



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117460837 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 26

(21) 申请号 202280036872.6

(22) 申请日 2022.03.24

(30) 优先权数据

63/192,554 2021.05.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/021826 2022.03.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/250774 EN 2022.12.01

(71) 申请人 加州理工学院

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 L·蔡 C·H·恩格

L·奥姆贝莱茨

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 张文辉

(51) Int.Cl.

G12Q 1/682 (2006.01)

G12Q 1/6841 (2006.01)

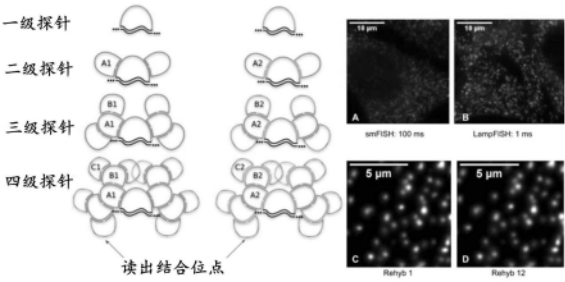
权利要求书4页 说明书23页 附图9页

(54) 发明名称

与指数辐亮度控系的连锁放大

(57) 摘要

本文公开了用于与指数辐亮度控系的连锁放大的组合物用于信号放大。本文还公开了用于与指数辐亮度控系的连锁放大的试剂盒用于信号放大。本文还公开了用于与指数辐亮度控系的连锁放大的方法用于信号放大。



1. 用于与指数辐亮度拴系的连锁放大的组合物,其包含多个探针,其中所述组合物包含:

(i) 一个或多个一级探针,其能够结合一个或多个靶标,其中每个一级探针包含一个或多个二级探针结合位点和任选地一个或多个读出探针结合位点;

(ii) 一个或多个二级探针,其各自能够结合所述一级探针,其中每个二级探针包含一个或多个三级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点;

(iii) 任选地,一个或多个三级探针,其各自能够结合至所述二级探针,其中每个三级探针包含一个或多个四级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点;

(iv) 任选地,一个或多个四级探针,其各自能够结合至所述三级探针,其中每个四级探针包含一个或多个读出探针结合位点;

(v) 一个或多个读出探针,其能够结合至所述一个或多个一级、二级、三级或四级探针上的读出探针结合位点,并且能够被检测;和

(vi) 一个或多个分子,其能够在将探针杂交时或之后或在探针杂交之后,使一个或多个一级、二级、三级或四级探针稳定化。

2. 用于与指数辐亮度拴系的连锁放大的试剂盒,其包含多个探针,使得所述试剂盒至少包含:

(i) 一个或多个一级探针,其能够结合一个或多个靶标,其中每个一级探针包含一个或多个二级探针结合位点和任选地一个或多个读出探针结合位点;

(ii) 一个或多个二级探针,其各自能够结合所述一级探针,其中每个二级探针包含一个或多个三级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点;

(iii) 任选地,一个或多个三级探针,其各自能够结合至所述二级探针,其中每个三级探针包含一个或多个四级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点;

(iv) 任选地,一个或多个四级探针,其各自能够结合至所述三级探针,其中每个四级探针包含一个或多个读出探针结合位点;

(v) 一个或多个读出探针,其能够结合至所述一级、二级、三级或四级探针上的读出探针结合位点,并且能够被检测;和

(vi) 一个或多个分子,其能够在将探针杂交时或之后或在探针杂交之后,使一个或多个一级、二级、三级或四级探针稳定化。

3. 用于与指数辐亮度拴系的连锁放大的方法,其包括以下步骤:

(i) 使样品与结合一个或多个靶标的一个或多个一级探针接触,其中每个一级探针与靶标杂交;

(ii) 使一个或多个二级探针与所述一级探针杂交;其中每个二级探针包含一个或多个三级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点;

(iii) 任选地,使一个或多个三级探针与至少一个二级探针杂交,其中每个三级探针包含一个或多个四级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点;

(iv) 任选地,使一个或多个四级探针与至少一个三级探针杂交,其中每个四级探针包含一个或多个读出探针结合位点;和

(v) 在步骤(i) - (iv) 期间或之后使一个或多个一级、二级、三级或四级探针稳定化;

(vi) 使能够检测的读出探针与所述一个或多个读出探针结合位点杂交;

(vii) 在步骤(vi)之后对细胞成像,以检测所述一级探针与核酸的相互作用;和

(viii) 任选地重复所述接触和成像步骤,每次用新的多个可检测地标记的读出探针进行,其中针对一个靶标的至少一个读出探针与针对同一靶标的至少一个其他读出探针的不同之处在于它们的可检测部分,使得所述样品中的靶标通过条形码描述,并且可以通过它们条形码的差异与所述样品中的另一靶标来区分。

4. 权利要求3的方法,其中个体地或以其任何组合重复步骤(i) - (vii)中的任何步骤。

5. 权利要求3的方法,其包括使所述一级探针稳定化。

6. 权利要求3的方法,其包括使所述二级探针稳定化。

7. 权利要求3的方法,其包括使所述三级探针稳定化。

8. 权利要求3的方法,其包括使所述四级探针稳定化。

9. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中每个二级、三级或四级探针包含至少两个放大器片段。

10. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述二级探针、二级和三级探针、二级和三级和四级探针、二级和四级探针、三级探针、三级和四级探针,或四级探针包含至少两个放大器片段。

11. 权利要求9或10的组合物、试剂盒或方法,其中所述二级探针放大器片段至少包含:

(a) 第一放大器片段,其中所述第一放大器片段包含与所述一级探针的互补性区域,并且其中所述互补性区域与所述一级探针杂交;和

(b) 第二放大器片段,其中所述第二放大器片段包含与所述一级探针的互补性区域,并且其中所述互补性区域与所述一级探针杂交。

12. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述三级探针放大器片段至少包含:

(a) 第一放大器片段,其中所述第一放大器片段包含与二级探针或所述二级探针的所述第一或第二放大器片段的互补性区域,并且其中所述互补性区域与所述二级探针或所述二级探针的所述第一或第二放大器片段杂交;和

(b) 第二放大器片段,其中所述第二放大器片段包含与所述二级探针或二级探针的所述第一或第二放大器片段的互补性区域,并且其中所述互补性区域与所述二级探针或所述二级探针的所述第一或第二放大器片段杂交。

13. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述四级探针放大器片段至少包含:

(a) 第一放大器片段,其中所述第一放大器片段包含与三级探针或所述三级探针的所述第一或第二放大器片段的互补性区域,并且其中所述互补性区域与所述三级探针或所述三级探针的所述第一或第二片段杂交;和

(b) 第二片段,其中所述第二片段包含与所述三级探针或所述三级探针的所述第一或第二放大器片段的互补性区域,并且其中所述互补性区域与所述三级探针或所述三级探针的所述第一或第二片段杂交。

14. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中连接酶连接任何二级、三级或四级放大器片段的所述第一或第二片段。

15. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中夹板序列与所述二级、三级

或四级放大器片段的所述第一放大器片段、所述第二放大器片段或这两个放大器片段杂交,并且其中所述夹板序列包含至少两个夹板序列片段。

16. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述夹板序列片段是连接的。

17. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中读出探针与所述二级、三级或四级探针的所述第一或第二放大器片段杂交。

18. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中读出探针与夹板序列片段杂交。

19. 权利要求3的方法,其中所述稳定化选自以下组成的组:酶连接、化学连接、使用或不使用寡聚物夹板探针的UV交联、夹板探针的杂交、通过基质的交联和化学交联和其任何组合。

20. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述靶标选自转录物、RNA、DNA基因座、染色体、DNA、蛋白质、脂质、聚糖、细胞靶标、细胞器和其任何组合。

21. 权利要求20的靶标,其中所述靶标与一个或多个寡核苷酸序列缀合。

22. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述一级、二级、三级或四级探针通过顺式连接稳定化。

23. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述一级、二级、三级或四级探针通过使用酶的顺式连接稳定化。

24. 权利要求23的酶,其中所述酶是DNA或RNA连接酶,或DNA聚合酶或RNA聚合酶,和或上述任何项的组合。

25. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中在探针的接触或杂交期间通过顺式连接使所述一级、二级、三级或四级探针稳定化。

26. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中每个一级探针包含与靶核酸序列互补的核酸序列。

27. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述序列互补性为至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

28. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述一级、二级、三级或四级探针通过丙烯酰胺交联顺式连接。

29. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述一级、二级、三级或四级探针通过所述探针上的反应基团顺式连接,其中所述反应基团是选自以下的反应对:烯烃、炔烃、叠氮化物、酰胺、胺、硝酮、磷酸酯、四嗪和四唑。

30. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述读出探针中的一个或多个包含具有可检测部分的寡核苷酸或抗体。

31. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述读出探针包含具有相同序列的寡核苷酸。

32. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述读出探针包含具有不同序列的寡核苷酸。

33. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述读出探针包含长度为至

少5个核苷酸的寡核苷酸。

34. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或方法,其包含至少两个不同的可检测部分。

35. 权利要求1-34中任一项的组合物、试剂盒或方法,其中所述可检测部分是相同的。

36. 前述权利要求中任一项的组合物或试剂盒,其中所述组合物或试剂盒进一步包含能够结合两个或更多个靶标的两个或更多个一级探针。

37. 前述权利要求中任一项的组合物或试剂盒,其中所述组合物或试剂盒进一步包含能够结合一个或多个一级探针的两个或更多个二级探针,其中每个二级探针包含两个或更多个三级探针结合位点或两个或更多个读出探针结合位点。

38. 前述权利要求中任一项的组合物或试剂盒,其中所述组合物或试剂盒进一步包含两个或更多个三级探针,其各自能够结合两个或更多个三级探针结合位点,并且其中每个三级探针包含一个或多个读出探针结合位点。

39. 前述权利要求中任一项的组合物或试剂盒,其中所述组合物或试剂盒进一步包含两个或更多个读出探针,其能够结合至所述一个或多个读出探针结合位点的至少一个并且能够被检测。

40. 权利要求2的试剂盒,其进一步包含DNA连接酶。

41. 前述权利要求中任一项的方法,其包括使样品与结合一个或多个靶标的一个或多个一级探针接触,其中所述一个或多个一级探针与所述靶标杂交。

42. 前述权利要求中任一项的方法,其包括使二级探针与所述一级探针杂交;其中所述二级探针包含两个或更多个三级探针结合位点或两个或更多个读出探针结合位点。

43. 前述权利要求中任一项的方法,其包括使三级探针与至少两个二级探针杂交;并且其中每个三级探针包含两个或更多个读出探针结合位点。

44. 前述权利要求中任一项的方法,其包括使能够检测的读出探针与两个或更多个读出探针结合位点杂交。

45. 权利要求3的方法,其进一步包括重复所述接触和成像步骤,每次用新的多个可检测地标记的读出探针进行,其中在每个新的多个中,针对一个靶标的至少一个读出探针与先前的多个中针对同一靶标的至少一个读出探针不同,其中它们至少在它们的可检测部分上不同。

46. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述一级探针是连接的或交联的。

47. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述一级、二级或三级探针是顺式或反式进行连接或交联的。

48. 前述权利要求中任一项的方法,其中每个一级、二级或三级探针是顺式连接的。

49. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中在每个步骤之后洗涤所述样品。

50. 权利要求49的方法,其中用除去非特异性杂交反应的缓冲液洗涤所述样品。

51. 权利要求50的方法,其中所述洗涤缓冲液是严格的。

与指数辐亮度拴系的连锁放大

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年5月24日提交的美国临时专利申请号63/192,554的优先权。上述申请的内容在此通过引用其整体并入。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的批准号HD075605下由政府支持完成的。政府对本发明具有一定权利。

发明领域

[0005] 本公开提供了用于扩增子的可缩放信号放大的方法、组合物、试剂盒,该扩增子可以应用于多路复用成像以对生物样品进行谱分析 (profile)。

背景技术

[0006] 细胞的转录谱分析 (profiling) 对于许多目的是有价值的。显微成像分辨单个细胞中的多个mRNA可以提供关于转录物丰度和定位的信息,这对于理解细胞识别的分子基础和开发疾病的治疗很重要。生物样品的分子谱分析诸如转录组学谱分析对于各种目的是有价值的。例如,它可以允许人们评估基因表达水平,以检测和鉴定异常生长状态诸如癌症。

[0007] 诸如qPCR和微阵列的技术已经是有用的,但它们不能达到单分子灵敏度。另一方面,下一代测序涉及样品的扩增和mRNA的逆转录,这可能在定量中引入偏差和不准确性。此外,样品制备和测序可能是耗时且昂贵的。尽管事实是成像已经用于mRNA转录物定量,但仅限于几百个基因。如果可以量化数千个基因甚至整个转录组,许多科学问题就变得可理解。

[0008] 所需要的是用于以时间高效的方式以高精度在单分子灵敏度下进行基于成像的转录组学谱分析的更好的方法和系统。

发明内容

[0009] 本公开提供了方法、组合物、试剂盒,并且用于与指数辐亮度拴系的连锁放大 (LANTERN) 精确的和确定的信号放大。LANTERN允许扩增子的可缩放信号放大,该扩增子可以应用于多路复用成像以对生物样品进行谱分析。本公开阐述了组合物和试剂盒,以及制备和使用该组合物和试剂盒,以及相关领域中问题的其他解决方案。

[0010] 在一些实施方案中,提供了用于与指数辐亮度拴系的放大的组合物,其包含多个探针,其中该组合物包含:一个或多个一级探针,其能够结合一个或多个靶标,其中每个一级探针包含一个或多个二级探针结合位点和任选地一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该组合物包含一个或多个二级探针,其各自能够结合一级探针,其中每个二级探针包含一个或多个三级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该组合物任选地包含一个或多个三级探针,其各自能够结合至二级探针,其中每个三级探针包含一个或多个四级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该组合物任选地包含一个或多个四级探针,其各自能够结合三级探针,其中每个四级探

针包含一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该组合物包含一个或多个读出探针,其能够结合至一个或多个一级、二级、三级或四级探针上的结合位点并且能够被检测。在某些实施方案中,该组合物包含能够在探针杂交时或杂交后或在将探针杂交后使一个或多个一级、二级、三级或四级探针稳定化的一个或多个分子。

[0011] 在一些实施方案中,提供了用于与指数辐亮度拴系的连锁放大的试剂盒,其包含多个探针,其中该组合物包含:其中每个一级探针包含一个或多个二级探针结合位点和任选地一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该试剂盒包含一个或多个二级探针,其各自能够结合一级探针,其中每个二级探针包含一个或多个三级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该试剂盒任选地包含一个或多个三级探针,其各自能够结合至二级探针,其中每个三级探针包含一个或多个四级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该试剂盒任选地包含一个或多个四级探针,其各自能够结合至三级探针,其中每个四级探针包含一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该试剂盒包含一个或多个读出探针,其能够结合至一个或多个一级、二级、三级、四级探针上的结合位点并且能够被检测。在某些实施方案中,该试剂盒包含能够在探针杂交时或杂交后或在将探针杂交后使一个或多个一级、二级、三级或四级探针稳定化的一个或多个分子。

[0012] 在一些实施方案中,提供了用于与指数辐亮度拴系的连锁放大的方法,其包括用于连接-放大荧光原位杂交的方法,其包括以下步骤:将样品与结合一个或多个靶标的一个或多个一级探针接触,其中每个一级探针与靶标杂交。在某些实施方案中,该方法包括将一个或多个二级探针与一级探针杂交;其中每个二级探针包含一个或多个三级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该方法任选地包括将一个或多个三级探针与至少一个二级探针杂交;并且其中每个三级探针包含一个或多个四级探针或一个或多个读出探针结合位点。在一些实施方案中,该方法包括任选地将一个或多个四级探针与至少一个三级探针杂交,其中每个四级探针包含一个或多个读出探针结合位点。在一些实施方案中,该方法包括在步骤(i)-(iv)期间或之后使一个或多个一级、二级、三级或四级探针稳定化。在某些实施方案中,该方法包括将能够检测的读出探针与一个或多个读出探针结合位点杂交。在某些实施方案中,该方法包括在步骤(vi)之后对细胞进行成像以便检测一级探针与核酸的相互作用。在某些实施方案中,该方法包括任选地重复接触和成像步骤,每次用新的多个可检测地标记的读出探针,其中针对一个靶标的至少一个读出探针与针对同一靶标的至少一个其他读出探针的不同之处在于它们的可检测部分,使得样品中的靶标由条形码描述,并且可以通过它们条形码的差异与样品中的另一靶标区分。在一些实施方案中,个体地或以其任何组合重复任何前述实施方案。

[0013] 在一些实施方案中,该方法用于生成探针,该探针用于可以应用于多路复用成像的高效且可缩放的信号放大方法。在某些实施方案中,该方法用于生成探针,该探针用于RNA和DNA顺序荧光原位杂交(seqFISH)。在某些实施方案中,该方法用于生成探针,该探针用于免疫荧光研究。

[0014] 相对于其他方法诸如杂交链式反应(HCR),其一次仅允许若干扩增子的放大,这在来自一个样品的数十或数百个种类进行成像时是极其耗时的,本文公开的关于一级、二级、三级、四级和读出探针的方法的合成比其他化学修饰明显更简单和更低成本,并且容易

与现有的酶促探针合成方案相容。

[0015] 附图简述

[0016] 图1.左:LANTERN方案概述,显示两个不同的靶序列作为示例。不同的颜色代表用于放大每个不同靶标的正交序列(显示为“A”和“B”),以及正交读出探针结合位点(显示为“C”)。显示了一轮放大,与直接读出一级探针相比,对应于 $2 \times 2 \times 4 = 16$ 倍的放大。右:上:用不同颜色的两个探针组针对Eef2的宽场RNA FISH,在NIH3T3细胞中显示为品红色和青色。(A)常规smFISH,曝光时间100ms。(B)6轮LANTERN,曝光时间1ms。下:在NIH3T3细胞中针对Eef2的共聚焦RNA LANTERN(6轮)。(C)第一次杂交(D)再杂交#12,对应于约10小时的实时,显示了重复的甲酰胺剥离和再杂交中放大信号的稳定性。除非另有说明,所有图像均使用63x油物镜拍摄。

[0017] 图2.左:用于60个LANTERN放大器的合并测试的成对共定位热图。通过在第二图像中的局部最大值周围的3-像素框中搜索一张图像中的局部最大值的最大投影图像来估计2D共定位。对应于相邻放大器的非对角正方形(例如:1和2,3和4)具有高共定位,因为对于这次实验,放大器对靶向相同的基因。中:散点图,其显示了由smFISH(横轴)和LANTERN(纵轴)在相同基因上检测到的点的数量之间的相关性。每个基因分配有两个放大器。右:散点图,其显示了对于相同基因,由第一放大器检测到的点的数量(横轴)与由第二放大器(纵轴)检测到的数量之间的相关性。

[0018] 图3.NIH3T3细胞中Eif4g1的RNA FISH的宽场图像,显示了相同基因的两个正交放大序列(A和B)和常规smFISH(C)之间的共定位。曝光时间40ms(A和B)和400ms(C)。(D)同时显示所有三个通道。DAPI核染色剂显示为灰色。

[0019] 图4.NIH3T3细胞中端粒DNA FISH的共聚焦图像(青色)。左:未放大的端粒DNA FISH,500ms曝光时间。右:LANTERN放大的端粒DNA FISH,500ms曝光时间。图像以相同的对比度显示。DAPI核染色剂显示为灰色。

[0020] 图5.在LANTERN放大之前(A和C)和之后(B和D)用DNA缀合抗体染色的NIH3T3细胞的宽场图像。A和B用抗核纤层蛋白B和DNA缀合第二抗体染色,显示了核纤层染色。曝光时间200ms(A)和10ms(B)。C和D用抗TIMM44和DNA缀合第二抗体染色,显示了线粒体染色。曝光时间200ms(C)和20ms(D)。

[0021] 图6.A-C:人乳腺癌活检样品中Eef2的RNA FISH的共聚焦图像。(A)澄清前,显示高背景,曝光1s。(B)澄清后,显示减少的背景,曝光1s。(C)澄清和LANTERN放大后,显示出更明亮和更清晰的点。曝光100ms。(D-E)成年小鼠脑切片中Eef2的RNA FISH的共聚焦图像。D:smFISH信号(青色),曝光4s。(E)澄清和LANTERN放大后的不同的脑样品(青色),曝光50ms。(F-G)整装鸡胚胎中Notch1(青色和品红色)和Lfng(绿色)内含子的RNA FISH的共聚焦图像。(F)未放大的信号,在此阈值几乎不可见,曝光1s。(G)LANTERN后的信号,曝光1s。相同类型的所有样品以相同的对比度水平展示,并且细胞核的DAPI染色在下小图中为灰色。

[0022] 图7:放大荧光信号并高度共定位的代表性放大器。

[0023] 图8:LANTERN是高度特异的。大多数放大信号来自正确结合的锁式探针(padlock probe)。图像以相同的对比度显示,以展示与未放大的荧光斑点相比更高强度的来自LANTERN的荧光斑点。

[0024] 图9:LANTERN克服了阿尔茨海默病人脑切片中的自发荧光和脂褐质。(A)在去除脂

褐质强度计数的阈值后,保留了基因Eef2的LANTERN放大的荧光斑点,表明放大的荧光斑点更明亮。(B)相比于未放大的单分子FISH荧光斑点,阈值化除去了转录物斑点,而脂褐质仍然强烈保留。图像以相同的对比度显示,以展示LANTERN放大后更明亮的信号。

[0025] 图10:LANTERN在灌注、过夜多聚甲醛固定的小鼠脑组织切片中放大荧光信号。上小图的对比度比中间小图低10倍,中间小图的对比度与下小图相同。这表明相同单细胞中的荧光信号在6个LANTERN循环后被放大。

[0026] 图11:高度多路复用seqFISH+实验中LANTERN的定量评估。(A) 上小图:LANTERN前seqFISH+实验中的“伪彩色”杂交之一的示例,所有荧光通道中曝光时间为5s。下小图:在647nm通道中200ms曝光、在561nm通道中300ms曝光和在488nm通道中400ms曝光的LANTERN放大图像。相同荧光通道中的图像以相同的对比度显示。(B) 每个荧光通道中的LANTERN放大倍数。相对于smFISH,在LANTERN的10个循环之后,647nm、561nm和488nm荧光通道分别显示76.03、59.49和59.82的放大倍数。(C) 用LANTERN谱分析3,000个基因的seqFISH+实验与批量RNA-seq测量的比较。在此实验中使用了45对独特LANTERN放大器。结果显示与RNA-seq测量的0.73的良好Pearson相关系数。

[0027] 图12:LANTERN的替代方案。(A) 在这种情况下,可以使用一对分裂放大器以与锁式一级探针杂交,或者在其他情况下,与倒置的锁式一级探针杂交。然后使用酶促连接酶以连接分裂放大器,不正确结合的分裂放大器将不被连接,并且将被高浓度甲酰胺洗剂洗掉。接下来,将分裂的三级放大器对与连接的二级放大器杂交,然后进行酶促连接和严格甲酰胺洗涤。通过迭代分裂放大器杂交、酶促连接和甲酰胺严格洗涤来重复该循环,直到达到期望的放大倍数。最后,可以用荧光团缀合读出寡核苷酸检测放大的支架。(B) 分裂放大器的任选设计,该分裂放大器含有可以通过夹板序列与连接酶进一步连接的附加序列,进一步使正确结合的放大器稳定化。(C) 在647nm荧光通道中用分裂放大器检测的Eef2转录物的放大样品。

[0028] 发明详述

[0029] 呈现以下描述以使本领域普通技术人员能够制作和使用所公开的主题且将其并入到本申请的上下文中。对于本领域技术人员来说,各种修改以及在不同应用中的各种用途将是显而易见的,并且本文定义的一般原理可以应用于广泛范围的实施方案。因此,本公开并不旨在受限于所呈现的实施方案,而是被赋予与本文所公开的原理和新颖特征一致的最宽范围。

[0030] 定义

[0031] 除非另有说明,否则术语应根据相关领域的普通技术人员的常规用法来理解。

[0032] 如本文所用,通常认为关于数字的术语“大约”或“约”包含落入该数字的任一方向(大于或小于)上5%、10%、15%或20%的范围内的数字,除非另有说明或从上下文中显而易见(除非此类数字小于可能值的0%或超过100%)。

[0033] 如本文所用,术语“LANTERN”是首字母缩写词,其是指与指数辐亮度拴系的连锁放大。

[0034] 术语“寡核苷酸”是指核苷酸单体的聚合物或寡聚物,其含有核碱基、修饰的核碱基、糖、修饰的糖、磷酸酯桥或修饰的桥的任何组合。寡核苷酸可以具有各种长度。在具体的实施方案中,寡核苷酸的长度范围可以是约2至约1000个核苷酸。在各种相关的实施方案

中,单链、双链和三链寡核苷酸的长度范围可以是约4至约10个核苷酸、约10至约50个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约15至约30个核苷酸、约20至约30个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为约9至约39个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少4个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少5个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少6个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少7个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少8个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少9个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少10个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少11个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少12个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少15个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少20个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少25个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为至少30个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸是长度为至少18个核苷酸的互补链的双链体。在一些实施方案中,寡核苷酸是长度为至少21个核苷酸的互补链的双链体。

[0035] 如本文所用,术语“探针”是指任何合成的或天然存在的分子,其可以将其自身直接或间接地附着于分子靶标(例如,mRNA样品、DNA分子、蛋白质分子、RNA和DNA同种型分子、单核苷酸多态性分子等)。例如,探针可以包含核酸分子、寡核苷酸、蛋白质(例如抗体或抗原结合序列)或其组合。例如,蛋白质探针可以与一个或多个核酸分子连接以形成作为嵌合体的探针。如本文所公开的,在一些实施方案中,探针本身可以产生可检测的信号。在一些实施方案中,探针直接地或经由中间分子间接地与可以产生可检测信号的信号部分(例如染料或荧光团)连接。

[0036] 如本文所用,术语“结合位点”是指探针的一部分,其他分子可以在此与探针结合。在某些实施方案中,探针的结合位点通过非共价相互作用与另一分子结合。

[0037] 如本文所用,术语“样品”是指从感兴趣的来源获得或衍生的生物样品,如本文所述。在一些实施方案中,感兴趣的来源包括生物体,诸如动物或人。在一些实施方案中,生物样品包括生物组织或流体。在一些实施方案中,生物样品是或包含骨髓;血;血细胞;腹水;组织或细针活检样品;含有细胞的体液;自由漂浮的核酸;痰;唾液;尿液;脑脊液、腹膜液;胸腔积液;粪便;淋巴;妇科液体;皮肤拭子;阴道拭子;口腔拭子;鼻拭子;洗涤剂或灌洗,诸如导管灌洗或支气管肺泡灌洗;抽吸物;刮屑;骨髓标本;组织活检标本;手术标本;粪便、其他体液、分泌物和/或排泄物;和/或来自其的细胞等。在一些实施方案中,生物样品是或包含从个体获得的细胞。在一些实施方案中,样品是通过任何适当的手段直接从感兴趣的来源获得的“初级样品”。例如,在一些实施方案中,初级生物样品通过选自以下的方法获得:活检(例如细针抽吸或组织活检)、外科手术、体液(例如血液、淋巴液、粪便等)收集等。在一些实施方案中,从上下文中可以清楚地看出,术语“样品”是指通过处理初级样品(例如,通过除去其一个或多个组分和/或通过向其添加一种或多种试剂)获得的制备物。例如,使用半渗透膜过滤。此类“处理的样品”可以包含,例如从样品提取的核酸或蛋白质,或通过使初级样品经受诸如mRNA的扩增或逆转录、某些组分的分离和/或纯化等技术而获得的核酸或蛋白质。在一些实施方案中,术语“样品”是指核酸,诸如DNA、RNA、转录物或染色体。在一些实施方案中,术语“样品”是指已从细胞提取的核酸。

[0038] 如本文所用,术语“基本上”是指表现出感兴趣的特征或性质的全部或接近全部的

范围或程度的定性状况。生物领域的普通技术人员将理解,生物和化学现象很少(如果有的话)达到完全和/或进行到完全或实现或避免绝对结果。因此,本文使用术语“基本上”以体现在许多生物和/或化学现象中固有的完全性的潜在缺乏。

[0039] 如本文所公开的,术语“标记物”通常是指可以识别并结合至细胞中分子靶标内的特定靶位点的分子。例如,标记物可以包含能够结合至细胞中的分子靶标的寡核苷酸。寡核苷酸可以与对分子靶标具有亲和力的部分连接。寡核苷酸可以与能够共价连接至分子靶标的第一部分连接。在某些实施方案中,分子靶标包含能够与标记物形成共价连接的第二部分。在具体的实施方案中,标记物包含核酸序列,该核酸序列能够提供对包含或曾包含分子靶标的细胞的鉴定。在某些实施方案中,多个细胞被标记,其中多个细胞中的每个细胞相对于其他标记的细胞具有独特的标记物。

[0040] 如本文所公开的,术语“条形码”通常是指通过本文所述方法产生的标记物的核苷酸序列。条形码序列典型地具有足够的长度和独特性,以鉴定包含分子靶标的单个细胞。

[0041] 如本文所公开的,术语“连接”是指两个分子之间的共价键或非共价相互作用。特别地,非共价相互作用的类型是杂交。

[0042] 如本文所公开的,术语“顺式连接”通常是指同一寡核苷酸上寡核苷酸5'到3'的连接。在某些实施方案中,“顺式连接”是指将寡核苷酸的末端连接在一起。在某些实施方案中,“顺式连接”是指寡核苷酸的一端与该寡核苷酸另一端之前的任何位置处的核苷酸连接。

[0043] 如本文所公开的,术语“反式连接”通常是指寡核苷酸5'至3'与不同寡核苷酸的连接。在某些实施方案中,“反式连接”是指一个寡核苷酸的末端与另一个核苷酸的末端连接在一起。在某些实施方案中,“反式连接”是指寡核苷酸的一个末端与不同寡核苷酸上任何核苷酸处的核苷酸连接。

[0044] 如本文所公开的,术语“夹板探针”或“夹板”或“夹板序列”是指与另一探针互补的探针,该另一探针与互补探针杂交或结合,探针彼此不共价连接。在某些实施方案中,术语“夹板探针”使用Lohman et al. Efficient DNA ligation in DNA-RNA hybrid helices by Chlorella virus DNA ligase. Nucleic Acid Research, 2014, vol. 42 No. 3 1831-1844 的定义和技术,通过引用将其整体并入。

[0045] 实施方案

[0046] 本文的公开内容阐述了用于与指数辐亮度拴系的连锁放大的组合物的实施方案,其包含多个探针。

[0047] 本文的公开内容阐述了用于与指数辐亮度拴系的连锁放大的试剂盒的实施方案,其包含多个探针。

[0048] 本文的公开内容阐述了用于与指数辐亮度拴系的连锁放大的方法的实施方案,其包含多个探针。

[0049] 本文的公开内容阐述了高效且可扩展的信号放大方法,该方法可以应用于多路复用成像,诸如RNA和DNA SeqFISH以及免疫荧光(图1,图3-5)。在一些实施方案中,可以一次进行数十或数百个正交扩增子的放大。

[0050] 相对于其他方法诸如杂交链式反应(HCR),其一次仅允许几个扩增子的扩增,这在来自一个样品的数十或数百个种类进行成像时是极其耗时的,一级、二级、三级、四级和

读出探针的合成比其他化学修饰明显更简单和更低成本,并且容易与现有的酶促探针合成方案相容。

[0051] 在一些实施方案中,提供了用于连接-放大荧光原位杂交的组合物,其包含多个探针,其中组合物包含:一个或多个一级探针,其能够结合一个或多个靶标,其中每个一级探针包含一个或多个二级探针结合位点和任选地一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该组合物包含一个或多个二级探针,其各自能够结合一级探针,其中每个二级探针包含一个或多个三级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,组合物任选地包含一个或多个三级探针,其各自能够结合至二级探针,其中每个三级探针包含一个或多个四级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,组合物任选地包含一个或多个四级探针,其各自能够结合至三级探针,其中每个四级探针包含一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,组合物包含一个或多个读出探针,其能够结合至一个或多个一级、二级、三级或四级探针上的结合位点并且能够被检测。在某些实施方案中,组合物包含能够在探针杂交时或杂交后或在将探针杂交后使一个或多个一级、二级、三级或四级探针稳定化的一个或多个分子。

[0052] 在一些实施方案中,提供了用于与指数辐亮度拴系的连锁放大的试剂盒,其包含多个探针,其中组合物包含:其中每个一级探针包含一个或多个二级探针结合位点和任选地一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,组合物包含一个或多个二级探针,其各自能够结合一级探针,其中每个二级探针包含一个或多个三级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,组合物任选地包含一个或多个三级探针,其各自能够结合至二级探针,其中每个三级探针包含一个或多个四级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,组合物任选地包含一个或多个四级探针,其各自能够结合至三级探针,其中每个四级探针包含一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,组合物包含一个或多个读出探针,该读出探针能够结合至一个或多个一级、二级、三级、四级探针上的结合位点并且能够被检测。在某些实施方案中,试剂盒包含能够在探针杂交时或杂交后或在将探针杂交后使一个或多个一级、二级、三级或四级探针稳定化的一个或多个分子。

[0053] 在一些实施方案中,提供了用于与指数辐亮度拴系的连锁放大的方法,其包括用于与指数辐亮度拴系的连锁放大的方法,其包括以下步骤:将样品与结合一个或多个靶标的一个或多个一级探针接触,其中每个一级探针与靶标杂交。在某些实施方案中,该方法包括将一个或多个二级探针与一级探针杂交;其中每个二级探针包含一个或多个三级探针结合位点或一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该方法任选地包括将一个或多个三级探针与至少一个二级探针杂交;并且其中每个三级探针包含一个或多个四级探针或一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该方法任选地包括将一个或多个四级探针与至少一个三级探针杂交,其中每个四级探针包含一个或多个读出探针结合位点。在某些实施方案中,该方法包括在步骤(i)-(iv)期间或之后使一个或多个一级、二级、三级或四级探针稳定化。在某些实施方案中,该方法包括将能够检测的读出探针与一个或多个读出探针结合位点杂交。在某些实施方案中,该方法包括对细胞进行成像以便检测一级探针与核酸的相互作用。在某些实施方案中,该方法包括任选地重复接触和成像步骤,每次用新的多个可检测地标记的读出探针,其中针对一个靶标的至少一个读出探针与针对同一靶

标的至少一个其他读出探针的不同之处在于它们的可检测部分。在一些实施方案中,个体地或以其任何组合重复任何前述实施方案。

[0054] 样品

[0055] 在一些实施方案中,方法包括分析样品,其中样品包含细菌细胞、古细菌细胞、真核细胞或其组合。在某些实施方案中,样品包含组织、细胞或来自细胞的提取物。在某些实施方案中,样品包含生物膜。在某些实施方案中,样品包含从患者获得的细胞。

[0056] 靶标

[0057] 在一些实施方案中,靶标选自转录物、RNA、DNA基因座、染色体、DNA、蛋白质、脂质、聚糖、细胞靶标、细胞器和其任何组合。在某些实施方案中,转录物、RNA、DNA基因座、染色体、DNA、蛋白质、脂质、聚糖、细胞靶标、细胞器及其任何组合与寡核苷酸缀合。

[0058] 一级、二级、三级和四级探针

[0059] 在一些实施方案中,一级、二级、三级或四级探针包含至少一个读出探针结合位点。在某些实施方案中,在任何前述实施方案中,一级、二级、三级或四级探针包含至少两个读出探针结合位点。在一些实施方案中,在任何前述实施方案中,一级、二级、三级或四级探针包含至少三个读出探针结合位点。在一些实施方案中,在任何前述实施方案中,一级、二级、三级或四级探针包含至少四个读出探针结合位点。在一些实施方案中,在任何前述实施方案中,一级、二级、三级或四级探针包含至少五个读出探针结合位点。在一些实施方案中,在任何前述实施方案中,一级、二级、三级或四级探针包含至少六个读出探针结合位点。在一些实施方案中,在任何前述实施方案中,一级、二级、三级或四级探针包含至少七个读出探针结合位点。在一些实施方案中,在任何前述实施方案中,一级、二级、三级或四级探针包含至少八个读出探针结合位点。在一些实施方案中,在任何前述实施方案中,一级、二级、三级或四级探针包含至少九个读出探针结合位点。在一些实施方案中,在任何前述实施方案中,一级、二级、三级或四级探针包含至少十个读出探针结合位点。

[0060] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级探针包含与靶核酸序列互补的核酸序列。

[0061] 在一些实施方案中,与靶核酸序列互补的序列为至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,序列互补性为至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0062] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级探针包含长度为至少5个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级探针包含长度为至少6个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级探针包含长度为至少7个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级探针包含长度为至少8个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级探针包含长度为至少9个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级探针包含长度为至少10个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级探针包含长度为至少11个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级探针包含长度为至少12个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级探针包含长度为至少13个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级探针包含长度为至少14

14个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的三级探针包含长度为至少15个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的三级探针包含长度为至少16个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的三级探针包含长度为至少17个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的三级探针包含长度为至少18个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的三级探针包含长度为至少19个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的三级探针包含长度为至少20个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的三级探针包含长度为至少21个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的三级探针包含长度小于30、50、100、200、250、500、750或1000个核苷酸的寡核苷酸。

[0065] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少5个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少6个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少7个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少8个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少9个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少10个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少10个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少11个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少12个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少13个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少14个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少15个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少16个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少17个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少18个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少19个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少20个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度为至少21个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的四级探针包含长度小于30、50、100、200、250、500、750或1000个核苷酸的寡核苷酸。

[0066] 在一些实施方案中,二级探针与一级探针上的二级探针结合位点互补。在一些实施方案中,三级探针与二级探针上的二级探针结合位点互补。在一些实施方案中,四级探针与三级探针上的三级探针结合位点互补。在一些实施方案中,探针互补物包含为至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列互补性。

[0067] 在一些实施方案中,一级、二级、三级和四级探针结合位点的长度范围为5-100个核苷酸。在一些实施方案中,一级、二级、三级和四级探针结合位点的长度范围为5-10个核苷酸。在一些实施方案中,一级、二级、三级和四级探针结合位点的长度范围为5-20个核苷酸。在一些实施方案中,一级、二级、三级和四级探针结合位点的长度范围为5-30个核苷酸。在一些实施方案中,一级、二级、三级和四级探针结合位点的长度范围为5-40个核苷酸。在

一些实施方案中,一级、二级、三级和四级探针结合位点的长度范围为5-50个核苷酸。在一些实施方案中,一级、二级、三级和四级探针结合位点的长度范围为5-60个核苷酸。在一些实施方案中,一级、二级、三级和四级探针结合位点的长度范围为5-70个核苷酸。在一些实施方案中,一级、二级、三级和四级探针结合位点的长度范围为5-80个核苷酸。在一些实施方案中,一级、二级、三级和四级探针结合位点的长度范围为5-90个核苷酸。

[0068] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的组合物或试剂盒包含能够结合两个或更多个靶标的两个或更多个一级探针。

[0069] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的组合物或试剂盒包含能够结合一级探针的两个或更多个二级探针,其中每个二级探针包含两个或更多个三级探针结合位点或两个或更多个读出探针结合位点。

[0070] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的组合物或试剂盒包含两个或更多个三级探针,每个三级探针能够结合两个或更多个三级探针结合位点,并且其中每个三级探针包含一个或更多个读出探针结合位点。

[0071] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的试剂盒包含DNA连接酶。

[0072] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的方法包括使样品与结合一个或多个靶标的两个或更多个一级探针接触,其中两个或更多个一级探针与靶标杂交。

[0073] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的方法包括将二级探针与连接的一级探针杂交,其中二级探针包含两个或更多个三级探针结合位点或两个或更多个读出探针结合位点。

[0074] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的方法包括将三级探针与至少两个二级探针杂交;并且其中每个三级探针包含两个或更多个读出探针结合位点。

[0075] 在一些实施方案中,任何前述权利要求的方法包括将能够检测的读出探针与两个或更多个读出探针结合位点杂交。

[0076] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的方法进一步包括重复接触和成像步骤,每次用新的多个可检测标记的读出探针,其中在每个新的多个中,用于一个靶标的至少一个读出探针不同于先前多个中用于相同靶标的至少一个读出探针,其中它们至少在其可检测部分上不同。

[0077] 放大器片段

[0078] 在一些实施方案中,每个二级、每个三级和/或每个四级探针包含至少两个放大器片段。

[0079] 在一些实施方案中,二级探针、二级和三级探针、二级和三级和四级探针、二级和四级探针、三级探针、三级和四级探针,或四级探针包含至少两个放大器片段。

[0080] 在某些实施方案中,二级探针放大器片段至少包含:第一放大器片段,其中第一放大器片段包含与一级探针互补的区域,并且其中该互补区域与一级探针杂交。在某些实施方案中,二级探针放大器片段至少包含:第二放大器片段,其中第二放大器片段包含与一级探针互补的区域,并且其中该互补区域与一级探针杂交。

[0081] 在一些实施方案中,三级探针放大器片段至少包含:第一放大器片段,其中第一放大器片段包含与二级探针或二级探针的第一或第二放大器片段互补的区域,并且其中该互补区域与二级探针或二级探针的第一或第二放大器片段杂交。在某些实施方案中,三级探

针放大器片段包含至少第二放大器片段,其中第二放大器片段包含与二级探针或二级探针的第一或第二放大器片段互补的区域,并且其中该互补区域与二级探针或二级探针的第一或第二放大片段杂交。

[0082] 在一些实施方案中,四级探针放大器片段至少包含:第一放大器片段,其中第一放大器片段包含与三级探针或三级探针的第一或第二放大器片段互补的区域,并且其中该互补区域与三级探针或三级探针的第一或第二片段杂交。在一些实施方案中,四级探针放大器片段包含第二片段,其中第二片段包含与三级探针或三级探针的第一或第二放大器片段互补的区域,并且其中该互补区域与三级探针或三级探针的第一或第二片段杂交。

[0083] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的组合物、试剂盒或方法包含连接任何二级、三级或四级放大器片段的第一或第二片段的连接酶。

[0084] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少5个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少6个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少7个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少8个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少9个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少10个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少11个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少12个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少13个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少14个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少15个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少16个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少17个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少18个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少19个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少20个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度为至少21个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的放大器片段包含长度小于30、50、100、200、250、500、750或1000个核苷酸的寡核苷酸。

[0085] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少5个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少6个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少7个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少8个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少9个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少10个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少11个核苷酸的任何

前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少12个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少13个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少14个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少15个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少16个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少17个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少18个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少19个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少20个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度为至少21个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含长度小于30、50、100、200、250、500、750或1000个核苷酸的任何前述实施方案的寡核苷酸的区域。

[0086] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的互补区域包含为至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列互补性。

[0087] 夹板序列

[0088] 在一些实施方案中,任何实施方案的组合物、试剂盒或方法包含夹板序列。

[0089] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的每个夹板序列包含长度为至少5个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少6个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少7个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少8个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少9个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少10个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少10个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少11个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少12个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少13个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少14个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少15个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少16个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少17个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少18个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少19个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度为至少20个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板

序列包含长度为至少21个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列包含长度小于30、50、100、200、250、500、750或1000个核苷酸的寡核苷酸。

[0090] 在一些实施方案中,夹板序列与第一放大器片段、第二放大器片段,或者二级、三级或四级放大器片段的两个放大器片段杂交。

[0091] 在某些实施方案中,夹板序列包含至少两个夹板序列片段。

[0092] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少5个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少6个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少7个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少8个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少9个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少10个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少10个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少11个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少12个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少13个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少14个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少15个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少16个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少17个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少18个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少19个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少20个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度为至少21个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的夹板序列片段包含长度小于30、50、100、200、250、500、750或1000个核苷酸的寡核苷酸。

[0093] 在一些实施方案中,将夹板序列片段连接。

[0094] 探针的稳定化

[0095] 在一些实施方案中,该方法包括使一级、二级、三级探针或四级探针稳定化。在一些实施方案中,该方法包括使一级探针稳定化。在一些实施方案中,该方法包括使二级探针稳定化。在一些实施方案中,该方法包括使三级探针稳定化。在一些实施方案中,该方法进一步包括使四级探针稳定化。

[0096] 在一些实施方案中,通过选自以下的方法使探针稳定化:酶连接、化学连接、使用或不使用寡聚夹板探针的UV交联、夹板探针的杂交、通过基质的交联和化学交联,或其任何组合。在某些实施方案中,用于酶连接的酶选自T4连接酶、T7连接酶、快速连接酶、T3连接酶和ampligase。在某些实施方案中,化学连接选自包含胺-磷酸酯、二胺和硫醇连接。在某些实施方案中,通过基质的交联包含由聚丙烯酰胺或琼脂糖制成的水凝胶。在某些实施方案中,用于稳定化的化学交联选自多聚甲醛、戊二醛和可逆交联剂诸如DSP(二硫代双琥珀酰亚胺基丙酸酯,dithiobis succinimidyl propionate)。在某些实施方案中,夹板探针包含

锁核酸 (LNA) 或肽核酸 (PNA)。

[0097] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针通过一个或多个另外的分子,诸如寡核苷酸探针、LNA或PNA,或蛋白质、分子复合物或小化学分子顺式连接。

[0098] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针直接地或通过中间分子间接地UV顺式连接。

[0099] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针直接地或通过中间分子来与细胞或样品基质顺式连接。在某些实施方案中,任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针使用包含多聚甲醛、戊二醛或可逆交联剂的化学交联剂顺式连接。在某些实施方案中,任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针使用包含天然组织基质、组织基质或外源性基质的基质顺式连接。在某些实施方案中,外源性基质包含水凝胶。

[0100] 在一些实施方案中,在下一轮探针杂交之前,使任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针稳定化。在某些实施方案中,在剥离步骤之前使任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针稳定化。

[0101] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针通过使用连接酶连接。在某些实施方案中,探针以顺式或反式连接。在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针是顺式连接的。在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针是反式连接的。

[0102] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针通过丙烯酰胺聚合作用顺式连接。

[0103] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针通过点击化学顺式连接。

[0104] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一级、二级、三级或四级探针通过反应基团顺式连接,其中反应基团形成选自烯烃、炔烃、叠氮化物、酰胺、胺、硝酮、磷酸酯、四嗪和四唑的反应对。

[0105] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的方法使用连接或交联的一级探针。在一些实施方案中,任何前述实施方案的方法包含顺式或反式连接或交联的一级探针。

[0106] 在一些实施方案中,将任何前述实施方案的一级、二级或三级探针连接或交联。

[0107] 在一些实施方案中,将任何前述实施方案的一级、二级或三级探针顺式连接。

[0108] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的酶包含DNA或RNA连接酶,或DNA聚合酶或RNA聚合酶,和或上述任何的组合。

[0109] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的试剂盒包含DNA连接酶。

[0110] 荧光团

[0111] 在一些实施方案中,任何实施方案的组合物、试剂盒或方法包含可检测部分。在一些实施方案中,前述实施方案中的任一者的组合物、试剂盒或方法包含至少两种不同的可检测部分。在某些实施方案中,可检测部分是相同的。

[0112] 在一些实施方案中,可检测部分是本领域技术人员认为合适的任何荧光团。

[0113] 在一些实施方案中,可检测部分包括但不限于荧光素、罗丹明、Alexa Fluors、DyLight fluors、ATTO染料或其任何类似物或衍生物。在某些实施方案中,可检测部分包括

但不限于荧光素和荧光素的化学衍生物;曙红;羧基荧光素;异硫氰酸荧光素 (FITC);荧光素酰胺 (Fluorescein amidite, FAM);赤藓红;玫瑰孟加拉红;铜绿假单胞菌分泌的荧光素;亚甲蓝;激光染料;罗丹明染料 (例如,罗丹明、罗丹明6G、罗丹明B、罗丹明123、金胺0、磺基罗丹明101、磺基罗丹明B和德克萨斯红)。

[0114] 在一些实施方案中,可检测部分包括但不限于ATTO染料;吖啶染料 (例如吖啶橙、吖啶黄);Alexa Fluor;7-氨基放线菌素D;8-苯胺基萘-1-磺酸盐 (8-Anilinonaphthalene-1-sulfonate);金胺-罗丹明染色剂;苯并蒽酮;5,12-双(苯乙炔基)并四苯;9,10-双(苯乙炔基)蒽;黑光漆 (Blacklight paint);脑彩虹 (Brainbow);钙黄绿素;羧基荧光素;羧基荧光素二乙酸酯琥珀酰亚胺酯 (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester);羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (Carboxyfluorescein succinimidyl ester);1-氯-9,10-双(苯乙炔基)蒽;2-氯-9,10-双(苯乙炔基)蒽;2-氯-9,10-二苯基蒽;香豆素;花青染料 (例如,青色素诸如Cy3和Cy5、DiOC6、SYBR Green I);DAPI、Dark Quencher、Dylight Fluor、Fluo-4、FluoProbes;荧光酮染料 (例如钙黄绿素、羧基荧光素、羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯、羧基荧光素琥珀酰亚胺酯、曙红、曙红B、曙红Y、赤藓红、荧光素、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate)、fluorescein amidite、印度黄、汞溴红);Fluoro-Jade染色剂;Fura-2;Fura-2-乙酰氧基甲酯;绿色荧光蛋白、Hoechst染色剂、印度黄、Indo-1、荧光黄 (Lucifer yellow)、萤光素 (Luciferin)、部花青、光学增亮剂、恶嗪染料 (例如甲酚紫、尼罗蓝、尼罗红);二萘嵌苯;菲啶染料 (溴化乙锭和碘化丙啶);荧光桃红、藻胆素、藻红蛋白、藻红素、Pyranine、罗丹明、罗丹明123、罗丹明6G、RiboGreen、RoGFP、红荧烯 (Rubrene)、SYBR Green I、(E)-均二苯代乙烯 ((E)-Stilbene)、(Z)-均二苯代乙烯 ((Z)-Stilbene)、磺基罗丹明101、磺基罗丹明B、Synapto-pHluorin、四苯基丁二烯、三(红菲绕啉二磺酸)四钠钌(II) (Tetrasodium tris(bathophenanthroline disulfonate) ruthenium(II))、德克萨斯红、TSQ、伞形酮或黄色荧光蛋白。

[0115] 在一些实施方案中,可检测部分包括但不限于Alexa Fluor家族的荧光染料 (Molecular Probes, Oregon)。Alexa Fluor染料广泛用作荧光显微术和细胞生物学中的细胞和组织标记物。Alexa Fluor系列的激发和发射光谱覆盖可见光谱并延伸至红外区。该家族的个体成员大致根据其激发最大值 (以nm为单位) 进行编号。某些Alexa Fluor染料通过香豆素、罗丹明、氧杂蒽 (诸如荧光素) 和花青染料的磺化合成。在一些实施方案中,磺化使得Alexa Fluor染料带负电荷且亲水。在一些实施方案中,Alexa Fluor染料比激发和发射相当的普通染料 (例如荧光素、罗丹明) 以及在某种程度上比更新的青色素系列更稳定、更明亮并且对pH更不敏感。示例性的Alexa Fluor染料包括但不限于Alexa-350、Alexa-405、Alexa-430、Alexa-488、Alexa-500、Alexa-514、Alexa-532、Alexa-546、Alexa-555、Alexa-568、Alexa-594、Alexa-610、Alexa-633、Alexa-647、Alexa-660、Alexa-680、Alexa-700或Alexa-750。

[0116] 在一些实施方案中,可检测部分包含Dylight Fluor家族的荧光染料 (Dyomics和Thermo Fisher Scientific) 中的一个或多个。示例性的Dylight Fluor家族染料包括但不限于DyLight-350、DyLight-405、DyLight-488、DyLight-549、DyLight-594、DyLight-633、DyLight-649、DyLight-680、DyLight-750或Dylight-800。

[0117] 在一些实施方案中,可检测部分包含纳米材料。在一些实施方案中,荧光团是纳米

颗粒。在一些实施方案中,可检测部分是或包含量子点。在一些实施方案中,荧光团是量子点。在一些实施方案中,可检测部分包含量子点。在一些实施方案中,可检测部分是或包含金纳米颗粒。在一些实施方案中,可检测部分是金纳米颗粒。在一些实施方案中,可检测部分包含金纳米颗粒。

[0118] 读出探针

[0119] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一个或多个读出探针包含具有可检测部分的寡核苷酸或抗体。

[0120] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一个或多个读出探针包含具有相同序列的寡核苷酸。

[0121] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一个或多个读出探针包含具有不同序列的寡核苷酸。

[0122] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的一个或多个读出探针包含长度为至少17个核苷酸的寡核苷酸。

[0123] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少5个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少10个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少11个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少12个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少13个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少14个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少15个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少16个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少17个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少18个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少19个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少20个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度为至少21个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,任何前述实施方案的读出探针包含长度小于30、50、100、200、250、500、750或1000个核苷酸的寡核苷酸。

[0124] 在一些实施方案中,读出探针与一级探针上的读出探针结合位点互补。在一些实施方案中,读出探针与二级探针上的读出探针结合位点互补。在一些实施方案中,读出探针与三级探针上的读出探针结合位点互补。在一些实施方案中,读出探针与四级探针上的读出探针结合位点互补。在一些实施方案中,读出探针与夹板序列片段互补。在一些实施方案中,探针互补物包含为至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列互补性。

[0125] 在一些实施方案中,读出探针结合位点的长度范围为5-100个核苷酸。在一些实施方案中,读出探针结合位点的长度范围为5-10个核苷酸。在一些实施方案中,读出探针结合位点的长度范围为5-20个核苷酸。在一些实施方案中,读出探针结合位点的长度范围为5-30个核苷酸。在一些实施方案中,读出探针结合位点的长度范围为5-40个核苷酸。在一些实施方案中,读出探针结合位点的长度范围为5-50个核苷酸。在一些实施方案中,读出探针结

合位点的长度范围为5-60个核苷酸。在一些实施方案中,读出探针结合位点的长度范围为5-70个核苷酸。在一些实施方案中,读出探针结合位点的长度范围为5-80个核苷酸。在一些实施方案中,读出探针结合位点的长度范围为5-90个核苷酸。

[0126] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的组合物或试剂盒包含两个或多个读出探针,该读出探针能够结合至一个或多个读出探针结合位点中的至少一个并能够被检测。

[0127] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的组合物或试剂盒包含两个或多个读出探针,该读出探针能够结合至一个或多个读出探针结合位点中的至少一个并能够被检测。

[0128] 样品成像

[0129] 在一些实施方案中,该方法包括对探针或条形码进行成像。在一些实施例中,该方法包括对目标探针或条形码进行成像。如本领域普通技术人员所理解的,不同的技术可以用于成像步骤。

[0130] 在一些实施方案中,成像方法包括但不限于落射荧光显微术、共焦显微术、不同类型的超分辨率显微术(PALM/STORM/SSIM/GSD/STED)和光片显微术(SPIM等)。

[0131] 在一些实施方案中,成像方法包括示例性的超分辨率技术,包括但不限于 I^5M 和4Pi显微术、受激发射损耗显微术(STEDM)、基态损耗显微术(GSDM)、空间结构化照明显微术(SSIM)、光激活定位显微术(PALM)、可逆可饱和光学线性荧光跃迁(RESOLFT)、全内反射荧光显微术(TIRFM)、荧光PALM(FPALM)、随机光学重建显微术、单纳米精度的荧光成像(FIONA)及其组合。例如:Chi,2009“Super-resolution microscopy:breaking the limits,”Nature Methods 6(1):15-18;Blow 2008,“New ways to see a smaller world,”Nature 456:825-828;Hell,et al,2007,“Far-Field Optical Nanoscopy,”Science 316:1153;R.Heintzmann and G.Ficz,2006,“Breaking the resolution limit in light microscopy,”Briefings in Functional Genomics and Proteomics 5(4):289-301;Garini et al.,2005,“From micro to nano:recent advances in high-resolution microscopy,”Current Opinion in Biotechnology 16:3-12;和Bewersdorf et al,2006,“Comparison of I^5M and 4Pi-microscopy,”222(2):105-117;和Wells,2004,“Man the Nanoscopes,”JCB 164(3):337-340。

[0132] 在一些实施方案中,电子显微镜(EM)用于成像。

[0133] 在一些实施方案中,成像步骤检测靶标。在一些实施方案中,成像步骤定位靶标。在一些实施方案中,成像步骤提供靶标的三维空间信息。在一些实施方案中,成像步骤量化靶标。通过使用多个接触和成像步骤,提供的方法能够以出人意料的高通量提供大量靶标的空间和/或定量信息。例如,当使用F个可检测的不同类型的标记物时,在N次接触和成像步骤之后可以获得多达 F_N 个靶标的空间和/或定量信息。

[0134] 用于成像的某些技术是本领域已知的。参见例如,于2014年4月30日提交、名称为“MULTIPLEX LABELING OF MOLECULES BY SEQUENTIAL HYBRIDIZATION BARCODING”的国际PCT专利申请号PCT/US2014/036258,出于所有目的,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0135] 在一些实施方案中,该方法包括分析细胞尺寸和形状、标志物、免疫荧光测量或其任何组合。

[0136] 除去探针

[0137] 在一些实施方案中,任何前述实施方案的方法包括在每个步骤后洗涤样品。在某

些实施方案中,用除去非特异性杂交反应的缓冲液洗涤样品。在某些实施方案中,在洗涤步骤中使用甲酰胺。在某些实施方案中,洗涤缓冲液是严格的。在某些实施方案中,洗涤缓冲液包含10%甲酰胺、2xSSC和0.1% triton X-100。

[0138] 在一些实施方案中,该方法包括在一个或多个成像步骤之后除去一个或多个探针的步骤。在一些实施方案中,除去探针的步骤包括使多个读出探针与消化探针的酶接触。在一些实施方案中,除去步骤包括使多个探针与DNA酶接触、使多个探针与RNA酶接触、光漂白、链置换、甲酰胺洗涤、热变性、化学变性、切割或其组合。在一些实施方案中,去除步骤包括光漂白以去除探针。

[0139] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在一个或多个成像步骤之后除去读出探针。在一些实施方案中,该方法包括除去步骤,该除去步骤包括使多个读出探针与消化读出探针的酶接触。在一些实施方案中,该方法包括通过使用剥离试剂、洗涤缓冲液、光漂白、化学漂白及其任何组合来除去读出探针。在一些实施方案中,该方法包括使多个靶读出探针与DNA酶接触、使多个靶探针与RNA酶接触、光漂白、链置换、甲酰胺洗涤、热变性或其组合。在一些实施方案中,通过光漂白除去靶读出探针。

[0140] 在一些实施方案中,该方法包括澄清样品。在一些实施方案中,通过CLARITY澄清样品。在一些实施方案中,在水凝胶包埋后澄清样品。

[0141] 用于除去探针的某些技术是本领域已知的。于2014年4月30日提交、名称为“MULTIPLEX LABELING OF MOLECULES BY SEQUENTIAL HYBRIDIZATION BARCODING”的国际PCT专利申请号PCT/US2014/036258,出于所有目的,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0142] 提供以下非限制性方法以进一步说明本文所公开的发明的实施方案。本领域技术人员应理解,在下面的实施例中公开的技术代表了已经发现在本发明的若干实施方案的实践中很好地发挥功能的方法,并且因此被认为构成其实践模式的实施例。然而,根据本公开,本领域技术人员应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以在所公开的具体实施方案中进行许多改变,并且仍然获得相同或类似的结果。

[0143] 方法

[0144] 探针设计与合成

[0145] 将基因或抗体条形码特异性一级探针设计为靶向感兴趣的RNA或DNA序列,这在FISH领域中是常见的。通常,使用25-35个核苷酸的互补区。对于RNA FISH,为每个转录物设计10-30个核苷酸的这些。

[0146] 为代替直接读出探针位点,一级探针携带用于第一轮放大锁式探针的1-4位点(以下称为‘A’序列),以及可以用于杂交夹板以进行连接的5’和3’共同序列。

[0147] 合成了三个5’-磷酸化放大探针池。第一池(二级探针)结合至一级探针上的‘A’序列,并显示‘B’序列的多个重复。第二池(三级探针)结合至‘B’序列,并显示‘A’序列的多个重复。第三池(读出探针)结合至‘A’序列或‘B’序列,并显示荧光缀合读出探针的结合位点。

[0148] 放大方案

[0149] 可以进行任选的样品的预澄清,诸如通过8% SDS或Triton X-100在室温达30分钟,或通过乙醇或甲醇在-20℃达1-24小时。

[0150] 将一级探针或抗体与正常用于smFISH的样品例如在标准杂交或标准免疫荧光封闭缓冲液中温育。

[0151] 如果一级探针是5'-磷酸化的,则它们通过连接酶连接。

[0152] 如果一级探针具有5' 丙烯酰胺 (acrydite) 基团,则将样品包埋在聚丙烯酰胺凝胶中。聚合后,进行样品的消化/澄清,例如在37℃用蛋白酶K在1% SDS/50mM Tris HCl/2mM CaCl₂中达1-24小时。

[0153] 将样品用二级和三级探针重复杂交、洗涤、稳定化、连接和洗涤,然后用读出寡核苷酸读出。

[0154] 可以将放大的样品任选地进行后固定。此步骤可以确保在甲酰胺剥离和再杂交的许多成像轮中放大的稳定性。

[0155] 成像

[0156] 然后,在RT-37℃,在合适的缓冲液(例如10%碳酸亚乙酯、4xSSC和10%6.5-10kDa 硫酸葡聚糖)中,将化学缀合的荧光读出探针直接或使用短桥与每个读出适体上的独特10-17核苷酸序列杂交5-40分钟,然后是温和洗剂(诸如10%甲酰胺、2xSSC和0.1% triton X-100),然后是核染色剂(诸如DAPI)。

[0157] 在通常由4Xssc、25mM Tris HCl、葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶和Trolox组成的抗漂白缓冲系统中,使用适当的滤光器组和激光照明,如在正常smFISH中一样进行成像。通常,激光功率为50-500mW,并且物镜在20x和100x之间,用于配备有sCMOS相机的共聚焦或宽场显微镜上。重要的是,放大允许显著缩短每个Z切片的曝光时间,在转盘式共聚焦显微镜上低至10ms,这显著降低了背景信号。或者,可以使用宽场设置来将组织样品中的smFISH进行成像,这通常需要共聚焦成像。

[0158] 荧光读出探针通过60%或更少的甲酰胺洗涤进行剥离,使用5-10个核苷酸的立足点进行链置换或不进行链置换。链置换可以有助于完全消除来自较高GC含量读出序列的荧光信号。

[0159] 实验1

[0160] 本文公开的方法使用DNA一级探针或DNA缀合的抗体原位或体外靶向感兴趣的核酸或蛋白质,DNA一级探针或DNA缀合的抗体可以连接到环状单链DNA(ssDNA)中或交联到聚丙烯酰胺凝胶中并含有二级探针结合位点。

[0161] 举例来说,一级结合位点(图1)与ssDNA一级探针杂交,该探针可以含有锁核酸(LNA)或其他修饰的寡核苷酸以具有更高的亲和力。

[0162] 一级探针在5'末端通过磷酸(其允许通过DNA连接酶共价环化)或丙烯酰胺(其允许自由基聚合成聚丙烯酰胺交联)修饰。此连接/聚合步骤在后续轮的杂交和洗涤期间将一级探针与靶核苷酸的结合稳定化。

[0163] 使用酶来连接探针比设计使用点击化学来连接探针具有若干优势。酶连接允许更大的特异性,因为探针的两端必须彼此紧邻以进行连接。相反,点击化学通常会连接不相邻探针的末端。酶连接的使用确保了放大是非常特异的。更进一步,酶的使用允许廉价地大量产生用于实验的寡核苷酸。利用点击化学的单个探针通常以每个探针大约1000美元购买。

[0164] 接下来,将具有5'-磷酸化修饰的锁式二级探针与一级探针内的一个或若干个二级结合位点杂交,并且然后用DNA连接酶连接。这些二级探针含有两个或更多个三级探针结合位点。在二级探针的杂交和连接之后,将具有5'-磷酸化修饰的锁式三级探针与二级探针内的两个或更多个三级结合位点杂交,然后用DNA连接酶连接。这些三级探针含有两个或更

多个二级探针结合位点。

[0165] 重要的是,上述步骤可以进行迭代。由于二级和三级探针携带两个或更多个二级或三级探针结合位点,所以步骤的迭代允许二级和三级探针的指数放大。例如,分别与两个探针结合位点的两轮二级和三级探针杂交和连接各自可以将一个二级探针结合位点放大至二级探针结合位点的 $2^4=16$ 。二级和三级探针杂交和连接的附加步骤理论上可以将读出探针结合位点的数量增加数千倍;在实践中,实现了几百次(图1和图6E)。

[0166] 在期望次数的迭代之后,类似地杂交和连接具有5'末端磷酸化修饰的锁式探针,其含有多个读出探针结合位点。然后通过荧光团缀合的17-nt或更短的读出探针使读出结合位点可视化,相比于直接来自一级探针的那些,这提供了指数放大的信号。可以通过使用60%或更低的甲酰胺溶液将来自读出探针的荧光信号剥离,而不影响一级探针和锁式结构(图1)。

[0167] 通过制备二级、三级和读出探针序列的正交组,可以对细胞、组织、整装样品或提取的体外样品中的许多感兴趣的核酸或蛋白质种类进行信号放大(图2)。由于序列是正交的并且彼此不交叉杂交,所以对于许多靶标的这种放大过程可以一次一起实现(图2)。多路复用放大可以用非条形码化SeqFISH(其中个体靶标逐个依序成像)或条形码化SeqFISH(其中分配到个体靶标的颜色或伪彩色在多层条形码化杂交中发生变化)来实施。例如,通过4次条形码化轮,每轮20个伪彩色($20^4=160,000$)可以检测超过20,000个基因。

[0168] 我们已经发现LANTERN与常规smFISH检测到的点之间,以及两种不同的LANTERN放大器之间具有良好的一致性(图2,中间和右边以及图3)。除RNA FISH外,LANTERN可以用于放大基因组DNA FISH信号(图4)和来自DNA缀合抗体的蛋白质信号(图5)。此外,我们已经应用LANTERN以放大多种组织和细胞类型(诸如小鼠脑、人乳腺癌活检和整装鸡胚胎)中的RNA FISH信号(图6)。LANTERN与聚丙烯酰胺水凝胶包埋方案高度相容,并且可以在包埋和澄清样品之前或之后进行。

[0169] 与现有的放大方法相比,该方法具有以下优点。由于一级、二级和三级探针是物理缠结的(图1B),所以LANTERN放大的信号可以在多层读出探针杂交和剥离中稳定地可视化。相反,在几轮读出探针杂交和剥离之后,来自其他扩增方法(诸如分支DNA扩增方法)的信号可能减少。

[0170] 放大水平由轮数和探针上连续轮数的结合位点的数量确定,这与本质上是随机的诸如滚环扩增(RCA)和杂交链式反应(HCR)的方法不同。

[0171] 可能由于dsDNA纳米结构的刚性,放大的信号在几轮中高度稳定(图1)。我们发现,在通过图像对齐对不完美的平台移动进行校正后,可以使用高斯拟合来将高度放大的RNA FISH点的中心定位至12次再杂交间(即约10小时实时)的X和Y方向上约3nm的均方根精度。

[0172] 参考文献

[0173] 以下参考文献通过其整体并入。

[0174] Agouridas, V., El Mahdi, O., Diemer, V., **Cargoët, M.**, Monbaliu, J. M., & Melnyk, O. (2019). Native Chemical Ligation and Extended Methods: Mechanisms, Catalysis, Scope, and Limitations. *Chemical Reviews*, 119 (12). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00712>

[0175] Bauer, R. J., Zhelkovsky, A., Bilotti, K., Crowell, L. E., Evans, T. C., Jr.,

McReynolds, L.A., & Lohman, G.J.S. (2017). Comparative analysis of the end-joining activity of several DNA ligases. *PloS One*, 12(12), e0190062.

[0176] Bharti, A., Rashmi, T., Pankaj, A., & Rohit, B. (2017). Chemical Crosslinking: Role in Protein and Peptide Science. *Current Protein & Peptide Science*, 18(9), 946-955.

[0177] Bi, X., & Liang, A. (2016). Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels. In *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*. IntechOpen.

[0178] Braasch, D.A., & Corey, D.R. (2001). Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chemistry & Biology*, 8(1). [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(00\)00058-2](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(00)00058-2)

[0179] Chen, F., Tillberg, P.W., & Boyden, E.S. (2015). Expansion microscopy. *Science*, 347(6221), 543-548.

[0180] Chen, F., Wassie, A.T., Cote, A.J., Sinha, A., Alon, S., Asano, S., Daugharthy, E.R., Chang, J.B., Marblestone, A., Church, G.M., Raj, A., & Boyden, E.S. (2016). Nanoscale imaging of RNA with expansion microscopy. *Nature Methods*, 13(8). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3899>

[0181] Chen, H., Du, F., Chen, G., Streckenbach, F., Yasmeen, A., Zhao, Y., & Tang, Z. (2014). Template-directed Chemical Ligation to Obtain 3'-3' and 5'-5' Phosphodiester DNA Linkages. *Scientific Reports*, 4(1), 1-6. Cross-link. (n.d.). Retrieved May 4, 2021, from <https://en.wikipedia.org/wiki/Cross-link>

[0182] El-Sagheer, A.H., & Brown, T. (2017). Single tube gene synthesis by phosphoramidate chemical ligation. *Chemical Communications*, 53(77), 10700-10702.

[0183] Eng, C.-H.L., Lawson, M., Zhu, Q., Dries, R., Koulana, N., Takei, Y., Yun, J., Cronin, C., Karp, C., Yuan, G.-C., & Cai, L. (2019). Transcriptome-scalesuper-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH. *Nature*, 568(7751), 235-239.

[0184] Eng, C.-H.L., Shah, S., Thomassie, J., & Cai, L. (2017). Profiling the transcriptome with RNA SPOTs. *Nature Methods*, 14(12), 1153-1155.

[0185] Ghesquière, J., Gauthier, N., De Winter, J., Gerbaux, P., Moucheron, C., Defrancq, E., & Kirsch-De, M.A. (2012). Photocrosslinking between peptide-peptide or peptide-oligonucleotide by Ru(II)-TAP complexes. *Chemistry*, 18(1). <https://doi.org/10.1002/chem.201101458>

[0186] Haque, M.M., & Peng, X. (2013). DNA-associated click chemistry. *Science China. Chemistry*, 57(2), 215-231.

[0187] Jin, J., Vaud, S., Zhelkovsky, A.M., Posfai, J., & McReynolds, L.A. (2016). Sensitive and specific miRNA detection method using SplintR Ligase. *Nucleic Acids Research*, 44(13). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw399>

[0188] Lubeck, E., Coskun, A.F., Zhiyentayev, T., Ahmad, M., & Cai, L. (2014). Single-

cell in situ RNA profiling by sequential hybridization. *Nature Methods*, 11(4), 360-361.

[0189] Nichols, N.M., Tabor, S., & McReynolds, L.A. (2008). RNA ligases. *Current Protocols in Molecular Biology*/Edited by Frederick M. Ausubel... [et al.], Chapter 3. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0315s84>

[0190] Nowak-Karnowska, J., Zielińska, K., Milecki, J., & Skalski, B. (2021). Thermally reversible and irreversible interstrand photocrosslinking of 5-chloro-2'-deoxy-4-thiouridine modified DNA oligonucleotides. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 19(6), 1292-1295.

[0191] Pellestor, F., & Paulasova, P. (2004). The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 12(9), 694-700.

[0192] Shah, S., Lubeck, E., Schwarzkopf, M., He, T.-F., Greenbaum, A., Sohn, C.H., Lignell, A., Choi, H.M.T., Gradinaru, V., Pierce, N.A., & Cai, L. (2016). Single-molecule RNA detection at depth by hybridization chain reaction and tissue hydrogel embedding and clearing. *Development*, 143(15), 2862.

[0193] Shah, S., Lubeck, E., Zhou, W., and Cai, L. (2016). In Situ Transcription Profiling of Single Cells Reveals Spatial Organization of Cells in the Mouse Hippocampus. *Neuron*, 92(2), 342-357.

[0194] Shah, S., Takei, Y., Zhou, W., Lubeck, E., Yun, J., Eng, C.-H.L., Koulina, N., Cronin, C., Karp, C., Liaw, E.J., Amin, M., & Cai, L. (2018). Dynamics and Spatial Genomics of the Nascent Transcriptome by Intron seqFISH. *Cell*, 174(2), 363-376.e16.

[0195] Shuman, S. (2009). DNA Ligases: Progress and Prospects. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(26), 17365.

[0196] Tillberg, P.W., Chen, F., Piatkevich, K.D., Zhao, Y., Yu, C.-C. (Jay), English, B.P., Gao, L., Martorell, A., Suk, H.-J., Yoshida, F., DeGennaro, E.M., Roossien, D.H., Gong, G., Seneviratne, U., Tannenbaum, S.R., Desimone, R., Cai, D., & Boyden, E.S. (2016). Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies. *Nature Biotechnology*, 34(9), 987-992.

[0197] Yang, B., Treweek, J.B., Kulkarni, R.P., Deverman, B.E., Chen, C.-K., Lubeck, E., Shah, S., Cai, L., & Gradinaru, V. (2014). Single-Cell Phenotyping within Transparent Intact Tissue Through Whole-Body Clearing. *Cell*, 158(4), 945.

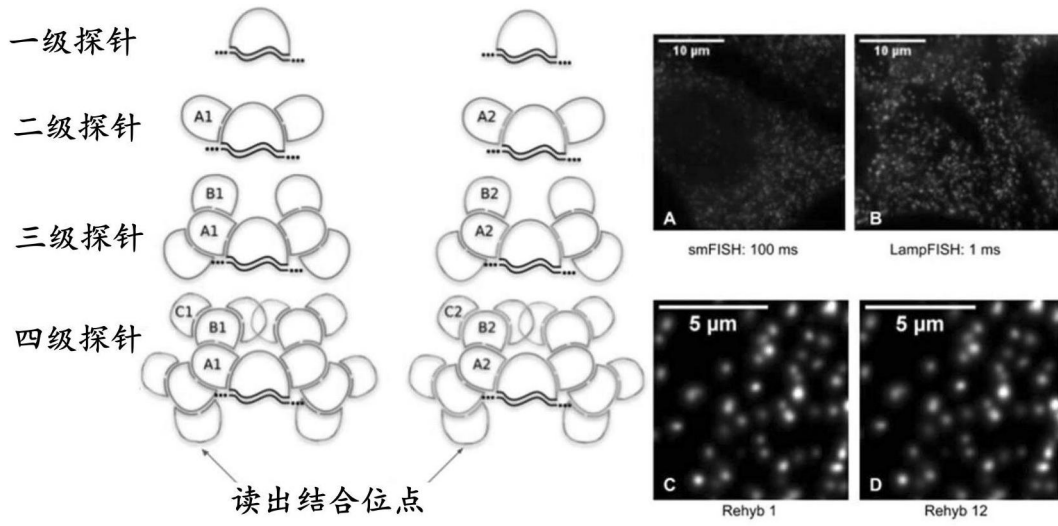


图1

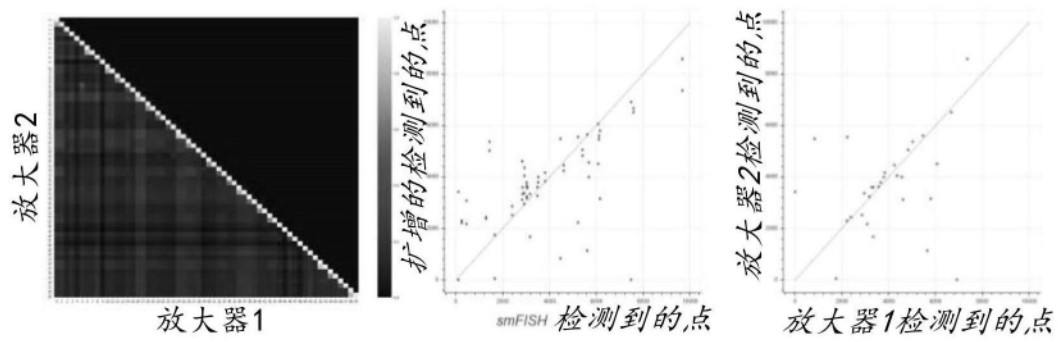


图2

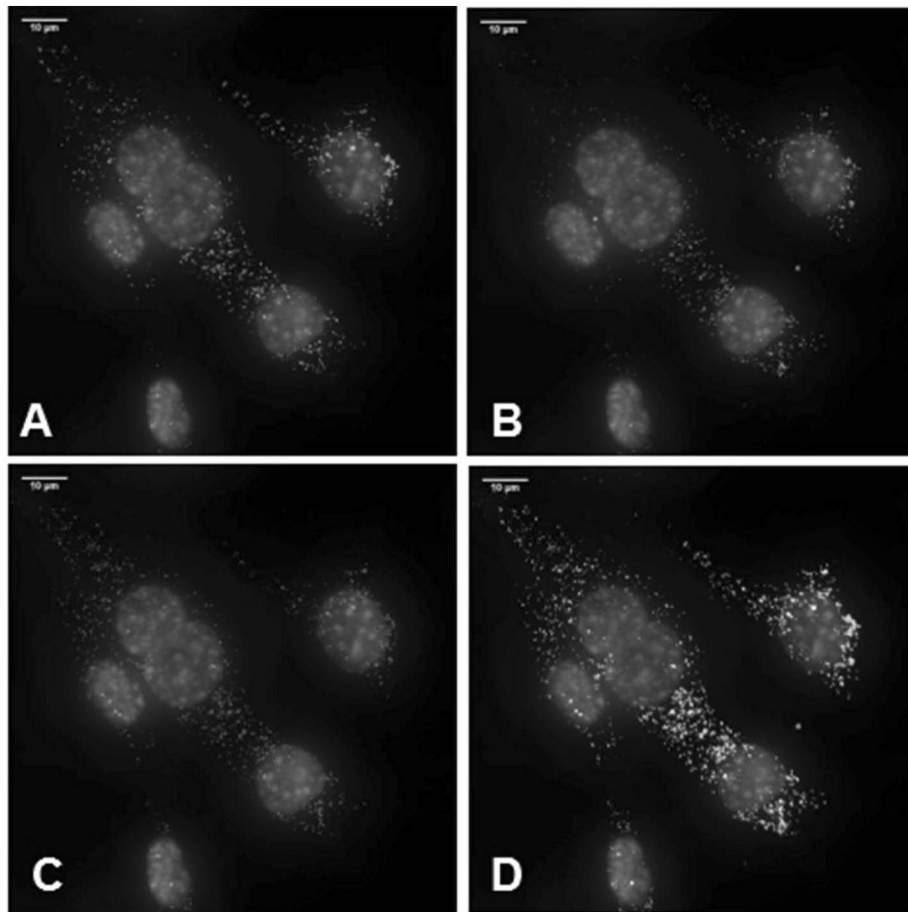


图3

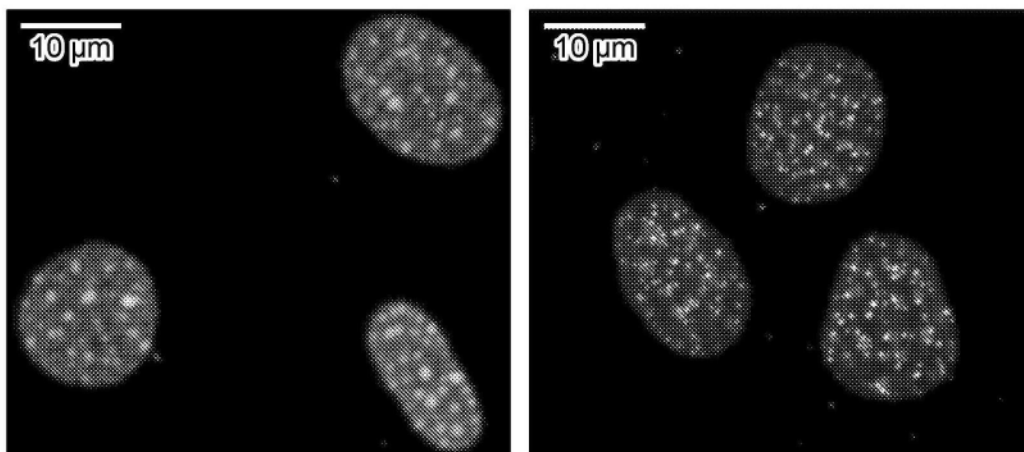


图4

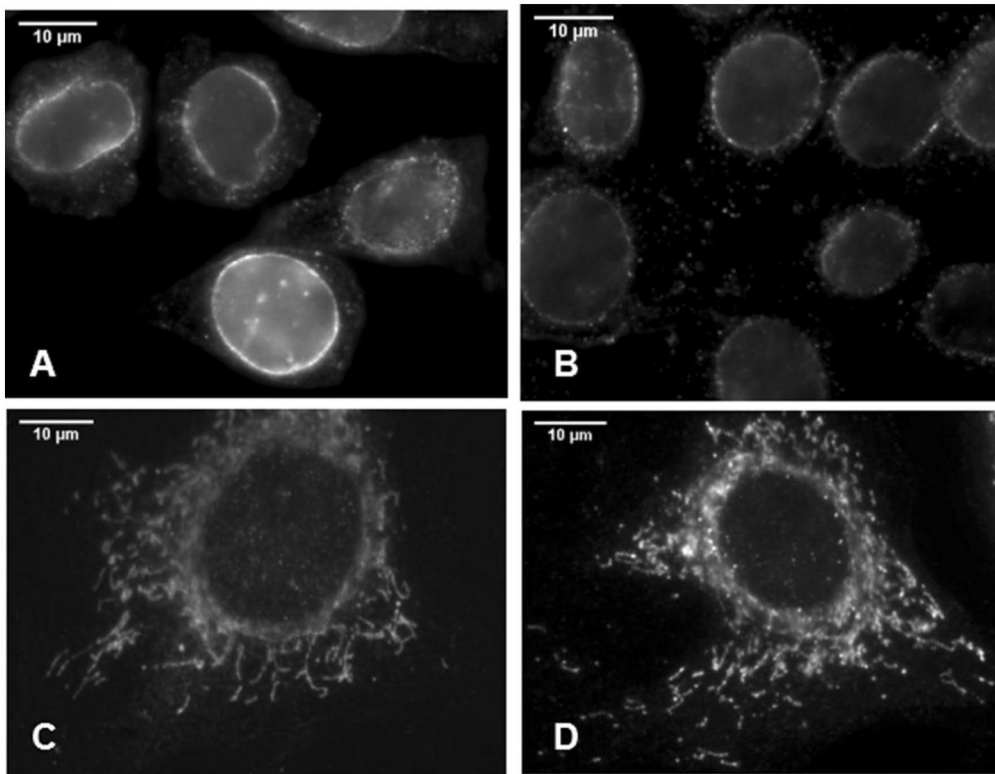


图5

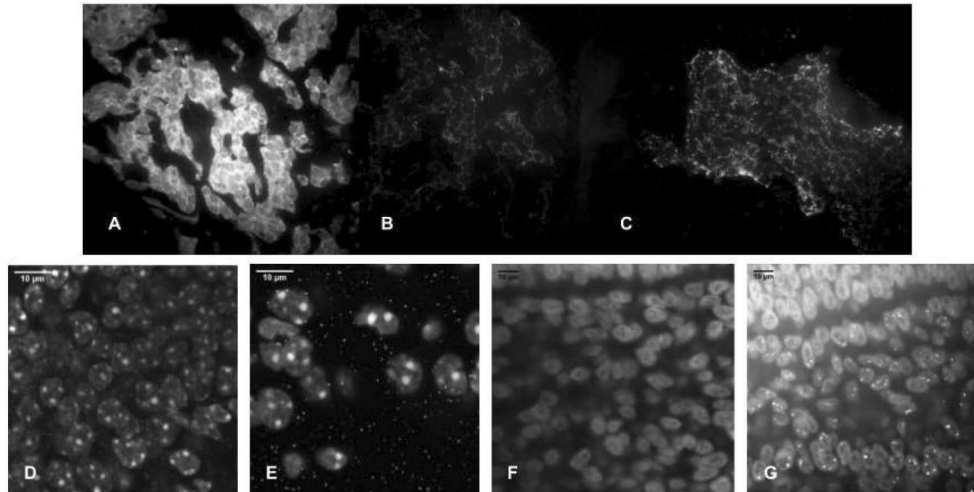


图6

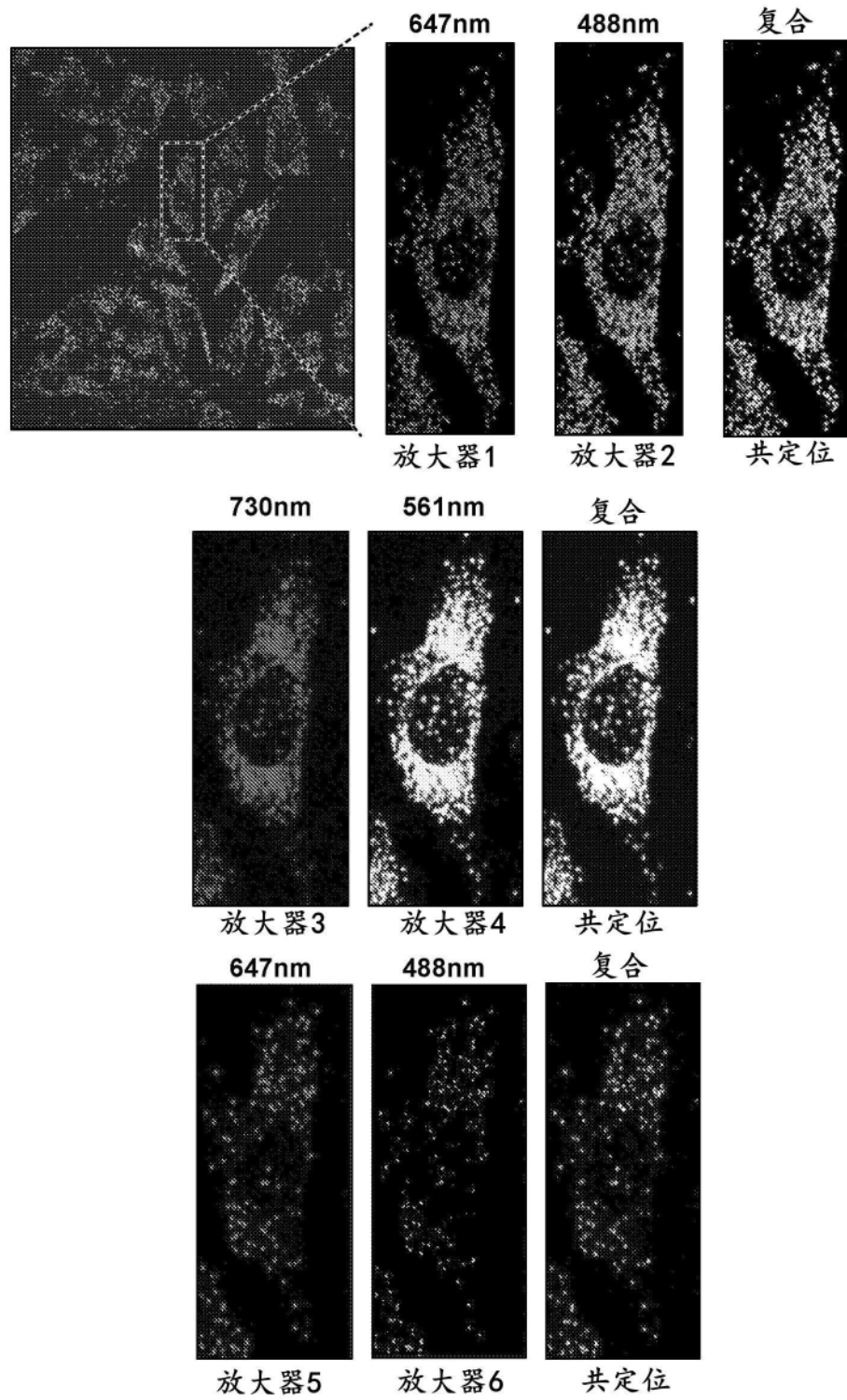


图7

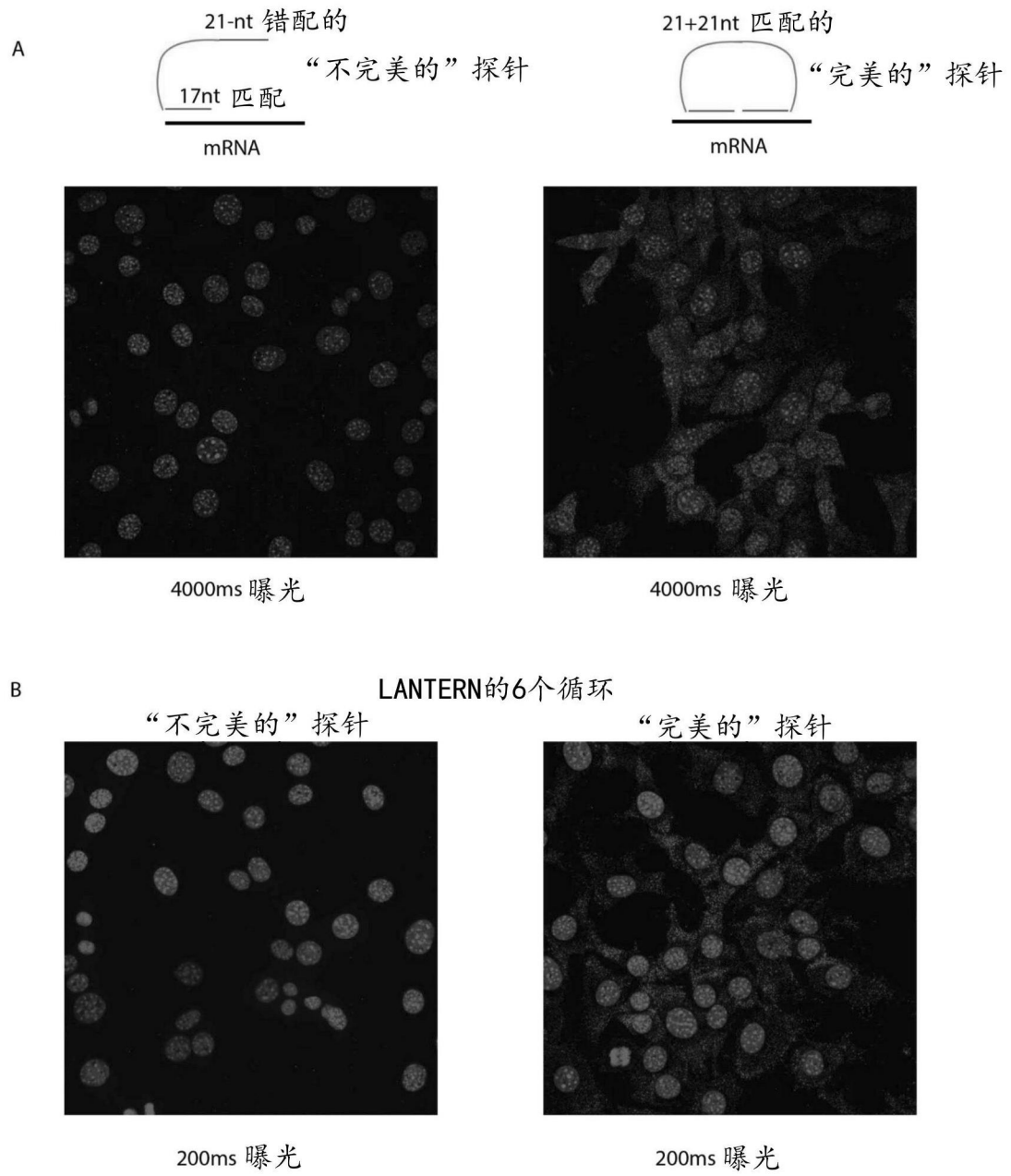


图8

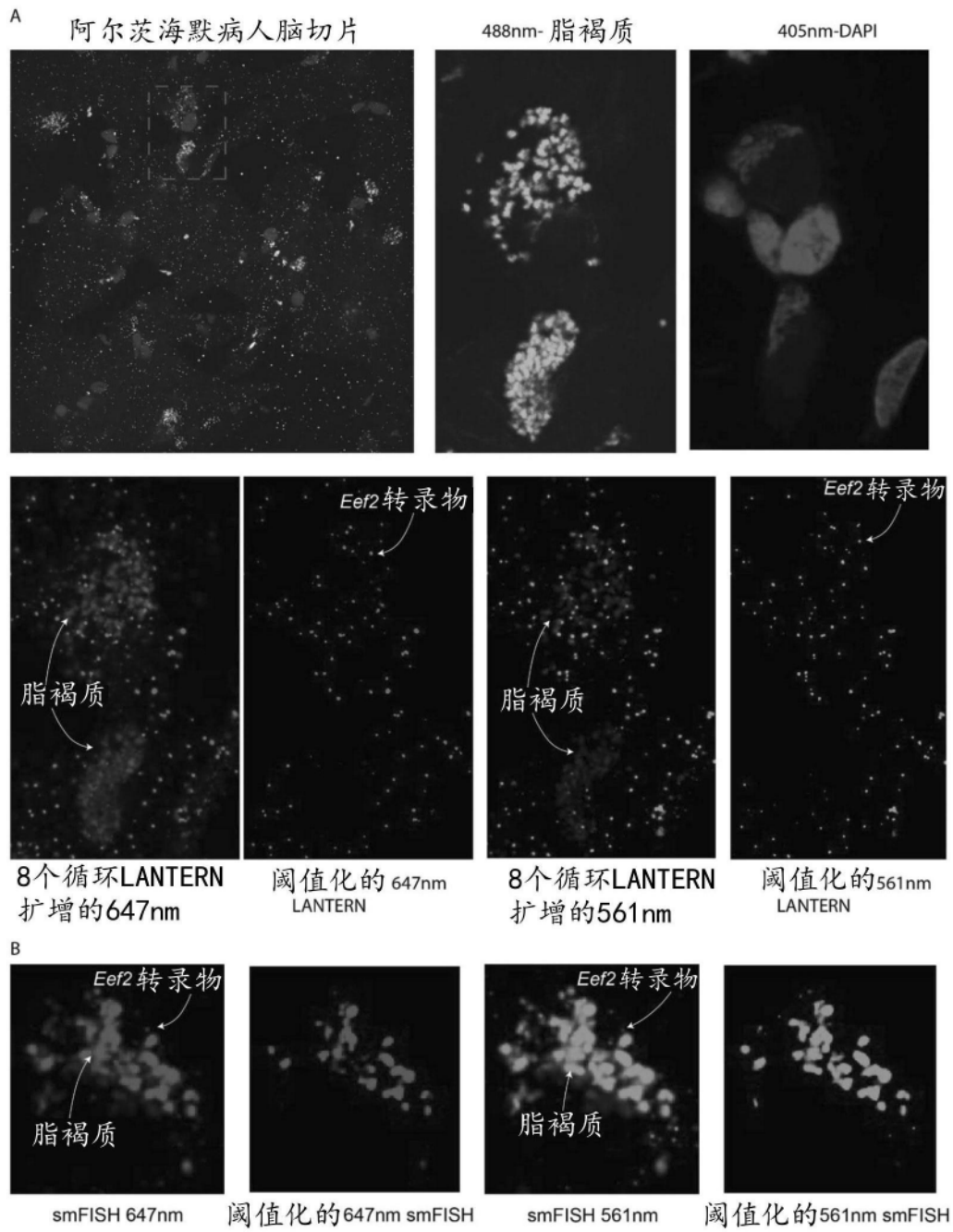


图9

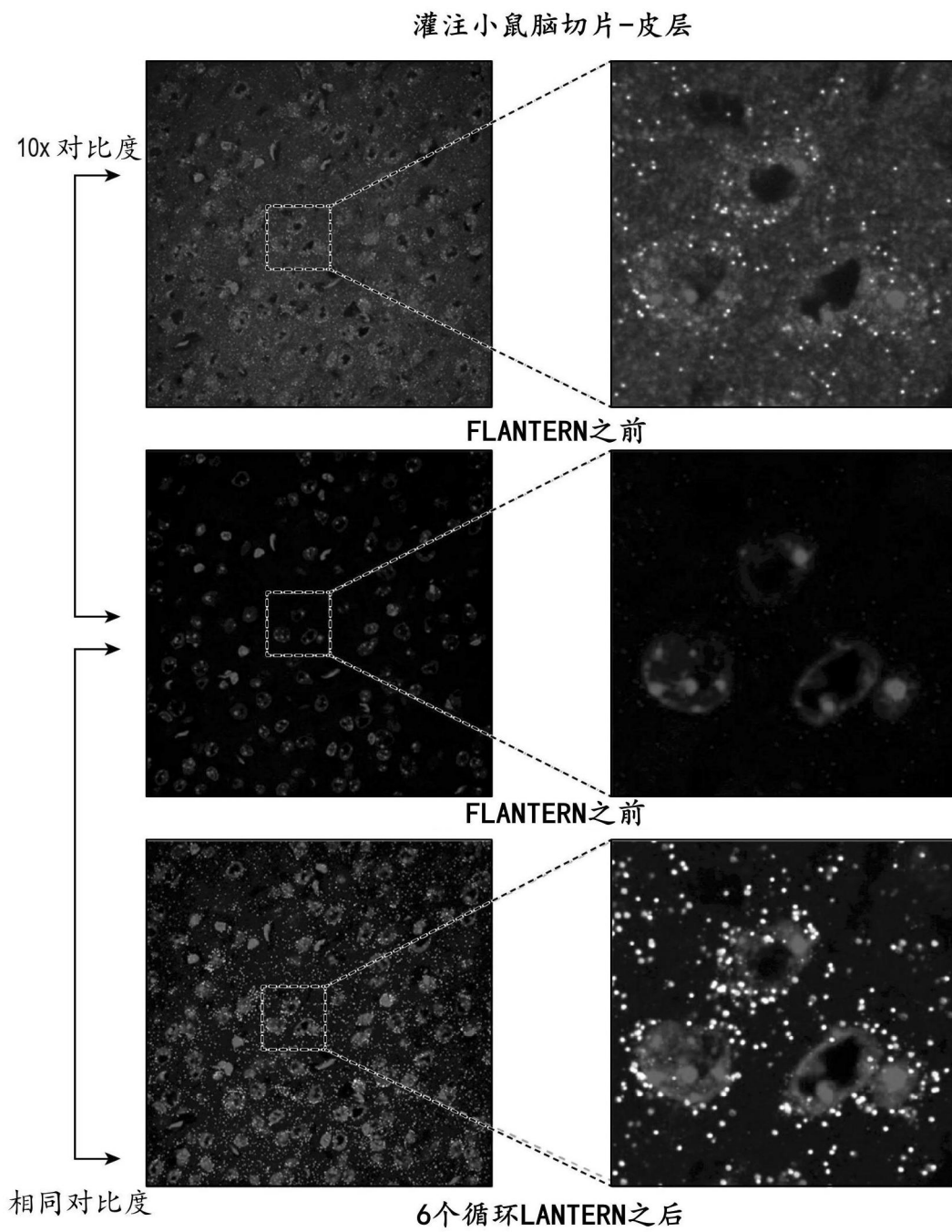


图10

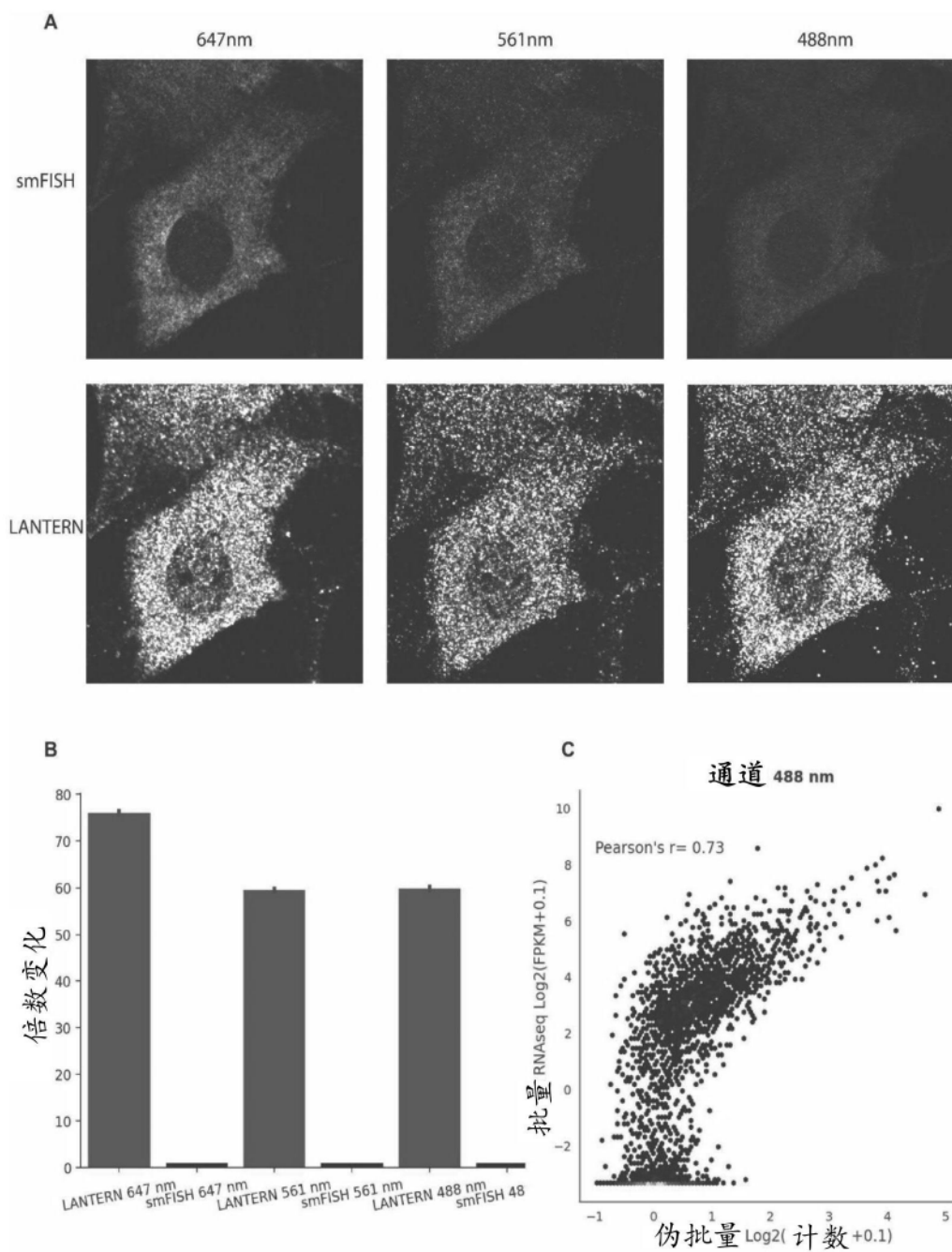


图11

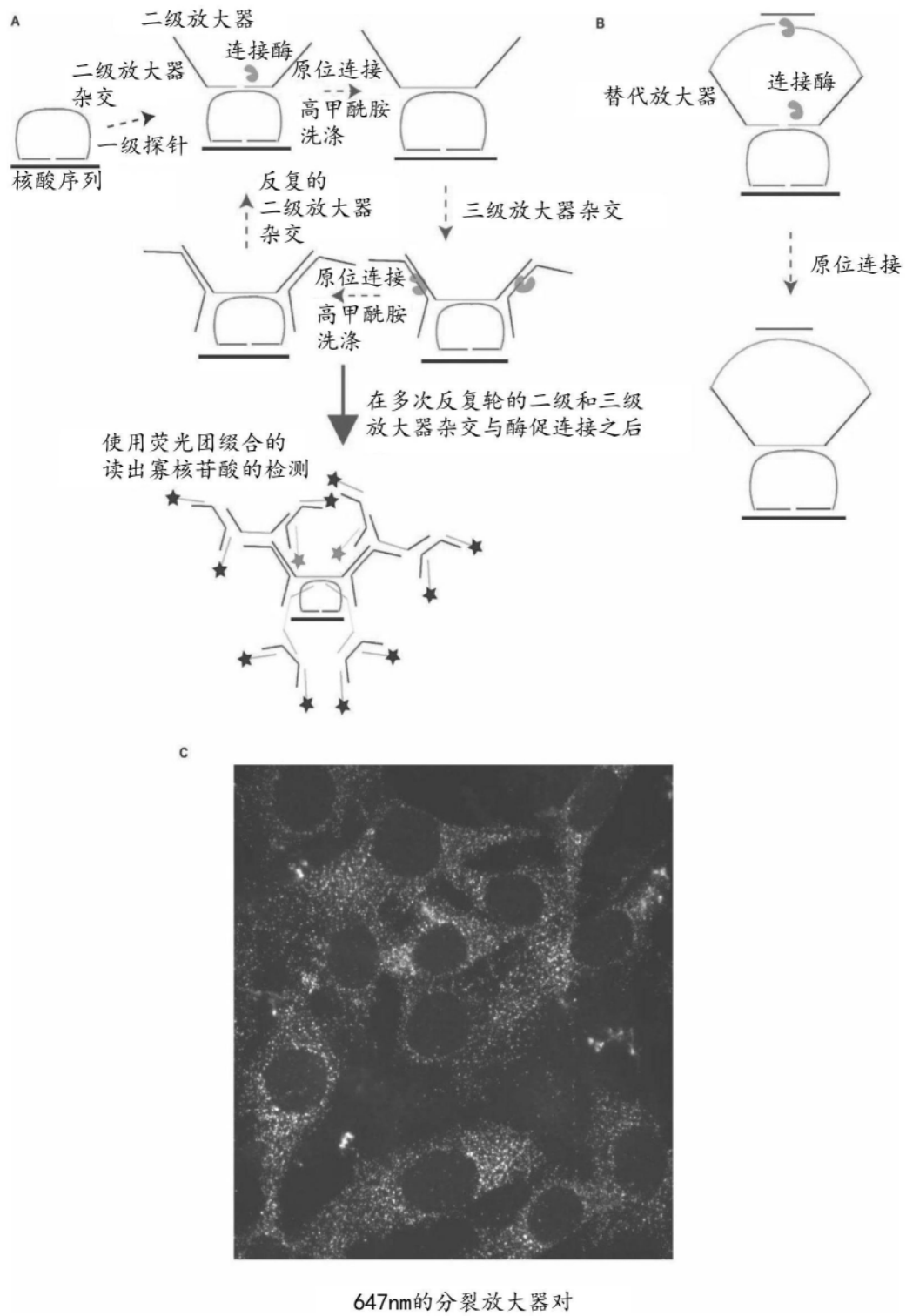


图12