



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101374965 B

(45) 授权公告日 2013.08.14

(21) 申请号 200780003268.9

(22) 申请日 2007.01.16

(30) 优先权数据

60/759,675 2006.01.17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.07.17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/060557 2007.01.16

(87) PCT申请的公布数据

W02007/084886 EN 2007.07.26

(73) 专利权人 私募蛋白质体公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 J·R·海尔 D·J·施奈德

D·T·尼乌沃兰特

S·K·维尔考克斯 D·济奇

T·甘德 B·伊顿 L·戈尔德

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2003219801 A1, 2003.11.27, 说明书第7段, 第11段, 第48段, 第62段, 第74段, 图1.

US 2003219801 A1, 2003.11.27, 说明书第7段, 第11段, 第48段, 第62段, 第74段, 图1.

W0 03070984 A1, 2003.08.28, 说明书第5页, 第6页, 第9页.

W0 0109156 A1, 2001.02.08, 说明书第32页.

US 2005250147 A1, 2005.11.10, 说明书第9段—第14段.

EP 1219708 A1, 2002.07.03, 全文.

US 2003228603 A1, 2003.12.11, 说明书第5段—第14段.

审查员 蔡苗

权利要求书1页 说明书34页 附图21页

(54) 发明名称

测试样品的多元化分析

(57) 摘要

本发明揭示了检测测试样品中可能存在的一个或多个靶分子的方法、设备、试剂和试剂盒。在一个实施方案中,测试样品与包含标记并对靶分子有特异性亲和力的适体接触。形成了包含结合其靶分子的适体的适体亲和复合物。如果测试样品含有靶分子,适体亲和复合物通常将会在测试样品中形成。这种适体亲和复合物任选被转化为适体共价复合物,其包含了共价结合其靶分子的适体。随后,这种适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)可以通过多种本领域技术人员已知方法包括运用固体载体、运用质谱分析法和运用定量聚合酶链反应(Q-PCR)来检测和/或定量。

1. 一种用于检测测试样品中可能存在的靶分子的方法,该方法包括:
 - (a) 将测试样品与对靶分子有特异性亲和力的适体接触,其中如果所述靶分子存在于所述测试样品中,则通过适体与其靶分子的接触而形成适体亲和复合物;
 - (b) 在适体亲和复合物形成的平衡之后,将所述测试样品暴露于动力学激发所述测试样品的成分的条件;
 - (c) 在 (d) 之前的任何时候,将所述适体亲和复合物与标记物质接触;以及
 - (d) 检测和 / 或定量与测试样品的残余物分开的所述适体亲和复合物,其中所述动力学激发包括 (i) 引入竞争分子到测试样品中,或 (ii) 稀释测试样品,或 (iii) 在固体载体上捕获适体亲和复合物,之后在清洗溶液中有竞争分子的情况下进行清洗。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述至少一种竞争分子独立地选自寡核苷酸、聚阴离子、无碱基磷酸二酯聚合物、dNTP、或焦磷酸酯。
3. 权利要求 2 的方法,其中所述竞争分子是聚阴离子。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述聚阴离子是硫酸葡聚糖。
5. 权利要求 1 的方法,其中动力学激发所述适体的所述条件包括稀释所述测试样品。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述适体为单链核酸或双链核酸。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述靶分子选自蛋白质、碳水化合物、激素、抗原、生长因子、和组织。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述测试样品为生物学样品,其中所述生物学样品选自全血、血浆、血清、痰、呼吸、尿、精液、唾液、脑膜液、羊水、腺体液、淋巴液、乳头抽吸液、支气管抽吸液、滑液、关节抽吸液、细胞、细胞提取物、粪便、组织、组织提取物、组织活检和脑脊髓液。
9. 权利要求 3 的方法,其中所述聚阴离子是肝素或聚葡聚糖。
10. 权利要求 6 的方法,其中所述适体为 DNA 或 RNA。
11. 权利要求 7 的方法,其中所述靶分子是蛋白质。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述蛋白质是糖蛋白。
13. 权利要求 11 的方法,其中所述蛋白质是受体或抗体。
14. 权利要求 7 的方法,其中所述靶分子是碳水化合物。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述碳水化合物是多糖。
16. 权利要求 8 的方法,其中所述测试样品是细胞的生物学样品。
17. 权利要求 16 的方法,其中所述细胞是白细胞或外周血单核细胞。

测试样品的多元化分析

发明领域

[0001] 本发明涉及检测样品中靶分子的方法、设备、试剂和试剂盒,更具体来说,涉及检测和 / 或定量测试样品中包含的一或多个靶分子。

背景技术

[0002] 以下的描述提供了本发明相关的信息摘要,不是承认本文所提供的任何信息或引用的出版物是本发明的现有技术。

[0003] 为了检测和定量生物学样品和其它样品中的有生理学重要意义的分子的分析是科学研究和医学领域上的重要手段。这种分析的其中一类涉及使用包括一或多个固定于固体载体上的适体的微阵列。这些适体每个都能够高特异性地和高亲和力地结合靶分子。参见标题为“Nucleic Acid Ligands”的美国专利 5,475,096,也可参见标题均为“Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip”的美国专利 6,242,246、6,458,543 和 6,503,715。一旦微阵列和样品接触,适体就结合存在于样品中的它们各自的靶分子,从而可以确定样品中靶分子的存在与否、数量和 / 或浓度。

[0004] 这种分析的一种变更方法使用包括光反应官能团的适体,使得适体可以与其靶分子共价结合或“光交联 (photocrosslink)”。见标题为“Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip”的美国专利 6,544,776。这些光反应适体也被称为“光适体”。见标题均为“Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX”的美国专利 5,763,177、6,001,577 和 6,291,184。也可参见标题为“Photoselection of Nucleic Acid Ligands”的美国专利 6,458,539。当微阵列和样品接触后,光适体有机会结合其靶分子,这些光适体被光激活,洗涤固体载体去除任何非特异性结合的分子。可以使用严苛的洗涤条件,因为由于在光适体上的光激活官能团的共价键作用,结合于光适体的靶分子通常不被除去。以此方式,分析可以测定测试样品中靶分子的存在与否,数量和 / 或浓度。

[0005] 在这两种分析形式中,在接触样品前适体都被固定于固体载体上。但是在某种环境下,在接触样品前固定适体可能不能提供最佳分析。比如,预先固定适体可能会造成在固体载体表面上适体和靶分子混合不充分,这样也许会导致过长的反应时间,因而要延长保温时间使得适体和其靶分子充分结合。而且,当在分析中并依赖作为固体载体的材料而使用光适体时,固体载体可能会分散或吸收用于实现光适体和其靶分子间共价键形成的光。而且,取决于所使用的方法,检测结合其适体的靶分子可能会不准确,因为固体载体表面可能同样会暴露于所使用的任何标记物质并受其影响。最后,固定适体到固体载体上通常包括在把适体暴露于样品之前的适体准备步骤(即固定),这个准备步骤可能会影响适体的活性或官能性。

[0006] 因此,需要有方法、设备、时间和试剂盒提供高灵敏度的分析来检测和 / 或定量测试样品中的靶分子,通过优化影响如下的条件来实现:(1) 适体的活性,(2) 实现适体-靶分子复合物的结合平衡的效率,(3) 适体和其靶分子间共价键的形成,和(4) 适体-靶分子复

合物的检测。

[0007] 发明简述

[0008] 本发明包括检测和 / 或定量测试样品中可能存在的一或多种靶分子的方法、设备、试剂和试剂盒。在一个实施方案中,测试样品与包括标记并与靶分子有特异亲和力的适体接触。包括结合其靶分子的适体的适体亲和复合物得以形成。如果测试样品中含有靶分子,适体亲和复合物通常将会在测试样品中形成。这种适体亲和复合物任选被转化为包括了共价结合其靶分子的适体的适体共价复合物。随后,这种适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)可以通过多种本领域技术人员已知任何方法包括但不限于运用固体载体、运用质谱分析法和运用定量聚合酶链反应(Q-PCR)来检测和 / 或定量。

[0009] 在一个实施方案中,所述适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)通过使用固体载体来检测和 / 或定量。在这个实施方案中,所述适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)附着于固体载体上。附着是通过将固体载体和适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)接触实现的,并允许包含于适体的标记直接或间接地与附着于固体载体的探针缔合。然后与固体载体上探针缔合的适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)被检测和任选地定量。在检测和任选定量前的任何时候,也就是,在适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)附着于固体载体之前或者之后的任何时候,复合物和标记物质接触使得可以检测结合的靶分子。

[0010] 在另一个实施方案中,所述适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)使用质谱法来检测和 / 或定量。在这个实施方案中,适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)附着于固体载体上,附着是通过将固体载体和适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)接触实现的,并允许包含于适体的标记直接或间接地与固体载体上的探针缔合。这样有利于从测试样品的残余物中分开适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物),从而在质谱法分析前浓缩靶分子并改善用这种分析工具对复合物混合物中分析物的检测和定量。与固体载体上的探针缔合的适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)随后被洗脱并用质谱法分析,质谱法生成峰谱,可用于鉴别及从而检测靶分子。一旦靶分子被检测,任选地它也可以用本领域技术人员所知道的标准技术来定量。在一个实施方案中,靶分子为蛋白质时,在运用质谱法分析适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)之前,适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)可以用蛋白酶例如蛋白酶 K 或胰蛋白酶消化,产生所结合的靶分子的片段,可用来鉴别靶分子,从而可以检测和任选定量靶分子。

[0011] 在进一步的实施方案中,适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)使用 Q-PCR 来检测和 / 或定量。在这个实施方案中,在检测和 / 或定量前,测试样品中游离的适体先与适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)分开。适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)的定量通过先进行 PCR,然后直接或间接地测定测试样品中结合于靶分子的适体的量或浓度来进行。测试样品中靶分子的量或浓度通常直接地和用 Q-PCR 定量的适体的量和浓度成比例。一个典型的可以此方式用于定量适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)的方法是 TaqMan[®]测定(PE Biosystems, Foster City, Calif.;也可参见美国专利 5, 210, 015)。

[0012] 附图简述

[0013] 图 1A 和 1B 阐述检测和 / 或定量测试样品中可能存在的一或多种靶分子的方法。

[0014] 图 2A、2B 和 2C 阐述检测和 / 或定量测试样品中可能存在的一或多种靶分子的方法。

[0015] 图 3 阐述检测和 / 或定量测试样品中可能存在的一或多种靶分子的方法。

[0016] 图 4 显示用图 2A、2B 和 2C 中描绘的分析测定的系列稀释的缓冲液 (图 4A) 和血浆 (图 4B) 中 VEGF 的剂量应答曲线。非蛋白缓冲液应答在两组的所有数据点中都被减去。显示了拟合 log 变换数据的最小平方线。

[0017] 图 5A-5J 显示用图 2A、2B 和 2C 中描绘的分析测定的系列稀释的缓冲液中 10 个靶蛋白复合 41 个光适体的剂量应答曲线。每个适体的非蛋白缓冲液应答在组的所有数据点中都被减去。也绘制了拟合为 Log 变换数据的最小平方线。只显示了拟合线中使用的数据点。

[0018] 图 6A 和 6B 显示了从图 2A、2B 和 2C 中描绘的分析获得的两个个体血清样本中 57 个光适体的应答在 RFU 中的重复测量结果。两组重复测量结果都展示了对于测量的 57 个目标的非常好的可重复性, Pearson 相关系数大于 0.99。

[0019] 图 7 显示了使用任选的动力学激发 (kinetic challenge) 的 UPS 杂交捕获测定的缓冲液 (●) 和血浆 (▲) 中 tPA 的剂量应答曲线。非蛋白缓冲液应答被平均后从两个曲线中减去。在没有加靶蛋白的血浆样品中, 0.1pM 的 tPA 中没有动力学激发的稀释的血浆应答用 (□) 表示, 有动力学激发的用 (△) 表示。由于动力学激发, 血浆中所测到的应答几乎降低了 1 个 log 值, 然而从添加了 10nM 的 tPA 的缓冲液 (○) 和血浆 (△) 的结果中得到证明, 靶-适体应答没有变化。

[0020] 图 8 显示用任选的动力学激发的有竞争剂 (■) 和没有竞争剂 (●) 的分析测量的血浆中 tPA 的剂量应答曲线。描绘了 1pM[tPA] 的非蛋白血浆值, 并由于添加了竞争剂而减少了 70%, 然而 30nM tPA 中的应答证明靶-适体应答没有变化, 这在有和无竞争剂的情况下基本上是相同的。

[0021] 图 9 显示了在缓冲液 (●) 和血浆中 (▲) 的 3 个靶蛋白质 (tPA (图 9A)、PAI-1 (图 9B) 和 IL-6 (图 9C)) 的剂量应答曲线。RFU 值通过对每个适体减去非蛋白缓冲液 RFU 值来校正。描绘了缓冲液数据的拟合为 log 变换数据的最小平方线。这些适体 (△在 1pM) 校正的非蛋白血浆 RFU 值分别为 66、26 和 49RFU。

[0022] 图 10A-10D 显示了在缓冲液中交联并在用 K⁺/SDS 沉淀 (●) 任选地去除游离适体之前加入血浆中的 4 个靶蛋白的剂量应答曲线, 与没有去除游离适体产生的曲线 (■) 对比。在去除游离适体后信号加强, 测量的动力学范围也通常增加。

[0023] 图 11 显示了当在杂交中使用去垢剂和高盐浓度时靶蛋白 (bFGF) 和其光适体的光诱导化学交联的作用。在没有光时, 也因而没有靶共价附着到其光适体上, 在缓冲液中的分析信号减少了超过 2 个数量级。内源 bFGF 浓度相当低, 相对于无光对照和一般背景应答的微弱信号所反映的。

[0024] 图 12 显示在缓冲液中靶蛋白 (C4b) 的剂量应答, 使用了修饰的 5- 苄基 -dT 库替换 dT 开发的光适体。靶浓度 3 个 log 值的线性应答表明了分析中修饰的核苷酸适体的活性。

[0025] 图 13 显示了在 Schott Nexterion 表面 (图 13A) 或甲基丙烯酸酯共聚物表面 (图 13B) 上直接标记靶蛋白 (▲) 或生物素化后荧光标记的链霉抗生物素蛋白 (■) 产生的剂

量应答曲线。两种表面都进行的很好并且两种标记策略是相当的。

[0026] 图 14 说明了在缓冲液 (图 14A) 或 10 % 血清 (图 14B) 中适体 - 靶复合物的杂交, 并在 Affymetrix GeneChip® Test3 Array 上用 NHS-PEO₄- 生物素标记。用 Phycoerythrin-R 染色是在 AffymetrixGeneChip® 应用流体学工作站上进行的。在缓冲液 (图 14A) 中, VEGF 适体和探针 201(1) 杂交, 强度为 3500RFU, bFGF 适体和探针 1121(2) 杂交, 强度为 23000RFU。在血清 (图 14B) 中, VEGF 和 bFGF 适体对应的相对强度分别为 5000(1) 和 18000(2)。

[0027] 图 15 说明了血浆样品中适体 - 靶复合物杂交前封闭 AffymetrixGeneChip® Test3 Array 的作用。生物素化探针在缓冲液 (图 15A) 和在血浆样品中与用脱脂乳 (图 15B)、“起始物封闭 (starter block)” (图 15C) 和未标记血浆 (图 15D) 封闭的表面杂交。这四种表面的背景值为 49、300、400 和 500RFU, 而这三种探针的杂交信号在 (图 15A) 和 (图 15B) 中为 16000、33000 和 18000, 在 (图 15C) 中为 17000、35000 和 18000, 在 (图 15D) 中为 20000、36000 和 18000。

[0028] 图 16 说明了添加到血浆中、和光适体交联、并在 AffymetrixGeneChip® Test3 Array 上杂交的靶蛋白的定量检测。在血浆中形成的靶蛋白 IL1-R4(▲) 和 bFGF(■) 的适体复合物的杂交应答被减去非蛋白应答的 RFU 值。封闭阵列表面以降低样品基质中分子的吸附后, 从血浆样品中观察到 two-log 的定量范围。

[0029] 图 17 显示了缓冲液中系列稀释的与光适体多元化的 3 个靶蛋白的靶蛋白剂量应答曲线。光适体 - 交联靶蛋白通过与特异性寡核苷酸缀合的 Luminex SeroMap™ 微球体杂交被捕获。Luminex 100 IS 设备系统用于信号定量。MFI (中间荧光强度) 值通过从每个适体中减去非蛋白对照 MFI 值来校正。

[0030] 详细描述

[0031] 本文揭示的发明的实施运用了 (除非特别指明) 本领域技术水平之内的传统的化学、微生物学、分子生物学和重组 DNA 技术方法。这些技术在以下文献中有详细的解释: 见例如 Sambrook 等, MolecularCloning :A Laboratory Manual (Current Edition); DNA Cloning :APractical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., Current Edition); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition)。

[0032] 所有在本说明书中引用的出版物、公开的专利文献和专利申请都指明了本发明所属技术领域的技术水平。因此, 虽然每个出版物、公开的专利文献和专利申请都被特别各自指明并入参考, 本文所有引用的出版物、公开的专利文献和专利申请都在同种程度上并入参考。

[0033] 如本说明书包括附加的权利要求书所使用, 单数的形式“一个”和“所述”都包含复数涵义, 除非内容中另外清楚指明, 并与“至少一个”和“一或多个”可互换使用。因此, “一个适体”包括适体的混合物, “一个探针”包括探针的混合等等。

[0034] 如本文所用, 术语“包含”、“包括”、“含有”及其变化词汇是指非排除的包含, 因此包含、包括或含有一种元件或一系列元件的过程、方法、方法限定的产品或者物质组合物不仅只包括这些元件, 还可能包括那些没有列出的或这些过程、方法、方法限定的产品或者物

质组合物固有的元件。

[0035] 本发明包扩检测和 / 或定量测试样品中可能存在的一或多个靶分子的方法、设备、试剂和试剂盒。所揭示的方法、设备、试剂和试剂盒提供高灵敏度的分析来检测和 / 或定量测试样品中的靶分子,通过优化影响如下的条件来进行:(1) 适体的活性,(2) 实现适体-靶分子复合物结合平衡的效率,(3) 适体和其靶分子间共价键的形成和(4) 适体-靶分子复合物的检测。

[0036] 参见图 1A 和 1B,首先将测试样品与对靶分子具有特异亲和力的适体接触来检测和 / 或定量测试样品中靶分子的存在。形成了包括结合其靶分子的适体的适体亲和复合物。如果测试样品含有靶分子,适体亲和复合物通常会在测试样品中形成。适体亲和复合物任选用适合于所使用的适体的方法转化为适体共价复合物,其包括共价结合其靶分子的适体。随后,检测和 / 或定量适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)。

[0037] 在一个实施方案中,适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)通过将适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)附着于固体载体上来检测和 / 或定量。参见图 2A、2B 和 2C,在检测和 / 或定量测试样品中可能存在的靶分子的示例方法,测试样品与包括标记并对靶分子有特异亲和力的适体接触。形成包括结合其靶分子的适体的适体亲和复合物。如果测试样品含有靶分子,适体亲和复合物通常会在测试样品中形成。所述适体亲和复合物任选用适合于所使用的适体的方法被转化为包括共价结合其靶分子的适体的适体共价复合物。适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)附着于固体载体上。附着是通过将固体载体和适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)接触并允许适体上包括的标记直接或间接地与固体载体上附着的探针缔合而实现。与固体载体上的探针缔合的适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)随后被检测和任选地定量。在检测和任选定量前的任何时候,也就是,在适体亲和复合物(或者任选适体共价复合物)附着于固体载体之前或者之后的任何时候,复合物和标记物质接触使得可以检测结合的靶分子。

[0038] 本文使用的“核酸”、“寡核苷酸”和“多核苷酸”可互换使用,指任何长度的核苷酸聚合物,这样的核苷酸可包括脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和 / 或类似物或者化学修饰的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸。术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”包含双链或单链分子,以及三螺旋分子。

[0039] 如果存在,核苷酸的化学修饰可以包括如下的单一修饰或任何组合:2-,位糖修饰,5-位嘧啶修饰(例如 5-(N-苄基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(N-异丁基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(N-[2-(1H-吡啶-3-基)乙基]羧酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(N-[1-(3-三甲基铵)丙基羧酰胺]-2'-脱氧尿苷氯化物,5-(N-萘基羧酰胺)-2'-脱氧尿苷和 5-(N-[1-(2,3-二羟基丙基)]羧酰胺)-2'-脱氧尿苷),8-位嘌呤修饰,环外胺修饰,4-硫尿苷取代,5-溴或 5-碘尿嘧啶取代,骨架修饰,甲基化,异常碱基配对组合例如 isobasesisocytidine 和异胍(isoguanidine)等等。修饰也可包括 3' 和 5' 修饰如加帽。其它的修饰可以包括一或多个天然核苷酸被类似物取代,核苷酸间修饰例如不带电连接修饰(磷酸甲酯、磷酸三酯、磷酰胺、氨基甲酸等)和带电连接修饰(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等),嵌入剂修饰(例如吡啶、补骨脂素)、含有螯合剂的修饰(例如金属、放射性金属、硼和氧化性金属等),含有烷化剂的修饰和用修饰的连接的修饰(例如 α 异头核酸等)。而且,任何通常存在于糖中的羟基可被磷酸酯基团或磷酸基团置换,被标准保护基

团保护,或者被激活以制备对额外核苷酸或固体载体的额外的连接。5' 和 3' 末端 OH 基团可以被磷酸化或者被胺、大约 1 到大约 20 个碳原子的有机加帽基团部分、或者大约 1 到大约 20 个聚乙二醇 (PEG) 聚合物或其它亲水或疏水的生物或合成聚合物的有机加帽基团部分取代。如果存在,对核苷酸结构的修饰可在聚合物组装前或之后进行。核苷酸序列可能会被非核苷酸成分间断。多核苷酸可以在聚合作用后被进一步修饰,如和标记成分缀合。

[0040] 多核苷酸也可以含有本领域通常已知的核糖或脱氧核糖的类似物,包括 2' -O- 甲基 -, 2' -O- 烯丙基、2' - 氟 - 或 2' - 叠氮 - 核糖、碳环糖类似物、 α - 异头糖、差向异构糖例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和无碱基核苷 (abasic nucleoside) 类似物例如甲基核苷。如上所述,一或多个磷酸二酯键可被其他连接基团置换。这些其他连接基团包括磷酸被以下基团置换的实施方案: P(O)S(" thioate"), P(S)S(" dithioate"), (O)NR₂(" 酰胺"), P(O)R, P(O)OR', CO 或 CH₂(" formacetal"), 其中 R 或 R' 每个为独立的 H 或取代或未取代的烷基 (1-20C), 任选含有醚 (-O-) 连接、芳基、烯基、环烷基、环烯基或 araldyl。不是所有多核苷酸中的连接都必须一致。糖、嘌呤和嘧啶的类似物的取代对设计终产物可能是有利的,例如可以改变骨架结构,像聚酰胺的骨架。

[0041] 本文所用的“适体”和“核酸配体”可互换使用,指对靶分子有特异结合亲和力的核酸。已知亲和力相互作用是程度问题,但是,在本文中,适体对其靶的“特异结合亲和力”指所述适体结合其靶通常比结合测试样品中其它成分的亲和力高得多。“适体”是一种类型或多种具有特定核苷酸序列的核酸分子的一组拷贝。适体可以包括任何适当数量的核苷酸。“适体”指的是一组以上的这样的分子。不同的适体可能具有相同或不同的核苷酸数量。本文揭示的任何方法可包括使用一或多种适体。本文揭示的任何方法也可能包括使用两或多种特异性结合相同靶分子的适体。在下面进一步的描述中,适体可包括标记。如果适体包括标记,所有的适体拷贝不需要具有相同的标记。而且,如果不同的适体均包括标记,这些不同的适体可以具有相同或不同的标记。

[0042] 适体可以用任何已知的方法鉴别,包括 SELEX 方法。见例如标题为“Nucleic Acid Ligands”的美国专利 5, 475, 096。一旦被鉴别,适体可以用已知的任何方法制备或合成,包括化学合成方法和酶合成方法。

[0043] 本文术语“SELEX”和“SELEX 方法”可互换使用,通常指的是下列方法的组合:(1) 选择可以所需的方式和靶分子互相作用的核酸,例如高亲和力地结合蛋白,(2) 扩增这种选择的核酸。见例如标题为“Nucleic Acid Ligands”的美国专利 5, 475, 096。SELEX 方法可用于生产共价结合靶的适体以及非共价结合靶的适体。见例如标题为“Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX”的美国专利 5, 705, 337。

[0044] 如本文所示,适体可以进一步包含“标记”,标记指的是提供手段以将适体(以及任何与它结合的靶分子)附着或固定在固体载体上的成分。“标记”为一种类型或多种种类的可以缔合探针的成分的一组拷贝。“多种标记”指的是一种以上的这样的成分组。标记可以用本领域任何已知方法附着或包括于适体上。通常,标记使得适体可以直接或间接地缔合附着于固体载体的探针。标记可以将适体共价复合物定位在固体载体上的空间特定地址。因此,不同的标记可以将不同的适体共价复合物定位在固体载体上不同的空间特定

地址。标记可以是多核苷酸、多肽、肽核酸、锁定核酸、寡糖、多糖、抗体、affybody、抗体模拟物、细胞受体、配体、脂质、这些结构的任何片段或衍生物、上述任何组合、或任何其它可以设计探针（或接头分子，如下所述）特异性地与之结合或缔合的结构。通常，标记被设计成不会分子内地与它本身或它所附着或其为之中一部分的适体互相作用。如果用 SELEX 鉴别适体，标记可以在 SELEX 前或后加入到适体中。在一个实施方案中，标记在 SELEX 后被包括到适体的 5' 末端。在另一个实施方案中，标记在 SELEX 后被包括到适体的 3' 末端。

[0045] 在一个实施方案中，标记包括多核苷酸，其被设计成可以通过与探针序列直接杂交而与包括互补核苷酸序列的探针缔合。在这个实施方案中，通常设计标记，杂交反应在一定条件下进行，所述条件为标记不与所述标记包括与之完全互补序列的探针以外的其它探针杂交。

[0046] 在一些实施方案中，标记包含是适体本身的一部分的核苷酸。例如，如果使用 SELEX 鉴别适体，适体通常包括 5' 固定末端，它与 3' 固定末端之间由一个取决于适体的可变的核苷酸序列也就是可变区隔开。在一个实施方案中，标记可以包含包括在适体的其中固定末端中的任何合适数量的核苷酸，例如，全部的固定末端或部分固定末端，包括对于固定末端是内部的核苷酸。在另一个实施方案中，标记可以包含包括在适体可变区域内的任意合适数量的核苷酸，例如，整个或部分可变区。在进一步的实施方案中，标记可以包含重叠可变区和一个固定末端的任意合适数量的核苷酸，也就是，标记可以包含包括任意部分（包括全部）可变区和任意部分（包括全部）的固定末端的核苷酸序列。

[0047] 在另一个实施方案中，标记直接和探针缔合，并共价地结合探针，因而将适体共价连接到固体载体的表面上。在这个实施方案中，标记和探针可以包括合适的反应基团，在标记和探针缔合的基础上，这些反应基团充分互相接近以发生形成共价键的化学反应。这个反应可以自发发生，也可以需要激活，例如光激活或化学激活。在一个示例的实施方案中，标记包括二烯部分而探针包括二烯亲合物，二烯和二烯亲合物通过自发的 Diels-Alder 缀合反应形成共价键。任何合适的互补化学都可以使用，例如，N-Mannich 反应、二硫键形成、Curtius 反应、醛醇缩合、Schiff 碱形成和 Michael 加成。

[0048] 在另一个实施方案中，标记间接和探针缔合，例如通过接头分子，如下所述。在这个实施方案中，标记包括与接头分子的一个特定区域或成分互补的多核苷酸序列。通常设计标记，进行杂交反应以使标记除了和接头分子包括的多核苷酸序列以外不和其它多核苷酸序列杂交。

[0049] 如果标记包含多核苷酸，则这个多核苷酸可以包括任意合适数量的核苷酸。在一个实施方案中，标记包括至少大约 10 个核苷酸。在另一个实施方案中，标记包括大约 10 到大约 45 个核苷酸。在另一个实施方案中，标记包括至少大约 30 个核苷酸。包括多核苷酸的不同标记可以包括相同或不同数量的核苷酸。

[0050] 在这里使用的术语“大约”代表一种无关紧要的数值上的修饰或变异，这些数值相关的基本功能不变。

[0051] 在这里使用到的“缔合”及其任何变化指的是标记和探针之间的相互作用或配位作用，并产生走狗稳定的复合物使得例如在所给的配位或反应条件下其它“未缔合”或未结合的物质例如未结合的测试样品的成分可以与标记-探针复合物分开。标记和探针可以通过特异性地相互作用和彼此结合直接地互相缔合。标记和探针也可以在如通过接头分子介

导配位作用时间间接地互相缔合。

[0052] 这里所提到的“探针”指的是一种分子，它被设计为可以直接或间接地缔合标记。“探针”为可以通过与标记直接或间接缔合而把适体固定在固体载体上的一种类型的分子或一种类型的多分子结构的一组拷贝。“多种探针”指的是一种以上的这种分子组。探针可以是多核苷酸、多肽、肽核酸、锁定核酸、寡糖、多糖、抗体、affybody、抗体模拟物、细胞受体、配体、脂质、这些结构的任何片段或衍生物，以上这些的任何组合，或任何其它可以通过设计标记（或接头分子）以特异性地与之结合或缔合的结构。探针可以使用本领域任何已知方法共价或非共价地附着于固体载体。

[0053] 在一个实施方案中，探针包括具有和多核苷酸标记序列互补的序列的多核苷酸。在这个实施方案中，通常设计探针，在一定的条件下进行杂交反应，所述条件为探针不与除了和探针包括与之互补的序列的标记以外的核苷酸序列杂交（即探针通常被设定成让杂交反应在探针不和不同的标记或适体杂交的条件下进行）。

[0054] 在另一个实施方案中，探针间接和标记例如通过接头分子缔合。在这个实施方案中，探针可以包括与接头分子的特定区域或成分互补的多核苷酸序列。通常设计探针，进行杂交反应以便探针不与接头分子中包括的多核苷酸序列以外的其它核苷酸序列杂交。

[0055] 如果探针包括多核苷酸，则这个多核苷酸可以包括任意合适数量的核苷酸。在一个实施方案中，探针包括至少大约 10 个核苷酸。在另一个实施方案中，探针包括大约 10-45 个核苷酸。在另一个实施方案中，探针包括至少大约 30 个核苷酸。包括多核苷酸的不同探针可以包括相同或不同数量的核苷酸。

[0056] 这里所提到的“接头分子”指的是被设计成介导标记和探针缔合的一或多个分子。通常，接头分子是双功能性的，其包括与标记连接的官能团和与探针连接的官能团。“接头分子”为一种类型或多种种类的可以缔合标记和探针的分子或多分子结构的一组拷贝。“多种接头分子”指的是一组以上的这样的分子或多分子结构。接头分子可能具有任何合适的构型，可包括任何合适的成分，包括多核苷酸、多肽、肽核酸、锁定核酸、寡糖、多糖、抗体、affybody、抗体模拟物、聚乙二醇（PEG）分子、细胞受体、配体、脂质、这些结构的任何片段或衍生物、以上这些的任何组合或任何其它可以设计成介导标记和探针特异性缔合的结构或化学成分。接头分子可以是脂肪族或芳香族的。

[0057] 接头分子的组成对于本文所揭示的任何方法来说并不重要。通常优选接头分子是亲水性的。通常情况下，特定接头分子的长度可以根据合成的方便和介导标记和探针缔合时的容易性来选择。接头分子不应含有干扰本发明方法所需的反应的官能性或长度。

[0058] 参考图 2A、2B 和 2C，当接头分子用于本文所揭示的任何方法时，接头分子可以在进行分析的任何适当时候引入，可以先和标记或探针接触。例如，包括在适体上的标记可以在适体共价复合物接触固体载体上探针之前的任何时候和接头分子接触。在另一个实施方案中，附着于固体载体的探针可以在探针暴露于适体共价复合物上的标记之前的任何时候和接头分子接触。在进一步的实施方案中，比如取决于进行的特定分析的复杂性和反应条件，探针可以同时和接头分子和适体共价复合物上的标记接触。

[0059] 接头分子通常包含标记缔合成分和探针缔合成分。标记缔合成分和探针缔合成分基于特定分析中使用的特定标记和探针是独立选择的。在一个实施方案中，标记缔合成分为与标记中包括的多核苷酸序列互补的多核苷酸。在另一个实施方案中，探针缔合成分为

与探针中包括的多核苷酸序列互补的多核苷酸。在进一步的实施方案中,标记缔合成分是多核苷酸,探针缔合成分也是多核苷酸。

[0060] 在进一步的实施方案中,接头分子包括通过第三个成分与探针缔合成分分开的标记缔合成分。在这个实施方案中,这个第三个成分可以包括一或多个分子或亚成分,包括多核苷酸、多肽、肽核酸、锁定核酸、寡糖、多糖、抗体、affybody、抗体模拟物、脂肪族碳分子、聚乙二醇(PEG)分子、细胞受体、配体、脂质、这些结构的任何片段或衍生物、以上这些的任何组合或任何其它可以帮助标记和探针缔合例如增加标记缔合成分和探针缔合成分之间的弹性的化学结构或成分。

[0061] 接头分子的多核苷酸成分可以包括任意合适数量的核苷酸。在一个实施方案中,接头分子的多核苷酸成分包括至少大约 10 个核苷酸。在另一个实施方案中,接头分子的多核苷酸成分包含大约 10-45 个核苷酸。在另一个实施方案中,接头分子的多核苷酸成分包含至少大约 30 个核苷酸。本文所揭示的任何方法中使用的接头分子可以包括具有相同或不同数量的核苷酸的多核苷酸成分。

[0062] 本文所用的“光适体”、“光反应核酸配体”和“光反应适体”可互换使用,指的是含有一或多个可以与靶分子共价结合或“交联”的光反应官能团的适体。例如,天然核酸残基可以被修饰成包括化学官能团,这个基团赋予核酸残基在暴露于适合波长的辐射源下的光反应性。光适体可以用任何已知方法鉴别和/或制备。在一些实施方案中,光反应适体用光 SELEX 方法鉴别。见例如标题均为“Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX”美国专利 5,763,177、6,001,577 和 6,291,184。也例如可参见标题为“Photoselection of Nucleic Acid Ligands”的美国专利 6,458,539。在另一些实施方案中,制备适体并随后修饰以掺入一或多个光反应官能团,从而生成光适体。在这些实施方案中,一或多个光反应核酸残基可以通过用光反应核酸残基替代一或多个其它核苷酸例如适体中的一或多个胸腺嘧啶和/或胞嘧啶核苷酸或通过修饰一或多个核酸残基以包括光反应官能团来掺入适体中。

[0063] 示例的可用于掺入光适体的光反应官能团包括:5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、5-溴乙烯尿嘧啶、5-碘乙烯尿嘧啶、5-叠氮尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-硫尿嘧啶、4-硫胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、5-溴乙烯胞嘧啶、5-碘乙烯胞嘧啶、5-叠氮胞嘧啶、8-叠氮腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、8-碘腺嘌呤、8-叠氮鸟嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-碘鸟嘌呤、8-叠氮次黄嘌呤、8-溴次黄嘌呤、8-碘次黄嘌呤、8-叠氮黄嘌呤、8-溴黄嘌呤、8-碘黄嘌呤、5-[(4-叠氮苯甲酰甲基)硫]胞嘧啶、5-[(4-叠氮苯甲酰甲基)硫]尿嘧啶、7-脱氮-7-碘腺嘌呤、7-脱氮-7-碘鸟嘌呤、7-脱氮-7-溴腺嘌呤和 7-脱氮-7-溴鸟嘌呤。

[0064] 除了这些示例的基于核苷的光反应官能团外,也可以使用其它可以用合适的接头分子加入到适体末端的光反应官能团。这些光反应官能团包括:二苯甲酮、蒽醌、4-叠氮-2-硝基苯胺、补骨脂素、这些的任何衍生物等等。

[0065] 掺入光适体的光反应官能团可以被任何合适的方法激活。在一个实施方案中,含有光反应官能团的光适体通过将光适体亲和复合物暴露于电磁辐射源使之与其靶交联。合适类型的电磁辐射包括紫外线、可见光、X-射线和伽马射线。合适的放射源包括利用单色光源或过滤多色光源。

[0066] 在一个实施方案中,光反应核苷酸如 4-叠氮-2-硝基苯胺可以被掺入光适体,波长范围大约在 325nm 到大约 470nm 的光可以用来照射包括这个光适体的光适体亲和复合物。在这些波长范围内的激发可以通过便宜的发光二极管(LEDs)使用单个 LED 或 LED 阵列来实现,因为所需的能量小。几乎波长范围在 465 到 475nm 内、100 度视角和提供 38 流明的单色光可以用一或多个高能量 LED 提供。在某些情况下当所需的光反应基团不能用 LED 产生的波长来激发时,合适的去电子或供电子基团的取代常常用来适度位移光反应官能团的激发波长以使得可以用 LED 产生的波长来激发光反应官能团。

[0067] 在一个实施方案中,光反应核苷酸被掺入光适体,波长范围在大约 300nm 到大约 350nm 的光可以用来照射包括这个光适体的光适体亲和复合物来将光适体亲和复合物转化为光适体共价复合物。

[0068] 在一个实施方案中,光反应核苷酸如 5-碘尿嘧啶或 5-碘胞嘧啶可以被掺入光适体,波长范围在大约 320nm 到大约 325nm 的光可以用来照射包括这个光适体的光适体亲和复合物。这个组合便于选择性地让含有生色团的适体和其靶分子交联而不诱导其它非特异性的光反应。例如,在靶蛋白的情况中,靶蛋白中可能包括的任何色氨酸残基和光适体中可能包括的任何胸腺嘧啶和尿嘧啶碱基也可能是光反应性的。因为 5-碘尿嘧啶或 5-碘胞嘧啶吸收波长大约为 325nm 的光而色氨酸和天然核酸碱基不吸收,所以使用这种波长的光使得在光反应亲和复合物中 5-碘尿嘧啶或 5-碘胞嘧啶处有选择性的光反应。例如,波长范围大约在 320nm 到 325nm 的单色光可以通过发射光波长大约为 320nm 的频率倍增可调谐染料激光或发射光波长大约为 325nm 的氩镭激光器来提供。

[0069] 在进一步的实施方案中,光适体亲和复合物可以暴露于发射光波长设为大约 308nm 的氯化氙(XeCl)受激准分子激光器。在这个实施方案中,光适体可以包括光反应官能团(例如 5-溴尿嘧啶或 5-溴胞嘧啶),并用光源处理光适体亲和复合物以光激活光反应官能团,由此光适体和其靶分子交联,形成光适体共价复合物。

[0070] 在另一个实施方案中,光适体可以通过将光适体亲和复合物暴露于发射光波长被设为大约 313nm 的高压汞灯中使之和其靶交联。在进一步的实施方案中,波长滤器可以用来限制发射光大于大约 300nm 从而最小化除光适体亲和复合物中包括的那些生色团以外的生色团的激活作用。

[0071] 在进一步的实施方案中,光适体可以通过将光适体亲和复合物暴露于发射光波长被设为大约 254nm 的低压汞灯中使之和其靶交联,这个光波随后被磷吸收,并再以大约 300nm 到大约 325nm 波长的再发射。在这个实施方案中,再发射光经过滤器去除未被磷吸收的大约 254nm 的光及任何波长在大约 290nm 到大约 305nm 的光,这些光波可能对靶蛋白有害。

[0072] 在另一个实施方案中,卤素光反应官能团例如碘尿嘧啶或溴胞嘧啶可以掺入光适体中,包括这个光适体的光适体亲和复合物可以用波长在大约 350nm 到大约 400nm 的光处理。例如,可以使用由 YAG 钕激光器第三谐波设定在大约 355nm 的单色光或氟化氙(XeF)受激准分子激光器第一谐波设定在大约 351nm 的单色光。

[0073] 这里提到的“靶分子”和“靶”可互换使用,指的是任何感兴趣的、可能存在于测试样品中的、适体可以高亲和力和特异性结合的分子。“感兴趣的分子”包括特定分子的任何微小变体,例如对于蛋白质来说,在氨基酸序列、二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸

化、或任何其它操纵和修饰例如与基本上不改变分子特性的标记成分缀合。“靶分子”和“靶”是一组一种类型或多种种类的可以和适体结合的分子或多分子结构的拷贝。“多种靶分子”和“多种靶”指的是一组以上这样的分子。示例的靶分子包括蛋白质、多肽、核酸、碳水化合物、脂质、多糖、糖蛋白、激素、受体、抗原、抗体、affybodies、抗体模拟物、病毒、病原体、有毒物质、底物、代谢物、过渡态类似物、辅因子、抑制剂、药物、染料、营养物、生长因子、细胞、组织和任何这些物质的任何片段或部分。适体实际上可以是任意大小的化学或生物学分子，因此实际上任意大小的化学或生物学分子均可以是合适的靶。靶也可以被修饰以加强靶和适体间相互作用的可能性和强度。在示例的实施方案中，靶分子为蛋白质。见标题为“Modified SELEX Process Without Purified Protein”的美国专利 6,376,190，其方法中 SELEX 靶为肽。

[0074] 本文中“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用，指的是任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可以是线性或分支的，其可包含修饰的氨基酸，其可被非氨基酸间断。该术语也涵盖被天然或人为修饰的氨基酸聚合物，例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化、或任何其它操纵和修饰，如与标记成分缀合。同样包括于定义中的有，例如含有一或多个氨基酸（包括例如非天然氨基酸等）类似物的多肽以及本领域已知的其它修饰。多肽可以为单链或缔合的链。

[0075] 这里提到的“非靶分子”和“非靶”可互换使用，指的是测试样品中含有的可以和适体形成非特异性复合物的分子。“非靶分子”和“非靶”为一组一种类型或多种种类的可以和适体结合的分子或多分子结构的拷贝。“多种非靶分子”或“多种非靶”指的是一组以上的这样分子。可知一个分子对第一个适体来说是非靶，但是可能成为第二个适体的靶。同样，一个分子可能是第一个适体的靶，而是第二个适体的非靶。

[0076] 这里提到的术语“适体亲和复合物”指的是非共价复合物，由适体和其靶分子相互作用形成。“适体亲和复合物”为一组一种类型或多种种类的由结合其相应靶分子的适体形成的复合物的拷贝。“多种适体亲和复合物”指的是一组以上的这样的复合物。适体亲和复合物在环境条件下通常可以被倒转或解离，例如温度升高，盐浓度增加，或添加变性剂。

[0077] 这里提到的术语“适体共价复合物”指的是其中适体被诱导或通过其它方式与其靶分子形成共价键的适体亲和复合物。“适体共价复合物”为一组一种类型或多种种类的通过和其相应的靶分子共价结合的适体形成的复合物的拷贝。“多种适体共价复合物”指的是一组以上的这样的复合物。适体和其靶分子间的共价键或连接可以通过适体上的化学部分包括上述关于光适体的那些部分的光激活而被诱导。适体和其靶分子间的共价键或连接也可以被化学诱导。适体上可能包括的用于诱导和靶的共价连接的化学基团包括但不限于醛、马来酰亚胺、丙烯酰衍生物、重氮衍生物、硫醇等。在一些实施方案中，化学交联基团例如马来酰亚胺或重氮盐可以简单地通过提供使特异并充分加强的化学反应发生所需的合适环境和反应基团的排列来将适体亲和复合物转化为适体共价复合物。在另一些实施方案中，化学交联物例如醛基可能需要添加其它成分，例如氰硼氢化钠来转化适体亲和复合物为稳定的、不可逆的适体共价复合物。在另外一些实施方案中，适体中不包括这样的化学交联物，而是用第三种试剂通过促进适体和其靶的共价附着来转化适体亲和复合物为适体共价复合物。例如，含有胺反应部分（例如 N-羟基琥珀酰亚胺酯、醛或酰胺）和核苷反应基团（例如碘乙酰胺或激活的醛）的同源或异源双功能试剂可以诱导适体亲和复合物例如

适体和靶蛋白形成的亲和复合物的共价配位作用。

[0078] 术语“测试样品”这里指的是任何含有多种分子和包括至少一种靶分子的材料、溶液或混合物。术语测试样品包括如下定义的生物样品和可能用于环境或毒性测试的样品,例如污染或可能污染的水和工业污水。测试样品也可能是终产物,中间产物或制备方法例如生产方法的副产物。测试样品可能包括任何合适的添加到从生物体或其它来源(例如环境或工业来源)获得的材料、溶液或混合物中的分析介质、缓冲液或稀释液。

[0079] 术语“生物样品”指的是任何从生物体获得的材料、溶液或混合物。这包括血液(包括全血、白细胞、外周血单核细胞、血浆和血清),痰,气息、尿、精液、唾液、脑膜液(meningeal fluid)、羊水、腺体液(glandular fluid)、淋巴液、乳头抽吸液、支气管抽吸液、滑液、关节抽吸液、细胞、细胞提取物和脑脊髓液。这也包括前述所有的实验分离级分。术语“生物样品”也包括例如从粪便样品、组织样品或组织活检获得的含有均匀的固体材料的材料、溶液或混合物。术语“生物样品”也包括从组织培养、细胞培养、细菌培养和病毒培养衍生的材料、溶液或混合物。

[0080] “固体载体”指的是任何具有分子可以直接或间接通过共价或非共价键附着的表面的基质。固体载体可能包括任何能提供给附着于表面的探针物理支撑的基质材料。这种材料通常能够耐受将探针附着于其表面上或在分析中任何后续处理或加工所需的条件。这种材料可能是天然的、合成的或经修饰的天然材料。合适的固体载体材料可包括硅、石墨、镜面、薄片、陶瓷、塑料(包括聚合物例如聚氯乙烯、环烯共聚物、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚乙烯、聚丙烯、聚(4-甲基丁烯)、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚(对苯二甲酸乙二酯)、聚四氟乙烯(PTEE 或 Teflon®)、尼龙、聚(丁酸乙酯)、锆、砷化镓、金、银等,或单独使用或和其它材料组合使用。其它的硬性材料也可以考虑,例如玻璃,其包括硅,并进一步包括例如可获得的 Bioglass 的玻璃。其它可以使用的材料包括多孔材料例如受控的有孔玻璃珠。也可以使用本领域任何已知的表面上能够掺入一或多个官能团如任何氨基、羧基、硫醇或羟基官能团的材料。

[0081] 用于固体载体的材料可能具有任何从简单到复杂的多样化构造。固体载体可以具有任何一种形状,包括条状、板状、盘状、颗粒状(包括珠状)、管状、孔状等。通常,材料相对平坦,例如载玻片,然而它也可以为球状,例如珠子或圆柱状(例如柱)。在许多实施方案中,材料通常被塑造成矩形固体。许多预先确定的排列,例如探针阵列,可在薄片上合成,然后沿着刻度线切割成单一阵列基质。可能使用的示例固体载体包括微滴定孔、显微镜载玻片、膜、顺磁性珠、带电纸、Langmuir-Bodgett 膜、硅晶片芯片、流通芯片(flow through chip)和微珠。

[0082] 固体载体的表面通常是形成固体载体的基质材料的外层部分。结合探针的固体载体表面可能是光滑的或基本上平坦的,或不规则状,例如凹陷、凹槽、凸起、或其它纹理。表面可以被一或多层不同的化合物层修饰,用于将表面性质改造成所需的样式。在许多实施方案中,这样的表面修饰层存在的时候,其厚度通常可以从单分子厚度到大约 1mm,或从单分子厚度到大约 0.1mm,或从单分子厚度到大约 0.001mm。

[0083] 感兴趣的表面修饰层包括无机和有机层,例如金属、金属氧化物、聚合物、小有机分子等。感兴趣的聚合物层包括甲基丙烯酸酯共聚物、聚丙烯酰胺、多糖、磷脂、聚氨酯、聚酯、聚碳酸酯、聚脲、聚酰胺、聚乙烯胺、聚亚芳基硫醚、聚硅氧烷、聚酰亚胺、聚乙酸

酯 (polyacetates) 等, 其中聚合物可以是杂聚或同聚物, 可能有或无单独的功能部分附着其上 (例如缀合的部分)。其它感兴趣的表面修饰包括三维网络, 例如水凝胶。本领域任何已知的合适的水凝胶都可以使用。见例如标题为 “Biochips with Surfaces Coated with Polysaccharide-Based Hydrogels” 的美国专利申请出版物 No. 2003/0218130, 标题为 “Method for Immobilizing a Biologic in a Polyurethane-Hydrogel Composition, a Composition Prepared from the Method, and Biomedical Applications” 的美国专利申请出版物 No. 20050147994, 标题为 “Photocrosslinked Hydrogel Blend Surface Coatings” 的美国专利申请出版物 No. 2005005908 和这些出版物中所引用的参考文献。

[0084] 在一个实施方案中, 固体载体表面包括水凝胶。水凝胶可以包含例如聚合物基质。水凝胶可以被化学附着于固体载体的表面上, 可以包括能够直接或间接将探针附着于水凝胶的结合官能团。示例的结合官能团包括疏水基团、亲水基团、反应基团例如醛、环氧、碳酸酯等, 羧基、硫醇、磺酸酯、硫酸酯、氨基、取代的氨基、磷酸酯、金属螯合基、硫醚、生物素、硼酸盐等。

[0085] 任何适用于基因表达或 SNP 分析的表面也可以使用, 包括由以下公司提供的基质或表面: Affymetrix、General Electric (例如 CodeLink), Agilent 和 Schott Nexterion, 或者以基质和表面的形式, 或者以进一步包含其它成分的产品成分的形式提供。

[0086] 探针可以通过任何合适的方式结合到固体载体的表面上, 只要在根据本发明所揭示的方法进行的后续保温和处理过程中, 例如清洗表面以去除非特异性复合物时探针不会脱落。探针可以通过非共价连接的方式结合, 例如粘附、吸附、吸附, 或共价连接到固体载体的表面上。在探针共价连接到固体载体时, 固体载体表面将含有连接探针的官能团。所使用的官能团的性质取决于探针的性质。将分子共价地附着于表面的方法已经有大量的报道。典型地, 这些反应通过将分子上的活性官能团与表面上激活的官能团反应来进行。例如, 含有胺的化合物可以通过形成羧酸的激活的酯例如 N-羟基琥珀酰亚胺衍生物而附着于含有羧酸的表面。这个胺易于与这个激活的酯反应形成稳定的酰胺键。这个反应在所需胺的反应比系统中其它亲核试剂都显著地快的情况下有用。

[0087] 本领域中先前描述的方法实例包括用以下成分激活表面: 溴化氰、N-羟基琥珀酰亚胺酯、羰基二咪唑、碳二亚胺、吡内酯、氰尿酸氯、有机磺酰氯、二乙烯基砜、硝基苯基酯、碘乙酰基、马来酰亚胺、环氧、酰肼、还原性胺化作用、重氮盐和 Mannich 缩合。和激活的表面反应的分子包括胺、醇、羧酸、硫醇、羰基和含有活性氢的化合物。

[0088] 在一个实施方案中, 探针在一个预先设定的空间排列或模式中结合固体载体表面, 所述空间排列或模式是指在表面上探针所在的特定位置的特征 (feature) 是已知的任何排列。在一个实施方案中, 这个预先设定的排列为阵列。阵列通常包括可寻址的区域的任何一维、二维或三维排列, 所述区域具有与该区域缔合的特定探针。一个阵列是可寻址的在于其有许多不同探针区域, 因此阵列上特殊的预先设定的位置或地址上的区域、特征或点可以检测特定的适体共价复合物, 从而借助与适体共价复合物上的标记特异性缔合来检测特定的靶分子。

[0089] 在固体载体表面上的阵列集合指的是一或多个置于单独固体载体表面上的、被阵列间区域分开的阵列。通常, 与具有阵列的表面相对的固体载体表面 (相反表面) 不含有任何阵列。阵列可以被设计用于检测任何类型的测试样品。固体载体表面可以携带至少 1

个、2 个、4 个、20 个、100 个或至少 500 个阵列。根据需要,任何或全部的阵列可以一样或彼此不同,每个可以含有许多分布于上的探针的点或特征。一个典型的阵列可能在一个小于大约 20cm^2 或小于大约 10cm^2 的面积内含有大于 10 个、大于 100 个、大于 1000 个或 1 万个、或甚至大于 10 万个特征。例如,特征可能具有大约 $10\mu\text{m}$ 到大约 1.0cm 的宽度(也就是一个圆点的直径)。在其他实施方案中,每个特征可能具有大约 $10\mu\text{m}$ 到大约 1.0mm 的宽度,或大约 $5.0\mu\text{m}$ 到大约 $500\mu\text{m}$ 的宽度,或大约 $10\mu\text{m}$ 到大约 $200\mu\text{m}$ 的宽度。非圆特征可能具有和以上圆特征等同的宽度(直径)范围。

[0090] 可以使用固体载体上任何多种几何阵列。如上面提到的,一个固体载体可能含有 1 个或多个阵列。阵列上的特征可能排列成直线行和列。这对固体载体上的单个阵列来说特别具有吸引力。如果存在多个阵列,这种阵列可能被排列成例如横过固体载体表面的一连串曲线行(例如一连串同心圆或半圆点)等。相似地,特征的模式可能与直线行和列的点不同在于包括例如横过固体载体表面的一连串曲线行(例如一连串同心圆或半圆点)等。阵列和其特征的设定可以根据生产、处理和使用的因素来选择。

[0091] 阵列中的每个特征或元件定义成固体载体表面的小的、规则形状的区域。这些特征按预先设定的方式排列。阵列的每个特征通常携有预先设定的探针或特征混合物。在分子阵列内的每个特征可以含有不同的探针,给定特征中的探针可能跟阵列中其它特征中的探针不同。一些或全部的特征可能是不同的组合物。每个阵列含有多个点或特征,每个阵列可能通过空间或区域和其它阵列分隔开。也已知不需要任何空间将阵列彼此隔开。阵列间区域和特征间区域通常存在但不是必要的。如果有任何边缘区域,这些阵列间和特征间区域不携带任何探针。已知如果存在阵列间和特征间区域,这些区域可以有各种大小和构型。

[0092] 在一些实施方案中,阵列可能通过将探针附着于第一固体载体例如珠子然后将这第一固体载体按阵列形式排列在第二固体载体例如微滴定板上形成。在另一些实施方案中,阵列可能通过附着探针于可寻址的珠上形成。“可寻址的珠”包括染料、条码和转发器。

[0093] 在一些实施方案中,取决于所选择的固体载体表面,表面可能被“封闭”或“钝化”以降低或抑制分子与固体载体表面的非特异性结合。封闭或钝化试剂包括奶粉、酪蛋白、混合血清、混合血浆、BSA、PEG-PLL、PEG-硅烷、SuperBlock 或 StarterBlock(Pierce Biotechnology, Rockford, Ill) 和以上这些的任意组合。

[0094] 这里提到的术语“标记物质”指的是一或多种可以用于检测结合适体共价复合物上的适体的靶分子的试剂。

[0095] 在一个检测靶分子的实施方案中,适体共价复合物与包括特异于靶分子结合适体的靶分子的结合配偶体的标记物质接触。特异性结合配偶体可以是任何合适的部分,包括抗体、抗体片段、合成的抗体模拟物、生物模拟物、适体、分子印记配体等。特异性结合配偶体与其他的标记物质成分通常是可检测部分或标记缀合或连接。特异性结合配偶体和标记的结合可能通过任何上述连接探针到固体载体表面的方法来进行。已知在检测多个靶分子的时候,多个适体共价复合物可以和特异性结合配偶体的混合物接触,每个特异性结合配偶体都特异于疑似存在的靶分子。使用的标记可以是本领域已知用于多元化检测多个靶分子的标记。

[0096] 可检测的部分或者标记能够被直接或间接检测到。通常,任何可检测的报告分子

都可以作为标记。标记包括例如 (i) 依靠产生信号而被直接检测的报告分子, (ii) 可以通过随后与含有报告分子的同源物 (cognate) 结合而被间接检测到的特异性结合配偶体成员, (iii) 可以被质谱仪检测到的质量标记, (iv) 能提供扩增或连接模板的寡核苷酸引物, 和 (v) 能够作为配体的特异性多核苷酸序列或识别序列, 例如阻遏蛋白, 其中在后两个例子中寡核苷酸引物或阻遏蛋白将具有或能够具有报告分子等等。报告分子可以是催化剂, 例如酶、编码催化剂的多核苷酸、启动子、染料、荧光分子、量子点、化学发光分子、辅酶、酶底物、放射性基团、小有机分子、可扩增的多核苷酸序列、颗粒如乳胶或碳颗粒、金属溶胶、微晶、脂质体、细胞等等, 这些可被标记或不标记染料、催化剂或其它可检测基团、改变其缀合的分子的重量以用于质谱检测的质量标记等等。标记可以从电磁或电化学材料中选择。在一个实施方案中, 可检测的标记是荧光染料。基于本发明, 其它标记和标记方案对于本领域技术人员也是明显的。

[0097] 在另一个检测靶分子的实施方案中, 靶分子为蛋白质, 适体共价复合物与包含通用蛋白染色的标记物质接触。这里提到的“通用蛋白染色”和“UPS”可互换使用, 指的是任何用可检测部分标记测试样品中存在的如果不是全部也是大部分的蛋白而不标记或最低限度地标记核酸或分析中其它成分例如固体载体的标记物质。任何在蛋白质上而不是核酸或其它基质表面上找到的化学反应基团可以作为共价附着的位点。示例的化学反应基团包括伯胺 (例如赖氨酸残基上的)、硫醇 (例如可能由于还原二硫键形成的半胱氨酸上的)、醇 (例如丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和糖蛋白 (包括氧化这些糖上的顺式二醇的产物) 上的糖部分和羧酸酯 (例如谷氨酸和天冬氨酸上的))。

[0098] 可检测的部分可以包括上述的任何报告分子和任何其它可以任何方式用于产生可检测信号的化学物或成分。可检测的部分可通过荧光信号、化学发光信号、或任何其它基于所述部分的特征的可检测信号来检测。当可检测的部分为酶 (例如碱性磷酸酶) 时, 信号可在酶底物和任何酶活性所需的额外因子存在的情况下产生。当可检测的部分为酶底物的时候, 信号可能在酶和任何酶活性所需的额外因子存在的情况下产生。合适的用于附着可检测的部分于靶蛋白上的试剂方法包括共价附着可检测的部分于靶蛋白上, 非共价缔合可检测的部分和另一个共价附着于靶蛋白上的标记物质成分, 并共价附着可检测的部分于另一个非共价缔合靶蛋白的标记物质成分。通用蛋白染色在 2004 年 8 月 12 日提交的、标题为“Methods and Reagents for Detecting Target Binding by Nucleic Acid Ligands”的美国专利申请序列号 10/504, 696 中详细描述。

[0099] 在一些实施方案中, UPS 为包含可检测部分的单个化学试剂, 其与蛋白质而不是适体特有的官能团共价反应, 并在这种反应中, 共价地将可检测部分附着于靶蛋白上。本实施方案的 UPS 包括具有能够与蛋白质特有的官能团共价反应的基团的染料。这些基团可通过衍生化添加到染料中, 或存在于未修饰的染料中。在一个实施方案中, UPS 包含 N- 羟基琥珀酰亚胺激活的染料, 该染料和胺基团反应, 例如 N- 羟基琥珀酰亚胺激活的荧光团, 包括 NHS-Alexa 荧光团 (例如 NHS-Alexa647)。另一个可使用的 UPS 为 CBQCA (3-(4- 羧基苯甲酰) 喹啉-2- 甲醛), 它也能在氰化物或硫醇的存在下与胺反应形成高度荧光的异吲哚。另外的适合用在 UPS 试剂中的胺反应基团包括异氰酸酯、异硫氰酸酯、酰叠氮、磺酰氯、醛、4- 硫-2,3,5,6- 四氟苯酚 (STP) 酯、TFP-Alexa 647 和芳基化试剂例如 NBD (7- 硝基苯并-2- 氧杂-1,3- 二唑) 氯化物, NBD 氟化物和二氯三嗪。

[0100] 在另一些实施方案中,UPS 包含许多试剂。例如,UPS 可以包含和靶蛋白共价反应的第一种试剂,一或多种直接或间接共价或非共价地通过第一种试剂引入的化学基团或其它官能团附着可检测部分于靶蛋白上的其他试剂。当 UPS 包含多个试剂时,可知在某些情况下试剂顺序加入,在另一些情况下,试剂同时加入。

[0101] 在一个实施方案中,合适的 UPS 包含 (a) 与靶蛋白反应的生物素衍生物和 (b) 链霉抗生物素蛋白可检测部分缀合物,例如荧光链霉抗生物素蛋白衍生物或链霉抗生物素蛋白-酶缀合物。生物素衍生物和胺基团反应,从而共价地将生物素附着于靶蛋白上,链霉抗生物素蛋白可检测部分缀合物与固定的生物素基团结合,从而在结合了蛋白质的固体载体位点上定位可检测部分。在这个实施方案中,合适的试剂包括 PFP-生物素、NHS-PEO₄-生物素(间隔臂 29 Å)、硫-NHS-LC-生物素(间隔臂 22.4 Å)和 TFP-PEO₃-生物素(间隔臂 32.6 Å)。

[0102] 在另一个实施方案中,合适的 UPS 包含 (a) 缀合到能够共价附着生物素或生物素衍生物到结合的靶蛋白上的反应基团的生物素或生物素衍生物;(b) 抗生物素蛋白和/或链霉抗生物素蛋白,和 (c) 生物素可检测部分缀合物,例如荧光生物素衍生物。在 (a) 中的生物素衍生物可为胺反应生物素衍生物,例如 NHS-生物素,其中的生物素任选通过间隔原子与 NHS 分开 (Calbiochem, Inc.)。NHS 基团与结合的靶蛋白上伯胺的反应导致生物素共价地附着到结合其相应适体的靶蛋白上。与其相应适体复合的靶蛋白随后可以用链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白处理。因为链霉抗生物素蛋白和抗生物素蛋白每个都能结合 4 个生物素,加入这些蛋白可以给原先通过 NHS-生物素偶联于结合的靶蛋白上的每个生物素提供 3 个生物素结合位点。然后添加 (c) 中的生物素可检测部分衍生物,于是其紧密地与链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白上未被占据的生物素位点结合。在这个实施方案中,合适的试剂包括 PFP-生物素、NHS-PEO₄ 小生物素(间隔臂 29 Å)、硫-NHS-LC-生物素(间隔臂 22.4 Å)和 TFP-PEO₃-生物素(间隔臂 32.6 Å)。

[0103] 考虑到例如标记物质的性质,靶分子的性质和预定的截断水平,特异性靶水平的生物学显著性等等通常决定了标记物质的浓度,包括各个可使用的特定试剂的浓度。每个试剂的终浓度通常根据经验来决定以最优化方法的灵敏度。在一个实施方案中,标记物质的浓度通常足够检测至少大约 1% 的靶分子。在另一个实施方案中,标记物质的浓度通常足够检测至少大约 10% 的靶分子。在进一步的实施方案中,标记物质的浓度通常足够检测至少大约 90% 的靶分子。

[0104] 标记物质的激活依赖于所使用试剂的性质。例如,对于那些通过光激活的试剂,用合适波长的光照射试剂。其它激活方法根据本发明内容对于本领域技术人员是明显的。对于一些标记物质,例如涉及放射性标记、酶等的标记物质,不需要激活剂。对于酶系统,可能需要添加底物和/或辅因子。

[0105] 检测固体载体由标记物质产生的信号的存在和/或量包括检测信号,这通常只是读取信号的步骤。信号通常用设备读取,设备的性质取决于信号的性质。设备可以是分光光度计、荧光计、吸收分光光度计、光度计、化学光度计、曝光计、照相设备等等。检测的信号的存在和/或量与测试样品中存在的高于预定截断水平的任何靶分子的存在和/或量相关。测量过程中的温度范围通常从大约 10° 到大约 70°C,或从大约 20° 到大约 45°C,或从大约 20° 到大约 25°C。在一个方法中,标准曲线使用测定已知浓度的靶分子来绘制。也可

使用校准物和其它对照。

[0106] 在一个实施方案中,包括阵列的固体载体例如被移到检测设备中,从而检测固体载体表面上任何结合的靶分子的存在。检测设备可是包含光学系统的扫描设备。阵列可以通过照明阵列并读取在每个阵列特征处产生的信号(例如荧光)的位置和强度来检查或读取。扫描仪可能同例如 Tecan Systems, San Jose, California 获得的 TECAN LS 300 扫描仪相似。但是,阵列可通过不同于前述的方法或仪器来检查或读取,其它检查阵列的方法包括其它光学技术(例如检测化学发光或电发光标记)和电子技术。

[0107] 从检测阵列得来的结果可能是原始数据(例如在一或多个彩色通道读取的每个特征的荧光强度读数)或处理过的结果,例如通过将预设阈值以下的特征读数去除产生的结果和/或基于阵列读取方式产生的结论(例如在测试样品中是否有某个特定靶分子的存在)。如果需要的话,检测结果(处理或未处理的)可能被传递(例如通过通讯)到远程位置,并在那里接收以便于进一步使用(例如进一步处理)。

[0108] 在另一个实施方案中,所述方法通过在计算机控制下进行,也就是在计算机的帮助下进行。例如可以使用 IBM®兼容的个人计算机。计算机由特别针对本发明方法的软件驱动。能够辅助本发明方法实施的计算机硬件可以包括以下系统:Pentium®处理器或更高的具有至少 100MHz 主频的处理器,至少 32M 内存(RAM),至少 80M 虚拟内存,在微软 Windows®95 或 Windows®NT 4.0 操作系统(或者后继的系统)下运行。

[0109] 可用于进行所述方法的软件可以是例如 Microsoft Excel 或 Microsoft Access®,可根据使用者编写的函数和模板进行适当扩展,并根据需要和可能需要的独立程序连接。用于辅助实施本发明方法的软件或计算机程序的实例可用以下程序语言编写:Visual BASIC®,FORTRAN,C,C++,Java,Python 和目前或将来可获得的其它任何合适的程序语言。需要理解的是,上述计算机信息和本文使用的软件只是作为示例性的,而不是限制性的。本发明揭示的任何方法可以适用于其它计算机、计算机系统和软件。其它可能使用的语言包括例如 PASCAL,PERL 或汇编语言。

[0110] 在另一个实施方案中,适体亲和复合物(或任选适体共价复合物)用质谱仪检测和/或定量。参见图 1B,在检测和/或定量可能存在于测试样品中的靶分子的示例方法中,测试样品与包括标记并对靶分子有特异性亲和力的适体接触。包括结合其靶分子的适体的适体亲和复合物可以形成。如果测试样品含有靶分子,通常在测试样品中将会形成适体亲和复合物。适体亲和复合物任选使用适合于所使用的适体的方法被转化为包括共价结合其靶分子的适体的适体共价复合物。适体亲和复合物(或任选适体共价复合物)附着在固体载体上。附着是通过将固体载体和适体亲和复合物(或任选适体共价复合物)接触并使适体上的标记直接或间接地与附着在固体载体上的探针缔合来实现的。然后制备用于质谱仪检测(或任选定量)的、与固体载体上的探针缔合的适体亲和复合物(或任选适体共价复合物)。

[0111] 适体亲和复合物(或任选适体共价复合物)可能通过任何方法来准备以用于质谱仪的检测和任选定量。例如,在一个实施方案中,当靶分子为蛋白质时,适体亲和复合物(或任选适体共价复合物)通过在复合物从固体载体上去除前或后用蛋白酶消化来制备。在另一个实施方案中,适体亲和复合物(或任选适体共价复合物)从固体载体上释放,并用本领域已知的任何方法来制备以用于质谱仪分析,这些方法包括基质辅助激光解吸离子化

(MALDI), 表面增强激光解吸离子化 (SELDI), 电喷射离子化或电子撞击离子化。在一个实施方案中, 适体亲和复合物 (或任选适体共价复合物) 可以被直接洗脱到电喷射离子化质谱仪中。在另一个实施方案中, 洗脱的测试样品可在质谱仪分析前进行进一步的处理, 例如酶消化或化学修饰。质谱可以通过电喷射离子化、基质辅助激光解吸离子化或电子撞击离子化来获得。

[0112] 典型地, 用质谱仪定量靶分子需要内在标准, 也就是在待分析的测试样品中引入已知浓度的化合物。理想的内在标准将具有和那些靶分子相似的洗脱和离子化特征, 但会产生具有不同质量-电荷比例的离子。常用的内在标准为稳定的同位素标记的靶分子。在一个实施方案中, 稳定的同位素标记的靶分子加入到测试样品中作为内在标准。随后将相应于测试样品中多种成分的光谱峰与内在标准的峰高度或面积对比, 从而来定量靶分子。

[0113] 在另一个实施方案中, 定量靶分子是通过对比对应于靶分子的光谱峰的高度或面积和一组含有已知浓度的靶分子的样品产生的光谱峰来实现。含有已知浓度的靶分子的样品获得的光谱峰的高度和面积构成标准曲线, 从中可以计算出测试样品中靶分子的未知浓度。

[0114] 在另一个实施方案中, 适体亲和复合物 (或任选适体共价复合物) 用 Q-PCR 来检测和 / 或定量。在这里提到的“Q-PCR”指的是以在分析的结果是定量的即分析能够定量测试样品中存在的适体的量或浓度的方式和控制的条件下进行的 PCR 反应。参见图 1B, 在检测和 / 或定量可能存在于测试样品中的靶分子的示例方法中, 测试样品与包括标记并对靶分子有特异性亲和力的适体接触。包括结合其靶分子的适体的适体亲和复合物可以形成。如果测试样品含有靶分子, 通常在测试样品中将会形成适体亲和复合物。适体亲和复合物任选通过使用适合于所使用的适体的方法被转化为包括共价结合其靶分子的适体的适体共价复合物。如本文进一步所述, 在适体亲和复合物和任何任选转化为适体共价复合物之后, 测试样品中存在的任何游离适体随后与适体亲和复合物 (或任选适体共价复合物) 分离。适体亲和复合物 (或任选适体共价复合物) 随后用定量复制多核苷酸的已知方法来定量。

[0115] 在一个实施方案中, 测试样品中的适体亲和复合物 (或任选适体共价复合物) 的量或浓度用 TaqMan[®] PCR 来测定。这个技术主要依赖于寡核苷酸复制酶的 5' -3' 核酸外切酶活性以从靶向的序列产生信号。TaqMan 探针是基于待定量的适体序列来选择的, 通常包括 5' -端荧光素, 例如 6-羧基荧光素, 和 3' -端淬灭基团, 例如 6-羧基四甲基荧光素, 从而在适体用聚合酶链反应 (PCR) 扩增的时候产生信号。当聚合酶复制适体序列的时候, 核酸外切酶活性释放探针上、PCR 引物下游退火的荧光素, 从而产生信号。信号随着复制产物的产生而增加。PCR 产物的量取决于复制循环进行的次数和适体的起始浓度。

[0116] 在另一个实施方案中, 适体亲和复合物 (或任选适体共价复合物) 的量或浓度用复制过程中嵌入荧光染料来测定。嵌入染料, 例如 SYBR[®] green, 与单链 DNA 存在时产生的荧光信号相比, 在双链 DNA 存在时产生大量的荧光信号。当 PCR 过程中形成双链 DNA 产物时, 染料产生的信号增加。产生信号的数量取决于 PCR 循环的次数和适体起始浓度。

[0117] 在另一个实施方案中, 适体亲和复合物 (或任选适体共价复合物) 的量或浓度用复制过程中的“分子信标”来测定 (见 Tyagi et al., Nat. Biotech. 16:49-53, 1998; 美国专利 5,925,517)。分子信标是一个特异的核酸探针, 其折叠形成发夹环并在发夹结构中的

一个末端含有荧光素而在另一个末端含有淬灭基团,这样当发夹结构形成时荧光素不产生或产生很小的信号。环序列特异于靶多核苷酸序列,当与适体序列杂交时,发夹环打开,从而产生荧光信号。

[0118] 可使用计算机程序来进行本文所揭示的任何方法的一或多个步骤。本发明的另一方面为计算机程序产品,包含计算机可读存储媒介,其中保存了计算机程序,当载入到计算机中时,可以进行或辅助本文所揭示的任何方法的执行。

[0119] 本发明的一个方面为本文所揭示的任何方法的产物,也就是分析结果,可能在测试场所进行评估,或根据需要转移到其它场所进行评估和通讯给在远程位置的有关当事人。本文提到的“远程位置”指的是物理上与结果获得场所不同的位置。因此,结果可能被送到另一个房间,另一栋建筑,或城市的另一部分,另一个城市等等。数据可能通过标准的手段来传输,例如传真、邮件、快递、电子邮件、ftp、语音邮件等等。

[0120] “通讯”信息指的是以电子信号的方式通过合适的通讯通道(例如私人或公共网络)传输代表信息的数据。“寄送”物品指的是将这个物品从一个地点拿到另一个地点的任何方法,可以通过物理运输该物品或其它方法(如果可能),包括,至少对数据来说,物理运输含有数据的媒介或传输数据。

[0121] 参见图 3,在另一个示例的检测和/或定量可能存在于测试样品中的一或多个靶分子的方法中,可能包含靶分子和至少一个非靶分子的测试样品可任选与竞争分子(如图 3 选项 A 所示)接触。可能形成一或多个非特异性复合物。然后测试样品同包括标记并对靶分子有特异性亲和力的适体接触。包括结合其靶分子的适体的适体亲和复合物可以形成。如果测试样品含有靶分子,通常在测试样品中将会形成适体亲和复合物。取决于测试样品的性质,也可以在适体和一或多个非靶分子间形成一或多个非特异性复合物。如果测试样品与竞争分子接触,各种各样包含竞争物的非特异性复合物也能形成并存在于测试样品中。

[0122] 然后,测试样品可任选暴露于动力学激发测试样品的成分(如图 3 选项 B 所示)的条件下。在下面的进一步描述中,动力学激发可包含稀释测试样品,引入竞争分子到测试样品中,或在固体载体上捕获适体亲和复合物,之后在清洗溶液中有或无竞争分子的情况下进行清洗。如果引入了动力学激发,适体和任何非靶分子间的非特异性复合物在解离后不太可能会重新形成。因为非特异性复合物通常比适体亲和复合物解离得更快,动力学激发减少适体参与和非靶的非特异性复合物的可能性。有效的动力学激发可以给分析提供在初始适体结合事件和随后共价相互作用以外的额外特异性。

[0123] 无论是否使用动力学激发,形成的适体亲和复合物随后通过使用适合于所用适体的方法被转化成包含共价结合其靶分子的适体的适体共价复合物。在适体共价复合物形成后,任何可能存在于测试样品中的游离的或非复合的适体可任选从测试样品中分离(如图 3 选项 C 所示)。任选地,任何测试样品中可能存在的游离或非复合的非靶和靶分子可从测试样品中分离(如图 3 选项 D 所示)。任选地,游离适体和游离非靶和靶分子可以任何顺序在适体共价复合物形成后被去除。

[0124] 如果稀释用来引入动力学激发,随后的含有适体共价复合物的测试样品优选被浓缩。如果适用,浓缩可以使用以下关于任选从测试样品中分离任何游离适体和/或任选去除可与标记物质反应的测试样品中的其它成分所描述的方法来实现。

[0125] 测试样品中的适体共价复合物随后使用任何本文所述方法或任何其它本领域技术人员所知的合适方法来检测和 / 或定量。例如, 适体共价复合物可以通过将固体载体与测试样品接触, 使得适体上的标记直接或间接与固定在固体载体表面的探针缔合来附着于固体载体表面。和固体载体上探针缔合的适体共价复合物随后被检测和任选定量。在检测和任选定量前的任何时候, 也就是在适体共价复合物附着于固体载体前或附着后的任何时候, 适体共价复合物与标记物质接触, 以检测结合的靶分子。本领域技术人员可知适体共价复合物也可以用质谱仪, Q-PCR 或任何其他本领域已知的合适方法来检测和 / 或定量。

[0126] 本文所用的“竞争分子”和“竞争物”可互换使用, 指的是任何可以与非靶分子形成非特异性复合物的分子。“竞争分子”和“竞争物”为一组一种类型或多种种类分子的拷贝。“多种竞争分子”和“多种竞争者”指的是一组以上这样的分子。竞争分子包括多核苷酸、聚阴离子 (例如肝素、单链鲑精 DNA、和聚葡聚糖 (例如硫酸葡聚糖)、无碱基磷酸二酯聚合物 (abasic phosphodiester polymers)、dNTP 和焦磷酸酯。在使用竞争物的动力学激发中, 竞争物也可以是任何可以与适体形成非特异性复合物的分子。这样的竞争分子包括聚阳离子 (例如精胺、亚精胺、聚赖氨酸和聚精氨酸) 和氨基酸 (例如精氨酸和赖氨酸)。

[0127] 本文提到的“非特异性复合物”指的是除了适体和其靶分子以外 2 或多个分子间的非共价缔合。因为非特异性复合物不是根据它的组成分子间的亲和性相互作用来选择的, 而是代表多类分子间的相互作用, 在非特异性复合物中缔合的分子平均起来将表现出彼此间低得多的亲和力, 并将具有相应的比适体和其靶分子高的解离速率。非特异性复合物包括适体和非靶分子、竞争物和非靶分子、竞争物和靶分子以及靶分子和非靶分子间形成的复合物。

[0128] 本文所用的“动力学激发”指的是通过提供动力学压力和使用这些类复合物的组成物的不同亲和特性包含解离速率, 从包括适体亲和复合物和非特异性复合物的一组复合物中富集适体亲和复合物的过程。动力学激发通常造成特异性的增加, 因为适体 - 非靶复合物比起适体 - 靶复合物显著地减少了。本文所用的“动力学压力”指的是提供复合物自然解离和 / 或抑制从复合物自然解离的分子的再结合的机会的手段。动力学压力可以通过添加竞争分子或样品稀释或在复合物结合到固体载体上后进行彻底清洗或任何本领域技术人员已知的其他方法来施加。正如本领域技术人员所已知的, 因为动力学激发通常取决于适体亲和复合物和适体非靶复合物的不同的解离速率, 选择动力学激发的持续时间以维持高比例的适体亲和复合物, 同时基本上减少适体非靶复合物的数量。对于有效的动力学激发, 适体亲和复合物的解离速率优选比适体非靶复合物的低很多。因为可以选择适体以包括特定的性质, 适体亲和复合物的组成可以设计成具有相对地的解离速率。

[0129] 本文的术语“分离”指的是将一或多个分子种类从测试样品中分离或除去。分离可以用于增加灵敏度和 / 或降低背景。当适体亲和复合物由于共价键变得不可逆后, 适体共价复合物形成后的分离最有效。

[0130] 例如, 从测试样品中去除游离适体可能增加分析的灵敏度, 因为游离适体可能会在适体共价复合物附着于固体载体表面的探针上的时候和适体共价复合物竞争。当使用 QPCR 检测或任选定量的时候, 去除游离适体促进了靶分子的检测和定量。在一个实施方案中, 靶分子为蛋白质, 游离适体通过使用沉淀样品中的蛋白质和包括蛋白质的复合物例如适体共价复合物和不沉淀游离核酸的试剂与适体共价复合物 (以及测试样品的其它部分)

分离。这样的试剂可以包括 K+/SDS、丙酮、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、ProCipitate 和其它本领域已知的带电聚合物。

[0131] 在一个实施方案中,适体例如被标记的对靶分子在本例中为靶蛋白有特异性亲和力的光适体被引入到测试样品中。如本文进一步描述,在形成适体亲和复合物并转化成适体共价复合物后,用合适的试剂例如上述所列的任何试剂或任何其他合适的试剂从测试样品中沉淀适体-蛋白共价复合物和非复合的蛋白。测试样品中沉淀的成分经过离心被沉淀,含有游离适体的上清被倒掉。含有游离蛋白和适体-蛋白共价复合物的沉淀随后悬浮于合适的溶液例如分析结合稀释液中,然后适体-蛋白共价复合物可以在适体共价复合物附着于固体载体前或后与标记物质接触。靶分子如果存在于测试样品中,随后可以通过检测适体共价复合物上的标记物质来检测和/或定量。

[0132] 为了减少分析背景,能和标记物质反应的分子和那些未和适体共价连接的分子将从测试样品中除去。在一个实施方案中,这通过沉淀测试样品中游离和复合的适体而将能与标记物质反应的其它分子留在上清中倒掉来实现。这样的核酸沉淀可以用包括十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、十二烷基三甲基溴化铵 (DTAB) 和例如乙醇等有机溶剂的试剂来实现。在另一个实施方案中,游离和复合的适体通过将适体与固体载体杂交而从样品中分离。在本例中的固体载体可以包括微珠(例如顺磁珠)、本文描述的任何其他合适的固体载体等。在使适体杂交到合适的固体载体表面上后,含有能和标记物质反应的分子的溶液易于除去,从而浓缩适体共价复合物。本领域技术人员可知,以这种方式分离适体可以使用包括在适体上的标记或适体上其它一些核酸序列来将适体杂交到合适的附着于固体载体上的互补核苷酸序列上。

[0133] 在一个实施方案中,被标记的适体例如标记的对靶蛋白具有特异性亲和力的光适体被引入到测试样品中。如本文进一步所述,在适体亲和复合物形成以及转化成适体共价复合物后,适体-蛋白共价复合物和游离适体使用合适的试剂例如任何上述所列的或任何其他合适的试剂从测试样品中分离。测试样品中沉淀的成分通过离心被沉淀,含有未复合的靶和测试样品其余物质的上清被倒掉。含有游离适体和适体共价复合物的沉淀随后被悬浮于合适的溶液例如分析结合稀释液中,随后适体共价复合物和游离适体可以在适体共价复合物附着于固体载体上之前或之后与标记物质接触。如果测试样品中存在靶分子,它将通过检测适体共价复合物上的标记物质来检测和/或定量。

[0134] 在另一个实施方案中,被标记的适体例如标记的、对靶蛋白具有特异性亲和力的光适体被引入到测试样品中。如本文进一步所述,在适体亲和复合物形成以及转化成适体共价复合物后,适体-蛋白共价复合物和游离适体在固体载体上使用含有与适体标记互补的探针的珠捕获。珠通过磁力(对于顺磁珠)或离心(对于非顺磁珠)被沉淀,含有未复合的靶和测试样品的上清被倒掉。沉淀随后被悬浮于合适的溶液例如分析结合稀释液中,适体共价复合物和游离适体用任何合适的破坏杂交相互作用的方法洗脱,包括例如加热、高 pH、蒸馏水,以及这些的组合,或任何其它已知方法。然后珠子再被沉淀,含有游离适体和适体共价复合物的上清可以在适体共价复合物附着于固体载体之前或之后与标记物质接触。如果测试样品中存在靶分子,它将通过检测适体共价复合物上的标记物质来检测和/或定量。

[0135] 在另一个实施方案中,按上述进行分析,一直到并包括将含有未复合的靶和测试

样品的上清被倒掉之后珠子悬浮的步骤。然后,在从珠上洗脱游离适体和适体共价复合物之前,适体共价复合物可和标记物质接触,然后再重复沉淀,在固体载体和适体共价复合物接触前清洗去除未反应的标记物质,以检测和 / 或定量靶分子。

[0136] 在本文揭示的任何方法中,测试样品可以制备为测试样品的 2 倍或多倍稀释液,这样可以增加存在于测试样品中的靶分子的浓度的动力学范围,以通过本文所揭示的方法来检测。各个稀释测试样品分开分析直到并包括适体共价复合物形成,随后稀释的测试样品可能被合并以进行剩下的分析,并在一个固体载体上同步检测。在一个实施方案中,每个稀释的测试样品包括唯一的适体,因而可以单独测量相应的靶。在另一个实施方案中,适体可以加入到 2 倍或多倍稀释液中,每个稀释液接触特定靶的独特的并标记的适体,使得在一个固体载体上可以检测每个不同稀释样品中特异性适体信号。将稀释样品以这种方式连接起来可以将一个靶分子的动力学范围扩大很多个数量级,当定量的重叠区域导致多元化检测一个靶的浓度时增加精确度。

[0137] 在一个实施方案中,制备了系列稀释的测试样品,在其中引入被标记的适体例如标记的、对靶分子有特异性亲和力的光适体。带有不同标记的相同适体可以被添加到每个测试样品稀释液中。如本文进一步所述,在形成适体亲和复合物并转化为适体共价复合物后,每个测试样品可以被合并,并在适体共价复合物附着于固体载体之前或之后与标记物质接触。如果测试样品中存在靶分子,它将通过检测适体共价复合物上的标记物质来检测和 / 或定量。具有不同标记的每个适体所检测到的信号可以被组合起来以精确地定量原始测试样品中靶分子的量或浓度。例如,第一个稀释度可能对靶产生最大的信号,只生成半定量的信息,而第二个稀释度可能产生小于饱和度的信号,使得可以精确地定量在原始测试样品中的靶。

[0138] 在另一个实施方案中,,制备了系列稀释的测试样品,在其中引入被标记的适体例如标记的、对靶分子有特异性亲和力的光适体。具有独特标记的不同适体可以被添加到每个样品稀释液中。如本文进一步所述,在形成适体亲和复合物并转化为适体共价复合物后,每个测试样品可以被合并,并在适体共价复合物附着于固体载体之前或之后与标记物质接触。测试样品中存在的靶分子将通过检测适体共价复合物上的标记物质来检测和 / 或定量。取决于对原始样品不同的系列稀释,产生的信号可以用来定量几个数量级范围的靶。

[0139] 在本文揭示的任何方法中,测试样品可与参考样品对比。本文中“参考样品”指的是任何含有许多分子和已知包括至少一个靶分子的材料、溶液或混合物。在参考样品中存在的任何靶分子的精确量或浓度也已经知道。术语参考样品包括如本文所定义的生物学样品和可能用于环境或毒物学测试的样品,例如污染的或可能污染的水和工业污水。参考样品也可能是终产物,中间产物或制备方法例如加工方法的副产物。参考样品可包括任何合适的添加到从生物体或其它来源(例如环境或工业来源)获得的材料、溶液或混合物中的分析介质、缓冲液或稀释液。

[0140] 在一个实施方案中,参考样品用相同方式和测试样品分开处理,直到但不包括暴露于标记物质,只在这个实施方案中,这一步必须在适体共价复合物附着于固体载体之前发生。使用两种不同的标记物质区分参考样品和测试样品中的靶水平。当样品和标记物质接触后,它们可以被同样混合,并同时和固体载体接触。这样,通过分别测量每个标记物质的信号,可以对参考样品和测试样品间的任何差异表现(即样品中靶的不同量或浓度)进

行直接对比。两种标记物质可以包括 Cy3 和 Cy5 对, Alexa555 和 Alexa647 对。在一个实施方案中, 参考样品可以是代表对照组的混合的生物学样品。在另一个实施方案中, 参考样品可以从一个个体中第一次收集的生物学样品, 而测试样品可以从同一个个体中, 但第二次收集到的样品, 因而通过测量和评估在一段时间内由所述个体提供的多个生物学样品中一或多个靶分子的量或浓度的任何变化可以便于对个体进行纵向研究。

[0141] 在一个实施方案中, 被标记的适体例如标记的并对靶分子有特异性亲和力的光适体被引入到参考样品和测试样品中。如本文进一步所述, 在形成适体亲和复合物并转化为适体共价复合物后, 两个样品可以和两种含有两种不同检测分子的不同的标记物质接触。两个分别标记的含有适体共价复合物的样品随后可以附着于固体载体上。如果样品中其中之一或两个都存在靶分子, 它将通过检测两个在适体共价复合物上的标记物质来检测和 / 或定量, 典型地例如当检测标记为荧光分子时, 通过进行在不同激发和发射波长下的多次扫描来检测。这样的定量可能导致对在参考样品和测试样品中不同的靶量或浓度更精确的评估, 并可以便于在使用相同参考样品时, 对不同测试样品进行比较。

[0142] 在本文所揭示的任何方法中, 多种标记物质可被用于分析一个测试样品。在一个实施方案中, 2 或多种标记物质 (每个都具有独特的化学成分以标记不同的靶分子部分和任选不同的检测基团) 可以用于一个测试样品。不同的化学成分将标记靶分子上不同的官能团, 从中可以获得更多的信息。例如, 在靶蛋白的情况中, 一个标记可以使用和伯胺 (例如赖氨酸) 反应的化学成分来附着于靶上, 而第二个标记通过和例如典型地与糖基化蛋白缔合的碳水化合物基团反应的化学成分附着于靶上。通过一个共同适体识别的在相同靶分子上的这两个部分的相对定量可以提供关于测试样品中靶的糖基化程度的有用信息。

[0143] 在一个实施方案中, 被标记的适体例如标记的并对靶分子有特异性亲和力的光适体被引入到测试样品中。如本文进一步所述, 在形成适体亲和复合物并转化为适体共价复合物后, 测试样品可以在适体复合物和固体载体接触前或后和两种含有两种不同检测分子的不同的标记物质接触。在一个实施方案中, 检测标记和化学成分是唯一的, 使得可以连续地标记含有适体共价复合物的相同测试样品。在另一个实施方案中, 化学成分可能在一个反应中同时进行。多元标记的适体共价复合物随后可以通过检测两个在适体共价复合物上的标记物质来检测和 / 或定量, 典型地例如通过当检测标记为荧光分子时, 通过进行在不同激发和发射波长下的多次扫描来检测。

[0144] 在另一个实施方案中, 两个或多个独特的标记物质使用相同的检测标记。分析如上述进行, 直到并包括转化为适体共价复合物, 之后测试样品根据不同的标记物质分成很多等份, 每份测试样品在适体共价复合物附着于固体载体前或后分别和标记物质接触。分别标记的含有适体共价复合物的测试样品等份可以被分别地检测和 / 或定量。

[0145] 本文所描述的任何方法都可以用于进行对测试样品的多元化分析。任何这样的多元化分析可以包括使用至少 2 个, 至少几十个, 至少几百个或至少成千上万个适体来同时分析测试样品例如生物学样品中同等数目的靶分子。在这些实施方案中, 许多被标记的适体例如标记的、对靶分子具有特异性亲和力的光适体被引入到测试样品中。如本文进一步所述, 在形成适体亲和复合物并转化为适体共价复合物后, 适体共价复合物通过许多固定在固体载体上的相应探针附着于固体载体上。适体共价复合物可以在适体共价复合物附着于固体载体前或后和标记物质接触。测试样品中存在的靶分子可以通过检测在适体共价复

合物上的标记物质来检测和 / 或定量。

[0146] 本发明的另一个方面涉及方便用于实施本发明方法以分析测试样品的试剂盒。为了增强本发明的多功能性,试剂可以以组合包装的形式提供,可以在同一个容器或不同的容器中,因此各种试剂的比例提供了充分最优化的方法和分析。试剂可以单独在分开的容器中或多个试剂组合在 1 个或多个容器中,这取决于试剂的交叉反应性和稳定性。

[0147] 试剂盒包装组合中包含至少一个被标记的适体,包括至少一个探针的固体载体和合适的标记物质。试剂盒也可能包括洗涤溶液例如用于样品稀释和洗涤阵列的缓冲液、样品制备试剂等等。试剂盒中各种试剂的相对数量可以差别很大以提供使分析中需要进行的反应最优化和进一步最优化分析灵敏度的试剂浓度。在适当的环境下,试剂盒中一个或多个试剂可以干粉形式提供,通常为冻干形式,包括赋形剂,它们溶解后将提供用于进行本发明的方法和分析的合适浓度的试剂溶液。试剂盒可以进一步包括本文所述的本发明方法的说明书。

[0148] 在示例的实施方案中,用于检测和 / 或定量可能存在于测试样品中的一个或多个靶分子的试剂盒包括至少一个对靶分子有特异性亲和力的适体并包含标记,标记物质和固体载体,其中固体载体包括至少一个分布于上的探针,其中探针能够和适体上的标记缔合。

[0149] 实施例

[0150] 下面提供的实施例仅用于说明目的,不是试图限制在附加的权利要求书中所限定的本发明的范围。

[0151] 实施例 1. 通过固定于表面的探针应用杂交捕获的光适体分析测量缓冲液和血浆系列稀释的 VEGF 用于检测和定量

[0152] 本实施例阐明了如图 2A、2B 和 2C 所示的对于单一光适体和其靶蛋白的分析步骤。分析用两种不同的测试样品、缓冲液和血浆进行。

[0153] A. 制备寡核苷酸:这里使用了包括在光适体 3' 末端的 DNA 寡核苷酸标记。在这个例子中,标记是在 SELEX 方法中使用的 3' 固定区域。VEGF 光适体 509-80 用在常规合成仪上合成固相亚磷酸胺 DNA 合成的标准方法来合成。含有光适体的 5-BrdU 被切割并在比 DNA 合成标准更温和的条件下(叔丁胺:甲醇:水=1:1:2,70°C,5 小时)去保护,过滤并蒸发干燥。适体用乙醇沉淀和反相 HPLC 纯化。和光适体上标记互补的并包括胺反应基团的 DNA 探针如上述合成并用 DNA 标准方法切割和去保护。探针仅用乙醇沉淀纯化。

[0154] B. 固定捕获探针于胺反应表面:反向互补的捕获标记如上述合成,具有 5' 胺并偶联到胺反应性载玻片表面,该表面包含用甲基丙烯酸酯共聚物包被的环烯共聚物(COC)基材(进一步的描述见国际申请号 PCT/US2006/008877(WO 2006/101798),于 2006 年 3 月 14 日提交,标题为“Polymer Compound for Biomedical Use and Biochip Substrate Using Such a Polymer Compound”),本文称为“甲基丙烯酸酯共聚物表面”。捕获探针的微阵列被印到表面上。简要地说,含有捕获探针的胺和表面嵌入的活性酯基团反应。捕获探针在缓冲液(300mM 磷酸钠、25mM 硼酸钠(pH9.5, 21°C)、0.01% Tween[®] 20 和 1mM 4-二甲氨基吡啶(DMAP))中稀释到 20 μM。捕获探针以 250pL 点一式三份地用 GeneMachines OmniGrid Accent 微阵列仪(microarrayer)沉积在阵列的载玻片表面。阵列化的载玻片在室温和 65%湿度下保温 1 小时,接着在 65°C 下 1 小时,最后在室温下过夜。剩余的胺反应基团用 20mM NaOH 水解 5 分钟,接着用 10H₂O,然后在 N₂ 气流下干燥。在使用前,载玻片在

室温下保存于暗室中的干燥室内。

[0155] VEGF 适体 509-80 在 1nM 浓度下与在 100 μ L 分析稀释液 (1xSB17 (40mM HEPES, 102mM NaCl, 5mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mMEDTA), 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20, 0.05% BSA, 100 μ g/mL 鲑鱼精 DNA) 或 10% 血浆 (10% 血浆于 1xSB18 (40mM HEPES, 102mM NaCl, 5mM KCl, 5mM MgCl₂), 200 μ g/mL 鲑鱼精 DNA, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20) 中系列稀释的 5nM 到 1.6pM 的靶蛋白 VEGF 保温。样品轻轻混匀并在 37°C 中保温 30 分钟。样品用受激准分子激光器 (Tui Laser ExciStar S200, 10ns 脉冲宽度, 200Hz, 0.8mJ/ 脉冲) 发射的 1 焦耳 308nm 光照射。通过在每个样品中加入 1 μ L 在 DMSO 中的 10mg/mL 的 succinimidyl-Alexa647 来进行染色。混合溶液并在 4°C 反应过夜。加入 5 μ L 10% BSA 并保温 2 小时淬灭染色反应。最后, 18 μ L 5M NaCl 和 4.5 μ L 10% Triton 加入到 90 μ L 10% 血浆样品中, 18 μ L 5M NaCl 和 0.9 μ L 10% Triton 加入到 90 μ L 缓冲液样品中。将 Grace Proplate 衬垫附着到含有固定探针的载玻片上, 形成 16 个孔。每个孔用 80 μ L 含有 600 μ L 5M NaCl, 30 μ L 10% Triton 和 3mL 分析稀释液的溶液在 42°C 保温 15 分钟。然后去除溶液, 换成 80 μ L 样品。孔用 Microseal' F' 膜封住, 载玻片在 EppendorfThermomixer R 在 37°C、600rpm 下混合 3 小时。去除杂交溶液, 孔用含有 SB17, 0.5% Triton, 100 μ g/mL 鲑鱼精 DNA 和 1M NaCl 的溶液冲洗 3 次。然后去掉衬垫, 将整个载玻片置于 pap 广口瓶中 30mL 含有 SB17, 0.5% Triton 和 1M NaCl 的溶液中 30 分钟, 接着用 1xSB17, 0.05% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 冲洗 2 分钟, 再用 0.5xSB17 冲洗 30 秒。载玻片在 N₂ 气流中干燥, 并用 TECAN LS300 荧光扫描仪 (激发 633nm/ 发射 670nm) 扫描。产生的 TIF 图用 Imaging Research, Inc. 公司的 ArrayVision 软件 分析, 用标准的处理微阵列图像的技术分离特征并计算平均强度。

[0156] 结果在图 4 中显示, 其中缓冲液 (图 4A) 和血浆 (图 4B) 的结果按上述方法用来定量 VEGF 适体捕获探针。通过减去每个反应中无蛋白缓冲液对照获得的在两个介质中系列稀释的线性反应, 包含了 VEGF 从 2pM 到 5nM 的浓度范围。

[0157] 实施例 2. 用固定于表面的探针进行杂交捕获的光适体分析检测和定量缓冲液中多个靶蛋白

[0158] 这个实施例阐明了如图 2A、2B 和 2C 所示的用 10 个光适体和缓冲液中其靶蛋白所进行的多元化形式的分析步骤。

[0159] A. 制备标记的光适体: 独特的寡核苷酸标记指派给 AffymetrixGeneChip $\text{\textcircled{R}}$ Test3 Array 获得的一组基因表达探针反向互补序列的每个光适体。如实施例 1 所述制备标记的光适体, 除了胺基团加在光适体的 5' 末端。使用前, 适体溶液在 95°C 加热 3 分钟, 接着在控制下以每秒 0.1°C 的速度冷却到 37°C。

[0160] B. 固定捕获探针于胺反应表面: 反向互补的捕获标记按实施例 1 所述固定, 除了在这里 3' 胺用于探针并且在印制 (print) 缓冲液中去除了 DMAP 而使用了 0.0025% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20。印制的载玻片在 65°C 保温 2 小时, 接着于干燥器中储存过夜。然后用甲氧基乙胺 (pH 9.5@37°C) 处理载玻片以去除未结合的探针并消耗表面上多余的活性酯基团。

[0161] 分析如图 2A、2B 和 2C 所示的方案进行。使用实施例 1 中描述的基本方法。但是 41 个光适体被复合, 这些适体亚组的 10 个靶蛋白在样品中系列稀释。在本实施例中, 定量的蛋白: 光适体对包括: bFGF: 6-7、ERBB4: 1797-38、IL-1 R4: 1472-3、MCP-3: 851-90、PAI-1: 1921-52、TIMP-1: 90536、tPA: 987-51、uPA: 1162-70、VEGF: 509-80、VEGF sR2: 1546-23。

[0162] 41 个光适体,每个浓度 2nM 和 10 个靶蛋白的 6 个系列稀释液以及无蛋白对照在 100 μ L 分析缓冲液 (SB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20) 中于 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟。样品被照射后,如实施例 1 所述染色,除了使用 2.1 μ L 的 succinimidyl-Alexa647 并且反应在暗室中室温下保温 2 小时。加入 25 μ L 的 5M NaCl, 5 μ L 的 Triton X-100, 13.5 μ L 的 100mM 甘氨酸和 1.5 μ L 的 10mg/mL 鲑鱼精 DNA 在暗室中室温下保温 40 分钟、接着在 70 $^{\circ}$ C 下 2 分钟以淬灭染色反应。在杂交前,如实施例 1 所述制备用杂交探针阵列化的带衬垫的载玻片。去除预杂交液,杂交样品加入到孔中,在潮湿的小室中在 45 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。去除杂交液,孔用 45 $^{\circ}$ C 洗液 (1xSB17, 0.33% Triton X-100 和 1M 盐酸胍) 冲洗 3 次。然后除掉衬垫,每个完整的载玻片在具有洗涤缓冲液的 pap 广口瓶中在 45 $^{\circ}$ C 放置 20 分钟,接着在 1xSB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 中冲洗 2 分钟,最后在 0.25xSB17 中冲洗。如实施例 1 所述干燥、扫描并定量载玻片。结果如图 5 所示,显示了由 10 个靶蛋白在缓冲液中蛋白浓度范围从 10pM 到 1nM 的多元化分析产生的信号。

[0163] 实施例 3. 用固定于表面的探针进行杂交捕获的光适体分析检测和定量血清中多个靶蛋白

[0164] 这个实施例证明了如图 2A、2B 和 2C 所示用 57 个光适体测量血清样品的多元化形式的分析。

[0165] A. 制备标记的光适体:如实施例 2 所述制备标记的光适体。

[0166] B. 固定捕获探针于胺反应表面:如实施例 2 所述固定反向互补的捕获标记。

[0167] 57 个光适体被分为 2 组来进行多元化,1 组 27 个光适体用于人类血清或血浆中低丰度的靶,一组 30 个光适体用于高丰度的靶。14 个血清样品制备 2 个稀释液,并和 2 组适体混合,使得每个适体的终浓度为 1nM,并且对于 27 个适体组使用了 10% 血清,0.9xSB1, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20, 50mg/mL lghsDNA, 10mg/mL (BrdU)₃₀, 对于 30 个适体组使用了 1% 血清, 0.99xSB1, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20, 5mg/mL lghsDNA, 1mg/mL (BrdU)₃₀。SB1 包含 40mM HEPES, 102mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂ 和 1mM CaCl₂。如实施例 2 所述平衡,交联并染色样品。通过添加 10 μ L 10% 低脂肪酸 (FA) BSA, 25 μ L 5nM NaCl, 5 μ L 10% Triton X100 和 7 μ L 100mM 甘氨酸并在室温下保温 40 分钟来淬灭染色反应。淬灭后,加入 1.5 μ L 的 10% SDS,样品在 42 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟。

[0168] 如实施例 1 所述制备带衬垫的载玻片,并用 1xSB1, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20, 0.66% 低 FA BSA, 830mM NaCl, 0.33% Triton X100, 0.1% SDS, 50mg/mL 大鲑鱼精 DNA 和 10mg/mL (BrdU)₃₀ 保温 15 分钟。去除预杂交缓冲液,加入染色样品并在潮湿培养箱中在 60 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。杂交后,如实施例 2 所述冲洗、干燥、扫描和定量载玻片。

[0169] 图 6 显示由重复测量两个个体血清样品中 57 个光适体的扫描图片定量化的信号。测量被证实具有高度可重复性,重复样品中对适体测量的 Pearson 相关值好于 0.99。

[0170] 实施例 4. 用固定于表面的探针进行杂交捕获的光适体分析中通过稀释的动力学激发

[0171] 这个实施例阐明了图 3 描绘的分析中两个任选步骤的应用,动力学激发然后去除游离蛋白质。通过稀释实现的动力学激发阐明了血浆中适体-蛋白非特异性复合物的去除和适体-靶亲和复合物的保留。这个实施例也阐明了在稀释后应用珠捕获来浓缩样品并使得游离蛋白在染色前被去除。

[0172] A. 制备标记的光适体 987-51 :如实施例 2 所述制备标记的光适体。

[0173] B. 固定捕获探针于胺反应表面 :如实施例 2 所述固定反向互补的捕获标记。

[0174] 浓度为 20nM 的光适体 987-51 和 2 个无蛋白对照以及 10 个系列稀释浓度的靶蛋白 tPA 在分析缓冲液 (SB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20) 或血浆 (10% 血浆于 SB18, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 中) 混合。为评估在无动力学激发时的反应, 另外 2 个对照样品在缓冲液和血浆中制备, 1 个没有蛋白, 另一个具有最高蛋白浓度。这 28 个样品体积为 10 μL , 14 个在缓冲液中, 14 个在血浆中, 于 37°C 保温 30 分钟。起先的 12 个在缓冲液和血浆中的样品通过添加 SB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 稀释 50 倍, 并保温 5 分钟, 接着用 1J UV (OAI Hg 灯过滤光源) 照射所有 28 个样品。照射后, 剩余的 2 个在缓冲液和血浆中的样品也如上稀释 50 倍。

[0175] 每个样品调整为 1M NaCl, 并与 25 μg 偶联于和适体 987-51 的 3' 末端互补的寡核苷酸的 Dynal 顺磁珠在 45°C 保温 90 分钟。样品在 1000g 下离心 2 分钟, 去除上清。珠用 100 μL SB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 洗 3 次。珠悬浮于 100mM 碳酸氢钠, 1mM EDTA, 0.02% Tween $\text{\textcircled{R}}$ -20, 0.2mg/mL Alexa647-NHS 染料中, 并在室温下振荡 1 小时。去除染色溶液, 替换为 100 μL SB17, 0.1% Tween-20, 10mM 甘氨酸以淬灭染色反应。然后珠用 100 μL 体积的胍冲洗缓冲液 (SB17, 0.1% Tween-20, 0.33% Triton X-100, 1M 盐酸胍) 洗 3 次, 悬浮于 70 μL 0.33% TritonX-100, 1mg/mL 硫酸葡聚糖中, 在 95°C 加热 5 分钟, 将适体从磁性珠上洗脱下来。如实施例 2 所述准备和预杂交带衬垫的载玻片。每个 65 μL 含有洗脱的适体的上清被转移到含有 25 μL 3.6M NaCl, 144mMHEPES, 0.33% Triton X-100 的孔中。载玻片在潮湿培养箱中在 45°C 保温过夜, 然后如实施例 2 所述冲洗、干燥、扫描和定量。

[0176] 图 7 显示在缓冲液 (●) 和血浆 (▲) 中 50 倍稀释后的结果示意图。从高蛋白对照无稀释样品 (○ 缓冲液, △ 血浆) 中得到的信号与稀释值很好地一致, 表明在动力学激发过程中几乎没有靶信号损失。无稀释和有稀释的无蛋白血浆 RFU 为 838 RFU (□ 0.1pM) 和 131 RFU (△), 造成信号 84% 的减弱, 大概是由于在动力学激发过程中适体非特异性复合物的去除。

[0177] 实施例 5. 用固定于表面的探针进行杂交捕获的光适体分析中用竞争物的动力学激发

[0178] 这个实施例阐明了图 3 描绘的分析中任选的引入动力学激发的步骤。在这个实施例中通过加入竞争分子的动力学激发阐明了血浆中适体-蛋白非特异性复合物的去除和适体-靶亲和复合物的保留。

[0179] A. 制备标记的光适体 987-51 :如实施例 2 所述制备标记的光适体。

[0180] B. 固定捕获探针于胺反应表面 :如实施例 2 所述固定反向互补的捕获标记。

[0181] 浓度为 20nM 的光适体 987-51 和无蛋白对照以及在 10% 血浆于 SB18, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 中稀释的 6 个系列稀释浓度的靶蛋白 tPA 混合。制备 2 组以便于比较有或无竞争物添加的样品。每个溶液都于 37°C 保温 30 分钟。30 分钟平衡后, 一组样品中的 1 半样品加入等体积 550 μM Mn^{2+} 竞争物 (在 SB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 中) 中在 37°C 保温 9 分钟, 接着如实施例 4 所述照射。照射后, SB17, 0.1% Tween-20 加入到无竞争物的那组样品中以便竞争者添加的体积相等。样品如实施例 4 所述染色, 除了保温时间为 2 小时。染色反应通过添加 45 μL 0.83M NaCl, 0.33% Triton X-100, 0.1mg/mL 大鲱鱼精 DNA 和 9mM 甘氨酸来淬灭。混合样品并在暗室中室温下保温 40 分钟, 接着在 70°C 加热 2 分钟。

[0182] 如实施例 2 所述制备带衬垫的载玻片并在溶液 (SB18, 0.1% Tween [®] 20, 0.33% Triton X-100 和 100 μ g/mL 大鲑鱼精 DNA) 中保温。样品加入到载玻片孔中, 并在潮湿培养箱中 45°C 保温过夜, 然后如实施例 2 所述冲洗、干燥、扫描和定量。

[0183] 结果显示在图 8 中, 其中显示了添加或未添加竞争物血浆中的 tPA 的剂量应答曲线。由于添加了竞争物, 未添加蛋白的血浆值减少了 70%, 而对最高靶浓度的应答在有竞争者存在的情况下并未改变。

[0184] 实施例 6. 用固定于表面的探针进行杂交捕获的光适体分析中通过珠捕获和适体亲和复合物洗涤的动力学激发

[0185] 这个实施例阐明了图 3 描绘的分析中任选的引入动力学激发的步骤。在这个实施例中通过在珠上捕获适体亲和复合物并洗涤固定的复合物以便在交联之前去除未缔合的靶蛋白来实现动力学激发。

[0186] A. 制备标记的光适体 987-51, 1152-46 和 1920-1: 如实施例 2 所述制备标记的光适体。

[0187] B. 固定捕获探针于胺反应表面: 如实施例 2 所述固定反向互补的捕获标记。

[0188] 浓度为 4nM 的光适体 987-51, 1152-46 和 1920-1 与浓度为 8nM 的生物素化的、和每个光适体的独特标记序列互补的探针混合并在 95°C 保温 15 秒, 然后以每秒 0.1°C 缓慢冷却到 37°C。浓度为 0.2nM 光适体: 0.4nM 探针的光适体: 生物素化探针复合物和在分析缓冲液 (SB17, 0.1% Tween [®] 20) 或血浆 (10% 血浆于 SB18, 0.1% Tween [®] 20 中) 中的无蛋白对照以及 6 个系列稀释浓度的靶蛋白 tPA、PAI-1 和 IL-6 混合。这 14 个样品体积为 100 μ L, 7 个在缓冲液中, 7 个在血浆中, 都于 37°C 保温 30 分钟, 之后 50 μ g 的 Dynal MyOne 链霉抗生物素蛋白珠加入到每个样品中并在 37°C 保温 2 分钟, 混合以捕获非共价光适体: 生物素化探针: 蛋白复合物。珠用 100 μ L SB17, 0.1% Tween [®] 20, 0.1mg/mL 鲑鱼精 DNA 洗 3 次 30 秒, 重悬于 100 μ L 同样的溶液中, 用 4J UV 光 (OAI Hg 灯过滤光源) 照射并混合。

[0189] 珠用 100mM 碳酸氢钠, 1mM EDTA, 0.02% Tween [®] -20 洗 1 次, 重悬于 100mM 碳酸氢钠, 1mM EDTA, 0.02% Tween [®] -20, 0.2mg/mL Alexa647-NHS 染料中, 并在室温下振荡 1 小时。珠用 100 μ L SB17, 0.1% Tween-20, 0.33% Triton X-100, 1M 盐酸胍, 25mM 甘氨酸洗 3 次, 用 100 μ L SB17, 0.1% Tween-20, 0.33% Triton X-100 洗 1 次, 重悬于 95 μ L 40mM HEPES, pH 7.5, 0.33% Triton X-100 中, 在 70°C 加热 5 分钟, 将适体从磁性珠上洗脱下来。如实施例 2 所述制备和预杂交带衬垫的载玻片。每个 90 μ L 含有洗脱的适体的上清和 30 μ L 的 40mM HEPES, pH 7.5, 3M NaCl, 0.33% Triton X-100 合并, 在 70°C 保温 2 分钟, 每个 110 μ L 溶液被转移到载玻片孔中。载玻片在潮湿培养箱中 45°C 保温过夜。除去样品, 用 150 μ L SB17, 0.1% Tween-20, 0.33% Triton X-100, 1M 盐酸胍在 45°C 冲洗 3 次。带衬垫的载玻片被拆开, 置于含有 30mL SB17, 0.1% Tween-20, 0.33% Triton X-100, 1M 盐酸胍的 pap 广口瓶中, 在 45°C 下旋转混合 20 分钟。载玻片随后被转移到含有 30mL SB17, 0.1% TWEEN-20 的 pap 广口瓶中并在 20°C 下旋转混合 2 分钟, 转移到含有 30mL 0.2X SB17, 0.02% TWEEN-20 的 pap 广口瓶中 15 秒, 不混合, 如实施例 2 所述干燥、扫描和定量。

[0190] 图 9 显示 tPA 适体 987-51 (图 9A), PAI-1 适体 1152-46 (图 9B) 和 IL-6 适体 1920-1 (图 9C) 在缓冲液 (●) 和血浆 (▲) 中的结果示意图。RFU 值已经通过减去每个适体的无蛋白缓冲液 RFU 值来校正。这些适体 (Δ , 1pM) 校正的无蛋白血浆 RFU 值分别为

66, 26, 和 49RFU。

[0191] 实施例 7. 在用固定于表面的探针进行杂交捕获的光适体分析中去除游离光适体

[0192] 这个实施例阐明了图 3 所描绘的在表面上杂交捕获之前去除游离适体的任选步骤。游离适体通过用 K^+ /SDS 沉淀蛋白质和适体-蛋白质共价复合物而使游离适体保留在溶液中来去除游离适体。含有游离适体的上清被倒掉, 悬浮沉淀以完成该步骤。

[0193] A. 标记的光适体的制备: 如实施例 2 所述制备标记的光适体。

[0194] B. 固定捕获探针于胺反应表面上: 如实施例 2 所述固定反向互补的捕获标记。

[0195] 如实施例 1 所述在 SB18 中准备结合反应物, 含有终浓度为 2nM 的光适体和系列稀释的 2nM-0.64pM 靶蛋白以及无蛋白对照。反应物在 37°C 保温 30 分钟, 并如实施例 1 所述照射。然后将样品转移到 1.5-mleppendorf 管中, 加入 10 μ L 混合血浆。每个样品中加入 300 μ L 如下 SDS 溶液: 1.33% SDS, 1.33 μ g/ml tRNA 和 10mM HEPES (pH 7.5) (终体积为 400 μ L)。剧烈涡旋样品 10 秒, 然后在 37°C 保温 10 分钟。每个反应物中加入 6 μ L 2.5M KCl, 样品再剧烈涡旋 10 秒然后在冰上放置 10 分钟。在小离心机中以 8,000g、4°C 离心 5 分钟沉淀。去除所得上清。沉淀用冷的 200mM KCl, 10mM HEPES (pH 7.5) 洗, 接着轻微涡旋 5 秒。在 8,000g、4°C 离心 5 分钟再次沉淀。去除洗涤上清。每个沉淀悬浮于 200 μ L 温的 (> 37°C) 1mM EDTA, 10mM HEPES (pH 7.5) 中。实实施例 4 所述的顺磁珠加入到每个样品中, 将珠悬浮液在 50°C 剧烈混合 30 分钟。使用微孔平板磁体, 珠用 100 μ L SB17, 0.1% Tween [®] 20 缓冲液洗 3 次。珠悬浮于含有 0.2mg/ml 胺反应 NHS-Alexa647 碳酸盐缓冲液 (pH 8.5) 中, 在持续混合中在 25°C 保温 60 分钟。淬灭反应, 清洗珠子, 并如实施例 4 所述洗脱适体和杂交。如实施例 1 所述扫描和定量载玻片。

[0196] 图 10 显示样品经过和未经过游离适体去除处理所得到的结果。在样品引入到探针前, 从样品中去除未复合的适体时信号较高。

[0197] 实施例 8. 在影响适体亲和复合物信号而不影响适体共价复合信号 的条件下产生 UPS 分析信号

[0198] 这个实施例证明了在光适体复合物和其固体载体上探针杂交时使用去垢剂和高盐浓度对于靶分子共价附着于其光适体的作用。比较在血浆样品和缓冲液中含有 bFGF 的样品的有或无共价交联 (在这里由光激活介导) 时进行的分析结果。

[0199] A. 标记的光适体 6-7 的制备: 这里使用的寡核苷酸标记为 SELEX 方法中使用的 3' 固定区域。如实施例 1 所述合成 bFGF 光适体。

[0200] B. 固定捕获探针于胺反应表面上: 如实施例 1 所述固定反向互补的捕获标记。

[0201] 如实施例 1 所述在缓冲液和血浆结合溶液中制备 1nM 6-7。只在缓冲液样品中加入 10nM bFGF 蛋白。样品轻微混合, 在 37°C 保温 30 分钟。如实施例 1 所述照射一组样品, 另一组重复样品无照射。样品然后如实施例 1 所述染色, 除了反应时间为室温下 3 小时, 接着加入 10 μ L BSA, 25 μ L 5M NaCl 和 5 μ L 10% Triton X-100 并保温 2 小时。如实施例 1 所述准备载玻片, 80 μ L 预杂交溶液 (500 μ L 5M NaCl 和 100 μ L 10% Triton 加入到 2mL 样品缓冲液中) 加入到每个孔, 在 42°C, 15 分钟。去除预杂交溶液, 替换为 80 μ L 样品。孔用 Microseal' F' 膜封口, 载玻片在 Eppendorf Thermomixer R 中以 600rpm、在 40°C 混合 2 小时, 接着在 35°C、20 分钟。孔用 1xSB17, 0.5% Triton, 1M NaCl 冲洗 2 次, 然后在第二次洗液中保温 15 分钟。杂交后, 如实施例 1 所述处理载玻片, 除了 3 次冲洗时间为 15 分钟, 2

分钟和 30 秒。如实施例 1 所述干燥、扫描和定量载玻片。

[0202] bFGF 光适体 6-7 的结果如图 11 所示。看上去缓冲液中和 10% 血浆中的 10nM bFGF 所获得的信号取决于光。其中不能形成靶和光适体的共价附着的无光照射样品的信号和在特征外观察到的信号相当,在这里称为“一般背景”。10% 血浆中的内源 bFGF 浓度相当低,如相对于无光及一般背景应答的血浆信号很弱所反映的。

[0203] 实施例 9. 在缓冲液中检测交联于包含 5- 苄基 -dT 和 5- 溴 dC 核苷酸的 DNA 光适体的 C4b

[0204] 这个实施例阐明了图 2A、2B 和 2C 中所示的在分析形式中含有修饰的核苷酸的光适体的活性。C4b 蛋白的 DNA 光适体 (1987-74) 由代替标准 dT 和 dC 的 5- 苄基 -dT 和 5- 溴 -dC 核苷酸组成。

[0205] A. 标记的光适体 1987-74 的制备:含有适体序列的载体插入物通过用特异于适体固定区域的引物用 PCR 从大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞中扩增。3' 引物是生物素化的,可以在 MyOne- 链霉抗生物素蛋白珠上捕获 PCR 产物。清洗后,捕获的双链中非生物素化的链用 20mM NaOH 清洗除去,适体通过具有偶联于 5' 引物序列上的独特捕获标记的寡核苷酸引物延伸而形成。在含有 dATP, 5-Br-dCTP, dGTP 和 5- 苄基 -dUTP 的混合物中,用仍然偶联于链霉抗生物素蛋白珠上的模板 DNA 使用用 KOD DNA 聚合酶进行引物延伸以掺入修饰的核苷酸。用 20mM NaOH 清洗接着用 HCl 中和从珠上收集适体。

[0206] B. 固定捕获探针于胺反应表面上:如实施例 1 所述固定反向互补的捕获标记。

[0207] 终浓度为 2nM 的 1987-74 和一系列 C4b 蛋白在 SB17, 0.1% Tween ® 20 中的稀释液和无蛋白对照保温,稀释液浓度为:25nM, 5nM, 1nM, 0.2nM, 0.04nM。平衡样品并如实施例 1 所述照射,之后加入 2 µL 鲑鱼精 DNA (10mg/ml)。加入 7.5 µL NHS-Alexa-647 (1.33mg/mL 于 DMSO 中) 到每个样品中并在室温下保温 2 小时以荧光标记 C4b 蛋白。加入 25 µL 5M NaCl, 5 µL 10% Triton-100 和 1 µL 100mM 甘氨酸淬灭未反应的标记,破坏非共价相互作用以便于随后的杂交。

[0208] 如实施例 1 所述制备带衬垫的载玻片,并用含有 SB17, 0.1% Tween ® 20, 0.8M NaCl, 20 µg/mL 鲑鱼精 DNA 和 0.33% Triton X-100 的溶液在 42°C 保温 15 分钟。除去溶液后,加入 80 µL 标记的样品到载玻片中,每个亚阵列 (subarray) 1 个,在转动平台上在 42°C 保温 30 分钟。除去样品,基材用预杂交溶液洗 2 次,用无鲑鱼精 DNA 或 Tween ® 20 的预杂交溶液洗一次,用 1xSB17, 0.1% Tween ® 20 洗 1 次,用 0.25xSB17 洗 1 次。然后如实施例 1 所述干燥、扫描和定量载玻片。

[0209] 图 12 显示作为靶浓度函数所获得的 1987-74 的剂量应答曲线结果,说明了在分析中修饰的核苷酸适体的活性。

[0210] 实施例 10. 用两个独立染色方法进行的在两种不同表面上的 UPS 杂交捕获分析

[0211] 这个实施例证明了在两种不同组合物表面以前实施例的甲基丙烯酸酯共聚物表面和在玻璃基材上的 Schott Nexterion 胺反应表面上的分析的官能性。另外,靶蛋白染色反应如前述实施例进行,将 Alexa-647 直接附着于靶蛋白或先将靶蛋白用生物素标记、接着用链霉抗生物素蛋白 -Alexa-647 标记。这个分析可以用表面或染色方法定量检测在缓冲液中的 VEGF 蛋白。

[0212] A. 标记的光适体 509-80 的制备:如实施例 1 所述制备标记的光适体。

[0213] B. 固定捕获探针于胺反应表面上:如实施例 1 所述合成带有 5' 胺的捕获探针并固定于两个表面上。在 Schott Nexterion 载玻片上的固定是通过将探针以 40 或 20 μM 溶解于由 300mM 磷酸钠 (pH 8.5)、.005% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 和 0.001% sarkosyl 组成的缓冲液中的来实现。如实施例 1 所述沉积捕获探针。探针沉积后,载玻片在干燥的盒中保温过夜,然后用 100mM 碳酸氢钠 (pH 8.5) 和 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 中在室温保温 8 小时。然后将载玻片用水冲洗 10 次,在 N_2 气流下干燥。如实施例 1 所述方法将捕获探针固定在甲基丙烯酸酯共聚物表面。

[0214] 体积 100 μL 、浓度为 1nM 的 VEGF 适体 590-80 与 6 个系列稀释的从 50nM 到 16pM 的 VEGF 浓度以及无蛋白对照在分析稀释液 (SB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20, 0.05% BSA, 100 $\mu\text{g/mL}$ 鲑鱼精 DNA) 中保温。样品轻微混合,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 分钟,接着如实施例 1 所述照射。分开样品,直接用 NHS-Alexa-647 染色,或与 NHS- PEO_4 -生物素反应并随后用链霉抗生物素蛋白 Alexa-647 染色。对于用 NHS-Alexa-647 染色,使用实施例 1 的方法,除了反应为在室温下 4 小时。对于用 NHS- PEO_4 -生物素的反应,在 100 μL 样品中加入 1 μL 溶解于 DMSO 中的 20mM NHS- PEO_4 -生物素。混合溶液,在室温下保温 4 小时。两种染色反应都通过添加 23 μL 的 5M NaCl, 11.4 μL 的 10% BSA 和 1.1 μL 的 10% Triton X-100 并保温 2 小时来淬灭。

[0215] 两个不同的载玻片如实施例 1 所述装上衬垫,用 1xSB17, 0.1% Triton X-100, 0.5% BSA 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 鲑鱼精 DNA 在 42 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 15 分钟。然后去除溶液,替换成 80 μL 样品。孔用 Microseal' F' 膜封口,载玻片用 Eppendorf Thermomixer R 在 600rpm, 42 $^{\circ}\text{C}$ 混合 3 小时,接着在 34 $^{\circ}\text{C}$ 、1 小时。对于用 NHS-Alexa-647 直接标记的样品,孔用 1xSB17, 0.5% Triton 和 1M NaCl 冲洗 3 次。去除衬垫,整个载玻片于 pap 广口瓶中的 30mL 的 SB17, 0.5% Triton, 1M NaCl 中放置 30 分钟,接着在 1xSB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 中冲洗 2 分钟,再在 0.25xSB17 中冲洗 20 秒。对于用 NHS- PEO_4 -生物素反应的样品,孔用 1xSB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20, 0.5M NaCl, 100 $\mu\text{g/mL}$ 鲑鱼精 DNA, 0.5% BSA (链霉抗生物素蛋白染色缓冲液) 冲洗 3 次。4 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉抗生物素蛋白 Alexa-647 溶液在链霉抗生物素蛋白染色缓冲液中制备,并添加 80 μL 这种溶液到每个孔中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分钟。然后孔用 1xSB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 冲洗 3 次。除去衬垫,整个载玻片在 30mL pap 广口瓶中的 1xSB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 中放置 30 分钟,接着用 0.25xSB17 冲洗 20 秒。如实施例 1 所述干燥、扫描和定量载玻片。

[0216] 图 13 显示了 Schott Nexterion (图 13A) 和甲基丙烯酸酯共聚物表面 (图 13B) 关于蛋白浓度函数的剂量应答结果。两种表面给出相似的定量结果,表明分析是表面非依赖性的。也可见两种染色策略效率相当。

[0217] 实施例 11. 在包被的石英表面上的 Affymetrix GeneChip $\text{\textcircled{R}}$ Test3 阵列中通过杂交捕获光交联蛋白检测缓冲液和血清中靶蛋白 VEGF 和 bFGF

[0218] 这个实施例证明了另一种表面 Affymetrix GeneChip $\text{\textcircled{R}}$ Test3 阵列 (石英玻璃表面) 在分析的杂交捕获步骤中的应用。分析在缓冲液和血清中进行。

[0219] A. 标记的光适体 509-80 和 6-7 的合成:反向互补的 Affymetrix GeneChip $\text{\textcircled{R}}$ Test3 阵列中名为 201 和 1121 的两个探针分配给如实施例 1 所述制备的适体 509-80 和 6-7。

[0220] B. 固定捕获探针于胺反应表面上:具有原位合成的探针的 GeneChip $\text{\textcircled{R}}$ Test3 阵列购自 Affymetrix 公司。

[0221] 体积 100 μ L 的 VEGF 适体 509-80 和 bFGF 适体 6-7, 每个浓度为 2nM, 在分析稀释液 (1xSB17, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20, 0.02% BSA, 100 μ g/mL 鲑鱼精 DNA) 中用 20nM VEGF 和 bFGF 蛋白制备。样品轻微混合, 并在 37°C 保温 60 分钟, 然后如实施例 9 所述照射并用 NHS-PEO₄- 生物素染色, 除了反应时间为 1 小时。反应通过添加 10 μ L 10% BSA, 1 μ L 10mg/mL 鲑鱼精 DNA, 5 μ L 10% Triton X-100 和 25 μ L 5M NaCl 来淬灭。10 μ L 血清加入到一个样品中, 达到大约 10% 血清样品。

[0222] Affymetrix 公司的 GeneChip $\text{\textcircled{R}}$ Test3 阵列用 100 μ L 溶液 (100 μ L 分析稀释液, 10 μ L 10% BSA, 1 μ L 10mg/mL 鲑鱼精 DNA, 25 μ L 5MNaCl, 5 μ L 10% Triton X-100 和 7 μ L DMSO) 在 45°C 保温 1 小时, 然后 100 μ L 样品加入到 Test3 阵列小室中, 在 45°C 保温 60 分钟, 然后用缓冲液 (1xSB1, 0.5% Triton X-100 和 1M NaCl) 冲洗。然后将阵列置于 Affymetrix GeneChip $\text{\textcircled{R}}$ 应用流体学工作台上, 该工作台用于进行标准 Affymetrix 清洗和染色程序。然后阵列在 Affymetrix 扫描仪读数并定量。结果显示在图 14 中。在缓冲液 (图 14A) 中 VEGF 适体和探针 201 (在图中表示为 1) 杂交, 强度为 3500RFU, bFGF 适体和探针 1121 (图中表示为 2) 杂交, 强度为 23000RFU。在血清中 (图 14B), VEGF 和 bFGF 的相对强度为 5000 (1) 和 18000 (2)。

[0223] 实施例 12. 用脱脂牛奶、Superblock 或未染色血浆的预封闭在包被的石英表面的 Affymetrix GeneChip $\text{\textcircled{R}}$ Test3 阵列的表面钝化这个实施例阐明了用脱脂牛奶、Superblock 或未染色血浆封闭对 Affymetrix GeneChip $\text{\textcircled{R}}$ Test3 阵列上的血清和血浆吸附的表面钝化。

[0224] A. 生物素化寡核苷酸的制备: 与固定于 GeneChip $\text{\textcircled{R}}$ Test3 阵列上表示为 201、1121 和 108 的 3 个不同探针退火的生物素化寡核苷酸如实施例 1 所述合成。

[0225] B. 血浆生物素化: 160 μ L 21mM NHS-PEO₄- 生物素加入到 100mL 于 1xSB18, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 中的 10% 血浆中, 溶液反应 2 小时, 然后加入 1mL 100mM 甘氨酸 (pH 7.5) 淬灭。生物素化血浆储存于 -20°C。

[0226] 对照缓冲液包含 0.75xSB17, 0.1% BSA, 100 μ g/mL 鲑鱼精 DNA, 0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 和 0.8M NaCl。10% 生物素化血浆用对照缓冲液和生物素化血浆制备。往 1mL 10% 生物素化血浆中加入 50 μ L 10% TritonX-100, 10 μ L 10% SDS 和 10 μ L 10mg/mL 鲑鱼精 DNA 来预处理血浆, 加热到 95°C、10 分钟, 然后加入 200 μ L 5M NaCl。1 μ L 1000x 生物素化探针混合物加入到 1mL 对照缓冲液或 10% 血浆中。

[0227] 4 个 Affymetrix Test3 阵列在 1xSB17, 1% BSA, 0.4% Triton X-100, 0.1% SDS, 1M NaCl 和 100 μ g/mL 鲑鱼精 DNA 中保温。阵列 B 用悬浮于 PBS, 0.1% SDS 和 0.4% 中的 2% 脱脂奶粉 (Nestle Carnation, INSTANT NONFAT DRY MILK) 溶液封闭, 阵列 C 用 StarterBlock (PIERCE), 0.1% SDS 和 0.4% 溶液封闭。阵列 D 用 10% 混合血浆, 0.1% SDS 和 0.4% Triton X-100 溶液封闭。每个封闭溶液都加热到 95°C 10 分钟, 并在加入阵列前冷却到室温。每个 Test3 阵列用 100 μ L 各自的封闭溶液在 45°C 封闭 1.5 小时。然后将 100 μ L 样品加入到每个阵列中。阵列 A 加入具有探针的对照缓冲液, 阵列 B、C 和 D 加入具有探针的 10% 血浆。阵列在 45°C 保温 45 分钟。

[0228] 然后用 1xSB17, 0.4% Triton X-100, 0.1% SDS, 1M NaCl, 1% BSA 通过将 1mL 洗液流过小室、将阵列保温 5 分钟、然后将另外 1mL 洗液流过小室、最后用 100 μ L 新鲜洗液替换

最后的 100 μ L 洗液来冲洗阵列。这个程序进行 3 遍。阵列在放置于 Affymetrix GeneChip[®] 应用流体学工作台之前保温大约 1 小时,然后在 Affymetrix 扫描仪上读数。

[0229] 结果显示在图 15A-D。4 个阵列的一般背景为 40、300、400 和 500RFU,3 个生物素化探针在阵列上的测量值为 $\sim 17,000$, ~ 34000 和 18000。

[0230] 实施例 13. 用脱脂牛奶预封闭的 GeneChip[®] Test3 阵列中通过杂交捕获光交联蛋白检测靶蛋白

[0231] 这个实施例阐明了在用脱脂牛奶封闭的包被玻璃表面上的 Affymetrix GeneChip[®] Test3 阵列上靶蛋白 IL-1 R4 和 bFGF 的杂交捕获。

[0232] A. 标记的光适体 1472-3 和 6-7 的合成:Affymetrix GeneChip[®] Test3 阵列中表示为 1364 和 1121 的反向互补的两个探针分配给适体 1472-3 和 6-7 并如实施例 1 所述合成。

[0233] 在 10% 血浆中制备每个含有浓度各为 2nM 的适体 1472-3 和 6-7 的 4 种溶液,达到如下终浓度的蛋白对 (IL-1 R4, bFGF): (0, 0), (1nM, 30pM), (100pM, 1nM) 和 (10pM, 100pM)。血浆稀释液含有 0.9xSB18, 100 μ g/mL 鲑鱼精 DNA, 5 μ g/mL (BrdU)₃₀, 0.1% Tween[®] 20 和 10% 血浆。样品在 37°C 保温 30 分钟,并如实施例 1 所述照射。1 μ L DMSO 中的 5mg/mL NHS-PEO₄-生物素加入到每个样品中,在室温下保温 2 小时,然后加入 2 μ L 100mM 甘氨酸 (pH7.5), 1 μ L 10% SDS 和 5 μ L 10% Triton X-100。然后样品加热到 95°C 10 分钟,冷却到室温,加入 10 μ L 10% BSA 和 25 μ L 5M NaCl 淬灭。然后加入 1 μ L 100x 探针 -108 作为对照序列。

[0234] 4 个 Test3 阵列用脱脂奶粉溶液如实施例 1 对于阵列 B 所述在 45°C 封闭 3 小时。然后用 PBS, 0.1% SDS 和 0.4% Triton X-100 冲洗阵列,并用 1xSB17, 1% BSA, 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS, 1M NaCl 和 0.1mg/mL 鲑鱼精 DNA 在 45°C 保温 20 分钟。然后 100 μ L 的每个样品加入到单独的阵列中。阵列在 45°C 保温 45 分钟。如实施例 12 所述完成阵列。结果显示在图 16 中,血浆中的两个靶可以观察到线性剂量应答。

[0235] 实施例 14, 在 Luminex SeroMap[™] 微球中通过杂交捕获光交联蛋白检测靶蛋白 C5b,6 复合物、Neurotrophin-3 和肌钙蛋白 I

[0236] 这个实施例证明了 Luminex SeroMap[™] 微球作为固体载体检测和任选定量可能存在于测试样品中的靶分子的应用。这些分析用加入缓冲液中的靶蛋白进行。检测设备为 Luminex 100 IS 设备系统。

[0237] 分配给光适体 2184-64 (C5b,6 复合物适体)、2273-34 (neurotrophin-3 适体) 和 2338-12 (肌钙蛋白 I 适体) 的胺-终止探针用 EDC (1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基] 碳二亚胺氢氯化物) 化学成分偶联到 -COOH 功能化的 SeroMap[™] 微球上。

[0238] 每个终浓度均为 2nM 的光适体 2184-64, 2273-34 和 2338-12 与和适体 3' 末端互补的生物素化寡核苷酸预退火,然后组合在缓冲液 SB17, 0.05% Tween[®] 20 中浓度范围为 169fM 到 3.33nM 的蛋白 C5b,6 复合物、neurotrophin-3 和肌钙蛋白 I 的混合物。也制备了双份无蛋白对照分析样品。100 μ L 体积的这些分析样品在 37°C 保温 15 分钟,然后光交联。Dynal MyOne 链霉抗生物素蛋白珠 (400 μ g) 加入到每个分析样品中, 25°C 保温 10 分钟,并混合以捕获光适体:生物素化寡核苷酸和蛋白-光适体:生物素化寡核苷酸杂种。珠用 100 μ L 100mM 碳酸氢钠, 1mM EDTA, 0.02% Tween[®] 20 和 10 μ M D-生物素 (pH8.5) 洗

30 秒,2 次。缓冲液中 D- 生物素成分的目的在于饱和游离的链霉抗生物素蛋白结合位点。洗过的珠悬浮于 100 μ L 100mM 碳酸氢钠 (pH 8.5),1mMEDTA,0.02% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 和 150 μ M 硫-NHS-LC- 生物素 (PierceBiotechnology) 中,以便于用生物素标记光适体缀合靶蛋白。这个生物素化反应在 25 $^{\circ}$ C 保温 1 小时,持续混合。然后珠用 100 μ L SB17,3.14M 盐酸胍,0.05% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20 洗 3 次,接着用 100 μ L SB17,0.33% TritonX-100 洗 2 次。洗后的珠悬浮于 100 μ L 10 μ M D- 生物素,0.05% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20,10mM HEPES, pH7.5 中,然后加热到 70 $^{\circ}$ C,5 分钟,从珠结合互补生物素化寡核苷酸上释放光适体。对于每个分析样品,75 μ L 珠洗脱物体积和 25 μ L 以下高盐缓冲液合并:4M NaCl,0.4% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20,160mM Tris-Cl, pH 8.0。加入 11.25 μ L 20% SDS,每个分析样品转移到 30 μ L 合适的探针缀合 SeroMapTM 微球 (1500 色编码的微球 / 探针,0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20,1M NaCl,1.25% BSA,40mM Tris-Cl, pH 8.0) 的混合物中。为促进光适体和微球缀合探针的杂交,分析样品在 65 $^{\circ}$ C 保温 2 小时,持续混合。在 65 $^{\circ}$ C,分析样品转移到 96 孔微滴定真空过滤板中,微球用 200mM NaCl,0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20,40mM Tris-Cl (pH 8.0) 在 65 $^{\circ}$ C 洗 4 次。然后微球悬浮于 80 μ L 的 200mM NaCl,0.1% Tween $\text{\textcircled{R}}$ 20,40mM Tris-Cl (pH8.0) 中,转移到 96 孔微滴定板。加入 20 μ L 10 μ g/ml 链霉抗生物素蛋白-R-藻红蛋白 (Molecular Probes # S866) 以检测光适体交联生物素化靶蛋白。在 37 $^{\circ}$ C 保温 15 分钟后,分析样品进行标准 Luminex 设备信号 (R-藻红蛋白) 定量方法。

[0239] 图 17 图形表示 C5b,6 复合物光适体 2184-64 (图 17A)、neurotrophin-3 光适体 2273-34 (图 17B) 和肌钙蛋白 I 光适体 2338-12 (图 17C) 的结果。对于每个适体,MFI (中值荧光强度) 值通过减去无蛋白对照 MFI 值来校正。

[0240] 以上所述本发明涉及到各种各样的实施方案和实施例。没有一个特定的实施方案、实施例、或特定实施方案或实施例的元素被解释成是任何权利要求的关键、必须或重要的元素或特征。进一步地说,保温描述的元素没有一个对实施本发明是必须的,除非表达上有“必需”或“关键”描述。

[0241] 可以知道的是,对于揭示的实施方案可以进行各种修饰和替换,而不背离在以下权利要求中限定的本发明的范围。说明书,包括附图和实施例,应被认为是说明的目的,而不是限制性的,所有这样的修饰和替换均是包括在本发明的范围中的。因此,本发明的范围将由所附的权利要求书和它们法律上的等加物来确定,而不是上面所给的实施例。例如,在任何方法权利要求中叙述的步骤可以以任何可行的顺序来执行,并不限于任何实施方案、实施例和权利要求书中所表述的顺序。

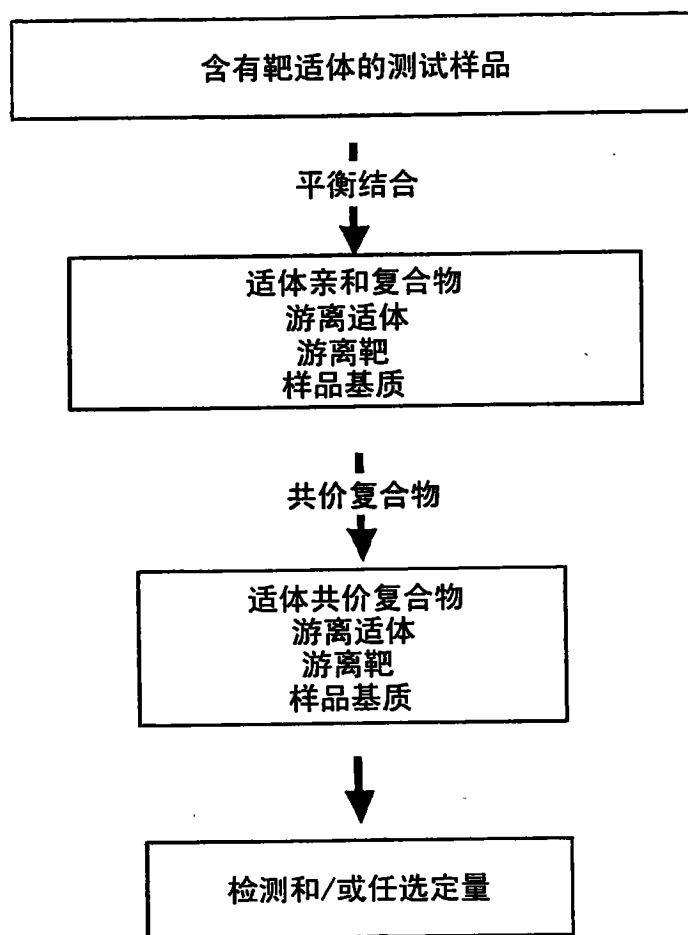


图 1A

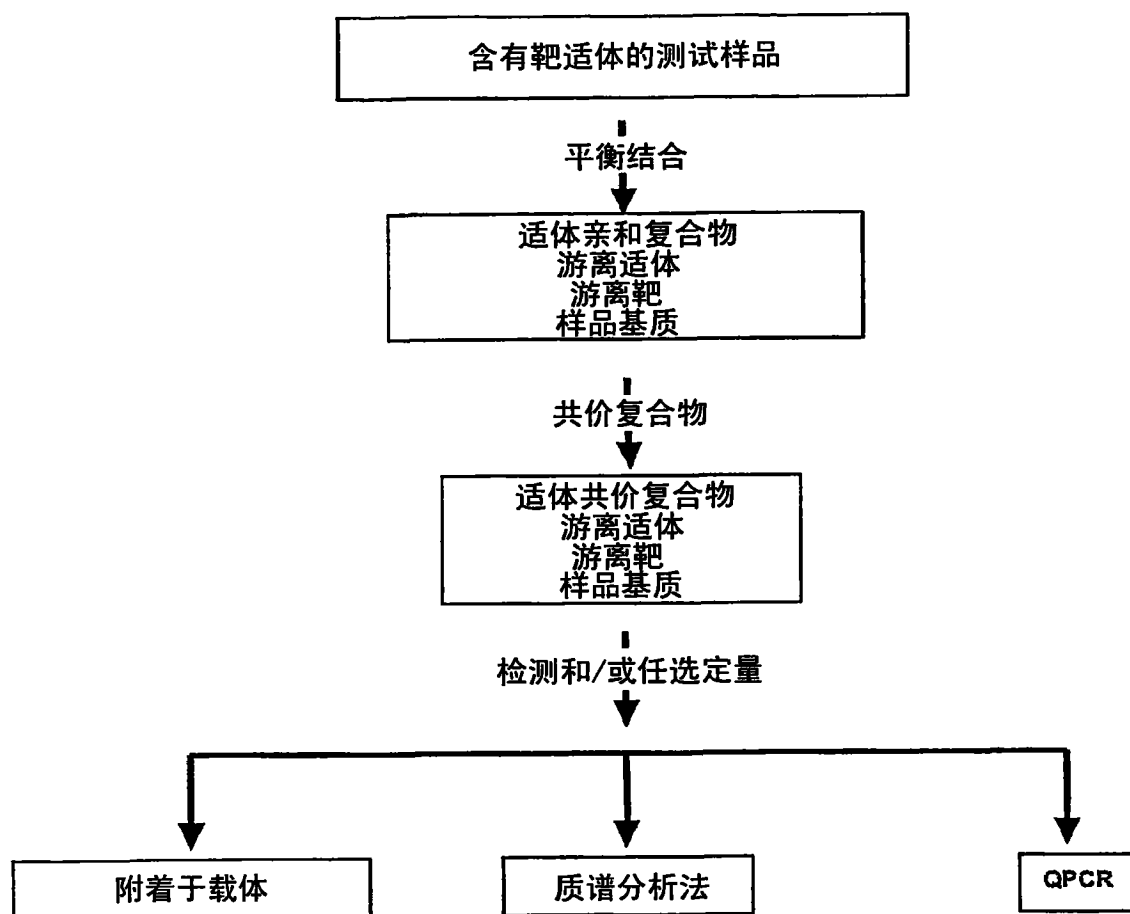


图 1B

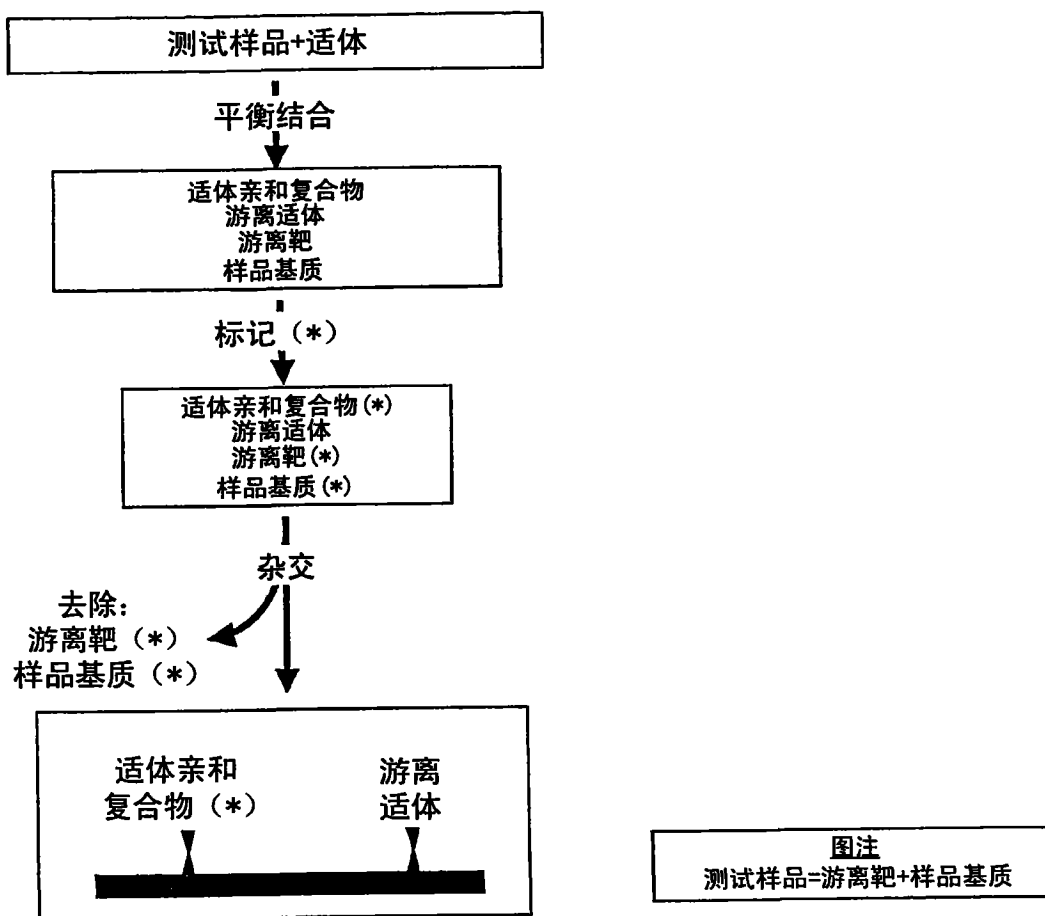


图 2A

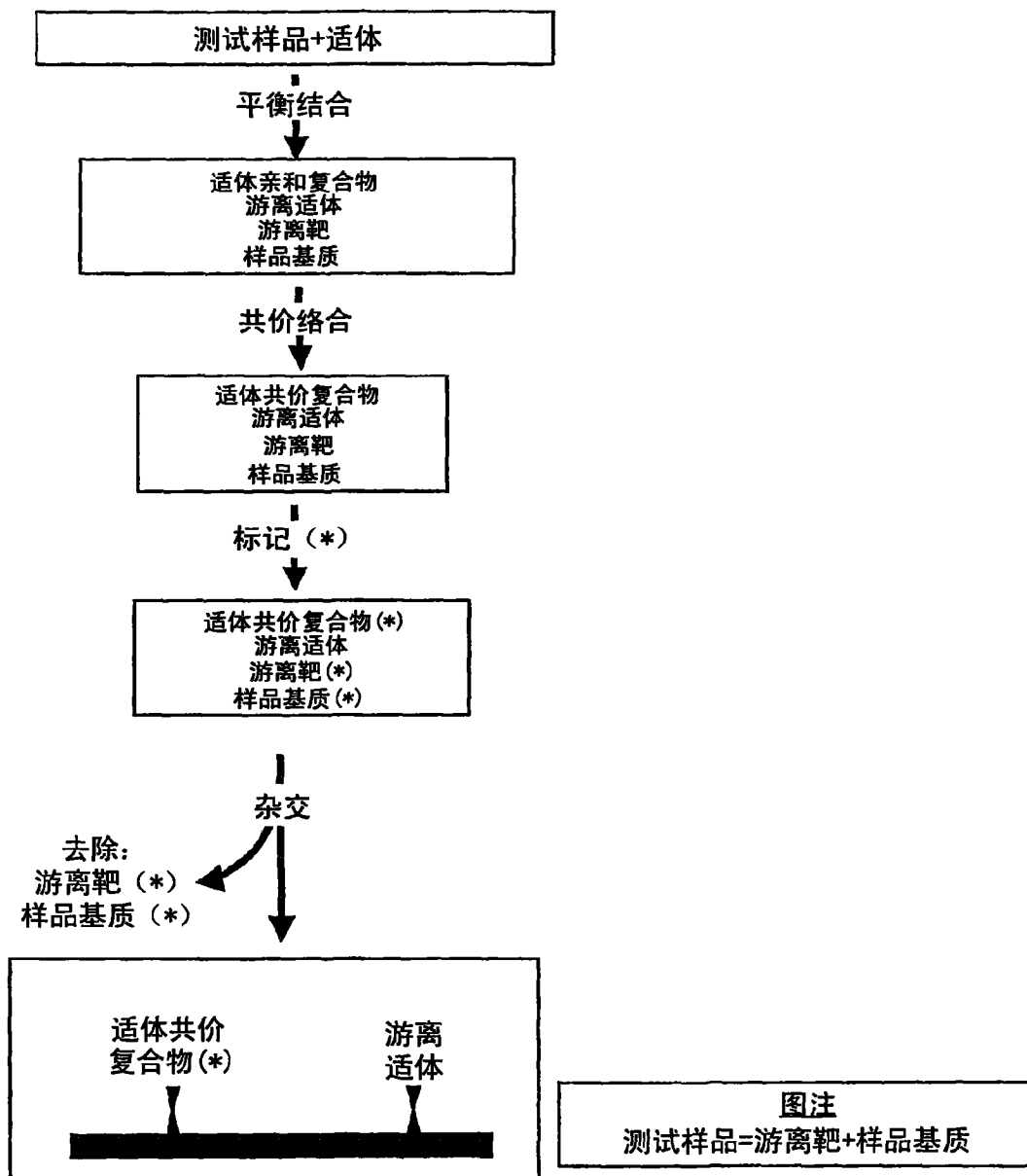


图 2B

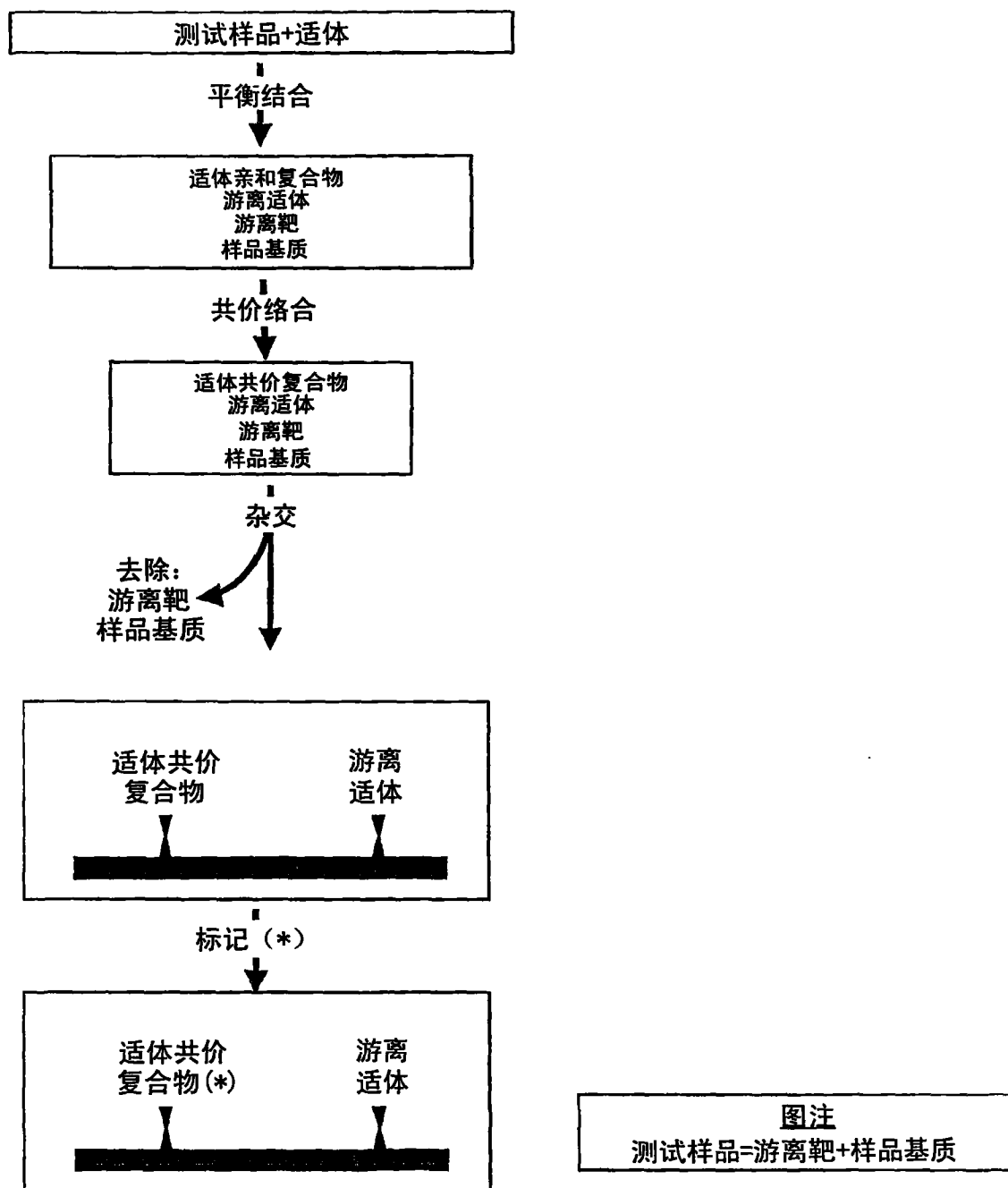
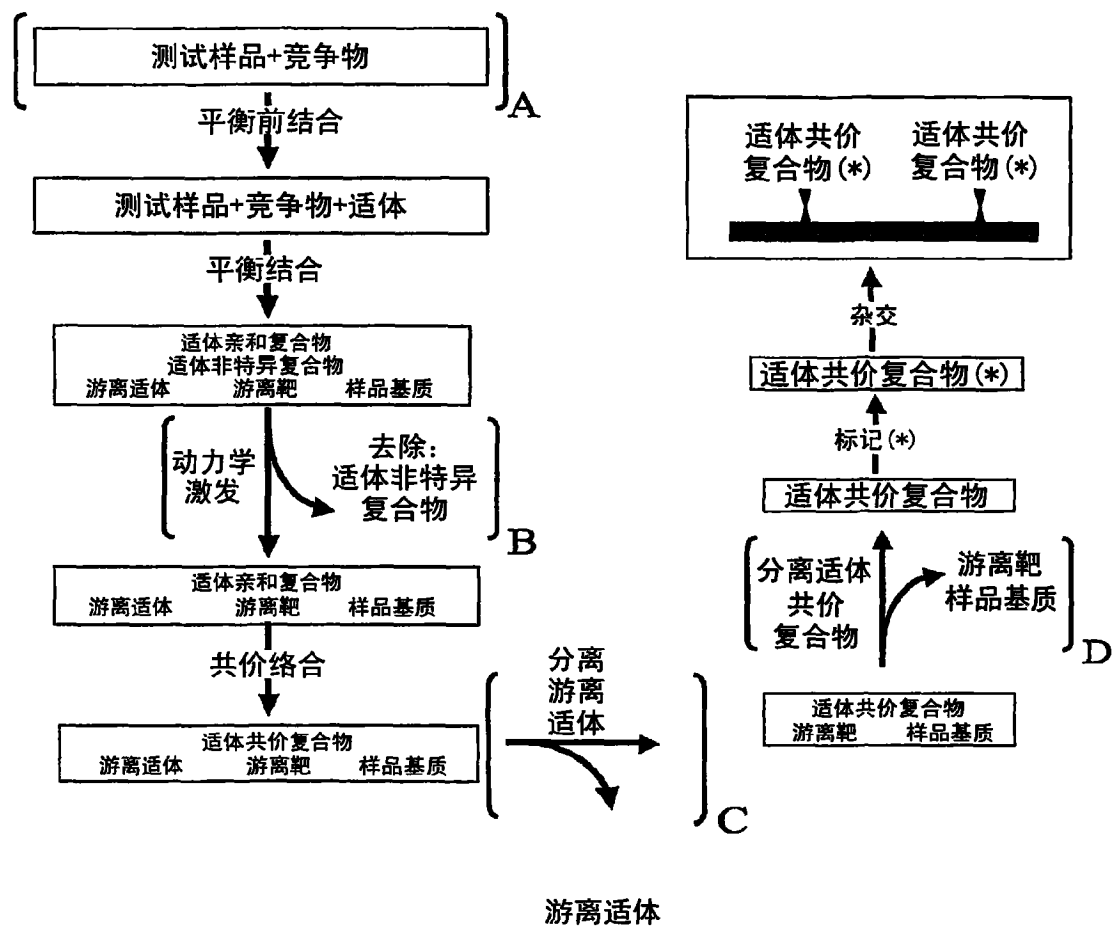


图 2C



图注
测试样品=游离靶+样品基质

图 3

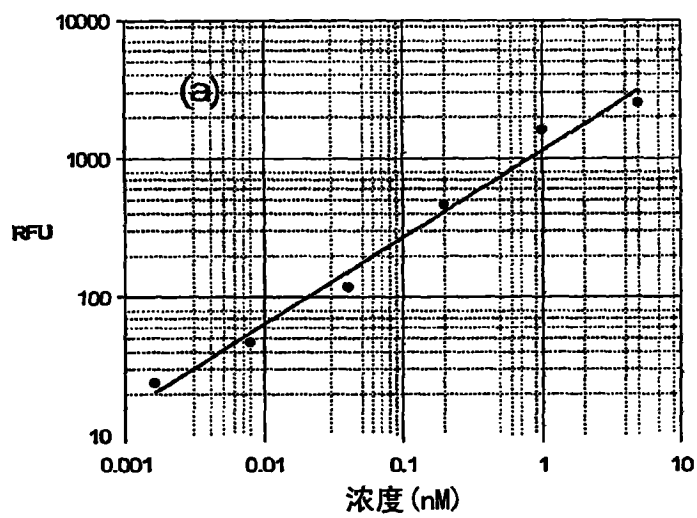


图 4A

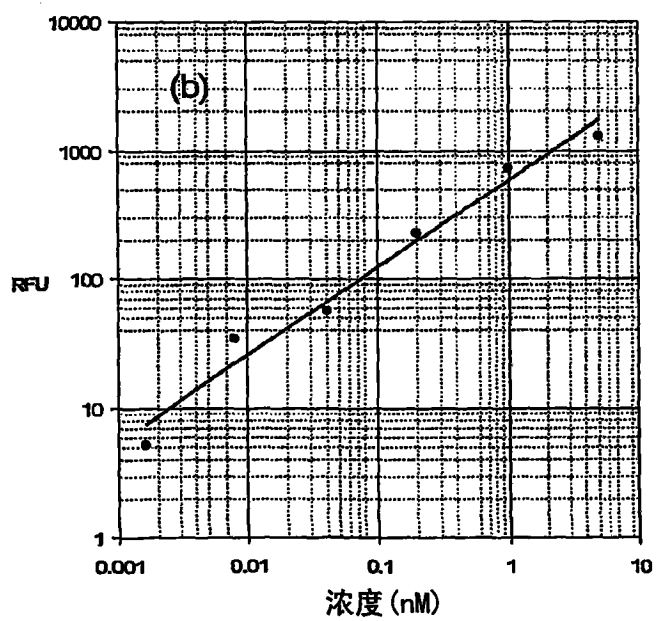


图 4B

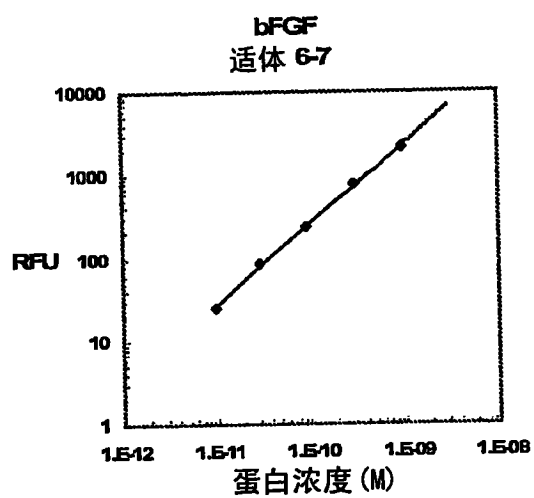


图 5A

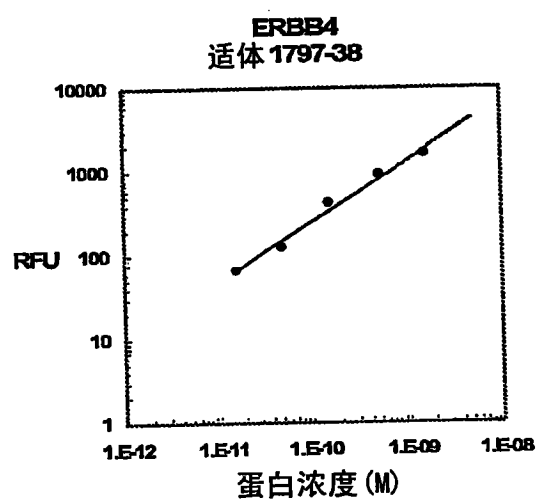


图 5B

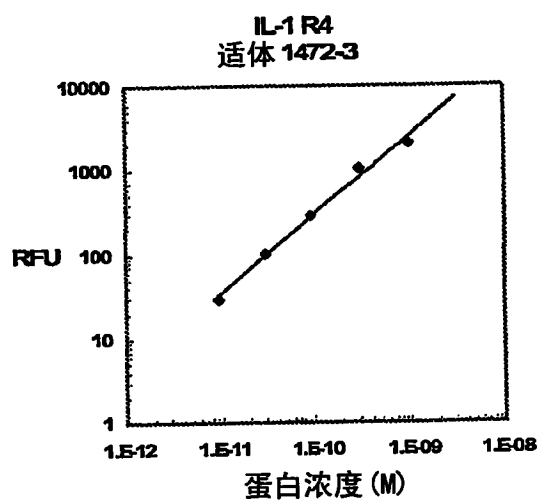


图 5C

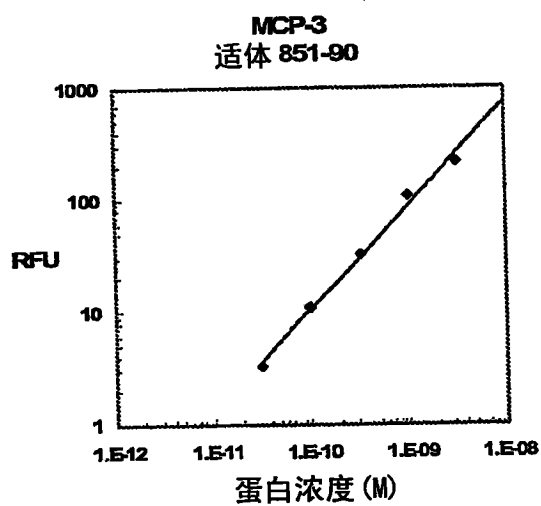


图 5D

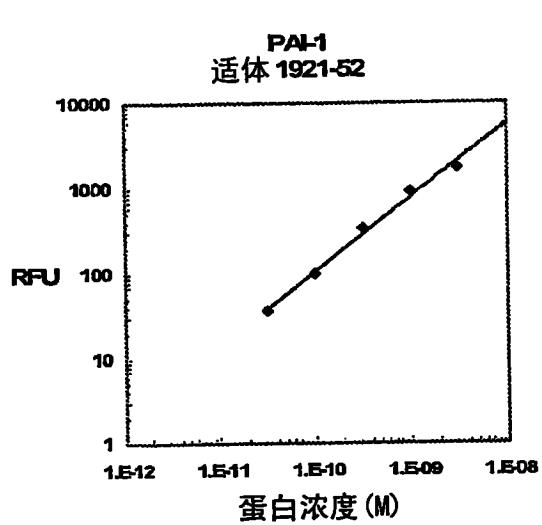


图 5E

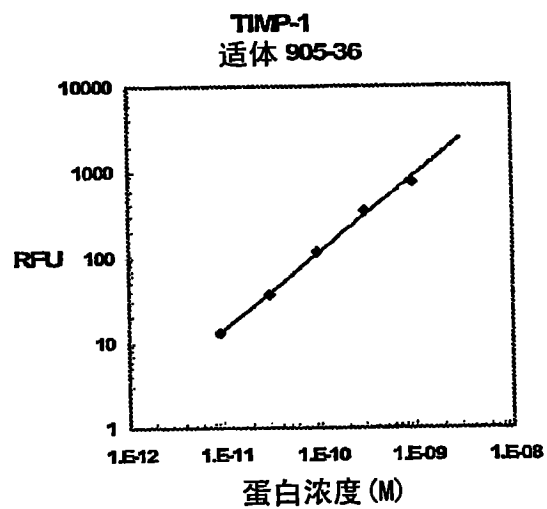


图 5F

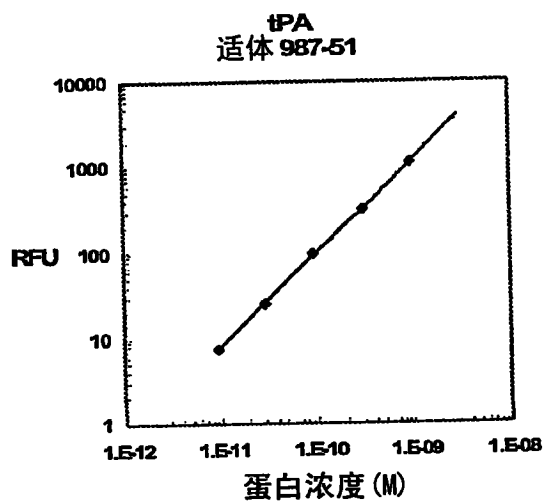


图 5G

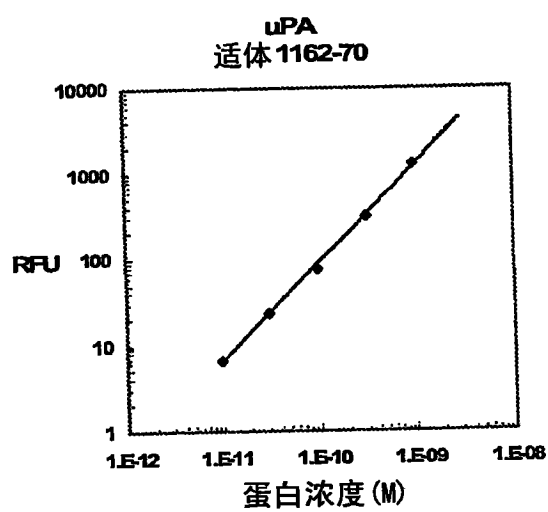


图 5H

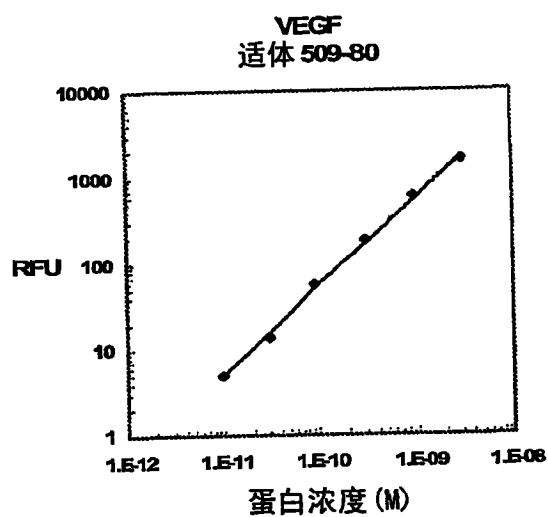


图 5I

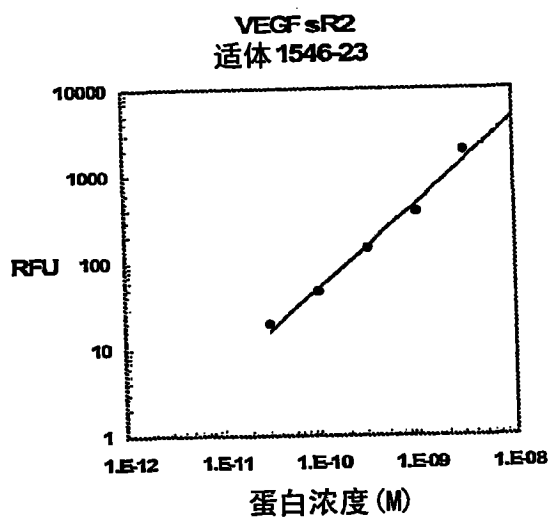


图 5J

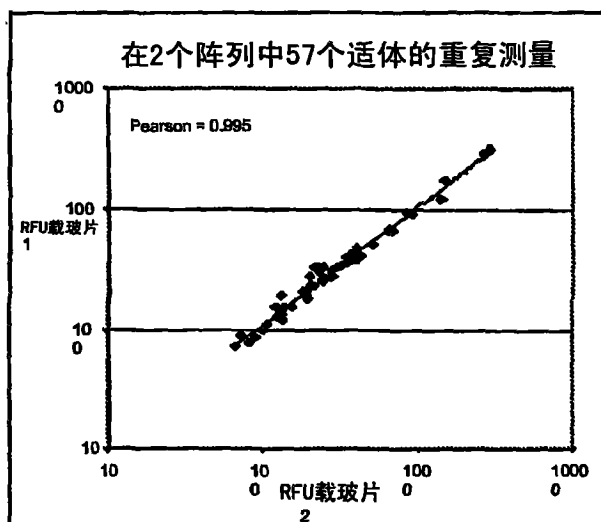


图 6A

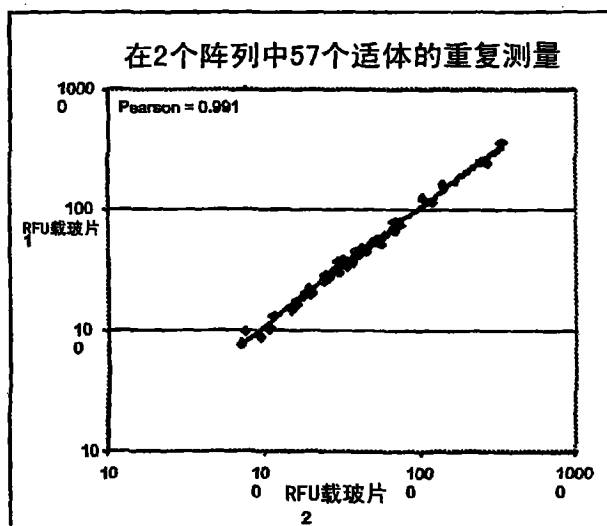


图 6B

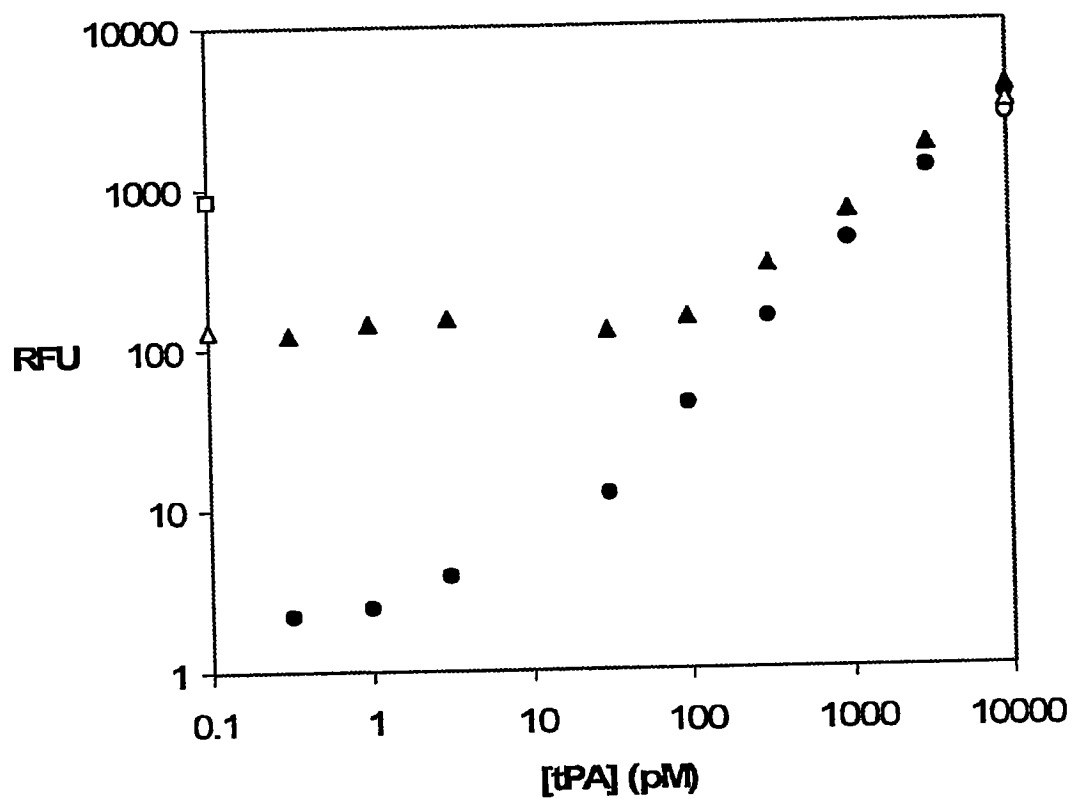


图 7

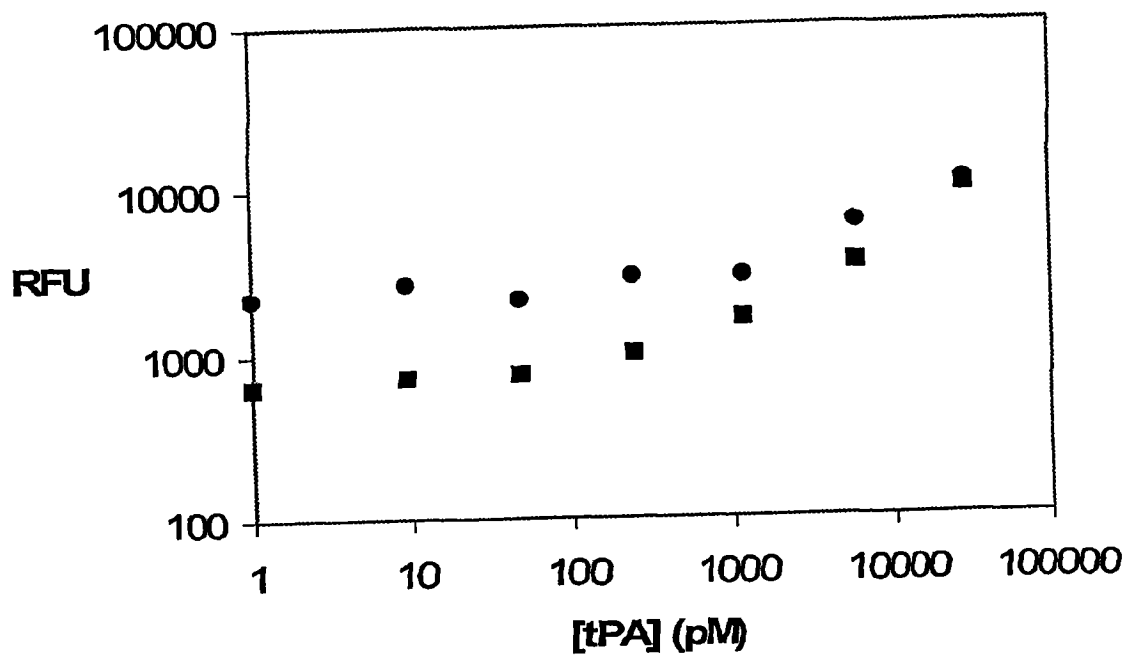


图 8

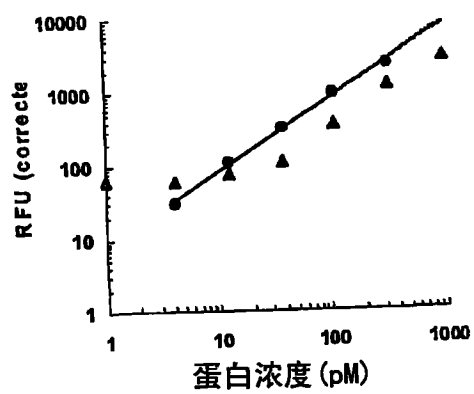


图 9A

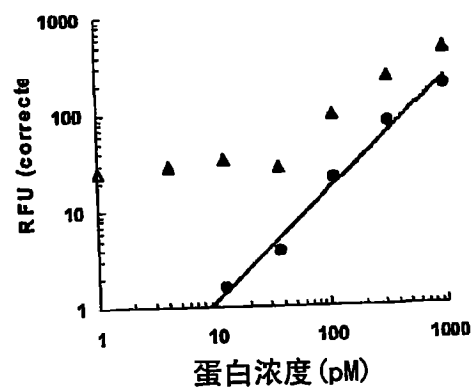


图 9B

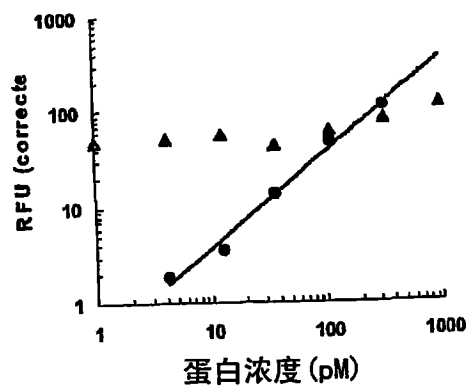


图 9C

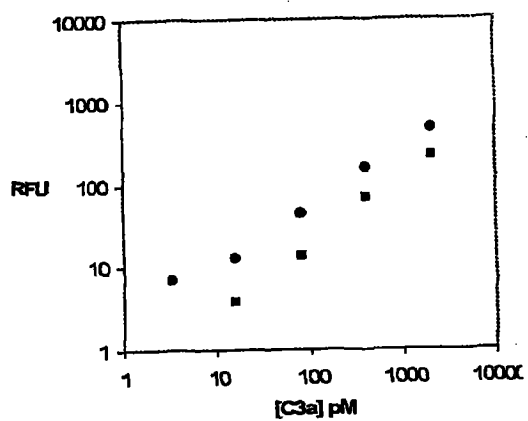


图 10A

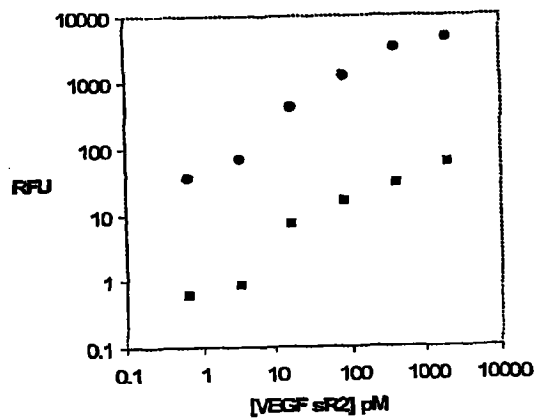


图 10B

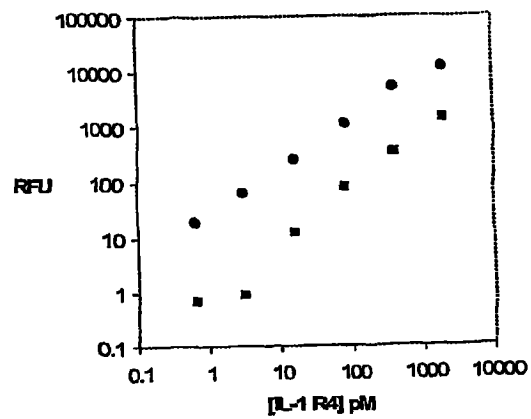


图 10C

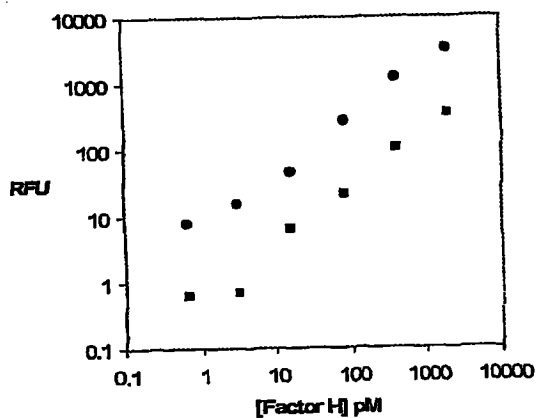


图 10D

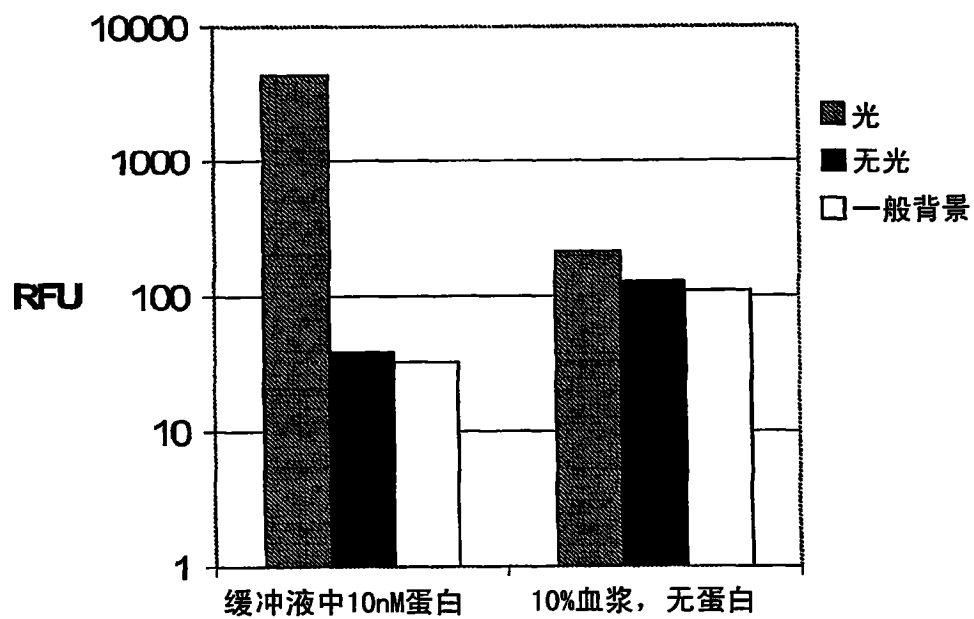


图 11

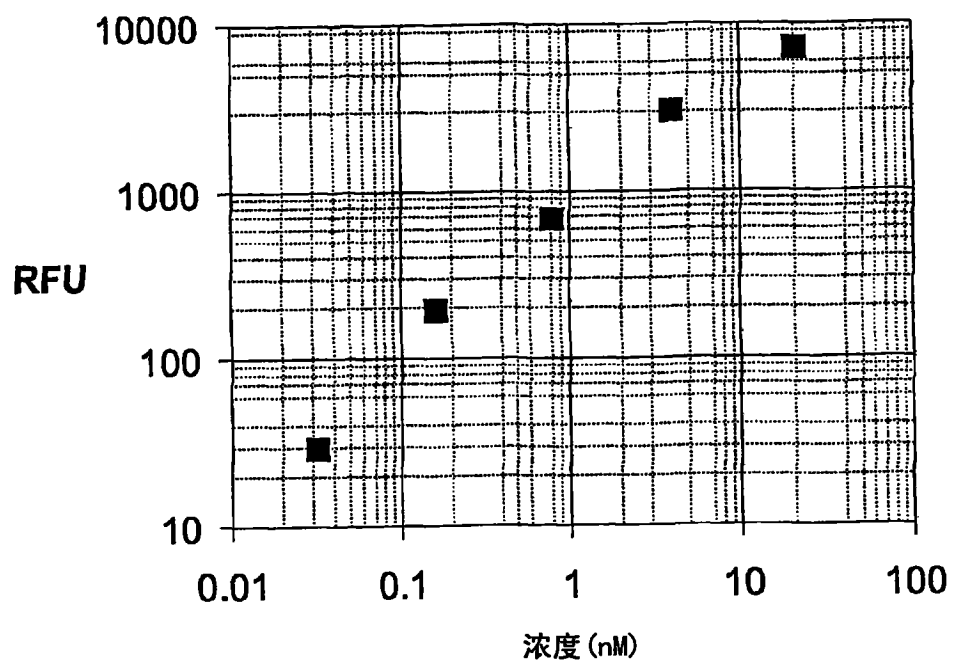


图 12

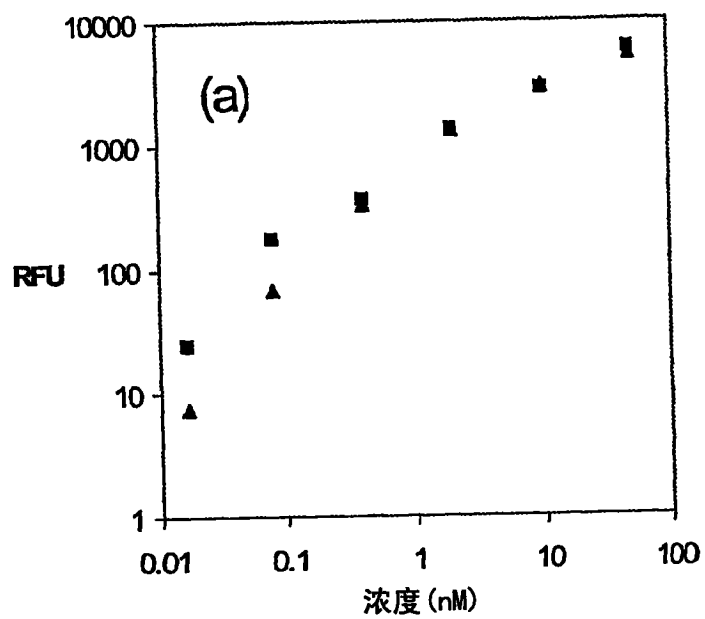


图 13A

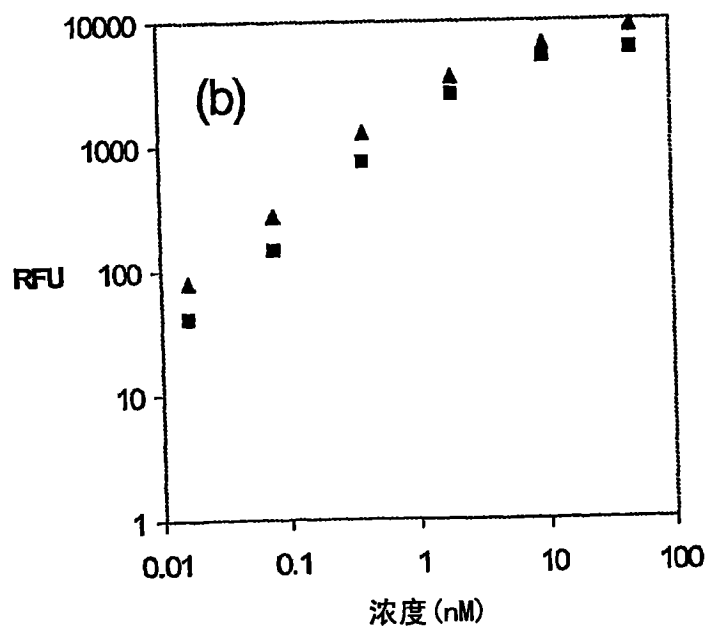


图 13B

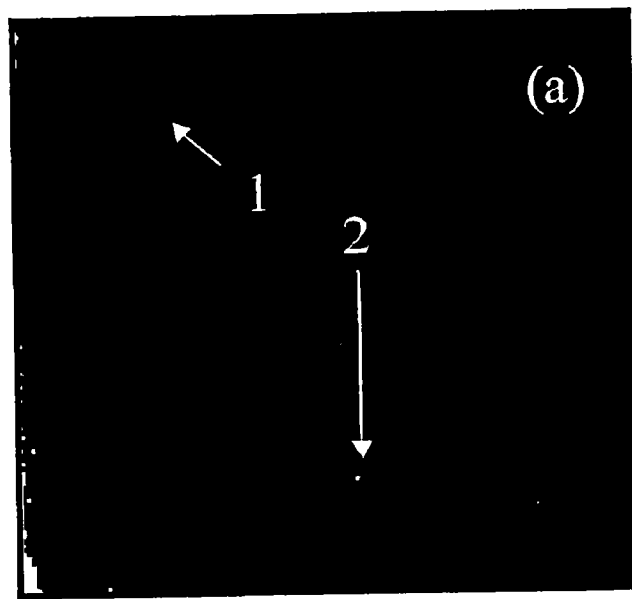


图 14A

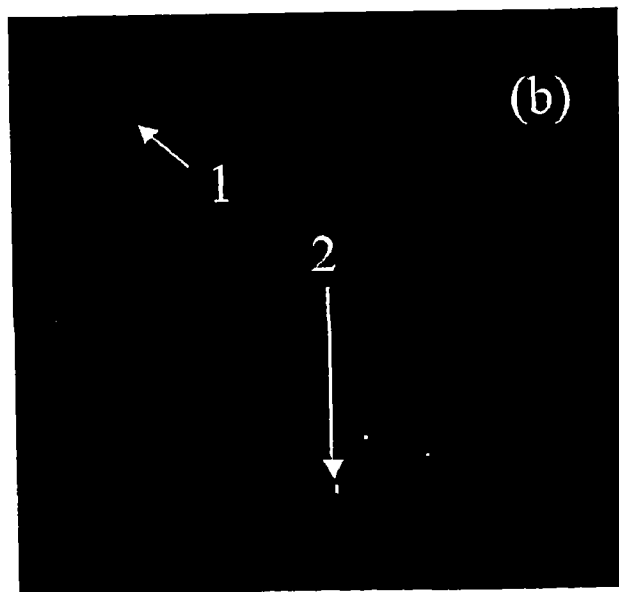


图 14B

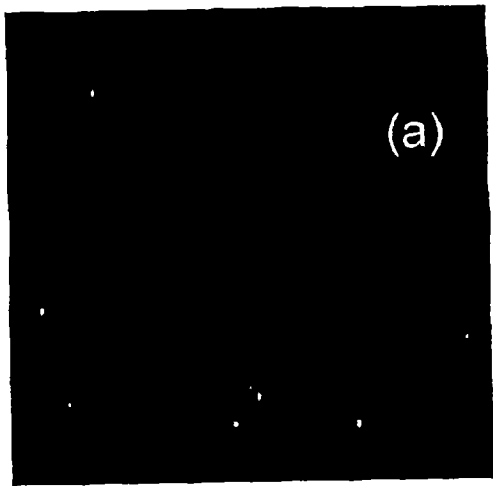


图 15A

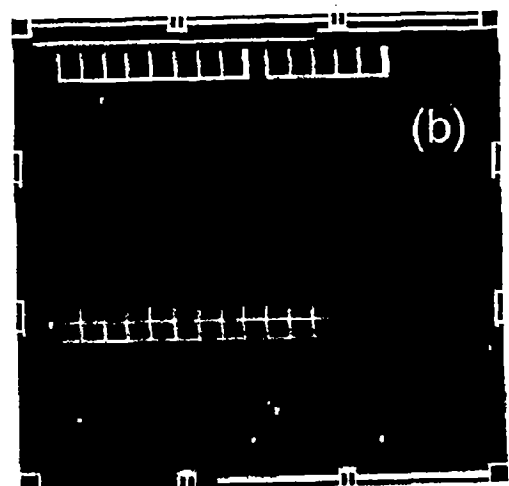


图 15B

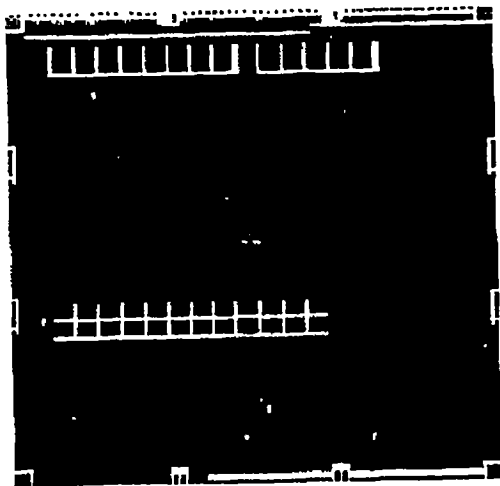


图 15C

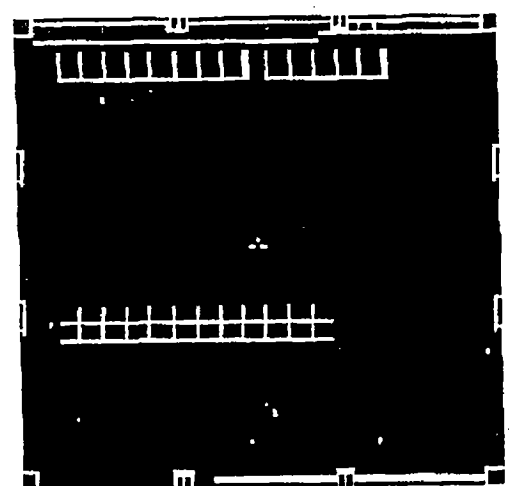


图 15D

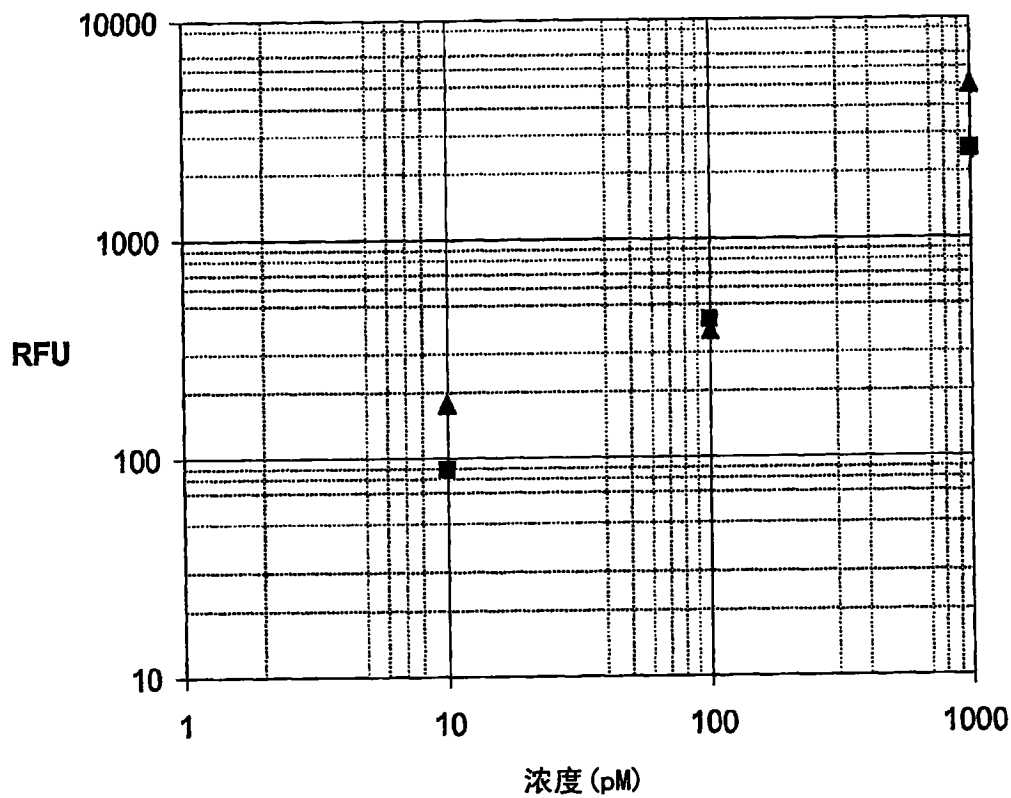


图 16

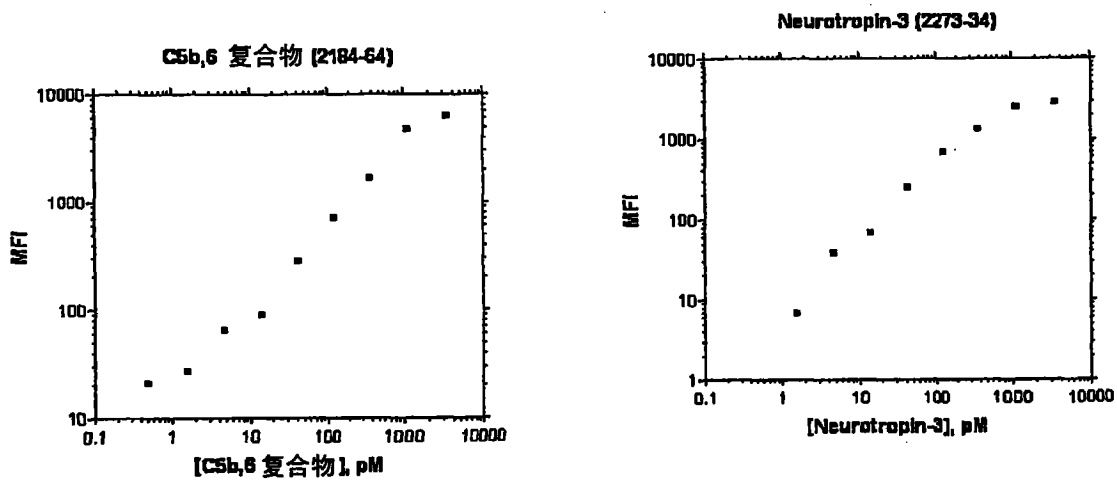


图 17B

图 17A

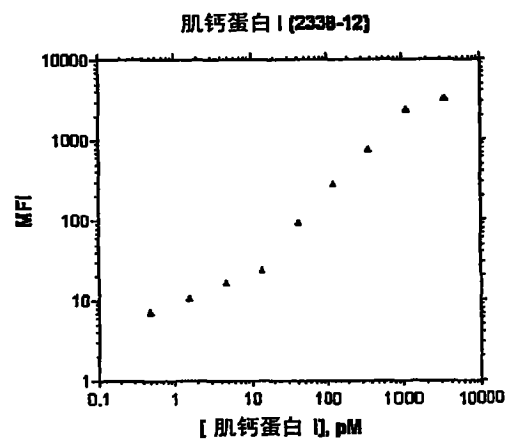


图 17C