(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1694967 B
(45)授权公告日 2010.12.15

(21)申请号 03824651.1

(22)申请日 2003.08.26

(30)优先权数据
60/406,266 2002.08.26 US
10/648,945 2003.08.26 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2005.04.26

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2003/026989 2003.08.26

(87)PCT申请的公布数据
WO2004/092324 EN 2004.10.28

(73)专利权人 加州大学评议会
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 G·C·巴赞 B·S·盖洛德 S·王

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 郭广迅 王景朝

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)
C07H 21/00(2006.01)
C07H 21/02(2006.01)
C07H 21/04(2006.01)

(56)对比文件
chen 1..highly sensitive biological and chemical sensors based onreversible fluorscence quenching in conjugated polymer.PNAS96 22.1999,96(22),12287-12292.

Wang,J.survey and summary from DNA biosensors to gene chips.Nucleic Acids Reseach28 16.2000,28(16),3011-3016.

审查员 赵彦豪

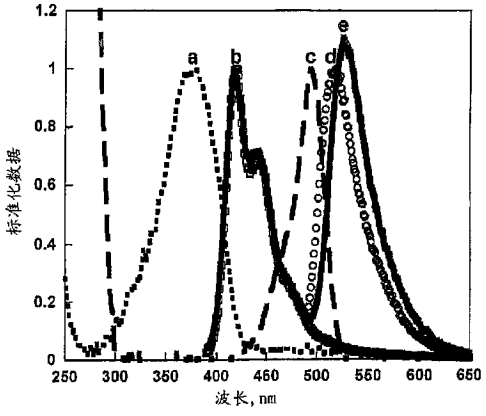
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 5 页

(54)发明名称

利用集光多发色团的多核苷酸的检测和分析的方法以及组合物

(57)摘要

提供了测定样品中目标多核苷酸的方法、组合物和生产的商品。将一种怀疑含有目标多核苷酸的样品与聚阳离子多发色团和同目标多核苷酸互补的传感器多核苷酸相接触。传感器多核苷酸包含一种信号发色团以接收来自受到激发的多发色团的能量并且在目标多核苷酸存在的情况下增强发射。该方法能够以多种形式进行利用。还提供包含实施此方法的试剂的试剂盒。



CN 1694967 B

1. 测定样品中目标多核苷酸的测试方法，包括：

提供怀疑含有目标多核苷酸的样品；

提供在激发后能够将能量传递给信号发色团的聚阳离子多发色团；

提供与目标多核苷酸互补的阴离子传感器多核苷酸，所述传感器多核苷酸缀合到信号发色团上，其中所述传感器多核苷酸能够与多发色团相互作用并且在多发色团激发后能够由信号发色团产生发射光，并且其中与非互补性多核苷酸存在的情况相比在目标多核苷酸存在的情况下多发色团激发后由信号发色团产生更大量的发射光；

在传感器多核苷酸能够与倘若存在的目标多核苷酸杂交的条件下，将样品与传感器多核苷酸和多发色团在溶液中进行接触；

以光源激发多发色团；和

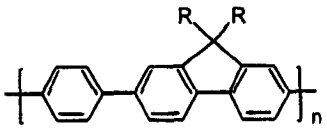
检测由信号发色团发射的光是否在样品存在的情况下增强。

2. 权利要求 1 的方法，其中多发色团包含树枝状化合物。

3. 权利要求 1 的方法，其中多发色团包含半导体纳晶体。

4. 权利要求 1 的方法，其中多发色团包含缀合分子。

5. 权利要求 4 的方法，其中多发色团具有结构

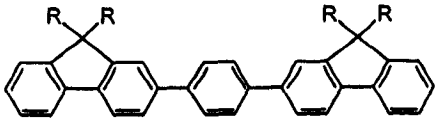


1 -R = -$(CH_2)_6NMe_3^{\oplus}I^{\ominus}$

。

6. 权利要求 4 的方法，其中多发色团包含缀合分子的聚集体。

7. 权利要求 6 的方法，其中聚集体包含具有结构



2 -R = -$(CH_2)_6NMe_3^{\oplus}I^{\ominus}$

的分子。

8. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中样品在足量有机溶剂存在下与传感器多核苷酸和多发色团相接触以减少传感器多核苷酸和多发色团之间的疏水相互作用。

9. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中在基片上实施该方法。

10. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中样品与多种不同的具有相应不同序列的传感器多核苷酸相接触，每种所述的不同传感器多核苷酸都包含相应不同的信号发色团，其中每种所述的不同传感器多核苷酸都能够选择性地与相应不同的目标多核苷酸杂交。

11. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中发射的光的量被量化并且用于测定样品中目标多核苷酸的量。

12. 权利要求 1-7 任一项的方法，进一步包括将溶液中的样品与传感器多核苷酸、多发色团和第二信号发色团接触，所述第二发色团在目标存在的情况下能够从信号发色团吸收能量并发射光，并且其中检测由信号发色团发射的光是否在样品存在的下增强包括检测由第二信号发色团发射的光是否在样品存在的情况下增强。

13. 权利要求 12 的方法，其中第二信号发色团是多核苷酸特异性染料。

14. 测定样品中目标多核苷酸的多核苷酸传感溶液，包含：

信号发色团；

包含选自树枝状化合物和缀合聚合物的分子的聚阳离子多发色团，其中当将其接近信号发色团时所述多发色团能够在激发后将能量传递给信号发色团，其中当多发色团被激发时在被传感的目标多核苷酸存在的情况下由信号发色团能够产生更大量的能量；和

与目标多核苷酸互补的传感器多核苷酸。

15. 权利要求 14 的多核苷酸传感溶液，进一步包含在目标存在的情况下能够吸收来自信号发色团的能量并且发射光的第二信号发色团。

16. 权利要求 14 或 15 的多核苷酸传感溶液，其中溶液包含多核苷酸特异性的染料。

17. 测试样品中目标多核苷酸的试剂盒，包含：

与目标多核苷酸互补的传感器多核苷酸；

信号发色团；

聚阳离子多发色团，当将其接近信号发色团时所述多发色团能够在激发后将能量传递给信号发色团，其中所述传感器多核苷酸与多发色团相互作用并且在目标多核苷酸存在的情况下多发色团激发后由信号发色团产生可检测到的比在非互补性多核苷酸存在的情况下更大量的发射光；和

一个容纳试剂盒试剂的包装。

18. 权利要求 17 的试剂盒，进一步包含能够在目标存在的情况下吸收来自信号发色团的能量并且发射光的第二信号发色团。

19. 权利要求 17 或 18 的试剂盒，其中试剂盒包含多核苷酸特异性染料。

20. 测定样品中目标多核苷酸的传感复合物，包含：

与目标多核苷酸互补的阴离子传感器多核苷酸，所述传感器多核苷酸附着于信号发色团上；

聚阳离子多发色团，当将其接近信号发色团时所述多发色团能够在激发后将能量传递给信号发色团，其中所述传感器多核苷酸与多发色团相互作用并且在目标多核苷酸不存在的情况下多发色团激发后能够由信号发色团产生发射光；以及其中在目标多核苷酸存在的情况下多发色团激发后由信号发色团产生比在非互补性多核苷酸存在的情况下更大量的发射光。

21. 权利要求 20 的复合物，其中复合物在基片上形成。

22. 权利要求 20 或 21 的复合物，其中复合物进一步包含能够在目标存在的情况下吸收来自信号发色团的能量并且发射光的第二信号发色团。

利用集光多发色团的多核苷酸的检测和分析的方法以及组合物

[0001] 关于联邦政府资助研究的声明

[0002] 产生本发明的工作是在来自国家卫生研究院补助金号 GM6295801、来自国家科学基金的补助金号 DMR-0097611 和来自海军研究办公室的补助金号 N00014-98-1-0759 之下进行的。美国政府可以在本发明中具有有限的权力。

技术领域

[0003] 本发明涉及在样品中检测和分析多核苷酸的方法、商品和组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 允许实时和高灵敏度地检测 DNA 序列的方法具有很大的科学和经济利益[1,2,3]。它们的应用包括医学诊断、遗传突变的鉴定、基因送递监控和特定的基因组技术[4]。阳离子有机染料如溴化乙锭和噻唑橙，当插入双链 DNA(dsDNA) 的沟槽中时发射，并作为直接的 DNA 杂交探针而起作用，但是缺乏序列特异性[5,6]。进行链特异性分析的能量 / 电子传递发色团对存在，但需要两种核酸的化学标记，或相同变化链的双重修饰 (例如分子信标)[7,8]。在标记两种 DNA 位点中的困难导致了低得率、高成本和单一标记的杂质，这降低了检测敏感性[9]。

[0006] 本领域需要检测和分析样品中特定多核苷酸的方法，以及在这种方法中有用的组合物和生产商品。

[0007] 发明概述

[0008] 提供检测和分析样品中目标多核苷酸的方法、组合物和生产的商品。

[0009] 将一种怀疑含有目标多核苷酸的样品与聚阳离子多发色团和一种同该目标多核苷酸互补的传感器多核苷酸相接触。传感器多核苷酸包含一个阴离子主链，如一般的磷酸糖类主链，并与一种信号发色团缀合。在样品中目标多核苷酸存在的情况下，信号发色团能够从激发的聚阳离子多发色团中更有效地获得能量并发出增加的能够检测的光或信号。目标多核苷酸能够当其在样品中出现时得到分析，或能够在分析之前或结合分析进行扩增。

[0010] 尽管阴离子传感器能够与阳离子多发色团在缺少目标的情况下结合，相对于由非互补序列混合物所产生的信号，在结合目标多核苷酸以形成双链复合物之后已发现令人惊讶的信号增强。这种信号的增强能够用来在测试样品中目标多核苷酸的检测方法中进行应用。

[0011] 提供了含有对于实施本发明方法有用的试剂的溶液，以及含有这种试剂的试剂盒。还提供了由多发色团和传感器多核苷酸形成的传感或检测复合物。这些方法能够用于多重配置中，其中多个不同的传感器多核苷酸用于测试多个不同的目标多核苷酸。这些方法能够任选在一种表面上进行，例如利用一种表面结合的聚阳离子多发色团；该表面可以是一种传感器。这些方法还能够以均一的形式提供。本文所述的这些方法和商品能够用作其它检测多核苷酸技术的替代物。

[0012] 附图简述

[0013] 图 1 描述了聚合物 1 和一种荧光素缀合传感器多核苷酸的吸收 (a(点状线) 和

c(短划线))和发射(b(正方形)和d(圆圈))光谱。分别对聚合物1和传感器多核苷酸于380nm和480nm进行激发。于380nm激发的聚合物1和传感器多核苷酸的能量传递复合物也以黑色(e,实线)显示。

[0014] 图2给出了传感器系统的发射光谱,所述传感器系统于pH＝8的10mmol柠檬酸钠和100mmol氯化钠缓冲液中包含杂交的(实线)和未杂交的(点状线)传感器多核苷酸。光谱相对于聚合物1的发射进行标准化。

[0015] 图3描述了由多发色团(聚合物1)的激发以及向传感器多核苷酸的能量传递以及随后向多核苷酸特异性染料(溴化乙锭)的能量传递所产生的传感器系统的发射光谱,所述传感器系统包含杂交的(实线)和未杂交的(点状线)传感器多核苷酸。测量是在磷酸钾-氢氧化钠缓冲溶液(50mM,pH＝7.40)中。见实施例4。

[0016] 图4描述了在传感器系统中一种多核苷酸特异性染料(溴化乙锭,EB)的放大的发射光谱,所述传感器系统包含杂交的(实线)传感器多核苷酸。放大的发射信号是多发色团(聚合物1)的激发以及向传感器多核苷酸的能量传递以及随后向EB的能量传递的结果。在双链DNA(点状线)中的直接的EB发射以及由传感器多核苷酸激发以及随后向EB的能量传递所产生的发射(短划线)证明了由聚阳离子多发色团所提供的增强的信号。测量是在磷酸钾-氢氧化钠缓冲溶液(50mM,pH＝7.40)中。见实施例5。

[0017] 图5给出了在磷酸钾-氢氧化钠缓冲溶液(50mM,pH＝7.40)中EB以及杂交的(实线)和未杂交的(点状线)传感器多核苷酸都存在的情况下,在聚合物1激发后EB的发射光谱。见实施例6。发射是仅仅在杂交的双链DNA的情况下由聚阳离子多发色团向插入的EB的能量传递的结果。

[0018] 发明详述

[0019] 目前的DNA和RNA传感器的技术(包括“基因芯片”和“DNA芯片”)依赖于荧光标记(生光团)与DNA单链的共价附着,从而依赖于样品或样品组分的标记,具有由样品间标记反应效率的不同所产生的不可避免的问题,因而需要复杂的相互校准。其它的系统依赖于多重标记的探针(例如,分子信标,**Taqman®**、**Scorpion®**探针、**Eclipse®**探针),从而需要生光团和猝灭剂与精确设计的序列之间的多重附着。

[0020] 发明方法包括将样品与包含至少两种组分的水溶液相接触;(a)一种集光的、聚阳离子的、发光的多发色团系统如,例如一种缀合的聚合物、半导体量子点状或树状结构,它是水溶性的,和(b)一种与发光信号发色团(称作“寡-C*”)缀合的传感器多核苷酸。具有信号发色团波长特性的光的发射表明具有与传感器多核苷酸序列互补的碱基序列的目标多核苷酸溶液的存在。通过利用具有不同碱基序列和不同信号发色团的多个传感器多核苷酸(寡$_1$-C_1*、寡$_2$-C_2*等),能够独立地检测多个各自具有特异性碱基序列的多核苷酸。可以引入第三种组分如多核苷酸特异性染料以通过进一步将能量从传感器多核苷酸传递给多核苷酸特异性染料来提高选择性。

[0021] 选择集光发色团和信号发色团(C*)以便两个物种的吸收波段具有最小的重叠,从而两个物种的发光发射光谱具有不同的波长。当在水溶液中进行制备时,集光和发光多发色团系统带正电(例如带正电的缀合聚合电解质)。通过静电引力确保带负电传感器多核苷酸和带正电集光和发光多发色团系统之间的接近。当暴露于具有集光发色团吸收波段中波长的入射辐射时,有来自信号发色团的发射,例如通过**Förster**能量传递机制。在加入

目标多核苷酸如具有与传感器多核苷酸序列相互补的碱基序列的单链 DNA(ssDNA) 之后，ssDNA 与传感器多核苷酸杂交，导致沿着 DNA 链负电荷密度的升高[10,11]。在这些环境下，并考虑到严格的静电力，传感器多核苷酸和带正电的集光多发色团系统之间的相互作用将是有利的，导致有效的能量传递和来自信号发色团的强烈发射。当加入具有与传感器多核苷酸序列不相互补的碱基序列的 ssDNA 时，不发生碱基对杂交。通过与非互补 ssDNA 的竞争来筛选集光多发色团系统与传感器多核苷酸之间的静电络合。因而，集光多发色团系统和寡 -C*之间的平均距离在非互补序列存在的情况下较大，导致较低效率的向信号发色团的能量传递。当在其互补目标存在的情况下信号寡 -C*的发射比在其非互补链存在的情况下要强烈。整个方案提供了一种传感器以在试验溶液中检测具有特异性碱基序列的目标多核苷酸的存在。通过使用具有不同碱基序列和不同信号发色团的多个传感器多核苷酸，能够单独检测多个目标。

[0022] 除了所述的方法，发明还提供含有至少两种组分的主要含水的溶液；(a) 一种阳离子多发色团，和 (b) 一种包含与信号发色团缀合的阴离子多核苷酸的“传感器多核苷酸”(寡 -C*)。

[0023] 如在实施例中所表明的，由水溶性多发色团如缀合的聚合物所提供的光学放大能够用来检测多核苷酸与传感器多核苷酸的杂交。这种放大能够通过利用较高分子量的水溶性缀合聚合物或其它结构如本文所述的聚阳离子多发色团增强。发明能够以利用荧光检测法的简易性的均一形式提供。发明能够用于检测扩增的目标多核苷酸或，由于大的信号放大，用作一种单独链的分析，而不需要多核苷酸的扩增。

[0024] 不像基因芯片技术，本发明不必需要在分析之前通过将生光团或发色团共价结合到包含于或源于样品的多核苷酸而对每个待分析样品进行标记。那些偶联方法在偶联效率的重复性上具有固有的困难并且产生对样品间相互校准的需要。

[0025] 本文所述的发明对于任何测试都是有用的，在所述测试中能够关于目标多核苷酸对样品进行分析。一般的测试包括测定样品中目标多核苷酸的存在或其相对量，或者测试可以是定量的或半定量的。

[0026] 发明的方法都能够以多种形式实施。通过与各个传感器多核苷酸缀合的不同信号发色团的应用，可以使用多种不同的传感器多核苷酸来检测样品中相应不同的目标多核苷酸。利用 2、3、4、5、10、15、20、25、50、100、200、400 或更多不同传感器多核苷酸提供多种方法，所述传感器多核苷酸能够同时用来测试相应不同的目标多核苷酸。

[0027] 这些方法能够在基片上，以及溶液中实施，尽管由于扩散问题溶液形式预计更快。因而测试能够，例如，在基片上以阵列形式实施，所述基片可以是一种传感器。这能够通过将一种测试组分锚定于或整合入基片，例如传感器多核苷酸、聚阳离子多发色团或二者之上。这些基片可以是玻璃、硅、纸、塑料的表面，或用作光电转换器的光电半导体 (如，但不限于，掺铟的硝酸镓或聚合的聚苯胺等) 的表面。给定的传感器多核苷酸的定位可以是已知的或在阵列形式中是可测定的，并且阵列形式可以是可微寻址的 (microaddressable) 或可纳寻址的 (nanoaddressable)。在一种变异型中，能够将一个或多个含有扩增产物的样品附着于基片，并且基片能够与一种或多种标记的传感器多核苷酸以及聚阳离子多发色团相接触。

[0028] 在进一步详述本发明之前，应理解本发明并不限于所述的特定方法、设备、溶液或

装置，因为这些方法、设备、溶液或装置当然能够变化。还应理解本文所用的术语仅仅是为了描述特定的实施方案的目的，并不限制本发明的范围。

[0029] 单数形式的使用包括复数含义，除非上下文清楚地另外指定。因而，例如，“一种目标多核苷酸”的含义包括多种目标多核苷酸，“一种信号发色团”的含义包括多种这类发色团，“一种传感器多核苷酸”的含义包括多种传感器多核苷酸等。此外，特定复数写法，如“二”、“三”等的使用理解为相同事物的较大数目，除非上下文清楚地另外指定。

[0030] 术语如“连接的”、“附着的”和“键合的”在本文中可交换使用并且包括直接以及间接的连接、附着、键合或缀合，除非上下文清楚地另外指定。当叙述一个范围的值时，应理解在所叙述的该范围的上限和下限之间的每一个中间整数值及其每个分数值也与这些值之间的小范围一起得到具体地公开。任何范围的上限和下限都能够独立地包括在该范围之内或排除于该范围之外，并且每个其中包括一个、零个或两个界限的范围也包括在发明之内。在讨论值具有固有的界限时，例如在一种组分能够以 0-100％的浓度存在时，或在水溶液的 pH 值能够由 1 到 14 时，对那些固有的界限进行具体地公开。在明确叙述一个值时，应理解与所叙述的值相同量的值也在发明的范围内，基于该值的范围也在发明的范围内。当公开一种组合时，该组合的要素的每种亚组合也得到具体地公开并且在发明的范围之内。相反地，在公开了不同的要素或要素组时，其组合也得到公开。在一个发明的任何要素公开为具有多个选择时，该发明的实施例也由此得到公开，所述发明中单一地将每一种选择或与其它选择组合排除在外；一个发明的一种以上的要素能够具有这类排除，并且由此也公开了具有这类排除的要素的所有组合。

[0031] 除非另外定义或上下文清楚地另外指定，本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域普通技术人员所通常理解的相同意义。尽管能够将与本文所述的那些相似或等同的任何方法和材料用于发明的实施或测试上，现在还是要描述优选的方法和材料。

[0032] 为了公开和描述参考文献所引的特定的材料和方法，在此将所提及的所有出版物引入作为参考。本文所讨论的出版物仅是基于其公开内容在本申请的申请日之前而提供。本文没有内容可以解释为承认本发明无权依靠优先权发明而早于这些公开内容。

[0033] 定义

[0034] 在描述本发明中，将会用到以下术语，并且如下所示进行定义。

[0035] 术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”在本文中可以交换使用指一种任何长度的核苷酸的聚合形式，并且可以包括核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸及其类似物，或其混合物。这些术语仅指分子的一级结构。因而，这些术语包括三链、双链和单链脱氧核糖核苷酸（“DNA”），以及三链、双链和单链核糖核苷酸（“RNA”）。它还包括多核苷酸的例如通过烷基化和 / 或通过加帽反应修饰的和未修饰的形式。

[0036] 不论是修饰的还是未修饰的，传感器多核苷酸都是阴离子化的并且能够在不存在目标多核苷酸的情况下与阳离子多发色团相互作用。目标多核苷酸在理论上能够加上电荷或去除电荷，尽管它一般预期是阴离子化的，例如 RNA 或 DNA。

[0037] 更具体地，术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”包括多脱氧核糖核苷酸（包含 2- 脱氧 -D- 核糖），多核糖核苷酸（包含 D- 核糖），包括剪接的或未剪接的 tRNA、rRNA、hRNA 和 mRNA，和其它类型的嘌呤或嘧啶碱基的 N- 或 C- 糖苷多核苷酸，和其它

包含磷酸或其它聚阴离子主链的聚合物，和其它合成的序列特异性核酸聚合物，前提是该聚合物包含构型允许如在 DNA 或 RNA 中所发现的碱基配对和碱基堆积的核碱基。在术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”，之间没有长度上的区别，且这些术语在本文可互换使用。这些术语仅仅指分子的一级结构。因而，这些术语包括，例如 3’- 脱氧 -2’，5’-DNA、寡脱氧核糖核苷酸 N3’P5’氨基磷酸酯、2’-O- 烷基取代 RNA、双链和单链 DNA，以及双链和单链 RNA，及其杂交物包括例如 DNA 和 RNA 之间的杂交物，并且还包括已知类型的修饰，例如标记、烷基化、“帽”、一个或多个用类似物进行的核苷酸的替代，核苷酸间修饰如，例如那些以带负电的键合（例如，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等）进行的修饰、那些包含侧基部分例如蛋白质（包括酶（例如核酸酶）、毒素、抗体、信号肽、聚 -L- 赖氨酸等）的修饰、那些包含插入物（例如，吖啶、补骨脂素等）的修饰、那些包含螯合物（例如，金属、放射性金属、硼、氧化性金属等）的修饰、那些包含烷基化物的修饰、那些具有改进的键合（例如，α 异头核酸等）的修饰、以及多核苷酸或寡核苷酸的未修饰形式。

[0038] 应当理解如本文所用的术语“核苷”和“核苷酸”将包括那些不但包含已知的嘌呤和嘧啶碱基，还包含其它已进行修饰的杂环碱基的部分。这类修饰包括甲基化的嘌呤或嘧啶、酰化的嘌呤或嘧啶，或其它杂环。经修饰的核苷或核苷酸还能够包括在糖部分上的修饰，例如，其中一个或多个羟基为卤素、脂肪族所取代，或功能化为醚、胺等。术语“核苷单位 (nudeotidic unit)”包括核苷和核苷酸。

[0039] 另外，对核苷单位的修饰包括重排、添加、替代或在嘌呤或嘧啶碱基上改变功能基，所述功能基与各自互补的嘧啶或嘌呤形成氢键。得到的经修饰的核苷单位可以任选地与其它这种经修饰的核苷单位但不与 A、T、C、G 或 U 形成碱基对。可以整合不会阻止多核苷酸功能的脱碱基位点；优选多核苷酸不包含脱碱基位点。在多核苷酸中的一些或全部残基能够任选以一种或多种方式进行修饰。

[0040] 在允许形成分别在胸腺嘧啶核苷的 N3-H 和 C4- 氧与腺嘌呤核苷的 N1 和 C6-NH2 之间和分别在胞嘧啶核苷的 C2- 氧、N3 和 C4-NH2 与鸟嘌呤核苷的 C2-NH2、N′ -H 和 C6- 氧之间的氢键的条件下，标准的 A-T 和 G-C 碱基对形成。因而，可以修饰鸟嘌呤核苷 (2- 氨基 -6- 氧 -9- β -D- 呋喃核糖基 - 嘌呤）以形成异鸟嘌呤核苷 (2- 氧 -6- 氨基 -9- β -D- 呋喃核糖基 - 嘌呤）。这种修饰产生了一种核苷碱基，它不再有效地与胞嘧啶形成标准的碱基对。但是，修饰胞嘧啶 (1- β -D- 呋喃核糖基 -2- 氧 -4- 氨基 - 嘧啶）以形成异胞嘧啶 (1- β -D- 呋喃核糖基 -2- 氨基 -4- 氧 - 嘧啶）产生一种修饰的核苷酸，它将不会有效地与鸟嘌呤核苷形成碱基对但将与异鸟嘌呤核苷形成碱基对。异胞嘧啶由 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) 可购得；异胞嘧啶核苷可以通过 Switzer 等 (1993)Biochemistry 32：10489-10496 和其中引用的参考文献中所述的方法制备；2′ - 脱氧 -5- 甲基 - 异胞嘧啶核苷可以通过 Tor 等 (1993)J. Am. Chem. Soc. 115：4461-4467 和其中引用的参考文献的方法制备；而异鸟嘌呤核苷酸可以利用 Switzer 等 (1993)，同上，和 Mantsch 等 (1993) Biochem. 14：5593-5601 所述的方法，或通过在授予 Collins 等的美国专利号 5,780,610 中所述的方法制备。其它非天然的碱基对可以通过在 Piccirilli 等 (1990)Nature343：33-37 中所述的合成 2,6- 二氨基嘧啶及其互补体 (1- 甲基吡唑 -[4,3] 嘧啶 -5,7-(4H,6H)- 二酮）的方法进行合成。其他这种形成独特碱基对的修饰的核苷单位是已知的，如在 Leach 等 (1992)J. Am. Chem. Soc. 114：3675-3683 和 Switzer 等，同上中所描述的。

[0041] “优选结合”或“优先杂交”指与样品中非互补性聚合物相比，一种多核苷酸或PNA结合到样品中它的互补体上的增强的倾向。

[0042] 杂交条件将一般包括小于大约1M的盐浓度，更通常小于大约500mM并且优选小于大约200mM。在肽核酸和多核苷酸之间杂交的情况下，杂交能够在含有小量或不含盐的溶液中进行。杂交温度能够低至5℃，但一般大于22℃，更通常大于大约30℃，并且优选超过大约37℃。较长的片段可以需要较高的杂交温度以进行特异性杂交。其它因素可以影响杂交的严格性，包括碱基组成和互补链的长度，有机溶剂的存在以及碱基错配的程度，并且所用参数的组合比任何单一参数的绝对测量更加重要。对于一种给定测试形式的适当的杂交条件能够由本领域技术人员进行测定；可以进行调节的非限制性参数包括测试组分的浓度、所用的盐及其浓度、离子强度、温度、缓冲液类型和浓度、溶液pH、降低背景结合封闭剂如重复序列或封闭蛋白质溶液的存在和浓度、去污剂的类型和浓度、提高多核苷酸相对浓度的分子如聚合物、金属离子及其浓度、螯合剂及其浓度，以其其它本领域公知的条件。

[0043] “多重性的”在此指一种测试或其它分析性方法，其中能够同时测试多个被分析物。

[0044] “任选的”或“任选地”意为随后所述的事件或环境可以发生或可以不发生，以及说明书包括发生了事件或环境的情况和其未发生的情况。

[0045] 样品

[0046] 含有或怀疑含有目标多核苷酸的样品的部分能够是任何来源的生物学材料，它含有能够直接或间接获自一种活体生物的多核苷酸，所述生物包括细胞、组织或流体，以及由该生物所遗留的沉积物，包括病毒、支原体和化石。样品可以包含通过合成方法制备的完整的或部分的多核苷酸。一般地，样品在一种主要含水的介质中获得或分散在该介质中。样品的非限制性例子包括血液、尿液、精液、乳、痰、粘液、口腔棉拭、阴道棉拭、直肠棉拭、吸出物、针刺活组织检查、例如通过外科手术或尸体解剖所获组织的切片、血浆、血清、脊髓液、淋巴液、皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外分泌物、眼泪、口水、肿瘤、器官、体外细胞培养组分样品（包括但不限于源自细胞培养基中细胞生长的条件培养基、推定为病毒感染的细胞、重组细胞和细胞组分）以及包含多核苷酸序列的重组文库。样品可以存在于本文所述基片上。基片可以是包含样品的载玻片，如用在荧光原位杂交(FISH)中的载玻片。

[0047] 样品可以是一种阳性对照样品，它已知包含目标多核苷酸或其替代品。也能够使用一种阴性对照样品，尽管预期其不含目标多核苷酸，但怀疑包含它（通过一种或多种试剂的污染）或能够产生假阳性的其它组分，并通过用于给定分析中的试剂的目标多核苷酸进行试验从而确认没有污染，以及测定一套给定的分析条件是否产生假阳性（即使在样品中没有目标多核苷酸的情况下的阳性信号）。

[0048] 样品能够进行稀释、溶液、悬浮、提取或另外进行处理来溶解和/或纯化任何存在的目标多核苷酸或使它易为用于扩增方案中的试剂或检测试剂所接近。在样品包含细胞的情况下，能够将细胞裂解或透化以释放细胞内的多核苷酸。能够使用一步透化缓冲液裂解细胞，它允许在裂解后直接进行进一步的步骤，例如聚合酶链反应。

[0049] 目标多核苷酸和由其产生的扩增产物

[0050] 目标多核苷酸可以是单链的、双链的，或更高级的，并可以是线性的或环状的。例示性的单链目标多核苷酸包括mRNA、rRNA、tRNA、hnRNA、ssRNA或ssDNA病毒基因组，尽管这

些多核苷酸可以包含内部互补序列和显著的二级结构。例示性的双链目标多核苷酸包括基因组 DNA、线粒体 DNA、叶绿体 DNA、dsRNA 或 dsDNA 病毒基因组、质粒、噬菌体和类病毒。目标多核苷酸能够合成制备或由生物来源纯化。可以对目标多核苷酸进行纯化以去除或减少一种或多种不希望的样品组分或浓缩目标多核苷酸。相反地，在目标多核苷酸太浓而不能进行特定分析的情况下，可以稀释目标多核苷酸。

[0051] 在样品收集和任选的核酸提取之后，含有目标多核苷酸的样品核酸部分能够进行一种或多种预备性反应。这些预备性反应能够包括体外转录 (IVT)、标记、片段化、扩增和其它反应。能够在检测和 / 或扩增之前首先以反转录酶和引物处理 mRNA 以产生 cDNA ；这能够在体外以纯化的 mRNA 进行或原位进行，例如在附着于载玻片上的细胞或组织中。核酸扩增提高了目的序列如目标多核苷酸的拷贝数。多种扩增方法适于应用 ；适合的扩增反应的非限制性例子包括聚合酶链反应 (PCR)、连接酶链反应 (LCR)、自动维持序列扩增 (3SR)、基于核酸序列的扩增 (NASBA)、Q Beta 复制酶的使用、反转录、切口平移等。

[0052] 在目标多核苷酸为单链的情况下，扩增的第一个循环形成了与目标多核苷酸互补的引物延伸产物。如果目标多核苷酸为单链 RNA，在第一扩增中使用具有反转录酶活性的聚合酶以将 RNA 反转录成 DNA，另外的扩增循环就能够进行以拷贝引物延伸产物。PCR 的引物当然必须设计为与在其相应模板中将产生可扩增片段的区域杂交 ；因而，每个引物必须杂交以便其 3’核苷酸与在其互补模板链中的一个核苷酸配对，所述核苷酸位于用来在 PCR 中复制该互补模板的引物的 3’ 核苷酸的 3’。

[0053] 目标多核苷酸一般通过将一种或多种目标多核苷酸的链与引物和聚合酶相接触来扩增，所述聚合酶具有延伸引物并拷贝目标多核苷酸以生产全长互补的多核苷酸或其较小部分的活性。可以使用任何具有能够拷贝目标多核苷酸的聚合酶活性的酶，包括 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、反转录酶、具有一种以上类型聚合酶活性的酶，并且酶可以是不耐热的或热稳定的。还能够使用酶的混合物。例示性的酶包括 ：DNA 聚合酶如 DNA 聚合酶 I(″ Pol I″)、PolI 的克列诺片段、T4、T7、**Sequenase®T7、Sequenase®Version** 2.0 T7、Tub、Taq、Tth、Pfx、Pfu、Tsp、Tfl、Tli 和火球菌属物种 (Pyrococcus sp)GB-D DNA 聚合酶 ；RNA 聚合酶如大肠杆菌 (E.coli)、SP6、T3 和 T7 RNA 聚合酶 ；和反转录酶如 AMV、M-MuLV、MMLV、RNAse、H-MMLV **(SuperScript®)、SuperScript® II、ThermoScript®、** HIV-1 和 RAV2 反转录酶。所有这些酶都是商业上现有的。具有多重特异性的例示性聚合酶包括 RAV2 和 Tli(exo-) 聚合酶。例示性的热稳定聚合酶包括 Tub、Taq、Tth、Pfx、Pfu、Tsp、Tfl、Tli 和火球菌属物种 GB-D DNA 聚合酶。

[0054] 选择适当的反应条件以允许进行目标多核苷酸的扩增，包括 pH、缓冲液、离子强度、一种或多种盐的存在和浓度、反应物和辅因子如核苷酸和镁和 / 或其它金属离子 (例如，锰) 的存在和浓度、任选的助溶剂、温度、包含一个聚合酶链反应的扩增方案的热循环曲线，并且可以部分依赖所用的聚合酶以及样品的性质。助溶剂包括甲酰胺 (一般于大约 2％到大约 10％)、甘油 (一般于大约 5％到大约 10％) 和 DMSO(一般于大约 0.9％到大约 10％)。可以在扩增方案中使用技术从而使假阳性产物或扩增过程中产生的假象最小化。这些包括″ 降落 (touchdown)″ PCR、热启动技术、使用嵌套引物或设计 PCR 引物使它们在引物二聚体形成的结果中形成茎环结构并因而不被扩增。能够利用加速 PCR 的技术，例如离心 PCR，它允许在样品中更强的对流，并且包括红外加热步骤以进行样品的快速加热和冷

却。能够进行一个或多个扩增循环。能够使用过量的一种引物以在PCR过程中产生过量的一种引物延伸产物;优选地,过量产生的引物延伸产物是待检测的扩增产物。可以使用多种不同的引物以扩增不同的目标多核苷酸或样品中特定目标多核苷酸的不同区域。

[0055] 扩增的目标多核苷酸可以进行扩增后处理。例如,在一些情况下,希望在杂交之前将目标多核苷酸片段化从而提供更易接近的片段。核酸的片段化能够通过任何产生在实施的分析中有用大小的片段的方法进行;适当的物理、化学和酶学方法是本领域公知的。

[0056] 扩增反应能够在允许传感器多核苷酸在一个扩增循环的至少一部分过程中杂交到扩增产物上的条件下进行。当分析以这种方式进行时,通过监控来自信号发色团的光发射的变化能够进行这种杂交事件的实时检测,该光发射基于该扩增方案过程中的杂交而发生。

[0057] 聚阳离子多发色团

[0058] 由于它们包含的多个发色团,集光多发色团系统已证实是有效的光吸收剂。例子包括,但不限于缀合的聚合物、缀合分子的聚集体、附着于饱和聚合物上的发光染料、半导体量子点状和树状结构。例如,在缀合聚合物上的每个重复单位能够认为是一个起作用的发色团,量子点由许多原子组成,饱和的聚合物能够为在侧链上的许多发光染料分子所功能化,包含许多共价连接的个体发色团的树枝状化合物(dendrimer)能够得到合成。发色团组件附着于固体支持物,如聚合物珠或表面上,也能够用于集光。

[0059] 集光多发色团系统能够将能量有效地传递给附近的发光物(例如,“信号发色团”)。能量传递的机制包括,例如,共振能量传递(**Förster**(或荧光)共振能量传递,FRET)、量子电荷交换(Dexter能量传递)等。但是一般地,这些能量传递机制是相对短范围的;即,需要集光多发色团系统密切接近信号发色团以进行有效的能量传递。在进行有效能量传递的条件下,当集光多发色团系统中的个体发色团数目很大时会发生来自信号发色团发射的扩大;即,当入射光(“泵光(pump light)”)处于集光多发色团系统吸收的波长时来自信号发色团的发射比当信号发色团被泵光直接激发时更加强烈。

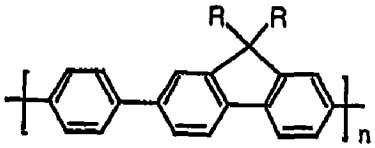
[0060] 缀合聚合物(CPs)的特征是非定域电子结构,它能够用作化学和生物学目标的高度易传感的光学报道分子[12,13]。因为有效的缀合长度基本上比聚合物链的长度短,所以骨架在靠近处包含大量的缀合片段。因而,缀合的聚合物对集光是有效的并使得通过**Förster**能量传递进行光学放大成为可能[14]。

[0061] 已经对阳离子聚电解质和DNA之间自发的共聚体络合进行过描述,并且主要是协同静电力的结果[15,16,17]。近来还认定了在芳香族聚合物单元和DNA碱基之间的疏水相互作用[18,19]。聚电解质/DNA相互作用的自由能受与溶液变量相关使用的参与物的结构控制,所述变量如pH、离子强度和温度[20]。近来对这些相互作用的强度和特异性进行了协调以识别质粒DNA的三级结构[21]。

[0062] 用于本发明的多发色团是聚阳离子的并能够与传感器多核苷酸静电相互作用。可以在所述方法中使用任何能够吸收光并将能量传递给传感器多核苷酸上信号发色团的聚阳离子多发色团。能够使用的例示性的多发色团包括缀合的聚合物、饱和的聚合物或以任何活的方式整合多个发色团的树枝状化合物,以及半导体纳晶体(SCNCs)。可以制备缀合的聚合物、饱和的聚合物和树枝状化合物以整合多个阳离子物或使它们在合成后衍生化为聚阳离子的;可以通过将阳离子物加至它们的表面上使半导体纳晶体聚阳离子化。

[0063] 在一个优选的实施方案中，使用一种缀合的聚合物作为聚阳离子多发色团。一个具体的例子示于结构 1 中，其中可溶于水的阳离子缀合聚合物是具有碘化物相反阴离子的聚 (9,9- 双 (6′ -N,N,N- 三甲基铵)- 己基)- 亚苯基芴 (fluorene phenylene))[22]。这种聚合物的特定大小并不重要，只要它能够吸收光并将能量传递给带至近处的信号发色团。一般的“n”值落入 2 到大约 100,000 的范围内。这种具体的分子结构并不重要；能够使用任何具有足够发光量子效率的水溶性阳离子缀合聚合物。

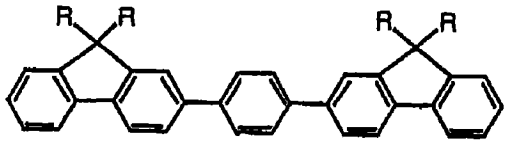
[0064]



1 -R = -(CH2)6NMe3 I

[0065] 水溶性缀合寡聚体也能够用作聚阳离子多发色团。这种具有碘化物相互阴离子的水溶性阳离子发光缀合寡聚体的一个例子示于下面 (这里表示为寡聚体 2)：

[0066]



2 -R = -(CH2)6NMe3 I

[0067] 尽管较小的寡聚体 2 并不呈现一种高分子量聚合物的大的信号放大特性，但这种小分子对于使结构特性关系简单化 (deconuolute) 是有用的，所述关系由于固有的多分散性和在聚合物中所发现的一批批之间的变化而难以测定。另外，在含水介质中寡聚体如 2 比它们的多聚对应体更加可溶，并且预计疏水相互作用对于 2 比对于聚合物结构更不重要。因而可以如愿地利用寡聚体的集合进行特异性的应用。加入有机溶剂，例如一种可混于水的有机溶剂如乙醇能够导致背景 C^* 发射的减少。有机溶剂的存在能够降低疏水相互作用并减弱背景 C^* 发射。

[0068] 传感器多核苷酸

[0069] 提供一种阴离子性的和与待测目标多核苷酸互补的，并且具有预定序列的传感器多核苷酸。传感器多核苷酸可以是带分枝的、多聚体的或环状的，但一般是线性的，并且可以包含非天然碱基。可以制备具有任何期望的碱基序列的传感器多核苷酸。将信号发色团附着于传感器多核苷酸多核苷酸上的化学方法是本领域公知的[23]。具体的传感器多核苷酸结构，包括缀合到发色团上的结构，能够利用商业来源进行定做或进行化学合成。

[0070] 信号发色团

[0071] 本文所述的在发明中有用的发色团包括任何能够在适当溶液中吸收来自聚阳离子多发色团的能量并发射光的物质。为了进行多重分析，可以使用多种具有可检测不同发射光谱的不同信号发色团。发色团可以是生光团或荧光团。一般的荧光团包括荧光染料、半导体纳晶体、镧系元素螯合物、多核苷酸特异性染料和绿色荧光蛋白。

[0072] 例示性的荧光染料包括荧光素、6-FAM、罗丹明、德克萨斯红、三甲基罗丹明、

羧基罗丹明、羧基罗丹明6G、羧基对甲氨基酚、羧基罗丹明110、Cascade蓝、Cascade黄、香豆素、**Cy2®、Cy3®、Cy3.5®、Cy5®、Cy5.5®**、Cy-Chrome、藻红蛋白、PerCP(多甲藻素叶绿素a蛋白)、PerCP-Cy5.5、JOE(6-羧基-4′,5′-二氯-2′,7′-二甲氧基荧光素)、NED、ROX(5-(和-6)-羧基-X-罗丹明)、HEX、萤光黄、Marina蓝、俄勒冈绿488、俄勒冈绿500、俄勒冈绿514、Alexa **Fluor®350**、Alexa **Fluor®430**、Alexa **Fluor®488**、Alexa **Fluor® 532**、Alexa **Fluor®546**、Alexa **Fluor®568**、Alexa **Fluor®594**、Alexa **Fluor®633**、Alexa **Fluor®647**、Alexa **Fluor®660**、Alexa **Fluor®680**、7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸、**BIODIPY®FL、BIODIPY®FL-Br_2、BIODIPY®530/550、BIODIPY®558/568、BIODIPY®564/570、BIODIPY®576/589、BIODIPY®581/591、BIODIPY®630/650、BIODIPY®650/665、BIODIPY®R6G、BIODIPY®TMR、BIODIPY®TR**、其缀合物以及其组合物。例示性的镧系元素螯合物包括铕螯合物、铽螯合物和钐螯合物。

[0073] 许多荧光半导体纳晶体(“SCNCs”)是本领域公知的;在公开于1999年5月27日的PCT公开号WO99/26299,发明人Bawendi等;1999年11月23日授权给Weiss等的美国专利号5,990,479;和Bruchez等,Science281:2013,1998中描述了生产和利用半导体纳晶体的方法。能够获得具有充分定义的峰发射波长的非常窄的发射波段的半导体纳晶体,从而允许在同一分析中将大量不同的SCNCs任选与其它非SCNC类型的信号发色团结合用作信号发色团。

[0074] 例示性的多核苷酸特异性染料包括吖啶橙、吖啶同型二聚体、放线菌素-D、7-氨基放线菌素D(7-AAD)、9-氮基-6-氯-2-甲氧基吖啶(ACMA)、BOBO™-1碘化物(462/481)、BOBO™-3碘化物(570/602)、BO-PRO™-1碘化物(462/481)、BO-PRO™-3碘化物(575/599)、4′,6-二脒基-2-苯基吲哚、二氢氯化物(DAPI)、4′,6-二脒基-2-苯基吲哚,二乳酸盐(DAPI,二乳酸盐)、二氢乙锭(氢乙锭)、溴化乙锭、二叠氮氯化乙锭、乙锭同型二聚体-1(EthD-1)、乙锭同型二聚体-2(EthD-2)、单叠氮溴化乙锭(EMA)、hexidium iodide、Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hoechst 34580、Hoechst S769121、羟司替巴脒、甲磺酸盐、JOJO™-1碘化物(529/545)、JO-PRO™-1碘化物(530/546)、LOLO™-1碘化物(565/579)、LO-PRO™-1碘化物(567/580)、NeuroTrace™ 435/455、NeuroTrace™ 500/525、NeuroTrace™ 515/535、NeuroTrace™530/615、NeuroTrace™ 640/660、OliGreen、**PicoGreen®ssDNA**、**PicoGreen®dsDNA**、POPO™-1碘化物(434/456)、POPO™-3碘化物(534/570)、PO-PRO™-1碘化物(435/455)、PO-PRO™-3碘化物(539/567)、碘化丙啶、**RiboGreen®、SlowFade®、SlowFade®** Light、**SYBR®** Green I、**SYBR®** Green II、**SYBR®** Gold、**SYBR®101、SYBR®102、SYBR®103、SYBR®DX、TO-PRO®-1、TO-PRO®-3、TO-PRO®-5、TOTO®-1、TOTO®-3、YO-PRO®-1**(唑黄)、**YO-PRO®-3、YOYO®-1、YOYO®-3**、TO、**SYTOX®** Blue、**SYTOX®** Green、**SYTOX®** Orange、**SYTO®9、SYTO®BC、SYTO®40、SYTO®41、SYTO®42、SYTO®43、SYTO®44、SYTO®45、SYTO®**

Blue、**SYTO®11、SYTO®12、SYTO®13、SYTO®14、SYTO®15、SYTO®16、SYTO®20、SYTO®21、SYTO®22、SYTO®23、SYTO®24、SYTO®25、SYTO®** Green、 **SYTO®80、SYTO®81、SYTO®82、SYTO®83、SYTO®84、SYTO®85、SYTO®** Orange、**SYTO®17、SYTO®59、SYTO®60、SYTO®61、SYTO®62、SYTO®63、SYTO®64、SYTO®** Red、纺锤菌素、偏端霉素、吖啶橙、3,4- 苯并芘、噻唑橙、TOMEHE、道诺霉素、吖啶、戊基 -TOTAB 和丁基 -TOTIN。非对称性花青染料可以用作多核苷酸特异性染料。其它目标染料包括由 Geierstanger, B.H. 和 Wemmer, D.E., Annu. Rev. Vioshys. Biomol. Struct. 1995, 24,463-493, 由 Larson, C.J. 和 Verdine, G.L., BioorganicChemistry :Nudeic Acids, Hecht, S.M. 编辑, 牛津大学出版社 : 纽约,1996, 第 324-346 页, 和由 Glumoff, T. 和 Goldman, A. Nudeic Acids iuChemistry and Biology, 第二版, Blackburn, G.M. 和 Gait, M.J., 编辑, 牛津大学出版社 : 牛津,1996, 第 375-441 页所介绍的那些染料。多核苷酸特异性染料可以是一种嵌入性染料, 并对双链多核苷酸是特异性的。其它染料和荧光团在 www.probes.com(Molecular Probes, Inc.) 中进行了描述。

[0075] 术语“绿色荧光蛋白”指天然多管水母属 (Aequorea) 绿色荧光蛋白和已经鉴定为显示变化了的荧光特性的突变型, 包括变化的激发和发射最大值, 以及不同形状的激发和发射光谱 (Delagrave, S. 等 (1995)Bio/Technology 13 :151-154 ;Heim, R. 等 (1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :12501-12504 ;Heim, R. 等 (1995)Nature 373 :663-664). Delgrave 等分离了具有向红效应的激发光谱的克隆的水母 (Aequoreavictoria)GFP 的突变型。Bio/Technology 13 :151-154(1995)。Heim, R. 等报道了一种具有蓝色荧光的突变型 (Tyr66 变为 His)(Proc. Natl. Acad. Sci. (1994)USA 91 :12501-12504)。

[0076] 在一种变型中, 利用第二信号发色团接收来自起始信号发色团的能量, 所述第二信号发色团可以直接或间接附着于另一种分析组分和 / 或基片上。在具体的应用中, 这能够提供显著的额外选择性。例如, 能够将一种多核苷酸特异性染料用作起始或第二信号发色团, 并且可以是对于双链序列特异性的。随后能够将能量由激发的阳离子多发色团传递至起始信号发色团, 所述起始信号发色团接下来以一种目标选择性的总体形式将能量传递至第二信号发色团。这种信号发色团的级联理论上能够延伸为利用任何数目的具有相容的吸收和发射特征的信号发色团。在这种变型的一个实施方案中, 利用一种对于双链多核苷酸特异的嵌入性染料作为第二信号发色团, 并将一种能够传递能量至第二信号发色团的起始信号发色团缀合到传感器多核苷酸上。嵌入性染料提供额外的选择性要求, 即传感器和目标多核苷酸在其补充到检测复合物中之前杂交。在目标存在的情况下, 形成双螺旋, 吸收染料, 并且多发色团的激发引起来自第二信号发色团的信号。

[0077] 基片

[0078] 本文所述的方法能够在任何形式的基片上进行。基片可以包括广泛的材料, 既可以是生物的、非生物的、有机的、无机的, 也可以是任何这些材料的组合。例如, 基片可以是一种聚合的 L-B 膜、功能化玻璃、Si、Ge、GaAs、GaP、SiO_2、SiN_4、改性硅或任何一种广泛变化的凝胶或聚合物如 (聚) 四氟乙烯、(聚) 偏 1,1- 二氟乙烯、聚苯乙烯、交联的聚苯乙烯、聚丙烯酸、聚乳酸、聚烃乙酸、交酯乙交酯共聚物、聚酐、聚甲基丙烯酸甲酯、乙烯醋酸乙烯酯共聚物、聚硅氧烷、聚合硅石、胶乳、葡聚糖聚合物、环氧物、聚碳酸酯、琼脂糖、聚 (丙烯

酰胺）或其组合物。能够使用导电性的聚合物和光电导性物质。

[0079] 基片可以是平面晶状基片如基于硅的基片（例如玻璃、石英等），或用于例如半导体和微处理器产业中的晶状基片，如硅、砷化镓、掺铟的 GaN 等，并且包括半导体纳晶体。

[0080] 基片可以取光电二极管、光电传感器，或生物芯片的形式，所述光电传感器如光电半导体芯片或光电薄膜半导体。个别传感器多核苷酸在基片上的定位可以是可寻址的；这能够以高密形式实现，并且定位可以是可微寻址的或可纳寻址的。

[0081] 硅石气凝胶也能够用作基片，并能够通过本领域公知的方法制备。气凝胶基片可以用作自由固定基片或用作涂布了其它基片物质的表面。

[0082] 基片可以取任何形式并且一般为盘、载玻片、珠、小球、圆盘、颗粒、微米颗粒、纳米颗粒、束条 (strand)、沉淀物、任选有孔的凝胶、薄片、管、球、容器、毛细管、垫、切片、膜、芯片、多孔板或盘、光纤等。基片可以是任何刚性或半刚性的形式。基片可以包含凸起的或降低的区域，在其上定位传感器多核苷酸或其它分析组分。基片的表面能够使用公知技术进行蚀刻以提供希望的表面特征，例如沟壕、v- 沟、台式结构等。

[0083] 基片的表面可以由与基片相同的材料组成或者可以由不同材料制成，并可以通过化学或物理方法偶联到基片上。这种偶联的表面可以由任何的广泛多种材料组成，例如，聚合物、塑料、树脂、多糖、硅石或基于硅的材料、碳、金属、无机玻璃、膜，或任何上面所列的基片材料。表面可以是光学透明的并可以具有表面 Si-OH 功能性，如在硅石表面所发现的那些。

[0084] 选择基片和 / 或其任意表面以提供对于所用的合成和 / 或检测方法合适的光学特征。基片和 / 或表面可以是透明的以允许基片暴露于来知多个方向应用的光。可以为基片和 / 或表面提供反射性的“镜面”结构以增强光的回收。

[0085] 基片和 / 或其表面通常耐受，或经处理以耐受它在应用中所暴露的条件，并且能够任选地进行处理以在暴露于这类条件后去除任何耐受性材料。

[0086] 能够通过任何适当方法将传感器多核苷酸装配或附着于基片上，例如在美国专利号 5,143,854、PCT 公开号 WO 92/10092、递交于 1990 年 12 月 6 日的美国专利申请系列号 07/624,120（目前放弃）、Fodor 等，Science，251 :767-777(1991) 和 PCT 公开号 WO 90/15070 中所描述的方法。利用机械合成策略合成这些阵列的技术在例如 PCT 公开号 WO93/09668 和美国专利号 5,384,261 中进行了描述。

[0087] 更进一步的技术包括基于珠的技术，如那些在 PCT 申请号 PCT/US93/04145 中所描述的那些，和基于针的方法，如在美国专利号 5,288,514 中所描述的那些。

[0088] 在递交于 1992 的 11 月 20 日的美国专利申请系列号 07/980,523，和美国专利号 5,384,261 中描述了其它的可用于将传感器多核苷酸附着于基片上的流体通道或点样法。通过 (1) 在定义于预定区域的通道内流动或 (2) 在预定区域上″ 点样 ″ 将试剂递送给基片。可以在要保护的基片的部分上使用保护性涂层如亲水性的或疏水性的涂层（依赖于溶剂的性质），有时在其它区域与促进由反应溶液进行湿润的材料结合。以这种方式，流动溶液进一步避免了流出它们设计的流动途径。

[0089] 一般的分配器包括一种任选由机器人控制的微量移液器、一种喷墨打印机、一系列管、一种复式接头、阵列移液器等从而能够将多种试剂顺序地或同时地递送到反应区域。

[0090] 发色团的激发和检测

[0091] 可以使用任何提供能够激发聚阳离子多发色团并短于发射波长的波长的仪器来进行激发。激发源优选不会直接显著激发信号发色团。该源可以是一种宽带紫外光源如具有适当滤光器的氘灯、在穿过单色仪以提取出期望波长后的光源如氙灯或氘灯的输出、连续波(cw)气体激光器、固态二极管激光器,或任何脉冲激光器。来自信号发色团的发射光能够通过任何适当的设备或技术进行检测,许多适当的方法是本领域公知的。例如,可以使用荧光计或分光光度计检测试验样品是否在多发色团的激发之后发出信号发色团的波长特征的光。

[0092] 试剂盒

[0093] 还提供包含对于实施本发明方法有用的试剂的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒包含与目标多核苷酸互补的单链传感器多核苷酸和聚阳离子多发色团。传感器多核苷酸缀合到信号发色团上。在样品中目标多核苷酸存在的情况下,传感器多核苷酸与目标杂交,导致能够检测的来自信号发色团能量的增强的发射。

[0094] 试剂盒的组分保持在一个包装(housing)里。使用该试剂盒以实施本发明的方法的说明书可以与包装一起提供,并且可以在任何固定的介质中提供。说明书可以位于包装之内或包装之外,并且可以在形成包装的任何表面的里面或外面进行印刷,这使得说明书印刷易读。试剂盒可以是多重形式,含有多数一种或多种能够与相应不同的目标多核苷酸杂交的不同传感器多核苷酸。

实施例

[0095] 给出下列实施例从而为本领域普通技术人员提供如何生产和使用本发明的完全的描述,并且不会限制视为本发明的范围。已经进行了努力以确保关于所用数字的精确性(例如,量、温度等),但一些实验误差和偏差应当进行估计。

[0096] 除非另外指出,份是重量的份、温度是摄氏度而压力是大气压或接近大气压,并且所有的材料是商业上可获得的。

[0097] 实施例1.FRET方案的鉴定

[0098] 利用阳离子水溶性缀合聚合物聚(9,9-双(6′-N,N,N-三甲基铵)-己基)-亚苯基芴)即具有碘化物相反阴离子的聚合物1证明杂交试验,所述杂交试验利用由集光多发色团系统到信号发色团的能量传递。传感器多核苷酸序列为5'-GTAAATGGTGTTAGGGTTGC-3',相应于炭疽(炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis))芽孢包裹质粒pX02,在5'位置具有荧光素,形成寡-C*的一个例子[24]。聚合物和信号发色团的吸收和发射光谱示于图1中。数据显示了在DNA和荧光素的吸收之间的聚合物1激发的一个光学窗口。如图1所示,聚合物1的直接激发导致向荧光素的能量传递(ET)。选择荧光素与聚合物1激发的吸收重叠部分以确保FRET[25]。ET的程度通过整合的受体与供体发射的比率进行评估。

[0099] 实施例2.在目标多核苷酸存在的情况下证明FRET

[0100] 寡-C*探针的杂交导致ET比率的变化。在等摩尔量的含有互补的20个碱基对序列的一种40个碱基对链5′-CATCTGTAAATCCAAGAGTAGCAACCCTAACACCATTTAC-3′,和相同模式的具有序列5′-AAAATATTGTGTATCAAAATGTAAATGGTGTTAGGGTTGC-3′的非互补的40个碱基链存在的情况下,将传感器多核苷酸([寡-C*]=2.1×10^{-8}M)在低于其

T_m(58.4℃)2℃下进行退火。所得荧光的直接比较显示了一个高于杂交 DNA 6 倍大的 ET 比率。参见图 2。在 10mmol 柠檬酸钠和 100mmol 氯化钠缓冲液存在时观察到这些光学差异也是具有高度意义的。缓冲离子掩蔽了互补 DNA 上的电荷,这促进杂交但弱化 CPs 和相反电荷的荧光猝灭剂之间的静电相互作用[26]。使用一种装备了标准 PMT 的氙灯荧光计,杂交的 DNA 提供了比非杂交 DNA 超过 3 倍高的 ET 比率,[传感器多核苷酸] = 2.8×10^{-9}M。

[0101] 实施例 3. 能量传递的优化

[0102] 通过改变聚合物 1 与寡 -C*的比率来优化能量传递。在[寡 -C*] = 2.1×10^{-8}M 的浓度下,聚合物的起始添加引起 ET 比率的立即升高,当聚合物 1 的量开始远远超过寡 -C*的量时 ET 比率降低。ET 比率的最大值相应于聚合物链对寡 -C*的近乎 1 ∶ 1 的比例。在高聚合物浓度下并非每条链都紧密地复合至寡 -C*上并且供体发射比信号发色团发射升高得更快。这样的关系是预料中的,因为当[聚合物 1]/[寡 -C*] < 1 时,并非所有的传感器多核苷酸链都能够有效地复合到独立的聚合物链上。相反地,在[聚合物 1]/[寡 -C*] > 1 时,并非所有的由聚合物 1(供体)束缚的光子都能传递给寡 -C*(受体)。一旦聚合物 - 寡 -C*的重复单位达到大约 100,报告发色团的光致发光不再增强,显示受体的饱和。在此比率的整合的荧光发射比在聚合物 1 缺失的情况下直接激发 (480nm) 的探针发射高大约 4 倍,给出了信号放大进一步的证据。

[0103] 实施例 4. 从多发色团通过传感器多核苷酸到多核苷酸染料的 FRET 传递以提高选择性

[0104] 寡 -C* 探针 (5′ -Fl-ATCTTGACTATGTGGGTGCT-3′) 的杂交导致两种不同传感器发色团 ET 比率的差异。在等摩尔量的含有互补的 20 个碱基对序列的 20 个碱基对链 (5′ -AGCACCCACATAGTCAAGAT-3′),和相同模式的具有序列 (5′ -CGTATCACTGGACTGATTGG-3′) 的非互补的 20 个碱基对链存在的情况下,将传感器多核苷酸 ([寡 -C*] = 1×10^{-8}M) 在低于其 T_m(58.5℃)2℃下进行退火。两种 DNA 混合物与溴化乙锭 ([EB] = 1.1×10^{-6}M) 于室温下在一价磷酸钾 - 氢氧化钠缓冲溶液 (50mM, pH = 7.40) 中进行混合,其中 EB 的插入发生在杂交 DNA 对的双链体结构之内。在水中加入聚合物 1([1] = 1.6×10^{-7}M) 以及随后 1 的激发 (380nm) 导致从 1 到传感器多核苷酸的能量传递以及随后从传感器多核苷酸到 EB 的能量传递。产生的荧光的比较提示传感器溶液仅仅显示在杂交 DNA 存在时来自插入的染料 EB 的发射。参见图 3。该结果证明本发明的 DNA 序列传感器能够通过在聚阳离子多发色团的激发之后检测来自多核苷酸特异性染料的发射而检测目标单链 DNA 的存在,所述目标单链 DNA 具有与传感器多核苷酸序列互补的特异性碱基序列。选择用于本实施例的发色团以寻求在多发色团和两种信号发色团之间能量上的适当重叠。

[0105] 实施例 5. 利用来自多发色团系统的 FRET 进行多核苷酸染料光学放大的证明

[0106] 在 1、传感器多核苷酸和多核苷酸特异性染料 (溴化乙锭,EB) 的溶液中的 1 的激发导致 EB 的发射强度,它比直接激发 (500nm) 包含在相同双链 DNA 序列中的 EB 高大约 8 倍,所述相同双链 DNA 序列缺少在传感器多核苷酸上的信号发色团。信号寡 -C*的直接激发 (480nm),在聚合物 1 不存在时,仅提供大约 4 倍的插入 EB 的感光作用。总之,本实施例显示了通过从聚阳离子多发色团 (缀合的聚合物 1) 到诊断性 EB 报道分子的 FRET 的信号放大的证据。参见图 4。

[0107] 实施例 6. 向多核苷酸染料的 FRET 传递

[0108] 利用 1 和溴化乙锭（“EB”）作为信号发色团的实验证明从 1 到 EB 的直接能量传递能够在双链 DNA 存在的情况下显示。在等摩尔量的含有互补的 20 个碱基对序列的 20 个碱基对链 (5′ -AGCACCCACATAGTCAAGAT-3′)，和相同模式的具有序列 (5′ -CGTATCACTGGACTGATTGG-3′) 的非互补的 20 个碱基对链存在的情况下，将缺少信号发色团的传感器多核苷酸 (5’-ATCTTGACTATGTGGGTGCT-3’)([寡] = 1×10^{-8}M) 在低于其 T_m(58.5℃)2℃下进行退火。两种 DNA 混合物与溴化乙锭 ([EB] = 1.1×10^{-6}M) 于室温下在一价磷酸钾 - 氢氧化钠缓冲溶液 (50mM, pH = 7.40) 中进行混合，其中 EB 的插入发生在杂交 DNA 对的双链体结构之内。在水中加入聚合物 1([1] = 1.6×10^{-7}M) 以及随后 1 的激发 (380nm) 仅仅在杂交的或双链 DNA 存在的情况下导致从 1 到插入的 EB 的能量传递。仅对于杂交的序列在聚合物 1 的激发之后检测到来自 EB 的发射。参见图 5。

[0109] 尽管已经关于优选的实施方案在一些细节上对发明进行了描述，但是本领域技术人员将认识到，根据本文的教导，能够进行某些变化和改进而不背离发明的精神和范围。因此，发明仅为权利要求书所限制。

[0110] 参考文献

[0111] 1 Wang, J. Nucleic Acid Res, 2000 28 3011.

[0112] 2 Umek, R. M. ; Lin, S. W. ; Vielmetter, J. ; Terbrueggen, R. H. ; Irvine, B. ; Yu, C. J. ; Kayyem, J. F. ; Yowanto, H. ; Blackburn, G. F. ; Farkas, D. H. ; Chen, Y. P. J. Mol. Diag. 2001 3 74.

[0113] 3 Schork N. J. ; Fallin D. ; Lanchbury J. S. Clini. Genet. 2000 58 250.

[0114] 4 Balakin, K. V. ; Korshun, V. A. ; Mikhalev, I. I. ; Maleev, G. V. ; Malakhov A. D. ; Prokhorenko, I. A. ; Berlin, Yu. A. Biosensors and Bioelectronics 1998 13 771.

[0115] 5 LePecg, J. B. ; Paoletti, C. J. Mol. Biol. 1967 27 87.

[0116] 6 Petty, J. T. ; Bordelon, J. A. ; Robertson, M. E. J. Phys. Chem. B 2000 104 7221,

[0117] 7 Cardullo, R. A. ; Agrawal, S. ; Flores, C. ; Zamechnik, P. C. ; Wolf, D. E. Proc. Natl. Acad. Sci. 1988 858790.

[0118] 8 Castro, A. ; Williams, J. G. K. Anal. Chem. 1997 69 3915.

[0119] 9 Knemeyer, J. ; Marmè, N. ; Sauer, M. Anal. Chem. 2000 72 3717.

[0120] 10 Minehan, D. S. ; Marx, D. A. ; Tripathy, S. K. Macromolecules 1994 27 777.

[0121] 11 Pullman, B. ; Lavery, R. ; Pullman, A. Eur. J. Biochem. 1982 124 229.

[0122] 12 McQuade, D. T. ; Pullen. A. E. ; Swager, T. M. Chem. Rev. 2000 100 2537.

[0123] 13 Chen, L. ; McBranch, D. W. ; Wang, H. -L. ; Helgeson, R. ; Wudl, F. ; Whitten, D. G. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999 96 12287.

[0124] 14 Dogariu, A. , Gupta, R. , Heeger, A. J. , Wang, H. Synthetic Metals 1999 100 95.

[0125] 15 Kabanov, A. V. ; Felgner, P. ; Seymour, L. W. , Eds. Self-Assembling Complexes for Gene Delivery. From Laboratory to Clinical Trial ; Jobn Wiley : Chichester, 1998.

[0126] 16 Kircheis, R. ; Blessing, T. ; Brunner, S. ; Wightman, L. ; Wagner, E. J. Controlled Release 2001 72 165.

[0127] 17 Wolfert, M. A. ; Dash, P. R. ; Navarova, O. ; Oupicky, D. ; Seymour, L. W. ; Smart,

S. ;Strohalm, J. ;Ulbrich, K. Bioconjugate Chem. 1999 10 993.

[0128] 18 Ganachaud, F. ;Elaïssari, A. ;Pichot, C. ;Laayoun, A. ;Cros, P. Langmuir 1997 13 701.

[0129] 19 Smith, J. O. ;Olson, D. A. ;Armitage, B. A. J. Am. Chem, Soc. 1999 121 2628.

[0130] 20 Harada, A. ;Kataoka, K. Science 1999 283 65.

[0131] 21 Bronich, T. K. ;Nguyen, H. K. ;Eisenberg, A. ;Kabanov, A. V. J. Am. Chem. Soc. 2000 122 8339.

[0132] 22 Stork, M. S. ;Gaylord, B. S. ;Heeger, A. J. ;Bazan, G. C. Adv. Mater. 2002 14 361. The molecularweight of polymer 1 was determined to be 8,600g/mole(Mn).

[0133] 23 Nielsen, P. E. ;Egholn, M. Peptide Nucleic Acids ;Protocols and Applications. Horizon ScientificPress, Portland, 1999.

[0134] 24 Makino, S. -I. ;Uchida, I. ;Terakado, N. ;Sasakawa, C. ;Yoshikawa, M. ; J. Bacteriol. 1989, 171, 722.

[0135] 25 Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kluwer Academic/Plenum Publishers ;NewYork, 1999.

[0136] 26 Wang, J. ;Wang, D. L. ;Miller, E. K. ;Moses, D. ;Bazan, G. C. ;Heeger, A. J. Macromolecules 2000, 33, 5153.

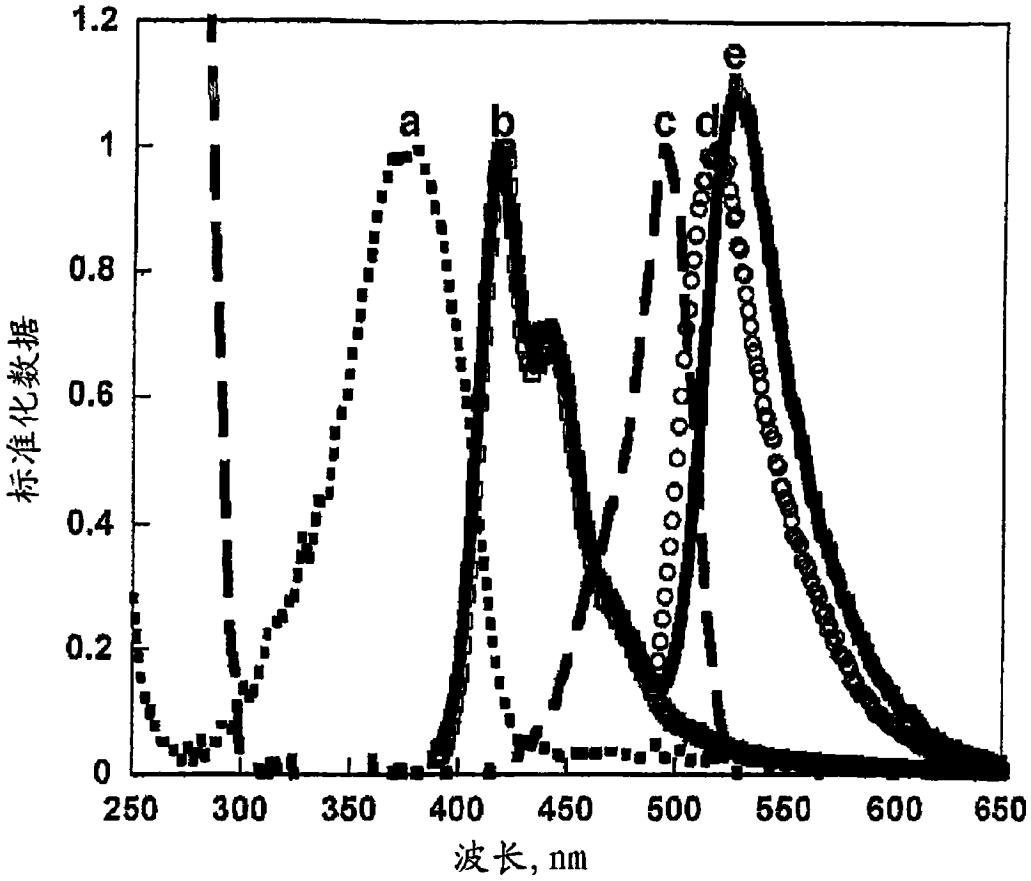

1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
标准化数据
a
b
c
d
e
250
300
350
400
450
500
550
600
650
波长, nm

图 1

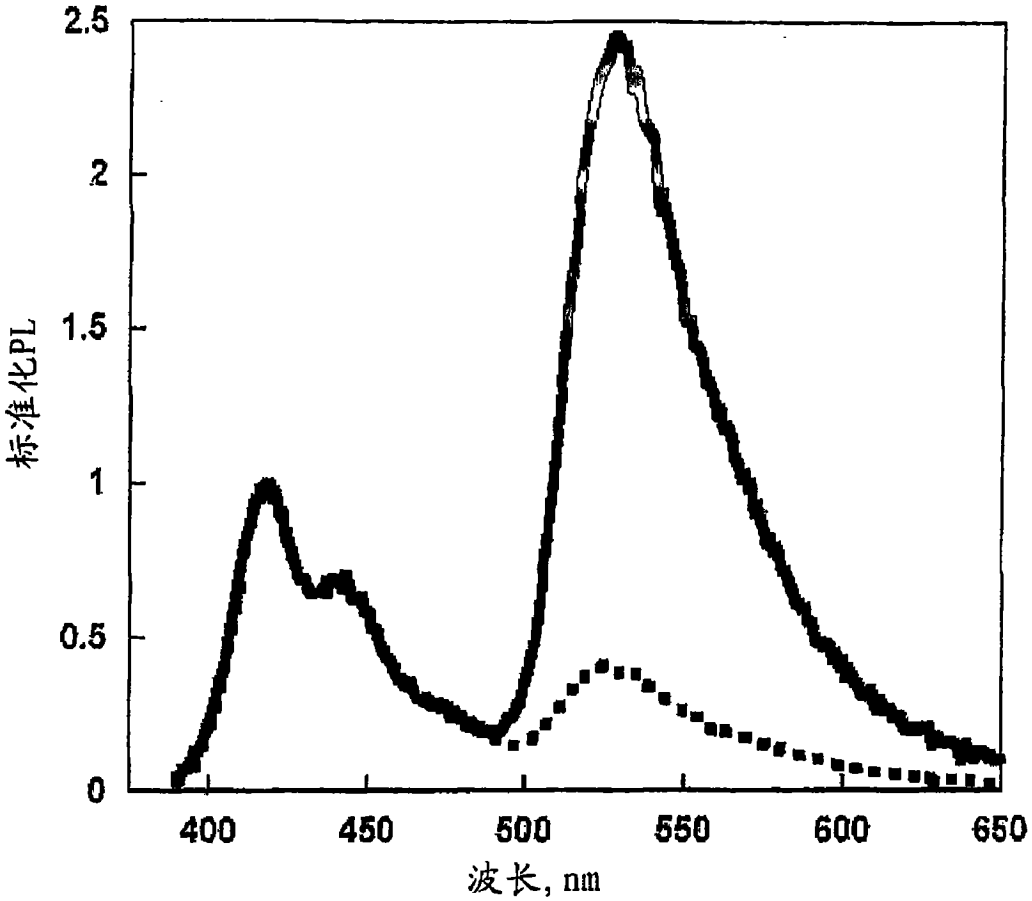


图 2

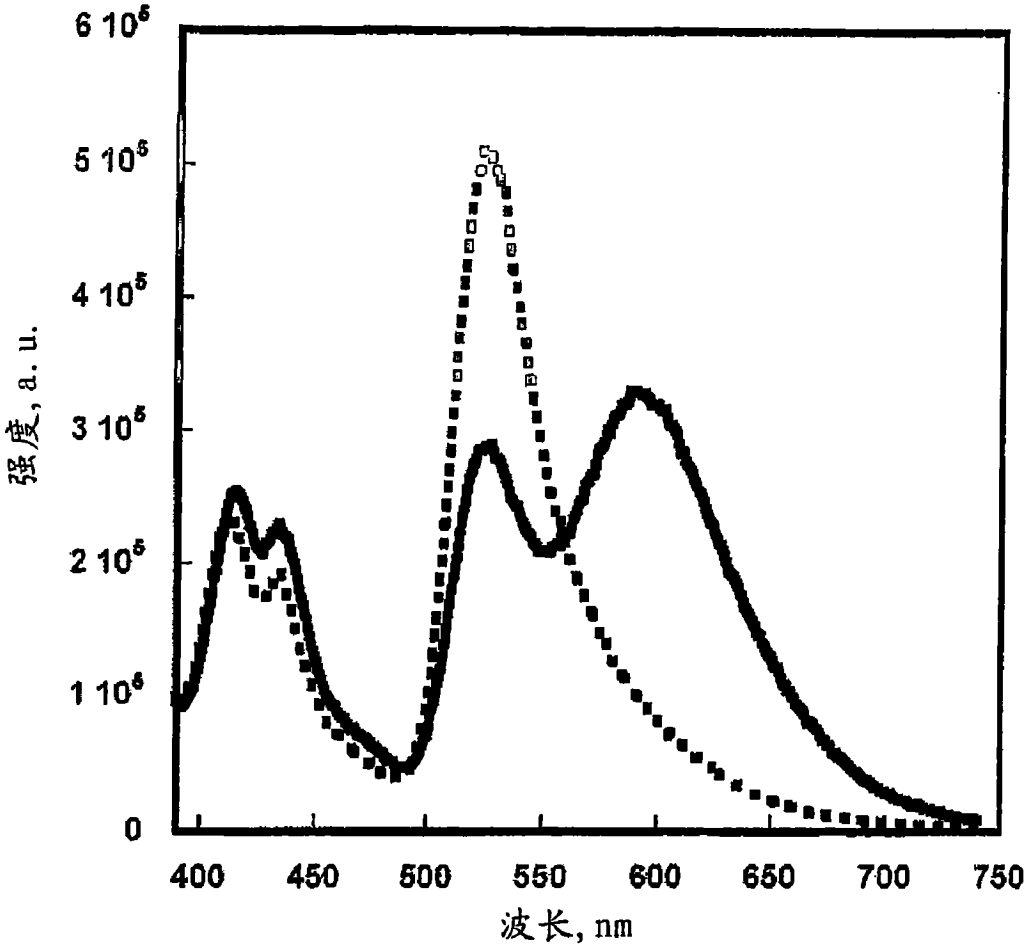

6 10⁵
5 10⁵
4 10⁵
3 10⁵
2 10⁵
1 10⁵
0
强度, a. u.
400
450
500
550
600
650
700
750
波长, nm

图 3

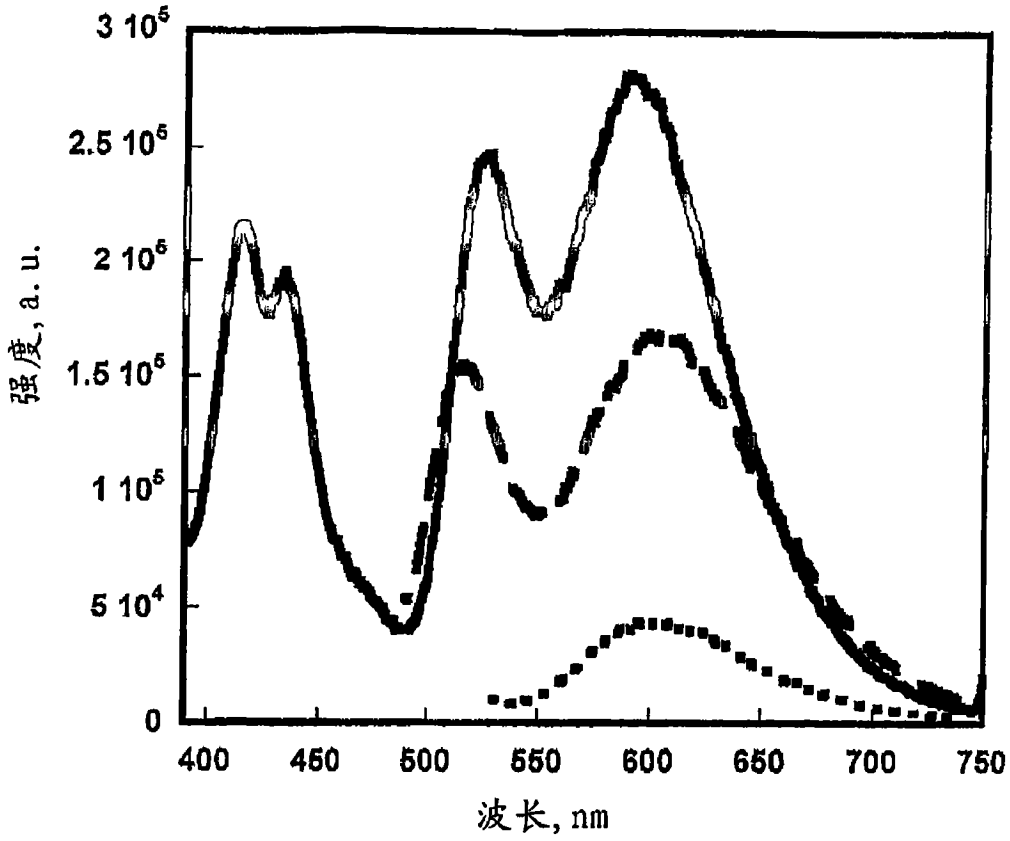

3 10^5
2.5 10^5
2 10^5
1.5 10^5
1 10^5
5 10^4
0
强度, a. u.
400
450
500
550
600
650
700
750
波长, nm

图 4

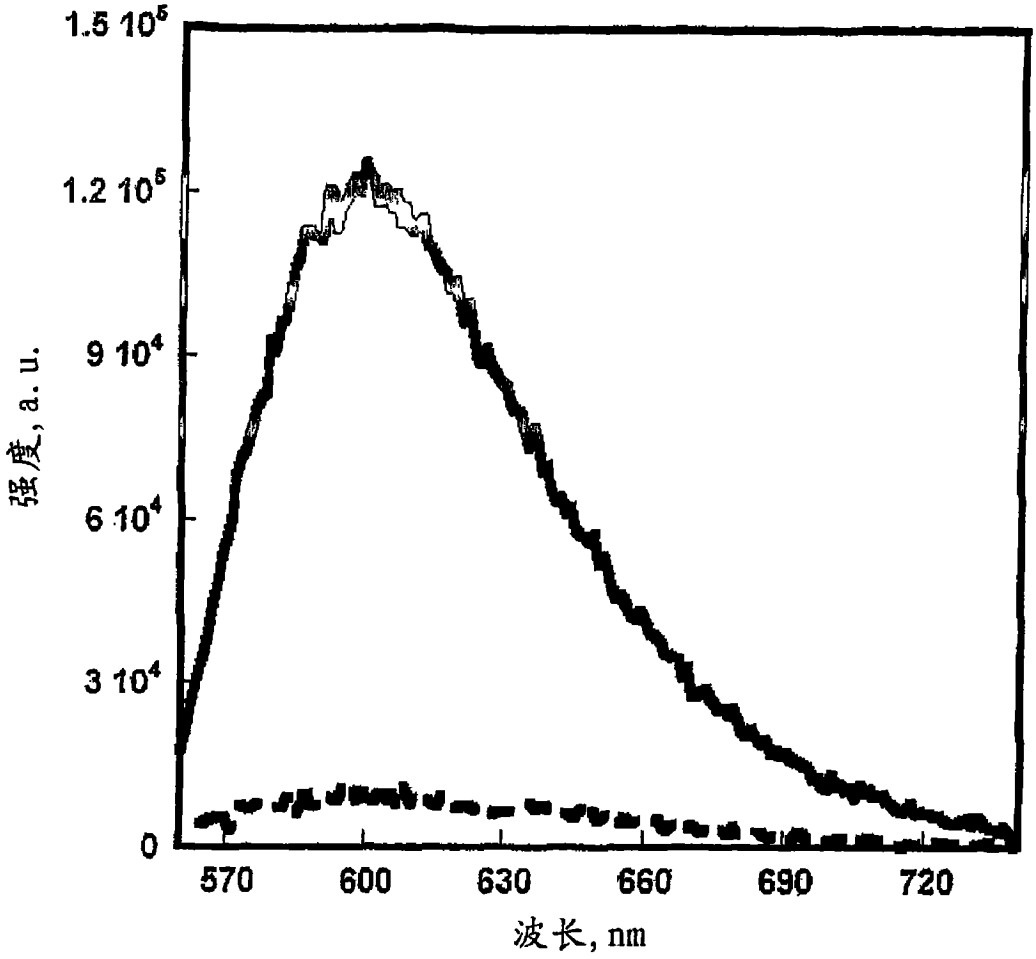


图 5