



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107090457 A

(43)申请公布日 2017. 08. 25

(21)申请号 201610828443.9

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22)申请日 2008.07.17

代理人 王健

(30)优先权数据

60/950,293 2007.07.17 US

60/950,283 2007.07.17 US

60/950,281 2007.07.17 US

61/031,420 2008.02.26 US

61/051,594 2008.05.08 US

(51)Int.Cl.

C12N 15/115(2010.01)

C12Q 1/68(2006.01)

(62)分案原申请数据

200880106852.1 2008.07.17

(71)申请人 私募蛋白质体公司

地址 美国科罗拉多州

(72)发明人 D·J·施奈德 D·尼乌沃特

B·伊顿 M·斯坦顿 S·古普塔

S·克雷默 D·济奇 L·戈尔德

权利要求书2页 说明书41页

序列表1页 附图25页

(54)发明名称

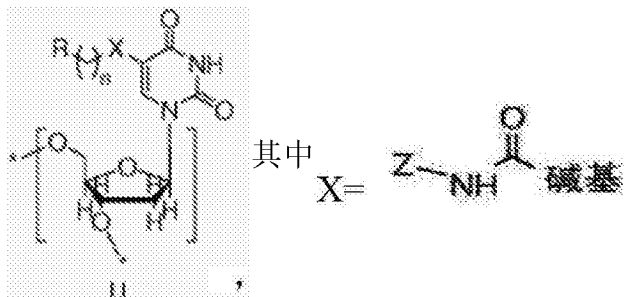
检测样品的多元分析

(57)摘要

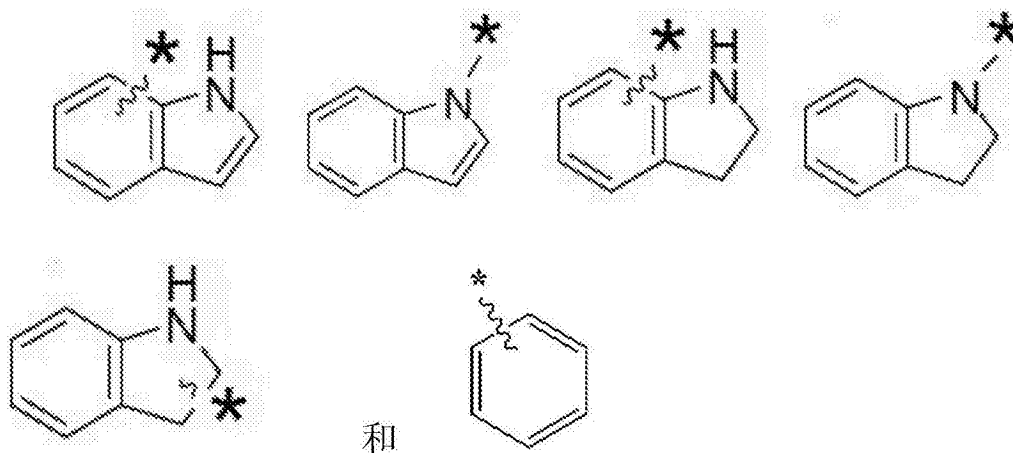
本发明描述了检测可能存在于检测样品中的一或多种靶分子的方法、装置、试剂和试剂盒。所述方法、装置、试剂盒和试剂通过检测和量化核酸(即适配体)而促进检测和量化检测样品中的非核酸靶(例如蛋白质靶)。所述方法产生非核酸靶的核酸替代物,因此使得多种核酸技术包括扩增可用于更广泛的预期的靶、特别是蛋白质靶。本发明进一步描述了适配体构建体,其促进适配体在各种分析检测应用中的应用。

1. 靶的慢解离速率适配体在制备用于在生物学样品中检测靶的方法的试剂盒中的用途,所述方法包括:

(a) 将生物学样品与靶的慢解离速率适配体接触,其中适配体与其靶分子结合形成适配体亲和性复合物或适配体共价复合物,其中所述适配体包括至少一个C-5修饰的嘧啶,所述C-5修饰的嘧啶在C-5位置具有以下结构的修饰:



并且其中 $Z = R + (CH_2)_n$ 连接基团,其中 $n = 1-3$,并且其中R选自以下基团:



其中R基团中的*表示R基团与 $(CH_2)_n$ 的附着点;

(b) 使适配体亲和性复合物或适配体共价复合物与任何游离适配体分开,从而除去游离适配体;和

(c) 检测和/或定量适配体亲和性复合物或适配体共价复合物或从复合物中分离的适配体,从而对生物学样品中的靶分子进行检测和/或定量。

2. 权利要求1的用途,其中所述慢解离速率适配体包括可检测部分。

3. 权利要求2的用途,其中所述可检测部分选自染料、量子点、放射性标记、电化学官能团、酶、和酶底物。

4. 权利要求1的用途,其中所述慢解离速率适配体是单链核酸或双链核酸。

5. 权利要求1的用途,其中所述慢解离速率适配体包括DNA、RNA、或者DNA和RNA二者。

6. 权利要求1的用途,其中所述适配体还包括至少一个额外的化学修饰,所述化学修饰包括在一或多个位置的化学取代,所述一或多个位置独立地选自核糖位置、脱氧核糖位置、磷酸酯位置、以及碱基位置。

7. 权利要求1的用途,其中所述靶选自图4所列的组。

8. 权利要求1的用途,其中所述慢解离速率适配体能够与所述靶形成共价键。

9. 权利要求8的用途,其中所述慢解离速率适配体是光适配体。

10. 权利要求1的用途,其中所述生物学样品选自:全血、白细胞、外周血单核的细胞、血浆、血清、痰、气息、尿液、精液、唾液、脑膜液、羊水、腺液、淋巴液、乳头抽吸液、支气管抽吸液、滑液、关节抽吸液、细胞、细胞提取物、粪便、组织、组织提取物、活检组织、以及脑脊髓液。

11. 权利要求10的用途,其中所述生物学样品是血浆或血清。

12. 权利要求1的用途,其中所述慢解离速率适配体具有高于或等于30分钟的从所述靶的解离速率($t_{1/2}$)。

13. 权利要求1的用途,其中所述慢解离速率适配体具有在30分钟至240分钟之间的从所述靶的解离速率($t_{1/2}$)。

14. 权利要求1的用途,其中所述慢解离速率适配体具有选自如下的从所述靶的解离速率($t_{1/2}$): ≥ 30 分钟、 ≥ 60 分钟、 ≥ 90 分钟、 ≥ 120 分钟、 ≥ 150 分钟、 ≥ 180 分钟、 ≥ 210 分钟、和 ≥ 240 分钟。

15. 权利要求1的用途,其中所述C-5修饰的嘧啶是5-(N-蔡基甲基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷。

16. 权利要求6的用途,其中所述化学修饰独立地选自:2'-位置糖修饰、2'-氟(2'-F)、2'-O-甲基(2'-OMe)、8-位置嘌呤修饰、在胞嘧啶环外胺的修饰、5-溴尿嘧啶的取代、主链修饰、甲基化、3'加帽、和5'加帽。

检测样品的多元分析

[0001] 本申请是申请日为2008年7月17日的申请号为201310447440.7标题为“检测样品的多元分析”的申请的分案申请

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2007年7月17日提交的美国临时申请系列号60/950,281、2007年7月17日提交的美国临时申请系列号60/950,293、2007年7月17日提交的美国临时申请系列号60/950,283、2008年2月26日提交的美国临时申请系列号61/031,420和2008年5月8日提交的美国临时申请系列号61/051,594的权益。本申请还是2007年1月16日提交的美国申请系列号11/623,580和美国申请系列号11/623,535的部分继续申请。所述每篇文献均以其全文援引加入本文。

发明领域

[0004] 本发明一般性涉及检测样品中靶分子及更特别地检测和/或量化检测样品中可能包含的一或多种靶分子的方法、装置、试剂和试剂盒。这种方法在诊断学应用及在生物标志物发现以及在治疗剂的设计和开发中具有广泛用途。

[0005] 背景

[0006] 下述说明书提供了与本发明相关的信息概述,并不承认本文提供的任何信息或参考的出版物是请求保护的发明的现有技术。

[0007] 检测和量化生物学样品及其它样品中生理学重要分子的测定在科学研究和卫生保健领域是重要工具。一类这样的测定包括使用包括固定于固体支持物上的一或多个适配体 (aptamer) 的微阵列。所述适配体均能以高特异性方式和极高亲和性结合靶分子。见例如名称为“Nucleic Acid Ligands”的美国专利No.5,475,096,也见例如美国专利No.6,242,246、美国专利No.6,458,543和美国专利No.6,503,715所述,这些专利的名称均为“Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip”。一旦将微阵列与样品接触,则适配体结合样品中存在的其各自的靶分子,从而可以确定样品中靶分子的存在、不存在、量和/或浓度。

[0008] 这种测定的一种变化应用包括光反应性官能团的适配体,使得适配体与其靶分子可以共价结合或“光交联”。见例如名称为“Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip”的美国专利No.6,544,776所述。这些光反应性适配体也称作“光适配体 (photoaptamer)”。见例如美国专利No.5,763,177、美国专利No.6,001,577和美国专利No.6,291,184所述,所述专利的名称均为“Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX”;也见例如名称为“Photoselection of Nucleic Acid Ligands”的美国专利No.6,458,539所述。在微阵列与样品接触及光适配体已经有机会结合其靶分子之后,所述光适配体被光活化,洗涤该固体支持物以除去任何非特异性结合的分子。可以使用严格洗涤条件,因为由于光适配体上被光活化的官能团产生的共价键,因此结合光适配体的靶分子一般不被除去。以这种方式,所述测定可以确定检测样品中靶分子的存在、不存在、量和/或浓度。

[0009] 在这两种测定形式中,适配体在与样品接触之前均固定于固体支持物上。然而在

某些情况中,适配体在接触样品之前的固定可能不提供最佳测定。例如,适配体的预先固定可导致适配体与靶分子在固体支持物表面上的无效混合,可能导致反应时间延长及因此需要延长保温时间以使得适配体与其靶分子有效结合。进一步地,当光适配体用于测定中且依赖于用作固体支持物的材料,该固体支持物可趋于散射或吸收用于实现光适配体与其靶分子之间形成共价键的光。此外,根据使用的方法,与其适配体结合的靶分子的检测可能不精确,因为固体支持物的表面也可以暴露及受使用的任何标记物质的影响。最后,适配体在固体支持物上的固定一般包括适配体-制备步骤(即固定),之后使适配体暴露于样品,这个制备步骤可以影响适配体的活性或者功能性。

[0010] 因此,需要通过优化影响如下一或多项的条件提供检测和/量化检测样品中靶分子的高灵敏性测定的方法、装置、试剂和试剂盒:(1) 适配体的活性,(2) 实现适配体-靶分子复合物结合平衡的效率,(3) 适配体与其靶分子之间的共价键形成,(4) 除去无关的样品成分及过量的适配体,(5) 通过使用慢解离速率(off-rate) 适配体解离形成的亲和性复合物,以及(6) 检测适配体-靶分子复合物。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明包括检测和/或量化可能存在于检测样品中的一或多种靶分子的方法、装置、试剂和试剂盒。更特别地,本发明提供了纯化适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)的方法,其通过从适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)中除去游离靶和游离适配体从而除去所述测定中潜在噪音源而进行。本发明还提供了基于适配体和基于光适配体的测定法以量化靶分子,其中适配体(或者光适配体)可以与适配体亲和性复合物(或者光适配体共价复合物)分离,用以通过使用任何合适的核酸检测方法进行最终检测。本发明还描述了适配体构建体,其便于测定成分与适配体亲和性复合物(或者光适配体共价复合物)分离,且允许分离适配体以进行检测和/或量化。本发明还描述了通过使用具有从其靶解离的慢解离速率及改良的结合效率的适配体提供改良的灵敏性和特异性的方法、装置、试剂盒和试剂。本发明还提供了多元分析检测样品的方法、装置、试剂盒和试剂,其中检测样品中的多个靶可以同时被检测和/或量化。最后,这些方法和试剂可以使靶浓度(例如检测样品中蛋白质靶浓度)转变为可以通过任何众多的核酸检测和量化方法检测和量化的核酸浓度。而且,一旦靶浓度已经被有效地转变为相应的核酸浓度,然后可以使用标准核酸扩增和检测步骤以增强信号。本发明的方法可以在体外进行。

[0013] 单捕获亲和性测定(Single Catch Affinity Assay). 在一个实施方案中,将检测样品与对靶分子具有特异性亲和性的适配体接触。如果检测样品含有靶分子,则检测样品的混合物中将形成适配体亲和性复合物。在一个实施方案中,使标签(tag)附着于适配体亲和性复合物的靶分子。(注意所述标签被设计为其可以以不破坏适配体亲和性复合物的方式附着于靶)。在另一个实施方案中,在适配体亲和性复合物形成之前使所述标签附着于靶。在另一个实施方案中,在将所述混合物暴露于固体支持物上的捕获元件之前的任何点将标签加入靶。接着,通过将所述混合物暴露于所述固体支持物将标签标记(tagged)的适配体亲和性复合物捕获在固体支持物上。通过将固体支持物与适配体亲和性复合物接触且使标签直接或间接与附着于固体支持物上的适当捕获剂缔合从而实现附着。将与固体支持物上的捕获剂缔合的适配体亲和性复合物与剩余的检测样品混合物分开(partition),从而除去任何游离适配体。与适配体亲和性复合物中的靶复合的适配体可以通过适配体亲和

性复合物的解离而从固体支持物释放。最后,可以通过各种合适的核酸检测方法检测和/或量化释放的适配体,所述方法包括但不限于质谱分析、Invader测定法、核酸芯片、定量聚合酶链反应(Q-PCR)等。在一些实施方案中,根据使用的特异核酸检测方法,可以检测仍是适配体亲和性复合物一部分的适配体。

[0014] 双捕获亲和性测定(Dual Catch Affinity Assay).在另一个实施方案中,将检测样品与包括可释放的第一标签且对靶分子具有特异性亲和性的适配体接触。如果检测样品含有靶分子,在检测样品的混合物中将形成适配体亲和性复合物。通过将所述混合物暴露于第一固体支持物将所述适配体亲和性复合物捕获在第一固体支持物上。通过将第一固体支持物与适配体亲和性复合物接触且使得包括在适配体上的可释放的第一标签直接或间接与第一固体支持物附着的合适的第一捕获剂缔合而完成附着。注意除了适配体亲和性复合物之外,未复合的适配体也将附着于第一固体支持物。然后将已经与固体支持物上的探针缔合的适配体亲和性复合物和未复合的适配体与剩余的混合物分开,从而除去检测样品中的游离靶及所有其它未复合的材料(样品基质);即不与所述第一固体支持物缔合的混合物组分。在分开之后,使用适于所用特定可释放的第一标签的方法从第一固体支持物释放适配体亲和性复合物以及任何未复合的适配体。使第二标签(可以与可释放的第一标签相同或不同)附着于适配体亲和性复合物的靶分子。第二标签被设计为其可以以不破坏适配体亲和性复合物的方式附着于靶。通过将释放的适配体亲和性复合物暴露于第二固体支持物使第二标签与附着于第二固体支持物的适当的第二捕获剂直接或间接缔合而将适配体亲和性复合物捕获在第二固体支持物上。将与固体支持物上的探针缔合的适配体亲和性复合物与剩余的混合物分开,从而除去任何游离的、未复合的适配体。通过适配体亲和性复合物的解离,与适配体亲和性复合物中的靶复合的适配体可以从固体支持物释放。最后,可以通过任何合适的核酸方法检测和/或量化已经从适配体亲和性复合物释放的适配体,所述方法包括但不限于质谱分析、Invader测定法、DNA芯片、定量聚合酶链反应(Q-PCR)等。在一些实施方案中,所述靶可以与第二标签反应,而适配体亲和性复合物仍固定于第一固体支持物。在分开步骤之后加入第二标签排除标记不是适配体亲和性复合物一部分的靶分子。在一些实施方案中,在使用核酸检测方法时,可以检测仍是适配体亲和性复合物一部分的适配体。

[0015] 单捕获光交联测定.在另一个实施方案中,将检测样品与对靶分子具有特异性亲和性的光适配体接触。如果检测样品含有靶分子,则检测样品的混合物中将形成光适配体亲和性复合物。通过光交联基团的适当激发使适配体亲和性复合物转变为适配体共价复合物。将标签附着于适配体共价复合物的靶分子。所述标签被设计为其可以以不破坏适配体共价复合物的方式附着于靶。通过将所述混合物暴露于所述固体支持物将所述适配体共价复合物捕获在固体支持物上。通过将固体支持物与适配体共价复合物接触并使得标签与附着于固体支持物的适当捕获剂直接或间接缔合从而实现附着。将与固体支持物上捕获剂缔合的适配体共价复合物与剩余的检测样品混合物分开,从而除去任何游离光适配体。可以使用任何合适方法检测和/或量化是适配体共价复合物一部分(同时仍附着于固体支持物上)的光适配体,所述方法包括但不限于Invader测定法、质谱分析、DNA芯片、定量聚合酶链反应(Q-PCR)等。

[0016] 在另一个实施方案中,修改上述单捕获光交联测定,由此在检测光适配体之前使

用核酸扩增步骤如聚合酶链反应产生是结合固体支持物的适配体共价复合物一部分的光适配体的一或多个拷贝。然后可以释放光适配体的这些拷贝,随后使用各种合适方法检测和/或量化,所述方法包括但不限于质谱分析、Invader测定法、DNA芯片、定量聚合酶链反应(Q-PCR)等。

[0017] 在单捕获光交联测定的另一个实施方案中,通过可裂解接头使光适配体的光交联基团附着于适配体。在一个实施方案中,这个可裂解接头是光可裂解接头,但也可以是化学可裂解接头或者任何其它可裂解接头,其可以在测定中的任何希望时间点被裂解从而从标签中释放靶分子。在这个实施方案中,修改上述单捕获光交联测定,由此在检测光适配体之前,使用可裂解接头从结合固体支持物的光适配体共价复合物中释放光适配体。可以使用任何合适方法检测和/或量化释放的适配体,所述方法包括但不限于质谱分析、Invader测定法、DNA芯片、定量聚合酶链反应(Q-PCR)等。

[0018] 在单捕获光交联测定的另一个实施方案中,与靶分子附着的标签通过可裂解接头附着。在一个实施方案中,这个可裂解接头是光可裂解接头。在这个测定的其它实施方案中,所述标签通过化学可裂解接头或者任何其它合适的可裂解接头附着,所述接头在所述测定的任何希望时间点可被裂解从而从标签中释放靶分子。在这个实施方案中,修改上述单捕获光交联测定,由此在检测光适配体之前使用可裂解接头从固体支持物中释放适配体共价复合物。可以使用任何合适方法检测和/或量化释放的适配体共价复合物,所述方法包括但不限于质谱分析、Invader测定法、DNA芯片、定量聚合酶链反应(Q-PCR)等。

[0019] 双捕获光交联测定. 在另一个实施方案中,将检测样品与含有第一可释放标签且对靶分子具有特异性亲和性的光适配体接触。如果检测样品含有靶分子,检测样品的混合物中将形成光适配体亲和性复合物。通过适当激发光交联基团将光适配体亲和性复合物转变为适配体共价复合物。通过将所述混合物暴露于第一固体支持物将所述适配体共价复合物捕获在第一固体支持物上。通过将第一固体支持物与适配体共价复合物接触且使得光适配体包括的可释放的第一标签与附着于第一固体支持物的合适的第一捕获剂直接或间接缔合从而实现附着。注意除了光适配体共价复合物之外,未复合的光适配体也附着于固体支持物。将适配体共价复合物及已经与固体支持物上的探针缔合的未复合的适配体与剩余的混合物分开,从而除去游离靶以及检测样品中所有其它未复合的材料(样品基质)。在分开之后,使用适于所用特定的可释放的第一标签的方法使光适配体共价复合物与任何未复合的光适配体一起从固体支持物释放。使第二标签附着于适配体共价复合物的靶分子。所述第二标签被设计为其可以以不破坏适配体共价复合物的方式附着于靶。通过将所述释放的适配体共价复合物暴露于第二固体支持物将所述适配体共价复合物捕获在第二固体支持物上。通过将第二固体支持物与适配体共价复合物接触且使第二标签与附着于第二固体支持物的适当的第二捕获剂直接或间接缔合从而实现附着。将与固体支持物上第二捕获剂缔合的适配体共价复合物与剩余的混合物分开,从而除去任何游离光适配体。可以使用任何合适方法检测和/或量化是适配体共价复合物一部分的(仍附着于固体支持物的)光适配体,所述方法包括但不限于Invader测定法、质谱分析、DNA芯片、定量聚合酶链反应(Q-PCR)等。

[0020] 在另一个实施方案中,修改上述双捕获光交联测定,由此在检测之前使用核酸扩增步骤如聚合酶链反应产生是与固体支持物结合的适配体共价复合物一部分的光适配体

的一或多个拷贝。可以释放光适配体的这些拷贝,随后使用任何合适方法检测和/或量化,所述方法包括但不限于质谱分析、Invader测定法、DNA芯片、定量聚合酶链反应(Q-PCR)等。

[0021] 在另一个实施方案中,修改上述双捕获光交联测定,由此光适配体的光交联基团通过可裂解接头附着于适配体。在一个实施方案中,这个可裂解接头是光可裂解接头。在这个测定的其它实施方案中,光适配体的光交联基团通过化学可裂解接头或者任何其它合适的可裂解接头附着于适配体,所述接头可在所述测定的任何希望的时间点被裂解从而从光适配体共价复合物释放光交联基团。在这个实施方案中,修改上述双捕获光交联测定,由此在检测光适配体之前,使用可裂解接头从结合固体支持物的光适配体共价复合物中释放光适配体。可以使用任何合适方法检测和/或量化释放的光适配体,所述方法包括但不限于质谱分析、Invader测定法、DNA芯片、定量聚合酶链反应(Q-PCR)等。

[0022] 在双捕获光交联测定的另一个实施方案中,附着于靶分子的标签通过可裂解接头附着。在一个实施方案中,这个可裂解接头是光可裂解接头。在这个测定的其它实施方案中,所述标签通过化学可裂解接头或者任何其它合适的可裂解接头附着,所述接头可以在所述测定的任何希望的时间点被裂解从而从标签中释放靶。在这个实施方案中,修改上述双捕获光交联测定,由此在检测光适配体之前使用可裂解接头从固体支持物中释放光适配体共价复合物。可以使用任何合适方法检测和/或量化释放的光适配体共价复合物,所述方法包括但不限于质谱分析、Invader测定法、DNA芯片、定量聚合酶链反应(Q-PCR)等。

[0023] 动力学攻击.在另一个实施方案中,可以使用动力学攻击增加本文揭示的测定的特异性和灵敏性。动力学攻击最初在于2007年1月16日申请的美国申请系列号No.11/623,580和美国申请系列号No.11/623,535中描述,这两篇文献均以其全文援引加入本文,提供了使用与非特异性复合物相比相对较长解离速率的特异性适配体靶复合物以增加某些测定的特异性。此外,援引加入本文的在2008年7月17日申请的发明名称为“Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates”的美国申请系列号No.12/175,434揭示了可以通过在SELEX方法期间应用慢解离速率富集过程和/或通过使用某些修饰的核苷酸鉴别慢解离速率适配体(见在2008年7月17日申请的发明名称为“Improved SELEX and PhotoSELEX”的美国申请系列号No.12/175,388所述,所述文献以其全文援引加入本文)。

[0024] 上述测定法(单捕获亲和性测定、双捕获亲和性测定、单捕获光交联测定以及双捕获光交联测定)均可以通过掺入动力学攻击而改良。仅是为了例证,下文描述了怎样在双捕获亲和性测定和双捕获光交联测定的选择的实施方案中加入动力学攻击。应理解动力学攻击可以相似方式加入本文所述任何其它测定和方法中。应进一步理解动力学攻击可以在除了在本文所述各个实施方案中所述的位置(步骤)之外的所述测定和方法的任何合适时间点加入。

[0025] 在一个实施方案中,在其中适配体亲和性复合物与已经与第一固体支持物上的探针缔合的未复合的适配体与剩余的混合物分开的步骤之后及在其中适配体亲和性复合物中适配体被释放或者被直接检测或量化的步骤之前,在双捕获亲和性测定中插入动力学攻击。在一个实施方案中,在适配体亲和性复合物从第一固体支持物中释放之后进行动力学攻击。在这个实施方案中,通过将适配体亲和性复合物释放进含有高浓度竞争剂的缓冲液中及随后将在竞争剂溶液中的适配体亲和性复合物保温少于或等于适配体亲和性复合物解离半衰期的时间而进行动力学攻击。

[0026] 在另一个实施方案中,在适配体亲和性复合物形成之后及在交联步骤之前,在双捕获光交联测定中插入动力学攻击。在一个实施方案中,通过在含有适配体亲和性复合物的混合物中加入竞争剂及随后将在竞争剂溶液中的适配体亲和性复合物保温少于或等于适配体亲和性复合物的解离半衰期的时间而进行动力学攻击。

[0027] 检测及量化方法.如上所述,可以通过使用许多不同的核酸检测技术检测适配体亲和性复合物(或者在光交联测定的情况中检测适配体共价复合物),所述检测技术包括质谱分析、Invader测定、DNA芯片、定量PCR方法等。

[0028] 在一个实施方案中,使用DNA芯片检测和/或量化适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)。在这个实施方案中,洗脱已经与固体支持物缔合的适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)并与已经印在DNA芯片上的互补探针序列杂交。在一个实施方案中,所述互补探针序列与完整适配体互补。在另一个实施方案中,所述互补探针序列仅与适配体的一部分互补。在另一个实施方案中,所述探针与加入适配体中用于杂交目的序列互补。为了检测DNA芯片上杂交的适配体(或者光适配体),可以导入标记(label)。在一个实施方案中,所述标记在适配体(或者光适配体)合成时被掺入适配体中。例如,荧光染料可以掺入化学(或者酶促)合成的适配体中。在一个实施方案中,在适配体合成期间将标记加入适配体中。在其它实施方案中,在所述测定之前、期间或者之后的任何时间将标记加入适配体。在另一个实施方案中,可以使用核酸扩增技术如PCR扩增适配体(或者光适配体)群。在这种情况下,标记也可以作为扩增步骤的一部分掺入。

[0029] 在另一个实施方案中,使用质谱分析检测和/或量化适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)。在这个实施方案中,洗脱已经与固体支持物缔合的适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)且使用质谱分析分析,其产生可用于鉴别且因此检测靶分子的峰谱。一旦检测了靶分子,任选也可以通过任何多种合适技术对其进行量化。在一个实施方案中,在靶分子是蛋白质或多肽的情况中,在使用质谱分析法分析适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)之前,可以将适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)用蛋白酶如蛋白酶K或胰蛋白酶消化,产生结合的靶分子的片段,其可用于鉴别靶分子,从而可以检测及任选量化靶分子。

[0030] 在另一个实施方案中,使用Q-PCR检测和/或量化适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)。如上所述,这可以在适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)附着于固体支持物时或者在从固体支持物中释放之后进行。通过进行PCR及直接或间接确定与检测样品中靶分子结合的适配体的量或浓度对适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)进行量化。检测样品中的靶分子的量或浓度通常与使用Q-PCR量化的适配体的量或浓度成正比。可用于以这种方式量化适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)的举例的方法是TaqMan[®]测定(PE Biosystems,Foster City,Calif.;也见美国专利No.5,210,015所述)。

[0031] 在另一个实施方案中,适配体任选在检测和/或量化之前与其相应靶分子解离。游离适配体可以通过使用任何已知检测和/或量化核酸的合适方法检测和测量。

[0032] 多元测定.在另一个实施方案中,上述测定和方法用于检测和/或量化两或多个靶。在一个实施方案中,多元适配体用于双捕获亲和性测定中以量化和/或检测多个靶。在适配体最后从适配体亲和性复合物中释放之后,可以使用多元检测核酸的合适方法检测每

种适配体。在一种方法中,使用多元DNA芯片检测和/或量化适配体。本文揭示的任何测定均可以多元方式进行以检测多个靶。由于对多元化规模无固有限制,因此这些多元测定可用于检测例如2或更多个靶、10或更多个靶、25或更多个靶、50或更多个靶、100或更多个靶、250或更多个靶、500或更多个靶,或者1000或更多个靶。

[0033] 试剂与试剂盒. 在一个实施方案中,可以基于本文揭示的方法制备用于各种检测应用的试剂盒,包括但不限于诊断试剂盒、生物标记物发现试剂盒、环境检测试剂盒、生物危害或生物武器检测试剂盒以及在生命科学和分析化学应用中检测靶的试剂盒。

[0034] 附图简述

[0035] 图1A和1B例证了检测和/或量化可能存在于检测样品中的一或多种靶分子的示例方法。

[0036] 图2A和2B例证了检测和/或量化可能存在于检测样品中的一或多种靶分子的示例方法。

[0037] 图3A-3L例证了用于本文所述测定法的示例适配体构建体。

[0038] 图4示出超过500种的已经产生适配体的靶的列表。许多这些适配体被设计为从其相应靶解离具有慢解离速率。

[0039] 图5A例证了杂交标记的实例。图5B-5D例证了适配体构建体的实例,所述适配体构建体包括可裂解的或者可释放的元件、标签(例如生物素)、间隔序列以及标记(例如Cy3)。

[0040] 图6例证了用于本文所述测定法中的适配体和引物构建体。Cy3表示花菁3染料,B表示生物素,PC表示光可裂解接头,ANA表示光反应性交联基团,(AB)₂表示由dA残基分隔的一对生物素残基,(T)₈表示聚dT接头。引物构建体与适配体构建体的完整3'固定区互补。图6A:单捕获亲和性测定方案中使用的适配体构建体。图6B:双捕获亲和性测定方案中使用的适配体构建体。图6C:单捕获交联测定方案中使用的适配体构建体。图6D:双捕获交联测定方案中使用的适配体构建体。

[0041] 图7A、7B和7C例证了使用亲和性测定方案与微阵列检测法检测缓冲液中靶蛋白的剂量应答曲线(RFU对log输入靶蛋白浓度)。重复的无蛋白质(Replicate no-protein)对照值绘制在y轴框架上。实线表示通过数据点的S形拟合。虚线表示重复的无蛋白质值的两个标准偏差。图7A:bFGF靶蛋白。图7B:FGF7靶蛋白。图7C:淋巴细胞趋化因子靶蛋白。

[0042] 图8例证了使用亲和性测定方案与微阵列检测法检测缓冲液中靶蛋白淋巴细胞趋化因子的三个重复测量的剂量应答曲线。重复的无蛋白质对照值绘制在y轴框架上。实线表示通过三次重复每个数据点的S形拟合。

[0043] 图9例证了使用亲和性测定方案与微阵列检测法检测在10%人血浆中靶蛋白淋巴细胞趋化因子的剂量应答曲线(RFU对log输入靶蛋白浓度)。重复的无蛋白质对照值绘制在y轴框架上且成圆形。实线表示通过数据点的S形拟合。

[0044] 图10例证了使用亲和性测定方案与微阵列检测法检测在10%人全血中靶蛋白淋巴细胞趋化因子的剂量应答曲线(RFU对log输入靶蛋白浓度)。重复的无蛋白质对照值绘制在y轴框架上且成圆形。实线表示通过数据点的S形拟合。

[0045] 图11例证了使用光-交联测定方案与微阵列检测法检测在缓冲液中靶蛋白血管生成素的剂量应答曲线(RFU对log输入靶蛋白浓度)。实线表示通过数据点的S形拟合。四个重复的无蛋白质数据点成圆形。

[0046] 图12例证了使用亲和性测定方案与Q-PCR检测法检测在缓冲液中血管生成素的剂量应答曲线(检测的适配体浓度对输入靶蛋白浓度)。四个重复的无蛋白质测量结果在y轴上以空心圆形表示。

[0047] 图13A-13C例证了三个不同靶的慢解离速率适配体对传统适配体的剂量应答曲线。

[0048] 图14例证了测定再现性研究的样品流程图。

[0049] 图15例证了集合和未集合的样品研究的CV。

[0050] 图16呈现了在本文中讨论的核苷酸的碱基修饰。除了在核苷酸附着点之间可以使用的接头(X)之外,描述了可使用的R基团,且示出了R基团。在各自的R基团上也示出了不同“R”基团的附着位置。

[0051] 发明详述

[0052] 除非特别指出,实施本发明使用本领域技术人员已知的化学、微生物学、分子生物学和重组DNA技术的常规方法。这些技术在文献中充分阐述。见例如Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Current Edition); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I&II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., Current Edition); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames&S. Higgins, eds., Current Edition); *Transcription and Translation* (B. Hames&S. Higgins, eds., Current Edition)。

[0053] 本说明书中引用的所有出版物、公开的专利文件以及专利申请均在本发明所述领域技术人员知识水平内。本文引用的所有出版物、公开的专利文件和专利申请均以如每篇出版物、公开的专利文件或专利申请通过特异和单独的援引加入形式相同的程度援引加入本文。

[0054] 本发明包括检测和/或量化可能存在于检测样品中的一或多种靶分子的改良的方法、装置、试剂和试剂盒。所述方法、装置、试剂和试剂盒通过优化影响如下一或多项的条件而提供了检测和/或量化检测样品中靶分子的高灵敏性测定法:(1) 适配体的活性,(2) 实现适配体-靶分子复合物结合平衡的效率,(3) 适配体与其靶分子之间共价键的形成,(4) 过量试剂与样品成分的除去,(5) 慢解离速率适配体的使用,(6) 希望的适配体构建,以及(7) 适配体-靶分子复合物的检测。

[0055] 重要的是除非在特异的实施方案中特别指出,本文所述靶分子的检测和/或量化方法与所述步骤的特定顺序无关。为了举例说明,以特定的步骤顺序描述;然而,应理解可以对步骤的特定顺序进行任何排列,只要实现所述特异测定的目的即可。换一种说法,任何所述方法中列举的步骤可以任何可行顺序进行,本发明的方法非限于任何所述实施方案、实施例或者所附权利要求书中描述的任何特定顺序。进一步地,为了方便及简易起见,针对一种靶分子和一种适配体描述了各种方法。然而,应理解任何所述方法均可以多元形式进行,可以使用多种适配体同时检测和/或量化多种靶,由此例如可以通过将检测样品与多种适配体接触从而检测和/或量化检测样品中的多种靶分子,其中每种适配体均对特异靶分子具有特异亲和性(即多元形式)。

[0056] 参照图1A和1B,通过首先将检测样品与对靶分子具有特异性亲和性的适配体接触检测和/或量化检测样品中靶分子的存在。通过使用相应数目的特异性适配体,所述方法可

用于检测和/或量化多个特异靶,即多元形式。单个靶讨论仅是为简便起见。如果检测样品中含有靶分子,通过适配体与其靶分子的结合形成适配体亲和性复合物。使用适于所用适配体的方法使适配体亲和性复合物任选被转变为适配体与其靶分子共价结合的适配体共价复合物。然后使用分开步骤除去游离适配体。检测和/或量化适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)。可以使用许多不同检测方法检测适配体亲和性复合物,例如Invader测定、杂交测定或DNA芯片、质谱分析或者Q-PCR。

[0057] 如上所述,本文所述测定法为说明目的而被分为四种测定形式:单捕获亲和性测定、双捕获亲和性测定、单捕获光交联测定和双捕获光交联测定。然而,应理解本发明也包括其它类别、组合和步骤顺序,这些均包含在本公开的范围。所有这四种测定形式具有一共有步骤,其中通过捕获靶例如蛋白质的分开步骤使适配体-靶复合物与游离适配体(或者游离光适配体)分离。这个分开步骤在本文被称作“Catch 2”分开。所述两个“双捕获”测定法具有另外的共有步骤,其中通过捕获适配体的分开步骤使适配体-靶复合物与游离靶分离。这个后者的分开步骤在本文被称作“Catch 1”分开。实施每个步骤的方法在下文详细描述。

[0058] 本发明进一步揭示了在每种这些测定形式中使用动力学攻击。传统上,通过使用夹心测定法(其中使用两种捕获试剂)已经改良检测预期靶的特异性。令人惊奇地观测到在使用适配体的检测方法中使用动力学攻击不再需要通过导入第二捕获试剂增强特异性。如果导入动力学攻击,则适配体与任何非靶分子之间的非特异性复合物在其解离后不可能再形成。由于非特异性复合物通常比适配体亲和性复合物更迅速解离,因此动力学攻击降低了适配体包含于非靶的非特异性复合物中的可能性。有效的动力学攻击可提供具有超过初始适配体结合事件及任何随后共价相互作用的特异性的额外特异性的测定法。因此,动力学攻击提供了在这些检测方法中另一种特异性决定因素。实施动力学攻击的方法在下文详细描述。

[0059] 参照图2A(双步骤亲和性测定)和2B(双步骤交联测定),在举例的检测和/或量化可能存在于检测样品中的靶分子的方法中,将检测样品与包括第一标签且对靶分子具有特异性亲和性的适配体(或者光适配体)接触。使包括与其靶分子结合的适配体(或者光适配体)的适配体亲和性复合物形成,其中检测样品含有靶分子。在光交联实例(2B)中,使用适于所用适配体的方法使适配体亲和性复合物转变为光适配体与其靶分子共价结合的适配体共价复合物。适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)通过第一捕获元件附着于第一固体支持物。通过将第一固体支持物与适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)接触且使得包括于适配体上的标签直接或间接与附着于第一固体支持物的第一捕获元件缔合从而实现附着。将与第一固体支持物上的第一捕获元件缔合的适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)与剩余的混合物分开。在分开之后,使用适于所用特定标签的方法使适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)从第一固体支持物中释放。或者,所述标签可以通过可裂解部分附着于适配体,其中这种可裂解部分被裂解以从第一固体支持物中释放适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)。将第二标签(其与第一标签可以相同或不同)附着于适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)的靶分子。任选地,可以进行动力学攻击以增加测定特异性及降低背景信号。使适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)附着于第二固体支持物。通过将第二固体支持物与适配体亲和性复合物(或者适配体

共价复合物)接触且使得包括于靶上的第二标签直接或间接与附着于第二固体支持物的第二捕获元件缔合从而实现附着。将与第二固体支持物上的第二捕获元件缔合的适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)与剩余的混合物分开。检测及任选量化所述适配体亲和性复合物(或适配体共价复合物)。

[0060] 在另一个实施方案中,首先将适配体(或者光适配体)与其各自的靶分子解离,并检测及任选量化游离适配体(或者光适配体)。

[0061] 所述适配体亲和性复合物可以通过使用任何合适的核酸检测技术检测,所述技术如杂交或DNA芯片、Q-PCR、质谱分析(MS)、Invader测定等。根据所用技术,可以设计或者修饰适配体以包括标记。这可以在合成(酶促或化学合成)期间或者在测定期间任何时候(即在检测之前的任何时候)完成。

[0062] 本文所述方法使得可以通过检测从测定中洗脱的游离适配体从而检测靶分子的存在和量。由于核酸的检测、量化和扩增的相对简便性而可以便利地检测和量化靶分子,且提供了具有非常好的信噪比的靶检测测定法。

[0063] 单捕获(仅Catch 2)亲和性测定

[0064] 在一个实施方案中,使用Catch 2分开进行单捕获亲和性测定,见图1A或1B。当样品基质不是非常复杂、由此样品中其它成分不竞争所述标签时适用这种方法。当样品中靶以高拷贝数或浓度存在时也适用该方法。

[0065] 提供对靶分子具有高亲和性和特异性的适配体。在一个实施方案中,使用图6A所示适配体构建体。在这个实施方案中,将适配体与可能含有靶分子的样品接触以形成含有适配体、靶分子及非靶分子或样品基质的混合物。在样品中存在靶分子的情况中,形成适配体亲和性复合物。任选将该混合物保温一定时间,以足以达到适配体与靶分子的平衡结合(例如至少大约10分钟、至少大约20分钟、至少大约30分钟)。

[0066] 在一个实施方案中,对所述混合物任选进行动力学攻击。动力学攻击帮助降低适配体与样品中存在的任何非靶分子之间的任何非特异性结合。在一个实施方案中,加入10mM硫酸葡聚糖,将该混合物保温大约15分钟。

[0067] 在一个实施方案中,进行Catch 2分开以除去游离适配体。在一个实施方案中,将含有适配体亲和性复合物的混合物用将捕获标签导入适配体亲和性复合物的靶分子成分中的物质处理。在其它实施方案中,在将适配体与检测混合物接触之前(平衡结合之前或者动力学攻击之前)导入所述标签。在一个实施方案中,所述靶是蛋白质或者肽,通过用NHS-PEO4-生物素处理将生物素标签附着于靶分子。然后将该混合物与固体支持物接触,所述固体支持物表面具有与其附着的能结合靶捕获标签的捕获元件。在这个实施方案中,典型选择固体支持物上的捕获元件,由此其与靶捕获标签高亲和性及特异性结合。在一个实施方案中,所述固体支持物是包含于微滴定平板孔内的磁珠(如DynaBeads MyOne Streptavidin C1),捕获元件是链霉抗生物素蛋白。所述磁珠提供分离混合物的分开成分的便利方法。混合物中含有的适配体亲和性复合物从而通过靶捕获标签与固体支持物上的捕获元件的结合相互作用而与固体支持物结合。然后将所述适配体亲和性复合物与剩余的混合物分开,例如通过洗涤固体支持物以除去未复合的适配体。在一个实施方案中,随后可从适配体亲和性复合物中释放适配体,通过如下一或多种处理进一步加工:高盐、高pH、低pH或者升高温度。

[0068] 在另一个实施方案中,通过任何合适的核酸检测方法检测及任选量化从Catch 2 分开释放的适配体,所述核酸检测方法如DNA芯片杂交、Q-PCR、质谱分析、Invader测定等。在另一个实施方案中,检测及任选量化仍与固体支持物接触的适配体亲和性复合物中的适配体。在一个实施方案中,所述适配体包含可检测部分以便于这个检测步骤。基于所用检测方法选择所述可检测部分。在一个实施方案中,所述可检测部分或标记在合成期间或者在测定之前加入适配体中。在另一个实施方案中,所述可检测部分在测定期间或者检测期间加入适配体中。然后可以使检测的适配体与原始检测样品中靶的量或浓度相关。

[0069] 双捕获(Catch 1&2)亲和性测定

[0070] 在一个实施方案中,双捕获亲和性测定与单捕获亲和性测定相似,但是具有额外的分开步骤以提供额外的灵敏性和特异性。

[0071] 在一个实施方案中,提供了对靶分子具有高亲和性和特异性且具有第一可释放标签的适配体。在另一个实施方案中,所述第一可释放标签在Catch 1分开之前的测定的任何时间加入,见图2A和2B。在一个实施方案中,该第一可释放标签是光可裂解生物素。在一个实施方案中,使用图6B所示适配体构建体。描述了这些及其它标签和可裂解部分以及含有这种标签和可裂解部分的适配体。将所述适配体与可能含有靶分子的样品接触以形成含有适配体、靶分子及非靶分子、或样品基质的混合物。在样品中存在靶分子的情况下,适配体-靶分子复合物(适配体亲和性复合物)形成。可任选将该混合物保温一定时间,以足以达到适配体与靶分子之间的结合平衡(例如至少大约10分钟、至少大约20分钟、至少大约30分钟)。

[0072] 在一个实施方案中,进行Catch 1分开以除去任何游离靶和样品基质。将混合物与第一固体支持物接触,所述支持物表面附着能结合适配体捕获标签、优选以高亲和性和特异性结合的第一捕获元件。在一个实施方案中,第一可释放标签是光可裂解生物素,第一固体支持物是柱中琼脂糖珠,捕获元件是链霉抗生物素蛋白。例如,可以使用Pierce固定化链霉抗生物素蛋白珠。混合物中含有的适配体亲和性复合物从而通过第一可释放标记与第一捕获元件的结合相互作用而结合第一固体支持物。将所述适配体亲和性复合物与剩余的混合物分开,例如通过洗涤第一固体支持物以除去未结合的分子。

[0073] 在一个实施方案中,用将第二标签导入适配体亲和性复合物的靶分子成分中的物质处理与固体支持物结合的适配体亲和性复合物。在一个实施方案中,所述靶是蛋白质或肽,且所述靶通过用NHS-PE04-生物素处理而被生物素化。导入靶分子中的第二标签与适配体捕获标记可以相同或不同。如果第二标签与第一标签或者适配体捕获标签相同,则可以在开始这个标签标记(tagging)步骤之前封闭第一固体支持物上的游离捕获位点。在这个举例的实施方案中,在开始靶标签标记之前用游离生物素洗涤第一固体支持物。描述了标签标记方法及特别是靶如肽和蛋白质标签标记方法。在其它实施方案中,在开始Catch 2分开之前的测定的任何其它时间点进行靶的标签标记,见图2A和2B。当第一和第二标签相同时,在已经进行Catch1分开的捕获步骤之后标签标记靶。

[0074] 通过从第一固体支持物中释放适配体亲和性复合物完成Catch 1分开。在一个实施方案中,第一可释放标签是光可裂解部分,其在使得 $\geq$ 大约90%的第一可释放标签释放的条件下通过用UV光照射裂解。在其它实施方案中,通过适于第一可释放标签中选择的可释放部分的方法实现释放。可以洗脱适配体亲和性复合物并收集以进一步用于测定中或者

可以与另一固体支持物接触以进行测定的剩余步骤(图2A和2B)。

[0075] 在一个实施方案中,可任选对所述混合物进行动力学攻击。动力学攻击帮助降低适配体与非靶分子之间的任何非特异性结合。在一个实施方案中,在适配体亲和性复合物中加入10mM硫酸葡聚糖,并将该混合物保温大约15分钟。在另一个实施方案中,通过在存在10mM硫酸葡聚糖的条件下进行Catch 1洗脱开始动力学攻击。在其它实施方案中,在平衡结合步骤之后及在Catch 2分开之前进行动力学攻击。

[0076] 在一个实施方案中,进行Catch 2分开以除去游离适配体。如上所述,在一个实施方案中,在Catch 2分开中使用的第二标签可以在适配体亲和性复合物仍与Catch 1分开中使用的固体支持物接触时加入靶中。在其它实施方案中,第二标签可以在开始Catch 2分开之前在测定的另一时间点加入靶中。将该混合物与固体支持物接触,所述固体支持物在其表面附着捕获元件(第二捕获元件),其能优选高亲和性和特异性地结合靶捕获标签(第二标签)。在一个实施方案中,所述固体支持物是包含于微滴定平板孔内的磁珠(如DynaBeads MyOne Streptavidin C1),捕获元件(第二捕获元件)是链霉抗生物素蛋白。所述磁珠提供分离所述混合物分开成分的便利方法。包含于混合物中的适配体亲和性复合物从而通过靶(第二)捕获标签与第二固体支持物上的第二捕获元件的结合相互作用而与固体支持物结合。然后将所述适配体亲和性复合物与剩余的混合物分开,例如通过洗涤支持物除去未复合的适配体。在一个实施方案中,可以从适配体亲和性复合物中释放适配体,通过如下一或多项处理进一步加工:高盐、高pH、低pH或者升高温度。

[0077] 在另一个实施方案中,通过任何合适的核酸检测方法检测及任选量化从Catch 2分开释放的适配体,所述核酸检测方法如DNA芯片杂交、Q-PCR、质谱分析、Invader测定等。这些检测方法在下文进一步详细描述。在另一个实施方案中,检测及任选量化仍与固体支持物接触的适配体亲和性复合物中的适配体。在一个实施方案中,适配体包含可检测部分以便于这个检测步骤。基于所用检测方法选择可检测部分。在一个实施方案中,在合成期间或者在测定之前任何时间在适配体中加入可检测部分(标记)。在另一个实施方案中,在测定期间或者在检测期间在适配体中加入可检测部分。使检测的适配体与检测样品中靶的量或浓度相关。

[0078] 单捕获(仅Catch 2)交联测定

[0079] 在一个实施方案中,使用Catch 2分开进行单捕获交联测定。当样品基质不非常复杂、所以样品中其它成分不竞争标记时适用这个方法。这种方法也适用于靶以高拷贝数或浓度存在的样品。在一些情况中,通过光适配体与靶之间形成共价连接提供额外的益处,因为这样在进行交联之后的步骤中允许更严格的洗涤(图1B)。

[0080] 提供对靶分子具有高亲和性和特异性的光适配体。在一个实施方案中,光适配体的交联部分通过可裂解接头与适配体连接。在一个实施方案中,交联基团是ANA(4-叠氮-2-硝基-苯胺),光可裂解基团是PC接头。在一个实施方案中,使用图6C所示适配体构建体。将光适配体与可能含有靶分子的样品接触以形成含有适配体、靶分子及非靶分子、或样品基质的混合物。在检测样品中存在靶分子的情况中,形成(光)适配体亲和性复合物。可任选将此混合物保温一定时间,以足以达到适配体与靶分子的结合平衡(例如至少大约10分钟、至少大约20分钟或者至少大约30分钟)。

[0081] 在一个实施方案中,可任选对混合物进行动力学攻击。动力学攻击帮助降低光适

配体与非靶分子之间的任何非特异性结合。在一个实施方案中,加入10mM硫酸葡聚糖并将该混合物保温大约15分钟。

[0082] 在一个实施方案中,通过用合适波长的光照射使光适配体亲和性复合物转变为适配体共价复合物。例如,可以使用大约470nm的照射以使得含有光适配体的ANA与蛋白质或肽靶交联。

[0083] 在一个实施方案中,进行Catch 2分开以除去游离光适配体。在一个实施方案中,用将捕获标签导入适配体共价复合物的靶分子成分中的物质处理含有适配体共价复合物的混合物。在其它实施方案中,在适配体与检测样品接触之前、在结合平衡之前或者在动力学攻击之间导入所述标签。在一个实施方案中,靶是蛋白质或肽,且通过NHS-PEO4-生物素处理使生物素标签附着于靶分子。将所述混合物与固体支持物接触,所述固体支持物表面附着能优选高亲和性和特异性结合靶捕获标签的捕获元件。在一个实施方案中,所述固体支持物是包含于微滴定平板孔内的磁珠(如DynaBeads MyOne Streptavidin C1),捕获元件是链霉抗生物素蛋白。磁珠提供了分离混合物的分开成分的便利方法。包含于混合物中的适配体共价复合物从而通过靶捕获标签与捕获元件的结合相互作用而与固体支持物结合。将适配体共价复合物与剩余的混合物分开,例如通过洗涤支持物以除去未复合的适配体。在一个实施方案中,可以从适配体共价复合物中释放光适配体以通过适于可裂解部分的方法进一步加工。例如,为了裂解PC接头,用UV光照射该混合物大约20分钟。

[0084] 在另一个实施方案中,通过任何合适的核酸检测方法检测及任选量化从Catch 2分开释放的光适配体,所述核酸检测方法如DNA芯片杂交、Q-PCR、质谱分析、Invader测定等。这些检测方法在下文进一步详细描述。在另一个实施方案中,检测及任选量化仍与固体支持物接触的适配体共价复合物中的光适配体。使检测的光适配体与原始检测样品中靶的量或浓度相关。

[0085] 双捕获(Catch 1&2)光交联测定

[0086] 在一个实施方案中,与单捕获光交联测定相似的双捕获光交联测定使用额外的分开步骤以提供额外的灵敏性和特异性(图2B)。

[0087] 提供对靶分子具有高亲和性和特异性的光适配体。在一个实施方案中,光适配体的交联部分通过可裂解接头与适配体连接。在一个实施方案中,交联基团是ANA(4-叠氮-2-硝基-苯胺),光可裂解基团是PC接头。在一个实施方案中,光适配体还包含第一可释放标签。在另一个实施方案中,在Catch 1分开之前在测定的任何时间加入第一可释放标签。在一个实施方案中,第一可释放标签部分是生物素,可释放元件是杂交接头。在一个实施方案中,使用图6D所示光适配体构建体。将光适配体与可能含有靶分子的样品接触,形成含有适配体、靶分子及非靶分子、或样品基质的混合物。在样品中存在靶分子的情况中,形成(光)适配体亲和性复合物。可任选将该混合物保温一定时间,以足以达到适配体与靶分子的结合平衡(例如至少大约10分钟、至少大约20分钟或者至少大约30分钟)。

[0088] 在一个实施方案中,可任选对混合物进行动力学攻击。动力学攻击帮助降低光适配体与非靶分子之间的任何非特异性结合。在一个特异的实施方案中,加入10mM硫酸葡聚糖并将混合物保温大约15分钟。

[0089] 通过用合适波长的光照射使(光)适配体亲和性复合物转变为适配体共价复合物。例如可以使用大约470nm的照射使含有光适配体的ANA与蛋白质靶交联。

[0090] 在一个实施方案中,进行Catch 1分开以除去游离靶和样品基质。将混合物与第一固体支持物接触,所述固体支持物的表面附着能优选高亲和性和特异性结合适配体捕获标签的第一捕获元件。在一个实施方案中,第一可释放标签包含是生物素的标签部分,第一固体支持物是柱中的琼脂糖珠,第一捕获元件是链霉抗生物素蛋白。例如可以使用Pierce固定化链霉抗生物素蛋白珠。混合物中包含的适配体共价复合物从而通过第一可释放标签与第一捕获元件的结合相互作用而与第一固体支持物结合。将适配体共价复合物与剩余的混合物分开,例如通过洗涤第一固体支持物以除去未结合的分子。

[0091] 在一个实施方案中,然后将仍结合第一固体支持物的适配体共价复合物用将第二标签导入适配体亲和性复合物的靶分子成分的物质处理,例如通过用NHS-PEO4-生物素处理使蛋白质或肽靶分子生物素化。导入靶分子中的第二标签与第一标签可以相同或不同。如果第二标签与第一标签相同,在开始这个标记步骤之前可以封闭第一固体支持物上的游离捕获位点。在这个实施方案中,在开始靶标签标记之前用游离生物素洗涤第一固体支持物。标签标记方法及特别是标签标记靶如肽和蛋白质的方法在下文详细描述。在其它实施方案中,在开始Catch 2分开之前在测定的任何其它时间点进行靶的标签标记。如果第一和第二标签相同,在进行Catch 1分开的捕获步骤之后标签标记靶。

[0092] 在另一个实施方案中,通过从第一固体支持物中释放适配体共价复合物完成Catch 1分开。在一个实施方案中,第一可释放标签是与所述固体支持物上所述第一捕获元件的全部或一些互补的杂交标签。通过用破坏杂交接头的条件如高pH处理混合物从而裂解第一可释放标签。在一个实施方案中,在混合物中加入20mM NaOH。在其它实施方案中,通过适于第一可释放标签中可释放部分的任何方法实现适配体共价复合物的释放。可以洗脱并收集适配体共价复合物用以进一步测定或可与进一步的固体支持物接触以进行该测定的剩余步骤。

[0093] 在一个实施方案中,进行Catch 2分开以除去游离光适配体。将混合物与固体支持物接触,所述固体支持物表面上附着能优选高亲和性和特异性结合第二捕获标签的捕获元件。在一个实施方案中,所述固体支持物是包含于微滴定平板孔内的磁珠(如DynaBeads MyOne Streptavidin C1),捕获元件是链霉抗生物素蛋白。所述磁珠提供分离混合物的分开成分的便利方法。包含于混合物中的适配体共价复合物从而通过靶第二捕获标签与第二捕获元件的结合相互作用而与固体支持物结合。然后将适配体共价复合物与剩余的混合物分开,例如通过洗涤支持物以除去未复合的适配体。在一个实施方案中,可以从适配体共价复合物中释放光适配体,用以通过适于可裂解部分的方法进一步加工。例如,为了裂解PC接头,用UV光照射混合物大约20分钟。

[0094] 在另一个实施方案中,通过任何合适的核酸检测方法检测及任选量化从Catch 2分开释放的光适配体,所述核酸检测方法如DNA芯片杂交、Q-PCR、质谱分析、Invader测定等。在另一个实施方案中,检测及任选量化仍与固体支持物接触的适配体共价复合物中的光适配体。使检测的光适配体与原始检测样品中靶的量和浓度相关。

[0095] 在本发明揭示的任何实施方案中,检测样品可以制备成检测样品的两或多倍稀释液,这样可以增加通过本发明揭示的方法检测靶的动态范围(dynamic range)。单独测定各个稀释检测样品,直至且包含适配体(或者共价)复合物形成,之后可以将稀释检测样品集合以进行剩余的测定并在一个固体支持物上同时检测。在一个实施方案中,每个稀释检测

样品均包含独特的适配体,从而使得可以对相应的靶进行单独测量。在另一个实施方案中,适配体可以加入两或多倍稀释液中,将每个稀释液与特定靶的独特标记的适配体接触,由此可以在一个固体支持物上检测每个不同稀释样品的特异性适配体信号。以此方式串连在一起的稀释样品可以使一种靶分子的动态范围扩大许多个数量级且当量化的重叠区导致一种靶的浓度出现多个测量值时可增加精确性。

[0096] 在本文揭示的任何实施方案中,在弃去含有未复合的靶和检测样品或样品基质的上清之后可以悬浮所述珠或固体支持物。在一个实施方案中,在从所述珠中洗脱游离适配体和适配体(或者共价)复合物之前和在直至悬浮珠的任何点,可以将适配体(或者共价)复合物与标记物质接触,随后重复沉淀和洗涤以除去未反应的标记物质,之后将固体支持物与适配体(或者共价)复合物接触以检测和/或量化靶分子。

[0097] 在一个实施方案中,制备一组检测样品的系列稀释液,其中导入对靶分子具有特异性亲和性的标签标记的适配体(或者标签标记的光适配体)。可以在每个检测样品稀释液中加入具有不同标签的相同适配体。如本文进一步描述,在形成适配体亲和性复合物(或者任选转变为适配体共价复合物)之后,可以集合各个检测样品及在适配体(或者共价)复合物与固体支持物附着之前或之后与标记物质接触。如果检测样品中存在靶分子,通过检测适配体(或者共价)复合物上所述标记物质而检测和/或量化靶分子。可以组合对具有不同标签的每个适配体检测获得的信号以精确量化原始检测样品中靶分子的量或浓度。例如第一个稀释液可获得靶的最大信号,仅产生半定量信息,而第二个稀释液可获得低于饱和的信号,可以精确量化原始检测样品中的靶。

[0098] 在另一个实施方案中,制备一组检测样品的系列稀释液,其中导入对靶分子具有特异性亲和性的标签标记的适配体(或者标签标记的光适配体)。在每个样品稀释液中可以加入具有独特标签的不同适配体。如本文进一步描述,在形成适配体亲和性复合物(或者任选转变为适配体共价复合物)之后,可以集合各个样品,在适配体(或者共价)复合物附着于固体支持物之前或之后与标记物质接触。检测样品中存在的靶分子通过检测适配体(或者共价)复合物上所述标记物质而被检测和/或量化。根据原始样品的不同系列稀释倍数,所得信号可以量化许多数量级范围的靶。

[0099] 在本发明揭示的任何实施方案中,检测样品可以与参考样品对比。本文中“参考样品”是指含有多种分子且已知包含至少一种靶分子的任何材料、溶液或混合物。参考样品中存在的任何靶分子的精确量或浓度也已知。如本文所定义,术语“参考样品”包括生物学样品,以及可用于环境或毒性检测如污染或潜在污染的水或工业废水的样品。参考样品也可以是制备过程如生产过程的终产物、中间产物或者副产物。参考样品可包括已经加入得自生物体或者得自一些其它来源(例如环境或者工业来源)的材料、溶液或者混合物中的任何合适的测定介质、缓冲液或者稀释液。

[0100] 在一个实施方案中,制备具有两种不同探针的适配体。例如一种适配体可具有Cy3染料,另一种具有Cy5染料。例如使用双捕获交联测定,将参考样品暴露于一种适配体,将检测样品暴露于另一种。每个样品以相同方式单独处理,直至并包括交联步骤。在交联后,可以将样品等量混合并进行剩余的测定步骤。可以通过单独测量每个标记物质的信号而直接对比参考样品与检测样品之间的任何差异表达(即样品中靶的差异量或浓度)。应理解这种方法可以掺入本文所述任何其它测定中。进一步地,除了使用不同染料,包括使用荧光染料

之外,也可以使用其它标记以区分每个不同适配体的信号。例如,在另一个实施方案中,每个样品中使用的适配体可具有不同的序列标记。例如当读出(readout)是QPCR或DNA杂交阵列时,适用这种方法。

[0101] 在一个实施方案中,参考样品可以是集合的生物学样品,代表对照组。在另一个实施方案中,参考样品可以是得自个体的在第一时间收集的生物学样品,检测样品可以得自相同个体但是在第二时间收集的,从而便于通过测量和评估个体随时提供的多个生物学样品中一或多个靶分子的量或浓度的任何改变而对个体进行纵向研究。

[0102] 本文描述的任何方法均可用于检测样品的多元分析。任何这样的多元分析可包括使用至少两种、至少十种、至少几百种、或至少几千种适配体同时测定检测样品如生物学样品中相等数目的靶分子。在这些实施方案中,在检测样品中导入多种适配体(或者标记的光适配体,每种适配体均识别且任选交联不同待分析物),可以进行任何上述测定。在释放适配体后,可以使用任何合适的多元核酸检测方法测量已经释放的不同适配体。在一个实施方案中,这可以通过与单独排列在固体表面上的互补探针杂交而实现。在另一个实施方案中,基于分子量使用质谱分析法检测每种不同的适配体。在再一个实施方案中,可以基于如在毛细管电泳、凝胶或者通过液相层析的电泳迁移率检测每种不同的适配体。在另一个实施方案中,可以使用独特的PCR探针通过Q-PCR量化每种不同适配体。

[0103] 在本文揭示的每种测定法中,使用动力学攻击增加测定的特异性及降低非特异性结合。在一个实施方案中,其可任选用于本文揭示的每种测定法中,非特异性结合的额外降低可通过将竞争剂与检测样品预保温或者通过在平衡结合期间在混合物中加入竞争剂而实现。在一个实施方案中,将4 μ M的Z-封闭竞争剂寡核苷酸(5'-(ACZZ)₂₈AC-3',其中Z=5-苄基-dUTP)与检测混合物预保温大约5分钟。

[0104] 本发明另一方面涉及可用于便利地进行本文揭示的任何方法以分析检测样品的试剂盒。为了增强本文揭示的方法的多功能性(versatility),试剂可以在同一或分离的容器中以包装组合提供,以便试剂的比率利于方法和测定的实质性最佳。试剂可以存在于单独的容器中或者根据试剂的交叉反应性和稳定性而可以将多个试剂组合在一或多个容器中。

[0105] 试剂盒以包装组合方式包含至少一种标记的适配体以及一或多种固体支持物,每个固体支持物均包含至少一种捕获剂。试剂盒也可包含洗涤溶液如稀释样品的缓冲的水溶液介质,以及阵列洗涤、样品制备试剂等。试剂盒还进一步含有可用于导入第二标签的试剂,通常通过修饰或衍生化靶进行。除此之外,试剂盒可含有适于在分析方法期间进行希望的动力学攻击的试剂。试剂盒中各个试剂的相对量可以变化以提供不同试剂浓度以在测定期间实质优化反应以及进一步实质优化测定的灵敏性。在适当条件下,试剂盒中一或多种试剂可以是干粉,通常是冻干的干粉,包括赋形剂,在其溶解时提供具有适当浓度的试剂溶液,用于进行本发明所述方法或测定。所述试剂盒可进一步包含本文所述方法的使用说明书。

[0106] 在一个实施方案中,检测和/或量化可能存在于检测样品中的一或多种靶分子的试剂盒包括至少一种对靶分子特异性亲和性且包含标签的适配体;以及固体支持物,其中所述固体支持物包括置于其上的至少一种捕获剂,且其中捕获元件能与适配体上的标签缔合。

[0107] 在另一个实施方案中,检测和/或量化可能存在于检测样品中的一或多种靶分子的试剂盒包括至少一种对靶分子具有特异性亲和性且包含标签以及标记的适配体;以及固体支持物,其中所述固体支持物包括置于其上的至少一种捕获剂,且其中捕获元件能与适配体上的标签缔合。

[0108] 在另一个实施方案中,检测和/或量化可能存在于检测样品中的一或多种靶分子的试剂盒包括至少一种对靶分子具有特异性亲和性且包含可释放标签以及标记的适配体;以及固体支持物,其中所述固体支持物包括置于其上的至少一种捕获剂,且其中捕获元件能与适配体上的标签缔合。

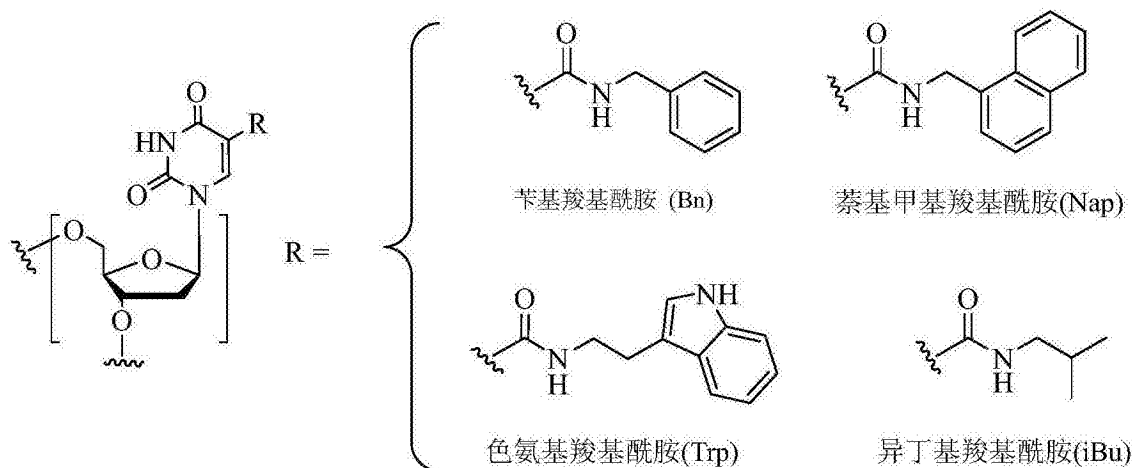
[0109] 此外,任何上述试剂盒均可含有在该试剂盒检测方法期间进行动力学攻击的试剂和材料。

[0110] 如本文所用,“核酸”、“寡核苷酸”和“多核苷酸”可以互换使用,是指任何长度的核苷酸聚合物,这种核苷酸可以包括脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和/或类似物或者化学修饰的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸。术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”包括双链或单链分子以及三螺旋分子。

[0111] 如果存在,核苷酸的化学修饰可包括单一或任意组合修饰,2'-位置糖修饰,5'-位置嘧啶修饰(例如5-(N-苄基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(N-异丁基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(N-色氨基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(5-(N-tryptaminocarboxyamide)-2'-deoxyuridine),5-(N-[1-(3-三甲基铵)丙基]羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷氯化物,5-(N-萘基甲基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷,5-(咪唑基乙基)-2'-脱氧尿苷以及5-(N-[1-(2,3-二羟基丙基)]羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷),8-位置嘌呤修饰,在环外胺的修饰,4-硫代尿苷取代,5-溴-或5-碘-尿嘧啶取代,主链修饰,甲基化,独特的甲基配对组合如异碱基异胞苷(isobases isocytidine)和异胍(isoguanidine)等。

[0112] 在一个实施方案中,术语“C-5修饰的嘧啶”指在C-5位置具有修饰的嘧啶,包括但不限于图16所述的那些部分。C-5修饰的嘧啶的例子包括U.S.Pat.Nos.5,719,273和5,945,527所述的那些。C-5修饰的例子包括在C-5位置用选自如下的取代基对脱氧尿苷的取代:苄基羧基酰胺(或者苄基氨基羰基)(Bn),萘基甲基羧基酰胺(或者萘基甲基氨基羰基)(Nap),色氨基羧基酰胺(或者色氨基羰基)(Trp),和异丁基羧基酰胺(或者异丁基氨基羰基)(iBu),如下文所述。

[0113]



[0114] 如上所示,代表性的C-5修饰的嘧啶包括:5-(N-苄基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(BndU),5-(N-异丁基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(iBudU),5-(N-色氨基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(TrpdU)和5-(N-萘基甲基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(NapdU)。

[0115] 修饰也可包括3'和5'修饰,如加帽。其它修饰可包括一或多个天然发生的核苷酸由类似物取代,核苷酸间修饰如具有无电荷键的那些(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等),具有带电荷键的那些(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等),具有嵌入物的那些(例如吡啶、补骨脂素等),含有螯合剂的那些(例如金属,放射性金属,硼、氧化金属等),含有烷化剂的那些以及具有修饰的键的那些(例如 α 异头核酸等)。进一步地,最初存在于糖中的任何羟基可以由磷酸酯或者磷酸酯基团置换;由任何合适的保护基团保护;或者激活用以制备与额外的核苷酸或者固体支持物的额外连接。5'和3'末端OH基团可以被磷酸化或者用胺、大约1到大约20个碳原子的有机加帽基团部分或者大约1到大约20个聚乙二醇(PEG)聚合物或者其它亲水性或疏水性生物或合成聚合物的有机加帽基团部分取代。如果存在,核苷酸结构修饰可以在聚合物装配之前或之后给予。核苷酸序列可以由非核苷酸成分中断。多核苷酸可以在聚合之后被进一步修饰,例如通过与标记成分缀合进行修饰。

[0116] 多核苷酸也可以含有本领域已知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟-或者2'-叠氮-核糖,碳环糖类似物, α -异头糖,差向异构糖如阿拉伯糖、木糖或者来苏糖,吡喃糖,呋喃糖,景天庚酮糖,无环类似物和无碱基核苷酸类似物如甲基核苷。如上所述,一或多个磷酸二酯键可以由可变连接基团置换。这些可变连接基团包括这样的实施方案,其中磷酸酯由P(O)S(硫代酯)、P(S)S(二硫代酯)、(O)NR₂(酰胺酯(amide))、P(O)R、P(O)OR'、CO或者CH₂(formacetal)置换,其中R或R'独立地是H或者取代或未取代的烷基(1-20C),任选含有醚(-O-)键、芳基、烯基、环烷基、环烯基或者araldyl。多核苷酸中不是所有键均需要相同。糖、嘌呤和嘧啶的类似形式的取代可有利于设计终产物,这样可以改变主链结构如多酰胺主链。

[0117] 在一个实施方案中,适配体构建体在适配体可变区中可包含一或多个C5-修饰的核苷酸,其有效地减慢适配体与其靶分子的解离速率。在适配体可变区产生中使用的核苷酸碱基修饰示出产生与其各自靶具有极慢解离速率的适配体。例如,有证据表明含有5位置修饰的嘧啶的适配体(如图16所示那些任何适配体)具有与其靶分子的慢解离速率。在一些实施方案中,在包括动力学攻击的测定方法中使用包含以这种方式修饰的核苷酸的适配体,使得在检测靶中产生增强的灵敏性和特异性。如图4所示,迄今为止已经对500种以上的靶产生了适配体。许多这些适配体具有慢解离速率特性。

[0118] 在一个实施方案中,适配体的可变区包含具有修饰的碱基的核苷酸。这些适配体可用于本文所述任何方法、装置和试剂盒中。有证据表明这些修饰的核苷酸可以鉴别适配体,所述适配体与其各自的靶具有极低解离速率而同时保持对靶的高亲和性。在一个实施方案中,嘧啶碱基的C-5位置可以被修饰。在其它实施方案中,适配体中的一些或所有嘧啶可以是碱基修饰的核苷酸。在再一些其它实施方案中,可以使用修饰的嘧啶的组合。含有具有修饰的碱基的核苷酸的适配体具有不同于仅含有未修饰核苷酸(即天然发生的核苷酸)的适配体的许多性质。在一个实施方案中,修饰核苷酸的方法是通过羧基酰胺键进行。然而也可以使用其它修饰方法。令人惊奇地观测到鉴别的慢解离速率适配体的结构未显现出符合通过碱基配对模型推测的结构。这个结果可以由这样的事实支持,即测量的适配体解链

温度与通过模型推测的温度不同。如本文所示,看起来在测量的与推测的解链温度之间的相关性较低或无相关性。此外,计算的平均 T_m 是6°C,低于测量的 T_m 。测量的解链温度表明包含这些修饰的核苷酸的适配体的稳定性比预测的更好,且潜在地具有新的二级结构。当在生产初始文库或者候选混合物中使用修饰的核苷酸时更可能鉴别慢解离速率适配体。

[0119] 如本文所用,“修饰的核酸”是指含有与SELEX方法相容的一或多个修饰的核苷酸的核酸序列。

[0120] 在本发明另一个实施方案中提供了适配体与靶的非共价复合物,其中适配体对靶的 K_d 为大约100nM或更低,其中适配体与靶的解离速率($t_{1/2}$)高于或等于大约30分钟,在大约30分钟和大约240分钟之间, $\geq$ 大约30分钟, $\geq$ 大约60分钟, $\geq$ 大约90分钟, $\geq$ 大约120分钟, $\geq$ 大约150分钟, $\geq$ 大约180分钟, $\geq$ 大约210分钟, $\geq$ 大约240分钟,和/或其中适配体核酸序列中的一个、几个或者所有嘧啶在碱基的5-位置被修饰。所述修饰可选自图16所示化合物的基团。适配体可以被设计为具有希望的碱基修饰的核苷酸的任意组合。

[0121] 如本文所用,“适配体”与“核酸配体”可互换使用,是指对靶分子具有特异性结合亲和性的核酸。本领域认识到亲和性相互作用是关于程度而言;然而本文中适配体与其靶的“特异性结合亲和性”通常是指适配体以远高于其结合检测样品中其它成分的亲和性程度结合其靶。“适配体”是具有特定核苷酸序列的一种类型或种类的核酸分子的一组拷贝。适配体可包含任何合适数目的核苷酸。“多种适配体”是指一组以上这种分子。不同适配体可具有相同或不同数目的核苷酸。本文揭示的任何方法均可包括使用一或多种适配体。本文揭示的任何方法也均可包括使用特异性结合相同靶分子的两或多种适配体。如下文进一步描述,适配体可包含标签。如果适配体包含标签,该适配体的所有拷贝不需要具有相同标签。此外,如果不同适配体均包含标签,这些不同适配体可具有相同标签或不同标签。适配体可以是ssDNA、dsDNA、RNA或DNA和RNA组合。

[0122] 可以使用任何已知方法包括SELEX方法鉴别适配体。见例如发明名称为“Nucleic Acid Ligands”的美国专利No.5,475,096所述。一旦鉴别了适配体,可以根据任何已知方法制备或合成适配体,所述方法包括化学合成方法和酶合成方法。

[0123] 术语“SELEX”和“SELEX方法”在本文可互换使用,通常是指组合(1)选择与靶分子以预期方式相互作用的核酸,例如与蛋白质高亲和性结合和(2)扩增这些选择的核酸。见例如发明名称为“Nucleic Acid Ligands.”的美国专利No.5,475,096所述。SELEX方法可用于产生与其靶共价结合的适配体以及与其靶非共价结合的适配体。见例如发明名称为“Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX.”的美国专利No.5,705,337所述。SELEX方法也可用于产生具有改良的解离速率的适配体,如发明名称为“Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates”的美国申请系列号No.12/175,434所述,其与本申请同时提交并且以其全文援引加入本文。

[0124] 如本文所用,术语“适配体亲和性复合物”或者“适配体复合物”是指通过适配体与其靶分子相互作用形成的非共价复合物。“适配体亲和性复合物”或者“适配体复合物”是结合其相应靶分子的适配体形成的一种类型或种类的复合物的一组拷贝。“多种适配体亲和性复合物”或者“多种适配体复合物”是指一组以上这种复合物。适配体亲和性复合物或者适配体复合物通常可通过环境条件改变而被逆转或解离,例如升高温度、增加盐浓度或者

加入变性剂。

[0125] 如本文所用,“非特异性复合物”是指除了适配体与其靶分子之外两或多个分子之间的非共价缔合。由于非特异性复合物不是基于其组成分子之间的亲和性相互作用而选择的,而是代表分子类别之间的相互作用,因此非特异性复合物中缔合的分子呈现出彼此平均低很多的亲和性且相应地具有比适配体与其靶分子高的解离速率。非特异性复合物包括在适配体与非靶分子、竞争剂与非靶分子、竞争剂与靶分子以及靶分子与非靶分子之间形成的复合物。

[0126] SELEX方法通常从制备不同序列的核酸的候选混合物开始。候选混合物通常包括这样的核酸序列,所述核酸序列包括两个固定区(即候选混合物的每个成员在相同位置均含有相同序列)和一个可变区。典型地,选择固定序列区,由此其有助于下文所述的扩增步骤,或者增强候选混合物中核酸的指定结构排列的潜力。可变区典型提供候选混合物中每个核酸的靶结合区,且这个可变区可以是完全随机的(即在任何位置发现碱基的概率是1/4)或者仅是部分随机的(例如在任何位置发现碱基的概率可以在0-100%之间的任意水平选择)。将制备的候选混合物与选择的靶在一定条件下接触,所述条件是有利于在靶与候选混合物成员之间发生结合的条件。在这些条件下,靶与候选混合物的核酸之间的相互作用通常形成核酸-靶对,成对成员之间具有最强的相对亲和性。将对靶具有最高亲和性的核酸与对靶具有较低亲和性的那些核酸分开。所述分开方法以保留最大数目的高亲和性候选物的方式进行。扩增在分开期间选择的对靶具有相对高亲和性的那些核酸以产生富集对靶具有相对高亲和性的核酸的新的候选混合物。重复上述分开与扩增步骤,新形成的候选混合物含有越来越少的独特序列,且核酸混合物与其靶的平均亲和性程度通常增加。最终,SELEX方法产生含有一或极少数独特核酸的候选混合物,表示来自原始候选混合物的对靶分子具有最高亲和性的那些核酸。

[0127] 如本文所用,“光适配体”、“光反应性核酸配体”以及“光反应性适配体”可互换使用,是指含有能与靶分子共价结合或者“交联”的一或多个光反应性官能团的适配体。例如,可以修饰天然发生的核酸残基,使其包括在所述核酸残基暴露于适当波长的放射源时赋予光反应性的化学官能团。可以使用任何已知方法鉴别和/或制备光适配体。在一些实施方案中,使用photoSELEX方法鉴别光反应性适配体。见例如名称均为“Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX”的美国专利No.5,763,177、美国专利No.6,001,577和美国专利No.6,291,184所述,也见例如名称为“Photoselection of Nucleic Acid Ligands”的美国专利No.6,458,539以及名称为“Improved SELEX and PHOTOSELEX”美国申请系列No.12/175,388所述,其与本申请同时提交并且以其全文援引加入本文。

[0128] 举例的可掺入光适配体的光反应性官能团包括5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、5-溴乙基尿嘧啶、5-碘乙基尿嘧啶、5-叠氮尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-硫尿嘧啶、4-硫胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、5-溴乙基胞嘧啶、5-碘乙基胞嘧啶、5-叠氮胞嘧啶、8-叠氮腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、8-碘腺嘌呤、8-叠氮鸟嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-碘鸟嘌呤、8-叠氮次黄嘌呤、8-溴次黄嘌呤、8-碘次黄嘌呤、8-叠氮黄嘌呤、8-溴黄嘌呤、8-碘黄嘌呤,5-[(4-叠氮苯甲酰甲基)硫代]胞嘧啶、5-[(4-叠氮苯甲酰甲基)硫代]尿嘧啶、7-脱氮-7-碘腺嘌呤、7-脱氮-7-碘鸟嘌呤、7-脱氮-7-溴腺嘌呤以及7-脱氮-7-溴鸟嘌呤。

[0129] 除了这些举例的基于核苷的光反应性官能团之外,可以使用其它光反应性官能团,其可以通过合适接头分子加入适配体的末端。这种光反应性官能团包括苯甲酮、蒽醌、4-叠氮-2-硝基-苯胺、补骨脂素、任何这些材料的衍生物等。

[0130] 掺入光适配体中的光反应性官能团可以通过任何合适方法激活。在一个实施方案中,通过将光适配体亲和性复合物暴露于电磁辐射源使含有光反应性官能团的光适配体与其靶交联。合适类型的电磁辐射包括紫外辐射、可见光、X-射线和 γ 射线。合适的放射源包括利用单色光源或者过滤的多色光源。

[0131] 如本文所用,术语“适配体共价复合物”是指适配体亲和性复合物,其中适配体被诱导或者以其他方式与其靶分子形成共价键。“适配体共价复合物”是通过适配体共价结合其相应的靶分子形成的一种类型或种类的复合物的一组拷贝。“多种适配体共价复合物”是指一组以上这种复合物。适配体与其靶分子之间的共价键或连接可以通过光活化适配体上的化学部分而被诱导,包括关于光适配体的上述那些部分。适配体与其靶分子之间的共价键或连接也可以通过化学诱导。可包含于适配体中且用于诱导与靶形成共价键的化学基团包括但不限于醛、马来酰亚胺、丙烯酰基衍生物、重氮衍生物、硫醇等。在一些实施方案中,化学交联基团如马来酰亚胺或者重氮盐例如可以通过提供为特异性和足以增强化学反应性发生所需的反应基团的适当的环境及排列而简便地将适配体亲和性复合物转变为适配体共价复合物。在其它实施方案中,化学交联剂如醛基团可能需要加入另一种成分如氰基硼氢化钠以将适配体亲和性复合物转变为稳定的不可逆的适配体共价复合物。在再一些其它的实施方案中,适配体中不包含这样的化学交联剂;而是使用第三种制剂通过促进适配体与其靶之间的共价附着而使适配体亲和性复合物转变为适配体共价复合物。例如,含有胺反应性部分(例如N-羟基琥珀酰亚胺酯、醛或者酰亚胺酯)和核苷反应性基团(例如碘乙酰胺或活化的醛)的同型-或异型双功能试剂可以诱导适配体亲和性复合物的共价复合,如适配体与靶蛋白形成的亲和性复合物。

[0132] 光适配体可以通过首先鉴别亲和性适配体及取代一或多个光反应性核苷酸残基而鉴别。或者,光适配体可以通过包括如下步骤的SELEX方法鉴别:(a) 制备核酸的候选混合物,其中每个核酸包含(i)至少一个非光反应性占位(placeholding)嘧啶及(ii)至少一个修饰的嘧啶;(b) 将该候选混合物与靶接触,其中将相对于候选混合物对靶具有增加的亲和性的核酸与剩余的候选混合物分开;(c) 将增加亲和性的核酸与剩余的候选混合物分开;(d) 扩增增加亲和性的核酸,产生核酸配体富集的核酸混合物,从而可以鉴别靶化合物的适配体;(e) 如果需要,重复(b)-(d)步骤;(f) 通过用光反应性嘧啶置换(d)的核酸配体富集的混合物的每个核酸中一或多个非光反应性占位嘧啶产生候选光适配体;(g) 将候选光适配体与靶接触,其中形成候选光适配体-靶复合物;(h) 照射所述候选光适配体-靶复合物;(i) 确定所述候选光适配体-靶复合物是否已经光交联;(j) 如果需要,重复步骤(f)-(i);以及(k) 鉴别靶的至少一种光适配体。

[0133] 术语“检测样品”在本文是指任何材料、溶液或者混合物,其含有多种分子且可能包含至少一种靶分子。术语检测样品包括如下文定义的生物学样品,以及可用于环境或毒理学检测的样品,如污染或者潜在污染的水以及工业废水。检测样品也可以是制备方法如生产过程的终产物、中间产物或者副产物。检测样品可包含已经加入得自生物体或者一些其它来源(例如环境或工业来源)的材料、溶液或者混合物中的任何合适的测定介质、缓冲

液或者稀释液。

[0134] 术语“生物学样品”是指得自生物体的任何材料、溶液或者混合物。这包括血液(包括全血、白细胞、外周血单核的细胞、血浆和血清)、痰液、气息(breath)、尿液、精液、唾液、脑膜液(meningial fluid)、羊水、腺液(glandular fluid)、淋巴液、乳头抽吸液、支气管抽吸液、滑液、关节抽吸液、细胞、细胞提取物以及脑脊髓液。这也包括所有前文所述样品的实验分离的级分。术语“生物学样品”也包括含有均质化的固体材料的材料、溶液或者混合物,例如得自粪便样品、组织样品或者活检组织样品。术语“生物学样品”也包括衍生自组织培养物、细胞培养物、细菌培养物或者病毒培养物的材料、溶液或者混合物。

[0135] 如本文所用,“靶分子”和“靶”可互换使用,是指适配体与其可以高亲和性和特异性结合的且可能存在于检测样品中的任何感兴趣的分子。“感兴趣的分子”包括特定分子的任何微小变化,如在蛋白质情况中,在例如氨基酸序列、二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化中的微小变化,或者任何其它操纵或修饰如与基本不改变分子特性的标记成分缀合。“靶分子”或者“靶”是能结合适配体的一种类型或种类的分子或多分子结构的一组拷贝。“多种靶分子”或者“多种靶”是指一组以上这种分子。举例的靶分子包括蛋白质、多肽、核酸、碳水化合物、脂质、多糖、糖蛋白、激素、受体、抗原、抗体、affybody、抗体模拟物、病毒、病原体、毒性物质、底物、代谢物、过渡态类似物、辅因子、抑制剂、药物、染料、营养素、生长因子、细胞、组织,以及前述任何分子的任何片段或一部分。实际上可以针对任何大小的任何化学或生物学分子鉴别适配体,且因此实际上任何大小的任何化学或生物学分子可以是合适的靶。靶也可以被修饰以增强靶与适配体之间相互作用的可能性和强度。靶也可以被修饰以包括如上述定义的标签。在举例的实施方案中,靶分子是蛋白质。见发明名称为“Modified SELEX Processes Without Purified Protein”的美国专利No.6,376,190所述方法,其中SELEX靶是肽。

[0136] “多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可互换使用,是指任何长度的氨基酸聚合物。所述聚合物可以是线性或者分支的,其可包含修饰的氨基酸,且其可以由非氨基酸中断。该术语还包含已经天然修饰或者通过干预修饰的氨基酸聚合物,所述干预如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化,或者任何其它操纵或修饰,如与标记成分缀合。这个定义还包含例如含有一或多个氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸等)以及本领域已知其它修饰的多肽。多肽可以是单链或缔合链多肽。

[0137] 如本文所用,“非靶分子”和“非靶”可互换使用,是指检测样品中包含的可以与适配体形成非特异性复合物的分子。“非靶分子”或“非靶”是能结合适配体的一种类型或种类的分子或多分子结构的一组拷贝。“多种非靶分子”或“多种非靶”是指一组以上这种分子。技术人员意识到是第一种适配体的非靶的分子可能是第二种适配体的靶。同样,是第一种适配体的靶可能是第二种适配体的非靶。

[0138] 如本文所用,术语“分开(partition)”是指从检测样品中分离或除去一或多种分子种类。分开可用于增加灵敏性和/或降低背景。在适配体复合物形成之后或者当适配体亲和性复合物在交联期间由于导入的共价键而成为不可逆的时候,分开是最有效的。在适配体亲和性复合物固定的情况中,分开步骤可以在任何步骤或者在每个步骤之后导入。分开也可以依赖于适配体亲和性复合物与检测样品中其它成分之间的大小差异或者其它不同的具体性质。分开也可以通过与适配体或靶的特异性相互作用而实现。分开也可以基于适

配体、靶、适配体亲和性复合物或者适配体共价复合物的物理或生物化学性质完成。

[0139] 如本文所用,“Catch 1”是指基于适配体的捕获分开适配体亲和性复合物或者适配体共价复合物。Catch 1的目的是基本上除去检测样品中与适配体未缔合的所有成分。除去大多数这种成分通常通过从用于Catch 2捕获的靶标签标记步骤中除去非靶分子而改善靶标签标记效率且可使得测定背景降低。在一个实施方案中,在测定之前、测定准备期间或者测定期间通过为适配体附加标签而使标签附着于适配体。在一个实施方案中,所述标签是可释放标签。在一个实施方案中,所述可释放标签包含可裂解接头和标签。如上所述,标签标记的适配体可以在固体支持物上被捕获,其中所述固体支持物包含适于所述标签的捕获元件。然后可以洗涤该固体支持物以除去检测混合物中与适配体未缔合的任何材料。

[0140] 在各个实施方案中,适配体亲和性(或者共价)复合物被捕获或固定在固体支持物上,使用掺入适配体中的捕获标签(适配体标签)进行。例如如上所述,如果适配体上捕获标签是生物素,则可以使用其表面具有抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白(neutravidin)、Extravidin等的珠捕获适配体亲和性(或者共价)复合物。洗涤该珠以除去任何游离(未复合的)靶以及其它样品基质成分。

[0141] 在另一个实施方案中,所述标签是与固定在第一固体支持物上的探针互补的杂交标签。在这种情况下,固体支持物可包括微珠(例如顺磁性珠),本文所述任何其它合适的固体支持物等。杂交标签可以是加入适配体中的独特序列标签或者其可以是适配体序列的一部分或者其可以是完整适配体序列。在适配体与固体支持物通过杂交缔合之后,可以洗涤检测样品以除去与适配体未缔合的任何材料。在一个实施方案中,可以使用任何合适方法从固体支持物中释放适配体共价复合物和游离适配体以逆转杂交,例如使用高盐、低或高pH、高温或者任意组合这些条件。Catch 1中杂交标签的释放通常与保留适配体亲和性复合物不相容,因为导致标签-探针杂交破坏的条件通常导致适配体结构变性,引起适配体亲和性复合物的解离。

[0142] 在另一个实施方案中,可以使用物理技术而不是明确的适配体标签和第一固体支持物除去与适配体未缔合的成分。在一个实施方案中,这可以通过从检测样品中沉淀游离和复合的适配体,弃去上清中可以与靶标签标记剂反应的其它分子而实现。注意要设计这种方法以用于光交联测定。可以使用试剂实现这种核酸沉淀,所述试剂包括十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基三甲基溴化铵(DTAB),以及有机溶剂如乙醇。

[0143] 如本文所用,“Catch 2”是指基于靶分子的捕获分开适配体亲和性复合物或者适配体共价复合物。Catch 2步骤的目的是在检测及任选量化之前从检测样品中除去游离的或者未复合的适配体。从样品中除去游离适配体使得可以通过任何合适的核酸检测技术检测适配体亲和性或者适配体共价复合物。当使用Q-PCR检测及任选量化时,除去游离适配体是精确检测和量化靶分子所需的。

[0144] 在一个实施方案中,靶分子是蛋白质或者肽,游离适配体与适配体亲和性(或者共价)复合物(及剩余的检测样品)分开,使用可以掺入蛋白质(和肽)以及包含蛋白质(或者肽)的复合物如适配体亲和性(或者共价)复合物中的试剂进行。标签标记的蛋白质(或者肽)和适配体亲和性(或者共价)复合物可以固定在固体支持物上,使得可以将蛋白质(或者肽)与适配体亲和性(或者共价)复合物与游离适配体分开。这种标签标记可包括例如可以掺入蛋白质或肽中的生物素部分。

[0145] 在一个实施方案中,Catch 2标签在测定之前、准备测定期间或者在测定期间通过使标签化学附着于靶而附着于蛋白质(或者肽)。在一个实施方案中,Catch 2标签是可释放标签。在一个实施方案中,所述可释放标签包含可裂解接头和标签。然而,通常非必需从Catch 2固体支持物中释放蛋白质(或者肽)。如上所述,标签标记的靶可以被捕获在第二固体支持物上,其中所述固体支持物包含适于靶标签的捕获元件。然后洗涤该固体支持物以从溶液中除去游离适配体。

[0146] 在一个实施方案中,针对Catch 2导入的靶标签与用于Catch 1的适配体上的标签相同。在这个实施方案中,靶标签标记在Catch 1步骤之后以及在导入Catch 2固体支持物之前进行。在一个实施方案中,如果靶标签标记在Catch 1支持物上进行,Catch 1支持物上未被适配体占据的位点在标签标记靶之前可以被封闭。

[0147] 在另一个实施方案中,所述适配体亲和性复合物或者适配体共价复合物可以直接通过与第二固体支持物上的捕获试剂缔合而被捕获在第二固体支持物上。在这个实施方案中不需要明确的靶标签标记。在一个实施方案中,第二固体支持物含有结合靶分子的抗体。在另一个实施方案中,所述支持物含有结合靶分子的Fc片段。在另一个实施方案中,当靶分子是IgG、IgM、IgA或者IgE时,所述支持物可含有结合靶蛋白的蛋白质A。结合适配体亲和性或者适配体共价复合物中靶分子的任何捕获试剂均可用于Catch 2步骤。

[0148] 在另一个实施方案中,可以使用物理技术而不是明确的靶标签和第二固体支持物除去游离适配体。在一个实施方案中,在靶分子是蛋白质或肽的情况中,这通过沉淀适配体共价复合物以及弃去上清中的游离适配体而实现[注意这种方法仅适于共价复合物]。这种蛋白质或肽沉淀可以使用SDS和高盐(例如通常是 K^+)实现。在SDS- K^+ 沉淀之后可以回收适配体共价复合物进行量化。

[0149] 在通过洗涤第二固体支持物除去游离适配体之后,对适配体亲和性复合物进行解离步骤,其中所述复合物被破坏产生游离适配体,而靶分子通常通过探针与靶捕获标签的结合相互作用而保持结合固体支持物。可以通过破坏适配体或者靶结构的任何方法从适配体亲和性复合物中释放适配体。这可以通过在高盐缓冲液中洗涤支持物结合适配体亲和性复合物使得非共价结合的适配体-靶复合物解离而实现。收集并检测洗脱的游离适配体。在另一个实施方案中,使用高或低pH破坏适配体亲和性复合物。在另一个实施方案中,使用高温解离适配体亲和性复合物。在另一个实施方案中,可以使用上述方法的任何组合。

[0150] 在适配体共价复合物的情况中,使用适配体构建体中可裂解接头完成适配体的释放以进行随后的量化。在另一个实施方案中,靶标签中的可裂解接头导致适配体共价复合物的释放。

[0151] 如本文所用,“竞争剂分子”和“竞争剂”可互换使用,是指可以与非靶分子形成非特异性复合物例如阻止非靶分子与适配体形成非特异性再结合的任何分子。“竞争剂分子”或者“竞争剂”是一种类型或种类分子的一组拷贝。“多种竞争剂分子”或者“多种竞争剂”是指一组以上这种分子。竞争剂分子包括寡核苷酸、聚阴离子(例如肝素、鲑鱼精DNA、单链鲑鱼精DNA以及多葡聚糖(例如硫酸葡聚糖))、无碱基(abasic)磷酸二酯聚合物、dNTP以及焦磷酸盐/酯。在使用竞争剂的动力学攻击中,竞争剂也可以是可与游离适配体形成非特异性复合物的任何分子,例如以阻止适配体与非靶分子形成非特异性再结合。这种竞争剂分子包括聚阳离子(例如精胺、亚精胺、聚赖氨酸和聚精氨酸)以及氨基酸(例如精氨酸和赖氨酸)。

酸)。当竞争剂用作动力学攻击时,使用相对于样品中存在的总蛋白质或者总适配体的预期浓度相当高的浓度进行。在一个实施方案中,在动力学攻击中使用大约10mM硫酸葡聚糖作为竞争剂。在一个实施方案中,动力学攻击包括向含有适配体亲和性复合物的混合物中加入竞争剂,并将含有适配体亲和性复合物的混合物保温一段时间,这段时间大于或等于大约30秒、大约1分钟、大约2分钟、大约3分钟、大约4分钟、大约5分钟、大约10分钟、大约30分钟和大约60分钟。在另一个实施方案中,动力学攻击包括向含有适配体亲和性复合物的混合物中加入竞争剂并将含有适配体亲和性复合物的混合物保温一段时间,由此适配体亲和性复合物的测量水平与非特异性复合物的测量水平的比率增加。

[0152] 在一些实施方案中,通过用结合缓冲液或者不显著增加适配体亲和性复合物的自然解离速率的任何其它溶液稀释检测样品进行动力学攻击。稀释倍数可以是大约2X、大约3X、大约4X、大约5X或者任何合适的更高稀释倍数。较高的稀释倍数通过在稀释后降低总蛋白质和适配体的浓度并因此降低其再缔合速度而提供更有效的动力学攻击。如果使用稀释导入动力学攻击,随后含有适配体亲和性复合物的检测样品混合物可以在进一步处理之前浓缩。如果可用,可以通过使用本文关于任选分开任何游离适配体与检测样品和/或任选除去检测样品中可以与标签标记剂反应的其它成分描述的方法进行这种浓缩。当使用稀释进行动力学攻击时,鉴于初始检测样品体积及从最终(稀释的)体积中回收适配体亲和性复合物而不引起复合物明显丧失的愿望,选择尽可能高的稀释量。在一个实施方案中,稀释适配体亲和性复合物并将混合物保温 $\geq$ 大约30秒, $\geq$ 大约1分钟, $\geq$ 大约2分钟, $\geq$ 大约3分钟, $\geq$ 大约4分钟, $\geq$ 大约5分钟, $\geq$ 大约10分钟, $\geq$ 大约30分钟,和 $\geq$ 大约60分钟。在另一个实施方案中,稀释适配体亲和性复合物并将含有适配体亲和性复合物的混合物一段时间,由此适配体亲和性复合物的测量水平与非特异性复合物的测量水平的比率增加。

[0153] 在一些实施方案中,以这样的方式进行动力学攻击,即同时实现样品稀释的作用以及导入竞争剂的作用。例如,可以用大体积的竞争剂稀释检测样品。组合这两种动力学攻击策略可提供比使用一种策略更有效的动力学攻击。在一个实施方案中,稀释倍数可以是大约2X、大约3X、大约4X、大约5X或者任何合适的更高稀释倍数,竞争剂是大约10mM硫酸葡聚糖。在一个实施方案中,动力学攻击包括稀释含有适配体亲和性复合物的混合物、向含有适配体亲和性复合物的混合物中加入竞争剂、并将含有适配体亲和性复合物的混合物保温一段时间,这段时间大于或等于大约30秒、大约1分钟、大约2分钟、大约3分钟、大约4分钟、大约5分钟、大约10分钟、大约30分钟和大约60分钟。在另一个实施方案中,动力学攻击包括稀释含有适配体亲和性复合物的混合物、向含有适配体亲和性复合物的混合物中加入竞争剂并将含有适配体亲和性复合物的混合物保温一段时间,由此适配体亲和性复合物的测量水平与非特异性复合物的测量水平的比率增加。

[0154] 在多个实施方案中,使用掺入适配体中的标签(适配体标签)或者附着于靶的标签将适配体亲和性(或者共价)复合物捕获或固定在固体支持物上。例如,如果适配体上的标签是生物素,可以使用其表面上具有捕获元件如抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、Extravidin等的珠捕获适配体亲和性(或者共价)复合物。洗涤珠以除去任何游离(未复合)的靶。

[0155] 如本文所揭示,适配体可进一步包含“标签”,其是指提供使适配体(以及与其结合的任何靶分子)附着或固定于固体支持物的成分。“标签”是能与“捕获元件”缔合的一种类

型或种类的成分的一组拷贝。“多种标签”或“多种捕获元件”是指一组以上这样的成分。可以通过任何合适方法使标签附着于或者包含于适配体中。通常标签使适配体直接或间接与附着于固体支持物的捕获元件或受体缔合。捕获元件典型地被选择(或者设计),由此其与标签高特异性相互作用且在随后的处理步骤或程序期间保持这种缔合。标签能使适配体亲和性复合物(或者共价适配体亲和性复合物)定位于固体支持物上空间限定的地址。因此,不同标签可以使不同适配体共价复合物定位于固体支持物上不同的空间限定的地址。标签可以是多核苷酸、多肽、肽核酸、锁定核酸、寡糖、多糖、抗体、affybody、抗体模拟物、细胞受体、配体、脂质、生物素、聚组氨酸,或者这些结构的任何片段或衍生物,前述这些材料的任意组合,或者利用其可以设计或者构型捕获元件(或者如下文所述接头分子)以特异性结合或者另外缔合的任何其它结构。通常标签被构型为自身或者与附着其的适配体或者其一部分不发生分子内相互作用。如果SELEX用于鉴别适配体,标签可以在SELEX前或后加入适配体。在一个实施方案中,标签包含在SELEX后适配体的5'-末端。在另一个实施方案中,标签包含在SELEX后适配体的3'-末端。在再一个实施方案中,标签可以包含在SELEX后修饰方法的适配体的3'和5'两个末端上。在另一个实施方案中,标签可以在适配体的内部片段。

[0156] 在一个实施方案中,标签是生物素基团,捕获元件是生物素结合蛋白如抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、Extravidin。这种组合可以便利地用于各种实施方案中,因为生物素在合成期间易于掺入适配体中且链霉抗生物素蛋白珠易于获得。

[0157] 在一个实施方案中,标签是聚组氨酸,捕获元件是与金属离子螯合的氨基三乙酸(NTA),所述金属离子如镍、钴、铁或者当与NTA螯合时能与聚组氨酸形成配位化合物的任何其它金属离子。

[0158] 在一个实施方案中,标签是多核苷酸,其被设计为与含有互补多核苷酸序列的捕获元件直接杂交。在这种情况下,标签有时称作“序列标签”,捕获元件通常称作“探针”。在这个实施方案中,标签通常被构型且杂交反应在一定条件下进行,由此所述标签不与除了该标签完全互补的探针之外的探针杂交。这样可以设计多元测定形式,因为每个标签/探针组合可具有独特的序列。

[0159] 在一些实施方案中,标签包含是适配体自身一部分的核苷酸。例如,如果使用SELEX鉴别适配体,则适配体通常包含通过核苷酸序列与3'-固定末端分离的5'-固定末端,所述核苷酸序列根据适配体而变化,即是可变区。在一个实施方案中,标签可包含任何合适数目的核苷酸,其包含于适配体的固定末端内,如全部固定末端或者固定末端的任何部分,包括固定末端内部的核苷酸。在另一个实施方案中,标签可包含任何合适数目的核苷酸,其包含在适配体可变区内,如全部可变区或者可变区的任何部分。在进一步的实施方案中,标签可包含任何合适数目的核苷酸,其与可变区及一个固定末端重叠,即所述标签可包含包括可变区任何部分(包括全部)以及固定末端任何部分(包括全部)的核苷酸序列。

[0160] 在另一个实施方案中,标签可以与探针直接缔合及与探针共价结合,从而使适配体与固体支持物的表面共价连接。在这个实施方案中,标签与探针可包含合适的反应基团,在标签与探针缔合时该反应基团足以彼此接近以经历化学反应,产生共价键。该反应可自然发生或者可需要激活如光-激活或者化学激活。在一个实施方案中,标签包含二烯部分,探针包含二烯亲合物,且共价键形成得自二烯与二烯亲合物的自发Diels-Alder缀合反应。任何合适的互补化学反应均可使用,例如N-Mannich反应、二硫键形成、Curtius反应、Aldol

缩合、Schiff碱形成以及Michael加成。

[0161] 在另一个实施方案中,标签与探针间接缔合,如通过接头分子间接缔合,如下文进一步描述。在这个实施方案中,标签可包含与接头分子的特定区或成分互补的多核苷酸序列。标签通常被构型且进行杂交反应,由此标签不与除包含于接头分子中的多核苷酸序列之外的多核苷酸序列杂交。

[0162] 如果标签包含多核苷酸,则所述多核苷酸可包含任何合适数目的核苷酸。在一个实施方案中,标签包含至少大约10个核苷酸。在另一个实施方案中,标签包含大约10至大约45个核苷酸。在再一个实施方案中,标签包含至少大约30个核苷酸。包含多核苷酸的不同标签可包含相同数目核苷酸或者不同数目核苷酸。

[0163] 在一些实施方案中,标签成分是双功能的,其包含与如下所述固体支持物上捕获元件或者“探针”特异性相互作用的功能性(探针缔合成分),以及使其附着的分子与标签的探针缔合成分解离的功能性。使标签的探针缔合成分解离的方式包括化学方式、光化学方式或者根据所用特定标签的其它方式。

[0164] 在一些实施方案中,标签附着于适配体。在其它实施方案中,标签附着于靶分子。标签可以在适配体结合步骤之前附着于靶分子,或者可以在已经实现结合平衡(或者光交联)之后附着于靶分子或者适配体亲和性(或者共价)复合物。

[0165] 如本文所用,“捕获元件”、“探针”或者“受体”是指构型为直接或者间接缔合标签的分子。“捕获元件”、“探针”或者“受体”是通过直接或者间接缔合标签而能将标签附着的部分固定于固体支持物的一种类型的分子或者一种类型的多分子结构的一组拷贝。“多种捕获元件”、“多种探针”或者“多种受体”是指一组以上这种分子。捕获元件、探针或受体可以是多核苷酸、多肽、肽核酸、锁定核酸、寡糖、多糖、抗体、affybody、抗体模拟物、细胞受体、配体、脂质、生物素、聚组氨酸,或者这些结构的任何片段或衍生物,前述这些结构的任意组合,或者利用其可以设计或构型标签(或者接头分子)以特异性结合或者另外缔合的任何其它结构。捕获元件、探针或受体可以通过任何合适方法共价或非共价附着于固体支持物。

[0166] 虽然术语“捕获元件”、“探针”和“受体”可互换使用,但是探针通常是指多核苷酸序列。在一个实施方案中,探针包含具有与多核苷酸标记序列互补的序列的多核苷酸。在这个实施方案中,探针序列通常被构型且在一定条件下进行杂交反应,由此探针不与除了探针包含互补序列的标签之外的核苷酸序列杂交(即探针通常被构型且在一定条件下进行杂交反应,由此探针不与不同标签或适配体杂交)。

[0167] 在另一个实施方案中,探针例如通过接头分子与标签间接缔合。在这个实施方案中,探针可包含与接头分子的特定区或成分互补的多核苷酸序列。探针通常被构型且进行杂交反应,由此探针不与除了接头分子内包含的多核苷酸序列之外的多核苷酸序列杂交。

[0168] 如果探针包含多核苷酸,该多核苷酸可包含任何合适数目的核苷酸。在一个实施方案中,探针包含至少大约10个核苷酸。在另一个实施方案中,探针包含大约10至大约45个核苷酸。在再一个实施方案中,探针包含至少大约30个核苷酸。包含多核苷酸的不同探针可包含相同数目或不同数目的核苷酸。

[0169] 在一些实施方案中,捕获探针是双功能的,即其包含与多核苷酸标签特异性相互作用的功能性以及使探针与固体支持物解离的功能性,由此探针与适配体同时被释放。使

探针与固体支持物解离的方式包括化学方式、光化学方式或者根据所用特定捕获探针的其它方式。

[0170] 由于特定标签与捕获元件对之间相互作用的交互性质,一个实施方案中的标签在另一个实施方案中可用作捕获元件,一个实施方案中的捕获元件在另一个实施方案中可用作标签。例如,在一个实施方案中,具有生物素标签的适配体可以用附着于固体支持物的链霉抗生物素蛋白捕获;而在另一个实施方案中,具有链霉抗生物素蛋白标签的适配体可以用附着于固体支持物的生物素捕获。

[0171] 在一些实施方案中,希望将适配体亲和性(或者共价)复合物固定于固体支持物上,使得可以分离适配体亲和性(或者共价)复合物及除去游离适配体。在一个实施方案中,使用与靶分子高反应性而与适配体低反应性(或者理想地无反应性)的试剂将标记加入亲和性(或者共价)复合物的靶分子中。在这个实施方案中,设计标签,由此实现适配体亲和性复合物的靶标签标记,而亲和性复合物很少或者不解离,例如在与亲和性相互作用相容且不改变所述靶或适配体的构象的pH和离子强度下以及在每个靶分子上不导入大量标签由此不影响与适配体的相互作用的标签标记程度下进行。适配体共价复合物的靶标签标记未呈现出这些限制,且可以在适于有效标签标记的任何条件下实现。

[0172] 在一些实施方案中,重要的是保证所述标签标记试剂标签标记检测样品中存在的大多数(如果不是全部)蛋白质,但是趋于不标签标记或者仅最低限度地标签标记该测定的核酸或者其它成分,如固体支持物。在蛋白质上发现的而不是在核酸或者基质表面上发现的任何反应性化学基团均可以作为共价附着位点。举例的反应性化学基团包括伯胺(例如赖氨酸残基上)、硫醇(例如半胱氨酸上,其可以通过还原二硫键而产生)、醇(例如丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸上,及糖蛋白上的糖部分(包括这些糖上顺式-二醇的氧化产物))以及羧酸盐/酯(例如谷氨酸和天冬氨酸上)。在一个实施方案中,标签标记试剂包含N-羟基琥珀酰亚胺激活的标签,其优先与蛋白质或肽上的赖氨酸残基反应。

[0173] 标签标记不同适配体亲和性(或者共价)复合物的最佳条件可以不同,且通常根据经验确定优化方法的灵敏性。在一个实施方案中,标签标记剂的浓度通常足以检测至少大约1%的靶分子。在另一个实施方案中,标记剂的浓度通常足以检测至少大约10%的靶分子。在进一步的实施方案中,标签标记剂的浓度通常足以检测至少大约90%的靶分子。

[0174] 在一个实施方案中,靶是蛋白质或者肽,标签是附着于靶的生物素,使用蛋白质生物素化的标准试剂如NHS-PEO4-生物素。其它合适的试剂包括Sulfo-NHS-LC-生物素、PFP-生物素、TFP-PEO3-生物素,或者可用于使标签附着于蛋白质的任何其它合适的试剂。

[0175] 如本文所用,接头是用于连接两个官能团或分子结构的分子结构。如本文所用,“间隔接头”或者更简便的“间隔序列”是指一组良性(benign)原子,其在适配体内两个不同官能团之间提供分离或间隔。如本文所用,“可释放”或者“可裂解”元件、部分或者接头是指可以被破坏产生两个单独成分分子结构。可释放(或者可裂解)元件可以包含一个分子,其中化学键可以被破坏(在本文称作“inline可裂解接头”),或者其可以包含两或多个分子,其中非共价相互作用可以被破坏或分裂(在本文称作“杂交接头”)。

[0176] 在一些实施方案中,需要在空间上将某些官能团与其它官能团分离,以防止干扰个体功能性。例如,与光可裂解基团接近的吸收一定波长光的标记的存在可干扰光裂解的效率。因此希望用非干扰部分分离这些基团,提供足够的空间间隔以例如恢复光裂解的全

部活性。在一些实施方案中，“间隔接头”已经导入具有标记和光裂解功能性二者的适配体中。

[0177] 在一个实施方案中，在合成期间将间隔接头导入适配体中，该接头可以包含许多亚磷酸胺间隔序列组成，包括但不限于长度为3、6、9、12和18个碳原子的脂肪族碳链，长度为1、3和9个乙二醇单位的聚乙二醇链，或者四氢呋喃部分（称作dSpacer (Glenn Research)）或者前述结构的任意组合或者可以设计或构型为沿着磷酸二酯主链增加长度的任何其它结构或化学成分。在另一个实施方案中，间隔接头包含多核苷酸，如poly dT、dA、dG或dC，或者poly U、A、G或C，或者前述多核苷酸的任意组合。在另一个实施方案中，间隔序列包含一或多个无碱基核糖或脱氧核糖部分。注意要设计这种序列，由此其不干扰适配体的结构或功能。

[0178] 如本文所用，“inline可裂解接头”是指含有可释放或可裂解元件的一组原子。在一些实施方案中，inline可裂解接头用于连接适配体与标签，从而形成可释放标签。例如，inline可释放接头可用于任何所述测定中，在适配体与生物素之间产生可释放连接（例如在亲和性测定和交联测定中）或者在适配体与光交联基团之间产生可释放连接（例如在交联测定）中。

[0179] 在一个实施方案中，inline可裂解接头可以是光可裂解的，其包含通过以适当波长光照射可释放元件而可被裂解的键。在另一个实施方案中，inline可裂解接头可以是化学可裂解的，其包含通过用合适化学或酶试剂处理可以裂解的键。在另一个实施方案中，可释放元件包含通过用还原剂处理破坏其键而可以裂解的二硫键。

[0180] 如本文所用，“杂交接头”是指包含两或多个分子的接头，其中非共价相互作用可以通过化学或物理方法破坏或分裂。在一些实施方案中，杂交接头用于连接适配体与标签，从而形成可释放标签。例如，杂交接头可用于任何所述测定中，在适配体与生物素之间产生可释放连接（例如在亲和性测定和交联测定中）或者在适配体与光交联基团之间产生可释放连接（例如在交联测定中）。

[0181] 在一个实施方案中，杂交接头包含杂交形成非共价键的两个核酸。在一个实施方案中，形成杂交连接的一个核酸可以是适配体自身的区域，另一个核酸可以是与该区域互补的核酸。释放可以通过破坏核酸双链体的任何合适机制（同时仍保持与该测定的相容性）实现。在一个实施方案中，在双捕获光交联测定中使用20mM NaOH破坏杂交接头。杂交接头分子可具有任何合适构象且可包含任何合适成分，包括一或多种多核苷酸、多肽、肽核酸、锁定核酸、寡糖、多糖、抗体、affybody、抗体模拟物或片段、受体、配体、脂质，这些结构的任何片段或衍生物，前述结构的任意组合，或者可以被设计或构型形成可释放结构的任何其它结构或化学成分。

[0182] 在一个实施方案中，可释放标签由至少一个多核苷酸组成，所述多核苷酸由合适数目的核苷酸组成。在一个实施方案中，接头分子的多核苷酸成分包含至少大约10个核苷酸。在另一个实施方案中，接头分子的多核苷酸成分包含大约10至大约45个核苷酸。在再一个实施方案中，接头分子的多核苷酸成分包含至少大约30个核苷酸。本发明揭示的任何方法中使用的接头分子可包含具有相同数目或不同数目核苷酸的多核苷酸成分。

[0183] “固体支持物”是指具有分子可以直接或者通过共价或非共价键间接附着的表面的任何基质。固体支持物可包含能为附着于表面的捕获元件或探针提供物理支持的任何基

质材料。所述材料通常能持久保持捕获元件或探针与其表面附着以及在实施测定期间遇到的任何随后的处理、操作或者加工的条件。所述材料可以是天然发生的、合成的或者对天然发生的材料进行修饰的材料。合适的固体支持物材料可包含硅、硅晶片芯片、石墨、镜面、薄片、膜、陶瓷、塑料(包括聚合物如聚氯乙烯,环烯共聚物,琼脂糖凝胶或珠,聚丙烯酰胺,聚丙烯酸酯,聚乙烯,聚丙烯,聚-4-甲基丁烯,聚苯乙烯,聚甲基丙烯酸酯,聚对苯二甲酸乙二酯,聚四氟乙烯(PTFE或Teflon[®]),尼龙,聚乙烯醇丁酸酯(poly(vinyl butyrate))、锗、砷化镓、金、银、Langmuir Blodgett膜、流控芯片等,单独使用或者联合其它材料一起使用。可以考虑其它刚性材料,如玻璃,包括二氧化硅及进一步包括如Bioglass。可用的其它材料包括有孔材料如受控有孔玻璃珠、交联的珠状Sepharose[®]或者琼脂糖树脂,或者交联的双-丙烯酰胺和氮代内酯(azalactone)共聚物。其他珠包括聚合物珠、固体核珠(solid core bead)、顺磁珠或微珠。也包含本领域已知的在其表面可以掺入一或多个官能团如任何氨基、羧基、硫醇或者羟基官能团的任何其它材料。

[0184] 用于固体支持物的材料可采用从简单到复杂的多种构型。固体支持物可具有任一种形状,包括条状、平板、盘状、杆状、颗粒,珠、管、孔(微滴定板)等。固体支持物可以是有孔或无孔的、磁性、顺磁性或者无磁性的、多分散或单分散的、亲水性或者疏水性的。固体支持物也可以是密闭包装的凝胶或泥浆形式(如在柱基质中)或者松散包装的颗粒。

[0185] 在一个实施方案中,具有附着的捕获元件的固体支持物用于从检测混合物中捕获标签标记的适配体亲和性复合物或者适配体共价复合物。在一个特定实例中,当标签是生物素部分时,固体支持物可以是链霉抗生物素蛋白包被的珠或者树脂,如Dynabeads M-280Streptavidin、Dynabeads MyOne Streptavidin、Dynabeads M-270Streptavidin (Invitrogen)、Streptavidin Agarose Resin(Pierce)、Streptavidin Ultralink Resin、MagnaBind Streptavidin Beads(ThermoFisher Scientific)、BioMag Streptavidin、ProMag Streptavidin、Silica Streptavidin(Bangs Laboratories)、Streptavidin Sepharose High Performance(GE Healthcare)、Streptavidin Polystyrene Microspheres(Microspheres-Nanospheres)、Streptavidin Coated Polystyrene Particles(Spherotech),或者本领域技术人员常用于捕获生物素标记的分子的任何其它链霉抗生物素蛋白包被的珠或树脂。

[0186] 如上所述,本发明的一个目的是将蛋白质信号转变为适配体信号。结果,收集/检测的适配体的数量表示样品中结合的靶分子的数量或者靶分子的数量并与其成正比。可以使用许多检测方案,而不用在Catch 2分开之后从第二固体支持物中洗脱适配体亲和性或者适配体共价复合物。除了如下检测方法的实施方案之外,本领域技术人员已知其它检测方法。

[0187] 许多检测方法需要在检测之前将明确的标记掺入适配体中。在这些实施方案中,通过使用核酸合成标准技术在合成期间或之后可以将标记如荧光或化学发光染料掺入适配体中。使用与合适试剂的标准酶反应可以在合成期间或者合成之后掺入放射性标记。通过使用适当酶促技术,标记也可以在Catch 2分开和洗脱之后发生。例如,使用具有上述标记的引物,PCR使标记掺入洗脱的适配体的扩增产物中。当使用凝胶技术量化时,使用PCR可以掺入不同大小的质量(mass)标记。为了额外的多元能力,这些质量标记也可以掺入不同的荧光或化学发光染料。通过使用掺入适配体中的特异性标签在合成期间或者在合成之后

将标记间接加入适配体中,然后加入与所述标签缔合且携带标记的探针。所述标记包含上述那些标记以及例如在生色读数标准测定中使用的酶。这些酶与酶底物联合作用,包括酶例如辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (AP)。标记还可包括是用于电化学检测的电化学官能团的材料或化合物。

[0188] 例如,适配体可以如上所述用放射性同位素如³²P标记,之后与检测样品接触。应用上述四种基本测定中任一种测定及其修改形式,可以通过在测定结束时量化第二固体支持物上的放射性简便地完成适配体检测。放射性的计数与原始检测样品中靶的量成正比。相似地,如上所述在与检测样品接触之前用荧光染料标记适配体可以直接在第二固体支持物上简便地进行荧光读数。化学发光标记或者量子点可以相似地用于从第二固体支持物直接读数,不需要适配体洗脱。

[0189] 通过从第二固体支持物中洗脱或释放光适配体共价复合物,可以使用除了上述方案之外的其它检测方案。例如,释放的适配体、光适配体或者光适配体共价复合物可以在PAGE凝胶上运行且使用核酸染色法如SYBR Gold检测及任选量化。或者释放的适配体、光适配体或者光适配体共价复合物可以通过使用毛细管凝胶电泳 (CGE) 使用上述掺入适配体中的荧光标记进行检测和量化。另一种检测方案应用定量PCR检测和量化洗脱的适配体,例如使用SYBR Green进行。或者可以使用Invader®DNA测定检测和量化洗脱的适配体。

[0190] 在另一个实施方案中,在复制期间使用“分子信标”确定适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)的量或浓度(见例如Tyagi et al., Nat. Biotech. 16:49-53, 1998; 美国专利No. 5,925,517)。分子信标是特异的核酸探针,其折叠成发夹环且在发夹结构的一个末端含有荧光团及在另一末端含有猝灭剂,由此当发夹形成时由荧光团产生的信号很少或无信号。所述环序列特异于靶多核苷酸序列,且在与适配体序列杂交时发夹解折叠,从而产生荧光信号。

[0191] 对于仍结合第二固体支持物的少量适配体的多元检测,具有不同激发/发射光谱的荧光染料可用于检测和量化2、或者3、或者5、或者直至10个单独的适配体。相似地,不同大小的量子点可用于多元读数。所述量子点可以在游离适配体与第二固体支持物分开之后导入。通过使用附着于独特量子点的适配体特异性杂交序列,可以进行2、3、5及直至10个适配体的多元读数。用可以单独检测的不同放射性同位素标记不同适配体也可以用于有限的多元读数,所述放射性同位素例如是³²P、¹²⁵I、³H、¹³C和³⁵S。

[0192] 为了多元检测从Catch 2第二固体支持物中释放的适配体,如上所述掺入每个适配体中的单一荧光染料可以与量化方法一起使用,使得可以鉴别适配体序列以及量化适配体水平。所述方法包括但不限于DNA芯片杂交、微珠杂交以及CGE分析。

[0193] 在一个实施方案中,使用标准DNA杂交阵列或芯片使每个适配体或者光适配体与固定在载玻片或者芯片上的一个独特的或者一系列独特的探针杂交,如Agilent阵列、Illumina BeadChip阵列或者NimbleGen阵列。每个独特的探针均与适配体上的序列互补。所述互补序列可以是掺入适配体中的独特的杂交标签,或者是适配体序列的一部分,或者是完整的适配体序列。将从Catch 2固体支持物中释放的适配体加入合适的杂交缓冲液中,使用标准杂交方法处理。例如,将该适配体溶液与DNA杂交阵列在大约60℃保温12小时以保证杂交严格性。洗涤该阵列,然后在荧光玻片扫描仪中扫描,产生每个阵列每一特征上的适配体杂交强度的图像。使用图像处理软件如ArrayVision完成图像分割和量化。在一个实施

方案中,多元适配体测定可以使用直至25、50、100、200、500、1000以及直至10,000个适配体检测。

[0194] 在一个实施方案中,具有与上述适配体互补的独特DNA探针的可寻址的微珠用于杂交。所述微珠可以用独特的荧光染料寻址,如Luminex珠技术,或者使用条形码标志,如在Illumina VeraCode技术中,或者使用激光动力发射器。在一个实施方案中,将从Catch 2固体支持物中释放的适配体加入合适的杂交缓冲液中,并使用标准微珠杂交方法处理。例如将该适配体溶液与一组微珠在大约60℃保温2小时以保证杂交的严格性。然后将该溶液在Luminex仪器上处理,计数各个珠类型及量化适配体荧光信号。在另一个实施方案中,将VeraCode珠与适配体溶液接触并在大约60℃杂交2小时,然后沉积在有网格的表面上,使用玻片扫描仪扫描进行鉴别和荧光量化。在另一个实施方案中,将发射器微珠与适配体样品在大约60℃保温,然后使用适于发射器微珠的装置量化。在一个实施方案中,多元适配体测定可以通过与微珠杂交进行检测,使用直至25、50、100、200以及直至500个适配体。

[0195] 可以对含有洗脱的适配体的样品进行处理以如上述掺入独特的质量标签以及荧光标记。然后将质量标记的适配体注射进CGE仪器、基本上是DNA测序仪中,在标记反应期间通过其独特的质量鉴别适配体并使用掺入的染料的荧光进行量化。一种举例的这种技术由Althea Technologies开发。

[0196] 在上述许多方法中,可以在量化之前扩增适配体溶液及任选标签标记。可以使用从Catch 2固体支持物中洗脱的适配体溶液进行标准PCR扩增。可以在DNA阵列杂交、微珠杂交和CGE读数之前进行这种扩增。

[0197] 在另一个实施方案中,使用Q-PCR检测和/或量化适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)。如本文所用,“Q-PCR”是指以这样的方式及在这样的受控条件下进行的PCR反应,由此测定结果是量化的,即所述测定能量化检测样品中存在的适配体的量或浓度。

[0198] 在一个实施方案中,检测样品中适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)的量或浓度通过使用TaqMan[®] PCR确定。这种技术通常依赖于寡核苷酸复制酶的5'-3'核酸外切酶活性,从靶定序列中产生信号。基于待量化的适配体的序列选择TaqMan探针,且通常包含5'-末端荧光团如6-羧基荧光素,以及3'-末端猝灭剂如6-羧基四甲基荧光素,由于使用聚合酶链反应(PCR)扩增适配体而产生信号。由于聚合酶拷贝适配体序列,因此核酸外切酶活性使荧光剂荧光团从探针释放,其从PCR引物下游退火,从而产生信号。信号随着复制产物的产生而增加。PCR产物的量依赖于进行复制循环的次数以及适配体的起始浓度。

[0199] 在另一个实施方案中,在复制期间使用嵌入荧光染料确定适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)的量或浓度。嵌入染料如SYBR[®] green在存在双链DNA条件下与存在单链DNA条件下产生的荧光信号相比产生大量荧光信号。由于双链DNA产物在PCR期间形成,染料产生的信号增加。产生的信号的量级依赖于PCR循环次数和适配体的起始浓度。

[0200] 在另一个实施方案中,使用质谱分析检测和/或量化适配体亲和性复合物(或者适配体共价复合物)。可以使用上述酶技术导入独特的质量标签。对于质谱分析读数,不需要检测标记,是质量自身用于鉴别及使用本领域技术人员常用的技术基于在质谱分析期间产生的质量峰的位置和面积进行量化。例如使用的质谱分析是Sequenom开发的

MassARRAY®系统。

[0201] 在其他实施方案中,本发明提供了包含不同内置功能性的适配体构建体。这些功能性可包含用于固定的标签、用于检测的标记、光反应性基团、促进或控制分离的手段等。在一个实施方案中,适配体在适配体序列中包含可裂解或可释放部分(也称作元件或成分)。这些额外的成分或元件是结构元件或成分,其为适配体导入额外的功能性。在其它实施方案中,适配体包含一或多个如下额外的成分(也称作功能性或结构元件或成分或部分):标记的或可检测的成分,间隔序列成分,可裂解元件以及特异性结合标签或者固定元件或成分。例如,在光交联适配体的一个实施方案中,适配体包含通过如下结构与适配体连接的标签:可裂解部分、标记、分离标记与可裂解部分的间隔序列成分,以及光交联部分,如图3L所示。

[0202] 所有适配体构建体均可以通过使用标准亚磷酰胺化学方法合成。代表性的适配体构建体在图3A至图3L中示出。所述功能性可以在5'与3'末端之间分裂,或者在任一端组合。除了光可裂解部分之外,可以使用其它可裂解部分,包括化学或酶促可裂解部分。可以使用许多间隔序列部分,且可以包含一或多个生物素部分。也可以掺入除了生物素之外的标签(也称作固定或特异性结合元件或成分)。合适的构建试剂包括生物素亚磷酰胺、PC接头(Glen Research PN 10-4920-02);PC生物素亚磷酰胺(Glen Research PN 10-4950-02);dSpacer CE亚磷酰胺(Glen Research PN 10-1914-02);Cy3亚磷酰胺(Glen Research PN 10-5913-02);以及Arm26-Ach Spacer Amidite(Fidelity Systems PN SP26Ach-05)。如图3K例证,可以在适配体的末端加入荧光染料(如Cy3)、间隔序列、光可裂解和生物素部分。在一个实施方案中,由于光可裂解部分与染料之间的潜在相互作用,在这两个部分之间插入间隔序列。

[0203] 在一个实施方案中,如图3I-3K例证,使标签共价附着于适配体。在另一个实施方案中,标签以杂交的多核苷酸序列形式间接附着于适配体,其与适配体序列的一部分互补,具有共价附着的标签,如图3E-3H例证。

[0204] 在一个实施方案中,适配体可被进一步修饰为包含位于适配体内交联基团与独特序列之间的第一可裂解部分。所述第一可裂解部分可以通过许多不同方式裂解,包括基于所用可裂解部分而通过化学、光化学或者离子方式裂解。在一个实施方案中,适配体具有图3B所示结构。例如,光交联基团可以是4-叠氮-2-硝基-苯胺,光可裂解基团或者可释放部分可以是得自Glen Research的PC接头,如亚磷酰胺(-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-1-(2-硝基苯基)-丙-1-基-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺)。

[0205] 在其它实施方案中,适配体包含通过可释放基团连接适配体的捕获标签。例如,生物素捕获标签可以通过与适配体杂交的第二个寡核苷酸附着于适配体,如图3F例证。在其它实施方案中,其它捕获标签或者可裂解元件可以附着于同一适配体。例如,聚-His标签可以通过第二个化学或者光可裂解部分附着于适配体。这种适配体构建体的优势是可以使用两个不同处理步骤分离适配体亲和性(或者共价)复合物与检测样品中的其它成分。这些分离步骤可以任何希望的顺序使用。

[0206] 在另一个实施方案中,检测标记也可以包含于适配体中,如图3C所示。这种检测标记使得可以在上文详细描述的最后步骤中检测和/或量化游离适配体。例如,对于荧光检测,可以将荧光染料如Cy3或者Cy5染料掺入适配体内。Cy3可以使用来自Glen

Research的Cy3亚磷酰胺([3-(4-单甲氧基三苯甲氧基)丙基]-1'-[3-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)亚磷酰胺基]丙基]-3,3,3',3'-四甲基吡啶碳菁氯化物))导入,但是适配体中也可以包含任何合适的标记。

[0207] 如本说明书包括所附权利要求书中所用,除非特别指出,则单数形式“一个”、“一种”、“所述……”包括复数,且可与“至少一个/一种”及“一或多个/种”互换使用。因此,提及“一个适配体”时包括适配体混合物,提及“一个探针”时包括探针混合物等。

[0208] 如本文所用,术语“包含”、“包括”、“含有”及其任何变化用语均意指非排除性包括,由此包含、包括或含有一个元件或一系列元件的过程、方法、方法限定的产物或物质组合物不仅只包括所述那些元件还包括没有明确列出的或所述过程、方法、方法限定的产物或物质组合物所固有的其他元件。

[0209] 如本文所用,术语“大约”代表数值的非显著修改或改变,从而数值涉及的项目的基本功能不变。

[0210] 如本文所用,“缔合”及其任何变化用语是指标签与探针之间的相互作用或复合,产生足够稳定的复合物,使得允许在指定复合或反应条件下从标签-探针复合物中分离“未缔合的”或未结合的材料,例如检测样品的未结合的成分。标签和探针可以通过彼此特异性相互作用和结合而彼此缔合。如当通过接头分子介导复合时,标签和探针也可以彼此间接缔合。

[0211] 可以利用计算机程序进行本文所述任何方法的一或多个步骤。本发明另一方面是计算机程序产物,包含其上存储了计算机程序的计算机可读存储介质,当其装载进计算机中时执行或有助于执行本发明揭示的任何方法。

[0212] 本发明的一方面是本文所述任何方法的产物,即测定结果,其可以在检测部位评估,或者如果需要可以运至另一部位与在远离部位的感兴趣的一方评估和通讯。如本文所用,“远离部位”是指与获得结果的部位在物理方面不同的部位。因此,结果可以递送至不同房间、不同建筑物、不同的城市部分、不同城市等。可以通过任何合适方式传递数据,例如传真、邮件、快递、电子邮件、ftp、语音邮件等。

[0213] “通讯”信息是指代表经合适的通讯信道(例如私人或公众网络)作为电信号的信息的数据的传递。“转发”项目是指使该项目从一个位置传递至下一位置的任何方式,无论通过物理转运该项目或相反(在可能情况中),且至少在数据的情况中包含物理转运携带数据或者通讯所述数据的介质。

实施例

[0214] 提供如下实施例仅是为了例证本发明,而无限限制所附权利要求书限定的本发明范围之意。

[0215] 前文参考各种实施方案和实施例描述了本发明。无任何特定的实施方案、实施例或者特定实施方案或实施例的元件被认为是任何权利要求的关键、必需或者是基本元件或特征。

[0216] 应意识到在不偏离下文权利要求书中所述本发明范围的前提下可以对本发明的实施方案进行各种修饰和取代。本说明书包括图和实施例只是举例说明本发明,而不是限制本发明,所有这种修饰和取代均可包含在本发明范围内。因此,本发明的范围可以由所附

权利要求书及其法律上的等价物确定,而不是由实施例确定。例如,任何方法和处理中列举的步骤可以任何可行顺序实施,非限于任何实施方案、实施例或者权利要求中表述的顺序。

[0217] 实施例1.适配体及引物构建体

[0218] 产生具有不同5'末端官能团的适配体及生物素化引物构建体,差异示于图6。适配体在5'末端含有Cy3荧光染料(Cy3亚磷酰胺,来自Glen Research (-[3-(4-甲氧基三苯甲基氧基)丙基]-1'-[3-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)亚磷酰胺基]丙基]-3,3,3',3'-四甲基吡啶羧花青氯化物)),引物含有两个生物素残基((AB)₂),一个(T)₈接头及一个光可裂解部分(PC接头作为亚磷酰胺(-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-1-(2-硝基苯基)-丙-1-基-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺得自Glen Research)。对于图6所述方法,适配体含有本文称作ANA(4-叠氮-2-硝基苯胺)的光反应性交联基团、光可裂解部分(PC接头)和Cy3染料在5'末端,引物含有两个生物素残基和一个(T)₈接头。

[0219] 实施例2.亲和性结合方法(双捕获(2Catch)方法)

[0220] a) 缓冲液

[0221] 30μL Cy3-适配体混合物(2nM每种适配体)与30μL的(AB)₂-T₈-PC-引物混合物(6nM每种引物)在SB17T中组合并在95℃保温4分钟,在37℃保温13分钟。在另一个反应中,制备60μL靶蛋白混合物(2X浓度于SB17T中)。将55μL靶蛋白混合物与55μL适配体/引物混合物在96孔板(Omni-Tube Plate, Abgene#AB0407)中组合并在37℃保温15分钟以实现结合平衡。所有后续步骤均在室温进行,除非另有说明。

[0222] b) 血浆、血清或全血

[0223] 30μL Cy3-适配体混合物(2nM每种适配体)与30μL的(AB)₂-T₈-PC-引物混合物(6nM每种引物)在SB17T中组合并在95℃保温4分钟,在37℃保温13分钟。在另一个反应中,在含有Z-封闭竞争剂寡核苷酸(5'-(ACZZ)₇AC-3',其中Z=5-苄基-dUTP, 4μM)的稀释剂中制备30μL复杂生物学蛋白质混合物(血浆、血清、全血)的1x至2.5x稀释液并保温5分钟。所述复杂生物学蛋白质混合物与30μL靶蛋白混合物(4X浓度于SB17T中)组合。55μL靶蛋白/生物学基质混合物与55μL适配体/引物混合物组合并在37℃保温15分钟以实现结合平衡。所有后续步骤均在室温进行,除非另有说明。

[0224] c) 生物素化适配体捕获及游离蛋白质去除

[0225] 133μL链霉抗生物素蛋白-琼脂糖树脂(Pierce Immobilized Streptavidin, #20353, 7.5%水性浆液)用200μL的SB17T经真空过滤通过Durapore膜(MultiScreen-HV45, Millipore#MAHVN4550)洗涤2次。将100μL适配体:蛋白质混合物加入到洗涤的树脂中并混合15分钟。树脂用含有200μL含有10μM生物素(Sigma-Aldrich, Inc.#B4501-1G)的SB17T洗1次,用200μL SB17T经真空过滤洗1次。

[0226] d) 蛋白质标签标记及适配体释放

[0227] 将100μL含有1.2mM NHS-PEO4-生物素(Pierce#21329)的SB17T加入到洗涤的树脂并混合20分钟。树脂用200μL SB17T经真空过滤洗涤5次并用200μL SB17T经离心洗涤1次,重悬于75μL含有10mM硫酸葡聚糖(Mr~5000, Sigma-Aldrich#31404)的SB17T中,并用UV灯(两个Sylvania 350Blacklight灯泡, 15W, 样品距灯源5cm)混合下照射5分钟。经离心通过Durapore膜除去树脂,具有释放的适配体:蛋白质复合物的洗脱液收集在含有150μL SB17T+10mM硫酸葡聚糖的1.1mL 96孔板(1.1mL Deep-Well plate, Marsh Biomedical#DW9611)

中。

[0228] e) 蛋白质捕获及游离适配体去除

[0229] 将50 μ L链霉抗生物素蛋白树脂(DynaBeads MyOne Streptavidin C1, Invitrogen#650-03, 10mg/mL in SB17T)加入到Durapore膜上。将225 μ L适配体:蛋白质混合物加入到树脂并混合15分钟。树脂用200 μ L含有10mM硫酸葡聚糖的SB17T洗涤2次,用200 μ L SB17T经真空过滤洗涤1次,及用200 μ L SB17T经离心洗涤1次。

[0230] f) 复合的适配体的释放

[0231] 树脂重悬于90 μ L洗脱缓冲液(2mM NaOH, 0.1%TWEEN-20)中并混合5分钟。在此期间,适配体从蛋白质:适配体复合物中释放。树脂经离心除去,收集具有释放的适配体的洗脱液。80 μ L洗脱液用20 μ L中和缓冲液(8mM HCl, 0.5mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1%TWEEN-20)中和及缓冲。适配体如实施例4所述检测。

[0232] g) 结果

[0233] 对于11个蛋白质分析物(bFGF, Eotaxin-2, FGF7, FGF-16, GDNF, IL-7, IL-20, 淋巴细胞趋化因子, TARC, tPA, VEGF)产生在缓冲液中的12个点稀释液系列,每种分析物浓度起自10nM或3nM(bFGF, FGF7, tPA, 淋巴细胞趋化因子)并以半对数稀释(稀释倍数3.1623)系列稀释至33fM。包括两个无蛋白对照以给出总共14个样品。Cy3-适配体混合物含有11个针对稀释系列中的靶蛋白的适配体以及28个其靶蛋白是不存在的对照适配体。制备3个重复稀释系列。结果示于图7-10。

[0234] 图7A-7C示出11个缓冲液中的靶蛋白中的3个的相对荧光单位(RFU)对浓度的图(log-log剂量应答曲线)。计算每种蛋白质的检测限值(LOD)作为给出信号的蛋白质浓度,等于无蛋白值的平均值加2个标准偏差)。三个蛋白质的LOD是630fM(bFGF), 90fM(FGF7)和530fM(淋巴细胞趋化因子)。亲和性测定能检测缓冲液中亚皮摩尔水平的蛋白质。

[0235] 图8示出针对缓冲液中的靶蛋白淋巴细胞趋化因子的三次重复测量的相对荧光单位(RFU)对浓度的图。三条线代表三次重复每次的剂量应答曲线。重复曲线彼此符合非常好,表示亲和性测定方案的高水平再现性。

[0236] 12个点稀释系列还在10%血浆中针对5个蛋白质分析物(bFGF, Eotaxin-2, 淋巴细胞趋化因子, tPA和VEGF)进行,每种分析物浓度起自10nM(VEGF和Eotaxin-2)或3nM(bFGF, tPA, 淋巴细胞趋化因子)并以2.5倍稀释系列稀释至420fM或126fM。包括两个无蛋白对照以给出总共14个样品,其随后杂交在微阵列玻片上。Cy3-适配体混合物含有5个针对稀释系列中的靶蛋白的适配体以及5个其靶蛋白是不存在的对照适配体。测定如上所述进行,但有如下例外。100%PPT-血浆(集合人血浆)用5 μ M Z-block在0.5x SB18, 0.05%TWEEN-20中1:2稀释。40 μ L这个50%血浆溶液与60 μ L 3.33x终浓度的蛋白质混合物混合。50 μ L血浆/蛋白质混合物与50 μ L适配体/引物混合物(3nM适配体, 9nM引物)组合。平衡结合反应在37 $^{\circ}$ C进行15分钟。40 μ L全血-蛋白质-适配体混合物(不是100 μ L)加入链霉抗生物素蛋白-琼脂糖树脂中并混合15分钟。

[0237] 图9示出针对在10%人血浆中的靶蛋白淋巴细胞趋化因子的相对荧光单位(RFU)对浓度的图。这个曲线在形状和应答方面类似于在缓冲液中的剂量应答曲线。这表明亲和性测定方案可以但不限于在10%血浆溶液中进行。

[0238] 图10示出针对在10%人全血中的靶蛋白淋巴细胞趋化因子的相对荧光单位(RFU)

对浓度的图。这个曲线在形状和应答方面类似于在10%人血浆中的剂量应答曲线(图9),证实亲和性测定方案在复杂生物学基质中的性能,无任何明显基质效应。

[0239] 实施例3.光交联测定方案

[0240] 这一方案的所有步骤均在最小光暴露条件下进行以防止光适配体的光活化。

[0241] a) 蛋白质结合

[0242] 30 μ L ANA-PC-Cy3-适配体混合物(2nM每种适配体)与30 μ L的(AB) 2-T8-引物混合物(6nM每种适配体)在SB17T缓冲液(40mM HEPES, pH 7.5, 120mM NaCl, 5mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0.05% TWEEN-20)中组合并在95 $^{\circ}$ C保温4分钟,在37 $^{\circ}$ C保温13分钟。在另一个反应中,制备2X浓度的60 μ L蛋白质混合物。将55 μ L靶蛋白混合物与55 μ L适配体/引物混合物在96孔板(Omni-Tube Plate, Abgene#AB0407)中组合并在37 $^{\circ}$ C保温15分钟以实现结合平衡。所有后续步骤均在室温进行,除非另有说明。

[0243] b) 动力学攻击及光交联

[0244] 将100 μ L平衡的样品加入到1400 μ L含有10mM硫酸葡聚糖(Mr $\sim$ 5000, Sigma-Aldrich#31404)的SB17T中并在37 $^{\circ}$ C保温15分钟。所述1.5mL样品用470nm光(Custom LED array)在37 $^{\circ}$ C照射10分钟以将结合的蛋白质共价交联到光适配体上。

[0245] c) 生物素化适配体捕获及游离蛋白质去除

[0246] 将40 μ L链霉抗生物素蛋白树脂(DynaBeads MyOne Streptavidin C1, Invitrogen#650-03, 10mg/mL于SB17T中)加入到所述1.5mL样品中并在25 $^{\circ}$ C混合下保温30分钟。树脂经离心沉淀,去除1.4mL上清。树脂及剩余上清转移到Durapore膜(MultiScreen-HV45, Millipore#MAHVN4550)并经真空过滤去除上清。树脂用200 μ L含有10 μ M生物素(Sigma-Aldrich, Inc.#B4501-1G)的SB17T洗涤2次并用200 μ L SB17T经真空过滤洗涤1次。

[0247] d) 蛋白质标签标记及适配体(游离及复合的)释放

[0248] 将100 μ L含有1.2mM NHS-PEO4-生物素(Pierce#21329)的SB17T加入到洗涤的树脂中并混合20分钟。树脂用200 μ L胍洗涤缓冲液(3M胍, 50mM NaCl, 40mM HEPES pH 7.5, 2mM EDTA, 0.05% TWEEN-20, 1mM TROLOX)洗涤3次,用200 μ L HEPES洗涤缓冲液(50mM NaCl, 40mM HEPES pH 7.5, 0.05% TWEEN-20, 1mM TROLOX)经真空过滤洗涤2次。树脂重悬于110 μ L的20mM NaOH中并混合5分钟。树脂经离心除去,收集具有释放的适配体:蛋白质复合物的NaOH洗脱液。将100 μ L洗脱液用25 μ L 80mM HCl中和,并用10 μ L含有2M NaCl和1% TWEEN-20的55mM HEPES(pH 7.5)缓冲。

[0249] e) 蛋白质捕获及游离适配体去除

[0250] 将133 μ L链霉抗生物素蛋白树脂(Pierce Immobilized Streptavidin, #20347, 10%水性浆液)用200 μ L SB17T经真空过滤通过Durapore PVDF膜洗涤2次。将135 μ L适配体:蛋白质混合物加入到洗涤的树脂中并混合20分钟。树脂用200 μ L胍洗涤缓冲液在50 $^{\circ}$ C混合下洗涤10分钟一次,用200 μ L 20mM NaOH混合下洗涤2分钟一次,用200 μ L SB17T真空过滤洗涤两次,用200 μ L SB17T经离心洗涤一次。

[0251] f) 光交联适配体释放

[0252] 树脂重悬于100 μ L SB17T中并用UV灯(两个Sylvania 350Blacklight灯泡, 15W, 样品距灯源5cm)混合下照射20分钟。在此期间,光交联到蛋白质的适配体被光裂解释放。树脂经离心通过Durapore膜而去除,收集具有释放的适配体的洗脱液。

[0253] 实施例4.微阵列检测方案

[0254] a) 样品制备

[0255] 将30 μ L 4X杂交缓冲液(3.638M NaCl,200mM磷酸钠,pH 7.5,1nM corner marker oligo,4mM TROLOX,0.1%TWEEN-20)加入90 μ L测定样品(实施例2的步骤e的产物或实施例3的步骤f的产物)中。

[0256] b) 微阵列玻片

[0257] 用含有14(7x2)个间隔9mm的阵列的微阵列玻片组装ProPlate Slide Module(CSW Gasket,FLC adhesive;Grace Bio-Labs,#204841)。每个阵列由96个胺修饰的互补于适配体的随机区的寡核苷酸的三份重复组成。寡核苷酸用内部(in house)接触式印刷机点印于自有(proprietary)3'x 1'聚合物玻片上。

[0258] c) 微阵列封闭

[0259] 将100 μ L封闭缓冲液(Blocker Casein in PBS,Pierce#37528,1mM TROLOX)加入到ProPlate Slide Module的孔中并在65 $^{\circ}$ C保温15-30分钟。除去封闭缓冲液。

[0260] d) 杂交及洗涤

[0261] 将110 μ L测定样品加入到微阵列中,并将3x1x0.125英寸的铝块置于ProPlate Slide Module上面。该组件用铝箔包裹并在恒湿器中65 $^{\circ}$ C保温16小时,无需混合。铝箔和铝块与测定样品一起除去,将微阵列用预热至65 $^{\circ}$ C的200 μ L洗涤缓冲液1(50mM磷酸钠,pH 7.5,0.1%TWEEN-20)洗涤1次。除去洗涤缓冲液1并拆卸ProPlate Slide Module。将微阵列玻片置于含有25mL洗涤缓冲液1(预热至65 $^{\circ}$ C)的pap jar中并在65 $^{\circ}$ C混合下保温15分钟。将微阵列玻片转移至含有25mL洗涤缓冲液2(50mM磷酸钠,pH 7.5,预热至65 $^{\circ}$ C)的第二个pap jar中并在65 $^{\circ}$ C混合下保温5分钟。将微阵列玻片转移至含有25mL洗涤缓冲液2的第三个pap jar中并在65 $^{\circ}$ C混合下保温5分钟。从缓冲液2中取出微阵列玻片并立即在干燥氮气流中干燥。

[0262] e) 检测

[0263] 将微阵列玻片用TECAN LS300Reloaded Fluorescence Laser Scanner扫描,荧光信号用软件包ArrayVision(8.0Rev 3.0,Imaging Research,Inc.)在每一特征上量化。荧光信号用密度作为主要测量进行量化,具有分段和可变点形状.xml输出文件输入到数据库中进行进一步数据分析。

[0264] f) 定量PCR检测方案

[0265] 引物设计

[0266] 用PrimerQuest(Integrated DNA Technologies)选择每一适配体的扩增引物,使用默认参数设定,除了引物T_m最小=60 $^{\circ}$ C,最佳=65 $^{\circ}$ C,及最大=70 $^{\circ}$ C,及产物大小范围=50-100bp。然后用OligoAnalyzer 3.0(Integrated DNA Technologies)分析候选引物的内部发夹,同二聚体和异二聚体3'末端互补性,使用默认参数设定,除了寡聚物浓度=0.2 μ M。如果3'末端互补性 $\Delta G < -3.5$ kcal/mol则排除候选物。

[0267] 定量PCR反应

[0268] 5 μ L中和测定样品(见亲和性测定方案(实施例2)的步骤5或者光交联测定方案(实施例3)的步骤6)用95 μ L dH₂O稀释20X。用5 μ L稀释的测定样品和1X KOD缓冲液(Novagen#),0.2mM每种dATP,dCTP,dGTP和dTTP,1X SYBR Green I(Invitrogen#),0.2 μ M每种5'和3'引

物及0.025U/ μ L KOD XL DNA聚合酶(Novagen#)制备20 μ L扩增反应。样品在具有无污染试剂的生物通风柜(bio hood)中制备。每个反应中使用一对引物量化一个适配体。还制备了具有已知数量的适配体的样品以产生标准曲线。样品在Bio-Rad iCycler中通过在95℃保温2分钟,在95℃15秒循环40次及72℃60秒而扩增。

[0269] 数据分析

[0270] 对于每种适配体,从扩增图中确定针对每个样品的阈值循环(Ct)值,并用于用Bio-Rad iCycler提供的数据分析软件产生针对每个适配体的标准曲线。每个测定样品中的每个适配体的拷贝数用标准曲线确定,并在调整稀释倍数和样品体积后转化为适配体浓度。每个测定样品中的适配体浓度作为输入蛋白质浓度的函数绘图。

[0271] 实施例5.用光交联测定方案和阵列检测在缓冲液中检测蛋白质

[0272] 对于13个蛋白质分析物(血管生成素,BLC,C3a,凝血因子V,凝血因子XI,CTACK,内皮抑制素,FGF7,IGFBP-3,前激肽释放酶,PSA-ACT,TIMP-1和tPA)在缓冲液中产生10点稀释系列,每种分析物浓度起自10nM并用半对数稀释(稀释倍数3.1623)系列稀释至330fM。包括4个无蛋白对照以给出总共14个样品。Cy3-适配体混合物含有13个针对稀释系列中的靶蛋白的适配体,以及14个其靶蛋白不存在的对照适配体。样品用光交联测定方案(实施例3)加工并用实施例4所述微阵列检测量化。结果见图11,其示出针对缓冲液中的靶蛋白血管生成素的相对荧光单位(RFU)对浓度的图。

[0273] 实施例6.用亲和性测定方案及QPCR在缓冲液中检测蛋白质

[0274] 对于12个蛋白质分析物(血管生成素,C1q,C5b,6复合物,CMP-SAS,EG-VEGF,IP-10,PAI-1,PDGF-BB,凝血酶原,E-选择蛋白,tPA和vWF)在缓冲液中产生10点稀释系列,每种分析物浓度起自10nM并用半对数稀释(稀释倍数3.1623)系列稀释至330fM。包括4个无蛋白对照以给出总共14个样品。Cy3-适配体混合物含有12个针对稀释系列中的靶蛋白的适配体。样品用亲和性测定方案(实施例2)加工并用QPCR(实施例4)量化。引物2175-47-F3(5'-GAGTGTGTGACGAGTGTGGAG-3') (SEQ ID NO:1)和2175-47-R3(5'-TCGGTTGTGGTGACGCCCG-3') (SEQ ID NO:2)用于量化测定样品中的血管生成素适配体2175-47。结果见图12,其示出针对血管生成素的检测的适配体浓度对输入蛋白质浓度的对数图。

[0275] 实施例7:具有慢解离速率的适配体使得可以在检测样品中测量蛋白质

[0276] 制备适配体/引物混合物及检测样品

[0277] 具有生物素Cy3检测标志的适配体(每种4nM)与3X过量的捕获探针(与适配体的3'固定区互补的寡核苷酸,含有生物素标签和光可裂解元件)在1X SB17T中混合,并在95℃加热4分钟,然后37℃加热13分钟,并在1x SB17T中1:4稀释。55uL适配体/引物混合物加入到微滴板(Hybaid#AB-0407)中并用铝箔密封。通过混合在SB17T中的已知浓度的蛋白质分析物并用SB17T系列稀释而在微滴板中制备检测样品。

[0278] 样品平衡

[0279] 55uL适配体/引物混合物加入到55uL检测样品中并在铝箔密封的微滴板中于37℃保温15分钟。平衡混合物中的每种适配体的终浓度是0.5nM。平衡后,这个方法的所有后续步骤均在室温进行,除非另有说明。

[0280] 适配体捕获及游离蛋白质去除

[0281] DuraPore过滤平板(Millipore HV cat#MAHVN4550)用100uL 1X SB17T经真空过

滤洗涤1次,将133.3uL的7.5%链霉抗生物素蛋白-琼脂糖树脂(Pierce)加入到每孔并用200uL 1X SB17T洗2次。将100uL平衡的样品转移到含有链霉抗生物素蛋白-琼脂糖树脂的Durapore平板中并在热混合仪(Eppendorf)上以800rpm保温5分钟。树脂用200uL 1X SB17T+100uM生物素洗1次及用200uL 1X SB17T洗1次。

[0282] 用生物素标签标记蛋白质

[0283] 在即将使用前制备的100uL于SB17T中的1.2mM NHS-PEO4-生物素加入到具有捕获的适配体和适配体:蛋白质复合物的树脂中并在热混合仪上以800rpm保温20分钟。树脂用200uL 1X SB17T经真空过滤洗涤5次。

[0284] 慢解离速率富集过程&光裂解

[0285] 从DuraPore板底部除去导管(drip director)并将平板置于1mL微滴定收集板之上。树脂用200uL 1X SB17T经1000x g离心30秒而洗涤1次。将80uL 1X SB17T+10mM硫酸葡聚糖加入到树脂并在热混合仪上以800rpm用BlackRay汞灯照射10分钟。DuraPore平板转移到新的1mL深孔板并在1000x g离心30秒以收集光裂解的适配体和蛋白质:适配体复合物。

[0286] 蛋白质捕获及游离适配体去除

[0287] 50uL MyOne-链霉抗生物素蛋白C1顺磁珠(Invitrogen)(10mg/mL于1X SB17T中)被加入到微滴板中。珠用磁铁分离60秒,除去上清。将225uL光裂解混合物加入到珠并混合5分钟。通过分离磁珠及更换洗涤缓冲液将珠用200uL 1X SB17T洗涤4次。去除最终的洗涤缓冲液。

[0288] 适配体洗脱

[0289] 将100uL磷酸钠洗脱缓冲液(10mM Na_2HPO_4 , pH 11)加入到珠并混合5分钟。将90uL洗脱液转移到微滴板并用10uL磷酸钠中和缓冲液(10mM NaH_2PO_4 , pH 5)中和。

[0290] 适配体与微阵列杂交

[0291] 用包含固定化在商业显微镜玻片支持物上的每一适配体的可变区的互补序列的寡核苷酸捕获探针制备DNA阵列。每个玻片上存在多个阵列(亚阵列),各亚阵列通过固定用于施加样品的衬垫(gasket)(Grace)而物理分隔。阵列用100uL封闭缓冲液预处理并在Thermal Cycler上于65℃保温15分钟。将30uL杂交缓冲液加入到微滴板中的90uL中和的适配体洗脱液中,在热循环仪中于95℃保温5分钟,以0.1℃/秒冷却至65℃。从阵列除去封闭缓冲液,将110uL适配体样品加入到阵列并在湿室中于65℃保温20小时。

[0292] 阵列洗涤

[0293] 从阵列中除去适配体样品,将阵列用200uL磷酸钠Tween-20洗涤缓冲液在65℃洗1次,其中衬垫在原位,在pap jar中用25mL磷酸钠Tween-20洗涤缓冲液在65℃洗3次,其中衬垫被除去。阵列用氮枪干燥。

[0294] 量化阵列上的信号

[0295] 阵列玻片在再装载在用于Cy3检测的合适通路中的TECAN LS300上扫描,量化每个阵列特征上的Cy3信号。

[0296] 结果:

[0297] 特异于3个不同靶(bFGF、VEGF和髓过氧化物酶)的适配体用传统的SELEX方法和材料产生。第二组特异于相同组的靶的适配体用5-位置修饰的核苷酸制备并选择对于它们的各自靶具有非常慢的解离速率。以传统方法制备的适配体测量的解离速率在小于5分钟级

别。用修饰的核苷酸及在选择过程中使用慢解离速率富集方法制备的适配体具有大于20分钟的解离速率。通过2种不同方法对每个靶制备两组适配体,总共每个靶有4个不同适配体群。这些适配体群测量检测样品中的分析物浓度的能力如上所述对一定的靶浓度范围进行评估。来自DNA芯片检测的相对信号对输入靶浓度绘图。见图13A-13C。传统适配体的应答曲线非常平,检测灵敏性相当低。用慢解离速率的适配体检测各自靶的灵敏性非常好。数据支持需要使用慢解离适配体以获得最大分析性能。

[0298] 实施例8.用慢解离速率适配体的再现性

[0299] 使用实施例7的方法,一个血浆样品分成68个不同等份。在这68个样品的每一个上进行实施例7的测定。34个样品被组合并再次分配。其余34个样品简单地再次测试。以此方式可以测试测定的再现性,以使得测定之中和之间一致。样品规划和检测方案示于图14。图15示出图14显示的所有样品的测量中的%CV。未集合的及集合的样品具有相同CV。

[0300] 实施例9:单捕获亲和性结合方法

[0301] a) 用血浆、血清或全血平衡适配体

[0302] 30uL Cy3-适配体混合物(20nM每种适配体)与30uL (AB) 2-T8-PC-引物混合物(60nM每种引物)在SB17T中组合并在95℃保温4分钟及在37℃保温13分钟。55uL在SB17T中稀释1:1000的复杂生物学蛋白质混合物(血浆、血清或全血)与55uL适配体/引物混合物组合并在37℃保温15分钟以实现结合平衡。所有接下来的步骤均在室温进行,除非另有说明。

[0303] b) 蛋白质标签标记

[0304] 100uL适配体:蛋白质混合物与10uL含有500uM NHS-PEO4-生物素(Pierce#21329)的SB17T组合并在37℃保温20分钟。过量的NHS试剂通过加入10uL 200mM TRIS缓冲液(pH 7.5)至反应混合物中并在37℃保温10分钟而猝灭。

[0305] c) 蛋白质捕获及游离适配体去除

[0306] 100uL链霉抗生物素蛋白树脂(DynaBeads MyOne Streptavidin C1,Invitrogen#650-03,10mg/mL于SB17T中)加入到Durapore膜以捕获适配体/蛋白质复合物。100uL适配体/蛋白质混合物加入到树脂中,混合15分钟,真空过滤除去游离适配体。树脂用200uL SB17T经真空过滤洗涤3次,用200uL SB17T经离心洗涤1次。

[0307] d) 复合的适配体释放

[0308] 树脂重悬于90uL洗脱缓冲液(2mM NaOH,0.1%TWEEN-20)并混合5分钟以从适配体/蛋白质复合物中释放适配体。树脂经离心除去,收集含有释放的适配体的洗脱液。80uL洗脱液用20uL中和缓冲液(8mM HCl,0.5mM Tris-HCl(pH 7.5),0.1%TWEEN-20)中和及缓冲。适配体如实施例4所述检测。

[0309] 一些专利、专利申请出版物和科学出版物被引用和/或列于说明书结尾。这些的每一篇均以其全文援引加入本文。类似地,援引加入的出版物中提到的所有出版物也以其全文援引加入本文。

[0310] 引用的出版物中的实例及其相关限制是例证的而非排除性的。在阅读说明书和研究附图后,引用的出版物的其它限制对于本领域技术人员是明显的。

[0311] 词语“包含”被解释为是包括性的而非排除性的。

序列表

[0001]	<110>	私募蛋白质体公司	
	<120>	检测样品的多元分析	
	<130>	0057.21 (formerly SML.21)	
	<140>	12/175,446	
	<141>	2008-07-17	
	<150>	60/950,293	
	<151>	2007-07-17	
	<150>	60/950,281	
	<151>	2007-07-17	
	<150>	60/950,283	
	<151>	2007-07-17	
	<150>	61/031,420	
	<151>	2008-02-26	
	<150>	61/051,594	
	<151>	2008-05-08	
	<150>	11/623,580	
	<151>	2007-01-16	
	<150>	11/623,535	
	<151>	2007-01-16	
	<160>	2	
	<170>	PatentIn version 3.4	
	<210>	1	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Synthetic	
	<400>	1	
		gagtgtgtga cgagtgtgga g	21
	<210>	2	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Synthetic	
	<400>	2	
		tcggttgtgg tgacgcccg	19

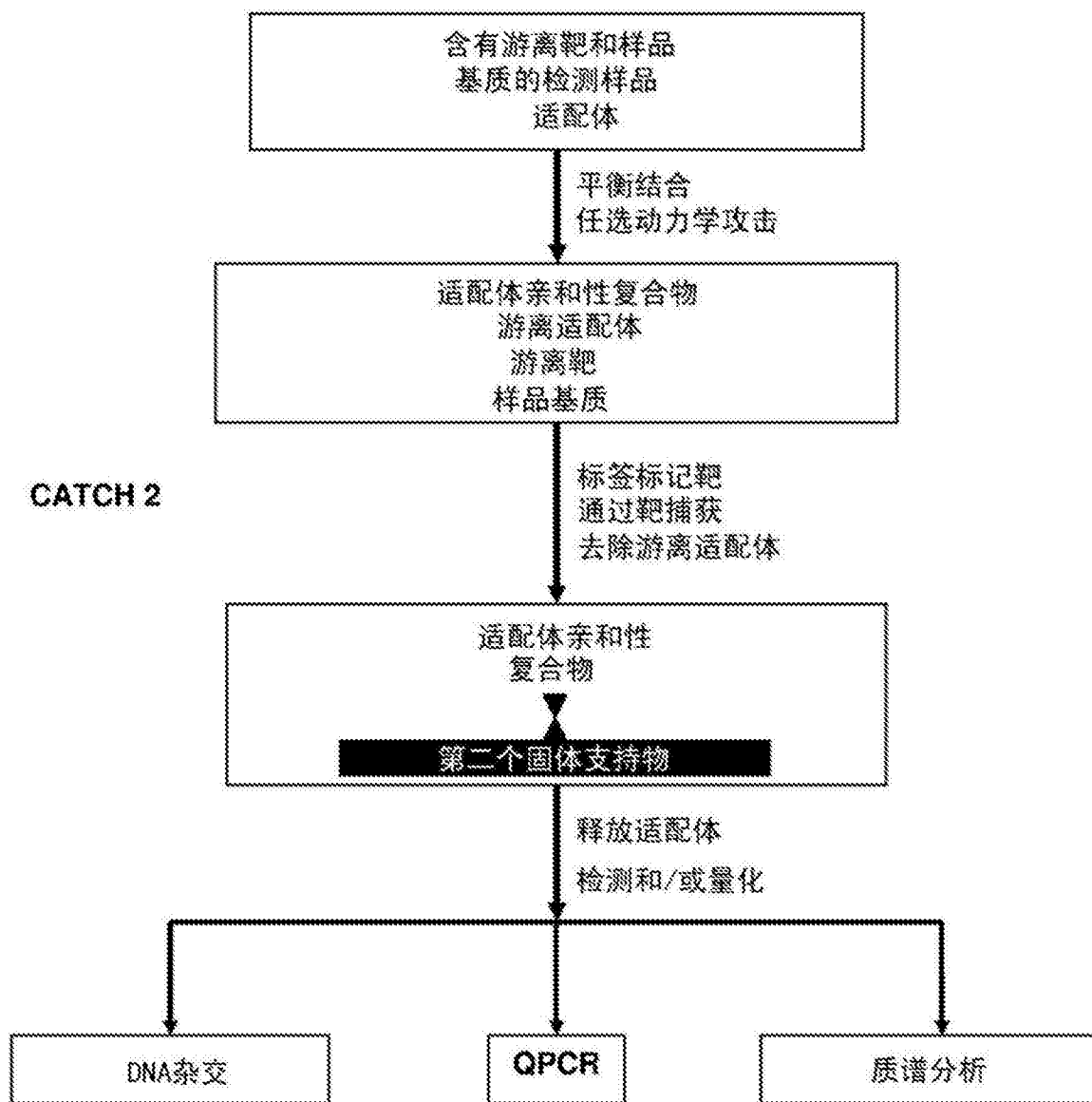


图1A

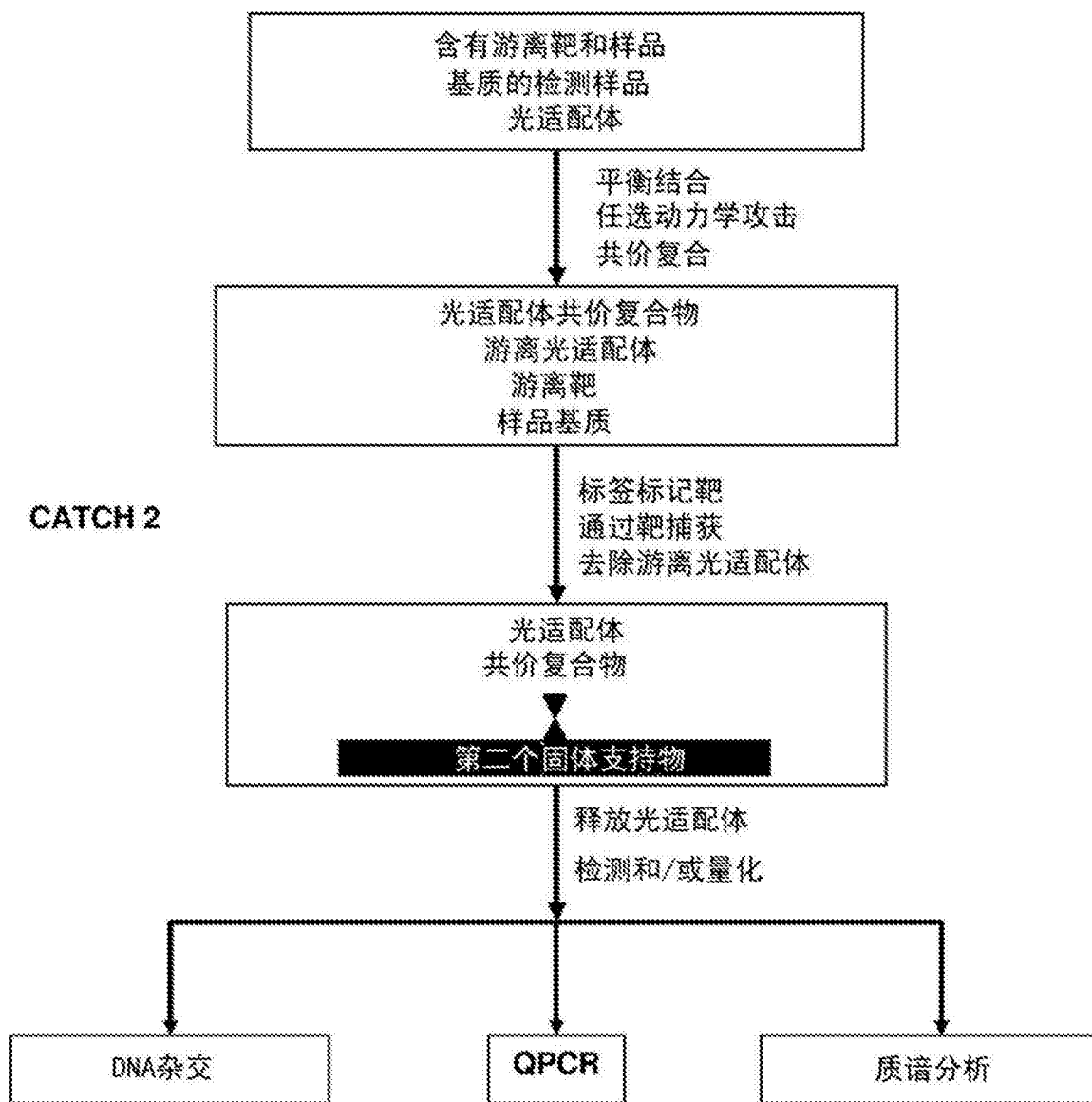


图1B

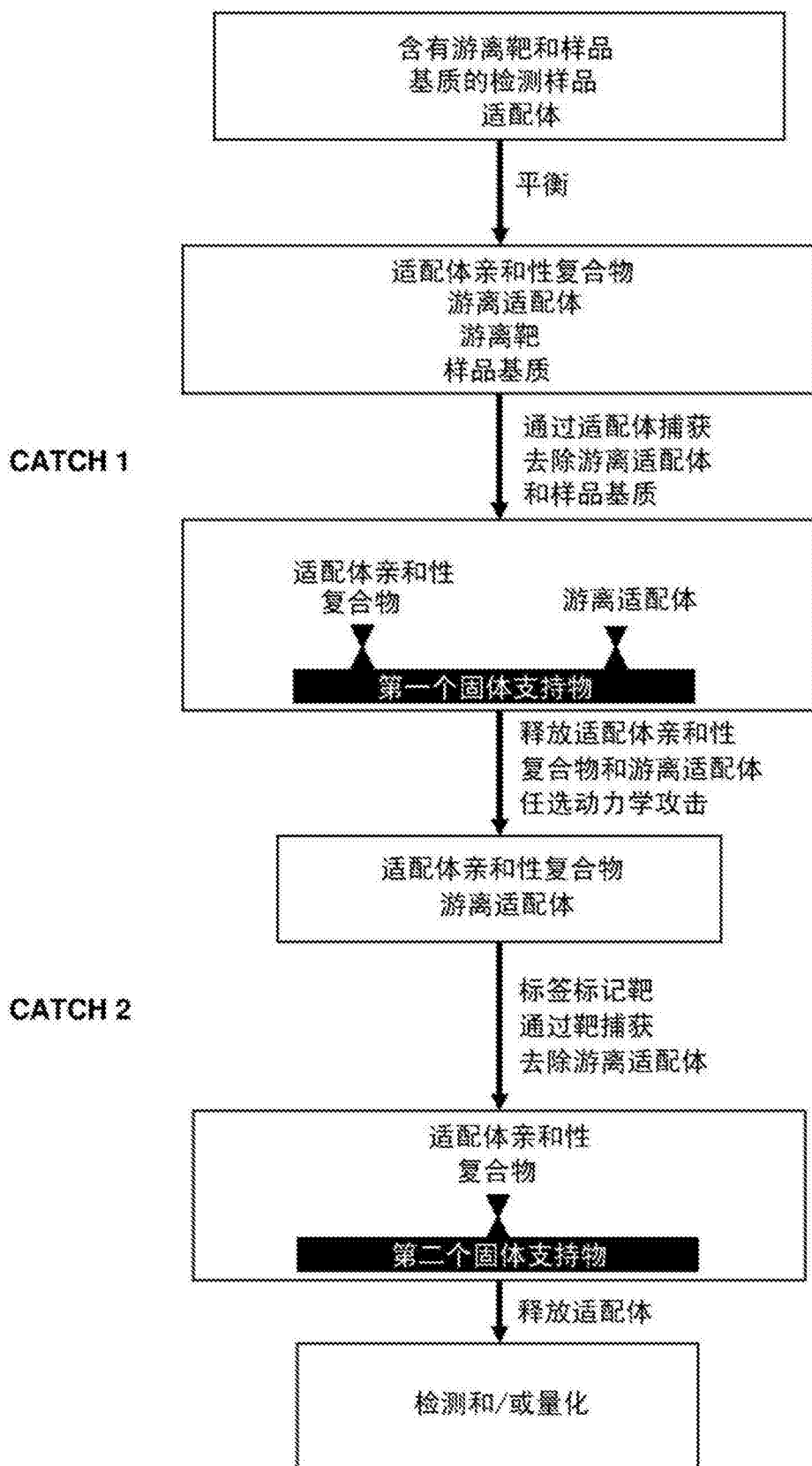


图2A

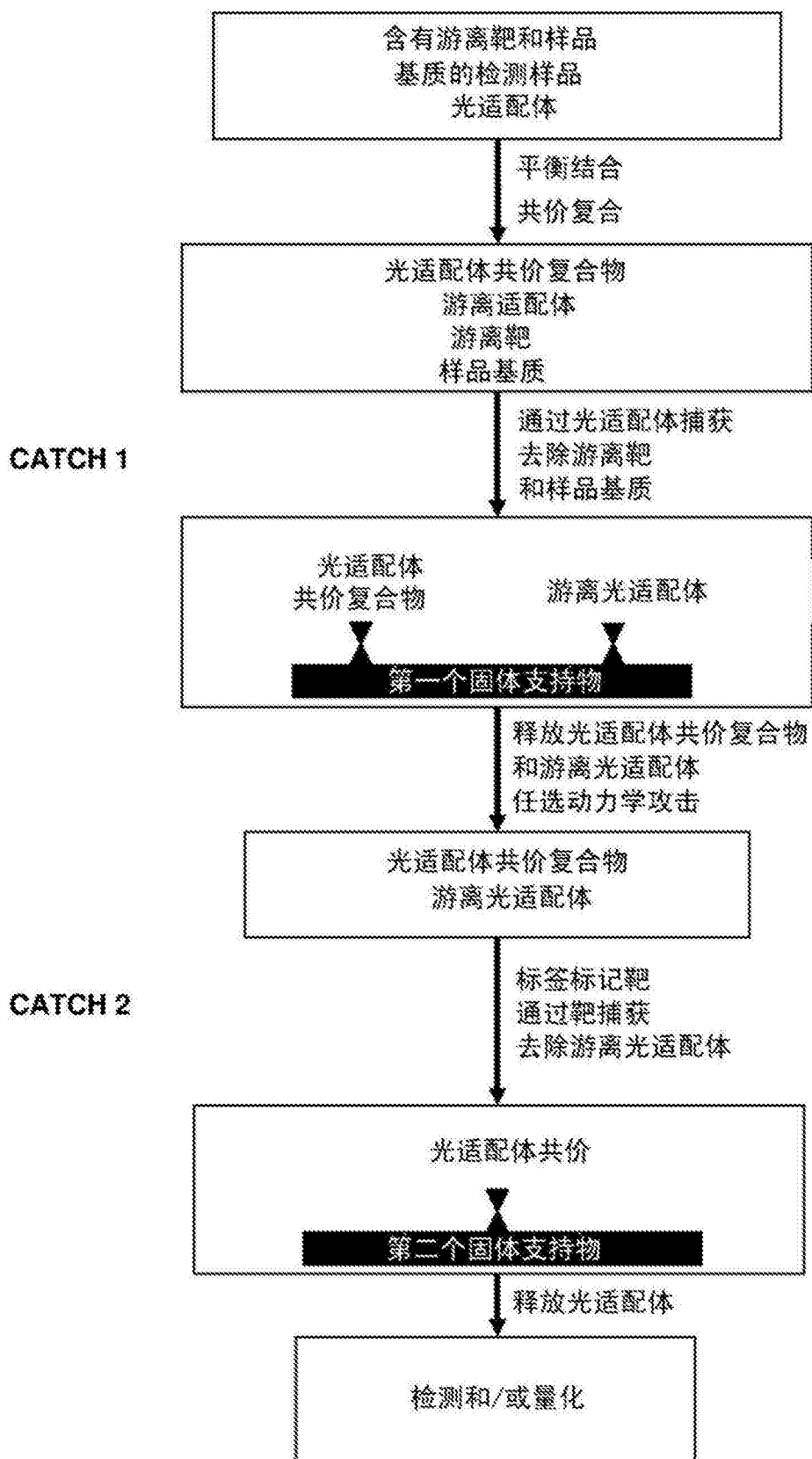


图2B

单捕获构建体

亲和性

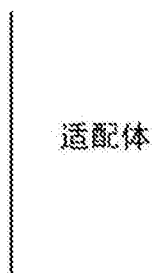


图3A

光交联

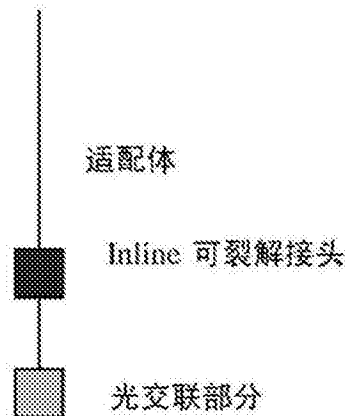


图3B

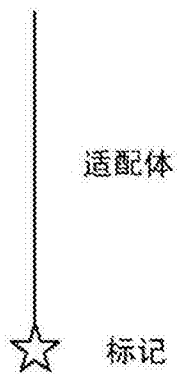


图3C

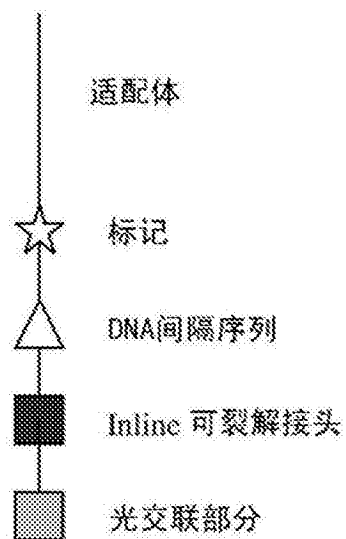


图3D

双捕获构建体

亲和性



图3E

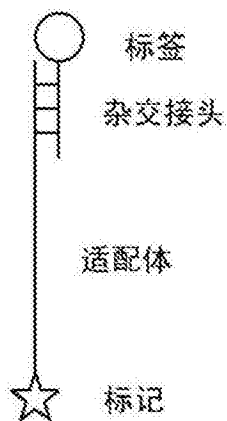


图3G

光交联

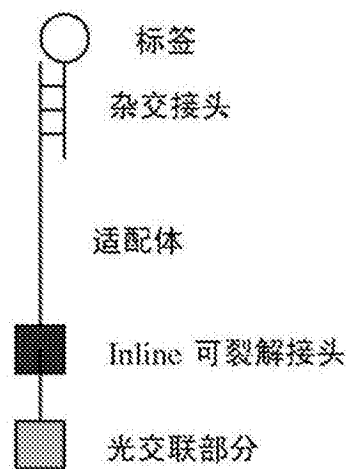


图3F

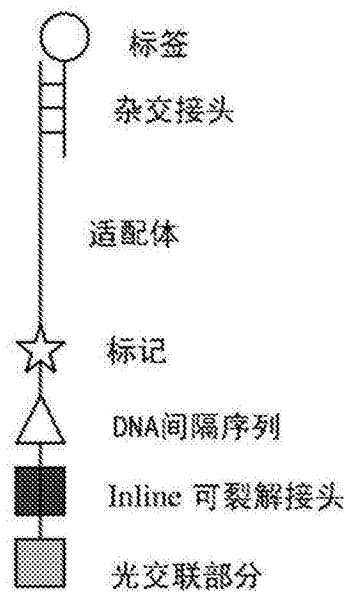


图3H

双捕获构建体

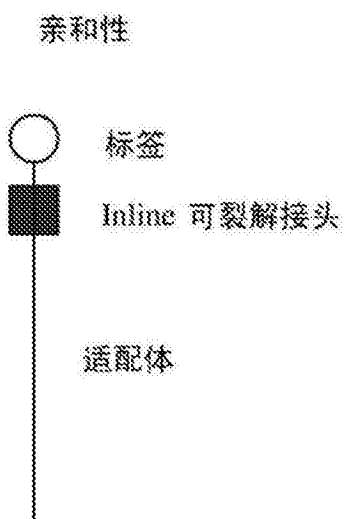


图3I

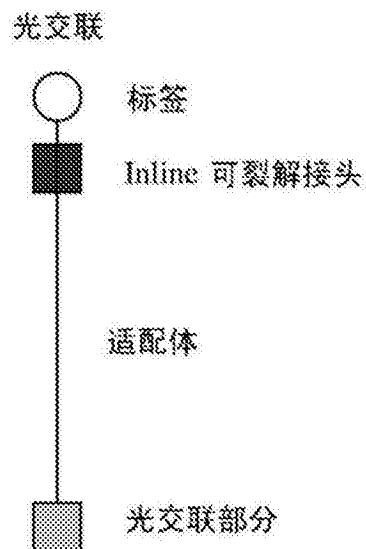


图3J

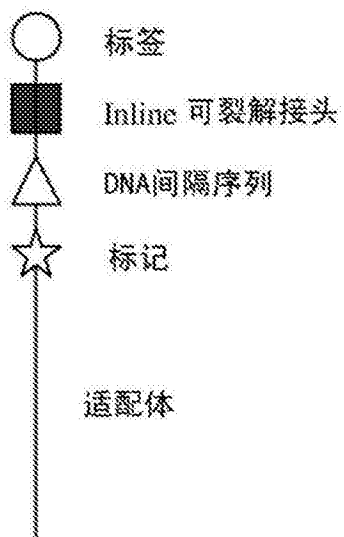


图3K

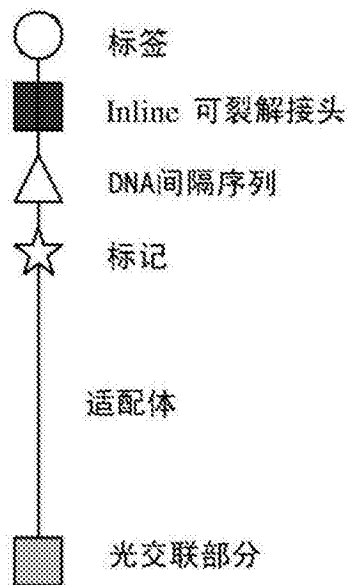


图3L

4-1BB	C4	Cytochrome P450 3A4	GAS1
4-1BB ligand	C4b	DAN	GASP-2
6Ckine	C5	DARPP-32	G-CSF-R
α 1-Antichymotrypsin	C5a	DC-SIGN	GDF-8
α 2-Antiplasmin	C5b, 6 Complex	DC-SIGNR	GDF-11
ACE2	C5	D-dimer	GDNF
Activated Protein C	C7	DEAD-box protein 19B	GFAP
Actin A	C8	Desmoglein-1	GFRa-1
Actin R1A	C8	DKK1	GFRa-2
Actin R1B	Cadherin E	DLL4	GFRa-3
ADAMTS-4	Cadherin-5	Dopa decarboxylase	GIB
ADAMTS-5	Calcineurin B a	DRG-1	GIIE
Aggrecan	Calpain I	DRR1	GITR
AIF1	Calpastatin	Dlk	Glucocorticoid receptor
ALCAM	Carbonic Anhydrase IV	EDA (A2)	Glutamate carboxypeptidase
ALK-1	Cardiotrophin-1	EDAR	Glutathione S-transferase P1
Alkaline phosphatase, bone	Caspase-3 (pro)	EG-VEGF	Glypican 3
AMPM2	Cathepsin A	eIF-5	gp130, soluble
Amyloid precursor protein	Cathepsin B	Elastase	GPC2
Angiogenin	Cathepsin D	EMAP-2	GPVI
Angiopoietin-1	Cathepsin G	ENA-78	Granulysin
Angiopoietin-2	Cathepsin S	Endostatin	Granulysin B
Angiopoietin-4	Cathepsin V	Eotaxin	Gro-a
ANGL3	CCL28	Eotaxin-2	Gro-g
ANGL4	CD5L	Eotaxin-3	Growth hormone receptor
Apo A-I	CD22	Ephrin-A4	GSK-3 beta
Apo B	CD23	Ephrin-A5	GV
Apo E	CD30	Ephrin-B3	GX
Apo E2	CD30 Ligand	Epithelial cell kinase	HA1-1
Apo E3	CD36 ANTIGEN	EPO-R	Haptoglobin, Mixed type
Apo E4	CD39	ER	Hat1
APRIL	CD39	ERBB1	HB-EGF
AREG	CD97	ERBB2	HCC-1
ARG1	CD109	ERBB3	HCC-4
ARSB	Ceruloplasmin	ERBB4	HDAC8
ART	CFC1	ERK-1	Hemexin
Artemin	Chk1	ESAM	Heparin cofactor II
ASAH2	Chk-b-B-1	Factor B	HGF
ASAH1	CK-BB	Factor D	Histone H1.2
ATS1	CK-MM	Factor H	HIV-2 Rev
ATS1.3	CLF-1/CLC Complex	Factor I	HMG-1
Aurora kinase A	CMP-Sialic Acid Synthetase	Fas ligand, soluble	HO-2
Azurocidin	CNTF	Fas, soluble	HPLN1
B7	CNTFR alpha	FCG2A	HPV E7 Type 16
B7-2	CNTN2	FCG2B	HPV E7 Type18
BAFF	Coagulation Factor a-XIIa	FCG3B	HSP 60
BCAM	Coagulation Factor IX	FCGR1	HSP 70
b-Catenin	Coagulation Factor IXab	Ferritin	HSP 90a
Bcl-2	Coagulation Factor V	FGF-4	HSP 90b
BCMA	Coagulation Factor VII	FGF-5	HTRA2
BONF	Coagulation Factor X	FGF-6	HVEM
b-Endorphin	Coagulation Factor Xa	FGF7	I11RA
bFGF	Coagulation Factor XI	FGF-8B	I12R2
bFGF-R	Coagulation Factor XIa	FGF9	I-309
BGH3	Coagulation factor XIII	FGF-10	IC3b
b-Glucosidase	Collagen Type I	FGF-16	ICOS
BGN	COLEC12	FGF-17	IDE
BLC	COMMD7	FGF-18	IDS
BMP-7	Contactin-1	FGF-19	IDUA
BMP-14	Contactin-4	FGF-20	IFN-g
BMPER	ODX-2	FGFR-2	IFN-g R1
BMPRIIA	Cripto	Fibrinogen	IFN-lambda 1
BMPRII	CRIS3	Fibronectin	IFN-lambda 2
b-NGF	CRP	Fit-3	IgE
Bone proteoglycan II	CTACK	Fit-3 ligand	IGFBP-1
BPI	CTGF	Fractalkine/CX3CL-1	IGFBP-2
C1q	CTLA-4	FSH	IGFBP-3
C1r	CXCL15, soluble	FST	IGFBP-4
C2	Cystatin C	FYN	IGFBP-5
C3	Cystatin M	GA733-1 protein	IGFBP-6
C3a	CYTD	Galectin-2	IGFBP-7
C3adesArg	CYTF	Galectin-3	IGF-1
C3b	CYTN	Galectin-4	IGF-1 sR
C3d	Cytochrome c	Galectin-7	IGF-II receptor

图4

IgM	Lysozyme	P-Cadherin	SPINT2
IL-1b	LYVE1	PCNA	Spondin-1
IL-1 R AcP	Macrophage mannose receptor	PDGF Rb	sPAGE
IL-1 R4	MAPK14	PDGF-AA	sRANKL
IL-1 sR1	MATN2	PDGF-BB	sTie-1
IL-1F7	MATN3	PD-L2	sTie-2
IL-1Rmp2	MBL	PDPK1	sTREM-1
IL-2	MCP-1	PECAM-1	STX1a
IL-2 sRg	MCP-2	Perlephin	Sulfotransferase, Nod Factor
IL-4	MCP-3	PF-4	suPAR
IL-4 sR	MCP-4	PGRP-S	TAC1
IL-6	M-CSF R	PIGR	TARC
IL-6 sRa	MDC	PNB	tau
IL-7	MEK1	PKC-A	TBP
IL-7 R alpha	MEPE	PKC-B-II	TECK
IL-8	MER	PKC-D	Tenascin
IL-10	Met	PKC-Z	Tenascin-2
IL-10 Rb	METAP1	Plasmin	TF
IL-11	MIA	Plasminogen	TFPI
IL-12	MICA	PIGF	TGF-b1
IL-12 Rb1	Miktoine	Prekallikrein	TGF-b2
IL-13	Mit4gd, Mouse	PRL	TGF-b RIII
IL-13 Ra1	MOG	Properdin	Thrombin
IL-15 Ra	Mox, Rat	Prostatic acid phosphatase	Thyroxine-Binding Globulin
IL-16	MIP-1a	Protease nexin 1	TIG2
IL-17 sR	MIP-1b	Protein C	TIMP-1
IL-17B	MIP-3a	Protein S	TIMP-2
IL-17D	MIP-3b	Prothrombin	TIMP-3
IL-17E	MK01	PSA	TNF sR-I
IL-17F	MMP-1	PSA-ACT	TNF sR-II
IL-18 Bpa	MMP-2	P-Selectin	TNFSF15
IL-18 Ra	MMP-3	PSMA	TNFSF16
IL-18 Rb	MMP-7	PTHrP	Tom34
IL-19	MMP-8	PTN	Topoisomerase I
IL-20	MMP-9	PTP-1B	TPA
IL-21 sR	MMP-13	Rab GDP dissociation inhibitor beta	Tpo
IL-22	MMP-14	Rac1	TRAIL
IL-27	MMP-17	RAD51	TRAIL R2
Inosine triphosphatase	MOZ	RANTES	TRAIL R4
IP-10	MP112	RAP	Transferrin
IR	MPF-1	REL1	TrATPase
I-TAC	MSP R	Resistin	TrkB
JAM-B	Myeloperoxidase	RET	TrkC
JAM-C	Myosin regulatory light chain 2	RGMB	Troponin I
Kalikrein 4	NADPH-P450 Oxidoreductase	ROM-C	Troponin T
Kalikrein 5	NANOG	S100A4	Trypsin
Kalikrein 8	NAP-2	SAP	Trypsin 2
Kalikrein 11	NCAM-L1	SARP-2	TSLP
Kalikrein 12	NET4	sCD14	TSLP R
Kalikrein 13	NEUREGULIN-1	SCF sR	TSP2
Karyopherin-a2	Neurotrophin-3	SCGF-alpha	TSP4
Kininogen, HMW, Single Chain	Neurotrophin-5	SCGF-beta	TWEAK
Kininogen, HMW, Two Chain	NG2S	SDF-1a	UBC9
KLH	Nidogen	SDF-1b	Ubiquitin+1
KREM2	NKG2D	Semaphorin 3A	ULBP-1
Ku70	NKp30	sE-Selectin	ULBP-2
Lactoferrin	NKp44	SET9	ULBP-3
LAG-1	Noggin	sFRP-3	uPA
Laminin	Nogo Receptor	sICAM-2	URB
Laylin	NovH	sICAM-3	VCAM-1
LBP	NPS-PLA2	SIGIRR	VEGF
LD78-beta	NRP1	Siglec-6	VEGF sR2
Leptin	OLR1	Siglec-7	VEGF sR3
Lipocalin 2	ON	Siglec-9	VEGF-C
LKHA4	OPG	SLAMF8	VEGF-D
LRIG3	OSM	sLeptin R	Vitronectin
LBP8	OX40 Ligand	SLP1	vWF
LSAMP	PAFAH beta subunit	sL-Selectin	WFKM2
Luteinizing hormone	PAI-1	SMAC	WIF-1
LY86	PAPP-A	sn-1,3-Diacylglycerol Kinase	WISP-3
LY9	PARC	SOD	XEDAR
Lymphotoxin	Partner protein A	Saggy-1	Yes
Lymphotoxin b R	Partner protein B	Sonic Hedgehog	

图4续

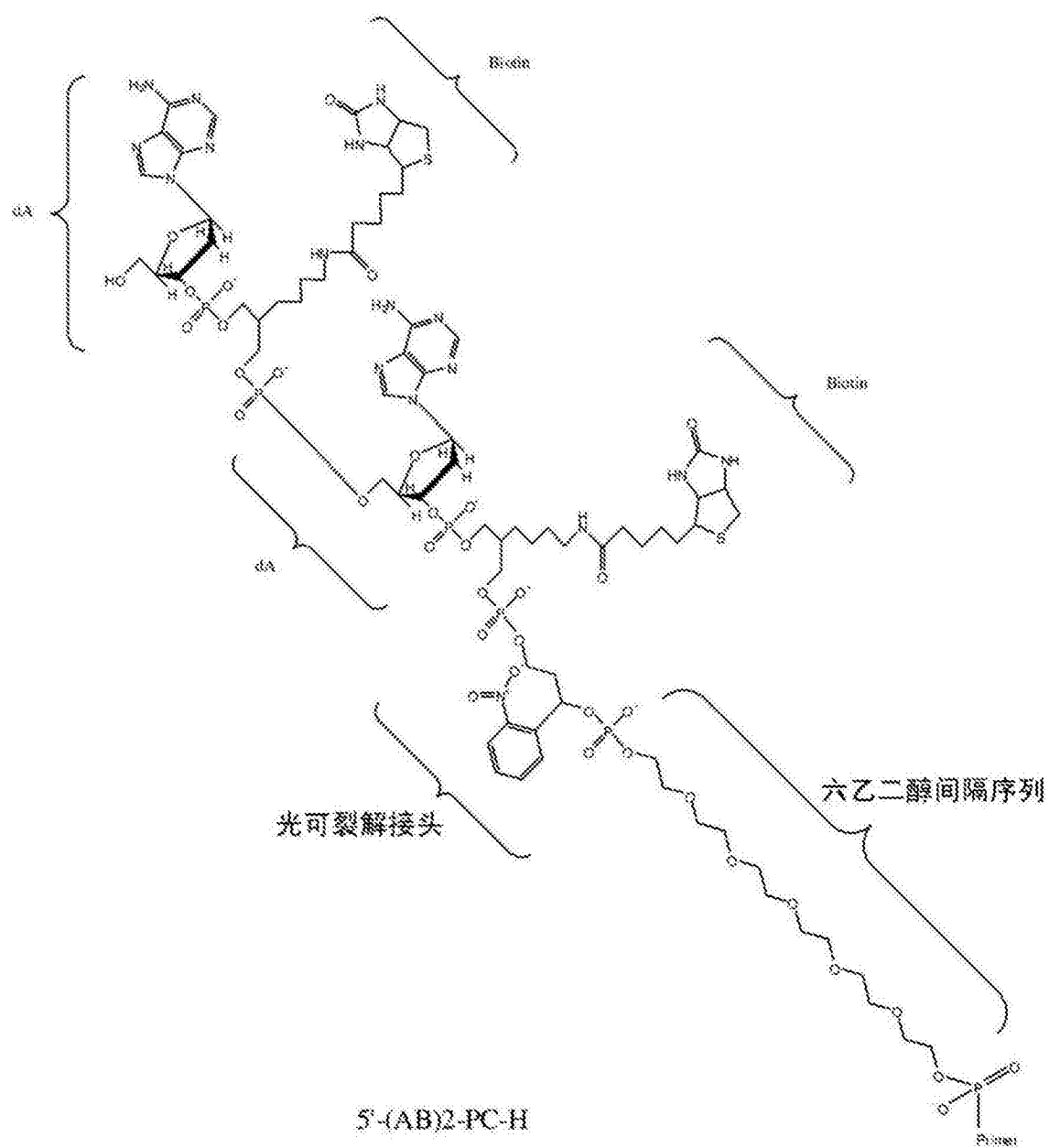


图5A

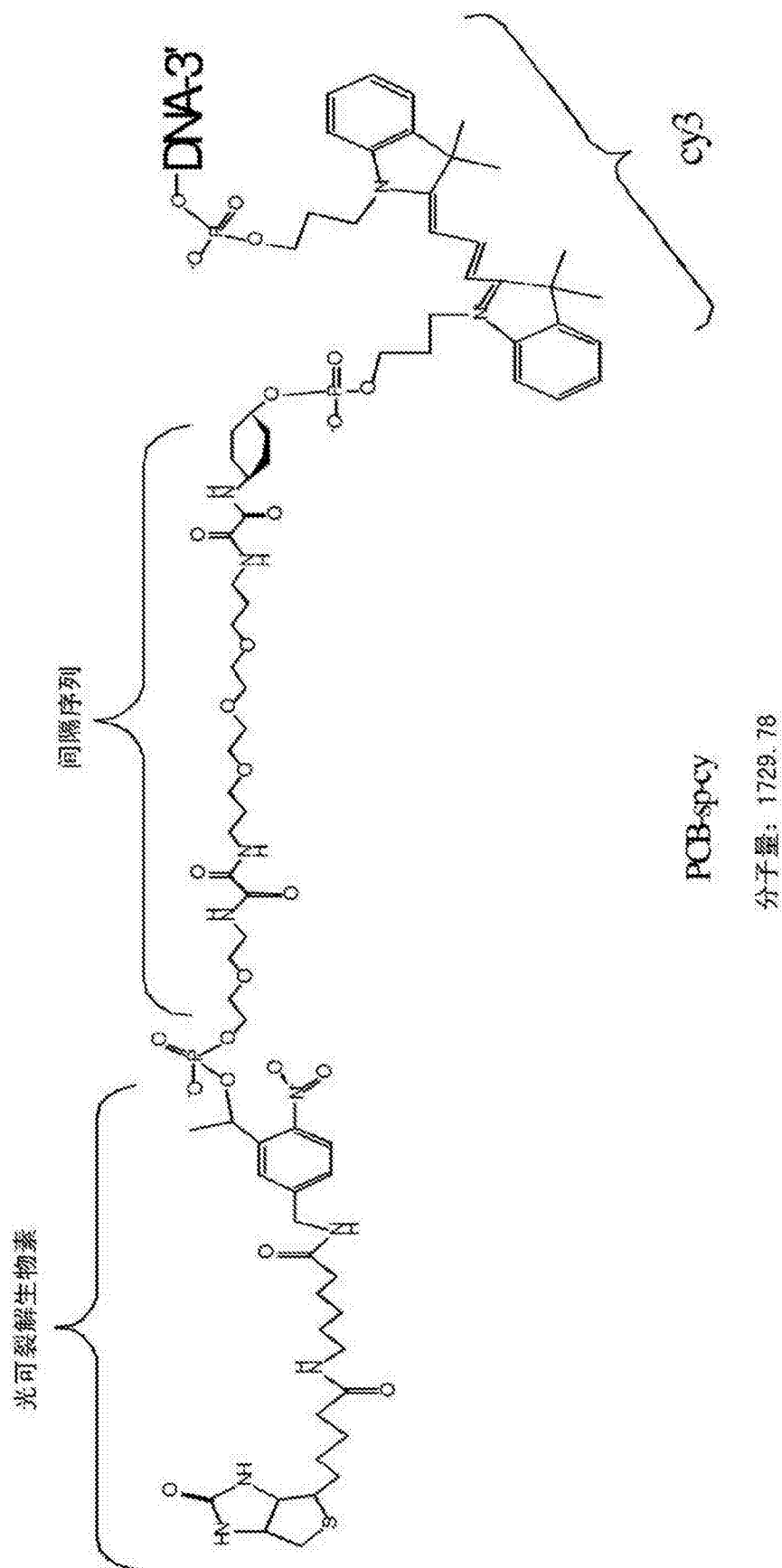


图5B

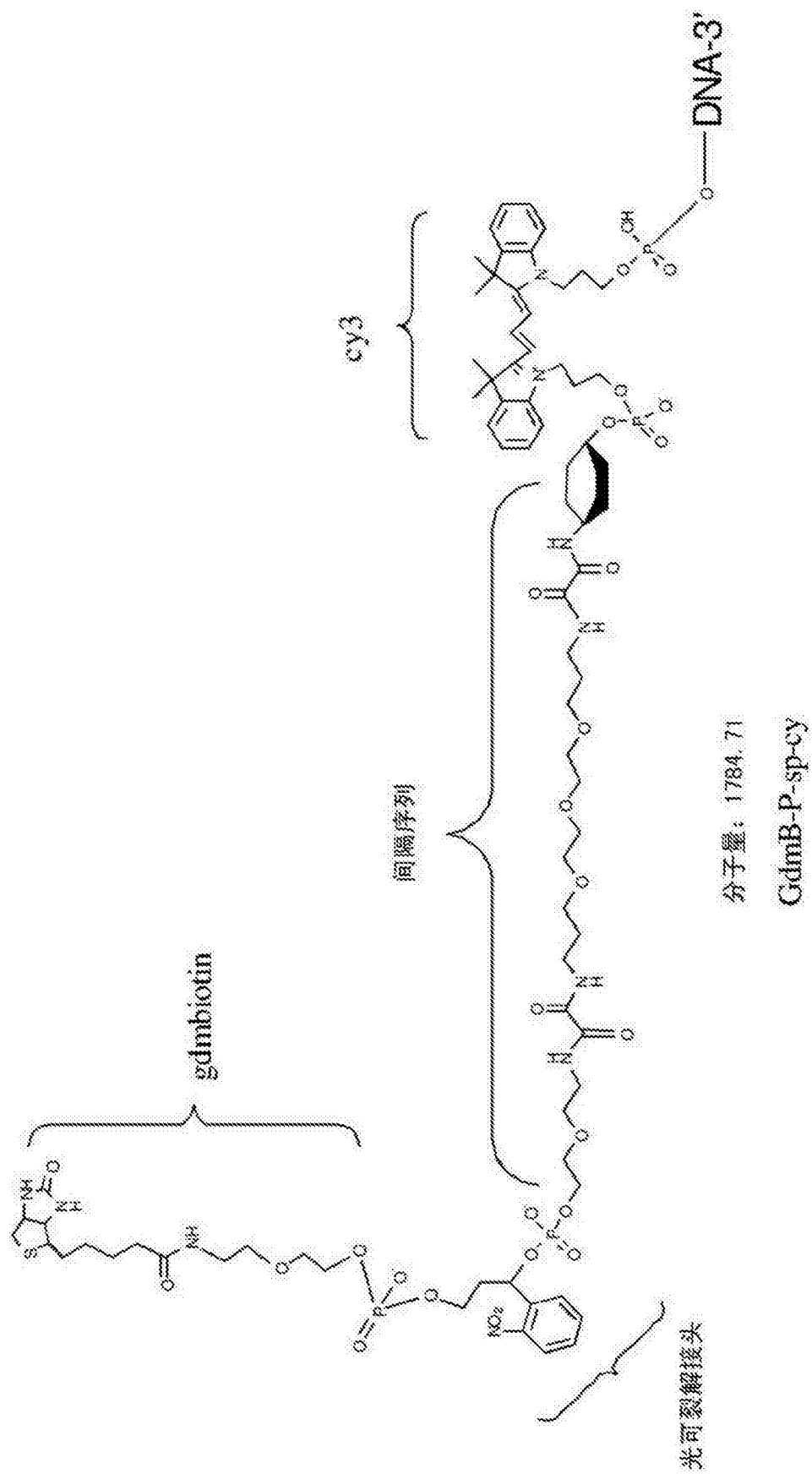


图5C

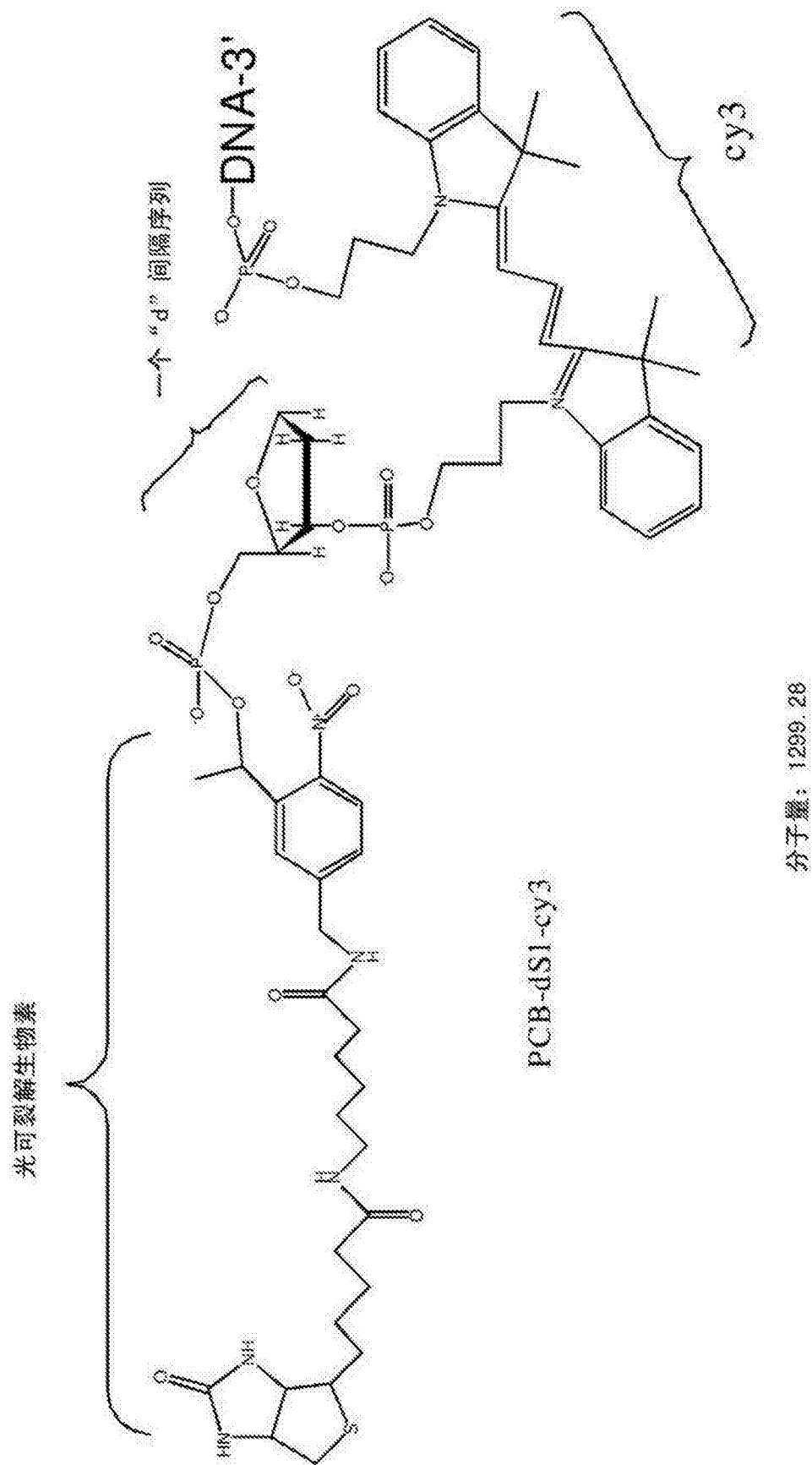


图5D

- A 5'-CY3-适配体-3'
- B 5'-B-PC-间隔序列-CY3-适配体
- C 5'-ANA-PC-间隔序列-CY3-适配体
- D 5'-ANA-PC-间隔序列-CY3-适配体-HYB/HYB⁺-(T)₈-(AB)₂

图6

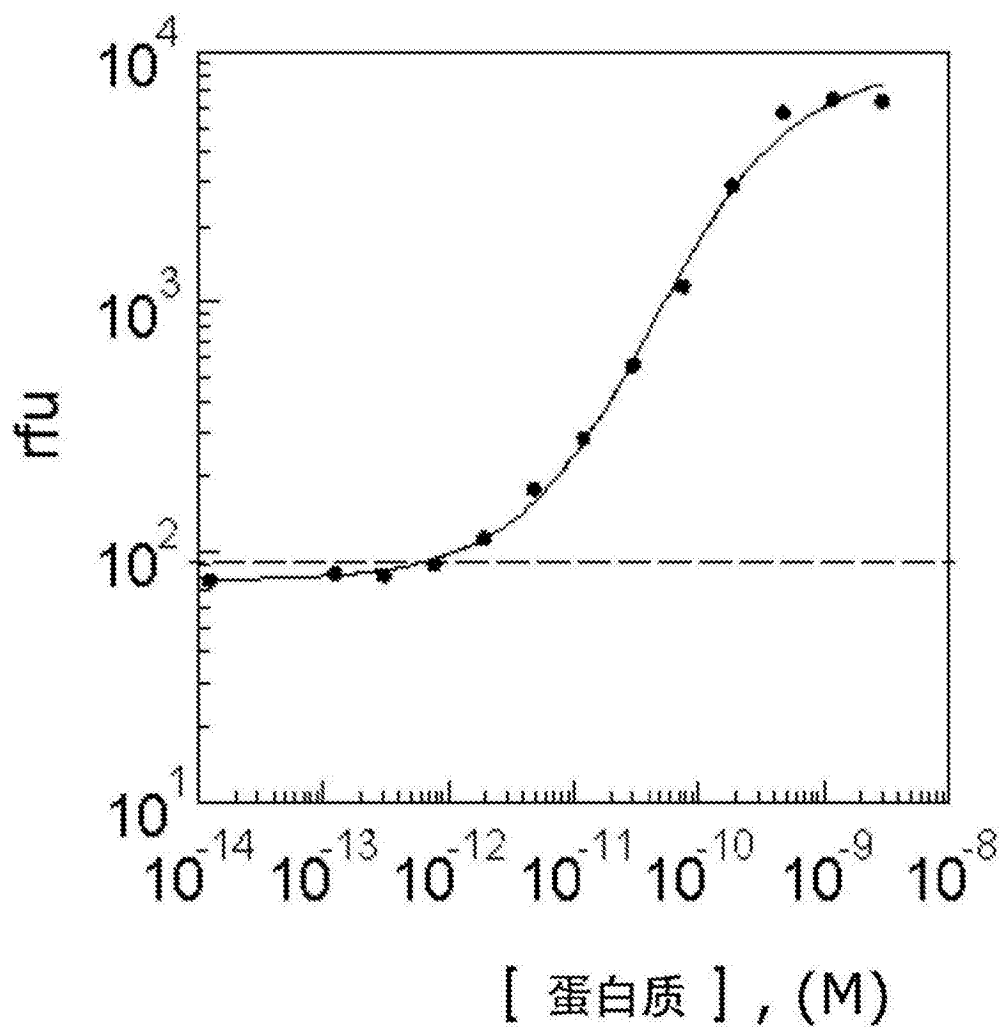


图7A

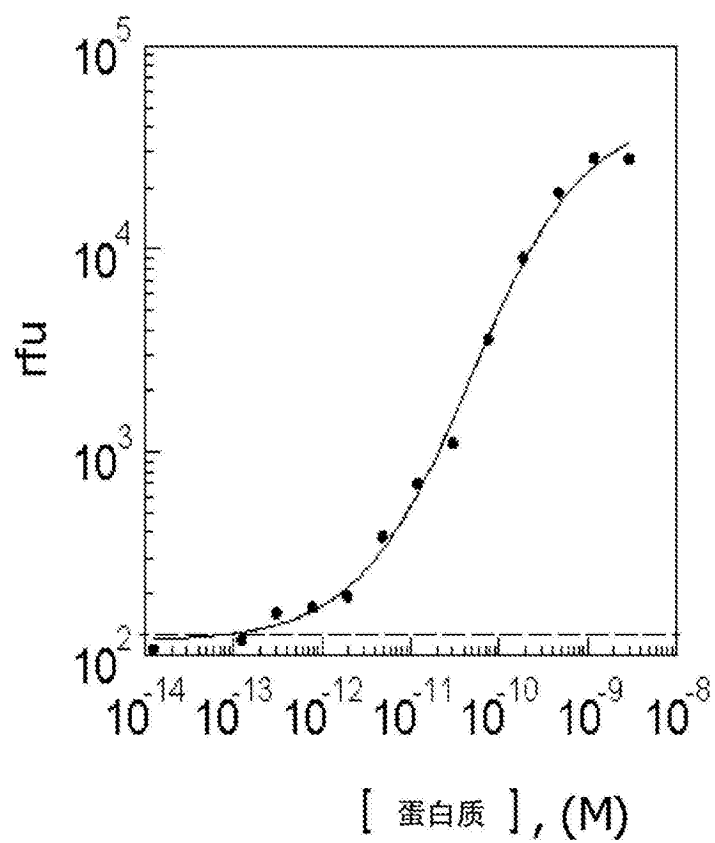


图7B

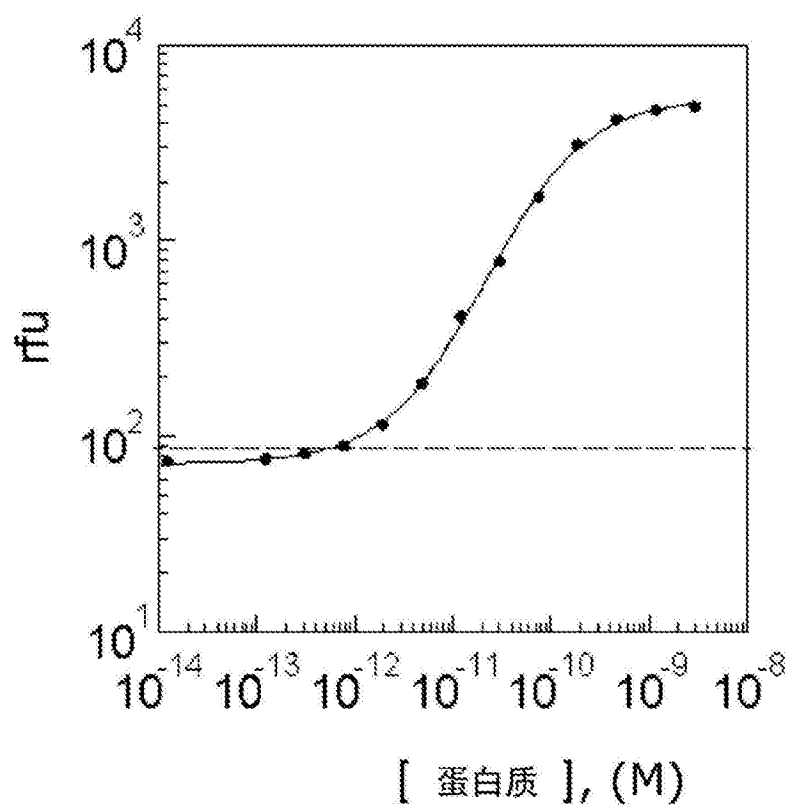


图7C

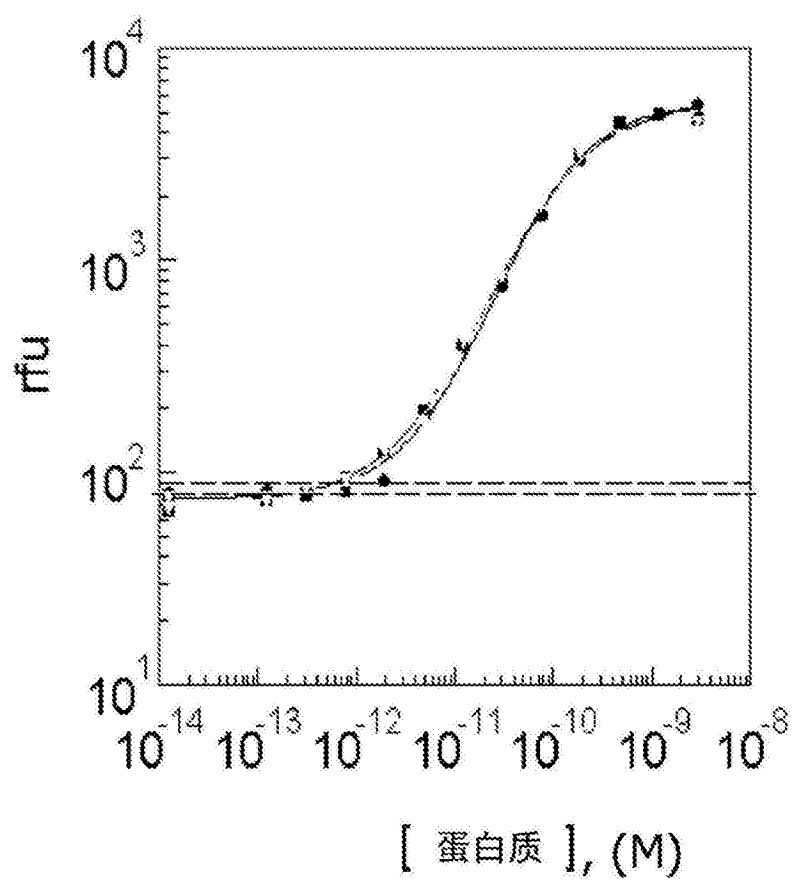


图8

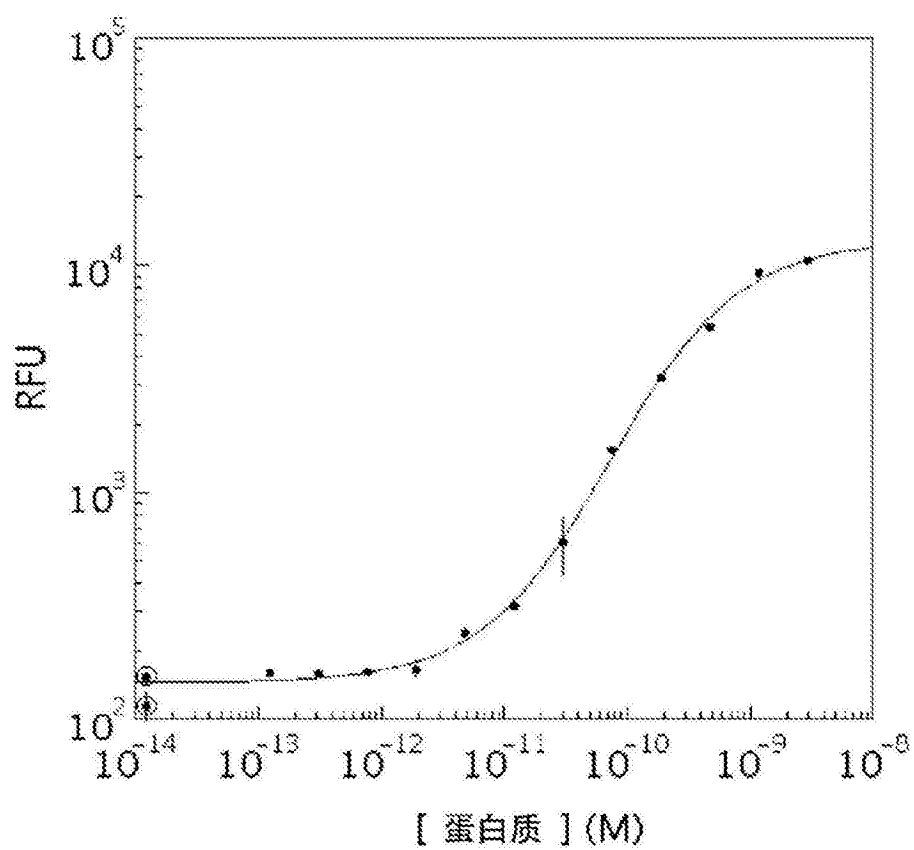


图9

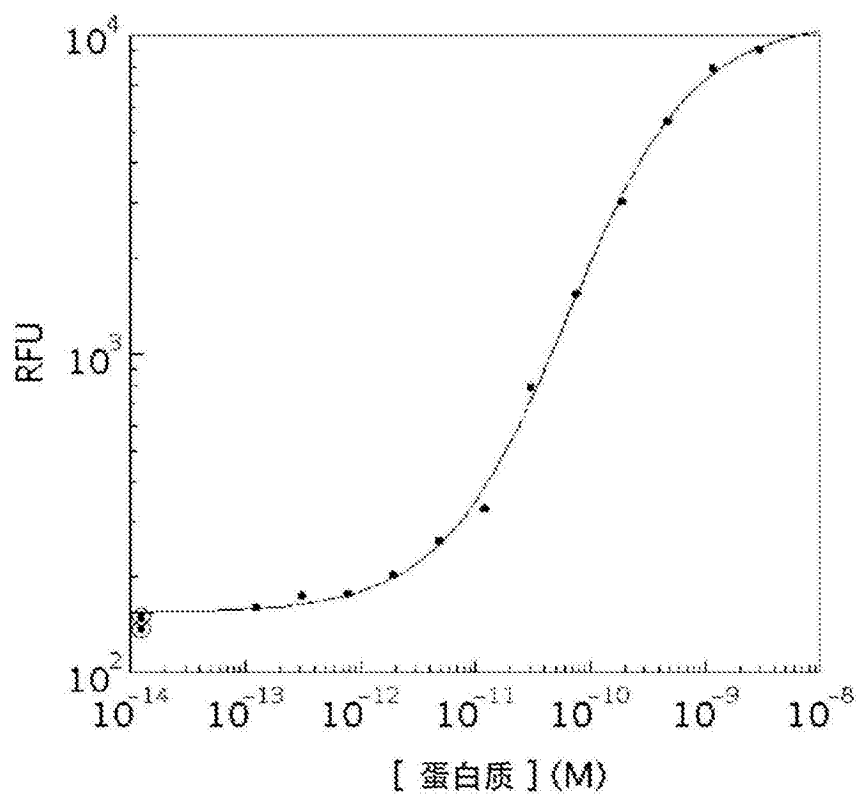


图10

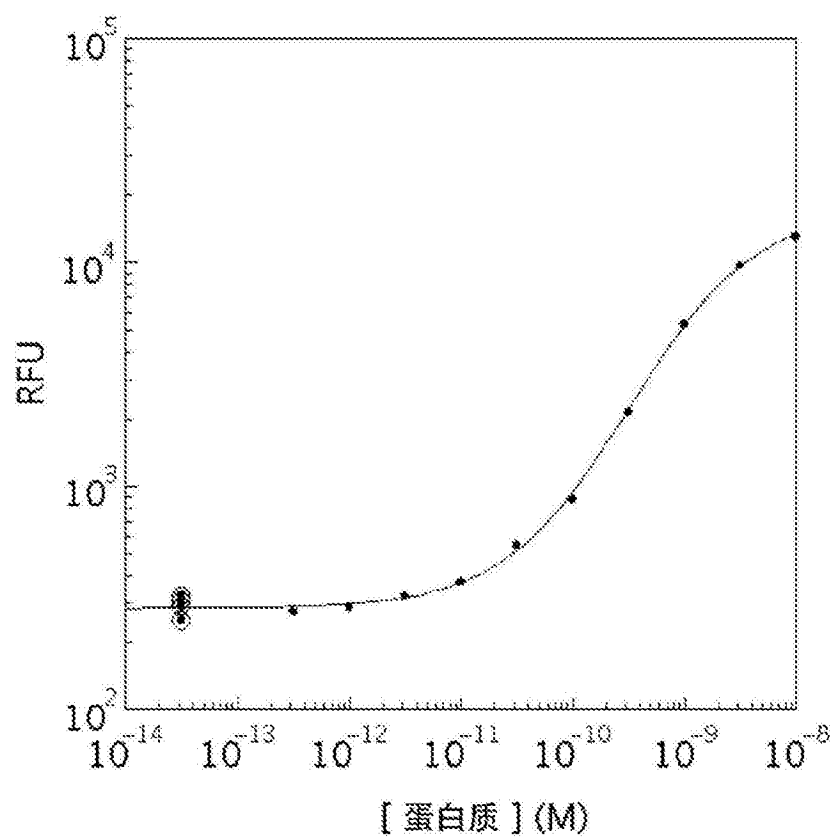


图11

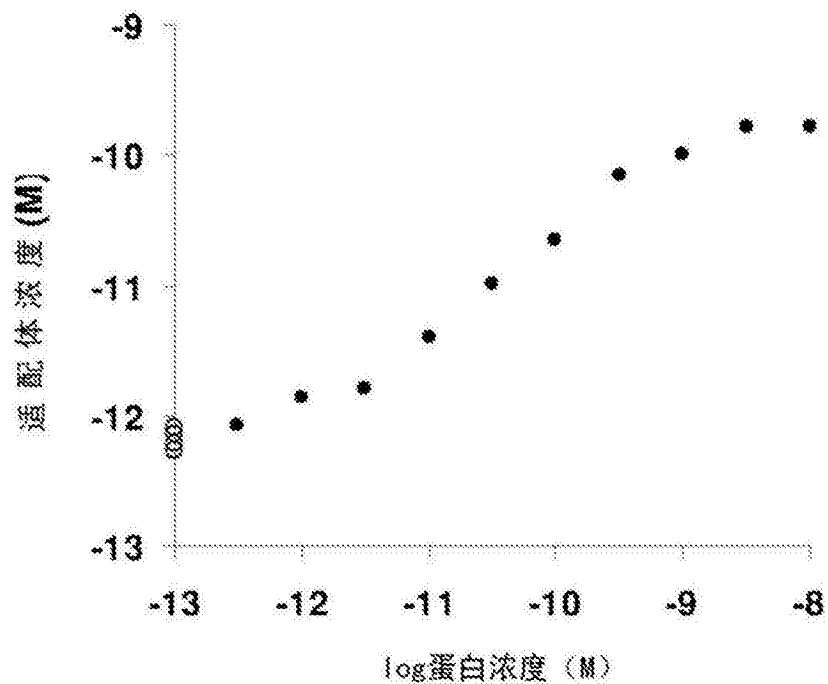


图12

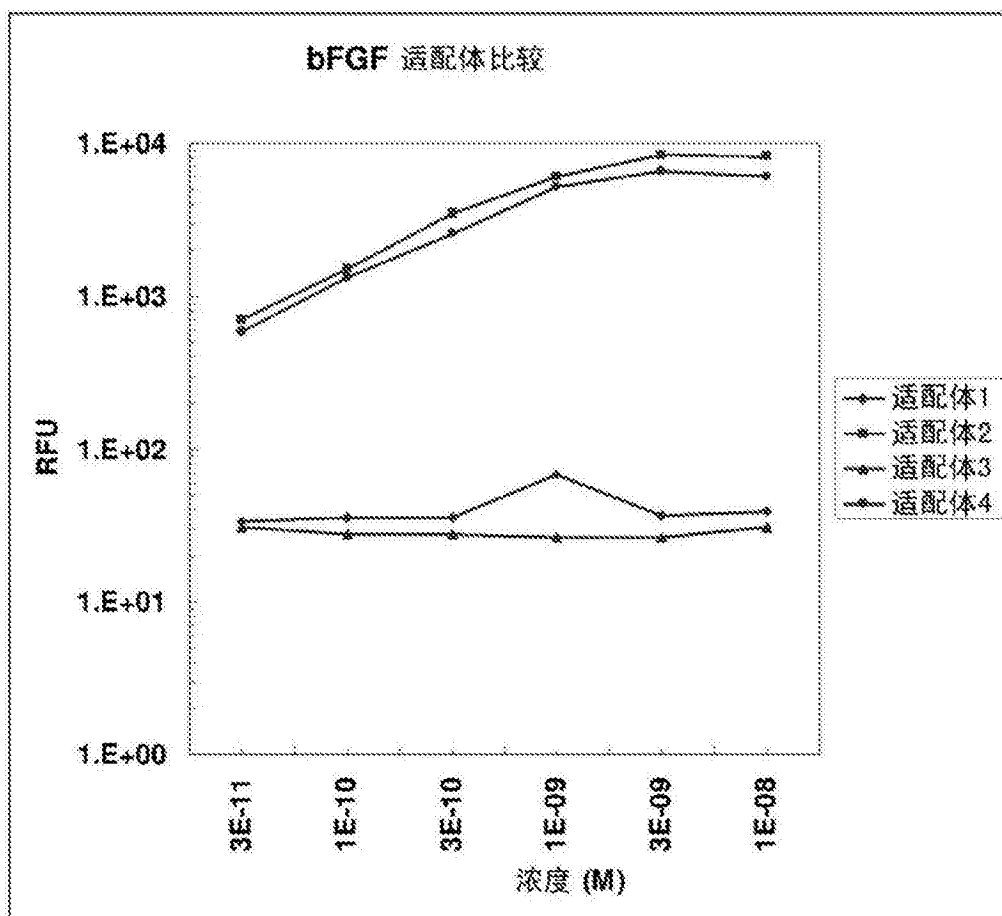


图13A

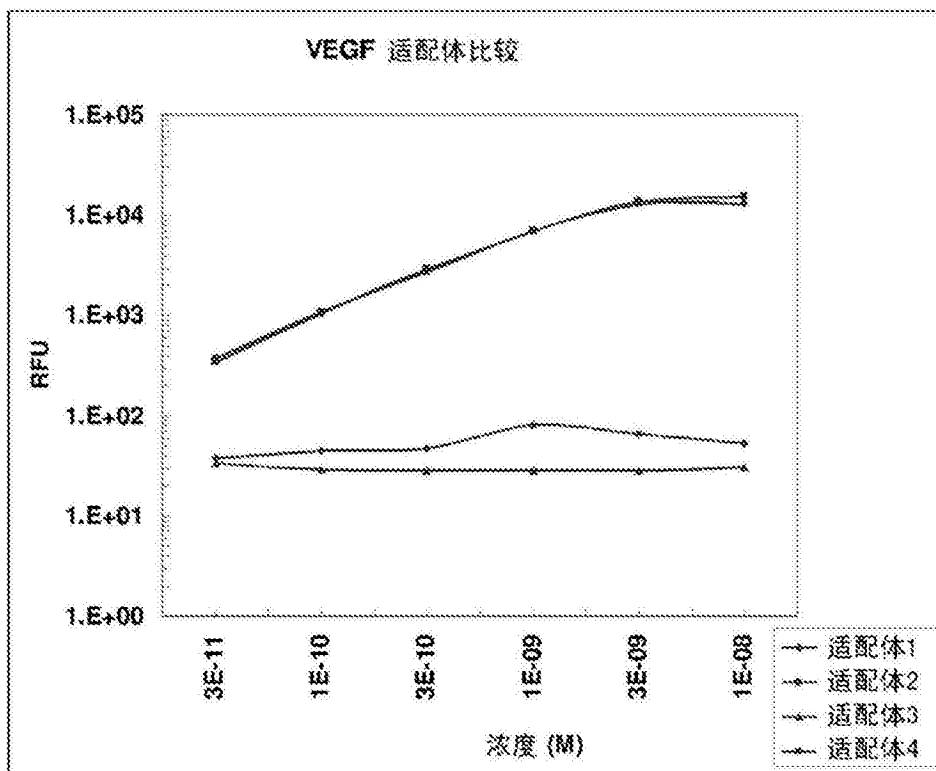


图13B

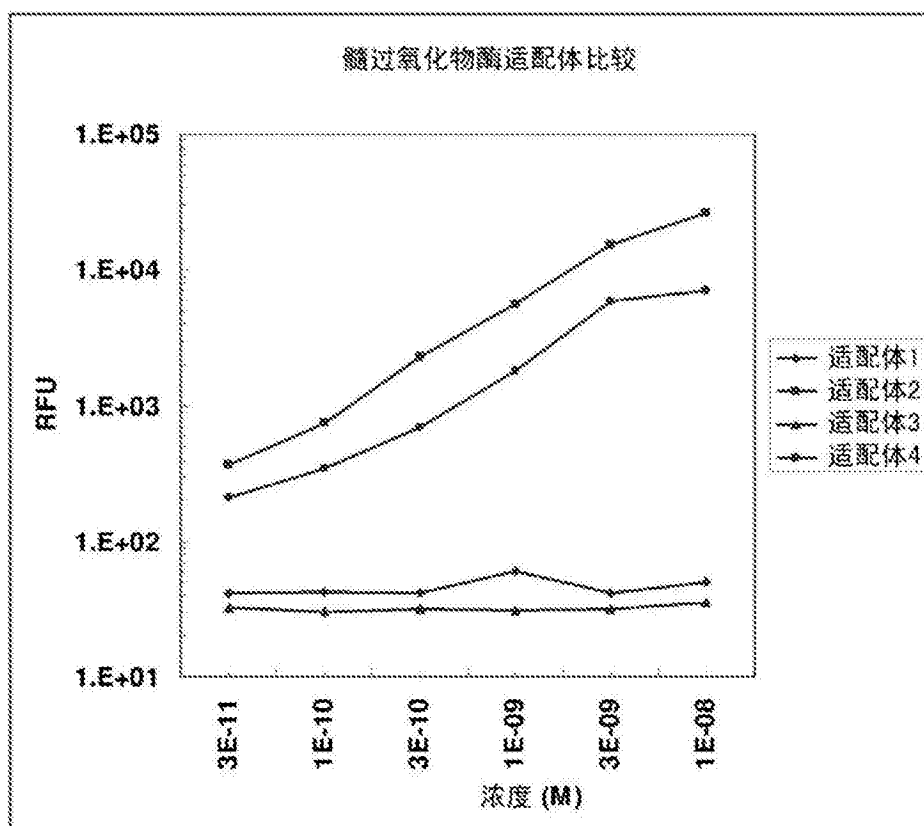


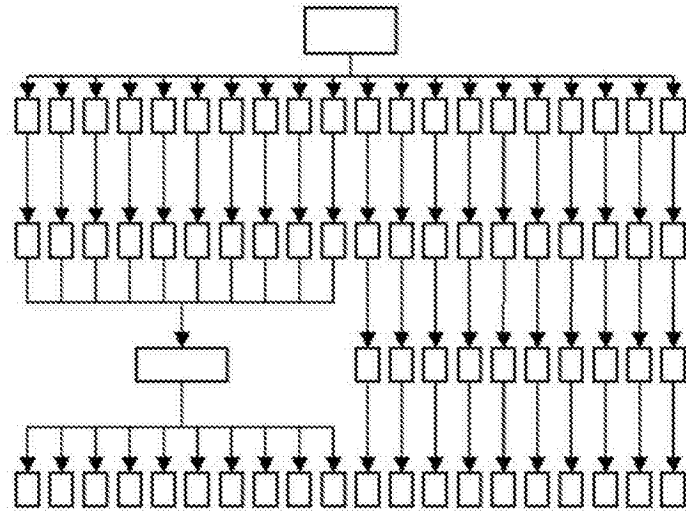
图13C

1个血浆样品

分成68个样品

对每个样品
进行测定

组合34个样品
再分配



用杂交检测

图14

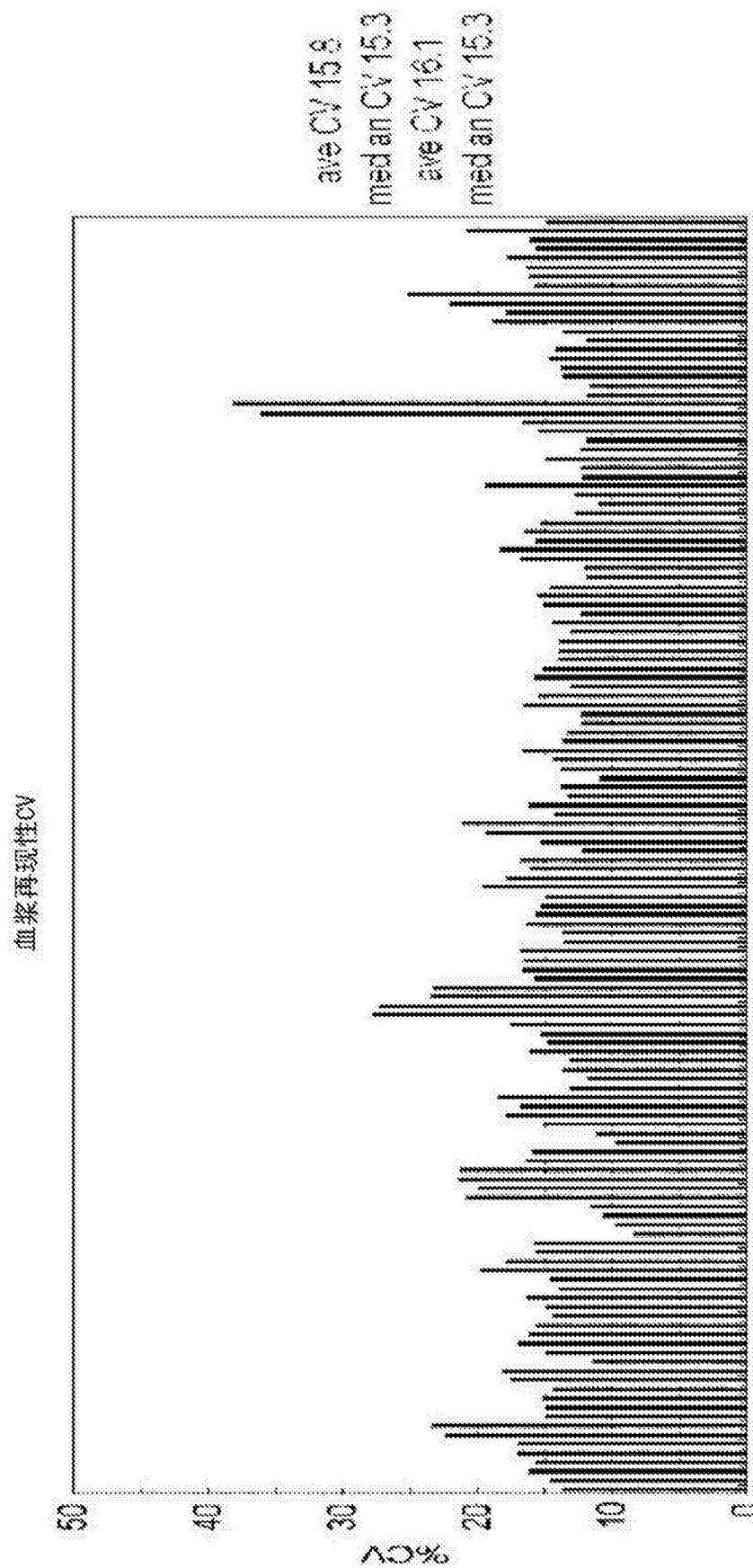


图15

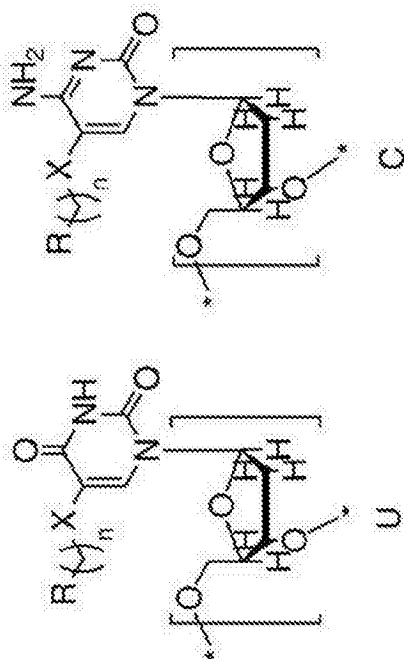
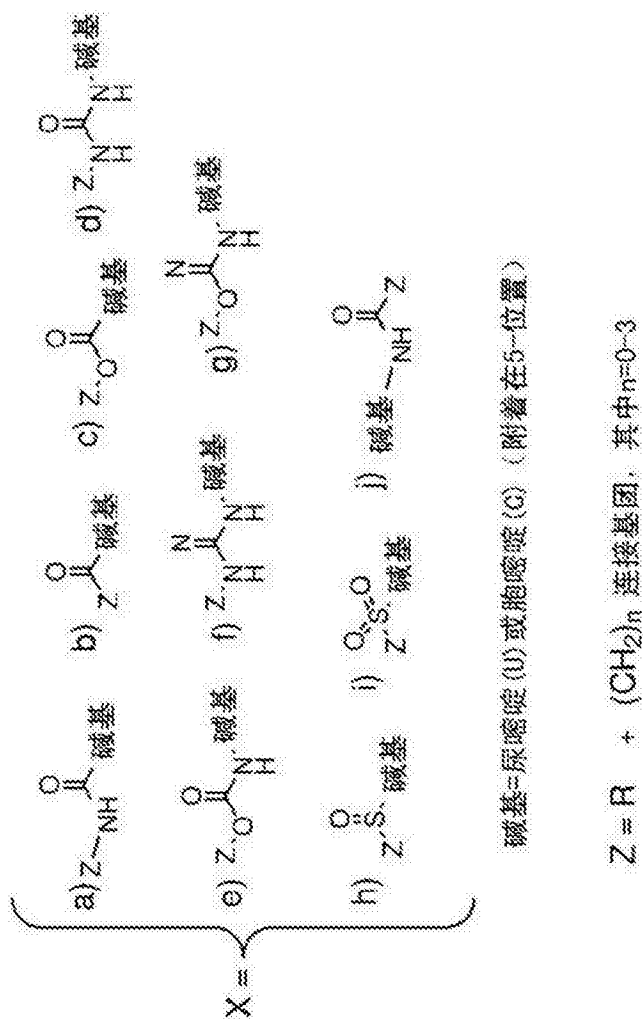


图16

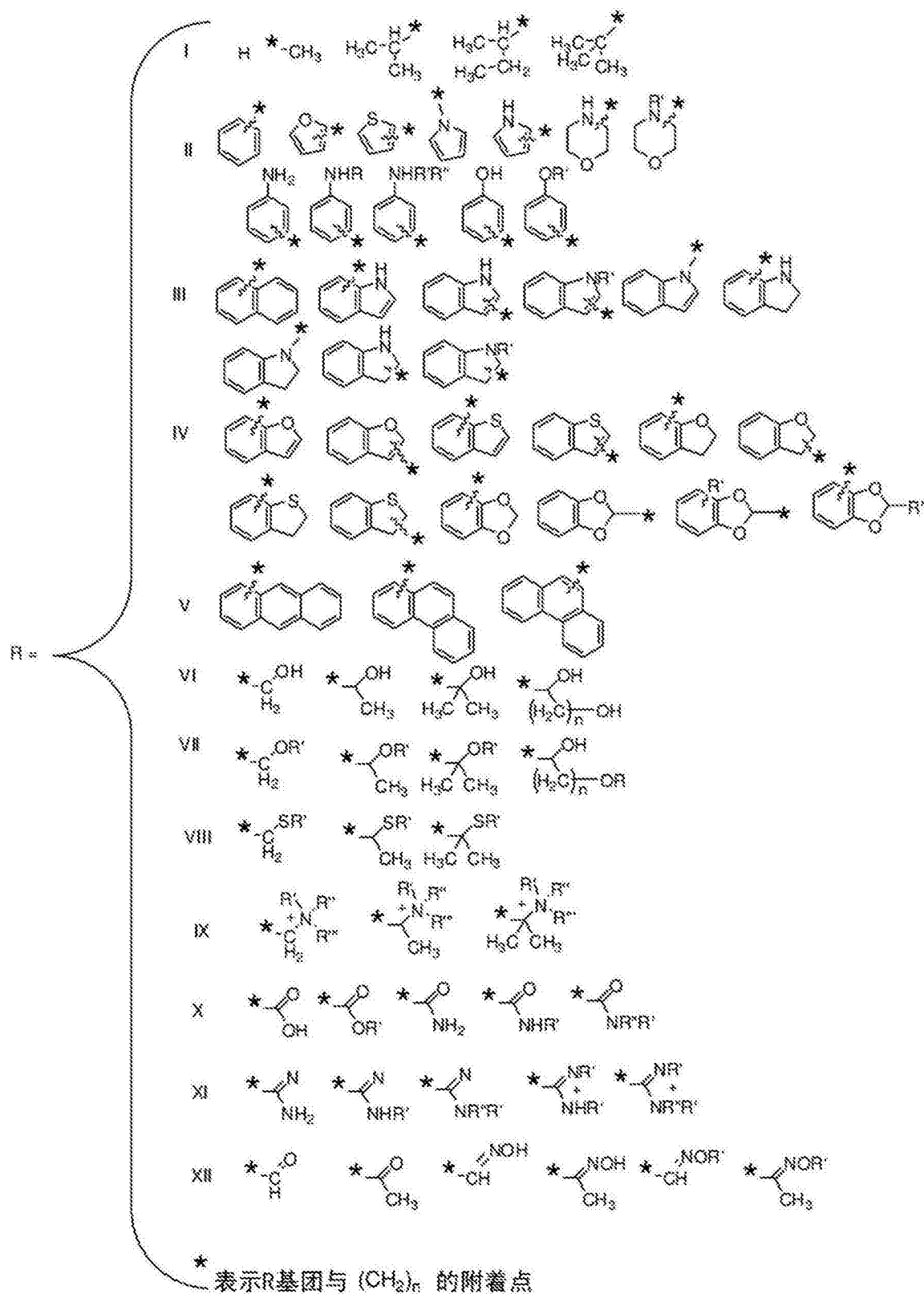


图16续