnson and Christy (1972) Phys. Rev. B6: 4370-4379提供的在各种波长下金的介电常数, 尽管他们的结果被认为更适合于大块金或多晶金。我们评估磷层厚度为2nm。双链DNA长度计算为0.34 nm / bp。双链DNA在切割前和KpnI、Sall、XhoI、HindIII切割之后的长度分别为54、48、

36、24、12和0bp, 因此生物聚合物壳厚度分别为18.36、16.32、12.24、8.16、4.08、和2 nm。使用由Bohren and Huffman (1983) Absorption and scattering of light by small particles. (John Wiley & Sons, Inc., New York)提供的针对涂覆颗粒的计算程序, 不同厚度的生物聚合物壳的介电常数在多次试验和错误之后被找到。等效折射率可以被认为只不过是介电常数的平方根。双链DNA的介电常数对双链DNA长度的依赖性已经被研究, 描述其关系的二次Langevin模型也已经建立(Mazur and Jernigan (1991) Biopolymers 31 : 1615 - 1629)。我们根据下列经验公式  $\epsilon(l) = n^2(l) = a [\text{Coth}(bl^2) - 1/bl^2] + c$  拟合所计算的折射率, 其中 a、b 和 c 是三个拟合变量(Bohren and Huffman, (1983) Absorption and Scattering of Light by Small Particles (Wiley, New York)。我们的计算结果与Mulvaney(1996) Langmuir 12: 788-800提供的结果非常一致。

应理解, 在此描述的实施例和实施方式仅用于说明性, 受其教导可为所属技术领域专业人员提示各种改变或变化, 应该被包括本申请的精神和范围内以及包括在随附的权利要求书范围之内。在此所引用的所有出版物、专利和专利申请通过针对所有用途全文参考而并入本文。



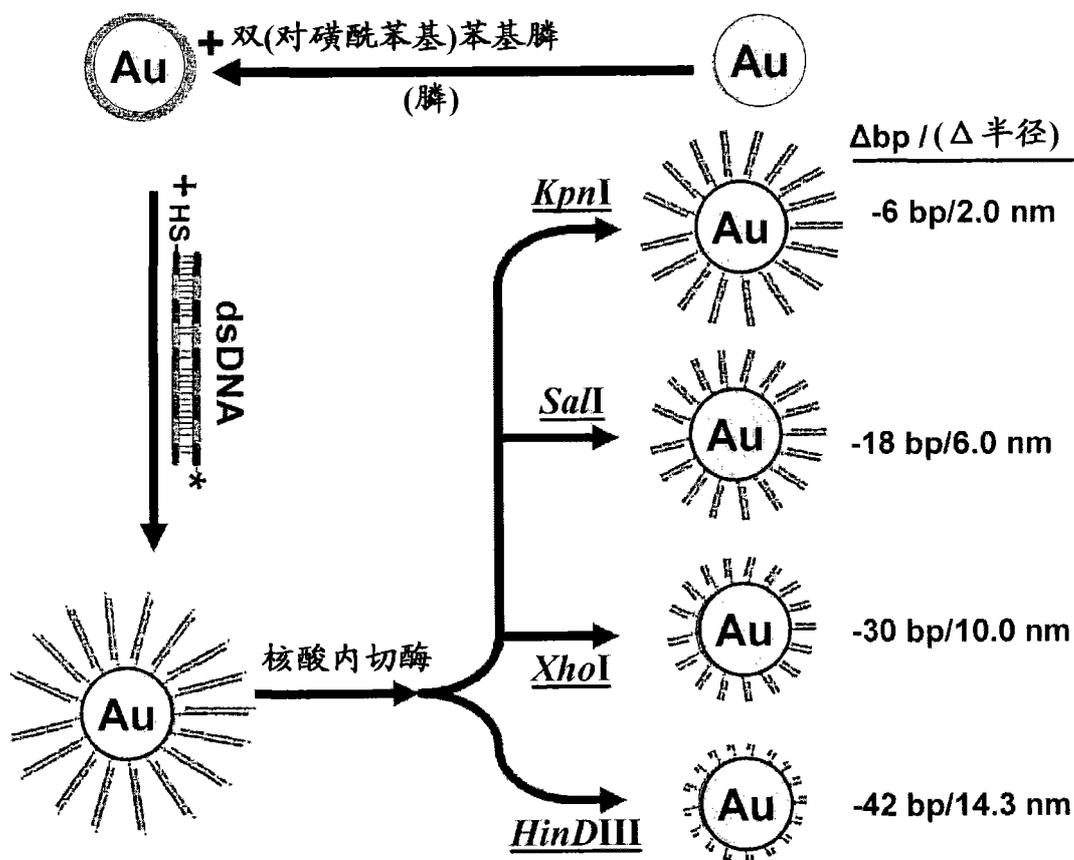


图 1A

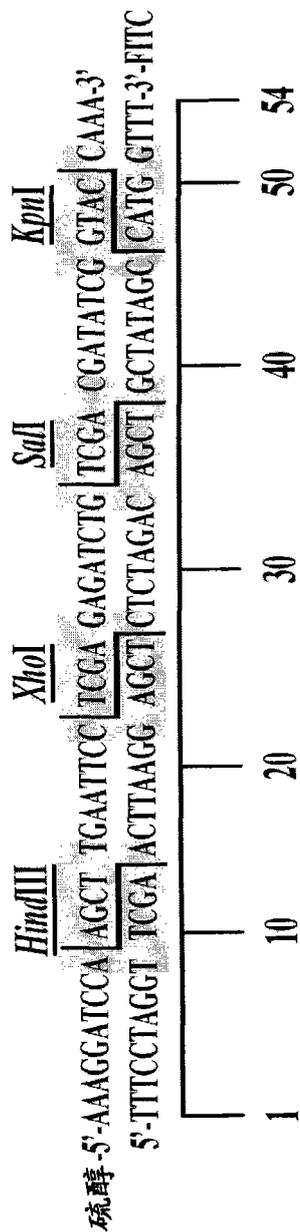


图 1B

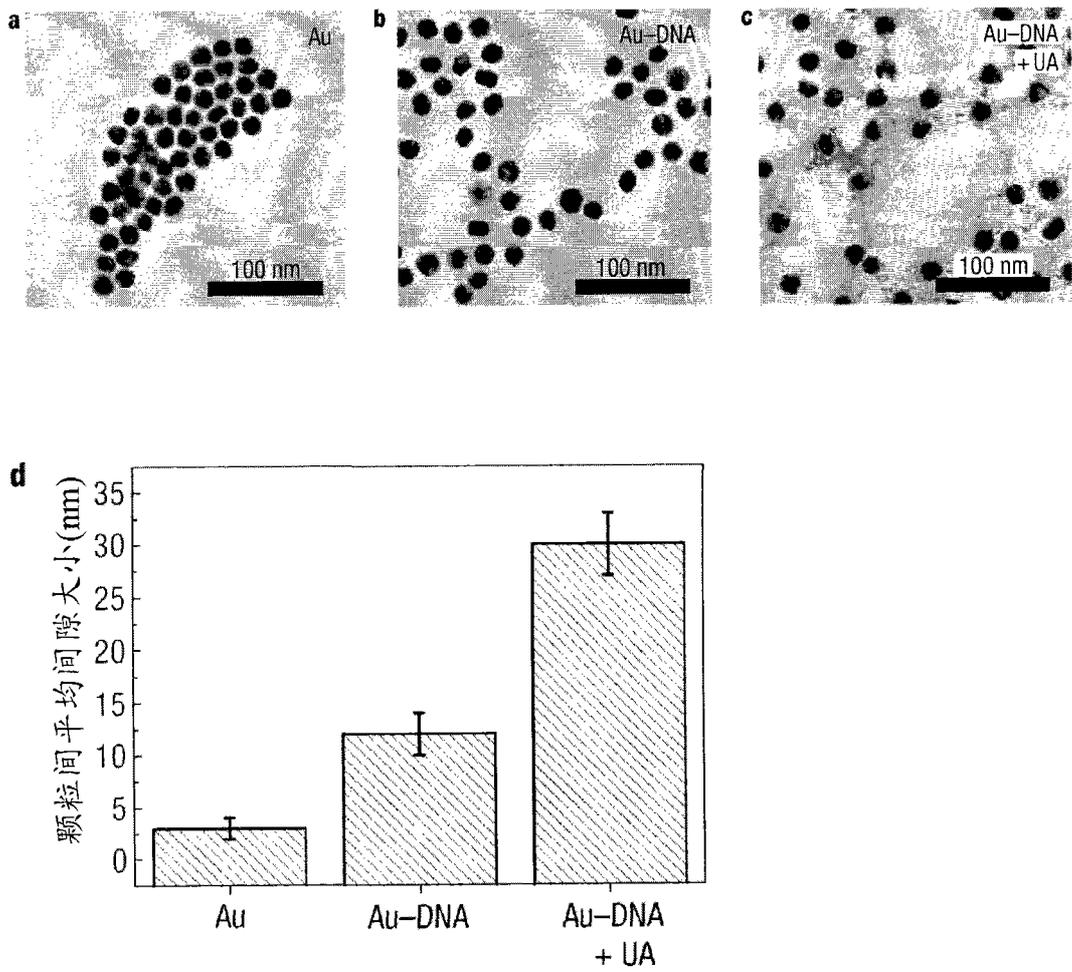


图 2A

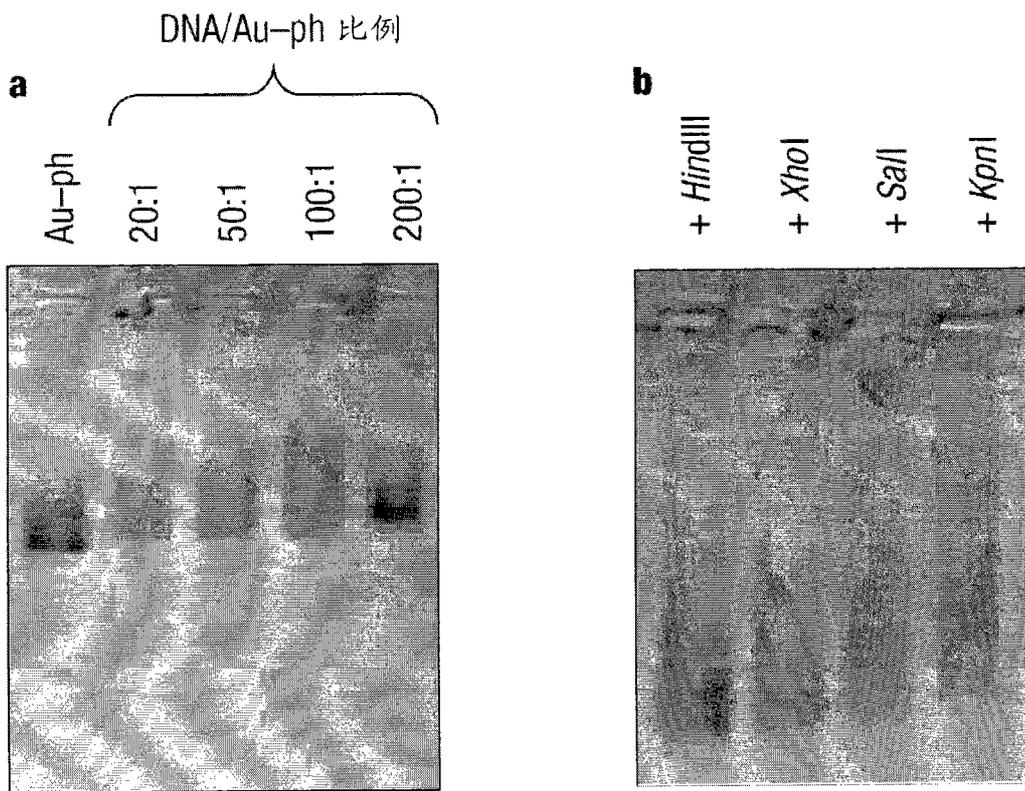


图 2B

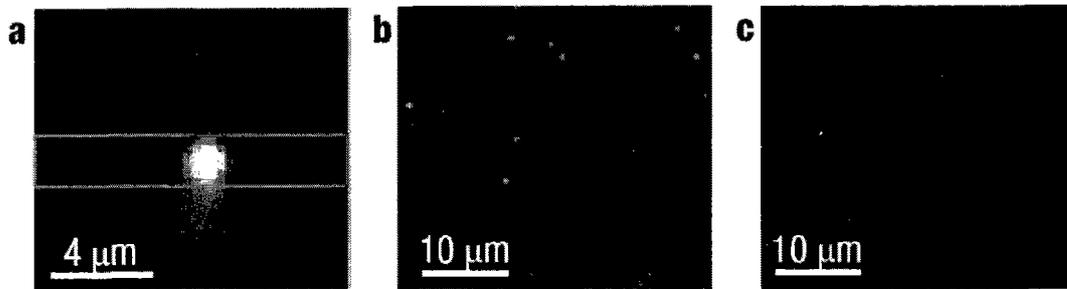


图 2C

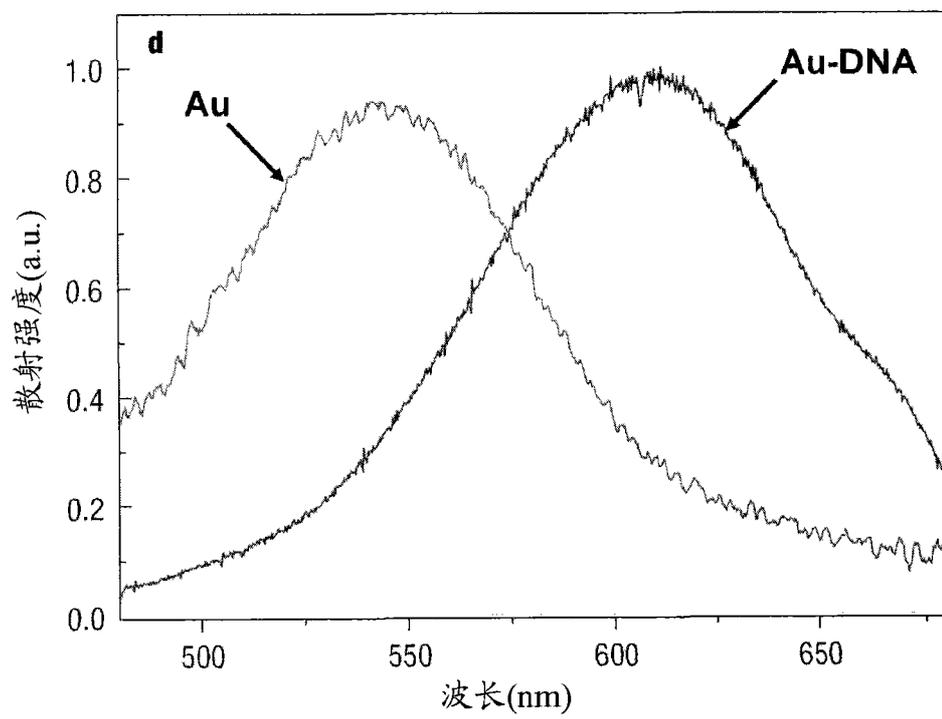


图 2D

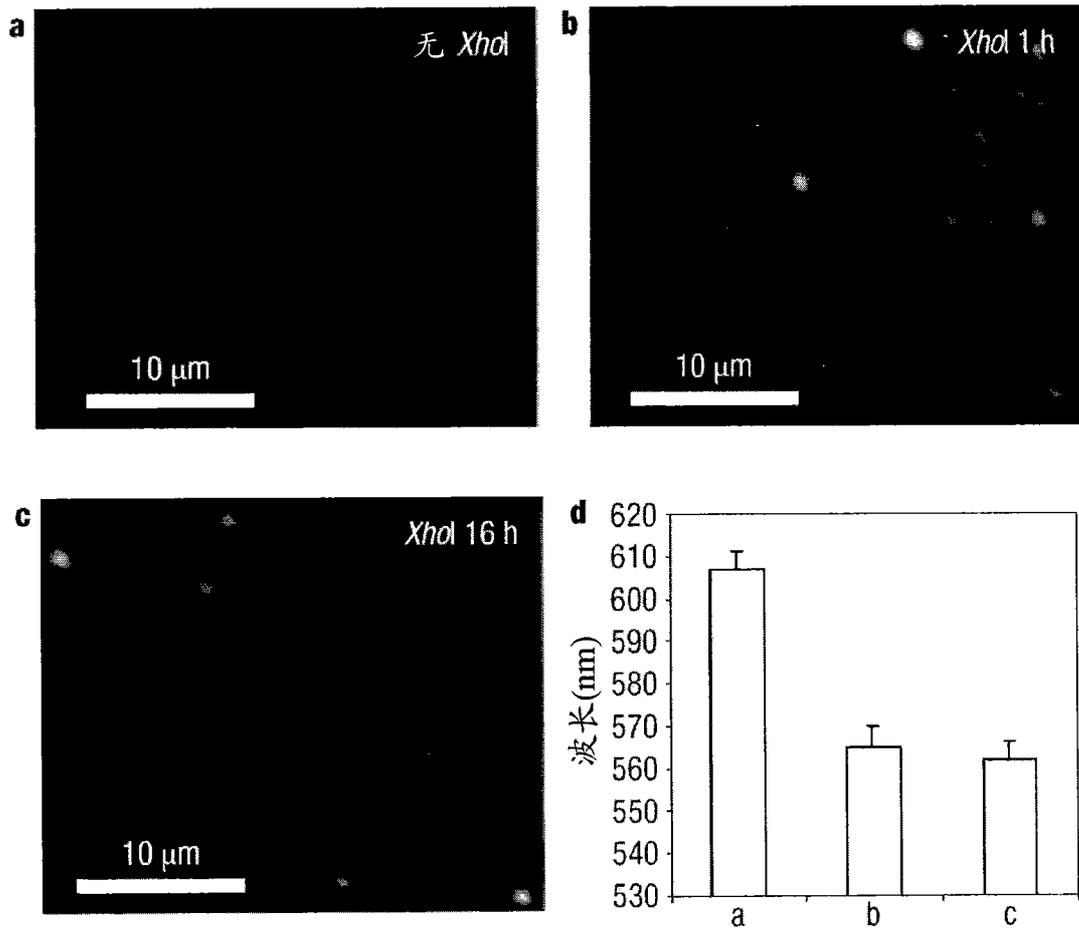


图 3A

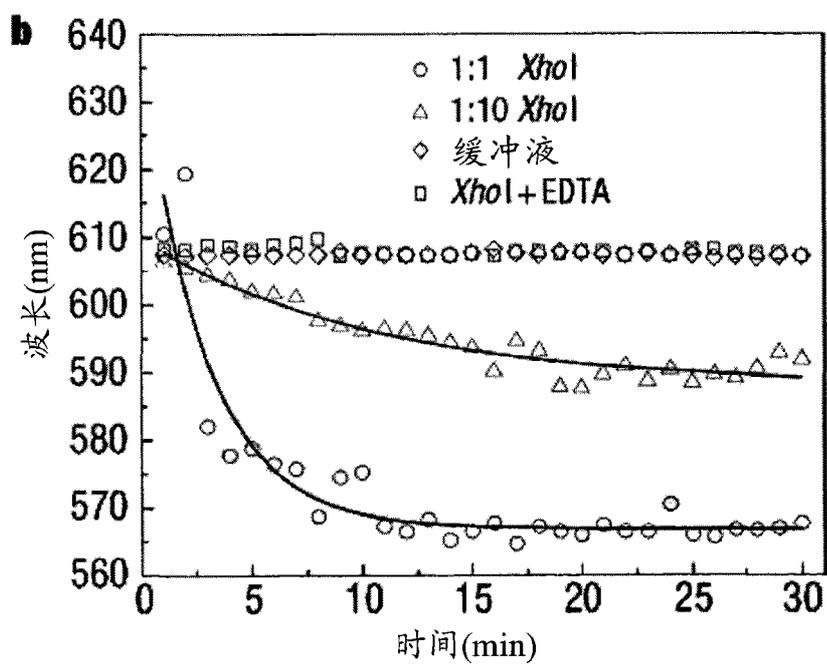
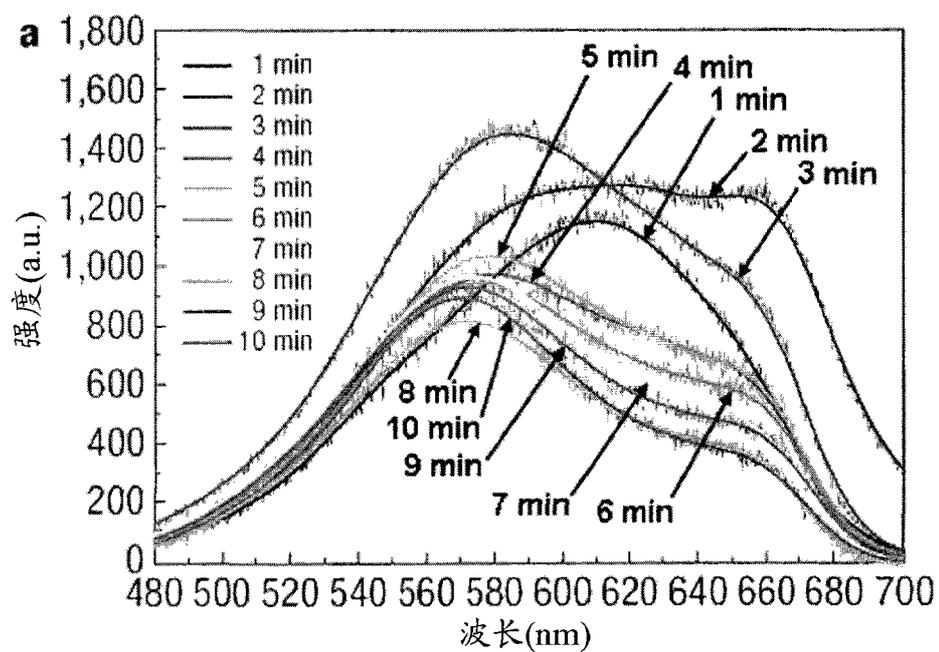


图 3B

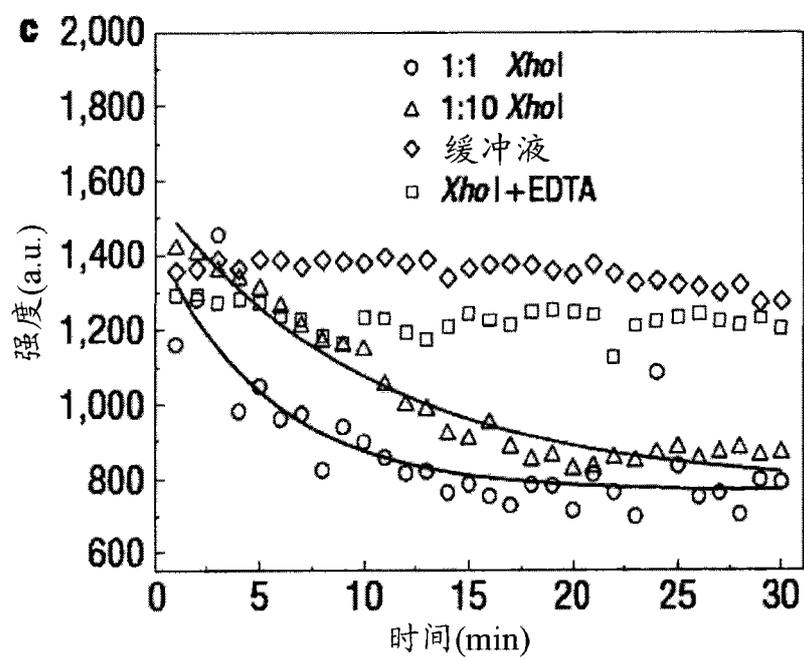


图 3B (续)



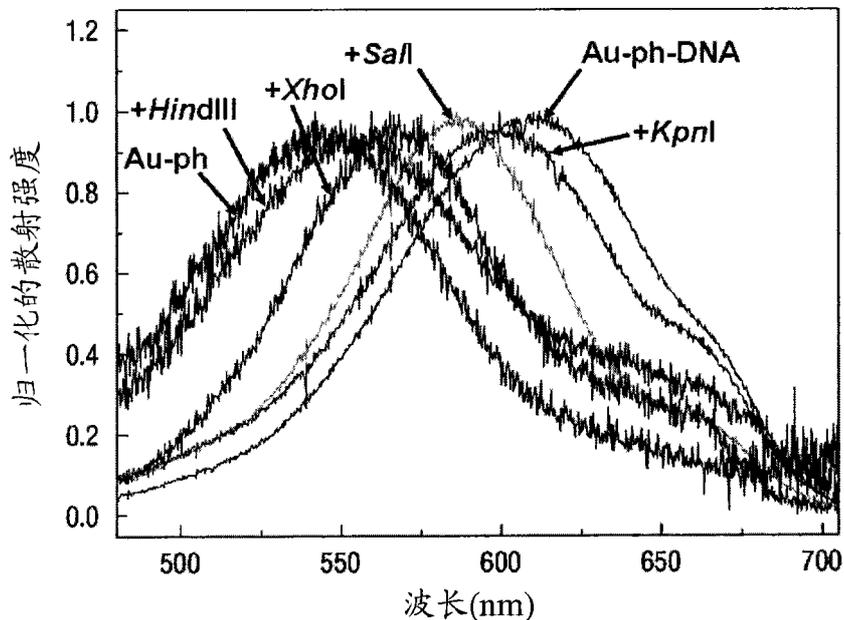


图 4A

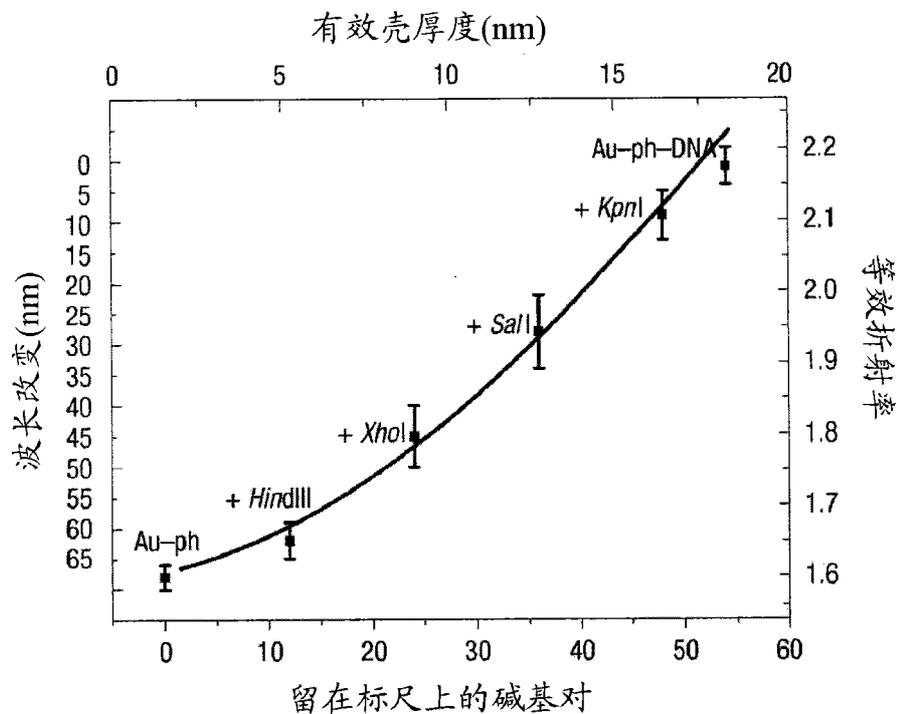


图 4B

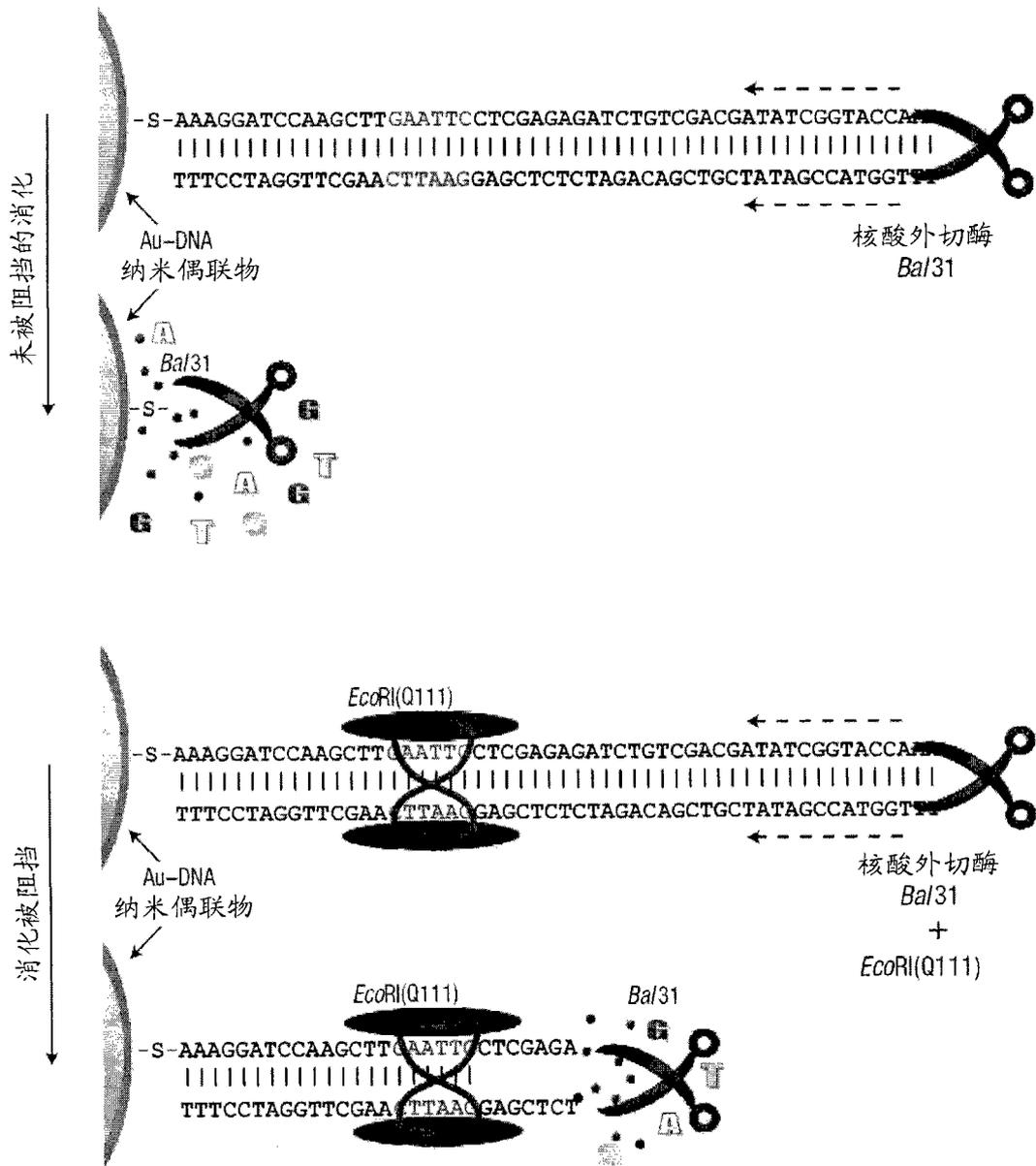


图 5A

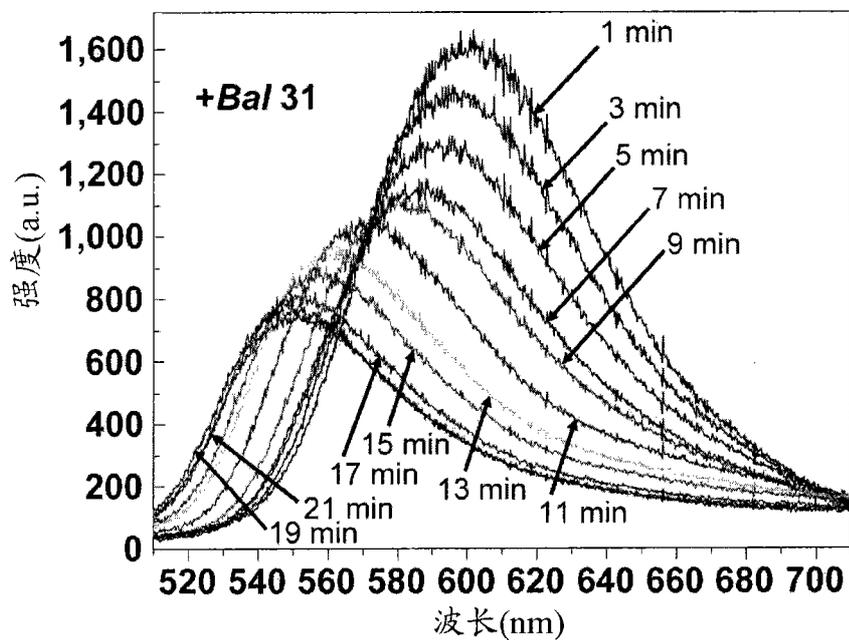


图 5B

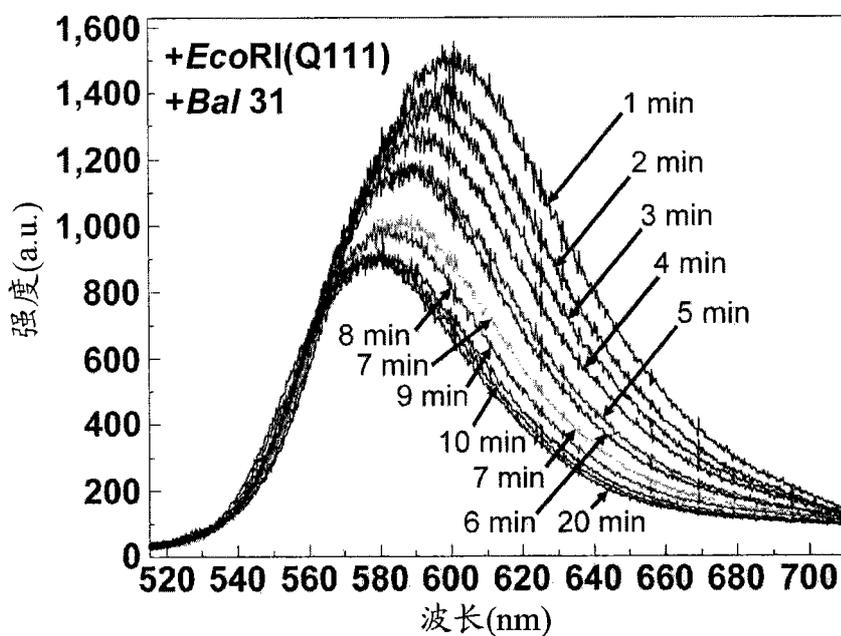


图 5C

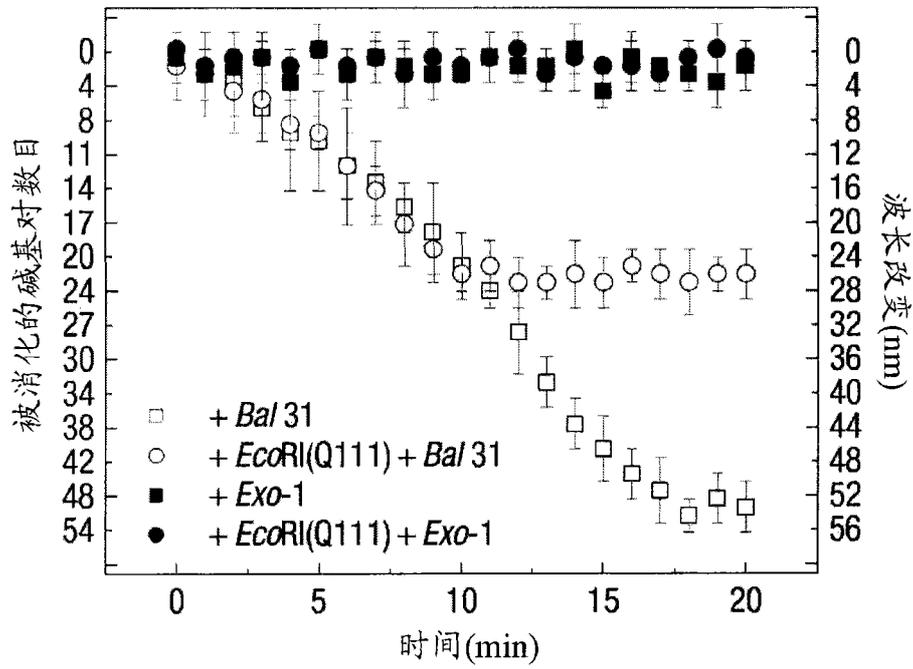


图 5D

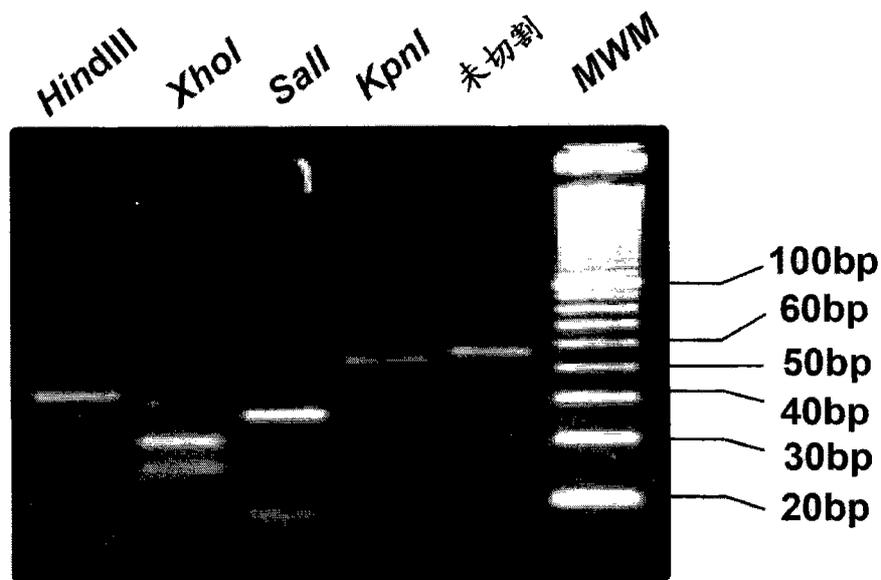


图 6

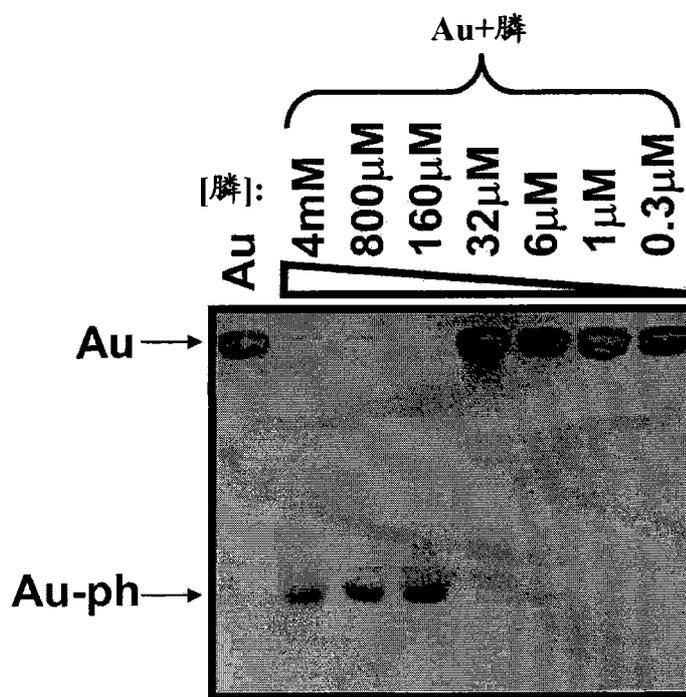


图 7

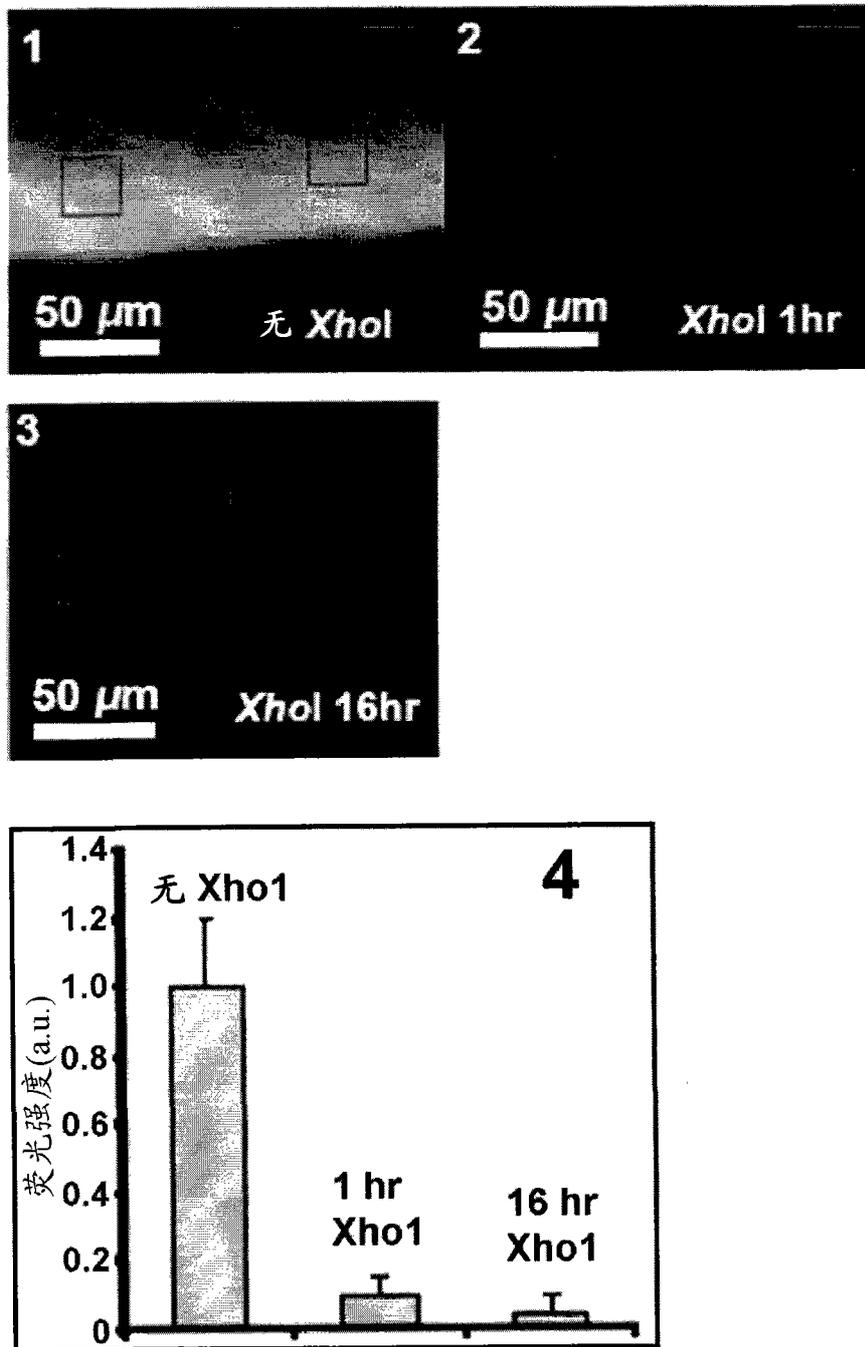


图 8

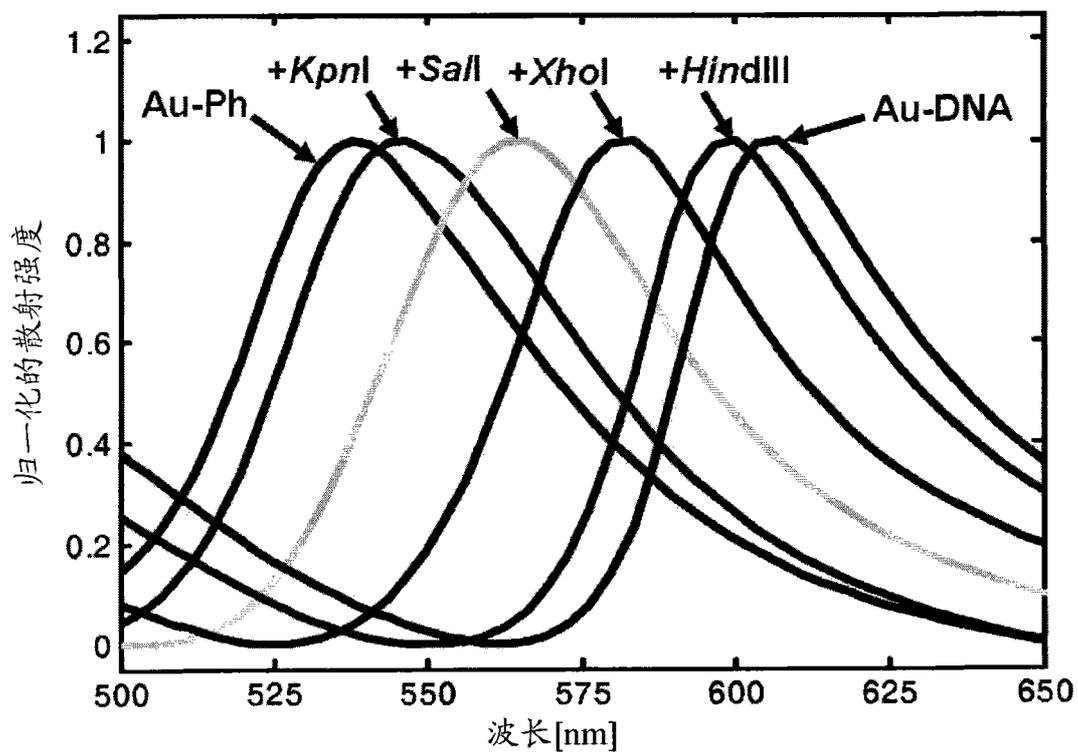


图 9

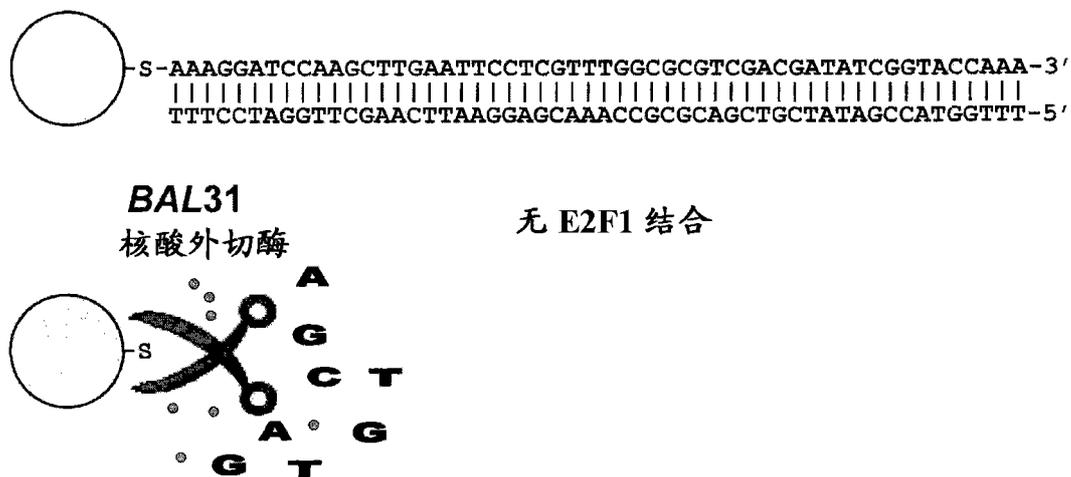


图 10A

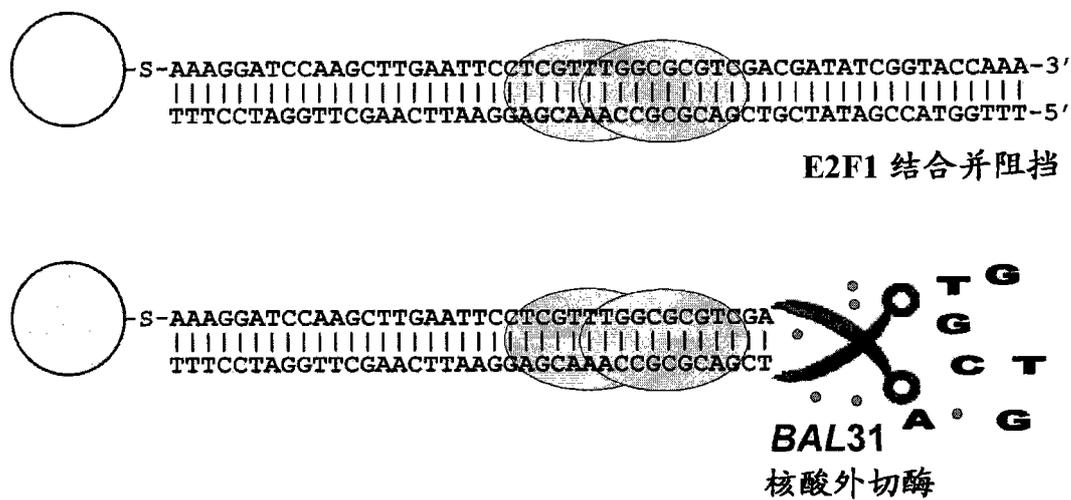


图 10B



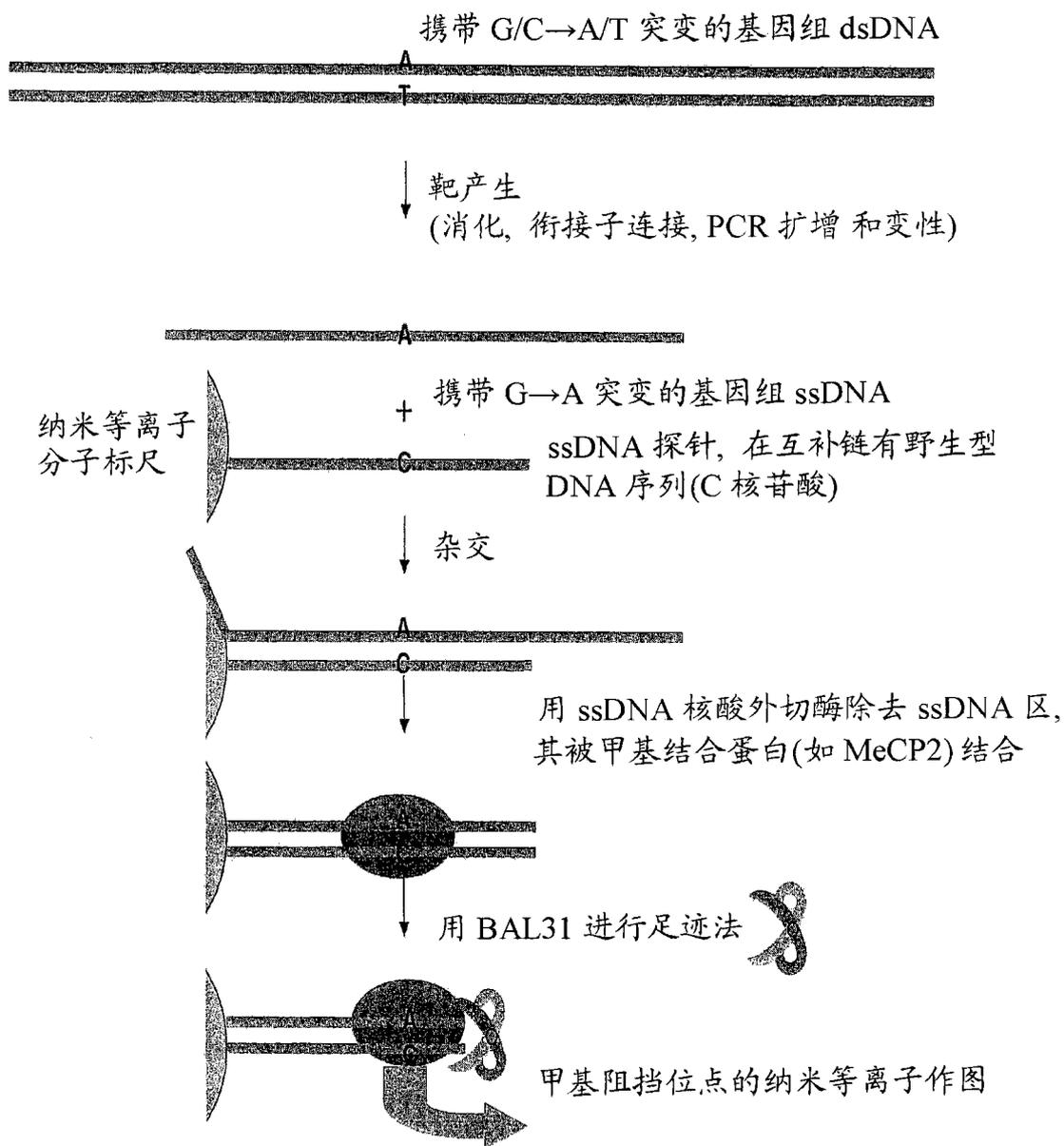
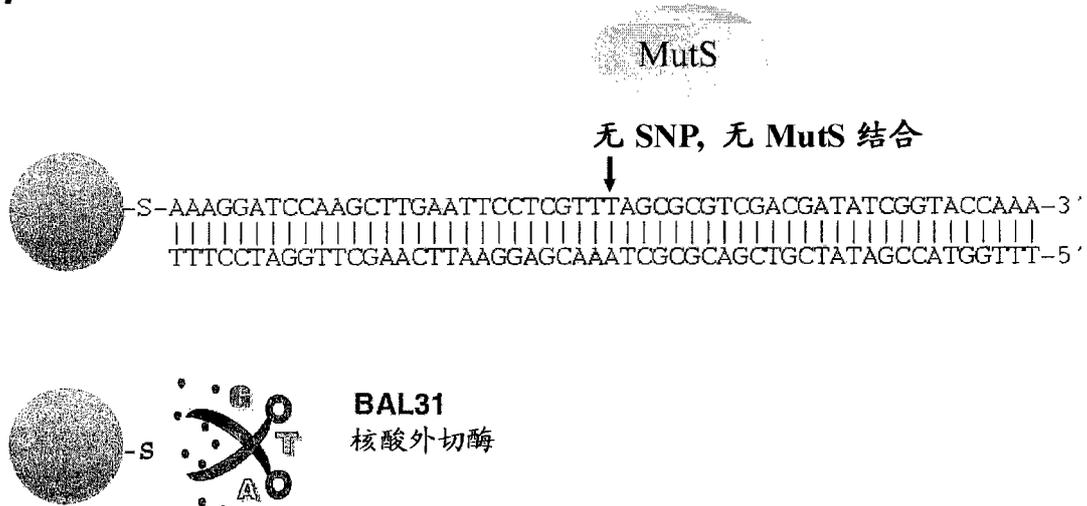


图 11A

**panel a**



**panel b**

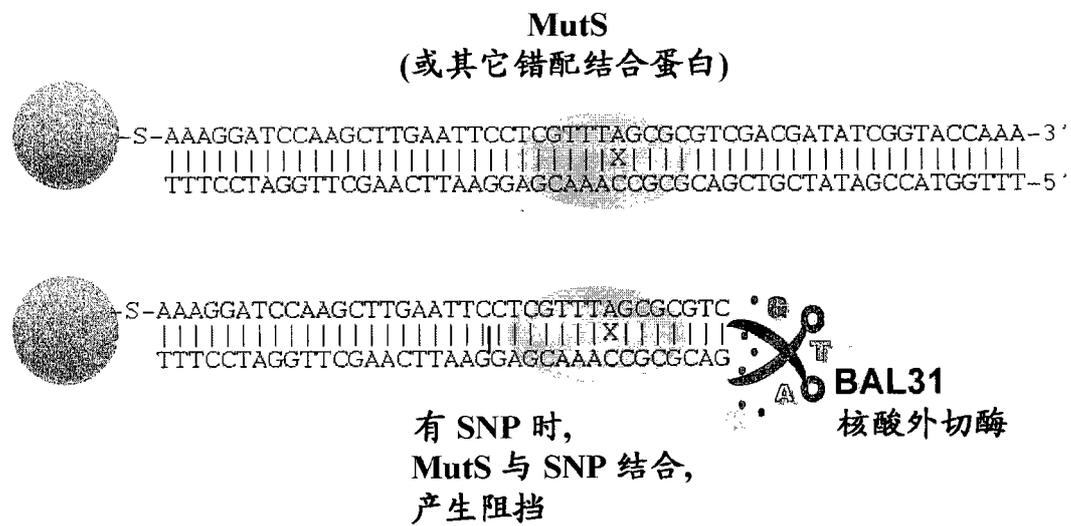


图 11B

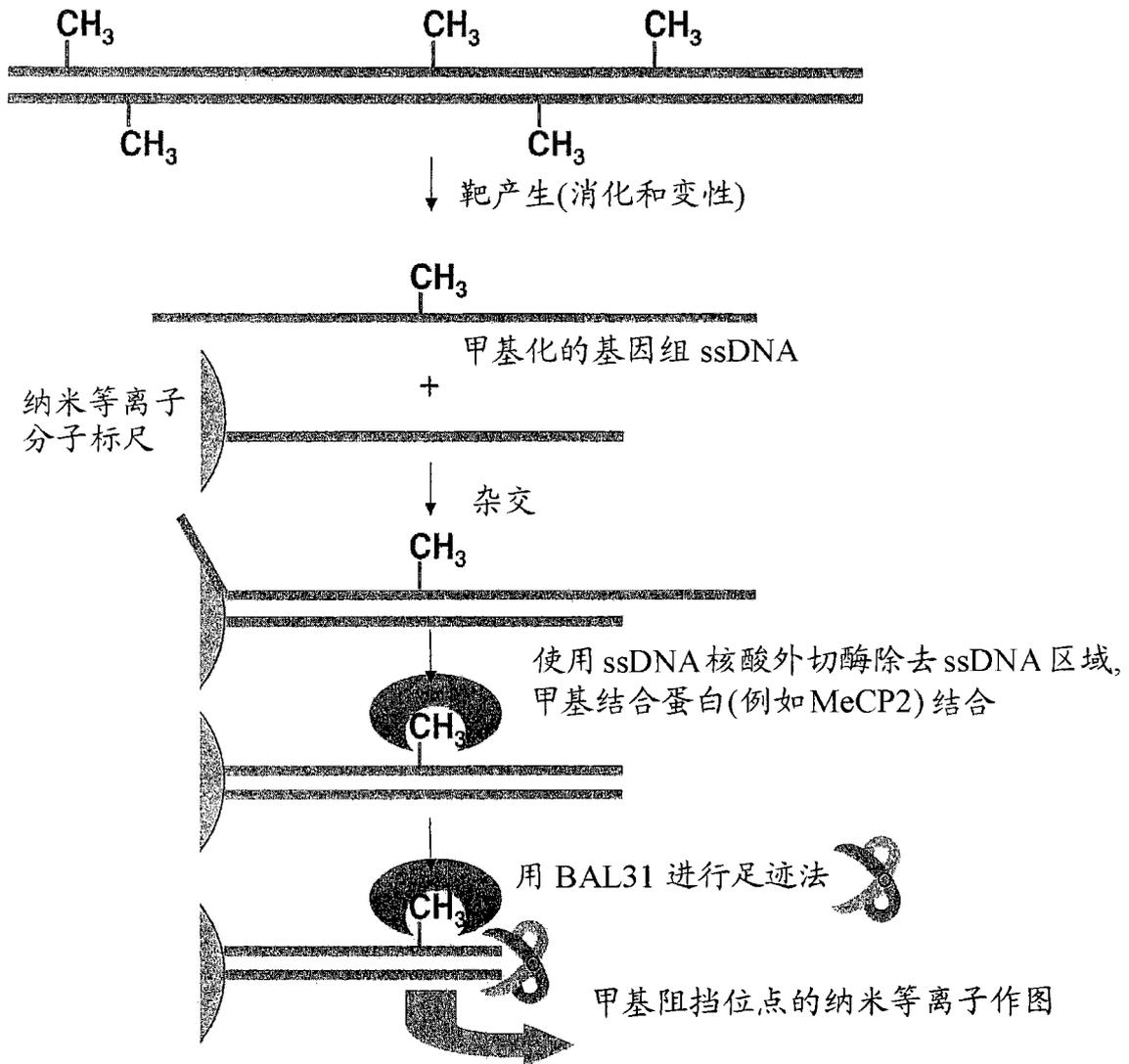
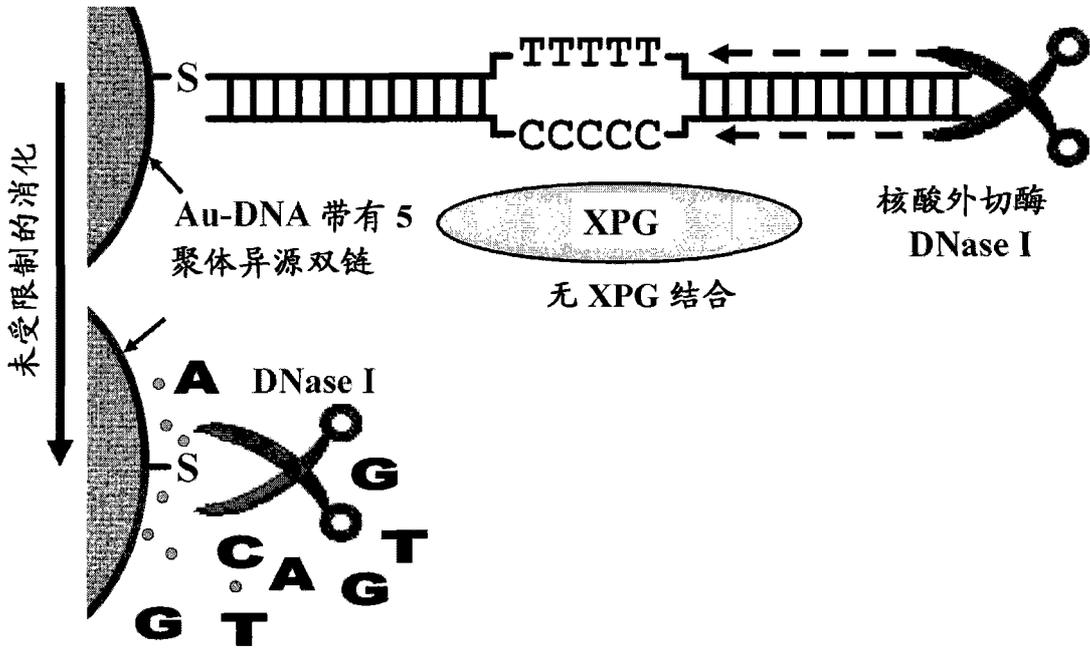


图 12

panel a



panel b

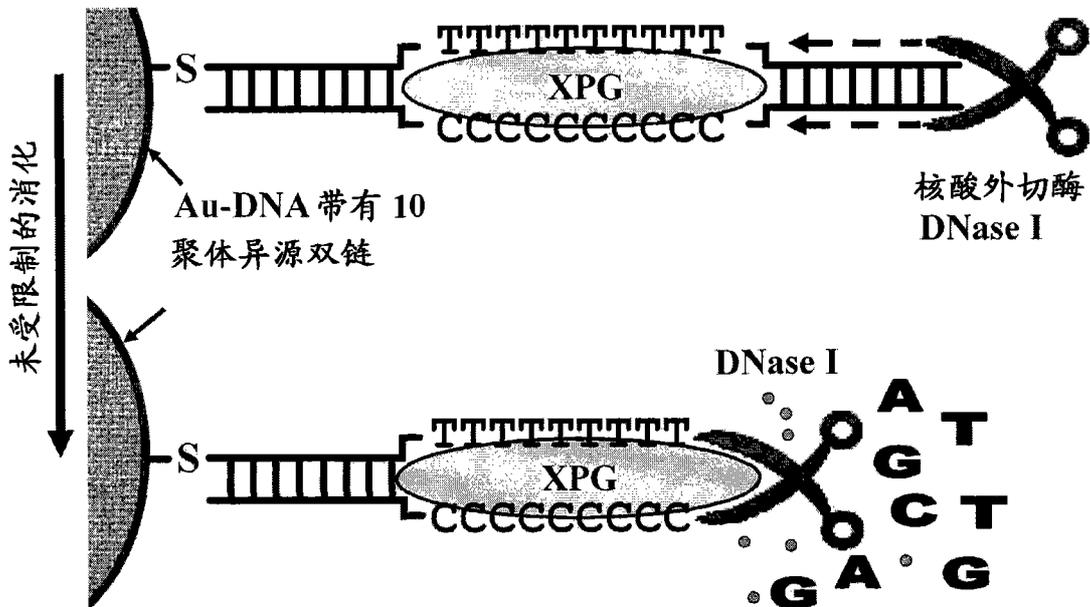


图 13

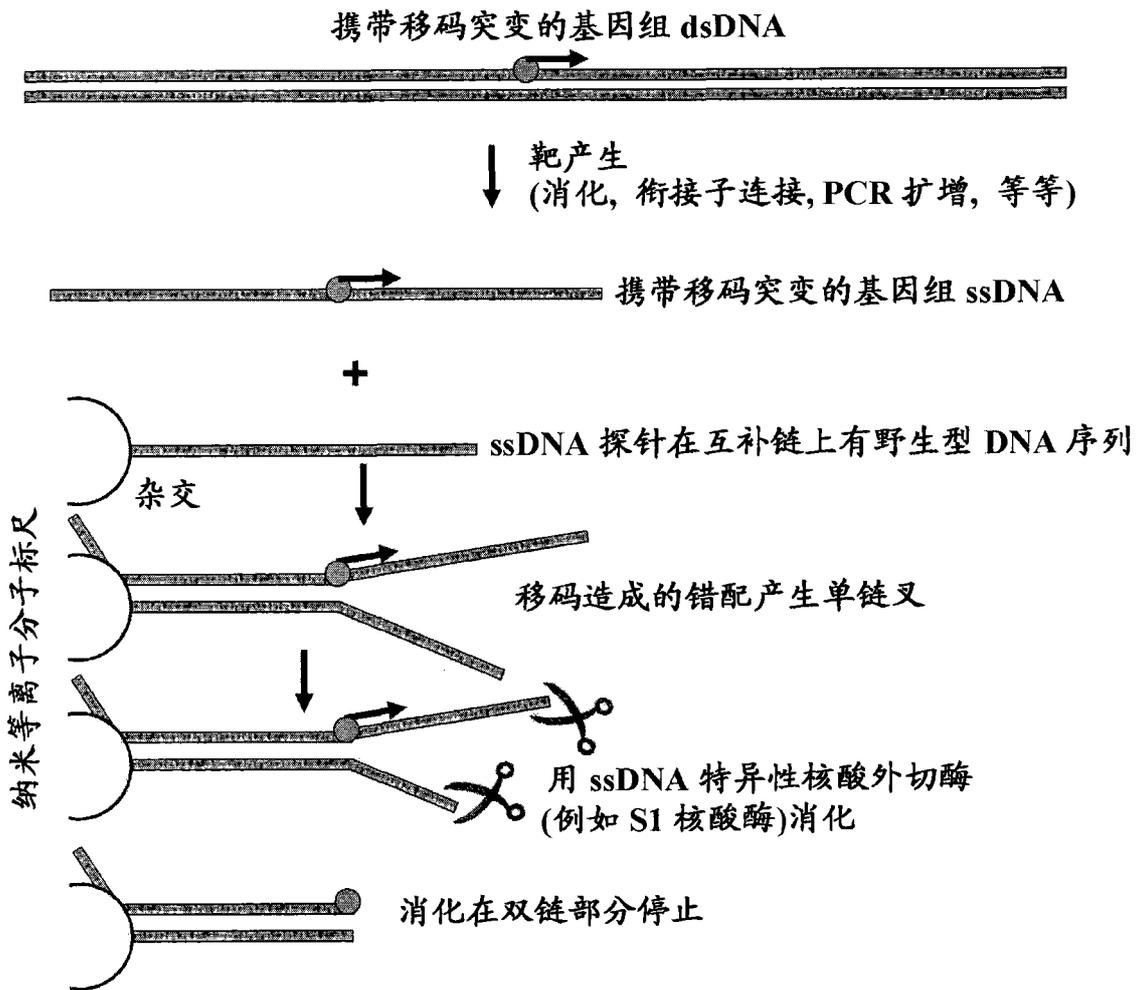


图 14

-S-AAAGGATCCAAGCTTGAATTCCTCGTTTAGCGCGTCGACGATATCGGTACCAA-3'  
 |||  
 TTTCTAGGTTTCGAACTTAAGGAGCAAACCGCGCAGCTGCTATAGCCATGGTTT-5'

TTTGGCGC=转录因子 E2F1 在 CYCD1 基因启动子上的结合位点

图 15A

↓

-S-AAAGGATCCAAGCTTGAATTCCTCGTTTAGCGCGTCGACGATATCGGTACCAA-3'  
 |||  
 TTTCTAGGTTTCGAACTTAAGGAGCAAACCGCGCAGCTGCTATAGCCATGGTTT-5'

A=DNA 错配结合蛋白 MutS  
 (来自大肠杆菌或 Taq 菌或其它错配结合蛋白)的结合位点

图 15B

↓

-S-AAAGGATCCAAGCTTGAATTCCTCGTTTAGCGCGTC  
 |||  
 TTTCTAGGTTTCGAACTTAAGGAGCAAACCGCGCAG

图 15C

