



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119110852 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 10

(21) 申请号 202380026045.3

(22) 申请日 2023.03.07

(30) 优先权数据

63/317,424 2022.03.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/063860 2023.03.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/172911 EN 2023.09.14

(71) 申请人 代表亚利桑那大学的亚利桑那校董
事会

地址 美国亚利桑那州

(72) 发明人 R·F·哈里亚迪

G·B·M·威斯纳 R·萨斯马尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

专利代理师 涂滔

(51) Int.Cl.

C12Q 1/686 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C40B 30/04 (2006.01)

权利要求书2页 说明书15页
序列表(电子公布) 附图11页

(54) 发明名称

与核酸传感器相关的组合物和方法

(57) 摘要

本公开提供了与核酸传感器相关的组合物和方法。具体而言,本公开提供了用于内部核酸的无裂解检测的跨膜核酸传感器、信号转导器和分子放大器。

1. 一种核酸传感器,其包含:
包含至少一个疏水标签的双链茎结构域;
位于所述双链茎结构域的末端的至少一个立足点结构域;和
任选地,位于所述双链茎结构域的末端的与所述立足点结构域相对的发夹结构域。
2. 如权利要求1所述的传感器,其中所述传感器包含位于所述双链茎结构域的两个末端两个立足点结构域。
3. 如权利要求1或权利要求2所述的传感器,其中所述传感器不包含发夹结构域。
4. 如权利要求1所述的传感器,其中所述传感器包含两个单独的核酸分子,所述核酸分子具有形成所述双链茎结构域的互补序列,并且其中所述单独的核酸分子中的每一个均包含立足点结构域。
5. 如权利要求1所述的传感器,其中所述传感器在所述双链茎结构域的相对末端包含一个立足点结构域和一个发夹结构域。
6. 如权利要求5所述的传感器,其中所述传感器包含单个核酸分子,并且其中所述单个核酸分子包含形成所述双链茎结构域的内部互补序列。
7. 如权利要求1所述的传感器,其中所述核酸传感器是DNA分子、LNA分子或其组合。
8. 如权利要求1所述的传感器,其中所述核酸传感器是RNA分子。
9. 如权利要求1所述的传感器,其中所述至少一个立足点结构域与靶核酸序列互补。
10. 如权利要求10所述的传感器,其中所述靶核酸序列是DNA分子或RNA分子。
11. 如权利要求1所述的传感器,其中所述至少一个立足点结构域为约5至约20个核苷酸。
12. 如权利要求1所述的传感器,其中所述茎结构域为约5至约30个核苷酸。
13. 如权利要求1所述的传感器,其中所述发夹结构域为约5至约20个核苷酸。
14. 如权利要求1所述的传感器,其中所述传感器包含至少两个疏水标签。
15. 如权利要求14所述的传感器,其中所述至少两个疏水标签彼此相距约120°至约180°定位。
16. 如权利要求14所述的传感器,其中所述至少两个疏水标签彼此相距约4至约6个核苷酸定位。
17. 如权利要求1所述的传感器,其中所述传感器包含至少三个疏水标签。
18. 如权利要求17所述的传感器,其中所述至少三个疏水标签彼此相距约90°至约120°定位。
19. 如权利要求17所述的传感器,其中所述至少三个疏水标签彼此相距约2至约4个核苷酸定位。
20. 如权利要求1所述的传感器,其中所述至少一个疏水标签定位成使得所述至少一个疏水标签跨度约1.0nm至约3.0nm。
21. 如权利要求1所述的传感器,其中所述传感器包含与SEQ ID NO:1或2至少90%相同的核酸序列。
22. 如权利要求1所述的传感器,其中所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少90%相同的核酸序列。
23. 一种组合物,其包含如权利要求1所述的核酸传感器。

24. 如权利要求23所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种报告基因核酸,其中所述至少一种报告基因核酸包含与所述任选发夹结构域的至少一部分互补的序列。

25. 如权利要求23所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种报告基因核酸,其中所述至少一种报告基因核酸包含能够引发以下至少一种的序列: (i) 立足点介导的链置换(TMSD); (ii) 环介导的等温扩增(LAMP); 和/或 (iii) 发夹链式反应(HCR)。

26. 一种使用如权利要求1所述的任何传感器或如权利要求23所述的组合物检测靶核酸的方法。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述靶核酸位于膜囊泡或细胞内。

28. 如权利要求27所述的方法,其中所述方法包括在不裂解所述膜囊泡或细胞的情况下检测所述靶核酸。

29. 如权利要求26所述的方法,其中所述靶核酸是DNA或RNA。

30. 如权利要求26所述的方法,其中检测所述靶核酸包括扩增步骤。

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述扩增步骤包括立足点介导的链置换(TMSD)、环介导的等温扩增(LAMP) 和/或发夹链式反应(HCR) 中的至少一种。

32. 如权利要求26所述的方法,其中所述方法包括靶标检测步骤。

33. 如权利要求26所述的方法,其中所述方法包括对所述靶核酸进行测序。

34. 一种试剂盒,其包含如权利要求1所述的任何传感器和用于检测靶核酸的说明。

35. 如权利要求34所述的试剂盒,其还包含校准品或对照。

36. 如权利要求35所述的试剂盒,其中所述校准品或对照包含检测部分。

37. 如权利要求35所述的试剂盒,其中所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少90%相同的核酸序列。

与核酸传感器相关的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年3月7日提交的美国临时专利申请第63/317,424号的优先权和权益,通过引用整体并入本文用于所有目的。

[0003] 序列表

[0004] 随附提交的计算机可读序列列表的文本名称为“SKYSG-40581-601”,创建于2023年3月7日,文件大小为12,686字节,该文本据此通过引用整体并入本文。

[0005] 关于联邦资助的声明

[0006] 本发明是在美国国立卫生研究院颁发的授权号AI144247下在政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0007] 本公开提供了与核酸传感器相关的组合物和方法。具体而言,本公开提供了用于内部核酸的无裂解检测的跨膜核酸传感器、信号转导器和分子放大器(molecular amplifier)。

背景技术

[0008] 在由脂质双层膜包围的囊泡(诸如外来体和细胞)内非侵入性地检测核酸靶标,是非常令人感兴趣的,因为它可以在医学和生物医学科学的许多分支中得到许多应用。这些应用中的许多应用可以利用核酸的各种特征。例如,DNA或RNA的茎-环结构或发夹结构是天然存在的,并且这种结构非常重要,因为它形成充当蛋白质的识别位点和RNA折叠的成核位点的RNA二级结构的构建块。除了溶液中的盐浓度之外,环和茎的不同长度和序列也会影响发夹的结构稳定性,以及折叠和解折叠状态下构象变化的热力学和动力学。此外,简单而强大的结构已被应用于,例如,分子信标、分子计算和发夹链式反应(HCR)扩增,以及其它用途。

[0009] 此外,立足点介导的链置换(toehold mediated strand displacement,TMSD)是指一种过程,其中DNA螺旋结构中称为保护链的DNA链可以被与原始螺旋结构中另一条链互补的入侵链置换和替代。原始螺旋结构中的另一条链被称为原始链,它具有称为“立足点”的突出端,突出端帮助入侵链移动和替代保护链。TMSD过程在DNA分子机器、DNA计算、DNA传感和可编程DNA纳米结构等方面有许多应用。而且,发夹链式反应(HCR)是一种基于两个(或更多个)亚稳态单体发夹的强大的无酶等温扩增方法。为了触发单体的聚合,引入引发链。除了固定细胞中的RNA成像之外,HCR可编程性被开发用于DNA和RNA检测的许多应用。

发明内容

[0010] 本公开的实施方案包括核酸传感器,其包含:包含至少一个疏水标签的双链茎结构域,位于所述双链茎结构域的末端的至少一个立足点结构域;和任选地,位于所述双链茎结构域的末端的与所述立足点结构域相对的发夹结构域。

[0011] 在一些实施方案中,所述传感器包含位于所述双链茎结构域的两个末端的两个立足点结构域。

[0012] 在一些实施方案中,所述传感器不包含发夹结构域。

[0013] 在一些实施方案中,所述传感器包含两个单独的核酸分子,所述核酸分子具有形成所述双链茎结构域的互补序列,并且其中所述单独的核酸分子中的每一个均包含立足点结构域。

[0014] 在一些实施方案中,所述传感器在所述双链茎结构域的相对末端包含一个立足点结构域和一个发夹结构域。

[0015] 在一些实施方案中,所述传感器包含单个核酸分子,并且其中所述单个核酸分子包含形成所述双链茎结构域的内部互补序列。

[0016] 在一些实施方案中,所述核酸传感器是DNA分子。在一些实施方案中,所述核酸传感器是LNA分子。在一些实施方案中,所述核酸传感器是RNA分子。

[0017] 在一些实施方案中,所述至少一个立足点结构域与靶核酸序列互补。

[0018] 在一些实施方案中,所述靶核酸序列是DNA分子或RNA分子。

[0019] 在一些实施方案中,所述至少一个立足点结构域为约5至约20个核苷酸。

[0020] 在一些实施方案中,所述茎结构域为约10至约30个核苷酸。

[0021] 在一些实施方案中,所述发夹结构域为约5至约20个核苷酸。

[0022] 在一些实施方案中,所述传感器包含至少两个疏水标签。在一些实施方案中,所述至少两个疏水标签彼此相距约120°至约180°定位。在一些实施方案中,所述至少两个疏水标签彼此相距约4至约6个核苷酸定位。

[0023] 在一些实施方案中,所述传感器包含至少三个疏水标签。在一些实施方案中,所述至少三个疏水标签彼此相距约90°至约120°定位。在一些实施方案中,所述至少三个疏水标签彼此相距约2至约4个核苷酸定位。

[0024] 在一些实施方案中,所述至少一个疏水标签定位成使得所述至少一个疏水标签跨度约1.5nm至约3.0nm。

[0025] 在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:1或2至少90%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少90%相同的核酸序列。

[0026] 本公开的实施方案还包括组合物,其包含本文所述的任何核酸传感器。

[0027] 在一些实施方案中,所述组合物包含至少一种报告基因核酸。在一些实施方案中,所述至少一种报告基因核酸包含与任选发夹结构域的至少一部分互补的序列。在一些实施方案中,所述至少一种报告基因核酸包含能够引发以下至少一种的序列:(i)立足点介导的链置换(TMSD);(ii)环介导的等温扩增(LAMP);和/或(iii)发夹链式反应(HCR)。

[0028] 本公开的实施方案还包括使用本文所述的任何传感器检测靶核酸的方法。

[0029] 在一些实施方案中,所述靶核酸位于膜囊泡或细胞内。在一些实施方案中,所述方法包括在不裂解所述膜囊泡或细胞的情况下检测所述靶核酸。

[0030] 在一些实施方案中,所述靶核酸是DNA或RNA。

[0031] 在一些实施方案中,检测所述靶核酸包括扩增步骤。在一些实施方案中,所述扩增步骤包括立足点介导的链置换(TMSD)、环介导的等温扩增(LAMP)和/或发夹链式反应(HCR)中的至少一种。

[0032] 在一些实施方案中,所述方法包括靶标检测步骤。

[0033] 在一些实施方案中,所述方法包括对靶核酸进行测序。

[0034] 本公开的实施方案还包括试剂盒,其包含本文所述的任何传感器和用于检测靶核酸的说明。

[0035] 在一些实施方案中,所述试剂盒还包含校准品或对照。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含检测部分。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少90%相同的核酸序列。

附图说明

[0036] 图1A-1B:根据本公开的一个实施方案,DNA传感器的代表性示意图。

[0037] 图2A-2B:根据本公开的一个实施方案,使用双链DNA传感器进行核酸检测的方法的代表性示意图。

[0038] 图3:代表性共聚焦图像,示出了双链DNA传感器穿过膜的插入,在右图中示出了GUV上的绿色环,在中间图中示出了在GUV上形成红色环的靶链的检测。

[0039] 图4A-4B:根据本公开的一个实施方案,使用发夹DNA传感器进行核酸检测的方法的代表性示意图。

[0040] 图5:本公开的DNA传感器的阴性对照实验的代表性实验结果。

[0041] 图6:代表性的共聚焦图像,示出了在具有几种POPC和胆固醇组成比率的囊泡中内部核酸靶标的检测。

[0042] 图7:代表性实验结果,证明双链传感器对GUV中存在的不相关分子具有最小的影响,在所有三个实验中仅引起平均约8.4%的渗漏。

[0043] 图8A-8B:代表性共聚焦图像,示出了发夹DNA传感器穿过膜的插入,在左图中示出了由于靶标与传感器结合而在GUV上形成的绿色环,在右图中示出了阴性对照,其中GUV内部的混杂DNA不在GUV上产生绿色环。

[0044] 图9A-9B:在上图示出了传感器在囊泡内靶标结合和打开以使报告基因链(reporter strand)能够结合之后发夹DNA传感器的TMSD示意图,以及在左下图示出了对GUV上形成绿色环的靶标的检测和在右下图示出了GUV上形成红色环的传感器的开放茎部分上报告基因链的结合的代表性共聚焦图像。

[0045] 图10:在上图示出了囊泡内靶标结合允许靶标的某个部分结合到GUV外部添加的报告基因之后双链DNA传感器的TMSD示意图,以及在左下图示出了由于靶标与发夹传感器结合引起的红色环形成和在右图示出了由于形成蓝色环的TMSD引起报告基因链与从GUV膜向外突出的靶标的部分的结合的靶标检测的代表性共聚焦图像。

[0046] 图11:双链DNA传感器的TMSD阴性对照实验的代表性实验结果,其显示没有报告基因结合,指示在本公开的混杂囊泡内DNA靶标的情况下没有跨脂质膜的TMSD。

具体实施方式

[0047] 本公开的实施方案提供了由DNA制造的纳米尺寸的生物传感器,所述生物传感器可以跨越脂质双层膜,检测囊泡中存在的内部核酸靶标,并放大来自检测事件的信号,以使得能够检测低浓度靶标。本公开的发明主题基于与DNA纳米技术和分子生物学密切相关的

几种现象和技术,包括DNA发夹结构、立足点介导的链置换、DNA杂交设计和自由能计算、分子动力学模拟、发夹链式反应和生物缀合。本公开的实施方案利用以上提到的多学科发展来创建具有以这样的方式设计的序列、结构和疏水性修饰的单链和双链DNA纳米结构,这种方式使其可以锚定、插入脂质双层膜上,并检测感兴趣的内部核酸,同时允许信息通过TMSD跨膜转导并通过等温扩增诸如HCR扩增。TMSD和HCR或其它等温扩增方法的使用将广泛应用于本公开的DNA传感器及其相关组分。

[0048] 本文描述了几种类型的核酸传感器,并且每种类型都已经设计和测试以适应跨囊泡的脂质双层膜的有效插入和锚定,用于无裂解的内部核酸靶标检测。来自跨膜检测事件的信号转导和囊泡内部信息的放大(amplification)是使用立足点介导的链置换(TMSD)、等温扩增(例如,发夹链式反应(HCR))和其它可能的扩增方法进行的。单链DNA和双链DNA的简单方法将防止在DNA生物传感器合成中经常遇到的化学计量问题。TMSD连同等温扩增的简单应用提供了一种使用DNA生物传感器来跨膜传递和放大信息以检测低浓度内部核酸的简单方法。可以进行外来体和细胞中存在的生物标志物的检测。另外,DNA纳米传感器的非侵入性检测方法也可用于诊断疾病和对细胞进行基因分型,以及靶向治疗。

[0049] 如本章节中使用的章节标题和本文的全部公开内容仅仅是为了组织的目的,而非旨在限制。

[0050] 1. 定义

[0051] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在冲突的情况下,以本文件(包括定义)为准。尽管与本文描述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料可于本公开的实践或测试中,但在下文中描述了优选方法和材料。本文中提及的所有公布、专利申请、专利和其它参考文献通过引用以其整体并入。本文公开的材料、方法和实施例仅是说明性的,并且不意图是限制性的。

[0052] 如本文所用,术语“包含(comprise)”、“包括(include)”、“具有(having)”、“具有(has)”、“可以(can)”、“含有(contain)”以及其变化形式旨在是不排除另外行为或结构的可能性的开放式连接词、术语或词语。除非上下文中另外明确指定,否则单数形式“一种/一个(a)”、“一种/一个(an)”和“该(the)”包括复数指代物。本公开还考虑了其他实施方案“包含文中提出的实施方案或元素”、“由文中提出的实施方案或元素组成”和“基本上由文中提出的实施方案或元素组成”,无论是否明确阐述。

[0053] 对于本文中数值范围的叙述,明确地考虑了其具有相同精确度的每个中间数值。例如,对于6至9的范围,除了6和9之外还涵盖数字7和8,并且对于6.0至7.0的范围,明确涵盖数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0054] 如本文中所用的“与之相关”是指与之比较。

[0055] 术语“单链”寡核苷酸通常是指含有一系列共价连接的核苷酸残基的那些寡核苷酸。

[0056] 术语“寡聚体”或“寡核苷酸”包括单链或双链体形式的多于一个核苷酸的RNA或DNA序列,具体地包括单链或双链体形式的短序列,诸如二聚体和三聚体,它们可以是产生特异性结合寡核苷酸的中间体。候选库中使用的“修饰”形式含有至少一个非天然残基。“寡核苷酸”或“寡聚体”一般指聚脱氧核糖核苷酸(含有2'-脱氧-D-核糖或其修饰形式),诸如DNA,指聚核糖核苷酸(含有D-核糖或其修饰形式),诸如RNA,以及指任何其它类型的多核苷

酸,其为嘌呤或嘧啶碱基的N-糖苷或C-糖苷,或经修饰的嘌呤或嘧啶碱基或脱碱基核苷酸。“寡核苷酸”或“寡聚体”也可用于描述人工合成的聚合物,其类似于具有经修饰的骨架和核苷的RNA和DNA或DNA和RNA分子,包括但不限于肽核酸(PNA)和锁核酸(LNA)的寡聚体。

[0057] 术语“RNA类似物”或“RNA衍生物”或“经修饰的RNA”通常是指一种聚合分子,其除了含有核糖核苷作为其单元之外,还含有以下的至少一种:2'-脱氧、2'-卤代(包括2'-氟)、2'-氨基(优选未取代或单取代或二取代)、2'-单卤代、二卤代或三卤代甲基、2'-O-烷基、2'-O-卤代烷基、2'-烷基、叠氮基、硫代磷酸酯、巯基、甲基膦酸酯、荧光素、罗丹明、苝、生物素、黄嘌呤、次黄嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-羟基-6-巯基嘌呤和在6-位被硫或在5位被卤素或C₁₋₅烷基基团取代的嘧啶碱基、碱性接头、3'-脱氧腺苷以及其它可用的“链终止子”或“不可延伸的”类似物(在RNA的3'-末端),或标记诸如³²P、³³P等。使用本文公开的标准合成技术,可以将所有前述物质掺入RNA中。

[0058] 术语“结合活性”和“结合亲和力”通常是指配体分子结合或不结合靶标的趋势。这些相互作用的能量学在“结合活性”和“结合亲和力”中显著,因为它们可以包括相互作用配偶体浓度的定义、这些配偶体能够缔合的速率以及溶液中结合分子和自由分子的相对浓度。

[0059] “互补”是指两个或更多个结构元件(例如,肽、多肽、核酸、小分子等)能够相互杂交、二聚化或以其它方式形成复合物的特征。例如,“互补肽和多肽”能够聚在一起形成复合物。互补元件可能需要辅助以形成复合物(例如,来自相互作用元件),例如,将元件置于互补的正确构象中,使互补元件共定位,降低互补的相互作用能等。

[0060] 如本文所用,术语“核苷酸序列同一性”或“核酸序列同一性”是指在两个多核苷酸的相应位置存在相同的核苷酸。如果两个多核苷酸中的核苷酸序列在最大对应性比对时(例如,在比较窗口中)是相同的,则多核苷酸具有“相同”序列。两个或更多个多核苷酸之间的序列比较通常通过比较窗口上比较两个序列的部分来进行,以鉴定和比较具有序列相似性的局部区域。比较窗口通常为约20至200个连续核苷酸。多核苷酸的“序列同一性百分比”,诸如约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的序列同一性,可以通过在比较窗上比较两个最佳比对的序列来确定,其中对于两个序列的最佳比对,与参考序列相比,比较窗中多核苷酸序列的部分可以包括添加或缺失(即,空位)在一些实施方案中,通过以下方式计算百分比:(a) 确定两个序列中出现相同核酸碱基的位置数目;(b) 将匹配位置的数目除以比较窗口中的位置总数;以及(c) 将结果乘以100。用于比较的序列的最佳比对也可以通过已知算法的计算机化实施或通过目视检查来进行。容易获得的序列比较和多重序列比对算法分别是可在互联网(例如,EMBL-EBI网站)上获得的基本局部比对搜索工具(BLAST)和ClustalW/ClustalW2/Clustal Omega程序。其它合适的程序包括但不限于GAP、BestFit、Plot Similarity和FASTA,它们是从美国加利福尼亚州圣地亚哥的Accelrys公司获得的Accelrys GCG软件包的一部分。还请参见Smith和Waterman,1981;Needleman和Wunsch,1970;Pearson和Lipman,1988;Ausubel等人,1988;及Sambrook和Russell,2001。

[0061] 2. 核酸传感器

[0062] 本公开的实施方案包括与核酸传感器相关的组合物和方法。具体而言,本公开提供了用于内部核酸的无裂解检测的跨膜核酸传感器、信号转导器和分子放大器。

[0063] 根据这些实施方案,本公开提供了核酸传感器,其包含:包含至少一个疏水标签的双链茎结构域,位于所述双链茎结构域的末端的至少一个立足点结构域;和任选地,位于所述双链茎结构域的末端的与所述立足点结构域相对的发夹结构域。

[0064] 在一些实施方案中,所述传感器包含位于所述双链茎结构域的两个末端的一个立足点结构域。在一些实施方案中,所述传感器不包含发夹结构域(例如,图1A)。在一些实施方案中,所述传感器包含两个单独的核酸分子,其具有形成双链茎结构域的互补序列。在一些实施方案中,所述单独的核酸分子中的每一个均包含立足点结构域(例如,图1A)。根据这些实施方案,立足点结构域可以在一端开放(即,核酸分子的5'或3'末端是非缀合的)。在一些实施方案中,立足点结构域的5'或3'末端与检测部分缀合。

[0065] 在一些实施方案中,所述传感器在所述双链茎结构域的相对末端包含一个立足点结构域和一个发夹结构域。在一些实施方案中,所述传感器包含单个核酸分子(例如,图1B)。在一些实施方案中,所述单个核酸分子包含形成双链茎结构域的内部互补序列(例如,图1B)。根据这些实施方案,所述发夹结构域是闭合的(即,它包含连续的核酸序列)。

[0066] 在一些实施方案中,所述核酸传感器是DNA分子。在一些实施方案中,所述核酸传感器是RNA分子。在一些实施方案中,所述至少一个立足点结构域与靶核酸序列互补。在一些实施方案中,所述靶核酸序列是DNA分子或RNA分子。

[0067] 在一些实施方案中,所述至少一个立足点结构域为约5至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述至少一个立足点结构域为约10至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述至少一个立足点结构域为约15至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述至少一个立足点结构域为约5至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述至少一个立足点结构域为约5至约10个核苷酸。在一些实施方案中,所述至少一个立足点结构域包括5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸。

[0068] 在一些实施方案中,所述茎结构域为约5至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述茎结构域为约10至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述茎结构域为约15至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述茎结构域为约20至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述茎结构域为约25至约30个核苷酸。在一些实施方案中,所述茎结构域为约5至约25个核苷酸。在一些实施方案中,所述茎结构域为约5至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述茎结构域为约5至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述茎结构域包括5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0069] 在一些实施方案中,所述发夹结构域为约5至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述发夹结构域为约10至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述发夹结构域为约15至约20个核苷酸。在一些实施方案中,所述发夹结构域为约5至约15个核苷酸。在一些实施方案中,所述发夹结构域为约5至约10个核苷酸。在一些实施方案中,所述发夹结构域包括5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸。

[0070] 在一些实施方案中,所述传感器包含至少两个疏水标签。在一些实施方案中,所述至少两个疏水标签彼此相距约120°至约180°定位。在一些实施方案中,所述至少两个疏水标签彼此相距约180°定位。在一些实施方案中,所述至少两个疏水标签彼此相距约4至约6个核苷酸定位。在一些实施方案中,所述至少两个疏水标签彼此相距2、3、4、5或6个核苷酸定位。

[0071] 在一些实施方案中,所述传感器包含至少三个疏水标签。在一些实施方案中,所述至少三个疏水标签彼此相距约90°至约120°定位。在一些实施方案中,所述至少三个疏水标签彼此相距约120°定位。在一些实施方案中,所述至少三个疏水标签彼此相距约2至约4个核苷酸定位。在一些实施方案中,所述至少三个疏水标签彼此相距约1、2、3或4个核苷酸定位。

[0072] 在一些实施方案中,所述至少一个疏水标签定位成使得所述至少一个疏水标签跨度约1.0nm至约3.0nm。在一些实施方案中,所述至少一个疏水标签定位成使得所述至少一个疏水标签跨度约1.5nm至约3.0nm。在一些实施方案中,所述至少一个疏水标签定位成使得所述至少一个疏水标签跨度约2.0nm至约3.0nm。在一些实施方案中,所述至少一个疏水标签定位成使得所述至少一个疏水标签跨度约2.5nm至约3.0nm。在一些实施方案中,所述至少一个疏水标签定位成使得所述至少一个疏水标签跨度约1.0nm至约2.5nm。在一些实施方案中,所述至少一个疏水标签定位成使得所述至少一个疏水标签跨度约1.0nm至约2.0nm。在一些实施方案中,所述至少一个疏水标签定位成使得所述至少一个疏水标签跨度约1.0nm至约1.5nm。

[0073] 在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:1或2至少90%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:1或2至少91%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:1或2至少92%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:1或2至少93%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:1或2至少94%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:1或2至少95%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NOs:1或2至少96%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:1或2至少97%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:1或2至少98%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:1或2至少99%相同的核酸序列。

[0074] 在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少90%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少91%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少92%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少93%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少94%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少95%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少96%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少97%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少98%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述传感器包含与SEQ ID NO:5、8或11至少99%相同的核酸序列。

[0075] 本公开的实施方案还包括使用本文所述的任何传感器检测靶核酸的方法。在一些实施方案中,所述靶核酸位于膜囊泡或细胞内。在一些实施方案中,所述方法包括在不裂解所述膜囊泡或细胞的情况下检测所述靶核酸。在一些实施方案中,所述靶核酸是DNA或RNA。

[0076] 在一些实施方案中,检测所述靶核酸包括扩增步骤。在一些实施方案中,所述扩增步骤包括立足点介导的链置换(TMSD)、环介导的等温扩增(LAMP)和/或发夹链式反应(HCR)

中的至少一种。在一些实施方案中,所述方法包括靶标检测步骤。例如,在一些实施方案中,核酸检测包括使用荧光团、发色团、荧光团对、荧光团-淬灭剂对或本领域已知的其它检测部分。

[0077] 在一些实施方案中,所述方法包括对靶核酸进行测序。例如,在一些实施方案中,靶核酸的检测包括使用桑格测序(sanger sequence)、下一代测序(NGS)或本领域已知的任何其它测序方法进行测序。

[0078] 本公开的实施方案还包括组合物,其包含本文所述的任何核酸传感器。在一些实施方案中,所述组合物包含至少一种报告基因核酸。在一些实施方案中,所述至少一种报告基因核酸包含与任选发夹结构域的至少一部分互补的序列。在一些实施方案中,所述至少一种报告基因核酸包含能够引发以下至少一种的序列:(i)立足点介导的链置换(TMSD);(ii)环介导的等温扩增(LAMP);和/或(iii)发夹链式反应(HCR)。

[0079] 本公开的实施方案还包括试剂盒,其包含本文所述的任何传感器和用于检测靶核酸的说明。在一些实施方案中,所述试剂盒还包含校准品或对照。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含检测部分。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少90%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少91%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少92%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少93%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少94%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少95%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少96%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少97%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少98%相同的核酸序列。在一些实施方案中,所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少99%相同的核酸序列。

[0080] 3. 序列

[0081] 下面提供了本文引用的各种核酸序列(即,SEQ ID NO)。

[0082] 表1:

[0083]

双链DNA传感器链	序列
链 1	GTTTTTGTTTGTAGGAGT/iCholTEG/GAGTT/iCholTEG/GAATG (SEQ ID NO: 1)
链 2	GTTTTTGTTTGTACATTCAA/iCholTEG/CTCAC/iCholTEG/TCC (SEQ ID NO: 2)
靶链	CCCTACTCACCTCCACATTCAACTCACTCCTACAAACAAAAAC/3Cy5/ (SEQ ID NO: 3)
信号/报告基因链	TGGAGGTGAGTAGGG/3Atto488/ (SEQ ID NO: 4)

[0084] 表2:

[0085]

发夹单链DNA传感器	序列
具有合成靶标的传	GTTTTTGTTTGTAGGA/iCholTEG/G

[0086]

传感器链(发夹传感器 a)	TG/iCholTEG/AGTT/iCholTEG /GAATGAGATTACGTTTAGCATTCA ACTCACTCC (SEQ ID NO: 5)
合成靶标 a (发夹传感器 a 的靶标)	CATTCAACTCACTCCTACAAACAA AAAC/3Cy3/ (SEQ ID NO: 6)
信号/报告基因链发夹传感器 a	/5Cy5/GGAGTGAGTTGAATGCTAAA CGTGAACGGACGTTTAGCATTCAA (SEQ ID NO: 7)
具有 miR23b 靶标的传感器链(发夹传感器 b)	TGC CAG GGA TTA CCT AAC CTC GGT A/iCholTEG/A TCC /iCholTEG/CT G/iCholTEG/G CAA TGT GAT (SEQ ID NO: 8)
miR23b 靶标	/5Atto488/ATCACATTGCCAGGGATT ACC (SEQ ID NO: 9)
信号链发夹传感器 b	GGTAATCCCTGGCA/3Cy5/ (SEQ ID NO: 10)
具有合成靶标的传感器链(具有 31 茎的发夹传感器 c)	CGGAGGTTGAGAGTGGATGGAGT/i CholTEG/GAGTT/iCholTEG/GAATGA GTGGATGAATCTAACCGCATCCAC TCATTCAACTCACTCCATCCACTC (SEQ ID NO: 11)
合成目标 c (发夹传感器 c 的靶标)	CATCCACTCATTCAACTCACTCCAT CCACTCTCAACCTCCG\Cy3\ (SEQ ID NO: 12)
信号/报告基因链发夹传感器 c	GAGTGAGTTGAAT\Cy5\ (SEQ ID NO: 13)

[0087] 对于本领域技术人员来说其它合适的修改显而易见。

[0088] 应当理解,前面的详细描述和所附的实施例仅仅是说明性的,不应当被认为是对本公开的范围的限制,本公开的范围仅由所附的权利要求书及其等同物来限定。

[0089] 对所公开的实施方案的各种变化和修改对于本领域技术人员将是显而易见的。可在不背离本发明的精神和范围的情况下进行此类变化和修改,包括但不限于与本公开的化学结构、取代基、衍生物、中间体、合成、组合物、制剂或使用有关的那些变化和修改。

[0090] 4. 实施例

[0091] 对本领域技术人员而言,显而易见的是,本文所述的本公开方法的其他合适的修

饰和修改是容易应用和可理解的,并且可以使用合适的等效物来做出,而不背离本公开或本文所公开的方面和实施方案的范围。现在已详细描述了本公开,通过参考以下实施例将对其有更明确理解,所述实施例仅意图用于说明本公开的一些方面和实施方案,并且不应被视为对本公开范围的限制。本文引用的所有期刊参考文献、美国专利和公布的公开内容据此通过引用以其整体并入。

[0092] 本公开具有多个方面,由以下非限制性示例说明。

[0093] 实施例1

[0094] 传感器的设计、结构和工作原理。在一个实施方案中,单链DNA传感器由立足点、茎和发夹节段组成。双链体DNA在每个末端具有两个立足点,由茎节段连接。该实施方案需要一条或两条链,这在克服传感器形成期间的化学计量问题方面非常有力,这通常是DNA纳米技术的挑战。另外,这种简单的方法将有利于插入动力学和所需疏水标签的数目。

[0095] 基于靶标长度,立足点可以为约6-13个核苷酸,与内部核酸靶标的待检测的部分互补。茎被设计成为发夹和双链体结构提供结构完整性。立足点介导茎节段的置换,允许信号从内部向外部转导。该茎具有约14-15个碱基对,取决于靶标长度,这些碱基对与靶序列相同或互补。单链传感器中的发夹设计成触发等温扩增(诸如HCR)或其它方法(诸如滚环扩增)的扩增。为了保持茎两侧的极性基团平衡,选择发夹与立足点相同的长度。疏水性修饰被策略性地置于茎的一侧。因此,一旦TMSD完成,茎的另一侧可以从膜上脱离。图1A-1B示出了DNA传感器设计的示意图。

[0096] 为了使DNA传感器有效地覆盖疏水液体,将疏水标签(两个或三个标签)的空间排列以这样的方式精心设计,使得当投影到茎的横截面上时,它们之间的距离对于两个疏水标签是180度,或者对于三个疏水标签是120度(参见图1A和图1B的中间图)。因此,两个标签之间的角度间隔在两个标签的情况下是5个核苷酸,在三个标签的情况下是3个和4个核苷酸。这可以在图1A和图1B的左图中看到,其中疏水标签以绿色示出,并且还示出了它们之间的间距。因此,茎将垂直于脂质双层膜内部的膜表面锚定。基于5个核苷酸和3-4个核苷酸的间隔,疏水标签所覆盖的距离为1.8至2.5nm左右,小于脂质双层的已知厚度3.5-4.0nm,这确保茎垂直位于膜中,并且发夹和立足点在相对侧是游离的。

[0097] 疏水标签沿茎不对称放置,以利于立足点插入囊泡,从而成功地进行内部核酸检测。因此,疏水基团更靠近立足点区定位,使其在立足点茎侧产生极性较低的核酸。考虑到立足点和发夹的长度相同,插入期间的取向仅取决于茎上疏水基团的位置,这在设计方面非常通用。疏水标签的放置如图1A和图1B的左图所示。

[0098] 在14-15个碱基对长的茎上引入两个错配,以产生更快的TMSD动力学,以及6-10个核苷酸左右的最佳立足点长度(Zhang和Winfree, 2009)。错配是经过精心选择和放置的,因此它们不会影响茎结构的完整性,而只会有助于TMSD的动力学。错配位于疏水基团附近。Nupack显示错配周围有很高的平衡概率,从而证实了茎的完整性,但降低了该区域的稳定性。

[0099] 一旦TMSD完成,信号就跨膜转导。由于被靶链置换,茎区的单链单元之一将从膜限制中释放到囊泡外部。当打开的单链发夹节段被茎的单链单元置换时,触发发夹链式反应。图1B的右图示出了在单链DNA传感器的情况下HCR的两个单体发夹。它们是以这样的方式特别设计的,使得只有存在内部靶标检测和跨脂质双层膜的TMSD成功事件时,才会触发反应。

对于双链传感器,将内部靶链设计成具有充当具有荧光团的信号链的靶标以结合和检测TMSD的节段。由于靶标的长度限制,不能对双链DNA传感器进行HCR,图1A示出了双链DNA传感器的内部靶标和信号链。

[0100] 在双链DNA的情况下,信号链将结合到图1A所示的部分c。对于发夹传感器,一旦发夹打开,就会发生HCR扩增。信号链或HCR单体的结合允许检测荧光团信号,该荧光团信号可以通过显微镜术或凝胶测定来检测。在显微镜术中,信号链和发夹单体之一可以与荧光团缀合,以检测由HCR形成的聚合物。还可以使用具有发射体-淬灭剂对或供体-受体对的单体发夹,或通过使用荧光去淬灭检测或FRET,在酶标仪上监测检测。

[0101] 使用上述设计原理,Nupack则可用于设计和生成单链和双链DNA传感器的优化序列。最初的目标之一是来自微RNA miR23b的序列,这是对实际应用的适应。表1和表2列出了DNA传感器,以及它们的靶标、双链传感器的信号链和单链传感器的发夹单体。

[0102] 膜中含有磷脂和一些胆固醇的巨大单层囊泡(guv)用于进行概念验证实验。GUV是用封装在其中的靶DNA合成的。使用荧光共聚焦显微镜术,DNA靶标和DNA传感器都将被荧光染料标记,以便能够分析DNA靶标与GUV的相互作用

[0103] 实施例2

[0104] 双链和发夹DNA传感器跨膜插入以及作为DNA传感器跨膜插入的概念验证的GUV内单链DNA的检测。进行实验以证明DNA传感器可以插入脂质双层膜并感测囊泡内的内部靶标。为了证明插入和检测的工作方式,从POPC和胆固醇的最低脂质组合物合成非常简单的囊泡。图2A和图4A的左图示出了一旦靶标与含有双链和单链DNA的传感器结合时的过程示意图。图8A示出了通过在GUV上形成绿色环的发夹DNA传感器进行的成功的囊泡内靶标检测,并且图8B是通过具有未观察到绿色环的混杂囊泡内DNA靶标的阴性对照。

[0105] 通过使用封装与单链和双链DNA传感器的立足点互补的特定靶DNA的GUV测试样品,证明内部核酸靶标的检测。这种GUV是通过反相乳液或cDICE方法合成的,其中POPC磷脂和胆固醇的比率分别为70%:30%。内部溶液含有一定浓度的蔗糖,以及250mM的KCl和100-1000nm浓度的靶标。存在一定浓度的葡萄糖和250mM的KCl的外部溶液。调节蔗糖和葡萄糖的浓度以平衡内部溶液和外部溶液的渗透压。然后将DNA传感器与测试样品混合并孵育约1.5小时,之后在共聚焦显微镜下检查。在图1A-1B中,DNA传感器用sybr金标记,而内部靶DNA用Cy5荧光团(称为荧光团1)标记。图3示出了共聚焦图像,其示出了双链DNA传感器穿过膜的插入,在右图中示出了GUV上的绿色环并且在中间图中示出了在GUV上形成红色环的靶链的检测。使用荧光共聚焦显微镜实验检查插入和检测。

[0106] 实施例3

[0107] 跨GUV膜的立足点介导的链置换。当DNA周围没有限制膜时,在溶液中发生立足点介导的链置换(TMSD)(Yurke等人,2000)。在该实施方案中,DNA传感器在脂质双层膜限制下经历TMSD。在设计部分,注意到传感器在双链茎的一侧具有疏水标签,一旦跨膜完成TMSD,允许另一侧释放到囊泡的外部。从单个碱基对的角度来看,跨膜TMSD在总吉布斯自由能上的差异将为零。预计只有在没有限制膜的情况下,TMS的动力学才会比在溶液中慢。图2A和图4A的右图示出了单链和双链DNA传感器的示意图。

[0108] 使用第II节中描述的GUV测试样品。它用具有与靶标不同的荧光团的信号链标记。在单链DNA传感器的情况下,信号链是用Nupack(nupack.org)设计的,以确保如果不发生跨

膜TMSD,则不会发生渗漏。另外,图2A和图4A所示的测定是精心设计的,使得不会触发假阳性。在跨膜TMSD完成后,内部靶标信息的检测转导到外部并且预计信号链会与释放到外部但仍通过传感器锚定到膜上的传感器部分结合,以便从传感器表面发出荧光信号,如图2B对于双链DNA传感器所示。使用荧光共聚焦显微镜术对事件进行调查。

[0109] 实施例4

[0110] 发夹传感器中内部靶标检测的HCR扩增。HCR扩增用于证明检测事件的放大(amplification)。Nupack(nupack.org)用于设计发夹单体。检查发夹和测定物的渗漏和假阳性信号。实验的示意图如图4B所示。其中一个发夹用与靶标不同的荧光团标记。作为HCR扩增的结果,传感器应该能够检测低浓度的DNA靶标。将相同的GUV测试样品与传感器和两种单体发夹混合。使用荧光共聚焦显微镜术观察扩增。

[0111] 实施例5

[0112] 对双链传感器的几种GUV组成比的测试。进行实验以检查双链传感器插入和检测具有几种POPC和胆固醇组成比的泡囊中的内部核酸靶标的能力。这些实验是为了测试双链传感器检测封装在不同脂质双层膜组合物中的靶标的能力。图6示出了作为内部核酸检测结果的红色环,证明双链传感器在不同的合成脂质双层组合物下仍然功能良好。

[0113] 双链传感器的小染料分子渗漏测定和侵入性表征。双链传感器的侵入性也通过进行小染料分子渗漏测定来检查。共聚焦图像指示,传感器没有对GUV造成任何可见的损伤。然而,进行渗漏测定以测试它如何仅影响非常小的染料分子,并与GUV内与传感器不相关的一定长度的单链DNA缀合。测试ATT0488染料分子、ATT0488-15nt单链DNA和ATT0488-22nt单链DNA的渗漏。图7描绘了它对小染料分子的影响。从结果可以得出结论,双链传感器对GUV中存在的不相关分子具有最小的影响,在所有三个实验中仅引起平均约8.4%的渗漏。

[0114] 实施例6

[0115] 双链和发夹DNA传感器上跨脂质双层膜的TMSD的可能性。进行实验以检查双链和发夹DNA传感器上跨脂质膜的TMSD的可能性。双链和发夹DNA传感器的相应DNA靶标封装在GUV内部。然后添加传感器并温育几小时以允许TMSD继续进行。最后,添加对传感器具有特异性的报告基因来探测TMSD的发生。

[0116] 图9A示出了发夹DNA传感器的实验和过程的示意图。图9B示出了左图上在GUV上形成绿色环的囊泡内靶标的检测,以及来自GUV外部的报告基因链与在GUV上形成红色环的传感器的开放茎部分的结合。在双链DNA传感器的情况下,图10的上图示出了跨膜TMSD和致使其可用于报告基因从GUV外部结合的靶标的某一部分的穿透的过程的示意图,并且下图示出了共聚焦图像的代表,其中在左下图中双链传感器对靶标的检测在GUV上形成红色环,并且在右下图中由于报告基因链结合在传感器上而在GUV上形成蓝色环。如图11所示,通过具有混杂的囊泡内DNA靶标和使用双链DNA传感器的阴性对照实验显示在GUV上没有形成蓝色环。

[0117] 应当理解,前面的详细描述和所附的实施例仅仅是说明性的,不应当被认为是对本公开的实施方案的范围的限制,所述范围仅由所附的权利要求书及其等同物来限定。对所公开的实施方案的各种变化和修改对于本领域技术人员将是显而易见的。可在不背离本发明的精神和范围的情况下进行此类变化和修改,包括但不限于与本公开的实施方案的化学结构、取代基、衍生物、中间体、合成、组合物、制剂或使用有关的那些变化和修改。

[0118] 出于完整性的原因,在以下编号的条款中阐述了本公开的实施方案的各个方面:

[0119] 条款1.一种核酸传感器,其包含:包含至少一个疏水标签的双链茎结构域;位于所述双链茎结构域的末端的至少一个立足点结构域;和任选地,位于所述双链茎结构域的末端的与所述立足点结构域相对的发夹结构域。

[0120] 条款2.如条款1所述的传感器,其中所述传感器包含位于所述双链茎结构域的两个末端的两个立足点结构域。

[0121] 条款3.如条款1或条款2所述的传感器,其中所述传感器不包含发夹结构域。

[0122] 条款4.如条款1至3中任一项所述的传感器,其中所述传感器包含两个单独的核酸分子,所述核酸分子具有形成所述双链茎结构域的互补序列,并且其中所述单独的核酸分子中的每一个均包含立足点结构域。

[0123] 条款5.如条款1所述的传感器,其中所述传感器在所述双链茎结构域的相对末端包含一个立足点结构域和一个发夹结构域。

[0124] 条款6.如条款5所述的传感器,其中所述传感器包含单个核酸分子,并且其中所述单个核酸分子包含形成所述双链茎结构域的内部互补序列。

[0125] 条款7.如条款1至6中任一项所述的传感器,其中所述核酸传感器是DNA分子、LNA分子或其组合。

[0126] 条款8.如条款1至6中任一项所述的传感器,其中所述核酸传感器是RNA分子。

[0127] 条款9.如条款1至8中任一项所述的传感器,其中所述至少一个立足点结构域与靶核酸序列互补。

[0128] 条款10.如条款10所述的传感器,其中所述靶核酸序列是DNA分子或RNA分子。

[0129] 条款11.如条款1至10中任一项所述的传感器,其中所述至少一个立足点结构域为约5至约20个核苷酸。

[0130] 条款12.如条款1至11中任一项所述的传感器,其中所述茎结构域为约5至约30个核苷酸。

[0131] 条款13.如条款1至12中任一项所述的传感器,其中所述发夹结构域为约5至约20个核苷酸。

[0132] 条款14.如条款1至13中任一项所述的传感器,其中所述传感器包含至少两个疏水标签。

[0133] 条款15.如条款14所述的传感器,其中所述至少两个疏水标签彼此相距约120°至约180°定位。

[0134] 条款16.如条款14或条款15所述的传感器,其中所述至少两个疏水标签彼此相距约4至约6个核苷酸定位。

[0135] 条款17.如条款1至13中任一项所述的传感器,其中所述传感器包含至少三个疏水标签。

[0136] 条款18.如条款17所述的传感器,其中所述至少三个疏水标签彼此相距约90°至约120°定位。

[0137] 条款19.如条款17或条款18所述的传感器,其中所述至少三个疏水标签彼此相距约2至约4个核苷酸定位。

[0138] 条款20.如条款1至19中任一项所述的传感器,其中所述至少一个疏水标签定位成

使得所述至少一个疏水标签跨度约1.0nm至约3.0nm。

[0139] 条款21.如条款1至20中任一项所述的传感器,其中所述传感器包含与SEQ ID NO: 1或2至少90%相同的核酸序列。

[0140] 条款22.如条款1至20中任一项所述的传感器,其中所述传感器包含与SEQ ID NO: 5、8或11至少90%相同的核酸序列。

[0141] 条款23.一种组合物,其包含如条款1至22中任一项所述的核酸传感器。

[0142] 条款24.如条款23所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种报告基因核酸,其中所述至少一种报告基因核酸包含与所述任选发夹结构域的至少一部分互补的序列。

[0143] 条款25.如条款23所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种报告基因核酸,其中所述至少一种报告基因核酸包含能够引发以下至少一种的序列:(i) 立足点介导的链置换(TMSD);(ii) 环介导的等温扩增(LAMP);和/或(iii) 发夹链式反应(HCR)。

[0144] 条款26.一种使用如条款1至22所述的任何传感器或如条款23至25所述的组合物检测靶核酸的方法。

[0145] 条款27.如条款26所述的方法,其中所述靶核酸位于膜囊泡或细胞内。

[0146] 条款28.如条款27所述的方法,其中所述方法包括在不裂解所述膜囊泡或细胞的情况下检测所述靶核酸。

[0147] 条款29.如条款26至28中任一项所述的方法,其中所述靶核酸是DNA或RNA。

[0148] 条款30.如条款26至28中任一项所述的方法,其中检测所述靶核酸包括扩增步骤。

[0149] 条款31.如条款30所述的方法,其中所述扩增步骤包括立足点介导的链置换(TMSD)、环介导的等温扩增(LAMP)和/或发夹链式反应(HCR)中的至少一种。

[0150] 条款32.如条款26至31中任一项所述的方法,其中所述方法包括靶标检测步骤。

[0151] 条款33.如条款26至32中任一项所述的方法,其中所述方法包括对所述靶核酸进行测序。

[0152] 条款34.一种试剂盒,其包含如条款1至22所述的任何传感器和用于检测靶核酸的说明。

[0153] 条款35.如条款34所述的试剂盒,其还包含校准品或对照。

[0154] 条款36.如条款35所述的试剂盒,其中所述校准品或对照包含检测部分。

[0155] 条款37.如条款35所述的试剂盒,其中所述校准品或对照包含与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、12或13至少90%相同的核酸序列。

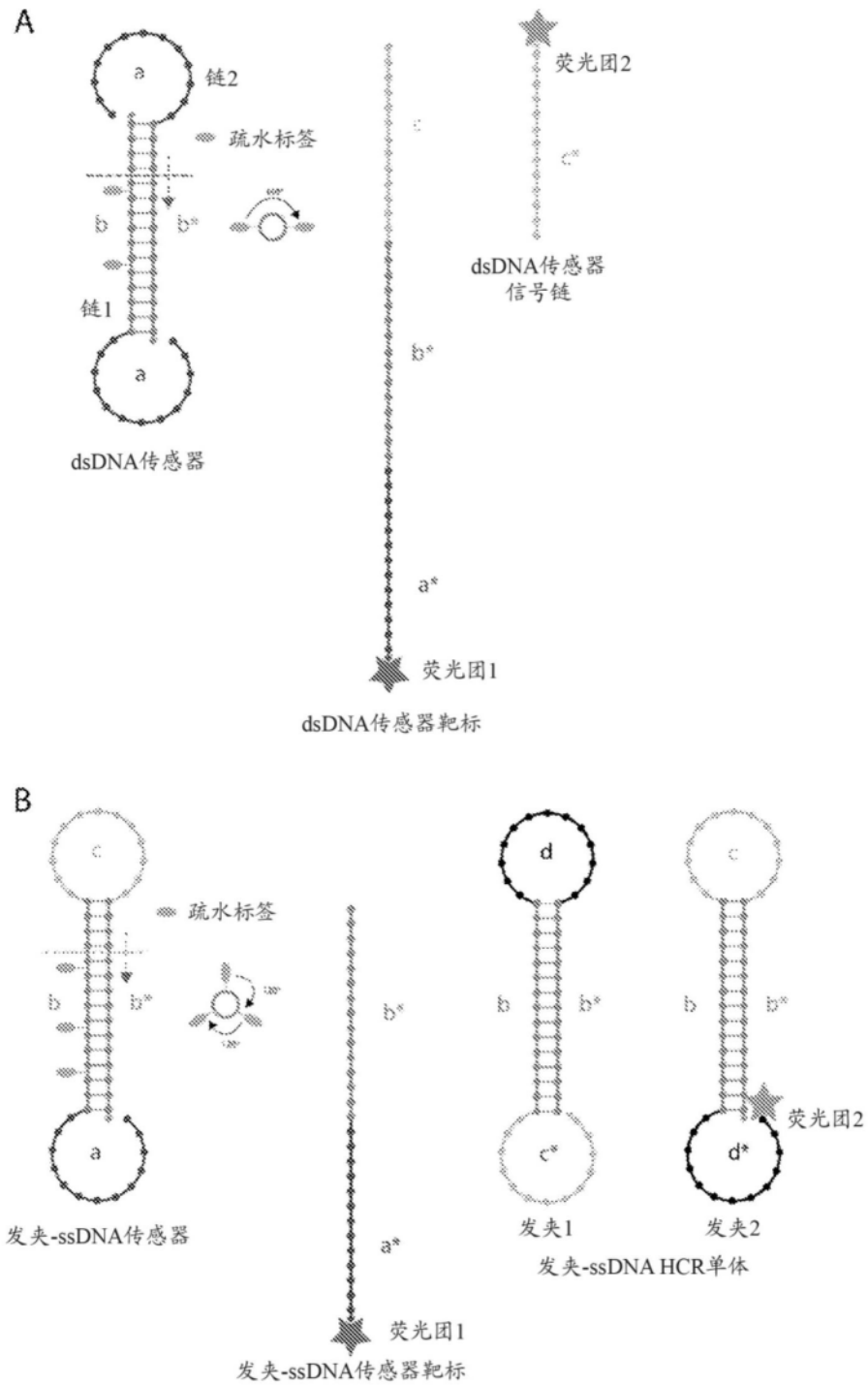


图1A-1B

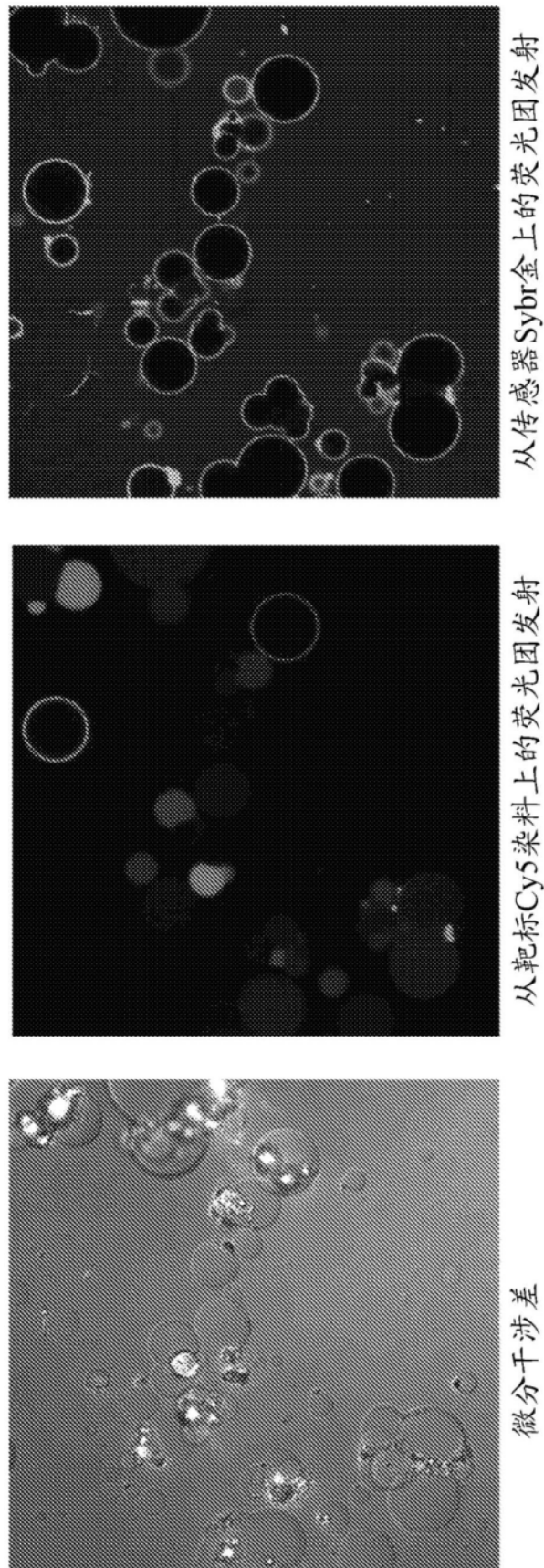


图3

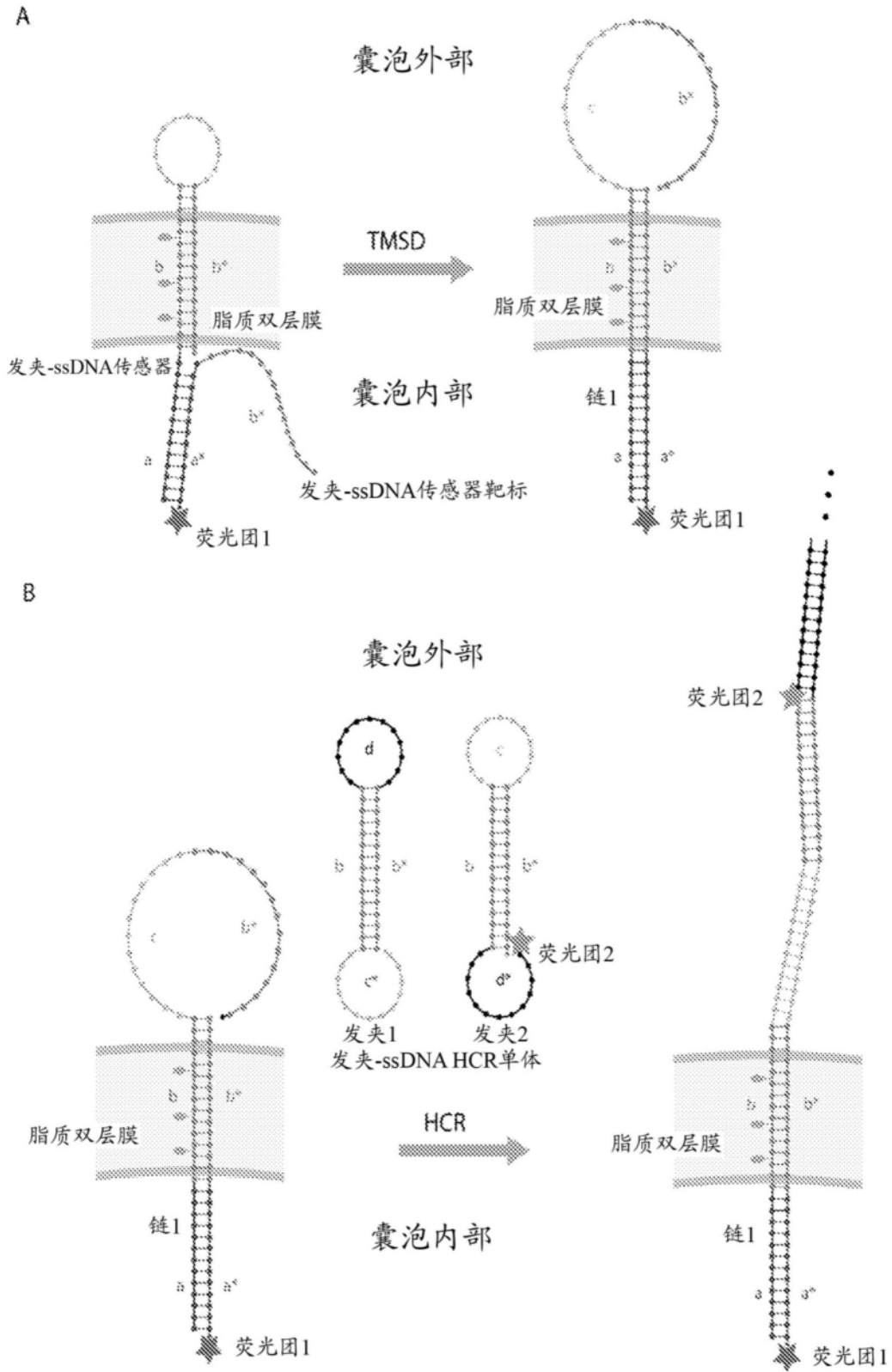


图4A-4B

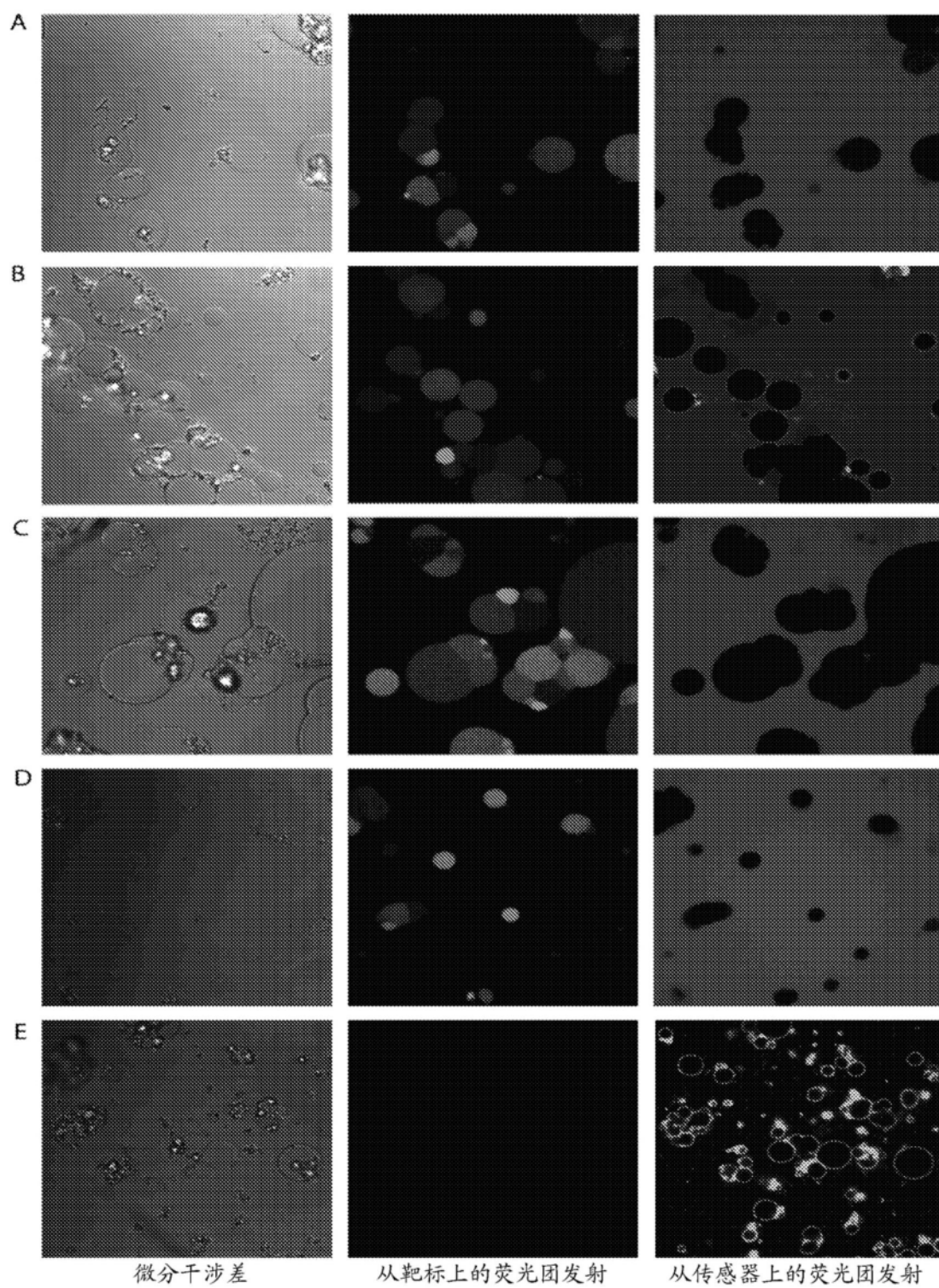


图5A-5E

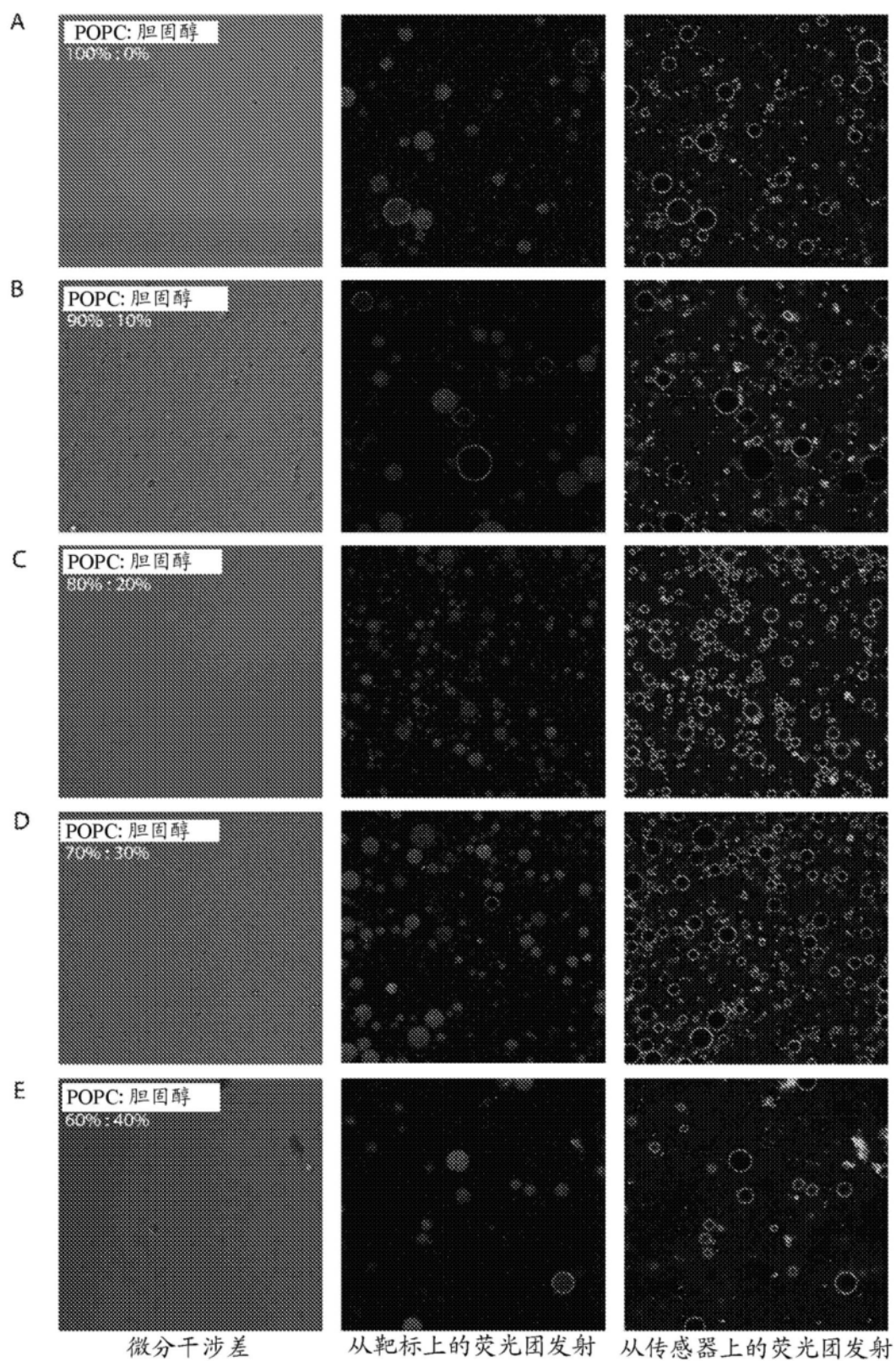


图6A-6E

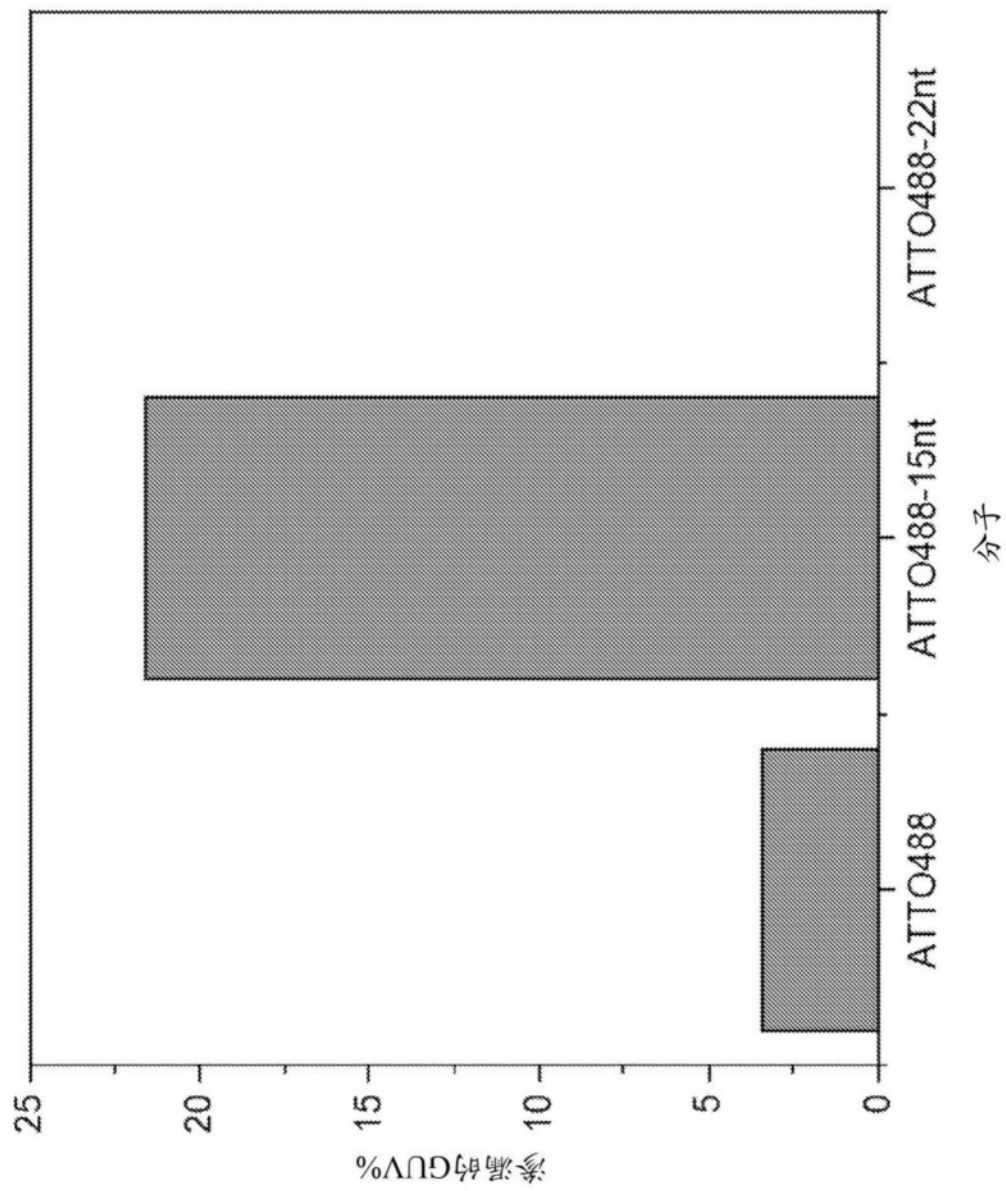


图7

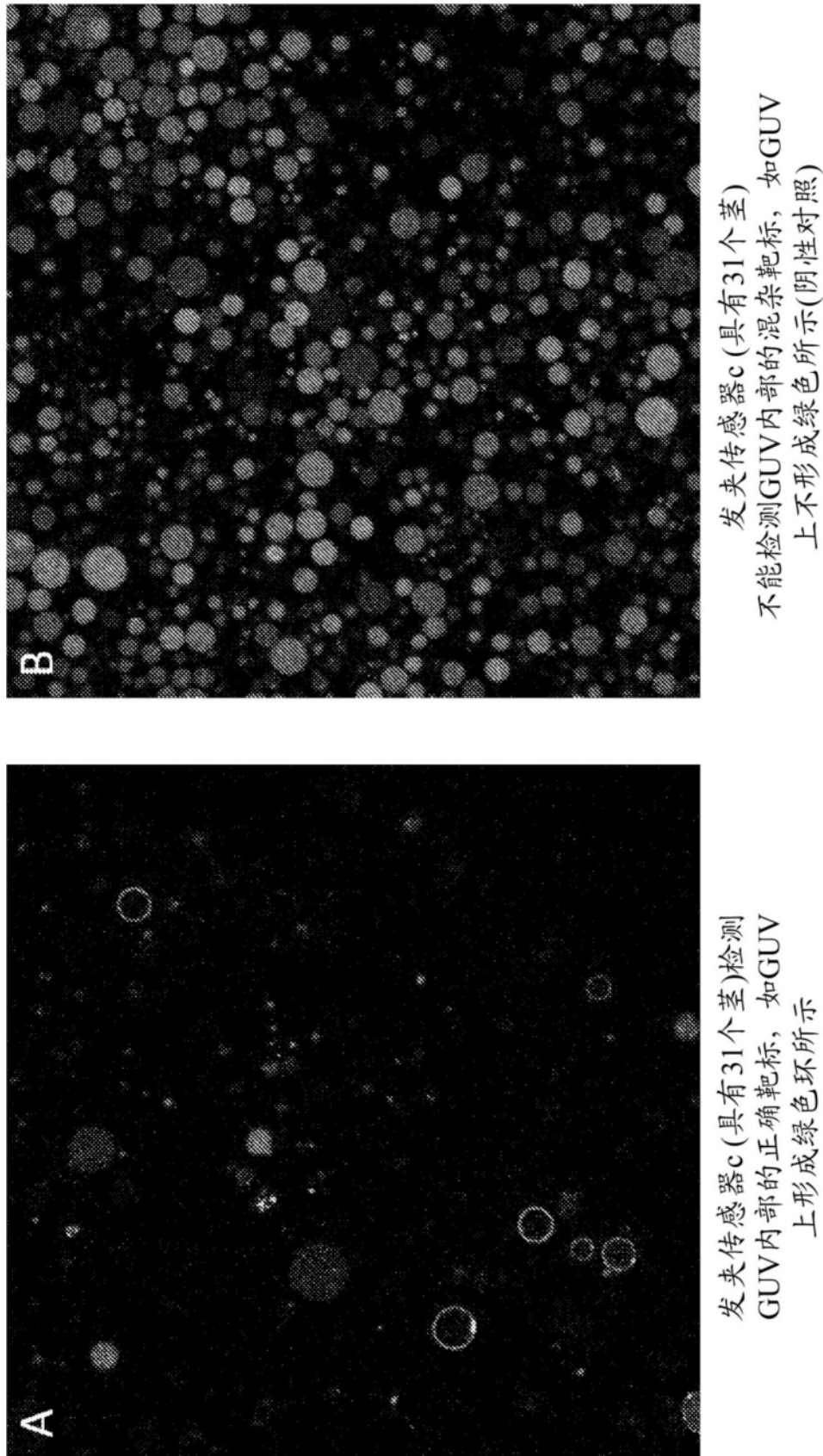


图8A-8B

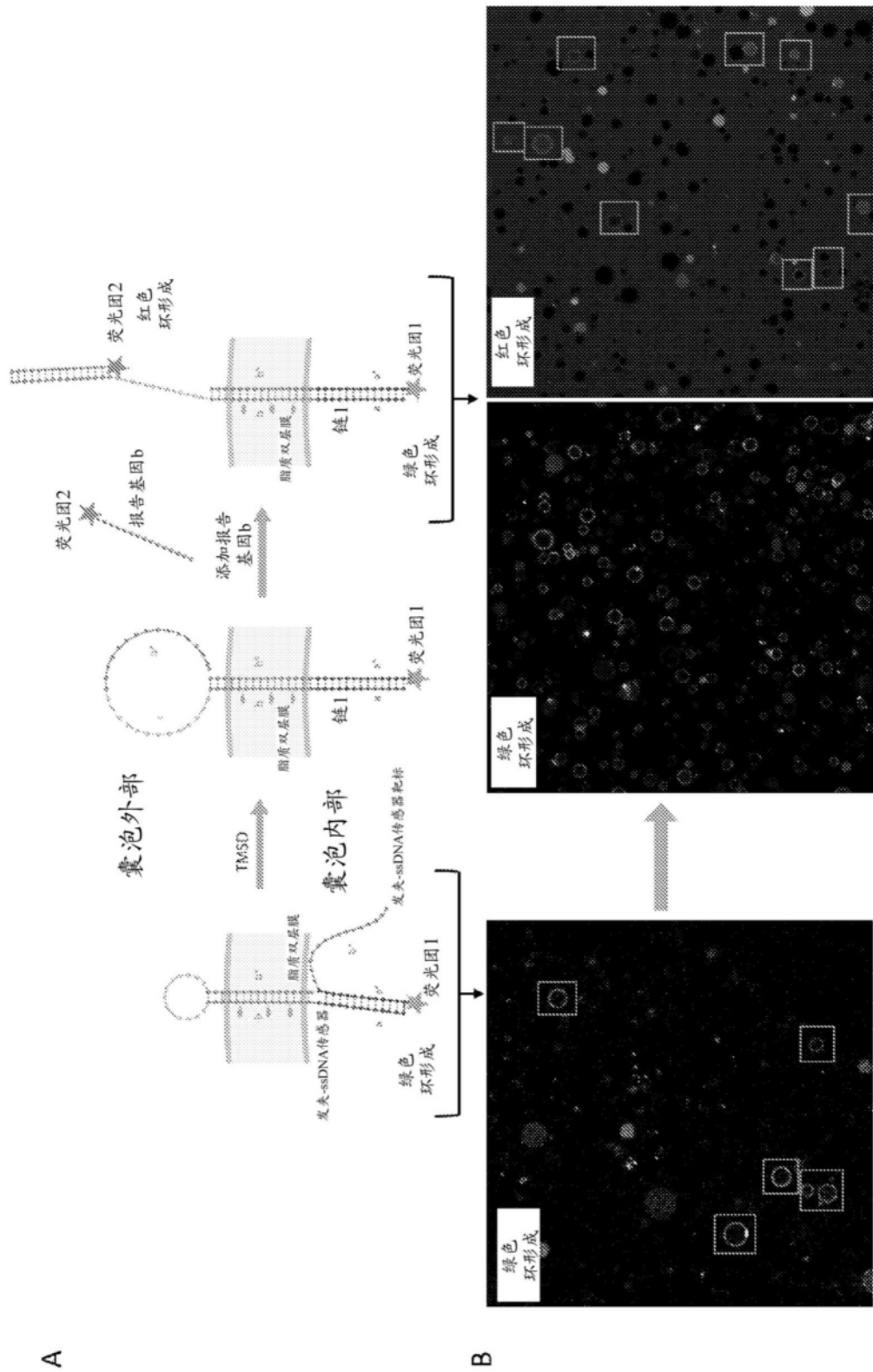


图9A-9B

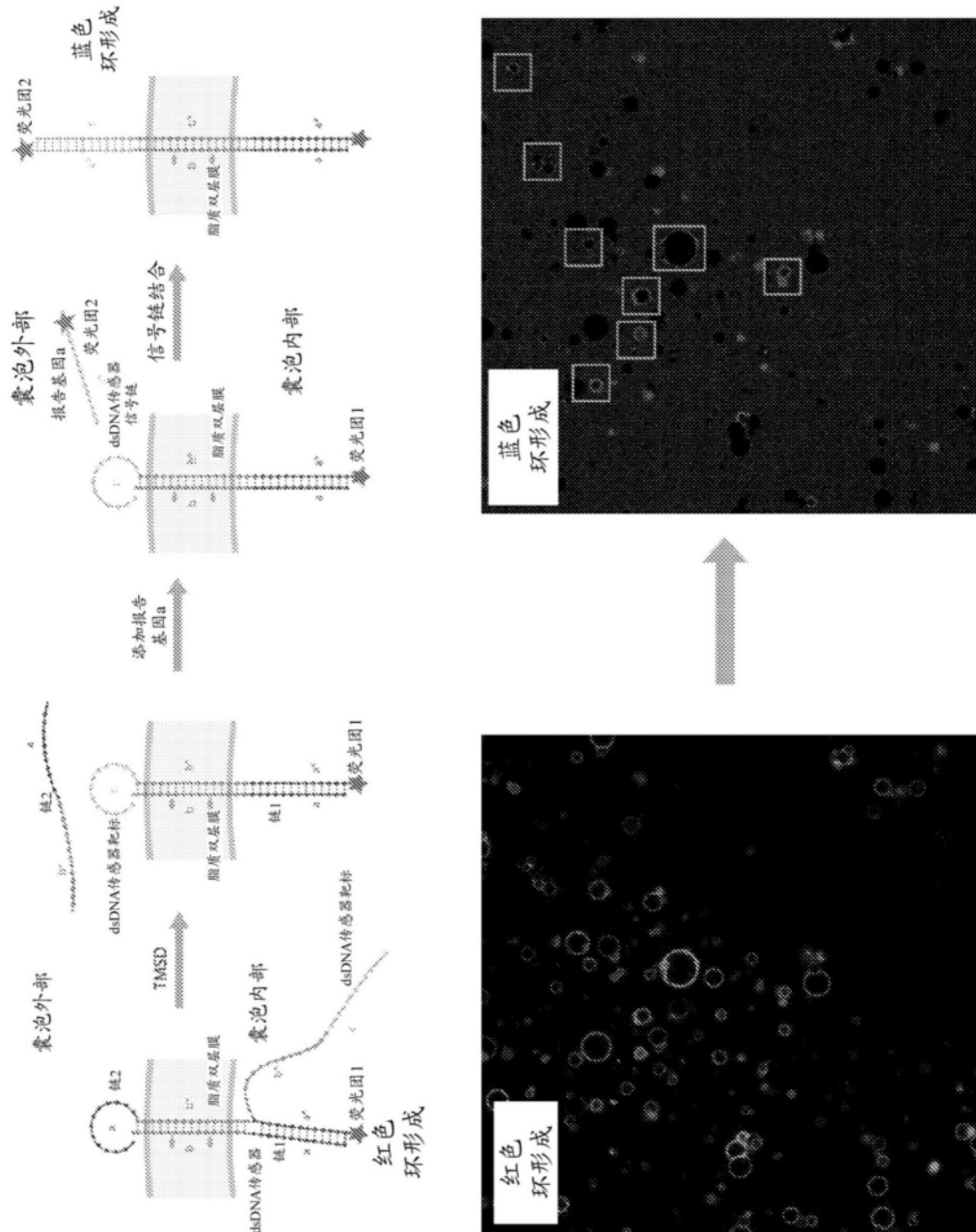


图10

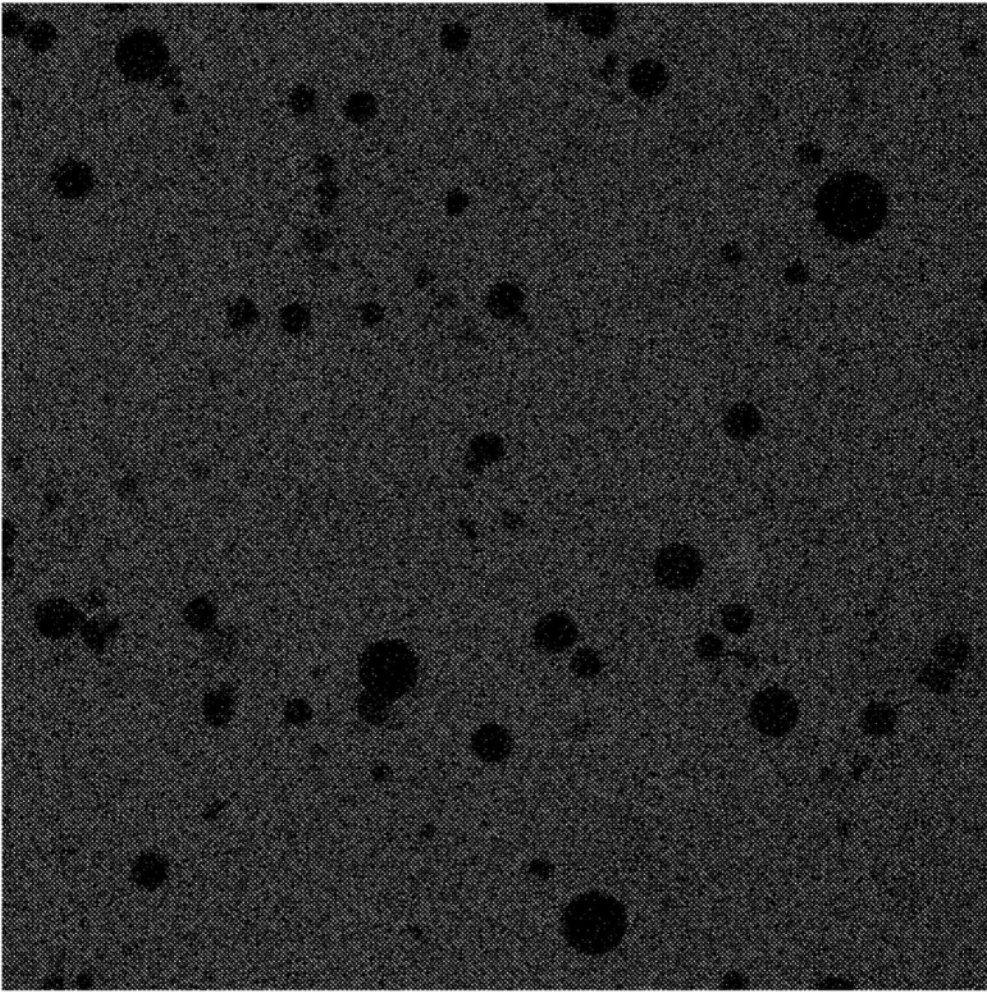


图11