(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114176586 B
(45)授权公告日 2025.01.07

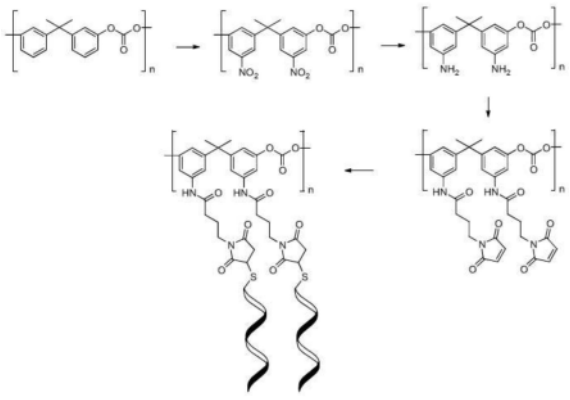
(21)申请号 202111395029.0
(22)申请日 2013.12.13
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114176586 A
(43)申请公布日 2022.03.15
(30)优先权数据
61/737,237 2012.12.14 US
(62)分案原申请数据
201380065515.3 2013.12.13
(73)专利权人 明德拉公司
地址 美国加利福尼亚州
专利权人 斯克利普斯研究所
(72)发明人 塔希尔·A·玛穆德
图斌·J·迪克森
内蒂尔·A·玛穆德
佩特·卡佩克
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 武晶晶
(51)Int.Cl.
A61B 5/1468(2006.01)
A61B 5/145(2006.01)
A61B 5/15(2006.01)
A61B 5/00(2006.01)
A61B 10/00(2006.01)
A61B 10/02(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
C12Q 1/6806(2018.01)
C12Q 1/6837(2018.01)
C12Q 1/6841(2018.01)
G01N 1/08(2006.01)
(56)对比文件
US 2011160069 A1,2011.06.30
CN 101370946 A,2009.02.18
审查员 孙晓彤
权利要求书1页 说明书41页 附图6页

(54)发明名称

用于检测和获取生物标志物的方法和装置

(57)摘要

本发明提供了用于原位检测和捕获来自受试者的分子生物标志物的装置和方法。具体而言,该装置包含微针阵列,该微针附接至对一种或多种感兴趣的生物标志物具有特异性的探针。该装置可以直接在受试者上使用(例如,通过皮肤刺穿)以检测受试者身体(例如,组织、血流)中的生物标志物。



CN 114176586 B

1.一种试剂盒,其包含:

(a)包含多个微针的装置,其中所述多个微针包含共价或非共价地附接至能够与生物标志物杂交的第一探针的至少一个微针,其中所述生物标志物包括受试者的皮肤样品中的mRNA多核苷酸;和

(b)用于聚合酶链反应的一组试剂。

2.权利要求1的试剂盒,其中至少一个微针共价或非共价地附接至能够与不同生物标志物杂交的第二探针。

3.权利要求1的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含固定器。

4.权利要求1的试剂盒,其中所述探针是与所述生物标志物互补的多核苷酸。

5.权利要求4的试剂盒,其中所述探针是能够与相同生物标志物的不同核苷酸多态性杂交的不同多核苷酸探针。

6.权利要求1的试剂盒,其中该组试剂包含聚合酶、缓冲液和对照样品。

7.权利要求1的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含关于其用途的书面说明。

8.权利要求1的试剂盒,其包含能够与多个不同生物标志物杂交的多个探针,其中所述多个探针附接至相同或不同的微针。

9.权利要求8的试剂盒,其中至少两个不同的探针附接至相同的微针。

10.权利要求1的试剂盒,其进一步包含能够与特异性生物标志物杂交的至少两个相同的探针,其中相同的探针附接至一个或多个微针。

11.权利要求1的试剂盒,其中所述微针由聚合物、金属或陶瓷制成。

12.权利要求11的试剂盒,其中所述微针包含聚合物。

13.权利要求1的试剂盒,其中所述探针经由连接体附接至所述微针。

14.权利要求13的试剂盒,其中所述连接体是巯基/氨基双官能连接体。

15.权利要求13的试剂盒,其中所述连接体是聚(乙二醇)连接体。

16.权利要求1的试剂盒,其进一步包含用于扩增和鉴别通过所述探针捕获的生物标志物的隔室。

17.权利要求1的试剂盒,其中所述探针包含当该探针检测到所述生物标志物时发射视觉信号的传感器。

18.权利要求1的试剂盒,其中与所述皮肤样品的接触从皮肤状况检测或提取一种或多种生物标志物。

19.权利要求1的试剂盒,其中与所述皮肤样品的接触从眼状况检测或提取一种或多种生物标志物。

20.权利要求1的试剂盒,其中该组试剂用于逆转录酶聚合酶链反应。

21.权利要求1的试剂盒,其中所述探针包含与所述生物标志物互补的DNA多核苷酸。

用于检测和获取生物标志物的方法和装置

[0001] 本申请是申请日为2013年12月13日、申请号为201380065515.3、发明名称为“用于检测和获取生物标志物的方法和装置”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2013年12月13日、申请号为PCT/US2013/075187)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2012年12月14日提交的美国临时专利申请系列号61/737,237的权益,其通过引用全文并入本文。

背景技术

[0004] 生物标志物的分析正快速地变为疾病的早期检测、患者分层和监测治疗效力的优选方法。对生物标志物变化的快速且高度灵敏的检测通常在技术上是不可能的,或者可能需要涉及多个处理步骤的繁琐程序,需要大的样品体积和延长的诊断/预后时间线。来自患者的样品通常具有有限的体积并且不适合需要延长处理时间的多个步骤的程序或处理。

[0005] 当前用于检测感兴趣的分子生物标志物或生物分析物以供诊断应用的方法主要依赖于从患者提取体液(例如,血液、间质组织液)。正是从这种体液样品来测定特异性生物标志物。最近的发明并非从应用部位直接对临床相关的生物标志物进行采样,而相反,需要对体液的进一步处理。并非基于分子测定的其它诊断方法例如活检通常是麻烦的,并且由于其固有的视觉和主观性质而伴有误诊风险。但是,对于局部的、非循环生物标志物而言,这通常已经成为迄今仅有的诊断选择。

[0006] 对于患有多种疾病或病症或处于发展多种疾病或病症的风险中的受试者,在本领域中存在对检测和分析其体内存在的生物标志物的更好手段的需求。本发明满足了这种和其它需求。

发明内容

[0007] 在一个方面,本发明提供了用于从受试者的组织或生物样品原位检测或提取一种或多种生物标志物的装置。该装置可以包含微针阵列和多个对该生物标志物具有特异性的探针,其中该探针共价地附接至微针。在一些所述装置中,该探针对不同生物标志物是特异性的,且各个不同的探针附接至不同的微针。在一些其它装置中,针对特异性生物标志物的相同探针附接至两个或更多个微针。所述装置中的微针可以由聚合物、金属、陶瓷或任何其它合适的材料制成。

[0008] 在一些情况下,本公开提供了用于从受试者的原位组织或生物样品检测或提取一种或多种生物标志物的装置,其包括一个或多个微针,和一个或多个对该生物标志物具有特异性的探针,其中该探针经由共价或非共价连接附接至微针。

[0009] 所述装置可以包含第一微针。该第一微针可以共价地附接至第一探针,第一探针对第一生物标志物是特异性的。或者,第一微针可以非共价地附接至第一探针。此外,第一探针可以附接至多个微针。在一些情况下,本发明提供了包含第一微针的装置,其中第一微针共价或非共价地附接至对第一生物标志物具有特异性的第一探针。在一些情况下,第一

生物标志物可以是多核苷酸。第一探针可以是与第一生物标志物互补的多核苷酸。在其它情况下,第一生物标志物可以是多肽、抗体、代谢物或小分子。此外,第一探针可以是多核苷酸、多肽、蛋白质、抗体、小分子或生物受体。在一些情况下,第一针在基底上形成。

[0010] 所述装置还可以包含第二探针,第二探针对第二生物标志物是特异性的。第二探针可以不同于第一探针。第二探针可以共价或非共价地附接至第一微针。或者,第二探针可以共价或非共价地附接至第二微针。第二生物标志物可以是多核苷酸。第二探针可以是与第二生物标志物互补的多核苷酸。第二生物标志物还可以是多肽、抗体、代谢物或小分子。此外,第二探针可以是多核苷酸、多肽、蛋白质、抗体、小分子、生物受体。在一些情况下,第一探针与第一核苷酸多态性(polymorphism)特异性地结合且第二探针与第二核苷酸多态性特异性地结合。在一些情况下,第一和第二探针是各自对相同生物标志物的不同表位具有特异性的不同抗体。

[0011] 在一些情况下,所述装置提供包含聚合物、金属或陶瓷的微针。第一探针可以共价或非共价地附接至多个微针。第二探针和多个其它探针可以共价或非共价地附接至多个微针。

[0012] 本发明的一些装置涉及检测核酸生物标志物。在这些装置中,可以缀合至微针的探针是与生物标志物互补的寡核苷酸或多核苷酸。一些装置使用用热塑性聚合物制成的微针。装置中的多核苷酸探针可以通过包括但不限于巯基/氨基双官能连接体或聚(乙二醇)连接体的许多合适的连接而缀合至微针。在一些情况下,本发明的装置进一步包含用于扩增和鉴别第一和第二生物标志物的隔室。

[0013] 本发明的一些其它装置特别设计用于检测肽或蛋白质生物标志物。在一些这样的装置中,固定在微针上的探针是对生物标志物具有特异性的抗体。在本发明的多种实施方案中,使用平面基底来支撑微针阵列。本发明的装置还可以包含用于扩增通过探针检测的生物标志物的工具。

[0014] 该装置可以包含多个微针。该多个微针可以包含共价或非共价地附接至对生物标志物具有特异性的至少一个探针的至少一个微针。该生物标志物可以指示特定状况,包括但不限于皮肤或眼状况。在一些情况下,该生物标志物可以指示皮肤状况。在一些实例中,该皮肤状况是皮肤癌。在其它情况下,该生物标志物可以指示眼状况。在一些实例中,该眼状况是眼癌或眼睛炎症。

[0015] 在一些情况下,本公开提供了包含多个微针的装置,其中所述多个微针包含共价或非共价地附接至对生物标志物具有特异性的至少一个探针的至少一个微针,并且该生物标志物指示皮肤或眼状况。在一些情况下,该生物标志物是多核苷酸,且该至少一个探针与生物标志物互补。在一些情况下,该至少一个探针包含对相同生物标志物的不同核苷酸多态性具有特异性的不同多核苷酸探针。在一些情况下,该生物标志物是肽或多肽,且所述至少一个探针是对该生物标志物具有特异性的抗体。在一些情况下,所述至少一个探针包含对相同生物标志物的不同表位具有特异性的不同抗体。

[0016] 本发明的装置可以包含对多个不同生物标志物具有特异性的多个探针,其中该多个探针附接至相同或不同的微针。在一些情况下,至少两个不同探针附接至相同的微针。在一些情况下,该装置包含至少两个针对特异性生物标志物的相同探针,其中所述至少两个相同探针附接至一个或多个微针。

[0017] 或者,生物标志物还可以在手术中程序期间获得。所述装置还可以包含在探针检测到生物标志物时发射光信号的传感器。在一些实例中,探针的光信号可以在探针检测到生物标志物时改变。

[0018] 在另一个方面,本公开提供了用于从受试者中的原位组织(例如,皮肤、血流、组织)或离体组织样品检测或扩增一种或多种生物标志物的方法。该方法要求(a)制备多个微针,多个对生物标志物具有特异性的探针共价地附接至该微针,(b)使微针与受试者的组织或生物样品接触,和(c)检测与微针上的探针结合的生物标志物。

[0019] 在一些情况下,本公开提供了用于从受试者中的原位组织或生物样品检测一种或多种生物标志物的方法,其包括(a)使微针与受试者的组织或生物样品接触,其中该微针附接至一组探针,并且其中该探针与一种或多种生物标志物原位结合;和(b)检测与探针结合的一种或多种生物标志物。

[0020] 在一些情况下,本公开提供了包含多个微针的装置,其中所述多个微针包含共价或非共价地附接至对生物标志物具有特异性的探针的至少一个微针,其中该探针包含当该探针检测到该生物标志物时发射光信号的传感器。在一些情况下,该探针的光信号当其检测到该生物标志物时增加。在一些情况下,该探针的光信号当其检测到该生物标志物时减少。

[0021] 在一些情况下,本公开提供了用于从受试者中的原位组织或生物样品检测一种或多种生物标志物的方法,其包括(a)制备包含一个或多个微针的装置,一个或多个对生物标志物具有特异性的探针共价地附接至所述微针;(b)使微针装置与受试者的组织或生物样品接触;和(c)检测与微针阵列上的探针结合的生物标志物。

[0022] 在一些情况下,本公开提供了用于从受试者中的原位组织或生物样品检测一种或多种生物标志物的方法,其包括:(a)使微针装置与受试者的组织或生物样品接触,其中该微针装置包含对所述一种或多种生物标志物具有特异性的一个或多个探针,其中至少一个探针包含在该探针检测到该生物标志物时发射视觉信号的传感器;和(b)基于该视觉信号检测生物标志物。

[0023] 或者,该方法可以包括(a)使微针装置与受试者的组织或生物样品接触,且至少两个探针对所述一种或多种生物标志物具有特异性,其中对所述生物标志物具有特异性的至少两个探针是不同的,其中该探针经由共价或非共价连接附接至微针,和(b)检测与该探针结合的生物标志物。

[0024] 在一些情况下,本公开提供了用于检测受试者的组织中的一种或多种生物标志物的方法,其包括(a)使微针与受试者的组织原位接触,其中该组织包含细胞外基质,其中该微针共价地附接至一组探针,且其中该探针与生物标志物原位结合;和(b)破坏细胞外基质。在一些情况下,通过酶活性破坏细胞外基质。在一些情况下,破坏细胞外基质包括向细胞外基质施加超声能。在一些情况下,通过电势破坏细胞外基质。

[0025] 在另外的实例中,方法可以包括(a)使微针装置与包含细胞外基质的样品接触,其中微针共价地附接至一组探针,且其中该探针与生物标志物原位结合;和(b)破坏细胞外基质。或者,该方法可以包括破坏细胞膜。在任一个实例中,可以通过酶活性、超声能或电势破坏细胞外基质或细胞膜。

[0026] 在又一个实例中,方法可以包括:(a)使微针装置与受试者的组织或生物样品接

触,其中该微针装置包含一个或多个对所述一种或多种生物标志物具有特异性的探针;和(b)扩增该生物标志物。

[0027] 生物标志物可以是多核苷酸,且探针可以是与该生物标志物互补的多核苷酸。在一些情况下,探针可以是对相同生物标志物的不同核苷酸多态性具有特异性的不同多核苷酸探针。

[0028] 生物标志物可以是肽或多肽,且探针可以是对该生物标志物具有特异性的抗体。在一些情况下,探针可以是对相同生物标志物的不同表位具有特异性的不同抗体。

[0029] 为了同时检测不同的生物标志物,在所述方法中所用的探针可以制成为对不同的生物标志物具有特异性。探针可以附接至不同的微针,或者探针可以附接至相同的微针。在一些其它实施方案中,至少两个微针可以带有相同的探针,或者多个探针可以用于检测特异性的生物标志物。

[0030] 本公开还提供了制备微针装置的方法,其包括:(a)获得包含无机盐的溶液;(b)向该溶液中添加探针和微针;和(c)在该溶液内使探针缀合至微针。在一些情况下,该无机盐是氯化钠。在一些情况下,该无机盐的浓度小于2.5M。

[0031] 任何合适的材料可以用于制造在这些方法中使用的微针阵列。例子包括但不限于聚合物、金属或陶瓷。本发明的一些方法拟用于检测核酸生物标志物。在这些方法中,所用的探针是具有与生物标志物的序列互补的序列的寡核苷酸或多核苷酸分子。在一些这样的方法中,通过PCR或定量实时PCR(qRT-PCR)检测和分析由微针装置捕获的核酸生物标志物。在一些这样的方法中,微针由聚合物制成,且探针经由巯基/氨基双官能连接体附接至微针。或者,微针由不锈钢制成并用金涂覆,且探针经由巯基连接体附接至微针。在一些实施方案中,微针可以是实心的。本发明的一些其它方法拟用于检测肽或多肽生物标志物。在这些方法中,所用的探针是能够与生物标志物特异性结合的分子,例如单克隆抗体。经用微针缀合的抗体捕获,与微针上的探针结合的肽或蛋白质生物标志物可以通过添加寡核苷酸标记的第二抗体以及后续对缀合的标签的PCR扩增来检测。

[0032] 在一些情况下,用于从受试者中的皮肤或眼组织检测一种或多种多核苷酸生物标志物的方法可以包括使微针装置与受试者的皮肤或眼组织接触。该方法可以进一步包括使微针装置与受试者的皮肤毛细血管接触。在其它情况下,该方法可包括在手术中程序期间使微针装置与受试者的组织或生物样品接触。该组织或生物样品可以来自选自脑、心脏、乳房、肝、胰脏、脾脏、膀胱、胃、肺、子宫、子宫颈、前列腺、肾、肠、阑尾和结肠的器官。该方法还可以包括在将肿瘤从受试者中去除后使微针与肿瘤的边缘接触。在一些情况中,本公开的方法检测存在于受试者的血液中的生物标志物。

[0033] 本公开还提供了用于将探针缀合至微针的方法,其中加入无机盐。无机盐的实例包括但不限于锂盐、钾盐、钠盐、镁盐和钙盐,其通常具有卤素反荷离子。在一些情况下,该无机盐是氯化钠。该无机盐可以以约0.1M至2.0M的浓度添加。此外,该无机盐可以以约0.5M至1.5M的浓度添加。

[0034] 本发明的多种方法可以进一步包括从获自受试者的参考组织检测一种或多种生物标志物。本发明的一些装置或方法被设计成用于从受试者的血流检测和获取生物标志物。在这些实施方案中,通过刺穿受试者的皮肤使探针缀合的微针阵列与受试者的血流接触。

[0035] 在又另一个方面中,本发明提供了包含任何用于检测或提取在本申请中描述的生物标志物的装置的试剂盒。该试剂盒还可以包含用于聚合酶链反应的一组试剂。在一些实例中,该组试剂可以用于逆转录酶聚合酶链反应。该试剂盒还可以包含固定器(holder)或关于其用途的书面说明。

[0036] 在一些情况下,本公开提供了一种试剂盒,其包含:(a)包含多个微针的装置,其中所述多个微针包含共价或非共价地附接至对生物标志物具有特异性的第一探针的至少一个微针;和(b)用于聚合酶链反应的一组试剂。在一些情况下,该试剂盒进一步包含固定器。在一些情况下,该组试剂包含聚合酶、缓冲液和对照样品。在一些情况下,该试剂盒进一步包含关于其用途的书面说明。

[0037] 在另一方面,本发明提供了一种组合物,其包含用能够破坏细胞外基质的物质(substrate)涂覆的多个微针。在一些情况下,该物质可以是酶。该酶可以选自丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶和MMP。特定的酶包括木瓜蛋白酶、透明质酸酶、链激酶、链道酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、α-胰凝乳蛋白酶、α-淀粉酶、DNase、胶原酶和舒替兰酶(sutilain)。在一个实例中,该酶是透明质酸酶。

[0038] 对本发明的性质和益处的进一步理解可以通过参考说明书和权利要求书的剩余部分而实现。

[0039] 援引并入

[0040] 在本说明书中提及的所有出版物和专利申请均通过引用而并入,其程度犹如特别地且单独地指出各单独的出版物或专利申请均通过引用而并入。

附图说明

[0041] 在所附权利要求书中特别地阐述了本发明的新颖特征。通过参考以下对其中利用了本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述和附图(还称为"图"),将会获得对本发明的特征和益处的更好理解,附图中:

[0042] 图1示出了聚碳酸酯表面的化学修饰和巯基修饰的DNA探针的附接的方案。

[0043] 图2示出了使用远红外滤光器(Far Red filter)通过共聚焦显微镜成像的、用带有5'-Cy5修饰的DNA修饰的聚合物表面。图像左部中的区域被修饰。

[0044] 图3示出了用包含荧光dUTP碱基的DNA修饰的不锈钢表面。A小图.DNA在钢表面上的荧光图像。B小图.显示不锈钢样品的表面的亮视野图像。

[0045] 图4是具有多个微针的本公开装置的表面的图示。

[0046] 图5示出了偶联至金表面的DNA探针与生物标志物杂交的过程。

[0047] 图6示出了利用本公开的装置提供处理的方法。

[0048] 图7显示了在将NaCl添加至偶联程序后,寡核苷酸与金属微针阵列表面的增强的结合。

[0049] 图8显示了使用本发明的方法测定匀浆化的人皮肤样品获得的qRT-PCR数据。

发明详述

[0050] 尽管已经在本文中显示和描述了本发明的多种实施方案,但是对本领域技术人员显而易见的是这些实施方案仅作为实例提供。在不偏离本发明的情况下,本领域技术人员

可以想到许多改变、变化和替换。应该理解,本文描述的本发明的实施方案的多个替代方案可用于实施本发明。

[0051] 本发明提供了用于从受试者的身体检测和获取生物标志物、尤其是分子生物标志物的装置和方法。在一些实施方案中,根据本发明制造具有单个或多个微针的基于微针阵列的装置。该阵列上的单独微针的长度可以改变,例如,从50μm至5mm。该装置可以通过不同的材料、复合材料和材料组合制造,包括但不限于金属和金属合金、无机陶瓷和聚合物。化学修饰微针以将针对生物标志物的探针偶联至微针表面。具体的偶联化学取决于微针的材料。可以用固定在相同阵列或相同微针上的同源探针检测不同的生物标志物。作为示例,为了使所需的生物标志物与呈现的探针相结合的目的,可以将装置施加于患者的解剖学位置如皮肤、眼、肿瘤或其它组织上。可以用手(例如,拇指按压)、施加器装置来进行施加,并在采样期间使用或不使用条或带将其保持在适当位置。微针探针的物理插入可以破坏细胞膜以释放遗传物质,包括生物标志物,使其可与插入的微针上的探针结合。细胞外生物标志物可直接与探针结合,并且不需要从由破坏的细胞释放的材料采样。

[0052] 生物标志物与微针结合所需的时间将取决于许多参数,包括但不限于生物标志物的普遍存在量(prevalent quantity)、生物分布和浓度,组织构造,和微针探针的物理和化学尺寸(例如,表面积、探针的数目、结合位点的数目)。施加时间可以为例如小于10秒至60分钟。从组织移除微针阵列后,可以使用包括但不限于PCR、定量PCR、蛋白质PCR、夹心ELISA、洗脱质谱法、洗脱Western印迹法和洗脱ELISA的多种不同技术来测定生物标志物。生物标志物可以在从微针上分离后测定或直接在微针上测定。

[0053] 如在实施例中详细说明的,取决于微针和待偶联的探针,可以在探针与微针的缀合中使用多种化学。为了生物分子的共价附接而对由聚合物制成的微针的化学修饰可以利用已经在本领域中开发的许多连接来进行。例如,对于具有聚碳酸酯表面的微针,碳酸酯单体包含可以在聚合后化学衍生的芳香族部分。利用硝酸处理微针,接着还原所得硝基基团,提供了胺柄(handle),通过该柄,分子可以偶联至聚合物主链。重要的是,此两步反应可以在制备的微针阵列上进行,而不会损害阵列或单独的微针的完整性。使用此程序,标准酰胺键偶联试剂可以用于将含羧酸探针附接至微针表面上。

[0054] 当用金属制造微针时,对金属表面应用如对于聚合物表面所述的相同原理是可获得的。例如,可以通过溅射涂覆法用金涂覆不锈钢表面,从而提供化学柄以供附接。通过利用良好表征的巯基对金表面的亲和性,可以将在一个末端上具有巯基而在另一个末端上具有胺的二价交联剂附接至金属表面上,由此允许相同的探针分子至微针表面的偶联化学。为了生物分子的共价连接而对其它类型微针表面(例如,无机陶瓷)进行化学修饰的合适方法在本领域中也是已知的。

[0055] 本文描述的发明在诊断的许多不同方面具有广泛的适用性,所述不同方面包括用于诊断和疾病预后的遗传(例如,mRNA、DNA)、蛋白质、激素、小分子和细胞生物标志物。例如,本文描述的装置或方法可以用于检测基于皮肤的生物标志物、检测全身循环生物标志物、病原体检测(例如,细菌、病毒或寄生虫)或在手术肿瘤切除过程中确定肿瘤的边缘。如本文所述,本发明的基于皮肤的诊断应用的具体实例包括皮肤恶性黑素瘤、非黑素细胞皮肤癌(例如,基底细胞癌、鳞状细胞癌)、自身免疫性疾病(例如,银屑病)、传染病和热带病(例如,布路里溃疡、盘尾丝虫病)的生物标志物的检测。本发明的非基于皮肤的诊断应用的

具体实例包括肿瘤疾病、血液系统疾病、心血管病、唐氏综合征的标志物的检测和在临床试验期间的实时、快速的生物标志物检测。

[0056] 下面的部分提供了关于实施本发明的更详细的指导。

[0057] 定义

[0058] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语均具有如本发明所属领域的技术人员通常理解的相同含义。下面的参考文献向技术人员提供了本发明中所用的许多术语的一般定义:Academic Press Dictionary of Science and Technology,Morris(编),Academic Press(第1版,1992);Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology,Smith等(编),Oxford University Press(修订版,2000);Encyclopaedic Dictionary of Chemistry,Kumar(编),Anmol Publications Pvt.Ltd.(2002);Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,Singleton等(编),John Wiley& Sons(第3版,2002);Dictionary of Chemistry,Hunt(编),Routledge(第1版,1999);Dictionary of Pharmaceutical Medicine,Nahler(编),Springer-VerlagTelos(1994);Dictionary of Organic Chemistry,Kumar和Anandand(编),Anmol Publications Pvt.Ltd.(2002);以及A Dictionary of Biology(Oxford Paperback Reference),Martin和Hine(编),Oxford University Press(第4版,2000)。此外,提供下面的定义以帮助读者实施本发明。

[0059] 生物标志物广义地是指作为正常生物过程、致病过程或对治疗性干预的药理学响应的指标而客观地测量和评价的任何特征。除非另外指出,如本文所用的术语生物标志物特别是指具有生物物理学性质的生物标志物,该生物标志物允许它们在生物样品(例如,血浆、血清、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、活检物)中的测量。除非另外指出,术语生物标志物与“分子生物标志物”或“分子标志物”可互换使用。生物标志物的实例包括核酸生物标志物(例如,寡核苷酸或多核苷酸)、肽或蛋白质生物标志物、脂质和脂多糖标志物。

[0060] 如本文所用,微针装置或微针阵列(微阵列)是指包含至少一个向其上固定诊断剂或化合物的小刺穿元件或微针的装置。微针能够在接触时刺穿人或其它哺乳动物受试者中的生物障碍(例如,皮肤的角质层)。优选地,该装置包含多个这样的微针,例如,2、5、10、25、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、2000、5000、10000、20000个或更多个。通过将诊断探针缀合至微针,本发明的微针装置提供了用于原位检测受试者的组织或生物样品(例如,血流或皮肤)中的生物标志物的手段。

[0061] 如本文所用的术语“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合形式,其包含嘌呤和嘧啶碱基或其它天然的、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基。本发明的实施方案的多核苷酸包括脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或核糖核酸的DNA拷贝(cDNA)的序列,所有这些可以由天然来源分离、重组生成或人工合成。多核苷酸的另外的实例是聚酰胺多核苷酸(PNA)。多核苷酸和核酸可以作为单链或双链存在。多核苷酸的主链可以包含如一般可以在RNA或DNA中发现的糖和磷酸基团,或修饰或取代的糖或磷酸基团。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。核苷酸的序列可被非核苷酸组分中断。由核苷酸组成的聚合物如核酸、多核苷酸和多核苷酸在本文中还可以称作核苷酸聚合物。

[0062] 术语“寡核苷酸”被定义为包含两个或更多个脱氧核糖核苷酸,优选多于三个脱氧核糖核苷酸的分子。其确切大小将取决于许多因素,这些因素进而取决于寡核苷酸的最终功能和用途。如本文所用的术语“引物”是指寡核苷酸,无论是如在纯化的限制酶切消化物中天然存在的还是合成生成的,当被置于诱导与核酸链互补的引物延伸产物的合成的条件下,即,在核苷酸和诱导剂如DNA聚合酶的存在下和在合适的温度和pH下,其能够充当合成的启动点。引物可以是单链的或双链的,并且必须足够长以引发在诱导剂的存在下所需延伸产物的合成。引物的确切长度将取决于许多因素,包括温度、引物来源和所用方法。例如,对于诊断应用,取决于靶序列的复杂性,寡核苷酸引物通常包含15-25个或更多个核苷酸,尽管其可以包含更少的核苷酸。在确定引物的合适长度中涉及的因素是本领域普通技术人员容易知晓的。

[0063] 多肽是包含通过酰胺键(肽键)连接在一起的氨基酸残基单体的聚合物链。该氨基酸可以是L-光学异构体或D-光学异构体。通常,多肽是指氨基酸残基的长聚合物,例如由至少多于10、20、50、100、200、500个或更多个氨基酸残基单体组成的聚合物。多肽可以是至少两个氨基酸、肽模拟物、蛋白质、重组蛋白、抗体(单克隆的或多克隆的)、抗体片段、抗原、表位、酶、受体、维生素或其结构类似物或组合的链。但是,除非另外指出,如本文所用的术语多肽还包括短肽,其通常包含两个或更多个氨基酸单体,但通常不超过10、15或20个氨基酸单体。

[0064] 蛋白质是通过肽键连接的氨基酸的长聚合物并且其还可以包含两个或更多个多肽链。更具体地,术语“蛋白质”是指包含特定顺序的氨基酸的一条或多条链的分子;例如,由编码该蛋白质的基因中核苷酸的碱基序列确定的顺序。蛋白质对于身体的细胞、组织和器官的结构、功能和调节是必不可少的,且各种蛋白质具有独特的功能。实例是激素、酶和抗体。在一些实施方案中,术语多肽和蛋白质可以互换使用。

[0065] 如本文所用的“生物样品”是怀疑包含感兴趣的生物标志物或分析物的生物组织或化学流体的样品。样品可以是离体样品或体内样品。样品包括,例如,体液如全血、血清、血浆、脑脊液、尿、淋巴液,和呼吸道、肠道和泌尿生殖道的多种外分泌物如泪液、唾液、精液、乳汁等;和其它生物流体如细胞培养悬浮液、细胞提取物、细胞培养上清液。样品还可以包括例如来自肺、肝、脑、眼、舌、结肠、肾、肌肉、心脏、皮肤、胰脏、子宫、子宫颈、前列腺、唾液腺等的组织活检物。样品还可以是例如使用激光捕获显微镜解剖法从患者提取并随后处理的显微活检物(microbiopsies)、小样品或甚至单细胞。样品可以悬浮或溶解在例如缓冲液、提取剂、溶剂等中。

[0066] 如本文所用,术语“组织”是指相似细胞和围绕它们的细胞内物质的集合。在身体中有4种基本组织:1)上皮;2)结缔组织,包括血液、骨和软骨;3)肌肉组织;和4)神经组织。

[0067] 在本文中范围可以表示为从“约”一个特定值和/或到“约”另一个特定值。当表示这样的范围时,另一个实施方案包括从一个特定值和/或到另一个特定值。类似地,当值通过使用在前的“约”而表示为近似值时,应当理解所述特定值构成另一个实施方案。可以进一步理解,各范围的端点在与另一个端点相关时和独立于另一个端点时都是重要的。如本文所用的术语“约”是指在特定用途的背景内自指定数值±15%的范围。例如,约10将包括8.5至11.5的范围。

[0068] 共价键是涉及原子间的电子对的共享的化学键。共价键合包括多种相互作用,包

括σ-键合、π-键合、金属-金属键合、抓氢(agostic)相互作用和三中心两电子键。非共价相互作用与共价键的不同之处在于其不涉及电子的共享。非共价键通常可以分为4个类别:静电的、π-效应、范德华力和疏水作用。

[0069] 生物标志物

[0070] 本文所述的装置和方法可用于多种诊断应用中以检测和捕获特异性生物标志物。生物标志物可在临床实践中用来鉴别疾病的风险或诊断疾病、对患者进行分层、评价疾病严重性或进展、预测预后或指导治疗。在药物开发中,生物标志物可以用于帮助确定药物如何在体内起作用,以确定药物的生物有效剂量,帮助评价药物是否安全或有效,以及帮助鉴别最可能响应治疗的患者或当用药物治疗时最不可能遭受不良事件的患者。生物标志物有时可用作药物或治疗的审批过程的一部分,以向管理决策提供信息。

[0071] 在一些情况下,利用本文所述的微针阵列装置和常规实施的扩增技术(例如,基因组或蛋白质组技术),可以使用本发明的方法和装置检测受试者体内的多种生物标志物。在一些情况下,可以使用微针阵列装置捕获一种生物标志物或一组生物标志物,然后使用一个或多个额外的标记的探针来检测被捕获的生物标志物,从而检测来自受试者的多种生物标志物。

[0072] 可以使用本公开检测的生物标志物包括基于核酸的生物标志物(DNA、RNA、mRNA转录物、基因组DNA、tRNA、siRNA、miRNA、线粒体DNA、线粒体RNA、外来体(exosomal)核酸、无细胞DNA或RNA、带有突变基因和多态性的多核苷酸)、肽、蛋白质、脂质、脂质代谢物和小分子。生物标志物包括诊断性生物标志物(例如,用于心肌梗死的诊断的心脏肌钙蛋白)、疾病分期生物标志物(用于充血性心力衰竭的脑钠肽(brain natriuretic peptide))、疾病预后生物标志物(癌症生物标志物)和用于监测对干预的临床响应的生物标志物(用于抗糖尿病治疗的HbAlc)。它们还包括在早期药物开发中的决策中所用的生物标志物。例如,药效学(PD)生物标志物是特定药理学响应的标志,其在剂量优化研究中是特别有意义的。有疾病暗示的生物标志物的实例包括针对高胆固醇和血压的血清LDL、针对癌症的P53基因和MMP。在下面描述了适用于用本发明的方法和装置检测的特异性核酸生物标志物和蛋白质生物标志物的其它实例。

[0073] 本发明的一些优选实施方案涉及核酸生物标志物的检测和扩增。在本领域中已知许多核酸生物标志物。例子包括作为肝细胞癌的诊断性生物标志物的端粒酶逆转录酶mRNA(Miura等,Clin.Cancer Res.11:3205-9,2005)、作为肺癌的生物标志物的血浆hnRNP B1 mRNA(Sato等,J.Cancer Res.Clin.Oncol.134:1191-7,2008)、作为小细胞肺癌的生物标志物的GD2/GM2合酶mRNA(Chen等,Lung Cancer.67:216-20,2010)、作为暴发性肝炎的预后生物标志物的血清转化生长因子-αmRNA(Miura等,Hepatol Int.2:213-21,2008)、针对胃肠癌的亲斑蛋白-3mRNA(Valladares-Ayerbes等,Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.19:1432-1440,2010)、作为重金属暴露的生物标志物的金属硫蛋白(Yamada等,Industrial Health 39:29-32,2001)、作为用于监测急性髓样白血病中的最小残留疾病的生物标志物的WT1 mRNA(Sakamoto等,Tohoku J Exp Med.219:169-76,2009)和作为肾移植排斥的生物标志物的粒酶A mRNA(van Ham等,Kidney Int'l.2010年8月18日)。这些生物标志物以及在本领域中已知的多种其它核酸生物标志物都适合于用本发明的方法和装置进行检测。这些已知生物标志物的多核苷酸序列已在本领域中描述和表征。基于它们的已知序列,对于检

测这些生物标志物(例如,寡核苷酸引物)为特异性的探针可以容易地设计并用分子生物学的常规实施方法合成。参见例如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,N.Y.,(第3版,2000);和Brent等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.(ringbou ed.,2003)。

[0074] 在一些其它实施方案中,用本发明的装置和方法检测肽或蛋白质生物标志物。本文所述的方法和装置可用于检测已经在本领域中表征的多种肽或蛋白质生物标志物。适用于本发明的肽或蛋白质生物标志物的具体实例包括但不限于,作为前列腺癌的生物标志物的PSA(Polascik等,J.Urol.162:293-306,1999)、作为卵巢癌的生物标志物的癌抗原125(CA125)(Jacobs等,Lancet 353:1207-1210,1999)、作为用于检测乳腺癌的血清生物标志物的BC1、BC2和BC3(Mathelin等,Breast Cancer Res.Treat.96:83-90,2006)、作为银屑病的血清生物标志物的β-防卫素-2蛋白(Patrick等,PLoS ONE 4:e4725,2009)、作为肾细胞癌的转移的生物标志物的C-反应蛋白(Johnson等,Mol.Diagn.Ther.14:191-3,2010)、作为结缔组织增生性黑素瘤的生物标志物的高分子量黑素瘤相关抗原(Goto等,Pigment Cell Melanoma Res.23:137-140,2010)、作为炎性肠病患者中恶性转化的生物标志物的端粒酶表达(Gonzalo等,Gastroenterol Hepatol.33:288-96,2010)和作为口腔鳞状细胞癌的预后性生物标志物的胰岛素样生长因子II mRNA-结合蛋白3(IMP3)(Li等,Head Neck.2010年7月22日)。用于检测这些生物标志物的探针(例如,单克隆抗体)可以容易地利用标准免疫学技术(例如,杂交瘤技术)生成或获自商业供应商(例如,Abnova Corporation、Full Moon BioSystems和Spring Bioscience)。

[0075] 取决于待检测的生物标志物的具体类型,本文所述的微针装置可以与本领域已知的多种方法组合以用于扩增和检查分子实体。许多基因组和蛋白质组技术适于在本发明的装置和方法中用于检测和分析蛋白质和核酸标志物。例如,PCR可以用于扩增和检查与微针上的探针结合的核酸分子。ELISA可以用于分析通过本发明的基于微针的装置捕获的肽或蛋白质标志物。除基因组学和蛋白质组学平台生物标志物测定技术外,代谢物组学、脂类组学(lipidomics)和糖组学技术也可用于其它化学类别的生物标志物的鉴别和检测。例如,质谱法、色谱法和核磁共振法可用于检测和分析与微针结合的多种生物分子。

[0076] 用于附接诊断探针的微针

[0077] 本发明提供了具有共价附接的分子探针的微针装置,其用于从受试者原位检测和获取生物标志物。基于微针的装置包含一个或多个可以刺入哺乳动物的生物障碍如皮肤或粘膜中的微针。通常,微针是无创的或微创的。当存在多个微针时,该装置还可以具有支撑微针的平面基底。该基底可以由与微针的材料相同的材料制成。该基底也可以由不同的材料制成。本发明中所用的微针具有通常为20μm至1mm,优选50μm至500μm的长度(高度)。图4是本发明的包含多个微针的装置的表面的图示。401中的每个“正方形”显示单个微针。401显示了在本发明装置的表面上的多个微针,其中所述针的高度为约400μm至约1000μm。在一些实施方案中,微针的高度为约20μm至约50μm、约20μm至约100μm、约20μm至约150μm、约20μm至约200μm、约20μm至约250μm、约20μm至约300μm、约20μm至约350μm、约20μm至约400μm、约20μm至约450μm、约20μm至约500μm、约20μm至约550μm、约20μm至约600μm、约20μm至约650μm、约20μm至约700μm、约20μm至约750μm、约20μm至约800μm、约20μm至约850μm、约20μm至约900μm、约20μm至约950μm或约20μm至约1mm。在一些情况下,微针的高度小于1μm、小于5μm、

小于10μm、小于15μm、小于20μm、小于25μm、小于30μm、小于35μm、小于40μm、小于45μm、小于50μm、小于75μm、小于100μm、小于150μm、小于200μm、小于250μm、小于300μm、小于500μm、小于750μm、小于1000μm、小于2000μm、小于3000μm、小于4000μm、小于5000μm、小于7500μm或小于10000μm。在一些情况下,微针的高度大于1μm、大于5μm、大于10μm、大于15μm、大于20μm、大于25μm、大于30μm、大于35μm、大于40μm、大于45μm、大于50μm、大于75μm、大于100μm、大于150μm、大于200μm、大于250μm、大于300μm、大于500μm、大于750μm、大于1000μm、大于2000μm、大于3000μm、大于4000μm、大于5000μm、大于7500μm或大于10000μm。

[0078] 尽管针形微针可以是钝头物体,但其优选是尖头的物体。在一些实施方案中,微针具有基部直径通常为10μm至500μm,优选20μm至200μm的圆锥结构。401显示本发明的具有多个微针的装置的表面,其中基部的直径在宽度上小于10mm。对于包含多个微针的装置,微针可以成行地存在于装置上。在一些实施方案中,所述行可以按照与在行中对齐的针的间隔几乎相等的间距隔开。在一些实施方案中,所述行可以按不规则的间距隔开。

[0079] 微针可以具有多种形状,例如微针可以是圆形、圆锥形、三角形、正方形、矩形、五角形、六角形、七角形、八角形或任何其它合适的形状。微针可以是尖微针、钝微针或其任意组合。例如,本发明的包含多个尖微针的装置可以用于穿透受试者的皮肤,由此使微针上的探针与例如RNA生物标志物接触。尖微针可以用于破坏生物样品的组织,例如细胞层或细胞外膜。钝微针可以用于触摸受试者的皮肤表面,由此使微针与例如皮肤上的细胞表面生物标志物接触。在一些情况下,本公开提供了包含具有不同形状的微针(例如,尖和钝微针)的微针装置。

[0080] 在一些实施方案中,本发明的装置包含至少1个微针、至少100个微针、至少200个微针、至少300个微针、至少400个微针、至少500个微针、至少600个微针、至少700个微针、至少800个微针、至少900个微针、至少1000个微针、至少1100个微针、至少1200个微针、至少1300个微针、至少1400个微针、至少1500个微针、至少1600个微针、至少1700个微针、至少1800个微针、至少1900个微针、至少2000个微针、至少2100个微针、至少2200个微针、至少2300个微针、至少2400个微针、至少2500个微针、至少2600个微针、至少2700个微针、至少2800个微针、至少2900个微针、至少3000个微针、至少3100个微针、至少3200个微针、至少3300个微针、至少3400个微针、至少3500个微针、至少3600个微针、至少3700个微针、至少3800个微针、至少3900个微针、至少4000个微针、至少4100个微针、至少4200个微针、至少4300个微针、至少4400个微针、至少4500个微针、至少4600个微针、至少4700个微针、至少4800个微针、至少4900个微针或至少5000个微针。

[0081] 在一些实施方案中,本发明的装置包含至多10000个微针、至多5000个微针、至多2500个微针、至多2000个微针、至多1000个微针、至多500个微针、至多400个微针、至多300个微针、至多100个微针、至多90个微针、至多50个微针、至多40个微针、至多30个微针、至多20个微针、至多15个微针、至多10个微针、至多9个微针、至多8个微针、至多7个微针、至多6个微针、至多5个微针、至多4个微针、至多3个微针、至多2个微针或1个微针。

[0082] 在一些实施方案中,本发明的装置包含约1个微针至约100个微针、约1个微针至约200个微针、约1个微针至约300个微针、约1个微针至约400个微针、约1个微针至约500个微针、约1个微针至约600个微针、约1个微针至约700个微针、约1个微针至约800个微针、约1个微针至约900个微针、约1个微针至约1000个微针、约1个微针至约1100个微针、约1个微针至

约1200个微针、约1个微针至约1300个微针、约1个微针至约1400个微针、约1个微针至约1500个微针、约1个微针至约1600个微针、约1个微针至约1700个微针、约1个微针至约1800个微针、约1个微针至约1900个微针、约1个微针至约2000个微针、约1个微针至约2100个微针、约1个微针至约2200个微针、约1个微针至约2300个微针、约1个微针至约2400个微针、约1个微针至约2500个微针、约1个微针至约2600个微针、约1个微针至约2700个微针、约1个微针至约2800个微针、约1个微针至约2900个微针、约1个微针至约3000个微针、约1个微针至约3100个微针、约1个微针至约3200个微针、约1个微针至约3300个微针、约1个微针至约3400个微针、约1个微针至约3500个微针、约1个微针至约3600个微针、约1个微针至约3700个微针、约1个微针至约3800个微针、约1个微针至约3900个微针、约1个微针至约4000个微针、约1个微针至约4100个微针、约1个微针至约4200个微针、约1个微针至约4300个微针、约1个微针至约4400个微针、约1个微针至约4500个微针、约1个微针至约4600个微针、约1个微针至约4700个微针、约1个微针至约4800个微针、约1个微针至约4900个微针或约1个微针至约5000个微针。

[0083] 阵列的基底和微针可以由多种可生物降解的或不可生物降解的材料制成。微针或基底的材料的实例包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、硅、二氧化硅、陶瓷、金属(例如不锈钢、钛、镍、钼、铬和钴)和合成或天然树脂材料。一些实施方案使用可生物降解的聚合物,例如聚乳酸、聚乙交酯、聚乳酸-聚乙交酯共聚物、支链淀粉、己内酯(capronolactone)、聚氨酯或聚酐。在一些其它实施方案中,不可降解的材料用于制造微针阵列,例如聚合物聚碳酸酯、合成或天然树脂材料如聚甲基丙烯酸、乙烯乙酸乙烯酯、聚四氟乙烯、聚砜或聚甲醛。在一些实施方案中,所用材料包含诸如透明质酸、支链淀粉、葡聚糖、糊精或硫酸软骨素这样的多糖或用该多糖涂覆。在一些情况下,微针用热塑性聚合物制造。

[0084] 阵列的基底和微针可以由多种热塑性聚合物制成。热塑性聚合物的非限制性实例包括丙烯酸聚合物如聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、尼龙、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯或特氟隆(Teflon)。在一些情况下,本发明的装置使用选自聚碳酸酯、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚乙烯和聚丙烯的热塑性聚合物制造。

[0085] 不可降解的聚合物的非限制性实例包括例如硅氧烷、水凝胶如交联的聚(乙烯醇)和聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、乙烯-乙酸乙烯酯、酰基取代的乙酸纤维素及其烷基衍生物、部分和完全水解的烯烃-乙酸乙烯酯共聚物、未增塑的聚氯乙烯、交联的聚乙酸乙烯酯的均聚物和共聚物、交联的丙烯酸和/或甲基丙烯酸的聚酯、聚乙烯基烷基醚、聚氟乙烯、聚碳酸酯、聚氨酯、聚酰胺、聚砜、苯乙烯丙烯腈共聚物、交联的聚(环氧乙烷)、聚(亚烷基)、聚(乙烯基咪唑)、聚酯、聚(对苯二甲酸乙二酯)、聚磷腈和氯磺化聚烯烃及其组合。在一些实施方案中,该聚合物包含乙烯乙酸乙烯酯。

[0086] 可生物降解的聚合物的非限制性实例包括聚酯,例如3-羟基丙酸酯、3-羟基丁酸酯、3-羟基戊酸酯、3-羟基己酸酯、3-羟基庚酸酯、3-羟基辛酸酯、3-羟基壬酸酯、3-羟基癸酸酯、3-羟基十一酸酯、3-羟基十二酸酯、4-羟基丁酸酯、5-羟基戊酸酯、聚丙交酯或聚乳酸,包括聚(d-乳酸)、聚(l-乳酸)、聚(d,l-乳酸)、聚乙醇酸和聚乙交酯、聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚(丙交酯-乙交酯)共聚物、聚(ε-己内酯)和聚二噁烷酮。包括淀粉、糖原、纤维素和壳多糖在内的多糖也可用作可生物降解的材料。

[0087] 402显示了本公开的装置的表面401,其包含多个已经与至少一种类型的探针偶联

的微针。402可以与例如多核苷酸探针、肽探针、蛋白质探针或其任意组合偶联。附接至装置402上的微针的探针可以共价或非共价地偶联至微针。实施例1和2进一步详细地描述了用于将探针共价地偶联至表面的多种方法。

[0088] 可以计算本公开的装置上的两个微针的中心之间的距离以确定该装置中的微针的密度。在一些实施方案中,两个微针之间的中心至中心距离可以小于1000μm、小于900μm、小于800μm、小于700μm、小于600μm、小于500μm、小于400μm、小于300μm、小于200μm或小于100μm。在一些实施方案中,两个微针之间的中心至中心距离可以不大于100μm、不大于200μm、不大于300μm、不大于400μm、不大于500μm、不大于600μm、不大于700μm、不大于800μm、不大于900μm或不大于1000μm。

[0089] 本公开的微针可以包含多个不同直径或基部宽度。微针的基部的形状可以是例如圆形、矩形、三角形、正方形、五角形、六角形、七角形或其它几何形状。本公开的微针可以具有不大于500μm、不大于400μm、不大于300μm、不大于200μm、不大于100μm、不大于50μm、不大于40μm、不大于30μm、不大于20μm、不大于10μm、不大于1000nm、不大于900nm、不大于800nm、不大于700nm、不大于600nm、不大于500nm、不大于400nm、不大于300nm、不大于200nm或不大于100nm的直径或基部宽度。

[0090] 探针可以在微针内的多个不同深度处共价或非共价地附接至微针。403显示了具有600μm高度和200μm宽度的微针。404显示了具有600μm高度和200μm宽度的微针和在10μm深度处共价附接的探针。405显示了具有600μm高度和200μm宽度的微针和在500μm深度处共价附接的探针。在一些情况下,微针内探针的深度可以用来确定在组织中可以发现生物标志物的深度。在一些情况下,包含在不同微针的不同深度处附接有多个探针的多个微针的装置可以用来确定在组织中何处可以发现生物标志物。例如,该装置可以用来确定病变如癌性病变的大小或深度。

[0091] 探针的深度可以是约10μm、约20μm、约30μm、约40μm、约50μm、约60μm、约70μm、约80μm、约90μm、约100μm、约110μm、约120μm、约130μm、约140μm、约150μm、约160μm、约170μm、约180μm、约190μm、约200μm、约210μm、约220μm、约230μm、约240μm、约250μm、约260μm、约270μm、约280μm、约290μm、约300μm、约310μm、约320μm、约330μm、约340μm、约350μm、约360μm、约370μm、约380μm、约390μm、约400μm、约410μm、约420μm、约430μm、约440μm、约450μm、约460μm、约470μm、约480μm、约490μm、约500μm、约510μm、约520μm、约530μm、约540μm、约550μm、约560μm、约570μm、约580μm、约590μm、约600μm、约610μm、约620μm、约630μm、约640μm、约650μm、约660μm、约670μm、约680μm、约690μm、约700μm、约710μm、约720μm、约730μm、约740μm、约750μm、约760μm、约770μm、约780μm、约790μm、约800μm、约810μm、约820μm、约830μm、约840μm、约850μm、约860μm、约870μm、约880μm、约890μm、约900μm、约910μm、约920μm、约930μm、约940μm、约950μm、约960μm、约970μm、约980μm、约990μm或约1000μm。

[0092] 任选地,本发明的微针装置还可包含可用于将该装置施加于受试者的施加器单元。该施加器单元可以控制多种应用参数,例如施加阵列的速度、施加阵列的力和/或阵列冲击受试者的组织(例如,皮肤)的角度。此外,施加器可助于处理或以其它方式将阵列从贮存单元转移至受试者。在一些实施方案中,该施加器可以是充当贮存单元和施加工具的单次使用的一次性使用、可丢弃工具。合适的施加器和施加微针阵列的方法的实例在美国专利6,293,925(Safabash等)、6,743,211(Prausnitz等)、6,881,203(Delmore等)和6,855,

131(Trautman等)和美国专利申请公开2004/0181203(Cormier等)、2002/0032415(Trautman等)和2002/0087182(Trautman等)中公开。该施加器单元可以具有多个不同的形状。在一些实施方案中,该施加器单元可以是例如线形、三角形、矩形或圆盘形。在一些实施方案中,该施加器单元是笔施加器。

[0093] 用于缀合诊断探针的微针阵列可以容易地使用本领域中公知的用于制备具有显微凸起结构的阵列的材料和方法来制造。参见,例如美国专利7416541、7332197、6663820、6503231、美国专利申请20100106105和欧洲专利申请2119469A。例如,微针阵列可以通过使用硅基底的湿法蚀刻加工或干法蚀刻加工、使用金属或树脂的精密机械加工(例如,放电加工、激光加工、切割加工、热压印和注塑)和机械切割来制造。利用此类加工方法,将针部分和支撑部分模塑成一体。使针部分成为中空的方法的实例包括在制造针部分后通过使用激光加工等进行二次加工的方法。在一些情况下,本公开的微针可以是实心(非中空)的微针。在一些情况下,可以蚀刻本公开的微针以增大微针的表面积。

[0094] 可能需要多个细胞破碎方法来使生物标志物成为探针可及的。可以通过破坏细胞外基质或破坏细胞膜而破碎细胞。当例如至少一个微针接触并穿透生物样品如人皮肤时,本公开的装置可以导致细胞破碎。

[0095] 多个原位或离体细胞可以用物质来破碎。于是,本发明进一步提供包含多个用能够破坏细胞外基质的物质涂覆的微针的组合物。在一些情况下,该物质是酶。多种酶,包括但不限于丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶和MMP,可以用于此过程。可用于细胞和组织破坏的酶的非限制性实例包括但不限于木瓜蛋白酶、透明质酸酶、链激酶、链道酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、α-胰凝乳蛋白酶、α-淀粉酶、DNase、胶原酶、舒替兰酶蛋白酶、溶菌酶、脂肪酶、消解酶、纤维素酶、变溶菌素或聚糖酶。在一些实例中,该酶是透明质酸酶。

[0096] 细胞和组织破坏的其它方法可以包括,例如,超声处理、电穿孔、低温粉碎、利用压力的物理破坏、研磨、基于去污剂的细胞裂解或利用例如匀浆器对组织的机械剪切。例如,细胞外基质或细胞膜可以通过超声能或通过电势而破坏。向生物样品施加溶剂还可以用来使生物标志物可用于与探针杂交。

[0097] 本公开的装置可以原位或离体地以微创方式破坏生物组织。例如,本公开的微针可以与受试者眼中的皮肤接触。该微针可以温和地破坏眼的皮肤中的细胞层的膜,由此提供眼中的生物标志物对微针中的探针而言的可及性。在一些实施方案中,可以将本公开的方法和装置应用于鉴别和表征来自脆弱的组织或不宜手术的组织的生物标志物。例如,存在于眼或脑中的生物标志物。在一些实施方案中,本公开的方法和装置应用于对来自生物样品的生物标志物的原位表征,该生物样品可能无法在活检中手术移除,例如,某些类型的脑肿瘤。

[0098] 探针缀合和用于扩增和检测生物标志物的测定

[0099] 与探针缀合的微针。

[0100] 多个探针可以附接至本公开的微针。在一些情况下,所述探针包含多核苷酸(例如,DNA、RNA、cDNA、cRNA等)。通常将多核苷酸探针设计成结合或杂交特异性多核苷酸生物标志物。本公开还提供用于检测肽或蛋白质生物标志物的方法和装置。在这些实施方案中,附接至微针的探针可以特异性地识别和结合感兴趣的靶肽或蛋白质。所述探针可以是能够与特定肽或蛋白质生物标志物结合的任何物质。它们可以是例如蛋白质(例如,抗体、抗原

或其片段)、糖或多核苷酸。该多核苷酸可以具有针对生物标志物的序列特异性。

[0101] 待使用的探针取决于待检测的一种或多种生物标志物。因此,根据待检测的生物标志物的性质和数目,固定于微针上的探针的数目可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多。在一些情况下,微针中的探针的总数可以为约1个探针至约1,000个探针、约1个探针至约10,000个探针、约1个探针至约100,000个探针、约1个探针至约1,000,000个探针、约1个探针至约10,000,000、约1个探针至约100,000,000个探针、约1,000个探针至约10,000个探针、约1,000个探针至约100,000个探针、约1,000个探针至约1,000,000个探针、约1,000个探针至约10,000,000、约1,000个探针至约100,000,000个探针、约10,000个探针至约100,000,000个探针、约10,000个探针至约1,000,000个探针、约10,000个探针至约10,000,000个探针、约10,000个探针至约100,000,000个探针、约100,000个探针至约1,000,000个探针、约100,000个探针至约10,000,000个探针、约100,000个探针至约100,000,000个探针、约1,000,000个探针至约10,000,000个探针、约1,000,000个探针至约100,000,000个探针或约10,000,000个探针至约100,000,000个探针。

[0102] 在一些情况下,微针中的探针的总数是至少约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约12、约14、约16、约18、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约150、约200、约250、约300、约350、约400、约450、约500、约600、约700、约800、约900、约1000、约1100、约1200、约1300、约1400、约1500、约2000、约2500、约3000、约3500、约4000、约4500、约5000、约6000、约7000、约8000、约9000、约10000、约12000、约14000、约16000、约18000、约20000、约30000、约40000、约50000、约60000、约70000、约80000、约90000、约100000、约200000、约300000、约400000、约500000、约600000、约700000、约800000、约900000、约1,000,000、约2,000,000、约3,000,000、约4,000,000、约5,000,000、约6,000,000、约7,000,000、约8,000,000、约9,000,000、约10,000,000、约20,000,000、约30,000,000、约40,000,000、约50,000,000、约60,000,000、约70,000,000、约80,000,000、约90,000,000或约100,000,000个探针。

[0103] 在一些情况下,微针中的探针的总数小于约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约12、约14、约16、约18、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约150、约200、约250、约300、约350、约400、约450、约500、约600、约700、约800、约900、约1000、约1100、约1200、约1300、约1400、约1500、约2000、约2500、约3000、约3500、约4000、约4500、约5000、约6000、约7000、约8000、约9000、约10000、约12000、约14000、约16000、约18000、约20000、约30000、约40000、约50000、约60000、约70000、约80000、约90000、约100000、约200000、约300000、约400000、约500000、约600000、约700000、约800000、约900000、约1,000,000、约2,000,000、约3,000,000、约4,000,000、约5,000,000、约6,000,000、约7,000,000、约8,000,000、约9,000,000、约10,000,000、约20,000,000、约30,000,000、约40,000,000、约50,000,000、约60,000,000、约70,000,000、约80,000,000、约90,000,000或约100,000,000个探针。

[0104] 此外,如本文中进一步描述的,用于生物标志物的探针可以固定至本公开的装置中的多个微针上,特别是用于检测低浓度的生物标志物。在一些情况下,单个微针包含多个能够结合或检测相同生物标志物的不同探针。在一些情况下,单个微针包含针对相同生物标志物的至少两个不同探针、至少3个不同探针、至少4个不同探针、至少5个不同探针、至少

6个不同探针、至少7个不同探针、至少8个不同探针、至少9个不同探针、至少10个不同探针、至少11个不同探针、至少12个不同探针、至少13个不同探针、至少14个不同探针、至少15个不同探针、至少16个不同探针、至少17个不同探针、至少18个不同探针、至少19个不同探针、至少20个不同探针、至少21个不同探针、至少22个不同探针、至少23个不同探针、至少24个不同探针、至少25个不同探针、至少26个不同探针、至少27个不同探针、至少28个不同探针、至少29个不同探针、至少30个不同探针、至少40个不同探针、至少41个不同探针、至少42个不同探针、至少43个不同探针、至少44个不同探针、至少45个不同探针、至少46个不同探针、至少47个不同探针、至少48个不同探针、至少49个不同探针或针对相同生物标志物的至少50个不同探针。在一些情况下,相同的微针包含针对相同生物标志物的多于50种不同类型的探针。

[0105] 在一些情况下,相同的微针包含多个不同的探针。所述不同的探针可以对相同的生物标志物或对不同的生物标志物是特异性的。微针可以包含至少2个不同探针、至少10个不同探针、至少100个不同探针、至少200个不同探针、至少300个不同探针、至少400个不同探针、至少500个不同探针、至少600个不同探针、至少700个不同探针、至少800个不同探针、至少900个不同探针、至少1,000个不同探针、至少1,100个不同探针、至少1,200个不同探针、至少1,300个不同探针、至少1,400个不同探针、至少1,500个不同探针、至少1,600个不同探针、至少1,700个不同探针、至少1,800个不同探针、至少1,900个不同探针、至少2,000个不同探针、至少2,100个不同探针、至少2,200个不同探针、至少2,300个不同探针、至少2,400个不同探针、至少2,500个不同探针、至少2,600个不同探针、至少2,700个不同探针、至少2,800个不同探针、至少2,900个不同探针、至少3,000个不同探针、至少3,100个不同探针、至少3,200个不同探针、至少3,300个不同探针、至少3,400个不同探针、至少3,500个不同探针、至少3,600个不同探针、至少3,700个不同探针、至少3,800个不同探针、至少3,900个不同探针、至少4,000个不同探针、至少4,100个不同探针、至少4,200个不同探针、至少4,300个不同探针、至少4,400个不同探针、至少4,500个不同探针、至少4,600个不同探针、至少4,700个不同探针、至少4,800个不同探针、至少4,900个不同探针、至少5,000个不同探针、至少5,100个不同探针、至少5,200个不同探针、至少5,300个不同探针、至少5,400个不同探针、至少5,500个不同探针、至少5,600个不同探针、至少5,700个不同探针、至少5,800个不同探针、至少5,900个不同探针、至少6,000个不同探针、至少6,100个不同探针、至少6,200个不同探针、至少6,300个不同探针、至少6,400个不同探针、至少6,500个不同探针、至少6,600个不同探针、至少6,700个不同探针、至少6,800个不同探针、至少6,900个不同探针、至少7,000个不同探针、至少7,100个不同探针、至少7,200个不同探针、至少7,300个不同探针、至少7,400个不同探针、至少7,500个不同探针、至少7,600个不同探针、至少7,700个不同探针、至少7,800个不同探针、至少7,900个不同探针、至少8,000个不同探针、至少8,100个不同探针、至少8,200个不同探针、至少8,300个不同探针、至少8,400个不同探针、至少8,500个不同探针、至少8,600个不同探针、至少8,700个不同探针、至少8,800个不同探针、至少8,900个不同探针、至少9,000个不同探针、至少9,100个不同探针、至少9,200个不同探针、至少9,300个不同探针、至少9,400个不同探针、至少9,500个不同探针、至少9,600个不同探针、至少9,700个不同探针、至少9,800个不同探针、至少9,900个不同探针或至少10,000个不同探针。微针可以包含少于2个不同探针、少于10个不同探针、少于100个不同探

针、少于200个不同探针、少于300个不同探针、少于400个不同探针、少于500个不同探针、少于600个不同探针、少于700个不同探针、少于800个不同探针、少于900个不同探针、少于1,000个不同探针、少于1,100个不同探针、少于1,200个不同探针、少于1,300个不同探针、少于1,400个不同探针、少于1,500个不同探针、少于1,600个不同探针、少于1,700个不同探针、少于1,800个不同探针、少于1,900个不同探针、少于2,000个不同探针、少于2,100个不同探针、少于2,200个不同探针、少于2,300个不同探针、少于2,400个不同探针、少于2,500个不同探针、少于2,600个不同探针、少于2,700个不同探针、少于2,800个不同探针、少于2,900个不同探针、少于3,000个不同探针、少于3,100个不同探针、少于3,200个不同探针、少于3,300个不同探针、少于3,400个不同探针、少于3,500个不同探针、少于3,600个不同探针、少于3,700个不同探针、少于3,800个不同探针、少于3,900个不同探针、少于4,000个不同探针、少于4,100个不同探针、少于4,200个不同探针、少于4,300个不同探针、少于4,400个不同探针、少于4,500个不同探针、少于4,600个不同探针、少于4,700个不同探针、少于4,800个不同探针、少于4,900个不同探针、少于5,000个不同探针、少于5,100个不同探针、少于5,200个不同探针、少于5,300个不同探针、少于5,400个不同探针、少于5,500个不同探针、少于5,600个不同探针、少于5,700个不同探针、少于5,800个不同探针、少于5,900个不同探针、少于6,000个不同探针、少于6,100个不同探针、少于6,200个不同探针、少于6,300个不同探针、少于6,400个不同探针、少于6,500个不同探针、少于6,600个不同探针、少于6,700个不同探针、少于6,800个不同探针、少于6,900个不同探针、少于7,000个不同探针、少于7,100个不同探针、少于7,200个不同探针、少于7,300个不同探针、少于7,400个不同探针、少于7,500个不同探针、少于7,600个不同探针、少于7,700个不同探针、少于7,800个不同探针、少于7,900个不同探针、少于8,000个不同探针、少于8,100个不同探针、少于8,200个不同探针、少于8,300个不同探针、少于8,400个不同探针、少于8,500个不同探针、少于8,600个不同探针、少于8,700个不同探针、少于8,800个不同探针、少于8,900个不同探针、少于9,000个不同探针、少于9,100个不同探针、少于9,200个不同探针、少于9,300个不同探针、少于9,400个不同探针、少于9,500个不同探针、少于9,600个不同探针、少于9,700个不同探针、少于9,800个不同探针、少于9,900个不同探针或少于10,000个不同探针。

[0106] 在一些情况下,所述多个探针是相同的(例如,相同多核苷酸或抗体的相同拷贝)。在一些实施方案中,微针可以与相同探针的多个拷贝(例如,相同探针的多于2、5、10、50、100、1000、5000、7500、10000或50000个拷贝)相关联。例如,微针可以包含多核苷酸探针的多个拷贝,该多核苷酸探针被设计成与相同的多态性或生物标志物杂交。在一些情况下,微针可以包含被设计成结合相同表位的抗体探针的多个拷贝。

[0107] 在一些情况下,微针包含多核苷酸探针。该探针可以被设计成检测与相同的疾病、病症或状况相关的不同生物标志物。在一些情况下,第一探针识别与疾病相关的多态性(例如,DNA多态性、RNA多态性),而第二探针识别与相同疾病相关的不同多态性。例如,微针上的第一DNA探针可以设计成检测与盘尾丝虫病(一种皮肤状况)相关的RNA生物标志物的第一多态性。微针上的第二DNA探针可以设计成检测与盘尾丝虫病相关的RNA生物标志物的第二多态性。多态性可以是例如单核苷酸多态性(SNP)。遗传和基因组变异可以包含单个SNP或多个SNP。SNP可以在单个基因座或在多个基因座处发生。在一个基因座处携带特定SNP等位基因的个体可以可预测地在其它基因座处携带特异性SNP等位基因。SNP的相关性可以在

使个体易患疾病或状况的等位基因之间提供关联性。在一些情况下,不同多核苷酸探针被设计成检测与不同状况相关的不同生物标志物。例如,一个探针可以检测疾病的生物标志物,而另外的探针可以检测持家基因或基因产物。在一些情况下,微针附接至多核苷酸、多肽或多核苷酸与多肽的混合物。

[0108] 微针还可以与多个不同的蛋白质或抗体探针相关联。例如,微针上的第一抗体探针可以被设计成检测与例如皮肤癌相关的抗原的第一表位。第二抗体探针可以被设计成检测与该抗原相关的第二表位。或者,在一些情况下,第二抗体探针可以检测与不同皮肤状况相关的表位。

[0109] 在一些情况下,本公开提供包含一组微针的微针装置,其中在该组中的各微针包含相同的探针或一组探针。在一些实施方案中,相同的探针附接至装置的多个微针。相同的探针可以附接至,例如,约1%的微针、约5%的微针、约10%的微针、约15%的微针、约20%的微针、约25%的微针、约30%的微针、约35%的微针、约40%的微针、约45%的微针、约50%的微针、约55%的微针、约60%的微针、约65%的微针、约70%的微针、约75%的微针、约80%的微针、约85%的微针、约90%的微针、约95%的微针或约100%的微针。在一些实施方案中,相同的探针附接至不多于5%的微针、不多于10%的微针、不多于15%的微针、不多于20%的微针、不多于25%的微针、不多于30%的微针、不多于35%的微针、不多于40%的微针、不多于45%的微针、不多于50%的微针、不多于55%的微针、不多于60%的微针、不多于70%的微针、不多于75%的微针、不多于80%的微针、不多于85%的微针、不多于90%的微针、不多于95%的微针或不多于99%的微针。

[0110] 在一些情况下,一组微针可以包含附接至第一探针的至少一个微针和附接至不同于第一探针的第二探针的至少一个微针。例如,如本文所述,第一探针可以是特异性地结合疾病或病症的生物标志物的多核苷酸或多肽(例如,抗体、蛋白质),而第二探针可以是特异性地结合与相同疾病或病症相关的不同生物标志物的多核苷酸或多肽。在一些情况下,第一探针可以是特异性地结合疾病或病症的生物标志物的多核苷酸或多肽(例如,抗体、蛋白质),而第二探针可以是特异性地结合与不同疾病、病症或状况相关的不同生物标志物的多核苷酸或多肽。在一些情况下,该不同疾病、状况或病症与相同器官相关。例如,第一探针可以与和皮肤相关的第一疾病、病症或状况相关联;而第二探针可以与和皮肤或眼相关的第二疾病、病症或状况相关联。在一些情况下,该装置可以包含微针阵列,其中各微针包含检测与和相同器官相关的不同疾病、病症或状况相关联的生物标志物的探针。微针的阵列可以包含与不同疾病、病症或状况相关的多于2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、75、100、150、200、50或1000个微针。在一些情况下,该不同疾病、病症或状况与不同器官(例如,多于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个器官)相关。

[0111] 在一些情况下,微针装置包含多个微针阵列;通常,该多个微针阵列适用于多重反应。在一些情况下,该多个阵列包含两个或更多个微针阵列,其中该阵列被设计成检测不同的生物标志物。在一些情况下,第一微针阵列可以被设计成检测与疾病、病症或状况相关的生物标志物,而第二微针阵列被设计成检测与相同疾病、病症或状况相关的不同生物标志物。在一些情况下,第一微针阵列可以被设计成检测与疾病、病症或状况相关的生物标志物,而第二微针阵列可以被设计成检测与不同疾病、病症或状况相关的不同生物标志物。在一些情况下,第一微针阵列可以被设计成检测与疾病、病症或状况相关的多种生物标志物;

而第二微针阵列可以被设计成检测与不同疾病、病症或状况相关的多种生物标志物。在一些情况下,第二微针阵列可以被设计成检测对照生物标志物(例如,持家基因),其为阳性对照或阴性对照。

[0112] 在一些情况下,本文提供的方法和装置可以用来使用或不使用荧光进行多重反应。例如,各微针可以插入其自身的腔(例如,针孔腔)中,所述腔包含独特的PCR试剂(例如,独特的探针或引物)。可以进行PCR反应并可以分析样品的多种生物标志物。在一些情况下,使用荧光标记的探针或发射不同光信号的探针进行多重反应。在一些情况下,不使用荧光。

[0113] 本文描述的微针装置可以包含任意数目的探针;通常,探针附接至该装置内的多个针。探针可以相同或不同。此外,用于生物标志物的探针可以固定至本公开的装置中的多个微针,特别是用于检测低浓度的生物标志物。在一些情况下,微针装置中的探针的总数可以是约1个探针至约1,000个探针、约1个探针至约10,000个探针、约1个探针至约100,000个探针、约1个探针至约1,000,000个探针、约1个探针至约10,000,000、约1个探针至约100,000,000个探针、约1,000个探针至约10,000个探针、约1,000个探针至约100,000个探针、约1,000个探针至约1,000,000个探针、约1,000个探针至约10,000,000、约1,000个探针至约100,000,000个探针、约10,000个探针至约100,000个探针、约10,000个探针至约1,000,000个探针、约10,000个探针至约10,000,000个探针、约10,000个探针至约100,000,000个探针、约100,000个探针至约1,000,000个探针、约100,000个探针至约10,000,000个探针、约100,000个探针至约100,000,000个探针、约1,000,000个探针至约10,000,000个探针、约1,000,000个探针至约100,000,000个探针或约10,000,000个探针至约100,000,000个探针。

[0114] 在一些情况下,微针装置中的探针的总数为至少约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约12、约14、约16、约18、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约150、约200、约250、约300、约350、约400、约450、约500、约600、约700、约800、约900、约1000、约1100、约1200、约1300、约1400、约1500、约2000、约2500、约3000、约3500、约4000、约4500、约5000、约6000、约7000、约8000、约9000、约10000、约12000、约14000、约16000、约18000、约20000、约30000、约40000、约50000、约60000、约70000、约80000、约90000、约100000、约200000、约300000、约400000、约500000、约600000、约700000、约800000、约900000、约1,000,000、约2,000,000、约3,000,000、约4,000,000、约5,000,000、约6,000,000、约7,000,000、约8,000,000、约9,000,000、约10,000,000、约20,000,000、约30,000,000、约40,000,000、约50,000,000、约60,000,000、约70,000,000、约80,000,000、约90,000,000或约100,000,000个探针。

[0115] 在一些情况下,微针装置中的探针的总数小于约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约12、约14、约16、约18、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约150、约200、约250、约300、约350、约400、约450、约500、约600、约700、约800、约900、约1000、约1100、约1200、约1300、约1400、约1500、约2000、约2500、约3000、约3500、约4000、约4500、约5000、约6000、约7000、约8000、约9000、约10000、约12000、约14000、约16000、约18000、约20000、约30000、约40000、约50000、约60000、约70000、约80000、约90000、约100000、约200000、约300000、约400000、约500000、约600000、约700000、约800000、约900000、约1,000,000、约2,000,000、约3,000,000、约4,000,000、约5,000,000、约6,000,000、约7,000,000、约8,000,000、约9,000,000、约10,000,000、约20,000,

000、约30,000,000、约40,000,000、约50,000,000、约60,000,000、约70,000,000、约80,000,000、约90,000,000或约100,000,000个探针。

[0116] 在一些情况下,微针装置包含针对相同生物标志物的至少2个不同探针、至少3个不同探针、至少4个不同探针、至少5个不同探针、至少6个不同探针、至少7个不同探针、至少8个不同探针、至少9个不同探针、至少10个不同探针、至少11个不同探针、至少12个不同探针、至少13个不同探针、至少14个不同探针、至少15个不同探针、至少16个不同探针、至少17个不同探针、至少18个不同探针、至少19个不同探针、至少20个不同探针、至少21个不同探针、至少22个不同探针、至少23个不同探针、至少24个不同探针、至少25个不同探针、至少26个不同探针、至少27个不同探针、至少28个不同探针、至少29个不同探针、至少30个不同探针、至少40个不同探针、至少41个不同探针、至少42个不同探针、至少43个不同探针、至少44个不同探针、至少45个不同探针、至少46个不同探针、至少47个不同探针、至少48个不同探针、至少49个不同探针或针对相同生物标志物的至少50个不同探针。在一些情况下,相同的微针包含针对相同生物标志物的多于50种不同类型的探针。

[0117] 在一些情况下,微针装置包含多个不同的探针。所述不同的探针可以对相同的生物标志物或对不同的生物标志物是特异性的。微针装置可以包含至少2个不同探针、至少10个不同探针、至少100个不同探针、至少200个不同探针、至少300个不同探针、至少400个不同探针、至少500个不同探针、至少600个不同探针、至少700个不同探针、至少800个不同探针、至少900个不同探针、至少1,000个不同探针、至少1,100个不同探针、至少1,200个不同探针、至少1,300个不同探针、至少1,400个不同探针、至少1,500个不同探针、至少1,600个不同探针、至少1,700个不同探针、至少1,800个不同探针、至少1,900个不同探针、至少2,000个不同探针、至少2,100个不同探针、至少2,200个不同探针、至少2,300个不同探针、至少2,400个不同探针、至少2,500个不同探针、至少2,600个不同探针、至少2,700个不同探针、至少2,800个不同探针、至少2,900个不同探针、至少3,000个不同探针、至少3,100个不同探针、至少3,200个不同探针、至少3,300个不同探针、至少3,400个不同探针、至少3,500个不同探针、至少3,600个不同探针、至少3,700个不同探针、至少3,800个不同探针、至少3,900个不同探针、至少4,000个不同探针、至少4,100个不同探针、至少4,200个不同探针、至少4,300个不同探针、至少4,400个不同探针、至少4,500个不同探针、至少4,600个不同探针、至少4,700个不同探针、至少4,800个不同探针、至少4,900个不同探针、至少5,000个不同探针、至少5,100个不同探针、至少5,200个不同探针、至少5,300个不同探针、至少5,400个不同探针、至少5,500个不同探针、至少5,600个不同探针、至少5,700个不同探针、至少5,800个不同探针、至少5,900个不同探针、至少6,000个不同探针、至少6,100个不同探针、至少6,200个不同探针、至少6,300个不同探针、至少6,400个不同探针、至少6,500个不同探针、至少6,600个不同探针、至少6,700个不同探针、至少6,800个不同探针、至少6,900个不同探针、至少7,000个不同探针、至少7,100个不同探针、至少7,200个不同探针、至少7,300个不同探针、至少7,400个不同探针、至少7,500个不同探针、至少7,600个不同探针、至少7,700个不同探针、至少7,800个不同探针、至少7,900个不同探针、至少8,000个不同探针、至少8,100个不同探针、至少8,200个不同探针、至少8,300个不同探针、至少8,400个不同探针、至少8,500个不同探针、至少8,600个不同探针、至少8,700个不同探针、至少8,800个不同探针、至少8,900个不同探针、至少9,000个不同探针、至少9,100个不同探针、至少9,200

个不同探针、至少9,300个不同探针、至少9,400个不同探针、至少9,500个不同探针、至少9,600个不同探针、至少9,700个不同探针、至少9,800个不同探针、至少9,900个不同探针或至少10,000个不同探针。在一些情况下,微针装置可以包含少于2个不同探针、少于10个不同探针、少于100个不同探针、少于200个不同探针、少于300个不同探针、少于400个不同探针、少于500个不同探针、少于600个不同探针、少于700个不同探针、少于800个不同探针、少于900个不同探针、少于1,000个不同探针、少于1,100个不同探针、少于1,200个不同探针、少于1,300个不同探针、少于1,400个不同探针、少于1,500个不同探针、少于1,600个不同探针、少于1,700个不同探针、少于1,800个不同探针、少于1,900个不同探针、少于2,000个不同探针、少于2,100个不同探针、少于2,200个不同探针、少于2,300个不同探针、少于2,400个不同探针、少于2,500个不同探针、少于2,600个不同探针、少于2,700个不同探针、少于2,800个不同探针、少于2,900个不同探针、少于3,000个不同探针、少于3,100个不同探针、少于3,200个不同探针、少于3,300个不同探针、少于3,400个不同探针、少于3,500个不同探针、少于3,600个不同探针、少于3,700个不同探针、少于3,800个不同探针、少于3,900个不同探针、少于4,000个不同探针、少于4,100个不同探针、少于4,200个不同探针、少于4,300个不同探针、少于4,400个不同探针、少于4,500个不同探针、少于4,600个不同探针、少于4,700个不同探针、少于4,800个不同探针、少于4,900个不同探针、少于5,000个不同探针、少于5,100个不同探针、少于5,200个不同探针、少于5,300个不同探针、少于5,400个不同探针、少于5,500个不同探针、少于5,600个不同探针、少于5,700个不同探针、少于5,800个不同探针、少于5,900个不同探针、少于6,000个不同探针、少于6,100个不同探针、少于6,200个不同探针、少于6,300个不同探针、少于6,400个不同探针、少于6,500个不同探针、少于6,600个不同探针、少于6,700个不同探针、少于6,800个不同探针、少于6,900个不同探针、少于7,000个不同探针、少于7,100个不同探针、少于7,200个不同探针、少于7,300个不同探针、少于7,400个不同探针、少于7,500个不同探针、少于7,600个不同探针、少于7,700个不同探针、少于7,800个不同探针、少于7,900个不同探针、少于8,000个不同探针、少于8,100个不同探针、少于8,200个不同探针、少于8,300个不同探针、少于8,400个不同探针、少于8,500个不同探针、少于8,600个不同探针、少于8,700个不同探针、少于8,800个不同探针、少于8,900个不同探针、少于9,000个不同探针、少于9,100个不同探针、少于9,200个不同探针、少于9,300个不同探针、少于9,400个不同探针、少于9,500个不同探针、少于9,600个不同探针、少于9,700个不同探针、少于9,800个不同探针、少于9,900个不同探针或少于10,000个不同探针。

[0118] 用于检测不同生物标志物的探针可以商业获得或根据本领域公知的方法合成。该探针可以根据任何合适的方法而设计。例如,计算机化的检索程序可用于设计对具有最小交叉杂交和类似杂交效率的靶生物标志物序列(例如,mRNA)具有特异性的核酸探针。这样的示例性程序包括Oligo 5.0(National Biosciences Inc.)、Primer 3(MIT)和Array Designer(Telechem International Inc.)。在本方法中使用的核苷酸探针可以具有任意合适的长度,例如约15至约100个核苷酸。对于蛋白质生物标志物,用于检测生物标志物的特异性探针(抗体)可以容易地生成或商业获得。在本方法中使用的核苷酸探针或多肽探针可以包含可检测标记。可以使用任意合适的标记。例如,可检测标记可以通过光、磁、机械、光谱、光化学、生物化学、免疫化学、放射性或酶手段检测。在一些实施方案中,可检测标记

是荧光或化学发光标记,例如GFP;磁性部分;蛋白质,例如抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白;或肽标签,例如组氨酸标签或FLAG标签。

[0119] 固定的探针存在于本文所述的微针装置的表面上。固定的探针可以通过本领域已知的方法或在本文实施例中描述的特定连接方法共价或非共价地结合至微针的表面。例如,探针可以经由例如生物素-抗生物素蛋白或生物素-链霉抗生物素蛋白相互作用、蛋白质A相互作用、蛋白质G相互作用、山羊抗小鼠Fc相互作用、酰胺键或通过任何其它共价或非共价相互作用而缀合至微针。探针可以在探针与微针表面之间具有或不具有合适的间隔区元件如聚(乙二醇)(PEG)的情况下共价地附接至微针。在本发明的实施中可以容易地采用以及适当地修改在本领域中常规实施的用于固定抗体探针或核苷酸探针的方法。这些方法描述在本领域中,例如,Mendoza等,Biotechniques 27:778-786,1999;Arenkov等,Anal.Biochem.278:123-131,2000;Zhu等,Nat.Genet.26:283-289,2000;MacBeath等,Science 289:1760-1763,2000;Jyoung等,Biosens.Bioelectron.21:2315-2319,2006;Lu等,Anal.Chem.67:83 87,1995;Vijayendran等,Anal.Chem.73:471-480,2001;Nakanishi等,Anal.Chem.68:1695-1700,1996;Rowe等,Anal.Chem.71:433-439,1999;Day等,Bichem.J.278:735-740,1991;Fodor等,Science 251:767-773,1991;Schene等,Science 270:467-470,1995;Lamture等,Nucl.Acids Res.22:2121-2125,1994;Guo等,Nucl.Acids Res.22:5456-5465,1994;以及PCT公开WO00/22108、WO01/75447和WO02/12891。

[0120] 该探针还可以用反应性部分修饰并附接至一个或多个微针的金涂覆的表面。该反应性部分可以是巯基基团。在一些情况下,可以添加无机盐。无机盐的实例包括但不限于通常具有卤素反荷离子的锂盐、钾盐、钠盐、镁盐和钙盐。在一些情况下,该无机盐是氯化钠。该无机盐可以以优选约0.1M至2.0M、约0.2M至2.0M、约0.2M至1.5M或约0.5M至1.5M的浓度存在。在一些情况下,该无机盐的浓度小于约0.1M、小于约0.2M、小于约0.2M、小于约0.3M、小于约0.4M、小于约0.5M、小于约1.0M、小于约1.1M、小于约1.2M、小于约1.3M、小于约1.4M、小于约1.5M、小于约1.6M、小于约1.7M、小于约1.8M、小于约1.9M、小于约2.0M、小于约2.5M、小于约3.0M、小于约3.5M、小于约4.0M或小于约4.5M。在一些情况下,该无机盐的浓度大于约0.1M、大于约0.2M、大于约0.2M、大于约0.3M、大于约0.4M、大于约0.5M、大于约1.0M、大于约1.1M、大于约1.2M、大于约1.3M、大于约1.4M、大于约1.5M、大于约1.6M、大于约1.7M、大于约1.8M、大于约1.9M、大于约2.0M、大于约2.5M、大于约3.0M、大于约3.5M、大于约4.0M或大于约4.5M。

[0121] 捕获生物标志物

[0122] 共价或非共价地附接至探针的微针可原位插入至生物样品,如人皮肤、眼、手术中的组织、真皮毛细血管等。共价地附接至探针的微针还可插入至离体生物样品,如活检过程中提取的组织中。可使探针在生物样品的生理条件下与生物标志物杂交或结合特定的一段时间。约20至约40摄氏度的温度范围、1个大气压、pH 6-8、1-20mM的葡萄糖浓度、大气氧浓度和地球重力可以是大部分受试者的生理条件的实例。可使探针与生物样品杂交或结合至少1分钟、至少2分钟、至少3分钟、至少5分钟、至少10分钟、至少15分钟、至少20分钟、至少25分钟、至少30分钟、至少45分钟、至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少5小时、至少10小时或至少24小时。在一些实施方案中,可使探针与生物样品杂交不超过1分钟、不超过2分钟、不超过3分钟、不超过5分钟、不超过10分钟、不超过15分钟、不超过20分钟、不超过25分钟、

不超过30分钟、不超过1小时、不超过2小时、不超过3小时、不超过5小时或不超过10小时。具有共价或非共价地连接的探针的微针可从生物样品如人皮肤移除。通过从人皮肤移除微针可将与探针杂交或结合的生物标志物从生物样品中分离。

[0123] 检测生物标志物

[0124] 本发明的一些实施方案涉及检测多核苷酸生物标志物(例如,mRNA、DNA)。在这些实施方案中,针对一种或多种生物标志物的探针(例如,寡核苷酸探针、多核苷酸探针)可以基于靶生物标志物的序列容易地合成。一旦核酸生物标志物与本发明的微针装置上的探针结合,它们通常经历扩增反应(例如,PCR、逆转录PCR)或通过标记的标签来检测。标记的标签可以直接与附接至微针的探针连接,或者在一些情况下,标记的标签在它已被附接至微针的探针捕获后与生物标志物结合。

[0125] 在本领域中常规实施的许多方法可容易地用来扩增从受试者获得的核酸生物标志物。这些方法包括,例如聚合酶链反应(PCR)或逆转录PCR。总体上参见PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification(H.A.Erlich编,Freeman Press,NY,NY,1992);PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications(Innis等编,Academic Press,San Diego,CA,1990);Mattila等,Nucleic Acids Res.19,4967(1991);Eckert等,PCR Methods and Applications 1,17(1991);PCR(McPherson等编,IRL Press,Oxford);和美国专利4,683,202(其每一个均为了所有目的而通过引用并入)。其它合适的扩增方法包括连接酶链反应(LCR)(参见Wu和Wallace,Genomics 4,560(1989),Landegren等,Science 241,1077(1988))、转录扩增(Kwoh等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,1173(1989))以及自动维持序列复制(Guatelli等,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,87,1874(1990))和基于核酸的序列扩增(NASBA)。后两种扩增方法涉及基于等温转录的等温反应,其分别以约30或100:1的比例产生单链RNA(ssRNA)和双链DNA(dsDNA)作为扩增产物。一旦扩增,则可以随后通过诸如序列分析、电泳等标准技术容易地确认捕获的生物标志物的身份。

[0126] 本发明的一些实施方案使用PCR来检测与探针杂交或以其它方式连接的生物标志物。通过PCR对生物标志物的扩增可跨越几个数量级,有时从靶标的单个或几个拷贝开始而产生特定DNA序列的数千到数百万个拷贝。PCR可以采用热循环,其包括用于DNA解链和DNA的酶促复制的重复加热和冷却该反应的循环。这些热循环操作可在被称为DNA解链的过程中在高温下物理地分离DNA双螺旋中的两条链。在较低温度下,每条链随后可在由DNA聚合酶进行的DNA合成中用作模板,以选择性地扩增靶DNA。PCR的选择性可能是由在特定热循环条件下使用与准备扩增的DNA区域互补的引物(短DNA片段)造成的。

[0127] 含有与感兴趣的生物标志物互补的序列的引物连同DNA聚合酶一起可用于实现选择性和重复性扩增。随着PCR进行,生成的DNA可以用作复制的模板,启动其中DNA模板指数式扩增的链反应。PCR应用可采用热稳定的DNA聚合酶,如Taq聚合酶,这是一种最初从细菌水生栖热菌(Thermus aquaticus)中分离的酶。这种DNA聚合酶可从核苷酸酶促地装配新DNA链,例如通过使用单链DNA作为模板并且使用DNA寡核苷酸(也称为DNA引物)启动DNA合成。

[0128] PCR反应可以直接在已插入至生物样品中的微针上进行。例如,可将微针放置在包含PCR反应所需试剂的管中或两块板(例如载玻片)之间。可通过多种不同的方法使生物标志物从针上脱离并释放到PCR管中。例如,可加热微针以从微针上释放生物标志物,或者生

物标志物可以自发地从针上释放至PCR溶液中。PCR反应可如上所述进行,并且可使用标准程序,例如电泳、实时PCR和其它程序,如在PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification(H.A.Erlich编,Freeman Press,NY,NY,1992)、PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications(Innis等编,Academic Press,San Diego,CA,1990)中所述的程序,来分析PCR产物。可使用不同的PCR方法分析该样品,例如标准PCR方法和实时PCR方法。实时PCR(RT-PCR)是基于PCR的实验室技术,其可以用于扩增并同时量化靶向的DNA分子。实时PCR可与逆转录相组合,以量化细胞或组织中的信使RNA和非编码RNA。

[0129] 在一些实施方案中,本公开的装置可进一步配置成包含至少一个能够进行PCR反应的隔室。例如,本公开的装置可配置成包含多个微针或微针阵列和能够在其中进行PCR反应的隔室。

[0130] PCR反应可选择性地扩增已与特定微针杂交的生物标志物,或者PCR反应可扩增一组已与多个微针杂交的生物标志物。例如,402显示了包含多个已与生物样品接触的微针的本发明装置的表面。402中的每个“正方形”显示单个微针,其中每个单独的微针包含至少一个探针。402中的每个探针可与生物标志物杂交或不杂交。402中示出的各个微针可置于单独的PCR管中并且可单独地分析每个PCR产物。或者,402中示出的多个微针可置于同一PCR管中以供同时分析。

[0131] 在一些情况下,捕获的生物标志物可通过使用能够与捕获的生物标志物结合的标记的探针来检测。在一些情况下,在生物标志物已经被本文所述的附接至微针的探针捕获后,标记的探针与该生物标志物结合。在一些情况下,微针直接附接至探针,该探针用设计为当与生物标志物结合时改变其光信号(或者降低或者增加强度)的标记加以标记。

[0132] 标记的探针可包含可发射光信号的标记(例如,荧光团、放射性同位素等)。荧光部分可以是荧光蛋白,如绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白(RFP)、黄色荧光蛋白(YFP)或其变体。在一些情况下,标记的探针包含当探针与其靶标结合时光信号增加或减少的标记。荧光部分可以是与荧光团结合的RNA适配体。RNA-荧光团复合物可发射跨越可见光谱的光信号,参见Paige等,Science 333,6042(2011)。例如,“菠菜(Spinach)适配体序列”是可被配置成当与生物标志物杂交时发射荧光光信号的GFP的RNA模拟物。

[0133] 在一些实施方案中,包含一组在其中非共价或共价结合的探针的微针可用于检测受试者中的生物标志物。例如,本公开的装置可与受试者的皮肤接触。该装置可包含含有RNA-荧光团部分的多核苷酸探针。RNA-荧光团部分可被配置成当与感兴趣的生物标志物杂交时发射光信号,如荧光信号。

[0134] 蛋白质或肽生物标志物可通过本领域技术人员公知用于多肽检测的许多方法中的任意方法来检测和量化。这些方法包括测定形式,如蛋白质PCR和ELISA。局部和全身性蛋白质和肽生物标志物都可使用本发明的微针阵列装置来测定。适于此目的的其它方法包括分析生物化学方法如电泳、毛细管电泳、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、超扩散色谱法、质谱法等,或各种其它免疫学方法如流体或凝胶沉淀素反应、免疫扩散(单或双)、免疫组织化学、亲和色谱法、免疫电泳、放射免疫测定(RIA)、免疫荧光测定、Western印迹法、试纸法(dipstick)等。关于免疫测定的一般性综述,请参见Methods in Cell Biology第37卷:Antibodies in Cell Biology,Asai编Academic Press,Inc.New York(1993);

Basic and Clinical Immunology第7版,Stites和Terr编(1991);IMMUNOASSAYS FOR THE 80s.Voller,A.等(编),Baltimore:University Park Press(1981);Maggio等,ENZYME-IMMUNOASSAY,Boca Raton:CRC Press pp 172-176(1980)以及Tijssen,Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology:Practice and Theory of Immunoassays,vol 15,Elsevier 1985。用于进行与任何特异性蛋白质或肽生物标志物(例如,抗体)相关的这些测定的试剂可容易地从商业来源获得或通过标准及常规实施的技术(例如,用于生产单克隆抗体的杂交瘤技术)产生。

[0135] 探针与生物标志物之间的结合相互作用可使用第二检测试剂如第二抗体来检测。例如,“夹心ELISA”可用于检测生物标志物与抗体探针的结合。生物标志物与探针的结合可使用对该生物标志物的不同表位具有特异性的检测抗体来检测。在检测中使用的抗体可以是与用作探针的抗体不同的同种型,例如,抗体探针可以是IgG抗体(包括其任何亚型,如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4),而第二抗体可以是IGA、IgM。检测抗体可以例如与可检测标记如荧光部分或放射性标记缀合。基于抗体的检测方法,如酶联免疫吸附测定(ELISA)方法,可用于检测探针与生物标志物的结合。

[0136] 蛋白质和肽生物标志物也可使用蛋白质PCR技术来测定。例如,在这些应用中,一种适合于检测生物标志物的测定是PCR-ELISA方案。该测定采用标准免疫测定程序。捕获抗体附接至该装置的微针的表面。不是使用报告酶来对分析信号进行显影,而是将第二抗体与随后可使用PCR来扩增的单链寡核苷酸融合。插入和捕获生物标志物后,可通过加入寡核苷酸标记的第二抗体及随后对缀合的标签的PCR分析来检测该生物标志物的存在。

[0137] 诊断应用和相关的试剂盒

[0138] 本文所述的装置和方法在多种诊断应用中可用于检测和捕获生物标志物。这些应用包括,例如皮肤病的诊断、循环遗传标志的检测和蛋白质或肽生物标志物的检测。作为一个实例,该装置可以方便地用于在怀疑患有皮肤恶性黑素瘤(CMM)或处于发展CMM的风险中的受试者中CMM的诊断。在这些应用中,针对CMM特异性生物标志物的探针可与微针偶联。然后,可将含有一个或多个探针缀合的微针的装置直接施加到受试者皮肤上的所有胎痣(痣)。将该装置从各个痣上移除,并随后在装置上原位地或从装置上分离后测定由微针捕获的任何生物标志物。本公开的装置可在临床上用于诊断和预后应用。

[0139] 作为另一个具体应用,本文所述的装置和方法用于皮肤癌切除术过程中的边缘检测。在这些实施方案中,所述装置包含不同长度的探针缀合的微针。用这些装置对肿瘤特异性生物标志物的检测和测定可告知外科医生关于肿瘤侵入皮肤、皮下和下部空间的程度。这些应用避免了当前在皮肤肿瘤切除术中确定边缘所需的反复组织病理学检查。在一些情况下,该方法不包括皮肤的活检。

[0140] 本发明的方法和装置可用于皮肤状况的诊断和/或治疗。这些方法可包括使微针与受试者的皮肤组织接触。皮肤状况可以是良性状况、恶化前状况或恶性状况。皮肤状况可以是健康状况。皮肤状况的非限制性实例包括:皮肤癌如黑素瘤和莫氏皮肤癌(Mohs skin cancer);盘尾丝虫病;狼疮;麻疹(rubeola)(麻疹(measles));血管瘤;银屑病;酒渣鼻;脂溢性湿疹;荨麻疹、白癜风;疣;坏死性筋膜炎;皮肤念珠菌病;痈;蜂窝织炎;少汗症;脓疱病;皮肤松弛症;褥疮性溃疡;丹毒;汗疱湿疹;复发性口溃疡;胎痣;疱疹性口腔炎;寻常性鱼鳞病;痤疮;冷疱;皮肌炎;触染性软疣;肢皮炎;皮脂腺囊肿;脂溢性角化病;藏毛窦;瘢痕

疙瘩;扁平苔藓;光化性角化病;瘀滞性皮炎;皮肤鸡眼和胼胝;湿疹;花斑癣;类天疱疮;溃疡;或带状疱疹。本发明的方法和装置可用于诊断和治疗多种眼状况,如葡萄膜炎、干眼病、视网膜疾病、青光眼、炎性疾病。本发明的装置可用于对癌症分期。癌症可分期为0期、I期、II期、III期或IV期。

[0141] 本发明的方法和装置也可用于诊断和/或治疗眼状况,例如角膜表面炎症、葡萄膜炎或干眼病。这些方法可包括使微针与受试者的眼组织接触,例如,通过接触结膜下空间。眼状况可以是良性状况、恶化前状况或恶性状况。眼状况可以是健康状况。眼状况的非限制性实例包括:视网膜母细胞瘤;皮肤或眼内(眼)黑素瘤;色素性视网膜炎(RP);糖尿病视网膜病变;青光眼(包括开角型青光眼(例如原发性开角型青光眼)、闭角型青光眼和继发性青光眼(例如色素性青光眼、假性表皮脱落性青光眼以及由创伤和炎性疾病导致的青光眼))、视网膜脱离、年龄相关性或其它黄斑病变、年龄相关性黄斑变性、光性视网膜病变、手术诱发的视网膜病变、中毒性视网膜病变、早产儿视网膜病变、因眼的创伤或穿透性损伤引起的视网膜病变、遗传性视网膜变性、手术诱发的视网膜病变、中毒性视网膜病变、因眼的创伤或穿透性损伤引起的视网膜病变。感兴趣的遗传性状况的具体示例包括但不一定限于巴比二氏综合征(Bardet-Biedl syndrome)、先天性黑朦、视锥或视锥-视杆营养不良、先天性静止性夜盲症、黄斑变性、视神经萎缩、综合征性或系统性视网膜病变和Usher综合征。

[0142] 本发明的方法和装置可用于在手术操作中或在整容操作中监测生物标志物的表达。本公开的装置和方法可用于例如进行脆弱的组织如眼组织或脑组织的活检。在一些情况下,微针装置可以在手术中程序期间与受试者的组织或生物样品接触。该组织或生物样品可以从选自脑、心脏、乳房、肝、胰、脾、膀胱、胃、肺、子宫、子宫颈、前列腺、肾、肠、阑尾和结肠的器官中获得。在进一步的情况下,微针可在从受试者中移除肿瘤之前或之后与肿瘤的边缘接触。

[0143] 作为本发明的诊断应用的进一步实例,本文所述的方法和装置可用于受试者体液(例如血流)中的系统和循环遗传生物标志物的检测。已知许多疾病(例如,唐氏综合征)具有在血液中循环的遗传(例如,mRNA)生物标志物。通过延长本发明装置中的微针的长度,针对生物标志物的探针能够通过刺入并到达真皮或皮下毛细血管而与此类生物标志物特异性地结合。也可以以类似的方式检测已知存在于血液中的任何其它核酸生物标志物。例如,本公开的装置上的微针可以原位穿透受试者的皮肤并与受试者的真皮毛细血管接触。真皮毛细血管可能是受试者体内的最小血管,并且真皮毛细血管的内皮衬里可以是约一层细胞的厚度。当本公开的装置与受试者的皮肤接触时,该装置可以穿透一个或多个真皮毛细血管的膜。在一些实施方案中,本公开的装置可用于检测在血流中循环的生物标志物而无需从受试者中移取血液样品。在一些情况下,本公开的装置可以检测状况的胎儿或母体生物标志物,包括与妊娠相关的生物标志物。在一些情况下,本发明的装置可检测在血流中循环的生物标志物,如蛋白质、激素、维生素、辅因子或多核苷酸。

[0144] 可用本发明的方法和装置基于多核苷酸生物标志物来诊断的遗传状况的非限制性实例包括:囊性纤维化、杜氏肌营养不良、血色素沉着、泰-萨克斯病(Tay-Sachs disease)、普拉德-威利综合征(Prader-Willi syndrome)、安格尔曼综合征(Angelman syndrome)、神经纤维瘤病、苯丙酮尿症、卡纳万病(Canavan disease)、腹部疾病、酸性β-葡糖苷酶缺乏症、戈谢病(Gaucher)、夏-马-图三氏病(Charcot-Marie-Tooth disease)、色

盲、猫叫样哭泣(Cri du chat)、多囊性肾病、颅缝早闭、家族性腺瘤性息肉病、肾上腺病症、肌萎缩侧索硬化(ALS)、阿尔茨海默病、帕金森病、贫血、共济失调、共济失调性毛细血管扩张症、孤独症、骨髓疾病、邦-乌二氏综合征(Bonnevie-Ullrich syndrome)、脑部疾病、希-林二氏病(von Hippel-Lindau disease)、先天性心脏疾病、克罗恩病、痴呆、强直性肌营养不良、法布里病(Fabry disease)、脆性X综合征、半乳糖血症、遗传性肺气肿、视网膜母细胞瘤、彭德莱综合征(Pendred syndrome)、Usher综合征、Wilson病、神经病、亨廷顿病、免疫系统病症、痛风、X连锁的脊髓-延髓肌萎缩症、学习失能、李弗劳明综合征(Li-Fraumeni syndrome)、脂肪酶D缺乏、Lou Gehrig病、马方综合征(Marfan syndrome)、代谢紊乱、尼曼-皮克病(Niemann-Pick)、努南综合征(Noonan syndrome)、成骨不全、波伊茨-耶格综合征(Peutz-Jeghers syndrome)、斐弗综合征(Pfeiffer syndrome)、卟啉病、早衰症、Rett综合征、结节性硬化症、言语和交流障碍、脊髓性肌萎缩症、特雷彻柯林斯综合征(Treacher Collins syndrome)、三体性和单体性。

[0145] 在一些情况下,本发明的探针可用于检测免疫系统的状况。本发明的装置可用于变态反应检测,以确认或排除变态反应。在一些情况下,本发明的装置可用于分析变态反应组。免疫紊乱的非限制性实例包括:HIV、糖尿病、帕金森病、阿尔茨海默病、类风湿性关节炎、狼疮、癌症、多发性硬化、炎性肠病、银屑病、硬皮病、自身免疫性甲状腺病、脉管炎、恶性贫血、重症联合免疫缺陷(SCID)、迪格奥尔格综合征(DiGeorge syndrome)、高免疫球蛋白E综合征、普通可变型免疫缺陷、慢性肉芽肿病、威斯科特-奥尔德里奇综合征(Wiskott-Aldrich syndrome)、自身免疫性淋巴组织增生综合征(ALPS)、高IgM综合征、白细胞粘附缺陷(LAD)、NF-κB必需调制蛋白(NEMO)病症、选择性免疫球蛋白A缺乏、X连锁的无丙种球蛋白血症、X-连锁的淋巴组织增生性疾病、共济失调-毛细血管扩张症、季节性变态反应、肥大细胞增多症、常年性变态反应、过敏反应、食物变态反应、变应性鼻炎和特应性皮炎。

[0146] 在一些实施方案中,本发明的装置和方法可用于诊断与多种癌症相关的多种生物标志物。癌症的非限制性实例可以包括:急性淋巴母细胞性白血病、急性髓样白血病、肾上腺皮质癌、AIDS相关的癌症、AIDS相关的淋巴瘤、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑部肿瘤如小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始性神经外胚层肿瘤、视觉通路和下丘脑神经胶质瘤、乳腺癌、支气管腺瘤、伯基特淋巴瘤、未知原发起源的癌、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、宫颈癌、儿童癌症、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、慢性骨髓增生性病症、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食管癌、尤因肉瘤、生殖细胞肿瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤、神经胶质瘤、多毛细胞白血病、头颈癌、心脏癌、肝细胞(肝)癌、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑素瘤、胰岛细胞癌、卡波西肉瘤、肾癌、喉癌、唇及口腔癌、脂肪肉瘤、肝癌、肺癌如非小细胞和小细胞肺癌、淋巴瘤、白血病、巨球蛋白血症、骨恶化纤维组织细胞瘤/骨肉瘤、髓母细胞瘤、黑素瘤、间皮瘤、隐性原发性转移性鳞状颈癌、口癌、多发性内分泌肿瘤综合征、骨髓增生异常综合征、髓样白血病、鼻腔及鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、胰腺癌、胰腺癌胰岛细胞、副鼻窦及鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体星形细胞瘤、松果体生殖细胞瘤、垂体腺瘤、胸膜肺母细胞瘤、浆细胞瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺

癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂及输尿管移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、皮肤癌梅克尔细胞、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、T细胞淋巴瘤、喉癌、胸腺瘤、胸腺癌、甲状腺癌、滋养细胞瘤(妊娠)、未知原发部位的癌症、尿道癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenström macroglobulinemia)和肾母细胞瘤(Wilms tumor)。

[0147] 本公开的装置可用于独立的诊断方法,或者用作提供关于治疗性处理的信息的伴随诊断。本公开的微针和方法提供了微创、快速且准确的诊断方法和治疗方法。此外,本文公开的装置和方法可向多个受试者提供便携式、无痛苦且可负担的诊断。本发明的受试者可以是任何年龄的,包括例如老年成人、成人、青少年、青春期前、儿童、幼儿和婴儿。本发明的受试者可以是哺乳动物、鸟、鱼、爬行动物或两栖动物。受试者的非限制性实例包括人、灵长类动物、狗、猫、马、猪和小鼠。

[0148] 受试者可以提供多个生物样品以供使用本发明的微针进行分析。受试者的生物样品的分析可以原位或离体进行。例如,原位分析可包括使本发明的微针直接与受试者的皮肤接触。离体分析可包括使本发明的微针与活检组织接触。在一些实施方案中,使用本发明的微针和方法进行的生物标志物分析需要约1mg、约5mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约7mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg或约100mg生物样品。

[0149] 在一些实施方案中,本发明的方法和微针需要不超过约1mg至约5mg、不超过约1mg至约10mg、不超过约1mg至约20mg、不超过约1mg至约30mg、不超过约1mg至约40mg、不超过约1mg至约50mg、不超过约50mg至约60mg、不超过约50mg至约70mg、不超过约50mg至约80mg、不超过约50mg至约90mg、不超过约50mg至约100mg、不超过约100mg至约1g、不超过约100mg至约2g、不超过约100mg至约3g、不超过约100mg至约4g、不超过约100mg至约5g、不超过约100mg至约6g、不超过约100mg至约7g、不超过约100mg至约8g、不超过约100mg至约9g、不超过约100mg至约10g、不超过约1g至约2g、不超过约1g至约3g、不超过约1g至约4g、不超过约1g至约5g、不超过约1g至约6g、不超过约1g至约7g、不超过约1g至约8g、不超过约1g至约9g或不超过约1g至约10g生物样品。

[0150] 在一些实施方案中,使用额外的测定来验证基于用本公开的微针和方法鉴别的生物标志物的鉴别而作出的诊断。可验证生物标志物的测定的非限制性实例包括:a)评估蛋白质与DNA的相互作用的测定,如DNA酶足迹测定和凝胶移位测定;b)评估RNA分子的完整性的测定,如核连缀测定;c)终点测定,其可以定量地或定性地测量该测定的最终结果;d)动力学测定,其可以评估在多个时间间隔对数据点的读取并比较生物过程的动力学;e)半定量测定,其提供可在一定背景下进行量化的读出,如Western印迹法、凝血和凝集测定;f)免疫测定,其评估抗原抗体结合型反应的应答;g)酶活性测定,其测试功能和活性;h)集落形成测定,其可测试细胞增殖和分化的能力;i)计数测定,如流式细胞术测定;和j)多个PCR测定,如实时PCR。

[0151] 此外,本公开的方法可进一步包括从获自受试者的参考组织检测一种或多种生物标志物。例如,该方法可包括从样品组织和参考组织检测生物标志物。参考组织可以是良性组织。在一些情况下,参考组织是来自与样品组织相同的器官或区域的组织。在一些情况下,样品组织包含怀疑具有疾病或病症(例如,恶性肿瘤)的组织且参考组织包含已知不具

有该疾病或病症的相同器官的组织。在一些情况下,检测到的样品组织中的生物标志物的水平可以进一步与检测到的参考组织中的生物标志物的水平进行比较。

[0152] 在一些情况下,本公开的装置可以在手术期间使用以移除肿瘤和/或鉴别肿瘤边缘。本发明的装置可用于原位或离体地表征具有不同形态的组织和组织边缘。例如,在莫氏皮肤癌手术中,其中通常通过组织学方法对组织进行移除、切片并评价,可以利用本发明的装置分析肿瘤的边缘。在一些情况下,本发明的装置可通过分析组织的边缘而用于鉴别癌症的转移。

[0153] 本公开的装置和方法可用于对医疗应用进行个性化。受试者可以向临床医生提供一定量的例如皮肤样品。临床医生可以使用本公开的装置来检测多种与受试者的皮肤相关的生物标志物。临床医生可使用经鉴别的生物标志物来确定对特定受试者的预期的治疗效果。本公开的装置和方法还可用于监测受试者对特定治疗的反应,例如,通过监测生物标志物表达的增加或减少。临床医生可依靠生物标志物表达水平的增加或降低来确定治疗的有效性。本发明的装置可用于定量地测量生物标志物的表达。例如,可以使用定量PCR来扩增已与微针上的多核苷酸探针杂交的生物标志物的拷贝数。未与生物样品接触或杂交的微针可以用作阴性对照。具有已知量的标准对照如持家基因的微针可以用作反应的阳性对照。定量PCR可以如The PCR Technique:Quantitative PCR,James W.Larrick,June 1997,Eaton Publishing中所述进行。

[0154] 本公开的装置和方法可用于生物防御中。生物防御可包括检测生物或化学物质的释放或传播。这些物质可以是细菌、病毒或毒素,并且可以是天然存在的或人工修饰的形式。本公开的装置可用于检测多种与可在生物战争中使用的病理剂相关的生物标志物。

[0155] 生物和/或化学战剂可包括可用作例如引起恐怖、混乱、疾病、不适和/或死亡的武器的任何生物和/或化学实体。化学和生物剂的非限制性实例包括炭疽;天花;土拉菌病;禽流感;鼠疫;HIV;埃博拉病毒;口蹄疫;蓖麻毒蛋白;神经毒性有机磷酸酯类;氰化物;起疱剂(或糜烂性毒剂),如芥子气和路易氏剂;窒息性毒剂,如氯和光气;神经毒剂,如沙林、塔崩(Tabun)、梭曼(Soman)和VX;致幻剂,如BZ;杀虫剂,如对硫磷、马拉硫磷和谷硫磷;及其衍生物或组合。

[0156] 本发明进一步提供了用于进行本文所述的诊断应用的试剂盒。该试剂盒通常包含含有一个或多个微针的微针装置。在一些试剂盒中,微针已经与对检测一种或多种生物标志物具有特异性的探针缀合。在一些其它试剂盒中,用于检测一种或多种生物标志物的探针和用于将它们与微针缀合的试剂作为单独的成分来提供。本发明的一些试剂盒旨在用于检测和捕获针对已知疾病或病症的一种特异性生物标志物(例如,针对胃肠癌的亲斑蛋白-3 mRNA)。在这些试剂盒中,该装置的微针通常与或将要与相同的探针分子(例如,与靶生物标志物互补的寡核苷酸)缀合。本发明的一些其它试剂盒被设计成用于检测与一种或多种疾病或病症相关的多种生物标志物。在这些试剂盒中,针对不同生物标志物的不同探针缀合至或准备缀合至该装置的微针。除了微针装置和探针外,本发明的试剂盒还可包含用于向受试者施加该装置或用于分析被捕获的生物标志物的其它试剂(例如,用于生物标志物的PCR扩增的试剂)。该试剂盒还可包含关于使用该试剂盒进行预期的诊断应用的说明书(例如,关于试剂盒中的说明页或试剂盒的包装材料)。

[0157] 本发明的装置可被包装为试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含关于使用该装

置治疗状况如基底细胞癌的书面说明书。该书面材料可以是,例如标签。该书面材料可对使用试剂盒中包含的微针和附加试剂的条件和方法给出建议。该说明书向受试者和监管医生提供关于实现生物标志物的最佳检测的最佳指导。

[0158] 本公开的试剂盒可包含本文所述的装置和用于聚合酶链反应的一组试剂。本公开的试剂盒可包含本文所述的装置和用于ELISA测定的一组试剂。试剂盒可设计为用于鉴别特定的状况,如基底细胞癌,或者试剂盒可设计成用于诸如鳞状细胞癌、卡波西肉瘤、黑素瘤、基底细胞癌和光化性角化病(鳞状细胞癌的先兆)等多种状况的同时诊断。在一些情况下,本公开的试剂盒可包含本发明的装置和书面材料。在一些情况下,本公开的试剂盒可包含本发明的装置、一组探针和可用于将探针连接至微针的一组试剂。

[0159] 本公开的试剂盒可以包含阳性和阴性对照。阳性对照可以是,例如包含已知生物标志物的样品。阳性对照可以是已知序列的多核苷酸,如与基底细胞癌相关的已知SNP的多核苷酸。阴性对照可以是,例如杂乱的(scrambled)多核苷酸序列。在一些情况下,试剂盒可包含已知浓度或量的试剂(例如多肽、多核苷酸),其可用来制作标准曲线以量化在组织或生物样品中存在的生物标志物的量。这类试剂还可以与本文提供的任何方法一起使用。

[0160] 动物模型

[0161] 针对疾病的许多药物、治疗和治愈可以使用动物模型来开发。动物模型可以是在疾病的研究和调查过程中使用的活动物。药物的制药学开发可包括在细胞试验中未检测到的毒性和不良副作用的研究。动物模型可用于评价药物治疗的功效、吸收、代谢、分布、排泄、毒性、药理学和副作用。本发明的装置和方法可用于鉴别动物模型上的生物标志物对药物治疗的响应。

[0162] 动物模型可以对选择药物化合物以供进一步评估提供指导。例如,动物模型可以对人类中的药代动力学/代谢研究提供指导。动物模型可以用于例如吸收、分布、代谢、排泄和毒理学(ADMET)参数的评价,以支持试验性新药(IND)应用。在动物模型中的研究可以例如导致选择在临床前试验和临床试验中进一步评价的化合物。

[0163] 临床干预和临床试验

[0164] 本公开的装置可以在临床试验中使用。例如,本公开的装置可以在手术操作期间用于鉴别在难以到达的组织或不能切除及移除以供活检的组织中的生物标志物。例如,本公开的装置可用于检测在手术操作期间暴露于临床医生的心血管组织、脑组织或内部器官中的生物标志物。在一些情况下,本发明的装置可防止医学并发症,否则当临床医生从受试者中移除组织用于活检时可出现该医学并发症。本公开的装置可以在例如常规医疗咨询中、手术操作期间使用或在受试者家中由受试者使用。本发明的装置可以在例如心血管外科手术或眼外科手术中使用。

[0165] 本公开的装置可以在临床试验方案的设计中使用。例如,本公开的装置可以与临床试验一起使用,以检测生物标志物的水平并监测受试者对药物治疗的响应。本公开的装置可对临床前开发和临床试验的设计、实施和分析提供指导。本公开内容提供了鉴别和量化可为了最佳施用治疗有效的化合物而选择的生物标志物的方法。

[0166] 本公开的装置可用于预测受试者在临床试验中对不同药物剂量的响应。例如,通过监测眼组织中生物标志物如视网膜疾病的生物标志物的水平的增加或减少,本发明的方法和装置可确立药物治疗对视网膜疾病的疗效。在一些情况下,基于用本公开的装置对生

物标志物的检测来进行或改变治疗剂的临床试验。在一些情况下,本公开的方法和装置可用来比较在临床试验中评价的治疗和已知的标准照护治疗。

[0167] 临床试验通常进行几个步骤,包括临床前研究、预备研究、安全性筛选研究以及疗效评价研究。对于待批准并上市的药物,通常必须满足在临床试验方案中指定的所有里程碑,包括在提出的置信区间内的功效的证明,以及包含显著数目的个体来证明本发明的统计功效。本发明的应用的非限制性实例包括在整个临床试验过程中监测多种生物标志物。本公开的装置和方法还可用于监测不同药物治疗如何能够影响生物标志物在临床试验的早期阶段(临床前和I期)的表达。

[0168] 本公开的装置和方法也可用来基于鉴别的生物标志物的表达水平而预测受药物治疗影响的潜在细胞途径的变化。可影响潜在细胞途径的药物治疗的药效学和药代动力学参数的非限制性实例包括:a)给药量,其可表示为剂量D;b)给药间隔,其可表示为τ;c)药物分布在其中的表观体积,其可表示为分布体积V_d,其中$V_d=D/C_0$;d)在给定体积的血浆中的药物量,其可表示为浓度C_0或C_{ss},其中C_0或$C_{ss}=D/Vd$;e)药物的半衰期$t_{1/2}$,其中$t_{1/2}=\ln(2)/k_e$;f)药物从体内移除的速率k_e,其中$k_e=\ln(2)/t_{1/2}=CL/V_d$;g)平衡方程式所需的输注速率$K_{in}$,其中$K_{in}=C_{ss}.CL$;h)单剂量给药后的浓度-时间曲线的积分,其可表示为$AUC_{0-\infty}$,其中$\int_0^\infty C\,dt$,或处于稳态,其可表示为$AUC_{\tau,ss}$,其中$\int_t^{t+\pi} C\,dt$;i)每单位时间内清除药物的血浆的体积,其可表示为CL(清除),其中$CL=V_d.k_e=D/AUC$;j)药物的全身可用分数,其可表示为f,其中$f=\frac{AUCpo.Div}{AUCiv.Dpo}$;k)给药后药物的峰值血浆浓度$C_{max}$;l)药物达到$C_{max}$所花的时间$t_{max}$;m)在施用下一剂量前药物达到的最低浓度$C_{min}$;和n)在稳态下在一个给药间隔内的峰谷波动,其可表示为$\%PTF=100.\frac{(Cmax,ss-Cmin,ss)}{Cav,ss}$其中$C_{av,ss}=\frac{AUC\tau,ss}{\tau}$。

[0169] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式:

[0170] 1.一种包含第一微针的装置,其中该第一微针共价或非共价地附接至对第一生物标志物具有特异性的第一探针。

[0171] 2.实施方式1的装置,其中所述第一生物标志物是多核苷酸,且所述第一探针是与所述第一生物标志物互补的多核苷酸。

[0172] 3.实施方式1的装置,其中所述第一生物标志物是多肽。

[0173] 4.实施方式1的装置,其中所述第一探针是对所述第一生物标志物具有特异性的抗体。

[0174] 5.实施方式1的装置,其进一步包含对第二生物标志物具有特异性的第二探针,其中该第二探针不同于所述第一探针。

[0175] 6.实施方式5的装置,其中所述第二探针共价或非共价地附接至所述第一微针。

[0176] 7.实施方式5的装置,其中所述第二探针共价或非共价地附接至第二微针。

[0177] 8.实施方式5的装置,其中所述第二生物标志物是多核苷酸,且所述第二探针是与所述第二生物标志物互补的多核苷酸。

[0178] 9.实施方式5的装置,其中所述第一探针与第一核苷酸多态性特异性地结合,且所述第二探针与第二核苷酸多态性特异性地结合。

[0179] 10.实施方式5的装置,其中所述第二生物标志物是多肽。

[0180] 11.实施方式5的装置,其中所述第一和第二探针是各自对相同生物标志物的不同表位具有特异性的不同抗体。

[0181] 12.实施方式1的装置,其中所述第一探针附接至多个微针。

[0182] 13.实施方式1的装置,其中所述第一微针包含聚合物、金属或陶瓷。

[0183] 14.实施方式1的装置,其中所述第一微针包含聚合物。

[0184] 15.实施方式1的装置,其中所述第一探针经由连接体附接至所述第一微针。

[0185] 16.实施方式15的装置,其中所述连接体是巯基/氨基双官能连接体。

[0186] 17.实施方式15的装置,其中所述连接体是聚(乙二醇)连接体。

[0187] 18.实施方式1的装置,其中所述第一微针在基底上形成。

[0188] 19.实施方式1的装置,其进一步包含用于扩增和鉴别所述第一和第二生物标志物的隔室。

[0189] 20.一种包含多个微针的装置,其中所述多个微针包含共价或非共价地附接至对生物标志物具有特异性的至少一个探针的至少一个微针,且该生物标志物指示皮肤或眼状况。

[0190] 21.实施方式20的装置,其中所述生物标志物指示皮肤状况。

[0191] 22.实施方式21的装置,其中所述皮肤状况是皮肤癌。

[0192] 23.实施方式20的装置,其中所述生物标志物指示眼状况。

[0193] 24.实施方式21的装置,其中所述眼状况是眼睛炎症或眼癌。

[0194] 25.实施方式20的装置,其中所述生物标志物是多核苷酸,且所述至少一个探针与所述生物标志物互补。

[0195] 26.实施方式25的装置,其中所述至少一个探针包含对相同生物标志物的不同核苷酸多态性具有特异性的不同多核苷酸探针。

[0196] 27.实施方式20的装置,其中所述生物标志物是肽或多肽,且所述至少一个探针是对所述生物标志物具有特异性的抗体。

[0197] 28.实施方式27的装置,其中所述至少一个探针包含对相同生物标志物的不同表位具有特异性的不同抗体。

[0198] 29.实施方式20的装置,其包含对多个不同生物标志物具有特异性的多个探针,其中所述多个探针附接至相同或不同的微针。

[0199] 30.实施方式29的装置,其中至少两个不同的探针附接至相同的微针。

[0200] 31.实施方式20的装置,其包含针对特异性生物标志物的至少两个相同的探针,其中所述至少两个相同的探针附接至一个或多个微针。

[0201] 32.实施方式20的装置,其中所述微针包含聚合物、金属或陶瓷。

[0202] 33.实施方式32的装置,其中所述微针包含聚合物。

[0203] 34.实施方式20的装置,其中所述探针经由连接体附接至所述微针。

[0204] 35.实施方式34的装置,其中所述连接体是巯基/氨基双官能连接体。

[0205] 36.实施方式34的装置,其中所述连接体是聚(乙二醇)连接体。

[0206] 37.权利要20的装置,其中所述多个微针在基底上形成。

[0207] 38.实施方式20的装置,其进一步包含用于原位扩增和鉴别通过探针捕获的生物

标志物的隔室。

[0208] 39.一种包含多个微针的装置,其中所述多个微针包含共价或非共价地附接至对生物标志物具有特异性的探针的至少一个微针,其中所述探针包含当该探针检测到该生物标志物时发射光信号的传感器。

[0209] 40.实施方式39的装置,其中当其检测到所述生物标志物时所述探针的光信号增加。

[0210] 41.实施方式39的装置,其中当其检测到所述生物标志物时所述探针的光信号减少。

[0211] 42.实施方式39的装置,其中所述生物标志物是多核苷酸,且所述探针是与所述生物标志物互补的多核苷酸。

[0212] 43.实施方式42的装置,其中所述探针是对相同生物标志物的不同核苷酸多态性具有特异性的不同多核苷酸探针。

[0213] 44.实施方式39的装置,其中所述生物标志物是肽或多肽,且所述探针是对所述生物标志物具有特异性的抗体。

[0214] 45.实施方式44的装置,其中所述探针是对相同生物标志物的不同表位具有特异性的不同抗体。

[0215] 46.实施方式39的装置,其包含对多个不同生物标志物具有特异性的多个探针,其中所述多个探针附接至相同或不同的微针。

[0216] 47.实施方式39的装置,其中至少两个不同的探针附接至相同的微针。

[0217] 48.实施方式39的装置,其包含针对特异性生物标志物的至少两个相同的探针,其中相同的探针附接至一个或多个微针。

[0218] 49.实施方式39的装置,其中所述微针由聚合物、金属或陶瓷制成。

[0219] 50.实施方式49的装置,其中所述微针包含聚合物。

[0220] 51.实施方式39的装置,其中所述探针经由连接体附接至微针。

[0221] 52.实施方式51的装置,其中所述连接体是巯基/氨基双官能连接体。

[0222] 53.实施方式51的装置,其中所述连接体是聚(乙二醇)连接体。

[0223] 54.实施方式39的装置,其进一步包含用于原位扩增和鉴别通过探针捕获的生物标志物的隔室。

[0224] 55.一种试剂盒,其包含:

[0225] (a)包含多个微针的装置,其中所述多个微针包含共价或非共价地附接至对生物标志物具有特异性的第一探针的至少一个微针;和

[0226] (b)用于聚合酶链反应的一组试剂。

[0227] 56.实施方式55的试剂盒,其中至少一个微针共价或非共价地附接至对不同生物标志物具有特异性的第二探针。

[0228] 57.实施方式55的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含固定器。

[0229] 58.实施方式55的试剂盒,其中所述生物标志物是多核苷酸,且所述探针是与所述生物标志物互补的多核苷酸。

[0230] 59.实施方式58的试剂盒,其中所述探针是对相同生物标志物的不同核苷酸多态性具有特异性的不同多核苷酸探针。

[0231] 60.实施方式55的试剂盒,其中该组试剂包含聚合酶、缓冲液和对照样品。

[0232] 61.实施方式55的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含关于其用途的书面说明。

[0233] 62.实施方式55的试剂盒,其包含多个对多个不同生物标志物具有特异性的探针,其中所述多个探针附接至相同或不同的微针。

[0234] 63.实施方式62的试剂盒,其中至少两个不同的探针附接至相同的微针。

[0235] 64.实施方式55的试剂盒,其进一步包含针对特异性生物标志物的至少两个相同的探针,其中相同的探针附接至一个或多个微针。

[0236] 65.实施方式55的试剂盒,其中所述微针由聚合物、金属或陶瓷制成。

[0237] 66.实施方式65的试剂盒,其中所述微针包含聚合物。

[0238] 67.实施方式55的试剂盒,其中所述探针经由连接体附接至所述微针。

[0239] 68.实施方式67的试剂盒,其中所述连接体是巯基/氨基双官能连接体。

[0240] 69.实施方式67的试剂盒,其中所述连接体是聚(乙二醇)连接体。

[0241] 70.实施方式55的试剂盒,其进一步包含用于原位扩增和鉴别通过探针捕获的生物标志物的隔室。

[0242] 71.实施方式55的试剂盒,其中所述探针包含当该探针检测到所述生物标志物时发射视觉信号的传感器。

[0243] 72.实施方式55的试剂盒,其中与生物样品的接触从皮肤状况检测或提取一种或多种生物标志物。

[0244] 73.实施方式55的试剂盒,其中与生物样品的接触从眼状况检测或提取一种或多种生物标志物。

[0245] 74.实施方式55的试剂盒,其中该组试剂用于逆转录酶聚合酶链反应。

[0246] 75.一种用于从受试者中的原位组织或生物样品检测一种或多种生物标志物的方法,该方法包括(a)使微针与受试者的组织或生物样品接触,其中所述微针附接至一组探针,且其中所述探针与所述一种或多种生物标志物原位结合;和(b)检测与所述探针结合的所述一种或多种生物标志物。

[0247] 76.实施方式75的方法,其中所述一种或多种生物标志物是多核苷酸,且所述探针是与所述生物标志物互补的多核苷酸。

[0248] 77.实施方式76的方法,其中所述探针是对相同生物标志物的不同核苷酸多态性具有特异性的不同多核苷酸探针。

[0249] 78.实施方式75的方法,其中所述一种或多种生物标志物是肽或多肽,且所述探针是对所述生物标志物具有特异性的抗体。

[0250] 79.实施方式78的方法,其中所述探针是对相同生物标志物的不同表位具有特异性的不同抗体。

[0251] 80.实施方式75的方法,其包括对多个不同生物标志物具有特异性的多个探针,其中所述多个探针附接至相同或不同的微针。

[0252] 81.实施方式80的方法,其中至少两个不同的探针附接至相同的微针。

[0253] 82.实施方式75的方法,其包括针对特异性生物标志物的至少两个相同的探针,其中相同的探针附接至一个或多个微针。

[0254] 83.实施方式75的方法,其中所述微针包含聚合物、金属或陶瓷。

[0255] 84.实施方式83的方法,其中所述微针包含聚合物。

[0256] 85.实施方式75的方法,其中所述探针经由连接体附接至微针。

[0257] 86.实施方式85的方法,其中所述连接体是巯基/氨基双官能连接体。

[0258] 87.实施方式85的方法,其中所述连接体是聚(乙二醇)连接体。

[0259] 88.实施方式75的方法,其中所述检测包括使所述一种或多种生物标志物与可检测标记接触。

[0260] 89.实施方式88的方法,其中所述可检测标记是荧光团。

[0261] 90.实施方式75的方法,其中所述检测包括扩增所述生物标志物。

[0262] 91.实施方式75的方法,其中通过聚合酶链反应检测与所述微针上的所述探针结合的所述生物标志物。

[0263] 92.实施方式75的方法,其中通过多核苷酸标记的第二抗体和通过对该多核苷酸标签的PCR扩增检测与所述微针上的所述探针结合的所述生物标志物。

[0264] 93.实施方式75的方法,其中所述生物标志物是小分子或代谢物,且所述探针是对所述生物标志物具有特异性的配体。

[0265] 94.一种用于从受试者中的原位组织或生物样品检测一种或多种生物标志物的方法,该方法包括:(a)使微针装置与受试者的组织或生物样品接触,其中所述微针装置包含对所述一种或多种生物标志物具有特异性的一个或多个探针,其中至少一个探针包含当该探针检测到该生物标志物时发射视觉信号的传感器;和(b)基于该视觉信号检测生物标志物。

[0266] 95.实施方式94的方法,其中所述一种或多种生物标志物是多核苷酸,且所述探针是与所述生物标志物互补的多核苷酸。

[0267] 96.实施方式95的方法,其中所述探针是对相同生物标志物的不同核苷酸多态性具有特异性的不同多核苷酸探针。

[0268] 97.实施方式94的方法,其中所述一种或多种生物标志物是肽或多肽,且所述探针是对所述生物标志物具有特异性的抗体。

[0269] 98.实施方式96的方法,其中所述探针是对相同生物标志物的不同表位具有特异性的不同抗体。

[0270] 99.实施方式94的方法,其包括对多个不同生物标志物具有特异性的多个探针,其中所述多个探针附接至相同或不同的微针。

[0271] 100.实施方式99的方法,其中至少两个不同的探针附接至相同的微针。

[0272] 101.实施方式94的方法,其进一步包括针对特异性生物标志物的至少两个相同的探针,其中相同的探针附接至一个或多个微针。

[0273] 102.实施方式94的方法,其中所述微针由聚合物、金属或陶瓷制成。

[0274] 103.实施方式102的方法,其中所述微针包含聚合物。

[0275] 104.实施方式94的方法,其中所述探针经由连接体附接至所述微针。

[0276] 105.实施方式104的方法,其中所述连接体是巯基/氨基双官能连接体。

[0277] 106.实施方式104的方法,其中所述连接体是聚(乙二醇)连接体。

[0278] 107.实施方式94的方法,其进一步包括用于原位扩增和鉴别通过探针捕获的生物标志物的系统。

[0279] 108.实施方式94的方法,其中所述检测包括使所述一种或多种生物标志物与可检测标记接触。

[0280] 109.实施方式108的方法,其中所述可检测标记是荧光团。

[0281] 110.实施方式94的方法,其中所述检测包括扩增所述生物标志物。

[0282] 111.实施方式94的方法,其中通过聚合酶链反应检测与所述微针上的探针结合的所述生物标志物。

[0283] 112.实施方式94的方法,其中通过多核苷酸标记的第二抗体和通过对该多核苷酸标签的PCR扩增检测与所述微针上的所述探针结合的所述生物标志物。

[0284] 113.实施方式94的方法,其中所述生物标志物是小分子或代谢物,且所述探针是对所述生物标志物具有特异性的配体。

[0285] 114.实施方式94的方法,其中所述一种或多种生物标志物与皮肤状况相关。

[0286] 115.实施方式94的方法,其中所述一种或多种生物标志物与眼状况相关。

[0287] 116.实施方式94的方法,其中蚀刻所述微针以增大所述微针的表面积。

[0288] 117.一种包含多个微针的组合物,所述微针用能够破坏细胞外基质的试剂涂覆。

[0289] 118.实施方式117的组合物,其中所述试剂是酶。

[0290] 119.实施方式117的组合物,其中所述酶选自丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、MMP、木瓜蛋白酶、透明质酸酶、链激酶、链道酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、α-胰凝乳蛋白酶、α-淀粉酶、DNase、胶原酶和舒替兰酶。

[0291] 120.实施方式117的组合物,其中所述酶是透明质酸酶。

[0292] 121.一种用于检测受试者的组织中的一种或多种生物标志物的方法,该方法包括(a)使微针与受试者的组织原位接触,其中所述组织包含细胞外基质,其中所述微针共价地附接至一组探针,且其中所述探针与生物标志物原位结合;和(b)破坏细胞外基质。

[0293] 122.实施方式121的方法,其中所述细胞外基质通过酶活性而破坏。

[0294] 123.实施方式121的方法,其中破坏细胞外基质包括向细胞外基质施加超声能。

[0295] 124.实施方式121的方法,其中所述细胞外基质通过电势而破坏。

[0296] 125.一种用于从受试者的原位组织检测一种或多种生物标志物的方法,该方法包括(a)使微针与所述组织接触,其中所述组织包含细胞膜,其中所述微针附接至一组探针,且其中所述探针与生物标志物原位结合,和(b)破坏细胞膜。

[0297] 126.实施方式125的方法,其中所述细胞膜通过酶活性而破坏。

[0298] 127.实施方式125的方法,其中破坏细胞膜包括向所述细胞膜施加超声能。

[0299] 128.实施方式125的方法,其中所述细胞膜通过电势而破坏。

[0300] 129.一种制备微针装置的方法,该方法包括:

[0301] (a)获得包含无机盐的溶液;

[0302] (b)向所述溶液中添加探针和微针;和

[0303] (c)使所述探针在所述溶液中缀合至所述微针。

[0304] 130.实施方式129的方法,其中所述无机盐是氯化钠。

[0305] 131.实施方式129的方法,其中所述无机盐的浓度小于2.5M。

[0306] 132.一种用于检测受试者中的一种或多种生物标志物的方法,该方法包括使微针装置与受试者的皮肤或眼组织接触。

[0307] 133.实施方式132的方法,其中所述一种或多种生物标志物与皮肤或眼状况相关。

[0308] 134.实施方式132的方法,其中所述生物标志物是多核苷酸。

[0309] 135.实施方式132的方法,其中所述生物标志物存在于受试者的血液中。

[0310] 136.一种用于检测受试者中的一种或多种生物标志物的方法,该方法包括使微针装置与受试者的皮肤毛细血管接触。

[0311] 137.实施方式136的方法,其进一步包括使微针装置与受试者的血液样品接触。

[0312] 138.一种用于从受试者中的原位组织检测一种或多种多核苷酸生物标志物的方法,所述方法包括使微针装置与受试者的组织在手术中程序期间接触。

[0313] 139.实施方式138的方法,其中所述组织来自选自脑、心脏、乳房、肝、胰脏、脾脏、膀胱、胃、肺、子宫、子宫颈、前列腺、肾、肠、阑尾、甲状腺和结肠的器官。

[0314] 140.实施方式138的方法,其中所述受试者的组织包含良性组织。

[0315] 141.实施方式138的方法,其中所述受试者的组织包含疑似恶性组织。

[0316] 142.实施方式138的方法,其中所述微针装置接触恶性组织和与该恶性组织相邻的良性组织。

[0317] 143.实施方式138的方法,其中所述微针装置接触与恶性组织相邻的良性组织。

[0318] 144.实施方式138的方法,其中所述微针装置接触肿瘤。

[0319] 145.实施方式138的方法,其进一步包括确定肿瘤的手术边缘。

[0320] 146.实施方式75、94、121、125、129、132、136或138的方法,其进一步包括从获自受试者的参考组织检测一种或多种生物标志物。

[0321] 147.实施方式14的装置,其中所述聚合物是热塑性聚合物。

[0322] 148.实施方式14的装置,其中所述热塑性聚合物选自聚碳酸酯、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚乙烯和聚丙烯。

实施例

[0323] 提供下列实施例是为了进一步说明本发明而非限制其范围。实施例1.用聚碳酸酯固定的探针检测溶液中的ssDNA

[0324] 该实施例描述了用DNA探针官能化的聚碳酸酯及其从溶液中特异性捕获ssDNA的应用。

[0325] DNA探针与聚碳酸酯的附接:首先对聚碳酸酯的表面进行硝化和还原,以引入进一步用于附接市售巯基/氨基双官能连接体的氨基(图1)。随后将具有3'巯基修饰的DNA与栓系到聚碳酸酯上的连接体偶联。

[0326] 附接至聚碳酸酯的5'-Cy5修饰的DNA的可视化:为了对聚碳酸酯表面上的DNA进行可视化,使用上述化学来附接在5'用一个Cy5修饰并且在3'用巯基修饰的DNA。用共聚焦显微镜检查对单层5'Cy5-DNA进行成像(图2),显示表面的成功官能化。在用特异性DNA探针修饰的聚碳酸酯上的ssDNA的体外捕获:为了测试附接至聚碳酸酯的DNA探针从溶液中特异性地捕获(杂交)ssDNA的能力,用与环状单链DNA(ssDNA,约3.4kb大小)的区域互补的DNA探针修饰聚碳酸酯盘。在修饰的盘与ssDNA溶液一起孵育后,彻底洗涤该盘,通过高温变性从盘上释放出杂交的ssDNA并通过定量PCR(qPCR)进行量化。在用特异性DNA探针修饰的聚碳酸酯上捕获的DNA的量被表示为与仅用连接体修饰的聚碳酸酯上的捕获量——背景对照的比

例(图1)。

[0327] 从该研究获得的结果总结于表1中。数据显示,在所有测试的ssDNA浓度(浓度变化超过6log)下,ssDNA靶标成功地富集在特异性探针上。

[0328] 表1.表示为从具有特异性探针的盘的DNA回收与从仅用连接体修饰的盘的DNA回收的比例的捕获效率。

[0329]

表 1

ssDNA 样品浓度	实验/阴性对照 DNA 回收
1.66 x 10^{-18} M (1.66 aM)	> 4
1.66 x 10^{-16} M (166 aM)	> 3
1.66 x 10^{-14} M (16.6 fM)	11.4
1.66 x 10^{-12} M (1.66 pM)	5

[0330] 本研究中使用的材料和方法在下文详细描述。

[0331] 聚碳酸酯衍生化:聚碳酸酯在30%HNO_3水溶液中于65℃振荡30分钟,继而用水充分洗涤。将硝化的聚碳酸酯(步骤1)浸入到10%$NaBH_4$水溶液中并在室温下振荡过夜,最后用水充分洗涤。将氨基修饰的聚碳酸酯(步骤2)浸入至6.4mM磺基-GMBS(Pierce)在PBS pH 7.2中的溶液中并在室温下振荡1.5小时,最后用水充分洗涤。

[0332] DNA巯基基团的脱保护:DNA购自IDT且在3'端具有巯基修饰物C3 S-S。为了使巯基修饰脱保护,5μL的100μM DNA水溶液用25μL在PBS pH 8.1中的100mM 2-巯基乙醇在室温下处理30分钟。为了纯化脱保护的DNA,将600μL来自Qiagen核苷酸去除试剂盒的PN缓冲液加入到反应混合物中,随后加入异丙醇(250μL)。将该溶液施加到Qiagen核苷酸去除试剂盒的二氧化硅柱上,并根据试剂盒的说明书进行洗涤,随后用35μL的PBS pH 7.2洗脱。DNA向聚碳酸酯的附接:立即将脱保护的巯基修饰的DNA的溶液(步骤4)施加到用马来酰亚胺连接体修饰的聚碳酸酯上(步骤3)并在37℃下在潮湿的气氛中孵育45分钟,然后用水充分洗涤并风干。

[0333] Cy5修饰的DNA的可视化:使用上述化学,将在5'端用一个Cy5修饰且在3'端具有巯基修饰的25聚体DNA附接至聚碳酸酯的表面上。在用水充分洗涤并干燥后,将聚碳酸酯安装到显微镜载玻片上并用使用远红外滤光器的共聚焦显微镜进行成像。对表面上的DNA修饰的区域的边缘进行定位和成像,清楚地显示了用Cy5标记的DNA单层修饰的效果。

[0334] 在用特异性DNA探针官能化的聚碳酸酯上的ssDNA的捕获:使用上述程序(步骤1-4),将在3'具有巯基修饰的DNA探针(5'-CAAGTTTGCCTTTAGCGTCAGACTGTATTTTTTTT/ThioMC3/-3')(SEQ ID NO:1)附接至聚碳酸酯盘。用于阴性对照实验的盘仅用连接体进行修饰(步骤1-3)。将盘浸入从丝状噬菌体中分离的环状ssDNA在SSC缓冲液3x(150mM NaCl,15mM柠檬酸钠)中的溶液(关于DNA浓度参见表1)中并在37℃下孵育10分钟。随后用三种洗涤缓冲液洗涤该盘。洗涤缓冲液1:1x SSC+0.03%SDS;洗涤缓冲液2:0.2x SSC,洗涤缓冲液3:0.05xSSC。洗涤后,将盘浸入最小体积的无菌蒸馏水中并在90℃下加热2分钟,此后从盘上去除仍温热的水。使用对丝状噬菌体的p3基因具有特异性的引物,利用qPCR对水溶液等份中的ssDNA进行量化。

[0335] 实施例2.DNA探针与不锈钢表面的缀合

[0336] 该实施例描述了含有3'巯基修饰的DNA寡聚体探针与金涂覆的不锈钢表面的附接。DNA探针与金涂覆的不锈钢的附接:通过附接巯基衍生化的单链DNA容易地修饰金表面。巯基化DNA形式的硫原子与金形成共价键。金涂覆的不锈钢上的DNA的可视化:为了对金涂覆的不锈钢样品表面上的DNA进行可视化,使用荧光标记的dUTP进行补平PCR反应以合成单链DNA的互补链。所得双链寡聚体含有Chromatide® Alexa Fluor®488-5-dUTP的多个拷贝,其类似于荧光素,在绿色通道内发荧光。荧光显微镜检查证明了金涂覆的不锈钢表面的成功官能化(图3)。

[0337] 在本研究中使用的材料和方法在下文详细描述。

[0338] DNA巯基基团的脱保护以及与不锈钢的缀合:DNA购自IDT且在3'端具有巯基修饰物C3 S-S。为了使巯基修饰脱保护,5pL的100pM DNA水溶液用25pL在PBS pH 8.1中的100mM 2-巯基乙醇在室温下处理30分钟。为了纯化脱保护的DNA,将600pL来自Qiagen核苷酸去除试剂盒的PN缓冲液加入到反应混合物中,随后加入异丙醇(300pL)。将该溶液施加至Qiagen核酸去除试剂盒的二氧化硅柱上,并根据试剂盒的说明书进行洗涤,随后用24pL的TE缓冲液(10mM Tris;1mM EDTA)pH 7.2洗脱。

[0339] 立即将脱保护的巯基修饰的DNA溶液施加到一片不锈钢(约5mm x 2.5mm)的金表面上。将溶液在潮湿的气氛中在37℃下孵育16-20小时,然后用水充分洗涤,随后风干。

[0340] 用于扩增荧光信号的补平反应:将在3'端具有巯基衍生化的75bp单链DNA寡聚体(5'-GCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCGCCTGTGGGCGACTAAATTCCGTTAAAGCCGGC/ThiolMC3/-3')(SEQ ID NO:2)附接至不锈钢样品的金涂覆的表面上。洗涤并干燥后,将不锈钢样品置于0.5mL管中。随后加入48.5pL dH_2O和1.5pL 10pM与巯基衍生化的DNA的3'端互补的引物。将混合物在55℃下孵育2分钟,以使引物与单链DNA退火。然后,让混合物恢复至室温。

[0341] 然后,使用购自Invitrogen的Chromatide® Alexa Fluor®488-5-dUTP进行补平反应。将下列组分加入到步骤3的混合物中:2pL的10mM dNTP混合物(dATP,dGTP,dCTP)、7.5pL的10X Klenow片段缓冲液(New England Biolabs)、9.5pL dH_2O、4pL的1mM 488-5-dUTP和2pL的Klenow片段(New England Biolabs)。该反应在37℃下孵育30分钟。将不锈钢样品从管中取出,用水充分洗涤并使之风干。

[0342] Chromatide® Alexa Fluor®修饰的DNA的可视化:一旦不锈钢样品已经干燥,则将其安装到显微镜载玻片上并用使用绿色滤光器的荧光显微镜进行成像。定位不锈钢上的DNA修饰的区域的边缘并对其成像,清楚地证明了DNA与金涂覆的表面的缀合。

[0343] 实施例3.寡核苷酸与金属微针阵列表面的增强的结合

[0344] 为了进一步促进包含3'巯基修饰的DNA寡聚体探针与金涂覆的不锈钢表面的附接,引入NaCl滴定。上述实施例2中的方案在增加浓度逐渐提高的NaCl的情况下进行。与该表面偶联的ssDNA的量与加入的NaCl的量成比例地增加,并且在1M NaCl浓度下观察到约10倍的增加(图7)。使用Quanti-iT Green ssDNA Reagent试剂盒(Invitrogen)确定与金表面结合的DNA的定量。

[0345] 实施例4.诊断方法

[0346] 缺乏黑素瘤的诊断对皮肤科医生是个很重要的问题。漏诊的后果对患者而言可能是灾难性的,对保险公司而言是代价高昂的,并且对医生而言是伤害性的,因此黑素瘤的早期检测是至关重要的。然而,标准活检程序的侵入性质可阻止医生在看起来为良性的组织上进行活检。图5和图6示出了用本公开的装置和方法对黑素瘤的非侵入性诊断。501-505更详细地描述了603的表面。

[0347] 图5示出了一个过程,由此使设计成检测黑素瘤的生物标志物的DNA探针与期望的生物标志物杂交。501示出了附接至微针的金表面上的单个DNA探针。501中的DNA探针包含选择性地与黑素瘤相关RNA杂交的单核苷酸多态性。如实施例2所述,501中的DNA探针共价地连接到微针的金表面。505示出了本发明装置的表面的亮视野和荧光视野图像,包含多个具有共价连接的DNA探针的微针。当该装置接触到受试者的皮肤时,微针轻轻地破坏正在接触的皮肤的细胞膜。该过程使微针上的探针暴露于细胞内的多核苷酸、肽和蛋白质生物标志物。可使微针上的探针在生理条件下与生物标志物原位杂交502指定的一段时间,例如,可使探针在生理体温(约37℃)下杂交约30分钟。逆转录酶-PCR(RT-PCR)试验503可用于将杂交的RNA转变成DNA。标准PCR方案504可用于扩增503的产物。

[0348] 图6示出了用本发明的装置提供处理的方法的概述。601示出了对受试者的皮肤进行目视检查的临床医生。临床医生601可确定皮肤602或皮肤的一部分看起来是健康的或不健康的。临床医生可以用本发明的装置触碰受试者的皮肤,从而以非侵入性的方式使针对生物标志物的探针与受试者的皮肤接触。603是装置的表面的图示,其在图5中更详细地描述。604示出了为扩增杂交的生物标志物而进行的PCR测定。605示出了临床医生将分析结果返回至受试者。

[0349] 实施例5.修饰的聚合物微针阵列的体内测试

[0350] 本实施例描述了使用本申请中描述的修饰的聚合物微针阵列对小鼠肌动蛋白的体内检测。聚碳酸酯微针用小鼠肌动蛋白ssDNA探针修饰,并且已与ssDNA探针偶联的微针样品还用透明质酸酶涂覆。用ssDNA修饰的聚碳酸酯微针处理小鼠(n=4;A/J,Swiss Webster)。使用拇指按压将微针阵列施加至小鼠的剃毛的后肢,并保持在适当位置约10秒。然后,通过在载玻片上翻转该阵列,用油密封针座与载玻片之间的空间,并且将载玻片置于50℃热块上30分钟,来将与阵列结合的mRNA直接在微针表面上逆转录成cDNA。然后将反应混合物从载玻片转移至PCR管中并使用传统PCR技术扩增。循环程序如下进行:94℃1分钟;94℃15秒、55℃30秒、68℃60秒的40个循环;68℃5分钟。样品通过凝胶成像进行可视化并使用光密度测定法进行量化。

[0351] 观察到了从包含探针的微针上分离的mRNA量的显著增加。包含ssDNA探针的样品与未修饰的微针阵列之间的差异约为2-3倍,而同时包含ssDNA探针和透明质酸酶的样品与未修饰的阵列之间的差异约为8倍。这表明不仅微针从皮肤提取靶标,而且细胞外基质的破坏可促进该提取过程,从而导致较高的收率。许多酶,包括但不限于丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶和MMP,在该过程中可能是有用的。酶的其它具体实例包括但不限于木瓜蛋白酶、透明质酸酶、链激酶、链道酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、α-胰凝乳蛋白酶、α-淀粉酶(amlyase)、DNase、胶原酶和舒替兰酶。

[0352] 实施例6.从匀浆化的人皮肤中分离靶mRNA

[0353] 本实施例描述了从匀浆化的人皮肤中分离靶mRNA。既包含癌组织又包含良性组织

的过量的人皮肤从Scripps Clinic获得,其在莫氏(Mohs)显微照相手术中切除。使用以下程序将皮肤匀浆化并提取总RNA。在RNAlater™中使用MP Biomedical FastPrep-24和Lysing Matrix D珠粒(约30-40mg组织/管)以6.0的设置将皮肤匀浆化25s。然后,使用RNA提取试剂盒(Qiagen™)根据制造商的说明从该匀浆中分离总RNA。具有与人β-肌动蛋白互补的序列的DNA探针缀合至金涂覆的不锈钢微针,置于从匀浆化的皮肤中分离的RNA溶液中,并在室温或37℃下孵育一段时间。从溶液中分离不锈钢条并将结合的mRNA逆转录为cDNA,然后使用qRT-PCR对其扩增并分析。结果,仅有与β-肌动蛋白探针偶联并随后使用适当的β-肌动蛋白探针扩增的微针产生可测量量的靶标(图8)。在本实施例中,非特异性DNA序列缀合至微针表面;针对非肌动蛋白靶标使用BMP-4:Taqman探针;并且Actb-人-1:β-肌动蛋白序列缀合至微针表面。

[0354] 实施例7.使用微针阵列从小鼠皮肤mRNA文库中检测mRNA

[0355] 在这些实验中,从小鼠皮肤mRNA文库(Zyagen™)中分离出靶mRNA。集合体中的mRNA的总浓度为250μg/mL。然后,将其上偶联有探针ssDNA的金涂覆的不锈钢微针阵列加至mRNA文库(5μL,在20μL水中)并在37℃下孵育约10分钟。随后轻轻地洗涤阵列并让其短暂地风干。然后,通过将逆转录酶反应混合物(3μL 10x逆转录酶缓冲液,6μL 25mM $MgCl_2$,3μL 0.1M DTT,1.5μL RNase OUT™,13μL DEPC水,2μL 10mM dNTP混合物)加入到含有微针阵列的管中并在42℃下孵育2分钟,随后加入1.5μL的SuperScriptII™逆转录酶,来进行cDNA合成。该反应通过下列程序循环:42℃50分钟,70℃15分钟,然后在冰上约15分钟。然后将RNase H加入到各个反应(1.5μL)中并将反应在37℃下孵育20分钟。之后使用20x TaqMan™测定引物(1.5μL)和2x TaqMan™基因表达混合物(15μL)进行TaqMan™ PCR扩增。反应具有30μL的总体积。四个循环后,取出5μL溶液并作为模板用于按照制造商的说明书进行的TaqMan™ qRT-PCR(40个循环)。

[0356] 尽管为了清楚理解的目的而以说明和举例的方式相当详细地描述了上述发明,但本领域普通技术人员根据本发明的教导将会容易地明白,在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下可以对其进行一定的改变和修改。

[0357] 本说明书中引用的所有出版物、数据库、GenBank序列、专利和专利申请均通过引用而并入本文,如同具体地和单独地指出其中每一个均通过引用而并入。

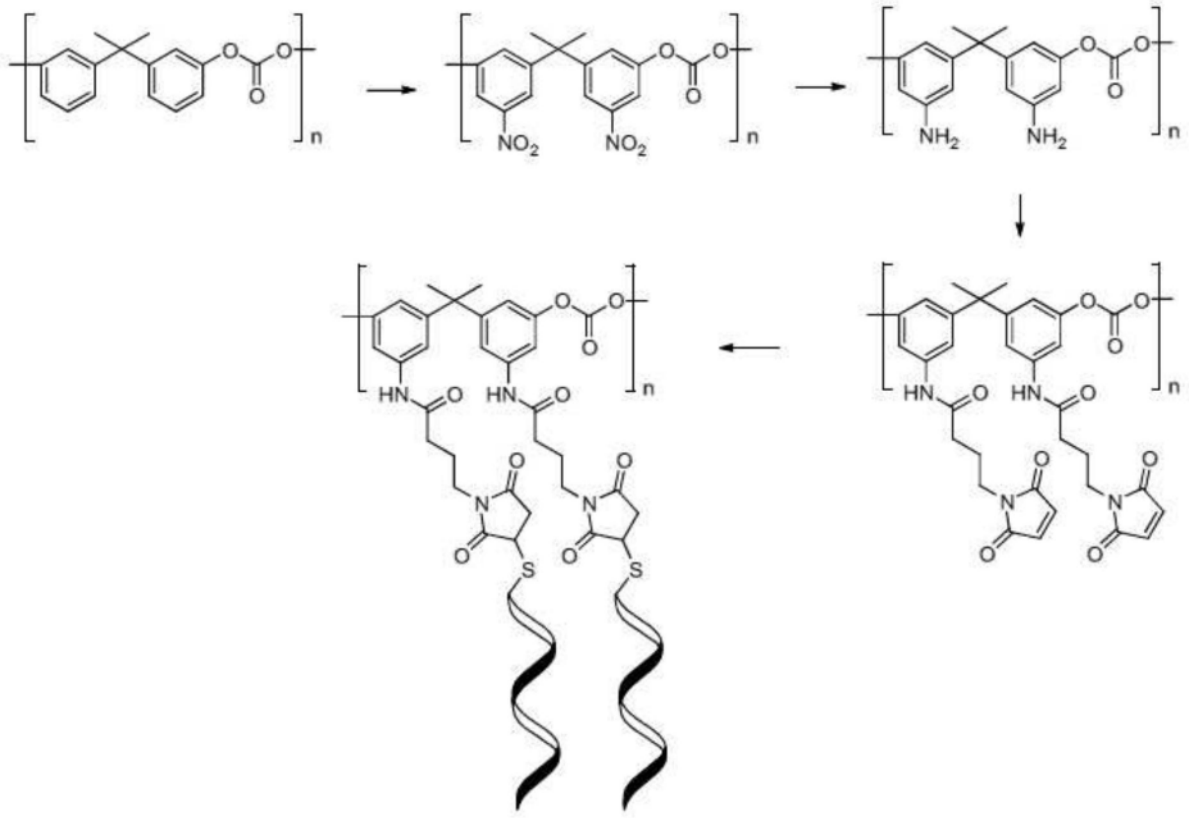


图1

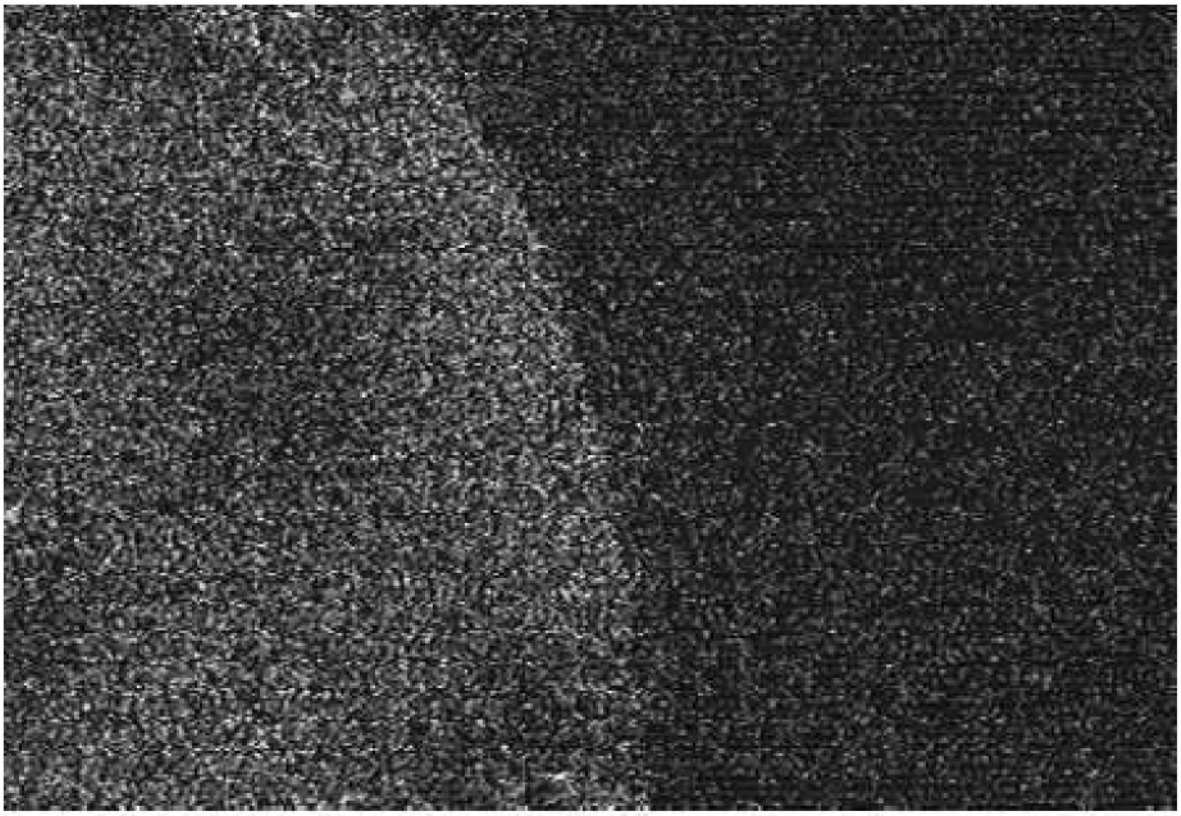


图2

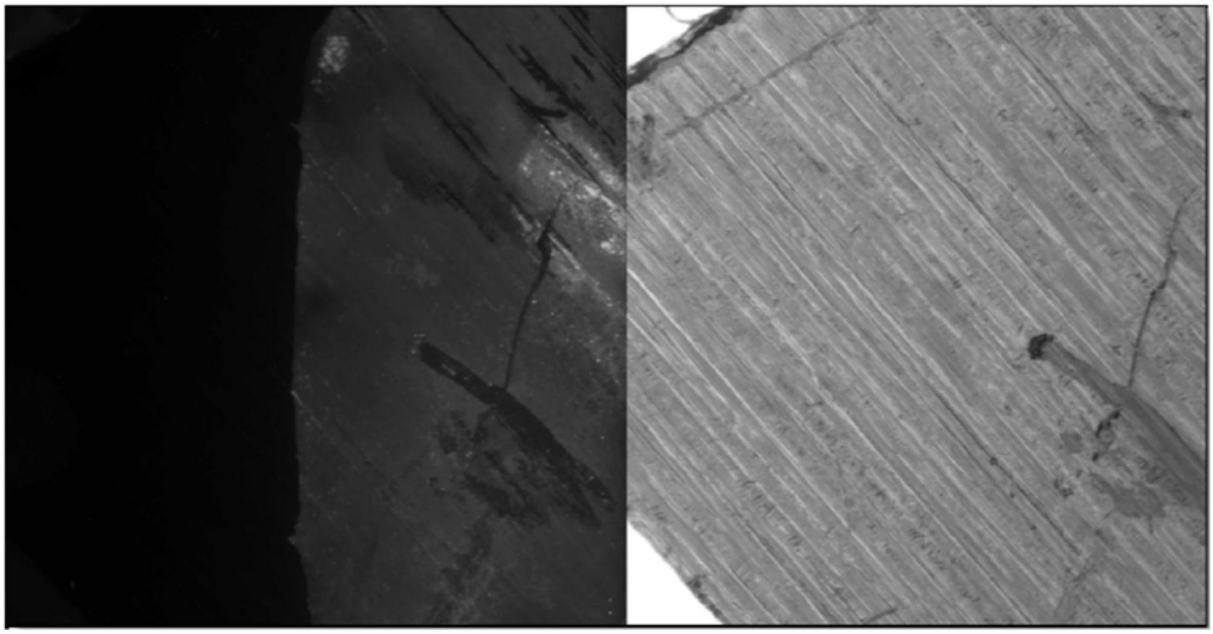


图3

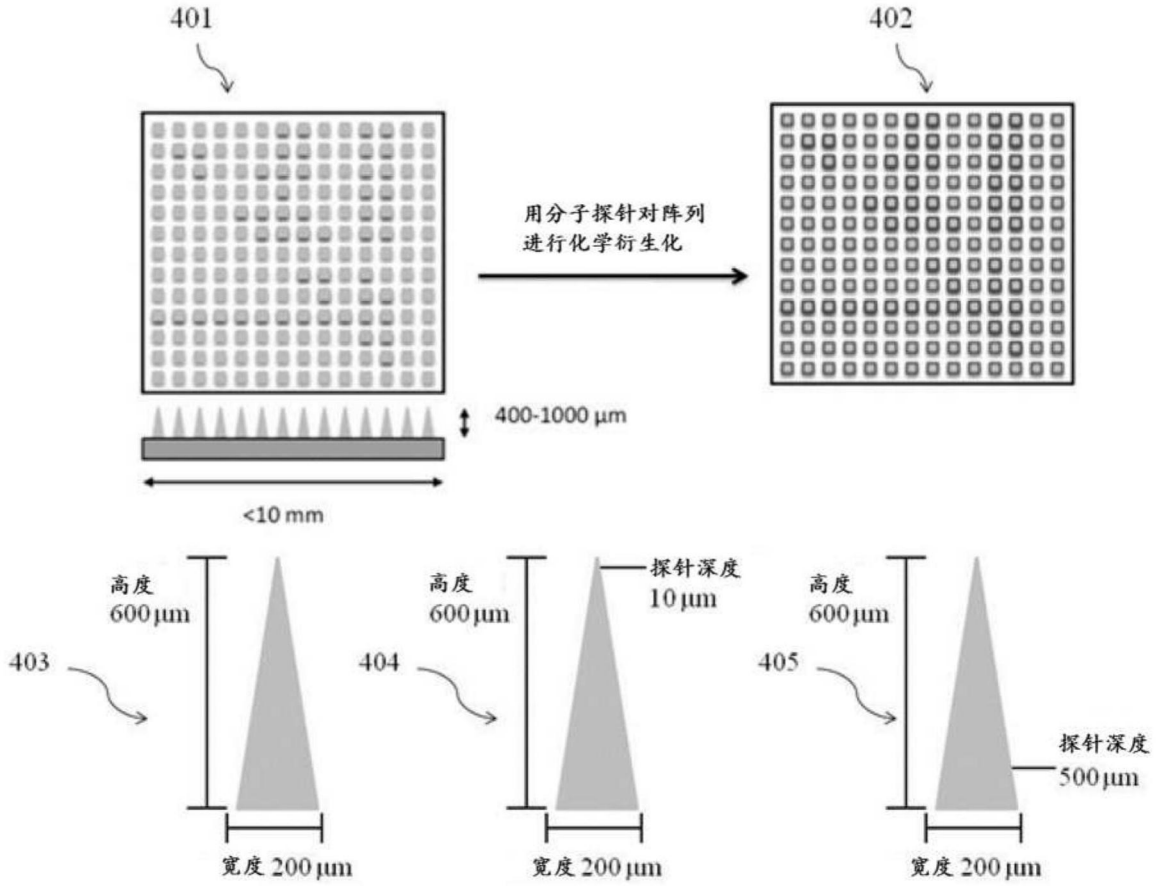

401
402
用分子探针对阵列
进行化学衍生化
400-1000 μm
<10 mm
高度
600μm
403
宽度 200 μm
高度
600μm
探针深度
10 μm
404
宽度 200 μm
高度
600μm
405
探针深度
500μm
宽度 200 μm

图4

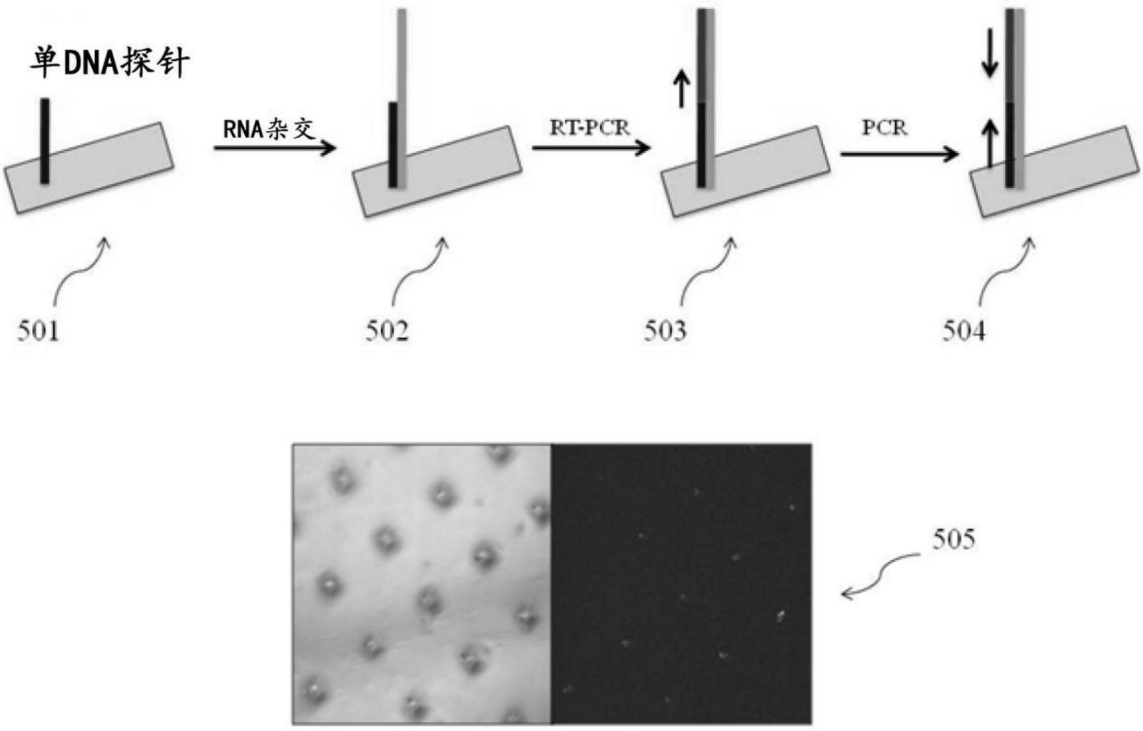


图5

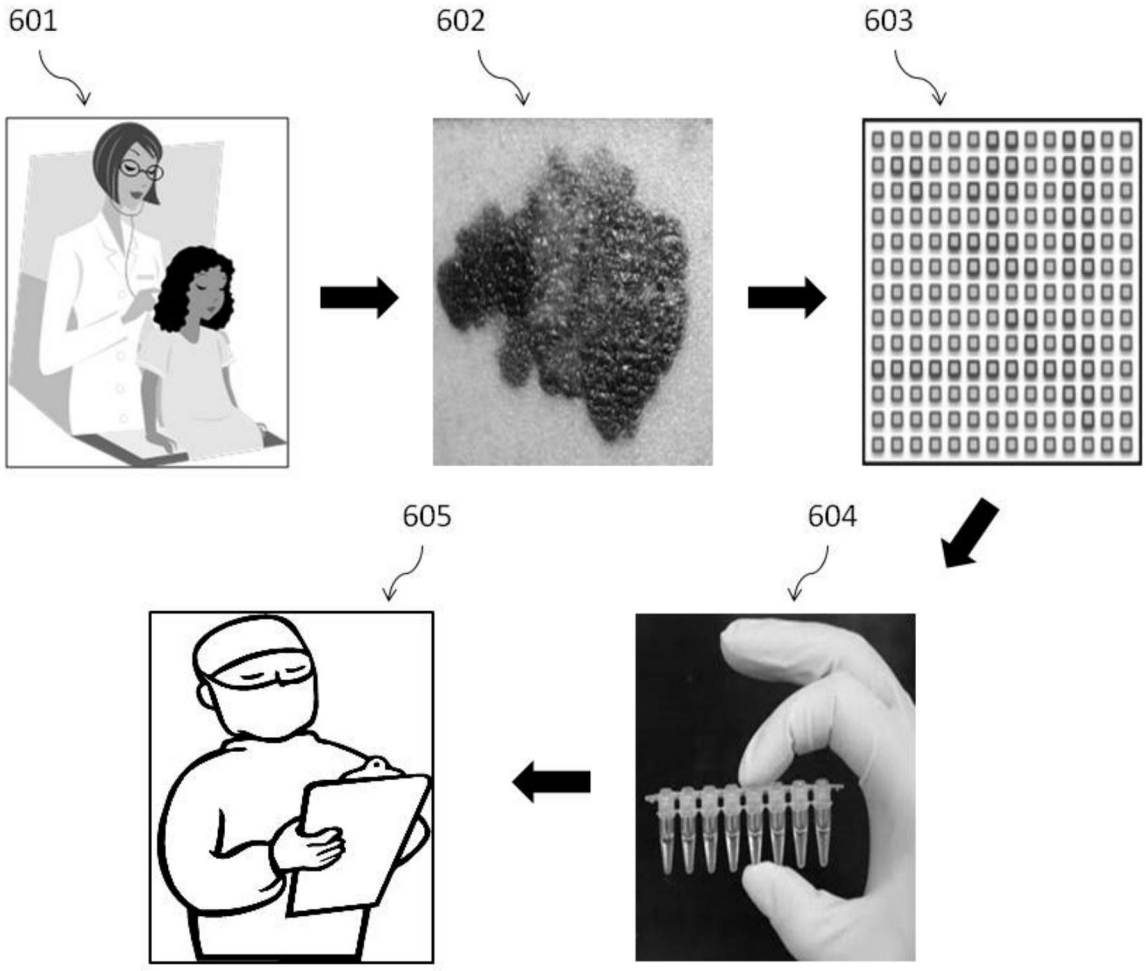


图6

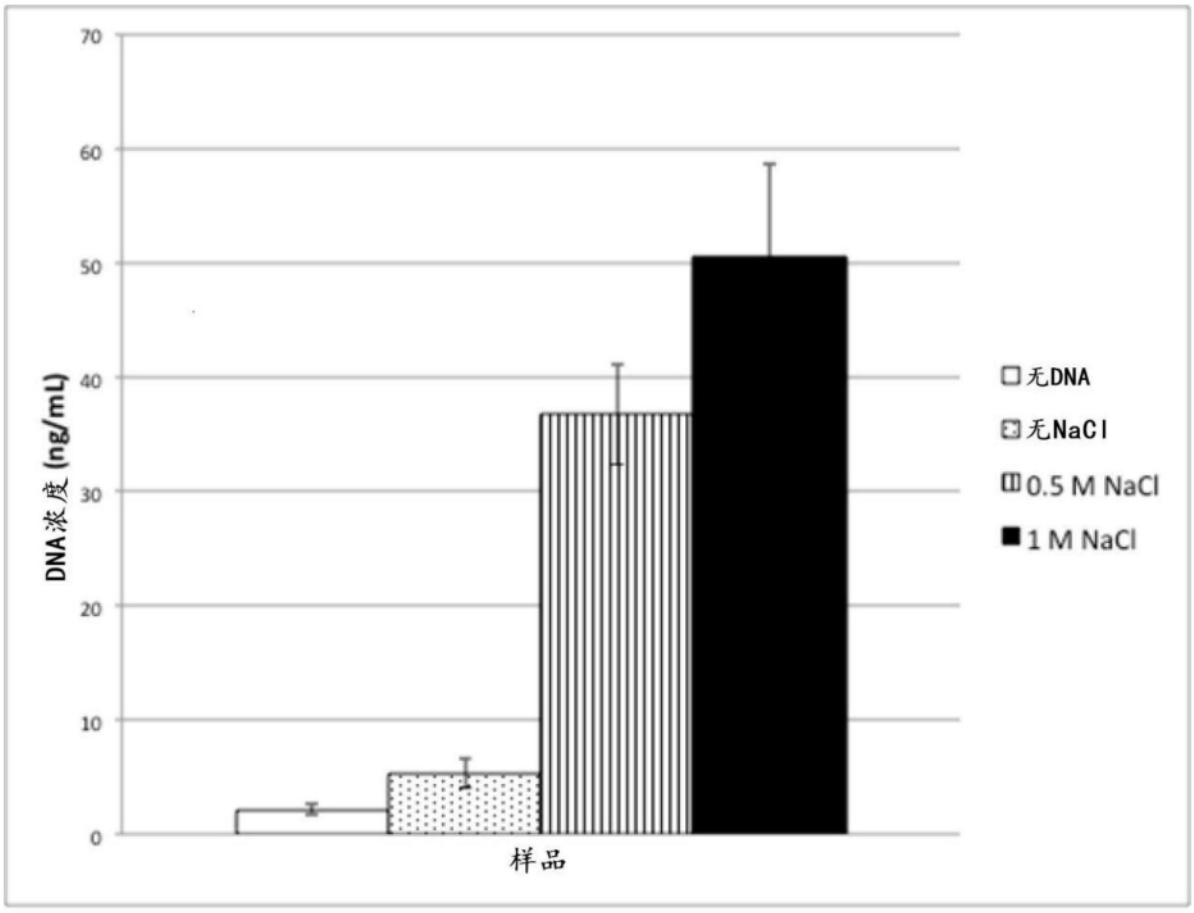


图7

MN DNA	TaqMan 探针	C(t)
P2s	BMP-4	-
P2s	Beta-肌动蛋白	-
Actb-人-1	BMP-4	-
Actb-人-1	Beta-肌动蛋白	40.51 +/- 0.92

图8