



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105283561 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201480031785. 7

(22) 申请日 2014. 04. 04

(30) 优先权数据

61/808, 447 2013. 04. 04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 12. 03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/033062 2014. 04. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/165814 EN 2014. 10. 09

(71) 申请人 佐治亚州立大学研究基金会公司

地址 美国佐治亚州

(72) 发明人 黄真

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 韩蕾 姚亮

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

B82Y 5/00(2006. 01)

权利要求书3页 说明书31页

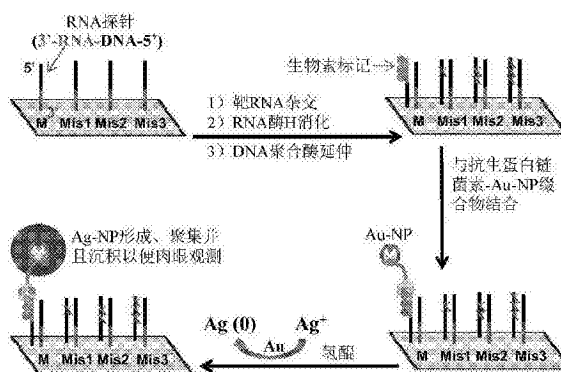
序列表7页 附图3页

(54) 发明名称

使用纳米粒子辅助信号放大的 RNA 微芯片检测

(57) 摘要

公开用于检测样品中的 RNA 的方法和材料。在一些形式中,所述方法涉及 (a) 使所述样品和探针阵列接触, (b) 使所述探针阵列和对 RNA/DNA 杂交体具有特异性的核糖核酸酶 (如 RNA 酶 H) 接触, (c) 使所述探针阵列、标记核苷酸以及能够使用 DNA 模板延伸 RNA 链并且能够在来自所述 RNA 链的延伸物中并入所述标记核苷酸的核酸聚合酶 (如克列诺 (Klenow) 片段 DNA 聚合酶) 接触, 以及 (d) 检测延伸核酸链中的所述标记核苷酸。所述探针阵列包含一个或多个嵌合探针。所述嵌合探针包含 DNA 区域和 RNA 区域, 其中所述 DNA 区域和所述 RNA 区域相邻, 并且其中所述 DNA 区域是所述 RNA 区域的 5'。所述嵌合探针还可以包括第二 DNA 区域。所述第二 DNA 区域还可以与所述 RNA 区域相邻并且可以是所述 RNA 区域的 3'。



1. 一种检测样品中的 RNA 的方法,所述方法包含:

(a) 使所述样品和探针阵列接触,其中所述探针阵列包含一个或多个嵌合探针,其中所述嵌合探针包含 DNA 区域和 RNA 区域,其中所述 DNA 区域和所述 RNA 区域相邻,其中所述 DNA 区域是所述 RNA 区域的 5',其中如果所述样品含有与所述嵌合探针中的至少一个的核苷酸序列互补的 RNA 分子,那么所述 RNA 分子将与所述互补嵌合探针杂交;

(b) 使所述探针阵列和对 RNA/DNA 杂交体具有特异性的核糖核酸酶接触,其中与所述嵌合探针的所述 DNA 区域杂交的所述 RNA 分子的部分被降解;

(c) 使所述探针阵列、标记核苷酸以及能够使用 DNA 模板延伸 RNA 链并且能够在来自所述 RNA 链的延伸物中并入所述标记核苷酸的核酸聚合酶接触,其中所述杂交 RNA 分子延伸形成延伸核酸链,其中至少一种标记核苷酸并入所述延伸核酸链中,其中所述标记核苷酸中的每一个包含第一标记;以及

(d) 通过使所述探针阵列和标记缀合物接触来检测所述延伸核酸链中的所述标记核苷酸,其中所述标记缀合物包含特异性结合分子和第二标记,其中所述特异性结合分子与所述第一标记结合,其中通过检测所述第二标记来检测所述延伸核酸链中的所述标记核苷酸,其中通过使所述探针阵列和检测缀合物接触来检测所述第二标记,其中所述检测缀合物包含聚集体,并且其中所述聚集体介导所述标记缀合物上的检测缀合物的聚集,

其中在所述延伸核酸链中检测到所述标记核苷酸表示所述样品中的所述 RNA 分子的存在。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中检测缀合物与所述第二标记缔合或结合。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述第二标记介导或允许所述检测缀合物在所述标记缀合物上和所述标记缀合物处聚集。

4. 根据权利要求 1 到 3 中任一权利要求所述的方法,其中所述检测缀合物包括或产生信号。

5. 根据权利要求 1 到 4 中任一权利要求所述的方法,其中所述检测缀合物包括标记的多个拷贝。

6. 根据权利要求 1 到 5 中任一权利要求所述的方法,其中多个检测缀合物与所述第二标记缔合或结合。

7. 根据权利要求 1 到 6 中任一权利要求所述的方法,其中所述检测缀合物自聚集。

8. 根据权利要求 1 到 7 中任一权利要求所述的方法,其中所述第一标记包含生物素,其中所述特异性结合分子包含抗生物素蛋白链菌素,其中所述第二标记包含金,并且其中所述聚集体包含银。

9. 根据权利要求 1 到 8 中任一权利要求所述的方法,其中步骤 (a)、(b) 以及 (c) 同时进行。

10. 根据权利要求 1 到 9 中任一权利要求所述的方法,其中所述标记缀合物包含与抗生物素蛋白链菌素缀合的金纳米粒子。

11. 根据权利要求 1 到 10 中任一权利要求所述的方法,其中所述检测缀合物包含银纳米粒子。

12. 根据权利要求 1 到 11 中任一权利要求所述的方法,其中所述核糖核酸酶是 RNA 酶 H,并且其中所述核酸聚合酶是 DNA 聚合酶的克列诺片段。

13. 根据权利要求 1 到 12 中任一权利要求所述的方法, 其中所述探针阵列进一步包含固态基质, 并且其中所述嵌合探针固定在所述固态基质上。

14. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述探针阵列包含一个以上嵌合探针, 其中各嵌合探针固定在所述固态基质的不同位置中, 其中各嵌合探针具有不同核苷酸序列, 其中各嵌合探针与不同 RNA 分子互补, 其中检测到的所述延伸核酸链中的所述标记核苷酸在所述固态基质上的所述位置表示所检测的所述 RNA 分子的特性。

15. 根据权利要求 1 到 14 中任一权利要求所述的方法, 其中所述嵌合探针是经稳定的核酸。

16. 根据权利要求 15 所述的方法, 其中所述 RNA 区域由 2'-O- 甲基核苷酸构成。

17. 根据权利要求 1 到 16 中任一权利要求所述的方法, 其中所述嵌合探针中的一个或多个与病毒、细菌或微生物特有的核苷酸序列互补。

18. 根据权利要求 1 到 17 中任一权利要求所述的方法, 其中所述嵌合探针中的一个或多个进一步包含第二 DNA 区域, 其中所述第二 DNA 区域是所述 RNA 区域的 3'。

19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中所述 DNA 区域和所述 RNA 区域相邻。

20. 根据权利要求 1 到 19 中任一权利要求所述的方法, 其中所述嵌合探针进一步包含 3'-连接基团, 其中所述连接基团介导所述嵌合探针的固定。

21. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述 3'-连接基团是氨基。

22. 一种包含探针阵列、标记核苷酸、标记缀合物以及检测缀合物的试剂盒,

其中所述探针阵列包含一个或多个嵌合探针, 其中所述嵌合探针包含 DNA 区域和 RNA 区域, 其中所述 DNA 区域和所述 RNA 区域相邻, 其中所述 DNA 区域是所述 RNA 区域的 5', 并且其中所述嵌合探针的核苷酸序列与相关 RNA 分子的核苷酸序列互补,

其中所述标记核苷酸中的每一个包含第一标记, 其中所述标记缀合物包含特异性结合分子和第二标记, 并且其中所述特异性结合分子与所述第一标记结合,

其中所述检测缀合物包含聚集体, 并且其中所述聚集体介导所述标记缀合物上的检测缀合物的聚集。

23. 根据权利要求 22 所述的试剂盒, 其中检测缀合物可以与所述第二标记缔合或结合。

24. 根据权利要求 22 或 23 所述的试剂盒, 其中所述第二标记可以介导或允许所述检测缀合物在所述标记缀合物上和所述标记缀合物处聚集。

25. 根据权利要求 22 到 24 中任一权利要求所述的试剂盒, 其中所述检测缀合物包括或可以产生信号。

26. 根据权利要求 22 到 25 中任一权利要求所述的试剂盒, 其中所述检测缀合物包括标记的多个拷贝。

27. 根据权利要求 22 到 26 中任一权利要求所述的试剂盒, 其中多个检测缀合物可以与所述第二标记缔合或结合。

28. 根据权利要求 22 到 27 中任一权利要求所述的试剂盒, 其中所述检测缀合物可以自聚集。

29. 根据权利要求 22 到 28 中任一权利要求所述的试剂盒, 其中所述探针阵列进一步包含固态基质, 并且其中所述嵌合探针固定在所述固态基质上。

30. 根据权利要求 22 到 29 中任一权利要求所述的试剂盒,其中所述探针阵列包含一个以上嵌合探针,其中各嵌合探针固定在所述固态基质的不同位置中,其中各嵌合探针具有不同核苷酸序列,并且其中各嵌合探针与不同 RNA 分子互补。

31. 根据权利要求 22 到 30 中任一权利要求所述的试剂盒,其中所述嵌合探针是经稳定的核酸。

32. 根据权利要求 31 所述的试剂盒,其中所述 RNA 区域由 2'-O- 甲基核苷酸构成。

33. 根据权利要求 22 到 32 中任一权利要求所述的试剂盒,其中所述嵌合探针中的一个或多个与病毒、细菌或微生物特有的核苷酸序列互补。

34. 根据权利要求 33 中任一权利要求所述的试剂盒,其中所述嵌合探针中的一个或多个进一步包含第二 DNA 区域,其中所述第二 DNA 区域是所述 RNA 区域的 3'。

35. 根据权利要求 34 所述的试剂盒,其中所述 DNA 区域和所述 RNA 区域相邻。

36. 根据权利要求 22 到 35 中任一权利要求所述的试剂盒,其中所述嵌合探针进一步包含 3'- 连接基团,其中所述连接基团介导所述嵌合探针的固定。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中所述 3'- 连接基团是氨基。

38. 一种包含一个或多个嵌合探针的探针阵列,其中所述嵌合探针包含 DNA 区域和 RNA 区域,其中所述 DNA 区域和所述 RNA 区域相邻,其中所述 DNA 区域是所述 RNA 区域的 5',并且其中所述嵌合探针的核苷酸序列与相关 RNA 分子的核苷酸序列互补。

39. 根据权利要求 38 所述的探针阵列,其中所述探针阵列进一步包含固态基质,并且其中所述嵌合探针固定在所述固态基质上。

40. 根据权利要求 38 或 39 所述的探针阵列,其中所述探针阵列包含一个以上嵌合探针,其中各嵌合探针固定在所述固态基质的不同位置中,其中各嵌合探针具有不同核苷酸序列,并且其中各嵌合探针与不同 RNA 分子互补。

41. 根据权利要求 38 到 40 中任一权利要求所述的探针阵列,其中所述嵌合探针是经稳定的核酸。

42. 根据权利要求 41 所述的探针阵列,其中所述 RNA 区域由 2'-O- 甲基核苷酸构成。

43. 根据权利要求 38 到 42 中任一权利要求所述的探针阵列,其中所述嵌合探针中的一个或多个与病毒、细菌或微生物特有的核苷酸序列互补。

44. 根据权利要求 43 中任一权利要求所述的探针阵列,其中所述嵌合探针中的一个或多个进一步包含第二 DNA 区域,其中所述第二 DNA 区域是所述 RNA 区域的 3'。

45. 根据权利要求 44 所述的探针阵列,其中所述 DNA 区域和所述 RNA 区域相邻。

46. 根据权利要求 38 到 45 中任一权利要求所述的探针阵列,其中所述嵌合探针进一步包含 3'- 连接基团,其中所述连接基团介导所述嵌合探针的固定。

47. 根据权利要求 46 所述的探针阵列,其中所述 3'- 连接基团是氨基。

使用纳米粒子辅助信号放大的 RNA 微芯片检测

[0001] 相关申请案的交叉参考

[0002] 本申请案要求 2013 年 4 月 4 日递交的第 61/808,447 号美国临时申请案的权益。2013 年 4 月 4 日递交的第 61/808,447 号申请案在此以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 序列表的参考

[0004] 依据 37C.F.R. § 1.52(e)(5), 以命名为“GSURF_2013_17_PCT_Sequence_Listing.txt”、于 2014 年 4 月 4 日创建并且大小为 4,889 字节的文本文件形式在 2014 年 4 月 4 日提交的序列表在此以引用的方式并入。

技术领域

[0005] 所公开的发明一般在核酸检测和分析领域中并且尤其在 RNA 检测和分析领域中。

背景技术

[0006] 自然大流行病(例如,西尼罗病毒(WNV)和流感大流行病)(普里普佐娃(Pripuzova)等人,公共科学图书馆·综合(PLoS One),7,e43246(2012);惠勒(Wheeler)等人,美国热带医学卫生(Am J Trop Med Hyg),87,559(2012);布劳特(Brault),医学昆虫学杂志(J Med Entomol),49,939(2012);科萨瓦拉珠(Kesavaraju)等人,美国热带医学卫生,87,359(2012))食物中毒爆发(如大肠杆菌(Escherichia coli)O157:H7)是对人类健康和生命的致命威胁。在护理点快速并且精确检测这些人类病原体为恰当医学治疗和挽救生命所必需。用于传染病快速诊断的病毒和细菌病原体检测是主要医疗挑战。举例来说,需要快速检测出 H1N1 流感、WNV、炭疽芽胞杆菌(bacillus anthracis)和病原性大肠杆菌以使爆发范围和爆发的致命影响减到最小。基于培养物的方法耗时并且在获得结论之前通常需要 2-3 天(马彻(March)和拉特曼(Ratnam),临床微生物学杂志(J Clin Microbiol),23,869(1986))。基于抗原-抗体的免疫分析(即,ELISA)无法有效地区别不同病毒株之间的细微差异,虽然其是快速并且稳健的。另一方面,基于核酸的检测方法,如实时聚合酶链反应(PCR)和 cDNA 阵列(巴斯汀(Bustin),分子内分泌学杂志(J Mol Endocrinol),25,169(2000);卡尔(Call),微生物学评论(Crit Rev Microbiol),31,91(2005);沃拉(Vora)等人,分子和细胞探针(Molecular and cellular probes),22,294(2008))可以检测单核苷酸差异并且提供较高检测特异性。然而,其未能直接检测 RNA,并且需要逆转录(RT)和多个步骤。PCR 扩增可能产生归因于缺乏严格的污染控制的假阳性结果。已研发出用于 DNA 检测的许多其它策略,如基于核酸序列的扩增(赵(Zhao)等人,临床微生物学杂志,47,2067(2009))、质谱分析(李(Li)等人,分析化学(Anal Chem),82,3399(2010))以及滚环扩增(穆拉卡米(Murakami)等人,核酸研究(Nucleic Acids Res),40,e22(2012))。

[0007] 此外,直接 RNA 检测的现用方法,如诺瑟印迹(Northern blot)、RNA 酶保护分析、微 RNA 谱分析以及直接 RNA 测序(纳尔逊(Nelson)等人,自然方法(Nat Methods),1,155(2004);桑德林(Sandelin)等人,基因株自然评论(Nat Rev

Genet), 8, 424 (2007); 奥索拉克 (Ozsolak), 自然 (Nature), 461, 814 (2009)) 是劳动密集型的、耗时、成本高的和 / 或仪器密集型的。这些途径并不非常适合于快速和精确 RNA 检测, 尤其是护理点诊断和现场应用。最近, 已展示基于表面等离子共振 (SPR) 的多重 RNA 生物传感器 (方 (Fang) 等人, 美国化学会志 (J Am Chem Soc), 128, 14044 (2006); 李等人, 朗缪尔 (Langmuir), 22, 5241 (2006)) 和基于锁核酸 (LNA) 的微 RNA 微阵列以及 Au- 纳米粒子缀合物 (卡斯托蒂 (Castoldi) 等人, RNA, 12, 913 (2006))。然而, RNA 样品制备和适宜检测仍是复杂并且耗时的, 其是用于护理点病原体和疾病诊断的直接 RNA 检测方面的主要挑战。

[0008] 本发明的一个目标是提供用于在不需要核酸扩增的情况下快速并且灵敏检测 RNA 的方法和组合物。

[0009] 本发明的另一个目标是提供用于在不需要昂贵和 / 或操作复杂的设备的情况下容易检测 RNA 的方法和组合物。

[0010] 本发明的另一个目标是提供用于检测病原体的方法和组合物。

发明内容

[0011] 公开用于检测样品中的 RNA 的方法和材料。在一些形式中, 所述方法涉及 (a) 使所述样品和探针阵列接触, (b) 使所述探针阵列和对 RNA/DNA 杂交体具有特异性的核糖核酸酶 (如 RNA 酶 H) 接触, (c) 使所述探针阵列、标记核苷酸以及能够使用 DNA 模板延伸 RNA 链并且能够在来自 RNA 链的延伸物中并入所述标记核苷酸的核酸聚合酶 (如克列诺片段 DNA 聚合酶) 接触, 以及 (d) 检测延伸核酸链中的所述标记核苷酸。所述探针阵列包含一个或多个嵌合探针。所述嵌合探针包含 DNA 区域和 RNA 区域, 其中所述 DNA 区域和所述 RNA 区域相邻, 并且其中所述 DNA 区域是所述 RNA 区域的 5'。所述嵌合探针还可以包括第二 DNA 区域。所述第二 DNA 区域还可以与所述 RNA 区域相邻并且可以是所述 RNA 区域的 3'。如果样品含有与嵌合探针中的至少一个的核苷酸序列互补的 RNA 分子, 那么 RNA 分子将与互补嵌合探针杂交。在一些形式中, 使样品和探针阵列接触, 使探针阵列和核糖核酸酶接触, 并且使探针阵列、标记核苷酸以及核酸聚合酶接触 (步骤 (a)、(b) 以及 (c)) 同时进行。

[0012] 在所述方法中, 所述样品中的 RNA 分子可以与具有互补序列的嵌合探针杂交。与嵌合探针的 DNA 区域杂交的 RNA 分子的部分被对 RNA/DNA 杂交体具有特异性的核糖核酸酶降解。杂交 RNA 分子可以接着延伸形成延伸核酸链, 其中嵌合探针的 DNA 区域用作模板。将至少一种标记核苷酸并入延伸核酸链中以用于标记。标记核苷酸包含第一标记。由于嵌合探针和与嵌合探针杂交的 RNA 分子之间的序列关系, 延伸核酸链中的标记核苷酸的检测表示样品中存在 RNA 分子。

[0013] 在方法的一些形式中, 标记和检测可以通过标记第一标记来增强。这可以例如通过使探针阵列和标记缀合物接触来实现, 其中标记缀合物包含特异性结合分子和第二标记, 并且其中所述特异性结合分子与第一标记结合。接着通过检测第二标记来检测延伸核酸链中的标记核苷酸。第一标记与标记缀合物的适用组合的一个实例是以生物素作为第一标记和以抗生物素链菌素缀合金纳米粒子作为标记缀合物。在这个实例中, 抗生物素链菌素是与第一标记 (生物素) 结合的特异性结合分子, 并且金纳米粒子是第二标记。

[0014] 通过使用可以聚集在第二标记位点上或位点处的另一种缀合物, 提高位点处的第二标记的量, 提高检测灵敏度并且使检测更容易。这可以例如通过使探针阵列和检测缀合

物接触来实现,其中检测缀合物包含聚集体,并且其中聚集体介导标记缀合物上检测缀合物的聚集。第二标记与检测缀合物的适用组合的一个实例是作为第二标记的金纳米粒子和作为检测缀合物的银纳米粒子。在这个实例中,银纳米粒子是聚集体。银纳米粒子与金纳米粒子反应以在金纳米粒子的位点处积聚银纳米粒子。反应的银纳米粒子的积聚可以有足够量以用肉眼检测到。

[0015] 在护理点处快速并且精确检测如 RNA 病毒的病原体将允许恰当治疗患者并且挽救生命。所公开的 RNA 微芯片可以在无逆转录和 PCR 扩增的情况下直接检测 RNA。所公开的 RNA 微芯片可以使用纳米粒子辅助信号放大。所公开的 RNA 微芯片技术是简单并且精确的,并且可以区别单一核苷酸差异。在一些形式中,可以在 1 小时内灵敏地检测 RNA,并且可以通过肉眼检测到信号。视觉读出格式和简单性使得所公开的 RNA 微芯片技术较适用于在诊所和具有最少资源的现场快速并且精确检测病原体。

[0016] 所公开的技术还可以用于检测并且分析来自单个或多个来源的任何 RNA 或 RNA 组合。举例来说,所述技术可以用于检测细胞和样品中的 RNA 表达谱。作为另一个实例,探针阵列可以包括一个或多个与例如病毒、细菌或微生物特有的核苷酸序列互补的嵌合探针。特有的核苷酸序列的检测表示存在对应病毒、细菌或微生物。

[0017] 可以通过使用嵌合探针固定到上面作为探针阵列的固态基质来帮助所公开的方法。特定嵌合探针的位置允许鉴别所检测的 RNA 分子,因为标记所检测到的位置处的嵌合探针的序列是已知的。通过在探针阵列上包括多个不同嵌合探针,可以检测多个不同 RNA 分子。可以通过在探针阵列上的相同位置处分组对不同 RNA 分子具有特异性的不同嵌合探针来共同地检测相关 RNA 分子。这可以简化例如具有可变序列的靶标的检测。

[0018] 在一些形式中,所述嵌合探针可以经稳定。如嵌合探针的经稳定的核酸可以例如使用抵抗降解的核酸的修饰核苷酸。适用的修饰核苷酸的实例包括 2'-O-甲基核苷酸。在一些形式中,嵌合探针还可以包括 3'-连接基团以促进或介导嵌合探针的固定。举例来说,3'-连接基团可以是氨基。

[0019] 还公开了探针阵列。适用于公开方法的探针阵列可以包含一个或多个所公开的嵌合探针。还公开了试剂盒。适用于所公开的方法的试剂盒可以包含探针阵列、标记核苷酸以及标记缀合物,全部都如本文中所公开。所述试剂盒还可以和/或替代地包括对 RNA/DNA 杂交体具有特异性的核糖核酸酶(如 RNA 酶 H)、能够使用 DNA 模板延伸 RNA 链并且能够在来自 RNA 链的延伸物中并入标记核苷酸的核酸聚合酶(如克列诺片段 DNA 聚合酶)或两种。

[0020] 所公开的方法和组合物的额外优势将部分阐述在其后描述中,并且部分将从所述描述理解,或可以由所公开的方法和组合物的实践习得。所公开的方法和组合物的优势将借助于尤其在所附权利要求书中指出的要素和组合来实现和获得。应理解,前文大体描述以及以下详细描述仅是示例性以及解释性的并且并不限制所要求的发明。

附图说明

[0021] 并入本说明书中并且构成其一部分的附图说明了所公开的方法和组合物的若干实施例,并且与说明书一起用来解释所公开的方法和组合物的原理。

[0022] 图 1 显示所公开的 RNA 微芯片和使用纳米粒子辅助信号放大的 RNA 视觉检测的实例。显示 RNA 快速并且直接的检测的流程图。RNA 探针与靶 RNA 杂交,继而 RNA 酶 H 消化并

且克列诺延伸并且并入生物素标记的 dNTP。抗生蛋白链菌素缀合 Au-NP 与生物素结合并且接着将生物素标记转换成 Au-NP 标记。Au-NP 催化 Ag-NP 形成和聚集以便用肉眼进行视觉检测（或借助于放大镜）。

[0023] 图 2A 显示在微芯片上利用单一核苷酸辨别的 RNA 直接检测。按顺序从上到下序列是 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:10 的核苷酸 1-13、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15 以及 SEQ ID NO:11。信号光点的尺寸大约是 75 微米，其是肉眼可见的（或借助于放大镜）。这一和其它 RNA 微芯片上的所有信号光点的尺寸类似。

[0024] 图 2B、2C、2D、2E 以及 2F 显示 RNA 微芯片和 RNA 视觉检测。(B) 在生物素化 dNTP 不存在下的 RNA 检测（阴性对照）。(C) 不存在 RNA（阴性对照）。(D) 使用天然 dNTP（阴性对照）。(E) 在 RNA 和生物素化 dNTP 存在下的 RNA 检测。(F) 利用单一核苷酸辨别的 RNA 检测。信号光点（大约 75 微米）是肉眼可见的。这一和其它 RNA 微芯片上的所有信号光点的尺寸类似。

[0025] 图 3A、3B、3C、3D、3E 以及 3F 显示利用所公开的 RNA 微芯片的一个实例的特异性和个别 mRNA 检测。RNA 微芯片用 RNA 探针固定。BF、AF、LacZ 以及 BA 探针分别检测鸟流感（BF）RNA、禽流感（AF）RNA、LacZ RNA 以及炭疽芽胞杆菌（BA）RNA。通过将生物素标记的 dNTP 特异性并入靶 RNA 中来检测靶 RNA。(A) 样品含有 BA RNA。(B) 样品含有 LacZ 和 BA RNA。(C) 样品含有 BF、AF 以及 LacZ RNA。(D) 样品含有所有 RNA。(E) 总 RNA 中的个别 RNA (LacZ mRNA) 的检测。芯片 I：水（无 RNA；阴性对照）；芯片 II：从 IPTG 诱导的大肠杆菌中分离的总 RNA（含有 LacZ）；芯片 III：从葡萄糖抑制的大肠杆菌中分离的总 RNA（不含有 LacZ）。(F) 经由 NaOH 直接处理大肠杆菌的简单 RNA 样品制备检测个别 RNA (LacZ mRNA)。芯片 I：水（无 RNA；阴性对照）；芯片 II 和 III：分别是经 NaOH 处理的用 IPTG 诱导的大肠杆菌以及葡萄糖抑制的大肠杆菌。

[0026] 图 4 显示作为探针固定的一个实例的玻璃微芯片表面的活化。表面化学反应实现胺修饰嵌合探针的固定。

[0027] 图 5A、5B、5C、5D 以及 5E 显示利用所公开的 RNA 微芯片的一个实例的灵敏并且快速的 RNA 检测。(A) 灵敏检测。芯片 1-5 分别含有 0、5、15 和 50 飞摩尔的 LacZ RNA。(B) 经由合并 RNA 酶 H 和克列诺步骤的 RNA 检测。(C) 经由合并杂交、RNA 酶 H 和克列诺步骤（15 分钟培育用于组合的步骤）的 RNA 检测。(D) 快速 RNA 检测（45 分钟内，包括 RNA 样品制备）。生物素化寡核苷酸 -35.2（阳性对照）；BA 探针（阴性对照）未检测到大肠杆菌 RNA。(E) 在用 70% 乙醇处理 IPTG 诱导细胞 0、30、45 和 60 分钟之后大肠杆菌 RNA (LacZ RNA) 的检测。葡萄糖抑制的大肠杆菌细胞 (Glu) 用作阴性对照。

具体实施方式

[0028] 参考特定实施例和其中所包括的实例的以下详细描述以及图和其先前和以下描述，可以更容易理解所公开的方法和组合物。

[0029] 微阵列技术呈现用于分析细胞群体的特异性 mRNA 的有力工具。DNA 微阵列的效用受其 RNA 非直接分析限制，所述 RNA 非直接分析增加了处理时间以及多个偏差和人为因素。RNA 的直接检测仍是个挑战，因为 RNA 易于降解，并且标记 RNA 混合物中的特异性 RNA 是困

难的。公开了用于例如病原体 and 病毒 RNA 检测的直接、快速、特异性、易于使用、经济并且灵敏的微芯片。通过使用核酸酶、聚合酶以及纳米材料,可以在无逆转录的情况下检测特异性 RNA。在所述方法的多靶标形式中,检测方法是特异性的并且可以在小于一小时内实现。所公开的技术可以用于检测并且分析多种领域,包括例如传染病诊断、食品安全、基因表达谱分析以及癌症检测方面的特异性 mRNA。

[0030] 在一些形式中,所公开的 RNA 检测系统是简单的:在靶 RNA 与用 RNA 探针固定的 RNA 微芯片杂交之后(斯潘塞(Spencer)等人,化学生物化学(ChemBioChem), 11, 1378(2010)),结合的 RNA 用 RNA 酶 H 消化并且通过克列诺 DNA 聚合酶用生物素标记的 dNTP 延伸。使用抗生蛋白链菌素与金纳米粒子的缀合物(Au-NP),接着将并入靶 RNA 中的生物素标记转换成 Au-NP 标记。Au-NP 可以经由银染色催化形成银纳米粒子(Ag-NP)(塔东(Taton), 科学(Science), 289, 1757(2000);曹(Cao)等人,生物传感器和生物电子学(Biosens Bioelectron), 22, 393(2006);齐(Qi)等人,分析和生物分析化学(Anal Bioanal Chem), 398, 2745(2010);唐(Tang)等人,诊断微生物学与传染病(Diagn Microbiol Infect Dis), 65, 372(2009);周(Zhou)等人,美国化学会志, 132, 6932(2010)),允许信号放大高达 100 倍。所形成的 Ag-NP(图 1 和 2)聚集并且沉积为 RNA 探针位点上的暗点。最后,将形成大量这些暗点的图像以便直接视觉观测。此外,我们发现,这一 RNA 微芯片可以在较低飞摩尔水平下区别单一核苷酸差异并且检测 RNA。RNA 检测系统是基于我们的 RNA 3'-标记途径,其中 DNA 聚合酶直接将标记的 dNTP 并入 DNA 模板上的 RNA(黄(Huang)和阿塞蒂(Alsaiddi),分析生物化学(Analytical Biochemistry), 322, 269(2003);阿塞蒂等人,化学生物化学, 5, 1136(2004))。为了直接检测 RNA,我们设计了官能化 RNA 作为 RNA 探针。RNA 探针由 RNA 3'-区域和 DNA 5'-区域组成(图 1 和 2)。

[0031] 公开用于检测样品中的 RNA 的方法和材料。在一些形式中,所述方法涉及(a)使所述样品和探针阵列接触,(b)使所述探针阵列和对 RNA/DNA 杂交体具有特异性的核糖核酸酶(如 RNA 酶 H)接触,(c)使所述探针阵列、标记核苷酸以及能够使用 DNA 模板延伸 RNA 链并且能够在来自 RNA 链的延伸物中并入所述标记核苷酸的核酸聚合酶(如克列诺片段 DNA 聚合酶)接触,以及(d)检测延伸核酸链中的所述标记核苷酸。所述探针阵列包含一个或多个嵌合探针。所述嵌合探针包含 DNA 区域和 RNA 区域,其中所述 DNA 区域和所述 RNA 区域相邻,并且其中所述 DNA 区域是所述 RNA 区域的 5'。如果样品含有与嵌合探针中的至少一个的核苷酸序列互补的 RNA 分子,那么 RNA 分子将与互补嵌合探针杂交。在一些形式中,嵌合探针还可以包括 3'-连接基团以促进或介导嵌合探针的固定。举例来说,3'-连接基团可以是氨基。

[0032] 应理解,除非另外规定,否则所公开的方法和组合物不限于特定合成方法、特定分析技术或特定试剂,并且因而可以改变。还应理解,本文所使用的术语仅出于描述特定实施例的目的,并且并不意图作为限制。

[0033] 材料

[0034] 公开了可以用于所公开的方法和组合物、可以与其结合使用、可以用于制备其或是其产物的材料、组合物以及组分。本文公开了这些和其它材料,并且应理解,当公开这些材料的组合、子集、相互作用、基团等时,虽然可能未明确公开各个不同个体和集体组合和

这些化合物的排列的特定参考,但在本文中尤其涵盖并且描述各者。举例来说,如果公开并且论述了嵌合探针并且论述了可以对包括嵌合探针的多种分子作出的多种修饰,那么除非特定相反说明,否则尤其涵盖嵌合探针和可能修饰的每一个组合和排列。因此,如果公开一类分子 A、B 和 C 以及一类分子 D、E 和 F,并且公开组合分子 A-D 的一个实例,那么即使未单独地叙述各者,也单独地和共同地涵盖各者。因此,在这个实例中,尤其涵盖每个组合 A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E 以及 C-F 并且应将其视为从 A、B 和 C;D、E 和 F 以及示例性组合 A-D 的公开内容公开。同样地,还尤其涵盖并且公开这些的任何子集或组合。因此,举例来说,尤其涵盖 A-E、B-F 和 C-E 的子群并且应将其视为从 A、B 和 C;D、E 和 F 以及示例性组合 A-D 的公开内容公开。此外,如上文所涵盖和公开的材料、组合物、组分等中的每一个还可以特定地并且独立地包括此类材料的任何群组、子组、清单、集合等或从其中排除。这些概念适用于本申请案的所有方面,包括(但不限于)制得并且使用所公开的组合物的方法中的步骤。因此,如果存在多个可以执行的额外步骤,那么应理解,这些额外步骤中的每一个可以与所公开的方法的任何特定实施例或实施例的组合一起执行,并且特定地涵盖各此类组合并且应将其视为被公开的。

[0035] A. 嵌合探针

[0036] 嵌合探针是可以序列特异性方式与 RNA 分子杂交的寡核苷酸。嵌合探针包含 DNA 区域和 RNA 区域,其中 DNA 区域和 RNA 区域相邻,并且其中 DNA 区域是 RNA 区域的 5'。在一些形式中,嵌合探针还可以包括第二 DNA 区域。在一些形式中,第二 DNA 区域还可以与 RNA 区域相邻并且可以是 RNA 区域的 3'。在所公开的方法中,嵌合探针用于基于 RNA 分子中所存在的互补序列捕获 RNA 分子。嵌合探针的 DNA 区域允许在嵌合探针与相关 RNA 分子之间形成 RNA/DNA 杂交体。这允许 DNA/RNA 杂交体中的 RNA 链被 DNA/RNA 杂交体特异性核糖核酸酶(如 RNA 酶 H)选择性地降解。

[0037] 为了促进所公开的方法中的嵌合探针的功能,与嵌合探针的 RNA 区域相邻的全部或部分 DNA 区域和与嵌合探针的 DNA 区域相邻的全部或部分 RNA 区域与相关 RNA 分子中的相邻序列互补。换句话说,跨越嵌合探针的 RNA 区域和 DNA 区域的连接点的嵌合探针的核苷酸序列与相关 RNA 分子中的序列互补。这允许一部分 RNA 分子与嵌合探针的 RNA 区域杂交以及 RNA 分子的另一相邻部分与嵌合探针的 DNA 区域杂交。RNA 分子的杂交部分将跨越嵌合探针的 RNA 区域和 DNA 区域的连接点。

[0038] 嵌合探针还可以包括间隔子、连接子、连接基团以将嵌合探针连接到基质和额外核酸区域上。这些额外组分可以用于适合的目的以便帮助生产或处理嵌合探针并且帮助将嵌合探针固定在基质上以形成探针阵列。一些额外组分可能是制得嵌合探针的方法的副产物。嵌合探针的这些额外组分的性质一般对于所公开的方法中的嵌合探针的功能并不是关键的。所有所需的是嵌合探针可以与相关 RNA 分子杂交并且所述方法的酶可以作用于杂交体。

[0039] 嵌合探针可以并且优选固定在基质上。嵌合探针无需由天然存在的核苷酸构成。可以使用修饰核苷酸、非天然碱基和核苷酸以及寡核苷酸类似物。所有所需的是探针具有本文所描述的通用结构并且能够进行所公开的方法中所需的相互作用和反应。具体来说,嵌合探针可以是经稳定的核酸。如本文所使用,经稳定的核酸是包括一个或多个相对于天然核酸的修饰的核酸,所述修饰使得核酸不易于降解或裂解。

[0040] 为了促进或介导嵌合探针的固定,嵌合探针可以包括 3'-连接基团。如本文所使用,3'-连接基团是促进或介导连接到基质的基团或部分。举例来说,3'-连接基团可以是氨基。

[0041] 嵌合探针优选包括互补部分(也称为探针部分(用于与样品片段杂交))和连接体部分,探针部分通过其偶联到基质。这些连接体部分可以具有任何适合的结构并且一般将基于嵌合探针的固定或合成方法进行选择。连接体部分可以由核苷酸组成或包括核苷酸。连接体部分可以具有任何适合的长度并且优选具有足够的长度以允许探针部分有效地杂交。为方便起见并且除非另外指明,否则提及嵌合探针的长度是指探针的探针部分的长度。固定的嵌合探针是固定在载体上的嵌合探针。

[0042] 嵌合探针可以用于具有多种探针序列的集合,如对应于多种靶 RNA 分子的探针的集合。举例来说,嵌合探针的集合共同地可以与对一组病原体具有特异性的 RNA 序列互补。嵌合探针可以用于各探针具有相同长度的集合中。嵌合探针的互补部分的优选长度是 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、和 30 个核苷酸。当 DNA/RNA 杂交体中的 RNA 分子的序列降解时,嵌合探针的 RNA 区域的互补部分优选足以与靶 RNA 分子形成稳定的杂交体。嵌合探针的 RNA 区域的互补部分的优选长度是 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 和 20 个核苷酸。

[0043] 嵌合探针无需由天然存在的核苷酸构成。可以使用修饰核苷酸、非天然碱基和核苷酸以及寡核苷酸类似物。所有所需的是引物具有本文所描述的通用结构并且能够进行所公开的方法中所需的相互作用和反应。嵌合探针的 DNA 区域一般可以由脱氧核糖核苷酸组成。可以使用修饰形式的核苷酸,只要 RNA 区域的 DNA 区域 5' 与 RNA 分子之间的杂交体被识别出并且用作 DNA/RNA 杂交体特异性核糖核酸酶的基质。经修饰的磷酸酯键可以在修饰的这一范畴内。

[0044] 嵌合探针的 RNA 区域一般可以由核糖核苷酸组成。可以使用修饰形式的核苷酸,只要 RNA 区域可以与靶 RNA 序列杂交以及只要 RNA 区域与 RNA 分子之间的杂交体不被识别出并且用作 DNA/RNA 杂交体特异性核糖核酸酶的基质。衍生化 2'-羟基和经修饰的磷酸酯键可以在修饰的这一范畴内。举例来说,探针的 RNA 区域中的多个核苷酸中的一个可以是 2'-O-甲基核糖核苷酸。

[0045] 如本文所使用,核糖核苷酸是具有 2' 羟基功能的核苷酸。类似地,2'-脱氧核糖核苷酸是仅具有 2' 氢的核苷酸。因此,如本文所使用的核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸是指分别具有核苷组分腺苷、鸟苷、胞苷以及尿苷或 2'-脱氧腺苷、2'-脱氧鸟苷、2'-脱氧胞苷以及胸苷的天然存在的核苷酸,而无任何化学修饰。

[0046] B. 探针阵列

[0047] 不同嵌合探针可以一起使用作为一组。所述集合可以用作探针的所有或子集、单独反应中所单独使用或固定在阵列中的探针的混合物。单独使用或作为混合物的探针可以通过例如使用第一标记、分选标签或固定在珠粒上来实现物理分离。探针阵列(在本文中也称作阵列)包括多个探针,如固定在阵列上所鉴别或预定的位置处的嵌合探针。在此上下文中,多个探针是指各具有不同序列的多个探针。阵列上的各预定位置具有一种类型的探针(即,在具有相同序列的所述位置处的所有探针)。各位置将具有探针的多个拷贝。所述阵列中的不同序列的探针的空间分离允许与探针杂交的 RNA 分子的单独检测和鉴别。

如果在探针阵列中的给定位置处检测到 RNA 分子,那么其表示与片段所杂交的核酸片段中的位点相邻的序列与固定在所述阵列中的所述位置处的探针互补。

[0048] 适用于探针阵列的固态基质可以包括寡核苷酸可以直接或间接偶联的任何固体材料。这包括了如丙烯酰胺、纤维素、硝化纤维素、玻璃、硅、聚苯乙烯、聚乙烯乙酸乙烯酯、聚丙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯、聚氧化乙烯、玻璃、聚硅酸盐、聚碳酸酯、铁氟龙 (teflon)、碳氟化合物、尼龙、硅橡胶、聚酸酐、聚乙醇酸、聚乳酸、聚原酸酯、聚丙基富马酸酯、胶原蛋白、葡糖胺聚糖以及聚氨基酸的材料。固态基质可以具有任何适用的形式,包括薄膜或膜、珠粒、瓶子、盘、纤维、编织纤维、成形聚合物、粒子以及微米粒子。固态基质的优选形式是硅芯片、载玻片以及微量滴定盘。

[0049] 用于将寡核苷酸固定到固态基质上的方法是良好确立的。嵌合探针可以使用所确立的偶联方法偶联到基质。连接方法的实例包括氨基修饰的寡核苷酸,其可以连接到例如环氧硅烷或异硫氰酸酯涂布的玻璃;丁二酰化寡核苷酸,其可以连接到例如氨基苯基或氨基苯基衍生的玻璃;二硫修饰的寡核苷酸,其可以连接到例如巯基硅烷化玻璃;以及肼,其可以连接到例如醛或环氧化物。示例性适合的连接方法由以下描述:集成 DNA 技术公司 (Integrated DNA Technologies),“用于将寡核苷酸连接到固体载体上的策略 (Strategies for Attaching Oligonucleotides to Solid Supports)”(2011);郭 (Guo) 等人,核酸研究 22:5456-5465(1994);皮斯 (Pease) 等人,美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 91(11):5022-5026(1994);拉普科 (Khrapko) 等人,分子生物学 (Mol Biol) (莫斯科 (Mosk)) (USSR) 25:718-730(1991);斯丁普森 (Stimpson) 等人,美国国家科学院院刊 92:6379-6383(1995);福多 (Fodor) 等人的第 5,871,928 号美国专利;勃伦那 (Brenner) 的第 5,654,413 号美国专利;第 5,429,807 号美国专利;以及皮斯等人的第 5,599,695 号美国专利。

[0050] 虽然是优选的,但探针阵列无需是单一单元或结构。探针集合可以分布在任何数量的固体载体上。举例来说,在一个极端,各探针可以固定在单独的反应管或容器中。分选标签是化合物,其可以用于从不具有分选标签的那些分选或分离出具有分选标签的化合物或复合物,其可以用于分选并且分离多部分探针阵列的部分的不同基团。

[0051] 阵列中的探针还可以经设计以具有类似的杂交稳定性。这将使 RNA 分子与嵌合探针的杂交更有效并且减少错配杂交的发生率。探针的杂交稳定性可以使用已知热力学公式和原理计算(参见例如桑塔露西娅 (Santa Lucia) 等人,生物化学 (Biochemistry) 35:3555-3562(1996);弗赖尔 (Freier) 等人,美国国家科学院院刊 83:9373-9377(1986);布雷斯劳尔 (Breslauer) 等人,美国国家科学院院刊 83:3746-3750(1986))。可以通过例如化学修饰探针(阮 (Nguyen) 等人,核酸研究 25(15):3059-3065(1997);霍斯赛尔 (Hohsisel),核酸研究 24(3):430-432(1996))来使探针的杂交稳定性更类似(可以称为平稳杂交稳定性的工艺)。杂交稳定性还可以通过在专门条件下进行杂交来平稳(阮等人,核酸研究 27(6):1492-1498(1999);伍德 (Wood) 等人,美国国家科学院院刊 82(6):1585-1588(1985))。

[0052] 使探针的杂交稳定性平稳的另一种方式是改变探针长度。这将允许调节各探针的杂交稳定性以(尽可能地)使得所有探针具有类似的杂交稳定性。因为从探针添加或缺失单一核苷酸使探针的杂交稳定性改变固定的增量,应理解,探针阵列中的探针的杂交稳定

性将不相等。由于这个原因,如本文所使用的杂交稳定性的类似性是指探针的杂交稳定性的类似性的任何提高(或换言之,探针的杂交稳定性的差异的任何减少)。这是适用的,因为杂交稳定性方面的任何此类提高的类似性可以改进杂交的效率和保真度以及嵌合探针的偶联。

[0053] 杂交效率和嵌合探针与样品片段的偶联还可以通过分组在可以经受不同杂交条件的探针阵列的区段或片段中具有类似杂交稳定性的嵌合探针来改进。以此方式,杂交条件可以针对特定类别的探针优化。

[0054] C. 样品

[0055] 所公开的方法可以用于检测和分析来自任何来源的任何 RNA 分子。因此,用于所公开的方法的 RNA 分子和含有 RNA 分子的样品的来源较广泛。适用于所公开的方法的样品一般可以是含有或可能含有 RNA 分子的任何样品。

[0056] 来自任何来源的任何样品都可以与所公开的方法一起使用。适合的靶样品的实例包括细胞样品、组织样品、细胞提取物、从另一种样品纯化的组分或馏份、环境样品、培养物样品、组织样品、体液以及活检体样品。已知或可以产生诸多其它来源的样品并且任一个都可以与所公开的方法一起使用。适用于所公开的方法的优选样品是细胞和组织的样品。

[0057] D. 标记核苷酸

[0058] 所公开的方法利用并入延伸核酸链中的标记(称为“第一标记”)。在所述方法中,此并入通过在所述链延伸期间并入标记核苷酸来实现。用于并入聚合的核酸中的标记核苷酸是熟知的并且可以用于所公开的方法。可以使用任何标记和任何标记核苷酸(可以通过核酸聚合酶并入)。然而,所公开的方法一般利用的第一标记为标记对的成员。标记对是彼此结合或相互作用的化合物对。生物素和抗生物素以及抗体和其半抗原是标记对的实例。第一标记优选是标记对的一个成员(标记对的另一个成员应用作标记缀合物中的特异性结合分子)。可以选择标记对和第一标记以使得用第一标记标记或衍生的核苷酸可以并入核酸聚合酶所合成的核酸链中。适用的标记核苷酸包括生物素化核苷酸、含地高辛(digoxigenin)核苷酸、含二硝基苯酚核苷酸、溴脱氧尿苷以及荧光核苷酸(如含荧光素核苷酸)。

[0059] 第一标记是并入所公开的方法中的延伸核酸链中并且特异性结合分子可以缔合的分子或部分。第一标记可以是充当特异性结合分子缔合靶标的任何类型的分子或部分。

[0060] E. 标记缀合物

[0061] 在所公开的方法中使用标记缀合物以使第二标记与并入延伸核酸链中的标记核苷酸缔合(因此使第二标记与所延伸的 RNA 分子缔合)。其充当待检测 RNA 分子与用于提高检测信号的检测缀合物之间的桥。标记缀合物是特异性结合分子和第二标记的缀合物。选择标记缀合物中的特异性结合分子以与第一标记缔合或结合。选择标记缀合物中的第二标记以与检测缀合物缔合或结合。标记缀合物可以具有任何结构和任何额外组分,其与所公开的方法中的标记缀合物的功能一致。

[0062] 如本文所使用,特异性结合分子是特异性地与特定分子或部分相互作用的分子。特异性地与特异性结合分子相互作用的分子或部分在本文中称为靶分子。一般来说,在所公开的方法的情况下第一标记是靶分子。应理解,术语靶分子指代单独的分子和分子部分

两者,如特异性地与特异性结合分子相互作用的蛋白质的抗原决定基。抗体(或受体/配体对的成员)和具有特异性结合亲和力的其它分子是特异性结合分子的实例,其适用作报告子结合分子的亲和性部分。

[0063] 任何特异性结合分子都可以用于所公开的标记缀合物中。然而,所公开的方法一般利用是标记对的成员的特异性结合分子。特异性结合分子优选是标记对的一个成员(标记对的另一个成员应用作第一标记)。可以选择标记对和特异性结合分子以使得用对应第一标记标记或衍生的核苷酸可以并入核酸聚合酶所合成的核酸链中。特异性结合分子是为标记缀合物的一部分并且第一标记可以缔合的分子或部分。优选特异性结合分子包括抗生蛋白链菌素、地高辛特异性抗体、二硝基苯酚特异性抗体、溴脱氧尿苷特异性抗体以及荧光素特异性抗体。

[0064] 特异性地与特定靶分子相互作用的特异性结合分子据称对所述靶分子具有特异性。举例来说,在特异性结合分子是与特定抗原结合的抗体的情况下,特异性结合分子据称对抗原具有特异性。抗原是靶分子。含有特异性结合分子的标记缀合物还可以被称为对特定靶分子(如特定第一标记)具有特异性。特异性结合分子优选是抗体、配体、结合蛋白、受体蛋白、半抗原、适体、碳水化合物、合成聚酰胺或寡核苷酸。

[0065] 适用作例如特异性结合分子、第一标记以及第二标记的抗体可以在商业上获得或使用良好确立的方法产生。举例来说,约翰斯通(Johnstone)和索普(Thorpe),实用免疫化学(Immunochemistry In Practice)(布莱克威尔科学公开案(Blackwell Scientific Publications),牛津(Oxford),英国(England),1987)在第30-85页描述了适用于生产多株和单株抗体两种的一般方法。整本书描述了许多关于分析系统中抗体的使用的一般技术和原理。

[0066] 任何标记都可以用作第二标记。第二标记是为标记缀合物的一部分并且检测缀合物可以缔合的分子或部分。第二标记是可以充当检测缀合物缔合靶标的任何类型的分子或部分。优选地,第二标记还介导或允许检测缀合物在标记缀合物上和标记缀合物处聚集。优选的第二标记包括金、金纳米粒子以及其它金缀合物。

[0067] F. 检测缀合物

[0068] 在所公开的方法中使用检测缀合物以使可检测信号与杂交并且延伸的RNA分子缔合。检测缀合物与标记缀合物中的第二标记缔合或结合。检测缀合物可以包括或产生任何信号。优选地,检测缀合物在第二标记上并且在第二标记周围聚集,其影响是多个检测缀合物更容易被检测到。检测缀合物还可以包括标记的多个拷贝以使得一个检测缀合物的缔合使许多标记与标记缀合物缔合。

[0069] 聚集可以任何适合方式实现。举例来说,可以选择第二标记以使得多个检测缀合物可以与第二标记缔合或结合。检测缀合物的缔合可以经由例如结合、共价偶联或化学反应。或者,或另外,检测缀合物可以自聚集。检测缀合物的聚集可以经由聚集体。聚集体是一种化合物,其多个拷贝可以与单一标记缀合物结合或缔合。

[0070] 适用的检测缀合物是银纳米粒子。当与作为第二标记的金纳米粒子一起使用时,银纳米粒子与金纳米粒子反应并且在金纳米粒子上聚集。举例来说,银可能在金存在下还原,其中所述还原导致银累积在金表面上。

[0071] G. 标记

[0072] 标记可以用于产生检测信号。标记是可以包括或直接或间接并入延伸核酸链、标记缀合物或检测缀合物中并且直接或间接产生可测量、可检测的信号的任何分子。当将标记与组分共价或非共价偶联或结合时,其与所述组分缔合。当标记与组分共价偶联时,其与组分偶联。已知许多用于并入核酸中、与其偶联或缔合的适合的标记。适用于所公开的方法中的标记的实例是放射性同位素、荧光分子、磷光分子、生物发光分子、酶、抗体以及配体。

[0073] 适合的荧光标记的实例包括荧光素 (FITC)、5,6-羧甲基荧光素、德克萨斯红 (Texas red)、硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-基 (NBD)、香豆素、丹磺酰氯、罗丹明 (rhodamine)、4'-6-二甲脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 以及花青染料 Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5 以及 Cy7。优选荧光标记是荧光素 (5-羧基荧光素-N-羧基琥珀酰亚胺酯) 和罗丹明 (5,6-四甲基罗丹明)。用于同时检测的优选荧光标记是 FITC 和花青染料 Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5 以及 Cy7。对于这些荧光剂来说吸收和发射最大值分别是: FITC (490nm ; 520nm)、Cy3 (554nm ; 568nm)、Cy3.5 (581nm ; 588nm)、Cy5 (652nm ; 672nm)、Cy5.5 (682nm ; 703nm) 以及 Cy7 (755nm ; 778nm), 因此允许其同时检测。可以获自多种商业来源的荧光标记包括俄勒冈州尤金的分子探针公司 (Molecular Probes, Eugene, OR) 和俄亥俄州克利夫兰的研究有机物公司 (Research Organics, Cleveland, Ohio)。

[0074] 标记核苷酸是标记的优选形式,因为其可以直接在合成期间并入核酸中。可以并入 DNA 或 RNA 中的标记的实例包括核苷酸类似物,如 BrdUrd (霍伊 (Hoy) 和斯齐克 (Schimke), 突变研究 (Mutation Research) 290:217-230 (1993))、BrUTP (万西克 (Wansick) 等人, 细胞生物学杂志 (J. Cell Biology) 122:283-293 (1993)) 以及经生物素 (兰格 (Langer) 等人, 美国国家科学院院刊 78:6633 (1981)) 或适合的半抗原 (如地高辛) (克霍夫 (Kerkhof), 分析生物化学 (Anal. Biochem.) 205:359-364 (1992)) 修饰的核苷酸。适合的荧光标记核苷酸是荧光素-异硫氰酸酯-dUTP、花青-3-dUTP 以及花青-5-dUTP (余 (Yu) 等人, 核酸研究, 22:3226-3232 (1994))。DNA 的优选核苷酸类似物检测标记是 BrdUrd (BUDR 三磷酸酯, 西格马 (Sigma)), 并且 RNA 的优选核苷酸类似物检测标记是生物素-16-尿苷-5'-三磷酸酯 (生物素-16-dUTP, 勃林格曼海姆 (Boehringer Mannheim))。荧光素、Cy3 以及 Cy5 可以连接到 dUTP 以便直接标记。Cy3.5 和 Cy7 可以抗生物素蛋白或抗地高辛缀合物获得以用于生物素或地高辛标记的探针的次级检测。

[0075] 并入核酸中的标记 (如生物素) 可以随后使用所属领域中众所周知的灵敏方法检测。举例来说,生物素可以使用抗生物素蛋白链菌素-碱性磷酸酶缀合物 (特洛匹克斯公司 (Tropix, Inc.)) 检测,其与生物素结合并且随后通过适合的基质 (例如,化学发光基质 CSPD:二钠,3-(4-甲氧基螺-[1,2,-二氧杂环丁烷-3-2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷]-4-基)苯基磷酸;特洛匹克斯公司)的化学发光检测到。

[0076] 其它标记包括分子或金属条码、质量标记以及通过核磁共振、电子顺磁共振、表面增强拉曼分散、表面等离子共振、荧光、磷光、化学发光、共振拉曼、微波或组合可检测的标记。质量标记是具有或产生标记组分 (质谱分析中独特的质量标签) 的化合物或部分。当质谱分析用于检测时质量标记是适用的。优选的质量标记是肽核酸和碳水化合物。标记的组合也可以是适用的。举例来说,具有例如 265 个唯一的标记组合的经颜色编码的微珠适用于区分诸多组分。举例来说,256 种不同嵌合探针可以独特地标记和检测,允许所公开的方法的多重化和自动化。

[0077] 适用的标记描述在德哈斯 (de Haas) 等人, "作为时间分辨显微法的磷光标记的铂卟啉 (Platinum porphyrins as phosphorescent label for time-resolved microscopy)," 组织化学与细胞化学杂志 (J.Histochem. Cytochem.) 45(9):1279-92(1997); 卡尔格 (Karger) 和盖斯特兰 (Gesteland), "使用电荷耦合装置摄像机的 DNA 测序印迹的数字化学发光成像 (Digital chemiluminescence imaging of DNA sequencing blots using a charge-coupled device camera)," 核酸研究 20(24):6657-65(1992); 凯斯 (Keyes) 等人, "如五原子系留自旋标记所监测的 DNA 的总体和内部动力学 (Overall and internal dynamics of DNA as monitored by five-atom-tethered spin labels)," 生物物理杂志 (Biophys. J.) 72(1):282-90(1997); 施泰因 (Kirschstein) 等人, "借助于时间分辨荧光方法检测 CFTR 基因中的 DeltaF508 突变 (Detection of the DeltaF508 mutation in the CFTR gene by means of time-resolved fluorescence methods)," 生物电化学与生物能量学 (Bioelectrochem. Bioenerg.) 48(2):415-21(1999); 克里卡 (Kricka), "用于提高免疫分析的灵敏度和可靠度的所选策略 (Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays)," 临床化学 (Clin. Chem.) 40(3):347-57(1994); 克里卡, "化学发光和生物发光技术 (Chemiluminescent and bioluminescent techniques)," 临床化学 37(9):1472-81(1991); 卡姆克 (Kumke) 等人, "DNA 杂交的荧光偏振检测的温度和淬灭研究 (Temperature and quenching studies of fluorescence polarization detection of DNA hybridization)," 分析化学 69(3):500-6(1997); 麦克里 (McCreery), "地高辛标记 (Digoxigenin labeling)," 分子生物技术 (Mol. Biotechnol.) 7(2):121-4(1997); 曼斯菲 (Mansfield), 等人, "使用非放射性标记方法的核酸检测 (Nucleic acid detection using non-radioactive labeling methods)," 分子细胞探针 (Mol. Cell Probes) 9(3):145-56(1995); 努尔米 (Nurmi), 等人, "在闭合导管中用于检测特异性聚合酶链反应产物的新标记技术 (A new label technology for the detection of specific polymerase chain reaction products in a closed tube)," 核酸研究 28(8):28(2000); 奥廷 (Oetting) 等人 "使用尾引物和红外荧光检测的标记的韦伯 8A 集合的多重短串联重复多态性 (Multiplexed short tandem repeat polymorphisms of the Weber 8A set of markers using tailed primers and infrared fluorescence detection)," 电泳 (Electrophoresis) 19(18):3079-83(1998); 罗达 (Roda) 等人, "使用光学显微镜的酶标记的探针的化学发光成像 - 视频摄像机发光显影图 (Chemiluminescent imaging of enzyme-labeled probes using an optical microscope-videocamera luminograph)," 分析生物化学 257(1):53-62(1998); 西迪基 (Siddiqi) 等人, "用于定量特异性 DNA 的基于电化学发光和生物发光的分析的评估 (Evaluation of electrochemiluminescence-and bioluminescence-based assays for quantitating specific DNA)," 临床实验室分析杂志 (J. Clin. Lab. Anal.) 10(6):423-31(1996); 史蒂文森 (Stevenson) 等人, "同步发光:用于 DNA 测序的多个荧光探针的新检测技术 (Synchronous luminescence:a new detection technique for multiple fluorescent probes used for DNA sequencing)," 生物技术 (Biotechniques) 16(6):1104-11(1994); 沃定 (Vo-Dinh) 等人, "表面增强的拉曼基因探针 (Surface-enhanced Raman gene probes)," 分析化学 66(20):3379-83(1994);

沃尔克斯 (Volkers) 等人, "用于 DNA 原位杂交的微波标记检测技术 (Microwave label detection technique for DNA in situ hybridization)," 欧洲神经学杂志 (Eur. J. Morphol.) 29(1):59-62(1991) 中。

[0078] 金属条码 (一种形式的分子条码) 是 30-300nm 直径 $\times$ 400-4000nm 多层多金属杆。这些杆通过电沉积到氧化铝模具中, 接着去除氧化铝, 留下这些较小多层物件来构造。在至多 7 种不同金属中, 系统可以具有至多 12 个经编码区域, 其中所述金属具有不同反射率并且因此取决于金属而在光学显微镜中显得较亮或较暗; 这产生实际上无限的鉴别编码。金属条可以涂布有玻璃或其它材料, 并且探针使用所属领域中通常已知的方法连接到玻璃; 通过来自靶标的荧光读取分析, 并且探针的特性来自条码的亮暗图案。

[0079] 用于检测并且测量由标记产生的信号的方法是已知的。举例来说, 放射性同位素可以通过闪烁计数或直接目测来检测; 荧光分子可以用荧光分光光度计来检测; 磷光分子可以用分光光度计来检测或用摄像机来直接目测; 酶可以通过检测或目测由酶催化的反应的产物来检测; 抗体可以通过检测与抗体偶联的次级检测标记来检测。此类方法可以直接用于所公开的扩增和检测方法中。如本文所使用, 检测分子是与扩增的核酸相互作用并且与一个或多个检测标记偶联的分子。在检测的另一种形式中, 经由不同荧光、磷光或化学发光发射寿命标记在时间上可以是突出的。多重时间相关性检测描述在斯夸尔 (Squire) 等人, 显微杂志 (J. Microscopy) 197(2):136-149(2000) 和 WO 00/08443 中。

[0080] 可以使用标记的量或强度的定量测量。举例来说, 定量可以用于测定给定标记和因此标记组分是否以阈值水平或量存在。阈值水平或量是信号的任何所需水平或量并且可以选择其以符合方法执行的特定形式的需要。

[0081] H. 核糖核酸酶

[0082] 所公开的方法使用对 RNA/DNA 杂交体具有特异性的核糖核酸酶以降解与嵌合探针的 DNA 区域杂交的 RNA 分子的部分。取决于 RNA/DNA 杂交体的任何核糖核酸酶都可以用于所公开的方法中。优选核糖核酸酶是充分表征的 RNA 酶 H (EC 3.1.26.4)。在包含在 7.5 与 9.1 之间的 pH 下, 在还原试剂存在下达到 RNA 酶 H 的最佳活性 (伯克威尔 (Berkower) 等人, 生物化学杂志 (J Biol Chem) 248:5914-5921(1973))。在 N-乙基马来酰亚胺 (与 SH 基团反应的化学物质) 存在下抑制 RNA 酶 H 活性, 并且其不受较高离子强度显著影响 (在 0.3M NaCl 存在下保留 50% 活性)。RNA 酶 H 需要 Mg^{2+} 离子, 其可以被 Mn^{2+} 离子部分置换。

[0083] I. 核酸聚合酶

[0084] 所公开的方法使用核酸聚合酶来延伸与嵌合引物杂交的 RNA 分子的末端。可以使用能够使用 DNA 模板延伸 RNA 链并且能够在来自 RNA 链的延伸物中并入标记核苷酸的任何适合的核酸聚合酶。大多数 DNA 聚合酶满足这些要求。优选的 DNA 聚合酶缺乏 5' 到 3' 核酸外切酶活性。适用的核酸聚合酶的实例包括克列诺片段 (DNA 聚合酶 I 的 large 片段) (雅各布森 (Jacobsen) 等人, 欧洲生物化学杂志 (Eur. J. Biochem.) 45:623-627(1974))、T4DNA 聚合酶 (卡波德 (Kaboord) 和本可维克 (Benkovic), 当代生物学 (Curr. Biol.) 5:149-157(1995)) 以及经修饰的 T7DNA 聚合酶 (塔波 (Tabor) 和理查森 (Richardson), 生物化学杂志 262:15330-15333(1987)); 塔波和理查森, 生物化学杂志 264:6447-6458(1989); Sequenase™ (美国生物化学品))。其它适用的核酸聚合酶包括噬菌体 ϕ 29 DNA 聚合酶 (布兰寇 (Blanco) 等人的第 5,198,543 号和第 5,001,050 号美

国专利)、噬菌体 M2DNA 聚合酶(松本(Matsumoto)等人,基因(Gene)84:247(1989))、噬菌体 ϕ PRD1DNA 聚合酶(荣格(Jung)等人,美国国家科学院院刊 84:8287(1987))、VENT® DNA 聚合酶(孔(Kong)等人,生物化学杂志 268:1965-1975(1993))、T5DNA 聚合酶(查特吉(Chatterjee)等人,基因 97:13-19(1991))、PRD1DNA 聚合酶(朱(Zhu)和依托(Ito),生物化学与生物物理学报(Biochim. Biophys. Acta.) 1219:267-276(1994))、T7DNA 聚合酶(斯蒂尔(Studier)等人,酶学方法(Methods Enzymol.) 185:60-89(1990))、DEEP VENT® DNA 聚合酶(新英格兰生物实验室(New England Biolabs), 贝弗利(Beverly), MA)、黄栖热菌 DNA 聚合酶(MBR, 密尔沃基(Milwaukee), WI) 以及 Taq DNA 聚合酶的斯托菲尔片段(Stoffel fragment)(劳耶(Lawyer)等人,PCR 方法应用(PCR Methods Appl.) 2(4):275-287(1993), 金(King)等人,生物化学杂志 269(18):13061-13064(1994))。

[0085] J. 经稳定的核酸

[0086] 虽然未经修饰的寡核糖核苷酸可以充当有效探针,嵌合探针和探针阵列可能是更稳定的并且如果通过使用核酸修饰来使探针稳定,那么其具有更长寿命。可以进行大大增强嵌合探针的核酸酶抗性的化学物质修饰。一般来说,此类修饰可以在嵌合探针中的核苷酸的 2' 位置处和嵌合探针中的核苷酸之间的磷酸酯键中进行。举例来说,使用可用的核酸合成方法,嵌合探针的一个或多个碱基可以是 2' 甲氧基核糖核苷酸、硫代磷酸脱氧核糖核苷酸或硫代磷酸核糖核苷酸。经修饰的核苷酸和寡核苷酸以及其合成方法是已知的。这些方法中的一些描述在奥芬斯伯格(Offensperger)等人,欧洲分子生物学杂志(EMBO J.), 12:1257-1262(1993);罗森堡(Rosenberg)等人的 WO 93/01286;阿格拉沃尔(Agrawal)等人,美国国家科学院院刊, 85:7079-7083(1988);萨林(Sarin)等人,美国国家科学院院刊, 85:7448-7794(1989);肖(Shaw)等人,核酸研究, 19:747-750(1991);奥森(Orson)等人,核酸研究, 19:3435-3441(1991);保利拉(Paolella)等人,欧洲分子生物学杂志, 11:1913-1919(1992);皮肯(Pieken), 等人,科学, 253:314-317(1991);海登里希(Heidenreich)和艾克斯坦(Eckstain),生物学化学杂志(J. Biol. Chem), 267:1904-1909(1992);海布里登公司(Hybridon, Inc.) 的 WO 91/17093;味之素公司(Ajinomoto Co., Inc.) 的 EP 0339842;核糖核酸酶医药公司(Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.) 的 WO 95/23225;约翰霍普金斯大学(Johns Hopkins University) 的 WO 94/15619;以及斯普罗特(Sproat)等人的美国专利 5,334,711 中。

[0087] 在描述用于修饰核苷酸、寡核苷酸以及嵌合探针的取代基时,烷基或烷基团是指饱和脂肪族烃,包括直链、支链和环状烷基。对于这种用途来说,此类烷基优选具有 1 到 12 个碳。此类烷基更优选具有 1 到 6 个碳。此类烷基再更优选具有 1 到 2 个碳。此类烷基最优选具有 1 个碳。这些烷基还可以包括一个或多个羟基、一个或多个氨基或两种。此类羟基和氨基可以与烷基中的任何碳原子偶联。如本文所使用,术语羟基烷基用于指包括一个或多个羟基的烷基,术语氨基烷基用于指包括一个或多个氨基的烷基,并且羟基氨基烷基用于指包括一个或多个羟基和一个或多个氨基的烷基。如本文所使用,烯丙基或烯丙基团是指不饱和脂肪族烃,包括直链、支链和环状烯丙基。对于这种用途来说,此类烯丙基优选具有 1 到 12 个碳。此类烯丙基更优选具有 1 到 6 个碳。此类烯丙基再更优选具有 2 到 3 个碳。此类烯丙基最优选具有 3 个碳。还可以使用其它取代基来修饰本文所描述的核苷

酸、寡核苷酸以及嵌合探针,如芳基、烷芳基以及芳烷基,其中芳基是指苯甲基,烷芳基是指经芳基取代的烷基,并且芳烷基是指经烷基取代的芳基。

[0088] 参考核苷酸、寡核苷酸以及嵌合探针的术语修饰在本文中的使用意图指代相对于常规核苷酸和寡核苷酸,核苷酸或寡核苷酸的化学差异。在本文中术语修饰的使用并不意图限制经修饰的核苷酸、寡核苷酸以及嵌合探针的产生方式。类似地,参考置换核苷酸、寡核苷酸或嵌合探针上的化学基团意图指代相对于常规核苷酸和寡核苷酸,核苷酸或寡核苷酸的化学差异,并且其并不意图限制核苷酸、寡核苷酸或嵌合探针的产生方式。

[0089] 3' 和 5' 端处的修饰:已证明,寡核苷酸类似物的降解主要可归因于 3'-核酸外切酶。若干研究还展示,各种 3'-修饰可以大大降低这些类似物的核酸酶敏感性。因此,降低对 3'-核酸外切酶的敏感性的另一种方法是将游离胺引入嵌合探针的 3' 末端羟基(参见例如奥森等人,核酸研究,19:3435-3441(1991))。另一种适用的 3' 末端修饰是使嵌合探针的胸腺嘧啶核苷酸末端与 3' 到 3' 键偶联。此类结构在本文中称为 3'-3'-胸腺嘧啶核苷酸或 T(3'-3')。

[0090] 优选的 3' 修饰是嵌合探针的 3' 羟基被如 -H、-O-R¹、-NH₂、-NH-R¹、-N-R₂¹、F 以及 -3'-核苷酸的化学基团置换的那些,其中各 R¹独立地是烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基、烯丙基、-PR²(O)-R²或 -PR²(S)-R²,其中各 R²独立地是 O、S、F、烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基、烯丙基、O-R³或 S-R³,并且其中各 R³独立地是烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基或烯丙基。如本文所使用,嵌合探针的 3' 羟基是指将通常存在于嵌合探针的 3' 末端核苷酸中的核糖残基的 3' 碳上的羟基。如本文所使用,嵌合探针的 3' 碳是指嵌合探针的 3' 末端核苷酸中的核糖残基的 3' 碳。

[0091] 虽然嵌合探针的 5' 端优选具有羟基或磷酸酯基,但 5' 端可以经修饰以提高嵌合探针对核酸酶的抗性。优选的 5' 修饰是嵌合探针的 5' 羟基被如 -H、-O-R⁴、-NH₂、-NH-R⁴、-N-R₂⁴以及 F 的化学基团置换的那些,其中各 R⁴独立地是烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基、烯丙基、-PR⁵(O)-R⁵或 -PR⁵(S)-R⁵,其中各 R⁵独立地是 O、S、F、烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基、烯丙基、O-R⁶或 S-R⁶,并且其中各 R⁶独立地是烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基或烯丙基。如本文所使用,嵌合探针的 5' 羟基是指将通常存在于磷酸酯基将通常连接的嵌合探针的 5' 末端核苷酸中的核糖残基的 5' 碳上的羟基。如本文所使用,嵌合探针的 5' 碳是指嵌合探针的 5' 末端核苷酸中的核糖残基的 5' 碳。另一种适用的修饰是如吡啶衍生物的插入剂共价连接到 5' 末端磷酸(例如,使用五亚甲基桥)(参见例如马赫(Maher)等人,科学,245:725-730(1989);格里戈里耶夫(Grigoriev)等人,生物化学杂志,267:3389-3395(1992))。

[0092] 核苷酸的 2' 位置处的修饰:另一种适用类别的化学修饰是核苷酸的核糖部分的 2' OH 基团的修饰,其已显示对于各种细胞内和细胞外核酸酶的活性来说是关键。典型的 2' 修饰是合成 2'-O-甲基寡核苷酸(保利拉等人,欧洲分子生物学杂志,11:1913-1919(1992))和 2'-氟和 2'-氨基-寡核苷酸(皮肯,等人,科学,253:314-317(1991);海登里希和艾克斯坦,生物学化学杂志,267:1904-1909(1992))。嵌合探针还含有脱氧核糖核苷酸(在 DNA 区域中)。然而,就所使用的核糖核酸酶在 2' 位置处需要未经取代的氢以识别 RNA/DNA 杂交体来说,2' 修饰不应用于嵌合探针的 DNA 区域(即 RNA 区域的 5')的核苷酸。

[0093] 优选的 2' 修饰是核苷酸的 2' 羟基被如 $-H$ 、 $-O-R^7$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH-R^7$ 、 $-N-R^7_2$ 、 F 以及 $-2'$ -核苷酸的化学基团置换的那些, 其中各 R^7 独立地是烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基、烯丙基、 $-PR^8(O)-R^8$ 或 $-PR^8(S)-R^8$, 其中各 R^8 独立地是 O 、 S 、 F 、烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基、烯丙基、 $O-R^9$ 或 $S-R^9$, 并且其中各 R^9 独立地是烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基或烯丙基。更优选 2' 修饰是核苷酸的 2' 羟基被如 $-H$ 、 $-O-CH_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH-CH_3$ 、 $-N-(CH_3)_2$ 、 F 、 $-OCH_2-CH=CH_2$ 、 $-OP(O)(O)-CH_3$ 以及 $-OP(O)(S)-CH_3$ 的化学基团置换的那些。最优选的 2' 修饰是其中核苷酸的 2' 羟基被 $-O-CH_3$ 置换。

[0094] 磷酸酯键的修饰: 在嵌合探针中修饰连接核苷酸的磷酸酯基也可以用于增强嵌合探针对核酸酶的抗性。出于此目的, 典型的修饰包括置换游离氧原子硫或卤素中的一个或两个。如果存在, 游离氧原子或硫原子还可以连接到如烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基或烯丙基的化学基团。此类取代基的实例, 如经 3' 和 / 或 5' 二卤磷酸酯取代的核苷酸 (例如, 经 3' 和 / 或 5' $-CF_2-$ 磷酸酯取代的核苷酸) 的使用描述在 WO 95/23225 中。优选的适用于嵌合探针的经修饰的磷酸连接基团包括 $-OPR^{10}(O)O-$ 、 $-OPR^{10}(S)O-$ 以及 $-OP(O)(S)O-$, 其中 R^{10} 是烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基、烯丙基、 $-O-R^{11}$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH-R^{11}$ 、 $-N-R^{11}_2$ 或 F , 并且其中各 R^{11} 独立地是烷基、羟基烷基、氨基烷基、羟基氨基烷基或烯丙基。更优选的适用于嵌合探针的经修饰的磷酸连接基团包括 $-OPR^{12}(O)O-$ 、 $-OPR^{12}(S)O-$ 以及 $-OP(O)(S)O-$, 其中 R^{12} 是 $-CH_3$ 、 $-O-CH_3$ 、 $-OCH_2-CH=CH_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH-CH_3$ 、 $-N-(CH_3)_2$ 或 F 。最优选的适用于嵌合探针的经修饰的磷酸连接基团是 $-OP(O)(S)O-$, 其通常被称为硫代磷酸酯基。

[0095] 另一种适用的修饰是序列中可能存在的胞嘧啶碱基的甲基化。可以通过使用经修饰的核苷酸 (其产生具有与 RNA 分子更强的碱基配对的寡核苷酸) 来提高嵌合探针 / RNA 分子杂交体的稳定性。举例来说, C-5 丙炔基嘧啶核苷酸增加核酸之间的氢键结 (氟罗勒 (Froehler) 等人, 四面体通讯 (Tetrahedron Letters) 33:5307-5310 (1992))。

[0096] 以上修饰可以用于嵌合探针的有限区域中和 / 或组合中以产生经修饰的嵌合探针的嵌合体。归因于由核糖核酸酶识别 RNA/DNA 杂交体区域和核酸聚合酶识别 DNA 区域的需求, 嵌合探针的某些区域比其它区域更容易进行修饰。举例来说, 已发现, 2' $-O-$ 甲基核苷酸可以在不影响所公开的方法的情况下引入嵌合探针的 RNA 区域中。

[0097] K. 寡核苷酸合成

[0098] 可以使用所确立的寡核苷酸合成方法合成嵌合探针和任何其它寡核苷酸。产生或合成寡核苷酸的方法在所属领域中是众所周知的。此类方法可以在标准酶消化继而核苷酸片段分离 (参见例如萨布鲁克 (Sambrook) 等人, 分子克隆实验指南 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第 2 版 (冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 冷泉港 (Cold Spring Harbor), 纽约 (N.Y.), 1989) 第 5、6 章) 到纯粹合成方法 (例如通过氰基乙基亚磷酰胺方法使用米利根 (Milligen) 或贝克曼 (Beckman) 系统 1Plus DNA 合成器 (例如马萨诸塞州伯林顿的米利根-生物谷猎头 (Milligen-Bioscience, Burlington, MA) 的型号 8700 自动化合成器或 ABI 型号 380B)) 范围内变化。生田 (Ikuta) 等人, 生物化学年鉴 (Ann. Rev. Biochem.) 53:323-356 (1984)、(磷酸三酯和亚磷酸酯-三酯方法) 和纳朗 (Narang) 等人, 酶学方法 (Methods Enzymol), 65:610-620 (1980) (磷酸三酯方法) 也描述了适用于制得寡核苷酸的合成方法。可以使用如尼耳森 (Nielsen) 等人, 生物结合化学 (Bioconjug. Chem.) 5:3-7 (1994) 所描述的那些的已知方法制得蛋白质核酸分子。

[0099] 许多本文所描述的寡核苷酸经设计以与其它寡核苷酸或核酸的某些部分互补以使得可以在其间形成稳定的杂交体。这些杂交体的稳定性可以使用已知方法计算,如莱斯尼克 (Lesnick) 和弗赖尔, 生物化学 34:10807-10815(1995)、麦格劳 (McGraw) 等人, 生物技术 8:674-678(1990) 以及李奇利克 (Rychlik) 等人, 核酸研究 18:6409-6412(1990) 中所描述的那些。

[0100] L. 试剂盒

[0101] 上文所描述的材料以及其它材料可以任何适合的组合包装在一起作为适用于执行或帮助执行所公开的方法的试剂盒。如果设计并且适配给定试剂盒中的试剂盒组分以便一起用于所公开的方法中,那么其是适用的。举例来说,公开了用于检测 RNA 分子的试剂盒,所述试剂盒包含探针阵列、标记核苷酸以及标记缀合物。所述试剂盒还可以含有检测缀合物。所公开的试剂盒还可以包括核糖核酸酶、核酸聚合酶或两种。

[0102] M. 混合物

[0103] 公开了执行或准备执行所公开的方法所形成的混合物。举例来说,公开了包含以下的混合物:探针阵列和样品;探针阵列和 RNA 分子;探针阵列和核糖核酸酶;探针阵列和标记核苷酸;探针阵列和核酸聚合酶;探针阵列和标记缀合物;探针阵列和检测缀合物;探针阵列、RNA 分子以及核糖核酸酶;探针阵列、RNA 分子以及核酸聚合酶;探针阵列、RNA 分子、标记核苷酸以及核酸聚合酶;探针阵列、RNA 分子、核糖核酸酶以及核酸聚合酶;以及探针阵列、RNA 分子、核糖核酸酶、标记核苷酸以及核酸聚合酶。

[0104] 每当所述方法涉及混合或使组合物或组分或试剂接触,执行方法产生多种不同混合物。举例来说,如果所述方法包括 3 个混合步骤,那么在那些步骤中的每一个之后形成唯一混合物(如果步骤单独执行)。另外,混合物在所有步骤完成后形成,不管步骤如何执行。本发明涵盖通过执行所公开的方法获得的这些混合物以及含有任何所公开的试剂、组合物或组分(例如本文所公开)的混合物。

[0105] N. 系统

[0106] 公开了适用于执行或帮助执行所公开的方法的系统。系统一般包含如结构、机器、装置等制品与组合物、化合物、材料等的组合。涵盖所公开或本发明显而易见的此类组合。举例来说,公开并且涵盖了包含探针阵列和反应控制器(例如 PCR 机器、自动移液系统以及反应培育箱)的系统。

[0107] O. 数据结构和计算机控制

[0108] 公开了用于所公开的方法、通过所公开的方法产生或由所公开的方法产生的数据结构。数据结构一般是组合物或媒体中所收集、组织、储存和/或体现的任何形式的数据、信息和/或对象。以电子形式储存在如 RAM 中或存储盘上的 RNA 检测结果是一种类型的数据结构。

[0109] 可以通过计算机控制来控制、管理或以其它方式辅助所公开的方法或其任何部分或其对应的制备。此类计算机控制可以通过计算机控制处理或方法实现,可以使用和/或产生数据结构,并且可以使用计算机程序。涵盖此类计算机控制、计算机控制处理、数据结构以及计算机程序,并且其应理解为本文所公开的。

[0110] 用途

[0111] 所公开的方法和组合物适用于诸多区域,包括(但不限于)RNA 检测和分析。具体

来说,所公开的方法和组合物可以用于检测相关的特定 RNA 分子,如病原体、疾病细胞以及疾病特有的 RNA 分子。其它用途包括产生细胞、样品等的表达目录。其它用途是公开的、从本发明显而易见的和 / 或将被所属领域的普通技术人员理解。

[0112] A. 基于鉴别的行动

[0113] 所公开的方法包括基于测量、检测、比较、分析、检定、筛查等的个体、疾病、病况、病状的测定、鉴别、表示、相关性、诊断、预后等(其可以统称为“鉴别”)。举例来说,基于所检测的 RNA 分子,个体、位置或环境可以鉴别为具有特定微生物。出于许多原因,此类鉴别是适用的。举例来说,并且具体来说,此类鉴别允许基于所进行的特定鉴别并且与其相关采取特定行动。举例来说,特定个体中特定疾病或病况的诊断(以及在其它个体中所述疾病或病况无诊断)具有基于诊断鉴别将受益于治疗、行动、行为等的个体的非常有用的作用。举例来说,在所鉴别的个体中特定疾病或病况的治疗明显不同于无此类鉴别的所有个体的治疗(或与所述鉴别无关)。需要治疗或可以受益于治疗的个体将接受其,并且不需要所述治疗或将不会受益于所述治疗的个体将不接受其。

[0114] 因此,本文还公开了包含遵循并且基于所公开的鉴别采取特定行动的方法。举例来说,公开了包含产生鉴别记录的方法(例如以物理形式一如纸、电子或其它形式)。因此,举例来说,基于所公开的方法产生鉴别记录物理上和实体上不同于仅执行测量、检测、比较、分析、检验、筛选等。此类记录的尤其实质和显著之处在于其允许以例如可以传送到其它人(如可以基于鉴别对个体进行治疗、监测、随访、建议等的那些人)的实体形式固定鉴别;保留以便后续使用或回顾;用作基于不同测量、检测、比较、分析、检定、筛查等评估个体、治疗功效、鉴别准确性的集合的数据等。举例来说,可以例如由与进行鉴别记录的个体或实体相同的个体或实体、不同的个体或实体或相同的个体或实体与不同的个体或实体的组合来进行鉴别记录的此类使用。所公开的记录产生方法可以与本文所公开的任何一种或多种其它方法组合,并且尤其与所公开的鉴别方法中的任何一个或多个步骤组合。

[0115] 作为另一个实例,公开了包含基于一种或多种其它鉴别进行一种或多种进一步鉴别的方法。举例来说,可以基于其它鉴别来鉴别特定治疗、监测、随访、建议等。举例来说,因高水平的特定组分或特性而被鉴别为患有疾病或病况的个体可以进一步鉴别为可以或应该用基于或涉及高水平组分或特性的疗法治疗的个体。可以产生(例如,如上文所描述)并且可以任何适合的方式使用此类进一步鉴别的记录。此类进一步鉴别可以例如直接基于其它鉴别、此类其它鉴别的记录或组合。可以例如由与进行其它鉴别的个体或实体相同的个体或实体、不同的个体或实体或相同的个体或实体与不同的个体或实体的组合来进行此类进一步鉴别。所公开的进行进一步鉴别的方法可以与本文所公开的任何一种或多种其它方法组合,并且尤其与所公开的鉴别方法中的任何一个或多个步骤组合。

[0116] 作为另一个实例,公开了包含对所公开的方法中的任一种中鉴别的个体进行治疗、监测、随访、建议等的方法。还公开了包含对已由所公开的方法中的任一种进行鉴别记录的个体进行治疗、监测、随访、建议等的方法。举例来说,可以基于鉴别和 / 或基于鉴别记录使用特定治疗、监测、随访、建议等。举例来说,因高水平的特定组分或特性被鉴别为患有疾病或病况的个体(和 / 或已进行此类鉴别记录的个体)可以用基于或涉及高水平组分或特性的疗法治疗。此类治疗、监测、随访、建议等可以例如直接基于鉴别、此类鉴别的记录或组合。可以例如由与进行鉴别和 / 或鉴别记录的个体或实体相同的个体或实体、不同的个

体或实体或相同的个体或实体与不同的个体或实体的组合来执行此类治疗、监测、随访、建议等。所公开的治疗、监测、随访、建议等的方法可以与本文所公开的任何一种或多种其它方法组合,并且尤其与所公开的鉴别方法中的任何一个或多个步骤组合。

[0117] 方法

[0118] 公开了用于检测样品中的 RNA 的方法。在一些形式中,所述方法涉及 (a) 使所述样品和探针阵列接触, (b) 使所述探针阵列和对 RNA/DNA 杂交体具有特异性的核糖核酸酶 (如 RNA 酶 H) 接触, (c) 使所述探针阵列、标记核苷酸以及能够使用 DNA 模板延伸 RNA 链并且能够在来自 RNA 链的延伸物中并入所述标记核苷酸的核酸聚合酶 (如克列诺片段 DNA 聚合酶) 接触,以及 (d) 检测延伸核酸链中的所述标记核苷酸。所述探针阵列包含一个或多个嵌合探针。所述嵌合探针包含 DNA 区域和 RNA 区域,其中所述 DNA 区域和所述 RNA 区域相邻,并且其中所述 DNA 区域是所述 RNA 区域的 5'。所述嵌合探针还可以包括第二 DNA 区域。所述第二 DNA 区域还可以与所述 RNA 区域相邻并且可以是所述 RNA 区域的 3'。如果样品含有与嵌合探针中的至少一个的核苷酸序列互补的 RNA 分子,那么 RNA 分子将与互补嵌合探针杂交。在一些形式中,使样品和探针阵列接触,使探针阵列和核糖核酸酶接触,并且使探针阵列、标记核苷酸以及核酸聚合酶接触 (步骤 (a)、(b) 以及 (c)) 同时进行。

[0119] 在方法的一些形式中,标记和检测可以通过标记第一标记来增强。这可以例如通过使探针阵列和标记缀合物接触来实现,其中标记缀合物包含特异性结合分子和第二标记,并且其中所述特异性结合分子与第一标记结合。接着通过检测第二标记来检测延伸核酸链中的标记核苷酸。第一标记与标记缀合物的适用组合的一个实例是作为第一标记的生物素和作为标记缀合物的抗生蛋白链菌素缀合金纳米粒子。在这个实例中,抗生蛋白链菌素是与第一标记 (生物素) 结合的特异性结合分子,并且金纳米粒子是第二标记。

[0120] 通过使用可以聚集在第二标记位点上或位点处的另一种缀合物,提高位点处的第二标记的量,提高检测灵敏度并且使检测更容易。这可以例如通过使探针阵列和检测缀合物接触来实现,其中检测缀合物包含聚集体,并且其中聚集体介导标记缀合物上检测缀合物的聚集。第二标记与检测缀合物的适用组合的一个实例是作为第二标记的金纳米粒子和作为检测缀合物的银纳米粒子。在这个实例中,银纳米粒子是聚集体。银纳米粒子与金纳米粒子反应以在金纳米粒子的位点处积聚银纳米粒子。反应的银纳米粒子的积聚可以足以用肉眼检测到。

[0121] 在护理点处快速并且精确检测如 RNA 病毒的病原体将允许恰当治疗患者并且挽救生命。所公开的 RNA 微芯片可以在无逆转录和 PCR 扩增的情况下直接检测 RNA。所公开的 RNA 微芯片可以使用纳米粒子辅助信号放大。所公开的 RNA 微芯片技术是简单并且精确的,并且可以区别单一核苷酸差异。在一些形式中,可以在 1 小时内灵敏地检测 RNA,并且可以通过肉眼检测到信号。视觉读出格式和简单性使得所公开的 RNA 微芯片技术较适用于在诊所和具有最少资源的现场快速并且精确检测病原体。

[0122] 所公开的技术还可以用于检测并且分析来自单一或多个来源的任何 RNA 或 RNA 组合。举例来说,所述技术可以用于检测细胞和样品中的 RNA 表达谱。作为另一个实例,探针阵列可以包括一个或多个与例如病毒、细菌或微生物特有的核苷酸序列互补的嵌合探针。特有的核苷酸序列的检测表示存在对应病毒、细菌或微生物。

[0123] A. 样品制备

[0124] 可以使用任何适合的技术制备样品。一般来说,所有所需的是去除或减少样品(如核酸酶)(如果存在)中的干扰组分,以及防止破坏 RNA 分子。然而,应注意,不需要 RNA 的纯化。简单制备技术足够用于所公开的方法中。因为 RNA 分子的较小片段对于所公开的方法来说是足够并且优选的,样品中的 RNA 的一定降解是优选的。来自细胞样品的 RNA 的优选制备是在无任何 RNA 分离的情况下的 NaOH 处理。RNA 样品可以通过在高温下用 NaOH 处理生物样本几分钟来制备,其使生物 RNA 水解成较短片段以便快速杂交和检测。在中和和离心之后,使 RNA 样品(上清液)准备好 RNA 的直接检测。

[0125] 举例来说,可以通过在高温下用 NaOH(如 200mM)处理样品(如细菌或经分离的细菌总 RNA)5 分钟,继而中和并且离心而在小于 10 分钟内制备样品。NaOH 处理使生物 RNA(如 mRNA,通常长度为几千个核苷酸)碎成较短片段(如 15-25 个核苷酸),其促进 RNA 分子与探针阵列的杂交(斯潘塞(Spencer)等人,化学生物化学,11, 1378(2010))。样品还可以使用任何适合的 RNA 分离或制备技术来制备。

[0126] B. 杂交

[0127] 在所述方法中,所述样品中的 RNA 分子可以与具有互补序列的嵌合探针杂交。杂交可以在多种条件下实现。一般来说,温度应不高于 RNA 分子与嵌合探针的 RNA 区域之间的杂交体的熔融温度。pH 和盐条件可以改变,但中性 pH 和中等盐条件是优选的。最优选的是与核糖核酸酶和核酸聚合酶相容的 pH、盐以及温度。此类条件是熟知的或其测定在核酸反应领域的知识范围内。

[0128] C. RNA 降解

[0129] 与嵌合探针的 DNA 区域杂交的 RNA 分子的部分被对 RNA/DNA 杂交体具有特异性的核糖核酸酶降解。这一降解可以在任何适合的条件下进行。一般来说,温度应不高于 RNA 分子与嵌合探针的 RNA 区域之间的杂交体的熔融温度。pH 和盐条件可以改变,但中性 pH 和中等盐条件是优选的。最优选的是与核糖核酸酶和核酸聚合酶相容的 pH、盐以及温度。

[0130] D. RNA 分子的延伸

[0131] 杂交的 RNA 分子可以接着延伸形成延伸核酸链,其中嵌合探针的 DNA 区域(即 RNA 区域的 5')用作模板。为了标记,将至少一种标记核苷酸并入延伸核酸链中。标记核苷酸包含第一标记。由于嵌合探针和与嵌合探针杂交的 RNA 分子之间的序列关系,延伸核酸链中的标记核苷酸的检测表示样品中存在 RNA 分子。

[0132] 这一延伸可以在任何适合的条件下进行。一般来说,温度应不高于 RNA 分子与嵌合探针的 RNA 区域之间的杂交体的熔融温度。pH 和盐条件可以改变,但中性 pH 和中等盐条件是优选的。最优选的是与核糖核酸酶和核酸聚合酶相容的 pH、盐以及温度。

[0133] 因为用于 RNA 分子的杂交、RNA/DNA 杂交体中的 RNA 的降解以及 RNA 分子的延伸的条件可以是可相容的,所以这些操作和反应可以同时进行。

[0134] E. 次级标记

[0135] 在方法的一些形式中,标记和检测可以通过标记第一标记来增强。这可以例如通过使探针阵列和标记缀合物接触来实现,其中标记缀合物包含特异性结合分子和第二标记,并且其中所述特异性结合分子与第一标记结合。接着通过检测第二标记来检测延伸核酸链中的标记核苷酸。第一标记与标记缀合物的适用组合的一个实例是作为第一标记的生物素和作为标记缀合物的抗生蛋白链菌素缀合金纳米粒子。在这个实例中,抗生蛋白链菌

素是与第一标记（生物素）结合的特异性结合分子，并且金纳米粒子是第二标记。

[0136] F. 聚集（三级标记）

[0137] 通过使用可以聚集在第二标记位点上或位点处的另一种缀合物，提高位点处的第二标记的量，提高检测灵敏度并且使检测更容易。这可以例如通过使探针阵列和检测缀合物接触来实现，其中检测缀合物包含聚集体，并且其中聚集体介导标记缀合物上检测缀合物的聚集。第二标记与检测缀合物的适用组合的一个实例是作为第二标记的金纳米粒子和作为检测缀合物的银纳米粒子。在这个实例中，银纳米粒子是聚集体。银纳米粒子与金纳米粒子反应以在金纳米粒子的位点处积聚银纳米粒子。所形成的银纳米粒子的积聚和聚集可以足以用肉眼检测到（或借助于放大镜）。

[0138] G. 检测

[0139] 所公开的方法通过添加标记组分来允许灵敏检测 RNA 分子，其中 RNA 分子已在探针阵列中杂交。在所公开的方法的各种形式中，RNA 分子可以通过以下检测：例如（a）检测并入 RNA 分子的延伸链中的标记核苷酸（经由第一标记），（b）检测与 RNA 分子缔合的标记缀合物中的第二标记，（c）检测与 RNA 分子缔合或聚集的检测缀合物或组合。优选地，RNA 分子可以通过以下检测：例如经由与 RNA 分子缔合的标记缀合物检测与 RNA 分子缔合或聚集的检测缀合物。

[0140] 待检测的组分可以使用允许从其它组分和材料中鉴别并且辨别出待检测的组分的任何技术或手段来检测。一般来说，待检测的组分和标记可以与适当的检测技术匹配。举例来说，产生荧光信号的组分和标记可以用例如分光光度计或通过照相术来检测。产生可见光信号的组分和标记可以例如以肉眼、用分光光度计或通过照相术来检测。产生放射能的组分和标记可以例如通过闪烁计数或自动射线照相术来检测。视觉检测是优选的。

[0141] 所公开的标记和组分还可以用所确立的酶联检测系统检测。举例来说，通过并入生物素-16-UTP（勃林格曼海姆）标记的扩增核酸可以如下检测。通过利用与扩增核酸中所存在的靶序列（或其补体）互补的互补 DNA 寡核苷酸（地址探针）的杂交来将核酸固定在固体玻璃表面上。在杂交之后，洗涤玻璃载玻片并且使其与碱性磷酸酶-抗生蛋白链菌素缀合物（马萨诸塞州贝德福（Bedford, MA）的特洛匹克斯公司）接触。这一酶-抗生蛋白链菌素缀合物与扩增核酸上的生物素部分结合。再次洗涤载玻片以去除过量酶缀合物，并且添加化学发光基质 CSPD（特洛匹克斯公司）并且用玻璃盖片覆盖。载玻片可以接着在伯乐荧光成像器（Biorad Fluorimager）中成像。

[0142] H. 密切相关 RNA 分子之间的辨别

[0143] 嵌合探针可以经设计以辨别密切相关的靶序列，如遗传等位基因。如实例中所示，所公开的方法可以精确鉴别 RNA 分子与差别为单一核苷酸的 RNA 分子。这最佳通过在嵌合探针的 DNA 区域（即 RNA 区域的 5'）中包括分化核苷酸来实现。因为杂交、RNA 酶 H 消化以及 DNA 聚合酶延伸取决于碱基配对，并且因为嵌合探针的 DNA 区域（即 RNA 区域的 5'）中的碱基配对涉及所有这些步骤，所以增强分化。辨别这三个层可以直接帮助实现较高检测特异性。这些辨别力的组合易于提供单一核苷酸辨别。

[0144] I. 检测 RNA 分子的群组

[0145] 多重 RNA 检测尤其适用于检测基因突变，其中诸多不同突变与某些疾病相关，或其中涉及多个基因突变。举例来说，虽然已鉴别出负责亨廷顿氏病舞蹈症（Huntington's

chorea) 的基因,但在感染的个体中存在基因的不同部分中的各种突变。结果是未设计出单一测试来检测个体是否具有许多亨廷顿氏病突变中的一个或多个。单一 RNA 检测检验可以用于检测一组任何数量的 RNA 分子的一个或多个成员的存在。这可以例如通过针对所述群组中的各 RNA 分子设计嵌合探针来实现。所有嵌合探针放置在探针阵列中的相同位置或点中。如果样品中存在任何 RNA 分子,那么其存在将在探针阵列中的对应位置处检测出。因为第一标记、标记缀合物以及检测缀合物可以对于所有探针和所有 RNA 分子来说是相同的,所以信号可以在群组中的任何 RNA 分子或 RNA 分子的任何组合存在下产生。检测表示表示 RNA 分子群组的至少一个成员存在于所述样品中。

[0146] J. 治疗

[0147] 可以接着治疗鉴别为具有特异性病原体的个体和对象以减少或消除病原体。对于此类治疗,一般并且针对特异性病原体来说,诸多组合物和方法是已知的。此类治疗可以所公开的方法一起使用、基于所公开的方法或遵循所公开的方法。

[0148] 如本文所使用,“个体”包括(但不限于)动物、植物、细菌、病毒、寄生虫以及任何其它生物体或实体。所述个体可以是脊椎动物,更尤其是哺乳动物(例如,人类、马、猪、兔、狗、绵羊、山羊、非人类灵长类动物、牛、猫、天竺鼠或啮齿动物)、鱼类、禽类或爬行动物或两栖动物。所述个体可以是无脊椎动物,更尤其是节肢动物(例如,昆虫和甲壳动物)。所述术语并不指代特定年龄或性别。因此,意图涵盖成人和初生儿个体以及胎儿(无论男性或女性)。患者是指罹患疾病或病症的个体。术语“患者”包括人类和兽医学个体。

[0149] “治疗(treatment)”和“治疗(treating)”意指以治愈、改善、稳定或预防疾病、病理性病况或病症的意图医学管理个体。这一术语包括积极治疗,即专门为了改善疾病、病理性病况或病症而进行的治疗,并且还包括病因治疗,即专门为了去除相关疾病、病理性病况或病症的原因而进行的治疗。另外,这一术语包括缓解性治疗,即为了缓解症状而非治愈疾病、病理性病况或病症而设计的治疗;预防性治疗,即为了最小化或部分或完全抑制相关疾病、病理性病况或病症的发展而进行的治疗;以及支持性治疗,即为了对另一种改善相关疾病、病理性病况或病症的特定疗法加以补充而采用的治疗。应理解,治疗虽然意图治愈、改善、稳定或预防疾病、病理性病况或病症,但无需实际上产生治愈、改善、稳定或预防。可以如本文所描述并且如适用于所涉及的疾病、病理性病况或病症的所属领域中已知,测量或评估治疗效果。可以定性和/或定量地进行此类测量和评估。因此,举例来说,疾病、病理性病况的特性或特征或病症和/或疾病、病理性病况或病症的症状可以降低到任何效果或任何量。

[0150] 如本文所使用的术语“监测”是指可以测量活动的所属领域中的任何方法。

[0151] 如本文所使用的术语“提供”是指所属领域中已知的将化合物或分子添加到某物中的任何手段。提供的实例可以包括使用移液管、移液器、注射器、针、导管、枪等。这可以是人工或自动的。其可以包括通过任何手段的转染或将核酸提供到盘、细胞、组织、无细胞系统的任何其它手段,并且可以在活体外或活体内。

[0152] 如本文所使用的术语“预防”是指在疾病或病况的临床症状发作之前投与化合物以预防与所述疾病或病况相关的失常的物理表现。

[0153] 细胞可以在活体外。或者,细胞可以在活体内并且可以在个体中发现。“细胞”可以是来自包括(但不限于)细菌的任何生物体的细胞。

[0154] 实例**[0155] A. 使用纳米粒子辅助信号放大的 RNA 微芯片检测**

[0156] 本实例描述用于经由直接目测和纳米粒子辅助信号放大直接检测 RNA 的所公开的 RNA 微芯片的一个实例。这一技术是简单并且精确的,并且其可以有效地区别单一核苷酸差异。RNA 样品制备是简单的并且可以在 5 分钟内完成。所公开的快速 RNA 检测可以在 45 分钟内(包括样品制备时间)完成并且在较低飞摩尔水平下具有检测灵敏度。另外,检测信号可以通过肉眼或用放大镜观测到。这一途径是无 PCR、容易进行并且有成本效益的。此外,策略不需要精密的设备并且可以用于帮助监测消毒处理。视觉检测格式和简单性使得这一 RNA 微芯片技术较适用于在较远、诊所以及具有最少设备的现场快速并且精确检测病原体。所公开的简单、快速并且精确的技术将大大有益于护理点应用,尤其在传染病爆发期间。

[0157] 本实例描述了用于经由纳米粒子形成和目测的快速并且直接的 RNA 检测的所公开的简单 RNA 微芯片(图 1)的一个实例。纳米粒子辅助信号放大和肉眼(看到小到尺寸为 40 μm 的物件)或借助于简单工具(如放大镜)的视觉检测。RNA 检测系统是简单的:在靶 RNA 与用 RNA 探针固定的 RNA 微芯片杂交之后(斯潘塞等人,化学生物化学,11,1378(2010)),结合的 RNA 被 RNA 酶 H 消化并且通过克列诺 DNA 聚合酶用生物素标记的 dNTP 延伸。使用抗生蛋白链菌素与金纳米粒子的缀合物(Au-NP),接着将并入到靶 RNA 中的生物素标记转换成 Au-NP 标记。Au-NP 可以经由银染色催化形成银纳米粒子(Ag-NP)(塔东,科学,289,1757(2000);曹等人,生物传感器和生物电子学,22,393(2006);齐等人,分析和生物分析化学,398,2745(2010);唐等人,诊断微生物学与传染病,65,372(2009);周等人,美国化学会志,132,6932(2010)),允许信号放大。所形成的 Ag-NP(图 1 和 2)聚集并且沉积为 RNA 探针位点上的暗点。将形成大量这些暗点的图像(其通过人类肉眼)以便直接视觉观测(图 2)。还展示了,这一 RNA 微芯片可以在较低飞摩尔水平下区别单一核苷酸差异并且检测 RNA。

[0158] 通过用于生物 RNA 的简单样品制备方案帮助所述方法。RNA 样品制备是方便的:仅直接用 NaOH 处理生物样品(如细菌)3 分钟。不同于其它技术,RNA 的分离和纯化不是必须的。利用所公开的 RNA 微芯片方法,可以在 45 分钟内完成简单并且快速的 RNA 检测。

[0159] RNA 检测系统是基于 RNA 3'-标记途径,其中 DNA 聚合酶直接将标记的 dNTP 并入 DNA 模板上的 RNA 中(黄和阿塞蒂,分析生物化学,322,269(2003);阿塞蒂等人,化学生物化学,5,1136(2004))。为了直接检测 RNA,设计官能化 RNA 探针。RNA 探针由 RNA 3'-区域和 DNA 5'-区域组成(图 1)。RNA 区域是用于捕获靶 RNA 的杂交粘结剂并且经 2' 甲基化修饰(诺瓦帕西那(Novopashina)等人,核苷、核苷酸以及核酸(Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids),24,527(2005);梅利希(Majlessi)等人,核酸研究,26,2224(1998))以提高抵抗 RNA 酶的 RNA 探针稳定性。DNA 区域用作用于 RNA 酶 H 消化和 DNA 聚合酶延伸的模板。因此,官能化 RNA 探针(3'-NH₂-RNA-DNA-5')经设计以经由将其固定在芯片上来构造 RNA 微芯片(或微阵列)。探针的 3'-NH₂基团能够将其固定在表面上。举例来说,探针可以固定在 1,4-亚苯基二异硫氰酸酯(PDITC)官能化表面(经由 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)置换)上(图 4)(本特斯(Benters)等人,化学生物化学,2,686(2001);维特曼(Wittmann)和艾格雷特(Alegret),DNA 在芯片上的固定(Immobilisation of DNA on chips),斯普林

格出版社 (Springer Verlag) (2005))。

[0160] 为了展示 RNA 微芯片, 针对 RNA 序列设计完全匹配探针 (图 2A 中的 M; SEQ ID NO:11) 和错配探针 (Mis)。将这四种 RNA 探针固定在芯片上 (图 2)。通过使用微阵列点样器将探针点样在表面上, 产生大约 75 μ 的光斑尺寸。

[0161] 在制备芯片之后, 进行若干对照实验。观测到不存在靶 RNA (图 2B) 不会产生任何信号。同样, 在克列诺延伸步骤包括 dNTP (图 2C) 或不存在生物素标记的 dNTP (图 2D) 不会产生任何信号。只有在用 RNA 探针固定的微芯片上 RNA 和生物素化 dNTP 都存在下才能观测到所需信号 (图 2E)。因为杂交、RNA 酶 H 消化以及 DNA 聚合酶延伸的过程取决于碱基配对, 所以总检测特异性归因于这三个步骤: 杂交、消化以及延伸。发现辨别这三个层 (或步骤) 可以帮助实现较高检测特异性。出人意料地, RNA 微芯片便于提供较高特异性。设计若干 RNA 探针 (参见以下登革热 (Dengue) 寡核苷酸文库探针的清单) 用于检测登革热病毒 RNA (DV RNA)。如图 2F 中所展示, 只有完全匹配探针 (M) 才能够检测 DV RNA, 而单一核苷酸错配探针和其它探针 (Mis-1、Mis-2、Mis-3) 不能。这一实验表示利用 RNA 微芯片的单一核碱基分化。可见, 三种辨别的组合可以易于在不严格调整杂交条件的情况下提供单一核苷酸辨别。

[0162] 图 3 显示多个靶 RNA 的同时检测。靶 RNA 仅与固定在微芯片上的对应探针杂交。举例来说, 当样品中包括 BA RNA 时, Ag-NP 仅沉积在 BA 探针位点处 (图 3A), 表示存在 BA RNA。当样品中包括 BA 和 lacZ RNA 两种时, Ag-NP 沉积在其两个探针位点处 (图 3B), 表示存在 BA 和 lacZ RNA。当样品中包括较多靶 RNA 时, 较多对应探针位点 (图 3B-D) 随着 Ag-NP 沉积, 形成暗点的阵列并且表示存在对应 RNA。RNA 检测信号的这些阵列可通过肉眼或借助于放大镜检测到。这些实验揭示所公开的 RNA 微芯片技术可以用于同时检测多个 RNA 靶标。

[0163] 还展示检测总 RNA 中的个别 mRNA。当用 IPTG (异丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷) 诱导大肠杆菌表达 LacZ mRNA (>2300 个核苷酸) 和 β -半乳糖苷酶时, 用 LacZ RNA 探针固定的 RNA 微芯片用于特异性地检测总 RNA 中所表达的 LacZ mRNA (两个图 3E 和 3F 中的芯片 II)。为了确认 LacZ mRNA 检测的特异性, 使用葡萄糖来抑制 LacZ mRNA 表达。在芯片 (两个图 3E 和 3F 中的芯片 III) 上未显示 LacZ mRNA 或非特异性 RNA, 但数千种不同 RNA 存在于大肠杆菌中 (罗迪斯 (Rhodius) 等人, 微生物学年度评论 (Annu Rev Microbiol) 56:599-624 (2002))。这些实验结果已展示, 我们的 RNA 微芯片是特异性的并且能够选择性地检测生物样品中的个别 RNA。另外, 展示了用于 RNA 样品制备的简单并且快速的策略。可以通过在 95 $^{\circ}$ C 下用 NaOH (400mM) 直接处理生物样品 (如大肠杆菌) 3 分钟来制备 RNA 样品 (5 分钟内)。在中和和离心之后, 使 RNA 样品 (上清液) 准备好芯片杂交。NaOH 处理将使生物 RNA (如 mRNA, 通常长度为几千个核苷酸) 碎成较短片段 (如短到 15-25 个核苷酸), 其主要促进微芯片上的靶 RNA 杂交和检测 (斯潘塞, L. 林 (Lin), C. F. 蒋 (Chiang), Z. 彭 (Peng), P. 赫斯基思 (Hesketh), J. 萨隆 (Salon), Z. 黄, 化学生物化学 11:1378-1382 (2010))。利用这一快速样品制备策略, 可以选择性地检测 LacZ mRNA (图 3F)。

[0164] 还展示了检测灵敏度。如图 5A 中所示, 用微芯片检验各种量的靶 RNA。展示 RNA 微芯片可以检测 RNA 直到较低的飞摩尔水平 (10^{-15})。明显地, 展示前三个步骤 (RNA 杂交、

RNA 酶 H 消化以及 DNA 聚合酶延伸) 可以合并为一个步骤 (图 5B 和 5C), 其进一步简化检测系统。从样品制备开始到检测结束的整个检测可以在 45 分钟内完成 (图 3F、5D 和 5E)。此外, 在用 70% 乙醇处理大肠杆菌之后 (其杀死细菌), 观测到 RNA 微芯片的细菌 RNA 减少 (图 5E)。这与归因于 RNA 合成终止和酶促水解的死亡微生物中的 RNA 快速降解一致。因此, 所公开的方法可以适用于在消毒处理和传染病爆发期间监测细菌生存或死亡。

[0165] 表 1 显示快速检测最佳化的一个实例。存在若干以逐步方式最佳化的步骤以产生快速 RNA 微芯片。在 5-20 分钟内完成银染色, 并且使用 CCD 摄像机在 0.6 秒内获取照片。

[0166] 表 1.

[0167]

RNA 杂交 (min)	RNA 酶 H (min)	克列诺并入 (min)	酶标记 (min)	金纳米粒子	总计 (min)
15	15	30	45	60	165
10	10	10	45	60	135
10	10	10	45	40	115
10	10	10	45	30	105
10	10	10	45	20	95
5	5	5	45	40	100
5	5	5	45	20	80
5	5	5	45	15	75
5	5	5	45	10	70
5	5	5	45	5	65
5	5	5	20	20	55
5	5	5	15	20	50
5	5	5	15	15	45
5	5	5	15	10	40
5	5	5	15	5	35

[0168] 1. 材料和方法

[0169] i. 寡核苷酸设计和合成

[0170] 天然 RNA 购自集成 DNA 技术公司 (IDT)。杂交体探针通过使用固相亚磷酰胺化学反应在 3400DNA/RNA 合成器 (应用生物系统公司 (Applied Biosystems)) 上设计并且合成, 并且通过聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化。RNA 探针由 RNA 区域和 5'-DNA 区域 (以及针对一些探针的 3'-DNA 区域) 组成。经 2' 甲基化修饰的 RNA 区域是用于捕获靶 RNA 的杂交粘剂。3'-DNA 区域用作 RNA 酶 H 消化的模板。5'-DNA 区域用作用于 RNA 酶 H 消化和 DNA 聚合酶延伸的模板。3'-NH₂- 基团用作用于微芯片固定的连接体。因此, 官能化 RNA 探针 (3'-NH₂-RNA-DNA-5' 或 3'-NH₂-DNA-RNA-DNA-5') 经设计以经由将其固定在芯片上来构造 RNA 微芯片 (或微阵列)。

[0171] ii. 病原性寡核苷酸

[0172] LacZ RNA : 大肠杆菌 LacZ mRNA (724-748 个核苷酸) :

[0173] 5'-AUGUGGAUUGGCGAUAAAAACAA-3' (SEQ ID NO:1)

[0174] LacZ 探针 :

[0175] 5'-d (GTTGTTTTT)-2'-O-Me-RNA (AUCGCCAAUCCACAU)-d (CTGTGAAAGA)-NH₂-3' (SEQ ID NO:2)

- [0176] BA RNA :炭疽芽胞杆菌 RNA (致死因子 mRNA, 855-892 个核苷酸) :
- [0177] 5'-AUCUUUAGAAGCAUUAUCUGAAGAUAGAAAAAAA-3' (SEQ ID NO:3)
- [0178] BA 探针 :
- [0179] 5'-d(GATTTTTTT)-2'-O-Me-RNA (CUUAUCUUCAGAUAA)-d(TGCTTCTAAAGAT)-NH₂-3' (SEQ ID NO:4)
- [0180] BF RNA :禽流感或禽流感 (H5N1) RNA [基质蛋白 1 (M1) mRNA (692-729 个核苷酸)] :
- [0181] 5'-AAUCUUCUUGAAAAUUUGCAGACCUACCAAAAACGA-3' (SEQ ID NO:5)
- [0182] BF 探针 :
- [0183] 5'-d(TCGTTTTT)-2'-O-Me-(GGUAGGUCUGCAAAAUUUU)-d(CAAGAAGATT)-NH₂-3' (SEQ ID NO:6)
- [0184] AF RNA :禽流感 (H5N1) RNA [基质蛋白 (M2) mRNA (838-872 个核苷酸)] :
- [0185] 5'-CAU UUAUCGUCGC CUUUAUUACG GUUUG AAAAGAG-3' (SEQ ID NO:7)
- [0186] AF 探针 :
- [0187] 5'-d(CTCTTTT)-2'-O-Me-(CAAACCGUAUUUAAG)-d(GCGACGATAAATG)-NH₂-3' (SEQ ID NO:8)
- [0188] 生物素标记的 DNA (LacZ DNA) :
- [0189] 3'-NH₂-AGAAAGTGTCTACACCTAACCGCTATTTTTTGTG-生物素 -Cy3-5' (SEQ ID NO:9)
- [0190] iii. 获自登革热 RNA 基因组的用于特异性研究的登革热寡核苷酸文库
- [0191] DENV-1 RNA (登录号 :U88536.1 ;10484-10504 个核苷酸) :
- [0192] 5'-GGAAGCUGUACGC-AUGGGGUA-3' (SEQ ID NO:10)
- [0193] DENV-1 探针 : (登录号 :U88536.1 ;10484-10504 个核苷酸) :
- [0194] 5'-TACCCCAT-[2'-O-Me-r(GCGUACAGCUUCC)]-NH₂-3' (SEQ ID NO:11)
- [0195] DENV-2 探针 : (登录号 :U87411.1 ;10470-10490 个核苷酸) :
- [0196] 5'-TACGCCAT-[2'-O-Me-r(GCGUACAGCUUCC)]-NH₂-3' (SEQ ID NO:12)
- [0197] DENV-3 探针 : (登录号 :AY099336.1 ;10457-10477 个核苷酸) :
- [0198] 5'-TACACCGT-[2'-O-Me-r(GCGUACAGCUUCC)]-NH₂-3' (SEQ ID NO:13)
- [0199] DENV-4 探针 : (登录号 :AF326825.1 ;10393-10413 个核苷酸) :
- [0200] 5'-TATGCCAC-[2'-O-Me-r(GCGUACAGCUUCC)]-NH₂-3' (SEQ ID NO:14)
- [0201] iv. 照相 / 成像系统
- [0202] RNA 微芯片上的阵列是肉眼 (或借助于放大玻璃) 可见的, 并且我们使用照相 / 成像系统以记录阵列照片。照相 / 成像系统由配备有经冷却的电荷耦合装置摄像机 (CCD, 维斯艾瑞系统 (VersArray System) ;新泽西州普林斯顿的普林斯顿仪器公司 (Princeton Instruments, Princeton, NJ)) 显微镜 (尼康 (Nikon) Eclipse 80i) 组成, 并且其受专业图像分析 (Image-Pro Plus) 6.1 计算机软件控制以便图像采集、处理以及分析 (马里兰州银泉市的媒体控制学公司 (Media cybernetics, Inc., Silver Spring, MD))。使用 2×2 图像分格进行检测持续平均 0.6 秒, 2× 透镜。
- [0203] v. 微芯片激活
- [0204] 玻璃芯片 (0.5×0.5cm) 首先在 CH₂Cl₂ (密苏里州圣路易斯的西格玛阿尔德里奇 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)) 中轻轻振荡 30 分钟来使其脱脂。随后在浓硫酸 (密苏里

州圣路易斯的西格玛阿尔德里奇) 中振荡 45 分钟来清洁所述芯片。用去离子水冲洗芯片若干次直到最后一次洗液达到 pH 7.0, 并且使其自然干燥。通过在振荡的情况下在 3% 3-氨丙基三甲氧基甲硅烷 (APTS; 密苏里州圣路易斯的西格玛阿尔德里奇) 于含水乙醇 (95% 乙醇和 5% 水) 中的溶液中培育所述芯片 45 分钟来进行硅烷化。在硅烷化完成后, 洗涤芯片三次: 乙醇、水以及乙醇。使所述芯片自然干燥, 继而在 1, 4-亚苯基二异硫氰酸酯 (PDITC; 10mM; 密苏里州圣路易斯的西格玛阿尔德里奇) 和 1% 吡啶 (福鲁卡 (Fluka)) 于 CH_2Cl_2 中的溶液中培育 2 小时。接着用 CH_2Cl_2 洗涤芯片三次, 自然干燥, 并且在室温下储存在干燥器中。激活过程的逐步图示显示在图 4 中。

[0205] vi. RNA 探针固定

[0206] 使杂交 RNA 探针溶解 (100–300 μM) 于磷酸钠缓冲液 (100mM, pH 8.5) 中, 继而使用具有沉积 0.7 纳升/样点的隐形插针 (SMP3 插针) 的欧尼格里得微阵列点样器 (Omnigrid Microarrayer) (加利福尼亚州欧文的笛卡耳技术公司 (Cartesian Technologies Inc., Irvine, CA)) 将其印刷在激活的微芯片上。在 37°C 下在水浴中培育点样芯片 30 分钟。

[0207] vii. 对照实验

[0208] 将由 LacZ、炭疽芽孢杆菌以及禽流感设计的不同探针固定在四个不同芯片上以用于对照实验。四个芯片接着用 StartingBlock 阻断缓冲液培育 20 分钟。在所有芯片上, 将不同 RNA 施加在 5×SSC 缓冲液 (20 μL , 0.75M NaCl, 75mM 柠檬酸钠, pH 7.0) 中, 并且除了芯片 A 外将其在 37°C 下培育 15 分钟。用 1×PBS 缓冲液 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na_2HPO_4 , pH 7.4) 洗涤未结合的 RNA 两次。所述芯片接着用 RNA 酶 H 缓冲液 (20 μL , 1× 新英格兰生物实验室, 伊普斯威奇 (Ipswich), MA) 中的 RNA 酶 H (0.5 μL , 5000U mL^{-1}) 培育, 继而在 37°C 下培育 15 分钟。接着用 1×PBS 缓冲液洗涤消化的 RNA 两次, 继而在克列诺缓冲液 (20 μL , 1× 新英格兰生物实验室, 伊普斯威奇, MA) 和生物素标记的 dATP (1 μL , 0.4mM, 英维罗根 (Invitrogen), 卡尔斯巴德 (Carlsbad), CA) 中用克列诺较大片段 (0.5 μL , 5000U mL^{-1}) 培育芯片 A 和 D, 而芯片 C 将 dNTP 施加到其上。所述芯片在 37°C 下培育 30 分钟, 继而用 1×PBS 缓冲液洗涤。所述芯片用金标记的抗生蛋白链菌素 (4 μL) 在金缀合物稀释缓冲液 (100 μL , KPL 公司, 盖瑟斯堡 (Gaithersburg), 马里兰州 (Maryland)) 中培育 1 小时, 继而用 1×PBS 缓冲液洗涤。随后, 施加 100 μL 银增强溶液直到观测到暗点。所述芯片用大量水洗涤以阻止进一步银沉积并且风干。使用 CCD 摄像机获取照片。

[0209] viii. 多个病原体的选择性和同时检测

[0210] 将由 LacZ、炭疽芽孢杆菌以及禽流感设计的不同探针固定在芯片上以用于选择性和同时检测研究。所述芯片接着用 StartingBlock 阻断缓冲液培育 20 分钟。随后, 所述芯片用 5×SSC 缓冲液中的不同 RNA 浸没并且在 37°C 下培育 15 分钟。未结合的 RNA 用 1×PBS 缓冲液洗涤两次。所述芯片接着用 RNA 酶 H 缓冲液 (20 μL , 1× 新英格兰生物实验室, 伊普斯威奇, MA) 中的 RNA 酶 H (0.5 μL , 5000U mL^{-1}) 培育, 继而在 37°C 下培育 15 分钟。消化的 RNA 接着用 1×PBS 缓冲液洗涤两次, 继而在克列诺缓冲液 (20 μL , 1× 新英格兰生物实验室, 伊普斯威奇, MA) 和生物素标记的 dATP (1 μL , 0.4mM, 英维罗根, 卡尔斯巴德, CA) 中用克列诺较大片段 (0.5 μL , 5000U mL^{-1}) 培育。所述芯片在 37°C 下培育 30 分钟, 继而用 1×PBS 缓冲液洗涤。所述芯片用金标记的抗生蛋白链菌素 (4 μL) 在金缀合物稀释缓冲液 (100 μL , KPL 公司, 盖瑟斯堡, 马里兰州) 中培育 1 小时, 继而用 1×PBS 缓冲液洗涤。随后,

施加 100 μ L 银增强溶液直到观测到暗点。所述芯片用大量水洗涤以阻止进一步银沉积并且风干。使用 CCD 摄像机获取照片。

[0211] ix. 芯片上的登革热特异性

[0212] 由登革热病毒 (DENV) RNA 的不同部分设计不同探针以用于特异性研究。以 100 μ M 点样四种登革热血清型探针并且在 37 $^{\circ}$ C 下培育 30 分钟。然后, 所述芯片用 StartingBlock (TBS, 皮尔斯 (Pierce), 罗克福德 (Rockford), IL) 阻断缓冲液培育 20 分钟。接着用 5 $\times$ SSC 缓冲液中的 DENV-1 RNA 浸没所述芯片。在 65 $^{\circ}$ C 下培育所述芯片 15 分钟。用 1 $\times$ PBS 洗涤未结合的 RNA 两次。所述芯片接着用 RNA 酶 H 缓冲液 (20 μ L, 1 $\times$ 新英格兰生物实验室, MA) 中的 RNA 酶 H (0.5 μ L, 5000U/mL) 培育, 继而在 65 $^{\circ}$ C 下培育 15 分钟。消化的 RNA 接着用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤三次, 继而在克列诺缓冲液 (20 μ L, 1 $\times$ 新英格兰生物实验室, MA) 和生物素标记的 dATP (1 μ L, 0.4mM, 英维罗根, 卡尔斯巴德, CA) 中用克列诺较大片段 (0.5 μ L, 5000U/mL) 培育。所述芯片在 65 $^{\circ}$ C 下培育 30 分钟, 继而用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤三次。随后, 所述芯片用金标记的抗生蛋白链菌素 (4 μ L) 在金缀合物稀释缓冲液 (100 μ L, KPL 公司, 盖瑟斯堡, 马里兰州) 中培育, 继而用 1 $\times$ PBS 洗涤三次。随后, 施加 100 μ L 银增强溶液 (1:1, BB 国际公司, 加的夫 (Cardiff), CF14 5DX, 英国) 直到观测到暗点。所述芯片用水洗涤以阻止银进一步沉积在金纳米粒子上。在干燥后, 使用 CCD 摄像机获取照片。

[0213] x. RNA 微芯片上的 RNA 检测的灵敏度

[0214] 用 LacZ 探针固定芯片 30 分钟, 其后将其用 TBS 阻断缓冲液培育 20 分钟。所述芯片接着用 5 $\times$ SSC 缓冲液中的不同浓度 LacZ RNA 浸没, 并且在 37 $^{\circ}$ C 下培育 15 分钟。用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤未结合的 RNA 两次。所述芯片接着用 RNA 酶 H 缓冲液 (20 μ L, 1 $\times$ 新英格兰生物实验室, 伊普斯威奇, MA) 中的 RNA 酶 H (0.5 μ L, 5000U mL $^{-1}$) 培育, 继而在 37 $^{\circ}$ C 下持续 15 分钟。消化的 RNA 接着用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤两次, 继而在克列诺缓冲液 (20 μ L, 1 $\times$ 新英格兰生物实验室, 伊普斯威奇, MA) 和生物素标记的 dATP (1 μ L, 0.4mM, 英维罗根, 卡尔斯巴德, CA) 中用克列诺较大片段 (0.5 μ L, 5000U mL $^{-1}$) 培育。所述芯片在 37 $^{\circ}$ C 下培育 30 分钟, 继而用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤。所述芯片接着用金标记的抗生蛋白链菌素 (4 μ L) 在金缀合物稀释缓冲液 (100 μ L, KPL 公司, 盖瑟斯堡, 马里兰州) 中培育, 继而用 1 $\times$ KPL 洗涤缓冲液洗涤。随后, 施加 100 μ L 银增强溶液直到观测到暗点。所述芯片用大量水洗涤以阻止进一步银沉积。在风干后, 使用 CCD 摄像机获取照片。

[0215] xi. 快速检测

[0216] 将三个不同探针固定在所述芯片上: 生物素标记的 LacZ 探针、LacZ 探针以及 BA 探针。在固定后, 所述芯片用 5 $\times$ SSC 缓冲液中的不同浓度 LacZ RNA 样品浸没, 并且在 37 $^{\circ}$ C 下培育 5 分钟。未结合的 RNA 用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤两次。随后, 所述芯片用 RNA 酶 H 缓冲液 (20 μ L, 1 $\times$ 新英格兰生物实验室, 伊普斯威奇, MA) 中的 RNA 酶 H (0.5 μ L, 5000U/mL) 培育, 继而在 37 $^{\circ}$ C 下培育 5 分钟。消化的 RNA 接着用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤两次, 继而在克列诺缓冲液 (20 μ L, 1 $\times$ 新英格兰生物实验室, MA) 和生物素标记的 dATP (1 μ L, 0.4mM, 英维罗根, 卡尔斯巴德, CA) 中用克列诺较大片段 (0.5 μ L, 5000U/mL) 培育。所述芯片在 37 $^{\circ}$ C 下培育 5 分钟, 继而用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤。所述芯片在 37 $^{\circ}$ C 下用金标记的抗生蛋白链菌素 (4 μ L) 在金缀合物稀释缓冲液 (100 μ L, KPL 公司, 盖瑟斯堡, 马里兰州) 中培育 10 分钟, 继而用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤。随后, 施加 100 μ L 银增强溶液并且在 37 $^{\circ}$ C 下培育 15 分钟, 其

后观测到暗点。所述芯片用水洗涤以阻止进一步银沉积并且风干。使用 CCD 摄像机获取照片。在小于 1 小时内实现检测。

[0217] xii. 针对 RNA 微芯片检测由大肠杆菌总 RNA 制备 RNA 样品

[0218] 给 10mL 卢里亚培养液 (Luria Broth) (LB, 密苏里州圣路易斯的西格玛阿尔德里奇) 接种细菌 (大肠杆菌 K-12MG1655。大肠杆菌细胞; 10 μ L 细胞培养物) 在 37°C 下在 220RPM 的振荡下培育过夜。接着将过夜培养物添加到含有灭菌 LB (100mL) 的 250mL 爱伦美氏烧瓶 (Erlenmeyer flask) 中, 继而拆分 (各 50mL) 并且在 37°C 下培养 1 小时。将异丙基 β -D-1- 硫代半乳糖苷 (IPTG, 密苏里州圣路易斯的西格玛阿尔德里奇) 添加到一个烧瓶中 (最终浓度 1mM)。对于另一个, 添加 D-(+) 葡萄糖 (密苏里州圣路易斯的西格玛) (最终浓度 1mM)。在 37°C 下培育两种培养物 4 小时之后, 接着通过离心采集细胞。将细胞团粒储存在 -80°C 下以便稍后用于 RNA 提取和分离。根据 MasterPure 完整 RNA 纯化试剂盒 (中心生物技术麦迪逊 (Epicenter Biotechnologies Madison), WI) 提取并且纯化大肠杆菌的总 RNA, 并且将分离的总 RNA 溶解于 TE 缓冲液 [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA] 中。通过测量吸光度使用 UV 可见光分光光度计 (瓦里安公司 (Varian Inc.), 萨那克拉拉 (Sana Clara), CA) 测定总 RNA 的量。

[0219] 通过加热、碱催化和 / 或金属催化的断裂进行 RNA 断裂。对于碱催化的断裂, 在 95°C 下总 RNA (0.1-10 μ L, 3ng/ μ L) 被氢氧化钠 (NaOH, 最终浓度 50-500mM) 消化持续几分钟。中和水解反应并且通过添加乙酸淬灭, 其提供准备好微芯片杂交和检测的所制备的 RNA 样品。对于金属离子催化的断裂, 在 95°C 下与 Tris-HCl (pH 7.4, 25mM) 中的氯化镁 ($MgCl_2$, 最终浓度 10mM) 和氯化锌 ($ZnCl_2$, 最终浓度 10mM) 一起加热总 RNA 持续 5 分钟。在冷却下来之后, 将 5 $\times$ SSC 添加到片段化总 RNA 中, 其提供准备好微芯片杂交和检测的所制备的 RNA 样品。

[0220] xiii. 通过直接 NaOH 处理由大肠杆菌快速制备 RNA 样品

[0221] 在 95°C 下用 NaOH (20 μ L, 400mM) 处理大肠杆菌团粒 (如来自 1mL LB 培养物) 3 分钟, 继而中和 (添加 2 μ L, 4M 乙酸) 并且离心 (10,000rpm) 1 分钟以去除沉淀物。上清液是针对微芯片杂交和检测所制备的 RNA 样品。RNA 样品制备可以在 5 分钟内完成。

[0222] xiv. 用于 RNA 微芯片上直接并且快速的 RNA 检测的一般方案

[0223] 将溶解于 5 $\times$ SSC 缓冲液 (0.75M NaCl, 75mM 柠檬酸钠, pH 7.0) 中的 RNA 样品 (20 μ L) 添加到用所设计的 RNA 探针固定的微芯片上, 继而在 37°C 下培育并且杂交 5-15 分钟。通过用 1 $\times$ PBS 缓冲液 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 11.8mM Na- PO_4 , pH 7.4) 洗涤两次来去除未结合的 RNA。所述芯片接着在 37°C 下用 1 $\times$ RNA 酶 H 缓冲液 (20 μ L) 中的 RNA 酶 H (2.5U, 新英格兰生物实验室, 伊普斯威奇, MA) 培育 5-15 分钟。通过用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤所述芯片两次, 继而在 37°C 下在克列诺缓冲液 (20 μ L) 中用克列诺 (2.5U, 新英格兰生物实验室, 伊普斯威奇, MA) 和生物素标记的 dATP (各 0.4mM 最终浓度; 英维罗根, 卡尔斯巴德, CA) 培育 5-20 分钟来去除消化的 RNA。在用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤所述芯片两次之后, 所述芯片用抗生蛋白链菌素标记的金纳米粒子 (4 μ L, KPL 公司, 盖瑟斯堡, 马里兰州) 在其缓冲液 (100 μ L) 中培育 5-30 分钟, 继而用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤所述芯片两次。随后, 在所述芯片上施加银增强溶液 (100 μ L 1:1 混合物; BB 国际公司, 加的夫, CF14 5DX, 英国), 并且在 37°C 下培育所述芯片 5-30 分钟直到暗点阵列形成于芯片的表面上。所述芯片用水洗涤以淬灭

银沉积并且自然干燥。芯片上的样点阵列通过肉眼（或借助于放大镜）观测到以便直接并且快速的 RNA 检测（整个检测时间 45 分钟，包括 RNA 样品制备）。还对 RNA 微芯片的表面上的样点阵列图像进行照相并且用显微镜-CCD-摄像机成像系统对其进行分析。

[0224] 应理解，所公开的方法和组合物不限于所描述的特定方法、方案以及试剂，因为这些可以变化。还应理解，本文所使用的术语是仅出于描述特定实施例的目的，并且并不意图限制本发明的范围，本发明的范围将仅受所附权利要求书限制。

[0225] 必须指出，除非上下文另外明确规定，否则如本文和所附权利要求书中所使用的单数形式“一 (a)”、“一 (an)”以及“所述”包括复数个表示物。因此，举例来说，提及“嵌合探针”包括多个此类嵌合探针，提及“嵌合探针”是对一个或多个嵌合探针和所属领域的技术人员已知的其等效物等的提及。

[0226] 在本说明书的说明书和权利要求书通篇中，词“包含 (comprise)”和所述词的变化形式（如“包含 (comprising)”和“包含 (comprises)”）意指“包括（但不限于）”，并且并不意图排除例如其它添加剂、组分、整数或步骤。

[0227] “任选的”或“任选地”意指随后描述的事件、情况或材料可能发生或存在或可以不发生或不存在，并且所述描述包括所述事件、情况或材料发生或存在的实例以及其不发生或不存在的实例。

[0228] 范围在本文中可以表达为“约”一个特定值和 / 或到“约”另一个特定值。当表达此类范围时，除非上下文特定另外表示，否则还特定涵盖并且视为公开的是一个特定值和 / 或到另一个特定值的范围。类似地，当值表示为近似值时，使用先行词“约”，应理解，特定值形成另一个特定涵盖的实施例，除非上下文特定另外表示，否则其应被视为公开的。将进一步理解，除非上下文特定另外表示，否则每个范围的端点相对于另一个端点以及独立于另一个端点都是重要的。最后，应理解，除非上下文特定另外表示，否则明确公开范围内所含有的所有个别值和值的子范围也是特定涵盖的并且应被视为公开的。不管在特定情况下这些实施例中的一些或全部是否明确公开，前述内容都适用。

[0229] 除非另有定义，否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与所公开的方法和组合物所属领域的技术人员通常所理解相同的含义。尽管可以在本发明的方法和组合物的实践或测试中使用类似或等效于本文所描述的那些的任何方法和材料，但确切地说适用的方法、装置和材料如所描述。本文所引用的公开案和其引用的材料在此以引用的方式特定地并入。不应将本文中的任何内容解释为承认本发明无权先于凭借先前发明的此类公开内容。不承认任何参考文献构成现有技术。参考文献的论述陈述了其作者的断言，并且申请人保留质疑所引用的文献的准确性和相关性的权利。将清楚地理解，虽然在本文中提及多个公开案，但此类参考文献未不承认这些文献中的任一个形成所属领域中的公共常识的一部分。

[0230] 虽然材料、组合物、组分、步骤、技术等描述可以包括诸多选择方案和替代方案，但这不应解释为并且不为承认此类选择方案和替代方案彼此等效或尤其是显而易见的替代方案。因此，举例来说，不同特异性结合分子的清单不表示所列出的特异性结合分子相比于另一个是显而易见的一个，或承认等效性或显而易见性。

[0231] 本文所公开的每一个组分意图并且应被视为本文所特定公开的。此外，在本发明内可以鉴别的每一个子组意图并且应被视为本文所特定公开的。因此，特定涵盖，任何组分

或组分的子组可以特定地包括或从使用中排除或包括在或排除出组分的清单。

[0232] 所属领域的技术人员顶多使用常规实验即可识别或能够确定本文所描述的方法和组合物的特定实施例的许多等效物。此类等效物意图由接下来的权利要求书涵盖。

[0001]

序列表

<110> 佐治亚州立大学研究基金会公司
黄真

<120> 使用纳米粒子辅助信号放大的 RNA 微芯片检测

<130> GCI15HK3184

<150> 61/808,447

<151> 2013-04-04

<160> 14

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> RNA

<213> 大肠杆菌

<400> 1

auguggauug gcgauaaaaa acaa

24

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LacZ 探针

<220>

<213> 多样性特征

<222> (1)..(10)

<223> DNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (11)..(25)

<223> RNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (11)..(25)

[0002]

<223> 2'-O Me 修饰

<220>

<213> 多样性特征

<222> (26).. (35)

<223> DNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (35).. (35)

<223> NH₂ 修饰

<400> 2

gttgtttttt aucgccaauc cacauctgtg aaaga

35

<210> 3

<211> 35

<212> RNA

<213> 炭疽芽孢杆菌

<400> 3

aucuuuagaa gcauuaucug aagauaagaa aaaaa

35

<210> 4

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BA 探针

<220>

<213> 多样性特征

<222> (1).. (9)

<223> DNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (10).. (24)

<223> RNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (10).. (24)

[0003]

<223> 2'-O Me 修饰

<220>

<213> 多样性特征

<222> (25).. (37)

<223> DNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (37).. (37)

<223> NH₂ 修饰

<400> 4

gatttttttc uuaucucag auaatgcttc taaagat

37

<210> 5

<211> 36

<212> RNA

<213> 禽流感病毒

<400> 5

aaucuuucug aaaauuugca gaccuaccaa aaacga

36

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BF 探针

<220>

<213> 多样性特征

<222> (1).. (8)

<223> DNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (9).. (27)

<223> RNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (9).. (27)

[0004]

<223> 2'-O Me 修饰

<220>

<213> 多样性特征

<222> (28).. (37)

<223> DNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (37).. (37)

<223> NH₂ 修饰

<400> 6

tcgttttttgg uaggucugca aaauuuucaaa gaagatt

37

<210> 7

<211> 36

<212> RNA

<213> 禽流感病毒

<400> 7

cauuuaucgu cgccuuuuaaa uacgguuuga aaagag

36

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AF 探针

<220>

<213> 多样性特征

<222> (1).. (7)

<223> DNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (8).. (22)

<223> RNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (8).. (22)

[0005]

<223> 2'-O-Me 修饰

<220>

<213> 多样性特征

<222> (23).. (35)

<223> DNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (35).. (35)

<223> NH2 修饰

<400> 8

ctctttttcaa accguauuuu aggcgacgat aaatg

35

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 生物素标记的 LacZ DNA

<220>

<213> 多样性特征

<222> (1).. (1)

<223> 生物素-Cy3 修饰

<220>

<213> 多样性特征

<222> (35).. (35)

<223> NH2 修饰

<400> 9

gttggtttttt atcgccaatc cacatctgtg aaaga

35

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> 登革热病毒

<400> 10

ggaagcugua cgcauggggu a

21

[0006]

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 匹配 (M) 探针

<220>

<213> 多样性特征

<222> (9).. (21)

<223> 2'-O-Me-r 修饰

<220>

<213> 多样性特征

<222> (21).. (21)

<223> NH2 修饰

<400> 11

taccccatgc guacagcuuc c

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 错配-1 (Mis-1) 探针

<220>

<213> 多样性特征

<222> (9).. (21)

<223> 2'-O-Me-r 修饰

<220>

<213> 多样性特征

<222> (21).. (21)

<223> NH2 修饰

<400> 12

tacgccatgc guacagcuuc c

21

[0007]

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 错配-2 (Mis-2) 探针

<220>
<213> 多样性特征
<222> (9)..(21)
<223> 2'-O-Me-r 修饰

<220>
<213> 多样性特征
<222> (21)..(21)
<223> NH₂ 修饰

<400> 13
tacaccgtgc guacagcuuc c 21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 错配-3 (Mis-2) 探针

<220>
<213> 多样性特征
<222> (9)..(21)
<223> 2'-O-Me-r 修饰

<220>
<213> 多样性特征
<222> (21)..(21)
<223> NH₂ 修饰

<400> 14
tatgccacgc guacagcuuc c 21

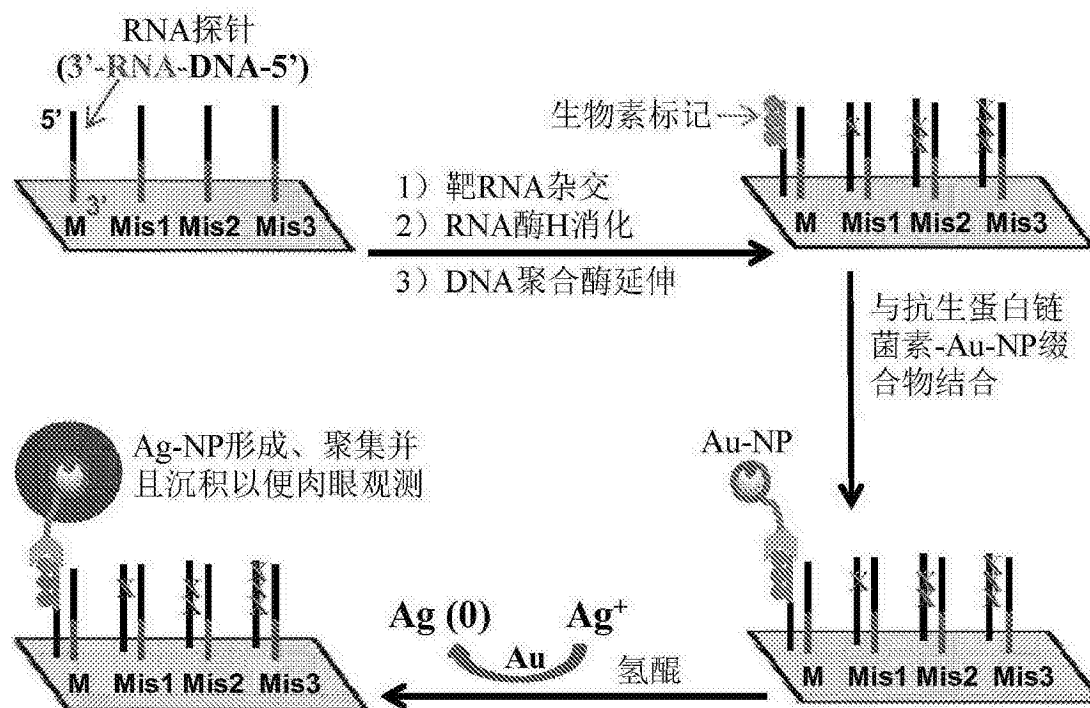


图 1

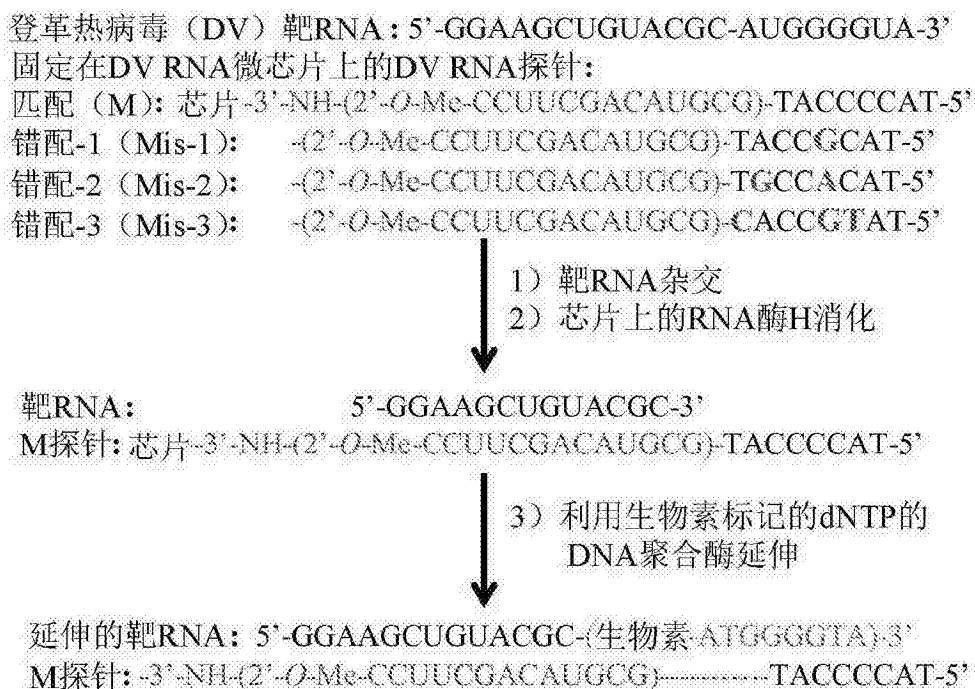


图 2A

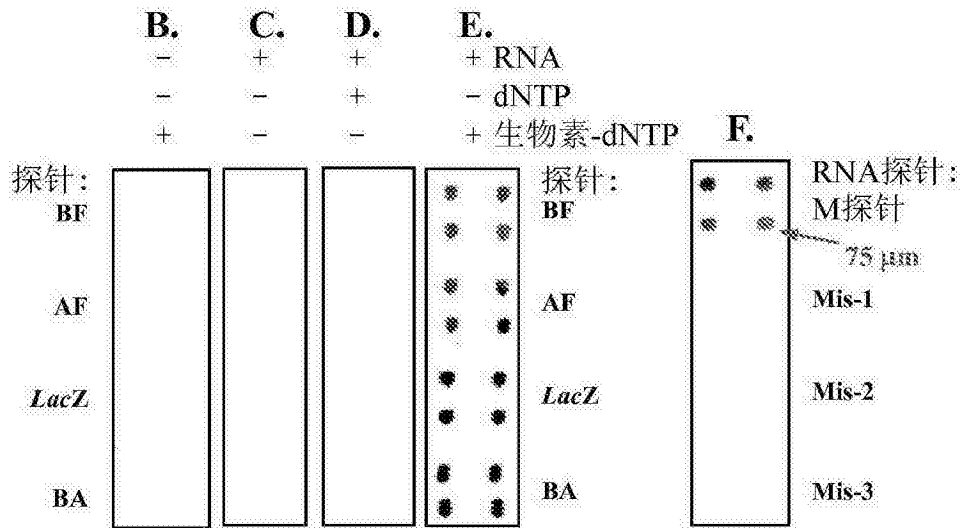


图 2B、2C、2D、2E 以及 2F

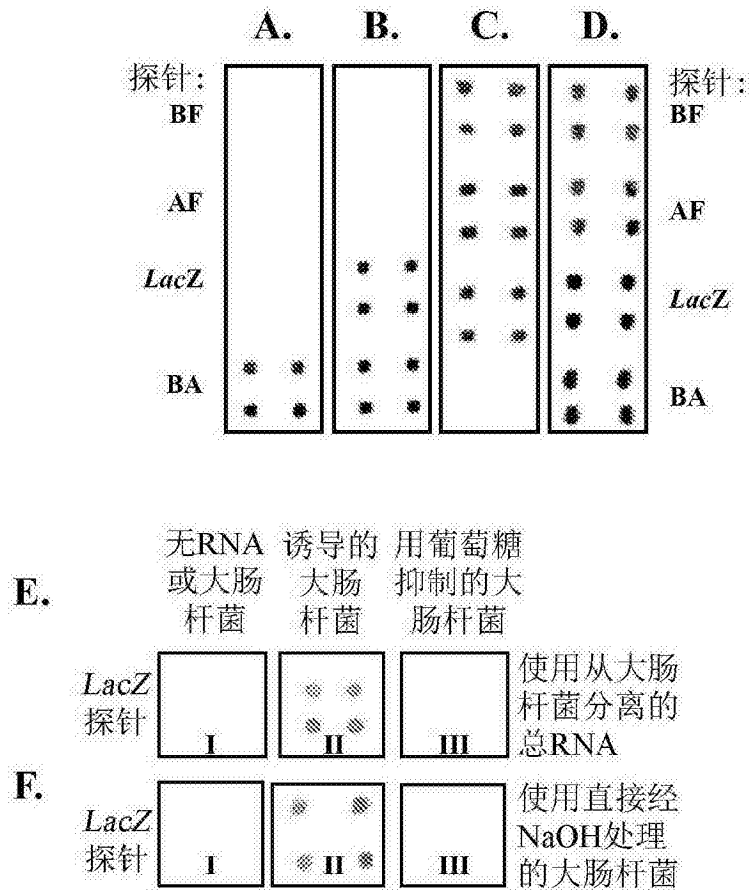


图 3A、3B、3C、3D、3E 以及 3F

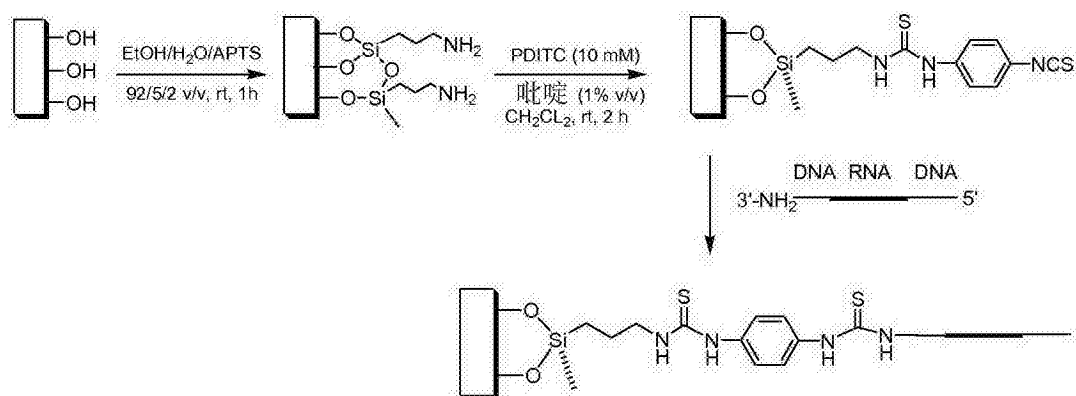


图 4

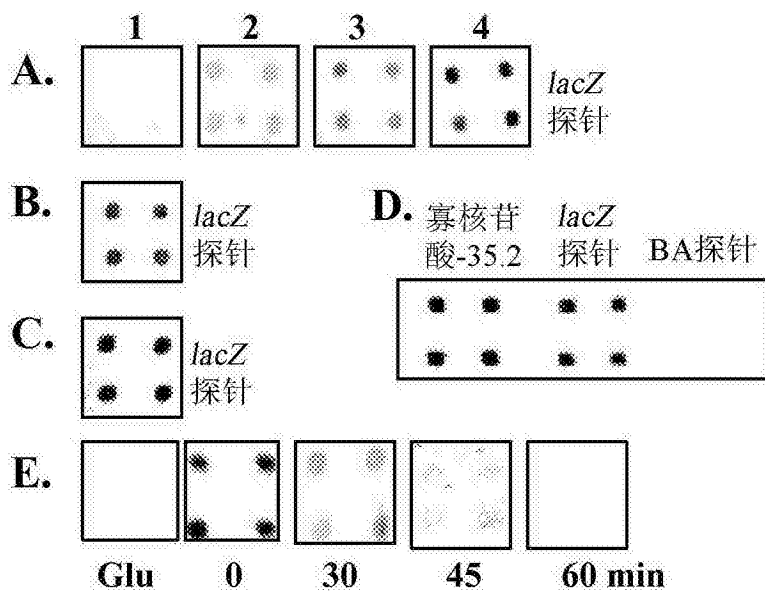


图 5A、5B、5C、5D 以及 5E