



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103354840 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 08

(21) 申请号 201280006856. 9

G01N 33/542(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 01. 30

G01N 33/58(2006. 01)

(30) 优先权数据

1101621. 9 2011. 01. 31 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 07. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/051474 2012. 01. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/104261 EN 2012. 08. 09

(73) 专利权人 欧凌科公司

地址 瑞典乌普萨拉

(72) 发明人 S·弗雷德里克松 M·伦德伯格

A·埃里克松 E·伦内尔-狄更斯

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 刘丹妮

(56) 对比文件

WO 2006137932A2 , 2006. 12. 28,

US 6558928B1 , 2003. 05. 06,

唐娜等. 蛋白质检测新技术-邻位连接技术及初步应用. 《中国生物工程杂志》. 2009, 第 29 卷(第 8 期), 第 113-118 页, 参见第 1. 1 节, 第 2. 3 节, 第 2. 4 节.

Irene Weibrecht et al. Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. 《Expert Rev. Proteomics》. 2010, 第 7 卷(第 3 期), 401 - 409. Ola Söl

derberg et al. Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. 《Methods》. 2008, 第 45 卷(第 3 期), 227 - 232.

审查员 程婷

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书3页 说明书38页

序列表2页 附图8页

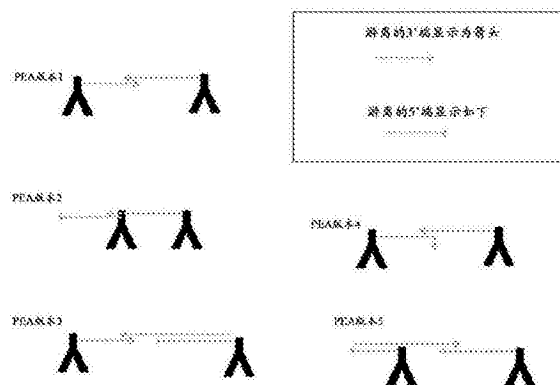
(54) 发明名称

测延伸产物。

核酸外切酶可实现的邻近延伸分析

(57) 摘要

本发明涉及针对样品中的分析物的基于邻近探针的检测分析(“邻近分析”), 具体地为邻近探针延伸分析(PEA), 并且特别涉及方法中的改进以降低非特异性“背景”信号, 其中改进包括在这样的分析中使用包括 3' 核酸外切酶活性的组分, 所述方法包括:(a) 将所述样品与至少一组至少第一和第二邻近探针接触, 所述探针各自包括分析物结合结构域和核酸结构域并可以同时结合于分析物;(b) 在所述邻近探针结合所述分析物之后允许邻近探针的核酸结构域彼此相互作用, 其中所述相互作用包括双链体的形成;(c) 将所述样品与包括 3' 核酸外切酶活性的组分接触;(d) 延伸所述双链体的至少一个核酸结构域的 3' 端以生成延伸产物, 其中所述步骤可以与步骤(c) 同时发生或在步骤(c) 之后发生;和(e) 扩增和检



1. 用于检测样品中的分析物的方法,其包括:
 - (a)将所述样品与至少第一和第二邻近探针的至少一组接触,所述探针各自包括分析物结合结构域和核酸结构域并可以同时结合于分析物;
 - (b)在所述邻近探针结合所述分析物之后,使得邻近探针的核酸结构域彼此相互作用,其中所述相互作用包括双链体的形成;
 - (c)将所述样品与包括3'核酸外切酶活性的组分接触;
 - (d)延伸所述双链体的至少一个核酸结构域的3'端以生成延伸产物,其中此步骤可以与步骤(c)同时发生或在步骤(c)之后发生;和
 - (e)扩增和检测延伸产物。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述检测是定量的。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述检测是定性的。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述分析物完全地或部分地是蛋白质分子。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少第一和第二邻近探针的至少一个的分析物结合结构域是抗体,或其结合片段或其衍生物。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(d)通过还包括3'核酸外切酶活性的核酸聚合酶来实施。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中包括3'核酸外切酶活性的组分选自以下的任意一个或多个:T4 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶、Phi29(Φ29)DNA聚合酶、DNA聚合酶I、DNA聚合酶I的Klenow片段、强烈火球菌(Pfu)DNA聚合酶和/或乌兹火球菌(Pwo)DNA聚合酶。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述步骤(d)通过没有3'核酸外切酶活性的核酸聚合酶来实施。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中在包括3'核酸外切酶活性的组分之后加入所述聚合酶,其中所述样品进一步孵育以使得延伸产物生成。
10. 根据权利要求8或9所述的方法,其中所述核酸聚合酶选自DNA聚合酶III的α亚基、DNA聚合酶I的Klenow exo(-)片段、Taq聚合酶、Pfu(exo⁻)DNA聚合酶和/或Pwo(exo⁻)DNA聚合酶。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述包括3'核酸外切酶活性的组分为核酸外切酶I。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述包括3'核酸外切酶活性的组分在扩增延伸产物的步骤之前灭活。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述3'核酸外切酶活性通过热变性灭活。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述3'核酸外切酶通过热变性灭活是步骤(e)的扩增反应的第一步。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述样品与包括3'核酸外切酶活性的组分接触之前将一些或所有用于步骤(e)的扩增反应的试剂加入到样品中,或者其中所述一些或所有试剂与包括3'核酸外切酶活性的组分同时接触样品。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述试剂在步骤(b)和(c)之间加入。
17. 根据权利要求1所述的方法,其中所述步骤(e)包括扩增延伸产物的延伸部分的一

部分。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中使用位于延伸产物的延伸部分的一部分的任一侧的引物和该部分的扩增来实现延伸产物的延伸部分的部分的扩增。

19. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述延伸产物的延伸部分的部分为寡核苷酸连接充当模板以生成环状的寡核苷酸, 其中所述环状寡核苷酸充当用于扩增的模板。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述扩增是滚环扩增。

21. 根据权利要求17或19所述的方法, 其中所述延伸产物的延伸部分的部分充当用于环状寡核苷酸的滚环扩增的引物。

22. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述步骤(e)包括聚合酶链式反应。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述聚合酶链式反应是定量聚合酶链式反应。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述定量聚合酶链式反应使用嵌入核酸分子的染料, 从而提供可检测的信号。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述可检测的信号为荧光信号。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述嵌入核酸分子以提供可检测的信号的染料为SYBR Green®或EvaGreen™。

27. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述用于聚合酶链式反应中的引物以修饰形式提供, 从而使其具有对3'核酸外切酶活性的抗性。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述引物在3'端包括至少一个修饰的核苷酸。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中所述修饰的核苷酸选自以下所列的任意一种或多种: 硫代磷酸酯修饰的核苷酸、锁核酸核苷酸、2'-OMe-CE亚磷酰胺修饰的核苷酸和/或肽核酸核苷酸。

30. 根据权利要求22所述的方法, 其中用于所述聚合酶链式反应中的引物是热启动引物。

31. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述聚合酶是热稳定聚合酶。

32. 根据权利要求1所述的方法, 其中第一和第二邻近探针的核酸结构域的一个或两个在步骤(d)中延伸。

33. 根据权利要求1所述的方法, 其中至少一个核酸结构域是部分双链的。

34. 根据权利要求33所述的方法, 其中部分双链的核酸结构域包括与夹板寡核苷酸杂交的单链核酸结构域。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中在步骤(a)之前, 所述夹板寡核苷酸预先杂交到所述邻近探针之一的核酸结构域。

36. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述夹板寡核苷酸在步骤(d)中延伸以形成延伸产物。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述延伸产物被环化以提供用于扩增的模板。

38. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述延伸产物的3'端通过模板化的连接与延伸产物寡核苷酸的5'端连接。

39. 根据权利要求36或37所述的方法, 其中所述扩增是滚环扩增。

40. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述夹板寡核苷酸作为游离的核酸分子单独提供。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述夹板寡核苷酸在邻近探针之前加入, 与邻近探针同时加入, 或在邻近探针之后加入。

42. 根据权利要求41所述的方法, 其中所述夹板寡核苷酸作为第三邻近探针的核酸结构域提供。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述第三邻近探针与所述第一和第二邻近探针同时加入到样品中。

44. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述延伸的核酸结构域是连接在一起的。

45. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述连接反应是通过根据权利要求34至44中任一项所定义的夹板寡核苷酸来介导的。

46. 根据权利要求1所述的方法, 其包括使用至少第一和第二邻近探针的几组来进行多重分析, 其中每组产生唯一的延伸产物。

47. 根据权利要求1所述的方法, 其中在步骤(a)和/或(b)中包括群集剂。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述群集剂为交联葡聚糖。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中所述交联葡聚糖是G-100型。

50. 用于在检测样品中的分析物的方法中使用的试剂盒, 所述试剂盒包括:

(a) 至少一组至少第一和第二邻近探针, 所述探针各自包括分析物结合结构域和核酸结构域并可以同时结合于分析物; 和

(b) 包括3'核酸外切酶活性的组分; 和

(c) 任选地, 用于延伸至少一个所述第一和第二邻近探针的核酸结构域以产生延伸产物的装置; 和

(d) 任选地, 用于扩增和检测所述延伸产物的装置。

51. 根据权利要求50所述的试剂盒, 还包括针对第一和第二探针的夹板寡核苷酸和/或封闭寡核苷酸。

52. 根据权利要求50所述的试剂盒, 还包括针对分析物的固定化的捕获探针, 或装备有用于固定的装置的捕获探针。

53. 根据权利要求50至52中任一项所述的试剂盒, 其中所述包括3'核酸外切酶活性的组分如权利要求7或11中所定义。

核酸外切酶可实现的邻近延伸分析

[0001] 本发明涉及针对样品中的分析物的基于邻近探针的检测分析(“邻近分析”),具体地为邻近探针延伸分析(PEA)。特别地,本发明涉及方法中的改进以降低非特异性“背景”信号,所述非特异性“背景”信号在所有样品类型中出现,并且在复杂生物样品中可以是特别有问题的。改进包括在这样的分析中使用包括3'核酸外切酶活性的组分。

[0002] 在邻近探针延伸分析中使用邻近探针,所述邻近探针结合于分析物并具有核酸结构域(或标记),所述核酸结构域在所述分析物结合后以邻近依赖性方式相互作用。所述相互作用通常通过一个或多个核酸双链体的形成(通过核酸结构域的杂交)进行,使得至少一个核酸结构域从其3'端延伸。该延伸产物形成可检测的,优选地可扩增的核酸检测产物,或检测标记,借助所述检测产物或检测标记可以检测到所述分析物。

[0003] 在本发明中,将包括3'核酸外切酶活性的组分在核酸结构域(或多个结构域)的延伸所必须的组分(例如,聚合酶)之前或与其同时加入。因此,认为包括3'核酸外切酶活性的组分能够降解具有游离的和未保护的3'端的核酸结构域,即邻近探针上不结合于靶分析物,因此不形成特异性的相互作用或双链体的结构域。在本发明中,将包括3'核酸外切酶活性的组分包含在内时可观察的影响是防止由非杂交的或“非双链体的”核酸结构域产生非特异性延伸产物,从而提高分析的特异性和灵敏度。本发明还提供了包括用于本发明的方法中的包括3'核酸外切酶活性的组分的试剂盒。

[0004] 一般地,邻近分析依赖“邻近探测”原理,其中通过多个(即,两个或多个,通常是两个或三个)探针的结合来检测分析物,当所述探针通过结合于分析物(从而是“邻近探针”)而邻近时,使得信号生成。一般地,邻近探针中的至少一个包括连接于探针的分析物结合结构域(或部分)的核酸结构域(或部分),以及信号的生成涉及核酸部分和/或由其它探针(或多个探针)携带的另外的功能部分之间的相互作用。因此信号生成取决于探针之间(更具体地由它们携带的核酸或其它功能部分/结构域之间)的相互作用,因此仅当两个(或多个)必须的探针都结合于分析物时才出现,从而向检测系统提供改善的特异性。近年来发展了邻近探测的概念,现在基于该原则的许多分析在本领域是熟知的。例如,“邻近探针延伸分析”或“邻近延伸分析”(PEA)是指具体类型的分析,所述分析利用核酸结构域的延伸,即,核苷酸模板化地加入核酸分子的末端,以生成可检测的信号。

[0005] 基于邻近探针的检测分析,特别是邻近延伸分析使得能够通过将样品中一种或多种分析物的存在转化成可以容易地检测的或可定量的基于核酸的信号,来灵敏地、快速地和方便地检测或定量该一种或多种分析物,并且所述的分析可以按照均质或异质形式进行。

[0006] 本领域的邻近探针通常成对使用,并且各个地由对靶分析物具有特异性的分析物结合结构域和功能结构域,例如偶联在其上的核酸结构域构成。所述的分析物结合结构域可以例如是核酸“适体”(Fredriksson等人(2002)Nat Biotech20:473-477)或可以是蛋白质的,如单克隆或多克隆抗体(Gullberg等人(2004)Proc Natl Acad Sci USA101:8420-8424)。各个邻近探针对的各自的分析物结合结构域可以针对分析物上的不同结合位点具有特异性,所述分析物可以由单一分子或相互作用的分子的复合物构成,或可以具有相同

的特异性,例如在靶分析物作为多聚体存在的情况下。当邻近探针对变得彼此紧密邻近时,这主要当两个均结合于相同分析物分子上的其各自的位点时发生,功能结构域(例如,核酸结构域)能够相互作用。在本发明的上下文中,例如,核酸结构域可以含有彼此互补的区域,因此邻近探针对的核酸结构域可以杂交以形成双链体。一个或多个结构域可以延伸以形成新的核酸序列,这通常地借助由其它邻近探针的核酸结构域模板化的聚合反应来进行。由此生成新的核酸序列用于报告样品中分析物的存在或量,并且可以定性地,或例如通过实时定量PCR(q-PCR)定量地检测。

[0007] 基于邻近探针的分析存在许多变化。例如邻近延伸试验描述于W001/61037、US6,511,809和W02006/137932中,并且基于邻近探针的分析的异质(即,分析物首先借助特异性分析物结合试剂固定在固体基质上)和均质(即,在溶液中)形式都被公开了,例如公开在W001/61037、W003/044231、W02005/123963、Fredriksson等人(2002)Nat Biotech20:473-477和Gullberg等人(2004)Proc Natl Acad Sci USA101:8420-8424中。

[0008] 虽然通常使用邻近探针对,但是邻近探针检测分析的改变已描述于例如W001/61037、W02005/123963和W02007/107743中,其中使用三种邻近探针来检测一种分析物分子。例如,第三邻近探针可以用于提供能够与前两种邻近探针的核酸结构域相互作用的另外的核酸结构域。

[0009] 除了邻近探针检测分析的改变,邻近探针自身结构的改变已描述于例如W003/044231中,其中使用了多价邻近探针。这样的多价邻近探针包括至少两个,但是多达100个的分析物结合结构域,所述的分析物结合结构域缀合于至少一个核酸,优选地多于一个核酸(或多个核酸)。

[0010] 基于邻近探针的检测分析,特别是邻近延伸分析,已证明在许多不同的应用中在特异地和灵敏地检测蛋白中是有用的,所述应用例如为检测弱表达或低丰度蛋白。然而,这样的分析在分析的灵敏度和特异性两方面都不是没有其问题,并且存在改进的空间。

[0011] 传统邻近分析,例如如上所述的邻近延伸分析的灵敏度受到两个主要因素的限制:(i)针对靶分析物的分析物结合结构域的亲和力,和(ii)由非结合探针,特别是探针对的随机邻近产生的非特异性背景信号。使用具有对分析物亲和力高的结合结构域时,灵敏度被限制在检测约6000个分子。传统地,为了实现低水平的背景,必须使用非常低浓度的邻近探针。这阻止了通过使用高浓度的探针来补偿包括低亲和力分析物结合结构域的探针的任何尝试。因此发现这可能限制分析的灵敏度和可能获得定量结果的范围。

[0012] 已提出了其它用于降低非特异性背景信号的方法,如使用封闭试剂,例如封闭寡核苷酸,所述封闭试剂结合于邻近探针上的核酸结构域的游离端,直到被取代,例如被置换寡核苷酸取代。在允许邻近探针结合于分析物之后加入置换寡核苷酸意味着邻近探针的核酸结构域的相互作用仅可能发生在结合于靶分析物的邻近探针上。用于降低背景信号的其它方法集中在改进核酸延伸产物的检测上。

[0013] 然而,仍然有改进背景信号水平的空间,并且为了克服邻近分析的局限性,特别是如上所述的本领域已知的邻近延伸分析,已发现在延伸反应之前或在延伸反应的同时使用包括3'核酸外切酶活性的组分可以显著提高分析的灵敏度和特异性。优选地,所述的包括3'核酸外切酶活性的组分与用于延伸核酸结构域的组分(例如,聚合酶)同时接触样品。在特别优选的实施方案中,用于延伸核酸结构域的聚合酶包括3'核酸外切酶活性。

[0014] 通过在分析中包括能够降解非邻近核酸结构域(具有游离的未保护的3'端的结构域)的组分,即,将还没有与结合于相同靶分析物的邻近探针的核酸结构域形成(稳定的)序列特异性双链体的核酸结构域降解,可能降低存在于分析中的非特异性背景信号。供选择地,使用包括3'核酸外切酶活性的组分可以视为降低或防止不需要的、不希望的或非特异性延伸产物的产生。

[0015] 虽然在用于产生核酸分子延伸产物的方法中使用包括3'核酸外切酶活性的组分是众所周知的,但是在用于检测样品中的分析物的方法中,特别是在本发明的邻近延伸分析中使用所述活性,提供了比先前的基于邻近探针分析相比独特的和意想不到的优点。

[0016] 一般地,特别地选择基于邻近探针的分析的组分以避免分析中其它组分的降解。部分或所有邻近探针,特别是核酸结构域的降解、破坏或损坏会阻碍或妨碍充当指示靶分析物存在的信号的核酸分子的产生,例如所述的阻碍或妨碍通过降低可能的相互作用的配偶体的浓度进行。

[0017] 此外,这样的活性的存在可以看作进一步扩增核酸产物的障碍,即,需要除去所述活性以避免信号扩增反应需要的核酸分子或组分的降解。通常不希望将另外的步骤加入到分析物检测分析中,由于其降低方法的简单性,从而提高了自动化和/或高通量使用适应性的难度。同样地,将组分加入分析中提高了样品的复杂性,可以预期这样会降低分析的灵敏度。

[0018] 然而,本发明的方法依赖于当包括3'核酸外切酶活性的组分在PEA中接触样品时所看到的背景的显著降低(即,信号:噪声比升高)。特别地,3'核酸外切酶活性有利地作为用于延伸邻近探针的核酸结构域的核酸聚合酶的部分提供。供选择地或另外地,包括3'核酸外切酶活性的组分可以作为独立的组分(即,未偶联于聚合酶或作为聚合酶的部分的单独的实体)提供。因此,可以看出包括3'核酸外切酶活性的组分可以按照任意合适的形式接触样品。

[0019] 虽然不希望被理论束缚,但是理论认为3'核酸外切酶活性能够降解具有游离和未保护的3'端的未结合的邻近探针的核酸结构域(例如,其中核酸结构域通过其5'端偶联于分析物结合结构域,其中“游离的”3'末端修饰成对3'核酸外切酶活性具有抗性)。就这一点来说,仅有在结合于靶分析物的邻近探针的核酸结构域之间形成的双链体可以形成稳定的相互作用(一旦结合后,在分析的条件下,邻近探针不容易从靶分析物上解离,从而使稳定的,即非短暂或持久的双链体形成)。双链体的形成起到保护邻近探针的核酸结构域免受3'核酸外切酶的活性的作用。然而,未结合于靶分析物的邻近探针不能形成稳定的双链体,即,游离的/未结合的探针(未结合于靶分析物)仅可以短暂地与其它邻近探针的核酸结构域或样品中的组分相互作用(形成不稳定和暂时的相互作用或双链体)。因此,在任何时候,分析中未结合的探针可能为非杂交的状态,并且那些包括具有游离和未保护的3'端的核酸结构域的未结合的探针会成为3'核酸外切酶组分的底物。这些未结合的探针的核酸结构域的降解防止非特异性延伸产物的产生,所述非特异性延伸产物可能在允许未结合的探针存留的分析中出现,例如,由于通过与邻近探针的核酸结构域或样品中的其它组分短暂或非特异性相互作用形成的双链体产生的延伸产物。

[0020] 加入这样的3'核酸外切酶组分导致在邻近探针延伸分析中非特异性背景信号改进地降低。如实施例中更详细地显示的,本发明代表了与本领域已知的邻近延伸分析相比

显著的进步。令人惊讶的是,甚至在已经包括了高水平的核酸外切酶活性的样品例如血浆中,显示了在使用包括3'核酸外切酶活性的组分的本发明的方法中观察到非特异性背景活性的降低。在缓冲液和血浆中含有靶分析物的样品用于进行分析时,3'核酸外切酶组分的加入导致信号:噪声比有相似改善,这是完全未意料到的。背景信号的这样的降低的结果是,邻近探针检测分析的特异性和灵敏度均提高。

[0021] 此外,本文公开的方法还包括简化的PEA,其中在将包括3'核酸外切酶的组分灭活之前,可以使用于扩增延伸产物的组分与延伸分析的组分合并。如下所讨论的,预期包括3'核酸外切酶活性的组分会降解扩增反应的特定组分,例如PCR引物,从而确保仅在3'核酸外切酶活性被灭活后加入这些组分。然而,本文所公开的方法描述了能够使两个分析阶段的试剂预混合的各种组分的改变。有利地,这导致更少的移液步骤和更少的动手时间,这使得此分析的容易自动化和误差减少。

[0022] 因此,可以看出本发明提供了包括3'核酸外切酶活性的组分在邻近探针延伸分析中检测样品中的分析物中的用途,其中随后扩增并检测延伸产物。

[0023] 更具体地,在邻近探针延伸分析中包括3'核酸外切酶活性的组分在生成延伸产物的过程中使用,更具体地,在进行聚合酶催化的延伸反应的步骤的过程中在邻近分析的邻近探针的核酸结构域的相互作用之后用来生成延伸产物(这样的相互作用通常是核酸结构域的杂交,随后是至少一个结构域的延伸;一般而言,核酸结构域杂交以使一个核酸结构域可以模板化另一个结构域的延伸)。因此,在基于邻近探针的延伸分析中生成初始延伸产物的步骤中,或换言之,在邻近探针延伸分析中由邻近探针的核酸结构域的相互作用生成延伸产物的步骤中包括具有3'核酸外切酶活性的组分。

[0024] 供选择地,本发明的这个方面提供了检测样品中分析物的方法,所述方法包括邻近探针延伸分析,其中所述分析包括在分析的延伸步骤中使用包括3'核酸外切酶活性的组分,并且随后扩增和检测延伸产物。

[0025] 从再另一个方面来看,本发明提供了在用于检测样品中的分析物的邻近探针延伸分析中减少非特异性延伸产物(或提高信号:噪声比)的方法,所述方法包括在所述分析的延伸步骤中包括含有3'核酸外切酶活性的组分,其中随后扩增和检测特异性延伸产物。

[0026] 如上所述,邻近探针延伸分析的延伸步骤是生成初始延伸产物的步骤,所述的初始延伸产物随后作为检测分析物的手段进行检测。换言之,延伸步骤是生成延伸产物的步骤,其基于邻近探针的核酸结构域的相互作用,特别地基于核酸结构域的杂交和随后将至少一个结构域的延伸,例如使用另一个作为模板来进行延伸。

[0027] 本发明的方法,以及包括3'核酸外切酶活性的组分是用于基于邻近探针的分析中的,并且所述探针为邻近探针。基于邻近探针的分析可以是本领域已知的任意分析,例如如上所述的,所述分析使用邻近探针来检测样品中的分析物。具体地,该分析是邻近延伸分析,该分析基于通过杂交检测邻近探针的核酸结构域之间的相互作用和一个或多个这种结构域的延伸。

[0028] 因此,在一个优选的方面中,本发明提供了用于检测样品中的分析物的方法,该方法包括:

[0029] (a)将所述样品与至少一组的至少第一和第二邻位探针接触,所述探针各自包括分析物结合结构域和核酸结构域并可以同时结合于分析物;

[0030] (b)在所述邻位探针与所述分析物结合之后,使邻位探针的核酸结构域彼此相互作用,其中所述相互作用包括双链体的形成;

[0031] (c)将所述样品与包括3'核酸外切酶活性的组分接触;

[0032] (d)延伸所述双链体的至少一个核酸结构域的3'端以生成延伸产物,其中此步骤可以与步骤(c)同时发生或在步骤(c)之后发生;和

[0033] (e)扩增和检测延伸产物。

[0034] 如以下更详细地描述的,所述分析物结合结构域可以直接或间接结合于分析物。

[0035] 因此将看到的是,包括3'核酸外切酶活性的组分可以用于扩大邻近延伸分析的灵敏度和/或特异性。因此本发明的方法可以被认为是提高(针对分析物的)邻近延伸分析的信号:噪声比的方法。用另一种方式表达,本发明的方法可以用于降低在邻近延伸分析中的非特异性延伸产物的量。供选择地,本发明可以视为提供了在邻近延伸分析中破坏或抑制非特异性双链体形成的方法。此外,本发明可以看作是提供了在邻近延伸分析中降解未结合的邻近探针的核酸结构域的方法。

[0036] 如上所述,邻近延伸分析涉及在两个或多个邻近探针的核酸结构域之间形成双链体之后延伸至少一个核酸结构域,其中所述的探针结合于靶分析物。然而,所述双链体(两个互补核酸结构域的杂交)可以按照多种方式形成,这取决于邻近探针上的核酸结构域的方向。

[0037] 邻近延伸分析形式的代表性的例子示意性地显示在图1中,并且这些实施方案在以下更详细地描述。然而,这些不同“版本”的PEA绝不是意图限制本发明的范围。根据以下描述的,其它排列对本领域技术人员是显而易见的,并且意图将其包括在本发明中。实际上,本发明仅要求至少一个邻近探针(如同所示,虽然这是发明的一个优选的方面,但是不限于蛋白质分子或抗体)具有包括能够延伸的游离3'端的核酸结构域,以及其中所述延伸可以被第二邻近探针的核酸结构域模板化。在这方面,以及如以下更详细地描述的,邻近探针的核酸结构域可以是单链的或部分双链的,但是配置为结构域的单链区域可以用于通过杂交而彼此相互作用。各邻近探针的核酸结构域也可以通过各自杂交于共同的“夹板”核酸分子而相互作用,从而间接地形成双链体。因此,在上述方法的步骤(b)中,核酸结构域形成双链体的相互作用可以是直接的或间接的;连接于邻近探针的分析物结合结构域的核酸结构域可以彼此杂交以直接形成双链体,或它们可以通过各自杂交于另外的核酸分子来间接地形成双链体。这样的另外的核酸分子可以被视为部分双链核酸结构域的第二条链;它将与连接于邻近探针的分析物结合结构域的核酸分子的至少一个区域杂交(从而形成部分双链的核酸结构域,所述核酸结构域通过它的一条链连接),留下一个末端(例如,3')单链区域,所述单链区域与另一个邻近探针的核酸结构域的区域互补,因此所述单链区域可以用于通过与所述另一个邻近探针的核酸结构域杂交而相互作用。供选择地,“夹板”可以作为另外的邻近探针的核酸结构域提供。

[0038] 图1的版本1描绘了“传统的”邻近延伸分析,其中每个邻近探针的核酸结构域(显示为箭头)通过其5'端连接于分析物结合结构域(显示为倒置的“Y”),从而留下两个游离的3'端。当所述邻近探针结合于其各自的分析物上的分析物结合靶时(分析物在图中未显示),在3'端互补的探针的核酸结构域能够通过杂交而相互作用,即形成双链体。加入例如核酸聚合酶使得能够使用另一个邻近探针的核酸结构域来延伸每个核酸结构域,以模板化

所述延伸。根据本发明的方法,可以特异性地扩增和检测延伸产物,从而检测靶分析物。

[0039] 图1的版本2描绘了供选择的邻近延伸分析,其中第一邻近探针的核酸结构域通过其5'端连接于分析物结合结构域,以及第二邻近探针的核酸结构域通过其3'端连接于分析物结合结构域。因此,第二邻近探针的核酸结构域具有游离的5'端(显示为钝箭头),所述游离的5'端不能使用通常的核酸聚合酶(其仅延伸3'端)来延伸。第二邻近探针的3'端被有效地“封闭”,即,它不是“游离的”并且由于缀合于分析物结合结构域因而被其封闭而不能被延伸。在该实施方案中,当邻近探针结合于分析物上的其各自的分析物结合靶时,在3'端具有互补区域的探针核酸结构域能够通过杂交而相互作用,即形成双链体。然而,与版本1相比,仅有第一邻近探针的核酸结构域(其具有游离的3'端)可以使用第二邻近探针的核酸结构域作为模板进行延伸。如上所述,可以扩增并检测延伸产物,从而检测靶分析物。

[0040] 在图1的版本3中,与版本2类似,第一邻近探针的核酸结构域通过其5'端连接于分析物结合结构域,并且第二邻近探针的核酸结构域通过其3'端连接于分析物结合结构域。因此,第二邻近探针的核酸结构域具有游离的5'端(显示为钝箭头),所述5'端不能被延伸。然而,在该实施方案中,连接于各自的邻近探针的分析物结合结构域的核酸结构域没有互补区域,因此不能直接形成双链体。作为替代,提供了第三核酸分子,所述第三核酸分子具有与每个邻近探针的核酸结构域同源的区域,该区域在核酸结构域之间充当“分子桥”或“夹板”。该“夹板”寡核苷酸桥接了核酸结构域之间的间隙,使他们彼此能间接相互作用,即,每个核酸结构域与夹板寡核苷酸形成双链体。因此,当邻近探针结合于其各自的在分析物上的分析物结合靶时,探针的核酸结构域各自通过杂交,即通过形成双链体来与夹板寡核苷酸相互作用。因此可看出,第三核酸分子或夹板可以看作是在邻近探针之一上提供的部分双链的核酸结构域的第二条链。例如,邻近探针中的一个可以具有部分双链的核酸结构域,所述结构域通过一条链的3'端连接于分析物结合结构域,并且其中另一条(未连接的)链具有游离的3'端。因此,这样的核酸结构域具有末端单链区域,所述单链区域具有游离的3'端。在该实施方案中,第一邻近探针的核酸结构域(其具有游离的3'端)可以使用“夹板寡核苷酸”(或另一个核酸结构域的单链的3'端区域)作为模板延伸,并且可以有利地连接到第二邻近探针的核酸结构域的5'端(具体地为连接链的5'端,或供选择地是指核酸结构域的双链部分的5'端)。供选择地或另外地,夹板寡核苷酸的游离的3'端(即,未连接的链,或3'单链区域)可以使用第一邻近探针的核酸结构域作为模板进行延伸。如上所述,可以扩增和检测延伸产物,从而检测靶分析物。

[0041] 从以上描述可以明显地看出,在一个实施方案中,夹板寡核苷酸可以作为分析的单独的组分提供。换言之,可以将其单独加入反应混合物中(即,与邻近探针分别地加入到含有分析物的样品中)。尽管如此,由于其杂交到作为邻近探针的部分的核酸分子并且当与这样的核酸分子接触时会这样做,尽管它是单独加入的,但是仍将其视为部分双链的核酸结构域的一条链。供选择地,所述的夹板可以预先杂交到邻近探针的一个核酸结构域,即,在将邻近探针与样品接触之间进行杂交。在该实施方案中,夹板寡核苷酸可以直接看作邻近探针的核酸结构域的部分,即,其中核酸结构域是部分双链的核酸分子,例如,邻近探针可以通过将双链核酸分子连接到分析物结合结构域(优选地,核酸结构域通过单链缀合于分析物结合结构域)并且(使用能够杂交于其它邻近探针的核酸结构域的单链突出端)修饰所述核酸分子以生成部分双链的核酸结构域来制备。因此,如本文所定义的邻近探针的核

酸结构域的延伸还包括“夹板”寡核苷酸的延伸。有利地,当延伸产物由夹板寡核苷酸的延伸产生时,所产生的延伸的核酸链仅通过核酸分子的两条链之间的相互作用(通过两条核酸链之间的杂交)偶联于邻近探针对。因此,在这些实施方案中,可以使用变性条件将所述的延伸产物从邻近探针对上解离,所述变性条件例如升高温度、降低盐浓度等。这在异质形式中是特别有用的,其中靶分析物结合于固体基质,由于延伸产物可以容易地从分析的其它组分上分离,例如,结合于固定化的分析物的邻近探针可以在固相中,而延伸产物在变性之后可以在液相中。

[0042] 虽然在图1的版本3中描绘的夹板寡核苷酸显示为与第二邻近探针的核酸结构域的全长互补,但这仅仅是一个实例,并且夹板能够与邻近探针的核酸结构域的末端(或在末端附近)形成双链体,即能够将间隙桥接就足够了,如下进一步定义的。

[0043] 在另一个实施方案中,夹板寡核苷酸可以作为如W02007/107743所描述的第三邻近探针的核酸结构域提供,将W02007/107743引入本文作为参考,这表明这样可以进一步提高邻近探针分析的灵敏度和特异性。

[0044] 图1的版本4是版本1的改变,其中第一邻近探针的核酸结构域在其3'端包括与第二邻近探针的核酸结构域不完全互补的序列。因此,当所述邻近探针结合于分析物上其各自的分析物结合靶标时,所述的探针的核酸结构域能够通过杂交,即形成双链体而相互作用,但第一邻近探针的核酸结构域的3'最末端(包括游离3'羟基的核酸分子的部分)不能杂交,因此作为单链的未杂交的“下垂物”存在。在加入例如核酸聚合酶后,仅有第二邻近探针的核酸结构域可以使用第一邻近探针的核酸结构域模板化延伸,来进行延伸。如上所述的,可以特异性地扩增和检测延伸产物,从而检测靶分析物。

[0045] 在该实施方案中,有益的是在第一邻近探针的核酸结构域的3'端修饰一个或多个核苷酸,例如以使其具有对3'核酸外切酶活性的抗性。适合的修饰如下进一步描述。如果核酸结构域是抗3'核酸外切酶活性的,那么仅有第二邻近探针的核酸结构域可以被延伸。相反地,如果核酸结构域对3'核酸外切酶活性敏感,那么“下垂物”可以被降解,产生与第二邻近探针的核酸结构域完全杂交(退火)的3'端。因此,第一邻近探针的核酸结构域也可以使用第二邻近探针的核酸结构域作为模板进行延伸。

[0046] 在图1中描绘的最后的实施方案,即版本5,可以看作是版本3的改变。然而,与版本3相比,两个邻近探针的核酸结构域均通过其5'端连接于其各自的分析物结合结构域。在该实施方案中,核酸结构域的3'端不互补,因此邻近探针的核酸结构域不能相互作用或直接形成双链体。作为替代,提供了第三核酸分子,所述第三核酸分子具有与每个邻近探针的核酸结构域同源的区域,该区域在核酸结构域之间充当“分子桥”或“夹板”。该“夹板”寡核苷酸桥接了核酸结构域之间的间隙,使得它们能彼此间接地相互作用,即,每个核酸结构域与夹板寡核苷酸形成双链体。因此,当邻近探针结合于其在分析物上的各自的分析物结合靶标时,探针的核酸结构域各自通过杂交,即形成双链体而与夹板寡核苷酸相互作用。因此,根据版本3可看出,第三核酸分子或夹板可以看作是在一个邻近探针上提供的部分双链的核酸结构域的第二条链。在优选的实例中,可以将探针之一与部分双链的核酸结构域一起提供,所述结构域通过一条链的5'端连接于分析物结合结构域,并且其中另一条(未连接的)链具有游离的3'端。因此,这样的核酸结构域具有末端单链区域,所述单链区域具有至少一个的游离的3'端。在该实施方案中,第二邻近探针的核酸结构域(其具有游离的3'端)

可以使用“夹板寡核苷酸”作为模板延伸。供选择地或另外地，夹板寡核苷酸的游离的3'端(即，未连接的链，或第一邻近探针的3'单链区域)可以使用第二邻近探针的核酸结构域作为模板进行延伸。如上所述，可以扩增和检测延伸产物，从而检测靶分析物。

[0047] 如以上与版本3相关地所讨论的，夹板寡核苷酸可以作为分析的单独的组分提供。另一方面，由于它杂交到作为邻近探针的部分的核酸分子，并且当与这样的核酸分子接触时会这样做，尽管它是单独加入的，但是仍将其视为部分双链的核酸结构域的一条链。供选择地，夹板可以预先杂交到邻近探针的一个核酸结构域，即，在将邻近探针与样品接触之间进行杂交。在该实施方案中，夹板寡核苷酸可以直接看作邻近探针的核酸结构域的部分，即，其中核酸结构域是部分双链的核酸分子，例如，邻近探针可以通过将双链核酸分子连接到分析物结合结构域(优选地，核酸结构域通过单链缀合于分析物结合结构域)并且(使用能够杂交于其它邻近探针的核酸结构域的单链突出端)修饰所述核酸分子以生成部分双链的核酸结构域来制备。因此，如本文所定义的邻近探针的核酸结构域的延伸还包括“夹板”寡核苷酸的延伸。有利地，当延伸产物由夹板寡核苷酸的延伸产生时，所产生的延伸的核酸链仅通过核酸分子的两条链之间的相互作用(通过两条核酸链之间的杂交)偶联于邻近探针对。因此，在这些实施方案中，可以使用变性条件将所述的延伸产物从邻近探针对上解离，所述变性条件例如升高温度、降低盐浓度等。这在异质形式中是特别有用的，其中靶分析物结合于固体基质，由于延伸产物可以容易地从分析的其它组分上分离，例如，结合于固定化的分析物的邻近探针可以在固相中，而延伸产物在变性之后可以在液相中。

[0048] 虽然在图1的版本5中描绘的夹板寡核苷酸显示为与第一邻近探针的核酸结构域的全长互补，但这仅仅是一个实例，并且夹板能够与邻近探针的核酸结构域的末端(或在末端附近)形成双链体，即能够将桥接间隙桥接就足够了，如下进一步定义的。

[0049] 在另一个实施方案中，夹板寡核苷酸可以作为如W02007/107743所描述的第三邻近探针的核酸结构域提供，将W02007/107743引入本文作为参考，这表明这样可以进一步提高邻近探针分析的灵敏度和特异性。

[0050] 从以上可以理解的是，邻近延伸分析有多个排列，其都依赖于当两个(或多个)邻近探针结合于分析物时，凭借探针之间相互作用形成包括可延伸的3'端(用于模板化的延伸)的核酸双链体。因此探针之间(或更具体地，在其各自的核酸结构域之间，所述核酸结构域包括夹板寡核苷酸)的相互作用是邻近依赖性的；检测探针在分析物上的结合共同地使得它们邻近，以使它们(或更具体地，它们的核酸结构域)可以相互作用。因此，可以通过检测该相互作用(或由此生成的延伸产物)来检测分析物。在本发明的方法中，邻近探针可以通过彼此杂交而(直接地或间接地)相互作用，以使得一个或多个核酸分子能够延伸。该延伸可以导致两个邻近探针的核酸结构域被缀合或相互连接，并且夹板寡核苷酸(其可以形成邻近探针的核酸结构域的部分)协助或介导该相互作用(缀合)。延伸(如果适用，缀合)可以通过检测延伸和/或缀合产物(相互作用产物)来检测。

[0051] 虽然不希望被理论束缚，但是认为本发明的方法依赖于包括3'核酸外切酶活性的组分的加入，所述组分降解未结合的邻近探针的核酸结构域的游离的和未保护的3'端。认为所述未结合的探针的核酸结构域非特异性地和/或短暂地(暂时地)结合于其它未结合的邻近探针或分析的组分，以生成非特异性/背景延伸产物，从而干扰分析物的检测。

[0052] 核酸外切酶是酶，其通过在3'或5'端之一水解磷酸二酯键而一次一个地从多核苷

酸链的末端切割核苷酸而起作用。因此,核酸外切酶作为5'或3'核酸外切酶存在,此命名是指切割开始的端,即,3'核酸外切酶沿着3'到5'方向来降解核酸分子。已知存在许多类型的核酸外切酶,所述核酸外切酶降解DNA和/或RNA,并且可以作用于双链或单链核酸。虽然核酸外切酶可以是不同的实体(具有降解核酸的唯一功能的单独的酶),例如,在真核生物和原核生物中发现的用于转化的mRNA的5'RNA核酸外切酶和来自大肠杆菌(*E.coli*)的核酸外切酶I,所述核酸外切酶I在3'-5'方向上降解单链DNA,具有多种功能的酶产生大量的核酸外切酶活性,例如,许多DNA聚合酶还包括3'和/或5'核酸外切酶活性(来自大肠杆菌的DNA聚合酶I)。

[0053] 因此,用于本发明的方法的包括3'核酸外切酶活性的组分包括能够从3'端降解核酸的任意元素。在本发明的一个优选的方面中,包括3'核酸外切酶活性的组分优先作用于单链核酸,即,它对单链分子比对双链分子具有更高的活性,例如对单链核酸分子的活性至少高2、3、4、5、10、20、50或100倍。

[0054] 包括核酸外切酶活性的组分必须能够完全地或部分地降解未结合的邻近探针的核酸结构域,所述未结合的邻近探针即未结合于靶分析物的探针,其中所述核酸结构域具有游离的和未保护的3'端。如下所述的,邻近探针的核酸结构域可以由任意的核苷酸残基构成,所述核苷酸残基能够参与沃森克里克型或类似的碱基对相互作用。然而,在核酸结构域包括DNA的实施方案中,包括3'核酸外切酶活性的组分作用于DNA,并优选地对DNA比对RNA具有更高的活性,例如,它对DNA比对RNA的活性至少高2、3、4、5、10、20、50或100倍。类似地,在核酸结构域包括RNA的实施方案中,包括3'核酸外切酶活性的组分作用于RNA,并优选地对RNA比对DNA具有更高的活性,例如,它对RNA比对DNA的活性至少高2、3、4、5、10、20、50或100倍。

[0055] 在本发明的一个方面中,包括3'核酸外切酶活性的组分是酶。在特别优选的实施方案中,所述酶是能够延伸核酸分子的3'端的核酸聚合酶,所述酶还包括3'核酸外切酶活性。具体地,包括3'核酸外切酶活性的组分可以选自以下的任意一个或多个:T4DNA聚合酶、T7DNA聚合酶、Phi29(Φ 29)DNA聚合酶、DNA聚合酶I、DNA聚合酶I的Klenow片段、强烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*, Pfu)DNA聚合酶和/或乌兹火球菌(*Pyrococcus woesei*, Pwo)DNA聚合酶。因此,在一些实施方案中,包括3'核酸外切酶活性的组分可以是超嗜热酶,特别是包括3'核酸外切酶活性的超嗜热聚合酶,例如Pfu DNA聚合酶或Pwo DNA聚合酶。

[0056] 超嗜热酶是来自或获得自超嗜热生物的典型的酶,所述超嗜热生物即在90°C以上的极端温度中最佳地生长的生物,例如在约100°C下(与在约70°C的最佳生长相比,所述约70°C通常针对大多数嗜热微生物)。超嗜热聚合酶(或更具体地来自超嗜热生物的聚合酶)可以在正常生物温度以上具有最佳的酶活性,例如37°C以上,如40、50、60或70°C以上,通常在60°C或70°C以上。值得注意的是,这样的酶会在较低的温度下有利地显示低的或降低的活性,如在室温下,例如在25°C下,或30°C下。特别有利的是,到至少45°C或50°C为止聚合酶活性可能较低。已从生活在极端温度条件下的生物体中鉴定出了这样的酶,所述的生物体例如古细菌(如强烈火球菌和乌兹火球菌等)。来自这些生物体的特别感兴趣的酶是聚合酶,所述聚合酶在许多分子生物学技术的发展中是有用的,尤其是PCR。和天然存在的超嗜热酶一样,具有高的最适温度的热稳定的酶可以被修饰以赋予在室温下活性降低或低的性质,以产生具有与天然存在的超嗜热酶相同或相似性质的酶,特别是相同或相似的温度活

性分布,即高的最适温度(例如50、55或60℃以上)与在室温下(或在更低的温度下,如在30℃、37℃或40℃下)低的或降低的活性的组合。这样的修饰的聚合酶包括例如所谓的Taq聚合酶的“热启动”衍生物,在约50℃下获得活性。如本文所使用的,术语“超嗜热聚合酶”不仅包括天然存在的酶,而且包括所有这样的修饰的衍生物,还包括天然存在的超嗜热聚合酶的衍生物。用于在本申请的方法中使用的特别优选的超嗜热酶包括Pfu DNA聚合酶和Pwo DNA聚合酶和衍生物,例如,序列修饰的衍生物,或其突变体。虽然在特定的实施方案中,超嗜热聚合酶可以是有利的或优选的,但这样的酶不是必须使用的,并且在另外的实施方案中,可以使用任何嗜热或热稳定的聚合酶,例如Taq聚合酶(即在高温下显示稳定性或显示升高的最适温度的任意聚合酶)。

[0057] 在另一个实施方案中,用于延伸邻近探针核酸结构域(和/或夹板寡核苷酸)的聚合酶活性可以由不具有3'核酸外切酶活性或具有最低的3'核酸外切酶活性的酶来提供,例如来自大肠杆菌的DNA聚合酶III的 α 亚基、DNA聚合酶I的Klenow $\text{exo}(-)$ 片段、Taq聚合酶、Pfu($\text{exo}-$)DNA聚合酶、Pwo(exo^-)DNA聚合酶等,并且包括3'核酸外切酶的组分可以作为单独的实体提供,例如,另一种包括3'核酸外切酶活性的酶。因此,不具有3'核酸外切酶活性或具有最低的3'核酸外切酶活性的聚合酶可以是超嗜热或热稳定聚合酶。在又一个实施方案中,包括3'核酸外切酶活性的组分可以按照多种形式包括,即,可以提供一种以上的包括3'核酸外切酶活性的组分,例如,作为聚合酶的部分和作为具有其主要功能,3'核酸外切酶活性的独立的酶来提供。在本发明的一个方面中,包括3'核酸外切酶活性的组分是核酸外切酶I。

[0058] 有利地,在延伸核酸结构域所需的组分之前或与延伸核酸结构域所需的组分同时将包括3'核酸外切酶活性的组分接触样品,但是在已允许邻近探针的核酸结构域相互作用,即形成双链体之后。在这方面,邻近探针的核酸结构域在接触样品时必须至少部分单链的,以使其可以在结合于靶分析物时彼此相互作用。因此,如果包括3'核酸外切酶活性的组分在上述双链体形成之前存在(以活性形式存在),所有具有游离的和未保护的3'端的邻近探针的核酸结构域会容易被降解。相反地,一旦使得在结合于靶分析物的邻近探针之间能够形成双链体,那么仅有未结合的邻近探针的核酸结构域可以被降解。如上所述的,未结合于靶分析物的探针不形成稳定的双链体,并且虽然它们可以与其它未结合的探针或样品的其它组分相互作用,但是这些相互作用可能是短暂的(暂时的),从而意味着这些探针的核酸结构域对于包括3'核酸外切酶活性的组分是可用的底物。

[0059] 当包括3'核酸外切酶活性的组分与延伸核酸结构域所需的组分同时接触样品时,例如,其中聚合酶包括3'核酸外切酶活性时,延伸和降解反应会同时发生。

[0060] 当包括3'核酸外切酶活性的组分在延伸核酸结构域所需的组分之前接触样品,例如,其中包括3'核酸外切酶活性(基本没有或没有可检测的聚合酶活性)的独立的酶与样品接触,未结合的探针的具有游离的和未保护的3'端的核酸结构域将被降解,并且可以将包括3'核酸外切酶活性的组分在延伸反应之前灭活(例如,去除、抑制或变性)。然而,3'核酸外切酶活性可以在延伸步骤的过程中保留。

[0061] 在一个实施方案中,将包括3'核酸外切酶活性的组分在扩增延伸产物之前灭活,以防止扩增步骤所需的组分被降解。术语“灭活的”是指组分被抑制、被变性或物理地从样品中去除,所述的变性例如通过加热变性。在这方面中,仅需要将3'核酸外切酶活性灭活。

[0062] 例如,其中延伸产物通过PCR扩增,标准的未修饰的引物(具有游离的和未保护的3'端)是3'核酸外切酶的底物,并且该活性的灭活失败会导致这些PCR试剂的降解,从而导致受限的扩增或无扩增。

[0063] 在一个优选的实施方案中,用于扩增反应的一些或所有试剂在接触包括3'核酸外切酶活性的组分之前加入样品中。在一个特别优选的实施方案中,所述试剂在以上定义的步骤(b)或(c)之间加入。供选择地,用于扩增反应的试剂的一些或所有与包括3'核酸外切酶活性的组分同时,即同时地(simultaneously)或同时地(contemporaneously)加入样品中。

[0064] 在一个实施方案中,引物以修饰的形式提供,以使其对3'核酸外切酶活性具有抗性。为了防止被核酸外切酶降解,对核酸分子或核酸分子中包含的核苷酸进行的修饰在本领域是众所周知的,并且通常利用对保护端例如3'端的一个或多个残基的修饰。可以在本发明的方法中利用适用于保护免受3'核酸外切酶活性的任何修饰。在这方面,用于本发明的引物优选地在3'端包括的至少一个修饰的核苷酸。例如,修饰可以选自以下的任意一种或多种:硫代磷酸酯修饰的核苷酸、锁核酸核苷酸(不可接近的RNA核苷酸)、2'-OMe-CE亚磷酰胺修饰的核苷酸或者肽核酸核苷酸。

[0065] 对于扩增本发明的方法的延伸产物的步骤,有利地使用“热启动”引物(描述于Kaboev等人,2000,Nuc.Acids Res.,28(21),pp.e94,将其引入本文作为参考)。热启动引物是包括借助5'和3'端的互补区域的茎环结构的寡核苷酸引物,其。在这方面中,引物被设计成与靶序列互补(在延伸产物中的特异性区域),并且将至少5-6个核苷酸加到引物的5'端来形成与引物的3'端互补的序列。在低温下,例如,在将反应的组分混合和/或延伸反应进行的温度下,引物形成茎环结构并且不能充当用于延伸产物扩增的有效引物。然而,在加热至PCR的退火温度后,引物获得线性结构并且引物延伸(扩增)可以开始。认为使用热启动引物可以防止PCR引物干扰该方法的邻近探针之间的相互作用,并进一步保护所述引物免受3'核酸外切酶活性。

[0066] 术语“扩增(amplifying)”或“扩增的(amplified)”在本文中通常用于包括在分析中增加延伸产物或其部分的拷贝数的任何手段,作为指示样品中靶分析物存在的手段。例如,本领域已知的任何扩增手段都可以用于本发明的方法中,例如PCR、LCR、RCA、MDA等。根据样品中靶分析物的丰度,可能需要扩增延伸产物或其部分,以使延伸产物的浓度倍增,即在扩增前存在的拷贝数的2倍。供选择地,可以优选地使拷贝数增加多个数量级。在一些实施方案中,样品中的扩增结果包括了延伸产物或其部分的初始量的2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、50或75倍。在进一步优选的实施方案中,优选地扩增延伸产物以使样品包括延伸产物或其部分的初始量的至少 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 等倍。

[0067] 明显的是,不需要扩增所有延伸产物以确定样品是否包括靶分析物。仅有必要扩增一部分延伸产物,所述延伸产物在延伸反应发生之前不存在于样品中。例如,延伸产物将有效地包括两部分:含有由邻近探针(或夹板)的核酸结构域构成的核苷酸序列的第一“旧的”部分(现有的部分),和含有由模板化的延伸反应生成的核苷酸序列的第二“新的”部分(延伸的部分)。对第二“新的”部分或“延伸的部分”的检测使得能够检测靶分析物,即,如果没有分析物,就没有延伸,因此没有“新的”或“延伸的”部分。因此,在本发明的优选的方面中,扩增延伸产物的步骤包括扩增延伸产物的延伸部分的一部分。

[0068] 一部分延伸的部分需要具有足够的尺寸以使其可以与存在于样品中的其它序列区分开。实际上,延伸产物的延伸部分的部分充当与靶分析物的存在相对应的独特的标志物或信号。因此,该部分包括了不存在于样品中的核苷酸序列,则该序列的扩增足以指示样品中靶分析物的存在和量。

[0069] 因此,该部分可以包括至少8个核苷酸,优选地至少9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个核苷酸。延伸产物的延伸部分的部分的长度通常可以为约8个至高达约1000个核苷酸,在某些实施方案中其长度可以是约8至约500个核苷酸,包括长度为约8至约250个核苷酸,例如长度为约8至约160个核苷酸,如长度为约12至约150个核苷酸,长度为约14至约130个核苷酸,长度为约16至约110个核苷酸,长度为约8至约90个核苷酸,长度为约12至约80个核苷酸,长度为约14至约75个核苷酸,长度为约16至约70个核苷酸,长度为约16至约60个核苷酸,等等。在某些代表性的实施方案中,延伸产物的延伸部分的长度可以为约10至约80个核苷酸,长度为约12至约75个核苷酸,长度为约14至约70个核苷酸,长度为约34至约60个核苷酸,以及规定的范围之间的任何长度。

[0070] 虽然设想的是可以扩增整个延伸产物,即,现有的和延伸的部分,但扩增产物包括延伸产物的延伸部分的一部分就足够了。在本发明的一个方面中,引物可以设计成在延伸产物的延伸部分的部分的任一侧,并且可以如以下所述地来检测例如通过PCR进行的该部分的扩增,和扩增产物(包括延伸产物的部分)。在本发明的另一个方面中,延伸产物的延伸部分的部分可以形成用于连接例如挂锁探针的(如本文别处所述的)模板以形成环状寡核苷酸,并且该序列的扩增,例如通过滚环扩增(RCA)进行的该序列的扩增会产生包括与延伸产物的延伸部分的部分相对应的序列的多个拷贝得到扩增产物。因此,以这种方式可以扩增延伸产物,或更具体地扩增其部分。供选择地或另外地,延伸产物的延伸部分的部分可以充当用于环状寡核苷酸的RCA的引物,所述寡核苷酸包括与延伸产物的延伸部分互补的序列。如上所述的,得到的产物会包括与延伸产物的延伸部分的部分相对应的序列的多个拷贝,其可以如下所述对其进行检测。因此在该实施方案中也扩增了延伸产物,或更具体地扩增了其部分。

[0071] 在“夹板”寡核苷酸被延伸的实施方案中,所述延伸的寡核苷酸可以被环化以提供用于扩增的模板,优选地用于滚环扩增的模板。在这些实施方案中,延伸的寡核苷酸的3'端(延伸端)连接于延伸的寡核苷酸的5'端(非延伸端),其中所述连接可以由任何适合的手段介导,如本文别处所述的。在特别优选的实施方案中,连接反应是模板化的连接,其中延伸的寡核苷酸的3'端和5'端通过杂交于核酸分子而彼此邻近,所述核酸分子例如加入反应以在延伸的寡核苷酸的3'端和5'端之间充当“夹板”或“分子桥”的寡核苷酸(如本文别处所述的)。当延伸的寡核苷酸的末端与“夹板”核酸分子杂交时,末端可以连接,例如通过连接酶的活性连接,以形成含有延伸产物的延伸部分的环状寡核苷酸。因此,所述环状寡核苷酸的扩增,例如通过滚环扩增的扩增,导致延伸产物的扩增。在这种情况下,扩增产物包括与延伸产物的延伸部分互补的序列。因此,环化的寡核苷酸的扩增导致延伸产物的间接扩增。

[0072] 从上文显而易见的是,延伸产物的延伸部分仅需要包括相对少量的核苷酸。此外,延伸产物的最大尺寸取决于邻近探针的核酸结构域和/或充当用于延伸产物的模板的夹板寡核苷酸(如下所定义)的尺寸。延伸产物可以由核酸结构域和/或夹板寡核苷酸的全部或部分延伸而产生,即,延伸反应可以产生延伸到模板核酸的末端的延伸产物,或延伸反应可

以使用条件以使延伸产物仅为模板核酸的部分互补链。

[0073] 术语“检测(detecting)”或“检测(detected)”广泛地用于本文以包括测定分析物存在(即,其是否存在)的任何手段或分析物的任意测量形式。在本发明的方法中,通过扩增延伸产物(其包括扩增基于或来自延伸产物或使用延伸产物生成的产物)并检测所述扩增产物来间接地检测分析物。因此,检测分析物相当于检测以上定义的扩增产物,并且这些术语在本文中可互换使用。

[0074] 因此,“检测(detecting)”可以包括以任何方式测定、测量、评估或分析分析物的存在或不存在或量或位置。包括了定量和定性测定、测量或评估,包括半定量。这样的测定、测量或评估可以是相对的,例如当样品中的两种或多种分析物被检测时,或是绝对的。因此,当用于定量样品中的靶分析物(或多种靶分析物)的情况下,术语“定量”是指绝对或相对定量。绝对定量可以通过包括已知浓度(或多个浓度)的一种或多种对照分析物和/或将靶分析物的检测水平与对照分析物进行对照(例如,通过生成标准曲线)来实现。供选择地,相对定量可以通过比较两种或多种不同的靶分析物的检测水平或量以提供两种或多种不同的靶分析物中每个的相对定量(即,相对于彼此的)来实现。

[0075] “分析物”可以是希望通过本发明的方法检测的任何物质(例如分子)或实体。分析物是本发明的分析方法的“靶标”。因此分析物可以是希望检测的任何生物分子或化学化合物,例如肽或蛋白,或核酸分子或小分子,包括有机和无机分子。分析物可以是细胞或微生物,包括病毒,或其片段或产物。因此可以看出分析物可以是形成特异性结合配偶体(例如,亲和结合配偶体)的任何物质或实体。所有要求的是分析物能够同时结合至少两个结合配偶体(更具体地,至少两个邻近探针的分析物结合结构域)。基于邻近探针的分析,如本发明的分析,在蛋白或多肽的检测中特别有用。因此特别感兴趣的分析物可以包括蛋白质分子,如肽、多肽、蛋白质或朊病毒或包括蛋白或多肽组分的任何分子,等等,或其片段。在本发明的特别优选的实施方案中,分析物完全或部分地是蛋白质分子。分析物可以是含有两个或多个分子亚基的单一分子或复合物,所述亚基可以或可以不彼此共价结合,并且可以相同或不同。因此,除了细胞或微生物,这样的复合物分析物也可以是蛋白复合物。因此这样的复合物可以是均多聚体或杂多聚体。分子例如蛋白的聚集体也可以是靶分析物,例如相同蛋白或不同蛋白的聚集体。分析物也可以是蛋白或肽和核酸分子如DNA或RNA之间的复合物。特别感兴趣的是蛋白和核酸之间的相互作用,例如调节因子,如转录因子,和DNA或RNA。

[0076] 包括所有生物和临床样品,例如,生物体的任何细胞或组织样品,或任何体液或来自其的标本,以及样品如细胞培养物、细胞标本、细胞裂解物等。也包括了环境样品,例如土壤和水样品或食物样品。样品可以新鲜制备或可以按照任何方便的方式对它们进行前处理,例如用于储存。

[0077] 因此代表性样品包括任何材料,所述材料可以含有生物分子,或任意其它希望的分析物或靶分析物,包括例如食物和有关产品,临床和环境样品。样品可以是生物样品,所述生物样品可以含有任何病毒或细胞材料,包括所有原核或真核细胞、病毒、噬菌体、支原体、原生质体和细胞器。因此这样的生物材料可以包括所有类型的哺乳动物和非哺乳动物细胞、植物细胞、藻类、真菌、细菌、原生动物等,所述的藻类包括蓝绿藻。因此代表性的样品包括全血和血衍生的产品,如血浆、血清、血沉棕黄层、血细胞,尿液,粪便,脑脊液或任何其

它体液(例如,呼吸道分泌物、唾液、乳汁等),组织,活体组织切片,细胞培养物,细胞混悬液,条件培养基或细胞培养物成分的其它样品等。样品可以按照任何方便或希望的方式预处理以制备用于在本发明的方法中使用,例如通过细胞裂解或分析物的纯化、分离等。

[0078] 用于本发明的方法的邻近探针包括分析物结合结构域和核酸结构域,并且实际上是(通过分析物结合结构域)结合于分析物的检测探针,可以通过在这样的结合后检测其核酸结构域之间发生的相互作用来检测所述检测探针的结合(以检测分析物)。因此,可以将探针视为核酸标记的亲配体或针对分析物的结合配偶体,所述分析物结合结构域是亲和结合配偶体,并且核酸结构域是核酸标记。核酸结构域偶联于分析物结合结构域,并且该“偶联”或连接可以通过本领域已知的任何手段,并且可以是希望的或方便的,可以是直接的或间接的,例如通过连接基团。例如,结构域可以通过共价连接(例如,化学交联)或通过非共价结合来彼此相连,例如,通过基于链酶亲和素-生物素的偶联(在一个结构域上提供生物素,在另一个上提供链酶亲和素)。

[0079] 分析物结合结构域可以是针对靶分析物的任何结合配偶体,并且可以是针对其的直接或间接结合配偶体。因此,它可以直接结合于靶分析物,或通过中间分子或结合于靶分析物的结合配偶体来间接结合于靶分析物,所述分析物结合结构域结合于所述中间分子(结合配偶体)。特别地,分析物结合结构域或中间结合配偶体是针对分析物的特异性结合配偶体。结合配偶体是能够与其靶标结合的任意分子或实体,所述靶标例如靶分析物,以及特异性结合配偶体是能够特异性结合于其靶标(例如,靶分析物)的结合配偶体,即结合配偶体以比对样品中其它组分更高的亲和力 and/或特异性结合于靶标(例如,分析物)。因此与靶分析物的结合可以区别于非靶分析物;特异性结合配偶体不结合于非靶分析物或可忽略地或不可检测地结合于非靶分析物,或者任何这样的非特异性结合,如果发生的话,可以被区分。靶分析物及其结合配偶体之间的结合通常是非共价的。

[0080] 可以选择分析物结合结构域以具有针对靶分析物的高的结合亲和力。高的结合亲和力是指至少约 10^{-4} M,通常至少约 10^{-6} M或更高,例如 10^{-9} M或更高。分析物结合结构域可以是多种不同类型的分子的任一种,只要它在作为邻近探针的部分存在时显示针对靶蛋白的所需的结合亲和力。在其它实施方案中,分析物结合结构域可以是对其靶分析物具有中等或甚至低亲和力的配体,例如,小于约 10^{-4} M。

[0081] 分析物结合结构域可以是小分子或大分子配体。小分子配体是指尺寸为约50至约10,000道尔顿的配体,通常为约50至约5,000道尔顿,更通常地约100至约1000道尔顿。大分子是指尺寸为约10,000道尔顿或分子量更大的配体。

[0082] 小分子可以是能够以需要的亲和力结合于靶分析物的任何分子,以及其结合部分或片段。一般地,小分子是能够结合于感兴趣的靶分析物的有机小分子。小分子会包括与靶分析物结构相互作用所必需的一个或多个官能团,例如疏水、亲水、静电或甚至共价相互作用所需的基团。当靶分析物是蛋白时,小分子配体包括与蛋白在结构上相互作用所需的官能团,如氢键、疏水-疏水相互作用、静电相互作用等,并通常包括至少一个氨基、酰胺基、巯基、羰基、羟基或羧基,优选地至少两个化学官能团。小分子还可以包括一个区域,所述区域可以被修饰和/或参与邻近探针的核酸结构域的共价连接,而基本没有不利地影响小分子结合于其靶分析物的能力。

[0083] 小分子亲和配体通常包括被一个或多个上述官能团取代的碳环或杂环结构和/或

芳香或聚芳香结构。还感兴趣的小分子是在生物分子中发现的结构,包括肽、多糖、脂肪酸、甾体、嘌呤、嘧啶,其衍生物、结构类似物或组合。可以对这样的化合物进行筛选以确定感兴趣的化合物,其中本领域已知各种不同的筛选方案。

[0084] 小分子可以来自多种来源获得的天然存在或合成的化合物,包括合成或天然化合物库。例如,可以使用许多方法来随机和定向合成多种有机化合物和生物分子,包括随机化的寡核苷酸和寡肽的制备。供选择地,细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物库是可得的或容易制备的。此外,天然或合成制备的库和化合物容易通过传统的化学、物理和生物化学手段修饰,并且可以用于制备组合库。已知的小分子可以进行定向或随机化学修饰,如酰化、烷基化、酯化、酰胺化等,以产生结构类似物。

[0085] 因此,所述的小分子可以从天然存在或合成分子库中获得,所述的库包括通过组合手段制备的化合物库即,化合物多样性组合库。当从这样的库中获得时,在方便的结合亲和力和分析中采用的小分子会显示对蛋白靶标具有某些希望的亲和力。组合库以及其制备和筛选方法,为本领域已知并描述于:US5,741,713、5,734,018、5,731,423、5,721,099、5,708,153、5,698,673、5,688,997、5,688,696、5,684,711、5,641,862、5,639,603、5,593,853、5,574,656、5,571,698、5,565,324、5,549,974、5,545,568、5,541,061、5,525,735、5,463,564、5,440,016、5,438,119、5,223,409中,将其公开引入本文作为参考。

[0086] 分析物结合结构域也可以是大分子,特别感兴趣的大分子分析物结合结构域是抗体,以及其结合片段和衍生物或模拟物。当抗体是分析物结合结构域时,它们可以来自多克隆组合物,以使通过从特异性上进行区分的抗体的异种群体各自“标记”相同的标记核酸(核酸结构域),或它们可以来自单克隆组合物,其中对靶分析物具有相同特异性的相同抗体的同种群体各自标记相同的标记核酸。因此,分析物结合结构域可以是单克隆或多克隆抗体。在再其它实施方案中,亲和配体是抗体结合片段或其衍生物或模拟物,其中这些片段、衍生物和模拟物对靶分析物具有需要的结合亲和力。例如,抗体片段,如Fv、F(ab)₂和Fab可以通过裂解完整蛋白来制备,例如,通过蛋白酶或化学裂解来裂解。感兴趣的还有重组地或合成地制备的抗体片段或衍生物,如单链抗体或scFv,或其它抗体衍生物如嵌合抗体或CDR接枝的抗体,其中该重组地或合成地制备的抗体片段保留了上述抗体的结合特性。这样的抗体片段或衍生物通常至少包括抗体的V_H和V_L结构域,以保留抗体的结合特性。本发明的这样的抗体片段、衍生物或模拟物可以使用任何便利的方法制备,如在第5,851,829号和第5,965,371号美国专利中公开的方法,将其公开引入本文作为参考。

[0087] 上述抗体、其片段、衍生物和模拟物可以由商业来源获得和/或使用任何便利的技术制备,其中本领域技术人员已知制备多克隆抗体、单克隆抗体、其片段、衍生物和模拟物,包括其重组衍生物的方法。

[0088] 也适合用作结合结构域的是多聚核酸适体。多聚核酸适体可以是RNA寡核苷酸,其作用是与受体或抗体相同的方式选择性地结合蛋白(Conrad等人,Methods Enzymol. (1996),267(Combinatorial Chemistry),336-367)。在分析物结合结构域是核酸(例如,适体)的某些实施方案中,靶分析物不是核酸。

[0089] 重要的是,分析物结合结构域是包括能够共价连接于核酸结构域而基本不消除分析物结合结构域与其靶分析物的结合能力的部分的结合结构域。

[0090] 除了基于抗体的肽/多肽或基于蛋白的结合结构域,分析物结合结构域也可以是

凝集素,可溶性的细胞表面受体或其衍生物,亲和体(affibody)或来自噬菌体展示或核糖体展示或任意类型的组合肽或蛋白库的任意组合衍生的蛋白或肽。可以使用任意分析物结合结构域的组合。

[0091] 针对一组中的邻近探针的各分析物结合结构域的分析物上的结合位点可以是相同的或不同的。因此,例如在同聚蛋白复合物或聚集物包括两种或多种相同的亚基或蛋白组分的情况下,两个或多个探针的分析物结合结构域可以是相同的。当分析物为单一分子或包括不同的亚基或组分时(例如,异聚复合物或不同蛋白的聚集体),分析物结合结构域是不同的。

[0092] 由于邻近探针的核酸结构域的长度可以构建成跨越不同的分子距离,分析物上的对分析物结合结构域的结合位点不需要在相同的分子上。它们可以在不同的但是紧密放置的分子上。例如,可以通过本发明的方法靶向生物体的多个结合结构域,所述生物如细菌或细胞,或病毒。

[0093] 如上所述,分析物结合结构域可以直接或间接地结合于分析物。在间接结合的情况下,靶分析物可以首先被特异性结合配偶体(或亲和配体)结合,并且邻近探针的分析物结合结构域可以结合于特异性结合配偶体。这使得邻近探针能够作为通用试剂来设计。例如,分析物特异性结合配偶体可以是抗体,并且通用邻近探针组可以通过结合于各种不同的分析物特异性抗体的Fc区域而用于检测不同的分析物。

[0094] 第一和第二邻近探针的核酸结构域可以视为相互作用以形成可检测的产物的核酸“标记”,可以检测所述可检测的产物来报告分析物的检测。因此核酸结构域可以被视为相互作用以提供信号的反应性核酸官能团,借助所述信号检测分析物(更具体地形成发出信号的产品)。换句话说,核酸结构域可以被视为“检测标记”,所述检测标记相互作用以形成或实现“可检测的”标记或产物的形成。当两种或多种分析物存在于同一样品中,可以使用两组或多组邻近探针同时对所述的分析物进行检测,设计每组邻近探针以使其在相互作用后形成一种或多种独特的核酸序列延伸产物或“可检测的标记”。这些独特的“可检测的标记”可以分别使用文献中众所周知的方法在扩增的同时或在扩增之后被检测和定量,,所述的方法包括液相色谱法、电泳法、质谱法、DNA测序、基于珠和平面的DNA阵列技术,还有多色实时PCR。

[0095] 在优选的实施方案中,可检测的标记(即,延伸产物)通过定量PCR(qPCR)进行扩增和检测,所述定量PCR也称为实时PCR。在特别优选的实施方案中,qPCR使用嵌入到核酸分子中的染料以提供可检测的信号,所述的信号优选为荧光信号。在本发明中特别有用的荧光嵌入染料是SYBR Green®和EvaGreen™,但是本发明的qPCR实施方案不限于这些染料。

[0096] 在本发明的方法中,可以将第一和第二邻近探针的核酸结构域中的一个或两个都进行延伸,这导致可以被扩增和检测的新的核酸分子或“延伸产物”的形成。

[0097] 在一些实施方案中,在将核酸结构域之一延伸之后,可以将核酸结构域连接在一起,以产生延伸产物或可检测的标记,即,使用“夹板”寡核苷酸作为模板,通过聚合酶“填充”核酸结构域之间的间隙。在核酸结构域被连接的一些实施方案中,该连接是通过夹板介导的,所述夹板如上所述并且可以认为是邻近探针之一的核酸结构域的部分,即,其中核酸结构域是部分双链的。夹板可以单独提供,作为游离的核酸分子或可以作为第三邻近探针的核酸结构域提供。

[0098] 连接导致新的核酸分子或序列的形成,可以对所述核酸分子或序列进行扩增和检测。

[0099] 核酸结构域可以是单链核酸分子(例如,寡核苷酸),部分双链的和部分单链的分子,或双链分子,所述双链分子包括双链区域和两条核酸链不互补因此是单链的区域。因此,在某些实施方案中,核酸结构域由单链核酸构成。在其它实施方案中,核酸结构域可以由两条部分互补的核酸链构成,其中两条链包括杂交的区域和未杂交的区域。

[0100] 第一和第二邻近探针的核酸结构域必须能够通过杂交相互作用,即,形成一个或多个双链体。这种相互作用可以是直接的,例如,核酸结构域包括彼此互补的区域,优选地在其3'端(但是互补区域可以在一个核酸结构域的内部,见例如图1的版本2和4),或间接的,例如,所述第一和第二邻近探针的核酸结构域可以各自与所谓的“夹板”寡核苷酸的区域杂交。

[0101] 核酸结构域的长度通常足以使其当结合于靶分析物时与另一个邻近探针的核酸结构域相互作用(或夹板介导的相互作用)。核酸结构域的长度通常为约8个至高达约1000个核苷酸,其中在某些实施方案中其长度可以是约8至约500个核苷酸,包括长度为约8至约250个核苷酸,例如长度为约8至约160个核苷酸,如长度为约12至约150个核苷酸,长度为约14至约130个核苷酸,长度为约16至约110个核苷酸,长度为约8至约90个核苷酸,长度为约12至约80个核苷酸,长度为约14至约75个核苷酸,长度为约16至约70个核苷酸,长度为约16至约60个核苷酸,等等。在某些代表性的实施方案中,核酸结构域的长度可以为约10至约80个核苷酸,长度为约12至约75个核苷酸,长度为约14至约70个核苷酸,长度为约34至约60个核苷酸,以及规定的范围之间的任何长度。在一些实施方案中,核酸结构域的长度通常不大于约28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、44、46、50、55、60、65或70个核苷酸。

[0102] 核酸结构域可以由核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸以及合成核苷酸残基构成,所述合成核苷酸残基能够参与沃森克里克型或类似的碱基对相互作用,即“杂交”或形成“双链体”。因此,核酸结构域可以是DNA或RNA或其任意修饰,例如PNA或含有非核苷酸骨架的其它衍生物。

[0103] 第一和第二邻近探针的核酸结构域的序列(即,“检测”核酸结构域)可以是能够形成双链体的任何序列,并且可以根据彼此或夹板(如果存在)进行选择。因此,只要第一和第二结构域可以互相杂交或与第三核酸结构域(夹板)杂交,其序列不是关键的。然而,应该选择序列以避免除了第一和第二邻近探针的核酸结构域之间或与夹板寡核苷酸的杂交以外的杂交事件的发生。一旦选择或确定序列后,可以使用任何便利的方法合成核酸结构域。

[0104] 邻近探针的两个组分通过键直接连接在一起或通过连接基团间接连接在一起。当采用连接基团时,可以选择这样的基团以提供核酸和分析物结合结构域通过连接基团的共价连接,以及维持分析物结合结构域对其靶分析物希望的的结合亲和力。感兴趣的连接基团可以根据分析物结合结构域而有很大的变化。在许多实施方案中,当连接基团存在时,其是惰性的。各种连接基团是本领域技术人员已知的,并且在题述的邻近探针中是有用的。在代表性的实施方案中,连接基团通常为至少约50道尔顿,通常为至少约100道尔顿,并且可以是1000道尔顿或更大,例如如果连接基团含有间隔子时高达1000000道尔顿,但是通常不会超过约500道尔顿并通常不超过约300道尔顿。通常地,这样的连接物包括在任一端以能

够共价结合于核酸或分析物结合部分的反应官能团封端的间隔子基团。感兴趣的间隔子基团可以包括脂肪族和不饱和的烃链、含有杂原子如氧(醚,如聚乙二醇)或氮(多胺)的间隔子、肽、糖类、可以含有杂原子的环状或非环状系统。间隔子基团也可以由结合于金属的配体构成,以使金属离子的存在与两个或多个配体配位以形成复合物。特异性间隔子元件包括:1,4-二氨基己烷、苯二甲撑二胺、对苯二甲酸、3,6-二氧杂辛烷二酸、乙二胺-N,N-二乙酸、1,1'-亚乙基双(5-氧代-3-吡咯啉羧酸)、4,4'-亚乙基二哌啶。可能的反应官能团包括亲核官能团(胺、醇、硫醇、酰胺),亲电官能团(醛、酯、乙烯基酮、环氧化物、异氰酸酯、马来酰亚胺),能够环加成反应、形成二硫键,或结合到金属的官能团。具体的实例包括伯胺和仲胺、异羟肟酸、N-羟基琥珀酰亚胺基酯、N-羟基琥珀酰亚胺基碳酸酯、氧基羰基咪唑、硝基苯基酯、三氟乙基酯、缩水甘油醚、乙烯基砜和马来酰亚胺。可以用于题述的邻近探针的具体的连接基团包括杂官能化合物,如叠氮基苯甲酰基酰胺、N-[4-(对叠氮基水杨基氨基)丁基]-3'-[2'-吡啶基二硫代]丙酰胺)、双-磺基琥珀酰亚胺辛二酸酯、二亚胺代己二酸二甲酯、二琥珀酰亚胺酒石酸酯、N-马来酰亚胺丁酰基氧基琥珀酰亚胺酯、N-羟基硫代琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯、N-琥珀酰亚胺基[4-叠氮基苯基]-1,3'-二硫代丙酸酯、N-琥珀酰亚胺基[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸酯、戊二醛和琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己基-1-羧酸酯、3-(2-吡啶二硫代)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SMCC)等。

[0105] 可以使用任何便利的方法制备在题述方法中采用的邻近探针。在代表性的实施方案中,核酸结构域可以直接或通过连接基团缀合于分析物结合结构域。如本领域已知的,可以将组分通过官能团彼此共价连接,其中这样的官能团可以存在于组分上或使用一个或多个步骤引入组分中,所述步骤例如,氧化反应、还原反应、裂解反应等。可以用于将组分共价结合在一起以产生邻近探针的官能团包括:羟基、巯基、氨基等。经修饰以提供用于共价连接的不同组分的具体部分可以经选择以便于基本不会不利地干扰组分对靶分析物所需的结合亲和力。如果必要和/或需要的话,可以如本领域已知的使用封闭基团保护组分上的某些部分,参见例如Green & Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis* (John Wiley & Sons) (1991)。用于产生核酸/抗体缀合物的方法对本领域技术人员是众所周知的。参见例如第5,733,523号美国专利,将其公开引入本文作为参考。

[0106] 在其它实施方案中,可以使用体外方案制备邻近探针,所述体外方案产生核酸-蛋白缀合物,即共价键连于蛋白的具有核酸的分子,例如编码序列,即其中由载体在体外产生编码邻近探针的分析物结合结构域。这样的感兴趣的体外方案的实例:基于RepA的方案(参见例如,Fitzgerald, *Drug Discov. Today* (2000)5:253-258和W098/37186),基于核糖体展示的方案(参见例如Hanes等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1997)94:4937-42; Roberts, *Curr Opin Chem Biol* (1999)Jun;3:268-73; Schaffitzel等人, *J Immunol Methods* (1999)Dec10;231:119-35;和W098/54312)等。

[0107] 在利用夹板寡核苷酸的实施方案中(所述夹板寡核苷酸可以是第三邻近探针的核酸结构域),所述夹板寡核苷酸的功能是介导第一和第二邻近探针的核酸结构域(即,“检测”结构域)之间的相互作用。如上所述,夹板寡核苷酸还可以充当待延伸的核酸结构域,产生延伸产物以根据本发明的方法扩增和检测。因此,夹板可以视为“连接器(connector)”寡核苷酸,其作用是连接第一和第二邻近探针的检测结构域或使第一和第二邻近探针的检测

结构域“结合在一起”，以使其可以相互作用，或可以连接在一起。供选择地或另外地，夹板可以视为核酸结构域或标记的可延伸的结构域或单独的核酸结构域，其充当用于延伸的“引物”以生成用于扩增和检测的延伸产物。

[0108] 在这些实施方案中，夹板与第一和第二邻近探针的核酸结构域杂交。更具体地，夹板同时与至少第一和第二邻近探针的核酸结构域杂交(退火)。然而，其中至少一个所述邻近探针的核酸结构域在与另一个邻近探针的核酸结构域杂交之前，与“夹板”寡核苷酸预先杂交。然而，“夹板”将优选地与两个邻近探针的核酸结构域同时杂交，以形成能够被延伸的稳定复合物。

[0109] 当夹板寡核苷酸作为第三邻近探针的核酸结构域提供时，所有邻近探针组的核酸结构域的相互杂交提高了结合于靶分析物后的探针-靶标复合物的亲和力。该亲和力的影响有助于通过支持产生信号的邻近探针-靶分析物复合物的形成提高分析的灵敏度。

[0110] 本文所使用的术语“杂交(hybridisation)”或“杂交(hybridise)”是指核苷酸序列之间的双链体的形成，所述核苷酸序列足够互补以通过沃森克里克碱基配对形成双链体。当两个核苷酸序列在碱基配对组织上有同源性时，这些分子彼此“互补”。“互补”的核苷酸序列在合适的杂交条件下将特异性地结合以形成稳定的双链体。例如，当第一序列的一部分可以按照反式平行的方式结合于一部分第二序列时，两个序列是互补的，其中每个序列的3'端结合于另一个序列的5'端，并且一个序列的每个A、T(U)、G和C另一个序列的T(U)、A、C和G分别配对。RNA序列也可以包括互补的A=U或U=A碱基对。因此，两个序列不需要具有完美的同源性以根据本发明“互补”。通常当至少约85%(优选地至少约90%，最优选地至少约95%)的核苷酸在限定长度的分子或结构域上具有确定互补的碱基对组织时，两个序列是足够互补的。因此，第一和第二邻近探针的核酸结构域含有对另一个邻近探针的核酸结构域互补的区域。供选择地，当使用夹板寡核苷酸时，第一和第二邻近探针含有与夹板寡核苷酸(可能存在于第三邻近探针上)互补的区域，以及反过来说，夹板寡核苷酸含有对第一和第二邻近探针的每个核酸结构域互补的区域。

[0111] 互补的区域(即，杂交区域)可以具有4-30bp范围的长度，例如6-20、6-18、7-15或8-12bp。

[0112] 夹板核酸结构域的长度通常足以提供第一和第二探针的核酸结构域进行上文所述的同时结合。在代表性的实施方案中，夹板寡核苷酸的长度为约6至约500核苷酸，包括约20至约40个核苷酸，例如约25至约30个核苷酸。

[0113] 如上所述，第一和第二邻近探针的核酸结构域之间的相互作用主要是双链体的形成，其中核酸结构域之一或全部两个可以被延伸，特别是使用另一个邻近探针的核酸结构域作为模板进行模板导向的延伸。这会导致形成完全双链的核酸，例如其中两个结构域完全延伸，或导致形成部分双链的分子，例如仅有一条单链延伸或两条链部分延伸。因此，一个或两个核酸结构域的延伸可以被认为各自结构域的“接合”，例如，由两条单链的分子产生一个双链核酸。

[0114] 在其它实施方案中，该“接合”可以是连接，特别是其中，例如，第一邻近探针的核酸结构域被延伸以使其3'端与第二邻近探针的5'端邻近，以使得两个结构域的模板导向连接。在这样的情况下，清楚地理解的是，连接模板可以由夹板提供，所述夹板可以形成核酸结构域之一的部分，或可以分别在溶液中游离地提供，或作为第三邻近探针的核酸结构域

提供。这样的连接可以使用连接酶进行,所述连接酶可以,例如,在聚合酶介导的第一邻近探针的核酸结构域的延伸之后加入反应中。

[0115] 因此,在本发明的方法的一个优选的实施方案中,第一和第二探针的核酸结构域可以借助由杂交的夹板模板化的反应连接,所述核酸结构域被连接(在一个核酸结构域延伸后),并且对“连接”产物进行扩增和检测,所述“连接”产物也是延伸产物。因此,在这样的实施方案中,夹板可以视为“夹板模板”或“连接模板”或“模板寡核苷酸”。在这样的实施方案中,还可以延伸夹板以产生另外的“延伸产物”,对所述“延伸产物”进行扩增和检测。

[0116] 如上所述,为了使核酸结构域之间发生各种相互作用,第一和第二邻近探针的核酸结构域需要按照特定的方向来偶联到分析物结合结构域上。例如,为了延伸两个包括单链核酸的结构域,每个核酸结构域必须通过其5'端偶联到分析物结合结构域,留下游离的3'羟基端,所述3'羟基端当邻近时可以“退火”或“杂交”。然而,为了单一结构域的延伸和/或两个结构域的缀合,通常(虽然不是必须的,参见图1的版本4)通过5'端偶联第一邻近探针的核酸结构域(留下可以被延伸的游离的3'羟基端),而另外的结构域可以通过其3'端偶联(留下游离的5'磷酸酯端,其不能使用传统聚合酶来延伸)。

[0117] 在核酸结构域可连接的实施方案中,第一和第二核酸结构域各自杂交于夹板或其中一个邻近探针的核酸结构域是部分双链的,具有单链突出段,另一个邻近探针的核酸结构域杂交于该突出段的结构域。随后可以将具有3'端的结构域通过模板导向的延伸来延伸至另一个结构域的5'磷酸酯,其中可以利用连接酶将两条链接合在一起。因此,3'和5'端不立即各自彼此邻近地在夹板(模板)上杂交,而是杂交于夹板,在它们之间留下空间(或一段核苷酸)。

[0118] 两端之间的间隙或间隔或一段核苷酸的长度为约8个至高达约1000个核苷酸,在某些实施方案中其长度可以是约8至约500个核苷酸,包括长度为约8至约250个核苷酸,例如长度为约8至约160个核苷酸,如长度为约12至约150个核苷酸,长度为约14至约130个核苷酸,长度为约16至约110个核苷酸,长度为约8至约90个核苷酸,长度为约12至约80个核苷酸,长度为约14至约75个核苷酸,长度为约16至约70个核苷酸,长度为约16至约60个核苷酸,等等。在某些代表性的实施方案中,核酸结构域的长度可以为约10至约80个核苷酸,长度为约12至约75个核苷酸,长度为约14至约70个核苷酸,长度为约34至约60个核苷酸,以及规定的范围之间的任何长度。在一些实施方案中,核酸结构域的长度通常不大于约28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、44、46、50、55、60、65或70个核苷酸。

[0119] 因此,夹板可以包括与5'游离邻近探针的核酸结构域互补的第一3'区域,和与3'游离邻近探针的核酸结构域互补的第二5'区域。夹板的第一和第二区域的长度可以是3至20、6至17、6至15或6至12或8至12个核苷酸,例如长度为约13至17、12至16、11至15或12至14个核苷酸,或长度为约6至12、7至11或8至10个核苷酸。

[0120] 如以下更加详细地描述的,连接/延伸产物的扩增在检测过程之前或与检测过程同时进行。因此,在一些实施方案中希望的是设计夹板以尽量减少在这样的步骤中可能发生的任何错误的扩增,例如,夹板充当扩增中使用的聚合酶的模板的任何可能性。因此,例如,夹板可以作为RNA寡核苷酸或DNA/RNA杂交体提供;通常用于扩增反应的Taq聚合酶不能使用RNA模板。供选择地,使用具有两个短杂交区域的DNA夹板可以实现相似的效果;由于杂交是弱的,这样的夹板将不能在PCR中使用的高温下模板化DNA聚合。

[0121] 供选择地,在其它优选的实施方案中,夹板有利地被延伸以产生如上所定义的延伸产物,根据本发明的方法对所述延伸产物自身进行扩增并检测。

[0122] 在某些实施方案中,可以针对两种或多种不同的靶分析物分析样品。在这样的实施方案中,将样品与用于每种靶分析物的邻近探针组接触,以使接触样品的组数可以是两个或多个,例如三个或四个,四个或更多等。这样的方法在重度的和高通量的应用中是特别有用的。

[0123] 可以选择加入样品中的邻近探针的量以在反应混合物中提供足够低浓度的邻近探针,以确保邻近探针在没有结合于靶分析物时将不会随机地彼此紧密邻近,至少不会紧密邻近到任何大的或实质的程度。因此,目的是仅当邻近探针通过邻近探针的分析物结合结构域和分析物的结合位点之间的结合相互作用来结合分析物时,邻近探针才会彼此紧密邻近。

[0124] 然而,令人惊讶地发现,加入包括3'核酸外切酶活性的组分可以通过降解具有游离的和未保护的3'端的核酸结构域来降低未结合于靶分析物的邻近探针之间的相互作用数量。在这方面,这样的相互作用比结合于靶分析物的探针之间的相互作用更加不稳定,因此是短暂的。因此,所述未结合的探针通过包括3'核酸外切酶活性的组分进行降解。因此,在本发明的方法中,可能使用之前在基于邻近的检测分析中不能使用的邻近探针的浓度。当邻近探针的分析物结合结构域对靶分析物具有中度或低亲和力时,这是特别有利的,并且因此在更高的浓度下需要如此。

[0125] 在代表性的实施方案中,在与样品组合后,反应混合物中的邻近探针的浓度为约1fM至1 μ M,如约1pM至约1nM,包括约1pM至约100nM。

[0126] 在样品和邻近探针组(或者多个组)组合后,如果分析物存在于样品中,可以将反应混合物温育一段时间,该时间足够使邻近探针结合靶分析物。在代表性的实施方案中,可以在约4至约50 $^{\circ}$ C,包括约20至约37 $^{\circ}$ C的温度下,将产物混合物孵育约5分钟至约48小时的一段时间,包括约30分钟至约12小时。反应混合物维持的条件应进行优化以促进邻近探针与分析物的特异性结合,同时抑制非特异性相互作用。条件应使得在上述的核酸结构域之间能有效的和特异的杂交。

[0127] 在一些实施方案中,邻近探针被冻干。在本发明的一个方面中,所述冻干的邻近探针在于含有分析的样品接触之前再水化。在本发明的一个优选的方面中,在加入包括靶分析物的样品后,将冻干的邻近探针再水化。

[0128] 在某些实施方案中,至少在邻近探针结合于靶分析物情况下的温育步骤的部分中,如果分析物存在于样品中,孵育混合物的有效体积降低。在这些实施方案中,孵育混合物的有效体积可以由于许多不同的原因而降低。在某些实施方案中,孵育混合物的有效体积降低以使得能使用中度和低亲和力的分析物结合结构域和/或能提高分析的灵敏度。例如,在孵育混合物的有效体积降低的某些实施方案中,分析物结合结构域可以是中度或低亲和力结合物,这是指分析物结合结构域的对其靶分析物的结合亲和力可以小于 10^{-4} M,如约1nM Kd。在某些实施方案中,分析的灵敏度可以升高以使分析可以检测1 μ l样品中低至约100个或更少的靶分析物,包括1 μ l样品中低至约75个或更少的靶分析物,包括1 μ l样品中低至约50个或更少的靶分析物。

[0129] 在某些实施方案中,在上述孵育步骤的过程中,在混合物中包括“加浓试剂”或“体

积排阻剂”，例如，用来在邻近探针与其靶分析物结合的过程中降低孵育混合物的有效体积。典型地，“加浓试剂”是水溶性的大分子材料。适合的大分子材料广泛地包括平均分子量为约1500至数百万的生物相容的天然或合成聚合物，所述聚合物不与混合物中的其它试剂或产物特异性地相互作用。在本领域将这样的聚合物称作“体积排阻剂”，由于其主要功能是占据体外反应介质中的体积并为生化反应提供高度浓缩的环境，例如接近于体内条件的环境。体积排阻聚合物当然必须足够可溶以提供所需的浓度。适合的典型聚合物包括但不限于：市售的聚乙二醇(PEG)聚合物，例如具有高于约2000的平均分子量的聚乙二醇聚合物，FICOLL聚合物如具有约70,000的平均分子量的那些，牛血浆白蛋白，糖原，聚乙烯吡咯烷酮，葡聚糖例如交联葡聚糖 **sephadex®**，等等。在代表性的实施方案中采用更高分子量的PEG聚合物，特别是分别具有约1450、3000–3700、6000–7500和15,000–20,000的平均分子量的PEG1450、PEG3350、PEG6000(也作为PEG8000出售)和PEG20,000。在代表性的实施方案采用PEG6000和PEG8000。在代表性实施方案中，孵育反应中的体积排阻聚合物的浓度根据聚合物的类型及其分子量落入约5%w/v至约45%w/v的范围。一般地，期望给定类型的更高的分子量的聚合物需要以比相同类型的分子量较低的聚合物更低的浓度存在，以实现酶活性的相同效果。

[0130] 在优选的实施方案中，加浓试剂或体积排阻剂是葡聚糖。在特别优选的实施方案中，葡聚糖是G-100型。

[0131] 在当采用体积排阻剂的那些实施方案中，在方法的下一个步骤前，可以由于存在体积排阻剂而根据存在的体积排阻剂的量、稀释流体的性质等将孵育混合物稀释，例如稀释至至少约2倍或更多，如至少约5倍或更多，包括至少约10倍或更多，其中在代表性的实施方案中稀释流体是水或一些水和一种或多种溶质的其它的适合的水性流体，所述溶质例如盐、缓冲剂等。

[0132] 作为体积排阻剂的替代，或在使用体积排阻剂的同时，可以通过将一部分水从孵育混合物中除去，来减少孵育混合物在孵育过程中的体积，例如通过蒸发。在这些实施方案中，根据需要，流体的体积可以减少至少约2倍或更多，如至少约5倍或更多，包括至少10倍或更多。重要的是，在这些实施方案中，并非所有的水均从孵育混合物中除去。可以采用任何方便的方案以通过从孵育混合物中除去选择的部分的水，以降低孵育混合物的体积。可以采用通过检测和调节湿度和温度来控制蒸发的仪器，其中在某些实施方案中监测孵育混合物的体积，例如通过连续测量孵育混合物的体积来监测孵育混合物的体积，其中当适当地蒸发时，可以如上所述加入聚合酶和PCR混合物。根据需要，可以使用加热块来加快蒸发。供选择地，可以通过将水过滤出来使孵育混合物的体积减少。在代表性的实施方案中，体积排阻滤器用于选择性地容纳大小大于临界值的分子，而较小的分子和水通过滤器而被除去。在溶液上施加的使其通过滤器的力可以通过离心或真空抽吸。

[0133] 当邻近探针的结合结构域与分析物结合后，邻近探针的核酸结构域互相紧密邻近。因此，第一和第二邻近探针的核酸结构域能够彼此直接杂交或间接杂交，所述间接杂交例如通过夹板间接杂交。

[0134] 当存在时，夹板可以在邻近探针之前、与邻近探针同时或在邻近探针之后加入样品中。在一个实施方案中，夹板预先杂交到邻近探针。在另一个实施方案中，夹板寡核苷酸形成邻近探针的部分核酸结构域。在又一个实施方案中，寡核苷酸可以以第三邻近探针的

形式偶联于分析物结合结构域,其中它优选地与第一和第二邻近探针同时加入。

[0135] 当样品与邻近探针组合后,样品可以被稀释,优选地通过加入延伸反应的非酶组分而不是包括3'核酸外切酶活性的组分来稀释,所述非酶组分例如,缓冲液、盐、核苷酸等。在优选的实施方案中,稀释液还包括用于扩增反应的试剂,例如缓冲液、盐、核苷酸、引物和聚合酶。稀释步骤的作用是降低未结合的邻近探针之间的相互作用和/或它们与样品中的其它组分的相互作用的可能性。

[0136] 稀释还可以破坏结合的探针的核酸结构域之间的相互作用。然而,由于结合的探针紧密邻近,因此在合适的条件下将使被破坏的任何相互作用稳定化(即,重新退火或重新杂交)。因此,在一个实施方案中,样品可以被孵育更长一段时间,该时间足以使结合的邻近探针之间的相互作用稳定化。在代表性的实施方案中,产物混合物可以在约4至约50℃,包括约20至约37℃的温度下,孵育约5分钟至约48小时的一段时间,包括约30分钟至约12小时。反应混合物孵育的条件应进行优化以维持邻近探针与分析物的特异性结合,同时抑制非特异性相互作用。条件应使得在上述的核酸结构域之间有效的和特异性的杂交。

[0137] 当扩增试剂在探针与样品孵育的步骤之后加入样品时,优选地将引物针对3'核酸外切酶活性进行保护,例如通过如上所述的来修饰其3'端。在进一步优选的实施方案中,引物可以作为替代地或另外地是热启动PCR引物,例如茎环引物。在优选的实施方案中,聚合酶是如下进一步定义的热稳定性聚合酶。在再另一个优选的实施方案中,缓冲液和/或盐使得所加入到样品中的所有酶有活性。

[0138] 在任何稀释步骤后,将包括3'核酸外切酶活性的组分与样品接触。该步骤可以包括进一步稀释样品,例如加入具有合适缓冲液和/或其它盐/组分的组分。如上所述的,包括3'核酸外切酶活性的组分可以在延伸反应需要的聚合酶之前或同时加入。在优选的实施方案中,聚合酶还包括3'核酸外切酶活性。样品可以在适当的条件下进一步孵育以使得3'核酸外切酶活性作用于未结合的邻近探针的核酸结构域。如果样品中存在聚合酶,条件应有利于核酸结构域的延伸。在一些实施方案中,聚合酶可以在包括3'核酸外切酶活性的组分之后加入,其中所述样品可以进一步孵育以使得生成延伸产物。孵化条件将取决于在反应中使用的组分,并且一些代表性的条件如上所述。然而,在用于延伸核酸结构域的聚合酶是如上所述的超嗜热聚合酶例如修饰的Taq聚合酶、Pfu DNA聚合酶、Pwo DNA聚合酶等,或热稳定性聚合酶如Taq聚合酶的实施方案中,在方法的核酸外切酶和/或延伸相中其它反应条件可以是优选的,特别是温度条件。例如,如果聚合酶还具有3'核酸外切酶活性,用于延伸反应的温度和用于核酸外切酶反应的温度可以为约4至约80℃,包括约20至约75℃,约30至约60℃,或约45至约55℃。因此,在一些实施方案中,用于延伸反应的温度,如果聚合酶还具有3'核酸外切酶活性时,和用于核酸外切酶反应的温度可以为至少20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、60或75℃。

[0139] 在生成延伸产物之后,可以将包括3'核酸外切酶活性的组分灭活。在优选的实施方案中,3'核酸外切酶活性通过热变性灭活,例如在65-80℃下10分钟,但显而易见的是,需要的条件将根据组分的性质而变化,例如包括3'核酸外切酶的超嗜热聚合酶可以不通过以上条件灭活。在一些实施方案中,热灭活可以是扩增反应的第一步。

[0140] 当在将邻近探针与样品接触的步骤之后不在样品中加入扩增反应物时,所述反应物应该在该阶段与样品接触。在优选的实施方案中,可以将等分的样品转移到包括扩增组

分的新的容器中,以用于扩增和检测。在这方面中,在包括3'核酸外切酶活性的组分灭活后,引物不需要针对3'核酸外切酶活性的抗性。

[0141] 在一些实施方案中,能够延伸邻近探针的核酸结构域的聚合酶还可以用于扩增反应中,例如,如果聚合酶是如上所述的嗜嗜热或热稳定的聚合酶,例如,Pfu DNA聚合酶、Pwo DNA聚合酶等。

[0142] 当在将邻近探针与样品接触的步骤之后在样品中加入扩增试剂时,可能直接进行扩增反应。在优选的实施方案中,将等分的反应混合物转移至新的容器中以扩增和检测。

[0143] 一般地,可以采用能够检测邻近依赖性相互作用的存在的任何方便的方案。检测方案可以需要或可以不需要分离步骤。

[0144] 在一个代表性的实施方案中(本发明的方法的其它代表性的实施方案如上所述),由第一和第二邻近探针的相互作用生成的延伸产物(或多种产物)是通过第一和第二邻近探针的核酸结构域的游离3'羟基端的核酸延伸实现的,并且通过随后对延伸产物的扩增和检测来检测该相互作用。在该代表性的实施方案中,第一和第二邻近探针的核酸结构域的延伸是通过将反应混合物与核酸延伸活性接触,并将混合物维持在足够使核酸结构域发生延伸的条件下而实现的,所述核酸延伸活性例如通过适合的核酸聚合酶提供。

[0145] 如本领域已知的,聚合酶催化并列的核苷酸之间的磷酸二酯键的形成,其中包括3'羟基部分(3'端)的核苷酸可以形成现存的核苷酸聚合物即核酸的部分。通常地,核酸被退火或杂交于互补的核酸分子,所述核酸分子的作用是模板化(即,模板核酸)具有游离3'端的核酸的延伸。与模板核酸上的下一个核苷酸互补的具有游离5'磷酸酯部分的游离核苷酸随后连接于具有游离3'端的核酸以使其延伸,并且重复该过程,例如,直到到达模板的末端。可以采用任何便利的聚合酶,其中感兴趣的代表性聚合酶包括但不限于,还包括具有3'核酸外切酶活性的组分的聚合酶,例如,T4DNA聚合酶、T7DNA聚合酶、Phi29(Φ29)DNA聚合酶、DNA聚合酶I、DNA聚合酶I的Klenow片段、Pfu DNA聚合酶和/或Pwo DNA聚合酶。具有3'核酸外切酶活性的聚合酶可以由任意适合的生物体获得,所述的生物体包括但不限于,原核生物、真核生物或古生生物。本发明的方法中也可以采用某些RNA聚合酶。

[0146] 当延伸步骤通过不具有3'核酸外切酶活性的聚合酶例如Klenow_{exo(-)}、Taq聚合酶、Pfu(_{exo⁻})DNA聚合酶、Pwo(_{exo⁻})DNA聚合酶等进行(生成延伸产物)时,将包括3'核酸外切酶的组分,例如核酸外切酶,在聚合酶之前或与聚合酶同时加入样品中。任何便利的3'核酸外切酶都可以采用,例如核酸外切酶I。在本发明的方法中也可以采用某些RNA核酸外切酶。

[0147] 在该延伸步骤中,适合的聚合酶,如果需要的话和另外的3'核酸外切酶,和需要的和/或希望的任何试剂与反应混合物组合并维持在足以使杂交的核酸结构域的延伸发生的条件下。所述条件还应该足以使未结合的邻近探针的核酸结构域的降解发生。聚合酶和核酸外切酶反应条件是本领域技术人员所熟知的。在延伸和/或降解过程中,在某些实施方案中的反应混合物可以维持在约4℃至约80℃,如约20至约75℃,约30至约60℃,例如约45至约55℃或约20℃至约37℃的温度下(根据分析中使用的聚合酶的最佳条件)约5秒至约16小时,如约1分钟至约1小时的一段时间。在再其它实施方案中,反应混合物可以维持在约35℃至约45℃,如约37℃至约42℃,例如在约38℃、39℃、40℃或41℃,或约35℃至约75℃,如约40℃至约60℃,如约45℃至约55℃,例如在约46℃、47℃、48℃、49℃、50℃、51℃、52℃、53℃

或54°C的温度下约5秒至约16小时,如约1分钟至约1小时,包括约2分钟至约8小时的一段时间。在代表性的实施方案中,其中在加入包括3'核酸外切酶活性的组分前不包括扩增组分,延伸和降解反应混合物包括70mM Tris pH7.5、17mM硫酸铵、1mM DTT、40μM的每种dNTP、3mM MgCl₂、62.5单位/ml DNA聚合酶,例如,T4DNA聚合酶。在代表性的实施方案中,其中在加入包括3'核酸外切酶活性的组分前包括扩增组分,延伸和降解反应混合物包括50mM KCl、20mM Tris HCl pH8.4、0.2mM的每种dNTP、3mM MgCl₂、SYBR Green I、20nM荧光素、3'-硫代酯保护的发夹引物、25单位/ml iTaq DNA聚合酶和62.5单位/ml DNA聚合酶,例如T4DNA聚合酶。

[0148] 延伸之后,将延伸产物(例如,第一和第二探针的延伸的核酸结构域)作为指示样品中的分析物的存在或作为度量样品中分析物的量和任选地度量其位置来扩增和检测。如上所述的,延伸的产物可以包括单链或双链核酸分子。单链核酸分子可以由夹板寡核苷酸的延伸产生,所述夹板寡核苷酸可以从第一和第二邻近探针的核酸或在分析物结合结构域中的每个末端封端的第一和第二探针的两个邻近核酸结构域的缀合产物上解离。

[0149] 方法在延伸步骤之后的下一步是测量反应混合物中的延伸产物的存在,以检测样品中的靶分析物。换言之,筛选(即,分析、评估、评价、测试等)反应混合物中任何所产生的延伸产物的存在以检测待分析的样品中靶分析物的存在。根据本发明,检测步骤涉及扩增步骤以生成被检测的扩增产物,通常所有或部分延伸产物进行扩增。

[0150] 由上述方法产生的延伸产物,或更具体地扩增产物,在最广泛的意义上使用任何便利的方案检测。具体的检测方案可以根据希望的灵敏度和实施方法的应用而变化。在本文所述的本发明的方法中,检测方案可以包括扩增组分,其中延伸产物核酸(或其部分)的拷贝数升高,例如,以提高具体分析的灵敏度。然而,可能的是,在其它方法中可以无需任何扩增而直接检测延伸产物。

[0151] 虽然这不是本发明的方法的优选的实施方案,其中无需扩增的检测是可实施的,可以以许多不同的方式检测核酸延伸产物。例如,一种或多种延伸产物可以是直接标记的,例如通过荧光,或通过分光光度法标记,或通过放射性同位素标记或使用任何产生信号的标记,以直接标记延伸产物。在这些实施方案中,直接标记的延伸产物可以从剩余反应混合物中按大小分离,包括从未延伸的寡核苷酸(即,核酸结构域寡核苷酸或夹板寡核苷酸)中分离,以检测延伸的核酸。供选择地,可以采用构象选择的探针,例如分子信标(如以下更详细地描述)来检测延伸产物的存在,其中这些探针针对仅存在于延伸的核酸产物中的序列。

[0152] 如上所述,在题述方法的优选的实施方案中,检测步骤包括扩增步骤,其中增加延伸核酸或其部分的拷贝数,例如,以提高分析的灵敏度。根据需要,扩增可以是线性的或指数的,其中感兴趣的代表性的扩增方案包括但不限于:聚合酶链式反应(PCR);等温扩增,滚环扩增等。在本发明的一个特别优选的实施方案中,扩增方案是定量PCR(qPCR)或实时PCR。

[0153] 例如US6,558,928中所述的使用挂锁探针,或实际上使用任意环状核酸分子作为模板的滚环扩增,也可以用于扩增现有的“信号”核酸分子或其部分,例如,由邻近延伸分析生成的延伸产物。因此,在方法的优选的方面中,延伸产物(或其部分)可以通过滚环扩增来扩增。在一个实施方案中,使用挂锁探针进行RCA。在另一个实施方案中,使用环状模板进行RCA(环状寡核苷酸)。

[0154] 当检测步骤包括扩增步骤(更具体地体外扩增延伸产物或其部分的步骤)时,扩增

的产物(或扩增产物)可以被检测以检测分析物。

[0155] 聚合酶链式反应(PCR)在本领域是众所周知的,描述于:第4,683,202号、第4,683,195号、第4,800,159号、第4,965,188号和第5,512,462号美国专利中,将其公开引入本文作为参考。在代表性的PCR扩增反应中,将包括以上延伸的核酸或延伸产物(也可视为扩增反应中的模板核酸)的反应混合物与在引物延伸反应中采用的一种或多种引物组合,所述引物例如PCR引物(如在几何(或指数)扩增中采用的正向和反向引物,或在线性扩增中采用的单一引物)。与模板核酸(以下为方便起见称为模板DNA)接触的寡核苷酸引物具有足够的长度以提供在退火条件下的与互补模板DNA的杂交(以下更详细地描述)。引物通常为至少10bp的长度,通常为至少15bp的长度,更通常为至少16bp的长度,可以是长达30bp的长度或更长,其中引物的长度一般地为18至50bp的长度,通常为约20至35bp。根据是否需要引物延伸、模板DNA的线性或指数扩增,可以将模板DNA与单一引物或一组两个的引物(正向和反向引物)接触。

[0156] 如上所述,可以在加入包括3'核酸外切酶活性的组分之前将引物加入到样品中,其中所述引物被修饰以抗3'核酸外切酶活性,所述的修饰例如为3'端的修饰。此外如上所述的,引物也可以是热启动引物。

[0157] 除了以上组分外,在题述的方法中产生的反应混合物通常包括聚合酶和脱氧核苷三磷酸(dNTP)。希望的聚合酶活性可以通过一种或多种不同的聚合酶提供。在许多实施方案中,反应混合物包括至少A家族聚合酶,其中代表性的感兴趣的A家族聚合酶包括但不限于:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)聚合酶,包括天然存在的聚合酶(Taq)和其同源物,如Klentaq(如Barnes等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA(1994)91:2216-2220中描述的)或iTaq(BioRad);嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)聚合酶,包括天然存在的聚合酶(Tth)和其衍生物和同源物等。在所进行的扩增反应是高保真反应的某些实施方案中,反应混合物可以进一步包括具有3'-5'核酸外切酶活性的聚合酶,例如,所述的3'-5'核酸外切酶活性由B家族聚合酶提供,其中感兴趣的B家族聚合酶包括但不限于:如Perler等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1992)89:5577-5581所描述的嗜热高温球菌(*Thermococcus litoralis*)DNA聚合酶(Vent);火球菌(*Pyrococcus*)物种GB-D(Deep Vent);如Lundberg等人,Gene(1991)108:1-6所述的强烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)DNA聚合酶(Pfu),乌兹火球菌(Pwo)等。当反应混合物包括A家族和B家族聚合酶时,A家族聚合酶可以按照比B家族聚合酶更高的量存在于反应混合物中,其中活性的差异通常为至少10倍,更通常地为至少约100倍。反应混合物通常包括四种不同类型的dNTP,这对应于下述的四种天然存在的碱基,即dATP、dTTP、dCTP和dGTP。在题述的方法中,每种dNTP通常以约10至5000 μ M,通常约20至1000 μ M的量存在。

[0158] 在题述的方法的该检测步骤中制备的反应混合物可以进一步包括水性缓冲介质,所述水性缓冲介质包括单价离子来源,二价阳离子来源和缓冲剂。可以采用单价离子的任何便利来源,如KCl、K-醋酸盐、NH₄-醋酸盐、K-谷氨酸盐、NH₄Cl、硫酸铵等。二价阳离子可以是镁、锰、锌等,其中阳离子可以通常是镁。可以采用任何镁离子的便利来源,包括MgCl₂、Mg-醋酸盐等。存在于缓冲液中的Mg²⁺可以为0.5至10mM,但优选地为约3至6mM,理想地为约5mM。可能存在于缓冲液中的代表性的缓冲剂或盐包括Tris、三甲基甘氨酸(Tricine)、HEPES、MOPS等,其中缓冲剂的量通常为约5至150mM,通常为约10至100mM,更通常地为约20

至50mM,其中在某些优选的实施方案中,缓冲剂将以足够的量存在以提供约6.0至9.5的pH值,其中最优选在72°C下pH7.3。其它可能存在于缓冲介质中的试剂包括螯合剂,如EDTA、EGTA等。

[0159] 在制备题述方法的该步骤的反应混合物时,各种组成组分可以可以按照任何方便的顺序合并。例如,缓冲液可以与引物、聚合酶合并、然后与模板DNA合并,或所有各种组成组分可以同时合并以产生反应混合物。在特别优选的实施方案中,将扩增反应物与用于延伸和降解反应的组分合并。在这方面,反应的组分优选地适合反应的所有酶组分的活性,所述的酶组分即包括3'核酸外切酶活性的组分,用于产生延伸产物的“第一”聚合酶和任选地用于扩增步骤的“第二”聚合酶,所述“第二”聚合酶可以与“第一”聚合酶不同。在一些实施方案中,“第一”和“第二”聚合酶是相同的,即,聚合酶能够延伸邻近探针的核酸结构域(或多个结构域)并且扩增至少一部分延伸的结构域(或多个结构域)。在另外的实施方案中,聚合酶包括3'核酸外切酶活性。例如,Phi29(Φ 29)DNA聚合酶可以用于通过RCA检测延伸反应的产物的实施方案中,即,Phi29(Φ 29)DNA聚合酶可以用作3'核酸外切酶组分、延伸组分和扩增组分。另外的非限定性实例是Pfu DNA聚合酶,所述Pfu DNA聚合酶可以用于通过PCR检测延伸反应的产物的实施方案中,即Pfu DNA聚合酶可以用作3'核酸外切酶组分、延伸组分和扩增组分。

[0160] 扩增反应的扩增产物可以使用任何便利的方案检测,其中采用的具体方案可以非特异性地或特异性地检测扩增产物,如以下更详细地描述的。感兴趣的代表性的非特异性检测方案包括采用信号生成系统的方案,所述信号生成系统例如通过嵌入选择性地检测双链DNA产物。代表性的可检测的分子在这样的实施方案中是有用的,所述实施方案包括荧光核酸染色剂,如菲啶(phenanthridinium)染料,包括其单体或同或异二聚体,当其与核酸复合时产生增强的荧光。菲啶染料的实例包括乙锭同二聚体、溴化乙锭、碘化丙锭和其它烷基取代的菲啶染料。在发明的另一个实施方案中,核酸染色剂是吖啶染料或包括吖啶染料,或其同或异二聚体,如吖啶橙、吖啶同二聚体、乙锭-吖啶异二聚体,或9-氨基-6-氯-2-甲氧基吖啶。在发明的另一个实施方案中,核酸染色剂是吲哚或咪唑染料,如Hoechst33258、Hoechst33342、Hoechst34580(BIOPROBES34, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg., (May2000))、DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)或DIPI(4',6-(二咪唑啉-2-基)-2-苯基吲哚)。其它允许的核酸染色剂包括但不限于7-氨基放线菌素D、羟基司替巴脒、LDS751、选择的补骨脂素(呋喃香豆素)、苯乙烯基染料、金属复合物如钆复合物,和过渡金属复合物(例如,包括 Tb^{3+} 和 Eu^{3+})。在本发明的某些实施方案中,核酸染色剂是花青染料或花青染料的同或异二聚体,其当与核酸连接时产生增强的荧光。可以使用Lee的第4,883,867号美国专利(1989)、Yue等人的第5,582,977号美国专利(1996)、Yue等人的第5,321,130号美国专利(1994)、和Yue等人的第5,410,030号美国专利(1995)(将所有四篇专利引入本文作为参考)描述的任意染色剂,包括市售的来自Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg的商标为TOTO、BO BO、POPO、YOYO、TO-PRO、BO-PRO、PO-PRO和YO-PRO的核酸染色剂。可以使用Haugland等人的第5,436,134号美国专利(1995)、Yue等人的第5,658,751号美国专利(1997)、和Haugland等人的第5,863,753号美国专利(1999)(将所有三篇专利引入本文作为参考)描述的任意染料,包括市售的来自Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg的商标为SYBR Green、SY TO、SYTOX、PICOGREEN、OLIGREEN和RIBOGREEN的核酸染色剂。在发明的其它实施方案中,核酸染

色剂是当与核酸连接时产生增强的荧光的单体、同二聚体或异二聚体的花青染料,包括氮杂或聚氮杂苯并唑杂环,如氮杂苯并恶唑、氮杂苯并咪唑或氮杂苯并噻唑,包括市售的来自Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg的商标为SYTO、SYTOX、JOJO、JO-PRO、LO LO、LO-PRO的核酸染色剂。可以用于本发明的方法的另外的嵌入染料为来自Biotium Inc的EvaGreen™。

[0161] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,延伸产物是通过PCR扩增的,其中所述PCR为定量PCR,并且扩增的核酸分子是使用嵌入染料定量的。在优选的实施方案中,嵌入染料选自SYBR Green®和EvaGreen™。

[0162] 在其它实施方案中,可以采用对扩增产物而不是一般的双链分子具有特异性的信号产生系统来检测扩增。在这些实施方案中,信号产生系统可以包括特异性结合于在扩增产物中发现的序列的探针核酸,其中所述探针核酸可以标记有直接或间接可检测的标记。直接可检测的标记是可以直接被检测而无需使用另外的试剂的标记,而间接可检测的标记是通过采用一种或多种另外的试剂才可检测的标记,例如,其中标记是有两种或多种组分构成的信号产生系统的成员。在许多实施方案中,标记是直接可检测的标记,其中感兴趣的直接可检测的标记包括但不限于:荧光标记、放射性同位素标记、化学发光标记等。在许多实施方案中,标记是荧光标记,其中在该实施方案中采用的标记试剂是荧光标记的核苷酸(或多种核苷酸),例如荧光标记的CTP(如Cy3-CTP、Cy5-CTP)等。可以用于标记核苷酸以产生标记的探针核酸的荧光部分包括但不限于:荧光素,花青染料如Cy3、Cy5, Alexa555, Bodipy630/650等。其它标记,如上所述的那些由于在本领域是已知的,因此也可以采用。

[0163] 在某些实施方案中,特异性标记的探针核酸是使用“能量转移”标记进行标记的。如本文所使用,“能量转移”是指荧光基团的荧光发射被荧光修饰基团转变的过程。如果荧光修饰基团是淬灭基团,那么来自荧光基团的荧光发射减弱(淬灭)。能量转移可以通过荧光共振能量转移,或通过直接能量转移发生。在这两种情况下确切的能量转移机制是不同的。应当理解的是,在本申请中所提到的任何能量转移包括所有这些在机制上不同的现象。如本文所使用,“能量转移对”是指参与能量转移的任意两个分子。通常地,一个分子充当荧光基团,另一个充当荧光修饰基团。“能量转移对”用来指形成单一复合物的分子的基团,在所述复合物中发生能量转移。这样的复合物可以包括,例如,彼此不同的两个荧光基团,和一个淬灭基团,两个淬灭基团和一个荧光基团,或包括多个荧光基团和多个淬灭基团。在有多个荧光基团和/或多个淬灭基团的情况下,单个基团可以彼此不同。如本文所使用的,“荧光共振能量转移”或“FRET”是指能量转移现象,其中由激发荧光基团发射的光至少部分被荧光修饰基团吸收。如果荧光修饰基团是淬灭基团,那么基团可以作为不同波长的光发出吸收光,或可以作为热消散。FRET取决于荧光基团的发射光谱和淬灭基团的吸收光谱之间的重叠。FRET还取决于淬灭基团和荧光基团之间的距离。超过一定的临界距离后,淬灭基团不能吸收由荧光基团发射的光,或仅能很差地吸收。如本文所使用,“直接能量转移”是指荧光转移机制,其中荧光基团和荧光修饰基团之间的光子未发生传递。不被单一的机理束缚,认为在直接能量转移中,荧光基团和荧光修饰基团干扰彼此的电子结构。如果荧光修饰基团是淬灭基团,这将导致淬灭基团甚至妨碍荧光基团发射光。

[0164] 能量转移标记探针核酸,例如,寡核苷酸,可以按照各种不同的方式构成,只要它包括供体、受体和靶核酸结合结构域。因此,在本方法的这些实施方案中采用的能量转移标

记寡核苷酸是核酸检测器,所述核酸检测器包括荧光团,其中放置了荧光能量供体,即供体,以及放置了荧光能量受体,即受体。如上所述,供体结构域包括供体荧光团。供体荧光团可以位于核酸检测器的任意部位,但通常存在于检测器的5'端。受体结构域包括荧光能量受体。受体可以放置在核酸检测器的任意部位,但通常存在于检测器或探针的3'端。

[0165] 除了荧光团和受体结构域,能量转移标记的探针寡核苷酸还包括靶核酸结合结构域,所述结构域结合于在感兴趣的扩增产物中发现的靶核酸序列(如上所述的),所述的结合例如为在严格的杂交条件下结合(如上所述的)。这样的靶结合结构域的长度通常为约10至约60个核苷酸,通常为约15至约30nt。根据寡核苷酸和分析自身的性质,靶结合结构域可以杂交于模板核酸的区域或引物延伸产物的区域。例如,当分析是5'核酸酶分析时,例如当采用 **TaqMan®** 型寡核苷酸探针时,靶结合结构域在严格的条件下杂交于模板核酸的靶结合位点,所述结合位点是引物结合位点的下游或3'端。在供选择的实施方案中,例如,在分子信标型分析中,靶结合结构域杂交到引物延伸产物的结构域。在这些实施方案中采用的包括上述所有三个结构域的能量转移标记寡核苷酸的总长度,通常为约10至约60个核苷酸,通常为约15至约30个核苷酸。

[0166] 在某些实施方案中,当能量转移标记寡核苷酸不杂交于靶核酸时,对能量转移标记的寡核苷酸进行构造以使荧光团激发后在荧光团和能量转移标记的寡核苷酸探针的受体之间发生能量转移。

[0167] 在某些实施方案中,寡核苷酸是不形成分子内结构的单链分子,并且由于供体和受体的间距使得能按照单链线性形式进行能量转移,因此其中发生能量转移。在这些实施方案中,当标记的寡核苷酸探针杂交于靶核酸时,在荧光团激发时能量转移也在荧光团和标记的寡核苷酸探针的受体之间发生。这样的标记寡核苷酸探针的具体实例包括 **TaqMan®** 型探针,如第6,248,526号美国专利中所描述的,将其公开引入本文作为参考(以及Held等人,Genome Res.(1996)6:986-994;Holland等人,Proc.Natl Acad.Sci.USA (1991)88:7276-7280;和Lee等人,Nuc.Acids Res.(1993)21:3761-3766)。在许多这些实施方案中,靶核酸结合结构域是与模板核酸的序列杂交的结构域,也即与其互补的结构域,即靶核酸结合结构域的靶核酸是存在于模板核酸中的序列(即,伪靶标或替代核酸)。

[0168] 在其它实施方案中,当能量转移标记寡核苷酸探针杂交于靶核酸时,对探针寡核苷酸进行构造以使荧光团激发后在荧光团和能量转移标记的寡核苷酸探针的受体之间不发生能量转移。这些类型的探针结构的实例包括:Scorpion探针(如Whitcombe等,Nature Biotechnology(1999)17:804-807;第6,326,145号美国专利所描述,将其公开引入本文作为参考),Sunrise探针(如Nazarenko等人,Nuc.Acids Res.(1997)25:2516-2521;第6,117,635号美国专利所描述,将其公开引入本文作为参考),分子信标(Tyagi等人,Nature Biotechnology(1996)14:303-308;第5,989,823号美国专利,将其公开引入本文作为参考),和构象辅助探针(如第60/138,376号临时申请所描述,将其公开引入本文作为参考)。在许多这些实施方案中,靶结合序列或结构域包括与扩增反应的引物延伸产物的序列互补的杂交结构域,而不是与伪靶核酸中发现的序列互补的序列。

[0169] 题述方法中的下一步是由感兴趣的标记的扩增产物进行的信号检测,其中信号检测可以根据所采用的具体的信号产生系统而变化。在某些实施方案中,在题述分析中仅测

定和使用可检测信号例如荧光的存在或不存在,例如以通过伪靶核酸和/或其扩增产物测定或确定靶核酸的存在或不存在。根据所采用的具体标记,信号的检测可以指示靶核酸的存在或不存在。

[0170] 在信号产生系统是荧光信号产生系统的那些实施方案中,信号检测通常包括检测来自反应混合物的荧光信号的变化以获得分析结果。换言之,评估了由反应混合物生成的荧光信号的任何调节。根据采用的标记的性质,变化可以是荧光的增强或降低,但在某些实施方案中是荧光的降低。可以使用任何便利的装置针对荧光的增强对样品进行分析,所述装置例如适合的荧光计,如热稳定的比色皿或板式阅读荧光计。使用已知的荧光计合适地监测荧光。将来自这些装置的信号,例如光电倍增管电压形式的信号发送到数据处理器板并转化成与每种样品管相关的光谱。可以同时评估多个管,例如96个管。

[0171] 当检测方案是实时方案时,例如,如在实时PCR反应方案中采用的,在整个反应中可以在频繁的间隔下以这种方式收集数据,例如每3分钟一次。通过在每个循环的过程中监测来自样品的反应性分子的荧光,可以按照各种方式监测扩增反应的进展。例如,可以通过计算解链峰下面积和根据循环数绘制的这些数据来分析由解链峰提供的数据。在本发明的一个优选的实施方案中,使用嵌入双链核酸分子的染料实现荧光信号,优选地其中嵌入染料选自SYBR Green®和EvaGreen™。

[0172] 可以解析以这种方式生成的光谱,例如使用预先选择的荧光部分如染料的“拟合”,以形成代表每个信号部分(即,荧光团)的峰。可以测定峰下的面积,所述峰下的面积代表每个信号的强度值,如果需要将其表达为彼此的商数。信号强度和/或比率的微分将使得能够在整个反应中或在不同的反应条件下记录标记探针的变化,所述反应条件如温度。变化涉及寡核苷酸探针和靶序列之间的结合现象或结合于靶序列的寡核苷酸探针的降解。微分峰下的面积的积分将使得能计算出标记影响的强度值。

[0173] 根据样品是否在引物延伸反应末,例如在扩增反应的每个循环后被筛选了一次或多次(例如,如在实时PCR监测中所做的),针对荧光变化筛选混合物提供一个或多个分析结果。

[0174] 可以按照各种方式解释如上所述生成的数据。在其最简单的形式中,在扩增反应的过程中或末期,来自样品的荧光的增加或降低表明样品中存在的靶分析物的量升高,例如,如与反应混合物检测中检测的扩增产物的量相关,表明扩增反应已进行并且因此靶分析物实际上存在于初始样品中的事实。通过在整个扩增过程中监测扩增反应也可能进行定量。如上所述的定量也可以包括分析反应混合物中的一种或多种核酸对照。

[0175] 以这种方式,可以容易地针对靶分析物(或者多种靶分析物)的存在来筛选(或评估或分析等)反应混合物。方法适合用于检测单一靶分析物以及多重分析,其中在样品中分析两种或多种不同的靶分析物。在这些后者的多重分析的情况下,可以采用的不同组的探针数通常为约2至约20或更多,例如高达100或更多,1000或更多等。

[0176] 通过使用3'核酸外切酶方法获得的提高的特异性和灵敏度可以使得许多分析物同时和使用几种不同的邻近探针组(多重)在单一反应中分析成为可能。每个探针组可以设计从而产生独特的延伸产物,所述延伸产物可以用于测定探针组所探测的分析物的存在或不存在,量和/或部位。延伸产物可以直接检测或优选地在扩增后使用任意已建立的用于分析核酸分子的方法进行检测,所述方法从文献中已知,包括液相色谱法、电泳法、质谱法、显

显微镜法、实时PCR(定量PCR)、荧光探针等。本发明的方法的优选的实施方案利用定量或实时PCR。特别感兴趣的是本发明与“DNA阵列”读出形式的组合。来自如本文所述的多重邻近延伸分析的几种独特的延伸产物可以杂交于标准化的DNA阵列,所述DNA阵列携带许多与延伸产物序列互补的寡核苷酸序列(标记)。杂交于阵列的每种延伸产物可以通过其在DNA阵列上的位置确定,并且在给定的杂交斑点中的检测的强度将表明特异性延伸产物的量,从而也表明产生该延伸产物的分析物的量。可以通过光谱法、荧光、放射性同位素等实现对延伸产物的检测。可以在扩增反应(PCR)中使用荧光标记的引物或荧光标记的核苷酸将荧光部分方便地引入延伸产物中。DNA阵列可以是含有少量斑点的膜上的简单的点印迹阵列,或携带成百上千的斑点的高密度阵列。

[0177] 本发明的方法可以进行修改以进一步降低与非特异性核酸杂交事件相关的背景。这样的修改包括会降低任何非特异性核酸杂交事件的方法的调整。在一些实施方案中,可以将蛋白加入含有样品和邻近探针的混合物中以减少弱的和非特异性DNA杂交时间。例如,已将大肠杆菌单链DNA结合蛋白用于提高引物延伸反应和PCR反应的产率和特异性(第5,449,603号和第5,534,407号美国专利)。噬菌体T4的基因32蛋白(单链DNA结合蛋白)明显提高扩增更大的DNA片段的能力(Schwartz等人,Nucl.Acids Res.18:1079(1990))并提高DNA聚合酶的保真度(Huang,DNA Cell.Biol.15:589-594(1996))。当采用时,这样的蛋白将用于在反应混合物中达到约0.01ng/ μ L至约1 μ g/ μ L的浓度,如约0.1ng/ μ L至约100ng/ μ L的浓度,包括约1ng/ μ L至约10ng/ μ L的浓度。

[0178] 在一些实施方案中,可以通过在分析中加入聚-A RNA和/或主体RNA来降低背景。主体RNA也称为总RNA,即,主体RNA仅仅是从样品例如细胞中提取的总RNA,包括存在于所述样品中一种以上的形式的,优选所有不同形式的RNA,例如mRNA、rRNA、微小RNA等。

[0179] 在其它实施方案中,部分双链的核酸可以用作第一和第二邻近探针的核酸结构域以降低弱的和非特异性DNA杂交事件。

[0180] 如上所述的,对本发明的方法进行设计,以使第一和第二邻近探针的核酸结构域之间的相互作用只有在探针结合于分析物时才发生,这是由于具有游离的和未保护的3'端的未结合探针的核酸结构域将被包括3'核酸外切酶活性的组分完全或部分降解。然而,在该类型的所有分析的情况下,不能总是保证这一点,并且如果探针在溶液中随机地邻近时,可能有核酸结构域的一些背景相互作用(该可能性在需要探针的核酸结构域借助夹板彼此杂交以发生这样的相互作用的实施方案中降低;与双探针分析相比,所有三种结构域随机邻近的机会降低,然而这仍然可以在某些情况下发生)。为了使由于未结合的(即,未反应的)探针导致的背景的可能性降低或最小化,除了上述的和本领域已知的任意其它封闭试剂以外,可以使用封闭寡核苷酸。在优选的实施方案中,样品可以在加入邻近探针之前与一种或多种封闭试剂孵育,所述的封闭试剂例如BSA等。

[0181] 封闭寡核苷酸结合(即,杂交或退火)于第一和第二邻近探针的核酸结构域的游离端。因此,封闭寡核苷酸可以结合于5'邻近探针的核酸结构域的游离3'OH端和3'邻近探针的核酸结构域的游离5'磷酸酯端。封闭寡核苷酸的结合在高局部浓度的例如夹板寡核苷酸存在下可以具有更高的竞争力,如在本发明的一些实施方案中出现的。以这种方式,封闭寡核苷酸在分析物结合不存在时可以防止第一和第二结构域杂交于夹板。在其它实施方案中,一种或多种特异性“竞争”寡核苷酸可以加入分析中,例如在邻近探针与靶分析物相连

后,以使封闭寡核苷酸从探针的核酸结构域的末端解离,从而使得邻近探针的结构域能相互作用。因此,可以防止5'和/或3'探针的游离端相互作用,直到它们结合于分析物。在使用夹板寡核苷酸并其形成第三邻近探针的核酸结构域的实施方案中,当所有三种探针结合于分析物时,夹板的局部浓度足以超过封闭寡核苷酸;第一和第二结构域杂交于夹板并且封闭寡核苷酸被取代。

[0182] 因此,封闭寡核苷酸使得能够使用基于竞争的策略以降低背景并从而提高分析的灵敏度。

[0183] 阻断寡核苷酸的长度可以为约4-100个核苷酸,例如6-75或10-50个。它们可以与在第一或第二探针的核酸结构域的游离末端或附近的区域杂交(“附近”是指在游离的3'或5'端的1-20或1-10个核苷酸以内,例如1-6个核苷酸)。杂交区域可以是3-15个核苷酸长,例如3-12、3-10、3-8、4-8、3-6、4-6个。

[0184] 封闭寡核苷酸通常相对于各自的探针过量使用,例如过量2-1000倍,例如20-500、50-300、100-500或100-300倍,例如20、200或300倍。

[0185] 竞争寡核苷酸通常相对于封闭寡核苷酸过量使用,例如过量2-1000倍,例如20-500、50-300、100-500或100-300倍,例如20、200或300倍。

[0186] 在使用具有低亲和力和缓慢的结合动力学的邻近探针检测分析物的情况下,与邻近探针在足够高的浓度下预孵育的步骤促进邻近探针与分析物的结合。该预孵育步骤可以快速在大体积的冷缓冲液中稀释(例如,不包括分析物或邻近探针的缓冲液),和随后将部分该稀释液加入延伸反应混合物中。低温使得存在的邻近探针分析物复合物的解离最小化,而大量稀释导致未结合邻近探针的浓度降低,从而降低其反应性和最小化背景信号,所述的低温例如为,约0℃至约20℃,包括约4℃至约10℃。

[0187] 在这样的实施方案中,通过使用约1μl至约20μl,如约1μl,或约2μl,或约3μl,或约4μl,或约5μl或约6μl的小孵育体积的样品和邻近探针来进行分析。因此邻近探针在终孵育体积中的有效浓度是稀释的,降低了背景,同时由于探针和分析物之间的结合在第一和第二核酸结构域被延伸之前没有时间解离而维持信号。只要延伸产物可以由较大的体积浓缩,如100μl以上或更多,并随后检测邻近依赖性相互作用,则该方法使得灵敏度极高。在这样的实施方案中,探针-探针相互作用可以通过使用单链结合蛋白来降低。

[0188] 与复杂样品相关的问题可以通过在分析前稀释复杂样品来解决。这将大大地降低探针非特异性地结合的蛋白的量,从而降低需要的探针的浓度。虽然分析物也可以被稀释,但邻近探测的高灵敏度将提供良好的检测和定量。

[0189] 可以如上所述均质地(即,在溶液中),或供选择地异质地使用固相采用本发明的方法,所述的使用固相例如其中结合的分析物固定在固相上,允许使用洗涤步骤。固相分析的使用提供了优点,特别是对困难样品的检测提供了优点:洗涤步骤可以有助于除去抑制性组分,并且可以从不希望的大样品体积中富集分析物。由于未结合的分析物和探针可以通过洗涤除去,因此可以使用更高浓度和更大量的邻近探针。通过洗涤除去未结合的或未缀合的探针的能力也意味着固相分析与均质分析相比耐受更低纯度的邻近探针。

[0190] 将分析物固定在固相上可以按照各种方式实现。因此,考虑本发明的固相分析的几种实施方案。在一个这样的实施方案中,一个(或多个)第一或第二(或第三邻近探针,如果使用)可以(或可以能够)被固定在固相(或固体支持物)上。分析物可以首先被一个(或多

个)固定的(或可固定的)探针(或者多个探针)捕获,其次被随后加入的探针结合。在这样的方案中,前述的亲合力效果可以不存在于结合步骤中,但是与洗涤步骤相关。优选地,在将非固定的/不可固定的探针(或者多个探针)加入反应混合物的同时,将分析物与固相结合(即,固定的,或可固定的)探针(或者多个探针)接触,使得亲合力效果也有助于检测(结合)步骤。

[0191] 固定化的邻近探针可以被固定,即,以任何方便的方式结合于支持物。因此,固定的方式或手段和固体支持物可以根据选择选自本领域众所周知和在文献中描述的任何数量的固定装置和固体支持物。因此,探针可以直接结合于支持物,例如通过分析物结合结构域(例如,化学交联的),它也可以借助连接基团或通过中间结合基团(或多个基团)间接地结合(例如,接触生物素-链酶亲和素相互作用)。因此,邻近探针可以具有用于固定在支持物上的装置(例如,能够结合于其结合配偶体的亲和结合配偶体,例如生物素或半抗原,所述结合配偶体即同源结合配偶体,例如链霉素或抗体)。探针可以在结合于分析物之前或之后固定。此外,这样的“可固定的”探针可以与支持物一起接触样品。

[0192] 固体支持物可以是目前广泛使用的或建议用于固定、分离等的任何众所周知的支持物或基质。这些可以呈现颗粒(例如,磁性或非磁性珠)、片、凝胶、滤器、膜、纤维、毛细管或微量滴定条、管、板或孔等的形式。

[0193] 支持物可以由玻璃、硅胶、乳胶或聚合物材料制成。适合的是呈现用于结合分析物的高表面积的材料。这样的支持物可以具有不规则的表面并且可以是例如多孔的或颗粒状的,例如,颗粒、纤维、纤网、烧结物或筛。颗粒材料例如珠由于其更高的结合能力而是有用的,特别是聚合珠。

[0194] 便利地,根据本发明使用的颗粒固体支持物将包括球形珠。珠的大小不是关键的,但可以例如为约至少1 μm 和优选地至少2 μm 的直径,并且具有优选地不大于10 μm 的最大直径,例如不大于6 μm 。

[0195] 单分散颗粒,即尺寸基本均匀的颗粒(例如,具有小于5%的直径标准偏差的尺寸),具有提供非常均匀的反应重现性的优点。代表性的单分散聚合物可以通过在US-A-4336173中描述的技术产生。

[0196] 然而,为了帮助操作和分离,磁性的珠是有利的。本文所使用的术语“磁性的”是指能够支持物当置于磁场中时能够具有赋予其的磁矩,例如,支持物可以是顺磁性的,因此在该场的作用下可以移动。换言之,包括磁性颗粒的支持物可以容易地通过磁聚集除去,所述磁聚集在分析物结合步骤之后提供了快速、简单和有效的分离颗粒的方式。

[0197] 在另一个实施方案中,除了均质分析的非固定的邻近探针以外,可以使用仅包括结合结构域(即,分析物捕获探针)的固定化的(或可固定的)分析物特异性探针。因此,在这样的实施方案中,分析物首先被固定的或可固定的捕获探针捕获,所述捕获探针仅用于将分析物固定在固相上,随后固定的分析物与邻近探针孵育。在这样的实施方案中,捕获探针可以是能够直接或者间接结合分析物的任何结合配偶体(例如,如以上就邻近探针的分析物结合结构域所讨论的)。更具体地,这样的捕获探针特异性结合于分析物。由于方法的该实施方案需要至少三种探针(结合结构域)同时结合于分析物或分析物复合物,因此可能能够探测至少三种不同的表位,使分析具有高特异性。

[0198] 在又一个实施方案中,分析物本身可以例如通过非特异性吸附来固定(或可固定)

在固相上。在一个具体的这样的实施方案中,分析物可以存在于可选地被固定和/或透化的细胞内,所述细胞(能够)连接于固体支持物。

[0199] 上述方法提供对存在于反应混合物的夹板介导的邻近依赖性相互作用的检测,其反过来提供了对被分析的样品中的靶分析物的量的测量。所述测量可以是定性或定量的。

[0200] 因此,上述检测复杂样品中的一种或多种靶分析物的存在的方法在多种不同应用中是有用的。

[0201] 题述方法可以用于针对样品中一种或多种靶分析物的存在或不存在来筛选样品。如上所述的,本发明提供了检测样品中一种或多种靶分析物的存在或定量样品中一种或多种靶分析物的量的方法。

[0202] 题述方法可以用于检测在各种不同类型的样品中的一种或多种靶分析物的存在,包括具有大量非靶标实体的复杂样品,其中题述方法提供对靶分析物(或者多种靶分析物)高灵敏度的检测。因此,题述方法是检测简单或复杂样品中的一种或多种靶分析物的高度灵敏的方法。在许多实施方案中,在题述方法中分析的样品是来自生理来源,如以上更详细地描述的。

[0203] 除了检测多种分析物,题述方法还用于筛选化合物,所述化合物调节具有分析物结合区域的邻近探针的分析物结合结构域之间的相互作用,即,分析物结合结构域与分析物的结合。术语调节包括降低(例如,抑制)和提高两个分子之间的相互作用。筛选方法可以是体外或体内形式,其中两种形式均容易地由本领域技术人员开发。

[0204] 各种不同的候选试剂可以通过上述方法筛选。候选剂包括多种化学种类,但是它们通常是有机分子,优选分子量大于50且小于2,500道尔顿的小有机化合物。候选试剂包括与蛋白结构相互作用必须的官能团,所述相互作用特别是氢键,并且包括至少氨基、羰基、羟基或羧基,优选地至少两个化学官能团。候选试剂通常包括被一个或多个上述官能团取代的环状碳或杂环结构和/或芳香或聚芳香结构。候选试剂还可以是生物分子中,所述生物分子包括肽、糖类、脂肪酸、载体、嘌呤、嘧啶、其衍生物、结构类似物或组合。

[0205] 候选试剂是由多种来源获得的,所述的来源包括合成或天然化合物的库。例如,许多方法可以用于多种有机化合物和生物分子的随机和定向合成,包括随机化的寡核苷酸和寡肽的制备。供选择地,细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物库是可得或容易制备的。此外,天然或合成制备的库和化合物容易通过传统的化学、物理和生物化学手段被修饰,并且可以用于制备组合库。已知的药物制剂可以进行定向或随机化学修饰,如酰化、烷基化、酯化、酰胺化等,以产生结构类似物。

[0206] 在上述筛选分析中确定的试剂在多种方法中是有用的,包括调节靶分析物活性的方法,和与其存在和/或活性相关的条件。

[0207] 还提供了在实施如上所述的题述方法中有用的试剂盒。例如,在一些实施方案中,用于实施题述方法的试剂盒包括至少一组邻近探针,所述邻近探针各自包括如上所述的分析物结合结构域和核酸结构域。如上所述,某些方案将采用两个或多个不同的这样的探针组,以同时检测样品中的两种或多种分析物,例如,以多重和/或高通量形式。因此,在某些实施方案中,试剂盒将包括两个或多个不同的邻近探针组。此外,在使用试剂盒组分实施的方案中可以存在需要或希望的另外的试剂,所述另外的试剂包括但不限于:包括3'核酸外切酶活性的组分,一种或多种聚合酶,夹板寡核苷酸(任选地为第三邻近探针的形式),封闭

寡核苷酸,竞争寡核苷酸,用于固定探针、结合结构域或分析物的固体支持物,用于固定探针、结合结构域或分析物的装置,扩增和检测装置,例如荧光标记的核苷酸或寡核苷酸或嵌入染料(例如,SYBR Green®和/或EvaGreen™),补充核酸对,单链结合蛋白,和PCR扩增试剂(例如,核苷酸、缓冲液、阳离子等)等。在某些实施方案中,试剂盒可以包括用于降低如上所述的孵育混合物的有效体积的元件,例如,体积排阻剂。试剂盒组分可以存在于单独的容器中,或一种或多种组分可以存在于相同的容器中,其中所述容器可以是储存容器和/或在试剂盒针对设计的分析过程中采用的容器。

[0208] 除了上述组分,题述试剂盒可以进一步包括用于实施题述方法的说明。这些说明可以按照多种形式存在于题述试剂盒中,所述一种或多种指示可以存在于试剂盒中。这些说明可能存在的一种形式是作为在适合的介质或基材上的印刷的信息,所述介质或基材例如,印刷了信息的一片或多片纸上,在试剂盒的包装中,在包装说明书中等。另一种装置可以是记录了信息的电脑可读的介质,例如,磁盘、CD、闪存盘等。可以存在的又一种装置是网址,所述网址可以通过互联网使用,以访问远离的站点的信息。任何便利的装置都可以存在于试剂盒中。

[0209] 因此,在本发明的又一个方面中提供了在用于检测样品中的分析物的方法中使用的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0210] (a)至少一组至少第一和第二邻位探针,所述探针各自包括分析物结合结构域和核酸结构域并可以同时结合于分析物;和

[0211] (b)包括3'核酸外切酶活性的组分;和

[0212] (c)任选地,用于延伸至少一个所述第一和第二邻位探针的核酸结构域以生成延伸产物的装置;和

[0213] (d)任选地,用于扩增和检测所述延伸产物的装置。

[0214] 如上所述,用于延伸核酸结构域的装置可以是聚合酶,并且这样的装置可以任选地进一步包括聚合酶反应所必需的试剂(例如,核苷酸等)。用于扩增和检测延伸产物的装置可以是以上在分析方法的上下文中描述的任意装置,例如扩增装置和用于检测其扩增产物的装置,例如用于PCR反应(例如,扩增引物,和任选地聚合酶和/或核苷酸等)和用于检测PCR扩增子等(例如,Taqman®探针,嵌入染料,如SYBR Green®和/或EvaGreen™等)的试剂。

[0215] 试剂盒还可以任选地包括针对第一和第二探针的夹板寡核苷酸和/或封闭寡核苷酸。

[0216] 试剂盒还可以任选地包括针对分析物的固定化的捕获探针,或装备有用于固定的装置的捕获探针。供选择地,试剂盒可以包括用于捕获或结合于分析物的固相,或一种或多种所述第一或第二邻近探针可以固定或装备有用于固定的装置。

[0217] 将参照以下附图以及参照以下非限定性实施例进一步描述本发明,其中:

[0218] 图1显示了五个不同版本的邻近延伸分析的示意图。

[0219] 图2是显示在使用本发明的方法进行的白细胞介素-8(50pM)检测中,各种具有3'核酸外切酶活性的聚合酶或与3'核酸外切酶组合的聚合酶的活性的条形图。

[0220] 图3显示了在“加浓试剂”交联葡聚糖G-100的存在和不存在下,通过使用本发明的方法检测样品中的分析物(ICAM抗原)而绘制生成的信号的图表。

[0221] 图4显示了通过使用本发明的方法检测样品中的分析物(藻红蛋白,PE)而绘制生成的信号的图表,其中将分析物加入缓冲液或血浆中。

[0222] 图5显示了通过使用本发明的方法检测样品中的分析物(神经胶质细胞源性神经营养因子,GDNF)而绘制生成的信号的图表,其中将分析物加入缓冲液或血浆中或者分析物天然存在于血浆中。

[0223] 图6显示了通过使用本发明的“一步”法检测样品中的分析物(白细胞介素8,IL-8)而绘制生成的信号的图表。

[0224] 图7显示了通过使用本发明的“一步”法检测样品中的分析物(血管内皮生长因子,VEGF)而绘制生成的信号的图表。

[0225] 图8显示了显示在使用本发明的方法进行的细胞白介素-8(100pM)检测中,两种具有3'核酸外切酶活性的超嗜热聚合酶的活性的条形图,所述聚合酶即Pfu DNA聚合酶和Pwo DNA聚合酶(标记为Hypernova[™],来自DNA GDANSK的市售聚合酶)。

实施例

[0226] 实验程序,细胞白介素-8(IL-8)的检测

[0227] 邻近探针的制备

[0228] 使用Innovas Lightning-Link缀合技术将一批多克隆抗体(RnD Systems,AF-208-NA)偶联于两条不同的ssDNA链,一个连接于5'端:

[0229] 5'-GGCCCAAGTGTTAATTTGCTTCACGATGAGACTGGATGAA-3'(SEQ ID NO: 1)

[0230] 以及第二个连接于3'端:

[0231] 5'-TCACGGTAGCATAAGGTGCAGTATGAGAACTTCGCTACAG-3'(SEQ ID NO:2)

[0232] 第三寡核苷酸,称为“延伸寡核苷酸(Extension oligo)”,以2:1(寡核苷酸:缀合物)的比例加入3'-连接的缀合物中。

[0233] PEA方案#1(两步版本)

[0234] 将1μL样品(PBS+0.1%BSA缓冲液,来自RnD Systems208-IL-010的IL-8抗原标准品,EDTA血浆)与1μL封闭缓冲液混合,所述封闭缓冲液含有0.21mg/ml山羊IgG(Sigma Aldrich I9140)、107μg/ml单链鲑鱼精子DNA(Sigma Aldrich D7656)、0.085%BSA、4.3mM EDTA、0.21%Triton-X100、0.02%叠氮钠和2.5μM封闭缀合物(Olink AB,W02012/007511)在25°C下封闭样品20分钟。

[0235] 向2μL的封闭的样品中加入2μL探针混合物(25mM Tris-HCl、4mMEDTA、1mM生物素、0.016mg/ml单链鲑鱼精子DNA(Sigma Aldrich D7656)、0.02%叠氮化钠和100pM的每种PEA缀合物),然后在37°C下孵育1小时。

[0236] 在探针孵育后,将样品转移到热循环仪中并保持在37°C下。向孵育的样品中加入76μL的稀释混合物,所述稀释混合物含有70.5mM Tris-HCl、17.7mM硫酸铵、1.05mM二硫苏糖醇和40μM(每种)dNTP。37°C下5分钟后,第二次加入20μL的延伸混合物(66.8mM Tris-HCl、16.8mM硫酸铵、1mM二硫苏糖醇、33mM氯化镁和62.5U/mL T4DNA聚合酶(Fermentas,#EP0062))或其它DNA聚合酶。延伸反应在37°C下再进行20分钟,然后在80°C下热灭活10分钟。

[0237] 对于延伸产物的qPCR检测,将4μL的延伸产物转移至qPCR板上并与6μL qPCR混合

物(25mM Tris-HCl、7.5mM氯化镁、50mM氯化钾、8.3mM硫酸铵、8.3%海藻糖(Acros Organics,182550250)、333μM(每种)dNTP、1.67mM二硫苏糖醇、833nM每种引物(正向:5'-TCGTGAGCCCAAGTGTTAATTTGCTTCACGA-3'(SEQ ID NO:3),反向:5'-TGCAGTCTGTAGCGAAGTTCTCATACTGCA-3'(SEQ ID NO:4),Biomers)、417nM分子信标(FAM-CCCGCTCGCTTATGCTACCGTGACCTGCGAATCCCGAGCGGG-D ABSYL,(SEQ ID NO:5)Biomers)、41.7U/mL重组Taq聚合酶(Fermentas#EP0402)和1.33μM ROX参比物(ROX-TTTTTTTT, Biomers)进行混合。运行两步qPCR,在95℃下进行初始变性5分钟,接着进行45个循环的95℃变性15秒,和60℃组合退火和延伸1分钟。

[0238] 不同DNA聚合酶的比较

[0239] 当将具有3'→5'核酸外切酶活性的DNA聚合酶样品(T4DNA聚合酶、DNA聚合酶、Phi29DNA聚合酶、DNA聚合酶I、Klenow片段)与没有所述活性的DNA聚合酶样品(Klenow片段exo(-))比较时,发现信号相对于背景具有显著的差异,参见图2。没有3'核酸外切酶活性的Klenow片段具有比Klenow片段(3'exo+)更高的背景,并且如果将核酸外切酶I加入Klenow片段exo(-),可以达到与使用Klenow片段(3'exo+)相似的结果。因此不是DNA聚合酶的核酸外切酶I可以挽救通过Klenow(exo-)聚合的反应。

[0240] 一些含有3'核酸外切酶活性的DNA聚合酶,例如T7和phi-29DNA聚合酶,对背景和抗原样品均产生低的信号(图2)。假设该结果是由于在这些酶中发现的强的3'核酸外切酶活性,并且对这些酶的具体反应条件进一步的优化可以使得这些酶在本文所描述的方法中

有用。

[0241] 认为在邻近延伸分析中使用包括3'核酸外切酶活性的酶的积极效果是由游离非邻近DNA端的降解产生的,所述降解使其不能在延伸反应本身的过程中随时间推移积累延伸产物。

[0242] 与交联葡聚糖G-100珠的探针孵育

[0243] 为了研究通过使用分子加浓试剂提高PEA性能的可能性,所述分子加浓试剂例如在US20090162840中针对邻近连接分析所建议的加浓聚合物,使用上述方法对交联葡聚糖珠的使用进行测试。干燥的交联葡聚糖珠在溶液中再水合后能够膨胀并且吸水,同时使可能存在于溶液中的更大的分子如蛋白(即,分析物)和邻近探针保持在珠外。这有效地提高了所述蛋白和邻近探针的浓度,从而促进所述探针的靶结合。图3显示了分析的结果,其中将0.5μg的交联葡聚糖G-100在PEA孵育管的底部冻干,在其上加入探针混合物和样品。可以看出灵敏度和信号噪声比的显著改善,表明靶结合提高。

[0244] PEA上的血浆回收率和基质效应

[0245] 为了使用3'核酸外切酶有效的DNA聚合酶测试PEA在复合物基质中准确检测蛋白的能力,使用人EDTA的制备血浆进行上述分析。将非人蛋白藻红蛋白(PE)以各种浓度加入具有0.1%BSA的不复杂的基质PBS(磷酸缓冲盐溶液),或非常复杂的基质EDTA血浆中,并通过PEA定量。选择非人蛋白以使即使在低浓度下也可以评价回收率。由于在复杂和不复杂基质之间的信号中几乎无差异,因此即使在10pM的血浆中也可以观察到该分析物的良好的回收率(图4)。

[0246] 在另一个实例中,将人蛋白GDNF(神经胶质细胞源性神经营养因子)加入人血浆中,图5。该蛋白在血浆中具有非常低的丰度,并且使用标准技术难以检测。此外,观察到对

该分析物的显著的回收率,表明内源性GDNF信号可以在0.1pM下定量。

[0247] 简化的PEA方案(#2)

[0248] 如果可能简化实验程序,总是希望这样做。发现可以将延伸混合物与qPCR混合物组合,从而可以直接将延伸产物从热循环仪中转移至qPCR仪器中,而不需进一步移液并具有更少的亲自动手时间。该方案证明保持高灵敏度和信号以及良好的精密度(图6和7)。为了能够在qPCR引物存在下使用3'核酸外切酶DNA聚合酶进行邻近延伸反应,需要制备所述的抗核酸外切酶的引物。这可以通过制备在PEA反应的更低温度下形成发夹结构的引物并使用硫代磷酸酯修饰3'端的最后两个残基来实现。PEA方案的一步版本描述如下。IL8和VEGF检测的结果分别描述于图6和7中,并使用一步方案获得。

[0249] PEA方案#2(一步版本)

[0250] 将1μL样品(PBS+0.1%BSA缓冲液,来自RnD Systems208-IL-010的IL-8抗原标准品,EDTA血浆)与1μL封闭缓冲液混合,所述封闭缓冲液含有0.19mg/ml山羊IgG(Sigma Aldrich I9140)、94μg/ml单链鲑鱼精子DNA(Sigma Aldrich D7656)、0.075%BSA、3.8mM EDTA、0.19%Triton-X100、0.015%叠氮钠和2.5μM封闭缀合物(Olink AB,W02012/007511)。在25°C下封闭样品20分钟。

[0251] 向2μL的封闭的样品中加入2μL探针混合物(25mM Tris-HCl、4mMEDTA、1mM生物素、0.016mg/ml单链鲑鱼精子DNA(Sigma Aldrich D7656)、0.02%叠氮钠和100pM的每种PEA缀合物),然后在37°C下孵育1小时。

[0252] 在探针孵育步骤之后,将样品转移到热循环仪中并保持在37°C下。向样品中加入36μL的稀释混合物,所述稀释混合物含有1x iTaq SYBR Green Supermix(BioRad,172-5851)和3'-硫酯保护的发夹引物(正向:5'-TCGTGAGCCCAAGTGTTAATTTGCTTCAC*G*A-3'(SEQ ID NO:6),反向:TGCAGTCTGTAGCGAAGTTCTCATACTG*C*A-3'(SEQ ID NO:7),*表明硫酯修饰)。37°C下3分钟后,加入10μL的延伸混合物(1x iTaq SYBR Green Supermix(BioRad,172-5851)和62.5U/mL T4DNA聚合酶(Fermentas,#EP0062))。延伸反应在37°C下再进行20分钟,然后在65°C下热灭活T4DNA聚合酶10分钟。

[0253] 反应混合物(50μL)含有延伸产物和qPCR所需的所有试剂。将10μL的反应混合物转移至光学qPCR板上以进行定量。运行两步qPCR,在95°C下进行初始变性5分钟,接着进行45个循环的95°C变性15秒,和64°C组合退火和延伸1分钟。

序列表

<110> OLINK AB

<120> 核酸外切酶可实现的邻近延伸分析

<130> 27. 20. 107618/01

<150> GB1101621.9

<151> 2011-01-31

<160> 7

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 邻近探针核酸结构域

<400> 1

ggcccaagtg ttaatttgct tcacgatgag actggatgaa 40

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 邻近探针核酸结构域

<400> 2

tcacggtagc ataaggtgca gtagagaac ttgctacag 40

[0001]

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> qPCR引物正向

<400> 3

tctgagccc aagtgttaat ttgcttcag a 31

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> qPCR引物反向

<400> 4

tgcagtcgt agcgaagtc tcatactgca 30

<210> 5

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> qPCR分子信标

<220>

<221> 修饰的 碱基

<222> (I) . . (I)

<223> 使用6-羧基荧光素标记

[0002]	<220>		
	<221>	修饰的 碱基	
	<222>	(42)..(42)	
	<223>	使用DABSYL标记	
	<400>	5	
		cccgcctcgct tatgetaccg tgacctgcca atcccgagcg gg	42
	<210>	6	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	qPCR引物正向	
	<220>		
	<221>	修饰的 碱基	
	<222>	(30)..(31)	
	<223>	硫酯修饰的	
	<400>	6	
		tcgtgagccc aagtgttaat ttgcttcacg a	31
	<210>	7	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	qPCR引物反向	
	<220>		
	<221>	修饰的 碱基	
	<222>	(29)..(30)	
	<223>	硫酯修饰的	
	<400>	7	
		tgcagtctgt agcgaagttc tcatactgca	30

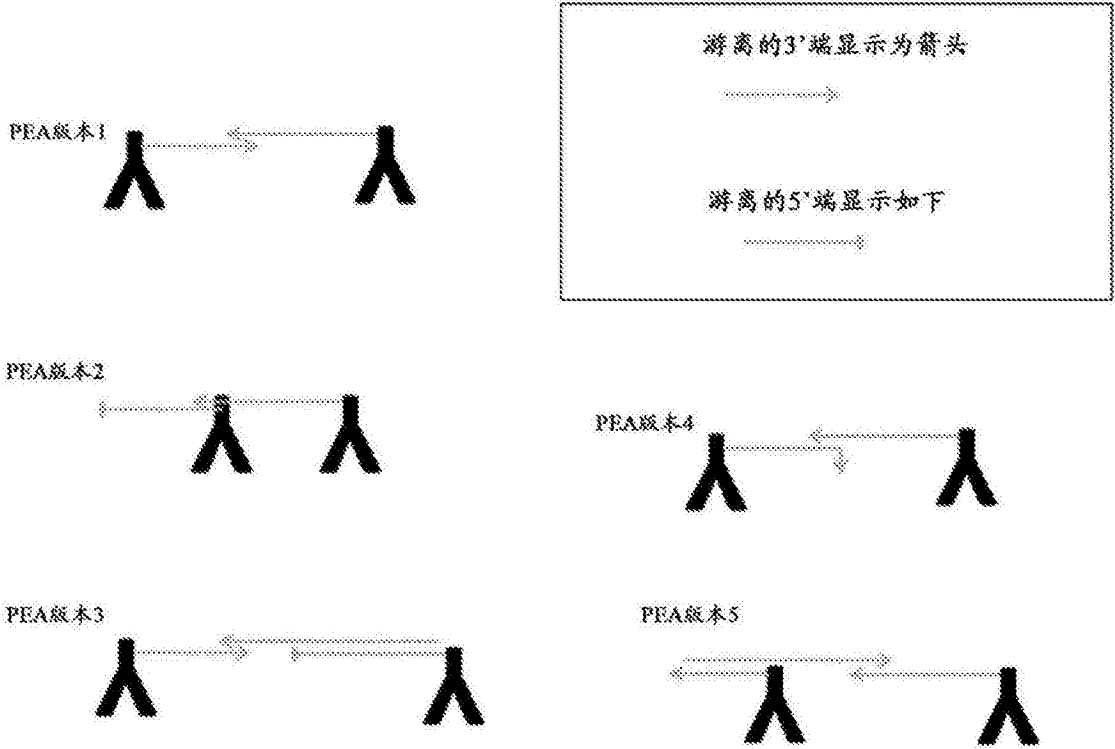


图1

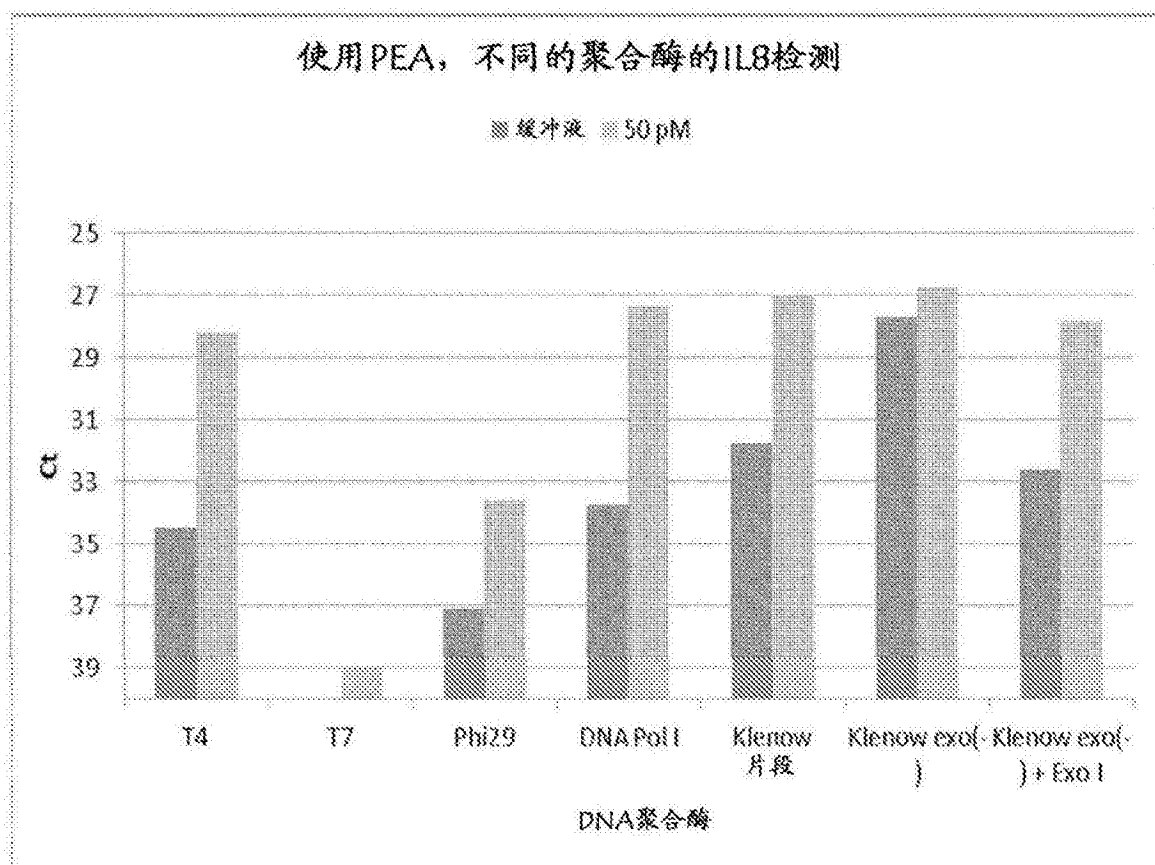


图2

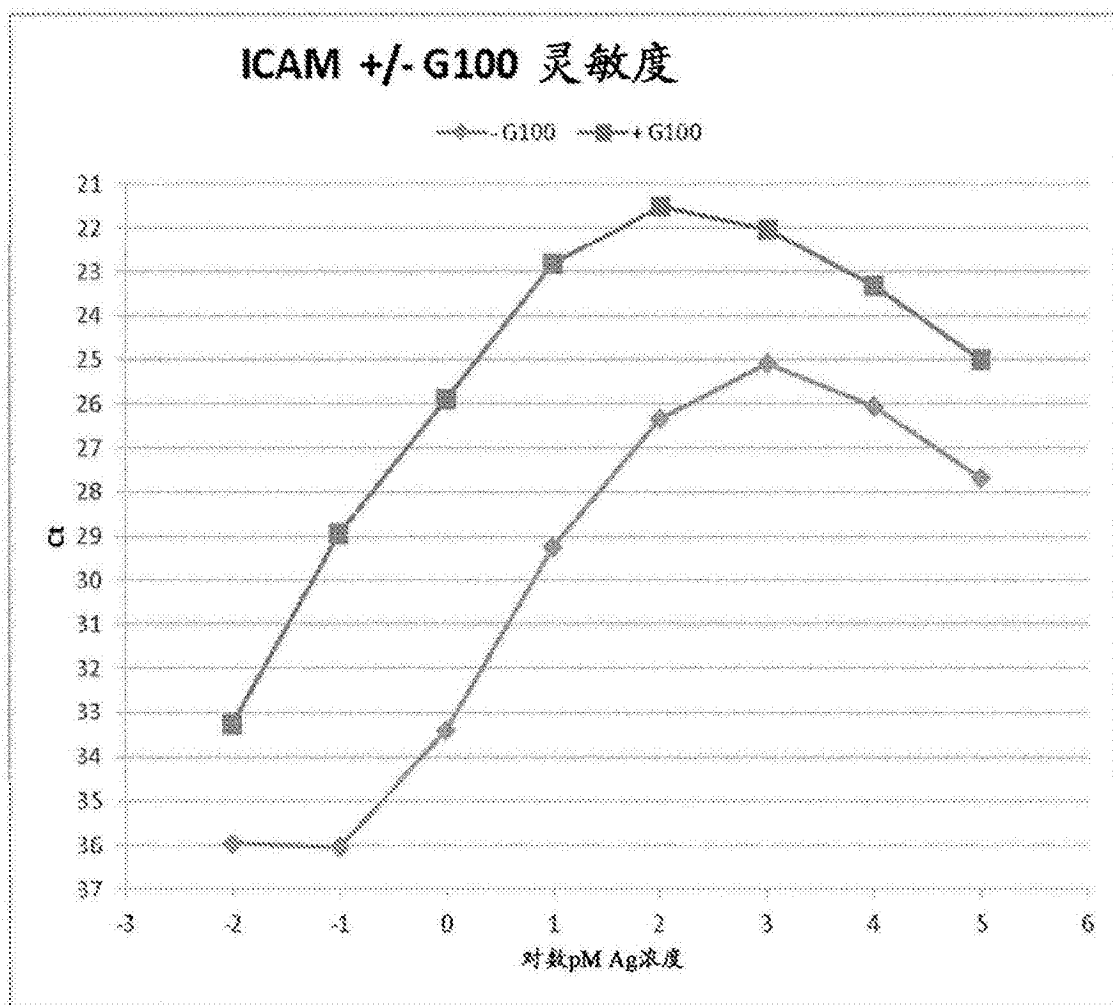


图3

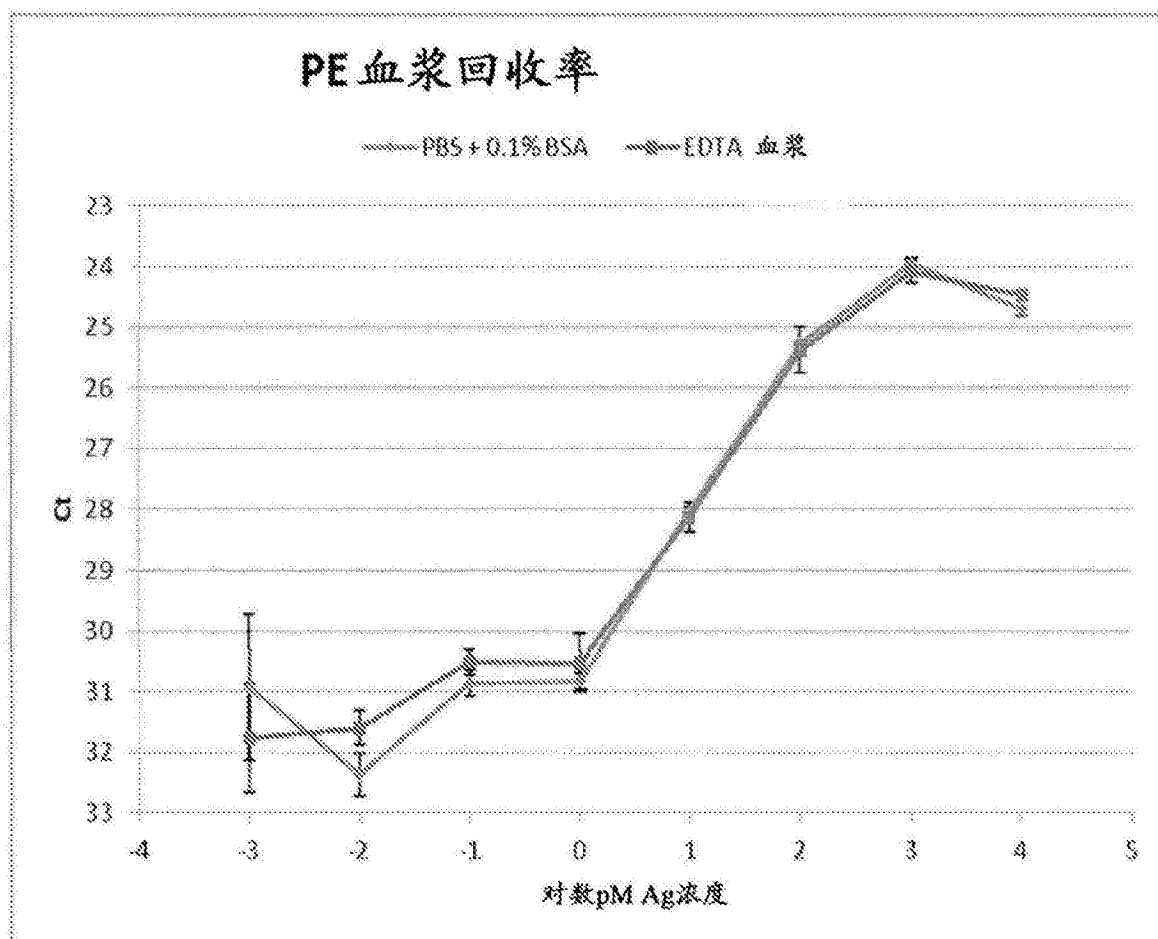


图4

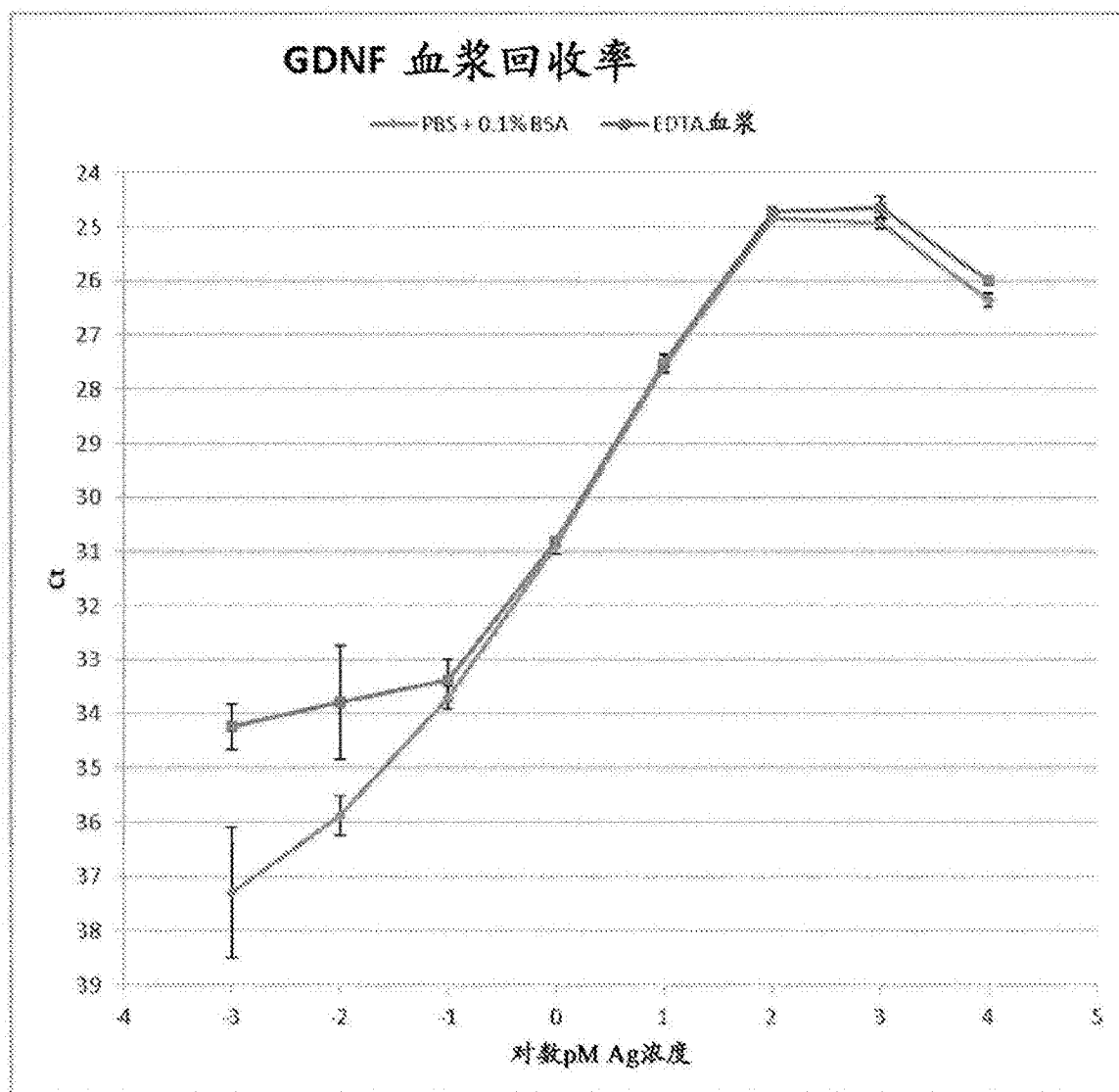


图5

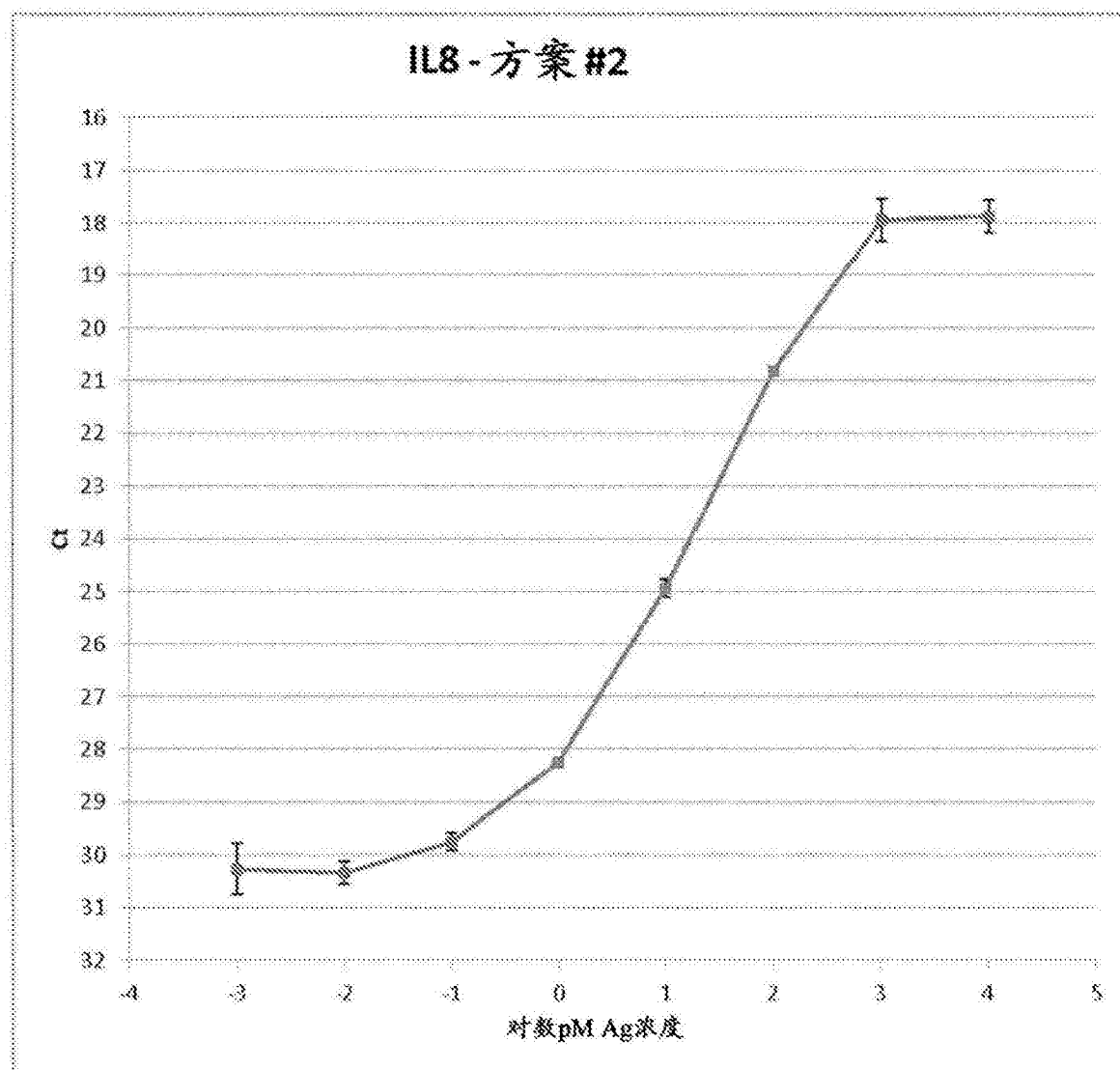


图6

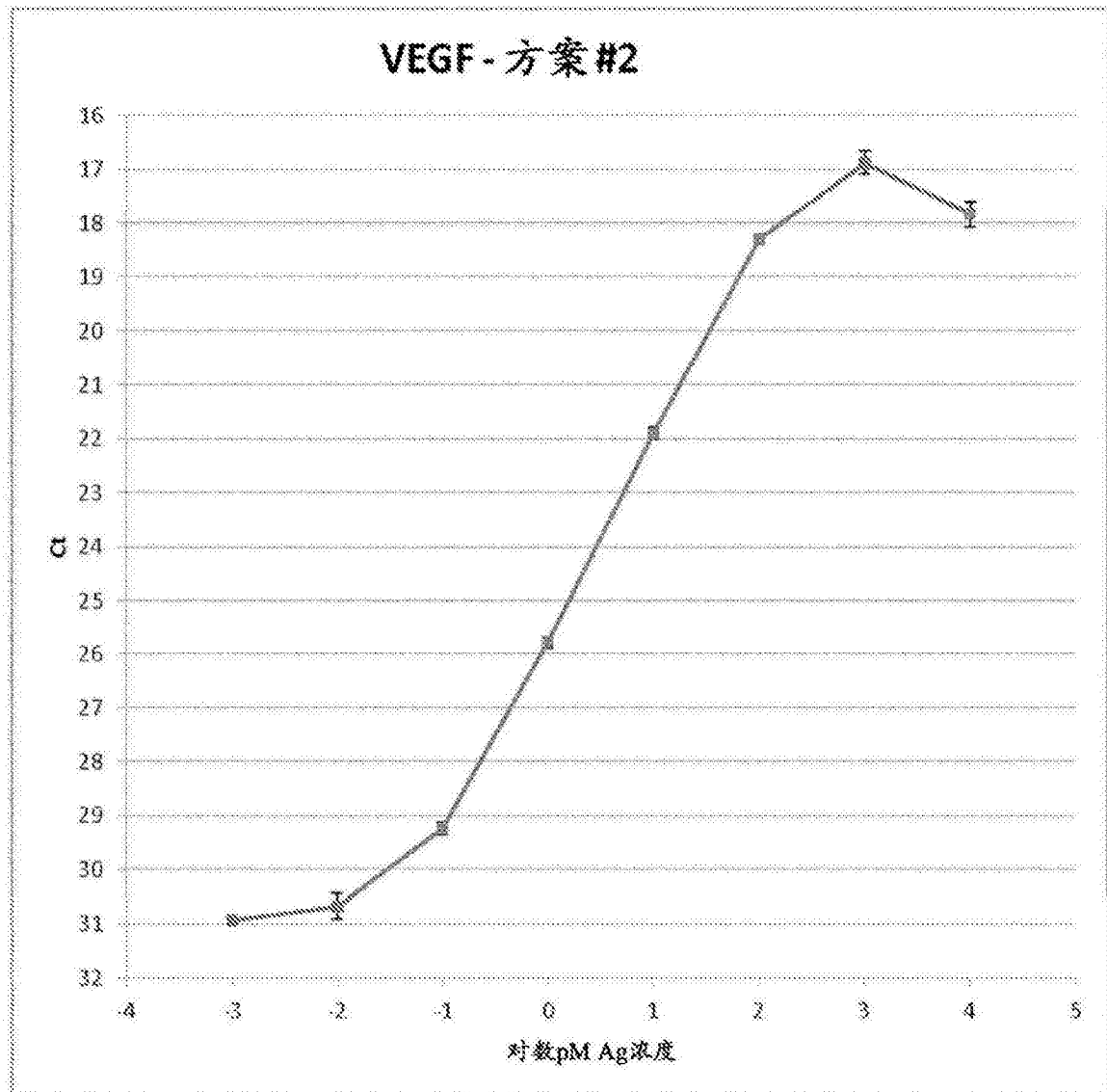


图7

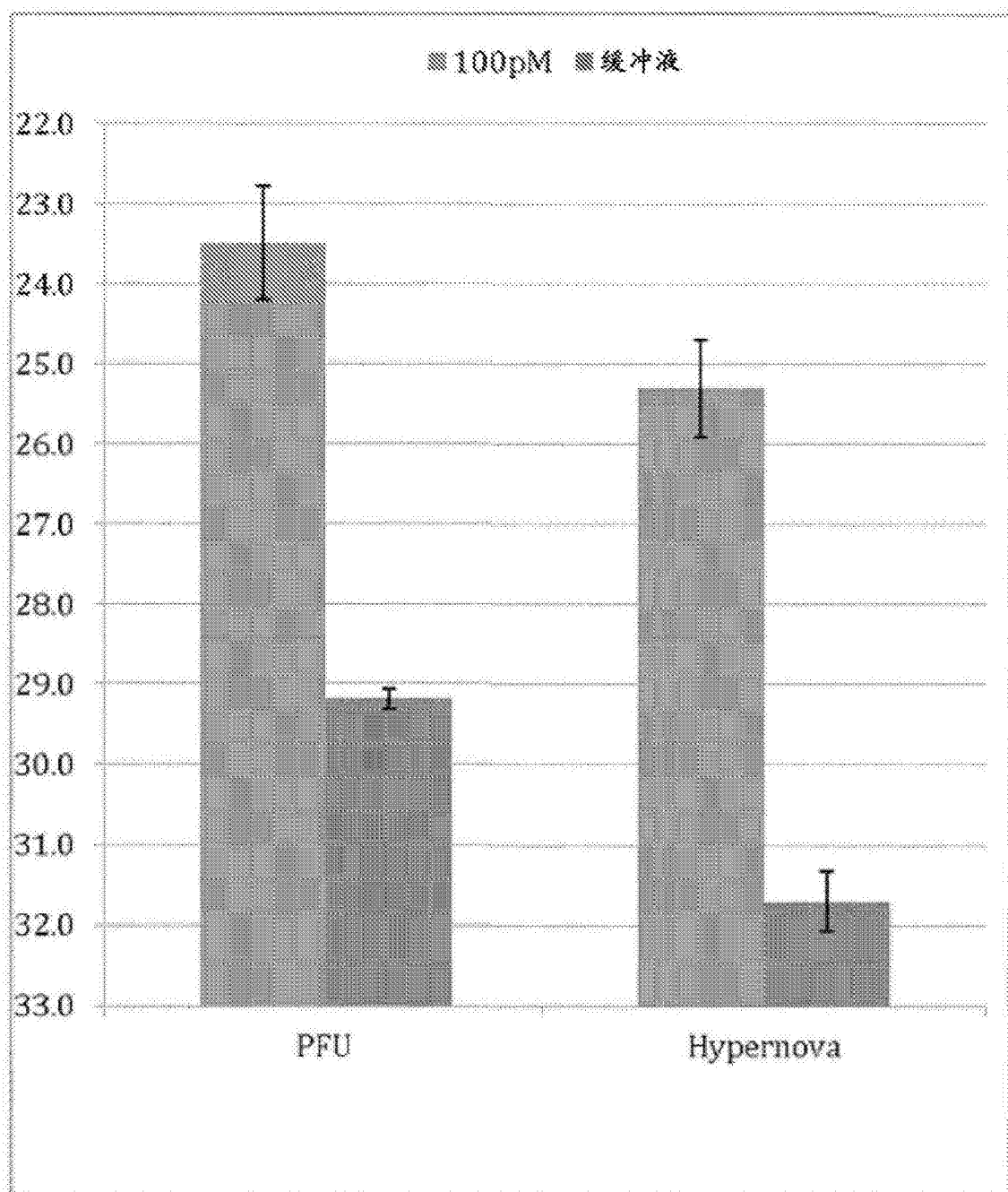


图8